

博士論文要旨

「活性酸素処理に伴う一過的酸化ストレスがリーフレタスに与える影響の生理学的研究」

農学研究科 資源生物学専攻 生理・生化学研究

学籍番号 142215003 氏名 森直哉

1. 序論

水耕栽培液の殺菌に過酸化水素 (H_2O_2) やオゾン水を始めとする反応分解時に有害な副産物を生成しない活性酸素種 (ROS : reactive oxygen species) が注目されてきた (Song *et al.*, 2004 ; Ohashi-Kaneko *et al.*, 2009)。しかし、栽培技術として ROS を用いるためには、ROS 付与条件下における植物の成長曲線や形質変化の詳細情報が重要となり、ROS が植物個体の成長特性や生理応答に与える影響を知る必要がある。

種子発芽の段階では、吸水後の種子内における酸化還元状態により発芽が制御されることが知られており、その反応には酸化ストレス強度に一定の至適値 (oxidative window) があることも示されている (Bailey *et al.*, 2008)。

既往研究において、ROS が植物の生理応答や形態形成に与える影響については多くの知見が報告されているものの、その多くは種子発芽から子葉展開後の生育段階での研究が多く、栄養成長の後期に対する外因性 ROS の処理濃度や処理期間が、植物成長曲線や形態、代謝物合成に与える影響について包括的に調べられた知見は報告されていない。

本研究では、ROS の一種である H_2O_2 を用いてストレス強度や処理時間がリーフレタスの成長特性と形態変化に与える影響を調査した。また、個体中の ROS および抗酸化酵素の活性、抗酸化物質の酸化還元比などを経時的に分析することで、異なる酸化ストレス下における器官別レドックス応答を評価した。

2. H_2O_2 がリーフレタスの成長特性および形態形成に与える影響

リーフレタス 18 日齢苗を 0.001-10 mM H_2O_2 含有水耕液へ定植し、酸化ストレス下における植物個体の生育調査を行った。その結果、0 mM H_2O_2 処理区に対して 0.03 および 0.1 mM H_2O_2 処理区において生育量 (地上部新鮮重量、乾物重量など) が増加し、1.0 mM 以上の処理濃度で生育が抑制されることが示された。その結果から、生育促進および抑制が起こる処理区間でのより詳細な生育調査を行うために、0、0.1、1.0 mM H_2O_2 の 3 処理区において経日変化を調査し、成長解析および形態解析を行った。

H_2O_2 処理区間において、処理 10 日後に根の形態が著しく変化した。0 mM H_2O_2 処理区に対して、0.1 および 1.0 mM H_2O_2 処理区では最大根長が抑制され、0.1 mM H_2O_2 処理区では

側根形成数が有意に増加した。この時、栽培ポッドの残液量から個体あたりの水分吸収量を算出したところ、0.1 mM H₂O₂ 処理区では H₂O₂ 処理 10-15 および 15-20 日後において 0 mM H₂O₂ 処理区よりも有意に増加した。さらに、水分吸収量が増加した 0.1 mM H₂O₂ 処理区では根活性も処理 10 および 20 日後に有意に増加していた。水分吸収能の変化に伴うイオン吸収の選択性への影響を考慮し、葉および根内の元素分析を行った。しかし、各器官ともに元素含量に H₂O₂ 処理区間で有意な差は認められなかった。

総乾物重や地上部乾物重、総葉面積が 0 mM H₂O₂ 処理区に対して 0.1 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加し、1.0 mM H₂O₂ 処理区で抑制される結果が、処理開始後 15 日後以降に認められたため、H₂O₂ 処理 10-15 日後に成長解析を行った。H₂O₂ 処理 10-15 日後における RGR (reactive growth rate) は、0 mM H₂O₂ 処理区よりも 0.1 mM H₂O₂ 処理区で大となった。LAR (leaf area ratio) は各処理区間での差が認められなかった。一方で、NAR (net assimilation rate) は 0 mM H₂O₂ 処理区よりも 0.1、1.0 mM H₂O₂ 処理区で大となった。このことは、0.1、1.0 mM H₂O₂ 処理は単位葉面積あたりの炭素同化量が高くなっている可能性を示唆した。成長解析の結果から植物個体中の葉内および根内炭素含有量を測定したところ、0 mM H₂O₂ 処理区に対して 0.1 mM H₂O₂ 処理区で有意な増加を示した。

H₂O₂ 処理前および後に出葉した葉の完全展開葉の葉身内部構造解析およびクロロフィル含量分析を行った。葉内の総クロロフィル量は H₂O₂ 処理区間で有意な差は認められなかった。葉厚は、H₂O₂ 処理区間で差異は認められなかった。一方で単位面積当たりの細胞密度は H₂O₂ 処理濃度依存的に増加する傾向を示した。また、表皮や海面上組織の形態は H₂O₂ 処理区間で差異は認められなかったが、柵状組織の形態は H₂O₂ 処理区間で有意な差異が認められた。柵状組織の縦長が 0 mM H₂O₂ 処理区に対して 0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で長くなり、柵状組織の横幅は 0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で短くなる形態を示した。

3. 異なる酸化ストレス下における植物器官別のレドックス応答

生育促進が認められた 0.1 mM H₂O₂ 処理区と生育抑制が引き起こされた 1.0 mM H₂O₂ 処理区において、ストレス強度間での成長特性の差異が認められた。この処理区間に酸化ストレス容量を介した生理応答の閾値があると仮定し、18 日齢苗に 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM H₂O₂ を付与し、植物内ストレス応答およびレドックス応答を経時的に調査した。

H₂O₂ 処理に対するストレス指標としてマロンジアルデヒド (MDA) および最大光合成活性 (Fv/Fm) を測定したところ、処理 3 時間後においては 0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で 0 mM H₂O₂ 処理区よりも MDA の増加、Fv/Fm の低下が認められた。1.0 mM H₂O₂ 処理区では継続的にストレス反応が見られたのに対して、0.1 mM H₂O₂ 処理区では、処理 5 日後より 0 mM H₂O₂ 処理区と有意な差異は認められなかった。

葉および根内 ROS (H_2O_2 , O_2^-) 含量は、全 H_2O_2 処理区で H_2O_2 付与直後に濃度依存的に増加する傾向を示し、処理 0.5-1.0 時間後でピークに達した。抗酸化酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) およびカタラーゼ (CAT) 活性も、全処理区で処理 0.5-3.0 時間後に活性のピークが確認された。 H_2O_2 および抗酸化酵素活性の増加が全ストレス強度で同一傾向を示した一方で、減少に関しては異なる応答を示した。生育促進が認められた 0.05-0.1 mM H_2O_2 処理区では、植物内 H_2O_2 は速やかに減少し、処理 6.0 時間後には無処理区と同レベルまで減少した。それに対して、生育抑制が認められた 0.5-1.0 mM H_2O_2 処理区では、処理 6.0-12 時間後まで植物内 ROS が高い濃度で維持し続けていたことが確認された。

葉内の抗酸化物質であり、様々なタンパク質の酸化還元応答にも関与するグルタチオン (GSH) の酸化還元状態を分析した。葉内の GSH/GSSG 比は、処理 3 時間後において H_2O_2 処理濃度依存的に低下する傾向を示し、0 mM H_2O_2 処理区に対して有意に減少した。処理 6、9、12 時間後においても 0.5 および 1.0 mM H_2O_2 処理区では、GSH/GSSG 比は 0 mM H_2O_2 処理区に対して有意に低下する傾向を維持した。しかし、0.05 および 0.1 mM H_2O_2 処理区では、GSH/GSSG 比が処理 6 時間後に 0 mM H_2O_2 処理区と同レベルまで戻り、処理 9、12 時間後においては 0 mM H_2O_2 処理区に対して有意に高くなった。これは、低濃度 (0.05 および 0.1) 処理区では、 H_2O_2 処理後にむしろ植物内の酸化還元状態が還元型に誘導されることを示した。

4. 結論

H_2O_2 含有水耕液で栽培したリーフレタスは、そのストレス強度で生育応答を二分化させ、ストレス要因であるはずの H_2O_2 が低濃度存在下する条件下でむしろ成長量が増加することを示した。根部領域での外因性 H_2O_2 を介したシグナル応答は、側根および根毛形成など根分化応答を誘導した。また、根での酸化ストレスは内生 ROS の生成および拡散により地上部へ伝達され、葉身内部での柵上組織の形態変化や細胞分裂活性を誘導した。ROS 拡散に伴う各器官の形態変化は、養液吸収量の増加を促し、光利用効率や炭素同化効率にも影響を与えた可能性を示した。ストレス強度間で個体中のレドックス応答は異なる反応を示し、生育促進時のレドックス応答は、内生 ROS の増加が一過的もしくは低容量であり、酸化刺激後の GSH/GSSG 比が、定常状態時よりも還元型へシフトすることが認められた。GSH/GSSG 比が高くなることで、炭素同化率が増加することが既往研究 (Jiang *et al.*, 2012) から示唆されており、本論においても葉内の炭素含有量が増加していることから、0.1 mM H_2O_2 処理が炭素同化反応に影響を与えた可能性を示唆した。

引用文献

Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. and Corbineau, F., 2008: From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes rendus biologiques*, **331(10)**, 806-814.

Jiang, Y. P., Cheng, F., Zhou, Y. H., Xia, X. J., Mao, W. H., Shi, K. and Yu, J. Q., 2012: Cellular glutathione redox homeostasis plays an important role in the brassinosteroid - induced increase in CO₂ assimilation in *Cucumis sativus*. *New Phytol.*, **194(4)**, 932-943.

Ohashi-Kaneko, K., Yoshii, M., Isobe, T., Park, J. S., Kurata, K. and Fujiwara, K., 2009: Nutrient solution prepared with ozonated water does not damage early growth of hydroponically grown tomatoes. *Ozone Sci. Eng.*, **31(1)**, 21-27.

Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L. and Liu, X., 2004: Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop protection*, **23(3)**, 243-247.