光照射がチャ培養細胞のアスコルビン酸含量及び 抗酸化系酵素活性に及ぼす影響

静岡大学農学部*

一家 崇 志・鳥羽 佑 典・切 岩 祥 和・森田 明 雄

静岡県農林技術研究所 茶業研究センター**

鈴木 利 和・中村 順 行

(平成22年10月 4 日受理)

Effects of Light Illuminations on the Ascorbate Content and Antioxidative Enzyme Activities in Suspension-cultured Tea (*Camellia sinensis* L.) Cells

Takashi Ikka, Yusuke Toba, Yoshikazu Kiriiwa and Akio Morita

Faculty of Agriculture, Shizuoka University

Toshikazu Suzuki and Yoriyuki Nakamura

Tea Research Center, Shizuoka Research Institute of Agriculture and Forestry

Summary

To investigate the effect of different light conditions on the antioxidative activities of suspension-cultured tea (*Camellia sinensis* L. cv. 'Yabukita') cells, we measured the growth, ascorbate (AsA) content and lipid peroxidation of suspension-cultured tea cells grown under continuously illuminating condition with red (light-emitting diodes) LEDs (650-670 nm), blue LEDs (450-470 nm), red LEDs with supplemental blue LEDs (red plus blue LEDs) or white fluorescent lamp with 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetic photon flux density for 7 days, comparing with ones grown under dark. The cell growth in all light-treated conditions has decreased to the half in the dark condition, and the lipid peroxidation has increased. The content of AsA in tea cells was increased in blue LEDs, red plus blue LEDs and white fluorescent light treatments. Oxalate contents of red plus blue LEDs and white light treatments were higher than that of other treatments. On the other hand, the catalase activity was decreased in light conditions including the blue wavelength band, whereas the ascorbate peroxidase activity did not change in any treatment conditions. Furthermore, superoxide dismutase activity was only decreased in red LEDs and red plus blue LEDs conditions. These results suggested

* 〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷836

** 〒439-0001 静岡県菊川市倉沢1706

that the blue light wavelength might be induced AsA synthesis directly or through the suppression of catalase activity in cultured tea cells.

Key Words : Ascorbic acid, LED, Tea (*Camellia sinensis* L.), light

キーワード：アスコルビン酸, LED, チャ (*Camellia sinensis* L.), 光

1 緒 言

一般に、光は植物の生育を左右する最も重要な環境因子である。光は、植物の光合成や光形態形成反応である発芽、花成¹⁾や気孔の制御、またバイオマス、二次代謝産物の合成²⁾に影響を与えるほか、酸化ストレス(活性酸素種の生成、それに伴う膜脂質過酸化の上昇)の原因ともなる。このような酸化ストレスに対し植物は、カタラーゼ(CAT)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)またはスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)等に代表される活性酸素消去系酵素群の遺伝子発現を増加させ、活性酸素を解毒していることが知られている³⁾。

日本の緑茶栽培では、古くから新芽の生育期間中に遮光処理が一部地域で行われ、高級茶である玉露やてん茶が生産されてきた。遮光処理により、チャの新芽は露地栽培に比べて葉厚が薄く、濃緑色を呈することに加え、遊離アミノ酸含量が高く、カテキン類含量が少ない、旨味に富む高品質茶が生産される^{4, 5)}。また、茶の遊離アミノ酸含量の約半分を占める主要なアミドであるテアニンは、光照射下で分解され、生成した炭素骨格がカテキン類に同化されることが知られている⁶⁾。したがって、遮光下での新芽中のアミノ酸含量の増加とカテキン類含量の減少は、テアニン分解の抑制が原因の一つと考えられている。また、中山⁷⁾は、特定波長域の光を除去する着色フィルムを用いて、光の波長域と新芽の生育との関係について検討し、500nm以下の波長域を除いた黄色光環境下で、同じ光照射度の

他の波長域に比べて生育が優れ、アミノ酸含量も高いことを明らかにしている。しかしながら、着色フィルムによる処理は、照射波長域を狭い範囲に限定することが困難であるため、光質の違いによるチャの生育、チャ葉の成分含量への影響を詳細に検討するには至っていない。

近年、様々な発光ダイオード(LED)が開発され、波長や光量を選択的に調節できるようになり^{8, 9)}、多くの作物で栽培用の光源として利用する試みが行われている¹⁰⁻¹⁵⁾。これらの試みの中で、光照射により酸化ストレスを与え、それに応答して生じる抗酸化反応を利用し、抗酸化物質含量を高める方法が注目されている。例えば、暗所下で発芽させたアズキ幼植物にLEDを用いて赤色光を照射すると、 β -カロテン集積や抗酸化能(酸素ラジカル吸収能、TEAC)の増加が誘導されることが報告されている¹⁶⁾。これは、光照射による光障害、つまり酸化ストレスに対する防御作用によって起こると考えられている。チャは、カテキン類やアスコルビン酸などの抗酸化物質を多く含んでおり、その効能は広く知られている。以上のことから、チャへのLEDによる特定波長光の照射により、これらの抗酸化物質含量を高めることができるのではないかと期待される。

既に、竹内・松元¹⁷⁾は、チャの新葉において、カテキン類生合成系の酵素であるフェニアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)、カルコンシンターゼ(CHS)並びにジヒドロフラボノールリダクターゼ(DFR)遺伝子の発現が白色光の光量が多いほど高く、特に赤色

光と青色光がCHSとDFR遺伝子の発現を高めることを明らかにし、光照射によりチャのカテキン類生合成が誘導されることを報告している。しかしながら、光照射によるチャのアスコルビン酸代謝への影響については未だ検討されていない。

植物の光環境に応答する生命現象を研究するにあたり、植物全体を対象とすると、環境変異の影響が大きく、試験や分析などが困難である。これに対し、培養細胞は人工環境下で栽培することが容易であるため、培養細胞を光照射下で培養することは、高等植物の光応答に対する単純な実験モデル系として利用でき、その機能解明に貢献できると考えられる。そこで本研究では、LEDを用いて赤色光、青色光、赤色+青色光をチャ懸濁培養細胞に照射し、抗酸化物質であるアスコルビン酸含量と各種抗酸化酵素活性に与える影響について検討した。その結果、青色光の照射によりアスコルビン酸含量が増加したことから、その機構を明らかにするため、アスコルビン酸分解産物の一つであるシュウ酸¹⁸⁾の含量への影響についても検討した。

2 材料及び方法

2. 1 供試材料

2008年10月にチャ (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 'Yabukita') の葯より誘導した懸濁培養細胞¹⁹⁾を、B5培地²⁰⁾で1週間毎に処理開始まで27℃の培養室内(暗所)、100 rpm振とう条件下で無菌的に継代培養し、各試験に用いた。尚、継代は1週間培養後の懸濁培養細胞(約6~7 g)を含む培地6 mL(培養細胞1 g程度)を、30 mLのB5培地が入った100 mL三角フラスコに移植する方法で行った。

2. 2 光照射処理方法

1週間培養後のチャ懸濁培養細胞をクリーンベンチ内で吸引ろ過し、ろ過後の培養細胞を新しいB5培地に再懸濁させ、全ての培

養細胞が均一となるように混合した。このチャ培養細胞2 gを30 mLのB5培地が入った100 mL三角フラスコに移植し、27℃の培養室内で光照射処理を開始した。処理は、赤色(650~670 nm)、青色(450~470 nm)、赤色と青色の両方(赤色+青色)をLED(赤色; L660-03V, 青色; L450-03V, Epitex社製)を用いて行った。また対照区として光照射しない暗所区と白色蛍光灯(FLR40S-W/M/36, Toshiba社製)を照射した処理区を設けた。なお、光照射区では、光強度を培地表面の高さでの光合成有効光量子束密度(PPFD)がいずれも $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように調整した。処理後7日目に、吸引ろ過した培養細胞を液体窒素で急速凍結し、膜脂質過酸化量と酵素活性測定用サンプルは-80℃で、アスコルビン酸及びシュウ酸分析用サンプルは凍結乾燥、微粉碎後に-20℃で、分析時まで保存した。

2. 3 分析方法

2. 3. 1 生育量の測定

処理開始後、0, 1, 3, 5および7日目に培養細胞を吸引ろ過し、新鮮重を測定した。

2. 3. 2 膜脂質過酸化量の測定

膜脂質過酸化量は、Cakmak and Horst²¹⁾の方法に従い測定した。具体的には、凍結保存しておいた細胞を、あらかじめ4℃に冷やしておいた乳鉢に約0.5 g量りとり、そこへ0.1%トリクロロ酢酸(TCA) 3 mLを加えて磨砕し、遠心管に懸濁液を移した。次に、0.1% TCA 2 mLとともに抽出残渣を遠心管に移した。4℃, $15000 \times g$ で、10分間遠心分離後、上清0.5 mLに0.5%チオバルビツル酸(TBA)を含む20% TCAを1.5 mL加えた。これを100℃の湯浴中で20分間振とう後、氷冷して反応を停止させた。十分に冷却した後、4℃, $10000 \times g$ で、5分間遠心分離した。得られた上清の532 nmと600 nmの吸光度を分光光度

計 (UVmini 1240, Shimadzu社製) で測定した。532 nmでの吸光度と600 nmでの吸光度との差と吸光度係数 ($155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) から、TBA reaction substances (TBARS) 量を算出した。

2. 3. 3 抗酸化系酵素の活性測定

凍結保存しておいた細胞を、あらかじめ 4°C に冷やしておいた乳鉢に約0.5 g量とり、ポリビニルポリピロリドン (PVPP) 50 mgと2 mMエチレンジアミン四酢酸を含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) を3 mL加え、磨砕した。懸濁液を 4°C , $16000 \times g$ で20分間遠心分離し、得られた上清をCAT, APX並びにSODの活性測定用の粗酵素液とした。

CAT活性は, Cakmak and Horst²¹⁾の方法に準じて測定した。上記のリン酸緩衝液2.3 mLに10 mM過酸化水素水0.5 mLを加えた後、粗酵素液0.2 mLを加え、240 nmの吸光度を分光光度計で3分間測定した。CAT活性は、1分間の吸光度の減少量を過酸化水素の分解量として算出した。

APX活性は, Nakano and Asada²²⁾の方法を一部改変して行った。上記のリン酸緩衝液1.95 mL, 3 mM過酸化水素水0.5 mLおよび0.2 mMアスコルビン酸ナトリウム0.5 mLの混合溶液に、粗酵素液0.05 mLを加え、290 nmの吸光度を分光光度計で90秒間測定した。APX活性は、吸光度係数 $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて算出した。

SOD活性は, Giannopolitis and Riseの方法²³⁾を一部改変して測定した。上記のリン酸緩衝液1.88 mL, 300 mM炭酸ナトリウム (pH 10.2) 0.2 mL, 195 mM L-メチオニン0.2 mLおよび1125 μM ニトロブルーテトラゾリウムクロリド (NBT) 0.2 mLの反応混合液に、粗酵素液またはブランクとして上記のリン酸緩衝液を0.02 mLを加え、30 mMリボフラビン0.2 mL添加後、直ちに蛍光灯下において10分間室温で反応させた。反応後、560 nmでの吸光度

(還元型NBT量) を分光光度計で測定した。SOD活性は、還元型NBTの生成を50%阻害するのに必要な酵素活性を1 Uとして求めた。

なお、粗酵素液のタンパク質濃度は、ブラッドフォード法²⁴⁾により測定した。具体的には、粗酵素液100 μL にブラッドフォード試薬1 mLを加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌し、20分間後に595 nmでの吸光度を測定した。標準タンパクとしてBSA (牛血清アルブミン) を用いて検量線を作成し、粗酵素液のタンパク質濃度を求めた。

2. 3. 4 アスコルビン酸の定量

アスコルビン酸含量は、池ヶ谷ら²⁵⁾の方法に準じて測定した。凍結乾燥した微粉末試料50 mgを5 mLの2%メタリン酸で30分間振とう抽出し、 4°C , 3000 rpm ($1550 \times g$) で10分間遠心分離した。上清を0.45 μm メンブレンフィルター (Advantec社製) でろ過し、得られたろ液を還元型アスコルビン酸の測定に用いた。次に、このろ液1 mLにジチオトレイトール (DTT) 溶液 (DTT 200 mgを0.066 Mリン酸二水素カリウム溶液28 mLと0.066 Mリン酸水素二ナトリウム溶液12 mLに溶解) 200 μL と0.72 M水酸化ナトリウム溶液、0.24 Mリン酸二水素カリウム溶液および0.37 Mリン酸水素二ナトリウム溶液からなる中和剤200 μL を添加し、15分間静置して反応させた。その後、0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し、得られたろ液を総アスコルビン酸の分析に供した。分析は、分析カラム (Develosil ODS HG-5 4.6/150, 野村化学社製) を装着した高速液体クロマトグラフィー (LC Module 1, Waters社製) を用いて行った。溶離液は1%メタリン酸溶液を使用し、流速は毎分1 mLとし、カラム温度は室温、検出波長は242 nmとした。

2. 3. 5 シュウ酸の定量

スピッツ管に、凍結乾燥させた微粉末試料

25 mg, PVPP 25 mgと脱塩水 5 mLを加え、1 時間振とう抽出した。その後、室温、3000 rpm ($1550 \times g$) で10分間遠心分離し、上清を $0.45 \mu\text{m}$ メンブレンフィルターでろ過した。ろ液を超純水で任意に希釈後、イオンクロマトグラフィー (ICS2000, Dionex社製) を用いてシュウ酸量を測定した。分析カラムはIon Pac AS17 (Dionex社製)、ガードカラムはIon Pac AG17 (Dionex社製) を用いた。溶離液は超純水と水酸化カリウム溶液を使用し、流速は毎分1.5 mL、カラム温度は 30°C とした。なお、チャ培養細胞中のシュウ酸の形態は、ほとんどが水溶性であり、不溶性シュウ酸はほとんど含まれないことを予備実験で確認している (データ省略)。このため、細胞中の全シュウ酸含量として水溶性シュウ酸含量を測定した。

2. 4 統計

各データ間の統計処理は、特に記さない限りチューキー法 ($P < 0.05$) を用いて行った。

3 結 果

3. 1 細胞生育量

処理期間中のチャ懸濁培養細胞の生育量を図1に示した。処理3日目までは、細胞が誘導期にあるため、新鮮重はいずれの処理区とも処理開始時とほぼ同じ値を示した。その後、対数増殖期に入り、処理5日目における細胞の新鮮重は暗所区が6 gに対し、光照射処理区における細胞の新鮮重は平均4.4 g、処理7日目における細胞の新鮮重は暗所区で平均11.2 gに対し、光照射区では平均値が約半分の5.7 gとなり、光照射により細胞生育が有意に抑制された。なお、処理期間中、赤色LED区、青色LED区、赤色+青色LED区および蛍光灯区の細胞の生育量は、いずれもほぼ同じ値を示し、光波長の違いによる差異はみられなかった。

3. 2 膜脂質過酸化量

培養細胞における膜脂質過酸化量としてTBARS含量を図2に示した。マロンジアル

図1 チャ懸濁培養細胞の生育に及ぼす光照射の影響

図中の値は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n = 3$) を示す。異なるアルファベットは5 %水準で有意差があることを示す (チューキー検定)。

図2 チャ懸濁培養細胞の膜脂質過酸化に及ぼす光照射の影響

図中の値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットは5%水準で有意差があることを示す (チューキー検定)。

デヒド (MDA: malondialdehyde) は脂質過酸化分解生成物の一つであり、脂質過酸化の主要なマーカーとしてよく用いられる。その結果、すべての処理区において、処理開始時よりTBARS量は増加したが、その程度は、暗所区が処理開始時の約1.4倍であったのに対して、光照射区では約2.4倍と多かった。しかし、赤色LED区、青色LED区、赤色+青色LED区および蛍光灯区に有意な差は認められなかった。

3. 3 アスコルビン酸及びシュウ酸含量

各処理区における培養細胞内のアスコルビン酸含量を図3 Aに示した。還元型及び総アスコルビン酸含量は同様の傾向を示し、暗所区と赤色LED区における1 g乾物重あたりの総アスコルビン酸含量は、処理開始時の2.1 mgと比較してほぼ変化がなく、それぞれ2.3 mgと2.4 mg程度であった。これに対して、青色LED区、赤色+青色LED区並びに蛍光灯区の1 g乾物重あたりの総アスコルビン酸含量は、それぞれ4.8 mg、4.6 mg及び5.3 mgとな

り、処理開始時、暗所区及び赤色LED区と比較して2倍以上の高い値を示した。

次に、アスコルビン酸の分解産物の一つであるシュウ酸の含量を測定した。1 g乾物重あたりのシュウ酸含量は、処理開始時の1.1 mgと比較して、赤色+青色LED区で3.0 mg、蛍光灯区で1.8 mgであり、シュウ酸含量の増加が認められた (図3 B)。一方、暗所区では0.7 mg、赤色LED区では0.8 mg、青色LED区では1.2 mgであり、処理開始時と比較して同程度、または低くなる傾向を示した。

3. 4 抗酸化系酵素活性

暗所区と赤色LED区における培養細胞内のCAT活性は、処理開始時とほぼ同レベルの活性を保持していた (図4 A)。しかし、青色光波長域を持つ光照射区 (青色LED区、赤色+青色LED区及び蛍光灯区) では平均で約40%のCAT活性低下が認められた。これに対し、APX活性は光照射区においてわずかに低い傾向を示したが、いずれの処理区

図3 チャ懸濁培養細胞のアスコルビン酸 (A) とシュウ酸含量 (B) に及ぼす光照射の影響
図中の値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す. 異なるアルファベットは5%水準で有意差があることを示す (チューキー検定).

においても有意な活性の変化は見られなかった (図4 B)。一方, 赤色LED区と赤色+青色LED区におけるSOD活性は, 処理開始時と比較して約35%の活性低下が観察された (図4 C)。しかしながら, 赤色光波長域を含む蛍光灯区では処理開始時と比較して活性の低下がみられず, そのレベルは暗所区及び青色LED区と同等であった。

4 考 察

4. 1 チャ培養細胞の生育

本研究において, チャ培養細胞の生育阻害は光照射区においてのみ観察された (図1)。

また, いずれの光照射区においても膜脂質過酸化量が暗所区と比較して多かった (図2)。このことから, 光質の種類に関わらず, チャ培養細胞では光照射により酸化ストレスが生じることにより, 活性酸素種の生成や膜脂質過酸化が引き起こされ, それによる細胞の酸化的損傷により細胞生育が抑制されたと推察された。また, 細胞の生育量と膜脂質過酸化量はいずれの光照射区においても同程度の値を示したため, 光質の違いによる影響は小さいことが示唆された。尚, 光照射処理期間を7日間にしたことに関して, 培養細胞の生育周期に準じたことと, その7日目で生育量が

図4 チャ懸濁培養細胞の抗酸化系酵素活性に及ぼす光照射の影響

(A) カタラーゼ (CAT) 活性, (B) アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) 活性, (C) スーパーオキシサイドディスムターゼ (SOD) 活性.

図中の値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す. 異なるアルファベットは5%水準で有意差があることを示す (チューキー検定).

半減したことなどから, 酸化ストレスに対する応答を試験する系として問題ないと判断した.

4. 2 培養細胞中のアスコルビン酸及びシュウ酸含量

培養細胞中において, 総アスコルビン酸含量が増加した処理区はいずれも青色域の波長を含んでいたことから, アスコルビン酸の

生合成の促進または分解の抑制に460 nm付近の青色光が関与していることが示唆された (図3 A). Akvilėら²⁶⁾ は, オオムギの緑葉にLEDを用いて445 nm (青色) と638 nm (赤色) を同時に照射すると, 高圧ナトリウムランプの照射に比べてアスコルビン酸含量が増加し, 445 nm, 638 nm, 669 nm (赤色) 並びに735 nm (遠赤色) の光を同時照射するとさらに増加し, 異なる波長の光を組み合

わせることでアスコルビン酸蓄積への相乗的な効果が期待できると推察している。しかしながら本実験では、青色LED区と赤色+青色LED区のアスコルビン酸含量に有意な差がみられなかったことから、アスコルビン酸蓄積への赤色光の相乗的な効果はないと考えられた。なお、本試験では遠赤色光処理を行っていないため、今後遠赤色光単独または他の波長光との組み合わせの効果について検討する必要がある。

一方、シュウ酸は、チャに含まれる有機酸の中でもっとも含有量が高いことが知られている²⁷⁾。現在までに、植物におけるシュウ酸の生合成経路としてはアスコルビン酸及びグリオキシル酸がその前駆物質であることが示されている。Yang and Loewus²⁸⁾は、ハウレンソウに代表されるシュウ酸集積植物において、アスコルビン酸はシュウ酸に代謝変換されると報告しており、アスコルビン酸の酸化分解によるシュウ酸の生合成経路は、現在最も重要な経路の一つとして示されている²⁹⁻³¹⁾。また、弱光条件下で栽培したハウレンソウでは、アスコルビン酸含量が低下し、シュウ酸含量が増加することが報告されている³²⁾。本研究において、赤色+青色光の両波長域を含む処理区でシュウ酸含量の増加が観察されたことから(図3B)、両波長域の照射によるアスコルビン酸からシュウ酸への代謝促進、あるいは、アスコルビン酸代謝を経由せずグリオキシル酸を基質とする経路によるシュウ酸の合成が促進される可能性が考えられた。今後、2つの経路の代謝関連酵素活性の測定による解明が必要である。

4. 3 光照射が抗酸化系酵素活性に及ぼす影響

アスコルビン酸含量が増加した青色光波長域を含む処理区での抗酸化系酵素活性について、処理開始時と比較してCAT活性の低下が観察されたが、APX活性に関しては有意

な変化は見られなかった(図4A, B)。また、SOD活性については赤色+青色LED区において赤色LED区と同等の活性低下がみられたことから(図4C)、赤色光がチャ細胞のSOD活性を特異的に抑制する可能性が推測された。しかし、青色光との関係性は得られず、本実験結果からそのメカニズムを推測することは困難であった。一般に、光照射により膜脂質過酸化が引き起こされた場合、これらの抗酸化系酵素活性が高まる。コムギの葉では、暗所処理に比べて白色、赤色、青色並びに緑色の光照射によりCAT活性とAPX活性が高まることが報告されている³³⁾。また、チャ培養細胞の培養条件において浸透圧ストレスを強めることにより、細胞内のペルオキシダーゼ活性が高まるが³⁴⁾、このペルオキシダーゼ活性は24時間暗期培養よりも24時間明期培養で活性が低いと報告されている³⁵⁾。チャ培養細胞において青色光の照射がCAT活性を低下させた機構について、本実験の結果から推察することは困難であるが、青色光照射によるアスコルビン酸含量の増加は、アスコルビン酸生合成系への直接的な影響に加え、CAT活性低下により増大した活性酸素種を消去するため、アスコルビン酸の生成が誘導された可能性が考えられた。また、アスコルビン酸による光照射下で生成する活性酸素種の消去には、APX活性を通じてのもの³⁶⁾とキサントフィルサイクルでの補因子としての役割を通じてのもの³⁷⁾が知られている。本実験でAPX活性が変化しなかったことから、青色光照射により増加したアスコルビン酸は、主にキサントフィルサイクルでの補因子として活性酸素種の消去に関与していると推察され、今後キサントフィルサイクルの側面からの検討が必要である。

以上のことから、本研究では、チャ培養細胞において青色光での特異的なアスコルビン酸集積が誘導されたことに加え、青色光によるCAT活性阻害と赤色光によるSOD活性阻

害という新たな知見が得られた。しかしながら、これらの光による阻害機構の詳細については不明のままである。現在、植物の光応答については、光受容体として赤色光と遠赤色光を吸収するフィトクロム、青色光とUV-A光を吸収するクリプトクロム、フォトトロピン及びZTL/ADOファミリータンパク質³⁸⁾が知られており、それぞれ遺伝子レベルでの研究が行われている。今後は、異なる光条件下での抗酸化物質の代謝関連酵素や抗酸化系酵素さらに光受容体遺伝子の発現を検討し、チャの光応答機構をより詳細に明らかにする必要がある。

5 摘 要

異なる光環境がチャ培養細胞の抗酸化能に及ぼす影響を調査するため、チャ懸濁培養細胞を赤色LED(650~670 nm)、青色LED(450~470 nm)、赤色+青色LED並びに白色蛍光灯の4つの光照射区(光合成有効光量子束密度 $100\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)と、非照射(暗所)区で7日間培養した。その結果、いずれの光照射区においても、生育量は暗所区の半分以下となり、膜脂質過酸化量は有意に増加した。また、アスコルビン酸含量は、青色LED区、赤色+青色LED区および蛍光灯区で高かった。一方で、アスコルビン酸分解により生成するシュウ酸の含量は、赤色+青色LED区と蛍光灯区のみで処理開始時より有意に高い値を示した。一方、カタラーゼ活性は、赤色LED区と暗所区において処理開始時と変化しなかったのに対して、青色LED区、赤色+青色LED区および蛍光灯区で低くなった。また、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は全ての処理区において処理開始時と変わらず、スーパーオキシドディスムターゼ活性は赤色LEDと赤色+青色LEDのみで処理開始時より低くなった。以上のことから、チャ培養細胞では、青色光の照射がカタラーゼ活性の抑制を通じてアスコルビン酸生成を誘導する、ま

たは直接アスコルビン酸生成を促進する可能性が示唆された。

6 謝 辞

本研究は、科学技術振興機構地域イノベーション創出支援事業地域結集型研究開発プログラム「静岡発 世界を結ぶ新世代茶飲料と素材開発」によった。

7 引 用 文 献

- 1) Lee, S.H., Tewari, R.K., Hahn, E.J., and K.Y. Paek (2007) : Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 90, 141-151.
- 2) Shohaela, A.M., Alib, M.B., Yua, K.W., Hahna, E.J., Islamc, R. and K.Y. Paek (2006) : Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. Proc. Biochem. 41, 1179-1185.
- 3) Apell, K and H. Hirt (2004) : Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55, 373-399.
- 4) 阿南豊正・中川致之(1974) : 茶葉の化学成分含量に及ぼす光の影響. 茶技研. No. 47, 132-137.
- 5) 梁瀬好光・田中静夫・青野英也・杉井四郎(1974) : シャ光の程度が茶の収量ならびに品質に及ぼす影響. 茶技研. No. 47, 48-53.
- 6) Konishi, S. (1969) : Utilization of ^{14}C for the study of theanine metabolism in tea plant (*Camellia sinensis* L.). Proc.

- 9th Jpn. Isotope cong. 423-425.
- 7) 中山 仰(1980) : 茶芽の形態形成と、その物理、化学的制御に関する研究. 茶研報. No. 16, 1-190.
- 8) Okamoto, K. Yanagi, T. and S. Kondo (1997) : Growth and morphogenesis of lettuce seedlings raised under using different combinations of red and blue light. Acta Hort. 445, 149-157.
- 9) Schuerger, A.C., Brown, C.S. and E.C. Stryjewski (1997) : Anatomical feature of pepper plants (*Capsium annuum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light. Ann. Bot. 79, 273-282.
- 10) Hoenecke, M.E., Bula, R.J. and T.W. Tibbits (1992) : Importance of blue photon levels for lettuce seedlings grown under red-light-emitting diodes. Hortscience 27, 427-430.
- 11) Brown, C.S., Schuerger, A.C. and J.C. Sager (1995) : Growth and photomorphogenesis of pepper under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 120, 808-813.
- 12) Okamoto, K., Yanagi, T., Takita, S., Tanaka, M., Higuchi, T., Ushida, Y. and H. Watanabe (1996) : Development of plant growth apparatus using and red LED as artificial light source. Acta Hort. 440, 111-116.
- 13) Goins, G.D., Yorio, N.C., Sanwo, M.M. and C.S. Brown (1997) : Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. J. Exp. Bot. 48, 1407-1413.
- 14) Yanagi, T. and K. Okamoto (1997) Utilization of upper-bright light emitting diodes as an artificial light source for plant growth. Acta Hort. 418, 223-228.
- 15) Duong, T.N., Hong, L.T.A., Watanabe, H., Goi, M. and M. Tanaka (2002) : Growth of banana plantlets cultured in vitro under red and blue light-emitting diode (LED) irradiation source. Acta Hort. 575, 117-124.
- 16) Wu, M.C., Hou, C.Y., Jiang, C.M., Wang, Y.T., Wang, C.Y., Chen, H.H. and H.M. Chang (2007) : A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. Food Chem. 101, 1753-1758.
- 17) 竹内敦子・松元 哲(2003) : チャ葉での合成系酵素の遺伝子発現に与える光の影響. 茶研報. No. 96, 27-32.
- 18) Loewus, F.A. (1980) : The Biochemistry of Plants. Vol. 3. Academic Press, New York, pp. 77-99.
- 19) Morita, A., Yokota, H., Ishka, M.R. and F. Ghanati (2006) : Changes in peroxidase activity and lignin content of cultured tea cells in response to excess manganese. Soil Sci. Plant Nutr. 52, 26-31.
- 20) Gamborg, O.L., Miller, R.A. and K. Ojima (1969) : Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50, 151-158.
- 21) Cakmak, I. and W.J. Horst (1991) : Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiol. Plant. 83, 463-468.
- 22) Nakano Y. and K. Asada (1981) : Hydrogen peroxide is scavenged

- by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- 23) Giannopolitis, C.N. and S.K. Ries (1977) : Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
- 24) Bradford, M.M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- 25) 池ヶ谷賢次郎・高柳博次・阿南豊正 (1990) : 茶の分析法. 茶研報. No. 71, 43-74.
- 26) Akvilė, U., Giedrė, S., Aušra, B., Vytautas, R., Gintarė, Š., Jurga, S., Pavelas, D. and Ž. Artūra (2009) : The effect of light quality on the antioxidative properties of green barely leaves. *Sodininkystė ir daržininkystė* 28, 153-161.
- 27) Libert, B. and V.R. Franceschi (1987) : Oxalate in crop plants. *J. Agric. Food Chem.* 35, 926-938.
- 28) Yang, J.C. and F.A. Loewus (1975) : Metabolic conversion of L-ascorbic acid to oxalic acid in oxalate-accumulating plants. *Plant Physiol.* 56, 283-285.
- 29) Keates, S.E., Tarlyn, N.M., Loewus, F.A. and V.R. Franceschi (2000) : L-Ascorbic acid and L-galactose are sources for oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. *Phytochem.* 53, 433-440.
- 30) Kostman, T.A., Tarlyn, N.M. Loewus, F.A. and V.R. Franceschi (2001) : Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant. Physiol.* 125, 634-640.
- 31) Loewus, F.A. (1999) : Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochem.* 52, 447-457.
- 32) Proietti, S., Moscatello, S., Leccese, A., Colla, G. and A. Battistelli (2004) : The effect of growing spinach (*Spinacia oleracea* L.) at two light intensities on the amounts of oxalate, ascorbate and nitrate in their leaves. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 79, 606-609.
- 33) Causin, H.F., Jauregui, R.N. and A.J. Barneix (2006) : The effect of light spectral quality of leaf senescence and oxidative stress in wheat. *Plant Sci.* 171, 24-33.
- 34) Aoshima, Y. and M. Takemoto (2006) : Increase in peroxidase activity in tea callus in response to darkness, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and carbohydrates. *Plant Biotechnol.* 23, 405-408.
- 35) 齋藤武範・青島洋一 (2007) : チャのペルオキシダーゼ活性を高める懸濁培養条件. 平成19年度静岡県農林水産関係試験研究成果情報. 70-71.
- 36) Asada, K. (1992) : Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85, 235-241.
- 37) Eskling, M., Arvidsson, P.O. and H.E. Åkerlund (1997) : The xanthophylls cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant.* 100, 806-816.
- 38) Banerjee, R. and A. Batschauer (2005) : Plant blue-light receptors. *Planta* 220, 498-502.