

(原著論文)

## クロマツ花粉のモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼと グルタチオンレダクターゼ

星 奈保美・丹羽 達也・船隈 透・原 彰

名城大学農学部生物化学研究室

〒468 名古屋市天白区塩釜口1-501

(1996年3月30日受付, 1996年4月27日受理)

### Monodehydroascorbate Reductase and Glutathione Reductase from *Pinus* Pollen

Naomi HOSHI, Tatsuya NIWA, Toru FUNAGUMA and Akira HARA

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

Monodehydroascorbate reductase (MDA-R) and glutathione reductase (GSSG-R) involved in ascorbate-glutathione cycle, an important defense system against active oxygens, were investigated in *Pinus* pollen. MDA-R in the extract from *Pinus* pollen was purified 138-fold by means of protamine treatment, anion exchange chromatography, affinity chromatography, and gel-filtration. The enzyme was monomers occurring as two isozymes with molecular masses of 48kDa and 46kDa, as determined by SDS-PAGE. Both NADH and NADPH served as the electron donors of the enzyme. The *Km* values were 15.9  $\mu$ M and 42.4  $\mu$ M for NADH and NADPH, respectively. The enzyme activity was inhibited by thiol-reagents and 1mM GSSG.

GSSG-R in the extract from *Pinus* pollen was purified 272-fold by means of protamine treatment, anion exchange chromatography, affinity chromatography, and gel-filtration. The major enzyme had a molecular mass of 76kDa, as determined by gel-filtration. The enzyme activity was inhibited by thiol-reagents, but stabilized by GSH.

Cultivation of the pollen with 500  $\mu$ M paraquat, a strong inhibitor for the tube elongation of *Pinus* pollen, resulted in the drastic decrease of ascorbate peroxidase (APX) activity, while the activities of other enzymes in ascorbate-glutathione cycle were almost conserved in contrast to those in the control.

**Key words :** Active oxygen, Monodehydroascorbate reductase, Glutathione reductase, Paraquat, *Pinus* pollen

## 緒 言

好気性生物は酸素をエネルギー獲得反応における電子受容体として利用し、生命を維持している。基底状態の三重項酸素分子 ( $^3\text{O}_2$ ) はそれ自体有害ではないが、反応性の高い活性酸素種は生体内で様々な酸素障害をひきおこす。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 ( $^1\text{O}_2$ ) がある。生物は酸素障害から身を守るために活性酸素消去系を持っている。植物での  $\text{O}_2^-$  の消去はアスコルビン酸と GSH を特異的に還元基質として用い、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を経て水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) まで還元するアスコルビン酸 - グルタチオン経路が知られている。この経路の構成酵素は SOD, APX, MDA-R, DHA-R および GSSG-R である<sup>(1-4)</sup>。

著者らは花粉における活性酸素消去経路を調べ、SOD, APX およびカタラーゼの単離と性質について報告した<sup>(5, 6)</sup>。また、クロマツ花粉をパラコート存在下で培養すると花粉管伸長が抑制されるが、その時 APX が完全に失活していることを見出した<sup>(7)</sup>。

本報告は、MDA-R および GSSG-R の精製、性質およびパラコート存在下で培養した花粉中の活性酸素消去系酵素の挙動を記述する。

## 実験材料および方法

### 1. 花 粉

クロマツ (*Pinus thunbergii* L.) の成熟花粉は、1995年4月に、名古屋市緑区大高緑地公園にて採取し、室温で6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

アスコルビン酸はナカライトスク社から、NADH, NADPH, GSSG および GSH は(株)コーポレーション社から、アスコルビン酸オキシターゼは東洋紡績(株)社から購入した。DE-52(セルロース陰イオン交換体)はWhatman Paper Ltd. 社から、Blue-Sepharose

CL-6B および HiLoad 26/60 Superdex 200pg は Pharmacia LKB Biotechnology 社から、Ultra Thimbles UH 100/10 膜は Schleicher & Schuell 社から購入した。タンパク質定量用の色素液 (PROTEIN ASSAY 試薬) は BIO-RAD 社から、電気泳動用ポリアクリルアミドゲル、パジェル SPU-15S, パジェル NPU-7.5L はアトー社から、タンパク質銀染色液キット (シルベストスティン) はナカライトスク社から購入した。

### 3. 酵素活性測定法

#### (1) SOD, APX およびカタラーゼ活性測定法

SOD, APX およびカタラーゼ活性は前報<sup>(5, 6)</sup>に準じて測定した。

#### (2) MDA-R 活性測定法

MDA-R 活性は Hossain らの方法<sup>(8)</sup>を一部改変して測定した。反応混合液 1 ml は 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5), 0.1mM NADH, 2.5mM アスコルビン酸、1 単位アスコルビン酸オキシダーゼおよび MDA-R を含み、酵素反応は 25°C で行った。NADH の 340nm での吸光係数を  $6.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  として MDA-R による NADH の酸化を 340nm における吸光度の減少で測定した。上記反応条件下で 1 分間に  $1\ \mu\text{mol}$  のモノデヒドロアスコルビン酸を還元する酵素量を 1 単位と定義した。

#### (3) GSSG-R 活性測定法

GSSG-R 活性は Foyer と Halliwell の方法<sup>(9)</sup>を一部改変して測定した。反応混合液 1 ml は 120mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5), 0.1mM NADPH, 1mM EDTA, 5mM GSSG および GSSG-R を含み、酵素反応は 25°C で行った。NADPH の 340nm での吸光係数を  $6.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  として GSSG-R による NADPH の酸化を 340nm における吸光度の減少で測定した。上記反応条件下で 1 分間に  $1\ \mu\text{mol}$  の GSSG を還元する酵素量を 1 単位と定義した。

#### (4) DHA-R 活性測定法

DHA-R 活性は Hossain と Asada の方法<sup>(10)</sup>を一部改変して測定した。反応混合液 1 ml は 100mM リ

略語: APX, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ; *p*-CMB, *p*-クロロメルクリ安息香酸; DHA-R, デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ; GSH, 還元型グルタチオン; GSSG, 酸化型グルタチオン; GSSG-R, グルタチオンレダクターゼ; MDA-R, モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ; PAGE, ポリアクリルアミドゲル電気泳動; SOD, スーパーオキシドジスムターゼ。

ン酸緩衝液 (pH 7.5), 5 mM GSH, 0.5mM デヒドロアスコルビン酸および DHA-R を含み, 酵素反応は 25°Cで行った。アスコルビン酸の 265nm での吸光係数を  $12.91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  として DHA-R によるアスコルビン酸の生成を 265nm における吸光度の増加で測定した。上記反応条件下で 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  のデヒドロアスコルビン酸を還元する酵素量を 1 単位と定義した。

#### 4. ポリアクリラミドゲル電気泳動

SDS-PAGE はパジェル SPU-15S (ゲル濃度 15%) と付属の専用緩衝液を用いて, 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, パジェル NPU-7.5L (ゲル濃度 7.5%) と Laemmli の緩衝液システム<sup>(11)</sup>を用いて, 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, 他のおもは MDA-R の活性染色を行った。

#### 5. MDA-R 活性染色法

MDA-R の活性染色は, Ogawa らのフェロシアン化銅法<sup>(12)</sup>を改変して行った。電気泳動後のゲルを 0.7mM NADH, 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), 10mM クエン酸ナトリウム, 10mM 硫酸銅および 0.5mM フェリシアン化カリウムを含む液に暗所で 5 分浸漬し, 活性部位を赤褐色のバンドとして検出した。また, 別の活性染色法として, Kaplan の方法<sup>(13)</sup>を一部改変して行った。電気泳動後のゲルを 1.2mM ニトロブルーテトラゾリウム, 0.04mM 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール, 2.5mM アスコルビン酸, 50mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.5), 0.1mM NADH および 1 単位アスコルビン酸オキシターゼを含む液に暗所で 2 時間浸漬し, 活性部位を濃青色のバンドとして検出した。

#### 6. 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, PROTEIN ASSAY 試薬による色素法によって測定した。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。

#### 7. クロマツ花粉 MDA-R の精製

クロマツ花粉 20g を 400ml の 10mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.5, A 緩衝液) に懸濁し, 50ml ずつを

テフロン - ガラスホモジナイザーで 15 分間破碎した。ホモジネートを  $20,000 \times g$  で 10 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,  $20,000 \times g$  で 10 分間遠心分離した。上清を, A 緩衝液で平衡化させた DE-52 隣イオン交換カラム (2.5 × 27cm) に通した。カラムを 30ml の A 緩衝液で洗浄した後, A 緩衝液 300ml と 0.8M NaCl を含む A 緩衝液 300ml による 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 A 緩衝液で平衡化させた Blue-Sepharose CL-6B カラム (1.5 × 28cm) に通した。カラムを A 緩衝液 100ml で洗浄した後, 10mM NADH を含む A 緩衝液 80ml でタンパク質を溶出させた。活性画分を, Ultra Thimbles UH 100 / 10 膜を用いて減圧下で約 1 ml に濃縮し, HiLoad 26 / 60 Superdex 200pg カラム (2.0 × 60cm) に添加し, 0.1M NaCl を含む A 緩衝液でゲルろ過した。

#### 8. クロマツ花粉 GSSG-R の精製

クロマツ花粉 30g を 600ml の 0.1mM GSH を含む 10mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.5, B 緩衝液) に懸濁し, 50ml ずつをテフロン - ガラスホモジナイザーで 15 分間破碎した。ホモジネートを  $20,000 \times g$  で 10 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,  $20,000 \times g$  で 10 分間遠心分離した。上清を, B 緩衝液で平衡化させた DE-52 隣イオン交換カラム (2.5 × 30cm) に通した。カラムを 30ml の A 緩衝液で洗浄した後, B 緩衝液 300ml と 0.8M NaCl を含む B 緩衝液 300ml による 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 B 緩衝液で平衡化させた Blue-Sepharose CL-6B カラム (1.5 × 13cm) に通した。カラムを 0.3M NaCl を含む B 緩衝液 80ml, 続いて 1.0M NaCl を含む B 緩衝液 100ml でタンパク質を溶出させた。

活性画分を, Ultra Thimbles UH 100 / 10 膜を用いて減圧下で約 1 ml に濃縮し, HiLoad 26 / 60 Superdex 200pg カラム (2.0 × 60cm) に添加し, 0.1M NaCl を含む B 緩衝液でゲルろ過した。

#### 9. クロマツ花粉培養および花粉抽出液調製法

クロマツ花粉 0.5g を, 直径約 20cm のベトリ皿を用い, 100ml の 3 % シュクロース液体培地上で 30°C で 24 時間培養した。また培地には微生物による汚染

を防ぐために、50ppm クロラムフェニコールを加えた。

培養後のクロマツ花粉を No. 2 のろ紙でろ過して集め、100mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.8) を加えて 10ml とし、テフロン-ガラスホモジナイザーで 10 分間ホモジナイズした後、ホモジネートを 20,000 × g で 10 分間遠心分離した。上清を酵素液として用いた。

## 実験結果

### 1. クロマツ花粉 MDA-R

#### (1) MDA-R の精製

クロマツ花粉 MDA-R の精製ステップのまとめを

Table 1 に示す。MDA-R は各クロマトグラフィーを通じて活性ピークは 1 個であり、ゲルろ過ではタンパク質のピークと活性ピークが一致した (Fig. 1)。最終精製標品は、SDS-PAGEにおいては、鮮明な 2 本のバンドを示し、Native-PAGEにおいては、活性染色 (フェロシアン化銅法) とタンパク質染色 (2 番目のバンドは不鮮明であるが矢印の位置) とで相対応する位置に 2 本のバンドを示した (Fig. 2)。比活性は 138 倍まで上昇し、収率は 21% であった。

#### (2) MDA-R の性質

クロマツ花粉 MDA-R の分子量は、ゲルろ過法により約 45kDa と算出された。SDS-PAGEにおいては、分子量はメインのバンドで約 48kDa、マイナー

Table 1. Summary of purification of MDA-R from *Pinus* pollen

Step	Volume (ml)	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	305	968.1	472.1	2.05	100
Protamine treatment	335	836.0	375.4	2.34	86.4
DEAE-Cellulose (DE-52)	30.0	232.3	42.18	5.51	24.0
Blue-Sepharose (CL-6B)	32.2	208.6	1.362	153	21.5
Gel-filtration (Superdex 200pg)	17.5	206.8	0.730	283	21.4

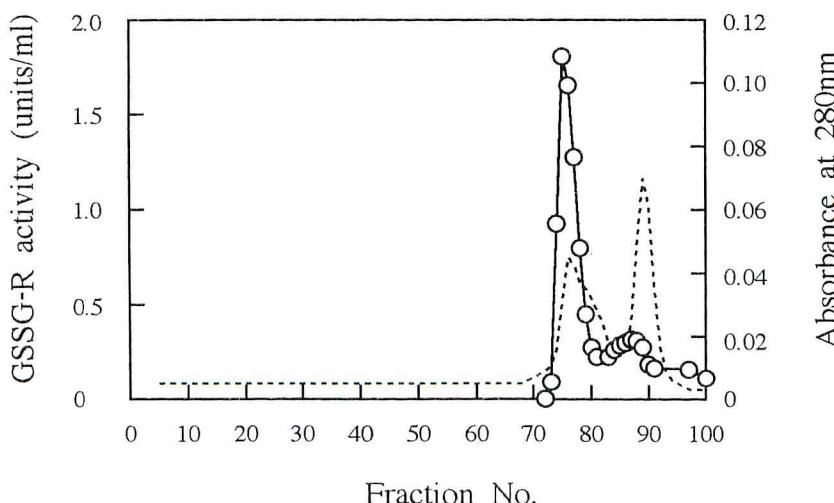


Fig. 1. Elution pattern of *Pinus* pollen MDA-R on a HiLoad 26/60 Superdex 200pg column following Blue-Sepharose CL-6B column chromatography. For the condition of chromatography, see Materials and Methods. Fractions of 2.5ml were collected. —○—, MDA-R activity ; ..... , absorbance at 280nm.

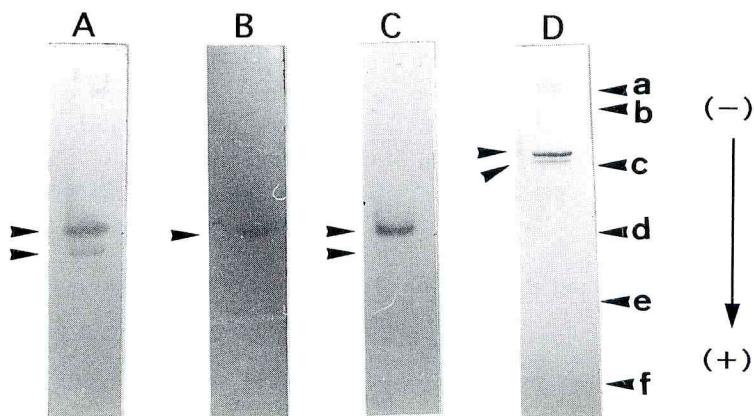


Fig. 2. Native- and SDS-PAGE of purified MDA-R from *Pinus* pollen. Purified enzyme was run on a native-polyacrylamide gel and stained for protein (A), MDA-R activity by Ferricyanide-copper method (B) and MDA-R activity by Kaplan method (C), and also analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (D). Molecular weight markers (a, phosphorylase, 94kDa ; b, bovine serum albumin, 67kDa ; c, ovalbumin, 43kDa ; d, carbonic anhydrase, 30kDa ; e, soybean trypsin inhibitor, 20.1kDa ; f,  $\alpha$ -lactalbumin, 14.4kDa).

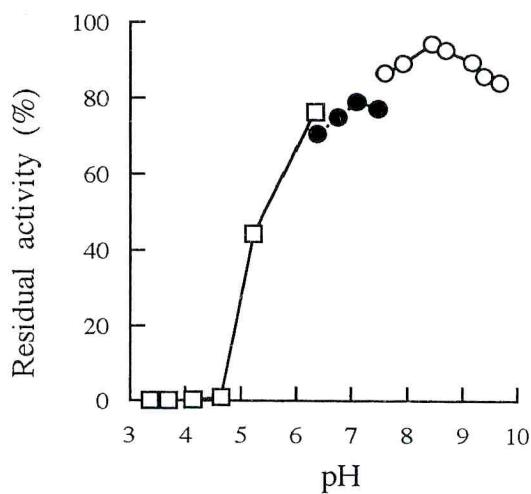


Fig. 3. Effect of pH on the stability of *Pinus* pollen MDA-R. Activity was measured in the standard assay method after the enzyme was kept for 24 hours at 5 °C in the indicated buffers. —□—, Sodium acetate buffer ; ⋯●⋯, Potassium phosphate buffer ; —○—, Tris-HCl buffer.

のバンドで約46kDaと見積もられた。MDA-R活性測定法でのモノデヒドロアスコルビン酸に対する活性を100%とすると、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール200μMに対し38.4%，フェリシアン化カリウム200μMに対し187%の活性を示した。

MDA-RのpH安定性では、pH 6.0-9.5, 24時間で80%以上の活性が維持された(Fig. 3)。また、10分間の加熱で50°Cまでは安定であったが、60°Cで70

%、70°Cで完全に失活した。MDA-RのK<sub>m</sub>値はNADHに対して15.9μM、NADPHに対して42.4μMであった。

MDA-R活性に及ぼすSH基阻害剤およびグルタチオンの影響を調べた。結果をTable 2に示す。MDA-Rはp-CMB、CuSO<sub>4</sub>および5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)によって強く阻害された。GSSGがMDA-Rに強い活性阻害を示したので、グ

Table 2. Effect of thiol-reagents and glutathione on MDA-R activity from *Pinus* pollen

Compound	Relative MDA-R activity (%)	
	0.1mM*	1.0mM*
None	100	100
N-Ethylmaleimide	79	62
Iodoacetate	95	56
p-CMB	15	0
CuSO <sub>4</sub>	15	0
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoate)	16	0
GSH	100	100
GSSG	100	49

\*Concentration of compound added.

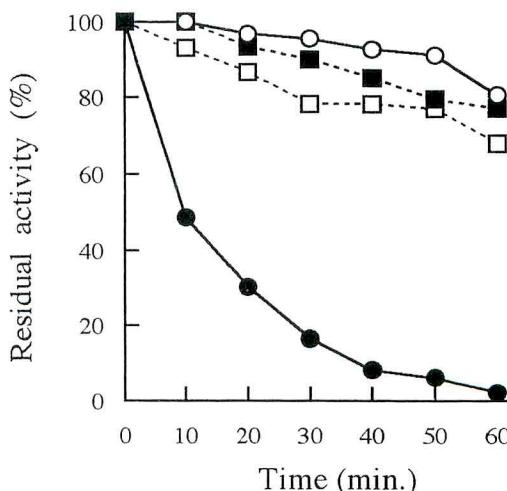


Fig. 4. Effect of glutathione concentration on the stability of *Pinus* pollen MDA-R. Activity was measured in the standard assay method after the enzyme was incubated with glutathione for indicated times. —●—, 1.0mM GSSG; —○—, 0.1mM GSSG; ···■···, 1.0mM GSH; ···□···, 0.1mM GSH.

ルタチオンの存在下での安定性を調べた。Fig. 4に示すようにMDA-Rは1 mM GSSGの存在下、1時間の放置によってほとんど失活した。

## 2. クロマツ花粉 GSSG-R

### (1) GSSG-Rの精製

クロマツ花粉 GSSG-R の精製ステップのまとめをTable 3に示す。アフィニティーコロマトグラフィーまでの活性ピークは1個であったが、ゲルろ過ではシャープなピークの後ろに弱いブロードなピークが確認された(Fig. 5)。しかし、ブロードなピークは活性が弱かったため、性質について調べることはできなかった。メジャーピークの比活性は粗酵素の272倍まで上昇したが、SDS-PAGE, Native-PAGE および活性染色の結果は均一性を証明するに至らなかった。

たため、性質について調べることはできなかった。メジャーピークの比活性は粗酵素の272倍まで上昇したが、SDS-PAGE, Native-PAGE および活性染色の結果は均一性を証明するに至らなかった。

### (2) GSSG-Rの性質

クロマツ花粉のGSSG-Rの分子量は、ゲルろ過法により約76kDaと算出された。精製したGSSG-Rの至適pHはpH 7.0-8.0であった(Fig. 6 (A))。データは示していないが、クロマツ花粉のGSSG-Rの測定には緩衝液濃度が重要であり、最大活性は、120mM以上で得られた。pH安定性では、pH 7.0-

Table 3. Summary of purification of GSSG-R from *Pinus* pollen

Step	Volume (ml)	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	490	120.1	627.0	0.192	100
Protamine treatment	575	111.3	190.8	0.583	92.7
DEAE-Cellulose (DE-52)	38.5	78.99	38.97	2.03	65.8
Blue-Sepharose (CL-6B)	6.8	57.91	1.886	30.7	48.2
Gel-filtration (Superdex 200pg)	10.0	15.61	0.298	52.4	13.0

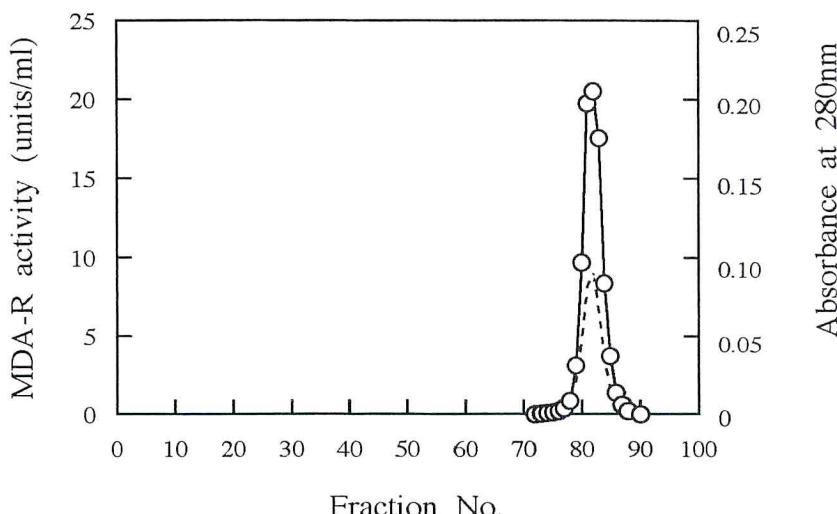


Fig. 5. Elution pattern of *Pinus* pollen GSSG-R on a HiLoad 26/60 Superdex 200pg column following Blue-Sepharose CL-6B column chromatography. For the condition of chromatography, see Materials and Methods. Fractions of 2.5ml were collected. -○-, GSSG-R activity; ..... , absorbance at 280nm.

10.0, 24 時間で 80%以上の活性が維持された。(Fig. 6 (B)). 温度安定性は比較的高く, 60°C, 10 分の加熱でも 80%の活性が保持された。GSSG-R の  $K_m$  値は GSSG に対して  $15.6 \mu M$ , NADPH に対して  $39.3 \mu M$  であった。クロマツ花粉の GSSG-R は NADH を電子供与体として利用することはできなかった。

GSSG-R 活性に及ぼす SH 基阻害剤の影響を Table 4 に示す。GSSG-R は *p*-CMB によって大き

く阻害されたが, 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) では 1 mM 濃度でも全く阻害されなかった。

### 3. クロマツ花粉の DHA-R

クロマツ花粉抽出液は DHA-R の強い活性を示す。その精製を試みたところ, MDA-R, GSSG-R と同様にプロタミン処理は有効であったが, DE-52 による陰イオン交換クロマトグラフィーによってほとんど失活した。現在まで有効な精製法は見つかっていない。

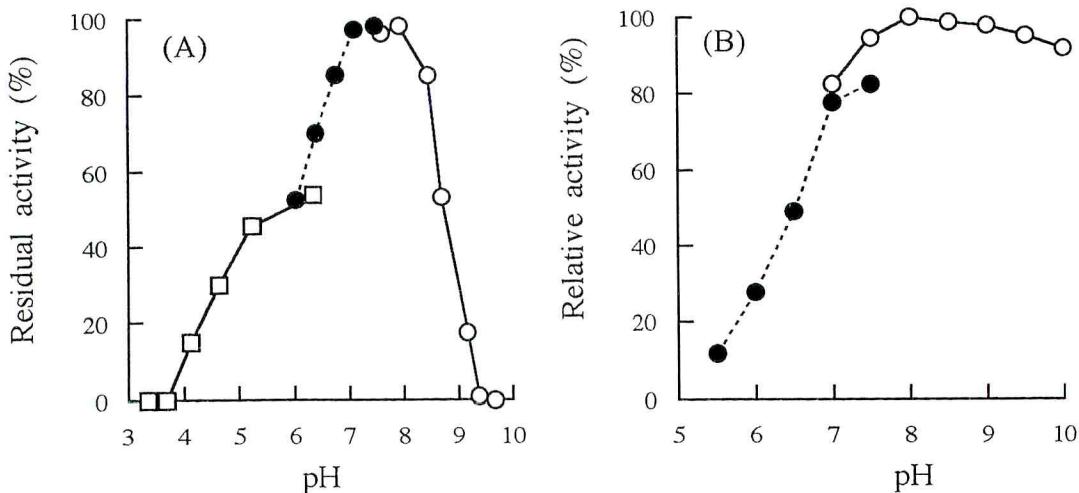


Fig. 6. (A) Effect of pH on the activity of *Pinus* pollen GSSG-R. Activity was measured in the standard assay method except that the indicated buffers were used. (B) Effect of pH on the stability of *Pinus* pollen GSSG-R. Activity was measured in the standard assay method after the enzyme was kept for 24 hours at 5 °C in the indicated buffers. —□—, Sodium acetate buffer ; ···●···, Potassium phosphate buffer ; —○—, Tris-HCl buffer.

Table 4. Effect of thiol-reagents on GSSG-R activity from *Pinus* pollen

Compound	Relative GSSG-R activity (%)	
	0.1mM*	1.0mM*
None	100	100
<i>N</i> -Ethylmaleimide	100	94
Iodoacetate	95	93
<i>p</i> -CMB	3	3
CuSO <sub>4</sub>	65	36
5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoate)	100	100

\*Concentration of compound added.

Table 5. Change in activities of SOD, APX, catalase, MDA-R, DHA-R and GSSG-R after 24-hour cultivation of *Pinus* pollen

	Relative activity (%)*					
	SOD	APX	Catalase	MDA-R	DHA-R	GSSG-R
Without paraquat	188	128	108	78.4	56.3	51.9
With paraquat	178	8.6	87.3	98.8	30.5	87.3

\*Each activity was expressed as a percentage of enzyme activity from mature pollen without cultivation. SOD, superoxide dismutase ; APX, ascorbate peroxidase ; MDA-R, monodehydroascorbate reductase ; DHA-R, dehydroascorbate reductase ; GSSG-R, glutathione reductase.

#### 4. パラコート存在下での培養クロマツ花粉中の活性酸素消去酵素の挙動

パラコート存在下で培養した花粉抽出液の活性酸素消去酵素の活性と、パラコートを含まない培地で培養した花粉抽出液中の酵素活性とを比較した。結果を Table 5 に示す。前報<sup>(7)</sup>で記述したように、500 μM のパラコートの存在下では、花粉は発芽が認められるものの花粉管は伸長しない。この抽出液中では APX の活性だけが大きく減少したが、他の酵素はパラコートの有無で大きな差は見られなかった。

## 考 索

MDA-R は、菌類ではアカパンカビ<sup>(14)</sup>、植物においてはホウレンソウ<sup>(8)</sup>、キュウリ<sup>(15)</sup>などの葉緑体だけでなくジャガイモの塊茎<sup>(16)</sup>、ダイズの根粒<sup>(17)</sup>などの非光合成部位からも単離されている。これは光合成のみでなく呼吸などの電子伝達系、窒素固定の経路でも活性酸素が生成しているためであると考えられている。我々もまた、非光合成器官であるクロマツ花粉に MDA-R の強い活性を発見した。

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 MDA-R の活性のピークは 1 個しか得られなかつたが、SDS-PAGE、Native-PAGE ともに 2 本のバンドが確認された (Fig. 2)。SDS-PAGE から算出した分子量は約 48kDa と 46kDa でゲルろ過から算出した分子量は約 45kDa であるから、モノマーの 2 つのアイソザイムが存在すると推測される。これまでに単離されている MDA-R は、ダイズ根粒の MDA-R が 39kDa と 40kDa のダイマーである以外はみなモノマーで、分子量はアカパンカビの MDA-R が 66kDa、キュウリの MDA-R が 47kDa、ジャガイモ塊茎の MDA-R が 41.5kDa と報告されて

いる<sup>(14-17)</sup>。

アカパンカビおよび動物の MDA-R は NADH のみを電子供与体として利用し、NADPH を利用することはできない<sup>(14)</sup>。クロマツ花粉の MDA-R は NADH と NADPH の両方を電子供与体として利用することができるが、NADPH に対する *Km* 値は NADH に対する *Km* 値の約 2.7 倍であった。他の高等植物の MDA-R も NADH と NADPH の両方を電子供与体として利用することができ、親和性の差は様々であるがいずれも NADH の方が親和性が強い<sup>(8, 15-17)</sup>。

これまでに単離された MDA-R は全てチオール酵素であると報告されている<sup>(8, 15-17)</sup>。クロマツ花粉の MDA-R もチオール試薬、特に *p*-CMB、CuSO<sub>4</sub>、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)で強い阻害が確認された。

また、MDA-R は 1.0 mM GSSG の存在下でインキュベートすると失活した。しかし 0.1 mM GSSG や GSH では急激な失活はなかったので、GSSG がある濃度以上になると MDA-R の活性中心に結合するのではないかと推測される。文献上調べた限りではこのような報告は発表されていない。

活性酸素消去系で GSH の再生という重要な役割を担っている GSSG-R もまた、数種の動植物で単離されている。マウスの肝臓<sup>(18)</sup>、酵母<sup>(19)</sup>およびミドリムシ<sup>(20)</sup>から単離された GSSG-R はいずれもモノマーで分子量は順に 125kDa, 124kDa, 79kDa であった。高等植物では、ホウレンソウ<sup>(9)</sup>、コメ<sup>(21)</sup>およびエンドウ<sup>(22)</sup>から単離されているが、これらはいずれもホモダイマーであり、分子量は、モノマーとしてそれぞれ 72kDa, 52kDa, 32kDa と報告されている。

クロマツ花粉の GSSG-R はメジャーピークの比活性が 272 倍まで上昇したが、完全に均一にはならなかっ

た。ゲルろ過の結果、メジャーピークは約 76kDa、マイナーピークは約 29kDa に現れた。

クロマツ花粉の GSSG-R は非常に不安定で、添加剤なしでは最終ステップまでに酵素が失活してしまうが、0.1mM の GSH を加えることで、収率よく精製できた。また、この酵素は、活性測定時の緩衝液濃度に大きく左右されたが、このような報告は他の GSSG-R では見られない。NaCl の存在下では GSSG-R 活性は影響を受けないことからイオン強度によるものではないと思われる。これまでに単離された GSSG-R は全てチオール酵素であり<sup>(9, 18-22)</sup>、マツ花粉の GSSG-R もまた例外ではなかった。しかし、MDA-R ほどは影響を受けず、p-CMB, CuSO<sub>4</sub> で強く阻害を受けた他はあまり阻害を受けなかった。

GSH の存在下でデヒドロアスコルビン酸をアスコルビン酸に再生する DHA-R はホウレンソウの DHA-R<sup>(10)</sup> が唯一均一に精製されただけである。これは DHA-R が非常に不安定であることに原因があるが、クロマツ花粉抽出液に強い活性を示す DHA-R も、その不安定な性質のため精製が困難を極めている。

パラコート添加時におけるアスコルビン酸-グルタチオン経路の構成酵素の変動は、コムギの実生<sup>(23)</sup>、クロマツおよびガマ花粉<sup>(7)</sup>で報告されている。コムギの実生では、SOD, APX, DHA-R および GSSG-R のすべてがパラコート存在下で大きく減少した<sup>(23)</sup>。本実験では SOD, APX およびカタラーゼについては培養法を変えた（寒天から液体培地）ので多少のずれはあるが以前の結果<sup>(7)</sup>を再現し、APX は 90% 以上の活性を失った。しかし、MDA-R, GSSG-R 活性は、パラコート存在下でむしろ増加を示し、DHA-R はパラコート存在下で若干減少した。この結果から、クロマツ花粉のパラコート存在下での花粉管伸長阻害は、APX の失活による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の増加に起因すると推測される。APX は還元剤が共存しないと失活することが報告されており<sup>(24, 25)</sup>、花粉中の還元基質として働くアスコルビン酸や GSH の量的変動について現在調べている。

## 要 約

活性酸素の防御系であるアスコルビン酸-グルタチオン経路に含まれる MDA-R と GSSG-R についてクロマツ花粉で調べた。

MDA-R を、プロタミン処理、陰イオン交換クロ

マトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーおよびゲルろ過によって比活性で 138 倍に精製した。精製 MDA-R は、SDS-PAGE およびゲルろ過から、分子量約 48kDa と約 46kDa のアイソザイムであると推定された。精製酵素は NADH と NADPH の両方を電子供与体として利用することができ、それぞれの Km 値は 15.9 μM と 42.4 μM であった。酵素活性はチオール試薬および 1.0 mM GSSG によって阻害された。

また GSSG-R を、プロタミン処理、陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーおよびゲルろ過によって比活性で 272 倍に精製した。精製 GSSG-R は、ゲルろ過から、分子量約 76kDa と推定された。酵素活性はチオール試薬によって阻害され、0.1 mM GSH によって安定化した。

花粉管伸長を阻害する 500 μM パラコートの存在下でクロマツ花粉を培養すると、APX 活性は減少したが、アスコルビン酸-グルタチオン経路の他の酵素はコントロールと比較して大きな変化はなかった。

## 引 用 文 献

- (1) 中野 稔・浅田浩二・大柳善彦：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：葉緑体内での活性酸素の生成と消去の分子機構、農化誌 67, 1225-1263 (1993)。
- (3) Asada, K. : Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In C. H. Foyer and P. M. Mullineaux (eds), causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press. pp77-104 (1994).
- (4) Dalton, D., 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).
- (5) 古谷一郎・船隈 透・原 彰：ガマおよびクロマツ花粉のスーパーオキシダクターゼ、花粉誌 40, 85-93 (1994)。
- (6) 古谷一郎・船隈 透・原 彰：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、

- 花粉誌 41, 1-11 (1995).
- (7) Hara, A., I. Huruya, T. Funaguma : Effect of paraquat on tube elongation of *Pinus* and *Typha* pollen. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1128-1129 (1995).
  - (8) Hossain, M. A., Y. Nakano and K. Asada : Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 25, 385-395 (1984).
  - (9) 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).
  - (10) Hossain, M. A. and K. Asada : Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25, 85-92 (1984).
  - (11) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
  - (12) Ogawa, K., T. Sato and H. Miyahara : 酸化還元酵素の電顕的細胞化学. 新酵素組織化学. 朝倉書店 pp150-151 (1980).
  - (13) Kaplan, J. C. : Electrophoretic study of glutathione reductase in human erythrocytes and leucocytes. *Nature* 217, 256-258 (1968).
  - (14) 真野純一, 浅田浩二 : モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素. 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦編, 蛋白質 核酸 酵素 33, 862-2868 (1988).
  - (15) Hosain, M. A. and K. Asada : Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J. Biol. Chem.* 260, 12920-12926 (1985).
  - (16) Borraccino, G., S. Dipierro and O. Arrigoni : Purification and properties of ascorbate free-radical reductase from potato tubers. *Planta* 167, 521-526 (1986).
  - (17) Dalton, D. A., L. Langeberg and M. Robins : Purification and characterization of monodehydroascorbate reductase from soybean root nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 281-286 (1992).
  - (18) Carlberg, I. and B. Mannervik : Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480 (1975).
  - (19) Moroff, G. and K. G. Brandt : Yeast glutathione reductase : studies of the kinetics and stability of the enzyme as a function of salt concentration. *Biochem. Biophys. Acta* 410, 21-31 (1975).
  - (20) Shigeoka, S., T. Onishi, Y. Nakano and S. Kitaoka : Characterization and physiological function of glutathione reductase in *Euglena gracilis* z. *J. Biochem.* 247, 511-515 (1987).
  - (21) Ida, S. and Y. Morita : Studies on respiratory enzyme in rice kernel : purification of an acidic flavoprotein, glutathione reductase, from rice embryos. *Agric. Biol. Chem.* 35, 1542-1549 (1971).
  - (22) Connel, J. P. and J. E. Mullet : Pea chloroplast glutathione reductase : purification and characterization. *Plant Physiol.* 82, 351-356 (1986).
  - (23) Kraus, T. E. and R. A. Fletcher : Paclobutrazol protects wheat seedlings from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved ? *Plant Cell Physiol.* 35, 45-52 (1994).
  - (24) 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).
  - (25) 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).

