

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	分化・形態形成学講座 (横田 明穂 教授)		
氏 名	嶋岡 泰世	提 出	平成13年 1月 9日
題 目	Enzymological studies of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves (ホウレンソウ葉緑体デヒドロアスコルビン酸レダクターゼの酵素化学的研究)		
<p>要旨</p> <p>Many electrons released from PSII are transported to dioxygen when the light intensity exceeds the demand of reducing equivalents by the Calvin cycle for CO₂ reduction in photosynthesis. Thus, the water-water cycle functions to dissipation of excess electrons and furthermore down-regulates the electron transport in the photosystem. Of the enzymes involved in the cycle, APX, SOD and GR have extensively been studied over the last two decades, but DHAR and MDAR in chloroplasts have remained to be studied. This study was focussed on the molecular and biochemical characterizations of DHAR functioning for the water-water cycle in photosynthesis.</p> <p>In Chapter I, chloroplast DHAR was purified from spinach leaves. The specific activity of chloroplast DHAR was 360 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. The K_m values for DHA and GSH were 70 μM and 1.1 mM, respectively. These kinetic parameters of chloroplast DHAR indicate that the spinach chloroplast DHAR is the entity functioning for the water-water cycle in spinach chloroplasts. The cDNA for spinach chloroplast DHAR was isolated. The comparison between the predicted amino acid sequence from the cDNA and the amino terminal sequence of the purified spinach chloroplast DHAR revealed that the isolated cDNA was for spinach chloroplast DHAR and the cDNA contained the sequence for transit peptide. When the coding</p>			

region of the cDNA except the sequence for the transit peptide was expressed in *E. coli*, the recombinant DHAR protein had the DHAR activity. The kinetic parameters of the recombinant DHAR were the same as those of the purified spinach chloroplast DHAR.

In Chapter II, the catalytic mechanism of chloroplast DHAR was analyzed with the recombinant DHAR. The initial velocity studies in the absence of the reaction products revealed that the catalysis chloroplast DHAR proceeded with a bi uni uni uni ping pong mechanism. Product inhibition study with GSSG revealed that the reduced enzyme first bound with DHA, followed by binding of GSH. The reaction intermediate complex predicted from the steady-state kinetic analysis was isolated and identified as an adduct between DHAR and the substrate GSH through a disulfide bond. These results with spinach chloroplast DHAR indicate that the DHAR reaction proceeds as follows: The reduced enzyme binds DHA on the active center. The reducing equivalents of the sulfhydryl groups of a cysteine residue and one of GSH are transferred to DHA to form ascorbate and the oxidized enzyme. The oxidized enzyme should be the adducts between the enzyme and GSH through a disulfide bond. The second GSH will reduce the oxidized enzyme to form the reduced enzyme and GSSG. The reaction intermediate complex of chloroplast DHAR revealed that the cysteine residue was involved in the reaction. The site-mutagenesis study of chloroplast DHAR showed that Cys-23 was essential for chloroplast DHAR to function. Cys-23 would be involved in the formation of the reaction intermediate complex of chloroplast DHAR.

These findings of the molecular properties of chloroplast DHAR in spinach leaves contributes to the elucidation of the regeneration system of ascorbate in chloroplasts.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 嶋岡 泰世

光照射中の葉緑体では活性酸素の生成速度が大きいため、活性酸素消去系酵素のアスコルビン酸ペルオキシダーゼの基質であるアスコルビン酸の再生は重要である。実際、葉緑体内に数十mM存在するアスコルビン酸は再生されないと、数分で枯渇すると考えられる。つまり、アスコルビン酸の再生は葉緑体機能の維持には欠かせない。しかし、葉緑体においてアスコルビン酸の再生に関与するデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (DHAR) の分子の実体は不明であった。本研究では、このDHARの分子の実体を明らかにし、その酵素化学的解析を行った。

第一章において、ホウレンソウ葉緑体DHARの精製を行い、その酵素学的性質を明らかにした。精製したホウレンソウ葉緑体DHARは、単離葉緑体を用いた研究で報告されていたDHAR活性を説明できるだけの能力を有していた。さらに、ホウレンソウ葉緑体DHARのcDNAを単離し、大腸菌において発現させることにより、ホウレンソウ葉緑体DHARと同じ酵素学的性質を示すリコンビナントDHARを作製することができた。

第二章において、ホウレンソウ葉緑体DHARの反応機構とその活性中心の解析を行った。定常状態の速度論解析により、葉緑体DHARの反応機構はbi uni uni uni ping pong機構であることを明らかにした。さらに、DHAR反応過程において形成される反応中間体の一つである酸化型酵素を同定した。その酸化型酵素は還元型酵素と還元型グルタチオン間でジスルフィドを形成した複合体であった。さらに、この酸化型酵素の形成に関与するシステイン残基を点変異を導入した変異DHARによって同定した。Cys-23をセリン残基に置換した変異DHARではDHAR活性はほぼ完全に消失したのに対し、葉緑体DHARに含まれる他のシステイン残基をセリン残基に置換した変異DHARではDHAR活性を有していた。このことから、Cys-23がDHARの活性発現には必須のアミノ酸残基であり、このシステイン残基がDHAR反応の反応過程における酸化型酵素の形成に関与するアミノ酸残基であると結論した。

以上のように、本論文はホウレンソウ葉緑体に局在し、単離葉緑体で検出される高いDHAR活性を説明できるだけの能力を有するDHARの分子の実体を初めて明らかにした。今後、本研究成果は葉緑体でのアスコルビン酸再生系の生理的役割の解明に大いに貢献するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。