

報告番号 * 甲 第 1580号

主論文の要旨

題名 種子吸水時におけるチトクロム
オキシダーゼ活性増大の機構

氏名 松 岡 信

主論文の要旨

報告番号 ※甲第 号 氏名 松岡 信

種子が吸水し始めると急速にその呼吸活性が増大する。この呼吸活性の増加は、ミトコンドリアの急速な発達及び形成がその主な原因であると考えられている。すなわち、乾燥種子中のミトコンドリアは、形態的に未発達であり、生理活性も低い。一方、十分に吸水した種子中のミトコンドリアは、クリステが発達しており、生理活性も高いことが知られている。こうしたミトコンドリアの発達に伴い、トリカルボン酸回路や電子伝達系の酵素活性も増加する。この吸水過程におけるミトコンドリア酵素の活性増大の機構としては、次の2つの機構が考えられている。その1つは乾燥種子中に不活性型酵素が存在し、吸水に伴い活性型に変化するという機構と、他の1つは、種子が吸水するとタンパク質合成が盛んになり、酵素量が増加するために酵素活性が上昇するという機構である。現在のところ、吸水の初期における酵素活性の増加は不活性型酵素の活性化によるものであり、吸水以後の増加は酵素タンパク質の合成によると考えられている。しかし、吸水初期における酵素活性の増加が、乾燥種子に既存の不活性型酵素の活性化であるという生化学的証明は皆無に等しい。さらに、実際の吸水過程における不活性型酵素の活性化機構については、ほとんど何もわかっていない。そこで、本研究では、エンドウ子葉を用いて、シクロムオキシゲナーゼ (Cycloox) の吸水に伴う活性増大の機構を生化学的に検討した。

Cyt ox はミトコンドリア内膜に結合した酵素で、その構造が複雑であることや、サブユニットの合成場所が細胞質とミトコンドリアの2カ所に別れていることから、その構造、機能及び生合成機構等が精力的に研究されている。しかし、高等植物の場合には、ほとんど研究されておらず精製例が1例あるのみである。そこで、本研究では、上述の目的と合せイントウ Cyt ox の構造と諸性質についても検討した。

イントウめは之のミトコンドリア粒子から、デオキシコール酸とトリトン X-100 を用い本酵素を選抜可溶化し、さらに、ジエチルアミノエチル (DEAE)-セルロースカラムフロマトグラフィー、ショ糖密度勾配遠心そして再度の DEAE-セルロースカラムフロマトグラフィーにより精製した。イントウ Cyt ox は、相互に分子量の異なる5種のサブユニット (I; 39,000, II; 33,000, III; 28,500, IV; 16,500 及び V; 8,000~6,000) から成っていた。しかし、精製標品に対して調製した抗体を用いて、未精製画分より得た Cyt ox の免疫沈殿物は、上記のサブユニット以外に2種のポリペプチドを含んでいた。このポリペプチドは、本酵素に弱く結合しているものの電子伝達には関与していないと考えた。なお、サツマイモの Cyt ox も5種のサブユニットから構成されていることから、高等植物の Cyt ox のサブユニット構成は、他の生物のもの (多くの場合7種) とは異なると推論した。

可溶化後の本酵素は、各種のリン脂質の添加により、約2.5倍に活性化された。この活性化に必要な濃度はリン脂質の種類及びソースにより異なった。すなわち、C₁₈の不飽和脂肪酸 (オレイン酸、

リノール酸)の含量が高く、C₁₆の飽和脂肪酸(パルミチン酸)の含量が低いリン脂質は、C₁₆の飽和脂肪酸が多く、C₁₈の不飽和脂肪酸が少いリン脂質より低濃度で本酵素を活性化した。このことから、リン脂質のアシル基が本酵素のコンホメーションを変化させることにより、活性化を引き起すものと考えた。また、添加したリン脂質の種類により、最適pHが変化する場合があった。

次に、吸水に伴う活性増大の機構について検討した。まず、Cyt oxの5種のサブユニットの内サブユニットIを認識する抗体を用いて実験を行った。その結果、吸水は時間で膜画分のCyt ox活性は約2.5倍に上昇するにもかかわらず、抗原量は変化しなかった。このことは、乾燥種子の膜画分に不活性型の抗原が存在することを示唆している。そこで、この不活性型の抗原を活性型の抗原と分離し、その性質を調べてみた。この不活性型抗原は、活性型酵素に比べて膜に弱く結合していて、1種類のポリペプチドのみからなっていた。そして、このポリペプチドはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、サブユニットIと同じ泳動度を示した。これらのことから、乾燥種子に存在する不活性型抗原は、他のCyt oxサブユニットとは結合していない遊離の状態のサブユニットIであると推論した。乾燥エンドウ子葉のミトコンドリア内膜は、ショ糖密度勾配遠心で3種類に分画できる。この3画分のうち最も軽い内膜画分は、多量の不活性型抗原を含んでいて、この画分におけるCyt ox活性は吸水直後に急速に増大した。

一方、膜画分をサブユニットⅡ、Ⅳ及びⅦを認識する抗体を用いて調べたところ、この抗体と反応する抗原量は、吸水は時間の間に、酵素活性の上昇と共に増加した。そして、乾燥種子の $10^6 \times g$ の上清に本抗体と反応する抗原が存在し、この可溶性抗原は吸水に伴い減少することを知った。そこで、この可溶性抗原の構造を調べるために、免疫電気泳動を行い寒天ゲル内に免疫沈殿を作り、それをSDS-尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。その結果、サブユニットⅣと同じ泳動度を示す1本のタンパク質バンドのみが検出された。

以上の結果から、エンドウ乾燥子葉には、他のサブユニットと結合していない遊離型のサブユニットⅠやⅣがあり、前者は乾燥子葉に存在する最も軽いミトコンドリア内膜に、後者は可溶性の状態でマトリクスに存在するものと推察した。そして、この軽い内膜は、そのサブユニットⅠにサブユニットⅣなどの可溶性の遊離型サブユニットが会合して活性型Cyt α を形成し、重い内膜に変化するものと考えた。