

(原著論文)

カタラーゼ阻害剤がクロマツおよびガマ花粉の 花粉管伸長に及ぼす影響

原 彰・星 奈保美・船隈 透

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9月30日受付, 1996年10月29日受理)

Effect of Catalase Inhibitors on Tube Elongation of *Pinus* and *Typha* Pollens

Akira HARA, Naomi HOSHI and Toru FUNAGUMA

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

The effect of catalase inhibitors (3-amino-1,2,4-triazole, thiosemicarbazide, salicylic acid) on germination and tube elongation was examined in *Pinus* and *Typha* pollens. Aminotriazole had no significant effect on germination and tube elongation in both pollens. It lowered specifically catalase activity, but induced no remarkable decline in reduced ascorbate and glutathione levels, and in activities of active oxygen scavenging enzymes except catalase. This suggests that catalase does not play an important role during tube elongation of pollens. Thiosemicarbazide inhibited more strikingly germination and tube elongation of *Typha* pollen, which showed 50% decrease in ascorbate peroxidase activity in comparison with the control, than those of *Pinus* pollen. Salicylic acid completely inhibited germination in both pollens, probably causing cell necrosis. These results indicate that the hypersensitive responses in plant defense mechanism; catalase inhibition → H_2O_2 increase → cell responses, do not function in these pollens.

Key words : *Typha* pollen, *Pinus* Pollen, catalase inhibitor, active oxygens, salicylic acid

緒 言

動物、植物を問わず、活性酸素は有害ではあるが、自己防衛のための積極的な利用もなされている。著者らは花粉の活性酸素消去酵素についてクロマツおよびガマを材料として調べ、花粉にもアスコルビン酸ーグ

ルタチオン経路に含まれる酵素が存在することを明らかにした⁽¹⁻⁴⁾。パラコートの存在下で花粉を培養すると、クロマツ花粉は完全に発芽を抑制されたが、過酸化水素の消去に関与する酵素のうち、カタラーゼはコントロールとほぼ同程度の活性を維持していたのに対し、アスコルビン酸ペルオキシダーゼは完全に失活

した。この事実からカタラーゼは花粉の発芽や花粉管伸長の過程では重要性が少ないことが推察された⁽³⁾。

一方、植物体の病原菌感染においてカタラーゼの阻害が情報伝達に密接に関わっているという報告⁽⁵⁻¹⁰⁾が増えつつある。カタラーゼがサリチル酸によって阻害されることにより細胞内での過酸化水素の濃度が増加する。それが引き金となって酸化的ストレスに応答する防御系遺伝子群のタンパク質合成が誘導され、獲得抵抗性が高まることになる。サリチル酸 → カタラーゼ阻害 → 過酸化水素の増加 → 細胞応答という情報伝達が、植物雄性配偶体として高度に目的化された花粉細胞で発現するかどうかは興味ある課題である。本研究では、花粉をカタラーゼ阻害剤であるアミノトリアゾール(3-amino-1,2,4-triazole)、チオセミカルバジドおよびサリチル酸の存在下で培養し、花粉の発芽および花粉管伸長を観察し、活性酸素消去系酵素活性、酸化的ストレスへの応答として生産の誘導が示唆されているグルタチオン S-トランスフェラーゼ⁽¹⁰⁾の活性、そして消去系酵素の基質でもあるアスコルビン酸およびグルタチオンの量的変動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*) 花粉は 1995 年 4 月に名古屋市緑区大高緑地公園において、ガマ花粉 (*Typha latifolia*) は 1996 年 6 月に愛知県日進市の休耕田において採取した。これらは、室温で 4 日間風乾させた後、使用時まで -20°C 以下で保存した。

2. 花粉の培養および抽出液の調製

クロマツ花粉 0.5g (ガマ花粉は 1.0g) を直径 20 cm のペトリ皿を用い、200ml の 3 % シュクロースを含む 1.5% 寒天上で 30°C、36 時間 (ガマ花粉は 3 時間) 培養した。カタラーゼ阻害剤として緑色植物での適用例^(7, 8, 11)に準じ、アミノトリアゾールは 2 mM、チオセミカルバジドは 5 mM、サリチル酸は 1 mM の濃度で添加した。また、微生物による汚染を防ぐために、クロマツ花粉の培地には 50 ppm のクロラムフェニコールおよび同濃度のナイスタチンを添加した。培養後の花粉に、50 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、全量を 15 ml 定容とし、テフロンー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 20,000 × 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、20,000 × g で 20 分間遠心分離した。上清を酵素活性の測定に使用した。アスコルビン酸およびグルタチオンの測定には同時に培養した花粉から抽出操作⁽¹²⁾を行い、得られた抽出液を分析に供した。培養前の花粉についても同様の処理を行った。いずれの画分についても 3 回の繰り返し実験を行い、再現性を確認した。

3. アスコルビン酸およびグルタチオンの定量

アスコルビン酸およびグルタチオンは Law らの方法⁽¹³⁾に従って定量した。アスコルビン酸については全アスコルビン酸量と還元型アスコルビン酸量を測定し、酸化型アスコルビン酸量は全アスコルビン酸量と還元型アスコルビン酸量の差により求めた。グルタチオンについては全グルタチオン量と酸化型グルタチオン量 (酸化型 1 mol を 2 mol の還元型に換算表示) を測定し、還元型グルタチオン量は全グルタチオン量と酸化型グルタチオン量の差により求めた。

4. 酵素活性測定法

スーパーオキシドジスマスター、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、カタラーゼは前報⁽¹⁻³⁾に、モノデヒドロアスコルビン酸レダクター、デヒドロアスコルビン酸レダクターおよびグルタチオンレダクターは前報⁽⁴⁾に準じて測定した。

グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は Habig らの方法⁽¹³⁾を一部改変して測定した。反応混合液 1 ml は 0.1 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ 緩衝液 (pH 6.5)、1 mM 還元型グルタチオン、1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) および酵素を含み、25 °C で、340 nm の吸収変化を 15 秒ごとに記録しながら 1 分間反応させた。CDNB は 10 mM の濃度でエタノールに溶解したものを 0.1 ml 加えた。グルタチオンと CDNB との反応生成物 (S-dinitrophenyl glutathione) の 340 nm における吸光係数を 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹ とし、1 分間に 1 μmol の反応生成物を生じる酵素量を 1 単位とした。

実験結果

Fig. 1 にカタラーゼ阻害剤の存在下、非存在下 (コントロール) で培養したクロマツおよびガマ花粉の光学顕微鏡写真を示す。クロマツ花粉は 36 時間培養したが、アミノトリアゾールの存在下ではコントロールに比べて花粉管の伸長は見劣りせず、デンプンの蓄

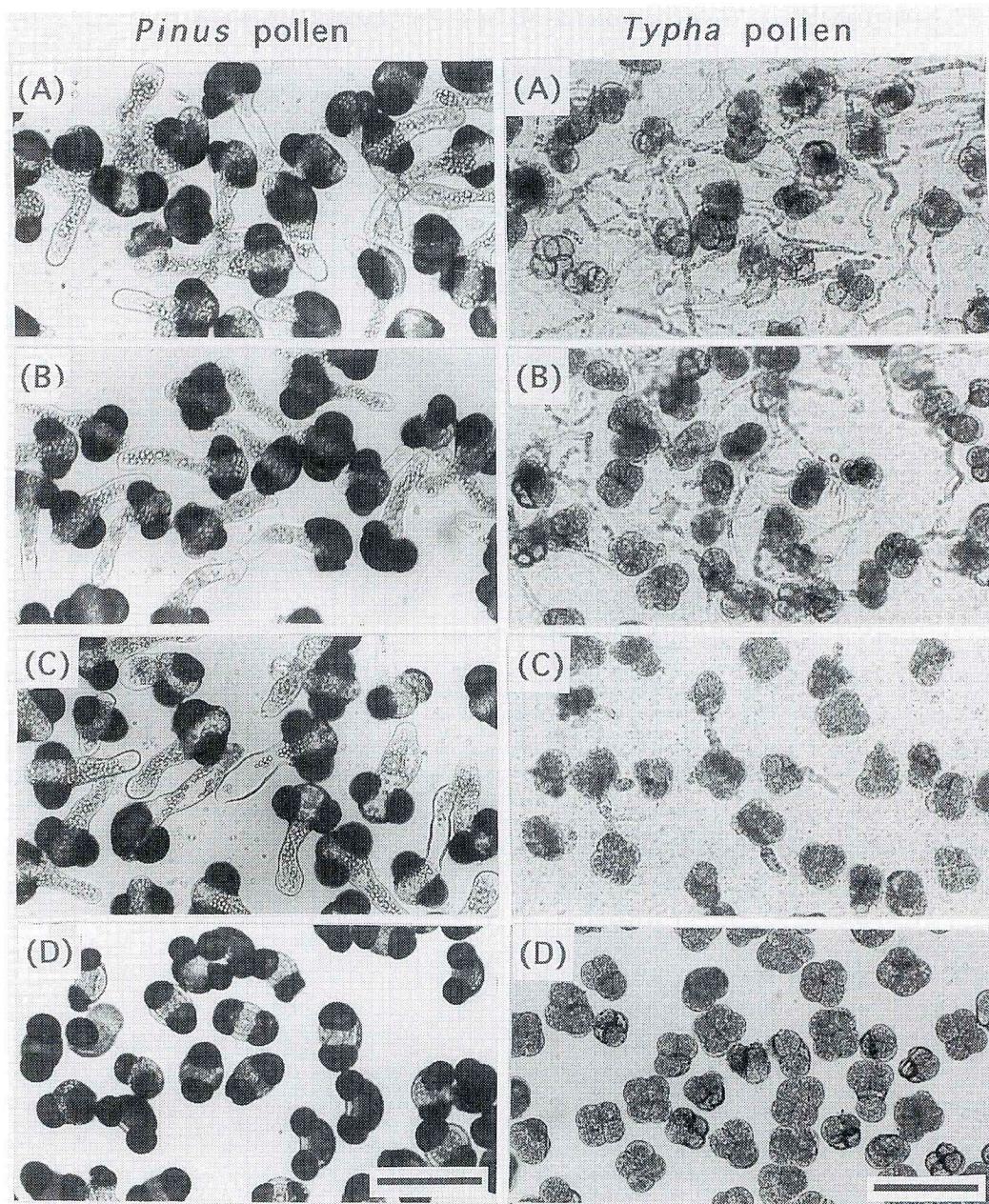


Fig. 1. Photomicrographs of *Pinus* and *Typha* pollens cultivated on a 3% sucrose-1.5% agar medium with or without catalase inhibitors. *Pinus* pollen after 36 h cultivation; (A) control, (B) with 2mM 3-amino-1,2,4-triazole, (C) with 5mM thiosemicarbazide, (D) with 1mM salicylic acid. *Typha* pollen after 3 h cultivation; (A) control, (B) with 2mM 3-amino-1,2,4-triazole, (C) with 5mM thiosemicarbazide, (D) with 1mM salicylic acid. Scale bars indicate 100 μ m.

Table 1. Ascorobate and glutathione contents, and activities of active oxygen scavenging related enzymes in *Pinus* and *Typha* pollens cultivated with or without catalase inhibitors

(A) *Pinus* pollen (36h cultivated)

	Content (nmole)				Enzyme activity (units)						
	ASA	DHA	GSH	GSSG	SOD	APX	MDA-R	DHA-R	GSSG-R	Cat	GST
Before cultivation	3,080	340	9,620	350	1,260	52	8.61	5.60	1.27	2,810	0
Control	5,710	590	5,040	130	1,380	135	9.28	5.60	0.98	4,550	0.22
3-Amino-1,2,4-triazole	4,570	530	4,610	130	1,530	133	9.97	4.86	0.91	180	0.21
Thiosemicarbazide	6,220	230	6,320	160	1,520	116	8.93	6.51	0.80	1,730	0.02
Salicylic acid	240	120	450	50	80	0	0.09	0	0.18	70	0.18

Each datum was expressed on the basis of the initial fresh pollen weight (0.5g).

(B) *Typha* pollen (3h cultivated)

	Content (nmole)				Enzyme activity (units)						
	ASA	DHA	GSH	GSSG	SOD	APX	MDA-R	DHA-R	GSSG-R	Cat	GST
Before cultivation	11,940	900	19,680	1,670	3,770	30.6	10.2	ND	7.35	5,120	5.72
Control	6,720	520	13,810	340	3,140	22.1	11.0	ND	6.20	6,180	5.50
3-Amino-1,2,4-triazole	6,720	220	12,840	350	3,150	22.1	11.1	ND	5.19	630	5.08
Thiosemicarbazide	5,370	550	10,770	250	2,510	11.3	9.7	ND	1.16	2,480	2.58
Salicylic acid	6,930	700	15,520	460	2,930	18.8	9.3	ND	6.29	4,850	5.63

Each datum was expressed on the basis of the initial fresh pollen weight (1.0g).

ASA, reduced ascorbate ; DHA, dehydroascorbate ; GSH, reduced glutathione ; GSSG, oxidized glutathione (as GSH content) ; SOD, superoxide dismutase ; APX, ascorbate peroxidase ; MDA-R, monodehydroascorbate reductase ; DHA-R, dehydroascorbate reductase ; GSSG-R, glutathione reductase ; Cat, catalase ; GST, glutathione S-transferase.

積にも差は認められなかったが、チオセミカルバジドの存在下ではいびつな形の花粉管が観察された。一方、サリチル酸の存在下では花粉の発芽が完全に阻害された。ガマ花粉は3時間培養したが、アミノトリアゾールの存在下ではコントロールと同程度に花粉管の伸長が認められた。チオセミカルバジドの存在下では発芽がかなり抑制され、花粉管の長さはコントロールに比べて非常に短く、またサリチル酸の存在下ではマツ花粉と同様に花粉の発芽は完全に阻害された。

Table 1 に、培養したクロマツおよびガマの花粉抽出液中のアスコルビン酸とグルタチオンの量および活性酸素消去酵素の活性を示す。クロマツ花粉では花粉管の伸長に大きな影響を与えたかったアミノトリアゾール、チオセミカルバジドの存在下で、還元型のアスコルビン酸とグルタチオンの量、およびカタラーゼを除く活性酸素消去酵素活性がコントロールと比較し

て、±20%の範囲内ではほぼ同じ値を示した。一方、発芽が完全に抑制されたサリチル酸の存在下では、還元型のアスコルビン酸とグルタチオンはともにコントロールの10%以下しか含まれず、活性酸素消去酵素活性もほとんど検出されないか、20%以下にまで低下していた。カタラーゼはチオセミカルバジド存在下でコントロールの約35%，アミノトリアゾール、サリチル酸の存在下で4%以下しか検出されなかった。

ガマ花粉では花粉管の伸長にほとんど影響を与えないアミノトリアゾールの存在下で還元型のアスコルビン酸とグルタチオンの量、およびカタラーゼを除く活性酸素消去酵素活性がコントロールとほぼ同程度の数値を示した。発芽や花粉管の伸長に大きな阻害を示したチオセミカルバジドの存在下では、アスコルビン酸ペルオキシダーゼがコントロールの約50%に、グルタチオンレダクターゼが20%以下に低下してい

た。また、完全に発芽が阻害されたサリチル酸の存在下では、アスコルビン酸ペルオキシダーゼやモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ活性がコントロールの約85%の数値を示した以外は、大きな差が認められなかった。そこで、サリチル酸の存在下、非存在下で12時間の培養を行ったところ、3時間培養のコントロールに比べ、サリチル酸非存在下では全ての活性酸素消去酵素の活性が50%以下にまで低下したが、サリチル酸存在下ではスーパーオキシドジスマターゼを除いてほとんど活性は検出されなかった（データは示していない）。カタラーゼはアミノトリアゾール存在下でコントロールの10%以下の活性を示した以外は、クロマツ花粉ほど顕著な阻害ではなく、チオセミカルバジド存在下でコントロールの40%，サリチル酸では78%の活性を維持していた。なお、グルタチオンS-トランスフェラーゼはクロマツ花粉では極めて低い活性しか検出されず、ガマ花粉ではチオセミカルバジドの存在下でコントロールの約50%の活性を示した。

考 察

花粉をパラコートの存在下で培養すると、クロマツ花粉では発芽および花粉管伸長が阻害されたのに対し、ガマ花粉では阻害を受けなかった。これらの花粉についてスーパーオキシドジスマターゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼおよびカタラーゼ活性の変動を調べたところ、過酸化水素の分解に関わるアスコルビン酸ペルオキシダーゼだけが培養中に失活した。特にクロマツ花粉では培養12時間で完全にアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は消失した。これらの結果から、パラコートによるクロマツ花粉の発芽および花粉管伸長の阻害は、アスコルビン酸ペルオキシダーゼの不活性化に起因していると推論した⁽³⁾。この推論はもう一つの過酸化水素消去酵素であるカタラーゼが発芽や花粉管伸長の過程で重要な働きをしていないことを示唆しており、それを証明するのが本研究の目的の一つであった。3種のカタラーゼ阻害剤のうち、両花粉に對し、アミノトリアゾールだけがカタラーゼを特異的に阻害し、還元型のアスコルビン酸やグルタチオン量、および各種活性酸素消去酵素に影響を与えたかった。そして花粉管伸長はコントロールと差が見られなかつたことから、前述の示唆を裏付ける結果が得られた。アミノトリアゾール存在下での過酸化水素の消去はアスコルビン酸ペルオキシダーゼによって行われている

ものと考えられる。チオセミカルバジドは培養時間の長いクロマツ花粉よりもガマ花粉に対して花粉管伸長をより強く阻害したが、これはガマ花粉でのアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が大きく低下したことが原因であると考えられる。

最近の知見では、植物体が病原菌感染、カタラーゼ阻害剤の添加あるいはオゾンへの曝露を受けると、誘導されたサリチル酸がカタラーゼに結合して活性を阻害する結果、獲得抵抗性遺伝子が発現し、グルタチオンS-トランスフェラーゼやペルオキシダーゼ等の酵素の誘導、細胞壁の強化、グルタチオンの増加、細胞死などをもたらすことが明らかにされている⁽⁵⁻¹¹⁾。

本研究の結果、両花粉においてグルタチオンS-トランスフェラーゼ活性の上昇やグルタチオン生産の増加は観察されなかった。また、サリチル酸の存在下で培養したクロマツ花粉、ガマ花粉ともに発芽が完全に阻害された。クロマツ花粉では還元型のアスコルビン酸やグルタチオンの量の大きな減少が示され、測定した全ての活性酸素消去酵素の不活性化が見られた。ガマ花粉では3時間の培養では発芽と管伸長にはコントロールと大きな差が認められなかったが、培養時間を長くするとクロマツ花粉と同様に酵素の失活が確認された。サリチル酸は発芽を完全に阻害することから、作用点は明確ではないものの花粉に対し吸水の段階で致命的なダメージを与え、細胞死をもたらすものと考えられる。

結論的には植物における、カタラーゼ阻害 → 過酸化水素の増加 → 細胞応答という情報伝達機構は、雄性配偶体として高度に目的化された花粉においては働かないものと考えられる。

要 約

クロマツおよびガマ花粉の発芽や花粉管伸長に及ぼすカタラーゼ阻害剤であるアミノトリアゾール、チオセミカルバジドおよびサリチル酸の影響を調べた。アミノトリアゾールは両花粉の発芽や花粉管伸長にはほとんど影響を与えたかった。それはカタラーゼ活性を特異的に阻害したが、還元型のアスコルビン酸やグルタチオンの量、およびカタラーゼを除く活性酸素消去酵素の活性を顕著に低下させなかった。この結果からカタラーゼは花粉管の伸長過程においてそれほど重要ではないことが分かった。チオセミカルバジドはクロマツ花粉よりもガマ花粉の発芽や花粉管伸長をより強く阻害した。このとき、ガマ花粉ではアスコルビン酸ペ

ルオキシダーゼ活性がコントロールの50%程度であった。サリチル酸は細胞死をもたらし、両花粉の発芽を強く阻害した。得られた結果は植物の防御機構としての応答、即ちカタラーゼ阻害 → 過酸化水素の増加 → 細胞応答という情報伝達が花粉においては機能していないことを示唆した。

引 用 文 献

- (1) 古谷一朗・船隈透・原彰：ガマおよびクロマツ花粉のスーパーオキシドジスムターゼ。花粉誌 40, 85-93 (1994).
- (2) 古谷一朗・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).
- (3) Hara, A., I. Huruya and T. Funaguma: Effect of paraquat on tube elongation of *Pinus* and *Typha* pollens. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1128-1129 (1995).
- (4) 星奈保美・丹羽達也・船隈透・原彰：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。花粉誌 42, 15-25 (1996).
- (5) Kangasjärvi, J., J. Talvinen, M. Utriainen and R. Karjalainen: Plant defense systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* 17, 783-794 (1994).
- (6) Chen, Z., J. Malamy, J. Henning, U. Conrath, P. Sánchez-Casas, H. Silva, J. Ricigliano and D.F. Klessig: Induction, modification and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4134-4137 (1995).
- (7) Chen, Z., H. Silva and D.F. Klessig: Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883-1886 (1993).
- (8) Malamy, J., J. P. Carr, D.F. Klessig and I. Raskin: Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1002-1004 (1990).
- (9) Metraux, J.P., H. Signer, J. Ryals, E. Ward, M. Wyss-Benz, J. Gaudin, K. Raschdorf, E. Schmid, W. Blum and B. Inverardi: Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004-1006 (1990).
- (10) Marrs, K.A.: The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127-158 (1996).
- (11) Smith, K.I.: Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.* 79, 1044-1047 (1985).
- (12) Law, M.Y., S.A. Charles and B. Halliwell: Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 210, 899-903 (1983).
- (13) Habig, W.H., M.J. Pabst and W.B. Jakoby: Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139 (1974).