



Function of Ascorbate Peroxidase Against Active Oxygen Species in Potato Tubers During Storage at Low Temperature

川上, 佐知子

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2001-09-30

(Date of Publication)

2009-08-17

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2409

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002409>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【365】

氏 名・(本 籍) 川上 佐知子 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博 士 (農学)

学 位 記 番 号 博い第54号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成13年9月30日

【学位論文題目】

**Function of ascorbate peroxidase against active oxygen
species in potato tubers during storage at low temperature**

(低温貯蔵中におけるジャガイモ塊茎に生成する活性酸素種に
対するアスコルビン酸ペルオキシダーゼの機能)

審 査 委 員

主査 教授 中村 千春

教授 朴 杓允 教授 眞山 滋志

助教授 水野 雅史

植物は、移動が不可能であるため、常に環境の変化によるストレスに耐えて生きていかなければならない状況に置かれている。この環境には、人為的環境に加えて自然環境が含まれており、その代表としては光や低温が挙げられる。植物の中でも特に青果物については、その品質を保持する目的で低温貯蔵が頻りに用いられているが、青果物によってはストレスを受けることになり、いわゆる低温障害が発生する。この低温障害発生機構については、未だに解明されていない部分が多く残されているが、最近の研究で、低温に曝された際に活性酸素が発生することが明らかにされつつある。植物は本来この活性酸素に対する防御機構を有しており、その機構の強弱が低温障害に対して耐性か感受性かを決定している可能性が示唆されている。これまで、光による酸化ストレス下でクロロプラスト中のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APx)が重要な働きをしていることはよく知られているが、低温ストレスにおける活性酸素の局在性およびその防御機構についての詳細な研究は行われておらず、耐性を獲得している植物の防御機構を解明することは、低温障害の解明につながるものと考えられ重要である。本研究では、低温耐性であり、光合成器官を含まないジャガイモ塊茎を用いて、クロロプラスト以外での活性酸素の局在性とそれに対する防御機構について生化学的および組織学的検討を行った。

第1章では、本研究の背景ならびに目的について論述した。

ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) 塊茎は、長期貯蔵された後でさえ高アスコルビン酸(AsA)含量を維持しているため、人々のビタミンCの重要な供給源となっている。また、ジャガイモ塊茎を低温貯蔵することは、呼吸活性の低下、老化や発芽の抑制、蒸散による水損失減少、微生物の発病抑制などさまざまな利点がある。しかしながら、ジャガイモを低温貯蔵した際には、常温貯蔵より AsA 含量の急速な減少が見られ、長期保存出来るという利点と引き換えに品質劣化を招くことになる。低温障害に見られるような低温ストレス時に活性酸素種が生成することや、植物が活性酸素種に対する抗酸化酵素群を含めた防御機構を有していることは、よく知られている。ジャガイモ塊茎は、低温耐性と言われているが、低温貯蔵中にどのように抗酸化酵素が機能しているかについては、いまだ解明されていない。そこで本論文では、生化学、分子生物学的、さらに組織学的に抗酸化酵素群を中心に、低温貯蔵中に生成される活性酸素消去に対する防御機構について検討した。

第2章では、‘トウヤ’を用いて、ジャガイモ塊茎中の抗酸化酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APx)、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) およびカタラーゼ (CAT) 活性の変化を低温貯蔵区と常温貯蔵区について比較検討した。その結果、低温貯蔵区と常温貯蔵区において APx が、他の抗酸化酵素に比べて最も処理温度に応答していたことから、常温貯蔵よりも低温貯蔵中に過酸化水素 (H_2O_2) がより生成されていると考えられた。また、アスコルビン酸再生系についても検討した結果、もっとも有意に差が見られたのは、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼであったが、その活性は、最大でも APx の約2%であっ

たことから、低温貯蔵中の AsA 含量の低下は、低温ストレスにより生成される H_2O_2 を解毒するために、APx の基質として消費されるためであると推定した。

第3章では、ジャガイモ塊茎で低温ストレスに対する防御機構として重要である APx の応答を調べるために、APx をコードしている cDNA クローンをジャガイモ cDNA ライブラリーより単離した。750 bp の ORF を含む 1039 bp の全長 APx cDNA が得られた。推定アミノ酸配列は、活性中心を構成する His-Asp-Trp (H163, W179, and D208) を保持しており、他の植物とのアライメントの結果、細胞質型 APx (cAPx) と相同性が高く、さらにトランジットペプチドが欠落していることから、単離したジャガイモ APx cDNA は細胞質型であることが明らかとなった。

第4章では、‘トウヤ’において、APx が *de novo* 合成されているかどうかを明白にするために、APx の mRNA とタンパク質レベルについて調べた。貯蔵直後と比較すると、APx mRNA は3週で2.5倍、6週で1.4倍のレベルまで増加していた。さらに貯蔵を継続させると、15週までにほとんど最初のレベルまで減少した。APx の活性染色の結果から、APx にはアイソザイムが存在しないことも確認された。また、貯蔵中の活性染色の経時的変化は、酵素活性測定時の結果に類似していた。次に、第3章でクローニングした全長 APx の推定アミノ酸配列の結果より APx に特有でありしかも親水性のペプチドを合成し、それを抗原として抗 APx 抗体を作成し、ウェスタンブロットを行った。その結果、APx のタンパク量は、酵素活性および活性染色の結果を十分に支持するものであった。これらの結果から、低温ストレスによって生成された過酸化水素(H_2O_2)を解毒するために、APx は *de novo* 合成されると考えられた。

第2章において、APx が、他の抗酸化酵素と比べて最も過敏であったことから、常温貯蔵より低温貯蔵中に、より多くの H_2O_2 が生成されたと考えられた。第5章では、内因性の AsA 含量が 30 μM 以下に達したときに APx が非活性化されるという報告があることから、抗酸化酵素に対する内因性 AsA 含量の影響を調べるために、AsA 含量の異なるジャガイモ品種を用いて検討を行った。‘キタアカリ’は高 AsA 含量品種として開発された品種であり、また‘ダンシャク’は‘キタアカリ’の片親で、通常の AsA 含量品種として用いた。‘キタアカリ’では低温貯蔵区においても貯蔵期間を通じて、AsA 含量は 30 μM 以上を維持しており、APx 活性は貯蔵期間を通して増加し続けたが、‘ダンシャク’では、内因性 AsA 含量が 30 μM 以下になった9週目以降に減少し始めた。したがって、低温ストレスに対して重要な酵素の1つである APx 活性は、ジャガイモ塊茎中の内因性 AsA 含量に依存していることが明らかとなった。

第6章では、APx 発現における内因性 AsA の影響について、‘キタアカリ’と‘ダンシャク’

ク’を用いて、4章と同様に調べた。‘キタアカリ’では、APx mRNA レベルは低温貯蔵において増加し続けた。‘ダンシャク’では、APx mRNA レベルは9週目まで一時的に増加して、その後3週目とほぼ同じレベルにまで低下した。このように、ジャガイモ塊茎中に発生した低温ストレスに対して重要である APx は、AsA 含量によって mRNA のレベルで抑制されていることが明らかとなった。

これまでの結果より、低温貯蔵下のジャガイモ塊茎内では H_2O_2 が生成しており、その消去に APx が深く関わっていることが明らかになった。第7章では、形態学的手法によってジャガイモ塊茎での H_2O_2 と APx の局在について検討した。Tissue printing assay の結果、 H_2O_2 の蓄積は、低温貯蔵下で、常温貯蔵下より多く、特に維管束と表皮で蓄積が見られた。さらに H_2O_2 の蓄積を、塩化セリウム法を用いて電顕で観察した結果、同じく低温において、ジャガイモ塊茎の特に維管束師部細胞の細胞壁と細胞膜上に H_2O_2 蓄積が検出された。また、APx は抗 APx 抗体を使った免疫染色の光学顕微鏡による観察結果より、 H_2O_2 が蓄積された同じ組織（維管束と表皮）に局在していた。しかしながら、表皮については、 H_2O_2 と APx とともに貯蔵以前より蓄積が見られたので、低温ストレスによって誘導されたために蓄積が起った部位は、維管束の師部細胞と推測された。

第8章においては、本論文の第2章から7章までの結果を総括した。

本研究において著者は、第2章および第4章でジャガイモ品種‘トウヤ’を用いて非光合成器官における活性酸素消去系酵素の挙動について検討を行い、特に APx については *de novo* 合成されていることを明らかにした。次に、第5章および第6章では、‘トウヤ’低温貯蔵下でみられた低温貯蔵中における AsA 含量の急激な減少の原因についてさらなる考察を行うために、AsA 含量の異なるジャガイモ品種（‘キタアカリ’と‘ダンシャク’）を用い、内因性 AsA 含量が APx の活性及び *de novo* 合成に影響を及ぼしていることを明らかにした。第7章においては、低温貯蔵中に生成していると考えられる H_2O_2 の蓄積が特に維管束の師部細胞で顕著であることを確認した。

以上の結果から、著者は、低温貯蔵中には、特に師部細胞のミトコンドリア呼吸鎖からの電子の漏れが起り、これによって生成した活性酸素をミトコンドリアに局在している Mn-SOD が不均化し、その結果生じた H_2O_2 を細胞質局在型の APx が消去しているという、活性酸素防御機構を提唱した。

論文審査の結果の要旨

氏名	川上佐知子		
論文題目	Function of ascorbate peroxidase against active oxygen species in potato tubers during storage at low temperature (低温貯蔵中におけるジャガイモ塊茎に生成する活性酸素種に対するアスコルビン酸ペルオキシダーゼの機能)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	中村千春
	副査	教授	林 祐一
	副査	教授	中真山滋志 [〒]
	副査	助教授	水野 雅史 ^日
	副査		^日
要 旨			
要旨 ジャガイモ塊茎は、低温耐性と言われており、低温により休眠が延長され呼吸作用や萌芽が抑制される一方で、低温ストレスによるジャガイモの品質特性の一つであるアスコルビン酸（ビタミンC）含量の急速な低下を招くことになり、その品質価値を低下させる。この原因を解明するため、本研究では、低温ストレスによる活性酸素種の発生が原因であると想定し、それに対する防御機構を生化学的、組織化学的に解析した。			

第一章では、緒論としてこれまでになされている低温障害についての研究と活性酸素発生との関係を述べ、抗酸化酵素群の重要性を述べた。

第二章では、低温貯蔵中におけるアスコルビン酸(AsA)含量の変化および抗酸化酵素群の経時的変化を調べ、AsA 含量の顕著な減少とアスコルビン酸を電子供与体として過酸化水素を特異的に消去するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APx)活性が、顕著に増加することを示した。また、植物特有のアスコルビン酸再生系酵素群についても検討し、アスコルビン酸が APx によって一電子酸化されたモノデヒドロアスコルビン酸をアスコルビン酸に還元するモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼが最も活性化されていることを明らかにしたが、その酵素活性は APx の約 2% であることから、再生系による再合成は、ほとんどジャガイモ塊茎中の AsA 含量には寄与していないことを明確にした。

第三章では、第二章で低温貯蔵中における増加が明らかとなった APx について、ジャガイモ塊茎からの cDNA ライブラリーより完全鎖長 cDNA のクローニングを行い、未決定であった APx cDNA の全塩基配列を決定し、推定ポリペプチドにシグナル配列や膜結合ドメインが存在しないことから本酵素がサイトゾル型であることを明らかにした。

第四章では、得られた APx cDNA をプローブとして低温貯蔵中における APx 転写産物の消長を Northern 法により検討した。

また APx 全配列より抗原決定基として最適の部分に対するペプチドを合成し、それを抗原としてウサギに免疫し、APx に特異的な抗ペプチド抗体を作製し Western 法により APx への翻訳を検討した結果、APx が低温貯蔵中に *de novo* 合成されることを明らかにした。

第五章では、APx が内在性 AsA 濃度によりその活性に影響を受けることから、高アスコルビン酸含量品種として開発された“キタアカリ”とその片親であり通常の AsA 濃度である“ダンシャク”を用いて、アスコルビン酸含量の違いによる APx および他の抗酸化酵素群の活性変化を調べた。その結果、高アスコルビン酸品種である“キタアカリ”では、低温貯蔵中 APx の活性は維持されたが、“ダンシャク”では一旦上昇した後、低下した。この際のそれぞれの品種における AsA 含量を測定した結果を総合すると、低温貯蔵中におけるこれら酵素群の経時的変化から、APx は細胞内での AsA 濃度が 30 μ M 以下になると不活化することを明らかにした。

第六章では、第四章で行った実験を内在性 AsA 含量の異なった上記 2 種類のジャガイモを用いて行い、APx の活性維持が遺伝子転写レベルで制御を受けていることを明らかにした。

以上の研究からジャガイモを低温貯蔵すると細胞にとって有毒である過酸化水素が発生し、それを消去するために APx が *de novo* 合成されることを明らかにしたが、過酸化水素が発生する部位や、それに応答する APx がどの細胞器官に局在し

ているのかは生化学的実験からは不明であった。そこで第七章では、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて、組織化学的に過酸化水素および APx の局在性を検討した。過酸化水素については、維管束周辺に集積が見られ、塩化セリウム法により電子顕微鏡を用いて観察した結果、維管束の特に師部細胞細胞壁および細胞膜上に過酸化セリウムの沈着が認められたことから、この部分に過酸化水素が集積していることを明確にした。また APx については、免疫染色および APx cDNA の構造特性より維管束細胞質に局在していることを明らかにした。

第八章では、本研究の総合考察を行い、低温貯蔵中におけるジャガイモ塊茎中に発生する活性酸素、特に過酸化水素の細胞内での局在部位とそれを消去する APx の機能について論述した。

以上のように、本研究は、低温貯蔵におけるジャガイモ塊茎の生理変化を特に過酸化水素とそれを消去する APx の機能から明らかにしたもので、極めて重要な知見を得た価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者 川上佐知子 は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。