

平成 28 年度

学位論文（博士）

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

玉川大学大学院農学研究科

森 直哉

目次

第一章 序論.....	2
第二章 H_2O_2 がリーフレタスの成長および形態形成に与える影響	9
第一節 緒論および目的	9
第二節 方法	12
第三節 結果	24
第一項 ストレス強度別の生育変化	24
第二項 成長解析	26
第三項 葉身内部構造解析	26
第四項 側根および根毛の形態形成	32
第五項 植物の炭素同化および養水分吸収	36
第四節 考察	41
第三章 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	44
第一節 緒論	44
第二節 方法	46
第三節 結果	49
第一項 ストレス応答	49
第二項 各器官別の ROS および抗酸化酵素の経時変化	49
第一項 抗酸化物質の酸化還元状態の推移	53
第四節 考察	61
第四章 総合考察	64
第一節 外因性 H_2O_2 によるリーフレタスの成長とレドックス応答への影響	64
第二節 ROS を用いた栽培液の殺菌および栽培の効率化・高付加価値化	65
引用文献	68
要旨	78
謝辞	80

第一章 序論

第一節 高度栽培技術の発展

世界的に進む人口増加や飢餓・貧困問題の拡大を背景に食料自給率や食料生産性の向上が求められている。さらに先進国をはじめとした国々においても、近年、食の安全や安心が強く求められ、農産物生産の品質に関心が寄せられている。

完全人工型植物工場や太陽光併用型植物工場などは、天候に左右されることがなく、高度な環境制御と生育予測を行うことができる栽培技術システムである。植物工場には大きく分け7つの利点が存在する。1つ目は、季節に左右されないため周年栽培が可能である。2つ目は、人工光型では太陽光を利用しないため、建物内や地下等農地以外での設置が可能である。3つ目は、空間を立体的に利用した多段栽培を行うことで、小スペースでも高い生産性を確保することができる。4つ目は、同一環境での栽培が可能のため農産物の品質や形、大きさなどの品質及び規格の統一化ができる。5つ目に、栽培時に農薬を使用しないため、安全安心な農産物が生産可能である。6つ目に、肥料や養液量を変えることで、農産物の高品質が期待出来る。7つ目に、ロボットによる作業補助などにより労働作業が軽易になる点である。

これら栽培技術の発展は、植物生産に必要な必須投入資源である光や温度、湿度、肥料、CO₂ガス等の環境条件を工学的に制御できる技術の進歩が大きい(Watanabe, 2009)。とりわけ土耕栽培から水耕栽培への転換は、作物の生育や品質制御の簡便化と、土壌病害虫や塩類集積による連作障害の回避を可能にすることによって安定多収かつ高品質生産を実現することが可能となった。また、作物の品質向上の技術として、ストレス処理による栽培方法は広く認知されてきたが、これも水耕栽培への移行によってストレス栽培技術は大きく発展した。液体としての水が有する物理的（流動性 etc.）、化学的特性（化合物の溶解能 etc.）の高さを利用できることにより、塩や温度、乾燥等の環境ストレス制御が容易になったのである（Kitano *et al.*, 2008）。

第二節 水耕栽培が抱える問題点とその解決に関するアプローチ

一方で、水耕栽培では新たな問題点が浮上した。水耕栽培では病原菌が循環する培養液により急速に蔓延し、固形培地耕では、病原菌が培地に蓄積して被害をもたらす(Song *et al.*, 2004)。日本で報告される病原菌としては、*Pythium* 属菌が多く見られる。この傾向は海外においても同様で、*Pythium aphanidermatum*, *P. sp. group F* 等による根腐病の被害が多く報告されている。病害発生の特徴は、病原菌の伝染方式、感染能力、および養液栽培方式や根域の微生物環境などが影響している。根腐病や疫病は、わずか 1.0-10.0

cfu/ml の遊走子密度で発病し、感染が 2 時間以内で成立し、作物は 2-3 日で枯死する。作物根部周辺の微生物密度は、水耕では固形培地耕の 1/100 程度で、これら水耕における根腐病菌の被害を大きくしている原因の 1 つと考えられている。

しかし、日本では水耕養液への農薬等の添加が規制されており、農薬を用いない培養液の殺菌・除菌技術の検討がなされている (Shimizu *et al.*, 2007)。その一つの手法として注目されているのが、オゾンや過酸化水素 (H_2O_2) 等の活性酸素を用いた殺菌である。オゾン殺菌では、培養液中にオゾンガスを曝気する方法とオゾンが溶解したオゾン水を培養液として用いる方法がある。活性酸素による殺菌は、活性酸素濃度と処理時間の積によって決まり、濃度が低ければ殺菌に長時間を要する。活性酸素はその特性上、酸素と水に分解され有害な副産物を生成しないことが利点の一つとして挙げられる。オゾンはウイルスや細菌、真菌を酸化し、不活性化させ、過酸化水素は緑藻の光合成活性の低下ひいては増殖率の低下を促すことが示され (Burleson *et al.*, 1975; Rice *et al.*, 1981; Drábková *et al.*, 2007)、加えて栽培装置内での藻の発生を抑えることが可能である (図 1)。

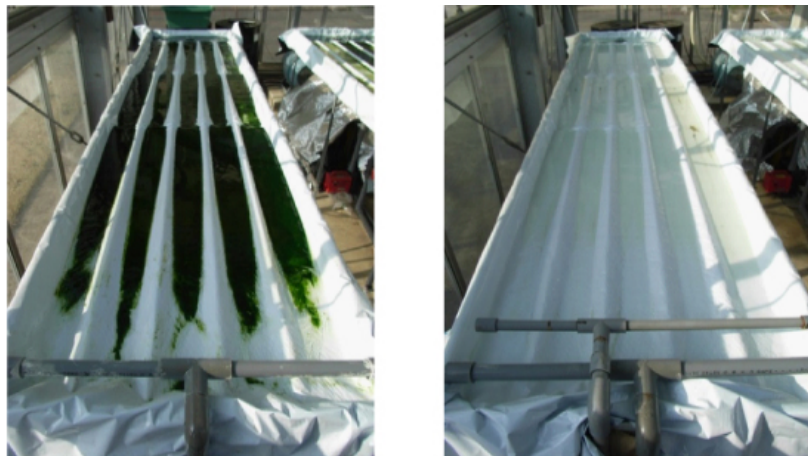
第三節 活性酸素種 (ROS : Reactive oxygen species)

活性酸素は、一般的にフリーラジカルのスーパーオキシドラジカル (O_2^-) とヒドロキシラジカル (OH^\cdot) とフリーラジカルではない H_2O_2 と一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の 4 種類とされる。広義としては、一酸化窒素 (NO)、二酸化窒素 (NO_2)、オゾン (O_3) も含まれる。活性酸素は、酸素分子が不対電子を捕獲することによって O_2^- 、 OH^\cdot 、 H_2O_2 という順に生成される。活性酸素の中でも OH^\cdot はきわめて反応性が高いラジカルであり、活性酸素による多くの生体損傷は OH^\cdot によるものとされている。

活性酸素は、高濃度では植物の生育に悪影響をもたらす。活性酸素種 (ROS : Reactive oxygen species) は、葉や根から吸収される酸素や水が酵素等で分解されることで生じ植物体中に存在する。好気性生物にとって酸素はエネルギー生産に不可欠であるが、細胞内の酸素濃度が非常に高い高等植物は、ROS を容易に生成してしまう (Asada, 2000)。

植物細胞内で O_2 や H_2O_2 等の ROS は、おもに葉緑体やミトコンドリアの電子伝達系や種々の酸化酵素反応により生成する。酸素発生型の光合成を行う高等植物は、他生物に比べ細胞内酸素濃度が非常に高く、特に葉緑体内では水の酸素飽和濃度にほぼ等しい $250\text{ }\mu\text{M}$ にも達する。したがって、葉緑体は植物細胞内で最大の ROS 発生源となる。

葉緑体では、光化学系 I における酸素への 1 電子還元により O_2 が生成する (Asada, K. 1999)。電子伝達系により生成した O_2 は、不均化反応もしくはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の触媒により H_2O_2 へと変換される。NADP⁺-グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、フルクトース 1,6-ビスホスファターゼ、セドヘプツロース-1,7-



**図1 NFT方式の養液栽培装置上の藻の発生抑制
(H19年オゾン水高度化研究報告より抜粋)**

ウレタン培地のNFT栽培装置に3 mg/Lのオゾン水を供給（3回 / 日，20分 / 日）し、定植カバー（栽培板）を外した状態での約3ヶ月経過後の栽培装置の比較。オゾン水の殺菌効果により藻の発生が抑制されている（引用URL：http://h2o-f.jp/ozon_nogyo.html：2016年12月15日）。

ビスホスファターゼなど分子内に SH 基をもつカルビン回路構成酵素（チオール酵素）は、 H_2O_2 に対して非常に不安定であるため ROS の標的分子となる。チオール酵素の酸化失活や環境ストレス時の気孔閉鎖による CO_2 供給不足は、連鎖的に NADP^+ や ADP の光合成電子伝達系への供給不足を引き起こし、余剰な還元力が酵素の還元作用することによって葉緑体内の ROS はさらに増大することになる。加えて、他の細胞内小器官、ミトコンドリアやペルオキシソームやグリオキシソームなどのミクロボディーでも ROS 生成がみられる（Foyer and Noctor, 2003）。

第四節 環境ストレスに伴う酸化ストレスとその防御機構

移動の自由のない植物は、いったん根付くとその環境に適応して生存していかななくてはならない。植物は強（弱）光、乾燥、塩、低（高）温などさまざまな複合的な環境ストレスにさらされている。しかし、生育時の環境条件（光、温度、塩など）の変化は前節で述べたように、葉緑体中や他の細胞小器官に ROS の急激な合成を導く。この急激な ROS 生成が消去系を凌駕すると、酸化ストレスとなり細胞膜の脂質酸化など細胞機能障害や細胞死を引き起こしてしまう。そのため、アスコルビン酸／グルタチオン（AsA/GSH）回路をはじめとする巧妙な ROS 消去系を発達させ、生成される ROS を消去し、細胞内の ROS 濃度を低く抑えている（図 2）。

AsA/GSH 回路には、AsA、GSH、NADPH 等の抗酸化物質が含まれており、 H_2O_2 はカタラーゼ（CAT）やペルオキシダーゼにより分解される（Noctor and Foyer, 1998）。CAT には、電子供与体を消費しないで済むという利点があるが、 H_2O_2 に対する親和性が低いため H_2O_2 の定常濃度をそれほど低く保つことは出来ない。これに対し、ペルオキシダーゼは H_2O_2 親和性が高いので細胞内 H_2O_2 濃度を低く保つことが出来るが、電子供与体を必要とする。緑葉では一般にアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）、チオレドキシンペルオキシダーゼが電子供与体として機能していると言われている。AsA は、APX によって酸化され MDA になる。MDA は、還元型フェレドキシンまたは NAD(P)H によって AsA に再還元される。前述の系とは別に、MDA の 2 分子が非酵素的に反応して AsA とデヒドロアスコルビン酸（DHA）になる経路も存在している。DHA は、グルタチオン（GSH）により還元され、酸化されたグルタチオンジスルフィド（GSSG）は NADPH によって再還元される（Well and Xu, 1994; Whitbread *et al.*, 2005）。

第五節 ROS を介したシグナル伝達

レドックスとは還元（reduction）と酸化（oxidation）の合成語で、酸化還元反応は 2 つの物質間に電子の授受が起こる反応だが、レドックス制御とは分子の酸化還元反応に

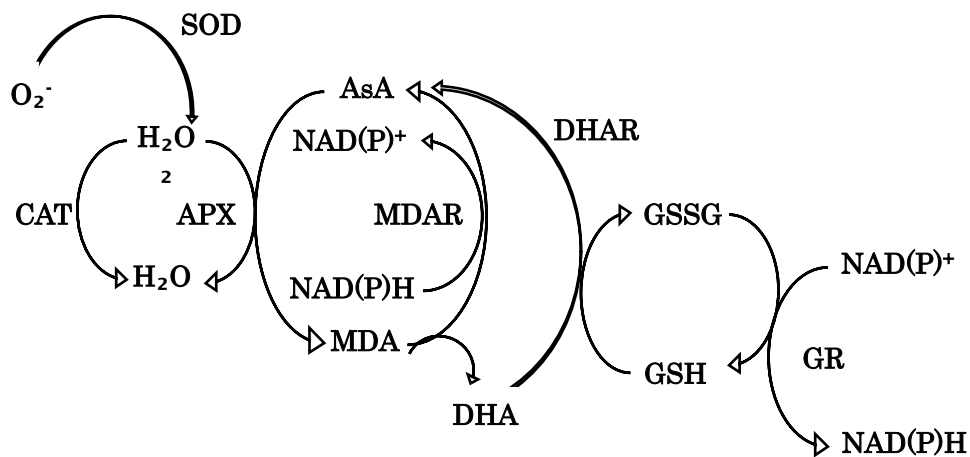


図2 アスコルビン酸/グルタチオン回路

アスコルビン酸 (AsA) は、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) によって酸化されモノデヒドロアスコルビン酸 (MDA) になる。MDAは、還元型フェレドキシンまたは $NAD(P)H$ によってAsAに再還元される。前述の系とは別に、MDA2分子が非酵素的に反応してAsAとデヒドロアスコルビン酸 (DHA) になる経路も存在している。DHAは、グルタチオン (GSH) により還元され、酸化されたグルタチオンジスルフィド (GSSG) は $NADPH$ によって再還元される。

よる細胞機能の調節、つまり遺伝子の転写や発現、タンパク質の局在や合成、分解、細胞分化などが制御される現象の総称である。ROS が生体内に生成されると細胞内が酸化状態になり、それを解消するために抗酸化系が働くことで還元状態に戻される。ストレス時には、これらの酸化還元応答が細胞内で活発に働いていることになる。既往研究から ROS には傷害特性だけでなく、細胞分化や伸長など植物中で重要な生理学的役割を果たし、その時の酸化還元反応は種々遺伝子発現やタンパク質合成を誘導することで様々な生理応答を誘導することが報告されている (Mittler *et al.*, 2004)。ROS は、それが生成したその場で直ちに消去されなければ細胞成分が酸化され、酸化障害を引き起こすことから、シグナル作用を示す ROS は細胞全体に生ずるのではなく、シグナルの標的分子がある近くでのみ生じると考えられている (Galvez-Valdivieso and Mullineaux, 2010)。つまり、植物の局所において生理応答には差異があることが報告されている。

種子発芽において ROS の重要性が示され、発芽メカニズムにおいては Oxidative windows と呼ばれる概念が生まれた (Bailly *et al.*, 2008)。その概念は、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というものであり、応答に適切な閾値があることが示されている。

葉緑体由来の H_2O_2 に応答する候補遺伝子群として、774 個の Responsive to tAPX Silencing (RTS) 遺伝子群が同定されている。RTS 遺伝子群には種々のストレス応答に関与する遺伝子が多く含まれていたが、既知の ROS 応答のマーカー遺伝子がほとんど含まれていなかった。このことは葉緑体由来の H_2O_2 は他の ROS とは異なる経路を介してストレス応答に関与することを示唆している (Murata *et al.*, 2012)。

根端のメリステム領域の細胞数とサイズは通常一定に保たれているが、細胞伸長領域の細胞は長軸方向へ急激に肥大して根が伸長する。この過程はメリステム領域と細胞伸長領域との境界に存在する位置情報により制御されているものと考えられ、植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンを介した転写因子によるこの境界領域における急激な細胞の機能転換の重要性が報告されている (Dunald *et al.*, 2007; Ioio *et al.*, 2008)。しかし、植物ホルモンによる制御のみが細胞の機能転換に重要であるかどうかについては不明な点が多く、植物ホルモンとは異なる制御機構のひとつとしてレドックスシグナルがメリステム領域の活性を保つことも報告されている (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009)。

以上のように、ROS は植物の様々な応答に関与しており、これによる生理応答を調査し、その遺伝子発現やそれを上位で制御する転写因子の同定、その機構を解明することで植物器官のかたちづくりの制御機構の解明や、ひいては、植物バイオマスの効率的な生産にも貢献できると考えられている。

第六節 目的

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形成、物質代謝に与える影響について包括的に調べられた知見はない。

本研究では、ROS の一種である H_2O_2 を用いて、酸化ストレスがリーフレタスの生育と形態形成に与える影響を調査した。加えて、異なる酸化ストレス強度下におけるレドックス応答の違いを調べることで、酸化ストレス強度別に分岐される反応の閾値を指標化することを試みた。

H_2O_2 処理条件を均一化するために、存在量をトレースしやすい水耕液に添加する形で栽培試験を行った。 H_2O_2 含有水耕液で栽培したリーフレタスの生育調査および成長解析を行い、葉身の内部構造や根の形態などの解剖学的解析を行った。さらに形態変化に伴う基質獲得性の変化を植物個体中の有機物の同化量や無機塩の吸収量、クロロフィル含有量や根活性等も分析することで考察した。 H_2O_2 処理後に引き起こされる各器官のレドックス応答の変化を見るために、ROS 含有量や抗酸化酵素活性、抗酸化物質の酸化還元状態の挙動を分析した。これらの包括的調査に基づき、異なる濃度の外因性 H_2O_2 が植物の生理応答に与える影響を評価し、生育促進や抑制に何が要因となるのか検討した。また、それらの結果から ROS 付与が作物の効率的生産に有効となるか検討した。

第二章 H₂O₂ がリーフレタスの成長および形態形成に与える影響

第一節 緒論および目的

1. 成長と ROS

環境ストレスにより、カルビンサイクルの炭素固定系が阻害されると、光合成色素に過剰に吸収された光エネルギーが酸素に渡り、ROS の H₂O₂ が生成される。H₂O₂ は、D1 タンパク質合成の翻訳段階を阻害し、光損傷を受けた PSII の修復を阻害する。それにより、光損傷速度が修復速度を上回り、光阻害が起こる。また Inada ら (2008) は、オゾン曝気は光合成を行なうために重要な色素であるクロロフィル、重要な酵素である Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) の含量や活性などを低下させることにより純光合成速度の低下が引き起こされることを報告している。以上のことが示すように植物個体内で ROS がある一定容量まで増加すると、光合成関連タンパク質が損傷し、光利用効率や炭素同化効率が下がることにより同化産物量が減り、植物の成長や収量も減少する。

しかし一方で、低濃度オゾン水をコマツナおよびトマトに葉面散布すると、新鮮重や茎長、葉長、SPAD 値の増加等、生育促進を示した報告も出ている (尾上ら., 2012)。Ohashi-Kaneko ら (2009) は、1.5mg L⁻¹ オゾン水で調製した栽培液で育てたトマトの初期生育は、0 mg L⁻¹ オゾン水で調製した栽培液で育てた個体よりも有意に大きくなったことを報告した。

以上の報告は、外因性 ROS が植物の生育に与える影響は品種および生育ステージ、処理方法で異なることを示している。

2. 葉身系とストレス

葉は、光合成や呼吸を行う代表器官であり、その内部構造を表皮組織、柵状組織、海綿状組織と分化させることで光の受光効率を高めている。柵状組織は陽葉型の葉緑体を持ち、海綿状組織は陰葉型の葉緑体を持つことが知られている (Terashima and Inoue, 1984)。柵状組織葉緑体の方が、単位クロロフィルあたりの反応中心の含量や、電子伝達系構成要素、Rubisco などの含量が海綿状組織葉緑体よりも高いことが報告されている (Terashima and Inoue, 1985)。しかし、これらの違いは柵状組織と海綿状組織で二分的ではなく、連続的であることが示されており、光の受光と葉身内部構造は非常に密接した関係を持っている (Terashima and Inoue, 1985)。

柵状組織は、強光や低温などの環境ストレスにさらされることで形態を変化させることが報告されている (Pino *et al.*, 2008; Dumlaoui *et al.*, 2012)。低光量環境に適応した植物

体への部分強光処理は、遠位の葉など他器官にも順化応答を誘導する全身獲得抵抗性をもたらしことが示されている (Karpinski *et al.*, 1999)。制御因子の一つである転写因子は、標的遺伝子のプロモーター中にある特異的なシス配列を認識して結合することで、それらの遺伝子の転写を調節する。環境ストレス誘導性の転写因子ファミリーとして、zinc-finger や MYB/MYC 等が報告されている (Nakashima *et al.*, 2009)。シロイヌナズナの C2H2 型 zinc-finger タンパク質である ZAT10 および ZAT12 は、強光や低温ストレス応答時に発現し、柵状組織の発達に関与することが知られている (Iida *et al.*, 2000; Rizhsky *et al.*, 2004)。また、転写因子 ZAT10、ZAT12 が ROS によって発現が上昇することが報告された (Davletova *et al.*, 2005; Mittler *et al.*, 2006; Rossel *et al.*, 2007)。

3. 根圏領域と ROS

根系の発達には、地上部の栄養状態すなわち炭水化物や窒素量が強く影響している。根は、植物体の支持や養水分吸収する役割の他に、同化養分の貯蔵や植物ホルモンの合成などの役割を持っている。根端成長点の下層は、細胞分裂が減少し細胞伸長が行われる伸長領域となり、内皮と呼ばれる環状細胞層群を分化する。内皮細胞の細胞壁にはカスパー線が見られ、養水分吸収に重要な役割を果たす (Peterson *et al.*, 1993)。伸長域のさらに基部には成熟領域があり、成熟領域の根の表皮には根毛が形成される。根毛は単一細胞で形成され、活発な原形質流動を行っている。根毛の細胞壁はペクチン質が多く、水和性が高いため水の吸収が活発となると共に、土壌粒子を包むように粒子間を伸長するため、根と土壌の接触面積が大きく、各種イオンの吸収の場となる。以上に挙げたように養水分吸収は、根の先端および根毛が重要な役割を担っていることが分かっている (Peterson and Steudle, 1993)。

根端のメリステム領域の細胞数とサイズは、通常一定に保たれているが、細胞伸長領域の細胞は長軸方向へ急激に肥大して根が伸長する。この過程はメリステム領域と細胞伸長領域との境界に存在する位置情報により制御されているものと考えられ、植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンを介した転写因子によるこの境界領域における急激な細胞の機能転換の重要性が報告されている (Donald *et al.*, 2007; Ioio *et al.*, 2008)。しかし、植物ホルモンによる制御のみが細胞の機能転換に重要であるかどうかについては不明な点が多く、植物ホルモンとは異なる制御機構のひとつとしてレドックスシグナルがメリステム領域の活性を保つことも報告されている (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009)。2つの領域の境界に特異的に発現する転写因子 UPBEAT1 (UPB1) が発見され、UPB1 はペルオキシダーゼを負に制御することで、根内部の ROS 恒常性に関与している。また UPB1 による転写ネットワークは、サイトカイニンやオーキシンなどの植物ホ

ルモンの影響を受けず、サイトカイニン、オーキシンといった植物ホルモンによる根端のメリステム領域のサイズ決定の機構とは独立していることが強く示唆された (Tukagoshi *et al.*, 2010)。

4. 目的

以上のように、ROS は植物成長における基質獲得器官として重要な葉や根の細胞分裂及び細胞分化応答の制御に密接に関係するシグナル因子であることが示唆されている。また、各器官の変化は基質獲得量や利用効率に影響し生育にも影響することが考えられる。しかし、序論で論じたようにこれらのストレス応答には閾値があり、品種間でその範囲も応答性も異なるであろうことが第2章第一節1からも示唆される。そこで、本章では各生育ステージにおいてROSの一種である H_2O_2 を、異なる濃度、期間で処理した時、どのような生育を示すのか包括的な調査を行った。

第二節 方法

1. 供試植物および栽培方法

1-1. 至適 H_2O_2 濃度の探索

リーフレタス *Lactuca sativa* L. ‘Red Fire’ (Takii, Co., Ltd., Kyoto, Japan) を、水道水を十分に吸水させたウレタンキューブ (23 mm×23 mm×27 mm : Flat-type, thickness 28 mm. Tomiyamass Co., Ltd., Tokyo, Japan) に播種し、保水用ペーパーで被覆し温度 24°C、相対湿度 60% 下で 24 時間暗処理を行った。発芽した種子を白色蛍光灯下 (FHF32EX-N-H. Iwasaki Electric Co., Ltd., Tokyo, Japan) で 2 日間静置し子葉展開後、植物体をウレタンキューブごと、発泡スチロール製定植マット (Tokyo Reikaki Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) へ移植し、ボックスタイプコンテナ (PM-76. Sekisui Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に定植マットを設置し、循環式 Deep flow technique (DFT) による 15 日間の育苗を行った。育苗条件は、光合成有効光量子束密度 (PPFD) $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期を明期 16 時間／暗期 8 時間、温度 24°C、相対湿度 60% とした。栽培液は、OAT ハウス A 処方 (OAT Agrio Co., Ltd., Japan) を用い、電気伝導率 (EC) 1.2 dS m^{-1} 、pH 6.0 とした。

18 日齢の苗 (本葉の第 6 葉展開時) より、葉長および葉幅、最大根長の差が 5% 以内の個体を選抜し、非循環式 DFT 栽培装置に定植し、20 日間 H_2O_2 含有水耕液で栽培した (図 3)。光、温度および湿度条件は育苗時と同様で、水耕液条件は EC 1.2 dS m^{-1} 、pH 6.0 で行った。栽培空間にはサーキュレーター (KJ-D994W. Twinbird Co., Niigata, Japan) による送風を行った。非循環式 DFT 水耕栽培では、養液中の溶存酸素量 (DO) が著しく減少する。そのため、エアーポンプ (W-1000. Japan Pet Design Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用し、水耕液中の DO 値が 8 ppm となるように連続通気した。 H_2O_2 を添加しない処理区を 0 mM (control) とし、0.03、0.1、0.3、1.0、3.0 mM H_2O_2 含有水耕液の試験区、計 6 処理区で栽培を行った。1 日毎に H_2O_2 を各水耕液へ添加し、水耕液中の H_2O_2 濃度の変化を図 4 に示した。栽培液の組成が変化するため、水耕液の更新は 5 日毎に行った。 H_2O_2 処理 20 日後に、地上部の新鮮重と乾物重、含水率、総葉面積、根乾物重、相対葉緑素量 (SPAD 値) を測定した。

(A)



(B)

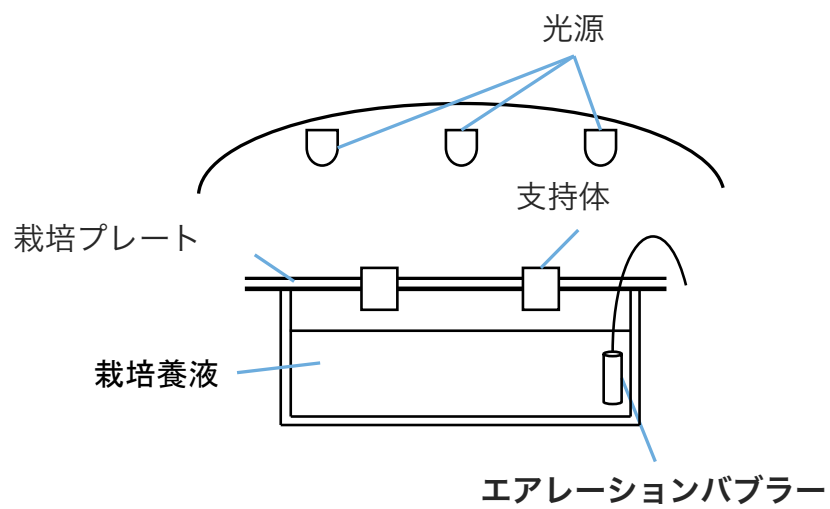


図3 栽培環境(A)およびDFT栽培装置の概念図(B)

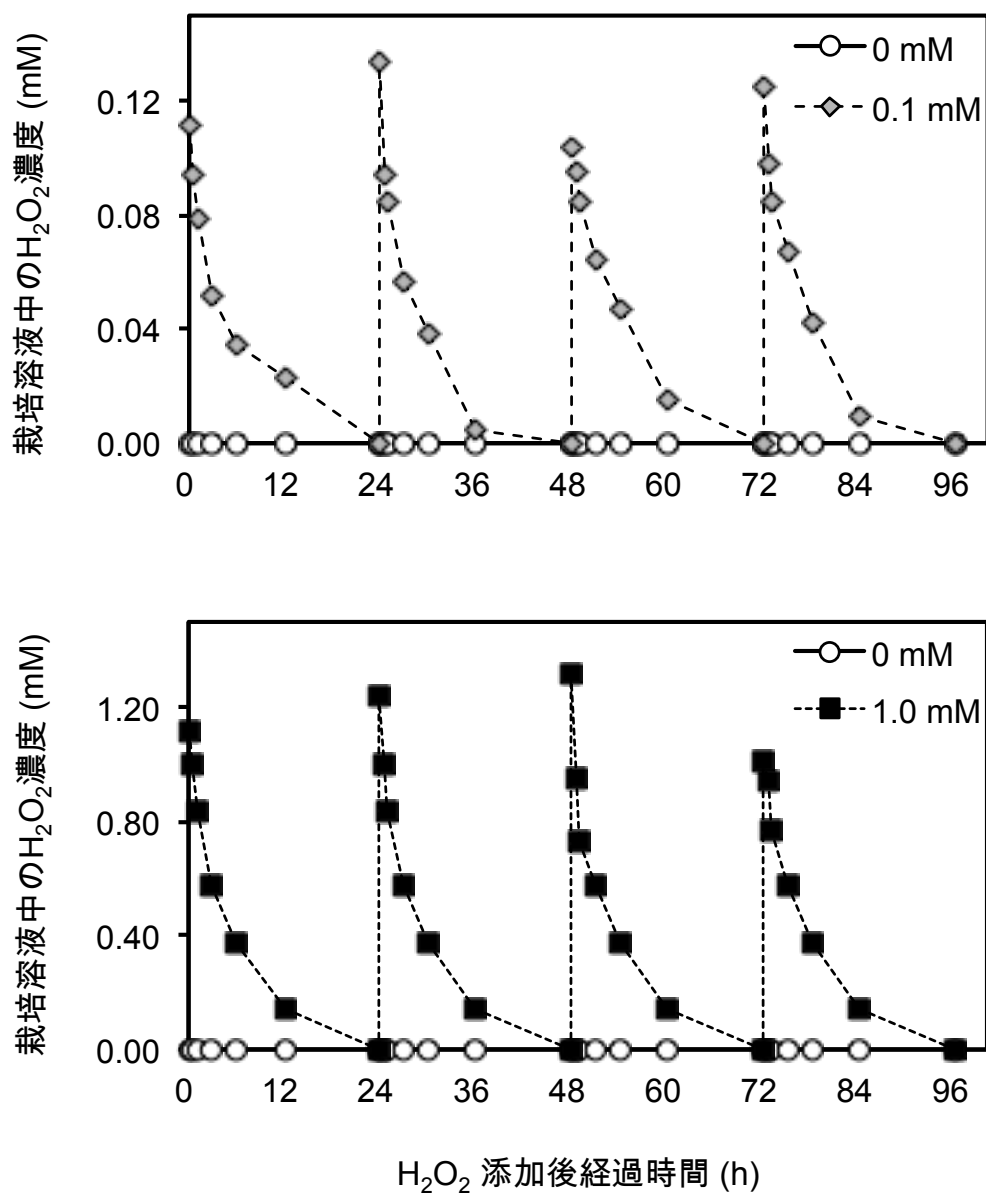


図4 24時間毎に H_2O_2 を添加した栽培溶液中の H_2O_2 濃度

1-2. 経日変化調査

リーフレタス苗の育苗および H_2O_2 処理栽培時の環境条件は、第二章第二節 1-1. に準じた。18 日齢の苗（第 6 本葉展開時）より、葉長および葉幅、最大根長の差が 5%以内の個体を選抜し、非循環式 DFT 栽培装置に定植し、20 日間 H_2O_2 含有水耕液で栽培した。 H_2O_2 を添加しない処理区を 0 mM (control) とし、0.1、1.0mM H_2O_2 含有水耕液で栽培を行った。1 日毎に H_2O_2 を各水耕液へ添加した。

2. サンプルングおよび成長解析 (Radford, 1967; Peterson and Neofotis, 2004)

サンプルングは、規定時間（午前 10 から 5 時間以内）に行った。サンプルングした植物個体は、全葉身、茎、根に分けて、新鮮重、葉面積、最大根長、総根長を測定し、乾燥後に乾物重を測定した。乾物重は 80°C の乾燥機内に 2 日間放置した後、計量し、再度乾燥機内に入れ、 65°C で 24 時間放置し、再度測定した値が前回値と誤差が無かった段階の値を正值とした。前回値より減少した場合はさらに 65°C で 24 時間乾燥機に放置し測定。この工程を繰り返し行った。葉面積はスキャナーにて画像をパソコンに取り込んだ後、画像解析ソフトウェア Image J ver.1.47v (National institutes of health, USA) を用いて計測した。ここで測定した葉面積と乾物重の値を用いて成長解析を行った。

RGR (reactive growth rate ; 相対成長速度)

RGR は、植物個体の乾物重増加を単位時間、単位乾物重あたりで表わしたもので、植物体の乾物重の増加を相対的増加率で求めたものである。すなわち、

$$\text{RGR} = (1/W) \cdot (dW/dt)$$

ここで、 W は植物体全乾物重、 t は時間を指す。実際の計算は、時期 t_1 、 t_2 における乾物重 W_1 、 W_2 の自然対数を取り、

$$\text{RGR} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

で求めた (単位 ; $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$)。

NAR (net assimilation rate ; 純同化率)

NAR は、植物個体の乾物重の増加を単位時間、単位葉面積あたりで表わしたもので、おおよそみかけの光合成速度を示すものと考えてよく、次式で表わされる。

$$\text{NAR} = (1 / L) \cdot (dW / dt)$$

この式で、L は葉面積を表わす。計算は時期 t_1 、 t_2 における L_1 、 L_2 および W_1 、 W_2 を用いて、

$$\text{NAR} = \{(W_2 - W_1) \cdot (\ln L_2 - \ln L_1)\} / \{(t_2 - t_1) \cdot (L_2 - L_1)\}$$

として求めた (単位 ; $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$)。

LAR (leaf area ratio ; 葉面積比)

LAR は、植物個体の乾物重に対する葉面の広がり程度を表したものであり、次式で表わされる。

$$\begin{aligned} \text{LAR} &= L / W \\ &= \{(L_2 - L_1) \cdot (\ln W_2 - \ln W_1)\} / \{(\ln L_2 - \ln L_1) \cdot (W_2 - W_1)\} \\ &= (L_1 / W_1 + L_2 / W_2) / 2 \quad (\text{単位 ; } \text{m}^2 \text{g}^{-1}) \end{aligned}$$

3. 葉および根の解剖学的解析（形態形成）

3-1. 葉身内部構造解析

(1). 葉身の固定処理

H₂O₂ 処理 20 日後に、H₂O₂ 処理開始前に展開していた第 4 葉と処理後に展開した第 9 葉を採取し、FAA 固定液（ホルマリン：酢酸：50%エタノール＝5：5：90）を用い、サンプルを固定した。細胞固定の効率を上げるために、葉から切片（4 mm × 2 mm）を剃刀（青箱両刃，フェザー）を用いて切り出し、FAA 固定液 2 mL が入ったバイアル瓶（3 mL 容）に入れた。バイアル瓶の蓋を開けた解放状態で、真空デシケータ（VDR-30G, Jeio Tech Co., LTd., Korea）にいれ、真空ポンプ（OM, Oriental Motor Co., Ltd., Japan）によって 20 分間の脱気を行った。一度脱気を行った後に、ピンセットで葉を裏返し再度 10 分間脱気を行った。気泡の発生がみられる場合は、さらに 10 分間の脱気を行った。

(2). 葉の横断切片作成（低温重合樹脂固定）

切片作成は Takechi ら（1999）の改変法を用いて行った。第二章第二節 3-1.で固定したサンプルを、100%アセトンを用いて 4°C で 1 時間、組織の脱水を行った（最初の 5 分間は、溶液が透明に保たれるまで何度も交換）。アセトンを取り除き、テクノビット 8100 浸漬液（Okenshoji Co., Ltd., Japan）を添加し、4°C 下で 12 時間、振とう浸漬を行った。振とう後、包埋フォーム（Murazumi-ind., Co., Ltd., Japan）に包埋液を流し込み、標本をその中にいれ、カバーフィルムで包埋フォームを覆い、4°C で 6 時間重合させた。カバーフィルムを剥がし、その上にヒストブロック（Frame green, Murazumi-ind., Co., Ltd., Japan）を置き、固定樹脂テクノビット 3040（Okenshoji Co., Ltd., Japan）を流し込みヒストブロックを固定した。ヒストブロックを万力で固定し、サンプルを傷つけないように硬化樹脂を糸鋸（Free way coping saw, Tiyoseiko, Co., Ltd., Japan）を用いて切り出した。切り出した硬化樹脂中を切片作成時に切り出したい面が上部になるようにパラフィン用木製ブロック（Asone, Co., Ltd）にテクノビット 3040 を用いて固定した（この時、接着およびマイクロームを用いて切片が切れやすくなるように、ヤスリで切り出し面を平らにした）。小型回転式マイクローム（PR50, Yamato kohki industrial Co., Ltd., Japan）で横断切片（厚さ 8 μm）を作製した。切片をスライドグラスに乗せ、100 °C のホットプレート上で加熱し、接着した。切片を倒立顕微鏡（ECLIPSE Ti-U, Nikon Co., Ltd, Japan）を用いて観察し、撮影画像を画像解析ソフトウェア Image J ver.1.47v を用いて計測した。

(3). 葉の横断切片作成（生葉および凍結固定）

滑走式マイクロトーム（REM-710, Yamato Kohki Industrial Co., Ltd., Japan）と電子冷却式の凍結ユニット ELECTRO FREEZE（MCR802A, KELK Ltd., Japan）を用いて、葉の横断切片を作製した。マイクロトームの試料台の温度は -20°C に設定した。第二章第二節 3-1. で固定したサンプルを FAA 固定液から取り出し、純水を用いて FAA 固定液を洗い流した。その後、葉の表面についた水分をキムワイプで除いた。切り出した葉片を試料凍結用のゲル（Tissue-Tek OCT compound 4583, Sakura Finetechnical）で完全に包埋し、試料台上に凍結・固定した。替刃ホルダーにマイクロトーム替刃 C35（フェザー）を取り付け、横断切片（厚さ $10\text{ }\mu\text{m}$ ）を作製した。得られた切片を 50%エタノールを入れた 10 mL スクリュー瓶に入れ、顕鏡するまで保存した。切片の観察は第二章二節 3-1. (2) に準じた。

3-2. 根の形態解析

総根長の測定には格子法を用いた（Tennant, 1975）。格子法とは、格子状に直角に配列された等間隔の直線と、測定しようとする根との交差頻度から根長を求める方法であり、Newman 法を簡略化したものである。縦 30 cm × 横 40 cm のバットに水を張り、3-4 cm に切った根を浮かべ、底面に配置した白いプラバンを持ち上げる。白いプラバンの上から、 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ の格子が入った塩ビ板を乗せ、その格子との交点数を測定した。以下の式に代入し、総根長を算出した。

$$\text{根長 (R)} = \text{交差点の数 (N)} \times \text{格子定数 (0.786)}$$

格子定数は、測定するサンプルの根長に合わせて、格子の大きさや格子定数が変動する。

3-3. 根毛および側根形成観察

(1). 培地作成法および培地組成

本研究では、組織からの根毛の脱落や根系の変形を避けるためインビトロ条件でゲル化培地を用いて供試植物の栽培を行った。1/2 濃度の Murashige and Skoog (1962) 培地（以下 1/2MS 培地）にグルコースを 10 g L^{-1} 、ジェランガム 3 g L^{-1} を添加し、緩衝剤として MES を 0.5 g L^{-1} 加え、KOH 溶液を用いて pH5.8 に調整後、オートクレーブ滅菌（ 120°C 、15 分）した。滅菌後、あらかじめ高圧蒸気滅菌しておいた培養試験管（ $\Phi 26 \times 118\text{ mm}$ ）に、80 mm の高さになるようにクリーンベンチ内で分注した。培養試験管は滅菌アルミホイル栓をした。

(2). 種子滅菌および無菌播種

リーフレタス種子を培地に無菌播種するにあたり、種子滅菌を行った。マイクロチューブ 1.5 mL 容に種子を入れ、1%次亜塩素酸ナトリウム 1 mL を添加し、種皮が取れない程度に Vortex し、10 分間静置した。卓上遠心機で遠心後、アンチホルミンを取り除いた。滅菌水 1 mL で洗浄を 3 回繰り返した。洗浄後の種子に滅菌水 1 mL を加えて、24 時間 4°C で暗処理および低温処理した（操作はすべてクリーンベンチ内における無菌操作で行った。マイクロピペット用チップやビーカーなどの実験器具はオートクレーブ滅菌済みを使用し、次亜塩素酸ナトリウムはクリーンベンチ内でのみ開封されたものを用いた。また、器具および手の消毒は 70%エタノールを用いた）。

滅菌後のリーフレタス種子を 1/2MS 培地にマイクロピペット用チップを用いて 1 粒ずつ無菌播種し、アルミホイルで閉栓した。

(3). 栽培法

無菌播種を行った培養試験管を光および温度制御環境下に移し、5 日間生育させた。培養試験管を静置した環境条件は、昼白色蛍光灯、PPFD150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明期 16 時間暗期 8 時間とし、温度は 20°C とした。5 日齢の側根未形成苗に、0、1、10、100 mM H_2O_2 （+ 0.01 % ダイン（Sumitomo Chemical Garden Product, Inc.））20 μL を葉面滴下処理し、10 日間栽培し主根長、側根数および根毛形成密度を測定した。

(4). 根毛観察

デジタルマイクロスコープ（VHX-1000, Keyence Co., Ltd., Japan）を用いて、根毛をデジタル画像として撮影、記録した。撮影時には根端領域と分化領域の 2 領域を観察した。

4. 養水分吸収

4-1. サンプルングおよび前処理

(1). 植物サンプルング

サンプルングは、0、0.1 および 1.0 mM H_2O_2 処理 10、20 日後のリータスを地上部（葉および茎）と根に分け、規定時間（午前 10 から 5 時間以内）に行った。試料は、第二章、第二節 2 に準じ乾燥させ、粉碎機（ワンダーブレンダー：WB-1）で粉碎し、粉碎乾物試料とした。

(2). 養液サンプルング

栽培養液のサンプルングは、 H_2O_2 処理 10-20 日後の期間、毎日規定時間（17 時）に 1 処理区 6 ポットずつ採取した。ポット内の養液を十分に攪拌後 5 mL 採取した。

(3). 湿式灰化

有機物は着色、錯化、緩衝、沈殿などさまざまな現象で、無機成分定量の妨害となりやすい。したがって、無機成分定量の定量にあたり、事前に完全に有機物を分解する必要がある。本試験では、湿式灰化を用いて試料中の有機物を分解した。分解には硝酸-塩酸-過酸化水素法を用いた。10 mg の乾燥粉末試料をテフロンビーカーに秤取した。硝酸 5 mL、塩酸 5 mL を加えて 24 時間放置した。その後、30%過酸化水素水 5mL を加え、時計皿でおおい 80°C で 45 分加熱した。時計皿を取り除き、温度を上げながら加熱を続け蒸発乾固させた（最終到達温度は 200°C）。残さに超純水を加え 1 時間煮沸し、過酸化水素を完全分解した。テフロンビーカー内の無機塩残さに対して 5%硝酸を用いて 10 mL にフィルアップした。

4-2. アンモニア態窒素

アンモニア態窒素の測定はインドフェノール法により行なった。アンモニウムイオンは次亜塩素酸ナトリウムと反応し、クロロアミンを生じる。このクロロアミンはフェノールと反応すると濃度と比例して鮮やかなインドフェノールブルーを生成するため、比色法によって定量した。本研究では、検液 200 μL に脱イオン水 2 mL を加えて希釈し、次亜塩素酸ナトリウム試薬（次亜塩素酸ナトリウム 1.25 mL と水酸化ナトリウム 0.6 g を脱イオン水 50 mL に溶解）とフェノール試薬（フェノール 1.25 g とペンタシアノニトロシル鉄(III)酸二ナトリウム・二水和物（ニトロプルシドナトリウム）6 mg を脱イオン水 50 mL に溶解）を各 100 μL ずつ添加し、35°C で 3 時間加温した後、分光光度計で 630 nm の吸光度（UV-1800, Shimazu Co., Ltd, Japan）を測定した。

4-3. 硝酸態窒素

硝酸態窒素の測定は、Cataldo ら（1975）のスルファニルアミド・ナフチルアミン法によって行なった。硝酸態窒素は、銅存在下で硫酸ヒドラジニウムによって亜硝酸態窒素に還元される。亜硝酸イオンは、酸性溶液中でスルファニルアミド（芳香族第一アミン）と反応し、アゾ化合物を生成する。そこにナフチルエチレンジアミン（芳香族アミン）を加えるとジアゾ化合物がピンク色に呈色する。本研究では、検液 20 μ L に脱イオン水 2 mL を加えて希釈し、銅－亜鉛溶液、水酸化ナトリウム溶液、硫酸ヒドラジン溶液を各 50 μ L 加え、35°C で 1.5 時間加温した。その後スルファニルアミド溶液 200 μ L を加え、室温で 15 分間放置し、さらに N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩溶液 200 μ L を加えた。さらに室温で 15 分間放置後、分光光度計で 540 nm の吸光度 (UV-1800, Shimadzu Co., Ltd, Japan) を測定した。

4-4. 無機塩分析

植物体中の無機塩分析には ICP-OES (Agilent 700 series ICP-OES, Agilent Technologies, Inc) を使用した。酸分解後の液体サンプルまたは固体サンプルに含まれる微量または少量成分の測定に使用する原子分析技術である。液体が 5500 K の誘導結合プラズマに噴霧され、サンプル内の原子が励起/イオン化される。光学検出を使用して、放出される光の強度を対象元素に固有の波長で測定する。これらの測定値を標準試料と比較することで、サンプル中の元素濃度を測定する。本試験では、植物体中および栽培液中の B、Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Cu、Zn および Mo を分析した。

4-5. 水分吸収量

H₂O₂ 処理期間において、栽培ポッドの養液残液量 (L) をメスシリンダーで測定し、日変化から一株当たりの推定水分吸収量を算出した。

$$\text{Water absorption} = (V_1 - V_2) / (t_1 - t_2) / \text{plant}$$

ここで、 V は DFT 栽培液量、 t は時間を指す。実際の計算は、時期 t_1 、 t_2 における栽培液量 V_1 、 V_2 の差より求めた

本試験系では、栽培プレートがポッドを密閉している状態にしており、かつ、ブランケットとして設定した植物個体を植えていないポッド内水分量の日変化が認められなかったため、蒸発量は加味しないものとした。

4-6. 根活性

α -ナフチルアミンによる根活性の測定は、パーオキシダーゼ活性を測っており、その活性が根の呼吸率と密接な関係を持つことを基礎としている。供試根 1.0 g FW を 100 mL 容の三角フラスコにとり、40 ppm α -ナフチルアミン溶液および 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の等量混合液 50 mL を加え、振とうした。10 分静置すると根による α -ナフチルアミンの急速な吸着が完了するので、その時点をゼロタイムとして、スタートの α -ナフチルアミン濃度を測定するために、1 mL を試験管に採取した。残部は栓をして振とう機にかけ、20°C で 5 時間反応を行った。反応時間終了後、1 mL を別の試験管に採取した。なお、 α -ナフチルアミン溶液は自然酸化を行うので、根を加えないでブランクテストを同様に操作した。

採取した 1 mL の検液に 5 mL の蒸留水を加え、これに 1%スルファニル酸溶液 500 μ L および 100 ppm 亜硝酸ナトリウム溶液 500 μ L を加えて攪拌し、5 分間室温で放置して発色させたのち、蒸留水を加えて全容 10 mL とした。発色 20 分後から 60 分以内の間に分光光度計で 510 nm の波長を用いて吸光度を測定した。同時に、上記の 20 ppm α -ナフチルアミン溶液を用いて、 α -ナフチルアミン 0、5、10、15、20 μ g 相当量を分取して同様の発色操作をし、標準線を作成した。以下の式により算出した。

*根活性：計算法

根活性は、根 1g、1 時間当たりの α -ナフチルアミンの酸化量 (μ g) でもって表示する。 α -ナフチルアミンの酸化量 (N) は、反応前後の差からブランクテストの値を差し引いて求められる。

$$N = [(\text{最初採取した検液中の } \alpha\text{-ナフチルアミン } \mu\text{g} \times 25) - (\text{反応終了後採取した検液中の } \alpha\text{-ナフチルアミン } \mu\text{g} \times 25)] - [(\text{ブランクテストの最初採取した検液中の } \alpha\text{-ナフチルアミン } \mu\text{g} \times 25) - (\text{ブランクテストの反応終了後採取した検液中の } \alpha\text{-ナフチルアミン } \mu\text{g} \times 25)]$$
$$\text{根活性} = N (\mu\text{g}) / \text{供試根量 (g)} \times \text{反応時間 (h)}$$

5. クロロフィル定量

凍結葉を新鮮重の 10 倍量 50 mM リン酸緩衝液 (5%(v/v)グリセロール、2 mM ヨード酢酸ナトリウム、0.8%(v/v)2-メルカプトエタノールを含む ; pH 7.0) で摩砕抽出を行った。クロロフィル (Chl) の定量は、摩砕抽出液 100 μ L を褐色試験管に取り秤量し、0.5 mL 蒸留水、2.4 mL アセトンを加えよく攪拌した。それを氷中に 30 min 放置した後、冷却遠心分離 1,800 rpm \times 15 min を行い、その遠心上清を、分光光度計を用いて 663 nm および 645 nm の吸光度 (UV-1800, Shimazu Co., Ltd, Japan) を測定した。それらの吸光度から Arnon (1949) の計算式を用いて算出した。

6. 炭素窒素固定

植物体中の C、N 分析には SUMIGRAPH NC-22 (Sumika Chemical Analysis Service, Ltd., Japan) を使用した。従来、煩雑かつ熟練を要する炭素および窒素分析を、簡便ながらも高精度に分析できる機器である。基本原理として、微粉末にした植物体試料を高温で完全燃焼させ、発生した燃焼ガス中の CO₂、NOX、N₂ 等のうち、窒素酸化物は還元し、他の部分は取り除き、最終的に炭素は CO₂ に、窒素は N₂ にし、それぞれ検出する。検出部条件設定は、1) INJ/DET TEMP=100°C、2) COL TEMP=70°C、3) CARRIER GAS (He) 1&2 \approx 200 kPa とした。反応部温度は、NC-H (還元炉) =830°C、NC-L (酸化炉) =600°C とし、O₂ FLOW=0.3 (-0.4) l/min とした。標準試薬には、アセトアニリドを使用し、それぞれ炭素、窒素含有量を測定した。

7. 統計解析

本実験で得られたデータは、統計解析ソフト JMP ver.8.0.1 (SAS Institute Inc., USA) を用いて Tukey-Kramer 法による検定を実施した。

第三節 結果

第一項 ストレス強度別の生育変化

本試験では、添加時濃度で 0 (control)、0.03、0.1、0.3、1.0、3.0 mM H_2O_2 の計 6 処理区を設け、毎日 H_2O_2 の添加を継続的に行いながら栽培したリーフレタスの生育を調査した。データは示さないが、本試験設定濃度以下 0.001、0.003、0.01 mM H_2O_2 の 3 処理区では、新鮮重や乾物重等生育への影響は認められなかった。また、10 mM 濃度では処理 1 日後には葉脈の色素が退色、葉が萎れて枯れた。

H_2O_2 処理 20 日後における植物個体の地上部新鮮重、地上部乾物重、水分含有率、根乾物重、総乾物重、Shoot/root 比、総葉面積、比葉重、SPAD 値の結果を図 5 に示す。 H_2O_2 処理 20 日後における地上部新鮮重、乾物重、葉面積、根乾物重が 0.03、0.1 mM H_2O_2 処理区で 0 mM H_2O_2 処理区に比べ増加し、1.0、3.0 mM H_2O_2 処理区において減少する傾向を示した。各種詳細結果を以下に示す。

地上部新鮮重は、0 mM H_2O_2 処理区に対して 0.03 mM H_2O_2 処理区で約 37%の増加が認められ、0.1 mM- H_2O_2 処理区では約 21%の増加が認められた。地上部乾物重では、0 mM- H_2O_2 処理区に対して 0.03 mM H_2O_2 処理区で約 24%、0.1 mM H_2O_2 処理区では約 32%の増加が認められ、新鮮重は増加しなかった 0.3 mM H_2O_2 処理区においても約 24%の増加が認められた。水分含有率は 0 mM H_2O_2 処理区に対して、有意な差異が認められたのは、3.0 mM H_2O_2 処理区だけだったものの、処理濃度依存的に低下する傾向が認められた。

根乾物重では、0 mM H_2O_2 処理区に対して 0.03 mM H_2O_2 処理区で約 35%、0.1 mM H_2O_2 処理区では約 29%増加で有意差が認められ、0.3 mM H_2O_2 処理区においては有意差は認められないものの増加する傾向が見られた。総乾物重は、0 mM H_2O_2 処理区に対して 0.03、0.1、0.3 mM H_2O_2 処理区で有意な増加が認められた。地上部および根において、0 mM H_2O_2 処理区に対して 0.03-0.3 mM H_2O_2 処理区で増加、1.0、3.0 mM H_2O_2 処理区で減少する応答が認められたものの、Shoot/root 比は H_2O_2 処理による影響は認められなかった。

総葉面積においても新鮮重と同様の傾向を示したが、0 mM H_2O_2 処理区に対して 0.03 mM H_2O_2 処理区で約 16%、0.1 mM- H_2O_2 処理区で約 17%増加と、増加率は新鮮重に比べ低い値を示した。比葉重に関して有意な差が見られたのは、3.0 mM H_2O_2 処理区のみだったが、 H_2O_2 処理濃度依存的に増加する傾向を示した。相対葉緑素量 (SPAD) は、各処理区において有意な差は認められなかった。

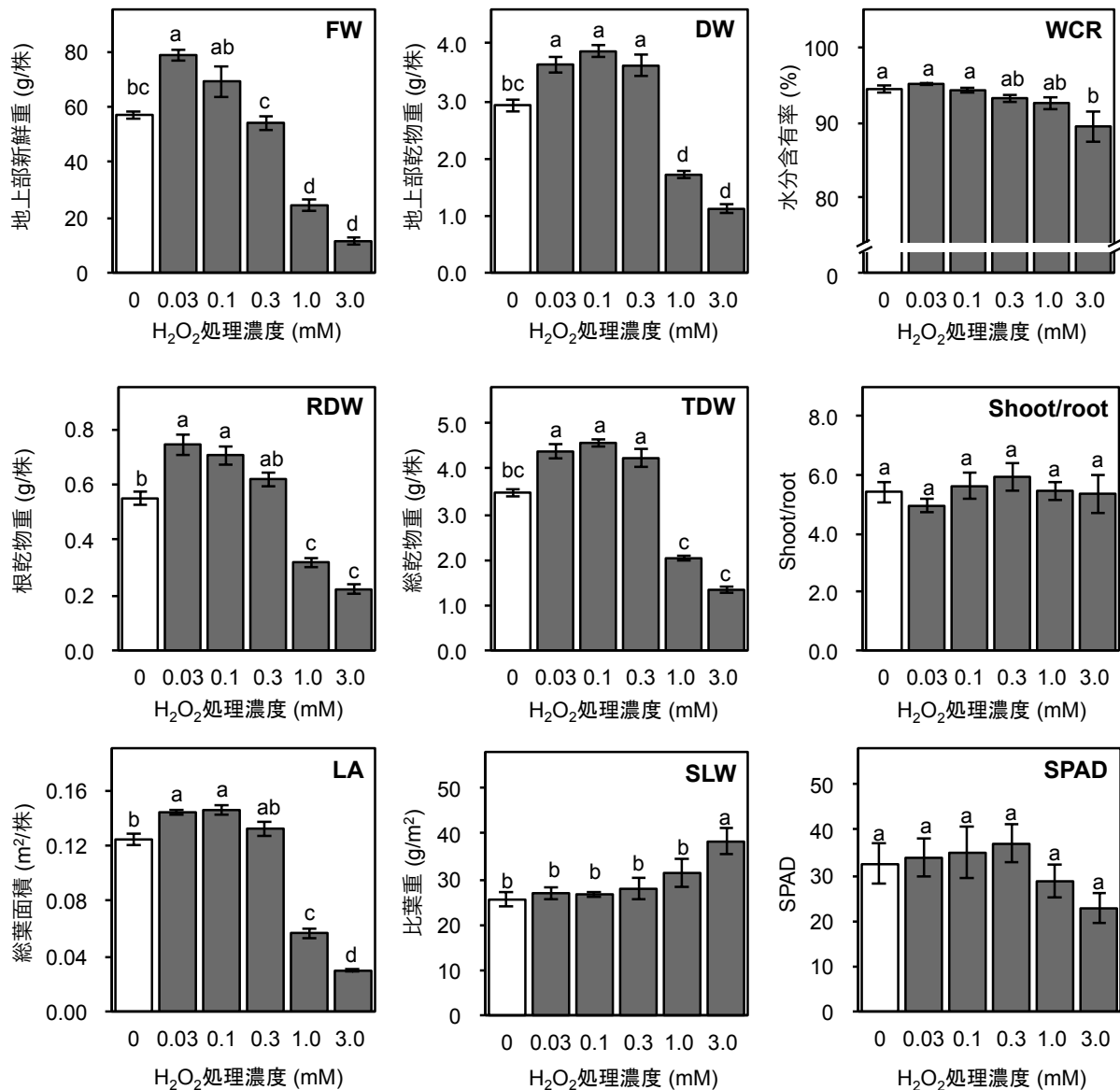


図5 H₂O₂処理20日後におけるリーフレタス各器官別生育調査

18日齢リーフレタス苗を、20日間各H₂O₂処理濃度含有水耕液で栽培したリーフレタスの地上部新鮮重 (FW)、地上部乾物重 (DW)、水分含有率 (WCR)、根乾物重 (RDW)、全乾物重 (TDW)、地上部地下部比率 (Shoot/root)、総葉面積 (LA)、比葉重 (SLW)、SPAD値 (SPAD)。図中のバーは標準誤差 (n=5) を、異なる英小文字はTukey-Kramer法により5%で有意差を示す。

第二項 成長解析

第二章、第三節、第一項より、0.03 および 0.1 mM H_2O_2 含有水耕液において生育量が増加し、1.0 mM H_2O_2 以上の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、その結果から成長解析を行った。

0.1 mM H_2O_2 処理区において、総乾物重や地上部乾物重、総葉面積、根乾物重が無処理区より有意に増加し、1.0 mM H_2O_2 処理区では抑制される傾向を第二章、第三節、第一項と同様に示した（図 6）。地上部乾物重および総葉面積は、 H_2O_2 処理区間における有意な差が 15 日後に認められたのに対し、根乾物重は H_2O_2 処理区間における有意な差は 10 日後に認められ、 H_2O_2 処理の影響は地上部よりも直接処理されている根圏領域で早く現れることが明らかとなった。

成長解析は、 H_2O_2 処理 0-5 日後および 10-15 日後に行った（図 7）。 H_2O_2 処理 0-5 日後における RGR は、0 および 0.1 mM H_2O_2 処理区よりも 1.0 mM H_2O_2 処理区で低くなった。また、LAR は各処理区間での差がなく、NAR が 0 および 0.1 mM H_2O_2 処理区よりも 1.0 mM H_2O_2 処理区で低くなった。このことは、1.0 mM H_2O_2 処理は単葉面積あたりの炭素同化量が下がっていることを示している。

H_2O_2 処理 10-15 日後における RGR は、0 mM H_2O_2 処理区よりも 0.1 mM H_2O_2 処理区で大となった。また、0-5 日後における解析結果と同様に LAR は各処理区間での差が見られなかった。一方で、NAR は 0 mM H_2O_2 処理区よりも 0.1、1.0 mM H_2O_2 処理区で大となった。このことは、0.1、1.0 mM H_2O_2 処理は単葉面積あたりの炭素同化量が高くなっている可能性がある。1.0 mM H_2O_2 処理において 10-15 日後の NAR が高くなっているのにも関わらず、RGR が低くなっているのは、LAR が有意差は無いものの 0 mM H_2O_2 処理区に比べて減少している傾向にあり、葉面積拡大が高強度の酸化ストレスにより阻害されていることが考えられる。これは、第二章、第三節、第一項の結果において地上部新鮮重や乾物重の増加割合に対し、総葉面積の増加率が低かった結果と一致した。

第三項 葉身内部構造解析

既往研究から、ROS およびストレス環境は葉身構造の変化を促すことを第二章第一節で述べた。 H_2O_2 処理前に出葉していた葉（第 4 葉）の完全展開時の葉身内部構造の結果を図 8 および表 1 に示す。葉厚は、 H_2O_2 処理区間で差異は認められなかった。表皮や海綿状組織にも H_2O_2 処理区間で差異は認められなかった（date not shown）。柵状組織の構造に H_2O_2 処理期間で差異が認められた。柵状組織の縦長が、0 mM H_2O_2 処理区

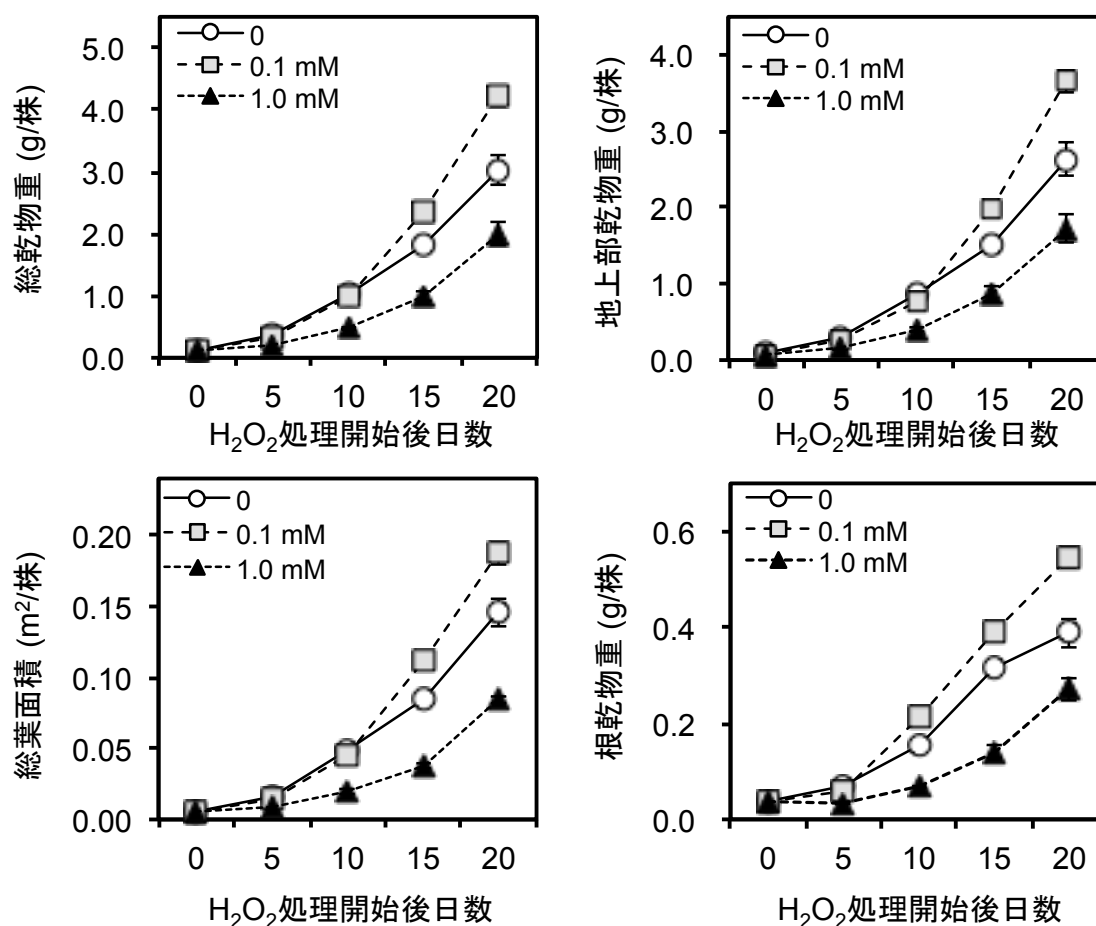


図6 H_2O_2 処理に伴うリーフレタスの地上部および根乾物重の経時変化

18日齢リーフレタス'Red Fire'苗を0、0.1、1.0 mM- H_2O_2 含有水耕液で20日間栽培した。過酸化水素は、24時間毎に規定濃度になるように添加した。乾物重量は、乾燥機で80°Cで48時間、24時間65°Cで乾燥させた後重量を測定し、乾燥機に再度サンプルを入れ24時間毎に測定を行った。重量誤差が前回測定時と同一値になった時を終点とした。図中のバーは標準誤差(n=5)を示す。

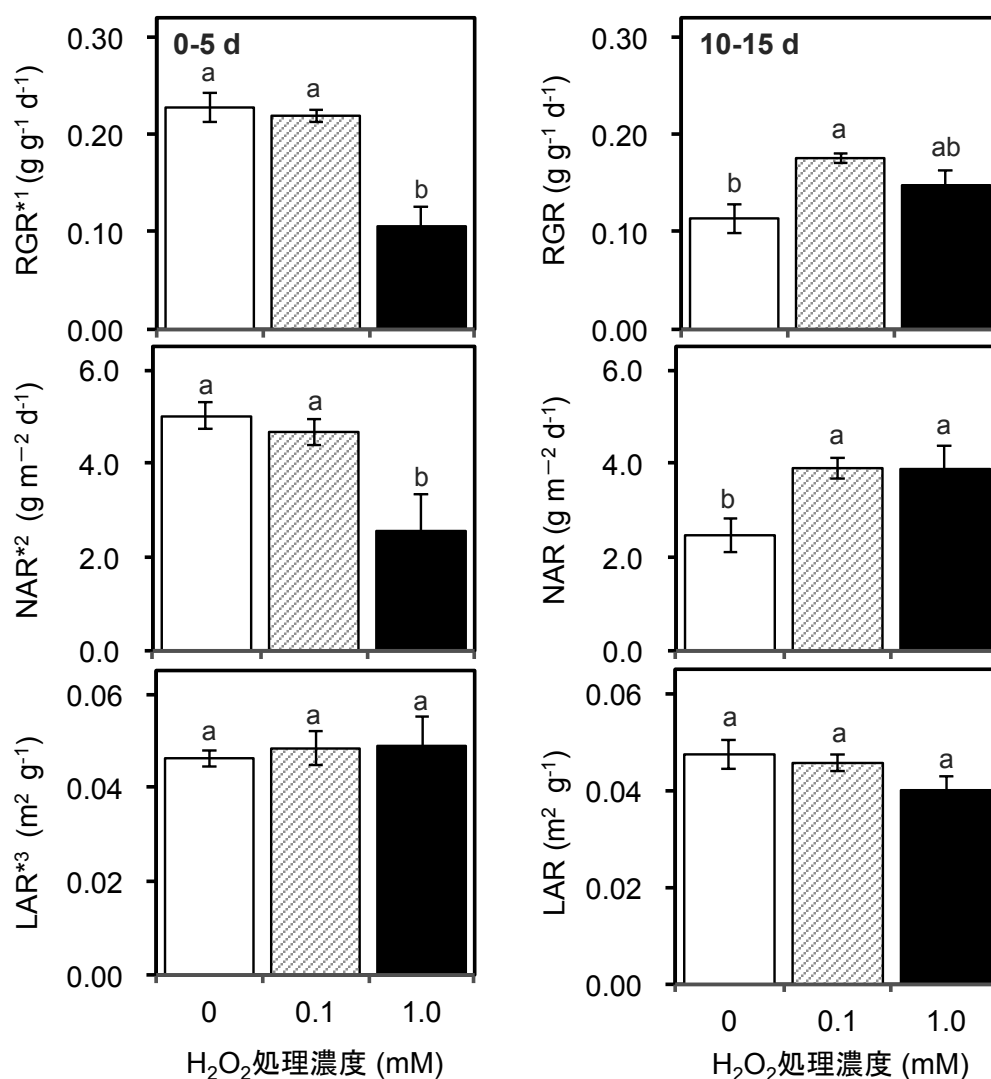


図7 葉面積および乾物重量を用いた成長解析

植物の全個体の成長解析をH₂O₂処理後0-5日後と10-15日後の期間で行った。図中のバーは標準誤差(n=5)を、異なる英小文字はTukey法により5%で有意差を示す。

- (*1) RGR(relative growth rate; 相対成長速度)は、植物個体の乾物重増加を単位時間、単位乾物重あたりで表したもので、植物体の乾物重増加を相対的増加率で求めたもの。
- (*2) NAR(net assimilation rate; 純同化率)は、植物個体の乾物重の増加を単位時間、単位葉面積あたりで表わしたもので、およそみかけの光合成速度を示すもの。
- (*3) LAR(leaf area ratio; 葉面積比)は、植物個体の乾物重に対する葉面の広がり程度を表したものの。

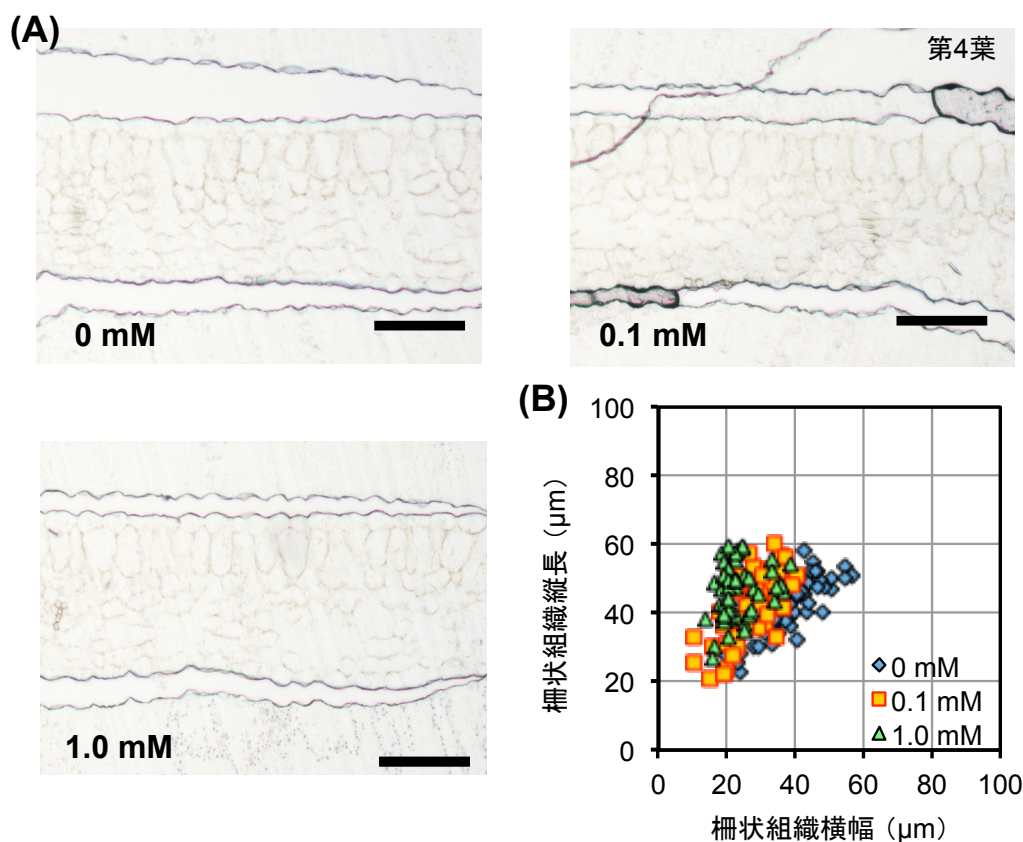


図8 H_2O_2 処理後に展開した完全展開葉の葉身内部構造

(A) 無処理区(0)および0.1、1.0 mM H_2O_2 処理後におけるリーフレタス第4葉の縦断面図。FAA固定液で保存後、包埋樹脂テクノビット8100により固定。固定液によるアーティファクトを考慮し、凍結マイクロームで同様に切片を作成し、細胞構造に影響しないことを予備試験で確認済み。図中のバーは100 μm であることを示す。

(B) 無処理区(0)および0.1、1.0 mM H_2O_2 処理後におけるリーフレタス第4葉における柵上組織の縦横長。1個体から5切片作成し、5切片の平均値を1個体値として10サンプル測定した(Table 1)。全測定値のプロット

表1 H_2O_2 処理後のリーフレタス第4葉における柵上組織構造および葉厚

H_2O_2 処理濃度 (mM)	細胞長(μm)	細胞幅(μm)	柵上組織 縦/横比	葉厚 (μm)	細胞密度 (cells mm ⁻²)
0 mM H_2O_2	42.0±1.2 ^b	39.0±1.2 ^a	1.1±0.0 ^c	151.9±11.9 ^a	512.8±24.7 ^b
0.1 mM H_2O_2	41.4±1.4 ^b	26.7±1.0 ^b	1.6±0.1 ^b	164.8±21.0 ^a	536.4±20.9 ^{ab}
1.0 mM H_2O_2	46.4±1.1 ^a	23.4±0.8 ^b	2.1±0.1 ^a	174.2±19.6 ^a	555.1±32.3 ^a

1個体から5切片作成し、5切片の平均値を1個体値として10サンプル測定した(n=10)。

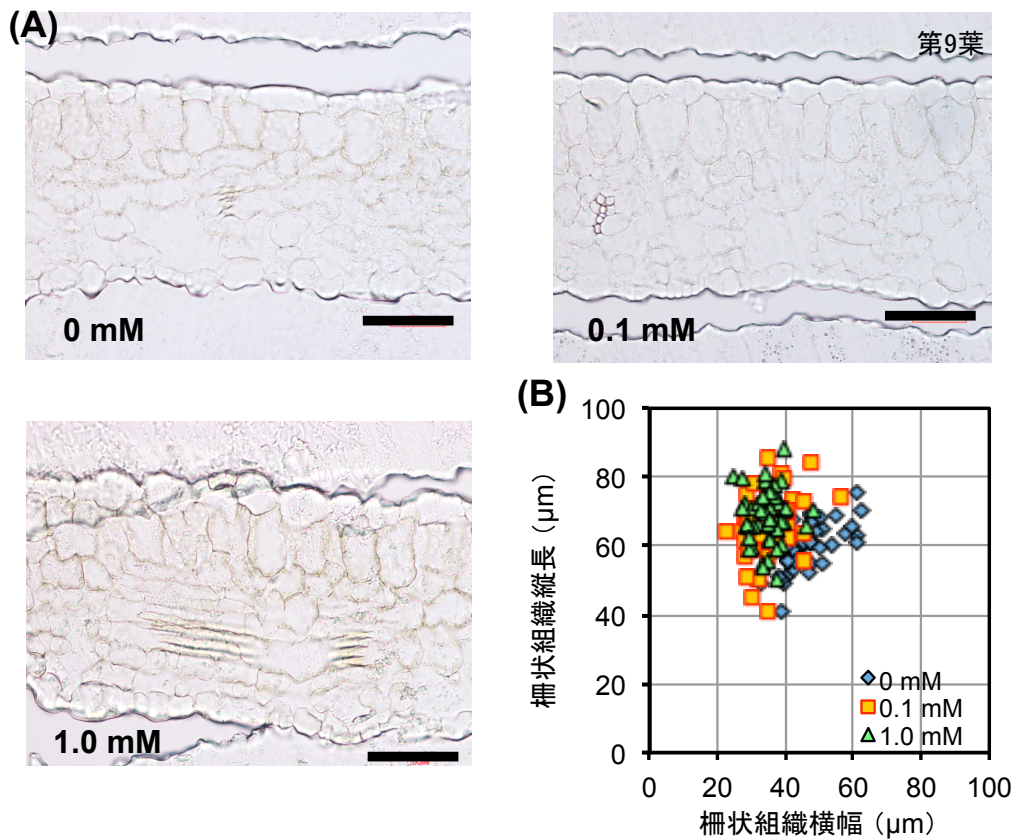


図9 H_2O_2 処理後に展開した完全展開葉の葉身内部構造

- (A) 無処理区(0)および0.1、1.0 mM H_2O_2 処理後におけるリーフレタス第9葉の縦断面図。FAA固定液で保存後、包埋樹脂テクノビット8100により固定。固定液によるアーティファクトを考慮し、凍結ミクロトームで同様に切片を作成し、細胞構造に影響しないことを予備試験で確認済み。図中のバーは100 μm であることを示す。
- (B) 無処理区(0)および0.1、1.0 mM H_2O_2 処理後におけるリーフレタス第9葉における柵上組織の縦横長。1個体から5切片作成し、5切片の平均値を1個体値として10サンプル測定した(Table 1)。全測定値のプロット

表2 H_2O_2 処理後のリーフレタス第9葉における柵上組織構造および葉厚

H_2O_2 処理濃度 (mM)	細胞長(μm)	細胞幅(μm)	柵状組織縦/横比	葉厚 (μm)	細胞密度 (cells mm^{-2})
0 mM H_2O_2	60.4 \pm 0.9 ^b	45.6 \pm 1.0 ^a	1.3 \pm 0.0 ^b	204.9 \pm 14.6	523.4 \pm 19.2 ^b
0.1 mM H_2O_2	66.3 \pm 1.3 ^a	34.3 \pm 0.9 ^b	2.0 \pm 0.1 ^a	207.2 \pm 15.0	600.5 \pm 26.3 ^a
1.0 mM H_2O_2	68.4 \pm 1.1 ^a	34.7 \pm 0.6 ^b	2.0 \pm 0.1 ^a	216.0 \pm 26.4	625.1 \pm 19.1 ^a

1個体から5切片作成し、5切片の平均値を1個体値として10サンプル測定した(n=10)。

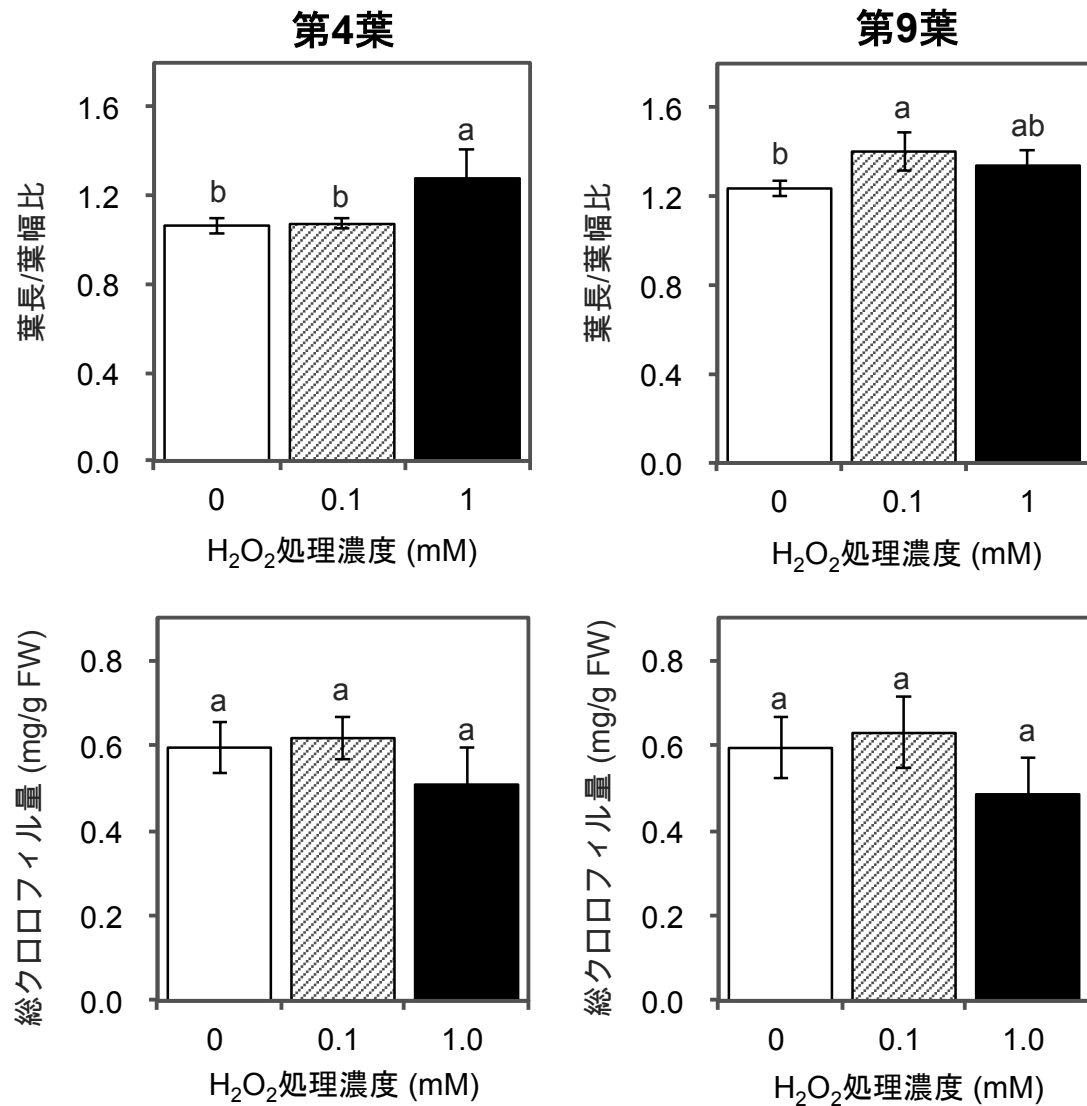


図10 H₂O₂処理後の第4、9葉の葉長/葉幅比および総クロロフィル含有量

H₂O₂処理前に出葉していた第4葉およびH₂O₂処理後に出葉した第9葉の完全展開葉を測定した。図中のバーは標準誤差 (n=10) を、異なる英小文字はTukey法により5%で有意差を示す。

に対して、1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加した。また、柵状組織の横幅は 0 mM H₂O₂ 処理区に対して、0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に抑制された。これらの変化に伴い、柵状組織の縦/横比は H₂O₂ 処理濃度依存的に高くなる傾向を示した。また、単位面積当たりの細胞数密度も H₂O₂ 処理濃度依存的に高くなる傾向を示し、0 mM H₂O₂ 処理区に対して、1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加した。

H₂O₂ 処理後に出葉した葉（第 9 葉）の完全展開時の葉身内部構造の結果を図 9 および表 2 に示す。葉厚は、H₂O₂ 処理区間で差異は認められなかった。表皮や海綿状組織にも H₂O₂ 処理区間で差異は認められなかった (date not shown)。柵状組織の構造に H₂O₂ 処理期間で差異が認められた。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 処理区で有意に増加した。また、柵状組織の横幅は 0 mM H₂O₂ 処理区に対して、0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に抑制された。これらの変化に伴い、柵状組織の縦/横比は 0 mM H₂O₂ 処理区に対して、0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に高くなった。また、単位面積当たりの細胞数密度も、0 mM H₂O₂ 処理区に対して、0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加した。

葉身内部構造を測定した葉（第 4 葉および第 9 葉）の葉長/葉幅比を見ると、第 4 葉は 0 mM H₂O₂ 処理区に対して、1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に高くなり、第 9 葉は 0 mM H₂O₂ 処理区に対して、0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で高くなる傾向を示した (図 10)。葉身内部の細胞数（細胞密度）が H₂O₂ 処理区で高くなっており、これらが葉身の縦横比に影響を与えた可能性が示唆された。この時、葉に含まれる総クロロフィル量には H₂O₂ 処理区間での差異は認められなかった (図 10)。

第四項 側根および根毛の形態形成

第二章第三節第一、二項において、0 mM H₂O₂ 処理区に比べて 0.1 mM H₂O₂ 処理区で根乾重が増加し、1.0 mM H₂O₂ 処理区で根乾物重が低下することが認められた。この時、根姿にも顕著な差異が観察された。また、地上部に比べ生育への影響が早期に現れることから、根の変化が地上部の生育部へ影響を与える可能性が示唆された。

H₂O₂ 含有水耕液で栽培したリーフレタスの根の形態解析結果を図 11 に示す。H₂O₂ 処理 10 日後において、最大根長は 0 mM H₂O₂ 処理区に比べて 0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に低くなった。それに対して、分枝根端密度（側根形成数）が 0 mM H₂O₂ 処理区に比べて 0.1 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加した。0.1 mM H₂O₂ 処理区は 0 mM H₂O₂ 処理区に比べて最大根長が短くなったが、側根形成数が増加したことで、総根長に差は見られなかった。

H₂O₂ 処理 20 日後において、最大根長は 0 mM H₂O₂ 処理区に比べて 1.0 mM H₂O₂ 処理

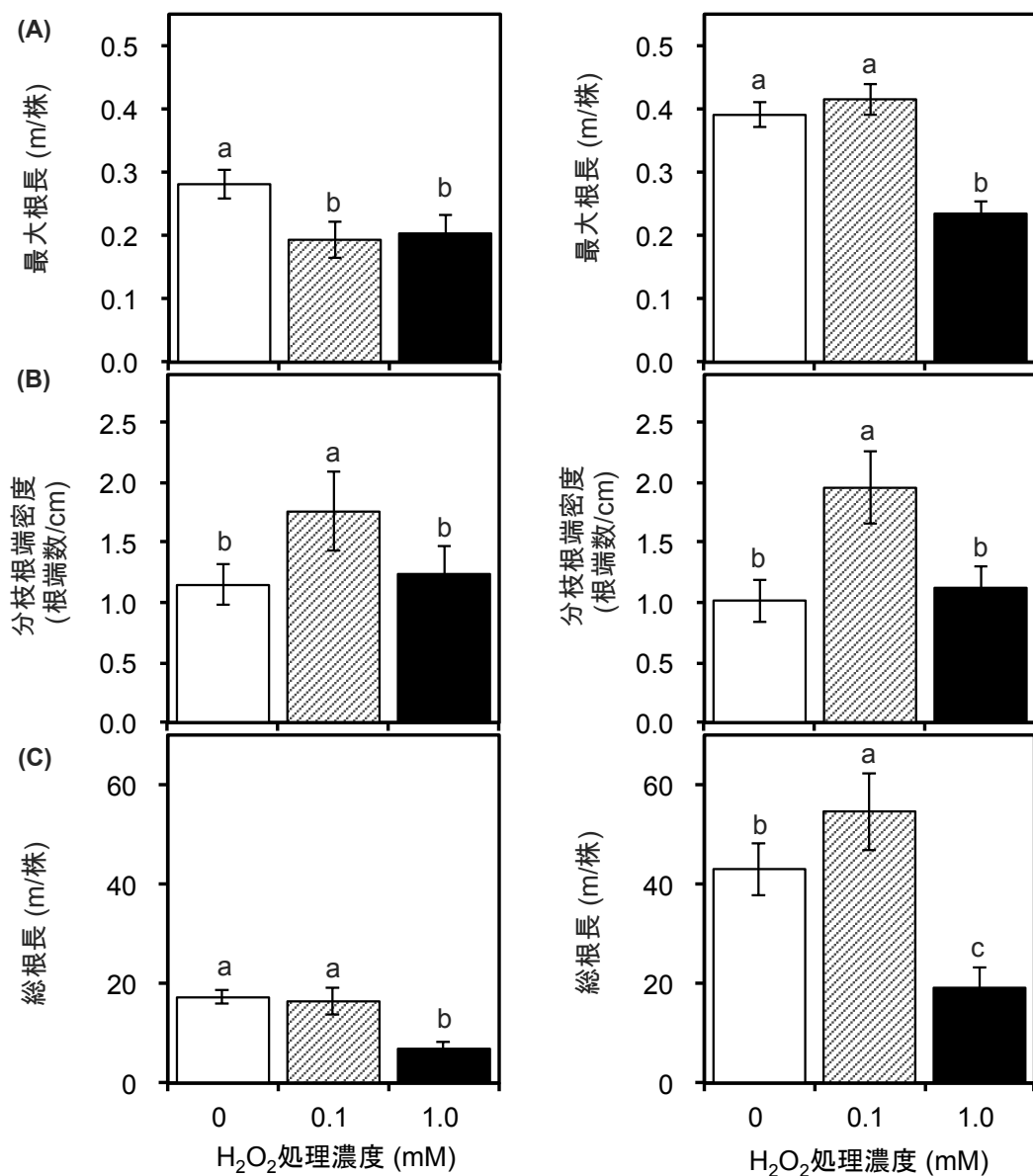


図11 H₂O₂処理10, 20日後の最大根長および分枝根端密度、総根長

18日齢リーフレタス苗を、10および20日間各H₂O₂処理濃度含有水耕液で栽培したリーフレタスの最大根長、分枝根端密度、総根長。図中のバーは標準誤差 (n=10) を、異なる英小文字はTukey-Kramer法により5%で有意差を示す。

- (A) 最大根長は、主根および側根を含む根の最大長を示す。
 (B) 分枝根端密度は、根長あたりの根端数で表した単位であり、およそその側根形成数を表す。
 (C) 総根長は、格子法を用いて算出した。格子法とは、格子状に直角に配列された等間隔の直線と、測定しようとする根との交差頻度から根長を求める方法であり、Newman法を簡略化したもの。

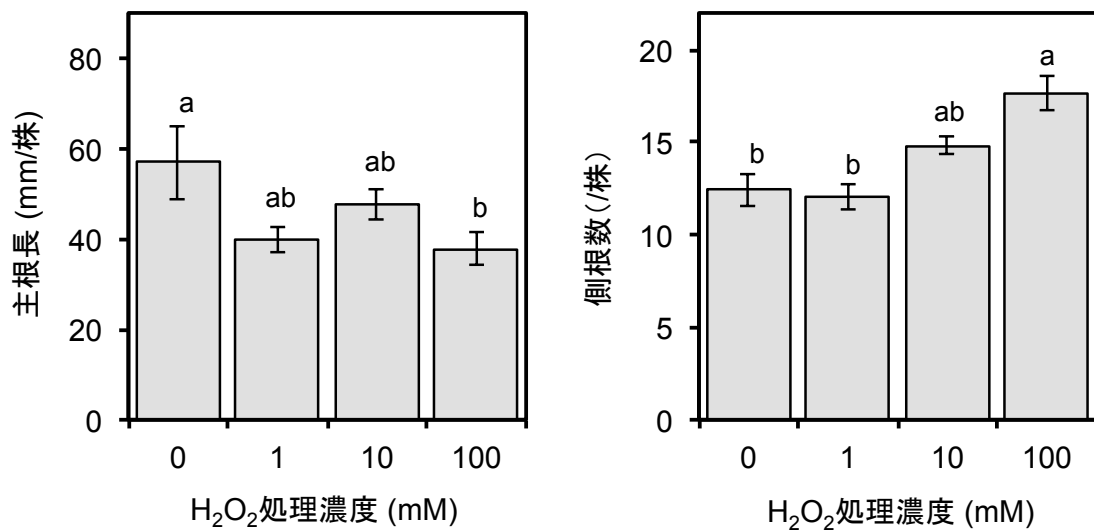


図12 H₂O₂葉面添加処理7日後の主根長および側根形成数

1/2MS培地で栽培した5日齢のリーフレタス苗の葉面に、各処理濃度のH₂O₂を20 μ L添加した7日後の主根長および側根形成数。図中のバーは標準誤差 (n=20) を、異なる英小文字はTukey-Kramer法により5%で有意差を示す。

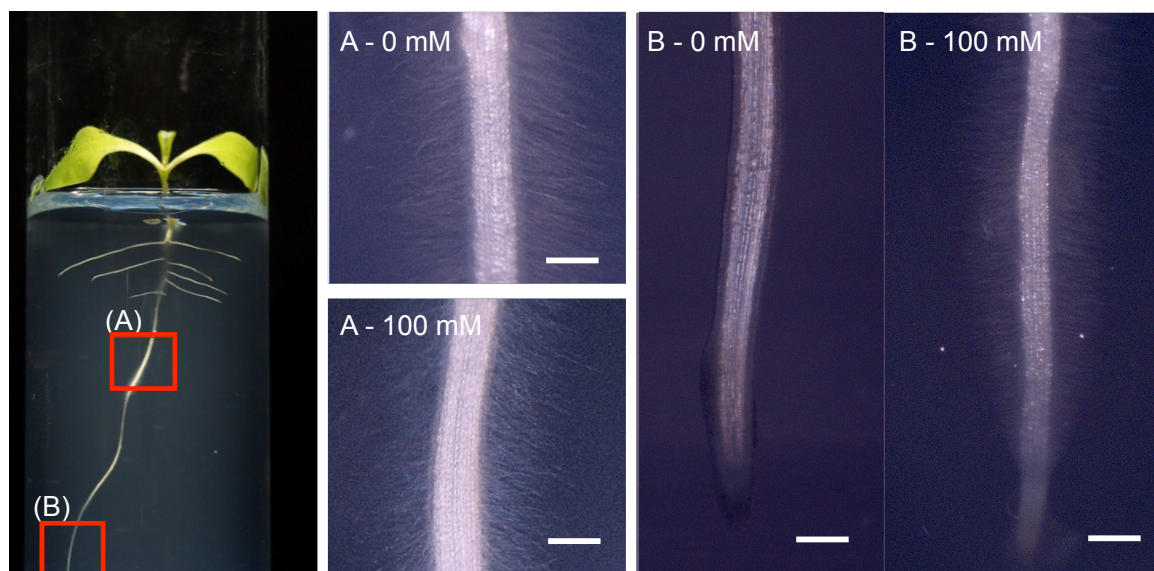


図13 H₂O₂葉面添付処理7日後における根毛の形成

(A) 5日齢リーフレタス苗の子葉に0および100 mM-H₂O₂を20 μ L添加した7日後のリーフレタス苗の分化領域となる部位。図中のバーは0.4 mmであることを示す。

(B) 5日齢リーフレタス苗の子葉に0および100 mM-H₂O₂を20 μ L添加した7日後のリーフレタス苗のメリステム領域を含む根端部位。図中のバーは0.4 mmであることを示す。

表3 H₂O₂葉面添付処理7日後における根の形態形成 (n=20)

H ₂ O ₂ 処理濃度 (mM)	主根長(mm)	側根数	根毛長 (μ m/分化領域)	根毛長 (μ m/根端領域)
0 mM	56.9 \pm 8.1 ^a	12.4 \pm 0.8 ^b	415.8 \pm 14.5	*n.f.
1 mM	39.9 \pm 2.9 ^{ab}	12.1 \pm 0.7 ^b	391.9 \pm 19.5	*n.f.
10 mM	47.7 \pm 3.5 ^{ab}	14.9 \pm 0.5 ^{ab}	413.9 \pm 20.0	*n.f.
100 mM	37.6 \pm 3.5 ^b	17.7 \pm 1.0 ^a	376.1 \pm 14.6	290.7 \pm 13.8

*根端領域において0, 1, 10 mM処理区では、根毛の形成が認められなかった (Non-formation : n.f.)。平均 \pm 標準誤差。異なる英小文字はTukey法により5%で有意差を示す。

区で有意に短くなった。それに対して、分枝根端密度（側根形成数）は処理 10 日後と同様に 0 mM H_2O_2 処理区に比べて 0.1 mM H_2O_2 処理区で有意に増加した。総根長が 0 mM H_2O_2 処理区に比べて 0.1 mM H_2O_2 処理区で有意に増加した。

水耕栽培処理試験において、0.1 mM H_2O_2 処理区ではウレタンマット培地から出根している分枝根の根毛形成率が 0 mM H_2O_2 処理区よりも高くなっているように観察された。根毛形成ををより明確に見るために、栽培スケールを落として再試験を行った。1/2MS 培地で栽培した 5 日齢のリーフレタス苗の葉面に、各処理濃度の H_2O_2 を 20 μL 滴下し、さらに 10 日間栽培を行った。 H_2O_2 処理を行う器官や苗齢が異なれば、応答が変化してしまう。そこで、0.1 mM H_2O_2 処理区で認められた主根長の伸長抑制および側根形成数の増加が認められる処理濃度の探索を行い、その結果を図 12 に示す。100 mM H_2O_2 処理区は、0 mM H_2O_2 処理区に比べて有意に主根長が抑制され、側根形成数が増加した。

根毛形成密度および根毛長に各 H_2O_2 処理区間で、有意差は認められなかったが、形成領域に差異が認められた（図 13 および表 3）。細胞伸長領域においては、全処理区で根毛形成が認められたが、根端領域においては 100 mM H_2O_2 処理区のみで根毛の形成が認められた。

第五項 植物の炭素同化および養水分吸収

植物個体中の炭素および窒素含有量を図 14 に示す。葉内炭素含有量は、処理 10 および 20 日後において 0 mM H_2O_2 処理区に対して、0.1 mM H_2O_2 処理区で有意に増加した。根内炭素含有量は、処理 10 日後において 0 mM H_2O_2 処理区に対して、1.0 mM H_2O_2 処理区で有意に増加し、処理 20 日後において 0 mM H_2O_2 処理区に対して、0.1 mM- H_2O_2 処理区で有意に増加した。葉内窒素含有量は、有意な差異は認められないものの、処理 10 日後において 0 mM H_2O_2 処理区に対して、0.1 mM H_2O_2 処理区で増加する傾向を示し、1.0 mM H_2O_2 処理区で低くなる傾向を示した。一方で処理 20 日後および根内窒素含有量に有意な差異は認められなかった。

第二章第三節第四項で、 H_2O_2 処理に伴い根の形態が変化することが認められた。根の形態は養水分吸収に影響をもたらす可能性がある。また、根による養水分吸収が、その必要なエネルギーの大部分を根の呼吸作用によって供給されることから、根の呼吸と関連するパーオキシダーゼの活性を測定し、根の活性および DFT の養液残量の経日変化から植物個体あたりの水分吸収量を評価した（図 15）。根活性は、処理 10 日後において 0 mM H_2O_2 処理区に対して、0.1 mM H_2O_2 処理区で有意に増加した。処理 20 日後

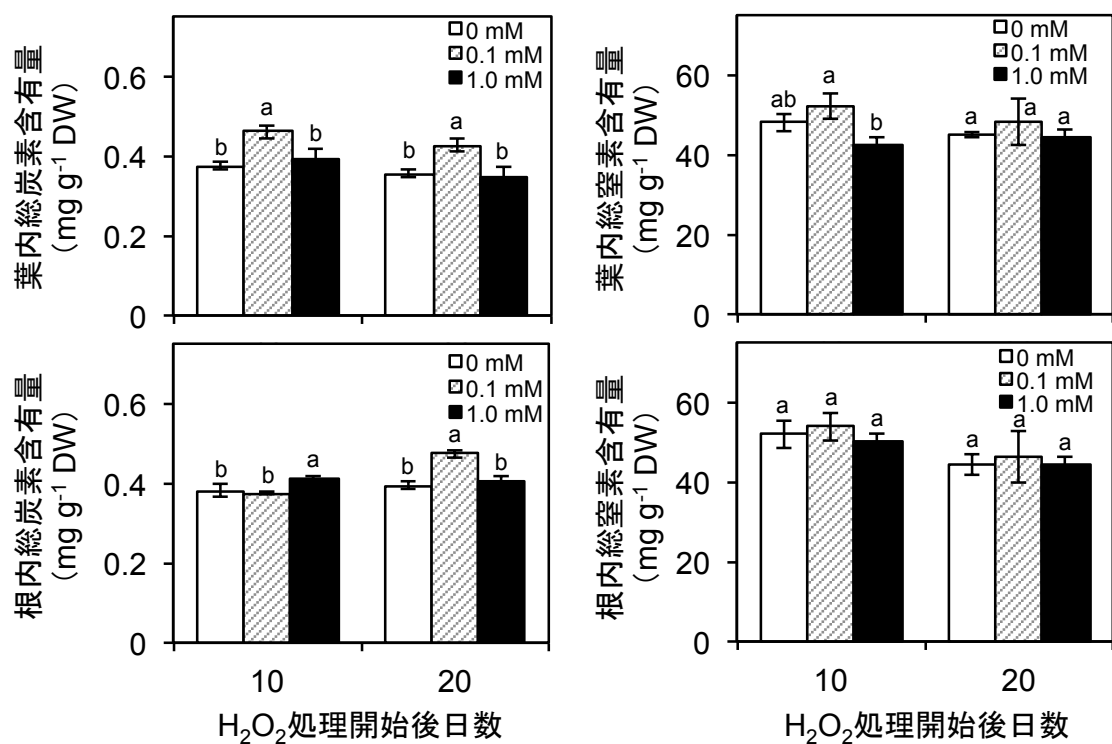


図14 H₂O₂処理10日後および20日後の植物個体中のCおよびN含有量

サンプリングは、0、0.1および1.0 mM H₂O₂処理10、20日後のリーレタスを地上部（葉および莖）と根に分け、一定時間（午前10時から5時間以内）に行った。図中のバーは標準誤差(n=6)を、異なる英小文字はTukey-Kramer法により5%で有意差を示す。

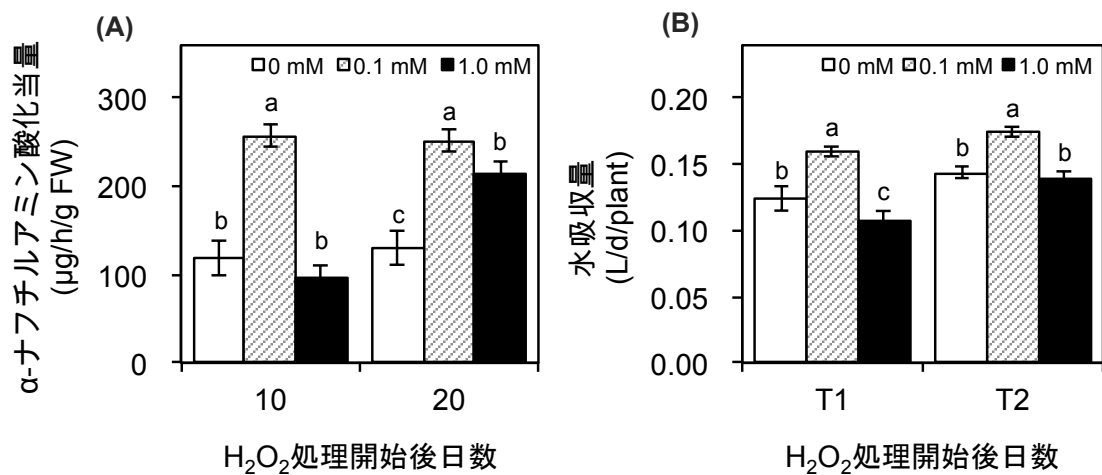


図15 H₂O₂処理後のリーフレタスの根活性および一個体一日あたりの吸水量

(A) 18日齢リーフレタスのH₂O₂処理10、20日後における根活性(α-ナフチルエチレンジアミン相当量)。根に付着したH₂O₂および養液の影響を受けないように蒸留水で3回洗浄した。その後、主根及び側根をまとめて10 mm毎に切断し、ホモジナイズしてサンプルとした。

(B) 18日齢リーフレタスのH₂O₂処理10-15日後(T1)、15-20日後(T2)における一個体一日あたり水分吸収量。栽培ポットの養液残液量(L)をメスシリンダーで毎日17時に測定し、日変化から一株当たりの推定水分吸収量を算出した。

図中のバーは標準誤差(n=6)を、異なる英小文字はTukey-Kramer法により5%で有意差を示す。

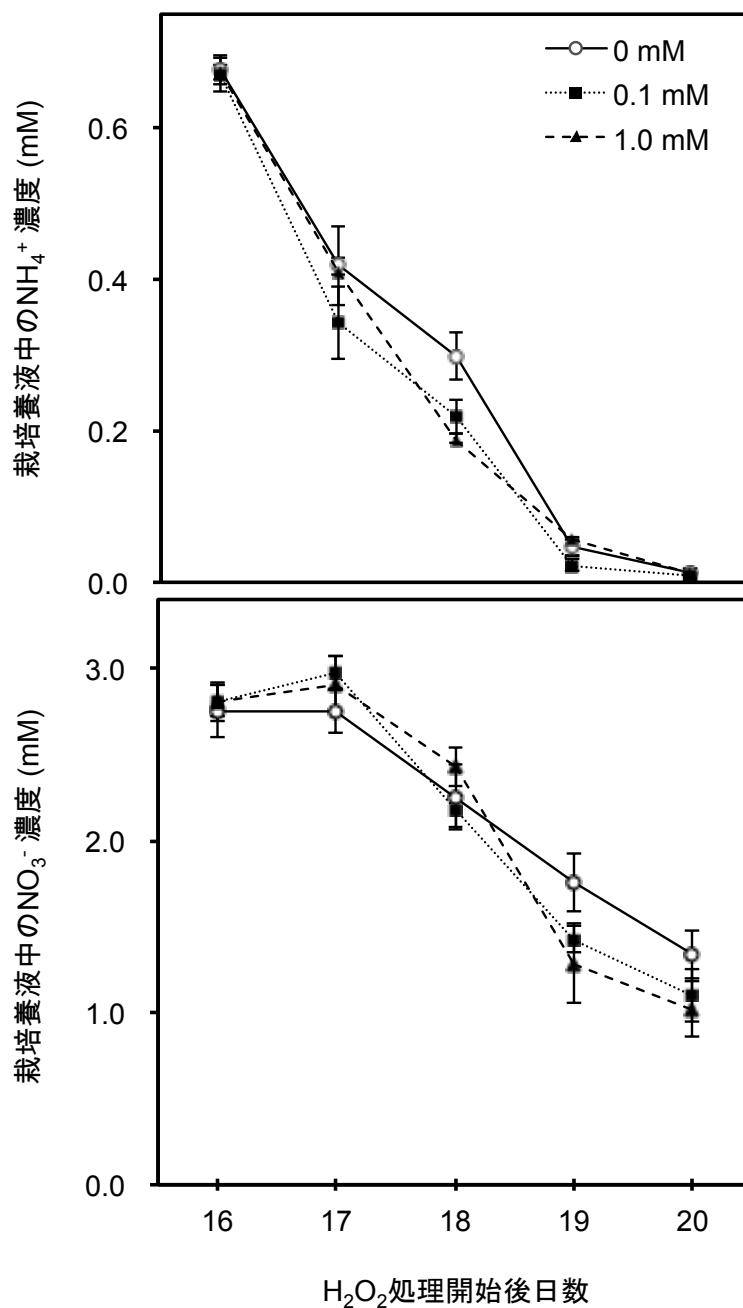


図16 H_2O_2 処理開始16日後から20日後の栽培液中の NH_4^+ および NO_3^- 濃度

栽培液のサンプリングは、 H_2O_2 処理16-20日後の期間、毎日規定時間(17時)に1処理区6ポットずつ採取した。ポット内の養液を十分に攪拌後5 mL採取した。図中のバーは標準誤差(n=6)を示す。

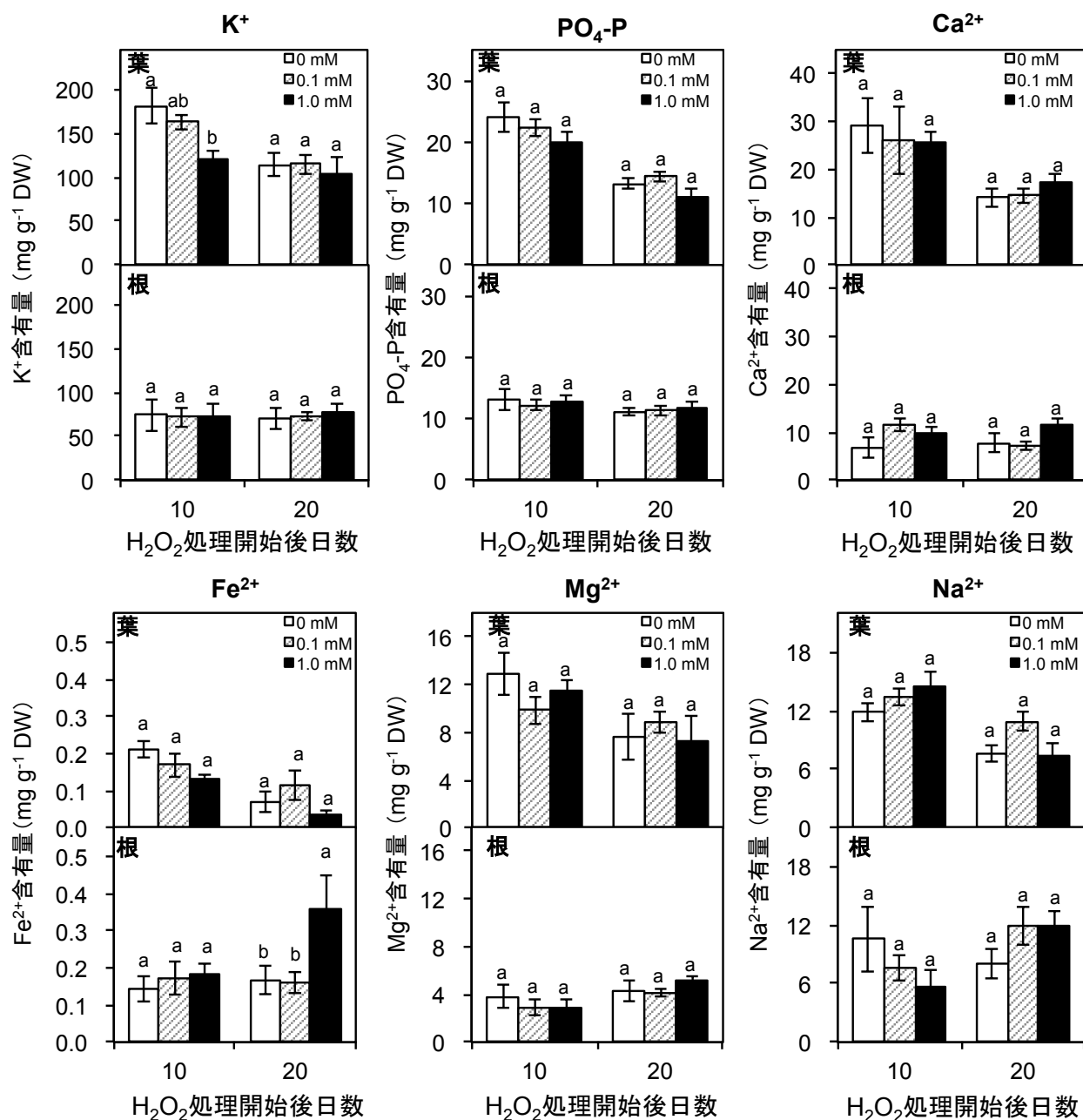


図17 H₂O₂処理10日後および20日後の植物個体中の無機イオンの含有量

サンプリングは、0、0.1および1.0 mM H₂O₂処理10、20日後のリータスを地上部(葉および茎)と根に分け、一定時間(午前10から5時間以内)に行った。図中のバーは標準誤差(n=6)を、異なる英小文字はTukey-Kramer法により5%で有意差を示す。

において、0 mM H₂O₂ 処理区に対して 0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加し、0.1 mM H₂O₂ 処理区で最大となった。植物一個体あたりの水分吸収量は、H₂O₂ 処理 10 日後において 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 処理区で有意に低くなった。H₂O₂ 処理 20 日後において 0 mM H₂O₂ 処理区に対して、0.1 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加した。

栽培液中の NH₄⁺ および NO₃⁻ 濃度は、0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で 0 mM H₂O₂ 処理区よりも H₂O₂ 処理 19-20 日後に減少している傾向を示すものの、有意な変化は認められなかった (図 16)。また、植物内のカリウム、リン酸、その他微量元素の内生量を葉および根に分け、H₂O₂ 処理 10 日後および 20 日後に測定した (図 17)。処理 10 日後において、葉内 K⁺ 含有量が処理濃度依存的に低くなる傾向を示し、0 mM H₂O₂ 処理区に対して 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に低下した。処理 20 日後において、根内 Fe²⁺ 含有量が 0 mM H₂O₂ 処理区に対して 1.0 mM-H₂O₂ 処理区で有意に増加した。他イオンに関しては処理区間で有意な変化は認められなかった。

第四節 考察

本章では外因性 H₂O₂ がリーフレタスの成長および形態形成に及ぼす影響に関して、試験を行った。H₂O₂ 処理条件を適正に評価するために、存在量をトレースしやすい水耕液に添加してその影響を評価した。本試験条件では、3.0 mM 以上の H₂O₂ 濃度下では、表皮細胞の破壊や電解質の漏出が確認され、また根部においても細胞破壊が観察され、枯死した (date not shown)。

植物には、ストレス時に発生する ROS 防御系応答があり、抗酸化系が活性することにより順化しようとする (Fryer et al., 2003)。また植物は、それら防御系応答にはエネルギーを消費し、相対的に生育は抑制される傾向を示す (Kitano et al., 2008; Wang et al., 2010)。しかし、その防御系応答性を超えるストレス負荷がかかると枯死してしまう (Pellinen et al., 1999)。本試験の結果からリーフレタス ‘Red fire’ においては、3.0 mM までがその防御応答性の限界値であることが示唆された。1.0 および 3.0 mM H₂O₂ 処理区では、0 mM-H₂O₂ 処理区と比べて地上部重量、総葉面積、根乾物重が有意に減少した (図 5)。これらは、1.0 mM 以上の H₂O₂ 濃度処理はリーフレタス ‘Red fire’ において酸化ストレスとなることを示し、同時に、生育量が増加した 0.03 および 0.1 mM-H₂O₂ 処理区では酸化ストレス応答が引き起こされていない可能性を示唆している。

植物の成長量を増加させるためには、生育に必要な基質の同化量や吸収量の増加、利用効率の向上、防御応答に利用される代謝物合成へのバイオマス分配の低下 (ストレス回避) が挙げられる。それらの応答の中で主エネルギー生産を担うのが光合成である。

植物にとって光は光合成のエネルギー源である。しかし、第二章第一節 1 でも述べたように過剰な光はストレスとなり、光阻害を引き起こす。これらの既往研究が示すように、葉内 ROS 濃度が増加することで光合成効率が上昇することは考えにくい。しかし、本研究での成長解析の結果、RGR は NAR に起因する結果が得られた（図 7）。これは葉の広がりに伴う受光面積の拡大ではなく、単位葉面積当たりの炭素同化量もしくは光利用効率が向上している可能性を示唆している。

比葉重が H_2O_2 処理濃度依存的に増加する傾向が図 5 で認められ、根域への H_2O_2 処理が葉厚へ影響を与える可能性が示された。柵状組織は、強光や低温などの環境ストレスにさらされることで形態を変化させ、光利用効率等を向上させるために葉厚を厚くすることも報告されている（Pino *et al.*, 2008; Dumlao *et al.*, 2012）。本試験において、葉身内部構造を観察したところ、葉厚は H_2O_2 処理濃度依存的に増加する傾向を示したが、有意な差異は認められなかった。しかし柵状組織の形態および葉身内部の細胞密度には変化が認められた（図 8、9 および表 1、2）。柵状組織は、0.1 および 1.0 mM H_2O_2 試験区で細胞幅が抑制されることによって縦横比が増加する形態を示した。

第二章第一節 2 で述べたように、柵状組織の発達に関与するとされる転写因子 *ZAT10*、*ZAT12* は ROS によって発現が上昇することが知られている（Davletova *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007）。また、 H_2O_2 処理が柵状組織の発達に関わるのかどうかを解析し、柵状組織の発達を誘導する長距離シグナル伝達機能の分子レベルの解明を目指した研究では、 H_2O_2 処理により柵状組織の発達が見られた。シロイヌナズナの下位成熟葉のみの処理や、上位未成熟葉のみに H_2O_2 処理した場合にも、展開した葉で柵状細胞が未処理葉に比べ縦が長く、横が短くなり縦長形態を示した（Munekage *et al.*, 2015）。これらの既往研究から、根域に付与した H_2O_2 が長距離シグナル伝達され、地上部のレドックス反応に影響を与え、柵状組織の形態変化を誘導したことが示唆された。

バイオマスなど生育量が増加した 0.1 mM H_2O_2 試験区では、処理 10 および 20 日後において 0 mM H_2O_2 試験区に対して炭素含有量が有意に増加していた（図 14）。大気中の CO_2 は大気中から気孔を通過して細胞間隙に拡散し、細胞壁の水に溶解、細胞膜、葉緑体包膜を通過して葉緑体ストロマに達して Rubisco によって固定される。葉厚や柵状組織や海綿状組織が薄くなってしまうと葉緑体の細胞接触面積は、薄い葉で顕著に小さくなってしまう。葉緑体接触面積当たりの細胞間隙から葉緑体内への CO_2 コンダクタンスが同じであると仮定した時、ストロマへの CO_2 流入濃度は接地面積が小さいほど著しく低下する（Terashima *et al.*, 2006）。単位重量あたりの Chl 含有量も各処理区間での差異が見られなかったことから（図 10）、葉身内部構造の変化が光利用効率および炭素同化効率を向上させた可能性を示した。

経時的生育変化を追った結果、地上部新鮮重や乾物重の増加は 15 日後以降に確認され、それより早い段階で根の乾物中に変化が出ていることが認められた (図 6)。0.1 mM H_2O_2 処理 10 日後において、根の形態は 0 mM H_2O_2 処理に比べ側根形成数が大となった (図 11)。根端領域は、分化領域に比べて水分吸収量やイオン吸収率が高いこと、細根や根毛などの分化組織において水分吸収率が根系内で高いと報告されている。さらに、0.1 mM H_2O_2 処理区は 0 mM H_2O_2 処理区に比べて根活性が増加し、一日あたりの一個体の水分吸収量も増加していた (図 15)。

ROS は、根の形態形成に極めて重要な役割を持つことが近年報告されている (Chen and Schopfer, 1999; Liskay *et al.*, 2004)。過酸化水素は、 OH^\cdot の前駆体であり、 OH^\cdot は根毛形成に関与していることが示唆されている (Foreman *et al.*, 2003)。根においては先端近く細胞伸長領域に分布し、細胞分化から細胞伸長への移行に関わることが示唆されている (Dunand *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Tsukagoshi *et al.*, 2010)。本試験においても、外因性 H_2O_2 がこれら根の形態形成のシグナルとなり分化を誘導したと考えられる。

根圏におけるイオン欠乏のセンシングに ROS が非常に重要な役割を果たすことが既往の研究から示唆されている (Shin and Schachtman, 2004)。ROS は根の異なった領域に蓄積され、そこではイオン取込とトランスロケーションが活発に起きている。また、HAK5 等輸送タンパクの発現にも ROS 生産によるエチレン量の増加という応答が必要であり、カリウムと窒素吸収において重要な役割を果たすことが示唆されている (Shin *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2009)。しかし、本試験においてはカリウムやリン含有量に差異は認められず、養液中のイオン動態からも選択的吸収等は引き起こされていないことが認められた (図 16、17)。しかし、養液吸収量が一個体あたりで大きく、バイオマスも増加した上で g 単位あたりの各イオン量に差異がないことは、取り込んだイオン量はバイオマスが高い 0.1 mM H_2O_2 処理区で最も大となったことを示している。

また、 H_2O_2 を付与することで、水耕液中に褐色の析出物 (酸化鉄および酸化マンガン等) が少量発生するが、それに伴う植物個体中の金属イオンの減少は認められず、栽培液として設定されている園試処方がリーフレタスを栽培する上で十分量の無機栄養素が供給されていることを示している。

根域に処理された低濃度 (0.03-0.1 mM H_2O_2) H_2O_2 は、葉内柵状組織の形態や葉身内部の細胞密度の増加を促し、それに伴い光利用効率を向上させている可能性が示された。さらに、根の側根等の形態形成を誘導し、根活性も増加させることにより養水分吸収量を向上させていた。これらの低濃度 H_2O_2 に伴う形態変化誘導が成長促進を誘導したのではないかと考えられる。

第三章 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

第一節 緒論

2-1. 環境ストレス応答と ROS シグナルおよびレドックス制御機構

ストレスによって生成される ROS の除去に、抗酸化物質・抗酸化酵素等の細胞内の酸化還元反応が関わっている。第一章第三節でも述べたようにチラコイド膜で O_2 が光還元され、 H_2O_2 が生成される。この H_2O_2 はストロマの CO_2 固定に関与する酵素を失活させてしまう。そのため活性酸素を速やかに消去させる機構として water-water サイクルや AsA/GSH 回路を有している (Asada, 2000)。

Water-water サイクルでは、光化学 II で H_2O から生じた $4e^-$ が光化学系 I を経て、その半分の $2e^-$ が O_2 の還元による O_2^- 生成に、残りの $2e^-$ が O_2^- の不均化反応で生じた H_2O_2 還元で使用される。AsA を持たないシアノバクテリアは、AsA の代わりにペルオキシレドキシシンが H_2O_2 を還元し、酸化されたペルオキシレドキシシンはチオレドキシシン、フェレドキシシンを介し H_2O からの電子により還元される。

Water-water サイクルが機能するためには葉緑体構造が保持されている必要とされており、ROS 消去に関与する酵素群が存在していても、構造が破壊されている場合には H_2O_2 を消去できないことが示されている (Asada and Badger, 1984)。CuZn-SOD は光化学系 I 反応中心が存在しているストロマチラコイド膜の表面に付いている (Ogawa *et al.*, 1997)。この CuZn-SOD をアンチセンス法で減少させると光阻害が大きくなる。効果的に ROS を消去するためには、消去に関与する酵素のミクロな局在が非常に重要であることがわかっている。

レドックスの制御機構が種々細胞応答の遺伝子発現に重要な役割を果たしていることが近年の研究でわかってきている。酸化ストレス下における各オルガネラで生成した種々の抗酸化酵素のアンチセンス発現抑制株や破壊株を用いた発現遺伝子の包括的解析が行われており、それらの結果および生体膜透過性から H_2O_2 がレドックスシグナル伝達物質であると考えられている (Pnueli *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2005)。酸化ストレス条件下において、葉緑体内の AsA のレドックス状態の変化に伴う葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) の迅速な失活が認められる。この葉緑体型 APX の失活は、葉緑体からの H_2O_2 の拡散による積極的なレドックスシグナルの発信であると考えられる。事実、各オルガネラ-核間を繋ぐ細胞質に局在する細胞質型 APX (cAPX) は、さまざまな酸化ストレスに対して迅速に誘導される (Yoshimura *et al.*, 2000; Yabuta *et al.*, 2004)。また、cAPX の発現抑制によって、植物細胞内の H_2O_2 濃度の増加およびそれに伴うさまざまな遺伝子の発現誘導/抑制が認められている (Pnueli *et al.*,

2003; Ishikawa *et al.*, 2005)。

2-2. 目的

ROS は、植物成長における基質獲得器官として重要な葉や根の細胞分裂及び細胞分化応答の制御に密接に関係するシグナル因子であることが示唆されており、第二章においても処理濃度間で生理応答の差異が認められた。序論で論じたようにストレス応答には閾値があり、品種間でその範囲も応答性も異なるであろうことが第二章第一節 1-1. からも示唆される。

そこで、本章では異なる生理応答を引き起こしている H_2O_2 処理区間で植物内の ROS 挙動やレドックス応答の変化を H_2O_2 および O_2^- 、活性酸素分解酵素である CAT、APX 活性および抗酸化物質である AsA、GSH を分析することにより、評価し、リーフレタにおける酸化ストレスの閾値し評価を試みた。

第二節 方法

1. 抗酸化物質の定量

1-1. 栽培方法およびサンプリング

供試植物、栽培方法、 H_2O_2 処理は、第二章、第二節、1-2 に記した方法に準じた。 H_2O_2 処理は、0、0.05、0.1、0.5 および 1.0 mM 処理区を設定した。サンプリングは、葉および根に分け行った。処理溶液から離脱後新鮮重を測定し、サンプルを 5 分以内に液体窒素で凍結し-35°C で保存し、6 週間以内に測定した。

1-2. アスコルビン酸

アスコルビン酸の測定は、Roe and Kuether (1943) の変法で分析を行った。凍結試料 1 g を乳鉢で粉砕した。粉砕後、9.0 mL の 5%メタリン酸を添加し暗所 4°C 下で一晩抽出後、遠心分離 3,000 rpm×15 min を行い、上澄みを検液とした。検液 0.5 mL にインドフェノール 50 μL 、1 %塩化スズ (II) 0.5 mL、ヒドラジン 0.25 mL を加えた後、50 °C で 1.5 時間加温した。氷冷し、85%硫酸 1.25 mL を加え、30 分室温で放置した。分光光度計で 540 nm の吸光度 (UV-1800, Shimazu Co., Ltd, Japan) を測定した。

1-3. アントシアニン

凍結試料 1 g を乳鉢で粉砕した。1 %塩酸-メタノールを 9.0 mL 加え、暗所 4°C 下で一晩抽出後、遠心分離 3,000 rpm×15 min を行い、上澄みを分光光度計で 530 nm の吸光度 (UV-1800, Shimazu Co., Ltd, Japan) を測定した。アントシアニンは複数種存在するが、標準試料には赤系リーフレタスに多く含まれるシアニジン-3-グルコシドを用いた。

1-4. グルタチオン

凍結試料を乳鉢で粉砕し、サンプルの 10 倍量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を添加しボルテックスで攪拌した。遠心分離 3,000 rpm×15 min を行い、上澄みをサンプル検液とした。検液をグルタチオン測定キット (Japan institute for the control of aging, Nikken seil Co, Ltd) を用いて、還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) を測定した。マイクロプレートに、キャリブレーター/サンプル検液 50 μL をウェルに分注した。全てのウェルに DTNB 試薬を 50 μL 添加した。室温 20°C でインキュベートを行い、NADPH 試薬を全てのウェルに 50 μL 分注した。405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000 Lab, Corona electric Co., Ltd., Japan) を用いて 20 秒間隔、3 分間測定した。吸光度変化率 ($\Delta A_{405 \text{ nm}}/\text{min}$) を算出し、検量線から濃度を求めた。

2. 活性酸素および抗酸化酵素活性の経時変化

2-1. サンプルリング

供試植物、栽培方法、 H_2O_2 処理は、第二章、第二節、1-2 に記した方法に準じた。 H_2O_2 処理は、0、0.05、0.1、0.5 および 1.0 mM 処理区を設定した。長期的応答を知るために H_2O_2 処理 1 日目、5、10 日後の経日変化サンプルリングを行った。また、短時間応答を調べるために各日で H_2O_2 を養液へ添加後 -1、0 (処理直前)、0 (処理直後 10 以内)、0.5、1、3、6、12、18、24 時間後の経時変化サンプルリングを行った。全葉と根に分けて FW を測定し、液体窒素にて凍結処理をした。すべての処理を処理溶液離脱後から 3 分以内に完結させ、サンプルは -35°C 保存後 1 ヶ月以内に分析した。

2-2. H_2O_2 の定量

H_2O_2 の定量は、Willekens ら (1997) の方法により行った。0.1 g FW サンプルを液体窒素で磨砕後、0.2 M 過塩素酸を 2 mL 添加しボルテックスで攪拌した。ホモジェネートを遠心分離 (4°C 、3,000 rpm \times 20 min) し、その上澄みに 4M 水酸化カリウムを加えて pH 6.0 に調製後、AG1-X8 カラム (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で濾過した。試料は、蒸留水 2 mL で溶出し、これを H_2O_2 検液とした。 H_2O_2 検液 800 μL に反応溶液 400 μL (1 mM ABTS : 2,2'-azino-di- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, 25 mM リン酸緩衝液 (pH 4.4)) および 400 μL 蒸留水、0.25 U ペルオキシダーゼを添加し、分光光度計で 412 nm の吸光度 (UV-1800, Shimazu Co., Ltd, Japan) を測定した。

2-3. 粗酵素液の調製

使用器具および緩衝液は予め低温 ($0-4^\circ\text{C}$) にし、以下、全ての操作は低温 (4°C 以下) で行った。試料 5.0 g を 30 mM メルカプトエタノールを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) 15 mL とともに乳鉢で磨砕した。磨砕液を 2 重のナイロンガーゼでろ過した後、ろ液を遠心分離 (4°C 、14,000 rpm \times 20 min) して、上清を得た。上清 2.5 mL を 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (1.5 \times 5.5 cm) に通し、10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 3.5 mL で 280 nm に吸収をもつタンパク質画分を溶出し、粗酵素液とした。

2-4. CAT 活性

CAT 活性の測定は Aebi (1984) の方法に準じた。50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) 300 μL と粗酵素液 300 μL を混ぜ、30 mM 過酸化水素水 300 μL を加え、反応させた (25°C)。過酸化水素に由来する 240 nm の吸光度の減少を追跡し、1 分間当たりの吸光度の減少

量を算出し、240 nm における過酸化水素の分子吸光係数 ($1\mu\text{mol/mL}=0.036$) より酵素活性 ($\mu\text{mol/min/g}$) を求めた。

2-5. APX 活性

APX 活性の測定は中野ら (1988) の方法に準じた。0.2 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) 250 μl 、10 mM アスコルビン酸溶液 17 μL に粗酵素液と蒸留水を合わせて 723 μl を加え、最後に 10 mM 過酸化水素水 10 μl を入れ全量 1.0 ml で反応させた (25°C)。アスコルビン酸に由来する 265 nm の吸光度の減少を追跡し、1 分間当たりの吸光度の減少を算出し、酵素活性 ($\mu\text{mol/min/g}$) を求めた。

3. 活性酸素の染色

3-1. 葉内 O_2^- 存在量

NBT は O_2^- により還元され、青色で不溶性のホルマザンとなり、組織に沈着する。本試験では、Fryer et al. (2002) の変法を用いて行った。測定サンプルを NBT 染色液 (2 mM NBT + 20 mM MES1 (pH 6.1)) に浸し、85 MPa で 20 分間のインフィルトレーションを行った。その後、蒸留水で洗浄し反応を停止させた。90% EtOH に浸し、80°C で 15 分間脱染処理 (クロロフィルの除去) を行った。その後、蒸留水で洗浄し、観察し撮影画像を photoshop CC を用いて画像解析し、染色強度を算出した。

4. マロンジアルデヒド (MDA)

MDA は Heath and Packer (1968) の方法に準じて、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 4 mL で摩砕抽出し、2 層ガーゼでろ過して 3,000 rpm \times 20 min 遠心分離した。上清 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 °C で 15 分インキュベートし、再遠心後、上清を分光光度計で 532 nm と 600 nm の吸光度 (UV-1800, Shimadzu Co., Ltd, Japan) を測定し、吸光度の差から含有量を算出した。

5. 最大光合成活性 (F_v/F_m)

測定には、PAM2100 (Portable Chlorophyll Fluorometer, Heinz Walz GmbH) を用いた。暗室に測定株を移動し、30 分間暗処理を行い、青色 LED を励起光として測定を行った。葉位は最大展開葉を用いた。

第三節 結果

第一項 ストレス応答

生育促進が見られた 0.1 mM H₂O₂ 処理区と生育抑制が認められた 1.0 mM 処理区において、ストレス強度間での生理応答の差異が認められた。H₂O₂ 処理に対するストレス指標として処理開始前期のステージにおいて細胞質の脂質酸化指標となるマロンジアルデヒド (MDA) および LI-6400 を用いて、最大光合成活性 (Fv/Fm) を測定し、処理後期に酸化ストレスの防御として抗酸化物質の合成が行われているか評価するためにアスコルビン酸 (AsA) およびアントシアニン含有量を測定した (図 18、19)。

H₂O₂ 処理 1 日目において、MDA 含有量は各処理区間において有意な差異は認められなかった。しかし、処理 5 日後において、MDA 含有量が処理濃度依存的に高くなる傾向を示し、0 mM H₂O₂ 処理区に対して 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加した。処理 10 日後においては、MDA 含有量は 0 および 0.1 mM H₂O₂ 処理区に対して 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加した。

処理 1 日目において、Fv/Fm は H₂O₂ 処理濃度依存的に有意に低くなり、1.0 mM H₂O₂ 処理区で最も低くなった。一方で生育促進が認められた 0.1 mM H₂O₂ 処理区では、処理後 5 および 10 日後において 0 mM H₂O₂ 処理区との差異は認められなくなったのに対し、生育抑制が認められた 1.0 mM H₂O₂ 処理区では、処理後 5 および 10 日後と継続的に減少していた。

H₂O₂ 処理 20 日後において、AsA 含有量は各処理区間において有意な差異は認められなかった。一方で、アントシアニン含有量は 0 mM H₂O₂ 処理区に対して 0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加した。

第二項 各器官別の ROS および抗酸化酵素の経時変化

植物個体中の H₂O₂ 含有量が本試験条件時にどのような挙動を示すのか、0 mM H₂O₂ 処理個体を分析した。明期 16 時間／暗期 8 時間 (LD) 条件と連続明期 (LL) 条件で試験を行った。葉内 H₂O₂ 含有量は、LD 条件において明期に対して暗期で有意に低くなった。それに対して、LL 条件において葉内 H₂O₂ は約 60-70 nmol g⁻¹FW で一定濃度に維持された (図 20A)。明期と暗期では、光条件の他に温度が 24-26°C から 18-20°C と異なることから温度条件を変更して、栽培試験も行った。LL-26°C 条件で栽培した 18 日齢リーフレタスを LL-26°C 環境下および LL-20°C 環境下にそれぞれ定植し、48 時間後に分析した。葉内 H₂O₂ 含有量は、両処理区間とも約 60 nmol g⁻¹FW で差異は認められなかった (図 20B)。本試験条件下におけるリーフレタスの H₂O₂ 含有量は、光環境に影響を受けていることが示された。

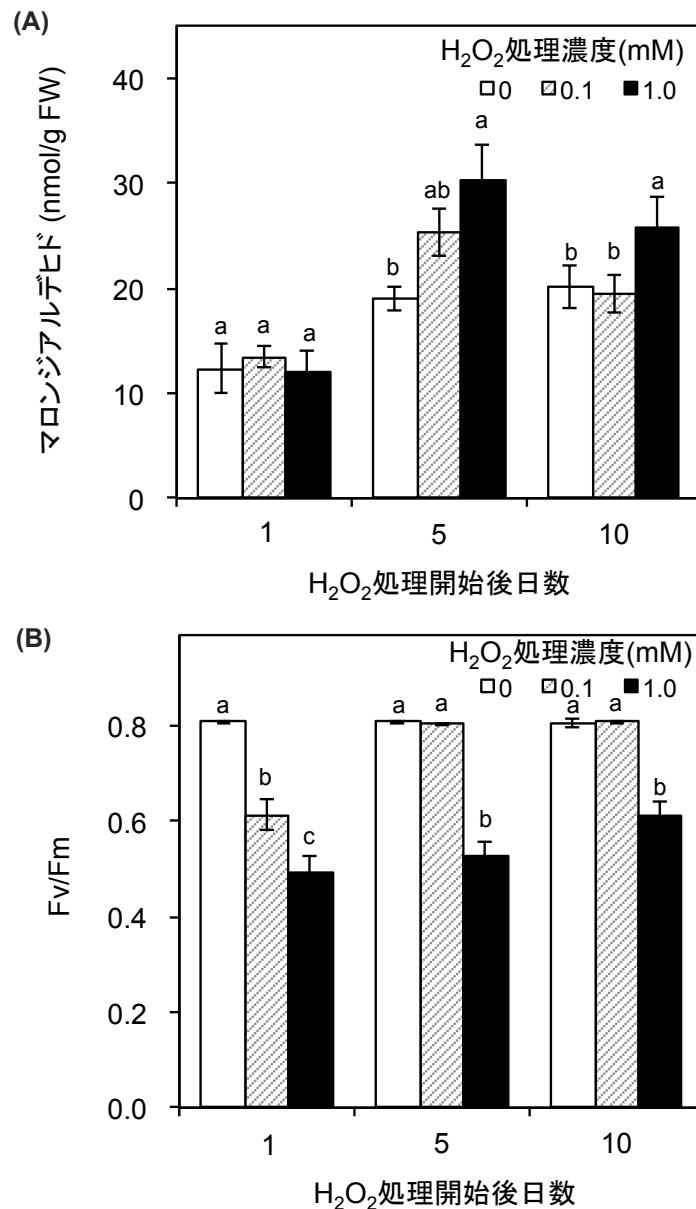


図18 H₂O₂処理1、5、10日目の葉内MDA含量および最大展開葉の最大光合成活性

(A) H₂O₂処理1、5、10日目のマロンジアルデヒド(MDA)含有量。サンプルはH₂O₂処理3時間後に地上部全葉をサンプリングした。

(B) H₂O₂処理1、5、10日目の最大光合成活性(Fv/Fm)。測定はH₂O₂処理3時間後に行い、測定葉位は、測定時の最大展開葉を用いた。

図中のバーは標準誤差(n=10)を、異なる英小文字はTukey-Kramer法により5%で有意差を示す。

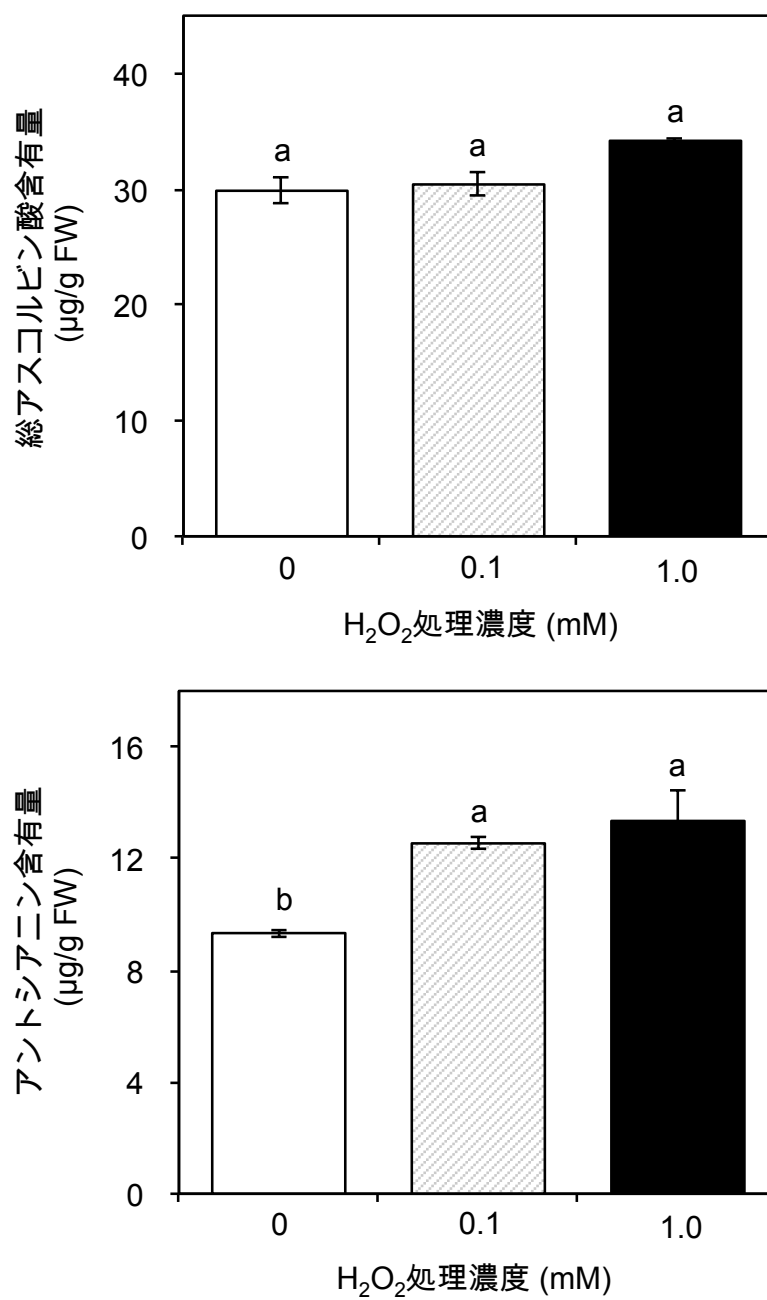


図19 H_2O_2 処理20日後の総アスコルビン酸およびアントシアニン含有量

図中のバーは標準誤差(n=5)を、異なる英小文字はTukey-Kramer法により5%で有意差を示す。

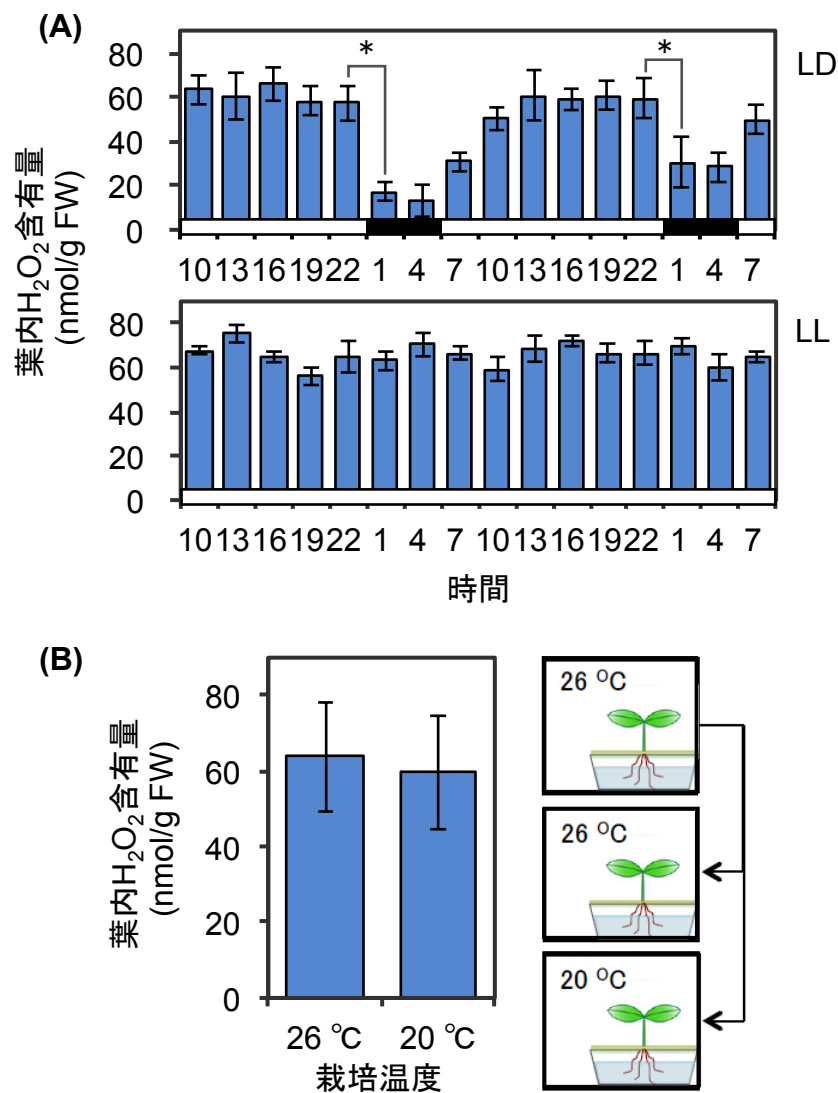


図20 異なる光および温度条件下における葉内 H_2O_2 含有量の経時変化

(A) 18日齢リーフレタス苗の明暗周期(LD)および連続明期(LL)条件下での葉内 H_2O_2 濃度の経時的変化($n=3$)。

(B) 異なる温度で栽培されたリーフレタスの葉内 H_2O_2 濃度($n=10$)。リーフレタス18日齢苗を異なる温度の栽培室に定植後、定植48時間後(10:00)にサンプル。温度環境以外の条件は他試験と同一とし、明期26°Cと明期20°Cの環境区を設定した。

図中のバーは標準偏差を示し、アスタリスクはStudentのt-検定で有意差を示す($p \leq 0.05$)。

H₂O₂ 処理 1 日目における葉内および根内 H₂O₂ 含有量の経時変化を図 21 に示す。葉内 H₂O₂ 含有量は、H₂O₂ 処理後濃度依存的に増加する傾向を示した。0.05 および 0.1 mM H₂O₂ 処理区では処理後 1 時間程度で増加はピークに達し、処理 3-6 時間後には定常状態である 60 nmol g⁻¹FW まで葉内 H₂O₂ 濃度は減少した。一方で 0.5 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区では速やかな減少は見られず、1.0 mM H₂O₂ 処理区では処理後 12 時間、定常状態の約 3-4 倍の濃度で維持された。根内 H₂O₂ 含有量においても、H₂O₂ 処理後濃度依存的に増加する傾向を示した。葉内 H₂O₂ の挙動と同様に 0.05 および 0.1 mM H₂O₂ 処理区では処理 3-6 時間後に速やかな減少が認められ、1.0 mM H₂O₂ 処理区は高濃度で長時間推移した。葉内に比べて根内 H₂O₂ 濃度は、H₂O₂ 含有量の増加率は高いが減少応答は約 3 時間程度早かった。

H₂O₂ 処理 5 および 10 日後における葉内および根内 H₂O₂ 含有量の経時変化を図 22 および図 23 に示す。H₂O₂ 処理 5 および 10 日後においても、植物個体中の H₂O₂ 含有量の経時変化は処理 0 日後と大きな差異は認められなかった。1.0 mM H₂O₂ 処理区において、根内 H₂O₂ 含有量の増加量は 1 日目に比べて 5 および 10 日後では 50 nmol g⁻¹FW 程度減少した。また、0.05 および 0.1 mM H₂O₂ 処理区では、葉内 H₂O₂ 含有量の増加ピークが 0 および 5 日後で処理 1 時間後にあったのに対し、処理 10 日後では葉内 H₂O₂ 含有量の増加ピークは処理 0.5 時間後であった。

H₂O₂ 処理 1 日目における葉内 O₂ 含有量（染色強度）の経時変化を図 24 に示す。葉内 O₂ 含有量は H₂O₂ 処理濃度依存的に増加する傾向を示した。処理 6 時間後に O₂ 含有量最も大となり、その後減少する傾向を示した。

H₂O₂ 処理 1 日目における葉内の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）活性を測定した結果を図 25 に示す。0 mM-H₂O₂ 処理区で、CAT および APX 活性は定常状態を示した。0.1 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区では、処理後 CAT および APX ともに活性が増加し、3 時間程度で活性はピークに達した。0.1 mM H₂O₂ 処理区ではその後速やかに活性は低下し、処理 6 時間で 0 mM H₂O₂ 処理区と同様の活性となった。しかし、1.0 mM H₂O₂ 処理区では CAT および APX ともに活性は継続的に高いレベルで維持されていることが認められた。

第一項 抗酸化物質の酸化還元状態の推移

H₂O₂ 処理 1 日目の葉内グルタチオン含有量および酸化還元比を図 26 および図 27 に示す。葉内の還元型 GSH は、処理 3 時間後において H₂O₂ 処理濃度依存的に減少する傾向を示し、0 mM H₂O₂ 処理区に対して有意に減少した。処理 6 時間以降では各処理区間で有意な差異は認められなかった。葉内の酸化型 GSH は、処理 3 時間後において

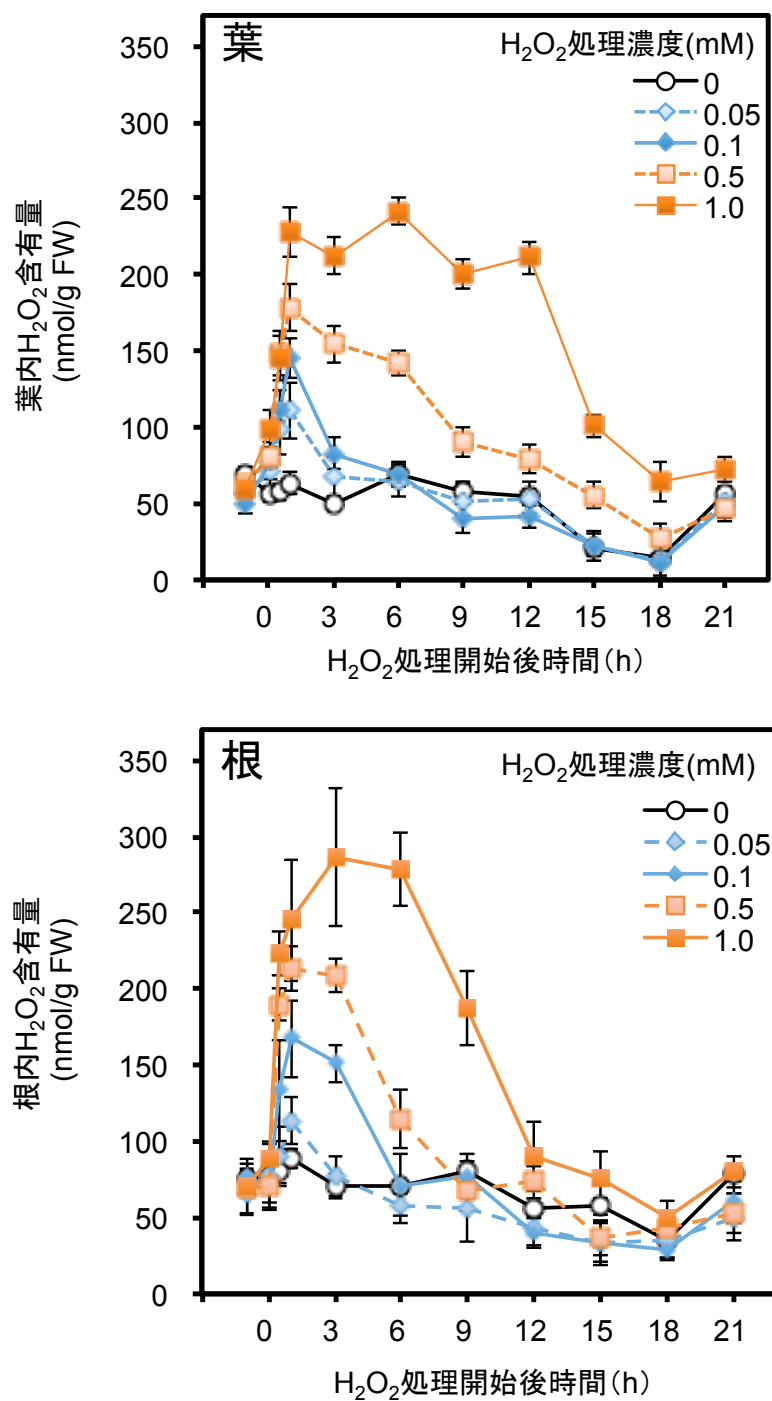


図21 H₂O₂処理後1日目における葉内および根内H₂O₂含有量の経時変化

18日齢リーフレタス苗をH₂O₂含有水耕液に定植し、処理1日目の24時間の挙動を分析した。サンプリングは、H₂O₂含有水耕液から離脱後2分以内に完結させ凍結保存し3週間以内に分析した。図中のバーは標準偏差 (n=3) を示す。

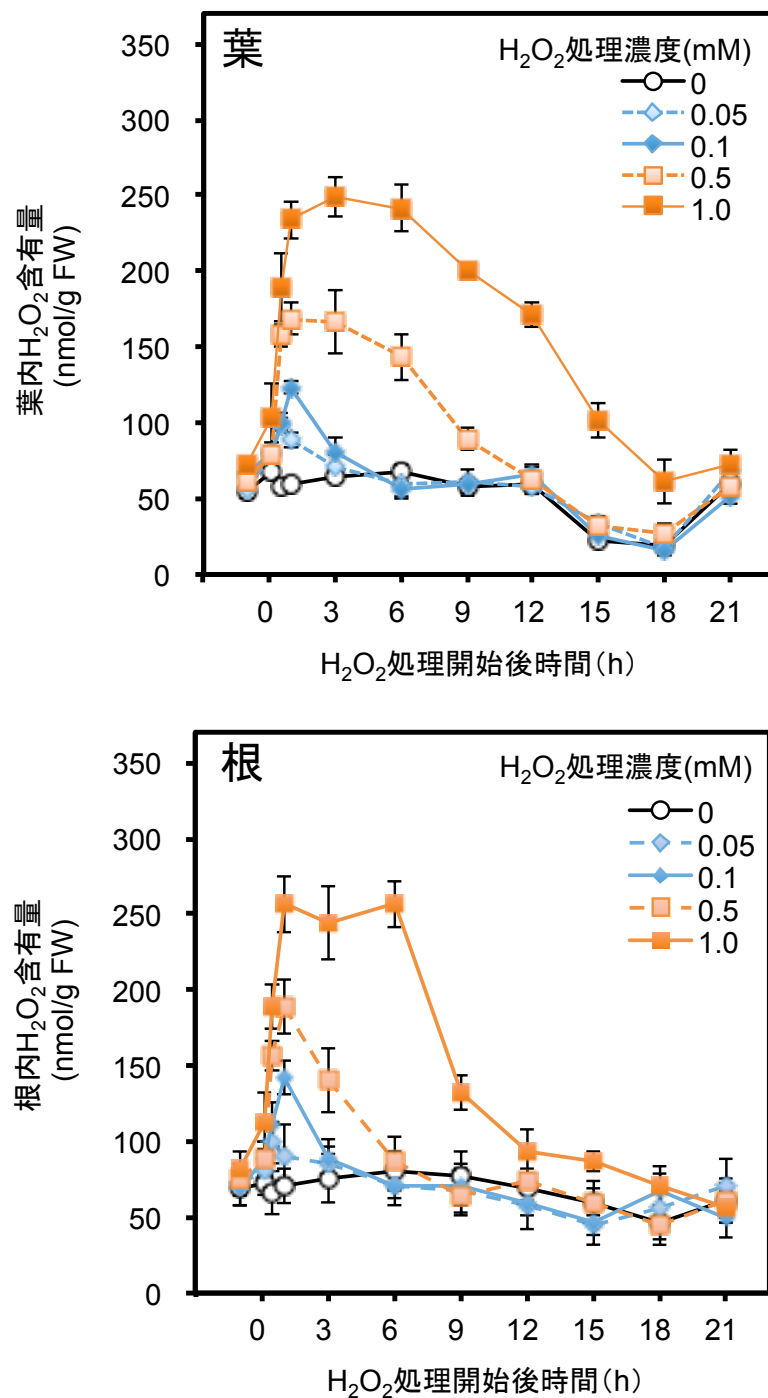


図22 H₂O₂処理後5日後における葉内および根内H₂O₂含有量の経時変化

18日齢リーフレタス苗をH₂O₂含有水耕液に定植し、処理5日後の24時間の挙動を分析した。サンプリングは、H₂O₂含有水耕液から離脱後2分以内に完結させ凍結保存し3週間以内に分析した。図中のバーは標準偏差(n=3)を示す。

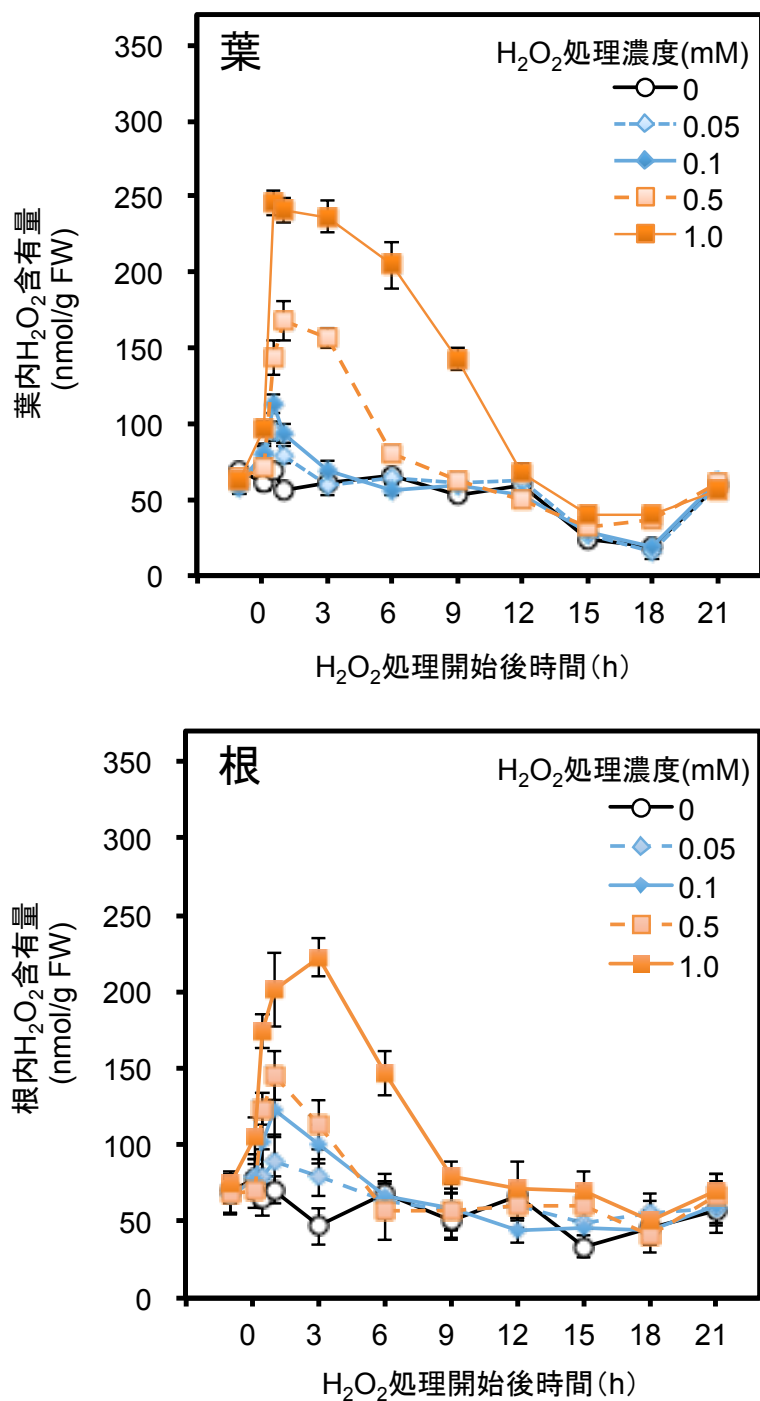


図23 H₂O₂処理後10日後における葉内および根内H₂O₂含有量の経時変化

18日齢リーフレタス苗をH₂O₂含有水耕液に定植し、処理10日後の24時間の挙動を分析した。サンプリングは、H₂O₂含有水耕液から離脱後2分以内に完結させ凍結保存し3週間以内に分析した。図中のバーは標準偏差(n=3)を示す。

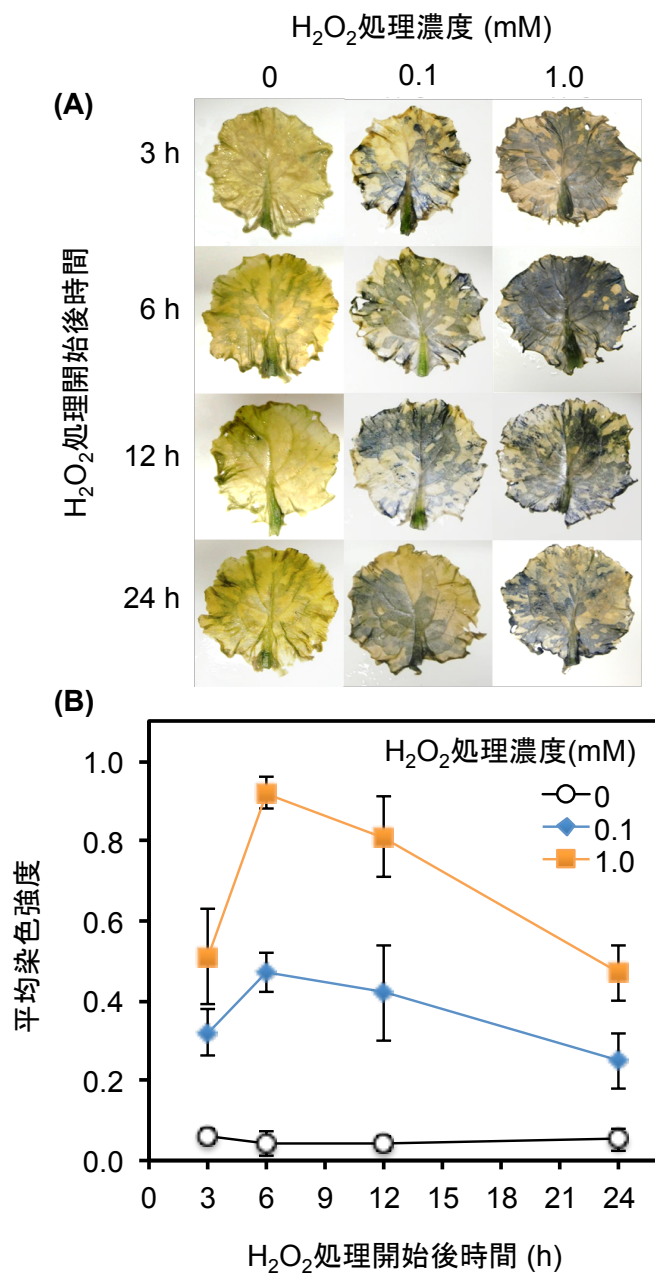


図24 H_2O_2 処理1日目における葉内 O_2^- の経時変化

(A) 18日齢リーフレタスの H_2O_2 処理1日目における葉内 O_2^- のNBT染色。染色葉は、本葉第4葉を用い、染色は真空湿潤85MPa下で20分間行った。

(B) 18日齢リーフレタスの H_2O_2 処理1日目における葉内 O_2^- のNBT染色。撮影画像をphotoshop CCを用いて画像解析し、平均染色強度を算出した。

図中のバーは標準誤差 (n=10) を示す。

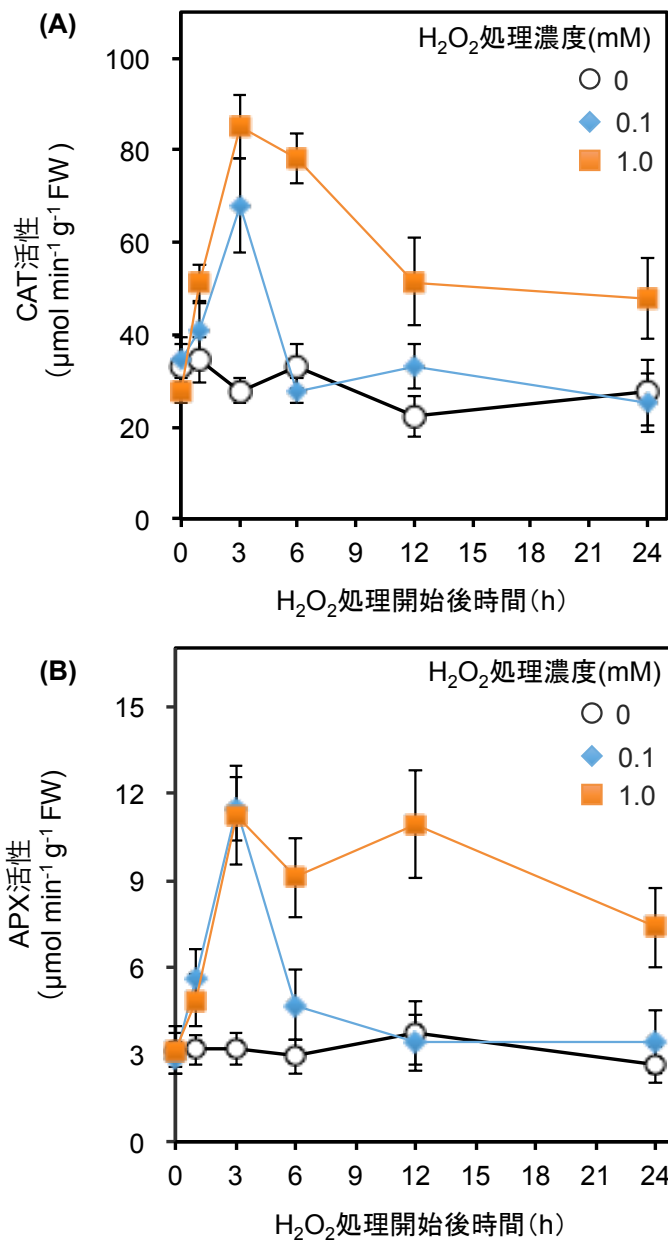


図25 H₂O₂処理1日目の葉内CAT、APX活性の経時変化

(A) 18日齢リーフレタスのH₂O₂処理1日目におけるカタラーゼ(CAT)活性の経時変化。サンプルは、H₂O₂処理0、1、3、6、9、12、24時間後に全葉をサンプリングした。

(B) 18日齢リーフレタスのH₂O₂処理1日目におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)活性の経時変化。サンプルは、H₂O₂処理0、1、3、6、9、12、24時間後に全葉をサンプリングした。

図中のバーは標準誤差(n=5)を示す。

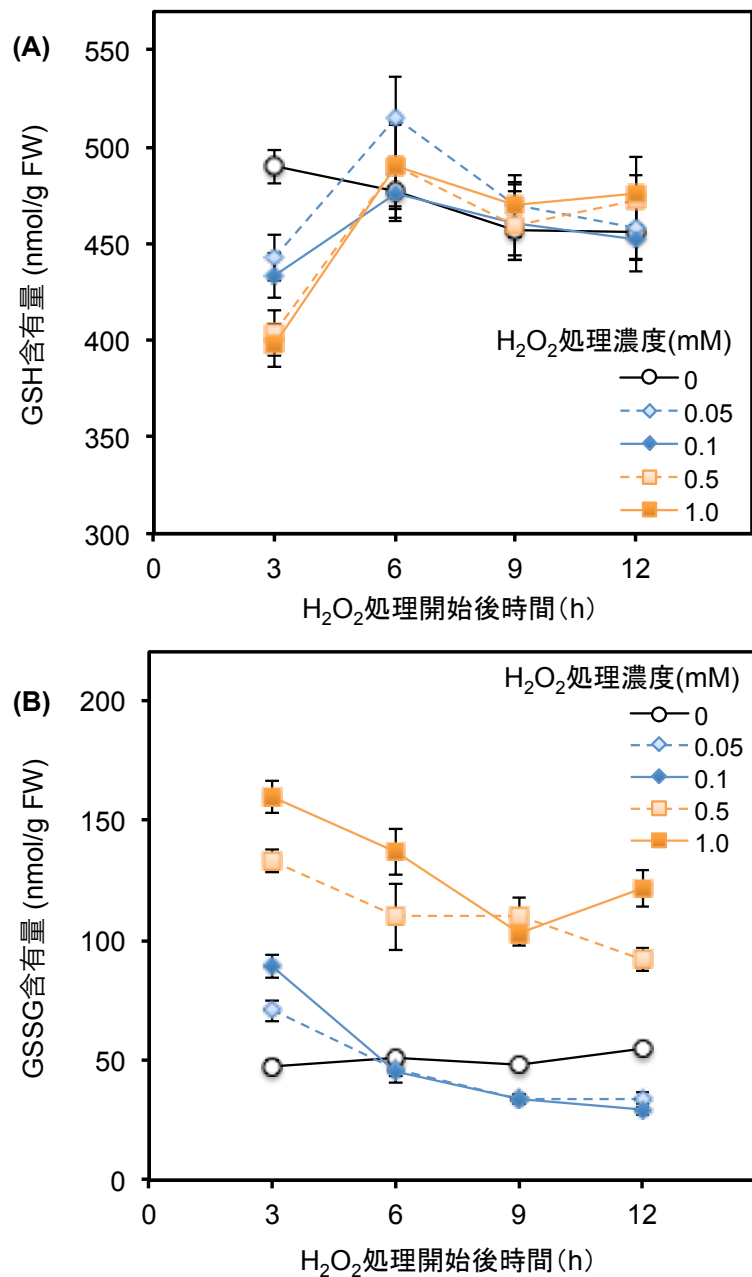


図26 H₂O₂処理1日目の葉内GSH、GSSG含有量の経時変化

(A) 18日齢リーフレタスのH₂O₂処理1日目におけるGSH含有量の経時変化。サンプルは、H₂O₂処理3、6、9、12時間後に全葉をサンプリングした。

(B) 18日齢リーフレタスのH₂O₂処理1日目におけるGSSG含有量の経時変化。サンプルは、H₂O₂処理3、6、9、12時間後に全葉をサンプリングした。

図中のバーは標準誤差(n=5)を示す。

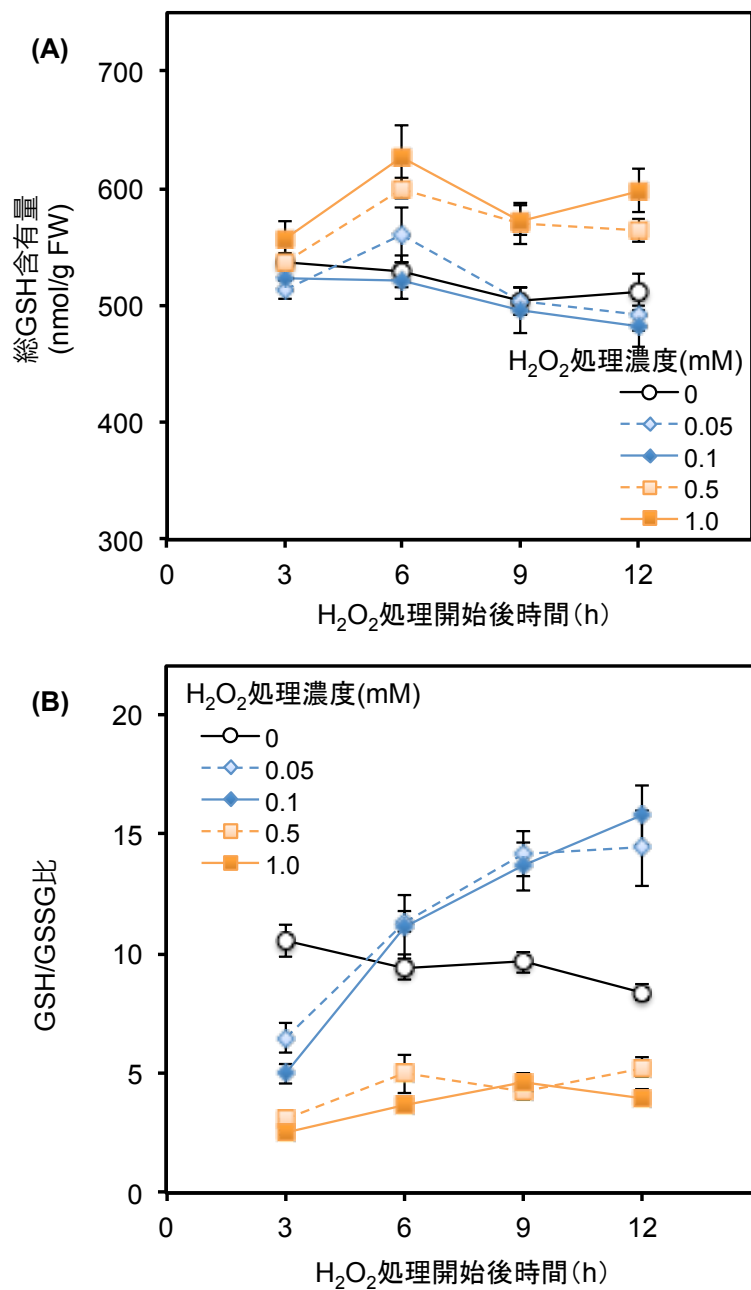


図27 H₂O₂処理1日目の葉内総GSH含有量およびGSH/GSSG比の経時変化

(A) 18日齢リーフレタスのH₂O₂処理1日目における総GSH含有量の経時変化。サンプルは、H₂O₂処理3、6、9、12時間後に全葉をサンプリングした。

(B) 18日齢リーフレタスのH₂O₂処理1日目におけるGSH/GSSG比の経時変化。サンプルは、H₂O₂処理3、6、9、12時間後に全葉をサンプリングした。

図中のバーは標準誤差 (n=5) を示す。

H₂O₂ 処理濃度依存的に増加する傾向を示し、0 mM H₂O₂ 処理区に対して有意に増加した。処理 6、9、12 時間後においても 0.5 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区では、酸化型 GSH 含有量は 0 mM H₂O₂ 処理区に対して有意に大となる傾向を維持した。しかし、0.05 および 0.1 mM H₂O₂ 処理区では処理 6 時間後に 0 mM H₂O₂ 処理区と同量まで減少し、処理 9、12 時間後においては 0 mM H₂O₂ 処理区に対して有意に減少した。

総 GSH 含有量は、H₂O 処理 6 時間後において 0、0.05 および 0.1 mM H₂O₂ 処理区に対して 0.5 および 1.0 mM H₂O₂ 処理区で有意に増加した。GSH の酸化還元比は、処理 3 時間後において H₂O₂ 処理濃度依存的に減少する傾向を示し、0 mM H₂O₂ 処理区に対して有意に減少した。

葉内の GSH/GSSG 比は、処理 3 時間後において H₂O₂ 処理濃度依存的に減少する傾向を示し、0 mM H₂O₂ 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 H₂O₂ 処理区では、GSH の酸化還元比は 0 mM H₂O₂ 処理区に対して有意に低くなる傾向を維持した。しかし、0.05 および 0.1 mM H₂O₂ 処理区では処理 6 時間後に 0 mM H₂O₂ 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 H₂O₂ 処理区に対して有意に大となった。

第四節 考察

第二章でも述べたように、植物はストレス時に発生する ROS によって細胞質等が酸化され、光合成などの光阻害を引き起こすことが報告されている。同時に ROS に対する防御機構として抗酸化系を働かせ、タンパク質などの酸化を防ぎ、環境への順化を誘導する。本試験結果では、生育が抑制された 1.0 mM H₂O₂ 処理では脂質酸化の指標である MDA が増加し、最大光合成活性も著しく抑制されていることが確認された(図 18)。一方で、生育が促進された 0.1 mM H₂O₂ 処理区では、最大光合成活性 (Fv/Fm) が処理開始 3 時間後においては低下することが認められたが、処理 5 および 10 日後においては低下する応答は見られなかった。また脂質酸化の指標でもある MDA は、0.1 mM H₂O₂ 処理区と 0 mM H₂O₂ 処理区の間で有意な差異は認められなかった。これは、低濃度 (0.1 mM) H₂O₂ 処理は植物個体に重度の酸化ストレス応答を引き起こしていないことを示している。

ホウレンソウでは、葉緑体内で O₂ が 120 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ で生成されることが報告されている (Asada and Takahashi, 1987)。これは O₂ 分解酵素 (SOD) により、直ちに H₂O₂ にされ、これにより生成された H₂O₂ は CAT や APX といった H₂O₂ 分解抗酸化酵素により直ちに分解される (Fryer *et al.*, 2003; Asada, 2006)。つまり、植物内の ROS は 0.1 mM (約 100 nmol/g fw) 程度の濃度で常に植物器官内に生成されており、本試験で用いたリーフ

レタスは無処理区で 60–70 nmol/g fw の H_2O_2 が生成されていた。つまり、生育促進が起きた 0.1 mM- H_2O_2 は生体内 H_2O_2 と極めて近い濃度であったことが示された。

経時的变化を見ると、葉および根内 ROS (H_2O_2 , O_2^-) 含量は、全処理区で 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 h 後にピークに達した。ROS 増加が全ストレス強度で同一傾向を示した。しかし、この時生育が抑制された高濃度 (1.0 mM) H_2O_2 処理区では、0 mM- H_2O_2 処理区 (定常状態) の約 4–5 倍程度まで増加し、その後、その濃度が長時間維持されていた (図 21、22、23、24)。一方で、生育促進が見られた低濃度 (0.05 および 0.1 mM) H_2O_2 処理区での内生 H_2O_2 生成量は葉緑体で生成される 120 nmol g⁻¹ と近い、120–150 nmol g⁻¹ であった。さらにこの時、速かに H_2O_2 分解酵素である APX および CAT 活性が増加し、処理 6 h 後には低濃度 H_2O_2 処理区の内生 H_2O_2 は、0 mM H_2O_2 処理区と同レベル (定常状態) まで減少した (図 25)。この結果は、低濃度 H_2O_2 処理による生育促進において、酸化ストレスに対してストレス強度とレッドックス応答の帰結時間という「速度」と「強度」もしくは「容量」が非常に重要な意味を持つことを示している。

入力となる刺激が小さい場合には、細胞の応答が確率論的な影響を受ける場合があることが報告されている。出芽酵母において低強度の浸透圧ストレスを処理した時、ストレスに応答して遺伝子を発現させた細胞と発現させなかった細胞が現れた。この時、浸透圧ストレスに重要となる MAP キナーゼ (Hog1) の活性化はストレス強度に比例して増加し、Hog1 により誘導される遺伝子発現量とは必ずしも相関しないことが示されている (Pelet *et al.*, 2011)。これは転写の活性に閾値があることを示している。また、低強度ストレスあるいは高強度ストレスにより処理した出芽酵母の mRNA およびタンパク質の量を網羅的に調べた結果では、高強度のストレス時には、多くの mRNA およびタンパク質の発現量の変動し、各々の遺伝子について mRNA の変動とおよびタンパク質の変動には相関が見られた。一方で低強度では変動の相関値がみられなかった (Halbeisen and Gerber, 2009)。これらの既往研究が示すように、必ずしも同一の外刺激が同様の生理応答を引き起こすわけではない。本試験においても、抗酸化物質の酸化還元状態は、その刺激の強度 (H_2O_2 濃度) 別に異なる応答を示した。

本試験結果において、高濃度 (1.0 mM) H_2O_2 処理区では葉内の酸化型 GSH (GSSG) が増加し、GSH/GSSG 比が低下した (図 26、27)。一方で、低濃度 (0.05、0.1 mM) H_2O_2 処理区では、処理 3 時間後において葉内の GSSG が増加し、GSH/GSSG 比が低下したが、6 時間以降は GSSG が減少し、GSH/GSSG 比が増加した。つまり、低濃度処理区では、 H_2O_2 処理後にむしろ植物体内の酸化還元状態が還元型に誘導されていることが認められた。

高等植物の葉緑体では、光合成で生じる還元力から NADPH を生産し、炭酸固定に用いている。この還元力の一部はフェレドキシン、フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素を通じて、チオレドキシン (Trx) にも受け渡される。これらの応答により GSH 等の抗酸化物質も還元される。生じた還元型 Trx や GSH は、さまざまな標的タンパク質に還元力を供給して、ジスルフィド結合の還元を行うことで酵素の活性制御を行うほか、酵素反応に必要な還元力 (電子) そのものを供給することが知られている。

さらに、葉緑体内に取り込まれた CO₂ は Rubisco によって固定されるが、Rubisco のサブユニットは酸化損傷を受けやすいことがわかっており、炭素同化系に關与する複数のタンパク質の活性に葉緑体内のレドックス状態が非常に重要であることも報告されている (Ishida *et al.*, 1999)。加えて、Jiang ら (2012) は、植物内の GSH/GSSG 比が増加した時、炭素同化量および Rubisco 活性の増加、カルビンベンソン回路においてジスルフィド結合の還元を行うことで活性制御が行なわれている酵素 PRK (ホスホリブローズキナーゼ) 等の活性が増加することを報告している。本試験において、第二章第三節 (図 14) では、低濃度 H₂O₂ 処理区は葉内および根内の炭素含有量が増加していた。これらは、低濃度 H₂O₂ 処理区においてもカルビンベンソン回路におけるレドックス制御により活性が調節される酵素群が活性化され、炭素同化効率を向上させた可能性が示唆された。

第四章 総合考察

第一節 外因性 H_2O_2 によるリーフレタスの成長とレドックス応答への影響

本研究では、水耕栽培液の殺菌への応用が期待される ROS が植物に対して与える影響を長期的かつ処理濃度条件を振り分けた環境下において、リーフレタスの成長特性とストレス応答を明確化するために、解剖学的解析とレドックス応答を分析した。各章で得られた結果から、酸化ストレス誘導条件下におけるリーフレタスの成長の全体像を捉えることにする。植物に致命的なストレスとならない程度の適度なストレス処理は、糖や機能性タンパク、抗酸化物質など有益な代謝物を多く生産させる事が示されている (Kitano *et al.*, 2008)。しかし、ストレス処理は機能性成分などの質的要因を向上させるが、バイオマスの炭素分配を介したトレードオフにより量的成長を抑制する (Walters *et al.*, 1996)。しかし、第二章第一節で挙げたように ROS 含有水耕液栽培や ROS 葉面散布による生育促進効果が複数の研究者から報告されている。しかし、「ROS 処理に伴う生育促進の反応メカニズムや植物個体での酸化ストレス閾値」に関しては未だ曖昧なままである。そこで、第二章および第三章では得た結果に基づいて、上記の問題について、 H_2O_2 含有水耕下でのケースに絞り考察する。

第二章では、 H_2O_2 含有水耕液下で 20 日間リーフレタスを生育させて、リーフレタスの成長と形態形成に関して解析した。冒頭で述べたように H_2O_2 処理に伴う成長は、その処理強度間で二分化した。低濃度処理では、リーフレタスの成長率は無処理区に比べて高くなる結果を得た。この時、成長率が高くなった個体では、葉身内部構造および根の形態形成に変化が認められた。まず、葉身内部の細胞密度の増加や柵状組織の縦横比を増加させることにより光利用効率や炭素同化効率を高める細胞配置を取っていた。根では、側根形成や根毛形成が促進され、根活性も増加していた。この時の個体の基質同化量を分析した結果、炭素含有量などに有意な増加が認められた。すなわち、 H_2O_2 処理に伴う生育促進は、ROS 応答に伴う形態変化が基質獲得効率を増加させていることが示された。

第三章では、第二章の結果に基づき生育応答が二分化する酸化ストレス強度間における、ストレス応答の差異を H_2O_2 分解に関わる抗酸化系の代表であるアスコルビン酸グルタチオン回路の酸化還元状態を評価した。生育が抑制された 1.0 mM H_2O_2 処理区では、抗酸化物質であるアスコルビン酸が増加する傾向にあり、総グルタチオン含有量は有意に増加していた。また脂質酸化の指標となる MDA 含有量が増加し、処理直後に最大光合成活性も低下する応答を示した。一方で、生育が促進された 0.1 mM H_2O_2 処理区では、抗酸化物質や MDA の増加は認められなかった。内生 ROS の挙動も異なる応答を示し、

生育抑制が引き起こされている処理区では、内生 ROS の増加が高いレベルで推移しているのに対し、生育促進が引き起こされている処理区では、内生 ROS の増加は一過的かつ低濃度であった。本試験条件においてリーフレタス個体内の ROS は $60\text{--}70\text{ nmol g}^{-1}\text{ fw}$ であった。低濃度処理下で一過的に増加した内生 H_2O_2 生成量は $120\text{--}150\text{ nmol g}^{-1}\text{ fw}$ と、既往研究で報告されている太陽光下で生育したホウレンソウ葉緑体で生成される $120\text{ nmol g}^{-1}\text{ fw}$ と極めて近い値であった。この結果は、低濃度 H_2O_2 処理による生育促進において、酸化ストレスに対してストレス強度とレドックス応答の帰結時間という「速度」と「強度」もしくは「容量」が非常に重要な意味を持つことを示している。さらにこの時、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 比が増加することで、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、 $0.1\text{ mM H}_2\text{O}_2$ 処理が炭素同化反応に影響を与えた可能性が示唆された。

まとめると、 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の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 の生成および各器官、細胞レベルでの拡散により地上部へ伝達され、葉身内部での柵状組織の形態変化や細胞数の増加を誘導した。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唆した。リーフレタスの酸化ストレス容量の閾値としては、一過的に増加する H_2O_2 含有量が $120\text{--}150\text{ nmol g}^{-1}\text{ fw}$ 程度に抑えられている必要を示し、かつ、抗酸化酵素活性や光阻害などのストレス応答が一過的であることが重要である可能性を示した。酸化ストレスが低強度かつ一過的であることが、抗酸化物質などの防御応答物質合成へのバイオマス投資へのシフトを回避しているのだと考えられた。

第二節 ROS を用いた栽培液の殺菌および栽培の効率化・高付加価値化

土耕栽培から水耕栽培への転換は、作物の生育や品質の制御の簡便化と、土壌病害虫や塩類集積による連作障害の回避を可能にすることによって安定多収・高品質生産を実現した。植物は自分に合った肥料成分を選択的に吸収して育ち、根からは有機酸などを排出する。その結果、培養液条件が不安定になりやすい。また、水耕栽培では微生物の働きがあまりないので、肥料が直ちに効く代わりに緩衝（バッファ）作用がほとんどなく、病原菌などの有害物が水に入ると生育障害が出やすくなるため、その防除は必須になる。

また、温室栽培においても植物工場での水耕栽培においても問題の一つとして挙げられるのが、水耕養液中に発生する緑藻類である。培養液中に藻が発生する最大の要因は、培養液に対する過多の日照と肥料過多である。藻の発生は、培養液の組成を崩す原因にもなり、栽培装置の配管等の詰まりの原因になってしまうことや施設の清潔性の確保に影響する。作物に付着すれば、洗浄などの労力が余計にかかってしまう。水耕栽培においては、これらの諸問題の解決も重要課題である。

本研究で着目した H_2O_2 は、工業用品として漂白剤や殺菌剤として広く使用されている。活性酸素はその特性上、酸素と水に分解され有害な副産物を生成しない。Drábková ら (2007) は、 H_2O_2 は 0.25 mM 程度の濃度でも藍藻類や緑藻類の光合成系に障害を与え、照射照度が高くなると 0.05 mM でも毒性を示すことを報告している。

本研究結果では、初期濃度 0.1 mM H_2O_2 となるように毎日水耕液に添加することで、収穫時新鮮重を増加させ、ポリフェノールであるアントシアニン含量を増加させた。0.05 - 0.3 mM H_2O_2 処理は、グリーン系リーフレタスでもバイオマスの増加を促し、かつ、緑藻 (*Scenedesmus*) の光阻害や増殖阻害を引き起こす濃度域と重なっていることから、徐藻もしくは防藻を行いながら栽培効率を向上させることが出来る可能性が示唆された (Mori *et al.*, 2014)。

また、1.0 mM H_2O_2 処理では、収量は低下するが防御応答のために代謝物合成などを促し機能性成分の蓄積による付加価値野菜の生産が期待される。既往研究で、極端な生育抑制や不可逆的なストレス障害を引き起こさない程度の環境ストレスを植物体に付与することによって、植物の有する適応機能や馴化機能を活用する栽培管理も行われている。例として、苗や果菜類の水切り栽培 (Adams *et al.*, 1989)、トマトの塩ストレス栽培 (Adames *et al.*, 1991)、寒冷地での寒締め栽培 (Ehert and Ho, 1986) などは、生産対象部位への有用物質 (糖、機能性成分など) 高濃度集積などによって生産物の高付加価値化を実現している (Moriyama and Aoki, 2004)。

収穫前に限定し H_2O_2 処理を行うことで、1.0 mM 処理区でも生育抑制が起こらず、抗酸化物質含量を増加させることが明らかになっている (森ら, 2013; Mori *et al.*, 2014)。葉菜類であるチンゲンサイやホウレンソウ、エンサイで H_2O_2 付与栽培を行った結果、生育促進は認められず、1.0 mM 処理区で総抗酸化能 (DPPH) が大となった。上記 3 品目においても、収穫前 3 日間に限定し H_2O_2 を付与した時、生育抑制は認められず、DPPH 活性が大となった。

一方で、実際の栽培現場においては、栽培スケールが大きく、均一濃度の H_2O_2 付与をどのように行うかという点が大きな課題となることが予想される。品種間や苗齢によって応答性が異なると、栽培系内に起こり得る ROS 濃度のムラが与える影響に関して

も考慮する必要がある。また今回の栽培系は非循環式 DFT であるが、基本的に栽培現場では循環式 DFT や NFT が利用される。栽培溶液の流速なども、植物に対する ROS の反応性が異なっていく可能性が予想される。

本試験研究では、リーフレタスの H_2O_2 を介した酸化ストレスが誘導する生育促進の閾値を明確にした。今後の展開としては、本研究を基礎として、低容量かつ一過的な酸化ストレスを誘導できる ROS の施与方法の開発を行っていくことで、より効率的な栽培法の創出が期待される。

引用文献

Adams, P., 1991: Effects of increasing the salinity of the nutrient solution with major nutrients or sodium chloride on the yield, quality and composition of tomatoes grown in rockwool. *J. Hort. Sci.*, **66(2)**, 201-207.

Adams, P. and Ho, L.C., 1989: Effects of constant and fluctuating salinity on the yield, quality and calcium status of tomatoes. *J. Hort. Sci.* **64**, 725-732.

Aebi, H., 1984: [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, **105**, 121-126.

Asada, K., 1999: The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, **50(1)**, 601-639.

Asada, K., 2000: The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*, **355(1402)**, 1419-1431.

Asada, K., 2006: Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiol.*, **141(2)**, 391-396.

Asada, K., and Badger, M. R., 1984: Photoreduction of $^{18}\text{O}_2$ and $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ with concomitant evolution of $^{16}\text{O}_2$ in intact spinach chloroplasts: evidence for scavenging of hydrogen peroxide by peroxidase. *Plant and cell physiol.*, **25(7)**, 1169-1179.

Asada, K. and Takahashi, M., 1987: Production and scavenging of active oxygen species in photosynthesis. In *Photoinhibition* (ed. by Kyle, D. J., Osmond, C. B., and Arntzen, C. J.). Elsevier, Amsterdam, pp. 227-287.

Arnon, D. I., 1949: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiol.*, **24(1)**, 1.

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.

Burleson, G. R., Murray, T. M. and Pollard, M., 1975: Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *Applied microbiology*, **29(3)**, 340-344.

Cataldo, D. A., Maroon, M., Schrader, L. E. and Youngs, V. L., 1975: Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **6(1)**, 71-80

Chen, S. X. and Schopfer, P., 1999: Hydroxyl-radical production in physiological reactions. *European Journal of Biochemistry*, **260(3)**, 726-735.

Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J. and Mittler, R., 2005: The zinc-finger protein *Zat12* plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **139**, 847–856.

Drábková, M., Admiraal, W. and Maršálek, B., 2007: Combined exposure to hydrogen peroxide and light selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environmental science and technology*, **41(1)**, 309-314.

Dumlao, M. R., Darehshouri, A., Cohu, C. M., Muller, O., Mathias, J., Adams, W. W. 3rd and Demmig-Adams, B., 2012: Low temperature acclimation of photosynthetic capacity and leaf morphology in the context of phloem loading type. *Photosynthesis Research*, **113**, 181–189.

Dunand, C., Crevecoeur, M. and Penel, C., 2007: Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol*, **174**, 332-341.

Ehret, D. L. and Ho, L. C., 1986: The effects of salinity on dry matter partitioning and fruit growth in tomatoes grown in nutrient film culture. *J. Hort. Sci.*, **61(3)**, 361-367.

Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Mledema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D. G., Davies J. M., Dolan, L. and Dolan, L., 2003: Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, **422**, 442–446.

Foyer, C. H., and Noctor, G., 2003: Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, **119**(3), 355-364.

Foyer, C. H. and Shigeoka, S., 2011: Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant physiol.*, **155**(1), 93-100.

Fryer, M. J., Louise B., Kevin, O., Stanislaw, K., Philip, M. M. and Neil, R. B., 2003: Control of *Ascorbate Peroxidase 2* expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, **33**, 691–705.

Fryer, M. J., Oxborough, K., Mullineaux, P. M. and Baker, N. R., 2002: Imaging of photo - oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany*, **53**(372), 1249-1254.

Galvez-Valdivieso, G. and Mullineaux, P. M., 2010: The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiologia Plantarum*, **138**(4), 430-439.

Halbeisen, R. E. and Gerber, A. P., 2009: Stress-dependent coordination of transcriptome and translome in yeast. *PLoS Biol.*, **7**(5), e1000105.

Heath, R. L. and Packer, L., 1968: Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 189-198.

Iida, A., Kazuoka, T., Torikai, S., Kikuchi, H. and Oeda, K., 2000: A zinc finger protein RHL41 mediates the light acclimatization response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **24**, 191–203.

Inada, H., Yamaguchi, M., Satoh, R., Hoshino, D., Nagasawa, A., Negishi, Y., and Nouchi, I., Kobayashi, K. and Izuta, T., 2008: Effects of ozone on photosynthetic components and radical scavenging system in leaves of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural Meteorology*, **64(4)**, 243-255.

Ioio, D. R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Aoyama, T., Costantino, P. and Sabatini, S., 2008: A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, **322**, 1380–1384.

Ishida, H., Makino, A. and Mae, T., 1999: Fragmentation of the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near *Gly-329*. *J. Biol. Chem.*, **274(8)**, 5222-5226.

Ishikawa, T., Morimoto, Y., Madhusudhan, R., Sawa, Y., Shibata, H., Yabuta, Y., Nishizawa, A. and Shigeoka, S., 2005: Acclimation to diverse environmental stresses caused by a suppression of cytosolic ascorbate peroxidase in tobacco BY-2 cells. *Plant and cell physiol.*, **46(8)**, 1264-1271.

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.

Jung, J. Y., Shin, R. and Schachtman, D. P., 2009: Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **21(2)**, 607-621.

Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. and Mullineaux, P. K., 1999: Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*, **284**, 654–657.

Kitano, M., Hidaka, K., Zushi, K. and Araki, T., 2008: Production of value-added vegetables by applying environmental stresses to roots in soil-less culture. *J. SHITA*, **20(4)**, 210-218

Li, S., Xue, L., Xu, S., Feng, H. and An, L., 2007: Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. *Plant growth regulation*, **52(2)**, 173-180.

Liszkay, A., van der Zalm, E. and Schopfer, P., 2004: Production of reactive oxygen intermediates (O_2^- , H_2O_2 , and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol.*, **136(2)**, 3114-3123.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van, B. F., 2004: Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, **9**, 490–498.

Mittler, R., Kim, Y., Song, L. H., Coutu, J., Coutu, A., Ciftci-Yilmaz, S., Lee, H., Stevenson, B. and Zhu J.K., 2006; Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Letters*, **580**, 6537–6542.

Mori, N., Kanazashi, E., Ishihara, C., Ogata, F. and Watanabe, H., 2014; Reactive oxygen species-mediated physiological response affects the growth and quality of leaf vegetables. *International Horticultural Congress 2014 Abstract*. 03872.

Moriyama, M. and Aoki, K., 2004: Improvement of green vegetable quality using cold weather condition (in Japanese). *Proceedings of vegetable and tea science*, **1**, 23-26.

Munekage, Y. N., Inoue, S., Yoneda, Y. and Yokota, A., 2015: Distinct palisade tissue development processes promoted by leaf autonomous signalling and long - distance signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell and environment*, **38(6)**, 1116-1126.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, **15(3)**, 473-497.

Murata, N., Suleyman, I. A. and Nishiyama, Y., 2012: The mechanism of photoinhibition in vivo: Re-evaluation of the roles of catalase, α -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *BBA-Bioenergetics*, **1817**, 1127–1133.

Nakashima, K., Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2009: Transcriptional regulatory network in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and Grasses. *Plant Physiol.*, **149**, 88-95.

Noctor, G. and Foyer, C. H., 1998: Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biol.*, **49(1)**, 249-279.

Ogawa, K., I., Kanematsu, S., and Asada, K., 1997: Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant and Cell Physiology*, **38(10)**, 1118-1126.

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.

Owusu-Ansah, E. and Banerjee, U., 2009: Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, **461**, 486–487.

Pelet, S., Rudolf, F., Nadal-Ribelles, M. Nadal, E., Posas, F. and Peter, M., 2011: Transient activation of the HOG MAPK pathway regulates bimodal gene expression. *Science*, **332**, 732-735.

Pellinen, R., Palva, T. and Kangasjärvi, J., 1999: Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J.*, **20**, 349–356.

Peterson, A. G. and Neofotis, P. G., 2004: A hierarchical analysis of the interactive effects of elevated CO₂ and water availability on the nitrogen and transpiration productivities of velvet mesquite seedlings. *Oecologia*, **141(4)**, 629-640.

Peterson, C. A., Murrmann, M. and Steudle, E., 1993: Location of the major barriers to water and ion movement in young roots of *Zea mays* L. *Planta*, **190(1)**, 127-136.

Peterson, C. A. and Steudle, E., 1993: Lateral hydraulic conductivity of early metaxylem vessels in *Zea mays* L. roots. *Planta*, **189(2)**, 288-297.

Pino, M. T., Skinner, J.S., Jeknic', Z., Hayes, P. M., Soeldner, A. H., Thomashow, M. F. and Chen, T. H., 2008: Ectopic *AtCBF1* over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. *Plant Cell and Environment*, **31**, 393–406.

Pnueli, L., Liang, H., Rozenberg, M. and Mittler, R., 2003: Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (*Apx1*) - deficient *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal*, **34**(2), 187-203.

Radford, P. J., 1967: Growth analysis formulae-their use and abuse. *Crop Sci.*, **7**(3), 171-175.

Rice, R. G., Robson, C. M., Miller, G. W. and Hill, A. G., 1981: Uses of ozone in drinking water treatment. *Journal (American Water Works Association)*, 44-57.

Rizhsky, L., Davletova, S., Liang, H. and Mittler, R., 2004: The zinc finger protein *Zat12* is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *The Journal of Biol. Chem.*, **279**, 11736–11743.

Roe, J. H. and Kuether, C. A., 1943: The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.*, **147**(2), 399-407.

Rossel, J. B., Wilson, P. B., Hussain, D., Woo, N. S., Gordon, M. J., Mewett, O. P., Howell, K. A., Whelan, J., Kazan, K. and Pogson, B. J., 2007: Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **19**, 4091–4110.

Shimizu, K., Matsuda, Y., Nonomura, T., Ikeda, H., Tamura, N., Kusakari, S., Kimbara, J. and Toyoda, H., 2007: Dual protection of hydroponic tomatoes from rhizosphere pathogens *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* and airborne conidia of *Oidium neolycopersici* with an ozone-generative electrostatic spore precipitator. *Plant Pathol.*, **56**(6), 987-997.

Shin, R. and Schachtman, D. P., 2004: Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**.23, 8827-8832.

Shin, R., Berg, R. H. and Schachtman, D. P., 2005: Reactive Oxygen Species and Root Hairs in *Arabidopsis* Root Response to Nitrogen, Phosphorus and Potassium Deficiency. *Plant Cell Physiol.* **46.8**, 1350-1357.

Shin, R., Burch, A. Y., Huppert, K. A. and Schachtman D. P., 2007: The *Arabidopsis* transcription factor *MYB77* modulates auxin signal transduction. *Plant Cell.* **19.8**, 2440-2453.

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.

Takechi, K., Sakamoto, W., Katsuhara, M., Murata, M. and Motoyoshi, F. 1999: *In situ* RNA hybridization using Technovit resin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter*, **17(1)**, 43-51.

Tennant, D., 1975: A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. Ecol.*, 63, 995-1001.

Terashima, I., Hanba, Y. T., Tazoe, Y., Vyas, P. and Yano, S., 2006: Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany*, **57(2)**, 343-354.

Terashima, I. and Inoue, Y., 1984: Comparative photosynthetic properties of palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts of *Camellia japonica* L.: functional adjustment of the photosynthetic apparatus to light environment within a leaf. *Plant and Cell Physiol.*, **25(4)**, 555-563.

Terashima, I. and Inoue, Y., 1985: Palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts in spinach: biochemical and ultrastructural differences. *Plant and Cell Physiol.*, **26(1)**, 63-75.

Terashima, I. and Inoue, Y., 1985: Vertical gradient in photosynthetic properties of spinach chloroplasts dependent on intra-leaf light environment. *Plant and Cell Physiol.*, **26(4)**, 781-785.

Tsukagoshi, H., Busch, W. and Benfey, P. N., 2010: Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, **143**, 606-616.

Walters, M. B. and Peter B. R., 1996: "Are shade tolerance, survival, and growth linked? Low light and nitrogen effects on hardwood seedlings." *Ecology*, **77(3)**, 841-853.

Wang, Y., Li J., Wang, J. and Li Z., 2010: Exogenous H₂O₂ improves the chilling tolerance of manilagrass and mascarenegrass by activating the antioxidative system. *Plant Growth Regulation*, **61(2)**, 195-204.

Watanabe, H., 2009: Light-controlled plant cultivation system in Japan-Development of a vegetable factory using LEDs as a light source for plants. *In VI International Symposium on Light in Horticulture* **907**, 37-44.

Wells, W. W. and Xu, D. P., 1994: Dehydroascorbate reduction. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **26(4)**, 369-377.

Whitbread, A. K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M. and Board, P. G., 2005: Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods in enzymology*, **401**, 78-99.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van M. M., Inze, D. and Van C. W., 1997: Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO J.*, **16(16)**, 4806-4816.

Yabuta, Y., Maruta, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S., 2004: Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant and Cell Physiol.*, **45(11)**, 1586-1594.

Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S., 2000: Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.*, **123(1)**, 223-234.

尾上美咲, 立澤文見, 金澤俊成, 阿部潤, 澤田公司, 加藤一機, 2012: 低濃度オゾン水によるコマツナおよびトマトの生育促進効果. *園芸学会研究*, **11(2)**, 473

中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦, 1988: 活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構— 蛋白質, 核酸, 酵素. *共立出版*, **33.16**, 2906-2920, 2957-2964.

森直哉, 金指絵里, 尾形文哉, 大橋（兼子）敬子, 渡邊博之, 2013; H₂O₂ 処理による葉菜類生産の効率化と品質向上に対するアプローチ. *生態工学会*, 37-38.

要旨

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。栽培技術として ROS を用いるためには、特定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。一方で、初期生育後の栄養成長期における生理応答に関しては詳細な情報が得られていない。

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成長解析および形態解析を行った。0.1 mM H_2O_2 (以下 H_2O_2 略) 処理区で生育量が 0 mM 処理区よりも有意に増加し、1.0 mM 以上の濃度域では生育量が抑制された。Shoot/root 比は処理区間で有意な差は認められなかったが、葉内の炭素含有量は 0.1 mM 処理区で増加し、葉の展開率や速度、根の形態形成においては処理区間で差異が認められた。

H_2O_2 処理後に展開した葉の完全展開葉の葉身内部構造に差異が認められた。0.1 および 1.0 mM 処理区では、0 mM 処理区に対して柵状組織細胞の縦横比の増加が認められた。また、 H_2O_2 処理区では 0 mM 処理区に対して細胞密度の増加が認められた。0.1 mM 処理区では、処理 0-10 日後において 0 mM に対して側根形成の促進および根端領域での根毛形成などの分化応答の活性化が認められた。また、根乾物重および総根長が 0.1 mM 処理区において 0 mM 処理区よりも有意に増加し、それに伴い処理後 10-20 日後における個体あたりの養液吸収量が増加していることが認められた。

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

生育促進が見られた 0.1 mM 処理区と生育抑制および抗酸化物質の増加が認められた 1.0 mM 処理区において、ストレス強度間での生理応答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 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。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 (F_v/F_m) 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 処理区で 0 mM 処理区よりも MDA の増加、 F_v/F_m の低下が認められた。1.0 mM 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 処理区では、処理 5 日後より 0 mM 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 , $O_2^{\cdot -}$) 含量は、全処理区で 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 APX および 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 ROS 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、生育抑制および抗酸化物質含量の増加が認められた 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。また、この時、0.05-0.1 mM H_2O_2 処理 6.0 時間後以降において抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) の酸化還元比が無処理区よりも増加した。

4. 結論

リーフレタスにおいて、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状組織の形態変化や細胞分裂活性を誘導した。これに伴う各器官の形態変化は、養液吸収量の増加を促し、光利用効率にも変化をもたらす可能性を示唆した。また、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 比が増加することで、炭素同化率が増加することが既往研究から示されており、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。

謝辞

本研究及び博士論文作成の遂行にあたり、多大なるご指導およびご助言を頂きました玉川大学大学院農学研究科渡邊博之教授に、厚く御礼申し上げます。ゼミ発表や学会発表時には、常に本質的かつ建設的な助言を賜り、私自身の意見や主張を尊重しながら研究に幅を与えて頂きました。国際学会等への挑戦にも背中を押していただき、また、他大学の先生方との交流や企業共同研究の場にも積極的に参加させて頂けたことで、広い視野での研究活動を行う事が出来たと思います。

同時に、本博士論文作成にあたり大変お忙しい中、副査としての御助力を賜った、同大学大学院農学研究科新本洋士教授および東京農業大学大学院農学研究科雨木若慶教授に感謝の意を表します。

ゼミや講習の場での議論を通じて多くの知識や示唆を頂きました、同大学学術研究所大橋敬子教授、宇佐見仁英元教授、布施政好研究員、大野英一博士に感謝の意を表します。先生方には、研究員としての在り方や一社会人としてのモラルなど、私的な相談にも乗っていただき大変助けて頂きました。

凍結ミクロトームによる切片作成および CN コーダーを用いた植物内炭素および窒素含量測定に御助力を賜った、同大学大学院農学研究科関川清広教授に感謝の意を表します。

また、博士課程という道の中で、自身がこれほどまでに楽しい気持ちで研究に打ち込み、努力できたのは、互いに協力し切磋琢磨することができた同年代の大学院生たちの存在がとても大きかったと感じています。学会等を機に繋がり、多くの場所と時間をかけてディスカッションを重ねた同年代の博士課程学生たちに感謝の意を表します。

最後になりましたが、5年間という長期間に渡る大学院生活の中で、研究活動に集中できる環境を提供し、私を支え続けてくれた両親に深く感謝を申し上げます。