ブドウ '巨峰' のアントシアノプラスト

中村正博

宮城県農業短期大学 982-02 仙台市太白区

Anthocyanoplasts in 'Kyoho' Grapes

Masahiro Nakamura

Miyagi Agricultural College, Taihaku, Sendai 982-02

Summary

The nature of anthocyanoplasts (ACPs) from colored skin tissues of 'Kyoho' grapes was investigated under a microscope in relation to their development, membrane and anthocyanin.

1. ACPs in the subepidermal cells enlarged rapidly by repeated coalescence of the smaller ones. The volume of a coalesced ACP was almost the same as the sum of volumes of respective ACPs before coalescence.

2. It was confirmed by using protoplasts and/or isolated ACPs that ACPs were located in the vacuoles and each possessed a transparent membrane which could be clearly observed under a microscope.

3. A few minutes after a piece of skin tissue was permeated with 40 or 70% ethanol, anthocyanin began to leak out from ACP into the vacuole of the epidermal cell, and the vacuole turned red. The ACP then decreased in size and eventually collapsed, leaving almost no trace. The vacuole also burst soon after the collapse of the ACP.

4. When a piece of skin tissue was permeated with redistilled acetone, ACP in the vacuole of the epidermal cell collapsed. However, the vacuole did not burst, and smaller ACPs soon reappeared in the vacuole and rapidly coalesced together, resulting in larger ACPs. Throughout the formation of smaller ACPs and their coalescence, anthocyanin accumulated in a few larger ACPs, while the vacuole became near colorless.

5. The data indicate that each ACP is surrounded by a membrane which maintains the concentration of anthocyanin within an ACP higher than that in the vacuole, and that the formation and coalescence of ACPs are means by which anthocyanin accumulates in ACPs.

緒 言

ブドウの黒色系品種である '巨峰' では、着色状況が良好な場合、果粒の軟化直後から果皮が赤紫色、黒紫色へと急速に変化する。さきに筆者 (中村, 1989) は、着色開始後まもなく、着色した果皮の液胞内により濃く着色した小球体 (アントシアノプラスト, 以下 ACP と略記) が出現することを認めるとともに、その発達過程を赤色種の '紅伊豆' との比較において調査し、ACP の発達と果皮色の濃さが密接に関連していることを明らかにした。しかし、ACP の肥大過程や

その性質については未検討のままであった。

Pecket・Small (1980) はアカキャベツの胚軸細胞に ACP を認め、その性質について、ACP は膜で囲まれており、その膜がアントシアニン生合成の場となっているのではないかと推定している。しかし、筆者 (中村, 1989) は、ブドウ '巨峰' では 1) 果皮の着色初期、着色した細胞の液胞内に ACP の出現がないこと、2) 果実の成熟が進んで ACP が発達・肥大し、果皮および ACP が黒色に変化すると、それとは逆に、液胞内の ACP を除く部分は透明に近くなること、3) また、'巨峰' と同じ黒色系の '高墨' で、すでに発達・肥大した ACP が破裂すると、透明に近い液胞が ACP から流出したアントシアニンによって赤色に変化することな

1992 年 12 月 4 日 受理。本報告の概要は園芸学会平成元年度春季大会で発表した。

どを認め、ACP はアントシアニンの濃縮される場ではないかと推定した。

本実験では、'巨峰'の着色した果皮細胞内に認められる ACP について、その融合過程、細胞内の存在部位、膜およびアントシアニンとの関係などを形態的に検討し、その性質を明らかにしようとした。

材料および方法

1988 年、宮城県農業短期大学果樹園に栽植されている '巨峰' を用い、7 月 22 日の時点で平均 73.8 ± 1.9 cm の新梢に着房した果房から、着色期に平均的な着色を示す果粒を採取して以下の実験に供試した。なお、観察はすべて光学顕微鏡下で行った。

実験 I. 9 月 15 日に採取した果粒から直径 3 mm 程度の果皮 (約 3 層) を薄くはがし、反転させて、表皮下第 2 層の細胞について ACP が互いに融合する過程を観察した。

実験 II. 10 月 20 日から 11 月 4 日の間に採取した果粒を中性洗剤で洗って、70% エタノールで 2 分間、ついで 2% 次亜塩素酸ナトリウムで 5 分間殺菌した後、果皮を直径 2 mm 程度の細片にして、0.4% マセロチーム R-10、1% セルラーゼ R-10、0.7 M マンニトール、10 mM 塩化カルシウムからなる酵素液 (pH 5.6) 10 ml の入った 20 ml のサンプル管に入れ、25℃ の恒温器内に静置した。24 時間以上経過した後、細胞片の混じった酵素液をスライドガラス上に滴下し、果皮片から分離した着色細胞のプロトプラスト、細胞外に流出した ACP、ならびに色素の抜けた細胞の状態などを観察した。また、細胞外に流出した ACP に 99.9% メタノールを滴下し、ACP の変化を観察した。

実験 III. 11 月 4 日に収穫した果粒の果皮表皮細胞に 70% エタノールを滴下・浸透させ、ACP と ACP を含む液胞について滴下後の直径の変化を一定時間ごとにマイクロメーターで測定した。また、これとは別の

果皮表皮細胞を用いて、40% エタノール滴下後の液胞および液胞内 ACP の変化について観察した。

実験 IV. 11 月 4 日に収穫した果粒の果皮表皮細胞に回収アセトンを滴下・浸透させ、滴下後の ACP および液胞の変化を観察した。

結 果

1. ACP の融合

9 月 15 日に採取した果粒の果皮表皮下第 2 層細胞において、顕微鏡下で観察中、ACP は短時間に融合を繰り返し、肥大した (第 1 図)。すなわち第 1 図の場合、観察を始めてまもなく、液胞内で隣接した 2 つの ACP が融合を開始し、93 秒で融合を完了した。融合して肥大した ACP は、続けて隣接した ACP と融合を開始し、211 秒後に融合を終え、さらに肥大した。第 1 図の写真からその体積を融合前、後で比較すると、1 回目、2 回目の融合とも、融合後の ACP の体積は融合前の二つの ACP の体積を加えたものと等しかった。

2. ACP の存在部位

10 月 20 日に採取して、47 時間セルラーゼ、ペクチナーゼを含む酵素液に入れた果皮片から、ACP を含む着色細胞のプロトプラストが単離された (第 2 図)。果皮のプロトプラストは赤色に着色した液胞がその大部分を占めており、内部により濃く着色した、直径でプロトプラストの 2/5 ほどの球状の ACP が一つ存在した。

3. ACP と膜

97 時間放置した酵素液中には液胞から細胞外に流出した ACP が見いだされたが、この ACP はすでにアントシアニンがほとんど抜けたものであった (第 3 図)。流出した ACP の観察を始めて 3 分後、その ACP の一部に亀裂が入り、球状の膜が裂けるように亀裂は数分間で徐々に広がった (第 3 図)。また、148 時間放置した酵素液中からは、アントシアニンの抜け

Fig. 1. Time course of ACPs coalescing in the subepidermal cells (third layer) of 'Kyoho' grape berries harvested on 15 September. (5×40)

た細胞が観察されたが(第4図), この細胞の中には液胞と ACP がほぼ完全な形で観察され, 第3図に示したものと同様 ACP の輪郭は明瞭であった. さらに, 細胞外に流出した ACP でまだ十分にアントシアニンが抜け切れていないものに 99.9% のメタノールを滴下すると, ACP は数分後に亀裂が入り裂開したが, その破片は透明な輪郭のはっきりした膜状のものであった(第5図).

4. ACP とアントシアニン

液胞がほぼ透明に近く, 発達した黒色の ACP を持つ果皮表皮細胞に 70% エタノールを滴下すると, 数分後, ACP から液胞内にアントシアニンが漏出し始め, 液胞は赤色に染まったが, まもなく ACP は壊れて急速に縮小し, その痕跡はほとんど確認できなくなった(第6図). 続いて, 液胞が破裂し(第7図), ア

ントシアニンは細胞全体に拡散した. エタノールの滴下によって ACP と液胞はどちらも多少拡大した後崩壊したが, 両者の崩壊のパターンは異なり, 液胞のそれは風船が破裂する状態に, 一方, ACP のそれは風船から空気が抜ける状態に類似した. ACP はその縮小が始まってから消失するまでに約2分間を要したのに対して, 液胞は, エタノール滴下後からわずかずつ拡大を始め, ACP の崩壊が始まってから若干拡大の速度を増したが, ACP が消失するまで拡大を続け, ACP の消失直後瞬間的に破裂した.

アセトンを滴下した場合, ACP 消失のパターンはエタノールの場合と同様であったが, 液胞膜は壊れなかった. 滴下数十分後この液胞内に再び小さな ACP が出現し, それらは急速に融合を繰り返してその数を減じ, 肥大した(第8図). この過程で, アントシアニンは ACP に吸収され, 液胞は再び透明に近くなっ

Fig. 2. Protoplast of skin cell containing an ACP. Protoplasts were obtained from the skin treated with an enzyme solution for 47 hr in 'Kyoho' grape berries harvested on 20 October. (5×40)

Fig. 4. Isolated skin cell which lost pigment. The skin of 'Kyoho' grape berries harvested on 21 October was treated with an enzyme solution for 148 hr. (5×40)

Fig. 3. Isolated ACP in an enzyme solution. The skin of 'Kyoho' grape berries harvested on 27 October was treated with an enzyme solution for 97 hr. (5×40)

実験でも、1) 酵素処理により細胞外に流出した ACP の観察で、すでにこの ACP はアントシアニンがほとんど抜け出したものであったが、細胞内のものと同様のものではあったこと、2) 観察中この ACP の一部から亀裂が入り、球体の膜が裂けるように亀裂が広がったこと、3) 細胞外に流出した ACP で、まだ十分にアントシアニンが抜け切れていないものにメタノールを滴下すると、ACP は亀裂が入って裂開したが、その破片は透明な膜状のものであったこと、4) 同じ酵素処理により、アントシアニンの抜けた ACP を持つ細胞が単離されたが、その ACP は液胞内で輪郭のはっきりし

た膜状のもので覆われて存在していたこと、などが確認されており、これらの事実から、ACP は明らかに膜で覆われているものと考えられた。

ACP が発達して黒色になり、一方、液胞がほぼ透明に近くなった果皮表皮細胞にエタノールを滴下すると、数分後、ACP から液胞内にアントシアニンが漏出し始め、透明な液胞が赤色に染まった。この事実は、明らかに ACP のアントシアニンを囲む膜がエタノールによって破壊されたためと考えられた。その後 ACP は縮小して消失し、液胞も、エタノール滴下後からわずかながら徐々に拡大を続け、ACP 崩壊後まもなく破裂した。おそらく、ACP の膜は、ACP を含む液胞よりもアントシアニンを濃い濃度に保つ働きをしているものと思われる。しかし、いったん ACP が破壊されると、液胞内のアントシアニン濃度が著しく高まり、一方、液胞膜もエタノールで弱体化しており、結果的に、液胞膜の破裂に至ったものと考えられた。

本実験から、ACP は膜構造を持っていることが明らかになったが、この ACP がどこでどのようにして作られるのかは明らかではない。発達した ACP を持つ果皮表皮細胞にアセトンを滴下すると、数分後 ACP は壊れて消失し、透明な液胞は赤色に染まったが、しばらくすると再び小さな ACP が多数形成された。これらの ACP は融合を繰り返して数を減じ、肥大した。この過程を通じて、再び、液胞内のアントシアニンは ACP に吸収され、ACP の肥大に伴って液胞は透明になっていった。こうした現象は、1) ACP の形成・融合と 2) ACP による液胞内のアントシアニン吸収というそれぞれの過程がお互いに関連し合っていることを示すものであり、ACP の形成と融合は ACP 内にアントシアニンを取り込むポンプの役割を果たしているものと考えられた。したがって、前報でも論議

Fig. 7. Changes with time in diameters of vacuole (○) and the largest ACP (●) contained in it in the epidermal cells after exposure to 70% ethanol in 'Kyoho' grape berries harvested on 4 November.

Fig. 8. Time course of ACP in the epidermal cells after exposure to redistilled acetone in 'Kyoho' grape berries harvested on 4 November. (5×100)

したように、ブドウ‘巨峰’の ACP は、Pecket・Small (1980), Small・Pecket (1982) の言うアントシアニン生成の場ではなく、液胞内で合成されたアントシアニンを吸収する場であると考えられた。Yasuda・Tsujino (1988) はハツカダイコンを暗所で発芽させた場合、実生胚軸の細胞内球体は無色で、明所では赤色に、また、暗所で発芽させて明所に移した場合、無色から赤色に変わったとし、ハツカダイコン胚軸の ACP はアントシアニン合成に不可欠な光反応の能力を持つと結論している。しかし、この論文では ACP を含む液胞の状態の記述がなく、この結果からだけで上述の結論を導き出すのは無理があると思われる。

また、アセトンを用いた実験から、液胞が健全ならば ACP はいったん壊れた場合でも再生され得ることが明らかとなった。今後、ACP のアントシアニン吸収のメカニズムをより明確にする上でも、ACP がどこからどのように形成されるのかについて検討することが必要と考えられた。

摘 要

1. ACP は短時間に融合を繰り返して発達・肥大した。融合前の二つの ACP の体積の和と融合後の ACP の体積はほぼ等しかった。

2. ACP は液胞内に存在し、光学顕微鏡下でも明瞭に判別できる透明な膜で覆われていた。

3. ACP の十分発達した果皮組織片にエタノールを滴下すると、数分後、ACP から液胞内にアントシアニンが漏出し始め、透明になっていた液胞が赤色に染まった。ACP は多少拡大した後急速に縮小し、光学顕微鏡下でその痕跡を明瞭に認めることはできなかった。

4. 一方、その ACP を含有する液胞もエタノール滴下後徐々に拡大したが、ACP からのアントシアニンの漏出に伴って拡大の速度が増し、ACP が壊れて消失した後まもなく液胞膜が破裂した。

5. ACP の十分発達した果皮組織片にアセトンを滴下すると、ACP は崩壊・消失したが、液胞は壊れなかった。滴下数十分後、再び小さな ACP が多数出現し、短時間に融合を繰り返して肥大した。その過程で液胞内のアントシアニンは ACP に吸収され、液胞は再び透明に近くなった。

6. 以上のことから、ACP は膜で覆われており、この膜がアントシアニンを液胞内より濃く保つ働きをしているものと推察された。また、ACP の形成と融合は、液胞内のアントシアニンを ACP 内に取り込むポンプの役割を果たしているものと考えられた。

謝 辞 本研究をまとめるに当たり、ご指導ならびにご校閲を賜った東北大学名誉教授堀 裕先生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 中村正博. 1989. 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.
- Nozzolillo, C. and N. Ishikura. 1988. An investigation of the intracellular site of anthocyanoplasts using isolated protoplasts and vacuoles. *Plant Cell Reports* 7: 389-392.
- Pecket, R. C. and C. J. Small. 1980. Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochemistry* 19: 2571-2576.
- Small, C. J. and R. C. Pecket. 1982. The ultrastructure of anthocyanoplasts in red-cabbage. *Planta* 154: 97-99.
- Yasuda, H. and Y. Tsujino. 1988. The studies on the spherical bodies containing anthocyanins in plant cells. II. The effects of light on the pigmentation of spherical bodies in the seedling hypocotyls of the radish plant. *J. Fac. Sci., Shinshu Univ.* 23: 1-6.
- Yasuda, H., T. Mitsui and M. Onishi. 1989. Studies on the spherical bodies containing anthocyanins in plant cells. III. Observations on the developments of anthocyanoplasts in the radish hypocotyls. *Cytologia* 54: 673-678.