

氏名	ラポル マドゥスダン RAPOLU MADHUSUDHAN
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	乙第36号
学位授与年月日	平成15年 9月19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	Functional analyses of ascorbate peroxidase isoenzymes in photosynthetic organisms (光合成生物におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ アイソザイム機能解析)
学位論文審査委員	(主査) 柴田 均 (副査) 田中 淨 澤 嘉弘 石川孝博 松井健二

学位論文の内容の要旨

The photosynthetic electron transport of higher plants and algae inevitably generates active oxygen species. Plants have developed extensive scavenging systems to deal with the deleterious effects AOS. Ascorbate peroxidase (APX) is the major H₂O₂-scavenging enzyme in photosynthetic organisms. In the present study, I have isolated a partial cDNA of *Euglena* APX by immunoscreening of *Euglena* cDNA library. The cDNA contained 1326 nucleotides with an open reading frame encoding for 296 amino acids of a calculated molecular weight of 32,800. However, the cDNA lacked the sequence that would encode approximately 43% of the enzyme in the N-terminal, because the weight of the purified native protein was approximately 58,000. Fortunately, the cDNA contained the sequence for encoding the whole of the active site region including the distal and proximal histidine residues for binding the heme ligand. Further, several of the previously identified internal peptide sequences were found in the deduced amino acid sequence of the cDNA suggesting the authenticity of the isolated cDNA sequence. When expressed in *E. coli*, the recombinant protein derived from the cDNA sequence showed the catalytic activity of APX. The kinetics of the recombinant enzyme were comparable to that of the native enzyme with the native substrates. However, the recombinant protein could not utilize aromatic substrates. Further, the recombinant enzyme expressed from the partial cDNA sequence exhibited the H₂O₂-sensitive inactivation, a characteristic feature of the chloroplastic isoenzyme of APX of higher plants.

I investigated the regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) in *Euglena* during light adaptation of dark-grown cells. Both the activity and protein levels of APX increased by nearly 4 fold in about 24 hours of illumination. Cycloheximide almost completely inhibited the APX

induction while transcription inhibitors did not have a significant effect, suggesting that light induction of APX is post-transcriptionally regulated. Northern hybridization with a partial cDNA of *Euglena* APX as the probe revealed a constant level of APX transcripts during the light adaptation. The APX induction was abolished by norflurazon, which inhibits the carotenoid synthesis. However, treatment of the dark-grown cells with H₂O₂, or methyl viologen did not induce APX. Our results suggest that the light induction of APX is dependent on the development of chloroplast.

I have purified and characterized an APX from the plastids of tobacco BY-2 cells. The plastidic APX was a monomer with a molecular weight of 34,000. The enzymatic properties of the plastidic APX, including the rapid inactivation by H₂O₂ in ascorbate-depleted medium, were highly comparable with those of the chloroplastic stromal APX of spinach and tea leaves. However, the other chloroplastic APX isoenzyme, the thylakoid-membrane bound APX, was not detected in the plastids of the BY-2 cells. The N-terminal amino acid sequence of the plastidic APX was almost completely identical with the deduced amino acid sequence of a previously identified cDNA sequence of tobacco chloroplastic APX. When a green fluorescence protein gene tagged with the chloroplast-targeting signal sequence of APX was expressed in the BY-2 cells, the fluorescence protein exclusively localized into plastids, and not into mitochondria. We conclude that plastidic APX in non-photosynthetic tissues is the same as the chloroplastic APX that occurs in leaves.

論文審査の結果の要旨

高等植物や藻類では、光合成に伴い電子伝達系より活性酸素種 (AOS) が生成する。AOS はタンパク質、DNA および脂質にダメージを与え、細胞の機能を阻害する。そのために、植物は多様な AOS 消去系を発達させている。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) は光合成生物における主要な H₂O₂ 消去酵素である。APX アイソザイムは細胞質、ペルオキシゾーム、プラスチドおよびミトコンドリアに局在している。本研究では、光合成生物における APX アイソザイムの分子特性や酵素学的性質の検討を行っている。

イムノスクリーニングによって単細胞真核藻類のユーグレナ cDNA ライブラリーから APXcDNA の部分配列を単離したユーグレナ APXcDNA は 296 アミノ酸残基、推定分子量 32,800 の ORF をコードする 1326 塩基を含んでいた。精製したユーグレナ APX のネイティブタンパク質の分子量は約 58,000 であるため、その cDNA は約 43% の N 末端コード領域が欠失していると推測された。しかしながら、その cDNA はヘム結合のための近位および遠位ヒスチジン残基を含む活性触媒領域全体をコードしていた。事実、大腸菌により発現させた組換え体タンパク質は幸いなことに APX 活性を有していた。数段階の精製過程により精製した組換え体酵素の種々の酵素学的性質はネイティブ酵素のそれらとほぼ一致していた。しかしながら、リコンビナント酵素は芳香族化合物を基質としなかった。また得られた領域の推定アミノ酸配列から、既知の植物 APX とは異なる立体構造を有することを予測した。

暗条件下で培養したユーグレナ細胞の光適応の期間における細胞質型 APX の発現制御機構を解析

した。APX 活性およびタンパク質レベルは光照射的 24 時間後に 4 倍近くまで増加した。その APX レベルの誘導は種々の転写阻害剤ではほとんど影響を受けなかったが、シクロヘキシミド添加によってほぼ完全に阻害されたことから、APX レベルの光誘導は転写後調節による制御が示唆された。

部分 cDNA をプローブとしてノーザンブロットィングによる解析を行った結果、光適応の期間における APX の転写レベルは恒常的であることが示された。APX の誘導はカロテノイド合成の阻害剤であるノルフルラゾン添加によって抑制された。しかしながら、 H_2O_2 もしくはパラコート処理によって APX は誘導されなかった。これらの結果から、APX の光による誘導は葉緑体の発達に依存していることが示された。

タバコ BY-2 培養細胞のプラスチドに局在する APX を精製し、諸性質を検討した。その結果、プラスチド型 APX は分子量 34,000 の単量体であった。プラスチド型 APX の酵素学的諸性質は、アスコルビン酸非存在下における H_2O_2 による不活化率を含めて、ハウレンソウや茶葉の葉緑体ストロマ型 APX の性質と極めて類似していた。しかしながら、葉緑体チラコイド膜結合型 APX は BY-2 細胞のプラスチドから検出されなかった。プラスチド型 APX の N 末端アミノ酸配列は以前に同定されているタバコの葉緑体型 APX と完全に一致していた。そこで、タバコ葉緑体型 APX の葉緑体移行シグナルと緑色蛍光タンパク質の融合遺伝子を BY-2 細胞で発現させた結果、蛍光は葉緑体のみで検出された。したがって、非光合成組織におけるプラスチド型 APX は緑色葉に存在する葉緑体型 APX と同一のものであることが明らかになった。

以上のように、本研究は藻類ユーグレナ APX の一次構造と発現調節機構を初めて明らかにし、またこれまで未解明であった高等植物の非光合成細胞内プラスチドにも葉緑体型 APX が発現している事実を培養細胞を用いて初めて証明している。本論文に含まれる一連の成果は、光合成生物間の AOS 消去系の違いおよび生理学的意義に関する考察に重要な知見を与えていることから学術的にも高い価値をもち、学位論文として十分な価値を有するものである。