

tert. -Butylhydroperoxide 処理による赤ビート切片からの ベタシアニンリーケージの諸性質

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
著者	松尾, 友明 米田, 敏幸 伊藤, 三郎
巻/号	55巻3号
掲載ページ	p. 332-338
発行年月	1986年12月

tert.-Butylhydroperoxide 処理による赤ビート切片 からのベタシアニン リークエージの諸性質¹

松尾友明・米田敏幸²・伊藤三郎
鹿児島大学農学部 890 鹿児島市郡元

The Properties of Betacyanin Leakage in Redbeet Discs Exposed to *tert.*-Butylhydroperoxide

Tomoaki MATSUO, Toshiyuki YONEDA and Saburo ITOO
Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890

Summary

In order to obtain information on the mechanism of leakage which is often observed at the onset of plant senescence or some physiological disorders, a model experimental system has been established, which examines the kinetics and properties of betacyanin leakage from red beet discs treated with *tert.*-butylhydroperoxide (*t*-BHP).

1. No leakage of betacyanin was observed even after 4 days when red beet discs (ϕ 13 mm \times 1.5 mm) were incubated in MES-NaOH (pH 5.8) buffer containing 0.2 M mannitol and streptomycin (0.5 μ g/ml) in the absence of *t*-BHP in the dark at 20°C.

2. In this experimental system, changing the concentration (2-10 mM) of *t*-BHP and the duration (2-8 hours) of the treatment enabled the time when the betacyanin leakage occurred to be easily controlled.

3. As well as betacyanin, potassium ions, reducing sugars, UV-absorbing components and proteins also leaked out from red beet discs after the *t*-BHP treatment, but the extent of leakage appeared to be related to the molecular size.

4. The leakage showed a remarkable pH dependence between pH 5.05 and 7.43; the leakage of betacyanin occurred much faster below pH 5.8 than near pH 7.

5. Addition of calcium ion and spermine to the medium effectively prevented the leakage of betacyanin until *t*-BHP treatment caused leakage. Glutathione was effective only when it was used before treatment with *t*-BHP. Their mechanisms of prevention seem to differ.

This experimental system, using red beet discs, appears to be very useful for investigating the mechanism of leakage.

緒 言

果実や野菜を含む種々の植物組織で、老化の際に見られる最も一般的な外部変化は「しおれ」や「ちぢみ」であろう。これらは、組織からの水分の蒸散が増加した結果と考えられる。老化に伴う水分損失は他の細胞内低分子物質のリークエージの増加に平行して起こるといわれており、実際、イオン(3, 6, 16, 17, 19)、水溶性色素(19)、糖(9)などのリークエージが観察されている。そして、こ

れらのリークエージは二次的な代謝異常を引き起こし、最終的には、細胞や組織の崩壊に至ると推察されている。

それゆえ、このような生体膜のリークエージの発生機構を研究することは、老化や他のストレスによる生理障害(低温障害など)の分子レベルでの理解を深め、その遅延や防止方法を開発する手がかりが得られるものと期待される。特に、リークエージの発生の際には生体膜にどのような構造的変化が生じているのか、その変化を引き起こす主な化学的・物理的要因は何なのか、など大きな興味ある問題である。

他方、一般的な生物の老化現象は外的及び内的原因で

¹ 1986年1月7日 受理

² 小中産業

生成される遊離基(ラジカル)によって引き起こされるという説(7, 13, 23)があり、ラジカルの発生原因としては、紫外線・放射線・薬剤、及び酸素分子を含む各種の過酸化などが挙げられている。たとえば、植物に関連しても、過酸化水素(2)・オゾン(14)・特殊な農薬(4)により、果実や葉の老化が促進されることが報告されている。そこで、本実験では、*t*-BHP (*tert.*-ブチルヒドロパーオキシド、一種の過酸化物質)が生理的条件下で赤ビートの切片からベタシアニン色素のリーケージを誘発すること(18)に着目して、この実験系の確立と、これが生体膜のリーケージを詳細に検討するための優れたモデル実験系になり得るかどうかを検討した。

材料及び方法

赤ビート (*Beta vulgaris* L., cv. 'Detroit dark red')の肥大根は、北海道大学農学部附属農場で栽培したものを使用した。1983年9月8日に収穫し、肥大根の平均重は約500gであった。それらは、実験に使用するまで蒸散を防ぐために個別に紙とサランラップで包装し、4°Cで貯蔵した。

リーケージの実験において、インキュベーションの間に微生物の増殖を極力抑えるために、ガラス器具は乾熱滅菌し、赤ビートの肥大根・ピンセット・コルクボーラー・包丁などは、使用直前に70%エタノールで45秒間処理した。それぞれの肥大根からステンレス製のコルクボーラーと薄刃の包丁で円盤状切片(大きさ:φ13×1.5mm)を切り出し、0.2Mマンニトール液(0.2μg/mlの濃度でストレプトマイシンを含む)で洗浄後、材料として使用した。ところが、この切片4個を5mlの蒸留水に浸漬し、20°C暗所で24時間放置すると、外液の540nmにおける吸光度は0.2~0.3に達し、明らかにベタシアニンのリーケージが生じた。そこで、この非特異的なリーケージを抑えるために、浸漬液のMES緩衝液の濃度とpH、浸透圧(マンニトールの濃度)、インキュベーションの温度などを様々に変えて検討した。その結果、次のような条件を設定し、以後の実験を行った。

50ml容のコニカルビーカーに5.0mlの20mM MES-NaOH緩衝液(pH 5.8, 0.2Mマンニトールと1.0μgのストレプトマイシンを含む)を入れ、そこに4個の赤ビート切片を浸漬して、20°C暗所で4日間インキュベーションを続けても、ベタシアニンのリーケージは全く認められなかった。そこで、この条件で浸漬液に適当な濃度の*t*-BHPを添加することにより任意にリーケージを誘発することができるようになった。リーケージの定量的測定には、島津UV-200分光光度計を用い、

540nmの吸光度増加を調べた。各試験区は3区から成り、それらの測定値を平均して結果を求めた。カリウムイオンのリーケージは浸漬液のカリウム濃度を偏光ゼーマン原子吸光度計(日立180-80)により測定し、ppmで表示した。浸漬液の還元糖はSomogyi-Nelson法で定量し、タンパク質の定量はLowry法によって行った。

t-BHP (*tert.*-ブチルヒドロパーオキシド)とグルタチオンはシグマ社より、グッドのパフファーであるMES[2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸]とスペルミン四塩酸塩は半井化学薬品のものを使用した。

結果

1. リーケージに及ぼす*t*-BHP濃度の影響

上述した浸漬液に*t*-BHPを終濃度1.25mMから15mMになるようにそれぞれに添加して、連続処理に伴うベタシアニンリーケージを経時的に調べた。第1図に見られるように、*t*-BHP無添加区では40時間まで全く540nmでの吸光度の増加は認められなかったが、1.25mMから15mMのいずれの濃度においても明らかに540nmでの吸光度が増加し、ベタシアニンのリーケージが観察された。15mMの添加区では10時間でリーケージが起こり、さらに2時間後からは急激にOD540nmが増加した。処理開始後16時間には、その吸光度は1.4に達し、切片は白っぽく脱色してしまった。この濃度範囲においては、濃度が低くなるにつれて、リーケージの開始が遅くなり、1.25mMの処理区では20時間後

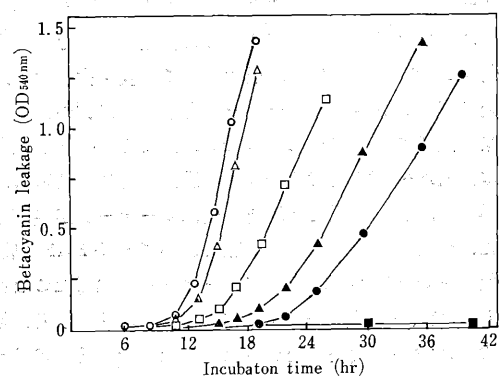


Fig. 1. Effect of *tert.*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) concentrations on the betacyanin leakage from discs of red beet roots. Four discs were incubated at 20°C in 5 ml of the MES-NaOH (pH 5.8) buffer containing 0.2 M mannitol and streptomycin (0.5 μg/ml) without (—□—) or with 1.25 mM (—●—), 2.5 mM (—▲—), 5 mM (—◊—), 10 mM (—△—), or 15 mM (—○—) *t*-BHP in the dark. Each value in the figure is the average of three measurements.

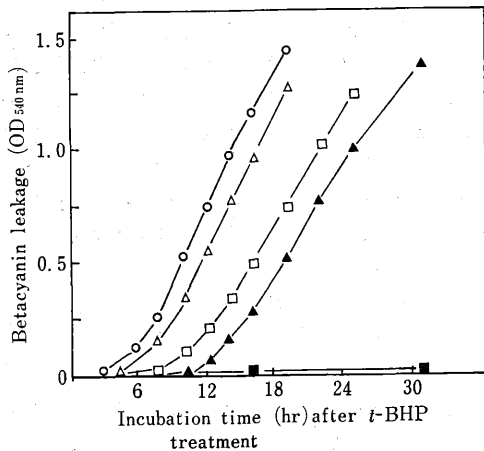


Fig. 2. Effect of duration of the *t*-BHP treatment on the betacyanin leakage from the discs of red beet roots. Four discs were treated with 10 mM of *t*-BHP for 0 hr (-■-), 2 hr (-▲-), 4 hr (-□-), 6 hr (-△-), or 8 hr (-○-), then washed with the MES-NaOH buffer containing 0.2 M mannitol and streptomycin (0.5 μg/ml) and incubated at 20°C in the same medium.

であった、また、それぞれの直線の勾配を比較してみると、リーケージの速度も *t*-BHP の濃度に依存して遅くなることがわかった。

2. リーケージに及ぼす *t*-BHP の処理時間の影響

リーケージを引き起こすのに必要な処理時間を調べるために、*t*-BHP の濃度を 10 mM に固定して、その処理時間を 2 時間から 8 時間に順次変えて実験を行った。処理後のベタシアニン リーケージを経時的に調べた結果が第 2 図である。10 mM の *t*-BHP による 8 時間処理区では、処理後 3 時間で 540 nm の吸光度増加が認められたが、2 時間処理区では 10 時間後にリーケージが観察された。つまり、いずれの処理区においても *t*-BHP 処理開始から 11 時間から 12 時間でリーケージが生じたことになり、最終的に達する OD 540 nm のレベルも各処理区の間において大差がなかった。また、それぞれのリーケージ速度、つまり、直線の勾配が *t*-BHP の濃度にかかわらず、ほぼ同じであるということは注目すべきである。

3. ベタシアニン リーケージに伴う他の細胞内成分のリーケージ

t-BHP により誘発されるリーケージがベタシアニンだけに起こる特殊なものか、他の細胞内成分もベタシアニンと平行してリークしている一般的な現象なのかを確

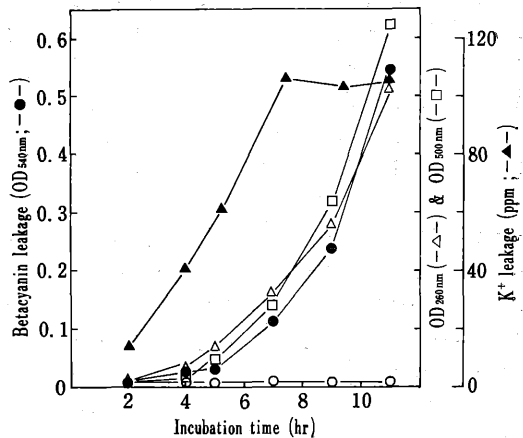


Fig. 3. Leakage of other cellular constituents from the discs of red beet roots exposed to 10 mM *t*-BHP for 6 hr in comparison of betacyanin. Leakage of betacyanin (OD 540 nm); -●-, reducing sugars determined by Somogyi-Nelson method (OD 500 nm); -□-, UV-absorbing compounds (OD 260 nm); -△-, proteins determined by Lowry method (OD 660 nm); -○-, and K⁺ determined by atomic absorption method (ppm); -▲-.

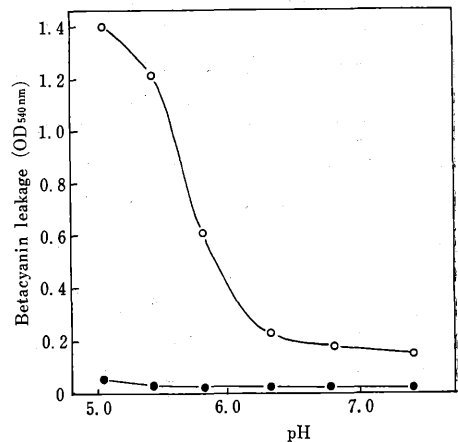


Fig. 4. pH dependence of the betacyanin leakage in the range of pH 5.08 to pH 7.45 from the discs of red beet roots exposed to 7.5 mM of *t*-BHP for 6 hr. *t*-BHP (-○-) and control (-●-).

かめるために、*t*-BHP 処理後、外液の OD 540nm に加えて、1) 原子吸光度法によるカリウムイオン量、2) OD 260nm、3) Somogyi-Nelson 法による還元糖量、4) Lowry 法によるタンパク質量を経時的に調べた。10 mM *t*-BHP で 6 時間処理した後の各成分のリーケージを第 3 図に示した。ベタシアニンのリーケージ (OD 540 nm の増加) と平行して、還元糖と UV 260nm の吸収物質のリーケージが観察されたが、注目すべきことは、ベ

タンシアニンより低分子のカリウムイオンは、ベタシアニンより早くリークエージを生じたことである。一方、高分子のタンパク質はこのインキュベーション時間内では全くリークが認められず、外液の 540 nm の吸光度が 1.0 を越えたところにタンパク質は初めて検出された。

4. 浸漬液の pH がベタシアニン リークエージに及ぼす影響

10 mM MES-NaOH 緩衝液を用い、pH を 5.05 から 7.43 の範囲で別々に調製し、それぞれの pH で 7.5 mM *t*-BHP で 6 時間処理した後、*t*-BHP を含まない浸漬液に変え、24 時間インキュベーションして、540 nm での吸光度を測定した (第 4 図)。その結果、*t*-BHP 処理によるベタシアニン リークエージは pH に強く依存して生じることが明らかとなった。中性付近では OD 540nm は 0.18 であったが、pH 6 以下ではその値は急に高くなった。pH 5.05 では、その吸光度は 1.4 に達した。

5. 数種の薬剤処理がベタシアニン リークエージに及ぼす影響

一般的に膜を安定化するといわれているカルシウムイオンとポリアミンの一種であるスペルミン、また、生体内還元物質である L-アスコルビン酸とグルタチオンの添加がベタシアニンのリークエージに及ぼす影響を調べた。それらの実験結果は、添加する時期により大きく変化した。たとえば、リークエージが少し始まった後に与えた L-アスコルビン酸及びグルタチオンは、ほとんど効果がなく、リークエージを逆に促進した。

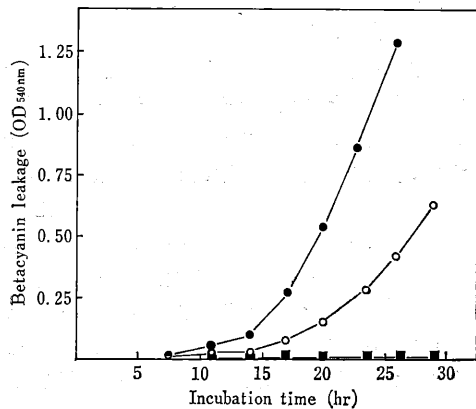


Fig. 5. Effect of post-treatment of spermine on the betacyanin leakage from discs of red beet roots exposed to 10 mM *t*-BHP for 4 hours. After the treatment of *t*-BHP four discs were washed with the buffer lacking *t*-BHP and then incubated in the same buffer containing 2.5 mM spermine. *t*-BHP only (●-), *t*-BHP and then spermine treatment (○-), no treatment (■-).

第 5 図と第 6 図に典型的な抑制効果の結果を示した。赤ビート切片を 5 mM の *t*-BHP を含む浸漬液中で 20 °C 暗所で 4 時間処理した後、2.5 mM のスペルミンを含んだ浸漬液 (*t*-BHP は含まれていない) に移し、その後の OD 540nm を経時的に測定した (第 5 図)。スペルミン処理区も無処理区も、リークエージの開始はほぼ同じ時期に見られ、*t*-BHP 処理後 10 時間目であった。その後のリークエージは、スペルミンの添加により約 70% 抑制された。24 時間後の OD 540nm は、無処理区では 0.87 であったが、スペルミン処理区は 0.29 であった。対照である *t*-BHP 無処理区は、29 時間全く OD 540nm の増加は認められなかった。このスペルミンの抑制効果は明らかに濃度に依存しており、他の実験におけるそのリークエージの抑制率は、0.5 mM で 45.6%、1 mM で 65%、2.5 mM で 74.1%、5 mM で 87.5% であった (5 mM *t*-BHP で 5 時間処理後 24 時間目に測定した値である)。カルシウムイオンの添加もスペルミンのそれとよく似た抑制効果を示した。

t-BHP で処理前に赤ビート切片を 20 mM の還元型グルタチオンで 6 時間処理し、その後 5 mM の *t*-BHP で 6 時間処理してから、緩衝液に移した。この外液の 540 nm を経時的に測定した結果が第 6 図である。*t*-BHP 処理のみの場合は、OD 540nm の増加が処理後 8 時間目に見られたが、グルタチオン前処理区では、そのリークエージがさらに 6 時間遅れて観察された。また、その後の OD 540nm の増加もかなり緩やかであった。21 時間目の測定ではリークエージは約 88% 抑制されていた。このような前処理による遅延効果は、スペルミンやカルシウムイオンでは認められなかった。L-アスコルビン酸 (5-40 mM) 処理もグルタチオンとよく似た抑制効果を示し

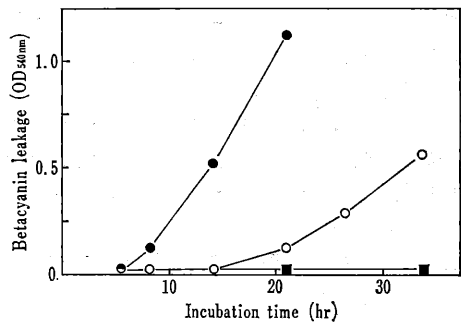


Fig. 6. Effect of pre-treatment of glutathione on the betacyanin leakage from discs of red beet roots exposed to 5 mM *t*-BHP for 6 hours. Four discs were pre-treated with 10 mM glutathione and subsequently with *t*-BHP. *t*-BHP only (●-), glutathione and then *t*-BHP treatment (○-), no treatment (■-).

た。

考 察

植物の老化や低温障害などの外的ストレスによる生理障害の発生初期において、生体膜のリーケージが起こると一般に考えられている(5, 9, 10, 11, 16, 17)。しかしながら、その実体はいまだ不明な点が多い。實際上、健全な植物組織や細胞内のリーケージを直接的に正確に測定することは難しく、それゆえ、その際の生体膜における化学的・物理的变化を調べた研究は数少ないように見受けられる。

赤ビートの肥大根切片からのベタシアニン色素のリーケージは、可視的に、あるいは簡便に早く調べることができるので、生体膜のリーケージを総合的に研究するには、極めて好都合なモデル実験系であると考えた。そこで、Siegel and Halgern(18)の実験を参考にして、過酸化処理によるベタシアニンリーケージの誘発を試みた。クメン・ヒドロパーオキドより水に溶けやすく、過酸化水素より沸点が高く、比較的取り扱いやすい点から *t*-BHP を過酸化物質として選んだ。

第1図と第2図に見られるように、赤ビート切片は *t*-BHP の濃度と処理時間に対応して、ベタシアニンのリーケージを生じた。これらの結果から、*t*-BHP の処理条件を適当に選ぶことにより任意の時期にリーケージを起こすことができ、生体膜リーケージを様々な観点から調べることが可能となった。

またこの現象は、ベタシアニン色素だけに見られる特殊なリーケージではなく、他の細胞内成分、糖や無機イオンなどの低分子成分も平行してリークしている一般的な現象であることも明らかとなった(第3図)。ここで注目すべきことは、ベタシアニンや糖などの低分子成分は、ほぼ同時期にリークし始めているが、高分子であるタンパク質は、この時にはまだリークしていないことである。このことは、この実験系で起こるリーケージが、いわゆる袋が破れるような性質のものではなく、大まかな選択透過性を残したリーケージであることが推測され興味深いものがある。

以上のことから、今後の重要な問題として、次の4つのことが考えられる。

- (i) *t*-BHP 処理は、どのようなメカニズムでリーケージを引き起こすのか。
- (ii) その際に、生体膜の化学的・物理的構造はどのように変化しているか。
- (iii) リーケージが起こると細胞内代謝はどう変化するのか。どんな異常が起こるのか。

(iv) そのリーケージ、あるいは膜の構造変化を防ぐにはどうすればよいか。

(i) の問題に関連して、筆者らの予備実験で次のことも明らかとなっている。つまり、この実験系で、*t*-BHP を添加せずに、その代わりに、(I) Fenton の試薬(1 mM FeCl₂+2 mM H₂O₂) で赤ビート切片を処理し、あるいは(II) 殺菌灯を利用して紫外線照射をした。その結果、処理開始から24時間後に、それぞれの外液の540 nm における吸光度が 0.42 と 0.33 となり、明らかにベタシアニンのリーケージが生じた。この両処理はともに、水溶液中でヒドロキソラジカル(OH[•])を生成することが知られているので、少なくとも活性なラジカルを与えることにより、赤ビート切片にリーケージを起こすことができるものと考えられる。

最近、Trotta ら(20, 22)は赤血球を *t*-BHP で処理し、それによって起こる溶血反応を詳しく調べているが、彼らの説明によれば、*t*-BHP がヘモグロビンに由来する鉄イオンの触媒作用によりラジカルとなり、それが赤血球の脂質に過酸化を引き起こして、最終的には膜が壊れ溶血が生じると推論している。また Boveris ら(1)は *t*-BHP をラットの摘出した肝臓に灌流して、その脂質過酸化物質の生成を微弱化学発光測定法により経時的に追跡している。これらの結果は、植物組織中においても、*t*-BHP がそれ自身でか、あるいは何かの作用を受けラジカルとなり、生体膜を攻撃して膜脂質の過酸化を起こす可能性を示唆させるものである。この点を明らかにするために、今後ラジカル捕捉剤や金属キレート剤を用いた実験を行う必要がある。

植物の老化に関しても、Mazliak(10)は生体膜の損傷の蓄積が老化の原因になると推論し、その際には、膜脂質の過酸化が重要な要因であると指摘している。そして、すでに多くの植物組織で過酸化脂質の蓄積が認められている(4, 5, 8, 15)。それゆえ、Mazliak の考えによれば、この赤ビートのモデル実験系で、過酸化物質(*t*-BHP) 処理によるリーケージの発生並びにそれに伴う生体膜の構造変化、生体内の代謝異常の発生を調べれば、自然に起こる老化のシミュレーション実験ともいえよう。今後、まず膜の化学的性質の変化、特に過酸化脂質の生成とリーケージの発生との関連性について調べる必要があると考えている。

他方、(iv) の問題に関連して、4種類の添加物の効果を調べた。本実験では、スベルミンが低濃度で効果的にベタシアニンのリーケージを抑制した(第5図)。スベルミンとカルシウムイオンは、一般に生体膜脂質、特にリン脂質と結合して膜を安定化するとされているの

で、恐らく BHP 処理により、リークージの起こり易い状態になった膜を補強して、リークージをより小さくするように働いているものと推測している。すでにスペルミンは、加温ショックによるベタシアニンのリークージも効果的に抑制することが報告されている(12, 21)が、その抑制機構については憶測の域を出ないままである。またグルタチオンは、前処理によりリークージの発生時期を遅延する効果を示した(第6図)が、それ自身の還元作用により *t*-BHP の作用を弱めたものと考えられる。このことは、この実験系で生体内の酸化還元のパランスがリークージの発生に大きな意味を持つことを示唆しており、今後、組織内の還元物質の動向にも関心が持たれる。

前述したように、この実験系が老化のシミュレーションの性格を持つとすれば、このような添加物の効果を調べることにより、老化抑制物質を検索するための bioassay 系として利用できる可能性もあり、現在、種々の薬剤についてリークージの抑制効果を検討している。

摘 要

老化や生理障害の初期に見られるリークージ現象の発生機構に関する知見を得るために、赤ビート切片を生理的条件下で *tert.*-ブチルヒドロパーオキシド (*t*-BHP) で処理することにより、ベタシアニン色素のリークージを起こすモデル実験を確立し、その諸性質を検討した。

1. 赤ビート切片(サイズ: ϕ 13 mm \times 1.5 mm)を 0.2 M マンニトールとストレプトマイシン (0.5 μ g/ml) を含む MES-NaOH 緩衝液 (pH 5.8) に浸漬し、20°C で暗所中 4 日間放置しても、ベタシアニンのリークージ (OD 540 nm の増加) は全く認められなかった。

2. この実験で、*t*-BHP の処理濃度 (2-10 mM) と処理時間 (2~8 時間) を変えることにより、任意の時期にリークージを起こすことができた。

3. ベタシアニンのリークージに前後して、カリウムイオン・還元糖・UV 260 nm 吸収物質・タンパク質も漏出したが、その漏出順序は分子サイズに関係していると考えられた。

4. このベタシアニン リークージは顕著な pH 依存性を示し、中性付近に比べて pH 5.8 以下ではより早くリークージが発生した。

5. カルシウムイオン・スペルミン・グルタチオンが処理時期によって効果的にベタシアニン リークージを抑制したが、それらの作用様式は異なっていると推測した。

以上のように、この赤ビート切片を用いたモデル実験

は、リークージを様々な観点から研究する上で極めて有用なことが明らかとなった。

謝 辞 実験材料の赤ビートを栽培・送付して下さいました北海道大学農学部田村 勉教授及び北海道大学農学部附属農場今村 茂他の皆様に深謝の意を表します。

引用文献

1. BOVERIS, A., E. CADENAS, R. REITER, M. FILIPKOWSKI, Y. NAKASE and B. CHANCE. 1980. Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions. Proc. Natl. Acad. Scic. 77: 347-351.
2. BRENNAN, T. and C. FRENKEL. 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. Plant Physiol. 59: 411-416.
3. BURG, S. P., E. A. BURG and R. MARKS. 1964. Relationship of solute leakage to solution tonicity in fruits and other plant tissues. Plant Physiol. 39: 185-195.
4. CHIA, L. S., J. E. THOMPSON and E. B. DUMBOFF. 1981. Simulation of the effects of leaf senescence on membranes by treatment with paraquat. Plant Physiol. 67: 415-420.
5. DHINDSA, R., P. PLUMB-DHINDSA and T. A. THORPE. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Bot. 32: 93-101.
6. FERGUSON, C. H. R. and E. W. SIMON. 1973. Membrane lipids in senescing green tissues. J. Exp. Bot. 24: 307-316.
7. 平井俊策. 1978. 老化と活性酸素. 代謝. 15: 1329-1335.
8. LURIE, S. and R. BEN-ARIE. 1983. Microsomal membrane changes during the reopening of apple fruit. Plant Physiol. 73: 636-638.
9. MAYAK, S., Y. VAADIA and D. R. DILLEY. 1977. Regulation of senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus*) by ethylene. Plant Physiol. 59: 591-593.
10. MAZLIAK, P. 1983. Plant membrane lipids—changes and alterations during aging and senescence. p. 123-140. In: M. LIEBERMAN (ed.) Post-harvest physiology and crop preservation. Plenum Press.
11. MURATA, T. and Y. TATSUMI. 1979. Ion leakage in chilled plant tissues. p. 141-151. In: J. M. LYONS, D. GRAHAM and J. K. RAISON (eds.) Low temperature stress in crop plants. the role of the membrane. Academic Press.
12. NAIK, B. I. and S. K. SRIVASTAVA. 1978. Effect of Polyamines on tissue permeability.

- Phytochem. 17 : 1885—1887.
13. 二木鋭雄. 1981. 過酸化脂質—生体内の招かれざる酸化反応—. 現代化学. No. 118 : 24—32.
 14. PAULS, K. P. and J. E. THOMPSON. 1980. In vitro simulation of senescence-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation. *Nature* 283 : 504—506.
 15. PAULS, K. P. and J. E. THOMPSON. 1984. Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiol.* 75 : 1152—1157.
 16. RHODES, M. J. C. 1980. The maturation and ripening of fruits. p. 157—205. In : K. V. THIMANN (ed.) *Senescence in plants*. CRC Press.
 17. SACHER, J. A. 1973. Senescence and postharvest physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24 : 197—224.
 18. SIEGEL, S. M. and L. A. HALPERN. 1965. Effects of peroxides on permeability and their modification by indoles, vitamin E, and other substances. *Plant Physiol.* 40 : 792—796.
 19. SUTTLE, J. C. and H. KENDE. 1980. Ethylene action and loss of membrane integrity during petal senescence in *Tradescantia*. *Plant Physiol.* 65 : 1067—1072.
 20. THORNALLEY, P. J., R. J. TROTTA and A. STERN. 1983. Free radical involvement in the oxidative phenomena induced by *tert*-butyl hydroperoxide in erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 759 : 16—22.
 21. TOPROVER, Y. and Z. GLINKA. 1976. Calcium ions protect beet root cell membranes against thermally induced changes. *Physiol. Plant.* 37 : 131—134.
 22. TROTTA, R. J., S. G. SULLIVAN and A. STERN. 1983. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to *tert*-butyl hydroperoxide. *Biochem. J.* 212 : 759—772.
 23. 吉田政幸・渡部徳子・上森まり子・中山伸一. 1980. 老化を招く遊離基 (I). *化学の領域.* 34 : 904—909.