低温貯蔵中のヨウサイに発生する褐変現象と 酸化還元バランスとの関係

於勢貴美子*・茶 珍 和 雄**・今 堀 義 洋**・上 田 悦 範**

Relationship between Browning and Redox System of Water Convolvulus
(*Ipomoea aquatica* FORSK.) Stored at Low Temperature

OSE Kimiko*, CHACHIN Kazuo**, IMAHORI Yoshihiro** and UEDA Yoshinori**

* Otani Women's Junior College

3-11-31 Nishikori-kita, Tondabayashi, Osaka 584-8522

** College of Agriculture, Osaka Prefecture University

1-1 Gakuencho, Sakai, Osaka 599-8531

The TBA value, an index to the degree of lipid peroxidation, and hydrogen peroxide contents of water convolvulus increased prior to the onset of chilling injury and decreased when severe symptoms appeared. The NAD^+/NADH ratio was higher at 1°C than at 20°C during storage. The $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio decreased in both storage conditions. Energy charge at 20°C storage was kept at high level state, but it decreased simultaneously with the appearance of chilling injury at 1°C . Polyphenoloxidase (PPO), ascorbate (AsA) peroxidase and catalase activities also increased before the onset of chilling injury. The results of the present study suggest that under low NAD^+/NADH ratio, lipid peroxide, hydrogen peroxide relate to the development of chilling injury in water convolvulus. (Received. Dec. 3, 1999 ; Accepted May 29, 2000)

ヒルガオ科のヨウサイは低温感受性が高く、収穫後低温で貯蔵すると若い茎や葉に褐変を呈する低温障害を発生する¹⁾。これまでに褐変物質生成に関与する種々の酵素活性や組織化学的な変化について調査してきたが、褐変に関する酸化酵素の活性が必ずしも低温によって強く影響を受けるという確証を得られなかった²⁾。

過酸化物の中で活性酸素は、大気を構成する安定な酸素分子よりも活性化状態にある酸素種の総称で、スーパーオキシドラジカルや、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素などがある^{3)~5)}。これらが生体内に生じると、様々な酸化ストレスを起し、直接生理機能に障害を与える。一方、生体内では呼吸代謝やフェノール

代謝反応において、 NADH や NADPH などの還元型ヌクレオチドが生成され、正常ならばスーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼなどのような酵素が働いて、活性酸素は消去される^{6),7)}。本研究では、ヨウサイにおける生体内の過酸化物の生成や消去に関連する酵素活性やヌクレオチドの動向が、低温貯蔵中に発生する低温障害とどのような関係があるのかについて調べた。

実験材料および方法

1. 貯蔵方法

収穫したヨウサイ (*Ipomoea aquatica* FORSK.) は数本ずつを厚さ $30\mu\text{m}$ のポリエチレン袋に密封し、1 お

* 大谷女子短期大学 (〒584-8522 大阪府富田林市錦織北3-11-31)

** 大阪府立大学農学部 (〒599-8531 大阪府堺市学園町1-1)

よび20℃に貯蔵した。

2. 過酸化物質の測定

(1) **TBA 値** STEWARTら (1980) の方法に従い、生体内過酸化脂質とチオバルビツール酸 (TBA) の反応によって発色する TBA 反応物質量を532および600 nmにおける吸光度より求めた⁸⁾。

(2) **過酸化水素含量** 葉身を冷アセトン中で摩砕し、THOMASらの方法に従い測定した⁹⁾。

3. ヌクレオチドの測定

NADH および NADPH の測定は、葉身を80mM NaOH と共に磨砕したものを60℃で10分インキュベートし NAD と NADP を破壊した後に、過塩素酸で pH を 6～7 に調整した抽出液¹⁰⁾を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いて分離した。NAD⁺, NADP⁺, AMP, ADP および ATP の測定は、葉身を2.5M 過塩素酸と共に磨砕し KOH で pH を 6～7 に調整した抽出液¹¹⁾を HPLC で分離した。HPLC の分離条件はMEYERらの方法¹¹⁾に従った。すなわち、ODS 逆相カラム (ϕ 4 mm×L 25cm) を用い、0.2M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH5.1) に対する100%アセトニトリルの0, 0～2, 2～3, 3～10%の濃度勾配によって分離し、254nmで検出した。内部標準はキサンチン-2-リン酸とし、標準のヌクレオチドの保持時間によって同定した。

4. 粗酵素の抽出と活性測定

前報と同じ方法²⁾で抽出した粗酵素液を20%ごとの段階に分けて硫酸分画を行った結果、活性分布を示した20～100%硫酸分画を粗酵素液として用いた。褐変物質を生成する酸化酵素の1つであるポリフェノールオキシダーゼ (PPO)²⁾、生体内の過酸化水素の消去に関連するカタラーゼ¹²⁾、ペルオキシダーゼ¹³⁾およびアスコルビン酸 (AsA) ペルオキシダーゼ²⁾活性を調べた。酵素タンパク質の測定はCBB法で行った¹⁴⁾。

結果および考察

1. TBA 値および過酸化水素含量

Fig. 1のように生体内過酸化脂質含量の指標となる TBA 値は、対照区の20℃でやや増加したのに対し、貯蔵4日で若い葉や茎に低温障害と思われる褐変が発生した1℃区では障害発生前にいったん増加した後減少し、4日で再び増加した。このような TBA 値の変化は植物の場合、ほとんど膜脂質由来の過酸化脂質によるものと考えられる。1℃区で TBA 値の変化が認められたことはヨウサイでも生体膜脂質の酸化が進行していることを示しており、低温下で膜結合型の酵素活性等に影響

Values are mean $\pm$ SD for n=3.

Fig. 1 Changes in TBA value of water convolvulus stored at 1℃ (●) and 20℃ (○)

があると思われる。植物によっては老化の過程でも TBA 値が変化することが報告されており、ホウレンソウにおいて¹³⁾外観の鮮度を保っている1℃貯蔵はほぼ一定であったのに対し、25℃貯蔵では黄化 (老化) に伴い増加することが認められている。

次に、生体内の様々な酸化反応の結果として生成される過酸化水素量の変化を Fig. 2に示した。過酸化水素量は20℃区で徐々に減少したのに対して、1℃区ではいったん増加後減少した。これらの結果から過酸化水素や過酸化脂質はいずれも1℃区で障害発生前に生成蓄積

Values are mean $\pm$ SD for n=3.

Fig. 2 Changes in hydrogen peroxide content of water convolvulus stored at 1℃ (●) and 20℃ (○)

し、低温障害の発生に関係するものと推定された。

2. ヌクレオチドの変化

NAD⁺は酸化還元に関連する補酵素の中では植物体内で最も多量に存在し、還元型のNADHは各種の基質の水素基を酸化しエネルギーを得るという生体のエネルギー代謝上で重要な働きをしている¹⁵⁾。NADP⁺も酸化還元酵素に関与する補酵素であり、主にポリフェノールオキシダーゼの分布が認められている¹⁶⁾クロロプラストにおいて光合成電子伝達系の最終電子受容体として、重要な役割を果たしており¹⁷⁾、特にNADP⁺/NADPH比は光照射によって低下し、種々の酵素活性に影響を与えるとされている。NAD⁺/NADH比やNADP⁺/NADPH比の値が増加すると酸化を促進する方向に傾くとされ、細胞の酸化還元状態を調べることができる^{10),18)}。Fig. 3 (A) に示したように、貯蔵中ヨウサイにおいて1℃区でNAD⁺/NADH比が、20℃区よりも高い傾向を示したことから細胞内は酸化側へ傾いていると推察された。一方Fig. 3 (B) に示すようにNADP⁺/NADPH比は、1℃区で減少し貯蔵4日には対照区の20℃と同じ値となった。1℃区においてはNAD⁺/NADH比が20℃区よりも高い傾向を示したことから、1℃区の細胞内では20℃区に比べ、より酸化側へ傾いていると推察され、褐変基質であるクロロゲン酸の酸化、キノンの蓄積が起り、褐変物質の生成が促進されるのに対し、20℃区では基質の供給が1℃に比べ少なく¹⁹⁾褐変物質が生成されにくいものと思われる。

次に、エネルギーチャージ (EC) の変化についてFig. 4に示した。ECはすべてのアデニンヌクレオチド

Values are mean $\pm$ SD for n=3.

Fig. 3 Changes in NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH of water convolvulus stored at 1°C (●) and 20°C (○)

Values are mean $\pm$ SD for n=3.

*Energy charge = $\{(\text{ADP} + 2(\text{ATP})) / \{(\text{AMP}) + (\text{ADP}) + (\text{ATP})\}\}$

Fig. 4 Changes in energy charge* of water convolvulus stored at 1°C (●) and 20°C (○)

がATPであるならば1であり、AMPであれば0となる。また、ECは細胞内のエネルギー状態を示すとされ、一般に、正常な状態ならばECは約0.85で、タバコでは葉の老化と共に減少すると報告されている^{11),15),18)}。ヨウサイでは褐変の発生しない20℃区では貯蔵中はほぼ0.8付近でエネルギー的に高い状態であったが、1℃区では障害の発生と共に減少したことから、対照区に比べ低温下でかなりのエネルギー消費が行われるものと思われる。

3. 酵素活性の変化

ヨウサイにおいてはFig. 1およびFig. 2に示したように、過酸化水素やTBA値で示した過酸化物は低温区で障害発生前にいったん増加後減少した。正常な状態ならば生体内において過酸化物が増えると、アスコルビン酸ペルオキシダーゼやカタラーゼなどの酵素やアスコルビン酸やトコフェロールなどの還元性物質が働き消去される²⁰⁾。そこで過酸化物の消去に関与する数種酵素活性について調べた。

Fig. 5 (A) に示したように褐変基質を酸化し褐変物質を生成するPPO活性は、両温度区とも増加後減少したが低温下でその程度が高かった。

ペルオキシダーゼ活性は様々な電子供与体から電子を受け取り、直接過酸化水素を分解し、またPPOと同様に褐変物質をも生成する酵素である。ハウレンソウにおいては1℃区に比べ25℃区で、高い活性を示し、黄化に伴い低下した¹³⁾。Fig. 5 (B) に示したようにヨウサイにおいても同様に1℃区は20℃区に比べ貯蔵中活性が少なく、低温障害との関連性は見い出せなかった。

Values are mean $\pm$ SD for n=3.

*unit=0.01 Δ OD/min.

Fig. 5 Changes in enzyme activities of water convolvulus stored at 1°C (●) and 20°C (○)

Values are mean $\pm$ SD for n=3.

還元型 AsA を特異的に電子供与体とする AsA ペルオキシダーゼは Fig. 5 (C) のように両温度区ともに増加後減少したが、その程度は 1°C 区で大きかった。

過酸化水素を水に分解するカタラーゼ活性は Fig. 5 (D) に示したように両区とも増加したが低温区では障害発生前の貯蔵 2 日に急増した。

以上、ヨウサイの褐変現象について、低温下における過酸化物質の変化やフェノール物質の酸化に関連する酵素活性を調べた。植物組織は低温にさらされても、活性酸素の発生による酸化ストレスや酸化還元バランスの崩れなどが起こるものの^{7),21),22)}、AsA ペルオキシダーゼやカタラーゼなどが働くならばこれらの消去機構が機能するために組織の機能障害は回避される。ヨウサイにおいて、細胞内のエネルギー状態を EC で示したところ 20°C 区より 1°C 区では低かった。また、細胞の酸化還元状態の指標として NAD⁺/NADH 比や NADP⁺/NADPH 比を調べたところ、NADP⁺/NADPH 比の低温による影響は明らかではなかったものの NAD⁺/NADH 比は 1°C 区で増加したことから、20°C 区に比べ 1°C 区において細胞内は酸化側に傾いていると推察された。一方低温貯蔵中、ペルオキシダーゼ活性への影響は明らかではなかったが、AsA ペルオキシダーゼとカタラーゼ活性が 1°C 区で障害発生前にいったん増加し、過酸化物質による酸化ストレスが機能障害となるのを回避すべく機能しているはずである。しかし、TBA 値や過酸化水素含量が 20°C 区は徐々に減少したのに対し 1°C 区

ではいったん増加後減少したことから、低温にある一定時間さらされると、まず、活性酸素や過酸化脂質等の増加が始まると推測される。さらに細胞のコンパートメンテーションの破壊、クロロプラストの崩壊やトノプラストの陥入²³⁾などにより膜酵素系の変化が誘導され、組織の機能障害が生じ、その結果ポリフェノールオキシダーゼなどの酸化酵素が働くと、褐変基質であるクロロゲン酸の酸化⁵⁾、キノンの蓄積が進展し褐変現象が発現するものと思われた。

要 約

- ① ヨウサイにおいて、低温下で障害発生前に TBA 値がいったん増加し減少したのは、生体膜脂質が酸化されることによるものと推測された。一方、生体内の酸化反応の結果生成される過酸化水素も同様の傾向を示した。
- ② NAD⁺/NADH 比は貯蔵中を通じて 20°C 区よりも 1°C 区で高かった。NADP⁺/NADPH 比は両区とも減少した。EC は 20°C 区で貯蔵中 0.8 付近を示し、エネルギー的に高い状態であったが、1°C 区では障害発生前に減少した。
- ③ ペルオキシダーゼ活性は 1°C 区で 20°C 区より低い値を示したが、AsA ペルオキシダーゼおよびカタラーゼ活性は 1°C 区で障害発生前に増加したもののその後減少した。一方、PPO 活性は 20°C 区より 1°C 区で高い活性を示した。

謝 辞

本研究を行うにあたり、実験にご協力いただきました玉置晴代さんに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 平田貴美子・茶珍和雄・岩田 隆：日食工誌, **34**, 566 (1987)
- 2) 於勢貴美子・茶珍和雄・岩田 隆：日食保蔵誌, **24**, 315 (1998)
- 3) 浅田浩二・中野 稔・柿沼カツ子編：活性酸素測定マニュアル (講談社, 東京), p. 5 (1993)
- 4) 金田尚志・植田信夫編：過酸化脂質実験法 (医歯薬出版, 東京), p. 85 (1983)
- 5) 寺尾純二：食品工業, 37 (1992)
- 6) 並木満夫・松下雪郎編：食品の品質と成分間反応 (講談社, 東京), p. 197 (1990)
- 7) 遠藤 剛・浅田浩二：食品工業, 20 (1992)
- 8) STEWART, R. R. C. and BEWLEY, J. D.: *Plant. Physiol.*, **65**, 245 (1980)
- 9) THOMAS, B. and FRENKEL, C.: *Plant Physiol.*, **59**, 411 (1977)
- 10) TAJIMA, S. and KOUZAI, K.: *Plant Cell Physiol.*, **30**, 589 (1989)
- 11) MEYER, R. and WAGNER, K. G.: *Physiol. Plant.*, **67**, 666 (1986)
- 12) BEERS, R. F. Jr. and SIZER, I. W.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 133 (1952)
- 13) YAMAUCHI, N., Iida, S., MINAMIDE, T. and IWATA, T.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **32**, 814 (1985)
- 14) BRADFORD, M. M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
- 15) 今堀和友・山川民夫：生化学辞典 (東京化学同人, 東京), p. 181 (1984)
- 16) HAYAT, M. A.: *Electron Microscopy of Enzymes Vol. 2* (VAN NOSTRAND REINHOLD Com., NY), p. 66 (1974)
- 17) 宮地重遠・田中市郎・加藤 栄編：葉緑体 (理工学社, 東京), p. 83 (1980)
- 18) 宮地重遠編：代謝 (朝倉書店, 東京), p. 55 (1992)
- 19) 平田貴美子・茶珍和雄・岩田 隆：園学雑, **55**, 516 (1987)
- 20) 岡田 正・武藤輝一・高久史磨・武藤泰敏・田中武彦・弓狩康三編：臨床栄養の進歩 (光生館, 東京), p. 72 (1992)
- 21) SPYCHALLA, J. P. and DESBOROUGH, S. L.: *Plant Physiol.*, **94**, 1214 (1990)
- 22) 重岡 成：食品加工技術, **13**, 359 (1993)
- 23) 於勢 (平田) 貴美子・茶珍和雄・岩田 隆：園学雑, **59**, 171 (1990)

(平成11年12月3日受付, 平成12年5月29日受理)