

## 中課題「環境ストレス制御による機能性食材創生を目指した生命活動センシング技術開発研究」

### 小課題「環境ストレス制御による機能性食材開発のための分光計測・画像化及び局所計測技術」

#### 研究の背景とねらい

##### i マルチバンド ESR 計測を中心とした生体内活性分子種計測法の確立と実用化研究

電子スピン共鳴 (ESR) 法は、病気やストレスの原因である活性酸素種の検出に有用であり、医学・薬学分野の研究に不可欠な測定法である。しかし、できるだけ少量のサンプルで高感度に検出したい、又は検出した生物ラジカルの種類や存在状態についてより多くの情報を得たいという要望が常にあり、新しい ESR 法の開発が望まれている。ESR 装置の性能は、原理的には使用する電磁波周波数と磁場強度で決まり、高周波・高磁場化した方が、高感度・高分解能が期待できる。そこで、本研究課題では、ESR の高感度・高分解能化を目指し、高周波・高磁場 ESR として Wバンドでの ESR 装置の開発を行う。

ここで Wバンド ESR の電磁波周波数及び磁場強度はそれぞれ 94 GHz 及び 3300 mT であり、共に通常の ESR で使われる Xバンドでの値の 10 倍である。Wバンドは、他の高周波電磁波と比べ、水の吸収による損失が少ないという特長があり、水分を含む生体試料の測定に適している。この理由から開発対象として Wバンド ESR を選んだ。さらに本研究課題では、Wバンド ESR 装置及び計測法の開発に加え、Wバンド ESR 測定にこれまで実用化されている Lバンド、Xバンド ESR 測定を組み合わせた新しい計測法 マルチバンド ESR 計測法 の開発も目指す。

##### ii 植物のストレス耐性能を評価するための *in vivo* ESR 計測法の実用化研究

本研究の主軸となる *in vivo* ESR 計測法は、生体試料を生きたまま (*in vivo*) の状態で、体内の酸化還元状態の観測ができる唯一の手法である。我々は、局部検出用の表面コイル型共振器 (surface-coil type resonator; SCR) を備えた生体計測用 700 MHz-ESR 装置を用いて、植物・動物に与えたスピンプローブ剤の ESR 信号を検出し、ストレスや抗酸化成分に対する酸化還元系での応答を捉えることに成功した。本研究では、植物のストレス耐性能を評価する計測系、および、食品の機能性成分の評価法を提供することによって、環境ストレスに強い作物や、機能性食材の栽培・育種を支援することを目的とする。特に、農学・工学を融合させた“植物計測用の SCR による *in vivo* ESR 計測法の実用化”をねらい、“植物の *in vivo* ESR 計測によって、如何に有効な情報を取得できるか”という視点から試験的な研究を繰り返す。まず、県立園芸試験場と連携し、栽培・育種の立場から計測データの有効性を検証する。酸化的損傷の度合いを判断する

指標を確定し、ストレス耐性能の評価、および、障害発生機構の把握に役立つ計測法を確立する。山形大学工学部で開発された可搬型 ESR 装置を圃地内の温室に設置し、栽培現場での計測試験を実施する。以上の結果を統合して、*in vivo* ESR 計測法の実用化へ展開する。

iii 植物の発芽、生長、ストレス耐性及び機能性成分等に与える活性分子種の影響の解明とその評価技術の確立

これまでの研究から、過酸化水素が植物の発芽や生長の促進、抗酸化成分の増大等に影響を与えることが明らかとなってきた。また最近の研究では、活性酸素消去酵素(SOD やカタラーゼ、ペルオキシダーゼなど) 遺伝子を導入したトランスジェニック植物が種々のストレス(塩、強光、低温など) に対して耐性を有することが報告されている。また、これらの上流に位置する転写調節因子遺伝子の発現増強によってもストレス耐性が誘導されることが明らかにされた。そこで、活性酸素消去酵素遺伝子の発現を誘導すると考えられる活性分子種として過酸化水素を選択し、その稲などの発芽や生長、酵素誘導に対する影響を明らかにし、その評価法を確立する

共同研究の体制と役割分担

i マルチバンド ESR 計測を中心とした生体内活性分子種計測法の確立と実用化研究

鈴木洋介(共同研究員、キーコム株式会社): Wバンド ESR 装置の事業化において、試作機を製作する。試作機の評価、問題点の洗い出しの後、指摘された点の改良を行う。

ii 植物のストレス耐性能を評価するための *in vivo* ESR 計測法の実用化研究

担当研究員 : 多田美香((財)山形県企業振興公社) 研究全般

内部研究分担者 : 白石卓夫((財)山形県企業振興公社) 研究指導; 尾形健明(山形大学工学部) 研究指導、および、可搬型 ESR 装置の開発

グループ代表者 : 大矢博昭((財)山形県企業振興公社、生物ラジカル研) 研究の統括

関連機関: 山形県園芸試験場(試供植物の提供、および、計測データの検証)

iii 植物の発芽、生長、ストレス耐性及び機能性成分等に与える活性分子種の影響の解明とその評価技術の確立

植物の成長に及ぼす過酸化水素の影響評価: 上野智子、野田博行

機能性評価技術の開発: 野田博行、伊東治、青山正明

共同研究の統括: 大矢博昭

## 研究の経過

### i マルチバンド ESR 計測を中心とした生体内活性分子種計測法の確立と実用化研究

Wバンド ESR 装置の感度向上のため以下のような改良を行った。

(1)より高性能なミリ波発振器の導入。ミリ波発振器のノイズは直接検出時のノイズに反映するため、これの低減がまず重要である。そこで、発振周波数安定性が良く、FM ノイズの少ないキャピティ-安定化型発振器を、Wバンドミリ波源として導入した。

(2)ミキサーによる位相検波法の導入。本研究以前の生物ラジカル研究所の装置では、試料から戻ってきたミリ波を単に直接検波していた。しかし検波法としては、少し装置が複雑になるが、発振源のミリ波を参照とした位相検波の方が高感度である。そこで、ミキサーを用いた位相検波法の導入を行った。

(3)その他、位相調整器、試料台等の改良も行った。

以上の改良の後、スピンプローブ溶液、植物葉片、種、玄米等を測定試料として、Xバンド ESR との性能差の評価を行った。さらに、Wバンド ESR の長所の一つである高感度性（少量の試料で測定できる）を生かした新しい測定法の開発を目指し、有用微生物研究グループの協力を得て大腸菌などの微生物試料の測定を試みた。また、スピンプローブのマルチバンド ESR 測定を行い、プローブ分子の大きさや溶液の粘性の効果を評価した。

### ii 植物のストレス耐性能を評価するための *in vivo* ESR 計測法の実用化研究（フェーズ 段階）

動植物の非破壊計測系を構築するために、数種類の SCR を試作し、計測対象に合わせて最適化した。また、SCR の特性・性能についての基礎データを蓄積した。

動物（ラット）の *in vivo* ESR 計測において、機能性成分を投与したラット体内（臓器・組織）の還元機能を評価することに成功した。この成果をベースに、植物のストレス応答計測に適用した計測法を提案し（特許出願）。

#### （フェーズ 段階）

植物を対象とした計測技術開発に絞って研究を進めた。まず、植物の *in vivo* ESR 計測に適したスピンプローブ剤の導入方法、および、スピンプローブ剤を探索し、*in vivo* 計測に必要な諸技術を洗練した。この技術を応用し、モデル植物のタバコを鉢植えのまま計測し、冷却によるタバコ葉中の酸化力の増加を観測した。本計測法は無傷の植物個体における冷却に対する応答の非破壊的観測を実現させ、生育条件に近い状態での植物の酸化的障害発生を捉える手法としての可能性が見出された（学術論文発表：1件）。

平成 12 年度後半より、本計測法によるオウトウ花芽の低温障害発生機構の解明を開始した（園芸試験場）。まず、低温感受性の高い開花時期の甘果オウトウ花芽を、圃場で凍冷障害が発生する温度条件で処理した後、花芽の酸化還元状態を計測した。その結果、凍結による花芽の酸化的障害の発生が非破壊的に確認された。さらに、連続的な温度ストレスに対する応答を観測するために、700 MHz-ESR 装置用の温度制御（冷却）ユニットを試作した。平成 14 年度では、冷却ユニットを活用し、試料測定空間（24×40 mm）温度を約 1hr で室温から -5℃ まで降下させ、その温度変化に伴うオウトウ花芽の酸化還元状態の変動を、花芽の温度を記録しながらリアルタイムで観察した。その結果、凍結したオウトウ花芽は、花芽内部の酸化力を融解過程で急激に増加させることが見出された。

加えて、凍結によって花芽プローブ剤の ESR 信号の線型がブロードになり、線型の変化から花芽内部の凍結を捉えられる可能性が示された。

平成 14 年度より、*in vivo* ESR 計測法の実用化を目指し、本計測法による分子育種の現場での植物の耐性能評価の準備に取り掛かった。まず、可搬型 ESR 装置（山工大）の植物への適用を確認するために、基礎的なデータを集積した。次に、園芸試験場実験温室に可搬型 ESR 装置を設置し、形質転換体である耐凍性付与タバコ葉における酸化還元状態の計測を開始した（園芸試験場）。

さらに、障害発生機構を把握するために、本計測法で得られた知見と、既知生理機能との関係を検討した。植氷処理を与えた後、2 hr で -1℃ から -5℃ まで冷却したタバコ葉では、電解質漏出度が 40% 以上の葉片において、酸化力の増加が確認された。従って、凍結によるタバコ葉の酸化力の増加は、細胞組織の損傷によって引き起こされたことが示された。また、耐凍性付与葉の酸化力の増加量は、コントロールと比較し有意に低下した。本計測法による耐凍性評価の計測データは、既知の情報と対応してした。

### iii 植物の発芽、生長、ストレス耐性及び機能性成分等に与える活性分子種の影響の解明とその評価技術の確立

活性酸素消去酵素遺伝子の発現を誘導すると考えられる活性分子種として過酸化水素を選択し、その植物の発芽や発根等に与える影響を調べ、過酸化水素がレタスや稲、ほうれん草の発芽や発根を促進することを見出した。種々の濃度で玄米やレタスの発芽を行い、最適な過酸化水素処理濃度を明らかにした。また、発根力が弱く、苗立ちに問題があり低収量になってしまう稲直播栽培に対する応用を念頭に、籾の発芽、発根に対する影響を調べた。その結果、籾の過酸化水素処理は発根を促進することを明らかにした。

蛍光画像法や化学発光画像法を用い、活性分子種（活性酸素種など）の挙動を解析する手法を確立した。これらの手法を用いて過酸化水素処理により発芽した玄米中のペルオキシダーゼ（POD）分布の画像化を試みた。その結果、化学発光画像法やルミノール重合染色により POD 分布の画像化が可能となった。そして、POD は発芽した玄米の胚芽や芽の部分に多く存在することがわかった。

## 成果とその意義

### (フェーズ )

- i 微弱発光計測装置において、オウトウ雌ずい柱頭、ウィルス感染葉の発光強度分布を細胞レベルで観測できること、発光レポーター遺伝子導入細胞を計測できることを明らかにした。
- ii Wバンド ESR 装置系は、これまで困難であった含水試料の測定を、簡便化する技術・測定法を開発した。
- iii 表面コイル型共振器を用いた局所 ESR 装置計測法によって、植物試料のストレス応答の非破壊計測に成功した。また、この計測法を支援する 2 つのスピンブローブ剤とスピンブローブ剤を評価するための測定セルを開発した。
- iv 自作の CCD 検出型蛍光画像計測装置を用い、蛍光プローブのジヒドロローダミンの酸化に及ぼす活性酸素種の影響を調べ、その評価技術を確立した。

### (フェーズ )

#### (マルチバンド ESR 計測を中心とした生体内活性分子種計測法の確立と実用化研究)

- i Wバンド ESR の開発においてキャピティ安定化型ミリ波発振器及びミキサの導入により、これまで不可能であった水溶液試料や含水性の生体試料の測定が可能になった。通常感度評価に使われる TEMPOL 水溶液試料については最低検出スピンの数として  $2 \times 10^{11}$  spins/gauss (@1 Hz) を達成した。これは、現在実用化されている高感度 Xバンド ESR 装置の値と並ぶ値である。さらに、特に  $Mn^{2+}$  イオンの検出については Xバンド ESR を凌駕することが分かった。例えば、生体 (例えば玄米胚芽) 中の  $Mn^{2+}$  イオン検出については Xバンド ESR の 10 倍以上の感度を実現している。
- ii Wバンド ESR の特長である高分解能性を生かし、異なった存在状態にあるスピンブローブを分離して観測できることを示した。これを利用し、生体に投与したスピンブローブの分布を調べるとか、水相中と脂質中の抗酸化能を別々に測定する、などの応用が考えられる。
- iii Wバンド ESR 信号の詳しい解析により溶液の粘度を測定できることを示し、解析方法の確立を行った。生体の状態と体液の粘度の間に関係があることが期待されるので、これを利用した新しい生体状態計測法が応用として考えられる。
- iv このような成果を受け、新しい計測法の確立を目指し、微生物や細胞の代表として大腸菌の測定を試みた。主に Xバンド ESR を用いた実験条件探索やスピンブローブ吸収・代謝について基礎的研究を行い、同機構について重要な知見を得ることが出来た。その一つの例として、「ガラクトシドパーミアーゼ活性測定法」を考案し、特許化した。これは、ESR を用いて遺伝子発現を検出した初めての例となっており、今後この分野の基礎となる成果である。
- v キーコム株式会社と共同で Wバンド ESR 装置の製品化を進めた。平成 14 年度

には、科学技術振興事業団の研究成果最適移転事業 成果育成プログラムB（独創モデル化）に採択され、製品化に向けた試作品が完成した。現在、製品としてほぼ完成し、キーコム株式会社で受注活動を始めた。

（植物のストレス耐性能を評価するための *in vivo* ESR 計測法の実用化研究）

- vi SCR を動物用に最適化した *in vivo* ESR 計測法によって、ラットの組織・臓器による還元機能の差異を確定した。計測データを反応速度論的な解析を行い、ラット肝臓内での食品に含まれる機能性成分の還元機能促進作用を見出した（学術論文発表：3件）。従来、生体内での機能性成分の作用や効能を調べる方法として、生きた動物を試験できるものは確立されていなかった。本計測法を適用すれば、臓器内での機能性成分の影響をリアルタイムで観測することができる。従って、機能性成分の作用機序、および、臓器特異性の効能の把握に役立つ計測法といえる。
- vii スピンプローブ剤、および、SCR の基本特性を解析し、植物用の計測プロトコールを作成した（特許出願）。それに従い、鉢植えのタバコを用いた無傷の植物個体における低温ストレス応答計測法の確立し、冷却による葉中の酸化力の増加を非破壊的に捉えた（学術論文発表：1件）。植物は、環境ストレスにより、活性酸素を産生する機能を持っている。活性酸素の発生に関与する酸化還元系の状態を観測することは、ストレス耐性機能の評価に役立つことが考えられる。また、最近、環境汚染問題との関連から、環境中に存在するフリーラジカルが及ぼす生体への影響が注目されており、これらの影響の調査が急務である。複雑な環境情報を反映した条件を実験で再現することは非常に困難であるため、実際に植物が生育している場において、環境汚染物質と植物の生理機能との関係を調べる必要がある。植物個体の非破壊計測法を活用することにより、環境汚染問題の解決に貢献できるような生育環境でのストレス応答計測の実現が期待される。700 MHz-ESR 装置用の温度可変ユニット（冷却ユニット）を試作した。
- viii この冷却ユニットを適用し、甘果オウトウ花芽の晩霜害のモデル環境を設定できた。温度変化に伴う花芽中のスピンプローブ剤の ESR 信号を連続的に観測することによって、ESR 信号強度（面積）から内部の酸化還元状態を観察し、同時に、ESR 信号線型から凍結状態を観察することが可能になった。甘果オウトウ花芽の酸化的障害発生には、花芽の凍結・融解による酸化力の増加が関与していることがリアルタイムで示された。オウトウ花芽の酸化的障害は、花芽の凍結・融解過程に発生することが明確になった。晩霜害は、オウトウの生産性を左右する大きな要因であるため、これまで多くの研究報告がなされてきた。しかしながら、そのほとんどは、解体した花芽を肉眼で形態観察することによって得られた知見であり、非破壊的な観測によって障害発生機構が把握されたのは、本研究が初である。従って、

*in vivo* ESR 計測法の農作物の栽培・育種を支援する計測法としての有効性が示された。

可搬型 ESR 装置（山大工）を栽培現場に搬入して行った計測試験によって、タバコ葉の損傷度合いを把握できた。タバコに耐凍性を付与することによって、凍結による葉中の酸化力の増加を有意に抑制することが見出された。ストレス耐性能を強化した植物の育種の現場では、肉眼での形態観察によって耐性獲得の有無を判定していたため、ストレス負荷後に判定基準となる形態の変化が明瞭に現れるまでの生育期間が必要であった。即ち、このような育種の多大な労力と時間を要していた。さらに、形態観察の情報から損傷度合いを数値化すること困難であるため、明確な判定基準が設定できなかった。

一方、*in vivo* ESR 計測法による耐性評価法は、形態に依存せずに、かつ、計測データから耐性の強弱を解析することができる。従って、本計測法を育種の現場で活用することによって、効率の良いストレス耐性能の評価、および、的確な植物への耐性付与が想定される。特に、低温ストレスに対する応答特性の実施データが蓄積されており、冷害・凍害に強い栽培品種の作出に繋がること期待される。

（植物の発芽、生長、ストレス耐性及び機能性成分等に与える活性分子種の影響の解明とその評価技術の確立）

x 玄米及びレタスを用い、その発芽や発根に対する過酸化水素の影響を調べた。その結果、玄米の場合、0.1~10mM の過酸化水素供与は玄米の発芽を促進した。また、レタスの場合、0.01~1mM の過酸化水素供与は発根を促進した。以上の結果をもとに、玄米の発根や生長に及ぼす過酸化水素の影響を調べた。過酸化水素の濃度は発芽を促進し、かつ、殺菌効果が期待できる 10mM とした。玄米の発芽時における過酸化水素の供与は発芽のみならず発根や生長、葉緑体の合成をも促進した。この原因として、発芽促進には過酸化水素が酸素供給源として作用していることや植物ホルモン（ジベレリンなど）の誘導などに関与していることが推定された。根の伸長については、過酸化水素の供与が発芽開始時のみであることから、植物ホルモン（オーキシンやジベレリン、サイトカイニンなど）の誘導に関与しているものと考えられる。葉緑体の合成促進については明確ではないがサイトカイニンの誘導や馬鹿苗菌の殺菌による効果などが考えられる。その後、過酸化水素共存下で発芽させたのち生育させた稲の苗を水耕栽培装置に移植し、結実まで生育させた。その結果、順調に生育して開花、受粉が起こり、登熟したのち籾を収穫した。

次に、稲直播栽培への適用を念頭に、籾の発芽、発根に及ぼす過酸化水素の影響を調べた。過酸化水素の濃度は玄米の場合と同様に 10mM とした。籾の場合も玄米と同様に発芽、発根及び生長を促進した。以上の結果から、籾の直播栽培への適用が可能と考えられた。本手法の利点として、発芽率の向上、発根の促進による苗立ち改善・倒伏の防止、減農薬、収量増大などが挙げられる。

xi 蛍光画像法及び化学発光画像法を用いた植物における活性分子種の挙動解析を試みた。セロリの自家蛍光画像により、褐変に対する活性酸素の関与が明らかとなった。また、蛍光試薬を用いた蛍光画像によりレンコンの切断により活性酸素が発生する様子が観察できた。次に、蛍光法より高感度な化学発光画像法を用い、発芽した玄米のペルオキシダーゼ分布画像を計測した。過酸化水素 - ペルオキシダーゼ系で触媒されるルミノール発光を用いた玄米のペルオキシダーゼ分布画像から、過酸化水素非共存下で発芽した玄米では種子全体が、過酸化水素共存下で発芽した玄米では胚芽部と芽の部分が発光することがわかった。この試料を一日放置すると、ルミノールがペルオキシダーゼの作用で重合して着色する現象を見出し、これを利用して、芽のどの部分が最も着色するか調べた。その結果、全体的な着色は、過酸化水素供与群の方が強かった。中でも、胚芽や芽の頂点部の着色が著しいことがわかった。これは、成長点にペルオキシダーゼが多く発現していることや細胞壁が未熟なためと考えられる。さらにルミノール化学発光法は、米の高感度鮮度評価にも応用できることを見出した。米のペルオキシダーゼ活性は、鮮度の低下とともに低下し、新米と古米では約50倍の強度差があることがわかった。

#### 今後の研究展開

##### i マルチバンド ESR 計測を中心とした生体内活性分子種計測法の確立と実用化研究

Wバンド ESR 装置の感度向上については満足すべき成果を得たが、理論的にはもっと高い感度が実現可能なはずである。そこで、もう一段の感度向上を行い、カタログ値として通常用いられる TEMPOL 水溶液試料で評価した感度について従来の Xバンド ESR の値を上回るようにする。応用面では、ここ数年基礎的研究を行ってきた微生物、さらには細胞の抗酸化能測定や遺伝子発現測定について、Wバンド ESR を用いた応用研究を進める。また、試料の極低温測定を行い、Fe(II)又は Mn(III)イオン検出を通じた生体評価法等を確立する。Fe(II)、Mn(III)イオンは生体中に多量に存在するが、これまでの Xバンド ESR では観測できなかった。しかし、高周波高磁場 ESR を用いれば、これらが観測できることが期待される。このような Wバンド ESR でしかできない又は Wバンド ESR が圧倒的な優位性を示す計測法の開発を進め、Wバンド ESR の有用性をアピールする。

ii 植物のストレス耐性能を評価するための *in vivo* ESR 計測法の実用化研究  
本事業での研究成果は、山形大学工学部、および、生物ラジカル研究所に引継ぎ、ラジカルが関わる生体機能計測の応用研究に活用させていく方針である。開発した計測技術の農業関連分野での利用については、今後も園芸試験場と連携して進めていく。具体的な事業化の計画はないが、本計測法は植物のストレス耐性能の評価法として有



効であり、計測実施例が蓄積されれば、栽培・育種の分野への貢献は大きいと想定される。本研究事業の成果を元に、可搬型 ESR 装置の用途を実証・拡大することによって、農学・医学・薬学などの研究分野における事業化の展観を検討中である。

iii 植物の発芽、生長、ストレス耐性及び機能性成分等に与える活性分子種の影響の解明とその評価技術の確立

今後、過酸化水素処理した籾の発芽促進効果や過酸化水素の殺菌効果を利用して、稲の減農薬直播栽培への応用を検討している。また、活性分子種の内、過酸化水素は生体において情報伝達物質として作用している可能性が高いので、その作用機構の解明とともに過酸化水素を制御した植物育種へ展開したいと考えている。

評価技術に関しては、自家蛍光画像法やルミノール化学発光法が米の鮮度評価装置としての事業化を目指している。また、化学発光画像法については培養細胞を用いた生体機能評価等に展開したいと考えている。

【成果を表す具体的な図表】

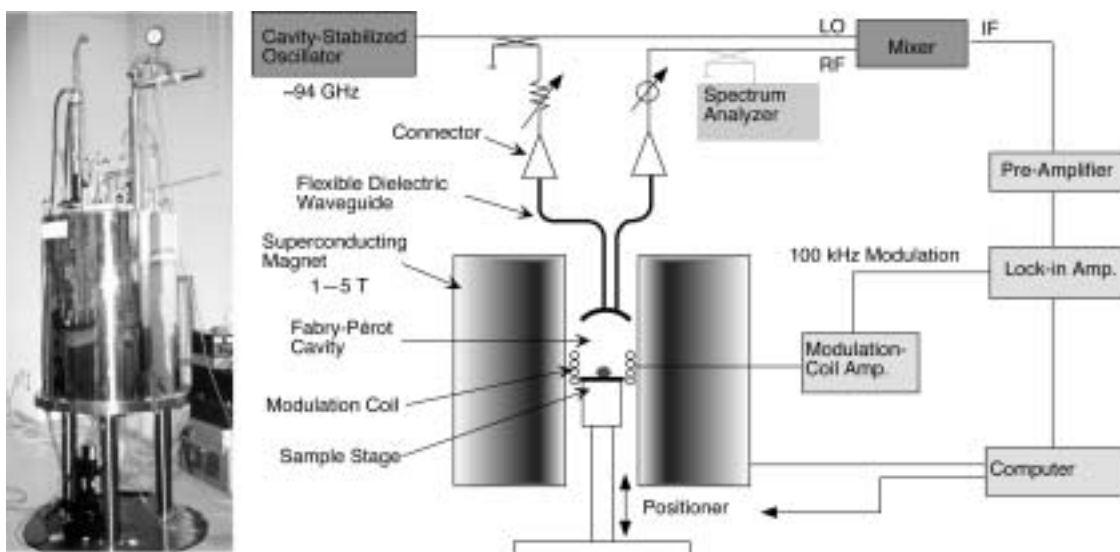


図1 山形県地域結集型共同研究事業で開発されたWバンドESR装置の外観(左)とブロック図(右)

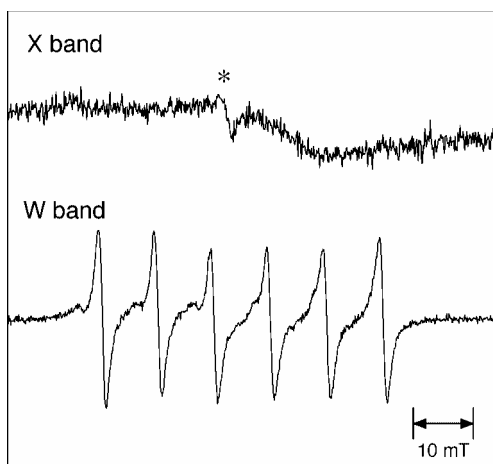


図2 Mn(EDTA)水溶液のXバンド及びWバンドESR信号(共に10 nmol)。XバンドESR中の\*印は不純物による信号である。

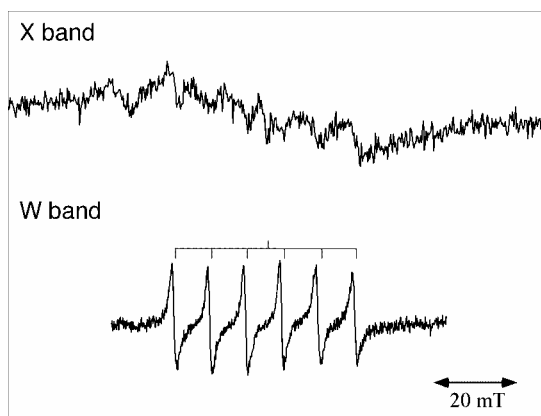


図3 玄米胚芽部中のMn<sup>2+</sup>のXバンド及びWバンドESR信号(共に玄米一粒からとった胚芽)

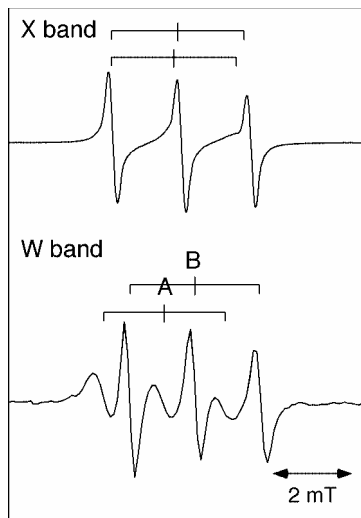


図4 かいわれ大根葉片中のスピンプローブ(TEMPO)のXバンド及びWバンドESR信号。Aは、細胞膜等の脂質中のスピンプローブ、Bは細胞液等の水相中のスピンプローブの信号である。XバンドESRでは分離していない。

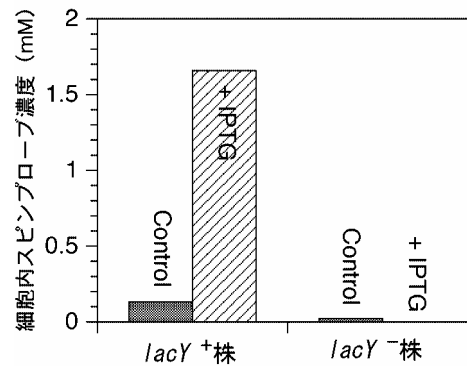
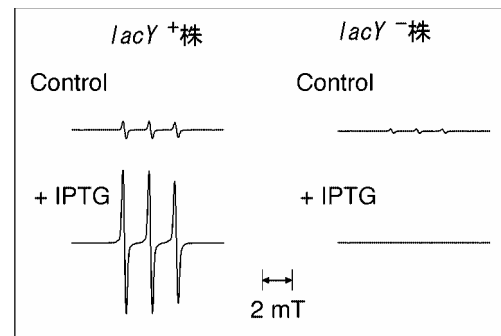


図5 ガラクトシドパーミラーゼ(LacY)活性測定の様子。上は生データ(XバンドESR)。下は、それを細胞内スピンプローブ濃度に換算したもの。*lacY*<sup>+</sup>株ではIPTG刺激により、LacY遺伝子が発現する。

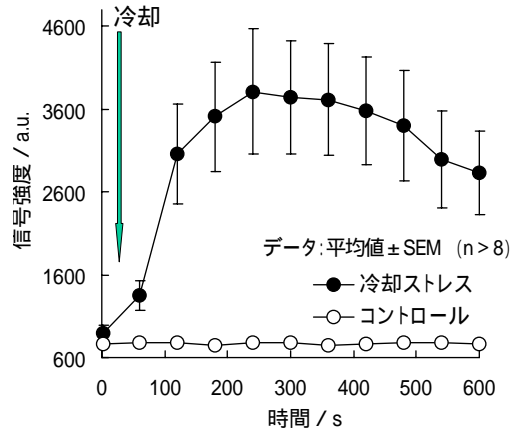
表1. *In vivo* ESR 法による植物のストレスに対する応答計測が可能なスピンプローブ剤の導入方法

導入方法	計測対象		スピンプローブ剤	
	種類	大きさ (cm)	種類	与えた量 ( $\mu\text{mol}$ )
枝の切り口	オウトウ(花芽)	1 × 1	C-PROXYL, G-TEMPO, G-PROXYL, CAT-1, HTIO, C-PROXYL還元型	10
茎の切り口	タバコ(花芽)	0.8 × 2	C-PROXYL, G-TEMPO, G-PROXYL, CAT-1, C-PROXYL還元型	1.5 ~ 2
	タバコ(葉)	5 × 5	C-PROXYL, G-TEMPO, G-PROXYL, CAT-1, HTIO	0.4 ~ 5
	ホウレン草(葉)	5 × 10	C-PROXYL, G-TEMPO	5
	パンジー(葉)	4 × 4	C-PROXYL	2.5
	ペニバナ(苗)	2 × 6	G-TEMPO	1
	カイワレ大根(葉)	1 × 2	C-PROXYL, C-PROXYL還元型	0.3 ~ 1.5
葉の表面	タバコ(葉)	10 × 15	C-PROXYL	100
	エンドウ(葉)	2 × 2	C-PROXYL	2
茎の表面	ホウレン草(葉)	4 × 5	C-PROXYL	30
根	タバコ(苗)	全個体	C-PROXYL	200
	エンドウ(苗)	全個体	C-PROXYL	200

鉢植えのタバコを用いた実験  
 ~ 葉の表面からスピンプローブ剤(C-PROXYL)を導入 ~



- ・冷却ストレス後の酸化力の増大
- ・個体間の酸化力の差異 (酸化速度)
- ・実験後の植物は生育し続けている (6ヶ月間)

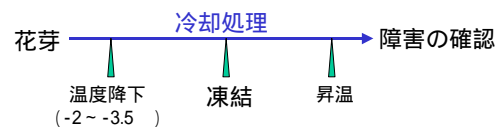


冷却ストレス後のC-PROXYL信号強度の推移

図1. 鉢植えのタバコ葉の冷却ストレス応答計測

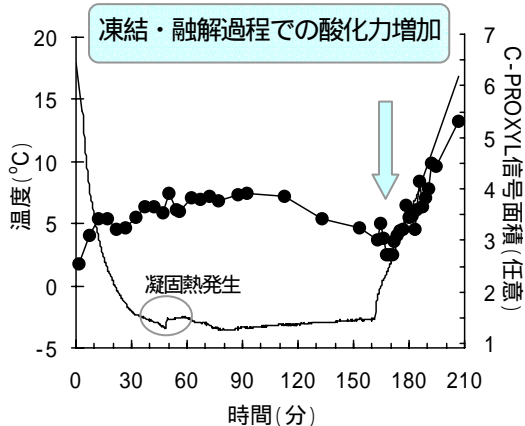
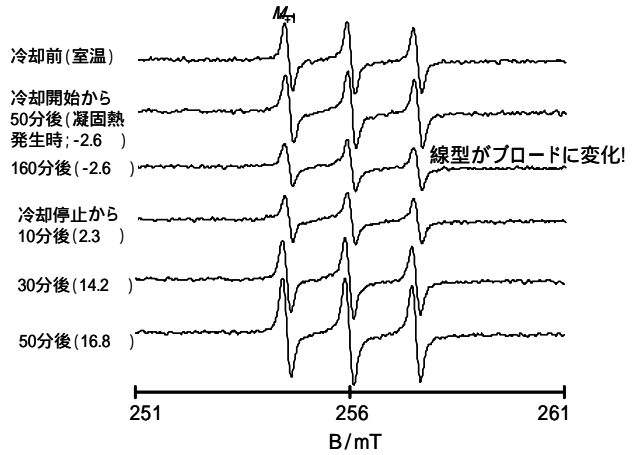
表2. ESR信号検出、雌ずいの褐変、および、花芽の凍結との関係

[2001年4月]	ESR信号検出	雌ずいの褐変	
冷却処理群(n=30)	33%	57%	
対照群(n=22)	4%	0%	
[2002年4月]	ESR信号検出	雌ずいの褐変	花芽の凍結
冷却処理群(n=47)	36%	87%	87%
対照群(n=12)	0%	0%	0%

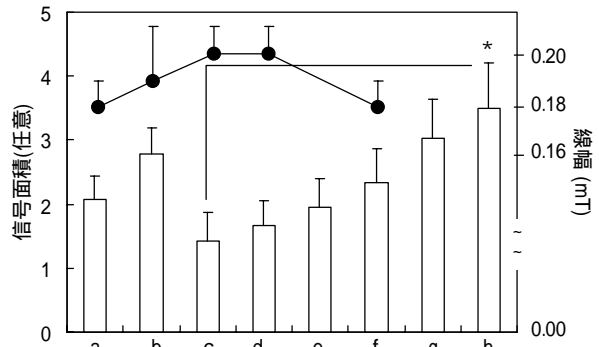


甘果オウトウ花芽において、*In vivo* スピンプローブESR法による非破壊計測により、晩霜害が発生する温度条件で花芽内部の酸化力の増大することが明らかになった。

甘果オウトウ花芽の  
晩霜害のモデル実験

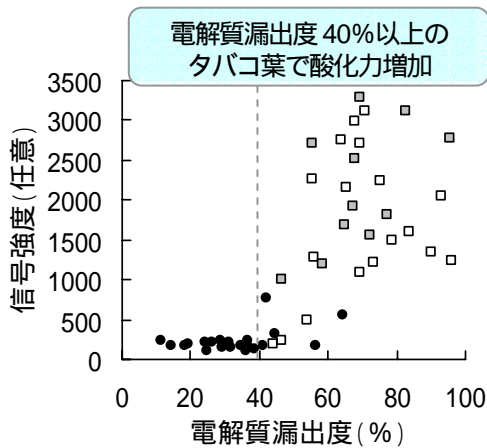


オウトウ花芽の温度と花芽で検出されたスピンプローブ剤(C-PROXYL)の信号面積の経時変化。○は花芽温度、●はC-PROXYL信号面積を示す。

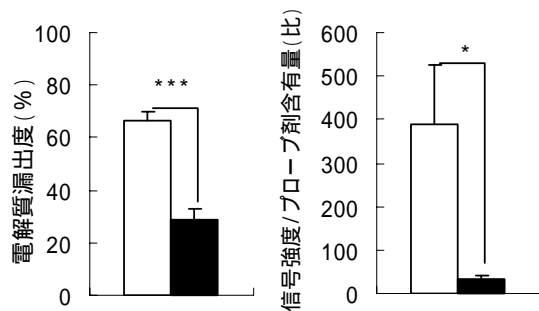


花芽で検出されたC-PROXYL信号(上図)と、凍結前後の信号面積・線幅の変化(下図)。棒グラフの値は、a;冷却前、b;凝固熱発生時(冷却60分以内)、c;冷却160分後、d・e・f・g;冷却停止から10・20・30・50分後、h;60-90分後のC-PROXYL信号面積(平均値±SEM, n=5-6)である。\* $p > 0.05$ , Student's t-test. 折れ線グラフは、それぞれのC-PROXYL信号から解析した線幅(平均値±SD, n=5-6)である。

図2. 甘果オウトウ花芽の凍結による障害発生機構の解明



- 耐凍性
- コントロール(カナマイシン耐性)
- WT



○:コントロール(n=9)、●:耐凍性付与(n=12)

データ:平均値±SEM, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$  Student's t-test  
 タバコ葉の凍結による酸化力の増加は、細胞組織の損傷によって引き起こされた。耐凍性付与によって、酸化的損傷を有意に抑制することが示された。

図3. 耐凍性付与タバコ葉の酸化的障害発生機構の把握、および、耐性評価  
 (携帯型ESR装置による園芸試験場実験温室での計測データ)

【成果を表す具体的な図表】



対照

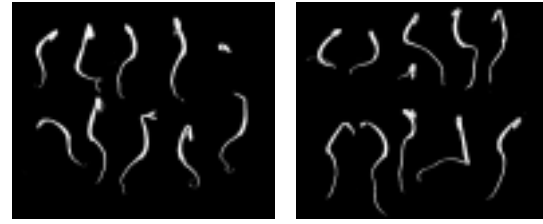
10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

温度:28 , 時間:30hr

0.1 ~ 10mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の共存は、玄米の発芽を促進

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がホルモン様作用orホルモンを誘導

図1 . 玄米の発芽に及ぼす H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の影響



対照

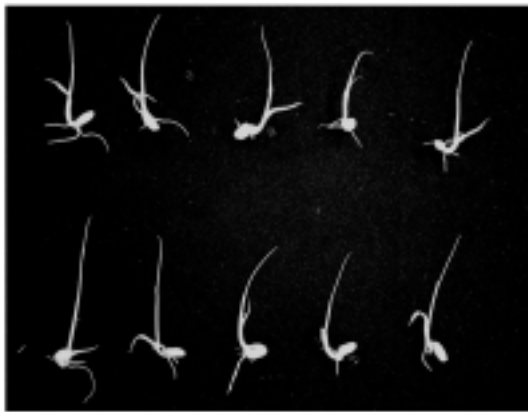
1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

温度:25 , 時間:66hr

0.01 ~ 1mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の共存はレタスの根の伸長を促進

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がホルモン様作用orホルモンを誘導

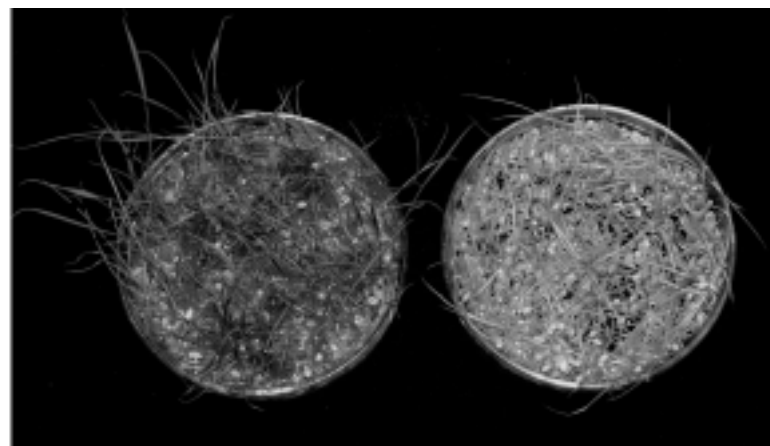
図2 . レタスの発根に及ぼす H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の影響



対照群

10mM 過酸化水素供与群

図3 . 稲の発根に及ぼす H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の影響



10mMH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 供与群

対照群

生育期間 : 22日

図4 . 稲の生長に及ぼす H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の影響

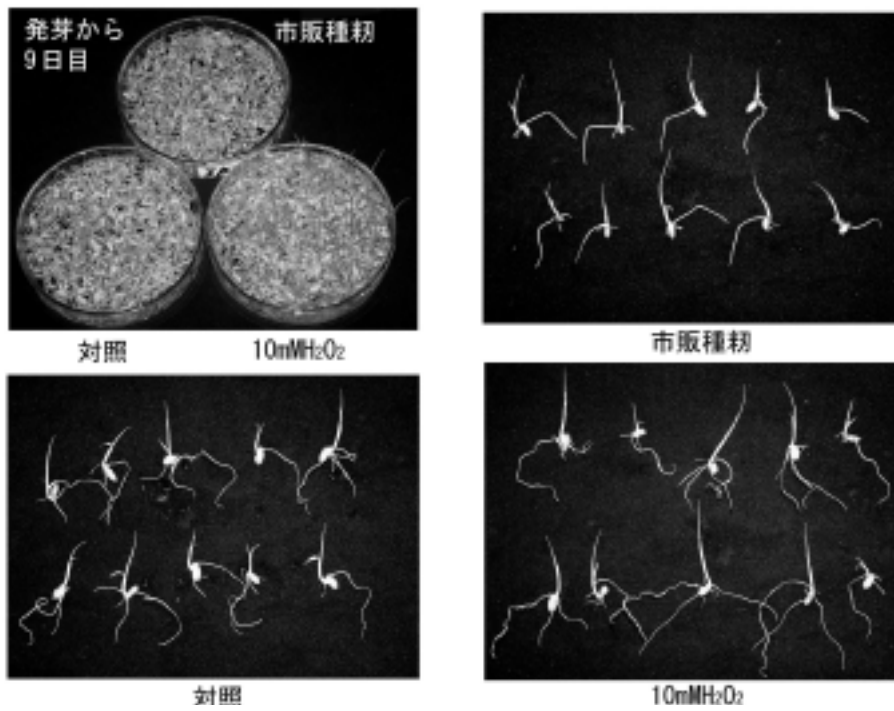


図5. 籾から発芽した稲の発根に及ぼす  $H_2O_2$  の影響

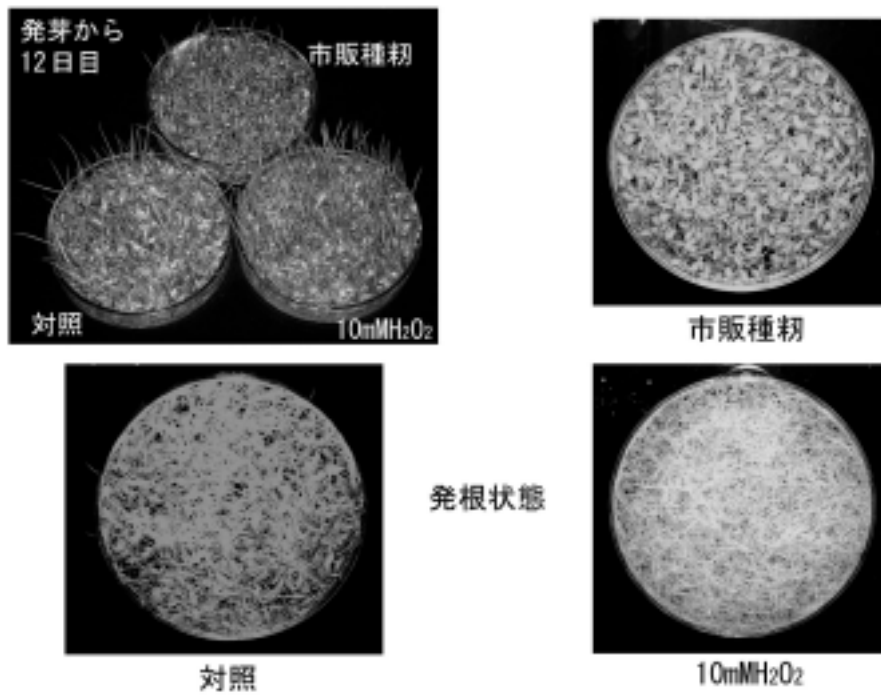


図6. 籾から発芽した稲の生長及び発根に及ぼす  $H_2O_2$  の影響