

# パンジー花卉における活性酸素消去機能

森村 洋子

## Detoxification against Active Oxygen in Pansy Petals

Yoko MORIMURA

### Summary

Changes in specific activity and protein level of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) were studied in pansy (*Viola wittrockiana*) petals during anthesis. The activity of ascorbate peroxidase in pansy petals was already present at a high level in immature buds covered with sepals and decreased gradually during development of buds. Thereafter, it decreased rapidly at the start of flowering. The protein level of ascorbate peroxidase decreased rapidly prior to the start of flowering. The amounts of phenylpropanoid compounds in pansy petals also decreased at the start of flowering. It was suggested that phenylpropanoid compounds may play an important role in detoxification of  $H_2O_2$  in pansy petals as well as ascorbate during anthesis.

### 緒 言

植物は動物と異なり自分自身で場所を移動することができないために、紫外線、強光、乾燥、低温、大気汚染などのさまざまな環境ストレスにさらされている。環境ストレスは植物体内で有害な活性酸素を生成するが、一方、植物はそのような活性酸素を分解・解毒するしくみをもち、絶えずそのしくみを働かせながら生息している。このような活性酸素の分解消去に関わる酵素系やその酵素系で作用する基質についての研究が近年、盛んになっている。とくに、アスコルビン酸ペルオキシダーゼとアスコルビン酸が関与する活性酸素消去系については、これまでにいくつかの報告がなされ (Grodén and Beck, 1979, Nakano and Asada, 1981, Gillham and Dodge, 1986), それにより植物がなぜ多量のアスコルビン酸を蓄えているかという古くからの疑問を解く手がかりが得られた。

アスコルビン酸が緑葉に高い含量で存在することは一般によく知られているが、著者は花や根の組織においても開花、発根などの生育の盛んな時期にアスコルビン酸含量が急速に高まり、アスコルビン酸ペルオキシダーゼが関与する活性酸素消去系が活発に機能していることを明らかにし、報告してきた (Morimura et al., 1996, Ohya et al., 1997, Morimura et al., 1999)

一方、最近、緑葉に含まれるフラボノイドが活性酸素の一種である  $H_2O_2$  を分解するペルオキシダーゼの基質として作用するという報告がなされた (Solecka, 1997, Yamasaki et al., 1997)。フラボノイドは白色花の花弁の主要な色素であり、このフラボノイドが開花過程の花弁における活性酸素消去系にどのように関わっているかを知ることはフラボノイドの生理機能の面から興味深い。

そこで、本稿ではまず、すでに報告した白色パンジー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 (森村ら, 1998) が酵素たんぱく質レベルの変化に基づくものであるかどうかを、アスコルビン酸ペルオキシダーゼの抗体を用いたイムノブロット法により調べた。次に、開花過程におけるフェニールプロパノイド (フラボノイド, アントシアニンなどを含む化合物群) 含量の変動を調べ、フラボノイドのパンジー開花に伴う活性酸素消去機能への関与の可能性について考察した。

### 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、収穫した白色パンジー (*Viola wittrockiana* cv. New crystal white) を実験材料として用いた。開花期 (3~5月) に収穫したパンジーは花の発達にあわせ

て次に示すように8段階（ステージ1～8）に分類し、各段階ごとに花卉のみを集め、液体窒素で凍結処理した後、使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

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：花卉のねじれがほどけ、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た蕾，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，ステージ8：十分開花し、大きさを増した花。

## 2. 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を含む50mM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共に乳鉢中で磨砕し、ホモジネートを4層ガーゼでろ過した後、ろ液を $20,000 \times g$ で20分間遠心分離し、上清を集め、粗酵素液とした。これらの操作はすべて $4^{\circ}\text{C}$ の低温下で行った。

## 3. 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ および粗酵素液を混合し、全量を2mlとして行った。 $\text{H}_2\text{O}_2$ を加え反応を開始した後、5～15秒間の290nm ( $2.8\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )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。酵素活性は1分間に減少するアスコルビン酸の $\mu\text{mol}$ 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Coomassie brilliant blue G-250を用いた比色法（Read and Northcote, 1981）により測定した。

## 5. 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ）中で $40^{\circ}\text{C}$ ，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0.74mM 3,3-ジアミノベンジジンおよび0.88mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ を含む15mMリン酸緩衝液（pH6.8）を用いた。

## 6. フェニールプロパノイドの定量

フェニールプロパノイド含量は、分光光度計（日立 spectrophotometer 100-50）を用いて粗酵素液の365nmにおける吸光度を測定し、相対値として表した（Swain, 1976, Kubo et al., 1999）。

## 結 果

### 1. 開花過程におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼタンパク質量の変動

実験に先立ち、パンジー花卉の生重量を前述のステージ1～8の各段階ごとに測定し、その結果をFig. 1に表した。各段階における測定値は3～10個体の平均値である。パンジー花卉は生育に伴い順調に生重量を増した。

ステージ1～8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、同時にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法およびイムノブロット法によりアスコルビン酸ペルオキシダーゼタンパク質量の増減を調べた。パンジー花卉に存在するア

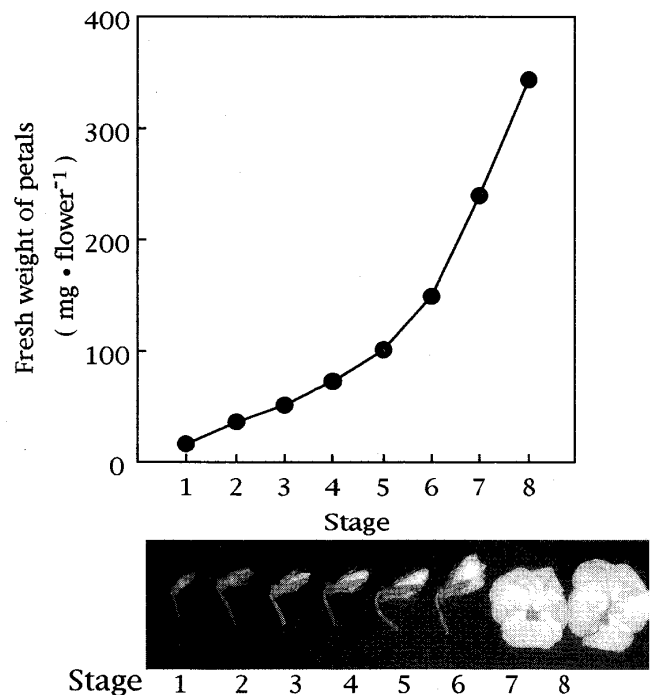


Fig.1 Changes in fresh weight of pansy petals during anthesis.

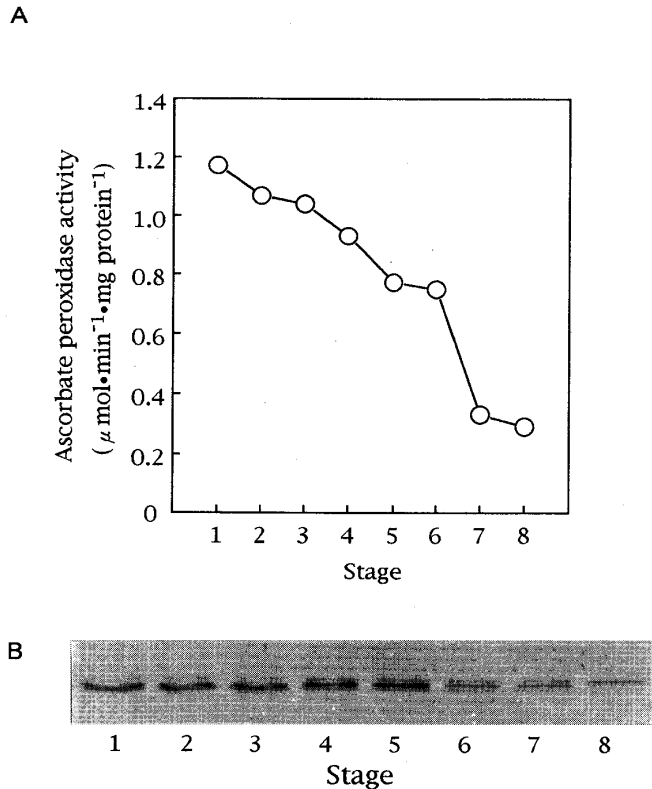


Fig. 2 Changes in activity and protein level of ascorbate peroxidase in pansy petals during anthesis. A. specific activities of ascorbate peroxidase. B. immunoblot analysis of SDS-PAGE of ascorbate peroxidase proteins. The same amounts of protein ( $7.5 \mu\text{g}$  per lane) from petals harvested at indicated stages during anthesis were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis using antibody raised against Japanese radish root cytosolic ascorbate peroxidase.

アスコルビン酸ペルオキシダーゼは、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より得られた抗体に対して強く応答することがこれまでに明らかにされている (森村ら, 1998) ので、イムノブロット解析ではこの抗体をプローブとして用いた。結果は Fig. 2 に示すとおりである。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性はステージ1においてすでに高い値を示し、開花直前のステージ6までは徐々に低下した。しかし、その後花卉が完全に開花すると (ステージ7)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は急速に低下し、花卉の大きさが増したステージ8では酵素活性はさらに低下した (Fig. 2 A)。ステージ8のパンジー花卉には外

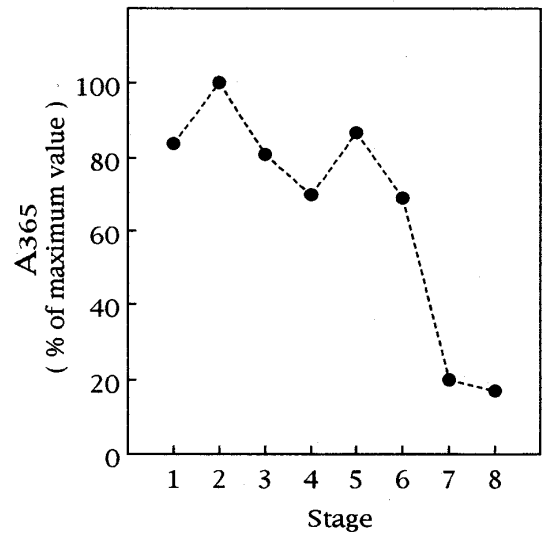


Fig. 3 Changes in absorbance at 365 nm of crude extracts from pansy petals during anthesis. Relative value was calculated as percentage of the maximum absorbance (an absorbance of 14.88 at 365nm in a 1-ml cuvette).

見上まだ老化の兆しは認められなかった (Fig. 1)。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼタンパク質量を示すバンドの発色は、ステージ1~5ではきわめて顕著であったが、開花直前のステージ6ではかなり弱まり、開花後のステージ7~8ではわずかに発色が認められた程度であった (Fig. 2 B)。

## 2. 開花過程におけるフェニールプロパノイド含量の変動

フラボノイド、シナベイトエステル、アントシアニンを含むフェニールプロパノイドが強光、低温、紫外線などの環境ストレスによって増加することが緑葉について報告されている (Solecka, 1997, Kubo et al., 1999) ので、開花過程のパンジー花卉 (ステージ1~8) の粗酵素液についてフェニールプロパノイド含量を測定した。粗酵素液の吸収スペクトルを測定した結果、365nm付近において吸収ピークが見られたので、ステージ1~8の各段階の花卉の抽出液についてこの波長における吸光度を測定し、結果を Fig. 3 に表した。ステージ1~6まではフェニールプロパノイド含量は顕著な変化を示さなかったが、その後、開花と同時に急速に減少し、十分開花した花卉 (ステージ8) においても低い値が保たれた。

### 考 察

動植物を含め、生物の細胞は多くの場合、酸化により大きな障害を受ける。発がん、老化、ストレスに対する抵抗力の低下などは細胞内の酸化作用に基づく場合が多く、そのため生物体は地球上に出現した初期の頃から酸化状態に対して細胞を守るしくみを体内に備えていたと考えられている。そのようなしくみを「酸素 ( $O_2$ ) 毒性に対する生体防御機構」と呼んでいる。 $O_2$  の存在下では生存できない生物 (嫌気性生物) にとってはこの  $O_2$  毒性に対する生体防御のしくみはきわめて重要な意味をもつが、ヒトを含む  $O_2$  を必要とする生物 (好気性生物) が  $O_2$  を利用する場合においても、多量の  $O_2$  がこのような生体防御機構によって分解・解毒されなければならない。したがって、生物は与えられた環境下で  $O_2$  による障害を防ぎながら  $O_2$  を利用していることになる。しかし、これまでの研究の歴史をふり返ると、 $O_2$  の有用性 (呼吸) に対する関心が高まるなかで、 $O_2$  毒性に対する生体防御については長い間詳細な研究が行われず、見落とされがちであった。約 20 年前、 $O_2$  毒性を分解消去する酵素 (アスコルビン酸ペルオキシダーゼ) が植物細胞において発見された (Kelly and Latzko, 1979)。このことをきっかけとしてこの酵素の作用を含む生体防御に関する研究が盛んになり、さらに、近年、自然環境破壊やヒトの健康上の問題と  $O_2$  毒性との関係が明らかになるにつれ、 $O_2$  毒性に対する生体防御機構は、動植物全般にわたる環境耐性のしくみとして社会的にも広く知られるようになった。

緑色植物の光合成器官である葉の細胞では光合成の結果、 $O_2$  が生成され、この  $O_2$  が有害な  $O_2$  分子である「活性酸素」を生成するため、アスコルビン酸ペルオキシダーゼによる  $O_2$  毒性の分解消去が盛んに行われることがこれまでに報告された (Groden and Beck, 1979, Nakano and Asada, 1981, Gillham and Dodge, 1986) が、著者は非光合成器官である根、花卉の組織にもアスコルビン酸ペルオキシダーゼが存在し、活性酸素の分解消去を行っていることを見出し、報告してきた (Morimura et al., 1996, Ohya et al., 1997, 森村ら, 1998, Morimura et al., 1999)。

一方、植物の開花に関する生理化学的研究は現在までのところまだ十分ではなく、開花のしくみそのものや開花の際の環境耐性も含め、不明な点が多い。そのような状況下で最近、熱帯植物ヤドリフカノキの葉から単離されたフラボノイド (ケルセチン、ケンフェロール) がペルオキシダーゼ反応の基質とし

て作用していることが報告された (Yamasaki et al., 1997)。また、シロイヌナズナの葉のフラボノイドが紫外線照射により誘導されることが明らかにされ (Solecka, 1997)、さらに、強光、低温、紫外線 (UV-B) などの環境ストレスがフラボノイドと思われるフェニールプロパノイド化合物の含量を増加させることがシロイヌナズナの葉を用いた研究の結果、明らかにされた (Kobo et al., 1999)。これらのことから、白色花の主要な色素であるフラボノイドが花卉の細胞においてもペルオキシダーゼ反応の基質として作用し、活性酸素の分解・解毒に関与しているのではないかと思われた。

そこで、まず、著者がすでに報告した白色パンジーの開花過程における花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の変化 (森村ら, 1998) について、それらがアスコルビン酸ペルオキシダーゼタンパク質の増減によるものであるかどうかを、この酵素の抗体を用いたイムブロット法により確認した。その結果、酵素タンパク質は酵素活性の低下が現れ

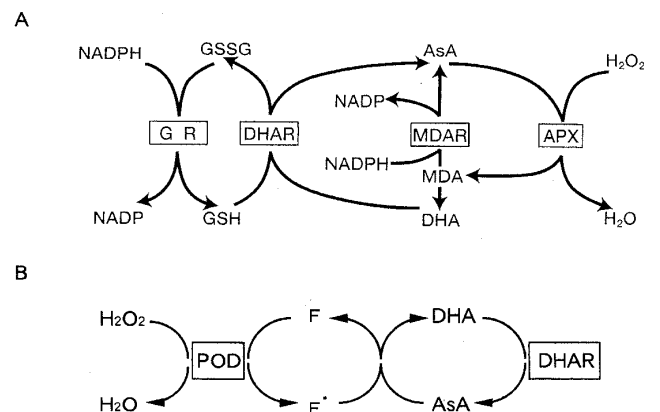


Fig. 4 Possible protective functions of ascorbate and flavonoids in  $H_2O_2$ -scavenging enzyme system in pansy petals during anthesis. A. Scheme of the  $H_2O_2$ -scavenging mechanism by ascorbate and ascorbate peroxidase (ascorbate-glutathione redox chain). B. Scheme of the  $H_2O_2$ -scavenging mechanism by flavonoids and flavonoid-peroxidase. AsA, ascorbate; APX, ascorbate peroxidase; DHA, dehydroascorbate; MDA, monodehydroascorbate; DHAR, dehydroascorbate reductase; MDAR, monodehydroascorbate reductase; GR, glutathione reductase; F, flavonoids; F', flavonoid radical; POD, flavonoid-peroxi-

る開花期よりやや早い、開花直前の段階で減少しはじめ、開花直後は酵素活性と同様に顕著な減少を示したので、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の低下はアスコルビン酸ペルオキシダーゼタンパク質量の減少に基づくものであると考えられる (Fig. 2 B).

パンジー花卉にはアスコルビン酸が緑葉に匹敵するほどの高い濃度で含まれ、さらに、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ことから、開花過程の花卉では Fig. 4 A に示すアスコルビン酸-グルタチオン酸化還元系 (ascorbate-glutathione redox chain) により活発に活性酸素が分解消去されていると考えられる。しかし、前述のように花卉のフラボノイド系色素が活性酸素の分解に関わっている可能性もあると思われるので、ここではその手がかりを得るためにアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の測定に用いた粗酵素液中のフェニールプロパノイド含量を吸収スペクトルの吸収ピーク波長 (365nm) における吸光度から推定することにした。測定の結果、フェニールプロパノイド含量はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性と同様に開花までは高い値を保ったが、開花と同時に著しく減少した。365nm 付近で吸収ピークを示すフェニールプロパノイド化合物は主としてフラボノイドであると考えられるので、パンジーの開花過程では花卉の主要色素であるフラボノイドがアスコルビン酸とともに活性酸素消去反応の基質として作用していることが推察される。アスコルビン酸ペルオキシダーゼはアスコルビン酸に対する基質特異性がきわめて高いため、フラボノイドを基質とする活性酸素分解酵素が存在するとすれば、それはアスコルビン酸ペルオキシダーゼとは性質の異なる、他のペルオキシダーゼではないかと思われる。さらに、パンジー花卉で高い含量を示すアスコルビン酸の役割を考えあわせると Fig. 4 B に示すようなフラボノイドを基質とするペルオキシダーゼ反応系の存在が推察される。この反応系ではアスコルビン酸は、フラボノイドの酸化生成物に対して作用し、フラボノイドに再び還元力を与えていると考えられる。

しかし、一般に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、植物の老化過程で活性が上昇することが知られており、また、フラボノイド以外にも数種類の電子供与体を基質として用いることができる。これらのことから、フラボノイドのペルオキシダーゼ反応への関与については、さらに詳細な酵素化学的研究が必要であろう。

今後は白色花の花卉に含まれるフラボノイド系色素についてより詳しく調べ、この色素が活性酸素の消去に役立っているかどうかを明らかにしたい。また、花卉にはアスコルビン酸が高濃度で含まれていることから、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とフラボノイドが関与するペルオキシダーゼ反応における活性酸素の消去との関係についても調べたい。

活性酸素の分解・解毒作用は、環境因子との関わりの中で生育する植物に広く抵抗力を与えるしくみであり、とくに、植物が環境ストレスを受けた場合には重要な役割を果たすと思われる。したがって、紫外線の増加、温暖化の進行などさまざまな自然環境の悪化が問題となっている現在、このような環境ストレスと白色花の主要色素であるフラボノイドとの関係を知ることはきわめて意義深い。

植物の花の色は、色彩そのものによっても十分に人々の目を楽しませ、心を潤してくれるが、さらに、それらの色素が植物の生育状態にあわせて、あるいは植物がおかれた環境のもとで環境に対する抵抗力として働くことが明らかになれば私達の花への興味は一層深いものになるであろう。

## 摘 要

パンジー開花過程における花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性、アスコルビン酸ペルオキシダーゼタンパク質量およびフェニールプロパノイド含量の変化を調べ、白色花の主要な色素であるフラボノイドが活性酸素の分解消去に関与する可能性について考察した。

1. パンジー開花過程における花卉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の変化は、アスコルビン酸ペルオキシダーゼタンパク質量の変化に基づくものであった。
2. フェニールプロパノイド含量はパンジーの開花直後に著しく減少し、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性と同様の変化を示した。吸収スペクトルの吸収ピーク波長から、白色パンジーの花卉にはフラボノイドが主要なプロパノイド化合物として含まれていると思われる。
3. これらのことから、パンジー開花過程においてフラボノイドが活性酸素の分解消去に関与していることが推察された。

## 謝 辞

本実験において試料として用いたパンジーを栽培し、ご提供くださいました村上睦朗教授に厚く御礼申し上げます。また、試料の準備、調整にあたり、ご協力くださいました木之下友海副手、松原由佳副手に深く感謝いたします。

## 引用文献

- Gillham, D. J. and A. D. Dodge. 1986. Hydrogen-peroxide-scavenging system within pea chloroplasts. *Planta* 167 : 246-251.
- Groden, D. and E. Beck. 1979. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruction by ascorbate dependent systems from chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 546 : 426-435.
- Ikeuchi, M., H. Koike and Y. Inoue. 1989. N-terminal sequencing of low-molecularmass components in cyanobacterial photosystem II core complex. *FEBS Lett.* 253:
- Kelly, G. J. and E. Latzko. 1979. Detection in plants and use in vitamin C estimation. *Naturwissenschaften* 66 : 617-618.
- Kubo, A. M. Aono, N. Nakajima, H. Saji K. Tanaka and N. Kondo. 1999. Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 112 : 279-290.
- Leammli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- 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. 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.
- Solecka, D. 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum* 19 : 257-268.
- Swain, T. 1976. Flavonoids. In T. W. Goodwin, ed., *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, London, pp. 166-206.
- Yamasaki, H., Y. Sakihama and N. Ikehara. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* 115 : 1405-1412.