

トマト果実の追熟過程における ミトコンドリア粒子の不均一性について*

中川弘毅・真田修**・竹花秀太郎

(農産製造学研究室)

Heterogeneity of Mitochondrial Particles in Various Stages of Tomato Fruits

Hiroki NAKAGAWA, Osamu SANADA and Hidetaro TAKEHANA

Laboratory of Food Science and Technology

Abstract

Heterogeneity of Mitochondrial Particles in Various Stages of Tomato Fruits. H. NAKAGAWA, O. SANADA and H. TAKEHANA. Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Japan. *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.*, No.17:29-33, 1969.

The tomato fruits of mature green were used as a stage 1. The sample of at stage 2 and 3 defined that the fruits were ripeked under the condition of npproximately 24°C, 1,100 lux in each 12 hr, for 5 days and 14 days respectively.

The extracting medium was composed of 0.1 M phosphmate buffer pH 7.4, 0.5 M sucrose and 0.01 M disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA). Tomato fruits were sliced and mixed with twice volume of extracting. medium.

The homogenate obtained above was then centrifuged with 500 x g for 10 min. The resulting supernatant was again centrifuged with 11,000 x g for 20 min. The resulting pellet was homogenized with extracting medium in a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The existence of the heterogeneous mitochondrial particle which distinguished with biochemical and physical property was proved in enah stage of tomato fruits. It was observed that the results of the biochemical activity obtained did not coincide with the respiratory pattern through the senescence and ripening process.

追熟果実から調製されたミトコンドリアの性質に関する研究は呼吸クライマクテリックを証明するために行なわれてきた。WORKMAN ら (1957) はトマト果実が呼吸クライマクテリックを示すことを明らかにした。しかし中川ら (1967) は追熟各過程のトマト果実より調製された。ミトコンドリア粒子の、コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性は減少の傾向にあり、呼吸クライマクテリックのパターンと平行関係は見い出せなかった。しかし果実の追熟老化は MARKS ら (1957), VARNER (1961) によ

って、エネルギーの必要とする過程であろうと述べられているし、ROWAN ら (1958) はトマト果実の追熟期間中、ATP量の変化がないことを示した。最近 QUJGLEY ら (1966) はユーグレナ, SAKANO ら (1968) は甘藷根に、それぞれ物理的、生化学的性質の異なる、少なくとも3つの型のミトコンドリア粒子の存在を報告している。著者らは、物理的性質として、沈降速度を、生化学的性質として、SDH、チトクロム C オキシダーゼ (Cyt.C-oxd) 活性を用い、トマト果実ミトコンドリアにも不均一性が存在することを明らかにし、また追熟老化中のそれらの変化から、追熟老化過程のエネルギーの

* 報文の大要は昭和43年度農芸化学関東支部会で発表した

** 御滝中学 千葉県船橋市

供給系について、若干の考察を行なった。

材料および方法

実験材料：トマト果実 (*Lycopersicum esculentum* var. HIKARI) は本学部農場で栽培された、緑熟期の果実を収穫し、0, 5, 14 日間、約24°C, 1,100 lux, 12 時間の間欠照明下で追熟させ、各々をステージ 1, 2, 3 とした。先に中川ら (1967) はそれらが呼吸ブレイクマクテリック、クライマクテリックピーク、ポストクライマクテリック期に相当するものとした。

実験方法：ミトコンドリア画分の調製、分画操作は0°C~4°C下で行なった。

1) ミトコンドリア画分の調製

各ステージのトマト果実の果肉部 25g をスライスし、25ml の抽出溶媒とブレンダー中で、1 分間トップスピードで均質化させ、ホモジネイトを、二重ガーゼでろ過した。ろ液を500×g 10 分間の遠心をかけ、上清画分を、さらに、11,000×g 20 分間の遠心をかけ、沈殿物に上記抽出溶媒 5 ml を加えポーターエルペーヅム型ホモゲナイザーで均質化したサスペンションを、ミトコンドリア画分とした。

2) ショ糖密度こう配遠心法

ショ糖密度こう配遠心法は大海 (1966) 及び McCONKEY (1967) の方法を参考にして行なった。

2-a) ショ糖密度こう配の調製 内径3.0cm高さ10cm のポリエステル製遠心管内のショ糖溶液層は二層からなり、底部は45mlのショ糖濃度40%から20%の直線的濃度こう配を形成し、上部は20%ショ糖溶液 5 ml からなる計50ml の展開層となっている。調製は室温下で行ない、調製ショ糖液層は0°C~4°Cで約10時間放置後、試料液を重層した。

2-b) 試料の重層 各ステージのトマト果実から調製されたミトコンドリア画分 5 ml を上記遠心管壁にそって注意深く流下させ、重層した。

2-c) 遠心分離 遠心はマルサン90-H型遠心機を用い、ショ糖液に機械的衝撃を少なくするため、最高重力加速度4,200×gへの到達に5分間かけ、最高重力加速度から回転停止に至るまで5分間かけた。

2-d) 分画 遠心の終了した遠心管内溶液は、Fig 1 に示す装置で、1 画分約 2 ml、約24のフラクションに分画した。コックで空気量を調節し、分画速度が、約40分間で、24分画が終了する様にした。

3) 酵素活性の測定

SDH活性はKING (1963) の方法を若干変更して測定した。温水還流により、熱交換された光路 1 cm のキ

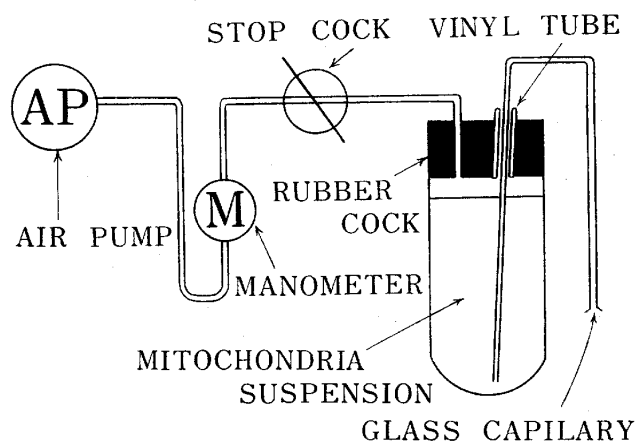


Fig. 1 Fractionating equipment for mitochondrial suspension.

ュベット中に、500mMリン酸緩衝液0.3ml, 1.5mM 2-6, ジクロロフェノールインドフェノール(DPIP) 0.1ml, 0.3%ポリビニルピロリドンK-30, 0.1ml 45 mM KCN 0.1ml, 10mMコハク酸ソーダ0.1ml, 1.25 M ショ糖溶液 0.1ml, 純水 (D. W.) 1.6ml を入れ、2.5 分間、プレインキュベイトした後、酵素液 0.1ml を加え、攪拌し、さらに2.5 分間、平衡化された後、60mM フェナジメトサルフェイト 0.2ml の添加により反応を開始させた。ブランクはコハク酸ソーダを標準反応液組成から除いた組成を用いた。活性は600mμでのDPIP還元初速度から求めた。1 酵素単位は1 分間のOD変化が0.01に相当する量とした。

Cyt. C-oxd 活性はSMITH (1954) の方法を参考にして行なった。SDHは活性測定に用いたキュベット中に、500mMリン酸緩衝液 0.3ml, 2 M ショ糖液 0.725ml, D. W. 1.075ml を入れ、2.5 分間、温度平衡化された後、酵素液 0.2ml を添加し、さらに2.5 分後、HORIEら (1963) の方法で調整した還元型チトクロムCを添加して反応を開始した。活性量は還元型、Cyt. Cの酸化による550mμのODの減少初速度から計算した。1 酵素単位は1 分間のOD変化が0.01に相当する量とした。

4) 蛋白質の測定

蛋白質の測定は、LOWRYら (1951) の方法に従った。標準曲線は、牛血アルブミン、フラクションVを用いて作成した。

実験結果

抽出条件

1) ショ糖濃度 100mMリン酸緩衝液, PH7.4, 10 mM EDTAを含み、ショ糖濃度を変化させた各抽出溶媒5mlを、スライスした各ステージのトマト果肉部25gと

ブレンダー中で、1分間トップスピードで磨砕する。磨砕物を、ガーゼで口過し、 $500 \times g$, 5分間 $\sim 11,000 \times g$ 20分間の沈殿画分のSDH活性を測定することにより、ミトコンドリア粒子の集積状態を検討した。

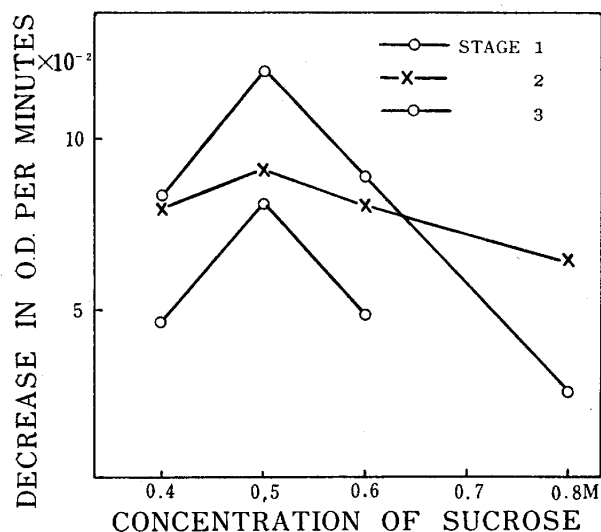


Fig. 2 SDH activity in the various mitochondrial fractions at different sucrose conc.

Fig. 2 に示す様に、各ステージとも 0.5M で、SDH 活性は最大であった。

2) PH

各PHの100mMリン酸緩衝液、0.5Mショ糖、100mM EDTAを含む抽出溶媒を用い、得られたミトコンドリア粒子のSDH活性を測定した。その結果はFig. 3 に示した。

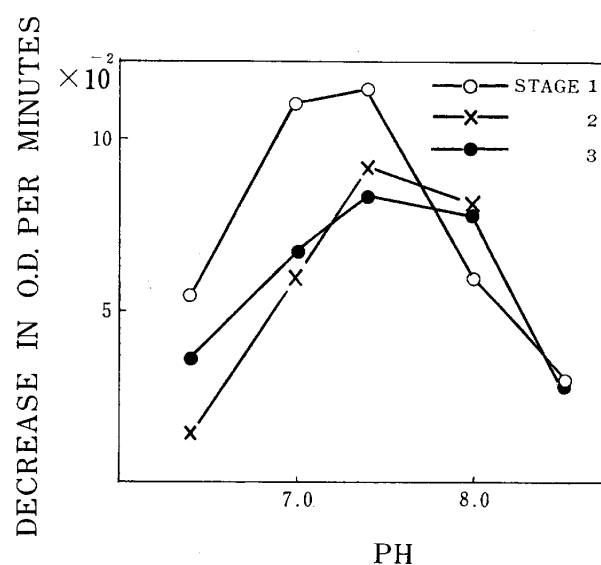


Fig. 3 SDH activity in the various mitochondrial fractions at different PH.

Fig. 3によると、各ステージとも PH7.4 でSDHの最大活性が得られた。

3) 遠心法による、ホモジネイトからのミトコンドリア粒子の回収。

ショ糖密度こう配遠心法を用い、ホモジネイトサスペンションからSDH活性の分布を調べた。100mMリン酸緩衝液、10mM EDTA、0.5Mショ糖を含む抽出液を用いて調整されたホモジネイトサスペンションを、10分間、異なる重力遠心場におき、5つの部分に分画して、各画分のSDH活性を測定した。

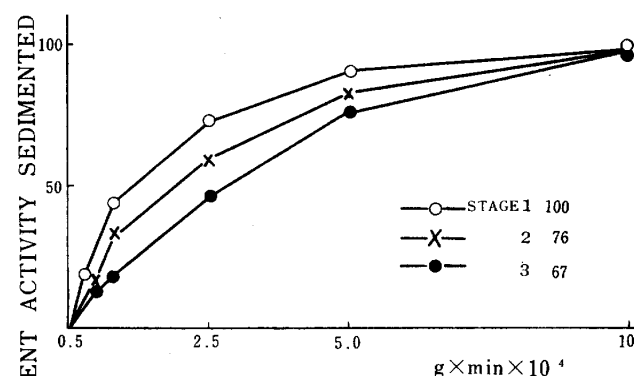


Fig. 4 Sedimentation of Tomato fruits SDH from nongradient suspension

Fig. 4は沈降粒子のSDH活性の百分率を重力遠心場の強さ($g \times min$)に対してプロットしたものである。その結果、 $500 \times g$, 10分間から $11,000 \times g$, 10分間の沈殿画分に、80%以上のSDH活性が回収された。

4) ショ糖密度こう配遠心法によるミトコンドリア粒子の不均一性。

ショ糖密度こう配遠心法で各ステージのミトコンドリア粒子を、 $4,200 \times g$, 200分間沈降分散させ、SDH活性、Cyt, C-oxd活性、蛋白質の測定の結果、ミトコンドリア粒子の不均一性が各ステージを通して認められた。

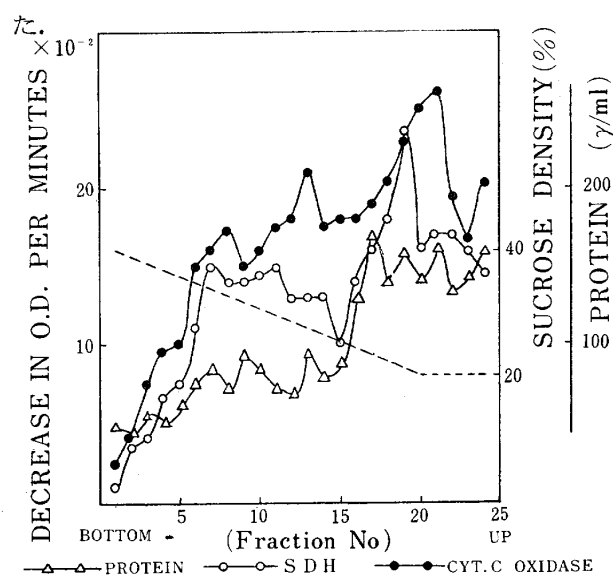


Fig. 5 Distribution of mitochondria in Stage 1

Fig. 5は典型的な、ステージ1のミトコンドリア粒子の分布状態を示したものである。

ステージ1のミトコンドリア粒子には少なくとも沈降速度の比較的速い画分 (Fraction NO 6~14) と、比較的遅い画分 (Fraction NO 16~23) の存在が認められた。量的には沈降速度の遅い画分が多かった。

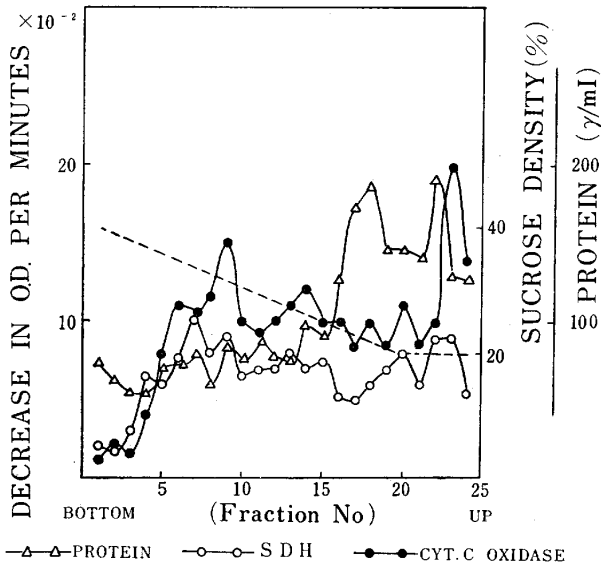


Fig. 6 Distributich of mitochondria in Stage 2

Fig. 6は、ステージ2のミトコンドリア粒子の分散を調べたものである。これによると蛋白質パターンはステージ1と大差はないがSDH, Cyt. C-oxd活性は沈降速度の遅い画分の減退が著しい。ステージ3のミトコンドリア粒子の沈降分散の結果はFig. 7に示した。

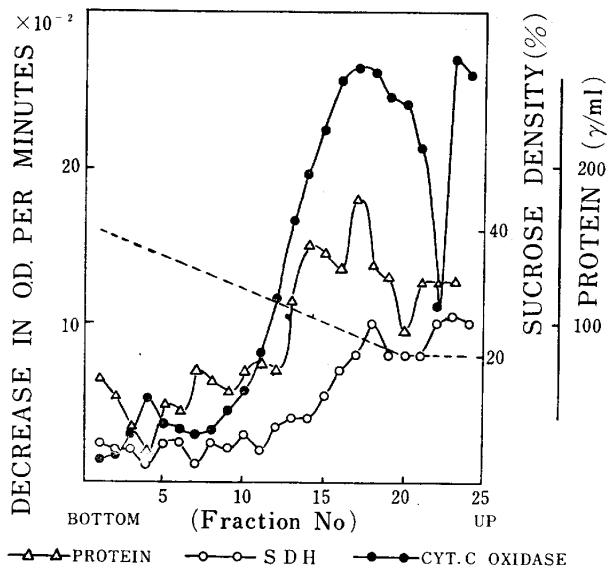


Fig. 7 Distribution of mitochondria in Stage 3

これによると、蛋白質パターンは、ステージ1および2と大差ないがSDH活性は沈降速度の速いミトコンドリア画分では痕跡程度しか残存しなかった。しかし沈降速度の遅い画分は、ステージ2に比較して、明らかな活性の減少は見られなかった。Cyt. C-oxd活性は沈降速度の比較的遅い画分のミトコンドリアにほぼ集約され、絶対量はステージ1の画分と同程度存在していた。

考 察

トマト果実からのミトコンドリア粒子の調整条件を設定する際、PHの影響が顕著であるが、HANSONら (1962) はCorn ScutellaのミトコンドリアをPH6.5で調整すると、阻害蛋白がミトコンドリアに結合浸透するため、基質の酸化能が低下するとしているが、トマト果実のPH6.4でのSDH活性低下は、阻害蛋白によるものかどうか未だ明確ではない。

追熟老化に伴う、いくつかの呼吸酵素活性の変化をショ糖密度こう配遠心法により分離したミトコンドリア画分について調べた結果、追熟老化現象がエネルギー供給系に何らかの攪乱が生じていることが考えられる。しかしながらBAINら (1964) のWilliams Pearを用いた電顕的実験によると、ミトコンドリア粒子の内部構造の顕著な破壊はポストクライマクテリック期に至るまで認められなかったと報告しており、DICKINSONら (1965) はトマト果実ミトコンドリアの酸化的リン酸化は追熟中も比較的安定であると述べていること等は、ROWANら (1958) のATP含量の不変性を支持し、追熟老化過程は、エネルギー供給系が破壊された結果生ずる現象ではない

Table 1 Distribution of mitochondria in Various stages of fruit. (These Values are means from 2 experiments.)

	Stage 1			Stage 2			Stage 3		
	F M S			F M S			F M S		
	F	M	S	F	M	S	F	M	S
Protein (mg)	494	722	1214	536	800	1224	627	847	1123
SDH (units)	5.0	9.85	12.75	7.72	8.36	8.46	1.09	4.20	6.04
Cyt. C oxd (units)	5.70	10.90	12.62	3.47	5.07	4.91	5.74	8.87	7.89
SDH/protein (x10 ²)	1.01	1.37	1.05	1.44	1.05	0.69	0.17	0.46	0.54
Cyt. C. oxd /protein (x10 ²)	1.16	1.51	1.04	0.65	0.64	0.41	0.92	1.05	0.7

という考えを強く支持するものである。実際追熟中にみられるカロチノイド合成、ペクチンエステラーゼ、インベルターゼ等の酵素合成はエネルギーを必要とする現象であり、前記結果と一致する。

Table 1は今回の結果の概要を示したものである。

これによるとCyt. C-oxdの比活性は各ステージを通じて大きな変動はみられないがSDHの比活性は、ステージの上昇につれて低下しており、特に沈降速度の速い画分の低下が著しい。一方DICKINSONら(1965)はリンゴ酸脱水素酵素の比活性は追熟期を通して低下しないことを報告している。そこで酸化的リン酸化能が比較的安定であるとする、少なくとも、コハク酸→SDH→Cyt系への電子の流れの重要性はステージの進行につれて低下するものと考えられる。特に沈降速度の速い画分の低下が著しいことを考えると、ミトコンドリア粒子の物理的性質も追熟とともにある変化をしていることが期待されるが、それがどのようなものであり、又その変化が、生理的にどのような意義を有するかは将来の問題である。

摘 要

トマト果実の追熟老化過程において、ミトコンドリア粒子の性質に変化があるかどうかを検討した。緑熟期のトマト果実を0.5, 14日間, 24°C, 1,100 lux 12時間の間欠照射により、プレクライマクテリック、クライマクテリックピーク、ポストクライマクテリック期の果実を得た。ミトコンドリア粒子の抽出に用いた溶媒は、0.1 Mリン酸緩衝液PH7.4 0.5M ショ糖, 10mM EDTAから成る。

各ステージのトマト果肉部25gに、抽出液25mlを混ぜ、ブレンダーで均質化し、500×g 10分間から11,000×g 20分間の遠心沈殿画分を上記抽出液中に分散させた。この分散液をショ糖密度こう配遠心法で、ミトコンドリア粒子を沈降分散させ、各画分のSDH, Cyt, C-oxd活性を測定した。各ステージのトマト果肉部のミトコンドリア粒子は物理的・生化学的に、不均一なものであることが明らかになった。

文 献

- 1) BAIN J. M. and F. V. MERCER (1964) :
Australian J. Biol. Sci. 17 : 78.
- 2) DICKINSON D. B. and J. B. HANSON (1965)
: Plant Physiol. 40 : 161.
- 3) HANSON J. B. and H. R. SWANSON (1962)
: Biochem. Biophys. Res. Commun. 9

: 442.

- 4) HORIE S. and M. MORRISON (1963) : J.
Biol. Chem. 238 : 2220.
- 5) KING T. E. (1963 : J. Biol. Chem. 238 :
4032.
- 6) LOWRY O. D. H. ROSENBROUGH, N. J.
Farrand, R. J. Randall (1951) : J. Biol.
Chem. 193 : 265.
- 7) MARKS J. D., R. BRNLNHAND J. E.
Varner (1957) : Plant Physiol. 33 : 259.
- 8) MCCONKEY E. H. (1967) : Methods in
Enzymology XII ed. dy Colowick S. P. and
N. O. Kaplan, Academic Press Inc. New
York and London, 620
- 9) 中川弘毅, 小池俊介, 竹花秀太郎 (1967) : 日本
農芸化学会昭和42年度関東支部大会講演要旨 1
- 10) 大海達雄 (1966) : 蛋白質核酸酵素 11 : 486
- 11) QUIGLEY, J. W. and C. A. PRICE (1966) :
Plant physiol. 41 : XXV.
- 12) ROWAN, K. S., H. K. PRATT and R. N.
ROBERTSON (1958) : Australian J. Biol. Sci.
11 : 329.
- 13) SAKANO, K., T. ASAHL and I. URITANI (1968)
: Plant and Cell Physiol. 9 : 49.
- 14) SMITH, L. (1954) : Methods of Biochemic¹
Analysis 2 ed. by Glick D., Interscience
Publisher Inc., New york 427.
- 15) VARNER, J. E. (1961) Ann. Rev. Plant
Physiol. 12 : 245.
- 16) WORKMAN, M. and H. K. PRATT (1957) :
Plant Physiol. 32 : 330.