

[Research Note]

ブドウ ‘ピオーネ’ 果皮中の AVI を構成する膜成分の定性

岡本五郎・水野秀明

岡山大学大学院自然科学研究科 (農) 〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1

Histochemical Study of AVI Membrane in Pione Grape Berry Skin

Goro OKAMOTO and Hideaki MIZUNO

Graduate School of Natural Science, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

Histochemical studies were conducted to determine membrane constituents of anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) developed in vacuoles of skin cells of Pione grape berries at the full ripe stage. The marginal portion of the AVIs in cross sections of skin tissues, prepared by a paraffin section technique, was positively stained by Coomassie brilliant blue (CBB) and Sudan black, but not by alcian blue. The results indicated that the AVIs have membrane involving protein and lipid, not polysaccharide. SDS-PAGE of a protein fraction extracted from AVIs also revealed that the AVI membrane is composed of several protein molecules with the molecular mass between 50 kDa and 150 kDa.

Key words: AVI, membrane, Pione grapes, protein, skin

緒言

成熟期のブドウの果皮中では、アントシアニンの多くが液胞中で円形または楕円形の小胞 (Anthocyanic vacuolar inclusion, AVI ; Anthocyanoplast, ACP と同義語) 内に濃縮された状態で存在する (4, 5, 9)。しかし、アントシアニンは極性を持つため、水に溶けやすい。したがって、アントシアニン分子だけでは液胞中で小胞状の構造を維持することは考えにくく、何らかの化合物が膜を構成している可能性が考えられる。ブドウ以外の植物では、AVI を構成する化合物についていくつかの報告がなされている (10, 11)。しかし、ブドウの AVI に関する報告は少なく、中村 (6) が顕微鏡観察によって膜の存在の可能性を示しているだけである。本研究では、ブドウの AVI を固定・染色し、AVI を構成する膜の存在とその化合物の化学的性質を推定するとともに、SDS-PAGE 電気泳動法によって AVI に含まれるタンパク分子のサイズを解析した。

材料と方法

1. 植物材料

AVI の染色実験には、2004 年 5 月に岡山市内の経済栽培園で収穫された加温栽培のピオーネ果実 5 果房を用いた。収穫果実の果汁の可溶性固形物含量 (TSS) は約 17 度で、農林水産省果樹試験場基準果実カラーチャート (ブドウ ; 赤・紫・黒色系) による着色スコアは 8~9 であった。また、AVI に含まれるタンパクの SDS-PAGE 実験には、2005 年 10 月に無加温の経済栽培園で収穫されたピオーネ果実 4 果房を用いた。この果実の果汁の TSS は約 16 度で、着色スコアは 5~6 であった。

2. パラフィン切片の作成

果粒を中性洗剤で洗い、カミソリを用いて果粒の赤道部分から直径 2 mm、厚さ 1 mm の果皮ディスク 30 個を切り出した。このディスクをリン酸クエン酸 Buffer で pH を 5.0 に調節した 4% ホルムアルデヒド溶液に浸し、25°C で 24 時間、固定した。この固定サンプル

2006 年 7 月 27 日受理

ルを約 12 時間流水で洗浄した後、エタノール・ブタノールシリーズで脱水した。これを組織用パラフィン(融点 53°C) で包埋し、マイクロームを用いて厚さ 14 μm の横断切片を作成した。

3. AVI の染色

スライドガラス上のパラフィンを 30°C キシレン中で溶除した後、キシレン・エタノールシリーズを経由して溶媒を除き、水中に浸した。スライドガラスを 4 グループ (各グループ 4~6 枚) に分け、グループ 1 は無染色、グループ 2 は 5%アルシアンブルー水溶液で 10 分間、グループ 3 は 0.25%クマジー・ブリリアント・ブルー (CBB; 25%メタノール+7.5%酢酸水溶液) で 10 分間、グループ 4 はスーダンブラック B (70%エタノール飽和溶液) で 10 分間、染色した。無染色のプレパラートおよびそれぞれの染色液で染色したプレパラートは、エタノール・キシレンシリーズで脱水し、エンテラン・ニュー (MERCK) を封緘剤としてカバーガラスで封入した。

4. AVI の単離と精製

パラフィン切片作成に用いたと同様の果皮ディスクを切り出し、1.5%セルラーゼ (Cellulase "ONOUKA" R-10、Yakult)、1%マセロチーム (Macerozyme R-10、Yakult)、0.4%PEG-6000、5 mM KCl、2 mM CaCl₂、0.7 M マンニトール、リン酸クエン酸 Buffer (pH 5.0) を混合した酵素液 10 mL に浸し、30°C のインキュベーター内で 24 時間置いた。その後、10 秒間超音波処理し、AVI を酵素液中に遊離させた。これを Miraclon

(Calbiochem) でろ過し、2,000 \times g で 10 分間遠心分離して得られた沈殿にリン酸クエン酸 Buffer (pH 3.0) を 3-5 mL 加え、ボルテックスで攪拌した。この操作を 3 度繰り返してから冷蔵庫内で 3 分間放置し、AVI を沈殿させた。これに 12% PEG-6000 を含むリン酸クエン酸 Buffer (pH 3.0) を静かに加え、AVI 沈殿と小さな残渣が遊離している溶液部分を分離した。以上の手順で得られた沈殿をパスツールピペットで取り出し、上記のリン酸クエン酸 Buffer に再懸濁した後、2,000 \times g で 10 分間遠心分離して、その沈殿を AVI のサンプルとした。

5. SDS-PAGE

西方 (7) が示した方法によった。すなわち、単離・精製した AVI サンプルから脂質を取り除くために、クロロホルム・メタノール溶液 (2:1 ; v/v) を加え、ボ

ルテックスで攪拌後、遠心分離してクロロホルム層を除き、残分を凍結乾燥した。この凍結乾燥サンプルに、2.5 mL の 0.5M Tris-HCl (pH 6.8)、2.0 mL の 10%SDS、2.0 mL のグリセロール、0.1 mL の 0.1%BPB、3.2 mL の蒸留水を混合した Sample Buffer を 60 μL と Tris-HCl Buffer (pH 8.8) 2 μL を加えて攪拌した。これを 60°C で変性後、メルカプトエタノールを 5%になるように加えた。20,000 \times g で 10 分間遠心分離し、上澄みをタンパク質試料溶液とした。

分離ゲルには、アクリルアミドを 7.5%含むゲルと 15%を含むゲルを用いた。7.5%ゲルは、2.25 mL の 30%アクリルアミド、2.25 mL の 1.5 M Tris-HCl Buffer (pH 8.8)、100 μL の 10% SDS、35 μL の 10%過硫酸アンモニウム、5 μL の TEMED、4.5 mL の蒸留水を混合した。また、15%ゲルは、4.5 mL の 30%アクリルアミド、2.25 mL の 1.5 M Tris-HCl Buffer (pH 8.8)、100 μL の 10% SDS、35 μL の 10%過硫酸アンモニウム、5 μL の TEMED、2.25 mL の蒸留水を混合した。それぞれをガラスプレートに流し込み、ゲル 1 枚あたり 200 mL の蒸留水を重層した。ゲルが固まってからろ紙で水分を取り除き、濃縮ゲル (0.9 mL 30%アクリルアミド、1.5 mL 0.5 M Tris-HCl Buffer (pH 6.8)、60 μL 10% SDS、18 μL 10%過硫酸アンモニウム、10 μL TEMED、3.6 mL 蒸留水) を流し込んだ。

完成したゲルにタンパク質試料溶液 20 μL を流し込み、30 mA・150 V でゲルの下端から約 1 cm の高さまで泳動した。泳動 Buffer として、0.025 M Tris、0.192 M グリシン、0.1% SDS 溶液を用いた。SDS ゲルの銀染色には、Protein Silver Staining Kit (Bexel Biotechnology) を用いた。

結 果

1. AVI の染色反応

果皮組織を固定・脱水してからパラフィン包埋しても、AVI の形状や色調は保たれていた (Fig. 1-A)。しかし、大型の AVI では裂開したものも見られた (Fig. 1-B)。

切片をアルシアンブルーで染色すると、果皮組織の細胞壁は青色に染色されたが、AVI の表面は赤色のままであり、青色に染色された形跡はなかった (Fig. 2-A)。しかし、CBB で染色すると、AVI の表面や周辺部には濃青色の染色反応が認められ、AVI 表面が染色された

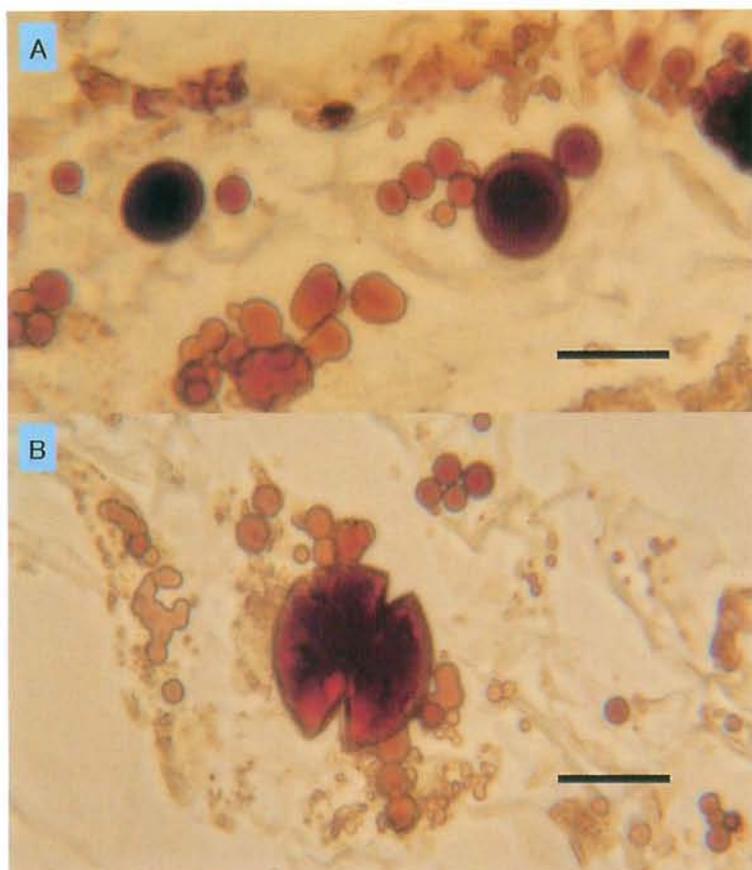


Fig. 1 AVIs observed in paraffin sections of dehydrated skin tissues in Pione grape berries. Most AVIs retained spherical body (A), while several large AVIs have been cracked (B). Bars indicate 20 μ m.

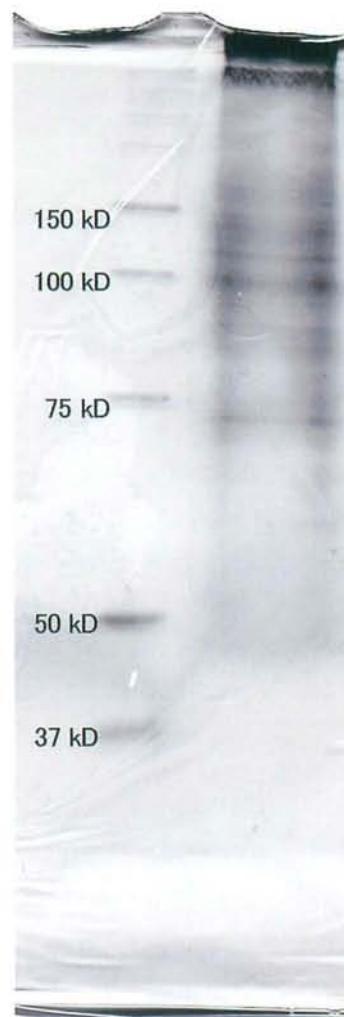


Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis of AVI protein extracted from Pione grape berry skin. Separation gel containing 15% acrylamide was used.

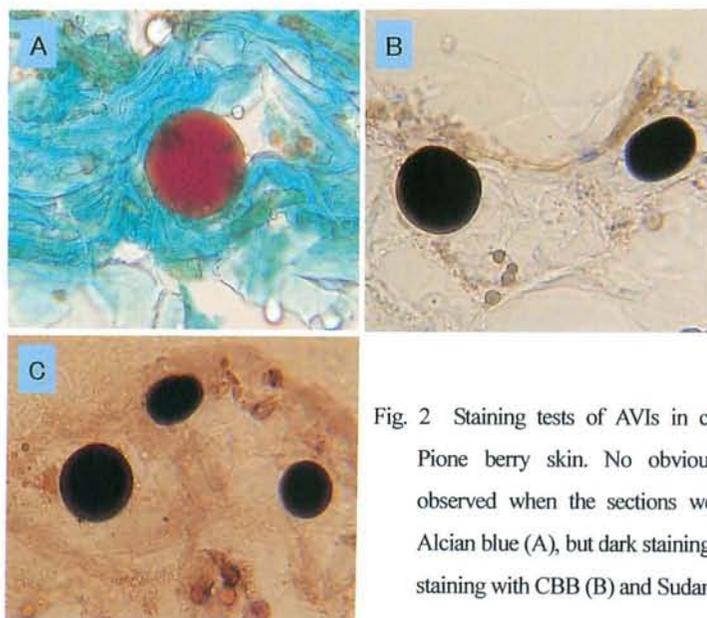


Fig. 2 Staining tests of AVIs in cross sections of Pione berry skin. No obvious staining was observed when the sections were treated with Alcian blue (A), but dark staining was found after staining with CBB (B) and Sudan Black B (C).

ことが推定された (Fig. 2-B)。また、スーダンブラックで染色すると、AVI 全体が黒く変色した (Fig. 2-C)。

2. SDS-PAGE

AVI 中のタンパク質を抽出して、SDS-PAGE を行った結果、タンパク質のバンドが検出された。アクリルアミド7.5%ゲルを用いた場合、ゲルの下端部分に濃い染色が見られ、バンドの確認が困難であった。一方、15%ゲルを用いた場合は、150 kDa から 50 kDa の範囲に濃く染色されたバンドがいくつか認められた (Fig. 3)。

考 察

アルシアンブルーはペクチン質などの酸性多糖類を青色に染色し (2, 3)、CBB はタンパク質を青色に染色 (3) する。一方、スーダンブラックはポリフェノールをオレンジ色に、脂質を暗青色・黒色に染色する (1)。本実験では、AVI はアルシアンブルーで染色されなかったことから、ブドウの AVI には多糖類が含まれていないか、少量しか存在しないと推察される。特に、AVI の周囲に青色の染色反応が認められなかったことから、AVI の膜物質として多糖類の存在はほぼないと思われる。一方、スーダンブラックと CBB による明らかな染色反応が認められたことから、ブドウ ‘ピオーネ’ の AVI は脂質とタンパク質を持つと考えられる。

Yasuda (10) および Yasuda and Shinoda (11) は、バラ ‘チャールズ・マーリン’ とハツカダイコン ‘コハク’ について同様の実験を行い、バラの AVI はペクチンとタンニン性物質を含むが、タンパク質を含まないこと、ハツカダイコンの AVI には還元糖、多糖類、脂質、ペクチンが含まれていないことを報告している。一方、中村 (6) は、顕微鏡観察の結果から、ブドウの AVI は膜構造を有するとしているが、その成分については明らかにしていない。われわれの染色反応実験の結果から、ブドウ ‘ピオーネ’ 果皮に含まれる AVI には脂質とタンパク質が存在すると推察され、特にタンパク染色反応は AVI の周囲に強く現れたことから、AVI は液胞膜や細胞膜と同じように、膜タンパク質で構成される膜に包まれている可能性が示唆された。

なお、本研究の予備実験において、脱脂処理を行わないまま SDS-PAGE を行った結果、マーカが直線的に流れず、サンプル側に引き寄せられる現象が観察さ

れた (データ省略)。そこで、クロロホルムで脂質を取り除く処理を行ってから SDS-PAGE を行った結果、マーカは直線的に流れた。このことは、スーダンブラックによる染色反応と同様に、ピオーネの AVI には脂質が存在していることを裏付けるものと思われる。

SDS-PAGE の結果、150 kDa から 50 kDa の間に濃いバンドが何本か見られ、多種のタンパク質が存在することが示された。Nozue (8) は、サツマイモの AVI 中には VP24 と呼ばれる 24 kDa のタンパク質が存在する事を報告している。しかし、今回の実験では、24 kDa 付近にはバンドが認められず、ブドウ ‘ピオーネ’ の AVI にはサツマイモとは別のタンパク質が含まれていると考えられる。

要 約

ブドウ ‘ピオーネ’ の果皮中に含まれる AVI は膜があるか、また、どのような物質で構成されているかを知るために、成熟期の果皮組織をパラフィン切片として、アルシアンブルー、CBB、スーダンブラックによる染色反応を観察した。その結果、アルシアンブルーでは染色反応が認められなかったが、CBB とスーダンブラックでは AVI 表面が強く染色され、AVI はタンパク質と脂質で構成される膜構造を持つことが推察された。AVI からタンパク質を抽出して SDS-PAGE で分析すると、分子量 50 kDa から 150 kDa の数種類のタンパク質が含まれていた。

謝 辞

本研究で、SDS-PAGE 実験を行うに当たって、岡山大学自然科学研究科 (農) 有用酵素化学研究室の木村吉伸教授よりご指導をいただいた。記して感謝の意を表す。

文 献

1. Bronner, R. Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissue. *Stain Technology* 50: 1-4 (1975).
2. Gonzalez, M. V., M. Coque and M. Herrero. Pollen-pistil interaction in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Amer. J. Bot.* 83: 148-154 (1996).
3. Herreno, M. and A. Arbeloa. Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *Amer. J. Bot.* 76: 1441-1447 (1989).

4. 水野秀昭・大西浩徳・平野 健・岡本五郎. ブドウの果皮色に及ぼすアントシアニン組成とアントシアノプラスト発達の影響. J. ASEV Jpn. 15: 17-23 (2004).
5. 中村正博. ブドウ '巨峰' の着色とアントシアノプラストの発達. 園学雑. 58: 537-543 (1989).
6. 中村正博. ブドウ '巨峰' のアントシアノプラスト. 園学雑. 62: 353-358 (1993).
7. 西方敬人. バイオ実験イラストレイテッド 5 タンパクなんてこわくない. 秀潤社. 東京 (1997).
8. Nozue, M., K. Yamada, T. Nakamura, H. Kubo, M. Kondo and M. Nishimura. Expression of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Physiol.* 115: 1065-1072 (1997).
9. Okamoto, G., H. Onishi and K. Hirano. The effect of different fertilizer application levels on anthocyanoplast development in berry skin of Pione grapevines (*Vitis vinifera* x *V. labrusca*). *Vitis* 42: 117-121 (2003).
10. Yasuda, H. Studies on the insoluble states of anthocyanin in rose petals. *Cytologia* 41: 487-492 (1976).
11. Yasuda, H. and H. Shinoda. The Studies on the spherical bodies containing anthocyanins in plant cells. *Cytologia*. 50: 397-403 (1985).