

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, 抗酸化物質および活性酸素消去酵素に及ぼす影響

西原英治¹・高橋国昭¹・中田 昇¹・田中 浄¹・渡辺圭太郎²

¹ 鳥取大学農学部 680-8553 鳥取市湖山町

² コスモ総合研究所 340-0112 幸手市権現堂

Effect of 5-Aminolevulinic acid (ALA) on Photosynthetic Rate, Hydrogen Peroxide Content, Antioxidant Level and Active Oxygen-Scavenging Enzymes in Spinach (*Spinacia oleracea* L.)

Eiji Nishihara¹, Kuniaki Takahashi^{1*}, Noboru Nakata¹, Kiyoshi Tanaka¹ and Keitaro Watanabe²

¹ Faculty of Agriculture, Tottori University, Koyama, Tottori 680-8553

² Cosumo Research Institute, Gongendo, Satte 340-0112

Summary

The effects of 5-aminolevulinic acid (ALA), a key precursor in the biosynthesis of porphyrins, in a low level (0, 0.18, 0.60 or 1.80mM) on the photosynthetic rate, hydrogen peroxide contents, antioxidant substrates, and active oxygen-scavenging enzymes were investigated in the 3rd leaves of spinach (*Spinacia oleracea*).

1. Photosynthetic rates of leaves that were treated with different concentrations of ALA, increased significantly in day 3, and remained so for 6 days.

2. Hydrogen peroxide (H₂O₂) contents in leaves increased from day 6 to 9. The increase seems to be correlated with the promotion of the photosynthetic rate.

3. Oxidized ascorbate (DHA)/reduced ascorbate (ASC) ratio in treated leaves tended to remain constant, whereas reduced glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio increased.

4. Catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR) activities increased by day 3 after the ALA treatment. Superoxide dismutase (SOD) activity did not vary after ALA treatment.

Key Words: 5-aminolevulinic acid, ascorbate peroxidase, catalase, photosynthetic rate, *Spinacia oleracea*.

緒 言

5-アミノレブリン酸 (ALA) は, クロロフィルやヘム等のテトラピロール化合物群の生合成における前駆体で, ALA 生合成はこれら一連の生合成における最初の律速段階である. 通常, 植物体内での ALA 濃度は 50 nmol・gFW⁻¹ 以下に維持されているが (Stobart・Ameen-Bukhari, 1984), ALA 自身の生理的な役割については十分解明されていない.

ALA を植物へ外生的に処理する研究は Granick (1959) に始まった. 高濃度 ALA 処理はプロトクロロフィライド, プロトポルフィリン IX 等のクロロフィル生合成中間体の植物体内での濃度上昇を誘起する. ALA 処理した植

物を一定期間暗条件に置いた後, 光照射を行うと, 蓄積したクロロフィル生合成中間体の光増感作用により活性酸素種である一重項酸素 (¹O₂) が発生する. これが細胞膜成分と急速に反応して過酸化され, 植物に障害を与えるジフィニルエーテル系除草剤と類似の殺草作用を示すことが報告されている (Rebeiz ら, 1984; Kittsteiner ら, 1991; Chakraborty・Tripathy, 1992).

しかしながら, 低濃度の ALA を処理した植物は, ¹O₂ 発生による外的障害を示さず (Hotta ら, 1997a), むしろ植物生長促進ならびに収量向上 (Hotta ら, 1997b), 硝酸還元酵素活性の増加 (Mishara・Srivastava, 1983), 収穫時における CO₂ 固定能力の向上, 暗呼吸の抑制およびクロロフィル含量の増加 (Hotta ら, 1997a), イネの耐寒性 (Hotta ら, 1998) およびワタの耐塩性向上 (Watanabe ら, 2000) 等の高濃度処理とは全く異なる反応を示す. 堀田ら (1997) は, 植物の生長を促進する外生的 ALA の適正濃度

2000年1月24日受付. 2000年9月25日受理.

*Corresponding author.

は、茎葉処理で 0.06 mM~0.60 mM であると報告しており、ホウレンソウ栽培におけるこれらの低濃度 ALA 処理でも収量増加が報告されている (葎田ら, 1995)。しかしながら、低濃度 ALA 処理後の植物体の光合成速度、過酸化水素 (H_2O_2) の生成、活性酸素種の消去に關与する種々の抗酸化物質および活性酸素消去酵素の影響を經時的に調査した報告はない。

そこで本研究は、実際のホウレンソウ栽培時の低濃度 ALA 茎葉処理を想定し、ある程度生長したホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) における ALA 処理が光合成速度、 H_2O_2 の生成、活性酸素消去に關与する抗酸化物質および活性酸素消去酵素に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 材料の育成

本実験は、鳥取大学農学部の人工気象室 (人工光により植物体直上で $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$, 12 時間照射, 昼夜温度は 24°C) で行った。実験には、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) の耐暑性品種 'バージニア' を供試した。実験材料の育成は 1999 年 2 月 4 日 (第 1 回目播種), 2 月 11 日 (第 2 回目播種) および 2 月 18 日 (第 3 回目播種) にそれぞれ砂丘砂を充填した 9 号素焼き鉢に、1 鉢当たり 3ヶ所へ 3 粒ずつ播種した。本葉 2 枚展葉時に 1ヶ所 1 株に間引きし、1 鉢で 3 株を栽培した。そして、本葉が 7~8 枚展葉した時点で人工気象室に搬入して ALA 処理を開始した。肥料としては 500 倍に薄めた液肥 (N, P_2O_5 , K_2O それぞれ 360, 200, 80 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$) を 3 日おきに 1 回、1 鉢当たり 1 liter 与えた。また灌水は、埋設型土壤感圧水分センサーによる土壤水分張力を利用した灌水理論 (井上, 1994) に基づき、ホウレンソウの最適灌水量 (西原ら, 1999) になるようにした。

2. ALA の茎葉散布方法および分析材料の採取方法

試験区は茎葉散布した ALA 濃度 (0 mM, 0.18 mM, 0.60 mM および 1.80 mM) の 4 区とし、ALA 処理量は 1 株当たり 15 ml とした。ただし、0 mM は蒸留水のみを同量散布した。ALA 処理は光増感作用で 1O_2 を生じるために、実際の栽培に準じて、人工気象室の照明が消灯した直後に茎葉散布を行った。分析用材料は第 3 葉とし、処理開始前 0 日目、処理後 3 日目、6 日目および 9 日目に各区 3 鉢、9 株から採取した。採取した材料は素早く液体窒素で凍結し、分析に供試するまで -80°C の冷凍庫で保存した。

3. 光合成速度の測定

光合成速度の測定には、2 月 4 日に播種し育成した 12 鉢を用いた。4 月 5 日に同型の人工気象室に移し、3 日後に 3 鉢ずつ各濃度で ALA 処理した。それぞれの第 3 葉の光合成速度を、処理開始前 0 日目、処理後 3 日目、6 日目および 9 日目に光合成測定装置 (ライカー社製, LI6400)

で測定した。

4. 過酸化水素と抗酸化物質の抽出および定量ならびに活性酸素消去酵素の抽出および活性の測定

1) 過酸化水素 (H_2O_2), 全アスコルビン酸 (ASA), 酸化型アスコルビン酸 (DHA), 全グルタチオン, 酸化型グルタチオン (GSSG) の抽出および定量

冷凍保存した第 3 葉を液体窒素存在下、乳鉢・乳棒で磨砕し、5% メタリン酸を試料 1.0 g に 5 ml 加えて、さらに磨砕後、磨砕液を 20 分間遠心分離 (15000 rpm, 4°C) した。得られた上清液 1.5 ml をアスコルビン酸定量用の抽出液とし、残りの上清液は、6 M トリシン・NaOH 緩衝液 (pH 7.0) を加えて約 pH 7.0 にした後、過酸化水素 (H_2O_2) およびグルタチオン定量用の抽出液とした。

H_2O_2 含量の定量は、Terashima ら (1998) の方法に準じて行い、200 mM MOPS-KOH 緩衝液 (pH 7.0) 400 μl , 蒸留水 450 μl , 抽出液 50 μl および 10 mM K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) の中に 25 mM NADH が混合されている液を 10 μl 加え攪拌後、340 nm における吸光度を分光光度計で測定した。次に、上記反応液中に 4 unit $\cdot \text{ml}^{-1}$ NADH ペルオキシダーゼが 100 mM MOPS-KOH 緩衝液 (pH 7.0) に混合されている液を 10 μl 加え、 25°C で 1 時間放置して、340 nm での吸光度を分光光度計で測定した。 H_2O_2 含量は、NADH ペルオキシダーゼを加える前と後の 340 nm における吸光度の差から求めた。

全アスコルビン酸 (ASA) 含量および酸化型アスコルビン酸 (DHA) 含量の定量はヒドラジン法に準じて行い、520 nm における吸光度を測定した。還元型アスコルビン酸 (ASC) 含量は、ASA 含量から DHA 含量を差し引いて求めた (田中・榊, 1988)。そして DHA 含量および ASC 含量から DHA/ASC 比を求めた。

全グルタチオン含量および酸化型グルタチオン (GSSG) 含量の定量は、Tietze (1969) の方法に準じ、412 nm における吸光度を測定した。全グルタチオン含量の定量は中和した抽出液 (pH 7.0) を 100 μl , 0.5 mM EDTA を含む 10 mM K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) 625 μl , 4 mM NADPH/5% NaHCO_3 62 μl , 0.5 mM EDTA を含む 10 mM K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) に 6 unit $\cdot \text{ml}^{-1}$ グルタチオン還元酵素が混合されている液 125 μl を加え、 37°C で 10 分間放置し 412 nm における吸光度を測定し、その後 10 mM DTNB/100 mM K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) を 62 μl 加え、その時の吸光度の変化を測定した。また、GSSG の定量は、抽出液 100 μl にビニルピリジン 60 μl を加え、15000 rpm で 10 分間遠心分離した。遠心分離した液の上層にはビニルピリジンが浮き、下の清んだ液を GSSG 抽出液とした。その後、全グルタチオン定量法と同様の方法で測定した。還元型グルタチオン (GSH) 含量は、全グルタチオン含量から GSSG 含量を差し引いて

求めた。そして、それらの結果から GSH/GSSG 比を求めた。

2) カタラーゼ (CAT), アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX), グルタチオン還元酵素 (GR) およびスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の抽出および活性の測定

粗酵素液の調製は、前項と同様に試料を液体窒素存在下で細かく磨砕し、その試料 0.3 g に 1 mM L-アスコルビン酸を含む 50 mM K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) を 5 ml 加えてさらに十分磨砕した後、20 分間遠心分離 (15000 rpm, 4°C) して行った。得られた上清液を CAT, APX および GR 活性の測定に用いた。またこの上清液の一部は 2 時間に 1 度 10 mM K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) を換えながら 4°C 下で 24 時間透析後、SOD 活性の測定に用いた。

CAT 活性は、Kubo ら (1995) の方法に準じ、0.5 M H_2O_2 20 μ l, 1 M K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) 100 μ l, 蒸留水 860 μ l を加えて 240 nm における吸光度を測定し、その後抽出液 20 μ l を加えてこの時の吸光度の減少を測定した。CAT 活性は、240 nm における吸光度の減少から H_2O_2 の分子吸光係数 $0.04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて計算した。

APX 活性は、Nakano・Asada (1981) の方法に準じた。1 M K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) 100 μ l, 10 mM L-アスコルビン酸 50 μ l, 蒸留水 780 μ l, 抽出液 20 μ l を加えて測定し、その後 10 mM H_2O_2 50 μ l を加えてこの時の 290 nm における吸光度の減少を測定した。APX 活性は、290 nm における吸光度の減少からアスコルビン酸の分子吸光係数 $2.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて計算した。

GR 活性は、Foyer・Halliwell (1976) の方法に準じ、1 mM EDTA を含む 0.5 M K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) 100 μ l, 蒸留水 770 μ l, 抽出液 50 μ l, 10 mM NADPH/10 mM K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) 20 μ l を加えて測定し、その後 10 mM 酸化型グルタチオン/10 mM K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) 20 μ l を加えて、この時の吸光度の減少を 340 nm で測定した。GR 活性は、340 nm における吸光度の減少から NADPH の分子吸光係数 $6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて計算した。

SOD 活性は、McCord・Fridovich (1969) の方法に準じ、1 mM EDTA を含む 0.5 mM K-Phosphate 緩衝液 (pH 7.8) 100 μ l, 1 mM キサンチン 100 μ l, 0.1 mM チトクロム *c* 100 μ l, 蒸留水 630 μ l および透析済み抽出液 50 μ l を加えて、550 nm の吸光度を測定した。その後 2 M 硫酸 (pH 7.8) の中に $0.3 \text{ unit} \cdot \text{ml}^{-1}$ キサンチンオキシダーゼが含まれている液 20 μ l を加えた時の吸光度の増加を 550 nm の波長で測定し、V 値を求めた。その後同量の反応液に抽出液 50 μ l を加えて反応させ v 値を求めた。SOD の 1 酵素単位は、チトクロム *c* の還元を 50% 阻害する量と定義されているので、 $V/v - 1$ (V: SOD のない時の

チトクロム *c* 還元速度, v: SOD のある時のチトクロム *c* 還元速度) から SOD 活性を求めた。

なお抗酸化物質の定量および酵素活性の測定は、すべて分光光度計 (島津 MPS-2000) を用いて行った。

結 果

1. 光合成速度の経時変化と生育への影響

光合成速度の経時変化は第 1 図に示した。光合成速度は、すべての ALA 処理区において処理後 3 日目から有意に高くなり、処理後 9 日目でも高い値を維持していた。ALA 0.60 mM 区の光合成速度が特に高く、0 mM 区に対して約 3 倍であった。ALA の濃度が高まるにつれて光合成速度が上昇したが、1.80 mM 区では濃度が高すぎたためか光合成速度はむしろ低下した。

すべての ALA 処理区のアサダの生育は処理後 9 日目まで正常で外観上の変化は認められなかった。

2. 過酸化水素含量 (H_2O_2) の経時変化

第 2 図に示すように、 H_2O_2 含量は ALA 処理後 3 日目まで処理の影響が認められなかった。しかし、処理後 6 日目になると、0.60 mM 区と 1.80 mM 区で有意に高くなった。処理後 9 日目では H_2O_2 含量がすべての ALA 区で有意に高かった。また、 H_2O_2 含量は、ALA 処理濃度に比例して高くなる傾向を示した。

3. 各抗酸化物質含量の経時変化

DHA/ASC 比および GSH/GSSG 比の経時変化は第 3 図に示した。その結果 DHA/ASC 比は ALA 処理による一定の関係を示さなかった。

一方 GSH/GSSG 比は、ALA 濃度が高ければ高いほど 0 mM 区に比べて大きくなった。特に処理後 9 日目における 1.80 mM 区は 0 mM 区に比べて約 8.8 倍と最も高く、次いで 0.60 mM 区も 7.4 倍で高かった。

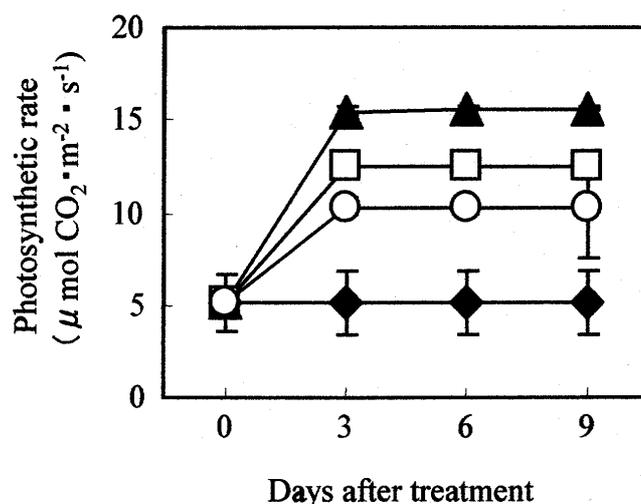


Fig. 1. Time-course changes in photosynthetic rate in spinach leaves sprayed with ALA.

ALA concentration applied: ◆ 0 mM, □ 0.18 mM, ▲ 0.60 mM and ○ 1.80 mM.

Vertical bars indicated SE values (n=3).

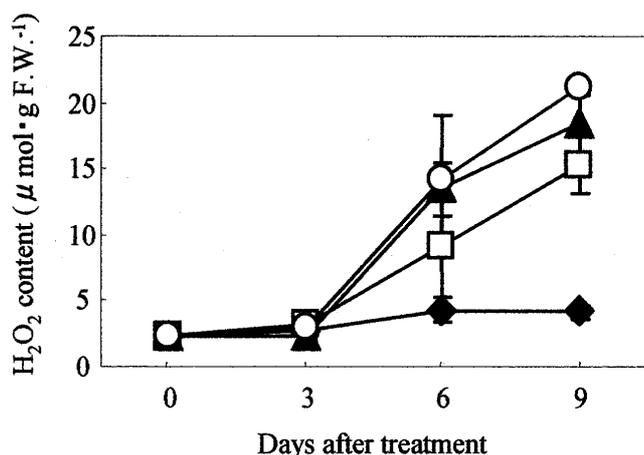


Fig. 2. Time-course changes in H_2O_2 content in ALA-treated spinach leaves.

ALA concentration applied: \blacklozenge 0 mM, \square 0.18 mM, \blacktriangle 0.60 mM and \circ 1.80 mM.

Vertical bars indicated SE values ($n=3$).

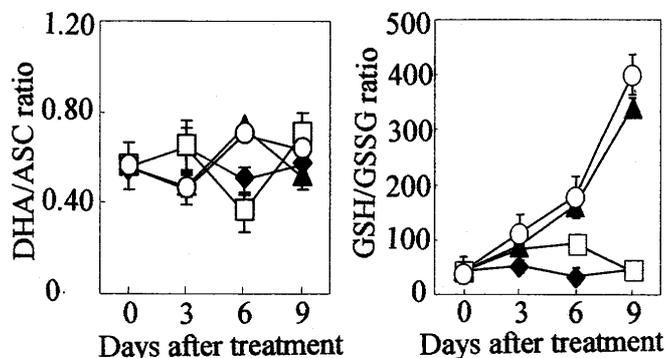


Fig. 3. Time-course changes in DHA/ASC ratio and GSH/GSSG ratio in ALA-treated spinach leaves.

ALA concentration applied: \blacklozenge 0 mM, \square 0.18 mM, \blacktriangle 0.60 mM and \circ 1.80 mM.

Vertical bars indicated SE values ($n=3$).

4. 活性酸素消去に關与する酵素活性の経時変化

第4図はCAT, APX, GRおよびSOD活性の経時的变化を示す。CAT活性は処理後3日目にはすべてのALA区で0 mM区に比べて有意に高く、特に1.80 mM区では0 mM区より約2.3倍の高い活性を示した。0.60 mM区および1.80 mM区のCAT活性は処理後6日目も0 mM区に比べて有意に高く、それぞれ2.7倍、2.4倍であった。さらに1.80 mM区は処理後9日目でも他区に対して1%水準で有意に高かった。

APX活性は、CAT活性同様に、処理後3日目にすべてのALA区で0 mM区より高く、0.18 mM区、0.60 mM区および1.80 mM区でそれぞれ0 mM区の1.2倍、2.0倍および2.5倍であった。その後6日目にはAPX活性がすべてのALA区で低下したが、0 mM区に比べると高い値を示した。処理後9日目の0.60 mM区および1.80 mM区はAPX活性が、それぞれ約1.7倍、2.3倍と高かったが、0.18 mM区は差がなくなった。

GR活性は、処理後3日目では、すべてのALA区で、0 mM区の約2倍と高かったが、ALA処理区間の差は認め

られなかった。最も処理濃度の低い0.18 mM区ではその後低下し、0.6 mM区では処理後6日目が最も高くその後低下した。これらに比べ、最も処理濃度の高い1.80 mM区では、処理後9日目まで高い活性を維持した。

SOD活性は、処理後3日目で処理区間に差が認められなかった。しかし、処理後6日目におけるすべてのALA区の活性は0 mM区に比べて有意に高かった。処理後9日目では、0 mM区に比べて高かったものの有意差が認められたのは0.60 mM区のみであった。

考 察

ALAはクロロフィルやヘム等のテトラピロール化合物群の生合成における前駆体(第5図)である。ホウレンソウでは、低濃度ALA茎葉散布処理による収量の増加が報告されている(葭田ら, 1995)が、同処理による光合成速度、過酸化水素(H_2O_2)の生成、活性酸素種の消去に關与する種々の抗酸化物質および活性酸素消去酵素の活性の経時的变化の報告はない。本研究ではその影響を調査し、実際のホウレンソウ栽培における低濃度ALA処理の収量増収の原因を明らかにしようとした。

一般に、光合成における光化学系Iの電子受容側でスーパーオキシカル(O_2^-)が生成されると、ストロマ内のSODにより、 O_2^- は H_2O_2 に変換され、さらに生成した H_2O_2 はAPXやCATによって無害な水や酸素になるとされている。本研究ではホウレンソウに低濃度のALAを散布して、 H_2O_2 の生成、活性酸素消去に關与する抗酸化物質および酵素活性の経時变化を調べたところ、特にALA処理の0.60 mM区から1.80 mM区で H_2O_2 含量、GSH/GSSG比、CAT、APXおよびGRの活性に有意な増加が認められた(第2, 3, 4図)。しかしながら、DHA/ASC比およびSODの活性の変化には、一定の傾向が認められなかった(第3図)。

本研究におけるALA処理によるホウレンソウ葉中の H_2O_2 蓄積の原因は、光合成速度の増加にともなう H_2O_2 生成系の促進と 1O_2 の蓄積が考えられる。本研究の低濃度でALA処理したホウレンソウの光合成速度は、処理後3日目にすべての処理区で高まり、9日目まで速度が維持されたが(第1図)、この結果はHottaら(1997b)によるALAのダイコン茎葉散布処理における光合成速度の増加と一致している。一方、 H_2O_2 含量はALA処理後3日目まで増加しなかったが、処理後6日目、9日目に高くなった(第2図)。このことからALA処理を行うことにより光合成速度が増加し、その結果 H_2O_2 生成が促進されたと考えられる。ところがALA処理後3日目に光合成速度が上昇したにもかかわらず H_2O_2 含量が増加しなかった。これは、CATやAPXの活性が、処理後3日目に高まったため H_2O_2 を消去したと考えられた(第4図)。しかし、処理後6日目以降CATやAPXの活性は低下したため、高いレベルで生成された H_2O_2 のすべてを水に還元することが出来

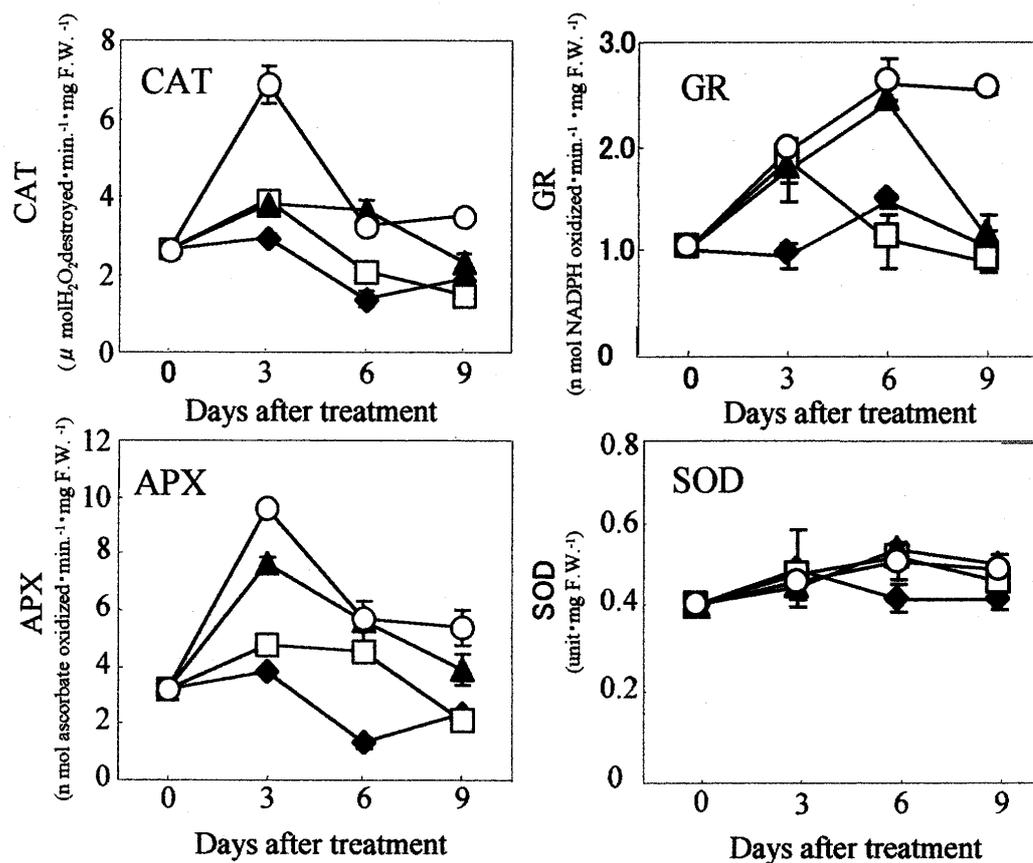


Fig. 4. Time-course changes in CAT, APX, GR and SOD activities in ALA-treated spinach leaves.

ALA concentration applied: \blacklozenge 0 mM, \square 0.18 mM, \blacktriangle 0.60 mM and \circ 1.80 mM.

Vertical bars indicated SE values (n=3).

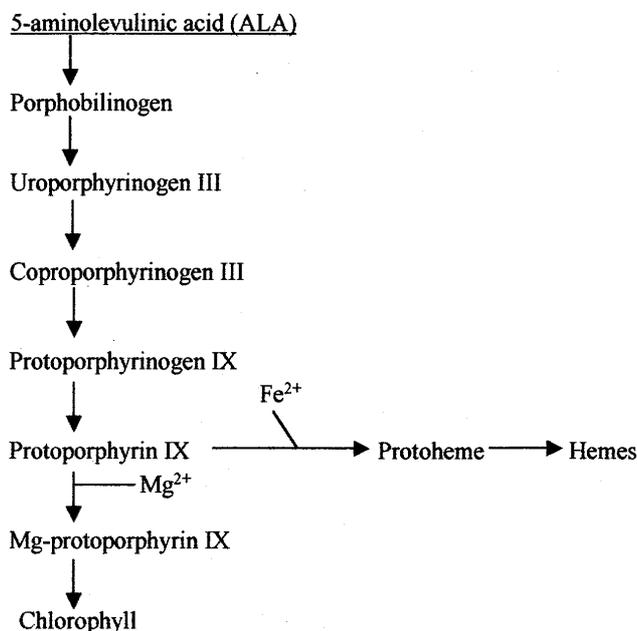


Fig. 5. Biosynthetic pathway of chlorophyll from 5-aminolevulinic acid (ALA).

ず、 H_2O_2 が増え続けたと推定される。また、GRはGSSGをGSHに還元する機能を持ち、APX等と共役し、アスコルビン酸-グルタチオンサイクルと呼ばれる H_2O_2 消去系を形成しているが(Jiménezら, 1997)、 H_2O_2 含量の増加を考慮するとGR活性の増加のみではAPX、CAT

の活性低下を完全に補うことができなかったと考えられる(第4図)。本研究におけるAPXおよびGR活性の増加のずれは次のように考えられる。通常葉緑体では光化学系で生成された H_2O_2 は、チラコイド還元系でAPXにより消去されるが、チラコイド還元系で消去できなかった H_2O_2 は、APXやGRを含むアスコルビン酸-グルタチオンサイクルからなるストロマ還元系で消去される(浅田, 1999)。それゆえ、ALA処理により光合成速度が増加するに従い H_2O_2 含量が増加してくると、チラコイド還元系だけでは消去できない H_2O_2 が多く生じてきて、ストロマ還元系での H_2O_2 の消去も活発となると考えられる。その結果、APXとGRの活性増加のタイムコースにずれが生じるものと推察される。

また、もう一つの H_2O_2 含量の増加の要因はALA処理により $^1\text{O}_2$ が生成し、チラコイド膜の構造が緩み、光化学系の電子受容側から電子の酸素への漏出が多くなったため、 O_2^- の生成速度が高まって、 O_2^- を多量に蓄積し、SODにより H_2O_2 へ変換されたのではないかと考えられる。

このように低濃度ALA処理による H_2O_2 含量の増加には2つの要因が考えられる。しかし、ALA処理により光合成速度が増加し、その結果 H_2O_2 が増えたという推定だけでは0.18 mM区の実験結果を理解することができな

い。ALA処理による H_2O_2 増加の原因は、光合成速度の増加以上に 1O_2 の蓄積の要因が大きく、しかもALA処理濃度が高くなればなるほど 1O_2 の蓄積が大きいと考えられる。

GSH/GSSG比の増加についてはGullner・Dodge (2000)がマメのリーフディスクにALAを処理するとGSH含量が増加すると報告している。本研究のGSH/GSSG比の結果はこの報告と一致している。

一方、ALA処理後3日目におけるCATおよびAPX活性の一時的な増加については、松下ら(1997)とJonesら(1996)が報告したように、リグニン分解菌において培地にALAを添加するとペルオキシダーゼ類の活性が一時的に2~10倍に増加することと類似している。また、Thomas・Weinstein (1990)もキュウリのプラスチックに50 μ M ALAを処理するとヘムの流出が増加し、ペルオキシダーゼ、カタラーゼおよびチトクロムP450等が増加する可能性を指摘している。従って、ホウレンソウにおいてもクロロフィルやヘムの前駆体であるALAの処理は、ある濃度でヘムの流出を高め、ヘムを含むCATやAPXの生合成を一時的に増加させたと考えられる。

堀田ら(1997)は、莖葉へのALA適正散布濃度が0.06 mM~0.60 mMで植物の生長促進および収量増加効果が認められたと報告し、葎田ら(1995)も、0.06 mM~0.60 mM ALA莖葉散布でホウレンソウの収量や非構造貯蔵炭水化物(フルクタン)が増加すると報告している。また、著者らは夏期栽培のホウレンソウに0.60 mM~1.80 mMのALA莖葉散布処理実験を行い、ホウレンソウの明らかな生育促進効果を確認している(西原ら, 2000)。本研究のALA処理区のホウレンソウの生育は、処理後9日目まで正常で外観上の変化は認められず、ALA処理による生育への影響はなかった。これは高濃度のALA処理で見られる殺草作用が低濃度のALA処理では発生しなかったと考えられ、Hottaら(1997a)の結果と一致した。

以上より、本研究におけるALA濃度の範囲では処理濃度が高いほどホウレンソウの H_2O_2 含量は増加を示したが、ホウレンソウの光合成速度の増加、GSH/GSSG比の増加、CAT、APXおよびGRの活性を一時的に高める効果も示した。乾燥ストレス条件下におけるホウレンソウでは、APX活性の増加は活性酸素生成に対して自己防御として作用しているとTanakaら(1990)により報告されている。加えて、Hottaら(1998)は低濃度ALA処理によりイネ葉身の低温障害が低減し、耐寒性が向上したこと、およびWatanabeら(2000)はワタの耐塩性が向上したことをそれぞれ報告している。これらのことから低濃度ALA処理は乾燥、低温及び塩ストレスのような環境ストレス条件下でのホウレンソウの生育を可能とするので、さらに実験を行う予定である。

摘 要

ポルフィリン生合成の前駆体であるALAの低濃度(0.18 mM~1.80 mM)莖葉処理がホウレンソウの光合成速度、葉中の過酸化水素量、活性酸素消去に關与する抗酸化物質および活性酸素消去酵素活性の経時的变化に及ぼす影響について調べた。

1. 光合成速度は、ALA処理により処理後3日目までに明らかに増加し、処理後9日目までほぼ同じ値を示した。
2. 過酸化水素(H_2O_2)含量は、ALA処理濃度が高いほど増加を示した。
3. 酸化型アスコルビン酸/還元型アスコルビン酸(DHA/ASC)比は一定の傾向が認められなかった。しかし、還元型グルタチオン/酸化型グルタチオン(GSH/GSSG)比はALA処理濃度が高いほど0mM区より大きい値を示した。
4. カタラーゼ(CAT)およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)活性はALA処理後3日目に一時的に顕著に増加し、グルタチオン還元酵素(GR)活性もALA処理後3日目に増加した。しかし、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性には一定の傾向が認められなかった。

引用文献

- 浅田浩二. 1999. 葉の光環境変動に対する迅速適応. p. 107-119. 渡邊昭・篠崎一雄・寺島一郎著. 細胞工學別冊植物細胞工學シリーズ11. 植物の環境応答-生存戦略とその分子機構-. 秀潤社. 東京.
- Chakraborty, N. and B. C. Tripathy. 1992. Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic damage of cucumber (*cucumis sativus* L.) chloroplasts. *Plant Physiol.* 98: 7-11.
- Foyer, C. H. and B. Halliwell. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts; a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* 133: 21-25.
- Granick, S. 1959. Magnesium porphyrins formed by barley seedling treated with δ -aminolevulinic acid. *Plant Physiol.* 34: XIII.
- Guller, G and A. D. Dodge. 2000. Accumulation of glutathione in pea leaf discs exposed to the photooxidative herbicides acifluorfen and 5-aminolevulinic acid. *J. Plant Physiol.* 156: 111-117.
- Hotta, Y., T. Tanaka, L. Bingshan, Y. Takeuchi and M. Konnai. 1998. Improvement of cold resistance in rice seedlings by 5-aminolevulinic acid. *J. Pesticide Sci.* 23: 29-33.
- Hotta, Y., T. Tanaka, H. Takaoka, Y. Takeuchi and M. Konnai. 1997a. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: The increase of photosynthesis,

- chlorophyll content, and plant growth. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 2025-2028.
- Hotta, Y., T. Tanaka, H. Takaoka, Y. Takeuchi and M. Konnai. 1997b. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. *Plant Growth Regulation.* 22: 109-114.
- 堀田康司・渡辺圭太郎・田中 徹・竹内安智・近内誠登. 1997. 5-アミノレブリン酸が幼植物の生育に及ぼす影響. *日本農業学会.* 22: 102-107.
- 井上光弘. 1994. 埋設型土壌感圧水分センサー. *日本砂丘学会誌.* 41(2): 74-79.
- Jiménez, A., J. A. Hernández, L. A. del Río and F. Sevilla. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114: 275-284.
- Jones, F. G., A. Wolstenholme, S. Fowler, S. Smith, K. Ziemnicka, J. Bradbury, J. Furmaniak and B. R. Smith. 1996. High-level expression of recombinant immunoreactive thyroid peroxidase in the high five insect cell line. *J. Mol. Endocrinol.* 17: 165-174.
- Kittsteiner, U., A. Mostowska and W. Rudinger. 1991. The greening process in cress seedlings. Pigment accumulation and ultrastructure after application of 5-aminolevulinic acid and complexing agents. *Physiol. Plant.* 81: 139-147.
- Kubo, A., H. Saji, K. Tanaka and N. Kondo. 1995. Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Mol. Biol.* 29: 479-489.
- 松下啓太・割石博之・田中浩雄. 1997. 外因性5-アミノレブリン酸の担子菌細胞外へム酵素発現への影響. *日本生物工学会大会要旨集.* 49: 59.
- McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- Mishara, S. N. and H. S. Srivastava. 1983. Stimulation of nitrate reductase activity by delta amino levulinic acid in excised maize leaves. *Experientia.* 39: 1118-1120.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 37: 679-690.
- 西原英治・高橋国昭・近藤謙介・中田 昇・渡辺圭太郎. 2000. 5-アミノレブリン酸(ALA)処理が砂地におけるハウレンソウ夏期栽培の生育に及ぼす影響. *農業生産管理学会誌.* 7(別1): 9-10.
- 西原英治・高橋国昭・中田 昇・井上光弘・近藤謙介. 1999. 砂地圃場における埋設型土壌感圧水分センサーによる土壌水分制御 - 秋期と春期におけるハウレンソウの生育, 収量及び品質. *日本砂丘学会要旨集.* 46: 22-23.
- Rebeiz, CA., A. Montazer-Zouhoor, H. J. Jopen and SM. Wu. 1984. Photodynamic herbicides: Concepts and phenomenology. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 390-401.
- Stobart, A. K. and J. Ameen-Bukhari. 1984. Regulation of δ -aminolevulinic acid synthesis and protochlorophyllide regeneration in the leaves of dark-grown barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Biochem. J.* 222: 419-426.
- Tanaka, K., R. Masuda, T. Sugimoto, K. Omasa and T. Sasaki. 1990. Water deficiency-induced changes in the contents of defensive substances against active oxygen in spinach leaves. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2629-2634.
- 田中 浄・榊 剛. 1988. 代謝調節物質の分析. アスコルビン酸, グルタチオン. p.51-52. 大政謙次・近藤矩朗・井上頼直著. *植物の計測と診断.* 朝倉書店・東京.
- Terashima, I., K. Noguchi, T. Itoh-Nemoto, Y-M. Park, A. Kubo and K. Tanaka. 1998. The cause of PSI photoinhibition at low temperatures in leaves of *Cucumis sativus*, a chilling-sensitive plant. *Physiol. Plant.* 103: 295-303.
- Thomas, J. and J. D. Weinstein. 1990. Measurement of heme efflux and heme content in isolated developing chloroplasts. *Plant Physiol.* 94: 1414-1423.
- Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- Watanabe, K., T. Tanaka, H. Kuramochi and Y. Takeuchi. 2000. Improving salt tolerance of cotton seedling with 5-aminolevulinic acid. *Plant Growth Regul.* (in press).
- 葭田隆治・田中陽子・田中 徹・堀田康司. 1995. ハウレンソウにおける非構造貯蔵炭水化物(フラクタン)の量的変動に及ぼす5-アミノレブリン酸の効果. *日作紀.* 64(別1): 140-141.