

ネギ属植物に含まれるアリイナーゼの活性染色によるアイソザイム解析

北 宜裕・道券秀雄¹⁾・上西愛子・野村 研

Isozyme Analysis of Alliinases in Different *Allium* Species by Active Staining

Nobuhiro KITA, Hideo DOUKEN¹⁾, Aiko KAMINISHI and Ken NOMURA

摘 要

ネギ (*Allium*) 属植物に広く存在するアリイナーゼは、ネギ属植物に特有な含硫アミノ酸の一種であるアリインを加水分解して揮発・催涙性のアリシンを生成させる酵素であり、マルチジーンファミリーを形成していることが遺伝子レベルで明らかにされている。本研究では、タマネギ (*A. cepa*)、ニラ (*A. tuberosum*)、ラッキョウ (*A. chinense*)、ニンニク (*A. sativum*)、ワケギ (*A. wakegi*) 及びネギ (*A. fistulosum*) の6種の *Allium* 属植物に含まれるアリイナーゼタンパクの等電点電気泳動(IEF)分離ゲルの活性染色によるアイソザイム解析を行った。各植物体の鱗茎または葉しょう組織から硫酸沈殿により析出させたタンパクを透析処理し、得られた粗タンパク抽出画分を carboxymethyl cellulose (CM) 樹脂を用いた弱陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分画した。その結果、いずれの植物においても0.25M NaCl で溶出される画分に高いアリイナーゼ活性が認められた。そこでこの画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、約50kDa のタンパクが特異的に分画された。さらにこのフロント画分を dimethylaminoethyl cellulose (DEAE) 樹脂による弱陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分画したところ、ワケギ及びネギのフロント画分からアリイナーゼ活性を有するフラクションが得られた。これらのアリイナーゼ活性を示すピークフラクションを濃縮し、等電点電気泳動(IEF)により分離した後、分離ゲルに対して Dinitrophenylhydrazine (DNP) 法をアリイナーゼ活性染色に適用した。その結果、いずれのフラクションについても複数のアリイナーゼ活性が濃茶色のスポットとして検出された。以上のことから、*Allium* 属植物においては、種内及び種間でそれぞれ異なる複数のアリイナーゼアイソザイムの存在が明らかになった。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、千葉大学薬学部齊藤和季教授には、アリイナーゼ活性の測定手法及びアリイン合成法についてご指導いただいた。また、横浜市立大学木原生物学研究所笹限哲夫教授には終始ご指導をいただいた。農業環境部植草秀敏博士には、実験を進める上で貴重なご助言をいただくとともに本報告を査読していただいた。ここに記して感謝の意を表す。

キーワード： *Allium* 属植物, アリイナーゼ, 等電点, 活性染色

Summary

Alliinase, which hydrolyses alliin (S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides; ACSO) to form allicin, pyruvate and ammonia under the presence of a cofactor, pyridoxal phosphate, confers the typical flavor of *Allium* plants. In the present study, we have performed isozyme analysis of the alliinases partially purified from onion (*A. cepa*), chinese chive (*A. tuberosum*), rakkyo (*A. chinense*), garlic (*A. sativum*), wakegi (*A. wakegi*) and welsh onion (*A. fistulosum*) by applying dinitrophenylhydrazine (DNP)-based detection of the isoelectrically focused alliinases. Crude protein extracts containing alliinases were obtained by ammonium sulfate precipitation of the homogenates from the bulb or leaf sheath tissues and applied to carboxymethyl (CM) and dimethylaminoethyl (DEAE) cellulose-column chromatography. Alliinase-active fractions were obtained by 0.25M NaCl elution by the CM-column chromatography of all the *Allium* species whereas the following DEAE-column chromatography fractionated alliinases only in wakegi and welsh onion. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the fractions revealed the presence of predicted alliinase proteins of ca.50 kDa almost homogeneity. When the same protein samples were further separated by isoelectric focusing (IEF) and subjected to the DNP-based active staining that detects pyruvates, several active spots with different pI values (6.5~9.3) were detected not only within the same species but also among the different *Allium* species, representing the species-specific profiles. These results suggest that alliinases consist of intra- and interspecifically several different isozymes that may be responsible for the unique aromatics corresponding to the species-specific ACSOs.

Key word : *Allium* species, alliinase, isoelectric focusing, active staining

緒言

アリイナーゼ (alliinase: EC4.4.1.4) は、タマネギ (*Allium cepa*) やニンニク (*A. sativum*) などのネギ (*Allium*) 属植物特有の催涙性揮発成分であるアリシン (allicin) の生成に関与するシステインリアーゼである。一般に、アリイナーゼは液胞内に、また、その基質となる S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (ACSOs) は細胞質に存在するため (Lancaster and Collin 1981), 細胞が破壊されたときにはじめてアリイナーゼが ACSOs に作用し、催涙性揮発成分であるアリシンが副生成物であるピルビン酸及びアンモニアを伴って生成する (Lancaster and Boland 1990)。アリイナーゼは糖タンパクで、タマネギでは全タンパクの6%を占めるなどネギ属植物のイオウ代謝系の中で重要な機能を果たしているものと考えられている (Nock and Mazelis 1987)。

アリイナーゼは、これまでにニンニク (Griffithsら2002, Jansenら1989, Mazelis and Crews 1968, Ravinkovら1994), タマネギ (Clarkら1998, Lancasterら2000a, Schwimmer and Mazelis 1963, Tobkin and Mazelis 1979), ニラ (*A. tuberosum*) (Manabeら1998) あるいはネギ (*A. fistulosum*) (Fujitaら1990) などを含む多数のネギ属植物から精製され (Krestら2000, Keusgenら2002, Lohmullerら1994, Won and Mazelis 1989), 詳細な生化学的解析がなされるとともに、最近、そのタンパク質の3次元立体構造も明らかにされた (Kuettnerら2002a,b)。アリイナーゼの触媒作用に

は、共因子としてピリドキサルリン酸が不可欠であり (Tobkin and Mazelis 1979), その結合部位はネギ属植物種間で高度に保存されていることが明らかにされている (Kitamuraら1997, Manabeら1998, Lancasterら2000a)。アリイナーゼ cDNA については、ニンニク、タマネギ、ニラ、ラッキョウ (*A. chinense*), ワケギ (*A. wakegi*) あるいはネギなどからすでに複数のクローンが単離され (Fujitaら1990, 上西ら2003, 北ら2002, Lancasterら2000a, Manabeら1998, Rabinkovら1994, van Dammeら1992), タマネギではそのゲノム DNA から転写制御領域を含む構造遺伝子も得られている (Doら2004, Gilpinら1995)。上西ら (2003) は、タマネギのアリイナーゼ構造遺伝子配列をもとにアリイナーゼ遺伝子特異的なプライマーを設計し、これを用いてアリイナーゼがヤマユリ (*Lilium auratum*), ハナニラ (*Ipheion uniflorum*) 及びアガパンサス (*Agapanthus giganteum*) 等を含むユリ科植物に広く存在することを明らかにした。これらのことから、アリイナーゼは複数のアイソザイムからなるマルチジーンファミリーを形成しているものと考えられる。しかし、アリイナーゼは生体内では二量体で存在すること (Lancasterら2000a,b), 糖鎖を有するため抽出過程でレクチンと結合するなど純化が難しいこと (Smeetsら1997) などから、これまでに酵素活性に注目したアイソザイム解析は行われておらず、実際にどのくらいの数のアリイナーゼアイソザイムが存在するかは明らかにされていない。

そこで、本研究では、タマネギ、ニラ、ラッキョウ、

ニンニク、ワケギ及びネギの6種のネギ属植物からアリイナーゼタンパクを粗分画し、それらを等電点電気泳動により分離したのち、Dinitrophenylhydrazine (DNP) 法を改変した活性染色を適用しところ、いずれのネギ属植物においても複数のアリイナーゼの存在が確認されたので、その結果を取りまとめて報告する。

材料及び方法

1. 供試植物

ネギ属の代表的作物として、タマネギ (品種: 湘南レッド), ニラ (品種: グリーンベルト), ラッキョウ (品種: らくだ), ニンニク (品種: ホワイト六片), ワケギ (品種: 農業総合研究所選抜系) 及びネギ (品種: 湘南) の6種を用いた。いずれの植物とも露地ほ場で栽培し、鱗茎、葉または葉鞘部を供試した。

2. 植物体からのアリイナーゼタンパクの分離・抽出

アリイナーゼタンパクの分離・抽出には、タマネギ、ニンニク、ワケギ及びラッキョウでは未発芽の鱗茎部を、ニラは2年生の宿根から発芽した長さ25cmの葉を及びネギでは草丈60cmの軟白葉鞘部の組織1kgをとり、緩衝液A (50mMリン酸緩衝液 (pH 7.0), 5% NaCl, 0.05%メルカプトエタノール, 5%ポリビニルピロリドン, 20 μ Mピリドキサルリン酸) とともに破碎し、10,000 \times gで10分間遠心分離して得られた上清に硫酸アンモニウムを55%飽和となるように加え、3時間穏やかに攪拌してタンパクを析出させた。これを10,000 \times gで10分間遠心分離し、得られた沈殿を250mlの緩衝液B (5mMリン酸緩衝液 (pH 6.0), 5% NaCl, 0.5mM CaCl₂, 0.01%メルカプトエタノール, 20 μ Mピリドキサルリン酸) で溶解した後、ポアサイズ8kDaの透析膜を用いて緩衝液Bに対して24時間透析することにより粗抽出画分を得た。次に、内径1.8cm、長さ45cmのガラス製のカラムにcarboxymethyl cellulose (CM) 樹脂 (BioRad社) を充填し、カラム容積の5倍量の緩衝液Bで平衡化した後、緩衝液Bに溶解させた粗抽出液を流してCM樹脂に正に荷電したタンパクを吸着させた。次に、カラム容積の5倍量の緩衝液Bで樹脂を洗浄した後、0.1~0.5Mの塩化ナトリウムを含む緩衝液Bで吸着したタンパクを順次溶出し、1.8mlずつ分取した。CMカラムクロマトグラフィーで樹脂に吸着されなかったフロント画分については、dimethylaminoethyl cellulose (DEAE) 樹脂を充填し、緩衝液Bで平衡化した同じサイズのガラス製カラムを用いて、同様に0.1~0.5Mの塩化ナトリウムを含む緩衝液Bで吸着したタンパクを順次溶出し、1.8mlずつ分

取した。各分画ごとにタンパク濃度及びalliinase活性を測定し、活性ピーク画分についてはセントリコン10 (アミコン社) を用いて10mg/ml濃度まで濃縮・脱塩後、20 μ lずつ分注し、SDS-PAGE解析、ウエスタンブロット解析、等電点電気泳動及びalliinase活性染色に供試するまで-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。いずれの操作とも4 $^{\circ}$ Cで行った。

3. アリイナーゼ活性の測定

(1) 基質合成

自然界にはアリイナーゼの基質となるアリインは側鎖の違いにより複数存在するが、本研究ではS-ethylcysteine (EC) から合成可能なS-ethyl-L-cysteinesulfoxide (ECSO; MW165, mp182-184 $^{\circ}$ C) を用い、Stoll and Seebeck (1951) の方法に基づいて合成した。すなわち、EC 1.5mg (2.03mM) を酢酸300mlに水浴で加熱しながら完全に溶解し、31%の過酸化水素水230 μ l (2.03mM) を加え、10 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、室温で5時間静置した。これに脱塩水を0.6ml加え、ロータリーエバポレーターを用いて42 $^{\circ}$ Cで溶媒を完全に除去した後、2倍量のアセトンを加えて結晶を析出させた。吸引ろ過により分離した結晶を5mlの脱塩水に再溶解し、アセトンで再結晶させる操作を3回繰り返すことにより純化し、最終的に吸引ろ過により分別後、アスピレーターを用いて乾燥させ、ラセミ体を50%含むECSOを得た。

(2) 活性測定

アリイナーゼ活性は、アリイナーゼが基質であるアリインを加水分解するとき生成するピルビン酸 (第1図)



第1図 アリイナーゼの機能

をDinitrophenylhydrazine (DNP) で発色させ、520nmにおける吸光度で定量した (Manabeら1998)。反応液は、基質として20mM ECSO 及びアリイナーゼの共役因子として20 μ Mピリドキサルリン酸を含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) とし、その15 μ lにアリイナーゼ粗抽出液あるいはCM/DEAEカラムクロマトグラフィーによる分画画分10 μ lを混合し、23 $^{\circ}$ Cで10分間静置した後、10%トリクロロ酢酸 (TCA) を25 μ l添加することにより反応を停止させた。これに0.033%DNP 50 μ lを添加し、5分間静置した後、2N NaOH 200 μ lを添加して発色させ (Walshら1971)、520nmにおける吸光度を測定した。生成したピルビン酸の濃度は、既知濃度のピルビン酸溶液

を用いて作成した検量線から算出した。アリイナーゼ活性は、1分間に1 μ Mのピルビン酸の生成をもって1 Uとした。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

CMまたはDEAEカラムクロマトグラフィーにより分画された各分画20 μ lに20 μ lの2倍濃度のLaemlli SDSサンプル緩衝液を加え、100°Cで5分間加熱することによりSDS-PAGE用サンプルを調製した。SDS-PAGEはBio-Rad社のミニゲルシステムを用い、アクリルアミド濃度12%、0.75mm厚のゲルを用いて、200Vの定電圧で1時間泳動した。分離したタンパクは0.5%のクマーシブリアントブルー R250 (CBB-R250) で染色した。

5. 等電点電気泳動 (IEF)

等電点電気泳動は、アマシャム・ファルマシア社のMultiphor IIシステムで、Ready Gel-Ampholine PAG plate (pH3.5-9.5) を用いて行った。陽極には1Mリン酸溶液を、陰極には1M水酸化ナトリウム溶液を浸したウィックを置いた。次にゲルの中央にろ紙片 (5×5mm) を置き、これに脱塩水で1mg/mlに調製した脱塩・濃縮サンプルを10 μ l吸収させた後、1,500V, 50mA, 30Wで90分間泳動した。泳動中は装置の蓋を密閉するとともに、二酸化炭素を吸収させるため予備バッファー槽を1Mの水酸化ナトリウム溶液で満たした。泳動終了後、直ちに活性染色を行った。pI値は、同時に泳動させた等電点マーカー (アマシャム・ファルマシア社) をCBB-R250で検出することにより推定した。

6. IEFゲル活性染色

IEFゲルの活性染色にはアリイナーゼ活性の測定手法を応用した。すなわち、等電点電気泳動終了後、ゲルを緩衝液Bに浸し、15分間振とうして平衡化した後、室温で30分間風乾した。風乾後、アリイナーゼ活性測定用の反応液5mlをゲル表面に塗布し、37°Cで30分間反応させた後、10%TCA 1mlをゲル表面に塗布して酵素反応を止めた。室温で30分間風乾した後、0.33% DNP 1mlをゲル表面に塗布し、室温で30分間反応させ、最後に1mlの4N NaOHをゲル表面に塗布することにより遊離してきたピルビン酸とDNPの反応生成物を検出した。活性染色像はピクトロスタット (フジフィルム社) を用いてカラー複写記録した。

結 果

1. 植物体からのアリイナーゼタンパクの分画

Allium属植物組織の磨砕抽出液の硫酸アンモニウム沈殿により得られたすべてのタンパク粗抽出画分にはアリ

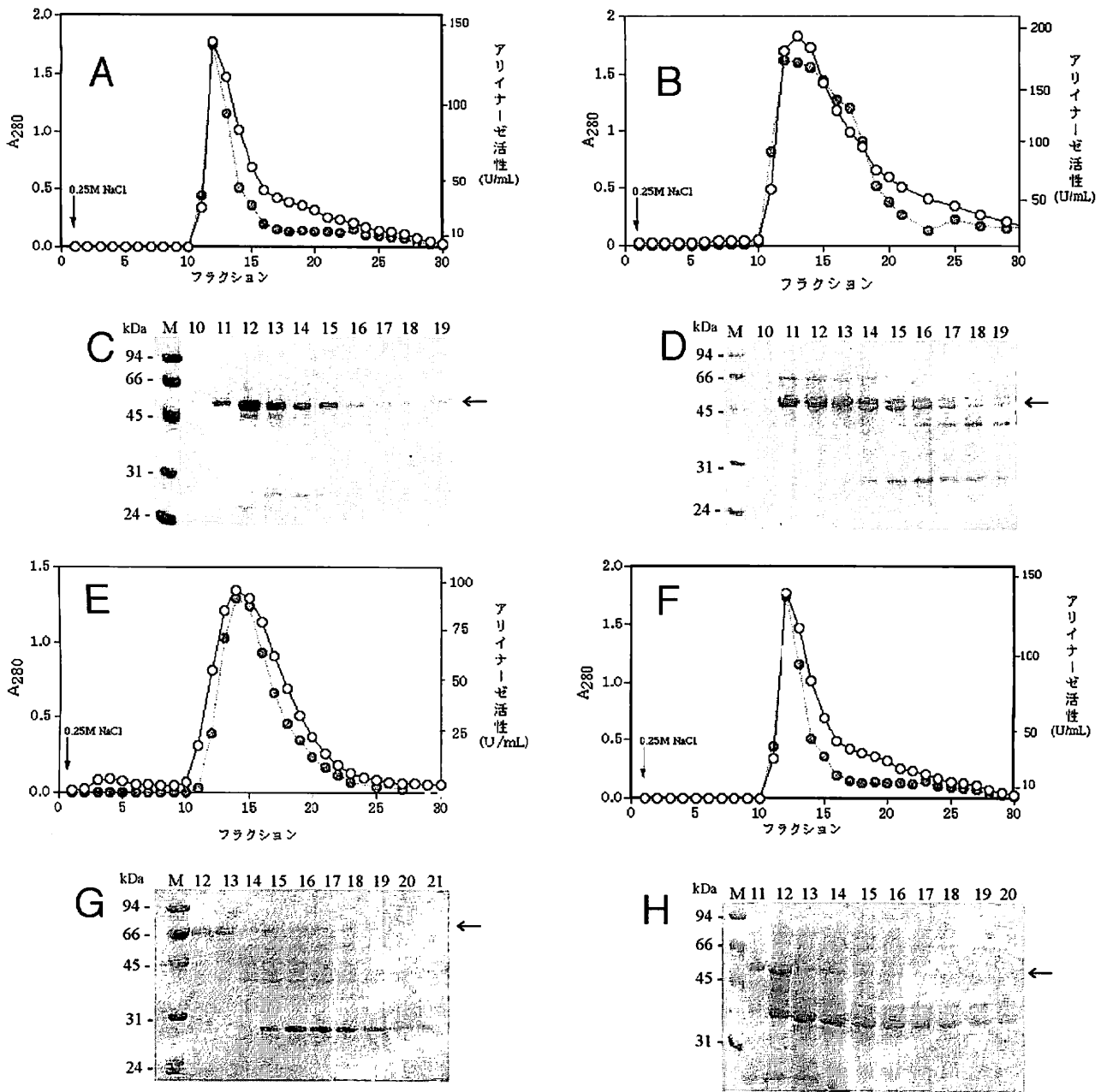
第1表 6種のネギ属植物から硫酸アンモニウム沈殿により得られたタンパク粗抽出画分のアリイナーゼ比活性

植 物	比 活 性 ²⁾
タ マ ネ ギ	1.80
ニ ラ	2.58
ラ ッ キ ョ ウ	0.87
ニ ン ニ ク	0.88
ワ ケ ギ	4.74
ネ ギ	0.91

²⁾U/mg protein

イナーゼ活性が認められた。単位タンパク量当たりのアリイナーゼ比活性ではワケギが最も高く、ニラ及びタマネギの順で低くなったが、ラッキョウ、ニンニク及びネギではほぼ同等の値を示した (第1表)。次に、これらの粗抽出画分を弱陽イオン交換体であるCM樹脂を用いた陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分画した。その結果、いずれのネギ属植物の粗抽出画分においても0.25Mの塩化ナトリウム溶液で溶出したときに、タンパクの溶出プロファイルとアリイナーゼ活性パターンとがほぼ一致した。第2図にタマネギ(A)、ラッキョウ(B)及びネギ(E)におけるCMカラムクロマトグラフィーの溶出プロファイルを示した。いずれにおいても高いアリイナーゼ活性を示す画分が一つのピークとして分画された。この分画ピークを含むフラクションをSDS-PAGEで分離したところ、ネギのCMフラクション以外のいずれの植物からもこれまでにニンニク及びタマネギで報告されているアリイナーゼと同じ約50kDaの大きさのタンパク (Clarkら1998, Lancasterら2000a, Ravinkovら1994) が検出された (第2図C, D)。一方、ネギのCM分画フラクションでは主要なタンパクは約66kDaの大きさであった (第2図G)。

CMカラムクロマトグラフィーでCM樹脂に吸着されずに溶出したフロント画分を、同じ条件で弱陰イオン交換体樹脂であるDEAEを用いてさらに分画した。その結果、ワケギ及びネギから抽出したタンパク粗抽出画分のCMカラムクロマトグラフィーフロント画分については、緩衝液Bで非吸着成分を洗浄した後、いずれも0.25Mの塩化ナトリウム溶液で溶出したときにアリイナーゼ活性を示すフラクションが得られた。ネギにおけるDEAEカラムクロマトグラフィーでは、アリイナーゼ活性は初期に溶出されるタンパク画分に認められるもののシャープな分画パターンを示さず、また、アリイナーゼ活性も低い値となった (第2図F)。溶出画分のSDS-PAGE解析では、予想される約50kDaのタンパク以外に低分子のタ

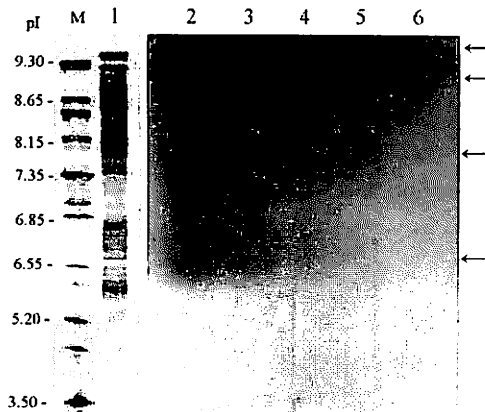


第2図 タマネギ (A,C) 及びラッキョウ (B,D)の鱗茎及びびネギ (E~H) の葉鞘組織から硫酸アンモニウム沈殿により得られたタンパク粗抽出画分のイオン交換クロマトグラフィーによる分画状況及びその分画フラクションのSDS-PAGE像。A,B,Eはカルボキシメチルセルロース樹脂及びFはジエチルアミノエチルセルロース樹脂による分画状況で、○は280nmにおける吸光度を ●はアリイナーゼ活性 (U/ml) を示す。C,D,G,HはそれぞれA,B,E,Fに、また、各レーン番号はフラクション番号に対応する。Mは分子量マーカを示し、大きさ (kDa) は左サイドに示した。

ンパクを含む複数のバンドが検出された (第2図 H)。

2. 等電点電気泳動 (IEF) 及びアリイナーゼ活性染色

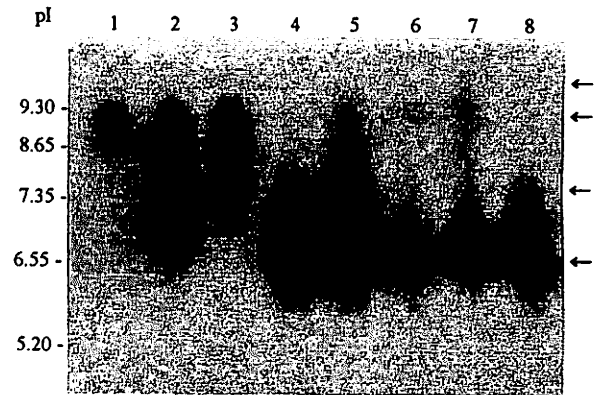
アリイナーゼ活性を示すピークフラクションを濃縮・脱塩し, 等電点電気泳動 (IEF) により分離した。第3図レーン1にタマネギからCMカラムクロマトグラフィーにより分画したアリイナーゼ活性ピーク分画の IEF 像を示した。その結果, pI9.5及び9.0付近に強い2本のバンドが, また, pI8.0付近にも明確なバンドが検出されるとともに, pI8.6付近には明確にフォーカスされないバンドがスメアリング状に確認された。そこで, どのバンドにアリイナーゼ活性が認められるのかを明らかにするために, DNP法をIEF分離ゲルに適用し, アリイナーゼについての活性染色を試みた。第3図レーン1で用いたサンプルを脱塩水で4段階の1/2希釈シリーズを調製して, IEFを行った後, アリイナーゼによって加水分解された ECSO から遊離してくるピルビン酸と DNP とを反応させたところ, ピルビン酸の存在部位が淡黄色のバックグラウンドに濃茶色のスポットとして少なくとも4箇所検出された (第3図レーン2~6)。



第3図 タマネギの鱗茎組織からカルボキシメチルセルロース樹脂を用いた弱陽イオン交換クロマトグラフィーで分画されたアリイナーゼ活性ピークフラクションのメンブレン濃縮・脱塩タンパクの等電点電気泳動 (IEF) による分画及びジニトロフェニルヒドラジン法を応用した分画ゲルの活性染色像。いずれも Ampholine-PAG plate (pH3.5-9.5) を用いて IEF を行った後, 活性染色を行った。レーン1: 濃縮・脱塩サンプル (タンパク濃度10mg/ml) の IEF 像, レーン2~6: レーン1と同じサンプルの濃度シリーズ (×1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16濃度) の IEF 後の活性染色像。M は等電点 (pI) マーカーで, 各 pI 値は左サイドに示した。←は活性スポットを示す。

そこで, 今回用いた6種の Allium 属植物の CM-及び DEAE-カラムクロマトグラフィーで得られたピークフラクションを濃縮・脱塩し, タンパク濃度で5mg/ml レベ

ルに調製して IEF により分離した後, 直ちに活性染色を行った。その結果, 第4図に示すように, CMカラムク



第4図 6種の Allium 属植物からカルボキシメチルセルロース (CM) 樹脂及びジエチルアミノエチルセルロース (DEAE) 樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィーで分画されたアリイナーゼ活性ピークフラクションの等電点電気泳動 (IEF) 後のジニトロフェニルヒドラジン法を応用した活性染色像。レーン1: タマネギ (CM), 2: ニラ (CM), 3: ラッキョウ (CM), 4: ニンニク (CM), 5: ワケギ (CM), 6: ワケギ (DEAE), 7: ネギ (CM), 8: ネギ (DEAE)。いずれも分画ピークフラクションの濃縮・脱塩サンプル (タンパク濃度5mg/ml) を Ampholine-PAG plate pH3.5-9.5 を用いて IEF した後, 活性染色を行った。各 pI 値は左サイドに示した。

ロマトグラフィー分画サンプルについては, ニンニク以外のいずれの植物においても pI9.0付近に強いスポットが認められ, ニラ, ワケギ, ニンニク及びネギでは pI7.0付近に, また, ニンニク, ワケギ及びネギでは pI6.5付近に活性スポットが検出された。一方, ワケギ及びネギの DEAE カラムクロマトグラフィー分画サンプルでは, pI6.5付近にいずれも明確なスポットが検出され, また, ネギでは pI10付近にも一つのスポットが認められた。以上の結果から, ネギ属には種内のみならず種間でも pI の異なる多様なアリイナーゼアイソザイムが存在することが明らかになった。

考 察

アリイナーゼはネギ属植物に広く存在し, 細胞質に存在するアリインを細胞が破壊されるのに伴って加水分解し, 揮発・催涙性でネギ属植物特有の辛味成分であるアリシンを生成させるシステインリアーゼの一種である (Clarkら1998, Griffithsら2002, Lancaster and Boland 1990)。ネギ属植物から単離されたアリイナーゼの cDNA 解析からアリイナーゼ遺伝子はマルチジーンファミリーを形成していることが示されたが (北ら2002, Kingら1998, Lancaster

ら2000a, Manabeら1998),タンパクレベルではアリイナーゼにどのくらいの数のアイソザイムが存在するかは明らかにされていなかった。そこで、本研究において、タマネギ, ニラ, ラッキョウ, ニンニク, ワケギ及びネギの6種の代表的なネギ属植物に含まれるアリイナーゼをイオン交換カラムクロマトグラフィーにより粗分画したタンパクをIEFにより分離した後, 分離ゲルをDNP法を応用して活性染色を行ったところ, アリイナーゼ活性を示す複数の濃茶色スポットが検出され, *Allium*属植物種内及び種間に等電点の異なる複数のアイソザイムが存在することが明らかになった。

アリイナーゼタンパクの粗分画過程で行った弱陽イオン交換カラムクロマトグラフィーでは, アリイナーゼは0.25Mの塩化ナトリウム溶液により溶出され, そのピーク分画のSDS-PAGE解析では, ネギを除いたいずれの植物からも約50kDaの大きさのタンパクが特異的に検出された。ネギでは, 約66kDaのタンパクが検出され, その他にもいくつかの狭雑タンパクが含まれていたことから, 粗分画したアリイナーゼを含むタンパク試料をさらに等電点の差により分離し, 活性染色によりアイソザイムを検出する必要があった。ところが, アリイナーゼに関してはこれまでに活性染色を適用した事例がなかったため(Mironら2002), 基質であるアリインの副分解産物として生成するピルビン酸をDNPと反応させて検出するDNP法に着目し(Manabeら1998, Walshら1971), これをアリイナーゼの活性染色に適用してみた。その結果, タンパク濃度で5mg/ml程度まで濃縮してIEFに供試すれば, IEFによりフォーカスされたアリイナーゼアイソザイムの存在位置を淡黄色のバックグラウンドに濃茶色のスポットとして検出することができた。

そこで, このDNP法によるアリイナーゼ活性染色手法を6種のネギ属植物のCM/DEAEカラムクロマトグラフィー粗分画試料に適用したところ, いずれの植物種においても複数のアリイナーゼ活性スポットが検出された。検出されたスポットには, 種間で共通するものも複数認められたが, 種ごとに特有の分離パターンを示した。このことは, ネギ属植物においては, 少なくとも種内のみならず種間にもpI値の異なる多様なアイソザイムが存在することを示している。全体としては, タマネギ, ニラ及びラッキョウにはpI値の高いアリイナーゼが, また, ニンニク, ワケギ及びネギにはpI値の低いアリイナーゼが主に含まれていた。これまでの研究で, アリイナーゼの基質となるアリインには, その側鎖の違いにより多くの誘導体が存在することが明らかにされている

(Krestら2000, Lancaster and Boland 1990, Schwimmer 1969)。したがって, ネギ属植物においては, アリインの誘導体分化に対応してアリイナーゼアイソザイムが分化し, 結果として種ごとに異なる特徴的な二次代謝産物としての催涙性揮発成分が生成・分化してきたものと考えられる(Griffithsら2002, Keusgenら2002, Lancasterら2000a, b, Schwimmer 1969)。

今回開発したアリイナーゼのDNP法による活性染色では, シャープなスポットとしては検出できないため, アリイナーゼのアイソザイム数は特定できなかった。しかし, これまでにアリイナーゼのcDNA解析により, 少なくとも分子量が同等で塩基配列の相同性が低い2種類のアリイナーゼcDNAが単離されていることから(北ら2002, Lancasterら2000a), 発現時期や発現組織別に異なるcDNAが存在しているものと予想される。今後, アイソザイム解析で認められた複数のスポットに対応するcDNAをさらに単離し, アリイナーゼアイソザイムとの相互解析を行うことにより, ネギ属植物における催涙性揮発成分の変異を生化学的に明らかにし, 新たな品種育成における選抜手法に応用すべく解析を進めて行く予定である。

引用文献

- Clark, S.A., Shaw, M.L., Every, D., and Lancaster, J.E. 1998. Physical characterization of alliinase, the flavor generating enzyme in onions. *J. Food Biochem.* 22:91-103.
- Do, G.S., Suzuki, G., and Mukai, Y. 2004. Genomic organization of a novel root alliinase gene, ALL1, in onion. *Gene* 325:17-24.
- Fujita, M., Endo, M. and Sano, M. 1990. Purification and characterization of the alliin lyase from Welsh Onion, *Allium fistulosum*. *Agric. Biol. Chem.* 54:1077-1079.
- Gilpin, B.J., Leung, D.W., and Lancaster, J.E. 1995. Nucleotide sequence of a nuclear clone of alliinase (accession no L48614) from onion (PGR 95-125). *Plant Physiol.* 110:336.
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., and Smith, B. 2002. Onions -- a global benefit to health. *Phytother. Res.* 16:603-615.
- Jansen, H., Muller, B., and Knobloch, K. 1989. Characterization of an alliin lyase preparation from garlic (*Allium sativum*). *Planta Med.* 55:434-439.
- 上西愛子・野村研・大矢武志・北宜裕. 2003. PCRによるユリ科植物からのアリイナーゼ遺伝子の検出. *神奈川農総研報.* 143:29-37.
- 北宜裕・柳下良美・大矢武志・道券秀雄・河田隆弘・上西愛子・野村研. 2002. RT-PCRによる植物有用遺伝子のcDNAクローニングと育種への応用. *神奈川農総研報.* 142:37-48.

- Kitamura, N., Shimomura, N., Iseki, J., Honma, M., Chiba, S., Tahara, S., and Mizutani, J. 1997. Cysteine-S-conjugate β -lyase activity and pyridoxal phosphate binding site of onion alliin lyase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61:1327-1330.
- Krest, I., Glodek, J., and Keusgen, M. 2000. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. *J. Agric. Food Chem.* 48:3753-3760.
- Keusgen, M., Schulz, H., Glodek, J., Krest, I., Kruger, H., Herchert, N., and Keller, J. 2002. Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles, and alliinase activity. *J. Agric. Food Chem.* 50:2884-2890.
- King, J. J., Bradeen, J. M., Bark, O., McCallum, J. A., and Havey, M. J. 1998. A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of extremely large diploid genome. *Theor. Appl. Genet.* 96: 52-62.
- Kuettner, E. B., Hilgenfeld, R., and Weiss, M. S. 2002a. Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic. *Arch. Biochem. Biophys.* 402:192-200.
- Kuettner, E. B., Hilgenfeld, R., and Weiss, M. S. 2002b. The active principle of garlic at atomic resolution. *J. Biol. Chem.* 277:46402-46407.
- Lancaster, J. E. and Collin, H. A. 1981. Presence of alliinase in isolated vacuoles and alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Sci. Lett.* 22:169-179.
- Lancaster, J. E. and Boland, M. J. 1990. Flavor biochemistry, in Onions and allied crops (ed. by Brewster, J. D. and Rabinovich, E.). vol.3, pp.33-72. CRC Press, London.
- Lancaster, J. E., Shaw M. L., Joyce M. D., McCallum J. A., and McManus M. T. 2000a. A novel alliinase from onion roots. Biochemical characterization and cDNA cloning. *Plant Physiol.* 122:1269-1279.
- Lancaster, J. E., Shaw M. L., and Walton, E. F. 2000b. S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, alliinase and aroma in *Leucocoryne*. *Phytochemistry.* 55:127-130.
- Lohmuller, E. M., Landshuter, J., and Knobloch, K. 1994. On the isolation and characterization of a C-S-lyase preparation from leek, *Allium porrum*. *Planta Med.* 60:337-342.
- Manabe, T., Hasumi, A., Sugiyama, M., Yamazaki, M., and Saito, K. 1998. Alliinase (S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase) from *Allium tuberosum* (Chinese chive), purification, localization, cDNA cloning and heterologous functional expression. *Eur. J. Biochem.* 257:21-30.
- Mazelis, M. and Crews, L. 1968. Purification of the alliin lyase of garlic, *Allium sativum* L. *Biochem. J.* 108: 725-730.
- Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilchek, M., and Rabinkov, A. 2002. A spectrophotometric assay for alliin, alliin, and alliinase (allin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfates. *Anal. Biochem.* 2002. 307:76-83.
- Nock, L. P. and Mazelis, M. 1987. The C-S lyases of higher plants: direct comparison of garlic (*Allium sativum* L.) and (*Allium cepa*). *Plant Physiol.* 85:1079-1083.
- Ravinkov, A., Zhu, X. Z., Graf, G., and Mirelman, D. 1994. Allin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*): biochemical characterization and cDNA cloning. *Appl. Biotechnol.* 48:149-171.
- Schwimmer, S. 1969. Characterization of S-propenyl-L-cysteine sulfoxide as the principal endogenous substrate of L-cysteine sulfoxide lyase of onion. *Archives Biochem. Biophys.* 130:312-320.
- Schwimmer, S. and Mazelis, M. 1963. Characterization of alliinase of *Allium cepa* (onion). *Arch. Biochem. Biophys.* 100:66-73.
- Smeets, K., Van Damme, E. J. M., Van Leuven, F., and Peumans, W. F. 1997. Isolation and characterization of lectins and lectin-alliinase complexes from bulbs of garlic (*Allium sativum*) and ransoms (*Allium urisnum*). *Glycoconjugate J.* 14:331-343.
- Stoll, A. and Seebeck, E. 1951. Chemical investigation on alliin, the specific principle of garlic. *Adv. Enzymol.* 11:377-400.
- Tobkin, H. E. Jr. and Mazelis, M. 1979. Allin lyase: preparation and characterization of the homogeneous enzyme from onion bulbs. *Arch. Biochem. Biophys.* 193:150-157.
- Van Damme, E. J. M., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Peumans, W. J. 1992. Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. *Eur. J. Biochem* 209: 751-757.
- Walsh, C. T., Schonbrunn, A., and Abeles, R. H. 1971. Studies on the mechanism of action of D-amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.* 246:6855-6866.
- Won, T. and Mazelis, M. 1989. The C-S lyases of higher plants: purification and characterization of homogeneous alliin lyase of leek (*Allium porrum*). *Physiol. Plant.* 77:87-92.