C₃, C₄ と CAM 植物における過酸化水素含量と抗酸化酵素活性の差異

李 進才¹・趙 習コウ²・松井鑄一郎^{2*}

¹ 岐阜大学連合農学研究科 501-1193 岐阜市柳戸 1-1

² 岐阜大学農学部 501-1193 岐阜市柳戸 1-1

Hydrogen Peroxide Contents and Activities of Antioxidative Enzymes among C₃, C₄ and CAM Plants

Jincai Li¹, Xiheng Zhao² and Shuichiro Matsui²

¹ The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Yanagido 1-1, Gifu 501-1193

² Faculty of Agriculture, Gifu University, Yanagido 1-1, Gifu 501-1193

Summary

Leaves of nine, seven and nine species, respectively, of C₃, C₄ and CAM plants, under usual growing conditions, were collected to determine H₂O₂ content and the activities of oxygen-scavenging enzymes.

H₂O₂ content in leaves of C₄ plants was similar to that of C₃ plants, whereas that of CAM plants was higher. The superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) activities were higher in C₃ plants compared to those of CAM plants. C₄ plants exhibited higher APX but lower CAT activities than C₃ plants; however, both activities were higher than those of CAM plants. Our findings indicate that oxygen-scavenging systems in plants, such as those involving H₂O₂, differ from their photosynthetic capacities.

Key Words: antioxidative enzyme, C₃, C₄, CAM, hydrogen peroxide.

緒 言

植物の光合成制御メカニズムは複雑であるが、光合成代謝系は C₃, C₄ および CAM 光合型に分けられる。C₄, CAM 植物は C₃ 植物から多元的に進化してきたものと推論されている (鮫島・上野, 1992)。クロロプラストでの光合成において、光エネルギーは H₂O を O₂, H⁺ および e⁻ に分解し、生じた e⁻ は、通常電子伝達系を経て最終的に CO₂ を還元する。しかし、水不足、高温、強光などによって気孔が閉鎖し、吸収された光エネルギーが CO₂ の供給を上回ったり、NADP⁺ の供給が低下すると、過剰となった e⁻ は O₂ を還元し、スーパーオキシド (O₂⁻) や過酸化水素 (H₂O₂) などの活性酸素を生成する (Asada, 1999; 宮尾・水澤, 1999; Powles, 1984)。ペルオキシソームにおける光呼吸も H₂O₂ を生じる。細胞内で有毒な活性酸素濃度が高いと、光合成の光阻害 (Powles, 1984)、膜脂質や DNA の損傷 (浅田, 1990)、Calvin サイクルを構成する酵素の失活 (Asada・Takahashi, 1987) およびクロロプラストの破壊や減少 (李ら, 2001; 田中, 2000) など

が起こる。植物細胞内の活性酸素の生成は環境ストレスによって助長され、環境ストレスによる障害や細胞死は活性酸素によってもたらされる (Holmberg・Bulow, 1998; Lamb・Dixon, 1997)。

一方、常に植物は生長に伴い不適当な環境ストレスにさらされているが、活性酸素から光障害を防御する機構も進化過程で獲得した。これにはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)、カタラーゼ (CAT) などの活性酸素の消去系、water-water サイクル、xanthophyll サイクルなどがある (浅田, 1990; Asada, 1999; Demmig ら, 1987; Halliwell, 1974; Salin, 1988)。光呼吸も光障害を回避する防御機構の一つとされる (宮尾・水澤, 1999)。生態的、形態的特徴や組織構造なども光障害に関与している (林, 2000)。細胞内で生成した活性酸素が生体防御、生合成反応、細胞分裂およびアポトーシスのシグナルなどの生体制御にも関与していることが明らかになってきた (浅田, 1990; Hirt, 2000)。

CAM 植物 *Cattleya* と C₃ 植物 *Cymbidium* の成株を温度や光条件を変えて栽培し、葉中の抗酸化物質や抗酸化酵素活性を比較した結果、両植物間でこれら酵素のみならず、抗酸化機能を持つアスコルビン酸含量なども異なる

2000年11月24日 受付。2001年4月2日 受理。

*Corresponding author.

本報告の一部は園芸学会平成12年度秋季大会において発表した。

ことが明らかとなった (Li ら, 2001; 李・松井, 2001; 李 ら, 2001). C_3 と C_4 植物の間で強光に対する xanthophyll サイクル (Brugnoli ら, 1998), 紫外線に対する感受性 (Basiouny ら, 1978) などが異なると報告されている. また, 異なる光合成型の植物間ではクロロフィル a/b, 最大光合成速度, 光呼吸, 光飽和点および CO_2 補償点などの相違が知られている (鮫島・上野, 1992).

このように C_3 , C_4 および CAM 植物間では, 活性酸素の生成とその消去機能が異なると考えられる. 光合成型の異なる植物について, 通常の生育環境での葉中の H_2O_2 含量および抗酸化酵素の SOD, APX, CAT 活性を分析し, 活性酸素とその消去酵素の光合成型との関連につい

て検討を加えた.

材料および方法

本実験では, ラン科植物を含めて通常の栽培条件で生育した C_3 植物 9 種, C_4 植物 7 種および CAM 植物 9 種を供試した (第 1 表). 6 月中旬, 晴天日の午前 10 時から各植物の新鮮葉を採取し, 細断後, 1 g ずつ秤量して液体窒素で凍結し, $-20^\circ C$ に貯蔵した. 凍結試料について H_2O_2 含量および SOD, APX, CAT 活性を測定した. H_2O_2 含量の測定は Okuda ら (1991) の方法に準じた. 葉を 0.2 N $HClO_4$ ml で磨砕後, 磨砕物を $13,200 \times g$, 8 分間遠心分離し, 上澄液を 4N KOH で pH7.5 に調節して 1,000

Table 1. Plant materials.

Plant name	Growing circumstance		
	Shading (%)	Temperature ($^\circ C$)	Place
C_3 plants			
Monocotyledon			
1 <i>Bletilla striata</i> (Orchidaceae)	-	15~32	Outside
2 <i>Cymbidium Sazanami</i> (Orchidaceae)	60	15~30	Vinyl house
3 <i>Lilium longiflorum</i> (Liliaceae)	20	15~32	Outside
4 <i>Lycaste cruenta</i> (Orchidaceae)	70	15~28	Glass house
5 <i>Oncidium Gower Ramsey</i> (Orchidaceae)	60	15~30	Vinyl house
6 <i>Paphiopedilum Robin Hood</i> (Orchidaceae)	70	15~28	Glass house
7 <i>Vriesea carinata</i> (Bromeliaceae)	70	15~28	Glass house
Dicotyledon			
8 <i>Cucumis sativus</i> (Cucurbitaceae)	30	15~31	Vinyl house
9 <i>Gibasis sp.</i> (Crassulaceae)	70	15~28	Glass house
C_4 plants			
Monocotyledon			
1 <i>Commelina communis</i> (Commelinaceae)	-	15~32	Outside
2 <i>Digitaria ciliaris</i> (Gramineae)	-	15~32	Outside
3 <i>Panicum crus-galli</i> (Gramineae)	-	15~32	Outside
4 <i>Zea mays</i> (Gramineae)	-	15~32	Outside
Dicotyledon			
5 <i>Amaranthus caudatus</i> (Amaranthaceae)	-	15~32	Outside
6 <i>Gomphrena globosa</i> (Amaranthaceae)	-	15~32	Outside
7 <i>Portulaca grandiflora</i> (Portulacaceae)	60	15~30	Vinyl house
CAM plants			
Monocotyledon			
1 <i>Gasteria sp.</i> (Liliaceae)	30	15~31	Vinyl house
2 <i>Oncidium ampliatum</i> (Orchidaceae)	70	15~28	Glass house
3 <i>Phalaenopsis mariae</i> (Orchidaceae)	70	15~28	Glass house
4 <i>Rhoeo discolor</i> (Commelinaceae)	70	15~28	Glass house
5 <i>Rhyncostylis gigantea</i> (Orchidaceae)	70	15~28	Glass house
6 <i>Sansevieria trifasciata</i> (Liliaceae)	70	15~28	Glass house
7 <i>Sophrrolaeliocattleya Estella Jewel</i> (Orchidaceae)	60	15~30	Vinyl house
8 <i>Tillandsia sp.</i> (Bromeliaceae)	70	15~28	Glass house
Dicotyledon			
9 <i>Kalanchoe tomentosa</i> (Crassulaceae)	30	15~31	Vinyl house

× g, 5分間再遠心分離した. その上澄液を 4ml AG-1 カラム (1.0 cm i.d. × 4 cm, Bio-Rod) に通し, カラムを蒸留水で洗浄後, 通過液 1.5 ml に 12.5 mM 3-ジメチルアミノ安息香酸 0.6 ml, 0.5 mM 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩水和物 120 μl と 0.25 units のペルオキシダーゼ 30 μl を加え, 590 nm における吸光度を測定した. SOD, APX, CAT の抽出と活性の測定には既報 (李・松井, 2001) の方法を用いた.

結 果

植物種別の葉中の H_2O_2 含量を比較すると, C_3 と C_4 植物の H_2O_2 含量はほぼ $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ であったのに対し, CAM 植物では $3.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ と多かった (第 1 図). しかし, C_3 植物の中にも *Vriesea carinata* のように, CAM 植物の平均値を上回る高いものが存在する一方, CAM 植物の *Gasteria sp.* と *Phalaenopsis mariae* は C_3 や C_4 植物の平均値より低い同等であった.

C_3 , C_4 と CAM 植物の葉中の SOD 活性について, C_3 と C_4 植物の平均値は $100 \text{ units} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 程度と同等であるのに対し, CAM 植物の平均値は $43 \text{ units} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ とかなり低かった. C_4 植物でも葉の厚い *Portulaca grandiflora* は例外的に低かった (第 2 図). APX 活性は C_4 , C_3 , CAM 植物の順で高く, それぞれの平均値は 17.2, 9.0, $2.1 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ であった. C_3 植物の *Cucumis sativus* と *Cymbidium Sazanami* は C_4 植物の平均的な活性と同等かそれ以上であった. CAT 活性は C_3 植物が平均値で $2.7 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ と高く, C_4 と CAM 植物はそれぞれ 0.8 と $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ を示し, 低かった.

考 察

植物細胞内の H_2O_2 はクロロプラスト, ミトコンドリアおよびサイトゾルにおいて SOD により O_2^- から生成するほか, ペルオキシソームでも光呼吸により生成する (芦原, 1991; Azevedo ら, 1998; Halliwell, 1974; Ka-

nematsu・Asada, 1990; Salin, 1988). C_3 植物は C_4 植物に比べ最大光合成能力や光飽和点が低く, 光呼吸が高い (鮫島・上野, 1992) ため, 強光などのストレスで, CO_2 固定に利用されない光エネルギーが多くの O_2^- や H_2O_2 を生成し (Asada, 1999; Powles, 1984), 光呼吸による H_2O_2 の生成もまた大である (芦原, 1991). 葉の柵状細胞では過剰な光エネルギーによる余剰の e^- が生じやすい (林, 2000). 本実験では海綿状細胞が少ない *Vriesea carinata* を除くと C_3 植物の H_2O_2 含量は C_4 植物に比べ高くなかった. この結果は各植物の生育条件が適当で光エネルギーは過剰でなく, 光呼吸も光障害の回避に役立っていた (宮尾・水澤, 1999) と考えられる. CAM 植物は日中, 気孔を閉じているが, 夜間に蓄積したリンゴ酸の分解により CO_2 の供給を受けて光合成を行うため, 葉内の CO_2 濃度が高く, 過剰な還元力の蓄積を避けながら光障害を回避している (野瀬, 1996; 上野, 1999). また, 細胞内のリブローズ 1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼは O_2 と接する機会が極めて少ないため, 光呼吸はほとんど検出されず (芦原, 1991), 発達した表皮細胞も強光から葉肉細胞のクロロプラストをより有効に保護している. 従って, CAM 植物は C_3 と C_4 植物に比べクロロプラストにおける過剰な還元力による O_2^- の生成が少なく, 低い SOD 活性でこれを消去でき, O_2^- からの H_2O_2 生成および光呼吸による H_2O_2 生成とも C_3 植物より少ないと考えられる. しかし, CAM 植物は最も高い H_2O_2 レベルを示した. この要因は, 細胞内の H_2O_2 含量がその生成と分解量に支配され, CAM 植物の SOD, APX および CAT 活性がそれぞれ C_3 植物の 42, 24 および 11% であり, 分解側の酵素活性が著しく低いためであると考えられる. また, クロロフィル含量が少なく, 葉が多肉棒状である *Gasteria sp.*, および茎が短く, 平たい葉が重なる *Phalaenopsis mariae* は, C_3 や C_4 植物の平均値より低い同等の H_2O_2 含量であった. 植物においては, クロロフィル含量と形態的特徴は光エネルギーの吸収を, 組織構造は CO_2 の拡散抵抗を通して (林, 2000) 活

Fig. 1. Content of hydrogen peroxide (H_2O_2) in leaves of C_3 (□), C_4 (▨) and CAM (■) plants. Vertical bars indicate SE (n=4). Dotted lines denote the average values. Number of horizontal axis assignments to the plants in Table 1.

Fig. 2. Activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in leaves of C₃ (□), C₄ (▨) and CAM (■) plants. AsA: ascorbic acid. Vertical bars indicate SE (n=4). Dotted lines in the figures indicate averages. Number of horizontal axis assignments to the plants in Table 1.

性酸素の発生に関与すると考えられる。

H₂O₂の消去には、過剰な光エネルギーの障害から防御する water-water サイクルの重要な酵素の一つである APX によりアスコルビン酸を酸化する系がある (Asada, 1999; Azevedo ら, 1998; Salin, 1988). 本実験では、APX 活性は高い順に C₄, C₃, CAM 植物であった。また、生育の速い *Cucumis sativus* は C₃ 植物でも APX 活性が高く、多肉で生育の遅い *Portulaca grandiflora* は C₄ 植物でもその活性が低かった。APX はクロロプラストに主に存在し (Nakano・Asada, 1981), *Cattleya* や *Cymbidium* ではクロロフィル含量と高い相関がみられ、後者で活性が高かった (李ら, 2001). クロロプラストでは、定常状態下で H₂O₂ は SOD により 240 μmol·sec⁻¹ の速度で生成するが、10 μmol の H₂O₂ が存在すると、Calvin サイクルのフラクトース-1,6-ビスリン酸ホスファターゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホリブロキナーゼが失活し、CO₂ 固定能力は

50% 失われる (Asada・Takahashi, 1987; Kaiser, 1976). また、APX 形質転換タバコでは高い APX 活性が保持されるとき、高温、強光と乾燥による活性酸素の光障害指標であるクロロフィル蛍光の減少は少なく、障害も軽減されると報告されている (田中, 2000). 従って、光合成能力が高い C₄ 植物の APX は H₂O₂ を効率的に消去するが、低い APX 活性の CAM 植物は H₂O₂ が多く残存し、H₂O₂ 量が光合成能力の制御に関係しているものと考えられる。

CAT はペルオキシソームに多量に局在し、H₂O₂ を速やかに H₂O と O₂ に分解する酵素である (Azevedo ら, 1998; Salin, 1988). C₃ 植物のヒマワリ (Eising ら, 1998) ではペルオキシソームの CAT は光により容易に不活性化し、*Cymbidium* (李ら, 2001) では葉の CAT 活性は強光により低下すると報告されている。しかし、C₄ 植物のトウモロコシ (Scandalios, 1994) では CAT アイソザイムの一つは光依存性の生成を示し、CAM 植物の

Cattleya(李ら, 2001)では強光下のCAT活性は増加あるいは回復する結果が得られている. 本実験では, 光呼吸が極めて少ないC₄とCAM植物はC₃植物より低いCAT活性を示した. 光呼吸は光障害を回避する防御機構とされ(宮尾・水澤, 1999), その副産物のH₂O₂を効率的に消去するため, C₃植物は高いCAT活性を維持する必要があると考えられる. 一方, C₄とCAM植物の低いCAT活性は光呼吸に伴い生じるH₂O₂が少ないためと考えられる.

SODの活性化は細胞におけるO₂⁻の増加の指標とされ(Fridovich, 1986), *Cattleya*や*Cymbidium*において, 温度や光のストレスでSODを含む抗酸化酵素活性の変化は種によって大きく異なる(李・松井, 2001; 李ら, 2001). 従って, SOD活性は植物種の特色や栽培環境の指標となる. ランのみならず, 他の園芸植物でもこのような観点から栽培条件の評価にSOD活性を利用できる可能性がある. 一方, H₂O₂は光合成能力を支配している可能性があり, その制御によりCAM植物の生長を促進することも検討していきたい.

摘 要

通常の生育条件下のC₃植物9種, C₄植物7種とCAM植物9種について, 晴天日の午前中に葉をサンプリングし, H₂O₂含量および抗酸化酵素のSOD, APXとCAT活性を調べた. その結果, C₃とC₄植物の葉中のH₂O₂含量は同レベルで, CAM植物より少なかった. C₃植物ではSOD, APXおよびCATともに高い活性を示したのに対し, CAM植物ではいずれの酵素ともに低い活性を示した. C₄植物はC₃植物より高いAPX活性と低いCAT活性を示した. これらのことから, 植物は光合成型によってH₂O₂などの活性酸素の酵素的な消去機能を異にすることが明らかになった.

引用文献

- 浅田浩二. 1990. 活性酸素種の生理作用. p.133-145. 日本化学会編. 活性酸素種の化学(季刊化学総説No.7). 学会出版センター. 東京.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
- Asada, K. and M. Takahashi. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. p. 227-287. In: D. J. Kyie, C. B. Osmond and C. J. Arntzen (eds.). *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam.
- 芦原 坦. 1991. 炭素の固定とその生成物のゆくえ — 炭素代謝 —. p.18-69. 太田次郎・石原勝敏・黒岩澄雄・清水碩・高橋景一・三浦謹一郎編. 基礎生物学講座5. 植物の生理. 朝倉書店. 東京.
- Azevedo, R. A., R. M. Alas, R. J. Smith and P. J. Lea. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104: 280-292.
- Basouny, F. M., T. K. Van and R. H. Biggs. 1978. Some morphological and biochemical characteristics of C₃ and C₄ plants irradiated with UV-B. *Physiol. Plant.* 42: 29-32.
- Brunoli, E., A. Scartazza, M. C. D. Tullio, M. C. Monteverdi, M. Lauteri and A. Augusti. 1998. Zeaxanthin and non-photochemical quenching in sun and shade leaves of C₃ and C₄ plants. *Physiol. Plant.* 104: 727-734.
- Demmig, B., K. Winter, A. Krüger and F. C. Czygan. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiol.* 84: 218-224.
- Eising, R., M. Hinze, S. Kleff and K. Tenberge. 1998. Subcellular distribution and photooxidation of catalase in sunflower. p. 53-62. In: G. Noga and M. Schmitz (eds.). *Antioxidants in higher plants*. Shaker Verlag. Aachen.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11.
- Hakam, N. and J. P. Simon. 1996. Effect of low temperatures on the activity of oxygen-scavenging enzymes in two populations of the C₄ grass *Echinochloa crus-galli*. *Physiol. Plant.* 97: 209-216.
- Halliwell, B. 1974. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. *New Phytol.* 73: 1075-1086.
- 林 孝洋. 2000. 葉の構造変化と強光適応 — 陰生植物の葉焼けと活性酸素 —. 園学雑. 69(別2): 90-91.
- Hirt, H. 2000. Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2405-2407.
- Holmberg, N. and L. Bulow. 1998. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci.* 3: 61-66.
- Jahnke, L. S., M. R. Hull and S. P. Long. 1991. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Environ.* 14: 97-104.
- Kaiser, W. 1976. The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 440: 476-482.
- Kanematsu, S. and K. Asada. 1990. Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horse-

- tail. *Plant Cell Physiol.* 31: 99-112.
- Lamb, C. and R. A. Dixon. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol Biol.* 48: 251-275.
- Li, J., S. Matsui and S. Onwona-Agyeman. 2001. Effects of cultural temperatures on antioxidant levels in leaves of *Cattleya* and *Cymbidium*. *Environ. Control in Biol.* 39: 1-7.
- 李 進才・松井鑄一郎. 2001. 低温処理が *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性に及ぼす影響. *園学雑.* 70: 360-365.
- 李 進才・趙 習コウ・松井鑄一郎. 2001. 光ストレスおよび遮光栽培における *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性および色素含量の変化. *園学雑.* 70: 372-379.
- 宮尾(徳富)光恵・水澤直樹. 1999. 強光環境から身を守る植物の防御機構. *化学と生物.* 37: 396-400.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- 野瀬昭博. 1996. CAM 型光合成の進化的側面. *生環調.* 34: 97-104.
- Okuda, T., Y. Matuda, A. Yamanaka and S. Sagisaka. 1991. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97: 1265-1267.
- Powles, S. B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 15-44.
- Salin, M. L. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72: 681-689.
- 鮫島宗明・上野 集. 1992. 光呼吸, C_4 光合成, CAM. p.98-124. 宮地重遠編. 現代植物生理 1. 光合成. 朝倉書店. 東京.
- Scandalios, J. G. 1994. Regulation and properties of plant catalases. p. 276-315. In: C. H. Foyer and P. M. Mullineaux (eds.). Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press. Boca Raton.
- 田中國介. 2000. 活性酸素消去系遺伝子の発現と作物の環境ストレス耐性. *園学雑.* 69(別 2): 92-93.
- 上野 修. 1999. 環境への適応からみた植物光合成代謝系の多様性と進化. *化学と生物.* 37: 464-470.