

[研究報文]

ブドウの葉および果実におけるキチナーゼの誘導

高柳 勉・内堀貴之・吉川正輝・横塚弘毅

山梨大学ワイン研究センター

〒400-0005 甲府市北新1丁目13-1

Induction of Chitinases in Grape Berries and Leaves

Tsutomu TAKAYANAGI, Takayuki UCHIBORI, Masaki YOSHIKAWA, and Koki YOKOTSUKA

The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400-0005, Japan

Infection of plants by pathogens such as viruses or fungi leads to the synthesis of various pathogenesis-related proteins, which may play a role in plants' self-defense against the pathogens. The activity of chitinase, a pathogenesis-related protein, in 'Koshu' leaves and berries and its induction by treatment with glycolchitin were determined. In grape leaves, induction of basic chitinase activity (maximal activity at pH 8.0) resulting from treatment with glycolchitin was observed throughout the growing season. The basic chitinase activity reached a maximum 24 hours after treatment and, the maximum value increased with increasing primary shoot age. On the other hand, little acid chitinase activity (maximal at pH 4.0) was detected and it was not induced by the treatment with glycolchitin. In grape berries, basic chitinase activity was detected after véraison [60 days after anthesis (DAA)] and its induction by treatment with glycolchitin was observed only before véraison, whereas acid chitinase activity increased throughout grape development and was induced by treatment with glycolchitin after 80 DAA. Induction of both basic and acid chitinase activities was a maximal 24 hours after treatment.

Key words: chitinase, induction, grapes, grapevine

緒 論

キチナーゼ (EC 3.2.1.14) はキチン (poly- β 1-4-N-acetylglucosamine) を加水分解し、N-アセチルグルコサミンおよびそのオリゴ糖を生成する酵素である。この酵素の基質であるキチンが植物病原菌の細胞壁に多く含まれており、実際に、植物キチナーゼが *in vitro* の実験系に於いて病原菌の生育を阻害すること (8)、さらに、キチナーゼが通常、健全な植物に存在する例は少なく、病原菌の感染や病原菌由来の誘導物質 (エリシター) の添加により誘導される場合が多い (7) などの理由から、植物の生体防御に重要な働きを持つと考えられている。

ブドウの葉や果実にも、電気泳動と活性染色を組み合わせた検出により、構成的あるいはエリシター依存的に発現する幾つかのキチナーゼが確認されて

いる (4)。また、その一次構造が明らかになっているブドウキチナーゼとしては、ベレゾーン以降のブドウ果実 (シラー) に発現するクラスIVキチナーゼ (9) とブドウ (ピノ・ノワール) の培養細胞にエリシターを添加した際に誘導されるクラスIおよびIIIキチナーゼ (2) がある。これらは、発現した mRNA をクローニングし、その塩基配列から推定した一次構造をもとに、キチナーゼであることの確認とクラス分け (3) を行っている。ブドウキチナーゼには、ブドウ樹の活動期において、外界の刺激に対するレスポンスとして多様な発現をしていると推測される。しかし、ブドウキチナーゼの発現に関して、ブドウ樹の新梢の発芽・展葉から、果実の成熟に至るまでのシーズンを通して、キチナーゼ活性の発現を連続的に測定した例は無い。

本研究では、山梨県の代表的白ワイン用ブドウである甲州種ブドウを用い、その葉および果実に構成的またはエリシター依存的に発現するキチナーゼ活

1999年8月18日受理

性を酸性および塩基性条件下で測定した。すなわち、酸性側 (pH 5.0) に至適pHを持つ酸性キチナーゼ活性と塩基性側 (pH 8.0) に至適pHを持つ塩基性キチナーゼ活性の両キチナーゼ活性が、ブドウ生育期の葉および果実のどの時期に発現 (構成的またはエリシター依存的) するかを検討し、その生体防御システムとしての役割を考察した。

材料および方法

1. 供試ブドウおよび試葉

ブドウ試料は、山梨大学ワイン研究センターにおいて栽培されている甲州種ブドウを用いた。エリシターとして1%グリコールキチン溶液を用いた。エビ殻由来のキチン粉末をエチレンクロロヒドリンによりグリコール化 (6) して得られたグリコールキチンを25%エタノール溶液に溶かして1%グリコールキチン溶液を調製した。

2. ブドウ葉へのエリシター処理と酵素抽出液の調製

甲州ブドウの葉へのエリシター処理は発芽後1、3、5カ月の新梢の各位置の葉 (新梢基部に最も近い葉を第1葉とした) に1%グリコールキチン溶液を塗布した。グリコールキチン塗布後、0、9、24、33、48、72時間後に各位置の葉を採取し、液体窒素で凍結後、 -80°C で保存した。

葉の試料1gに0.2M Mops緩衝液 (pH7.5、0.5M塩化ナトリウム、0.2%システイン、1%ポリエチレングリコール#4000を含む) 5mLを加え、乳鉢ですりつぶした後、ポルトロンホモジナイザーでホモジナイズ (17,000rpm、2分間) した。ホモジナイズ後の液を遠心分離 (20,000g、10分間) し、得られた上清を酵素抽出液とした。

3. ブドウ果実へのエリシター処理と酵素抽出液の調製

甲州ブドウ果実へのエリシター処理は、開花後10~100日の甲州果実に1%グリコールキチン水溶液を塗布した。グリコールキチン塗布後、0、9、24、33、48、72時間後にブドウ果実を採取した。採取した果実は種子を取り除き、液体窒素で凍結後、 -80°C で保存した。

保存果実試料を液体窒素存在下で乳鉢により粉末化し、この粉末1gに対して0.2M Mops緩衝液

(pH7.5、0.5M塩化ナトリウム、0.2%システイン、1%ポリエチレングリコール#4000を含む) 5mLを加え、乳鉢ですりつぶした。以下、葉の場合と同様に酵素を抽出した。

4. キチナーゼ活性測定

葉および果実試料から得られた酵素抽出液をMicrocentrifuge desalting法 (5) によりゲル濾過し、低分子物質を除いた。すなわち、プラスチックシリンジ (15mm×70mm) の先端に脱脂綿を敷き、Sephadex G25ゲルを詰め、スイング型ローターを用いて1,400gで2分間遠心分離した。ゲル容量を5mLに調製後、0.2M Mops緩衝液 (pH7.5、0.5M塩化ナトリウム、0.2%システイン、1%ポリエチレングリコール#4000を含む) 2mLを添加し、1,400gで2分間遠心分離した。この操作を3回繰り返した。このカラムに酵素抽出液500 μL を添加し、1,400gで2分間遠心分離して得られた溶出液を以下の酵素活性測定に用いた。

キチナーゼ活性測定は、Arakiら (1) の方法に従って行った。すなわち、0.1%グリコールキチンを含む50mM酢酸緩衝液 (pH4.0) または50mMリン酸緩衝液 (pH8.0) 1mLと酵素液100 μL からなる反応液を37 $^{\circ}\text{C}$ で60分間インキュベートした後2mLの0.5Mフェリシアン化カリウム溶液を添加して反応を停止した。この液を15分間煮沸後、室温まで冷却して420nmの吸光度を測定した。酵素単位は、上記反応条件下で1分間に1 μmol のN-アセチルグルコサミンに相当する還元力を生成する酵素量を1unit (U) とした。反応に酢酸緩衝液 (pH4.0) を用いた場合を酸性キチナーゼ活性、リン酸緩衝液 (pH8.0) を用いた場合を塩基性キチナーゼ活性とした。

実験結果

1. ブドウの葉におけるキチナーゼの誘導

発芽後1、3、5カ月の新梢の葉にグリコールキチン溶液を塗布し、キチナーゼ活性を経時的に測定した。新梢の先端の葉 (発芽後1カ月の新梢では第13葉、3カ月では第17葉、5カ月では第24葉) でのキチナーゼ活性の変化をFig. 1に示した (各キチナーゼ活性は、非誘導時に存在するキチナーゼ活性を差し引くことにより、誘導されたキチナーゼ活性のみを示している)。いずれの葉においても、塩基性キチナーゼ

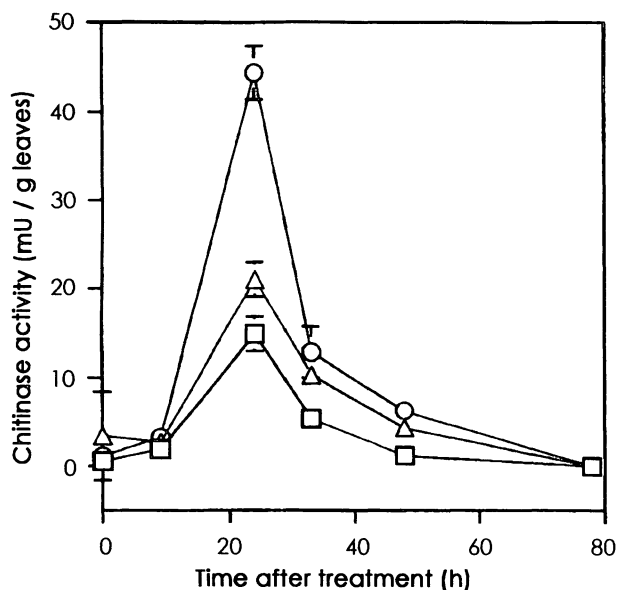


Fig. 1. Changes in basic chitinase activity in 'Koshu' leaves after glycolchitin treatment. Symbols: □, 1 month-old-shoots; △, 3 month-old-shoots; ○, 5 month-old-shoots.

活性は増加し、24時間後に最大となり、それ以後減少した。誘導されたキチナーゼ活性の最大値を新梢月数で比較すると5カ月（第24葉）の葉が最も大きく、次いで3カ月（第17葉）、1カ月（第13葉）の順であった。グリコールキチン処理による酸性キチナーゼ活性の誘導は、いずれの葉においても見られなかった。

発芽後1、3、5カ月の新梢のグリコールキチン非処理の葉においても、塩基性キチナーゼ活性は検出されたが、グリコールキチン処理24時間後に誘導される酵素活性に比べて小さかった (Fig. 2)。一方、グリコールキチン非処理の葉の酸性キチナーゼは検出されなかった。グリコールキチン処理により誘導される塩基性キチナーゼ活性量は、新梢月数が大きくなるほど増加した。葉位別の誘導酵素活性量は先端葉ほど少ない傾向が認められたが、新梢月数の違いによる差に比べると小さかった。

2. ブドウ果実におけるキチナーゼの誘導

グリコールキチン処理後の甲州ブドウ果実の塩基性および酸性キチナーゼ活性を経時的に測定した。誘導された塩基性または酸性キチナーゼ活性（各キチナーゼ活性は、非誘導時に存在するキチナーゼ活性を差し引くことにより、誘導されたキチナーゼ活性のみを示している）は、開花後20、40、60、80、100日後のいずれの果実においても、グリコー

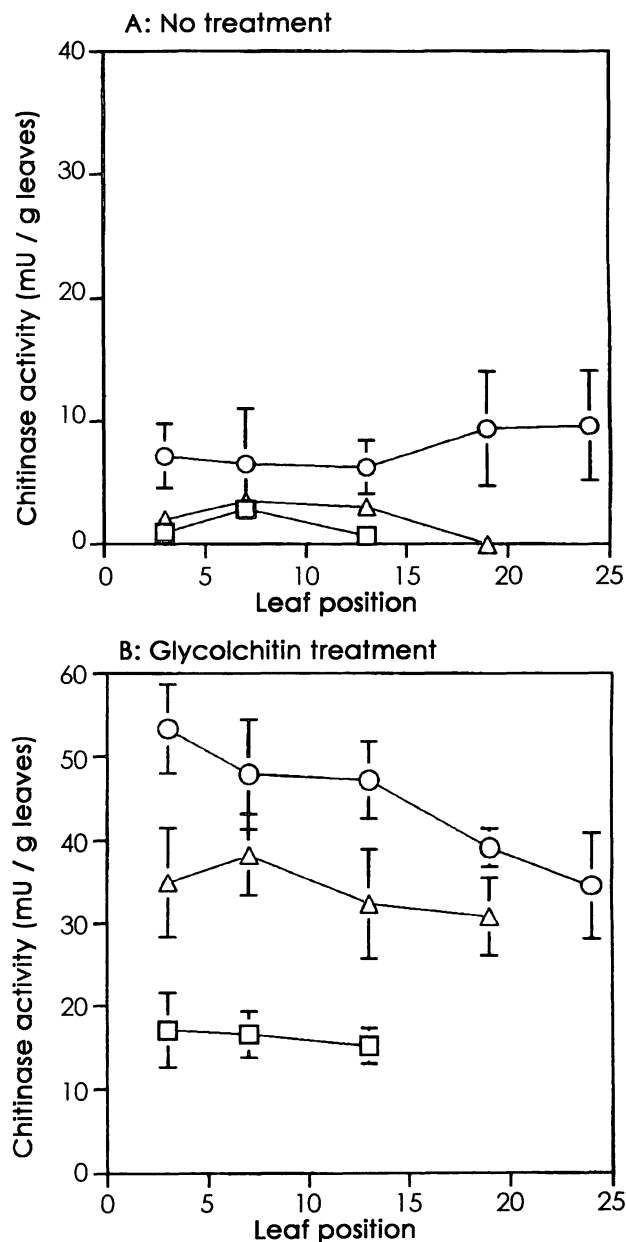


Fig. 2. Effects of leaf position and shoot age on induction of basic chitinase activity by glycolchitin treatment. Symbols: □, 1 month-old-shoots; △, 3 month-old-shoots; ○, 5 month-old-shoots.

ルキチン処理後24時間で最大となった (Fig. 3)。誘導されるキチナーゼ活性の最大値を果実の生育時期で比較すると、塩基性キチナーゼ活性は開花後40日の果実で最も大きく、酸性キチナーゼ活性は開花後80日で最も大きかった。

グリコールキチン非処理の果実のキチナーゼ活性と処理後（24時間後）のキチナーゼ活性を開花後10～100日の果実で比較した。グリコールキチン非処理の果実においても、塩基性および酸性キチナーゼ

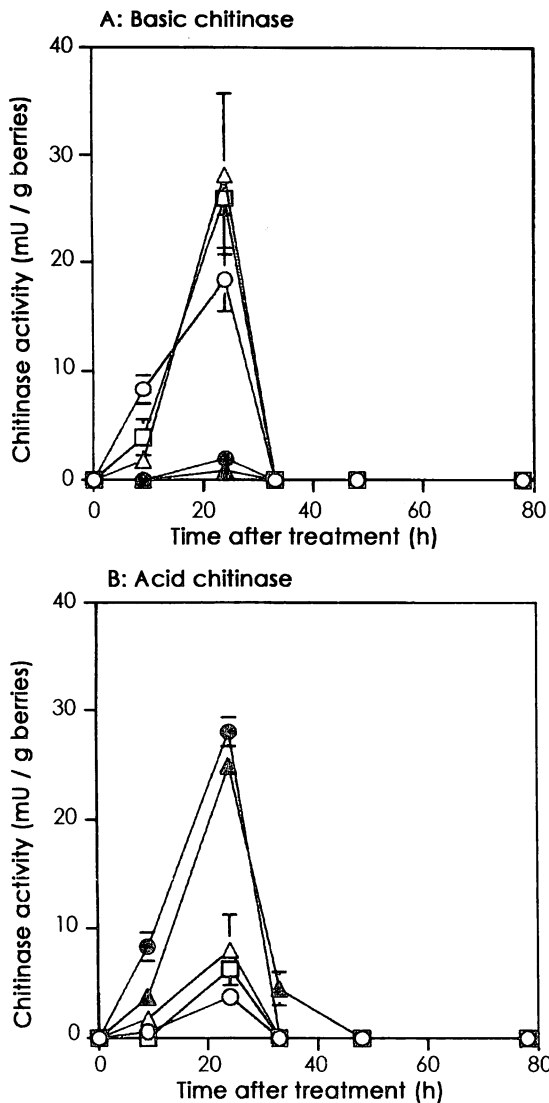


Fig. 3. Changes in basic and acid chitinase activity in 'Koshu' berries after glycolchitin treatment. Symbols: ○, 20 days after anthesis; △, 40 days after anthesis; □, 60 days after anthesis; ●, 80 days after anthesis; ▲, 100 days after anthesis.

活性は存在し、糖度の上昇が開始する開花後60~70日以降の果実においてその活性は顕著に増加した (Fig. 4)。

グリコールキチン処理による塩基性キチナーゼ活性の誘導は、糖度の上昇が開始する開花後60日以前の果実に観察されたのに対して、酸性キチナーゼ活性の誘導は、開花後80日以降の果実において顕著であった (Fig. 4)。

考 察

Derckelらは (4)、ブドウの各組織のキチナーゼ

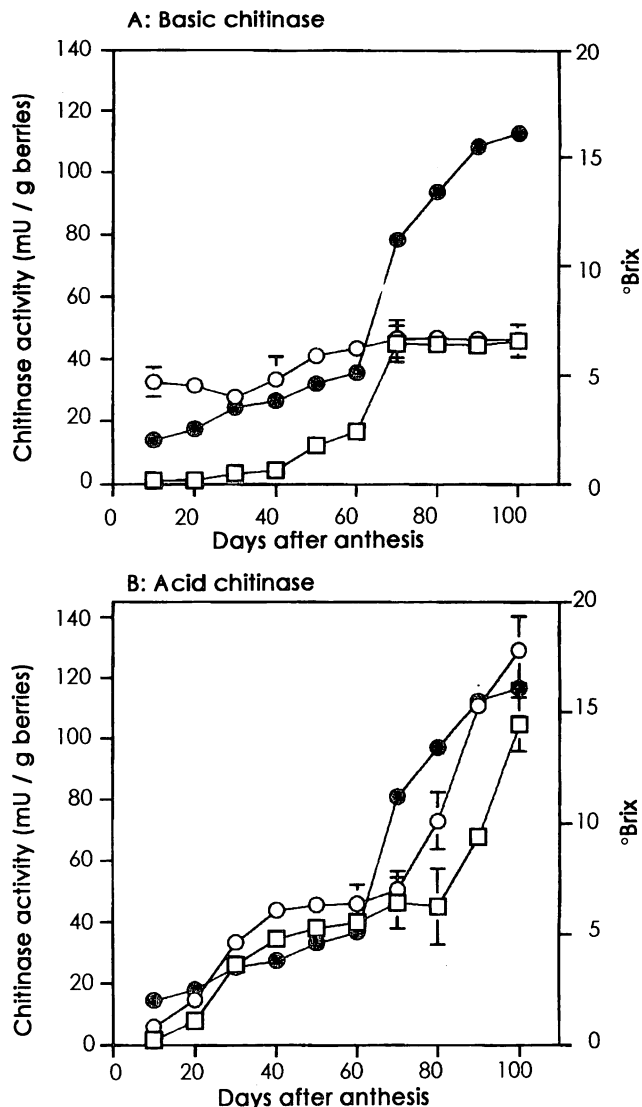


Fig. 4. Changes in basic and acid chitinase activity in 'Koshu' berries during development. Symbols: ○, 24 hours after glycolchitin treatment; □, control; ●, °Brix.

を電気泳動と活性染色を組み合わせた方法により検出し、多くのアイソザイムが存在することを報告している。今回の研究結果は、甲州ブドウの葉や成熟期の果実に構成的に発現するキチナーゼやグリコールキチン処理により誘導されるキチナーゼには、酸性側または塩基性側に反応最適pHを持つ、少なくとも2種類以上のキチナーゼが存在することを示している。酵素の反応最適pHは、その酵素が生体内で働く場所の環境を反映していると推測される。植物に発現するキチナーゼを、その発現場所で分類すると、細胞外に分泌される分泌型と液胞内に蓄積する液胞型に分けられる。一般に、細胞内で最も酸性環境下にあるとされる液胞内に、酸性側に反応最適pHを示

す酸性キチナーゼが存在すると考えるのが合理的ではあるが、これを確認するためには、発現したキチナーゼを精製し、その性質と局在性との関係を明らかにする必要がある。

近年、キチナーゼの発現がブドウの生体防御機構の一つであることを示す研究結果が幾つか報告されている。すなわち、ピノ・ノワールの葉に病原菌 (*Plasmopara viticola*) の胞子を接種してその反応を観察する実験では、クラスIIIキチナーゼのmRNAの発現が確認されている(2)。また、Robinsonら(9)は病原菌の感染が見られない健全なブドウ果実において、ベレゾーン以降にクラスIVキチナーゼ(酸性側に等電点を持つ)が発現することを報告しており、エリシター誘導性のPRタンパク質(Pathogenesis-related protein)(7)ではないものの、病原糸状菌に対する防御の役割を持つのではないかと推測している。本研究においても、ベレゾーン以降の甲州ブドウ果実に酸性および塩基性キチナーゼ活性が構成的に発現することが観察されており、この活性発現にクラスIVキチナーゼがどの程度寄与しているかは不明であるが、Robinsonらの報告を支持する結果であった。

Salzmanら(10)は、成熟したブドウ(コンコード)果実に蓄積したいくつかのタンパク質を精製し、その一つがキチナーゼ活性を示すと同時に病原性糸状菌(*Botrytis cinerea*)に対して抗菌性を示し、さらに、その抗菌性がグルコース存在下で増強することを報告している。今回の研究では、グリコールキチン処理により、ブドウの葉およびベレゾーン以前の果実で塩基性キチナーゼ、ベレゾーン以後の果実では酸性キチナーゼが誘導されるという新しい知見が得られた。本実験は、酵素活性のみをモニターしているため、分子レベルでのキチナーゼの種類や発現量、そしてその抗菌作用を議論することはできないが、酸性および塩基性キチナーゼが特定の時期の葉または果実において、エリシター刺激に対して特異的に発現することは、これらキチナーゼがブドウの生体防御機構において重要な役割を持つことを強く示唆している。今後、これらキチナーゼを精製し、その性質や組織内における局在性を研究することにより、そのクラス分けおよびブドウの生体防御機構における役割が明らかになると期待される。

要 約

甲州種ブドウの葉および果実に構成的またはエリシター依存的に発現する酸性および塩基性キチナーゼ活性を測定した。発芽後1、3、5カ月の新梢の葉にグリコールキチン溶液を塗布し、キチナーゼ活性を経時的に測定した。いずれの葉においても、塩基性キチナーゼ活性は増加し、24時間後に最大となり、それ以後減少した。グリコールキチン処理による酸性キチナーゼ活性の誘導は見られなかった。グリコールキチン処理により誘導される塩基性キチナーゼ活性量は、新梢月数が大きくなるほど増加した。

開花後10~100日後の果実において、グリコールキチン処理により塩基性または酸性キチナーゼ活性が誘導され、その活性は処理後24時間で最大となった。グリコールキチン処理による塩基性キチナーゼ活性の誘導は、糖度の上昇が開始する開花後60日以前の果実に観察されたのに対して、酸性キチナーゼ活性の誘導は、開花後80日以降の果実において顕著であった。

上記の結果のように、酸性および塩基性キチナーゼが特定の時期の葉または果実において、エリシター刺激に対して特異的に発現することは、これらキチナーゼがブドウの生体防御機構において重要な役割を持つことを示唆している。

文 献

1. Araki, T., J. Funatsu, M. Kuramoto, H. Konno, and T. Torikata. The complete amino acid sequence of yam (*Dioscorea japonica*) chitinase. A newly identified acidic class I chitinase. *J Biol Chem* 267:19944-19947 (1992).
2. Busam, G., H. H. Kassemeyer, and U. Matern. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol.* 115:1029-1038 (1997).
3. Collinge, D. B., K. M. Kragh, J. D. Mikkelsen, K. K. Nielsen, U. Rasmussen, and K. Vad. Plant chitinases. *Plant J.* 3:31-40 (1993).
4. Derckel, J.-P., L. Legendre, J.-C. Audran, B. Haye, and B. Lambert. Chitinases of the

- grapevine (*Vitis Vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science* 119:31-37 (1996).
5. Helmerhorst, E., and G. B. Stokes. Microcentrifuge desalting. A rapid quantitative method for desalting small amounts of protein. *Anal. Biochem.* 104:130-135 (1980).
 6. Hirano, S. Water-soluble glycol chitin and carboxymethylchitin. *Methods in Enzymology* 161:408-409 (1988).
 7. Linthorst, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10:123-150 (1991).
 8. Mauch, F., B. Mauch-Mani, and T. Boller. Antifungal hydrolases in pea tissue. *Plant Physiol.* 88:936-942 (1988).
 9. Robinson, S. P., A. K. Jacobs, and I. B. Dry. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol.* 114:771-778 (1997).
 10. Salzman, R. A., I. Tikhonova, B. P. Bordelon, P. M. Hasegawa, and R. A. Bressan. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 117:465-472 (1998).