

氏名	おがわ けん いち 小川 健 一
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	論理博第1336号
学位授与の日付	平成10年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Function of CuZn-superoxide Dismutase in Protection from and Utilization of Active Species of Oxygen in Plants 植物の活性酸素に対する防御と利用における CuZn-スーパーオキシドジスムターゼの機能)
論文調査委員	(主査) 教授 岡田清孝 教授 町田泰則 講師 田中 歩

論 文 内 容 の 要 旨

酸素により障害を被る危険性をもつ好気性生物は O_2^- の H_2O_2 と O_2 への不均化反応を拡散律速で触媒するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を備え持っている。しかしながらその SOD の生理的意義を理解するのに必要な生体内における SOD の組織分布、細胞内分布についての知見はすくなく、特にオルガネラ内分布について、さらに O_2^- の生成部位との関係を詳しく調べた研究は皆無であった。そこで申請者は細胞内局在性が詳細には分かっていないホウレンソウの chloroplast 型および cytosol 型 CuZn-SOD について組織、細胞、オルガネラ内での分布を調べ、その分布が O_2^- の生成部位とどう相関があるかを調べた。

まず第一に申請者は、細胞内およびオルガネラ内分布を高分解能で解析できるように、急速凍結置換固定法と免疫電顕法を組み合わせることを試みた。急速凍結置換固定法は植物細胞ではそのままで応用は難しく、成功例は極限られた組織のみであった。特に葉の組織はクチクラ層の発達や気層の多さのため細胞の凍結が悪く構造の破壊を招きやすかったが、申請者は表皮細胞を取り除くことにより、殆ど無傷で葉肉細胞を凍結することに成功した。これは急速凍結・免疫電顕法を葉肉細胞に導入したはじめての例である。

そして第二に申請者は、上記のような方法を用いて Chloroplast 型 CuZn-SOD が葉緑体に局在し、さらに可溶性であるにもかかわらずストロマに均一に分布するのではなく、70%以上がストロマに露出したチラコイド膜、すなわち O_2^- が生成する光化学系 I 複合体 (PSI) の局在するチラコイド膜に付着していることを見出した。さらにシミュレーションにより CuZn-SOD の局在効果とチラコイド膜結合型のアスコルビン酸ペルオキシターゼがその生成源に局在することにより、 O_2^- 、 H_2O_2 の局部濃度を低下させることを示し、NADPH や ATP を効率的に利用するためにチラコイド膜近傍に局在している CO_2 固定系酵素の失活を防いでいるという生理的意義を明らかにした。

第三に申請者は、可溶性の Chloroplast 型 CuZn-SOD のチラコイド膜への結合は Mg^{2+} によって特異的に保たれることを示し、これが葉緑体ストロマの Mg^{2+} 濃度で可能なことを示す一方で、Chloroplast 型 CuZn-SOD の O_2^- 生成 site への局在効果を明らかにすべく研究を進めた。タバコ Chloroplast 型 CuZn-SOD の antisense gene を導入したトランスジェニックタバコを作成したが、そのような植物は光障害を受けやすく、これは葉緑体にミトコンドリア Mn-SOD を overexpression しても回復しなかった。さらにそのアンチセンスタバコでみられる光障害においては O_2^- 生成 site である光化学系 I の反応中心の減少が認められた。このように SOD は O_2^- の生成部位に局在して効果的に O_2^- を消去できることを初めて見出した。

第四に申請者は、Chloroplast 型の場合と同様の方法を用いることにより、ホウレンソウにおいて Cytosol 型 CuZn-SOD の約50%近くがトノプラストおよび細胞核に、40%以上がアポプラスト領域に局在することを示した。また、細胞外洗浄液にも CuZn-SOD が存在することを示し、Cytosol 型 CuZn-SOD のアポプラストでの存在を更に確かなものにした。Cytosol 型 CuZn-SOD はアポプラストでも特にリグニンが蓄積する細胞壁第二次肥厚部に分布していた。

そこで第五に申請者は、リグニン合成との関わりに注目して組織内における CuZn-SOD の分布と O_2^- の生成部位、リグニン合成部位との比較を行った。ホウレンソウの胚軸を用い、組織レベルにおいて CuZn-SOD は維管束系、特に木部に分布し、これは O_2^- の生成部位とリグニン合成部位と一致し、CuZn-SOD がリグニン合成に関わっている可能性を示した。また、 O_2^- の生成部位が植物体の部位や age にかかわらず、リグニンの合成部位と相関があることを示し、 O_2^- が正常な植物の器官形成（木部形成）時に生成することを示した。

第六に申請者は、ホウレンソウ胚軸で、 O_2^- はこれまでに考えられてきたペルオキシターゼ依存の経路でなく、NADPH オキシターゼ依存の経路で生ずることを証明した。更に O_2^- の生成部位、CuZn-SOD の分布部位と細胞形態との比較から、 O_2^- の発現が管状要素への分化過程で制御されている可能性を見出した。その可能性を証明するため、管状要素分化を時間的に解析できるヒヤクニチソウの培養細胞系を用い、管状要素の分化過程で O_2^- は極めて短時間に一過的に生じることを見出し、その生成時期はリグニンの蓄積時期と一致することを明らかにした。一個の細胞での O_2^- の生成時期は3分であり、アポプラストのように低い pH (O_2^- の自発的不均化が速い条件) であっても、CuZn-SOD がリグニン合成のための H_2O_2 の供給に必要なことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

申請論文は、高等植物におけるスーパーオキシドアニオンラジカルの消去と利用に関して、CuZn-スーパーオキシドジスムターゼがどのような生理的な意義を持つかを明らかにした研究成果であり、主論文の内容は利用と消去という2つの内容からなっている。第一部では葉緑体内での CuZn-SOD のマイクロコンパートメンテーションとその生理的意義について、第二部では葉緑体外での CuZn-SOD の局在とその生理的な意義、特にリグニン合成との関わりについての研究である。

申請者はまず、これまでの方法を改良し、高分解能の細胞組織化学を可能にしたことで評価できる。この方法に成功したからこそ、その後の成果が生み出されたことは注目すべき点である。動物、陸上動物、真菌類等で主要な SOD として含まれる CuZn-SOD は可溶性の酵素であるが、第一部で申請者は、そのような SOD といえどもその基質である O_2^- の生成 site の膜に局在し、その局在があって初めて SOD は機能することを一連の実験で示した。これは葉緑体ストロマで可溶性酵素が細胞小器官内局在性を示したはじめての例である上、酵素が真に機能するためには細胞小器官への標的化ばかりでなく、細胞小器官内での標的化が重要であるという新しい概念をもたらすものであるから、大きく評価できる。活性酸素というと最近では悪い面ばかりが注目される一方、第二部で申請者は、リグニン合成という観点にたつて植物が活性酸素の積極的な利用も行っていることを明らかにしたことは大きく評価できる。SOD の局在部位からその酵素のリグニンの合成への関与を推測し、各種の観点で実験を進めた結果すべてについて新しい結果であり評価に値するが、特にリグニン合成への過酸化水素の供給メカニズムはこの20年間の仮定を覆すもので、大きな反見である。この反見は、リグニン合成の基礎および応用研究に役立つばかりでなく、植物にとって活性酸素が毒という面を持つばかりでなく必要であるという面を浮き彫りにするものであり、大きく評価されるべき成果である。本申請論文は、生物が活性酸素が必要なところ以外で生じたときには消去し、必要なところでは積極的に利用しており、そのバランスを保つために巧妙なシステムを構築しているというもっとも基礎的な概念を築くものである。そして今後行われる研究において消去系と利用系の両者のバランスに注目することが極めて大切であるという道しるべを示すものであり、非常に評価できる。

本申請論文によって明らかにされた事実は極めて新規性があるばかりでなく、生理的意義についても深く探究されており、論文に含まれる概念は非常に新しく評価されるべきものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値があるものと認めた。

なお、申請者が京都大学理学研究科生物科学専攻に2年間在籍した後に、東レ株式会社ケミカル研究所において研究に従事していることで、研究・教育の面で十分の実績を積んでいることを考慮し、本学大学院博士課程を修了した者と同等の学力を有すると認め、学識確認のための試問を免除した。そして、平成10年1月21日に論文内容に関する口頭試問を行った結果、合格と認めた。