

コマツナ葉の老化に伴うフラボノイド含量および ペルオキシダーゼ活性の変化

森村 洋子 木之下 友海

Changes in contents of flavonoids and activity of peroxidase in leaves
of *Brassica campestris* L. cv. Komatsuna during senescence

Yoko MORIMURA · Tomomi KINOSHITA

Summary

During leaf senescence an increase in activity of peroxidase (EC 1.11.1.7) was observed using *Brassica campestris* L. cv. Komatsuna. Contents of flavonoids that are probably utilized as substrates of peroxidase decreased during leaf senescence of the plant. Activity of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) decreased rapidly. Leaf senescence is a natural process genetically regulated, in which peroxidase may have an important role in scavenging hydrogen peroxide to protect cell constituents against oxidative damage in leaves of *Brassica campestris* during senescence. Contents of protein scarcely decreased and contents of chlorophyll gradually decreased during leaf senescence of *Brassica campestris*.

緒 言

酸素はヒトや緑色植物を含む好気性生物にとって必要不可欠のものである。しかし、一方では酸素は、生体中の遺伝子や酵素あるいは細胞膜のような生体膜に対して強い酸化障害を与えるものでもあり、いわば、両刃の剣として存在している。近年、この酸素による障害が、自然環境破壊やヒトの老化、発がんなどと深く関わっていることが明らかになり、自然環境保全、公害防止、高齢化社会およびストレス社会における健康維持への希求とあわせて、このような酸化障害回避への社会的関心が高まっている。

酸化障害をひき起こす酸素は、通常、空気中に含まれる酸素とは異なり、反応性が高く、このような酸素は「活性酸素」と呼ばれ、区別されている。自然環境破壊やヒトの加齢、ストレスは活性酸素の生成を促し、このことが植物の生長阻害、病傷害、ヒトの老化促進、がんおよび多くの生活習慣病の引きがねとなることが知られている。

野菜・果実には一般にビタミンC、カロチノイド、ビタミンE、ポリフェノールなどの抗酸化性化合物が含まれ、これらの化合物が直接的あるいは間接的に野菜・果実の組織を酸化障害から守っていると

考えられている。これらの生体内物質のうち、ビタミンC、カロチノイド、ビタミンEについては活性酸素の分解・除去反応のメカニズムが比較的良好に知られている。しかしながら、ポリフェノールについては植物体に多種類の化合物として広く分布し、古くからその生理機能に関心もたれているにも拘らず、現在のところ、その反応機構の詳細は明らかにされていない。

著者らは、花卉の活性酸素分解・除去酵素の動向について調べる中で、これまでに花卉に含まれる色素成分であるポリフェノール化合物、フラボノイドの活性酸素分解・除去作用への関与の可能性について報告した(森村, 2001)。

本稿では、緑葉の老化に伴い、フラボノイド含量およびフラボノイドを基質とすると考えられるペルオキシダーゼの活性がどのように変化するかを、コマツナの異なる葉期の葉を用いて調べ、フラボノイドと葉の組織中に生成する活性酸素の分解反応との関係について考察した。

材料および方法

1. 実験材料

材料としてコマツナ (*Brassica campestris* L.

cv. Komatsuna) を用いた。コマツナ種子 (晩生コマツナ, タキイ種苗より導入) をパーライト単用播種床に点播し, 2日ごとに粉末ハイポネックス (N:P:K = 6.5:6.0:19.0) 1000倍希釈液による浸透灌水を行いながら, 人工気象器 (明条件 6500lux, 12時間, 25℃, 暗条件 12時間, 15℃, 光源として白色蛍光ランプ東芝 FL40SW, 10灯使用) 内で1週間栽培した。本葉第1葉が出始めた苗を, 次に水耕用フラスコ (黒色ビニル塗料塗布, 50ml容) に移し, 前記のハイポネックス 1000倍希釈液を用いて1週間栽培, その後, 100ml容水耕用フラスコに移し, さらに1週間栽培を行った。水耕液は3日ごとに交換した。

以上の方法により草丈約 13cm, 5葉期まで生育したコマツナ苗のうち, 生育状態のよいものを選び, 実験試料とした。

2. 酵素抽出

酵素の抽出には 1mM アスコルビン酸ナトリウム, 5%ソルビトール, 3mM メルカプトエタノール, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 2%PVPPを含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.8) を用いた。5葉期まで生育したコマツナ苗から, 生育順に第1葉, 第3葉, 第5葉を採取し, それぞれについて葉身部を集め, 試料とした。葉身は水洗し, 水分を拭き取った後, 乳鉢中で前述の緩衝液とともに摩砕した。得られたホモジネートを4層ガーゼで濾過し, 濾液を 20000×g で20分間遠心分離した後, 上清を集め, 粗酵素液とした。

3. フラボノイドの定量

フラボノイド含量は, 分光光度計 (日立 spectrophotometer 100-50) を用いて粗酵素液の 389nm における吸光度を測定し, 相対値として表した (Swain, 1976, Kubo et al., 1999)。

4. アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の測定

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の測定は, 50mM リン酸緩衝液 (pH6.0), 0.5mM アスコルビン酸ナトリウム, 0.1mM EDTA, 1mM H₂O₂ および粗酵素液を混合し, 全量を 2ml として行った。H₂O₂ を加え反応を開始した後, 5~15秒間の 290nm (2.8mM⁻¹·cm) における吸光度を測定し, 吸光度の変化から L-アスコルビン酸の減少速度を求めた。酵素活性は1分間に減少する L-アスコルビン酸の μmol 数として表した (Nakano et al., 1981)。

5. ペルオキシダーゼ活性の測定

粗酵素液の抽出は次のようにして行った。試料を 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で少量の石英砂と

ともに乳鉢を用いて摩砕し, 次に 11000×g, 10分間遠心分離し上清を集め, これを粗酵素液として用いた。ペルオキシダーゼ活性の測定は, Vetter らの方法 (Vetter et al., 1958) に基づき行った。クエン酸リン酸緩衝液 (pH6.5) 7.75ml, 1%o-フェニレンジアミン 0.5ml, 0.3% H₂O₂ 0.5ml, 粗酵素液 0.25ml を混合し, 30℃で5分間反応させ, o-フェニレンジアミンを酸化させた後, この反応液の 430nm における吸光度を測定し, 吸光度の増加から o-フェニレンジアミンの酸化速度を求め, 酵素活性とした。ペルオキシダーゼ活性は反応初期1分間の吸光度の増加量 0.01 を 1unit として unit により表した。

6. アスコルビン酸含量の測定

L-アスコルビン酸含量は, 還元型 (ascorbate), 酸化型 (dehydroascorbate) ともにヒドラジン法 (Roe et al., 1943) に基づき測定した。試料をメタリン酸溶液 (最終濃度 5%) 中で少量の海砂とともに磨砕し, 900×g, 10分間遠心分離した後, 上清を試料液とした。試料液中の L-アスコルビン酸をジクロロフェノールインドフェノールにより酸化し, 2, 4-ジニトロフェニールヒドラジンを加え 50℃, 90分間反応させた後, 生成したヒドラゾンについて 540nm における吸光度を測定し, L-アスコルビン酸含量を求めた。L-アスコルビン酸含量は試料 100g (生重量) あたりの mg 数として表した。

7. タンパク質含量の測定

タンパク質含量は粗酵素液を試料として Coomassie brilliant blue G-250 を用いた比色法 (Read and Northcote, 1981) により測定した。

8. クロロフィル含量の測定

クロロフィル含量は試料の 80%アセトン抽出液について, 663nm および 645nm における吸光度を測定することにより求め (Mackinney, 1941), 試料 1g (生重量) あたりの mg 数として表した。

結 果

1. 葉の老化とフラボノイド含量およびペルオキシダーゼ活性との関係

前述の方法により栽培したコマツナ苗から生育状態のよいものを5個体選び, それぞれの個体から生育の順序に従って, 第1葉 (老葉), 第3葉 (成熟葉), 第5葉 (幼葉) を採取し, 実験試料とした。葉期の異なるそれぞれの試料から前述の方法を用いて粗酵素液を抽出し, 得られた粗酵素液のフラボノイド含量を測定した。予め, 粗酵素液の吸収スペクトルを測定したところ, 389nm に顕著なピークが

見られたので、第1葉、第3葉、第5葉のそれぞれの試料について、この波長における吸光度を測定した。結果はFig. 1に示すとおりである。フラボノイド含量は第1葉では低く、葉期が進むにつれて順次増加し、第5葉では第1葉の約2倍の値を示した。

次にフラボノイドを基質として活性酸素を分解すると考えられるペルオキシダーゼの活性を第1葉、第3葉、第5葉のそれぞれの試料について測定した。結果はFig. 2に示すとおり、第1葉ではペルオキシダーゼ活性が最も高く、葉期が進むにつれて低下した。

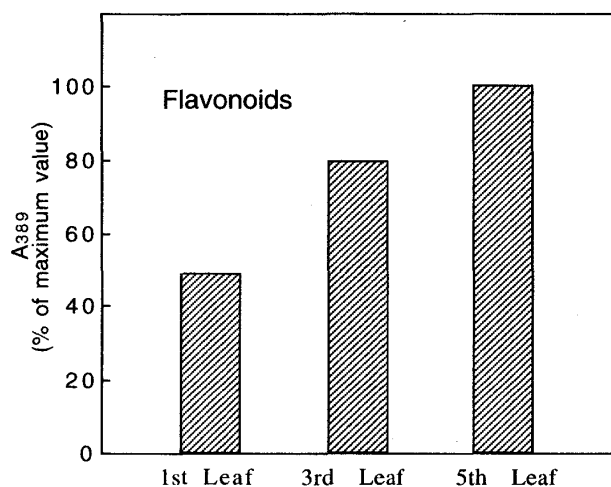


Fig. 1 Absorbances at 389 nm of crude extracts from *Brassica campestris* leaves harvested at different stages of senescence. 1st leaf represents senescent leaves and 3rd leaf, 5th leaf represent pre-senescent leaves, young green leaves, respectively. Relative value was calculated as percentage of the maximum absorbance (an absorbance of 2.65 at 389 nm in a 1-ml cuvette).

2. 葉の老化とアスコルビン酸含量およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性との関係

一般に高等植物では細胞内に生じる活性酸素をすばやく分解し、解毒するために葉緑体および細胞質にはアスコルビン酸を特異基質とするアスコルビン酸ペルオキシダーゼが存在することが知られている。また、緑葉中にはアスコルビン酸が比較的高濃度(数mM)で含まれ、そのおもな生理機能はアスコルビン酸ペルオキシダーゼの基質(電子供与体)として作用することであるとされている。

そこで、コマツナの第1葉、第3葉、第5葉につ

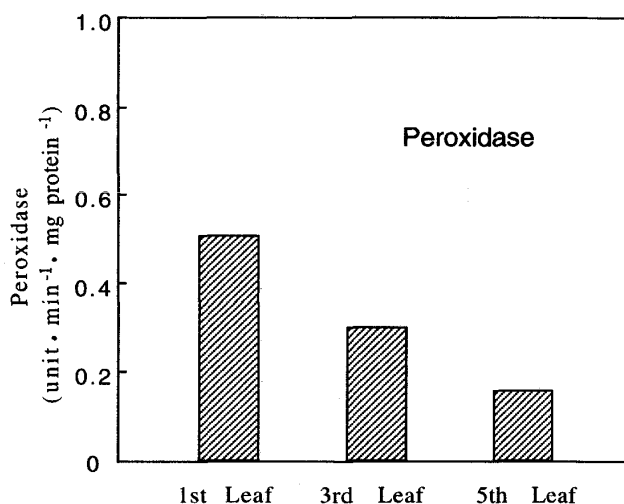


Fig. 2 Specific activities of peroxidase in *Brassica campestris* leaves harvested at different stages of senescence. 1st leaf represents senescent leaves and 3rd leaf, 5th leaf represent pre-senescent leaves, young green leaves, respectively.

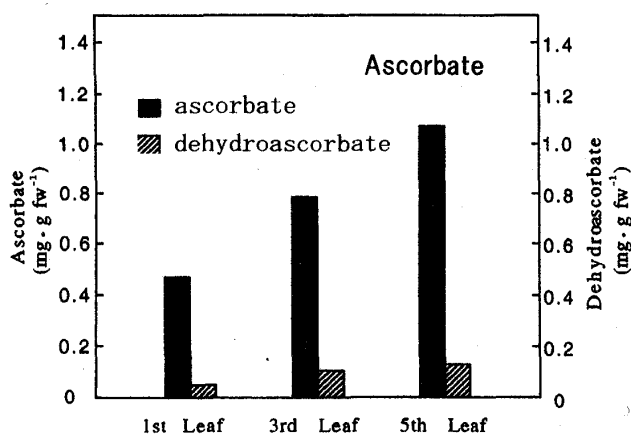


Fig. 3 Ascorbate and dehydroascorbate contents in *Brassica campestris* leaves harvested at different stages of senescence. 1st leaf represents senescent leaves and 3rd leaf, 5th leaf represent pre-senescent leaves, young green leaves, respectively.

いて、アスコルビン酸含量およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定し、結果をそれぞれFig. 3, Fig. 4に表した。図に示すとおり、アスコルビン酸含量、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性ともに葉期が進むに従って増大した。とくにアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、第5葉では第1葉

と比較してきわめて高く、およそ6倍の値を示した。

また、コマツナ葉では、デヒドロアスコルビン酸含量はアスコルビン酸含量と比較してきわめて低く（アスコルビン酸含量の10～13%）、葉期の進行に伴う増加量もわずかであった。

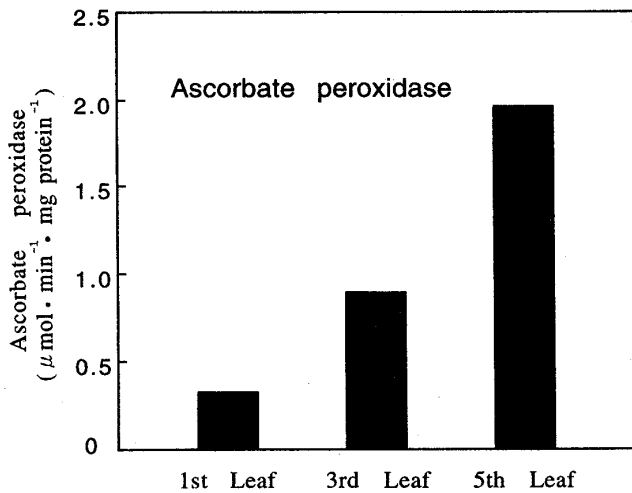


Fig. 4 Specific activities of ascorbate peroxidase in *Brassica campestris* leaves harvested at different stages of senescence. 1st leaf represents senescent leaves and 3rd leaf, 5th leaf represent pre-senescent leaves, young green leaves, respectively.

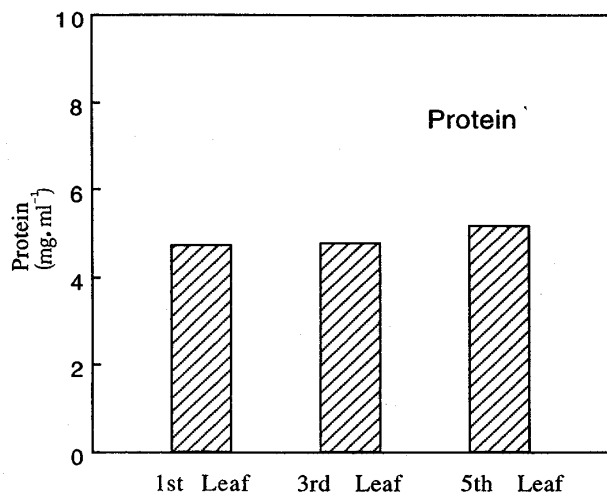


Fig. 5 Protein contents in *Brassica campestris* leaves harvested at different stages of senescence. 1st leaf represents senescent leaves and 3rd leaf, 5th leaf represent pre-senescent leaves, young green leaves, respectively.

3. 葉の老化とタンパク質含量およびクロロフィル含量との関係

従来、葉の老化の指標として用いられてきたタンパク質含量およびクロロフィル含量を第1葉、第3葉、第5葉について測定した。結果はFig. 5、およびFig. 6に示すとおりである。クロロフィル含量は第1葉では低く、葉期の進行に伴い、増加する傾向を示したが、タンパク質含量には大差が認められなかった。

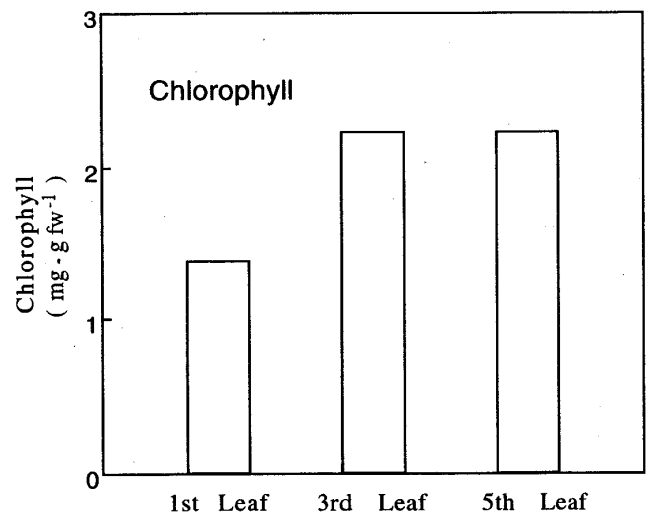


Fig. 6 Chlorophyll contents in *Brassica campestris* leaves harvested at different stages of senescence. 1st leaf represents senescent leaves and 3rd leaf, 5th leaf represent pre-senescent leaves, young green leaves, respectively.

考 察

著者らは園芸作物である野菜、花、果実の活性酸素による酸素ストレスとその防御機構について研究を行っている。

酸素ストレスとは「生体内の酸化と抗酸化のパランスが崩れ、酸化により生体が好ましくない状態におかれること」と定義されている。生命の歴史を辿ると、植物、動物を問わず、すべての生物はその発生のはじめから体内でさまざまな抗酸化物質を合成し、生命を維持してきた。生体内の抗酸化物質には多くの種類があることは古くから知られているが、それらの抗酸化物質がたがいどのように関わり合い、生体を酸化ストレスから守っているかということについては、現在まだほとんど知られていない。植物体にはビタミンC（L-アスコルビン酸）、カロチノイド、ビタミンE（ α -トコフェロール）、ポリフェノール類などの抗酸化性化合物が存在し、これ

らは必要に応じて植物体内で合成され、細胞が酸化によりダメージを受けることを防いでいる。これらの抗酸化性化合物は還元力を示すという共通の性質をもっているが、溶解性や細胞内局在性などその他の面では異なる点も多い。従って、それらが植物のライフサイクルにおいて相互にどのように関わり、抗酸化作用を表しているかを知ることは興味深い。

著者らはコマツナ、ダイコンの発芽過程において、最も若い幼根に強い抗酸化作用が現れ、この時アスコルビン酸を特異基質とするアスコルビン酸ペルオキシダーゼが活発に作用することを遺伝子レベルで明らかにした (Morimura et al., 1996, Ohya et al., 1997, Morimura et al., 1999)。また、パンジーの開花過程において、開花前の花蕾の段階でアスコルビン酸とアスコルビン酸ペルオキシダーゼによる抗酸化作用が盛んになり、開花後は急速にこの作用が弱まることを報告した (森村ら, 1998)。これらの過程ではいずれもポリフェノール類を基質とする、いわゆる非特異的ペルオキシダーゼの活性はきわめて低かった。

最近、ポリフェノールの一種であるフラボノイド (クエルセチン, ケンフェロール) がペルオキシダーゼ反応の基質として作用することが熱帯植物ヤドリフカノキの葉から抽出したフラボノイドを用いた *in vitro* の実験により報告され (Yamasaki et al., 1997)、また、シロイヌナズナの葉のフラボノイドが紫外線照射により誘導されることが明らかにされた (Solecka, 1997)。さらに、強光、低温、紫外線 (UV-B) などの酸化ストレスが、シロイヌナズナ葉のフラボノイドと思われるフェニールプロパノイド化合物の含量を増加させることが報告された (Kubo et al., 1999)。しかし、フラボノイドによる活性酸素分解・除去のしくみの詳細は現在まだ知られていない。さらに、これらとアスコルビン酸ペルオキシダーゼによる活性酸素分解・除去との相互作用についても現在のところ、報告されていない。

そこで、緑葉の老化過程においてフラボノイドを基質とする可能性のあるペルオキシダーゼの活性とアスコルビン酸を特異基質とするアスコルビン酸ペルオキシダーゼの活性を同時に測定し、両酵素反応の相互の関係について比較・検討した。生育段階の異なるコマツナの第1葉 (老葉)、第3葉 (成熟葉)、第5葉 (幼葉) を試料とし、第5葉から第1葉への変化を老化過程とした。

実験の結果、ペルオキシダーゼ活性は、葉の老化に伴い増大した。389nm に吸収のピークを示すポリフェノール類はおもにフラボノイドであると思わ

れたので、粗酵素液の389nmにおける吸光度を葉の老化過程において調べたところ、ペルオキシダーゼ活性とは異なり、葉の老化に従って順次、低下した。

また、アスコルビン酸含量およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性も葉の老化とともに急速に低下し、とくに、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の低下は顕著であった。

一般に、緑色植物の老化は葉のタンパク質含量およびクロロフィル含量の減少を伴う。そこで、葉期の異なる葉のクロロフィル含量を測定した結果、葉の老化により低下する傾向を示した。一方、タンパク質含量は葉の老化過程でわずかに減少したものの、大きな変化は示さなかった。

これらの結果から、フラボノイドを基質とすると考えられるペルオキシダーゼとアスコルビン酸を特異基質とするアスコルビン酸ペルオキシダーゼは、緑葉の生育に応じてそれぞれ異なる段階で活性酸素の除去を行っていることが推察された。ペルオキシダーゼはおもに成熟葉が老化する過程で生じる活性酸素を分解・除去するために作用していると考えられる。しかし、アスコルビン酸ペルオキシダーゼは生育初期の幼葉で著しい活性を示し、光合成や呼吸の盛んな若い細胞に多量に生じる活性酸素を急速に分解・除去していると思われる。これらの結果は著者らがこれまでに報告したコマツナの発芽過程の若い根におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の消長およびパンジー開花過程におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の消長と一致した。

生体にとって強い毒性をもつ活性酸素は、生体の老若を問わず常に生成するために細胞はどのような時にも活性酸素に対する防御機構を働かせていなければならない。しかし、若い細胞と老化の進んだ細胞とでは生体防御の目的に違いがあり、幼細胞では活発な細胞分裂とともに生じる有害物質から敏速に生体を守る必要があるのに対し、老細胞では老化や死に対する抵抗性として持続的に有害な活性酸素の除去を行っていると考えられる。このように活性酸素の分解・除去という生物にとって必要不可欠の生体防御作用に対して、生理学的な目的にあわせて異なる酵素が異なる時期にそれぞれの役割を果たしていることは興味深い。

今後、生体内に存在するさまざまな抗酸化物質や抗酸化酵素の作用の相互関係についてより詳細に調べることが植物、とくに園芸作物の健全な生育を期待する上で重要であろう。また、近年、生物が置かれている環境についてさまざまな問題が指摘されて

いるが、一般に、自然環境の悪化は植物体内で活性酸素の生成を促進することが多い。そのようにして生じた活性酸素が生体内においてどの種類の抗酸化酵素の発現を誘導し、解毒作用を行うかを知ることがこれからの環境問題への根本的な対応策を考える上できわめて有効であると思われる。

摘 要

緑色植物の老化過程において細胞内に生じる活性酸素の分解・解毒のメカニズムを知る目的で、生育段階の異なるコマツナ葉を用いてペルオキシダーゼおよびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の変化を調べた。

1. 葉の老化に伴い、ペルオキシダーゼ活性は上昇したが、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は著しく低下した。
2. それぞれの酵素の基質であるフラボノイドおよびアスコルビン酸含量を測定した結果、両者とも葉の老化に伴い、減少した。デヒドロアスコルビン酸含量はアスコルビン酸と比較してわずかに10～13%にすぎなかった。
3. 植物の老化を表すパラメーターとして知られているタンパク質含量の減少はきわめてわずかであり、また、クロロフィル含量の減少は顕著であった。
4. これらのことから、コマツナ葉の老化過程では主としてペルオキシダーゼが細胞内に生じる活性酸素を分解・解毒していると考えられ、この酵素が一般に葉の活性酸素消去系酵素として知られているアスコルビン酸ペルオキシダーゼとは異なる重要な生理機能を果たしているものと思われる。

引用文献

- Kubo, A., M. Aono, N. Nakajima, H. Saji, K. Tanaka and N. Kondo. 1999. Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 112 : 279-290.
- Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140 : 315-322.
- 森村洋子. 2001. パンジー花卉における活性酸素消去機能. 恵泉女学園短期大学研究紀要 32 : 19-24.
- Morimura, Y., K. Iwamoto, T. Ohya, T. Igarashi, Y. Nakamura, A. Kubo, K. Tanaka and T. Ikawa. 1999. Light-enhanced induction of ascorbate peroxidase in Japanese radish roots during postgerminative growth. *Plant Sci.* 142 : 123-132.
- Morimura, Y., T. Ohya and T. Ikawa. 1996. Presence of ascorbate peroxidizing enzymes in roots of *Brassica campestris* L. cv. Komatsuna. *Plant Sci.* 117 : 55-63.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22 : 867-880.
- Ohya, T., Y. Morimura, H. Saji, T. Mihara and T. Ikawa. 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. *Plant Sci.* 125 : 137-145.
- Read, S. M. and D. H. Nothcote. 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 116: 53-64.
- Roe, J. H. and C. A. Kuether. 1943. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenyl hydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.* 147: 399-407.
- Solecka, D. 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum* 19 : 257-268.
- Swain, T. 1976. Flavonoids. In T. W. Goodwin, ed., *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, London, pp. 166-206.
- Vetter, J. L., M. P. Steinberg and A. I. Nelson. 1958. Quantitative determination of peroxidase in sweet corn. *J. Agric. Food Chem.* 6: 30-41.
- Yamasaki, H., Y. Sakihama and N. Ikehara. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115 :1405-1412.