

# モモ及びスモモの成熟及び貯蔵中のAsparagine 代謝関連酵素活性

—Asparagine transaminaseを中心として—

小宮山美弘・辻 政雄

Enzyme activities in relation to Asparagine metabolism  
in peach and plum during maturation and storage

—On main enzyme, asparagine transaminase—

Yoshihiro KOMIYAMA and Masao TSUJI

## 要 約

モモとスモモ果実のアスパラギン代謝関連酵素活性を調べたが、成熟期における活性はいずれも低かった。貯蔵中においても同様であったが、貯蔵温度により若干の差異が認められた。

モモとスモモの成熟及び貯蔵中のアラニン増加に伴うAsparagine transaminase活性は極めて低く、顕著な増加は認められなかった。

モモのAsparagine transaminase活性の最適温度は70°C、最適pHは9付近であった。

Enzyme activities in relation to asparagine metabolism in peach and plum fruits were measured and their activities during ripening were low. Those during storage were also low but a little differences were observed among the storage temperatures.

Asparagine transaminase activity during ripening and storage in peach and plum fruits was very low and the notable increase of the activity was not observed. The increase of alanine during ripening and storage in these fruits did not caused the increase of asparagine transaminase activity.

Optimum temperature and pH in asparagine transaminase activity of peach were 70°C and 9.0.

## 1. 緒 言

著者らは、スモモの成熟及び貯蔵過程で熟度の進行とともに、また貯蔵中の品質低下に伴いグルタミン酸とアラニンが急増し、特にアラニンの増加量と増加パターンが特徴的に果実の品質指標になることを報告した<sup>1)2)</sup>。また両者のアミノ酸の生合成経路も図1の様に提案した<sup>3)</sup>。この中でアラニンとグルタミン酸の主要経路は、GPT (Glutamate pyruvate transaminase) とGOT (Glutamate oxaloacetate transaminase) 活性の増大によるものと推定したが、スモモのようなバラ科果実の主要アミノ酸であるアスパラギンから直接アラニンを生成するAsparagine transaminase (AT) 活性<sup>4)</sup>については検討しなかった。

ATは主に哺乳動物類の肝臓や腎臓などに見い出されている<sup>5)</sup>が、植物界にも広く分布していると考えられるので、その活性を調べて提案経路との関係を検討し、併せてその他のアスパラギン代謝関連酵素活性についても若干検討を加えた。

なお、モモ果実も量的には少ないが、スモモと同様にアラニンが顕著に増加するので、これらの酵素活性も合わせて測定した。

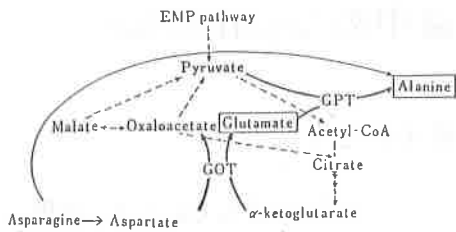


Fig. 1 Assumed pathways of glutamate and accumulation in ripening plum fruits  
 — Main pathway in soluble fraction  
 - - - Sub pathway in soluble fraction  
 ..... Metabolism of oxaloacetate in mitochondrial fraction

## 2. 実験方法

### 2-1 実験材料

モモは山梨県若草町産の「白鳳」種，スモモは同町産の「ソルダム」種を用い，7月から8月にかけて未熟，適熟及び完熟期に分けて果実を収穫した。

### 2-2 貯蔵方法

適熟期の果実を約70 lのガラス容器と約130 lのプラスチック容器に入れ，5℃，20℃及び35℃の温度で貯蔵した。容器は通常は密閉状態とし，1日2時間開放した。

Table 1 Composition of the reaction mixture for the determination of enzyme activities in relation to Asparagine metabolism

Enzyme	Reaction mixture	Product
AN	Asparagine	<u>Aspartic acid</u>
AS-II	Asparagine, AMP, Pyrophosphate, Mn	<u>Aspartic acid</u> , ATP, NH <sub>3</sub>
AT	Asparagine, Pyruvic acid	<u>Alanine</u> , 2-oxosuccinamic acid

The products on underline were used as index of the activities.

The reaction was carried out for 4 hr at 30°C and pH 8.0 and was stopped by heating at 100°C for 3 min.

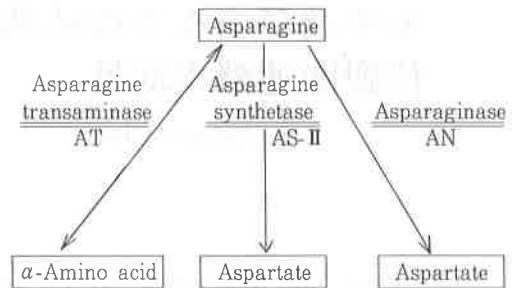


Fig. 2 Enzymes in Relation to Asparagine Metabolism

### 2-3 粗酵素の抽出方法

果実約30 gを採取して細断し，Tris-HCl buffer (pH8.0) 30mlでホモジナイズ後直ちにガーゼを用いて濾過した。濾液は10%NaOHで中和した後10,000rpmで10分間遠心分離し，上澄液を得た。この上澄液に飽和硫酸アンモニウム溶液を80%の濃度になるよう添加して約1時間静置した後10,000rpmで遠心分離を行い沈殿物を集めた。これをTris-HCl bufferに溶解し，同一bufferに対して19時間透析した。透析内液は濾過して粗酵素液とした。

### 2-4 酵素反応液組成

図2にアスパラギンの代謝関連酵素を示した。アラニンを生成する酵素はATであるが，それ以

外にAsparagine synthetaseはアスパラギン酸を生成する酵素AS-II<sup>6)</sup>及びアスパラギンを脱水してアスパラギン酸を生成するAsparaginase活性<sup>7)</sup>を測定した。

AT活性: L-Asparagine (25  $\mu$ mol) 0.2ml, Pyruvic acid (20  $\mu$ mol) 0.1ml, Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.5ml, Enzyme sol. 0.2ml 計1ml.

AS-II活性: L-Asparagine (20  $\mu$ mol) 0.1ml, Pyrophosphate (20  $\mu$ mol) 0.1ml, AMP (20  $\mu$ mol) 0.1ml, MnCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ mol) を含むTris-HCl buffer (pH8.0) 0.5ml, Enzyme sol. 0.2ml 計1ml.

AN活性: Asparagine (50  $\mu$ mol) 0.2ml, Tris-HCl buffer (pH8.0) 0.6ml, Enzyme sol. 0.2ml 計1ml.

酵素反応は40°Cで4時間行い、100°C, 3minの加熱で反応を停止し、反応液は10,000rpm, 10minの遠心分離を行い生成物を得た。反応液組成の概略は表1に示したが、酵素活性は生成物の中からアスパラギン酸及びアラニンを指標とし、反応液中の全生成量で示した。アミノ酸は日本電子(株)製アミノ酸自動分析機5AH型で分析した。

### 3. 実験結果

#### 3-1 モモ果実の成熟及び貯蔵中の酵素活性の変化

結果は表2に示した。ATを除いてはいずれも活性は低く、AN活性が適熟期に若干、またAS-II活性はわずかにみられた程度であった。AT活性は未熟期の果実に比較的高い活性がみられたものの、適熟期には減少し、完熟期には全く認められなかった。図3にはアラニンの増加に最も関与すると思われるAT活性の変化を示した。20°C貯蔵の未熟果では貯蔵中急激に減少し、6日後に活性は全く認められなくなった。9日後には再び活性が認められたが、貯蔵初期の20%程度であった。適熟期もほぼ同様なパターンを示した。一方完熟果ではこれらとは異なった変化を示し、当初活性はなかったが、3日目に若干認められた後減少した。適熟果での貯蔵温度の活性に与える影響をみると、5°Cと35°Cではほぼ減少の一途で、貯蔵後の顕著な増加は認められなかった。

Table 2 Changes in various enzymatic activities at three maturities of 'Hakuho'peach

Enzyme	Formed products(nmol)		
	unripe	Ripe	Full ripe
AN	ND	3.4	ND
AS-II	ND	0.05	ND
AT	26.5	7.7	ND

Enzymatic activities were expressed as total amounts of products formed in the reaction mixtures.

#### 3-2 モモ果実のATの最適pHと温度

ATの最適pHと温度を調べた結果を図4に示した。pHは9.0付近、温度は70°C付近が最適であった。pHは他のAT<sup>5)</sup>と同様であったが、温度はかなり高い領域に最適条件があることがわかった。

#### 3-3 スモモ果実の成熟過程における酵素活性の変化

結果は表3に示した。未熟期にはいずれの活性も認められなかったが、適熟期にはAS-IIに比較的高い活性が認められた。AT活性はAS-IIの約3分の1であった。完熟期になるとAT活性が若干増加したが、AS-II活性は全く認められず、AN活性がわずかに認められた。次に貯蔵中のAT活性についてはデータは示さないが、いずれの活性も低い値で推移した。なお、本酵素の最適温度とpHは活性が低く、明確な値は得られなかった。

### 4. 考 察

本試験の結果からモモ、スモモ中のアスパラギンの代謝活性は比較的低いことが分かった。モモのアラニンは白鳳の場合、最も増加する時期で8mg/100g程度である<sup>8)</sup>。図1でも明らかのように、適熟果は20°Cでは9日目まで増加しており、アラニンの増加パターンと類似しているものの貯蔵当初より低かった。このことから本酵素活性はアラニンの増加にあまり関与していないのではないかと推察された。モモとスモモはアスパラギン系果実と称される<sup>9)</sup>ようにアミノ酸のほとんどがアスパラギンであるが、芥尾ら<sup>10)</sup>はこれらの蓄積はAsparatotransferase, Asparaginase, Asparagine synthetaseにより生合成されると結論づけ

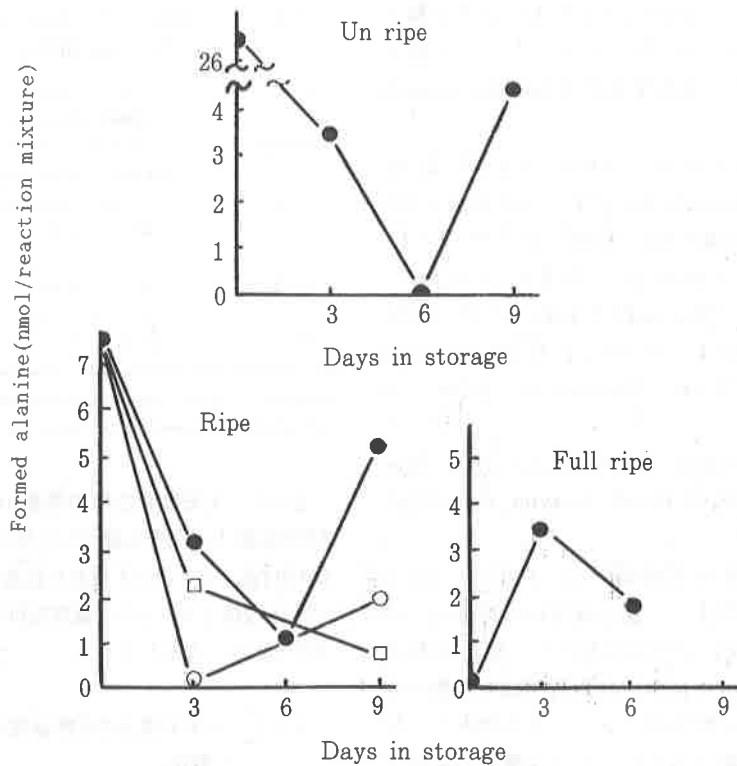


Fig. 3 Changes in asparagine transaminase activities during storage at 5°C, 20°C and 35°C

○ — ○ 5°C, ● — ● 20°C, △ — △ 35°C

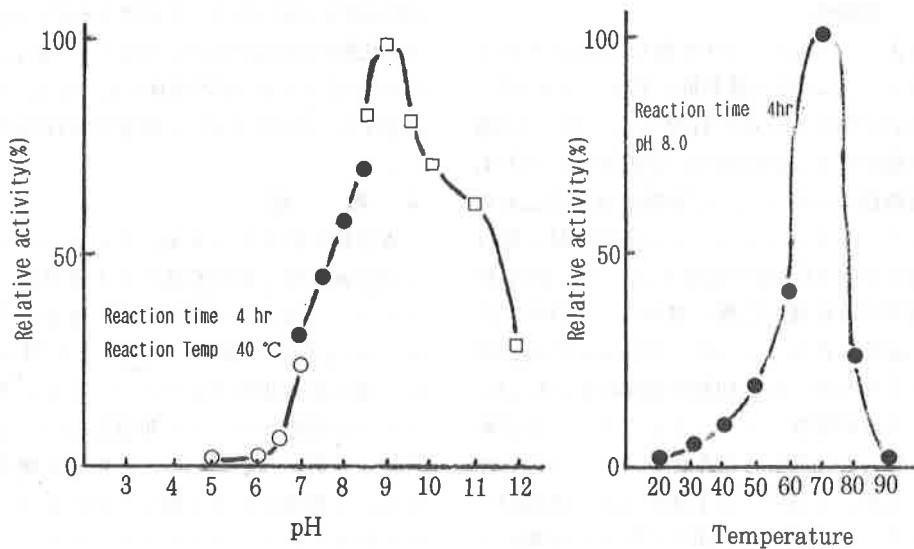


Fig. 4 Effect of pH and temperature on asparagine transaminase activity of peach

○ — ○ Citrate-Phosphate buffer  
 ● — ● Tris-HCl Buffer  
 □ — □ Glycine-NaOH buffer

Table 3 Changes in various enzymatic activities at three maturities of 'Sordum' plum

Enzyme	Formed products(nmol)		
	Unripe	Ripe	Full ripe
AN	ND	ND	1.3
AS- II	ND	9.4	ND
AT	ND	3.0	5.8

Enzymatic activities were expressed as total amounts of products formed in the reaction mixtures.

ている。したがって本結果からこれらの酵素は成熟過程は勿論貯蔵中でもほとんどアスパラギン合成側に傾いていると考えて良いであろう。

著者らはスモモの成熟及び貯蔵過程で増加するグルタミン酸とアラニンの生合成経路を図1のように提案し<sup>3)</sup>、蛋白質からの分解によるアラニンとグルタミン酸の増加のないことも証明した<sup>1)</sup>。しかし、AT活性の経路については未検討であったが、その活性は非常に低いことがわかった。例えばGPTは本試験の反応時間より短くて活性は57 $\mu$ mol、貯蔵中には200 $\mu$ molに増加した<sup>3)</sup>。このことから著者らの提案経路中のAT活性によるアラニンの生成は極めて少ないものと結論づけた。

なお、アスパラギンのようなアミドの生理的意義については未だ説明されていないが、窒素肥料の施肥量の増加時期と蛋白質の分解時期に増加すること<sup>9)</sup>から、蛋白質の合成と分解時期に分けて考えることが重要であり、さらに詳細な検討が必要であろう。

#### 文 献

- 1) 小宮山美弘・原川 守・辻 政雄：日食工誌, 26, 351 (1979)
- 2) 小宮山美弘・原川 守・辻 政雄：日食工誌, 26, 371 (1979)
- 3) 小宮山美弘・原川 守・辻 政雄：日食工誌, 31, 180 (1984)
- 4) MEISTER ALTON: Biochemistry of Amino Acid, II, (Academic Press), P358 (1965)
- 5) 丸尾文治・田宮信雄監修：酵素ハンドブック, (朝倉書店), p315 (1966)
- 6) 同 上, P580,
- 7) 同 上, P774,
- 8) 小宮山美弘・辻 政雄：山梨食工指報告, 18, 23 (1986)
- 9) 田村真八郎・塩入英次：農産技研, 3, 116 (1956)
- 10) 斉尾健二・木村次郎：日本土壤肥料学会誌, 28, 101 (1957)
- 11) 小宮山美弘・辻 政雄：日食工誌, 36, 202 (1989)