



Title	活性酸素種, 抗酸化物
Author(s)	真野, 純一; Khorobrykh, Sergey; 尼子, 克己
Citation	低温科学, 67, 179-195 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39137
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 1. 代謝産物量の定量 d
File Information	67-029.pdf



[Instructions for use](#)

1. 代謝産物量の定量

d. 活性酸素種, 抗酸化物

真野 純¹⁾, Sergey Khorobrykh^{1,2)}, 尼子 克己³⁾

光合成に伴い生成する活性酸素種は、細胞のレッドクスシグナルとして作用すると同時に環境ストレス障害の要因ともなる。活性酸素には化学的特性の異なるいくつかの分子種があり、それぞれ特異的な検出法がある。活性酸素種およびそれを消去するアスコルビン酸やグルタチオンなどの還元剤は、寿命が短い、相互の酸化還元反応が容易に進行する、といった特性をもつため、定量的な抽出・測定に注意を要する。この節では、チラコイド膜を用いる活性酸素生成機構解析、組織抽出液の過酸化物質、酸化タンパク質、抗酸化物の定量法を中心に解説する。

Reactive Oxygen Species and Antioxidants Associated with Photosynthesis

Jun'ichi Mano, Sergey Khorobrykh, Katsumi Amako

Photosynthesis reactions are intrinsically accompanied by the production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide, singlet oxygen (1O_2) and hydroxyl radical ($HO\cdot$), which influence the productivity and stress responses of plants. Selected methods for determining individual ROS in vitro and in vivo and for evaluating the redox status of ascorbate and glutathione in plant tissue extracts are described, with specific precautions.

1.d.1 はじめに

C3 光合成を行う葉での典型的な活性酸素生成フラックス (H_2O_2 換算) は、試算によると葉緑体で $4,000 \text{ nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、ペルオキシソームで $10,000 \text{ nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、ミトコンドリアで $200 \text{ nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 程度である¹⁾。ペルオキシソームの H_2O_2 生成はほとんどグリコール酸オキシダーゼ反応によるが、葉緑体では主要な活性酸素反応は2つある(図1)^{2,3,4)}。ひとつはいわゆる Mehler 反応で、光化学系 I (PSI) で O_2 が一電子還元されスーパーオキシド (O_2^-) が生成し、 O_2^- の不均化反応で H_2O_2 が生成する^{5,6)}。もう一つは光化学系 II (PSII) での一重項酸素 (1O_2) 生成である⁷⁾。この他にも PSII 還元側での O_2^- 生成⁸⁾、それに由来する H_2O_2 、ヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) の生成⁹⁾、 H_2O 酸化酵素が機能しないときの PSII 酸化側での酸化力による活性種の生成¹⁰⁾、プラストセミキノンによる O_2^- 生成¹¹⁾、亜硝酸、アスパラギンからの一酸化窒素 ($NO\cdot$) 生成¹²⁾ などの可能性が指摘されている。活性酸素には化学的特性の異なる複数の分子種があ

り、検出法はそれぞれに特異的である。また、研究目的と材料に応じて最適な測定手法は異なる。例えば活性酸素生成機構解明にはチラコイド膜などを材料とした in vitro 測定、酸化的損傷・ストレス耐性の評価には過酸化物質やアルデヒドなどの組織からの抽出・定量、活性酸素のシグナル作用解明には蛍光プローブなどを用いた組織の in situ 観察が行われる。各手法の原理と限界を理解することが、結果の正しい解釈には不可欠である。本節ではまず活性酸素測定法を研究目的と検出法の特徴によって分類し、研究目的に応じた測定手段選択のガイドラインを提供する。その後 in vitro 測定、in situ 測定の具体例をいくつか紹介する。

なお、 $NO\cdot$ 、ペルオキシ亜硝酸 ($ONOO^-$) など活性酸素種の植物試料での測定については最近の文献^{12,13,14,15)}を参照されたい。より広範な活性酸素、酸化ストレスマーカーの測定法の成書もある^{16,17)}。測定の限界やアーテファクトの原因は活性酸素種の化学的性質と密接に関連している。基礎的理解のため総説、成書^{18,19,20)}を一読されることをお勧めする。

1.d.2 活性酸素種の特性と検出法の選択

活性酸素とは酸素分子 (O_2) に由来する反応性の高い分子種の総称で、「活性酸素種」という表現がより正確で

1) 山口大学総合科学実験センターアイソトープ分析施設

2) Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences

3) 神戸学院大学栄養学部

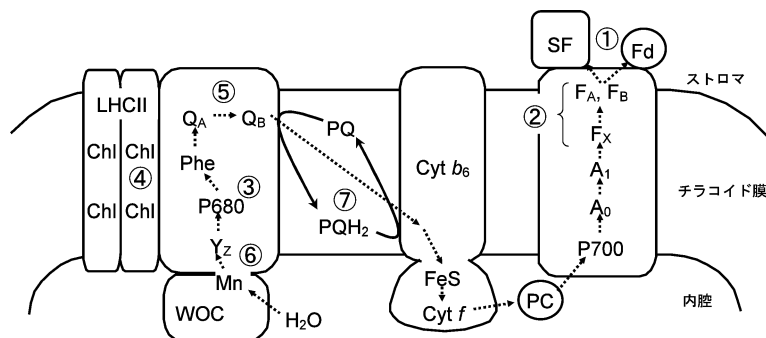


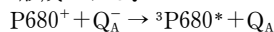
図1：葉緑体電子伝達に伴う活性酸素生成。点線は電子伝達経路を表す。

① PSI ストロマ側での O_2 還元による $O_2^{\cdot-}$ 生成。触媒としてグルタチオンレダクターゼ、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (MDAR) などストロマのフラビンタンパク (SF)⁹⁾、フェレドキシン (Fd) が考えられる。

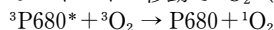
② PSI 還元側の鉄硫黄センター- F_X , F_A , F_B の自動酸化による $O_2^{\cdot-}$ 生成。

③ PSII 反応中心での 1O_2 生成。

段階1：プラストキノールが過還元状態となり、 Q_A/Q_A^- の還元レベルが上昇すると、 $P680^+$ と Q_A^- の電荷再結合の確率が高まり $P680$ の励起三重項状態 $^3P680^*$ が形成される。



段階2： $^3P680^*$ から基底状態酸素分子 (3O_2) へのエネルギー移動で 1O_2 (励起一重項状態) が生成。

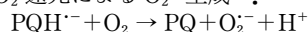


④ アンテナクロロフィルでの 1O_2 生成 ($^3Chl^*$, 1O_2 の消去剤であるカロテノイドが欠損すると起こりうる)。

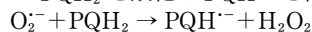
⑤ PSII 還元側での O_2 還元による $O_2^{\cdot-}$ 生成⁹⁾。

⑥ PSII 酸化側での $P680^+$, Chl^+ , Y_z などによる周辺分子の酸化により生成する有機ラジカル ($R\cdot$) が O_2 と反応し、ペルオキシラジカル、有機ペルオキシド、さらにアルコキシルラジカルを生成する¹⁰⁾。

⑦ プラストセミキノールラジカル ($PQH^{\cdot-}$) の O_2 還元による $O_2^{\cdot-}$ 生成¹¹⁾。



いったん $O_2^{\cdot-}$ が生成すると、プラストキノール PQH_2 を酸化し $PQH^{\cdot-}$ を再生する。



ある。本節の活性酸素種の表記は IUPAC Recommendations 2000²¹⁾ およびその簡略版²²⁾ に従う (表1)。ここに含まれる分子種の性質は、それぞれの酸化力 (酸化還元電位) および、ターゲットとの反応性 (二次反応速度定数) により異なる²⁰⁾。

表2に活性酸素測定法を目的および分子種ごとに整理した。葉緑体やチラコイド膜を用いると、光照射時の活性酸素種生成をリアルタイムで検出できる。これは活性酸素の生成速度または定常濃度測定である。組織からの過酸化物質、酸化生成物抽出では、含量が得られる。これ

表1：活性酸素種の種類と性質

活性酸素種	表記	
スーパーオキシド (アニオン) ラジカル	$O_2^{\cdot-}$	酸化力は中程度で、還元剤としても働く。プロトン化 ($pK_a=5.5$) したスーパーオキシドラジカル HO_2^{\cdot} は、アニオン型より酸化力が強く、中性分子なので膜にも溶け込む。
過酸化水素	H_2O_2	酸化力は中程度で、還元剤としても働く。中性分子で生体膜を通過する。金属触媒が存在しなければきわめて安定。ラジカルではない。
ヒドロキシルラジカル	HO^{\cdot}	酸化力、反応性ともに極めて大きく、ほとんどの有機、無機分子と拡散律速で反応し酸化する。
一重項酸素	1O_2	酸化力、反応性ともに大きい。励起電子のエネルギー準位により $^1\Sigma_g^+$ 状態と $^1\Delta_g$ 状態に区別される。本稿で 1O_2 の表記は後者の意。 $^1\Sigma_g^+$ は寿命が極めて短く生化学的に重要でない。 $^1\Delta_g$ の寿命は H_2O 中で $3.8 \mu s$, D_2O 中で $62 \mu s$ 。
過酸化脂質 (有機ペルオキシド)	LOOH (ROOH)	酸化力、安定性は H_2O_2 と似ている。ラジカルではない。
脂質 (有機) ペルオキシルラジカル	LOO $^{\cdot}$ (ROO $^{\cdot}$)	ラジカル連鎖反応の中間体で定常濃度は低い。
アルコキシルラジカル	LO $^{\cdot}$ (RO $^{\cdot}$)	HO^{\cdot} と似た性質を持つ。酸化力が強く、寿命が短い。
一酸化窒素	NO^{\cdot}	酸化力は中程度で、還元剤としても働く。中性分子で生体膜を通過する。
ペルオキシ亜硝酸	$ONOO^{\cdot}$	NO^{\cdot} と $O_2^{\cdot-}$ の結合で生成する。きわめて反応性が高い。ラジカルではない。

表 2：試料の種類と活性酸素種に応じた分析法

	$^1\text{O}_2$	O_2^-	H_2O_2	HO^\cdot	LOOH	その他
生組織, 細胞	DanePy 蛍光減少 SOSG 蛍光	NBT 染色 蛍光プローブ DCF 蛍光*	DAB 染色 DCF 蛍光*	DCF 蛍光* ※	化学発光 DCF 蛍光*	ESR (Asc) DCF 蛍光*
組織抽出液	LOOH 分析 (LC/MS/MS)	※※	FOX 吸光 ルミノール 発光	※※	Spy-LHP 蛍光 TBARS (MDA)	酸化タンパク質 ASA/DHA GSH/GSSG
葉緑体	DanePy 蛍光減少		O_2 測定 (カタラーゼ法)		Spy-LHP 蛍光 TBARS	
チラコイド膜	DanePy 蛍光減少 His/RNO 法	Cyt <i>c</i> 還元 スピントラップ ESR	O_2 測定 (カタラーゼ法)	スピントラップ ESR	Spy-LHP 蛍光 TBARS	スピントラップ ESR
特異的消去剤	N_3^- イオン (水系) β -カロテン (膜系)	SOD	カタラーゼ	(マンニトール, Hepes など) ※※※		
その他	重水 (D_2O) 中では寿命が 20 倍長いため、検出レベルが上がる。			Fenton 反応による生成はキレート剤 (DTPA など) で抑えられる。		

* ジクロロジヒドロフルオレセイン (DCFH₂; 非蛍光) は HO[·] などによって非酵素的に酸化され蛍光性のジクロロフルオレセイン (DCF) となる。過酸化水素 (H₂O₂, ROOH) による DCFH₂ 酸化はペルオキシダーゼに依存する。すなわち細胞での DCF 蛍光増大は非特異的な活性酸素種増大の指標である。DCFH₂ は光でも酸化されるため、光照射する試料には適さない。光酸化を受けにくい hydroxyphenyl fluorescein, aminophenyl fluorescein (Alexis Biochemicals) が販売されているが、植物試料への適用例はまだない。

※ 細胞内 HO[·] の特異的検出法は確立されていない。

※※ 組織抽出液では ASA 等の還元剤が遊離金属イオンの触媒により自動酸化され、O₂⁻ が生じる。O₂⁻ は不均化して H₂O₂ を生じ、Haber-Weiss 反応 (金属イオン触媒による H₂O₂ の還元的分解) で HO[·] が生成する。すなわち、抽出液で検出される O₂⁻, HO[·] は、遊離金属イオンと還元剤の存在を示しているにすぎない。

※※※ HO[·] はほとんどの化合物と非選択的に反応するため、どんな物質も濃度に応じて HO[·] を「消去」する効果をもつ。すなわち HO[·] に「特異的な」消去剤があるわけではなく、ターゲットの濃度より過剰に (100 mM 程度) 添加しても測定系、反応系に影響を与えない化合物 (Hepes など) が消去剤として利用されるのである。

らの測定ではすぐれた定量性が得られる。一方、蛍光プローブなどを用いる in situ 測定では生成の積算量を見積もるが、定量性は高くない。このように測定法によって得られるパラメータが異なることに注意が必要である。また検出法 (試薬) の活性酸素種に対する特異性にも注意を払う必要がある。表 2 にはさらに、個々の活性酸素種の特異的消去剤を記載した。検出されたシグナルが特異的消去剤によって低下すれば、その活性酸素種が検出された証拠のひとつとなる。

1.d.3 葉緑体, チラコイド膜を用いた in vitro 活性酸素測定

1.d.3.1 電子スピン共鳴

電子スピン共鳴 (ESR, 同じものを電子常磁性共鳴 EPR ともいう) 測定は分光法であり、不対電子をもつ分子すなわちラジカルを直接検出する唯一の方法である。ESR では試料を強い磁場の中におき、ラジカル分子がも

つ不対電子のスピンエネルギー準位 (磁場のない状態では縮退している) を分裂させ、マイクロ波 (数 cm 波長の電磁波) を照射し、共鳴により電子スピンの遷移するときの吸収を測定する。この共鳴エネルギーの大きさは不対電子の微環境 (分子内の隣接原子など) によって決まるため、ラジカル分子種ごとに特徴的なスペクトルが得られる。紫外・可視領域の分光法とは異なり、マイクロ波の波長は固定したまま、磁場強度を変え (「掃引する」という) ラジカル分子の共鳴エネルギーレベルを変化させることでスペクトルを得る。マイクロ波吸収は微弱であり、S/N 比改善のために磁場変調という一種の微分測定 (これを高周波数で行い平均化してノイズをキャンセルする) を行う。通常 ESR スペクトルとして示されるのはこの一次微分シグナルである。測定原理の詳細は成書を参照されたい^{23,24)}。

生物試料のラジカル測定に最もよく用いられる Xバンド ESR のマイクロ波領域は H₂O の分子振動と共鳴する。この不都合な水の影響を抑えるため、水系・常温で

の測定には、扁平な石英セルを用いる（注：凍結状態での測定には通常の石英管を使用する）。扁平セルは厚さ 0.4 mm であり光照射を行う場合の光路長が短いため、試料のクロロフィル濃度を高くできる。

O_2^- や HO^\cdot などは寿命が短く常温での定常濃度がきわめて低い。これらの測定には、ラジカル種と付加反応して寿命の長い有機ラジカルをつくる化合物（スピントラップ剤）を加え、生成したラジカル付加物（spin adduct）を検出する。スピントラップ剤なしで直接測定できるアスコルビン酸ラジカル（Asc $^\cdot$ ）は、スピントラップ剤の使用が難しい細胞や組織でのラジカル生成の指標として有用である（1 d.4.1 に記載）。（Asc $^\cdot$ ラジカルはモノデヒドロアスコルビン酸、セミデヒドロアスコルビン酸、アスコルビン酸フリーラジカルとも標記される）しかし、アスコルビン酸（AsA）酸化による Asc $^\cdot$ 生成は活性酸素に対する特異性がなく、in vitro での特異的活性酸素検出には不適當である。

1.d.3.1.1 PSII 膜への光照射で生じる O_2^- , HO^\cdot のスピントラップ検出

スピントラップ剤自体は ESR サイレントであり、ラジカル付加物となって ESR シグナルを生じる。付加するラジカルの種類により、ラジカル付加物の超微細結合定数が異なり特異的なスペクトルがあらわれる。水溶性スピントラップ剤で O_2^- , HO^\cdot 検出に比較的好く使われるのは *N-tert-butyl- α -phenylnitrone* (PBN), *α -(4-pyridyl 1-oxide)-*N-tert-butyl*nitrone* (POBN), 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) である。PBN や POBN の場合は、 O_2^- 付加物と HO^\cdot 付加物はいずれも 6 本線によく似たシグナルを生じ、両者を一目で判別することは難しい。これに対し DMPO の O_2^- 付加物 (DMPO-OOH) と HO^\cdot 付加物 (DMPO-OH) のスペクトルは明確に区別できる (図 2)。DMPO-OOH シグナルの検出は O_2^- 生成の証拠となる。これに対し、DMPO-OH シグナルの検出から HO^\cdot 生成を立証する際は注意を要する。DMPO-OH シグナルはさまざまな酸化系で容易に検出されるが、DMPO-OH は DMPO の直接酸化反応でも生じる。また DMPO-OOH も 1 分程度で DMPO-OH に変化する (図 2 の実験例でも、DMPO-OOH からの DMPO-OH 生成が観測された)。 HO^\cdot 生成の検証には、 HO^\cdot によらない DMPO-OH 生成の可能性を排除する実験、すなわち (i) Fenton 反応を抑制するカタラーゼやキレート剤により DMPO-OH シグナルが低下する、(ii) SOD で DMPO-OH 生成が抑制されない、(iii) ジメチルスルホキシド添加により DMPO-OH シグナルが DMPO-CH $_3$ シグナルに変化する、などの確認が必要で

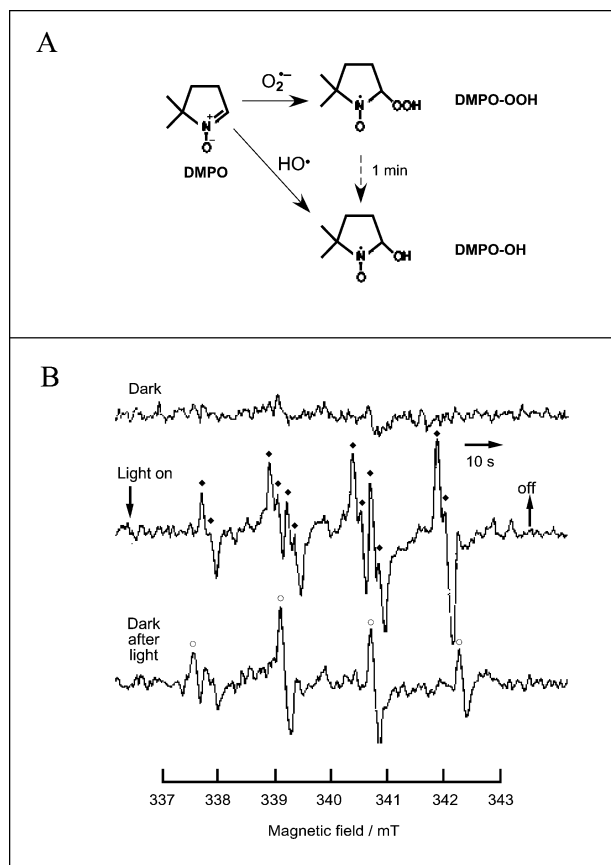


図 2: DMPO スピントラップ法による O_2^- , HO^\cdot の検出。A) DMPO の構造と DMPO-OOH, DMPO-OH の生成反応。DMPO-OH はこの他にも DMPO の直接酸化反応によっても生じる。B) PSII 膜標品への光照射による O_2^- 生成の検出。光照射により、DMPO-OOH に特有の 2, 4, 4, 2 本に分裂したシグナル (◆) が観測される。光照射停止後約 1 分で、DMPO-OOH シグナルは消失し、DMPO-OH (○) が生成する。

ある。最近、DMPO-OOH より寿命の長い O_2^- 付加物をつくる 5-(diethylxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (DEPMPO) およびその類縁体の使用例が増えてきている²⁵⁾。

光合成反応系での使用に際してはスピントラップ剤が還元剤の性格をもち電子供与体または阻害剤となりうることに注意しなければならない。とくに O_2^- の検出には比較的高濃度 (50–100 mM) のスピントラップ剤が必要であり、その影響を別の実験で評価する必要がある。

また、複数のラジカル種が同時に生成すると、それぞれの付加物シグナルが重なり複雑なスペクトルが得られることがある。この場合は、予測される個別のスペクトルを、主要なラジカル付加物の超微細結合定数 (文献値) からシミュレーションし、それらを線形結合させ、観測したスペクトルを近似する。これにより、もとのスペクトルを構成する成分とそれらの存在比率 (※) を推定す

る。この機能は ESR 装置のデータ解析システムに備えられている。(※スピン濃度の比であり、ラジカル付加物の定常濃度比を示す。ただしラジカル付加物ごとに寿命が違うので、付加物の濃度比がもとのラジカルの濃度比を示すわけではない)

[実験方法]

1. 用意するもの

- (1) キレックス処理水。重金属イオンはラジカル反応を触媒するため、ラジカル測定に用いる水は、重金属の混入を最小限にする必要がある。キレックス 100 樹脂 (バイオ・ラッド, 142-2832) はキレート剤を表面に結合した樹脂である。樹脂 30 g を適当なカラムに充填し、ここに蒸留水 (ミリ Q 水など、できるだけ精製した水) 1 リットルを通し、集める。使用するガラス器具もキレックス水でゆすいでおく。
 - (2) DMPO 500 mM。DMPO は自動酸化によりラジカルとなることがある。試料を加えず DMPO だけで ESR 測定を行い、ラジカルが検出されないことを確認する。ラジカル種が混入している場合は以下の要領で精製する。
 - ① 器具・容器はなるべくガラスを避け、プラスチック製のものをを用いる。
 - ② DMPO 1 g を 9 ml のキレックス水に溶解し、約 1.8 g の活性炭を加え、よく攪拌する。
 - ③ ガラスフィルターろ過により活性炭を除く。(ガラスフィルターがない場合、遠心し、上清を 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過する)
 - ④ 濃度測定のため、10 μl 程度を 95% エタノールで 10,000 倍希釈し、232 nm の吸光度 ($\epsilon = 7,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) から希釈前の濃度を計算する。
 - ⑤ キレックス水で 500 mM に希釈し、プラスチック製マイクロチューブ中、 -80°C 冷凍保存する。この状態で数ヶ月間は安定である。
 - (3) ホウレンソウチラコイド膜から調製した PSII 膜²⁶⁾。
 - (4) スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 例えば *Bacillus* sp.由来 Mn-SOD (和光純薬 195-10291)
 - (5) 照射用の窓を備えた ESR キャビティ。
 - (6) 熱カットフィルターを備えた光源。
2. PSII 膜 (0.5 mg Chl ml^{-1}) を 20 mM MES-NaOH, pH 6.5, 10 mM CaCl_2 , 100 mM DMPO に懸濁し、石英フラットセル (4 × 45 mm, 厚さ 0.4 mm) に入れ (セルの上端にプラスチックの注射器 (1 ml) を接続し、下端からゆっくり吸引する。気泡を残さない

ようにする)、下端をキャップで閉じる。

3. フラットセルの平たい面が照射光に対し正面となるよう ESR キャビティ内に固定し、チューニングを行う。

4. 以下の測定条件で磁場の掃引を行う。暗所ではラジカル付加物は検出されない (図 2)。

マイクロ波出力	5 mW
磁場変調周波数	100 kHz
磁場変調幅	0.079 mT
時定数	0.3 s

5. 試料はそのまま、再度低磁場側から磁場掃引し、白色光 (1,500 W m^{-2} , 熱カットフィルター使用) をキャビティの窓から照射する。DMPO-OOH のシグナルが観測される。

6. 光照射を止め、再度スペクトルを記録する。DMPO-OOH が DMPO-OH に変化するため、異なるスペクトルが得られる。

7. 新たに SOD (10 units ml^{-1}) を添加した試料を調製し、上の 4~6 と同様の測定を行う。光照射時のシグナルが観測されなくなることから、 O_2^- 付加物であったことが確認できる。

8. Fenton 反応による $\text{HO}\cdot$ 生成を阻害するカタラーゼ (60,000 units ml^{-1})、キレート剤 (0.5 mM DTPA) を添加しても、光照射による DMPO-OOH シグナル生成および光照射後の DMPO-OH シグナル生成は影響を受けない。このことから DMPO-OH は DMPO-OOH から変化して生じたもので、 $\text{HO}\cdot$ と DMPO の付加反応によるものではないと考えられる。すなわちこの系では検出可能なレベルの $\text{HO}\cdot$ は生成しなかったといえる。

1.d.3.1.2 アスコルビン酸ラジカル ($\text{Asc}\cdot$) の測定

in vitro での $\text{Asc}\cdot$ ラジカル測定は、活性酸素生成の指標より、むしろチラコイド膜や葉緑体での AsA や $\text{Asc}\cdot$ ラジカルそのものの代謝を解析するために行う。 $\text{Asc}\cdot$ ラジカルが PSI の電子受容体であること²⁷⁾、また、AsA がチラコイド内腔で PSII, PSI の電子供与体となり $\text{Asc}\cdot$ ラジカルに変換されること^{28,29)} の証明に用いられた。

1.d.3.2 チラコイド膜への光照射による O_2^- 生成の測定 (Cyt *c* 還元法)³⁾

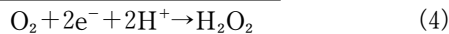
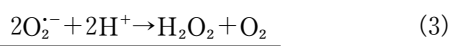
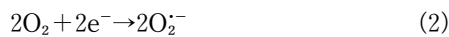
酸化型シトクロム *c* (Cyt *c*(III)) が O_2^- により還元されると 550 nm に強い吸収をもつ還元型 (Cyt *c*(II)) になる ((還元型) - (酸化型) の分子吸光係数差: $\epsilon_{550} = 19,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。



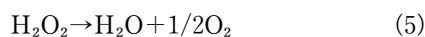
チラコイド膜に酸化型 Cyt *c* を加え、光照射しながら 550 nm の吸光度増大により O₂⁻ を検出する。吸光度増大が SOD 添加により阻害されれば O₂⁻ 生成の証拠となる。O₂⁻ による Cyt *c* 還元反応の 2 次反応速度定数 1.4×10⁶ M⁻¹s⁻¹ (pH<7.4) に基づき、Cyt *c* 還元速度から O₂⁻ の定常濃度が求められる。なお O₂⁻ が Cyt *c* で 100% 捕捉されるなら、(Cyt *c* 還元速度) = (O₂⁻ 生成速度) となるが、実際の捕捉率は 100% ではなく、この方法での O₂⁻ 生成速度見積りは過小になる。測定にはクロスイルミネーションのできる分光光度計が必要で、検出器には干渉フィルターで 550 nm の光のみを透過させ、試料の照射には 550 nm より長波長側の光 (650 nm 以下をカットする赤色フィルターなど使用) を用いる。

1.d.3.3 チラコイド膜、葉緑体での H₂O₂ 生成速度 (O₂ 測定/カタラーゼ法)

光化学系 I (PSI) での O₂ の光還元で生成する O₂⁻ は H₂O₂ と O₂ に不均化する。この反応は酸素電極で酸素消費として測定できる。



カタラーゼを充分量加えると、H₂O₂ が O₂ と H₂O に不均化する。



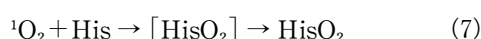
カタラーゼを加えたときと加えないときの O₂ 消費速度の差 ΔO₂ (μM min⁻¹) を求め、これを 2 倍することで、H₂O₂ 生成速度 v_{H₂O₂} (μM min⁻¹) を求める。

$$v_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2 \times \Delta\text{O}_2 \quad (6)$$

このカタラーゼ有無の差をとる方法は、光合成の電子供与体が H₂O で O₂ が発生する場合でも、それ以外の場合でも同じように適用できる。インタクト葉緑体では、酸化的ストレスによってアスコルビン酸ペルオキシダーゼが失活したとき、葉緑体外に H₂O₂ が放出される速度を測定することができる³⁰⁾。

1.d.3.4 PSII 反応中心標品での ¹O₂ 生成 (His/RNO 法)

¹O₂ が生成し、His (またはイミダゾール) が存在すると、両者はペルオキシド中間体 [HisO₂] を形成し、最終的に安定な酸素付加物 HisO₂ となる。すなわち His 依存 O₂ 消費は ¹O₂ 生成の指標となる。



また、[HisO₂] は *p*-nitrosodimethylaniline (RNO) を酸化し、脱色する (λ_{max}: 440 nm)。これを分光学的に追跡することができる。



測定にはクロスイルミネーションのできる分光光度計を用い、検出器には干渉フィルターで 440 nm の光のみを透過させ、試料の照射には 440 nm より長波長側の光を用いる。

¹O₂ の寿命はアジ化物イオン (N₃⁻) で短くなり、重水 (D₂O) 中で長くなる (つまり ¹O₂ の定常濃度が高くなる) ことを利用し、コントロール実験として、上の 2 つの反応が、(i) アジ化物イオンにより抑制され、(ii) D₂O 溶媒中で促進されることを確認する。この検出法により、Telfer らは、エンドウマメ PSII 反応中心に光照射したとき ¹O₂ が生成することを示した⁷⁾。

1.d.3.5 PSII 膜標品での過酸化脂質生成

感度の高い過酸化脂質検出試薬として、ペリレン環にトリフェニルホスフィンを結合させたジフェニル-1-ピレニルホスフィン (DPPP) が用いられてきた。ホスフィンが過酸化物と反応して生成するホスフィンオキシドが強い蛍光をもつ。最近開発された Spy-LHP は、DPPP に長鎖アルキルを結合させ親油性を高めており、H₂O₂ および他の活性酸素種との反応性が極めて低く、過酸化脂質にほぼ特異的である³¹⁾。励起・発光波長域が 500~550 nm であること、nM レベルの検出感度をもち少量の試料で測定できることからクロロフィルによる消光を低く抑えることができ、植物試料に適している。検量線作成の標準過酸化物には *m*-chloroperbenzoic acid を用いる。水溶性の過酸化脂質標準物としてよく用いられる *tert*-butyl hydroperoxide や cumene hydroperoxide は Spy-LHP との反応性が低く、本法の標準物としては不適である。

[実験方法]³²⁾

1. 用意するもの

- (1) Spy-LHP ストック溶液。Spy-LHP (同仁化学, S 343) をアセトンに溶解し、1 mM 溶液とする。ガラス容器中、窒素雰囲気下、-20°C で保存できる。酸素存在下では次第に酸化される³¹⁾。
- (2) Spy-LHP 測定溶液 (用時調製)。上記ストック溶液をエタノールで希釈し、2.7 μM とする。一測定あたり 2.7 ml 使用する。
- (3) 標準 LOOH。 *m*-chloroperbenzoic acid のエタノール溶液 (25 nM~250 nM) を調製する。

2. PSII 膜標品を 50 mM Mes-NaOH, pH 6.0, 35 mM NaCl に懸濁し (50 μg Chl/ml), 光照射する. 経時的に 0.3 ml を取り, Spy-LHP 測定溶液 2.7 ml と混合する. (Chl 終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる. 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで上げてよい)
3. 暗所で 30 分間静置した後, 膜画分を遠心 (18,000 $\times g$, 5 分) により除き, 上清を得る. 上清中の蛍光体は暗所で数時間安定である.
4. 励起光 524 nm での 535~537 nm の蛍光を測定する.
5. 検量線および消光補正は次のように得る. 標準 LOOH (各濃度) に, PSII 膜標品を加えたもの (+PSII) と加えないもの (-PSII) を調製する. 光照射せず, Spy-LHP 測定溶液と混合, 静置, 遠心し, 上清を得る. +PSII, -PSII 試料それぞれの標準 LOOH 濃度ゼロでの蛍光強度を a_1, a_2 , それぞれの検量線の傾きを b_1, b_2 とする. クエンチング係数は b_1/b_2 であり, 光照射後の試料の蛍光強度 x が得られたなら, それに対応する過酸化脂質濃度は $(x - a_1) \times b_2 / b_1$ となる. また光照射前の PSII 膜に含まれる LOOH 濃度は, $(a_1 - a_2) \times b_2 / b_1$ となる.

1.d.4 組織抽出液の過氧化物・酸化生成物測定

1.d.4.1 組織からの抽出に関する諸注意

組織から抽出して測定できるのは, 比較的安定な物質であり, 活性酸素としては H_2O_2 や LOOH などの過氧化物に限られる. また, 細胞内活性酸素生成の間接的な指標として, 過酸化脂質が分解して生じるアルデヒドや, 酸化タンパク質など, 活性酸素による酸化生成物の増大, および抗酸化物である AsA や GSH の酸化, 減少も測定できる. これらの物質も充分安定ではなく, また酸化還元を受けやすいため, 組織からの抽出に際してはつぎのような注意が必要である.

- (1) 分析物の安定性. 過氧化物は -80°C で保存していてもしだいに分解する. 試料調製後はなるべく早く抽出し測定する必要がある. アルデヒドは比較的安定だが, 過酸化脂質の分解で次第に生成するため, 植物材料を長期間凍結保存することは望ましくない. AsA, グルタチオン測定の試料は凍結保存せず, フレッシュな植物材料から測定試料を当日抽出し, 測定する.
- (2) 抽出操作に伴うアーテファクト. 組織の磨砕により鉄イオン等が結合タンパク質から遊離すると, 還

元剤が鉄イオン等で容易に酸化され減少すると同時に, 還元された鉄イオンが O_2 を還元し O_2^- を生成することで H_2O_2 , HO^\cdot , 有機ラジカル生成の原因となる. キレート剤の添加が不可欠である. アルデヒド抽出の際は, 過酸化脂質の生成を防ぐため還元剤を加える.

- (3) 検量線の作成. 試料からの分析物の回収率を見積もるため, 量の異なる標準化合物を試料に加え, 検量線を作成する.

1.d.4.2 過酸化水素, 有機ペルオキシドの測定

H_2O_2 と二価鉄イオンにより生成した HO^\cdot とキシレノールオレンジによる発色を定量する FOX アッセイ, ペルオキシダーゼ反応による酸化生成物の蛍光 (ホモバニリン酸) や発光 (ルミノール) を測定する方法がある. いずれの測定でも H_2O_2 だけでなく有機ペルオキシド (LOOH, ROOH) も検出される. 有機ペルオキシド由来のシグナルを見積もるために, カタラーゼを加え H_2O_2 のみを消去した試料で同じ測定を行う. Queval らは H_2O_2 の抽出・検出条件を詳細に検討し, 次のような注意事項を挙げている³³⁾.

- (1) 抽出: 酸で抽出, 中和し塩を除く. 低温ですばやく行う. 試料量と抽出液量の比を一定にする.
- (2) 抽出後の処理: AsA をアスコルビン酸酸化酵素 (AOX) で酸化し除去する (AsA 除去は Cheeseman の推奨する脱気処理³⁴⁾ に代わるもので, より優れている). イオン交換樹脂でフェノール類を除く. カタラーゼ処理したネガティブコントロールを作る.
- (3) アッセイ法と定量: 蛍光またはルミネセンス測定が高感度である. 内部標準を加えたコントロール試料を作成する.
- (4) その他コントロール実験: 抽出液の体積と測定値の直線的相関性を確認. 抽出および試料調製時の H_2O_2 収率を確認.

ここでは, シロイヌナズナ葉からの H_2O_2 抽出と測定例^{33,34)}を紹介する. ルミノール化学発光法の方が FOX 法より感度が高いが, 分光光度計で測定する後の方が汎用性が高いため, FOX 法を例示した.

【実験方法】

1. 用意する試薬

- (1) 0.2 M 塩酸.
- (2) 0.2 M NaOH.
- (3) AOX.
- (4) カタラーゼ.
- (5) FOX 指示薬 (X 2), 0.5 mM 硫酸アンモニウム第

一鉄, 0.2 mM キシレノールオレンジ, 0.2 mM ソルビトール, 2% (v/v) エタノール, 50 mM 硫酸

- (6) H₂O₂ 標準液 (1.0, 2.0, 5.0 μM). 240 nm での分子吸光係数 $\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ を用いる.
2. 葉 100 mg を液体窒素凍結下で磨砕し, さらに 0.2 M 塩酸 20 ml を加え磨砕する.
 3. 遠心上清 5 ml をとり, 50 mM Na₂HPO₄ 水溶液 40 ml を加え, 0.2 M NaOH で pH 5 に調整し, 体積を 50 ml にする.
 4. 0.5 ml をとり, AOX を 2 U ml⁻¹ となるよう加え, 5 分間インキュベートする.
 5. AOX 処理後の試料を 2 つに分け, 一方にカタラーゼを 25 U ml⁻¹ となるよう加え, 5 分間インキュベートする.
 6. 試料液 ((+) カタラーゼまたは (-) カタラーゼ) 100 μl, FOX 指示薬 (X 2) 0.5 ml, 蒸留水 0.4 ml を混合する.
 7. 5 分以上おいてから, A₅₅₀ - A₈₀₀ を測定する.
 8. 検量線は, 各濃度の H₂O₂ 標準液 100 μl に FOX 指示薬 (X 2) 0.5 ml, 蒸留水 0.4 ml を加え, 作成する.
 9. 検量線から試料の過酸化物質濃度を求める. カタラーゼ添加試料で得られる値は LOOH に由来すると見なせるので, 試料の H₂O₂ 含量は (カタラーゼ不添加) - (カタラーゼ添加) の値から求める.

1.d.4.3 過酸化脂質分解物 (チオバルビツール酸反応物 TBARS) 測定³⁵⁾

過酸化脂質の非酵素的分解産物であるマロンジアルデヒド HOCCH₂CHO (MDA) などのアルデヒドとチオバルビツール酸 (TBA) を酸性条件で反応させ, 生成する赤色の色素 (チオバルビツール酸反応物; TBARS) を分光学的に定量する. 過酸化脂質生成の指標として広く用いられている. アルデヒドは比較的安定であり, 抽出前の植物試料は -80°C で数日間保存できる. 一測定に試料 0.5 g 程度を用いる. 試料に含まれるアントシアニンなど色素の影響を除くために, TBA を含まない溶液で同じ処理を行った試料との差をとる. TBARS には MDA 以外のアルデヒド反応物も含まれるため, MDA を用いた検量線から計算した値を「MDA 当量」と表わす.

[実験方法]

1. 用意するもの
 - (1) 抽出溶液. エタノール: 水, 80: 20 (v/v)
 - (2) TBA(-)液. 20% トリクロロ酢酸, 0.01% ブチルヒドロキシトルエン (BHT)
 - (3) TBA(+)液. 上の TBA(-)液にチオバルビツール

ル酸を 0.65% (w/v) 溶解する.

2. 試料 0.5 g を乳鉢に入れ, 抽出溶液 10 ml と海砂を加えよく磨砕する.
3. 室温で 20 分静置した後, 遠心分離 (3,000 × g, 10 分) する.
4. ふた付遠心管 2 本を用意し, 一方には上清 1 ml と TBA(-)液 1 ml を混合する. もう一方には上清 1 ml と TBA(+)液 1 ml を混合する. どちらも激しく振とうし, 沸騰湯浴中で 25 分間加熱する.
5. 試料を冷まし (室温で 5 分, 水中で 5 分), 遠心分離 (3,000 × g, 10 分) し, 上清を得る.

440 nm, 532 nm, 600 nm の吸光度を測定し (TBA(-) は 440 nm の測定不要), 以下の計算式から MDA 当量を求める.

$$A_{532}(\text{TBA}(+)) - A_{600}(\text{TBA}(+)) - \{A_{532}(\text{TBA}(-)) - A_{600}(\text{TBA}(-))\} = X \quad (9)$$

$$\{A_{440}(\text{TBA}(+)) - A_{600}(\text{TBA}(+))\} \times 0.0571 = Y \quad (10)$$

$$\text{MDA 当量}(\text{nmol ml}^{-1}) = \{(X - Y) / 157,000\} \times 10^6 \quad (11)$$

1.d.4.4 酸化タンパク質 (カルボニル化タンパク質) 測定³⁶⁾

タンパク質のアミノ酸残基のうち, Cys, Met, His, Trp, Tyr, Lys, Arg, Pro は活性酸素によって酸化されやすい. このうち Lys, Arg, Pro の酸化でカルボニル基が生じる³⁷⁾. また, Lys への MDA 付加や Cys, His へのアクロレイン (脂質由来アルデヒドのひとつ) 付加によってもカルボニル基が生じる³⁸⁾. これに 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) を反応させ (DNP 化), 発色させて定量する. 一測定に試料 1 g 程度が必要で, 試料調製から 1 日以内で終了する. 実験例を下に紹介する.

この DNP 化タンパク試料の電気泳動を行い, 抗 DNP モノクローナル抗体を一次抗体としたイムノブロットングによって修飾タンパクのバンドを特定すれば, ペプチドシーケンシングからカルボニル化タンパク質が同定できる. また, MDA などアルデヒド修飾タンパク質に対する抗体がいくつか市販されている (日油^株, 東京). Yamauchi ら³⁹⁾ は, 抗 MDA 修飾タンパク抗体を用い, 高温ストレス処理を行ったシロイヌナズナ, ホウレンソウでは, それぞれ OEC33 および LHCI が優先的に MDA 修飾を受けることを明らかにしている.

[実験方法]

1. 用意する試薬
 - (1) 抽出メディウム. 10 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.2%

(v/v) Triton X-100, 1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF)

(2) 10 mM DNPH 溶液 (2 M 塩酸中)

- 洗った葉 1 g を乳鉢に入れ, 4 ml の抽出メディウムと少量の海砂を加え, 磨砕し, ミラクロス (Calbiochem) 一層でろ過後, 遠心分離し (27,000×g, 20 分), 上清を得る. これを試料とする.
- タンパク濃度を測定しておく. 一測定あたり少なくとも 0.5 mg タンパク質を用いる.
- 核酸を除くため, 試料に 1% (w/v) 硫酸ストレプトマイシンを加え, 20 分間静置し, 遠心分離する (2,000×g, 5 分).
- 上清 (200 μL) に 10 mM DNPH 溶液 300 μL を加え, 混合する. ブランク試料には 2 M 塩酸を同量加える. 室温で 1 時間静置する.
- トリクロロ酢酸を 10% となるよう加え, 遠心し, 沈殿したタンパク質を 500 μL エタノール/酢酸エチル (1:1) で 3 回洗浄する.
- 沈殿を 6 M グアニジン塩酸, 20 mM リン酸カリウムバッファー, pH 2.3 に溶解する.
- A₃₇₀ からカルボニル含量を求め (ε=22.0 mM⁻¹ cm⁻¹), mg タンパク質あたりのカルボニル含量を計算する.

1.d.4.5 ¹O₂ により特異的に生成する過酸化脂質の検出⁴⁰⁾

リノール酸やリノレン酸など多価不飽和脂肪酸は酸化

を受け, 過酸化脂質となる. 不飽和脂肪酸のペンタジエニル構造 (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) に対し, ¹O₂ は不飽和結合をつくる 2 つの C 原子にエンドペルオキシドの形で付加し, 結果として 4 種のヒドロペルオキシド (R-OOH) が生じる. 一方, HO[•] などラジカルによる酸化では, 中央の C 原子の水素引き抜きが優先的に起こり, ペンタジエニル構造の両端の C 原子にしか O₂ は付加しないため, 2 種類のヒドロペルオキシドしか生成しない. 中央の C 原子の隣の C 原子に -OOH をもつ過酸化脂質は ¹O₂ 付加反応でのみ生成するので ¹O₂ マーカーとなる (図 3)⁴¹⁾. リノレン酸の過氧化物では, 10-hydroperoxy-8, 12, 15 (E,Z,Z) octadecatrienoic acid, 15-hydroperoxy-9, 12, 16 (Z,Z,E) octadecatrienoic acid の 2 つである. 組織から脂質画分を抽出し, 過酸化物をアルコールに還元し安定化させてから, LC/MS/MS で分離・定量する. このとき, ラジカル反応で生成する他の LOOH アイソマーも定量し, ¹O₂ 付加反応とラジカル酸化反応の比を求める. Triantaphylidès ら⁴⁰⁾ はこの方法で, さまざまな酸化的ストレスを与えたとき葉で ¹O₂ が生成することを示した.

1.d.4.6 アスコルビン酸 (AsA), グルタチオンの含量および酸化還元レベルの測定

AsA とグルタチオンは植物における主要な抗酸化物であり, 組織中に mM レベルで含まれる. 生細胞ではほぼ 9 割が還元型, 1 割が酸化型であり, これらの中間の酸化状態にあるラジカル分子 (微量) との三者間で化学

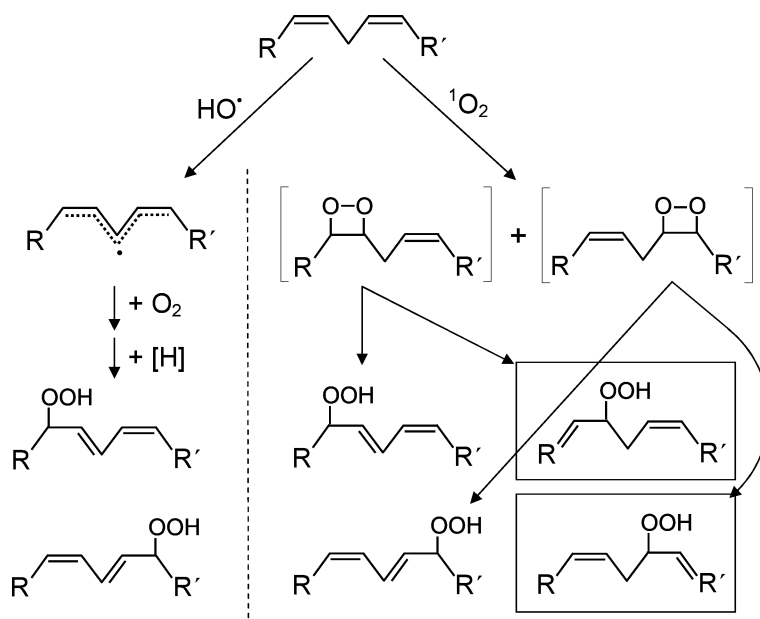


図 3: 多価不飽和脂肪酸と活性酸素の反応で生成する過酸化脂質. 左の経路は HO[•], HO₂[•] などラジカルによる酸化, 右の経路は ¹O₂ の直接付加反応. 枠で囲んだ分子種が ¹O₂ 付加反応のマーカーとなる.

平衡が成立している。還元型・酸化型の比率，および両者の合計量は，植物が受ける酸化ストレスの種類・程度によってダイナミックに変化するだけでなく，抗酸化物の生合成・分解速度にも影響される。組織中の抗酸化物の酸化還元比率を変化させず，かつ高効率で抽出し，測定するには，いくつか注意が必要である。(1) 抗酸化物は，溶存酸素による酸化（自動酸化）を受ける。例えば AsA は $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ など遷移金属イオンの共存下で容易にデヒドロアスコルビン酸 (DHA) に酸化される。DHA は不安定で分解しやすい。(2) 共存する抗酸化物どうしの酸化還元反応が起こる。たとえば DHA は還元型グルタチオン (GSH) と酵素的または非酵素的に反応し，AsA と酸化型グルタチオン (GSSG) を生じる。これらの反応は特に pH が高い領域で速いため，動・植物・微生物材料を問わず，抗酸化物の抽出には通常氷冷した強酸性溶液 (トリクロロ酢酸，メタリン酸，過塩素酸，スルホサリチル酸等) を用いる。試料等の制約で中性付近の pH での抽出が必要なときは，自動酸化を防ぐため 1~5 mM 程度の EDTA を添加する。また，試料は抽出したその日のうちに全て測定する。

一般に抗酸化物の測定では酸化型・還元型のいずれか一方を検出する。抽出液中の酸化型と還元型の総量を求めるには，全てを酸化または還元した後に測定を行って総量を求め，別と同じ試料を用いて酸化型・還元型の片方を化学的にマスクし，残った一方のみを測定する。両者の差から酸化型と還元型の量を求める。これらの前処理に用いるジチオスレイトール (DTT) や *N*-エチルマレイミド (NEM) は，測定前に除去する必要がある。操作の煩雑さ，工程の多さから微量定量ではしばしば誤差の要因となる。近年，測定に影響しない新規試薬の使用 (例えば DHA の還元剤としてのトリス [2-カルボキシエチル] フォスフィン)⁴²⁾，総量からではなく還元体・酸化体をそれぞれ直接測定する方法などが開発され，これらの問題は徐々に解消されつつある。

1.d.4.6.1 アスコルビン酸 (AsA) とデヒドロアスコルビン酸 (DHA)

活性酸素により AsA が Asc^{\cdot} ラジカルに酸化され，不均化反応で DHA が生じる (後述 1.d.5.1)。DHA は酵素により AsA へ還元再生されるが，AsA 酸化速度が DHA 還元速度を上回れば AsA/DHA 比が低下する。また，DHA は分解しやすいため，DHA の蓄積は [AsA + DHA] プール全体の量の低下につながる。

従来，AsA の測定は，ジクロロインドフェノールや活性炭で AsA を酸化させ，生成した DHA をスズ・メタリン酸存在下でジニトロフェニルヒドラジンと反応させて

オサゾンに変換し HPLC で分析する方法が行われてきた。この方法は感度および特異性に優れており，食品成分表に記載のビタミン C 含量は基本的にこの方法に依っているが，操作が煩雑で時間がかかる。ここでは最近適用例が増えてきた， α, α' -ジピリジルを用いる方法⁴³⁾ と，DHA を直接測定する酵素法⁴⁴⁾ を紹介する。一測定あたり 1 g 程度の試料が必要である。AsA は凍結試料中でも酸化されるため，試料を採取したその日のうちに抽出・定量する必要がある。

1.d.4.6.1.1 ジピリジル法

α, α' -ジピリジルは Fe^{2+} と反応して 525 nm 付近にピークを持つ赤色の化合物を生成する。AsA は酸性条件下でも Fe^{3+} をよく還元することから，この性質を用いて AsA が測定できる。本法は他の抗酸化物の影響を若干受けるものの，比較的短時間に測定を完了できる。

[実験方法]

1. 用意する試薬

- (1) 6% トリクロロ酢酸 (抽出用)。冷蔵保存可
- (2) 10% トリクロロ酢酸。冷蔵保存可
- (3) 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)。常温保存可
- (4) 10 mM DTT ((2)に溶解させる)。用時調製
- (5) 0.5% NEM。用時調製
- (6) 42% (w/w) リン酸。常温保存可
- (7) 4% α, α' -ジピリジル (和光純薬)。70% エタノールに溶解させる。冷蔵保存可
- (8) 3% FeCl_3 。冷蔵保存可
- (9) AsA 標準液 (検量線用，0~1.0 mM)。6% トリクロロ酢酸に溶解させる。用時調製

2. 植物組織からの抽出

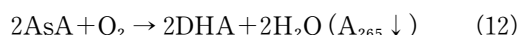
- (1) 切り取った組織 0.4~1.2 g (洗った場合は表面の水をペーパータオルなどでよく拭き取る) を計量 (g 新鮮重あたりで AsA 量を求める場合) し，液体窒素で予め冷却した乳鉢に入れる。
- (2) 液体窒素を加え，乳棒で粉末になるまですり潰す。液体窒素が完全に気化する前に，氷冷した 6% TCA 0.8 ml を加え，溶解と同時に TCA が試料に浸潤するように，乳棒で擦ってこれを溶かす (液体窒素が蒸発してしまうと，粉碎した試料の AsA が空気に触れ，低温でも酸化されてしまう。その前に酸性にしてしまうことが重要である。TCA を加えたとき，凍るくらいの方がよい)。乳鉢・乳棒の表面を 6% TCA で洗いながら抽出液を集め，全容を 2 ml に調整する。多検体の抽出を行うときは，一検体

の抽出が終わってから次の試料の採取を行う。フェオフィチンあたりのアスコルビン酸量を求める場合は、この抽出液から一部を取ってフェオフィチン定量に用いる。

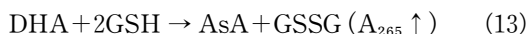
- (3) 抽出液を 10,000×g, 4°C, 10 分間遠心し、上清を新たな試験管に移す。これを測定試料とする。
3. 表 3 に従い、新たな試験管に、試料、試薬を 1)~10) の順に混合していく。
4. すべてを加えた後、42°C 恒温槽で 40 分間加温する。
5. A₅₂₅ を測定し、(本試験) - (盲検) の値から検量線により AsA 濃度を求める。

1.d.4.6.1.2 アスコルビン酸オキシダーゼ (AOX)・デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ法

AsA の紫外吸収は、DHA に酸化されると消失する。AsA の O₂ による酸化を触媒するアスコルビン酸オキシダーゼ (AOX) を加え AsA を DHA に酸化し、吸光度減少から AsA 濃度を測定することができる。



DHA は、GSH による DHA から AsA への還元を触媒する DHA レダクターゼを用い、AsA 生成として定量する方法を筆者らが最近開発した⁴⁴⁾。



AsA と DHA の測定値から、酸化型と還元型の比を求める。この方法は酵素を用いるため特異性が高い。また、DHA レダクターゼ法は、従来の DHA 定量法 (DTT で DHA を AsA に還元、総アスコルビン酸量を求め、(総アスコルビン酸) - (AsA) を DHA 量とする) に比べ、精度が改善されている。

[実験方法]

1. 用意する試薬

- (1) 6% トリクロロ酢酸 (TCA) (抽出用)。
- (2) 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4), 1 mM EDTA。
- (3) 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0), 1 mM EDTA。
- (4) 200 mM GSH。
- (5) AOX (東洋紡, 0.1 U/μl)。

0.5 mM AsA, 0.5 mM EDTA, 5 mM リン酸ナトリウム (pH 5.6) 混合液中で A₂₆₅ の減少 ($\epsilon = 14.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) から求め、1 分間に 1 μmol の AsA を酸化する酵素量を 1 U とする。

- (6) DHA レダクターゼ (組換え体, イネ由来, 0.2 U/μl⁴⁴⁾。

0.1 mM DHA, 2 mM GSH, 50 mM リン酸カリウム (pH 7.8) 混合液中で A₂₆₅ の増大から求め、1 分間に 1 μmol の AsA を生成する酵素量を 1 U とする。この酵素量検定に用いる DHA は AsA から以下のように用時調製する (ドラフト内で行う)。ミリ Q 水に溶解させた 100 mM AsA 水溶液に等容の臭素水 (3% w/v) を加えて混合した後、窒素ガスを 2 分程度吹き込み過剰な臭素を追い出す。これを 6% TCA で希釈し 10 mM とする。市販の DHA 標品は純度が低く、正確な濃度が決められない。

AOX および DHA レダクターゼは、1 mg/ml 以上の濃度で 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0), 1 mM EDTA に溶解させたものを 100 μl 程度ずつマイクロチューブに入れ、-20°C で保存する。AsA 測定時に活性を検定する。数回の凍結融解は実用上問題な

表 3: ジピリジル法の測定液調製法。「-」は、加えないことを示す。単位は ml。

	AsA (還元型) 量		総アスコルビン酸量	
	本試験	盲検	本試験	盲検
1) 測定試料/標準液	0.2	-	0.2	-
2) 10 mM DTT	-	-	0.2	0.2
3) 6% TCA	-	0.2	-	0.2
4) 0.2 M リン酸緩衝液 混合後, 42°C 恒温槽で 15 分加温する。	0.6	0.6	0.4	0.4
5) 0.5% NEM 混合後, 1 分間室温におく。	-	-	0.2	0.2
6) ミリ Q 水	0.2	0.2	-	-
7) 10% TCA	1.0	1.0	1.0	1.0
8) 42% リン酸	0.8	0.8	0.8	0.8
9) 4% α, α'-ジピリジル	0.8	0.8	0.8	0.8
10) 3% FeCl ₃ FeCl ₃ を加えたら速やかにボルテックスミキサーで混合する。	0.4	0.4	0.4	0.4
合計	4.0	4.0	4.0	4.0

- い。
2. 組織からの抽出. 1 d.4.6.1.1 の 2. と同じ.
 3. AsA の測定.
 - (1) 10~100 μl の粗抽出液をキュベットに入れ, 3 倍体積の 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4), 1 mM EDTA を加え, 中和する.
 - (2) ここに, 全容が 999 μl になるよう 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0), 1 mM EDTA を加え, A_{265} を測定する.
 - (3) 1 μl の AOX を加えて, 5 分放置後, A_{265} を測定する.
 - (4) AOX 添加による吸光度減少から, 測定溶液中の AsA 濃度を求める ($\epsilon_{265} = 14.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
 4. DHA の測定 (※).
 - (1) 上の 3.(1)と同様の操作によりキュベット内で粗抽出液を中和する.
 - (2) ここに, 全容が 989 μl になるように 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0), 1 mM EDTA を加え, A_{265} を測定する.
 - (3) 1 μl の DHA レダクターゼ, 次いで 10 μl の 200 mM GSH を加え, 5 分後, A_{265} を測定する.
 - (4) DHA レダクターゼ反応により増大した吸光度に対応する AsA 濃度が, 測定溶液中に存在していた DHA の濃度である.

※ DHA は試料中の GSH によって非酵素的に還元され減少する可能性がある. 非酵素的反応の速度定数は pH が低いほど小さいので, 本法では DHA レダクターゼの至適 pH である pH 7.8~8 ではなく pH 6 の緩衝液を用いる. pH 8 と pH 6 では, GSH と DHA の非酵素的反応の速度定数は 2 桁以上小さくなるのに対し, DHA レダクターゼ活性は約半分の低下にとどまる. これにより非酵素的 DHA 還元

を実質的に抑えることができる. DHA レダクターゼは, 至適 pH で校正した酵素量から計算される必要量の 2 倍を用いている.

1.d.4.6.2 グルタチオン還元型 (GSH), 酸化型 (GSSG)

GSH は AsA とほぼ同じ安定性, 測定感度であり, 同様の制約がある. グルタチオンレダクターゼ (GR) とジチオビスニトロ安息香酸 (DTNB) を用いた酵素リサイクリング法が第一選択であり, この方法を紹介する. 試料調製から測定終了まで半日以内である.

本法では, GSSG が GR によって GSH に還元される反応と, GSH による DTNB の還元反応をカップルさせ, DTNB の還元生成物である 5-メルカプト-2-安息香酸の吸収増大 ($\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$) を計測する (図 4). 充分量の NADPH と DTNB が存在し, かつ, 反応液中の GSSG 濃度が GR の GSSG に対する K_m 値に対して低い条件では, GR の GSSG 還元反応が全過程の律速段階となり, 吸光度は添加したグルタチオン濃度, および反応時間に比例して増加する.

GSH と GSSG を分別するには, チオール基と不可逆的に結合する試薬を試料に加え GSH をマスクし, 過剰量のマスキング剤を除去してから, 試料中に残る GSSG を上の測定で求める. 紹介する方法⁴⁵⁾ は, 抽出にスルホサリチル酸, チオールのマスキングに 2-ビニルピジリンを用いるもので, 従来法(トリクロロ酢酸抽出, NEM によるマスキングの後, エーテル抽出を繰り返す)に比べ簡略で, 回収率のばらつきとスルーブットが改善されている. なお, 本法は試料中の他のチオールの影響を受けるが, 組織内の代謝物濃度や酵素の基質特異性を考慮すると, おおそ問題のないレベルで測定が可能であり, 筆者らはこの方法で植物・酵母の抽出液中のグルタチオン量を良好に測定している. GSH をそれ以外のチオール

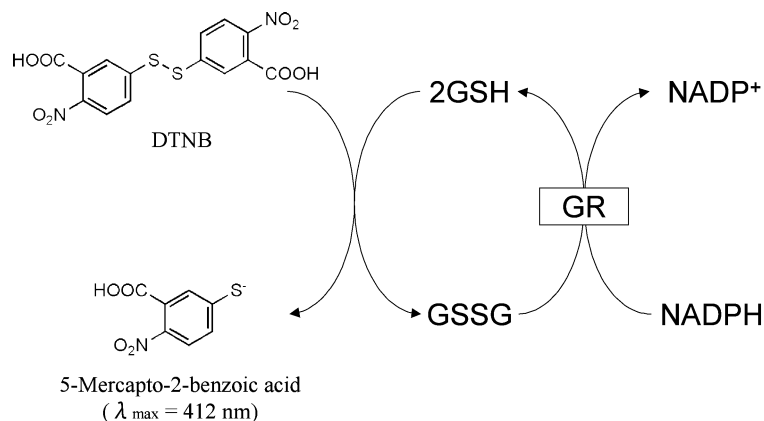


図 4: グルタチオンの酵素リサイクリング反応の原理.

化合物と分別して精密定量する HPLC 分析法も確立されている⁴⁶⁾。

[実験方法]

1. 用意する試薬

- (1) 4% スルホサリチル酸 (抽出用)。
- (2) 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5), 1 mM EDTA。
- (3) 50 mM GSSG, 4% スルホサリチル酸, 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5), 1 mM EDTA に溶解させる。
- (4) 50 mM NADPH, 4% スルホサリチル酸, 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5), 1 mM EDTA に溶解させる。用時調製。
- (5) 1 mM DTNB (10 mM 溶液は -20°C で少なくとも 1 ヶ月は安定に保存できる。実験当日に 10 倍希釈し使用する)。
- (6) 97% 2-ビニルピリジン。
- (7) 20% トリエタノールアミン。
- (8) グルタチオンレダクターゼ (GR: オリエンタル酵母, 1 U/ μ l の液状品)。

2. 組織から抽出液を調製する。操作は 1 f.3.4.1.1 の 2.~4. に準じる。ただし抽出液には 4% スルホサリチル酸を用いる。

3. 50 mM GSSG 6 μ l を 4% スルホサリチル酸 994 μ l と混合する (終濃度 300 μ M)。さらにこれを 4% スルホサリチル酸で段階的に希釈し, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.38, 4.68 μ M および 0 の GSSG 標準液を調製する。

<総グルタチオン濃度 (GSH+1/2×GSSG) の測定>

4. 2. で調製した抽出液または 3. で調製した GSSG 標準液 4 μ l をマイクロタイタープレートのウェルに入れる。
5. 196 μ l の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5), 1 mM EDTA を 4. のウェルに加えて混合する。
6. 5. の混合液を 50 μ l × 3 連とって, 別のウェルに移す。
7. 別の容器で 2.8 ml の 1 mM DTNB, 3.75 ml の 1 mM NADPH, 5.85 ml の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5), 1 mM EDTA, および 4 U の GR を混合し, リザーバーに移す。これをマルチチャンネルピペッターで 100 μ l ずつ, 6. のウェルに加える。記載した量で 96 穴プレート 1 枚分のウェルに試料を添加できる。
8. プレートミキサーでウェル内の溶液を混合し, マイ

クロプレートリーダーで A₄₁₂ を測定する。

9. 10~30 分後にもう一度 A₄₁₂ を測定する。インターバル時間は試料の呈色程度に応じて任意に決定してよい。
10. 9. と 8. の吸光度の差を, GSSG 標準液の濃度に対してプロットし, 比例関係が保持されている濃度範囲を用いて検量線を作成する。複数時間で測定することにより, 試料測定に適した濃度の検量線が得られる。

<1/2×GSSG 濃度の決定>

11. 2. で調製した抽出液, および 3. で調製した GSSG 標準液を 260 μ l ずつ別々のマイクロチューブにとる。それぞれに 2-ビニルピリジン 10 μ l を加え, 30 秒間ボルテックスミキサーの最高速で攪拌する。次いで 20% トリエタノールアミンを 80 μ l 加え, 同様に攪拌する。
12. 室温で 10,000 rpm, 1 分間遠心分離する。
13. 下層を 50 μ l × 3 連とって, マイクロタイタープレートのウェルに分注する。このとき 2-ビニルピリジンの油滴を取らないように注意する。
14. <総グルタチオン濃度 (GSH+1/2×GSSG) の決定> の 7.~10. と同様, グルタチオン濃度を求める。
15. (総グルタチオン濃度) - (1/2×GSSG 濃度) から, もとの試料の GSH 濃度を求める。

1.d.5 活性酸素の in situ (in vivo) 測定

生きた組織や植物体では恒常的に活性酸素種が生成しているが, そのほとんどは, 細胞の抗酸化成分によって消去されており, 細胞での活性酸素種の定常濃度は数 μ M 以下 (分子種による) である。in situ 測定では抗酸化物やプローブ試薬が活性酸素種と反応して生じる酸化生成物を検出する。

1.d.5.1 葉切片のアスコルビン酸ラジカル測定⁴⁷⁾

AsA は植物細胞に数十 mM 含まれ, アスコルビン酸ペルオキシダーゼの電子供与体として H₂O₂ を還元し, 自身は Asc[•] に酸化される。



また AsA は非酵素的に水溶性のラジカル種 (R[•]) を一電子還元・消去し, この反応でも Asc[•] ラジカルが生成する。



すなわち Asc[•] は活性酸素種の包括的マーカーと見な

すことができる。

細胞には Asc[•] ラジカルを特異的に還元する酵素系がある。ストロマでは Asc[•] ラジカルは還元型フェレドキシン (Fd_{red}) によって速やかに還元される²⁷⁾。NAD(P)H を電子供与体とするモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (MDAR) もストロマ、ミトコンドリア、ペロキシソームに存在する。



これらによって還元されない場合、Asc[•] ラジカルは、自己不均化で AsA と DHA になる。



活性酸素種が生成する条件で細胞内コンパートメントの Asc[•] ラジカルの定常濃度 [Asc[•]]_{st} は、上記の反応のバランスによって決まる。AsA 酸化による Asc[•] ラジカル生成速度を v_p 、Asc[•] ラジカルの還元速度と不均化速度をそれぞれ v_r 、 v_d とすると、定常状態では

$$v_p = v_r + v_d \quad (18)$$

となり、 $v_r = k_r[\text{Asc}^{\bullet}]_{st}$ 、 $v_d = k_d[\text{Asc}^{\bullet}]_{st}^2$ (反応速度定数 k_r は Fd_{red} 濃度、MDAR 濃度、NADPH 濃度に依存、 k_d は pH に依存) である。すなわち、活性酸素種による AsA 酸化が増大すると (k_r 、 k_d が一定として) Asc[•] ラジカルの定常濃度が増大する。また酵素の失活などにより Asc[•] ラジカル還元速度が低下しても [Asc[•]]_{st} は増大する。葉の切片を ESR キャビティ内にセットし、Asc[•] ラジカルを測定することで、細胞内のこうした状況を観測することができる。Asc[•] ラジカルの細胞内での寿命はミリ秒レベル以下であり、ESR で検出するシグナル強度は Asc[•] ラジカルの定常濃度に対応する。ただし、肉厚の葉、毛状突起のある葉、平らにできない葉 (シロイヌナズナ、タバコ、セントポーリアなど) は本法には不向きである。これは水によってマイクロ波が吸収されたり、不規則な形状によって ESR キャビティ内のマイクロ波共鳴が乱されるためである。

[実験方法]

1. 用意するもの

- (1) 石英製ティッシュセル
- (2) メチルピオローゲン 0.1 mM

2. 植物の生葉を 4 mm×2.5 cm 大に切り取り、ティッシュセルにシリコングリースで貼り付ける。これを ESR のキャビティに差し込み、ラジカル測定を行う。Xバンド ESR (JES-RE2X, JEOL) での測定条

件例を示す。

- (1) マイクロ波周波数 9.40 GHz
- (2) マイクロ波出力 3 mW
- (3) 磁場変調 幅 0.1 mT, 周波数 100 kHz
- (4) 応答時間 0.3 s
- (5) 磁場 (中央) 337.5 mT
- (6) 磁場掃引速度 1.25 mT/min

3. ポジティブコントロールとして、葉切片に 0.1 mM メチルピオローゲンを減圧吸引によって与え、暗所で 30 分置いた後、ESR キャビティ内で光照射する。Asc[•] ラジカルが超微細結合定数 0.23 mT のダブルレットシグナルとして観測できる。

4. 一次微分シグナルの一方のピークの山と谷との差をシグナル強度として評価する。これは Asc[•] ラジカルの定常濃度に対応する (絶対値は求められない)。

1.d.5.2 プローブ試薬を用いた活性酸素の in situ 検出

生組織に蛍光プローブや発色試薬を与え、活性酸素を検出する方法は、活性酸素生成部位の空間的な分布を知ることができ、シグナル作用研究などに最近よく用いられている⁴⁸⁾。プローブ試薬は活性酸素種と反応して比較的安定な化学形に変化し、この蓄積量を評価する。すなわちこれらの方法では、活性酸素生成量の積算値に相当するパラメータが得られる。細胞内の反応であり、検量線を得ることは困難で、測定試料に対する適切なコントロール試料と比較しシグナル強度の大小を判定する。

in situ 測定では 2 つの注意点がある。(1) プローブ試薬の活性酸素種に対する特異性。ほとんどの場合、活性酸素種の検出はプローブ試薬との酸化還元反応を利用している。例えばニトロブルーテトラゾリウム (NBT) による O₂⁻ 検出は NBT の還元で生成するホルマザンの発色を O₂⁻ の指標とするが、この還元反応は AsA によっても進行する。検出されたシグナルが AsA によらないことを確認するコントロール実験が必要である。また、プローブ試薬の細胞内代謝や葉緑体チラコイド電子伝達系での直接酸化還元の可能性を検証する実験が必要である。(2) プローブ試薬の組織内、細胞内分布の均一性。例えば葉の組織にプローブ試薬を与える場合、葉脈から蒸散流によって吸引させると維管束に沿って試薬が分布する。より均一に分布させるには気孔からの減圧吸引や、葉面にピンホールを作り、針のないシリンジで加圧注入するといった方法がある⁴⁹⁾。ただし組織に強制的に溶液を注入した直後は細胞間隙が水で満たされておりガス交換が制限されるため、暗所では酸素不足、光照射下では CO₂ 不足となることに留意する必要がある。

なお、動物細胞での活性酸素プローブ使用に関する総説^{17,50)}も参照されたい。

1.d.5.2.1 ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) による O_2^- の in situ 検出⁵¹⁾

NBT は O_2^- により還元され、青色で不溶性のホルマザンとなり、組織に沈着する。NBT 水溶液 6 mM を減圧吸引によりシロイヌナズナ葉に浸透させ、葉の半分を遮光し、強光 ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) を 60 分間照射する。クロロフィルを脱色するため、乳酸：グリセロール：エタノール (1:1:4 (v/v)) 混液中で 5 分間煮沸した後、ホルマザンの青色を観察する。光照射部と遮光部を比較することで、光照射による O_2^- 生成を見積もることができる。上述のように NBT は AsA による非酵素的還元を受ける。また、アルコールデヒドロゲナーゼの存在下で NAD(P)H により還元される。上記の実験で観測した NBT 還元が O_2^- によるという結論は、光照射では AsA や NAD(P)H は増大しないとの仮定に基づいている。

1.d.5.2.2 3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) による H_2O_2 の in situ 検出

細胞外から与えた DAB は細胞内にも浸透し、ペルオキシダーゼの存在下で H_2O_2 により酸化されポリマーを形成し、細胞に沈着する⁵²⁾。植物細胞内外の各コンパートメントにはペルオキシダーゼが存在するため、DAB の酸化は H_2O_2 の生成に対応する。DAB は酸性条件 (pH 3.8) で水溶性となるので、DAB 塩酸塩 (たとえば同仁化学, D 006) を用いればよい。5 mM 溶液を調製し、減圧吸引によりシロイヌナズナ葉に浸透させる。あるいは DAB 溶液に 0.1% TritonX-100 を加え、この液に 8 時間浸しておく。この葉を 1.d.5.2.1 と同様に一部遮光し、強光照射後、クロロフィルの脱色を行う。光照射を受けた部位は赤褐色の色素が形成されており、 H_2O_2 の生成を示す⁵¹⁾。DAB は直接光を吸収し着色する。生成した H_2O_2 が光合成電子伝達反応に由来することを検証するコントロール実験として、30 μM DCMU など光合成電子伝達阻害剤を与え光照射する。また、カタラーゼを組織に与えて DAB の酸化が抑制されれば、細胞外で H_2O_2 が生成したことが確認できる。

1.d.5.2.3 蛍光プローブを用いた 1O_2 と O_2^- の in situ 検出

dansyl-2, 2, 5, 5-tetramethyl-1, 5-dehydro-1H-pyrrole (DanePy) は蛍光物質であり 1O_2 と反応し酸化されると蛍光を失う。 1O_2 に選択性が高いが、 O_2^- 、 H_2O_2 によっても酸化される⁵³⁾。DanePy を葉に与え、強光照射などで 1O_2 を生成させたときに消失する蛍光を蛍光顕微鏡や蛍光イメージアナライザーで評価する。励起波長 330-345

nm での発光は溶液中で 550 nm、葉の組織中では 532 nm に極大をもつ。葉には減圧吸引あるいはピンホールからの加圧によって与える。葉に与えた DanePy は代謝され次第に蛍光を失うため、光照射と同じ時間だけ暗所においたときの蛍光低下を測定し、これを差し引くことで光照射による 1O_2 を評価する⁵⁴⁾。もう一つの蛍光物質 HO-1889NH (励起 330 nm, 発光 540 nm) は 1O_2 、 O_2^- どちらでも酸化され、蛍光を失う⁴⁹⁾。これらのプローブを与えたインゲンマメ葉に UV-B 照射すると、HO-1889NH の蛍光が消光し DanePy の蛍光が消光しなかった。これは UV-B 照射によって葉で O_2^- が生成することを示す⁴⁹⁾。

Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG; モレキュラープローブ社) は非蛍光性であり、 1O_2 と反応して蛍光性 (励起 480 nm, 発光 532 nm) となる^{54a)}。使用に際しては光化学系 II 活性を 10% 程度阻害することを考慮する必要がある^{54b)}。

1.d.6 おわりに

冒頭で述べたように細胞内での活性酸素種の生成フラックスはかなり大きい。しかし、細胞には大量の抗酸化物質・抗酸化酵素が存在するため、活性酸素種の定常濃度はきわめて低いレベルに保たれている。おおまかに言って、活性酸素消去能が一定であれば、活性酸素定常濃度は生成フラックスに比例して増大する。一方、生成フラックスが一定でも消去能が低下すれば定常濃度は容易に一桁以上上昇する。生体内の活性酸素の動態をできるだけ正確に把握するには、生成速度の変動だけでなく消去活性の変化も常に意識しなければならない。実際、活性酸素消去酵素の中には活性酸素によって失活しやすいものがあり、また環境ストレス条件下で特定の酵素だけが失活する例もある^{55,56)}。本節では述べなかったが、活性酸素消去酵素の活性評価も細胞の酸化的ストレス状態を知る上で重要であることを指摘しておきたい。

活性酸素種の「分かりにくさ」は、その寿命の短さに負うところが大きい。時間と空間のスケールを日常感覚の 1000~100 万倍ほど拡大して考えてみれば、これらの分子がそれほど特別な性質をもつわけではないことが理解できるとおもう。化学、とくに反応速度論的理解に基づき、活性酸素と抗酸化物質、標的分子の細胞内でのふるまいを正しくイメージできるようになれば、実験結果の解釈において大きな間違いは防げるはずである。

参考文献

- 1) C. H. Foyer and G. Noctor, *Physiol. Plant.* **119** (2003) p. 355
- 2) K. Asada, *Plant Physiol.* **141** (2006) p.391
- 3) 真野純一, 浅田浩二, 蛋白質核酸酵素 **44** (1999) p.2239
- 4) 浅田浩二, 「植物の環境応答」(1999) 秀潤社, p.107
- 5) K. Asada, K. Kiso and K. Yoshikawa, *J. Biol. Chem.* **249** (1974) p.2175
- 6) C. Miyake, U. Schreiber, H. Hormann, S. Sano and K. Asada, *Plant Cell Physiol.* **39** (1998) p.821
- 7) A. Telfer, S. M. Bishop, D. Philips and J. Barber, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) p.13244
- 8) G. Ananyev, G. Renger, U. Wacker and V. Klimov, *Photosynth. Res.* **41** (1994) p.327
- 9) P. Propšil, A. Arató, A. Krieger-Litzkay and A. W. Rutherford, *Biochemistry* **43** (2004), p.6783
- 10) É. Hideg, C. Spetea and I. Vass, *Biochim. Biophys. Acta* **1186** (1994) p.143
- 11) S. Khorobrykh, M. Mubarakshina and B. Ivanov, *Biochim. Biophys. Acta* **1657** (2004) p.164
- 12) S. Jasid, M. Simontacchi, C. G. Bartoli and S. Puntarulo, *Plant Physiol.* **142** (2006) p.1246
- 13) Y. Sakihama, S. Nakamura and H. Yamasaki, *Plant Cell Physiol.* **43** (2002) p.290
- 14) M. Romero-Puertas, M. Laxa, A. Mattè, F. Zaninotto, I. Finkemeier, A. M. E. Jones, M. Perazzolli, E. Vandelle, K.-J. Dietz and M. Delledonne, *Plant Cell* **19** (2007) p. 4120
- 15) J. N. Bouchard and H. Yamasaki, *Plant Cell Physiol.* **49** (2008) p.641
- 16) 谷口直之(編著), 「活性酸素実験プロトコール」秀潤社, 1994
- 17) 二本鋭雄, 野口範子, 内田浩二(編), 「酸化ストレスマーカー」学会出版センター, 2005
- 18) 「活性酸素」蛋白質核酸酵素臨時増刊 33, No.6 (1988) 共立出版
- 19) 斉藤烈, 松浦輝男, 化学総説, No.7 (1990) p.3
- 20) B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fourth edition, Oxford, Oxford Univ. Press, 2007
- 21) W. H. Koppenol, *Pure Appl. Chem.* **72** (2000) p.437
- 22) <http://www.healthcare.uiowa.edu/CoreFacilities/esr/education/FRRB-FreeRad-names.pdf>
- 23) 大矢博昭, 山内淳, 「電子スピン共鳴」講談社サイエンティフィック, 1989
- 24) G. M. Rosen, B. E. Britigan, H. J. Halpern and S. Pou, *Free Radicals* (1999) Oxford Univ. Press
- 25) K. Stolze, N. Udilova and H. Nohl, *Free Radic. Biol. Med.* **29** (2000) p.1005
- 26) R. C. Ford and M. C. W. Evans, *FEBS Lett.* **160** (1983) p.159
- 27) C. Miyake and K. Asada, *Plant Cell Physiol.* **35** (1994) p.539
- 28) J. Mano, T. Ushimaru and K. Asada, *Photosynth. Res.* **53** (1997) p.197
- 29) J. Mano, É. Hideg and K. Asada, *Arch. Biochem. Biophys.* **429** (2004) p.71
- 30) J. Mano, C. Ohno, Y. Domae and K. Asada, *Biochim. Biophys. Acta* **1504** (2001) p.275
- 31) N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, K. Nakano, M. Irie and T. Imato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) p. 2943
- 32) K. Khorobrykh, A. Khorobrykh, J. Mano, 投稿中.
- 33) G. Queval, J. Hager, B. Gakière and G. Noctor, *J. Exp. Bot.* **59** (2008) p.135
- 34) J. M. Cheeseman, *J. Exp. Bot.* **57** (2006) p.2435
- 35) D. M. Hodges, J. M. DeLong, C. F. Forney and R. K. Prange, *Planta* **207** (1999) p.604
- 36) M. C. Romero-Puertas, J. M. Palma, M. Gómez, L. A. del Río and L. M. Sandalio, *Plant Cell Environ.* **25** (2002) p.677
- 37) I. M. Möller, P. E. Jensen and A. Hansson, *Annu. Rev. Plant Biol.* **58** (2007), p.459
- 38) 内田浩二, 「酸化ストレスマーカー」学会出版センター, 2005, p.80
- 39) Y. Yamauchi, A. Furutera, K. Seki, Y. Toyoda, K. Tanaka and Y. Sugimoto, *Plant Physiol. Biochem.* **46** (2008) p.786
- 40) C. Triantaphilidès, M. Krischke, F. A. Hoerberichts, B. Ksas, G. Gresser, M. Havaux, F. Van Breusegem, M. J. Mueller, *Plant Physiol.* **148** (2008) p.960
- 41) N. A. Porter, *Methods Enzymol.* **105** (1984) p.273
- 42) J. Lykkesfeldt, *Anal. Biochem.* **282** (2000) p.89
- 43) K. Kampfenkel, M. V. Mongatu, and D. Inzé. *Anal. Biochem.* **225** (1995) p.165
- 44) K. Amako, T. Ushimaru, A. Ishikawa, Y. Ogishi, R. Kishimoto and K. Goda. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **92** (2006) p.89
- 45) M. A. Baker, G. J. Cerniglia, and A. Zaman. *Anal. Biochem.* **190** (1990) p.360
- 46) R. A. Winters, J. Zukowski, N. Ercal, R. H. Matthews and D. R. Spitz, *Anal. Biochem.* **227** (1995) p.14
- 47) U. Heber, C. Miyake, J. Mano, C. Ohno and K. Asada, *Plant Cell Physiol.* **37** (1995) p.1066
- 48) F. van Breusegem, J. Bailey-Serres and R. Mittler, *Plant Physiol.* **147** (2008) p.978
- 49) É. Hideg, C. Barta, T. Kálai, I. Vass, K. Hideg and K. Asada, *Plant Cell Physiol.* **43** (2002) p.1154
- 50) B. Halliwell and M. Whiteman, *Br. J. Pharmacol.* **142** (2004) p.231
- 51) M. Fryer, K. Oxborough, P. M. Mullineaux and N. R. Baker, *J. Exp. Bot.* **53** (2002) p.1249
- 52) H. Thordal-Christensen, Z. Zhang, Y. Wei and D. B.

- Collinge, *Plant J.* **11** (1997) p.1187
- 53) T. Kálai, É. Hideg, I. Vass and K. Hideg, *Free Radic. Biol. Med.* **24** (1998) p.649
- 54) É. Hideg, T. Kálai, K. Hideg and I. Vass, *Biochemistry* **37** (1998) p.11405
- 54a) C. Flors, M. J. Fryer, J. Waring, B. Reeder, U. Bechtold, P. M. Mullineaux, S. Nonell, M. T. Wilson, N. R. Baker, *J. Exp. Bot.* **57** (2006) p.1725
- 54b) É. Hideg, *Cent. Eur. J. Biol.* **3** (2008) p.273
- 55) J. Mano, *Oxidative Stress in Plants*, ed. D. Inzé and M. von Montagu, London, Francis & Taylor, 2002, p.217
- 56) S. M. Choi, S. W. Jeong, W. J. Jeong, S. Y. Kwon, W. S. Chow and Y.-I. Park, *Planta* **216** (2002) p.315