

ヨウサイ(*Ipomoea aquatica* Forsk.)の低温障害発生に伴う  
K<sup>+</sup>漏出速度,遊離アミノ酸含量並びにフェニルプロパノイド代  
謝の変化

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
著者	平田, 貴美子 茶珍, 和雄 岩田, 隆
巻/号	55巻4号
掲載ページ	p. 516-523
発行年月	1987年3月

ヨウサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk.) の低温障害発生に伴う  $K^+$  漏出速度, 遊離アミノ酸含量並びにフェニルプロパノイド代謝の変化<sup>1</sup>

平田貴美子・茶珍和雄・岩田 隆  
大阪府立大学農学部 591 堺市百舌鳥梅町

Changes of  $K^+$  leakage, Free Amino Acid Contents and Phenylpropanoid Metabolism in Water Convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) with Reference to the Occurrence of Chilling Injury

Kimiko HIRATA, Kazuo CHACHIN and Takashi IWATA

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

Summary

Water convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) is widely distributed as leafy vegetables in South-East Asia including southern area in Japan. It shows chilling injury manifested as browning of young leaves (2-3 immature leaves located at top part of each vine) and young stems (top part of each vine) when stored at temperatures about below 9°C. In the present study, the changes of  $K^+$  leakage, free amino acid contents, phenylpropanoid contents, and some enzyme activities relating to the biosynthesis of phenylpropanoids were investigated with reference to the chilling injury. The materials were sealed in polyethylene bags (0.03 mm thickness) and stored at 1, 6, 9, 12, 15, 20, and 30°C.

A break point of Arrhenius plot for  $K^+$  leakage in young and mature leaves was found between 10 and 16°C, whereas the matured leaves showed only a little chilling-sensitivity. A marked increase of the rate of  $K^+$  leakage occurred in young leaves stored at 1°C, preceding the appearance of browning.

As the contents of phenylpropanoids such as *t*-cinnamic, *p*-coumaric, caffeic and chlorogenic acids were investigated, they increased before the occurrence of chilling injury and then tended to decline almost simultaneously with the development of chilling injury. They also increased at 15°C, but the rise delayed and the extent was considerably lower than that at 1°C.

Among the enzymes relating to the biosynthesis of chlorogenic acid, a main substrate of browning, hydroxycinnamoyl CoA ligase (CL) activity increased in both of 1°C and 15°C storages, then the increase was faster at 1°C reaching to a peak before the occurrence of chilling injury. Hydroxycinnamoyl CoA : quinate hydroxycinnamoyl transferase (CQT) activity showed a markedly higher increase in the 1°C storage.

On the results, we present a conclusion of the low temperature induced browning mechanism as follows; exposure to low temperature leads to a rise of phenolic contents through activation of the enzymes such as CL and CQT. The accumulated phenolics induce the browning after its enzymic oxidation.

緒 言

ヨウサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk.) はサツマイモ葉に似た植物で、東洋の熱帯、亜熱帯に広く分布する重

<sup>1</sup> 1986年3月7日 受理

要な野菜の一つである(4, 6, 8). わが国では、沖縄や九州の一部地域でアサガオナ、エンサイなどと呼ばれ、自家栽培あるいは販売されてきた(2, 17) が、最近では東京、大阪などの都市のスーパーマーケットでも販売され、一

般化してきた(2)。ヨウサイは湿地を好むが、畑地でも栽培できる。次々に伸びてくる若い莖葉を摘んで利用されるが(4, 16), Ca や Fe などの無機質やビタミン類を豊富に含有するので(9, 27), 栄養豊かな野菜の一つとして利用が広まりつつある。

ヨウサイは日本においては、夏期の高温多湿時に栽培、利用されるため、収穫後の品質変化が早く、日持ちが悪い。そこで著者らは、さきに低温による品質保持効果を調べたところ、ヨウサイは低温障害にかかりやすいことを認め、 $9^{\circ}\text{C}$  以下の低温貯蔵中には若い葉及び莖が褐変することを報告した(7)。

本研究においては、ヨウサイの貯蔵温度と低温障害発生までの期間を調べ、また貯蔵中における  $K^+$  漏出速度、遊離アミノ酸及びフェノール物質の含量、フェノール物質代謝に関する酵素活性の変化を測定し、低温障害発生との関連について検討した。

### 材料及び方法

ヨウサイは大阪府立大学附属農場で6月から10月にかけて畑地栽培した。貯蔵方法は、葉が7~8枚ついた若い莖を数本ずつポリエチレン袋(厚さ0.03 mm)に密封し、1, 6, 9, 12, 15, 20 及び  $30^{\circ}\text{C}$  に貯蔵し、以下の項目について実験を行った。実験のなかで“若葉”と称するものは先端の2~3葉であり、“成熟葉”と称するものは先端より6~7番目の葉とした。

#### 1. 低温障害の症状

各温度に貯蔵したヨウサイの外観変化の有無や様相について観察した。

#### 2. $K^+$ 漏出速度

葉をカミソリ刃で5 mm 四方に切断したものを0.5 gを、あらかじめ  $1\sim 30^{\circ}\text{C}$  の種々の温度に保った脱イオン水50 ml 中に入れ、2時間振とうしながらインキュベートした後、脱イオン水中に漏出した  $K^+$  量をフリュームフォトメーターで測定した。 $80^{\circ}\text{C}$  に一晚放置して漏出した  $K^+$  量を漏出総量とし、これに対する割合で漏出速度を表した。貯蔵中の  $K^+$  漏出速度の変化については、 $20^{\circ}\text{C}$  の水中に2時間インキュベートした場合の、漏出速度の  $K^+$  漏出総量に対する割合で比較した。

#### 3. 遊離アミノ酸含量

$80\%$  熱エタノール抽出物を減圧乾固した後、エーテルで脱脂したものにアミノ酸分析用クエン酸緩衝液(pH 2.0)を加え一定量にした。この試料について、日立034型液体クロマトグラフィーにより定量分析した。

#### 4. フェノール物質の分離・定量

1) 薄層クロマトグラフィー: ヨウサイの若葉の  $80\%$  熱エタノール抽出物100  $\mu\text{l}$  を、シリカゲル薄層にス

ポットし、*n*-ブタノール:酢酸:水(6:1:2)を用いて展開した。展開後のフェノール物質の検出は、ヨウサイのアセトンパウダーから0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で抽出した粗酵素液、ジアゾ化 *p*-ニトロアニリン及び  $2\%$   $\text{FeCl}_3$  の噴霧によって行い、また紫外線照射下で蛍光を発するバンド部分の薄層をかきとり、メタノールで抽出したのものについて紫外外部吸収曲線を調べた。

2) ガスクロマトグラフィー: Castele らの方法(3)に準じて行った。すなわち、 $80\%$  熱エタノール抽出物を  $\text{N}_2$  気流下で乾固し、*N*, *O*-ビストリメチルシリルトリフルオロアセトアミド100  $\mu\text{l}$  を加え、密栓して  $125^{\circ}\text{C}$  で10分間反応させたもの一定量をカラムに注入した。使用した機器は水素炎イオン化型検出器を備えた日立163型である。カラムはガラス製(内径3 mm×長さ2 m)を用い、カラム充填剤にはクロモソルブ W AW DMCS ( $80\sim 100$  mesh)に SE-30 と SE-52 をそれぞれ  $1.5\%$  ずつコーティングしたものを使用した。キャリアガス(He)の流速は30 ml/min、試料注入口温度は  $285^{\circ}\text{C}$ 、カラムの昇温は  $80\sim 330^{\circ}\text{C}$  ( $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )とした。ピークの同定は標準物質の保持時間との比較による。

#### 5. 酵素の調製と酵素活性

0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)中にその  $10\%$  ポリクラー AT 並びに10 mM ジチオスレイトールを加えた抽出液中で組織を磨碎し、ミラクロスでろ過した後、 $20,000\times g$  で15分間遠心分離した。その上澄を  $80\%$  飽和硫酸で塩析し、一晚透析したものを酵素液とした。

1) ヒドロキシシンナモイル CoA リガーゼ (CL) 活性の測定: 0.05 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.45), 100  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ , 2.5  $\mu\text{M}$  ATP, 0.5  $\mu\text{M}$  基質及び酵素液をセルに入れ、全量を2.0 mlとした。反応は0.2  $\mu\text{M}$  の CoA の添加により開始した(5, 19)。

2) カフェオイル CoA キナ酸ヒドロキシシンナモイルトランスフェラーゼ (CQT) 活性の測定: 0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0), 1  $\mu\text{M}$  EDTA, 0.2  $\mu\text{M}$  クロロゲン酸及び酵素液を入れ、全量を2.0 mlとした。0.2  $\mu\text{M}$  CoA の添加により反応を開始した(20)。

#### 6. タンパク質含量

酵素液中のタンパク質含量は Lowry の方法(14)で測定した。

### 結 果

#### 1. 低温障害発生の様相及び $K^+$ 漏出速度

ヨウサイを  $1\sim 30^{\circ}\text{C}$  の各温度下に貯蔵し、貯蔵中の外観の変化を観察した。低温障害は  $9^{\circ}\text{C}$  以下でみられたが、発生までの期間は季節により差があり、7~8月のものに比べ、9~10月に収穫したものは障害の発現が1

～3日遅れる傾向にあった。1°C貯蔵では1～4日、6及び9°C貯蔵では3～7日で症状が現れた。症状としては、まず頂芽から2～3葉までの若葉に急激に黒斑が現れ、さらに茎が褐変、萎凋し、基部の成熟葉も徐々に暗緑色化した。12、15°C貯蔵ではこのような症状は観察されず、1週間以上も緑色を保持した後黄化が始まった。20°C貯蔵では約3～5日で成熟葉の葉脈付近から黄化が始まり、葉身全体が黄化し、その後茎から脱落した。30°C貯蔵では1～2日で黄化、葉の脱落が生じた(第1図)。

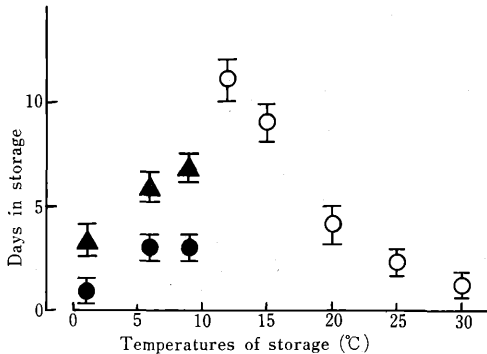


Fig. 1. The days until occurrence of chilling injury or yellowing of water convolvulus leaves stored at various temperatures ranging from 1°C to 30°C.

- Onset of chilling injury observed in July and August-harvest.
- ▲ Onset of chilling injury observed in September and October-harvest.
- Onset of yellowing.

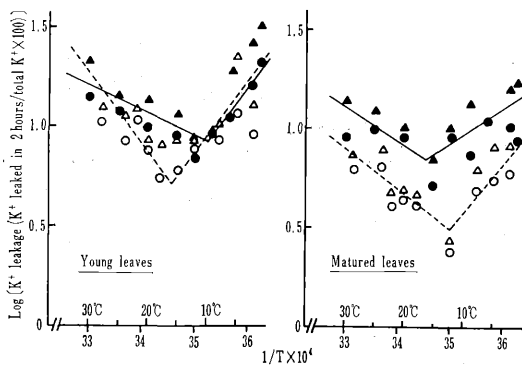


Fig. 2. Arrhenius plots of the rate of potassium ion leakage from the sliced tissues of water convolvulus leaves at harvest. The sliced tissues were incubated in the deionized water at various temperatures (1–30°C).

- Results in 1981 (●, ▲ show duplicated values).
- Results in 1982 (○, △ show duplicated values).

生体膜はある臨界温度以下にさらされると相転換が起こり、構造的・機能的な変化を受けるとされている(15)。たとえば、膜が変性すると膜透過性が増し、イオンなどの漏出が激しくなり、さらに組織の破壊を招くとされている。生理・化学的特性に対するアレニウスプロットをとると、低温に敏感な植物は、臨界温度付近で直線に折れ曲り(break)が生じるとされている(23)ので、ヨウサイの $K^+$ 漏出速度に対するアレニウスプロットを求めた(第2図)。低温で障害発生が顕著であった若葉からの $K^+$ 漏出速度は、温度低下とともに減少したが、ある温度を限界にそれ以下は低温であるほど増大し、ほぼ2本の直線関係が得られた。両直線の交わるbreak温度は10～16°C付近であったが、年により若干の差があった。若葉に比べると低温障害の発生が遅く、障害の程度も軽い成熟葉においてもやはり同温度付近でbreakが起こった。

次に、低温障害が明らかに発生した1°C貯蔵区及び、低温障害が発生せず緑色がよく保持された15°C貯蔵区のものについて貯蔵中の $K^+$ 漏出速度の変化を測定した。成熟葉では1°C、15°Cとも、貯蔵中わずかに増大したが若葉では増大傾向が顕著であった。特に1°C区で漏出速度の増大の程度が非常に大きく、目に見える障害発生以前に急激な膜透過性の増大が起きることがわかった

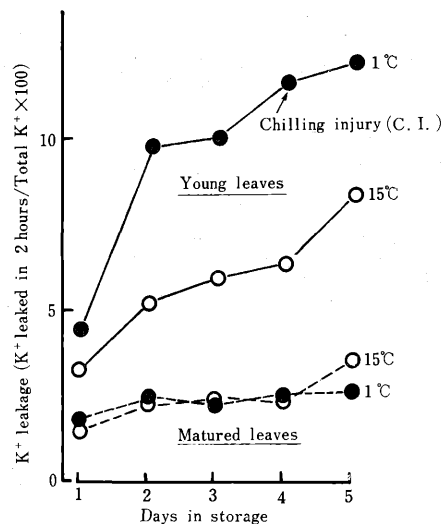


Fig. 3. The changes in the rates of potassium ion leakage from the sliced tissues of water convolvulus stored at 1 and 15°C. Measured at 20°C.

- Young leaves stored at 1°C.
- Young leaves stored at 15°C.
- Matured leaves stored at 1°C.
- Matured leaves stored at 15°C.

Table 1. Changes of amino acid contents in water convolvulus stored at 1°C and 15°C.

Temperature	Amino acid	Days	1°C					15°C			
			0	1	3	4	6	1	3	4	6
	Aspartic acid	*5.0	11.1	33.4	21.5	4.5	20.4	55.5	84.4	61.6	
	Serine fr.	12.5	13.7	32.6	27.6	19.4	18.2	83.4	119.2	166.7	
	Gultamic acid	10.8	9.1	21.7	24.2	7.8	17.8	30.7	41.0	31.6	
	Proline	2.3	1.5	5.0	7.8	8.0	0.4	7.2	7.7	8.2	
	Glycine	0.3	0.7	1.8	1.1	1.2	0.9	1.2	1.9	2.8	
	Alanine	2.3	7.9	31.5	30.6	31.7	3.3	7.9	10.3	10.7	
	Valine	2.0	2.8	7.4	8.0	5.3	3.2	23.4	43.4	32.4	
	Isoleucine	1.7	1.7	4.6	4.5	2.9	2.0	2.2	18.5	26.1	
	Leucine	1.0	2.0	5.7	5.5	3.6	0.9	28.3	16.3	20.3	
	Tyrosine	1.2	2.8	8.6	8.4	7.2	0.5	7.1	12.1	19.4	
	Phenylalanine	1.5	1.4	3.3	2.5	0.5	1.2	9.2	11.0	27.3	
	γ-ABA	13.7	7.8	2.7	2.9	2.4	1.6	4.6	3.0	2.7	
	Lysine	0.2	0.4	0.7	7.3	6.6	0.2	1.6	1.8	6.2	
	Histidine	3.2	2.2	4.0	6.1	1.6	2.6	10.0	13.9	16.2	
	Arginine	1.5	6.4	9.3	11.9	6.7	2.4	19.6	29.4	22.2	
	Total	59.2	71.5	172.3	169.9	109.4	75.6	284.8	413.9	461.7	

\* mg/100g FW.

Table 2. Identification of phenolics in water convolvulus separated with thin-layer chromatography.

*Band No.	Rf-value (×100)	color			Ultraviolet absorption	
		2%FeCl <sub>3</sub>	dialzo- <i>p</i> -nitroaniline	**crude enzyme	λ <sub>max</sub>	λ <sub>shoulder</sub>
1	90	Dark green	Red brown	Brown	326~9	301~2
2	81	Deep green	Brown	Brown	324~9	296
3	66	Light green	Yellow brown	Brown	327~30	287
4	44	Light green	Yellow brown	Brown	329~30	298

\* Silica-gel thin-layer was developed by *n*-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O (6 : 1 : 2) as a solvent.

\*\* Crude enzyme was extracted from the young leaves of water convolvulus.

(第3図).

## 2. 遊離アミノ酸含量の変化

1°C 及び 15°C 貯蔵に伴う各遊離アミノ酸含量の変化を調べたところ、プロリン、グリシン及びリジンは増加し、γ-アミノ酪酸は減少したが、変化の程度は両温度区間で大差がなかった。アラニンも両温度区とも増加したが、15°C 貯蔵に比べ 1°C 貯蔵での増加の程度が大きかった(第1表)。

フェニルプロパノイドの生合成に密接な関連を持つチロシンとフェニルアラニンは 15°C では増加し続けたのに対し、1°C ではいったん増加した後減少しており、特にチロシンは貯蔵3日まで 15°C と同程度まで急増した。

## 3. フェニルプロパノイド類の分離・定量並びに貯蔵中の変化

ヨウサイの 80% 熱エタノール抽出物を薄層クロマトグラフィーで分離したところ、フェノール発色剤である

ジアゾ化 *p*-ニトロアニリンや 2% FeCl<sub>3</sub> で呈色し、また紫外線照射によって蛍光を発する 4 本のバンドが得られた(第2表)。ヨウサイから抽出した粗酵素液によっていずれのバンドも褐変した。これらのことから、各バンドにはフェノール物質が含まれ、何らかの形で褐変の基質となっていると思われる。Rf 値及び紫外外部における吸収曲線の形から、バンド No. 2 にカフェー酸、バンド No. 3 にクロロゲン酸が多く含有されているものと推察された。

次に、ガスクロマトグラフィーによりフェノール物質を分離したところ、シキミ酸経路を経て生合成される芳香族アミノ酸から代謝されて生ずるフェニルプロパノイド類の中で *trans*-桂皮酸、*p*-クマール酸、カフェー酸、フェルラ酸及びクロロゲン酸を同定した(第4図)。さらにこれらの貯蔵中の変化を調べたが(第5図)、シキミ酸経路からの生成物であるフェニルアラニンが脱アミノされてできる *t*-桂皮酸は、15°C では貯蔵3日後に増

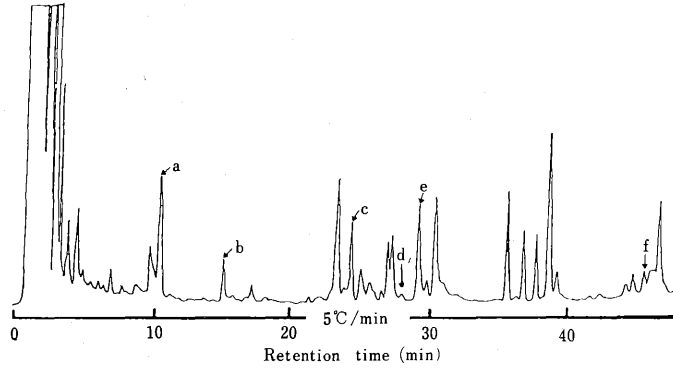


Fig. 4. Gas chromatogram of TMS derivatives of phenolics in water convolvulus at harvest.  
a: internal standard, catechol, b: *t*-cinnamic acid, c: *p*-coumaric acid, d: ferulic acid, e: caffeic acid, and f: chlorogenic acid.

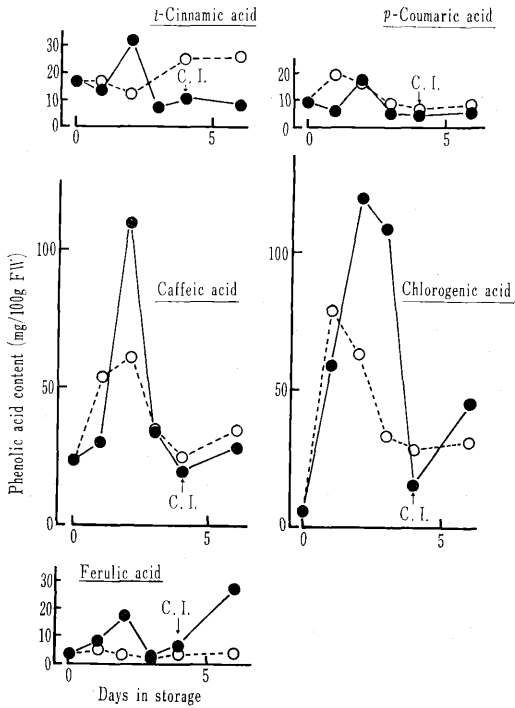


Fig. 5. Changes in some phenolic acids contents, extracted from the young leaves of water convolvulus stored at 1°C (●—●) and 15°C (○---○).

加したのに対し、1°Cでは障害発生前である貯蔵2日に著しく増加しその後急減した。*t*-桂皮酸が水酸化されてできる*o*-クマール酸は、1及び15°C貯蔵ともに一時的に増加しその後減少したが、この場合は15°Cの方が早く増加した。*o*-クマール酸の3位の位置に水酸基が導入されてできるカフェー酸、及びカフェー酸がキナ酸とエ

Table 3. Substrate specificity of hydroxycinnamic acid: CoA ligase extracted from young leaves of water convolvulus.

Substrate	Enzyme activity
	(Units/mg protein)
<i>t</i> -Cinnamic acid	34.8
Caffeic acid	109.5
<i>o</i> -Coumaric acid	3.3
<i>p</i> -Coumaric acid	13.3
Ferulic acid	11.0
Quinic acid	4.8
Shikimic acid	4.8

\* One unit was defined as the amount of enzyme to give a change in absorbance of 0.01 OD/min.

ステル結合してできるクロロゲン酸は、貯蔵中いったん増加しその後減少しており、両成分ともに1°C貯蔵区での増加量は15°C区のものよりかなり大きかった。カフェー酸が*o*-メチル化されて生ずるフェルラ酸は15°C貯蔵ではほぼ一定であったが、1°Cでは増加した。

#### 4. クロロゲン酸生成に関与する数種酵素活性の変化

クロロゲン酸生成に重要な役割を持つ酵素の一つに、ヒドロキシシンナモイル CoA リガーゼ (CL) がある。本研究のヨウサイにおいてはカフェー酸含量の貯蔵中の変化が大きかったが、まず CL がカフェー酸やその他のフェニルプロパノイド類にどの程度の基質親和性をもつかを調べた。その結果、カフェー酸が最も大きな基質親和性を持ち、*t*-桂皮酸はカフェー酸の約 1/3、*o*-クマール酸とフェルラ酸は約 1/10 であった (第3表)。

カフェー酸を基質に用いて CL 活性の貯蔵中の変化を調べたところ、両温度区ともに増加した後減少したが、

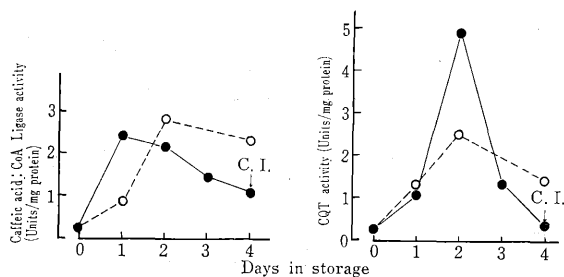


Fig. 6. Changes in the activities of caffeic acid : CoA ligase (CL) and caffeoyl CoA : quinate hydroxycinnamoyl transferase (CQT) extracted from the young leaves of water convolvulus stored at 1°C (●—●) and 15°C (○---○). CL activity was measured with caffeic acid as a substrate and CoA. CQT activity was measured with chlorogenic acid as a substrate and CoA. 1 unit=0.01 Δ OD/min.

1°C 区の変化が先行した (第 6 図)。

また、生成されたカフェオイル CoA とキナ酸を縮合してクロロゲン酸を生成するカフェオイル CoA : キナ酸トランスフェラーゼ (CQT) 活性の貯蔵中の変化を調べたところ、1°C 及び 15°C 貯蔵ともにはほぼ同時期に増加後減少する傾向であったが、その増加の程度は 1°C 貯蔵で大きかった。

### 考 察

本研究ではまず、生体膜の透過性に対する影響を調べるために、K<sup>+</sup> 漏出速度に対するアレニウスプロットをとったところ、10~16°C 付近で break が起こった。このことは、ヨウサイを様々な温度に貯蔵した場合の外観の変化とはほぼ一致する。次に貯蔵中の K<sup>+</sup> 漏出速度の変化について調べたところ、1°C 貯蔵では 15°C 貯蔵よりも急激に増加し、その急増は低温障害の症状が現れる前に起こった。すなわち、膜変性の結果、障害が現れるものと考えられる。一方キュウリについて、低温における K<sup>+</sup> 漏出速度の増大が報告されている(24)が、その資料では障害の進展と漏出速度の増大が並行して現れており、前後関係は明らかでないように思われる。また貯蔵中の K<sup>+</sup> 漏出量の増大は、若葉で顕著であり成熟葉ではわずかであった。これらのことは、低温によるヨウサイの生体膜の変性が低温障害と密接に関連することを示すと思われる。しかし、アレニウスプロットからみた変性の臨界温度にはかなりの幅がみられ、このような研究では切片あるいは個体レベルでみるばかりでなく、細胞内小器官レベルにおいても検討しなければならないことを示唆しているように思われる。

低温障害の症状として褐変を起こすものは多いが、ピ

ーマン種子(12, 28), ナス(1) その他において褐変現象の原因の一つに低温に伴うフェノール物質の蓄積があげられている。チャにおいては、生育時の低温によって葉に褐変が発生する場合、茎の先端部の葉ほどその程度は顕著でその部分にはクロロゲン酸の含量が多いとされている(25)。ヨウサイにおいても成熟葉より若葉でフェノール物質が多く含まれており、低温貯蔵に伴う褐変も後者で著しいことはさきに報告した(7)。

本報では、フェノール物質の生成過程に関連すると思われるこれら各成分及び酵素活性の変化を調べた。

まず遊離アミノ酸に対する低温処理の影響を検討したところ、パッションフルーツ(18)その他で報告されているように、低温下でアラニンが増加した。一方、糖代謝系からシキミ酸経路を経て、フェニルプロパノイド類へと代謝される際の間mediateである芳香族アミノ酸のフェニルアラニン及びチロシンは、15°C では貯蔵中増加し続けたが低温下では貯蔵 3 日まで増加した後減少した。低温区での減少は、フェニルプロパノイド類への代謝に利用される程度が大きいためと思われる。

t-桂皮酸、p-クマール酸、カフェー酸及びクロロゲン酸は低温区において 15°C 区に比べ大きく変化し、障害発生前に急激に増加、その後減少した。これは低温によってクロロゲン酸などの褐変の基質となる物質の生成・蓄積が進行し、さらに褐変物質への代謝の進行に伴い消費されていったことを示すと思われる。

次に、クロロゲン酸の生合成に関与する酵素の特性について調べたところ、ヒドロキシシンナモイル CoA を作る CL はヨウサイにおいて含量の多いカフェー酸に最も強い基質特異性を示した。このことは、ヨウサイにおける CL の生体内基質が含量的にも多いカフェー酸であり、ヨウサイの低温障害にカフェー酸が重要な役割をもつのではないかとと思われる。トマト果実では、p-クマール酸、カフェー酸、フェルラ酸の順に特異性が高く(20)、*Erthrina crista-galli* などの木質部から抽出した CL はフェルラ酸に対して基質特異性を示す(13)とされ、植物により本酵素の基質特異性が異なるようである。

生成された CoA チオエステルは、CQT によってクロロゲン酸へと代謝されるが、トマト果実から抽出された CQT は、どの熟度段階においても低温(2°C) 下で活性が増加し、20°C より高いレベルを保持し続け、フェニルプロパノイド代謝の律速酵素である PAL と同じ挙動を示すことが報告されている(21)。また、ジャガイモやサツマイモから抽出された CQT も同様であり、クロロゲン酸含量もこの酵素活性の変化に連動するといわれる

(22). ヨウサイにおいて CL と CQT の貯蔵中の変化はともに 1°C で障害発生前に増大しその後減少しており、カフェー酸やクロロゲン酸の含量変化とも関連が認められた。

なお、小島らがサツマイモ塊茎を用いた研究(10, 11)で、クロロゲン酸生合成系の中間体として桂皮酸類のグルコースエステルが介在している可能性を示しており、ヨウサイにおいてもエステルの存在について検討する必要があると思われる。

障害発生前にカフェー酸、クロロゲン酸の生成・蓄積や酵素活性の増大が起こったことは、既述のような生体膜の透過性の変化とも関連して植物体が異常な状態へ変化しつつあることを示すと推察される。Yoshida ら(30)は低温感受性植物において、プロプラスチドなど微細構造が変化し始めた後液胞膜の崩壊が起こり、機能的な面が影響を受け、2次的に膜の透過性に変化が始まるとしている。植物体の低温条件が生体膜の機能や構造に影響を与え(15, 26, 29)区画化が崩れること、また生成された褐変基質が他の正常な代謝系に影響を与えることなどがさらに低温障害を進行させる要因となると考えられ、そのような状態のもとで酸化還元系のバランスの崩れや、フェノール物質と酸化酵素との会合を引き起こし、酵素的酸化が進行し、褐変物質生成へと進むのではないかと思われる。

### 摘 要

1. ヨウサイを 1, 6, 9, 12, 15, 20 及び 30°C に貯蔵したところ、1~9°C で低温障害が発生し、また茎の先端から2~3枚までの若葉と若茎が褐変した。成熟葉も後に暗緑色化した。比較的成熟葉は低温耐性が大きであった。収穫時のヨウサイの K<sup>+</sup> 漏出速度に対するアレニウスプロットをとると、10~16°C 付近で break が起こり、この温度付近がヨウサイの生体膜相転換の臨界温度であろうと推定した。1°C 及び 15°C 貯蔵のヨウサイについて K<sup>+</sup> 漏出速度の変化を調べると、1°C の若葉において障害発生前に著しい増大が認められたが、成熟葉ではほとんど変化しなかった。

2. 貯蔵中の遊離アミノ酸の変化を調べたところ、アラニンが低温で急激に増加した。フェニルプロパノイド代謝の出発物質であるチロシンとフェニルアラニンは、15°C 貯蔵では増加し、低温下では障害発生前に増加した後減少した。

3. ヨウサイの褐変基質としてカフェー酸及びクロロゲン酸の存在が確認された。フェニルアラニンからクロロゲン酸へと代謝される経路に位置するフェニルプロパノイド類の貯蔵中の含量変化を調べたところ、低温区で

は 15°C 区に比べ障害発生前に大きく増加、あるいは 15°C 区における増加に先行して増加した。

4. クロロゲン酸生成の前段階で重要な役割を持つヒドロキシシナモイル CoA リガーゼ (CL) の特性を調べたところ、ヨウサイではカフェー酸に対する基質特異性が大きであった。CL 活性は 1°C 及び 15°C 貯蔵ともに増大した後減少したが、1°C での増大が早く、障害の出現する前にピークに達した。同様の変化が、クロロゲン酸生成の最終段階に関与するカフェーオイル CoA: キナ酸ヒドロキシトランスフェラーゼ (CQT) においてもみられた。若葉中の CQT 活性は 1°C 貯蔵のものが 15°C 貯蔵のものより顕著に増大した。

### 引用文献

1. 阿部一博・茶珍和雄・緒方邦安. 1976. ナス果実の低温障害に関する研究. 第2報. 低温障害発生に対する熟度並びに収穫時季の影響. 園学雑. 45: 307—312.
2. 芦澤正和. 1983. 中国野菜といわれるものの現状. 食の科学. 70: 54—57.
3. CASTEEL, V. K., D. H. POOTER and C. F. VAN-SUMERE. 1976. Gas chromatographic separation and analysis of trimethylsilyl derivatives of some naturally occurring non-volatile phenolic compounds and related substances. J. Chromatogr. 121: 49—63.
4. FRANCLIN, W. and Ph. D. MARTIN. 1984. CRC Handbook of Tropical Food Crops. p. 168—170. CRC Press. I. N. C. USA.
5. GROSS, G. G. and M. H. ZENK. 1966. Darstellung und Eigenschaften von Coenzym A-Thiolester substituierten Zimtsäuren. Z. Nature forschg. 21 b: 683—690.
6. 平尾陸郎. 1983. 中国野菜の栽培と性状. 食の科学. 70: 41—53.
7. HIRATA, K., K. CHACHIN and T. IWATA. 1983. Chilling injury of water convolvulus (*Ipomoea reptans* Poir.) with reference to its phenolic metabolism. Proceedings of the Sixth International Congress of Food Science and Technology. 1: 11—12.
8. 岩佐俊吉. 1980. 熱帯の野菜. 農林省熱帯農業研究センター編. p. 406—409. 養賢堂. 東京.
9. 科学技術庁資源調査会編. 1982. 四訂日本食品標準成分表. p. 226—227. 大蔵省印刷局.
10. 小島峯雄. 1973. クロロゲン酸の生合成——*t*-cinnamyl-D-glucose の関与. 化学と生物. 11: 23—26.
11. KOJIMA, M. and I. URITANI. 1973. Studies on chlorogenic acid biosynthesis in sweet potato root tissue in special reference to the isolation of a chlorogenic acid intermediate. Phytochem. 16: 655—659.



12. 小机信行・緒方邦安. 1971. 貯蔵ピーマン果実の低温障害に関する生理・化学的研究. 第2報. 低温障害に関する種子褐変基質ならびに中間代謝物質の変化. 園学雑. 40: 100—104.
13. KUTSUKI, H., M. SHIMADA and T. HIGUCHI. 1982. Distribution and roles of p-hydroxycinnamate CoA Ligase in lignin biosynthesis. *Phytochem.* 21: 267—271.
14. LOWRY, O. H., N. J. RESEBROUGH, A. L. FARR and D. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265—275.
15. LYONS, J. M. 1973. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 445—466.
16. 沖縄県農林部営農指導課編. 1983. 夏季にできる野菜と調理法. p. 5, p. 19.
17. 沖縄県農林水産部流通園芸課編. 1983. 生鮮食料品の流通. p. 67.
18. PATTERSON, B. D., J. A. PEARSON, L. A. PAYNE and L. B. FERGUSON. 1981. Metabolic aspects of chilling resistance: Alanine accumulation and glutamate depletion in relation to chilling sensibility in passion fruits species. *Aust. J. Plant Physiol.* 8: 395—403.
19. RHODES, M. J. C. and L. S. C. WOOLTORTON. 1973. Formation of CoA esters of cinnamic acid derivation by extracts of *Brassica Napobrassica* root tissues. *Phytochem.* 12: 2381—2387.
20. RHODES, M. J. C. and L. S. C. WOOLTORTON. 1976. The enzymic conversion of hydroxycinnamic acids to p-coumarylquinic and chlorogenic acids in tomato fruits. *Phytochem.* 15: 947—951.
21. RHODES, M. J. C. and L. S. C. WOOLTORTON. 1977. Changes in the activity of enzymes of phenylpropanoid metabolism in tomatoes stored at low temperatures. *Phytochem.* 16: 655—659.
22. RHODES, M. J. C. and L. S. C. WOOLTORTON. 1978. Changes in the activity of hydroxycinnamyl CoA : quinate hydroxycinnamyl transferase and in the levels of chlorogenic acid in potatoes and sweet potatoes stored at various temperatures. *Phytochem.* 17: 1225—1229.
23. SUTCLIFFE, J. 1977. *Plants and temperature.* p. 17—24. Edward Arnold. England.
24. 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.
25. ULLAH, M. R. and J. C. JAIN. 1980. Seasonal variations of the chlorogenic acids content of tea. *J. Sci. Food Agric.* 31: 355—358.
26. 瓜谷郁三. 1976. 植物と低温障害—その化学的基礎. 植物の化学調節. 11: 47—54.
27. WILLS, R. B. H., A. W. WONG, F. M. SCRIVEN and H. GREENFIELD. 1984. Nutrient composition of Chinese vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 32: 413—416.
28. 山内直樹・稲葉 誠・南出隆久・緒方邦安. 1977. 果実・そ菜のアスコルビン酸に関する生理・化学的研究. 第8報. 貯蔵ピーマン果実の種子のかわ変発生に伴うフェノール生成酵素の変化とフェノール酸化還元反応におけるアスコルビン酸の役割. 園学要旨. 昭52秋. 456—457.
29. 山木昭平. 1975. 植物低温障害の機構. 化学と生物. 13: 62—67.
30. YOSHIDA, S. and T. NIKI. 1979. Cell membrane permeability and respiratory activity in chilling stressed callus. *Plant cell Physiol.* 20: 1237—1242.