

過酸化水素処理に対するイチゴの酸化還元応答

森 直哉¹⁾, 亙理ちひろ²⁾, 泊由紀子¹⁾, 渡邊博之^{1),2)}

Effect of Hydrogen Peroxide on the Redox Response in Strawberry

Naoya Mori, Chihiro Watari, Yukiko Tomari and Hiroyuki Watanabe

Tamagawa University Research Institute, Machida-shi, Tokyo, 194-8610 Japan.
Tamagawa University Research Review, 25, 9-18 (2019)

Abstract

In this study, the redox response of strawberry plants treated with H₂O₂ were evaluated by measuring the time-course of H₂O₂ contents and the activity of the antioxidative system. *Fragaria × ananassa* Duch. 'Yotsuboshi' seedlings were transplanted to DFT hydroponic apparatus containing H₂O₂, and were grown for 80 days under white florescent lamps. Following this cultivation, the growth, H₂O₂ contents, antioxidant contents, and antioxidative enzyme activities were examined in the leaves of strawberry. The results of this study showed that the treatment with 1.0 mM H₂O₂ significantly decreased the number of leaves, petiole length, and the fruit yield in strawberry. Conversely, the treatment with 0.1 mM H₂O₂ significantly increased the fruit yield. Hydrogen peroxide content and the activities of antioxidative enzymes (ascorbic acid peroxidase and catalase activities) were increased immediately after treatment with 0.1 and 1.0 mM H₂O₂. However, only the 0.1 mM H₂O₂ treatment caused a gradual decrease H₂O₂ concentrations in leaves from 3 to 6 h after treatment. These results suggested that a relatively rapid increase in antioxidative activities against oxidative stresses and an even more rapid decrease in H₂O₂ content were important factors in the growth regulation in strawberry upon treatment with appropriate concentrations of H₂O₂.

Keywords : ascorbic/glutathione cycle, hydrogen peroxide, redox response, strawberry

1. 緒言

水耕栽培は、作物の生育や品質制御を簡便化し、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出来る。水耕液を長期利用するためには、養液の殺菌は重要な課題であり、紫外線殺菌やオゾン、ファインバブルを用いた殺菌方法が研究されている (Shimizu *et al.*, 2007)。しかし、オゾン水を用いる場合は残留オゾンが、

ファインバブルは空気の圧壊過程で生じるヒドロキシラジカルといった外的な ROS が植物に影響を与える可能性が考えられる (Takahashi *et al.*, 2007)。

ヒドロキシラジカル等は活性酸素種 (Reactive oxygen species (ROS)) と呼ばれ、これらにより植物体内のタンパク質が酸化されると光利用効率や炭素同化効率が下がり、同化産物量を減少することで植物の成長抑制を引き起こすことが報告されている (Fryer *et al.*, 2003, Asada, 2006)。今後、ROS を用いた養液殺菌等では、養

1) 玉川大学学術研究所

2) 玉川大学大学院農学研究科

液内に残留もしくは発生する ROS の正確な測定と、これらの ROS が植物体の成長および酸化還元応答に与える影響を正確に捉えることが、適正な活性酸素利用に重要な課題になると考えられる。

外的な ROS や強光や高温などのストレス条件により植物体内で生成される主要な ROS としては、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) やスーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル (OH^-) の4つが挙げられるが、反応性の高い $^1\text{O}_2$ や OH^- は 20°C の水溶液中での半減期がそれぞれ 1×10^{-6} 秒、 O_2^- では 1×10^{-1} 秒オーダーと短い。対して H_2O_2 は 12 から 14 時間程度と長く比較的安定しているため、葉面散布や栽培養液への添加に用いられる。

筆者らは、 H_2O_2 を栽培養液へ添加してリーフレタスを栽培した結果、 H_2O_2 処理濃度が 1.0mM 以上の条件下で栽培すると生育が著しく抑制され、葉内の抗酸化物質であるアスコルビン酸およびアントシアニン含有量が増加した。一方で、0.1 mM H_2O_2 処理では新鮮重量や乾物重量が増加することを明らかにした (Mori and Watanabe, 2017)。ストレスにより植物体内の ROS が増加すると、植物体内の ROS 濃度を適切に維持しようと、アスコルビン酸 / グルタチオン (AsA/GSH) 回路をはじめとする ROS 消去系が働き、 H_2O_2 はカタラーゼ (CAT) やアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) により分解されることが分かっている (Noctor and Foyer, 1998)。この時活性化する AsA や GSH をはじめとする抗酸化系は ROS を消去させるだけでなく、酸化されて不活性化したタンパク質の還元などを通して、光合成速度を増加させる可能性も示唆されている (Mittler *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2012)。既知の研究は、植物体内の酸化還元状態の変化が光合成活性の増大に寄与する可能性を示しており、生育を促進した 0.1 mM H_2O_2 処理時には、植物体内の酸化還元状態がどのように変化しているのか明確にする必要がある。

ROS 処理での植物の成長および収量調査を行う試験において、露地栽培など光や温度などの環境制御が困難である条件では、ROS 処理以外のストレス応答が成長に影響することが考えられる。人工光型植物工場は、天候に左右されることなく栽培空調の気温や光制御をすることができる。そのため植物種に合わせて適正な環境に制御することができ、かつグロースチャンバーに比べ多量の株で栽培試験が可能という点でも優れている。一方で植物工場は、今後さらに安定的・持続的な運用を行う

ために電力コストを削減するのみならず、収益性・事業性を確保するために作物の生産サイクルの短縮や生産物の高付加価値化、収益性が高い作物種の生産拡充が重要な課題となっている。本研究では、今後植物工場での栽培が期待されている種子繁殖性四季成りイチゴに注目して、 H_2O_2 処理が苗の成長と果実形成に与える影響および植物体内の酸化還元応答について調査を行った。

四季成り品種は、短日条件や日中夜温の温度変化に伴う花芽分化を誘導する一季成り品種とは異なり、長日条件においても花芽分化することが可能であり、果実生産を安定して継続できる利点がある (西山, 2007)。イチゴの果実中には多くの抗酸化物質が含まれており、アスコルビン酸は 0.3 ~ 0.9 mg/g FW と高く、アントシアニンも多く含まれている (西沢, 2007)。アントシアニンは複数種存在するが、赤系イチゴには pelargonidin 3-glucoside が多く含まれる (西山, 2007)。既往研究において低温や UV などによるストレス応答知見は多く調べられているが、イチゴに対して ROS 処理が生育や抗酸化応答にどのような影響を与えるのか調査した例は報告されていない。

以上の背景を踏まえて本研究では、人工光型植物工場での種子繁殖性四季成りイチゴの水耕栽培を行い、栽培養液に H_2O_2 を添加した条件で果実形成初期までの栽培試験を実施した。 H_2O_2 は添加後、栽培養液中に含まれる金属イオン等と反応して分解が進んでしまうことが考えられたため、24 時間毎に H_2O_2 の濃度調整を行った。栽培期間中のイチゴ葉内における酸化還元状態の変化を H_2O_2 濃度、CAT および APX 活性、AsA および GSH 含有量を測定することで評価した。加えてイチゴの生育調査を行い、それらの結果を合わせて、イチゴの H_2O_2 処理に対する酸化還元の応答評価および H_2O_2 のイチゴ生産への利用について考察を行った。

2. 材料および方法

2.1. 植物材料および育苗

植物材料は種子繁殖性四季成りイチゴ (*Fragaria* × *ananassa* Duch. 'Yotsuboshi', (三好アグリテック株)) を使用した。水道水を十分に吸水させたウレタンキューブ (長さ 23 mm × 幅 23 mm × 厚さ 27 mm) に 1 粒ずつ播種し保水用ペーパーで被覆後、白色蛍光灯下 (FHF32EX-N-H, 岩崎電気株) で 14 日間静置した。この

時、光強度は光合成有効光量子束密度 (PPFD) で $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に、室温は 24°C に設定した。PPFD の測定は光量子メーター (LI-190SA, LI-COR 社) を用いて測定した。

子葉が展開した植物体をウレタンキューブごと、白色蛍光灯を光源とした、循環式の湛液水耕装置 (育苗装置) に移植し、26 日間育苗を行った。育苗装置は $640 \text{ mm} \times 414 \text{ mm} \times 92 \text{ mm}$ のポリコンテナ (PM-76, 積水化学工業(株)) に給水口と排水口が備わっており、200 個の穴 (縦 10 穴 \times 横 20 穴) が空いた発泡スチロール板を設置したものである。株が並び合わないよう縦一列あたり 5 株の苗を植え付け、合計 100 株の苗を植えた。光強度は、PPFD $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、光周期は 16 時間明期および 8 時間暗期に設定した。また室温は 24°C に設定した。栽培液は OAT ハウス A 処方 (OAT アグリオ(株)) を用い、電気伝導率 (EC) 1.0 dS m^{-1} および pH6.5 となるよう 2 日毎に調整した。ボックス内の栽培液量は、常時 8 L になるよう給水口から供給されるように設定した。

2.2. 過酸化水素処理および植物体の生育調査

播種 40 日後、第 3 成葉が出葉した苗を選抜した。葉長 / 葉幅比、根長が処理区間で同じとなるよう苗を選んだ。非循環型湛液水耕装置に移植した。育苗時に用いたポリコンテナを用い、10 L の栽培液を入れた。 H_2O_2 を添加しない処理区を 0 mM 処理区とし、栽培液が H_2O_2 の終濃度が 0.1, 1.0 mM となるように 1.0 M H_2O_2 を各栽培液へ毎朝 10 時に添加した。栽培液への H_2O_2 添加は播種 42 日後から最終生育調査を行った播種 122 日後までの期間において実施した。

5 日毎に栽培液の全量交換を行った。エアポンプ (W-1000, 日本動物薬品(株)) を使用し、栽培液中の溶存酸素濃度 (DO 値) が 8 ppm となるように連続通気した。DO 値の測定には、デジタル溶存酸素濃度測定器 (DO-5509, (株)マザーツール) を用いた。PPFD を $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、室温は 20°C とし、光周期および栽培液条件は育苗時と同様とした。

頂花房およびから 1 次側花房、2 次側花房の摘花を行い、花房あたりの着花数を 3 花にし、花芽形成が観察された後、2 日毎に株観察を行い、筆を用いて開花した花の人工受粉作業を行った。

H_2O_2 処理開始後は、 H_2O_2 処理開始 40 日後までは 7

日毎に、40 日後以降は 2 日毎に観察を行い、出葉数および頂部の開花までの日数、果実の形成日数を測定した。果実収穫は、果実表面が 8 割以上赤色化したものを順次収穫した。栽培期間中、複葉を構成する 3 枚の小葉のうち 1 枚が 3 割程度枯死していた場合には摘葉し、摘葉した葉の数を株毎に記録した。生育調査は 1 処理区 12 株、3 反復とし、 H_2O_2 処理開始 80 日後の株あたりの総出葉数、総葉面積、果実収量および果実形成数を測定した。

2.3. 各種成分分析用サンプリングの手法

H_2O_2 含有量、CAT 活性および APX 活性のために、処理開始 0 日、40 日後および 80 日後において、 H_2O_2 を養液へ添加する前を 0 時間後とし、処理開始後 10 分、30 分および 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 時間後に葉のサンプリングを行った。最大展開葉の複葉を構成する 3 枚のうち小葉 1 枚を H_2O_2 含有量に、2 枚を CAT 活性および APX 活性分析に用いた。直ちに液体窒素で凍結し、 -35°C で保存した。

総アスコルビン酸含有量および総グルタチオン濃度の経日変化のために、処理開始 0 日、40 日後および 80 日後において葉のサンプリングを行った。各日 H_2O_2 処理 3 時間後に株内で 2 番目に大きく展開している葉から直径 5 mm のリーフディスクを作成し、1 g 秤量後マイクロチューブに入れ、液体窒素で凍結し -35°C で保存した。

果実分析は 1 次側花房および 2 次側花房に形成された果実を用い、6 g 以上かつ 15 g 以下のものを選び、 -35°C で保存したものをアスコルビン酸およびアントシアニン含有量の分析に使用した。

2.4. 過酸化水素の分析

H_2O_2 の定量は、Queval ら (2008) の方法に準じた。葉を液体窒素凍結下で磨碎し 100 mg を秤量した。粉砕試料を褐色試験管に移し 2 mL の 0.2 M 塩酸を加えボルテックスで攪拌し、 $3,000 \times g$ で 15 分間、 4°C で遠心分離を行った。上清 500 μL をとり、400 μL の 50 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液を加え、0.2 M 水酸化ナトリウムで pH 5.0 に調整し、純水で 5 mL にメスアップした。500 μL を分取し、APX を $2 \mu\text{mol min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ となるよう加え、5 分間 25°C でインキュベートした。APX 処理後の試料を 2 つに分け、一方に CAT を $25 \mu\text{mol}$

$\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ となるよう加え、5分間25°Cでインキュベートした。試料液((+)CATまたは(-)CAT) 100 μL 、FOX指示薬(0.5 mM 硫酸アンモニウム第一鉄, 0.2 mM キシレノールオレンジ, 0.2 mM ソルビトール, 2% (v/v) エタノール, 50 mM 硫酸) 500 μL 、純水 400 μL を混合した。5分以上静置し、分光光度計(UV-1800, (株)島津製作所)を用いて30秒間隔で、3分間560 nmを測定した。吸光度変化率($\Delta A_{560} \text{ nm/min}$)を算出し、検量線から濃度を求めた。試料の H_2O_2 含量は(CAT不添加) - (CAT添加)の値から求めた。検量線は、各濃度の H_2O_2 標準液100 μL にFOX指示薬500 μL 、純水400 μL を加え、作成した。

2.5. 抗酸化酵素活性の測定

(1) 粗酵素液の調製

凍結試料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とともに乳鉢で氷上磨砕した。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 $\times g$ で20分)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)で平衡化したカラム(Sephadex G-25カラム, GEヘルスケア)に通し、10 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4) 3.5 mLで溶出し、粗酵素液とした。

(2) カタラーゼ活性の分析

カタラーゼ(CAT)活性の測定はAebi (1984)の方法に準じ行った。50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.2) 300 μL と粗酵素液300 μL を混合し、30 mM過酸化水素水300 μL を加え、反応させた(25°C)。過酸化水素由来する240 nmの吸光度の減少を1分毎に計10分間、分光光度計(UV-1800)で追跡し、1分間あ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($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{f.w.}$)を求めた。

(3) アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の分析

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)活性の測定は中野ら(1988)の方法に準じ行った。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 、蒸留水523 μL を粗酵素液200 μL と混合し、最後に10 mM過酸化水素水10 μL を加えた。過酸

化水素を添加後、直ちに25°C条件でアスコルビン酸由来する265 nmの吸光度の減少を1分毎に計10分間、分光光度計(UV-1800)で追跡し、1分間あたりの吸光度の減少を算出し、酵素活性($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{f.w.}$)を求めた。

2.6. 総アスコルビン酸の分析

Roe and Kuether (1943)の変法で分析を行った。凍結試料1 gを液体窒素を用いて乳鉢で凍結粉砕した。粉砕後、9.0 mLの5%メタリン酸を添加し暗所4°C下で20時間抽出後、3,000 $\times g$ で15分間遠心分離を行い、上清を検液とした。検液500 μL にインドフェノール50 μL 、1%塩化スズ(II) 500 μL 、2%ヒドラジン250 μL を加えた後、50°Cで1.5時間加温した。氷冷しながら85%硫酸1.25 mLを加え、30分室温で静置した後、ボルテックスで攪拌し分光光度計(UV-1800)を用いて540 nmの吸光度を測定した。

2.7. アントシアニンの分析

凍結試料1 gを液体窒素を用いて乳鉢で凍結粉砕し、1%塩酸-メタノール混合液を9.0 mL加え、暗所4°C下で20時間抽出後、3,000 $\times g$ で15分間遠心分離を行い、上清を分光光度計(UV-1800)を用いて530 nmの吸光度を測定した。標準試料にはpelargonidin 3-glucosideを用いた。

2.8. グルタチオンの分析

凍結試料1 gを液体窒素を用いて乳鉢で凍結粉砕し、サンプルの10倍量の5%メタリン酸を加え、遠沈管に移しボルテックスで攪拌した。3,000 $\times g$ で15分間遠心分離を行い、上清を検液とした。検液をグルタチオン測定キット(日研ザイル(株))を用いて、総グルタチオン(GSH+GSSG)と酸化型グルタチオン(GSSG)濃度を測定した。総グルタチオン測定用試料は検液をそのまま用い、GSSG測定用試料には検液200 μL にGSH除去剤として500 mM 4-ピニルピリジン10 μL を加え、ボルテックスで攪拌したものを測定検液とした。マイクロプレートウェルに、キャリアプレート(GSSG) 50 μL 、検液50 μL をそれぞれ分注した。全てのウェルに5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)試薬を入れ、

そこへグルタチオン還元酵素を全てのウェルに 50 μL 添加して 20°C で 5 分インキュベートした。その後、全てのウェルに NADPH 溶解液（リン酸緩衝液, EDTA, pH7.6）に溶解した NADPH を 50 μL 分注して、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, コロナ電気株）を用いて 20 秒間隔で、3 分間測定した。吸光度変化率 ($\Delta A_{405 \text{ nm/min}}$) を算出し、検量線から濃度を求めた。また以上の結果から還元型グルタチオン (GSH) 濃度および GSH/GSSG 比を求めた。

2.9. 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 Institut, Japan 株) を用いて、Tukey-Kramer 検定による多重比較を行った。多重比較の有意水準は 5% とした。至花日数に関しては、0 mM 処理区に対して各処理区の 2 群間で Wilcoxon の順位和検定を行った。

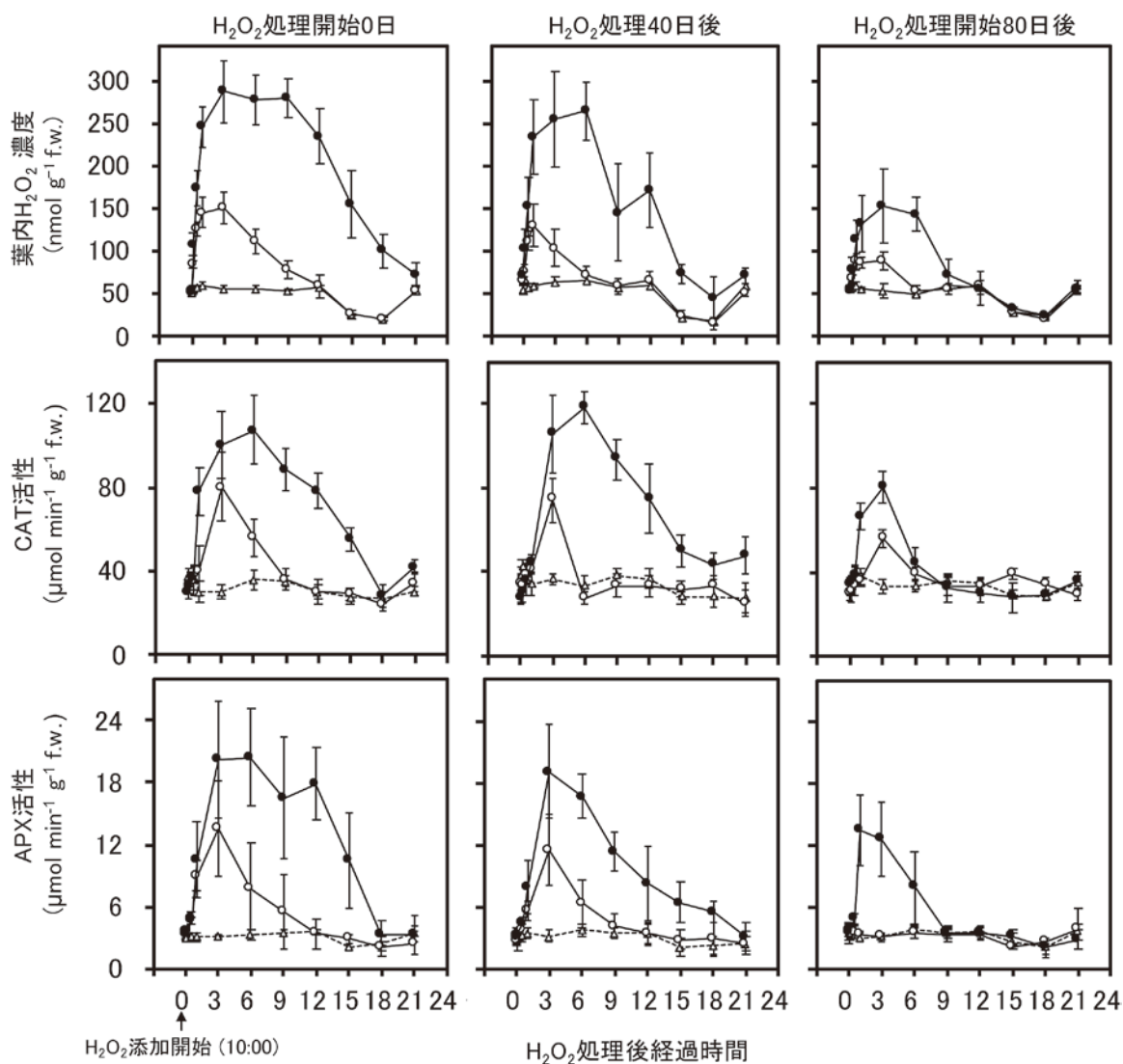


図1 H_2O_2 処理開始0日および40, 80日後におけるイチゴ葉内 H_2O_2 濃度および抗酸化酵素 (CAT, APX) 活性。図中の折れ線マーカーはそれぞれ (Δ) が 0 mM, (\circ) が 0.1 mM, (\bullet) が 1.0 mM H_2O_2 処理を示している。また、白色背景は明期 (16時間)、灰色背景は暗期 (8時間) を示し、図中のバーは標準偏差 ($n=3$ から 6) を示す。

3. 結果

3.1. 葉内の酸化還元応答

葉内の H_2O_2 濃度および CAT, APX 活性の処理開始 0 日および 40, 80 日後における経時変化および経日変化を図 1 に示した。葉内 H_2O_2 含有量は, H_2O_2 処理後濃度依存的に増加する傾向を示した。処理開始日および 40 日後において 0.1 mM H_2O_2 処理では処理後 1 時間程度で増加はピークに達し, 処理 3-6 時間後には減少をはじめ, 6-9 時間後には処理開始前の 60 nmol g^{-1} 程度まで葉内 H_2O_2 濃度は減少した。対して 1.0 mM H_2O_2 処理では速やかな減少は見られず, 1.0 mM H_2O_2 処理では処理後 12 時間, 処理開始前の約 3-5 倍の濃度で維持されていた。

CAT および APX 活性は, 0 mM H_2O_2 処理で定常状態を示した。0.1 および 1.0 mM H_2O_2 処理では, 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 H_2O_2 処理比べ 1.0 mM H_2O_2 処理で 2 倍程度の活性の増加が認められた。その後, 0.1 mM H_2O_2 処理では速やかに活性は低下し, 6-9 時間後には処理開始前と同様の活性となった。しかし, 1.0 mM H_2O_2 処理では CAT および APX ともに活性は 15 時間の間で高く維持されていることが認められた。

葉内の H_2O_2 含有量, CAT 活性は, 処理開始 80 日後において, 開始日および 40 日後に比べて増加率が 1/2 程度に減少し, 反応の帰結時間も 1/2 程度になった。一方で APX 活性に関しては, 0.1 mM H_2O_2 処理後に活性の変化が認められなかった。

葉内の総 AsA 含有量, 総 GSH (GSH+GSSG) 濃度および GSH/GSSG 比の処理開始 0 日, 40 日後, 80 日後における経日変化を図 2 に示した。総 AsA 含有量は 1.0 mM H_2O_2 処理が他処理に比べて有意に増加した。

一方で総 GSH 濃度は H_2O_2 処理による有意な差は認められなかった。しかし, 葉内の GSH/GSSG 比は, H_2O_2 処理 40 日後において 0.1 mM H_2O_2 処理で有意に増加し, 80 日後において 1.0 mM で有意な増加が認められた。

H_2O_2 処理 40 日後の葉内 GSH, GSSG 濃度および GSH/GSSG 比の経時変化を図 3 に示した。葉内の GSH は, 1.0 mM H_2O_2 処理では, 他処理に対して H_2O_2 処理 3-12 時間後において有意に減少した。一方で, 0.1 mM H_2O_2 処理では H_2O_2 処理 3 時間および 6 時間後において, 0 mM H_2O_2 処理に対して有意な増加が認められた。対して葉内 GSSG 濃度は, 1.0 mM H_2O_2 処理では, 他処理に対して H_2O_2 処理 3-12 時間後において有意増加した。0.1 mM H_2O_2 処理では H_2O_2 処理 3 時間および 6 時間後において, 0 mM H_2O_2 処理に対して有意な減少が認められた。GSH および GSSG の結果からもわかるように, 葉内グルタチオンの酸化還元比 (GSH/GSSG) は, 0.1 mM H_2O_2 処理では H_2O_2 処理 3 時間および 6 時間後において増加し, 1.0 mM H_2O_2 処理では処理開始後 3-12 時間において減少した。酸化還元比が H_2O_2 処理に伴い影響を受けている一方で, 総 GSH 濃度に関しては差異は認められなかった。

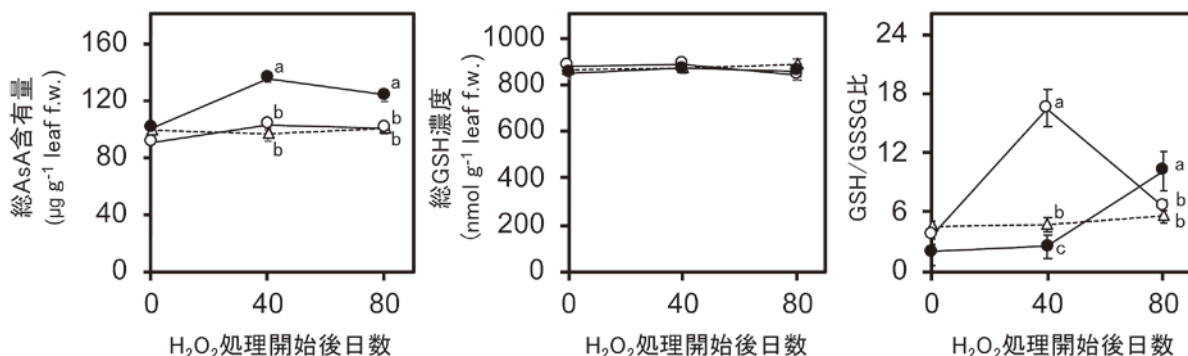


図2 H_2O_2 処理開始 0 日および処理開始 40, 80 日後各日における H_2O_2 添加 3 時間後のイチゴ葉内総 AsA 含有量, 総 GSH 含有量および GSH/GSSG。図中の折れ線マーカーはそれぞれ (△) が 0 mM, (○) が 0.1 mM, (●) が 1.0 mM H_2O_2 処理を示している。図中のバーは標準偏差 ($n=3$) を示し, 異なる英小文字間は Tukey-Kramer の多重検定で有意水準 5% を示す。検定は同じ時間軸の処理区間で実施した。

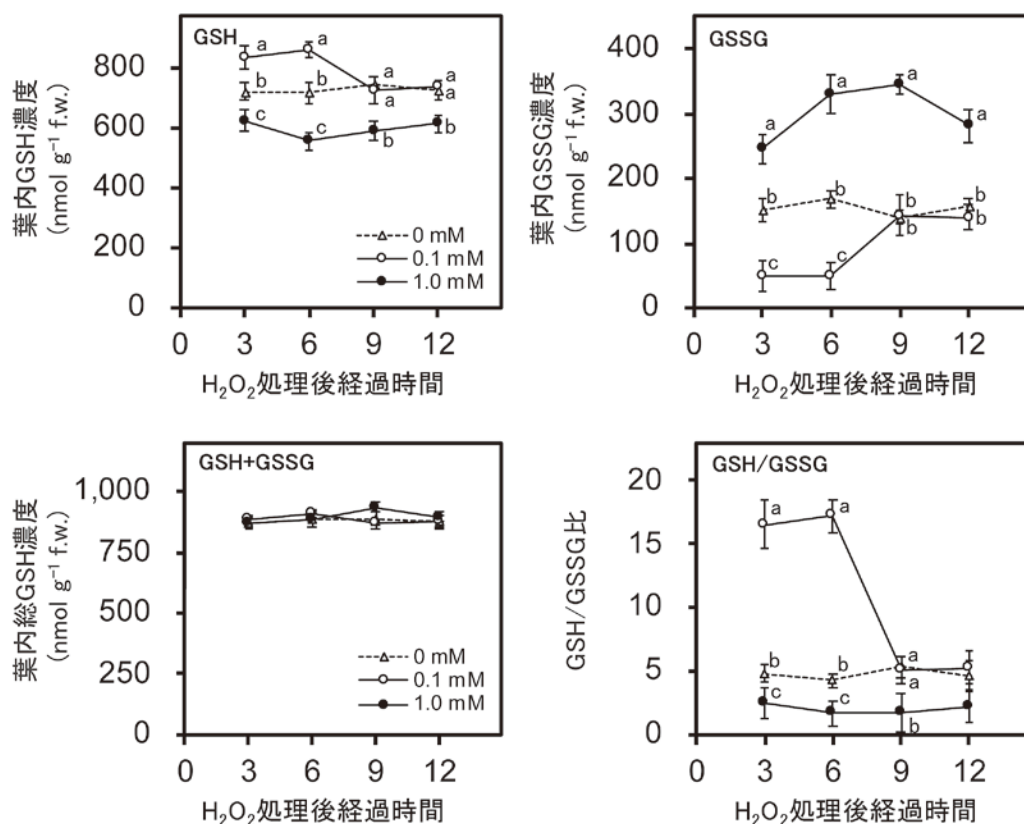


図3 H₂O₂ 処理開始後40日後における最大葉の葉内の還元型グルタチオン (GSH), 酸化型グルタチオン (GSSG), 総グルタチオン含有量および酸化還元比 (GSH/GSSG)。図中の折れ線マーカーはそれぞれ (△) が0 mM, (○) が0.1 mM, (●) が1.0 mM H₂O₂ 処理を示している。図中のバーは標準偏差 (n=6) を示し, 異なる英小文字間にはTukey-Kramerの多重検定で有意水準5%を示す。検定は同じ時間軸の処理区間で実施した。

表1 H₂O₂ 処理80日後における生育速度と果実形成

処理濃度	総出葉数 (枚/株)	総葉面積 (cm ² /株)	至花日数	果実収量 (g/株)	果実形成数 (個/株)
0mM	26 ± 3 a	1623 ± 226 a	47 ± 1	46.8 ± 5.5 b	5 ± 1
0.1mM	28 ± 3 a	1707 ± 273 a	45 ± 1	61.2 ± 7.2 a	6 ± 1
1.0mM	22 ± 1 b	1244 ± 167 b	40 ± 2 <i>p</i> < 0.01	36.2 ± 3.3 c	4 ± 1

総出葉数, 総葉面積, 果実収量, 果実形成数における, 異なる英小文字間にはTukey-Kramerの多重検定で有意水準5%を示す (n=12)。至花日数は, 0 mM 処理区に対して各処理区の2群間でWilcoxonの順位和検定を行った。

表2 H₂O₂ 処理を行った果実中の抗酸化物質含有量

処理濃度	総AsA含有量 (μg g ⁻¹ f.w.)	アントシアニン含有量 (μg pelargonidin 3-glucoside g ⁻¹ f.w.)
0mM	603.7 ± 30.2 b	212.4 ± 15.5 b
0.1mM	612.3 ± 27.9 b	206.3 ± 20.0 b
1.0mM	694.8 ± 37.7 a	270.2 ± 21.2 a

異なる英小文字間にはTukey-Kramerの多重検定で有意水準5%を示す (n=12)。

3.2. 生育および果実形成と果実中の抗酸化物質含量

H₂O₂ 処理 80 日後（播種後 142 日後）における植物個体の総出葉数，総葉面積，至花日数，株あたり果実収量および果実形成数を表 1 に示した。

株あたり総出葉数，総葉面積は，0.1 mM 処理においては有意な差が認められないが，1.0 mM H₂O₂ 処理において 0 mM 処理よりも有意に低くなり，減少する傾向を示した。頂花房の開花は，1.0 mM H₂O₂ 処理が最も早く，0.1 mM H₂O₂ 処理よりも 5 日間，0 mM H₂O₂ 処理よりも 7 日間早くなった。

H₂O₂ 処理 80 日後における株あたりの果実形成数には有意な差は認められなかったが，果実収量は，0 mM H₂O₂ 処理に対して 0.1 mM H₂O₂ 処理で有意に増加し，1.0 mM H₂O₂ 処理で有意に低くなった。果実の収穫は果実表皮の赤熟率が 8 割を超えた際に行ったが，この時 0.1 mM H₂O₂ 処理が最も第 1 果の果実形成までの速度が速かった。

果実中に含まれるアスコルビン酸およびアントシアニン含有量を表 2 に示した。アスコルビン酸およびアントシアニン含有量は，他処理に対して，1.0 mM H₂O₂ 処理で有意に高くなった。この時，果実糖度および果実酸度を Brix 計（PAL-BX|ACID4，株アタゴ）を用いて測定したが H₂O₂ 処理による有意な差は示さなかった（データ示さず）。

4. 考察

高濃度の H₂O₂ 処理はリーフレタスの生育を抑制させるが，低濃度 H₂O₂ 処理はバイオマスや葉面積を増加させることを報告した (Mori and Watanabe, 2017)。しかし，この際に起こっているストレス応答や植物体内の酸化還元状態がどのように変化しているのかはわかっていない。そこで，本研究ではイチゴを用いて H₂O₂ 処理が生育と酸化還元応答にどのような影響を及ぼすのかについて長期的かつ短期的な評価を行った。

H₂O₂ を処理していないイチゴの葉内 H₂O₂ 濃度は，本試験条件下において明期では 50–60 nmol g⁻¹，暗期では 20–35 nmol g⁻¹ の H₂O₂ が生成されていた (図 1)。これに対して栽培液への H₂O₂ 添加後，処理された個体の葉内で速やかな H₂O₂ 濃度の増加がみられたことは，根から葉内への速やかな H₂O₂ の取り込みと輸送もしくは酸化刺激のシグナル伝達起きたことが考えられる (図

1)。H₂O₂ 処理における植物内への H₂O₂ の取り込みおよび輸送に関して明瞭な結果は既往研究においても十分に得られてはいないが，酸化刺激のシグナル伝達に関しては Munekage ら (2015) によって報告されており，H₂O₂ の葉面散布処理をした下位葉だけではなく処理を行っていない上位葉においても葉内の H₂O₂ 濃度が増加し，酸化ストレス誘導時に見られる柵状組織の形態変化を誘導することを示した。これは，H₂O₂ の長距離誘導シグナルが存在することを示唆している。

H₂O₂ 処理されたイチゴ葉内の H₂O₂ 濃度は 0.1 mM H₂O₂ 処理で約 3 倍，1.0 mM H₂O₂ 処理では約 5 倍まで増加していたが，処理直後に過酸化水素分解酵素である CAT および APX の速やかな活性化が認められ，葉内の過 H₂O₂ 濃度が定常状態の濃度まで低下する反応が認められた (図 1)。既知の研究によれば，葉内の H₂O₂ が速やかに消去されなければ，H₂O₂ によって葉緑体のストロマにおけるカルビンサイクルに含まれるチオール調節酵素は，分子内に存在するシステイン残基の SH 基がジスルフィド結合することで酵素活性が低下し，CO₂ 固定が阻害されることが知られている (浅田, 1993)。本研究において，1.0 mM H₂O₂ 処理は 0.1 mM H₂O₂ 処理に比べ葉内 H₂O₂ 濃度の増加率が 2 倍程度高く，また増加した葉内 H₂O₂ の分解に 9 時間程度余剰に時間がかかっていた (図 1)。これは葉内 H₂O₂ の増加率と分解までに要する時間がストレス応答に強く影響を与えていることを示唆した。

果実の成長には多くの光合成産物が必要となるが，1.0 mM H₂O₂ 処理においては，株あたりの総出葉数および総葉面積が有意に低下しており，これらが果実収量の低下や果実形成数の低下に影響していると考えられた (表 1)。強光や高温，高塩濃度や水分欠乏などの植物にとってのストレス条件下では，葉内や果実内のアスコルビン酸濃度等の抗酸化物質の合成を促進するとの指摘がある (Cakmak and Marshner, 1992 ; Hasegawa, *et al.*, 2000 ; Wajima *et al.*, 2007)。本研究においても 1.0 mM H₂O₂ 処理では，処理 40, 80 日後における葉内の総アスコルビン酸含有量および果実内の総アスコルビン酸，アントシアニン含有量が有意に増加しており，1.0 mM H₂O₂ 処理はストレスを受けていたと考えられた (図 2, 表 2)。一方で 0.1 mM H₂O₂ 処理では出葉数や葉面積，果実収量が低下せず，葉内および果実内の抗酸化物質の含有量に変化も見られなかったことから，0.1 mM H₂O₂ 処理はイチゴの生育に対してストレスとならないことが示唆され

た。

グルタチオンは細胞内に存在するSH基を有するトリペプチドであり、還元型のGSHと酸化型のGSSGが存在し、GSHはグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)を介して H_2O_2 を除去する酸化還元応答に寄与する。植物体内の抗酸化容量を超える酸化ストレス応答時には総GSH量が増加し、総GSH量が増加せずGSH/GSSG比が増加する反応は植物体内の抗酸化容量内の応答であることが既往研究より示されている(Asensi, *et al.*, 1999)。以上のことからGSHは植物体内の酸化還元状態や酸化ストレスの程度を示す指標になっている。1.0 mM H_2O_2 処理では葉内の総GSH濃度が増加し、GSH/GSSG比が低下していることから、酸化ストレスにさらされ、葉内が酸化状態に誘導されていると考えられる。一方で0.1 mM H_2O_2 処理では処理3-6時間後に総GSH濃度に変化は見られず、GSH/GSSG比が増加していることから、葉内の酸が還元状態へ誘導されていることが示唆された(図3)。

Ogawaら(2001)は、 O_2^- を生じるパラコートや H_2O_2 処理によって花芽形成が促進されることや、この時GSHの内生量が高いと花芽形成が抑制されることを報告している。本研究においても1.0 mM H_2O_2 処理において、頂花房の至花日数が0 mMおよび0.1 mM H_2O_2 処理よりも早くなり、GSH含量は有意に低い値を示した。これらのことから植物体内が酸化状態になると花芽形成が誘導させることが示唆された。

本研究において、0.1 mM H_2O_2 処理では総出葉数、総葉面積には有意な差が認められず、果実収量のみが有意に増加した。果実収量のみが増加した原因に関しては本実験においては明らかにすることは出来なかった。既知の研究において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われている酵素ホスホリブローズキナーゼ(PRK)等の活性が増加することを報告している。したがって、今後は H_2O_2 処理時において炭素同化効率に寄与するタンパク質の酸化還元状態や活性状態の評価、光合成速度などに対する研究を進めていく予定である。

以上のことから、外的な H_2O_2 に対する酸化ストレスの影響を考慮する際には、植物体内の一過的な H_2O_2 増加だけでなく分解までの時間が非常に重要であることが示された。また、一過的かつ低濃度の H_2O_2 増加は植物

体内のGSHなどの抗酸化物質の状態から還元状態を誘導していることが認められた。イチゴ生育に対する影響としては低濃度の H_2O_2 処理は果実収量の増加を促すことが示唆され、高濃度 H_2O_2 処理は生育が抑制されるが開花応答を促進し、抗酸化物質含量の増加による果実の高付加価値化の可能性を示した。本論では、イチゴの抗酸化応答について示したが、今後は果実の収量増加、品質の向上を目指した栽培法についても併せて検討していく予定である。

謝 辞

本研究に際し研究施設利用にご協力頂いた玉川大学学術研究所生物機能開発研究センター主任の大橋敬子教授に厚く御礼申し上げます。試験の実施に際して多量の栽培試験株の管理やサンプル調製に協力してくれた玉川大学農学研究科市村篤志修士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Aebi, Hugo, 1984: [13] Catalase in vitro. *In Methods in enzymology*, Academic Press, 121-126.
- Asada, K., 2006: Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiol.*, 141(2), 391-396.
- Asensi, M., Sastre, J., Pallardo, F. V., Lloret, A., Lehner, M., Garcia-De-La Asuncion, J. and Viña, J., 1999: [23] Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *In Methods in enzymology*, Academic Press, 299, 267-276.
- Cakmak, I. and Marshner, H., 1992: Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant physiol.*, 98, 1222-1227.
- 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.
- Hasegawa, P., Bressan, R., Zhu, J. and Bohnert H., 2000: Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biol.*, 51, 463-499.
- 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 CO_2 assimilation in *Cucumis sativus*. *New Phytol.*, 194(4), 932-943.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van, B. F., 2004: Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9, 490-498.

- Mori, N. and Watanabe, H., 2017: Effects of oxidative stress on the growth of leaf lettuce upon H₂O₂ treatment. *Eco-Eng.*, 29(2), 31–38.
- Munekage, Y. Nakajima, Inoue, S., Yoneda, Y. and Yokota, A., 2015: Distinct palisade tissue development processes promoted by leaf autonomous signalling and long-distance signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Env.*, 38(6), 1116–1126.
- 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., Tasaka, Y., Mino, M., Tanaka, Y. and Iwabuchi, M., 2001: Association of glutathione with flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell physiol.*, 42(5), 524–530.
- Queval, G., Hager, J., Gakière, B. and Noctor, G., 2008: Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 135–146.
- 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.
- 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.
- Takahashi, M., Chiba, K. and Li, P., 2007: Free-radical generation from collapsing microbubbles in the absence of a dynamic stimulus. *The Journal of Physical Chem. B*, 111(6), 1343–1347.
- Wajima, T., Sago, Y., Ishikawa, K., Hidaka, K., Yasutake, D., Matsuoka, T. and Matsuzoe, N., 2007: High quality tomato production by suitable application of concentrated deep seawater. *In International Symposium on High Technology for Greenhouse System Management: Greensys 2007*, 801, 1437–1444.
- 浅田浩二, 1993: 葉緑体での活性酸素の生成と消去の分子機構. *日本農芸化学会誌*, 67(9), 1255–1263.
- 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.
- 西沢 隆, 2007: 野菜園芸学. 金浜耕基編. *文永堂出版*, 86–88.
- 西山 学, 2007: 野菜園芸学. 金浜耕基編. *文永堂出版*, 91–92.