

Changes in ascorbate peroxidase activity during the root development of *Raphanus sativus* L.

Yoko MORIMURA

Summary

Relatively high levels of ascorbic acid content and ascorbate peroxidase activity exist in higher plants and it has been found to be of interest for their physiological roles in detoxification of H_2O_2 inevitably produced from superoxide radicals in plant tissues.

Ascorbate peroxidase activity in roots of *Raphanus sativus* L. increased rapidly at an early stage of

germination and the maximum activity corresponded to the maximum activity of superoxide dismutase. At this stage the nonspecific peroxidase activity with guaiacol was very low compared with ascorbate peroxidase activity. From these results possible roles for ascorbic acid and ascorbate peroxidase in root development of *Raphanus sativus* L. are discussed.

ダイコン芽生えの根における アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の消長とその生理的意義

森村 洋子

緒言

動植物の細胞内に生じる種々の活性酸素は、その非特異的酸化力により生体に障害を与えることが知られている。これに対し生体はスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素群やアスコルビン酸、グルタチオン、トコフェロールなどの抗酸化性物質を備えて活性酸素による障害から生体を守っている。

活性酸素の一種である H_2O_2 は、高等植物の細胞ではペルオキシソームに局在するカタラーゼのほか、アスコルビン酸ペルオキシダーゼにより分解消去されることが報告されている(1)。このアスコルビン酸ペルオキシダーゼはグアヤコールやピロガロールをおもな電子供与体とする一般的なペルオキシダーゼとはさまざまな点で異なり、とくに電子供与体としてのアスコルビン酸に対する特異性が高い。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼは高等植物の葉の葉緑体および細胞質に存在することがすでに報告されているが(1, 2, 3)、新たに根にも存在することがコマツナ芽生えを用いた実験によって明らかになり(4)、その酵素学および分子的性質についての研究が進められつつある。しかし、根においてアスコルビン酸ペルオキシダーゼが果たす生理的役割については現在のところまだほとんど知られていない。

そこで高等植物の根に存在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼの生理機能を知ることを目的として、ダイコン芽生えの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を調べ、スーパーオキシドジスムターゼ、グアヤコールペルオキシダーゼ、カタラーゼ活性との関係について比較検討した。

材料および方法

1. 実験材料

実験としてダイコン (*Raphanus sativus* L. cv. Taibyosobutori) を用いた。

2. 栽培方法

あらかじめ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、2日ごと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グローσκヤビネット(10000 lux連続照射, 25℃, 光源として白色蛍光ランプ東芝FL40SW 12灯使用)内で9日間栽培した。生育過程において1~3日ごとにダイコン芽生えを採取し水洗した後、根のみを集め実験試料とした。種子は5時間水浸した後、剥皮し、実験に用いた。

3. 酵素の抽出

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。ダイコン根を前述の緩衝液中で磨碎し、得られたホモジネートを4層カーゼで濾過し、濾液を20000×gで20分間遠心分離した後、上清を粗抽出液とした。

4. 酵素活性の測定

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 H_2O_2 および酵素液を混合し、全量を2mlとして行った。 H_2O_2 を加え反応を開始した後、5~15秒間の290nmにおける吸光度を測定し、吸光度の変化からアスコルビン酸の減少速度を求めた($\epsilon_{290}=2.8mM^{-1}\cdot cm^{-1}$)。酵素活性は1分間に減少するアスコルビン酸の μmol 数として表した(1)。

グアヤコールを電子供与体とするペルオキシダーゼの活性測定には、50mMリン酸緩衝液(pH4.5)、10mMグアヤコール、0.1mM EDTA、1mM H_2O_2 を混合し、全量を2mlとした。反応は H_2O_2 を加えて開始し、20~30秒間の470nmにおける吸光度の増加速度を求めた($\epsilon_{470}=26.6mM^{-1}\cdot cm^{-1}$)。酵素活性は1分間に増加するグアヤコール酸化生成物、テトラグアヤコールの μmol 数として表した(1)。

スーパーオキシドジスムターゼ活性の測定は次に述べるキサンチン-キサンチンオキシダーゼによる O_2^- 生成系およびチトクロームcの還元に基づく O_2^- 反応系を用いて行った。50mMリン酸緩衝液(pH7.8)、0.1mM EDTA、0.1mMキサンチン、0.1mMチトクロームc(Sigma Type III)および酵素液を混合し、さらにキサンチンオキシダーゼを加えて(全量2ml)反応を

開始した後、チトクロームcの還元速度を550nmにおける吸光度の増加速度(30~60秒)から求めた。酵素活性はこの条件下でチトクロームcの還元を50%阻害するスーパーオキシドジスムターゼ濃度を1単位とする単位数で表した(5)。

カタラーゼ活性は10mM H₂O₂を含む50mM リン酸緩衝液(pH7.0)に酵素液を加え(全量2ml)反応を開始し、240nmにおける吸光度の減少から求めた。酵素活性は1分間に減少するH₂O₂の μmol 数として表した($\epsilon_{240}=0.04\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 6)。

アスコルビン酸オキシダーゼ活性は0.17mM アスコルビン酸を含む100mM リン酸緩衝液(pH5.6)に酵素液を加え(全量2ml)反応を開始し、265nmにおける吸光度の減少速度から求めた($\epsilon_{265}=13.2\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。酵素活性は1分間に減少するアスコルビン酸の μmol 数として表した(7)。

5. タンパク質含量の測定

タンパク質含量はCoomassie brilliant blue G-250を用いた比色法(8)により測定した。

結果

ダイコン芽生えの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活性の消長を調べるのに先立ち、前述の方法により播種栽培したダイコンの根の生育状態を調べた。播種後1~3日ごとに根の生重量を測定し、種子(0日目)については5時間水浸し剥皮し

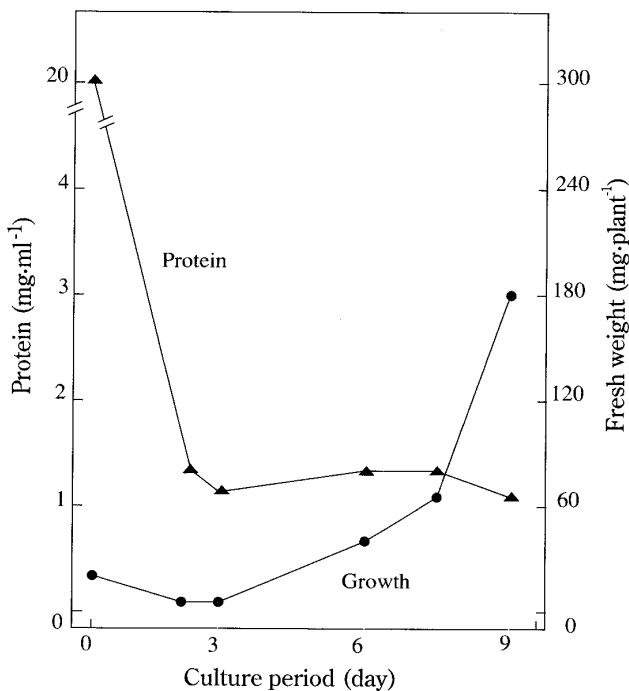


Fig. 1. Changes in the fresh wight and the content of protein during the culture period

た後、生重量を測定した。各測定値は試料10~100個体の平均値である。図1に示すとおり、ダイコン芽生え1個体あたりの根の生重量は、播種後6日目まで顕著な増加を示さなかったが、7日目以降急速に増加し、9日目には6日目の値の約4倍に達した。ダイコン芽生えの根のタンパク質含量は、種子中では著しく高い値を示したが、発芽と同時に急速に減少し、2日目には種子中の値の約7%に低下した。その後9日目まで顕著な変化を示さなかった。

ダイコン芽生えの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活性について測定した結果を

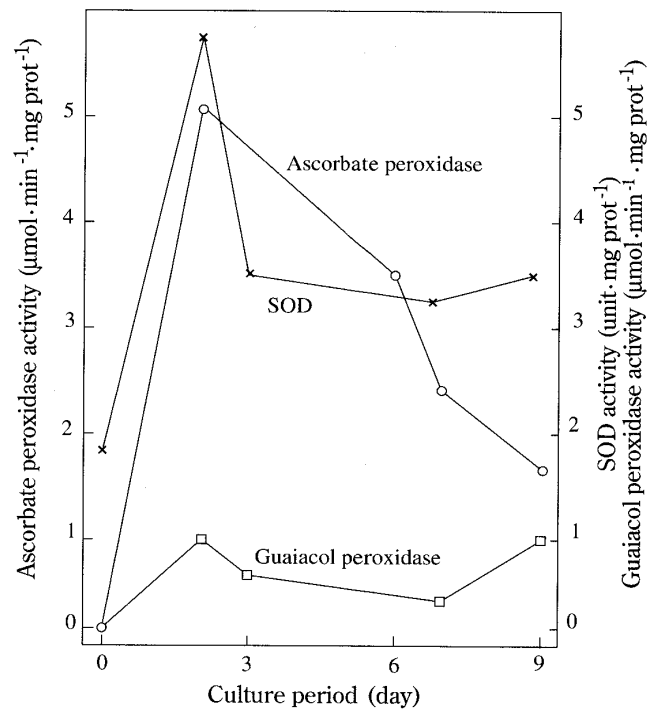


Fig. 2. Changes in the activities of ascorbate peroxidase, superoxide dismutase (SOD) and guaiacol peroxidase during the culture period

図2に示した。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は種子には全く認められなかったが、発芽と同時に急速に増大した。しかし、3日目には活性は低下し始め、その後9日目まで漸次低下し続けた。

スーパーオキシドジスムターゼ活性を測定したところ、種子にもわずかな活性が認められたが、発芽と同時に活性は急速に高まり、2日目には種子の約3.5倍に達した。しかし、3日目には活性は低下し、種子の値の2倍程度となり、この値は9日目までほとんど変化しなかった(図2)。

グアヤコールを基質として非特異的なペルオキシダーゼの活性を測定した結果は図2に示すとおりである。ダイコン芽生えの根ではグアヤコールペルオキシダーゼ活性はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性と

比較してきわめて低く、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の場合と同様に発芽と同時に上昇し始めたものの2日目の値はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活

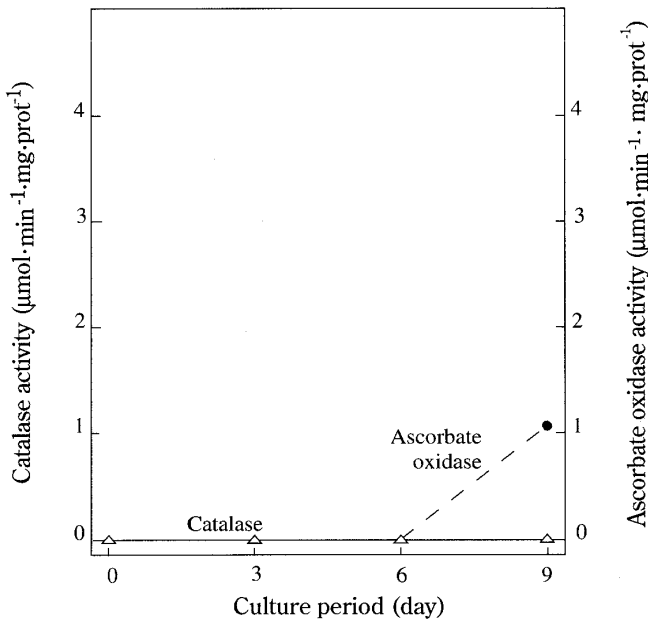


Fig. 3. Changes in the activities of catalase and ascorbate oxidase during the culture period

性の約18%に止まり、3日目以降7日目まではさらに低下する傾向を示した。

細胞内の H_2O_2 消去に関与する主要な酵素の1つであるカタラーゼ活性の変化を種子および播種から9日目までのダイコン芽生えの根について調べた。結果は図3に示すとおり、ダイコン芽生えの根にはカタラーゼ活性は全く認められなかった。また、アスコルビン酸オキシダーゼがアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性に及ぼす影響を調べるためにアスコルビン酸オキシダーゼ活性を測定したところ、播種後6日目までは活性は認められず、9日目にわずかに上昇した程度であった。

考 察

一般に植物体には比較的多量のアスコルビン酸が含まれ、高等植物の緑葉ではその濃度は数mMにも達する。それにもかかわらず、植物体内においてアスコルビン酸が果たす生理的役割については長い間詳細な研究報告が行われず、不明のままであった。しかし、近年、アスコルビン酸ペルオキシダーゼの発見(9)とそれに基づくアスコルビン酸の新しい生理作用の解明がなされ(10)、アスコルビン酸の植物体における生理的役割を知る上で1つの重要な布石となった。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼについて現在までに進められてきた研究はおもに高等植物の葉(1, 2)

や単細胞緑藻(11, 12)などを用いて行われ、その機能は光合成と密接な関係を持っていると考えられている。葉緑体が発達した細胞では、葉緑体チラコイド膜は光合成明反応において水の光酸化により光還元力を生じ、この光還元力で O_2 が還元されてスーパーオキシドラジカル(O_2^-)を生成し、これはさらにスーパーオキシドジスムターゼに触媒されて H_2O_2 を生じる。 O_2^- や H_2O_2 は反応性の高い O_2 分子種であり、これらは葉緑体内の他の成分と反応してさらに反応性の高いヒドロキシラジカル($OH\cdot$)や励起1重項酸素分子(1O_2)を生成する。この $OH\cdot$ や 1O_2 は低濃度であっても葉緑体ストロマに存在する CO_2 固定系のSH酵素を失活させるために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 H_2O_2 消去系の機能は植物の生存に不可欠なものとしてされている(13)。

しかし、アスコルビン酸は高等植物の葉のみならず根、茎にも見いだされ、コマツナでは根、茎にはそれぞれ葉の60%、30%の濃度のアスコルビン酸が含まれている。また、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活性もコマツナの葉、根のいずれにも認められ、アスコルビン酸含量が高まる条件下でアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が高まる傾向が見られた。とくに、発芽直後のコマツナ根では、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活性はともに葉より高い値を示した(14)。

そこで、高等植物の根におけるアスコルビン酸の生理的役割を知るためにコマツナ根を用いてアスコルビン酸ペルオキシダーゼの単離精製を試み、この酵素の諸性質を明らかにした(4)。さらに、ダイコン根から高い純度でこの酵素を精製し、諸性質を免疫学的に調べた。その結果、高等植物の根には葉と同様に基質特異性の高いアスコルビン酸ペルオキシダーゼが存在し、生育の初期に何らかの生理的役割を果たしていると思われるのでダイコン芽生えの根を用いて生育に伴うアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の変動について調べた。同時に H_2O_2 生成系に作用するスーパーオキシドジスムターゼの活性を測定した。実験の結果、ダイコン根では生育のきわめて初期にアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が急速に上昇し、その後再び急速に低下することおよびこのようなアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の一時的な上昇はスーパーオキシドジスムターゼ活性の変動と一致することが明らかになった。これらのことから細胞分裂の盛んな生育初期に根に存在する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が活性酵素による根の生育障害を防いでいることが示唆された。

ダイコンの根では生育のきわめて初期に何らかの生

理作用により生じたスーパーオキシドラジカル (O_2^-) がスーパーオキシドジスムターゼの作用を受けて H_2O_2 を生成し、この物質はさらにアルコールペルオキシダーゼにより H_2O に分解されて組織内の酸化力を弱め、根の組織を酸素毒性による障害から守っているものと考えられる。種子では発芽と同時に急速に呼吸活性が高まり、ATPを消費してさまざまな物質の合成が行われる。 H_2O_2 は呼吸基質からも生成され、 H_2O_2 の生成速度がアスコルビン酸ペルオキシダーゼによる H_2O_2 消去系の律速要因となることがユーグレナの単離ミトコンドリアを用いて明らかにされている (12)。一般にミトコンドリアは酸素消費の場でありながら活性酸素の生成量は少ないと言われているが (15)、発芽初期には急速な呼吸活性の上昇が起ることからスーパーオキシドラジカルや H_2O_2 の生成も高まり、従って、スーパーオキシドジスムターゼ活性およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性も一時的に増大するものと思われる。とくに、ダイコン根の生育初期のようにカタラーゼによる H_2O_2 の分解が行われない条件下ではこれらの酵素系の果たす役割は重要であろう。

最近、光、温度、酸素、オゾン、 NO_2 、 SO_2 などの環境要因の変化がもたらすさまざまなストレスが植物体内のスーパーオキシドジスムターゼ活性やアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を高めることが報告されている (16)。このことから、植物細胞の耐ストレス機構においてもスーパーオキシドジスムターゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼを含む酵素系が活発に作用していると考えられるが、植物をとりまく環境が大きく変化しつつある昨今、植物体内で不可避の活性酸素の生成に対して植物体がどのような生体防御機構を備えているかを知る意義は大きく、また、今後は解明された生体防御機構を利用して、遺伝子操作によるストレス耐性植物の作出を図ることも園芸作物の栽培において一層重要な課題になるものと思われる。

要 約

高等植物の組織には比較的高濃度のアスコルビン酸が含まれ、そこでは同時に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活性も高い。アスコルビン酸ペルオキシダーゼは生体に毒性をもたらす活性酸素の一種である H_2O_2 を分解消去する酵素反応を触媒することが知られ、このような解毒機構は高等植物の生命維持のために不可欠なものと考えられている。

ダイコン芽生えの根では生育の初期にアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の一時的な高まりが見られ、

この変化はスーパーオキシドジスムターゼ活性の変化と一致した。しかし、この時期には H_2O_2 を非特異的に分解するグアヤコールペルオキシダーゼ活性はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性と比較してきわめて低く、カタラーゼ活性は認められなかった。また、アスコルビン酸オキシターゼがアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性に影響を及ぼすこともなかった。

これらの結果から、ダイコン芽生えの根において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が H_2O_2 分解機構に関与していることが示唆された。

本研究を行うにあたり御指導御鞭撻いただきました筑波大学猪川倫好教授、および秋田県生物資源センター大屋俊英博士に厚く御礼申し上げます。また、実験材料の栽培について御協力くださいました本学中野由紀子副手に深く感謝いたします。

文 献

1. Y. Nakano and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22:867-880.
2. G.-X. Chen and K. Asada. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* 30:987-998.
3. R. Mittler and A. Zilnikas. 1991. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol.* 97:962-968.
4. Y. Morimura, T. Ohya and T. Ikawa. Ascorbate peroxidase in roots of *Brassica campestris* L. cv. komatsuna. *Plant Sci.* in press.
5. J. M. McCord and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
6. H. Lück. 1965. Catalase. In Bergmeyer, H-U. [Ed.] *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic press, New York, 885-894.
7. M. F. Oberbacher and H. M. Vines. 1963. Spectrophotometric assay of ascorbic acid oxidase. *Nature.* 197:1203-1204.
8. S. M. Read and D. H. Northcote. 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.
9. G. J. Kelly and E. Latzko. 1979. Soluble ascorbate peroxidase. Detection in plants and use in vitamin C estimation. *Naturwissenschaften*. 66:617-618.
 10. Y. Nakano and K. Asada. 1980. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol*. 21:1295-1307.
 11. C. Miyake, F. Michihata and K. Asada. 1991. Scavenging of hydrogen peroxide in prokaryotic and eukaryotic algae: acquisition of ascorbate peroxidase during the evolution of cyanobacteria. *Plant Cell Physiol*. 32:33-43.
 12. 重岡成. 1992. 活性酸素代謝の分子的機作の解明. 日本農芸化学会誌. 66:1739-1749.
 13. 中野善行・浅田浩二. 1983. 葉緑体での H_2O_2 消去系. 京都大学食糧科学研究所報告. 46:55-58.
 14. 森村洋子. 1990. 植物体における L-アスコルビン酸の代謝と生理機構—コマツナ根における L-アスコルビン酸の生理的役割—私学研修. 117:102-113.
 15. 西田俊朗・田川邦夫. 1988. ミトコンドリアにおける活性酸素の発生とその障害. 活性酸素. 蛋白質核酸酵素 33:2717-2722.
 16. K. Tanaka, Y. Suda, N. Kondo and K. Sugahara. 1985. O_3 tolerance and the ascorbate-dependent H_2O_2 decomposing system in chloroplast. *Plant Cell Physiol*. 28:1425-1431.