

活性酸素消去酵素アスコルビン酸ペルオキシダーゼのダイコン根における組織内局在性

森村 洋子

Tissue Localization of Ascorbate Peroxidase in Japanese Radish Roots

Yoko MORIMURA

Summary

Tissue localization of ascorbate peroxidase in root of Japanese radish during germination was investigated using a tissue-print immunoblot method with specific antibodies. The longitudinal-section from apical region of root at an early stage of germination (2 days after imbibition) was used for tissue printing. Tissue-print immunoblots showed that ascorbate peroxidase protein was located in meristem of root in which different cells were created by active division of a mother cell. From these results, ascorbate peroxidase may play an important role in deoxygenation of H_2O_2 in this zone of root of Japanese radish during germination.

緒言

植物には多くのビタミンCが含まれていることに人々は古くから気づいていた。しかし、なぜ植物はビタミンCを多量に合成するのか、それらは植物体内でどのような役割を果たしているのかという疑問は長い間、解明されないままであった。ところが、20年余り前、ビタミンC (アスコルビン酸) を基質とするペルオキシダーゼの存在が明らかになり (Kelly et al., 1979), 続いてこの酵素の化学的性質やアスコルビン酸との密接な関係が報告される (Nakano et al., 1981) と、植物体におけるアスコルビン酸およびアスコルビン酸を特異基質とするペルオキシダーゼ (アスコルビン酸ペルオキシダーゼ) の果たす役割に関心が集まった。

多くの動植物にとって、生命活動のエネルギーを産み出すために酸素は不可欠な物質であるが、このエネルギー産生の際に酸素の一部は有害な酸素である“活性酸素”に変化し、体内でさまざまな酵素の酸化やDNAの損傷などを引き起こし、生体に重大なダメージを与える。そのために動植物体内には巧妙に組み立てられた活性酸素分解・消去のしくみが備えられている。従って、生物は酸素の有害性を自ら防ぎながら、一方で酸素を生存のために役立てていることになる。

植物体中ではアスコルビン酸およびアスコルビン

酸ペルオキシダーゼは、このような活性酸素分解・消去機構の中心的存在であることが、その後の研究により明らかにされ、それにより現在では植物が多量のビタミンCを合成する必要性も、主としてそのような生理的役割との関係から説明されている。

さらに、現代社会は、自然環境の破壊という深刻な問題と向き合わなければならない事態になっている。地球規模での温暖化、放射線汚染、大気汚染などが起こる場合、植物体内には活性酸素が生じることが知られ、それにより生体は上述のようなダメージを受ける。従ってこのような観点からもアスコルビン酸およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼによる活性酸素分解・消去作用、すなわち、抗酸化作用には今、多くの関心が寄せられている。言い換えれば、アスコルビン酸、アスコルビン酸ペルオキシダーゼは、自然環境破壊という、植物にとって好ましくない環境のもとで植物の生育を可能にする「生体内抵抗性物質」としても重要な役割を果たしていると言える。

植物体のアスコルビン酸含量はこのような生理的役割との関係から、植物の生育段階および生育環境によりその値が大きく変動する。また、アスコルビン酸ペルオキシダーゼの作用も同様に植物の生育状態や環境条件と密接に関わり、生育過程のある段階で高い活性を示したり、組織や細胞のある部位で特

に強く作用したりする。

著者はこれまでに植物の根、花などの非光合成器官における活性酸素分解・消去機構について調べてきたが、本稿ではダイコンの発芽過程の根において、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性がとくに高い部位を見出し、免疫顕微鏡法によりこの酵素タンパク質の組織内局在性を明らかにしたので報告する。

材料および方法

1. 実験材料

実験材料としてダイコン (*Raphanus sativus* L. cv. Taibyousoubutori) を用いた。

2. 栽培方法

予め、5時間水浸したダイコン種子をパーライト単用播種床に点播し、1日置きに粉末ハイポネックス (N:P:K=6.5:6.0:19.0) の1000倍希釈液による浸透灌水を行いながら、人工気象器 (10000lux, 32Wm²連続照射, 25°C, 光源として白色蛍光ランプ東芝FL40SW12灯使用) 内で7日間栽培した。その間、1日ごとにダイコン芽生えを採取し、水洗後、根のみを集め、実験材料とした。種子は5時間水浸した後、剥皮し、実験に用いた。

3. 酵素抽出

酵素の抽出には1 mM アスコルビン酸ナトリウム、5%ソルビトール、3 mMメルカプトエタノール、1 mM EDTA、0.5 mM PMSF、2%PVPPを含む50 mMリン酸緩衝液 (pH7.8) を用いた。ダイコン根を上記の緩衝液とともに乳鉢中で磨砕し、ホモジネートを4層ガーゼで濾過した後、濾液を20000×gで20分間遠心分離し、上清を粗酵素液とした。これらの操作はすべて4°Cの低温下で行った。

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、50 mM リン酸緩衝液 (pH6.0)、0.5 mM アスコルビン酸ナトリウム、0.1 mM EDTA、1 mM H₂O₂ および粗酵素液を混合し、全量を2 mlとして行った。H₂O₂ を加え反応を開始した後、5~15秒間の290nm (2.8 m M⁻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. 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。

6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびイムノブロット

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は12.6%アクリルアミドを用い、Laemmli法により行った (Laemmli, 1970)。ゲル中に分画されたタンパク質を0.055%SDSおよび20% (v/v) メタノールを含む17 mMホウ酸溶液中でニトロセルロース膜に移し取り (20V, 1h, Ikeuchi et al., 1989)、5% (w/v) スキムミルクおよび0.05% Tween20を含むリン酸緩衝液 (0.14M NaCl, 7.4M Na₂HPO₄, 2.5mM NaH₂PO₄) 中で40°C、1時間ブロッキングを行った。次にダイコン根のアスコルビン酸ペルオキシダーゼから得られた抗ウサギ血清アスコルビン酸ペルオキシダーゼ抗体を一次抗体とし、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG (和光純薬) を二次抗体としてイムノブロット法により酵素タンパク質の検出を行った。発色には0.74 mM 3, 3'-ジアミノベンジジンおよび0.88 mM H₂O₂ を含む15 mM リン酸緩衝液 (pH6.8) を用いた。

7. アスコルビン酸含量の測定

アスコルビン酸含量はヒドラジン法 (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°C、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、アスコルビン酸含量を求めた。アスコルビン酸含量は試料1g (生重量) あたりのmg数として表した。

8. 組織プリント法

アスコルビン酸ペルオキシダーゼの組織内局在性を調べるために組織プリント法 (蒲地ら, 1993) を用いた。実験に先立ち、ニトロセルロース膜を10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) および0.15 M NaClを含むPBS溶液に10分間浸した後、濾紙上で風乾した。次にダイコン幼根の先端下部から1.5 mmの位置で横断切片を切り出し、この切片を実体顕微鏡下で縦に2分し、縦断切片を作製した。ただちに

ピンセットを用いて縦断面をニトロセルロース膜上に静置し、切片が動かないように4枚の薄紙(キムワイプ)で固定しながら指先で20秒間押し、軽く圧力をかけて切片の切断面からタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。次に切片を除いたニトロセルロース膜を上述のPBS溶液中で5分間振とうした。その後、PBS溶液に0.1% Tween-20 (w/v) および5% スキムミルクを加えたPMST-Milk溶液中にニトロセルロース膜を浸し、室温下で1時間振とうし、ブロッキングを行った。次に抗ウサギ血清アスコルビン酸ペルオキシダーゼ抗体を一次抗体とし、アルカリフォスファターゼ標識抗体を二次抗体としてイムノプロット法により酵素タンパク質の検出を行った。発色には100mM トリシュー塩酸 (pH9.5), 100mM NaCl, 5mM 塩化マグネシウムを含むアルカリフォスファターゼ緩衝液 15ml に 100 μ l ニトロブルーテトラゾリウム (NTB) と 50 μ l 5-ブromo-4-クロロ-3-インドールリン酸 (BCIP) を溶解したアルカリフォスファターゼ発色溶液を用いた。発色後、ただちにニトロセルロース膜を水洗することにより発色を停止し、濾紙上で風乾後、実体顕微鏡下で検鏡し、同時に結果を写真に記録した。対照として非免疫血清を用いて同様の操作を行い、発色しないことを確かめた。

結果

1. 発芽過程の根におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の変化

上述の方法で栽培し、採取したダイコン根のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定した結果を

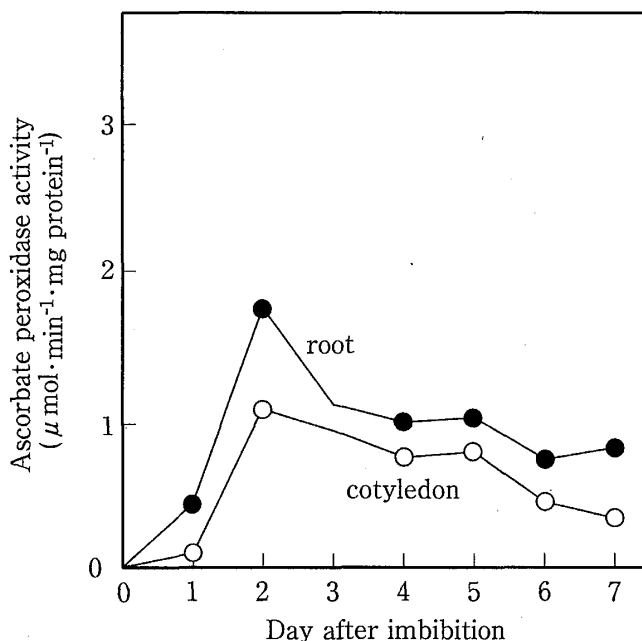


Fig.1 Changes in ascorbate peroxidase activity under light condition

Fig.1 に示した。ダイコン種子にはアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性はほとんど認められなかったが、発芽と同時に根におけるこの酵素の活性が急速に上昇し、播種後2日目に最大値を示した。その後、3日目から7日目までは最大値の約60%の酵素活性を維持した。対照として子葉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定したところ、根の場合と同様に播種後2日目に最大値を示したが、その値は根における値の約60%に止まった。

2. 発芽過程の根におけるアスコルビン酸含量の変化

上述の方法で栽培し、採取したダイコン根のアスコルビン酸含量を測定し、結果をFig.2に表した。図

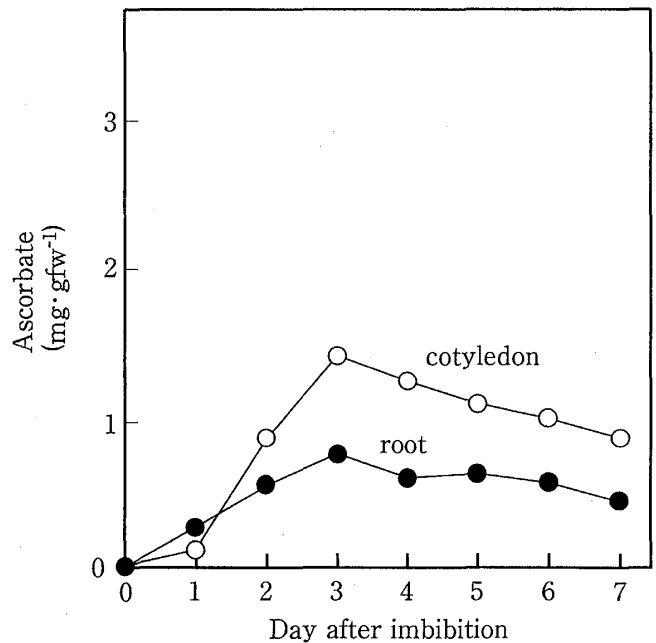


Fig.2 Changes in ascorbate content under light condition

に示されているとおり、アスコルビン酸は種子には認められなかった。しかし、発芽すると根のアスコルビン酸含量は徐々に増加し、播種後3日目に最大値を示し、その後7日目まではわずかに減少した程度であった。子葉におけるアスコルビン酸含量も播種後3日目に最大値を示したが、その値は根における値の約2倍であった。

3. 光照射が発芽時の根のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性に及ぼす影響

ダイコン種子を上記の方法で播種し、発芽させた時、光照射が根のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性にどのような影響を及ぼすかを調べた。播種

後, 10000luxの光を40時間連続照射した場合, 18時間暗黒下で発芽, 生育させ, その後, 10000luxの光を22時間照射した場合, また, 40時間暗黒下で発芽, 生育させた場合のそれぞれの試料について, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定した. 結果はFig.3Aに示すとおりである. 発芽直後にはアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は光の影響を受け

ないが, 40時間後には光照射のもとで生育したダイコン根のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は, 暗黒下で生育した場合と比較して明らかに高い値を示し, 光の影響を受けていることがわかる. 子葉について同様の実験を行ったところ, Fig.3Bに表されているように根の場合に類似した結果を示したが, 光照射による酵素活性の増大は根の場合ほど顕著ではなかった.

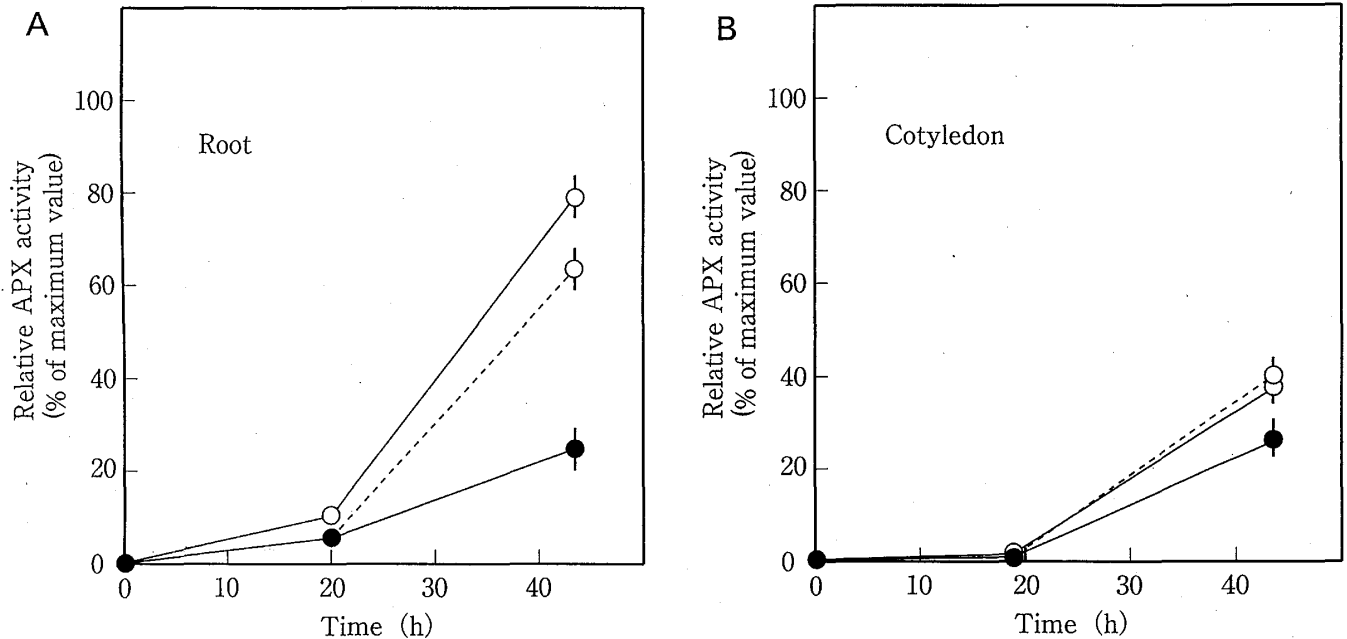


Fig.3 Effect of light on ascorbate peroxidase activities in roots (A) and cotyledons (B) during germination of Japanese radish. Seeds were germinated and grown in continuous light (10000 lux, 32Wm²) (—○—), or in darkness (—●—) for 42 h, or in darkness for 18 h and then transferred to light (10000lux, 32 Wm²) (—○—). Samples at 0 h were obtained as those at 0 day in Fig. 1. Relative activity was calculated as percentage of the maximum activity (1.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$) in roots in continuous light. Data are the mean \pm S.E. for three independent experiments. Bars are not shown when smaller than the symbols.

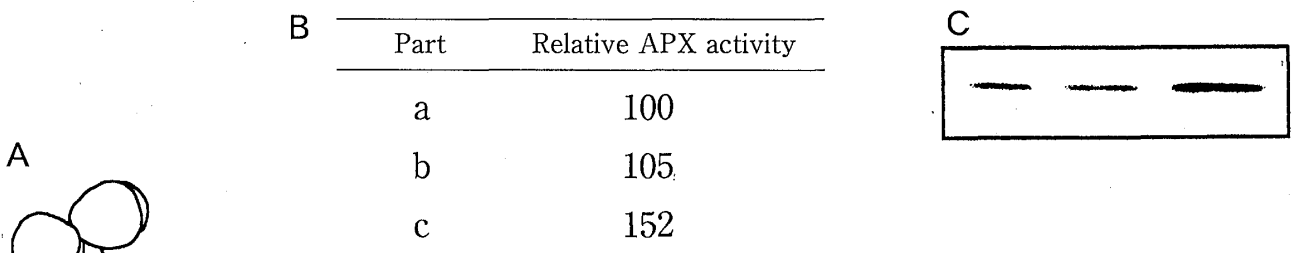


Fig.4 Comparison of activity and protein level of ascorbate peroxidase in segments from different regions in roots of Japanese radish seedlings. A: Schematic representation of Japanese radish seedlings grown for 42 h in the light, showing positions of three regions. Roots were cut into three segments (1.5 mm in the length): a, basal region; b, middle region; c, apical region. B: ascorbate peroxidase activities in three regions (a, b and c) of the root. The enzyme activity in the basal region of root ($116 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$) was defined as 100% and relative activity was calculated as a percentage of that in the basal region. C: Immunoblot analysis of SDS-PAGE gel probed with antibody raised against Japanese radish root cytosolic ascorbate peroxidase. The same amounts of protein (6 μg per lane) from three regions (a, b and c) of the root were separated by SDS-PAGE, and subjected to immunoblot analysis after transfer

4. ダイコン幼根の部位によるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の比較

播種後2日目のダイコン根の先端部から1.5mmごとに3片の横断切片を切り出し (Fig.4A), 下部 (先端より0-1.5mm), 中間部 (先端より1.5-3.0mm), 上部 (先端より3.0-4.5mm) の各部位におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定した。その結果, 下部における活性値が最も高く, その値は上部, 中間部の値の約1.5倍であった (Fig.4B)。さらに上部, 中間部, 下部のアスコルビン酸ペルオキシダーゼタンパク質をイムノプロット法により検出し, 結果を Fig.4C に表した。図に示されるように, 下部には上部, 中間部より明らかに濃いバンドが認められた。

5. 発芽時のダイコン根におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの組織内局在性

播種後2日目のダイコン根の先端下部 (Fig.4A, 先端より0-1.5mm) の縦断切片を作製し, 前述の組織プリント法により, アスコルビン酸ペルオキシダーゼの検出を行った。その結果, 根の頂端分裂組織が根冠と接する部分にこの酵素の強い発色が見られ, 細胞分裂の盛んな頂端分裂組織付近でアスコルビン酸ペルオキシダーゼの作用が強まることが推察された (Fig.5A)。Fig.5B は対照として播種後2日目のダイコン根の先端下部 (Fig.4A, 先端より0-

1.5mm) の縦断面をトルイジンブルー染色液により染色したものである。

考 察

多くの動植物は糖から生じた多量のエネルギーを用いて生命活動を行っている。このしくみが「呼吸」である。このようなエネルギー発生の際には一連の生体反応の最終段階において酸素を電子受容体として取り込まなくてはならない。この時, 酸素の一部は生物にとって有害な酸素, いわゆる活性酸素となり, 細胞にダメージを与えることが不可避となっている。このために細胞には活性酸素を分解・消去する一連の酵素系が備えられている。このような活性酸素から身を守る“生体防御”の重要性は, 地球上の生命の歴史をふりかえってみても明らかである。

原始の地球の大気にはきわめて低い濃度の酸素しか含まれていなかったと考えられている。その後, 約35億年前に最初の光合成生物であるシアノバクテリア (ラン藻) が出現し, 大気中の酸素濃度が次第に上昇するとそれに伴い, エネルギー消費量の多い大型の動植物が生息するようになり, やがて人類が誕生し, 現在に至っている。しかし, シアノバクテリアが現れる以前にすでに存在していたと思われる, 酸素を用いない生物である嫌気性菌 (メタン細菌, 硫黄細菌など) にも低い濃度の酸素を分解・消去する酵素 (スーパーオキシドジスムターゼ) が検出

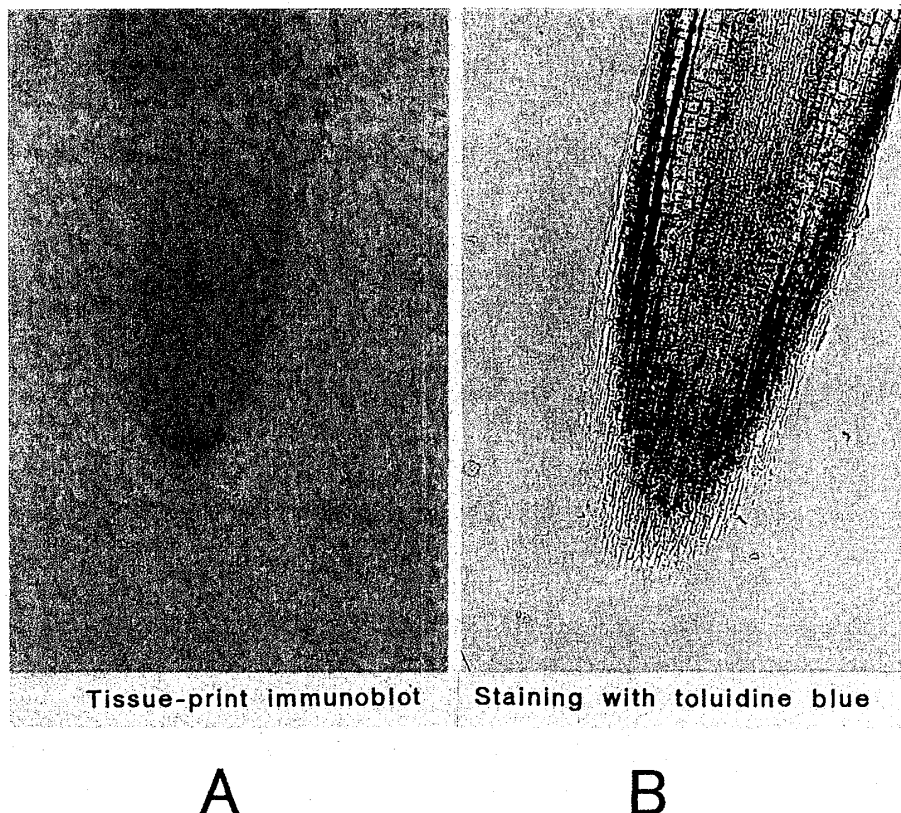


Fig.5 Tissue-print immunoblot localization of ascorbate peroxidase in the apical region of radicle of Japanese radish grown for 2 days in the light. Results of tissue printing and staining (A) and direct staining with toluidine blue (B). Methods of tissue printing and staining are described in the Methods section.

された。このことから、酸素毒性から生体を守るしくみはすべての生物に不可欠なものとして備えられていることがわかる。

植物における活性酸素消去の中心的役割を果たす酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼについての研究は、当初、主として光合成との関係から進められた。光合成を活発に行う緑色植物の葉緑体にはアスコルビン酸が高濃度（数十 mM）で含まれ、このアスコルビン酸は、光合成により生じた酸素の一部が活性酸素となり毒性を現すことを防ぐために、アスコルビン酸ペルオキシダーゼの特異基質として作用している。このために光合成に参与するアスコルビン酸ペルオキシダーゼは、葉緑体のチラコイドおよびストロマに局在することがわかっている（Nakano et al., 1987, Miyake et al., 1993）。

一方、アスコルビン酸ペルオキシダーゼは葉緑体を含まないマメ科植物の根粒にも見いだされ（Dalton et al., 1987）、この酵素はその化学的性質から葉緑体に見いだされたアスコルビン酸ペルオキシダーゼのアイソザイムであると考えられている。

その後、葉緑体にも根粒のアスコルビン酸ペルオキシダーゼに類似した新たなアイソザイムが見いだされ（Mittler et al., 1991）、これらは葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼに対して細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼと呼ばれている。

著者は緑色植物の非光合成器官である根や花などの組織では生育段階や環境条件の違いによりアスコルビン酸含量に大きな変動が見られることに着目し、これらの器官におけるアスコルビン酸含量の変動とアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性との関係を調べ、その生理的意義を明らかにしようとした。これまでにダイコン幼根からアスコルビン酸ペルオキシダーゼを抽出・精製し、この酵素の化学的性質を調べ、この酵素が葉緑体に見いだされたアスコルビン酸ペルオキシダーゼの細胞質型アイソザイムの一種であると結論づけた（Ohya et al., 1997）。

さらに、ダイコン根の生育過程におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ作用の生理的意義を知る目的で、この酵素のタンパク質レベルおよび遺伝子レベルでの発現について調べ、次のような結果を得た。

アスコルビン酸は種子には全く検出されないが、種子の発芽と同時に根のアスコルビン酸含量が増大し、それに伴い、芽生えの成長速度は著しく高まった。しかし、その後、芽生えの成長が定常期に入り、成長速度が低下すると、根のアスコルビン酸含量の増加も停止した。この時、根のアスコルビン酸ペル

オキシダーゼ活性にも同様の変化が見られ、種子にはわずかな活性しか認められなかったにもかかわらず、発芽すると一時的に急速な活性の上昇が見られ、その後、再び低下した（Morimura et al. 1999）。発芽初期にはアスコルビン酸含量は、根より子葉において高い値を示すのに対してアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、根における値が子葉における値を上まわったことはきわめて興味深い。発芽初期には子葉の出現に先立ち、幼根の急速な成長が見られるが、この時、根の呼吸活性が増大し、二次的にもたらされる活性酸素の生成に対応するために、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が高まるのではないかと思われる。さらに、発根の際に光を照射すると、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は暗黒条件の場合と比較して著しく増大した。自然状態においては発根には通常、光は無関係であり、光を与えると一般に根の成長は遅れると考えられている。なぜ光照射のもとで発生初期の根のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が高まるかは現在のところ、明らかではないが、光が根の成長に対して阻害的に働くとするならば、このときに光照射により生じる活性酸素をアスコルビン酸ペルオキシダーゼが速やかに分解し、解毒していることが推測される。

また、花の開花過程では、一般に花卉のアスコルビン酸含量は成葉における値と比べ、かなり高い（1.3mM）ことから、花卉にアスコルビン酸ペルオキシダーゼが存在するか否かを調べ、もし、存在するのであればその生理的意義について明らかにしようとした。実験の結果、パンジー花卉にはダイコン根と同様に細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼが存在し（森村ら, 1998）、この酵素活性は花蕾形成の初期から開花直前まで高い値を維持するが、花卉が完全に開花すると急速に活性が低下することがわかった（森村ら, 2001）。現在のところ、花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の増大が呼吸活性の増大によるものかどうかは明らかではないが、植物にとっては開花過程も発芽過程と同様に急速な生理的変化の段階であり、この時に何らかの原因により生じる活性酸素をアスコルビン酸ペルオキシダーゼが分解・消去する必要があるのではないかと思われる。

このようにアスコルビン酸ペルオキシダーゼは、植物の生育過程におけるさまざまな段階において不可避に生成される有害な活性酸素を取り除く、重要な役割を果たし、この点において一般によく知られているペルオキシダーゼとは異なる生理的意義をもつと考えられる。

ダイコンの発芽過程において幼根のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を詳細に測定したところ、播種後2日目に活性は最大値を示し、その値は成熟した根における値の約20倍であった。また、播種後2日目には根のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、子葉における値より高く、その差は約1.8倍であった (Fig.1)。そこで、播種後2日目の根のどの部位でアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の高まりが見られるかを調べることにした。

ダイコン幼根 (播種後2日目) の先端部から長さ1.5mmずつ、3片の横断切片を切り出し、それぞれを下部、中間部、上部とした。これらの試料についてアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定した結果、下部における活性が最も高く、上部、中間部での値の約1.5倍であった。根の先端下部には根冠および頂端分裂組織が存在する。そこでそれらの組織におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの役割について知る目的で、次に組織プリント法によりダイコン幼根の先端下部におけるこの酵素の組織内局在性について調べた。播種後2日目のダイコン根の先端下部の縦断面を、切り取った直後にニトロセルロース膜に写し取り、さらに免疫顕微鏡法によりアスコルビン酸ペルオキシダーゼの存在を調べたところ、頂端分裂組織の下部、すなわち根冠部と頂端分裂組織部とが接する位置にアスコルビン酸ペルオキシダーゼによる強い発色が認められた (Fig.5A)。

一般に発芽後まもない幼根の頂端分裂組織では、活発な細胞分裂が行われ、それにより将来、葉、茎、花などの異なる器官に分化していく細胞のすべてを供給すると考えられている。従って、この時、頂端分裂組織では活発な細胞分裂を促すエネルギーが必要となり、ATP生成の際、生じる活性酸素をアスコルビン酸ペルオキシダーゼが効率的に分解し、若い根の組織を酸素毒性から守っているのではないかとされる。このように植物の生育において重要な役割を果たす頂端分裂組織におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの動向をさらに詳しく知るためには、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いてmRNAの組織内発現を調べることが有効であろう。それにより細胞分化におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの役割が一層明確になるものと思われる。

現在、アスコルビン酸ペルオキシダーゼは、植物がもつ「生体内抵抗性物質」としてその作用の重要性が注目されている。このことは植物をとりまく環境がより強い抵抗力を必要とするものに変化していることを意味している。生態系の成り立ちを考えれば、

植物の生育は地球上のすべての生物の生存を左右するものであり、その重要性を深く認識しながら、植物が本来備えている抵抗性、免疫力についてより深く研究を進めることが今後の自然環境問題の解決のために急務であると考えられる。

摘 要

緑色植物の細胞内に不可避に生じる有害な活性酸素は、アスコルビン酸ペルオキシダーゼを中心とした分解・消去酵素系により解毒される。この解毒作用は光合成や呼吸が盛んに行われるときに活発になることが知られている。緑色植物の発芽過程の初期には、呼吸活性の増大とともに幼根が急速に生長する。そこでダイコンの発芽過程初期 (播種後2日目) の幼根を用いてアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が高い先端下部におけるこの酵素の組織内局在性について調べた。

組織プリント法により幼根先端下部 (先端より0-1.5mm) の横断切片をさらに縦に2分し、その縦断面をニトロセルロース膜に写し取り、抗体を用いた免疫学的方法により顕微鏡下でアスコルビン酸ペルオキシダーゼを検出したところ、頂端分裂組織下方の根冠と接する位置にこの酵素の存在を示す顕著な発色が現れた。この結果から、ダイコン発芽過程初期の根においては、細胞分裂が最も盛んに行われる頂端分裂組織で呼吸活性が急速に高まり、その結果生じる活性酸素をアスコルビン酸ペルオキシダーゼが活発に分解・解毒することが推測された。

引用文献

- Dalton, D. A., F. J. Hanus, S. A. Ressel and H. J. Evans. 1987. Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol.* 83, 789-794.
- Ikeuchi, M., H. Koike and Y. Inoue. 1989. N-terminal sequencing of low-molecular-mass components in cyanobacterial photosystem II core complex. *FEBS Lett.* 253.
- 蒲地一成, 山谷知行. 1993. 遺伝子発現の組織・細胞レベルでの検出法③ - Tissue Print Immunoblot 法 - . *植物細胞工学* 5 : 326-330.
- Kelly, G. J., and E. Latzko. 1979. Soluble ascorbate peroxidase. *Naturwissenschaften* 66, 617-618.
- Leamml, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Mittler, R. and B. A. Zilinskas. 1991. Purification and

- characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol.*, 97: 962-968.
- Miyake, C., W. H. Cao and K. Asada. 1993. Purification and molecular properties of the thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 34: 881-889.
- 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., T. Ohya and T. Ikawa. 1996. Presence of ascorbate peroxidizing enzymes in roots of *Brassica campestris* L. cv. Komatsuna. *Plant Sci.* 117: 55-63.
- 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.
- 森村洋子, 村上睦朗, 秋田まりな, 引田美和. 1998. パンジー開花過程における花卉の過酸化水素分解酵素活性の変動. 恵泉女学園短期大学研究紀要 29: 21-26.
- 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.