

低温と光がアズキ実生の抗酸化酵素活性に与える影響

何 寧^{1,2}・太野友和¹・小嶋道之¹

(受理：2005年4月28日)

The effect of low temperature and light on the antioxidative enzyme activity of the Adzuki bean seedling.

Ning He^{1,2}, Tomokazu Futono¹, Michiyuki Kojima¹

摘 要

出芽期の低温に強いアカネダイナゴンと出芽期の低温に弱い斑小粒系-1の実生を15℃で低温処理した時に、両品種の抗酸化酵素活性に違いがあるのかどうかを調べた。アカネダイナゴンの緑化実生を低温処理すると、APX活性やCAT活性は上昇したが、斑小粒系-1のCAT活性は顕著に低下した。しかし、黄化実生に4000Lxの光照射下で低温処理すると、斑小粒系-1のCAT活性は上昇したが、アカネダイナゴンのそれはほとんど変化しなかった。斑小粒系-1の緑化実生は、光のある状態で低温を受けると代謝が乱れ、CAT活性が低下して細胞内の過酸化水素が過剰となり、細胞障害を起こすのかもしれない。

キーワード：アズキ、実生、低温処理、SOD、APX、CAT

緒 言

日本で生産されるアズキ (*Vigna angularis* L.) の約7割は、北海道で生産されている。十勝地方は、本州に比べて病害虫の発生が少なく、アズキ種実の成熟期である夏～秋の天候が良好なことから、特にアズキの栽培に適している¹⁾。しかし、アズキはインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) など他のマメ科植物に比べて冷害に弱く、低温障害を受けやすい植物である。アズキ栽培の歴史からみると、十勝地方では4年に1度の冷害、10年に1度の冷害が発生している¹⁾。冷害年のアズキの収量や品

質は著しく低下し、不足分を輸入アズキにたよることになり和菓子加工業者などへの影響も大きい。北海道でアズキを栽培する上での重要課題の一つは、道産品種の耐冷性の改善にある。アズキの低温障害は、①出芽期：出芽直後の長期低温日照不足によるカップリング及び枯死、②生育初期：本葉4～5葉期の低温による生育停止（芯止まり）、③開花期頃：開花期頃の低温による花粉不稔による着莢障害などとして観察されている^{1,2)}。これら①～③の時期に発生する低温障害が複合的に起こると著しい不作及び品質の低下を招くことになる。

¹ 帯広畜産大学畜産科学科食料生産科学講座

¹ Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Department of Animal Science, Department of Food Production Science, Food Nutritional Science

² 岩手大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻

² Iwate University, The United Graduate School of Agricultural Sciences, Science of Bioproduction, Plant Production

一般的に植物は、最適生育温度の上限および下限を超えた温度環境では、高温又は低温ストレスのために細胞の生理機能が損なわれて、著しい細胞障害を受ける³⁾。その原因物質の一つとして、活性酸素が考えられている。植物は、通常の生理条件下においても活性酸素を生成しているが、通常の生理条件で生じている活性酸素の量では細胞に障害を与えることはない⁴⁾。すなわち、発生した活性酸素はSOD(スーパーオキシドディスムターゼ)により過酸化水素に不均化され、生じた過酸化水素を葉緑体のAPX(アスコルビン酸ペルオキシダーゼ)や細胞質のCAT(カタラーゼ)が無毒な水に分解している。しかし、乾燥、強光、低温などの環境ストレス条件下では多量の活性酸素を生成することになる。また、低温下では、代謝活性が低下するにもかかわらず、太陽からのエネルギーが流入し続けるために、過剰なエネルギーによる光合成装置などの細胞構造の破壊が起こると考えられている。

出芽期の耐冷性が強い品種である「アカネダイナゴン」と出芽期耐冷性の弱い品種である「斑小粒系-1」の実生が受ける低温障害の程度は顕著に異なっていて、後者は低温障害によりカップリング症状や枯死する。これらの症状の原因を解明する第一段階として、低温処理による抗酸化酵素活性の変動に注目した。シンビジウムやサツマイモ、シロイヌナズナなどの葉は、低温ストレスにより抗酸化酵素の活性が増加することが報告⁵⁻⁷⁾されている。本研究は、アズキの低温障害発生機構について生化学的な基礎解析の一環として行い、低温処理によりアズキ2品種の抗酸化酵素活性が増加するのかどうか、また活性の変化に品種間差がみられるのかどうかについて検討した。

実験方法

1. 実験材料の調製

出芽期の低温に強い品種である「アカネダイナゴン」と出芽期の低温に弱い品種である「斑小粒系-1」を実験に用いた。アズキ種子は北海道立中央農業試験場(芽

室)の豆類第二科より分譲していただいた。プラスチックバットにバーミキュライトを詰め、給水させたのち、アズキ種子を約10cm間隔に1粒ずつ播種した。

上記のアズキ2品種は、帯広畜産大学Ⅲ号館の培養室(25℃)においてバットで育成させた。25℃、暗所で出芽させた黄化実生は、そのまま暗黒におくものと、光あり(照度4000Lx)におくものに分け、低温処理として15℃のグロースキャビネット(SANYO)に移した。アズキ実生は、処理0時間、12時間、24時間後に初生葉のみを採取して、粗酵素液を調製した。また、コントロールの材料は、25℃、明または暗条件でそれぞれ培養した実生を用いた。また、緑化実生は、出芽後に光あり(25℃)の条件で5日間育成し、15℃(弱光)のグロースキャビネット(SANYO)に移して、数日間培養し、低温処理したサンプルとした。初生葉のみを24時間毎に採取して、粗酵素液を調製した。

2. 粗酵素液の調製

予め冷やしておいた乳鉢に液体窒素と初生葉を加えて乳棒で粉碎した。粉碎した葉1gに対して0.4mM EDTA, 1mM アスコルビン酸, 2%(w/v)polyvinyl poly-pyrrolidoneを含む25mMリン酸カリウムバッファーを加えてよく混ぜ、25分間、遠心分離(4℃, 14000rpm)して得られた上清を粗酵素液とした。

3. 抗酸化酵素活性の測定⁸⁾

3-1. スーパーオキシドジスムター(SOD)活性の測定

粗酵素液は、セルロース透析チューブに入れ、2Lの10mMリン酸カリウムバッファーで20時間(4℃)、攪拌しながら透析して、SOD活性の測定用酵素液とした。分光光度計のセルに蒸留水2089.5 μ l(ブランクでは2099.5 μ l)、0.1mM EDTAを含む500mMリン酸カリウムバッファーと0.1mM シトクロムC, 1mM キサンチン溶液をそれぞれ300 μ lずつ取り、そこに8倍希釈した酵素液を加えてよく攪拌した。その後、キサンチンオキシダーゼ(XOD, 25Unit, 和光純薬工業製)を0.5 μ l加えて

直ちに攪拌し、550nmの吸光度の変化を測定した。反応は、XODの添加により開始し、シトクロムCの還元を吸光度の増加量から測定して活性を求めた。シトクロムCの還元を50%阻害する活性を1Unitとした。

3-2. アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) 活性の測定

1ml容の石英セルに、蒸留水832.5 μ l, 500mMリン酸カリウムバッファーを50 μ l, 40mMEDTAを2.5 μ l, 50mMアスコルビン酸を5 μ l, 酵素液(タンパク質量700 μ gの酵素液)50 μ lを加えてよく攪拌した。その後、50 μ lの10mM過酸化水素を加えて直ちに混和後、290nmの吸光度を測定した。反応は、過酸化水素を添加することにより開始し、アスコルビン酸の酸化を吸光度の減少から測定して活性とした。アスコルビン酸の分子吸光係数は2.8mM/cmを用いた。

3-3. カタラーゼ (CAT) 活性の測定

1ml容の石英セルに、10mM過酸化水素を950 μ l入れ、酵素液(タンパク質量450 μ gの酵素液を1000倍希釈)50 μ lを加え、直ちに240nmの吸光度を測定した。酵素液を加えた後の過酸化水素の分解を吸光度の減少から測定してCAT活性とした。過酸化水素の分子吸光係数は0.0394mM/cmを用いた。

3-4. 粗酵素タンパク質の定量

アズキ初生葉から抽出した粗酵素液のタンパク質量は、20倍希釈して、ブラッドフォード法で測定した。すなわち、エッペンチューブにサンプル20 μ lをとり、ブラッドフォード試薬(SIGMA社製)1mlを加えて混和、10分後に595nmの吸光度を求めた。検量線の作成には、既知量のウシ血清アルブミンを用いた。

結果及び考察

1. 低温と光がアズキ黄化実生の抗酸化酵素活性に及ぼす影響

アカネダイナゴンと斑小粒系-1の黄化実生を光有り/無で低温処理した場合のSOD活性に変化は認められなかったが、光無しで低温処理した場合には、両品種ともに24h以内にSOD活性が低下した(Table 1)。すなわち、両品種ともに光無しの低温条件でSOD活性は低下するが、光有りの低温条件では活性を維持していることが示された。また、両品種のAPX活性は、光の有無に関係なく減少した(Table 1)。コントロールと低温処理したサンプルでの値の違いがほとんど認められなかったため、APX活性の低下は低温による影響ではないと考えられる。また、光無しで低温処理した場合、両品種ともにCAT活性が低下したが、光有り/無で低温処理した時のアカネダイナゴン黄化実生のCAT活性は低下し、斑小粒系-1のそれは逆に上昇した(Table 1)。

Table 1 アズキ黄化実生を低温処理したときの抗酸化酵素活性の変化

品種名	光 ¹⁾ 処理時間 ²⁾ (Hour)	SOD ³⁾ 活性		APX ⁴⁾ 活性		CAT ⁵⁾ 活性		
		25°C	15°C	25°C	15°C	25°C	15°C	
アカネダイナゴン	0	0.011 \pm 0.001 ^a	0.011 \pm 0.001 ^a	1.15 \pm 0.12 ^a	1.15 \pm 0.12 ^a	82.2 \pm 1.0 ^a	82.2 \pm 1.0 ^a	
	無	12	0.008 \pm 0.004 ^a	0.008 \pm 0.004 ^a	0.81 \pm 0.01 ^b	0.61 \pm 0.01 ^b	ND	ND
		24	0.004 \pm 0.001 ^b	0.004 \pm 0.001 ^b	0.81 \pm 0.01 ^b	0.61 \pm 0.01 ^b	42.4 \pm 11.5 ^b	42.9 \pm 8.0 ^c
	有	12	0.011 \pm 0.001 ^a	0.011 \pm 0.001 ^a	1.01 \pm 0.01 ^a	0.91 \pm 0.12 ^a	42.9 \pm 6.8 ^b	65.1 \pm 3.3 ^b
		24	0.011 \pm 0.001 ^a	0.011 \pm 0.001 ^a	0.67 \pm 0.11 ^c	0.61 \pm 0.01 ^b	41.5 \pm 6.0 ^b	63.6 \pm 7.5 ^b
	斑小粒系-1	0	0.011 \pm 0.001 ^a	0.011 \pm 0.001 ^a	0.94 \pm 0.23 ^a	0.94 \pm 0.23 ^a	59.4 \pm 8.0 ^a	59.4 \pm 8.0 ^b
無		12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		24	0.004 \pm 0.001 ^b	0.006 \pm 0.001 ^b	0.61 \pm 0.01 ^b	0.61 \pm 0.16 ^b	32.5 \pm 7.8 ^b	45.2 \pm 1.4 ^b
有		12	0.011 \pm 0.001 ^a	0.011 \pm 0.001 ^a	0.87 \pm 0.12 ^a	0.81 \pm 0.16 ^a	60.7 \pm 4.4 ^a	79.3 \pm 5.0 ^a
		24	0.011 \pm 0.001 ^a	0.011 \pm 0.001 ^a	0.40 \pm 0.01 ^c	0.51 \pm 0.12 ^b	58.6 \pm 4.0 ^a	85.9 \pm 12.8 ^a

1)光: 無は暗所, 有は4000Lxを使用した。2)処理時間: 処理開始してからの時間で示した。15°C(もしくは25°Cのまま)に移してからの時間で示した。3)SOD, スーパーオキシドジスムターゼ(単位はUnit/ μ g protein) 4)APX, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(単位は μ mol/min/ μ g protein) 5)CAT, カタラーゼ(単位は μ mol/min/ μ g protein) データは平均値 \pm 標準偏差で表した。ND: 分析しなかった。データ間の有意差検定はダンカンの多重検定法で行った(p<0.05)。

すなわち、斑小粒系-1の黄化実生は、光のある状態で低温ストレスを受けるとCAT活性が上昇するが、アカネダイナゴン黄化実生のそれは変化しないことを示している。斑小粒系-1の黄化実生が光有りの低温処理によりCAT活性を上昇させるのは、品種の生理的な特徴の一つであるかもしれない。クロロフィルは葉緑体に特異的成分で、光合成を行うのに必要な色素分子である。アカネダイナゴン初生葉のクロロフィル合成能力は、斑小粒系-1のそれよりも高いことが圃場やファイトロンなどで観察された。低温遮光条件下で出芽させた斑小粒系-1の初生葉は、アカネダイナゴンのそれよりも顕著に黄色く、この状態が長く続くとカップリング症状を示し、やがて枯死してしまう。黄化葉が緑化するための環境条件は、アズキ品種によって異なっているようで、特にアカネダイナゴンと斑小粒系-1では顕著に認められた。光とともに低温に影響を受ける黄化葉から緑化葉になる生理機構、クロロフィルの合成機構；クロロフィルや前駆体（プロトクロロフィリドや5-アミノレブリン酸など）⁹⁾の合成酵素や転写因子などの関与も重要であろう。

2. 低温処理によるアズキ緑化実生の抗酸化酵素活性の影響

低温処理による斑小粒系-1緑化実生のAPX活性の変動はほとんど認められなかったが、アカネダイナゴンのそれは3日目に上昇した（Table 2）。また、斑小粒系-1の緑化実生を低温処理した時のCAT活性は著しく低下したが、アカネダイナゴンのCAT活性の顕著な変動は認められなかった（Table 2）。アカネダイナゴンと斑小粒

系-1の緑化実生のSOD活性も、低温に移したことによる顕著な活性変動は認められなかった。これらの結果から、アカネダイナゴンの緑化実生が低温を受けると、APX活性やCAT活性は上昇するが、斑小粒系-1のCAT活性は顕著に低下することが示された。出芽期の低温感受性の異なる2品種のアズキ実生において、黄化実生を低温処理した時にはCAT活性に違いが認められ、また緑化実生を低温処理した時にはAPX活性とCAT活性に違いが認められた。どちらも過酸化水素を消去する酵素の変動である点が興味深い。CATは細胞質にあり、APXは葉緑体に存在する酵素であり、それぞれの細胞器官での過酸化水素の消去に影響を与えている可能性が考えられる。北海道の5月中・下旬～6月初旬に弱光、低温状態が長く続く年があるが、このような冷害年の斑小粒系-1実生の多くは枯死もしくはカップリング状態となる。このような状態となるアズキ実生のCAT活性は顕著に低下して過酸化水素が増加することによる細胞障害を起こしているのかもしれない。Tewariら(1998)は、低温に弱い作物であるキュウリに低温ストレスを与えた時、プロトポルフィリンIXやプロトクロロフィリド含量が低下することを報告¹⁰⁾した。李ら(2001)は、カトレアとシンビジウムの葉に含まれるクロロフィル量と抗酸化酵素活性の間に顕著な正の相関のあることを報告⁵⁾している。シロイヌナズナなどと同様⁷⁾に、低温処理によりアカネダイナゴンのAPXやCAT活性の増加が認められたが、斑小粒系-1のそれは認められなかった。このことは、アズキ品種の違いにより、低温誘導性の抗酸化酵素遺伝子の発現や制御因子などが異なる可能性を示唆している。

Table 2 アズキ緑化実生を低温処理したときの抗酸化酵素活性の変化

光 ¹⁾ 温度	処理日数 ²⁾ (Day)	SOD ³⁾ 活性		APX ⁴⁾ 活性		CAT ⁵⁾ 活性	
		アカネダイナゴン	斑小粒系-1	アカネダイナゴン	斑小粒系-1	アカネダイナゴン	斑小粒系-1
有 25°C	0	0.023±0.003 ^a	0.018±0.003 ^a	0.14±0.02 ^b	0.20±0.01 ^a	43.2±7.6 ^b	71.4±5.2 ^a
15°C	1	0.020±0.003 ^a	0.016±0.004 ^a	0.18±0.01 ^b	0.20±0.01 ^a	ND	ND
	2	ND	ND	0.21±0.02 ^b	0.20±0.01 ^a	40.1±6.7 ^b	31.2±4.3 ^b
	3	0.026±0.004 ^a	0.012±0.001 ^b	0.47±0.17 ^a	0.20±0.01 ^a	55.1±5.9 ^a	34.2±5.0 ^b

1)光：有は4000Lxを使用した。2)処理日数：15°Cで処理開始してからの日数で示した。3)SOD. スーパーオキシドジスムターゼ（単位はUnit/μg protein）4) APX, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（単位はμmol/min/μg protein）5)CAT, カタラーゼ（単位はμmol/min/μg protein）データは平均値±標準偏差で表した。データ間の有意差検定はダンカンの多重検定法で行った（p<0.05）。ND：分析しなかった。

また、クロロフィル前駆体の合成活性や代謝中間体の量などによる光合成器官の障害も考えられるので、低温ストレス時の抗酸化酵素活性の発現調節機構との関連や、長期低温ストレスを受けたときのクロロフィル合成酵素の発現など制御因子についても今後、検討する必要がある。

謝辞：この研究に関する予備実験をしていただいた安藤舞子さんに感謝します。この研究は日本豆類基金協会の学術研究プログラムおよび帯広畜産大学 21 世紀 COE プログラム研究の一環で行われた。

引用文献

- 1.村田吉平(1997) アズキの耐冷性育種の成果と展望 北海道立農業試験場資料第 27 号 48-56.
- 2.土屋武彦・佐々木宏(1998) 北海道における作物育種 p141.
- 3.新免輝夫(1991) 現代植物生理学 環境応答 p142.
- 4.嶋岡泰世・三宅親弘(2001) 植物オルガネラにおける活性酸素生成 生物工学会誌 第 79 巻 第 8 号 304 - 307.
- 5.李進才・松井鑄一郎(2001) 低温処理が *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性に及ぼす影響 園芸学雑誌 70:360-365.
- 6.瓜谷郁三(2001) ストレスの植物生化学・分子生物学 187; 219-221.
- 7.Kudo,A., Aono,M., Nakajima,N., Saji,H., Tanaka, K. and Kondo,N.(1999) Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 112:279-290.
- 8.沈利星(2001) 雑草科学実験法 p296-298.
- 9.西原英治・高橋国昭・中田昇・田中浄・渡辺圭太郎(2001) 5-アミノレブリン酸(ALA)処理がホウレンソウの光合成速度、過酸化水素の生成、抗酸化物質及び活性酸素消去系に及ぼす影響 園芸学雑誌 70:346-352.
- 10.Tawari,A.K. and Tripathy,B.C (1998) Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat. *Plant physiology* 117:851-858.

Abstract

Seedlings of 2 varieties of Adzuki beans – the Buchisouryukei-1 variety, which is weak under low temperatures in the budding stage, and the Akanedainagon variety, which is resistant to low temperatures in the budding stage – were investigated to clarify whether differences in the antioxidative enzyme activity are associated with exposure to low temperatures (15°C). APX and CAT activity rose when greenish Akanedainagon seedlings were exposed to low temperatures, and the CAT activity of greenish Buchisouryukei-1 seedlings decreased significantly. CAT activity of etiolated Buchisouryukei-1 seedlings rose during chilling under light (4000Lx), but there was no recognizable change in etiolated Akanedainagon seedlings. It is the decreased CAT activity when greenish Buchisouryukei-1 seedlings are exposed to low temperatures, in combination with the resultant excessive hydrogen peroxide, that causes cell damage.

Keyword: Adzuki, seedling, low-temperature, Superoxide dismutase, Ascorbate peroxidase, Catalase

Res.Bull.Obihiro.,26(2005):21~25