

[Research Note]

ブドウ果皮キチナーゼの品種間比較

高柳 勉, 相川大介, 奥田 徹, 久本雅嗣, 横塚弘毅

山梨大学ワイン科学研究センター 〒400-0005 甲府市北新 1-13-1

Comparison of Chitinases in Skins of Four Grape Cultivars

Tsutomu TAKAYANAGI, Daisuke AIKAWA, Tohru OKUDA, Masatsugu HISAMOTO,
and Koki YOKOTSUKAThe Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi
1-13-1 Kitashin, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan

Chitinases in the skins of four grape cultivars (Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Koshu and Muscat Bailey A) were separated and characterized. Chitinase activity in the skins of Muscat Bailey A was higher than that in the other three cultivars. The chitinase fraction was obtained by subjecting the extract of grape skins to affinity chromatography with chitin beads (Chitoparl BL-01), followed by cation-exchange chromatography (HiTrap SP HP). The cation-exchange chromatography yielded two protein peaks (CHI-1 and CHI-2) that exhibited chitinase activity. The molecular weights of CHI-1 and CHI-2 were estimated to be 29.2 kDa and 27.7 kDa, respectively, by SDS-PAGE. The optimum pHs for CHI-1 and CHI-2 activities were 3.5 – 4.5 and 4.5 – 5.0, respectively. The skins of Muscat Bailey A, Cabernet sauvignon, and Koshu contained CHI-1 and CHI-2, whereas those of Chardonnay contained only CHI-1. These results suggest that the quantity and number of chitinase isozymes in grape skins are related to the disease resistance level of the grapevines.

Key words: *V. vinifera*, chitinase, disease resistance

緒 言

植物キチナーゼ (EC 3.2.1.14) は植物の病害抵抗性応答において重要な役割を持つと推測されている。植物キチナーゼの多くが、植物に病害菌が感染した時に誘導される PR-タンパク質 (pathogenesis-related protein) として見出されており (4), *in vitro* の実験系でキチナーゼが植物病害菌の生育を抑制することも報告されている (5, 8)。ブドウにおいては成熟果実にキチナーゼが存在することが報告されているが、このブドウ果粒キチナーゼは病気誘導性ではなく、果粒の成熟と同時に増加する (7, 9)。ブドウ果粒に発現するキチナーゼに関する研究は、主に遺伝子レベルでの発現解析が行われているが (1, 6, 7), キチナーゼの酵素としての性質に関してはほとんど明らかになっていない。本研

究では、4ブドウ品種 (マスカット・ベリーA, カベルネ・ソービニオン, シャルドネ, 甲州) の果皮からキチナーゼを分離し、その種類と量および性質を比較し、果粒の耐病性との関係を考察した。

材料と方法

1. 供試材料

山梨大学ワイン科学研究センターで栽培されている4ブドウ品種, すなわち, *V. vinifera* の3品種 (カベルネ・ソービニオン, シャルドネ, 甲州) およびマスカット・ベリーA (Bailey×Muscat Hamburg) を使用した。成熟ブドウ果粒から果皮を手で分離し, 液体窒素で凍結させた後に-80℃で保存し, 以後の実験に使用した。

2. キチナーゼの抽出と分離

4ブドウ品種 (カベルネ・ソービニオン, シャルド

2005年3月28日受理

ネ, 甲州, マスカット・ベリーA) の果皮 10 g を測り取り, これを液体窒素で凍結後, ホモジナイザー (15,000 rpm) で粉末化した。この果皮粉末に 20 mL の抽出緩衝液 (1% PEG #4000, 2 mM EDTA-Na, 1.5% PVPP, 0.5% システインを含む 0.5 M リン酸バッファ pH 7.0) を加え, ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズ (15,000 rpm, 2 分間) した (10)。この果皮抽出液を綿布で濾過後, 遠心分離 (11,000 rpm, 10 分間) した。この上清にダウエックス AG 1-X2 を 7.5 g 入れ, 10 分間攪拌した。濾紙で吸引濾過し, 得られた濾液にキトパール BL-01 (25 mL) を加え, 4°C で一晩攪拌してキチナーゼをキトパールに吸着させた。吸着後のキトパールを濾過により回収し, 0.2 M リン酸バッファ (pH 7.0) で洗浄後, ガラスカラム (16×200 mm) に充填し, 0.05 M リン酸バッファ (pH 7.0) で洗浄後, 0.1 M 酢酸バッファ (pH 2.7) でキチナーゼを溶出した (流速 0.5 mL/min)。溶出液を 0.005 M 酢酸バッファ (pH 4.0) で透析後, 陽イオン交換体の HiTrap SP HP カラム (Amersham Bioscience, 5 mL) で分離した。分離溶媒には 0.01 M 酢酸バッファ (pH 4.0) を使用し, 流速 0.5 mL/min で, 0 から 0.5 M の塩化ナトリウムの直線濃度勾配をかけてキチナーゼを溶出した。

SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) は, 12.5% ゲルを使用し, 100 V 定電圧で泳動した。泳動後のゲルを銀染キット (Silver stain Kanto III) で染色し, タンパク質バンドを検出した。

3. キチナーゼ活性の測定

反応液 (0.1 M 酢酸バッファ pH 5.0, 50 μ L; 酵素液, 50 μ L; 1.6% β -キチン, 100 μ L) を 40°C で 5 分間インキュベートした後, 反応停止液 (0.5 M 炭酸ナトリウムを含む 0.05% フェリシアン化カリウム水溶液) 400 μ L を加えて反応を停止した (3)。この反応液を 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し, 上清 500 μ L を 15 分間煮沸した。この液を室温まで冷却後, 420 nm の吸光度を測定した。上記反応条件下で 1 分間に 1 μ モルの *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 1 ユニット (U) とした。酵素試料が, 果皮抽出液のように還元糖を含む場合, 次のゲル濾過方法で低分子物質を除去した。0.2 M PBP (pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-25 Fine カラム (2 mL) に酵素試料 500 μ L を添加し, スイング式遠心分離機

で 3,000 rpm で 1 分間遠心分離してゲル濾過試料を得た。

結果と考察

成熟したブドウ果粒の果皮中のキチナーゼ活性を品種間で比較した (Fig. 1)。マスカット・ベリーA (MBA) のキチナーゼ活性が最も高く, 次いで甲州 (KOS), カベルネ・ソービニオン (CAS), シャルドネ (CHA) の順であった。MBA 果皮のキチナーゼ活性は, CHA の約 10 倍であった。ブドウ果皮のキチナーゼ活性は, ベレーゾン以前には, ほとんど検出されないが, ベレーゾン以降, 果粒の成熟にともない急激に増加し, 成熟した果粒ではほぼ一定となる (7, 9)。本実験で測定した 9 月中旬の果粒の糖度は, それぞれ MBA 19.5 Brix, KOS 14.7 Brix, CAS 18.3 Brix, CHA 19.0 Brix であった。これら成熟果粒の 1 週間のキチナーゼ活性の変化は数%程度であったことから, Fig. 1 のキチナーゼ活性の違いは, 品種の特性に起因していると考えられる。

各ブドウ品種の果皮抽出液をキチンビーズ (キトパール BL-01) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより分離した。いずれのブドウ品種の果皮中のキチナーゼ活性においても 70% 以上の回収率を示したことから, ブドウ果皮に存在するキチナーゼの多く

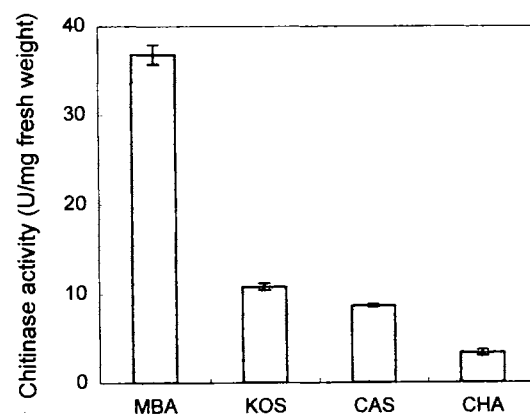


Fig. 1 Chitinase activity in the skins of four grape cultivars, MBA, CAS, CHA and KOS. MBA, Muscat Bailey A; CAS, Cabernet Sauvignon; CHA, Chardonnay; KOS, Koshu. Error bars represent SE (n = 2).

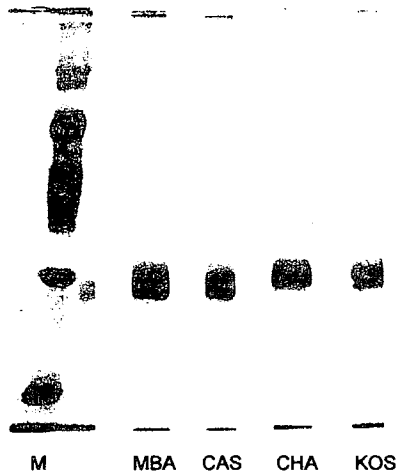


Fig. 2 SDS-PAGE of chitinase fractions of MBA, CAS, CHA and KOS obtained by affinity chromatography with chitin beads. MBA, Muscat Bailey A; CAS, Cabernet Sauvignon; CHA, Chardonnay; KOS, Koshu; M, molecular weight marker proteins (97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20.1 kDa, and 14.4 kDa).

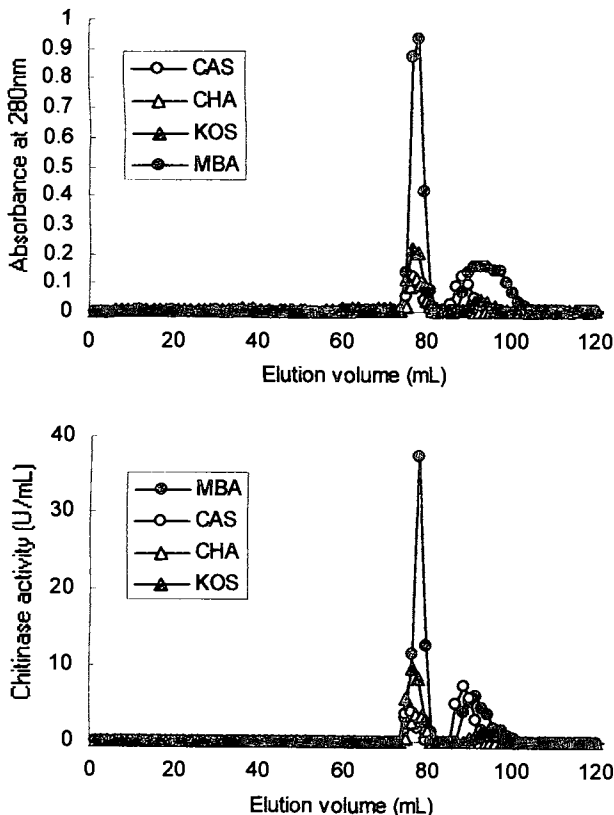


Fig. 3 SP-Sepharose chromatography of chitinase fractions of MBA, CAS, CHA and KOS. MBA, Muscat Bailey A; CAS, Cabernet Sauvignon; CHA, Chardonnay; KOS, Koshu.

がキチン結合性であることが明らかになった。分離されたキチン結合画分をSDS-PAGEにより分析したところ、MBA, CAS, KOSは29.2 kDaと27.7 kDaの位置に二つのタンパク質染色バンドが検出されたのに対して、CHAでは29.2 kDaのバンドのみが検出された (Fig. 2)。試験に用いた4ブドウ品種すべてにおいて、この2種類のバンド以外は検出されなかった。2種類のキチナーゼの量的な比較と性質を明らかにするために、キチン結合画分を陽イオン交換体 (HiTrap SP HP) カラムクロマトグラフィーにより分離した。キチン結合画分をHiTrap SP HPカラムに添加し、洗浄後、溶出液量50 mLの位置から塩化ナトリウムの直線濃度勾配 (0 → 0.5 M NaCl/130 mL) をかけて、タンパク質を溶出した。280 nmの吸光度によりタンパク質の溶出位置を特定したところ、塩化ナトリウム濃度が約0.11 Mの位置に最初のピーク (CHI-1)、約0.15 Mの位置に2番目のピーク (CHI-2) が検出された (Fig. 3)。CHI-1およびCHI-2ともにキチナーゼ活性を示し、SDS-PAGE分析の結果、CHI-1が29.2 kDa、CHI-2が27.7 kDaの位置のタンパク質バンドを示した。品種間でクロマトグラムパターンを比較すると、MBA, CAS, KOSはCHI-1とCHI-2が検出されたが、CHAはCHI-1のみ検出された。MBA, CAS, KOSの3ブドウ品種において、CHI-1の量はCHI-2に比べて多く、特にKOSのCHI-2は微量であった。MBAは、CHI-1およびCHI-2ともに、他の品種に比べて多く、MBA果皮に検出される高いキチナーゼ活性 (Fig. 1) は、この2種類のキチナーゼ画分に起因していると考えられる。これらの結果は、経験的にカビ病害に対して抵抗性の高いMBAは(2)、キチナーゼの量および種類ともに、他の品種に比べて多いことを示しており、キチナーゼの量と種類が耐病性に関連していることを示唆している。

分離された2種類のキチナーゼ (CHI-1とCHI-2) の反応速度に及ぼすpHの影響を調べた。CHI-1とCHI-2の反応最適pHは、それぞれpH 3.5~4.5とpH 4.5~5.0であった (Fig. 4)。CHI-1とCHI-2ともにブドウ果皮から分離されたキチナーゼであるが、反応最適pHが異なっていた。ブドウ組織のpH環境は、細胞外、細胞内そして液胞内で異なっており、本キチナーゼが活発に作用できるpH 4~5の環境は、細胞外および液胞内にあると推測される。また、CHI-1とCHI-2で反応最適pHが少し異なっていることは、両酵素の局在

性が異なっていることに起因しているとも考えられる。本キチナーゼは、ブドウ果皮において、病原菌の侵入により誘導されるのではなく、ブドウ果粒の成熟プログラムの1つとして発現している。このことは、このキチナーゼが病害に対する予防的な役割を担っている可能性が高いことを示唆している。今後、これらキチナーゼの構造や性質をより詳細に調べることにより、キチナーゼのブドウ果粒での役割を明らかできると期待される。

本研究は、平成14年度～平成16年度科学研究費(基盤研究B14360018)の支援を受けて行った。

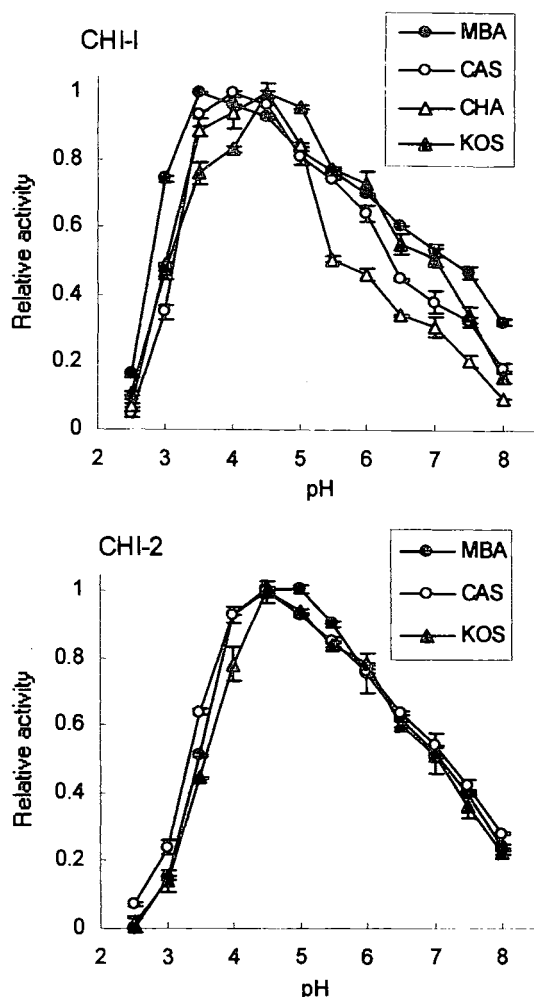


Fig. 4 Effects of pH on CHI-1 and CHI-2 activities in MBA, CAS, CHA and KOS.

MBA, Muscat Bailey A; CAS, Cabernet Sauvignon; CHA, Chardonnay; KOS, Koshu. Error bars represent SE (n = 2).

要約

4 ブドウ品種 (カベルネ・ソービニオン, シャルドネ, 甲州, マスカット・ベリーA) の果皮からキチナーゼを分離し, その種類と性質を比較した。成熟ブドウ果粒の果皮に検出されるキチナーゼ活性はマスカット・ベリーA が最も大きく, 次いで甲州, カベルネ・ソービニオン, シャルドネの順であった。キチンアフィニティークロマトグラフィー (キトパール BL-01) および陽イオン交換 (HiTrap SP HP) カラムクロマトグラフィーを順次行うことにより, 果皮抽出液から二つのキチナーゼ画分 (CHI-1 と CHI-2) を分離した。CHI-1 と CHI-2 を SDS-PAGE により分析したところ, それぞれ 29.2 kDa と 27.7 kDa の分子量を示した。CHI-1 と CHI-2 の反応最適 pH は, それぞれ pH 3.5~4.5 と pH 4.5~5.0 であった。マスカット・ベリーA, カベルネ・ソービニオン, 甲州の果皮から CHI-1 と CHI-2 の両方が検出されたが, シャルドネの果皮からは CHI-1 のみが検出された。4 品種のなかでは最も耐病性の高いマスカット・ベリーA の CHI-1 および CHI-2 の量が, 他の 3 品種に比べて多かった。これらの結果はブドウ果皮のキチナーゼの量や種類が果粒の耐病性に関与していることを示唆している。

文 献

1. 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).
2. 後藤昭二, 青野力三. ブドウ灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* のブドウ果粒および葉上での繁殖. 山梨大学発研報告, 16 巻, 1-4 (1981).
3. Imoto, T. and K. Yagishita. A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.* 35: 1154-1156 (1971).
4. Linthorst, H. J. Pathogenesis-related proteins of plant. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 123-150 (1991).
5. Mauch, F., B. Mauch-Mani, and T. Boller. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and beta-1, 3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942 (1988).
6. Robert, N., K. Roche, Y. Lebeau, C. Breda, M. Boulay,

- R. Esnault, D. Buffard. Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Sci.* 162: 389-400 (2002).
7. 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).
8. 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).
9. 高柳 勉, 内堀貴之, 吉川正輝, 横塚弘毅. ブドウの葉および果実におけるキチナーゼの誘導. *日本ブドウ・ワイン学会誌*, 10 巻, 3 号:131-136 (1999).
10. Uchibori, T., K. Yokotsuka, and T. Takayanagi. Purification and characterization of elicitor-induced chitinase from grape berries. *J. Appl. Glycosci.* 47: 163-168 (2000).