

キュウリにおける節位の異なる葉の抗酸化レベル

趙 習コウ^{1**}・李 進才^{2***}・松井 鑄一郎²・前澤 重禮^{2*}

¹ 岐阜大学連合農学研究科 501-1193 岐阜市柳戸

² 岐阜大学農学部 501-1193 岐阜市柳戸

Antioxidative Levels in Leaves at the Different Nodal Positions of Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Xiheng Zhao^{1**}, Jincal Li^{2***}, Shuichiro Matsui² and Shigenori Maezawa^{2*}

¹The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193

²Faculty of Agriculture, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193

Summary

Antioxidative levels in cucumber leaves, attached to different nodes of main stems were determined on plants decapitated at the 21st node. Leaf samples were collected from the 4th, 8th, 12th, 16th and 20th nodes. Chlorophyll content was lowest in the 4th node; it peaked at the 12th node. Protein content in leaves decreased with a descending nodal position from the 16th to the 4th node, while malondialdehyde content increased concurrently. Superoxide dismutase and catalase activities were lower on the basal 4th and 8th leaves. Hydrogen peroxide content was highest in leaves of the 12th node; it decreased successively above and below that position. Ascorbate peroxidase and peroxidase activities in the 8th leaf and in the 4th leaf, respectively, were highest. The antioxidative compounds, ascorbic acid, β -carotene and flavonoids were less concentrated below the 12th node. These results indicate that cucumber leaves have different antioxidant levels depending on the nodal position, and therefore, age.

Key Words: antioxidative level, cucumber, different nodal position.

緒 言

植物細胞内では、スーパーオキシド (O_2^-) や過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、1重項酸素 (1O_2) および3重項励起クロロフィル ($^3Chl^*$) や脂質ラジカルなどが常に発生しており、 O_2^- と H_2O_2 は主に抗酸化酵素によって、 $\cdot OH$ 、 1O_2 および $^3Chl^*$ と脂質ラジカルなどは抗酸化物質によって消去され (浅田, 1990; 真野・浅田, 1999), 通常の代謝活動が維持されている。これらの活性酸素やフリーラジカルは生育ステージや環境条件の変化に伴って多く発生したり、スムーズに消去されない場合には、様々な現象が誘導される。これまでに、細胞老化の進行 (Dhindsa ら, 1981; McRae・Thompson, 1983; Mondal, 1988), 光合成能の低下 (Kaiser, 1976; Powles, 1984; Asada・Takahashi, 1987; Asada, 1999; 李ら, 2001b), 病原菌の抑制 (浅田, 1990;

Sutherland, 1991), 光 (Azevedo ら, 1998; 李ら, 2001a) や温度 (Omran, 1980; 李・松井, 2001) などのストレスによる障害の発生に活性酸素や抗酸化レベルの変化が関与することが知られている。

キュウリは、葉の老化が下位節から上位節へ進む逐次的老化型植物 (Leopold, 1975) であり、強光、高温、低湿ほど下位節葉と上位節葉の生育ステージの差異が際立っている。下位節の葉は老化が進み、光合成能が低く、病原菌に感染しやすいのに対し、上位節の葉は温度、湿度および光などのストレスによる障害を発生しやすい。これらの現象を詳細に理解するには、活性酸素を消去する抗酸化機能を考慮すべきであり、個葉の抗酸化レベルについて調べる必要がある。

そこで、本研究はキュウリの異なる節位の主枝葉について老化の指標となるクロロフィル、タンパク質および脂質過酸化の最終産物マロンジアルデヒド (MDA) の含量を測定し、抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD), カタラーゼ (CAT), アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX), ペルオキシダーゼ (POD) 活性, 活性酸素の一つ H_2O_2 の含量, 抗酸化物質の還元型アスコルビン酸

2002年3月8日 受付. 2002年11月28日 受理.

* Corresponding author.

** 現在:山西農業大学園芸学院 中国 山西省

*** 日本学術振興会外国人特別研究員.

(AsA), β -カロテン, フラボノイド含量を調べ, 節位別の葉の抗酸化レベルについて検討した.

材料および方法

1. 栽培概要

キュウリ '夏すずみ'(タキイ)を2001年2月14日にバーク堆肥:土(1:1)を入れた直径10 cmの育苗用ポットに播種し, 3月23日に本葉4枚となった苗を株間60 cm, 畦幅120 cmでプラスチックハウスに定植した. ハウス内の気温は15~32℃の範囲で推移した. 主枝については基部の第4節以下の側枝と花芽を除去し, 5月15日に21節を残して摘心し, 第一, 二次側枝については生育に伴い1節を残して摘心した.

2. サンプリング

5月31日に, 生長が揃った5株を選び, 下から数えた各株の第4, 8, 12, 16, 20葉をサンプリングし, 速やかに細切りして2 gずつ計量し, 次いで液体窒素で凍結後, -20℃に貯蔵した. 凍結試料について以下の測定を行った.

3. クロロフィル, タンパク質およびMDAの定量

クロロフィルの定量はArnon(1949)の方法に従った. タンパク質はLowry(1951)の方法に従い, 牛血清アルブミン(ナカライテスク)を標準タンパク質として定量した. MDAはHeath・Packer(1968)の方法に準じ, 50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)4 mlで磨砕抽出し, 4層ガーゼでろ過して10,000 x g × 20分間遠心分離した. 上澄み液1 mlと0.5%2-チオバルビツール酸含有のトリクロロ酢酸溶液2 mlを混和して90℃で15分間インキュベートし, 再遠心分離後, 532と600 nmの吸光度の差から含量を算出した. MDAの分子吸光係数は 1.56×10^5 とした.

4. 抗酸化酵素活性の測定

酵素の抽出およびSOD, CAT, APXの活性測定は李・松井(2001)の方法に従った. POD活性の測定はKochbaら(1977)に準じ, 酵素抽出液0.5 mlに50 mMリン酸緩衝

液(pH 7.0)24 mlと20 mMグアヤコール1 mlの混和液2.3 mlを加え, 8 mM H_2O_2 0.2 mlを添加してから470 nm波長における1分間の吸光度の変化を測定することから酵素の活性を求めた.

5. H_2O_2 の定量

H_2O_2 含量は既報(李ら, 2001b)と同様の方法で測定した.

6. 抗酸化物質の定量

AsAはヒドラジン比色法(Roeら, 1948)に従い, β -カロテンは李ら(2001a)の方法に準じ, 酢酸エチル:アセトニトリル:メタノール(50:10:40)を移動相として高速液体クロマトグラフィーにより定量した. フラボノイドのフラボンとフラボノールは $AlCl_3$ 法(中林, 1967)に準じ, 80%エタノールの抽出液を減圧濃縮後, 石油エーテルを用いて脂溶性物質を5回繰り返し取り除き, 次いで残液をエタノールで定容し, ルチン(ナカライテスク)を標準として比色定量した.

結果

1. クロロフィル, タンパク質およびMDA含量

クロロフィル含量は中位節の第12葉が最も多く, これに比べ第8, 16葉は少ない傾向があり, 下位節の第4葉と上位節の第20葉が有意に少なかった(第1図). タンパク質含量は第16, 20葉が多く, 下位節の葉ほど少なかった. MDA含量は第4葉が最も高く, 上位節になるほど低下した.

2. 抗酸化酵素活性

SOD活性は第16葉が最も高く, 第16葉より第8葉が, 第12, 20葉より第4葉が有意に低かった(第2図). CAT活性は第4, 8葉に比べて第12, 16, 20葉で有意に高かった. APX活性は第8葉から第20葉では下位節ほど高い傾向を示したが, 第4葉が第8葉よりやや低かった. POD活性は下位節の葉ほど高い傾向があり, 第4葉が最も高く, 第20葉が最も低かった.

3. H_2O_2 含量

H_2O_2 含量は第12葉が最も多く, それより上位および

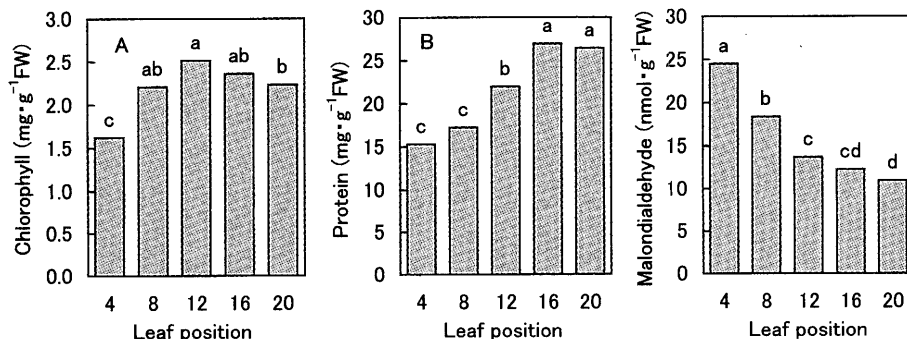


Fig. 1. Chlorophyll (A), protein (B) and malondialdehyde (C) contents in leaves at different nodal positions on the main stems of decapitated cucumber plants. Different letters show significant differences by Duncan's new multiple range test at 5% level.

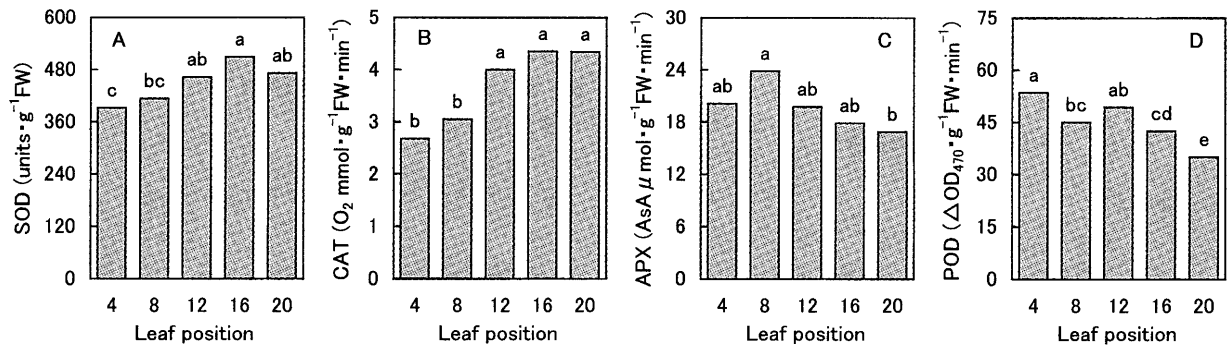


Fig. 2. Superoxide dismutase (SOD, A), catalase (CAT, B), ascorbate peroxidase (APX, C) and peroxidase (POD, D) activities in leaves at different nodal positions on the main stems of decapitated cucumber plants. AsA: ascorbic acid. O_2 : oxygen. Different letters show significant differences by Duncan's new multiple range test at 5% level.

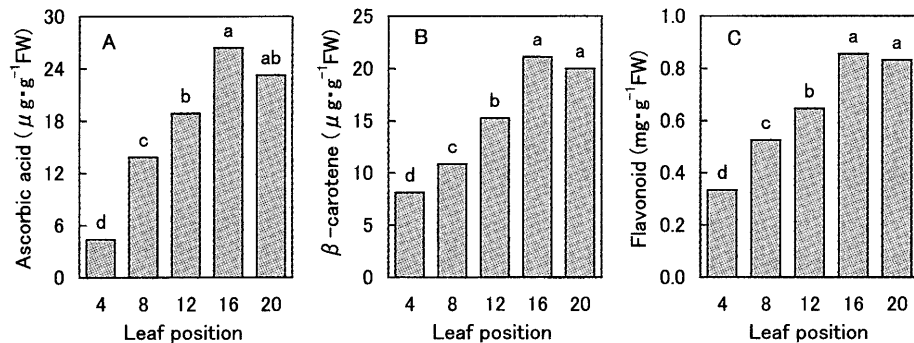


Fig. 4. Ascorbic acid (A), β -carotene (B) and flavonoid (C) contents in leaves at different nodal positions on the main stems of decapitated cucumber plants. Different letters show significant differences by Duncan's new multiple range test at 5% level.

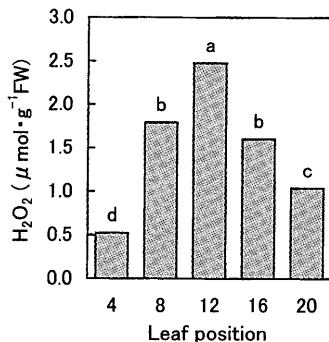


Fig. 3. Hydrogen peroxide (H_2O_2) contents in leaves at different nodal positions on the main stems of decapitated cucumber plants. Different letters show significant differences by Duncan's new multiple range test at 5% level.

下位節の葉ほど少なくなった(第3図)。

4. 抗酸化物質含量

AsA, β -カロテンおよびフラボノイド含量は同様な変化を示し, 第16, 20葉が多く, 第4, 8および12葉では下位節の葉ほど有意に少なくなった(第4図)。

考 察

キュウリは葉の逐次的老化型植物(Leopold, 1975)に

属し, 一般的に下位節の葉ほど老化が進行し, より上位節の葉は時間的, 生理的に若い. クロロフィルやタンパク質含量の低下は緑葉の老化の初期にみられる現象であり(Naitoら, 1978; Huffaker, 1990), MDAの含量は老化の進行とともに増加する(Dhindsaら, 1981; Pauls-Thompson, 1984). 同一節位葉の分析結果ではないが, 本実験で下位節の葉ではクロロフィル含量が少なく, 中, 下位節の葉ではタンパク質含量の低下とMDA含量の増加がみられた. これらの結果はインゲン(Naitoら, 1978)やタバコ(Dhindsaら, 1981)で報告されている老化に伴うクロロフィル, タンパク質の減少およびMDAの増加と同様であった.

植物の葉において, 細胞内の O_2^- はクロロプラストで光過剰のとき発生し, H_2O_2 は主にSODにより O_2^- から生じる(Asada-Takahashi, 1987; Azevedoら, 1998; Salin, 1988). また, ベルオキシソームでは H_2O_2 が光呼吸により生成され, ミトコンドリアおよび細胞質ではいくつかのオキシダーゼにより O_2^- , H_2O_2 が生成される(浅田, 1990; 芦原, 1991). O_2^- を不均化するSOD, H_2O_2 を分解するCATは活性酸素の消去に大きな役割を果たしているが, SODは O_2^- の増加により活性化し(Fridovich, 1986), CATは光依存性があり(Scandalios, 1994), 光

呼吸の程度によっても活性が異なる (Azevedoら, 1998, 李ら, 2001b). キュウリ下位節の葉では, 上位節の葉に比べ光エネルギーを捕捉するクロロフィルが少なく, 受光強度が低く, 生理活動が緩慢であるため, 光過剰の状態になりにくい. その結果, 光呼吸量が低く, 酸化還元反応 (光過剰に伴った余剰電子により 1 電子還元される酸素の還元反応や H_2O_2 生成を伴うグリコール酸の酸化反応) 速度が低下すると考えられる. すなわち, 下位節の葉では通常 O_2^- , H_2O_2 の発生が上位節の葉より少ないと考えられるため, SOD と CAT 活性が低くなったと推測される. また, タバコ (Dhindsaら, 1981) では老化が進んだ下位節の葉ほど, インゲン (McRae・Thompson, 1983) では齢の進んだ葉ほど SOD および CAT 活性は低く, かつ CAT 活性の低下は SOD より大きいことが報告されている. 上述の老化の面からみたキュウリの異なる節位葉の SOD および CAT 活性はこれらの結果と一致した.

一方, APX 活性は第 8 葉が, POD 活性は第 4 葉が最も高く, 両酵素ともに下位節の葉ほど高い活性を示した. APX は植物特有の酵素としてクロロプラストに局在し, AsA を利用して H_2O_2 を H_2O へ還元するが, APX が十分に機能しないときには, CO_2 固定系酵素が残存 H_2O_2 によって失活したり, H_2O_2 から生成した $\cdot OH$ がチラコイド膜などに損傷を与えることにより, 光合成が阻害される (Kaiser, 1976; Powles, 1984; Asada・Takahashi, 1987; Asada, 1999). また, 葉細胞内の光過剰には高クロロフィル含量, 高受光強度だけでなく, 光合成機能の低下も関与する (Powles, 1984). 本実験における葉の採取時期は主枝の上位節の結果期に当たり, 下位節の葉ほど光合成速度は低いと考えられる (李ら, 2000). これらのことより, 第 8 葉から第 20 葉において示された下位節ほど高い APX 活性は, 光合成機能の低下によって下位節の葉で発生するクロロプラスト内の H_2O_2 が効率的に消去されていることを示すと考えられる. 本実験でみられた POD 活性はタバコ (Dhindsaら, 1981) と同様に下位節の葉ほど高い傾向を示し, インゲンでも加齢に伴い葉の POD 活性は上昇することが報告されている (McRae・Thompson, 1983).

活性酸素の一つである H_2O_2 の含量は中位節の第 12 葉が最も高く, 下, 上位節の葉は少なかった. この結果は, クロロフィル含量の分布パターンと類似した. O_2^- , H_2O_2 は Haber-Weiss 反応あるいは Fenton 反応により反応性のより高い $\cdot OH$, 1O_2 を生成して, クロロフィルの分解, タンパク質の損傷, 脂質の過酸化などを誘導する. H_2O_2 の生成と消去に関わる SOD, CAT, APX および POD 活性の変化は細胞の老化に関与すると考えられるが, 異なる節位葉におけるこれらの酵素活性の分布は H_2O_2 含量の分布と異なったことから, 異なる節位葉の H_2O_2 含量に及ぼす抗酸化酵素活性の影響は単純ではなく

非常に複雑であることが示唆された. また, H_2O_2 は O_2^- , $\cdot OH$ とともに病原菌の感染を抑制する生体制御の作用を保持している (浅田, 1990; Sutherland, 1991). キュウリにおける下位節の葉が病原菌に感染しやすいことはその低い H_2O_2 含量に関係している可能性が考えられる.

$\cdot OH$, 1O_2 , $^3Chl^*$ および脂質ラジカルは細胞成分との反応性が高く, 細胞内では酵素的に消去されず, AsA, β -カロテン, フラボノイドなどの抗酸化物質によって消去される (真野・浅田, 1999). 本実験では, AsA, β -カロテンおよびフラボノイド含量は第 16 葉より下位節の葉ほど少なく, 抗酸化物質の面からみたキュウリ葉の抗酸化レベルは下位節の葉で低いことが示唆された. この結果は下位節の葉ほどクロロフィルおよびタンパク質含量が少なく, MDA 含量が多いといった老化現象にこれらの抗酸化物質が関与していることを示唆しており, 下位節葉における光合成能の低下などにもこれらの抗酸化物質の減少が関与している可能性が考えられる.

以上のように, キュウリの葉の抗酸化酵素活性, 活性酸素レベルおよび抗酸化物質含量は節位により異なることが明らかになった. 今後, 葉の節位も考慮してキュウリ葉の加齢による抗酸化レベルの経時変化を調査し, 高温, 低温, 低湿, 強光などの環境ストレスによる障害発生機構を抗酸化レベルから検討する予定である.

摘 要

キュウリにおける異なる節位葉の抗酸化レベルを調べるために, 2001年2月14日に播種したキュウリを主枝の21節で摘心し, 5月31日に主枝の第4, 8, 12, 16, 20葉をサンプリングして分析した. クロロフィル含量は第4葉が少なく, 第12葉が最も高かった. タンパク質含量は第4葉から第16葉では下位節の葉ほど少なかった. MDA 含量は下位節の葉ほど多かった. 抗酸化酵素の SOD と CAT 活性は第4, 8葉が低かったが, APX 活性は第8葉が, POD 活性は第4葉が最も高く, 両酵素ともに下位節の葉ほど高い傾向があった. 活性酸素の一つである H_2O_2 含量は第12葉が最も多く, それより上位節および下位節の葉ほど少なくなった. 抗酸化物質の AsA, β -カロテンおよびフラボノイド含量は第4葉から第16葉では下位節の葉ほど少なかった. 以上の結果より, キュウリの葉の抗酸化レベルは節位によって異なることが明らかになった.

引用文献

- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.
- 浅田浩二. 1990. 活性酸素種の生理作用. p. 133-145. 日本化学会編. 活性酸素種の化学 (季刊化学総説 No. 7). 学会出版センター. 東京.

- Asada, K. and M. Takahashi. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. p. 227-287. In: D. J. Kyie, C. B. Osmond and C. J. Arntzen (eds.). Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
- 芦原 坦. 1991. 炭素の固定とその生成物のゆくえ — 炭素代謝 —. p. 18-69. 太田次郎・石原勝敏・黒岩澄雄・清水 碩・高橋景一・三浦謹一郎編. 基礎生物学講座 5. 植物の生理. 朝倉書店. 東京.
- Azevedo, R. A., R. M. Alas, R. J. Smith and P. J. Lea. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104: 280-292.
- Dhindsa, R. S., P. Plumb-Dhindso and T. A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of SOD and catalase. *J. Exp. Bot.* 32: 93-101.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11.
- Heath, R. L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198.
- Huffaker, R. C. 1990. Proteolytic activity during senescence of plants. *New. Phytol.* 116: 199-231.
- Kaiser, W. 1976. The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 440: 476-482.
- Kochba, J., S. Lavee and P. Spiegel-Roy. 1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines. *Plant Cell Physiol.* 18: 463-467.
- Leopold, A. C. 1975. Aging senescence and turnover in plants. *Bioscience* 25: 659-662.
- 李 進才・松井鑄一郎・吉田徹志・福元康文. 2000. 幼葉の摘葉がキュウリの生育, 無機成分, 光合成及び収量に及ぼす影響. *農生技管誌.* 7(2): 51-57.
- 李 進才・松井鑄一郎. 2001. 低温処理が *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性に及ぼす影響. *園学雑.* 70: 360-365.
- 李 進才・趙 習コウ・松井鑄一郎. 2001a. 光ストレスおよび遮光栽培における *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性および色素含量の変化. *園学雑.* 70: 372-379.
- 李 進才・趙 習コウ・松井鑄一郎. 2001b. C₃, C₄および CAM 植物における過酸化水素含量と抗酸化酵素活性の差異. *園学雑.* 70: 747-752.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 真野純一・浅田浩二. 1999. 光酸素ストレスを回避する分子機構. *蛋白質 核酸 酵素.* 44: 2239-2245.
- McRae, D. G. and J. E. Thompson. 1983. Senescence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves. *Planta* 158: 185-193.
- Mondal, R. 1988. Role of hydrogen peroxide in senescence of excised leaves of rice and maize. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 176: 700-709.
- 中林敏夫. 1967. 植物性色素の変色・フラボノイド色素. p. 3-33. 中林敏夫・木村 進・加藤博通編. 食品の変色とその化学. 光琳書院. 東京.
- Naito, K., H. Tsuji and I. Hatakeyama. 1978. Effect of benzyladenine on DNA, RNA, protein and chlorophyll contents in intact bean leaves: Differential responses to benzyladenine according to leaf age. *Physiol. Plant.* 43: 367-371.
- Omran, R. G. 1980. Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase, and indoleacetic acid oxidase during and after chilling in cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 65: 407-408.
- Pauls, K. P. and T. E. Thompson. 1984. Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiol.* 75: 1152-1157.
- Powles, S. B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 15-44.
- Roe, J. H., B. M. Mary, M. J. Oesterling and M. D. Charlotte. 1948. The determination of diketo-L-gulonic acid, dehydro-L-ascorbic acid, and L-ascorbic acid in the sametissues by 2,4-dinitrophenyl hydrazine method. *J. Biol. Chem.* 174: 201-208.
- Salin, M. L. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72: 681-689.
- Scandalios, J. G. 1994. Regulation and properties of plant catalases. p. 276-315. In: C. H. Foyer and P. M. Mullineaux (eds.). Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press. Boca Raton.
- Sutherland, M. W. 1991. The generation of oxygen radicals during host plant response to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 79-83.