

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

森田重人

目 次

序論	1
第1章 イネ細胞質型SODとイネ細胞質型APXの協調的発現	6
第2章 イネ細胞質型APXの酸素ストレスに対する発現応答； シグナルとしての過酸化水素の可能性	27
第3章 イネ葉緑体型APXのcDNAクローニングと光に 対する発現応答	42
第4章 イネカタラーゼの酸素分圧の変動に対する発現応答	63
第5章 イネ酸素ストレス防御遺伝子のプロモーターに存在する 共通配列の解析	79
結論	97
謝辞	98
引用文献	99

要 旨

活性酸素は生体内で不可避免的に生成しており、細胞構成成分を酸化することにより細胞に毒性をもたらす。あらゆる好気性生物は活性酸素を消去する代謝系を備えており、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)、カタラーゼ等の複数の酵素が活性酸素の消去に関与している。本研究では、イネ活性酸素消去系酵素遺伝子群の発現応答を調べることにより、それらの発現調節機構について考察を試みた。

これまでにイネでは2個の細胞質型SOD遺伝子の存在が知られている。イネ細胞質型APXのcDNAクローニングを行った結果、イネには2種類の細胞質型APXが存在することが明らかとなった。イネにおいて2種の細胞質型SOD遺伝子 (*sodCc1*, *sodCc2*) と2種の細胞質型APX遺伝子 (*apxa*, *apxb*) が協調的な発現応答を示すかどうかを調べたところ、イネ緑葉において*sodCc1*, *sodCc2*および*apxa*, *apxb*はいずれもパラコート、過酸化水素により誘導された。一方ABAに対する応答を調べたところ、細胞質型SOD、細胞質型APXとも2つの遺伝子のうち一方 (*sodCc2*, *apxa*) はABAにより誘導されたが、他方は顕著な応答を示さなかった。以上の結果から、2種のイネ細胞質型SOD遺伝子と2種の細胞質型APX遺伝子はABAによりそれぞれ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。

イネ細胞質型APXはパラコートおよび過酸化水素により誘導されるが、過酸化水素による誘導はパラコートによる誘導に比べて早いことが明らかとなった。この結果から、パラコートによる細胞質型APXの誘導は、スーパーオキシドによる直接的なものではなく、SODの反応によりスーパーオキシドから生じた過酸化水素による可能性が考えられた。細胞内の過酸化水素レベルを変動させるためにSOD阻害剤および過酸化水素消去酵素 (APX、カタラーゼ) 阻害剤で処理を行った。その結果、SOD阻害剤処理によりパラコートによる細胞質型APXの誘導が抑制された。またAPX阻害剤、カタラーゼ阻害剤で処理を行うと、細胞中の過酸化水素量の上昇がみられるとともに、パラコート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。この結果から、細胞質型APXが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の上昇がみられたことから、パラコートによる細胞質型APXの誘導において、過酸化水素がシグナルとして働いている可能性が示唆された。

また葉緑体型APXについても2種類のcDNA（ストロマ型およびチラコイド型）を単離した。チラコイド型APXは主に光合成組織において発現していたのに対して、ストロマ型は根においてmRNA、活性とも多量に存在した。黄化芽生えの緑化過程において、ストロマ型は顕著な応答がみられなかったが、チラコイド型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ことが示唆された。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はプラスチキソンの酸化還元状態によって調節されていることが示唆された。

水中で発芽させたイネ芽生えを空气中へ移すと、酸素分圧の上昇に伴って、活性酸素消去系の6つの酵素の活性が上昇することが知られている。その中でも最も顕著に誘導されるカタラーゼについて、酸素分圧の変動に対する応答を調べた。その結果カタラーゼの発現は酸素分圧の上昇または低下に応答して誘導または抑制されたことから、カタラーゼ遺伝子は酸素分圧の変動により調節されていることが明らかとなった。

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*sodCc1*、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非常に相同性の高い28bpの配列が共通して存在する。この共通配列が、これらの遺伝子を制御するシス-エレメントである可能性を検討した。共通配列を含む*sodCc1*プロモーターの77bpの領域をCaMV 35Sプロモーターとルシフェラーゼの融合遺伝子の上流に連結してトランジェントアッセイを行った。その結果、ルシフェラーゼ活性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たことから、この77bpの領域は酸化還元に応答するシス-エレメントとして機能することが明らかとなった。またゲルシフトアッセイにより、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。核抽出物を*in vitro*で過酸化水素処理を行うことにより、核タンパク質と共通配列との結合が促進された。また核抽出物をSDS-PAGEで分画後Southwestern blotを行った結果、共通配列と直接結合する2種類のタンパク質の存在が明らかとなった。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ドックス制御を受けている可能性が示唆された。

略 号

ABA	abscisic acid
APX	ascorbate peroxidase
cAPX or cyt APX	cytosolic APX
sAPX or str APX	stromal APX
tAPX or thy APX	thylakoidal APX
BSA	bovine serum albumine
CaMV	cauliflower mosaic virus
CAT	catalase
COX	cytochrome <i>c</i> oxidase
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
2, 4-D	2, 4-dichlorophenoxyacetic acid
DBMIB	2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl- <i>p</i> -benzoquinone
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethyl urea
DDC	<i>N, N</i> -diethyldithiocarbamate
DHAR	dehydroascorbate reductase
DMSO	dimethylsulfoxide
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EST	expressed sequence tag
GR	glutathione reductase
GUS	β -glucuronidase
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonic acid
ICL	isocitrate lyase
LUC	luciferase
LUC+	modified luciferase
MDAR	monodehydroascorbate reductase
ORF	open reading frame

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RubisCO	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SDS	sodium dodecylsulfate
SOD	superoxide dismutase
cyt SOD	cytosolic SOD
pls CuZn-SOD	plastidic CuZn-SOD
TCA	trichloroacetic acid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
UTR	untranslated region

序 論

酸素は好気性生物にとって生命の維持に不可欠である。しかしながら、分子状酸素 (O_2) の還元によって生じるスーパーオキシド (O_2^-) ならびに過酸化水素 (H_2O_2)、およびそれらが反応して生成するヒドロキシラジカル ($OH\cdot$) 等の活性酸素は、細胞の構成成分を酸化することにより細胞に毒性をもたらす [24]。活性酸素による酸化は酵素の不活化、膜脂質の過酸化等を引き起こし、細胞に致命的な障害を与える [101]。活性酸素は代謝反応の副産物として生体内で不可避免的に生成する。高等植物においては、葉緑体の光化学系 I やミトコンドリアおよびマイクロボディの電子伝達鎖においてスーパーオキシドが生成し [5, 19, 93]、またスーパーオキシドの不均化やマイクロボディに局在するオキシダーゼの反応によって過酸化水素が生成している [102]。あらゆる好気性生物は、活性酸素を消去する代謝系を備えており、活性酸素の生成と消去のバランスの上で生きている。このバランスが傾くことによって生じる活性酸素によるストレスを酸素ストレスという。

植物は移動する能力を持たないため環境条件の変動により低温、乾燥、強光等のストレスを受ける。このような環境ストレスは植物体内における活性酸素の生成を増大させることが知られていることから、植物は常に酸素ストレスの脅威に曝されている。他の生物と同様、高等植物においても活性酸素消去系が存在し、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)、カタラーゼ (CAT)、モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素 (MDAR)、デヒドロアスコルビン酸還元酵素 (DHAR)、グルタチオン還元酵素 (GR) の 6 つの酵素が活性酸素の消去に機能している [8] (Fig. 0-1)。この代謝系において、スーパーオキシドは SOD によって不均化され過酸化水素と分子状酸素に変換される。また過酸化水素は APX またはカタラーゼによって消去される。APX の反応に伴ってアスコルビン酸が酸化されモノデヒドロアスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸が生じるがこれらは MDAR、DHAR によって還元されアスコルビン酸へと再生する。DHAR はその反応にグルタチオンの還元力を必要とするが、還元型グルタチオンの供給に GR が機能している。カタラーゼの細胞内局在はマイクロボディに限られているが、他の 5 つの酵素は細胞内局在の異なる複数のアイソザイムが存在し、主に葉緑体、ミトコンドリア、細胞質に分布してい

る。これらの酵素のストレス防御における重要性は、センスまたはアンチセンスの形質転換植物で証明されている。SOD、APX、GRの過剰発現によって酸素ストレス [2, 3, 7, 47, 123]、光阻害 [29, 106]、低温 [61]、乾燥 [62]、オゾン [122] に対する耐性の上昇がみられる。またAPXのアンチセンス形質転換体 [82]、カタラーゼのアンチセンス形質転換体 [129] ではそれぞれオゾン、強光によって野生型に比べより顕著な障害が観察されている。

生体内での活性酸素レベルを適正に調節するために、活性酸素消去系酵素遺伝子の発現は精密に制御されていると考えられる。酸素ストレス下において、複数の消去系酵素の協調的な発現がみられる。その例として、低温 [103]、強光 [10, 66]、乾燥 [69]、オゾン曝露 [15, 91]、酸素分圧の上昇 [120] といったストレスにおいて複数の活性酸素消去系酵素、特にSODとAPXの協調的な誘導が知られている。SODとAPX（および他の消去系酵素）が同時に誘導されることによって細胞は酸素ストレスを効果的に防御していると考えられる。極端に過剰なSOD活性は植物にとって有害であることが葉緑体型SODの形質転換タバコにおいて観察されている [116]。この現象は上昇したSOD活性により生じた過酸化水素が原因であると推測されており、SODと他の消去系酵素とのバランスが不可欠であることを示唆している。

本研究では活性酸素消去系酵素のうちSOD、APX、カタラーゼについて、酸素ストレスを初めとする様々な刺激に対する発現応答を調べることにより、これらの遺伝子の発現調節機構についての考察を試みた。これまでに筆者の属する研究グループでは、イネSOD遺伝子の構造および発現について研究がなされてきた。SODには、活性中心の金属の違いおよび細胞内局在の違いにより細胞質型CuZn-SOD、葉緑体型CuZn-SOD、ミトコンドリア型Mn-SOD、葉緑体型Fe-SODの複数のアイソザイムが存在する [8]。イネにおいてこれらのアイソザイムに対するcDNAおよび核遺伝子のクローニングが行われ [48, 49, 50, 97, 98, 99]、種々のストレスに対する発現応答の解析が進められている [47, 99]。そこで筆者はSODに続く反応を触媒するAPXを中心に、cDNAの単離と発現応答の解析を行った。またSOD遺伝子の構造解析の結果から、イネ細胞質型SOD遺伝子のプロモーター領域には新規なシス-エレメント様の配列の存在が明らかとなっている [99, 本論文第5章]。この配列は、活性酸素による障害の修復に機能しているイネグルタレドキシシン遺伝子とイネチオレドキシシン遺伝子のプ

ロモーターにも共通に存在している。この配列が遺伝子発現調節に関与しているかどうかを検討することにより、SOD遺伝子の発現調節機構の解明を試みた。本研究で行ったそれぞれの研究の詳細を、5章に分けて以下に述べることとする。

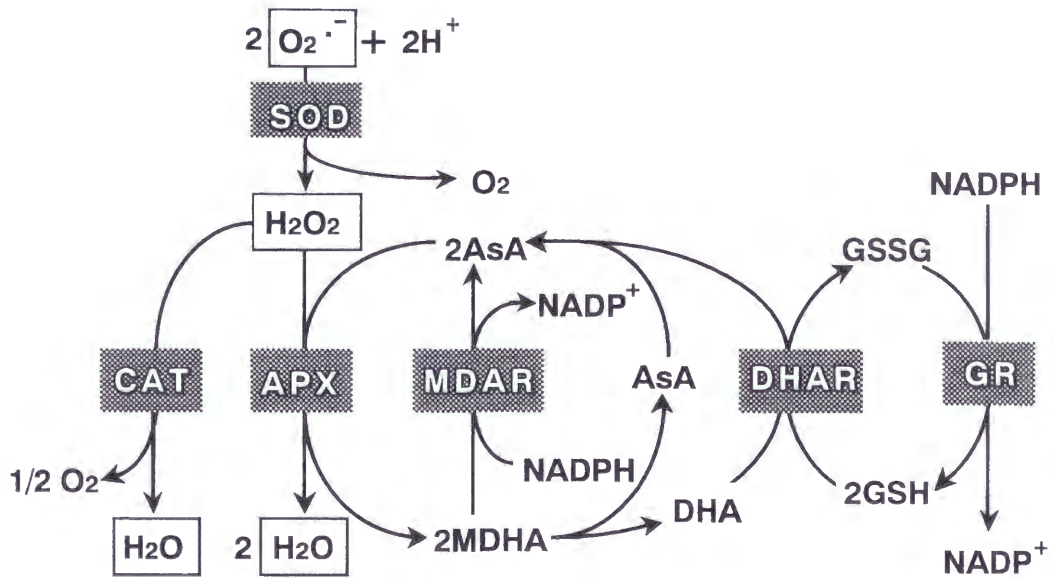


Fig. 0-1 高等植物における活性酸素消去系の反応経路

SOD: スーパーオキシドジスムターゼ、CAT: カタラーゼ、
 APX: アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、MDAR: モノデヒド
 ロアスコルビン酸還元酵素、DHAR: デヒドロアスコルビン酸
 還元酵素、GR: グルタチオン還元酵素、AsA: アスコルビン酸、
 MDHA: モノデヒドロアスコルビン酸、DHA: デヒドロアスコ
 ルビン酸、GSH: 還元型グルタチオン、GSSG: 酸化型グルタチ
 オン。

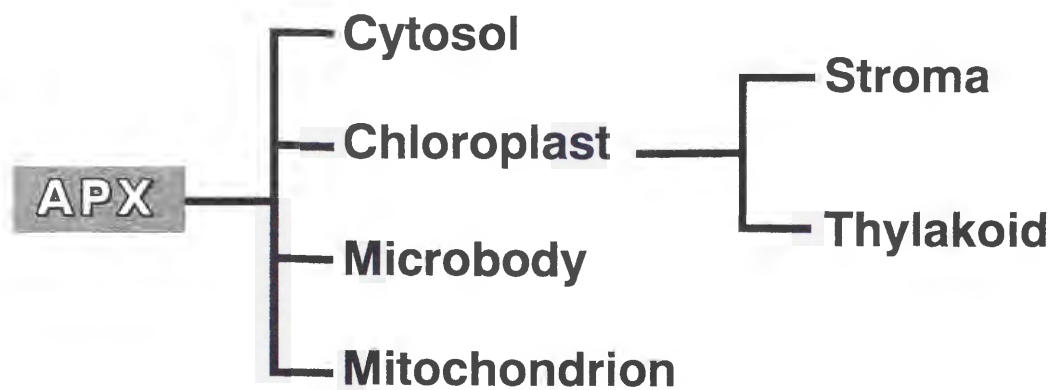
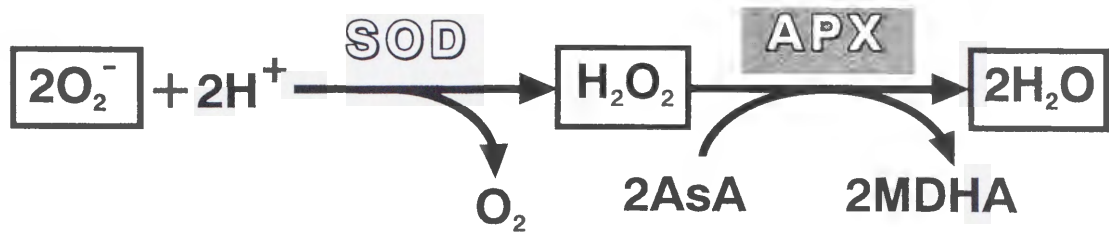


Fig. 0-2 アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) の反応経路およびアイソザイム

略号はFig. 0-1に同じ。

第1章

イネ細胞質型SODとイネ細胞質型APXの協調的発現

APX (EC 1.11.1.11) は高等植物、緑藻、一部のシアノバクテリアにおいて存在する過酸化水素消去酵素である [4]。APXには、細胞質型、葉緑体型、マイクロボディ型、ミトコンドリア型のアイソザイムが存在する [4, 45, 131] (Fig. 0-2)。このうち葉緑体型は、可溶性のストロマ型APXと膜結合型のチラコイド型APXに分かれる [70]。最近のAPX cDNAのクローニングにより、細胞質型APX遺伝子は複数存在することが明らかとなっている [39, 44, 100]。Jespersenらは、これらのAPXアイソザイムを、ストロマ型、チラコイド型、可溶性細胞質型1および2 (cs1, cs2)、膜結合細胞質型1~3 (cm1-3) の7種類に分類している [44]。APXは、乾燥、塩、強光、低温、紫外線照射、オゾン、亜硫酸ガス、酸素分圧の上昇といった環境ストレスや傷害、病原体の感染によって誘導される [15, 23, 34, 51, 54, 66, 69, 83, 91, 103, 115, 120, 128]。これまでに、ABA、スーパーオキシド、過酸化水素、グルタチオン、メチルジャスモン酸、フィトクロム、プラストキノンの酸化還元状態によってAPXの発現が調節されていることが示されている [21, 51, 55, 68, 83, 85, 117]。しかし、APX遺伝子の発現調節機構は未だ不明な点が多い。

本研究ではAPXアイソフォームの発現調節機構に関する知見を得ることを目的として、イネにおいてAPX cDNAのクローニングを行い、酸素ストレスを初めとする様々な刺激に対するAPXの発現応答を調べた。

材料と方法

植物の育成とストレス処理

イネ (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) を材料として用いた。種子を28℃で一晩吸水させた後播種し、明期16時間 (光量220 μ E/m²/s)、暗期8時間の明暗周期下で28℃で10-14日間、水耕で育成させた。

パラコート、過酸化水素、ABAによる薬剤処理は、水耕液を所定濃度の薬剤液に換

え、根から薬剤を吸収させることで行った。低温処理は、植物を4℃に移すことで行った。12時間の低温処理後、植物を再び28℃に戻して12時間栽培し低温ストレスから回復させた。乾燥処理は、水耕液を抜き去り水を断つことによって行った。12時間の乾燥処理後、再度水を与えて12時間栽培した。塩処理は、水耕液を0.25M NaClに換えることで行った。48時間の処理後、0.25M NaClを水に換えて塩ストレスから回復させた。薬剤処理、ストレス処理およびストレス後の回復は全て連続光照射下（光量220 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ）で行った。サンプルは採取後直ちに液体窒素によって凍らせ、使用時まで-80℃で保存した。

イネ細胞質型APX cDNAのクローニング

播種後14日目のイネ緑葉よりグアニジンチオシアネート/CsCl-超遠心法 [13] によって調製したtotal RNAから、Oligotex-dT30（宝酒造）を用いてpoly(A)⁺ RNAを精製した。得られたpoly(A)⁺ RNAを鋳型にしてTimeSaver cDNA synthesis kit（Amersham-Pharmacia）を用いてcDNAを合成し、 λ ZAPIIベクター（Stratagene）に組み込みcDNAライブラリーを作製した。

細胞質型APXをコードすると思われるイネESTクローン（accession no. D25238）の配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、PCRによってイネ緑葉由来の一本鎖cDNAを増幅しpartial cDNAを得た。このpartial cDNAをプローブに用いたプラークハイブリダイゼーションにより、cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。得られたクローンのインサートをプローブに用いてさらにスクリーニングを行い、より長いインサートを持つクローンを単離した。単離されたクローンをサブクローニング後、塩基配列の決定を行った。なおAPXaの配列は、EMBL、DDBJ、GenBankシークエンスデータベースにaccession no. D45423として登録された。塩基配列に基づく構造解析、他のAPXとのホモロジー検索および分子系統樹の作成は、GENETYX-WIN Ver. 3（ソフトウェア開発）により行った。

細胞質型SOD、細胞質型APXに対するプローブの調製

イネ細胞質型SOD遺伝子、*sodCc1*、*sodCc2*、イネ細胞質型APX遺伝子、*apxa*、*apxb*のそれぞれのcDNAの3'-UTRをPCRにより増幅し、得られたDNA断片をそれぞれ

れの遺伝子に特異的なプローブとした。PCRにより増幅した領域は次の通りである。SODCc1 (accession no. D00999) : base no. 526-760、SODCc2 (accession no. D01000) : base no. 475-667、APXa: base no. 793-983、APXb: base no. 815-1058。また*apxa*の全長cDNAおよびイネactin cDNA (accession no. D15628、イネゲノム研究プログラムより分与された) のインサートDNA (*apxa*: *EcoRI* 断片、actin: *Sal I*-*Not I* 断片) を制限酵素切断によりベクターより切りだし、プローブに用いた。それぞれのプローブをBcaBEST Random Primer Labeling Kit (宝酒造) を用いて³²Pで標識した。

Genomic Southern blot

播種後14日目のイネ緑葉よりCTAB法 [77] によってゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNA 10 μ gを100Uの制限酵素で一晩切断した後、アガロースゲル電気泳動により分画した。DNAをナイロンメンブレンにプロットした後、*apxa*および*apxb*に特異的なプローブ、あるいは*apxa*の全長cDNAをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションを、5 \times Denhardt's, 6 \times SSPE, 0.1% SDS, 100 μ g/ml salmon sperm DNA、65 $^{\circ}$ Cの条件で一晩行い、洗浄を55 $^{\circ}$ Cの6 \times SSC, 0.1% SDS中で20分間2回行った。オートラジオグラフィーにより結果を得た。

Northern blot および RNA slot blot

各サンプルよりグアニジンチオシアネート/CsCl-超遠心法により調製したtotal RNA 20 μ gをformamideにより変性させた。アガロースゲル電気泳動により分画後、ニトロセルロースメンブレンにプロット、あるいはスロットプロッター (Bio-Dot microfiltration apparatus, BIO-RAD) を用いてニトロセルロースメンブレンにプロットした。*sodCc1*、*sodCc2*、*apxa*、*apxb*のそれぞれに特異的なプローブおよびinternal controlとしてイネactinプローブを用いて、ハイブリダイゼーションを、50% formamide, 5 \times Denhardt's, 6 \times SSPE, 0.1% SDS, 100 μ g/ml salmon sperm DNA、42 $^{\circ}$ Cの条件で一晩行った。洗浄を42 $^{\circ}$ Cの2 \times SSC, 0.1% SDS中で20分間2回行った。オートラジオグラフィーあるいはバイオイメージアナライザー (BAS1000、富士写真フィルム) により結果を得た。BAS1000により得られたデータを定量化する

ことによって、mRNA量を測定した。

結 果

イネ緑葉由来のmRNAからcDNAライブラリを作製し、細胞質型APX cDNAのスクリーニングに用いた。シーケンスデータベースを検索したところ、エンドウ細胞質型APXとホモロジーの高いイネEST (accession no. D25238) が登録されていた。イネ一本鎖cDNAを鋳型としたPCRによってこのESTの配列を増幅し、得られたpartial cDNAを用いてライブラリのスクリーニングを行った。その結果インサート長 1.0kb、0.6kbの2種類のクローンが単離され、それぞれAPXa、APXbと名付けた。APXbの塩基配列はno. D25238のESTクローンと一致した。APXbについては、単離されたクローンをプローブに用いて再度スクリーニングを行いインサート長 1.1kbのクローンを単離し、さらなる解析に用いた。塩基配列を決定した結果、APXaおよびAPXbはそれぞれ全長989bpおよび1138bpで、それぞれ250アミノ酸、27.2kDaおよび251アミノ酸、27.1kDaのタンパク質をコードするORFを含んでいた (Fig. 1-1、Fig. 1-2)。ホモロジー検索を行った結果、これらのクローンはいずれも細胞質型APXをコードすることが明らかとなった。APXa、APXbともにその推定アミノ酸配列中に、エンドウ細胞質型APXで同定されているヘム結合部位および活性中心のアミノ酸残基 [86] が全て保存されていた (Fig. 1-1、Fig. 1-2)。またAPXaとAPXbの推定アミノ酸配列のN末端にはいずれもトランジットペプチドと推定される配列は存在しなかった (Fig. 1-3)。APXaとAPXbはアミノ酸レベルで84%と高いホモロジーを示した。またAPXa、APXbの推定アミノ酸配列はエンドウ細胞質型APX [67]、シロイヌナズナ細胞質型APX1 [53] と80%近いホモロジーを示したが、ホウレンソウAPX1 [39]、ホウレンソウチラコイド型APX [40] とのホモロジーは50%以下であった (Table 1-1)。これまでに知られているAPXのアミノ酸配列 (推定アミノ酸配列を含む) を比較し分子系統樹を作成したところ、APXは5つのサブファミリー、すなわち葉緑体型、マイクロボディ型、細胞質型1、細胞質型2、細胞質型3に分類された (Fig. 1-4)。細胞質型1-3はそれぞれ、Jespersenら [44] による分類では、cs1、cs2、cm2およびcm3に相当した。イ

ネAPXaとAPXbはいずれも細胞質型1のサブファミリーに分類されたことから、APXaとAPXbは遺伝子重複の結果生じた相同なアイソザイムであることが示唆された。

イネ細胞質型APX遺伝子 $apxa$ および $apxb$ のコピー数を検討するために、 $apxa$ と $apxb$ のそれぞれに特異的なプローブおよび $apxa$ の全長cDNAをプローブに用いて genomic Southern blotを行った。特異的なプローブを用いた場合には1-2本のバンドが検出されたことから (Fig. 1-5)、 $apxa$ と $apxb$ はいずれもシングルコピーの遺伝子であると推定された。 $apxa$ のcDNAの配列にはNco Iのサイトが1箇所存在するが、それ以外に $apxa$ と $apxb$ のcDNAにはここで用いた制限酵素サイトは存在しない。 $apxa$ の全長cDNAをプローブに用いた場合、Nco I、Kpn Iの各レーンでそれぞれ3本、2本のバンドが検出された (Fig. 1-5)。Hind IIIのレーンにおいて4本のバンドが検出されたものの、 $apxa$ 、 $apxb$ 以外に細胞質型1のサブファミリーに属するAPX遺伝子が存在する可能性は低いと考えられた。低いstringencyでハイブリダイゼーションを行った場合にもFigure 1-5と同様な結果であったことから (データ省略)、 $apxa$ の全長cDNAをプローブとした場合も他のサブファミリーのAPXアイソフォームとはクロスハイブリダイズしないことが明らかとなった。

次に $apxa$ と $apxb$ の組織における発現をNorthern blotによって調べた。その結果、 $apxa$ と $apxb$ はいずれも緑葉、黄化葉、根で発現していたが、特に根で高い発現がみられた (Fig. 1-6)。非光合成組織においても発現がみられることから $apxa$ 、 $apxb$ は細胞質型をコードすることが確認された。

本実験により2種類のイネ細胞質型APX遺伝子、 $apxa$ と $apxb$ の存在が明らかとなったが、一方イネには2種類の細胞質型SOD遺伝子 ($sodCc1$ 、 $sodCc2$) [99]が存在する。イネSODとAPXのこれらの遺伝子が様々な刺激やストレスに対してどのような発現応答を示すかを次に調べた。まず初めに、細胞質型SODと細胞質型APXの酸素ストレスに対する応答を調べた。イネ芽生えをパラコートあるいは過酸化水素で処理し、Northern blotを行ってそれぞれの遺伝子の発現を調べた。その結果、 $sodCc1$ 、 $sodCc2$ はいずれもパラコート処理、過酸化水素処理によって誘導がみられた。また $apxa$ 、 $apxb$ の双方とも同様にパラコート、過酸化水素によって誘導されたが、細胞質型APXの誘導は細胞質型SODに比べて顕著であった (Fig. 1-7)。このように、2種の

細胞質型SOD遺伝子と2種の細胞質型APX遺伝子はいずれも酸素ストレスに応答することが明らかとなった。

*sodCc1*および*sodCc2*はABAに対して異なった応答を示すことがこれまでに解っている [99] ことから、細胞質型APXがABAに対してどのように応答するか、また細胞質型SODと細胞質型APXで協調的な発現がみられるかどうかを検討した。イネ緑色芽生えをABA処理しRNA slot blotを行った。その結果Figure 1-8に示すように、細胞質型SODのうち、*sodCc2*は顕著な誘導がみられたが*sodCc1*は大きな変動はみられなかった。一方細胞質型APXでは、*apxa*のmRNA量がABAによって上昇したが、*apxb*では誘導はみられなかった。*sodCc2*および*apxa*の誘導はABA処理24時間まで続き、それらのmRNA量の上昇は処理24時間でそれぞれ2.6倍、2.3倍であった。このように2種の細胞質型SODと2種の細胞質型APXのうち、一方がABAによって誘導されることが明らかとなった。

ABAは低温、乾燥、浸透圧などのストレス条件下においてセカンドメッセンジャーとしてシグナルの伝達に機能する [113]。そこでABAがシグナリングに関与すると考えられるストレスにおいて、細胞質型SODと細胞質型APXがFigure 1-8でみられたものと同様な応答を示すかどうかを検討した。まず初めに細胞質型SODと細胞質型APXの低温に対する応答を調べた。イネ芽生えを4℃で処理したところ、*sodCc1*、*sodCc2*ともmRNA量は処理12時間でやや減少した。この減少はその後常温に戻して12時間後にも回復しなかった。一方、細胞質型APXにおいては異なった応答がみられた。*apxa*は12時間の低温処理の間大きな変動はみられなかったが、処理後常温に戻すとmRNA量が減少した。*apxb*においては、低温処理によりmRNA量の減少がみられたが、続いて常温に戻した後にはmRNA量は処理前と同レベルまで回復した (Fig. 1-9)。このように*apxa*と*apxb*で逆の応答がみられた。

次に乾燥に対する細胞質型SODと細胞質型APXの応答を調べた。乾燥処理により2種の細胞質型SODおよび2種の細胞質型APXのうち、*sodCc2*のみが処理24時間で顕著に誘導された。その後芽生えに再び水を与えてストレスから回復させると、*sodCc2* mRNA量はコントロールのレベルまで低下した。他の3つの遺伝子については顕著な変動はみられなかった (Fig. 1-10)。

次に塩処理に対する細胞質型SODと細胞質型APXの発現応答を調べた。イネ芽生え

を0.25M NaClで処理した結果、Figure 1-11に示すように*sodCc1*、*sodCc2*、*apxa*、*apxb*はいずれも48時間までmRNA量の上昇がみられた。このように塩ストレスに対する応答において細胞質型SODと細胞質型APXが協調的に誘導されることが示された。

考 察

イネ細胞質型APX cDNAの単離を試みた結果、APXa、APXbの2種類のcDNAが単離された (Fig. 1-1、Fig. 1-2)。これらのクローンのコードするポリペプチドにはトランジットペプチド様の配列が存在しないことと (Fig. 1-3)、黄化葉や根などの非光合成組織においても発現していたことから (Fig. 1-6)、これらが細胞質型アイソザイムのcDNAであることが確認された。ホモロジー検索の結果これまでに知られているAPXは5つのサブファミリーに分類されたが、APXa、APXbは同じサブファミリー (細胞質型1) に属していた (Fig. 1-4)。同一種で複数の細胞質型APXが存在しているのは、ホウレンソウ [39]、シロイヌナズナ [53, 100]、ice plant (accession no. AF079512, AF079513) であるが、複数の細胞質型1のAPXアイソザイムが存在するのはイネのみである。細胞質型2のサブファミリーに属するシロイヌナズナAPX2は通常は発現しておらず強光により強く誘導される [51]。また細胞質型3のサブファミリーは膜結合型のアイソザイムであると推定されている [44]。このようにサブファミリーの異なる細胞質型アイソザイムは、発現パターンや細胞内での局在が大きく異なっており、それぞれ異なった機能を果たしていると考えられる。それに対しAPXa、APXbは極めて相同なアイソザイムであり、酵素としての性質や細胞内局在は類似していると考えられる。Genomic Southernの結果、*apxa*と*apxb*の他に細胞質型1に属する相同なアイソザイム遺伝子は存在しないことが示唆された (Fig. 1-5)。この結果から、イネには極めて相同性の高い2種類の細胞質型SOD遺伝子 [99] と2種類の細胞質型APX遺伝子が対になって存在しているといえる。

*apxa*と*apxb*の組織における発現を調べたところ、双方とも緑葉におけるmRNAレベルは、黄化葉、根に比べて低かった (Fig. 1-6)。本実験のNorthern blotはtotal RNAベースで行っているため、Figure 1-6の結果は、total RNAに占める*apxa*と*apxb*の

mRNAの存在比が緑葉においては小さいことを示しており、実際に*apxa*と*apxb*の発現が緑葉において低いわけではないと考えられる。

2種の細胞質型SOD遺伝子と本実験で明らかとなった2種の細胞質型APX遺伝子が協調的に発現しているかどうかを検討した結果、*sodCc1*と*sodCc2*、*apxa*と*apxb*はいずれもパラコートおよび過酸化水素により誘導されることが明らかとなった (Fig. 1-7)。細胞質型SOD、細胞質型APXとも2種のアイソフォームは酸素ストレスにより同様な発現調節を受けていると考えられる。これまでに細胞質型SOD、細胞質型APXのパラコートによる誘導が活性レベルおよびmRNAレベルでよく知られており [21, 59, 68, 85, 87, 119]、本実験の結果はこれまでの報告と一致するものである。一方これまでに過酸化水素による誘導は、細胞質型SODに関しては1例 [85]、細胞質型APXに関しては2例が [55, 85] 活性レベルで報告されているのみである。本実験の結果は細胞質型SODと細胞質型APXのmRNAの過酸化水素による誘導を示した初めての報告である。またABAに対する応答を調べた結果、2種の細胞質型SODと2種の細胞質型APXはABAに対して協調的かつ異なった応答を示した (Fig. 1-8)。すなわちイネ細胞質型SODと細胞質型APXにおいては、ABAによって協調的に誘導を受けるアイソフォームと、ABAによる誘導を受けないアイソフォームがそれぞれ対をなしていることが示された。

SODとAPXの協調的誘導についてはこれまでに多くの報告例があり、本実験の結果はそれらと一致するものである。SODとAPXの協調的な発現が、細胞内のスーパーオキシドおよび過酸化水素量を低く維持し、酸素ストレスを防御する上で必須であると考えられる。環境ストレスは植物体内に酸素ストレスを引き起こすことが知られており、低温 [36]、乾燥 [107] によってスーパーオキシドが、低温 [26, 79, 81, 88]、紫外線照射 [76]、高温 [18, 30]、強光 [51]、塩処理 [34] によって過酸化水素が植物体内で生成する。環境ストレスによるSODおよびAPXの協調的誘導には、植物体内で生成する活性酸素の関与が考えられる。中でもオゾン¹は細胞内で過酸化水素、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカルに分解されることから [24]、オゾンによる細胞質型SOD mRNAと細胞質型APX mRNAの誘導 [15] は分解で生じた過酸化水素あるいはスーパーオキシドによって引き起こされていると考えられる。またFigure 1-11でみられたように塩処理によって*sodCc1*、*sodCc2*、*apxa*、*apxb*がいずれも誘導されたことか

ら、イネ緑葉の塩ストレスにおける細胞質型SODと細胞質型APXの誘導は、塩処理によって生じた酸素ストレス [34] によるものと考えられる。塩ストレスのシグナル伝達には、ABA [113]、細胞内Ca²⁺ [52]、MAPキナーゼ [71] の関与が知られているが、これらに加えて活性酸素の関与する新規なシグナル伝達経路の可能性が示唆される。

本実験によりイネ細胞質型APXも細胞質型SODと同様ABAにより誘導されることが示された (Fig. 1-8)。ABAによるAPXの誘導はエンドウ [68]、シロイヌナズナ [79] でも知られている。またシロイヌナズナGR [79]、トウモロコシ細胞質型SOD [33] およびMn-SOD [133] においてABAによる誘導がみられる。イネでは細胞質型MDAR、細胞質型GR、Mn-SODにおいてもABAによる誘導が観察されている [47, 49]。このようにABAは複数の活性酸素消去系酵素を制御する重要な機能を果たしている。

またトウモロコシの細胞質型SODおよびMn-SODにおいては複数のアイソザイム遺伝子がABAに対して異なった応答を示す [33, 133]。2種の植物種で共通にみられるこのようなABAに対する応答の違いが、どのような生理的な意義を持っているのかは興味深い。トウモロコシの例においては、ABA応答性のアイソザイム遺伝子は浸透圧ストレスによっても誘導されることからABAはストレス応答に機能していると推測されている [33, 133]。しかしながら、イネにおいては低温、乾燥、塩のいずれのストレスに対しても細胞質型SODと細胞質型APXの応答は、ABAに対するものとは異なっていた (Fig. 1-9, 1-10, 1-11)。よって細胞質型SODおよび細胞質型APXの発現調節において、ABAのストレスシグナルとしての役割は小さいと考えられる。それではイネ細胞質型SODと細胞質型APXのABAによる調節はどのような生理的機能があるのだろうか。ひとつの可能性としてABAの種子形成における機能が考えられる。種子形成後期にはABA応答性の多くの遺伝子が発現する [27]。種子形成後期は種子の脱水・乾燥が始まる時期であり、通常の芽生えにおける乾燥と同様、種子組織は酸素ストレスに曝されると考えられる。これに対する防御として細胞質型SODと細胞質型APXが機能しているのではないかと考えられる。登熟期のトウモロコシ種子においてカタラーゼが [101]、また登熟期のイネ種子において酸素ストレスの防御に機能するグルタレドキシシンが発現していること [65] から、種子形成期における酸素ストレスの重要性が示唆される。登熟期種子における細胞質型SODおよび細胞質型APXの発現のキャラクタリゼーションは今後の課題である。

```

1 TCTCCTCCTCCTCCTCGATTTCGGAGCTCCACCCGAGCCATGGCTAAGAACTACCCCGTC
      M A K N Y P V
61 GTGAGCGCCGAGTACCAGGAGGCCGTCGAGAAGGCCAGGCAGAAGCTGCGCGCCCTCATC
  V S A E Y Q E A V E K A R Q K L R A L I
121 GCCGAGAAGAGCTGCGCCCTCTCATGCTCCGCTCGCGTGGCACTCGGCGGGGACGTTT
  A E K S C A P L M L R L A W H S A G T F
181 GACGTGTCGTCGAAGACCCGGGGCCCGTTCCGGGACGATGAAGACCCCGGCGGAGCTGTCG
  D V S S K T G G P F G T M K T P A E L S
241 CACGCCGCAACGCGGGGCTGGACATCGCGGTGCGGATGCTCGAGCCCATCAAGGAGGAG
  H A A N A G L D I A V R M L E P I K E E
301 ATACCCACCATCTCCTACGCCGATTTCTACCAGCTTGCCGGAGTTGTGGCCGTCGAGGTG
  I P T I S Y A D F Y Q L A G V V A V E V
361 TCCGGTGGACCTGCCGTCCCCTTCCACCCAGGAAGGGAGGACAAACCTGCACCCCCACCT
  S G G P A V P F H P G R E D K P A P P P
421 GAGGGCCGTCTTCTGATGCTACCAAGGGTTCTGACCACCTAAGGCAGGTCTTCGGTGCG
  E G R L P D A T K G S D H L R Q V F G A
481 CAGATGGGCTTGAGTGATCAGGACATTGTTGCCCTCTCTGGCGGTACACCCTGGGAAGG
  Q M G L S D Q D I V A L S G G H T L G R
541 TGCCACAAGGAAAGATCTGGTTTTGAGGGACCTTGGACAAGAAACCTCTGCAGTTTGAC
  C H K E R S G F E G P W T R N P L Q F D
601 AACTCTTACTTCACGGAGCTTCTGAGTGGTGACAAGGAGGGCCTTCTTCAGCTTCTAGT
  N S Y F T E L L S G D K E G L L Q L P S
661 GACAAAGCCCTGCTGAGTGACCCTGCCTTCCGCCCACTCGTCGAGAAATATGCTGCAGAT
  I K A L L S D P A F R P L V E K Y A A D
721 GAGAAGGCTTTCTTTGAAGACTACAAGGAGGCCACCTCAAGCTCTCCGAACTGGGGTTC
  E K A F F E D Y K E A H L K L S E L G F
781 GCTGATGCTTAAGAGGTTTCTAGTCTACTACTGCTAGTACATTGCCCGTGGTACTCTTGT
  A D A *
841 TTTGCATCTAGGCTAGGGCCAGTGTGAACCAGCAGACTACCACTGTGAGTCGCCTCTGTA
901 ATAAAATTTGTTCCGGCCTATGGCATCCTCAGTACGTTGTCAATGTCTCGGTGGGCTGTTA
961 TGCTCAACTGCAATGCTGCATCC

```

Fig. 1-1 APXaの塩基配列および推定アミノ酸配列

*は終止コドンを示す。白抜きで表わしたアミノ酸はヘム結合部位を、網かけで表わしたアミノ酸は活性中心を示す。ここに示した配列は、DDBJ、EMBL、GenBankシーケンズデータベースにaccession no. D45423として登録されている。

1 TGTGGAGTTGGGGATTGATTGATTGATTTCGGATTGGGAAGAAGAAGAAGCAGGGGAGCAT
 M
 61 GGGCAGCAAGTCGTACCCGACGGTGAGCGATGAGTACCTGGCGGCCGTGGGCAAGGCGAA
 G S K S Y P T V S D E Y L A A V G K A N
 121 CGGCAAGCTCCGCGGCCTCATCGCCGAGAAGAACTGCGCCCCACTCATGCTCCGCTCGC
 G K L R G L I A E K N C A P L M L **R** L A
 181 GTGGCACTCTGCTGGCACCTTCGATGTGTCGTCGAGGACCGGCGGGCCCTTCGGCACCAT
W **H** S A G T F D V S S R T G G P F G T M
 241 GAAGAACCCCGGCGAGCAGTCCCACGCCCAACGCCGGCCTCGACATCGCCGTCAGCGT
 K N P G E Q S H A A N A G L D I A V S V
 301 TCTCGACCCCATCAAGGACCAACTTCCCATCCTCTCCTACGCCGACTTCTACCAGCTTGC
 L D P I K D Q L P I L S Y A D F Y Q L A
 361 TGGCGTTGTGGCCGTCGAGGTCACCGGCGGACCTGAGGTCCCCTTCCATCCGGGCAGGCA
 G V V A V E V T G G P E V P F H P G R Q
 421 GGACAAGCCTGAGCCTCCTCCTGAAGGCCGTCTTCTGATGCCACACAAGGTTCTGACCA
 D K P E P P P E G R L P D A T Q G S D H
 481 CCTAAGGCAGGTCTTTTCTGCGCAGATGGGTTTGAGTGACAAGGACATAGTTGCTCTTTC
 L R Q V F S A Q M G L S D K D I V A L S
 541 TGGTGGTCACACACTGGGAAGATGCCACAAGGAGAGATCTGGCTTTGAGGGAGCCTGGAC
 G G **H** T L G R C H K E R S G F E G A **W** T
 601 GTCCAACCCTTTGATCTTTGACAACTCTTACTTCACCGAGCTTGTGAGTGGCGAGAAGGA
 S N P L I F D N S Y F T E L V S G E K E
 661 AGGCCTTCTTCAGCTGCCAAGTGACAAAGCCCTCATGGCTGACCCAGCCTTCCGTCCACT
 G L L Q L P S **D** K A L M A D P A F R P L
 721 GGTGGAGAAATATGCTGCGGATGAGGACGCCTTCTTTGCGGATTACGCCGAGGCCACCT
 V E K Y A A D E D A F F A D Y A E A H L
 781 CAAGCTCTCTGAACTGGGATTTGCTGAGGAATAAGAAGCCTTTAGAGAGCGGGATATCCG
 K L S E L G F A E E *
 841 CAAAAGATTAATGCCGATTTGTATTTTGCGCCTTAGAGTCAGTACGATCAAGACTGTCGT
 901 GGCGGTTGTAATAAAAATTAGTGTGCTTTGGGCCATCTTTTTATGTGATTCCAATTGTCT
 961 TTCTCTTCATTCTTGCTTTGATGCTCTTTGTCTGGACCTCTAGACCGCCGTATTGTA CTG
 1021 TGGAGTTTCAAAGTTACCAAGCTATTTGCTGTCAAGAT

Fig. 1-2 APXbの塩基配列および推定アミノ酸配列
 記号はFig. 1-1に同じ。

```

riceAPXa      1:                               M-AKNYPVW----- 8
riceAPXb      1:                               MGSKSY T----- 9
peaAPX        1:                               M-GKSY T----- 8
At APX1       1:                               M-TKNY T----- 8
sp apx1       1:                               SS-SKMGRV I----- 11
sp tAPX       1:MTDRLAMASFTTTTAAASRLLPSSSSSISRLSLSSSSSSSSSLKCLRSSL SHLFLRQ 60

riceAPXa      9:--SAEY-----QEAVEKARQKL--R-A---AEKSCAPLMRLRLAWHSA--GTFD-- 48
riceAPXb     10:--D-----LA G KR-----G-----N----- 49
peaAPX        9:--PD-----K I KR-----GF-----K I----- 48
At APX1       9:--ED-----KK C R-----G-----N I V----- 48
sp apx1      12:--NEN-----RRVI A RD--H--S VQ--DNNNS IL SF D--VDY-- 53
sp tAPX      61:RGGSA VTKTRFSTKCYASDPAQ KNA EDIKELLQSKF H I V G D GTYNK IK 120

riceAPXa     49:VSSKTGGPFGTMKTPAELSHAANAGLDIAVRMLEPTKEEPTISYADFYQLAGVVAVEVS 108
riceAPXb     50: R N G Q L D DQL IL T 109
peaAPX      49:SKT I HQ A G N L QF IV IT 108
At APX1     49:CQ R RFD QA G S IH L L D R QF F H T 108
sp apx1     54:AAT R AN SVRLAQ NRTP K IET FC RRH D T L I T 113
sp tAPX    121:EWPR AN SLSFDV K G VN LKL Q DKYSGVT LF SAT I EA 180

riceAPXa    109:GGPAVPFHPGRED--KPAPPPEGRLP-DATKG-SDHLRQVF GAQMGLSDQDIVALSGGH 163
riceAPXb    110: E Q E Q S K 164
peaAPX     109: E E D KA 163
At APX1    109: DI Q C D AK K A 163
sp apx1    114: ID A VADQD NI NPRR A T YR N K V A 159
sp tAPX    181: TI MKY V ATGPEQC E DAGPPSPAQ D YR D K A 239

riceAPXa    164:TLGRCHKERS--G-----EGPWTRNP--LQFDNSYFTELLSGDKEGLLQIPS 207
riceAPXb    165: A S I V E 208
peaAPX     164: I AA S I T E D 207
At APX1    164: D A S I K V 207
sp apx1    160:A GA D D DF T V R TP VKF T 203
sp tAPX    240: SRP GW KPETKYTKDGPAP GQSWTAEW K KDIKEKRDAD V T 299

riceAPXa    208:DKALLSDPAFRPLVEKYAADEKAFFEDYKEAHLKLSLGFADA 250
riceAPXb    209: MA D A A FAEE 251
peaAPX     208: T SV DV A A FAEA 250
At APX1    208: D V D A A M FADA 250
sp apx1    204: T R F DL R QR R A S K M L LNHPESNLYESNSCST-RL-S 261
sp tAPX    300: A FE S KVYA QE K A A NQ AKFDPAEGITLNGTPAGAPE 359

sp apx1     262:VVL-NPTLSKTEA-V-QCNTDMLDP-MQLEMVAAQAA-TDTYNMPIYTAVNC-NSLRD 313
sp tAPX     360:KFVAAKYSSNKRSELSDSMKEKIRAHEYEGFGGSPNKPLPTNYFLNIMIVIGVLAVLSYLA 419

```

Fig. 1-3 APXaおよびAPXbの推定アミノ酸配列と他のAPXとのアラインメント

イネAPXaと同じアミノ酸をドットで表し網かけで示す。pea APX: エンドウ細胞質型APX、At APX1: シロイヌナズナ細胞質型APX1、sp APX1: ホウレンソウ細胞質型APX1、sp tAPX: ホウレンソウチラコイド型APX。

	rice APXa	rice APXb
rice APXa	*	
rice APXb	83.9	*
pea APX	80.0	81.5
Arabidopsis APX1	78.0	80.2
spinach APX1	49.8	47.6
spinach tAPX	45.3	46.1
cotton mbAPX	65.2	64.9

Table 1-1 APXaおよびAPXbのコードするAPXと他のAPXのホモロジー
 pea APX: エンドウ細胞質型APX (accession no. X62077)、Arabidopsis APX1: シロイヌナズナ細胞質型APX (accession no. X59600)、spinach APX1: ホウレンソウ細胞質型APX (accession no. D49679)、spinach tAPX: ホウレンソウチラコイド型APX (accession no. D77997)、cotton mbAPX: ワタマイクロボディ型APX (accession no. U37060)。

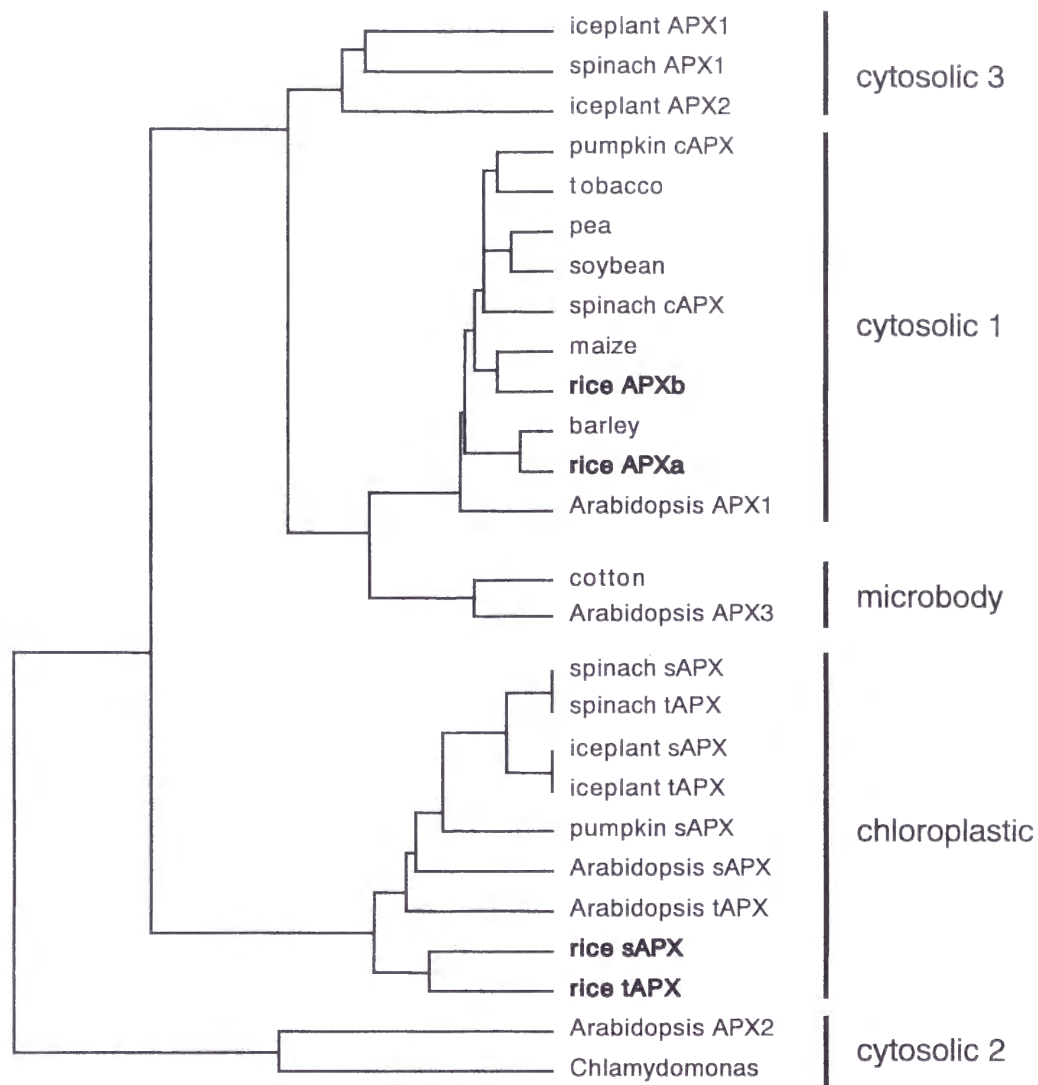


Fig. 1-4 APXの分子系統樹

ここで用いたAPXの配列は以下から引用した。Ice plant APX1: accession no. AF079513, spinach APX1: D49679, ice plant APX2: AF079512, pumpkin cAPX: D88649, tobacco: U15933, pea: X62077, soybean: L10292, spinach cAPX: L20864, maize: Z34934, barley: AJ006358, Arabidopsis APX1: X59600, cotton: U37060, Arabidopsis APX3: U69138, spinach sAPX: D83669, spinach tAPX: D77997, ice plant sAPX: AF069316, ice plant tAPX: AF069315, pumpkin sAPX: D88420, Arabidopsis sAPX: X98925, Arabidopsis tAPX: X98926, rice sAPX and rice tAPX: 本論文第4章, Arabidopsis APX2: X98275, Chlamydomonas: AJ223325.

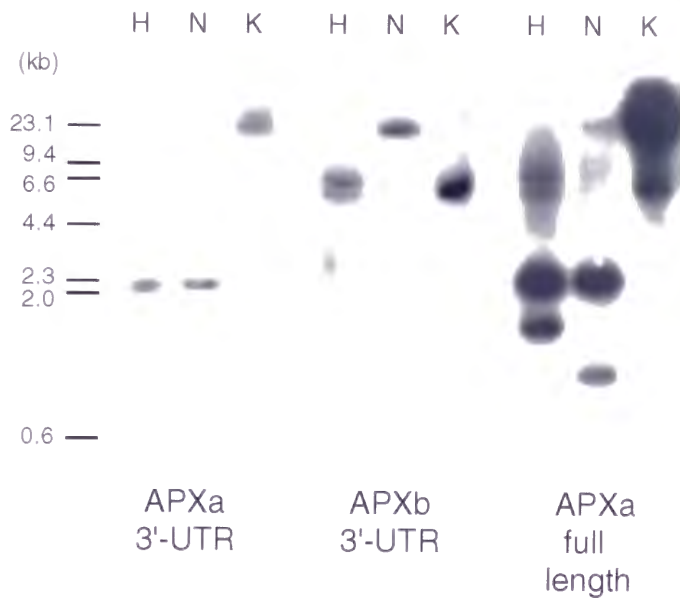


Fig. 1-5 APXaおよびAPXbのgenomic Southern解析

イネゲノムDNA10 μ gを制限酵素で切断、泳動した後に、ナイロンメンブレンにブロットした。APXaまたはAPXbの3'-UTR、およびAPXaの全長cDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、 $6\times$ SSC, 0.1% SDSを用い55°Cで2回洗浄を行った。レーン左にDNAサイズマーカーを示す。H: *Hind* III、N: *Nco* I、K: *Kpn* I。



Fig. 1-6 APXaおよびAPXbの組織における発現

イネ芽生え（播種後8日目）の各組織から抽出したtotal RNA 20 μ gを泳動により分画後、ナイロンメンブレンにブロットした。APXaおよびAPXbの3'-UTRをプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、2 \times SSC, 0.1% SDSを用い42 $^{\circ}$ Cで2回洗浄を行った。G: 緑葉、E: 黄化葉、R: 根。

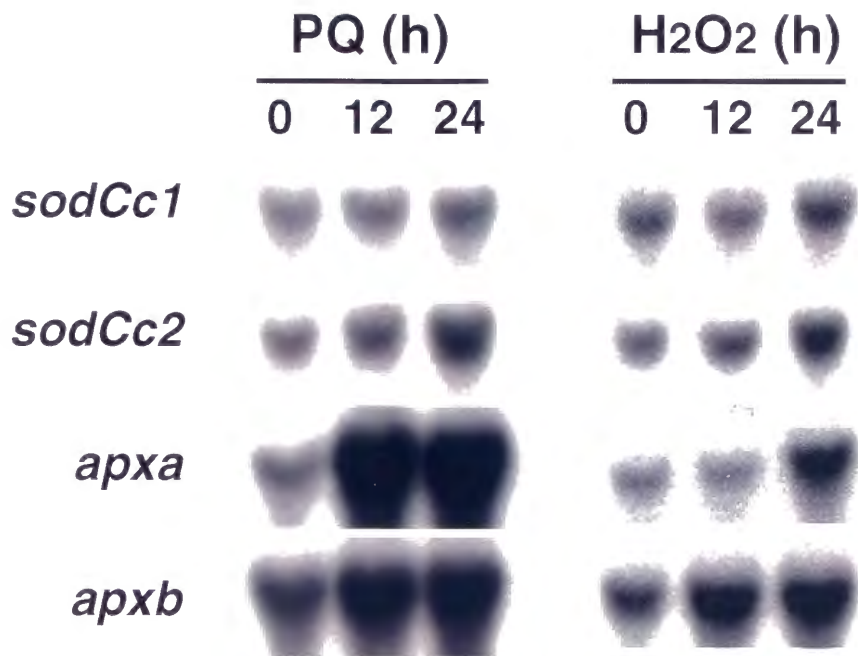


Fig. 1-7 イネ芽生えにおける細胞質型SODと細胞質型APXの酸素ストレスに対する応答

播種後14日目のイネ芽生えを10 μ M パラコートまたは1mM H₂O₂で処理した。各サンプルから抽出したtotal RNA 20 μ gを用いてNorthern blottingを行った。*sodCc1*、*sodCc2*、*apxa*、*apxb*のそれぞれに特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。レーン上の数字は処理を行った時間を示す。

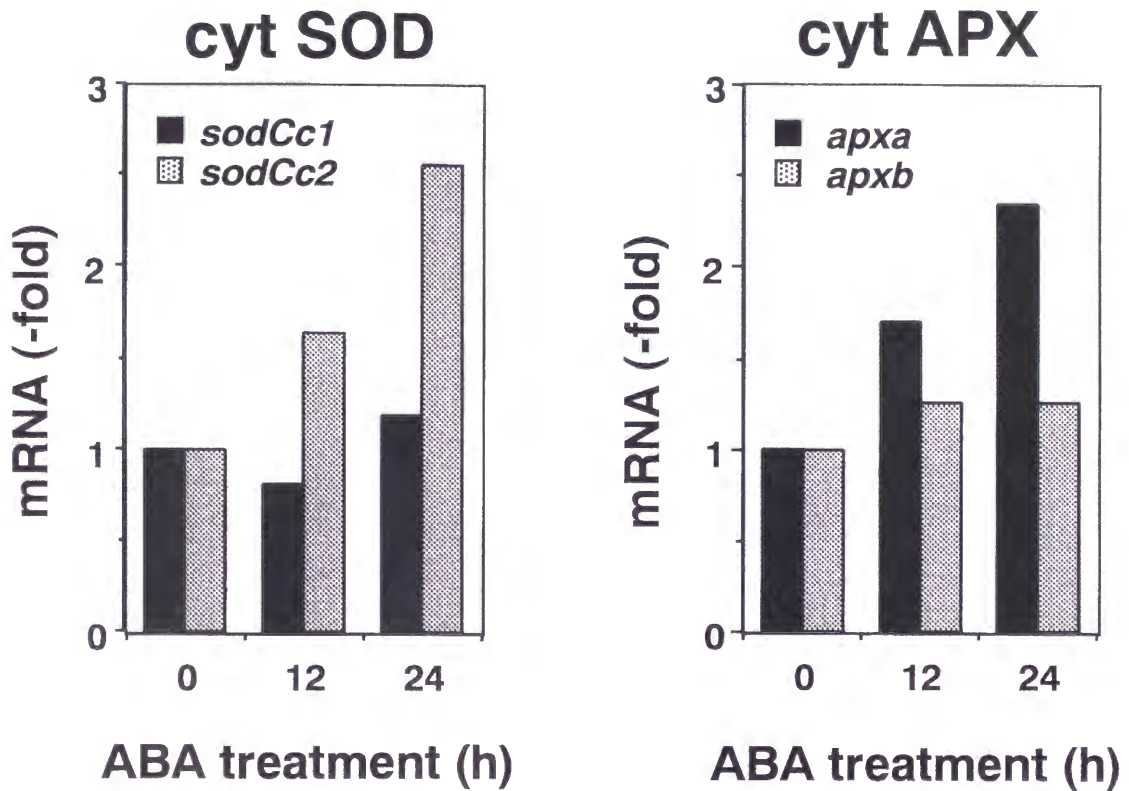


Fig. 1-8 イネ細胞質型SODと細胞質型APXのABAに対する応答

播種後10日目のイネ芽生えを0.1mM ABAで処理した。各サンプルから抽出したtotal RNA 20 μ gに対してRNA slot blotを行った。*sodCc1*、*sodCc2*、*apxa*、*apxb*のそれぞれに特異的なプローブをハイブリダイズさせた後に、同じメンブレンにイネactin cDNAをinternal controlとしてハイブリダイズさせ、得られた結果をイメージアナライザーを用いて定量化した。細胞質型SODおよび細胞質型APXのmRNA量をactin mRNA量で補正した値をグラフに表した。ここに示したデータは独立な3回の実験の平均値である。cyt SOD: 細胞質型SOD、cyt APX: 細胞質型APX。

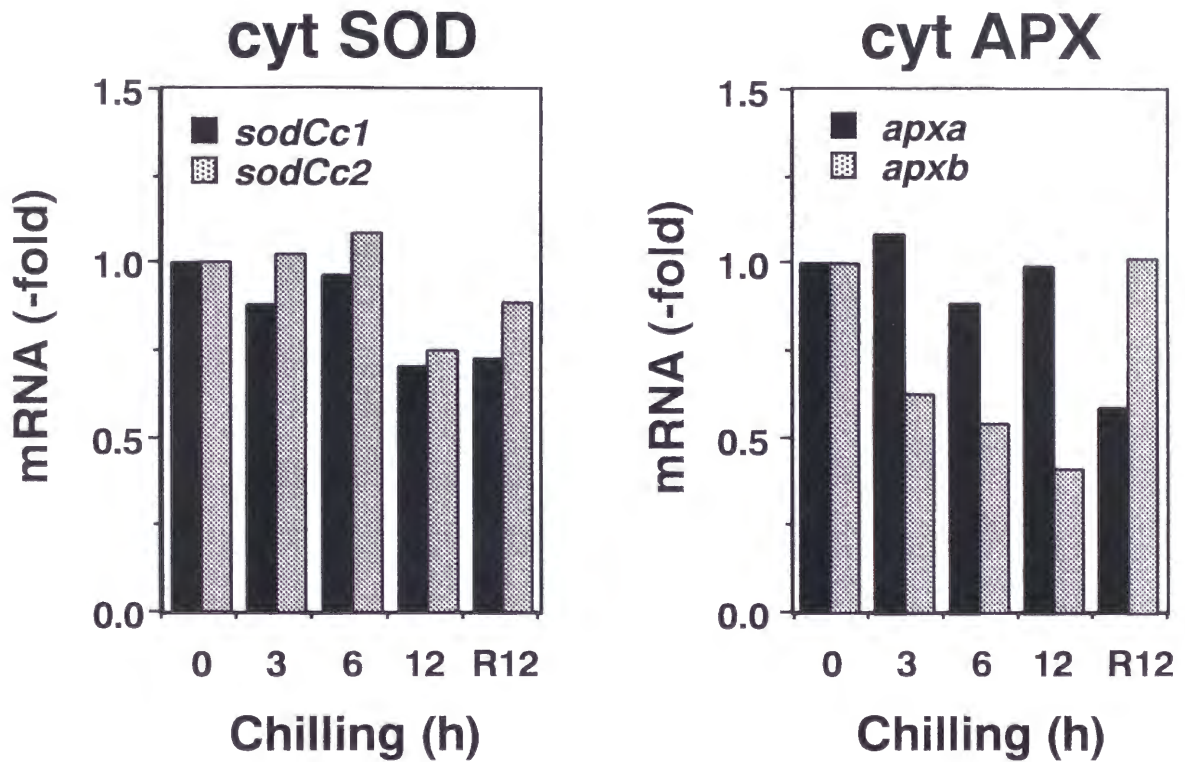


Fig. 1-9 イネ細胞質型SODと細胞質型APXの低温に対する応答

28℃で10日間生育させたイネ芽生えを4℃に移し、12時間低温処理を行った。その後、再び28℃に戻し12時間育成させた。Fig. 1-8と同様にRNA slot blotを行い、得られた結果をグラフに示した。「R12」は、低温処理後28℃に戻し12時間インキュベーションを行ったサンプルを表している。ここに示したデータは独立な3回の実験の平均値である。cyt SOD: 細胞質型SOD、cyt APX: 細胞質型APX。

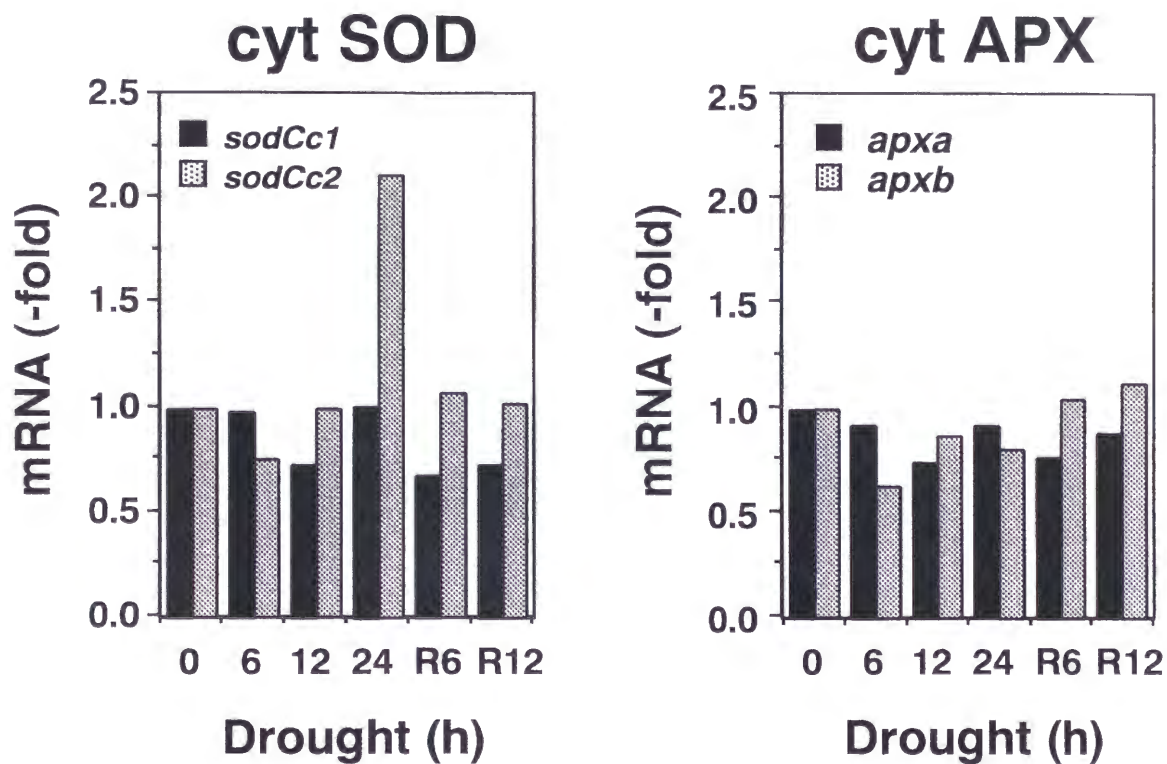


Fig. 1-10 イネ細胞質型SODと細胞質型APXの乾燥に対する応答

10日間水耕栽培したイネ芽生えの、水を抜いて12時間乾燥処理を行った。その後、再び水を与え12時間育成させた。Fig. 1-8と同様にRNA slot blotを行い、得られた結果をグラフに示した。「R6」、「R12」は、再給水させたサンプルを表している。ここに示したデータは独立な3回の実験の平均値である。cyt SOD: 細胞質型SOD、cyt APX: 細胞質型APX。

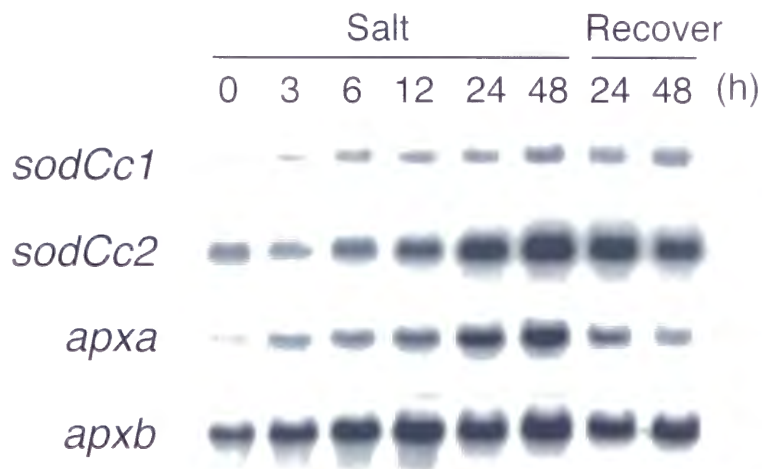


Fig. 1-11 イネ細胞質型SODと細胞質型APXの塩ストレスに対する応答

10日間水耕栽培したイネ芽生えを、根を0.25M NaClに浸すことにより塩ストレス処理を行った。48時間処理の後、再び根を水に浸し48時間育成させた。各サンプルから抽出したtotal RNA 20 μ gに対してNorthern blottingを行った。*sodCc1*、*sodCc2*、*apxa*、*apxb*のそれぞれに特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。レーン上の数字は処理を行った時間を示す。

「Recover」は、塩処理後、再度水に戻したサンプルを表す。

第2章

イネ細胞質型APXの酸素ストレスに対する発現応答；シグナルとしての過酸化水素の可能性

第1章において筆者は、イネにおいて2個の細胞質型SOD遺伝子と2個の細胞質型APX遺伝子がいずれも酸素ストレスにより誘導されることを見出だした。本章では、細胞質型SODと細胞質型APXの酸素ストレスに対する応答をRNAレベルでより詳細に調べることにより、それらの遺伝子の調節機構に関する知見を得ようと試みた。本実験では、葉緑体内で光合成により生成する活性酸素の影響を除外するために、暗所で培養したイネ胚芽を材料として用いた。

材料と方法

植物材料の培養と薬剤処理

イネ (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) 胚芽を材料として用いた。イネ完熟種子より得た米ぬかを目の大きさが0.5 mmのふるいを通すことにより、ぬかと胚芽に分離した。米ぬかは、月桂冠酒造(株)より寄贈されたものを用いた。得られた胚芽を70%エタノールに3分間浸した後、次亜塩素酸ナトリウム(0.4% 活性塩素)に15分間浸して滅菌した。胚芽を滅菌蒸留水で洗浄した後、N6液体培地に懸濁した。ロータリーシェーカーで110rpmで振とうし、28℃、暗所で6-7日間培養した。培養2日目に培地を新しいものに交換した。培養5-6日目に胚芽を小わけにし、新しい培地を加えてさらに1日間培養を行った。培養6-7日目に、濃縮ストック薬剤液を培地に添加することにより、パラコート、過酸化水素等の薬剤処理を行った。所定時間の処理後、培地を捨て胚芽を2度蒸留水で洗浄した後、サンプルとして採取した。

Northern blotting

胚芽よりSDS/phenol法により調製したtotal RNA 15-20 μ gを、第1章(p8)と同

様に、プロットイングおよびハイブリダイゼーションを行った。プローブとして細胞質型*sodCc1*の全長cDNA (*EcoRI* 断片) あるいは細胞質型*apxa*の全長cDNA (*EcoRI* 断片) をハイブリダイズさせ、その後 internal controlとしてイネactinプローブ (第1章 p7 参照) をハイブリダイズさせた。オートラジオグラフィーあるいはバイオイメージアナライザー (Molecular Imager、BIO-RAD) により結果を得た。Molecular Imagerにより得られたデータを定量化することによって、mRNA量を測定した。

過酸化水素の定量

細胞中の過酸化水素の定量は、Ishikawaら [38] のホモバニリン酸を用いた蛍光法、またはWarm and Laties [126] のルミノールの化学発光による定量法に準じて行った。胚芽サンプル (0.4g) を1.5mlの氷冷した5% TCAでホモジェナイズした。ホモジェネートを400 × g、5分間遠心することにより、Dowex 1×8 (Dow Chemical) のイオン交換スピンカラム (カラム体積 1ml) を通した。溶出液を5% TCAで3mlに調整した後、過酸化水素定量に用いた。

蛍光法による定量を以下のように行った、100 μ lの抽出液に等量の0.5M カリウムリン酸バッファー (pH 7.5) を加えた。25mM カリウムリン酸バッファー (pH 7.5)、1.25mM ホモバニリン酸、1 Uのhorseradish peroxidase (和光純薬)、200 μ lの中和させた抽出液を含む反応液 (1ml) を作製し、励起波長315nm、蛍光波長425nmで蛍光収率を測定した。

ルミノール化学発光による定量には、50 μ lの抽出液に等量の0.2M NH_4OH を加え、次に50 μ lの0.5mM luminol, 0.2M NH_4OH を加えた。50 μ lの1mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.2 M NH_4OH を加えることにより発光を開始させ、ルミノメーター (Lumat LB 9507、EG & G Berthold, Wildbad, Germany) を用いて5秒間発光を測定した。過酸化水素に依存した発光を測定するために、50 μ lの抽出液に等量の1M Tris-HCl (pH 8.0) を加え中和させた後、250Uのカタラーゼ (Sigma) を加え室温で10分間反応させた。その後、上記と同様にルミノールとフェリシアン化カリウムを加えて発光を測定した。2つの測定の差を、過酸化水素に特異的な発光とした。

結 果

懸濁培養物は均一で簡便な薬剤処理が可能であることから、本実験ではイネ胚芽の懸濁培養物を材料に用いた。またカルス由来の培養細胞は通常の細胞が示す生理的な反応とは異なった応答を示す可能性が考えられるため、培養6-7日目の発芽途上のイネ胚芽を材料として用いた。

イネ培養胚芽における、細胞質型SODの酸素ストレスに対する応答を調べるために、胚芽を10 μ M パラコートあるいは1mM 過酸化水素による処理を行った。イネ細胞質型SOD、*sodCc1*の全長cDNAをプローブとしてNorthern blottingを行い、細胞質型SODのmRNA量の変動を調べた。Figure 2-1に示すように、イネ培養胚芽においてもパラコート、過酸化水素のいずれの処理によっても細胞質型SODの一過的な誘導がみられた。mRNA量はパラコート処理により2.5倍に、過酸化水素処理により2.9倍に上昇した。パラコート処理、過酸化水素処理のいずれにおいてもmRNA量の上昇は4時間以内に起こり、4-8時間にかけてピークに達した。

次に、細胞質型APXの酸素ストレスに対する応答を同様にイネ培養胚芽において調べた。イネ細胞質型APX、*apxa*の全長cDNAをプローブに用いたNorthern blottingの結果から、細胞質型APXも同様にイネ胚芽においてパラコート、過酸化水素により顕著な誘導を受けることが明らかとなった (Fig. 2-2)。転写産物量はパラコート処理により7.9倍に、過酸化水素処理により6.1倍に上昇した。しかしながら、2つの処理においてmRNA量は異なったカイネティクスを示した。パラコート処理においては、処理8時間でmRNA量が最大となったのに対し、過酸化水素処理の場合にはmRNA量は4時間でピークに達した。また2時間のパラコート処理によりmRNA量は2.1倍に上昇したのに対し、2時間の過酸化水素処理では4.2倍の上昇がみられた。このように過酸化水素による細胞質型APXの誘導は、パラコートによる誘導に比べて速いことが明らかとなった。この結果から、細胞質型APXのパラコートによる誘導は、パラコート添加の直接的な結果ではなく二次的な影響によるものであることが考えられた。*apxa*および*apxb*のそれぞれに特異的なプローブを用いたNorthern blottingを行った結果、2個のイネ細胞質型APX遺伝子はいずれも同様にパラコート、過酸化水素により誘導さ

れることが明らかになった(データ省略)。

Figure 2-2の結果から、イネ細胞質型APXのパラコートによる誘導は、パラコートによる直接的なものではないことが示唆された。細胞内でパラコートにより生じたスーパーオキシドは、SODの反応によりまたは自発的な不均化反応により速やかに過酸化水素に変換されることが知られている(Fig. 2-3)。そこで細胞質型APXのパラコートによる誘導に、スーパーオキシドから生じた過酸化水素が関与している可能性が考えられた(Fig. 2-3)。この可能性を検討するため、活性酸素消去系酵素の阻害剤を用いることにより細胞内の過酸化水素量を変動させることを試みた(Fig. 2-4)。SODの反応により過酸化水素が生成することから、SOD阻害剤であるDDC (diethyldithiocarbamate) の処理によって細胞中の過酸化水素量が減少することが予想された。そこで、イネ胚芽をパラコートとともにDDCによって処理し、細胞質型APXの応答がどのように影響されるかを調べた。その結果、DDC処理によって細胞質型APXのパラコートによる誘導が有意に抑制された(Fig. 2-5)。パラコートによるmRNA量の上昇は、DDC処理条件下では48%にまで低下した。また細胞内の過酸化水素量を上昇させる目的で、過酸化水素消去酵素であるAPXおよびカタラーゼの阻害剤を用いた。その結果、カタラーゼ阻害剤であるaminotriazoleあるいはAPX阻害剤であるhydroxyurea [11] の添加により、パラコートや過酸化水素による処理なしで細胞質型APXの顕著な誘導がみられた(Fig. 2-6)。またこの処理条件下でのイネ胚芽中の過酸化水素の定量を行った。その結果、4時間のaminotriazole処理またはhydroxyurea処理により、過酸化水素量はそれぞれ23%、39%上昇することが明らかとなった(Table 2-1)。これらの結果から、イネ細胞質型APX遺伝子は細胞内の過酸化水素量に応答していることが示された。

次に、パラコート処理により胚芽中の過酸化水素量が上昇するかどうかを調べた。過酸化水素の定量はルミノールの化学発光によって行った。Figure 2-7に示すように、1時間のパラコート処理によりルミノールの発光は39%上昇した。過酸化水素量の上昇(23-64%)はパラコート処理3時間まで観察された。この結果により、パラコートによる酸素ストレスによって生体内で過酸化水素が蓄積することが示された。

考 察

本実験により非光合成組織においても、パラコートおよび過酸化水素によりイネ細胞質型SODと細胞質型APXが誘導されることが明らかとなった (Fig. 2-1、Fig. 2-2)。本実験で用いたプローブは、細胞質型SOD、細胞質型APXともcDNAの全長を用いており、それぞれの2個のアイソザイムのいずれのmRNAにもクロスハイブリダイズしていると考えられる。Figure 1-7ですでに緑葉において、細胞質型SOD遺伝子 *sodCc1* と *sodCc2*、細胞質型APX遺伝子 *apxa* と *apxb* がいずれも酸素ストレスにより誘導されることが示されている。培養胚芽においても *sodCc1* と *sodCc2* は同様に酸素ストレスによる誘導を受けていると考えられる。

緑葉においても培養胚芽においても酸素ストレスにより、細胞質型APXの方が細胞質型SODに比べてより顕著に誘導された (Fig. 1-7、Fig. 2-1、Fig. 2-2)。APXはアスコルビン酸のない状態では不可逆的に失活するが [4]、酸素ストレス条件下では細胞中のアスコルビン酸の酸化に起因すると思われるAPXの阻害が起きている [112]。酸素ストレス下で十分なAPX活性を維持するために、細胞質型APXの高い発現が必要であると考えられる。

細胞質型APXはパラコート、過酸化水素のいずれによっても顕著に誘導されたが、そのタイムコースは異なっており、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れていた (Fig. 2-2)。このことはパラコートが直接細胞質型APXを誘導しているわけではないことを示唆している。この結果から筆者は、パラコートによる細胞質型APXの誘導に、スーパーオキシドから生じた過酸化水素が関与しているという仮説を立てた。阻害剤処理によってSOD活性を阻害すると、パラコートによる細胞質型APXの誘導は抑制された (Fig. 2-5)。また過酸化水素消去酵素を阻害すると、細胞内の過酸化水素量の上昇と細胞質型APXの誘導がみられた (Table 2-1、Fig. 2-6)。これらの結果は、細胞質型APXが細胞内の過酸化水素レベルによって調節されていることを示している。CuZn-SODを過剰発現する形質転換タバコ [105] とカタラーゼのアンチセンス形質転換タバコ [129] において内在性の細胞質型APXの発現が上昇していることが報告されている。これらは本実験の結果と一致するものである。またFigure 2-

7で示したように、パラコート添加によって生体内での過酸化水素の蓄積がみられた。パラコートによる過酸化水素の上昇は23-64%であり、これはFigure 2-6、Table 2-1でみられた細胞質型APXを誘導する過酸化水素の蓄積(23-39%)に匹敵する。これらの結果を総合すると、イネ細胞質型APXの酸素ストレスに対する応答は、細胞内の過酸化水素によって媒介されていることが示唆される。

パラコートによる細胞内の過酸化水素の蓄積は処理1時間でみられた(Fig. 2-7)。一方細胞質型APX mRNA量はパラコート処理8時間で最大に達したが、これは過酸化水素による誘導のピークと比べて4時間のずれがある。Figure 2-1で示したようにパラコート処理によって細胞質型SODが誘導されるが、これにより過酸化水素の生成が増大しさらに細胞質型APXの誘導が促進されると予想される。その結果として、細胞質型APX mRNAの上昇が8時間まで続くと考えられる。

過酸化水素はスーパーオキシド、ヒドロキシラジカルとは異なり、細胞中では安定でその寿命は長い。過酸化水素は、低温[88]、高温[18]、病原体[12, 56, 63]に対する防御においてシグナル分子として機能しており、ストレス防御に関与する多くの遺伝子やタンパク質を誘導することが知られている(カタラーゼ[88, 102]、ペルオキシダーゼ[89]、グルタチオンペルオキシダーゼおよびグルタチオンS-トランスフェラーゼ[56]、SOD[85]、PRタンパク質[12]、alternative oxidase[124, 125])。さらに過酸化水素は膜透過性分子であり、細胞間シグナルとしても機能していることが示されている[56]。このように様々なストレス防御においてシグナル分子としての過酸化水素の機能が知られつつあるが、本実験の結果により酸素ストレスにおいても過酸化水素がシグナリングに機能している可能性が示唆された。

細胞質型SODと細胞質型APXの酸素ストレスによる誘導にはどのような調節機構が関与しているのだろうか。細胞質型SODおよびAPXの発現がグルタチオンにより誘導されるという報告[35, 55, 99]と抑制されるという報告があり[51, 130]相矛盾する結果となっているが、これらの結果から細胞質型SODと細胞質型APXの発現調節に、酸化還元を受けるコンポーネントの関与が示唆される。

イネ細胞質型SODはパラコート、過酸化水素により誘導されるが、いずれの処理においても同様なカイネティクスで発現の誘導がみられた(Fig. 2-1)。イネ細胞質型SOD遺伝子のプロモーターにはスーパーオキシドに応答するが過酸化水素に応答しな

いシス-エレメントが存在することから [本論文第 5 章]、イネ細胞質型SODはスーパーオキシドと過酸化水素によってそれぞれ独立に調節されていると考えられる。大腸菌においてはスーパーオキシド、過酸化水素によりそれぞれ調節される転写因子 SoxRSとOxyRが知られている [14, 20]。また哺乳類においても過酸化水素応答性の転写因子 (NF- κ B [104], AP-1 [64]) が存在する。高等植物においてもこのようなスーパーオキシド、過酸化水素による調節機構が存在する可能性は高い。*sodCc1*と*sodCc2*のプロモーターにはいずれも、マウスにおいて過酸化水素による応答が報告されているY-box [22] が存在している。このエレメントが過酸化水素による誘導に関与しているかも知れない。また過酸化水素による細胞内Ca²⁺の上昇 [90] が、細胞質型SODの調節に機能している可能性が考えられる。

これまでにエンドウとシロイヌナズナの細胞質型APX遺伝子において、プロモーター領域上のシス-エレメントと考えられる配列が報告されている。エンドウのプロモーターではARE (Antioxidant Responsive Element) と思われるモチーフが存在している [68]。ラットのグルタチオン S-トランスフェラーゼ遺伝子のAREは過酸化水素に反応することから [95]、細胞質型APXの過酸化水素による反応はこのエレメントにより媒介されているかも知れない。またヒートショックエレメントがエンドウとシロイヌナズナの細胞質型APX遺伝子において保存されており、シロイヌナズナにおいてはこのエレメントが酸素ストレスに対する反応に部分的に関与していることが示された [68, 100, 114]。イネ細胞質型APX遺伝子にも酸素ストレス反応配列が存在しているかどうかは今後の遺伝子解析によって明らかとなろう。また細胞質型APXの調節においても、前述の大腸菌や哺乳類で報告されているものと同様な過酸化水素により調節される転写因子や細胞内Ca²⁺の関与が考えられる。細胞質型SODの調節機構および細胞質型APX遺伝子の過酸化水素による調節機構の解明は今後の課題である。

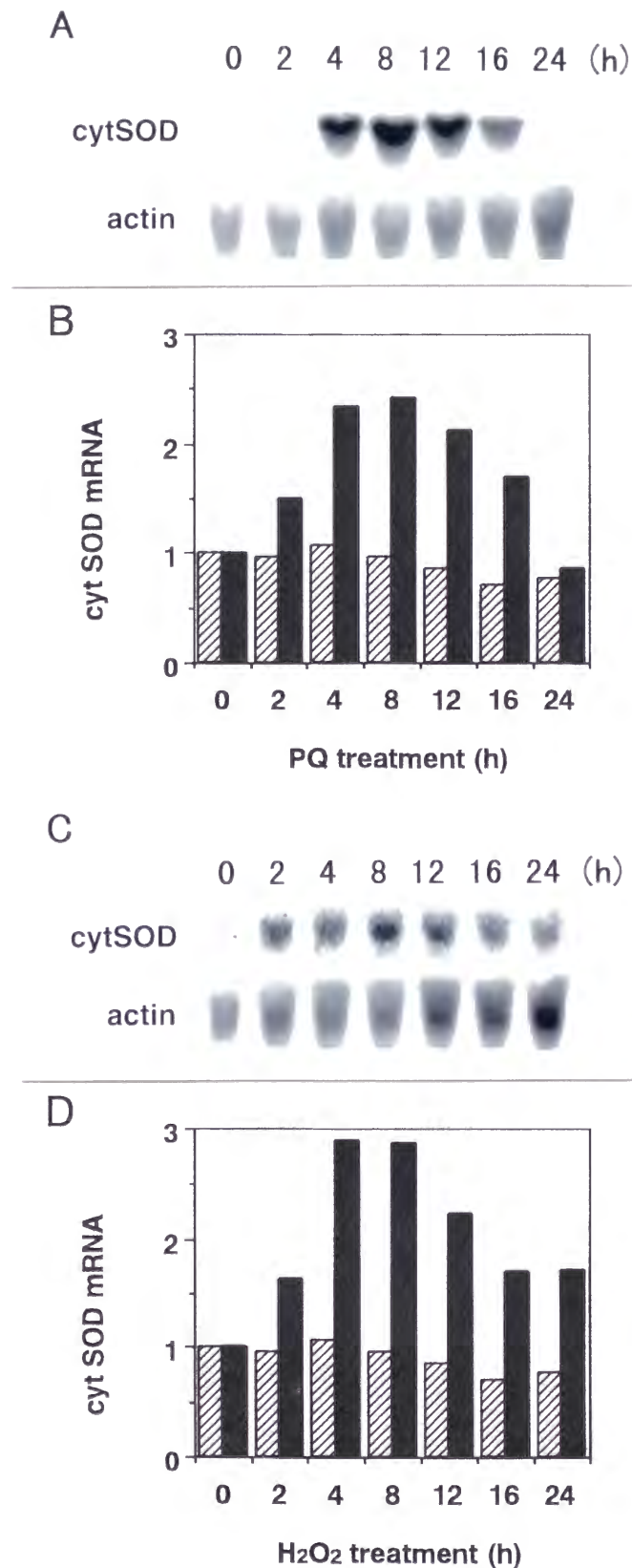


Fig. 2-1 イネ培養胚芽における細胞質型SODの酸素ストレスに対する応答

イネ懸濁培養胚芽を10 μ M パラコート(A, C) または1mM H₂O₂ (B, D) で処理した。各サンプルから抽出したtotal RNA 15 μ gを用いてNorthern blottingを行った。*sodCc1*の全長cDNAおよびイネactin cDNAプローブとして用いた。得られた結果を定量化し、細胞質型SOD mRNA量をactin mRNA量で補正した値をグラフに示す。黒いバーは処理を行ったサンプルを、斜線のバーは未処理のサンプルを表している。グラフに示したデータは独立な3回の実験の平均値である。

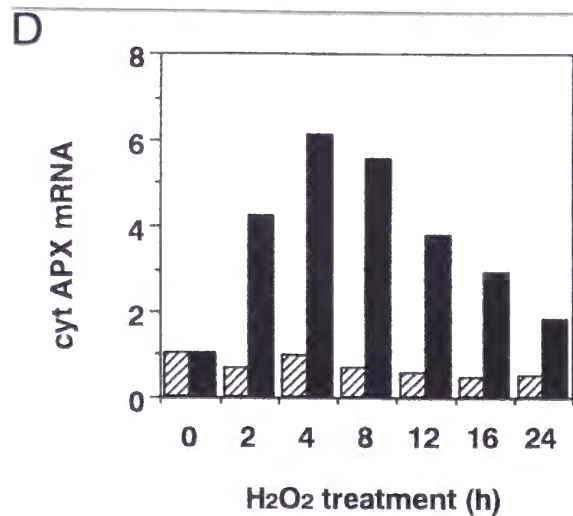
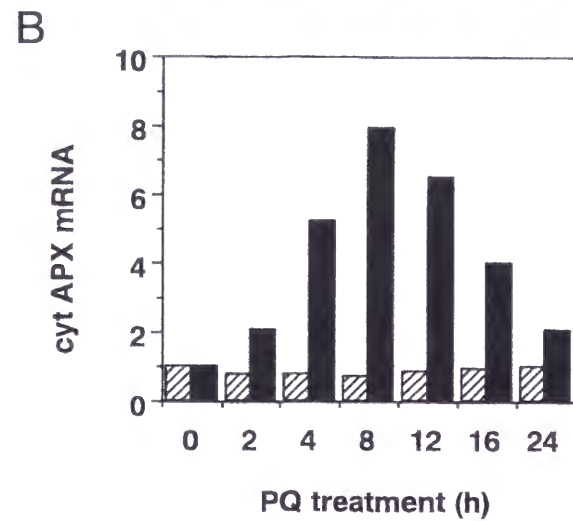
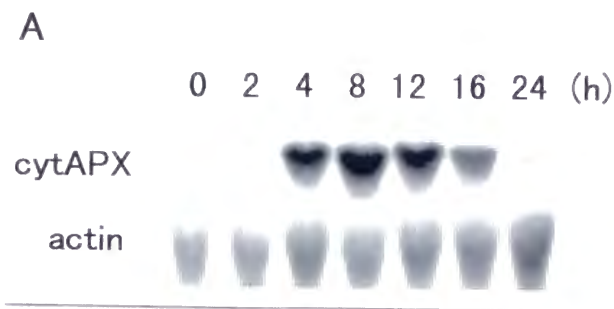


Fig. 2-2 イネ培養胚芽における細胞質型APXの酸素ストレスに対する応答

Fig. 2-1と同様に、イネ培養胚芽にパラコートあるいはH₂O₂処理を行い*apxa*の全長cDNAおよびイネactin cDNAをプローブとしてNorthern blottingを行った。定量し補正した細胞質型APX mRNA量をグラフに示す。データは独立な3回の実験の平均値である。

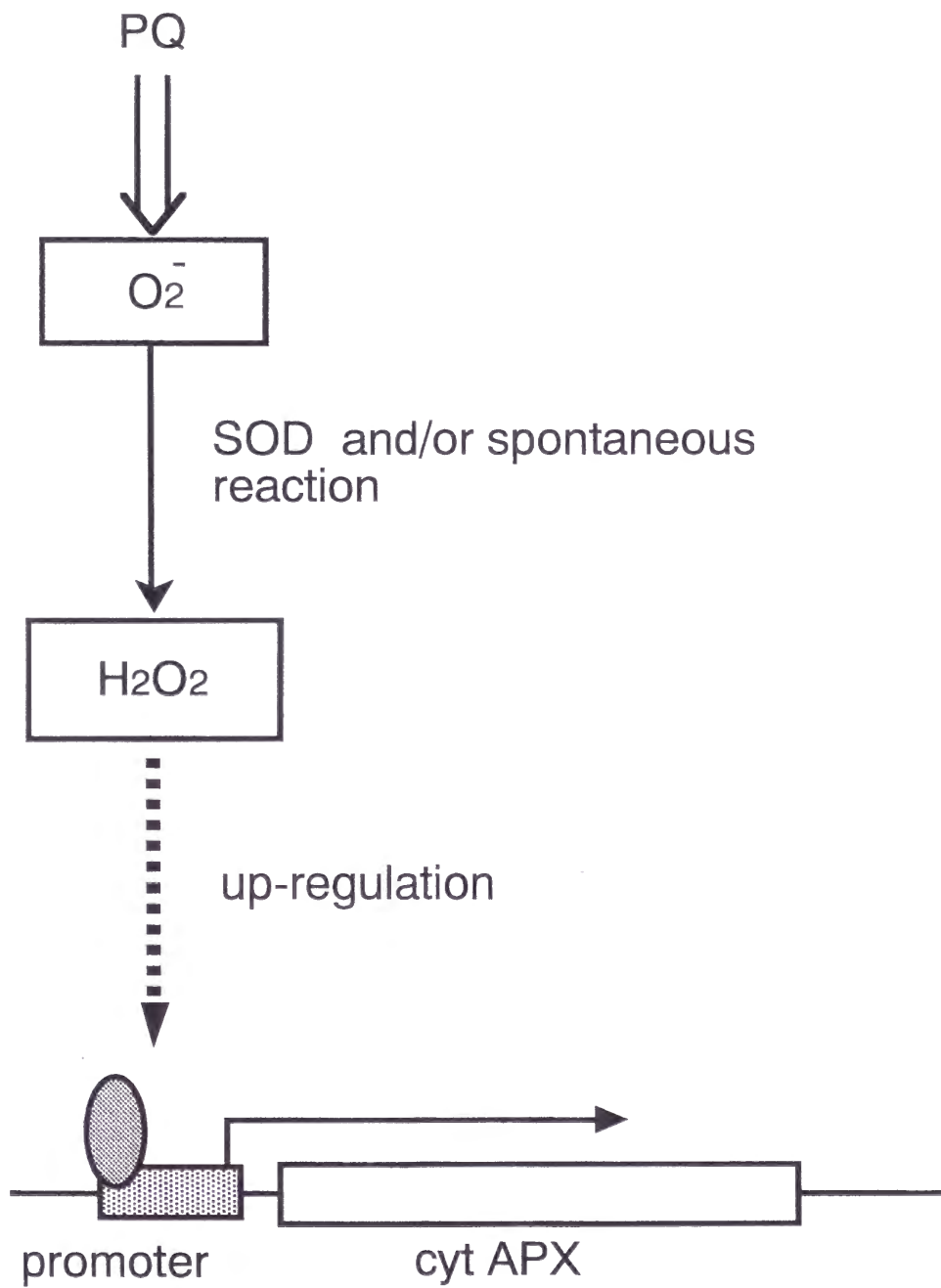


Fig. 2-3 酸素ストレスによるイネ細胞質型APXの調節の仮想モデル

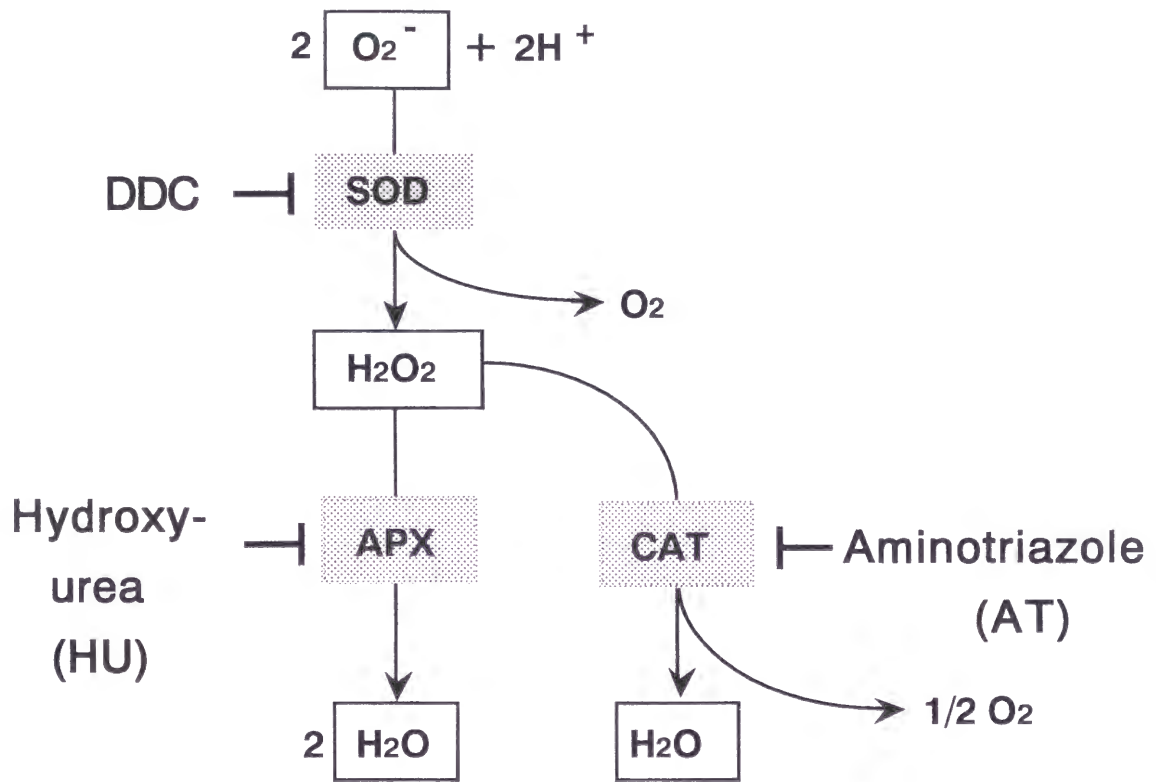


Fig. 2-4 本実験で用いた活性酸素消去系酵素の阻害剤

CAT: カタラーゼ。SOD阻害剤であるDDC処理により細胞中の過酸化水素量が減少することが、またAPX阻害剤、hydroxyureaやカタラーゼ阻害剤、aminotriazoleで処理することにより細胞中の過酸化水素量が上昇することが予想される。

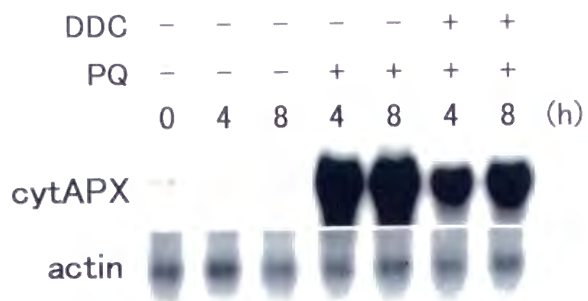


Fig. 2-5 イネ細胞質型APXのパラコートによる誘導に対するSOD阻害剤の効果

イネ懸濁培養胚芽を10 μ M パラコートおよび1mM DDCで処理を行い、Fig. 2-2と同様にNorthern blottingを行った。3回の実験のうちの代表的な結果を示している。



Fig. 2-6 イネ細胞質型APXの発現に対するAPX阻害剤およびカタラーゼ阻害剤の効果

イネ懸濁培養胚芽を10mM 3-aminotriazole (AT: カタラーゼ阻害剤) あるいは0.1M hydroxyurea (HU: APX阻害剤) で処理を行い、total RNA20 μ gを用いてFig. 2-2と同様にNorthern blottingを行った。「cont」は未処理のサンプルを表わす。3回の実験のうちの代表的な結果を示している。

Table 2-1 APX阻害剤およびカタラーゼ阻害剤の添加による、イネ培養胚芽中の過酸化水素量の変動

Treatment (time)	H ₂ O ₂ (nmole/g FW)	fold
None (0 h)	238±19	1.00
3-Aminotriazole (4 h)	291±20	1.23
Hydroxyurea (4 h)	330±12	1.39

細胞中の過酸化水素量はホモバニリン酸を用いた蛍光法により定量した。データは2回の実験の平均±標準偏差を示している。

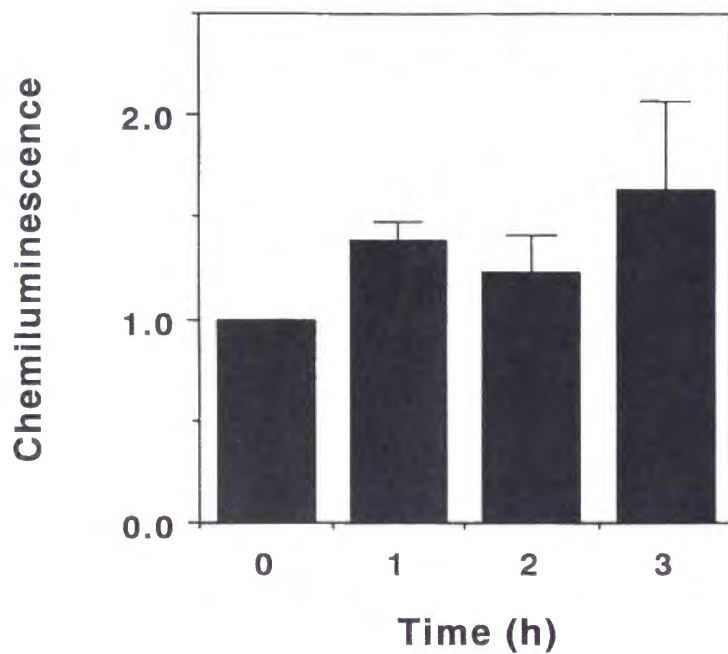


Fig. 2-7 パラコート処理による、イネ培養胚芽中の過酸化水素量の変動

イネ懸濁培養胚芽を $10\mu\text{M}$ パラコートで処理し、細胞中の過酸化水素量をルミノールの化学発光により定量した。データは発光の相対値で示しており、4回の実験の平均値 \pm 標準偏差を表わしている。

第3章

イネ葉緑体型APXのcDNAクローニングと光に対する発現応答

第1章、第2章ではイネ細胞質型APXについてcDNAのクローニングと発現応答の解析を行った。緑色組織における主な活性酸素発生源は葉緑体の光合成電子伝達系であり、活性酸素の生成は光強度の変化によって影響されると考えられる。本章においては、イネ葉緑体型APXについてcDNAのクローニングを行い、葉緑体型APXの光に対する発現応答を調べた。その結果から葉緑体型APXの調節機構についての考察を行った。

材料と方法

植物の育生と電子伝達阻害剤処理

イネ (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) 種子を第1章 (p 6-7) と同様に播種し明暗周期下で14日間、あるいは暗所で8日間、水耕で育生させた。暗所で育生させた黄化芽生えに、連続光 (光量 $220 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) を照射することにより緑化させた。

電子伝達阻害剤の処理は、水耕液に濃縮ストック薬剤液を加えることによって行った。DCMU、DBMIBともDMSO溶液をストック液としているため、controlのサンプルにも同濃度のDMSOを加えた。

イネ葉緑体型APX cDNAのクローニング

暗所で育生した黄化芽生えにそれぞれ2時間または10時間光を照射し、サンプルとして採取した。これらの芽生えからtotal RNAを抽出し、Oligotex-dT30 (宝酒造) によりpoly (A)⁺ RNAを調製した。得られたpoly (A)⁺ RNAを鋳型としてSuperScript Choice System cDNA synthesis kit (GIBCO BRL) を用いてcDNAを合成し、 λ ZIPLOX *EcoRI* arms (GIBCO BRL) をベクターとしてcDNAライブラリーを作製した。葉緑体型APXをコードすると思われるイネEST (accession no. D23646、イネゲノム研究プログラムより分与された) をプローブとしてプライクハイブリダイゼーション

ンにより、cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。単離されたクローンをサブクローニング後、塩基配列の決定を行った。塩基配列に基づく構造解析および他のAPXとのホモロジー検索は、GENETYX-WIN Ver. 3 (ソフトウェア開発) により行った。

プローブの調製

ストロマ型APX cDNAの5'側の*Eco* RI-*Sac* I断片 (1-341 bp)、およびチラコイド型APX cDNAの3'側の*Bam* HI-*Eco* RI断片 (1125-1703 bp) を制限酵素で切りだし、それぞれのアイソザイムに特異的なプローブとして用いた。またイネ細胞質型*apxa*の全長cDNAおよびイネ葉緑体型CuZn-SODの全長cDNA [48] (accession no. D85239) のインサートを制限酵素切断によりベクターより切りだしプローブに用いた。RubisCO (リブローズニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ) の小サブユニット遺伝子*rbcS*のプローブは以下のようにして調製した。イネ緑葉由来の1本鎖cDNAを鋳型としたPCRによって、イネ*rbcS* cDNA [58] (accession no. D00643) のコード領域 (base no. 50-600) を増幅し、得られたDNA断片をイネ*rbcS*プローブとした。それぞれのプローブを*Bca*BEST Random Primer Labelling Kit (宝酒造) を用いて³²Pで標識した。

Genomic Southern blot

第1章 (p 8) と同様な方法で行った。イネストロマ型APXとイネチラコイド型APXのそれぞれに特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション、洗浄の条件は第1章 (p 8) と同じ条件で行い、オートラジオグラフィーにより結果を得た。

Northern blot

第1章 (p 8) と同様に、各サンプルから抽出したtotal RNA 20 μ gを変性、泳動、プロット後、イネストロマ型APXとイネチラコイド型APXのそれぞれに特異的なプローブ、およびイネ葉緑体型CuZn-SOD、イネ*rbcS*に対するプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション、洗浄の条件は第1章と同じ条件で

行い、オートラジオグラフィーにより結果を得た。

APX活性の測定

播種後14日目のイネ芽生えから緑葉および根を採取し、サンプル生重量0.2g当たり1mlの抽出バッファー (50mM カリウムリン酸バッファー (pH 7.0)、1mM AsA、1mM EDTA、20% (w/v) ソルビトール) で破碎した。ホモジェネートを20,000 × g、10分間遠心した後、上清を抽出バッファーで平衡化したNAP-10脱塩カラム (Amersham-Pharmacia) に通し、1.5mlの抽出バッファーで溶出した。以上の操作は全て4℃あるいは氷上で行った。

得られた抽出液に対して、Amakoら [1] の方法によって全APX活性および葉緑体型APX活性を測定した。ただし活性測定の反応液組成を、50mM カリウムリン酸バッファー (pH 7.0)、0.5mM AsA、0.5mM H₂O₂とした。全APX活性から葉緑体型APX活性を差し引いた値を非葉緑体型APX活性とした。またBradford法 [9] によりタンパク質の定量を行った。

クロロフィル蛍光の測定

黄化芽生えの緑化過程において、葉緑体での電子伝達の有無を調べるためにクロロフィル蛍光の測定を行った。イネ緑色芽生えあるいは緑化途上の芽生えを暗所に移し、15分間暗順応させた後、intactな芽生えのクロロフィル蛍光をPAMクロロフィル蛍光測定装置 (PAM chlorophyll fluorometer, Walz, Germany) で測定した。10秒おきに飽和パルス光を0.8秒間照射し、クロロフィル蛍光を連続的に測定した。

結 果

イネ黄化芽生えにそれぞれ2時間、10時間光を照射した緑化途上のサンプルからcDNAライブラリーを作製し、イネ葉緑体型APX cDNAのクローニングに用いた。シーケンスデータベースを検索した結果、ハウレンソウストロマ型APX [40] とホモロジーの高いイネEST (accession no. D23646) の存在を見出した。このESTクローンを

イネゲノム研究プログラムより分与を受けスクリーニングのプロープとして用いた。スクリーニングの結果単離されたポジティブクローンは、インサート長 1.4kb、1.7kb の2種類に分類された。塩基配列を決定した結果、これらのcDNAはそれぞれ全長 1416bpおよび1741bpで、それぞれ359アミノ酸、38.3kDaおよび478アミノ酸、51.2kDaのタンパク質をコードするORFを含んでいた (Fig. 3-1、Fig. 3-2)。ホモロジー検索を行った結果、これらのクローンはそれぞれストロマ型APX、チラコイド型APXをコードすることが明らかとなった。ストロマ型APX、チラコイド型APXともにエンドウ細胞質型APXで同定されている活性中心のアミノ酸残基 [86] が全て保存されていた (Fig. 3-1、Fig. 3-2)。ストロマ型APXとチラコイド型APXはアミノ酸レベルで87%と高いホモロジーを示した (Table 3-1)。またイネ葉緑体型APXはいずれも他の植物種の葉緑体型APXとアミノ酸レベルで80%以上のホモロジーを示したが、一方イネ細胞質型APXとは約45%と低いホモロジーを示した (Table 3-1)。他の葉緑体型APXのアミノ酸配列との比較から、イネの葉緑体型APXはいずれもN末端領域にトランジットペプチドと推定される配列が存在した (Fig. 3-3)。またイネチラコイド型APXは他のチラコイド型APXと同様、ストロマ型APXと比べてC末端側に長く伸びた配列を持っていた (Fig. 3-3)。ハウレンソウチラコイド型APXにおいては、このC末端に延長した配列が疎水性に富む領域を含んでいることが示されており、チラコイド膜への結合に関与していることが示唆されている [40]。ハイドロパシー分析の結果、イネチラコイド型APXにおいても、C末端の延長配列中に疎水性の高いドメインが存在していた (Fig. 3-4)。

ハウレンソウ、カボチャにおいてはストロマ型APXとチラコイド型APXが同一の遺伝子から differential splicing によって生じることが示されている [41, 57]。イネのストロマ型APXとチラコイド型APXのcDNAは互いに塩基配列が異なっていたことから、イネ葉緑体型APXは別々の遺伝子にコードされていることが示唆された。これを確認するためにストロマ型APXとチラコイド型APXのそれぞれに特異的なプロープを用いて genomic Southern blot を行った。得られたバンドのパターンはそれぞれのプロープで全く異なっていたことから (Fig. 3-5)、イネストロマ型APXとチラコイド型APXは独立の異なった遺伝子にコードされていることが明らかとなった。またいずれのハイブリダイゼーションにおいても 1-2本のバンドが検出されたことから (Fig. 3-

5)、イネストロマ型APX遺伝子とチラコイド型APX遺伝子のコピー数はいずれも1コピーであると推定された。

次に、イネストロマ型APXとチラコイド型APXの組織における発現をNorthern blotによって調べた。その結果、チラコイド型APXは光合成器官である茎および緑葉において高い発現がみられ、葉緑体を持たない根や黄化葉での発現は低かった (Fig. 3-6)。それに対しストロマ型APX mRNAレベルは予想に反し根で最も高く光合成器官では低かった (Fig. 3-6)。非光合成器官である根においてAPX活性が存在するかどうかを確かめるために、緑葉と根のAPX活性を測定した。葉緑体型APXが嫌気条件では過酸化水素存在下で急速に失活することを利用して [1]、葉緑体型APX活性とそれ以外のAPX活性の分別定量を行った。ここで行った活性測定は可溶性のタンパク質に対して行ったため、検出された葉緑体型APX活性はすべてストロマ型であると考えられる。測定の結果、タンパク質量当たりで根では緑葉の1.9倍のAPX活性がみられた。また全APX活性に占める葉緑体型APXの割合は、緑葉では16%であったのに対し根では30%であった。根における葉緑体型APX活性は緑葉の3.5倍と高かった (Table 3-2)。このように根において高い葉緑体型APX活性が存在していることが明らかとなった。

次に、イネ葉緑体型APXの光に対する発現応答を調べた。黄化芽生えに光を照射したサンプルに対しNorthern blotを行って、ストロマ型APXおよびチラコイド型APXの発現を調べた。またこのとき葉緑体型CuZn-SODおよびRubisCOの小サブユニット遺伝子*rbcS*の発現応答についても調べた。その結果Figure 3-7に示すように、イネストロマ型APXは緑化4時間でやや誘導がみられたのに対して、チラコイド型APXのmRNA量は緑化24時間まで大きく上昇した。一方、葉緑体型CuZn-SODと*rbcS*においても発現誘導がみられたが、誘導は緑化の初期にのみ見られ、緑化4時間以降はmRNA量に大きな変動は見られなかった。このような緑化過程における誘導は、developmentalな誘導であるのか、光合成によって生じた酸素ストレスによるものであるかが問題となる。Ohashiら [80] はオオムギの緑化過程において葉緑体の光合成電子伝達鎖が緑化4時間で完成することを報告している。イネの緑化過程においてどの時点で電子伝達が始まっているかを調べるために、葉緑体のクロロフィル蛍光を測定することにより電子伝達の有無を調べた。Figure 3-8に示すように、24時間緑化させた芽生えに飽和パルス光を照射すると、緑葉でみられるものと同様な一過的なクロロ

フィル蛍光のピークがみられる。これは光化学系 II において光化学反応がおこっていることおよび励起された電子が電子伝達鎖を流れていることを示している。黄化葉ではクロロフィル蛍光は全く検出されなかった。緑化2時間の芽生えにおいて検出されるクロロフィル蛍光はノイズレベル以下であったが、緑化4時間で飽和パルス光に対応した蛍光のピークが現われた。このようにイネ芽生えにおいて緑化4時間で光合成電子伝達が確認された。この結果から、緑化4時間から24時間にかけてみられるイネチラコイド型APXの誘導は、葉緑体での光合成電子伝達によって引き起こされたものである可能性が示唆された。

また葉緑体型APXの光に対する応答を調べるもう1つの手段として、緑葉を暗所に移し暗順応させることを試みた。その結果、ストロマ型APX、チラコイド型APXとも16時間の暗順応によってmRNA量の低下が認められた (Fig. 3-9)。このことから葉緑体型APXが光に対して応答していることが確認された。

葉緑体型APXの緑化過程における誘導が光合成に依存しているかどうかを調べるために、光合成電子伝達の阻害剤処理を試みた。本実験ではDCMUとDBMIBを用いることによってそれぞれ光化学系IIからプラストキノンに至る経路とプラストキノンからチトクロムb6/f複合体に至る経路の電子伝達を阻害した (Fig. 3-10A)。なおDCMUによる電子伝達阻害によって、プラストキロンは電子を受け取ることができなくなるため酸化状態に、DBMIB処理によって、プラストキロンはせき止められた電子によって還元状態になると考えられている。イネ緑化過程の芽生えをDCMUあるいはDBMIBで処理し、葉緑体型APXの発現がどのように影響されるかを調べた。その結果、ストロマ型APX、チラコイド型APXのいずれもDCMUの添加により発現の低下がみられた。一方、DBMIB処理によってストロマ型APX、チラコイド型APXのmRNA量に顕著な変動はみられなかった (Fig. 3-10B)。この結果から葉緑体型APXは、電子伝達そのものではなくプラストキノンの酸化還元状態に応じて発現していることが示唆された。

考 察

本実験において緑化途上のイネ芽生えより、ストロマ型APX、チラコイド型APXを

それぞれコードする2種の葉緑体型APX cDNAを単離した。ストロマ型、チラコイド型いずれのアイソザイムにおいても、細胞質型APXで同定された活性中心のアミノ酸残基は全て保存されていた (Fig. 3-1, Fig. 3-2)。葉緑体型APXと細胞質型APXは酵素としての安定性に大きな違いがあり、アスコルビン酸のない条件では葉緑体型は急速に失活するのに対して、細胞質型では失活は緩やかに起こるか、あるいは全く失活はみられない [4]。この安定性の違いは両アイソザイムの構造が異なることに起因するが、少なくとも活性中心のアミノ酸残基の違いによるものではないことが示された。

イネチラコイド型APXはホウレンソウなど他の植物種と同様、C末端領域にチラコイド型特有の膜結合ドメインと推定される疎水性に富む領域を持っていた (Fig. 3-3, Fig. 3-4)。この構造は全ての植物のチラコイド型APXに共通な特徴であると考えられる。一方、イネストロマ型APXとチラコイド型APXは、ホウレンソウやカボチャとは異なり独立な別々の遺伝子によってコードされていることが明らかとなった (Fig. 3-5)。シロイヌナズナにおいてもストロマ型とチラコイド型でcDNAの配列が異なっていることから [44] イネと同様2種類の遺伝子が存在すると考えられる。このように葉緑体型APXが単一の遺伝子にコードされている植物と、独立な2種類の遺伝子にコードされている植物の、2つのタイプに分けられることが明らかとなった。

イネ葉緑体型APXの組織における発現を調べた結果、チラコイド型APXは緑色組織において高い発現がみられ非光合成組織において発現が低かった (Fig. 3-6)。この結果は、光合成により生成する過酸化水素の消去という葉緑体型APXの機能と一致する。緑色組織ではチラコイド型APXのほうがストロマ型APXよりも強く発現していること (Fig. 3-6)、また緑化過程においてストロマ型APXよりもチラコイド型APXのほうがより顕著な誘導がみられることから (Fig. 3-7)、葉緑体内で生成する過酸化水素は主にチラコイド型APXによって消去されていると考えられる。

しかしながら、根におけるストロマ型APXの発現 (Fig. 3-6, Table 3-2) は予想を覆すものであった。これまでにAmakoらによりキュウリ、エンドウの根において細胞質型APXに対してそれぞれ7.4%、6.4%の葉緑体型APX活性が存在すると報告されている [1]。しかし今回イネで得られた結果は、全APX活性に対して30%の葉緑体型APX活性という驚異的な数字であった (Table 3-2)。このような高い葉緑体型APX活性に

は、どのような生理的機能があるのだろうか。現時点ではそれを示唆する実験的なデータは何も得られていないが、2つの可能性が考えられる。1つはストロマ型APXがプラスチドで生成する過酸化水素とともに他のオルガネラから生成する過酸化水素の消去に機能している可能性である。過酸化水素は膜透過性の分子であるため、オルガネラ膜を越えて細胞中に拡散する。そのためプラスチドのAPXが他のオルガネラで生成した過酸化水素のシンクとなりうると考えられる。あるいは、エンドウのグルタチオン還元酵素で示されたように同一のポリペプチドが葉緑体、ミトコンドリアの両方にターゲットされている例が知られている [17] ことから、イネ「ストロマ型APX」がプラスチドとミトコンドリアの両方のオルガネラで機能しているかもしれない。これまでに多くのAPX cDNAがクローニングされているがミトコンドリア型をコードすると思われるものは未だ発見されていない (Fig. 1-4)。このことから、葉緑体型APXが同時にミトコンドリア型アイソザイムである可能性が考えられる。イネ根における「ストロマ型APX」の細胞内局在の同定は、今後の興味ある課題である。

イネ芽生えの緑化過程において葉緑体型APX、葉緑体型CuZn-SODの発現応答を調べたところ、いずれも光誘導されることが明らかとなった (Fig. 3-7)。カボチャではストロマ型APXとチラコイド型APXの光誘導がタンパク質レベルで明らかとなっており [57]、本実験の結果を一致する。しかしストロマ型APX、葉緑体型CuZn-SODが緑化4時間でmRNA量が上昇した後は、顕著な変動がみられなかったのに対して、チラコイド型APXは緑化24時間までmRNA量の急激な上昇がみられた (Fig. 3-7)。

これらの誘導には光そのものに応答したdevelopmentalな発現調節と、光合成に起因した酸素ストレスによる発現調節の双方が関与していると考えられる。マスタードにおいては、細胞質型APX、葉緑体型APXとも光誘導を受けることが報告されており、その誘導にフィトクロムの関与が示唆されている [117]。本実験ではイネ細胞質型APXはマスタードの例とは異なり、顕著な光応答を示さなかった (Fig. 3-7)。RubisCOの小サブユニット遺伝子*rbcS*は光誘導を受ける遺伝子のひとつである [118]。イネ*rbcS*の光応答を調べた結果、葉緑体型CuZn-SODと同様な挙動を示し、緑化の初期にのみ誘導がみられた (Fig. 3-7)。イネ葉緑体型CuZn-SOD遺伝子には、光に反応するシス-エレメントとして知られるG-boxが保存されている [47]。このことは、イネ葉緑体型CuZn-SODが*rbcS*と同様にファイトクロムを介して光そのものによって

調節されている可能性を示唆している。

また葉緑体型APXは暗所へ移すことによって発現が抑制されたことから (Fig. 3-9)、光に依存して可逆的に調節を受けていることが示された。Figure 3-8の結果から、イネ芽生えの緑化過程において、電子伝達鎖が完成し電子伝達が開始されるのは緑化4時間以降である。チラコイド型APX mRNA量は緑化4時間から24時間まで上昇を続けることから、この間のチラコイド型APXの誘導は、電子伝達によって生じる葉緑体内の酸化還元状態の変化に起因すると考えられる。電子伝達阻害剤であるDCMU処理により、ストロマ型APXとチラコイド型APXはいずれも発現が抑制された (Fig. 3-10)。しかしDBMIB処理では有意な影響はみられなかったことから (Fig. 3-10)、葉緑体型APXが電子伝達そのものによって調節されているわけではない。DCMU処理、DBMIB処理によりプラストキノンの酸化還元状態がそれぞれ酸化側、還元側に傾くと考えられている。暗所ではプラストキノンは酸化状態に、光照射下では還元状態にあることから、イネ葉緑体型APXの発現はプラストキノンの酸化還元状態に応答して調節されており、プラストキノンが還元/酸化状態にあるときに誘導/抑制されていると考えられる。

これまでに緑藻*Dunaliella*の*cab*遺伝子 [25] やシロイヌナズナの細胞質型APX遺伝子、*APX2* [51] において、強光-弱光に対する発現応答が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が示されている。本実験により、イネ葉緑体型APX遺伝子の光応答においても、プラストキノンの酸化還元状態によって光強度が感知されていることが示唆された。*Dunaliella*においては、葉緑体内で感知された強光/弱光のシグナルはプロテインキナーゼによって核に伝達されることが示唆されている [25]。光強度に応答するこのようなレドックス-キナーゼカスケードは、あらゆる光合成生物に普遍に存在すると考えられる。今後のイネ葉緑体型APX遺伝子の発現調節機構の解析により、このようなシグナル伝達経路に関する知見が得られるものと期待される。


```

CGCTCCCCTCCCTCCCACCAACCCACCACCAGCGTCACCCATGGCGGCCAGCGACTCGC 60
                                     M A A Q R L A
CGCCCTCCACGCCGCCGCGCCGCTCGGCCTTCTCCTCCACCTCCTCCGCCTCGCATGGCCG 120
A L H A A A P S A F S S T S S A S H G R
CCCCGCGGCgCGA+CCAGCACCAACCGCTCTCCTCCCGGTGGCCCTCCCGCGCgCCTCCGC 180
P A A R S S T T A L L P V A L P R A S A
CACCTCCGCGCCGCACCTTCTCGGCTCCTCCCCAGGAGGCGAAGGCGGGGGAGCGG 240
T L R A A P S R L L P Q E A K A A G S G
CAGGTCGGTGATGTGCATGGCGTCGGCGTCGGCGGCGTCGGCGGCGGTGGCGCTC 300
R S V M C M A S A S A S A A S A A V A S
GGGCGCGGGGAGCTGAAGGCCGCTCGCGAGGACATCAGGGAGCTCTCAAGACGACGCA 360
G A A E L K A A R E D I R E L L K T T H
CTGCCACCCATCCTGGTTCTGCTTGGATGGCATGATTCCGGTACGTATGACAAGAATAT 420
C H P I L V R L G W H D S G T Y D K N I
TAAAGAGTGGCCACAACGAGGTGGAGCTAATGGAAGCTTGAGATTTGATGTTGAGTTAAA 480
K E W P Q R G G A N G S L R F D V E L K
ACATGGAGCCAATGCTGGGCTGGTAAATGCTCTAAAGCTTGTCCAACCTATCAAGGACAA 540
H G A N A G L V N A L K L V Q P I K D K
ATACCCAAATATCTCATATGCGGATTTATTCCAGCTGGCAAGTGCTACAGCAATTGAGGA 600
Y P N I S Y A D L F Q L A S A T A I E E
AGCTGGTGGTCCAAAGATTCCAATGACATATGGACGGATTGATGTCACAGGTCCTGAGCA 660
A G G P K I P M T Y G R I D V T G P E Q
GTGTCCACCTGAGGGGAAGCTTCCCGATGCTGGCCCAAGTGCAcCTGCGGATCACTTGAG 720
C P P E G K L P D A G P S A P A D H L R
GAAGGTATTTACAGGATGGGTCTTGATGACAAGGAGATTGTTGTGCTGTCTGGAGCACA 780
K V F Y R M G L D D K E I V V L S G A H
TACACTTGGAAAGTCCAGACCTGAACGGAGTGGCTGGGGGAAACAGAAACGAAATATAC 840
T L G R S R P E R S G W G K P E T K Y T
TAAGAATGGCCCTGGTGCACCTGGTGGGCAATCGTGGACAGCTGAATGGCTTAAGTTTGA 900
K N G P G A P G G Q S W T A E W L K F D
TAACAGTTATTTCAAGGAGATAAAAGAGAAAAGAGATCAGGATCTCCTGGTCTTGCTAC 960
N S Y F K E I K E K R D Q D L L V L P T
AGATGCTGCATTATTTGAGGACCCAACATTCAAGGTCTATGCAGAAAAATACGCAGAGGA 1020
D A A L F E D P T F K V Y A E K Y A E D
CCAAGAAGCATTCTTTAAAGACTATGCCGGAGCTCATGCTAAACTGAGCAATCTGGGTGC 1080
Q E A F F K D Y A G A H A K L S N L G A
AAAATTCAATCCTCCTGAGGGATTACGTTGGACGGTTAATGCGATGCGCATGAGCCAGA 1140
K F N P P E G F T L D G *
TCGCTGAAGTGGCCAACCACTTTTACAGAAAGGATCAAGAGAGAAACACTACACAATCCA 1200
ATTTCTGCTCCAACGTTGTGCATCATTCCAGATGAAGCTTTTCTGACCACGAGTCAT 1260
ATTGGATTTGAAACTGAGTATTCGAATAAAAAACAGACTGGCTAGAGAGGCCAAATTTG 1320
AGCCGAACCTGCGGACCAATTTCGACGAGAAACCAAAAAGAAAAACATTTTAATACTAT 1379

```

Fig. 3-1 イネストロマ型APX cDNAの塩基配列および推定アミノ酸配列

*は終止コドンを示す。白ぬきで表わしたアミノ酸は活性中心を示す。網かけで表わしたアミノ酸はトランジットペプチドと推定される配列を示す。枠で囲んだ塩基配列は、ストロマ型APXに特異的なプローブとして用いた領域を示す。

```

AAAACTCACTCGACTCGAGCGCGCGCCATGGCGGAGCGCATCGCCGCTCCCTCCTC 60
                                M A E R I A A S L L
CCGGCTGCCTCGCCCTCGCTGCTCCGTCCCCTCCCCCGCGCCCCGCTCCTCCGCC 120
P A A S P S P A P S P P P P R P R V S A
GCGGCCGCGCTCCTTCCCATGCTGCTCCACCAGCGCCGGCGGCCTCCGCTCCGCTCC 180
A A A A S F P C C S T S A G G L R L R S
CGCCGCTCGCTTCCCGCAGAAGGCTGCGACGACGAGGAGCGGGCGCGCCGGCGGGG 240
R P S R F P Q K A A T T R S G R A G A G
GCGCGGGCGGTGGTCCGGTGCATGGCGGGCGGGCGGTGGCGGCGTCCGACGCGGCGAG 300
A R A V V R C M A A A A V A A S D A A Q
CTCAAGAGCGCCCGGAGGACATCAGGGAGATCCTCAAGACCACCTACTGCCACCCATC 360
L K S A R E D I R E I L K T T Y C H P I
ATGGTCCGTCTTGGGTGGCAGATTCTGGCACGTACGACAAGAACATCGAGGAGTGGCCG 420
M V R L G W H D S G T Y D K N I E E W P
CAGAGGGGCGGAGCCGACGGGAGCTTGAATTTGACGCCAATTGAGCCACGAGCCAAT 480
Q R G G A D G S L R F D A E L S H G A N
GCTGGTCTGATTAATGCTTTGAAGCTTATCCAACCAATCAAGACAAATACCCGGGTATA 540
A G L I N A L K L I Q P I K D K Y P G I
ACTTATGCTGATTTGTTCCAGTTGGCAAGTGTACAGCAATTGAGGAAGCTGGTGGGCCG 600
T Y A D L F Q L A S A T A I E E A G G P
AAAATTCCAATGAAATATGGACGAGTTGATGTCACAGCAGCTGAGCAGTGCCACCAGAA 660
K I P M K Y G R V D V T A A E Q C P P E
GGGAGGCTTCTGATGCCGGTCCACGTGTGCCGCTGATCATCTTAGGGAGGTATTCTAC 720
G R L P D A G P R V P A D H L R E V F Y
AGGATGGGCCTTGATGACAAGGAAATGTTGCATTATCTGGAGCACACACTTGGAAGA 780
R M G L D D K E I V A L S G A H T L G R
TCAAGACCTGACAGGAGTGGTGGGAAAGCCAGAAACAAAATATACTAAGGATGGGCCT 840
S R P D R S G W G K P E T K Y T K D G P
GGTGAACCTGGAGGGCAATCATGGACAGTTGAATGGTTGAAGTTTGATAACAGTTACTTC 900
G E P G G Q S W T V E W L K F D N S Y F
AAGGACATAAAAGAGCAAAGGGACCAGGATCTTCTAGTGCTACCCACAGATGCTGCATTA 960
K D I K E Q R D Q D L L V L P T D A A L
TTTGAGGATCCGTCCTTCAAGGTATATGCCGAAAATATGCAGAGGATCAGGAGGCATTC 1020
F E D P S F K V Y A E K Y A E D Q E A F
TTTAAAGACTACGCTGAAGCTCATGCTAAACTGAGCGACCTTGGTGCAAAGTTGATCCA 1080
F K D Y A E A H A K L S D L G A K F D P
CCTGAGGGATTTTCACTGGACGATGAACCAGCCGTCGAAGAGAAAGGATCCTGAACCAGCA 1140
P E G F S L D D E P A V E E K D P E P A
CCAGCGCCAGCAGCAGCACACCACCTCCACCAGTCGAGGAGAAGAAGGAAGCTGAACCA 1200
P A P A A A P P P P P V E E K K E A E P
ACTCCAGTACCAGTAACGGTAGGAGCAGCAGTGGCATCATCGCCAGCGGATGACAACAAC 1260
T P V P V T V G A A V A S S P A D D N N
GGTGCAGCACCGCAACCAGAGCCCTTCTGCTGCGGAAATACTCCTACGAAAGAAGGAG 1320
G A A P Q P E P F V A A K Y S Y G K K E
CTGTCCGACTCGATGAAGCAGAAGATCAGGGCGGAGTACGAGGGATTCCGAGGCAGCCCG 1380
L S D S M K Q K I R A E Y E G F G G S P
GACAAGCCTCTGAGTCCAACCTACTTCCCTCAACATCATGCTCTTGATCGGAGGGCTGGCC 1440
D K P L Q S N Y F L N I M L L I G G L A
TTCTTGACGCTCTGCTCGGGAGCTGAGAGCGATGGTCTGATGACCTCCTCTGACGAGTG 1500
F L T S L L G S *
TTTTGAGTTGTTCTGCCTGTGCTAAGATTTGCGTGTTTCTTTCCATGTTTGGAGTCGT 1560
TATTCCGTAATAAATTGAGGTAAGGATGGGCATGTGAATGGATTCCAGTACTTTCTG 1620
AACTTCTTGAGTAATTCCTCTAGAGAAATATTTGTCGGAGAGAAATGTCACATTATCTAG 1680
TTGTCATGGCTCATGACTAAAAA 1703

```

Fig. 3-2 イネチラコイド型APX cDNAの塩基配列および推定アミノ酸配列
 記号はFig. 3-1に同じ。枠で囲んだ塩基配列は、チラコイド型APXに特異的なプローブとして用いた領域を示す。

rice sAPX	1:MAA-QR-LAALHAAAPSAFSSSTSS-ASHGRP-AARSSTTALLPVALPRASA-TLRAAPS-	54
At sAPX	1:MAERVSLTLNVTLSPPTTTTTTMSSSLRSTTAASLLRSSSSSSSRSTLTLSASSSLSF	60
sp sAPX	1:-----M-AS-F-----TTTTAA-AAS-R-----LLPSSSSSI RLSLSL-SSSSSSS	37
rice tAPX	1:M-A-ER-IAASLLPAASP-SPAPS-PPPPRP-RVSAAAAASFCCSTSAGGLRLRSRPS-	53
At tAPX	1:-----MSVLSAASHLLCSSTRVLSLPAVTSSSSSPVVALSSSTS	40
sp tAPX	1:MTDR--LAM-AS-F-----TTTTAA-AAS-R-----LLPSSSSSI RLSLSL-SSSSSSS	43
rice sAPX	55:--RL--LPQ---EAKAAGSG-RSYM-CMASASASAASAASVSGAAELKAAREDI RELLKT	105
At sAPX	61:VRSLVSSPRLSSSSPLSQKCR IASVNRFSNSTTAAKSSSDPDQLKN: K: S: I	120
sp sAPX	38:LKCLRSP-L--VSHLFLRQ-RGGSAYVT-K-TRFSTKCYASDPAQLKN: K: QS	91
rice tAPX	54:--R---FPQ---KAATTRSG-RAGAGARAVVRCMAAAVAASDAAQLKS: I: I	104
At tAPX	41:PHSLGSVAS-SSLFPHSSFVLQKHP INGTSTRK I SPKCAASDAAQL I S: K: KV: R: I	99
sp tAPX	44:LKCLRSP-L--VSHLFLRQ-RGGSAYVT-K-TRFSTKCYASDPAQLKN: K: QS	97
rice APXa	1: MAKNYPVVSAEYQEAVEK: QKL: A: IAE	29
rice sAPX	106:THCHPILVRLGWHDSGTVDXNI KEWPORGANGSLRFQVELKHGANAGLVNALKLVOPIK	165
At sAPX	121:KF: A: N: I: A: N: I: KD: I	180
sp sAPX	92:KF: M: A: N: D: S: L: I	151
rice tAPX	105:Y: M: E: D: A: S: I: I: I	164
At tAPX	100:KF: A: N: E: L: EA: A: L: I: L	159
sp tAPX	98:KF: M: A: N: D: S: L: I	157
rice APXa	30:KS: A: LML: A: SA: F--DV-S-SKT: PF: TMKTPA: S: A: DI: VRMLE: I	85
rice sAPX	166:DKYPNISYADLFQLASATAIEEAGGPKIPMTYGRIDVTGPEOCPPEGKLPDASFPAPADH	225
At sAPX	181:E: SG: K: V: AS: D: E: R: PS: T: I	240
sp sAPX	152: SGVT: T: K: V: A: E: R: PS: Q: I	211
rice tAPX	165: G: T: K: V: AA: R: RV: I	224
At tAPX	160: D: K: V: VA: E: R: PS: I	219
sp tAPX	158: SGVT: T: K: V: A: E: R: PS: Q: I	217
rice APXa	86:EEI: T: FY: GVV: V: VS: AV: FHP: E: K: AP: R: -TKG-S: I	140
rice sAPX	226:LRKVF-YRMGLDDKEI VVLSGAHTLGRSRPERSGWGKPEPKYTKNGPAGGGOSWTAEWL	284
At sAPX	241: E: D: A: E: P: I	299
sp sAPX	212: D: D: A: D: D: I	270
rice tAPX	225: E: A: D: D: E: V: I	283
At tAPX	220: D: A: D: T: EA: VK: I	278
sp tAPX	218: D: D: A: D: I	276
rice APXa	141: Q: GAQ: S: OD: A: G: CHK: F: E: RNP: I	184
rice sAPX	285:KFQNSYFKEI KEKRQDQDLLVLPIDAALFEDPTFKVYAEKYAEDQEAFFKDYAGAHAKLSM	344
At sAPX	300: E: I: SS: A: D: V: I	359
sp sAPX	271: D: A: S: A: E: I: I	330
rice tAPX	284: D: Q: S: E: D: I	343
At tAPX	279: D: D: S: N: VA: E: I	338
sp tAPX	277: D: A: S: A: E: I	336
rice APXa	185: Q: T: LLSGDKEG: Q: S: K: LS: A: RPLV: A: EK: E: KE: L: E	244
rice sAPX	345:LGAKFNPPPEGFTLDG	359
At sAPX	360: E: EG: I: I: I	372
sp sAPX	331:Q: D: AEG: I: TLN: G: I	345
rice tAPX	344: D: EGFSLDDEPAVEEKDPEPAPAPAAAPPPVVEEKKEAEPVVPVTVGAAVAS	403
At tAPX	339: D: EGIV IENVP--EKFVAAKYST-GKKELSDSM--KK--K-IRA EY-EAIGG	387
sp tAPX	337:Q: D: AEG: I: TLN: G: I	351
rice APXa	245: ADA	250
sp sAPX	346:TPA----GAA--PEKFVAAKYSSNKD	365
rice tAPX	404:SPADDNNGAAPQPEPFVAAKYSGK-KELSDSMKQKIRA EYEGFGGSPDKPLQSNYFLN I	462
At tAPX	388:SP--D-K-PLP-TNYFLN I I I AIGVLVLLSTLFGGNNNSDFSGF	426
sp tAPX	352:TPA----GAA--PEKFVAAKYSSNKRS ELSDSMKEKIRA EYEGFGGSPNKPLPTNYFLN I	405
rice tAPX	463:MLLIGGLAFLTSLLGS	478
sp tAPX	406:MIVIGVLAVLSYLAGN	421

Fig. 3-3 イネ葉緑体型APXと他のAPXとのアラインメント

イネストロマ型APXと同じアミノ酸をドットで表し網かけで示す。N末端側の影をつけた領域はトランジットペプチドと推定される配列を、C末端側の影をつけた領域はチラコイド型APXに特有の領域を示す。At sAPX: シロイヌナズナストロマ型APX、sp sAPX1: ホウレンソウストロマ型APX、At tAPX: シロイヌナズナチラコイド型APX、sp tAPX: ホウレンソウチラコイド型APX、rice APXa: イネ細胞質型APX。配列の引用元はTable 3-1を参照。

	rice sAPX	rice tAPX
rice sAPX	*	
rice tAPX	87.2	*
Arabidopsis sAPX	82.7	80.6
spinach sAPX	84.7	82.6
Arabidopsis tAPX	81.7	84.5
spinach tAPX	84.7	82.6
rice APXa	44.9	45.3

Table 3-1 イネ葉緑体型APXと他のAPXとのホモロジー

ここで用いたAPXの配列は以下から引用した。Arabidopsis sAPX: X98925、spinach sAPX: D83669、Arabidopsis tAPX: X98926、spinach tAPX: D77997、rice APXa: D45423。

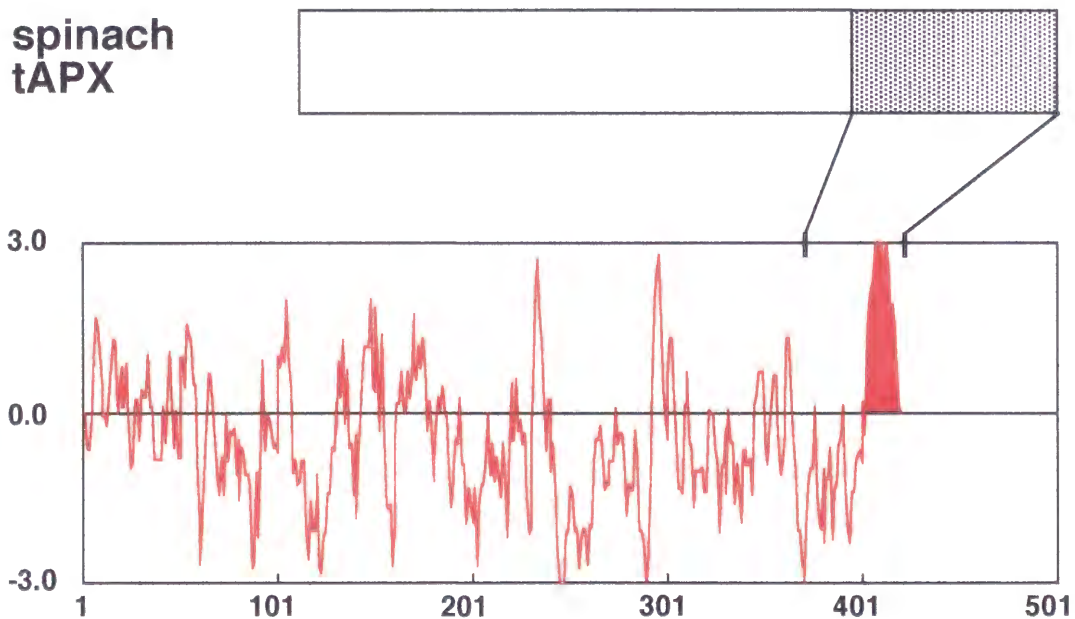
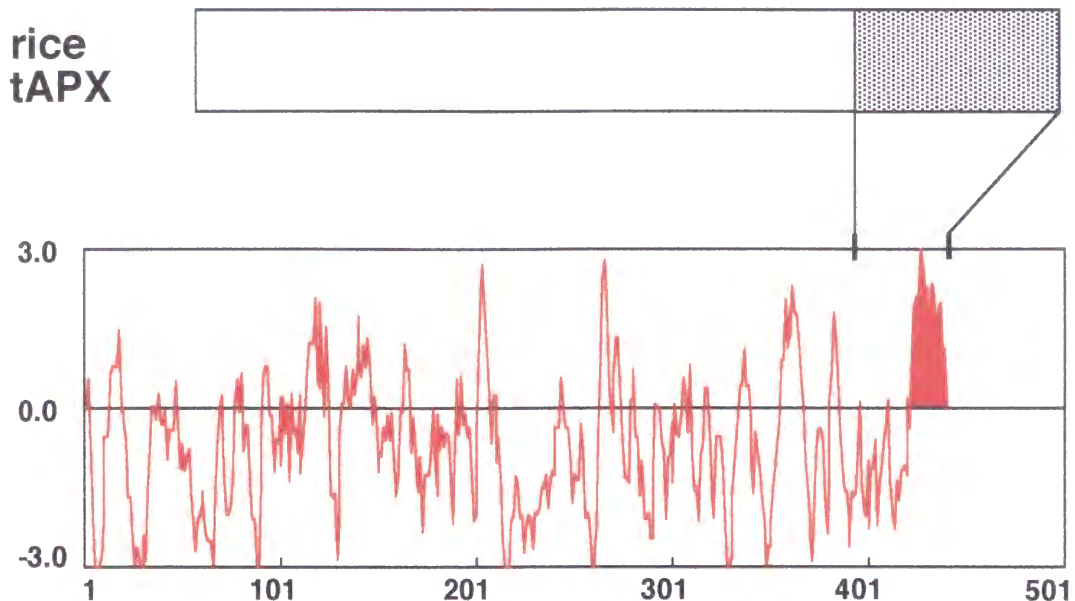


Fig. 3-4 イネチラコイド型APXとホウレンソウチラコイド型APXのハイドロパシープロット

プロットの上のボックスは、それぞれのチラコイド型APXのアミノ酸配列を表わした模式図であり、右端の網かけの領域はチラコイド型APX特有のC末端の延長配列を表わす。プロットの縦軸の正の値が疎水性、負の値が親水性を示す。プロットの横軸の数字はアミノ酸残基の番号を示す。

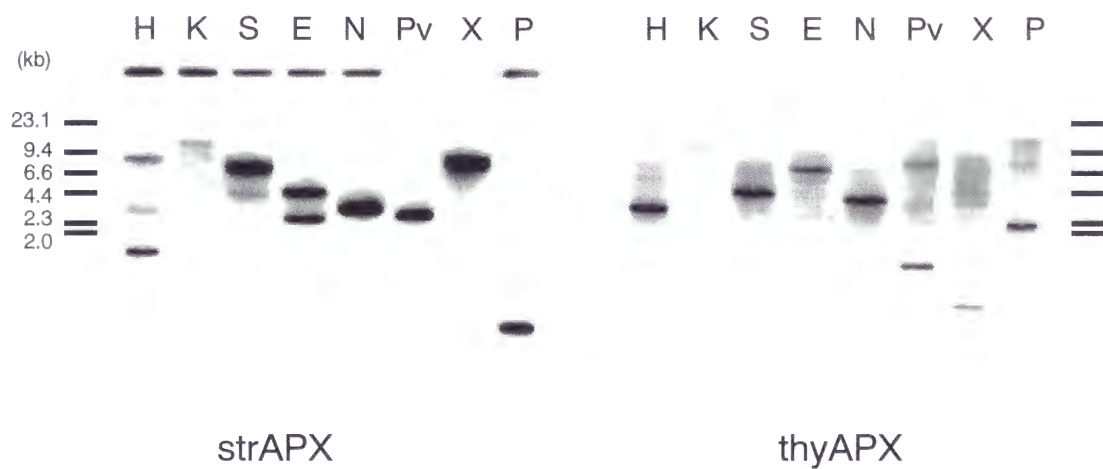


Fig. 3-5 イネ葉緑体型APXのgenomic Southern解析

イネゲノムDNA10 μ gを制限酵素で切断、泳動した後に、ナイロンメンブレンにブロットした。ストロマ型APX、チラコイド型APXのそれぞれに特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、6 \times SSC, 0.1% SDSを用い55 $^{\circ}$ Cで2回洗浄を行った。H: *Hind* III、K: *Kpn* I、S: *Sph* I、E: *EcoRV*、N: *Nco* I、Pv: *Pvu* II、X: *Xba* I、P: *Pst* I。

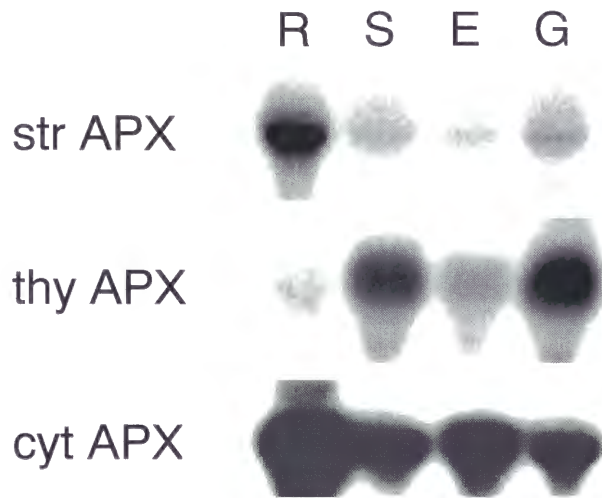


Fig. 3-6 イネ葉緑体型APXの組織における発現

イネ緑色芽生え（播種後14日目）およびイネ黄化芽生え（播種後8日目）の各組織から抽出したtotal RNA 20 μ gを泳動により分画後、ナイロンメンブレンにプロットした。ストロマ型APX、チラコイド型APXのそれぞれに特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、 $2\times$ SSC, 0.1% SDSを用い42°Cで2回洗浄を行った。R: 根、S: 茎、E: 黄化葉、G: 緑葉。

Table 3-2 イネ緑葉および根におけるAPX活性

	green leaf		root	
	(mM AsA/mg protein)	(fold)	(mM AsA/mg protein)	(fold)
total APX	3.83	1.00	7.34	1.00
chl _t APX	0.63	0.16	2.21	0.30
non-chl _t APX	3.20	0.84	5.14	0.70

播種後14日目のイネ芽生えの葉および根のそれぞれの全APX活性、葉緑体型APX活性、非葉緑体型APX活性を測定した。

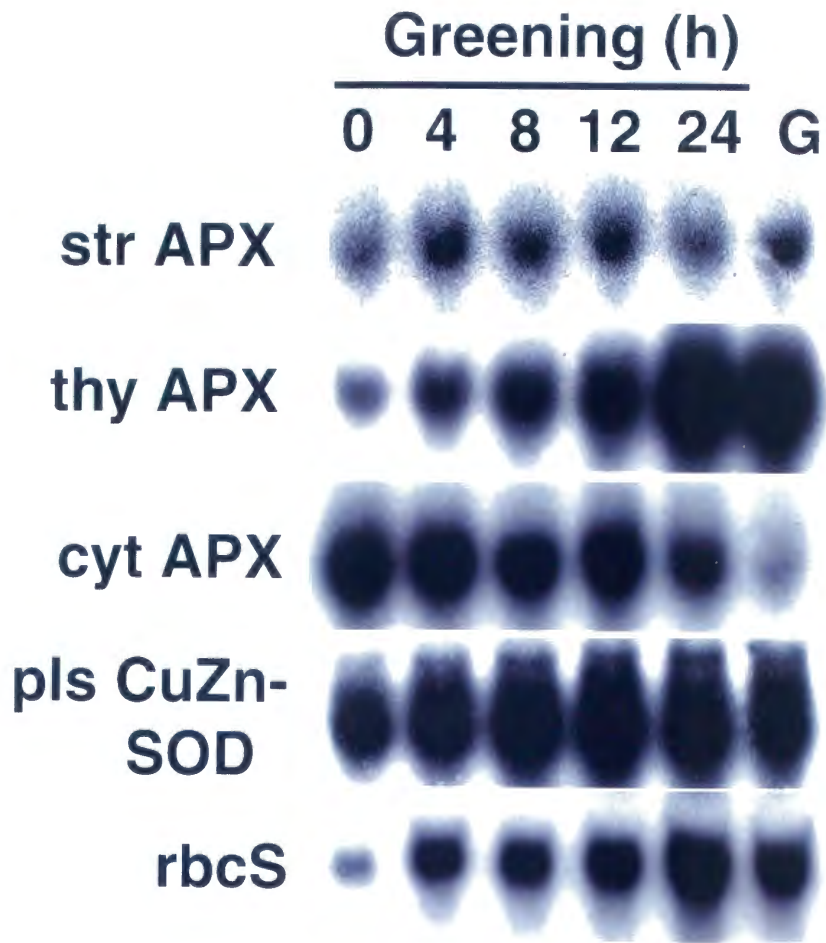


Fig. 3-7 緑化過程におけるイネ葉緑体型APXの発現

暗所で8日間生育させたイネ黄化芽生えに、 $220 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の白色光を照射した。各サンプルから抽出したtotal RNA $20 \mu\text{g}$ を用いてNorthern blottingを行った。イネストロマ型APX、イネチラコイド型APXそれぞれに特異的なプローブ、イネ細胞質型APXaの全長cDNA、イネ葉緑体型CuZn-SODの全長cDNA、イネ*rbcS*のcDNAをプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。レーン上の数字は光を照射した時間を示す。「G」はコントロールとして、明暗周期で14日間生育させたイネ緑葉を示している。

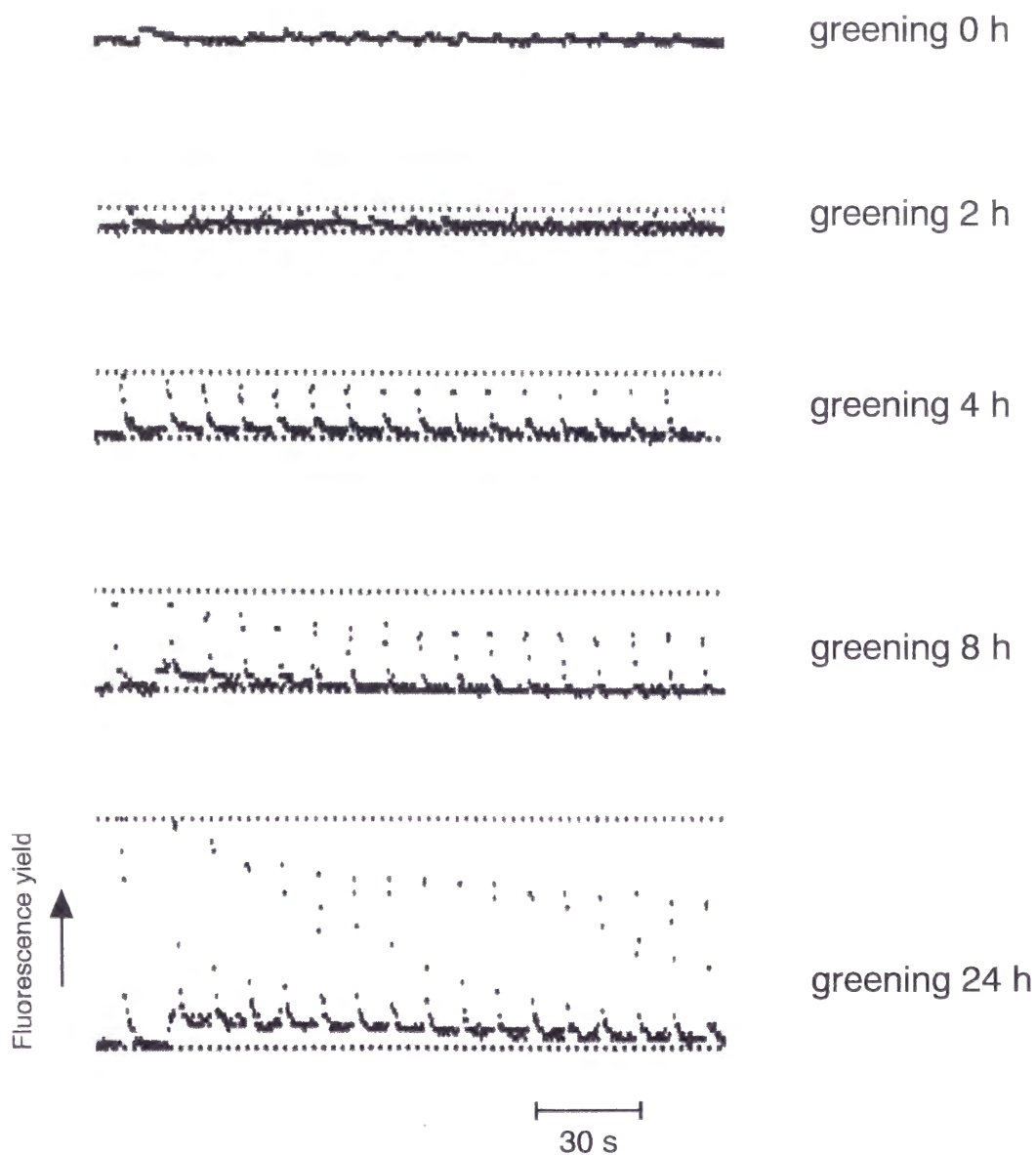


Fig. 3-8 緑化過程における葉緑体電子伝達鎖の発達

暗所で8日間生育させたイネ黄化芽生えに $220 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の白色光を照射し、クロロフィル蛍光の測定を行った。グラフ中の2本の平行な破線はそれぞれ F_0 (蛍光収率の基底値)、 F_m (蛍光収率の最大値)を示す。黄化芽生え (greening 0 h) では F_m が検出されなかったため破線を示していない。

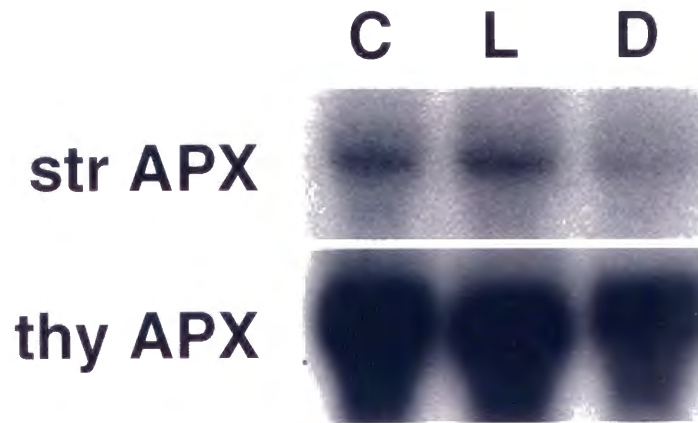
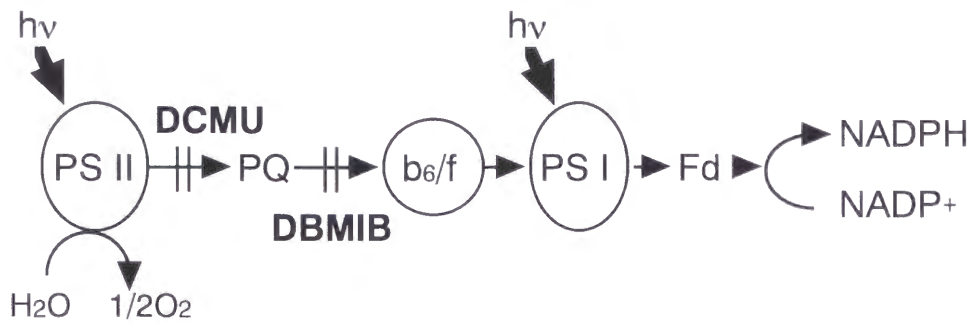


Fig. 3-9 緑葉の暗順応時におけるイネ葉緑体型APXの発現

明暗周期で14日間生育させたイネ緑葉を暗所に移し16時間培養し暗順応させた。各サンプルから抽出したtotal RNA 20 μ gに対してイネストロマ型APX、イネチラコイド型APXそれぞれに特異的なプローブを用いてNorthern blottingを行った。C: 暗所に移す前、L: 暗所に移さずに16時間光照射を行ったサンプル、D: 16時間暗順応を行ったサンプル。

A



B

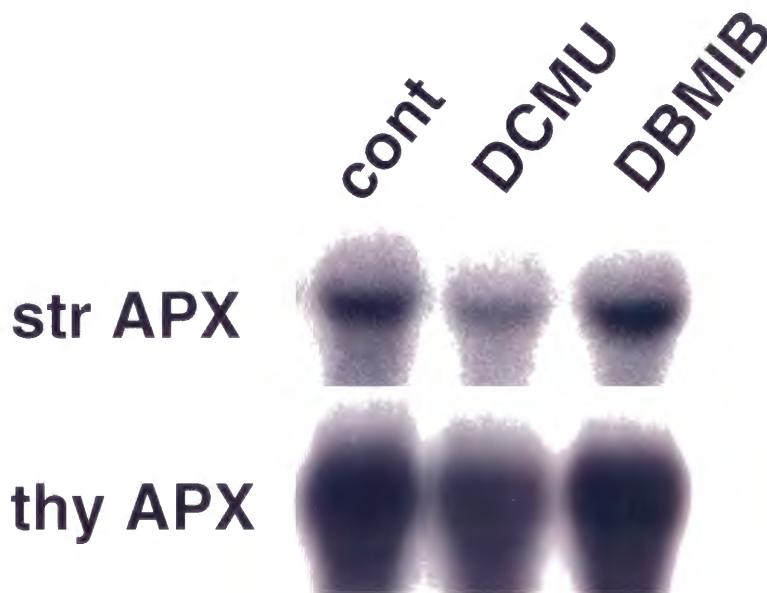


Fig. 3-10 イネ葉緑体型APXの発現に対する葉緑体電子伝達阻害剤の効果

A、本実験で用いた電子伝達阻害剤

PS II: 光化学系II、PQ: プラストキノ、b₆/f: チトクロムb₆/f複合体、PS I: 光化学系 I、Fd: フェレドキシン、hν: 光。

B、阻害剤処理による葉緑体型APXの発現の変動

暗所で8日間生育させたイネ黄化芽生えに220 μE/m²/sの白色光を8時間照射した後に、10 μM DCMUあるいは10 μM DBMIBで16時間処理を行い、Fig 4-9と同様にNorthern blottingを行った。阻害剤処理は連続光(220 μE/m²/s)照射下で行った。「cont」は阻害剤処理なしで16時間連続光照射を行ったサンプルを表わす。

第4章

イネカタラーゼの酸素分圧の変動に対する発現応答

イネは嫌気条件下でも発芽する植物である。低酸素条件下である水中で発芽させたイネ芽生えを水中から空気中へ移すと、呼吸活性が上昇し [110]、ミトコンドリア呼吸鎖の成分であるチトクロム c 、チトクロム $a-a_3$ 、ヘム a が増加する [111, 120]。このように酸素分圧の上昇に伴ってイネ芽生えでは呼吸系の発達を初めとする様々な代謝系の変化がみられるが、これを酸素適応という。酸素適応過程においては、酸素分圧の上昇によって活性酸素消去系の6つの酵素活性がいずれも上昇するが、中でもカタラーゼ活性の上昇が最も顕著である [121]。酸素分圧の変動は、植物体内の活性酸素の生成に直接影響することから、本章ではイネカタラーゼについてcDNAのクローニングを行い、酸素分圧の変動に対する発現応答を調べた。

材料と方法

植物の育成

植物材料の育成方法はShibasaka and Tsuji [110] によった。育成条件は暗所水中、暗所空気中の2通りで、これらの条件下で4日間発芽させた芽生えをそれぞれ水中芽生え、好気芽生えと呼ぶ。イネ (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) 種子を60%エタノールに3分間浸した後、次亜塩素酸ナトリウム (1% 活性塩素) に20分間浸して表面を滅菌した。蒸留水で洗浄した後に、ふせたステンレス製のふるい (直径15cm) に種子を播きガーゼで覆いをした。このふるいをWitt's jar (直径18cm) の底に置き、水中芽生えの場合は種子までの深さが10cmになるように、好気芽生えの場合には種子がちょうど水に浸るように蒸留水を入れ、暗所、30℃で4日間発芽させた。水中芽生えの好気処理の場合には、水面がふるいの高さになるように水を捨てた。好気芽生えの低酸素処理の場合には、芽生えを10cmの深さになるように蒸留水中に沈めた。処理後、芽生えを刈り取り直ちに液体窒素で凍らせ冷凍保存した。

イネカタラーゼcDNAのクローニング

暗所空气中で4日間育成させたイネ芽生えよりSDS/phenol法によって調製したtotal RNAから、Oligo dT celluloseカラム (Amersham-Pharmacia) を用いてpoly(A)⁺ RNAを精製した。得られたpoly(A)⁺ RNAを鋳型にしてZap-cDNA synthesis kit (Stratagene) を用いてcDNAを合成し、λZAPIIベクター (Stratagene) に組み込みcDNAライブラリーを作製した。既知の植物カタラーゼ (トウモロコシ [92]、ワタ [78]、エンドウ [43]、サツマイモ [96]) の保存領域配列に基づいて、合成オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。合成したプライマーの配列は以下の通りである (Xは4種類の塩基の混合を表わし、下線部はプライマー末端に設計した制限酵素部位を示す)。

catS: 5'-GGGAATTCTTXACXTG(T,C)GCXGA(T,C)TT(T,C)(T,C)T-3'

catA: 5'-GGAAGCTTCXGG(G,A)TA(G,A)TTXCCXGCXGC-3'

イネ好気芽生え由来の2本鎖cDNAを鋳型として上記のプライマーを用いてPCRを行いpartial cDNAを得た。これをプローブに用いたプラークハイブリダイゼーションにより、cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。単離されたクローンをサブクローニング後、塩基配列の決定を行った。なおCatBの配列は、EMBL、DDBJ、GenBankシークエンスデータベースにaccession no. D26484として登録された。塩基配列に基づく構造解析、他のAPXとのホモロジー検索は、GENETYX-WIN Ver. 3 (ソフトウェア開発) により行った。

イネカタラーゼに対するプローブの調製

イネCatA cDNA [74] (accession no. X61626) の3'-UTR (base no. 1531-1835) をPCRにより増幅し、得られたDNA断片をCatAに特異的なプローブとした。なおCatA cDNAおよびPCRに用いたプライマーはいずれも農水省生物資源研究所 肥後健一博士より分与された。またCatB cDNAの3'-末端領域 (*Sal*I-*Xho*I 領域: base no. 1671-1831) を制限酵素切断により切りだし、CatBに特異的なプローブとした。それぞれのプローブをBcaBEST Random Primer Labeling Kit (宝酒造) を用いて³²Pで標識した。

Northern blot

第1章(p8)と同様に、各サンプルから抽出したtotal RNA 20 μ gを変性、泳動、プロット後、イネCatAとCatBのそれぞれに特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション、洗浄の条件は第1章と同じ条件で行い、オートラジオグラフィーにより結果を得た。

酵素活性の測定および溶存酸素の測定

イネ芽生えを50mM リン酸バッファー (pH 7.6)、0.1% (w/v) Triton X-100で破碎し、ホモジェネートを10,000 \times g、20分間遠心した後、上清を酵素活性測定に用いた。以上の操作は全て4℃あるいは氷上で行った。カタラーゼ、チトクロムcオキシダーゼ、イソクエン酸リアーゼの活性測定はそれぞれ[110]、[121]、[16]によった。

また低酸素処理において、芽生えを沈めている水を一部くみ取り、溶存酸素計 (DO-30A, TOA Denpa Co.) を用いて水中の酸素量を測定した。

結 果

イネにおいては既に登熟期種子のライブラリからカタラーゼcDNA CatAが単離されている[74]。トウモロコシにおいては3種のカタラーゼアイソザイムが存在しそれらは組織・時期によって異なった発現を示すことから[101]、イネにおいても芽生えで発現している別のアイソザイムの存在が予想された。そこで芽生えにおいて発現しているカタラーゼアイソザイムのcDNAクローニングを試みた。既知のカタラーゼの保存配列から作製したプライマーを用いてPCRを行い、イネ好気芽生え由来のcDNAを増幅してカタラーゼpartial cDNAを得た。このpartial cDNAをプローブに用いてイネ好気芽生えのcDNAライブラリをスクリーニングした。その結果単離されたクローンは、制限酵素地図から見てCatAと異なるクローンであったため (Fig. 4-1)、CatBと名付けた。塩基配列を決定した結果、CatBは全長1,831bp、492アミノ酸、56.5kDaのタンパク質をコードするORFを含んでいた (Fig. 4-2)。またCatBの推定アミノ酸配列には、活性中心 (His-74, Ser-113, Asn-147) とヘム結合部位のアミノ酸 (Val-73,

Arg-111, Tyr-114, Phe-150, Pro-335, Arg-353, Tyr-357) [28] が全て保存されていた (Fig. 4-2)。CatBは、イネCatA、トウモロコシCat1、Cat2、Cat3とそれぞれアミノ酸レベルで71.1、93.3、63.3、67.4%のホモロジーを示した (Table 4-1)。

単離されたクローンが、イネ芽生えにおいて発現しているアイソザイムかどうかを検討するために、CatAとCatBの芽生えでの発現を調べた。CatAとCatBのそれぞれの3'-UTRをプローブに用いてNorthern blotを行った結果、暗所空気中で生育させた芽生えにおいてCatAは顕著に発現していたのに対し、CatB mRNAレベルは極めて低かった (Fig. 4-3)。CatA、CatBとも緑葉では黄化芽生えに比べ発現量が少なかった (データ省略)。この結果から、芽生えにおいてはCatAのほうがCatBよりもメジャーなアイソザイムであることが明らかとなった。またCatBは酸素分圧の変動に対しても顕著な応答を示さなかったため (データ省略)、以降の実験はCatAについてのみ行った。

次に、イネ芽生えの酸素適応過程におけるCatAの発現を調べた。その結果Figure 4-4に示したように、水中で4日間育成させた芽生えにおいてCatA mRNAは検出されなかったが、芽生えを空気中へ移すことにより顕著な誘導がみられた。CatA mRNA量の上昇は酸素適応1時間ではみられず、3時間から24時間にかけてみられた。本実験は暗所で行っているため、過酸化水素の主な発生源はミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの不均化とグリオキシゾームにおける β -酸化である。そこでミトコンドリアおよびグリオキシゾームのそれぞれのマーカー酵素であるチトクロムc オキシダーゼとイソクエン酸リアーゼの活性、ならびにカタラーゼの活性を測定した。その結果、酸素適応過程においてカタラーゼ活性は24時間まで上昇がみられた (Fig. 4-5)。チトクロムc オキシダーゼ活性とイソクエン酸リアーゼ活性はいずれも空気中へ移して3時間までの早い段階で顕著な上昇がみられた (Fig. 4-5)。

CatAの発現が酸素分圧の変動によりどのように影響されるかを調べるために、暗所空気中で発芽させた芽生えを水没させることにより低酸素処理を行った。Figure 4-6は、芽生えを沈めた水の中に含まれる溶存酸素量の変動を示している。水中の溶存酸素量は、芽生えを水没後6時間で2.9mg/lから1.1mg/lまで急速に減少した。このような条件で低酸素処理を行い、CatAの発現の変動を調べた。その結果、CatA mRNA量は水没後3時間で検出限界以下にまで減少した (Fig. 4-7)。また空気中で育成させた芽生えを12時間低酸素処理を行った後に再度空気中に移し酸素適応を行った。この再適

応時において、空气中へ移して3時間でCatA mRNAが検出され、その後12時間までCatAの誘導がみられた (Fig. 4-8)。また低酸素処理およびそれに引き続く再適応におけるカタラーゼ、チトクロムc オキシダーゼ、イソクエン酸リアーゼの活性の変動を調べた。その結果、12時間の低酸素処理においていずれの酵素活性も減少はみられなかった。またその後の酸素分圧上昇によってもいずれの酵素活性も顕著な上昇はみられなかった (Fig. 4-9)。

考 察

水中で発芽させたイネ芽生えの酸素適応過程において、カタラーゼアイソザイムCatAのmRNA量の著しい増加がみられた (Fig. 4-4)。水中で発芽させたイネ芽生えでは、呼吸鎖の構成成分であるヘムaやプロトヘムは好気芽生えに比べ少なく [120] ミトコンドリアは未発達な状態にある。Figure 4-4でみられたCatAの誘導は、水中において未発達な状態にあったオルガネラが酸素適応過程において発達するのに伴ったdevelopmentalな発現上昇と、酸素分圧の上昇に対する応答の双方が関与していると考えられる。実際、過酸化水素の発生源であるミトコンドリアおよびグリオキシゾームのマーカー酵素活性を測定した結果、酸素適応過程においてこれらのオルガネラの代謝が活発化していることが明らかとなった (Fig. 4-5)。好気条件下で生育させた芽生えを低酸素処理しその後再度酸素適応させたところ、ミトコンドリアおよびグリオキシゾームの代謝系にdevelopmentalな変化はみられなかった (Fig. 4-9)。この条件下におけるCatAの発現応答を調べることにより、イネCatAの発現は酸素分圧の変動に応答して調節されていることが明らかとなった (Fig. 4-7, Fig. 4-8)。

酵母の酸素適応過程においてもカタラーゼの誘導がみられるが [134]、酵母カタラーゼ遺伝子CTT1の酸素に対する応答はヘムによって媒介されている [94]。また土壌細菌*Rhizobium*において窒素固定系遺伝子の調節を行う酸素センサー分子が同定されている [31]。このような酸素による遺伝子発現調節が知られていることから、本実験で観察されたCatAの発現応答には、酸素分圧の変動に起因する酸素ストレスによる調節と、酸素分子そのものによる調節の双方が関与していると考えられる。

高等植物の活性酸素消去系の酸素分圧の変動に対する応答については、これまでにトウモロコシの細胞質型SODのタンパク質レベルが高酸素分圧により上昇することや [60]、嫌気条件に対して耐性を持たない3種の植物、*Glyceria maxima*、*Juncus effusus*、*Iris germanica*で、嫌気処理後空气中へ戻すとカタラーゼ活性が上昇することが報告されている [72]。一方、*Iris pseudacorus*のSOD活性は逆に嫌気条件へ移すことによって誘導される [73]。*Iris*におけるSODの嫌気による誘導は、嫌気後の酸素分圧の上昇によって引き起こされる酸素ストレスに対する防御として機能していると考えられている。

本実験で用いたイネ芽生えは暗所で生育させた従属栄養条件下のものである。この状態の芽生えにおいては、グリオキシゾームの β -酸化による呼吸基質の供給がエネルギー生産にとって不可欠である。カタラーゼはAPXに比べ過酸化水素に対するアフィニティは低く、またその局在はマイクロボディにのみ限定されている。しかしながら、オオムギのカタラーゼ欠損変異体で葉緑体の形態異常が観察されているように [84]、カタラーゼによる過酸化水素の消去は細胞全体の酸素ストレスの防御にとって重要である。酸素適応過程においてAPXよりもカタラーゼの誘導が顕著であることから [121]、本実験でみられたCatAの発現は、グリオキシゾームで生成する過酸化水素を消去し細胞を酸素ストレスから保護する上で不可欠な役割を果たしていると考えられる。

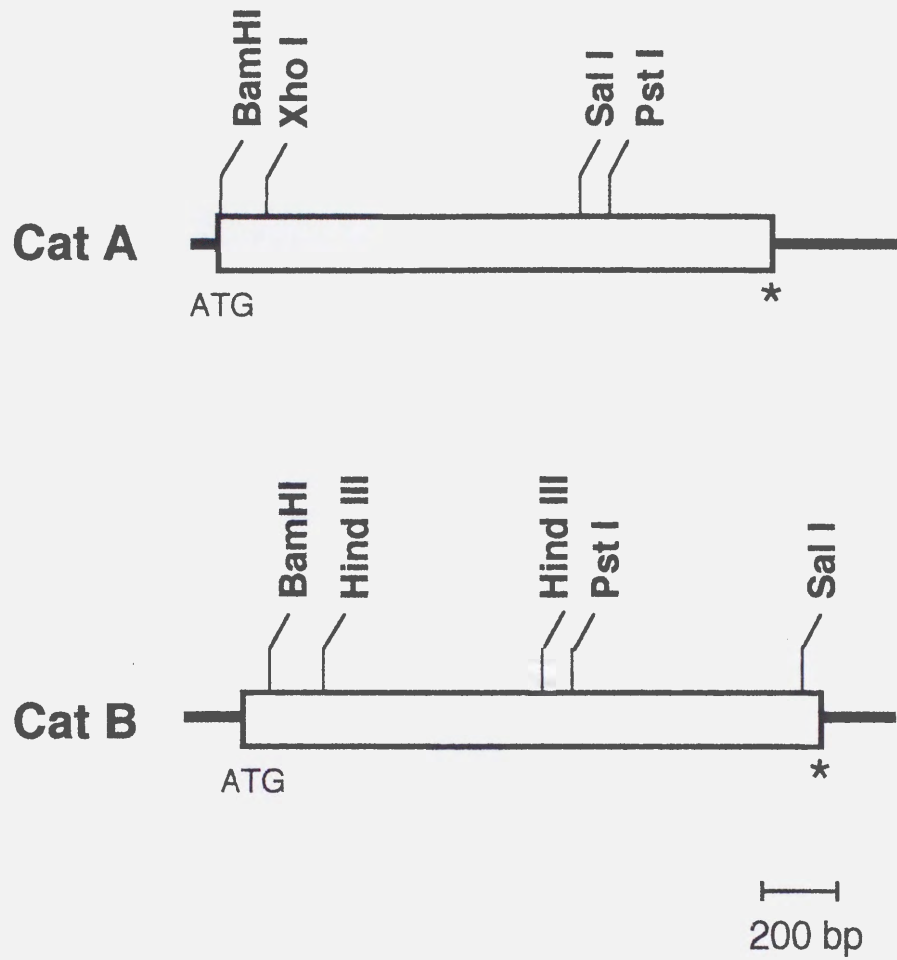


Fig. 4-1 イネCatAとCatBの制限酵素地図

白いボックスはコード領域を、黒い実線は非翻訳領域を示し、*は終止コドンを表している。

```

ggcacagcaaaaaaggccgccctttctctctctctctctctctccttatcaccaccaatccgatcctctctctctctctctctct  80
tcttccccacatccagttcgattctcatctctccacaacaaatcacgccatggatccctacaagcatcgggctccagc 160
                                         M D P Y K H R A S S
gggagcaattccacctcttgaccaccaactccggcgccccctgtggaacaacaactccgccctcaccgtcggagagcg 240
G S N S T F W T T N S G A P V W N N N S A L T V G E R
aggccctatcctccttgaggactatcatctgattgaaagcttgacacagtttgacagggagcgtatccctgaacgtgtcg 320
G P I L L E D Y H L I E K L A Q F D R E E R I P E R V
tcatgcaaggggagccagtgccaagggatTTTTGAGGTTactcatgatatttctca<u>ctcaca</u>tgtgctgatttctc 400
<del>N</del> A R G A S A K G F F E V T H D I S H L T C A D F L
cgtgctcctggtgttcagaccctgattattgttcggttctccacagtcggtgatgagcgtggaagcctgagacattgag 480
R A P G V Q T P V I V <del>N</del> F <del>S</del> V V H E R G S P E T L R
ggatccacgtggttttctgtcaagttttacactagagagggtaattttgatcttgttgggaacaatatgcctggctttt 560
D P R G F A V K F Y T <del>N</del> E G N F D L V G N N M <del>P</del> G F F
ttatccgagatgggatgaaattccctgacatggctcatgctttcaagccaagtccaagaccaatgatcaggagaactgg 640
I R D G M K F P D M V H A F K P S P K T N M Q E N W
agaatagtgtatttctttcacaccaccagagagcctgcacatgttctcttctcttggacgatgtaggcacccact 720
R I V D F F S H H P E S L H M F S F L F D D V G I P L
caactacaggcacatggaggggttttgggtgcaacacctacacctaatcaataaggatggaagcctcacctgtcaaat 800
N Y R H M E G F G V N T Y T L I N K D G K P H L V K F
tccactggaagcctacctgtggtgcaaatgcctgttggatgatgaagctgtgactgttggcggcacctgccacagccat 880
H <del>W</del> K P T C G V K C L L D D E A V T V G G T C H S H
gccacgaaggacttgactgattctatt<u>gcagcaggaattaccag</u>agtggaagctttacatccagactattgatcctga 960
A T K D L T D S I A A G N Y P E W K L Y I Q T I D P D
tcatgaggacagatttgacttcgatctcttggatgccaagacatggccagaggatatcatccctcgcagccagttg 1040
H E D R F D F D P L D V T K T W P E D I I P L Q P V G
gacggatggtcctgaaacaaaacattgataacttcttgcagaaaatgaacagcttcttctgcccagcgataattgtc 1120
R M V L N K N I D N F F A E N E Q L A F C <del>P</del> A I I V
cctggaatccattactctgatgataagctgctccagacaagaatttctctatgctgataccacaaagcaccgtcttgg 1200
P G I H Y S D D K L L Q T <del>N</del> I F S <del>Y</del> A D T Q R H R L G
cccaactatttgatgcttctgtgaatgcacaaaatgtgcataccacaacaaccaccagatggctccatgaatttca 1280
P N Y L M L P V N A P K C A Y H N N H H D G S M N F M
tgacagggatgaagaggttaactacttcccttcaaggtttgatgtgcacgtcatgctgagaaggtccctattctctct 1360
H R D E E V N Y F P S R F D A A R H A E K V P I P P
cgtgttctaacaggctgtcgggaaaagtgtgtcattgacaaggagaaacaatttccaacaggctggtgagagataccggtc 1440
R V L T G C R E K C V I D K E N N F Q Q A G E R Y R S
attgaccctgccaggcaagatcgttttctccagcgggtgggtgatgctctctcagatcctcgtattacacatgaactcc 1520
F D P A R Q D R F L Q R W V D A L S D P R I T H E L R
gtggcatctggatctcctactggctgcagtgatgcgtcccttggcagaagctggcttcacgtctcaacctgaaacca 1600
G I W I S Y W S Q C D A S L G Q K L A S R L N L K P
aacatgtagatcggccaggaggaatccagtggtggtgctatggtggacagtcaaacatgaactgtaatgtgtcagaccgc 1680
N M *
cgtagtctggaataaaatgtgatacgggtgatgtatactggtgacgcaagttgtgaaactgtatctggaatcctgaaaa 1760
tatgccttctgtgtcttgggaaagagataataaagactgatcagtggggtgctaaaaaaaaaaaaaaaaa 1832

```

Fig. 4-2 イネCatBの塩基配列と推定アミノ酸配列

*は終止コドンを示す。白ぬきで表わしたアミノ酸はヘム結合部位を、網かけで表わしたアミノ酸は活性中心のアミノ酸を示す。枠で囲んだ塩基配列は、スクリーニングのプロープを調製するためのPCRで用いたプライマーの配列を示す。

Homologies among amino acid sequences of plant catalases

	Rice B	Rice A	Cotton1	Sweetpotato	Pea	Maize1	Maize2	Maize3
Rice B	*	71.1	84.1	75.0	82.2	93.3	63.3	67.4
Rice A		*	72.8	70.9	69.8	72.0	56.5	81.8
Cotton1			*	77.4	86.0	85.0	64.0	68.0
Sweetpotato				*	75.3	74.0	56.6	67.7
Pea					*	81.2	60.4	65.9
Maize1						*	61.1	67.0
Maize2							*	55.1
Maize3								*

Table 4-1 CatBのコードするカタラーゼと他の植物カタラーゼとのアミノ酸配列の比較

ここで用いたカタラーゼの配列に引用元は以下の通りである。イネCat A [Mori et al.1992]、ワタCat 1 [Ni et al.1990]、サツマイモCat [Sakajo et al.1987]、エンドウCat [Isin and Allen 1991]、トウモロコシCat 1、Cat 3 [Redinbaugh et al.1988]、トウモロコシCat 2 [Bethards et al.1987]。

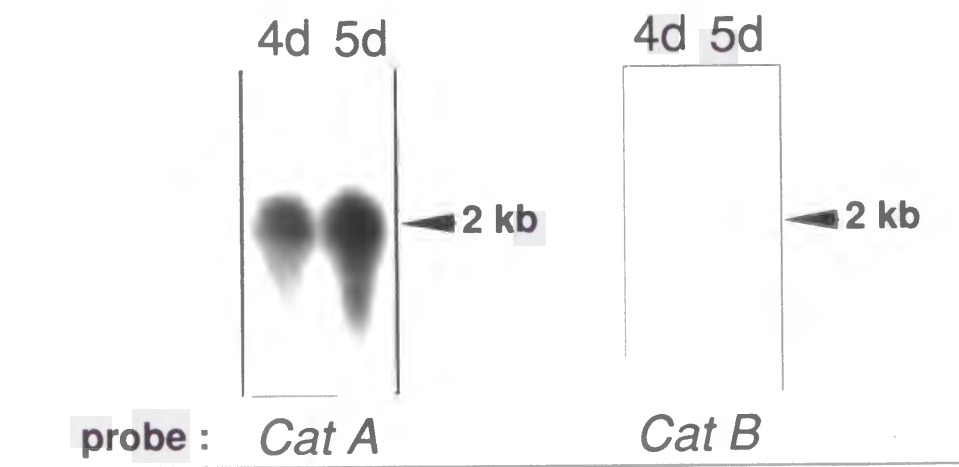


Fig. 4-3 イネCatAとCatBの芽生えにおける発現

暗所空気中で発芽させた4日目または5日目の芽生えからRNAを抽出し、CatAとCatBに特異的なプローブを用いてNorthern blotを行った。

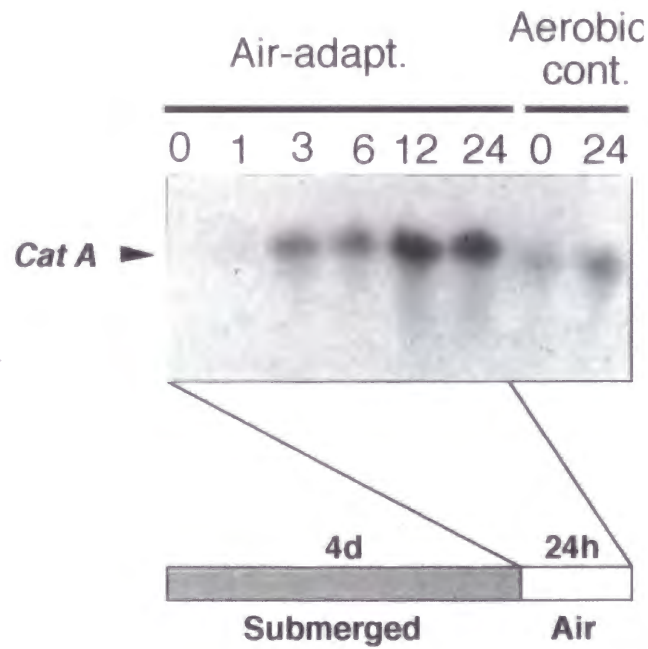


Fig. 4-4 イネCatAの酸素適応過程における発現

水中で発芽させた芽生えを空气中へ移し酸素適応させたサンプルからRNAを抽出し、CatAに特異的なプローブを用いてNorthern blotを行った。レーンの上の数字は時間を表す。「Air-adapt.」は酸素適応させた芽生えを、「Aerobic cont.」は好気条件下で育成させた芽生えを表す。

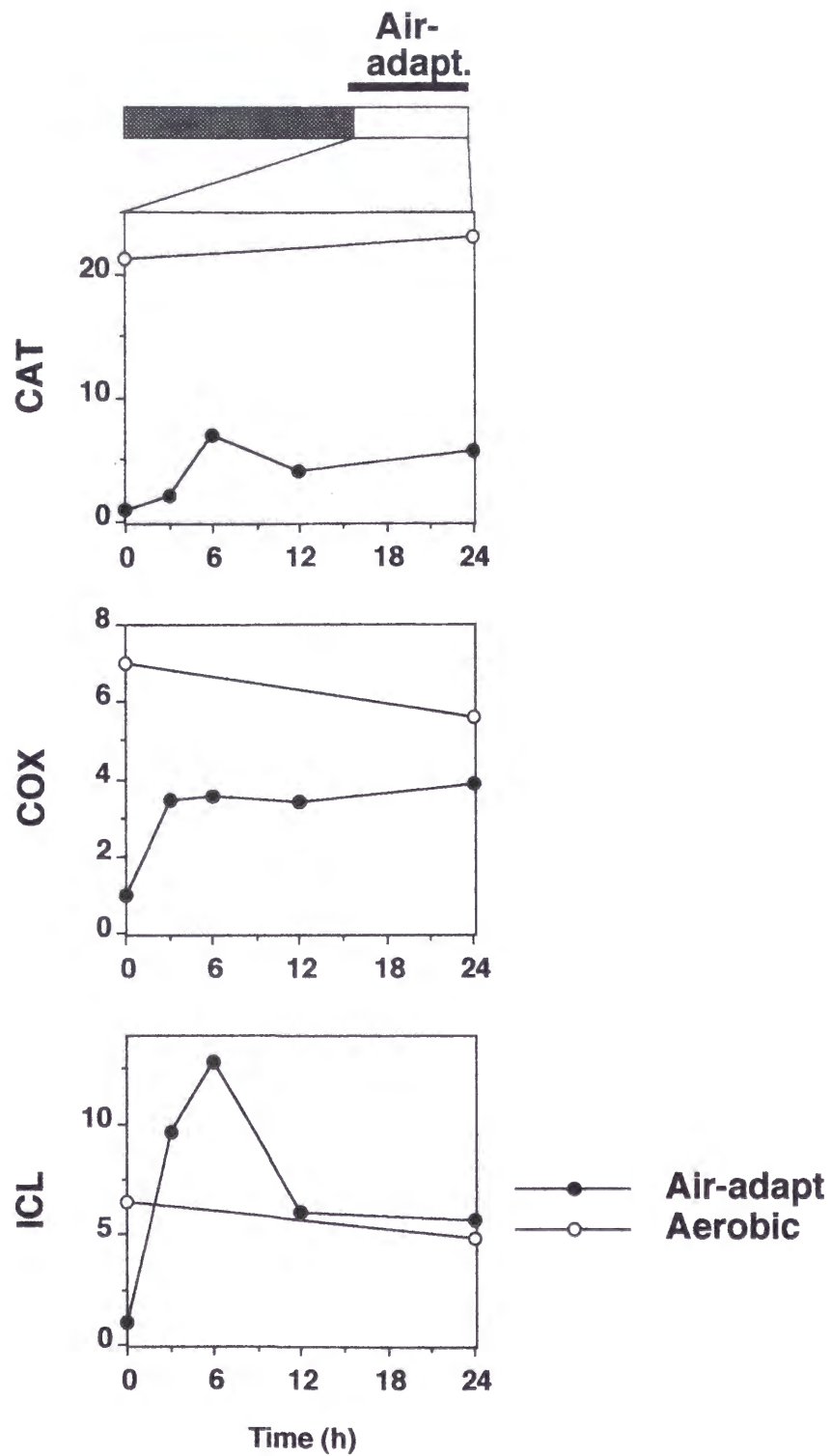


Fig. 4-5 イネ芽生えの酸素適応過程におけるカタラーゼ、チトクロムc オキシダーゼ、イソクエン酸リアーゼの活性の変動

暗所水中で発芽させたイネ芽生えを空气中に移したサンプルの、それぞれの酵素活性を測定した。全タンパク質量あたりの酵素活性を、0時間における値を1とした相対値で示している。黒丸は水中で発芽させた芽生えを酸素適応させた場合の活性を、白丸は好気条件で発芽させた芽生えの活性を表す。CAT: カタラーゼ、COX: チトクロムc オキシダーゼ、ICL: イソクエン酸リアーゼ。

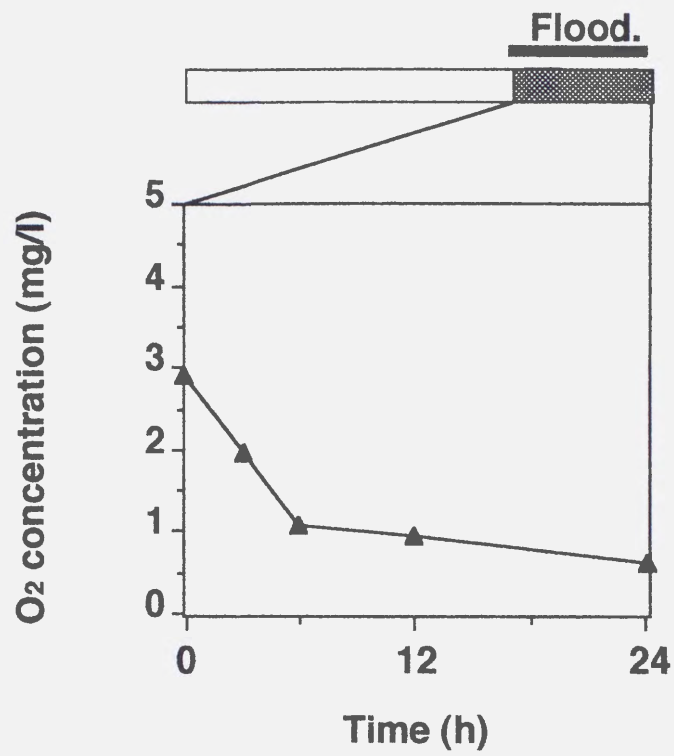


Fig. 4-6 イネ芽生えの水没時の水中溶存酸素量

空気中で発芽させたイネ芽生えを、水没させることにより低酸素処理を行った。この時の芽生えを沈めている水の溶存酸素量を測定した。0時間における溶存酸素量は2.9mg/lであった。

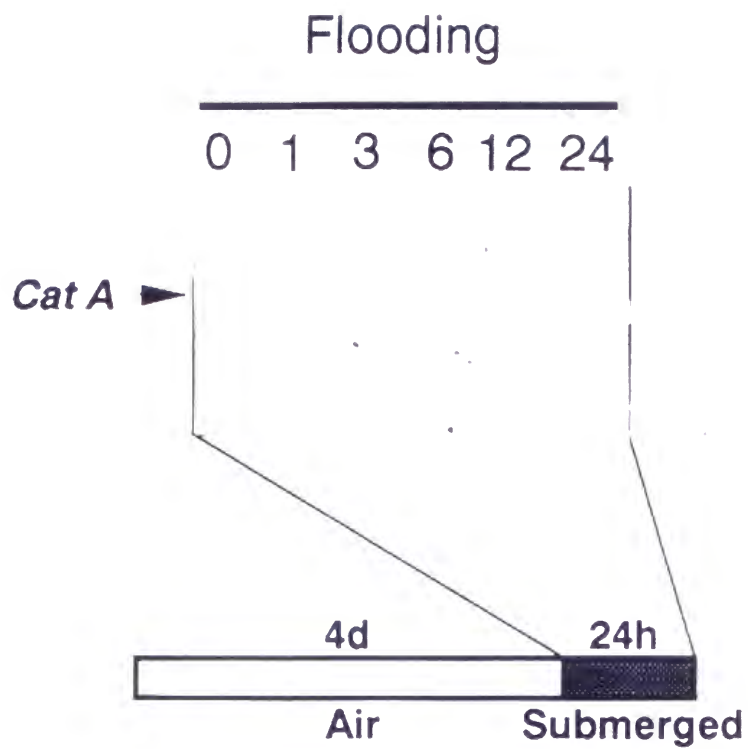


Fig. 4-7 イネ芽生えの低酸素処理におけるCatAの発現応答
 空気中で発芽させた芽生えを水没させることにより低酸素処理をしたサンプルからRNAを抽出し、CatAに特異的なプローブを用いてNorthern blotを行った。レーンの上の数字は時間を表す。

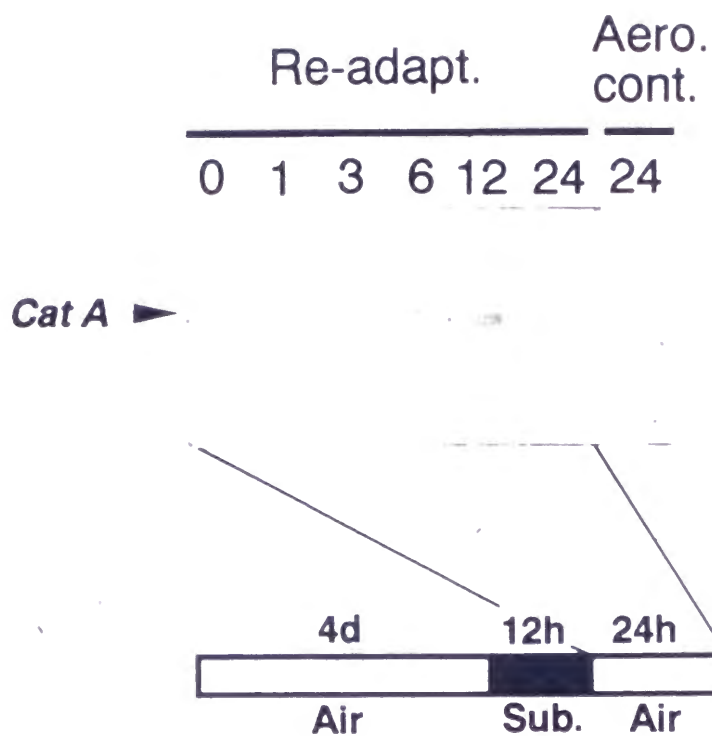


Fig. 4-8 低酸素処理を行ったイネ芽生えの酸素分圧上昇に対するCatAの発現応答

空気中で発芽させた芽生えを低酸素処理を行った後、再び空気中で移し酸素適応させたサンプルからRNAを抽出し、CatAに特異的なプローブを用いてNorthern blotを行った。レーンの上の数字は時間を表す。「Re-adapt.」は低酸素処理後、酸素適応させた芽生えを、「Aero. cont.」は空気中で生育させた芽生えを表す。

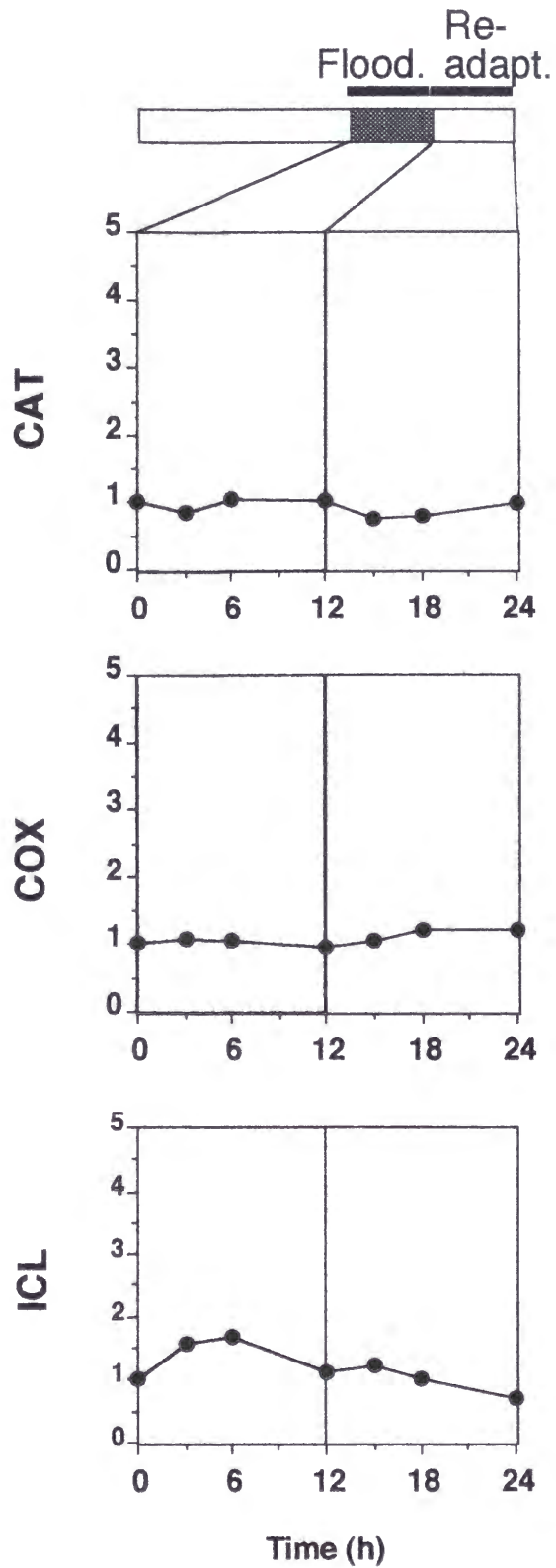


Fig. 4-9 低酸素処理および再適応におけるカタラーゼ、チトクロムc オキシダーゼ、イソクエン酸リアーゼの活性の変動

空気中で発芽させた芽生えを水没させることにより12時間低酸素処理を行い、その後空气中へ移して12時間酸素適応させた。全タンパク質量あたりの酵素活性を、0時間における値を1とした相対値で示している。CAT: カタラーゼ、COX: チトクロムc オキシダーゼ、ICL: イソクエン酸リアーゼ。

第5章

イネ酸素ストレス防御遺伝子のプロモーターに存在する共通配列の解析

酸素ストレスの防御には、活性酸素の消去ばかりでなく、酸化による障害の修復も不可欠である。活性酸素の消去と同様、酸化的障害の修復においても、DNAやタンパク質の修復、還元力の供給などの複数の酵素が関与している。大腸菌や酵母においては酸素ストレスの防御に関わる複数の遺伝子が共通の転写因子 (OxyR、SoxRS、Yap1) によって調節されている [46]。植物を含む高等生物においても同様な調節機構が存在すると想定されるが、その実態は明らかとなっていない。

筆者の所属する研究グループではこれまでに活性酸素消去系酵素の遺伝子の他にも、酸素ストレスの防御に関与するグルタレドキシシン遺伝子の単離・解析を行ってきた [65, 109]。グルタレドキシシンはチオレドキシシンと同様に、タンパク質のジスルフィド結合を還元するチオールトランスフェラーゼ活性を持っている [37]。グルタレドキシシンとチオレドキシシンはいずれも、酸素ストレスによりSH基が酸化され不活化されたタンパク質を還元して修復する機能をもっていると考えられている (Fig. 5-1)。*in vitro*の実験では酸化されたタンパク質がグルタレドキシシンとチオレドキシシンによって修復されることが示されている [132]。グルタレドキシシンは活性酸素消去系酵素の一つであるデヒドロアスコルビン酸還元酵素 (Fig. 0-1 参照) の活性も有している [108, 127]。またチオレドキシシンがフェノキシラジカルを消去することが知られている [32]。これらのことからグルタレドキシシンとチオレドキシシンは、活性酸素消去の機能も持っていることが示唆される。

グルタレドキシシン遺伝子の構造解析およびシークエンスデータベースの検索により、細胞質型SOD遺伝子*sodCc1*、グルタレドキシシン遺伝子*grx*、イネ細胞質型チオレドキシシン遺伝子*trxh*のプロモーター領域には、28bpの配列が共通に保存されていることが明らかとなっている (Fig. 5-2)。28bpの保存配列には、19bpから成るパルンドローム構造がみられる。また*sodCc1*と*trxh*のみを比較すると、共通に保存されている配列は28bpの配列の前後77bpにわたっている (Fig. 5-2)。本実験では、3つの遺伝子に存在するこの共通配列が遺伝子発現調節に機能しているかどうかを検討した。*sodCc1*と

*trxh*に共通な77bpの領域を、77bp共通配列、3つの遺伝子に保存されている28bpの配列を、コア配列と呼ぶこととする。

材料と方法

植物材料の培養

イネ (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) 胚芽およびカルスを材料として用いた。

第2章 (p27) と同様にイネ胚芽を滅菌し、N6液体培地中で懸濁培養した。

カルスの誘導および培養は以下のようにして行った。イネ完熟種子を70%エタノールに1分間浸した後、次亜塩素酸ナトリウム (1% 活性塩素) に60分間浸して滅菌した。種子を滅菌蒸留水で洗浄した後、2mg/l 2,4-D、1g/l casamino acidを含むN6固形培地に置き、28℃、暗所で3週間培養した。誘導されたカルスをG液体培地に懸濁し、ロータリーシェーカーで110rpmで振とうし、28℃、暗所で培養した。1週間おきにカルスの一部を新しい培地に移し培養を継続させた。

プラスミドの構築

ルシフェラーゼ (LUC) レポータープラスミドの構築を以下のようにして行った。

イネ *sodCc1* (accession no. L19435) のプロモーター領域のうち、77bp共通配列 (base no. 766-842) をPCRにより増幅した。用いたプライマーの配列は以下の通りである。SODF: 5'-AAGAGAAACAACATATTTAC-3'、SODR: 5'-ATTTAGATCGCTAAAAACAC-3'。増幅された産物を、pBSK (Stratagene) の *EcoRV* サイトにTを付加して作製したTベクターにTAクローニングによって組み込み、得られたプラスミドを pBSK-HS と名付けた。

イネ細胞中でトランスジーンが発現量の上昇に効果のあるイネ細胞質型SOD遺伝子 *sodCc2* (accession no. L19434) の5'-non coding intron [Sakamoto A, Tanaka K 未発表データ] をPCRにより増幅した。得られたDNA断片を、プライマーの末端に設計した *Xba*I サイトおよび *Bam*HI サイトを用いて、*Xba*I および *Bam*HI で切断した pBI 221 に組み込んだ。これにより CaMV 35S プロモーターと GUS コード領域の間に

*sodCc2*の5'-non coding intronが挿入された。このプラスミドを35SINTGUSと名付けた [Makino H 私信]。pBSK-HSをHind III およびPst I で切断してインサートを切りだし、35SINTGUSにHind III サイトおよびPst I サイトで組み込んだ。これによりCaMV 35Sプロモーターの上流に77bp共通配列をもったGUSプラスミド、77HS-35SINTGUSが構築された。

一方、35SINTGUSをBamH I およびSac I 切断によりGUSコード領域を除去し、代わってpGEM-luc (Promega) のBamH I -Sac I 断片を挿入して、GUSコード領域をLUCコード領域に入れ替えたプラスミド、35SINTLUCを構築した。さらに35SINTLUCをBamH I およびStu I 切断によりLUCコード領域を除去し、pSP-luc+NF (Promega) 由来のLUCコード領域 (pSP-luc+NFのHind III - Xba I 断片を平滑化してpBSKに組み込んだ後に、BamH I およびEcoRV切断により得られた断片) を挿入して、得られたプラスミドを35SINTLUC+と名付けた [Makino H 私信]。

77HS-35SINTGUSをBamH I およびSac I 切断によりGUSコード領域を除去し、代わって35SINTLUC+のBamH I -Sac I 断片を挿入して、LUC+コード領域をもつプラスミド、77HS-35SINTLUC+を作製した。

トランジェントアッセイ

イネ懸濁培養カルスに、パーティクルガン (IDERA GIE-III、タナカ) を用いて、LUCレポータープラスミド (35SINTLUC+、77HS-35SINTLUC+) を導入した。またinternal controlとして35SINTGUSをco-transformした。bombardmentを行ったカルスをG培地に懸濁し、培地に所定量の濃縮ストック薬剤液を加え、28℃、暗所で24時間振とう培養した。培養後、抽出バッファー (50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0)、10mM EDTA、10mM b-mercapto-ethanol、0.1% sarcosyl、0.1% Triton X-100) でカルスを破碎し、20,000 × g、1分間遠心した後、上清をLUCおよびGUS活性測定に用いた。LUC活性は、Luciferase Assay System (Promega) を用いてルミノメーター (Lumat LB 9507、EG & G Berthold, Wildbad, Germany) によって測定した。GUS活性はSakamotoら [99] の方法に従って測定した。LUC活性をGUS活性で補正した値をデータとした。

Northern blot

イネ *sodCc1*、*trxh*、*grx* の cDNA の 3'-UTR をそれぞれに特異的なプローブとして用いた。*sodCc1* プローブの調製については第 1 章 (p 7-8) と同様に行った。また *trxh* プローブは以下のように調製した。イネ *trxh* cDNA [42] (accession no. D21836) の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、イネ緑葉由来の 1 本鎖 cDNA を鋳型として PCR を行い、イネ *trxh* の全長 cDNA を増幅した。得られた産物を、pBSK (Stratagene) の *EcoRV* サイトに T を付加して作製した T ベクターに TA クローニングによって組み込んだ。このようにして得られた *trxh* cDNA プラスミドを *EcoRI* で切断することにより、*trxh* cDNA の 3'-UTR (base no. 426-687) を切り出し、プローブとして用いた。また *grx* cDNA [65] (accession no. X77150) の 3'-UTR (base no. 361-516) を PCR によって増幅し、得られた断片を *grx* に対するプローブとした。

イネ懸濁培養胚芽を第 2 章 (p 27) と同様にパラコート処理を行い、total RNA 20 μ g を用いて第 1 章 (p 8) と同様にプロッティングおよびハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション、洗浄の条件は第 1 章と同じ条件で行い、オートラジオグラフィーあるいはバイオイメージアナライザー (Molecular Imager、BIO-RAD) により結果を得た。

核抽出物の調製

以下の操作は全て氷上または 4°C で行った。培養 4 日目の懸濁培養胚芽に、抽出バッファー A (50mM Tris-HCl (pH 7.9)、5mM MgCl₂、1mM PMSF、5mM DTT、1.6mM salicylhydroxamic acid、1mg/ml *t*-butylated hydroxytoluene) を加え、POLYTRON PT 3100 (KINEMATICA AG) を用いて破碎した。ホモジェネートを 2 層の Miracloth (CALBIOCHEM) でろ過した後、3,300 × g で 10 分間遠心した。沈殿を抽出バッファー A に懸濁し、再度 3,300 × g で 10 分間遠心した。沈殿を抽出バッファー A に懸濁した後、Percoll の密度勾配 (それぞれ 80% sucrose、80% Percoll、60% Percoll、40% Percoll を含む抽出バッファー A を順に重層したもの) に重層し、4,000 × g で 30 分間遠心した。80% sucrose と 80% Percoll の界面に形成されるバンドを回収し、抽出バッファー A を加えた。これを 3,300 × g で 10 分間遠心し、得られた沈殿を核画分とした。

核画分を抽出バッファーB (25mM Tris-HCl (pH 7.9)、5mM MgCl₂、0.1mM EDTA、25% glycerol、1mM PMSF、2mM DTT、0.5M NaCl) に懸濁し、30分間攪拌して塩抽出を行った。25,000 × gで30分間遠心して得られた上清を、透析バッファー (20mM HEPES-KOH (pH 7.9)、100mM KCl、12.5mM MgCl₂、0.2mM EDTA、20% glycerol、1mM PMSF、2mM DTT) を用いて一晩透析した。その後25,000 × gで30分間遠心して得られた上清を、核抽出物とした。

ゲルシフトアッセイ

28bpのコア配列のプロープは以下のようにして調製した。イネ*sodCc1*プロモーターのコア配列 (base no. 794-821) を2個直列に連結したDNA断片ができるように、相補的な配列をもつ2本の合成オリゴヌクレオチドを設計した。これらをアニールさせた時に両端に*Eco*RI と*Hind* III の突出末端ができるようにそれぞれのオリゴヌクレオチドを合成した。それらの配列は次の通りである (下線部はオリゴヌクレオチド末端に設計した制限酵素部位を示す)。

coreII d+: 5'-AGCTTAATAATTTATAAATAAAAACTTTTTATATA

GATATCAATAATTTATAAATAAAAACTTTTTATATAG-3'

coreII d-: 5'-AAITCTATATAAAAAGTTTTATTTTATAAATTATT

GATATCTATATAAAAAGTTTTATTTTATAAATTATTA-3'

これらのオリゴヌクレオチドをT4ポリヌクレオチドキナーゼで末端をリン酸化した後、アニールさせ、pBSKの*Eco*RIおよび*Hind* III サイトに組み込んだ。このプラスミドを*Eco*RIおよび*Hind* IIIで切断しインサートDNAをベクターより切りだした。これをKlenow fragmentを用いた平滑化によって³²Pで標識し、プローブとして用いた。

標識したプローブ2ngと核抽出物 (タンパク質量で1-13 μg) を混合し、結合バッファー (前項の透析バッファーと同じ組成のもの) を加えて全量を15 μlとした。室温で30分間インキュベートして結合反応を行った後、4%非変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行った。泳動バッファーには、25mM Tris、190mM glycine、1mM EDTAを用い、12mA、4°Cで泳動を行った。泳動後ゲルを乾燥し、オートラジオグラフィあるいはバイオイメージアナライザー (Molecular Imager、BIO-RAD) により結果を得た。

競合実験においては、標識したプローブ2ng、核抽出物2 μ g、competitor DNA 40-200ngを混合し、結合バッファーを加えて全量を15 μ lとした後、上記と同様に結合反応を行った。

Southwestern blot

核抽出物をSDS-PAGE (ゲル濃度12%) により分画した後、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、150mM glycine、0.05% SDS、10% methanolをtransfer bufferに用いて、2mA/cm²で30分間通電し、PVDF膜 (BIO-RAD) にプロットした。SDS-PAGEおよびプロットを4 $^{\circ}$ Cで行った。プロット後のPVDF膜を、5% BSAを含む結合バッファー (25mM HEPES-KOH (pH 7.9)、100mM KCl、0.5mM DTT) に浸し、室温で一晩振とうした。0.25% BSA、20 μ g/ml poly (dI-dC) \cdot poly (dI-dC) を含む結合バッファーに、標識したプローブDNA 20ngを加えPVDF膜を浸し、室温で4時間インキュベートして結合反応を行った。反応後、結合バッファーを用い室温で30分間、2回洗浄を行い、オートラジオグラフィーあるいはバイオイメージアナライザー (Molecular Imager、BIO-RAD) により結果を得た。

結 果

3個のイネ遺伝子、*sodCc1*、*trxh*、*grx*に共通に存在する配列がシス-エレメントとして機能しているかどうかを検討するために、トランジェントアッセイを行った。*sodCc1*プロモーターの77bp共通配列を、CaMV 35SプロモーターとLUCの融合遺伝子の5'に連結したレポーターコンストラクト (77HS-35SINTLUC+) を作製した (Fig. 5-1)。コントロールとしてCaMV 35Sプロモーターのみをもつレポーターコンストラクト (35SINTLUC+) を用いた (Fig. 5-1)。いずれのコンストラクトもレポーター遺伝子の発現を上昇させるためにCaMV 35SプロモーターとLUCコード領域の間に*sodCc2*の5'-non-coding intronを組み込んでいる。これらのコンストラクトのそれぞれを、internal controlのGUSレポーターコンストラクト (35SINTGUS) と同時に、イネ懸濁培養カルスにパーティクルガンを用いて導入した。その結果、77bp共通配列

をもつコンストラクトを導入したカルス(LUC)活性は、35Sプロモーターのみのコンストラクトのbasalな活性に比べて1.5倍に上昇していた (Fig. 5-3)。この活性上昇は1mM 過酸化水素処理によって顕著な影響を受けなかった。一方、DTT処理によって共通配列をもつコンストラクトのLUC活性はbasalレベルと同程度に抑えられた。また1 μ M および10 μ M パラコート処理を行うと、共通配列をもつコンストラクトを用いた場合には、35Sプロモーターのみのコンストラクトのそれぞれ2.6倍および2.7倍のLUC活性がみられた。共通配列をもつコンストラクトでのパラコート処理によるLUC活性の誘導は、無処理のサンプルに比べ1.7倍および1.8倍であった。このように77bp 共通配列中には、スーパーオキシドに応答するシス-エレメントが存在することが明らかとなった。

また*sodCc1*、*trxh*、*grx*の3個の遺伝子が、パラコートにより誘導されているかどうかを調べた。イネ懸濁培養胚芽を10 μ M パラコートで処理し、3つの遺伝子の3'-UTRをそれぞれプローブに用いてNorthern blot解析によってmRNA量の変動を調べた。その結果、*sodCc1*、*trxh*、*grx*のmRNA量はいずれもパラコート処理によって上昇した (Fig. 5-4)。これにより3つの遺伝子が*in vivo*でパラコートにより誘導されていることが確認された。

次に、3つの遺伝子の共通配列に結合する核タンパク質が存在するかどうかを検討するために、ゲルシフトアッセイを行った。イネ培養胚芽から調製した核抽出物と28bpのコア配列を混合し結合反応を行ったところ、DNA-タンパク質複合体のバンドが1本検出された (Fig. 5-5)。結合反応に投入する核抽出物の量を増加させるとこのバンドの強度が上昇した。またプローブの20-100倍量の標識されていないコア配列をcompetitorとして加えると、このバンドが消失したが、poly (dI-dC) \cdot poly (dI-dC)を加えた場合にはバンド強度に変化は見られなかったことから (Fig. 5-5)、このバンドはプローブと核タンパク質との特異的な結合によるものであると考えられた。なおパラコート処理を行った培養胚芽と未処理の培養胚芽からそれぞれ核抽出物を調製し、プローブと核タンパク質との結合に差がみられるかどうか検討した。その結果、いずれの場合においても1本のバンドが検出されその強度に顕著な差はみられなかった (データ省略)。また核抽出物を*in vitro*で過酸化水素処理またはDTT処理をすることにより、核タンパク質とプローブとの結合が酸化還元によって影響されるかどうかを調

べた。その結果、過酸化水素処理によってDNA-タンパク質複合体のバンド強度が上昇した (Fig. 5-6)。過酸化水素処理の効果は1mM以上の濃度において観察された。一方、DTT処理を行った場合には核タンパク質とプローブとの結合に顕著な変動はみられなかった。

次にSouthwestern blot解析を行い、28bpのコア配列に結合するタンパク質のキャラクタリゼーションを行った。核抽出物をSDS-PAGEで分画後メンブレンにプロットし、コア配列をプローブとして結合反応を行った。その結果、17kDaと24kDaの大きさの2本のバンドが検出された (Fig. 5-7)。これにより、コア配列と直接相互作用をする2種類のタンパク質の存在が明らかとなった。

考 察

77bp共通配列をCaMV 35Sプロモーターに連結したレポーターコンストラクトを用いてトランジェントアッセイを行った結果、*sodCcl*遺伝子の77bp共通配列中には、スーパーオキシドに応答するシス-エレメントが存在することが明らかとなった (Fig. 5-3)。高等植物の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である。77bp共通配列をもつコンストラクトのLUC活性は、スーパーオキシドの酸化により誘導されDTTの還元により抑制されることから (Fig. 5-3)、*sodCcl*はこのシス-エレメントを介してレドックス制御を受けていることが示唆された。

77bp共通配列をもつコンストラクトのLUC活性はCaMV 35Sプロモーターのみのものに比べ1.5倍に上昇していた (Fig. 5-3)。このLUC活性の上昇は、77bpの配列中にエンハンサーが存在するというわけではなく、通常的环境下において細胞中で生成するスーパーオキシドによるものであると考えられる。77bp共通配列はスーパーオキシドに応答してLUCの発現を誘導したが、過酸化水素に対しては応答しなかった。大腸菌の転写因子OxyRとSoxRはそれぞれ過酸化水素、スーパーオキシドに応答することが知られている [14, 20]。第1章、第2章でみられたように細胞質型SODはパラコートと過酸化水素のいずれによっても誘導されることから、*sodCcl*遺伝子には他に過酸化水素に応答するシス-エレメントが存在すると考えられる。

シークエンスデータベースのホモロジー検索によって、イネゲノムDNA中に28bpコア配列とホモロジーの高い配列 (accession no. D25363) が存在することが明らかとなった (Fig. 5-7)。この配列は77bp共通配列と比較しても86%のホモロジーを示した。この配列が遺伝子の一部であるかどうかは明らかでないが、*sodCc1*、*trxh*、*grx*の3つの遺伝子の他にも、本実験で明らかとなったシス-エレメントにより調節される遺伝子が存在する可能性が示唆された。またイネのフェニルプロパノイド生合成系の4-クマル酸-CoAリガーゼ遺伝子 (accession no. X52623) と *Euglena*の光化学系 I 反応中心のサブユニット *psaB* 遺伝子 (accession no. M37526) において、28bpコア配列とホモロジーの高い配列がみられたが、いずれの遺伝子においてもそれらの配列はプロモーターではなくコード領域中のイントロンに存在しているため、シス-エレメントとして機能している可能性は小さい。

sodCc1、*trxh*、*grx*はいずれもパラコートにより誘導されることと (Fig. 5-4)、28bpのコア配列に特異的に結合する核タンパク質が存在することから (Fig. 5-5)、酸素ストレスの防御に関与する3つの遺伝子が、共通な調節機構により制御されている可能性が示唆された。この可能性を検討するために、77bp共通配列のうち28bpコア配列がパラコートによる誘導に関与しているかどうかを明らかにすることが今後の課題である。

28bpコア配列に結合する核タンパク質は過酸化水素により酸化されると、コア配列への結合が促進された。このことから本実験において検出されたDNA結合タンパク質は、レドックス制御に関与するものであることが示唆された。本実験において用いている核抽出物は2mM DTTを含むバッファーに懸濁していることから、核タンパク質は還元状態で存在していると思われる。過酸化水素処理の効果が1mM以上でみられたこと、DTT処理により核タンパク質とDNAの結合に影響がみられなかったこと、また *in vivo*でのパラコート処理によって核タンパク質とDNAの結合に顕著な変化がみられなかったのは、このためであると思われる。

核タンパク質をSDS-PAGEにより分画後、Southwestern blotを行った結果、28bpコア配列と直接相互作用する2種類のタンパク質の存在が明らかとなった。これらのタンパク質は、複合体としてコア配列に結合している可能性が考えられるが、それぞれのタンパク質単独でDNAに結合できると推測される。このことから、

Southwester screeningあるいはone hybrid法によってコア配列に結合するタンパク質のcDNAクローニングが可能であることが示唆された。今後、DNA結合タンパク質cDNAをクローニングすることにより、この共通配列を制御する転写因子とレドックス制御機構について解析を進めたい。

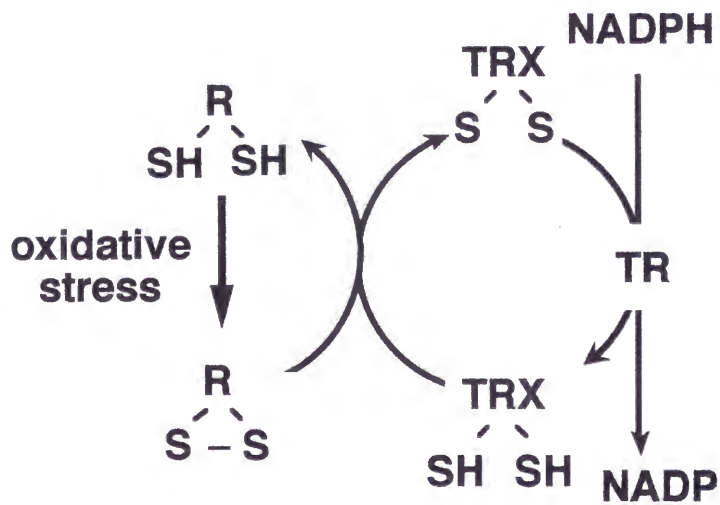
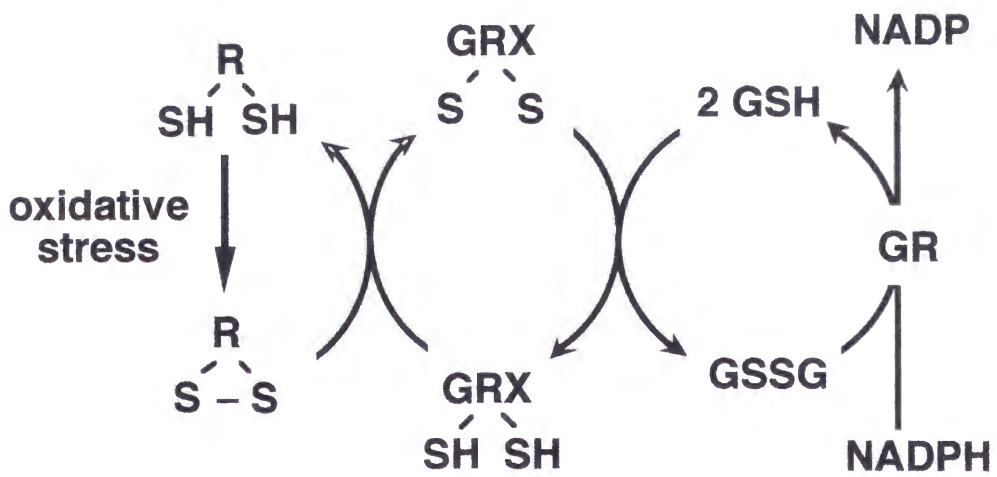
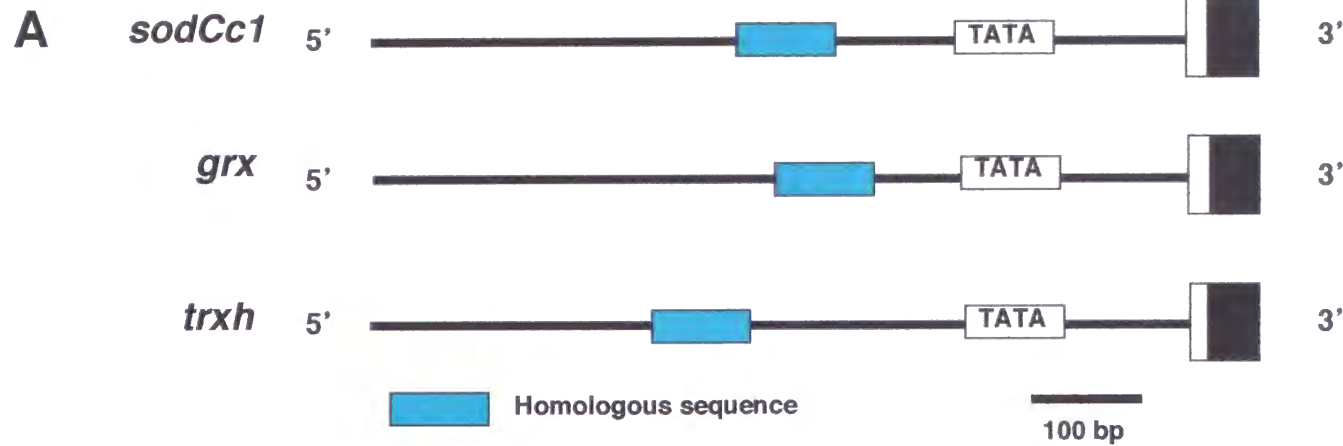


Fig. 5-1 グルタレドキシシンおよびチオレドキシシンによるタンパク質のジスルフィド結合の還元

GRX: グルタレドキシシン、TRX: チオレドキシシン、R: チオール基を持つタンパク質、GSH: 還元型グルタチオン、GSSG: 酸化型グルタチオン、GR: グルタチオン還元酵素、TR: チオレドキシシン還元酵素。



B

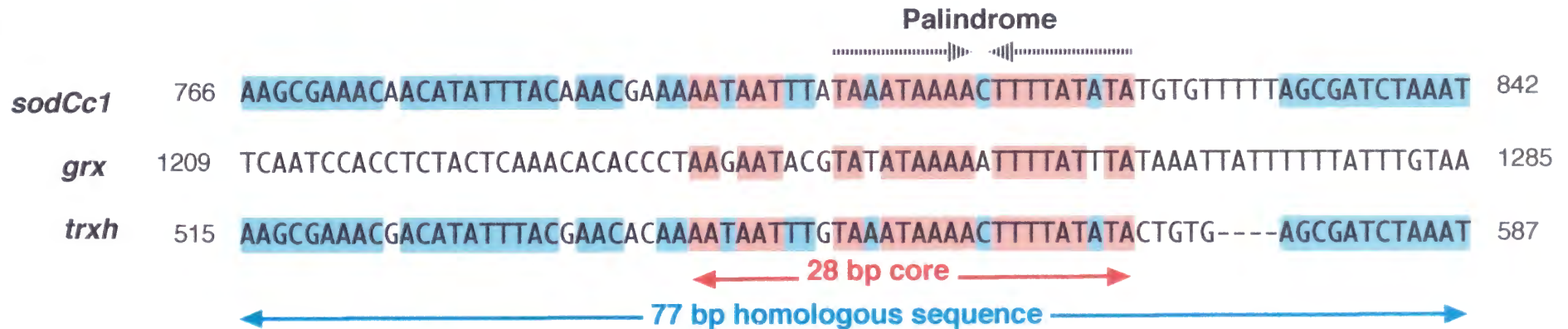
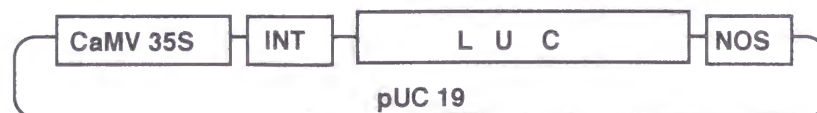


Fig. 5-2 イネ酸素ストレス防御遺伝子プロモーターに保存されている共通配列

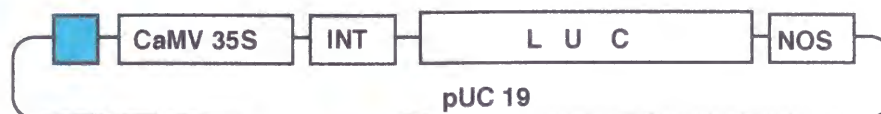
A. イネ細胞質型SOD遺伝子*sodCc1*、グルタレドキシシン遺伝子*grx*、細胞質型チオレドキシシン遺伝子*trxh*のプロモーター領域の模式図。青いボックスは、3つの遺伝子に保存されている共通配列を示す。

B. イネ細胞質型SOD遺伝子*sodCc1*、グルタレドキシシン遺伝子*grx*、細胞質型チオレドキシシン遺伝子*trxh*に共通な配列。3つの遺伝子に保存されている配列(28bpコア配列)を赤い網かけで示している。また*sodCc1*と*trxh*に共通な配列(77bp共通配列)を青い網かけで示している。配列の両端に示した数字は、それぞれaccession no. L19435、D86744、D26547としてデータベースに登録されている配列に基づいている。

A Control plasmid (35SINTLUC+)



HS plasmid (77HS-35SINTLUC+)



77bp共通配列

B

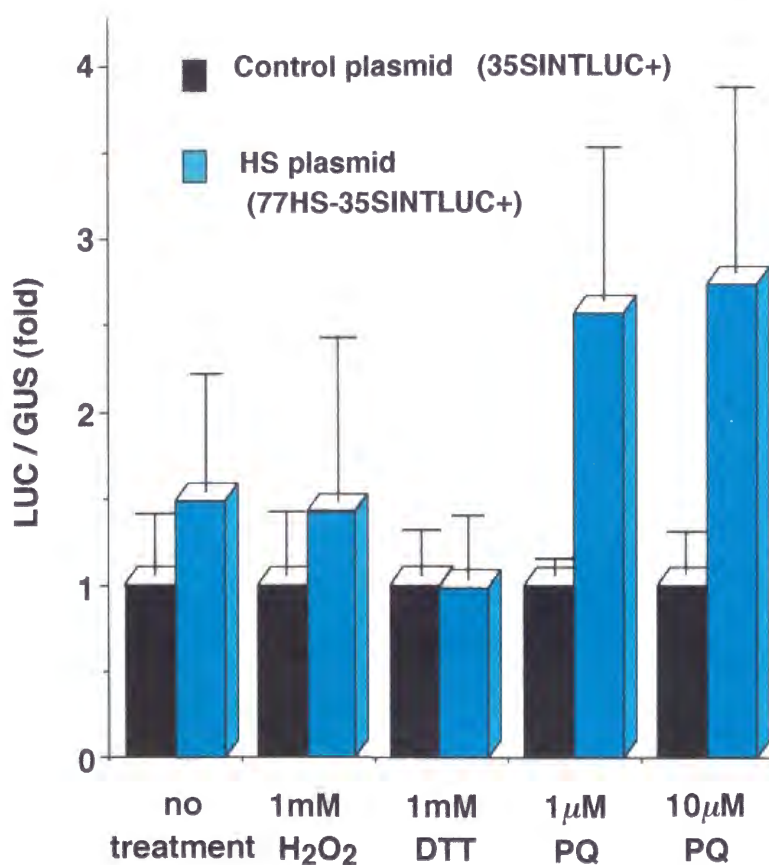


Fig. 5-3 77bp共通配列をもつレポーターコンストラクトおよびそれを用いたトランジェントアッセイ
A. 77bp共通配列をもつLUCレポーターコンストラクト (77HS-35SINTLUC+) をHSプラスミドとし、35SINTLUC+をコントロールプラスミドとした。CaMV 35S: カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、INT: 細胞質型SOD遺伝子*sodCc2*由来の5'-non-coding intron、NOS: ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター。

B. 35SINTLUC+と77HS-35SINTLUC+をそれぞれイネカルスに導入し、LUC活性を測定した。Internal controlとしてGUSレポーターコンストラクト35SINTGUSをco-transformしてGUS活性を測定し、LUC活性をGUS活性で補正した値を示している。データはコントロールプラスミドである35SINTLUC+のLUC活性を1とした相対値で示している。

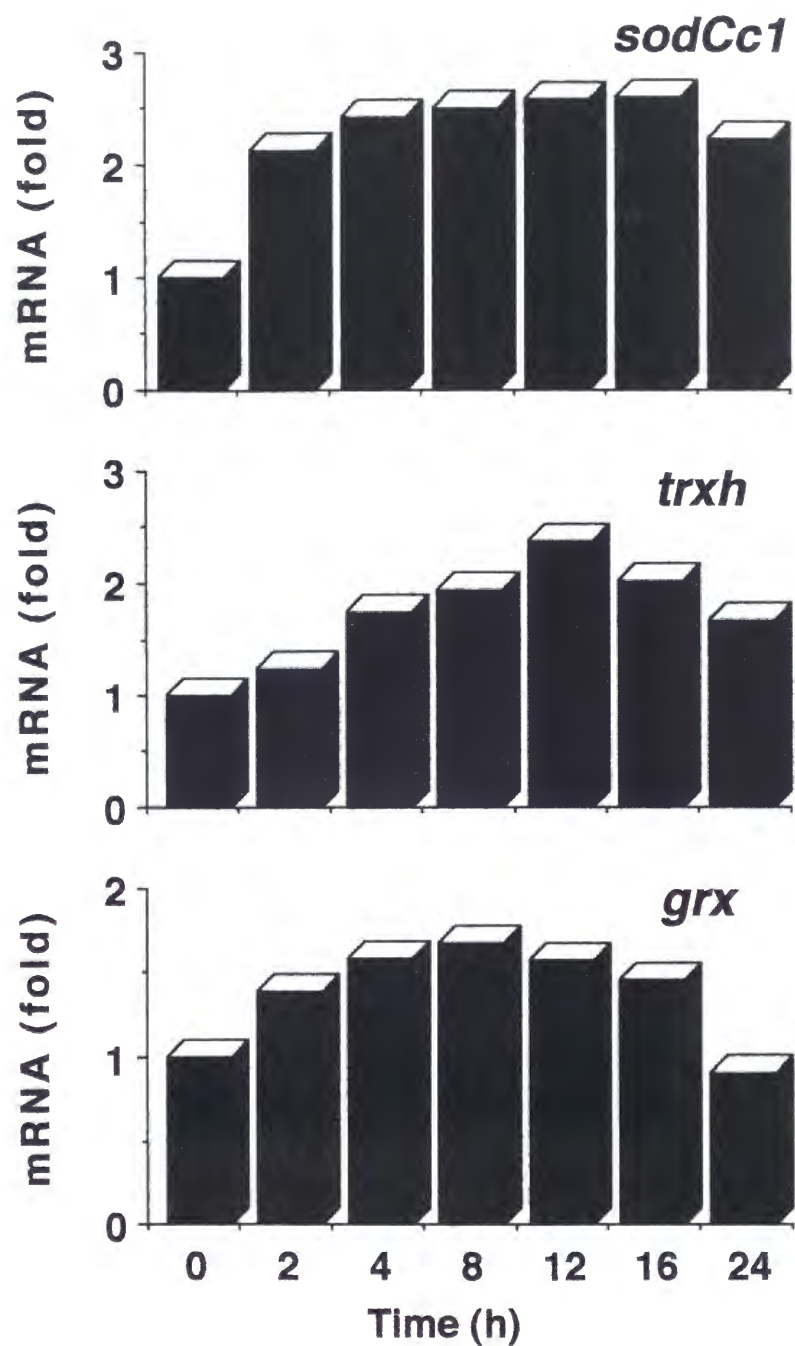


Fig. 5-4 パラコートに対する*sodCc1*、*trxh*、*grx*の応答

イネ培養胚芽を10 μ M パラコートで処理を行い、*sodCc1*、*trxh*、*grx*のそれぞれのcDNAの3'-UTRをプローブに用いてNorthern blotを行った。0時間におけるmRNA量を1とした相対値で示している。

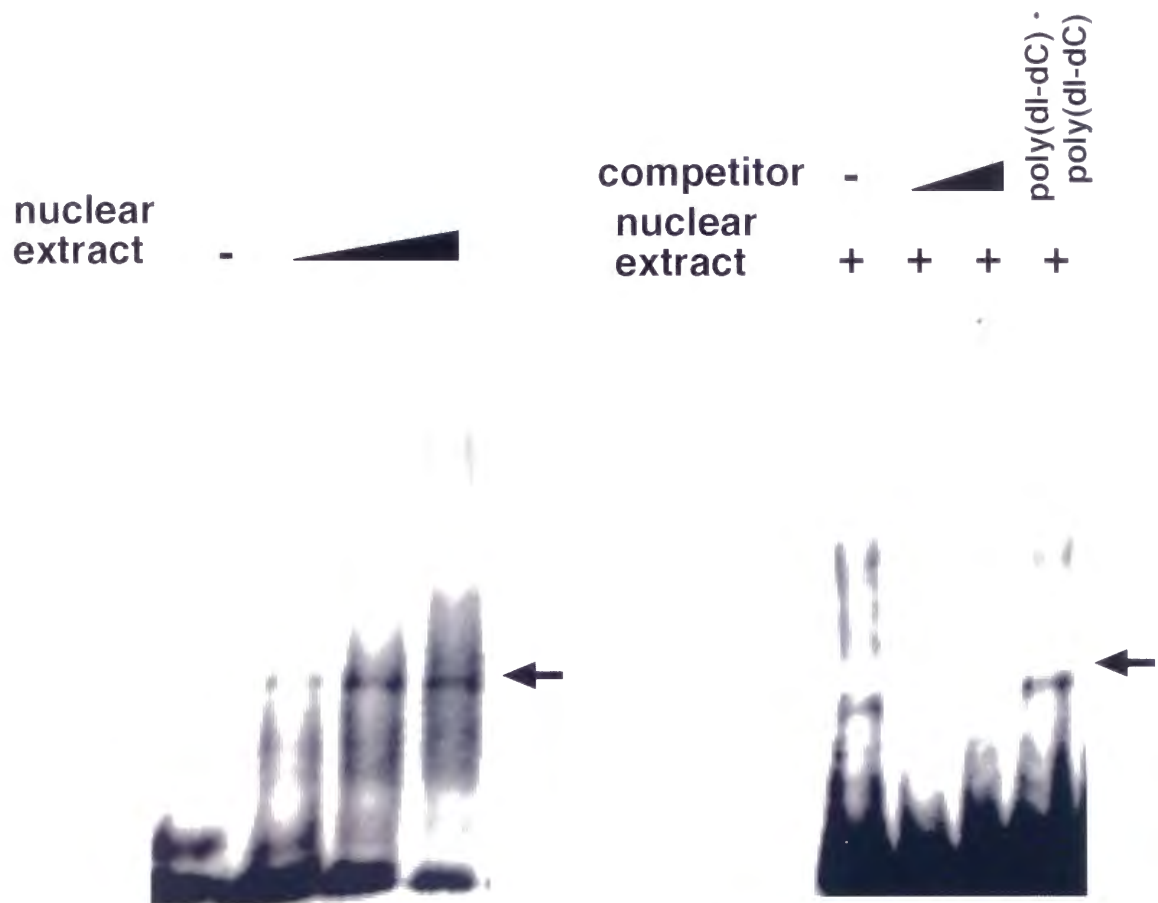


Fig. 5-5 ゲルシフトアッセイによるDNA結合タンパク質の検索

イネ培養胚芽より調製した核抽出物を用いて、28bpコア配列をプローブとして結合反応を行い非変性ポリアクリルアミドゲルにより分画した。

A. 結合反応に加える核抽出物の量を変化させた。最も左のレーンは核抽出物を加えていない。レーン左から順に0、1、4、13 μ gの核抽出物を用いた。

B. 競合実験によるプローブDNAと核タンパク質の結合特異性の検討。最も左のレーンはcompetitorを加えていない。左から2番目および3番目のレーンはそれぞれプローブの50倍量、100倍量の非標識の28bpコア配列をcompetitorとして加えた。最も右のレーンはプローブの50倍量のpoly (dI-dC) · poly (dI-dC)を加えた。

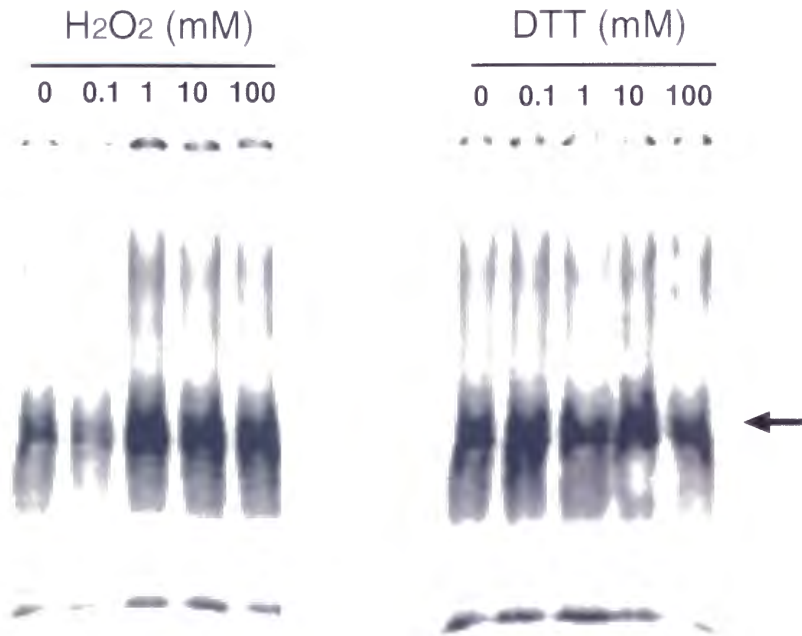


Fig. 5-6 核抽出物の酸化還元による28bpコア配列に結合する核タンパク質の結合活性の変動

イネ培養胚芽より調製した核抽出物を過酸化水素により酸化またはDTTにより還元した後に、28bpコア配列をプローブとしてゲルシフトアッセイを行った。



Fig. 5-7 Southwestern blot解析による28bpコア配列に結合する核タンパク質のキャラクタリゼーション

イネ培養胚芽より調製した核抽出物をSDS-PAGEにより分画後PVDF膜にプロットし、28bpコア配列をプローブとして結合反応を行った。いずれのレーンも同一の核抽出物サンプルを泳動している。

結 論

植物はSOD、APX、カタラーゼを初めとする複数の活性酸素消去系酵素を持っており、それらの酵素遺伝子の調節によって酸素ストレスを防御している。本研究ではイネ活性酸素消去系酵素遺伝子群の発現応答を調べることにより、それらの発現調節機構について考察を試みた。

本研究ではまず、SODとAPXの細胞質型と葉緑体型アイソフォーム、およびカタラーゼについて、様々な刺激やストレスに対する発現応答を調べた。その結果、細胞質型SODと細胞質型APXは酸素ストレスやABAにより、チラコイド型APXは光照射により、カタラーゼは酸素分圧の上昇によってmRNAレベルで誘導された。これらの誘導のいくつかについては、発現調節に関与する示唆が得られた。細胞質型APXの発現調節においては過酸化水素が酸素ストレスのシグナルとして、葉緑体型APXにおいてはプラストキノンの酸化還元状態が光強度のシグナルとして機能していることが示唆された。また細胞質型SODと細胞質型APXのアイソフォームは、それぞれABAにより誘導されるタイプとABAに応答しないタイプに分かれており、ABAにより協調的な発現制御を受けていることが示された。

筆者はまた、細胞質型SOD遺伝子*sodCc1*に存在するシス-エレメント様の配列について解析を行い、その発現調節機構の解明を試みた。このシス-エレメント様の配列は、酸素ストレスの防御に関与する遺伝子である、イネ細胞質型チオレドキシシン遺伝子*trxh*とグルタレドキシシン遺伝子*grx*のプロモーターにおいても共通に存在する。この共通配列は、スーパーオキシドに応答するシス-エレメントとして機能することが明らかとなった。また*sodCc1*、*trxh*、*grx*はいずれもパラコートにより誘導されたことから、これらの遺伝子が共通な制御を受けている可能性が示唆された。3つの遺伝子に共通な配列に結合する核タンパク質の存在が確認されたが、過酸化水素処理による酸化によってこの核タンパク質の結合が促進された。これらの結果から、酸素ストレスの防御に関わる複数の遺伝子が共通なシス-エレメントによってレドックス制御を受けている可能性が示された。このような調節機構は大腸菌や酵母では知られているものの、高等生物では未解明である。今後、この共通配列に結合するタンパク質のクローニングを行い、このシス-エレメントを制御する転写因子を解明することにより、酸素ストレス防御遺伝子の調節機構を明らかにしたい。

謝 辞

本研究を進めるにあたりご指導、ご支援をいただきました京都府立大学農学部生物資源化学科 田中國介教授ならびに増村威宏博士、神戸女子大学 辻英夫教授（京都大学理学部植物学教室前教授）、静岡大学理学部 丑丸敬史博士、京都大学理学部植物学教室 藤澤久雄前教授、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 田坂昌生教授（京都大学大学院理学研究科植物学教室前助教授）に深く感謝いたします。また筆者と共に実験を行い本研究にご協力をいただいた、京都府立大学農学部生物資源化学科 上中弘典氏、横井秀行氏、平野悦子氏、小谷忠明氏、中谷晋也氏に感謝いたします。

また過酸化水素定量およびクロロフィル蛍光測定にあたりそれぞれ有益なご助言をいただきました京都府立大学農学部生物資源化学科 齊藤和實教授ならびに佐野智博士に感謝いたします。イネCatA cDNAおよびプライマーを分与いただいた農水省農業生物資源研究所 肥後健一博士に感謝いたします。またGUSレポーターコンストラクト (35SINTGUS) およびLUCレポーターコンストラクト (35SINTLUC+) を作製および分与いただいた京都府立大学農学部生物資源化学科 牧野英志氏に感謝いたします。イネESTクローンならびにイネactin cDNAを分与いただいたイネゲノム研究プログラム（農水省農業生物資源研究所）、米ぬかを寄贈いただいた月桂冠酒造（株）に感謝いたします。

また、現在に至るまでご指導、ご助言をいただきました京都大学大学院理学研究科植物学教室 岡田清孝教授、北海道大学低温科学研究所 田中歩教授に感謝いたします。

最後にこれまでの筆者の研究生活を支えてくれた家族に感謝いたします。

引用文献

- [1] Amako K, Chen G-X, Asada K (1994) Separate assay for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol.* 35: 497-504
- [2] Aono M, Kubo A, Saji H, Natori T, Tanaka K, Kondo N (1991) Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 32: 691-697
- [3] Aono M, Saji H, Sakamoto A, Tanaka K, Kondo N, Tanaka K (1995) Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant Cell Physiol.* 36: 1687-1691
- [4] Asada K (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241
- [5] Asada K (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Edited by Foyer CH, Mullineaux PM pp. 77-104. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [6] Bethards LA, Skadsen RW, Scandalios JG (1987) Isolation and characterization of a cDNA clone for the *Cat2* gene in maize and its homology with other catalases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6830-6834
- [7] Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inze D (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* 10: 1723-1732
- [8] Bowler C, Van Montagu M, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116
- [9] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

- [10] Cakmak I, Marschner H (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathion reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* 98: 1222-1227
- [11] Chen G-X, Asada K (1989) Hydroxyurea and *p*-aminophenol are the suicide inhibitors of ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.* 265: 2775-2781
- [12] Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886
- [13] Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299
- [14] Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, Ames BN (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41: 753-762
- [15] Conklin PL, Last RL (1995) Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol.* 109: 203-212
- [16] Cooper TG, Beevers H (1969) Mitochondria and glyoxisomes from castor bean endosperm. *J. Biol. Chem.* 244: 3507-3513
- [17] Creissen G, Reynolds H, Xue Y, Mullineaux P (1995) Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J.* 8: 167-175
- [18] Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 116: 1351-1357
- [19] del Rio LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jimenez A, Lopez-Huertas E, Hernandez JA (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol.* 116: 1195-1200
- [20] Demple B, Amabile-Cuevas CF (1991) Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* 67: 837-839

- [21] Donahue JL, Okpodu CM, Cramer CL, Grabau EA, Alscher RG (1997) Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiol.* 113: 249–257
- [22] Duh JL, Zhu H, Shertzer HG, Nebert DW, Puga A (1995) The Y-box motif mediates redox-dependent transcriptional activation in mouse cells. *J. Biol. Chem.* 270: 30499–30507
- [23] El-Zahaby HM, Gullner G, Kiraly Z (1995) Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate–glutathione cycle and other antioxidants in different host–pathogen interactions. *Phytopathology* 85: 1225–1230
- [24] Elstner EF (1987) Metabolism of activated oxygen species. In *The biochemistry of plants*. Edited by Davies DD vol. 2, pp. 253–314. Academic Press, Orlando, Florida.
- [25] Escoubas J-M, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG (1995) Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10237–10241
- [26] Fadzillah NM, Gill V, Finch RP, Burdon RH (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Planta* 199: 552–556
- [27] Finkelstein RR, Tenbarger KM, Shumway JE, Crouch ML (1985) Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. *Plant Physiol.* 78: 630–636
- [28] Fita I, Rossman MG (1985) The active center of catalase. *J. Mol. Biol.* 185: 21–37
- [29] Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert K-J, Pruvost C, Jouanin L (1995) Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol.* 109: 1047–1057
- [30] Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241–254
- [31] Gilles-Gonzalez MA, Ditta GS, Helinski DR (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 350: 170–172

- [32] Goldman R, Stoyanovsky DA, Day BW, Kagan VE (1995) Reduction of phenoxyl radicals by thioredoxin results in selective oxidation of its SH-groups to disulfides. An antioxidant function of thioredoxin. *Biochemistry* 34: 4765
- [33] Guan L, Scandalios JG (1998) Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *Sod4* and *Sod4a*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 117: 217-224
- [34] Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Rio LA (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* 105: 151-167
- [35] Herouart D, Montagu MV, Inze D (1993) Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3108-3112
- [36] Hodgson RAJ, Raison JK (1991) Superoxide production by thylakoids during chilling and its implication in the susceptibility of plants to chilling-induced photoinhibition. *Planta* 183: 222-228
- [37] Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol. Chem.* 264: 13963-13966
- [38] Ishikawa T, Takeda T, Shigeoka S, Hirayama O, Mitsunaga T (1993) Hydrogen peroxide generation in organelles of *Euglena gracilis*. *Phytochemistry* 33: 1297-1299
- [39] Ishikawa T, Sakai K, Takeda T, Shigeoka S (1995) Cloning and expression of cDNA encoding a new type of ascorbate peroxidase from spinach. *FEBS Lett.* 367: 28-32
- [40] Ishikawa T, Sakai K, Yoshimura K, Takeda T, Shigeoka S (1996) cDNAs encoding stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding regions. *FEBS Lett.* 384: 289-293
- [41] Ishikawa T, Yoshimura K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S (1997) Alternative mRNA splicing of 3'-terminal exons generates ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 328: 795-800

- [42] Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H, Chino M (1995) Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* 195: 456-463
- [43] Isin SH, Allen RD (1991) Isolation and characterization of a pea catalase cDNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1263-1265
- [44] Jespersen HM, Kjaersgard IVH, Ostergaard L, Welindar KG (1997) From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem. J.* 326: 305-310
- [45] Jimenez A, Hernandez JA, del Rio LA, Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114: 275-284
- [46] Jimienson DJ, Storz G (1997) Transcriptional regulators of oxidative stress responses. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Edited by Scandalios JG pp. 91-115. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [47] 上中弘典 博士学位論文 (1999) 京都府立大学農学部
- [48] Kaminaka H, Morita S, Yokoi H, Masumura T, Tanaka K (1997) Molecular cloning and characterization of a cDNA for plastidic copper/zinc-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* 38: 65-69
- [49] Kaminaka H, Morita S, Nakajima M, Masumura T, Tanaka K (1998) Gene cloning and expression of cytosolic glutathione reductase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* 39: 1269-1280
- [50] Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Yokoyama H, Masumura T, Tanaka K (1999) Molecular cloning and characterization of a cDNA for an iron-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.). *Biosci. Biotech. Biochem.* in press
- [51] Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Mullineaux PM (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 9: 627-640

- [52] Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12: 1067–1078
- [53] Kubo A, Saji H, Tanaka K, Tanaka K, Kondo N (1992) Cloning and sequencing of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 18: 691–701
- [54] Kubo A, Saji H, Tanaka K, Kondo N (1995) Expression of arabidopsis cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Mol. Biol.* 29: 479–489
- [55] Lappartient AG, Touraine B (1997) Glutathione-mediated regulation of ATP sulfurylase activity, SO_4^{2-} uptake, and oxidative stress response in intact canola roots. *Plant Physiol.* 114: 177–183
- [56] Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593
- [57] Mano S, Yamaguchi K, Hayashi M, Nishimura M (1997) Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase are produced by alternative splicing in pumpkin. *FEBS Lett.* 413: 21–26
- [58] Matsuoka M, Kano-Murakami Y, Tanaka Y, Ozeki Y, Yamamoto N (1988) Classification and nucleotide sequence of cDNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from rice. *Plant Cell Physiol.* 29: 1015–1022
- [59] Matters GL, Scandalios JG (1986) Effect of the free radical-generating herbicide paraquat on the expression of the superoxide dismutase (*Sod*) genes in maize. *Biochim. Biophys. Acta* 882: 29–38
- [60] Matters GL, Scandalios JG (1987) Synthesis of isozymes of superoxide dismutase in maize leaves in response to O_3 , SO_2 and elevated O_2 . *J. Exp. Bot.* 38: 842–852
- [61] McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inze D, D'Halluin K, Botterman J (1993) Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103: 1155–1163
- [62] McKersie BD, Bowley SR, Harjanto E, Leprince O (1996) Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 111: 1177–1181

- [63] Mehdy MC (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472
- [64] Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA (1993) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 12: 2005-2015
- [65] Minakuchi K, Yabushita T, Masumura T, Ichihara K, Tanaka K (1994) Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rice glutaredoxin. *FEBS Lett.* 337: 157-160
- [66] Mishra NP, Mishra RK, Singhal GS (1993) Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol.* 102: 903-910
- [67] Mittler R, Zilinskas BA (1991) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS* 289: 257-259
- [68] Mittler R, Zilinskas BA (1992) Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.* 267: 21802-21807
- [69] Mittler R, Zilinskas BA (1994) Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.* 5: 397-405
- [70] Miyake C, Asada K (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 33: 541-553
- [71] Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotech.* 15: 15-19
- [72] Monk LS, Braendle R, Crawford RMM (1987) Catalase activity and post-anoxic injury in monocotyledonous species. *J. Exp. Bot.* 38: 233-246
- [73] Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RMM (1987) Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide: A key factor in recovery from oxygen deprivation in *Iris pseudacorus*? *Plant Physiol.* 85: 1016-1020

- [74] Mori H, Higo K, Higo H, Y.Minobe, H.Matsui, Chiba S (1992) Nucleotide and derived amino acid sequence of a catalase cDNA isolated from rice immature seeds. *Plant Mol. Biol.* 18: 973-976
- [75] Morita S, Hirano E, Yokoi H, Kaminaka H, Masumura T, Tanaka K (1998) Redox response of *cis*-activity of a novel *cis*-element-like sequence existing in antioxidative deffense genes in rice. *Plant Cell Physiol.* 39: s95
- [76] Murphy TM, Huerta AJ (1990) Hydrogen peroxide formation in cultured rose cells in response to UV-C radiation. *Physiol. Plant.* 78: 247-253
- [77] Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nuc. Acid Res.* 8: 4321-4325
- [78] Ni W, Turley RB, Trelease RN (1990) Characterization of a cDNA encoding cottonseed catalase. *Biochim. Biopys. Acta* 1049: 219-222
- [79] O'Kane D, Gill V, Boyd P, Burdon R (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* 198: 371-377
- [80] Ohashi K, Tanaka A, Tsuji H (1989) Formation of the photosynthetic electron transport system during the early phase of greening in barley leaves. *Plant Physiol.* 91: 409-414
- [81] Okuda T, Matsuda Y, Yamanaka A, Sagisaka S (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97: 1265-1267
- [82] Orvar BL, Ellis BE (1997) Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant J.* 11: 1297-1305
- [83] Orvar BL, McPherson J, Ellis BE (1997) Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *Plant J.* 11: 203-212
- [84] Parker ML, Lea PJ (1983) Ultrastructure of the mesophyll cells of leaves of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 159: 512-517

- [85] Pastori GM, Trippi VS (1992) Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant Cell Physiol.* 33: 957-961
- [86] Patterson WR, Poulos TL (1995) Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry* 34: 4331-4341
- [87] Perl-Treves R, Galun E (1991) The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17: 745-760
- [88] Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74
- [89] Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR (1994) Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol.* 105: 619-627
- [90] Price AH, Taylor A, Ripley SJ, Griffiths A, Trewavas AJ, Knight MR (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6: 1301-1310
- [91] Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136
- [92] Redinbaugh MG, Wadsworth GJ, Scandalios JG (1988) Characterization of catalase transcripts and their differential expression in maize. *Biochim. Biophys. Acta* 951: 104-116
- [93] Rich PR, Bonner Jr WD (1978) The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 188: 206-213
- [94] Ruis H, Koller F (1997) Biochemistry, molecular biology, and cell biology of yeast and fungal catalases. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Edited by Scandalios JG pp. 309-342. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [95] Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB (1991) The antioxidant responsive element; activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* 266: 11632-11639

- [96] Sakajo S, Nakamura K, Asahi T (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for sweet potato catalase mRNA. *Eur. J. Biochem.* 165: 437-442
- [97] Sakamoto A, Ohsuga H, Tanaka K (1992) Nucleotide sequences of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 19: 323-327
- [98] Sakamoto A, Nosaka Y, Tanaka K (1993) Cloning and sequencing analysis of a complementary DNA for manganese-superoxide dismutase from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol* 103: 1477-1478
- [99] Sakamoto A, Okumura T, Kaminaka H, Sumi K, Tanaka K (1995) Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase genes, *SodCc1* and *SodCc2*, in rice protoplasts. *FEBS Lett.* 358: 62-66
- [100] Santos M, Gousseau H, Lister C, Foyer C, Creissen G, Mullineaux P (1996) Cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* L. is encoded by a small multigene family. *Planta* 198: 64-69
- [101] Scandalios JG (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv. Genet.* 28: 1-41
- [102] Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN (1997) Catalases in plants: Gene structure, properties, regulation, and expression. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Edited by Scandalios JG pp. 343-406. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [103] Schoner S, Krause GH (1990) Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta* 180: 383-389
- [104] Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10: 2247-2258
- [105] Sen Gupta A, Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* 103: 1067-1073

- [106] Sen Gupta A, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplast Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1629–1633
- [107] Sgherri CL, Pinzino C, Navari-Izzo F (1996) Sunflower seedlings subjected to increasing stress by water deficit: Changes in O_2^- production related to the composition of thylakoid membranes. *Physiol. Plant.* 96: 446–452
- [108] Sha S, Minakuchi K, Higaki N, Sato K, Ohtsuki K, Kurata A, Yoshikawa H, Kotaru M, Masumura T, Ichihara K, Tanaka K (1997) Purification and characterization of glutaredoxin (thioltransferase) from rice (*Oryza sativa* L.). *J. Biochem.* 121: 842–848
- [109] Sha S, Yabushita T, Minakuchi K, Masumura T, Tanaka K (1997) Structure of the rice glutaredoxin (thioltransferase) gene. *Gene* 188: 23–28
- [110] Shibasaka M, Tsuji H (1988) Respiratory properties of mitochondria from rice seedlings germinated under water and their changes during air adaptation. *Plant Physiol.* 86: 1008–1012
- [111] Shibasaka M, Tsuji H (1988) Cytochromes of mitochondria from rice seedlings germinated under water and their changes during air adaptation. *Plant Cell Physiol.* 29: 629–635
- [112] Shikanai T, Takeda T, Yamauchi H, Sano S, Tomizawa K, Yokota A, Shigeoka S (1998) Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Lett.* 428: 47–51
- [113] Skriver K, Mundy J (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503–512
- [114] Storozhenko S, Pauw PD, Van Montagu M, Inze D, Kushnir S (1998) The heat-shock element is a functional component of the Arabidopsis *APX1* gene promoter. *Plant Physiol.* 118: 1005–1014
- [115] Tanaka K, Suda Y, Kondo N, Sugahara K (1985) O_3 tolerance and the ascorbate-dependent H_2O_2 decomposing system in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 26: 1425–1431

- [116] Tepperman JM, Dunsmuir P (1990) Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol. Biol.* 14: 501-511
- [117] Thomsen B, Drumm-Herrel H, Mohr H (1992) Control of the appearance of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) in mustard seedling cotyledons by phytochrome and photooxidative treatments. *Planta* 186: 600-608
- [118] Tobin EM, Silverthorne J (1985) Light regulation of gene expression in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 569-594
- [119] Tsang EWT, Bowler C, Herouart D, Van Camp W, Villarroel R, Genetello C, Van Montagu M, Inze D (1991) Differential regulation of superoxide dismutase in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3: 783-792
- [120] Ushimaru T, Shibasaka M, Tsuji H (1992) Changes in levels of heme *a*, protoheme and protochlorophyll(ide) in submerged rice seedlings after exposure to air. *Plant Cell Physiol.* 33: 771-778
- [121] Ushimaru T, Shibasaka M, Tsuji H (1992) Development of the O₂⁻ detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 33: 1065-1071
- [122] Van Camp W, Willelens H, Bowler C, Montagu MV, Inze D, Reupold-Popp P, Sandermann Jr H, Langebartels C (1994) Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Biotechnology* 12: 165-168
- [123] Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inze D, Slooten L (1996) Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol.* 112: 1703-1714
- [124] Vanlerberghe GC, McIntosh L (1996) Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol.* 111: 589-595
- [125] Wagner AM (1995) A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett.* 368: 339-342

- [126] Warm E, Laties GG (1982) Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry* 21: 827-831
- [127] Wells WW, Xu DP, Yang Y, Rocque PA (1990) Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J. Biol. Chem.* 265: 15361-15364
- [128] Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D, Langebartels C, Sandermann Jr H (1994) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiol.* 106: 1007-1014
- [129] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816
- [130] Wingsle G, Karpinski S (1996) Differential redox regulation by glutathione of glutathione reductase and CuZn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. *Planta* 198: 151-157
- [131] Yamaguchi K, Mori H, Nishimura M (1995) A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* 36: 1157-1162
- [132] Yoshitake S, Nanri H, Fernando MR, Minakami S (1994) Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *J Biochem* 116: 42-46
- [133] Zhu D, Scandalios JG (1994) Differential accumulation of manganese-superoxide dismutase transcripts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 106: 173-178
- [134] Zimniak P, Hartter E, Woloszczuk W, Ruis H (1976) Catalase biosynthesis in yeast: formation of catalase A and catalase T during oxygen adaptation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 71: 393-398