

トロピカルフルーツについての研究

—パパイヤ果実の追熟に関する研究—

高野 三郎

Study on the Tropical Fruit

—Part5, Study on the Ripening of Papaya Fruit—

Saburou Takano

緒言

現在、日本に輸入されている果実類の多くは外国から搬出する前に害虫や病原菌の駆除あるいは輸送の際の腐敗防止のため、ポストハーベストとして知られる農薬処理や熱処理などを行い、植物防疫をしている。パパイヤ果実も例外ではなく、炭そ病や地中海ミバエによる被害が甚大であった。パパイヤはハワイ産が大部分で防疫対策に当初はくん蒸剤のEDB（エチレンブロマイド）を使っていたが、発癌の疑いがあり、熱処理法に切替えられた。この方法は蒸熱処理と言って、47.2℃、7時間処理する方法である。この方法では若干のパパイヤにヒートショックによる生理障害果が生じた。パパイヤ果実の果肉が硬く軟化が進まなくなり、成分のうち追熟軟化に関与する酵素などの変動がみられた⁽¹⁻⁴⁾。生理障害がみられない正常な果実では、特に追熟軟化に関与する酵素としてはポリガラクトナーゼ（PG-I、PG-II、PG-III）が高い活性を示した。今回はその中でも主要な活性を示すと推察されるアイソザイムのPG-Iに着目し、その性質などを検討した結果、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. PG-Iの精製

試料のパパイヤは追熟が進行し外皮が完全に緑色から黄色に変わった時にPG-I活性は最大を示す。その時期のパパイヤ果実（ハワイ産ソロ種）を用いて精製した。なお、試料は抽出に用いるまで常温で保存した。

パパイヤの果皮や種子を除いた果肉2KgをTris-HCl緩衝液（0.2 M Tris-HCl pH 9.0 + 5 % NaCl）

でホモゲナイズした後、遠心分離（7000 rpm、20 min）をし得られた上清を粗酵素液とした。Butyl-Toyopearl、SP-Toyopearl、Con A Sepharose、Sephadex G-200のカラムクロマトグラフィーにより順次精製し、さらにPAGEゲルからの抽出、次いでゲルろ過法（Smart System Superose 12）によりPAGE電気泳動上単一なバンドになるまで精製を行った。PG-IはOD 280 nmの測定および活性測定により検出しPAGEでは活性染色により確認した。なお、PG活性の測定はPolygalacturonic acidを基質とし、反応は37℃で30分間行った。また、酵素活性はこの条件で1分間に1 μ molのGalacturonic acidを精製する酵素量を1 unitとして求めた。

Native-PAGE；Resiefieldらの方法に準じて行った。分離用ゲルには10%ポリアクリルアミドを、電極用緩衝液（pH 4.5）を用いて電気泳動を行った。泳動は4℃において濃縮ゲル中は10 mA、分離ゲル中は20 mAの定電流で行った。泳動後のゲル上のタンパク質のバンド検出は銀染色（銀染色IIキットワコー）またはCBB染色を用いて行った。また、活性染色はZainonらの方法に準じて行った。

実験結果および考察

パパイヤの果肉より抽出し、カラムクロマトグラフィーなどで精製したPG-IをさらにPAGEからの抽出法などを用いることにより、単一なタンパク質として精製することができた。（Fig.1）

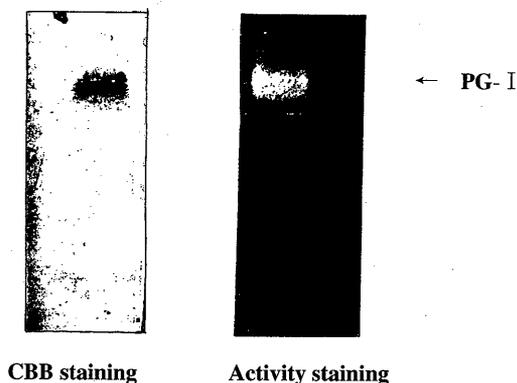


Fig.1 PAGE of PG- I

Table.1 Purification of PG- I from Papaya

	Protein (mg)	Total units	Yield (%)	Specific activity	Fold
Tris-HCL	5413.0	—	—	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	1852.4	—	—	—	—
Butyl	675	654	100	0.97	1
SP	73.7	395	60.4	5.36	5.53
Con A	10.8	235	35.9	21.76	21.20
G-200	5.4	92	14.1	17.07	17.61
Recovery of PG- I	1.19	50	7.73	26.77	27.62
Smart	0.18	47	7.26	266.1	276.7

さらに本酵素は最終的に比活性が266 Unit/mg Proteinとなり、精製倍率が約277倍の精製酵素となった。(Table.1)

一方、PG-Iの諸性質についても検討した。至適pHと至適温度を求めた。その結果、至適pHは4.6、至適温度は46℃であることが分かった。(Fig.2)

精製したPG-Iを用い、ゲルろ過 (Smart System Superose 12) を用いて分子量測定を行った。分子量マーカーとしてcytochrom C (12.5 kDa)、Albumin (45 kDa、68 kDa)、Aldolase (158 kDa) を使用した。その結果、PG-Iの分子量は200 kDaであることが判明した。(Fig.3)

また、精製したPG-Iを用い、12%アクリルアミド濃度のSDS電気泳動を行い、さらに泳動後は銀染色をし、バンドの検出を行った。その結果、約50 kDaのタンパク質で1種類のみが確認された。(Fig.4)

精製したPG-Iを用いて行ったゲルろ過による分子量測定とSDS-PAGEの結果より考察すると

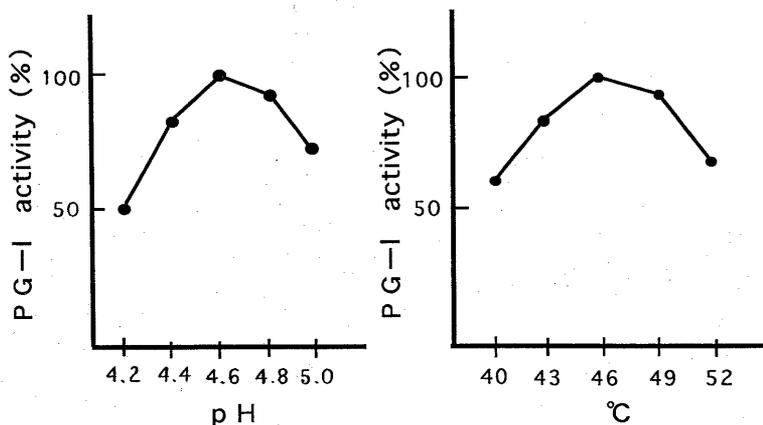


Fig.2 pH Dependent of PG- I and Temperature Dependent of PG- I

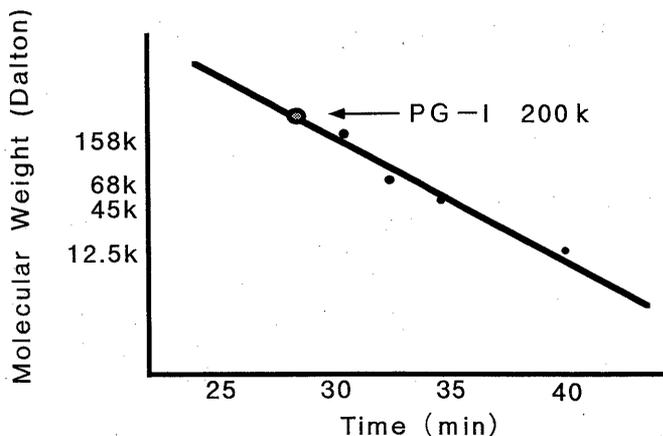


Fig.3 Molecular Weight Determination by Gel Filtration

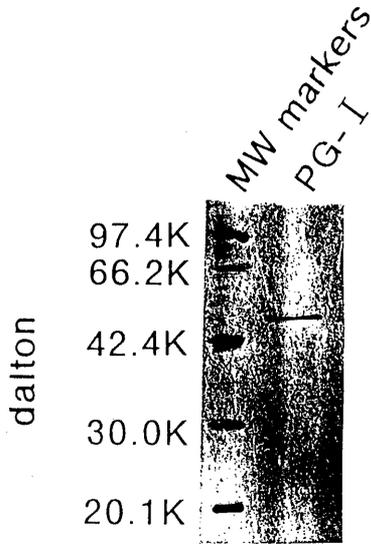
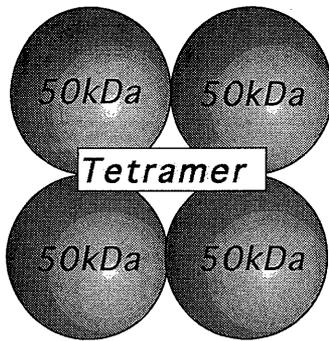
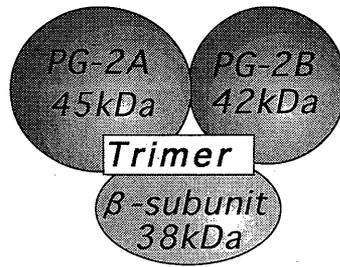


Fig.4 SDS-PAGE of PG- I



200 kDa
PG-1 of Papaya



125 kDa
PG-1 of Tomato

PG- I は 50 kDa のサブユニットからなる 4 量体として機能しているものと考えられた。既に諸性質が明らかにされているトマトの PG には PG- I (125 kDa)、PG- 2A (45 kDa)、PG- 2B (42 kDa) の 3 個のタイプが存在し、最も分子量が大きい PG- I は PG- 2A、PG- 2B、 β -subunit (38 kDa) と呼ばれるタンパク質の 3 量体であることが明らかにされている。このことより、パパイアの PG- I のサブユニットはトマトの PG- I とは異なるサブユニット構造である可能性が示唆された。また、パパイアには PG- I の他にアイソザイム PG- II、PG- III が存在するが、トマトと同様 PG- I のサブユニットであるか否かは不明である。今後このことを含め検討していきたい。

文 献

- 1) 高野三郎：トロピカルフルーツについての研究、生活科学研究、文教大学生活科学研究所、39～43
1991
- 2) 高野三郎：トロピカルフルーツについての研究、生活科学研究、文教大学生活科学研究所、41～45
1992
- 3) 高野三郎：トロピカルフルーツについての研究、生活科学研究、文教大学生活科学研究所、51～57
1993
- 4) 高野三郎：トロピカルフルーツについての研究、生活科学研究、文教大学生活科学研究所、112～
116 1997