In vivo におけるバナナ (*Musa sapientum* L.) 果実のエチレン誘導 クロロフィル分解に関する研究

馬 旭偉・池田妃美子・門畑かおり・下川敬之

宮崎大学農学部 889-21 宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 番地

In vivo Studies on Ethylene-Enhanced Chlorophyll Degradation in Banana (*Musa sapientum* L.) Fruits

Xu-Wei Ma, Kimiko Ikeda, Kaori Kadohata and Keishi Shimokawa

Faculty of Agriculture, Miyazaki University Miyazaki 889-21

Summary

Ethylene-enhanced chlorophyll degradation in the peel of banana fruits (*Musa sapientum* L.) was measured *in vivo*, with a Minolta chromometer. N, N-Dimethylformamide was used for chlorophyll extraction from peel slices. $(L+b)/2+a$ value is useful as a color index during degreening, based on the high correlation coefficients between extracted chlorophyll concentration and Hunter's color index.

The ethylene-enhanced chlorophyll degradation *in vivo* is inhibited by 2, 2'-bipyridyl, 1, 10-phenanthroline, bathophenanthroline disulfonic acid, NaN_3 and ascorbate, but not by N-ethylmaleimide, DIECA, dithiothreitol, monoiodoacetate and KCN. PCMB, EDTA, Tiron and hydroquinone had a weak inhibitory effect.

The possible *in vivo* participation of Fe^{2+} (Fe^{3+}) and O_2 (O_2^-) requiring enzyme as a key system in the chlorophyll degradation process is discussed.

緒 言

クロロフィルは植物界で最も分布の広い色素で、高等植物にとって基本的な物質であり、生命維持にはなくてはならない重要なものである。現在、地球上では毎年 10 億トンものクロロフィルが無色物質に分解されているといわれている (Hendry ら, 1987)。クロロフィル分解に関する研究は近年、急速な進展を見せているものの、まだ明らかとなっていない点が多い。そうした研究の多くは *in vitro* の実験系で行われており、生体内での反応を対象とした *in vivo* の実験系で行われたものは少ない。著者らはこれまでの研究で、*in vitro* および *in vivo* におけるウンシュウミカン果実を対象としてエチレン誘導クロロフィル分解 (脱緑) 機構を明らかにしてきた (Shimokawa ら, 1978, 1990; 下川, 1994; 下川ら, 1994; 柳迫ら, 1994; 田部ら, 1996)。

代表的な呼吸のクライマクテリックライズを示すバ

ナナ果実はエチレン処理によって成熟が促進され、その成熟の促進には急激な果色の変化つまりクロロフィル分解も含まれる。しかしながら、そのエチレン誘導クロロフィル分解機構についてはまだ明らかになっていない。著者らはこのクロロフィル分解機構を明らかにするため、色彩色差計で果皮表面の L , a , b を測定するとともに、測定部位の果皮切片からの N, N-Dimethylformamide (DMF) 抽出によるクロロフィル測定を同時に行い、両測定法の比較検討を行った。さらにクロロフィル分解を阻害すると思われる試薬を用いて脱緑に対する影響を *in vivo* で検討した。

材料および方法

1. 材 料

材料としては宮崎市中央市場バナナ株式会社から購入したエチレン未処理の緑バナナ (*Musa sapientum* L., フィリピン産) 果実を使用した。なお、採取した果実には外観上傷のない、色のそろったものを選んだ。また、実験前に表面の汚れを軽く拭き取った。

1995 年 12 月 8 日 受付. 1996 年 6 月 7 日 受理.

2. 方 法

1) DMF抽出によるクロロフィル含量の測定

バナナ果実は3個体を1区として1個体につき2ヶ所、合計6ヶ所を測定に適する中央部分を選んだ。次に果実は約200 ppmのエチレンで処理後、16時間目から12時間ごとに76時間目までの果色の測定を色彩色差計(MINOLTA CR-200)によって行い、測定結果はLab表色系で表した。次に、直径11 mmのコルクボーラーでエチレン処理したバナナ果実1本につき中央部分から2個果皮切片を取り、1区として3本を使い、合計6個の切片を10 ml スクリューバイアルに入れ、5 ml のDMFを加え、密封・避光状態で冷蔵庫(4℃)に入れ、振とう器で横振とうしながら12時間ごとに新しい5 ml のDMFを加えて放置し、60時間目まで同じ切片から合計5回色素を抽出した。毎回のDMF抽出液を0.5 μ m カラムカート(LCR 13, ミリポア)でろ過し、分光光度計(島津, UV-2200 A)を用いて664.5 nm, 647nmの吸光度を測定し、次のInskeepらの式(Inskeep・Bloom, 1985)に代入し、抽出毎にクロロフィル量を計算し、クロロフィル量は5回抽出分を合計して表した。このような操作を処理前からエチレン処理後まで経時的に行い、クロロフィル含量の変化を追跡した。

$$\text{クロロフィル } a = 12.70 A_{664.5} - 2.79 A_{647}$$

$$\text{クロロフィル } b = 20.70 A_{647} - 4.62 A_{664.5}$$

$$\text{全クロロフィル} = 17.90 A_{647} - 8.08 A_{664.5}$$

2) クロロフィル分解に対する阻害剤の影響

果実は用意しておいた試薬(10⁻²M水溶液, pHの範囲は6.0~7.0)に浸漬し、30分間室温に放置した。なお、KCNについては注意深くpHを調整した。また、これらの溶液には0.02% TritonX-100を界面活性剤として加え、試薬が果皮に均一に展着されるようにした。Controlについては、蒸留水に0.02% TritonX-100を入れ、それに浸すことで条件を同じにした。30分経過後、果実を取り出し風乾した後、容器内が約200 ppmになるようにエチレンを封入し、16時間、密封状態でエチレン処理を行った。エチレン無処理区については、エチレン処理区と同じ容器に16時間密封状態にすることで対照区とした。処理中の果実は暗黒下、25℃の室内中に放置し、処理終了後は容器から取り出し果色の測定が終了するまで同室に続けて放置した。果色の測定は処理前と処理後16時

間目から12時間ごとに88時間目まで色彩色差計(MINOLTA CR-200)によって行い、測定結果はLab表色系で表した。

3. 試薬および主な作用

- Hydroquinone (還元剤, ラジカル消去剤)
- N-Ethylmaleimide (チオール基やアミノ基のアルキル化試薬)
- Ethylenediaminetetraacetate Na (EDTA, 金属との錯体形成)
- 2, 2'-Bipyridyl (Fe²⁺のキレート剤)
- 1, 10-Phenanthroline (Fe²⁺のキレート剤)
- Tiron (O₂⁻の消去剤, Fe³⁺のキレート剤)
- Bathophenanthroline disulfonic acid (Fe²⁺のキレート剤)
- Diethyldithiocarbamate Na (DIECA, Cu²⁺のキレート剤)
- Monoiodoacetate Na (SH試薬, SH基の修飾)
- Dithiothreitol (SH基保護剤)
- L-Ascorbate Na (ラジカル消去剤, 還元剤)
- p-Chloromercuribenzoate Na (PCMB, SH酵素の阻害剤)
- Potassium cyanide (KCN, ヘム鉄含有酵素の阻害剤)
- NaN₃ (電子伝達阻害剤)

結果および考察

1. クロロフィル含量に対するエチレン処理の影響

この実験は、ウンシュウミカン果実のエチレン処理による果色の変化を*in vivo*で調べるため使われるL, a, b法による式(L+b)/2+a(下川ら, 1994; 田部ら, 1996)の有用性をバナナ果皮でも検討するため行った。まず、エチレン処理を施したバナナ果皮の色を色彩計でL, a, bを測定し、次にその測定部位から切片をつくり、色素をDMFで抽出することによりクロロフィル含量を求めた。

第1図は無処理区のバナナ果実の果皮から色素をDMFで抽出し、全クロロフィルの含量を分光光度計(島津, UV-2200 A)を用いて経時的に測定し抽出効果を調べたものである。図に示すようにDMF抽出による全クロロフィルの抽出量は60時間目からはほぼ一定値になり、クロロフィルaとbの含量比がほぼ3:1になることから、全クロロフィルが60時間で抽出されたと判断した。また、抽出を、暗黒、密封、避光、12時間間隔、4℃で行うかぎり、クロロフィルの分解

Fig. 1. Time course of chlorophyll extraction with N, N-dimethylformamide from peel slices of ethylene-treated banana fruit. Total chlorophyll (—○—). Chlorophyll a (—□—). Chlorophyll b (—△—). Concentration of Chlorophylls represents the mean $\pm$ SD of five determinations.

等の問題はなかった。このことは、すでに Inskeep ら (1985), Moran (1982), Moran・Porath (1980) も明らかにしている。

エチレン処理後の各区バナナ果実における DMF 抽出によるクロロフィル量とクロロフィル a/b に対するエチレンの影響は第 2 図に示している。エチレン処理区が全クロロフィル量、クロロフィル a, b 量とも 28 時間後には有意に減少した。しかし、クロロフィル a が急速に減少すると同時にクロロフィル b は 40 時間目からはほぼ一定値になり、分解が進んでいないことが分かった。また、クロロフィル a/b は低くなり、エチレンの影響はクロロフィル a の分解量に強く表れている。この結果はウンシュウミカン果実の場合 (Shimokawa ら, 1978) とまったく逆になっており、バナナ果実におけるエチレン誘導クロロフィル分解は、エチレンにより誘導または促進される酵素により、クロロフィル a を優先的に分解し脱緑を促進することがわかる。

Fig. 2. Effects of ethylene treatment on concentration of total chlorophylls and chlorophyll a : b ratio. Concentration of chlorophylls represents the mean $\pm$ SD of ten determinations. Chlorophylls (—□—). Chlorophylls a : b (—■—).

2. クロロフィル含量とL, a, b 値との関係

1.の実験では、L, a, b 値の異なる果皮からクロロフィルを抽出しその含量を求めることができた。第3図はバナナ果実をエチレン処理後、色彩計を用いて得られたL, a, b 値と、その部位（果皮）から色素を抽出して求めたクロロフィル含量との関係をグラフにしたものである。その結果、エチレン処理により脱緑は進行し、この脱緑の程度 $((L+b)/2+a)$ とクロロフィル含量との間に非常に高い負の相関関係 ($r = -0.959$, $p < 0.001$) があることが分かる。一方、第1表に示すとおり、a 値単独を除いて非常に高い相関関係があることが分かった。このことは、脱緑の度合を表す式にはL, a, b の3つの要素が含まれていなければならないことを示している。従って、ウンシュウミカンの黄化のときに採用した式をバナナの黄化に使用したところ、高い相関係数 ($r = -0.959$) および有意性 ($p < 0.001$) が得られた。表1に見られるように従来の関係式と同等な良い結果が得られたので、ウンシュウミカン果実で脱緑の程度を表す式として用いた $(L+b)/2+a$ がバナナの場合も有用であると判断した。

3. 果色の変化への試薬処理の影響

この実験はクロロフィル分解に影響すると思われる

Fig. 3. Correlation between chlorophylls and Hunter's color index $((L+b)/2+a)$ in ethylene-treated banana fruit. Concentration of chlorophylls represents the mean $\pm$ SD of five determinations. Significant at 0.1% level. $r = -0.959$.

Table 1. Linear regression and correlation coefficient (r) between chlorophylls and Hunter's color index in ethylene-treated banana fruit.

Index	Linear regression	r-value
L	$y = -0.189x + 14.747$	-0.984
a	$y = -0.223x - 0.776$	-0.893
b	$y = -0.183x + 10.459$	-0.967
$(L+b)/2+a$	$y = -0.106x + 6.554$	-0.959
$1a/b \times L$	$y = 0.149x - 0.716$	+0.926
a/b	$y = -7.382x - 0.165$	-0.957

14 試薬によって処理を行い、果色の変化を $((L+b)/2+a)$ 値を用いて表し、バナナ果実のエチレン誘導クロロフィル分解の機構をそれぞれの試薬のもつ作用から検討した。

第2表は測定開始28時間目から52時間目までの果色の変化を1時間当たりの反応速度(52時間目の果色を示す数値から28時間目値の差を24時間で割った値)として表わしたものである。この結果をもとに、エチレン処理区において、果色の変化を阻害したと思われる試薬は以下のとおりである。なお、エチレン無処理区については、果色の変化がかなり小さいため明らかな傾向を得ることはできなかった。

(1) エチレン処理区において強い阻害反応を示した試薬

- 2, 2'-Bipyridyl
- 1, 10-Phenanthroline
- Bathophenanthroline disulfonic acid Na
- L-Ascorbate Na
- NaN_3

(2) エチレン処理区において弱い阻害反応を示した試薬

- PCMB Na
- EDTA Na
- Hydroquinone
- Tiron

(3) エチレン処理においてほとんど影響を示さなかった試薬

- Monoiodoacetate Na
- Diethyldithiocarbamate Na
- N-Ethylmaleimide
- KCN
- Dithiothreitol

Table 2. Effect of inhibitors on ethylene-enhanced degreening *in vivo*

Inhibitors	- Ethylene (v) ^z	+ Ethylene (v) ^z	t - test
Control	0.016 ± 0.110	0.434 ± 0.011	
2,2' - Bipyridyl	0.042 ± 0.065	0.198 ± 0.035	p < 0.001
1,10 - Phenanthroline	0.015 ± 0.069	0.201 ± 0.014	p < 0.001
Bathophenanthroline disulfonic acid	0.046 ± 0.050	0.264 ± 0.046	p < 0.005
L - Ascorbate Na	0.036 ± 0.077	0.267 ± 0.036	p < 0.01
NaN ₃	0.024 ± 0.010	0.287 ± 0.067	p < 0.02
PCMB Na	0.008 ± 0.098	0.292 ± 0.090	p < 0.02
EDTA Na	0.032 ± 0.085	0.301 ± 0.027	p < 0.05
Hydroquinone	0.024 ± 0.113	0.309 ± 0.072	p < 0.05
Tiron	0.026 ± 0.083	0.315 ± 0.014	p < 0.05
Monoiodoacetate Na	0.016 ± 0.060	0.331 ± 0.003	p < 0.05
Diethyldithiocarbamate Na	0.022 ± 0.090	0.330 ± 0.031	p < 0.1
N - Ethylmaleimide	0.032 ± 0.050	0.357 ± 0.017	p < 0.1
KCN	0.020 ± 0.098	0.341 ± 0.051	p < 0.2
Dithiothreitol	0.009 ± 0.078	0.391 ± 0.031	p < 0.5

^z $\frac{[(L+b)/2+a]}{52-28\text{ hrs}}$ at 52 hrs - $\frac{[(L+b)/2+a]}{28\text{ hrs}}$ at 28 hrs

Fig. 4. Effect of 2, 2'-bipyridyl on ethylene-enhanced coloring of banana fruits *in vivo*. Each a (L + b)/2 + a amount represents the mean ± SD of six determinations. Control (—□—). 2, 2'-Bipyridyl (—■—).

(4) 果色の変化における鉄キレート剤の関与

Bathophenanthroline disulfonic acid, 1, 10-phenanthroline, 2, 2'-bipyridyl, EDTA は 2 価鉄をキレートし, Tiron は 3 価鉄をキレートすることが知られている。これらの試薬が果色の変化を阻害すること (経時変化の例として 2, 2'-bipyridyl の場合について第 4 図に示す) は, クロロフィル分解に鉄が関

与することを示唆している。クロロフィル分解への鉄の関与としては, ヘム鉄タンパク質酵素であるペルオキシダーゼ, 非ヘム鉄あるいはヘム鉄などを補因子とするジオキシゲナーゼ, 非ヘム鉄を含み反応によってはヘム鉄を要求するもののあるリポキシゲナーゼといった酸化酵素あるいは酸素添加酵素が考えられる。この他にも酸化反応を触媒する酵素の中には金属原子やヘム鉄を含むものもあり, 上記以外の酵素の関与も考えられる。一方, 電子伝達阻害剤およびヘム鉄含有酵素の阻害剤である NaN₃ により阻害されるところから, クロロフィル分解過程におけるヘム鉄が関与することを示唆している。このような結果は, 下川ら (1992) によるクロロフィル *a* 分解ペルオキシダーゼの *in vitro* での研究でも得られている。

(5) 果色の変化の SH 試薬による弱い阻害

著者らのこれまでのウンシュウミカン果実の *in vitro* における研究により, SH 阻害剤である PCMB がクロロフィル *a* からクロロフィル *d* を経てフェオフィル *d* までの反応を阻害することを明らかにしている (柳迫ら, 1994)。また, これら 2 つの反応に関与する酵素は主にクロロフィラーゼ (EC. 3. 1. 1. 14) と “Mg-デキレターゼ” であることを明らかにしている (Shimokawa ら, 1990)。これらの酵素のうちクロロフィラーゼは PCMB によってその活性が阻害されることは *in vitro* で明らかになっている (McFeeters ら, 1971)。本研究においてバナナ果実の

場合、ウンシュウミカン果実の場合に強く阻害される PCMB により弱い阻害しかないところから、バナナ果実のクロロフィル分解の初期反応にはクロロフィラーゼの関与は少なく、つまり脱フィチルせず、直接、酸化酵素が関与しているものと考えられる。このような結果は、Kato・Shimizu (1985) によるタバコ葉、山内 (1989) によるパセリ、ミツバ、Yamauchi ら (1991) によるカボス果実、Yamauchi・Watada (1991) によるホウレンソウにおける *in vitro* でのクロロフィル *a* 分解の研究でも得られている。

(6) 果色の変化の阻害におけるラジカル消去剤の関与

Tiron は 3 価鉄のキレート剤として作用するが、最近の研究では O_2^- (スーパーオキシド) のラジカル消去剤として利用される例が多い。従って Tiron により阻害が認められることは、エチレン誘導クロロフィル分解への鉄 (特に Fe^{3+}) と同時に O_2^- の関与も考えねばならない。Hydroquinone, L-ascorbate はラジカル消去剤あるいは還元剤としての作用をもち、これらの試薬による結果はクロロフィル分解へのラジカル関与を示唆するものである。

(7) エチレン処理果実の果色の変化に影響を及ぼさない試薬

このうち、KCN の阻害については第 2 表に示すように 52 時間までのクロロフィル分解の反応速度は t -検定により有意差が認められない。しかし、KCN とほぼ同じ作用を示す NaN_3 は有意に阻害していることから、ヘム鉄含有酵素のクロロフィル分解への関与を否定することはできない。DIECA で阻害が認められないことから銅あるいは銅を含有する酵素の関与はないものと思われる。Dithiothreitol は SH 基の保護剤として *in vitro* ではよく使われるが、*in vivo* での必要性が低いのであろう。

本研究で得られた PCMB の結果は、バナナ果実では、ウンシュウミカン果実と違ってクロロフィル分解の初期反応にはクロロフィラーゼの関与は少なく、脱フィチル型分解でなく、フィチル型分解が行われることを示唆している。また、本研究における鉄キレート剤や還元剤による結果は、Ginsburg ら (1994) の *in vitro* での結果、つまりクロロフィル分解にジオキシゲナーゼの関与を強く支持するものとなっている。つまり、*in vivo* での結果からも、クロロフィル分解のある段階 (おそらく開環反応) に、 Fe^{2+} と O_2^- が必要なことを示唆している。

摘 要

バナナ果実におけるクロロフィル含量の変化に及ぼすエチレン処理の影響を明らかにするため、DMF 抽出法を用いて果皮から色素を抽出しクロロフィル含量を測定した。その結果、バナナ果実のエチレン誘導クロロフィル分解は、エチレンにより誘導または促進される酵素によりクロロフィル *a* を優先的に分解し、脱緑を促進することが分かった。また、エチレン誘導クロロフィル分解過程に果色の色彩表現法による脱緑程度を表わす式 $((L+b)/2+a)$ とクロロフィル含量との間には非常に高い負の相関関係 ($r = -0.959$, $p < 0.001$) があることから、果色の脱緑を示す指標として、この式はバナナ果実の場合も適切であることが確認された。

In vivo におけるバナナ果皮のエチレン誘導クロロフィル分解機構を明らかにするため 14 種類の阻害剤で処理を行い、それにとりも果色の変化を色彩色差計で測定し、上記の式を用いて検討した。その結果、鉄キレート剤による阻害より鉄要求性の酸化酵素の関与と、還元剤あるいはラジカル消去剤により阻害されることからラジカル関与とが明らかとなった。また、PCMB により弱く阻害されたことから、バナナ果皮ではウンシュウミカン果実の場合とは異なり、クロロフィラーゼがクロロフィル分解の初期反応にあまり関与していないのと思われた。

これらの結果から、バナナ果皮のエチレン誘導クロロフィル分解において Fe^{2+} (Fe^{3+})、 O_2 (O_2^-) の関与する酸化反応が分解系路の一段階であることが示唆された。

引用文献

- Hendry, G. A. F., J. D. Houghton and S. B. Brown. 1987. The degradation of chlorophyll-a biological enigma. *New Phytol.* 107: 255-302.
- Ginsburg, S., M. Schellenberg and P. Matile. 1994. Cleavage of chlorophyll-porphyrin. *Plant Physiol.* 105: 545-554.
- Inskeep, W. P and P. R. Bloom. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77: 483-485.
- Kato, M and S. Shimizu. 1985. Chlorophyll metabolism in higher plants VI. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation. *Plant Cell Physiol.* 26: 1291-1301.
- McFeeters, R. F., C. O. Chichesters and J. R. Whiteaker. 1971. Purification and properties of chlorophyllase from *Ailanthus altissima* (Tree-of-heaven).

- Plant Physiol. 47 : 609-618.
- Moran, R. 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N, N-dimethylformamide. Plant Physiol. 69 : 1376-1381.
- Moran, R and D. Porath. 1980. Chlorophyll determination in intact tissues using N, N-dimethylformamide. Plant Physiol. 65 : 478-479.
- 下川敬之. 1994. 葉緑体の老化とクロロフィル分解機構. 植物細胞工学, 6 : 5-14.
- Shimokawa, K., S. Shimada and K. Yaeo. 1978. Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during greening of *Citrus unshiu* Marc. Sci. Hort. 8 : 129-135.
- Shimokawa, K., A. Hashizume and Y. Shioi. 1990. Pyropheophorbide *a*, A catabolite of ethylene-induced chlorophyll *a* degradation. Phytochemistry 29 : 2105-2106.
- 下川敬之・柳迫 睦・内田好則・1992. ウンシュウミカン果実のクロロフィル *a* 分解酵素 (クロロフィル *a* ペルオキシダーゼ) の精製と酵素化学的性質について. 園学雑. 61 : 665-673.
- 下川敬之・橋本栄弘・前田義志・内田好則・柴崎 康. 1994. ウンシュウミカン果実におけるエチレン誘導クロロフィル分解のアリルイソチオシアネートによる抑制. 園学雑. 63 : 195-201.
- 田部 大・馬 旭偉・下川敬之. 1996. *In vivo* におけるウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marc) 果実のエチレン誘導クロロフィル分解に関する研究. 園学雑. 65 : 645-649.
- 山内直樹. 1989. 葉葉類の貯蔵に伴うクロロフィル分解物の変化, 収穫後における葉葉類のクロロフィル分解機構 (第5報). 日食低保誌. 15 : 82-86.
- Yamauchi, N and A. E. Watada. 1991. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 : 58-62.
- Yamauchi, N., F. Hashinaga and S. Ito. 1991. Chlorophyll degradation with degreening of kabosu (*Citrus sphaerocarpa* Hort. ex Tanaka) fruits. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59 : 869-875.
- 柳迫 睦・前田義志・下川敬之. 1994. ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marc.) 果実のエチレン処理後のクロロフィル分解における pheophorbide *a* の代謝一関与する酵素の性質について. 園学雑. 63 : 189-194.