



Title	低温ストレスに対する高等植物の情報発現
Author(s)	奥田, 徹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第3240号
Issue Date	1993-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3071536
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51180
Type	doctoral thesis
File Information	000000265378.pdf



低温ストレスに対する高等植物の情報発現

農芸化学専攻 博士後期課程

奥田 徹

①

低温ストレスに対する 高等植物の情報発現

北海道大学大学院農学研究科博士後期課程

農芸化学専攻

奥田 徹

目 次

	項
第1章 序論	1
1-1 歴史	1
1-2 本研究の目的	3
第2章 低温及び過酸化物の生成を促進する試薬に対する 秋播小麦葉組織の酵素活性及び基質濃度の変化	4
2-1 緒言	4
2-2 実験方法	6
2-3 実験結果	8
2-4 考察	10
2-5 要約	12
第3章 低温処理による秋播小麦葉組織における過酸化水素の生成	19
3-1 緒言	19
3-2 実験方法	20
3-3 実験結果	21
3-4 考察	21
3-5 要約	22
第4章 低温処理による秋播小麦茎組織における過酸化水素の生成	27
4-1 緒言	27
4-2 実験方法	28
4-3 実験結果	29
4-4 考察	30
4-5 要約	32
第5章 低温処理による秋播小麦茎組織のhydroxyl radicalの生成	40
5-1 緒言	40
5-2 実験方法	41
5-3 実験結果	42
5-4 考察	43
5-5 要約	44

第6章 総合考察1 — — — 低温処理による活性酸素種の生成系	49
6-1 緒言	49
6-2 考察	49
第7章 総合考察2 — — — 細胞内の活性酸素除去系	56
7-1 緒言	56
7-2 考察	56
第8章 要約	65
第9章 謝辞	67
第10章 参考文献	68

略号

AsA, ascorbate.

ASFRD, ascorbate free radical reductase.

AT, 3-amino-1,2,4-triazole.

CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone.

DHA, dehydroascorbate.

DHARD, dehydroascorbate reductase.

DMAB, 3-(dimethylamino)benzoic acid.

F6P, fructose-6-phosphate.

G6P, glucose-6-phosphate.

G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Glyphosate, N-(phosphonomethyl)glycine mono-(isopropylammonium) salt.

GSH, reduced glutathione.

GSSG, oxidized glutathione.

MBTH, 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone.

MSA, methanesulfinic acid.

PQ, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyrimidinium dichloride (paraquat).

第 1 章

序 論

1 - 1 歴 史

高等植物には越冬できるものと越冬出来ないものが知られている。ポプラは -20°C 以下になる北海道の厳しい冬季に於いても越冬し翌年の春に出芽することができる。クローバーやタンポポなどの一部の植物は積雪下でも越冬できるがトマト、キュウリ、ベコニアなどは低温にさらされると枯れる。同じ種類の植物でも越冬能力が異なるものがあり、越冬する秋播小麦と越冬できない春播小麦などが知られている。

高等植物を低温下にさらした場合、一般に "cold injury" と呼ばれる傷害が細胞内に生じる。この "cold injury" を回避することができるか、または受けた傷害を修復する能力を持つことが越冬できるかできないかの差になっていると考えられる。

また植物を予め低温処理することにより低温順化がおこり、細胞が低温耐性になる。これは低温順化の過程で "cold injury" を防ぐ何らかの変化が生じるためと考えられ、これらの現象の解明が古くから行われている。

Levitt (1,2) は cold injury は細胞内の disulfide bond の生成によって生じるという仮説を発表している。Elisabeth *et al.* (3) はホウレンソウに於いて protein-sulfhydryl (SH) や non-protein-sulfhydryl が減少することを示している。このことは細胞が低温度によって酸化状態になることを示している。Kuiper (4) は alfalfa に於いて生育温度と脂質との関係を明らかにした。Huner *et al.* (5) は Δ^3 -hexadecenoic acid が凍結耐性に関与していると報告している。Duncan and Widholm (6) は、proline の蓄積が低温耐性と関係していると述べている。その後 Duncan and Widholm (7) は maize callus において proline は低温耐性の主要な物質ではないとしている。

これに対して低温耐性に関与するタンパク質の誘導的な合成という立場からのアプローチも数多くなされている。Goldstein *et al.* (8) は *E. coli* において 7.4kDa のタンパク質が低温処理の際に合成されることを報告している。また植物

においては Guy and Haskell (9)はハウレンソウの葉において低温処理により処理していない場合には見られない22のタンパク質が見られると報告している。また Perras and Sarhan (10)は低温処理により少なくとも8つのタンパク質が誘導合成されていると報告している。

また酵素活性の方面からのアプローチもなされており、Sagisaka (11)は glucose-6-phosphate dehydrogenase の活性が冬季のポプラにおいて増加すること、また Nakagawara and Sagisaka (12)は ascorbate free radical reductase、ascorbate peroxidase、dehydroascorbate reductase 等の酵素活性が冬季のポプラにおいて増加することを示している。Esterbauer and Grill (13)は glutathione reductase の活性が冬季期間高まることをトウヒを用いて示し、Guy and Carter (14)も glutathione reductase 活性が低温処理により66%高まることをハウレンソウの葉を用いて示している。さらに Anderson *et al.* (15)は最近松(eastern white pine)を用いて一連の抗酸化システムを測定し、これらが冬季に高まることを示した。

Weiser (16)や Guy *et al.* (17)及び Hahn and Walbot (18)らが述べたように、これらのタンパク質や酵素活性の増加は普段使われていない遺伝子が低温処理によって発現するようになったためと考えられる。最近 mRNA や cDNA の研究から低温誘導性の遺伝子を明らかにする試みがいくつかなされている。

Mohapatra *et al.* の一連の研究(19-22)でアルファルファの低温耐性に関与する遺伝子が最近クローニングされ、Orr *et al.* (23)も *Brassica napus* の低温誘導性遺伝子と *Arabidopsis* の kin 1 遺伝子は77%の相同性があると報告している。また、Lin *et al.* (24)は *Arabidopsis* の低温誘導性遺伝子が凍結保護活性を持つタンパク質をコードしていると述べている。

また Sagisaka *et al.* (25-27)は植物の細胞内微細構造を電子顕微鏡を用いて観察し、越冬中の高等植物はミトコンドリアをはじめとしていろいろな変化をしていることを示した。

1 - 2 本研究の目的

前述のように低温処理によって glucose-6-phosphate dehydrogenase のようないくつかの酵素活性が増加し、これらの酵素の多くが活性酸素種の除去機構に関与している。中でも glucose-6-phosphate dehydrogenase は superoxide によって誘導的に合成され(28)、glutathione reductase は過酸化水素により誘導的に合成される(29)ことが細菌において知られているので、植物に於いても同様な機構が存在するならば低温処理によって細胞内に活性酸素が生成し、生じた活性酸素を除去するためにいろいろな酵素が誘導合成されている可能性が示唆される。Kendall and McKersie (30) は植物を低温処理した際に受ける細胞膜のダメージと *in vitro* で細胞膜を活性酸素で処理した場合のダメージが非常に良く似ていることから、低温処理と活性酸素種に関係があることを示唆している。しかし現在低温度ストレスに対してどのように生理的变化が生じ、酵素等の誘導的な合成がどのような仕組みで起こるのかに関する研究はあまりされていない。

低温処理による細胞のダメージと回避のメカニズムを研究することを目的として本研究を行った。特に本論文では植物に低温ストレスを与えた場合に起こる酸化の原因とその防御について生理的な立場から検討を加えた。

第2章

秋播小麦葉組織における低温、 パラコート及びアミノトリアゾール処理 に対する代謝的応答

2-1 緒言

過酸化水素やこれに関係する活性酸素種は強力な酸化剤であり、細胞中の過酸化水素濃度が高まると細胞構築物に酸化的傷害を引き起こすと考えられる。既に Halliwell and Foyer (31) は glutathione (GSH) と glutathione reductase が ascorbate (AsA) と共に過酸化水素の除去系を構成することを示している。

細胞を低温処理すると、細胞内の酵素反応が低下して、結果として ATP の様な代謝産物の要求量が低下する(32)。特に ATP の要求量の低下は電子伝達系のある位置での電子の飽和状態をもたらし、さらに非特異的な流出によって過酸化水素のような活性酸素種の生成を促すものと考えられる。このため過酸化水素の除去系に関与する酵素活性や基質濃度の増加は、低温順化に必須な適応能力の一つと考えられる(11,12,34,35)。AsA-GSH cycle とこれに関与する ascorbate free radical reductase (ASFRD)、catalase や peroxidase がこれらの役割を担っている(36,37)。

代謝活性が低温処理によって変化することは以前から知られている。アルファルファにおいては低温処理により脂肪酸の不飽和化が生じる(4)。ポプラでは冬季期間 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) の活性と glucose-6-phosphate (G6P) の濃度が増加し(11)、ASFRD、dehydroascorbate reductase (DHARD) 及び ascorbate peroxidase (ASPOD) の活性が増加する(12)。GSH と AsA を必要とする過酸化物除去系がリンゴにおいては最初の霜の後に誘導され(33,34)、また秋播小麦(35)及びトウモロコシ(38)においては低温処理によって同様に誘導されることが報告されている。これらの酵素活性及び基質濃度の増加は低温環境に対する細胞の適応反応であることが示唆され、これらの酵素活性

の高まり及び関連基質濃度の維持能力の強化状態が冬季期間に特徴的な代謝であると思われる(11)。

第3章及び第4章で述べるとおり我々は秋播小麦を低温処理すると過酸化水素の濃度が一時的に増加することを見いだした(39)。リンゴの芽を凍結状態から溶かし始めると同様に急激な過酸化水素の増加が生じ、同時に GSH と G6P の濃度が減少することも報告されている(40)。ポプラにおいても過酸化物が mM 水準の濃度で存在することが示されている(41)。さらに凍結したポプラの枝では GSH の濃度が徐々に低下し、これに続いて G6P の濃度も低下することが示されている(42)。また凍結状態での細胞の酸化に関する報告も既に為されている(11,43)。

凍結状態下で起こる細胞の傷害はおそらく superoxide anion や過酸化水素のような活性酸素種によって引き起こされると思われる。Halliwell ら(31,36,37)、Asada ら(44-46)、Sagisaka ら(12,33,35,42,43)は植物細胞は酸化による傷害を防ぐために過酸化物を除去する AsA-GSH cycle や ASPOD、catalase のような除去システムを持っていることを示した。低温処理によりこれらの過酸化物の除去系(12,33-35,42,43)を含む酵素活性の増加が見られることは、この変化が主として過酸化物を介した反応によって引き起こされることを示唆しており、このことから過酸化水素のレベルは植物にとって一つの環境応答のシグナルになっていると考えられる。秋播小麦の根茎移行部においても低温処理で誘導されるタンパク質のうち、一部が過酸化水素によっても同様に誘導される(Matsuda ら、未発表)。これらの結果は活性酸素が低温ストレスに対する応答に関して遺伝子発現に関与する非常に大切な役割を担っていることを強く示唆している。

第2章では、秋播小麦の葉を用いて、低温及び人工的に与えた酸化的ストレスに対して酵素活性及び基質濃度においてどのような変化が生じるのかを調べた結果を述べる。人工的な酸化条件は paraquat または 3-amino-1,2,4-triazole 処理によって作りだした。Paraquat はクロロプラスト中に superoxide を発生させる試薬として(47)、3-amino-1,2,4-triazole は catalase の特異的阻害剤(48,49)として用いた。その他、比較のために 5-enolpyruvyl-3-phosphate synthase の触媒反応を特異的に阻害し(50,51)、細胞内で過酸化水素を生成しない試薬として、除草剤 glyphosate を用いた。

2-2 実験方法

1. 試薬

NADP⁺、NADPH、及び NAD⁺ は Oriental Yeast Co., LTD. の製品を用いた。G6PDH(yeast)、phosphoglucosmutase(rabbit muscle)、phosphoglucosmerase (yeast)、glutathione reductase(yeast)、GSH 及び GSSG は Boehringer Mannheim GmbH の製品を用いた。Ascorbate oxidase は Toyo Jozo Co., LTD. の製品を使用した。AT、AsA、および PQ(methyl viologen) は Nakarai Tesque の製品を使用した。DHA と Darco G-60 はそれぞれ Fluka AG (Buchs, Switzerland) 及び Atlas Powder Co. の物を用いた。Glyphosate 除草剤の Roundup は市販品を用いた。その他の試薬は全て市販の特級品を用いた。

2. 植物材料

秋播小麦の種子は吸水後4日間の暗所処理を行い、昼間 28℃ (16時間、10,000 lux の光照射)、夜間 24℃ (8時間)、相対湿度 75% の一定環境下で湿潤させたパーミキュライト上で生育させた。発芽後7-10日目の1枚目の葉を測定に用いた。

3. 低温処理

低温処理は若苗を2℃に保った発泡スチロールの暗箱に移すことで行った。

4. PQ 処理

0.01% Triton X-100 に溶解した 50 μM PQ 溶液を発芽後7日目の小麦の葉表面に噴霧(50 ml / 80 若苗)した。

5. AT 処理

0.01% Triton X-100 に溶解した 30 mM AT 溶液を発芽後7日目の小麦の葉表面に噴霧(50 ml / 80 若苗)した。

6. Glyphosate 処理

3 倍に希釈した glyphosate 除草剤(0.8 M glyphosate)を発芽後 7 日目の小麦の葉表面に噴霧(50 ml / 80 若苗)した。処理後 1 日以内に植物体の委縮が認められ、水分含量が急激に低下した。比較のため基質濃度及び酵素活性は g dry weight 当たりで示した。

7. 基質の抽出

0.5 g の葉組織を 2 ml の 5% 過塩素酸、0.6 g の海砂と共に乳棒及び乳鉢を用いて氷上で摩砕した。15,000xg で 5 分間遠心分離後、上清は KHCO_3 で pH 7.5 に中和し、1,000xg で 1 分間遠心分離した。この上清を基質濃度の測定に使用した。

8. 基質濃度の測定

過酸化水素は第 3 章に述べる方法(39)で測定した。

AsA 及び DHA については以前に述べた方法(12,52)に従った。

G6P 及び F6P は次のような酵素法で測定した。すなわち 0.5 ml 中和抽出液、0.5 ml 0.5 M Tris-HCl (pH7.7)、0.76 ml 蒸留水から成る溶液にを 25 mg の Darco G-60 を加えてよく混合し、16,000xg で 5 分間遠心分離を行った。上清 1.5 ml、10 μ l 60 mM NADP^+ 、10 μ l 0.6 M MgCl_2 を混合し、さらに 1.75 units G6PDH (G6P assay)、2.0 units phosphoglucomutase (G1P assay)、3.5 units phosphoglucoisomerase (F6P assay) をこの順に加え、340 nm の吸光度の増加をダブルビーム吸光度計(Shimadzu UV-190)で測定した。

全 glutathione 量(GSH+GSSG)は glutathione reductase-5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) recycling 法(53)で求めた。GSSG 濃度を求めるため、200 μ l の中和抽出液に 5 μ l 2-vinylpyridine を加え GSH をマスクした。GSSG 濃度はこれらの差から算出した。

GSH と GSSG の濃度の比較のため、GSH の濃度は 2 倍の濃度(2GSH)として示した。

9. 酵素の抽出

0.3 g の小麦葉組織を 2 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.7)、4 μ l 1 M dithiothreitol、0.1 g 海砂及び 0.1 g Polyclar AT と共に乳鉢及び乳棒で氷上で摩擦した。20,000xg で遠心分離後、上清を粗酵素液として酵素活性測定に用いた(12)。

10. 酵素活性の測定

反応液の組成は以下のとおりとした。反応系は 1.5 ml とした。

G6PDH : 50 mM Tris-HCl (pH 7.7)、4 mM MgCl₂、0.4 mM NADP⁺、0.7 mM G6P 及び粗酵素液。反応は G6P の添加で開始し、340 nm の吸光度の増加を測定した(11)。

Catalase : 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.9)、11.6 mM H₂O₂ 及び粗酵素液。反応は粗酵素液の添加で開始し、240 nm の吸光度の減少を測定した(12)。H₂O₂ の比吸光係数は 0.0436 mM⁻¹ cm⁻¹(54) とした。

DHARD : 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.1)、1.7 mM GSH、1 mM NADPH、0.6 units glutathione reductase、3.3 mM DHA 及び粗酵素液。反応は DHA の添加で開始し、340 nm 吸光度の減少を測定した(12)。

ASFRD : 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)、1 mM NADH、1 mM AsA、1 unit ascorbate oxidase 及び粗酵素液。反応は ascorbate oxidase の添加で開始し、340 nm の吸光度の減少を測定した(12)。

2 - 3 結果

1. 植物体の形態上の変化

PQ 処理では処理後 4 日目には葉全体に褐変化が認められた。AT 処理では処理後 3 日目から葉の基部に褐変化が見られた。Glyphosate 処理では 1 日以内に葉の萎縮が見られた。これに対して低温処理では特に変化は認められなかった。

2. 過酸化水素濃度の変化

PQ 処理 1 日目に細胞内の過酸化水素濃度は control に比べて約 2 倍 ($0.6 \mu\text{mol/g fresh weight}$) に増加した (Fig. 1)。AT 処理の場合も同様な傾向を示した。この高いレベルの過酸化水素は処理 3 日目までに減少した。低温処理の場合、過酸化水素濃度は数分内に数倍に高まり (詳細は第 3 章に述べる)、その後は control よりも少し高いレベルにまで減少した。

3. 基質濃度の変化

低温及び PQ 処理を施すと、1 日以内に G6P と F6P の濃度が control の約 2 倍に増加した (Figs. 2A, 2B)。同様の糖リン酸エステルの濃度増加が AT 処理に於いても見られた (Figs. 2A, 2B)。以上の 3 つの処理に対して glyphosate 処理では G6P と F6P の濃度は明らかに減少した (Fig. 3)。 $[\text{F6P}]/[\text{G6P}]$ 値は control では 0.32-0.42 であったが、低温・PQ・glyphosate 処理によって増加する傾向を示した。

AsA 濃度は PQ 処理によって 2 日以内に control の約半分に減少した ($0.95 \mu\text{mol/g fresh weight}$) (Fig. 2C)。低温及び AT 処理に於いても AsA 濃度は若干減少した (Fig. 2C)。DHA 濃度は PQ 及び AT 処理によって 1 日以内に急激に減少した (Fig. 2D)。

GSH 濃度は低温・PQ・AT 処理後もほぼ一定したレベルを保っていた (Fig. 2E)。これに対して GSSG の濃度は PQ 処理で 2 倍 ($0.1 \mu\text{mol/g fresh weight}$)、AT 処理で 3.6 倍 ($0.18 \mu\text{mol/g fresh weight}$) にそれぞれ処理 1 日以内に増加し、その後 PQ 処理ではそのレベルを保ち、AT 処理では更に GSSG 濃度は上昇し続けた (Fig. 2F)。

3. 酵素活性の変化

低温、PQ、及び AT 処理後、G6PDH 活性は増加を示した (Fig. 4A) が、glyphosate 処理した葉組織では明かな減少が見られた (Fig. 5)。 NAD^+ 特異的な glycer aldehyde-3-phosphate dehydrogenase 活性は低温及び AT 処理後に増加を示したが、PQ 処理では変化は見られなかった (データは示していない)。

今回測定した酵素活性の中で catalase は最も高い活性 ($1-2 \text{ mmol/min/g}$)

fresh weight)を有していたが、この活性は低温及び PQ 処理によってさらに増加した(Fig.4B)。一方、AT 処理により catalase 活性は1日以内に完全に阻害された(Fig.4B)。DHARD 活性は低温及び PQ 処理によって増加したが、AT 処理を施した場合変化は認められなかった(Fig.4C)。ASFRD 活性は PQ 処理によって大きく増加した(Fig.4D)。一方、glyphosate 処理した葉では、catalase、DHARD、及び ASFRD 活性は変化しなかった(データは示していない)。

低温、PQ、及び AT 処理による基質濃度及び酵素活性の変化を Table. 1 にまとめた。

2 - 4 考察

植物が過酸化水素などの酸化物が生成する条件下で生存し続けるには、細胞を還元状態に保つ必要があり、過酸化傷害を受けないように過酸化物の除去機構を誘導する必要があると考えられる。

G6P は G6PDH との反応で NADPH を生成するため、細胞を還元状態に保つのに大切であると考えられる。[F6P]/[G6P]の比が低温や PQ 処理によって増加することは、G6P を供給するために、小麦の主要な貯蔵物である fructan からの F6P の合成が進んだためと考えられる。G6P のレベルと G6PDH の活性の増加は、過酸化水素除去系の誘導される条件下では細胞が生存していくために必須な応答と考えられる。

低温や過酸化処理により catalase、DHARD、及び ASFRD 活性が増加することは、これらの酵素が過酸化水素を除去するために誘導されたと考えられる。低温誘導性のタンパク質は低温処理後約1日後に合成され始めることが分かっており(Matsuda ら、未発表)、これらの酵素活性の増加の時間はこのことと良く一致する。このように低温はその程度と時間に依存する酵素活性の増加を引き起こす。低温処理に対する mRNA の誘導合成は 0 °C での処理後、11時間から見られはじめ24時間で完結する(Matsuda ら、未発表)。酸化ストレスに対する程度及び時間依存的なタンパク質の合成制御機構については、植物に於いてはほとんど分かっていない(55)。

PQ 処理によって AsA のレベルが下がり GSSG の濃度は上昇したが、この理由は以下のように考えられる。クロロプラスト内で PQ によって生成した superoxide は AsA を酸化して ascorbate free radical を生成し(56-58)、これが ASFRD によって AsA に戻される。Superoxide から生じる過酸化水素も同様に AsA を消費して ascorbate free radical を生成するが、この反応速度は superoxide との反応に比べて遅い(57)。このことから細胞質中の過酸化水素は catalase や GSH の消費を伴う非酵素的な反応(36)によって除去される。この反応で AsA が酸化され、DHA を生成し、DHA が DHARD の触媒作用(59,60)で AsA に戻り、結果として GSSG のレベルが増加する。

小麦の茎組織は低レベルの glutathione peroxidase ($0.06 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ fresh weight) を含んでいるが、過酸化水素との反応自体は pH 7.0 において 1.5 mM GSH 及び DHA との非酵素的な反応の方が速い(36)。それ故、AT によって細胞質中の catalase を阻害した場合、細胞質中の大部分の過酸化水素は AsA と GSH による非酵素的な反応で除去されると考えられ、結果として DHA と GSSG が生成する。生成した DHA は GSH によって還元され、その結果多量の GSSG が細胞内に蓄積する。また、PQ または AT 処理のように GSH が消費され GSSG が蓄積するような条件下でも GSH の濃度が変化しないのは、細胞質に存在する過酸化水素を除去するために多くの GSH が新しく合成されているためだと考えられる。このことは細胞内の還元力を一定に保つための何らかの制御機構が存在することを示唆している。

一方、control における glutathione reductase の活性は約 $0.2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ fresh weight であり、この活性は低温、PQ、及び AT 処理によって変化しなかった(データは示していない)。

これらの結果は、上述のことと考え合わせても Halliwell ら(31,36,37)が述べたように、GSH と AsA が酵素的及び非酵素的に過酸化水素を除去する大切な役割を担っていることを示唆している。

これらの結果から細胞を PQ で処理した場合、過酸化物除去系は主として AsA が働き、これに GSH が続く。AT で処理した場合には除去系は両方の還元剤を使用しているが主として GSH が過酸化水素除去に大きな役割を担っていることが示唆された。このことから細胞内で酸化傷害を回避する役割を担う過酸化物除去系

はクロロプラストと細胞質またはミトコンドリアでは異なっていることが考えられた。

2 - 5 要約

秋播小麦の葉を低温、paraquat、及び 3-amino-1,2,4-triazole で処理し代謝上での応答を比較した。測定した酵素活性及び基質濃度は glucose-6-phosphate dehydrogenase、catalase、dehydroascorbate reductase 及び ascorbate free radical reductase の各酵素活性、hydrogen peroxide、glucose-6-phosphate、fructose-6-phosphate、ascorbate、dehydroascorbate、reduced glutathione 及び oxidized glutathione の濃度であった。これら 3 種の処理により細胞内の過酸化物及び糖リン酸エステルの濃度が増加した。細胞内に活性酸素を発生させる paraquat 処理によって細胞内の ascorbate 濃度は著しく減少したが、他の 2 つの処理ではこの減少は見られなかった。Catalase の特異的阻害剤である 3-amino-1,2,4-triazole で細胞を処理した場合は、oxidized glutathione 濃度が数倍に高まった。Glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性は 3 つの処理すべてにおいて増加したが、細胞内に過酸化物を生成しない glyphosate で処理した場合にはこの活性は減少した。Catalase、および dehydroascorbate reductase の活性は低温処理及び paraquat 処理により増加したが、3-amino-1,2,4-triazole で処理した場合には dehydroascorbate reductase 活性に影響は認められなかった。Ascorbate free radical reductase 活性は paraquat 処理をした場合にのみその活性が増加した。

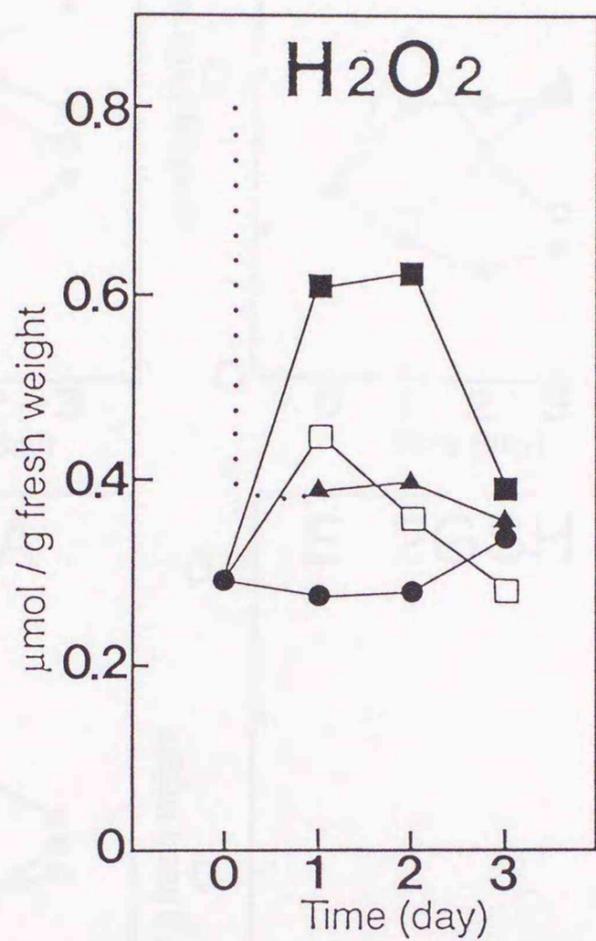


Fig. 1. Changes with oxidative treatment in the hydrogen peroxide levels in leaves of winter wheat.

Each treatment started at time 0 when plants were 7 days old. The first leaf was measured. ●, control; ▲, cold; ■, PQ; □, AT.

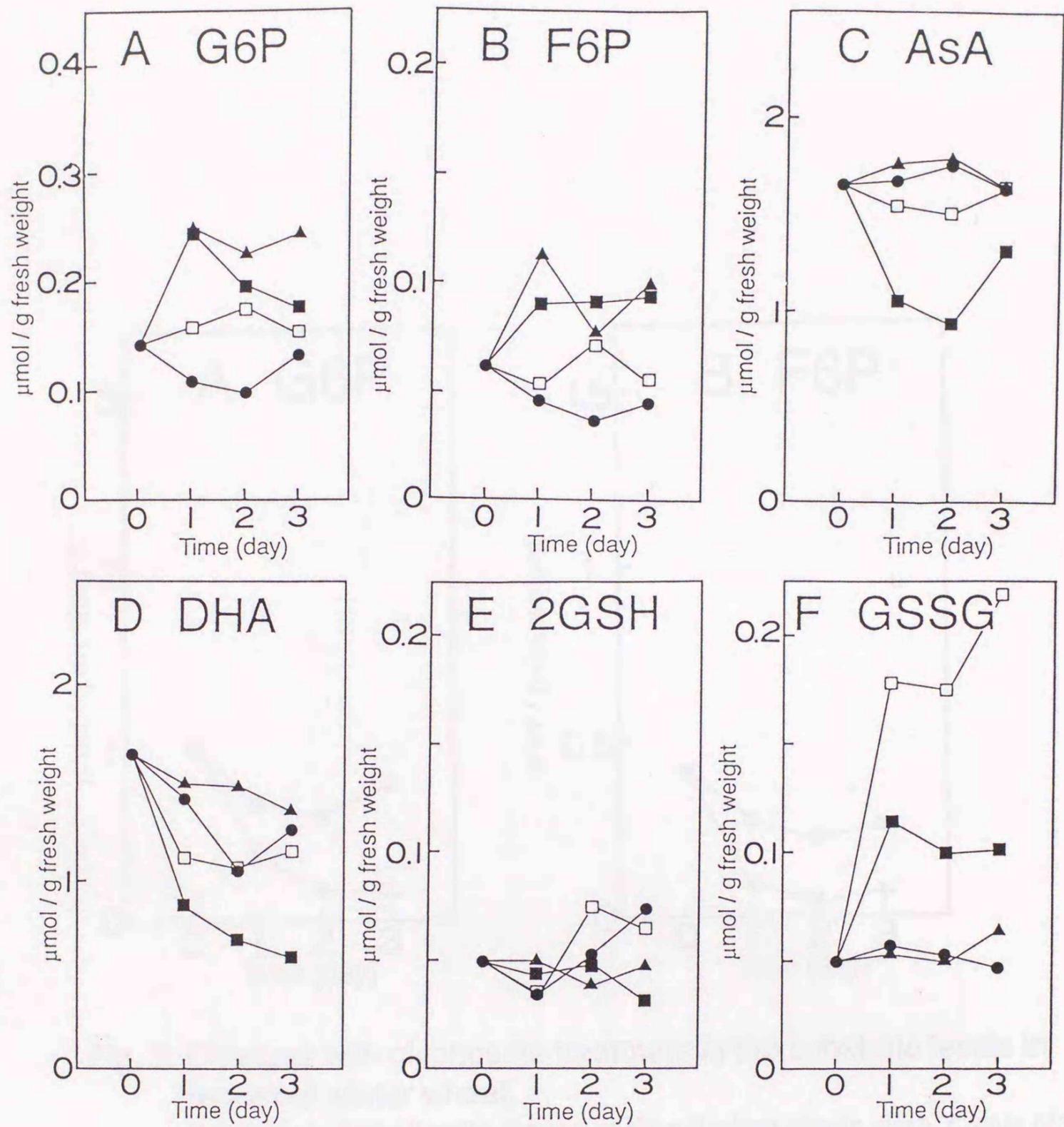


Fig. 2. Changes with oxidative treatment in the substrate levels in leaves of winter wheat.

Each treatment started at time 0 when plants were 7 days old. The first leaf was measured. A, G6P; B, F6P; C, AsA; D, DHA; E, 2GSH; F, GSSG.

●, control; ▲, cold; ■, PQ; □, AT.

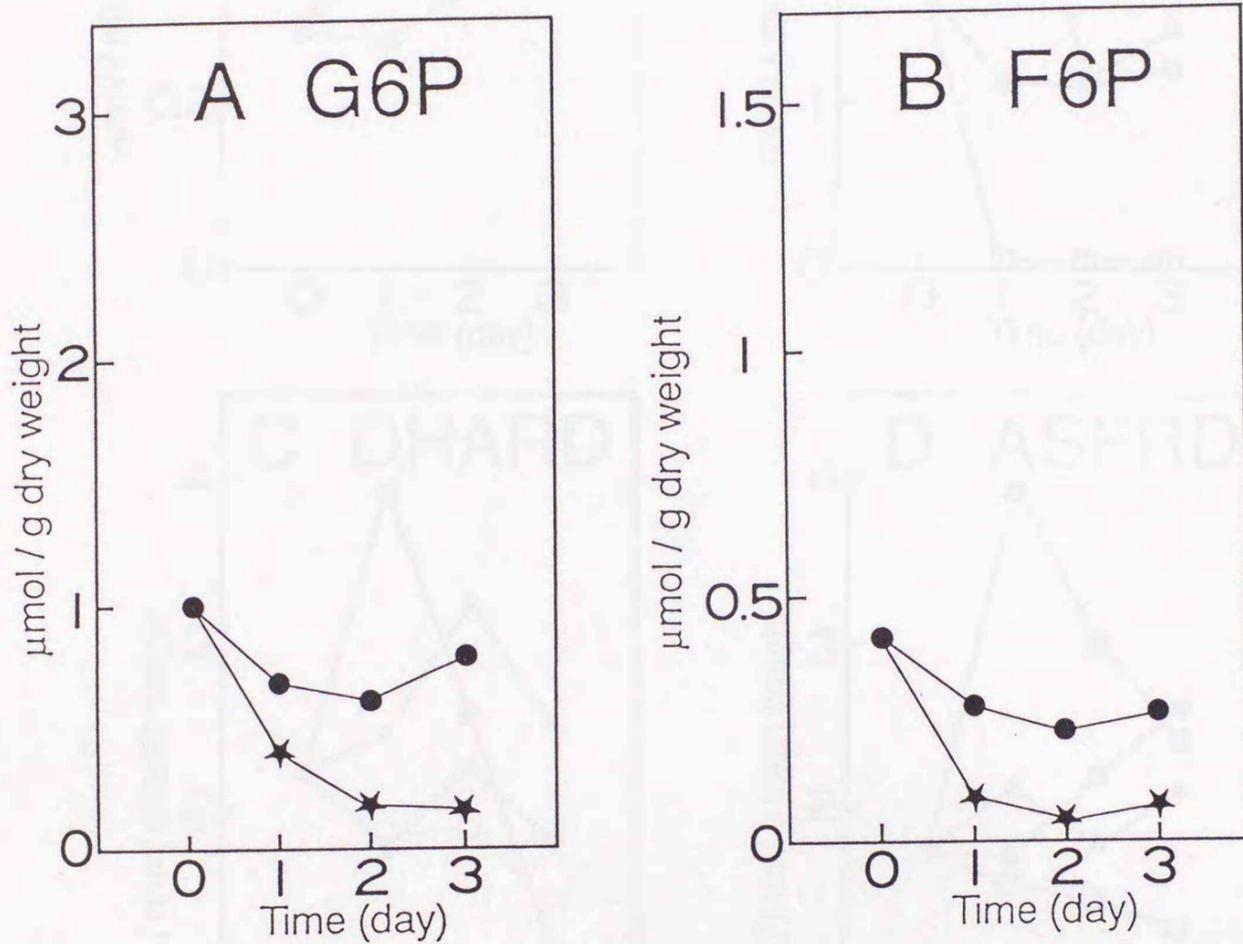


Fig. 3. Changes with glyphosate treatment in the substrate levels in leaves of winter wheat.

Treatment of glyphosate started at time 0 when plants were 7 days old. The first leaf was measured. A, G6P; B, F6P. ●, control; ★, glyphosate.

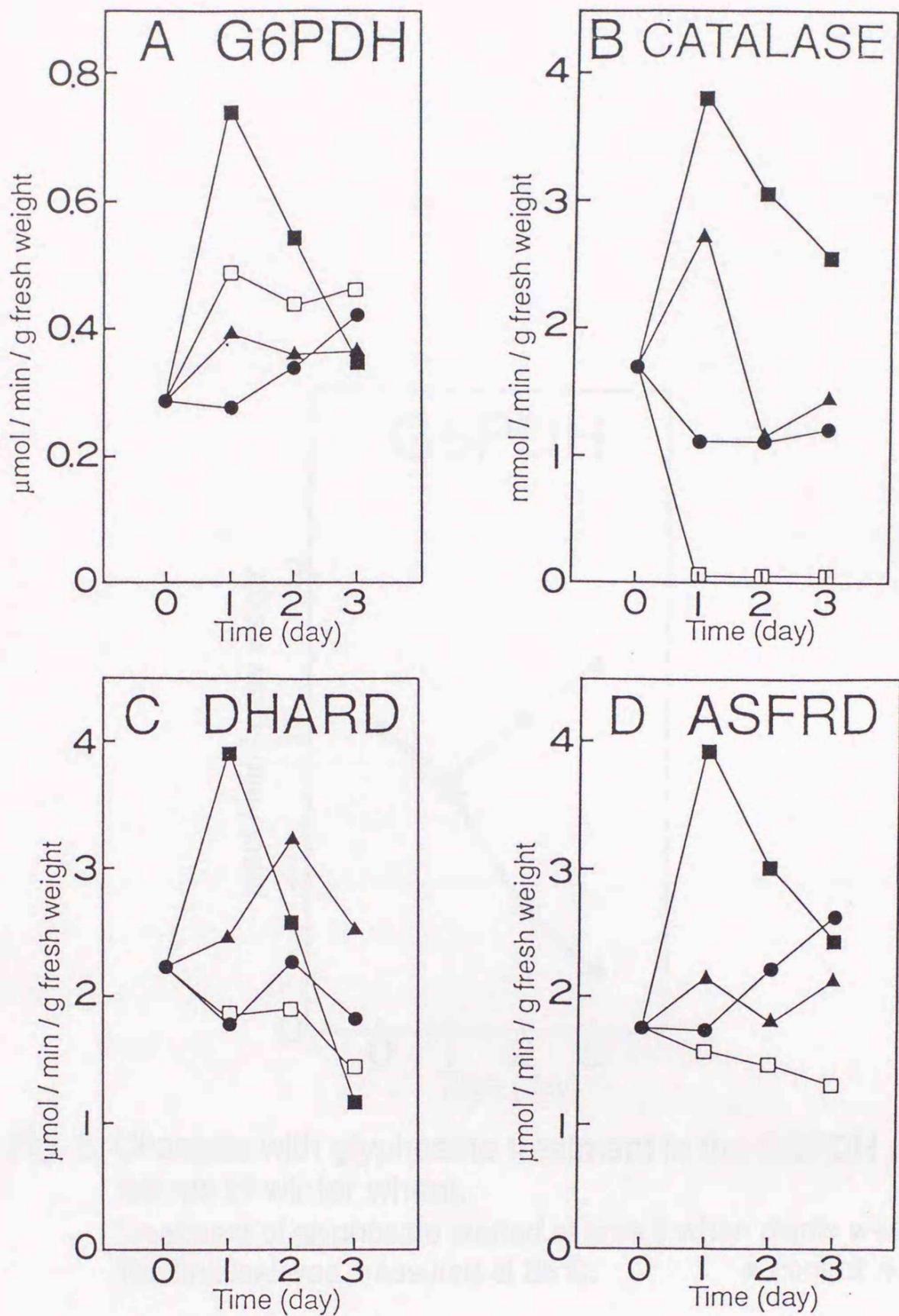


Fig. 4. Changes with oxidative treatment in the enzyme activities in leaves of winter wheat.

Each treatment started at time 0 when plants were 7 days old. The first leaf was measured at 25°C. A, G6PDH; B, catalase; C, DHARD; D, ASFRD. ●, control; ▲, cold; ■, PQ; □, AT.

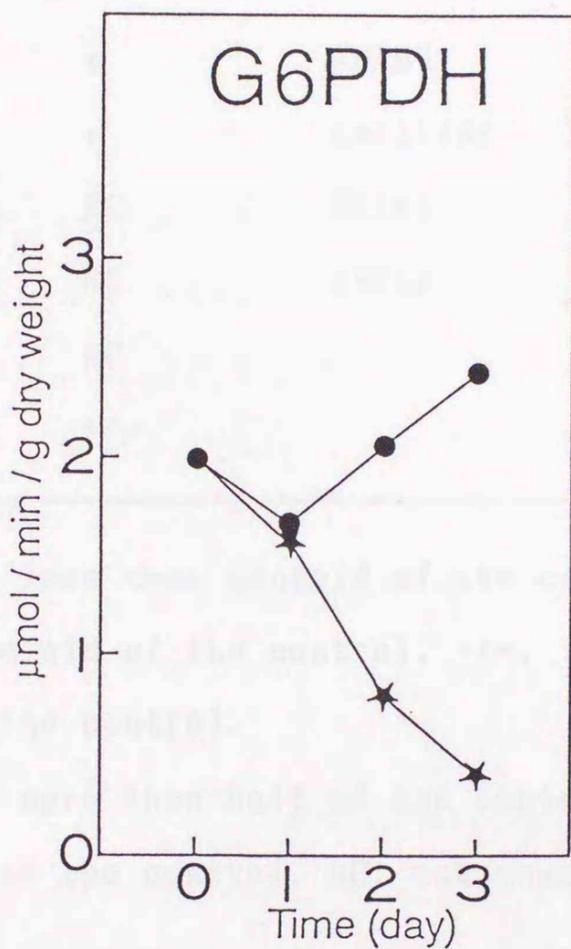


Fig. 5. Changes with glyphosate treatment in the G6PDH activity in leaves of winter wheat.

Treatment of glyphosate started at time 0 when plants were 7 days old. The first leaf was measured at 25°C. ●, control; ★, glyphosate.

Table I *Changes caused by cold, PQ, or AT treatment in the substrate levels and enzymatic activities.*

Substrate	Treatment			Activity	Treatment		
	Cold	PQ	AT		Cold	PQ	AT
G6P	++	++	+	G6PDH	+	+++	++
F6P	++	++	+	CATALASE	++	+++	--
AsA	NC	--	NC	DHARD	+	++	NC
DHA	NC	--	NC	ASFRD	NC	++	-
GSH	NC	NC	NC				
GSSG	NC	++	+++				

+, Increased to a level less than twofold of the control; ++, increased to a level more than twofold of the control; +++, increased to a level more than threefold of the control.

-, Decreased to a level more than half of the control; --, decreased to a level less than half of the control. NC, not changed.

第3章

秋播小麦の葉組織における 低温処理による過酸化水素の濃度増加

3-1 緒言

低温順化の際、多年生植物において一連の酵素活性の増加することが知られている(11, 12, 33, 34, 43)。特に細胞を還元状態に維持する酵素活性の増加が認められ、これらの酵素は低温環境下での酸化的ダメージから細胞を守っていると考えられる。低温環境下では合成系の反応速度が低下するため ATP の要求度も減少すると考えられる。このような環境下では電子が電子伝達系の特定の段階で余り、結果として電子のリークが起こると思われる。リークした電子は細胞内で酸素分子と反応し、過酸化水素のような活性酸素種を生成する。Patterson and Myers は *Anacytis nidulans* の光合成系を用いて *in vivo* における過酸化物の生成を示している(61)。Asada ら(44)と Robinson and Gibbs(62)は単離したホウレン草のクロロプラストを用い、*in vitro* での過酸化物の生成を報告した。最近 Wise and Naylor(63, 64)は chilling-enhanced photooxidation について報告している。さらに Sagisaka(41)と Puntarulo ら(65)はポプラの枝及び大豆の胚軸を用いて定常状態の過酸化物の測定した。しかしながら *in vivo* での低温度依存性の過酸化物の生成についての報告はされていない。

本章では 3-(dimethylamino)benzoic acid (DMAB) と 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone (MBTH) のカップリング反応(66)を用いて秋播小麦における低温処理の際の過酸化水素のレベルの増加を検討した結果を述べる。

3 - 2 実験方法

1. 試薬

3-Dimethylaminobenzoic acid(DMAB), Aldrich(USA); 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone(MBTH), Nakarai Tesque(JAPAN); peroxidase(horse radish), catalase(beef liver), Boehringer Mannheim(GERMANY); AG-1, Bio-Rad(USA); その他の試薬は市販品を用いた。

2. 実験材料

ホロシリコムギの種子は24時間の吸水後、予め吸水させたパーミキュライト上に播種し、4日間人工気象器による一定環境で暗所生育した。その後、10,000 luxの光を照射した。生育条件は気温昼間28℃夜間24℃、日長16時間とした。播種後7日目の一枚目の葉を実験に用い、使用前に3時間10,000 luxの光を照射した。低温処理はサンプルを4℃の発泡スチロールの暗箱へ移すことによって行った。キュウリは市販の苗を購入し、同様な条件で生育・処理を行った。

3. 過酸化水素の抽出

0.2 gの小麦の葉またはキュウリの子葉は0℃で乳鉢と乳棒を用いて2 mlの0.2 N HClO₄と0.1 g海砂とともに磨碎し、20,000xgで5分間遠心分離した。HClO₄を除くため、上清は4 N KOHでpH 7.5に中和し、生じたKClO₄を1,000xgで1分間遠心分離して除いた。上清200 μlを1 mlのAG-1x8カラムに加えて、800 μlの蒸留水で洗浄し、溶出液を過酸化水素の測定に用いた。

4. Catalase 処理

10 unitsのcatalaseを上記溶出液に加え、20℃で15分間処理を行った。その後、1分間沸騰中の湯浴に浸して反応を停止した。

5. 過酸化水素濃度の測定

反応液の組成は1 mlの溶出液、400 μlの12.5 mM DMABを含む0.375 Mリン酸緩衝液(pH 6.5)、80 μlの1.31 mM MBTH及び20 μlのperoxidase

(0.25 units) で総液量 1.5 ml とした。反応は25°Cで peroxidase の添加によって開始した。590 nm の吸光度の増加を double-beam spectrophotometer (Shimadzu UV-190) で測定した。

3 - 3 結果

今回用いた方法で、過酸化水素濃度の測定に関する検量線は 2 から 200 nmol の間で直線性を示した。Table II に示したように発色は過酸化水素に特異的であった。さらに、peroxidase が入っていない系ではこの反応は進行しなかった。しかし peroxidase だけ ($-H_2O_2$) でも若干の吸光度の増加が認められた (blank値)。Catalase で予め過酸化水素または溶出液を処理すると $-H_2O_2$ と同じ値まで 590 nm の吸光度が減少した。

光照射した小麦の葉では、過酸化水素の濃度は 4 °C 暗所処理により急激に増加し、control レベルの約 3 倍になった (Fig.6)。過酸化水素濃度は処理後数分間に最も高くなり、その後通常の値まで減少した。濃度の増加は処理後 3 - 5 分で終わった。典型的な例を Fig.6 に示した。これに対して処理を行わないもの (28 °C in the light) では過酸化水素の濃度は 0.6-0.8 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight であった (Figs.6,7)。

28°C 暗所処理を行ったものは全く異なる結果を示した (Fig.7)。1 分以内に急激な過酸化水素濃度の低下が見られ、その後この濃度は約 0.2 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight に保たれた。キュウリの子葉の場合も低温処理により全く同じ傾向で過酸化水素の生成がみられた (Fig.8)。キュウリの子葉の場合、control では 0.2~0.4 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight 程度の過酸化水素濃度であったのに対して低温処理を施すことにより処理後 1 分以内にその濃度が約 2.5 倍に高まった (Fig.8)。

3 - 4 考察

今回過酸化水素の測定に用いた系は元来微量の peroxidase 活性を測定する目

的で開発された方法である(66)。この方法は例えば ascorbate や GSH のような溶出液に存在する還元剤を取り除くことで非常に鋭敏な過酸化水素測定方法として用いることができる(Table 1)。今回の研究により我々は秋播小麦の葉組織において、低温処理によって過酸化水素の濃度が増加することを示した。同様の低温処理による過酸化水素の濃度増加はキュウリの子葉においても認められた。これらの結果は電子伝達系からの電子のリークが実際に起こり、この電子が細胞内で酸素分子と反応して過酸化水素が生成することを示唆している。秋播小麦だけでなく木本類においても細胞内に非常に高い過酸化水素除去酵素の存在が知られており(12,33,34)、これらの scavenging system は生じてくる過酸化水素の濃度をある一定の低いレベルに維持するのに寄与していると考えられる。これらの scavenging system の存在下で通常の数倍の過酸化水素が低温処理によって検出されることは、低温暗所処理によって小麦の葉組織内において非常に多量の過酸化水素が生成していることを示唆している。これに対して28℃暗所で処理を行った小麦の葉組織では過酸化水素の濃度低下が見られた(Fig. 2)。このことは急激な過酸化水素の生成は通常の電子の流れが低温処理のような何らかの原因で急激に阻害されたとき生じることを示している。さらにもし多量の過酸化水素の生成が長期間続くような状態や、または過酸化水素除去酵素が十分に働くことができない状態になったとき、過酸化傷害が生じると考えられる。低温処理の際に過酸化水素が生成する機構は更に調べる必要がある。

3 - 5 要約

低温処理を施した秋播小麦の葉の過酸化水素濃度を測定した。過酸化水素の濃度は低温処理後数分以内に control の約3倍に増加し、15~20分後にはもとのレベルにもどった。増加時の過酸化水素の濃度は $1.5 \mu\text{mol/g fresh weight}$ であった。

Table II Specificity of the Assay for Hydrogen Peroxide

	A at 590 nm	
	H ₂ O ₂ ^a	Sample
Complete reaction mixture	0.163	0.179
-Peroxidase and H ₂ O ₂	0.001	0.001
-Peroxidase	0.001	0.001
-H ₂ O ₂	0.056	0.062
10 units catalase ^b	0.049	0.064

^a Authentic sample, 20 nmol.
15 min at 20°C.

^b Treated 10 units of catalase for

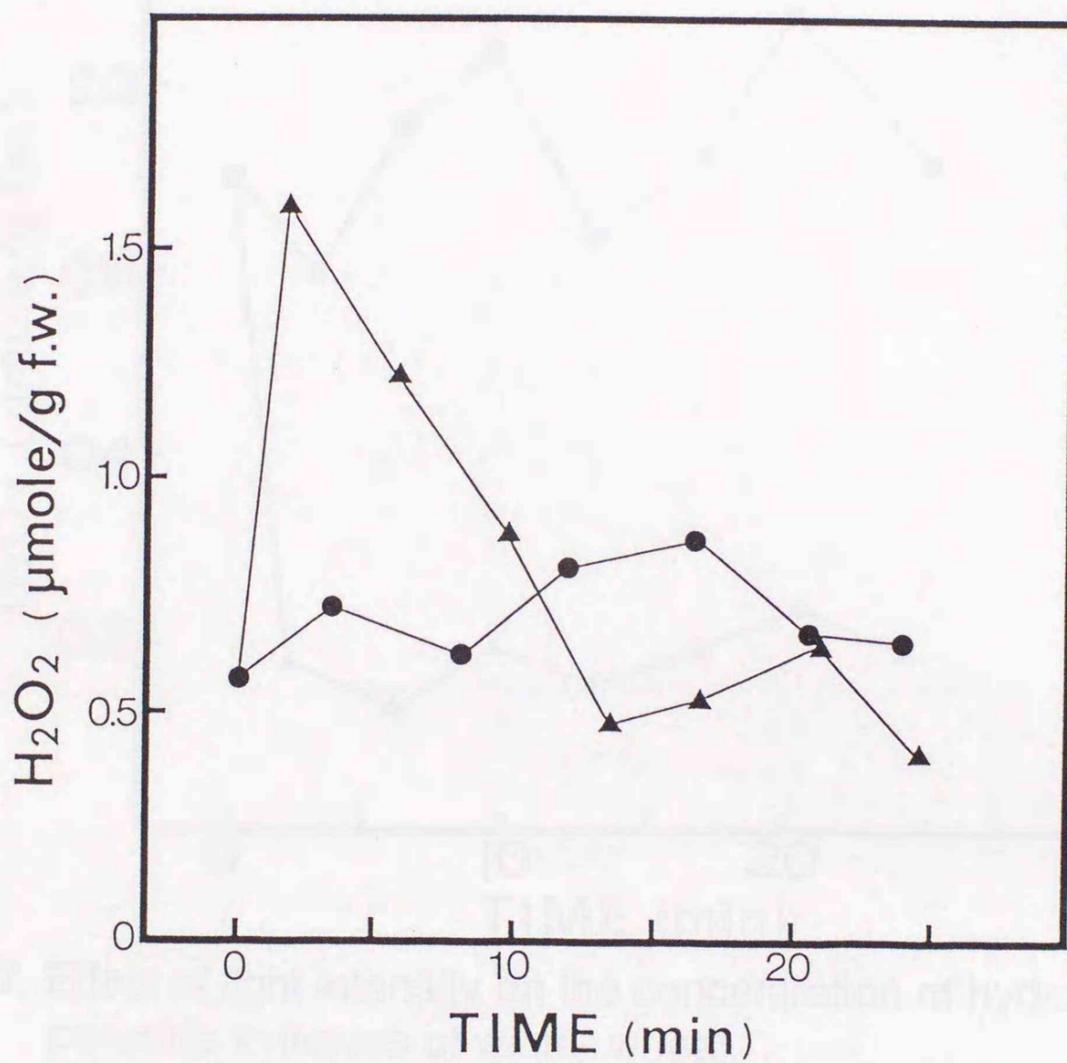


Fig. 6. Abrupt formation of hydrogen peroxide by cold treatment in leaves of winter wheat.

Seedlings of winter wheat were grown in a growth chamber. Before the cold treatment, the seedlings were exposed to 10,000 lux for 3 h at 28°C, and part of the seedlings were moved to a dark ice-box at 4°C at 0 time (▲). The control seedlings were kept at 28°C in the light (●).

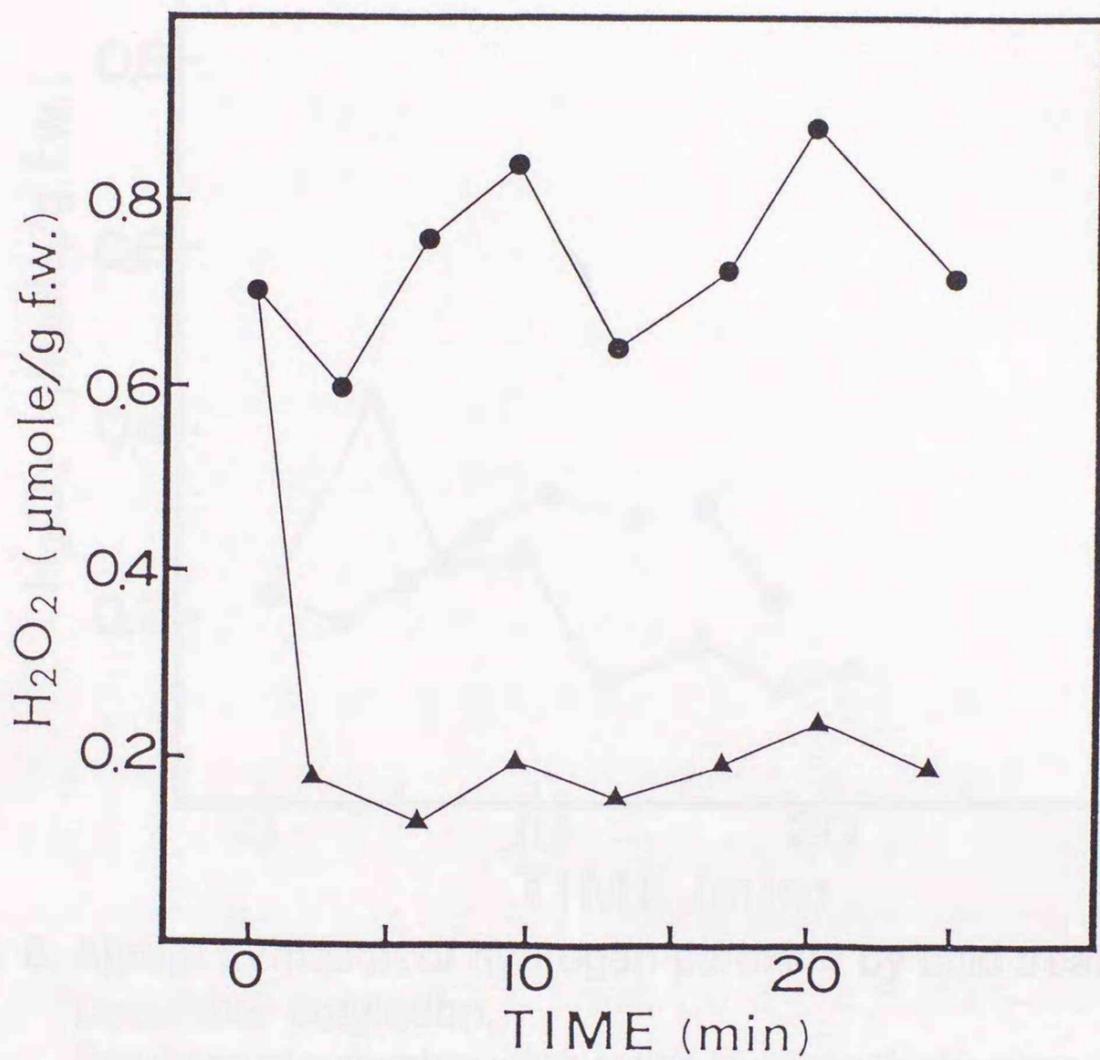


Fig. 7. Effect of light intensity on the concentration of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat.

Seedlings of winter wheat were grown in a growth chamber. Before the dark treatment, the seedlings were exposed to 10,000 lux for 3 h at 28°C. The illumination was terminated at 0 time and kept at 28°C (▲). The control wheat plants were kept at 28°C in the light (●).

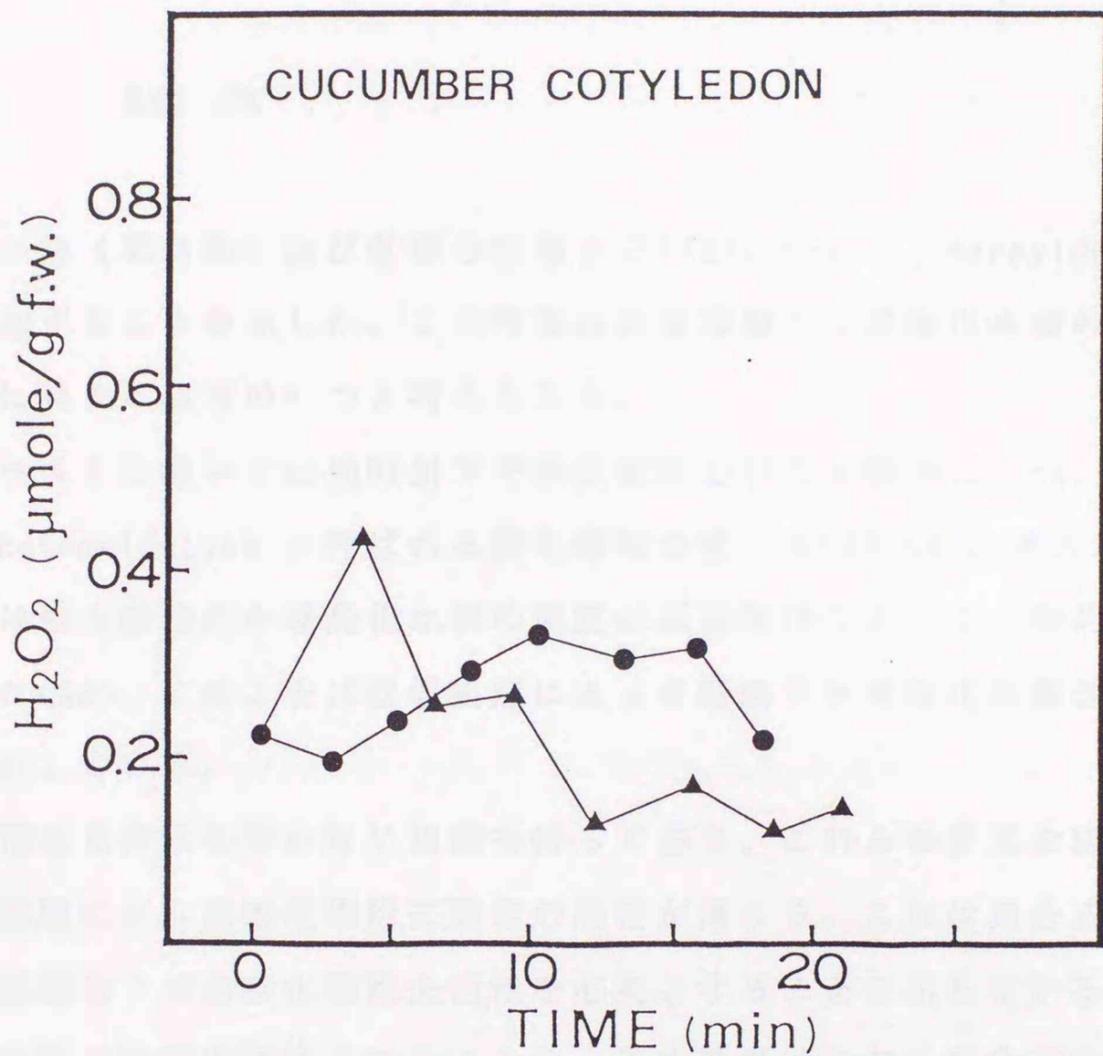


Fig. 8. Abrupt formation of hydrogen peroxide by cold treatment in cucumber cotyledon.

Seedlings of cucumber were grown in a growth chamber. Before the cold treatment, the seedlings were exposed to 10,000 lux for 3 h at 28°C, and part of the seedlings were moved to a dark ice-box at 4°C at 0 time (▲). The control seedlings were kept at 28°C in the light (●).

第4章

低温処理による茎組織における 過酸化水素の生成

4-1 緒言

低温処理の際（第2章）及び冬季の秋播小麦(12)について、peroxide 除去酵素の活性が増加することを示した。この現象は低温環境下で過酸化水素の濃度が高まり、これに対する応答の一つと考えられる。

クロロプラストにおいては光照射下で低温処理を行うと植物は 'chilling-enhanced photooxidation と呼ばれる酸化傷害を受ける(63,64)。第3章で述べたとおり我々は最近細胞内の過酸化水素の濃度が低温処理によって一時的に高まることを示した(39)。このことは低温処理によって暗所でも過酸化水素が生成していることを示している。

多くの植物は光合成を行わない組織を持っており、これらの非光合成組織においても低温処理により過酸化物除去酵素の活性が高まる。これは光合成を行わない組織が低温環境下で過酸化物除去活性を必要とすることを示している。

本章では暗所で低温処理することにより、葉組織だけでなく光合成を行わない茎組織でも過酸化水素の濃度が高まることを明らかにした結果を示した。過酸化水素は酸素分子が水分子に還元される過程での中間産物であり、この反応は細胞内ではオキシダーゼによって触媒されている。実際、NADH oxidation の過程(67)や NADPH oxidase(68)、ミトコンドリア(69)からの過酸化水素または super-oxide の生成が報告されている。

光照射下の植物ではクロロプラストが電子の流れが最も多いところと考えられるが、茎組織においては活発な電子のやりとりはミトコンドリア中の酸化的磷酸化を行っている電子伝達系にあると考えられる。

本章の実験では、ミトコンドリアの電子の流れに影響を与えるいくつかの試薬による処理もあわせて行い、非光合成組織である茎における過酸化水素の濃度の

変化も調べた。ミトコンドリアの電子の流れの阻害剤としては、cytochrome *c* oxidase の作用する段階で電子の流れを阻害する KCN(70) 及び NaN_3 (71) を用いた。また比較のためにミトコンドリアの脱共役剤である carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) による処理(72,73)も行った。

さらに茎組織における過酸化水素の生成が、低温処理の際だけでなく低温処理したものを再び加温して温度を高めた場合にも起きることをも示す。

4-2 実験方法

1. 試薬

3-(Dimethylamino)benzoic acid は Aldrich Chemical Company, Inc. (USA) のものを用いた。3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone、KCN 及び NaN_3 は Nakarai Tesque, Inc. のものを用いた。Peroxidase (horse radish) は Boehringer Mannheim (Germany) のものを用いた。陰イオン交換樹脂 AG-1x8 は Bio-Rad (USA) のものを使用した。CCCP は SIGMA Chemical Co.(USA) のものを使用した。その他の試薬は特級品を用いた。

2. 実験材料

ホロシリコムギの種子は24時間の吸水後、予め吸水させたパーミキュライト上に播種し、4日間人工気象器による一定環境で暗所生育した。その後、10,000 lux の光を照射し、生育条件は気温昼間28℃夜間24℃、日長16時間とした。播種後7日目の茎組織を実験に用いた。この茎組織をアルミホイルに包んだ後、28℃で1時間暗所で前処理してから、-5~30℃の温度処理を行った。温度処理は各温度のエタノールまたは湯浴で行った。

3. 低温処理

低温処理はアルミホイルに包み1時間28℃で前処理を行った試料を-5℃のエタノール浴中に浸漬することで行った。

4. 各試薬による処理

KCN、 NaN_3 、及び CCCP により処理は茎7本当たり 0.6ml の 0.1mM の各溶液に茎組織を浸漬することによって行った。この後さらに低温処理を行う場合は試薬による処理後10分後に上述の方法で行った。

5. 過酸化水素の測定

茎組織中の過酸化水素濃度は第3章に述べた方法(39)で測定した。また、AsA 及び DHA は第2章に述べた方法(12)で、GSH 及び GSSG も第2章に述べた方法(53)で測定した。

4-3 結果

秋播小麦茎組織中の過酸化水素の濃度は $0.1\sim 0.2\mu\text{mol/g}$ fresh weight 程度であった(Fig.9)。これに対して、低温処理を施したものは処理後5分以内に過酸化水素の濃度が約5倍にまで高まった(Fig.9)。その後数分内に高まった過酸化水素のレベルは低下し始め、さらにまた増加し減少するオシレーションを繰り返した。

1時間 -5°C で低温処理した後、 30°C の湯浴で加温処理を行った場合にも同様に一時的な過酸化水素の濃度増加が認められた(Fig.10)。

AsA の濃度は低温処理5分後には明らかに低下し、代わりに DHA のレベルが増加した(Fig.11)。その後 AsA と DHA のレベルは徐々にもとのレベルに戻った。

GSH の濃度は AsA と同様に低温処理により減少したが、GSSG の濃度は GSH の濃度に関係なくほぼ一定であった(Fig.12)。

茎組織を KCN で処理した場合、処理後10分後に低温処理と同様な一時的な過酸化水素濃度の増加が見られ、その後はオシレーション現象が見られた(Fig.13)。

茎組織を同様に NaN_3 で処理した場合にも、KCN ほどはっきりしてはいなかったが過酸化水素の濃度の増加とオシレーション現象が認められた(Fig.14)。

これに対して茎組織を CCCP で処理した場合、KCN や NaN_3 処理の際に見られた過酸化水素の濃度増加やオシレーション現象は見られなかった(Fig.15)。

4-4 考察

低温処理によって小麦葉組織に見られたものと同様な過酸化水素の増加とオシレーション現象が見られた(Fig.9)。また低温処理による AsA 及び GSH の濃度低下と DHA の濃度増加(Figs.11,12)も細胞内での過酸化水素の生成を裏付けている。GSH の濃度が減少したのにもかかわらず GSSG の濃度が増加しなかった理由はわかっていないが、おそらく酸化された GSH が他の SH 基、例えばタンパク質のシステイン残基等と結合したためと考えられる。この実験により低温処理によって過酸化水素の生成する酸化的な効果の高まることが立証された。この実験は光合成を行わない莖組織を用い、さらに1時間の暗闇処理を行った後に低温処理を施している。従って生じる過酸化水素はクロロプラスト内での光合成阻害によって生じるものではなく、ミトコンドリアでの電子の流れの阻害によって生じた余剰電子が酸素分子と結合することによって生じると思われる。低温処理を施した莖組織を再度暖めることによって過酸化水素が生じることは、低下していた電子の流れが急に活発になり、余剰電子が生じたためと考えられる。

予め -5°C で1時間前処理を行った莖組織を 30°C にした場合にも急激な過酸化水素の増加がみられた(Fig.10)が、この理由については抑えられていた電子の流れが急激にもとのレベルに戻る時にもリークする電子が発生するためだと考えられた。

これらの過酸化水素の生成場所を確かめるために、ミトコンドリアの電子の流れに関与する試薬による処理を行った。KCN 及び NaN_3 はミトコンドリアの電子伝達系中の cytochrome c oxidase を阻害する目的で用いた。秋播小麦の莖組織を KCN で処理した場合、Fig.13 に見られるように一時的な過酸化水素の濃度増加とその後のオシレーション現象が認められ、低温処理と同様な挙動を示した。同様の傾向は NaN_3 で処理した場合にも認められ(Fig.14)、ミトコンドリアでの電子伝達系が細胞中の過酸化水素生成に大きく関与していることが明らかになった。これらの過酸化水素濃度の増加の原因は以下のように説明される。細胞を KCN または NaN_3 で処理した場合、ミトコンドリア内の cytochrome c oxidase の関与する段階で電子の流れが抑制され、リークした電子は酸素分子と結合して superoxide や過酸化水素のような活性酸素種を生じる。

一方 CCCP によって電子の流れを脱共役させた場合は、過酸化水素の濃度に変化は認められず、さらに低温処理を行っても過酸化水素の濃度は変化しなかった (Fig.15)。このことは低温処理によって生じる過酸化水素がミトコンドリアの電子伝達系で発生していることを示唆している。しかしながら過酸化水素発生の詳細なメカニズムは明らかにされていない。

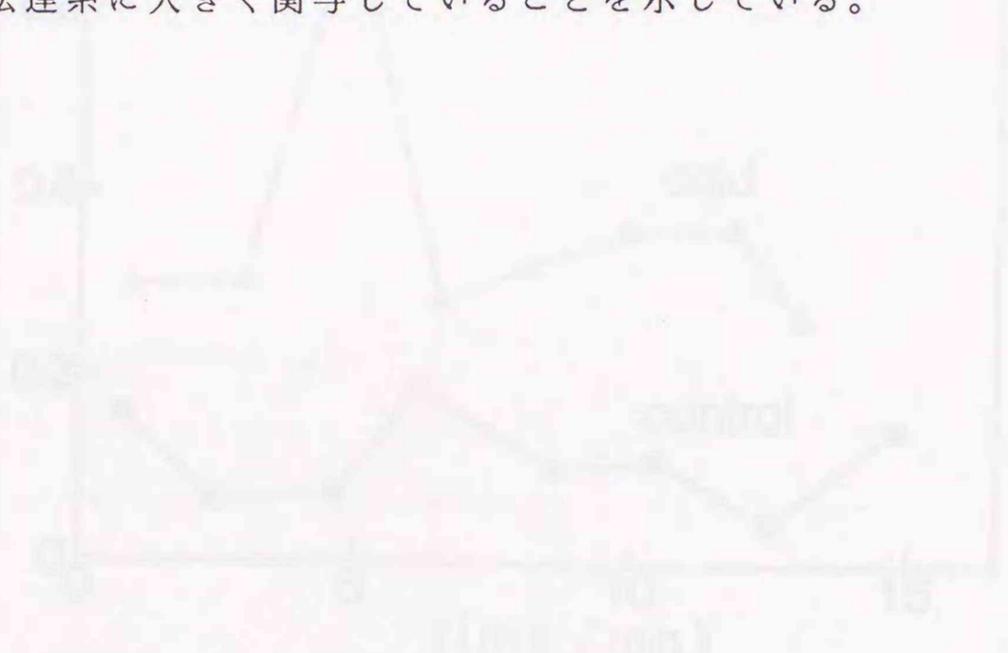
植物の葉を低温処理した場合、過酸化水素の生成は 4℃で見られたが(39)、莖組織の場合、この現象は 4℃では認められなかった(データは示していない)。この違いは莖と葉の熱容量と熱伝達性の差に起因するものと考えている。

環境温度の変化で高いレベルの過酸化水素が生じた場合、タンパク質合成に関与する遺伝子発現の調節機構に影響を与えると考えられる。実際低温処理により glucose-6-phosphate dehydrogenase の活性が高まること(第2章(74))、低温処理によって誘導されるタンパク質の内、いくつかは過酸化水素によって誘導されること(松田ら、未発表)等も知られている。これらの現象は今回の我々の結果とよく一致する内容である。

今後、過酸化水素生成のメカニズムの詳細を調べる必要がある。

4 - 5 要約

光を照射していない条件下で秋播小麦の莖を低温処理（ -5°C ）したところ、過酸化水素の濃度が処理後5分以内に処理しない場合の5倍に高まった。このことは低温処理が酸化条件を引き起こす直接的な証拠である。アスコルビン酸と還元型グルタチオンのレベルの減少もこの現象と良く一致した結果を示した。さらに、ミトコンドリアの電子の流れを cytochrome *c* oxidase の作用する所で阻害する試薬である KCN や NaN_3 で小麦の莖を処理しても同様な過酸化水素濃度の増加が見られた。このことは低温処理の際生じる過酸化水素はミトコンドリア中の cytochrome *c* oxidase の作用段階で電子の流れが急激に低下することによって発生することを示唆している。また低温（ -5°C ）に保った試料を 30°C に移す際にも過酸化水素の生成が起こった。この結果は細胞内での過酸化水素の生成がミトコンドリアの電子伝達系に大きく関与していることを示している。



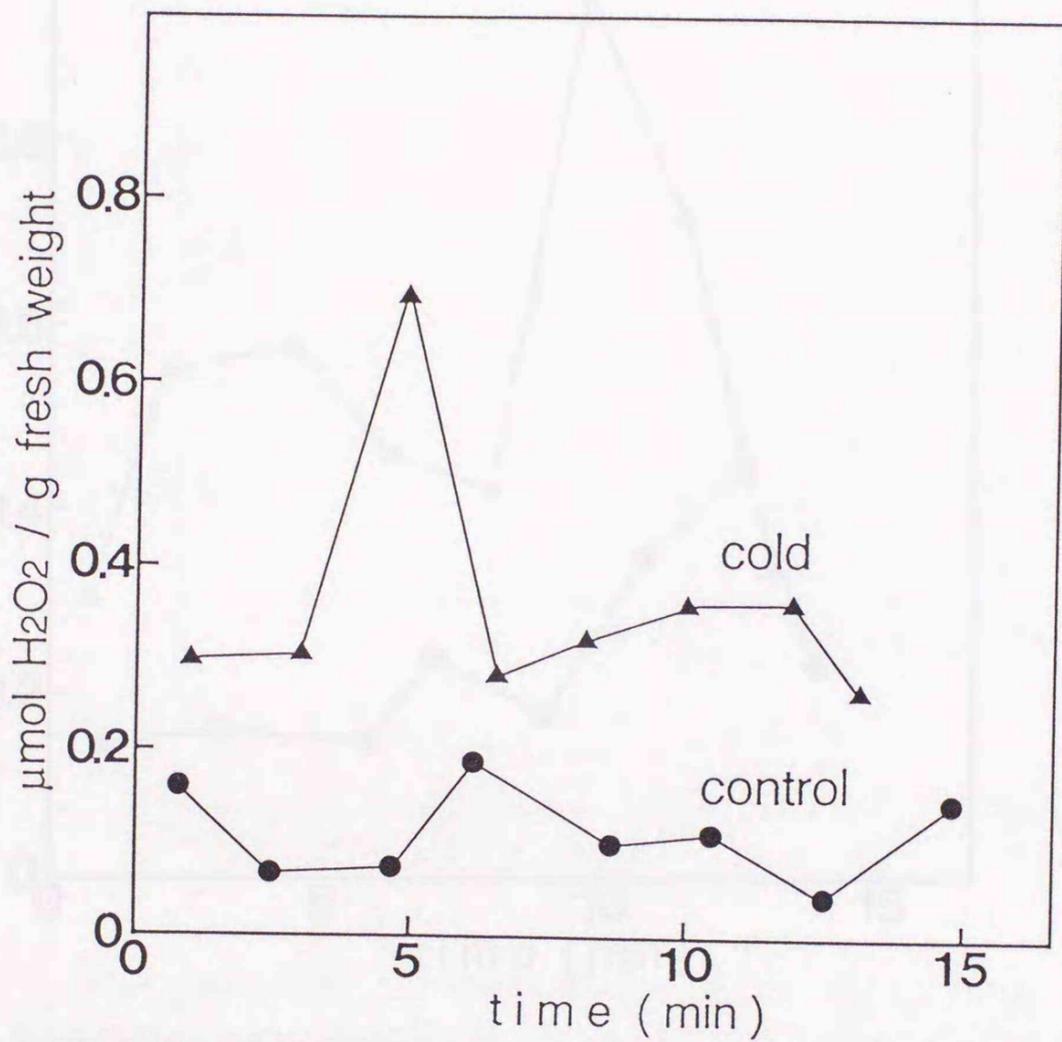


Fig. 9. Formation of hydrogen peroxide in stems of winter wheat during early stage of cold treatment.

Stems were wrapped in aluminum foil and pre-incubated at 28°C in the dark for 1 h. The control wheat stems were kept at 28°C (●), and the cold treatment was done by moving the sample into the ethanol bath of -5°C at 0 time (▲).

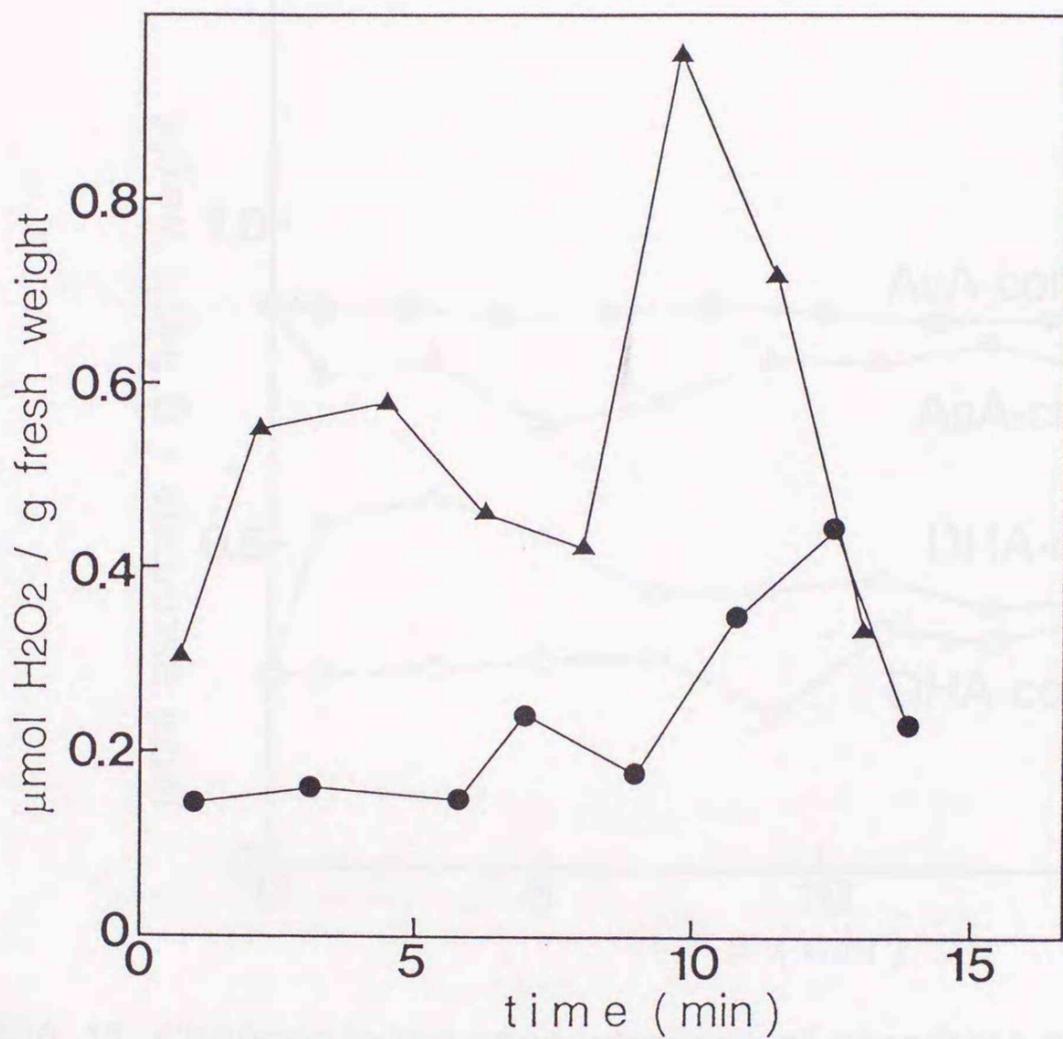


Fig. 10. Formation of hydrogen peroxide in stems of winter wheat caused by re-warming after cold treatment.

Stems of winter wheat were wrapped in aluminum foil and incubated at 28°C in the dark for 1 h. Then the sample was incubated in the ethanol bath of -5°C for 1 h. After that, the concentration of hydrogen peroxide in the stem was measured (●). Re-warming was done by moving the samples kept at -5°C for 1 h into the water bath of 30°C at 0 time and the concentration of hydrogen peroxide was measured (▲).

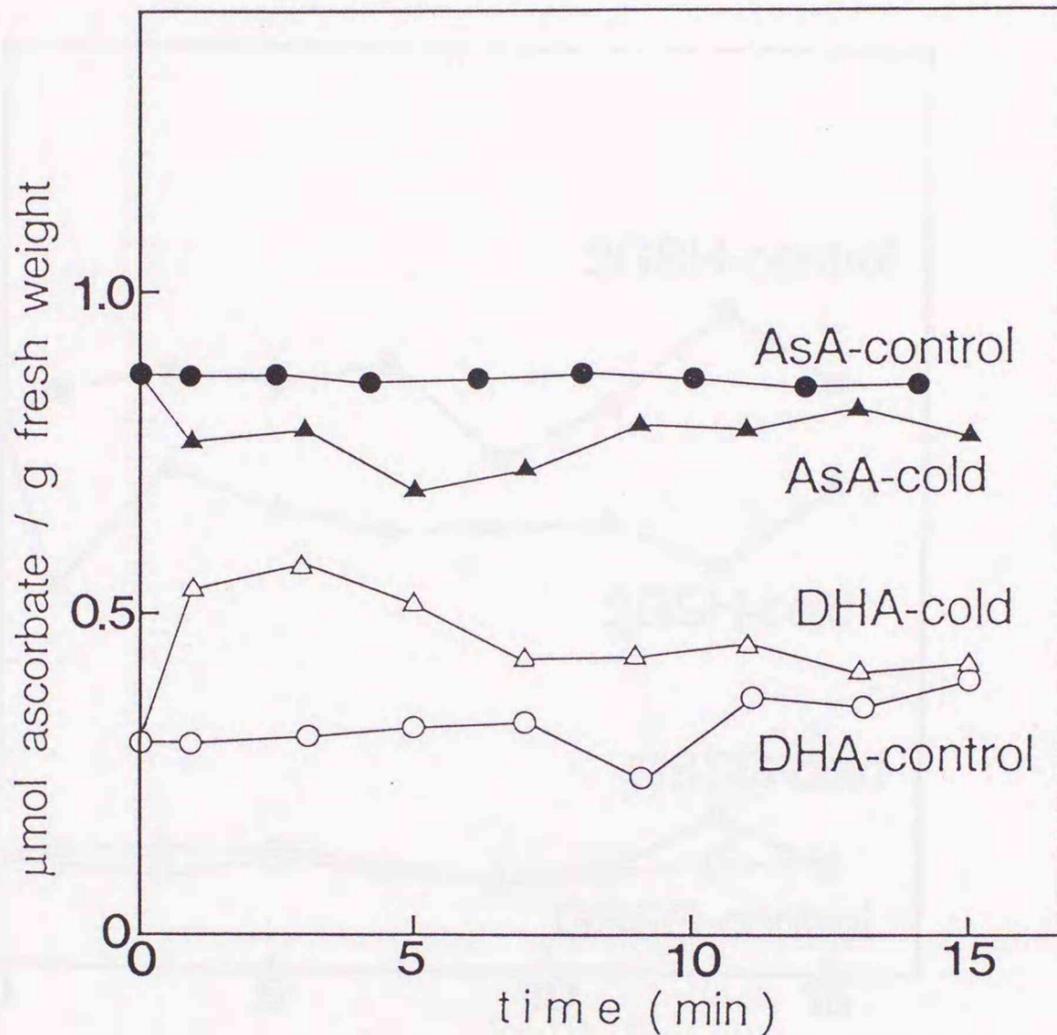


Fig. 11. Changes in the concentrations of ascorbate and dehydroascorbate in stems of winter wheat during the early stage of cold treatment.

Stems were wrapped in aluminum foil and pre-incubated at 28°C in the dark for 1 h. Ascorbate and dehydroascorbate were measured as described (12,52). The control wheat stems were kept at 28°C and ascorbate (\bullet) and dehydroascorbate (\circ) were measured. Cold treatment was done by moving the sample into the ethanol bath of -5°C and ascorbate (\blacktriangle) and dehydroascorbate (\triangle) were measured.

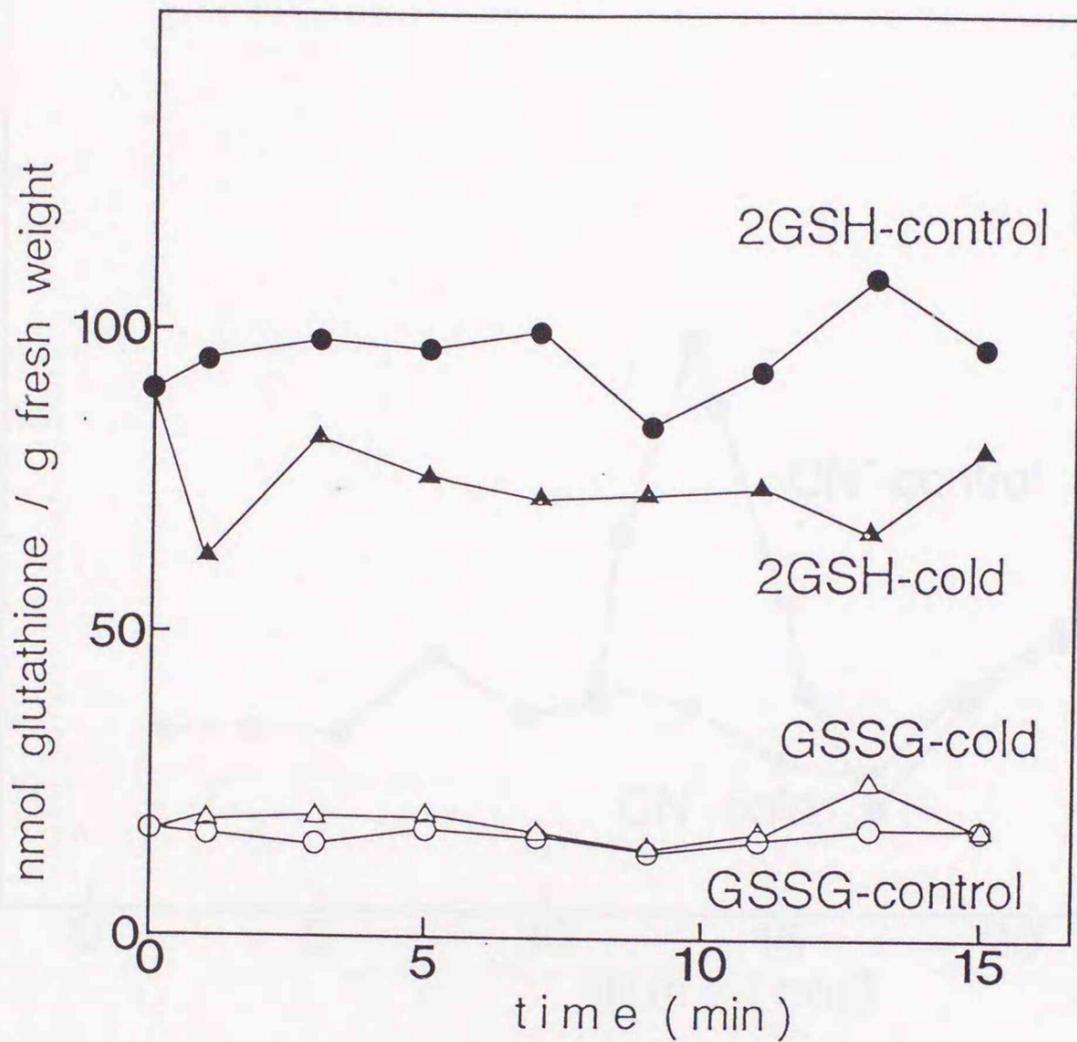


Fig. 12. Changes in the concentrations of GSH and GSSG in stems of winter wheat during the early stage of cold treatment.

Stems were wrapped in aluminum foil and pre-incubated at 28°C in the dark for 1 h. GSH and GSSG were measured as described (53). The control stems were kept at 28°C and GSH (●) and GSSG (○) were measured. Cold treatment was done by moving the sample into the ethanol bath of -5°C at 0 time and GSH (▲) and GSSG (△) were measured.

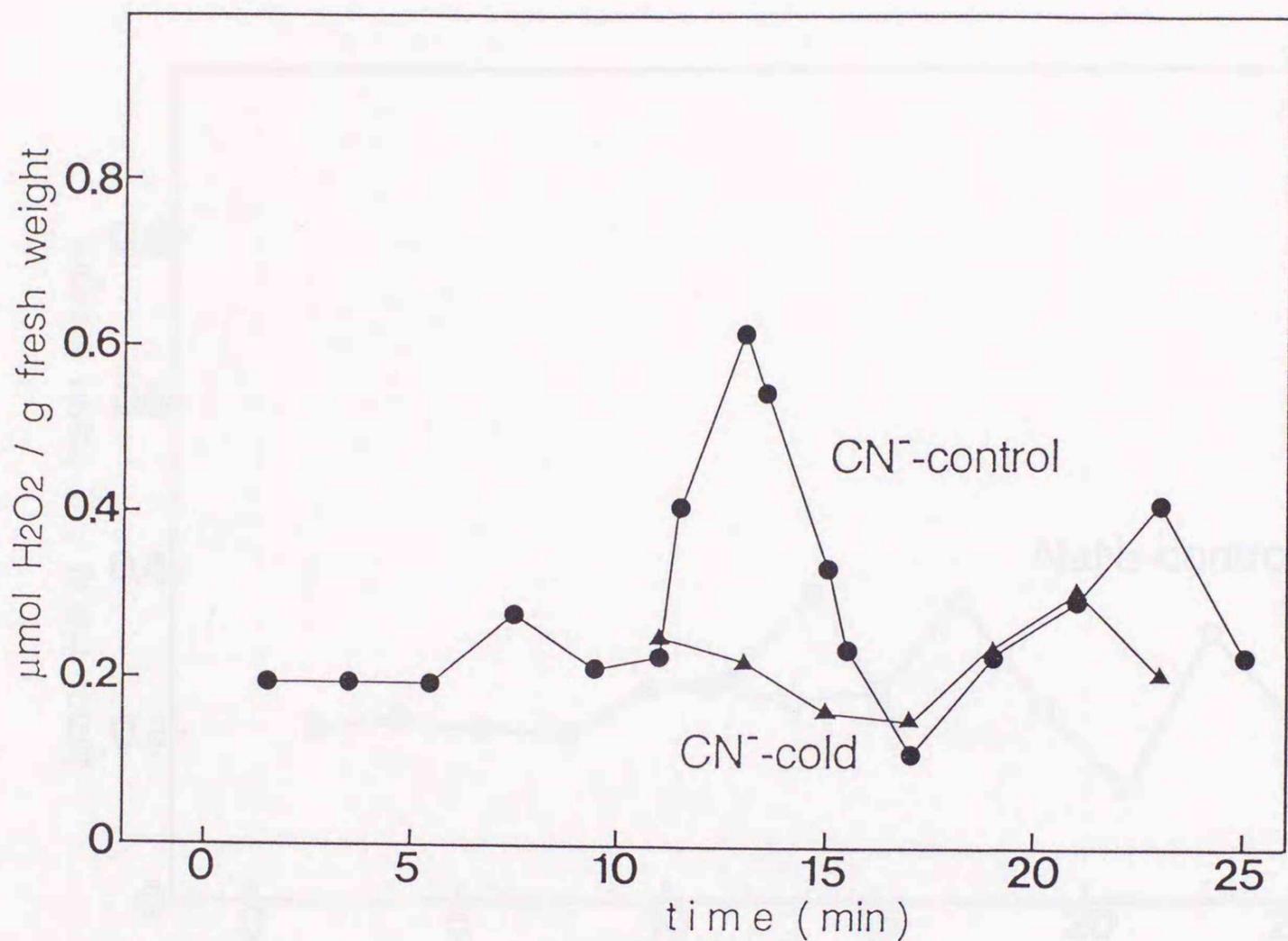


Fig. 13. Formation of hydrogen peroxide in stems of winter wheat caused by CN⁻ treatment.

Stems were wrapped in aluminum foil and pre-incubated at 28°C in the dark for 1 h. Hydrogen peroxide was measured as described (39). The CN⁻ treatment was done by immersion of stems in 0.1 mM KCN in the dark at 0 time at 28°C and the concentration of hydrogen peroxide was measured (●). Cold treatment was done by moving the CN⁻ treated sample into the ethanol bath of -5°C at 10 min and the concentration of hydrogen peroxide was measured (▲).

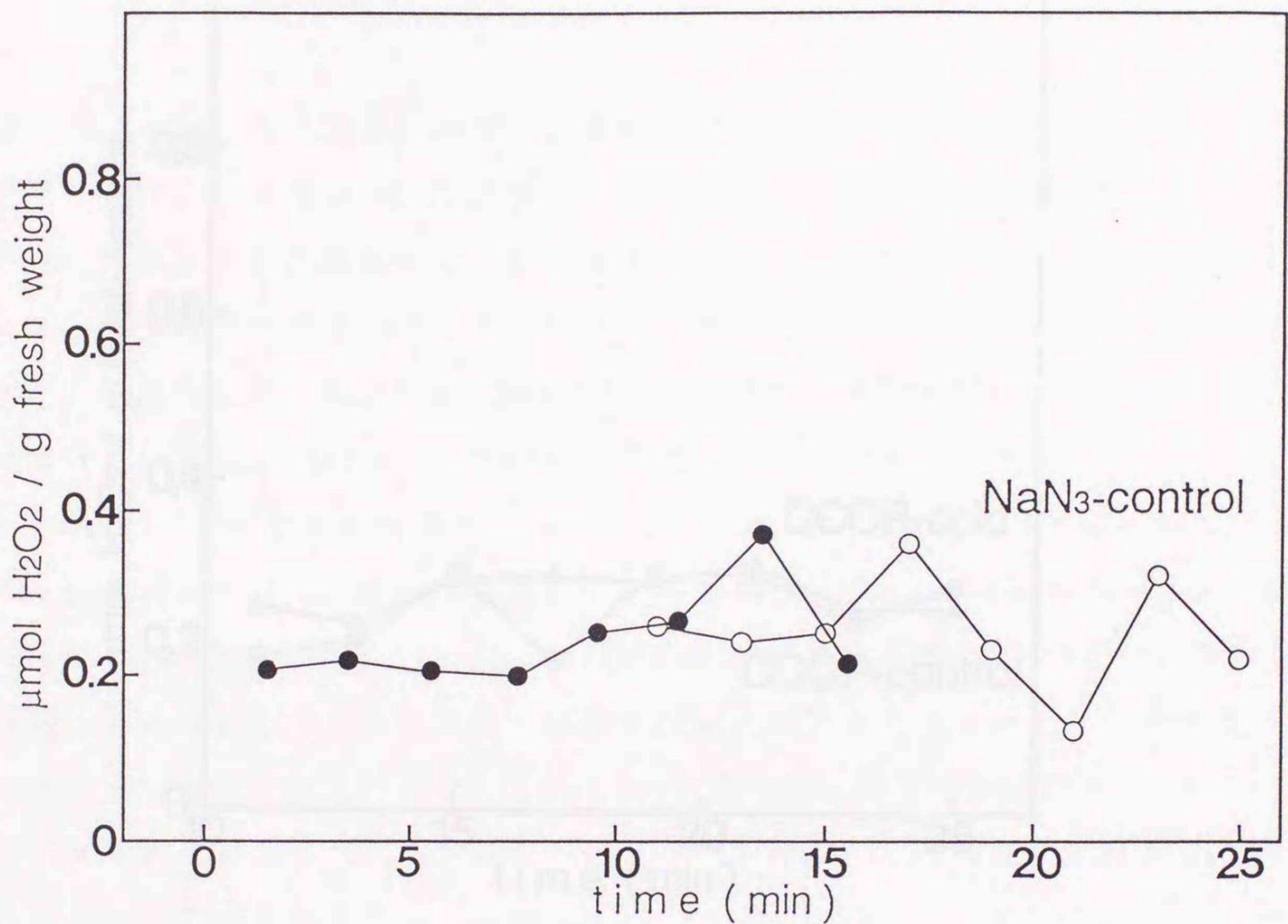


Fig. 14. Formation of hydrogen peroxide in stems of winter wheat caused by NaN₃ treatment.

Stems were wrapped in aluminum foil and pre-incubated at 28°C in the dark for 1 h. Hydrogen peroxide was measured as described (39). The NaN₃ treatment was done by immersion of stems in 0.1 mM NaN₃ in the dark at 0 time at 28°C and the concentration of hydrogen peroxide was measured (●).

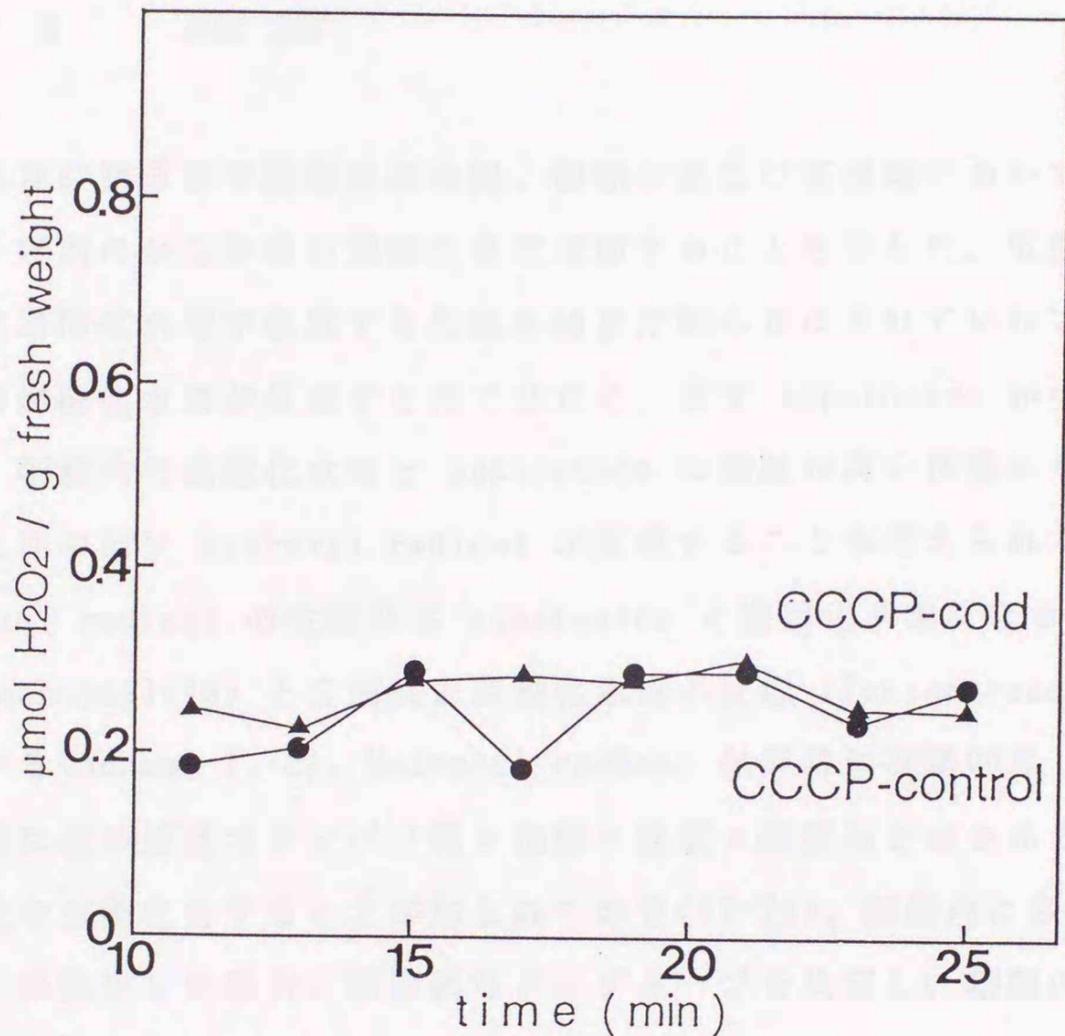


Fig. 15. Effect of CCCP on the concentration of hydrogen peroxide in stems of winter wheat.

Stems were wrapped in aluminum foil and pre-incubated at 28°C in the dark for 1 h. Hydrogen peroxide was measured as described (39). The CCCP treatment was done by immersion of stems in 0.1 mM CCCP in the dark at 0 time at 28°C and the concentration of hydrogen peroxide was measured (●). Cold treatment was done by moving the CCCP treated sample into the ethanol bath of -5°C at 10 min and the concentration of hydrogen peroxide was measured (▲).

第5章

低温処理による茎組織における Hydroxyl Radical の生成

5-1 緒言

第2章及び第3章で低温処理の際、植物の葉及び茎組織において過酸化水素の濃度が一時的にかなり高い濃度にまで増加することを示した。低温処理によって細胞内に過酸化水素が生成する仕組みはまだ明らかにされていないが、酸素分子から直接過酸化水素が生成するのではなく、まず superoxide が生成すると考えられる。細胞内の過酸化水素と superoxide の濃度が高い状態になった場合、さらに反応性の高い hydroxyl radical が生成することが考えられる。

Hydroxyl radical の生成系は superoxide と過酸化水素による反応 (Haber-Weiss reaction)(75) と2価鉄と過酸化水素の反応 (Fenton reaction)(76) が知られている (Scheme 1, 2)。Hydroxyl radical は非常に攻撃的な radical であり、拡散律速に近い速度でタンパク質・核酸・脂質・糖質などほとんどの化合物と反応し酸化や水酸化をすることが知られており(77-79)、細胞内に多量の hydroxyl radical が発生した場合、細胞膜などにダメージを及ぼし、細胞の死滅の原因の一つになると考えられる。

Scheme 1

Haber-Weiss Reaction



Scheme 2

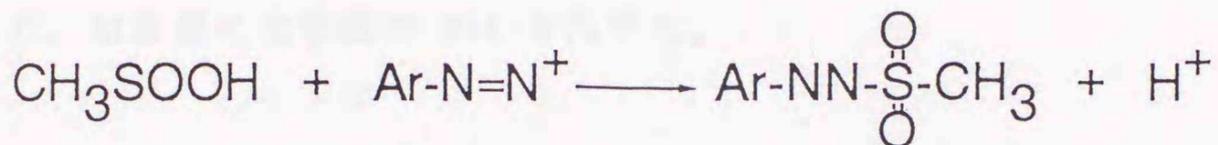
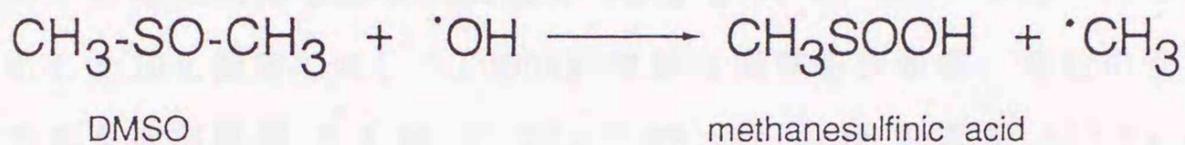
Fenton Reaction



一方、クロロプラストなどの凍結の際、dimethylsulfoxide (DMSO) が有効な保護剤になることが知られている(80)。また DMSO は hydroxyl radical の捕捉剤としても知られている(81)。これらのことから細胞に急激な凍結等の低温処理を施した場合、細胞内の superoxide と過酸化水素の濃度が一時的に高まり、これらから生成する hydroxyl radical が細胞の死滅の原因の一つをなしていることが示唆されたので、細胞内の hydroxyl radical の測定を試みた。

Hydroxyl radical は前述のとおり反応性が高く直接的な定量は非常に困難である。従って本報では DMSO と hydroxyl radical との反応で生成する methanesulfinic acid (MSA) を測定する間接法(82)を用いた(Scheme 3)。

Scheme 3



C.F.Babbs and M.J.Gale

Analytical Biochemistry, 163, 67-73 (1987)

5 - 2 実験方法

1. 試薬

Dimethyl sulfoxide は Nakarai Tesque (Japan) のものを使った。Fast Blue BB salt は Sigma (USA) のものを使用した。Methanesulfinic acid は Lancaster MTM Research Chemicals (England) のものを使用した。その他の試薬は分析用のものを用いた。

2. 実験材料

ホロシリコムギの種子は24時間の吸水後、予め吸水させたパーミキュライト上に播種し、4日間人工気象器による一定環境で暗所生育した。その後、10,000 lux の光を照射した。生育条件は気温昼間28℃夜間24℃、日長16時間とした。播種後7日目の茎組織を実験に用いた。7日目の茎組織はアルミホイルに包

んだ後、0.6 ml の 20% DMSO で 28°C で 1 時間暗所で前処理し、-20~30°C の温度処理は各温度のエタノールまたは湯浴で行った。

3. Methanesulfinic acid の抽出及び測定

各温度処理後の茎組織はアルミホイルから出した後直ちに 2 ml の蒸留水中で乳鉢及び乳棒を用いて摩砕した。抽出液は 14,000xg で 15 分間遠心分離し、上清に 2 ml の toluene:butanol(3:1) を加え激しく攪拌した。さらに 14,000 xg で 5 分間の遠心分離後、水層に 0.2 ml の 1 N HCl を加え、続いて 0.1 ml の 30 mM Fast Blue BB salt を加えて攪拌した。室温暗所で 10 分間反応させた後、2 ml の toluene:butanol(3:1) を加えて激しく攪拌した。14,000xg で 5 分間遠心分離後、有機溶媒層を集め未反応の Fast Blue BB salt を除くために 2 ml の 1 mM HCl を加え攪拌した。14,000xg で 5 分間遠心分離後、発色の安定化のために得られた有機溶媒層 0.4 ml に 20 μ l の pyridine を加え 420 nm の吸光度を測定した。検量線には市販の MSA を用いた。

4. 低温処理に対する LT₅₀ の測定

7 日目のホロシリ小麦の若苗は、葉を切り落とした茎と根の部分をアルミホイルで包み 28°C 暗所で 1 時間前処理した。その後各温度のエタノールまたは湯浴で 15 分間温度処理を施し、アルミホイルから取りだして根の部分をキムワイプ紙で包み、28°C 暗所で 5 日間生育させた。その後さらに 10 日間人工気象器内で生育させて温度処理後 15 日目の生存率を測定した。一つの温度処理に対して 15 本以上の若苗を使用した。

5 - 3 結果

今回の実験に用いた MSA の定量法では数 nmol から 1 μ mol 程度の微量の MSA が定量可能であった (Fig. 16)。また検量線における直線性は約 0.1 μ mol から 1 μ mol の間に見られた。

各温度処理を施した場合、処理後 15 分までに control (28°C) では MSA の生成はほとんど見られなかったが、-5°C から生成が始まり -10°C では相当な量の MSA

の蓄積が認められた(Fig. 17)。さらに温度を下げて -20°C になると $0.3\mu\text{mol/g}$ fresh weight 以上の著量の MSA が蓄積した。MSA の生成は処理後 1 分以内に見られ始め、 -20°C 処理を施したものでは処理後 15 分後も徐々に蓄積量が増加する傾向を示した(Fig. 17)。

さらに長時間の経時変化を調べた結果、低温処理直後の一時的な MSA 濃度の増加(Fig. 17)の後、4~6 時間目をピークとする 1 つの山と 12 時間目をピークとする 2 つの山が確認された(Fig. 18)。また 4~6 時間目の山のピークは処理温度が低いほど前の方へシフトする現象が見られた。

これらの温度での植物体の死滅と hydroxyl radical の関係を調べるために、MSA 測定の場合と同じ処理を 15 分間行い、その後室温に戻して生育させた場合の生存率を調べた結果(Fig. 19)、 -5°C から死滅が見られ始め -10°C で約 7 割が死滅し、 -13°C ではほとんど生存する個体が認められなくなった。

5 - 4 考察

Hydroxyl radical は非常に反応性の強い活性酸素種であり、DNA をはじめとする細胞内の分子レベルでのいろいろなダメージに直接関与している。植物を低温処理した場合過酸化水素の濃度が高まることから(39,74)、低温処理の程度や方法によっては hydroxyl radical が細胞内で生じると考えられた。今回 DMSO から生じる MSA の濃度から hydroxyl radical の測定を行ったが、この方法は間接的であり、定量性には欠けるものと考えられる。その理由は *in vivo* の場合、生成した hydroxyl radical が DMSO 以外にも別の分子と反応することや、MSA が必ずしも DMSO からのみ生成するのではなく methionine 等からも生成する可能性があるからである。しかし MSA が細胞内で生成するには hydroxyl radical のような非常に反応性に富む分子の関与が必要であり、このことから *in vivo* で生成した MSA はほとんどが hydroxyl radical 由来であると考えられた。

実際に低温処理によって MSA の生成量が増加し、MSA の生成量は処理温度が低いほど多くなることが認められた(Fig. 17)。この結果は低温処理の際に hydroxyl radical が生じていることを示している。 -20°C で処理した場合 MSA の生成量が $0.3\mu\text{mol/g}$ fresh weight と非常に多いことから低温処理の際の膜やその他

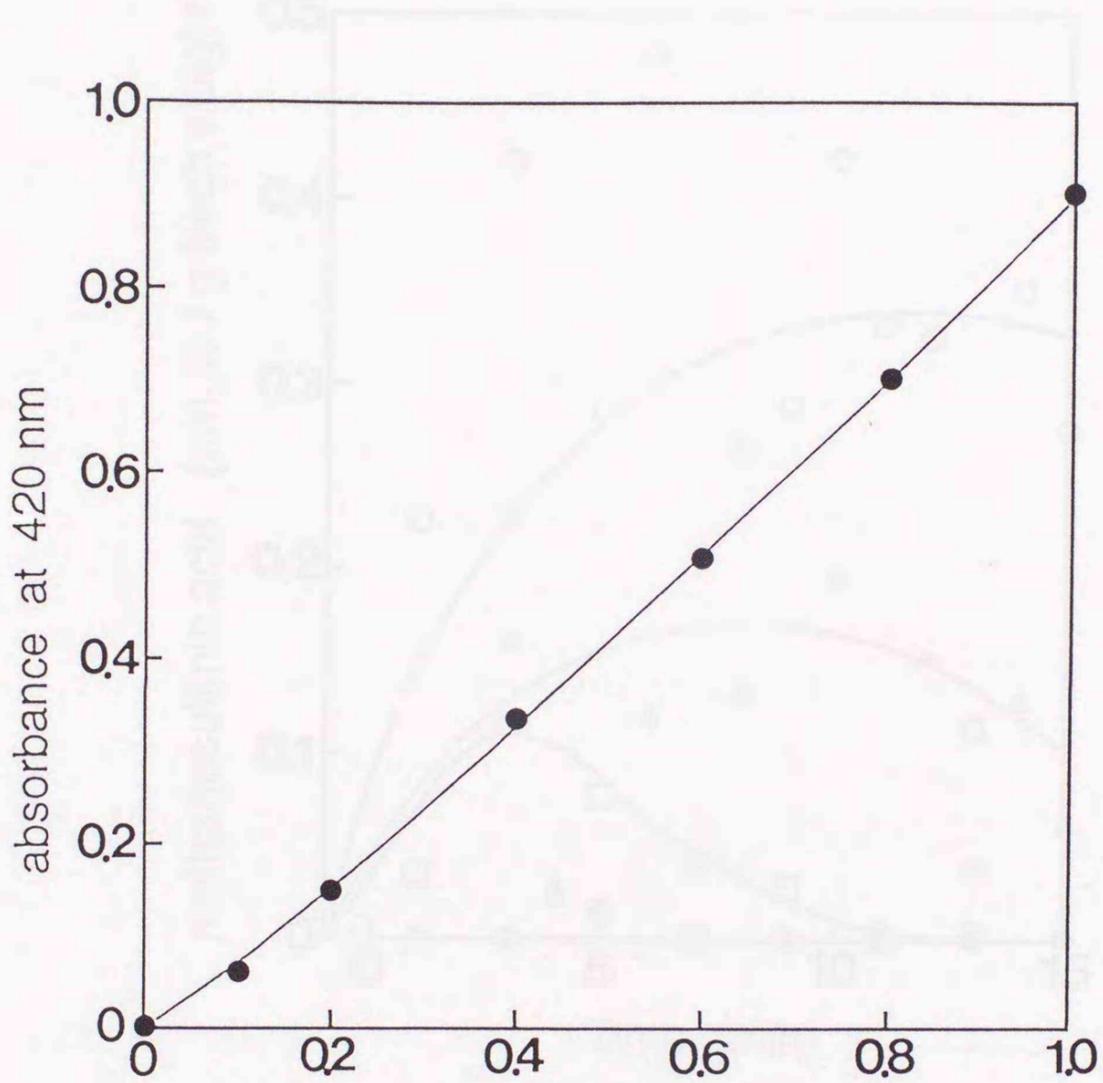
のダメージが hydroxyl radical 由来で起こっている可能性は十分に考えられた。細胞の死滅温度 (Fig. 19) と MSA の生成温度とが良く一致していることから細胞の死滅と hydroxyl radical の間に直接的な関係があることが示唆された。

長時間の MSA 濃度の経時変化から MSA が低温処理直後に一度生じ、その後増加した MSA 濃度が低下した (Fig. 18)。このことは細胞内で MSA が代謝され得ることを示している。さらにその後 MSA の生成には2つのピークが見られたことより細胞内での hydroxyl radical の生成は1段階で起こるのではなく複数の段階があることが示された。

今回の実験で、低温処理の際に著量の hydroxyl radical が生成している可能性が示唆された。細胞膜等の凍結保存の際、DMSO がダメージ防止に役立つことは、DMSO が hydroxyl radical をトラップするためと考えられ、今回の実験結果と良く一致した。しかしながら実際に低温処理の際にどの程度の量の hydroxyl radical が生じているのか、膜組織や DNA 等にダメージを与えているかどうかは、さらに研究を要する重要な問題である。

5 - 5 要約

秋播小麦の茎組織を用いて低温処理の際に生成する hydroxyl radical を間接的に測定した。測定法は DMSO が hydroxyl radical と反応して生成する MSA を測定する方法を用いた。その結果 control では MSA はほとんど認められなかったが、 -5°C から -10°C 、 -20°C と温度を下げるに従って処理後1分以内に MSA の生成量が増加し、 -20°C 処理では $0.3\mu\text{mol/g fresh weight}$ とかなりの量の MSA が検出された。さらに低温処理を続けると一時的に MSA 濃度は低下し、その後4時間目から6時間目にかけて第2回の生成、さらに12時間位に第3回の生成が認められた。また、MSA の生成する処理温度は細胞の死滅する温度と一致していた。



methanesulfinic acid (μmole in reaction mixture)

Fig. 16. Standard curve for the measurement of methanesulfinic acid.

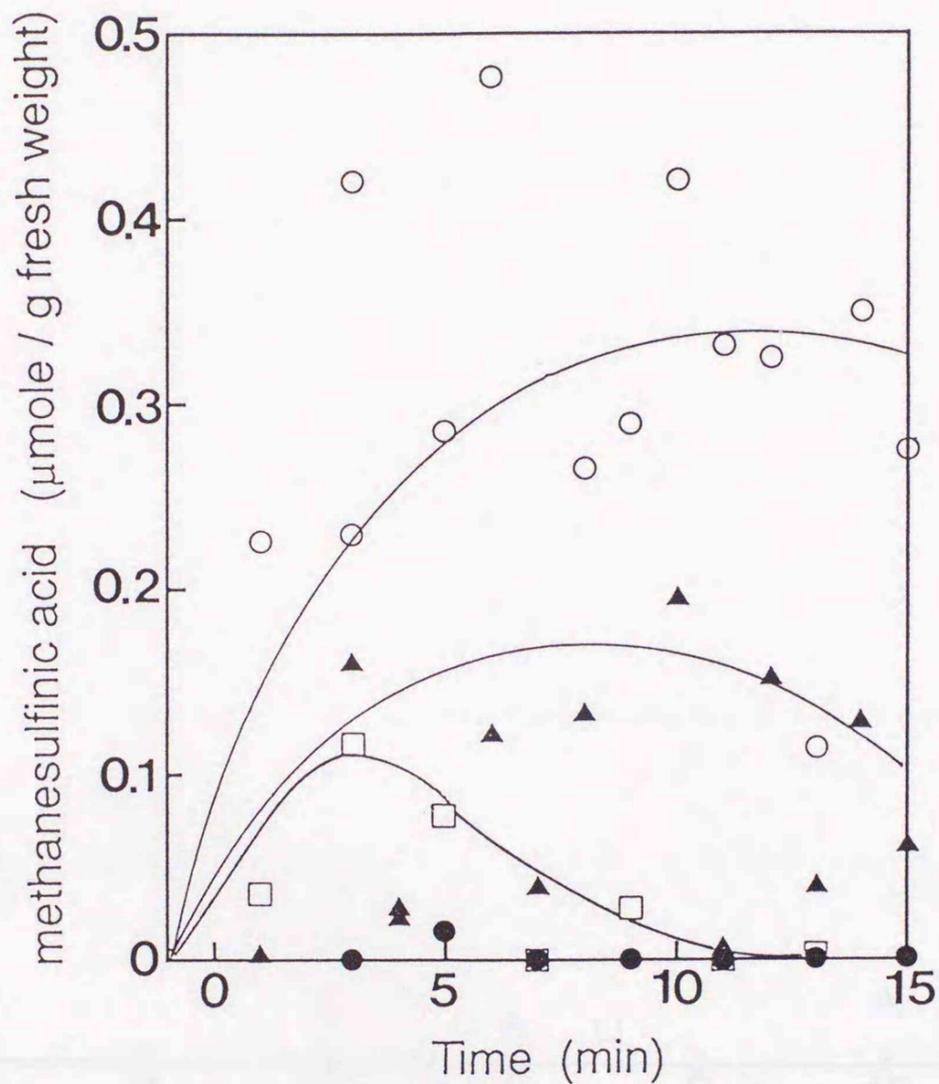


Fig. 17. Formation of methanesulfinic acid in stems of winter wheat caused by cold treatment. Stems were wrapped in aluminum foil and pre-incubated in the presence of 20% DMSO at 28°C in the dark for 1 h. Cold treatment was done by moving the sample into the ethanol bath at various temperature (●, 28°C; □, -5°C; ▲, -10°C; ○, -20°C) at 0 time.

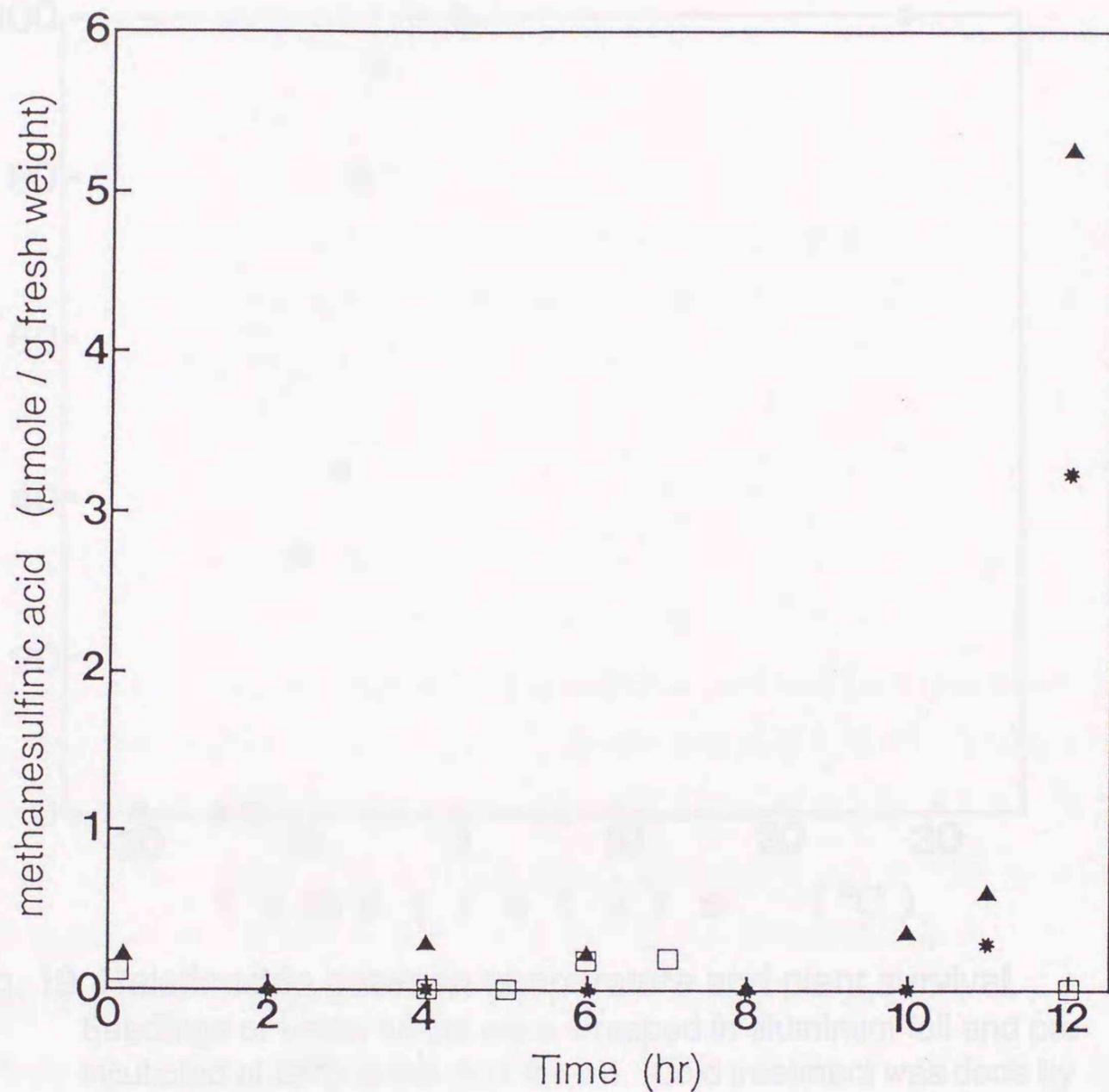


Fig. 18. Formation of methanesulfinic acid in stems of winter wheat caused by cold treatment.

Stems were wrapped in aluminum foil and pre-incubated in the presence of 20% DMSO at 28°C in the dark for 1 h. Cold treatment was done by moving the sample into the ethanol bath at various temperature (□, -5°C; *, -9°C; ▲, -10°C) at 0 time.

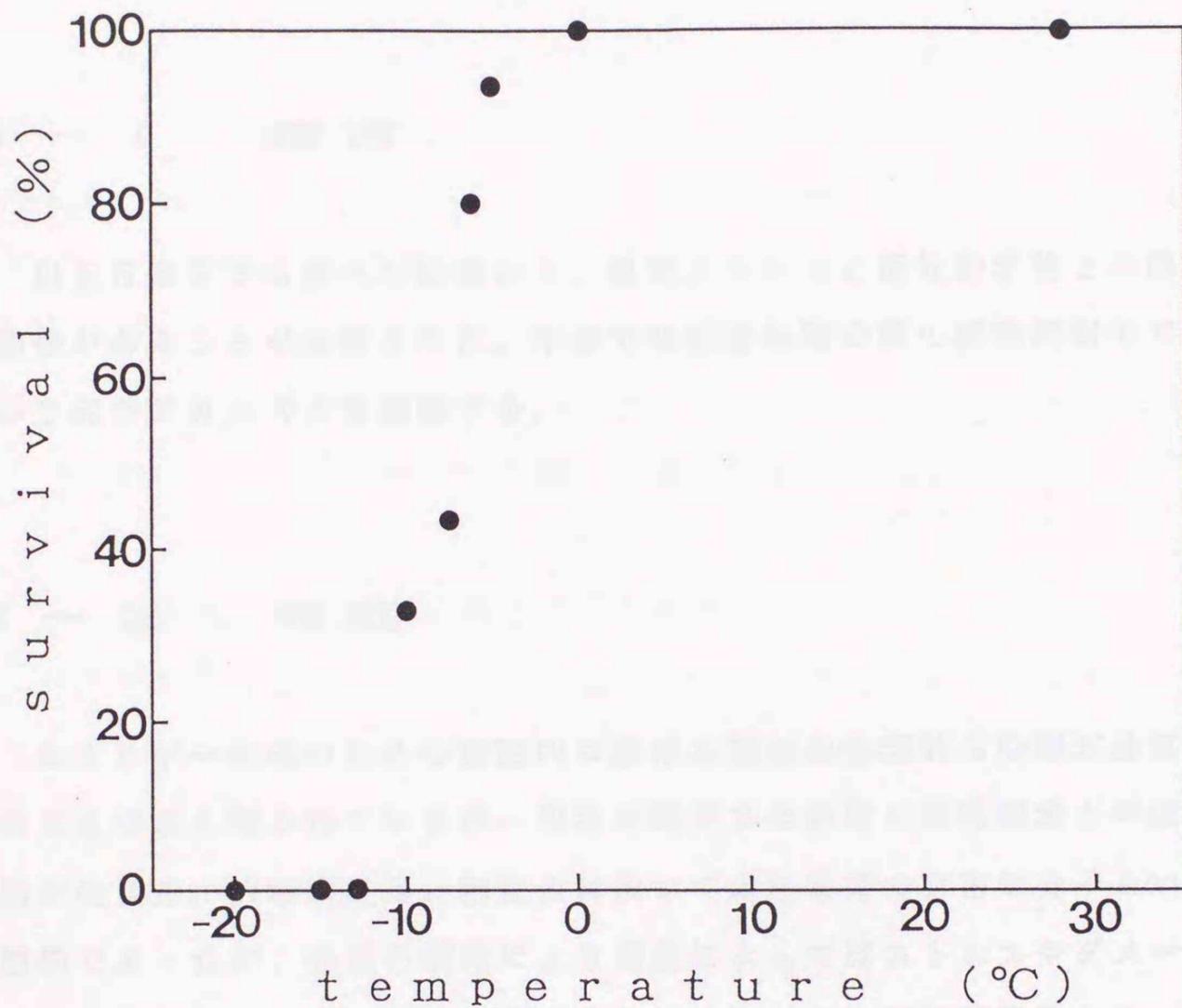


Fig. 19. Relationship between temperature and plant survival.

Seedlings of winter wheat were wrapped in aluminum foil and pre-incubated at 28°C in the dark for 1 h. Cold treatment was done by moving the wrapped sample into the ethanol bath at various temperature and incubated for 15 min. After that, the sample was moved to a growth chamber and grown for 5 d in the dark. Then the sample was grown in a growth chamber with light for 10 d and survivals of seedlings were determined. Each treatment was consisted of more than 15 pieces of seedlings.

第6章

総合考察 1

低温処理による活性酸素種の生成系

6-1 緒言

以上5章までに述べた結果から、低温ストレスと活性酸素種との間に何らかの関係があることが示唆された。本章では低温処理の際の植物細胞中での活性酸素の生成のメカニズムを議論する。

6-2 考察

エネルギー生成のための細胞内に於ける酸素の生理的な役割が非常に大切であることはよく知られているが、酸素を利用する過程で活性酸素と呼ばれる中間産物が生じる。活性酸素は、細胞内に於いて毒性を持つ有害な分子という見方が一般的であったが、最近の研究により濃度によってはストレスやダメージの回復に大きく関与している可能性が示唆され始めている。活性酸素種には superoxide、過酸化水素、一重項酸素、hydroxyl radical などが知られているが、生体内で生成し重要な影響を与えるものと考えられているのは superoxide、過酸化水素及び hydroxyl radical の3つである。

活性酸素種の内、いちばんよく研究対象にされているのは superoxide である。Superoxide は酸素分子の1電子還元で生じ、活性酸素種のうち酸素分子から最初に生成されると考えられるが、生体内では白血球やマクロファージ、赤血球、葉緑体、ミトコンドリア、核などいろいろな場所での生成が報告されている(83)。また、*E. coli* や *Salmonella* 等の細菌類には superoxide によって活性化される soxR と呼ばれる regulon の存在も明らかになり(84,85)、遺伝子のレベルでもストレスに対する応答に関与していると考えられる。しかしながら、superoxide 自

体は反応性が小さく膜透過性も低いと考えられるので、細胞内で酸化傷害を与える分子としてはそれほど大きな寄与をしているとは考えにくい。

これに対して superoxide から生じる過酸化水素は比較的寿命が長く細胞内でいろいろな情報源として存在していることが考えられる。実際に先に述べた細菌の系では oxyR と呼ばれる regulon が存在し、catalase をはじめとしたいいくつかの蛋白質の合成に過酸化水素が関与していることが明らかになってきた(29, 86, 87)。

また過酸化水素は hydroxyl radical の発生源であり、分子としてみた場合細胞内での酸化傷害に大きく関与していると考えられる。

Hydroxyl radical は5章にも述べたように非常に反応性の高い分子種であり生体内で発生した場合膜系や DNA に大きな影響を与える。Hydroxyl radical 遺伝子(88)やタンパク質に与える影響(89)は大きいと考えられる。

1. 光照射下の葉組織の場合の活性酸素生成系

光照射下の葉組織では主な電子の流れは光合成にあると考えられる。低温のみならず第2章で述べたように paraquat 処理によっても過酸化水素の生成が見られたことは、過酸化水素の発生源が葉緑体内にあることを示していると考えられる。以下の機構により活性酸素種が生成すると考えられる(Fig. 20)。

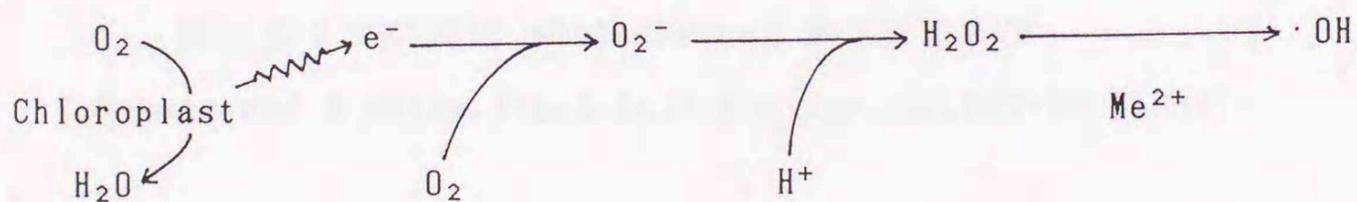


Fig.20 光照射下の葉組織中の活性酸素生成

説明：低温処理等の理由でリークした電子は葉緑体内で酸素分子と結合し、superoxide を生成する。生成した superoxide は superoxide dismutase または不均化反応により過酸化水素を生成する。過酸化水素は peroxidase や catalase などの酵素や ascorbate 等の還元剤によって還元されるか、細胞内の遷移金属

(Me^{2+}) と反応して hydroxyl radical を生じる。ただし上記の反応のどこまでが *in vivo* のクロロプラスト内で起こっているかはわかっていない。

残念ながら葉緑体内の詳しい活性酸素種の発生場所はまだ明らかにされていないが Patterson and Myers (61) の研究以来、*in vitro* でクロロプラストを用いていくつかの実験がなされてきた。Asada *et al.* (44) は DCMU によりクロロプラスト中での cytochrome *c* の還元力が低下することからクロロプラスト内の電子伝達系が酸素からの superoxide や過酸化水素の発生に関与していると述べた。さらにクロロプラストの Photosystem I をヒストンで覆うと光照射下でのエピネフリンの酸化が起こらないことから、酸素の還元が Photosystem I の最初の電子受容体の所で起こることを示唆している (Fig. 21)。

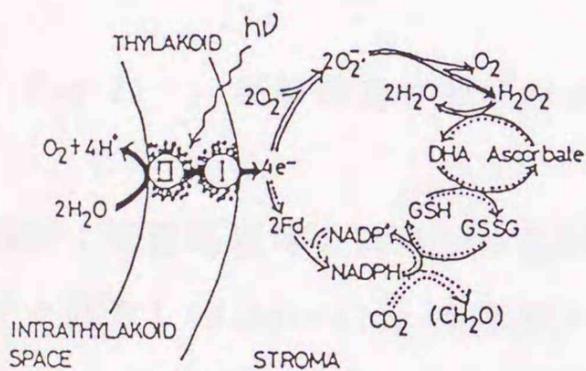
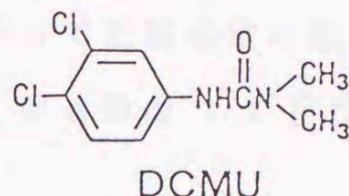


Fig. 9 Formation and scavenging of superoxide and hydrogen peroxide in chloroplasts. When molecular oxygen is reduced by two electrons from photosystem I, one molecule of hydrogen peroxide is produced (\Rightarrow). This hydrogen peroxide is reduced further to water by one molecule of ascorbate which has been generated by the (\dashrightarrow) system with two electrons from photosystem I.

図中の I 及び II は photosystem I 及び II を示す

Y. Nakano and K. Asada, *Plant Cell Physiol.*, 22, 867-880 (1981)

Fig. 21 クロロプラストにおける superoxide と過酸化水素の生成と消去

同様に、Robinson (90) はフェレドキシンの酸化還元の過程で過酸化水素が発生すると述べている。

低温処理した場合の過酸化水素の生成場所についてはよくわかっていないが、フェレドキシンの酸化還元の部分で低温処理により電子が急にリークし、これが

酸素分子と結合することによって superoxide が生成し、さらにこれから過酸化水素ができるものと考えられる。

2. 茎組織及び光照射を受けていない葉組織の場合の活性酸素生成系

茎及び光照射を受けていない場合の葉組織での主な電子の流れはミトコンドリア内での酸化リン酸化の過程であると考えられる。したがって低温処理の際の活性酸素種の生成はミトコンドリア内で起こると思われる。第4章の KCN 及び CCCP の実験結果はこのこととよく一致する。

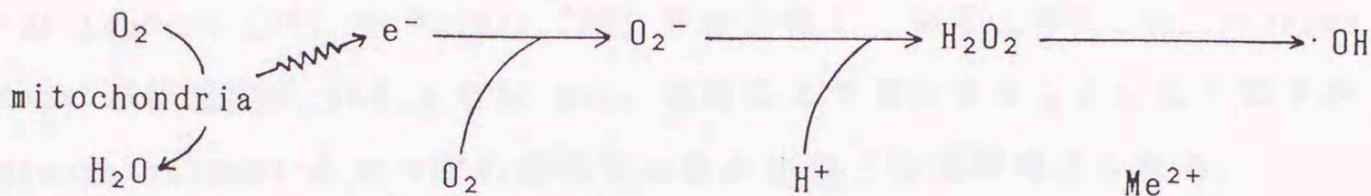


Fig.21 茎組織及び光照射を受けていない葉組織における活性酸素種の生成

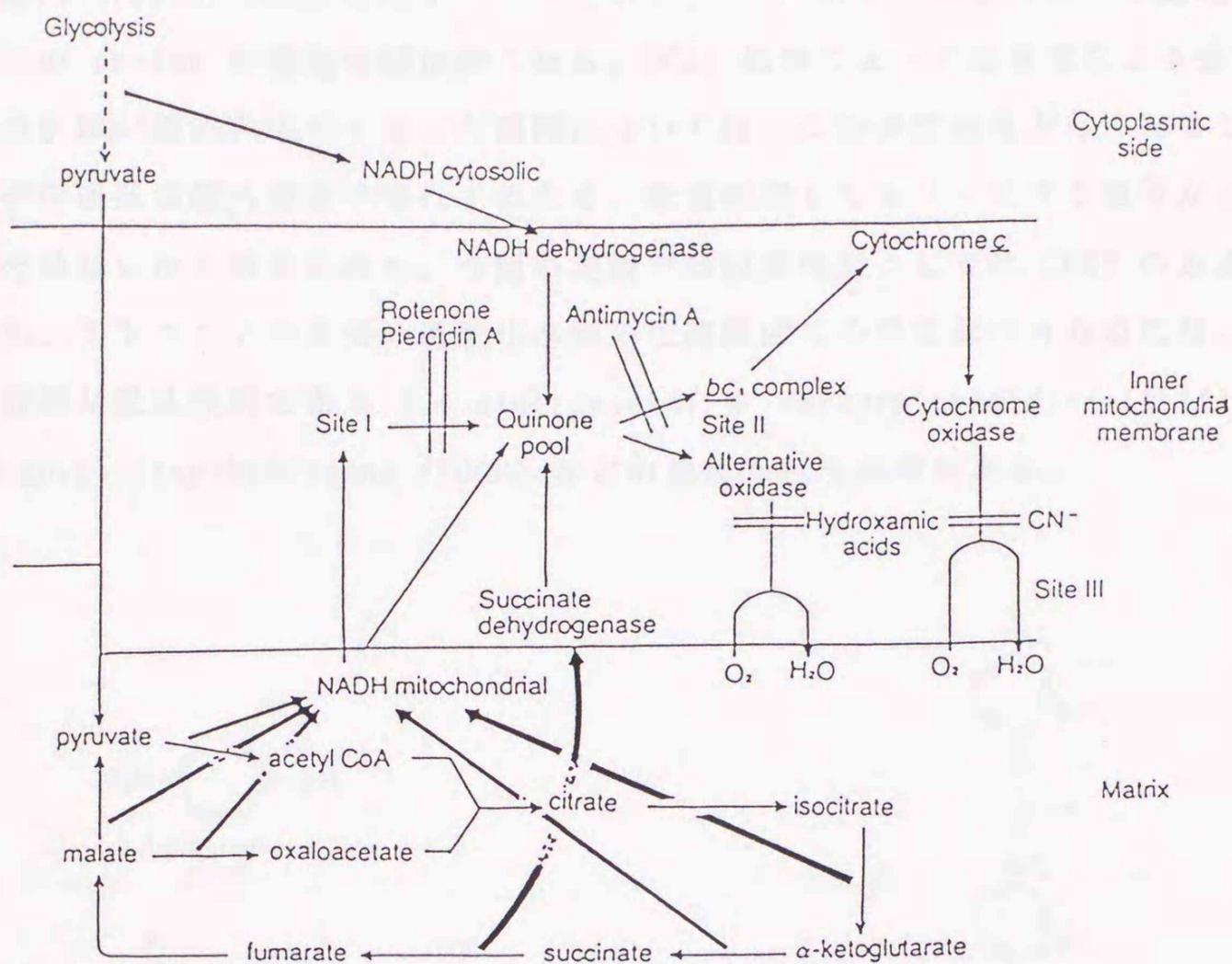
説明：低温処理等の何らかの原因でリークした電子はミトコンドリア内で酸素分子と結合し superoxide を生成する。生成した superoxide は superoxide dismutase や不均化反応により過酸化水素を発生させる。過酸化水素は peroxidase や catalase 等の酵素や AsA 等の還元剤により還元されるが、遷移金属イオン (Me^{2+})により hydroxyl radical が生じる。ただし実際に上記の反応のどこまでが *in vivo* のミトコンドリア内で起こっているかはわかっていない。

ミトコンドリアにおける活性酸素の生成が実際に電子伝達系のどの部分で起こっているかはまだわかっていなが、Boveris et al.(91-94) や Bonner Jr. et al.(95,96) の研究により様々なアプローチがなされてきた。Boveris らは動物の心臓および植物のミトコンドリアを単離し、KCN、Antimycin 等のミトコンドリアの電子伝達系に作用する試薬による処理を行い、過酸化水素の生成が電子伝達系中の alternate oxidase の場所から起こっていることを示している。一方、

Bonner Jr.らも同様の方法で植物のミトコンドリアでの superoxide の生成場所を調べた結果、Boveris らと同じ結果を得ている。さらに Huq and Palmer (97) も同様に *Arum maculatum* のミトコンドリアを用いて superoxide と過酸化水素の生成が alternate oxidase によって起こっていることを示した(Fig.22)。

本論文中で報告しているように、秋播小麦の茎でも低温処理の際に過酸化水素が生成するが、これもミトコンドリアで起こっていると考えられた。第4章に述べた KCN や NaN_3 による処理で過酸化水素が生成することから、1つの可能性としては KCN 処理によって cytochrome c oxidase が阻害されることにより電子伝達速度が急激に低下し、この部分でリークした電子が酸素分子と結合することにより superoxide や過酸化水素が生成すると考えられた。もう一つの可能性としては Lambers (98) や Palmer (99) らが示唆しているように、cytochrome pathway が低温度や KCN または NaN_3 処理により飽和することにより電子が alternate oxidase の方へ流れ過酸化水素が生成する系が考えられる。

さらに最近の Ordentlich et al.の報告 (100) によればこの alternate oxidase pathway はエネルギーを熱に変換することが考えられており、このことはもし低温処理により alternate oxidase pathway に電子が流れれば、発生する熱によって一時的に細胞を低温ストレスから回避できる可能性も示唆される。



A.L. Moore and P.R. Rich, *TIBS*, 5, 284-288 (1980)

Fig.22 ミトコンドリア中での基質酸化の主要なルート

今回の実験で alternate oxidase を阻害する hydroxamic acid や salicyl hydroxamic acid (SHAM) が低温度による過酸化水素の生成にどのような影響を与えるか調べることが考えられたが、*in vivo* の系でのこれらの試薬の取り込みが十分なされないことが考えられた。

第4章の実験で、CCCP で小麦の茎を処理した場合過酸化水素の生成が見られなくなった。CCCP は代表的な脱共役剤でその水酸基に proton が結合するとミトコンドリアの内膜を通過することができ (Fig.23)、その結果内膜の外から内側へ

proton を輸送することになる。ミトコンドリアは化学浸透説によれば内膜の外側と内側の proton の濃度勾配をつくっている。CCCP のような脱共役剤で処理した場合この proton の濃度勾配が無くなる。CCCP 処理によって低温度による過酸化水素の生成が認められなくなった原因については、この濃度勾配がなくなることで電子伝達系は最大速度で進行するため、低温処理してもリークする電子が少ないのではないかと考えられた。今回の実験では脱共役剤としては CCCP のみを用いたが、ミトコンドリアでの過酸化水素の生成原因について調べるためには、他の代表的な脱共役剤である 2,4-dinitrophenol や carbonylcyanide-*p*-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) などの処理も行う必要がある。

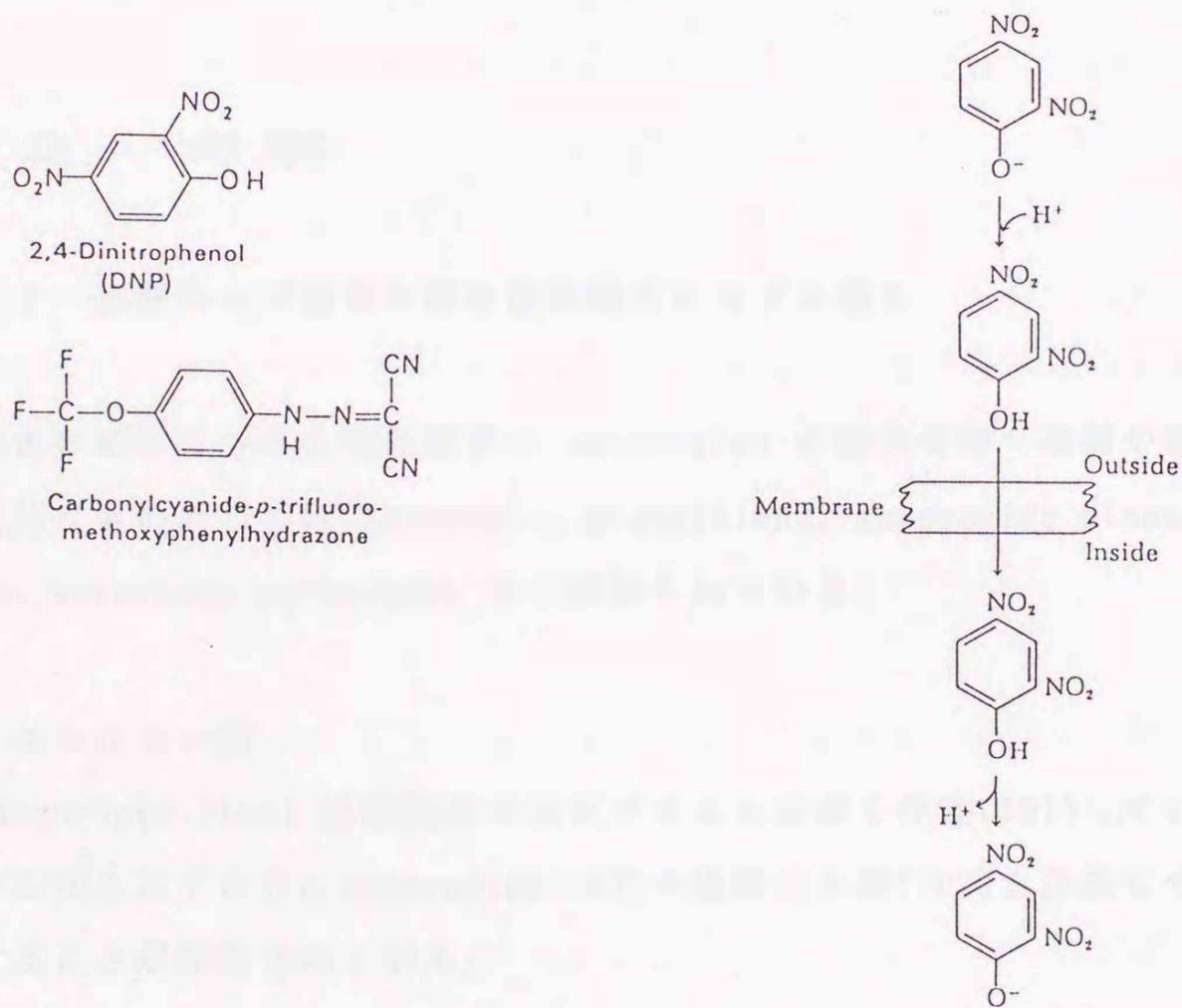


Fig.23 脱共役剤の作用機構

第7章

総合考察2

細胞内の活性酸素の除去系

7-1 緒言

本章では第6章に続いて、細胞内に生成した過酸化水素や superoxide の除去の仕組みについて議論する。

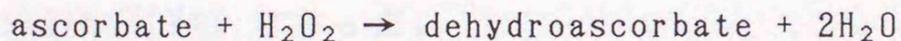
7-2 考察

7-2-1 基質および酵素の活性酸素除去に対する働き

細胞内にはいくつかの活性酸素の scavenging の能力を持つ基質や酵素があるが代表的なものとしては ascorbate、glutathione、superoxide dismutase、catalase、ascorbate peroxidase などが知られている。

1. アスコルビン酸

Ascorbate (AsA) は植物のクロロプラストに多く存在(101)していることは古くから知られており、superoxide(102)や過酸化水素(103)と反応してこれらを除去することが報告されている。



植物細胞内での AsA の濃度は、ホウレンソウのクロロプラストで13mM(37)、French Bean の葉で1 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight(104)、松(eastern white pine)の葉では冬季の最高値が 23 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight(105)、またトウヒ属の葉では9.2

$\mu\text{mol/g}$ fresh weight(106)、ポプラ枝条では $20\mu\text{mol/g}$ dry weight(12)と報告されており、今回第2章に述べた小麦の葉においても $1.7\mu\text{mol/g}$ fresh weight(74)であった。

これらの濃度は他の基質と比べて比較的高い値であると思われる。特にクロロプラスト中の AsA の濃度が高いといわれており、catalase 活性の弱い(107)クロロプラストにおいて生成する活性酸素種の除去に非常に大切な役割を演じていると考えられる。過酸化水素との反応は非酵素的及び ascorbate peroxidase による触媒作用によっておこるが(31,36,37,108)、その結果 AsA は酸化されて dehydroascorbate (DHA) が生成する。生じた DHA は reduced glutathione (GSH) によって AsA へ還元されるので、細胞内での過酸化水素除去という点では AsA と GSH は 'ascorbate-glutathione cycle'(36) を形成していると考えられる。第2章で paraquat 処理によってクロロプラスト内に superoxide を発生させた場合 AsA の濃度が低下したが、このことは AsA がクロロプラスト内での過酸化水素や superoxide の除去に深く関わっていることをよく示している。

季節的な AsA の濃度の変化も既に調べられており、冬季に AsA の濃度が明らかに高まることが示されている(105)。このことは植物細胞が冬季期間細胞を還元状態に保つ活性調節をしている証拠であると考えられる。

2. グルタチオン

Reduced glutathione (GSH) は AsA と同様に過酸化水素除去能を有するが(36)、その細胞内の存在割合は動物細胞に比べて植物細胞では少ないとされている。植物細胞での GSH の濃度は、ホウレンソウクロロプラストで 4.2mM (37)、ポプラ皮層部で $0.66\mu\text{mol/g}$ dry weight(43)と報告されている。第2章で述べたように小麦の葉においては GSH 濃度は $0.1\mu\text{mol/g}$ fresh weight($0.4\mu\text{mol/g}$ dry weight)(74)であった。

季節的な GSH 及び oxidized glutathione (GSSG) の濃度変化を調べた報告によれば、夏期に低く冬期に高い傾向があり、リンゴの花芽では夏期は 40nmol/g dry weight で冬期には $1\mu\text{mol/g}$ dry weight まで増加する。松の葉では夏期は $0.2\mu\text{mol/g}$ fresh weight で冬期は $0.8\mu\text{mol/g}$ fresh weight (105)、トウヒ属

の葉でも同様に夏期に比べ冬期では GSH の濃度が 3 倍以上に高まる ($0.4 \mu\text{mol/g}$ fresh weight)(13)と報告されている。

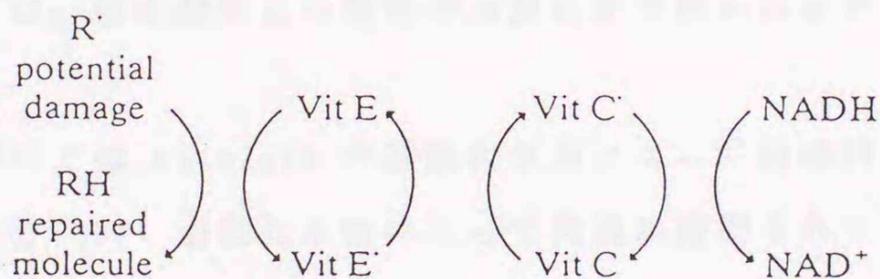
第 2 章に示した通り paraquat や aminotriazole で小麦の葉を処理すると、GSH の濃度はあまり変化せず GSSG の濃度が大きく増加した。この理由については明らかになっていないが次のようなことが考えられる。

グルタチオンの合成は γ -glutamylcysteine synthase [EC 6,3,2,2] と glutathione synthase [EC 6,3,2,3] によって触媒されているが、paraquat や aminotriazole によって、また冬期間に全グルタチオン量が増加することから、これらの 2 つの酵素が過酸化水素濃度の高まるような処理によって誘導的に合成されるかまたは活性化されることが示唆される。この点についてはもう少し実験を進めてみないとはっきりした結論を出せないものと思われる。

3. その他の分子

細胞内には AsA や GSH 以外にも過酸化反応を防止する役割を担っているものがいくつか知られている。

α -Tocopherol (vitamin E) は脂溶性で生体膜の酸化を防ぐ効果が知られている。この仕組みについて Packer *et al.* は α -tocopherol と ascorbate (Vit.C) がラジカルによる分子のダメージの回復のモデルを示した(109)(Fig. 24)。



J.E.Packer, T.F.Slater and R.L.Willson, *Nature*, 278, 737-738(1979)

Fig.24 α -tocopherol と ascorbate による radical 反応の停止

また、チロキシン等のフェノール性の水酸基を持つ分子は proton を脂質ラジカルや脂質過酸化ラジカルに与えて過酸化反応を停止することが知られている(83)。

しかし植物細胞内でのこれらの分子の濃度は低く、細胞内でどの程度の役割を果たしているのかはよくわかっていない。

4. Catalase

Catalase [EC 1,11,1,6] は古くからよく知られた酵素で、いろいろな生物から単離生成されている(110,111)。一般に peroxisome に局在し過酸化水素の分解をすることが知られているが(112)、mitochondria にも存在するという報告もある(113)。

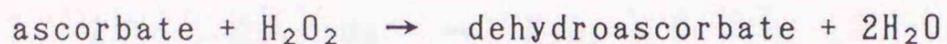
植物ではトウモロコシにおいて研究が進んでおり、Scandalios らは CAT1~CAT3 の3種の isoform が存在すると述べている。彼らの報告では CAT1 は構成的に発現され(114,115)、CAT2 は光誘導性で(116)、一方 CAT3 は暗所生育した根からその存在が見いだせるとしている(114)。

Catalase の過酸化水素の対する K_m 値は rat liver のもので 1.1M と非常に高い(117)。植物細胞の中にも高活性で存在し、第2章で述べたように小麦の葉細胞中には 1~2mmol/min/g fresh weight の非常に高い活性の存在を確かめている(74)。また、年間を通してみると細胞中のオルガネラや蛋白質の合成活性が高まるときに catalase 活性が増加し(12)、他の過酸化水素除去酵素の10倍以上の活性があるが、他の酵素とは活性の増減の面で逆の応答をしていると思われる(12)。

細菌においては catalase が過酸化水素によって誘導的に合成されることが報告されており(86)、過酸化水素によって発現が調節されていることがわかってきた(118)。植物細胞での調節機構はまだよくわかっていないが、第3章と第4章で述べたように過酸化水素が発生するような低温処理の際、一時的に catalase 活性が増加することから(74)、catalase の合成が過酸化水素によって何らかの影響を受けている可能性も示唆される。

5. Ascorbate peroxidase

Ascorbate peroxidase (ASPOD) は AsA を用いて過酸化水素を分解する酵素で反応は以下のように示される。



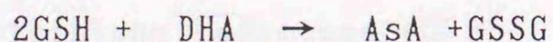
ホウレンソウのクロロプラストにおいて初めて見いだされ(108)、マグネシウム欠乏にすることによって活性が7.5倍に増加することが報告されている(104)。本酵素の季節的な変化は、ポプラ枝条において6~8月が活性が低く、3月と10月に高まる傾向がみられ(12)、りんごの花芽においても9~10月に高まること示されている。また、松(eastern white pine)の葉においても同様な傾向が報告されている(105)。

さらにこの酵素は霜の降りるような急激な温度の低下により強い活性の増加が認められ(34)、過酸化水素とこの酵素の誘導的な合成との関連に興味を持たれた。

秋播小麦の葉組織においても活性はかなり強く $10 \mu\text{mol/g}$ fresh weight 程度の活性が認められた(データは示していない)。 19°C と 5°C の活性の比較でも低温による活性の低下が40%以内と低いため(38)、低温環境下においても充分働き過酸化水素の除去を行っていると考えられる。

6. Dehydroascorbate reductase

Dehydroascorbate reductase は GSH を基質とし DHA を還元する酵素であり、反応は以下の式に示される。

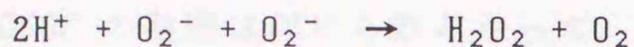


この酵素もいくつかの植物において存在が確認され(120)、エンドウ(121)及びホウレンソウ(59, 122)から部分精製されている。GSH 及び DHA に対する K_m 値はそれぞれ 4.4 と 0.44mM (60)、 2.5 と 0.07mM (59) と報告されている。クロロプラストのストロマに存在するとされ(60)、クロロプラストでの過酸化水素の除去に ASPOD と共に働いていると考えられる。

7. その他の酵素で活性酸素除去に関与しているもの

① Superoxide dismutase (SOD)

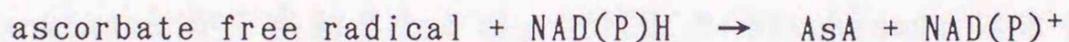
この酵素は superoxide と反応して過酸化水素を生じる。



第6章で述べたように細胞内で過酸化水素は superoxide から本酵素の働きまたは不均化反応で生じると考えられる。トウモロコシにおいては19℃と5℃の活性の比較から SOD が低温度による阻害をあまり受けない(13.4%)ことが示され(38)、SOD は低温環境下でも十分に superoxide を過酸化水素に還元していると考えられる。

② Ascorbate free radical reductase (ASFRD)

ASFRD は AsA とラジカル等との反応で生じる ascorbate free radical (=monodehydroascorbate) を NAD(P)H を用いて還元する働きを持つ。



Borracino *et al.*によれば potato tuber の ASFRD の NADH 及び NADPH に対する K_m 値はそれぞれ 7.7 及び 30 μM であり ascorbate free radical に対する K_m 値は 0.9 μM であった(58)。本酵素も DHARD と同様に細胞内で AsA 及び ASPOD と共に過酸化物除去に関して重要な役割を果たしていると考えられる。

③ Glutathione reductase (GSR)

GSR は GSSG を NADPH を基質として GSH に還元する働きを持ち、反応式は以下の様に示される。



GSR についても季節的な変化が既に調べられていて、松(eastern white pine)

の葉では冬期の活性が高いと報告されている(105)。一方、小麦の葉においても同様な傾向が認められているが、茎及び根茎移行部では冬期間の活性の増加は認められなかった(35)。また、第2章の実験からも明かな増加は認められていない(74)。Paraquat や aminotriazole で処理した場合、GSSG が蓄積したが、低温処理では GSSG の蓄積は認められなかった。トウモロコシにおいて19℃と5℃の活性の比較では 78.4% が低温度によって阻害されており、もし低温処理をした小麦でも同じことが起こっているとすればグルタチオンの濃度を一定に保つためには生合成系と分解系のバランスが大切であると考えられる。しかし NADPH が glucose-6-phosphate dehydrogenase 等から十分に供給されるならば比較的弱い GSR 活性でも DHA の還元で消費された GSSG を還元できるとも考えられる。

④ Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

G6PDH はペントースリン酸経路の最初の酵素としてよく知られており、glucose-6-phosphate (G6P) と NADP^+ から 6-phosphogluconolactone と NADPH を生成するが、過酸化物除去に必要な NADPH の供給源として大切である(42)。G6P は hexokinase から供給されるが、G6PDH と hexokinase はともに冬季期間活性が高まり(11,33)、協調的活性調節を受けているように見受けられる。

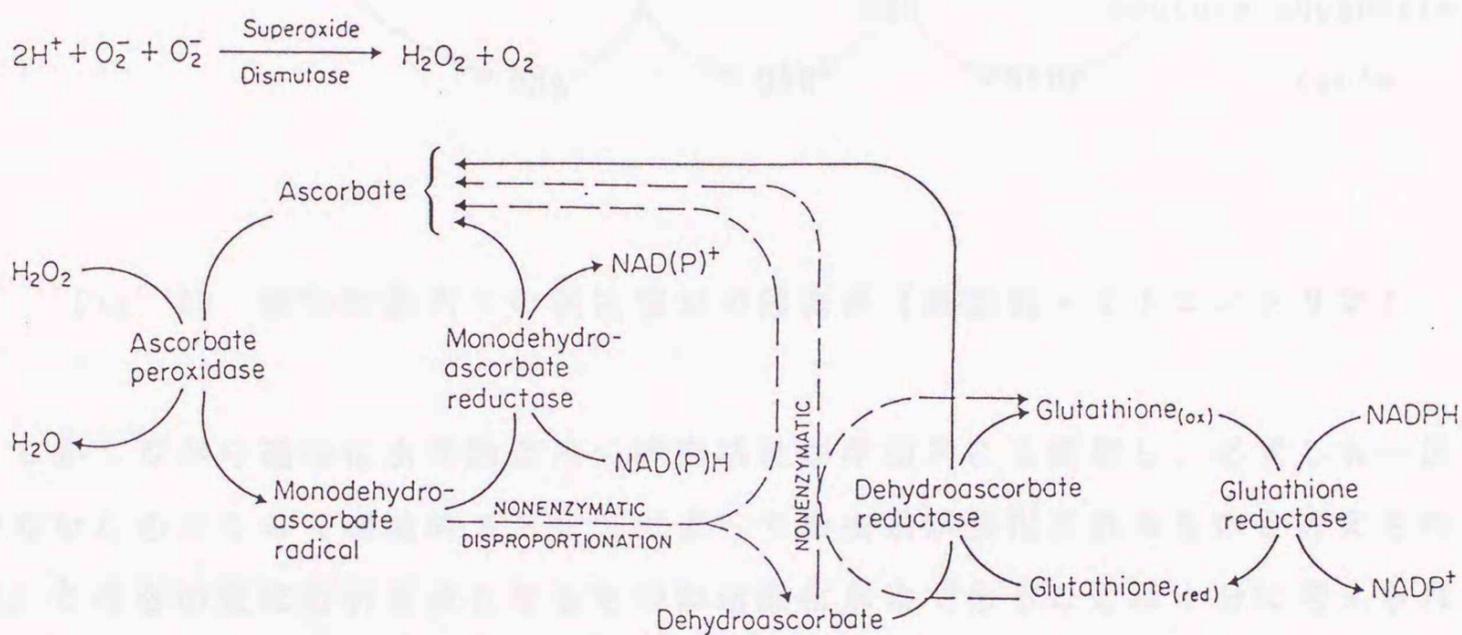
⑤ その他の過酸化物除去系

その他細胞内で過酸化物の除去に関与している酵素として glutathione-S-transferase(123)、セルロプラスミン(124)などが知られている。

7-2-2 細胞中の活性酸素除去機構

現時点で考えられている植物細胞中の活性酸素除去機構について以下のような流れが考えられている(Figs.25,26)。

Chloroplast



The superoxide and hydrogen peroxide scavenging system of the chloroplast. The solid lines indicate enzyme catalysed reactions and the dashed lines indicate non-enzyme catalysed reactions.

L.S. Jahnke, M.R. Hull and S.P. Long, *Plant Cell Environ.*, 14, 97-104 (1991)

Fig. 25 植物細胞内での活性酸素の除去系 (クロロプラスト)

Cytosol-Mitochondria

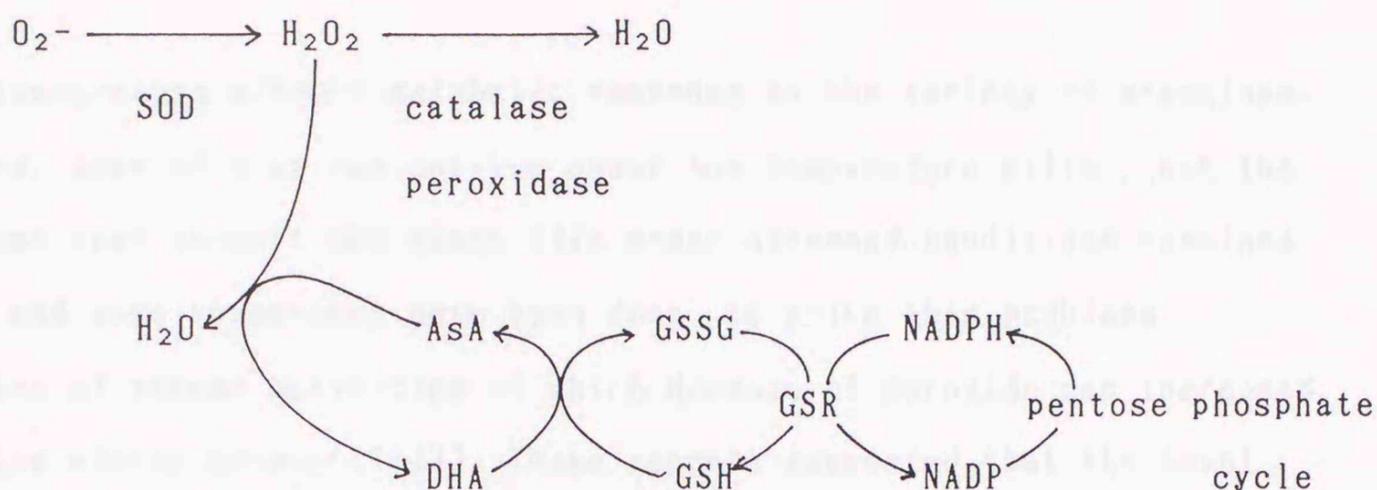


Fig. 26 植物細胞内での活性酸素の除去系（細胞質・ミトコンドリア）

しかしながら過酸化水素除去系の酵素活性が季節的にも変動し、必ずしも一定でないためおそらく環境のストレスによって除去系が強化されるものと考えられる。これらの変化の引き金となるものが過酸化水素であることは十分に考えられるが、その他 glutathione、ascorbate なども関与している可能性がある。

今後、これらのストレスに対する応答について代謝的及び遺伝子のレベルで説明が進むことが期待される。

第 8 章

要約

Cold temperature affects metabolic response to the variety of organisms. In plants, some of them can survive under low temperature milieu, but the mechanisms that support the plant life under stressed conditions remained unclear and some researches have been done to solve this problems.

A series of enzyme activities of which dispose of peroxide was increased during the winter season(11-13). These reports suggested that the level of peroxide in the plant cell increased in winter season or under cold treatment.

In this report, I show the relationship between peroxide formation and cold temperature, and discussed the role of peroxide in cells under the cold temperature.

At second section, the relationship between cold treatment and artificial oxidativetreatment on levels of enzymatic acitivities and substlate in leaves of winterwheat were discussed. Artificial oxidative treatment was attained by the treatment of paraquat or 3-amino-1,2,4-triazole, which affects the activities in the cell compartments of chloroprast and cytosol, respectively. Cold and these chemical treatments increased concurrently the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and levels of sugar phosphates. The levels of ascorbate and glutathione showed different patterns of responses toward these treatments. This result suggests that the response to peroxide is different between cytosol or mitochondria and chloroplast.

Third section showed the evidence of the formation of hydrogen peroxide caused by cold treatment in leaves of winter wheat. The levels of hydrogen peroxide in leaves increased three times ($1.5\mu\text{mol/g}$ fresh weight) of the control by cold treatment in the dark with-in a few min, and then the level

decreased to the normal level within 10-15 min. This increase in the level of hydrogen peroxide was also shown in cotyledon of cucumber, and these high concentrations of hydrogen peroxide might cause oxidation of cellular components.

Fourth section showed the formation of hydrogen peroxide in stems of winter wheat caused by cold treatment. The stem is known to be a non-photosynthetic tissue and the formation of hydrogen peroxide by cold treatment occurred in samples which pre-treated in the dark. This result suggests that the formation of hydrogen peroxide caused by cold treatment may occur as a result of an abrupt retardation of electron flow at electron transport system in mitochondria. The decreasing levels of ascorbate and reduced glutathione and the increasing level of dehydroascorbate occurred simultaneously at the formation of hydrogen peroxide, and these data indicate directly the oxidation of cells caused by cold treatment.

Fifth section showed the formation of methanesulfinic acid (MSA) by cold treatment from dimethyl sulfoxide (DMSO) in stems of winter wheat. MSA is considered as one of reaction products of DMSO and hydroxyl radicals (82). Hydroxyl radical is known as a most reactive radical and may cause disruption of membrane or genetic materials (77-79). This radical is known to be formed from hydrogen peroxide (75,76). In this experiment, the formation of MSA was shown only when the samples were treated at the low temperatures, of critical point and the temperature was corresponded to the limiting temperature for plant survival. These results indicate that to avoid hydroxyl radical formation is one of the important factor devoid of freezing damage.

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始懇篤なご指導、ご助言をいただきました北海道大学低温科学研究所生理学部門教授、匂坂勝之助先生に心より感謝いたします。

本論文を提出するにあたり御助言・御校閲下さりました北海道大学農学部、千葉誠哉教授、水谷純也教授に厚くお礼申し上げます。

また、本研究期間中に暖かいご助言、ご協力を賜りました北海道大学低温科学研究所生理学部門及び動物学部門の皆様と、小麦種子を恵与下さいました農林水産省北海道農業試験場の皆様に厚くお礼申し上げます。

参考文献

1. J. Levitt, *J. Theoret. Biol.*, 3, 335-391(1962)
2. J. Levitt, *Cryobiology*, 1, 312-316(1965)
3. C. Elisabeth, E. Stuiver, L. J. de Kok and P. J. C. Kuiper, *Physiol. Plant.*, 74, 72-76(1988)
4. P. J. C. Kuiper, *Plant Physiol.*, 45, 684-686(1970)
5. N. P. A. Huner, J. P. Williams, E. E. Maissan, E. G. Myscich, M. Krol, A. Laroche and J. Singh, *Plant Physiol*, 89, 144-150(1989)
6. D. R. Duncan and J. M. Widholm, *Plant Physiol.*, 83, 703-708(1987)
7. D. R. Duncan and J. M. Widholm, *Plant Physiol.*, 95, 1284-1287(1991)
8. J. Goldstein, N. S. Pollitt and M. Inoue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 283-287(1990)
9. C. L. Guy and D. Haskell, *Plant Physiol.*, 84, 872-878(1987)
10. M. Perras and F. Sarhan, *Plant Physiol.*, 89, 577-585(1989)
11. S. Sagisaka, *Plant Physiol.*, 54, 544-549(1974)
12. S. Nakagawara and S. Sagisaka, *Plant Cell Physiol.*, 25, 899-906(1984)
13. H. Esterbauer and D. Grill, *Plant Physiol.*, 61, 119-121(1978)
14. C. L. Guy and J. V. Carter, *Cryobiology*, 21, 454-464(1984)
15. J. A. Anderson, B. I. Chevone and J. L. Hess, *Plant Physiol.*, 98, 501-508(1992)
16. C. J. Weiser, *Science*, 169, 1269-1278(1970)
17. C. L. Guy, K. J. Niemi and R. Brambl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3673-3677(1985)
18. M. Hahn and V. Walbot, *Plant Physiol.*, 91, 930-938(1989)
19. S. S. Mohapatra, R. J. Poole and R. S. Dhindsa, *Plant Physiol.*, 84, 1172-1176(1987)
20. S. S. Mohapatra, R. J. Poole and R. S. Dhindsa, *J. Exp. Bot.*, 38, 1697-1703(1987)
21. S. S. Mohapatra, R. J. Poole and R. S. Dhindsa, *Plant Physiol.*, 87, 468-473(1988)
22. S. S. Mohapatra, L. Wolfraim, R. J. Poole and R. S. Dhindsa, *Plant Physiol.*, 89, 375-380(1989)
23. W. Orr, B. Iu, T. C. White, L. S. Robert and J. Singh, *Plant Physiol.*, 98, 1532-1534(1992)
24. C. Lin and M. F. Thomashow, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 183, 1103-1108(1992)
25. M. Asada, Y. H. Ann and S. Sagisaka, *Plant Cell Physiol.*, 29, 243-246(1988)
26. S. Sagisaka, M. Asada and H. Kuroda, *Plant Cell Physiol.*, 30, 79-84(1989)

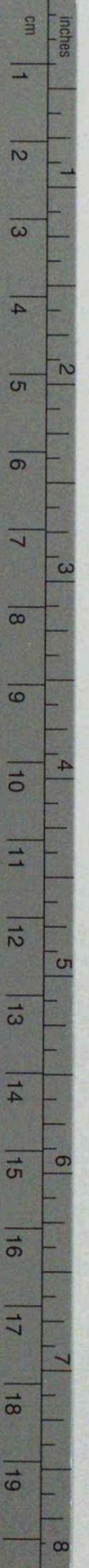
27. S. Sagisaka, M. Asada and Y. H. Ahn, *Trees*, 4, 120-127(1990)
28. S. M. Kao and H. M. Hossain, *J. Biol. Chem.*, 260, 10478-10481(1985)
29. M. F. Christman, R. W. Morgan, F. S. Jacobson and B. N. Ames, *Cell*, 41, 753-762(1985)
30. E. J. Kendall and B. D. McKersie, *Physiol. Plant.*, 76, 86-94(1989)
31. B. Halliwell and C. H. Foyer, *Planta*, 139, 9-17(1978)
32. S. Sagisaka, *Plant Cell Physiol.*, 22, 1287-1292(1981)
33. H. Kuroda, S. Sagisaka and K. Chiba, *J. Jpn. Hort. Soc. Hort. Sci.*, 59, 399-408(1990)
34. H. Kuroda, S. Sagisaka and K. Chiba, *J. Jpn. Hort. Soc. Hort. Sci.*, 59, 409-416(1990)
35. S. Sagisaka, Y. Matsuda, T. Okuda and S. Ozeki, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37, 543-550(1991)
36. C. H. Foyer and B. Halliwell, *Planta*, 133, 21-25(1976)
37. M. Y. Law, S. A. Charles and B. Halliwell, *Biochem. J.*, 210, 899-903(1983)
38. L. S. Jahnke, M. R. Hull and S. P. Long, *Plant Cell Environ.*, 14, 97-104(1991)
39. T. Okuda, Y. Matsuda, A. Yamanaka and S. Sagisaka, *Plant Physiol.*, 97, 1265-1267(1992)
40. H. Kuroda and S. Sagisaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 712-715(1992)
41. S. Sagisaka, *Plant Physiol.*, 57, 308-309(1976)
42. S. Sagisaka, *Plant Cell Physiol.*, 27, 1209-1212(1986)
43. S. Sagisaka, *Plant Cell Physiol.*, 26, 1135-1145(1985)
44. K. Asada, K. Kiso and K. Yoshikawa, *J. Biol. Chem.*, 249, 2175-2181(1974)
45. M. A. Hossain, Y. Nakano and K. Asada, *Plant Cell Physiol.*, 25, 385-395(1984)
46. M. A. Hossain and K. Asada, *Plant Cell Physiol.*, 25, 1285-1295(1984)
47. C. F. Babbs, J. A. Pham and R. C. Coolbaugh, *Plant Physiol.*, 90, 1267-1270(1989)
48. P. Nicollis, *Biochim. Biophys. Acta*, 59, 414-420(1962)
49. G. Cohen and N. L. Somerson, *J. Bacteriol.*, 98, 543-546(1969)
50. H. Hollander and N. Amrhein, *Plant Physiol.*, 66, 823-829(1980)
51. P. B. Goldsbrough, E. M. Hatch, B. Huang, W. G. Kosinski, W. E. Dyer, K. M. Herrmann and S. C. Weller, *Plant Sci.*, 72, 53-62(1990)
52. N. Arakawa, K. Tsutsumi, N. G. Sanceda, T. Kurata and C. Inagaki, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1289-1290(1981)
53. O. W. Griffith, *Anal. Biochem.*, 106, 207-212(1980)
54. H. Luck, in "Methods of Enzymatic Analysis", ed by H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie

- Weinheim, 1965, pp 885-888
55. L.B. Clerch and D. Massaro, *J. Biol. Chem.*, 267, 2853-2855 (1992)
 56. M. Nishikimi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 463-468 (1975)
 57. O. Arrigoni, S. Dipierro and G. Borracino, *FEBS Lett.*, 125, 242-244 (1981)
 58. G. Borracino, S. Dipierro and O. Arrigoni, *Planta*, 167, 521-526 (1986)
 59. M.A. Hossain and K. Asada, *Plant Cell Physiol.*, 25, 85-92 (1984)
 60. P.P. Jablonski and J.W. Anderson, *Plant Physiol.*, 67, 1239-1244 (1981)
 61. C.O.P. Patterson and J. Myers, *Plant Physiol.*, 51, 104-109 (1973)
 62. J.M. Robinson and M. Gibbs, *Plant Physiol.*, 70, 1249-1254 (1982)
 63. R.R. Wise and A.W. Naylor, *Plant Physiol.*, 83, 272-277 (1987)
 64. R.R. Wise and A.W. Naylor, *Plant Physiol.*, 83, 278-282 (1987)
 65. S. Puntarulo, R.A. Sanchez and A. Boveris, *Plant Physiol.*, 86, 626-630 (1988)
 66. T.T. Ngo and H.M. Lenhoff, *Anal. Biochem.*, 105, 389-397 (1980)
 67. M. Mader, P. Schloss, and V. Amberg-fisher, *Plant Sci. Lett.*, 23, 63-69 (1981)
 68. A. Abo and E. Pick, *J. Biol. Chem.*, 266, 23577-23585 (1991)
 69. A. Boveris, *Methods in Enzymol.*, 105, 429-435 (1984)
 70. E.C. Slater, *Methods in Enzymol.*, 10, 48-57 (1967)
 71. K. Bogucka and L. Wojtczak, *Biochim. Biophys. Acta*, 122, 381-392 (1966)
 72. R.A. Goldsby and P.G. Heysler, *Biochem.*, 2, 1142-1147 (1963)
 73. K. Imai, A. Asano, and R. Sato, *Biochim. Biophys. Acta*, 143, 462-476 (1967)
 74. T. Okuda, Y. Matsuda, M. Sugawara, and S. Sagisaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1911-1915 (1992)
 75. F. Haber and J. Weiss, *Proc. Roy. Soc.*, A147, 332 (1974)
 76. C. Walling, *Acc. Chem. Res.*, 8, 125-131 (1975)
 77. G. Cohen, *Photochem. Photobiol.*, 28, 669-675 (1978)
 78. K.J.A. Davies, *J. Biol. Chem.*, 262, 9985-9901 (1987)
 79. K.J.A. Davies, M.E. Delsignore and S.W. Lin, *J. Biol. Chem.*, 262, 9902-9907 (1987)
 80. J. Yuan, K. Cline and S.M. Theg, *Plant Physiol.*, 95, 1259-1264 (1991)
 81. A.I. Cederbaum, E. Dicker, E. Rubin and G. Cohen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78, 1254-1262 (1977)

82. C.F. Babbs and M.J. Gale, *Anal. Biochem.*, 163, 67-73(1987)
83. 八木国夫、中野稔 監修, 活性酸素, 医歯薬出版(1988)
84. J.T. Greenberg, P.A. Monach, J.H. Chou, P.D. Josephy and B. Demple, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6181-6185(1990)
85. I.R. Tszneva and B. Weiss, *J. Bacteriol.*, 172, 4197-4205(1990)
86. H.E. Richter and P.C. Loewen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 100, 1039-1046(1981)
87. J.T. Greenberg and B. Demple, *EMBO J.*, 7, 2611-2617(1988)
88. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, *FEBS Lett.*, 128, 347-352(1981)
89. R. Cathcart, E. Schwiers, R.L. Soul and B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5633-5637 (1984)
90. J.M. Robinson, *Physiol. Plant.*, 72, 666-680(1988)
91. A. Boveris and B. Chance, *Biochem. J.*, 134, 707-716(1973)
92. A. Boveris and E. Cadenas, *FEBS Lett.*, 54, 311-314(1975)
93. P.R. Rich, A. Boveris, W.D. Bonner Jr. and A.L. Moore, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 695-703(1976)
94. A. Boveris, R.A. Sanchez and M. Beconi, *FEBS Lett.*, 92, 333-338(1978)
95. G.R. Schonbaum, W.D. Bonner Jr., B.T. Storey and J.T. Bahr, *Plant Physiol.*, 47, 124-128 (1971)
96. P.R. Rich and W.D. Bonner Jr., *Arch. Biochem. Biophys.*, 188, 206-213(1978)
97. S. Huq and J.M. Palmer, *Plant Sci. Lett.*, 11, 351-358(1978)
98. H. Lambers, *Plant Cell Environ.*, 3, 293-302(1982)
99. J.M. Palmer, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 27, 133-157(1976)
100. A. Ordentlich, R.A. Linzer and I. Raskin, *Plant Physiol.*, 97, 1545-1550(1991)
101. B. Gerhard, *Planta*, 61, 101-129(1964)
102. B. Halliwell, *New Phytol.*, 73, 1075-1086(1974)
103. G. Groden and E. Beck, *Biochim Biophys. Acta*, 546, 426-435(1979)
104. I. Cakmak and H. Marschner, *Plant Physiol.*, 98, 1222-1227(1992)
105. J.V. Anderson, B.I. Chevone and J.L. Hess, *Plant Physiol.*, 98, 501-508(1992)
106. A. Polle, K. Chakrabarti, W. Schurmann and H. Rennenberg, *Plant Physiol.*, 94, 312-319 (1990)

107. N.E. Tolbert, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 22, 45-73 (1971)
108. Y. Nakano and K. Asada, *Plant Cell Physiol.*, 22, 867-880 (1981)
109. J.E. Packer, T.F. Slater and R.L. Willson, *Nature*, 278, 737-738 (1979)
110. B. Chance and A.C. Maehly, *Methods in Enzymol.*, 2, 764-791 (1955)
111. F. Beaumont, H.M. Jouve, J. Gagnon, J. Gaillard and J. Pelmont, *Plant Sci.*, 72, 19-26 (1990)
112. B. Chance, H. Sies and A. Boveris, *Physiol. Rev.*, 59, 527-605 (1979)
113. R. Radi, J.F. Turrens, L.Y. Chang, K.M. Bush, J.D. Crapo and B.A. Freeman, *J. Biol. Chem.*, 266, 22028-22034 (1991)
114. M.G. Redinbaugh, M. Sabre and J.G. Scandalios, *Plant Physiol.*, 92, 375-380 (1990)
115. G.J. Wadsworth and J.G. Scandalios, *Dev. Genet.*, 10, 304-310 (1989)
116. R.W. Skadsen and J.G. Scandalios, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2785-2789 (1985)
117. R. Nicholls and G.R. Schonbaum, *The Enzyme*, ed. by P.B. Boyer, H. Lardy and K. Myback, vol. 8, Acad. Press, New York, pp147-225 (1963)
118. P.C. Loewen, B.L. Triggs, C.S. George and B. Hrabarchuk, *J. Bacteriol.*, 162, 661-667 (1985)
119. D. Groden and E. Beck, *Biocim. Biophys. Acta*, 546, 466-435 (1979)
120. L.W. Mapson, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 9, 119-150 (1958)
121. M. Yamaguchi and M.A. Joslyn, *Arch. Biochem. Biophys.*, 38, 451-465 (1977)
122. C.H. Foyer and B. Halliwell, *Phytochemistry*, 16, 1347-1350 (1977)
123. R.F. Burk and J.M. Lane, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 50, 467-478 (1979)
124. I.M. Goldstein, *J. Biol. Chem.*, 254, 4040-4045 (1979)





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

