

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

森村洋子・村上睦朗・秋田まりな・引田美和

Changes in Activities of Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzymes in Pansy Petals during Anthesis

Yoko MORIMURA, Mutsuo MURAKAMI, Marina AKITA, Miwa HIKITA

Summary

Changes in activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes, ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11), catalase (EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7) were studied in pansy (*Viola wittrockiana*) petals during anthesis. The activity of ascorbate peroxidase increased gradually during development of buds and peaked when buds were in full expansion stage just prior to the start of flowering. The enzyme activity decreased rapidly thereafter. No activity of catalase was detected and the activity of guaiacol peroxidase was extremely low in petals during anthesis.

Extracts of pansy petals reacted to antibody raised against cytosolic ascorbate peroxidase from Japanese radish roots.

These results suggest that ascorbate peroxidase has an important role in scavenging hydrogen peroxide and protecting cell constituents against oxidative damage in petals of pansy during anthesis.

緒言

緑色植物は光合成により酸素を生じるため、一般に細胞内の酸素濃度は動物細胞に比べてはるかに高い(250 μ M以上)。また、光合成に加えて乾燥、高温、低温、強光、大気汚染などの環境条件の変化も植物細胞内の酸素濃度を高める原因となる。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を生成し、DNAおよびタンパク質の特異的部位の損傷をもたらすことが知られている。一方、植物細胞内には多くの抗酸化物質(アスコルビン酸、グルタチオン、カロチノイド、 α -トコフェロール、フラボノイドなど)や抗酸化酵素(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)が存在し、それらは互いに関わり合って複雑な抗酸化機構を作り上げている。このため緑色植物を含む好気性生物は、酸素障害を防ぐ抗酸化機構の獲得とともに進化してきたと考えられている(浅田, 1980)。抗酸化機構を構成する重要な酵素の一つであるアスコルビン酸ペルオキシダーゼは、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安定化するヘムタンパク質である。この酵素には細胞内局在性の違いから4種類のアイソザイム(葉緑体チラコイド膜結合型、葉緑体ストロマ型、細胞質型、グリオキシソーム膜結合型)が存在することが現在までに明らかにされている。しかし、それらのアイソザイムの生理機能の全容はまだ十分に解明さ

れていない。

著者らは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、その諸性質を調べた(Morimura et al., 1996, Ohya et al., 1997)。本稿では、パンジーの花弁に、ダイコン根に見られる細胞質型のアスコルビン酸ペルオキシダーゼが存在し、この酵素の活性はパンジーの開花過程で変動することが明らかになったので報告し、その生理的意義について考察する。

材料および方法

1. 実験材料

材料として白色パンジー (*Viola wittrockiana*, ニュークリスタルホワイト, サカタのタネより導入)を用いた。9月10日には種、1回移植後、10月下旬に畑に定植した。畑は予め、牛糞堆肥を200kg/a、化成肥料(15-15-15)を10kg/a施し、耕耘整地した。定植後、約5カ月を経て3月に開花期を迎えた。

2. アスコルビン酸含量の測定

アスコルビン酸含量は、還元型(ascorbate)、酸化型(dehydroascorbate)ともにヒドラジン比色法(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 \times g、10分間遠心分離した後、上清を試料液とした。試料液中のアスコルビン酸をジクロロル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と反応(50℃, 90分間)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.

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. 採取したパンジーの花弁のみを集め, 水洗し, 水分を拭きとった後, 乳鉢を用いて前述の緩衝液中で磨砕した. 得られたホモジネートを4層ガーゼで濾過し, 濾液を20,000×gで20分間遠心分離した後, 上清を集め粗酵素液(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 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($\epsilon_{290} = 2.8\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). 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(Nakano et al., 1981).

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 H₂O₂を混合し, 全量を2mlとした. 反応はH₂O₂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($\epsilon_{470} = 26.6\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). 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(Nakano et al., 1981). グアヤコールペルオキシダーゼはアスコルビン酸の存在下では反応が妨げられる. そのため粗酵素液は, 予め, アスコルビン酸を除いた20mMリン酸緩衝液(pH7.8, 5%ソルビトール, 3mMメルカプトエタノール, 1mM EDTAを含む)を用いて一晚透析を行った.

カタラーゼ活性は, 10mM H₂O₂を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に粗酵素液を加え(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($\epsilon_{240} = 0.04\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Lück et al., 1965). カタラーゼ活性もアスコルビン酸により妨げられることが知られている(Orr, 1967)の

で, 粗酵素液は反応に先立ち, 前述の20mMリン酸緩衝液を用いて一晚透析を行った.

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(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17mM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, 7.4mM Na₂HPO₄, 2.5mM NaH₂PO₄)中で40℃, 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0.74mM 3,3'-ジアミノベンジジンおよび0.88mM H₂O₂を含む15mMリン酸緩衝液(pH6.8)を用いた.

結 果

パンジーの花弁には, 比較的高い濃度(2mg/g生重量)のアスコルビン酸が含まれ, その値は一般に用いられる緑黄色野菜のアスコルビン酸含量を上まわる. 緑葉中では, アスコルビン酸含量の増加はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の上昇に基づく場合が多いと考えられている. そこで, パンジー花弁中にアスコルビン酸ペルオキシダーゼが存在するかどうかをイムノブロット法により調べた. パンジー花弁にアスコルビン酸ペルオキシダーゼが存在するとすれば, それは細胞内局在性の面から前述の4種類のアスコルビン酸ペルオキシダーゼのアイソザイムのうち, 細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼである可能性が高いと思われた. そこで, ダイコン根の細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼに由来する抗体(ポリクローナル抗体)をイムノブロットにおけるプローブとして用いた. 結果は図1に示すとおりである. パンジー花弁の抽出液は, ダイコン根のアスコルビン酸ペルオキシダーゼより得られた抗体に対して強く応答した. 白色花弁と紫色花弁とを比較すると, 白色花弁では紫色花弁に比

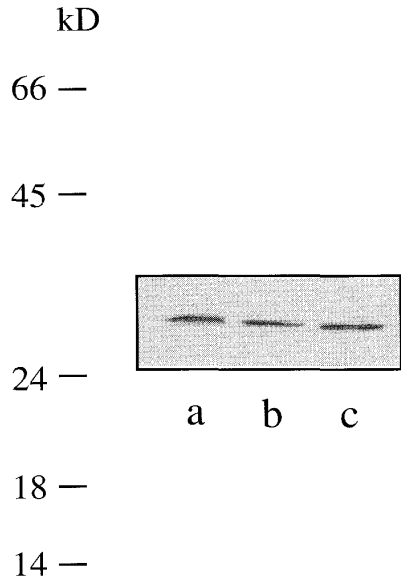
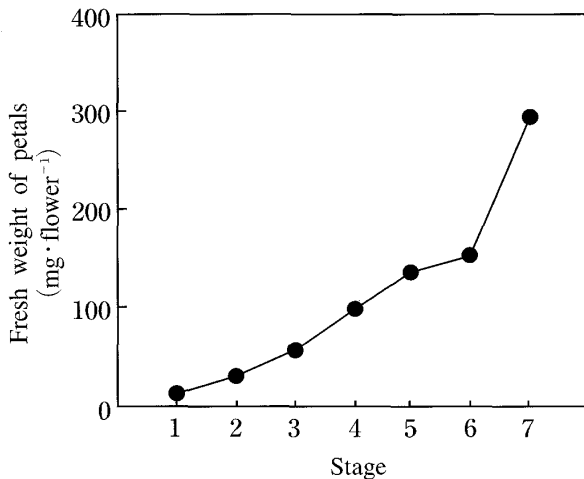


Fig.1 Immunoblot analysis of ascorbate peroxidase protein of pansy petals.
a. pansy petal (white) b. pansy petal (purple) c. Japanese radish root
15 μ g protein per lane was loaded onto SDS-PAGE gel. Immunodetection was performed using an antibody raised against ascorbate peroxidase purified from Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) roots.



Stage 1 2 3 4 5 6 7

Fig.2. Changes in fresh weight of pansy petals during anthesis.

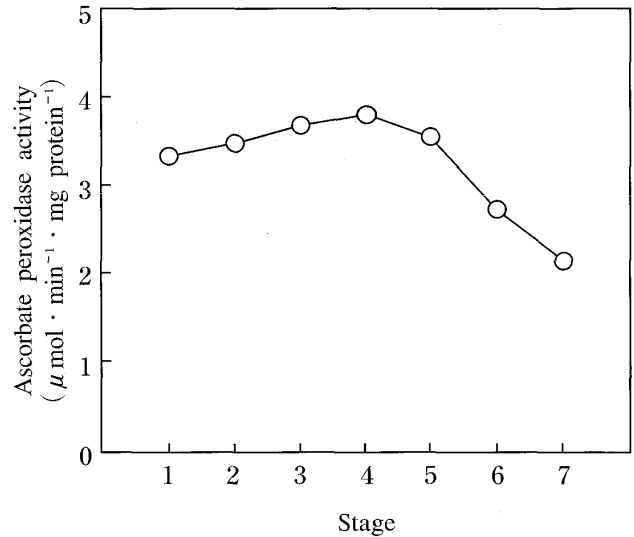


Fig.3 Changes in ascorbate peroxidase activity of pansy petals during anthesis.

べて強い応答が現れた。

そこで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活性の変動を調べることにした。採取したパンジー花弁は、花の発達に合わせて次に示すように7段階(ステージ1~7)に分類し、各段階ごとに生重量を測定した。結果は図2に示すとおりである。各段階における花弁の生重量は試料5~20個体の平均値である。

ステージ1 : 全体をがく片に包まれた未熟蕾

ステージ2 : がく片上端が広がり、先端がやや伸びた蕾

ステージ3 : 全体が膨らみはじめた蕾

ステージ4 : 花弁のねじれがほどけ、膨らみを増した蕾

ステージ5 : 外側2枚の花弁が開きはじめて蕾

ステージ6 : 完全開花直前の蕾

ステージ7 : 完全開花直後の花

次に、ステージ1~7の花弁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、結果を図3に表した。ステージ1~4までアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は緩やかに上昇し、花弁の展開直前にピークに達したが、開花とともに急速に低下した。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼの特異基質であるアスコルビン酸含量は、ステージ1から5まで徐々に増加し、開花時には低下しはじめたものの、全体としては大きな変動を示さなかった。酸化型ア

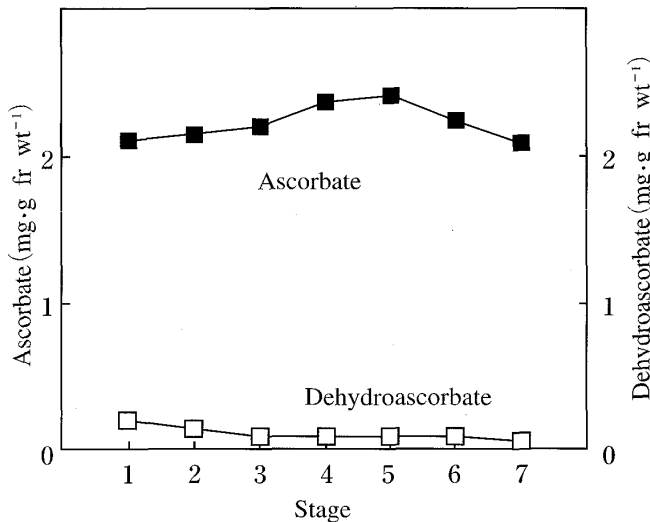


Fig.4 Changes in ascorbate and dehydroascorbate contents of pansy petals during anthesis.

スコルビン酸であるデヒドロアスコルビン酸は全アスコルビン酸含量の1~9%にすぎなかった(図4)。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼと同様に過酸化水素を分解、消去する酵素であるカタラーゼおよびグアヤコールペルオキシダーゼの活性を測定し、結果を図5に表した。一般に、細胞内の過酸化水素を分解する主要な酵素と考えられているカタラーゼの活性は、開花過程におけるパンジー花卉には認められなかった。また、グアヤコールペルオキシダーゼは、アスコルビン酸ペルオキシダーゼと異なり、人工基質であるグアヤコールを基質とする非特異的ペルオキシダーゼである。このグアヤコールペルオキシダーゼ活性は、パンジーの開花過程で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と同様に花卉の展開直前(ステージ4)にピークに達したが、その値はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の1%以下であった。アスコルビン酸オキシダーゼ活性はいずれのステージの試料にも認められなかった。

考 察

アスコルビン酸は一般に緑黄色野菜・果実類に多く含まれ、そのほとんどが還元型として存在している。アスコルビン酸の還元力に基づく生理機能は大まかに次のように分類される。

- 1) 抗酸化剤として酵素的および非酵素的に作用する。
- 2) 酵素反応での補欠分子族(Fe^{3+} , Cu^{2+} など)の還元状態を保持する。

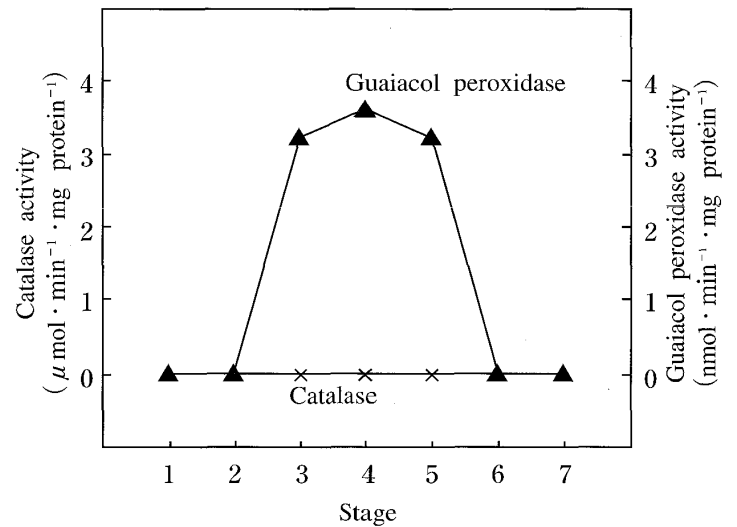


Fig.5. Changes in guaiacol peroxidase and catalase activities of pansy petals during anthesis.

- 3) 電子伝達系において電子供与体として作用する。

一方、酵素分子の光還元により生じるスーパーオキシドラジカル(O_2^-)は、葉緑体あるいはミトコンドリアで活性酵素の一種である H_2O_2 を生成し、さまざまな細胞障害(酵素の不活性化、色素の脱色、脂質の過酸化、タンパク質の分解など)を引き起こし、光合成の効率を低下させ、植物を死滅させる。細胞内におけるこのような H_2O_2 の生成は、乾燥、強光、大気汚染をはじめとするさまざまな環境ストレスの増大とあわせて、近年、とくに注目されている。生体内の H_2O_2 はカタラーゼ、グアヤコールペルオキシダーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼなどにより分解、消去され解毒されるが、これらの H_2O_2 分解酵素のうち、アスコルビン酸ペルオキシダーゼについては、基質に対する特異性が高く、また、アスコルビン酸が存在しないところでは急速に失活するなどの安定性の面から発見が遅れ、最近になってさまざまな研究成果が盛んに報告されるようになった。その結果、これまでに細胞内局在性の異なる4種類のアイソザイム(葉緑体チラコイド膜結合型、葉緑体ストロマ型、細胞質型、グリオキシソーム膜結合型)の存在が報告された。それらのアイソザイムの生理機能については、葉緑体に局在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼを除いて現在のところまだ十分には明らかにされていない。しかし、いずれのアイソザイムも発芽、発根、乾燥、 O_3 および SO_2 暴露などの植物の生理的変化および生育環境の変化が大きいときに活性が増大することから、これらのアイソザイムは生理的および環境的变化に

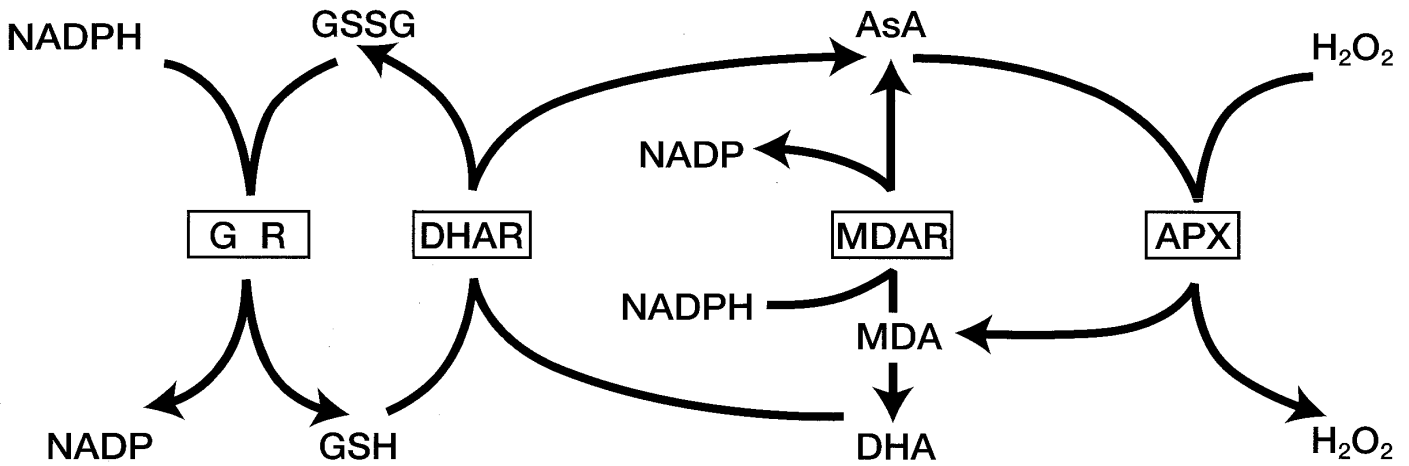


Fig.6 Possible functions of ascorbate peroxidase and ascorbate in hydrogen peroxide-scavenging enzyme system in higher plants. APX, ascorbate peroxidase; AsA, ascorbate; DHA, dehydroascorbate; MDA, monodehydroascorbate; DHAR, dehydroascorbate reductase; MDAR, monodehydroascorbate reductase; GR, glutathione reductase.

対応して生成される H_2O_2 を分解，消去するために細胞内に誘導されると考えられている。

パンジー開花過程において花卉の H_2O_2 分解酵素の変動を調べたところ，アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性はグアヤコールペルオキシダーゼ活性と比較してとくに高く，カタラーゼ活性およびアスコルビン酸オキシダーゼ活性は全く認められなかった。従って，開花過程のパンジー花卉では， H_2O_2 の分解は主としてアスコルビン酸ペルオキシダーゼによって行われ，開花前の花卉を活性酸素に基づく細胞傷害や病傷害から守っていると推察される。カーネーション切花の花卉では，老化が進み，花卉に「しおれ」や退色が認められる段階で H_2O_2 レベルの上昇とともにカタラーゼ活性の著しい上昇が見られ，このことからカタラーゼが H_2O_2 を分解し，解毒していることが示唆されている (Droillard et al., 1987)。パンジー花卉では開花の段階でカタラーゼ活性が認められないことから，器官としての花の発達の過程と老化の過程とでは，そこで生成される H_2O_2 の分解，消去のメカニズムが異なるものと思われる。アスコルビン酸ペルオキシダーゼとカタラーゼを比較すると， H_2O_2 に対する K_m 値は前者の方が後者に比べてはるかに低い。従って，低濃度の H_2O_2 はカタラーゼによって分解されにくいことも考えられる。現在，アスコルビン酸ペルオキシダーゼによる H_2O_2 消去の酵素系として図6に表す代謝経路が示されている。今後はこの経路を構成する諸酵素の活性を花卉の開花から老化にいたるまでの各発達段階ごとに調べるにより，開花過程におい

て花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼおよびアスコルビン酸が果たす役割が一層明確になるものと思われる。

パンジー開花過程の花卉に認められるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は，ダイコン根より抽出・精製された細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼに由来するポリクローナル抗体と強く反応した。このことから，パンジー花卉に存在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼは細胞質型であると思われる。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼは植物細胞に広く存在し，アスコルビン酸とともに生体にとって有害でありながら生成を回避することができない活性酸素に対して作用し，生体内において解毒の役割を果たしている。今後，植物のさまざまな生理的状況の違いや環境条件の変化（乾燥，強光，紫外線，大気汚染物質）に伴うこれらの酵素系の変動を一層詳細に調べ，現在，いくつかのオルガネラに見いだされているアイソザイムの遺伝子発現やその調節機構を知ることにより，植物が本来備えている「環境耐性」の一端を分子レベルでより明らかにすることができるであろう。さらに，植物細胞におけるこのような「環境耐性」のしくみは，その植物がおかれている環境を生理的な面から評価する指標となり，また，自然環境と動植物とのよりよい関係の保全あるいは再構築が唱えられている現代社会において“環境に強い”植物（作物）の新たな作出への道を切り開く鍵ともなるであろう。花き栽培においてもさまざまな栽培技術が考案，改良される中で，開花を一

層確実にするためにアスコルビン酸ペルオキシダーゼのような抗酸化酵素の作用を活用することは有意義であると思われる。

摘 要

パンジー開花過程の花弁における過酸化水素分解酵素活性の変化を調べた。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は蕾の発達とともに増大し、開花直前にピークに達した。しかし、開花と同時にこの酵素活性は急速に低下した。パンジー開花過程の花弁では、カタラーゼ活性は認められず、また、グアヤコールペルオキシダーゼ活性はきわめて低い値を示した。また、パンジー花弁の抽出液はダイコン根より精製したアスコルビン酸ペルオキシダーゼに由来する抗体に強く応答した。

これらの結果から、パンジー開花過程の花弁では、アスコルビン酸ペルオキシダーゼが開花に先立ち誘導され、細胞内で生成される活性酸素を分解・消去し、開花時の細胞傷害や病傷害から植物体を守る役割を果たしているものと推察される。

引用文献

- 浅田浩二. 1988. 活性酸素の生成・消去・作用. p.7-12. 中野稔・浅田浩二・大柳善彦編. 活性酸素-生物での生成・消去・作用の分子機構-. 共立出版. 東京.
- Droillard, M.J., A. Paulin and J.C. Massot. 1987. Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Physiologia Plantarum* 71: 197-202.
- Leammli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lück H. 1965. Catalase. p. 885-894. In H-U Bergmeyer (ed) . *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York.
- 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.
- Orr C.W.M. 1967. Studies on ascorbic acid. I. Factors influencing the ascorbate-mediated inhibition of catalase. *Biochemistry* 6:2995-2999.
- Read S.M. and D.H. Nothcote. 1968. 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.