

3Aa-8

プロトプラスト単離過程における活性酸素の発生

石井茂寿(キッコーマン・生科研)

植物の組織より酵素法でプロトプラストを単離する際、傷害を受け、プロトプラストが生成することはしばしば観察されることである。このプロトプラストに対する傷害の要因については、ほとんど解明されていない。市販酵素剤を用いてプロトプラストを単離する場合には、それらの中に含まれる夾雑物がその一因になると考えられている。従って、植物組織よりプロトプラストを単離するのに必要な酵素系を明らかにし、これらのすべての酵素を蛋白的に同一な状態にまで精製し、これらの精製酵素を組み合わせてプロトプラストの単離を試み、この精製した酵素を用いて、徐々に単離されるプロトプラストは傷害を受けていることが判明した。このことは、傷害の要因が細胞壁の分解に伴って細胞側に起因する有害な変化によるものと考えられる。これには種々の要因が考えられるが、従って、まず酵素毒性に注目し、今回、プロトプラストの単離過程でスーパーオキシド(O_2^-)が生成するかどうかの検討と、精製した細胞壁分解酵素を用いて行なったその結果を報告する。

播種後5~7日目のアバナの第一葉を用いた。6cmのプロスタックシマールに0.5M マンニトールと酵素を含む20mM Mes buffer (pH 5.5) 3ml をとり、これに、ウレタ表皮を剥いだアバナの葉切片200 mg を酵素液の表面に浮かべ反応を行なった。セルラーゼC₁及びキシランナーゼは、市販セルラーゼ剤より、ペクチンリアーゼは、ペクトリアーゼY-23より精製したものをを用いた。スーパーオキシドの測定は、通常は、トリクロムC₁の還元法で行なったが、その他にも、ニトロブルーテトラゾリウム₄の還元、及び、エピネフリンの酸化によるものも行なった。

酵素反応の調査には、ほとんどスーパーオキシドは検出されなかったが、反応中のアバナの葉からは、スーパーオキシドの発生が認められた。その発生量は、使用するアバナの葉の重量にほぼ比例して増加した。スーパーオキシドは、セルラーゼC₁+キシランナーゼ+ペクチンリアーゼによるプロトプラスト化反応系では勿論のこと、キシランナーゼ+ペクチンリアーゼによるマセレーション反応系においても認められた。さらに、葉切片からのスーパーオキシドの発生は、酵素を全く添加しない対照区でも、0.5M マンニトール存在下ではある程度認められたが、0.25M マンニトール存在下では発生が認められなかった。ただし、低濃度のマンニトール存在下でも、表皮を剥いだ直後の葉や、切断した直後の葉からは、スーパーオキシドの発生が認められた。以上からは、スーパーオキシドは、酵素的なマセレーション及びプロトプラスト化の過程で発生するばかりでなく、酵素分解なくとも、原形質分離を起している状態か、または、表皮を剥ぐと、傷をつけることによる物理的刺激による一時的にはスーパーオキシドが発生することを示すものであった。なお、単離後、洗浄したプロトプラストからもスーパーオキシドの生成が認められ、プロトプラスト単離過程で発生するスーパーオキシドの少なくとも一部は、プロトプラストの膜表面で生成するものと考えられた。