コマツナ葉ディスクの L-アスコルビン酸含量および ペルオキシダーゼ活性に及ぼす光の影響

森 村 洋 子・相 見 靈 三*

恵泉女学園短期大学園芸生活学科*

制御環境下で生育させたコマツナ (*Brassica campestris* L.) の葉身から切り取ったディスク (直径 1 cm) をあらかじめ純水 20 ml を入れたペトリ皿中に浮かべ、25°C, 相対湿度 60% の下で、13,000 lux の光を 4 日間連続照射したところ、ディスクの L-アスコルビン酸含量は時間の経過に伴い急速に増加した。しかし、ペルオキシダーゼ活性は 4 日間の光照射の後もわずかな増大しか示さなかった。一方、ディスクが暗黒下に置かれた場合、L-アスコルビン酸含量は 4 日後に著しく減少したが、ペルオキシダーゼ活性は光照射下に置かれた場合よりはるかに高い値を示した。クロロフィル含量およびタンパク質含量は光照射下、暗黒下ともに時間の経過に伴って減少する傾向が認められた。

これらのことから、コマツナ葉のディスクにおけるペルオキシダーゼ活性の消長と L-アスコルビン酸含量は密接な関係をもつと考えられ、光照射はペルオキシダーゼ活性の上昇を抑える効果がある。

1984 年 9 月 10 日受付

緒 言

植物体における L-アスコルビン酸の生理的役割についてはこれまでに数多くの生理化学的研究が報告されている。すなわち、光照射下に置かれたナス葉ディスクのクロロフィル、DNA、RNA およびタンパク質含量の減少が L-アスコルビン酸の添加により抑えられることが明らかにされ¹⁾、また、ピーマン果実の種子中では L-アスコルビン酸は電子伝達系の一員としてフェノール物質の生成および酸化還元調節に関与していることが報告されている²⁾。さらに、ハウレンソウ葉の葉緑体において L-アスコルビン酸はその酸化還元系を基本として生体内の活性酸素を消去する役割を果たしていることが報告され^{3,4)}、植物体内における L-アスコルビン酸の生理機能は漸次明らかにされつつある。

筆者ら⁵⁾はコマツナを用いて光、温度などの環境要因

が L-アスコルビン酸含量に及ぼす影響について調べ、これまでに光がある程度強まると L-アスコルビン酸含量は光飽和の状態を示し、その場合の光の強さは温度が高いとき大となるが、それは必ずしもみかけの光合成の増減の影響を直接的に受けるものではないことを報告した。

一般に L-アスコルビン酸は生体内の還元剤として過酸化物の除去作用に関与していると考えられていることから、本実験ではコマツナの葉身から切り取ったディスクに光を照射したとき、L-アスコルビン酸含量とペルオキシダーゼ活性がどのような関係を示すかをディスクが暗黒下に置かれた場合と比較しながら検討した。

材料および方法

1. 供試材料

供試植物としてコマツナ (*Brassica campestris* L.) を用いた。コマツナ種子をパーライト単用播種床に点播し、2 日ごとに粉末ハイポネックス (N:P:K=6.5:6.0:19.0) 1,000 倍希釈液による浸透灌漑を行いながら、グロースキャビネット (明条件 6,500 lux, 12 時間, 25°C, 暗条件 12 時間, 15°C 相対湿度 60%, 光源として白色蛍光灯ランプ東芝 FL 40SW 10 灯使用) 内で 1 週間栽培した。本葉第 1 葉が出始めた苗を、次に水耕用フ

Yoko MORIMURA* and Reizo AIMI*: Effects of Light on L-Ascorbic Acid Content and Peroxidase Activity in the Leaf Disks of Japanese Komatsuna, a Kind of *Brassica campestris*.

* Department of Horticulture, Keisen Junior College, Isehara, Kanagawa 259-11, Japan.

ラスコ（黒色ビニル塗料塗布，50 ml 容）に移し，前記のハイポネックス 1,000 倍希釈液を用いて 1 週間栽培，その後 100 ml 容水耕用フラスコに移し，さらに 1 週間栽培を行った．水耕液は 3 日ごとに交換した．

以上の方法により草丈約 11 cm，4 葉期まで生育させたコマツナ苗のうち，生育状態のよいものを選び実験に供した．

2. 光照射および暗黒処理

コマツナ苗の十分展開した本葉のうち，第 1 葉（老葉）および第 4 葉（幼葉）を用いて次のとおり光照射および暗黒処理を行った．老葉および幼葉の葉身の中肋を避けた中央部から本葉 1 枚につき 2 枚のディスク（直径 1 cm）をコルクボーラーを用いて切り取った．老葉，幼葉のそれぞれについてディスク 24 枚ずつを 1 処理とし，それらをあらかじめ純水 20 ml を入れたペトリ皿中に葉の表面を上に向けて浮かべ，25°C，相対湿度 60% となるように条件を設定したグロースキャビネットの明条件（13,000 lux，光源として白色蛍光ランプ東芝 FL 40SW 12 灯使用）および暗条件の下に 4 日間置いた．

3. L-アスコルビン酸含量の測定

L-アスコルビン酸含量はヒドラジン法⁹⁾に基づき測定した．すなわち，試料をメタリン酸溶液（最終濃度 5%）中で少量の海砂とともに磨砕し，900×g，10 分間遠心分離した後，上澄を試料液とした．試料液中の L-アスコルビン酸をジクロロフェノールインドフェノールにより酸化させ，2,4-ジニトロフェニールヒドラジンと反応（50°C，90 分間）させた後，生成したヒドラゾンについて 540 nm における吸光度を測定し，L-アスコルビン酸含量を求めた．L-アスコルビン酸含量は試料 100 g（生重量）当りの総アスコルビン酸 mg 数として表した．

4. ペルオキシダーゼ活性の測定

粗酵素液の抽出は次の方法により行った．試料を 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.0）中で少量の石英砂とともに乳鉢を用いて磨砕し，11,000×g，10 分間遠心分離し，得られた上澄を粗酵素液とした．

ペルオキシダーゼ活性の測定は Vetter ら¹⁰⁾の方法に基づき行った．すなわち，クエン酸リン酸緩衝液（pH 6.5）7.75 ml，1% *o*-フェニレンジアミン 0.5 ml，0.3% 過酸化水素 0.5 ml，酵素液 0.25 ml を混合し，30°C で 5 分間反応させ，*o*-フェニレンジアミンを酸化させた後，この反応液の 430 nm における吸光度を測定し，吸光度の増加から *o*-フェニレンジアミンの酸化速度を求め，酵素活性とした．

ペルオキシダーゼ活性は試料 1 g（生重量）当りの反応初期 1 分間の吸光度の増加量 0.01 を 1 unit として，

unit により表した．

5. クロロフィル含量の測定

クロロフィル含量は試料の 80% アセトン抽出液を 663 nm および 645 nm の両波長で比色定量して求め⁸⁾，試料 1 g（生重量）当りの mg 数として表した．

6. タンパク質含量の測定

タンパク質含量はケルダール法により窒素含量を測定し，得られた値に 6.25 を乗じて求め，試料 1 g（生重量）当りの mg 数として表した．

結 果

1. 明，暗条件下における L-アスコルビン酸含量の経時変化

コマツナの第 1 葉（老葉）および第 4 葉（幼葉）の葉身から切り取ったディスクをグロースキャビネット内の明条件および暗条件の下に 4 日間置き，その間 0，1，3，4 日目にディスクをそれぞれ 6 枚ずつ採取し，L-アスコルビン酸含量を測定した．結果は Fig. 1 および Fig. 2 に示したとおりである．光照射および暗黒処理の間，同一ペトリ皿中のディスクには外見上の差異は認められなかった．

明条件下に置かれたディスクの L-アスコルビン酸含量は時間の経過に伴って増加し，その速度は幼葉では老葉と比較して高くなる傾向を示した（Fig. 1）．一方，暗条件下に置かれたディスクでは L-アスコルビン酸含量は幼葉，老葉ともに 4 日間に漸次減少したが，とくに幼葉における第 1 日目の減少は顕著であった（Fig. 2）．

Fig. 1 Changes in the content of L-ascorbic acid under light condition.

Fig. 2 Changes in the content of L-ascorbic acid under dark condition.

2. ペルオキシダーゼ活性と光条件との関係

明条件および暗条件においてディスクの L-アスコルビン酸含量が上記のとおり増加または減少するとき、ペルオキシダーゼ活性がどのような変化を示すかを L-アスコルビン酸含量測定の場合と同様の光条件の下で調べた。すなわち、コマツナの新葉および幼葉から切り取っ

Fig. 3 Changes in peroxidase activities under light and dark conditions. Δ , young leaves in the light; $\circ$, old leaves in the light; $\blacktriangle$, young leaves in the dark; $\bullet$, old leaves in the dark.

たディスクをグロースキャビネット内の明および暗条件下に置き、0、2、4日目に明、暗各光条件についてそれぞれ8枚ずつのディスクを採取し、ペルオキシダーゼ活性を測定した。結果は Fig. 3 に示したとおりである。

図から明らかなように、ペルオキシダーゼ活性は明条件下では4日間にわずかな上昇しか示さなかったのに対し、暗条件下では急速な上昇が認められた。しかし、いずれの光条件の場合にも老葉および幼葉の間には大差は見られなかった。

3. クロロフィル含量およびタンパク質含量の経時変化

グロースキャビネット内の明および暗条件下に置かれたディスクを0、2、4日目に明、暗各光条件についてそれぞれ8枚ずつ採取し、クロロフィル含量を測定した。結果は Fig. 4 に示したように明、暗いずれの光条件下においてもクロロフィル含量は時間の経過に伴い次第に減少した。照射または暗黒処理後2日目には老葉、幼葉ともに明条件下におけるクロロフィル含量の減少が暗条件下の場合より顕著であるが、4日目になると明、暗両条件下で同様に著しい減少が認められた。

グロースキャビネット内の明条件または暗条件の下に置かれたディスクを0、2、4日目に8枚ずつ採取し、タンパク質含量の経時変化を調べ、その結果を Fig. 5 に表した。図に示したとおり、タンパク質含量は明、暗い

Fig. 4 Changes in the contents of chlorophylls under light and dark conditions. Δ , young leaves in the light; $\circ$, old leaves in the light; $\blacktriangle$, young leaves in the dark; $\bullet$, old leaves in the dark.

Fig. 5 Changes in the contents of proteins under light and dark conditions. Δ , young leaves in the light; $\circ$, old leaves in the light; $\blacktriangle$, young leaves in the dark; $\bullet$, old leaves in the dark.

ずれの光条件の下でも時間の経過に伴い減少した。減少の速度は老葉では光の有無に無関係にほぼ同程度であったのに対し、幼葉では光照射によりやや高くなる傾向を示した。

考 察

植物体中の L-アスコルビン酸は光合成産物を基質として生成され、したがって、光照射により含量が高まると考えられている。事実、コマツナの本葉から切り取ったディスクを水中に浮かべ、25°C、相対湿度 60% の条件下で 13,000 lux の光を 4 日間連続照射したところ、L-アスコルビン酸含量は急速に増加したが、ディスクを暗黒下に置いた場合には顕著な減少が認められた。このような傾向は幼葉では老葉にくらべ、より強く現れた。

L-アスコルビン酸は生体各部の酸化還元系において広く作用していると考えられているが、植物体における生理的役割について最近、L-アスコルビン酸が葉緑体で生成される過酸化水素を分解し、活性酸素に基づく毒性を消去することが報告されている⁹⁾。

一方、生体内の代表的な酸化酵素であるペルオキシダーゼが植物が病傷害を受けた場合に活性が上昇するほか、老化の際にも顕著な活性の増大が認められ、このことからペルオキシダーゼ活性の上昇はクロロフィル含量およびタンパク質含量の減少より信頼しうる老化の指標

となることが報告されている⁹⁾。

これらのことから、コマツナ葉ディスクにおける L-アスコルビン酸含量とペルオキシダーゼ活性との関係を明、暗両条件下で経時的に調べた結果、両者の間に密接な関係があることが認められた。すなわち、L-アスコルビン酸含量の増加が見られる明条件下ではペルオキシダーゼ活性は低い状態に抑えられているが、L-アスコルビン酸含量が減少する暗条件下ではペルオキシダーゼ活性は明条件よりはるかに高い値を示した。明条件の下では光合成産物からの L-アスコルビン酸の生成は高まり、暗条件下では抑制されるものと思われるが、コマツナの L-アスコルビン酸含量はみかけの光合成量の増減の影響を必ずしも直接的に受けるものではなく⁹⁾、他の生理的条件により L-アスコルビン酸含量が変動することも考えられる。しかし、その場合にも光は重要な環境要因になると思われる。本実験の結果から、コマツナ葉ディスクのペルオキシダーゼ活性は L-アスコルビン酸含量の増減を介して光の影響を受けることが示唆されるので、これについて生理化学的研究をさらに進め、L-アスコルビン酸の植物体内における生理的役割を明らかにしていきたい。また、このことはそ菜の栄養の見地からも栽培技術の確立に必要な基礎的研究となるものと思われる。

文 献

- 1) GARG, O. P., and V. KAPOOR. 1972. Retardation of leaf senescence by ascorbic acid. *J. Exp. Bot.* **23**: 699-703.
- 2) 山内直樹・緒方邦安. 1979. 果実、そ菜のアスコルビン酸に関する生理化学的研究 (第 5 報) 低温障害発生時のフェノール物質代謝に關与するアスコルビン酸の作用機作——とくに貯蔵ピーマン果実の種子について (その II). *園学雑* **47**: 537-545.
- 3) GRODEN, D., and E. BECK. 1979. H_2O_2 destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **546**: 426-435.
- 4) NAKANO, Y., and K. ASADA. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **22**: 867-880.
- 5) 森村洋子・青木順子・相見雪三. 1982. コマツナのアスコルビン酸含量に及ぼす光の強さと温度の影響. *生物環境調節* **20**: 53-56.
- 6) ROE, J. H., and C. A. KUETHER. 1943. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.* **147**: 399-407.
- 7) VETTER, J. L., M. P. STEINBERG, and A. I. NELSON. 1958. Quantitative determination of

- peroxidase in sweet corn. J. Agric. Food Chem. **6**: 30-41.
- 8) MACKINNEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. **140**: 315-322.
- 9) PARISH, R. W. 1968. Studies on senescing tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. I. The effects of cutting, and of inhibition of nucleic acid and protein synthesis. Planta **82**: 1-13.

Summary

Leaf disks (1.0 cm in diameter) of tender-green mustard (*Brassica campestris* L. var. *perviridis* L. H. Bailey) grown under controlled environmental condition were incubated on water in the light (13,000 lux) or in the dark at 25°C for 4 days.

During incubation L-ascorbic acid content of the leaf

disks rapidly increased in the light and decreased in the dark. Peroxidase activity increased in the dark during incubation, but the increase of activity was considerably suppressed in the light.

On the other hand, the fall in levels of chlorophyll and protein during incubation was observed in both light and darkness. The result indicates that senescence of leaf disks proceeds during incubation.

These suggest that the change in peroxidase activity during senescence of leaf disks of tender-green mustard is closely related to L-ascorbic acid content affected by light.

The differences between disks cut from old and young leaves were also studied about the changes in the contents of L-ascorbic acid, chlorophyll, protein and peroxidase activity during incubation of the leaf disks, but there was no significant difference in both disks.

(Received September 10, 1984)