

# パセリ葉の活性酸素消去系における アスコルビン酸ペルオキシダーゼの役割

森 村 洋 子

## 緒 言

高等植物の葉，花，根などの器官にはL-アスコルビン酸（ビタミンC）が数mMという比較的高い濃度で含まれ，さまざまな生理的役割を果たしている。その生理機能のおもなものはLアスコルビン酸の還元力に基づく抗酸化作用である。多くの動植物にとって酸素は生存のために不可欠な物質であるが，一方で酸素は動植物の細胞内で反応性の高い，有害な“活性酸素”を生じ，生体に遺伝子の損傷や酵素の失活などによる重大なダメージを与える。そのために生体内にはLアスコルビン酸を含む多くの抗酸化物質が蓄えられ，細胞のさまざまな場でこの抗酸化物質を用いて活性酸素を消去する，複雑な酵素系が働いている。この一連の生理作用を抗酸化作用と呼んでいる。

Lアスコルビン酸にはこのような抗酸化作用のほかに生体内の電子伝達系における電子供与体としての機能があり，また，ある種の酵素反応のコファクターとして作用することも知られている。

高等植物のLアスコルビン酸含量は，同一植物体においても生育段階や部位の違いにより大きく変動する。このことは抗酸化作用をはじめとするLアスコルビン酸の生理機能が植物の生育過程と深く関わっていることを示している。一般に，Lアスコルビン酸は高等植物の種子には検出されないが，発芽すると幼根や子葉で急速に生成される。さらに多くの葉緑体を持ち，光合成を司る本葉が発達する段階になると，本葉では光合成反応に伴い

大量に生成される O<sub>2</sub>から活性酸素が生じる。そこで、この活性酸素の除去のために L アスコルビン酸は重要な役割を担うことになる。葉緑体では活性酸素は最終的に L アスコルビン酸を特異基質とする酵素、アスコルビン酸ペルオキシダーゼによって分解・消去されるからである。このことから植物細胞における L アスコルビン酸含量の増減は、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性に直接的な影響を及ぼすと考えられている。

著者はこれまでに高等植物の生育過程におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの発現について、また、環境条件（光強度、温度）の変化とアスコルビン酸ペルオキシダーゼの発現との関係について、酵素化学的に、あるいは遺伝子レベルで研究を行ってきた。その中で、一般に幼葉の段階では L アスコルビン酸含量は高く、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ反応も活発であるが、十分に生育した本葉（成熟葉）では、L 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はともに幼葉より低下することを報告した（森村ら、1984、Morimura et al., 1999、森村ら、2002）。しかし、パセリでは本葉が十分成熟した段階においても、他の一般的な草本性食用植物に比べ、きわめて高い L アスコルビン酸含量を維持した。そこで本稿では、パセリ成熟葉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定し、結果をアスコルビン酸ペルオキシダーゼと同様に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を分解する酵素である、基質非特異性ペルオキシダーゼ（以下ペルオキシダーゼと略す）およびカタラーゼの活性と比較することにより、パセリ成熟葉の活性酸素消去系における L 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の生理的役割について検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

実験材料としてパセリ (*Petroselinum crispum*) を用いた。パセリ種子（モモセ種苗より導入）を 4 月上旬に恵泉女学園伊勢原キャンパス圃場に点播し、栽培を開始した。6 月下旬以降は高温、強光を避けるために寒冷紗で被覆しながら育苗を継続したところ、7 月上旬には十分な生育状態に達した

ので1個体ごとに丁寧に採取し、実験材料とした。

## 2. L アスコルビン酸含量の測定

L 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。還元型アスコルビン酸(アスコルビン酸)、酸化型アスコルビン酸(デヒドロアスコルビン酸)についても同様の方法を用いた。採取したパセリを水洗し、水分を拭き取った後、生育のよい個体から、若い成熟葉を集め、試料とした。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碎し、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させ、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1g(生重量)あたりのmg数として表した。

## 3. 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。ダイコン根を上記の緩衝液とともに乳鉢中で磨碎し、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℃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、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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>および粗酵素液を混合し、全量を2mlとして行った。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加え反応を開始した後、5~15秒間の290nm(2.8mM<sup>-1</sup>・cm<sup>-1</sup>)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  $\mu\text{mol}$  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

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、50 mM リン酸緩衝液 (pH4.5), 10mM グアヤコール, 0.1mM EDTA, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ を混合し、全量を 2 ml とした。反応は  $\text{H}_2\text{O}_2$ を加えて開始し、20~30 秒間の470nm ( $26.6\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) における吸光度の増加速度を求めた。酵素活性は 1 分間に増加するテトラグアヤコール (グアヤコール酸化物) の  $\mu\text{mol}$  数として表した (Nakano et al.,1981)。ペルオキシダーゼは、アスコルビン酸の存在下では酸化還元反応が妨げられる。そのために粗酵素液は酵素活性の測定に先立ち、アスコルビン酸ナトリウムを除いた20mM リン酸緩衝液 (pH7.8, 5%ソルビトール, 3 mMメルカプトエタノール, 1 mM EDTA を含む) を用いて一晩、透析した。

#### 6. カタラーゼ活性の測定

カタラーゼ活性は、10mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ を含む50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に粗酵素液を加え (全量 2 ml), 反応を開始した後、240nm ( $0.04\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) における吸光度の減少速度から求めた。酵素活性は 1 分間に減少する  $\text{H}_2\text{O}_2$ の  $\mu\text{mol}$  数として表した (Lück et al.,1965)。カタラーゼもペルオキシダーゼと同様にアスコルビン酸の存在により活性が妨げられることが知られている (Orr, 1967)。そのために粗酵素液はあらかじめ、前述のとおり、アスコルビン酸ナトリウムを除いた20mM リン酸緩衝液 (pH7.8, 5%ソルビトール, 3 mMメルカプトエタノール, 1 mM EDTA を含む) を用いて一晩、透析した。

#### 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。

## 結 果

前述の方法により播種，栽培したパセリ苗のうち，生育状態のよい個体を選び，成熟葉のL アスコルビン酸含量を測定し，同時に測定した他の数種の草本性食用植物の成熟葉あるいは果実のL アスコルビン酸含量と比較した。パセリ以外の植物は，それぞれの栽培適期を考慮しながらパセリに準じた方法で伊勢原キャンパス圃場で栽培・採取し，試料とした。

表1に示すとおり，パセリ成熟葉のL アスコルビン酸含量は，他の草本性食用植物の成熟葉あるいは果実における値より明らかに高く，成熟葉では最大約5倍，果実では約19倍に達した。L アスコルビン酸は生体内の酸素毒性に対する防御系においてそれ自身が還元型（アスコルビン酸）または酸化型（デヒドロアスコルビン酸）への転換を繰り返しながら，全体として効果的な防御システムを作り上げている。しかし，通常，草本植物では特別な酸化状態にある場合を除いて，L アスコルビン酸の多くは還元型として存在している。パセリ成熟葉のL アスコルビン酸について，還元型および酸

表1．食用植物のL アスコルビン酸含量

植物種	L アスコルビン酸 (mg · g fr wt <sup>-1</sup> )		
	総量	アスコルビン酸	デヒドロアスコルビン酸
パセリ(葉) <i>Petroselinum crispum</i> , leaf	3.61	2.98	0.63
ピーマン(葉) <i>Capsicum annuum</i> , leaf	2.76	2.54	0.22
ダイコン(葉) <i>Raphanus sativus</i> , leaf	2.35	2.12	0.23
モロヘイヤ(葉) <i>Corchorus olitorius</i> , leaf	1.48	1.15	0.33
コマツナ(葉) <i>Brassica campestris</i> , leaf	0.72	0.69	0.03
ピーマン(果実) <i>Capsicum annuum</i> , fruit	0.87	0.70	0.17
キュウリ(果実) <i>Cucumis sativus</i> , fruit	0.19	0.10	0.09

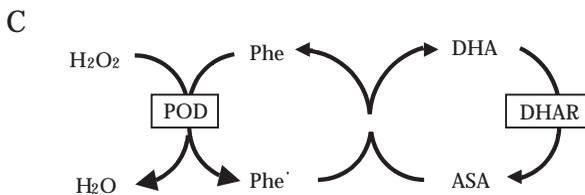
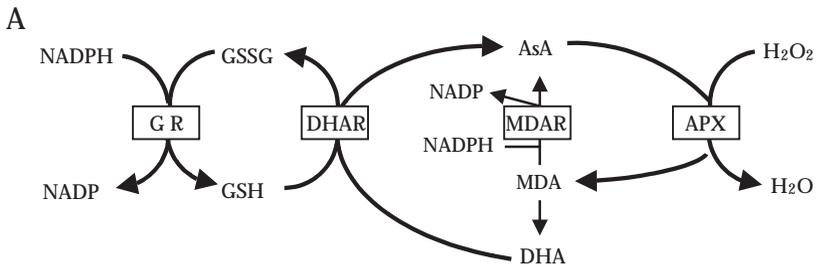


図 1 . 高等植物における  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解・解毒経路

**A** : アスコルビン酸ペルオキシダーゼが関与する  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解経路 (ascorbate–glutathione redox chain)

**B** : カタラーゼによる  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解反応 **C** : ペルオキシダーゼが関与すると考えられる  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解経路

APX : ascorbate peroxidase, GR : glutathione reductase, DHAR : dehydroascorbate reductase, MDAR : monodehydroascorbate reductase, AsA : ascorbic acid, DHA : dehydroascorbic acid, MDA : monodehydroascorbic acid, CAT : catalase, POD : peroxidase, Phe : phenylpropanoid compounds, Phe· : phenylpropanoid radical

化型の含量を測定した結果，80%以上が還元型であり，パセリ葉も一般の草本と同様の傾向を示すことがわかった。

パセリ成熟葉に見られる高いL アスコルビン酸含量が，L アスコルビン酸を特異基質とする H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解酵素，アスコルビン酸ペルオキシダーゼの活性に反映されるか否かを知る目的で，前述の方法によりこの酵素の活性を測定した。結果は表 2 に示すとおり，パセリ成熟葉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性はダイコン成熟葉，コマツナ成熟葉における値と比べ，著しく高く，倍率はそれぞれ，約 3 倍，約 7 倍であった。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼは，植物細胞の活性酸素消去酵素系において中心的な役割を果たすと考えられている。しかし，植物細胞にはカタラーゼおよびペルオキシダーゼが存在し，これらもそれぞれ異なる反応形式で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の分解・解毒作用に関与している。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ，カタラーゼおよびペルオキシダーゼによる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解の作用機作は，概ね図 1 のように考えられている。

パセリ，ダイコン，コマツナの成熟葉についてカタラーゼ，ペルオキシダーゼの活性を測定し，アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性と比較した。一般に，十分に成熟した本葉では光合成活性の上昇に伴い，カタラーゼ活性が上昇すると考えられているが，実験の結果からコマツナ葉ではこの傾向が顕著に示された（表 2）。また，ペルオキシダーゼは若い細胞をもつ幼葉では一般に，活性がきわめて低く，葉の成熟あるいは老化に伴い，次第に上昇することが知られている。ダイコン幼葉ではペルオキシダーゼ活性は2.0以下であったが（Morimura et al. 1999），成熟葉では幼葉における値の 4 倍を上まわった（表 2）。

表 2 . H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消去酵素の活性

植物種	アスコルビン酸 -	カタラーゼ	ペルオキシダーゼ
	ペルオキシダーゼ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgprot}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgprot}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgprot}^{-1}$ )
パセリ (葉)	2.99	4.13	0.01
ダイコン(葉)	0.93	0.34	8.77
コマツナ(葉)	0.43	55.30	0.04

一方、パセリ成熟葉では前述のとおり、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性がダイコンおよびコマツナの成熟葉の場合と比べきわめて高値であるのに対して、カタラーゼ活性はコマツナ成熟葉と比較して明らかに低く、また、ペルオキシダーゼ活性はダイコン成熟葉に比べ、著しく低い値を示した(表2)。コマツナとダイコンにおいてそれぞれのカタラーゼ活性およびペルオキシダーゼ活性に大きな差異が見られるのは、種間の成熟・老化速度の違いによるものと思われる。

これらのことから、パセリの成熟葉では $H_2O_2$ の分解・解毒に対してアスコルビン酸ペルオキシダーゼが重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 考 察

光合成を行う緑色植物の細胞内の酸素濃度は、動物細胞に比べてはるかに高い(250 $\mu$ M以上)。このような高濃度の酸素は細胞内で生体にとって有害な活性酸素分子種( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ )を生成し、DNAおよびタンパク質の特異的部位の損傷、酵素の酸化失活などをもたらすことが知られている。また、植物は動物と異なり、生息する場所を移動することができない。そのためにさまざまな環境ストレス(高温, 強光, 乾燥, 大気汚染など)を受けることになり、これが生体内の活性酸素を増加させる原因となることもある。そこで植物はこのような酸素毒性に対する防御機構として細胞内に多くの抗酸化物質(L-アスコルビン酸, グルタチオン, トコフェロール, フラボノイド, カロテノイドなど)および抗酸化酵素(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)を配し、それらは相互に関わり合って複雑な抗酸化酵素系を作り上げている。言いかえれば、緑色植物を含むすべての好気性生物は、酸素障害から身を守るために進化の過程で獲得した抗酸化機構を十分に働かせながら、一方で呼吸のために酸素を利用し生命を維持していることになる。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼは植物細胞において抗酸化機構を構成する重要な酵素の一つである。この酵素は植物細胞に広く存在する、基質特異

性の低いペルオキシダーゼと異なり，L アスコルビン酸を特異基質とし，アスコルビン酸の存在下でのみ安定化するヘムタンパク質である。高等植物ではアスコルビン酸ペルオキシダーゼには5種類のアイソザイムが存在することが現在までに明らかにされている。それらは細胞内局在性の違いからそれぞれ葉緑体チラコイド膜結合型，葉緑体ストロマ型，細胞質型，ミクロソーム膜結合型およびミトコンドリア型と名づけられている。これらのアスコルビン酸ペルオキシダーゼは，それぞれが存在するオルガネラまたは細胞内の特定の場において独自の酸化還元系（ascorbate- glutathione redox chain）を通して継続的に抗酸化作用を行っている。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との反応の結果，酸化されたL アスコルビン酸はモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ（MDAR）およびアスコルビン酸レダクターゼ（DHAR）により再還元され，再び生成されたL アスコルビン酸を基質として用いることにより抗酸化反応は継続して行われると考えられている（図1A）。

著者らはこれまでにダイコンの根からアスコルビン酸ペルオキシダーゼを抽出・精製し，この酵素の諸性質からこれを細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼと定義づけた（Moeimura et al., 1996, Ohya et al., 1997）。この酵素の活性はダイコンの発芽過程の根において一時的に急速な上昇を示し，活性値は照射によりさらに上昇した（Morimura et al., 1999）。この時，L アスコルビン酸ペルオキシダーゼは発芽直後の根の先端部にある，細胞分裂の盛んな組織，すなわち頂端分裂組織にとくに高い濃度で存在することが明らかにされた（森村，2004）。L アスコルビン酸ペルオキシダーゼによる活性酸素の消去・解毒の意義は当初，光合成の結果，大量に生成されるO<sub>2</sub>の処理のための反応経路として注目されたが，その後，根のような非光合成器官においても細胞分裂の盛んな組織では，活性酸素分解酵素の活性が高まることが知られるようになった。細胞分裂が活発に繰り返される組織ではエネルギーの供給のために呼吸活性が上昇するが，これに伴い大量の酸素が集められ，その一部から活性酸素が生成されるためにこのような活性酸素の分解が必要になると考えられている。

パンジー開花過程の花弁には，ダイコン根に存在する細胞質型アスコルビ

ン酸ペルオキシダーゼと同質の酵素が存在することが、抗体を用いた免疫化学的方法により明らかにされた(森村 et al., 1998)。この酵素の活性はパンジー開花過程の前半期である、蕾の段階では高い値を維持したが、花卉が完全に開くと直ちに低下した(森村, 2001)。このことから、開花前の細胞分裂が盛んな花卉では、アスコルビン酸ペルオキシダーゼによる抗酸化反応が活発に行われ、花冠全体を酸素毒性から守るしくみが十分に作用していることが推察された。

これらの結果は、いずれも高等植物の生育過程において植物体が不可避に晒される酸素毒性から身を守る機能、言い換えれば、生物が本来、固有のものとして備えている抵抗性(環境耐性)を明らかにしたものである。

一方、高等植物のL アスコルビン酸含量が、植物種により大きく異なることは古くから知られているが、その生理的意味についてはほとんど報告されていない。また、アスコルビン酸ペルオキシダーゼが発見され(Kelly et al., 1979)、それに続いてこの酵素の特性や植物細胞における生理的意義が指摘されて以来(Asada et al., 1981)、L アスコルビン酸含量とアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性との関係についても関心がもたれるようになった。しかし、両者の関係について現在までに詳細な研究はなされていない。

本研究では通常、食用として利用される数種類の草本性植物について、L アスコルビン酸含量を測定した結果、パセリ成熟葉のL アスコルビン酸含量は他の食用植物の成熟葉と比べ、きわめて高い値を示した。そこでなぜパセリ成熟葉に高濃度のL アスコルビン酸が含まれるかを知る手がかりとして、パセリ成熟葉の抽出液について、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定し、その値をアスコルビン酸ペルオキシダーゼと同様に $H_2O_2$ を分解する酵素である、カタラーゼおよびペルオキシダーゼの活性値と比較した。

前述のとおり、植物の生育過程において、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は発芽、発根、開花、種子形成の際、細胞分裂が活発に行われる組織で急速に高まると考えられている。それに対して、生育の安定期にある成熟葉ではこの酵素活性は通常、比較的低い値を保ち、さらに葉の老化が進むと活性値は急速に低下する。一方、カタラーゼは光合成が盛んに行われる時期

に成熟葉において急速に活性が高まる。これは光合成により大量に生成された酸素に由来する  $H_2O_2$  が、おもにペルオキシソーム(ミクロボディの一種)に存在するカタラーゼにより分解・消去されることを示している。また、ペルオキシダーゼ活性は種子や若い葉にはほとんど認められないが、葉の老化が進むにつれて次第に上昇する。この酵素は葉のみならず、多くの植物の成熟した根、果実などにも広く分布し、アントシアニン、フラボン、カテキンなど多種のポリフェノール類を酸化する酵素として知られている。

実験の結果、パセリ成熟葉ではダイコン、コマツナの成熟葉と異なり、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性はきわめて高い値を示した(表2)。アスコルビン酸ペルオキシダーゼはLアスコルビン酸に対する基質特異性がきわめて高く、また、この酵素はLアスコルビン酸が存在しないところではわずか数時間のうちに失活した(morimura et al., 1996)。また、精製されたアスコルビン酸ペルオキシダーゼについて、Lアスコルビン酸に対する  $K_m$  値を調べたところ、きわめて小さい値(0.77mM)となり(Ohya et al., 1997)、このことからアスコルビン酸ペルオキシダーゼはLアスコルビン酸との親和性がきわめて高く、古くから知られている基質非特異性ペルオキシダーゼとは性質が大きく異なることがわかる。

さらに、Lアスコルビン酸はアスコルビン酸ペルオキシダーゼの基質として働くだけでなく、他のさまざまな電子伝達系、酸化還元反応にも関与している。したがって、アスコルビン酸ペルオキシダーゼが活発に作用するためには高濃度のLアスコルビン酸の蓄えが必要となるはずである。パセリ成熟葉にはLアスコルビン酸が他の一般的な草本性食用植物の成熟葉よりはるかに高い濃度で含まれているが(表1)、これらのことからパセリ成熟葉における高いアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性値は、高濃度のLアスコルビン酸含量に基づくものであることが推察される。

コマツナ、ダイコンの成熟葉ではパセリ成熟葉に比べ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が低く、それに対してカタラーゼ活性あるいはペルオキシダーゼ活性が高い。このことは成熟葉における  $H_2O_2$  分解機構が植物種により異なることを示している。

しかし、これらの異なる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解機構に対して L アスコルビン酸含量が制限要因となるかどうかは現在のところ、まだ、明らかではない。さまざまな植物種がそれぞれのライフサイクルの全般に亘って、生体内に不可避に生じる有害な活性酸素をどのように分解・解毒し、生体の抵抗性を高めているかを知るためには、さらに詳細な研究が必要であろう。

近年、生命に関する科学技術の発達はめざましく、その技術は自然界の生命現象をより詳細に解き明かすことに用いられるばかりでなく、人間社会の目的に合わせて遺伝子を改変する生命操作にまで及んでいる。その一つとして活性酸素の分解を制御するために活性酸素消去系酵素の遺伝子を植物に導入し、形質転換植物を創出する試みも盛んに行われている。自然界における環境変化あるいは人為的な環境破壊への対策が急務とされ、自然環境の保全や破壊環境の修復への新たな技術の開発が求められている現在ではあるが、遺伝子改変に見られるように自然環境の構成員である生物を根本から作りかえることには、期待とともに重大な問題が潜んでいるはずである。従って、そこでは生態系やそこに存在する生命のあり方について改めて根源的な問いかけがなされていると言えるのではないだろうか。このような状況を考えたとき、生物が進化の過程で自ら獲得した、生体にとって不可欠な機能である「環境耐性」を、生物本来の抵抗性としてとらえ、その仕組みの詳細を知ることが、単に生命現象の解明のためのみならず、現在直面している多くの環境問題を考える上でもきわめて意義深いと思われる。

#### 引用文献

Kelly, G. J. and E. Latzko. 1979. Soluble ascorbate peroxidase—Detection in plants and use in vitamin C estimation—. *Naturwissenschaften* 66 : 617–618.

Lück, H. 1965. Catalase. In H-U Bergmeyer (ed). *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York. pp.885–894.

森村洋子, 相見霊三. 1984. コマツナ葉ディスクの L アスコルビン酸含量およびペルオキシダーゼ活性に及ぼす光の影響. *生物環境調節* 22 : 57

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.

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弁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 .

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. 2001. パンジー花弁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 .

森村洋子, 木之下友海. 2002. 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. 恵泉女学園短期大学研究紀要 33 : 19 - 24 .

森村洋子. 2004. 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. 恵泉女学園園芸短期大学研究紀要 36 : 51 - 58 .

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.

Orr, C. W. M. 1967. Studies on ascorbic acid. . Factors influencing the ascorbate-mediated inhibition of catalase. *Biochemistry* 6 : 2995-2999.

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.