

亜硝酸法によるスーパーオキシドの簡便定量法

李 進才・前澤重禮*・中野浩平

岐阜大学農学部 501-1193 岐阜市柳戸1-1

Determination of Superoxide by Nitrite ion Method

Jincai Li, Shigenori Maezawa* and Kohei Nakano

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

Summary

In the present study, we investigated the spectrophotometrical method to quantitate nitrite ion produced from the reaction of hydroxylammonium (NH_2OH) with O_2^- , as a method of measuring the O_2^- level. Sensitivity of the reaction of hydroxylammonium with O_2^- was high and the accuracy and color development were stable. The O_2^- level in some fresh produce containing pigments could easily be determined after elimination of plant pigments in the extracted solution with AG 1-X8 resin. This nitrite ion method would be a convenient technique to determine O_2^- concentration in plant tissues.

キーワード： 亜硝酸法, スーパーオキシド

緒言

植物において、活性酸素は光合成制御、生体防御、組織老化、情報伝達、環境耐性などに関与している。それらの研究を進めるには、活性酸素を正確に検出、定量することが必要であり、さまざまな植物生命現象の解明に重要な意義を有する。スーパーオキシド (O_2^-) は植物細胞内で生じた一次酸素であり、過酸化水素やヒドロキシルラジカルなどを生成する。 O_2^- の定量法には、多くの方法が活用されているが、そのほとんどは検出手法として用いられ、定量としては種々の問題点が指摘されている。すなわち、化学発光法と電子スピン共鳴法は選択性や定量性に難があり、装置も高価であること、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元法は pH の設定などが必要であり、 O_2^- の還元により生成したブルーホルマザンが水不溶性のため、不均一な分散が生じて測定の実現性に乏しいこと、シトクロム C とテトラニトロメタンの還元法は O_2^- 以外の夾雑物質の影響が常に存在すること、およびエピネフリン、亜硫酸および乳酸脱水素酵素-NADH の酸化法は連鎖反応があり、反応系における O_2^- 含量の評価が困難であることなどが指摘されている (戸恒, 1987; 大柳, 1988; 吉川ら, 2000; 受田, 2001)。

亜硝酸法はスーパーオキシドジスムターゼ活性の測定法として用いられ、ヒドロキシルアンモニウムが O_2^- により亜硝酸イオンにまで酸化され ($\text{NH}_2\text{OH} + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$)、スルファニル酸と N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩 (NEDA) を用いて赤紫色を発色させる手法であり、感度が高く、試薬および発色物が安定で、夾雑物の影響が少なく、再現性に優れ、薬品が安価であるという特徴がある (Elstner・Heupel, 1976; Ōyanagui, 1984; 大柳, 1988)。これまでの多くの研究 (McRae・Thompson, 1983; Murphy ら, 1998; Frahy・Schopfer, 2001; Schopfer ら, 2001) では緩衝液中における植物組織などの O_2^- 発生量を測定しているが、組織中の O_2^- 含量を直接定量する方法は確立されていない。そこで、本研究では O_2^- とヒドロキシルアンモニウムとの反応を量的に検討し、亜硝酸法を O_2^- 定量法として確立させるとともに色素を含む植物組織内の O_2^- 定量法について検討した。

材料および方法

1. 試薬

1) 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.8: リン酸二水素カリウム (特級, ナカライテスク) とリン酸水素二ナトリウム七水合物 (特級, ナカライテスク) を蒸留水に溶かして調製した。

2) 50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 pH 10.2: 炭酸ナトリウム (特級, ナカライテスク) と炭酸水素ナトリウム (特

2002年5月7日 受付. 2002年8月30日 受理.
本研究は日本学術振興会科学研究費補助金 (特別研究員奨励費) (No. 01316) の助成によって行われた。

*Corresponding author.

級, ナカライテスク)を蒸留水に溶かして調製した。

3) 4 mM キサンチン: キサンチン (SIGMA CHEMICAL)を 50 mM炭酸ナトリウム緩衝液 pH 10.2に溶かして調製した。

4) 0.0125~0.2 unit・ml⁻¹ キサンチンオキシダーゼ: 使用時に, キサンチンオキシダーゼ (ナカライテスク)を蒸留水に溶かして調製した。

5) 0.5~10 mMヒドロキシルアンモニウム: 塩化ヒドロキシルアンモニウム (特級, キシダ化学)を蒸留水に溶かして調製した。

6) 20 mMスルファニル酸: スルファニル酸 (特級, キシダ化学)を 1.5N塩酸 (特級, ナカライテスク)に溶かして調製した。

7) 10 mM NEDA: NEDA (特級, ナカライテスク)を 1.5N塩酸 (特級, ナカライテスク)に溶かして調製した。

8) 1 mM NBT: NBT(ナカライテスク)を蒸留水に溶かして調製した。

9) 8 mM塩化銅: 塩化銅(II)(2水合物)(特級, キシダ化学)を蒸留水に溶かして調製した。

10) 1~50 μM亜硝酸ナトリウム: 亜硝酸ナトリウム (特級, キシダ化学)を蒸留水に溶かして調製した。

11) 0.2 N過塩素酸: 過塩素酸 (特級, キシダ化学)を蒸留水で調製した。

12) 4 N水酸化カリウム: 水酸化カリウム (特級, ナカライテスク)を蒸留水に溶かして調製した。

13) 20%トリクロ酢酸: トリクロ酢酸 (特級, ナカライテスク)を蒸留水に溶かして調製し冷蔵した。

2. 材料

実験試料のブロッコリー, ホウレンソウ, コマツナおよびサツマイモは市販のものを用い, 試料の凍結には液体窒素を使用した。植物組織の抽出液の pH調節には pH(6.2~7.8)試験紙(アドバンテック)を用いた。抽出液に混在する色素の除去は直径 1 cm×長さ 5 cmのカラムに充てんした AG 1-X8 Resin (Bio-Rad)に通して実施した。吸光度の測定には紫外可視分光光度計 (UV-1600, 島津製作所)を用いた。

3. 分析法

1) O₂とヒドロキシルアンモニウムとの量的反応の検討

50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.8) 0.4 ml, 4 mMキサンチン 0.2 mlおよび 4 mMヒドロキシルアンモニウム 0.2 mlの混合液に, 0~0.2 unit・ml⁻¹ キサンチンオキシダーゼ 0.2 mlを添加して 24℃・10分間反応させた。一方, その混合液に 0.1 unit・ml⁻¹ キサンチンオキシダーゼ 0.2 mlを添加して正確に 0~10分間反応させた。次いで 20 mMスルファニル酸 1 mlを加えて反応を停止させ, 10 mM NEDA 1 mlを添加して (反応液全量は 3 ml) 24℃・20分間放置, 発色後, 50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.8)をブランクとして吸収極大波長 545 nmでの吸光度を測定した。

また, NBT法と比較するために, 50 mMリン酸緩衝

液 (pH 7.8) 2.2 mlに 4 mMキサンチン 0.2 mlと 1 mM NBT 0.2 mlを加え, 0.1 unit・ml⁻¹ キサンチンオキシダーゼ 0.2 mlを添加して振り混ぜ, 24℃で正確に 0~10分間反応後, 8 mM塩化銅 0.2 ml (反応液全量は 3 ml)で反応を停止して 50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.8)をブランクとして直ちに波長 560 nmの吸光度を測定した。

2) ヒドロキシルアンモニウム濃度の検討

50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.8) 0.4 mlと 4 mMキサンチン 0.2 mlの混合液に 0~10 mMヒドロキシルアンモニウム 0.2 mlを加え, 0.1 unit・ml⁻¹ キサンチンオキシダーゼ 0.2 mlを添加して 24℃・20分間反応し, 20 mMスルファニル酸 1 ml, 次いで 10 mM NEDA 1 mlを加えて 24℃・20分間放置, 発色後, 50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.8)をブランクとして波長 545 nmの吸光度を測定した。

3) 試料の測定

(1) 検量線

1~50 μM亜硝酸ナトリウム 1 mlに 20 mMスルファニル酸 1 mlと 10 mM NEDA 1 mlを加えて 24℃・20分間放置, 発色させた。亜硝酸ナトリウムのかわりに水を用いたものをブランクとした。波長 545 nmの吸光度を測定し, 吸光度と亜硝酸イオン含量との関係式(検量線)を求めた。

(2) O₂の抽出

植物新鮮組織を約 2 g採取し, 速やかに秤量して液体窒素で凍結し, -30℃に貯蔵した。0.2N過塩素酸 2 mlと 0.1 g海砂で磨砕し, 2層ガーゼで濾過して 13,000xg・8分間遠心した。上澄液を 4N水酸化カリウムで pHを約 7.5に調節して 13,000xg・5分間再遠心し, その上澄液を AG 1-X8のカラム (1 cm i. d.×5 cm)に通し, 溶出液を O₂の測定に供試した。

(3) 測定法

溶出液 0.8 mlに 4 mMヒドロキシルアンモニウム 0.2 mlを添加し, 24℃・30分間後, 20 mMスルファニル酸 1 mlと 10 mM NEDA 1 mlを加え, 24℃・20分間放置, 発色後, 波長 545 nmの吸光度を測定した。この測定値には O₂によるヒドロキシルアンモニウムの酸化により生成した亜硝酸イオンだけではなく, 試料に存在する亜硝酸塩も含まれているため, スルファニル酸と NEDAを加えたのち, 4 mMヒドロキシルアンモニウム 0.2 mlを添加したものをコントロールとした。測定した吸光度からコントロールの吸光度を引いて検量線により亜硝酸イオン量を求め, O₂含量を算出した。なお, 発色後, タンパク質が多くて混合液が白濁することがあったが, この場合には, 20%トリクロ酢酸 1 mlを添加して 3,000xg・10分間遠心し, 上澄液の吸光度を測定した。

結果および考察

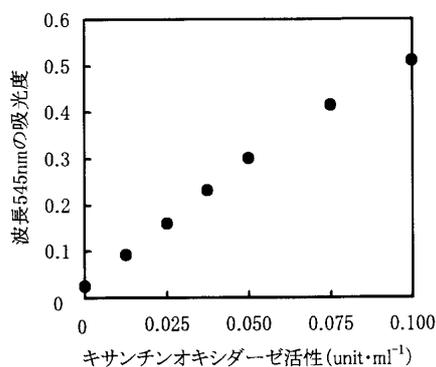
1. O₂とヒドロキシルアンモニウムとの量的反応の検討

キサントニンがキサントニンオキシダーゼにより酸化されて O_2^- が発生する。 O_2^- の発生量はキサントニンオキシダーゼ活性や反応時間と正に相関する。この O_2^- 発生系にヒドロキシルアンモニウムを加え、 O_2^- の還元により生じた亜硝酸イオンの量(吸光度)を測定したところ、吸光度はキサントニンオキシダーゼ活性の増大(第1図)や反応時間の延長(第2図)とともに大きくなり、それらの相関は極めて高かった。従って、波長545 nmの吸光度すなわち亜硝酸イオンの生成量は O_2^- の量に依存すること、およびヒドロキシルアンモニウムによる O_2^- 検出精度は高いことが明確になった。

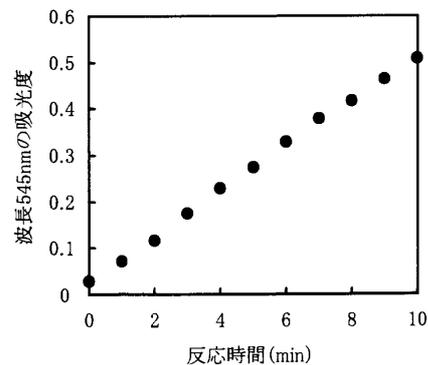
NBT法により測定したキサントニン-キサントニンオキシダーゼ系の反応時間に伴う O_2^- の発生量(吸光度)を第3図に示した。第2図と比較すると、亜硝酸法はNBT法より吸光度値が高く、相関性も高く、亜硝酸法は感度、精度ともにNBT法より優れることが明らかになった。

2. ヒドロキシルアンモニウム濃度の検討

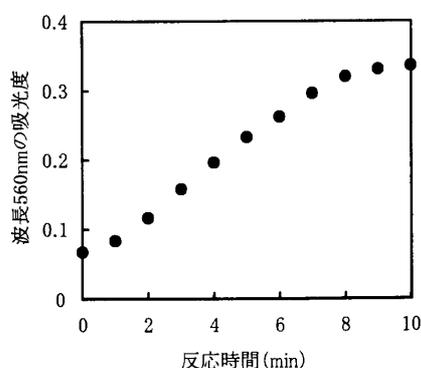
キサントニン-キサントニンオキシダーゼの O_2^- 発生系に加えたヒドロキシルアンモニウム濃度4 mMで最大の吸光度が得られた(第4図)。その後、被検液を20℃の下で放置し、1時間ごとに吸光度を測定した結果、4時間後までも吸光度はほぼ変化せず、安定な発色が保たれた。



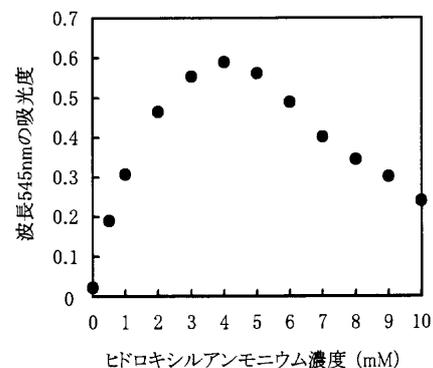
第1図 キサントニン、キサントニンオキシダーゼおよびヒドロキシルアンモニウムを含んだ反応系において、波長545 nmの吸光度(亜硝酸イオン生成量)に及ぼすキサントニンオキシダーゼ活性(スーパーオキシド発生量)の影響



第2図 キサントニン、キサントニンオキシダーゼおよびヒドロキシルアンモニウムを含んだ反応系において、波長545 nmの吸光度(亜硝酸イオン生成量)に及ぼす反応時間(スーパーオキシド発生量)の影響



第3図 キサントニン、キサントニンオキシダーゼおよびニトロブルーテトラゾリウムを含んだ反応系において、波長560 nmの吸光度(ブルーホルマジン生成量)に及ぼす反応時間(スーパーオキシド発生量)の影響



第4図 キサントニン、キサントニンオキシダーゼおよびヒドロキシルアンモニウムを含んだ反応系において、波長545 nmの吸光度(亜硝酸イオン生成量)に及ぼすヒドロキシルアンモニウム濃度の影響

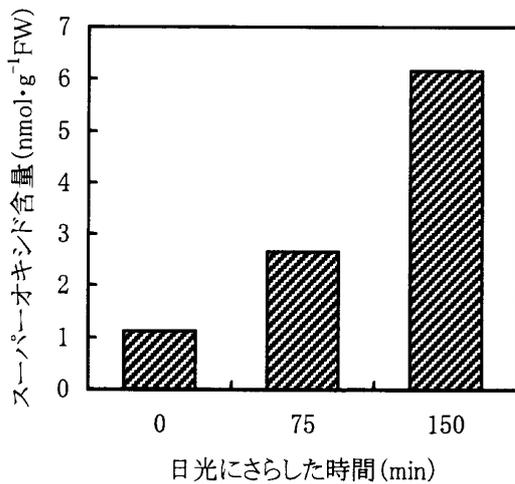
3. 検量線

亜硝酸ナトリウムとスルファニル酸、NEDAの反応系から求めた吸光度(A)と亜硝酸イオン含量(N: nmol·ml⁻¹)との関係式は $N=56.546A+0.005$ ($r=0.9996^{**}$)であった。

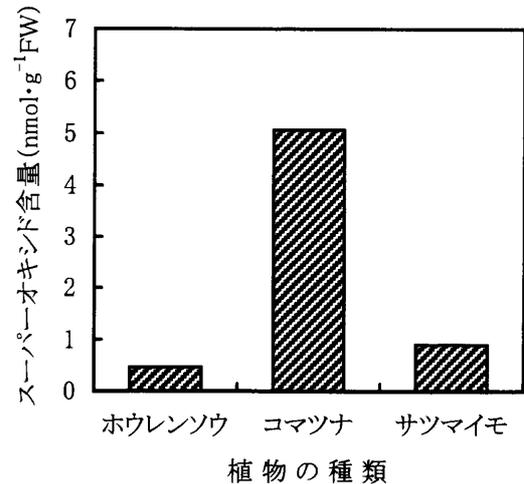
4. 試料の抽出と O_2^- 含量

測定中における O_2^- の消長を抑制するため、植物試料を採取する際、速やかに液体窒素で凍結し、過塩素酸を用いて抽出した。抽出液に混在する色素は比色測定を妨げるため、それを除去するためにAG 1-X8樹脂のカラムを使用した。

収穫後のブロッコリーが直射日光にさらされたとき、花らいの O_2^- 含量の上昇がみられ(第5図)、また収穫後のハウレンソウ、コマツナおよびサツマイモ地下茎内では異なる O_2^- 含量を示した(第6図)。葉緑体を有する植物体を太陽光にさらすと O_2^- の生成量は増大する。それは、葉緑体で受け取った光エネルギーは過剰になったとき、光化学系IIの加水分解で発生した電子は過剰となり、光化学系Iで酸素を1電子還元して O_2^- を多く生成するためである(真野・浅田, 2001)。日光照射による緑色ブロッコリー花らいの O_2^- 含量の上昇から、本手法の有効性が確認された。また、この亜硝酸法により植物組織内の O_2^- を



第5図 収穫後のブロッコリー花らいのスーパーオキシド含量に及ぼす太陽光照射時間の影響



第6図 収穫後のホウレンソウ、コマツナとサツマイモ地下茎内のスーパーオキシド含量

nmol·g⁻¹FW レベルで定量できる可能性を示した。

これまでの多くの研究では緩衝液中における植物組織 (Frahry・Schopfer, 2001; Schopfer ら, 2001) や細胞内小器官 (McRae・Thompson, 1983; Murphy ら, 1998) の O₂⁻ 発生量を測定しているが、今後、本研究成果を進展させ、植物試料中の O₂⁻ レベルを直接測定できる方法を検討する予定である。

摘 要

本研究ではスーパーオキシド (O₂⁻) 含量を定量する手法として、O₂⁻ とヒドロキシルアンモニウムとの反応で生じた亜硝酸イオンを分光学的に定量する方法を検定した。O₂⁻ とヒドロキシルアンモニウムとの反応を定量的に検討した結果、両者の反応は感度と精度ともに高く、発色も安定であった。色素を多く含む植物組織についても、抽出液を AG 1-X8 樹脂に通すことで色素を除去し、本定量法を適用することができた。本手法は植物組織中の O₂⁻ 含量の簡便定量法として活用できる可能性が示された。

謝 辞 本実験の遂行にあたり、ご助言頂いた岐阜大学農学部教授松井鑄一郎博士に厚く感謝の意を表す。

引用文献

- Elstner, E. F. and A. Heupel. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: A simple assay for superoxide dismutase. *Anal. Biochem.* 70: 616-620.
- Frahry, G. and P. Schopfer. 2001. NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay. *Planta.* 212: 175-183.
- 真野純一・浅田浩二. 2001. 光酸素ストレスを回避する分子

機構. p. 2239-2245. 篠崎一雄・山本雅之・岡本 尚・岩淵雅樹編. 環境応答・適応の分子機構. 共立出版社. 東京.

McRae, D. G. and J. E. Thompson. 1983. Senescence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves. *Planta.* 158: 185-193.

Murphy, T. M., H. Vu and T. Nguyen. 1998. The superoxide synthases of rose cells. Comparison of assays. *Plant Physiol.* 117: 1301-1305.

Ō yanagui, Y. 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 142: 290-296.

大柳善彦. 1988. SOD測定法. p. 254-261. 中野 稔・浅田浩二・大柳善彦編. 活性酸素-生物での生成・消去・作用の分子機構. 共立出版社. 東京.

Schopfer, P., C. Plachy and G. Frahry. 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 125: 1591-1602.

戸恒(中野)博子. 1987. スーパーオキシド O₂⁻ の測定法. p. 86-100. 二木鋭雄・島崎弘幸編. 活性酸素. 医歯薬出版社. 東京.

受田浩之. 2001. 酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の新規活性測定法. *農化.* 75: 562-565.

吉川敏一・河野雅弘・野原一子. 2000. 活性酸素・フリーラジカルを測る. p. 109-123. 活性酸素・フリーラジカルのすべて-健康から環境汚染まで-. 丸善株式会社. 東京.