

## 根の活性酸素防御系酵素－グルタチオン還元酵素の性質

(Active Oxygen-Defensive Enzymes in Roots. Properties of Glutathione Reductase)

国立環境研究所

生物圏環境部分子生物学研究室

田中 淨

### 1. 序論

湿原に生息している植物種の多様性が失われつつある。この原因として植物根の周囲の水が富栄養化したり流れが中断されることにより嫌気ストレスを受け、その後の酸素の供給による好気状態への変化に植物根が生理レベルで対応できないことが考えられる。植物葉は光合成をすることから必然的に活性酸素の毒性にさらされ、その防御系が発達していることが知られている(図1)。最近、植物の葉以外の組織に活性酸素防御系が存在することが知られるようになったがその機能については不明な点が多い。ここでは水耕栽培したホウレンソウの根を嫌気状態にした時の活性酸素防御系酵素と嫌気代謝に関連する酵素であるアルコール脱水素酵素の変動について検討した。また、活性酸素防御系酵素の一つであるグルタチオン還元酵素を根から単離し葉酵素と比較した。この実験において嫌気状態では活性酸素防御系酵素活性が減少し、アルコール脱水素酵素が増加すること、好気状態ではその逆の現象が起こること期待された。しかし、実際には活性酸素防御系酵素の変動は余り見られず、アルコール脱水素酵素は予測通りの変動を示した。

### 2. 材料と方法

播種後7日目のホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. cv New Asia) を水耕液中で約8週間栽培した。その後はポンプによるバブリングを止めることにより、ホウレンソウに嫌気状態ストレスを与えた。1週間の嫌気状態ストレスで葉に萎れ、根の萎縮等の障害が現れた。ホウレンソウを水耕栽培することにより、酵素活性を測定したり、単離精製するに十分な根の生育が見られた。

### 3. 結果及び考察

根を嫌気状態においたときの活性酸素防御系酵素は図2に示したように大きな変化を示さなかった。一方、アルコール脱水素酵素活性は顕著な増加を示した。この結果は嫌気ストレスによる植物の障害は活性酸素防御系酵素が低下することにより活性酸素の障害が現れるのではなく、根が嫌気状態になり蓄積したアルコールの毒性により障害が生じると思われる。ここで観察されたアルコール脱水素酵素活性の増加は植物のアルコール毒性防御反応であると思われるが湿原植物の水環境に対する適応性を評価する上で注目すべき酵素であるかも知れない。ホウレンソウでは嫌気ストレスによる活性酸素防御系酵素の変動は認められなかったが湿原植物等について再度このような実験をしてみたいと思っている。

我々はグルタチオン還元酵素を遺伝子工学的に強化した植物を開発し、これが活性酸素毒性に強抵抗性を示すことを明らかにしてきた。この研究過程でホウレンソウ葉から本酵素を単離し、その性質について検討した。活性酸素防御系酵素は葉で特に発達しているが他の組織、ここでは根の酵素と同一の物なのかまた別個の物なのかに興味を覚えた。表

において葉と根のグルタチオン還元酵素の性質を比較した。葉酵素は葉緑体に存在していることが知られているので至適pHが根酵素よりも高いものと思われる(図3)。大きな違いとしてN-末端のアミノ酸が葉酵素はグリシンで根酵素はブロック(おそらくアセチル化)されていることであった。活性酸素防御系酵素の組織特異性に関する詳しい解析はこれら防御系酵素の生理学的意味を知る上で重要であると思われる。

以上、当初の目的とは少し外れた研究について紹介する羽目になり読者の方は当惑されたと思われますが湿原植物の適応性を研究する上で根と水の関係が重要であると思い、私の得意分野である活性酸素代謝と絡めて研究した結果について説明しました。

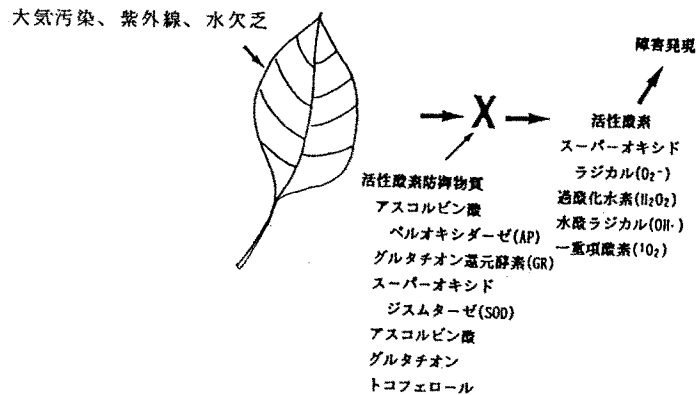


図1. 環境ストレスによる活性酸素生成と活性酸素防御系酵素の関係

水欠乏、紫外線、大気汚染等の環境ストレスにさらされた植物体内において活性酸素の蓄積が起こり、障害が発現する。活性酸素防御系酵素がこの障害抑制に働いている。

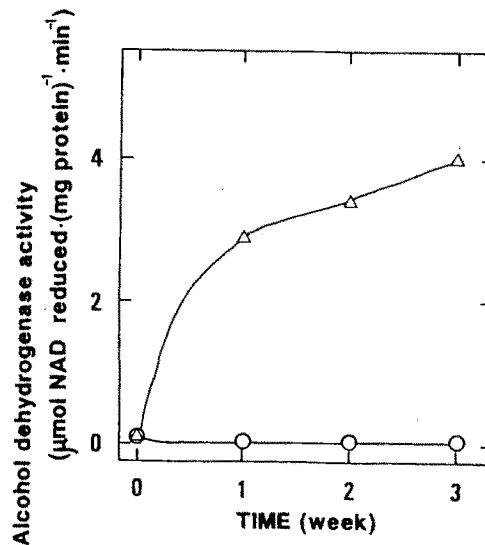


図2. 嫌気状態ストレスによるアルコール脱水素酵素活性の誘導

白丸は十分バブリングして水耕栽培した根中の酵素活性、白三角はバブリングを止めて栽培した根中の酵素活性を示す。

表1. ホウレンソウの葉と根のグルタチオン還元酵素の性質の比較  
 それぞれ、ADP-セファロースやDEAE-トヨパール等のカラムクロマトグラフィーによりSDS-PAGEで均一なまでに精製し、性質を比較した。

	葉酵素	根酵素
DEAE-トヨパール溶出パターン	25 mM KCl以下	100 mM KCl以上
サブユニットの分子量	6万	6万
至適pH	pH 7.8	pH 7.3
N-末端アミノ酸	glycine	blockされている
葉酵素の抗体との反応性 (イムノプロット)	有り	有り
最終精製標品の比活性	149 unit/mg protein	240 unit/mg protein
K <sub>m</sub>	0.029 mM(NADPH) 0.15 mM(GSSG)	0.021 mM(NADPH) 0.30 mM(GSSG)

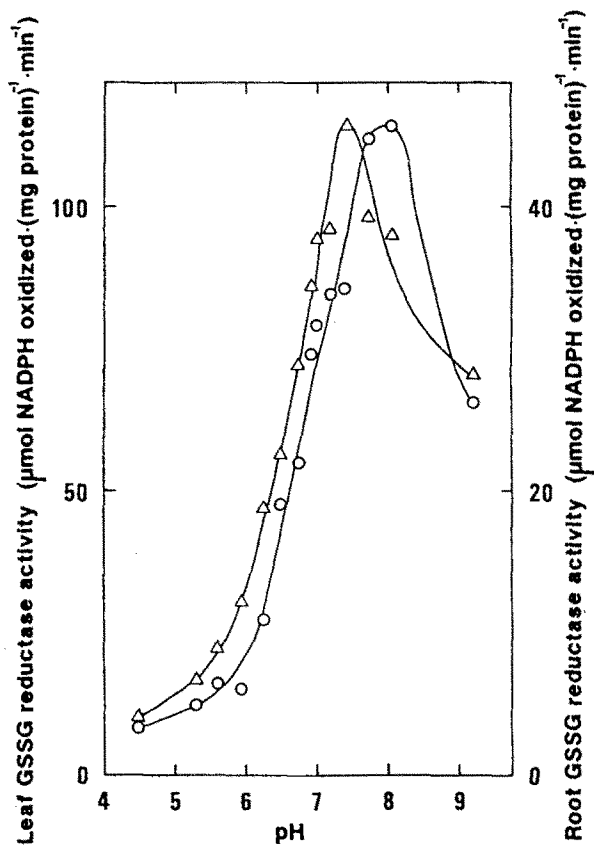


図3. ホウレンソウの葉と根のグルタチオン還元酵素のpH依存性  
 白丸は葉酵素、白三角は根酵素を示している。