

環境ストレス下における パンジー花のアスコルビン酸ペルオキシダーゼの役割

森村 洋子

Response of Ascorbate Peroxidase in Stressed Pansy Flowers

Yoko MORIMURA

An activity of ascorbate peroxidase, which is an antioxidative enzyme in pansy petals increased markedly under the condition of high temperature (25°C) and the enzyme activity attained 3-fold higher level at 6 days after the treatment of high temperature. This was followed by a steep decrease in the enzyme activity at 9 days after the treatment. However, the flowers of pansy at 6 days after the treatment of high temperature were apparently small and few with a little withering, compared with those at 3 days after the treatment.

From these results, the ascorbate peroxidase may be used as a marker enzyme of evaluation of environment in pansy flowers stressed by higher temperature in the natural environment where the plant grows.

緒 言

生息する場所を自ら変えることができない植物にとって、太陽光線、温度、水分などの通常は有用な環境要因が、時には有害なものとして作用することがある。また、さまざまな産業廃棄物による大気汚染、農薬散布、放射線照射などのような人為的な原因によって植物が悪影響を受けることもある。このような植物の生育を妨げる要因やそれらが作用した結果を「環境ストレス」と総称している。近年、温暖化の進行が憂慮されるようになり、それに伴って、植物の環境耐性に関する研究も盛んになっている。

強光、乾燥、紫外線、大気汚染物質などは、いずれも植物細胞内に反応性の高い酸素分子種である「活性酸素」を生成し、これにより生育が抑えられ、生産性の低下をもたらすことが知られている。

一方、植物体にはこのような原因によって細胞内に生じた活性酸素を分解・消去する抗酸化酵素系が存在し、環境ストレスから身を守るしくみが備えられている。活性酸素は植物が正常な生育状態にある時にもある程度生成されるため、抗酸化酵素系の存在は必須であるが、環境条件の悪化による活性酸素の生成が、抗酸化酵素による活性酸素の分解・消去の能力を上回った場合には環境ストレスが重大な問題となってくる。

著者は、植物体の抗酸化酵素系において重要な役割を果たすアスコルビン酸ペルオキシダーゼの酵素学的特性および反応メカニズムについて研究を行ってきた (Morimura et al., 1996, Ohya et al., 1997, Morimura et al., 1999)。とくに、最近、パンジーの開花過程におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの動向を酵素学および免疫学的方法により調べ、この抗酸化酵素が開花過程で果たす役割について報告した (森村ら, 1998, 森村, 2001)。また、温暖化がパンジー花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性に顕著な変化をもたらすことを明らかにした (森村, 2002)。

本稿では開花したパンジーを高温 (25°C) に晒すことにより環境ストレスを与え、その際の花弁のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の変動と花の外観との関係について調べたので、その結果を報告し、環境ストレス下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考察する。

材料および方法

1. 実験材料

本学園芸生活学科農場において栽培した白色パンジー (*Viola wittrockiana* cv. New crystal white) を実験材料として用いた。9月上旬に播種、10月下旬に定植したパンジー苗は3月中旬に草丈約15cm

に生長し、開花期を迎えた。

2. 試料の調製

前述の方法で栽培したパンジー苗の中から生育のよいもの10個体を選び、1個体ずつポットに移植した後、人工気象器（18℃、11000 lux、光源として白色蛍光ランプ NEC FLSEX-NHG 使用）内でさらに3日間栽培を続けた。その間、1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漑を行った。次にあらかじめ、25℃、11000 luxに条件を設定した人工気象器内にパンジー苗を移し、さらに11日間栽培した。この間、灌漑は上記のとおり行った。25℃の高温条件で栽培しながら、0、3、6、9、11日目にパンジー苗から、開花直後の花5個ずつを採取した。採取後ただちに水洗し、水分を拭き取り、花卉のみをていねいに集めた。栽培日数ごとに花卉の生重量を測定し、その後、液体窒素で凍結処理し、使用時まで-80℃で保存した。

3. アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の測定

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。パンジー花卉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分間遠心分離した。遠心分離後、上清を集め、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。

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290 nm（2.8 mM⁻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μ mol数として表した（Nakano et al., 1981）。

4. 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

酵素活性の測定に先立ち、25℃の高温条件下で11日間生育したパンジー苗の花弁の生重量の変化を調べ、結果をFig. 1に表した。パンジー花弁の生重量は、高温処理の開始時から3日目までは大きな変化を示さなかったが、その後9日目まで徐々に減少し、11日目には処理前の約30%にまで低下した。高温処理に伴う花弁の生重量の減少は、外見上からも確認することができた。25℃の高温条件下に置かれたパンジー苗を10℃で栽培した苗と比較すると、3日目まではほとんど差がなく、1個体に付く花数もそれぞれ10個であった（Fig. 2A, B）。しかし、6日目、9日目になると、25℃では10℃の場合に比べ、花が小さくなり、花数も6～7個に減少した。さらに、花にわずかな萎れが認められた（Fig. 2C, D）。

11日目には25℃では花数が3個となり、花の萎れも一層進んだ（Fig. 2E）。10℃では、高温処理開始から11日目まで、花の大きさ、花数ともにほとんど変化はなく、良好な生育状態を示した。

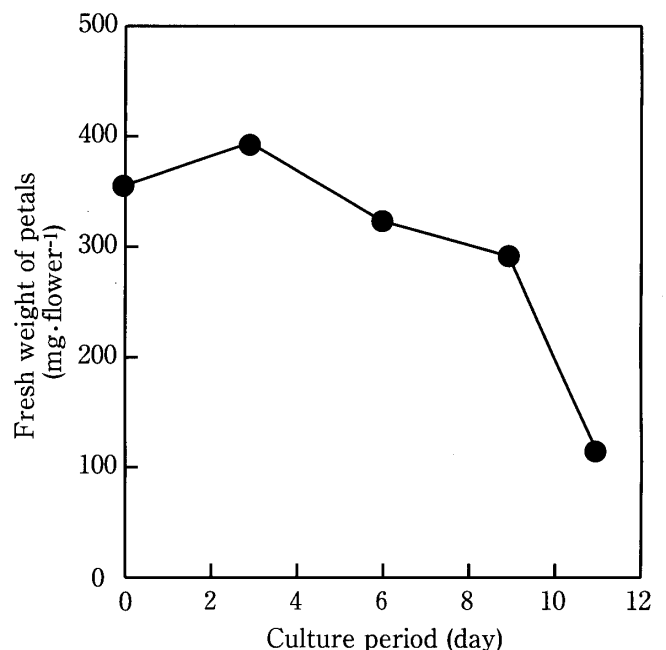


Fig.1 Effect of high-temperature treatment on fresh weight of pansy petals.

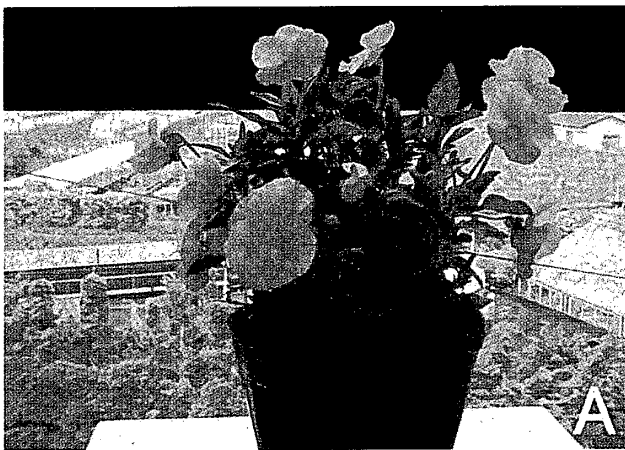


Fig.2 Effect of high-temperature treatment on pansy flowers.

Plants (left) were grown on soil under 11000 lux at 25°C and plants (right) were grown under 11000 lux at 10°C. Plants from A to E were cultivated for 0, 3, 6, 9, 11 days under the conditions described above. (A: 0day, B: 3day, C: 6day, D: 9day, E: 11day)

花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、Fig.3に示すように、高温処理開始時(0日目)から6日目まではほぼ直線的に上昇し、その値は処理前の約3倍となった。しかし、9日目には酵素活性は再び、処理前のレベルにまで急速に低下し、11日目にはさらに低い値を示した。

花卉のタンパク質含量は、高温処理後6日目に処理前の約60%に低下したが、その後11日目までほとんど変化することなく、その値を維持した(Fig.4)。

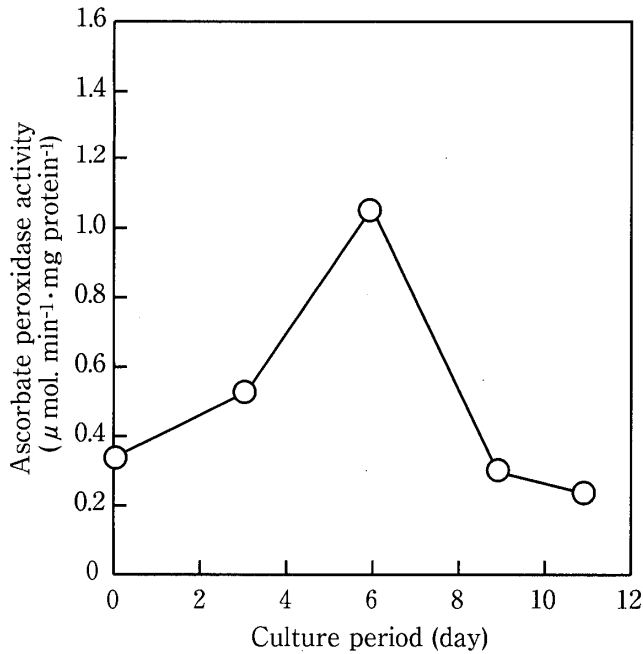


Fig.3 Effect of high-temperature treatment on activity of ascorbate peroxidase of pansy petals.

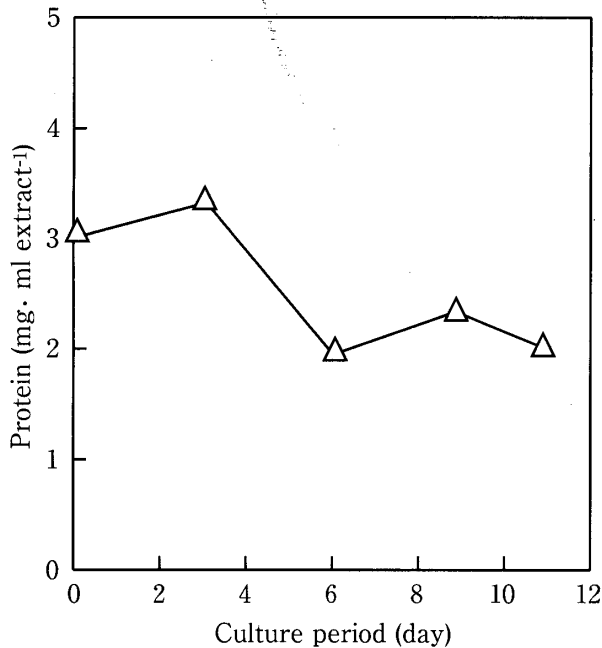


Fig.4 Effect of high-temperature treatment on protein content of pansy petals.

考 察

あらゆる生物は生物同士あるいは生物と環境との間で互いに関わり合い、バランスをとりながら生息している。従って、個々の生物がさまざまなストレスに耐えるために体内に備えている「抵抗力」は、生物の生存に対する基本的な能力として重要な意味をもつと考えられる。

植物における抵抗力、言い換えれば環境ストレス

耐性能についての研究は、生長、成熟に代表される生産性と直結した生理化学的研究に比べると、最近まで関心が寄せられることが少なく、そのためにかなり遅れて開始された。しかし、1970年代以降、公害ガス、温暖化現象、オゾン層破壊による紫外線の影響など、さまざまな環境問題が表出し、植物が持つ環境ストレス耐性に関する研究も盛んに行われるようになった。

ストレスを受けた植物の細胞内では、多くの場合、活性酸素 (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2) が生成され、この反応性の高い活性酸素の作用により、植物細胞はDNAの損傷や酵素をはじめとするタンパク質類や生体膜の酸化などのダメージを受ける。そのために細胞内にはあらかじめ、このような生存に関わる重大な変化を避けるための生体防御系が備えられている。これが「抗酸化酵素系」と呼ばれるものである。とくに、植物は動物と異なり、生息する場所を移動して環境を変えることができない。従って、植物においては、抗酸化酵素系による生体防御機構の果たす役割は一層大きいと言える。一般に、植物細胞が動物細胞に比べて高い濃度のカロテノイド、L-アスコルビン酸 (ビタミンC)、 α -トコフェロール (ビタミンE) を蓄えているのはそのためであると考えられている。

近年、自然環境の破壊がさまざまな面から伝えられ、植物の環境ストレス耐性のしくみを解明しようとする研究が進められるようになった。その中で、抗酸化酵素系による反応の詳細も次第に明らかにされつつある。また、最近、生物体内の物質変化を遺伝子レベルで追跡し、確認する方法が一般化し、その結果に基づいて植物細胞に特定の遺伝子を導入する技術も急速に発達しつつあり、その手法を用いて、植物の環境ストレス耐性を強めた“トランスジェニック植物”の作出が試みられるようになった。たとえば、これまでに乾燥、強光、パラコート (活性酸素を生じることにより殺草する農薬) に対して耐性を示す植物の作出が報告されている (重岡ら, 1999, Miyagawa et al., 2000, Murakami et al., 2000)。しかし、現在のところ、まだ、このような環境ストレス耐性を獲得したトランスジェニック植物を実用化段階で使用するまでには至っていない。

著者は、実験材料である植物を農場で栽培し、生育状態を日常的に観察しながら、抗酸化酵素の反応メカニズムや抗酸化酵素系による環境ストレス耐性を明らかにする研究を行ってきた (Morimura et al., 1996, Ohya et al., 1997, Morimura et al., 1999, 森村, 2002)。その中で、抽出粗酵素、あるいは精製

酵素による生体反応では顕著な抗酸化作用が認められるにもかかわらず、実際に生育している植物の花や葉には萎縮の兆しが見られ、植物全体の生育状況からは必ずしも環境耐性を示しているとは思われない場合に遭遇してきた。また、一般に高温、強光などの環境条件のわずかな変化に対して、植物組織内の抗酸化酵素活性が急速に変動することが知られている。これらのことから、抗酸化酵素は、環境ストレスの発生に敏速に対応して活性を高めたり、反対に低下させたりする一方で、環境耐性を持続させることに対しては必ずしも十分に有効であるように思われなかった。

そこで、環境悪化時における抗酸化酵素活性の変動を詳細に知る目的で、生育中のパンジー苗に高温ストレスを与え、花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の消長と開花直後の花の外観との関係を経時的に調べた。実験に先立ち、農場で開花時期まで生育させたパンジー苗を一旦、実験室内に移し、18℃で3日間栽培した後、適温(10~15℃)より高い温度(25℃)で花蕾を開花させ、採取した花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性を測定した。同時に高温下で開花した花の外観を観察した。その結果、パンジー花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、25℃に置かれると急速に上昇しはじめ、6日目にピークに達した。しかし、9日目になると、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は急速に低下し、11日目ではさらに低い活性を示した(Fig.3)。一方、10℃に置かれたパンジー花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、実験開始時から11日目までほとんど変化することなく、低い値を維持した(森村, 2002)。

外見上、25℃の高温下に置かれたパンジーの花には3日目まで顕著な変化が認められなかったが、6日目になると花全体がわずかに萎縮しはじめ、その後、花の大きさ、1個体あたりの花数を著しく減じた(Fig.2 C, D, E)。

このような結果から、抗酸化酵素活性の上昇をただちにパンジーの花の生育に対する環境耐性の現れと結論づけることは困難であり、むしろ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性がピークに達した後、急速に低下した結果から、この抗酸化酵素は環境悪化を早期に知らせる指標酵素として用いることが望ましいと思われた。抗酸化酵素の環境耐性能を的確に知るためには、遺伝子導入を行った植物の場合にもかなり長期間の生育状態を追跡することが必要であろう。

地球的規模での環境悪化が懸念される中で、植物

の環境耐性能を期待した研究が盛んになっているが、しかしまた、一方ではこのような生態系を変える恐れのある人為的操作が、遺伝子導入という技術開発の勢いに乗って進められることへの疑問が生じていることも事実である。自然環境の保全が重要視される中で、人間の生活を支えるための自然環境の改変が行われるという矛盾に対して、私達は冷静な判断と的確な選択を自らに課していかなくてはならないであろう。自然界における生物の生存について“原点に立ち返って考えることの厳しさ”を受け入れなくてはならない時期を迎えているのかもしれない。

本研究を行うにあたり、パンジーの播種、育苗にご協力いただきました本学の村上陸朗教授に感謝申し上げます。また、実験にご協力下さいました卒業生上田麻子さん、小松宏美さんに御礼申し上げます。

摘 要

環境ストレスがパンジーの開花に及ぼす影響を、抗酸化酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの活性と花の外観から調べた。花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、25℃の高温下では6日目まで上昇し続け、その後、急速に低下した。25℃で生育したパンジーは6日目に花の大きさおよび1個体あたりの花数を減じ始め、11日目にはさらにその傾向が顕著に現れた。また、6日目以降花卉に萎れを生じた。

一方、10℃では11日目までアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性、花の大きさ、花数に変化はなく、正常な生育状態を示した。

これらのことから、温暖化はパンジーの開花に著しい悪影響を及ぼすが、この変化は花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の上昇から比較的早い段階で知ることができる。従って、アスコルビン酸ペルオキシダーゼは温暖化の開花への影響を表す指標酵素となり得ると思われる。

引用文献

- Miyagawa, Y., M. Tamoi and S. Shigeoka. 2000. Evaluation of the defence system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 41: 311-320.
- 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.
- 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.
- Murakami, Y., M. Tsuyama, Y. Kobayashi, H. Kodama and K. Iba. 2000. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science* 287 : 476-479.
- 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.
- 重岡成・田茂井政宏・宮川佳子. 1999. 光・酸素毒耐性植物のエンジニアリング. 蛋白質 核酸 酵素 44 : 2246-2252.