

地球温暖化に向けたシソ科植物の高温適応メカニズムの解析

磯田, 真奈帆 / ISODA, Manaho

(発行年 / Year)

2014-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2014-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(理工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2013年度 修士論文

論文題名 地球温暖化に向けたシソ科植物の
高温適応メカニズムの解析

指導教員 佐野俊夫

大学院工学研究科
生命機能学専攻修士課程

12R7203

氏名 イソダ マナホ
磯田 真奈帆

目次

要約	4
1. 背景及び目的	4
(1) 地球温暖化について	4
a) 世界の現状	4
b) 日本の現状	5
(2) 温暖化が農業に与える影響と対策	5
a) 現在の影響	5
b) 今後予測される影響	5
c) 対策	6
(3) 植物への高温影響	6
a) 植物の高温環境応答で知られていること	7
a) 光合成に対する影響	7
b) 熱ショックタンパク質	7
(4) 酸化ストレスと抗酸化物質	8
a) 酸化ストレス	8
b) 抗酸化物質	8
c) 抗酸化物質；ポリフェノール類について	9
d) アスコルビン酸 (ascorbic acid) について	10
(5) 本研究目的	10
2. 材料と方法	11
(1) 使用した植物	11
a) シソ科植物について	11
b) バジル (<i>Ocimum basilicum</i>)	11
c) シソ (<i>Perilla frutescens</i>)	11

d)	セージ (<i>Salvia officinalis</i>)	12
(2)	栽培環境と実験条件	12
(3)	活性酸素濃度の測定	12
(4)	抗酸化物質質量 (ポリフェノール) の測定	12
a)	分析サンプルの調製方法	12
b)	総抗酸化物質質量の測定 ; Folin-Denis 法	13
c)	ポリフェノール類の定性分析	13
d)	ロスマリン酸の定量分析	13
e)	バジルにおけるポリフェノール成分の定量	14
(5)	アスコルビン酸の測定	14
a)	アスコルビン酸の抽出と還元処理	14
(6)	抗酸化関連遺伝子の発現量解析	14
3.	結果	15
(1)	活性酸素発生量の変化	15
(2)	各葉のメタノール抽出物の定性と定量	16
a)	総抗酸化物質質量	16
b)	ロスマリン酸量	16
c)	バジル葉 40 %エタノール抽出物の定性及び定量分析	17
(3)	バジルにおける抗酸化関連遺伝子発現量	17
(4)	アスコルビン酸	17
a)	定性分析	17
b)	アスコルビン酸量と酸化率	18
(5)	各葉の生重量	18
4.	考察 (1) シソ科植物の高温環境とその適応性について	18
(1)	高温条件下での活性酸素濃度と植物の生育の比較	18

(2)	抗酸化物質と高温環境移行した各植物との比較.....	19
a)	総抗酸化物質と高温環境下での植物	19
b)	各温度条件に移行した植物のロスマリン酸量	19
c)	バジルにおけるロスマリン酸合成酵素とロスマリン酸との比較	20
d)	高温環境下でのバジルにおけるその他のポリフェノール量	20
(3)	アスコルビン酸と高温環境下での植物応答.....	20
a)	高温移行バジル株における <i>cAPX</i> と <i>HSP70</i> 遺伝子の発現量	20
b)	アスコルビン酸量	21
5.	考察 (2) 抗酸化物質の測定法と定量性について.....	21
(1)	DCFH-DA を使った活性酸素濃度測定.....	21
(2)	抗酸化物質 (ポリフェノール類) の抽出と定量	21
a)	抗酸化物質 (ポリフェノール類) の抽出法	21
b)	Folin-Denis 法の定量性.....	22
c)	ロスマリン酸とその他のポリフェノール測定の定量性.....	23
(3)	アスコルビン酸の定量性.....	23
6.	まとめ (表 9)	23
7.	今後の展望.....	24
a)	抗酸化物質関連遺伝子の活用	24
b)	ラジカル消去活性の検討	25
c)	α -トコフェロール (ビタミン E) の定量.....	25
d)	高温移行した葉の抗酸化物質と形態変化	25
e)	生育限界温度と光合成	26
8.	謝辞.....	26
9.	参考文献.....	26
10.	図表	33

要約

地球温暖化により、平均気温が上昇し、植物に高温障害が発生することで、作物の収量低下が懸念されている。このことから、高温適応のしくみを解明することで、高温下での栽培可能性を高められると考えた。高温障害の一つとして、植物細胞内で活性酸素種の発生が挙げられるので、活性酸素種を減弱する働きがある抗酸化物質に着目した。私は卒業研究において、シソ科バジルは 37℃の高温下でも枯死せず、アオジソやセージは枯死することを観察し、シソ科植物において、バジルは高温適応性が高いことを示唆した。本研究ではシソ科植物 3 種について、活性酸素発生量、抗酸化物質であるポリフェノール及び、アスコルビン酸の葉内蓄積量変化、抗酸化関連遺伝子発現量を測定し、23℃条件と比較した。バジルは活性酸素発生量が抑えられており、高温応答には抗酸化物質の一であるアスコルビン酸が関与していると考えられた。アスコルビン酸量が多い、あるいは酸化ストレス除去に使われた酸化型アスコルビン酸を還元型に戻す活性の高い植物が高温適応性を高める遺伝資源となりうると推測された。

1. 背景及び目的

(1) 地球温暖化について

地球の歴史の中で、温暖化は繰り返されていると言われているが、近年、20 世紀後半からの温暖化について、世界中で議論されている。この温暖化は、大気や海洋の平均気温の上昇に加えて、生態系の変化や海面上昇による海岸線の侵食など、気温上昇による二次的な諸問題を抱えている。今後も気温上昇するとの予測が立てられ、人類や環境への悪影響を評価するとともに、世界各地で、様々な対策が立てられている [1]。

a) 世界の現状

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change: 気候変動による政府間パネル) が 2013 年 9 月に発表した第五次評価報告書によると、1880 年から 2012 年において、世界平均気温は 0.85℃上昇したとのことであった (図 1, [1])。特に最近 30 年間は他のどの 10 年よりも平均気温が高く、過去に例のない急激な気温上昇がみられている (図 1, [1])。さらに、今後の予測として、今世紀末までの世界平均地上気温の変化予測は 0.3~4.8℃である可能性が高いとされている (図 2, [1])。この平均気温上昇は CO₂ 濃度と比例関係にあり、RCP (Representative Concentration Pathways: 代表的濃度経路) シナリオに基づいて推測されている。シナリオは大きく 4 つに分かれており、RCP2.6、4.0、6.0、8.5 がある。RCP2.6 は温室効果ガス排出量を最小に抑えた低位安定化シナリオで、RCP8.5 は 2100 年における温室効果ガス最大排出量に相当するシナリオである [1]。いずれにせよ、温暖化は現在進行形で進んでおり、環境や人類の将来を考える上で、重要な問題である。

b) 日本の現状

日本では、平均気温が 100 年間で 1℃上昇したと気象庁によって発表されており、世界の温暖化の例外ではないことがわかる (図 3, [2])。平均気温が 1℃上昇することは、東京都から宮崎県の気候になることと同じであり、かなりの気候変動があったことがうかがえる。また、ここ数年では夏の平均気温上昇が目立ち、真夏日、猛暑日が続いており [2]、2013 年の 6~8 月も西日本、東日本ともにほとんどの地域で 0.5-2.0℃の平均気温上昇が見られた (図 4, [3])。このことから、夏の平均気温上昇時における対策が必要である。

(2) 温暖化が農業に与える影響と対策

a) 現在の影響

環境変化に対する作物生産性への影響は、光合成を介した作物の応答に大きく依存する。光合成は原料である CO₂の量が増加すれば促進されるため、大気中の CO₂濃度上昇により、作物生産性は増加する [4, 5]。また、光合成は、反応のエネルギー源である「光エネルギー」が増加すると促進されるため [6]、日射量の増加は作物生産性を増加させるとも考えられている。一方で、降水量が減少して根から吸い上げる土中水分量が減少、高温に弱い植物の生育不良など、植物への悪影響が出ることが予想される [1, 5]。

温暖化による被害として、ナシ等での開花期の前進化による結実障害 [7, 8]、トマト等での稔性の低下による収量低下 [9, 10]、コメの乳白化による品質低下 [11] など平均気温上昇による直接的影響が報告されている。特にコメの乳白化は九州地方で問題となり [12]、原因が解明されてきた。主な原因として、出穂日数の短期化、登熟期間 (8 月から 10 月上旬) の高温化があげられる [13, 14]。これにより、穂が出て平均気温 26℃以上だと乳白化し、等級が下がってしまう (図 5, [12])。これは、合成基質の供給能力の低下、胚乳の合成能力の低下によるものである。デンプン分解酵素である α -アミラーゼ (イネでは 8 つ) 活性の上昇があり、 α -アミラーゼ抑制ホルモンであるアブシジン酸の減少などがこの要因となっていることが明らかとなっている [15]。

また、トマト青枯れ病などの台木の耐病性の打破による細菌病の増加 [16]、害虫の野外越冬や異常発生による害虫の増加 [7, 17] など病害虫の発生を助長してしまうという報告もある。害虫による植物病の発生もあり、ウイルス保毒虫によってウイルス病が媒介されることもある。埼玉県では、2013 年 9 月、イネに「ヒメトビウンカ」が大発生した。このヒメトビウンカは高温少雨で大発生し、病原ウイルス (イネ紋葉枯れ病ウイルス) を媒介する。これにより、イネ紋葉枯れ病が多発し、また、ヒメトビウンカの保毒虫率も高まった [18]。

b) 今後予測される影響

世界レベルで見ると、将来的には、低緯度地方、とくに季節的に乾燥する熱帯地域では 1~2℃の温度上昇がおきるだけで農作物の生産量が減少し、その結果として、飢餓のリス

クがふえると予想されている [19, 20]。

今後の展開として、日本では、コメ、リンゴ、ミカン、ブドウなどの栽培適地が徐々に北上すると予想されている [21, 22]。こうした要因で温度が 3℃程度上がると一部北海道や東北でコメの収量の増加が予測される例を除き、特に西日本で減少する可能性が高く、日本全体では 10 %減少するとされている [22]。さらに果樹の栽培適地はすでに北上を開始しており、21 世紀半ばには現在の産地の多くが気候的に不利になる可能性が高い。比較的涼しい気候を好むリンゴの産地は東北、長野から北海道に移動し、栽培適地も狭くなるとされる [21]。ミカンは北関東まで栽培適地が広がるが、果物は収穫までの期間は長いため、簡単に栽培地を移動することもできない。

c) 対策

このような問題に対し、日本では 2011 年に農林水産省で、「地球温暖化が農業に及ぼす影響評価と緩和及び適応技術の開発（プロジェクト研究成果シリーズ 483）」がまとめられている [5]。これは農林水産省農林水産技術会議が研究機関に委託して推進した研究の成果を、総合的かつ体系的にとりまとめ、研究機関及び行政機関等に報告することにより、今後の効率的な推進に資することを目的として、刊行されたものである。この研究では、農林水産分野における総合的な温暖化対策への貢献を目的として、農林水産生態系における炭素循環の解明、農林水産生態系からの温室効果ガスの排出削減技術及び炭素吸収機能向上技術の開発、地球温暖化が農林水産業に与える影響評価、温暖化に伴う環境変動に対処する生産安定技術の開発などについて 500 ページ程で記されている。その中で温度調節や光処理、新品種の導入などが温暖化に対する取り組みとして書かれている（表 1）。

コメの乳白化問題に対して、九州地方では従来の品種「ヒノヒカリ」に代わる新品種として「にこまる」が 2005 年に登録された [23]。「にこまる」は高温耐性品種で、高温登熟に強く、白未熟が少ないため収量があがる [24]。また、食味はヒノヒカリと同様で、大きく厚みのある米粒が特徴である。

(3) 植物への高温影響

高温環境下で農業に影響するレベルで被害やとその対策が立てられていることが分かった。そして、温暖化が進行することで、高温環境に弱い植物にさらなる影響が出てくる可能性がある。したがって、将来の農業の維持発展のためには、高温環境に耐えうる作物の開発が重要となってくるだろう。そのためには、まず、植物の高温環境下でのストレス応答や生育を可能にするメカニズムについて理解することが必要である。そこで、ここからは、植物の高温環境応答について考えていくことにする。

a) 植物の高温環境応答で知られていること

種子の段階では 70℃程度の超高温下でも貯蔵が可能なものもあるが、一般的にどんな植物でも、45℃以上になると生育出来なくなってしまう [25]。高温による影響として、光合成阻害、熱ショックタンパク質 (HSPs: Heat Shock Proteins) の生産、膜の安定性減少などがあげられる [25, 26]。以下、光合成に対する影響と熱ショックタンパク質について述べる。

a) 光合成に対する影響

光合成は、植物が生育する上で重要であり、光合成効率は作物の収量を考える上で重要である。気温上昇が蒸散量を増加させ、これに見合う土中水分量が十分でない場合、葉中の水分量が低下することにより光合成が抑制される [25]。また、光合成はその反応過程に酵素反応を含んでおり、至適温度以上になると反応が阻害され、光合成速度は低くなる [6, 25]。さらに、温度補償点 (CO₂ 固定量=放出量) 以上になると、呼吸による CO₂ 放出量が光合成による CO₂ 固定量を上回り、炭水化物蓄積量が減少する [25]。

また、熱 (e.g. 40℃) による光合成阻害には、ルビスコ (リブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ: ribulose-bisphosphate carboxylase, Rubisco) の活性低下が影響している [27]。ルビスコアクチベースによってルビスコ活性が保たれているため [28]、熱不安定性のために高温下でルビスコ活性が保てないことが原因であると分かっている [29-31]。また、高温下において、定常状態での光合成時に、活性が少なくなるとの報告があった [32]。

b) 熱ショックタンパク質

植物の高温影響として、光合成阻害と共に研究が進んでいるのが熱ショックタンパク質 (HSPs) である。HSPs は様々な生物が持っている高温耐性に重要なタンパク質の総称であり、細菌から植物まで高く保存されたアミノ酸配列を持つ [25, 26]。高等植物では 5~10℃の急な温度上昇、または 40℃前後で生産される。これは、15~104 kDa で 5 つのクラスに分けられており、HSP60、70、90 の機能がよく知られている [25]。変性したタンパク質を助ける分子シャペロンとして働き、誤って折りたたまれ、凝集したタンパク質を正しい折りたたみに戻したり、誤ったタンパク質の折りたたみを防いだりする機能を持つ [25, 26]。HSPs は熱ストレス特異的転写因子 (HSF: heat shock factor) によって調節され、熱ショック応答により、誘導を受ける HSE (熱ショックエレメント) 領域に特異的に結合する (図 6, [25, 26])。

最近、*HSP101*、*HSP70s*、*small HSP* 遺伝子は、植物の熱耐性に重要な、熱ストレス応答遺伝子であることが報告されている [33, 34]。例えば *HSP70* 遺伝子の一つであるシロイヌナズナ *Hsc70-1* 遺伝子過剰発現株では熱耐性が高まることが報告されている [35]。また、HSF は、沢山の熱ストレス誘導遺伝子の発現によって制御され、シロイヌナズナにおいて、HSF の一つによって熱耐性が制御されているとの報告があった [36, 37]。シロイヌナズナ

の HSF では、A、B、C の 3 つのクラスに分けられている。そしてこれらがさらに、A1-9、B1-4、C1 の 14 のグループに分けられている [38]。中でも HsfA1 グループは、植物の熱ストレスの主要制御因子となっている [39]。さらに、シロイヌナズナと近縁（相同性 90 %）の *Thellungiella salsuginea* は、熱耐性を持ち、*TsHsfA1d* がこれに関与していることが明らかとなっている [40]。

（４）酸化ストレスと抗酸化物質

a) 酸化ストレス

植物細胞内で活性酸素種（ROS: reactive oxygen species）が発生し、それらが生体高分子である核酸、タンパク質、脂質にダメージを与えることが知られている [25, 41]。活性酸素はイチゴにおいて、CO や SO₂、NO_x などの気体の濃度を濃くすると活性酸素の発生が高まることなどが知られている [42]。また、活性酸素種は、スーパーオキシドラジカル（superoxide radicals: O^{2•}）、ヒドロキシラジカル（hydroxyl radicals: OH[•]）、過酸化水素（hydrogen peroxides: H₂O₂）、一重項酸素（singlet oxygen: ¹O₂）などがある [25]。中でも、ヒドロキシラジカルは、活性酸素種の中でも、強い酸化活性を持っており、さまざまな有機分子に対してラジカル反応を連鎖的に引き起こすことが知られている [25]。また、熱ストレスによっても、これらの ROS が細胞の酸化を引き起こす [43]。ROS は膜脂質を自己触媒的に過酸化するため、膜脂質の半透過性を減少、機能を改変することが知られている [44]。スーパーオキシドラジカルは、葉緑体やミトコンドリアで合成されることが多く、SOD(superoxide dismutase)により、除去され、過酸化水素ができる。過酸化水素は APX (ascorbate peroxidase) あるいは、CAT (catalase) によって取り除かれる [41]。

b) 抗酸化物質

抗酸化物質は、活性酸素種を減弱もしくは除去する働きがあり、細胞の酸化を防ぐことが出来る（図 7, [45]）。生体内由来のものではアスコルビン酸（ビタミンC）、 α -トコフェロール（ビタミンE）、グルタチオン、ポリフェノール等（表 2, [46]）が知られており、多くの二次代謝産物（secondary metabolites）がこれに含まれる。二次代謝産物は役割不明のものが多く、無くても即死には至らない産物であり、一次代謝で生成した炭素・窒素酸化物の終末処理経路や物理的・化学的防御機構、花粉媒介昆虫の誘引、アレロパシー作用などが知られている。抗酸化物質があることによって、細胞の酸化が、抑制でき、交差防護が出来る [25]。また、ビタミンCやEは酸化防止剤として食品添加物としても利用されている。抗酸化物質の種類によって、どの活性酸素種に働くかは変わり、例えばフラボノイド（ポリフェノール）は、ヒドロキシラジカル除去に働く（表 2, [46]）。

抗酸化物質は、生活習慣病を予防する等の報告があり、食品としての利用価値も高い。そのため、抗酸化物質を高蓄積させた植物や、その栽培条件の研究は、栽培作物としての付加価値を高めることにつながる。例えば、光条件を変えることによって、抗酸化物質量

が高まることが知られている [47]。

c) 抗酸化物質；ポリフェノール類について

ポリフェノールとは、分子内に複数のフェノール性ヒドロキシ基(-OH 基)を持つ植物成分の総称で、5000 種以上が知られている。この中にカテキンやアントシアニンなどが含まれる。植物の色素や苦味の成分であり、植物細胞の生成、活性化などを助ける働きや抗酸化作用をもつ。細胞膜の水溶性部分、脂溶性部分、細胞膜で抗酸化効果があり、抗酸化作用の強さは種類による [48]。

ポリフェノールは、植物の二次代謝物質であるフラボノイド (flavonoid) の一つであり、フラボノイドはビタミン P としても知られる [48]。フラボノイドと植物の関係は、マメ科植物の根に共生する根粒菌が感染する際に分泌することや、フザリウム (*Fusarium*) のような植物病原菌の働きを抑制することが知られている [49]。

シソ科やムラサキ科の植物に多く含まれるポリフェノール成分の一つにロスマリン酸 (rosmarinic acid, 図 8) がある [50]。ロスマリン酸は、強い抗酸化性を有し、花粉症、動脈硬化の抑制など様々な薬理機能を示すことが報告されている [51]。植物体内におけるロスマリン酸の役割としては、病原菌の感染後に植物体内で合成される防御物質；ファイトアレキシン作用をもつという報告がある [52]。ロスマリン酸はカフェ酸と 3,4-dihydroxy-phenylalanine から合成されるエステル化合物である。L-フェニルアラニンと L-チロシンの 2 種類のアミノ酸を起点として合成されることがキンランジソとムラサキの研究から明らかにされている [53-55]。

この詳細は、L-フェニルアラニンから phenylalanine ammonia-lyase (PAL)、cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) および 4-coumaric acid: coenzyme A ligase (4CL) の酵素反応によって生成された p-coumaroyl-CoA と、L-チロシンから tyrosine aminotransferase (TAT) と hydroxyphenyl pyruvate reductase (HPPR) を介して生成された 4-hydroxy phenyllactic acid が rosmarinic acid synthase (RAS) によって結合され、最終的に cytochrome P450 monooxygenase (CYP98) によってヒドロキシ化することでロスマリン酸が合成されると考えられている (図 9, [47, 53])。

バジルにおいては、ロスマリン酸の他にチコリ酸 (chicoric acid)、カフタル酸 (caftaric acid、caffeoyl tartaric acid)、カフェ酸 (caffeic acid、3,4-ジヒドロキシケイ皮酸 (3,4-dihydroxycinnamic acid)、コーヒー酸、カフェイン酸) などとも含有することが知られている (図 8, [47, 56])。チコリ酸は、キク科のムラサキバレンギク (*Echinacea purpurea*) で単離され [57]、動物のインスリンの分泌やグルコースの取り込みに関わる成分としても知られている [58]。また、ロスマリン酸やカフェ酸より抗酸化活性が高いことが報告されている [59]。ムラサキバレンギクの葉に 3900 $\mu\text{g FWg}^{-1}$ 含まれ、バジルでは 370 $\mu\text{g FW}^{-1}$ 含まれる [60]。カフタル酸は、白ブドウ (*vitis*) の果肉から見つかり、*vitis venefira* の果肉では 145 mg g^{-1} 含まれ [61]、バジル葉では、154 $\mu\text{g FWg}^{-1}$ 含まれるとの報告がある [56]。

カフェ酸は、フトモモ科のユーカリ・グロブリス (*Eucalyptus globulus*) で見つかり [62]、高等植物の木化に関与するリグニン (lignin) の生合成に関わるため、全ての植物にみられる [63]。バジルでは、20-170 $\mu\text{g FWg}^{-1}$ 含まれていると報告がある [47]。

d) アスコルビン酸 (ascorbic acid) について

アスコルビン酸は、強い還元性をもつ水溶性物質で、ビタミン C として知られている。グルタチオン-アスコルビン酸回路における重要な物質で、活性酸素種の一つ、過酸化水素を解毒化（水にする）する際の電子供与体となる。酸化防止剤として、食品に添加されることも多い。アスコルビン酸には、還元型の L-アスコルビン酸 (L-ascorbic acid: AA) と還元型のデヒドロアスコルビン酸 (dehydroascorbic acid: DHA) がある (図 10)。AA は紫外吸光を持つが、DHA は持たず、可視吸光を示す。これらはグルタチオン-アスコルビン酸回路において、各種酵素の働きにより、リサイクルされている (図 11, [64])。

グルタチオン-アスコルビン酸回路には、アスコルビン酸、グルタチオン、NADPH 及び代謝に関連する酵素等の抗酸化物質が含まれている。この経路の最初のステップで、過酸化水素は、アスコルビン酸を電子供与体として利用し、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) によって水に還元される。APX は植物中の細胞質やミトコンドリア、葉緑体に存在し、ROS の中でも過酸化水素に働く、抗酸化関連酵素である [64]。

植物のグルタチオン-アスコルビン酸回路は、細胞質、ミトコンドリア、色素体及びペルオキシソームで機能する。グルタチオン、アスコルビン酸及び NADPH は、植物細胞に高濃度で存在しているので、グルタチオン-アスコルビン酸回路が過酸化水素の解毒に重要な役割を担っていることが想定される。それにもかかわらず、チオレドキシンまたはグルタレドキシンを還元基質として利用したペルオキシレドキシンやグルタチオンペルオキシダーゼを含む他の酵素（ペルオキシダーゼ）もまた、植物での過酸化水素の解毒に貢献している [64]。

(5) 本研究目的

これまでに、シソ科のスイートバジル (*Ocimum basilicum*、以下バジル) は 37°C の高温下に 6 週間置いても枯死せず、アオジソ (*Perilla frutescens*、以下シソ) やセージ (*Salvia officinalis*) は高温下で枯死することを観察した (図 10)。このことから、シソ科植物において、バジルは高温適応性が高いと考えた。本研究ではシソ科植物 3 種 (バジル、シソ、セージ) を 37°C (高温) 条件で栽培し、活性酸素発生量、抗酸化物質であるポリフェノールおよび、アスコルビン酸の葉内蓄積量変化、抗酸化関連遺伝子発現量を測定し、23°C 条件と比較することで植物の高温適応性を解析した。

2. 材料と方法

(1) 使用した植物

a) シソ科植物について

シソ科植物は第一真正キク群 (*euasterids I*) -シソ目 (*Lamiales*) に属し、180 属 3500 種で多くのハーブを含む[65]。葉は対生で、精油を含むため香気に富むものが多く、葉や茎にある腺毛から分泌される。茎の断面は正方形のことが多い。花は左右相称で 5 枚の花弁 (合弁) とがくをもつ。ハーブの歴史は古く、紀元前数千年の頃から薬剤、保存剤として利用されてきた。その他、抗酸化機能、抗菌機能、生体調節機能 (疾病の予防や疾病からの回復補助機能) や、抗炎症機能などをもつことも知られている。

ハーブの機能性成分の一つである精油は、細胞質内のメバロン酸経路でアセチル Co-A から合成されるセスキテルペン (C15) 類、液胞内の非メバロン酸経路でゲラニル 3 リン酸から合成されるモノテルペン (C10) 類、フェニルプロパノイド経路でフェニルアラニンから合成されるフェニルプロペン類などが知られている [66]。

その他にもポリフェノール類、カロテノイド類、アントシアニン類やアルカロイドなどの二次代謝産物が機能性成分として知られている。

b) バジル (*Ocimum basilicum*)

シソ科メバウキ属のインド原産の一年生草本植物である。近縁植物としては数種類が知られており、20 世紀になって生まれた交配種であるレモンバジル (*Ocimum citridrum*)、古代から高く尊ばれてきたホーリーバジル(*Ocimum canum*)などがある [65]。

生育適温 20~30℃の比較的暑い気候を好み (半耐寒性または非耐寒性) 日本では 4~5 月に播種すると、7 月下旬~10 月下旬に開花する。直立型の一年草で大きいものでは草丈 90 cm にもなる。葉は対生で細い卵形ないし楕円形で光沢のある鮮やかな緑色である。

精油成分としては、フェニルプロパノイドとして、「メチルチャビコール (Methyl chavicol)、オイゲノール (Eugenol)」、テルペン類では「リナロール (Linalool)、ゲラニール (Geranial)、ネラール (Neral)」を 2~6mg g⁻¹ 葉内に含む [66]。

c) シソ (*Perilla frutescens*)

シソ科シソ属の中国原産の一年生草本植物である。生育適温 15~25℃と低温に強く、日本では 4~5 月に播種し、7~9 月に開花する。葉は対生し、卵円形で先がとがり、縁は深い鋸歯状となり、長い葉柄がある [65]。

精油成分として、モノテルペン類であるペリラルデヒド (perillaldehyde) を 30~70 mg g⁻¹ 葉内に含む [67]、精油成分の中では 50 %を占める。他にβ-カリオフィレン (β-caryophyllene) リモネン (*l*-limonene)、ペリラルコール (*l*-perilla alcohol) などを含む [68, 69]。

d) セージ (*Salvia officinalis*)

シソ科アキギリ属、地中海原産の多年生草本または常緑低木である [64]。高さ 50~70cm ほどで 5~7 月ごろに紫または白色の唇状花を咲かせる。長楕円形で柄のある葉は対生し、表面に細かい縮れがあるのが特徴である。茎は成長するに従って根本から木質化し、株全体に独特の香りがある。葉の色が異なったり斑が入ったりする園芸品種も存在する。

精油成分として、1,8-シネオール (1,8-cineol)、 α -ツジヨン (α -thujone)、 β -ツジヨン (β -thujone)、カンファー (camphor) を 4~26 % (v/v) 葉内に含む [70, 71]。

(2) 栽培環境と実験条件

種子はバジル (トーホク、タキイ種苗)、シソ (太田種苗)、セージ (トーホク、タキイ種苗) を入手し、土壌は再生土壌を用いた。植物は気温約 27°C の空調温室で育苗した。126 穴セルトレイに播種してから 4 週間後に 12 cm ポットに定植し、更に 8 週間生育させた植物体を各温度条件に移行した。グロースチャンバーは、23°C 環境は、MLR-351 (SANYO)、37°C 環境には CLE-303 (TOMY) を用いた。光条件は、明期 16 時間、暗期 8 時間、光量 3000 lux とした。

(3) 活性酸素濃度の測定

活性酸素検出試薬 DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) を用いて測定した。葉 100 mg を 1~2 mm 幅に刻み、96 穴マイクロプレート (Optical Btm Plt PolymerBase 黒 Narge Nunc International) に入れ、マイクロプレートリーダー (コロナ MTP-800) にて、励起光 $E_x=490$ nm、蛍光 $E_m=530$ nm で蛍光強度を測定した。DCFH-DA は DMSO (ジメチルスルホキシド; Dimethyl Sulfoxide) によって、10 mM の濃度に希釈し、マイクロプレート 1 ウェル (300 μ l) に 3 μ l 添加し、約 100 μ M の濃度とした。25 秒おきに 5 秒間ミキシングし、180 分間測定した。

(4) 抗酸化物質 (ポリフェノール) の測定

a) 分析サンプルの調製方法

各個体の葉 100 mg を液体窒素中ですりつぶし、1 ml のメタノールに入れ、10 倍希釈濃度とした。このとき、窒素凍結した葉粉末のまま、メタノールにつけることに留意した。これは、葉粉末を溶かしてしまうと、ポリフェノール分解酵素の働きにより、各ポリフェノールの定量が不可能となってしまうためである (表 6, [56])。その後、ボルテクスミキサーに 5 秒間かけ、5 分間 75~85°C の熱湯でブランピングし、直ちに 10 分間氷浴した。その後、抽出液は 0.2 μ m フィルター (Millex-LG MILLIPORE) でろ過したものを分析サンプルとして用いた。

b) 総抗酸化物質量の測定 ; Folin-Denis 法

総抗酸化物質量 (Total Polyphenolics, TP) は、Folin 試薬を用いて測定した。Folin-Denis 法 [72]は、還元型物質の総量を調べるのによく用いられる比色法で、ワインや蒸留酒中のタンニンを測定する方法として用いられている [73]。総抗酸化物質量を測定する方法として、感度が高い Folin-Ciocalteu 法 [74]があり、茶葉や茶飲料中のポリフェノールを測定する方法である [72]。どちらもフェノール試薬を用いるため、化学的反応原理が似ており、今回は Folin-Denis 法を用いた。原理としては、フェノール性水酸基がアルカリ性でリントングステン酸、モリブデン酸を還元して青色に呈色することを利用している (図 13 [73])。ポリフェノールの種類や構成比によって、分析試薬との反応性が違うため、正確性は低いが、簡易で迅速な方法である [73]。葉のメタノール抽出液 50 μ l または、標準物質であるカテキン ((+)-Catechin Hydrate SPECTRUM) の段階希釈 (0~2000 mg g⁻¹) 溶液 50 μ l に超純水 4 ml、5 倍希釈フェノール試薬 (関東化学) を 1 ml、10 % (w/v)炭酸ナトリウムを加えた [75]。常温で 1 時間反応させ (図 13)、分光光度計 (U-2900 HITACHI) 760 nm で測定した。23.5°C で反応に安定性があることから、常温で、様々な濃度においてばらつきが少なかった 1 時間を反応時間に設定した。カテキンによる検量線は、相関係数 $R^2 = 0.99$ となり、ポリフェノールは新鮮重あたりのカテキン相当量として算出した。

c) ポリフェノール類の定性分析

総抗酸化物質の測定と同様の各葉のメタノール抽出物の成分(ポリフェノール類)を High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) によって分析した。HPLC 分析は、ポンプ (L-2160U HITACHI)、オートサンプラー (L-2200U HITACHI)、カラムオーブン (L-2300 HITACHI)、及び UV 検出器 (L-2400U HITACHI) を使用した。分析カラムは TSK-gel ODS-120T (ϕ 5 μ m 4.6 $\times$ 150 mm, 東ソー) [76]を用い、カラムオーブンの温度は 40°C に設定した。溶離液は A 液 (メタノール : 水 : ギ酸=35 : 213 : 2 (v/v/v)) と B 液 (メタノール : 水=13 : 7 (v/v)) を使用し、ポンプ流量は 1.0 ml min⁻¹とした [47]。1 サンプルあたりの分析時間は 40 分とし、A 液 100 %から B 液 100 %へのリニアグラジエントを 0-35 分の間に行った。UV 検出器の分析波長を 310 nm [77]とし、サンプル量は 10 μ l とした。

d) ロスマリン酸の定量分析

各葉メタノール抽出物を高速液体クロマトグラフ (HPLC) 解析し、シソ科に多い抗酸化物質であるロスマリン酸 (Rosmarinic acid) を定量した。分析カラムは TSK-gel ODS-120T (ϕ 5 μ m 4.6 $\times$ 150 mm, 東ソー) を用い、カラムオーブンの温度は 40°C に設定した。溶離液は A 液 (メタノール : 水 : ギ酸= 55 : 69 : 1(v/v/v)) と B 液 (メタノール : 水=3 : 1 (v/v)) を使用し、ポンプ流量は 1.0 ml min⁻¹とした。1 サンプルあたりの分析時間は 10 分とし、A 液 100 %から B 液 75 %へのリニアグラジエントを 0-10 分の間に行った。UV 検出器の分析波長を 310 nm とし、サンプル量は 5 μ l とした。ロスマリン酸標品 (和光 分子生物学用)

を用いて検量線を作成した。

e) バジルにおけるポリフェノール成分の定量

バジルは、多様なポリフェノール成分を含むことから、この成分についても定量した。ロスマリン酸以外の成分は有機溶媒比率の低い溶媒で抽出しやすいこと（図 27）から、40 % エタノール抽出した（方法はメタノール抽出同様）。分析カラムは TSK-gel ODS-120T（ $\phi 5 \mu\text{m}$ 4.6 $\times$ 150 mm, 東ソー）を用い、カラムオーブンの温度は 40°C に設定した。溶離液は A 液（メタノール：水：ギ酸 = 25 : 96 : 1 (v/v/v)）と B 液（メタノール：水 = 13 : 7 (v/v)）を使用し、ポンプ流量は 0.8 ml min⁻¹ とした。1 サンプルあたりの分析時間は 22 分とし、A 液 100 % から B 液 75 % へのリニアグラジエントを 0-20 分の間に行った。UV 検出器の分析波長を 310 nm、サンプル量は 5 μl とした。サンプルは 10 倍希釈抽出液を 3 倍希釈し、30 倍希釈サンプルとした。また、バジルに含まれるポリフェノール成分であるカftaric acid（caftaric acid）、カフェ酸（caffeic acid）、チコリ酸（chicoric acid）は微量成分であるため、ピークが小さく出てしまうことがあった。そのため、標準添加法を用い、カftaric acid、カフェ酸、チコリ酸標品をそれぞれ、5、2、5 $\mu\text{g mg}^{-1}$ の濃度になるように添加し、後でその量を差し引いて定量した。

（5）アスコルビン酸の測定

a) アスコルビン酸の抽出と還元処理

葉のアスコルビン酸抽出及び、酸化型アスコルビン酸の還元は、Cardoso ら（2011）の方法に従った [78]。各葉の液体窒素粉末を抽出液（3 % メタリン酸、8 % 酢酸、0.3 N 硫酸、1 mM EDTA）中に入れた [78]。この抽出物を 3000 $\times$ g で 10 分間遠心し、氷冷した。この抽出物を 0.45 μl フィルター（Millex-LH MILLIPORE）でろ過し、試料とした。デヒドロアスコルビン酸には紫外吸光をもたないため、0.5 M Tris- 40 mM DTT（(±)ジチオトレイトール: Dithiothreitol, 和光）で酸化型アスコルビン酸を還元処理し、デヒドロアスコルビン酸（酸化型アスコルビン酸）とアスコルビン酸（還元型アスコルビン酸）を合わせ、総アスコルビン酸量とした [78]。還元処理しないものは還元型アスコルビン酸量として算出した [78]。L(+)-アスコルビン酸（和光 試薬特級）を標準物質として用いた。HPLC 装置はロスマリン酸分析時と同様とし、分析カラムも TSKgel ODS-120T（ $\phi 5 \mu\text{m}$ 4.6 $\times$ 150 mm, 東ソー）を用い、カラムオーブンの温度も 40°C とした。溶離液は 1 mM EDTA を含む 1 mM リン酸緩衝液（pH = 3.0, NaH₂PO₄ と H₃PO₄ により調製）を使用し、ポンプ流量は 1.0 ml min⁻¹ とした。1 サンプルあたりの分析時間は 10 分とし、サンプル量は 20 μl 、UV 検出器の波長は 245 nm とした [78]。

（6）抗酸化関連遺伝子の発現量解析

バジルにおいて、リアルタイム RT-PCR 法を用いて抗酸化関連遺伝子発現量変化を調べ

た。用いた遺伝子は、ロスマリン酸の合成経路の下流に位置する酵素遺伝子 *CYP98*、アスコルビン酸の酸化に働く細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子 *cAPX*、熱誘導遺伝子 *HSP70* の 3 種である。内在性コントロールには *Actin* 遺伝子を用いた。

前処理として、各条件のバジル葉 100 mg を 1~2 mm 幅に刻み、グアニジンチオシアネート溶液 400 μ l に入れた。RNA 抽出には Plant Total RNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN) を用い、付属のマニュアルに従った。cDNA の合成には、抽出 RNA 6.8 μ l と 10mM オリゴ dt(20)プライマー 0.5 μ l を入れ、サーマルサイクラーにて、65°C で 3 分間インキュベートさせた。これをただちに氷冷し、5 $\times$ RT Buffer (TOYOBO) 2 μ l、RNA dNTPs (TOYOBO) 0.5 μ l、Rever Tra Ace (TOYOBO) 0.25 μ l を入れた。サーマルサイクラーにて、以下の通り設定した。

65°C 3 min

42°C 65 min

72°C 2 min

4°C ∞

この逆転写産物をテンプレートとして、リアルタイム RT-PCR 法に用いた。リアルタイム PCR 用 96 穴プレート 1 ウェルに超純水 8.5 μ l、Fast Start Universal SYBR Green Master[Rox] (Roche) を 10 μ l、forward 側、reverse 側の各プライマーを 0.25 μ l、テンプレート 1 μ l を入れた。解析は 7500Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用い、以下の通り設定した。

Holding stage

95°C 10 min

Cycling stage (50 サイクル)

95°C 3 sec

60°C 30 sec

Melt curve stage

95°C 15 sec

60°C 1 min

95°C 15 sec

60°C 15 sec

3. 結果

(1) 活性酸素発生量の変化

高温移行した植物における、活性酸素種の影響を調べ、生育量との比較をするために、各葉における活性酸素発生量の測定をした。DCFH-DA 添加後の各葉において、180 分間で蛍光強度が上昇した。また、葉の代わりに、蒸留水を用いた場合は 180 分後も蛍光がほと

んど上がらなかったことから、測定は 180 分間行うことにした。

バジルを各温度条件に移行して 7 日目の活性酸素 60, 120, 180 分後の蛍光強度は 23°C で栽培した葉では、450, 1100, 1300 を示し、一方 37°C では 350, 850, 1100 となった。(図 14)。一方、シソは 60, 120, 180 分後の蛍光強度が 23°C 条件の葉で 350, 700, 800, 37°C 条件の葉で 460, 1100, 1470 であった(図 14)。セージについては 23°C 条件株が 600, 1100, 1000 となり、37°C 条件株では、680, 1630, 2050 の蛍光強度を示した。

これらの結果から、バジルでは両温度による、活性酸素発生量に差は無かったが、シソとセージでは、37°C で生育させたもので活性酸素発生量が上昇した(図 14)。

(2) 各葉のメタノール抽出物の定性と定量

a) 総抗酸化物質量

23°C、37°C 条件に移行した各植物の、活性酸素種の発生量の違いの理由を調べるため、葉内の総抗酸化物質量を測定した。Folin-Denis 法によって、標準物質のカテキンと各葉メタノール抽出物を青色に呈色させ、分光光度計 760 nm の吸光度を測定した。カテキンによる検量線は二次式ではあるが、相関係数 $R^2 = 0.99$ と良好なこと(図 15)から、これを用いて定量した。

バジルでは、移行前の 4.0 mg g^{-1} から 23°C 移行条件の葉では減少し、21 日目には、総抗酸化物質量が 2.2 mg g^{-1} となった(図 16, 表 3)。これに対し、37°C 移行の葉では 14 日目には 4.0 mg g^{-1} となり、移行前同程度となった(図 16, 表 3)。

また、シソについては、移行前の 10 mg g^{-1} に対して、23°C 条件移行 21 日目まで、総抗酸化物質量に変化はなかった(図 16, 表 4)。一方 37°C 条件では、移行 21 日目には 13.0 mg g^{-1} となり、増加した(図 16, 表 4)。セージは移行前の 9.9 mg g^{-1} から、移行 21 日目でそれぞれ、23°C 条件の葉で 10.8 mg g^{-1} 、37°C 条件の葉で 15.1 mg g^{-1} となり、高温条件で増加した(図 16, 表 5)。

b) ロスマリン酸量

次に Folin-Denis 法では還元性物質の総量しか分からないことから、抗酸化物質の種類の詳細について調べるために、シソ科植物に多く含まれている抗酸化物質の一種であるロスマリン酸(rosmarinic acid)量の定量をした。各植物葉のメタノール抽出物はロスマリン酸標品と同様の保持時間($T_R = 4.2$ 分)にピークが出た(図 17)。各サンプルは 100 %メタノールのままだとピーク割れを起こしたため、20 %メタノール濃度になるように希釈した。10 倍希釈のサンプルをバジルはさらに 5 倍希釈、シソはさらに 10 倍希釈し、分析に用いた。また、ロスマリン酸標品を 20 %メタノールに溶解し、0~200 mg g^{-1} に段階希釈したものを標準とした。検量線は相関係数 $R^2 = 0.99$ となった(図 18)ことから、これを用いて定量した。

バジルは、移行前でロスマリン酸量が 1.5 mg g^{-1} であったが、23°C 条件の葉で移行 7 日

目には 0.9 mg g^{-1} となり、その後減少した (図 19, 表 3)。一方で、 37°C 条件の葉では、移行 7 日目には 1.3 mg g^{-1} 、21 日目には 0.9 mg g^{-1} となり、減少がみられたが、 23°C に比べると移行前同程度に保たれた (図 19, 表 3)。

一方、シソについては、移行前のロスマリン酸量の 4.8 mg g^{-1} から、移行 14 日目で 23°C 条件の葉で 4.6 mg g^{-1} となり、移行前同程度であった (図 19, 表 4)。 37°C 条件では、移行 21 日目には 5.9 mg g^{-1} と増加した (図 19, 表 4)。そして、セージは移行前 3.0 mg g^{-1} に対し、移行 21 日目で 3.0 mg g^{-1} と移行前同程度で、 37°C では移行 21 日目で 3.6 mg g^{-1} となって、増加した (図 19, 表 5)。

c) バジル葉 40 %エタノール抽出物の定性及び定量分析

バジルは、シソとセージに比べると、ロスマリン酸量は少ないが、多様なポリフェノール成分を含むことが知られている。これらの成分も抗酸化物質として知られていることから、その働きを調べるため、定量した。

まず、カフタル酸 (CtA: caftaric acid)、カフェ酸 (CaA: caffeic acid)、チコリ酸 (ChA: chicoric acid)、ロスマリン酸 (RA: rosmarinic acid) 標品のクロマトグラムは、それぞれ、保持時間 $T_R = 4.2, 6.9, 9.7, 15.2$ 分にピークが出た (図 20)。バジルにおいても、同様の保持時間でピークが出たこと (図 20)、バジル葉抽出物に CtA、CaA、ChA の各標品を添加時に各保持時間のピークが高くなったこと (図 20)。各検量線も良好である (図 21) ことから、これらの抗酸化物質について定量した。CtA は移行前の $83.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ から 5 日目には 23°C で $54.1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ 、 37°C で $85.7 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ となった。CaA は移行前の $38.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ から 5 日目には 23°C で $50.8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ 、 37°C で $46.0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ となった。ChA は $261.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ から 5 日目には 23°C で $317.0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ 、 37°C で $315.9 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ となった。CtA は 37°C 条件で高まり、CaA、ChA は、温度条件によって差が無かった (図 22, 表 3)。

(3) バジルにおける抗酸化関連遺伝子発現量

高温条件に移行することで、遺伝子レベルでの応答があるかを調べるため、抗酸化関連遺伝子発現量を解析した。バジルの遺伝子解析では、 23°C 移行個体の発現量を 1 とした時に、 37°C 移行個体の *CYP98* の相対的発現量は移行 2 時間、6 時間、1 日後、3 日後、7 日後で、0.9, 0.5, 0.4, 0.7, 0.3 倍となり、日を追うごとに減少した (図 23)。一方で *cAPX* では 2.0, 0.9, 0.6, 1.4, 1.4 倍、*HSP70* には、2.7, 1.2, 0.7, 1.6, 1.7 倍となった (図 23)。この二つの遺伝子については、高温移行 2 時間後、3 日後において、それぞれ発現量が増加した (図 23)。

(4) アスコルビン酸

a) 定性分析

植物の高温条件での生育と別の抗酸化物質として知られるアスコルビン酸量を比較する

ため、その定量をした。サンプル抽出液 (3 %メタリン酸混合液) のみでもピークが出たが、別の保持時間でアスコルビン酸のピークが出た (図 24)。各葉のメタリン酸混合液抽出物を HPLC で分析したところ、アスコルビン酸標品と同様の保持時間 ($T_R = 2.2$ 分) にピークが確認された (図 25)。また、アスコルビン酸標品をサンプル抽出液 (3 %メタリン酸混合液) に $0 \sim 50 \mu\text{g mg}^{-1}$ の濃度で段階希釈したところ、検量線は相関係数 $R^2 = 0.99$ を示した (図 26)。これにより、各葉におけるアスコルビン酸量を測定した。

b) アスコルビン酸量と酸化率

各温度条件に移行前の総アスコルビン酸量はそれぞれ、バジル $407 \mu\text{g g}^{-1}$ 、シソ $558 \mu\text{g g}^{-1}$ 、セージ $403 \mu\text{g g}^{-1}$ となった。各温度条件に移行 1 日目の各植物で、総アスコルビン酸量が 26～53 %減少した (図 27)。

次に各植物の温度条件による差をみることにした。バジルにおいて、総アスコルビン酸量は、移行 1 日目には 23°C 移行株、 37°C 移行株でそれぞれ $304 \mu\text{g g}^{-1}$ 、 $238 \mu\text{g g}^{-1}$ となり、 37°C で減少した (図 27)。しかし、5 日目では、 23°C 、 37°C 移行株でそれぞれ、 $305 \mu\text{g g}^{-1}$ 、 $279 \mu\text{g g}^{-1}$ となり、 23°C 条件と同程度になった (図 27)。また、 37°C 移行バジルの酸化率は、高温移行 1 日目で 23°C 条件株と 7 %の開きがあったが、5 日目には 2 %の差に縮まり、同程度となった (図 27)。

37°C 移行のシソの総アスコルビン酸量は、移行 3 日目で $266 \mu\text{g g}^{-1}$ まで減少し、 23°C 株では $400 \mu\text{g g}^{-1}$ であった (図 27)。また、酸化率は 1、3、5 日目でそれぞれ、 23°C 条件株は 38、43、57 %、 37°C 条件株は 60、59、63 %となった。 (図 27)。

セージの総アスコルビン酸量は移行後、 $238 \sim 272 \mu\text{g g}^{-1}$ で、温度条件による顕著な差はみられなかった (図 27)。高温移行株では、 23°C 条件株より 11～17 %高い酸化率を示した (図 27)。

(5) 各葉の生重量

一枚あたりの葉の量と抗酸化物質の関係について調べるため、各葉の生重量を測定した。バジル、シソ、セージをそれぞれ 23°C 、 37°C 条件下に置き、移行して 21 日目までの生重量を測定した。抗酸化物質量の測定に用いた葉を用い、中央の葉脈に沿って、半分の葉の生重量を測定した。なお、中央の葉脈の量は除いた。このようにすると、高温下に置いた葉の方が生重量は小さかった (図 28)。

4. 考察 (1) シソ科植物の高温環境とその適応性について

(1) 高温条件下での活性酸素濃度と植物の生育の比較

活性酸素検出試薬 DCFH-DA [79]によって、活性酸素濃度を測定した。活性酸素濃度は、CO や NO_x 、 SO_2 の過剰条件下で増加すること [42]など、様々なストレスによって、高まることが知られている。

37℃条件移行 7 日目で、シソとセージは、活性酸素濃度が 23℃条件に比べて高まっていることから、高温条件に応答していると考えられる (図 14)。高温移行により、活性酸素濃度が高まり続け、植物細胞はストレスを受け続ける。高温移行 6 週目になると、生理活性が停止し、枯死に至ると考えられる (図 13)。

一方で、バジルは 37℃環境で活性酸素濃度が 23℃と同程度となっており、高温条件下においても活性酸素濃度を 23℃と同程度に保てる機構があることが示唆される (図 14)。これらの結果から、シソ、セージは高温影響を受けやすく、活性酸素濃度が高まる。バジルが高温環境でも生育できたのは、活性酸素濃度を 23℃と同程度に保てることが理由であると考えられる。

(2) 抗酸化物質と高温環境移行した各植物との比較

a) 総抗酸化物質と高温環境下での植物

高温環境下に移行したバジルにおいて、活性酸素濃度が 23℃移行株と同程度に保たれた要因として、抗酸化物質が酸化されることで細胞の活性酸素濃度が抑えられているのではないかと考えた。Folin-Denis 法によるメタノール抽出物中の抗酸化物質については 37℃環境の各植物において、総抗酸化物質が移行前と同程度、もしくは増加した (図 16)。Folin-Denis 法は還元型の総抗酸化物質を測定する手法であるため、メタノール抽出物の還元物が抗酸化物質として働いているのなら、総抗酸化物質は減少すると考えやすい。しかし、23℃条件株より、増加している (図 16) ため、酸化量よりも合成量が多いことが考えられる。

また、イネにアルミニウム条件下で生育させると、カテキン相当量による総抗酸化物質が増加するとの報告がある [80] ことから、ストレスを受けると総抗酸化物質は増加すると考えやすい。また、スイカ (*Citrulus vulgaris*) において、熱ストレス順化の誘因因子として、フェノール性物質が合成され、酸化を抑えていると報告がある [81]。この考え方からすると、シソ・セージは高温影響を受けやすいため、23℃環境に比べ、37℃で総抗酸化物質が増加する (図 16)。一方で、バジルは高温影響をそれほど受けないために、移行前と同程度に保たれたのではないかと考えられる (図 16)。

b) 各温度条件に移行した植物のロスマリン酸量

HPLC 解析により、抗酸化物質の一種であるロスマリン酸について、葉内蓄積量を測定した。バジルでは、23℃条件に比べると 37℃移行条件で、移行前と同程度となっている (図 19, 表 3) ため、高温環境下において、減少しにくいことが考えられる。また、シソとセージにおいては、23℃移行株で移行前同程度であるのに対し 37℃移行株では移行前よりも増加した (図 19, 表 4,5)。総抗酸化物質と同様に、高温に応答してロスマリン酸量が増加していると考えられる。

バジルの生育において、光質条件を変えると、ロスマリン酸量が増加していること [47]、

ガンマ線に対して、抗酸化活性が上昇すること [82]から、環境条件の変化が関わっていると考えられる。ロスマリン酸には、高温ストレスに対する防御応答としての働きがあるため、23℃条件株よりも高まっているのかもしれない。

c) バジルにおけるロスマリン酸合成酵素とロスマリン酸との比較

ロスマリン酸生合成経路の下流の遺伝子、*CYP98* 発現量はバジルにおいて、高温移行によって減少した (図 23)。今回のコピーの遺伝子がロスマリン酸合成に直接的に働いているのなら、葉内のロスマリン酸量も減少していくと考えやすい。しかし、37℃移行バジル株において、ロスマリン酸量は同等に保たれていたこと (図 19, 表 3) から、23℃条件に移行したバジル葉よりも合成酵素遺伝子発現が高まると考えられる。さらに、高温に応答する抗酸化物質に、ロスマリン酸以外が働いている可能性もある。また、バジルは複数の *CYP98* 遺伝子を持っており、今回用いた遺伝子は、ロスマリン酸合成にそれほど関わっていないことも考えられる。光質処理により、*PAL*、*TAT*、*CAH*、など上流酵素遺伝子の発現量が移行 24 時間で上昇すると報告がある [47]。このことから、高温条件においても、生合成経路の上流合成酵素遺伝子が働いて、ロスマリン酸を合成しているのかもしれない。

d) 高温環境下でのバジルにおけるその他のポリフェノール量

バジルにおける、ポリフェノール成分として知られているカftar酸とカフェ酸、チコリ酸について定量した。カftar酸は移行前の $83.5 \mu\text{g g}^{-1}$ から 5 日目には 23℃で $54.1 \mu\text{g g}^{-1}$ 、37℃で $85.7 \mu\text{g g}^{-1}$ となった (図 19, 表 3)。カftar酸はロスマリン酸同様、23℃で減少するのに対し、高温下で増加していることから、高温下で高まることで、防御応答として働きやすい成分であることが考えられる。また、カフェ酸、チコリ酸は温度条件によって差がなかったことから、これらの含有量は温度条件によって変化しないことが考えられる (図 19, 表 3)。

(3) アスコルビン酸と高温環境下での植物応答

a) 高温移行バジル株における *cAPX* と *HSP70* 遺伝子の発現量

HSP70 遺伝子は高温などのストレスに応答して発現量が上がることが知られている [41]。また、*HSP70* は抗細胞死作用や抗炎症作用を持ち、紫外線など種々のストレスに対し、細胞を保護することが報告されている [83]。

一方 *APX* は主に過酸化水素を無毒化する酵素であり、ヒドロキシラジカルなどは全て過酸化水素になるため、グルタチオンアスコルビン酸回路において、*APX* は ROS 除去に対する役割は大きい。過酸化水素に対して、*APX* の発現量が増加すること [84]、ガンマ線照射により、*APX* 活性が上昇すること [85]などが知られている。また高温環境下のトマトにおいて、他の抗酸化物質関連酵素である *SOD* や *POX* (peroxidase) や *CAT* の活性が上昇す

ることも知られている [86]。

HSP70 発現量が高温に移行して 2 時間後に上昇したこと (図 20) から、高温に応答していることが考えられる。よって、バジル *cAPX* 遺伝子発現パターンは *HSP70* のそれと似ていたこと (図 23) から、*cAPX* は高温に応答し、高温環境適応の初期段階にはアスコルビン酸が関与している可能性がある。

さらに、*HSP* と *APX* 遺伝子は高温移行 3 日目でも、発現量が増加した (図 23) ことから、長期的な高温適応にもアスコルビン酸が関わっていることが考えられる。

b) アスコルビン酸量

アスコルビン酸については 3 種の ROS において、抗酸化物質としての働きがある (表 2) ため、重要な抗酸化物質である。高温移行後のバジルのアスコルビン酸の酸化率は、シソやセージよりも早く 23°C と同程度に回復したこと (図 27) から、この回復能力がバジルの高い高温適応能力を持つ要因の一つと考えられる。

還元型のアスコルビン酸を酸化型のデヒドロアスコルビン酸にすることで、細胞を ROS の酸化ストレスから身を守っていると考えられる。

よって、バジルでは高温移行 3 日目まではアスコルビン酸を酸化すること (図 27) で細胞の酸化を防いでいる。しかし、5 日目になると 23°C 条件の葉と同程度の酸化率となり (図 24)、23°C 環境同程度に生育出来るような状態にストレス順化機構が備わったと考えられる。一方でシソやセージは、高温移行 5 日目まで酸化率が 23°C より高まっている (図 27)。アスコルビン酸は抗酸化物質として細胞の酸化を防ぐように働いており、シソやセージでは、バジルに比べると、高温環境に慣れるまでに時間がかかることが考えられる。

5. 考察 (2) 抗酸化物質の測定法と定量性について

(1) DCFH-DA を使った活性酸素濃度測定

活性酸素検出試薬 DCFH-DA は細胞膜を透過すると細胞内エステラーゼにより、脱アセチル化され、DCFH となる [79]。DCFH は活性酸素種 (ROS) により酸化され、DCF となり、強い蛍光を発する。細胞質内の ROS レベルに比例して蛍光を発するため、非特異的な活性酸素種の増大を表せる。今回 DCFH-DA を用いて測定した結果、水では蛍光が上昇しなかったが、各葉では蛍光値が高まった。よって、葉の活性酸素を測定できており、植物細胞質において、活性酸素濃度が高まっていることが考えられる (図 14)。

(2) 抗酸化物質 (ポリフェノール類) の抽出と定量

a) 抗酸化物質 (ポリフェノール類) の抽出法

Lee ら (2009) により、葉抽出液をブランチングすることで、ポリフェノールの抽出効率が上がることが報告されている [56]。この結果を参考にし、液体窒素で磨砕した葉粉末の抽出方法を検討した。凍結状態の葉粉末を溶媒に浸けること、ブランチングの有無、ポ

ルテクスの有無について考えた。なお、ロスマリン酸定量の分析条件は、庄司ら（2010）[47]の HPLC メソッドに従った。

室素凍結葉を溶解してから、40 %エタノールで抽出すると総抗酸化物質量はバジル、シソで 2.46、1.78 mg g⁻¹ となった（表 6）。これに対し、溶解せずに抽出液に浸けるとそれぞれ、5.16、6.98 mg g⁻¹ となり、2.1、3.9 倍増加した（表 6）。また、ロスマリン酸量についても凍結させたまま抽出することで、抽出効率が大幅に上がった（表 6）。

次に、ブランチングの有無について考えるため、約 80℃の熱湯に 5 分間、エタノール葉抽出物を浸けた。バジルとシソで総抗酸化物質量はそれぞれ 6.71、10.61 mg g⁻¹ となり、ブランチング無しの場合と比べてそれぞれ 1.3、1.5 倍増加した（表 7）。また、ロスマリン酸量についてもブランチングすることで、バジルで 0.67 mg g⁻¹ から 2.59 mg g⁻¹ となり、3.9 倍増加した（表 7）。

さらに、ろ過や各測定のための試料のボルテクスミキサーの効果を考えるため、5 分間の振とうの有無による抗酸化物質量を比較した。振とうしないものでは総抗酸化物質量がバジル、シソでそれぞれ 6.02、8.45 mg g⁻¹ となり、振とうを加えることで 1.1、1.3 倍増加した（表 8）。このことから、抽出の際は、液体室素葉を凍結させたまま溶媒に浸け、ブランチングし、抽出物を振とうさせることが効果的であることが示唆された。また、ロスマリン酸の定量時には特に重要な操作であることが考えられる。

次に抽出溶媒の検討をするため、メタノール、エタノールを用いて各葉サンプルを抽出した。これは鈴木ら（2002）[75]や浦部ら（2005）[87]の報告を参考にした。まず、メタノールとエタノール濃度を変えて抽出し、HPLC 分析した。メタノールバジル葉抽出物は、ロスマリン酸のピークの高さが 60 であった（図 29）。一方エタノール葉抽出物では 45 程度であった。この傾向は 70 %濃度でも見られ、メタノール、エタノールでロスマリン酸のピーク高さがそれぞれ 48、30 となった（図 29）。よって、有機溶媒濃度の高い場合、メタノールの方が、抽出効率が高いことが考えられた。鈴木ら（2002）の報告でもメタノールが抽出に適している [75]とあり、同様の結果となった。

次に、メタノール濃度の違いによる抽出効率の違いを調べるため、0、20、40、60、80、100 %のメタノールでバジル葉を抽出した。ロスマリン酸のピーク高さは nd、20、25、60、80、82 となった（図 30）。よって、メタノール濃度が高いほど、ロスマリン酸の定量に適していることが示唆された。このことから、メタノールを抽出溶媒として使うことにした。

b) Folin-Denis 法の定量性

Folin-Denis 法は簡易な方法ではあるが、ポリフェノールの種類や構成比によって分析試薬との反応性が異なり、注意が必要である。実際に水と有機溶媒で抽出したサンプルを測定したところ、総抗酸化物質量が変わらなかったこと（データ掲載無し）、別の抗酸化物質であるアスコルビン酸においても反応したこと（データ掲載無し）から、ポリフェノール

でない成分も反応していることが考えられる。そして、今回のメタノール抽出物の総抗酸化物質量はバジルにおいて約 4 mg g^{-1} 程度となった (表 3)。庄司ら (2010) の報告においても、メタノール抽出物の総抗酸化物質量没食子酸 (gallic acid) 相当量で $2.5 - 7.5 \text{ mg g}^{-1}$ であること [47] から実験における定量性には問題ないと考えられる。

c) ロスマリン酸とその他のポリフェノール測定の定量性

バジルでロスマリン酸量が $3.8 - 5.9 \text{ mg g}^{-1}$ となり (表 3)、 1.1 mg g^{-1} [56] や $1.0 - 6.0 \text{ mg g}^{-1}$ [47] との報告があり、定量性には問題ないことが考えられる。

また、ポリフェノールの一種、カftar酸については、バジルにおいて、 $165 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ 程含まれているとの報告 [56] もあり、今回の結果は、trace や $28 - 40 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ となり (表 3)、定量性に問題があるかもしれない。今回は 40 % エタノールを用いて定量したが、カftar酸は保持時間が小さいため、有機溶媒比率を小さくしたほうが、定量性が上がると考えられる。そして、サンプルは 2013 年 6 月のもので光条件が 23°C で 3000 lux なのに対し、 37°C で 1000 lux 程度のため条件が揃っていないことも差が出ない要因であるかもしれない。また、エタノールよりメタノールの方が分解しにくいとの報告もある [87]。今回はエタノールで抽出したものを -80°C で長期的に保存したため、分解されて減少してしまったものもあるかもしれない。一方で、2014 年抽出サンプルは、 $54 - 90 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ となり、この条件を揃えているため、この結果のほうが生育温度のみでの差を表していると推測できる。

(3) アスコルビン酸の定量性

総アスコルビン酸量については、食品分析の結果より、バジルでは $160 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ 含まれているとの報告があり [88]、今回は総アスコルビン酸量が $195 \sim 407 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ となり (図 24)、定量性には問題ないと考えられる。

6. まとめ (表 9)

シソとセージは、高温移行 7 日目の葉の活性酸素濃度が高まっていることから、高温に応答し、移行 6 週目には枯死にいたると考えられた。一方、バジルは、高温条件下においても、 23°C 条件同程度に活性酸素濃度を保てることが生育出来る要因であると考えられた。

Folin-Denis 法によって定量した還元型の抗酸化物質量は、各植物において同程度または、増加した。葉抽出物中の還元物が還元剤となって、酸化される量より、合成量が多いことが考えられた。また、総抗酸化物質量やロスマリン酸量は、高温条件でシソとセージが増加するのに対し、バジルでは 23°C 同程度に保たれた。

次に、*HSP70* と *cAPX* 遺伝子の発現量が高温移行後 2 時間後に増加し、発現パターンが似ていた。*cAPX* は高温に応答しており、高温環境適応初期段階にはアスコルビン酸が関わっている可能性がある。また、これらの遺伝子発現量が高温移行 3 日目にも増加したことから、長期的な高温適応にもアスコルビン酸が関わっていることが考えられた。

さらに、アスコルビン酸の酸化率は、バジルでは移行 5 日目で 23℃同程度に回復した。一方、シソ、セージは高温移行 5 日目でも酸化率が高かった。アスコルビン酸は、酸化型のデヒドロアスコルビン酸にすることで、ROS による酸化から細胞を守っている。バジルでは、3 日目までこの機能が働き、5 日目になるとストレス順化機構が出来ることで 23℃同程度に生育できていると考えられる。一方、シソとセージは 5 日目でも酸化を防ぐように働いており、バジルにおける回復能力が高い高温適応能力を持つ要因の一つであると考えられた。

今回の結果から、高温ストレスによって、抗酸化物質が増加することが示唆された。バジルが高温に強いのは、高温環境移行前、もしくは 23℃移行株と同程度に活性酸素濃度と抗酸化物質が保たれているためであると思われる。一方で、遺伝子レベルでは短時間で高温に応答していることが考えられたため、抗酸化物質の生合成には今回調べた合成酵素遺伝子以外にも複雑に働いていることが考えられる。アスコルビン酸や APX は高温環境に応答していることが考えられたため、アスコルビン酸の有効利用が高温ストレスに対して、効果的である。また、抗酸化物質の豊富な植物は、作物としての利用価値が高いため、高温環境で生育させることで高抗酸化物質蓄積作物の作出に活かせるかもしれない。

7. 今後の展望

a) 抗酸化物質関連遺伝子の活用

本研究結果から、今後、地球温暖化の進行による作物の生育抑制への対策の一つにアスコルビン酸の活用が考えられる。アスコルビン酸蓄積量が多い、あるいは酸化ストレス除去に使われた酸化型アスコルビン酸を還元型に戻す活性の高い植物が、高温適応性を高める遺伝資源となりうる。高温での知見はまだ多くないが、低温では APX を過剰発現イネにおいて、低温伸長性が高まることが分かっている [89]。また、デヒドロアスコルビン酸をアスコルビン酸にする合成酵素 DHAR (dehydroascorbate reductase) の遺伝子を過剰発現させたイネについても低温伸長性が上昇したとの報告がある [89]。また、キュウリにおいて、高温下での活性酸素除去に CAT の関与が大きいことも知られている [90]。このことから、APX だけでなくグルタチオンアスコルビン酸回路内の他の合成酵素についても高温環境下での発現量を検討すると、高温応答性の高い合成酵素について考えられるかもしれない。

ポリフェノール類については、どの合成酵素遺伝子がロスマリン酸などの合成に特に関わっているかの特定が必要である。そして、PAL 活性が高温化のトマトで上昇し、熱耐性を持つトマトに普通のトマトを接ぎ木すると、高温下での活性が抑えられ、接ぎ木株は生育もよくなることから、熱耐性をもつことが知られている [91]。このことから、高温環境移行バジルの PAL 遺伝子発現量は、シソとセージの発現量よりも抑えられるとの仮説が立てられる。よって、様々なフラボノイド（ポリフェノールを含む）開始点の合成酵素でもある PAL に注目すると総合的に考えられるかもしれない。また、ポリフェノール酸化酵素

である POO (polyphenol pxidase) も熱耐性に関与しているため、抗酸化物質の酸化との関連を調べられるかもしれない [86]。

b) ラジカル消去活性の検討

ヒドロキシラジカルに対して、抗酸化活性と総抗酸化物質質量と相関があるとの報告がある [92]。ヒドロキシラジカルは、反応性が高いため、その消去活性を調べることは、重要であると考えている。フラボノイド (ポリフェノール) は、ヒドロキシラジカルに対して働く抗酸化物質 (表 2) であるため、DPPH ラジカル補促活性により抗酸化活性を測定したい。

c) α -トコフェロール (ビタミンE) の定量

また、 α -トコフェロールは脂溶性の抗酸化物質で、植物の脂質膜に存在する。高温下での植物細胞は膜の安定性が減少すると知られているため、高温適応性の高いバジルで働きが大きいかもしれない。また、アスコルビン酸は α -トコフェロールの再生機能をもつことも知られているため [93]、 α -トコフェロールの含有量についても調べ、アスコルビン酸との関連についても考えていきたい。バジルとシソ、セージとの高温適応性の違いについて考え、高温適応に有効な物質を見つけていきたい。

d) 高温移行した葉の抗酸化物質質量と形態変化

様々な文献で、茎の抗酸化物質質量についても測定されているが、茎の抗酸化物質質量は葉に比べて少ない。Lee ら (2009) の報告によると、バジル茎における総抗酸化物質質量は、葉の 0.5 倍、ロスマリン酸量は、葉の 0.3 倍となっている [56]。また、シソにおいても茎のロスマリン酸量は葉の 0.08-0.8 倍との知見がある [94]。このため、今回は、表面積が大きく、高温の影響を受けやすいと考えられる、葉のみで抗酸化物質質量を測定した。

37°Cで生育させたいずれの植物も葉一枚当たりの生重量が小さくなったこと (図 25) から、高温環境で生育が抑えられていることが分かる。よって、葉一枚あたりの抗酸化物質質量に換算すると 23°Cとの差が少なくなることから、濃縮されたため 1 g あたりの抗酸化物質質量が増加するとも考えられる。また、バジルにおいては 37°Cで 6 週間生育する過程で、葉一枚を厚く小さくし、表面積の割合を低くすることで、高温ストレスによる水分の蒸発などを回避していることが考えられる。今後、葉の細胞内の柵状組織や海綿状組織、表皮の厚さについて検討していきたい。

さらに、バジルにおいて光刺激により、精油成分量が増えることが報告されている [95]。そして、ストレスに応じてこの精油を多量に含む腺毛が増えるとの報告がある。腺毛は顕微鏡観察によって見ることでできるため、この分布についても考えたい。

e) 生育限界温度と光合成

また、今回バジルは 37℃で枯死しなかったため、生育出来なくなる温度について確かめる必要がある。バジルが何度まで耐えられるかについて検討するために、42℃でも生育させたいと考えている。また、低温では光合成収率が抑えられるが、高温では光合成の高温順化が知られている [6]。高温での光合成収率について、バジルとシソ、セージについて比較していきたい。

8. 謝辞

本修士論文は、筆者が法政大学大学院 工学研究科 生命機能学専攻 修士課程在学中に植物栄養医科学研究室において行った研究をまとめたものです。

本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました佐野俊夫准教授に厚く御礼申し上げます。また、本論文をご精読頂き、有用なコメントを頂きました長田敏行教授に深謝致します。

本研究を進める上で、使用植物の栽培指導、温室の管理、防除をしていただいた永吉秀光氏、HPLC 装置の立ち上げを手伝っていただきました清水隆博士に心より、感謝しております。

また、同研究室 2 期生の太郎良圭祐くん、3 期生の鳥垣内大志くん、4 期生の森茉莉絵さん、川野博之くんには、播種やサンプル抽出、測定などの作業を手伝っていただきました。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた同研究室の皆様に感謝いたします。

9. 参考文献

- [1] 気象庁 (2013) IPCC 第 5 次評価報告書.
- [2] 気象庁 (2010) 2010 年気象変動監視レポート.
(<http://www.data.kishou.go.jp/climate/cpdinfo/monitor/index.html>)
- [3] 気象庁 (2013) 2013 年 9 月 2 日発表資料.
- [4] Baker, J.T., Allen, L.H., Jr. and K. J. Boote K.J. (1990) Growth and yield responses of rice to carbon dioxide concentration. The Journal of Agricultural Science Vol. 115, No. 03, 313-320.
- [5] 農林水産省 (2011) 地球温暖化が農業に及ぼす影響評価と緩和及び適応技術の開発. プロジェクト研究成果シリーズ 483.
- [6] 彦坂 幸毅 (2005) 光合成の生理生態学講座「光合成速度の環境応答」.
(<http://hostgk3.biology.tohoku.ac.jp/hikosaka/photosyn-home.html>)

- [7] 気象庁 (2012) 気象変化ポート 2012 -関東甲信・東海・北陸地方-
- [8] 栃木県農業試験場 (2011) 農業試験場ニュース 発芽・開花期の前進化. NO. 286.
- [9] 佐藤卓 (2006) 地球温暖化における穏やかな高温ストレスがトマトの生産性と雄性器官の発達に与える影響. 食と緑の科学 HortResearch 60, 85-89.
- [10] 栃木県農業試験場 (2011) 農業試験場ニュース トマト. NO.288.
- [11] 西尾博之, 橋本俊司 (1997) 登熟期間の気温がコシヒカリの玄米品質に及ぼす影響. 日本作物学会研究集 38, 70-71.
- [12] 九州沖縄農業研究センター (2006) 温暖化による米の品質低下の実態と対応について. (<http://konarc.naro.affrc.go.jp/topics/ondanka/ondanka1.html>)
- [13] Peng, S., Huang, J., Sheehy, J.E., Laza, R.C., Visperas, R.M., Zhong, X., Centeno, G.S., Khush, G.S. and Cassman, K.G. (2004) Rice yields decline with higher temperature from global warming. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 101, no. 27, 9971-9975.
- [14] 森田敏, 米丸淳一, 高梨純一 (2005) 登熟期の高夜温は胚乳細胞の成長抑制を介して玄米 1 粒重を小さくする. Annals of Botany 95, 695-701.
- [15] Hakata, M., Kuroda, M., Miyashita, T., Yamaguchi, T., Kojima, M., Sakakibara, H., Mitsui, T. and Yamakawa, H. (2012) Suppression of α -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. Plant Biotechnology Dec, 10(9).
- [16] 農林水産省 (2002) 気候変動が国内の農林水産業に及ぼす影響—気候変動 (温暖化) が農作物の生育や収量等に及ぼす影響について—.
(http://www.maff.go.jp/j/kanbo/kihyo03/gityo/g_kiko_hendo/eikyo/)
- [17] 栃木県農業試験場 (2010) 農業試験場ニュース 病虫害. No.271.
- [18] 埼玉県病虫害防除所. (2013) 平成 25 年度病虫害発生予察注意報第 4 号.
- [19] Fischer, G., Huang, J., Keyzer, M.A., Qiu, H., Sun, L. and van Veen, W.C.M. (2007) Chinas agricultural prospects and challenges. Centre for World Food Studies (SOW-VU). Vrije Universiteit. Amsterdam. Netherlands.
- [20] Fischer, G., Ermolieva, T., Ermoliev, Y., Sun, L. (2007) Integrated risk management approaches for planning sustainable agriculture. Atlantis Press. Paris. France.
- [21] 杉浦俊彦, 樺沢正幸 (2004) 平均気温の変動から推定したリンゴおよびウンシュウミカンの栽培環境に対する地球温暖化の影響園芸学会雑誌 73, 72-78.
- [22] 林陽生, 石郷岡康史, 樺沢正幸, 島谷均, 後藤慎吉 (2001) 温暖化が日本の水稻栽培の潜在的特性に及ぼすインパクト. 地球環境 vol.6, no.2, 141-148.
- [23] 田村克徳 (2007) 高温条件でも品質が低下しにくい水稻新品種「にこまる」の育成. 米麦改良 7 月号, 22-29.
- [24] 長谷川航, 大成忍, 安井利昭, 衛本圭史, 佐藤吉昭, 北園景一, 壽福和子, 山崎哲, 良.

- 永元良知, 小野和也, 二宮淑恵, 後藤志乃, 河津浩二. (2009) 地球温暖化に対応して緊急導入した水稻品種「にこまる」, 「あきまさり」の大分県における特性. 大分県農林水産研究センター研究報告 農業編 3, 27-44.
- [25] L.テイツ, E.ザイガー (2004) テイツザイガー植物生理学第3版. 西谷和彦, 島崎研一郎訳. 培風館.
- [26] 幸田泰則, 桃木芳枝, 三宅博, 大門弘幸 (2003) 植物生理学—分子から個体へ. 三共出版.
- [27] Salvucci, M.E. and Crafts-Brandner, S.J. (2004) Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiol. Plant.* 120, 179-186.
- [28] Portis, A.R., Jr (2003) Rubisco activase; Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth. Res.* 75, 11-27.
- [29] Crafts-Brandner, S.J. and Salvucci, M.E. (2000) Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 13430-13435.
- [30] Salvucci, M.E. and Crafts-Brandner, S.J. (2004) Mechanism for deactivation of Rubisco under moderate heat stress. *Physiol. Plant.* 122, 513-519.
- [31] Salvucci, M.E. and Crafts-Brandner, S.J. (2004) Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiol.* 134, 1460-1470.
- [32] Yamori, W., Masumoto, C., Fukayama, H. and Makino, A. (2012) Rubisco activase is a key regulator of non-steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *The Plant J.* 71, 871-880.
- [33] Lim, C.J., Yang, K.A., Hong, J.K., Chpi, J.S., Yun, D.J., Hong, J.C., Chung, W.S., Lee, S.Y., Cho, M.J. and Lim, C.O. (2006) Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells. *J. Plant Res.* 119, 373-383.
- [34] Larkindale, J. and Vierling, E. (2008) Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiol.* 146, 748-761.
- [35] Sung, D.Y. (2003) Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*: evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiol.* 132, 979-987.
- [36] Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E. and Scharf, K.D. (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 310-316.

- [37] Akerfelt, M., Morimoto, R.I. and Sistonen, L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11, 545-555.
- [38] Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A. and Scharf, K.D. (2001) *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor would: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones*. 6, 177-189.
- [39] Mishra, S.K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., Nover, L. and Scharf, K.D. (2002) In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*. *Mol. Genet. Genomics*. 271, 11-21.
- [40] Higashi, Y., Ohyama, N., Ishikawa, T., Katori, T., Shimura A., Kusakabe, K., Yamazaki-Shinozaki, K., Hayashi, T. and Taji, T. (2013) Hsf1d, a protein identified via FOX hunting using *Thellungiella salsuginea* cDNAs improves Heat Tolerance by regulating heat-stress-responsive gene expression. *Molecular Plant*. Vol. 6, No. 2, 411-422.
- [41] Wahid, A., Gelani, S. Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007) Heat tolerance in plants: An over view. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199-203.
- [42] Muneer, S., Kim, T.H., Choi, B.C., Lee, B.S. and Lee, J.H. (2014) Effect of CO, NOx and SO2 on ROS production, photosynthesis and ascorbate-glutathione pathway to induce *Fragaria×annasa* as a hyperaccumulator. *Redox Biology* 2, 91-98.
- [43] Liu, X. and Huang, B. (2000) Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bent grass. *Crop Science*. 40, 503-510.
- [44] Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H. and Cui, L. (2006) Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environ. Exp. Bot.* 56, 274-285.
- [45] Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291-295.
- [46] 大阪武雄・日本化学会. (1999)『活性酸素』丸善.
- [47] 庄子 和博, 淨閑正史, 橋田慎之介, 後藤文之, 吉原利一 (2010) スイートバジルのポリフェノール蓄積に及ぼす光質影響. 電力中央研究所報告, V09030.
- [48] Benthath, A., Rusznyak, S.T. and Szent-Györgyi, A. (1937). Vitamin P. *Nature* 139, 326-327.
- [49] Galeotti, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M. and Lanzotti, V. (2008) Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry Letters* 1, 44
- [50] Hakkim, F.L., Shankar, C.G. and Girija, S. (2007) Chemical composition and

- antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. *J. Agr. Food. Chem.* 55, 9109-9117.
- [51] Sanbongi, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagisawa, R., Inoue, K., Sadakane, K., Ichinose, T. and Yoshikawa, T. (2004) Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clin. Exp. Allergy.* 34, 971-977.
- [52] Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P. and Vivanco, J.M. (2002) Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiol. Biochem.* 13, 983-995.
- [53] Petersen, M., Häusler, E., Karwatzki, B. and Meinhard, J. (1993) Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta.* 189, 10-14.
- [54] Peterson, M. and Simmonds, M.S. (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121-125.
- [55] Mizukami, H., Ogawa, T., Ohashi, H. and Ellis, B.E. (1993) Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. *Plant Cell. Rep.* 11, 480-483.
- [56] Lee, J. and Scagel, F.C. (2009) Chicoric acid found in basil (*Ocimum Basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry* 115, 650-656.
- [57] Nusslein, B. and Kurzmann, M., Bauer, R. and Kreis, W. (2000) Enzymatic degradation of chicoric acid in *Echinacea purpurea* preparations. *J. Nat. Prod.* 63, 1615-1618.
- [58] Tusch, D., Lajoix, A., Hosy, E., Azay-Milhau, J. Ferrane, K., Jahannault, C., Cros, G. and Petit, P. (2008) Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 131-135.
- [59] Dalby-Brown, L., Barsett, H., Landbo, A.K. Meyer, A.S. and Mølgaard, P. (2005) Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 9413-9423.
- [60] Lee, J. and Scagel, C.F. (2010) Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* products. *Jornal of Functional Foods.* 2, 77-84.
- [61] Singleton, V.L., Zaya, J. and Trousdale, E.K. (1986) Caftaric and coutaric acids in fruit of *vitis*. *Phytochemistry* Vol. 25, No. 9, 2127-2133.
- [62] Santos, S.A.O., Freire, C. S. R., Domingues, M.R.M., Silvestre, A.J.D., Pascoal, N. and Carlos, P. (2011) Characterization of Phenolic Components in Polar Extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. Bark by High-Performance Liquid Chromatography–

- Mass Spectrometry. J. Agric. Food. Chem. 59(17), 9386-9393.
- [63] Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. (2003) Ligninbiosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 54, 519-546.
- [64] Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 249-279.
- [65] クリストファーブリッゲル, 横井政人 (2003) A-Z 園芸植物百科事典. 誠文堂新光社.
- [66] Iijima, Y., Davidovich-Rikanati, R., Fridman, E., Gang, D.R., Bar, E., Lewinsohn, E. and Pichersky, E. (2004) The Biochemical and Molecular Basis for the Divergent Patterns in the Biosynthesis of Terpenes and Phenylpropenes in the Peltate Glands of Three Cultivars of Basil. Plant Physiol. Vol. 136, 3724-3736.
- [67] 大橋 (兼子) 敬子, 小川瑛利子, 大野英一, 渡邊博之 (2013) 異なる光質環境下で生育したシソ、ルッコラおよびコリアンダーの成長と精油含有量. 植物環境工学 25(3), 132-141.
- [68] 弓場亜紀子, 本多義昭, 水越恒夫, 田端守 (1992) シソのがくにおけるモノテルペン合成の遺伝子支配. 生薬学雑誌 46(3), 257-260.
- [69] 吉田照雄, 東富士雄, 猪川重徳 (1965) 香料用青シソの含油組織, 精油含量および精油成分について. 日本作物学会紀事 3.
- [70] Schmiderer, C., Torres-Londoño, P. and Novak, J. (2013) Proof of geographical origin of Albanian sage by essential oil analysis. Biochem. Systematics. Ecol. 51, 70-77.
- [71] Taarit, M.B., Msaada, K., Hosni, K. and Marzouk, B. (2010) Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. Food Chemistry 119, 951-956.
- [72] Folin, O. and Denis, W. (1915) A colorimetric method for the determination of phenols (and phenolo derivatives) in urine. J. Biol. Chem. 22, 305-308.
- [73] 金谷健一郎 (2006) ポリフェノール類. 食品分析法 (II). 東京, 光琳.
- [74] Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927) J. Biol. Chem. 73, 627.
- [75] 鈴木 誠, 渡辺敏郎, 三浦麻子, 原島恵美子, 中川靖枝, 辻啓介 (2002) Folin-Denis 法による総ポリフェノール量測定のための抽出溶媒の検討. 日本食品科学工学会誌 Vol. 49, No. 7, 507-511.
- [76] 山本典久, 水江智子, 佐野一成, 高野済, 望月聡 (1999) 大分県産スウィートバジルの抗酸化性に関する研究 (第 2 報) - 抗酸化性ポリフェノールの探索 -. 大分県産業化学技術センター, 平成 11 年度 研究報告.
- [77] Wang, H., Provan, G.J. and Helliwell, K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. Food Chemistry 87, 307-311.

- [78] Cardoso, P.C., Tomazini, A.P.B., Stringheta, P.C., Ribeiro, S.M.R. and Pinheiro-Sant'Ana, H.M. (2011) Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. *Food Chemistry* 126, 411-416.
- [79] コスモ・バイオ株式会社 (2012) 商品情報「OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (GreenFluorescence).
(http://www.cosmobio.co.jp/connections/p_ku_view.asp?PrimaryKeyValue=3016107&ServerKey=Primary&selPrice=1.)
- [80] Ezaki, B., Jayaram, K., Higashi, A. and Takahashi, K. (2013) A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to wild species of Poaceae, *Andropogon virginicus* L. *Environ. Exp. Bot.* 93, 35-44.
- [81] Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcia, P.C., Lopez-Lefebvre, L.R., Sanchez, E. and Romero, L. (2001) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant. Sci.* 160, 315-321.
- [82] Pérez M.B., Calderón N.L. and Croci C.A. (2007) Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chemistry* 104, 585-592.
- [83] Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y. and Mizushima, T. (2010) Prevention of UVB radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 285(8), 5848-5858
- [84] Rosa, S.B., Caverzan, A., Teixeira, F. K., Lazzarotto, F., Silveira, J.A.G., Ferreira-Silva, S.L., Abreu-Neto, J., Margis, R. and Margis-Pinheiro, M. (2010) Cytosolic Apx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry* 71, 548-558.
- [85] Jan, S., Parween, T., Siddiqi, T.O. and Mahmooduzzafar (2012) Anti-oxidant modulation in response to gamma radiation induced oxidative stress in developing seedlings of *Psoralea corylifolia* L. *J. Environ. Radioact.* 113, 142-149.
- [86] Mazorra, L.M., Nunez, M., Echerarria, E., Coll, F. And Sánchez-Blanco, M.J. (2002) Influence of brassinosteroids and antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Plant Biol.* 45, 593-596.
- [87] 浦部貴美子, 灘本知憲, 平尚子, 田尾桃子, 西川善之 (2005) Folin-Denis 法により測定した野草中の総ポリフェノール量. *日本家政学会誌* Vol. 56, No. 6, 405-408.
- [88] 文部科学省 (2010) 日本食品標準成分表 2010. 資源調査分科会報告
(http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/houkoku/1298713.htm)
- [89] 保田浩 (2011) アスコルビン酸をリサイクルする酵素遺伝子を過発現させた遺伝子組換えイネの低温耐性について. *育種作物学会北海道談話会会報* 52.

- [90] Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., Ying, Q. and Qian Q. 2006. Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis saliv*a L. Plant Growth Regul. 48, 127-135.
- [91] Rivero, R.M., Ruiz, J.M. and Romero, L. (2003) Can grafting in tomato plants strengthen resistance to thermal stress? J. Sci. Food. Agric. 83, 1315-1319.
- [92] 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, 新本洋士 (2002) 農産物のラジカル消去能. 日本食品科学工学会誌 49, 257-266.
- [93] 平原文子. (1994) ビタミン E と抗酸化性. 国立健康・栄養研究所、栄養学雑誌 Vol.52, No.4, 205-206.
- [94] Liu J., Wan Y., Zhao Z. and Chen H. (2013) Determination of the content of rosmarinic acid by HPLC and analytical comparison of volatile constituents by GC-MS in different parts of *Perilla frutescens* (L.) Britt. Chemistry Central J. 7, 61.
- [95] Nitz, G.M. and Schnitzler, W.H. (2004) Effect of PAR and UV-B radiation on the quality and quantity of the essential oil in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Acta. Hort. 659, 375-381.

10. 図表

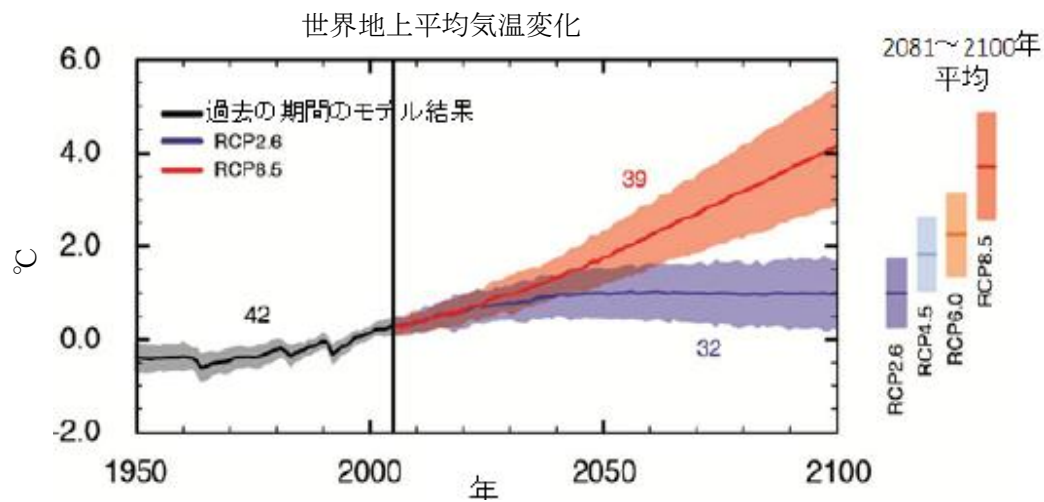


図 1. CMIP5（第 5 期結合モデル相互比較計画）マルチモデルによる時系列による世界平均地上気温の変化（1950～2100 年）。予測と不確実性の幅（陰影）の時系列を RCP2.6（青）RCP8.5（赤）のシナリオについて示した。黒（と灰色の陰影）は、復元された過去の強制力を用いてモデルにより再現した過去の推移である。全ての RCP シナリオについて色つきの縦棒で示している。[1]より。

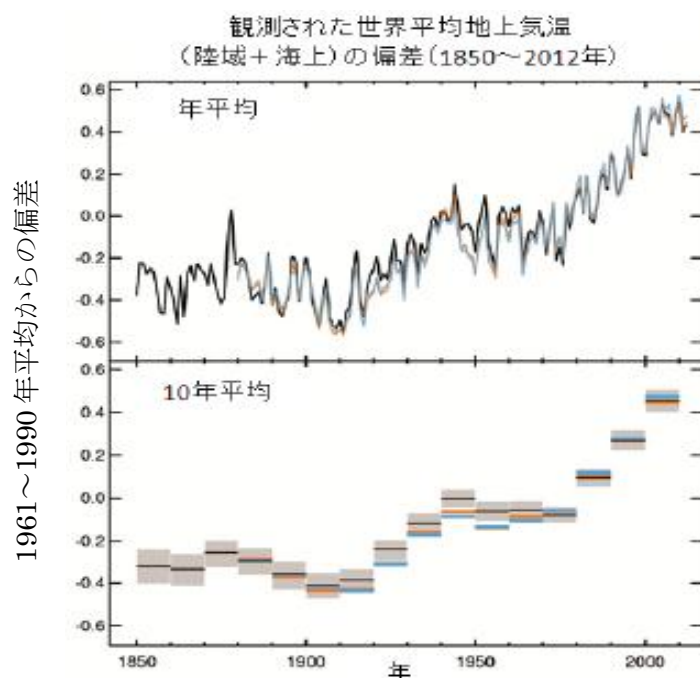


図 2. 1850～2012 年の陸域と海上とを合わせた世界平均値上気温偏差の観測地。上図：年平均値、下図：10 年毎の平均値。偏差は 1961～1990 年を基準とする。[1]より。

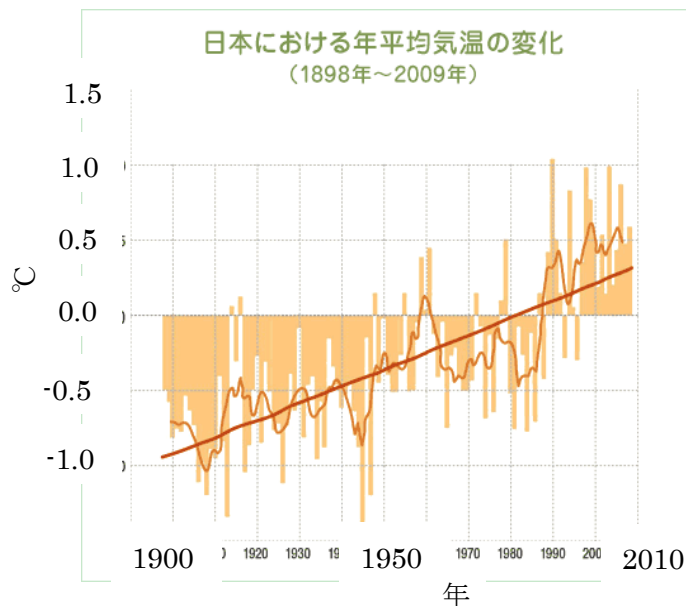


図 3. 100 年間の日本における平均気温の変化。

基準値 (0.0°C) は、1971～2000 年の 30 年間の平均値。

棒グラフは、国内 17 地点（網走、根室、寿都、山形、石巻、伏木、長野、水戸、飯田、銚子、境、浜田、彦根、多度津、宮崎、名瀬、石垣島）での年平均気温の平年差（平年値との差）を平均した。太線（オレンジ）は、その年と前後 2 年を含めた 5 年間について平年差との平均をとった 5 年移動平均で直線（赤）は平年差の長期的傾向を直線として表示した。[2]より。

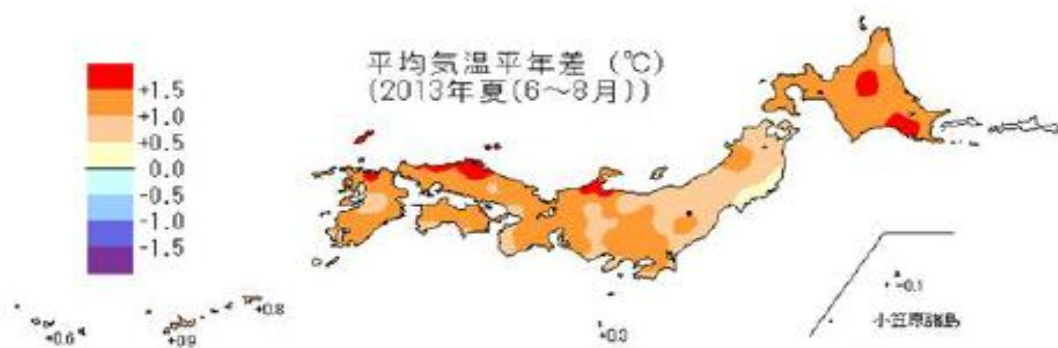


図 4. 2013 年夏（6～8 月）の平均気温平年差 (°C) 1970～2010 年の平均気温を平均値 (0.0°C) として示した。[3]より。

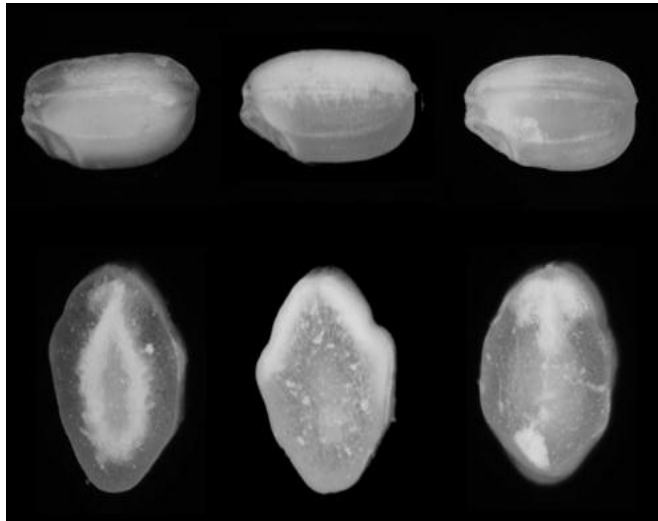


図 5. ヒノヒカリにおける白未熟粒（白濁した玄米）。左から乳白粒、背白粒、基部未熟粒でそれぞれ横に切った断面が下の写真である。[12]より。

表 1. 温暖化に対する問題点とその対応策。[5]より。

作物	問題点	対応策
トマト	稔性低下	ハウス内の冷却
イチゴ	秋季花芽分化遅延	尿素施用による吸熱反応の利用
ナシ	低温遭遇の不足 (自発休眠覚醒のため)	反射被覆資材と細霧冷房
ハウレンソウ	遮光栽培によるアスコルビン酸量の低下	遮光除去処理の導入
夏秋キク・トルコギキョウ	開花期不安定化	光・温度応答反応の相互作用解析
ナス	高温による結実不良	高温体制付与単為結果性系統の導入

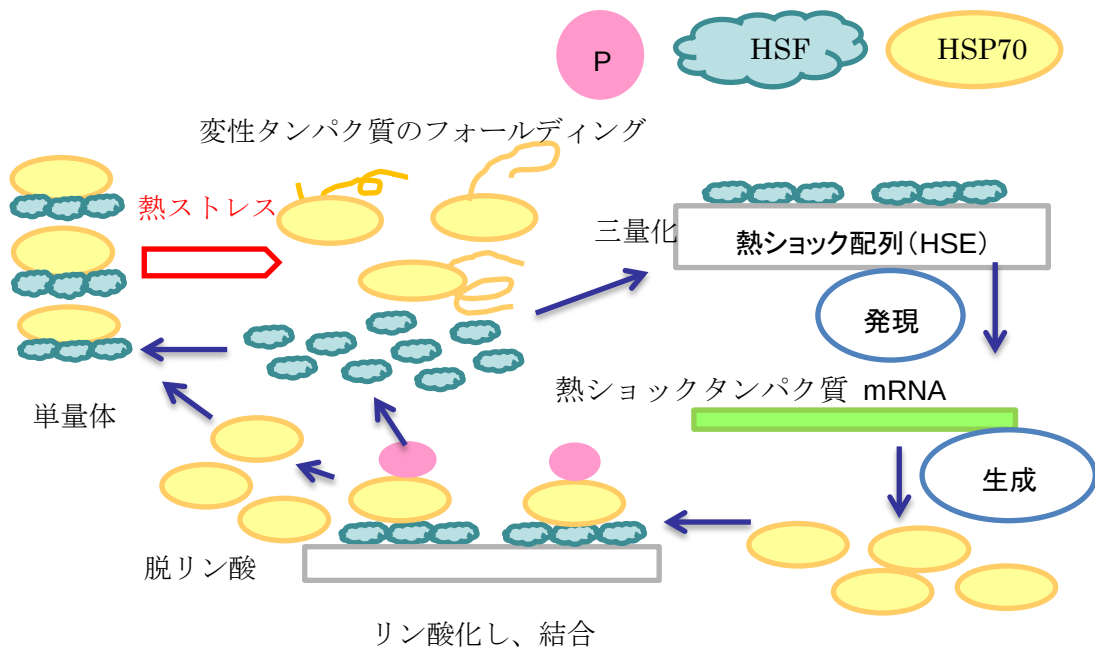


図 6. HSF(熱ショック因子)の活性調節機構。これにより、熱ショックタンパク質 mRNA の合成を活性化する。ストレスの無い状態だと、HSP70-HSF 単量体として存在する(1)。熱が加わると、HSP70 は HSF から単離し、HSF は三量化する(2)。活性な三量体は、熱ショックタンパク質のプロモーター内の熱ショック配列(HSE)に結合(3)し、HSP mRNA の転写を活性化(4)し、その結果、HSP70 を含む HSPs の翻訳がおこる(5)。HSE と会合した三量体 HSF はリン酸化され、HSP はリン酸化された三量体と結合しやすくなる(6)。その HSP70-三量体複合体は、HSE から解離し、会合を解き、脱リン酸化を受け、HSF 単量体を遊離する(7)。HSF 単量体は引き続き HSP と結合し、休止状態の HSP70/HSF 複合体を再形成する。[25, 26]より。

表 2. 抗酸化物質と活性酸素種の反応。[46]より。

抗酸化物質	活性酸素種			
	O_2^-	H_2O_2	$\cdot OH$	1O_2
スーパーオキシドジスムターゼ	+	-	-	-
グルタチオンペルオキシダーゼ	-	+	-	-
ペルオキシダーゼ	-	+	-	-
カタラーゼ	-	+	-	-
アスコルビン酸 (V.C)	+	+	-	+
システイン	-	-	+	-
グルタチオン	-	-	+	-
(リノール酸=>過酸化脂質)	-	-	+	-
α -トコフェロール (V.E)	-	-	+	+
α -カロテン	-	-	+	-
β -カロテン	-	-	+	+
フラボノイド	-	-	+	-
リボフラビン (B_2)	-	-	-	+
ビリルビン	+	-	-	-
尿酸	-	-	+	+

(+)はその活性酸素種を除去する働きがあるもので、(-)はその活性酸素種に対して働かないものを示す。

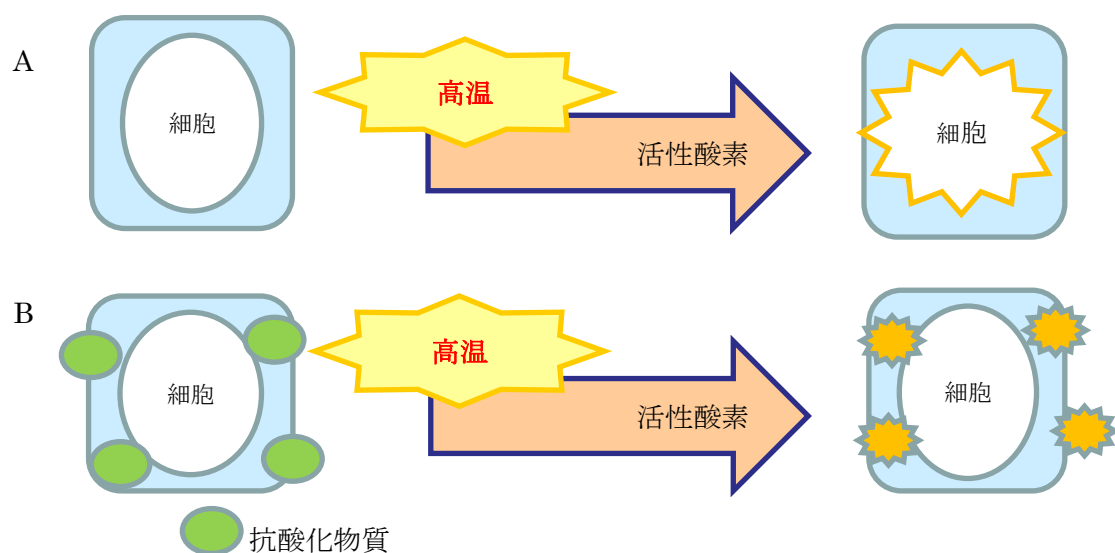
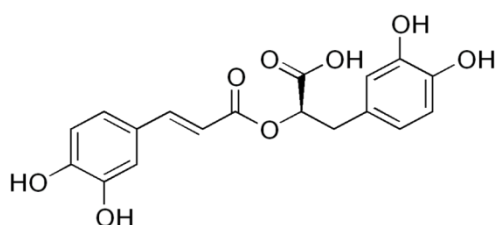
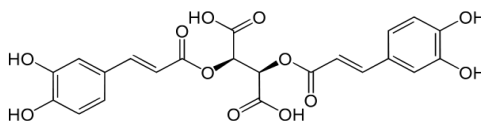


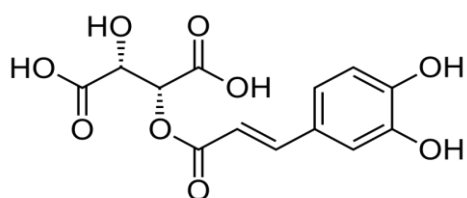
図 7. 細胞の酸化と抗酸化物質の働きのモデル。(A) 抗酸化物質が無い場合。活性酸素が発生すると、細胞自体が酸化されてしまう。(B) 抗酸化物質がある場合。活性酸素が発生すると抗酸化物質が酸化されるため、細胞の酸化が抑えられる [45]。



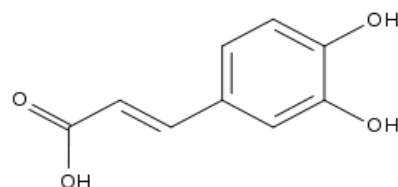
rosmarinic acid



chicoric acid



caftaric acid



caffeic acid

図 8. 本論文に登場するポリフェノール類；ロスマリン酸 (rosmarinic acid)、チコリ酸 (chicoric acid)、カフタル酸 (caftaric acid)、カフェ酸 (caffeic acid) の化学構造。

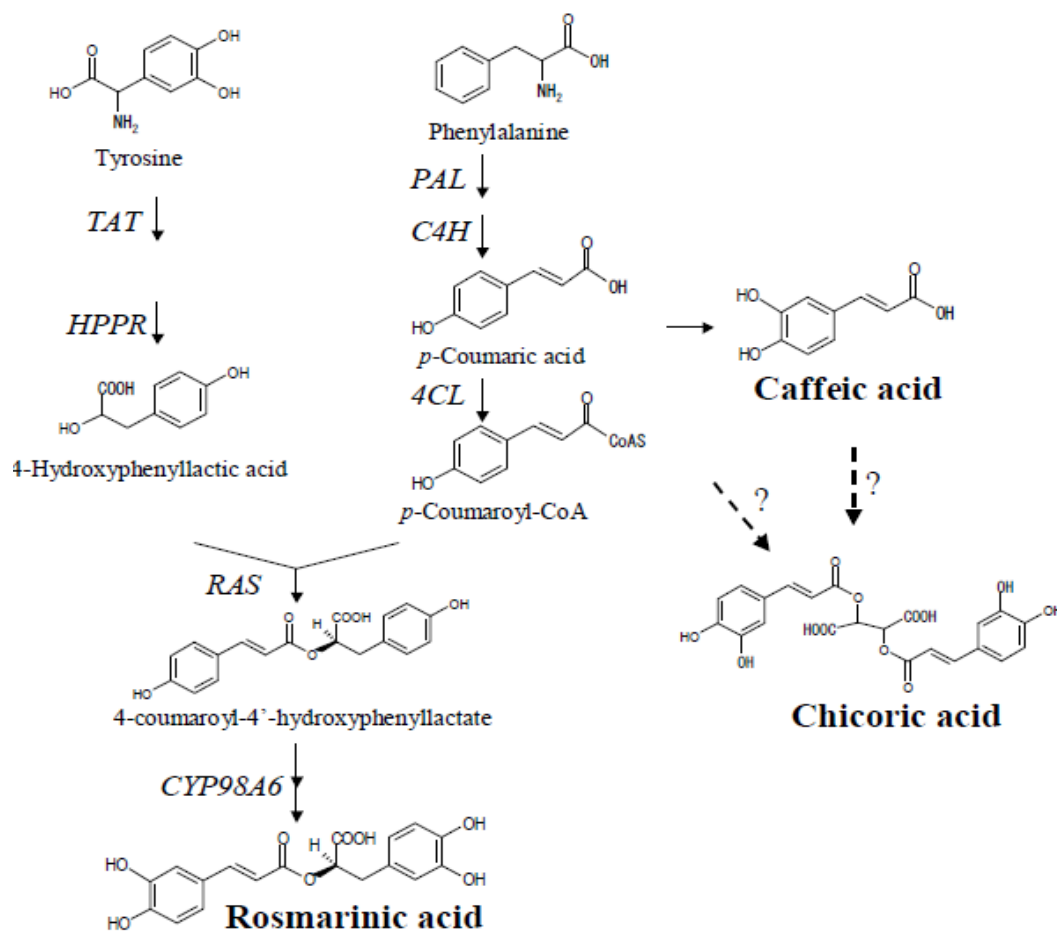
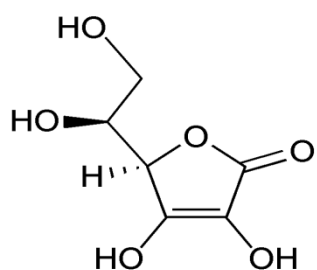
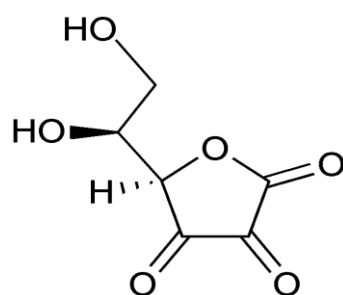


図 9. ロスマリン酸の生合成経路。フェニルアラニンとチロシンからロスマリン酸が合成される。[47, 53]より。



L-ascorbic acid (AA)



dehydroascorbic acid (DHA)

図 10. アスコルビン酸(AA)とデヒドロアスコルビン酸(DHA)の化学構造。

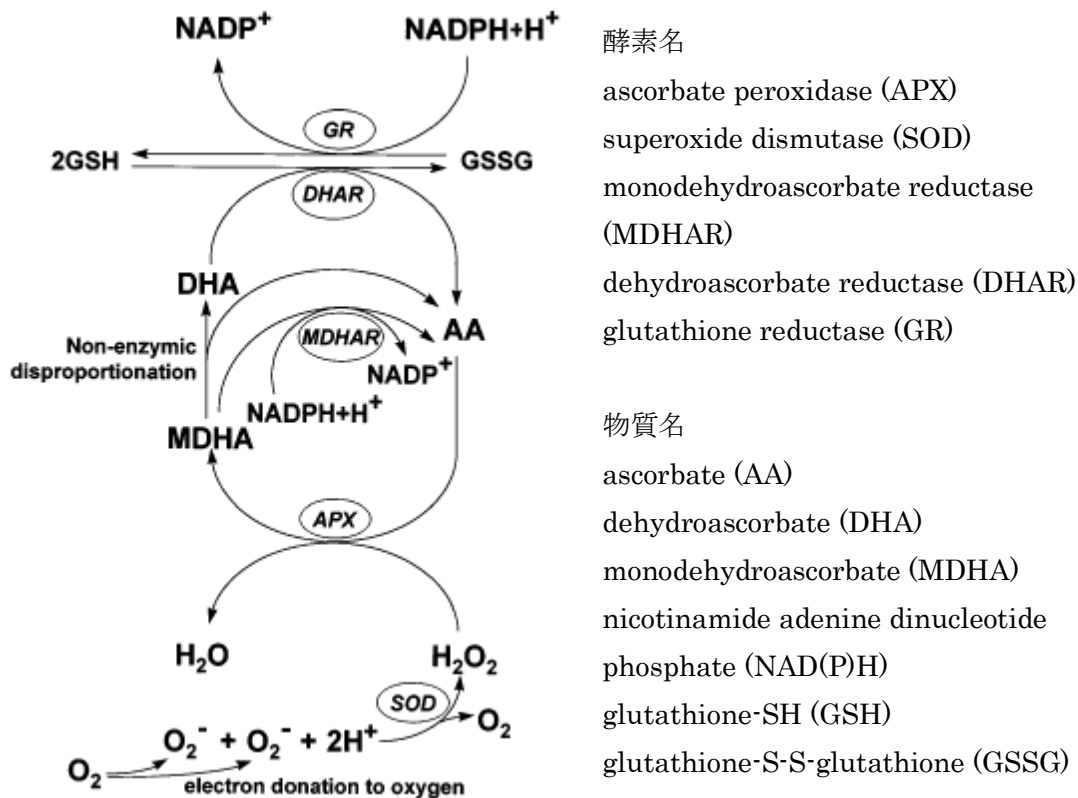


図 11. グルタチオンアスコルビン酸回路 (Glutathione-ascorbate cycle)

APX は、過酸化水素を水にすることで過酸化水素を減らすために、2 分子のアスコルビン酸を使う。

酸化されたアスコルビン酸は、モノデヒドロアスコルビン酸 (MDA) となるが、即座にデヒドロアスコルビン酸となる。は、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (NADH) (MDAR) によってアスコルビン酸 (AA) に再生される。

デヒドロアスコルビン酸 (DHA) は、還元型グルタチオン (GSH) を消費してデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (DHAR) によってアスコルビン酸に還元され、酸化型グルタチオン (GSSG) (グルタチオンジスルフィド) を生成する。最後に、酸化型グルタチオンは、NADPH を電子供与体として利用してグルタチオンレダクターゼ (GR) によって還元される。こうしてアスコルビン酸とグルタチオンが消費されることはない。電子は実質的に NADPH から H_2O_2 に流れることとなる。デヒドロアスコルビン酸の還元は、非酵素的または例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼオメガ 1 やグルタレドキシンなどのようにデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (DHAR) 活性を有したタンパク質によって触媒される。[64]より。

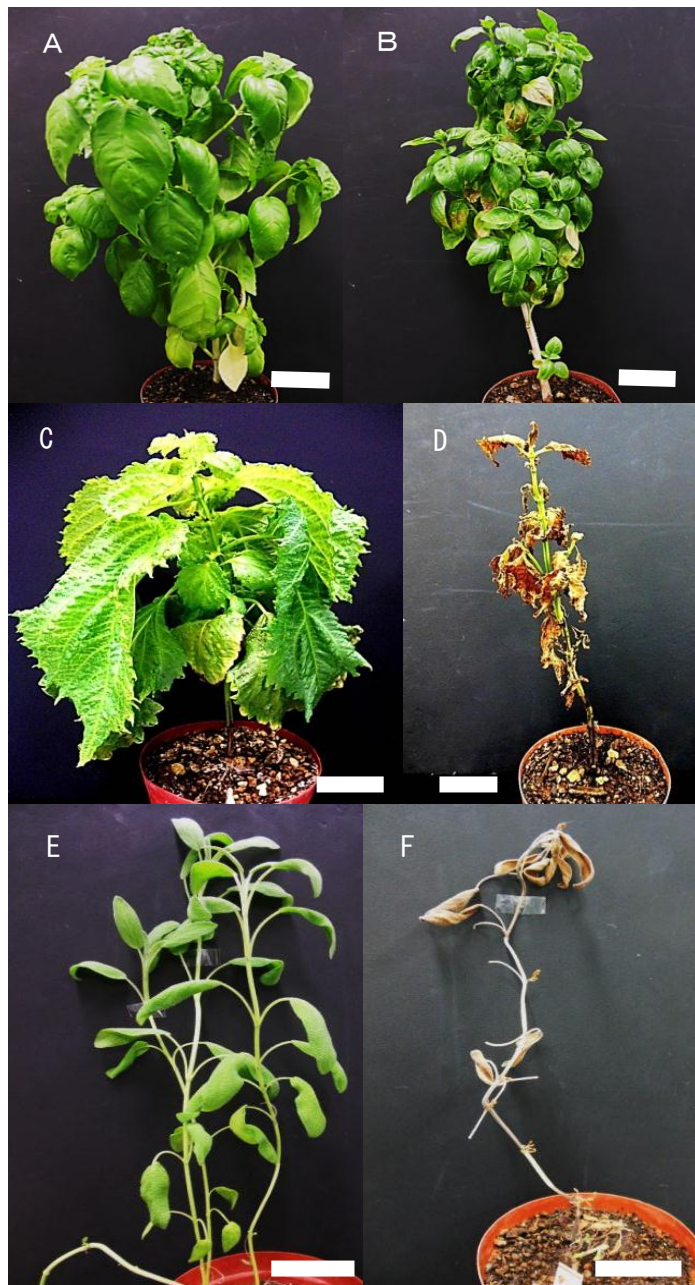


図 12. 播種後 12 週間の植物体を 23℃及び 37℃環境（明期 16 時間、暗期 8 時間、光量 3000 lux）に置いて、6 週目の各個体の様子。(A) 23℃に置いたバジルの様子。(B) 37℃に置いたバジルの様子。(C) 23℃に置いたシソの様子。(D) 23℃に置いたシソの様子。(E) 23℃に置いたセージの様子。(F) 23℃に置いたセージの様子。バーは 5 cm を表す。

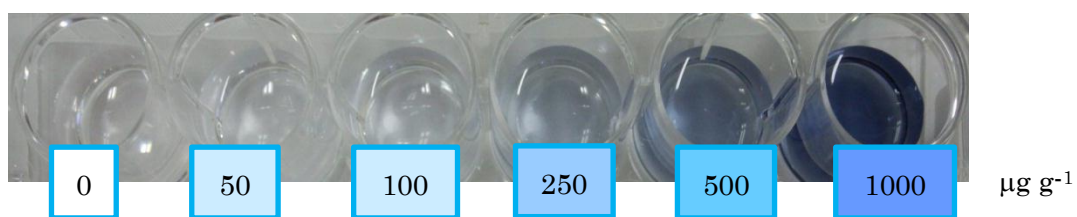


図 13. Folin-Denis 法で呈色させたカテキン段階希釈溶液。標準物質であるカテキン (catechin) を、メタノールで段階希釈し、Folin-Denis 法で呈色した。

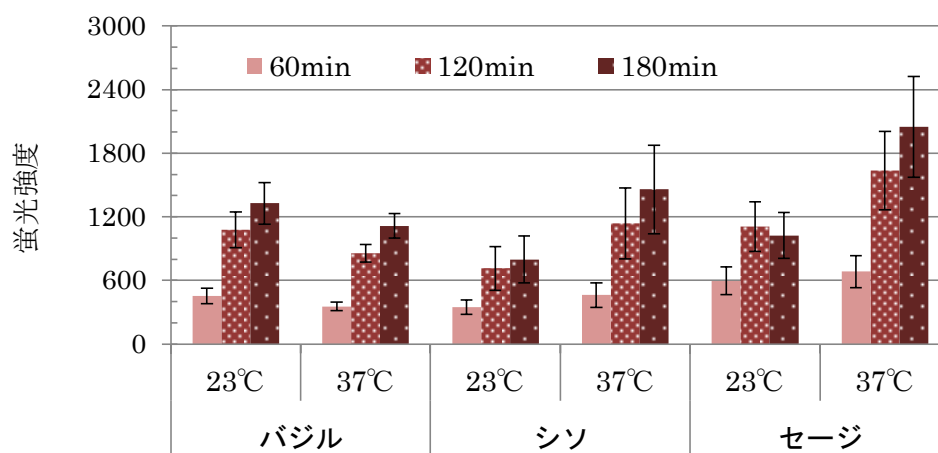


図 14. 温度条件移行 7 日目の葉の活性酸素発生量の変化。DCFH-DA 添加 60、120、180 分後の DCF 蛍光値を蛍光強度として示した。値は実験の平均値 (バジル 40 回、シソ・セージ 17 回) を、バーは標準誤差を表す。

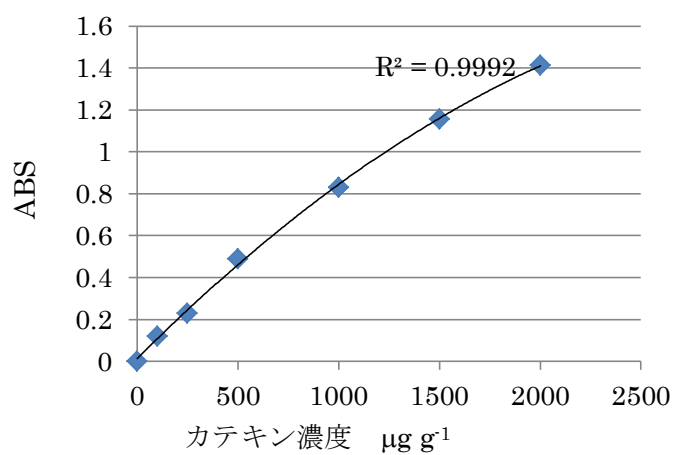


図 15. Folin-Denis 法の検量線。分光光度計 760 nm で測定した。

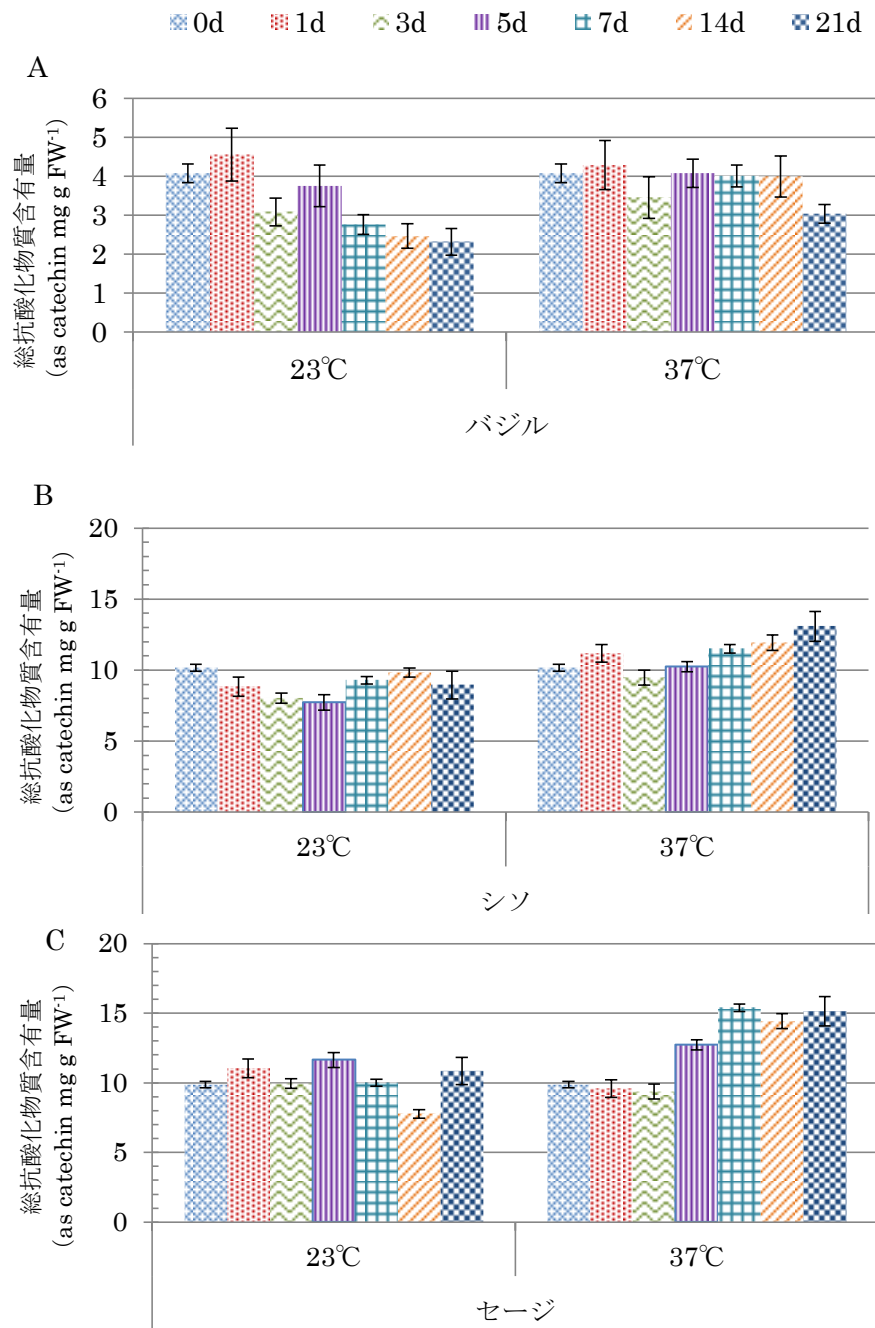


図 16. 温度条件移行 21 日目までの総抗酸化物質質量 (TP: total polyphenolics) の変化。各植物体の上位の展開葉を採取し、メタノール抽出した。Folin-Denis 法により呈色、総抗酸化物質質量をカテキン相当量として、波長 760 nm の吸光度を測定した。値は 9 回の平均値を、バーは標準誤差を示す。

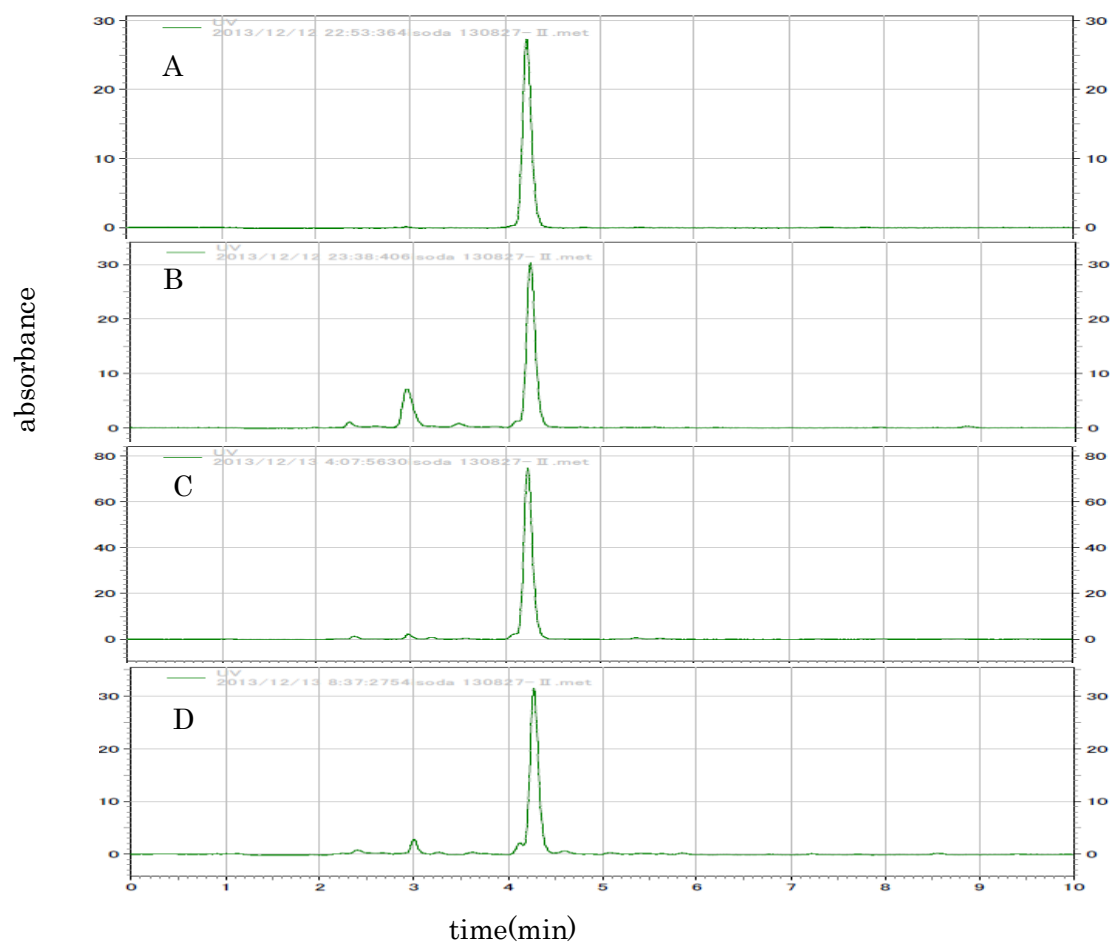


図 17. メタノール抽出物の HPLC クロマトグラム。(A) ロスマリン酸 (Rosmarinic acid) 標品のクロマトグラム。(B) バジル葉メタノール抽出物のクロマトグラム。(C) シソ葉メタノール抽出物のクロマトグラム。(D) セージ葉メタノール抽出物のクロマトグラム。

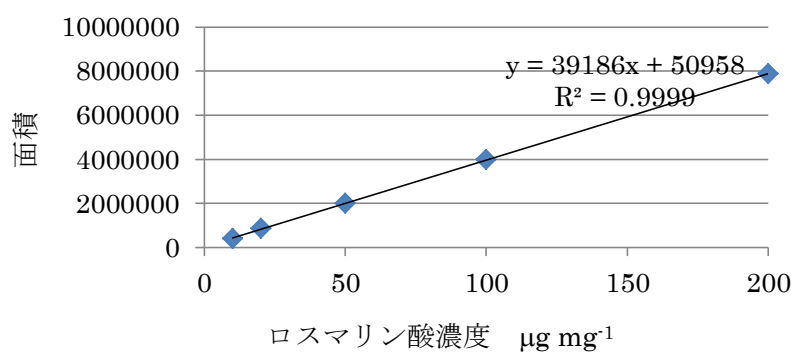


図 18. ロスマリン酸の検量線。ロスマリン酸 (rosmarinic acid) 標品を 20 %メタノールに段階希釈したものを検量線用試料とした。HPLC 分析し、ピーク面積値法を用いて作成した。

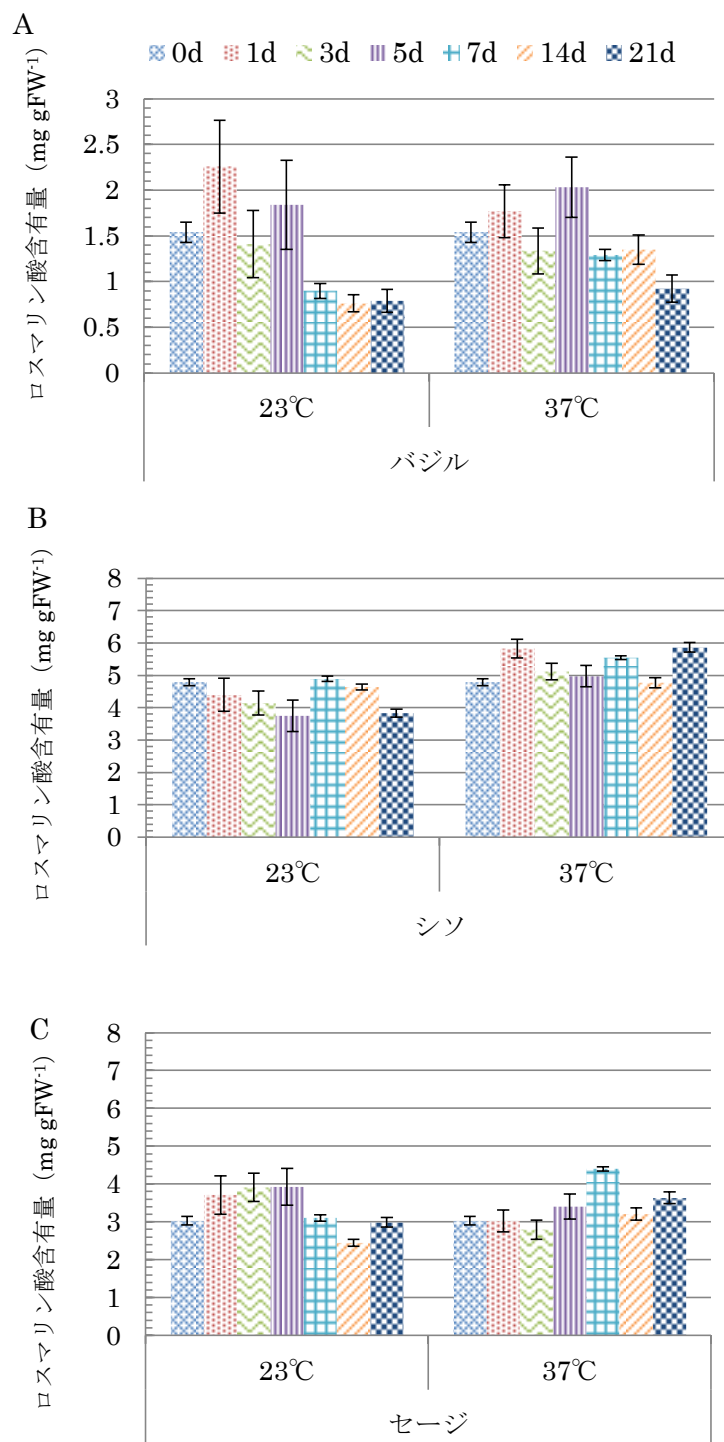


図 19. 温度条件移行 21 日目までの葉内ロスマリン酸 (rosmarinic acid) 量の変化。葉抽出サンプルと抽出法は図 16 と同様とし、HPLC により、ロスマリン酸を定量した。値は 9 回の平均値を、バーは標準誤差を示す。

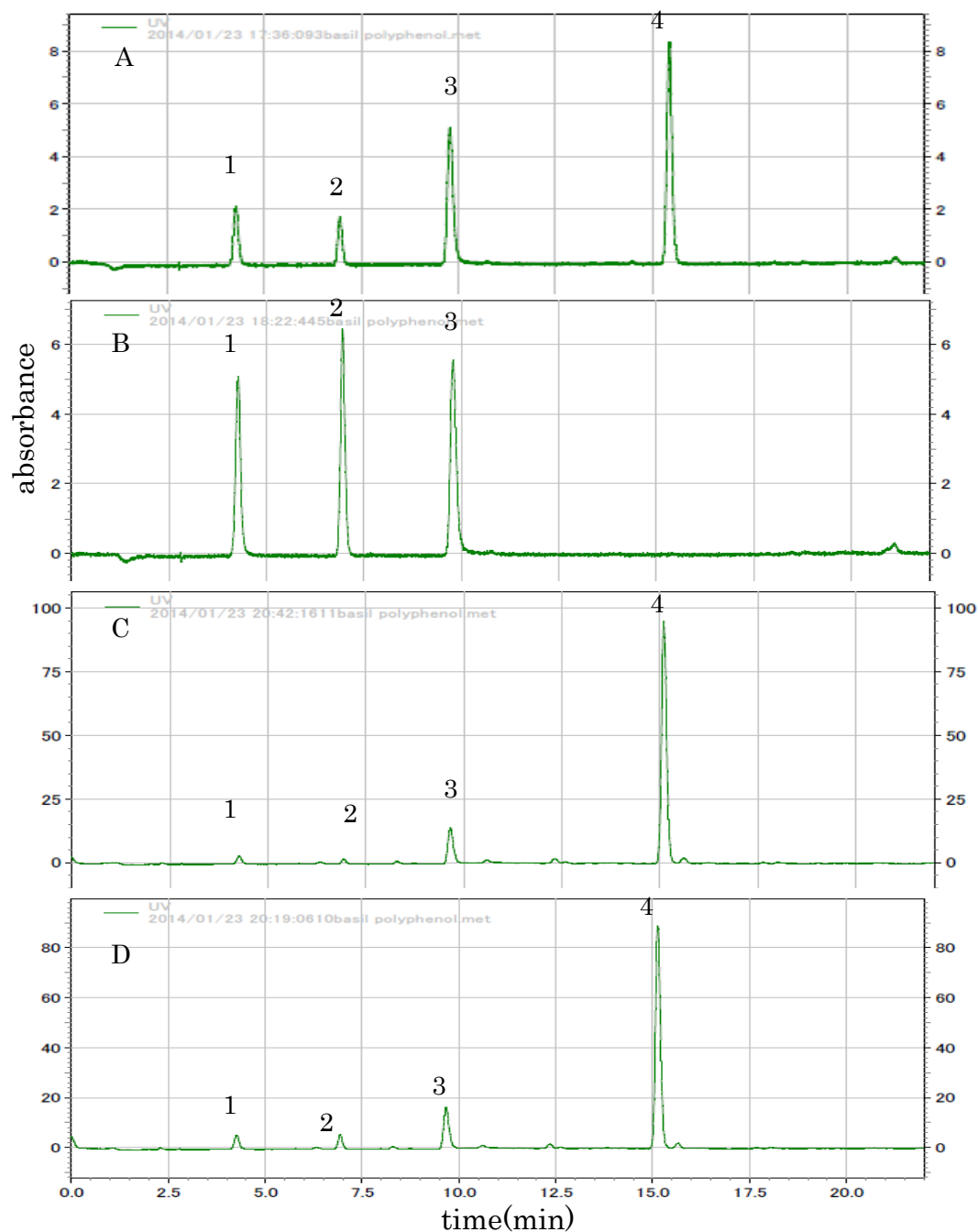


図 20. バジル葉 40 %エタノール抽出物のクロマトグラム。

1; カフタル酸、2; カフェ酸、3; チコリ酸、4; ロスマリン酸

(A) カフタル酸、カフェ酸、チコリ酸、ロスマリン酸標準 4、1、8、10 $\mu\text{g g}^{-1}$ のクロマトグラム。(B) カフタル酸、カフェ酸、チコリ酸 10、4、10 $\mu\text{g g}^{-1}$ のクロマトグラム。(C) 40 %バジル抽出物 30 倍希釈のクロマトグラム。(D) 40 %バジル抽出物 30 倍希釈物にカフタル酸、カフェ酸、チコリ酸標品をそれぞれ 5、2、5 $\mu\text{g g}^{-1}$ 添加したクロマトグラム。

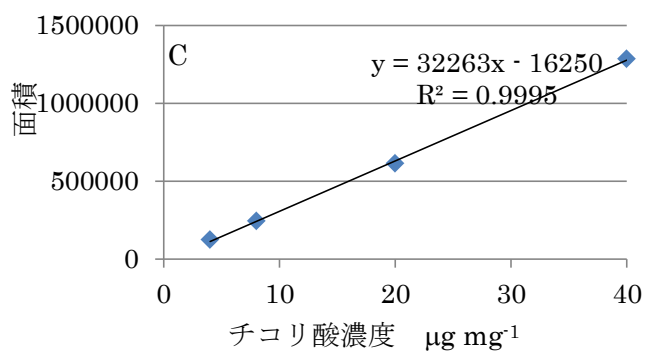
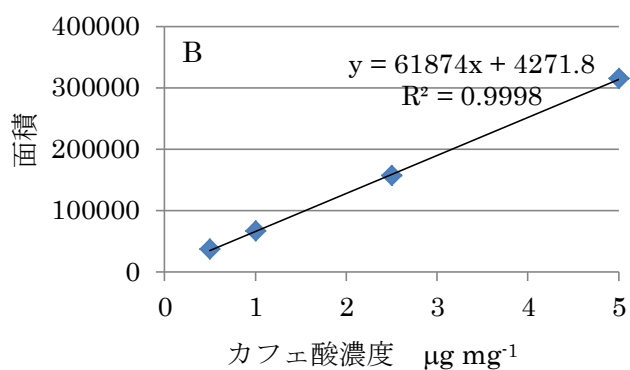
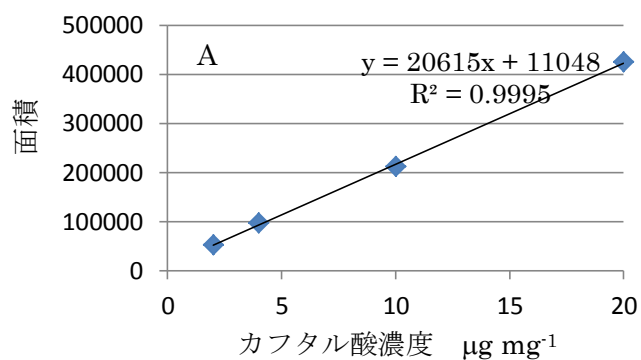


図 21. バジル葉に含まれるポリフェノール成分の検量線。各標品を 40 %エタノールに段階希釈したものを HPLC 分析し、ピーク面積値法を用いて作成した。(A) カフタル酸の検量線。(B) カフェ酸の検量線。(C) チコリ酸の検量線。

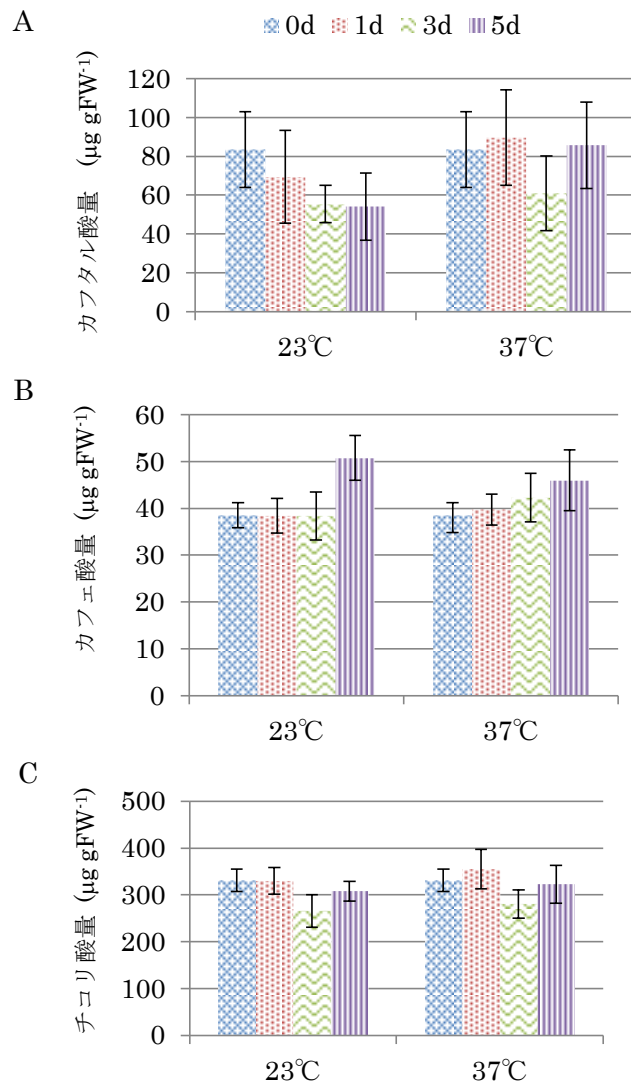


図 22. 温度条件移行 5 日目までのバジル葉内各ポリフェノール量の変化。各温度条件で生育させたバジル株の上位の展開葉を採取し、40%エタノール抽出した。その抽出物をろ過後、HPLC により各ポリフェノール成分を定量した。(A) カフタル酸 (caftaric acid) 量の変化。(B) カフェ酸 (caffeic acid) 量の変化。(C) チコリ酸 (chicoric acid) 量の変化。値は 12 回の平均値を、バーは標準誤差を示す。

表 3. バジル葉メタノール抽出物のポリフェノール量。

含有量	移行前	移行条件	移行後					
			1d	3d	5d	7d	14d	21d
TP (mg g ⁻¹)	4.0	23℃	4.6	3.1	3.8	2.8	2.3	2.2
		37℃	4.3	3.5	4.1	4.0	4.0	3.0
RA (mg g ⁻¹)	1.5	23℃	2.3	1.4	1.8	0.9	0.7	0.7
		37℃	1.8	1.3	2.0	1.3	1.4	0.9
CtA (μg g ⁻¹)	27.8 (tr)	23℃	23.6	33.4	27.8			
		37℃	39.2	30.1	40.0			
CaA (μg g ⁻¹)	41.4	23℃	33.9	40.3	47.7			
		37℃	39.3	44.7	35.0			
ChA (μg g ⁻¹)	261.5	23℃	322.7	302.8	317.0			
		37℃	297.4	287.9	315.9			

TP(total polyphenolics、カテキン相当量), RA(rosmarinic acid), CtA(caftaric acid), CaA(caffeic acid), ChA(Chicoric acid)の各葉内含有量を示した。値は9回の平均値で、tr = trace (微量)であることを示す。

表 4. シソ葉メタノール抽出物のポリフェノール量。

含有量	移行前	移行条件	移行後					
			1d	3d	5d	7d	14d	21d
TP (mg g ⁻¹)	10.0	23℃	8.8	8.0	7.7	9.3	9.8	9.0
		37℃	11.2	9.5	10.2	11.5	11.9	13.0
RA (mg g ⁻¹)	4.8	23℃	4.4	4.1	3.8	4.9	4.6	3.8
		37℃	5.8	5.1	5.0	5.5	4.8	5.9

TP(total polyphenolics、カテキン相当量), RA(rosmarinic acid)の各葉内含有量を示した。値は9回の平均値である。

表 5. セージ葉メタノール抽出物のポリフェノール量。

含有量	移行前	移行条件	移行後					
			1d	3d	5d	7d	14d	21d
TP (mg g ⁻¹)	9.9	23℃	11.1	9.9	11.6	10.0	7.8	10.8
		37℃	9.6	9.4	12.7	15.4	14.4	15.1
RA (mg g ⁻¹)	3.0	23℃	3.7	3.9	3.9	3.1	2.4	3.0
		37℃	3.0	2.8	3.4	4.4	3.2	3.6

TP(total polyphenolics、カテキン相当量), RA(rosmarinic acid)の各葉内含有量を示した。値は9回の平均値である。

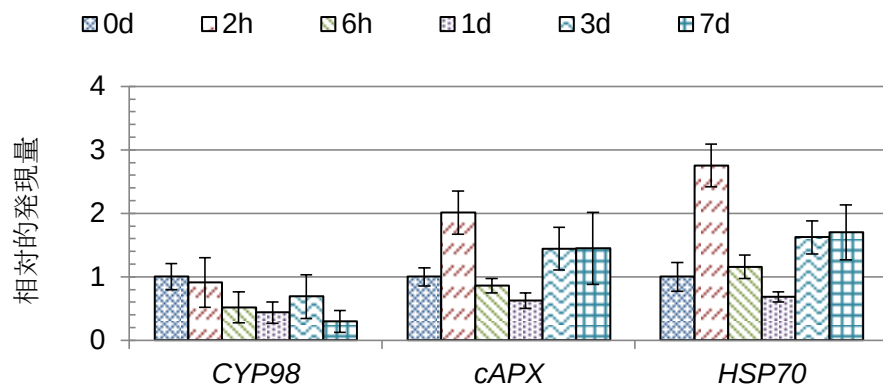


図 23. バジルの抗酸化関連遺伝子の高温移行における発現量変化。値は 23°C 栽培時の発現量を 1 とした時の相対的発現量を、バーは標準誤差を示す。

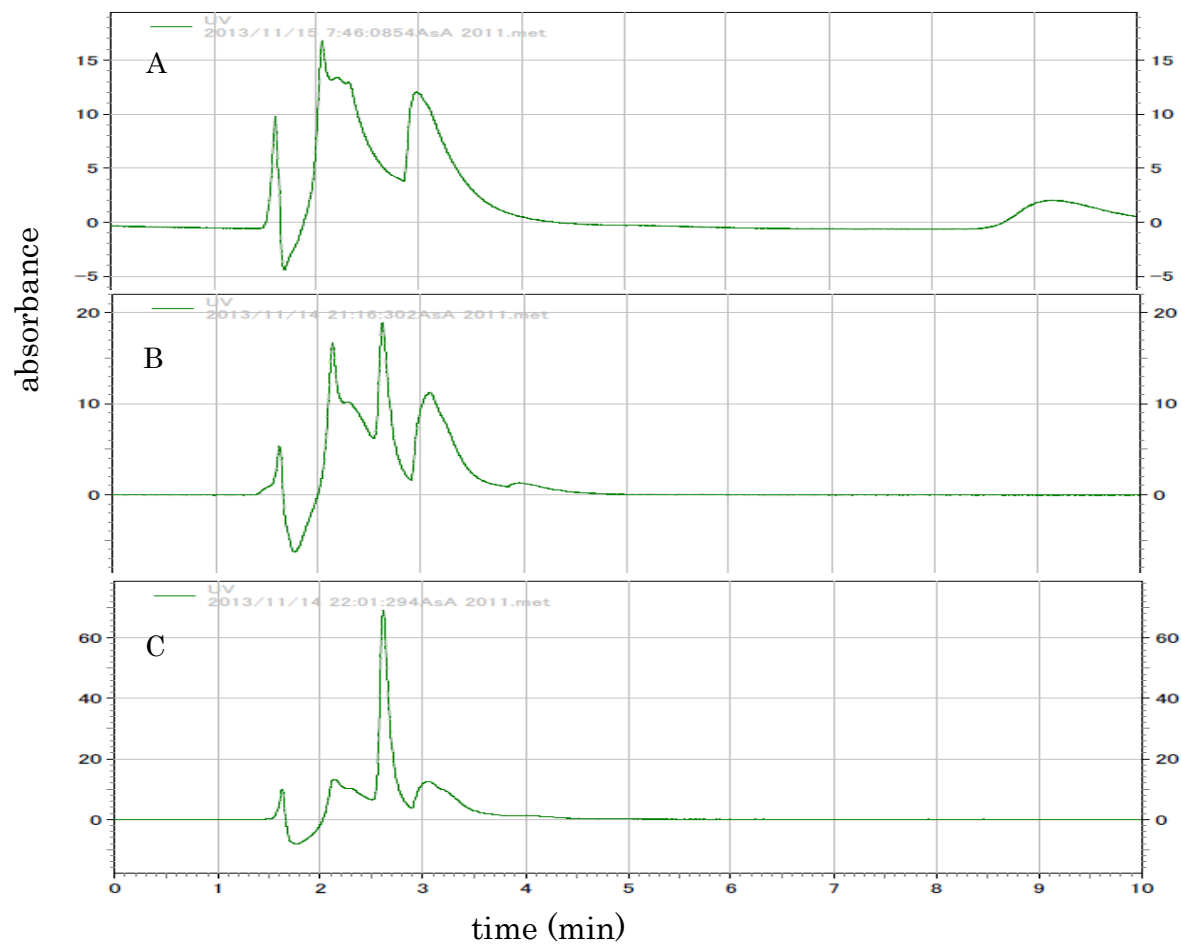


図 24. アスコルビン (ascorbic acid) 標品の HPLC クロマトグラム。アスコルビン酸標品は 3 %メタリン酸混合液 (サンプル抽出液) に溶解した。(A) アスコルビン酸 0 $\mu\text{g mg}^{-1}$ のクロマトグラム (B) アスコルビン酸 5 $\mu\text{g mg}^{-1}$ のクロマトグラム。(C) アスコルビン酸 20 $\mu\text{g mg}^{-1}$ のクロマトグラム。

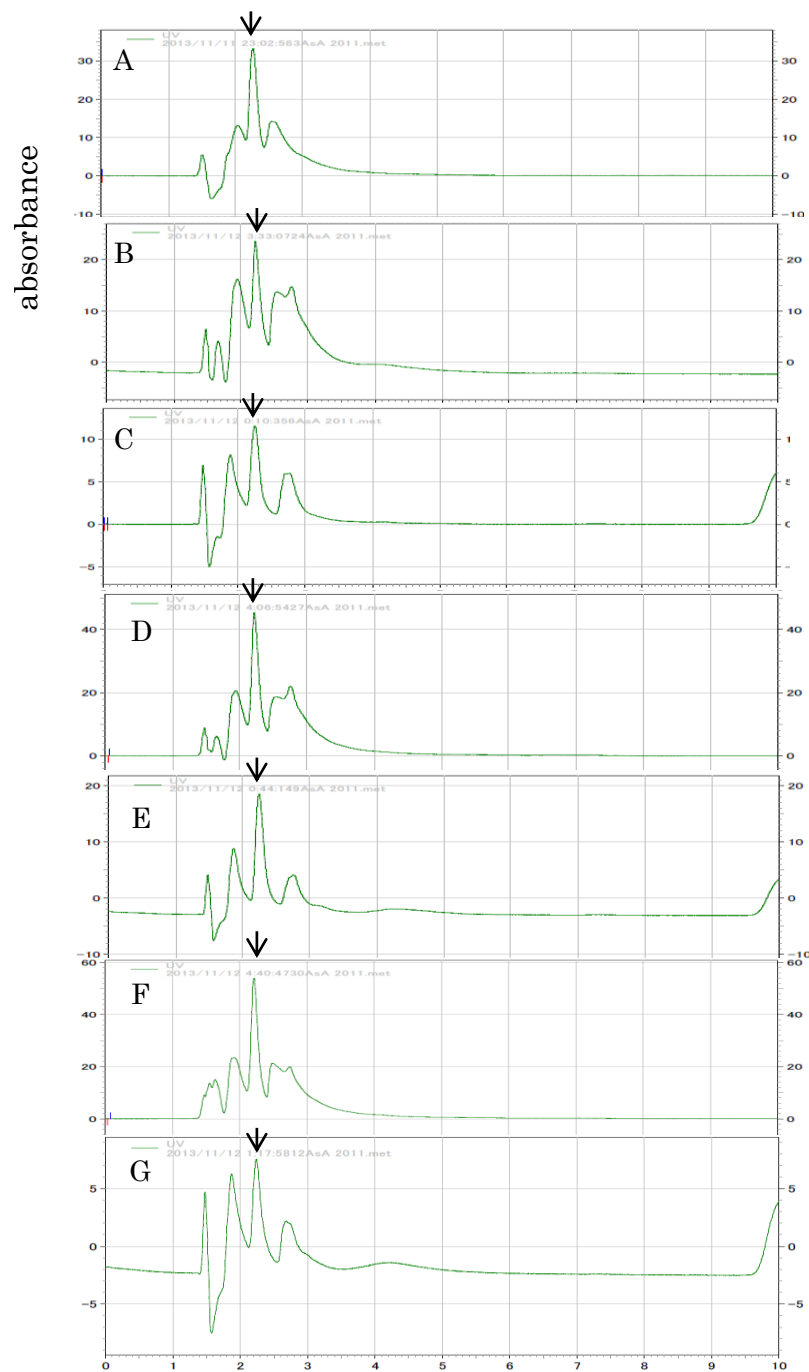


図 25. メタリン酸抽出物の HPLC クロマトグラム。(A) アスコルビン酸 (ascorbic acid) 標品のクロマトグラム。(B) バジル葉メタリン酸抽出物のクロマトグラム。(C) バジル葉メタリン酸抽出物還元処理後のクロマトグラム。(D) シソ葉メタリン酸抽出物のクロマトグラム。(E) シソ葉メタリン酸抽出物還元処理後のクロマトグラム。(F) セージ葉メタリン酸抽出物のクロマトグラム。(G) セージ葉メタリン酸抽出物還元処理後のクロマトグラム。

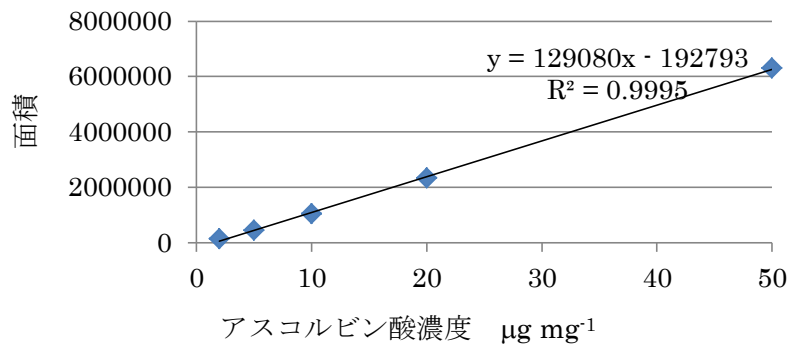


図 26. アスコルビン酸の検量線。アスコルビン酸をサンプル抽出液に希釈したものを検量線用試料とした。

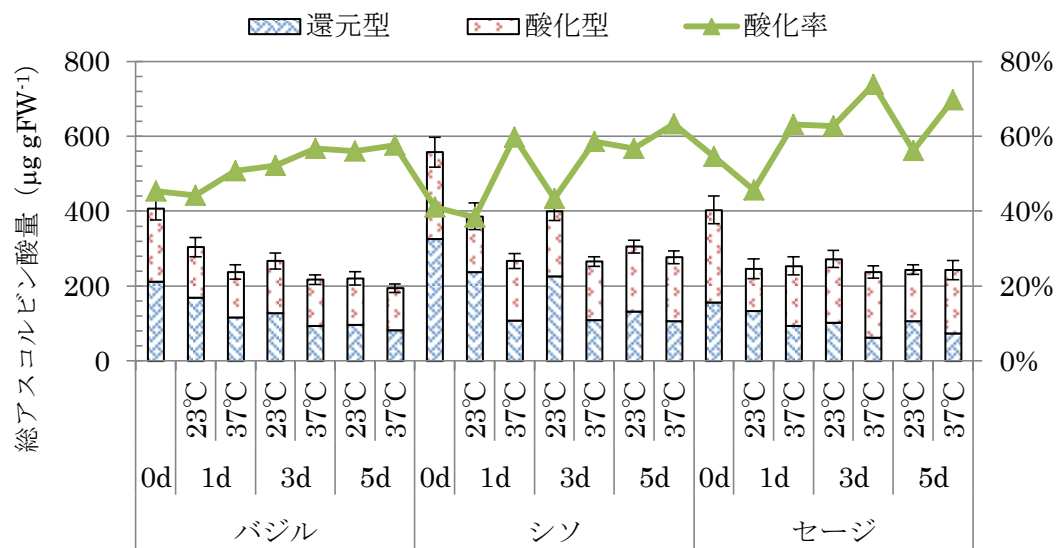


図 27. 温度条件移行 0、1、3、5 日目までの葉内アスコルビン酸量の変化。還元型 (AA) と酸化型 (DHA) の和を総アスコルビン酸量とした。各植物体の上位葉を採取し、メタリン酸混合液で抽出し、還元処理したものを総アスコルビン酸、しないものを還元型として、HPLC により、定量した。酸化率は総アスコルビン酸量に対する酸化型の割合で示した。値は 12 回の平均値を、バーは総アスコルビン酸の標準誤差を示す。

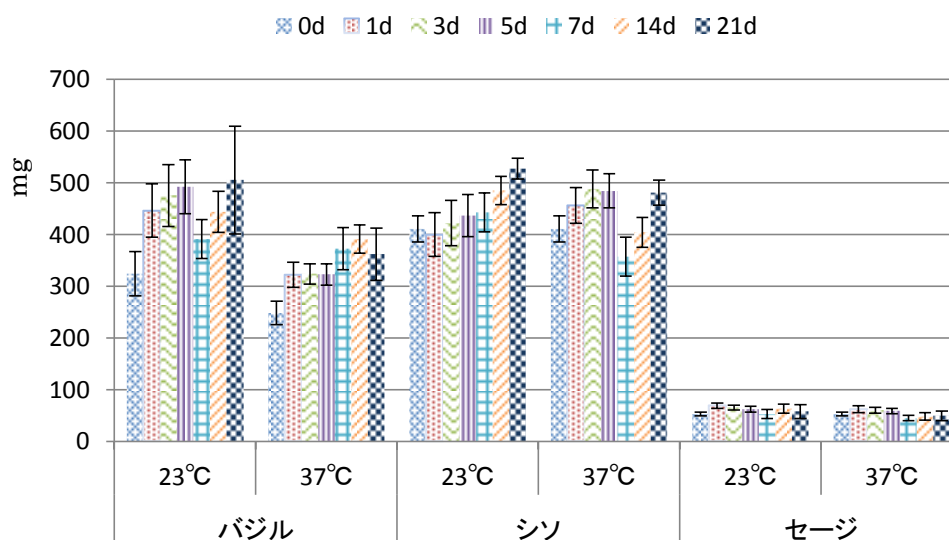


図 28. 各温度条件に移行した各葉の生重量。中央の葉脈に沿って、半分にしたときのもので、中央の葉脈の重さは含まれていない。バジルは、0 日目（各温度条件移行前）の葉で、各温度条件の重量にばらつきがあったため、揃えていない。値は 12 枚の葉の平均値でバーは標準誤差を表す。

表 6. 液体窒素凍結葉粉末の溶解の有無によるバジル、シソ葉抽出物におけるフェノール含量の変化。

含有量	液体窒素粉末 溶解	液体窒素粉末 凍結
TP (mg g ⁻¹)	2.46 (1.78)	5.16 (6.98)
rosmarinic acid (mg g ⁻¹)	tr	0.67

全て生重量比。TP: total phenolics ;総抗酸化物質量(mg catechin g⁻¹)。Rosmarinic acid ロスマリン酸量 (mg g⁻¹)。tr = trace. (カッコ)内はシソを表す。溶解したものは凍結葉粉末を溶解させてから 40 %エタノール抽出した。凍結させたものは溶解せずに 40 %エタノール抽出した。値は 2 回の平均値を示す。

表 7. ブランチングの有無によるバジル、シソ葉抽出物におけるフェノール含量の変化。

含有量	ブランチング 有	ブランチング 無
TP (mg g ⁻¹)	6.71(10.61)	5.16 (6.98)
Rosmarinic acid (mg g ⁻¹)	2.59	0.67

全て生重量比。TP: total phenolics ;総抗酸化物質量(mg catechin g⁻¹)。Rosmarinic acid ロスマリン酸量 (mg g⁻¹)。 (カッコ)内はシソを表す。ブランチングしたものは、凍結葉粉末を 40 %エタノールに浸けた後、約 80°C でブランチングし、氷冷した。しないものは、ブランチングせず氷冷した。値は 2 回の平均値を示す。

表 8. ボルテクスの有無によるバジル、シソ葉抽出物におけるフェノール含量の変化。

含有量	ボルテクス 有	ボルテクス 無
TP (mg g ⁻¹)	6.71(10.61)	6.02 (8.45)

全て生重量比。TP: total phenolics ;総抗酸化物質質量(mg catechin g⁻¹)。 (カッコ内はシソを表す。凍結葉粉末を 40 %エタノールに浸けた後、約 80℃でブランチングし、氷冷した試料を使用した。ボルテクス有りの試料はろ過、測定の前に 5 分間振とうさせた。値は 2 回の平均値を示す。

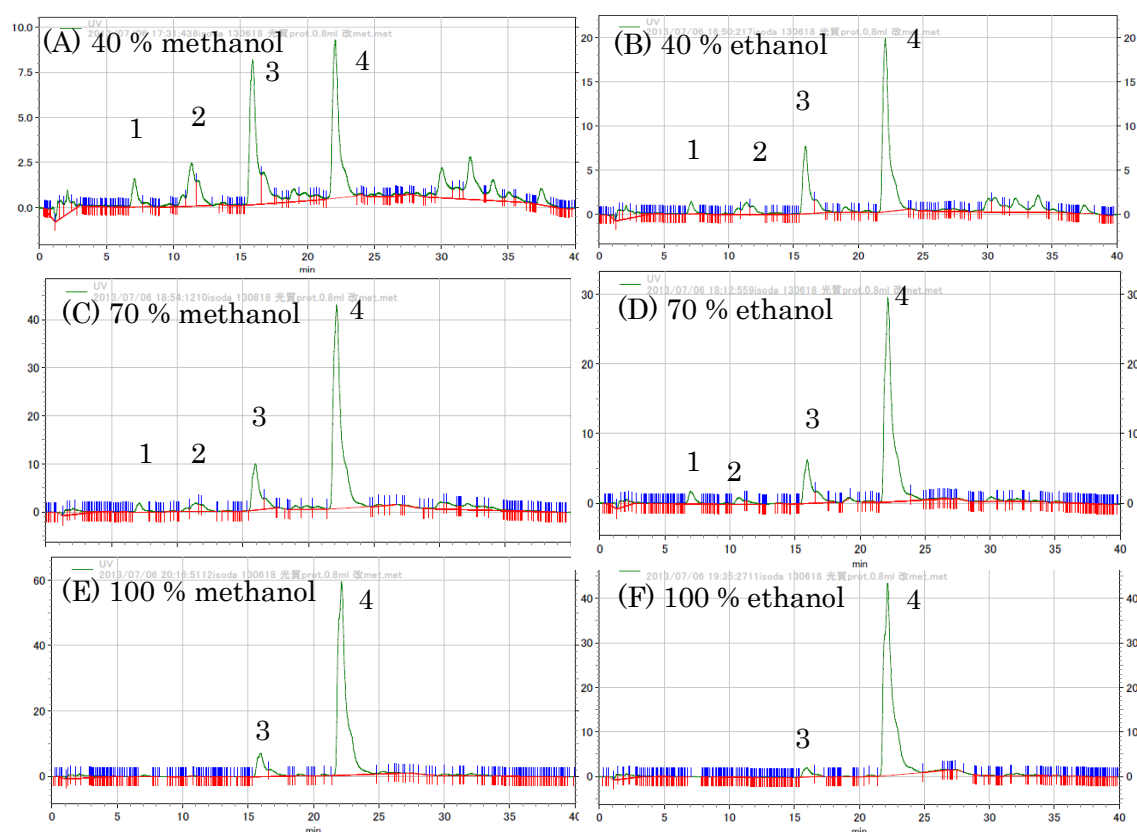


図 29. 抽出溶媒の違いによるバジル葉抽出物の HPLC クロマトグラム。ピーク 1: カフタル酸(caftaric acid), ピーク 2: カフェ酸(caffeic acid), ピーク 3: チコリ酸(chicoric acid), ピーク 4: ロスマリン酸(rosmarinic acid)を表す。(A) 40 %メタノール葉抽出物のクロマトグラム。(B) 40 %エタノール葉抽出物のクロマトグラム。(C) 70 %メタノール葉抽出物のクロマトグラム。(D) 70 %エタノール葉抽出物のクロマトグラム。(E) 100 %メタノール葉抽出物のクロマトグラム。(F) 100 %エタノール葉抽出物のクロマトグラム。

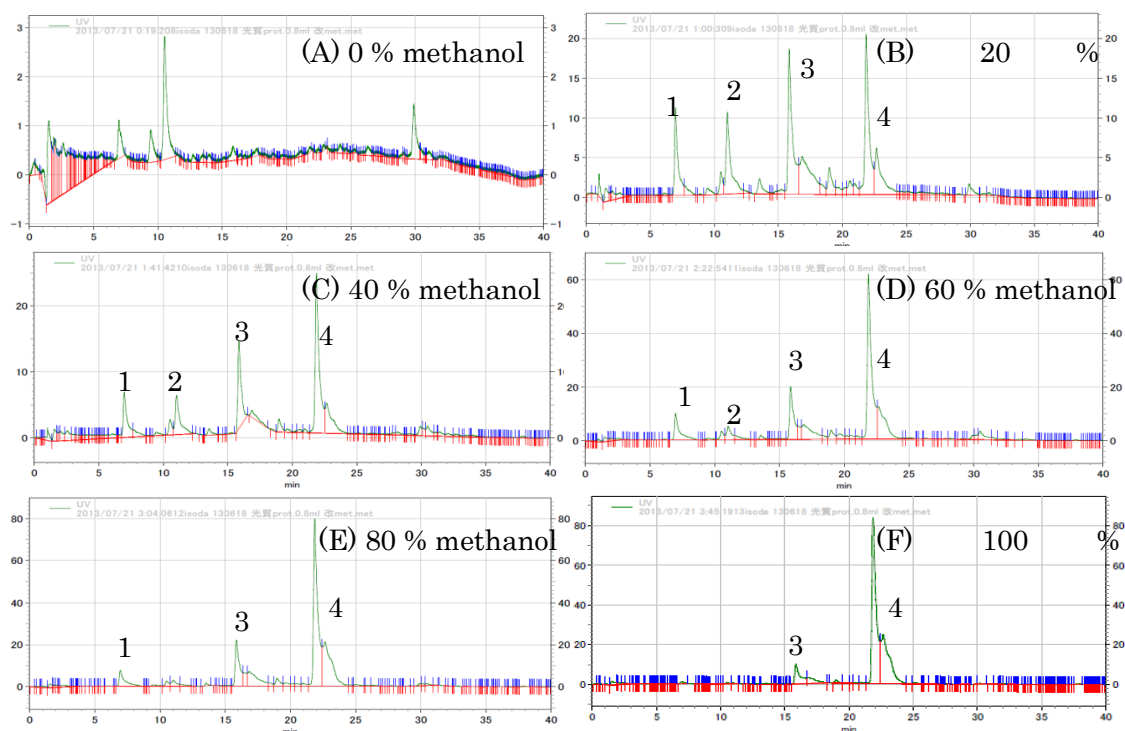


図 30. メタノール濃度の違いによるバジル葉抽出物の HPLC クロマトグラム。ピーク 1 : カフタル酸(caftaric acid)、ピーク 2 : カフェ酸(caffeic acid)、ピーク 3 : チコリ酸(chicoric acid)、ピーク 4 : ロスマリン酸(rosmarinic acid)を表す。(A) 0 %メタノール葉抽出物のクロマトグラム。(B) 20 %エタノール葉抽出物のクロマトグラム。(C) 40 %メタノール葉抽出物のクロマトグラム。(D) 60 %エタノール葉抽出物のクロマトグラム。(E) 80 %メタノール葉抽出物のクロマトグラム。(F) 100 %エタノール葉抽出物のクロマトグラム。

表 9. 今回の結果のまとめ

高温で	生育	活性酸素濃度	総抗酸化物質量 (0-21d)	cAPX HSP70 発現量	AsA 酸化率 (0-5d)
バジル	可能	23℃同程度	変化なし	2h,3d で増加	1,3d で 高まる
シソ	枯死	上昇	増加	—	1,3,5d で 高まる
セージ	枯死	やや上昇	増加	—	1,3,5d で 高まる