

## キュウリの葉の加齢に伴う抗酸化レベルの変化

李 進才<sup>1,2,\*</sup>・趙 習コウ<sup>2</sup>・松井鑄一郎<sup>1</sup>・前澤重禮<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>岐阜大学農学部 501-1193 岐阜市柳戸

<sup>2</sup>山西農業大学園芸学院 030801 山西省太谷県 中国

### Changes in Antioxidative Levels in Aging Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Leaves

Jincai Li<sup>1,2,\*</sup>, Xiheng Zhao<sup>2</sup>, Shuichiro Matsui<sup>1</sup> and Shigenori Maezawa<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193

<sup>2</sup>Faculty of Horticulture, Shanxi Agriculture University, Shanxi Taigu 030801 China

### Summary

To investigate the relationship between aging and antioxidative levels of fully developed, aging cucumber leaves, we measured the contents of protein, malondialdehyde, chlorophyll, reactive oxygen species (superoxide and hydrogen peroxide), and antioxidative compounds (ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and flavonoid), then analyzed the activities of antioxidative enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POD). Protein, malondialdehyde and chlorophyll contents in the leaves decreased linearly for 22, 35, and 55 days, respectively, whereas superoxide and hydrogen peroxide contents accumulated for 35 and 25 days, respectively, and then decreased. These results suggest that the aging process after leaf development could be divided into two periods, the earlier one representing a growth process lasting until 25 to the 30th day, the later one is the senescence process beginning about the 35th day. Thus, SOD, CAT, and APX decreased rapidly after 35 days of development, while ascorbic acid and flavonoid contents decreased with time for 25 days. Our data indicate that SOD, CAT and APX, are closely related with the senescence process, whereas ascorbic acid and flavonoid are related with the growth process in developed cucumber leaves.

**Key Words:** antioxidative compound, antioxidative enzyme, antioxidative level, cucumber leaf aging.

### 緒 言

生物体の老化過程は細胞や組織に生ずる活性酸素およびフリーラジカルによる酸化傷害の蓄積である (Harman, 1956). 植物において, 活性酸素のスーパーオキシド ( $O_2^-$ ), 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ), ヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) および 1 重項酸素 ( $^1O_2$ ) は脂質過酸化の反応を引き起こし, 老化進行を促進すると考えられている (McRae・Thompson, 1983; Mondal, 1988; Pastori・del Rio, 1997; Thompson ら, 1987). 老化進行中における酸化ストレスへの感受性は, 活性酸素の生成や活性酸素を消去する酵素的および非酵素的抗酸化機能の変化に依存し (del Rio ら, 1998), 抗酸化酵素活性および抗酸化物質含量の変化は葉の老化

に関与することが報告されている (Dhindsa ら, 1981; McRae・Thompson, 1983; Prochazkova ら, 2001).

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であり (Leopold, 1975), 葉の相互遮蔽により葉の老化が生じやすい (稲山, 1987; 李ら, 2000). 特に, 強光条件下や高温の春期~秋期栽培では下位節の葉の老化が速く, 病原菌の感染などを伴って収穫期間が縮まる (高橋・西, 1982). キュウリの葉の老化現象と抗酸化機能との関連性に関して, 趙ら (2003) は同一植物体で節位の異なる葉の抗酸化レベルを測定したところ, 主枝の上位節の葉に比べ老化程度の高い下位節の葉では, 抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) とカタラーゼ (CAT) の活性が低く, 抗酸化物質のアスコルビン酸 (AsA),  $\beta$ -カロテンおよびフラボノイド含量が少ないことを報告している. しかし, 老化過程を抗酸化レベルで検討するには同一植物器官の生理現象の経時的変化を把握する必要がある.

2004年1月8日 受付. 2004年2月20日 受理.

\* 日本学術振興会外国人特別研究員.

\*\* Corresponding author.

そこで、本研究では、キュウリの葉が展開してから老化するまでの加齢過程を抗酸化レベルの見地から検討するため、主枝の下位節の第4葉を用い、時間的加齢に伴うタンパク質、マロンジアルデヒド(MDA)およびクロロフィル含量(Dhindsaら, 1981; Huffaker, 1990; Naitoら, 1978; 趙ら, 2003)の変化を測定するとともに、活性酸素含量、抗酸化酵素活性および抗酸化物質含量の変化を調べた。

## 材料および方法

### 1. 栽培条件

実験は気温を15~32°Cに設定したプラスチックハウス内で行い、キュウリ‘夏すずみ’(タキイ種苗)を3月18日にバーク堆肥:土(1:1)を入れた直径10cmの育苗用ポットに播種し、4月16日に本葉3枚となった苗を株間60cm, 畦幅120cmで定植した。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、21節を残して摘心した。第一、二次側枝についてはいずれも生育に伴い1節を残して摘心した。

### 2. サンプリング

主枝の下位節の第4葉が展開(葉幅5cm)後5日目の4月26日から6月15日までの10日間ごとに、毎回4株について第4葉をサンプリングし、速やかに細切りして2gずつ計量し、次いで液体窒素で凍結後、-30°Cに保存した。凍結試料について以下の測定を行った。

### 3. タンパク質、MDAおよびクロロフィル含量の定量

タンパク質、MDAおよびクロロフィル含量は趙ら(2003)の方法に従って測定した。

### 4. $O_2^-$ と $H_2O_2$ の定量

$O_2^-$ および $H_2O_2$ の定量はそれぞれ李ら(2002)および李ら(2001)の方法に従った。

### 5. 抗酸化酵素活性の測定

抗酸化酵素のSOD, CAT, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)およびペルオキシダーゼ(POD)の活性は李・松井(2001)の方法により測定し、新鮮重当たりの酵素活性を算出した。

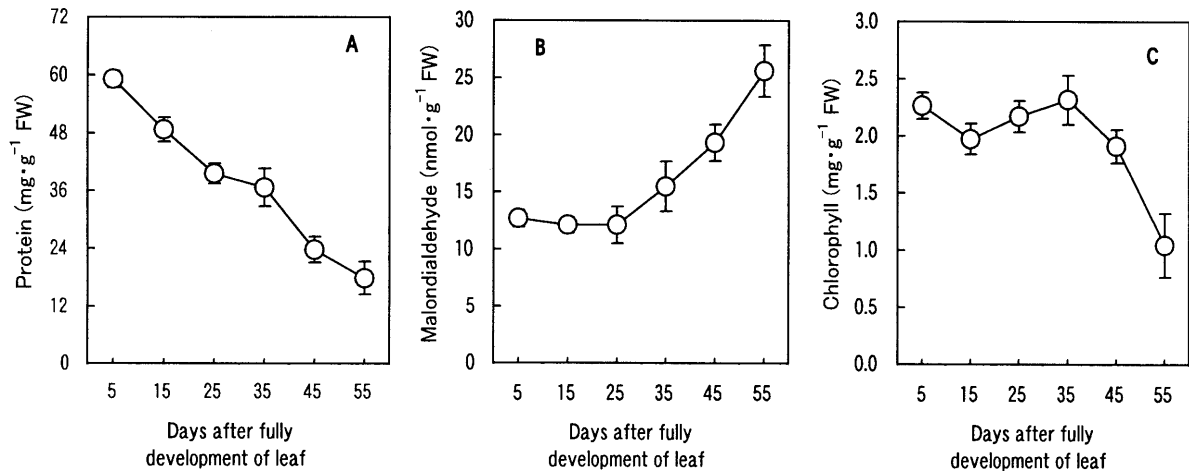


Fig. 1. Changes in protein (A), malondialdehyde (B) and chlorophyll (C) contents during aging of the 4th leaf in cucumber plants. Vertical bars indicate SE (n=4).

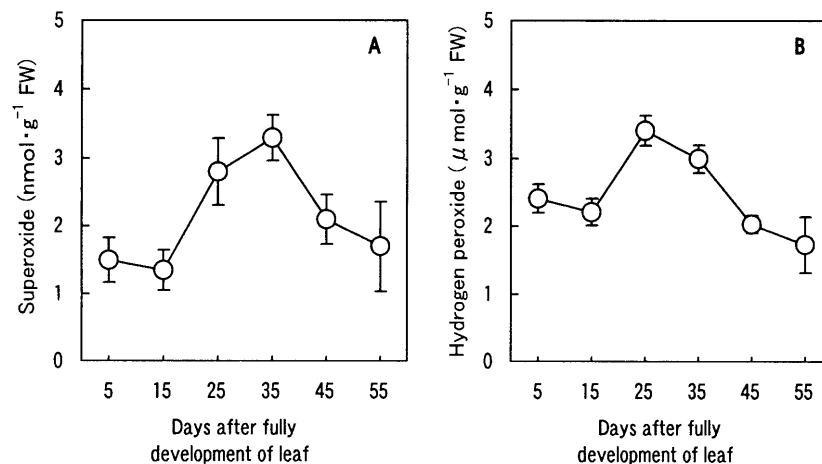


Fig. 2. Changes in superoxide (A) and hydrogen peroxide (B) contents during aging of the 4th leaf in cucumber plants. Vertical bars indicate SE (n=4).

## 6. 抗酸化物質の定量

AsA,  $\beta$ -カロテンおよびフラボノイドは趙ら(2003)の方法に従って定量した.

## 結 果

## 1. タンパク質, MDA およびクロロフィル含量の変化

第4葉の新鮮重当たりのタンパク質含量は加齢に伴い減少し, 展開55日後は5日後に比べ約30%になった(第

1図). MDA含量は展開後25日後まではほぼ一定で, その後増加し, 55日後には25日後のほぼ2倍になった. クロロフィル含量は展開15日後から35日後にかけて漸次増加し, その後急速に減少して, 55日後には35日後の約45%になった.

2.  $O_2^-$  および  $H_2O_2$  含量の変化

$O_2^-$  および  $H_2O_2$  含量は展開後5~15日後に比べ25~35日後でそれぞれ約2.1倍および1.5倍になり, その後, 両活性酸素ともに展開5日後のレベルまで減少した(第2図).

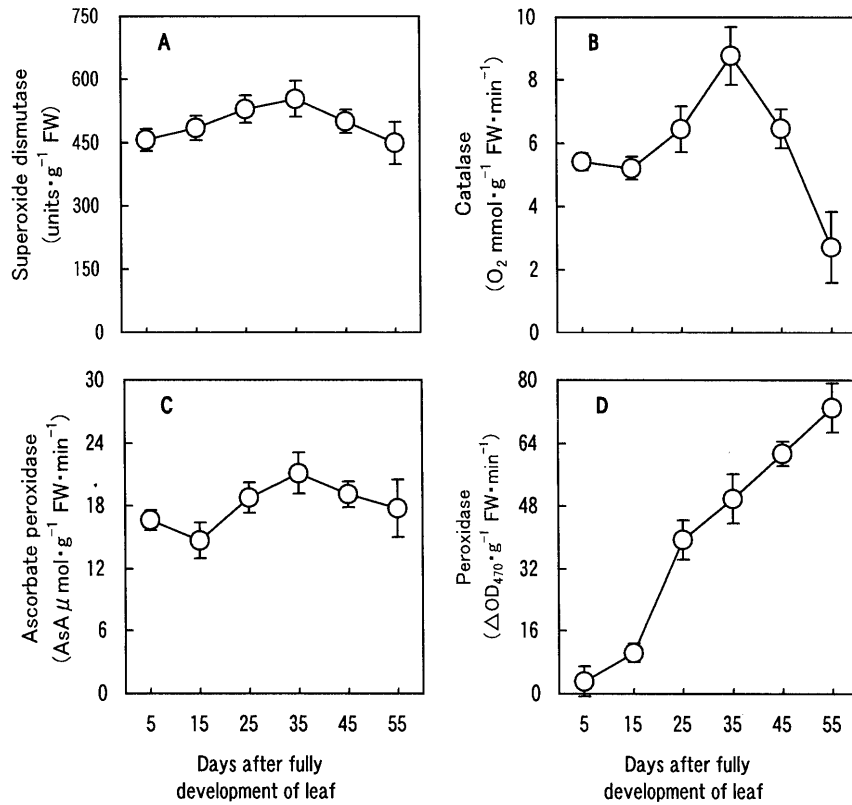


Fig. 3. Changes in superoxide dismutase (A), catalase (B), ascorbate peroxidase (C) and peroxidase (D) activities during aging of the 4th leaf in cucumber plants. Vertical bars indicate SE (n=4). O<sub>2</sub>: oxygen, AsA: ascorbic acid.

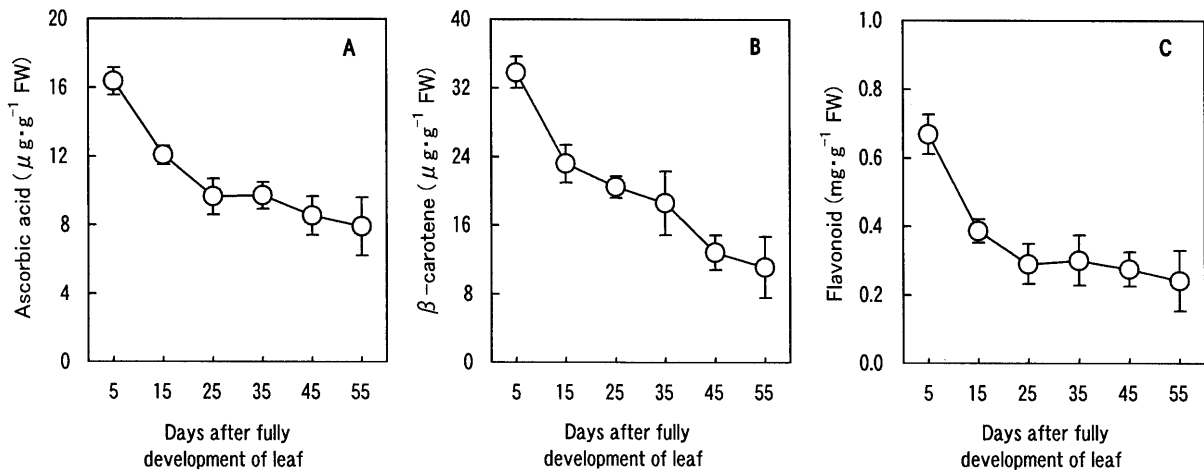


Fig. 4. Changes in ascorbic acid (A),  $\beta$ -carotene (B) and flavonoid (C) contents during aging of the 4th leaf in cucumber plants. Vertical bars indicate SE (n=4).

### 3. 抗酸化酵素活性の変化

SOD活性は展開後5日後から35日後にかけて約1.2倍に上昇し、その後低下する傾向を示した(第3図A). CAT活性は展開15日後から35日後にかけて約1.7倍に上昇し、その後急速に低下して、55日後には35日後の約30%まで低下した(第3図B). APX活性は展開15日後から35日後にかけて約1.4倍に上昇し、その後低下する傾向が認められた(第3図C). POD活性は加齢に伴い上昇し続け、展開55日後には5日後の20倍以上に上昇した(第3図D).

### 4. 抗酸化物質含量の変化

AsA,  $\beta$ -カロテンおよびフラボノイド含量は展開後5日後から25日後にかけて40~60%程度まで減少した. その後, AsAとフラボノイド含量はほとんど変化しなかったが,  $\beta$ -カロテン含量はさらに減少し, 展開55日後には5日後の約30%まで低下した(第4図).

## 考 察

植物の葉においては, 老化に伴うタンパク質の減少, および脂質過酸化反応の最終産物であるMDAの増加は老化進行に固有の特徴であり, 黄化つまりクロロフィルの減少は最も明瞭な老化現象である(Dhindsaら, 1981; Huffaker, 1990; Naitoら, 1978; 趙ら, 2003). 本実験では, 第4葉のタンパク質は加齢に伴い展開55日後まで減少し続け, MDAは25日後以降増加し, クロロフィルは35日後から減少し始めた(第1図). 趙ら(2003)はこれまでに節位の異なる葉のタンパク質, MDAおよびクロロフィル含量を測定し, 齢の若い上位節の第16, 20葉に比べ, タンパク質は加齢した第12葉以下の葉で少ないこと, MDAは老化が進んだ第4, 8葉では多いこと, およびクロロフィルは第4葉で少ないことを報告している. これらの結果から, キュウリの葉における加齢に伴うタンパク質の減少は脂質の過酸化よりも, 脂質の過酸化はクロロフィルの減少よりも先に起こることが示唆される.

葉緑体中のクロロフィルの大部分は光捕集機能をもつ集光性色素であるため, 葉の光エネルギーの吸収能力はクロロフィルの量に依存する. 植物の葉はCO<sub>2</sub>の還元に必要な光エネルギーを過剰に受け取ると, 葉緑体で活性酸素の生成を促進する(真野・浅田, 1999). RubiscoはCO<sub>2</sub>を固定する酵素として葉緑体に存在し, その含量は葉の老化に伴う窒素やタンパク質の減少と同様のパターンで変化する(Makinoら, 1984; Yamauchiら, 2002). 本研究では, キュウリの第4葉の展開25~35日後のクロロフィル含量は, 展開後5日後とほぼ同じ高いレベルに維持されたが, タンパク質含量は展開5日後に比べて約35%減少した(第1図). これらの結果から, 展開後25~35日目にO<sub>2</sub><sup>-</sup>とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が蓄積したのは, 光エネルギーの吸収能力が高いことに対して, Rubiscoの減少に伴いCO<sub>2</sub>固定能力が低下して, 光エネルギーが過剰になった

ためと考えられる. 活性酸素は植物細胞内で常に一定の濃度範囲に存在しているが, 過剰になると, 脂質の過酸化を引き起こして老化を促進する(del Rioら, 1998; McRae・Thompson, 1983; Mondal, 1988; Thompsonら, 1987; Pastori・del Rio, 1997). 本実験で観察された両活性酸素の蓄積は, MDAの増加よりも約10日間, クロロフィルの減少よりも約20日間早く生じた(第1, 2図)ことから, 活性酸素がキュウリの葉の老化を誘導する可能性が示唆された. 一方, 展開35日後以降のO<sub>2</sub><sup>-</sup>とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の減少(第2図)は, クロロフィルの減少に伴う光エネルギーの吸収能力の低下によって, 過剰な光エネルギーが少なくなったことによると考えられる.

本実験では, 第4葉の展開15~35日後においてO<sub>2</sub><sup>-</sup>を不均化するSODの活性とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を消去するCAT, APXおよびPODの活性が, O<sub>2</sub><sup>-</sup>とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の増加と同時に上昇しており(第2, 3図), これらの活性酸素を積極的に消去したものと考えられる. トウモロコシの旗葉においても, 雄ずいの成長25日後までにこれらの酵素活性が上昇することが報告されている(Prochazkovaら, 2001). しかし, 展開35日後以降のSOD, CATおよびAPX活性は, タンパク質とクロロフィルの減少およびMDAの増加とともに低下し, POD活性は上昇し続けた(第1, 3図). 趙ら(2003)はキュウリにおいて, Dhindsaら(1981)はタバコにおいて, SODとCATの活性は老化が進んだ下位節の葉ほど低下し, POD活性は下位節の葉ほど高くなる傾向を示すことを報告しており, 本研究と一致する. また, トウモロコシ(Prochazkovaら, 2001)では雄ずいの成長25日後以降, 旗葉のSOD, CATおよびAPXの活性が低下し, インゲン(McRae・Thompson, 1983)では葉の老化に伴いSOD, CATおよびAPXの活性は低下し, PODの活性は上昇することが報告されている. 抗酸化酵素のSOD, CATおよびAPXの活性変化からみて, キュウリはこれらの植物と同様, 老化に伴い葉の抗酸化レベルが低下することがわかった.

葉細胞内の活性酸素は, O<sub>2</sub><sup>-</sup>とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以外に, 反応性のより高いヒドロキシルラジカル( $\cdot$ OH), 1重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)の活性酸素も存在し, これらは3重項励起クロロフィル(<sup>3</sup>Chl\*)や脂質ラジカルとともに細胞成分と反応し, 細胞老化の誘導因子となる(Thompsonら, 1987; Pastori・del Rio, 1997). これらの活性酸素およびフリーラジカルは酵素的に消去されず, AsA,  $\beta$ -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). 本研究では, これら3つの抗酸化物質は老化指標の一つであるタンパク質の減少と並行して, 葉の展開後から減少し続けた(第1, 4図). 趙ら(2003)もこれらの抗酸化物質含量の減少はタンパク質の減少と並行し, 老化が進んだ下位節の葉ほどそれらの含量は少なくなること報告している. このような葉の展開後における抗酸化物質含量の減少は抗酸化レベルの低下をもたらし,

・OH,  $^1\text{O}_2$  およびフリーラジカルの消去にも影響して、葉の老化進行と関連すると考えられる。

### 摘 要

キュウリの葉の老化と抗酸化レベルの関連性を把握するために、本研究では主枝下位節の葉について、展開から55日間のタンパク質、活性酸素および抗酸化物質の含量を測定した。加齢に伴いタンパク質含量は展開後から55日目まで直線的に減少したが、マロンジアルデヒドおよびクロロフィル含量は展開後ほぼ一定値を示し、それぞれ展開25日後および35日後から大きく変化した。これらの結果から、葉の加齢に伴い、まずタンパク質が減少し、次に脂質の過酸化が生じ、その後にクロロフィルが減少することが示唆された。活性酸素のスーパーオキシドおよび過酸化水素は、葉の展開15日後から35日後にかけてそれぞれ約2.1倍および1.5倍に増加し、葉の老化を誘導する可能性が示唆された。抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼおよびアスコルビン酸ペルオキシダーゼの活性変動は活性酸素含量の変動と類似し、これらの酵素活性から評価される葉の抗酸化レベルは老化進行に伴い低下することが明らかになった。抗酸化物質であるアスコルビン酸、 $\beta$ -カロテンおよびフラボノイド含量はタンパク質の減少と同様に葉の展開後から減少し続け、主に葉の生長に関与していると考えられた。

### 引用文献

- del Rio, L. A., G. M. Pastori, J. M. Palma, L. M. Sandalio, F. Sevilla, F. J. Corpas, A. Jimenez, E. Lopez-Huertas and J. A. Hernandez. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol.* 116: 1195-1200.
- Dhindsa, R. S., 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.
- Harman, D. 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300.
- Huffaker, R. C. 1990. Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol.* 116: 199-231.
- 稲山光男. 1987. キュウリ生理と栽培技術. p. 2-92. 誠文堂新光社. 東京.
- Leopold, A. C. 1975. Aging senescence and turnover in plants. *Bioscience* 25: 659-662.
- 李 進才・前澤重禮・中野浩平. 2002. 亜硝酸法による植物組織内のスーパーオキシドの簡便定量法. *園学研.* 1: 279-282.
- 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・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・趙 習コウ・松井 鑄一郎. 2001.  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  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.
- Makino, A., T. Mae and K. Ohira. 1984. Relation between nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves from emergence through senescence. *Plant Cell Physiol.* 25: 429-437.
- 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.
- 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.
- Pastori, G. M. and L. A. del Rio. 1997. Natural senescence of pea leaves. An activated oxygen-mediated function for peroxisomes. *Plant Physiol.* 113: 411-418.
- Prochazkova, D., R. K. Sairam, G. C. Srivastava and D. V. Singh. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci.* 161: 765-771.
- 高橋和彦・西 泰道. 1982. 原色 施設野菜の生理障害と病害. 農山漁村文化協会. 126-134.
- Thomson, J. E., R. L. Ledge and R. F. Barber. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* 105: 317-344.
- Yamauchi, Y., T. Sugimoto, K. Sueyoshi, Y. Oji and K. Tanaka. 2002. Appearance of endopeptidases during the senescence of cucumber leaves. *Plant Sci.* 162: 615-619.
- 趙 習コウ・李 進才・松井 鑄一郎・前澤重禮. 2003. キュウリにおける節位の異なる葉の抗酸化レベル. *園学雑.* 72: 324-328.