

低酸素条件がパイナップル及びコダカラベンケイのミトコンドリア呼吸特性に及ぼす影響

富永慧*¹⁾・野瀬昭博・Hoang Thi Kim Hong・東江栄
(佐賀大学農学部, ¹⁾佐賀県上場営農センター(現在の所属))

The effect of low oxygen conditions on respiration properties of mitochondria isolated
from Pineapple and *Kalanchoë daigremontiana*.

Kei Tominaga¹⁾, Akihiro Nose, Sakae Agarie

(Faculty of Agriculture, Saga University. ¹⁾Present address, Saga Prefectural Upland Farming Research and
Extension Center)

Crassulacean Acid Metabolism (CAM) 植物は夜間に CO₂ を吸収し、昼間は停止する特異的なガス交換パターンを示す。CAM 型光合成は、リンゴ酸の脱炭酸酵素の違いにより、リンゴ酸酵素型 (ME 型) とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ型 (PCK 型) の 2 つのサブタイプに分けられる。明期に 10% 酸素濃度下では、PCK 型のパイナップルは CAM 型光合成を維持するが、ME 型のコダカラベンケイは CO₂ を吸収することが報告されている。この原因の一つとして、酸素濃度の低下によりミトコンドリアのオルタナティブオキシダーゼ (AOX) への電子伝達が低下することで、リンゴ酸の脱炭酸が抑制されていると考えられている。しかし、関与するミトコンドリア内の呼吸や代謝メカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究は、コダカラベンケイソウとパイナップルから無傷ミトコンドリアを単離し、サブタイプの違いによるミトコンドリアの電子伝達メカニズム及びリンゴ酸の酸化におけるミトコンドリアの役割を明らかにすることを目的として実施した。

材料及び方法

供試材料は、コダカラベンケイ (*Kalanchoë daigremontiana*) 及びパイナップル (*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. smooth cayenne N67-10) である。ガラスハウスで育成し、12 時間日長、温度を明/暗 35/30°C、湿度 70% 及び葉の表面に当たる光量子束密度を 420-450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に調節した人工気象器内で、7 日間馴化させた。無傷ミトコンドリアはパーコール密度勾配法で単離した。ミトコンドリアのリンゴ酸を基質とした酸素消費速度は、液相型酸素電極 (Hansatech CB1-3D, England) を用い測定した。低酸素条件は、8%, 14% 及び 21% O₂ とし、ミトコンドリアの呼吸速度を評価した。

結果及び考察

オルタナティブ経路 (Alt) 及びシトクロム経路 (Cyt) の阻害剤であるサリチルヒドロキシサム酸 (SHAM) 及びシアン化カリウム (KCN) を用い、リンゴ酸を基質とした呼吸への影響を調べた。コダカラベンケイでは SHAM への感受性が高く、パイナップルでは KCN への感受性が高いことが明らかとなった (図 1)。コダカラベンケイでは酸素濃度の低下に伴い呼吸は減少したが、パイナップルでは変化しなかった (表 1)。またコダカラベンケイの KCN 存在下における呼吸は酸素濃度の低下に伴い減少した (表 2)。コダカラベンケイにおいて ME の活性を抑制し、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) によりリンゴ酸の酸化を行った時、KCN への感受性は高くなり、低酸素の影響は受けなかった (表 3, 4)。これらの結果より、パイナップルは Cyt へ電子を伝達していること、またコダカラベンケイは、ME を用いたリンゴ酸の酸化では Alt へ、MDH では Cyt へ電子を伝達していることが分かった。

コダカラベンケイにおいて、ME を用いたリンゴ酸の酸化はピルビン酸を生成し、ピルビン酸は AOX を活性化するという報告がある。このことはコダカラベンケイにおいて、ピルビン酸による AOX の活性化により、オルタナティブ経路へ電子が流れやすくなったと考えられる。しかし、パイナップルやコダカラベンケイの MDH によるリンゴ酸の酸化のように、ピルビン酸を生産せず、ATP を消費するような経路では、シトクロムオキシダーゼ (COX) の活性が増加するため、シトクロム経路へ流れやすくなったと考えられる。以上のことより、ピルビン酸による AOX の活性化や ATP 需要の増大が、CAM 植物のリンゴ酸酸化に伴う NADH の処理におけるミトコンドリア電子伝達鎖での電子の流れを制御しているものと考えられる (図 2)。

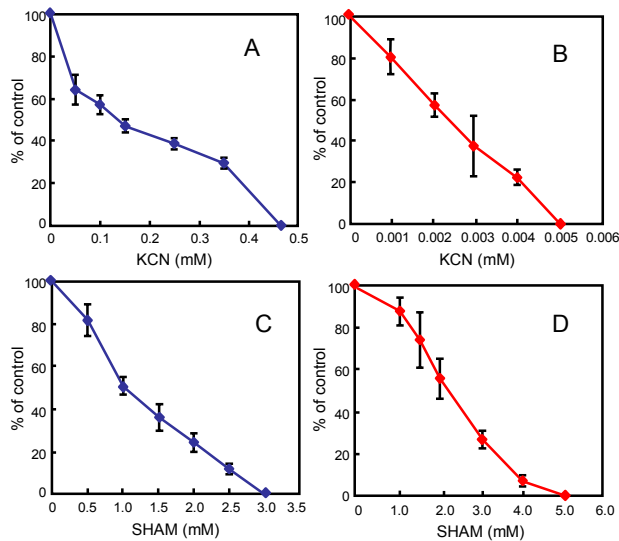


図1. KCNとSHAMがコダカラベンケイ及びパインアップルのリンゴ酸酸化に及ぼす影響。
A, C, コダカラベンケイ; B, D, パインアップル。

表1. 酸素濃度がコダカラベンケイ及びパインアップルのリンゴ酸を基質とした呼吸に及ぼす影響。

酸素濃度	呼吸速度 (nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)		ADP/O	RCR
	+ADP (state 3)	-ADP (state 4)		
コダカラベンケイ				
21%	161±45	93±17	2.5±0.2	1.7±0.2
14%	111±3 (69)*	70±18	2.6±0.5	1.6±0.4
8%	75±13 (47)*	56±6	2.5±0.2	1.3±0.1
パインアップル				
21%	291±8	221±23	2.4±0.1	1.3±0.1
14%	271±26	193±37	2.2±0.1	1.4±0.1
8%	256±31	191±47	2.1±0.1	1.4±0.1

*: 21%O₂ (state 3) の値との割合。ADPの終濃度は0.1 mMとした。

表2. 酸素濃度がコダカラベンケイ及びパインアップルのKCN存在下における呼吸に与える影響。

酸素濃度	呼吸速度 (nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)		阻害率 (%)
	+ADP	+KCN	
コダカラベンケイ			
21%	238±17	155±10	35±2
14%	116±4	53±6	54±5
8%	79±15	31±2	60±7
パインアップル			
21%	304±51	0	100
14%	292±32	0	100
8%	278±14	0	100

ADP及びKCNの終濃度はそれぞれ0.2 mM及び0.1 mMとした。

表3. 酸素濃度がコダカラベンケイにおけるMDHを用いたリンゴ酸の酸化時の呼吸に及ぼす影響。

酸素濃度	呼吸速度 (nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)		ADP/O	RCR
	+ADP (state 3)	-ADP (state 4)		
21%	148±22	103±23	2.3±0.1	1.4±0.1
14%	134±12	95±10	2.2±0.2	1.4±0.03
8%	121±25	106±11	2.4±0.2	1.3±0.1

ADPの終濃度は0.1 mMとした。

表4. 酸素濃度がコダカラベンケイのKCN存在下におけるMDHを用いたリンゴ酸の酸化時の呼吸に及ぼす影響。

酸素濃度	呼吸速度 (nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)		阻害率 (%)
	+ADP	+KCN	
21%	151±7	52±1	65±2
14%	135±34	44±12	68±1
8%	121±14	40±1	67±5

ADP及びKCNの終濃度はそれぞれ0.2 mM及び0.1 mMとした。

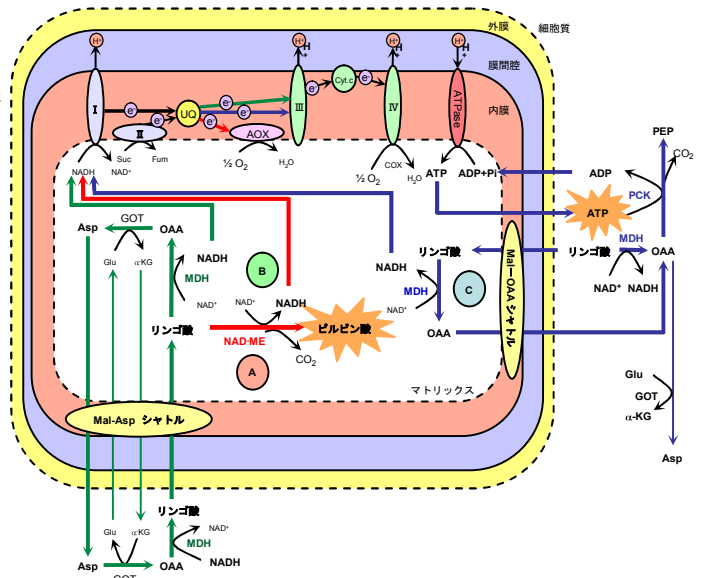


図2. コダカラベンケイ及びパインアップルのリンゴ酸の酸化における電子伝達経路。

A (→), B (⇌), C (⇌), コダカラベンケイ; C (⇌), パインアップル。I-IV, 複合体; UQ, ユビキノン; AOX, オルトナチフオキシダーゼ; COX, シトクロムオキシダーゼ; ATPase, ATP合成酵素; Suc, コハク酸; Fum, フマル酸; NAD-ME, NAD-リンゴ酸脱羧酵素; MDH, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ; PCK, ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ; PEP, ホスホエノールピルビン酸; OAA, オキサロ酢酸; Asp, アスパラギン酸; GOT, グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ; α-KG, α-ケトグルタル酸; Mal-Asp シャトル, リンゴ酸-アスパラギン酸シャトル; Mal-OAAシャトル, リンゴ酸-オキサロ酢酸シャトル。