

# 湛水処理によるブドウの根のパーオキシ ダーゼ活性について\*

西元直行・大野正夫  
(果樹園芸学研究室)

## Effects of Flooding on the Peroxidase Activity in the Grape Roots

Naoyuki NISHIMOTO and Masao OHNO  
*Laboratory of Pomology*

### Abstract

Effects of Flooding on the Peroxidase Activity in the Grape Roots. N. NISHIMOTO and M. OHNO. Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Japan. *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.*, No. 22: 1-6 1974.

The flooding experiments were carried out from Sept. 1 using Delaware grapes grown in the 30 cm pots. During the study, peroxidase activity and its isozyme in the roots were assayed.

Peroxidase activity in flooded plant rootlets was increased significantly on both third and 55th days after flooding compared with that from unflooded plants, and the activity in the lateral roots from flooded plants was lower than that from unflooded ones except it was slightly higher on the third day.

Protein content in flooded rootlets was lower in 19 days from the start of flooding than that from unflooded ones. The content in the lateral roots of flooded plants was much higher than that of unflooded lateral roots during the period from 19 to 29 days after flooding.

Specific activity of peroxidase in rootlets was greatly affected by flooding, that is, specific activity was increased on both third and 55th days, however, the activity in lateral roots was unchanged.

In disc electrophoresis, three or four isoperoxidases were found in both rootlets and lateral roots of grape plants. Apparent change in the pattern of zymogram of flooded rootlets was observed as compared with that of unflooded roots.

著者らは、果樹の根の活力という問題をとりあげ、水との関連で2, 3の観察を続けてきた。この一連の仕事として、根のパーオキシダーゼ (E. C. 1. 11. 1. 7) を取扱った。

この酵素はほとんどの動植物に存在するヘミンを含む酵素で、生体外では種々のフェノール類、インドール類、チトクローム C やピロガロールを酸化する。しかし、生体内での働きについては不明な点が多いが、ALLDRIGE ら (1968) および MACNICOL (1966) らは、呼吸系に関与すると考え、LAMPOR (1970) および MUDD

(1959) によれば IAA の合成・分解に関与するとしている。なお、YANG ら (1967) はメチオナルを基質としてエチレン生成をひきおこすとし、FLEET (1959) はリグニン化に関与するという考えを出している。さらに、稲田 (1957) は小麦の新根では活性が低く、根の生長に従って活性の増大することを報告した。吉田ら (1958) は組織老化の指標となることをあげ、嶋田 (1972) もパーオキシダーゼが組織の老化ときわめて密接な関連をもっていることを指摘した。

この酵素は多くのアイソザイムをもち、傷害等の外因により、アイソザイムの出現や量的変化のおこることが

\* 本報告の概要は園芸学会昭和49年度春季大会にて発表した。

知られている。KUら(1970)はトマト果肉のパーオキシダーゼについて7~9個, 小倉ら(1971)は少なくとも3~4個のアイソザイムの存在を報告した。このようにパーオキシダーゼには, いろいろな働きが考えられており, 重要な生理作用を行なっていると考えられる。

小林ら(1949)は, モモやナシに比べて, ブドウが長期間(約20日間)の湛水状態に耐えることを報じ, さらに近年, 水田転換作目の1つとしてブドウがとりあげられており, 西元ら(1972, 1973)は高地下水位条件下で栽培されたブドウは同条件下で栽培されたナシに比べて, 地上部に及ぼされる悪影響が比較的少ないことを報告した。これらのことから, ブドウの根はモモやナシの根と比較して, 生理活性が異なるものと考えられる。そこで, 本実験では, パーオキシダーゼは根の老化の指標になり得ること, パーオキシダーゼアイソザイムの出現は根の質的变化を示すことになるであろうことからブドウの根の生理活性の一端を解明しようとした。水田転換作とした場合, 深層部の根はおそらくかなり長期間水と接触すると考えられるので, 根群全体を長期(約55日間)にわたり湛水状態にし, 細根およびその細根を群生させる側根についてパーオキシダーゼの量的質的变化を調査した。ここにその結果を報告する。

#### 実験材料および方法

ブドウ・デラウェア (*Vitis Labruscana* BAILEY cv. Delaware) は千葉県原種農場で育成されたさし木1年生苗木を1973年3月21日に素焼尺鉢, 土壌は火山灰質壤土に植え, 実験に供した。なお, 湛水処理に供した水は溶存酸素を低下させ, バクテリア等による悪影響を除去するため, 井戸水を90°Cに熱し, 冷却したものである。実験処理前は慣行法に従って栽培し, 1973年9月1日から10月25日まで湛水処理を行なった。無処理区は朝夕水を一定量与え, 土壌水分含量を一定に保った。各時期そろったものをそれぞれ2個体ずつ掘り上げ, 細根および細根の群生していた側根を採取し, 酵素抽出の材料に供した。

##### (1) 酵素液の調製

この酵素の細胞中における局在性に関して, PLESNICARら(1967)はその大部分は可溶型として細胞質中に存在するとし, また小倉ら(1971)もトマト果肉のパーオキシダーゼは75%以上が可溶型として存在していると報告した。本実験の場合, 各分画に区別せずに酵素液を調製した, 生体重10gの根を等量の0.1M (pH 6.0) リン酸緩衝液で磨砕し, 二重ガーゼでこし, ろ液を一昼夜0.01M (pH 6.0) リン酸緩衝液中で透析して, 10,000×gで15分間遠心分離し, その上澄液を粗酵素液とした。

##### (2) 酵素活性の測定法

MUDD (1959)の方法をもとにして, ピロガロールを基質とし, これが酸化されて生ずるプロピロガリンの生成量を430 nmの波長で日立139型分光光度計を用いて測定した。酵素量は酵素単位数で示し, 基質1 μMを1分間に变化させる酵素量を1単位とした。

##### (3) タンパク質の定量

牛血清アルブミンを標準タンパク質とし, LOWRYら(1951)の方法を用いて行なった。

##### (4) Disc 電気泳動法

ORNSTEINE (1964) および DAVIS (1964)の方法に従いポリアクリルアミドゲル(7.5%) pH 8.3を用いて, 3 mAで泳動した。パーオキシダーゼのバンドはKUら(1970)の方法に従い, 30°C下で発色させた。約2時間後にゲルを50%メタノールに浸し, 酵素反応を停止させ, 発色したバンドを観察した。

#### 実験結果および考察

##### (1) パーオキシダーゼの量的変化

湛水処理が根のパーオキシダーゼ活性量にいかなる影響を及ぼすかについて観察した。その結果は第1図および第2図に示すとおりであった。

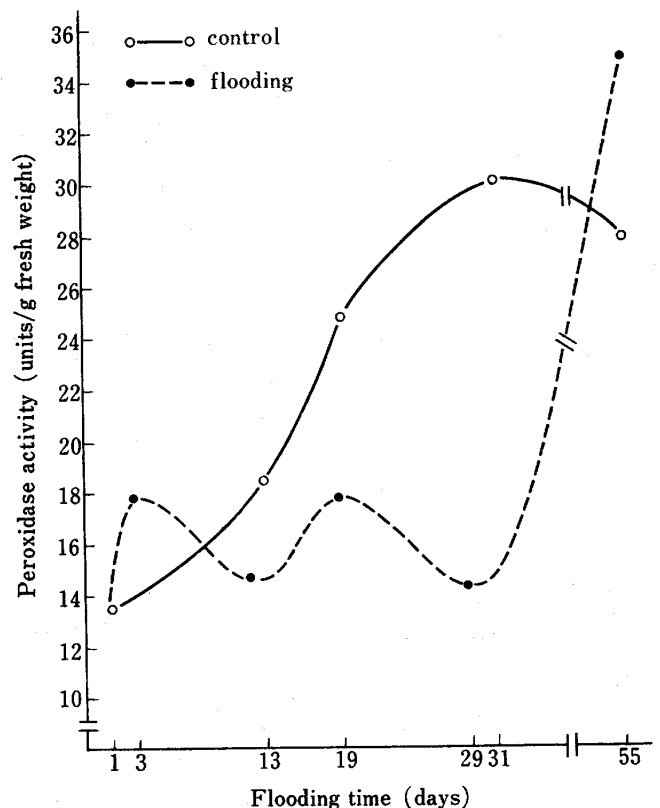


Fig. 1 Changes in peroxidase activity of rootlets during flooding. A unit of peroxidase activity is the amount of enzyme decomposing 1 μmole of pyrogallol per min at 37°C.

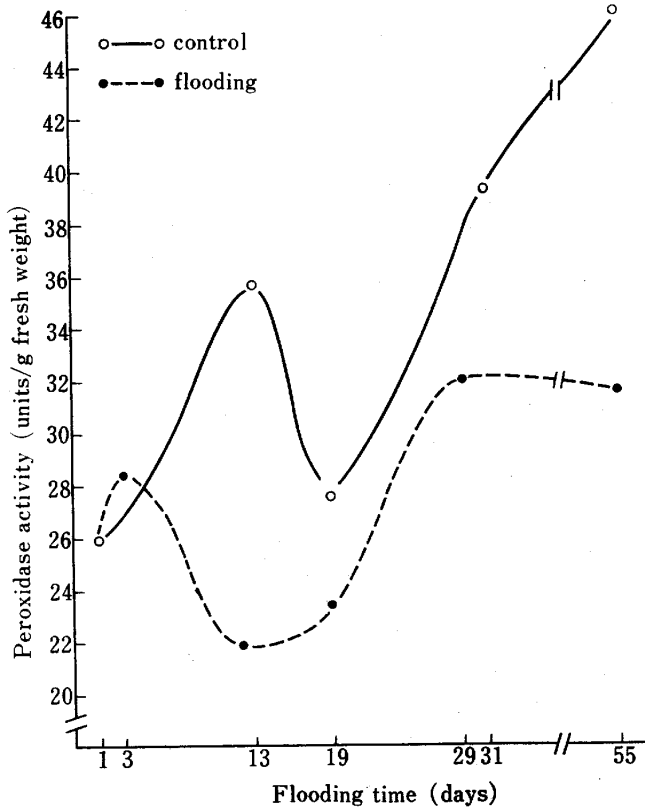


Fig. 2 Changes in peroxidase activity of lateral roots during flooding.

第1図によれば、湛水処理3日後に1時的な増加を示し、無処理区は活性増加がみられるにもかかわらず、処理区は処理29日まで低い活性を保った。処理55日後には無処理区のものより高い活性を示した。無処理区の活性は時間の経過と共に高くなる傾向を示した。既存の報告によれば、パーオキシダーゼは組織の老化につれて活性が高くなることを指摘しており、生育ステージを考慮すると無処理区の場合はその妥当性が考えられる。しかし、湛水処理の場合、処理29日後まで活性の減少がみられ、単純に老化が早まるものとは考えがたい。この29日後までの経過は山崎(1951)の小麦の実験とおおむね一致した。この現象は、湛水処理による低酸素条件下であること、西元ら(1974)の湛水処理したブドウの根のTTC還元力測定からみたコハク酸脱水素酵素活性も減少していること等から考えて、呼吸系に関与するパーオキシダーゼの合成が阻害されてきたものと推察される。なお、処理55日後になると、活性の急激な増大がみられると同時に根が新たに多数発根していることから、これらの根は処理開始のころの根と質的に異なる根であると推察される。

第2図によれば、側根のパーオキシダーゼ活性は全体的に細根のそれよりも、特に無処理区において増加していることから老化の指標となりうることを示唆している。処理区の活性変化は処理3日後の根で多少の増加を

みせた。その後12日後まで減少し、あとは増加したが、無処理区の根より低い活性を示した。側根では細根に比べて、処理55日後に活性増加がみられないこと、無処理区の側根で12日後に非常に活性が増加し、19日後に減少するという変化がみられるなど2つの相違点があった。この相違点の前者は側根の水に対する感受性等と関連するであろうし、後者はタンパク質含量の推移やチモグラムパターンからだけでは、この変化が何に起因するか不明である。

### (2) タンパク質含量の変化

タンパク質レベルの維持は耐水性の強弱と密接に関連するとされている。根のタンパク質含量の変化は第3図に示すとおりであった。

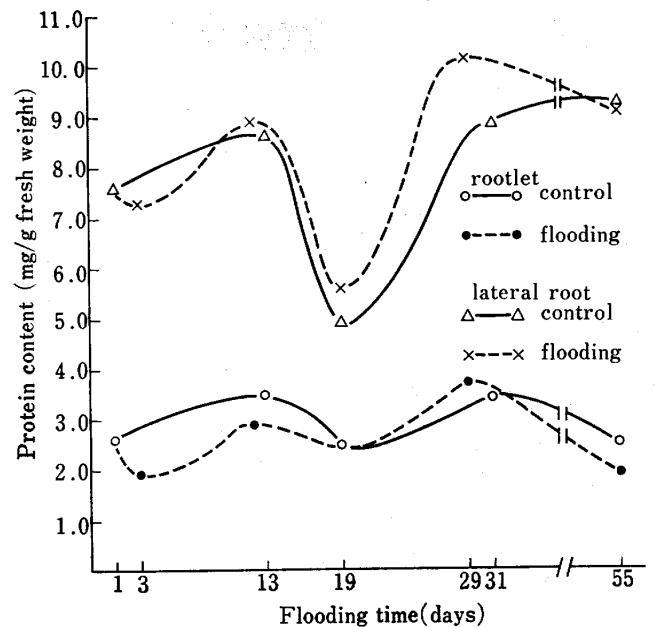


Fig. 3 Changes in protein content of roots during flooding.

第3図によれば、湛水処理区の細根中タンパク質含量が処理開始から処理19日後まで無処理区のそれよりも少ない傾向を示した。

側根では、処理開始から19日後まで両区間に有意な差はみられないが、19日・29日後は湛水処理のタンパク質含量が増加した。

次に、処理19日後(暦日9月20日ごろ)の時点でタンパク質含量が細根、側根共に減少していることは、ブドウの生育段階の質的転換期と何らかの関連があるのではないかと考えられる。

### (3) パーオキシダーゼ比活性の変化

前述(1)(2)の値を総合して、パーオキシダーゼの比活性を求めた。それは第4図に示すとおりであった。

第4図によれば、細根のパーオキシダーゼに顕著な変化がみられ、無処理区では漸増するのにくらべ、処理区

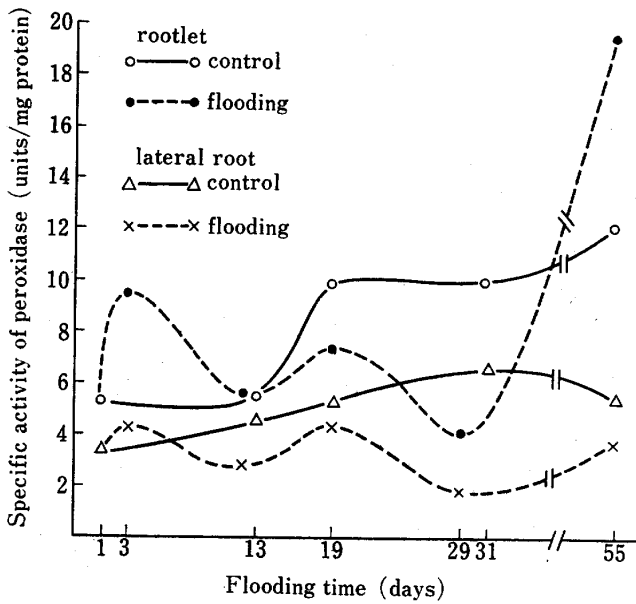


Fig. 4 Changes in specific activity of peroxidase of roots during flooding.

では3日後において増加を示し、29日後において最も低い比活性を示した。処理55日後になると、比活性は増加を示した。一方、側根の比活性は大きな変化を示さ

ず、総じて、処理区のものが無処理区のものより低い比活性を示した。無処理区では、細根、側根ともに時間の経過につれて比活性の増大がみられ、老化と関連していると考えられる。側根ではタンパク質含量が細根より多くなり、比活性は細根より低くなった。

#### (4) チモグラムパターンよりみたパーオキシダーゼアイソザイムの変化

パーオキシダーゼ活性の変化を質的に観るために各時期の酵素液を電気泳動後、ベンジンで発色させ、パーオキシダーゼの存在を示すバンドを観察した。そのチモグラムパターンは第5図および第6図に示すとおりであった。

第5図によれば、湛水処理開始時にバンドは1本であったが、湛水処理区において3日後には中心のaバンドが太くなり、その(-)極側にbバンドが現われ、前述の活性増大と一致した。そして29日後には、無処理区ではみられないdバンドが(+)極側に現われ始め、55日後の根になると、はっきり現われた。これを無処理区の根と比較してバンドの位置からして明らかに質的に異なるパーオキシダーゼのアイソザイムを持ち、この時期の根は、処理開始時のもの、無処理区のものとは質的に異なる

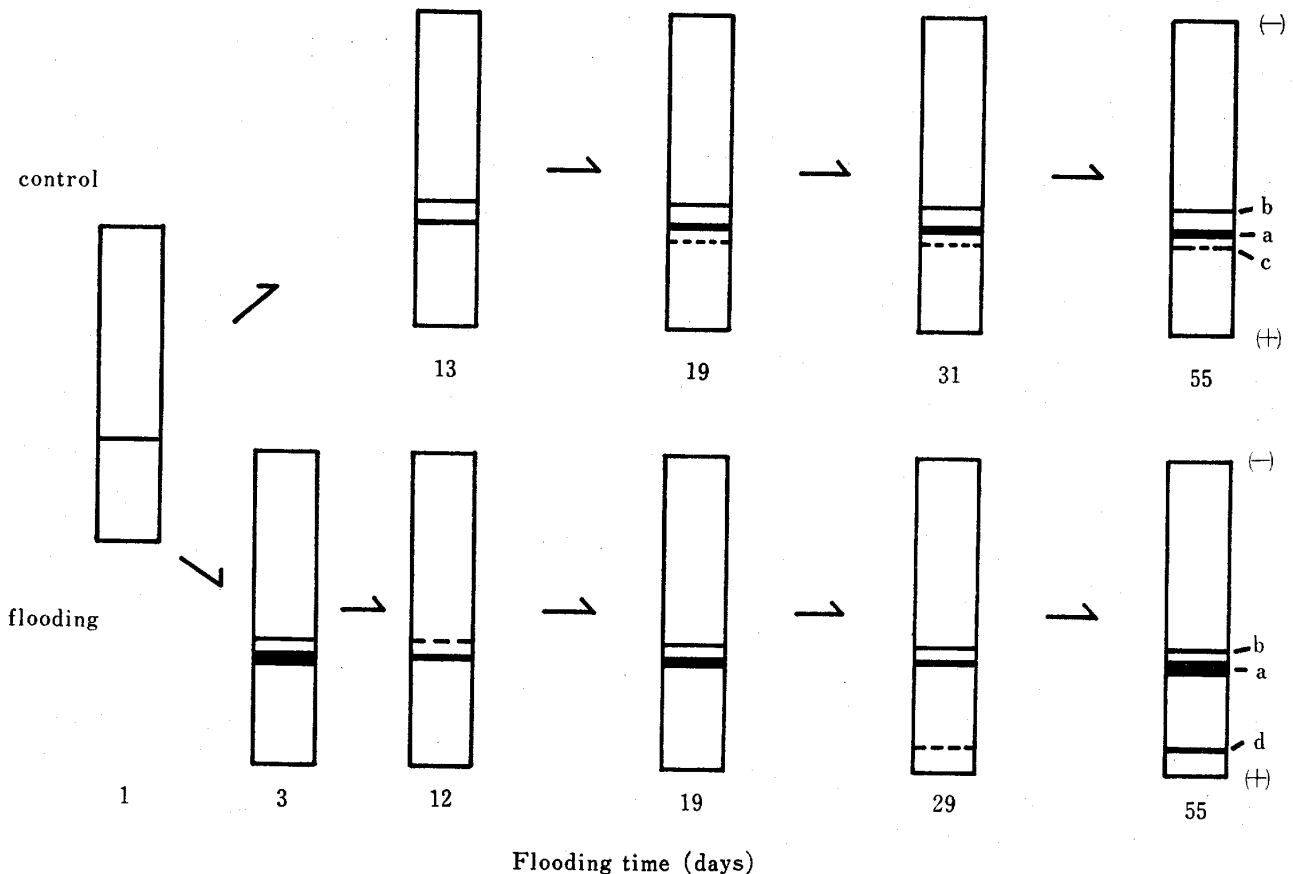


Fig. 5 Isoperoxidase patterns of polyacrylamide gel from rootlets during flooding. Electrophoresis was carried out at 4°C using 3.0 m amp per tube. a, b, c and d in the figure refer to the peroxidase band in the electrophoresis.

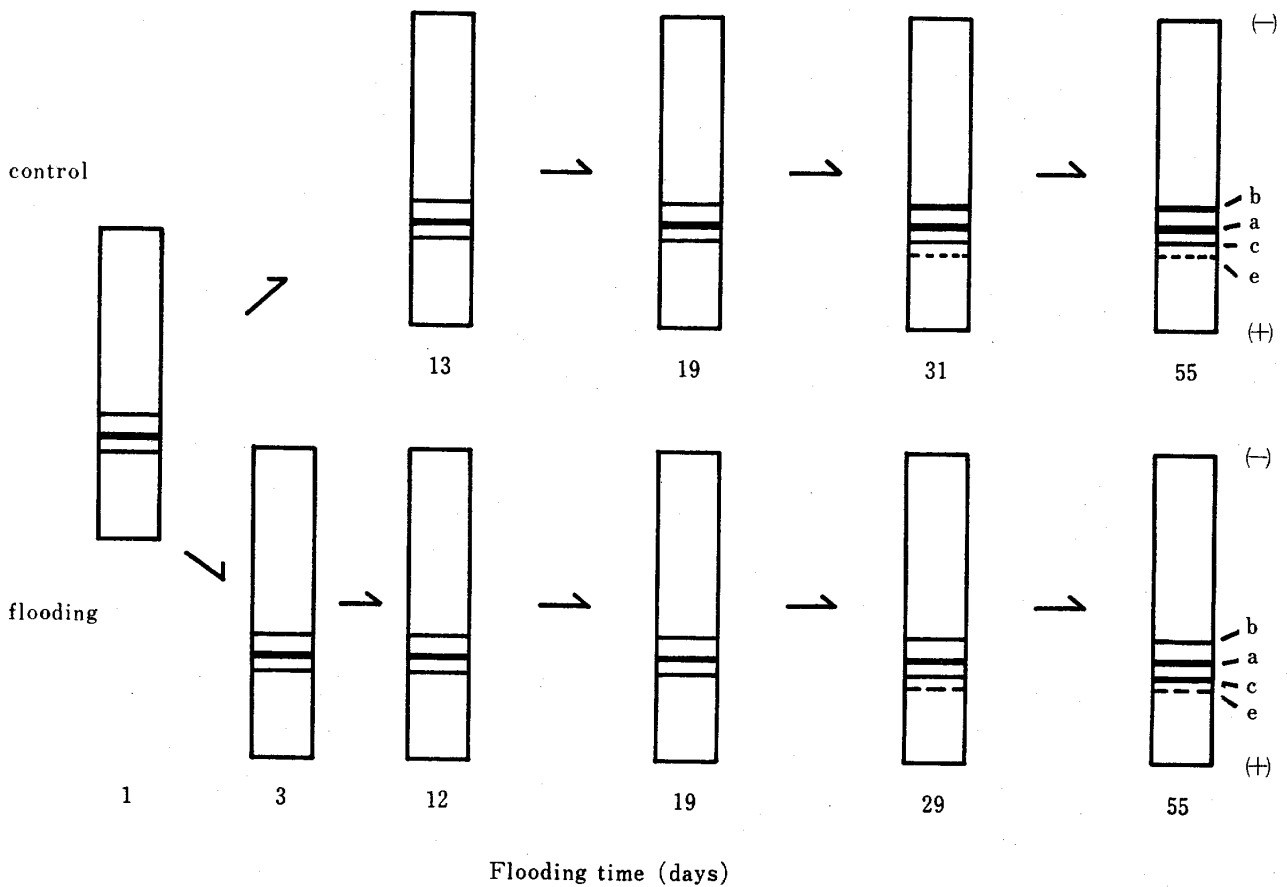


Fig. 6 Isoperoxidase patterns of polyacrylamide gel from lateral roots during flooding. a, b, c and e in the figure refer to the peroxidase band in the electrophoresis.

ったものと考えることができる。

第6図は側根のパーオキシダーゼのチモグラムパターンである。細根と異なり、両区間にチモグラムパターンの差はみられず、アイソザイムの数はエイジが進むにつれて増加してゆく傾向を示した。このことから、側根におけるパーオキシダーゼ活性の処理区との差は質的な差ではなく、量的な差であったと考えることができる。

なお、地上部生長（外徴）は湛水処理によるはっきりした影響を認めなかった。

#### 摘要

ブドウ・デラウエアを供試し、湛水処理を行ない、根のパーオキシダーゼ活性の量的質的变化を観察した。

(1) 細根のパーオキシダーゼ活性は湛水処理の3日後と55日後に急激な増加を示し、無処理区のものより高い活性量であった。側根では無処理区のものより低い活性量であった。

(2) 細根のタンパク質含量は、処理の前半期において、処理区の方が無処理区のものより少なくなった。しかし、側根では処理の後半期において、処理区の方が無処理区のものより多くなった。

(3) 比活性でみると、細根において、処理3日後と55日後に比活性が大きく増加した。側根の比活性は処理区の根が無処理区のものより低い値を示したが大差はなかった。

(4) 電気泳動のチモグラムパターンによると、細根・側根ともに3~4個のアイソザイムの存在を認め、細根は処理により、無処理区の根には現われないアイソザイムの存在が認められた。側根のパーオキシダーゼチモグラムパターンは無処理区との間に差は認められなかった。

謝辞 本実験を実施するにあたり、千葉県原種農場から苗木を提供していただき、本学農産製造学研究室の竹花秀太郎教授、小倉長雄講師ならびに中川弘毅助手から御助言をたまわり、実験に際し、多大な御便宜を与えていただいた。ここにあわせて感謝の意を表します。

#### 文献

- 1) ALLDRIGE, N. and A. GORDON (1968): J. Cell Biol., **39**: 5.
- 2) COLOWICK, S. P. and N. O. KAPLAN (1955): Met-

- hods in Enzymology, Vol. II: 773.  
Academic Press Inc., New York.
- 3) FLEET, V. (1959): Can. J. Bot., **37**: 449.
  - 4) 稲田勝美 (1967): 農技研報告 **D 16**: 19.
  - 5) 小林章・庵原遜・村井兼二・林真二(1949): 園芸学研究集録 **4**: 127.
  - 6) KU, H. S., S. F. YANG and H. K. PRATT (1970): Plant & Cell Physiol., **11**: 241.
  - 7) LAMPORT, D. (1970): Ann. Rev. Plant Physiol., **21**: 253.
  - 8) LOWRY, O., O. ROSENBROUGH, N. FARR and R. RANDALL (1951): J. Biol. Chem., **193**: 265.
  - 9) MACNICOL, P. K. (1966): Arch. Biochem. Biophys., **117**: 347.
  - 10) MAPSON, L. W., R. SELF and D. A. WARDALE (1969): Biochem. J. **111**: 413.
  - 11) MUDD, J. (1959): Plant Physiol., **34**: 144.
  - 12) 永井裕(1967): 蛋白質・核酸・酵素 (生物化学実験法IX): 3.
  - 13) 西元直行・小柳津朝子・永沢勝雄(1972): 千大園学報 **20**: 9.
  - 14) ————・—————・野田健男・大野正夫・永沢勝雄(1973): 千大園学報 **21**: 9.
  - 15) ————・—————・—————・—————(1974): 園芸学会春季大会要旨: 90.
  - 16) 小倉長雄・川久保歌子・飯島正・中川弘毅・竹花秀太郎(1971): 千大園学報 **19**: 55.
  - 17) PLESNICAR, M., W. D. BONNER Jr. and B. T. STOREY (1967): Plant Physiol., **42**: 366.
  - 18) 嶋田典司(1972): 千大園特報 **6**: 1.
  - 19) YANG, S. F. and H. S. KU (1967) J. Biol. Chem. **242**: 5274.
  - 20) 吉田武彦・高橋治助(1958): 土肥誌 **29**: 341.
  - 21) 山崎傳(1952): 農技研報告 **B1**: 1.