キュウリ果実の低温障害とミトコンドリアの酵素活性との関係¹

山脇和樹・山内直樹・茶珍和雄・岩田 隆

大阪府立大学農学部 591 堺市百舌鳥梅町4丁 804

Relationship of Mitochondrial Enzyme Activity to Chilling Injury of Cucumber Fruit

Kazuki YAMAWAKI, Naoki YAMAUCHI, Kazuo CHACHIN
and Takashi IWATA

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591

Summary

For clarifying the process of chilling injury in cucumber fruit, organelles were isolated by means of sucrose density gradient centrifugation, and the profiles of distribution of activities of marker enzymes, especially in mitochondria, on the sucrose density gradient were analyzed. The fruit packed with perforated polyethylene bag was stored at 1°C and 15°C. Pitting on the surface of the fruit, a visible symptom of chilling injury, was observed after 5 days of storage at 1°C, whereas in the fruit stored at 15°C, sound appearances were kept for more than 7 days. The fruit stored at 1°C for 3 days was healthy, and even after transferred to 15°C no pitting injury developed. The rate of K⁺ ion leakage into desalted water from the section prepared from the fruit stored at 1°C increased linearly as storage time increased, indicating that an increase of membrane permeability may occur preceding the development of pitting.

The activities of cytochrome c oxidase located in inner membrane of mitochondria and malate dehydrogenase located in matrix decreased before the development of pitting. This suggests that the lowering of the function of mitochondria took place at low temperature before the occurrence of visible symptom of injury. When the fruit was transferred to 15°C at early stage of low temperature storage (3 days at 1°C), a recovery of the enzyme activities was recognized.

The activity of NADH cytochrome c reductase located in outer membrane of mitochondria increased soon during the storage at 1°C, and broadening of distribution of this enzyme on sucrose density gradient was observed with the fruit which exhibited pitting injury, while the activity of the enzyme taken from the fruit stored at 15°C decreased during the storage.

緒 言

キュウリ果実は、約7°C以下の温度で冷蔵された場合、低温障害を受ける(15)。キュウリ果実の低温障害については、かなり以前から調べられているが(14)、最近では Fukushima ら(4)が一連の研究で、低温によって細胞壁が硬化し、原形質分離や細胞破壊へと導かれるという障害発生機構を提出している。また辰巳・邨田(19, 20)や辰巳ら(21)は、膜透過性の変化その他の研究から、Lyons (13) のいう膜脂質の相転換が、ウリ科果

実の低温障害発生の重要な要因であるとしている。また細胞内顆粒のレベルで生理的障害発生の機構をみようとする試みもあり、山木(24)は、サツマイモ塊根の低温障害において、低温下でミトコンドリアの膜の構造が変化することによって呼吸活性が減少し、組織が崩壊していくと述べ、阿部・緒方(1)はナス果実において、低温障害の発生に伴って、ミトコンドリアの膨潤など、細胞内の微細構造が変化することを電顕観察で認めている。キュウリ果実についてこの種の関係を調べた報告はみられないようである。

¹ 1983年4月14日 受理

本研究では、キュウリ果実を用い、密度こう配遠心分離法で細胞内顆粒を分離し、各顆粒の標識となる酵素活性を測定し、それら顆粒の形態的、機能的変化を調べ、低温障害との関係を見いだそうとした。特に細胞内において生命活動に重要な役割を持ち、種々の植物組織において低温下で機能的、あるいは形態的变化が報告されているミトコンドリアを中心に検討を行った。なお、低温障害に伴う顕著な変化の一つとして、生体膜の透過性が増大することがキュウリ果実やその他の材料について報告されている(9, 20, 21)ので、本研究でも低温障害進展の状況を示す内的な指標として、組織からの K^+ イオン漏出量を測定した。

材料及び方法

キュウリ果実‘北進’は、大阪府千早赤阪村の農家で温室抑制栽培された果重 95 ± 10 g のものを実験に供した。果実は $55 \text{ cm} \times 25 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$ のトレイに入れて貯蔵したが、トレイ内の底及び果実の上には新聞紙を置き、さらに直径約 7 mm の孔を片面につき 4 個開けたポリエチレン袋(厚さ 0.03 mm, $44 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$)で全体を包装した。 K^+ イオン漏出量の測定及び細胞内顆粒の調製には、1 測定当たり 3 本の果実から、果実中央部の種子を含む部分を除き、果皮を含む果肉部を用いた。

K^+ イオン漏出量は、上記果肉部から厚さ約 1 mm, 重量約 0.1 g の切片を調製し、脱塩水中に 30 分間静置して洗浄後、数回脱塩水ですすぎ、水気を取り、2 g を秤量した。これを 20 ml の脱塩水中に入れ、 30°C で穏やかに振とうし、2 時間後、漏出した K^+ イオンを蛍光光度計で測定し、試料中に含まれる K^+ イオン総量に対する割合(%)で表した。

細胞内顆粒の調製は Parish の方法(16)にはほぼ準じ、0.5 M ソルビトール、2.5% フィコール、1 mM EDTA、1 mM システインを含む 50 mM トリシン緩衝液(pH 7.5)を用いた。試料を、その 2 倍容の上記抽出液中で、目の細かいステンレス鋼製おろしがねを用いてすりおろし、摩砕物は、2 層のミラクロスで細胞壁や未破壊の組織などをろ別した。ろ液は、10,000g、20 分の遠心分離を行って沈でんを得、これをシステインを含まない抽出液に穏やかに懸濁させ、次記の密度こう配遠心分離の試料とした。

密度こう配は、2.5% フィコール、1 mM EDTA、5 mM トリシン緩衝液(pH 7.5)を含む Sho 糖液によって、13 ml 容の遠心管内に、80% (w/v) 1 ml, 65% (w/v) ~ 20% (w/v) の連続こう配 10 ml を作成した。この上に、10,000g、20 分の遠心分離で得た細胞内顆粒の懸濁液 1.5 ml を重層し、MSE 製 ss 75 超遠心分離機を

用い、水平ローターで 25,000 rpm (平均 80,000g)、3 時間の遠心処理を 4°C で行った。この後、密度こう配液はぜん動ポンプで遠心管の底から吸い上げ、14 滴(約 0.5 ml) ずつのフラクションに分けた。

各フラクションについては、細胞内顆粒の標識酵素活性などの測定を行った。チトクロム C 酸化酵素(ミトコンドリア内膜に局在)は、還元型チトクロム C の酸化を 550 nm の吸光値の減少で測定した(18)。リンゴ酸脱水素酵素(主にミトコンドリアのマトリックスに局在)は、オキザロ酢酸を基質にして補酵素 NADH の酸化を 340 nm の吸光値の減少で測定した(22)。NADH チトクロム C 還元酵素(ミトコンドリア外膜及び小胞体に局在)は、KCN 及び NADH 存在下で酸化型チトクロム C の還元を 550 nm の吸光値の増加で測定した(5)。カタラーゼ(ペルオキシゾームに局在)は、 H_2O_2 の減少を 240 nm の吸光値の減少で測定した(8)。以上の酵素活性は、 25°C で吸光値が 0.01 変化する強さを 1 unit として表した。タンパク量は、Lowry らの方法(10)によった。比重は屈折糖度計示度を Sho 糖液の比重に換算して求めた。

結果及び考察

1. K^+ イオン漏出量

辰巳・邨田(19, 20)は、キュウリ果実の 0°C 及び 5°C 下の貯蔵において、低温障害の発生に伴って K^+ イオン及び電解質の漏出量が急増することを報告している。本実験においては 1°C 及び 15°C に貯蔵した果実につき、 K^+ イオン漏出量の変化を調べた(第1図)。

Fig. 1. Changes in the rate of K^+ leakage from the cucumber fruit flesh sections into desalted water during storage at 1 and 15°C .

○—○: stored at 1°C and leaked into water at 30°C .

●—●: stored at 1°C and leaked into water at 1°C .

×—×: stored at 15°C and leaked into water at 30°C .

1°C 貯蔵果では、1日後より全貯蔵期間を通じてほぼ直線的に漏出量が増大した。ピッチングの症状は4日後ごろから認められるようになったが、特にこの時期に漏出量が急増することではなく、その点では辰巳・邨田の報告と相違した。すなわち、本実験の結果からみると、1°C では直ちに膜透過性に変化が生じるのであって、ピッチングが発生した結果ではないことが明らかであった。15°C 貯蔵果でも貯蔵期間中に増大する傾向がみられたが、1°C に比べると極めて低いレベルであった。これらはサツマイモで報告された傾向と一致する(9)。

以上は1°C及び15°C貯蔵果とも、30°Cの水中で測定した結果であるが、他に1°C貯蔵果の切片を1°Cの水中で漏出量を測定することを行った。その結果も第1図に示したが、15°C貯蔵果の切片を30°C水の中で測定したものよりは多少上回る増大を示したものの、1°C貯蔵果の30°C水中での測定値に比べると極めて低い値となった。1°C貯蔵果の、1°C及び30°C測定の差は、水温の差による拡散速度の相違から生じたところが多少あるとしても、主な原因ではない。このことは、貯蔵開始時(図の0日)において、1°C及び30°Cの間にほとんど差のないこと、並びに1°C貯蔵日数が進むにつれて両測定値の差が拡散速度で説明できないほど大きくなったことから明らかである。したがって、この結果は、低温において、いったん異常な変化(膜透過性の増大)を生じたものを、高温に移すとその変化が急速に進展する現象と解することができる。低温耐性の小さい青果物を低温においた後に室温に移すと、低温障害の症状が急速に現れることはよく知られており、キュウリについても同じような現象が認められている(3)。膜透過性における上記の変化は、このような現象に通ずるものと思われる。

2. 細胞内顆粒の密度こう配遠心分離後の標識酵素活性の分布パターン

青果物の低温障害に伴う細胞内顆粒の形態的、生化学的变化についてはいくつかの報告がみられる。ミトコンドリアに関しては、Lyonsら(11)、及びLyons and Raison(12)による呼吸活性(コハク酸酸化)と温度との関係についての研究があり、低温障害感受性植物のミトコンドリアの酵素では、障害の発生する限界温度に近い温度以下で、活性化エネルギーが高くなることを報告している。また、山木(24)はサツマイモのミトコンドリアについての研究から、ミトコンドリア膜を構成するリン脂質の相変化と膜タンパク質の立体構造の変化に始まる低温障害進展の機構を考察した。トマト子葉ではIlker(6)が、低温処理2時間ではプラスチドとミトコンドリアの微細構造に変化を生じることを観察している。

Fig. 2. The distribution profiles of marker enzyme activities on sucrose gradient (65% w/v~20% w/v) after centrifugation (25,000 rpm, 4°C, 3 h) of crude particles, which were prepared from cucumber fruit immediately after harvest. Crude particles had been sedimented at 10,000 g for 20 minutes from pulp homogenate in 50 mM tricine buffer (pH 7.5) containing 0.5 M sorbitol, 2.5% Ficoll, 1 mM EDTA, and 1 mM cysteine.

Fig. 3. The distribution profiles of marker enzyme activities on sucrose gradient (65% w/v~20% w/v) after centrifugation (25,000 rpm, 4°C, 3 h) of crude particles, which were prepared from cucumber fruit stored at 1°C for 3 days.

本実験は、細胞内顆粒を密度こう配遠心分離し、その中で標識酵素活性の分布状態から、顆粒の機能の変化及び低温耐性を知らうとしたもので、ここでは特にミトコンドリアに注目し、内膜、外膜及びマトリックスに局在する酵素を中心に調べた。

なお、本実験での障害発生状況は、1°C貯蔵では5日後にピッチングが観察された。対照区の15°C貯蔵区では貯蔵7日後でも新鮮な外観を保っていた。また変温区として、まだピッチングがみられない1°C3日後に15°Cに移す区を設けたが、この区では15°Cに移して4日後、外観の変化はほとんどみられなかった。

Fig. 4. The distribution profiles of marker enzyme activities on sucrose gradient (65% w/v~20% w/v) after centrifugation (25,000 rpm, 4°C, 3 h) of crude particles, which were prepared from cucumber fruit stored at 1°C for 7 days.

貯蔵開始時の標識酵素活性の分布は、第2図のようになった。ミトコンドリア内膜にあるチトクロムC酸化酵素、マトリックスにあるリンゴ酸脱水素酵素、及び外膜と小胞体に存在するNADHチトクロムC還元酵素は、コフラクションNo.13付近にピークをもち、ここにミトコンドリアが分離されていることがわかる。なお、NADHチトクロムC還元酵素活性の大半は、10,000g遠心分離の上澄液にあり（データ省略）、また小胞体の大部分は上澄液に残っていた。すなわち、ここで密度こう配遠心分離に用いた10,000gの沈でんには、ミトコンドリアと一部の小胞体が含まれていたことになる。したがって、フラクションNo.23~24にみられるピークは小胞体の一部と思われるが、この消長については言及しないこととする。また、ペルオキシゾームの存在はカタラーゼ活性の分布で示されるが、フラクションNo.5付近、並びにそれよりも小さい密度の区分にもかなりのカタラーゼ活性がみられ、ミトコンドリアのように単一な酵素活性のピークを示さなかった。これはペルオキシゾームの比重が不ぞろいなのか、遠心分離の時間あるいは回転数の不足で十分に密度こう配を移動しなかったのか検討の余地はあるが、貯蔵に伴う一定の傾向はみられなかった。

1°C3日貯蔵果から調製したものでは、チトクロムC酸化酵素及びリンゴ酸脱水素酵素の活性は貯蔵前より低下した（第3図）。これに対して、ミトコンドリア外膜に存在するNADHチトクロムC還元酵素活性は、貯蔵開始時より若干増加した。しかし、これら3種の酵素の分布パターンは貯蔵開始時とほぼ同様であり、いずれもミトコンドリアに局在している形に変わりはないと思われ

Fig. 5. The distribution profiles of marker enzyme activities on sucrose gradient (65% w/v~20% w/v) after centrifugation (25,000 rpm, 4°C, 3 h) of crude particles, which were prepared from cucumber fruit stored at 1°C for 3 days and after then held at 15°C 4 days.

Fig. 6. The distribution profiles of marker enzyme activities on sucrose gradient (65% w/v~20% w/v) after centrifugation (25,000 rpm, 4°C, 3 h) of crude particles, which were prepared from cucumber fruit stored at 15°C for 7 days.

た。

1°C7日貯蔵果では、すでに低温障害が発生していたが、チトクロムC酸化酵素及びリンゴ酸脱水素酵素は1°C3日のものとあまり差がなかった（第4図）。しかし、NADHチトクロムC還元酵素活性の分布には大きな変化がみられ、1°C3日のものに比べ、より重い区分及び軽い区分の両方にわたり広がったパターンとなった。

低温障害の症状がまだみられない1°C3日貯蔵果を、その後15°Cに4日保持した果実中では、チトクロムC酸化酵素及びリンゴ酸脱水素酵素は1°C3日当時より活性が増大し、貯蔵開始時に近い活性の回復がみられ、分布パターンも正常であった（第5図）。しかし、NADH

チトクロムC還元酵素は、1°C 3日貯蔵のものに比べ、ミトコンドリア相当区分における活性が著しく低下し、明確なピークを作らなかった。

当初から15°Cに7日貯蔵したものでは、NADHチトクロムC還元酵素のミトコンドリアにおける局在性はほとんどみられず、むしろフラクション No. 18 付近の、より軽い区分でやや高い活性を示した(第6図)。チトクロムC酸化酵素及びリンゴ酸脱水素酵素活性の分布パターンは、貯蔵前に比べて大きな違いはなかった。

以上のように、貯蔵温度がミトコンドリアの酵素活性に及ぼす影響についてみると、内膜及びマトリックスに存在するチトクロムC酸化酵素及びリンゴ酸脱水素酵素は、低温下では目に見える障害が現れる前に活性が低下し、障害発生によって特に変わることはなかった。このことは、低温下でのミトコンドリアの機能的な変調は低温障害(ピッチング)発生前に起こるもので、障害発生の結果として機能低下が促進されるものではないことを示唆する。

ミトコンドリア外膜に存在するNADHチトクロムC還元酵素は、1°C貯蔵では活性が低下することなく、むしろ増加の傾向にあったが、15°C貯蔵中では、ミトコンドリアにおける局在性がみられなくなる傾向が認められた。ジャガイモ塊茎では、傷をつけたり、切片にするとミトコンドリアのNADHチトクロムC還元酵素の活性が増加することが認められている(2, 23)。キュウリ果実の場合は、異常な低温によるストレスがジャガイモの傷害に相当する引き金となって酵素活性が増加したものと思われる。NADHチトクロムC還元酵素は、一般には脂肪酸の不飽和化に関与するとされている(23)。合目的なみかたをすると、低温におかれた植物体はNADHチトクロムC還元酵素を活性化して脂肪酸の不飽和度を増大し、脂質の相転換を起こり難くすることで低温耐性を獲得する態勢を作るものと考えられる。岩田ら(7)は、ウメ果実に収穫直後短時間の急冷(0°C)処理を施すと、膜の脂肪酸組成において不飽和脂肪酸の割合が増し、その後の6°C貯蔵における低温耐性が増大することを報告している。一方、15°Cにおかれて低温ストレスが与えられないと、NADHチトクロムC還元酵素は活性が次第に失われていくものと思われる。傷害ジャガイモ塊茎においても、傷害によって増加したこの酵素の活性が、治癒に伴って消失していくという現象が観察されている(2)。ただし、ジャガイモのミトコンドリアにおいては、脂肪酸を不飽和化するデサチュラーゼ活性は見いだせず、NADHチトクロムC還元酵素はミトコンドリア外膜においては脂肪酸の不飽和化に関与しないとされて

いるので(23)、これらについては、なお詳細な検討を必要とする。いずれにしても、キュウリ果実のミトコンドリアにおいては、外膜に局在するNADHチトクロムC還元酵素は、低温ストレスの有無によって活性の消長がみられるようである。

1°Cに7日貯蔵し、低温障害の現れたものでは、NADHチトクロムC還元酵素の分布が広がり、貯蔵開始時あるいは1°C3日貯蔵時にみられるような、内膜及びマトリックスの酵素と一致するパターンが崩れた。これについては、まず低温におけるミトコンドリア外膜の破壊が考えられる。しかし、ミトコンドリア外膜小胞の比重は小さく(17)、恐らく密度こう配中のミトコンドリア区分付近に分離されることはないと思われる。したがってこの現象については、ミトコンドリア以外の細胞内顆粒、例えばクロロプラストなどにミトコンドリアから遊離した外膜小胞が付着し、これらが密度こう配中に分離された可能性が考えられる。

摘 要

キュウリ果実の低温障害の発生機構を細胞内顆粒のレベルで解明する目的で、ショ糖密度こう配遠心分離法によって細胞内顆粒を分離し、密度こう配中での顆粒標識酵素活性の分布パターンを調べた。ここでは、特にミトコンドリアの酵素を中心に低温障害との関係を考察した。貯蔵は果実を有孔ポリエチレン袋詰とし、1°Cあるいは15°Cに保った。

1. 低温障害の症状としては、ピッチングが1°C貯蔵5日ごろから認められた。1°C3日では外観は健全であり、これを15°Cに移しても明確な症状は現れなかった。15°Cでは7日後も健全な外観であった。
2. 低温障害に伴う内的異常を示す指標として、膜透過性の変化をみるため、キュウリ果肉切片からのK⁺イオン漏出速度を測定した。1°Cでは直ちにK⁺イオン漏出速度が増大し始め、ピッチング発生に先立って膜透過性の増大が進展すると思われた。15°C貯蔵果ではほとんど変化がなかった。
3. 1°Cに貯蔵したキュウリ果実のミトコンドリアのチトクロムC酸化酵素とリンゴ酸脱水素酵素の活性は、ピッチング発生に先立って低下した。すなわち、低温によるミトコンドリアの機能低下が障害発生前に起こったと考えられる。早期(1°C3日)に昇温すると、この活性の低下は回復した。
4. ミトコンドリアのNADHチトクロムC還元酵素は、1°C貯蔵で活性が増大し、ピッチング発生果ではショ糖密度こう配中での分布が広がった。15°C貯蔵果では活性が低下した。

引用文献

1. 阿部一博・緒方邦安. 1978. ナス果実の低温障害に関する研究(第4報) 障害の進展に伴う細胞の微細構造の変化. 園学雑. 46: 541—547.
2. DIZENGREMEL, P., J. C. KADER, P. MAZLIAK and C. LANCE. 1978. Electron transport and fatty acid synthesis in microsomes and outer mitochondrial membranes of plant tissues. *Plant Sci. Lett.* 11: 151—157.
3. EAKS, I. L. and L. L. MORRIS. 1957. Deterioration of cucumbers at chilling and non-chilling temperatures. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 69: 388—399.
4. FUKUSHIMA, T., M. YAMAZAKI and T. ODAZIMA. 1977. Chilling-injury in cucumber fruits. III. Dynamic changes of osmotic quantities and the importance of cell wall rigidity. *Scientia Hortic.* 6: 311—321.
5. HENDRIKS, T. 1977. Multiple location of K-ATPase in maize coleoptiles. *Plant Sci. Lett.* 9: 351—363.
6. ILKER, R. 1979. Sequence of ultrastructural changes in tomato cotyledons during short period of chilling. p. 97—113. In: J. M. LYONS, D. GRAHAM and J. K. RAISON (eds.) *Low temperature stress in crop plant*. Academic Press.
7. 岩田 隆・藤井雅弘・南出隆久・上田悦範. 1982. 低温ショックがウメ果実の低温障害, 膜透過性および膜構成脂肪酸に及ぼす影響. 園学要旨. 昭57春: 414—415.
8. 木佐木卓郎. 1976. パーオキシゾーム, 植物酵素・蛋白質研究法(蛋白質・核酸・酵素, 別冊) p. 100—108.
9. LIEBERMAN, M., C. C. CRAFT, W. V. AUDIA and M. S. WILCOX. 1958. Biochemical studies of chilling injury in sweet potatoes. *Plant Physiol.* 33: 307—311.
10. LOWRY, W. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265—275.
11. LYONS, J. M., T. A. WHEATON and H. K. PRATT. 1964. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiol.* 39: 262—268.
12. LYONS, J. M. and J. K. RAISON. 1970. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* 45: 386—389.
13. LYONS, J. M. 1973. Chilling injury in plant. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 445—466.
14. MORRIS, L. L. and H. PLATENIUS. 1939. Low temperature injury to certain vegetables after harvest. *Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 36: 609—613.
15. 邨田卓夫. 1977. 青果物の市場病害. 生理障害, 緒方邦安編. 青果保蔵汎論 p. 260—277.
16. PARISH, R. W. 1971. The isolation of peroxisomes, mitochondria and chloroplasts from leaves of spinach beet. *J. Biol.* 22: 423—429.
17. QUAIL, P. H. 1979. Plant cell fractionation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 425—484.
18. ROCHA, V. and I. P. TING. 1970. Preparation of cellular plant organelles from spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 140: 398—407.
19. 辰巳保夫・邨田卓夫. 1978. 青果物の低温障害に関する研究(第1報) キュウリ果実の低温障害と生体膜の変性について. 園学雑. 47: 105—110.
20. 辰巳保夫・邨田卓夫. 1981. ウリ科果実の低温耐性と組織の膜透過性との関係について. 園学雑. 50: 108—113.
21. 辰巳保夫・岩本光弘・邨田卓夫. 1981. ウリ科果実の低温障害と果実組織切片からのイオン漏出について. 園学雑. 50: 114—119.
22. TING, I. P. 1968. Malic dehydrogenases in corn root tips. *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 1—7.
23. VAN DER PLAS, L. H. W., P. A. JOBSE and J. D. VERLER. 1976. Cytochrome c dependent, antimycin-A resistant respiration in mitochondria from potato tuber. Influence of wounding and storage time on outer membrane NADH-cytochrome c reductase. *Biochem. Biophys. Acta.* 430: 1—12.
24. 山本昭平. 1975. 植物低温障害の発生機構. 化学と生物. 13: 62—67.