

# ガマおよびクロマツの花粉のスーパーオキシドジスムターゼ

古谷 一朗・船隈 透・原 彰

名城大学農学部生物化学教室  
〒468 名古屋市天白区塩釜口  
(1994年11月9日 受理)

## Superoxide Dismutases of *Typha* and *Pinus* Pollen

Itirō HURUYA, Toru FUNAGUMA and Akira HARA

Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Meijo University,  
shiogamaguchi, Tempaku-ku, Nagoya 468, Japan

Superoxide dismutases in the extracts from *Typha* and *Pinus* pollen were purified by means of protamine treatment, anion exchange chromatography, cation exchange chromatography, chromatofocusing and gel-filtration. Three superoxide dismutases from *Typha* pollen and four from *Pinus* pollen were fractionated. On the basis of the sensitivity to cyanide and hydrogen peroxide, the occurrence of copper, zinc- and manganese-superoxide dismutases in the extracts of both pollen was demonstrated.

**Key words:** Superoxide dismutase, Superoxide, Active oxygen scavenger, *Typha* pollen, *Pinus* pollen.

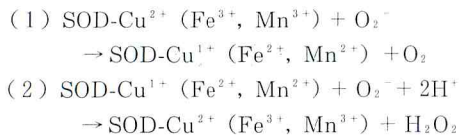
### 緒 言

酸素を利用して生命を維持している全ての生物体では、酸素はエネルギー獲得反応における電子受容体として作用している。基底状態の三重項酸素分子 ( $^3\text{O}_2$ ) は、生体内に取り入れられた後、電子受容体として段階的に還元されて最終的には  $\text{H}_2\text{O}$  になるが、完全には還元されなかった一部の酸素分子から、 $^3\text{O}_2$  よりも反応性の高い酸素種である活性酸素が生じる。活性酸素には、スーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ )、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )、一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) の4種がある。活性酸素は、代謝に寄与したり、白血球やマクロファージで生成され生体を異物、細菌、癌化などから守ったりする。しかし一方では、

生体膜の機能の損傷、DNA 傷害、酵素の不活性化など、さらにはそれらの傷害から起こる発癌や老化などを引き起こす。これを一般的に酸素毒性と呼ぶ<sup>(1)</sup>。

この酸素毒性を防ぐために活性酸素をできる限り消去することは生命を維持する上で必須であり、酸素を利用する生物体では、活性酸素消去機構が進化している。その機構に関与する酵素としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) があり、SODは  $\text{O}_2^-$  に対し捕捉物質として働き  $\text{H}_2\text{O}_2$  に還元する<sup>(2, 3)</sup>。

現在までに発見された SOD は、含有する金属の種類によって、Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD の3種に分類され、式 (1) と (2) に示すような反応機構で、活性中心にある金属の還元-酸化サイクルにより  $\text{O}_2^-$  を不均化する。



3種のSODは阻害剤に対する感受性によって区別することができる。すなわち、Cu、Zn-SODは $\text{H}_2\text{O}_2$ および $\text{CN}^-$ によって阻害され、Fe-SODは $\text{H}_2\text{O}_2$ によって阻害される。Mn-SODはどちらの阻害剤に対しても感受性がない。植物における主要なSODはCu、Zn-SODであり、主として細胞質ゾルおよび葉緑体のストロマに存在する。ミトコンドリアのマトリクスにはMn-SODが分布している。葉緑体のラメラにはMn-またはFe-SODが含まれている<sup>(3)</sup>。

花粉の細胞は生殖にかかわる細胞であり、植物の種の維持にきわめて大切な役割をはたしているため、活性酸素の消去は特に重要である。本稿では、花粉における活性酸素の消去機構を明らかにする手始めとして、ガマおよびクロマツの花粉のSODについての若干の知見を報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 花粉

ガマ (*Typha latifolia* L.) の成熟花粉粒は、1993年6月に愛知県日進市の湿地において、クロマツ (*Pinus thunbergii* P.) の成熟花粉粒は、1992年4月に名古屋市緑区大高緑地公園にて採取した。これらは、室温で4日間風乾させた後、使用時まで $-20^\circ\text{C}$ 以下で保存した。

### 2. 試薬

キサンチンオキシダーゼ (18 units/ml) はSIGMA CHEMICAL CO. から購入した。DE-52 (セルロース陰イオン交換体) およびCM-52 (セルロース陽イオン交換体) はWhatman Paper Ltd. から購入した。DEAE-TOYOPEARLPAK 650Sは東ソー社から購入した。Polybuffer 74, Polybuffer交換体PBE 94 およびHiLoad 26/60 Sephaeryl S-200 HRはPharmacia LKB Biotechnologyから購入した。Ultra Thimble UH 100/10はSchleicher & Schuellから購入した。パジェルSPU-15S (既製ポリアクリルアミドゲル, ゲル濃度15%) はアトー社から購入した。タンパク質用シルベストステイン (銀染色液キット) はナカライテスク社から購入した。

### 3. SOD活性測定法

SOD活性は大柳の方法<sup>(4)</sup>に従って測定した。キサンチンにキサンチンオキシダーゼを作用させることによって生じた $\text{O}_2^-$ はヒドロキシルアミンの介在で亜硝酸に変わり、N-1-ナフチルエチレンジアミン、スルファニル酸と反応して発色する。この系にSODを加え発色の阻害度を調べる。反応条件下において発色を50%阻害するSOD量を1単位と定義すれば、酵素液中のSOD活性は $(V/v-1)$ で与えられる。VはSOD非存在下での吸光度変化を、vはSOD存在下での吸光度変化を示す。

### 4. SOD活性染色法

電気泳動後のポリアクリルアミドゲル上でのSOD活性染色はBeauchampとFridovichの方法<sup>(5)</sup>に従った。ポリアクリルアミドゲルをニトロブルー-テトラゾリウム溶液に浸漬し、さらにリボフラビン、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン溶液に浸漬した後に光を照射し、濃紺色の背景に対し活性部位を白いバンドとして検出した。

### 5. タンパク質の定量

タンパク質量は、標準タンパク質として牛血清アルブミンを用い、Lowry法の変法<sup>(6)</sup>によって測定した。クロマトグラムにおいては、タンパク質量は280nmの吸光度で表示した。

### 6. ガマ花粉SODの精製

ガマ花粉20gを200mlの10mM Tris-HCl, pH7.8 (A緩衝液) に懸濁し、10mlずつをテフロンガラスホモジナイザーで10分間破碎した。ホモジネートを23,000 × gで20分間遠心分離し、上清に1/5量の1%硫酸プロタミンを加えた。混合液を30分間放置し、再度23,000 × gで20分間遠心分離した。回収した上清をA緩衝液で平衡化させたDE-52陰イオン交換カラム (3 × 30cm) に通した。カラムを60mlのA緩衝液で洗浄した後、A緩衝液300mlと0.6M NaClを含むA緩衝液300mlによる0~0.6M NaClの直線の濃度勾配によりタンパク質を溶出させた。活性画分T1, T2, T3をそれぞれ回収した。

T1とT2を、10mM imidazole-HCl, pH 7.4 (B緩衝液) に対して透析した。これらをそれぞれ、B緩衝液で平衡化させたPBE 94ゲルのカラム (1 × 30cm) に通した。300mlのPolybuffer 74-HCl, pH 4.0によりタンパク質を溶出させた。T3を、A緩衝

液に対して透析した後、A緩衝液で平衡化させたDEAE-TOYOPEARLPAK 650S カラム (2.2 × 20cm) に通した。カラムを20mlのA緩衝液で洗浄した後、A緩衝液150mlと1M NaClを含むA緩衝液150mlによる0~1M NaClの直線的濃度勾配によりタンパク質を溶出させた。

各クロマトグラフィーによって、活性画分がそれぞれ1つずつ得られた。これらの画分をそれぞれ、Ultra Thimble UH 100/10膜を用いて減圧下で約1mlに濃縮し、おのおのをHiLoad Sephacryl S-200 HR カラム (2.6 × 60cm) に添加し、0.1M NaClを含む20mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.8 (C緩衝液) でゲルろ過した。

#### 7. クロマツ花粉SODの精製

クロマツ花粉20gを200mlのA緩衝液に懸濁し、10mlずつをテフロン-ガラスホモジナイザーで10分間破碎した。ホモジネートを23,000 × gで20分間遠心分離し、上清に1/5量の1% 硫酸プロタミンを加えた。混合液を30分間放置し、再度23,000 × gで20分間遠心分離した。回収した上清をA緩衝液で平衡化させたDE-52陰イオン交換カラム (3 × 30cm) に通した。カラムを60mlのA緩衝液で洗浄した後、A緩衝液300mlと0.6M NaClを含むA緩衝液300mlによる0~0.6M NaClの直線的濃度勾配によりタンパク質を溶出させた。活性画分P1, P2をそれぞれ回収した。

P1をB緩衝液に対して透析した。これを、B緩衝液で平衡化させたPBE94ゲルのカラム (1 × 30cm) に通した。300mlのPolybuffer 74-HCl, pH4.0でタンパク質を溶出させた。このクロマトグラフィーによって、活性画分P1-1, P1-2, P1-3が得られた。

これらの画分をそれぞれ、Ultra Thimble UH 100/10膜を用いて減圧下で約1mlに濃縮し、おのおのをHiLoad Sephacryl S-200 HR カラム (2.6 × 60cm) に添加し、C緩衝液でゲルろ過した。ゲルろ過によって、活性画分がそれぞれ1つずつ得られた。

P1-1から得られた活性画分をさらに、20mM acetate, pH 5.0 (D緩衝液) に対して透析した後、D緩衝液で平衡化させたCM-52陽イオン交換カラム (1 × 30cm) に通した。カラムを10mlのD緩衝液で洗浄した後、D緩衝液100mlと0.6M NaClを含むD緩衝液100mlによる0~0.6M NaClの直線的濃度勾配によりタンパク質を溶出させた。

#### 8. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

ガンマ花粉由来の酵素について、SDS-PAGEを、Laemmliの方法<sup>(7)</sup>に従って行った。濃縮ゲル濃度4%, 分離ゲル濃度15%とし、30mAの定電流で、室温にて行った。泳動後、タンパク質をクーマシーブリリアントブルー R-250で染色した。Native-PAGEは、Laemmliの緩衝液システムを用いてSDS非存在下で行った。濃縮ゲル濃度4%, 分離ゲル濃度10%とし、30mAの定電流で、室温にて行った。ゲルの一部はタンパク質をクーマシーブリリアントブルー R-250で染色し、他の一部はSOD活性染色を行った。

クロマツ花粉由来の酵素について、SDS-PAGEは、パジェルSPU-15Sと付属の専用緩衝液を用いて、スラブゲルあたり20mAの定電流で、室温にて行った。泳動後、タンパク質をシルベストステインで染色した。Native-PAGEは、Laemmliの緩衝液システムを用いてSDS非存在下で行った。濃縮ゲル濃度4%, 分離ゲル濃度10%とし、30mAの定電流で、室温にて行った。ゲルの一部はタンパク質をシルベストステインで染色し、他の一部はSOD活性染色を行った。

## 実験結果

### 1. ガンマ花粉SODの精製

DEAE-セルロース (DE-52) による陰イオン交換クロマトグラフィーでは、Fig. 1に示すようにT1, T2, T3の3個の活性ピークが検出された。

分子量は、ゲルろ過法により、T1は約28kDa, T2は約43kDa, T3は約56kDaと算出された。ガンマ花粉SODの精製結果をTable 1に要約した。

Fig. 2に示すように、T1, T2, T3いずれも、Native-PAGEゲルの活性染色とタンパク質染色とで同じ位置にバンドが検出された。SDS-PAGEにおいては、分子量はT1では約19.3kDaと約17.8kDa, T2では約21.7kDa, T3では約24.8kDaと見積もられた。

SODの種類を確認するために、T1, T2, T3の各々の最終精製標品について、10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共存下25°Cで1時間インキュベートした後に、または反応液中に1mM KCNを加え、活性を測定した。その結果T1, T2の活性は失われたが、T3は活性を示した。

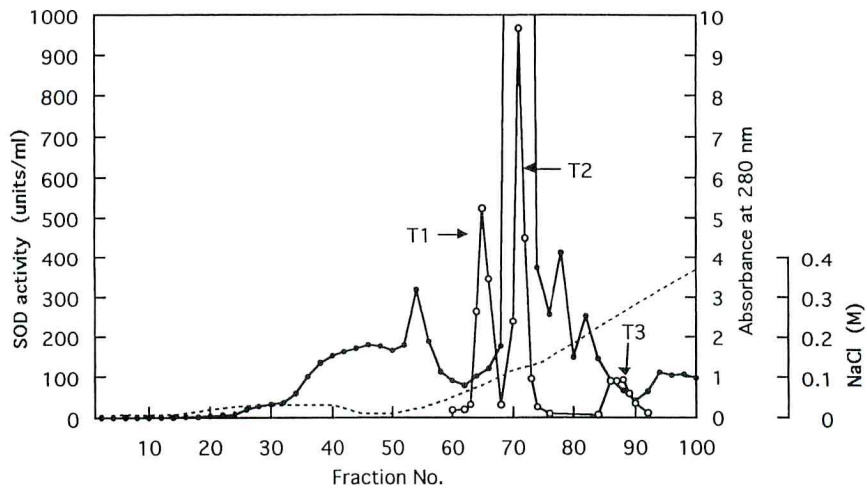


Fig. 1. Elution pattern of SODs in the extract from *Typha* pollen on a DE-52 anion exchange column. For the conditions of chromatography, see Materials and Methods. Fractions of 9 ml were collected. —○—, SOD activity; —●—, absorbance at 280 nm; -----, NaCl concentration.

Table 1. Summary of purification of SODs from *Typha* pollen

Step	Volume (ml)	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	
Crude extract	170.0	48,110	671.5	71.6	100	
Protamine	198.0	42,996	436.6	98.5	89.4	
T 1	DEAE-cellulose	26.5	12,694	10.63	1,194.2	26.4
	PBE 94	11.4	10,921	ND	ND	22.7
	Sephacryl S-200	14.8	7,666	0.117	65,521	15.9
T 2	DEAE-cellulose	26.0	6,630	21.16	313.3	13.8
	PBE 94	26.5	3,922	ND	ND	8.2
	Sephacryl S-200	15.6	2,449	0.156	15,699	5.1
T 3	DEAE-cellulose	26.0	3,557	5.64	630.7	7.4
	DEAE-TOYOPEARL	7.7	2,380	0.824	2,888	4.9
	Sephacryl S-200	7.1	1,271	0.0675	18,830	2.6

ND : not determined.

## 2. クロマト花粉 SOD の精製

DEAE-セルロースによる陰イオン交換クロマトグラフィーでは、Fig. 3 に示すように、P 1、P 2 の 2 個の活性ピークが検出された。

クロマトフォーカシングによる P 1 の精製では、Fig. 4 に示すように、P 1-1、P 1-2、P 1-3 の 3 個の活性ピークが検出された。

分子量は、ゲルろ過法により、P 1-1 が約 33kDa、

P 1-2 が約 32kDa、P 1-3 が約 35kDa と算出された。クロマト花粉 SOD の精製結果を Table 2 に要約した。

Fig. 5 に示すように、P 1-1、P 1-2、P 1-3 いずれも、Native-PAGE ゲルの活性染色とタンパク質染色とで同じ位置にバンドが検出された。SDS-PAGE においては、分子量は P 1-1 では約 18.8kDa と約 18.3kDa と見積もられた。

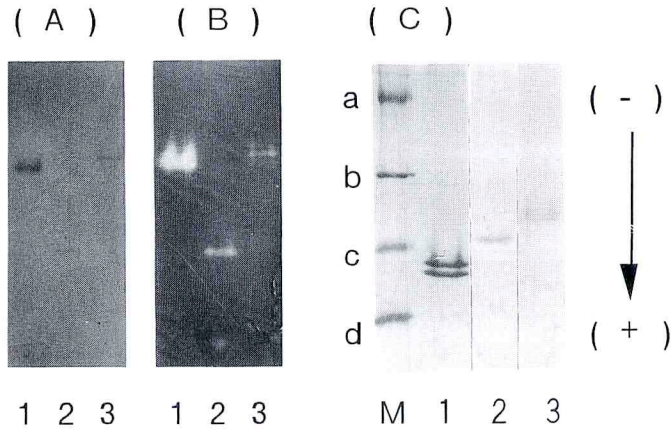


Fig. 2. Native- and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified SODs from *Typha* pollen. Purified enzymes were run on a native-polyacrylamide gel and stained for protein (A) and SOD activity (B), and also analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (C).

Lane 1, T 1; 2, T 2; 3, T 3; M, molecular weight markers (a, ovalbumin, 43 kDa; b, carbonic anhydrase, 30 kDa; c, soybean trypsin inhibitor, 20.1 kDa; d,  $\alpha$ -lactalbumin, 14.4 kDa).

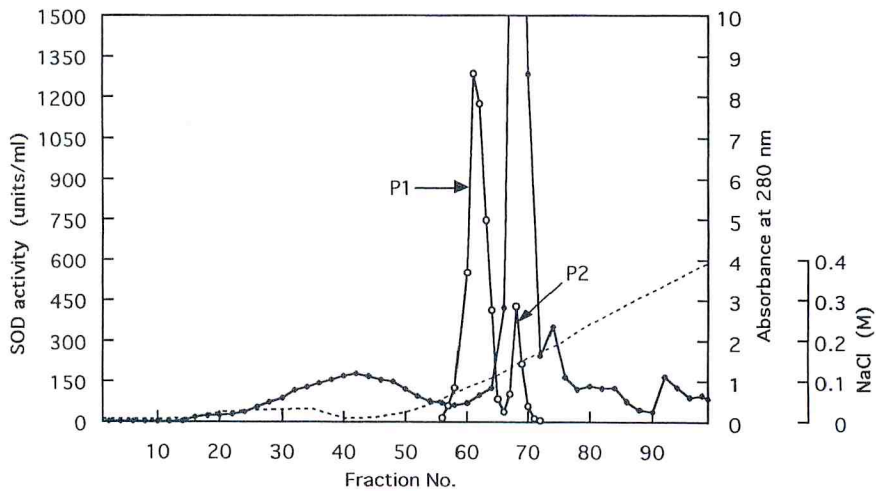


Fig. 3. Elution pattern of SODs in the extract from *Pinus* pollen on a DE-52 anion exchange column. For the conditions of chromatography, see Materials and Methods. Fractions of 9 ml were collected. —○—, SOD activity; —●—, absorbance at 280 nm; -----, NaCl concentration.

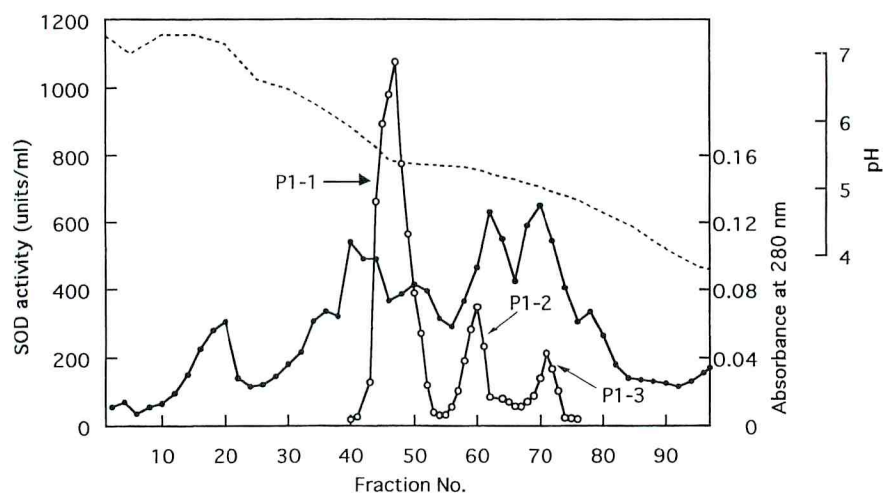


Fig. 4. Elution pattern of *Pinus* SODs on a PBE 94 column following DE-52 column chromatography. For the conditions of chromatography, see Materials and Methods. Fractions of 3.5 ml were collected. —○—, SOD activity ; —●—, absorbance at 280 nm ; -----, pH.

Table 2. Summary of purification of SODs from *Pinus* pollen

Step	Volume (ml)	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	
Crude extract	124.0	48,360	307.2	157	100	
Protamine	144.0	47,808	229.9	208	98.9	
P 1	DEAE-cellulose	42.5	34,085	19.27	1,566	70.5
	PBE 94	28.2	23,011	ND	ND	47.6
	P 1-1 Sephacryl S-200	14.0	15,778	0.171	92,377	32.6
	CM-cellulose	11.7	2,551	0.076	33,544	5.3
	P 1-2 PBE 94	13.8	5,161	ND	ND	10.7
Sephacryl S-200	11.3	2,497	0.200	12,485	5.2	
P 1-3	PBE 94	13.8	3,616	ND	ND	7.5
	Sephacryl S-200	14.4	1,944	0.277	7,031	4.0
P 2 DEAE-cellulose	24.0	624	10.51	59	1.29	

ND : not determined.

SODの種類を確認するために、P 1-1、P 1-2、P 1-3の各々の最終精製標品およびDEAE-セルロースで溶出されたP 2について、10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>共存下

25°Cで1時間インキュベートした後に、または反応液中に1mM KCNを加え、活性を測定した。その結果P 1-1、P 1-2、P 1-3の活性は失われたが、

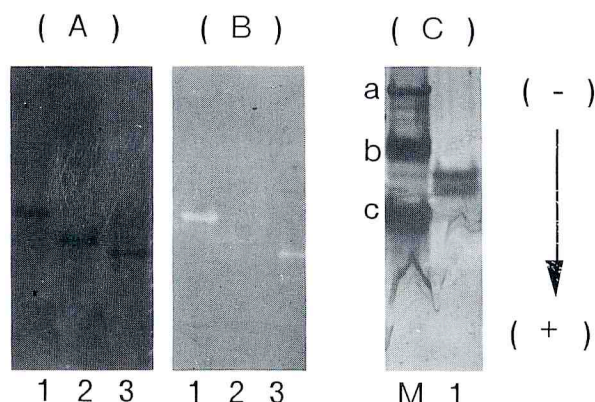


Fig. 5. Native- and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified SODs from *Pinus* pollen. Purified enzymes were run on a native-polyacrylamide gel and stained for protein (A) and SOD activity (B), and also analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (C).

Lane 1, P 1-1; 2, P 1-2; 3, P 1-3; M, molecular weight markers (a, carbonic anhydrase, 30 kDa; b, soybean trypsin inhibitor, 20.1 kDa; c,  $\alpha$ -lactalbumin, 14.4 kDa).

Table 3. Properties of SODs from *Typha* and *Pinus* Pollen

Fraction		Sensitivity to $\text{KCN}$ $\text{H}_2\text{O}_2$		Metals contained	Molecular weight(kDa)		
					Gel-filtration	SDS-PAGE	
<i>Typha</i>	T 1	+	+	Cu, Zn	28	17.8	19.3
	T 2	+	+	Cu, Zn	43		21.7
	T 3	-	-	Mn	56		24.8
<i>Pinus</i>	P 1-1	+	+	Cu, Zn	33	18.3	18.8
	P 1-2	+	+	Cu, Zn	32		ND
	P 1-3	+	+	Cu, Zn	35		ND
	P 2	±	±	(Mn)	ND		ND

ND : not determined.

P 2 は約 60% の残存活性を示した。

## 考 察

SOD は多くの生物から単離されている。植物は動物に比べ多くのイソ酵素をもち、Cu, Zn-SOD について見ると葉緑体イソ酵素と細胞質ゾルイソ酵素をもっ

ている。調べられた植物の大部分で、前者には1種だけのSODが認められているが、後者にはさらに数種のイソ酵素が認められており、ホウレンソウでは2種<sup>(8)</sup>、コメでは3種<sup>(9)</sup>、トクサでは2種<sup>(10)</sup>、トウモロコシでは3種<sup>(11)</sup>確認されている。本実験においても、ガマ花粉由来の2種類のイソ酵素 T 1 と T 2、クロマツ花粉由来の3種のイソ酵素 P 1-1、P 1-2、

P1-3は、KCN および  $H_2O_2$  により阻害を受けたのでCu, Zn-SOD であると思われる (Table 3)。

クロマトフォーカシングによる精製では、SOD 活性の見られた画分の pH は、ガンマ花粉の T1 は 6.3, T2 は 4.6, クロマツ花粉の P1-1 は 5.4, P1-2 は 5.3, P1-3 は 5.0 であった。クロマトフォーカシングの原理を考慮にいれると、等電点上では見かけ上の電荷が 0 となるため溶出されるのは実際の等電点を 0.2 程度過ぎてからである。従って SOD の等電点は T1 は pH 6.5, T2 は pH 4.8, P1-1 は pH 5.6, P1-2 は pH 5.5, P1-3 は pH 5.2 であろうと推測される。

これまでに単離された Cu, Zn-SOD のほとんどは 30kDa から 35kDa の分子量をもつホモダイマーであるが<sup>(1, 3)</sup>, 本実験で得られたクロマツ花粉の 3 種の Cu, Zn-SOD も同様な分子量をもっていた。ゲルろ過と SDS-PAGE の結果から、ガンマ花粉の T2 はホモダイマーであると考えられる。しかし、ガンマ花粉の T1 とクロマツ花粉の P1-1 は SDS-PAGE において 2 本のバンドを示すのでヘテロダイマーではないかと推測される。ガンマ花粉とクロマツ花粉の標品にともに見られるので、花粉に特有なイソ酵素の形態であるとも考えられる。他種の花粉についてさらに検討が必要である。

ガンマ花粉由来の T3 およびクロマツ花粉由来の P2 は、KCN および  $H_2O_2$  により活性を阻害されないで Mn-SOD であると考えられる (Table 3)。これらは、おそらくミトコンドリアに局在しているものと思われる。ガンマ花粉の T3 はゲルろ過および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から、分子量が約 48kDa のホモダイマーであると推測され、これは Mn-SOD がホモダイマーあるいはホモテトラマーである<sup>(1, 3)</sup>とした他の知見と一致している。Mn-SOD は KCN および  $H_2O_2$  によって阻害されないとされるが、クロマツ花粉の酵素 P2 はこれらによって約 40% 阻害された。測定に用いたのは陰イオン交換クロマトグラフィーの画分であり、これは不均一な標品であるから、他のタンパク質が影響しているのかもしれない。

Fe-SOD は、高等植物では 3 種類の科でのみ発見されている<sup>(1, 2)</sup>が、ガンマ花粉およびクロマツ花粉からは検出されなかった。

生体内には多くの  $O_2^-$  生成反応がある。 $O_2^-$  から  $H_2O_2$  が生成し、 $O_2^-$  や  $H_2O_2$  から  $\cdot OH$  や  $^1O_2$  が生成する。 $\cdot OH$  と  $^1O_2$  は反応性が高く、主としてこれらが細胞成分を酸化し障害をもたらすらしい。そのた

め、SOD による  $O_2^-$  の消去は重要である。

植物では、葉緑体における活性酸素消去機構が詳しく調べられている。SOD の作用によって生じた  $H_2O_2$  は発見者に因んで Halliwell-Asada 経路と呼ばれる経路によって除去される<sup>(1, 3-16)</sup>が、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)、モノデヒドロアスコルビン酸 (MDA) 還元酵素、デヒドロアスコルビン酸 (DHA) 還元酵素、グルタチオン還元酵素がこの経路をなしている。

筆者らは、クロマツ花粉の抽出液中にも、APX, MDA 還元酵素, DHA 還元酵素, グルタチオン還元酵素の活性を検出した。現在、これらの酵素について調査中である。

## 要 約

ガンマとクロマツの成熟花粉粒に含まれるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を、プロタミン処理、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシングおよびゲルろ過によって精製した。ガンマ花粉からは 3 種、クロマツ花粉からは 4 種の SOD が分画された。これらの、KCN と  $H_2O_2$  に対する感受性の差から、ガンマとクロマツの花粉の細胞抽出液中に Cu, Zn-SOD と Mn-SOD があることを確認した。

## 引用文献

- (1) 活性酸素 - 生物での生成・消去・作用の分子機構 (蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊号). 共立出版株式会社 (1988).
- (2) Fridovich, I. : Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* Vol. 58 (ed. A. Meister). John Wiley and Sons pp. 61-97 (1986).
- (3) 浅田浩二: 酸素毒性. 生化学 48, 226-257 (1976).
- (4) 大柳善彦: 活性酸素消去酵素の測定法. 活性酸素 (八木國夫・中野稔 監修, 二本鋭雄・島崎弘幸 編集). 医歯薬出版株式会社 pp. 139-183 (1987).
- (5) Beauchamp, C. and I. Fridovich : Superoxide dismutase : Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels.



- Anal. Biochem.* **44**, 276-287 (1971).
- (6) Hartree, E. F. : Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427 (1972).
- (7) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- (8) Kanematsu, S. and K. Asada : Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiol.* **31**, 99-112 (1990).
- (9) Kanematsu, S. and K. Asada : CuZn-superoxide dismutases in rice: occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isozyme in leaf and nonphotosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol.* **30**, 381-391 (1989).
- (10) Kanematsu, S. and K. Asada : CuZn-superoxide dismutases from the fern *Equisetum arvense* and the green alga *Spirogyra* sp. : occurrence of chloroplast and cytosol types of enzyme. *Plant Cell Physiol.* **30**, 717-727 (1989).
- (11) Baum, J. A., J. M. Chandlee and J. G. Scandalios : Purification and partial characterization of a genetically-defined superoxide dismutase (SOD-1) associated with maize chloroplasts. *Plant Physiol.* **73**, 31-35 (1983).
- (12) Bridges, S. M. and M. L. Salin : Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol.* **68**, 275-278 (1981).
- (13) Foyer, C. H. and B. Halliwell : The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts : a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25 (1976).
- (14) Nakano, Y. and K. Asada : Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol.* **21**, 1295-1307 (1980).
- (15) Halliwell, B. : Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem. Phys. Lipids* **44**, 327-340 (1987).
- (16) Asada, K. and M. Takahashi : Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In D. J. Kyle, C. B. Osmond and C. J. Arntzen (eds.), *Photoinhibition* Elsevier Science pp. 227-287 (1987).

