

シチメンソウ (*Suaeda japonica* Makino) の光合成速度、クロロフィル蛍光および酸化ストレス耐性に対するベタシアニンの生理作用

早川啓亮^{1,2}・東江 栄^{1*}・野瀬昭博¹

¹佐賀大学農学部 〒 840-8502 佐賀県佐賀市本庄町 1

²鹿児島大学大学院連合農学研究科 〒 890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24

要約 アカザ科のシチメンソウは有明海干潟に自生する耐塩性の高い塩生植物である。本種は生育段階や環境条件に応じて、ベタシアニンを蓄積して葉身を緑色から赤色に変化させる。ベタシアニンはストレスによって誘導されることが報告されているが、その機能については不明な点が多い。本研究はシチメンソウのストレス耐性に対するベタシアニンの生理機能を明らかにすることを目的に、光合成速度、クロロフィル蛍光および酸化ストレス耐性に対するベタシアニンの影響を検討した。

ベタシアニンは主に表皮組織および表皮に近い柵状組織の葉肉細胞に局在していた。ベタシアニン含量の増加に伴い、ベタシアニン抽出液の光透過度は低下した。葉身中のベタシアニン含量とクロロフィル含量は負の相関関係にあった。単位葉面積当たりの光合成速度はベタシアニンの蓄積に従い低下したが、単位クロロフィル当たりの光合成速度はベタシアニンを含む赤緑色および赤色の葉身で高かった。純化したベタシアニンは DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) ラジカル消去能を示し、活性酸素種によるクロロフィルの漂白を抑えた。パラコートで誘導した酸化ストレスに対する耐性は赤色葉身で高かった。ベタシアニンの蓄積によってクロロフィル蛍光における光化学的消光 (qP) は低下し、非光化学的消光 (qN) は増加したことから、赤色葉身では過剰な光エネルギーを熱として放散する能力が高いことが明らかになった。

以上のことから、ベタシアニンはシチメンソウの葉内で入射光量を調節して活性酸素種の発生を抑制し、さらに抗酸化物質として活性酸素種を消去し、光酸化および光阻害の発生を防いでいると考えられた。

キーワード 塩生植物、活性酸素、抗酸化能、光酸化、光阻害

Physiological Functions of Betacyanin in Photosynthetic Rate, Chlorophyll Fluorescence and Oxidative Stress Tolerance in *Suaeda japonica* Makino Keisuke HAYAKAWA^{1,2}, Sakae AGARIE^{1*} and Akihiro NOSE¹ ¹Faculty of Agriculture, Saga University, 1, Honjo-machi, Saga 840-8502, Japan. ²The United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan.

Abstract *Suaeda japonica* Makino is an annual hydrohalophyte belonging to Chenopodiaceae and inhabits salt marshes in Ariake tidal flats, Japan. One of the distinct traits of *S. japonica* is the change of the leaf color from green to red-purple and red at different growth stages in response to environmental conditions. The red leaf coloration is due to the accumulation of betacyanin. Although betacyanin biosynthesis is induced by stress conditions, the physiological functions of betacyanin have not been fully elucidated. In the present study, we surveyed the effects of betacyanin on the photosynthetic rate, chlorophyll fluorescence, oxidative stress tolerance based on chlorophyll degradation.

Betacyanin accumulated in the epidermal tissues and upper palisade mesophyll. The light intensity transmitted to the betacyanin solution decreased with the increase in the betacyanin content. The betacyanin level varied significantly in leaves, and was negatively correlated to the chlorophyll content. The rate of photosynthetic oxygen evolution, on a leaf area basis, decreased with the accumulation of betacyanin, but on a chlorophyll basis, the rate was higher in the green-red leaves containing some amounts of betacyanin. Betacyanin showed a free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging capacity, and it prevented chlorophyll bleaching caused by the hydroxyl radical. In red leaves treated with paraquat, a superoxide anion inducer, the degree of chlorophyll degradation caused by oxidative stress was alleviated. The value of non-photochemical quenching (qN), a parameter of chlorophyll fluorescence, was higher and that of photochemical quenching (qP) was lower in red leaves than in green leaves.

These results indicated that betacyanin acts as a filter for the light intensity transmitted into the leaf tissues to reduce reactive oxygen species (ROS) generation, and it also acts as a ROS scavenger under stress conditions. Betacyanin may prevent photo-oxidation and photo-inhibition in *S. japonica* under the harsh environmental conditions prevailing in salt marshes.

Key Words: Antioxidant, Halophyte, Photo-inhibition, Photo-oxidation, Reactive oxygen species

緒言

近年、塩類集積による土壌の劣化が進行しており、特に熱帯・亜熱帯の乾燥・半乾燥地域における灌漑農

業では二次的な塩類集積が深刻な問題となっている。沿岸域、塩沼地、塩漠といった海水と同程度か、あるいはそれ以上の塩を含む土壌でも生育できる塩生植物は油糧種子 (Marcone, 2003) や生理活性物質 (Meot-Duros ら, 2008) および塩類を除去するクリーニングクロープとして利用可能であり (Ravindran ら, 2007)、塩害地域において利用価値の高い資源として期待される。国内最大級の塩性湿地である有明海の干潟には多くの塩生植物が自生しており、農業資源とし

責任編集者 野村和成

2008年2月26日受付

2008年8月23日受理

*Corresponding author

agarie@cc.saga-u.ac.jp

での利用も期待されるが、その特性や利用法について検討した例はほとんどない。本研究では有明海の代表的な塩生植物であるシチメンソウ (*Suaeda japonica* Makino) を用いて色素の機能性からストレス耐性機構を解析した。

シチメンソウは、アカザ科マツナ属の一年生草本である。本種はアッケシソウ (*Salicornia europea* L.) およびハママツナ (*Suaeda maritime* L.) 等と並ぶ湿塩生植物であり、我が国では九州北部の有明海沿岸、国外においては朝鮮半島のごく限られた地域に分布する (岩村, 1987)。有明海干潟にはシチメンソウ以外にもホソバナハマアカザ (*Atriplex gmelinii* C. A. Meyer) やヒロハママツナ (*Suaeda malacosperma* Hara) 等の塩生植物が自生するが、シチメンソウの自生地は最も海に近く、満潮時には冠水するような地帯にある。したがってシチメンソウは他種よりも環境変動が激しくストレスを受けやすい条件におかれていると考えられる。

シチメンソウは生育段階や環境条件に応じて、葉色を緑色、赤色および赤紫色等に変化させる。多くの一年生草本および落葉樹は秋季から冬季にかけて紅葉するが、本種は発芽直後の冬季、生育初期の早春および生育終期の秋季にかけて紅葉する。植物の一般的な紅葉色素はアントシアニンやカロテノイドであるが、シチメンソウの場合はベタシアニンであり、中心子目のみに存在する。ベタシアニンはベタレイン系色素の一つであり、水溶性で、植物体内では葉身、花弁および果実等を構成する細胞の液胞に局在する。ある種の植物では、生育環境の劣悪化やストレス処理によってベタシアニンが蓄積することが報告されている。アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) は強光および紫外線照射下で (Ibdah ら, 2002; Vogt ら, 1999)、またビート (*Beta vulgaris* L.) は、機械的な傷害や病原菌の接種、あるいは過酸化水素によって葉身表皮にベタシアニンが蓄積する (Sepúlveda-Jimenez ら, 2004)。

シチメンソウの紅葉する時期や生育環境から判断すると、少なくとも低温、土壤養分および塩分濃度などがベタシアニン合成の誘導に関与すると考えられる。このようなストレス条件下では活性酸素種が生成され、酸化ストレスが引き起こされる。したがって、シチメンソウにおけるベタシアニンの合成は酸化ストレスを回避あるいは軽減するために誘導されると考えられるが、詳細は調べられておらず、ベタシアニンの生理機能についてはよく分かっていない。

植物の代表的な赤色色素であるアントシアニンもベタシアニンと同様、ストレスによって蓄積することが報告されている (Grace ら, 1998; Mendez ら, 1999; Pietrini・Massacci, 1998)。アントシアニンの機能については、吸収光量や吸収波長を調節す

る光フィルターとしての役割 (Lee, 1986; Barker ら, 1997)、UV-B からの防御 (Klaper ら, 1996) や光阻害を回避すること (Gould ら, 1995; Dodd ら, 1998)、および活性酸素種を消去すること (Neill ら, 2002; Yamasaki, 1997) 等が報告されている。ベタシアニンとアントシアニンの植物界における分布は互いに排他的で、同一種に共存する例は報告されていないが、植物体内における局在性から機能的な類似性が示唆されている (Stafford, 1994)。シチメンソウのベタシアニンもアントシアニンと同様の機能を持つことが期待されるが、これまでほとんど調べられていない。

本研究はシチメンソウのストレス耐性に対するベタシアニンの作用を明らかにすることを目的に、ベタシアニン含量の異なる葉身の光合成速度、酸化ストレスによるクロロフィル漂白およびクロロフィル蛍光に及ぼすベタシアニンの影響を調べた。

材料および方法

供試材料

供試材料はアカザ科マツナ属のシチメンソウ (*Suaeda japonica* Makino) であった。東与賀海岸西側干潟に自生する緑色、赤色および両者の中間的な赤緑色を呈する個体を、2004年10月6日および10月22日に採取した。採取にあたっては、東与賀町より許可を得た。光合成速度の測定およびパラコート処理に供した個体は土壌ごと採取し、それ以外の実験に供した試料は、葉身のみを採取し、液体窒素に浸漬して凍結させた後、 -80°C で保存した。

顕微鏡による形態観察

徒手切片法により完全展開した2次葉から中心横断面の切片を作成し、光学顕微鏡 (Nikon, Labophoto) を用い形態観察を行なった。葉身全体および葉肉細胞の顕微鏡倍率はそれぞれ50倍および200倍とした。

ベタシアニン溶液中の光透過度

アクリル製のキュベット ($1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 3\text{cm}$) に超純水を入れ、キュベットを透過する光量子束密度が $1500\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ になるように光を照射した後、キュベットにシチメンソウの葉身から抽出・精製したベタシアニンを添加し、透過光量を照度計 (東京光学機械, SPI-71) で測定した。

クロロフィルの定量

クロロフィル含量は Porra ら (1989) の方法を一部改変して測定した。すなわち、凍結試料に100%アセトンを加え磨砕し、 17000G 、 4°C で10分間遠心分離した。上清に 2.5mM リン酸ナトリウム緩衝溶液 ($\text{pH}7.8$) を加えてアセトン濃度を80%とし、波長 663.6nm および 646.6nm における吸光度を分光光度計

(Shimadzu, UV-160) で測定し含量を算出した。

ベタシアニンの定量

ベタシアニン含量はクロロフィルを抽出した沈澱残渣を暗所で減圧乾燥させ、超純水を加えた。17000G, 4.0°Cで10分間遠心分離して得た上清の波長538nmにおける吸光度を上述の分光光度計で測定した。ベタシアニンの分子吸光係数を $60,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ とし含量を算出した (Stintzing ら, 2003)。

光合成速度の測定

光合成速度は気相型酸素電極 (Hansatech, LD2/2) で測定した。測定は切除葉身について行い、測定に供試した葉身の総葉面積は約 10 cm^2 であった。測定チャンパー内温度を 29°C, 光量子束密度を 0, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 および $2500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とした。またチャンパー内の二酸化炭素、窒素および酸素濃度は、それぞれ 3%, 76% および 21% とした。

ベタシアニンの精製

ベタシアニンは Wang ら (2006) の方法を一部改変して精製した。凍結試料に10倍量のメタノールを加え磨砕し、17000G, 4.0°Cで10分間遠心分離した。沈殿に10倍量のメタノールを添加し、ホモジナイザー (日音理科器械製作所, NS-50) で破碎した。17000G, 4.0°Cで15分間遠心分離し、上清に含まれるクロロフィル、カロテノイドおよびポリフェノール類を除去した。沈殿に10倍量のエタノールを加え、上述のホモジナイザーで破碎し、17000G, 4.0°Cで15分間遠心分離して、上清に含まれるアスコルビン酸などの抗酸化物質を除去した。沈殿に50%エタノールを加え、同様に破碎し、17000G, 4.0°Cで10分間遠心分離し上清を得た。さらにタンパク質を除去するため、上清に中性フェノール (pH 7.0), クロロホルムおよびイソアミルアルコールを 25:24:1 の割合で混和した溶液を等量加え、17000G, 4.0°Cで10分間遠心分離し、水層を得た。混入したフェノールを除去するために、水層にクロロホルムとイソアミルアルコールを 24:1 の割合で混和した溶液を加え、17000G, 4.0°Cで10分間遠心分離した。得られたベタシアニン溶液の波長538nmにおける吸光度を分光光度計で測定し濃度を算出した。

クロロフィルの漂白に及ぼすベタシアニンの効果

クロロフィルの漂白はフェントン反応によった。上述した方法で抽出したクロロフィル抽出液に終濃度が 0.5mM になるように硫酸鉄を加え、さらに終濃度が 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 および 2.0% になるように過酸化水素を添加し、ヒドロキシラジカルを発生させた。過酸化水素添加10分後の波長663nmにおける吸光度を上述の分光光度計で測定した。同様に過酸化水素濃

度を 2.0% としたクロロフィル抽出液と硫酸鉄の混合溶液に、上述の方法で葉身から抽出、精製したベタシアニンを終濃度 0, 0.1, 0.3, 0.6 および 1.3mg/L になるように加え、波長663nmにおける吸光度を測定した。

パラコート処理によるクロロフィルの分解

パラコート処理は Pogány ら (2004) の方法を一部改変し行なった。すなわち、0.1% Tween-20 を含む $100 \mu\text{M}$ パラコート溶液に、ベタシアニン含量の異なる葉身を浸漬し、明期 25°C および暗期 20°C, 日長 12 時間、光を約 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とした人工気象器内 (日本医化器械製作所, LPH-350S) に2日間置いた。その後、葉身に残存するクロロフィル含量を上述した方法で測定した。

ベタシアニンの抗酸化能

葉身から抽出、精製したベタシアニン溶液に MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) バッファー (pH6.0) およびエタノールを添加し、それぞれの濃度が 100mM および 50% となるように希釈した。抗酸化能はメタノールに溶解した $100 \mu\text{M}$ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) に等量の抽出液を添加し、室温、暗所に5分間おいた後、波長518nmにおける吸光度を上述の分光光度計で測定し評価した。

クロロフィル蛍光の測定

測定にはクロロフィル蛍光測定装置 (OPTISCIENECES, OS5-FL) を用いた。葉身を付属の暗適応クリップで15分間暗処理した後、光化学的消光 (qP) ならびに非光化学的消光 (qN) を測定した。

結果および考察

土壌塩分濃度が高く潮汐によって水没と乾燥を繰り返す干潟のような厳しい環境下では、植物の体内に活性酸素種が発生し、細胞や組織等に損傷を与える。一般に植物は酸化ストレスに対する防御反応として、活性酸素消去系酵素の活性を上昇させ、抗酸化物質を生成し、二次代謝産物の合成を促進する (Mittler, 2002; Shohael ら, 2006)。ベタシアニンも二次代謝産物に分類されるアルカロイドの一種で、ストレスおよびそれに付随して発生する活性酸素種によって誘導が促進されることがビート (*Beta vulgaris* L.) で示されている (Sepúlveda-Jimenez ら, 2004)。したがって、シチメンソウにおけるベタシアニンの蓄積も同様な機構によるものと考えられ、適応あるいは防御反応の一つと推察される。ベタシアニンの生理機能を調べるために、まずシチメンソウの葉身におけるベタシアニンの局在を調べた。ベタシアニンは赤色葉身の表皮組織および表皮に近い柵状組織の葉肉細胞に局在していた

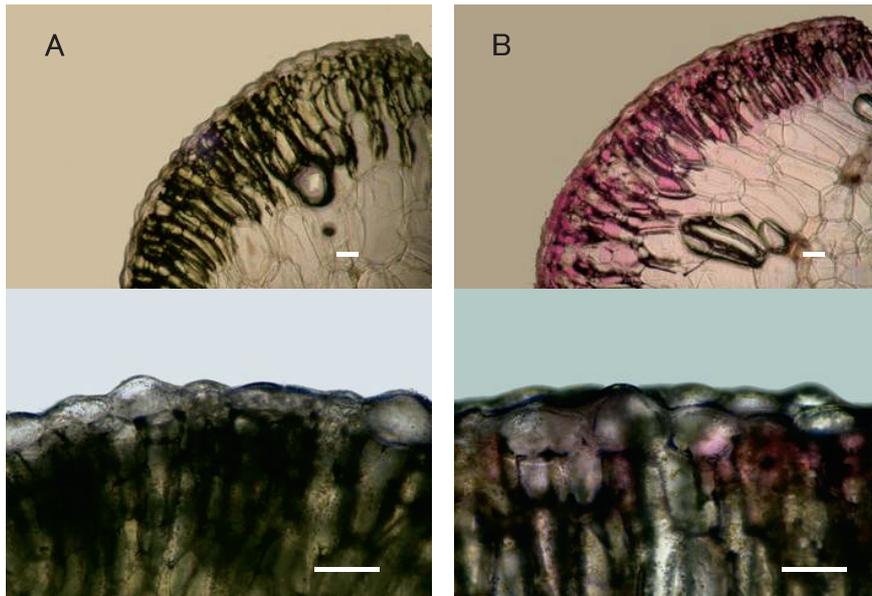


Fig. 1 Microscopic views of transverse sections of *S. japonica* leaves.
Micrograph of green (A) and red leaves (B).
Scale bars show 100 μ m.

(Fig. 1). これはストレス処理したアイスプラントの葉身で観察された結果と一致する (Ibdah ら, 2002). Stafford (1994) はベタシアニンが葉内に到達する光量を調節するフィルターとして機能する可能性を示唆している. シチメンソウにおけるベタシアニンの機能を調べるため, ベタシアニン抽出液の光透過度を測定した (Fig. 2). その結果, 一定強度の光を照射したキュベットにシチメンソウから抽出したベタシアニンを添加すると, 添加量の増加に伴い光透過度は低下した. このことから, シチメンソウのベタシアニンもフィルター機能を有することが示唆された. 光合成の光阻害は通常, 過度な光エネルギーによって引き起こされる

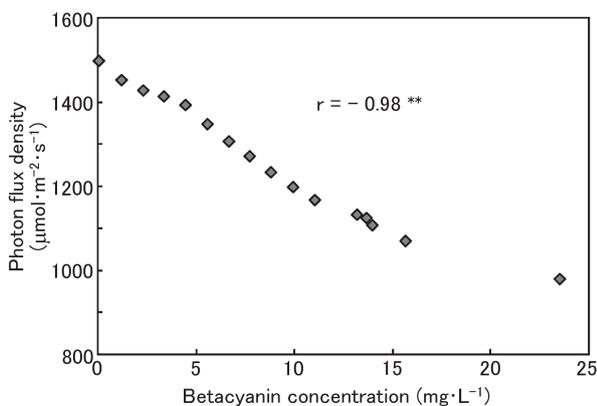


Fig. 2 Relations of photon flux density and betacyanin concentration in extract buffer.
 r is Pearson's correlation coefficients between betacyanin concentration and Photon flux density.
The asterisk (**) indicates a significant difference at the 1% level.

が, 不良環境下, 特に低温下では, 光合成関連酵素の活性が低下するため, 強光でなくても光阻害が起こりやすい状態となる. アントシアニンの合成は強光で誘導されるが, 過剰な光量子を吸収し, クロロフィルに吸収される光量を制限するため, 結果として活性酸素の生成を抑制し, 光阻害を防ぐことが示唆されている (Gould, 2004). シチメンソウの紅葉は気温や海水温の低下した光阻害の起きやすい時期にみられる. ベタシアニンはこのような環境下で光量の調節に関与し,

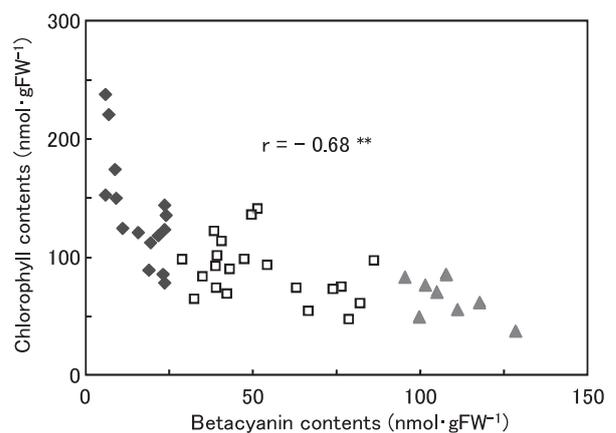


Fig. 3 Relations of chlorophyll and betacyanin contents in leaves of *S. japonica*.
Betacyanin contents of green (◆), red-green (□) and red (▲) leaves were 5-10, 20-50 and 60-130 (nmol·gFW⁻¹), respectively.
 r is Pearson's correlation coefficients between betacyanin contents and chlorophyll contents.
The asterisk (**) indicates a significant difference at the 1% level.

光阻害を回避していると考えられる。

Fig. 3には葉身のクロロフィル含量とベタシアニン含量との関係を示した。緑色葉身ではクロロフィルは多く、ベタシアニンはほとんど含まれていなかった。赤色葉身では逆にベタシアニンは多いがクロロフィルが少なく、両色素の間には負の相関関係が認められた。クロロフィルとベタシアニンはいずれもグルタミン酸を初発物質として合成されることから(旭, 1981; Ginsら, 2002), ベタシアニンの合成にはクロロフィルとの間に中間代謝産物の競合が起こると推察される。ハゲイトウ (*Amaranthus tricolor* L.)の葉身は、ベタシアニンの蓄積した層の上にクロロフィルを重ねるように蓄積するため、クロロフィルの分解が進むと下層にあるベタシアニンが顕在化し、赤色化する(Iwamotoら, 2001)。本研究の結果から、シチメンソウの場合はこれとは異なり、環境条件の変化に伴って、クロロフィルからベタシアニンの合成へ代謝が切り替わると考えられた。代謝の切り替えは、葉身が赤くなる時期から推察して、低温、強光および乾燥などに左右されると考えられる。ベタシアニンの合成は強光、紫外線照射下および低温(Ibdahら, 2002; Vogtら, 1999; Wangら, 2006)などのストレス条件下で誘導されるが、クロロフィルの合成は逆に強光や低温などで抑制される。これはクロロフィルの前駆体である5-アミノレブリン酸の合成が阻害されるためである(Aartiら, 2007; Tewari・ripathy, 1998)。ストレス条件下ではクロロフィル代謝の阻害により、ベタシアニン合成に用いられる基質量は増加すると考えられる。クロロフィル含量の低下は、光エネルギーの過剰吸収を抑え、活性酸素種の発生を減少させることが示唆されている(李ら, 2004)。またストレス条件下におけるクロロフィルの減少は熱放散に関わるキサントフィルおよび活性酸素の消去に関わるトコフェロール、ルチン、アビエタン型ジテルペンなどの相対含量を増加させ、葉身の熱放散および抗酸化能力を高めることが報告されている(Adamsら, 1994; Munné-Bosch・Alegre, 1999; Verhoevenら, 1997)。シチメンソウにおけるクロロフィルの減少は、光阻害や光傷害の誘発される環境下においては、活性酸素の生成抑制および消去に対し有利に作用すると考えられる。

Fig. 4Aにはベタシアニン含量の異なる葉身の光強度と単位葉面積当たりの光合成速度の関係を示した。単位葉面積当たりの光合成速度は光強度の増加に伴い上昇し、光強度 $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下でほぼ飽和した。飽和光下の単位葉面積当たりの光合成速度は緑色葉身で最も高く、ついで緑色と赤色の中間的な赤緑色、赤色および濃赤色とベタシアニン含量の増加に伴い減少した。Fig. 5Aに示したように、単位葉面積当たりの光合成速度とクロロフィル含量の間には高い正の相関関係が認められた。また、ベタシアニン含量と葉面

積当たりの光合成速度との間には負の相関関係が認められたが(Fig. 5B)、これはFig. 3で示したように、ベタシアニン含量の高い葉身でクロロフィル含量が低いためと考えられる。一方、光強度に対するクロロフィル当りの光合成速度は、単位葉面積当たりの光合成速度と同様に光強度 $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で飽和する傾向を示したが、飽和光下のクロロフィル含量当たりの光合成速度はベタシアニンとクロロフィルを含む赤緑色葉身で最も高く、次いでベタシアニン含量の高い赤色、ベタシアニン含量の低い緑色葉身の順で低くなった(Fig. 4B)。ベタシアニンを含む葉身でクロロフィル当りの光合成速度が増加した要因としてHill反応の活性化が考えられる。Hill反応と光合成速度には相関関係があるが、ベタシアニンを蓄積する *Bougainvillea spectabilis* では、緑色の展開葉より赤色の苞葉でHill反応が大きいことが報告されている(Sharma, 1980)。またアントシアニンを蓄積する

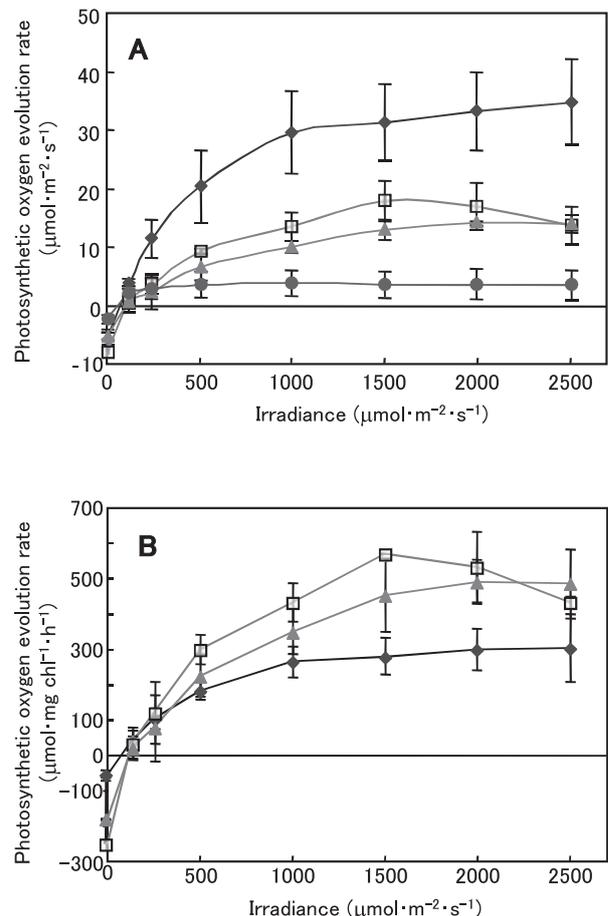


Fig. 4 Light-response curves for photosynthetic oxygen evolution in the leaves with different contents of betacyanin, on a leaf area basis (A), and on a chlorophyll basis (B).

Betacyanin contents of green (◆), red-green (□), red (▲) and deep-red (●) leaves were 5-10, 50-80, 100-120 and 150-200 ($\text{nmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$), respectively.

Bars show the standard error; $n = 3$.

Rosa damascene および *Euphorbia pulcherrima* では、クロロプラストの懸濁液にアントシアニンを添加すると Hill 反応が活性化するが、これはアントシアニンが光受容体として働き、クロロプラストへエネルギーを伝達するためと考えられている (Sharma・Banerji, 1981). Fig. 3 に示したように赤色葉身はクロロフィル含量が少ないため、単位葉面積当たりの光合成速度は低下するが、これを補うためにベタシアニンが Hill 反応を活性化させ、クロロフィル含量の低い赤色葉身における光合成能力を補償していると推察される. この点についてはさらに検討する必要がある.

Fig. 6 にはヒドロキシラジカルによるクロロフィルの漂白を示した. ここでは二価の鉄イオンと過酸化水素のフェントン反応によってヒドロキシラジカルを発生させた. クロロフィルの漂白率は添加する過酸化水素濃度の増加に従って増加した (Fig. 6A). しかし、ベタシアニンが共存するとクロロフィルの漂白は緩和され、漂白率は反応液に添加するベタシアニン濃度の増加に伴って低下した (Fig. 6B). このことはベタシアニンが活性酸素を捕捉し、クロロフィルの分解を防い

でいることを示唆している. 同様なことがパラコートを用いた実験でも示された (Fig. 7). パラコートは光照射下で光化学系 I の NADPH から電子を奪い、パラコトラジカルとなり、電子を酸素に渡しスーパーオキシドアニオンを生成する. 一般に、パラコート処理で生成した活性酸素によりクロロフィルは分解するが、シチメンソウでは、パラコート処理によりベタシアニン含量の少ない葉身でクロロフィル含量が大きく減少し、逆にベタシアニンを多く含む赤色葉身でクロロフィルの分解はほとんどなかった. このことはベタシアニンが抗酸化能を有していることを示唆している.

ベタシアニンの抗酸化能を調べるために、シチメンソウの葉身からベタシアニンを抽出・精製し、フリーラジカルである DPPH の消失能力を測定した (Fig. 8). その結果、DPPH の残存率はベタシアニンの濃度上昇に従って低下し、両者間には高い負の相関関係が認められた. これらの結果から、シチメンソウのベタシアニンは、ビートやアマランサスのベタレインと同様に、抗酸化能を有することが明らかとなった. ベタシアニ

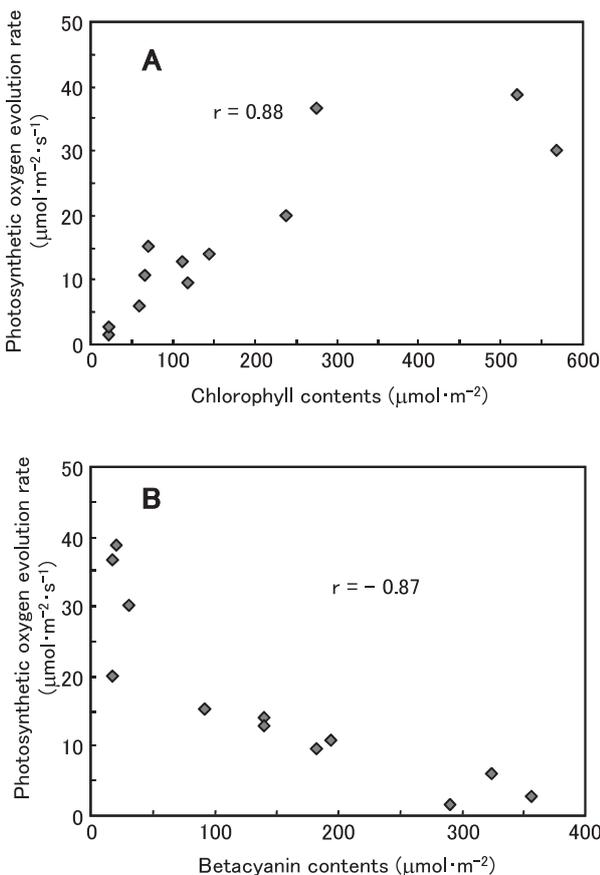


Fig. 5 Relations between photosynthetic oxygen evolution rate and contents of chlorophyll (A) and betacyanin (B).
r is Pearson's correlation coefficients between betacyanin, chlorophyll contents and photosynthetic oxygen evolution rate.

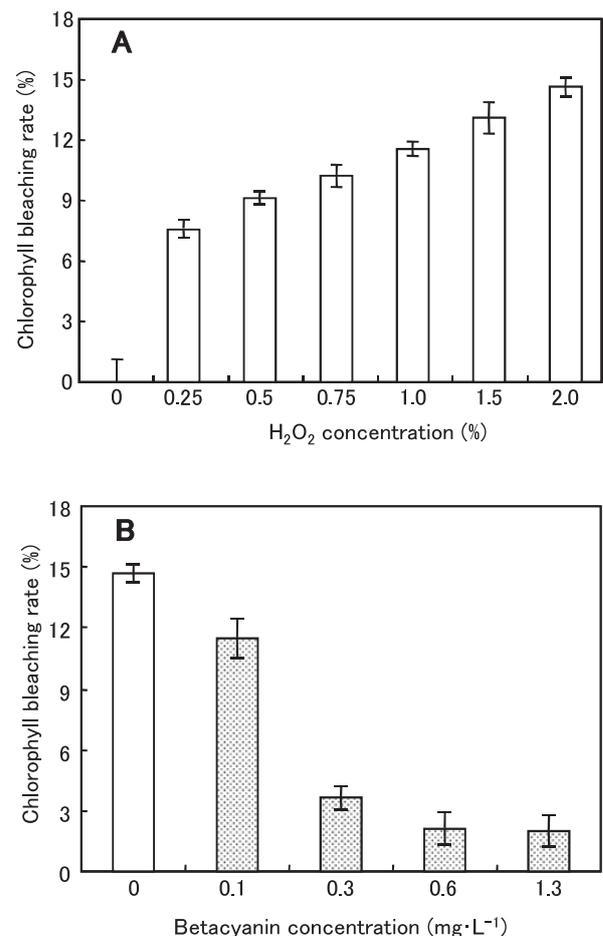


Fig. 6 Chlorophyll bleaching induced by H_2O_2 (A) and effect of betacyanin on chlorophyll bleaching caused by 2% H_2O_2 (B).
Bars show the standard error; $n = 3-4$.

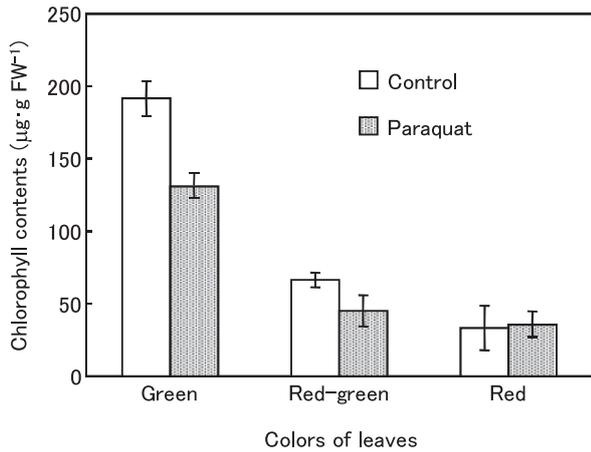


Fig. 7 Effect of paraquat on chlorophyll degradation in the leaves with different contents of betacyanin. Betacyanin contents of green, red-green and red leaves were 5-10, 50-80 and 100-120 (nmol·gFW⁻¹), respectively. Bars show the standard error; $n = 3-4$.

ンの蓄積する低温下では炭酸固定能が低下し光阻害の危険性が増加する (Foyer ら, 2002). 炭酸固定能が低下すると, スーパーオキドや過酸化水素等の生成量が増大し, 脂質, タンパク質および色素に深刻な損傷を与えると考えられる. したがって低温期に合成されるベタシアニンは, 抗酸化物質として機能し, 活性酸素種によるダメージを軽減すると考えられる.

Fig. 9A には, ベタシアニン含量の異なる葉身におけるクロロフィル蛍光の光化学的消光 (qP) を示した. qP は緑色葉身で大きく, ベタシアニンの蓄積に伴い低下する傾向にあった. 一般に, 光化学系に流れるエネルギー量は, ストレス強度の増加に伴い減少することが報告されている (Mohammed ら, 1995; Tanyolac ら, 2007). qP が低下したことは, 赤色葉身が何らかのストレスを受けていることを示唆している. このことはベタシアニンの合成がストレスによって誘導されることから推察される.

Fig. 9B にはベタシアニン含量の異なる葉身におけるクロロフィル蛍光の非光化学的消光 (qN) を示した. qN は余剰な光エネルギーを熱として放散する能力の指標であるが, qN はベタシアニンの蓄積に伴い増加する傾向を示した. このことからシチメンソウは, 吸収した光エネルギーを熱エネルギーとして放散し, 活性酸素種の生成を抑制していると推察される. 熱放散は主にキサントフィルサイクルのゼアキサントニンによるが, ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) と *Arbutus unedo* L. に低温下で強光照射するか乾燥処理を施すと, それぞれ, キサントフィルのプールサイズが増大し, ゼアキサントニンの含量が高くなることが報告されている (Munné-Bosch · Peñuelas, 2004; Thiele ら, 1996). ベタシアニンがキサントフィルおよびゼアキサントニン含量に及ぼす影響については今後

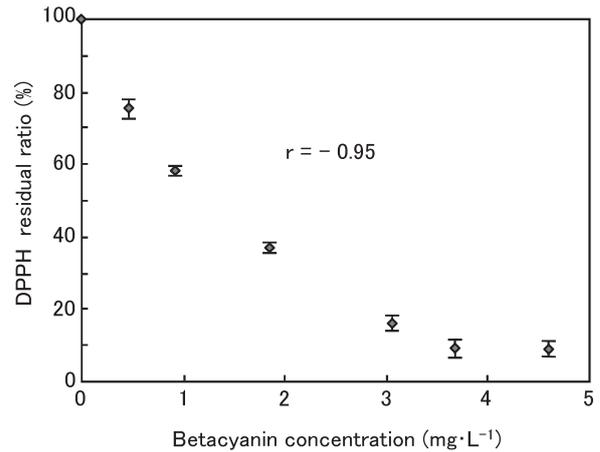


Fig. 8 Effect of purified betacyanin on DPPH degradation. Bars show the standard error; $n = 3-4$. r is Pearson's correlation coefficients between betacyanin concentration and DPPH residual ratio.

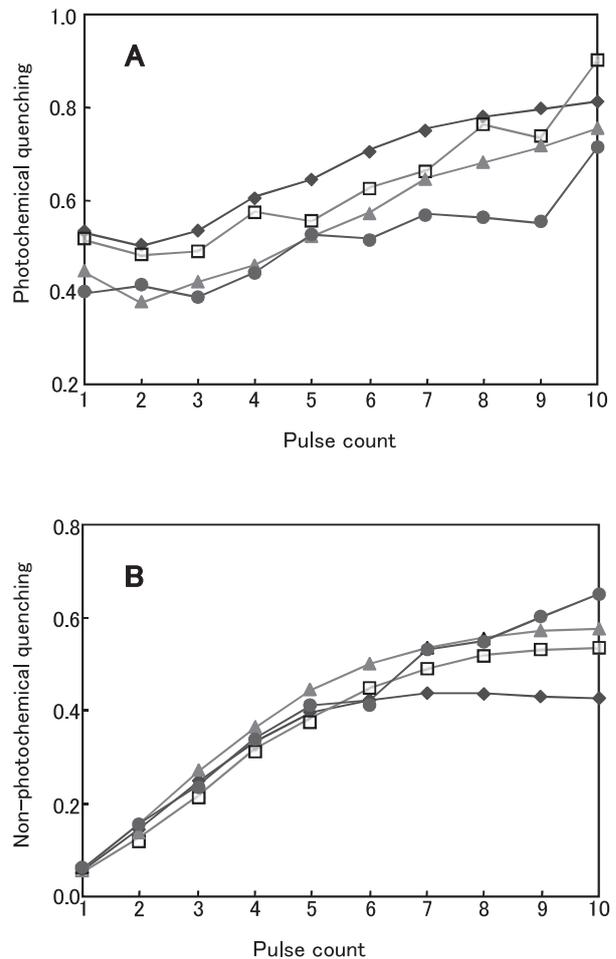


Fig. 9 Kinetics of photochemical quenching, qP (A) and non-photochemical quenching, qN (B) in leaves with different contents of betacyanin. Betacyanin contents of green (◆), red-green (□), red (▲) and deep-red (●) leaves were 8-15, 20-30, 40-50, 60-70 (nmol·gFW⁻¹), respectively. Each value is the average of three to four measurements.

検討する必要がある。

以上の結果から、シチメンソウの赤色葉身ではベタシアニンが葉身内部の入射光量を調節することで活性酸素の生成を抑え、さらに抗酸化物質として機能することで活性酸素による光酸化および光阻害を回避していると考えられた。これらの機能はシチメンソウのストレス耐性を高め、干潟という厳しい環境下における生存を可能にしている一要因であると推察された。

謝 辞

佐賀大学農学部 駒井史訓准教授には葉身の顕微鏡観察に際して、御指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。

引用文献

- Aarti, D., Tanaka, R., Ito, H. and Tanaka, A. 2007. High light inhibits chlorophyll biosynthesis at the level of 5-aminolevulinic acid synthesis during deetiolation in Cucumber (*Cucumis sativus*) Cotyledons. *Photochemistry and Photobiology* **83**: 171-176.
- Adams, W. W. III., Demmig-Adams, B., Verhoeven, A. S. and Baker, D. H. 1994. Photoinhibition during winter stress: Involvement of sustained xanthophylls cycle-dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 261-276.
- 旭 正 1981. 植物生理学3代謝 I. 朝倉書店 p. 276.
- Barker, D. H., Seaton, G. G. R. and Robinson, S. A. 1997. Internal and external photoprotection in developing leaves of the CAM plant *Cotyledon orbiculata*. *Plant, Cell and Environment* **20**: 617-624.
- Dodd, I. C., Critchley, C., Woodall, G. S. and Stewart, G. R. 1998. Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1437-1445.
- Foyer, C. H., Vanacker, H., Gomez, L. D. and Harbinson, J. 2002. Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 659-668.
- Gins, M. S., Gins, V. K. and Kononkov, P. F. 2002. Change in the biochemical composition of amaranth leaves during selection for increased amaranthine content. *Applied Biochemistry and Microbiology* **38**: 474-479.
- Gould, K. S. 2004. Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **5**: 314-320.
- Gould, K. S., Kuhn, D. N., Lee, D. W. and Oberbauer, S. F. 1995. Why leaves are sometimes red. *Nature* **378**: 241-242.
- Grace, S. C., Logan, B. A. and Adams, W. W. III. 1998. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell and Environment* **21**: 513-521.
- Ibdah, M., Krins, A., Seidlitz, H. K., Heller, W., Strack, D. and Vogt, T. 2002. Spectral dependence of flavonol and betacyanin accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* under enhanced ultraviolet radiation. *Plant, Cell and Environment* **25**: 1145-1154.
- Iwamoto, K., Fukuda, H. and Sugiyama, M. 2001. Elimination of POR expression correlates with red leaf formation in *Amaranthus tricolor*. *The Plant Journal* **27**: 275-284.
- 岩村政浩 1987. シチメンソウの分布と生態：有明海沿岸。佐賀の植物 **23**: 40-48.
- Klaper, R., Frankel, S. and Berenbaum, M. R. 1996. Anthocyanin content and UVB sensitivity in *Brassica rapa*. *Photochemistry and Photobiology* **63**: 811-813.
- Lee, D. W. 1986. Unusual strategies of light absorption in rain-forest herbs. In: Givnish TJ, ed on the economy of plant form and function. Cambridge: Cambridge University Press 105-131.
- 李 進才, 趙習コウ, 松井鑄一郎, 前澤重禮 2004. *Oncidium* における黄緑色葉株での高温障害の軽減. *生物環境調節* **42**: 91-94.
- Marcone, M. F. 2003. *Batis maritima* (Saltwort/Beachwort): a nutritious, halophytic, seed bearings, perennial shrub for cultivation and recovery of otherwise unproductive agricultural land affected by salinity. *Food Research International* **36**: 123-130.
- Mendez, M., Gwynn Jones, D. and Manetas, Y. 1999. Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *New Phytologist* **144**: 275-282.
- Meot-Duros, L., Le Floch, G. and Magné, C. 2008. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology* **116**: 258-262.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410.
- Mohammed, G. H., Binder, W. D. and Gillies, S. L. 1995. Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scandinavian Journal of Forestry Research* **10**: 383-410.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L. 1999. Role of dew on the recovery of water-stressed *Melissa officinalis* L. plants. *Journal of Plant Physiology* **154**: 759-766.
- Munné-Bosch, S. and Peñuelas, J. 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Science* **166**: 1105-1110.
- Neill, S. O., Gould, K. S., Kilmartin, P. A., Mitchell, K. A. and Markham, K. R. 2002. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant Cell and Environment* **25**: 539-547.
- Pietrini, F. and Massacci, A. 1998. Leaf anthocyanin content changes in *Zea mays* L. grown at low temperature: Significance for the relationship between the quantum yield of PS II and the apparent quantum yield of CO₂ assimilation. *photosynthesis Research* **58**: 213-219.
- Pogány, M., Koehl, J., Heiser, I., Elstner, E. F. and Barna, B. 2004. Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to *Tobacco necrosis virus* and confers tolerance to oxidative stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 39-47.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedemann, P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents; verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**: 384-394.
- Ravindran, K. C., Venkatesan, K., Balakrishnan, V., Chellappan, K.P. and Balasubramanian, T. 2007. Restoration of saline land by halophytes for Indian soils. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 2661-2664.
- Sepúlveda-Jimenez, G., Rueda-Benitez, P., Porta, H. and Rocha-Sosa, M. 2004. Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64**: 125-133.
- Sharma, V. 1980. Hill activity in chloroplasts from red pigmented corolla bracts and leaves. *Photosynthetica* **14**: 79-82.

- Sharma, V. and Banerji, D. 1981. Enhancement of Hill activity by anthocyanins under both 'white incandescent' and green irradiation. *Photosynthetica* **15**: 540-542.
- Shohael, A. M., Ali, M. B., Yu, K. W., Hahn, E. J., Islam, R. and Paek, K. Y. 2006. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. *Process Biochemistry* **41**: 1179-1185.
- Stafford, H. A. 1994. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science* **101**: 91-98.
- Stintzing, F. C., Schieber, A. and Carle, R. 2003. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European food research and technology* **216**: 303-311.
- Tanyolaç, D., Ekmekçi, Y. and Unalan, S. 2007. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. *Chemosphere* **67**: 89-98.
- Tewari, A. K. and Tripathy, B. C. 1998. Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat. *Plant Physiology* **117**: 851-858.
- Thiele, A., Schirwitz, K., Winter, K. and Krause, G. H. 1996. Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Science* **115**: 237-250.
- Verhoeven, A. S., Demmig-Adams, B. and Adams, W. W. III. 1997. Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiology* **113**: 817-824.
- Vogt, T., Ibdah, M., Schmidt, J., Wray, V., Nimtz, M. and Strack, D. 1999. Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochemistry* **52**: 583-592.
- Wang, C. Q., Zhao, J. Q., Chen, M. and Wang, B. S. 2006. Identification of betacyanin and effects of environmental factors on its accumulation in halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* **32**: 195-201.
- Yamasaki, H. 1997. A function of colour. *Trends in plant science* **2**: 7-8.