

葉菜類組織内部の水移動に関する基礎研究

五月女 格

目次

第1章 序論

1-1 研究の背景	1
1-2 葉菜類の鮮度低下	2
1-3 葉菜類の鮮度保持と水分に関する既往の研究	3
1-4 研究の目的および構成	6

第2章 細胞内水の動的状態と細胞の低浸透圧耐性の経時変化

2-1 緒言	9
2-2 供試材料および実験方法	
2-2-1 供試材料	11
2-2-2 実験区	13
2-2-3 $^1\text{H-NMR}$ による縦緩和時間(T_1)測定	
2-2-3-1 NMRの原理	14
2-2-3-2 測定装置と測定条件	17
2-2-3-3 試料の調整方法	19
2-2-3-4 T_1 の算出方法	23
2-2-4 細胞の低浸透圧耐性測定	
2-2-4-1 細胞の浸透圧耐性について	25
2-2-4-2 プロトプラストの作成方法	25
2-2-4-3 プロトプラストの生存率の算出方法	27
2-2-4-4 プロトプラストの限界浸透圧算出方法	29
2-3 結果および考察	
2-3-1 T_1 の測定結果	31
2-3-2 浸透圧耐性の測定結果	34
2-3-3 貯蔵中における細胞内水移動に関する仮説	37
2-4 摘要	39

第3章 細胞膜の水伝導係数測定	
3-1 緒言	40
3-2 細胞膜の水伝導係数について	
3-2-1 水伝導係数について	41
3-2-2 細胞膜水伝導係数の測定原理	43
3-2-3 既往の研究における細胞膜水伝導係数の測定例	46
3-2-4 既往の研究における測定法の本研究への応用可能性	49
3-2-5 既往の研究における測定法の精度	51
3-3 二層流式水伝導係数測定法の開発	
3-3-1 二層流式水伝導係数測定法の原理	57
3-3-2 水伝導係数測定装置の構造	
3-3-2-1 二層流セルの構造	60
3-3-2-2 周辺装置の構成	63
3-3-3 二層流形成の確認	65
3-4 供試材料と実験方法	
3-4-1 供試材料	67
3-4-2 従来法による水伝導係数測定 (対照実験)	68
3-4-3 二層流式水伝導係数測定法による水伝導係数測定	
3-4-3-1 装置の設置	70
3-4-3-2 プロトプラストの導入	72
3-4-3-3 プロトプラストの体積変化測定	73
3-4-4 細胞(プロトプラスト)体積の算出方法	74
3-4-5 水伝導係数の算出方法	75
3-5 結果および考察	
3-5-1 従来法による水伝導係数測定結果	77
3-5-2 二層流式水伝導係数測定法による水伝導係数測定結果	80
3-5-3 水伝導係数測定結果の比較	82
3-6 摘要	84
第4章 結論	
4-1 本研究で得られた結果	85
4-2 今後の課題	87
参考文献	88
謝辞	93

第 1 章 序論

1-1 研究の背景

葉菜類は我々の食生活において、様々なビタミン、無機質、繊維などの栄養源として、また潤いをもたらすものとして欠かせないものである。葉菜類は日々大量に流通・消費されており、平成 12 年における卸売数量は 370 万 t、卸売価額は 4500 億円を超えている(農林水産省統計情報部, 2001)。

葉菜類は購入される際には、はり・色などの鮮度が重視され、萎れのあるものは倦厭される(目黒ら, 1986)。しかし葉菜類は鮮度低下が激しいものが多く、そのたな持ちは 1 日程度とされる。そのため青果物販売店では鮮度低下のために、販売できず廃棄する葉菜類がかなりの量に上るとされている(大久保, 1993)。葉菜類の廃棄により経済的な損失が発生し、また食料資源の損失という問題が発生する。現在、地球規模で食料資源が逼迫しつつあり、また将来食糧問題が深刻化することが予測されている事を考慮すると、食料資源の損失は放置できない問題と考えられる。また近年、食糧生産による環境への負荷が問題視されてきている(Houghton *et al*, 1990)。消費されずに廃棄される葉菜類は食糧の余剰とみなすことができるが、これは食料の過剰生産により環境に無用な負荷をかけているということになる。

葉菜類の鮮度保持技術が向上することにより、たな持ちが延長されればその廃棄は減少し、経済的損失・食料資源の損失が低減されることになる。また過剰な食糧生産の減少による環境負荷の低減も期待できる。さらに消費者は店頭においてより新鮮な葉菜類を購入する機会に恵まれるなど、様々な利益がもたらされると考えられる。

1-2 葉菜類の鮮度低下

葉菜類は生育途中で収穫されることが多く、収穫後も生育中と変わりなく生理活動が続く。水分・養分の供給が無いにもかかわらず、呼吸・蒸散などの生理作用を続けることにより、成分の損耗や水分損失が起こる。また収穫時の切断による障害は、呼吸の増加、ATP 供給の増加、エチレンの生成などを引き起こし、成分の損耗や、水移動を促進していると考えられる(清水, 1996)。

葉菜類は以上に述べた水分損失や成分の損耗により、商品価値や鮮度の低下をおこす。まず水分損失に関しては、質量の減少、すなわち目減りとなり直接的な損失となる(樽谷, 1986)。また水分損失により、葉組織を構成する細胞の膨圧低下が起こる。これにより、しおれの発生、つやの喪失等が起こり、外観が大きく損なわれることになる。さらに葉菜類は水分損失によるしおれや成分の損耗により、変色・味ぼけ・肉質の劣変、ビタミン含有量の減少などの品質低下を起こすとされる(Wills, 1982; Lazan *et al*, 1987)。葉菜類は特に水分が多く90~95%の水分を含むことから、水分は上記のように極度に品質に影響し、水分損失に関しては5%前後が商品性の限界と言われている(大久保, 1993)。そのため貯蔵時には極力、水分損失を防止する慣例にある。

葉菜類の水分損失の原因は、生理作用としての気孔蒸散や、表面からの物理的な水分の散逸であるクチクラ蒸散などである。これらの現象には葉菜類の外部環境以外にも、葉菜類内部の水の動的状態、生体膜の状態などが深く関わっていると考えられる(笠毛, 1993)。さらに生体内部の水は生体反応の場となっているだけでなく、生体高分子や生体膜との相互作用により、その動的状態を変えると同時に生体高分子、生体膜の状態にも影響を与えるとされる(上平, 1997)。

以上に述べたとおり、葉菜類の鮮度と内部の水は密接な関係にあり、その鮮度保持を図る上では、内部の水について知る必要があると言える。

1-3 葉菜類の鮮度保持と水分に関する既往の研究

葉菜類の鮮度保持と水分に関する既往の研究について以下に述べる。

Wells(1962)は青果物から水分損失を起こさせるための条件として Vapor pressure deficit(V.P.D)を導入した。これは青果物の示す蒸気圧と周囲環境の蒸気圧の差により、水が移動するというモデルであり、V.P.D は以下の式で表される。

$$V.P.D = 0.98V - V' \quad (1-1)$$

上式にて V は対象としている青果物の温度において、純水の示す蒸気圧である。青果物中の水には、様々な成分が溶解していることから蒸気圧降下を起こすが、青果物の場合、その水蒸気圧は純水の0.98倍とされる(Mann, 1951)。したがって右辺第一項は青果物中の水が示す蒸気圧となる。また V' は周囲環境の蒸気圧であり、貯蔵環境の湿度により変化する。Wells(1962)の実験から、V.P.D が0.5mmHg以上の領域では、青果物の水分損失速度とV.P.Dは線形の関係であることが明らかにされた。また水移動がV.P.Dのみによるとすれば、周囲環境の蒸気圧が飽和する以前に、青果物からの水移動が停止することを式1-1は示している。しかし現実には、蒸気が飽和した環境においても青果物からの水分損失は起こる。したがって青果物からの水分損失はV.P.Dのみならず、青果物自身の生理作用等によっても起きていると考えられる。いずれにせよ青果物からの水分損失を防止するには、高湿度での貯蔵が望ましいことはWells(1962)の実験より明らかであるが、強制的な加湿により、微生物の繁殖や高湿度障害が起こる可能性も指摘されている(大久保, 1992)。したがって青果物からの水分損失を防止し、鮮度保持を図る上では、単に周囲環境を高湿度に保つのみならず、他の有効な対策を講じなければならないと言える。

樽谷(1963)は青果物の蒸散について調べ、温度と蒸散の関係にA型、B型、C

型の 3 つの型があるとした。A 型には温度が低くなるにつれて蒸散量が極度に低下するもの、B 型には温度が低くなるにつれて蒸散量も低下するもの、C 型には温度によらず激しく蒸散するものが分類される。そして葉菜類の蒸散特性は主に C 型であることを明らかにした。これは葉菜類では品温の低下による蒸散の抑制はあまり期待できないを示している。

黒田(1977)はハウレンソウにあたる風の速度と蒸散の関係を調べ、無風の場合と送風した場合では明らかに水分蒸散に差があるが、風速が水分蒸散速度にあまり影響しない事を明らかにした。自由水面では蒸発量は風速の平方根に比例して増加する。これは風により蒸発面の水蒸気を大量に含んだ空気が乾燥した空気に置換され、蒸発面における水ポテンシャル勾配が大きく保たれるためである。葉菜類においては、水分蒸散速度は外部環境と青果物自身の蒸気圧差のみならず、青果物内部の水移動によって律速されているため、風速の影響をあまり受けないとした。

Linke ら(1995)はレタスの形状、葉の色などと蒸散速度の関係を調べ、蒸散速度を葉の面積と色、形状で表す実験式を得た。気孔抵抗とレタス全体の蒸散抵抗の関係から、レタス全体の表面積のみでは蒸散速度は予測できず、形状を考慮する必要があるとした。

以上のように、葉菜類もしくは青果物全般からの水分損失について、外部環境との関係から研究が行われ、水分蒸散速度に外部環境が与える影響等が明らかにされている。また近年は生体内部の水について、生体反応の場として捉えた研究や、生体膜、生体高分子等の状態に影響を与えるものとして捉えた研究がなされている。それらの研究について以下に述べる。

大下ら(1996)は、無極性ガスであるキセノンをおオムギ子葉鞘に加圧し溶解させ、その原形質流動速度を観察した。その結果、キセノン分圧の増加にともな

い原形質流動速度の低下が顕著になることを明らかにし、これは生体内部の水が無極性ガスの溶解により構造化し、粘度が増大したためとした。また大下ら(1997-a, 1997-b, 1998, 1999)はブロッコリにキセノンガスを溶解させることにより脱水の抑制、褐変の抑制等の効果が見られるとした。脱水の抑制に関しては、キセノンガスの溶解により生体内部の水分子間に水素結合が発達した結果、蒸発エネルギーが増大したため、または生体膜の機能が保全されたためとした。また褐変の抑制については、生体内部の水が構造化し粘度が増大したため、酵素反応が抑制されたためとした。

松嶋ら(2000)はカーネーション切り花にキセノンガスの溶解処理を施した後、蒸散速度を調べ、キセノン処理により蒸散が抑制されることを明らかにした。これはキセノンガスが細胞膜上のチャンネルタンパク質と会合し、構造を変化させチャンネルの働きを抑制したためとした。

吉野ら(2000)はオオムギ子葉鞘にキセノンガスを加圧溶解させ、原子間力顕微鏡にて子葉鞘表面を観察した。その結果、キセノンガスを加圧していない子葉鞘では、切り取り後 3 日目には表面のクチクラ層が失われるが、キセノンを溶解させた子葉鞘ではクチクラ層が残ることを明らかにした。このことからキセノンガスの溶解によりクチクラ層が保全され、脱水が抑制される可能性があるとした。

以上に述べたこと等が明らかにされているが、今後葉菜類の鮮度保持に関して研究を進めていく上で、生体内部の水についての詳細な情報が必要となると考えられる。具体的には葉菜類内部の水の動的状態、また組織、細胞内部での微視的な水移動について知る必要があるといえる。また組織、細胞内部での水移動に関わると考えられる生体膜の水伝導係数等の物性を明らかにする必要があるといえる。

1-4 研究の目的および構成

先に、水分損失が葉菜類の鮮度を大いに損なうこと、また生体内部での水の状態が、水分損失や鮮度低下に結びつく様々な生体反応に関係していることを述べた。また今後、葉菜類の鮮度保持に関する研究を進め、鮮度保持技術の向上を図る上では、外部環境の制御のみならず、生体内部に着目する必要性が高くなると考えられる。葉菜類の水分損失の機構を明らかにし、さらに生体内部の状態や生体反応に操作を加える等の、新たな鮮度保持の研究を進めていくためには、葉菜類の組織内部の水移動や細胞膜を通じた水移動および細胞内の水移動について、また葉菜類内部の水の動的状態について明らかにする必要がある。

以上のことをふまえ本研究では全体的な方向性として、葉菜類組織内部における水移動を把握することを掲げ、次に述べる目的を設定した。

1. 葉組織内部における水の動的状態の経時変化を、縦緩和時間(T_1)を通して検討する。
2. 葉細胞プロトプラストの低浸透圧への耐性を通して、細胞膜の物性・機能などの経時変化について検討する。
3. 細胞膜の水伝導係数測定について検討する。

1 番目の目的については、 $^1\text{H-NMR}$ による生体内水の縦緩和時間(T_1)と生体内水の動的状態の関連性が報告されていることに基づき設定した。また 2 番目の目的については、細胞膜が細胞内外および組織内の水移動に深くかかわっていると考えられることから設定した。3 番目の目的については、2 番目の目的と大きく関係するが、に設定されたが、細胞膜の定量的な物性値を得る上で不可欠であることから、独立した目的として挙げた。

本文は全 4 章で構成されており、各内容を以下に示す。第 1 章は序論、第 2

章では葉組織内部の水の動的状態について、収穫後の貯蔵による変化を¹H-NMRによる縦緩和時間(T_1)測定をとおして検討し、また葉組織から作成したプロトプラストの低浸透圧耐性を測定し、細胞膜の物性・細胞の浸透圧調節機能の経時変化について検討した。第3章ではまず、細胞膜水伝導係数に関する既往の測定法を検討した。その上で既往の方法が葉菜類細胞膜の水伝導係数の経時変化を求めるなどの、葉菜類の鮮度保持に関する研究で想定される用途に、応用が可能なかを検討した。その結果、既往の測定法では測定結果に大きな誤差が含まれると判断されたことから、新たな水伝導係数測定法を考案し、それを実現するための装置を開発した。また既往の測定法と新たな測定法にて水伝導係数を測定し、新たに考案した測定法の利点を示した。

本研究では、実験には主にオオムギ子葉を用いた。オオムギ子葉を用いた最大の理由は、NMR試料管(後述)への挿入の際に、試料の切断を最小限に抑えることができるという、形態上の利点からである。本研究で用いたNMR装置用の試料管(内径8mm)に、ハウレンソウ等の葉を挿入する際には、葉を短冊状に切断する必要がある、切断面が広くなる。しかし切断面からの水分の漏出等を考慮すると、同一試料を測定し、緩和時間等の経時変化について調査することは困難と考えられた。オオムギ子葉は基部付近を切断するのみで、試料管への挿入が可能であることから切断の影響が小さいと考え、これを試料として選択した。しかし、オオムギは単子葉植物であるが多くの葉菜類は双子葉植物であるなど、オオムギと葉菜類には違いもあり、本研究で得られた結果を葉菜類に適用する際には注意をしなければならない点もある。オオムギ子葉とハウレンソウ本葉の海綿状組織の写真をFig.1-1に示した。Fig.1-1よりオオムギ子葉の組織はハウレンソウに比べ細胞間隙が少ないことや、細胞の形状が異なることが分かる。このことから葉菜類の細胞間隙水や細胞間隙を通じた水移動等に

ついて考察する際はオオムギ子葉との違いを考慮しなければならないと考えられる。また Fig.1-2 にオオムギとホウレンソウのプロトプラストを示した。Fig.1-2 よりオオムギとホウレンソウのプロトプラストはほぼ等しい大きさを持つことが分かる。また、プロトプラスト内部の構造、および細胞膜や液胞膜等の生体膜の機能には、オオムギとホウレンソウ等の葉菜類に共通する部分も多いと考えられる。したがってオオムギ子葉を試料として得られた、細胞内水の動的状態や生体膜の状態等の研究結果は、葉菜類の貯蔵に関して研究を進めていく上で有用であると考えられる。

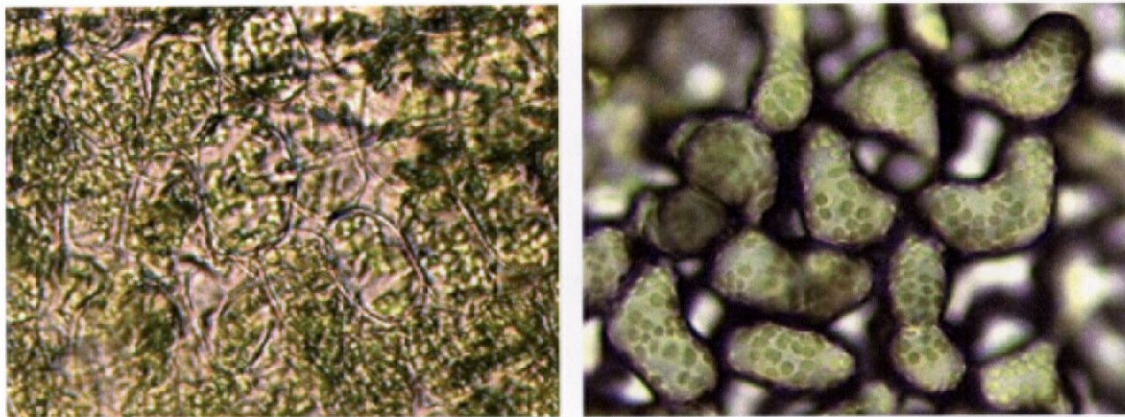


Fig.1-1 海綿状組織(左：オオムギ、右：ホウレンソウ)、200倍

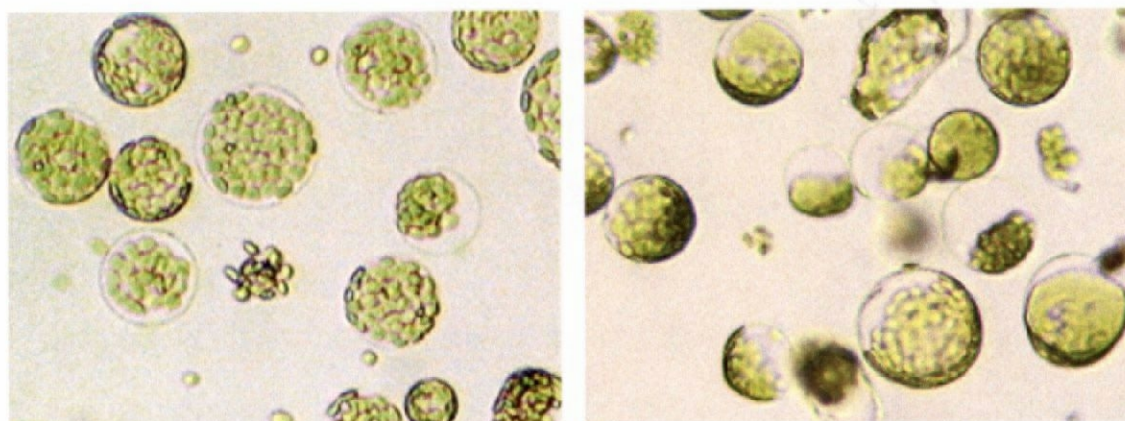


Fig.1-2 プロトプラスト(左：オオムギ、右：ホウレンソウ)、200倍

第2章 細胞内水の動的状態と

細胞の低浸透圧耐性の経時変化

2-1 緒言

生体は大部分が水で占められており、特に葉菜類では90~95%の水分を含む。そして生体の細胞内部には水と共に様々な生体高分子や電解質、細胞器官等が含まれているが、細胞内の水は単なる希薄な溶液とは異なり、生体高分子や生体膜との強い相互作用により構造化しており、水溶液中のバルク水とは異なる動的状態にあると考えられている(上平, 1989)。生体内部の水の動的状態は核磁気共鳴(NMR)による水プロトン緩和時間を通して知ることができるが、NMRによる研究によれば細胞内には少なくとも3種の異なる動的状態にある水が存在すると考えられている(上平, 1976)。またこれら3種の動的状態にある水について、構造化の程度等の物理状態や存在比も報告されている(Belton *et al*, 1972 ; Hazlewood *et al*, 1974)。しかしこれらの研究例の多くは動物細胞を対象としたものであり、植物細胞を対象とした研究は少ない(加来, 1993)。成熟した植物細胞では多くの場合、液胞の占める割合が細胞全体の体積の90%に及ぶことを考慮すると、既往の動物細胞を対象とした細胞内水の動的状態モデルをそのまま植物細胞に当てはめることは困難と考えられる。農産物の貯蔵では農産物内の水が重要であり、そのため植物体内に存在する水の動的状態の解明が望まれている。

細胞膜や植物細胞に特徴的な液胞膜をはじめとする生体膜は、細胞内の水や代謝生成物の移動、さらには生体内の水の構造化に関わることから、細胞内水の動的状態に深く関わっていると考えられる。生体膜はリン脂質二重層とその

連続性を壊した形でモザイク状に存在するタンパク質からなっており、その構造が流動的であるという Singer-Nicolson の流動モザイクモデル(Singer and Nicolson, 1972)として広く知られている。リン脂質二重層は温度やその他の要因によって固相（ゲル領域）と流動相（液晶領域）をとる。リン脂質二重層では細胞の老化等によりリン脂質が減少し(Thompson *et al*, 1982)、リン脂質の分解産物等により固相が形成されてくるとされる(Yao *et al*, 1991)。また固相にはチャンネルやポンプとなる蛋白質が含まれておらず(Platt-Aloia *et al*, 1985)、固相が増大すると膜の機能が低下し、膜の選択透過性や細胞内物質の局在性の喪失をもたらすとされる(鈴木, 1993)。生体膜の機能低下は細胞内水の漏出にも関係し、また生体膜が生体内水の動的状態に及ぼす影響を考慮すると、葉菜類の水分損失の防止策を講じる上で生体膜の経時的な変化を知ることは重要である。

したがって第 2 章の目的は、切り取られたオオムギ子葉内部の水の動的状態が、その後の貯蔵によりどのように変化するかを、 $^1\text{H-NMR}$ による縦緩和時間 T_1 をとおして検討することとした。また同時に子葉組織から作製したプロトプラストが低張液中での膨張により破壊されるとき溶液の浸透圧を計測し、貯蔵による細胞膜の状態の経時変化を検討することとした。

2-2 供試材料および実験方法

2-2-1 供試材料

試料には播種後 12 日目のオオムギ（ヒノデハダカ）の子葉を用いた。試料の育成方法は以下の通りである。はじめに約 30 時間水道水に浸漬したオオムギ種子を、プラスチック容器(150mm×90mm×40mm)に入れたバーミキュライト（昭和バーミキュライト製、2号）に約 10mm の深さにほぼ等間隔に 21 粒播種した。これを 20℃の恒温室にて、バーミキュライト上面から約 30cm の距離に設置した植物育成灯（松下電工製、プラントルクス FL20SS-BRN/18、40W）の下で、明期 13 時間、暗期 11 時間で育成した。育成中は肥料液を 2 日に一度約 50g 与えた。肥料液は、蒸留水 100g に硫酸マグネシウム 1g、硝酸カルシウム 0.5g、硝酸カリウム 0.5g、およびリン酸二水素カリウム 0.5g を溶解させたもので(KNOP 液)、使用時に蒸留水で 20 倍に希釈して用いた。Fig.2-1 に育成中のオオムギの写真を示した。

育成したオオムギから、子葉の付け根から先端までの長さが 80mm から 120mm のものを 12 個体選び、子葉の先端から約 70mm のところで切り取り実験に供試した。



Fig.2-1 育成中のオオムギ

2-2-2 実験区

実験区はオオムギ子葉を切り出した後、プロトプラストを作製するまでの保存時間で設定し、0時間、24時間、48時間、72時間をそれぞれ、0h区、24h区、48h区、72h区とした。貯蔵を行わない0h区を除く全ての実験区において、オオムギ子葉を切り出した後、3本のNMR試料管(長さ160mm、内径8mm)にオオムギ子葉を4枚ずつ入れ、20℃暗所にて貯蔵を行った。

実験区48h区、72h区にて、貯蔵開始から終了まで24時間おきに T_1 測定を行った。また貯蔵の前後で試料の質量を測定し、目減りを算出した。各実験区における実験を3回繰り返した。

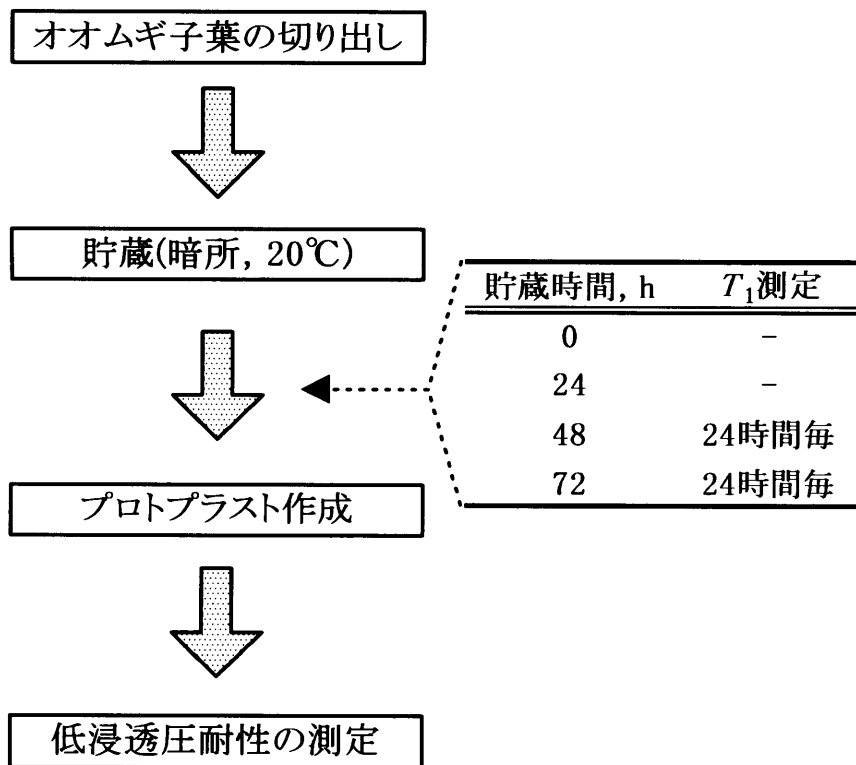


Fig.2-2 実験手順と実験区

2-2-3 ^1H -NMR による縦緩和時間(T_1)測定

2-2-3-1 NMR の原理

生体中の水分子の水素原子核、つまりプロトン(^1H)はスピンを持っており、自転運動をしていると考えることができる。 ^1H は正の電荷をもっているのでスピンによって磁場を発生しており、磁石とみなすことができる。通常この ^1H のスピンの向きはランダムであるが、強い外部磁場 B_0 の中に置かれると ^1H のスピンは外部磁場に沿ったものと、それに逆らって逆方向を向いたものに分かれる。この状態をゼーマン分裂と言う(Fig.2-3)。

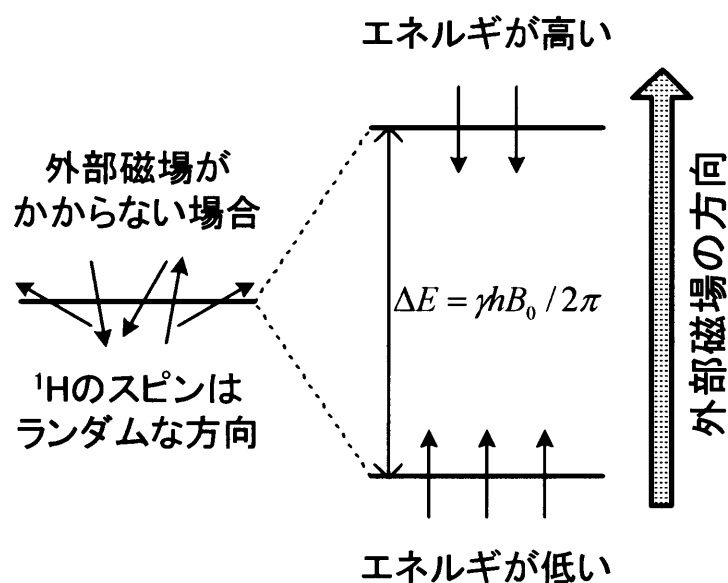


Fig.2-3 ゼーマン分裂

外部磁場と逆方向のスピンを持った ^1H は磁場に沿ったスピンを持つ ^1H に比べてわずかながらエネルギーが高い。そのエネルギーの差 ΔE はゼーマンエネルギーと呼ばれ、次式で表される。

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 / 2\pi \quad (2-1)$$

ここで γ は磁気回転比と呼ばれ原子核種に固有の値であり、 ^1H では $2.675 \times$

$10^4[\text{rad} \cdot \text{G}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}]$ とされている(安藤ら, 1998)。 h はプランク定数である。エネルギーの高い ^1H の数は、低いものの数よりわずかに少なくなる。この状態をボルツマン平衡と言い、この数の差により巨視的には磁化 M_0 が観測される。

このとき ΔE に相当するエネルギーを持つラジオ波を照射すると、低いエネルギーをもつ ^1H がエネルギーを吸収し、高いエネルギーを持った状態に励起される。ラジオ波の周波数が ν [Hz]であるとき、そのエネルギーは $h\nu$ と表される。

$$h\nu = \hbar\gamma B_0 / 2\pi \quad (2-2)$$

のとき、すなわち

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi \quad (2-3)$$

を満たす周波数 ν [Hz]のラジオ波を照射すると共鳴による ^1H のエネルギーの吸収が起きる。

ラジオ波の照射を止めると、励起された ^1H は ΔE だけのエネルギーを自身の側にある核に与え、その結果このエネルギーは分子の熱運動となって散逸する。 ^1H のスピンのボルツマン平衡へ戻る過程を縦緩和と言い、この過程で観測される磁化 M_t は時間 t の関数として次式にて表される(Freeman, 1988)。

$$M_t = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (2-4)$$

上式における T_1 が縦緩和の速さを決める時定数、縦緩和時間である。

^1H と周囲とのエネルギー交換は、磁場による相互作用のみとなるが、縦緩和過程においては励起された ^1H がエネルギーを放出するには、その ^1H のところに共鳴周波数 ν で揺動する磁場が存在する必要がある。この揺動磁場は周囲の分子の運動により与えられるが、水の場合は通常、分子運動の周波数の分布は ν においては少なく、 ν よりも速いものが多い(Fig.2-4)。分子運動が全体的に遅くなるにしたがって周波数 ν で運動する分子が多くなり、縦緩和時間は短くなる。したが

って生体内部の水が、生体分子などとの相互作用により動きが束縛されている条件では、その水の緩和時間は短くなる。

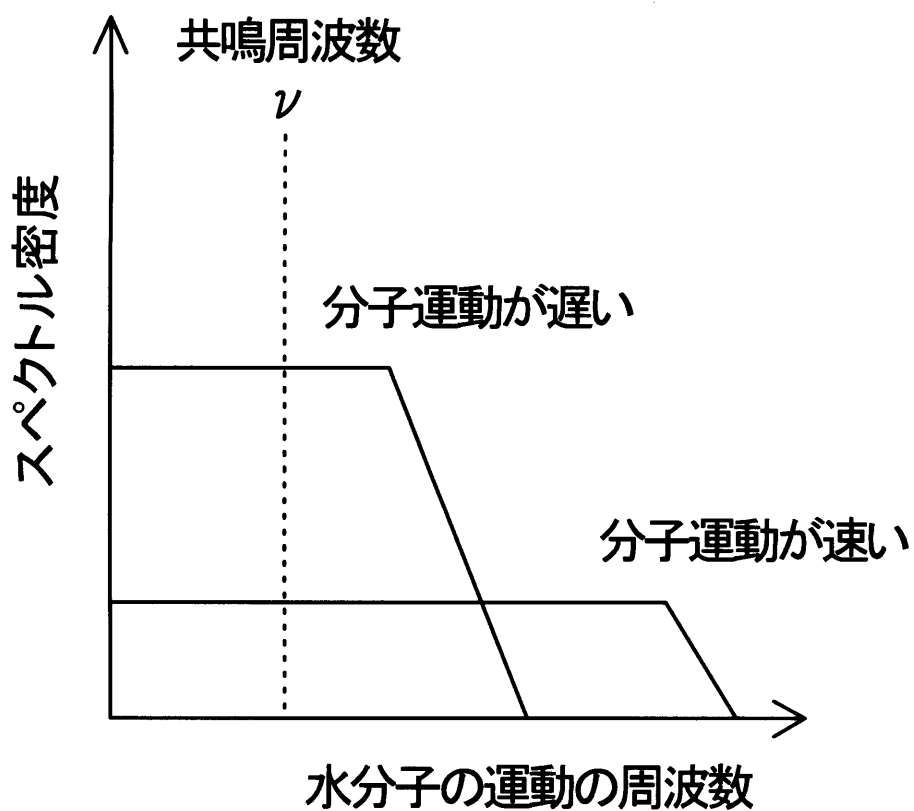


Fig.2-4 分子運動のスペクトル密度

2-2-3-2 測定装置と測定条件

測定装置には ^1H -NMR スペクトロメータ(JNM-MU2、日本電子、観測周波数 25MHz、磁束密度 0.5872T)を用いた(Fig.2-5)。この装置では外部磁場は永久磁石により作られ、磁束密度 B_0 が 0.5872[T]、すなわち 5872[G]であるから、 ^1H の共鳴周波数 ν は、

$$\begin{aligned}\nu &= \gamma B_0 / 2\pi \\ &= (2.675 \times 10^4 \times 5872) / (2 \times 3.14159) \\ &= 2.50 \times 10^7\end{aligned}\tag{2-5}$$

となり、25[MHz]ということになる。

測定時の試料温度は 25°Cとした。 T_1 の値は分子の運動の速さにより変化するので、試料の温度により変化する。本実験では試料温度を安定させるため、試料の入った試料管を温度制御機能を装備した装置に装着して、約 15 分が経過した後、測定を行った。

また測定にはパルス系列が $90^\circ - \tau - 90^\circ$ である飽和回復法を用いた。 τ は各 90° パルス間の時間間隔を表している。 ^1H 励起用のパルスは磁化 M_z を回転させる働きをもっており、その長さ、強さで回転させる角度を調節することができる。NMR 装置では通常、磁化 M_z の検出コイルは外部磁場に対して 90° の向きに設置されている。そのため飽和回復法では、磁化 M_z を検出用コイルの方向に傾けるために 90° パルスをかける。



Fig.2-5 NMR スペクトロメータ

2-2-3-3 試料の調整方法

本実験で用いた NMR 装置では、使用可能な試料管の外径は 10mm と制限されており、試料管には外径 10mm、内径 8mm のものを用いた。NMR 装置で検出される信号強度は試料の ^1H の数に依存しており、試料に含まれる ^1H が少なくなるにつれて S/N 比が低下する(Fig.2-6)。

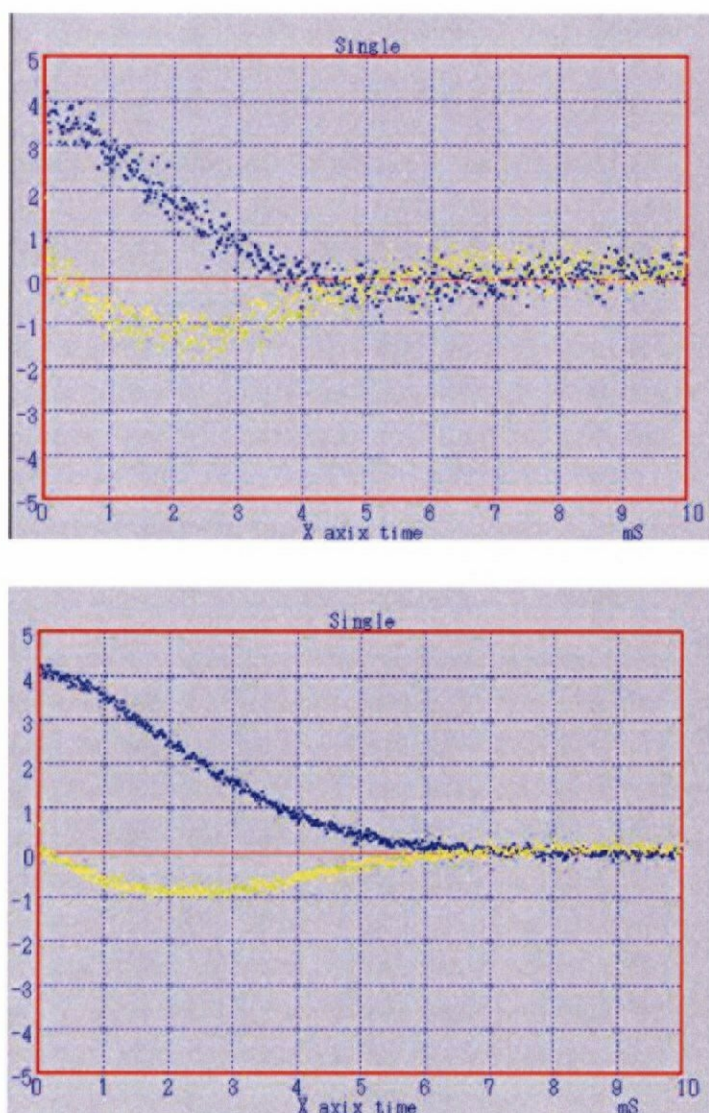


Fig.2-6 子葉枚数と NMR 出力信号
(上：子葉 1 枚，下：子葉 4 枚)

つまり試料管に挿入するオオムギ子葉の枚数が多いほど、測定された T_1 の値は信頼できるものになる。しかし挿入する子葉の枚数が増えると、試料管への挿入時に子葉の一部が圧壊される問題が出てくる。そこで試料管へ挿入する子葉の適度な枚数を決定するために、オオムギ子葉鞘を1枚から6枚まで変え T_1 を測定した。測定された NMR 信号を式 2-4 に回帰し、 T_1 を求めた際の分散を Fig.2-7 に示した。Fig.2-7 より子葉鞘枚数が1枚から4枚まで増えるにしたがって分散が減少するが、4枚以上では分散はあまり変化しないことが分かる。オオムギの子葉鞘と子葉ではその肉厚から、 ^1H の量にはあまり違いがないものと判断し、この結果から試料管に挿入する子葉の枚数を4枚とした。

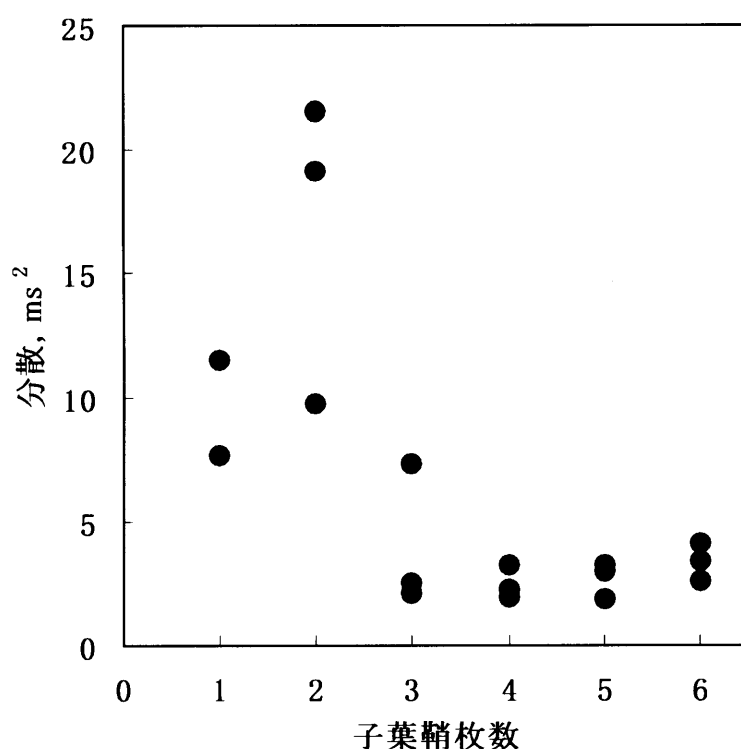


Fig.2-7 子葉鞘枚数と分散

また子葉の測定部位による T_1 の変化をあらかじめ調べた。子葉を先端から70mmのところまで切り取りとったものを4枚、試料管に挿入し、Fig.2-8に示したとおり、先端から10mm、35mm、60mmの部位をそれぞれ3回測定した。同じ実験を2回行い、測定順序は試料1では基部、中部、先端の順であり、試料2では先端、中部、基部の順である。その結果、子葉の測定部位による T_1 の違いが認められた。よって測定部位をオオムギ子葉の切断部位（基部）から先端に向かって約30mmの部分とし、一定に保つようにした。

また12枚の子葉を、4枚ずつ3本の試料管に挿入したが、それぞれの試料管につき3回の測定を行い、合計9回の測定の平均値から T_1 を決定した。

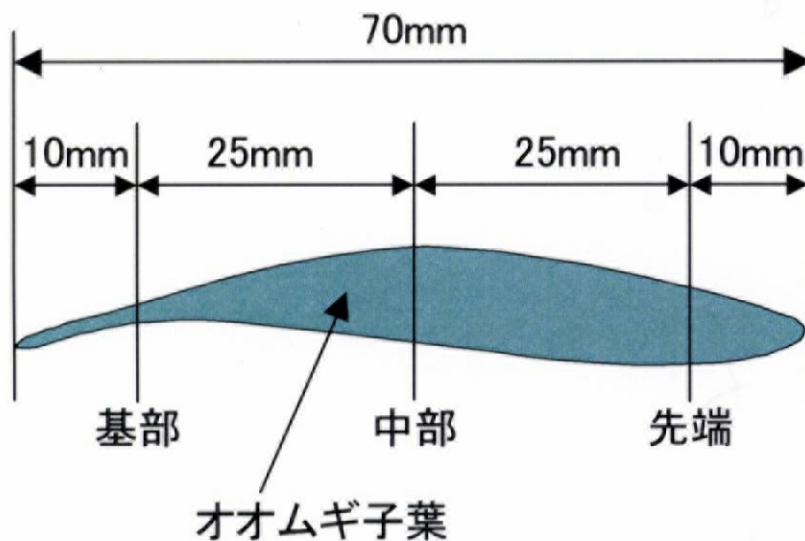


Fig.2-8 オオムギ子葉の測定部位

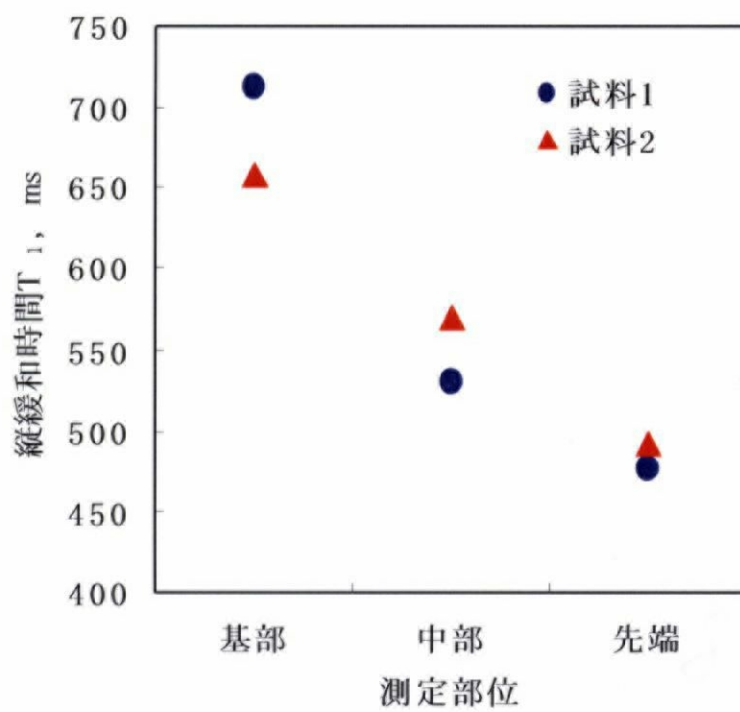


Fig.2-9 子葉部位による T_1 の違い

2-2-3-4 T_1 の算出方法

NMR において飽和回復法を用いたとき T_1 と観測される磁化 M_t の関係は式 2-4 で表される。すなわち T_1 は NMR の出力信号を指数関数へ近似することにより得られる。生体組織等、内部に様々な異なる動的状態の水が存在すると考えられる試料では、NMR 出力信号は多項の指数関数となって現れる。

$$\frac{M_0 - M_t}{M_0} = A_1 e^{-\frac{t}{T_{1,1}}} + A_2 e^{-\frac{t}{T_{1,2}}} + \dots + A_n e^{-\frac{t}{T_{1,n}}} \quad (2-6)$$

A_i はそれぞれの状態にある水の試料内での存在比で、

$$\sum_{i=1}^n A_i = 1 \quad (2-7)$$

である。

例えば試料内に $0.8[s]$ の T_1 を示す水が 3 割、 $0.2[s]$ の T_1 を示す水が 7 割存在したとすると、その NMR 出力信号は Fig.2-10 の緑線に示したようになる。Fig.2-10 には参考のために、試料内に $0.8[s]$ の T_1 を示す水、または $0.2[s]$ の T_1 を示す水のみが存在する場合の出力信号をそれぞれ青い線、赤い線で示した。

またこの出力信号の対数をとると Fig.2-11 の緑線に示したようになる。Fig.2-11 において緑線は短い $0.2[s]$ の T_1 を示す水の緩和がほぼ終了すると見られる $0.8[s]$ 付近で屈折している。そして $0.8[s]$ 以降の線の傾きはほぼ長い T_1 を示す水の緩和によって決まるといえる。すなわちこの場合については、 $0.8[s]$ 以降を直線で近似し、その傾きと切片を求めることにより、長い T_1 を示す水について、その T_1 と存在比を知ることができる。その後、出力信号から長い T_1 を示す水による出力を差し引き、更に回帰を行うことにより短い T_1 を求める。

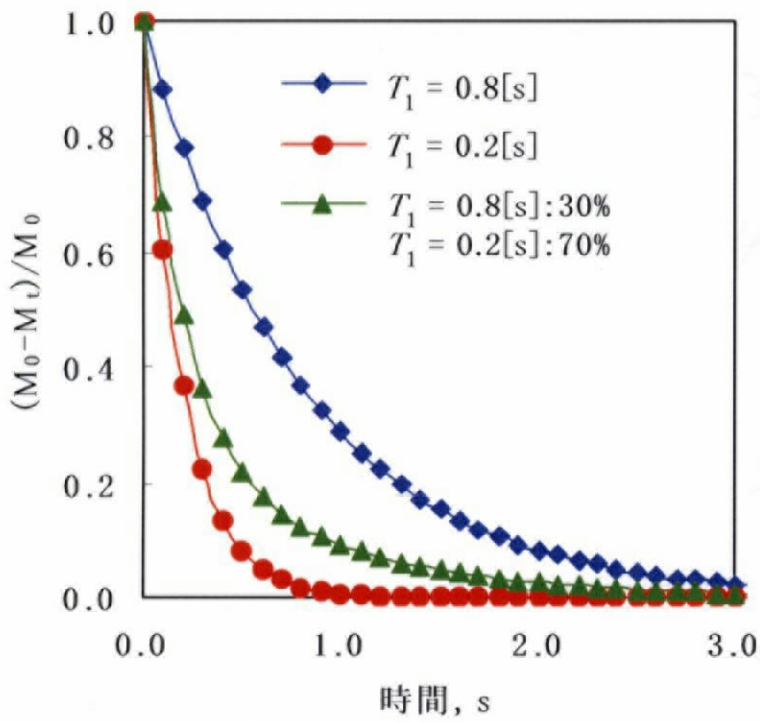


Fig.2-10 NMR の出力信号

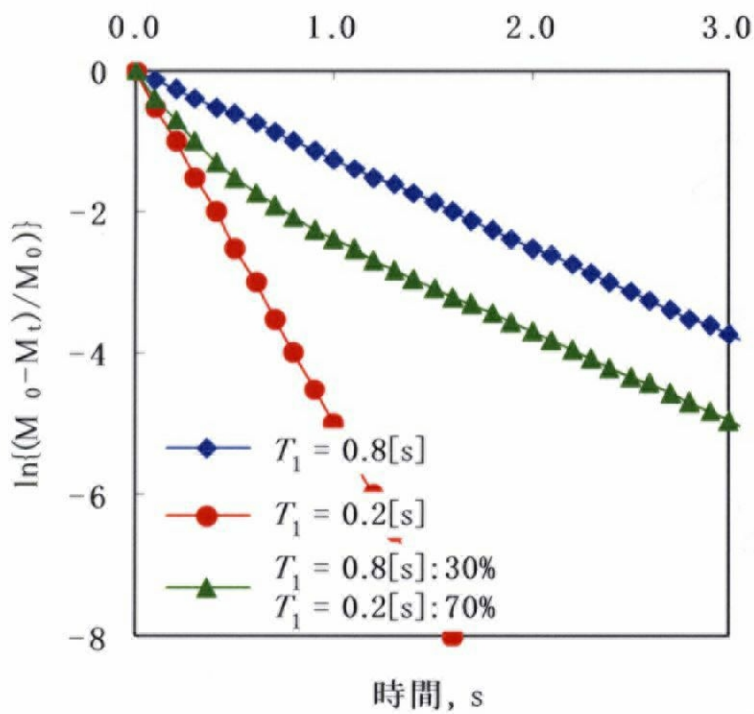


Fig.2-11 NMR 出力信号の対数表示

2-2-4 細胞の低浸透圧耐性測定

2-2-4-1 細胞の浸透圧耐性について

細胞(植物細胞においては細胞壁を取り除いたプロトプラスト)は低張液にさらされると、一般的には、細胞内外の浸透圧の差により水が細胞膜をとおして内部に移動し、細胞は膨張する。低張液の浸透圧を下げていくと細胞は更に膨張し、ついには破裂する。細胞が破裂する浸透圧は細胞膜の力学的物性や細胞が自身の浸透圧を調節する機能などによって決まると考えられる。したがって細胞が破裂する浸透圧、すなわち低浸透圧耐性を調べることにより、貯蔵により細胞膜の物性や浸透圧調節機能など、細胞内外の水移動に関すると考えられる要素についての情報が得られる。

2-2-4-2 プロトプラストの作成方法

プロトプラストの作製は次の手順で行った。オオムギ子葉の先端部および基部を約 **10mm** 切り取り、裏面の表皮を剥離した。表皮を剥離した面が液面に接するようにオオムギ子葉を酵素液(マンニトール **0.5M**、セルラーゼオノヅカ **1%**、マセロザイム **0.05%**) に浮かべ、**20°C**において **50rpm** で、**2** 時間振盪した(Fig.2-12)。その後酵素液からオオムギ子葉の残った部分を取り除き、**100G** で**2** 分間の遠心分離により酵素液にプロトプラストを沈殿させた。上澄み液を捨て、マンニトール **0.5M** 溶液を加えて攪拌し、更に遠心分離を行うという操作を **3** 回行いプロトプラストを洗浄した。このようにして作製したプロトプラストにマンニトール **0.5M** 水溶液を加え、プロトプラストの密度が約 **$1.0 \times 10^6/\text{ml}$** になるように調整した。

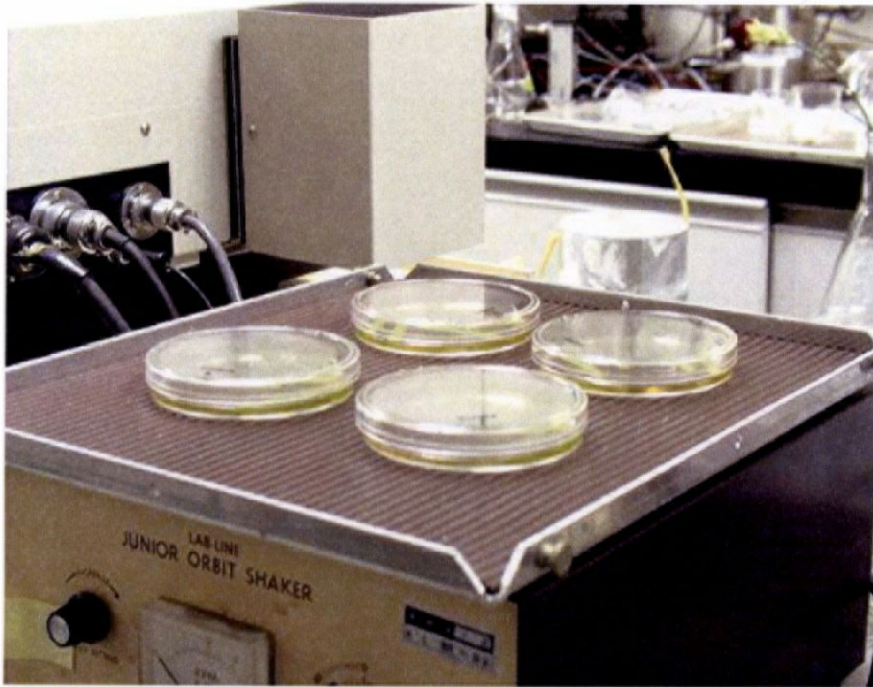


Fig.2-12 酵素液中でオオムギ子葉を振盪

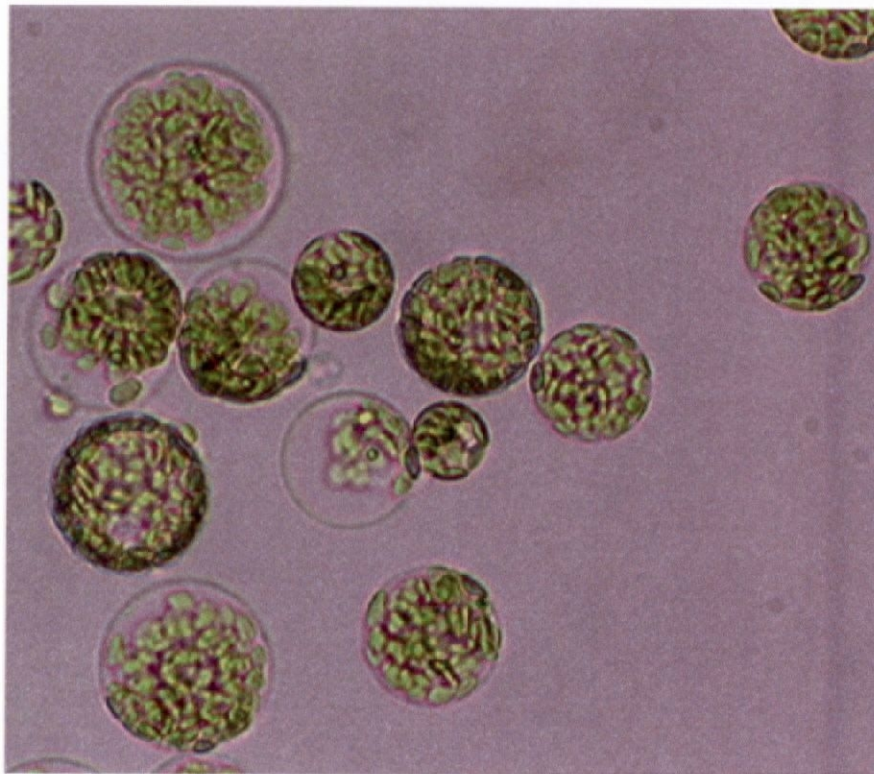


Fig.2-13 作成されたプロトプラスト

2-2-4-3 プロトプラストの生存率の算出方法

はじめに、8種類に濃度を調整したマンニトール水溶液を 200 μ l ずつ用意した。別途用意したマンニトール水溶液の濃度と、それぞれの 20°Cにおける浸透圧を Table2-1 に示した。溶液の浸透圧は次に示す van't Hoff の式より得た。

$$\Pi = [B]RT \quad (2-8)$$

式 2-8 において Π は溶液の浸透圧、 $[B]$ は溶質のモル濃度、 R は気体定数、 T は溶液の温度を表す。これらのマンニトール水溶液にプロトプラスト懸濁液を 4 μ l ずつ滴下し静置した。浸透圧平衡に達したプロトプラスト懸濁液を 2 μ l ずつ 5 回採取し、細胞膜が破壊されたプロトプラストと破壊されていないプロトプラストの数を顕微鏡観察により測定した。浸透圧により破壊された様子と正常なプロトプラストを Fig.2-14 に示した。Fig.2-14(a)は細胞膜が破壊されて葉緑体のみが集合した状態、(b)、(c)は細胞膜が破壊された部位から葉緑体が漏出した状態であり、(d)は正常なプロトプラストである。すべてのプロトプラストの数と正常なプロトプラストの数の比を求め生存率とした。

Table2-1 実験に用いたマンニトール溶液の濃度と浸透圧

溶液濃度 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	浸透圧(20°C) MPa
0.500	1.20
0.400	0.96
0.300	0.72
0.275	0.66
0.250	0.60
0.225	0.54
0.200	0.48
0.100	0.24

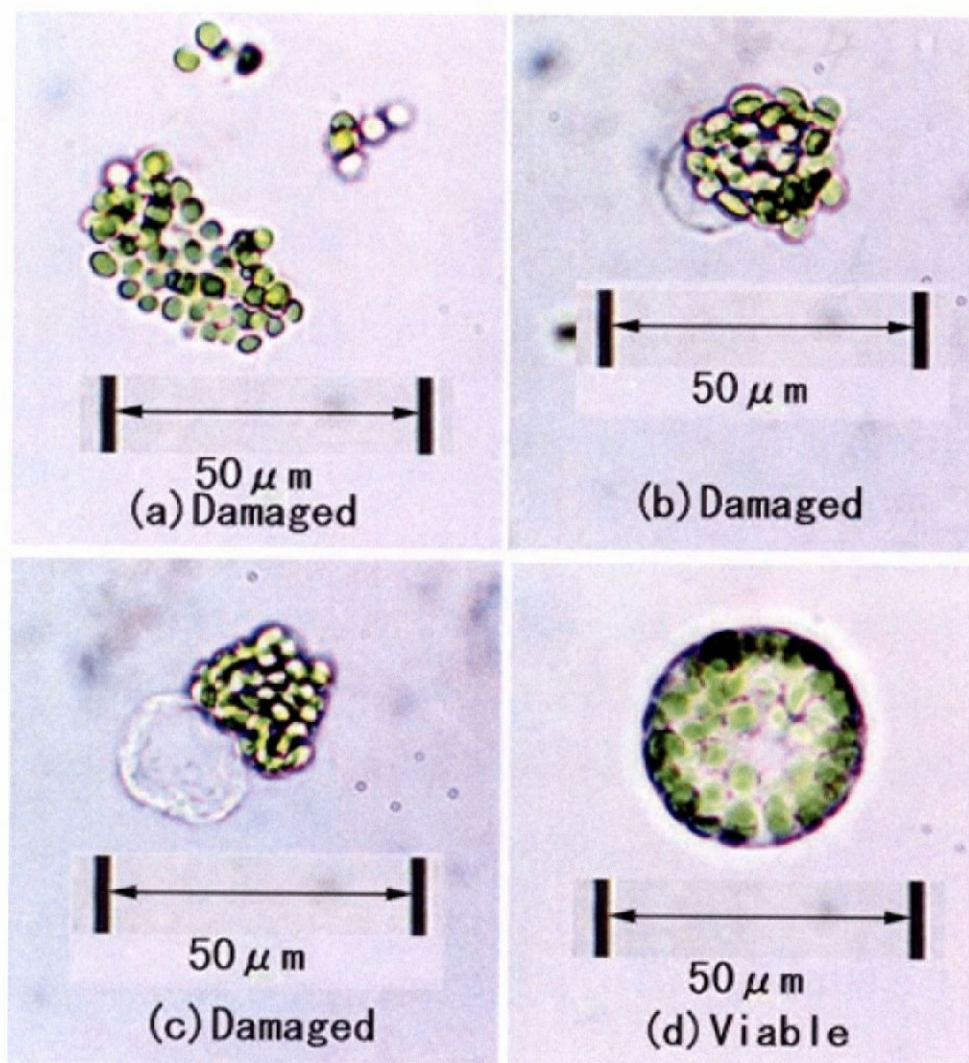


Fig.2-14 破壊されたプロトプラストと
正常なプロトプラスト

2-2-4-4 プロトプラストの限界浸透圧算出方法

Fig.2-15 にオオムギ子葉プロトプラストの浸透圧耐性を計測した結果の一例を示した。オオムギ子葉細胞の本来の浸透圧は 1.2MPa 以上と考えられ、それ以下の浸透圧を持つ溶液中ではプロトプラストは膨張し、一部のプロトプラストは破裂する。破裂せずに残るプロトプラストの割合は Fig.2-15 の記号◆に示されるように周囲の溶液の浸透圧が 1.2MPa から低くなるにつれて曲線を描いて下がっていく。プロトプラストの浸透圧耐性の違いによって、この生存率の下がり方が異なってくる。得られた結果を比較し浸透圧耐性の違いを検討するため、次のようにしてプロトプラストの低浸透圧耐性を表す、平均破壊浸透圧を定義した。

ある実験区において、全てのプロトプラストがある同じ浸透圧で一斉に破裂するとすると、Fig.2-15 に赤の破線で表された生存率変化を示すことになる。しかし実際には生存率の変化は Fig.2-15 の記号◆のような変化を示すことになるが、これはプロトプラスト間の格差として説明できる。ある浸透圧でプロトプラストが破裂する確率が正規分布に従うと仮定すると、溶液の浸透圧に対するプロトプラストの生存率変化は、次式に示す正規分布の累積分布関数になる。

$$\Phi(z) = \int_{-\infty}^z \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right\} dx \quad (2-9)$$

ここで、 z : 溶液の浸透圧 [MPa]

$\Phi(z)$: プロトプラストの生存率

μ : プロトプラストが破裂する浸透圧の平均値 [MPa]

σ^2 : 分散

である。プロトプラストの低張液中での生存率の計測結果を式 2-9 の関数で帰することにより、各実験区でのプロトプラストが破裂する浸透圧の平均値 μ

を求めることができる。この平均値 μ を平均破壊浸透圧と定義した。

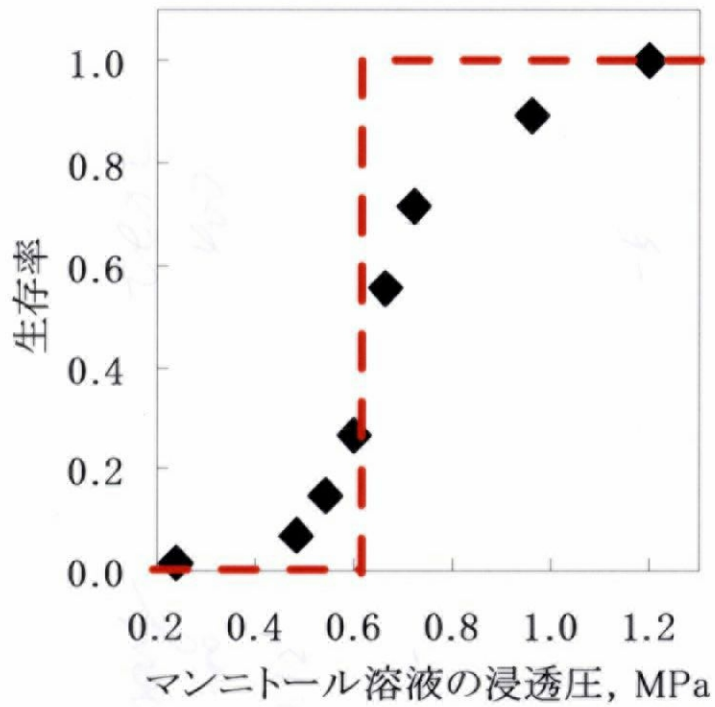


Fig.2-15 プロトプラスト生存率測定結果の一例と
プロトプラスト格差が無いと仮定した場合の生存率変化

2-3 結果および考察

2-3-1 T_1 の測定結果

本実験では、測定された信号は二つの指数項の和で表された。これはオオムギ子葉内の水に主に2種類の動的状態があることを反映していると考えられる。Fig.2-16 にオオムギ子葉内に存在する2種の動的状態にある水について、それぞれの T_1 の経時変化を、Fig.2-17 に2種の状態の水がオオムギ子葉内で占める割合の経時変化を示した。また貯蔵中の目減りを Fig.2-18 に示した。Fig.2-16 および Fig.2-17 より貯蔵開始直後には 700ms 前後の T_1 を示す水が約 85%、300ms 前後の T_1 を示す水が約 15%存在することが分かる。Snaar(1992)らはリンゴ柔組織細胞の T_1 および T_2 を測定して 80%の長い T_1 を示す水と、20%の短い T_1 を示す水が存在するとし、これらは更に 75.2%の長い T_2 、16.4%の短い T_2 および 8.4%の最も短い T_2 を持つ成分に分けられることを示した。 T_2 は T_1 とは異なる緩和過程を表す値であるが、 T_1 と同様に水の動的状態を反映するとされている。この結果、長い緩和時間を示す水は液胞内部の水であり、短い緩和時間を示す水は細胞質や細胞壁中の水であるとしている(Snaar *et al*, 1992)。成熟した植物細胞では液胞が占める割合は多くの場合、全体積の 90%に及ぶことと(Nobel, 1999)、Snaarらのモデルを考慮すると、Fig.2-16 で示した長い T_1 を示す水は主に液胞中の水であり、短い T_1 を示す水は細胞質や細胞壁中の水であると考えられる。

また Fig.2-17 より、長い T_1 を示す水は貯蔵開始直後では 85%前後を占めているが時間とともに減少し、貯蔵開始後 72 時間では約 70%となった。この構成割合の変化を起こす原因としては、結合力の弱い長い T_1 を示す水が蒸散等によりオオムギ子葉から失われた、あるいは細胞内で長い T_1 を示す水が短い T_1 を示す

水に状態変化したことが考えられる。細胞の 90%が水分であると仮定した場合、Fig.2-17 で示された変化が水分損失によってのみ生じたとすると最低でも 20% の目減りがなければならない。しかし Fig.2-18 に示したように貯蔵中の試料の目減りは最大でも 2.5%以内となっており、目減りではこの構成割合の変化は説明できない。したがってこの構成割合の変化は、細胞内の水の状態変化が原因であると考えられる。すなわち液胞への糖類等の代謝産物の蓄積、もしくは液胞からの水分の流出である。しかし前者に関しては生体外の実験より、葉組織内に含まれる代謝産物の予測される濃度変化では T_1 への影響は認められないとされていることから(加来, 1993)、この構成割合の変化は液胞からの水分流出によるものと考えられる。貯蔵後 48 時間、72 時間のオオムギ子葉では萎れが観察されたが、これは液胞からの水分流出により細胞の膨圧が低下したことを示している。また細胞質中の水は、核酸や膜系に結合することにより短い T_1 を示すとされるが(上平, 1989)、液胞から細胞質へ漏出した水は、短い T_1 を示す水に変化したと考えられる。

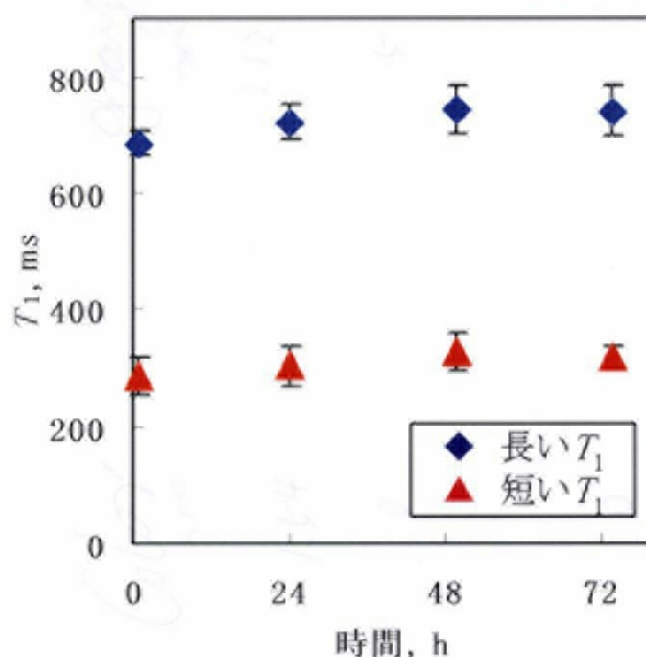


Fig.2-16 オオムギ子葉内水の T_1 の経時変化

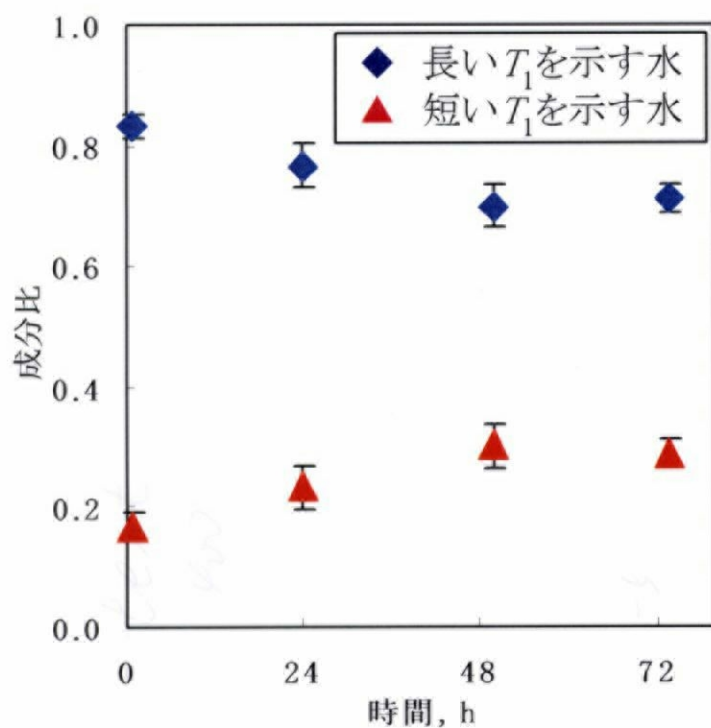


Fig.2-17 オオムギ子葉内水の成分比の経時変化

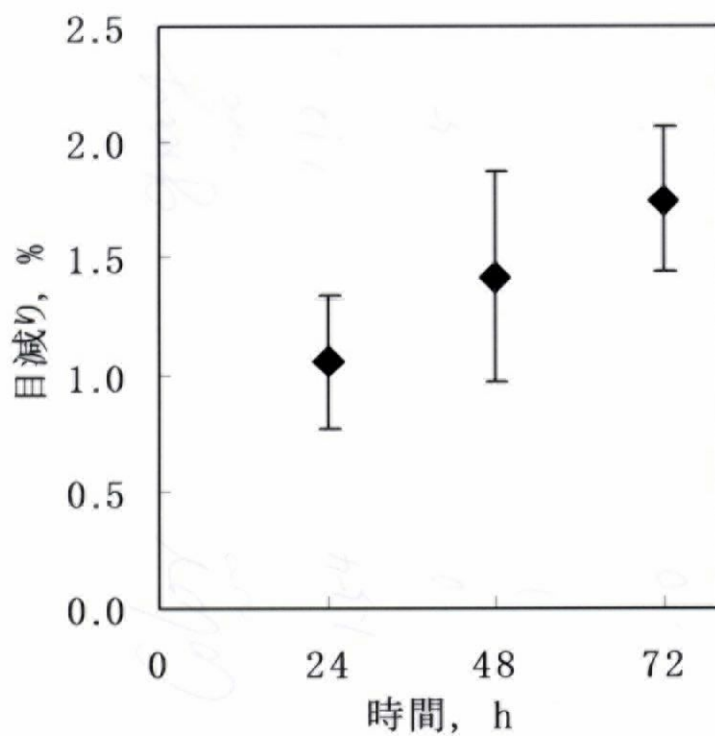


Fig.2-18 オオムギ子葉の目減り

2-3-2 浸透圧耐性の測定結果

オオムギ子葉の貯蔵時間に対するプロトプラストの平均破壊浸透圧 μ の変化を Fig.2-19 に示した。切り取った直後のオオムギ子葉から作製したプロトプラストは溶液の浸透圧が 0.7MPa 前後で破裂するが、72 時間貯蔵したオオムギ子葉から作製したプロトプラストは 0.8MPa 付近で破裂した。このことからオオムギ子葉の貯蔵時間が長くなるにしたがってプロトプラストが破裂する溶液の浸透圧は高くなり、プロトプラストの低張液への耐性が低くなることが示された。この原因としては、細胞膜の力学的物性の変化や、細胞が持つ内部の浸透圧を調節する機能の低下が考えられる。細胞膜や液胞膜等の生体膜では老化等による局所的なゲル領域の形成が指摘されているが(Yao *et al*, 1991)、ゲル領域は液晶領域に比べて弾性率が大きい(山崎, 2000)、ゲル領域が細胞膜上に増えることにより低張液中での膨張時に細胞膜により大きな応力が加わると考えられる。またゲル領域では膜を通した物質輸送を行うとされるポンプ、チャンネル蛋白質が含まれておらず(Platt-Aloia, 1985)、ゲル領域の増加は細胞の浸透圧調節機能を低下させると考えられる。これらのことを考慮すると本実験で得られた結果は、オオムギ子葉の貯蔵中に細胞膜のゲル化が進行し、細胞膜の物性や浸透圧調節機能が低下した事を示している可能性がある。

プロトプラストの低張液中での生存率を式 2-9 で回帰した際に得られる分散 σ^2 を Fig.2-20 に示した。尚、本実験で計数したプロトプラストの数は合計で約 2 万個であった。式 2-9 における分散 σ^2 は正規分布における分散であり、プロトプラストの低浸透圧耐性の個体差を表している。オオムギ子葉プロトプラストの低浸透圧耐性の個体差は貯蔵開始後 48 時間では減少するが、72 時間で再び増加することが示された。プロトプラストの低浸透圧への耐性において個体差をもたらす要因としては各プロトプラストの細胞膜に働く応力の個体差、あ

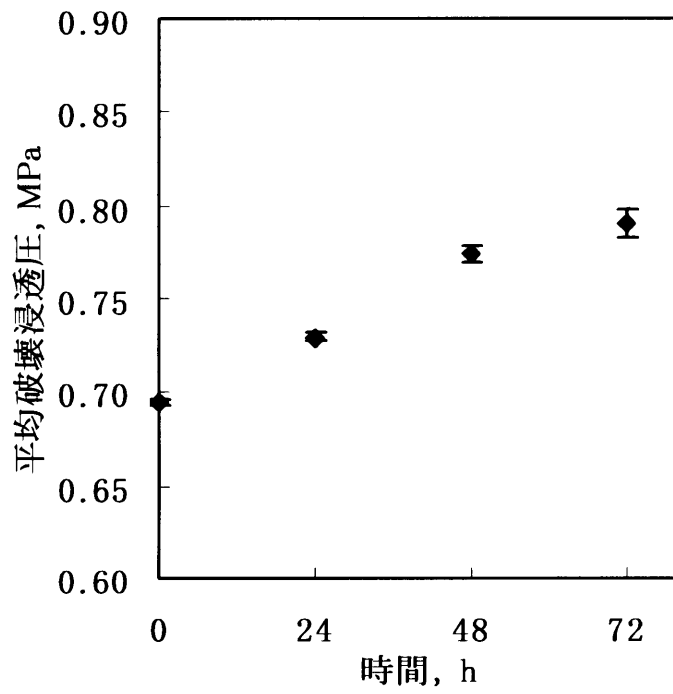


Fig.2-19 平均破壊浸透圧の経時変化

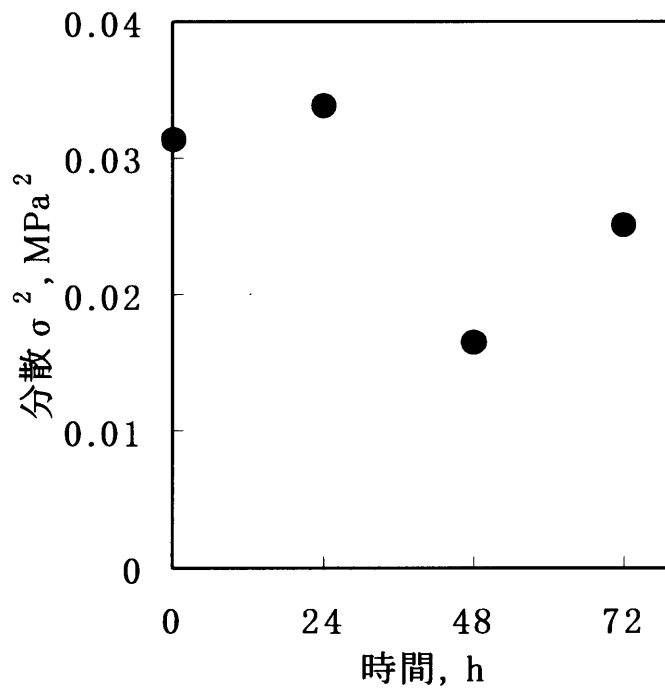


Fig.2-20 平均破壊浸透圧の分散

るいは細胞膜、液胞膜の物質輸送機能の個体差が考えられる。細胞膜に働く応力について考えると、応力はプロトプラストの半径に比例し細胞膜の厚さに反比例する。また細胞膜の弾性率が大きいほど働く応力も大きくなる。しかし細胞膜の厚さは全ての細胞でほぼ均一であり、プロトプラスト半径の分布は実験区毎に大きく異なっている可能性は低い。よって細胞膜に働く応力の細胞格差に経時変化があるとすれば、細胞膜の弾性力、つまり細胞膜のゲル化の程度に格差があることを反映していると考えられる。またゲル化した領域にはチャンネル・ポンプとして働く蛋白質が含まれていないとされることから、細胞膜および液胞膜におけるゲル化の程度の細胞格差は、浸透圧調節に働くと考えられる細胞膜および液胞膜の物質輸送能力の格差をも反映することになる。

また低浸透圧への耐性における細胞間格差が増減することに着目すると、細胞の低浸透圧耐性の低下に二段階の過程が存在する可能性が考えられる。これは細胞膜の力学的物性の変化、あるいは細胞の浸透圧調節機能の低下に二段階の過程の存在が考えられるということになる。このことと、NMRによる T_1 測定の結果より導いた細胞内の水移動に関する仮説を次に述べる。

2-3-3 貯蔵中における細胞内水移動に関する仮説

植物細胞の老化は液胞膜の機能低下に始まり、液胞内容物の細胞質への漏れにより、細胞質のイオンバランスの崩壊、蛋白質分解酵素群による細胞の劣化が引き起こされると考えられている(Thimann, 1987)。このことを考慮すると Fig.2-20 において分散が減少する 48 時間までの間は液胞膜の機能低下の過程を反映しており、48 時間以降は液胞内容物の漏れにより引き起こされた細胞膜の機能低下の過程を反映していると考えられる。すなわちオオムギ子葉の貯蔵開始後、各細胞の液胞膜の機能低下における程度の差より、作成したプロトプラストの低浸透圧への耐性に個体差が生じるが、貯蔵開始後 48 時間にはほぼ全ての細胞において液胞膜の機能低下が起こり、低浸透圧への耐性の個体差が減少した。しかし貯蔵開始後 72 時間では液胞内容物の漏れによる細胞膜の機能低下が始まっており、その進行に細胞毎の差があることから、再び低浸透圧への耐性の格差を増大させたと考えられる。

また Fig.2-17 に示したオオムギ子葉内の長い T_1 を持つ水、すなわち液胞内部の水の減少は貯蔵開始から 48 時間までの間に起こっており、48 時間から 72 時間までの間ではほぼ一定であることを考慮すると、液胞膜は貯蔵開始後 48 時間までに機能が低下し、それにより液胞内部の水が細胞質へ漏れ出したとみることができる。また 48 時間以降はほぼ全ての細胞において液胞膜の機能低下のプロセスが終了し、液胞と細胞質の間の水移動が平衡状態になったとみることができる。

以上の仮説からオオムギ子葉では貯蔵中に液胞から水分が流出することにより萎れを起し、また細胞全体の劣化が引き起こされていると考えられる。すなわち全体的な水分損失が少ない状態においても、組織や細胞内部の局所的な水移動により、オオムギ子葉は萎れを起こすと考えられる。以上の仮説と同様の

現象が葉菜類の細胞においても起こると仮定すると、葉菜類の貯蔵においては、全体的な水分損失が無い状態でも液胞から細胞質への水分流出により膨圧の低下や細胞全体の劣化が起こり、萎れや品質低下を招く可能性があることが考えられる。また葉菜類の貯蔵においては液胞からの水分の漏出を防ぐことにより、より長期にわたる鮮度保持が可能となると考えられる。

2-4 摘要

貯蔵による細胞内水の動的状態と、生体膜の状態の変化を明らかにすることを目的とし、モデル試料としてオオムギ子葉を用い、 $^1\text{H-NMR}$ による縦緩和時間 T_1 およびプロトプラストの低張液への耐性を測定した。

T_1 の測定から、オオムギ子葉内には約 700ms の長い T_1 を示す水と約 300ms の短い T_1 を示す水の存在が確認され、長い T_1 を示す水は液胞内部の水であると考えられた。貯蔵開始時では長い T_1 を示す水の存在比は約 85%であったが 48 時間後には約 70%まで減少した。この時の目減りが約 2%であったことから、この長い T_1 を示す水の減少は水分損失によるものではなく、貯蔵中に液胞内部の水が細胞質へ漏出したことによると考えられた。

またプロトプラストの低張液耐性の測定から、オオムギ子葉の浸透圧調節機能が貯蔵により低下し、さらにプロトプラストの低張液耐性の個体差が増減することを明らかにした。この個体差の増減と、前述の液胞内部の水が細胞質へ漏出するという考察から、プロトプラストの低浸透圧耐性の低下には、初期の液胞膜の機能低下と、それに誘起される細胞膜の機能低下という、少なくとも 2 つの過程が存在すると考えられた。

また実験結果よりオオムギ子葉においては全体的な水分損失の少ない条件においても、液胞から細胞質への細胞内部における局所的な水移動により、萎れが起こるといふ仮説を導いた。この仮説が葉菜類に適用可能であれば、葉菜類の貯蔵においては全体的な水分損失のみならず液胞から細胞質への水分移動を防ぐことが鮮度保持技術の向上へつながる可能性がある。