

氏名	あま 尼	こ 子	かつ 克	み 己
学位(専攻分野)	博士(農学)			
学位記番号	農博第930号			
学位授与の日付	平成9年3月24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	MOLECULAR ASPECTS OF ASCORBATE PEROXIDASE ISOZYMES (アスコルビン酸ペルオキシダーゼアイソザイムの分子的性状)			
論文調査委員	(主査) 教授 浅田浩二 教授 池田篤治 教授 佐藤文彦			

### 論文内容の要旨

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) はアスコルビン酸を電子供与体とし、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 消去に機能している植物特有のヘム・ペルオキシダーゼである。植物で  $H_2O_2$  は強光、高温、低温、乾燥などの環境ストレスによってとくに生じやすく、 $H_2O_2$  による細胞障害を防御するため APX は植物にとって必須の酵素である。本論文はこの植物特有のペルオキシダーゼおよびそのアイソザイムの活性測定法の開発、分子的性質、反応機構、分子進化などについて行った研究をまとめたもので、その主な内容は以下の通りである。

#### 1. APX の活性測定法

植物には APX 以外にリグニン生合成などに関与するグアヤコール・ペルオキシダーゼ (GPX) が存在する。APX, GPX はそれぞれの電子供与体であるアスコルビン酸、ピロガロールを相互に酸化するため、粗抽出液を用いたそれぞれのペルオキシダーゼ活性の測定はこれまでできなかった。著者は APX, GPX のアミノ酸配列の相異に注目し、APX のみがチオール基修飾試薬によって阻害されることを利用し、両活性を分別測定する方法を開発した。さらに、 $H_2O_2$  による失活の差を利用して葉緑体型、サイトゾル型 APX アイソザイムを分別測定する方法をも開発した。ここで開発した方法を用い、高等植物には全ての組織に両 APX アイソザイムが存在するが、真核藻類にはサイトゾル型 APX のみが存在することを明らかにした。

#### 2. サイトゾル型 APX (cAPX) の分子的性質

キュウリ cDNA ライブラリーより cAPX の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。cDNA から推定されるアミノ酸配列は植物の GPX よりも酵母のシトクロム c ペルオキシダーゼ (CPX) と高い相同性を示し、とくに、CPX の  $H_2O_2$  による 2 電子酸化反応中間体 Compound I で Trp ラジカルとなる Trp 残基が cAPX にも保存されていることを示した。

cAPX 遺伝子を組み込んだ大腸菌発現系を構築し、培地に 5-アミノレブリン酸を添加することによ

て、形質転換株から活性をもつ組換え型 cAPX を産生させることを可能とした。さらに APX, CPX で保存されている Trp 残基を置換した W178F, W178Y の変異 cAPX が活性を示さないことより Trp-178 が APX 活性に必須であることを証明した。

### 3. cAPX の反応機構

cAPX を  $H_2O_2$  で滴定し、等モルで CPX の Compound I と同じ吸収スペクトルを与えることを示し、cAPX の Compound I が  $Fe(IV)$ ,  $Trp^+$  の状態であることを証明した。一方、チオール基修飾試薬は  $H_2O_2$  による Compound I 形成に影響せず、Compound I  $\rightarrow$  Compound II  $\rightarrow$  APX の反応段階を阻害して、APX 反応を阻害することを明らかにした。

### 4. $H_2O_2$ による cAPX の失活と cAPX による $H_2O_2$ 不均化反応

cAPX はアスコルビン酸のない条件では過剰量の  $H_2O_2$  によって失活するがこれは Compound I の  $H_2O_2$  によるヘムの分解によることを Soret 吸収帯の低下から証明した。一方、 $H_2O_2$  が cAPX に対し数倍のモル濃度で存在する時には、cAPX は  $H_2O_2$  の不均化反応を Compound I  $\rightleftharpoons$  cAPX の反応サイクルで触媒することを発見した。

5. APX のアミノ酸配列、反応中間体の構造、反応機構、生理機能などを GPX, CPX, 細菌のカタラーゼ-ペルオキシダーゼと比較し、APX が GPX と異なる植物ヘム・ペルオキシダーゼの Superfamily であることを明らかにし、細菌のカタラーゼ-ペルオキシダーゼが APX の祖先タンパク質であると推定している。

### 6. APX の自殺基質による阻害の速度論的解析

APX の自殺基質としてヒドラジンとその誘導体、ヒドロキサム酸誘導体、ヒドロキシルアミンとその誘導体 (12種) を見だし、その失活に対する親和性 ( $K_i$ ), 失活の速度定数 ( $K_{inact}$ ), 60秒で半失活する濃度 ( $I^{0.5}$ ) を決定した。これらの化合物のうち、ヒドラジンが最も低い  $I_{0.5}$ ,  $K_i$  を与え、ヒドロキシルアミンの  $H_2O_2$ , APX による酸化生成物  $6.2 \times 10^4$  分子が 1 分子の APX を失活させることを示した。

## 論文審査の結果の要旨

植物は光合成によって酸素を発生するため葉の組織の酸素濃度は他の生物に比べ高く、酸素障害の作用分子種である活性酸素に常に曝されている。さらに、温度、強光、乾燥ストレス、公害ガス、病原菌などの環境ストレスにより活性酸素、とくに過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の生成量が増加する。酸素障害を防御するために活性酸素の消去酵素が不可欠であり、 $H_2O_2$  消去のため植物ではカタラーゼ以外に、 $H_2O_2$  濃度をさらに低下できるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) が機能している。本論文は、植物特有の  $H_2O_2$  消去ヘム・ペルオキシダーゼである APX の分子的性質、反応機構、分子進化などを解明したもので、成果のうちとくに評価できる点は以下の通りである。

1. 植物粗抽出液を用いグアヤコール・ペルオキシダーゼ (GPX) に妨害されない APX 活性測定方法を開発した。本法は生理機能解明のための APX 測定標準法として用いられている。さらに、細胞内分布の異なる葉緑体型、サイトゾル型アイソザイムの活性分別測定法をも開発した。

2. APX の  $H_2O_2$  による 2 電子酸化反応中間体 Compound I が酵母シトクロム c ペルオキシダーゼ

(CPX)と同様、Fe(IV)、Trp<sup>+</sup>の状態であることをアミノ酸配列、吸収スペクトル、変異APX(W178F, W178Y)の活性などから明らかにした。これらの結果から、APXは従来から知られているGPXとは機能的にも分子的にも異なる植物ヘム・ペルオキシダーゼの新しい Supercamily であることを明らかにした。

3. APX, CPX および細菌のカタラーゼ-ペルオキシダーゼのアミノ酸配列などをもとに、APXの祖先蛋白質はカタラーゼ-ペルオキシダーゼであると推定できることを示し、また、葉緑体型アイソザイムは陸上植物になって初めて獲得されたことを明らかにした。

4. APXがH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の不均化反応を触媒できることを発見し、APXの電子供与体であるアスコルビン酸が供給されないときでも、APXはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>をカタラーゼ作用によって消去できることを示した。

以上のように本論文は、植物のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消去ペルオキシダーゼとして機能するアスコルビン酸ペルオキシダーゼの活性測定法を開発し、その分子的進化を明らかにしたもので、今後予想されるストレス環境下での作物生産性の維持、向上に必要なストレス耐性植物の分子育種のための基礎を提供するとともに、酸素障害防御の分子進化学、植物光生科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9年2月17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。