

氏名	み やけ ちか ひろ 三 宅 親 弘
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 793 号
学位授与の日付	平 成 6 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	Scavenging Systems of Hydrogen Peroxide in Chloroplast Thylakoid Membranes and Algal Cells (葉緑体チラコイド膜及び藻類細胞の過酸化水素消去系)
論文調査委員	(主 査) 教 授 浅 田 浩 二 教 授 山 田 康 之 教 授 關 谷 次 郎

論 文 内 容 の 要 旨

葉緑体では光エネルギーによって CO_2 固定のため ATP, NADPH が生成するが, この時光化学系 I で酸素分子の光還元によるスーパーオキシドラジカル (O_2^-), 過酸化水素 (H_2O_2) の生成は避けられない。 H_2O_2 は低濃度で CO_2 固定反応を阻害するため H_2O_2 消去は光合成反応の進行にとって必須であり, 本論文はホウレンソウ葉緑体チラコイド膜の H_2O_2 消去の分子機構および藻類での H_2O_2 消去機構について行った研究をとりまとめたもので, その主な内容は以下の通りである。

1. チラコイド膜結合アスコルビン酸ペルオキシターゼ

アスコルビン酸 (AsA) を特異的な電子供与体とするアスコルビン酸ペルオキシターゼ (APX) がチラコイド膜に結合していることを発見した。さらに酸素分子の光還元が生ずる光化学系 I 複合体の存在するストロマチラコイド膜に APX が局在すること, APX の反応中心は膜表面に露出していることを明らかにした。

チラコイド膜結合 APX を界面活性剤で可溶化し, クロマトグラフィによって精製し, その分子的性質を明らかにした。 NH_2 -末端のアミノ酸配列はストロマ APX と高い相同性をもつが, チラコイド膜結合 APX の分子量はストロマ APX より約 1 万大きい。チラコイド膜結合 APX はプロトヘム IX を補欠分子とし, また, 他のヘム・ペルオキシダーゼと異なり AsA 濃度が低いと速やかに失活するが, この失活機構が APX の反応中間体である Compound I の自発的ヘム分解によることを証明した。

2. チラコイド膜結合 APX による H_2O_2 消去

チラコイド膜の光照射によって生成する H_2O_2 は AsA 存在下でチラコイド膜結合 APX によって消去されること, この時に生ずる AsA の酸化産物が光還元されることを O_2 の吸収変化, クロロフィル蛍光のクエンチングなどによって証明した。

3. モノデヒドロアスコルビン酸ラジカル (MDA) のチラコイド膜での光還元

APX 反応で AsA の初期酸化産物は MDA であるが, MDA をアスコルビン酸オキシダーゼで生成さ

せるとチラコイド膜のクロロフィル蛍光がクエンチされること、MDA の EPR による測定などから、MDA のチラコイド膜での光還元を証明し、さらにこの還元は光化学系 I でフェレドキシンを介して進行することを明らかにした。以上の結果から、光化学系 I で生成した H_2O_2 のチラコイド膜結合 APX による H_2O への還元、これに伴って生成する MDA のフェレドキシンを介する AsA への光還元からなるチラコイド H_2O_2 消去サイクルを確立した。

4. 藻類の H_2O_2 消去系

藍藻、緑藻細胞に $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ を加え、光照射により生成する $^{16}\text{O}_2$, $^{18}\text{O}_2$ を薄膜透過型質量分析計により測定し、 H_2O_2 消去がカタラーゼ反応によるか、光還元産物を電子供与体とするペルオキシターゼ反応によるかを決定した。その結果、藍藻の一部の種のみがカタラーゼ反応で H_2O_2 を消去していることを明らかにし、 H_2O_2 消去効率の高いペルオキシダーゼ系は原核藻類である藍藻の進化の過程で獲得されたことを示した。

論文審査の結果の要旨

植物光合成は葉緑体チラコイド膜の光化学反応によって光化学系 I で生成する NADPH および電子伝達に伴い生成する ATP によって進行するが、一部の電子は光化学系 I で酸素分子を 1 電子還元し、スーパーオキシドラジカル (O_2^-) を生成する。 O_2^- はスーパーオキシドジスムターゼに触媒される反応によって速やかに過酸化水素 (H_2O_2) と酸素分子に不均化される。この酸素の光還元による H_2O_2 生成は光ストレス下ではさらに増加し、 H_2O_2 が CO_2 固定系酵素を低濃度で失活させるため H_2O_2 の速やかな消去が光合成の進行にとって不可欠である。本研究は葉緑体にはストロマの H_2O_2 消去系に加えて、新しいチラコイド膜に結合した消去系が機能していることを証明し、その分子機構を明らかにしたものである。成果のうちとくに評価できる点は以下の通りである。

1. チラコイド膜にアスコルビン酸ペルオキシターゼ (APX) が結合していることを発見し、これが O_2^- を生成する光化学系 I が存在するストロマチラコイド膜に局在していることを示した。これまで活性酸素が生成する細胞小器官にその消去酵素が局在することは示されていたが、この発見は細胞小器官内で活性酸素の生成サイトにその消去酵素が近接して存在することを証明した最初の例である。

2. チラコイド膜結合 APX を膜から可溶化、精製し、その分子的性質を解明し、ストロマに存在する APX に比べ分子量が約 1 万大きいことを明らかにした。さらに APX は電子供与体であるアスコルビン酸のない時に失活する特徴をもつが、これは APX の反応中間体である Compound I が自己分解しやすいためであることを明らかにした。

3. チラコイド膜結合 APX が実際に H_2O_2 を効果的に消去できることを証明し、さらにペルオキシターゼ反応の結果生成するモノデヒドロアスコルビン酸ラジカル (MDA) が還元型フェレドキシンによってアスコルビン酸に還元されることを明らかにした。これはフェレドキシンを電子供与体とする新しい反応である。

4. これらの結果からチラコイド H_2O_2 消去サイクルを確立したが、これは O_2^- , H_2O_2 の生成サイトであるチラコイド膜光化学系 I 複合体に H_2O_2 の H_2O への還元を触媒する APX が近接して結合し、さら

にその反応の結果生成する MDA が同じサイトで光還元され、アスコルビン酸が再生することを示している。

5. 地球大気に酸素を最初に供給した藍藻の進化過程でペルオキシターゼによる H_2O_2 消去サイクルが獲得されたことを証明し、カタラーゼに比べ格段に効果的な H_2O_2 消去機構が光合成生物にとって地球大気酸素濃度の低い時期から不可欠であったことを示した。

以上のように本研究は、チラコイド膜上で酸素分子の光還元によって生じた H_2O_2 が、ストロマに拡散して CO_2 固定系酵素を失活させることのないよう、 H_2O_2 生成サイトにマイクロ局在化している APX によって直ちに消去されることを証明している。さらにペルオキシダーゼによる H_2O_2 消去サイクルが藍藻にすでに獲得されていることを示し、植物光生理学、植物光生化学、進化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 6 年 1 月 14 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。