HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結保存中におけるポプラ枝条の代謝活性低下と致死
Author(s)	匂坂, 勝之助
Citation	低温科學. 生物篇, 30, 15-21
Issue Date	1972-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17794
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_p15-21.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Shonosuke SAGISAKA 1972 Decrease in the Metabolic Activity in Poplar Twigs to a Fatal Level during Storage in Frozen State. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 30.*** (With English Summary p. 21)

凍結保存中におけるポプラ枝条の代謝活性低下と致死*

匂坂勝之助
(低温科学研究所)

(昭和47年8月受理)

I. 緒　　言

札幌付近における越冬期間は約6カ月であるから，ポプラのような落葉性の樹木はこの期間の基礎代謝維持に必要な貯蔵養分，開芽伸長が定常状態に達するのに必要な代謝活性とその基質及び細胞内に僅かの異状事態が生じてもそれを打消し得る代謝活性の強さの三要素を厳冬期までに備える必要があると思われる。厳冬期は酵素の新たな合成が不可能であるから代謝活性の強さと細胞の正常な生活との関係は細かな検討を要する問題であろう。

越冬中のポプラの枝を切りとって凍結保存すると，通常の越冬期間（6カ月）中に死ぬものはないが1年を経過する頃から死ぬものが現われる。皮層部の褐変化の速さからみると4年間凍結保存した枝では室温で2時間以内，2年間凍結保存したものは約5時間後にそれを認め得るように相違がある。

この報告はこのような貯蔵中のポプラ枝条の致死現象を物質代謝の立場から明らかにする事を試みたものである。越冬中の正常な代謝体制，代謝活性，基質濃度についてこれまでにしらべた結果[1-3]がよりどころとなっている。高等植物の示す多彩な代謝活性とこれと関連した調節機能を考えると，これらの理解の為にはこれまでのようにバクテリアや動物から得た知見の類推にとどまらず，植物の生活を理解する一層包括的な研究が必要と思われる。

本文で次の略号を用いた。G6P，グルコース6-燐酸；G6PDH，グルコース-6-燐酸脱水素酵素；6PGDH，6-ホスホグルコン酸脱水素酵素；G-1-^{14}C，グルコース-1-^{14}C：G-6-^{14}C，グルコース-6-^{14}C；PGI，ホスホグルコイソメラーゼ；HK，ヘキソキナーゼ；ポリPhO，ポリフェノールオキシダーゼ；POD，パーオキシダーゼ；ICDH，イソクエン酸脱水素酵素。

II. 材料と方法

材料： ポプラ（*Populus gelrica* と *I*-455）は圃場に生育しているもので，その枝を長さ約30 cmに切ってポリエチレンの袋に入れて −6°C に保存した。5年生のポプラの幹（直径約10 cm）は長さ約1 mに切ってその両端をポリエチレンの袋で包み −30～−20°C に保存した。直径約4 cmの3年生の幹も同様に取扱った。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1206号

対照として用いた枝は，越冬中のものを採取して上述のものと同様に保存したもので，その期間は6カ月以内である。酵素と主な試薬は Boehringer u. Sohne GmbH 製を用いた。

方法： 酵素液の調製は前報[1]と同様に擂潰機を用いて行なった。代謝活性，酵素活性及び基質濃度の測定法は次の通りである。フェノール，クロロゲン酸[4]を用いた Nair ら[5]の方法；全糖，アンスロン法[6]；可溶性蛋白質[1]，G6P[3]，G6PDH[2]，G-6-^{14}C[2]，PGI[1]等の測定と放射性化合物（G-1-^{14}C，G-6-^{14}C，^{14}C-蛋白質加水分解物，ピルビン酸-2-^{14}C）の代謝活性測定[7]はそれぞれ前報の通り。ポリ PhO 活性は Brouwer らの方法[4]を改変して 330 nm における吸収の減少を測定することによった。HK の活性測定系は次の通りで，ATP を加えたのちの 340 nm の吸収増加を測定した。トリス-塩酸緩衝液 150 μmole, $NADP^+$ 0.12 μmole, $MgCl_2$ 1.2 μmole, グルコース 1.5 μmole, G6PDH 1.4 単位, ATP 1.0 μmole, 酵素液 0.1～0.2 ml, 水で全容 1.5 ml。ICDH 活性の測定系は次の通りである。トリス-塩酸緩衝液 150 μmole, $NADP^+$ 0.12 μmole, $MgCl_2$ 1.2 μmole, イソクエン酸 2.5 μmole, 酵素液 0.1～0.2 ml, 全容 1.5 ml。

III. 結　　果

放射性化合物による代謝活性変化の検討　皮層部の褐変化が約2時間（室温）で明瞭に認められるポプラの材部と皮層部は，グルコースの代謝活性が正常な試料の約 10% あるいはそれ以下である。材部と皮層部を比較すると皮層部の活性低下率が大きく，材部においては G-1-^{14}C が G-6-^{14}C より代謝を受け難くなったことがわかる（第1表）。

第1表　正常な組織と褐変化する組織の代謝活性*

放射性化合物	材部或は皮層部	対照	4年凍結保存
		cpm/0.1 g 乾物・時	
G-1-^{14}C	材部	3,740	300
G-6-^{14}C		740	120
G-1-^{14}C	皮層部	16,560	1,140**
G-6-^{14}C		3,390	150**
ピルビン酸-2-^{14}C	材部	680	130
	皮層部	8,150	1,380
^{14}C 蛋白質の加水分解物	材部	16,100	9,570
	皮層部	24,140	11,400

* *P. gelrica*

** 5年生のポプラも同様の結果を与えた。一試料当りの使用放射能量は本文参照

ピルビン酸-2-^{14}C の脱炭酸は TCA 回路内でおこるからこの代謝活性はミトコンドリアの活性判定となる。材部と皮層部の活性は正常なものの約 20% に低下している。

一方，蛋白質加水分解物を与えた場合は，グルコースやピルビン酸と異なって可成活潑に代謝されることがわかる（第1表）。材部と皮層部の活性は正常な試料の 50～60% である。

可溶性蛋白質，全糖，フェノール性化合物，G6P 等の濃度　可溶性蛋白質含有量には個体差が

あり，同一個体でも上部と下部によって異なる。このような点を考慮しても，長期保存による材部の可溶性蛋白質減少は明らかである（第2表）。皮層部における量的変化は使用した材料ではっきりしないが，酵素活性の変化から考えると酵素の不活性化はほとんどおこらなかったものと思われる（第5表）。第2表，第4表及び第5表の結果はよく一致していて，材部の酵素は皮層部のそれより失活し易いことを示している。形成層と接している材部 G6PDH 等の失活は致命的損傷と思われる。

第2表　長期の凍結保存後に褐変化するポプラの蛋白質濃度

ポプラ	保存期間	材部* 年齢 1	2	3	皮層部 可溶性蛋白*	磨砕混液
		mg 蛋白質/g 乾物				
ゲルリカ　5年生	4年間凍結	1.08	0.32	0.16	3.40	12.48
〃　3年生	〃	1.04	0.58	—	2.38	15.68
ゲルリカ　5年生	対照	4.40	1.62	—	—	—
〃　3年生	〃	5.30	4.40	2.88	0.32	3.36
455　6年生	対照	2.63	1.60	1.60	0.26	4.96
〃　6年生	〃	2.70	1.60	—	—	—
〃　3年生	〃	1.90	2.00	—	—	—

*　組織磨砕混液の 12,000×*g* 上清。対照は −6°C で6ヵ月以内の保存期間

全糖の含有量には全くちがいが認められない（第3表）。エネルギー源としての糖を利用する以前の段階に致命的な所があることを示している。皮層部のフェノール性化合物は対照の約1/3に減少していた（第3表）。材部は皮層部のような褐変化が認められないが，第3表に示したように材部のフェノール性化合物は皮層部の約 1/100 である。従って褐変の度合いから，材部と皮層部の何れが先に死ぬかの判定は出来ないことを意味している。材部のフェノール性化合物は長期保存したもので減少している。

G6P の濃度低下が著しい（第3表）。この現象は材部と皮層部の両方にみられ，材部では

第3表　長期の凍結保存後に褐変化するポプラの全糖，フェノール性化合物及び G6P の濃度

化合物	分析材料	材部*		皮層部*	
		μmole/g 乾物			
全糖	4年凍結保存	180	184	750	726
	対照	256	184	650	600
フェノール性化合物	4年凍結保存	1.6	1.8	67	75
	対照	2.6	1.8	185	220
G6P	4年凍結保存	0.02	0.025	0	0.05
	対照	0.18	0.28	0.30	0.31

*　3年生と5年生の幹の分析結果。対照は −6°C で6ヵ月以内の保存期間

正常なものの1/10の濃度となっていた。皮層部では変動が激しくG6Pのほとんど存在しないものもあった。

長期凍結保存中の酵素活性の低下 第4表にG6PDHと6PGDHについてしらべた結果を示した。これらの脱水素酵素活性は生きている材部のどの部分でも検出可能であって，年輪別に測定すると一番新らしい材部の活性が最も強く順次低くなる傾向を有する（第4表)。長期間の凍結保存でこれらの脱水素酵素の活性が殆んど無くなっていることが明らかである。同様な活性低下はICDH, HK及び可溶性ポリPhOについてもみられる（第5表)。つまり，脱水素反応を接触する酵素群はその活性が殆んど消失し，G6P合成の能力も低下していることが明らかである。材部のポリフェノールの濃度は非常に低いことは前述した（第3表）が可溶性ポリPhO活性も極めて低く検出されなかった。皮層部は容易に検出し得るポリPhO活性を有するが長期間の凍結保存で活性が顕著に低下する。

第4表 長期凍結保存とG6PDH及び6PGDH活性の低下

ポプラ	保存期間	G6PDH 材部の年齢			6PGDH 材部の年齢		
		1	2	3	1	2	3
		μmole/g 乾物・時					
ゲルリカ 5年生	4年凍結	0.005	0.002	0	0.05	0.009	0.009
〃 3年生	〃	0.43	0.004	0	4.6	0.015	0
ゲルリカ 5年生	対照	8.3	0.97	2.6	20.7	6.2	—
〃 3年生	〃	8.3	5.2	—	26.0	20.7	13.5
455 6年生	対照	3.1	1.0	—	13.0	5.7	—
〃 6年生	〃	9.4	2.6	—	24.0	9.8	—

対照は−6℃で6カ月以内の保存期間

第5表 長期凍結保存と酵素活性の低下

	分析材料	材部		皮層部	
		μmole/g 乾物・時			
ICDH	4年凍結保存	7.0	9.2	41.8	74.0
	対照	40.0	36.0	41.8	38.4
PGI	4年凍結保存	28.8	28.8	61.2	63.6
	対照	64.8	50.4	32.4	40.8
HK	4年凍結保存	0.3	0.5		
	対照	1.9	1.3		
可溶性ポリPhO*	4年凍結保存	0	0	0.26	2.28
	対照	0	0	8.06	23.4

対照はすべて−6℃で6カ月以内の保存期間
* 活性の単位はOD 330 nm/g・乾物・時

V. 考　　察

長さ約1mのポプラの幹を4年間 −20～−30°C に保存して代謝活性の変化，基質濃度の変化及び酵素活性の低下をしらべた。このような変化は −6°C に保存しても観察出来る。厳寒期に採取したポプラの枝でも貯蔵期間が 12 カ月に達すると皮層部に褐変化のおこるものが現われ始める。2年間，−6°C で枝を保存すると殆んどが褐変化するようになり，室温においてから褐変化するに要する時間は長期間凍結保存したものほど短時間であった。このように褐変化に時間差のあることは，正常な代謝に必要な酵素活性の低下が起っていることを示唆している。

実際，長期間保存で代謝活性の著しい低下のおこっていることがわかった。代謝活性の変化を大きく把握する為に行なった放射性化合物の代謝実験で解糖系と TCA 回路の活性低下の著しいことがわかった。しかし，活性が全く消失したのではない。一方，基質濃度をみると，G6P とフェノール性化合物の減少が顕著である。G6P は −20°C で徐々に代謝されているものと考えられる。フェノールと呼吸酵素系との関係に関して田川[8]の総説がある。皮層部のフェノール類は 0.2 M クロロゲン酸相当量で，全糖に次いで高濃度の基質であり，−20°C での保存期間中に約 1/3 の濃度に低下した。−20°C の貯蔵で全糖の濃度は変らない。

G-1-^{14}C からの $^{14}CO_2$ 発生量の低下は G6PDH などの活性低下によるものであることが明らかになった。長期間の凍結保存により褐変化するようになったポプラでは脱水素酵素群の活性低下が著しく，ついで可溶性ポリ PhO と HK の活性低下が明らかである。G-6-^{14}C からの $^{14}CO_2$ 発生が低下した理由の一つは HK 活性の低下であるが，そのあとの反応系に関してはこの実験ではわからない。G-1-^{14}C と G-6-^{14}C を用いた実験条件は TCA 回路の影響の少ない反応時間なので，HK 以外で活性低下のおこっている解糖系の酵素の影響があらわれていると思われる。

ピルビン酸-2-^{14}C による実験でミトコンドリア (TCA 回路) の機能も甚だ弱まっていることがわかった。ATP 生成の機能が極めて低くなっていることがわかる。

分析を行なった結果から，ポプラの組織は −20°C での保存中にエネルギー生成機能が損われるのに加えて，直ちにエネルギー源となり得る基質 (G6P 等) が減少してきたものと考えられる。ポプラの G6PDH は G6P が存在しないと不安定となり失活し易くなる[9]。正常に越冬する G6P 濃度 (皮層部 0.3 mM) に比べて褐変化するポプラの G6P 濃度は極めて低いか零に近いから (第3表)，酵素活性が正常なものの水準にあったとしても NADPH の生成量は極めて僅かであるに違いない。このことはフェノール類の酸化が進んでも還元反応は進まないから結果としてフェノール性化合物の減少となると思われる。実際にフェノール類の濃度低下の著しいことは既に述べた (第3表)。芳香核の水酸化には NADPH が必要であるがこの反応も進行し難くなるからこれもフェノール類の濃度低下の一因であろう。

G-1-^{14}C の代謝量から正常な組織における NADPH 生成量が計算出来る (第1表)。20°C で1時間に発生した $^{14}CO_2$ から冬の材部 1 g (乾重量) は約 7 nmole/時のグルコースを G6PDH で酸化している (開芽後の材も同程度である)。一方，G6PDH 活性は，開芽後の材は 300 nmole/

時，越冬中の材は 8 μmole/時であるから，20°C の測定で比較すると $^{14}CO_2$ 発生で測定した値の 43 倍及び 1,140 倍の活性となる。褐変化するポプラの材の活性 5 nmole/時（第 4 表）は，この全活性が作動しても NADPH 等の必要量を満足に供給することが不可能である。実際上は G6P が 0.2～0.3 mM（正常）よりも 1/10 の低い濃度になっているから，NADPH や基質供給不足の状態は G6PDH 活性が比較的高くとも（430 nmole/時，54 倍の活性）起り得る。生体の組織に含まれている酵素活性は，活動上に必要な活性水準よりもはるかに高いことが動物で知られている[10]。ポプラの組織でも同様であった。

クロロゲン酸を基質として褐変化に関する予備的な実験を試みた。ポリ PhO によってクロロゲン酸から生成する化合物は 320 nm 付近の吸収の低い化合物であって褐変物質でない[4]。実際，ポプラの皮層抽出液にクロロゲン酸を加えて反応させても褐変化はおこらない[9]。褐変化したポプラ組織中のエーテル可溶性褐変物質（Purpurogallin）[11] の量は少なく，褐変物質は水と溶媒の界面に集まる。従ってピロガロールが *in vivo* でポプラの褐変化に関与している度合いはまだわからない。この実験は，代謝異常によって数時間かかって褐変化する機構の解明を目的としている。従って，クロロゲン酸を用いて褐変化する条件と褐変化を防ぐ条件を検討した結果，褐変化に過酸化水素が必要であり，NADPH が存在すると褐変化はおこらないことがわかった[9]。前述の G6P 濃度と G6PDH 活性の低下とよく一致した知見である。市販 POD，カブ抽出液或はポプラ抽出液によってクロロゲン酸から生成する褐変物質は，褐変したポプラ皮層部に存在する物質と似た吸収スペクトルを与える[9]。今後，ポプラを用いて過酸化水素の検出と定量を急務と考えている。

IV. 摘要および結論

1. 厳寒期に採取したポプラの枝や幹は 1 年以上凍結保存すると室温にもどしてから皮層部が褐変するようになる。

2. 4 年間，−20°C に保ったポプラではグルコースとピルビン酸の代謝活性が顕著に低下していた。

3. G6PDH 等の脱水素酵素活性の低下が著しく G6P の濃度も正常な試料の 1/10 であった。また，フェノール性化合物の濃度も約 1/3 に低下していた。

文　献

1) 匂坂勝之助 1969 植物の低温生化学的研究 II. ポプラのトランスケトラーゼ活性の変動とこれにともなう燐酸エステル代謝系の体制変化. 低温科学，生物篇，**27**，73–81.

2) 匂坂勝之助 1970 植物の低温生化学的研究 VI. ポプラ材部のグルコース-6-燐酸および 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素の活性について. 低温科学，生物篇，**28**，37–42.

3) 匂坂勝之助 1971 ポプラの糖燐酸エステル含有量と生活相の関係 II. 低温科学，生物篇，**29**，19–28.

4) Van Kammen, A. and Brouwer, D. 1964 Increase of polyphenoloxidase activity by a local virus infection in uninoculated parts of leaves. *Virology*, **22**, 9–14.

5) Nair, P. M. and Vining, L. C. 1965 Cinnamic acid hydroxylase in spinach. *Phytochemistry*, **4**, 161–168.

6) Ashwell, G. 1957 Colorimetric analysis of sugars. *In* Methods in Enzymology (S. P. Colo-

wick and N. O. Kaplan *eds.*), Academic Press, New York, **3**, 73–105.
7) 匂坂勝之助 1970 植物の低温生化学的研究 VIII. 冬型代謝の転換と分解およびとりこみの反応について. 低温科学, 生物篇, **28**, 49–56.
8) 田川 隆 1961 植物発育の化学 (芦田・江上・吉川編：生命現象の化学), 朝倉書店 東京, **II**, 524–529.
9) 匂坂勝之助 未発表.
10) Scrutton, M. C. and Utter, M. F. 1968 The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 249–302.
11) Chance, B. and Maehley, A. C. 1955 Assay of catalases and peroxidases. *In* Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan *eds.*), Academic Press, New York **2**, 764–775.

Summary

The twig and stem collected from wintering poplar (*Populus gelrica*) were stored in polyethylene bags at −6°C and −20°C. Metabolic disorders leading to the development of the browning inside the living bark appeared to proceed slowly during storage. Within a period of 6 month storage, browning was rarely seen when the materials were transfered to a warm room and kept at about 20°C. After 1 year or 2, however, the symptoms of metabolic lesions could clearly be seen and the twigs were unable to survive.

Activities to metabolize pyruvate-2-^{14}C, glucose-6- and -1-^{14}C were studied using 4-year-stored stems. It was found that the activities declined to the 1/10 of the level of normal. Dehydrogenase activities, particularly glucose-6-phosphate dehydrogenase, decreased to a very low level. Concentrations of glucose 6-phosphate and phenols were lowered to about 1/10 and 1/3 of normal, respectively, while that of free sugar remained at a normal level.