

### 第3章 ナシ及びモモ果実の糖代謝関連酵素活性の季節変動

#### 3-1 はじめに

ナシ及びモモ等のバラ科果樹では、ソルビトールが主たる転流型糖である (10, 63, 106)。そのためソルビトールの濃度勾配を果肉の篩管と柔細胞との間に形成して、果実中に糖を多く引き入れるためには、転流型糖であるソルビトールの転換を触媒する酵素を明らかにすることが重要であり、この転流してきたソルビトールが果実中でどのように、どの程度の割合で他の糖に代謝転換されるかは果実品質を左右する要因でもある。さらに、モモの未熟果にはスクロース含量は少ないが、成熟期直前に急速に増加し、成熟果では全糖中の約70%以上を占めるようになる (44, 49)。このため、モモ果実におけるスクロース代謝もソルビトール代謝とともに直接的に果実品質に重要な影響を及ぼすものと思われる。また、ナシにおいてはスクロースを蓄積する品種としない品種があり (48)、これら品種間でのスクロース代謝を酵素活性を基にして育種素材の特性を明らかにすることは実際の育種を行う上にも重要であり、より糖度の高い高品質果実の育種の指標となる。そこで、ナシ及びモモ果実中での糖の蓄積と糖代謝関連酵素活性の季節変動を調べ、ソルビトールとスクロース代謝を明らかにすることを目的とした。

### 3-2 実験方法

本実験で使用したナシ及びモモ果実は農林水産省果樹試験場または果樹試験場千代田試験地に栽植されている樹より採集し供試した。成熟果を供試するに当たり熟度判定は開花後日数、果梗からの果実の離れ易さ、そしてカラーチャートにより行った。

ナシ及びモモ果実の糖代謝関連酵素活性の季節変動を調べるために、果実から酵素の抽出を行った。ナシのソルビトール代謝関連酵素 ( $\text{NAD}^+$ -SDH、 $\text{NADP}^+$ -SDH、S6PDH) については‘幸水’を、スクロース代謝関連酵素については‘長十郎’及び‘ヤーリー’を、酸性インペルターゼについてはいずれの品種をも供試した。モモでは‘白桃’を供試した。ソルビトール代謝関連酵素の抽出は以下のように行った。まず果肉よりソルビトール代謝関連酵素を10 mM アスコルビン酸、1 mM DTTそして10% PVPPを含む0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) で抽出し、遠心分離 (12,000 X gで20分間) を行い、上澄をセファデックス G-25で脱塩し、つづいて飽和硫酸で蛋白質を塩析した。これを1 mM DTTを含む0.01 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.2) に透析し、あらかじめ0.01 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したDEAE-セルロースカラムにとおした。これを0.2 M 塩化カリウムを含む0.01 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.2) で溶出し、溶出液をコロジオンバッグで濃縮した後、試料とした。

SSとSPSの抽出は以下のように行った。まず果肉よりSSとSPSを10 mM アスコルビン酸、1 mM DTT、10% PVPPを含む0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) で抽出し、遠心分離 (10,000 X gで20分間) を行い、上澄を1 mM DTTを含む0.01 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に透析した後、試料とした。モモの場合は遠心分離後の上澄をセファデックス G-25で脱塩した後、飽和硫酸で蛋白質を塩析した。これを1 mM DTTを含む0.01 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.2) に透析した後、試料とした。

酸性インペルターゼとSOXの抽出は以下のように行った。まず果肉より酸性インペルターゼとSOXを10 mM アスコルビン酸、1 mM DTTを含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で抽出し、遠心分離 (12,000 X gで20分間) を行い、上澄を得た。残渣

を再度、緩衝液で抽出し、遠心分離（12,000 X gで20分間）を行い、先程の上澄と合せて1 mM DTTを含む0.01 M Tris-塩酸緩衝液（pH 7.0）に透析した後、試料とした。モモの場合は遠心分離後の上澄の蛋白質を飽和硫酸で塩析し、1 mM DTTを含む0.01 M Tris-塩酸緩衝液（pH 7.0）に透析し、コロジオンバッグで濃縮し、この上澄は可溶性型のインベルターゼとSOXの試料とした。残渣も透析後、結合型のインベルターゼとSOXの試料とした。

糖の抽出は第1章に従った。分析、定量は第1章に記述した液体クロマトグラフィーあるいはガスクロマトグラフィーによる方法で行った。ガスクロマトグラフィーによる分析、定量の場合、80%エタノール抽出液の1部をミリポアフィルター（ $\phi$  0.45  $\mu$ m）で濾過し、濾液に内部標準としてn-ドコサン 0.05 ml（2 mg/ml）を加えた。つづいてペーパーミックスで試料を吸引乾燥した後、真空ポンプで乾固させ、トリメチルシリル誘導体試薬（ピアス）0.2 mlを加えて沸騰水中で10分間反応させた後、50 mのキャピラリーカラム（CP-Sil 8CB, ガスクロ工業）を装着したガスクロマトグラフィー（GC-9A, 島津製作所）で分析を行った。各糖の定量は既知量の標準試薬と内部標準との比較により行った。

果実中の澱粉含量は80%エタノール不溶残渣にDMSOを加え、沸騰水中で30分間抽出した後、遠心分離（1,500回転で30分間）を行い上澄画分を回収した。残渣についてはさらに2回、DMSO抽出を行い、同様にして回収した上澄画分を合せて定容した後、F-キット スターチ（ベーリンガー・マンハイム山之内）を用いて定量を行った。

酵素活性の測定は以下の方法を用いた。

SS活性は第2章のRoe (91)の方法に従った。SPS活性の測定の場合は、SSで用いた15 mM HEPES-KOH緩衝液（pH 8.5）を（pH 8.0）に、15 mM フルクトースをフルクトース-6-リン酸に変え、さらに1.3mM ふっ化ナトリウムを加えて全量を1.2 mlとし、Roe (91)の方法に従い生成されるスクロース-6-リン酸を間接的に520 nmの吸光度を分光光度計で測定した。

インベルターゼ活性及びSOX活性の測定は次の方法に従った。1) Enzyme-coupling法により、生成されるグルコースを測定した。反応液の組成は59 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0; 酸性インベルターゼ) または 59 mM HEPES-KOH緩衝液 (pH8.0; アルカリ性インベルターゼ)、70 mM スクロースで、この反応液に試料を加え1.7 mlとし、30°Cで20分間反応させた後、煮沸を行って反応を止めた。つづいて第2章の3) に従い測定した。2) 反応液の組成は75 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0; 酸性インベルターゼ) または 75 mM HEPES-KOH緩衝液 (pH8.0; アルカリ性インベルターゼ)、95 mM スクロースに試料を加え0.5 mlとし、第2章の Nelson-Somogyi (82) 法により還元糖を定量した。

SOXの場合は1)の方法で59 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) そして 235 mM ソルビトールに試料を加え1.7 mlとし、反応時間2時間で以下同様に行った。2)の方法でも同様に75 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) そして310 mM ソルビトールに試料を加え 0.5 mlとし、反応時間2時間で以下同様に行った。

SDH活性及びS6PDH活性の測定は次の方法に従った。反応液の組成は 30 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 9.6)、1 mM NAD<sup>+</sup>またはNADP<sup>+</sup>、235 mM ソルビトール、3 mM 塩化マグネシウム (NADP<sup>+</sup>の場合添加) で、この反応液に試料を加え0.33 mlとし、30°Cで30分間反応させ、340 nmの吸光度を分光光度計で測定した。

S6PDH活性の場合は、同様に30 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 9.6)、1 mM NADP<sup>+</sup> そして12 mM ソルビトール-6-リン酸 に試料を加え 0.33 mlとし、30°Cで30分間反応させ、340 nmの吸光度を分光光度計で測定した。

NAD<sup>+</sup>-SDH、NADP<sup>+</sup>-SDHとS6PDHの酵素活性の1 unitは1時間当たり1  $\mu$  moleのNAD<sup>+</sup> (NADP<sup>+</sup>) を還元する酵素量と定義した。SSとSPSの活性はそれぞれ1時間当たり1  $\mu$  moleのスクロースとスクロース-6-リン酸を生成する酵素量と、酸性インベルターゼとSOXについては1時間当たりの1  $\mu$  moleのグルコースを生成する酵素量として表わした。

### 3-3 結果

#### 1) SPSの抽出及び測定方法の比較

SPSは不安定な酵素のため注意深い抽出の必要性(41, 54)、及びグルコース-6-リン酸がSPS活性を上昇させること(22)が報告されている。そこで、ナシとモモにおける脱塩方法と反応液中のグルコース-6-リン酸の有無の効果を比較した(Table 16)ところ、抽出法により有意な活性の差は認められないこと、さらにモモ果肉を小麦の葉とともに抽出した時には高いSPS活性が得られ、抽出過程でのSPSの不活性化もおこっていないことが明らかとなった(Table 17)。そのため、本法に従っても大きなSPSの失活にはならないことが明らかとなった。

#### 2) ナシ果実の糖蓄積の季節変動

糖含量はナシ果実の肥大とともに徐々に蓄積し、9月10日の成熟果では6月7日の未熟果に比べて約5倍以上の糖含量となった(Fig. 17)。転流してきたソルビトールは果実肥大に伴い他の糖に転換された。すなわち、未熟果ではソルビトールが主で、他の糖に転換されにくく、全糖中の70%以上を占めていたが、成熟果ではソルビトールの占める割合はわずか20%となった。7月10日にフルクトースとグルコースが蓄積しはじめ、果実肥大に伴い急速に蓄積し、最終的には全糖中のそれぞれ40%と15%を占めるようになった。また、スクロースは果実肥大とともに急速に蓄積し、最終的には全糖中の30%を占めるに至った。

#### 3) ナシ果実のスクロース及びソルビトール代謝関連酵素の季節変動

ソルビトール代謝関連脱水素酵素の中では $\text{NAD}^+$ -SDH活性のみがニホンナシ果実中に有意に検出された(Fig. 18)。他の $\text{NADP}^+$ -SDHやS6PDH活性は生育時期をとおしてほとんど検出できなかった。 $\text{NAD}^+$ -SDHの果肉1g当たりの活性は未熟期(7月10日)に著しく高く、果実肥大とともに減少し、再び8月20日より成熟期にむかい上昇した。

Table 16. Effect of extraction method and reaction mixtures on the activity of SPS from pear ( 'Choju' ) fruit.

Method	Activity ( $\mu$ mole/hr·gFW)	
	Expt. 1 <sup>z</sup>	Expt. 2 <sup>y</sup>
I <sup>x</sup>	2.71 ± 1.07	2.10 ± 0.22
II <sup>w</sup>	2.08 ± 0.10	2.06 ± 0.11

<sup>z</sup>Average from two replications.

<sup>y</sup>Average from four replications.

<sup>x</sup>Sample was desalted immediately by gel filtration or ultrafiltration, and assayed according to Hubbard et al. (41).

<sup>w</sup>Desalting method and reaction mixtures described in the text were used.

Table 17. Activity of SS and SPS from peach fruit and wheat leaf.

	Activity ( $\mu$ mole/hr·gFW)	
	SS	SPS
Expt. 1		
Wheat leaf (5 gFW)	162	18.6
Peach fruit (10 gFW)	27	0.44
Wheat leaf (5 gFW) + Peach fruit (10 gFW)	248	19.4
Expt. 2		
Wheat leaf (3 gFW)	73	9.0
Peach fruit (10 gFW)	6	5.2
Wheat leaf (3 gFW) + Peach fruit (10 gFW)	57	12.8

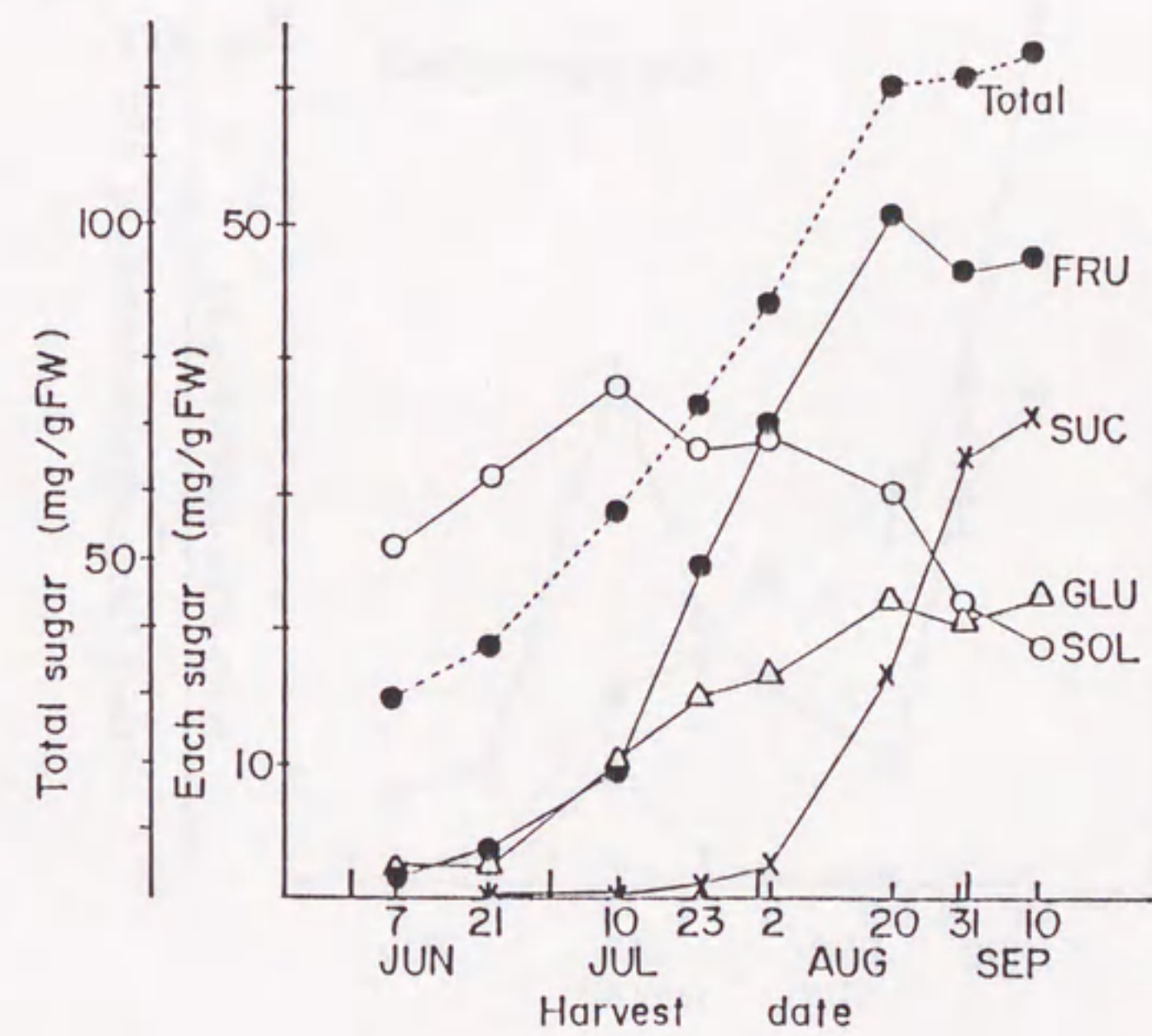


Fig. 17. Seasonal changes in soluble carbohydrates in Japanese pear fruit.  
 ×:Sucrose, ●:Fructose, △:Glucose, ○:Sorbitol.  
 Each point is the mean of parallel experiments and its error is small.

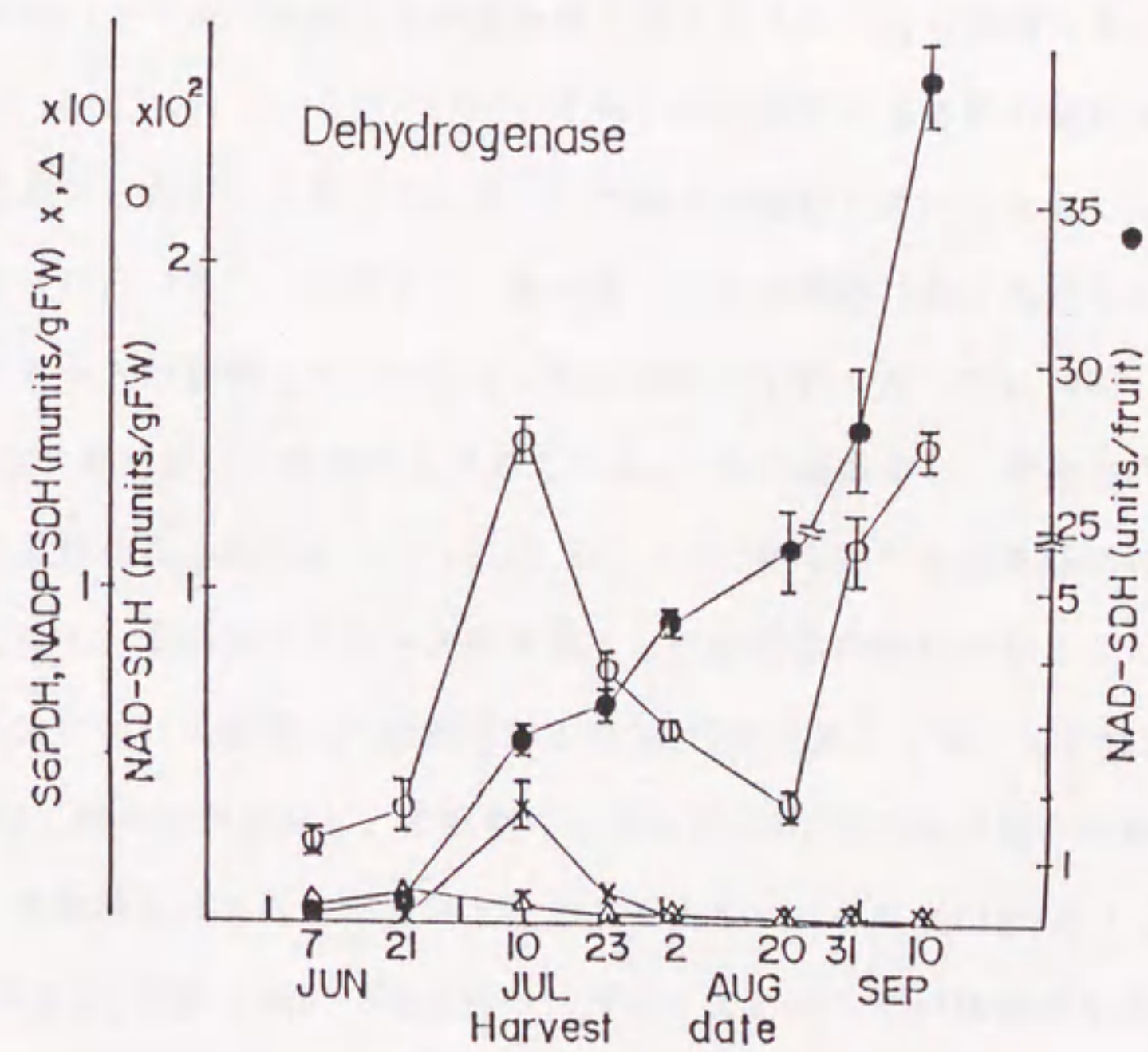


Fig. 18. Seasonal changes in NAD<sup>+</sup>-SDH, S6PDH and NADP<sup>+</sup>-SDH activities in Japanese pear fruit.  
 ○: NAD<sup>+</sup>-SDH, ×: S6PDH, △: NADP<sup>+</sup>-SDH per gFW,  
 ●: NAD<sup>+</sup>-SDH per fruit.  
 Each point is the mean ± SE of parallel experiments.



果実当たりでこの活性を表わすと、未熟期から果実肥大期に渡って上昇しつづけ、成熟期にはさらに急速に活性が上昇し、果肉1g当たりで表わした時のような活性の減少はみられなかった。この $\text{NAD}^+$ -SDH活性の強さと季節変動の様相はリンゴの場合と類似していた(8,113)。

スクロースを蓄積する‘長十郎’と蓄積しない‘ヤーリー’でのSS及びSPS活性の季節変動をみると、‘長十郎’のSS活性は5月30日の未熟期に最も高く、その後減少し、成熟期まで低いレベルで推移したが成熟期になりスクロースの蓄積に伴い活性が急速に上昇した(Fig. 19)。一方、‘ヤーリー’のSS活性の未熟期の様相は、‘長十郎’と同様に高かったが、6月3日に減少した後は成熟期に至っても低いレベルのまま推移した(Fig. 19)。SPS活性は‘長十郎’では未熟期に低く推移したが、成熟期になりスクロースが蓄積しはじめるとともに活性が上昇した(Fig. 20)。「ヤーリー」のSPSは6月12日に1度活性は上昇したが、その後減少し、果実の成熟に伴う顕著な活性の上昇はみられなかった(Fig. 20)。「長十郎」は未熟期にはスクロースがほとんどなく、その後スクロースの蓄積へと代謝経路の転換がおこった。この‘長十郎’でのスクロース蓄積への転換はSSとSPS活性の上昇と一致していた。

SOXは可溶性型と結合型が存在し、未熟期には全体のSOX活性の約50%が結合型由来のものであり、成熟期にはそれが70%以上を占めるようになった(Fig. 21)。果肉1g当たりの全体のSOX活性は $\text{NAD}^+$ -SDH活性の10分の1であり、その活性は比較的未熟期で高く、果実肥大に伴わずかに減少し、成熟期には再び急速に上昇した。この活性の上昇は主に結合型に由来していた。果実当たりでSOX活性をみると、全体の活性は未熟期はほぼ一定の活性で推移したが、成熟期になり急速に活性が上昇した。このニホンナシでのSOX活性はリンゴの4分の1であった(113)。

酸性インベルターゼも可溶性型と結合型が存在していた。生育期間をとおして全体の酸性インベルターゼ活性の80%以上が結合型であった(Fig. 22)。この活性は他のソルビトール関連酵素の活性より明らかに高かった。果肉1g当たりの全体の活性

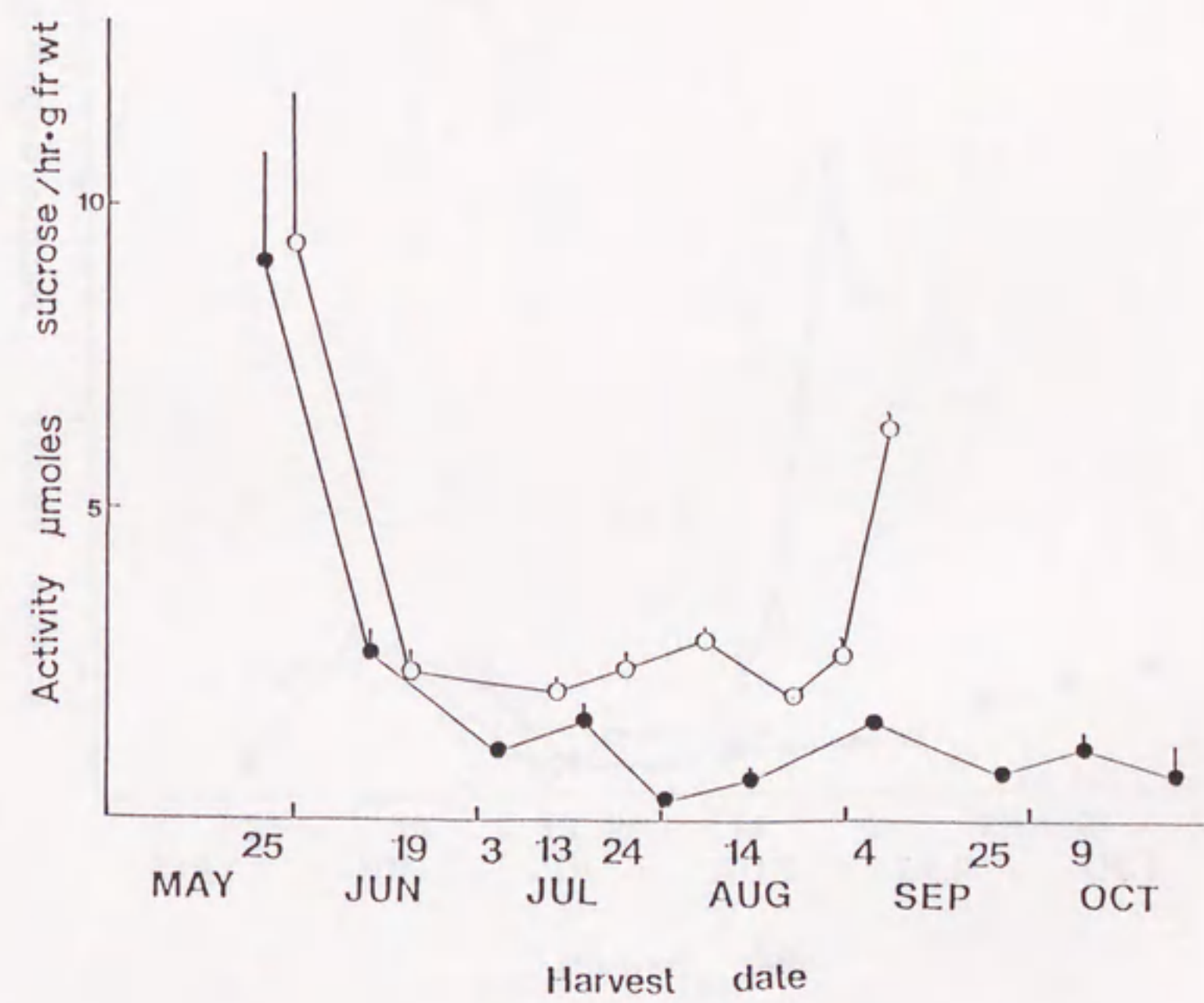


Fig. 19. Seasonal changes in SS activity in pear fruit.  
 ○; 'Chojuro', ●; 'Yali' per gFW.  
 Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

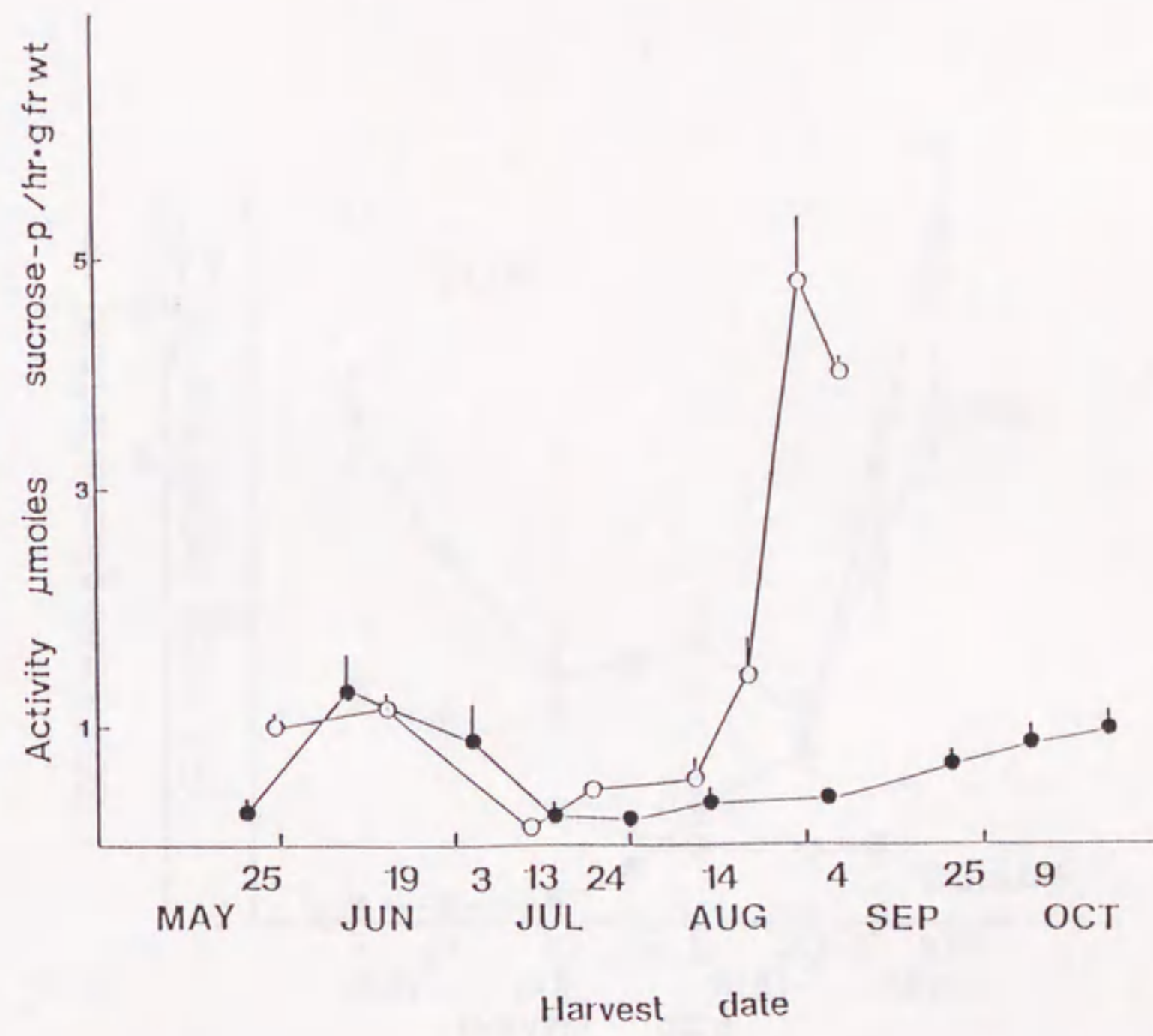


Fig. 20. Seasonal changes in SPS activity in pear fruit.  
 ○: 'Chojuro', ●: 'Yali' per gFW.  
 Each point is the mean  $\pm$  se of parallel experiments.

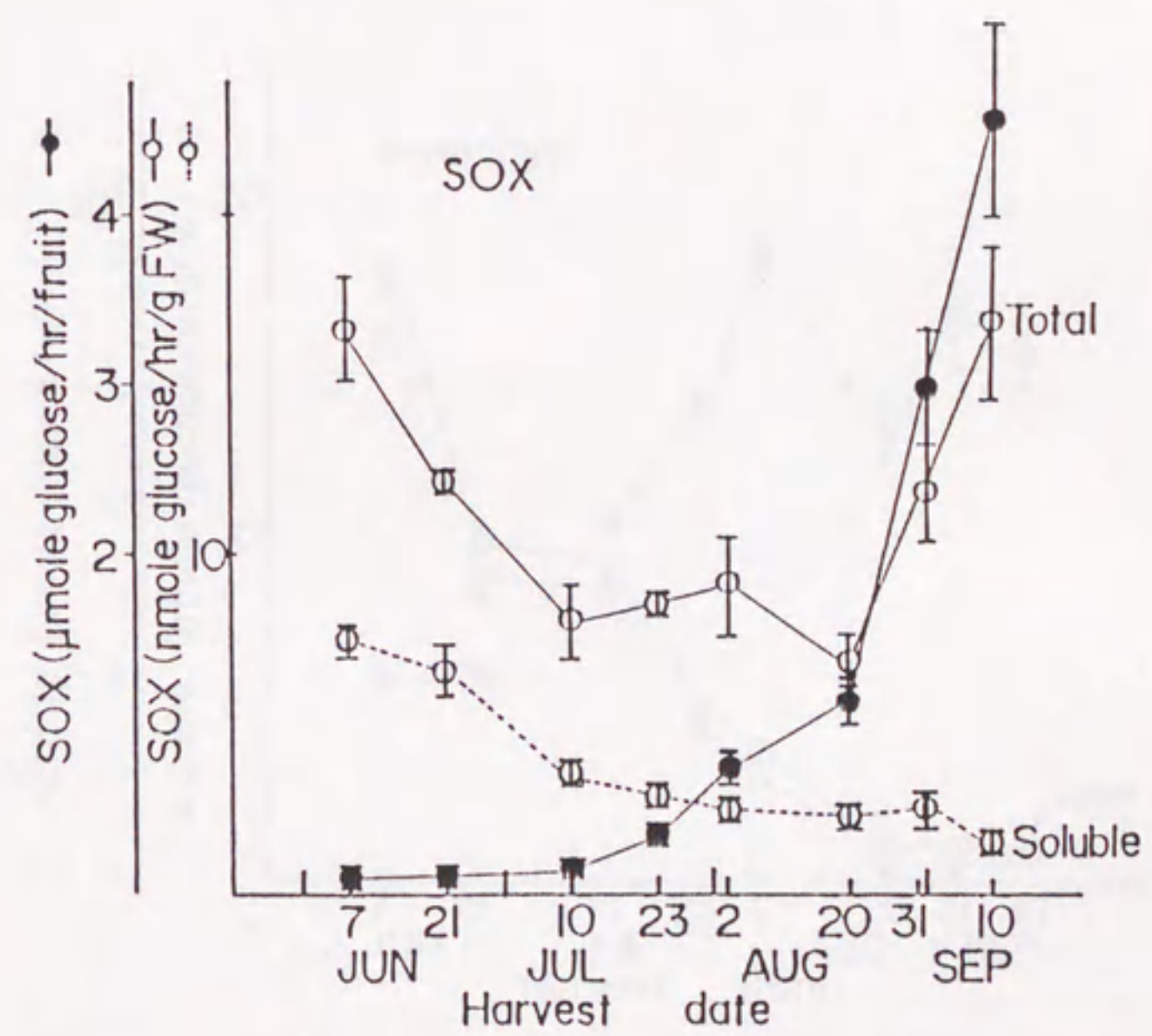


Fig. 21. Seasonal changes in SOX activity in Japanese pear fruit.  
 -○-: Total activity of bound and soluble forms per gFW.  
 --○--: Activity of soluble form per gFW.  
 -●-: Total activity of bound and soluble forms per fruit.  
 Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

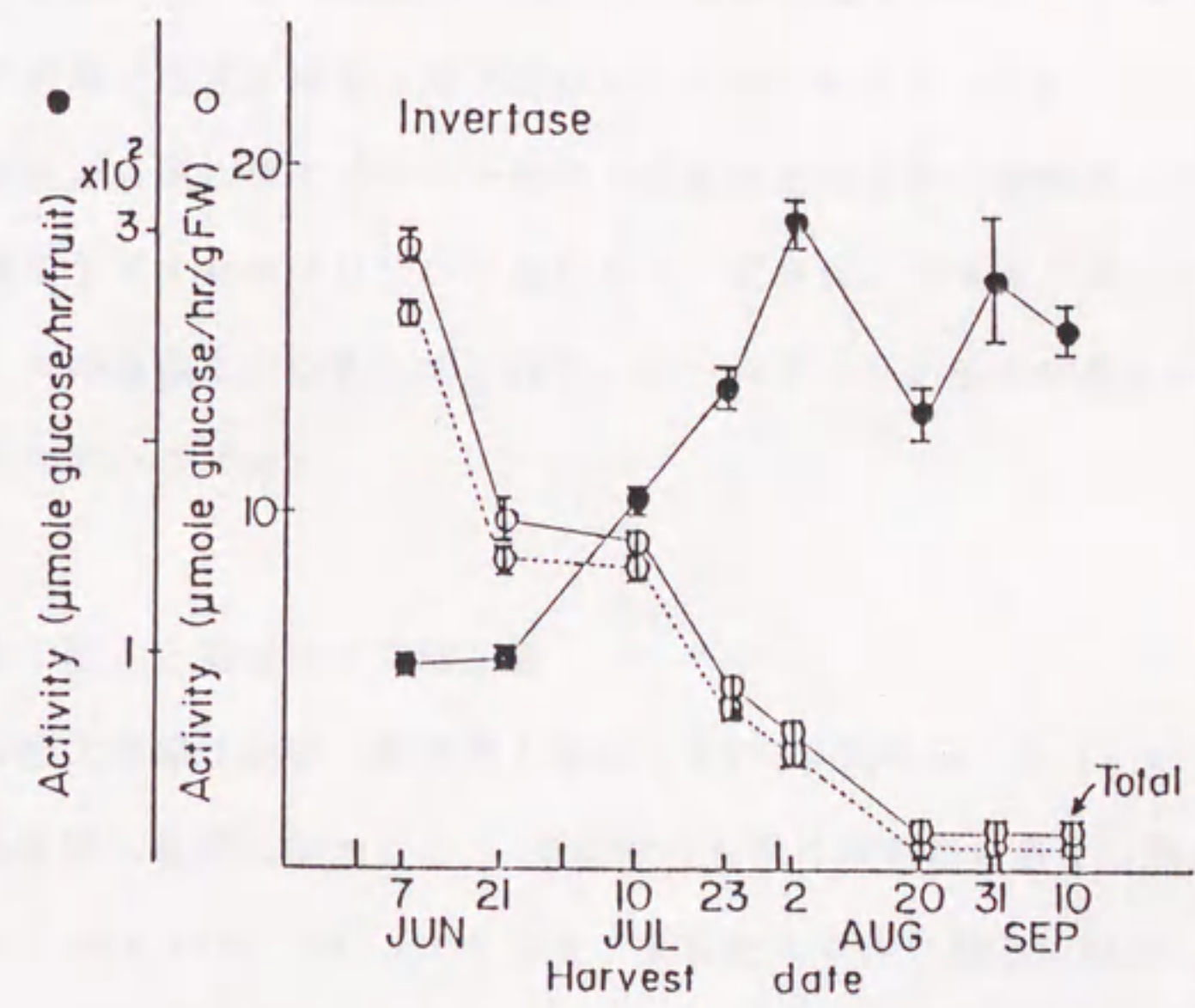


Fig 22. Seasonal changes in acid invertase activity in Japanese pear fruit.  
 -○-: Total activity of bound and soluble forms per gFW.  
 --○--: Activity of bound form per gFW.  
 -●-: Total activity of bound and soluble forms per fruit.  
 Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

は6月7日の未熟期に高く、その後8月20日まで急速に減少した。それ以降は成熟期まで低いレベルのまま推移した。果実当たりで酸性インペルターゼの活性をみると、果実肥大に伴い徐々に上昇し、その後はほぼその活性を成熟期まで保持したまま推移した。スクロースの蓄積量に差のある‘長十郎’と‘ヤーリー’の酸性インペルターゼ活性の季節変動をみると、‘長十郎’では7月3日に最大となり、それ以降は果実の成熟に伴い急速に減少し、結果的には成熟果での活性は未熟果の約14分の1になった。‘ヤーリー’では5月25日に酸性インペルターゼ活性が最大となり、果実の成熟に伴い減少したが、その程度は‘長十郎’に比べて少なかった。しかし、スクロースの蓄積の有無で活性に顕著な差が認められなかったため (Fig. 23)、酸性インペルターゼ活性の成熟に伴う減少は一般的な成熟現象であり、積極的にスクロースの蓄積量に影響を及ぼすものではないと思われた。同様に、マスクメロンの品種においてもスクロースの蓄積にかかわらず、酸性インペルターゼ活性が成熟に伴い減少することが報告されている (41)。

#### 4) モモ果実の肥大と糖蓄積の季節変動

モモ果実の肥大曲線は直径、果実重ともに2重のS字型を示した (Fig. 24)。特に、果実重は成熟直前に急速に増加した。果実中の澱粉は未熟期に多く、果肉1g当たり約0.8 mg含んでいた (Fig. 25)。その後、果実肥大に伴い急速に減少し、7月18日には約0.07 mgとなり、その後わずかに蓄積し、成熟期には約0.1 mgの澱粉含量となった。

モモ果実の果肉1g当たりのスクロース含量は未熟期には低いレベルで推移した (Fig. 26) が、果実の成熟する7月4日に急速に蓄積し、成熟果では優先的な糖となり、最終的には全糖中の70%以上を占めた。未熟期の果実ではグルコースとフルクトースが優先的な糖であり、ほぼ同量含まれていた。これらは果肉1g当たり10 mg前後の量で成熟期まで推移した。ソルビトールは生育期間をとおして果肉1g当たり

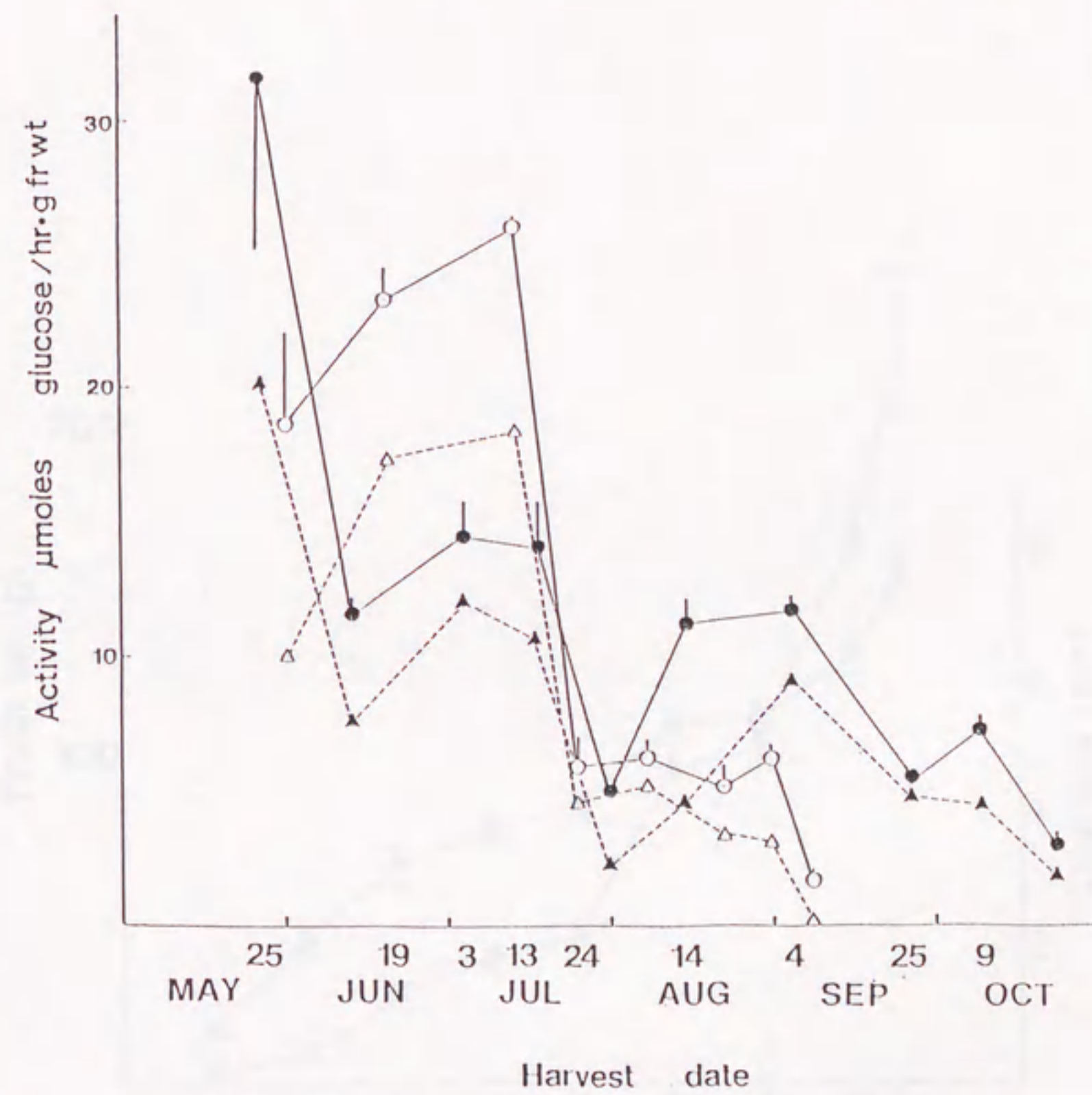


Fig. 23. Seasonal changes in acid invertase activity in pear fruit.  
 -○-; Total activity of bound and soluble forms per gFW in 'Chojuro'.  
 --△--; Activity of soluble form per gFW in 'Chojuro'.  
 -●-; Total activity of bound and soluble forms per gFW in 'Yali'.  
 --▲--; Activity of soluble form per gFW in 'Yali'.  
 Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

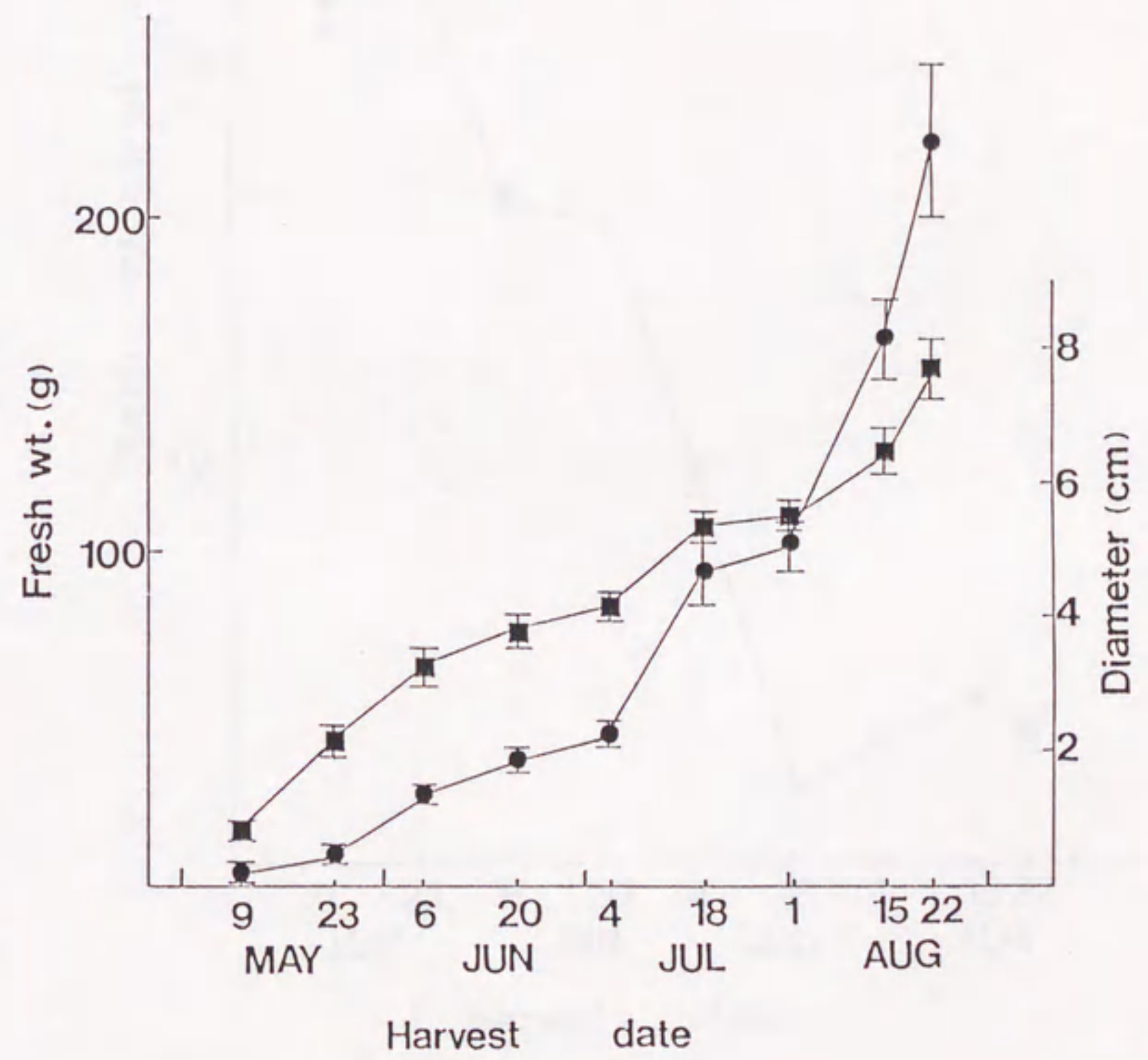


Fig. 24. Seasonal changes in FW and diameter in peach fruit.  
 ●:FW, ■:Diameter.



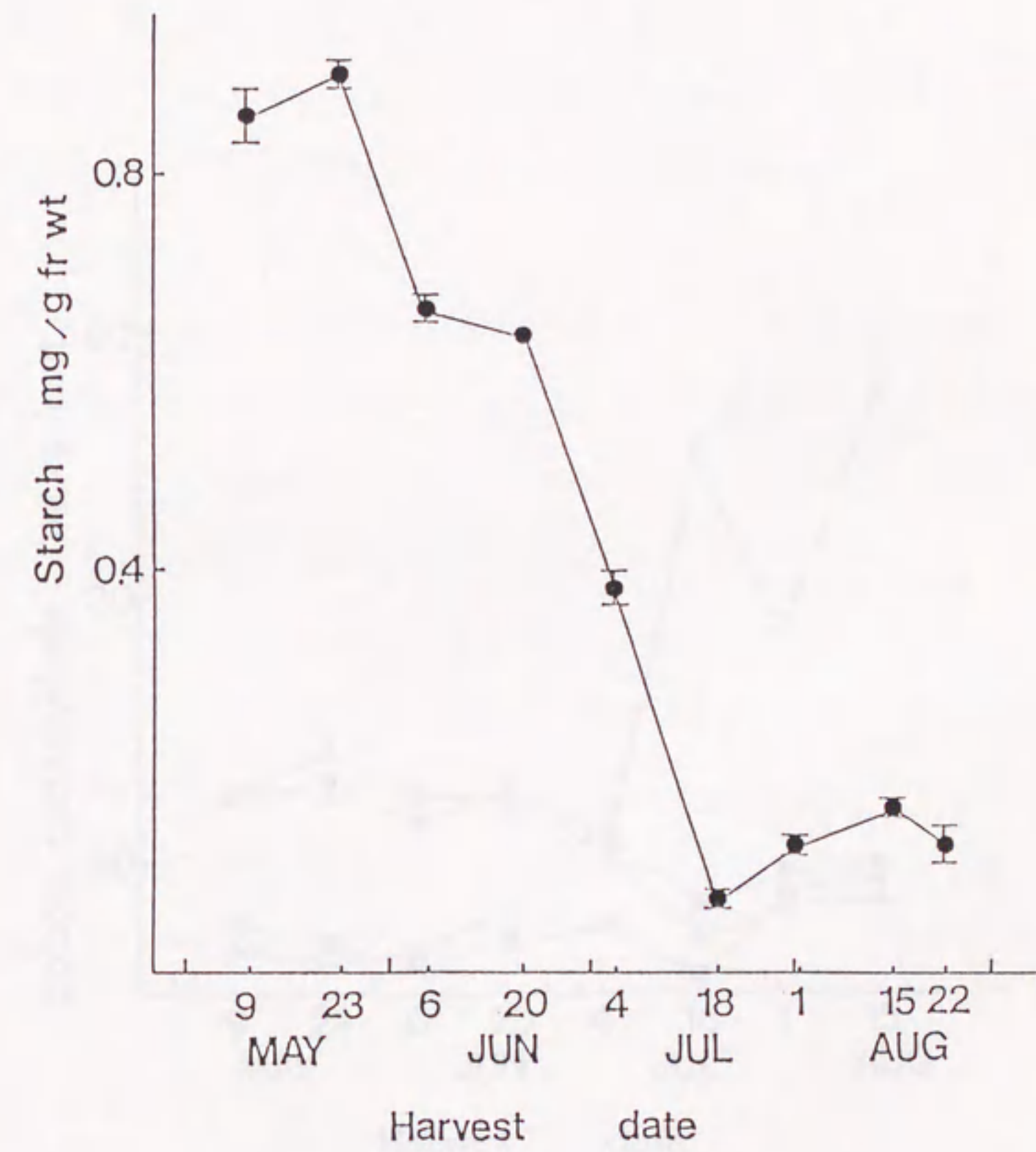


Fig. 25. Seasonal changes in starch content in peach fruit. Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

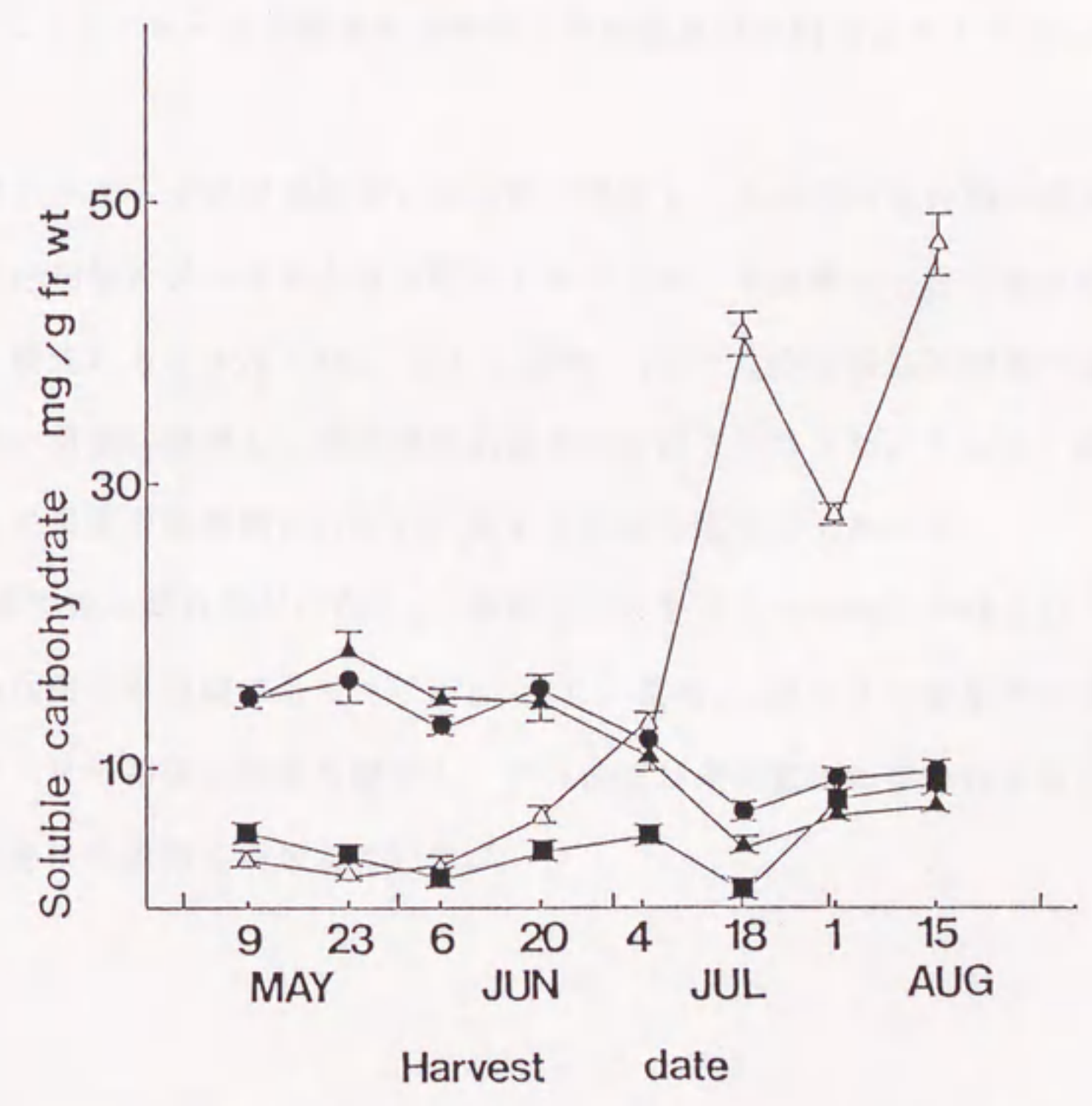


Fig. 26. Seasonal changes in soluble carbohydrates in peach fruit. △; Sucrose, ●; Fructose, ▲; Glucose, ■; Sorbitol. Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

約5 mgで推移し、成熟果では全糖中の約10%を占めた。

5) モモ果実のスクロース及びソルビトール代謝関連酵素の季節変動

モモ果実の果肉1g当たりのSS活性はSPS活性よりも高かった (Fig. 27)。SS活性は未熟期に高く、その後急速に減少したが、果実の成熟期直前のスクロースの蓄積に伴い再び上昇し、7月18日に最大となった (Fig. 27)。一方、SPSは主なスクロース合成をつかさどる酵素と考えられているが (36,103)、その活性は低いレベルのまま推移し、スクロースの蓄積する時期での活性はSSの約10分の1であった (Fig. 27)。

酸性インペルターゼは可溶性型と結合型が存在し、未熟期の結合型の酸性インペルターゼ活性は可溶性型のそれとほぼ同じであったが、成熟期には結合型の酸性インペルターゼが優先的となった (Fig. 28)。果肉1g当たりの全活性は幼果で高く、果実の生育に伴い急速に減少し、未熟期の活性の10%以下となった。そして、再び8月1日から15日の果実の成熟期にむかい、わずかながら活性が上昇した。

SOXも可溶性性と結合型が存在し、未熟期には全活性の約50%が結合型であり、成熟期には約70%が結合型であった (Fig. 29)。果肉1g当たりの全活性は未熟期に高く、スクロースの蓄積に先立ち減少し、その後再び果実肥大に伴わずかに上昇した。この増加は主に結合型に由来していた。

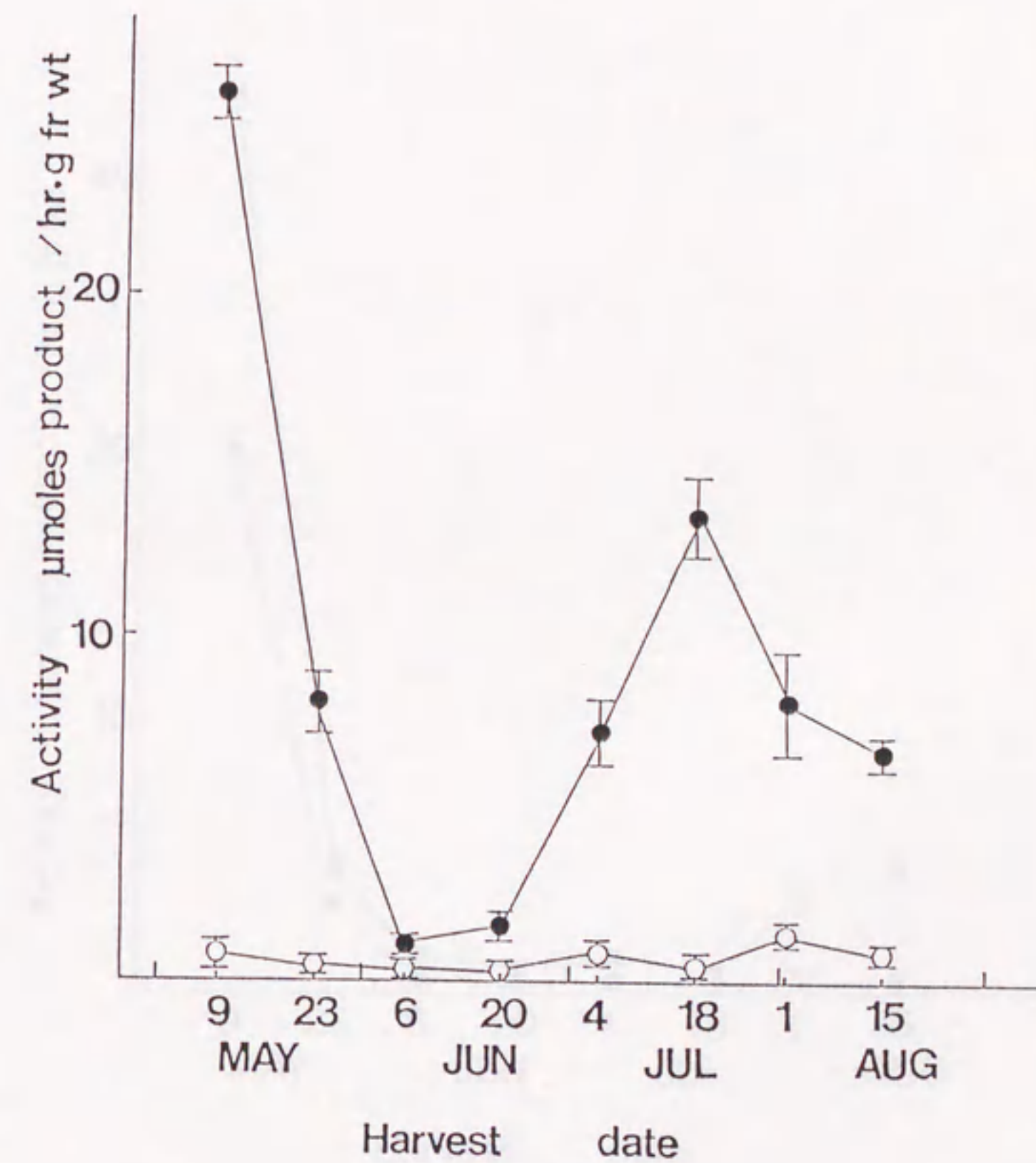


Fig. 27. Seasonal changes in SS and SPS activities in peach fruit. ●:Activity of SS per gFW. ○:Activity of SPS per gFW. Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

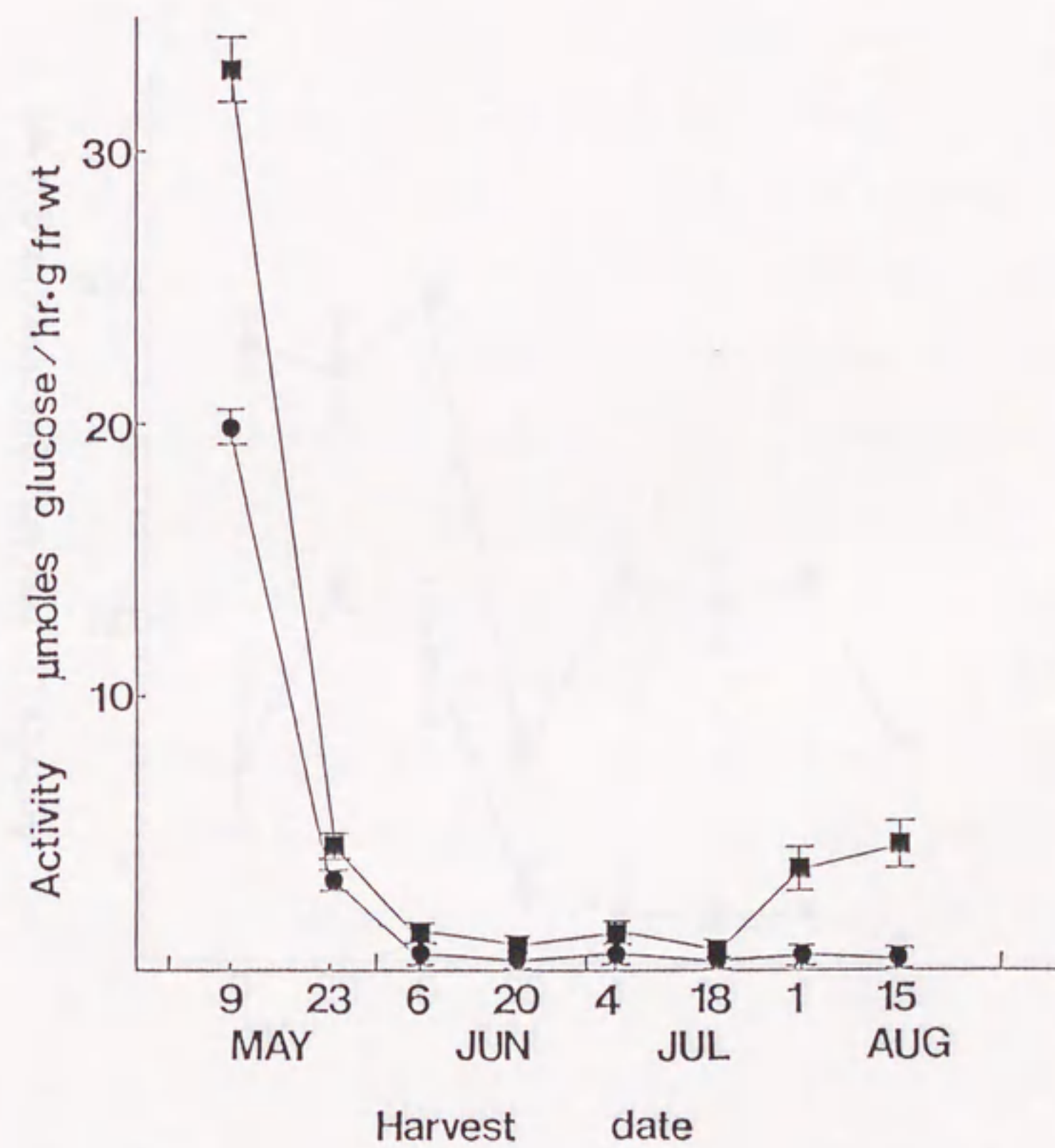


Fig. 28. Seasonal changes in acid invertase activity in peach fruit.  
 ●; Activity of soluble form per gFW.  
 ■; Total activity of bound and soluble forms per gFW.  
 Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

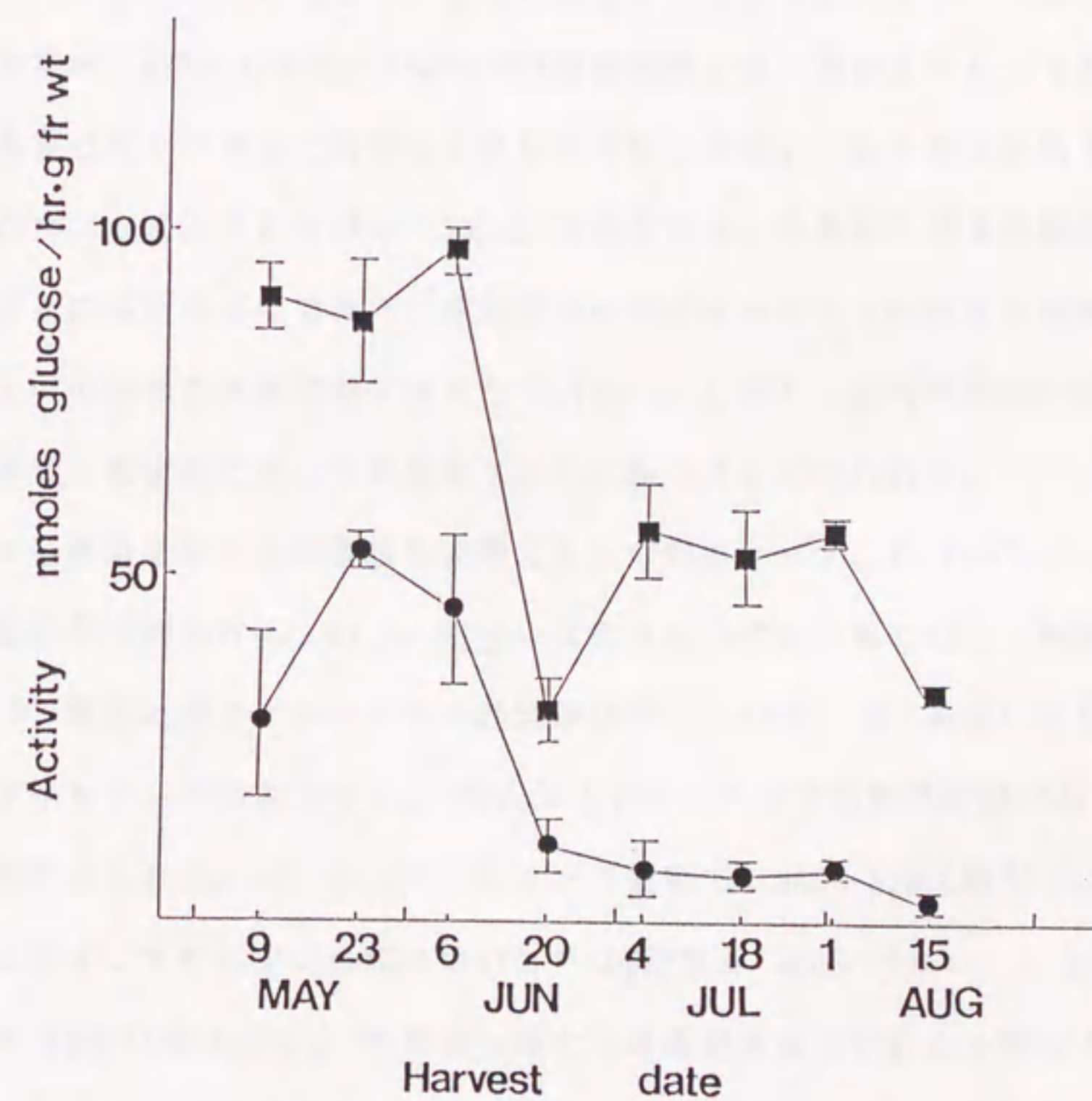


Fig. 29. Seasonal changes in SOX activity in peach fruit.  
 ●: Activity of soluble form per gFW.  
 ■: Total activity of bound and soluble forms per gFW.  
 Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

### 3-4 考察

ナシ果実ではソルビトールは主にはNAD<sup>+</sup>-SDHによりフルクトースに、次にはSOXによりグルコースに転換されていると思われた。未熟期のNAD<sup>+</sup>-SDH活性の上昇は急速な果実肥大の時期と一致し、この頃よりフルクトースも蓄積した。そのため、NAD<sup>+</sup>-SDHがフルクトースを合成し供給する役割を有していると推定された。成熟期でのNAD<sup>+</sup>-SDHとSOX活性の上昇はスクロースの急速な蓄積と一致していた。これら酵素はスクロース合成の基質や前駆体を供給する役割を果たしていると推定された。また、成熟期前にみられる果肉1g当たりのNAD<sup>+</sup>-SDHとSOX活性の減少は、果実肥大による希釈のためであり、果実当たりでみると活性は上昇しつづけるため、十分な糖の供給が可能になると思われた。検出できたNAD<sup>+</sup>-SDHとSOXの活性は、未熟期の果実の糖蓄積の約70%を供給するに可能なものであり、成熟期では約20%がそれらの活性で説明できた。この値はリンゴの場合とほぼ同様であった(113)。しかし、他の代謝物への転換や呼吸による消費を考慮すると、その比率はさらに減少すると思われた。

*in vitro*の全酵素活性で全糖蓄積を説明できない理由として、1) NAD<sup>+</sup>-SDHとSOXは抽出過程で活性が抑制される、2) *in vivo*にはそれらの活性を高めたり、刺激する要素がある、3) 果実に他のソルビトール酵素が存在している、4) あるいは果実に転流する糖はソルビトールが主でなく、例えばスクロースが主な転流型糖である可能性がある等が考えられた。1) についてはリンゴ果実でのNAD<sup>+</sup>-SDH活性がDEAE-セルロース処理により、またリンゴの葉でのNADP<sup>+</sup>-SDH活性がDEAE-セルロースと2,5ADP-セファロース4Bの処理により、活性が上昇する事実があるためおこり得ると思われた(112)。この酵素に対する抗体との酵素免疫測定によりNAD<sup>+</sup>-SDHの存在の有無を確認する必要がある。2) についてはSOXは生体膜に存在しているため、その活性は*in vivo*で膜に付着することにより、高められる可能性があると思われた。3) については微生物や動物においてもソルビトールをフルクトースやグルコースに転換する他の酵素が報告されていないため、その可能性はないと思われた。4) については果実

での酸性インベルターゼ活性が高く、グルコースとフルクトースの量を供給するに十分な活性を有しているため、可能性はあるように思われた。しかし、茎や果梗で検出される糖はほとんどいつもソルビトールであり、スクロースはむしろ少ないこと(113)やナシやリンゴの木部や篩管の溢液中にはほとんどソルビトールであることなどから(9)、ニホンナシ果実での転流型糖としてスクロースを期待することは難しいと思われた。

SSは主にスクロースの分解を触媒するとされている(36,103)。しかし、モモではSS活性とスクロース含量の季節変動(75)及び精製したSSのKm値やVmax値等の酵素の諸性質(74)から、モモのSSは合成方向を触媒する可能性を示唆したが、ナシの場合においてもスクロースの蓄積がSS活性の上昇と一致すること、また先述したように部分精製したSSの諸性質がモモのSSと同じ傾向を示したことから、合成方向に反応が偏向していることが推定された。セイヨウナシにおいても果実のスクロースの蓄積はSS活性の上昇と一致していることがLatcheら(58)により報告されている。サトウダイコン(27)、メロン果実(72,92)そしてキュウリ果実の果梗(29)でも同様に、SSの合成方向の作用が報告されている。さらに、スクロースによるSPS(85)とSPP(34)の反応阻害作用やSS反応のみかけ上の平衡が合成方向に偏っていること(6)からもナシやモモ果実でのSSによるスクロースの合成の可能性が示唆された。また、ナシではSPS活性もスクロースの蓄積に伴い上昇したことより、SSとSPSによりスクロースが蓄積されることが推定された。

ナシやモモで見られるスクロース含量の少ない未熟期における高いSS活性の理由として、1) SSは主に分解方向に働き、多糖類合成の前駆体であるUDPGの合成に寄与し、これを基にして他の糖類の合成や細胞壁の構築が行われる、2) SSは合成方向に働くとしても、合成されたスクロースはこの時期の比較的高い酸性インベルターゼ活性の作用で容易に分解され、高いSS活性にもかかわらずスクロース含量が低い等が考えられた。



果実の成熟に伴う酸性インベルターゼ活性の減少は、サトウダイコン(27)、リンゴ(113)、メロン(62, 72, 92)、サトウキビ(32)そしてニンジン(88)でもナシやモモと同様に報告されている。また、高い酸性インベルターゼ活性はサトウキビの茎の活発な生長と一致し、スクロースの蓄積に伴いその活性はほとんど検出されなくなり、代ってアルカリ性インベルターゼの活性が上昇するという(31)。さらに、カンキツでは未熟期には酸性とアルカリ性のインベルターゼ活性が検出されるが、成熟に伴い酸性インベルターゼは消失し、アルカリ性インベルターゼ活性のみが残存するという(51)。一方、スクロースをほとんど蓄積しないトマトでは、酸性インベルターゼ活性は成熟に伴い上昇しつづけ、過熟果でその活性が最も高くなることが報告されている(68)。また、スクロースを蓄積しないラデシュやカブにおいても酸性インベルターゼ活性の減少は認められないという(89)。酸性インベルターゼ活性はエネルギー源としてのヘキソースの供給のため、活発に生長している成長点のような組織で高いことが報告されている(14, 67)。ナシではスクロースの蓄積の有無にかかわらず酸性インベルターゼ活性は減少した。モモでは未熟期に酸性インベルターゼ活性が高く、これは細胞分裂の時期と一致していた。その後、モモではスクロースの蓄積する成熟期にむかい酸性インベルターゼ活性が減少したが、成熟期にわずかに上昇した。これは果実が急速に肥大する時期と一致していた。これらの結果より、ナシやモモ果実でのスクロースの蓄積には必ずしも酸性インベルターゼ活性の減少が必要でないことが推定された。

モモ果実でのSOXの活性はSS、SPS及び酸性インベルターゼの活性と比較して低いものであった。SOXはソルビトールを不可逆的にグルコースに転換する反応を触媒し、モモ果実でのソルビトール代謝関連酵素で検出される優先的なものであったが、*in vivo*でのソルビトールの代謝転換を説明するには活性が低かった。しかし、モモ果実でのSOX活性はナシ果実と比較して2~3倍高く(116)、モモ果実でのソルビトールの転換に果たすSOXの重要性が推定された。他のバラ科果樹であるリンゴやビワ等を

含めてソルビトール代謝関連酵素の活性についてみると、未熟期のモモ果実で $\text{NAD}^+$ -SDHと $\text{NADP}^+$ -SDHの活性は極めてわずかに検出できたが、それ以降は $\text{NAD}^+$ -SDH、 $\text{NADP}^+$ -SDHそしてS6PDHともに有意な活性を検出することができなかった。リンゴ(113)やナシ(116)では $\text{NAD}^+$ -SDH活性が果実の生育期間をとおして検出できた。すなわち、リンゴでは転流してきたソルビトールの大部分が果実で他の糖に転換される(113)が、ナシでは未熟期においてもソルビトールが検出され、果実の成熟に伴いソルビトールは他の糖に転換された(116)。しかし、リンゴと比べて成熟果においてもソルビトールの量は多かった。この比較的多いソルビトール含量は、リンゴとナシでの $\text{NAD}^+$ -SDH活性には差が認められないことより、ナシではリンゴに比べて低いSOX活性のため、グルコースに転換されずにソルビトールとして蓄積するためと推定された。モモではソルビトールは主にSOXによりグルコースに転換されると考えられた。ビワではS6PDH活性が高く、果実の成熟に伴い上昇した(39)が、リンゴ(113)、ナシ(116)そしてモモ(75)の果実では、このS6PDH活性はほとんど検出できなかった。また、 $^{14}\text{C}$ -ソルビトールの果実への取り込みをみると、リンゴではフルクトースに(108)、プルーンではフルクトースよりむしろグルコースに(30)に転換されていた。プルーンでソルビトールがグルコースに転換される事実は、我々が推定したモモやプルーン等の核果類におけるSOXの役割と一致するものである。

### 3-5 まとめ

ナシ果実の糖の蓄積に重要な働きをする  $\text{NAD}^+$ -SDH、 $\text{NADP}^+$ -SDH、SOX、S6PDH、SS、SPSそして酸性インペルターゼ活性の季節変動と糖の蓄積との関係を検討した。ソルビトールをフルクトースに可逆的に触媒する $\text{NAD}^+$ -SDHがソルビトール代謝関連酵素の中で、果実の肥大、成熟過程をとおして最も高い活性を示した。その活性は6月に上昇し、果実肥大に伴って減少し、果実の成熟に伴い再び上昇した。この活性の変動は未熟果でのフルクトースの蓄積と密接な関連を示した。ソルビトールをグルコースに転換するSOXは $\text{NAD}^+$ -SDHの約10分の1の活性を有し、幼果において活性が高く、活性が1度減少したが、果実の成熟に伴い再び上昇した。 $\text{NAD}^+$ -SDHとSOX活性の成熟期における上昇はスクロースの蓄積と一致し、スクロース合成の基質や前駆体供給としての役割が推定された。しかし、 $\text{NADP}^+$ -SDHとS6PDH活性はほとんど検出できなかった。スクロースを蓄積する品種では成熟期のスクロースの蓄積に伴ってSS及びSPS活性が上昇したが、スクロースを蓄積しない品種ではこれらの酵素の活性は低いレベルのままであった。SSは酵素の諸性質からスクロースの合成方向を触媒していることが推定された。酸性インペルターゼ活性はソルビトール及びスクロース関連酵素活性よりもはるかに高く、スクロースの蓄積によらず成熟期にむかい活性が減少した。以上の結果より、ナシ果実ではソルビトールは主には $\text{NAD}^+$ -SDHによりフルクトースに、従にはSOXによりグルコースに転換され、反応生成物を用いてSSとSPSによりスクロースが合成されることが考えられた。

モモ果実の糖の蓄積に重要な働きをするSS、SPS、酸性インペルターゼそしてSOX等のソルビトール関連酵素活性の季節変動と糖の蓄積との関係を検討した。果実の生育初期にはグルコースとフルクトースがほぼ同量含まれ、優先的な糖であった。スクロースは成熟直前に急速に蓄積し、成熟果では全糖中70%以上を占める優先的な糖となった。ソルビトールは生育期間をとおして低い含量で推移した。SS活性は未熟果で高く、その後減少し、成熟直前になり再び急速に上昇した。SPS活性は生育期間をとお

して低いレベルで推移し、スクロースの蓄積との一致はみられなかった。酸性インペルターゼ活性は幼果で高く、成熟に伴い減少した。しかし、成熟期にわずかながら再び上昇した。この時期は果実が急速に肥大する時期で果実肥大に伴うエネルギー源としてのヘキソース供給の役割が推定された。SOX活性は低いものの、ニホンナシのSOX活性と比べると2~3倍の高い活性があった。しかし、他のソルビトール代謝関連酵素活性(NAD<sup>+</sup>-SDH、NADP<sup>+</sup>-SDH及びS6PDH)はほとんど検出できなかった。以上の結果より、モモでは主に転流してきたソルビトールはSOXによりグルコースへ転換されることが推定された。また、スクロースの蓄積はSS活性の急速な上昇と密接な関連を示し、スクロースの蓄積に対して重要な役割を果たしていることが推定された。

#### 第4章 ナシ及びモモ果実の糖含量と糖代謝関連酵素活性の関係

##### 4-1 はじめに

ナシ及びモモでは光合成産物をソルビトールとして果実に転流し (10, 63, 106)、果実中で他の糖に代謝転換され、その結果生じた糖の種類や量が直接的に果実品質に重要な影響を及ぼす。遺伝的に果実の品質を改良するためには、果実に蓄積する糖組成の分析を多様な品種・系統についても行うことは無論のこと、鍵となる糖代謝関連酵素の解明とこれら糖組成の相互関係を明らかにする必要がある。ニホンナシ (116) やリンゴ (113) では  $\text{NAD}^+$ -SDH 及び SOX により、それぞれソルビトールがフルクトース及びグルコースに転換される。しかし、ナシ果実でのスクロースの蓄積と関連酵素活性の関係については、スクロース蓄積と酸性インベルターゼ活性に負の関係がみられること (110) やセイヨウナシでスクロースの蓄積に伴い SS 活性が上昇すること (58) 以外の情報は必ずしも明白ではない。

梶浦ら (48) は東アジア産ナシ類において、その糖組成の差を基に主成分分析により、6つのグループに分類している。そして彼らはスクロースの量についてみると、‘長十郎’、‘二十世紀’そして‘巾着’はスクロース蓄積タイプ、‘ヤーリー’、‘ツーリー’そして‘ウーウーリー’はほとんどスクロースを蓄積しないタイプであることを明らかにしている。また、本研究においてナシ果実ではスクロース蓄積の有無により、SS及びSPS活性に差が認められた。これらの結果は、ナシのスクロース含量によりスクロースの代謝に関与する酵素活性が異なる可能性を示唆している。一方、モモ果実においてもフルクトースの量に品種間差が認められ、食用に供するモモは在来種や花モモに比べてフルクトース含量の高いことが明らかとなった (76)。そのため、成熟期やフルクトース含量に差のあるモモの品種におけるスクロース蓄積に及ぼすスクロース代謝関連酵素活性の季節変動を調べるとともにナシやモモ果実でみられる糖蓄積量の差異を関連酵素活性の側面から明らかにすべく両者の関係を調べた。

#### 4-2 実験方法

本実験で使用したナシ及びモモ果実は農林水産省果樹試験場または果樹試験場千代田試験地に栽植されている樹より採集し供試した。成熟果を供試するに当たり熟度の判定は開花後日数、果梗からの果実の離れ易さ、そしてカラーチャートにより行った。

ナシ及びモモ果実からのSS、SPS及びUDPG-ピロホスホリラーゼの抽出は第3章のSSとSPSの抽出法に従い行った。

酸性インベルターゼの抽出は第3章の酸性インベルターゼの抽出法に従い行った。

モモの未熟果実からのSSの部分精製は第2章のナシの部分精製で用いた方法に従い行った。

糖の抽出と分析、定量は第1章に従った。

酵素活性の測定はSS及びSPSは第2、3章のRoe (91)の方法に従った。インベルターゼ活性の測定は第2章のNelson-Somogyi (82)の方法に従った。

SSとSPSの活性はそれぞれ1時間当たり1  $\mu$ moleのスクロースとスクロース-6-リン酸を生成する酵素量と、酸性インベルターゼについては1時間当たりの1  $\mu$ moleのグルコースを生成する酵素量として表わした。

UDPG-ピロホスホリラーゼ活性の測定は次の方法を用いた。反応液の組成は42 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.8)、1.5 mM ピロリン酸ピロホスフェート、1 mM UDPG、6.6 mM 塩化マグネシウム、0.42 mM NADP<sup>+</sup>、0.02 mM グルコース-1,6二リン酸、40 unit ホスホグルコムターゼ (ベーリンガー・マンハイム山之内)、18 unit グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (ベーリンガー・マンハイム山之内) で、この反応液に試料を加え3.0 mlとし、30°Cで340 nmの吸光度を分光光度計で測定した。

UDPG-ピロホスホリラーゼ活性は1時間当たり1  $\mu$ moleのグルコース-1-リン酸を生成する酵素量として表わした。

#### 4-3 結果

##### 1) ナシ果実の糖含量とスクロース代謝関連酵素活性の関係

ナシ‘長十郎’と‘ヤーリー’の糖含量の生育期間をとおしての変動をFig. 30に示した。‘長十郎’ではスクロース含量が未熟期にはわずかでソルビトールが優先的な糖であり、全糖中の約80%を占めていた。フルクトースの蓄積は7月13日にはじまり、成熟期には全糖中の25%を占めるに至った。グルコースもフルクトース同様に7月13日に蓄積しはじめたが、その程度は少なく、成熟期には7%を占めるにとどまった。成熟期にはスクロースは果実の成熟に伴い急速に蓄積し、全糖中の53%を占めるに至った。結果的に未熟期に比べて成熟期では約4倍の糖含量となった。一方、‘ヤーリー’では未熟期にはソルビトールが多く、生育期間をとおして高い含量で推移した。しかし、成熟に伴いフルクトースが急速に蓄積し、成熟果では全糖中の45%を占める優先的な糖となった。スクロースとグルコースの量はわずかであり、成熟に伴いわずかに蓄積したが、全糖中のそれぞれ8%と16%を占めるに過ぎなかった。

東アジア産ナシ類の23品種についてのSS、SPS及び酸性インベルターゼ活性と糖含量をTable 18に示した。一般的な傾向としてはスクロースを蓄積する品種は、蓄積しない品種に比較してSS及びSPS活性が高かった。これら酵素活性とスクロース含量の関係を明らかにするため、横軸に酵素活性を、縦軸にスクロース含量をとり、各品種を記した。SS活性とスクロース含量の間には $r=0.633^{**}$ の正の相関があり (Fig. 31)、この相関係数の値はSPS活性とスクロース含量の間の相関 ( $r=0.445^*$ ) より高かった (Fig. 32)。

インベルターゼには至適pHにより酸性、中性そしてアルカリ性の3つのタイプが一般的に存在している (32, 88)。しかし、ナシのインベルターゼ活性は酸性領域に高い活性が認められ、中性やアルカリ性領域では低いため (110)、酸性インベルターゼのみを考慮した。酸性インベルターゼ活性はナシ品種間でかなり差がみられ、可溶性型の酸性インベルターゼ活性とスクロース含量の間には有意な相関が得られな

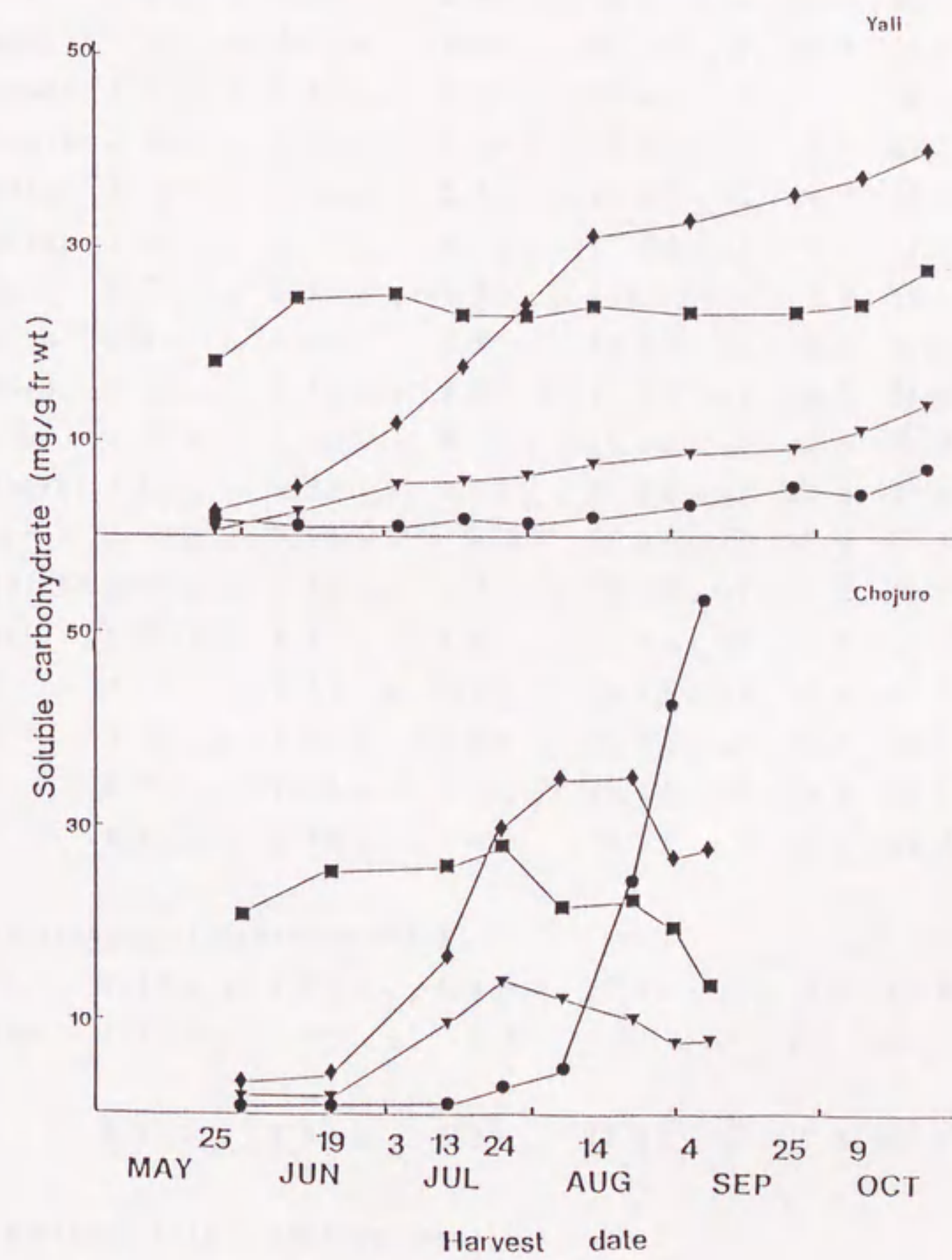


Fig. 30 Seasonal changes in soluble carbohydrates in Japanese pear fruit.  
 ●; Sucrose, ◆; Fructose, ▼; Glucose, ■; Sorbitol.  
 Each point is the mean of parallel experiments and its error is small.



Table 18. Enzyme activity and individual sugars in mature fruits of some pear cultivars.

Cultivar	Enzyme activity ( $\mu$ mol/hr·gFW)				Individual sugar (mg/gFW)			
	SS	SPS	S-INV <sup>z</sup>	(INV) <sup>y</sup>	SUC	FRU	GLU	SOR
<i>Pyrus pyrifolia</i> (Japanese pear)								
1. Okuroku	6.6 $\pm$ 0.8	5.9 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.5	(3.0 $\pm$ 0.9)	23.5	42.3	13.7	9.3
2. Kinchaku	9.8 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.5	(3.9 $\pm$ 0.1)	35.8	30.1	6.5	12.3
3. Shirayuki	1.2 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 1.1	2.4 $\pm$ 0.1	(2.4 $\pm$ 0.1)	2.5	25.2	5.6	9.2
4. Imamuraaki	2.3 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	(1.8 $\pm$ 0.4)	9.0	43.2	12.0	9.5
5. Tosanashi	1.8 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.4	(1.9 $\pm$ 0.4)	17.1	52.4	3.1	6.1
6. Yokogoshi	2.3 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.9	4.6 $\pm$ 0.5	(7.6 $\pm$ 0.6)	2.2	34.0	6.4	25.5
7. Ruisan	2.7 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.3	12.4 $\pm$ 0.9	(14.1 $\pm$ 0.5)	2.0	46.1	12.9	21.5
8. Meigetsu	2.1 $\pm$ 1.0	2.0 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 1.8	(3.2 $\pm$ 0.9)	13.9	40.3	10.3	13.1
9. Konpeito	3.1 $\pm$ 1.5	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0	(1.0 $\pm$ 0)	50.6	25.8	7.5	19.7
10. Shinchu	5.3 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 0.8	(4.0 $\pm$ 0.3)	45.5	20.3	8.6	11.9
11. Nijisseiki	3.5 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 1.5	2.5 $\pm$ 0.9	(3.2 $\pm$ 0.8)	44.6	31.8	7.2	9.7
12. Chojuro	6.5 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.1	n.d.*	(1.3 $\pm$ 0.2)	57.1	27.0	7.1	15.2
13. Hakuteiryu	2.0 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.2	(3.2 $\pm$ 0.2)	2.7	46.9	21.1	24.0
14. Kikusui	5.4 $\pm$ 1.0	4.3 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.3	(5.5 $\pm$ 1.5)	21.0	46.4	8.2	16.2
15. Kosui	4.7 $\pm$ 1.5	2.4 $\pm$ 1.8	2.7 $\pm$ 0.3	(3.4 $\pm$ 0.3)	32.4	45.8	13.8	16.5
16. Hosui	5.1 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 0	(3.6 $\pm$ 0.2)	45.5	42.2	15.1	19.9
17. Hakko	5.7 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 2.5	(6.3 $\pm$ 2.0)	18.0	29.5	12.8	16.5
18. Choju	4.4 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 1.8	n.d.	(0.5 $\pm$ 0)	26.3	49.2	19.4	24.3
<i>Pyrus bretschneideri</i> (Chinese pear)								
19. Wowoli	1.4 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	6.4 $\pm$ 0	(7.2 $\pm$ 0.2)	3.0	43.8	16.5	17.0
20. Laiyang-cili	1.9 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	n.d.	(1.6 $\pm$ 0.2)	4.4	57.1	14.4	25.0
21. Yali	0.8 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0	(3.9 $\pm$ 0.2)	7.5	40.5	14.5	28.0
Hybrids (Chinese pear x Japanese pear)								
22. Hattatsu	1.9 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 1.0	(5.0 $\pm$ 1.0)	16.7	51.3	20.5	9.2
23. Ninomiya-hakuri	7.1 $\pm$ 1.1	7.5 $\pm$ 1.1	0.5 $\pm$ 0.1	(0.6 $\pm$ 0.1)	31.9	33.5	7.1	13.0

<sup>z</sup>Activity of soluble form of acid invertase.

<sup>y</sup>Total activity (soluble and bound forms) of acid invertase.

\*Not detected.

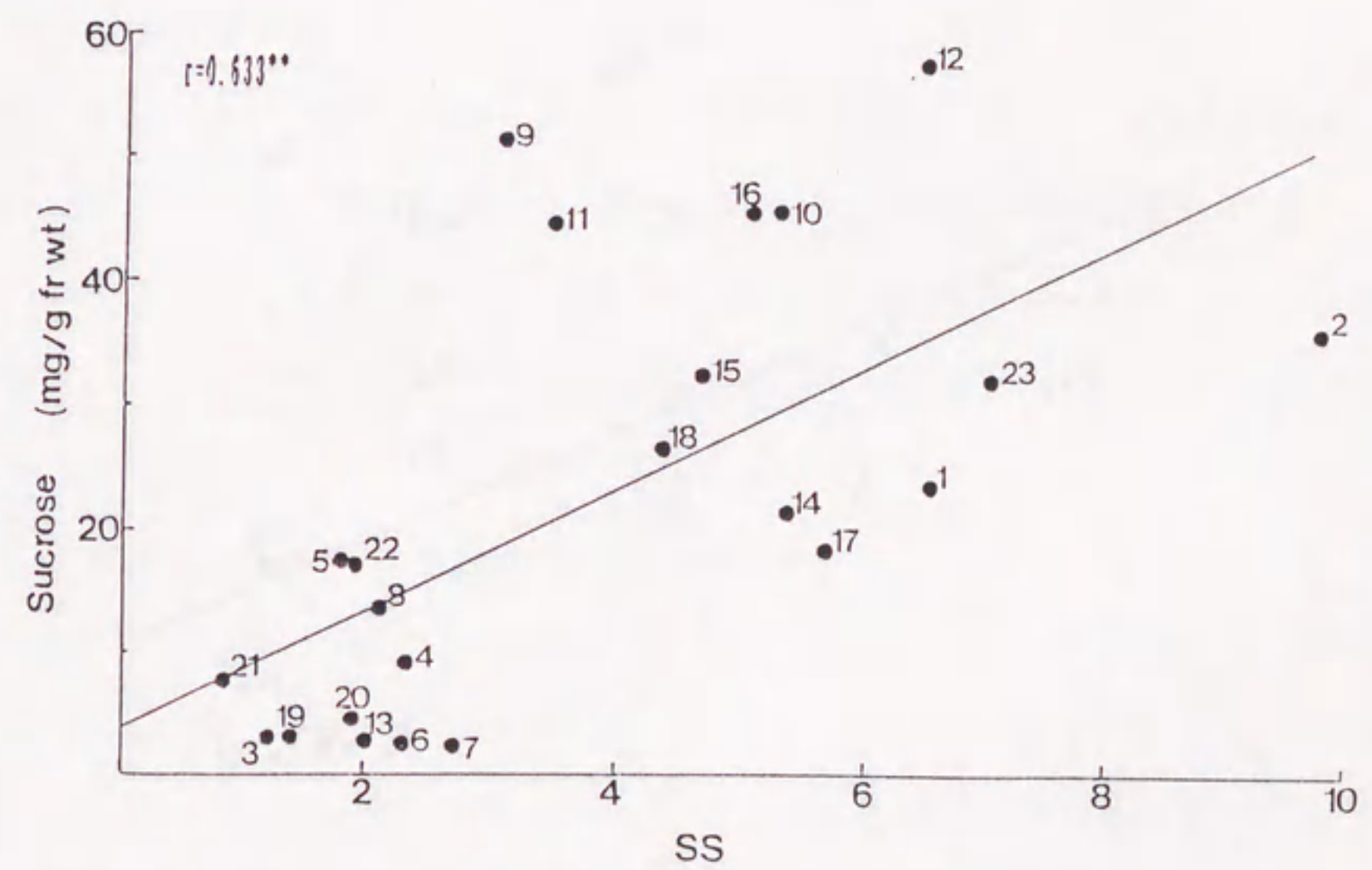


Fig. 31. Relationship between sucrose content and SS activity. Each point indicates an individual pear cultivar as listed in Table 18.

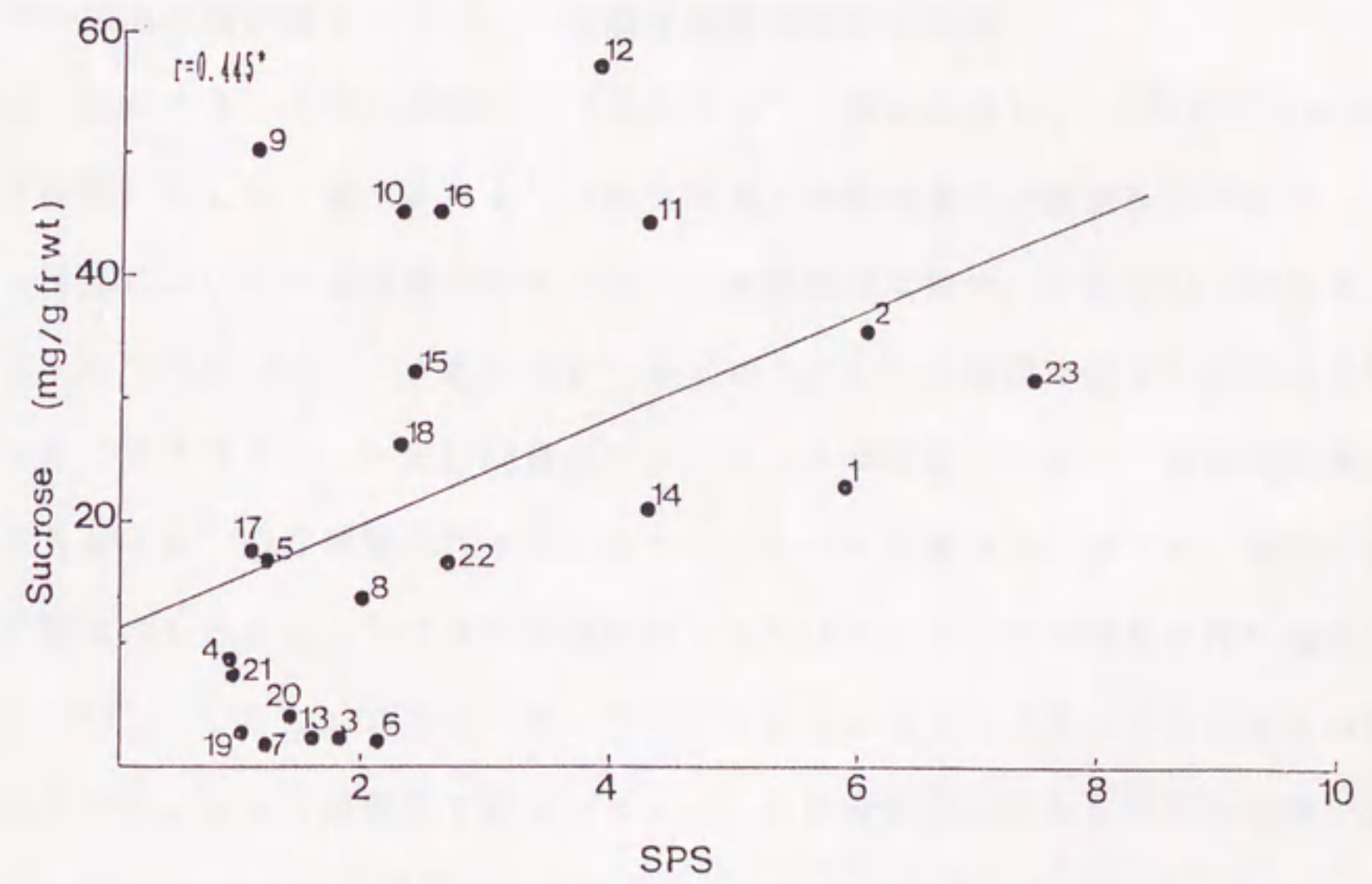


Fig. 32. Relationship between sucrose content and SPS activity. Each point indicates an individual pear cultivar as listed in Table 18.

った (Fig. 33)。さらに、SSとSPS活性 (SS + SPS) のスクロース蓄積に対する寄与をみると、スクロース含量の間には $r=0.584^{**}$ の正の相関があった (Fig. 34)。次に、{(SS + SPS) - 酸性インベルターゼ} としてスクロース含量との間の相関をみると $r=0.621^{**}$ の高い正の相関が得られた (Fig. 35)。この場合、差の値が0~2の付近ではスクロースを蓄積する品種としない品種が混在していたが、酵素活性差が2以上ではスクロースを蓄積するタイプのみが、また0以下では蓄積しないタイプのみとなり、スクロース含量との関係を表わすことができた。

## 2) モモ果実の糖含量とスクロース代謝関連酵素活性の関係

モモ 'あかつき' (中生品種)、'ゆうぞら' (晩生品種)、'長野野生桃早生' (中生品種) そして 'ほうきもも' (晩生品種) の糖含量の季節変動をみると、いずれの品種においても成熟期にはスクロースが優先的な糖で、全糖の62~88%を占めるに至った (Fig. 36)。「あかつき」や「ゆうぞら」の食用に供する品種は生育期間をとおしてグルコースとほぼ同量のフルクトースが存在したが、「長野野生桃早生」や「ほうきもも」の在来種や花モモではフルクトース含量が少なかった。果実の果梗中での糖組成をみると、いずれの品種においてもソルビトールが成熟に伴い増加した (Fig. 37)。しかし、スクロース、グルコースそしてフルクトースもかなりの量が含まれていた。リンゴの果梗ではソルビトールが生育期間をとおして主たる糖である (113) が、モモでは生育期の半ばまでソルビトール以外の糖の割合が比較的高く、成熟期になりソルビトールが主たる糖となり、リンゴの場合と様相が異なっていた。

SS (Fig. 38)、SPS (Fig. 38) そして酸性インベルターゼ (Fig. 39) の活性に品種間差は認められなかった。

モモ果実中で検出されるインベルターゼ活性は酸性インベルターゼであり、アルカリ性インベルターゼ活性はほとんど検出されなかった (77)。モモ果実の酸性インベルターゼ活性は未熟期に高く、成熟に伴い急速に減少し、「ゆうぞら」と「ほうき

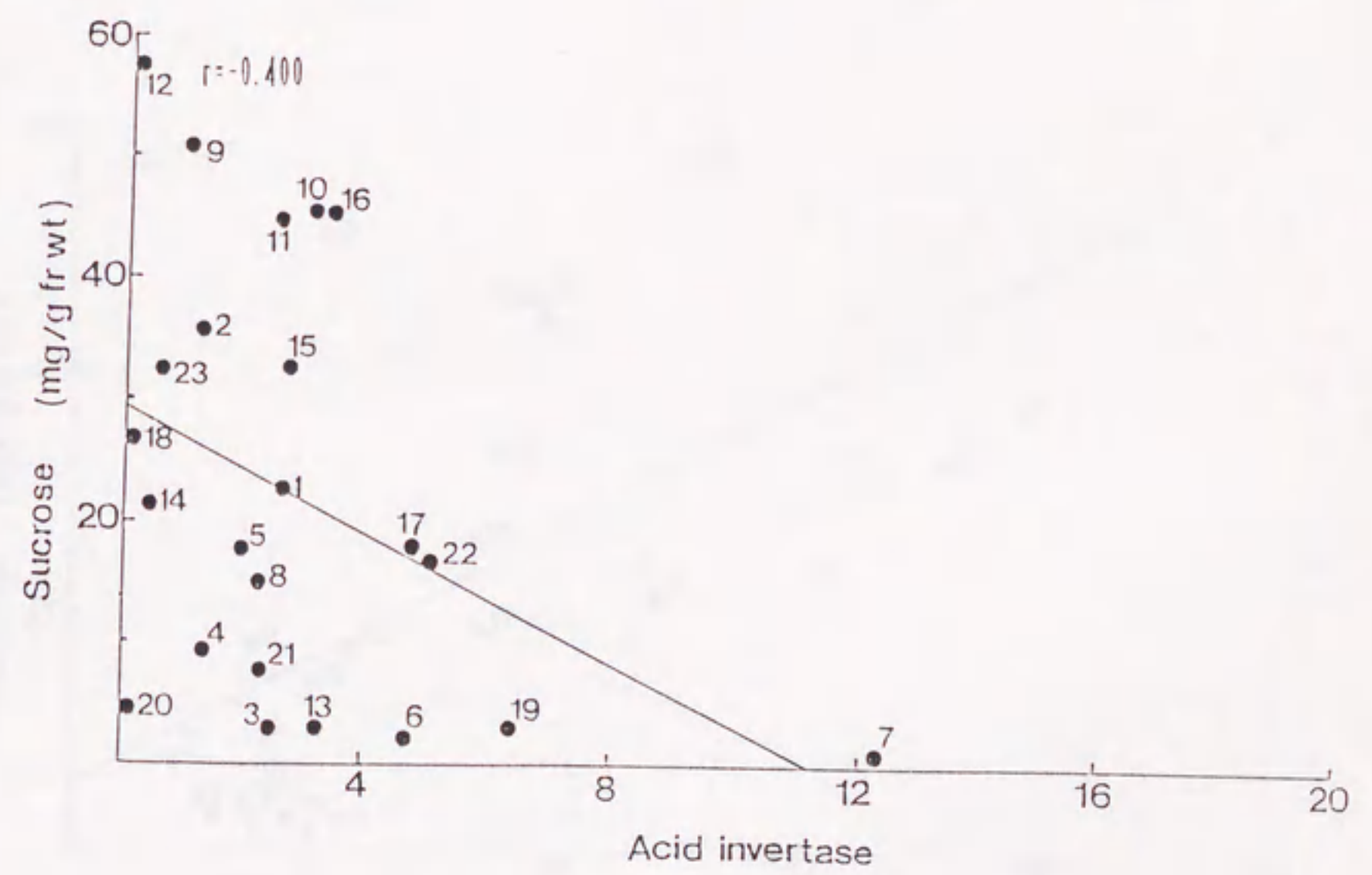


Fig. 33. Relationship between sucrose content and soluble acid invertase activity. Each point indicates an individual pear cultivar as listed in Table 18.

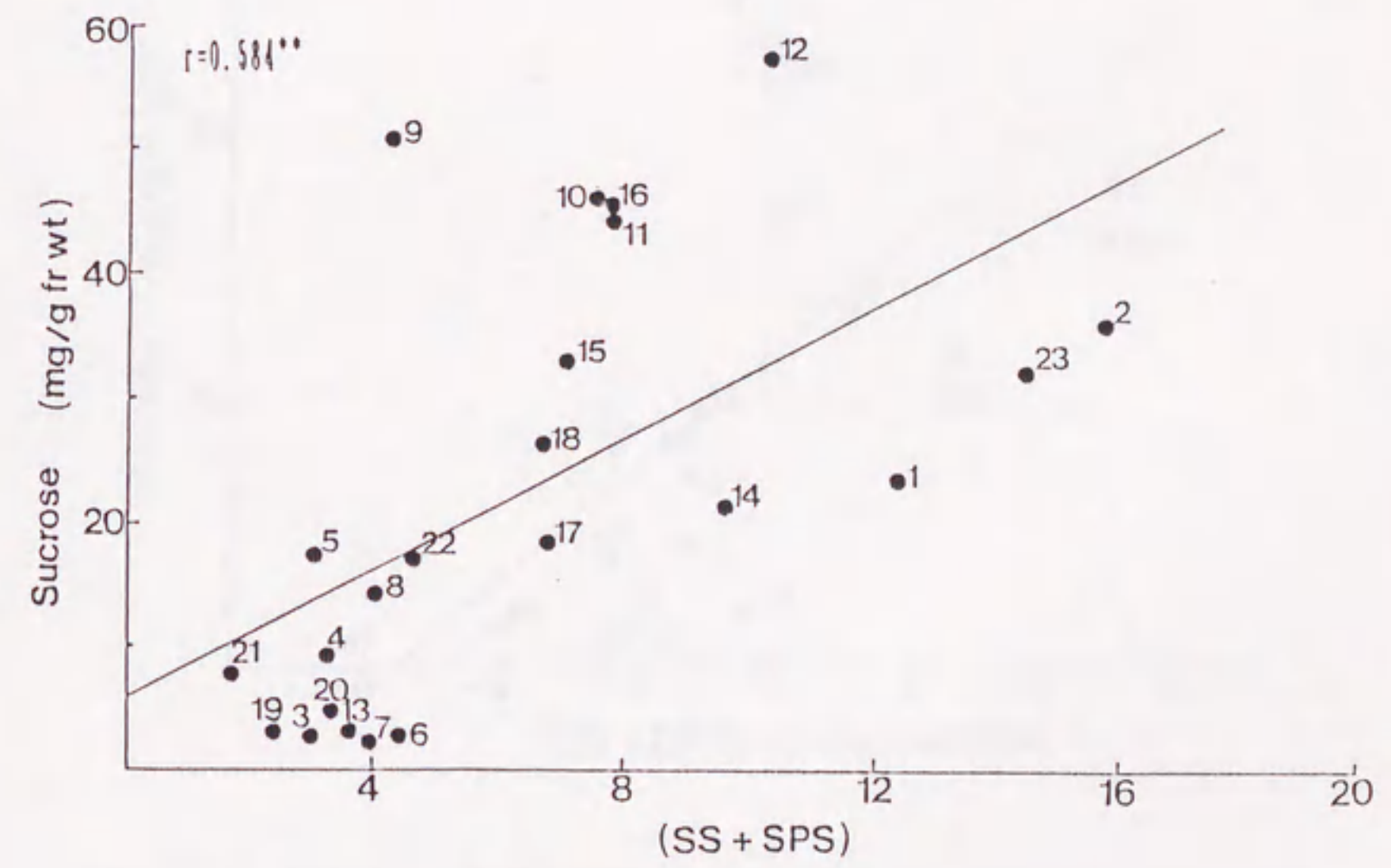


Fig. 34. Relationship between sucrose content and the activities of the potential sucrose-synthesizing enzymes (SS + SPS). Each point indicates an individual pear cultivar as listed in Table 18.

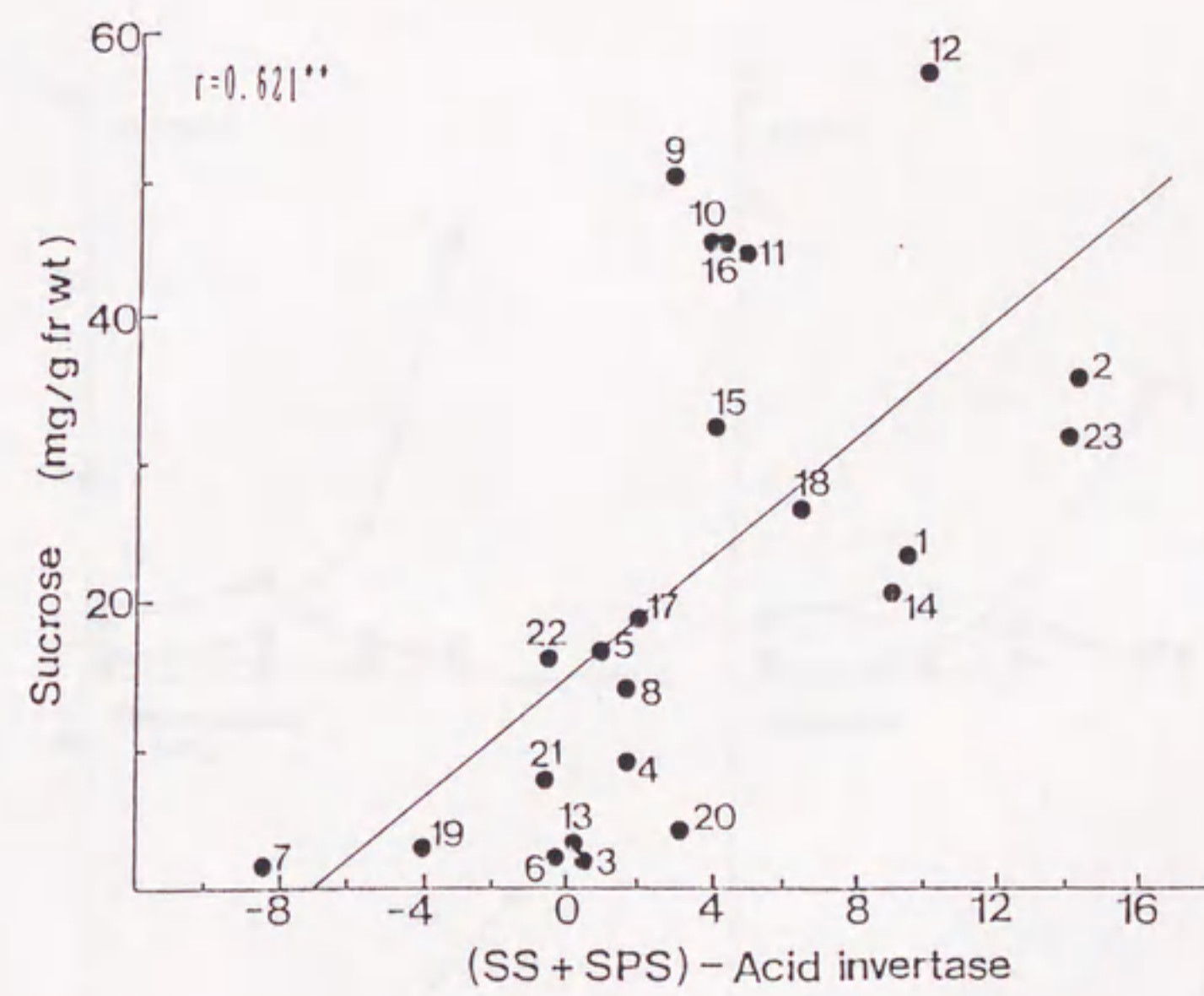


Fig. 35. Relationship between sucrose content and the value subtracting soluble acid invertase activity from activity of the potential sucrose-synthesizing enzymes { (SS + SPS) - Acid invertase}. Each point indicates an individual pear cultivar as listed in Table 18.

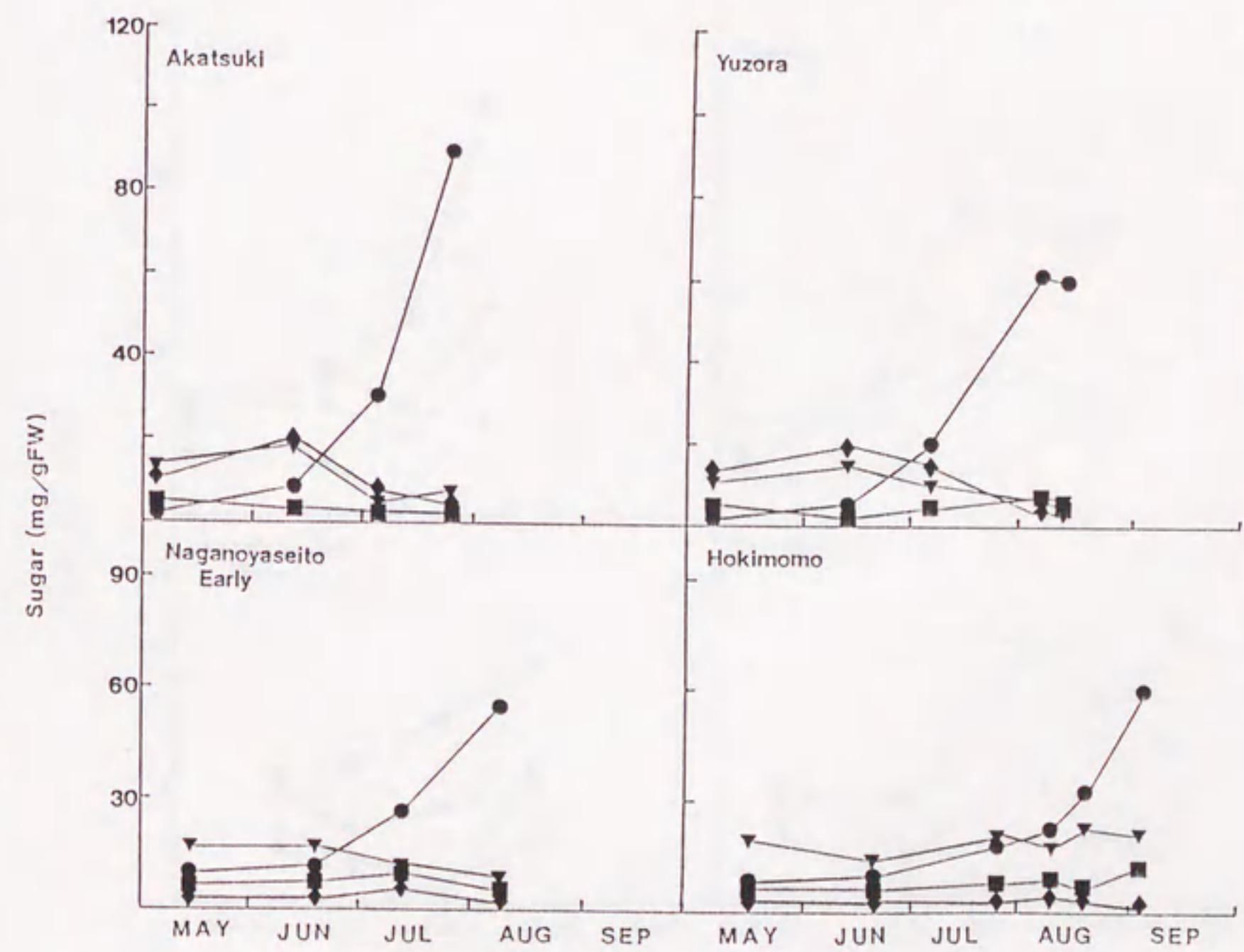


Fig. 36. Seasonal changes in soluble carbohydrates in peach fruit.  
 ●: Sucrose, ◆: Fructose, ▼: Glucose, ■: Sorbitol.  
 Each point is the mean of parallel experiments and its error is small.



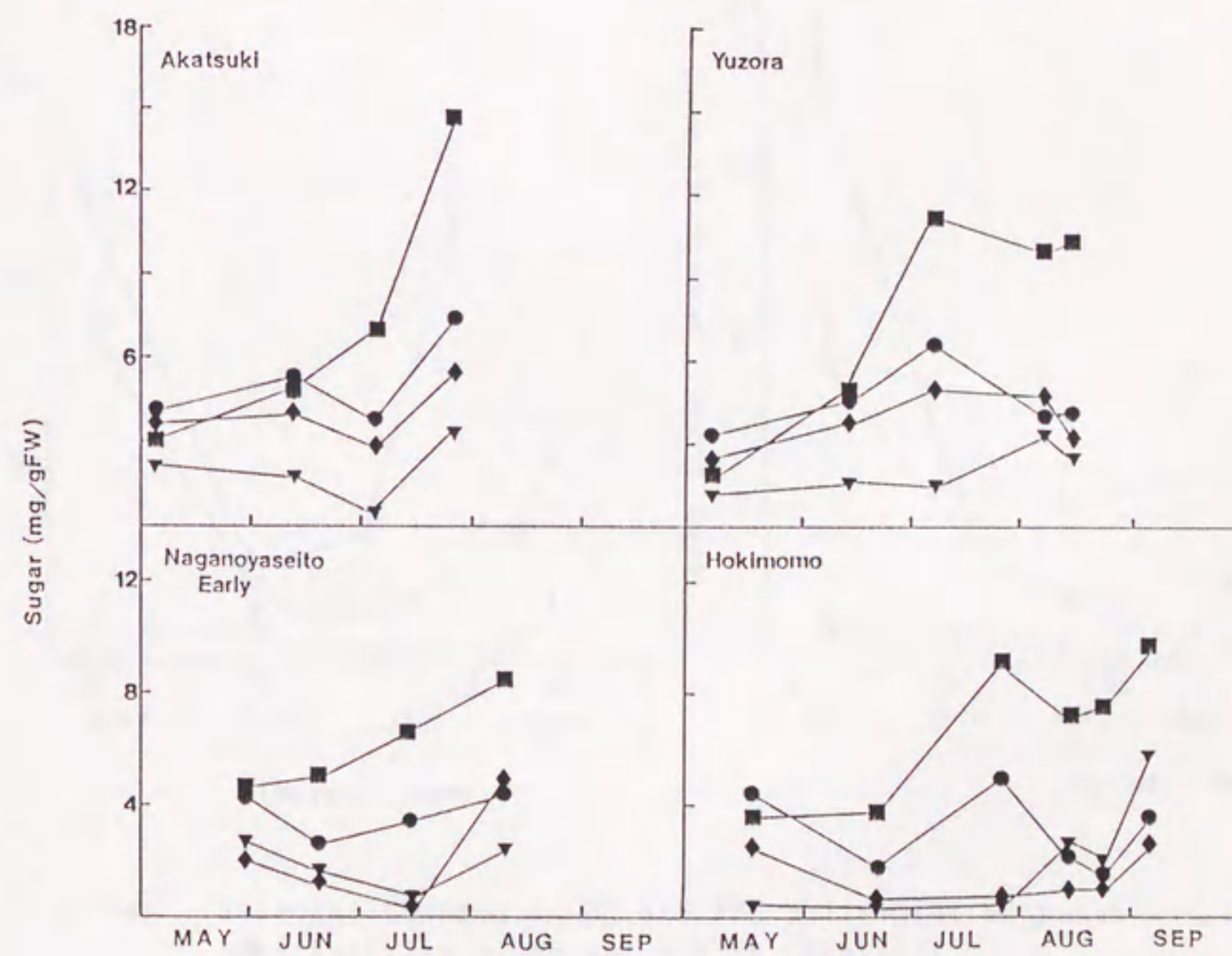


Fig. 37. Seasonal changes in soluble carbohydrates in peach fruit peduncle.  
 ●; Sucrose, ◆; Fructose, ▼; Glucose, ■; Sorbitol.  
 Each point is the mean of parallel experiments and its error is small.

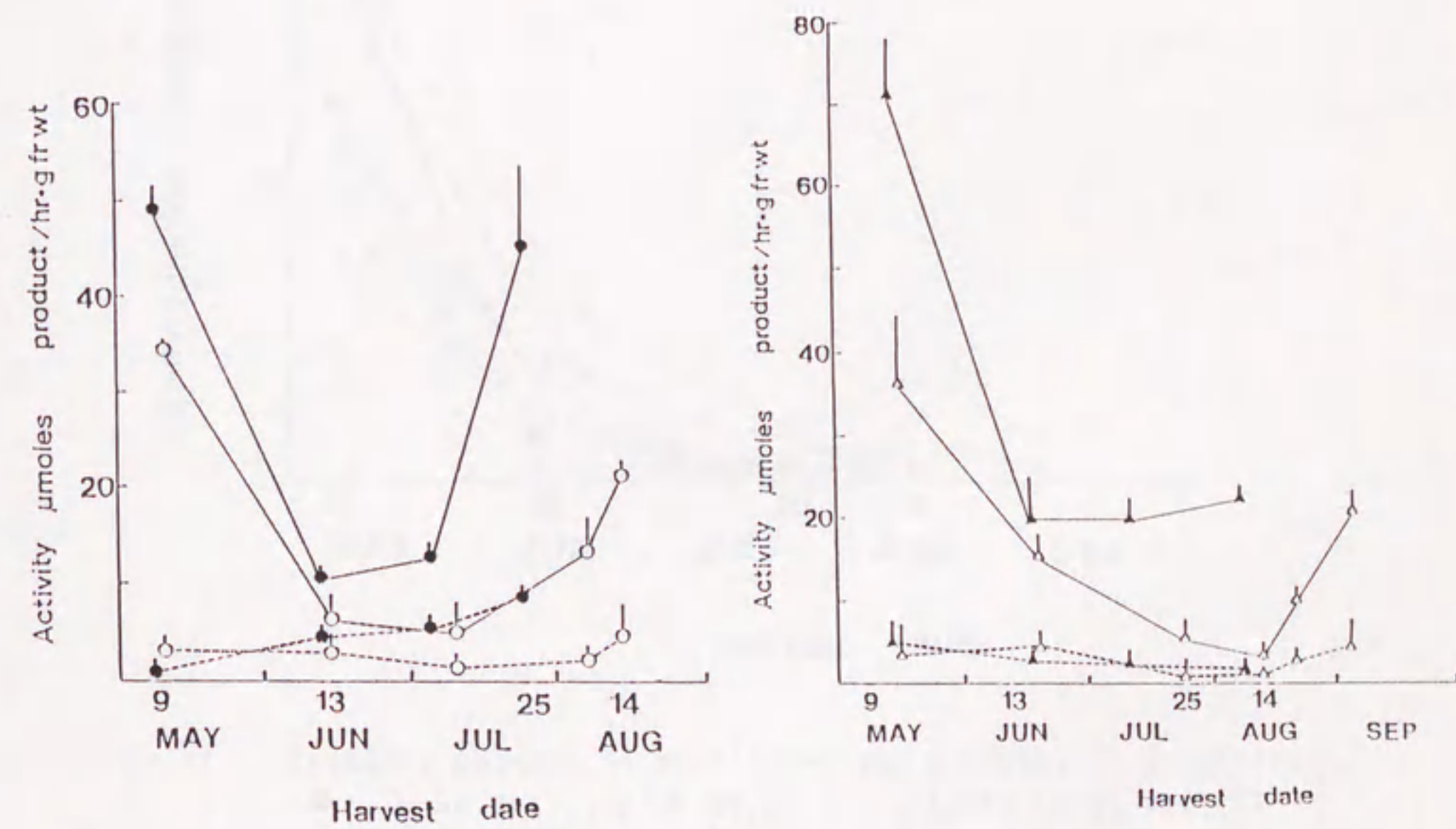


Fig. 38. Seasonal changes in SS and SPS activities in peach fruit.  
 -●-: Activity of SS per gFW in 'Akatsuki',  
 --●--: Activity of SPS per gFW in 'Akatsuki',  
 -○-: Activity of SS per gFW in 'Yuzora',  
 --○--: Activity of SPS per gFW in 'Yuzora',  
 -▲-: Activity of SS per gFW in 'Naganoyaseito-early',  
 --▲--: Activity of SPS per gFW in 'Naganoyaseito-early',  
 -△-: Activity of SS per gFW in 'Hokimomo',  
 --△--: Activity of SPS per gFW in 'Hokimomo'.  
 Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

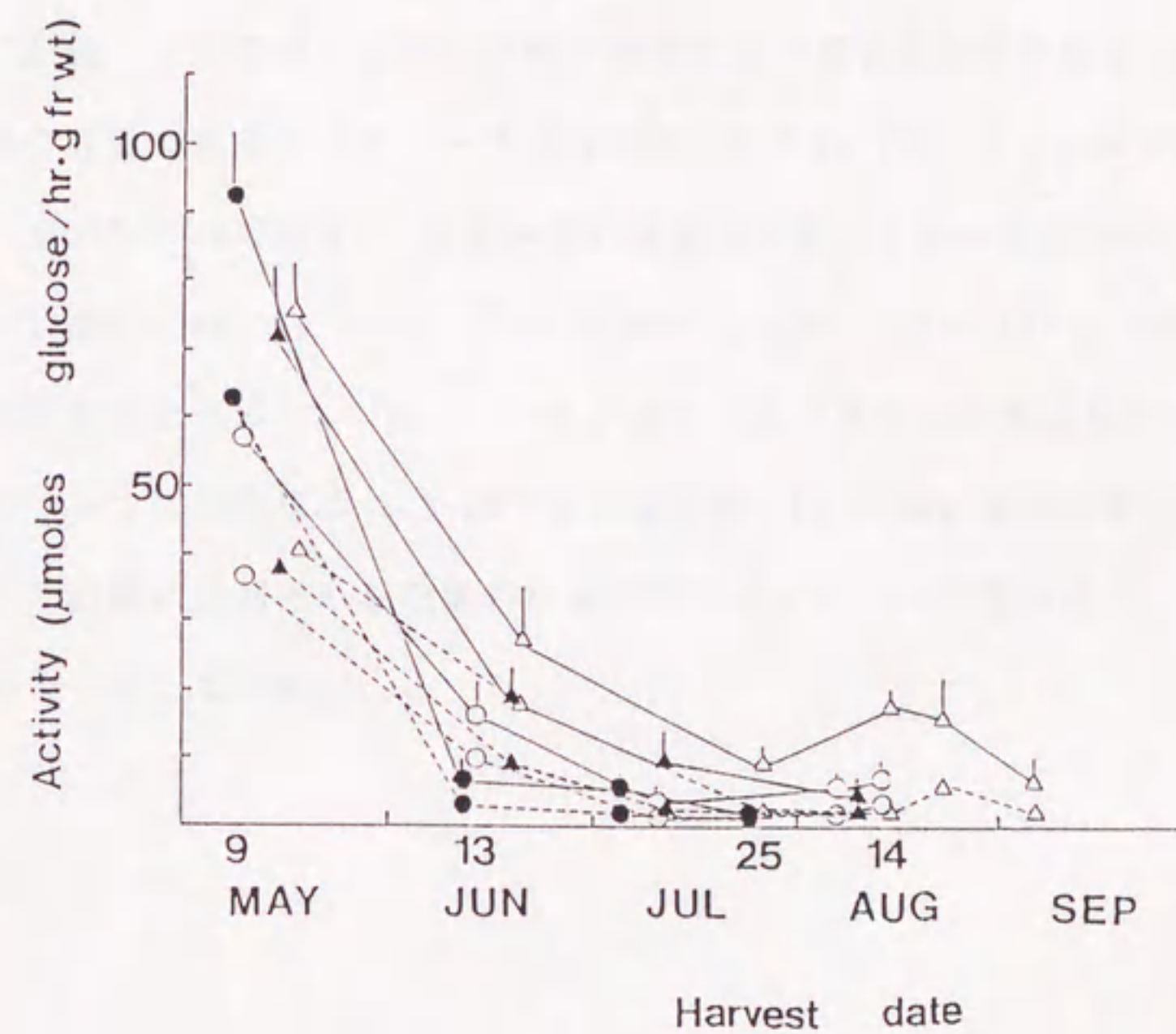


Fig. 39. Seasonal changes in acid invertase activity in peach fruit.  
 -●-: Total activity of bound and soluble forms per gFW in 'Akatsuki'.  
 --●--: Activity of soluble form per gFW in 'Akatsuki'.  
 -○-: Total activity of bound and soluble forms per gFW in 'Yuzora'.  
 --○--: Activity of soluble forms per gFW in 'Yuzora'.  
 -▲-: Total activity of bound and soluble forms per gFW in 'Naganoyaseito-early'.  
 --▲--: Activity of soluble forms per gFW in 'Naganoyaseito-early'.  
 -△-: Total activity of bound and soluble forms per gFW in 'Hokimomo'.  
 --△--: Activity of soluble forms per gFW in 'Hokimomo'.  
 Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

もも' では再びわずかな活性の上昇が認められた。UDPG-ピロホスホリラーゼ活性は全ての品種において未熟期に高く、その後急速に減少し、'長野野生桃早生'以外の品種においては果実の成熟に伴わずかに上昇し (Fig. 40)、スクロース合成の基質であるUDPGを供給している可能性が考えられた。しかし、生育期をとおしての酵素活性の様相には差が認められなかった。

モモ'白桃'の未熟果からのSSの部分精製を行い基質に対するKm値を求めたところ、合成方向の基質であるフルクトースとUDPGについてKm (フルクトース) が4.3 mM、Km (UDPG) が0.029 mMであり、分解方向の基質であるスクロースとUDPについてKm (スクロース) が5.3 mM、Km (UDP) が0.03 mMであった (Table 19)。成熟果から精製したSSの結果と比べると、スクロース以外のKm値はほとんど差がなかったが、スクロースについては未熟果は5.3 mMで成熟果の値 (62.5 mM) より小さく未熟果ではスクロースは容易に分解され、結果的に未熟ではスクロース含量が低く、ヘキソースが多い結果と一致していた。

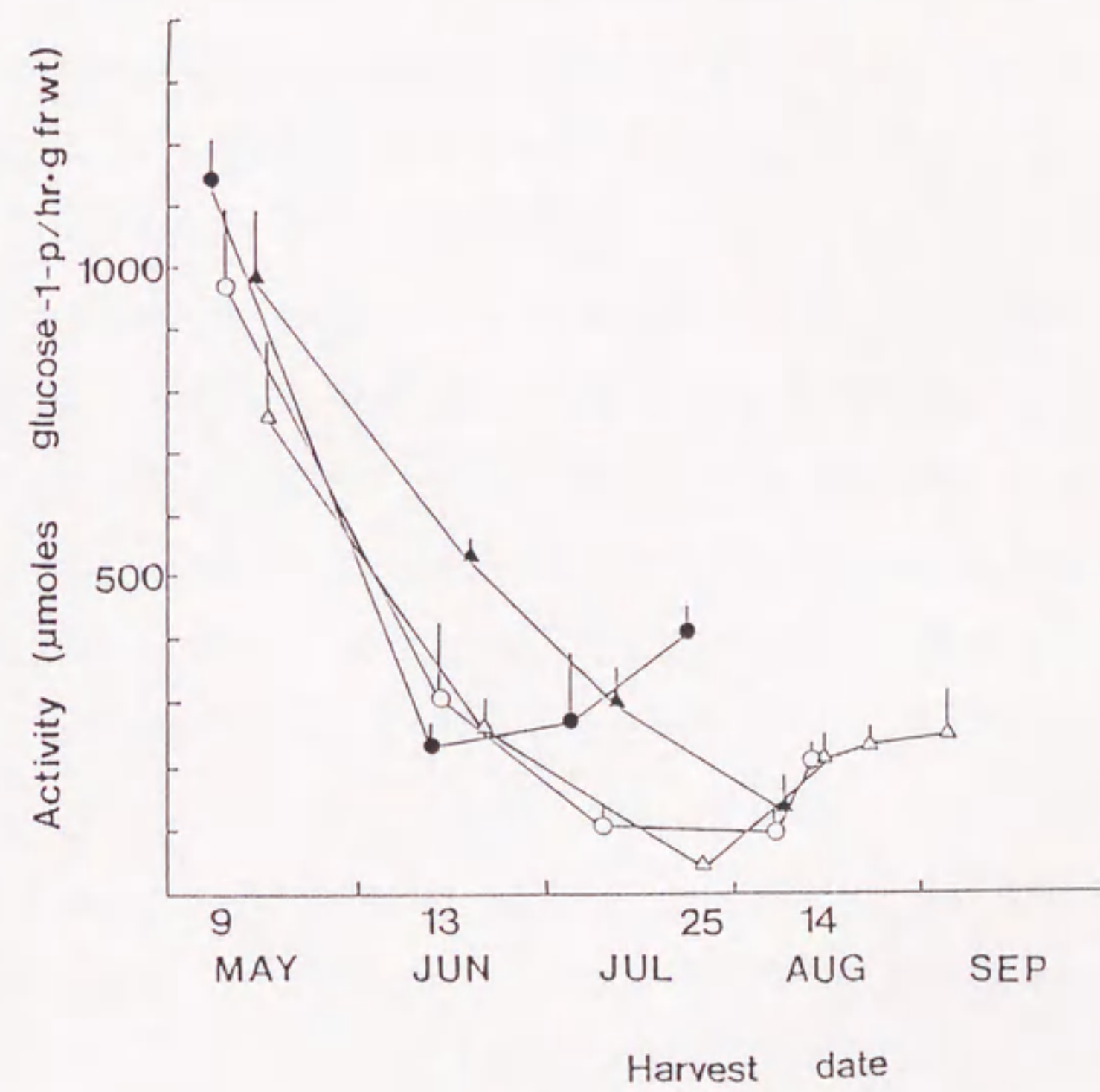


Fig. 40. Seasonal changes in UDPG-pyrophosphorylase activity in peach fruit.  
 ●: 'Akatsuki', ○: 'Yuzora',  
 ▲: 'Naganoyascito-early', △: 'Hokimomo' per gFW.  
 Each point is the mean  $\pm$  SE of parallel experiments.

Table 19. Comparison of Km values of SS between immature and mature peach fruit.

Substrate	Immature	Mature
	Km value (mM)	
Fructose	4.3	4.8
UDPG	0.029	0.033
Sucrose	5.3	62.5
UDP	0.03	0.08

#### 4-4 考察

SSとSPSの作用をみると、メロンではSPSがスクロース蓄積に重要な役割を果たしていることが示されている(41)。さらに、カンキツでは果実の維管束部や表皮部ではSS活性が高く、スクロースを蓄積する液囊部ではSPS活性が高いこと(65)や可溶性固形物量に差の認められるトマトでは、スクロースを蓄積する品種はSS活性が弱く、蓄積しない品種ではSSが強く、SSがスクロース分解方向を触媒する役割が示されている(117)。このようにSPSのスクロース蓄積における主要な役割が示されているが、ナシでは部分精製したSSの諸性質や果実のスクロース蓄積とSS活性の一致より判断して、SSはスクロース合成方向に反応が偏向していること示した。さらに、SSとSPS各々のスクロース含量との相関係数から判断して、SPSよりむしろSSのスクロース蓄積への寄与の大きい可能性が考えられた。一方、酸性インベルターゼ活性として、主に液胞に存在してスクロースを分解している役割を有する可溶性型の酸性インベルターゼのみを考慮すると、スクロース含量の間には有意な相関が得られなかったものの、酸性インベルターゼ活性の値が高いとスクロース含量が少なくなる傾向がみられた。

{(SS + SPS) - 酸性インベルターゼ}の値とスクロース含量との間の相関関係は、(SS + SPS)とスクロース含量や酸性インベルターゼ活性とスクロース含量との相関関係よりも高くなり、{(SS + SPS) - 酸性インベルターゼ}の値はナシ果実のスクロース含量をより適切に示していると思われた。以上、これら相関係数や酵素の諸性質を含めて考え、ナシではSSがスクロース含量を決定する主要な要因であり、SPS及び酸性インベルターゼはスクロース含量に影響を及ぼすものの主たる要因ではないと推定された。特に酸性インベルターゼ活性はスクロースを蓄積しない品種においても成熟に伴い減少することから、酸性インベルターゼ活性の減少は成熟過程で一般的な現象であるように思われた。

モモ果実のスクロース代謝関連酵素の活性は第3章のモモの結果と比較し3倍程度高かったが、この差は酵素の抽出法の差によると思われた。今回の実験では酵素活性

を抽出後、硫酸で塩析させずに測定したため、この操作中の失活が少なかったと思われる。‘長野野生桃早生’でのSS活性の上昇は‘あかつき’、‘ゆうぞら’そして‘ほうきもも’と比較して顕著ではないものの、スクロース蓄積に伴って上昇し、SSのモモ果実でのスクロース蓄積における重要な役割が推定された。SPSの活性はいずれの品種においてもSSよりも低いレベルで推移し、スクロースも蓄積に伴う活性の上昇もSSほど顕著でなかった。これらの結果はHubbardら(42)の結果と一致していた。そのため、SSは主にスクロースの分解を触媒し、SPSがスクロース蓄積に対して重要な役割を果たしているとされるマスクメロン(41)やカンキツ(65)とは異なっていると推定された。以上の結果より、成熟期や糖組成の異なるモモ品種においてもSSがスクロースの合成と蓄積に重要な役割を果たしていること、SPSはスクロースの蓄積にあまり積極的には寄与していないことが明らかとなった。しかし、SSによるスクロース合成反応ではフルクトースが基質の1つとなるが、‘長野野生桃早生’と‘ほうきもも’においてフルクトース含量が少なく、この少ないフルクトースでスクロースの十分な合成が可能なのか。また、果梗中にかなりのスクロースが認められるため、転流してきたスクロースが代謝を受けずに果実に直接蓄積されるのか。これらの解明には今後の研究が必要である。



#### 4-5 まとめ

東アジア産ナシ類のSS、SPS及び酸性インベルターゼ活性とスクロース含量の関係を調べた。スクロース合成を触媒するSS活性とスクロース含量の間には $r=0.633^{**}$ の正の相関が、スクロース合成を触媒するSPS活性とスクロース含量の間には $r=0.445^*$ の正の相関が得られた。またSSとSPS活性の合計(SS + SPS)とスクロース含量の間には $r=0.584^{**}$ の正の相関が得られた。一方、スクロースの分解を触媒する可溶性型の酸性インベルターゼ活性とスクロース含量の間には有意な相関が認められなかったものの、酸性インベルターゼ活性の値が高いとスクロース含量が少なくなる傾向がみられた。さらに、 $\{ (SS + SPS) - \text{酸性インベルターゼ} \}$ とスクロース含量の間には $r=0.621^{**}$ の高い正の相関が得られた。この場合、差の値が0~2の付近ではスクロースを蓄積する品種としない品種が混在していたが、酵素活性差が2以上ではスクロースを蓄積するタイプのみが、また0以下では蓄積しないタイプのみとなり、ナシ品種におけるスクロース関連酵素活性とスクロース含量の関係を表わすことができた。これら相関係数より、ナシ果実のスクロース蓄積にはSSが重要な役割を果し、SPSと酸性インベルターゼはスクロース含量に影響を及ぼすものの主たる要因ではないと推定された。

モモでは成熟期と糖組成の異なる品種を用いて比較を試みた。フルクトース含量の多い‘あかつき’（中生品種）と‘ゆうぞら’（晩生品種）、そしてフルクトース含量の少ない‘長野野生桃早生’（中生品種）と‘ほうきもも’（晩生品種）を供試し、SS、SPS及び酸性インベルターゼ活性を比較したところ、いずれの品種においても成熟期や糖組成の差にかかわらずSSがスクロース蓄積に対して積極的な役割を果していること、SPSはスクロース蓄積に対してSSに比べて寄与していないこと、酸性インベルターゼは成熟に伴い減少することが明らかとなった。また、UDPG-ピロホスホリラーゼ活性も品種間で活性の様相に差が認められなかった。しかし、果梗中にかなりの量のスクロースが認められるため、このスクロースが代謝を受けずに果実に直接蓄

積される可能性はあるものの、SSのスクロース合成方向の基質であるフルクトースの少ない品種でのスクロース蓄積に対する説明は不十分であり、今後さらに研究を要すると思われた。

未熟果‘白桃’からのSSの部分精製を行い基質に対するKm値を求め、成熟果から精製したSSの結果と比べると、スクロース以外のKm値はほとんど差がなかったが、スクロースについては未熟果は5.3 mMで成熟果の値(62.5 mM)より小さく未熟果ではスクロースは容易に分解され、結果的に未熟ではスクロース含量が低く、ヘキソースが多い結果となるものと推定された。

## 第5章 総括

### 5-1 総合考察

ナシ及びモモ果実における糖の代謝・集積の機構を明らかにして、効率的な果樹育種素材の利用を図ること、及び遺伝子レベルでの調節の基礎的知見を得ることを目的として本研究を行ってきた。以下、本研究で得られた結果を総括し、考察を試みた。

果実の甘味は品質を決める重要な要因の1つであり、これからの高品質果実の育成のためには、甘くて、しかも甘味の質の良いことが条件となる。この甘味の中心になる糖は葉の光合成によって合成され、果実中に送り込まれる。この葉から果実への光合成同化産物の転流、分配、蓄積を調節している重要な段階として、1) 葉の光合成能力の段階、2) 葉の葉肉細胞から篩管に光合成同化産物を送り出す段階、3) 篩部を転流型糖が果実にむかい移動する段階、4) 篩管を転流してきた糖が果実の細胞間隙に（アポプラスティック）、または直接的に細胞内に送り込まれる（シンプラスティック）段階、5) 果実中で転流型糖を細胞内器官に隔離する段階、6) 果実中で転流型糖を他の成分に代謝、転換する段階が考えられる。この光合成同化産物の糖をできる限り効率よく果実に引き入れることができれば果実の甘味は増すことになる。さらに、果実中に蓄積する糖は、その種類によって甘味の質が微妙に異なるため、それらの組成が変われば味も微妙に変化することになる。上述した各段階のうちで、6) の果実中で転流型糖を他の成分に代謝、転換する段階を我が国の主要な果樹であるナシ及びモモについてみると、ナシ及びモモは、ソルビトールが光合成産物の転流型糖として重要な役割を果していることが知られている(10, 63, 106)。そのため、第1に、転流型糖であるソルビトールを果実中でつぎつぎと他の糖に転換し、細胞質での濃度を低下させ、ソルビトールとして細胞質内に蓄積しないように調節するソルビトール代謝関連酵素の生理的役割の解明が重要となる。しかしながら、最終的に消費者が購

入し、食べ、評価の対象となるのは成熟した果実である。成熟果においては糖をスクロースとして蓄積するものも多く、特にモモではスクロース含量が全糖中の70%以上を占める(44,49)。また、ナシの成熟果においては糖組成に著しい品種間差が認められている(48)。特に、明治時代になり、スクロース含量の多い‘二十世紀’や‘長十郎’がみつきり、これらを交配親として新品種を育成してきたため、近年の品種の中にもスクロースを蓄積するものが多くみられる。そのため、このスクロースが直接的に果実品質に影響を及ぼすことは明白であり、第2に、ナシとモモ果実におけるスクロースの代謝関連酵素の生理的役割の解明も重要となる。

ナシ果実でのソルビトールの代謝において、ソルビトールは主に $\text{NAD}^+$ -SDHの働きによりフルクトースに転換される経路が主であり、一方、モモ果実では、転流してきたソルビトールはSOXの働きによりグルコースに転換される経路が主であることを示唆した。スクロースの蓄積に関しては、ナシ果実ではSSとSPSによりスクロースが合成されることを、モモ果実ではスクロースは主にSSの作用により合成され、SPSのスクロース蓄積における寄与は小さいことを示した。さらに、酸性インペルターゼ活性の減少は、果実の成熟過程における一般的な現象であり、ナシ及びモモの両果実ともに、酸性インペルターゼがスクロース含量を決定する主たる要因ではないことが示唆された。以上、ナシ及びモモ果実において、転流型糖であるソルビトールが果実で他の糖に転換されるまでの主要な経路の概要をFig. 41に示す。

ナシ及びモモ果実での糖代謝の鍵となる酵素が明らかとなったが、次の段階としてこれら酵素の遺伝子をクローニングできれば、有用遺伝子を組み入れた組み換え体植物を作出することも可能であろう。果樹の分野では、植物体の1部やカルスからの完全な植物体への再分化系が確立した樹種に限られており、現在のところナシ、モモともに安定した再分化系が確立していないが、研究は着実に進められており、実用遺伝子を組み入れた新しい果樹の登場も遠い夢のことではないであろう。さらに、最近では遺伝子の器官特異的あるいはステージ特異的な発現についての制御機構の研究が進

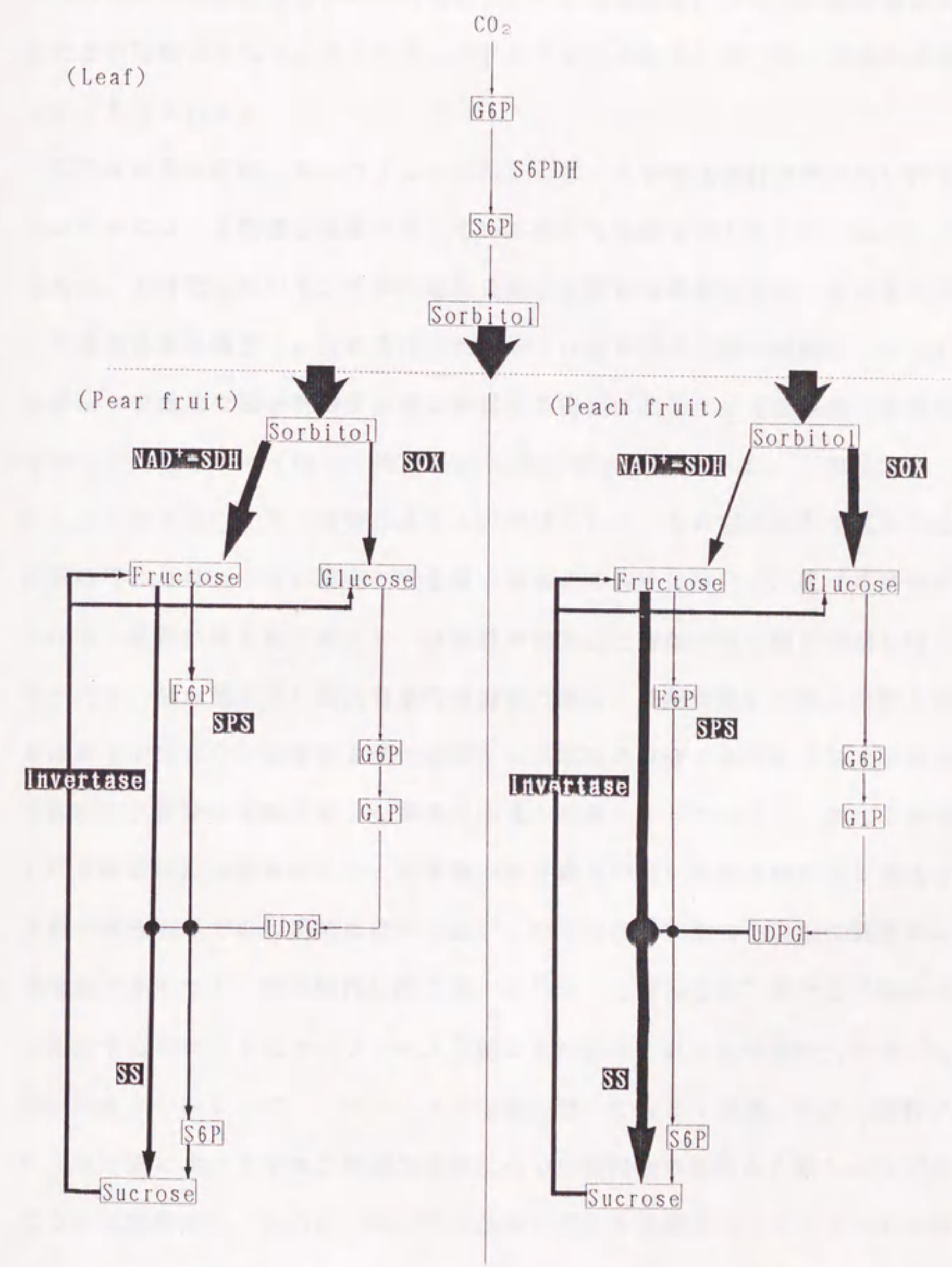


Fig. 41. Sorbitol- and sucrose-relating enzymes and metabolic pathway in Japanese pear and peach fruit.

んでいるので、将来果実だけに特異的に、しかも成熟時にこれらの鍵酵素を発現させることが可能となろう。それによって初めて果実の甘味の質、量の調節が可能となるものと考えられる。

高品質果実を育成するもう1つの方法として、果樹育種素材の効率的な利用がある。そのためには、果樹遺伝資源が有している様々な特性を明らかにしておくことが必要である。本研究において、モモの遺伝資源の有効利用を図るため、糖含量や糖組成という実用形質に着目し、分析を行った。モモは我が国の主要な果樹の1つであるため、生育期や収穫後の糖や有機酸含量の変動等の特性に関する化学成分の研究は従来より多く行われてきた(44, 49, 50)が、分析に供されるモモは、'白桃'、'大久保'そして'砂子早生'等の食用に供する品種ばかりで、それ以外の在来種や花モモの糖分析は行われなかった。果実の糖含量や糖組成の特性について、様々な果樹遺伝資源が有する変異の幅を明らかとし、糖含量や糖組成と酵素活性の間の相関を明らかにすることは、糖含量の高い高品質果実の育成の際に、交配に用いる親の選択が容易になるばかりではなく、蓄積する糖の種類をも人為的に改変できるような交配親の選択も可能とし、微妙な甘味を有した果実の育成も可能とするであろう。また、糖代謝の鍵となる酵素活性の測定により、糖蓄積の潜在能力の高い個体が効率的に選抜できる等、実際の育種現場での利用度は極めて高い。モモでは、明治時代以前に栽培されていた在来種や花モモと、明治時代以降に導入された'上海水蜜桃'やその子孫等を含む食用に供するモモとではフルクトース含量に差が認められた。明治時代を境にして、果実の大きさのみならずフルクトースの含量においてもモモ品種・系統の遷移が認められ、我が国におけるモモの栽培の変遷について糖組成の側面から新しい知見が得られたことは興味深い。さらに、華北系の食用に供する品種ではフルクトースの多いものと少ないものが混在していることが認められた。中国の華北部はモモの発祥地とされており、そこにフルクトース含量において様々な遺伝的変異に富んだモモが存在していることは、遺伝子中心説と一致しているものである。モモの糖組成差の変異の幅を

明確にし、育種に活用するためには、さらに多くの品種、系統及び野生種についての分析が必要である。そのためにも、世界に広く分布する果樹遺伝資源の計画的な調査、収集、確保に努めるとともに、国際的な規模での研究協力と分担が焦眉の急となっている。

以上のように高品質果実の育成のため、糖の代謝・集積と鍵となる酵素についての品種間差異に焦点をおいて研究を行ってきたが、高品質果実とは、単に糖度だけで決るものではなく、あくまでも糖、酸の多さと調和、肉質の良さ、果汁の多さ、芳香の質と量、鮮度、形状そして着色・色調の総合されたものである。しかもそれは、品種本来の特性と栽培技術の総合化によって生れるものである。しかし、糖度は高品質果実の重要な要因の1つであることはいうまでもない。果樹の新品種の育成には、現在の交雑育種法では約20年という長年月を要する。そこで、果樹での糖代謝関連酵素の生理的役割や果樹遺伝資源のもつ糖含量や糖組成の多様性についての知見を蓄積させ、分子生物学的な手法と結びつけることができれば、より短期間に、しかも高品質な果実の育成が達せられるものと確信する。そしてこれらの手法は他の果実成分にも適用でき、より効率のよい成分育種が可能となるものと思う。最後にこれら基礎的な研究の積み重ねが、将来において果樹産業の振興に貢献するものと期待している。

## 5-2 要旨

近年、消費者の果物に対する消費ニーズは高級品・高品質志向が高まり、量よりも質を求める時代となっている。そのため高品質の果実を育種することが必要である。一般に果物の味覚は甘味、肉質、酸味、香りそして色調等によって支配されている。甘味は品質と直接的に関連し、高品質の果実は、甘くてしかも甘味の質がよいことが重要な条件となる。果実の糖は従来からも重要視されてはきたものの、その代謝生理や糖含量と糖代謝関連酵素の視点からの知見は乏しいのが現実である。

本研究においては、1) ナシ及びモモの果実中での糖の代謝・蓄積の機構とその鍵となる酵素を明らかにするとともに、その酵素を単離し諸性質を調べ、調節機構の基礎的知見を得ること、2) 効率的な果樹育種素材の利用を図るため、ナシ及びモモの糖組成の特徴と糖代謝に関与する酵素活性の発現との関係により品種特性を明らかにし、それを基にナシ及びモモの分類を試みることを目的として実験を行い、以下の成果を得た。

第1に、モモ果実での糖含量や組成の実験は従来より行われていたが、分析材料としては食用に供する栽培種に限られ、在来種や花モモでの分析例はなかった。そこで、高品質のモモ果実の育種を行う上でモモ遺伝資源の糖組成に関する特性の基礎的資料を得るために、モモの栽培種、在来種そして花モモでの糖組成を検討した。その結果、フルクトース含量の割合に差異が認められ、在来種や花モモは食用に供する栽培種と比較し、生育期間をとおして少ない傾向がみられた。主成分分析によるスコアの分布は大きく2つのグループに分けられ、これらグループはフルクトース含量の多少と一致していた。また、モモの原産地とされる中国華北部にはフルクトース含量に様々な遺伝的変異に富んだモモの存在していることが明らかとなった。さらに、耐病虫性等の有用遺伝子をフルクトース含量の少ない在来種や花モモから導入した場合、そのF<sub>1</sub>を糖組成において食用に供する品種・系統に近づけるためには、さらに交配の要示することを示した。



第2に、ナシ及びモモ果実から、スクロース合成酵素(SS)を精製した。従来より、SSの主にスクロースの分解方向を触媒する役割について論じられていたが、ナシ及びモモでのSSは基質に対するKm値やVmax値の酵素の諸性質より、スクロース合成方向の反応に親和性のあることを示し、ナシ及びモモ果実でのスクロース蓄積に重要な役割を果していることを明らかにした。また、モモ果実より、酸性インベルターゼを精製し、至適pH、Km値、Vmax値、分子量そしてカチオンの活性に及ぼす影響等を明らかにした。さらに、モモ果実の酸性インベルターゼは基質特異性より $\beta$ -フルクトフラノシダーゼであることを示した。

第3に、バラ科果樹であるナシ及びモモの転流糖は主にソルビトールであり、果実中で他の糖に代謝転換される。そこで、果実での糖代謝を明らかにするためソルビトール及びスクロース代謝関連酵素と酸性インベルターゼ活性の季節変動を検討した。その結果、ナシではソルビトールをフルクトースに転換するNAD<sup>+</sup>依存ソルビトール脱水素酵素(NAD<sup>+</sup>-SDH)の活性の変動が果実中のフルクトース濃度と一致していることが明らかとなった。モモではソルビトールをグルコースに転換するソルビトール酸化酵素(SOX)の活性が他のソルビトール関連酵素よりも高かった。そのため、同じバラ科果樹であっても、ナシでは転流してきたソルビトールが主にNAD<sup>+</sup>-SDHによりフルクトースに、そしてモモではSOXにより主にグルコースに転換されることが明らかとなった。また、スクロースを蓄積するナシ品種ではスクロースはSSとスクロース-6-リン酸合成酵素(SPS)により合成されること、モモでは主にはSSにより合成され、SPSのスクロース蓄積に対する寄与は少ないことが明らかとなった。酸性インベルターゼはナシ及びモモ果実において、成熟に伴いその活性は減少した。特にスクロースを蓄積しないナシ品種においても活性の減少がみられたため、これら果実ではこの酸性インベルターゼ活性の減少は成熟過程での一般的な現象であり、スクロースの濃度を決定する主要な要因ではないことを示した。

第4に、ナシ及びモモ果実の糖組成差に着目し、その差と関連酵素活性の関係を検

討した。東アジア産ナシ類のスクロース含量と関連酵素活性の関係を調べた結果、SS活性とスクロース含量の間には $r=0.633^{**}$ の高い正の相関があり、SSとSPS活性の合計(SS + SPS)とスクロース含量の間にも $r=0.584^{**}$ の高い正の相関のあることが明らかとなった。また、可溶性型の酸性インベルターゼ活性とスクロース含量の間には有意な相関が得られなかったものの、酸性インベルターゼ活性の値が高いとスクロース含量が少なくなる傾向がみられた。さらに、{(SS + SPS) - 酸性インベルターゼ}とスクロース含量との間の相関をみると $r=0.621^{**}$ の高い正の相関が得られ、差の値が0~2の付近ではスクロースを蓄積する品種としない品種が混在していたが、酵素活性差が2以上ではスクロースを蓄積するタイプのみが、また0以下では蓄積しないタイプのみとなり、品種におけるスクロース関連酵素活性とスクロース含量の関係を表わせることを示した。これらより、ナシではSSがスクロース含量を決定する主要な要因であり、SPS及び酸性インベルターゼはスクロース含量に影響を及ぼすものの主たる要因ではないことを示した。モモではフルクトース含量の多い‘あかつき’と‘ゆうぞら’、そして少ない‘長野野生桃早生’と‘ほうきもも’を供試し、SS、SPS、酸性インベルターゼ及びUDPG-ピロホスホリラーゼ活性を比較した。その結果、いずれの品種においてもSSがスクロース蓄積に対して積極的な役割を果たしていること、SPSはスクロース蓄積に対してSSほどは寄与していないこと、酸性インベルターゼ活性は成熟に伴い減少すること、UDPG-ピロホスホリラーゼの活性の様相も品種間差が認められないこと等が明らかとなり、これらの酵素活性での説明は期待できなかった。

以上のように、ナシ及びモモ果実でのソルビトール及びスクロースの代謝を酵素レベルで明らかにするとともに、育種素材の糖組成や糖蓄積能力を酵素活性を基に説明付けた。これらの結果は、高品質果実の育種における有用な基礎的情報の供給に資する。

謝辞

本研究は農林水産省育種第1及び4研究室において実施されたものである。

本研究の遂行及び本論文の取りまとめにあたっては、終始御指導と御援助を賜りました名古屋大学農学部教授山木昭平博士に謹んで感謝の意を表わします。また、本論文の研究に協力していただいた真田哲朗博士（育種第4研究室室長）、阿部和幸氏（育種第2研究室）、石沢ゆり氏（育種第3研究室）には深く感謝します。さらに、研究遂行に際し、多くの援助を受けた林節氏、本吉邦子氏に御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Al-Bakir, A. and J. R. Whitaker. Purification and characterization of invertase from dates (*Phoenix dactylifera* L., var. Zahdi). *J. Food Biochem.* 2, 133-160 (1978).
- 2) Anderson, R. S. and E. E. Ewing. Partial purification of potato tuber invertase and its proteinaceous inhibitor. *Phytochemistry* 17, 1077-1081 (1978).
- 3) Arai, M., H. Mori and H. Imaseki. Roles of sucrose-metabolizing enzymes in growth of seedlings. Purification of acid invertase from growing hypocotyls of mung bean seedlings. *Plant Cell Physiol.* 32, 1291-1298 (1991).
- 4) Ardhbold, H. K. Chemical studies in the physiology of apples. IX. The chemical composition of mature and developing apples, and its relationship to environment and to the rate of chemical changes in store. *Ann. Bot.* 42, 541-566 (1928).
- 5) Arnold, W. N.  $\beta$ -Fructofuranosidase from grape berries. *Biochim. Biophys. Acta* 110, 134-147 (1965).
- 6) Avigad, G. Sucrose-uridine diphosphate glucosyltransferase from Jerusalem artichoke tubers. *J. Biol. Chem.* 239, 3613-3618 (1964).
- 7) Bernt, E. and H. U. Bergmeyer.  $\beta$ -Fructose. *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer ed.) Academic Press p1304-1307 (1974).
- 8) Berüter, J. Sugar accumulation and changes in the activities of related enzymes during development of the apple fruit. *J. Plant Physiol.* 121, 331-341 (1985).
- 9) Bialeski, R. L. Accumulation and translocation of sorbitol in apple

- phloem. Austral. J. Biol. Sci. 22. 611-620 (1969) .
- 10) Bielecki, R.L. Sugar alcohols. Encyclopedia of Plant Physiol New Series vol 13A (Loewus and Tanner eds.) Springer-Verlag p158-192 (1985) .
- 11) Briskin, D.P., W.R. Thornley and R.E. Wyse. Membrane transport in isolated vesicles from sugarbeet taproot. I. Isolation and characterization of energy-dependent, H<sup>+</sup>-transporting vesicles. Plant Physiol. 78, 865-870 (1985) .
- 12) C.E. Cardini, L.F. Leloir and J. Chiriboga. The biosynthesis of sucrose. J. Biol.Chem. 214, 149-155 (1955) .
- 13) 中條利明. 富有カキ果実の発育ならびに品質に及ぼす温度条件に関する研究. 香川大農紀 37, 1-63 (1982) .
- 14) Claussen, W. Netto-photosyntheseraten sowie Saccharose- und Stärkestoffwechsel in unterschiedlich alten Blättern der Aubergine (*Solanum melongena* L.). Angew. Bot. 51, 129-141 (1977) .
- 15) Cooper, R.A. and R.N. Greenshields. The partial purification and some properties of two sucrases of *Phaseolus vulgaris*. Biochem. J. 92, 357-364 (1964) .
- 16) 大東宏・佐藤義彦. ウンシュウミカン果実の成熟に伴う糖、有機酸の変化. 園学雑 54, 155-162 (1985) .
- 17) Davies, J.N. Occurrence of sucrose in the fruit of some species of *Lycopersicon*. Nature 209, 640-641 (1966) .
- 18) Davis, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. New York Acad. Sci. 121, 404-427 (1964) .
- 19) DEL ROSARIO, E.J. and V. Santisopasri. Characterization and inhibition

- of invertases in sugar cane juice. *Phytochemistry* 16, 443-445 (1977).
- 20) Delmer, D.P. and P. Albersheim. The biosynthesis of sucrose and nucleotide diphosphate glucoses in *Phaseolus aureus*. *Plant Physiol.* 45, 782-786 (1970).
- 21) Delmer, D.P. The purification and properties of sucrose synthetase from etiolated *Phaseolus aureus* seedlings. *J. Biol. Chem.* 247, 3822-3828 (1972).
- 22) Doehlert, D.C. and S.C. Huber. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. *Plant Physiol.* 73, 989-994 (1983).
- 23) Eguchi, H. and K. Fujieda. Chromatographic analysis of sugar accumulation in fruits of *Cucumis melo* L. *Bull. Hort. Res. Sta.* D6, 49-56 (1969).
- 24) Faye, L., C. Berjonneau and P. Rollin. Studies on  $\beta$ -fructosidase from radish seedlings. I. Purification and partial characterization. *Plant Sci. Lett.* 22, 77-87 (1981).
- 25) Gabriel, O. and S-F Wang. Determination of enzymatic activity in polyacrylamide gels. I. Enzymes catalyzing the conversion of nonreducing substrates to reducing products. *Anal. Biochem.* 27, 545-554 (1969).
- 26) Giaquinta, R. Source and sink leaf metabolism in relation to phloem translocation. *Plant Physiol.* 61, 380-385 (1978).
- 27) Giaquinta, R. Sucrose translocation and storage in the sugar beet. *Plant Physiol.* 63, 828-832 (1979).
- 28) Glasziou, K.T. and K.R. Gayler. Storage of sugars in stalks of

- sugar cane. Bot. Rev. 38, 471-490 (1972) .
- 29) Gross, K.C. and D.M. Pharr. A potential pathway for galactose metabolism in *Cucumis sativus* L., a stachyose transporting species. Plant Physiol. 69, 117-121 (1982) .
- 30) Hansen, P. and K. Ryugo. Translocation and metabolism of carbohydrate fraction of  $^{14}\text{C}$ -photosynthates in 'French' prune, *Prunus domestica* L.. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104, 622-625 (1979) .
- 31) Hatch, M.D., J.A. Sacher and K.T. Glasziou. Sugar accumulation cycle in sugar cane. I. Studies on enzymes of the cycle. Plant Physiol. 38, 338-343 (1963) .
- 32) Hatch, M.D. and K.T. Glasziou. Sugar accumulation cycle in sugar cane. II. Relationship of invertase activity to sugar content & growth rate in storage tissues of plants grown in controlled environments. Plant Physiol. 38, 344-348 (1963) .
- 33) Hawker, J.S. and M.D. Hatch. A specific sucrose phosphatase from plant tissues. Biochem. J. 99, 102-107 (1966) .
- 34) Hawker, J.S. Inhibition of sucrose phosphatase by sucrose. Biochem. J. 102, 401-406 (1967) .
- 35) Hawker, J.S. Enzymes concerned with sucrose synthesis and transformations in seeds of maize, broad bean and castor bean. Phytochemistry 10, 2313-2322 (1971) .
- 36) Hawker, J.S. Sucrose. Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants (Dey and Dixon eds.) Academic Press p1-51 (1985) .
- 37) 林真二. 日本梨果実の発育に関する研究. 鳥取大農学部園芸学教室 p137 (1961) .

- 38) Hirai, M. Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from loquat fruit. *Plant Physiol.* 63, 715-717 (1979).
- 39) Hirai, M. Accelerated sugar accumulation and ripening of loquat fruit by exogenously applied ethylene. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 51, 159-164 (1982).
- 40) 平井重三. イチジク果実の発育に関する研究. 大阪府立大 紀要 18, 169-218 (1966).
- 41) Hubbard, N. L., S. C. Huber and D. M. Pharr. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Physiol.* 91, 1527-1534 (1989).
- 42) Hubbard, N. L., D. M. Pharr and S. C. Huber. Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiol. Plant.* 82, 191-196 (1991).
- 43) 稲葉昭次・傍島善次・石田雅士. カキ果実中の主要成分の季節的变化. 京都府大報・農 23, 24-28 (1971).
- 44) Ishida, M., A. Inaba and Y. Sobajima. Seasonal changes in the concentration of sugars and organic acids in peach fruits. *Sci. Rep. Kyoto Pref. Univ. Agr.* 23, 18-23 (1971).
- 45) 石原三一. 本邦各地産の梨「長十郎」果実の調査. 園試報 7, 1-35 (1926).
- 46) Ishikawa, N., H. Nakagawa and N. Ogura. Isoforms of invertase in grape berries. *Agr. Biol. Chem.* 53, 837-838 (1989).
- 47) Isla, M. I., M. A. Vattuone, M. I. Gutierrez and A. R. Sampietro. Acid invertase from *Tropaeolum* leaves. *Phytochemistry* 27, 1993-1998



(1988) .

- 48) 梶浦一郎・山木昭平・大村三男・秋浜友也・町田裕. 東アジア産ナシ類の果実中に含まれる糖成分の歴史的变化と糖組成についての主成分分析による品種分類. 育種 29, 1-12 (1979) .
- 49) 垣内典夫・時田鉄二・田中敬一・松田好祐. モモ果実の熟度と呼吸、エチレン生成及び諸成分との関係. 果樹試報 A8, 57-77 (1981) .
- 50) 加藤公道・佐藤良二. 異なる温度での白肉桃の追熟生理. 園学雑 44, 89-97 (1975) .
- 51) Kato, T. and S. Kubota. Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus fruit and changes in their activities during maturation. *Physiol. Plant.* 42, 67-72 (1978) .
- 52) 菊池秋雄. 果樹園芸学 上巻 果樹種類各論. 養賢堂 p129-170 (1948) .
- 53) 小林章・行永寿二郎・板野徹. ブドウの温度条件に関する研究 (第3報). 成熟期の夜温がDelawareの熟期と品質に及ぼす影響. 園学雑 34, 26-32 (1965) .
- 54) Köhler, J., E. Komor, M. Thom and A. Maretzki. Activity of sucrose-phosphate synthase in sugar cane leaves. *Phytochemistry* 27, 1605-1608 (1988) .
- 55) 小崎格・平井正志・上野勇・泉嘉郎・奥代直巳・石内伝治・生山巖・高原利雄・柴田萬・岩切徹・児玉雅信・松本恭郎・別所康守. 果汁品質に關与するウンシュウミカン果実の風味成分. II. 地域性等による風味成分の差異. 果樹試報 B11, 17-39 (1984) .
- 56) Krishnan, H. B., J. T. Blanchette and T. W. Okita. Wheat invertases. Characterization of cell wall-bound and soluble forms. *Plant Physiol.* 78, 241-245 (1985) .

- 57) Krotokov, G. and V. Helson. Carbohydrate metabolism of McIntosh apples during their development on tree and in cold storage. Can. J. Res. Sec. C. 24, 126-144 (1946).
- 58) Latche, A., J.C. Pech and J. Fallot. Amylolyse et maturation chez la pomme et la poire. Physiol Veg. 13, 637-649 (1975).
- 59) Leloir, L.F. and C.E. Cardini. The biosynthesis of sucrose phosphate. J. Biol. Chem. 214, 157-165 (1955).
- 60) Lemoine, R., J. Daie and R. Wyse. Evidence for the presence of a sucrose carrier in immature sugar beet tap roots. Plant Physiol. 86, 575-580 (1988).
- 61) Lin, W., M.R. Schmitt, W.D. Hitz and R.T. Giaquinta. Sugar transport into protoplasts isolated from developing soybean cotyledons. I. Protoplast isolation and general characteristics of sugar transport. Plant Physiol. 75, 936-940 (1984).
- 62) Lingle, S.F. and J.R. Dunlap. Sucrose metabolism in netted muskmelon fruit during development. Plant Physiol. 84, 386-389 (1987).
- 63) Loescher, W.H. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. Physiol. Plant. 70, 553-557 (1987).
- 64) Lopez, M.E., M.A. Vattuone and A.R. Sampietro. Partial purification and properties of invertase from *Carica papaya* fruits. Phytochemistry 27, 3077-3081 (1988).
- 65) Lowell, C.A., P.T. Tomlinson and K.E. Koch. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. Plant Physiol. 90, 1394-1402 (1989).
- 66) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. Protein

- measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
- 67) Maclachlan, G.A., A.H. Datko, J. Rollit and E. Stokes. Sugar levels in the pea epicotyl : Regulation by invertase and sucrose synthetase. Phytochemistry 9, 1023-1030 (1970).
- 68) Manning, K. and G.A. Maw. Distribution of acid invertase in the tomato plant. Phytochemistry 14, 1965-1969 (1975).
- 69) Masuda, H. and S. Sugawara. Purification and some properties of cell wall-bound invertases from sugar beet seedlings and aged slices of mature roots. Plant Physiol. 66, 93-96 (1980).
- 70) Matsui, T. and H. Kitagawa. Seasonal changes in invertase activity in relation to sugar content in kiwifruit. Nippon Shokuhin Kogyo akkaishi 35, 856-859 (1988).
- 71) 松岡仲助. 果実の生育に伴ふ化学的成分の変化に就て. 園芸之研究 24 付録 p1-26 (1929).
- 72) McCollum, T.G., D.J. Huber and D.J. Cantliffe. Soluble sugar accumulation and activity of related enzymes during muskmelon fruit development. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113, 399-403 (1988).
- 73) Morell, M. and L. Copeland. Sucrose synthase of soybean nodules. Plant Physiol. 78, 149-154 (1985).
- 74) Moriguchi, T. and S. Yamaki. Purification and characterization of sucrose synthase from peach (*Prunus persica*) fruit. Plant Cell Physiol. 29, 1361-1366 (1988).
- 75) Moriguchi, T., T. Sanada and S. Yamaki. Seasonal fluctuations of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit.

- J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115, 278-281 (1990) .
- 76) Moriguchi, T., Y. Ishizawa and T. Sanada. Differences in sugar composition in *Prunus persica* fruit and the classification by the principal component analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59, 307-312 (1990) .
- 77) Moriguchi, T., T. Sanada and S. Yamaki. Properties of acid invertase purified from peach fruits. Phytochemistry 30, 95-97 (1991) .
- 78) Murata, T. Sucrose synthetase of sweet potato roots. Part II. A kinetic study. Agr. Biol. Chem. 35, 1441-1448 (1971) .
- 79) Murata, T. Sucrose synthetase of rice grains and potato tubers. Agr. Biol. Chem. 36, 1815-1818 (1972) .
- 80) Nakagawa, H., Y. Kawasaki, N. Ogura and H. Takehana. Purification and some properties of two types of  $\beta$ -fructofuranosidase from tomato fruit. Agr. Biol. Chem. 36, 18-26 (1971) .
- 81) 中川昌一. 果樹園芸各論 第4章ブドウ. (小林章, 若名孝共編) 養賢堂 p132 (1979) .
- 82) Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380 (1944) .
- 83) Nomura, T. and T. Akazawa. Enzymic mechanism of starch synthesis in ripening rice grains. VII. Purification and enzymic properties of sucrose synthetase. Arch. Biochem. Biophys. 156, 644-652 (1973) .
- 84) 大井上康. 理論實際 葡萄之研究. 養賢堂 p870 (1930) .
- 85) Pontis, H.G. Riddle of sucrose. Plant Biochemistry II Int. Rev. Biochem. Vol. 13 (Northcote ed.) Univ. Park Press p79-117 (1977) .
- 86) Prado, F.E., M. A. Vattuone, O. L. Fleischmacher and A. R. Sampietro.

- Purification and characterization of *Ricinus communis* invertase. J. Biol. Chem. 260, 4952-4957 (1985).
- 87) Pressey, R. Potato sucrose synthetase: Purification, properties, and changes in activity associated with maturation. Plant Physiol. 44, 759-764 (1969).
- 88) Ricardo, C.P.P. and T. ap Rees. Invertase activity during the development of carrot roots. Phytochemistry 9, 239-247 (1970).
- 89) Ricardo, C.P.P. and D. Sovia. Development of tuberous roots and sugar accumulation as related to invertase activity and mineral nutrition. Planta 118, 43-55 (1974).
- 90) Robinson, N.L., J.D. Hewitt and A.B. Bennett. Sink metabolism in tomato fruit. I. Developmental changes in carbohydrate metabolizing enzymes. Plant Physiol. 87, 727-730 (1988).
- 91) Roe, J.H. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. J. Biol. Chem. 107, 15-22 (1934).
- 92) Schaffer, A.A., B. Aloni and E. Fogelman. Sucrose metabolism and accumulation in developing fruit of *Cucumis*. Phytochemistry 26, 1883-1887 (1987).
- 93) Shukla, R.N. and G.G. Sanwal. Studies on UDP-glucose: D-fructose 2-glucosyltransferase from tapioca tuber. Arch. Biochem. Biophys. 142, 303-309 (1971).
- 94) Silvius, J.E., D.F. Kremer and D.R. Lee. Carbon assimilation and translocation in soybean leaves at different stages of development. Plant Physiol. 62, 54-58 (1978).
- 95) Singh, R. and G. Maclachlan. Differential rates of uptake of glucose,

- fructose and sucrose by pea stem protoplasts. J. Exp. Bot. 37, 1164-1169 (1986).
- 96) Singh, M. B. and R. B. Knox. Invertases of *Lilium* pollen. Characterization and activity during *in vitro* germination. Plant Physiol. 74, 510-515 (1984).
- 97) Su, J. C., J. L. Wu and C. L. Yang. Purification and characterization of sucrose synthetase from the shoot of bamboo *Leleba oldhami*. Plant Physiol. 60, 17-21 (1977).
- 98) Takehana, H. and H. Nakagawa. Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from tomato fruit. Bull. Fac. Hort., Chiba Univ. 18, 67-76 (1970).
- 99) Thom, M., J. Willenbrink and A. Maretzki. Characteristics of ATPase from sugarcane protoplast and vacuole membranes. Physiol. Plant. 58, 497-504 (1983).
- 100) 苫名孝・山田寿. 栽培地の異なるリンゴ果実における成熟期の糖組成の変化. 園学雑 57, 178-183 (1988).
- 101) Tsai, C. Y. Sucrose-UDP glucosyltransferase of *Zea mays* endosperm. Phytochemistry 13, 885-891 (1974).
- 102) Turner, J. F. Starch synthesis and changes in uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase and adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase in the developing wheat grain. Austral. J. Biol. Sci. 22, 1321-1327 (1969).
- 103) Turner, J. F. and D. H. Turner. The regulation of carbohydrate metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 159-186 (1975).
- 104) Tupy, J. and L. Primot. Sucrose synthetase in the latex of *Hevea*

- brasiliensis* Muell. Arg.. J. Exp. Bot. 33, 988-995 (1982) .
- 105) Walker, R.R. and R.A. Leigh. Characterization of a salt-stimulated ATPase activity associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). Planta 153, 140-149 (1981) .
- 106) Webb, K.L. and J.W.A. Burley. Sorbitol translocation in apple. Science 137, 766 (1962) .
- 107) Weber, K. and M. Osborn. The reliability of molecularweight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969) .
- 108) Williams, M.W., G.C. Martin and E.A. Stahly. The movement and fate of sorbitol-<sup>14</sup>C in the apple tree and fruit. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 90, 20-24 (1967) .
- 109) Wyse, R. Sucrose uptake by sugar beet tap root tissue. Plant Physiol. 64, 837-841 (1979) .
- 110) Yamaki, S., I. Kajiura and N. Kakiuchi. Changes in sugars and their related enzymes during development and ripening of Japanese pear fruit (*Pyrus serotina* Rehder var. *culta* Rehder). Bull. Fruit Tree Res. Sta. A6, 15-26 (1979) .
- 111) Yamaki, S. Property of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase and its connection with sorbitol accumulation in apple. HortScience 15, 268-270 (1980) .
- 112) Yamaki, S. NADP<sup>+</sup>-dependent sorbitol dehydrogenase found in apple leaves. Plant Cell Physiol. 25, 1323-1327 (1984) .
- 113) Yamaki, S. and K. Ishikawa. Roles of four sorbitol related enzymes and invertase in the seasonal alteration of sugar metabolism in apple

- tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111, 134-137 (1986) .
- 114) Yamaki, S. ATP-promoted sorbitol transport into vacuoles isolated from apple fruit. Plant Cell Physiol. 28, 557-564 (1987) .
- 115) Yamaki, S. and T. Asakura Energy coupled transport of sorbitol and other sugars into the protoplast isolated from apple fruit flesh. Plant Cell Physiol. 29, 961-967 (1988) .
- 116) Yamaki, S. and T. Moriguchi Seasonal fluctuation of sorbitol-related enzymes and invertase activities accompanying maturation of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehder var. *culta* Rehder) fruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 57, 602-607 (1989) .
- 117) Yelle, S., J. D. Hewitt, N. L. Robinson, S. Damon and A. B. Bennett. Sink metabolism in tomato fruit. III. Analysis of carbohydrate assimilation in a wild species. Plant Physiol. 87, 737-740 (1988) .
- 118) Yoshida, M. Recent trend of peach breeding in Japan. JARQ. 15, 106-109 (1981) .