

クロマツ花粉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼとカタラーゼ

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
(1995年4月24日 受理)

Ascorbate Peroxidase and Catalase from *Pinus* Pollen

Itirō HURUYA, Toru FUNAGUMA and Akira HARA

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

Ascorbate peroxidase in the extracts from *Pinus* pollen was purified to homogeneity by means of protamine treatment, anion exchange chromatography, affinity chromatography, and gel-filtration. Purified ascorbate peroxidase was a monomer with a molecular mass of 28-29kDa, as determined by gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme activity was inhibited by thiol reagents, KCN, and NaN_3 . Guaiacol, pyrogallol, and pyrocatechol functioned as substrates for the enzyme.

Catalase in the extracts from *Pinus* pollen was also purified to homogeneity by means of protamine treatment, salting-out, hydrophobic interaction chromatography, and gel-filtration. Purified catalase had a molecular mass of 225 kDa and consisted of four subunits, as determined by gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme activity was inhibited by KCN, NaN_3 , and 2-mercaptoethanol.

Key words: Ascorbate peroxidase, Catalase, Hydrogen peroxide, Active oxygen scavenger, *Pinus* pollen.

緒 言

酸素分子 ($^3\text{O}_2$) は、生体内に取り入れられ段階的に還元されて水 (H_2O) になるまでに、より反応性の高い還元分子種のスーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) や励起分子種の一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) などを生じる。これらは活性酸素と呼ばれ、強い酸化力を持つため有用である

一方、生体成分を非特異的に酸化して毒性を示す^(1, 2)。生物体は活性酸素の細胞内濃度を最小限に保つ機構の一つとして、 O_2^- 消去酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、 H_2O_2 消去酵素であるカタラーゼ (Cat) やペルオキシダーゼなどを備えている^(1, 2)。Cat は H_2O_2 を分解し H_2O と O_2 を生じる。ペルオキシダーゼは電子供与体を介して H_2O_2 を H_2O に還元するが、電子供与体に対する特異性が生物種によって異なる。植物にはアスコルビン酸

(AsA) を電子供与体とする AsA ペルオキシダーゼ (APX) が存在する^(3,4)。花粉の APX に関してはほとんど報告されていない⁽⁵⁾。

前報では、クロマツとガマの花粉の SOD について報告した⁽⁶⁾。本稿では、 H_2O_2 の消去において APX と Cat がどのように役割分担しているかを解明する手始めとしてクロマツ花粉の両酵素の精製を試み、性質を調べた結果について報告する。

実験材料および方法

1. 花粉

クロマツ (*Pinus thunbergii*) の成熟花粉粒は、1992年4月および1994年4月に名古屋市長区大高緑地公園にて採取し、室温で4日間風乾させた後、使用時まで -20°C 以下で保存した。

2. 試薬

GSSG (酸化型グルタチオン) 還元酵素は Boehringer Mannheim から購入した。DE-52 (セルロース陰イオン交換体) は Whatman Paper Ltd. から購入した。Epoxy-activated Sepharose 6B, Hi-Load 26/60 Sephacryl S-200 HR および Hi-Load 26/60 Superdex 200 pg は Pharmacia LKB Biotechnology から購入した。TSK-GEL DEAE-3 SW および TSK-GEL Phenyl-TOYOPEARL 650M (疎水クロマトグラフィー用充填剤) は東ソー社から購入した。Ultra Thimble UH 100/10 は Schleicher & Schuell から購入した。パジェル SPU-15S (既製 SDS-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。

3. 酵素活性測定法

(1) APX 活性測定法

APX 活性は Nakano らの方法⁽⁷⁾ を改変して測定した。反応混合液の組成を 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5), 0.2mM H_2O_2 , 0.5mM AsA とし, AsA の 290nm での分子吸光係数を $2.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として, H_2O_2 依存の AsA の酸化を 290nm の吸光度の減少で測定した。反応条件下において 1 分間に $1\mu\text{mol}$ の AsA を酸化する APX 量を 1 単位と定義した。

APX の電子供与体に対する特異性を調べるための反応混合液は Nakano らの方法⁽⁷⁾ に準じて調製した。

(2) Cat 活性測定法

Cat 活性は、反応混合液の組成を 25mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8), 10mM H_2O_2 とし, H_2O_2 の 240nm での分子吸光係数を $39.4\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として, H_2O_2 の分解を 240nm の吸光度の減少で測定した⁽⁸⁾。反応条件下において 1 分間に $1\mu\text{mol}$ の H_2O_2 を分解する Cat 量を 1 単位と定義した。

4. 酵素活性染色法

(1) APX 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 APX 活性染色は De Gara らの方法⁽⁵⁾ に従った。ポリアクリルアミドゲルを 4 mM AsA-4mM H_2O_2 に浸漬し、水洗した後さらに 0.125N 塩酸-1% 塩化第二鉄-1% フェリシアン化カリウムに浸漬し、暗緑色の背景に対し活性部位を無色のバンドとして検出した。

(2) Cat 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 Cat 活性染色は Woodbury らの方法⁽⁹⁾ に従った。ポリアクリルアミドゲルを水洗した後 0.003% H_2O_2 に浸漬し、さらに 1% 塩化第二鉄-1% フェリシアン化カリウムに浸漬し、暗緑色の背景に対し活性部位を黄色の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⁽¹⁰⁾ 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. AsA 結合 Sepharose ゲルの調製

Epoxy-activated Sepharose 6B (5g) をガラスフィルター上で水および 0.1M 炭酸ナトリウムで洗浄した。このゲルを AsA (2g) を溶解させた同液 100ml に懸濁し、穏やかに攪拌しながら室温にて 16 時間放置した。このゲルをガラスフィルター上で水、0.1M 炭酸水素ナトリウムおよび 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で洗浄した後、ゲルの遊離オキシラン基を 1M モノエタノールアミンでブロックした。このゲルを再びガラスフィルター上で水で洗浄し、APX のアフィニティークロマトグラフィーに使用した。

7. クロマツ花粉 APX の精製

クロマツ花粉 20g を 200ml の 20mM 磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 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20mM 磷酸カリウム緩衝液、pH 7.0-20 μM グアイアコール(B緩衝液)で洗浄した後、B緩衝液300mlと0.6M NaClを含むB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。

活性画分を10mM 磷酸カリウム緩衝液、pH 7.0-20 μM グアイアコール(C緩衝液)に対して透析し、C緩衝液で平衡化させたAsA結合Sephacryl S-200 HRカラム(1 × 10cm)に通した。カラムを50mlのC緩衝液で洗浄した後、C緩衝液50mlと0.1M NaClを含むC緩衝液50mlによる0-0.1M NaClの直線的濃度勾配によりタンパク質を溶出させた。

活性画分を、Ultra Thimble UH 100/10膜を用いて減圧下で約1mlに濃縮し、HiLoad 26/60 Sephacryl S-200 HRカラム(2.0 × 60cm)に添加し、C緩衝液でゲルろ過した。

活性画分をさらに、C緩衝液に対して透析した後、C緩衝液で平衡化させたTSK-GEL DEAE-3SWカラム(0.75 × 7.5cm)に通した。カラムを30mlのC緩衝液で洗浄した後、C緩衝液30mlと0.6M NaClを含むC緩衝液30ml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. クロマツ花粉 Cat の精製

クロマツ花粉10gを100mlの10mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.8, 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、23,000 × gで20分間遠心分離し、上清に硫酸アンモニウムを加えて45%飽和にした。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。回収した沈殿を10mM トリス-塩酸緩衝液、pH 7.8-1M 硫酸アンモニウム(B緩衝液)に懸濁し、B緩衝液で平衡化させたTSK-GEL Phenyl-TOYOPEARL 650M 疎水カラム(1.05 × 30cm)に通した。カラムを60mlのB緩衝液で洗浄した後、B緩衝液300mlとA緩衝液300mlによる1-0M 硫酸アンモニウムの逆直線的濃度勾配によりタンパク

質を溶出させた。

活性画分を回収し、Ultra Thimble UH 100/10膜を用いて減圧下で約1mlに濃縮し、HiLoad 26/60 Superdex 200 pgカラム(2.6 × 60cm)に添加し、A緩衝液でゲルろ過した。

9. ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)

精製酵素について、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⁽¹¹⁾を用い、濃縮ゲル濃度を4%、分離ゲル濃度をAPXについては10%、Catについては6%とし、20mAの定電流で行った。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APXおよびCatの活性染色を行った。

実験結果

1. クロマツ花粉 APX

(1) クロマツ花粉 APX の精製

クロマツ花粉の細胞抽出液中のAPXを、プロタミン処理DE-52陰イオン交換クロマトグラフィー、AsA結合ゲルによる親和性クロマトグラフィー、ゲルろ過およびDEAE-3SWカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。最終クロマトグラフィーの結果をFig. 1に示す。各クロマトグラフィーを通じて、検出された活性ピークは1個であった。クロマツ花粉APXの精製段階をTable 1に要約した。最終精製標品は、SDS-PAGEにおいて単一のバンドを与え、Native-PAGEにおいても活性染色とタンパク質染色とも同じ位置に単一のバンドを与えた(Fig. 2)。

(2) クロマツ花粉 APX の性質

クロマツ花粉APXの分子量は、ゲルろ過法により、約28kDaと算出された。SDS-PAGEにおいては、分子量は約29kDaと見積もられた(Table 2-(A))。

APXの電子供与体に対する特異性を調べた(Table 2-(B))。GSH, NAD(P)H, チトクロムcに対する活性は見られなかったが、グアイアコール、ピロカテコール、ピロガロールに対して活性を示した。

精製したAPXの至適pHは、Fig. 3-(A)に示すようにpH 5.5であった。pH安定性については

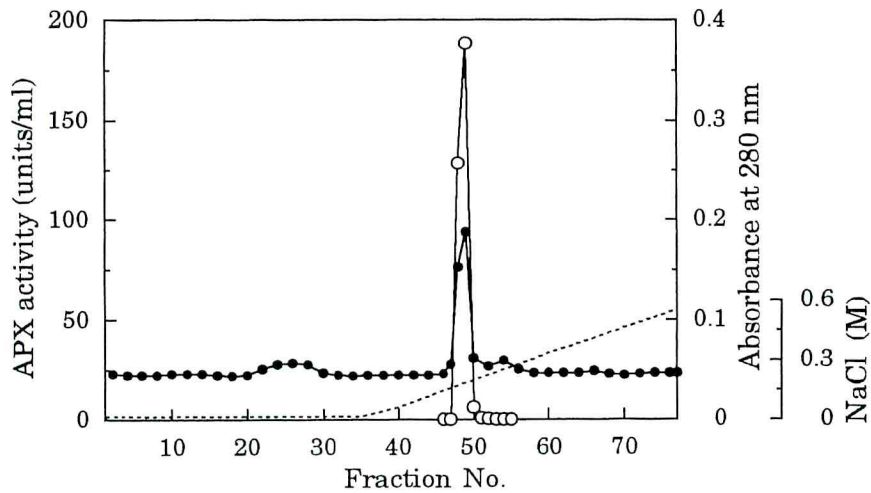


Fig. 1. Elution pattern of *Pinus* pollen APX on a TSK-GEL DEAE-3 SW column following HiLoad 26/60 Sephacryl S-200 HR column chromatography. For the conditions of chromatography, see Materials and Methods. Fractions of 1.5ml were collected. —○—, APX activity; —●—, absorbance at 280nm; ·····, NaCl concentration.

Table 1. Summary of purification of APX from *Pinus* pollen

Step	Volume (ml)	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	118.0	1,298	321.1	4.042	100.0
Protamine	136.0	1,360	227.7	5.973	104.8
DEAE-Cellulose	26.8	1,070	9.255	115.6	82.4
AsA-Sepharose	11.4	855	1.573	543.5	65.9
Sephacryl S-200	10.0	497	0.220	2,259	38.3
DEAE-3 SW	2.6	412	0.164	2,512	31.7

Fig. 3-(B) に示すように pH 6.0–8.5 で安定であった。温度安定性は低く、活性は 40°C、10 分間のインキュベーションによって大幅に減少し、50°C、10 分のインキュベーションによって消失した。

最終精製標品について、反応液中にヘム酵素阻害剤である 1 mM KCN または 1 mM NaNO₂ を加え活性を測定した結果、どちらの場合も活性は失われた。チオール酵素阻害剤である 1 mM *N*-エチルマレイミド、1 mM ヨード酢酸、1 mM *p*-クロロマーキュリー安息香酸または 1 mM 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息

香酸) の共存下室温で 10 分間放置した後に活性を測定すると、残存活性はそれぞれ、約 90%、約 50%、0%、0% であった (Table 2-(C))。

2. クロマツ花粉 Cat

(1) クロマツ花粉 Cat の精製

クロマツ花粉の細胞抽出液中の Cat を、プロタミン処理、塩析、疎水クロマトグラフィーおよびゲルろ過によって精製した。最終クロマトグラフィーの結果を Fig. 4 に示す。両クロマトグラフィーにおいて、

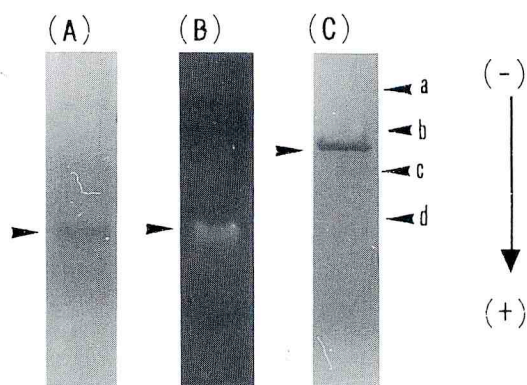


Fig. 2. Native- and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified APX from *Pinus* pollen. Purified APX was stained for protein (A) or APX activity (B) after run on a native-polyacrylamide gel, and stained for protein after run on a SDS-polyacrylamide gel (C). Molecular weight markers (a, ovalbumin, 43kDa; b, carbonic anhydrase, 30kDa; c, soybean trypsin inhibitor, 20.1kDa; d, α -lactalbumin, 14.4 kDa).

Table 2. Properties of APX from *Pinus* pollen

(A) Molecular mass	
Gel-filtration	SDS-PAGE
28 kDa	29 kDa
(B) Specificity for electron donors	
Donor	Relative activity
	H ₂ O ₂ 0.2 mM 2 mM
Ascorbate	100 120
GSH	0
Cyt c	0
NADH	0
NADPH	0
Pyrocatechol	0.08
Guaiacol	2
Pyrogallol	50 140
(C) Effect of inhibitor on APX activity	
Inhibitor (1 mM)	Relative activity
None	100
KCN	0
NaN ₃	0
<i>N</i> -Ethylmaleimide	90
Iodoacetate	50
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate	0
5, 5' -Dithiobis (2 -nitrobenzoate)	0

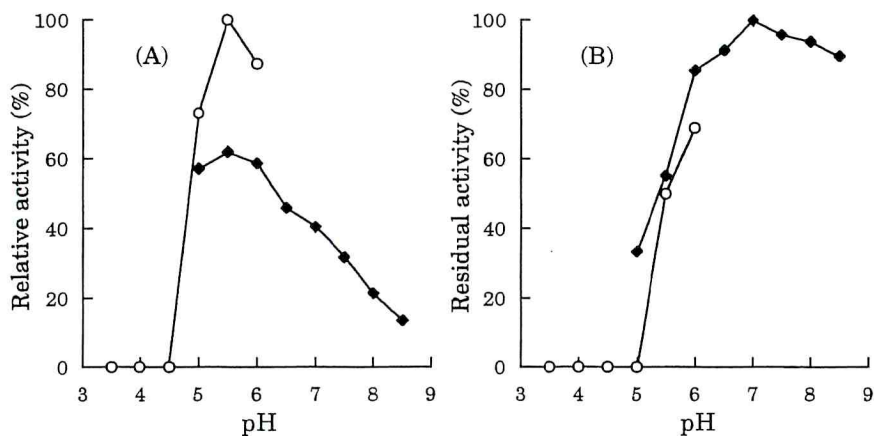


Fig. 3. (A) Effect of pH on the activity of *Pinus* pollen APX. Activity was measured in the standard assay method except that the indicated buffers were used. (B) Effect of pH on the stability of *Pinus* pollen APX. Activity was measured in the standard assay method after the enzyme was incubated for 24 hours at 5 °C in the indicated buffers. ○, Sodium acetate buffer; ◆, Potassium phosphate buffer.

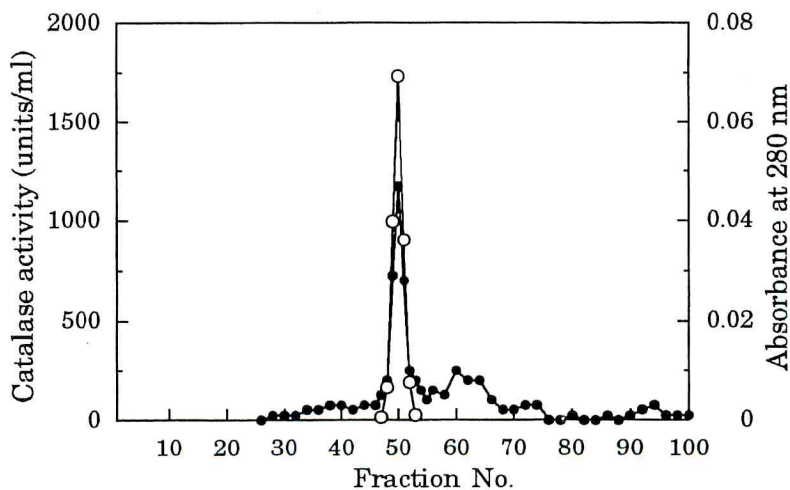


Fig. 4. Elution pattern of *Pinus* pollen catalase on a HiLoad 26/60 Superdex 200 pg column following TSKgel Phenyl-TOYOPEARL 650M column hydrophobic interaction chromatography. For the conditions of chromatography, see Materials and Methods. Fractions of 3 ml were collected. —○—, catalase activity; —●—, absorbance at 280 nm.

Table 3. Summary of purification of catalase from *Pinus* pollen

Step	Volume (ml)	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	66.0	19,043	239.6	79.5	100.0
Protamine	76.0	16,944	135.3	125.2	89.0
Ammonium sulfate	30.0	22,131	ND	ND	116.0
Phenyl-TOYOPEARL	36.0	15,934	ND	ND	83.7
Superdex 200	10.0	11,656	0.142	82,085	61.2

ND, not determined.

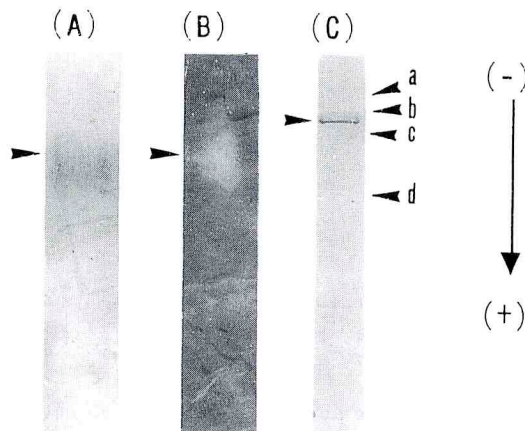


Fig. 5. Native- and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified catalase from *Pinus* pollen. Purified catalase was stained for protein (A) or catalase activity (B) after run on a native-polyacrylamide gel, and stained for protein after run on a SDS-polyacrylamide gel (C). Molecular weight markers (a, phosphorylase b, 94kDa; b, bovine serum albumin, 67kDa; c, ovalbumin, 43kDa; d, carbonic anhydrase, 30kDa).

検出された活性ピークは1個であった。クロマツ花粉 Cat の精製段階を Table 3 に要約した。最終精製標品は、SDS-PAGE において単一のバンドを与え、Native-PAGE においても活性染色とタンパク質染色とで同じ位置に単一のバンドを与えた (Fig. 5)。

(2) クロマツ花粉 Cat の性質

クロマツ花粉 Cat の分子量は、ゲルろ過法により約 225kDa と算出された。SDS-PAGE においては、分子量は約 53kDa と見積もられた (Table 4-(A))。

最終精製標品について、反応液中に 1 mM KCN ま

たは 1 mM NaN₃ を加え活性を測定した結果、いずれの場合も活性は失われた。1 mM または 10mM 2-メルカプトエタノール共存下 5 °C, 10 分インキュベートした後に活性を測定すると、残存活性はそれぞれ、約 60%, 約 20% であった (Table 4-(B))。

至適 pH については、Fig. 6-(A) に示すように pH 7 以下では pH が低くなるにつれて活性も低くなったが、pH 7 以上ではほとんど変化がなかった。pH 安定性については、Fig. 6-(B) に示すように pH 7 以上ではほぼ安定であった。

Table 4. Properties of catalase from *Pinus* pollen

(A) Molecular mass	
Gel-filtration	SDS-PAGE
225 kDa	53 kDa
(B) Effect of inhibitor on catalase activity	
Inhibitor (1 mM)	Relative activity
None	100
KCN	0
NaN ₃	0
2-Mercaptoethanol	60
2-Mercaptoethanol (10 mM)	20

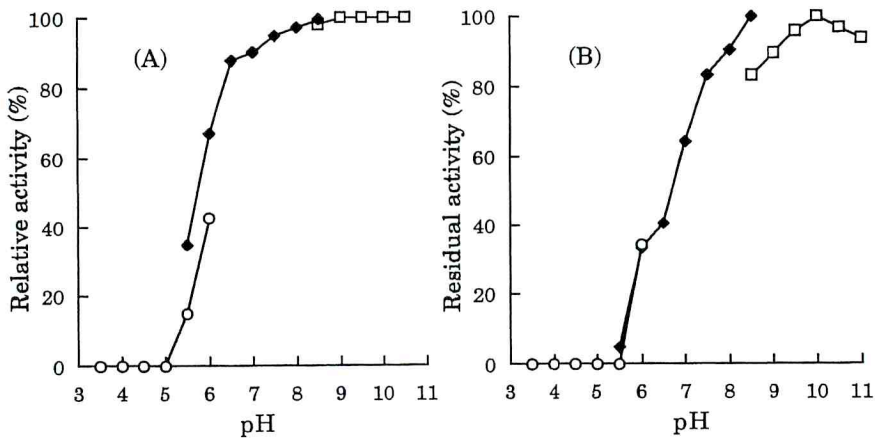


Fig. 6. (A) Effect of pH on the activity of *Pinus* pollen catalase. Activity was measured in the standard assay method except that the indicated buffers were used. (B) Effect of pH on the stability of *Pinus* pollen catalase. Activity was measured in the standard assay method after the enzyme was incubated for 24 hours at 5°C in the indicated buffers. ○, Sodium acetate buffer; ◆, Potassium phosphate buffer; □, Sodium carbonate buffer.

温度安定性については、活性は 60°C、10 分間のインキュベーションに対しては安定であったが、70°C、10 分間のインキュベーションによって消失した。

考 察

植物の APX には、葉緑体チラコイド膜に結合した酵素 (tAPX)、葉緑体ストロマに存在する酵素 (sAPX)、細胞質ゾルに存在する酵素 (cAPX) の 3 種のイソ酵素があることが知られている^(3, 4)。

これまでに単離された cAPX には、分子量約 30kDa の単量体の酵素⁽¹²⁻¹⁴⁾と分子量約 58kDa の 2 量体の酵素⁽¹⁵⁾とがある。クロマツ花粉抽出液から

は各クロマトグラフィーを通して APX 活性ピークは 1 個しか得られず、この酵素はゲルろ過と SDS-PAGE の結果から、分子量約 28-29kDa の単量体であると推測される。

APX に特徴的な性質の一つとして、電子供与体非存在下での失活がある。現在までに調べられた APX のうち、tAPX および sAPX は、電子供与体非存在下では数分以内に活性がすべて消失する^(16, 17)。cAPX については、ジャガイモ塊茎由来の酵素⁽¹²⁾以外のものでは、電子供与体非存在下で顕著な失活が見られない⁽¹³⁻¹⁵⁾。クロマツ花粉の酵素ではある程度の不安定性が見られたため、DEAE-セルロース陰イオン交換カラム以下の精製の過程で 20 μM グアイアコー

ルを加えたところ、酵素は安定化した。100 μ M ピロカテコールを用いても、酵素を安定化させることが可能であった。APX はヘム酵素であり、ヘムタンパク質の強力な阻害剤である KCN や NaN_3 によって阻害されるが、これはクロマツ花粉酵素でも同様であった。N-エチルマレイミド、ヨード酢酸、p-クロロマーキュリー安息香酸、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)などのチオール試薬による失活も他の APX と共通した性質であるが、このことから、酵素の活性中心に遊離のチオール基が存在することが示唆される。

ホウレンソウ、チャなどの葉緑体の APX は AsA に対して強い特異性を持っている⁽⁴⁾が、チャ⁽¹⁷⁾、エンドウの実生⁽¹⁵⁾、ホウレンソウの葉⁽³⁾、マメ科植物の根粒⁽¹⁴⁾などの cAPX はピロガロールを AsA より効率的に酸化することができる。たとえば、チャの葉から得られた2種の酵素のうち、葉緑体由来の酵素が AsA を酸化する速度はピロガロールとグアイアコールを酸化する速度のそれぞれ2.4倍と22倍であるが、細胞質由来の酵素が AsA を酸化する速度はピロガロールとグアイアコールを酸化する速度のそれぞれ0.2倍と4倍である⁽¹⁷⁾。クロマツ花粉の精製標品でも、反応液中の H_2O_2 濃度を2 mM とすると、ピロガロールを酸化する速度がアスコルビン酸を酸化する速度より速かった。しかし、反応液中の H_2O_2 濃度が低いとピロガロールに対する活性が低くなったが、これはエンドウの精製 cAPX でも示されている⁽¹⁵⁾。

Cat は多くの生物から単離されており、これまでに単離された Cat のほとんどは200kDa から240kDa の分子量をもつホモ4量体であるが⁽¹⁾、本実験で得られたクロマツ花粉の Cat も、ゲルろ過と SDS-PAGE の結果から、同様な分子量をもつホモ4量体であると考えられる。

クロマツ花粉の Cat は、塩析の際、45% 飽和の硫酸アンモニウム濃度でほとんどすべて沈殿した。また、疎水カラムに強く結合し、硫酸アンモニウム逆濃度勾配の終わり近くにしないと溶出されなかった。これらのことから、本酵素の疎水性はかなり強いと思われる。知られている他の Cat も疎水性が強いようである。ヘム蛋白質の阻害剤である KCN や NaN_3 に対する感受性、およびチオール(2-メルカプトエタノール)による失活⁽¹⁸⁾も、他の起源の Cat に見られる。他の Cat では、pH 6 から8.5 までの幅の広い至適 pH が見られている^(19, 20)が、本酵素では pH 7 以上でほぼ一定の活性を示した。レンズ豆葉⁽²¹⁾やサツマイモ根微生物⁽¹⁹⁾の Cat は非常に不安定で、特

に中性以下の pH での失活が著しいが、クロマツ標品は、10mM トリス-塩酸緩衝液、pH 7.8 中で数ヶ月間冷蔵保存しても活性の顕著な低下は見られなかった。

花粉では APX と Cat は H_2O_2 の消去にどのように関わっているのだろうか。著者らは、クロマツ花粉を O_2^- 増産剤バラコートが存在下で培養すると花粉管伸長が阻害されるが、そのとき SOD と Cat の活性は抑制されないのに APX は完全に失活することを報告した⁽²²⁾。この知見は花粉での H_2O_2 消去にも APX が重要であることを示唆しているように思われる。

光合成生物では、ホウレンソウ葉緑体ストロマ⁽²³⁾、ユーグレナ⁽²⁴⁾、マメ科植物の根粒⁽²⁵⁾などで、APX が AsA 再生系と共役して H_2O_2 消去に機能していることが証明されている。AsA 再生系には、NADH 依存性モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素、グルタチオン依存性デヒドロアスコルビン酸還元酵素、NADPH 依存性グルタチオン還元酵素などが関与している⁽²⁵⁾。

著者らの研究室では、クロマツ花粉の抽出液中にもこれらの還元酵素の活性を検出し、モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素とグルタチオン還元酵素をほぼ均一な状態にまで精製した。これらの酵素による AsA の再還元系が花粉の細胞内でも活性酸素消去機能の一翼を担っている可能性は高い。

要 約

クロマツの成熟花粉粒に含まれるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) を、プロタミン処理、陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過によって均一に精製した。精製 APX は、SDS-PAGE およびゲルろ過から、分子量28–29kDa の単量体と推定された。酵素活性は、チオール試薬、KCN および NaN_3 によって阻害された。グアイアコール、ピロガロール、ピロカテコールも酵素の基質として機能した。

また、クロマツの成熟花粉粒に含まれるカタラーゼを、プロタミン処理、塩析、疎水クロマトグラフィーおよびゲルろ過によって均一に精製した。精製カタラーゼは、SDS-PAGE およびゲルろ過から、分子量約225kDa で四量体と推定された。酵素活性は、KCN、 NaN_3 および2-メルカプトエタノールによって阻害された。

引用文献

- (1) 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（蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊号）. 共立出版株式会社（1988）.
- (2) 浅田浩二：酸素毒性. 生化学 48, 226-257 (1976).
- (3) Asada, K. : Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85, 235-241 (1992).
- (4) Asada, K. : Molecular properties of ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. In K. Asada and T. Yoshikawa (eds.), *Frontiers of reactive oxygen species in biology and medicine*. Elsevier Science pp. 103-106 (1994).
- (5) De Gara, L. , C. Paciolla, R. Liso, A. Stefani, A. Blanco and O. Arrigoni: Ascorbate metabolism in mature pollen grains of *Dasypyrum villosum* (L) Borb. during imbibition. *J. Plant Physiol.* 141, 405-409 (1993).
- (6) 古谷一朗・船隈 透・原 彰：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. 花粉誌 40, 85-93 (1994).
- (7) Nakano, Y. and K. Asada : Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880 (1981).
- (8) Nelson, D. P. and L. A. Kiesow : Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474-478 (1972).
- (9) Woodbury, W. , A. K. Spencer and M. A. Stahmann : An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44, 301-305 (1971).
- (10) Hartree, E. F. : Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48, 422-427 (1972).
- (11) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- (12) Elia, M. R. , G. Borraccino and S. Dipierro : Soluble ascorbate peroxidase from potato tubers. *Plant Science* 85, 17-21 (1992).
- (13) Koshiba, T. : Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiol.* 34, 713-721 (1993).
- (14) Dalton, D. A. , F. J. Hanus, S. A. Russell and H. J. Evans : Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol.* 83, 789-794 (1987).
- (15) Mittler, R. and B. A. Zilinskas : Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol.* 97, 962-968 (1991).
- (16) Amako, K. , G. -X. Chen and K. Asada : Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol.* 35, 497-504 (1994).
- (17) Chen, G. -X. and K. Asada : Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* 30, 987-998 (1989).
- (18) Takeda, A. , T. Miyahara , A. Hachimori and T. Samejima : The interactions of thiol compounds with porcine erythrocyte catalase. *J. Biochem.* (Tokyo) 87, 429-439 (1980).
- (19) Esaka, M. and T. Asahi : Purification and properties of catalase from sweet potato root microbodies. *Plant Cell Physiol.* 23, 315-322 (1982).
- (20) Beaumont, F. , H. -M. Jouve , J. Gagnon, J. Gaillard and J. Pelmont : Purification and properties of a catalase from potato tubers (*Solanum tuberosum*) .

-
- Plant Science* 72, 19-26 (1990).
- (21) Schiefer, S. , W. Teifel and H. Kindl :
Plant microbody proteins 1. Purification
and characterization of catalase from
leaves of *Lens culinaris*. *Hoppe Seyler's*
Z. Physiol. Chem. 357, 163-175 (1956).
- (22) Hara, A. , I. Huruya and T. Funaguma :
Effects of paraquat on tube elongation of
Pinus and *Typha* pollens. *Biosci. Biotech.*
Biochem. 59, 1128-1129 (1995).
- (23) 浅田浩二：葉緑体での活性酸素の生成と消去の
分子機構. 農化誌 67, 1255-1263 (1993).
- (24) 重岡 成：活性酸素代謝の分子的機作の解明.
農化誌 66, 1739-1747 (1992).
- (25) Dalton, D. A. , S. A. Russell , F. J.
Hanus , G. A. Pascoe and H. J. Evans :
Enzymatic reactions of ascorbate and
glutathione that prevent peroxide damage
in soybean root nodules. *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA 83, 3811-3815 (1986).
- (26) Asada, K. : Production and action of
active oxygen species in photosynthetic
tissues. In C. H. Foyer and P. M.
Mullineaux (eds.), Causes of photooxi-
dative stress and amelioration of defense
systems in plants. CRC Press pp. 77-104
(1994).
-

