

氏 名	もり た しげ と 森 田 重 人
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2089 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 植 物 学 専 攻
学位論文題目	イネアスコルビン酸ペルオキシダーゼの酸素ストレスに対する発現 応答

(主査)

論文調査委員 教授 岡田清孝 教授 長谷あきら 助教授 飯 哲夫

論 文 内 容 の 要 旨

活性酸素は生体内で不可避的に生成しており、細胞に致命的な障害をもたらす。高等植物においてはスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) 等の複数の酵素が活性酸素の消去に関与している。本研究は、イネにおいてSODとAPXの遺伝子の発現応答を調べることにより、それらの発現調節機構の解明を目的としたものである。

2種類の細胞質型SOD遺伝子と2種類の細胞質型APX遺伝子のABAに対する発現応答を調べた結果、細胞質型SOD、細胞質型APXとも2つの遺伝子のうち一方のみがABAにより誘導されたことから、イネの2種類の細胞質型SOD遺伝子と2種類の細胞質型APX遺伝子はABAにより協調的かつ異なった制御を受けていることが示唆された。またイネ細胞質型APXはパラコートおよび過酸化水素によって誘導がみられたが、細胞質型APXのパラコートによる誘導は過酸化水素による誘導に比べて遅かった。過酸化水素消去酵素 (APX, カタラーゼ) の阻害剤処理により、細胞中の過酸化水素量が上昇するとともに、パラコート処理や過酸化水素処理なしでも細胞質型APXの誘導がみられたことから、細胞質型APXは細胞内の過酸化水素に応答して誘導されることが明らかとなった。またパラコート処理により細胞内の過酸化水素量が上昇したことから、パラコートによる細胞質型APXの誘導は過酸化水素により引き起こされていることを示した。これらの結果から酸素ストレスにおいて過酸化水素が細胞内シグナルとして機能していることを示唆した。

また葉緑体型APXの光に対する発現応答を調べた結果、イネ黄化芽生えの緑化過程においてチラコイド型APXは光照射により緑化24時間まで顕著に誘導された。緑化4時間以降において光合成の電子伝達が確認されたことから、緑化4時間から24時間までの誘導は電子伝達に起因すると考えられた。また光合成電子伝達の阻害剤で処理を行うとDCMU処理により葉緑体型APXの発現が抑制されたが、DBMIBでは抑制はみられなかったことから、葉緑体型APXはプラストキノンの酸化還元状態によって調節されていることを示した。

一方、酸素ストレスの防御には活性酸素の消去、酸化的障害の修復などを行う複数の酵素が関与しており、大腸菌、酵母においてはそれらの酵素遺伝子が共通な転写因子により調節されている。酸素ストレスの防御に関与する3個のイネ遺伝子、細胞質型SOD遺伝子 *sodCc 1*、細胞質型チオレドキシシン遺伝子、イネグルタレドキシシン遺伝子のそれぞれのプロモーターには28bpの配列が保存されている。この共通配列を含む *sodCc 1* プロモーターの77bpの領域は、スーパーオキシドにより誘導されDTTの還元により抑制されるシス-エレメントとして機能していることを明らかにした。また、28bpの共通配列に結合する核タンパク質の存在を確認したが、*in vitro* で過酸化水素で酸化することによりこの核タンパク質と共通配列との結合が促進された。これらの結果から、酸素ストレス防御に関わる3つの遺伝子が、共通なシス-エレメントによりレッドックス制御を受けている可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は高等植物における活性酸素消去系酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) とアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) について、遺伝子の発現応答を解析することによりその発現調節機構の解明を行ったものである。

本論文において申請者はイネAPX遺伝子の発現応答をRNAレベルで解析している。特に、細胞質型APXの酸素ストレスに対する応答の解析において、活性酸素消去系酵素の阻害剤を用いた生理学的な実験によって、細胞質型APXが細胞内の過酸化水素によって誘導されることを明らかにした。またパラコートによる細胞質型APXの誘導が、細胞内で生成する過酸化水素によって引き起こされていることを示した。これらの知見に基づいて申請者は、細胞内において過酸化水素が酸素ストレスのシグナルとして機能していることを提唱した。また葉緑体型APXについて、黄化芽生えの緑化過程における発現応答を調べることにより、光合成電子伝達とチラコイド型APXの発現との関連を示した。さらに、電子伝達阻害剤を用いた実験により、プラストキノンの酸化還元状態によって葉緑体型APXが調節されていることを初めて明らかにした。このように申請者はAPX遺伝子の発現調節に関与する因子についての重要な知見を得た。

一方、酸素ストレスの防御には活性酸素の消去、酸化的障害の修復などを行う複数の酵素が関与しており、大腸菌、酵母においてはそれらの酵素遺伝子が共通な転写因子により調節されていることが知られている。申請者は、イネ細胞質型SOD遺伝子 *sodCc 1*、イネ細胞質型チオレドキシシン遺伝子、イネグルタレドキシシン遺伝子のプロモーターに共通に保存されている新規なシス-エレメント様配列を解析することにより、酸素ストレス防御に関わる上記の3つの遺伝子が、共通なシス-エレメントによりレドックス制御を受けている可能性を示した。この結果は、大腸菌や酵母で見られるものと同様な制御機構が高等生物の酸素ストレス防御系においても存在する可能性を指摘したものである。また申請者は、*sodCc 1*プロモーターにおいて、スーパーオキシドに応答するシス-エレメントを発見しているが、植物のSOD遺伝子においてシス-エレメントとして同定された配列はこれが初めての例である。このように申請者の得た成果は、高等生物における遺伝子発現のレドックス制御に関する研究に新しい領域を開拓したものであり、学術的意義は極めて大きい。

よって本論文は博士(理学)の学位を授与するに十分であると判断し、平成11年1月19日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。