

メトキシ基含量の異なるペクチンに対する ポリガラクトクロナーゼ (PG) と活性酸素の作用性

稲荷妙子, 竹内徳男

家政学部家政学科管理栄養士専攻

(2004年9月16日受理)

Reaction of Polygalacturonase (PG) and Active Oxygen to Pectin with Different Methoxyl Content

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Home Economics,
Gifu Women's University, 80 Taromaru, Gifu, Japan (〒501 - 2592)

INARI Taeko and TAKEUCHI Tokuo

(Received September 16, 2004)

I. 緒 言

果実や野菜の軟化は、細胞組織の構成成分であるペクチンの変化が関与していると考えられているが、機構などは現在も不明な点が多い。ペクチンの基本成分はポリガラクトクロン酸で、ガラクトクロン酸のカルボキシ基の一部はメチルエステル化されたメトキシ基を有している。一般的に未熟な果実はメトキシ基含量が高く、成熟するに従ってメトキシ基含量が低くなる傾向がある¹⁾。また、メトキシ基含量はペクチンのゲル化機構などに対し、大きな要素を担っている²⁾。

ペクチンの加水分解酵素の1つであるポリガラクトクロナーゼ polygalacturonase (E.C. 3.2.1.15 poly-(1,4- α -D-galacturonide)-glycanohydrolase, PG と今後略する) はポリガラクトクロン酸の α 1,4結合を切断する酵素で、果実の軟化、成熟等種々の報告がある³⁾⁻⁶⁾。また活性酸素生成系の1つであるアスコルビン酸銅イオン系によって生じるヒドロキシラジカルがペクチンの低分子化に寄与すること

を我々は報告している⁷⁾。そこで今回は、PG 並びに活性酸素をメトキシ基含量の異なるペクチンへ作用させて、ペクチンの粘度、分子量の変化を調べて、ペクチンの低分子化の機構について少しでも明らかにし、ペクチンの分解並びに果実組織の軟化、成熟に関する知見を得ることを目的として実験を行った。

II. 実験方法

1. 試 料

試料は市販レモンペクチン(和光純薬工業株式会社製)並びにメトキシ基含量の高い市販 GENU ペクチン(三晶株式会社製, 柑橘類の果皮から抽出)を用いた。

2. 試料の調製

メトキシ基含量の異なるペクチン試料の調製は、加水分解酵素の一つであるペクチンエステラーゼ pectinesterase (E.C.3.1.1.11, pectin pectylhydrolase, PE と今後略する)を用いた。PE は、ペクチンのメチルエステルに作用して、メトキシ基をカルボキシ基に変化さ

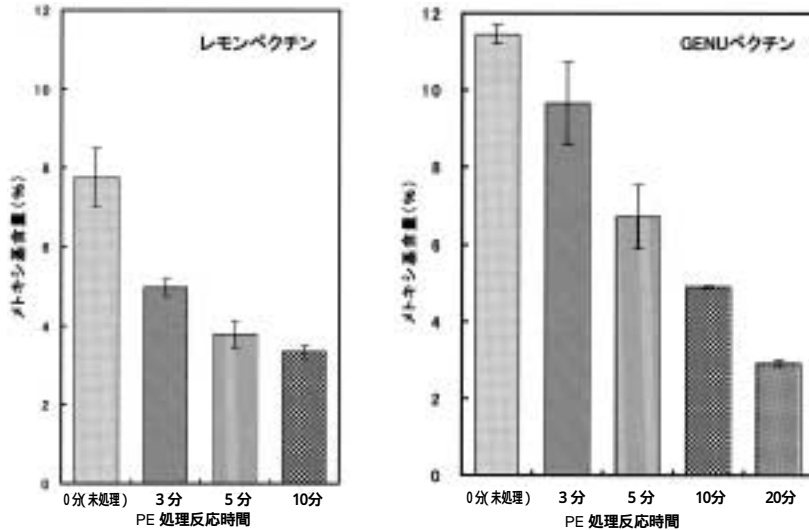


図1 PE処理ペクチンのメトキシ基含量

せる酵素であるから、PE処理をすることによってメトキシ基含量が減少する。

始めに、市販ペクチンに含まれる遊離の糖を除去するためにエタノール処理をして、精製ペクチンを得た。精製ペクチンをpH 7.0, 50にて3分、5分、10分、20分間PE処理をして、メトキシ基含量の異なるペクチンを調製した。なお、用いたPEはミニトマトから抽出し、電気泳動のバンドが1本にまで精製したPEである⁸⁾。

PE処理をしたペクチンのメトキシ基含量を図1に示した。レモンペクチンはPE未処理ではメトキシ基含量が7.77%であったが、PE処理をすることにより、また処理時間が長くなるにつれてメトキシ基含量が減少することを確認できた。GENUペクチンは、市販品の中で最もメトキシ基含量の高い試料を用いたため、PE未処理は11.50%とかなりの高メトキシペクチンであったが、20分間PE処理を行うことにより、両ペクチンともメトキシ基含量が約3%まで種々のメトキシ含量のペクチンを調製できた。

3. PGの作用

1%ペクチン(0.15M NaClを含むpH3.8 0.05M 酢酸緩衝液)にミニトマトから抽出した部分精製PG(0.1224U⁹⁾を37℃で、1, 10, 20, 30分、1, 2, 3, 4, 6, 24, 26, 28時間反応させた。

4. 活性酸素の作用

1%ペクチン(2mMアスコルビン酸, 0.25mM CuSO₄を含むpH7.2 1/15Mリン酸緩衝液)を37℃で、PG処理と同時間反応させた¹⁰⁾。

5. ペクチンの粘度

粘度は振動式粘度計(YAMAICHI VISCOMATE VM 1G)を用いて測定した⁷⁾。

6. ペクチンのメトキシ基含量の定量

既報¹⁾と同様に定量した。

7. ペクチンの分子量の定量

Cellulofine GCL-2000-m カラム(80×3.0cm,i.d.)を使用して各ペクチンの分子量を求

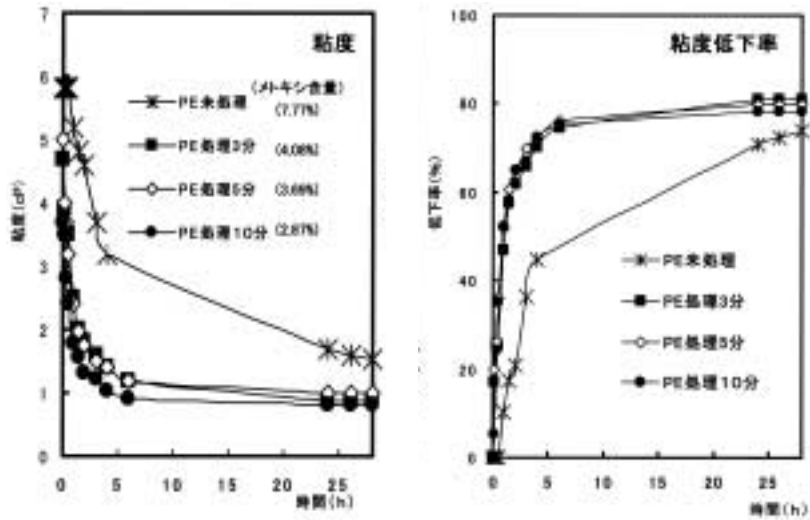


図2 メトキシ基含量の異なるレモンペクチンのPG作用による粘度変化

めた。溶出液は0.2M NH_4HCO_3 溶液を用い、1 ml/minの流速で10mlずつ分画した。糖の定量はフェノール硫酸法を用いた。

なお、標準物質として、デキストラン (M_w . 2,000,000, 40,800, 11,000), アミロース (M_w . 294,000, 118,000), 乳糖 (M_w . 360) を用いた。

Ⅲ. 実験結果及び考察

1. ペクチンに対するPGの作用

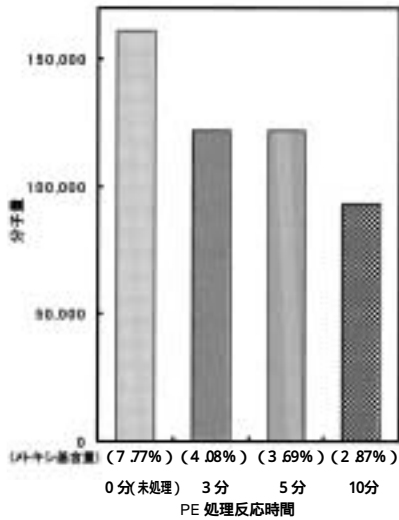
ペクチンが何らかの作用によって分子量が小さくなると、粘度が低下することが知られていることから、ペクチンの変化の指標として粘度を測定した。図2(左)にメトキシ基含量の異なる4種のレモンペクチンにPGを28時間作用させた粘度変化を示した。メトキシ基含量の一番高いPE未処理ペクチン(メトキシ基含量7.77%)の粘度は反応開始から28時間まで常に他のペクチンに比べて粘度が極めて高いことが判明した。

反応開始時の粘度がペクチンによって異なることから、図2(右)に開始時の粘度を基にそれぞれの粘度低下率も示した。メトキシ基

含量の一番高いPE未処理ペクチンの粘度低下率が、他の3種に比較して最も低いことから、メトキシ基含量の高いペクチンはPGの作用を受けにくいということが確認できた。

次にこの現象を分子量の面から検討した。予め、PG並びに活性酸素処理を行っていないメトキシ基含量の異なるレモンペクチンの分子量を測定し、図3に示した。PE未処理ペクチンは約16万であるがPE処理をして、メトキシ基含量を減少させることにより分子量もメトキシ基含量と伴に低くなることが分かった。

図4に両ペクチンのメトキシ基含量の最も大きいペクチンと最も小さいペクチンのPG未処理とPGを2時間作用させた後の平均分子量を示した。レモンペクチンのPE未処理(メトキシ基含量7.77%)の分子量はPG未処理約16万がPG処理によって9万にまで減少し、PE10分処理(メトキシ基含量3.34%)の分子量は約9万がPG処理によって4万にまで減少した。すなわちPG処理をすることによる分子量の減少率は、メトキシ基含量7.77%の高メトキシ基ペクチンは42%、メト



カラム：セルロファイン GCL-2000-m(30mm × 785mm)
 溶出液：0.2M NH₄HCO₃， 流速：1 ml/min

図3 メトキシ基含量の異なるレモンペクチンの分子量

キシ基含量3.34%の低メトキシ基ペクチンは約56%と、メトキシ基含量の高いペクチンの方は減少率が小さいことからPGの作用を受けにくいといえる。図4(右)に示したようにGENUペクチンも同様にPGを作用させ

ることにより分子量は減少したが、その減少率はメトキシ基含量11.45%の高メトキシ基ペクチンが61.9%、メトキシ基含量2.90%の低メトキシ基ペクチンが80.5%と、メトキシ基含量の低い方が大きいことからPGの作用を受けやすいといえる。

2. ペクチンに対する活性酸素の作用

GENUペクチンに活性酸素を作用させた時の粘度変化を図5(左)に示した。粘度変化ではメトキシ基含量の高いPE未処理ペクチンの粘度が高かったが、図5(右)に示したようにメトキシ基含量の高いペクチンは低下率が高く、メトキシ基含量の低いペクチンほど低下率が低く、メトキシ基含量と粘度低下率は比例関係にあることが分かった。図には示さなかったがレモンペクチンからも全く同様の結果が得られた。すなわち、メトキシ基含量の高いペクチンは活性酸素の作用を受けやすく、逆にメトキシ基含量の低いペクチンほど活性酸素の作用を受けにくいといえる。

図6に活性酸素未処理と活性酸素を2時間

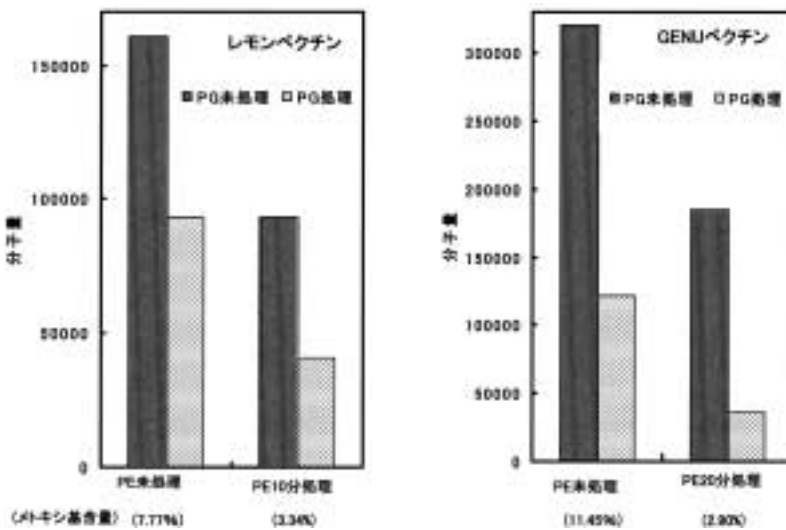


図4 PG未処理・処理のメトキシ基含量の異なるペクチンの分子量

メトキシ基含量の異なるペクチンに対する
 ポリガラクトクロナーゼ (PG) と活性酸素の作用性 (稲荷妙子, 竹内徳男)

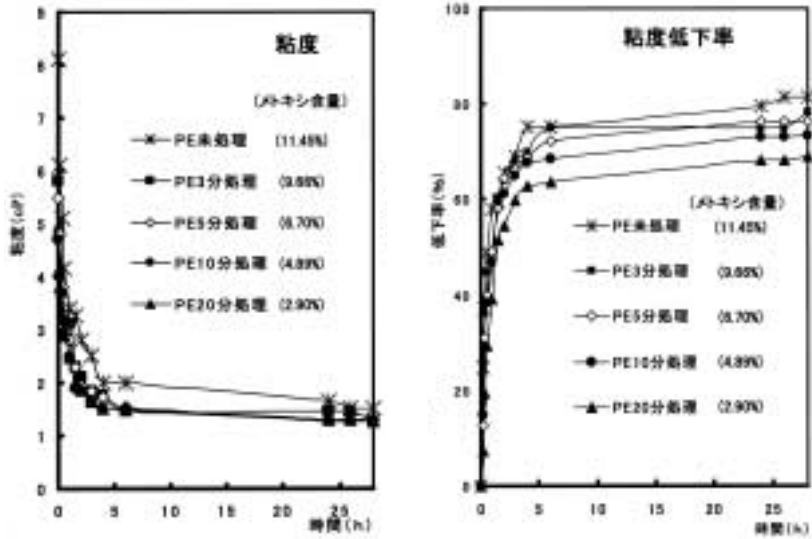


図5 メトキシ基含量の異なる GENU ペクチンの活性酸素作用による粘度変化

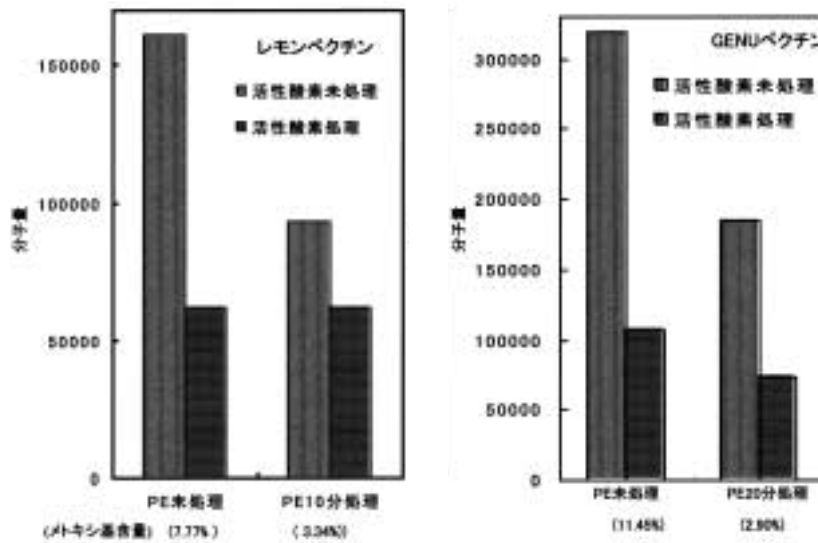


図6 活性酸素未処理・処理のメトキシ基含量の異なるペクチンの分子量

表1 PG 処理および活性酸素処理によるペクチンの分子量の減少率 (%)

メトキシ含量 (%)	レモンペクチン		GENUペクチン	
	7.74	3.34	11.45	2.90
PG 処理	42.2	55.9	61.9	80.5
活性酸素処理	61.5	33.3	66.6	60.0

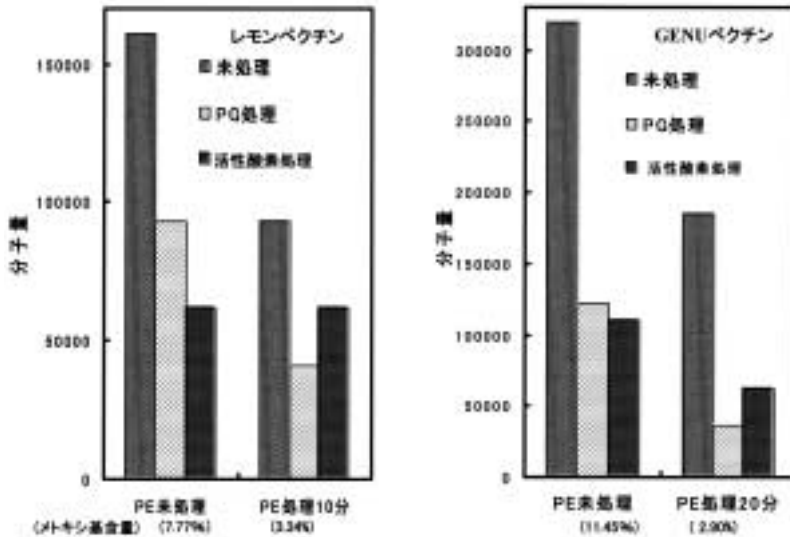


図7 未処理・PG処理・活性酸素処理のメトキシル基含量を異にしたペクチンの分子量

作用させたペクチンの分子量を示した。レモンペクチンのPE未処理では活性酸素未処理の分子量約16万が活性酸素処理によって6万にまで減少し、PE10分処理の約9万が活性酸素処理によって6万にまで減少した。表1に示したようにメトキシ基含量の高いPE未処理の減少率は62%で、メトキシ基含量の低いペクチンの減少率は約33%と、分子量からもメトキシ基含量の高いペクチンの方が活性酸素の作用を受けやすいといえる。GENUペクチンでも同様の傾向が見られた。

3. ペクチンに対するPGと活性酸素の作用の比較

ペクチンに対するPGと活性酸素作用後のペクチン分子量を処理前と併にまとめて図7に示した。レモンペクチン、GENUペクチン共に左側に高メトキシペクチン、右側に低メトキシペクチンを記した。レモンペクチン、GENUペクチンとも共通して、高メトキシペクチンはPG処理よりも活性酸素処理の方が分子量の減少が大きいことから、活性酸素

の作用を受けやすいと言える。一方低メトキシペクチンは活性酸素処理よりもPG処理によってより分子量が減少していることから、PGに作用を受けやすいことが明らかとなった。

PGがメトキシ基含量の低いペクチンに作用しやすいことは以前から述べられていた¹¹⁾ことであるが、活性酸素に関しては今回の研究で新しい知見として見出すことができたと思われる。

すなわち、未熟な果実のペクチンであるプロトペクチンのようなメトキシ含量が高く、分子量の大きいペクチンは活性酸素の作用を受けやすく、ある程度熟度の進んだ果実のメトキシ含量が小さくなったペクチンはPGの作用を受けやすいと推察できる。

しかし、表1に示したように同じ種のペクチンに関しては今回の知見はいえるが、ペクチンの種を考慮しなければ単にメトキシ含量だけでは言い切れない。このことは、天然のペクチンは単一な物質ではなく複雑な形態であり、種によって全く異なるため一概にはい

えない所以であろう。

一般的に果実は未熟な時にはメトキシ基含量が高く、成熟するに従ってメトキシ基含量が低くなる傾向がみられる。メトキシ基含量を減少させるのは PE が関与していることは事実である⁸⁾。しかし、我々はペクチンに活性酸素を処理することにより、メトキシ基含量の減少が顕著に見られ、活性酸素には、メトキシ基含量を減少させるといった、PE と同じような作用があることも実験結果から見出ししている (未発表)。そして、今回の実験結果から、果実の未熟時のようにメトキシ含量の高いペクチンの分子量低下には活性酸素が PG よりも強く働くことより、従来定説となっているペクチン分解酵素の PE, PG 以外にも果実の軟化には活性酸素が関与している可能性が示唆された。

また、ペクチンは主鎖のポリガラクトン酸のみではなく、側鎖などに中性糖を有している。Gross 等はペクチンの中性糖の脱離がペクチンの低分子化とペクチンの水溶性を増大させたと報告している¹²⁾。よって、ペクチンの低分子化に関与している、中性糖との結合の切断にも酵素が関与しているであろうが、中性糖の遊離などに関しても活性酸素が関与し、その結果ペクチンが低分子化している可能性も考えられる。

我々は、以前の研究で市販レモンペクチンに、AsA-Cu²⁺ と反応させることにより活性酸素開始剤の AAPH 系より AsA-Cu²⁺ 系の活性酸素の方がペクチンの粘度低下並びに低分子化が顕著に起こることを見出した⁷⁾。すなわち、ペクチン分子は AAPH 系で生成するペルオキシラジカルよりも AsA-Cu²⁺ で生成するヒドロキシラジカルと高い反応性を示すと考えられた。活性酸素もこれら以外にも存在する。ラジカルのペクチンの作用部位や、更には果実の成熟、軟化との関係など、

まだまだ不明なことも多いが、植物と活性酸素の関係なども今後更に詳しく検討していく必要があると思われる。

IV. 要 約

ペクチンはポリガラクトン酸のカルボキシ基の一部がメチルエステル化されたメトキシ基を有している。今回、ポリガラクトナーゼ (PG) 及び活性酸素 (ヒドロキシラジカル) のペクチンへの作用性がメトキシ基含量によってどのような差異があるかを検討した。その結果、

1) PE 処理により、ペクチンのメトキシ基含量を減少させ、メトキシ基含量の異なるペクチンを作製した。

2) レモンペクチン (PE 未処理) のメトキシ基含量は 7.77%、分子量は 161,000 であったが、PG の作用で 93,000、活性酸素の作用で 62,000 に減少した。一方、PE10 分処理により、低メトキシ (3.34%) 化したレモンペクチン (分子量: 93,000) は、PG の作用で 41,000、活性酸素の作用で 62,000 の分子量となった。即ち、高メトキシ基ペクチンに対しては活性酸素、低メトキシ基ペクチンに対しては PG が強く作用するという差異が見られた。

3) 2) で示したメトキシ基含量の異なるペクチンに対する PG 及び活性酸素の作用性の差異は、粘度変化の面からも裏付けられた。

4) レモン・GENU ペクチンの両ペクチンについても上記の 1) ~ 3) と同様な結果が得られた。

V. 文 献

- 1) Inari, T., Yamauchi, R., Kato, K. and Takeuchi, T.; Changes in pectic polysaccharides during the ripening of cherry tomato fruits, *Food Sci. Technol. Res.*, 8, 55-58

- (2002)
- 2) 辻啓介, 森文平; 食物繊維の科学, 朝倉書店 (1997)
- 3) Nakagawa, H. Yanagawa, Y. and Takenaka, H.; Studies on the pectolytic enzyme (IV). *Agric. Biol. Chem.*, 34, 991-997 (1970)
- 4) Nakagawa, H. Yanagawa, Y. and Takenaka, H.; Studies on the pectolytic enzyme (V). *Agric. Biol. Chem.*, 34, 998-1003 (1970)
- 5) Takehana, H., Shibuya, T. and Nakagawa, H.; Purification and some properties of endopolygalacturonase from tomato pericarp, 千葉大学園芸学部学術報告, 23, 29-34 (1977)
- 6) Inari, T. and Tomoeda, M.; Texture and pectin-hydrolyzing enzymes in various fruits and vegetables. *J. Home Economics of Japan*, 36, 617-621 (1985)
- 7) 稲荷妙子, 竹内徳男; 活性酸素のペクチンに及ぼす影響. 岐阜女子大学紀要, 30, 1-7 (2001)
- 8) Inari, T., Yamauchi, R., Kato, K. and Takeuchi, T.; Purification and some properties of pectinesterase from fruits of a miniature-fruited red type tomato. *Food Sci. Technol. Res.*, 6, 54-58 (2000)
- 9) 稲荷妙子, 竹内徳男, 森本仁美; ミニトマト果実のポリガラクトナーゼ活性. 岐阜女子大学紀要, 33, 83-91 (2001)
- 10) Uchida, K. and Kawakishi, S.; Oxidative Degradation of α -Cyclodextrin Induced by an Ascorbic Acid-Copper Ion System. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 367-373 (1986)
- 11) 桜井直樹, 植物には血管があるか. 生長・代謝防御の場“アポプラスト”, 化学と生物, 34, 24-33 (1996)
- 12) Gross, K.C. and Wallner, S. J.; Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiol.*, 63, 117-120 (1979)