

報告番号

※ 甲第 1383 号

主論文の要旨

題名 高等植物の傷害組織における
チトクロムオキシダーゼの生合成機構

氏名 前 鳥 正 義

主論文の要旨

報告番号 ※甲第 号 氏名 前島正義

本研究は、高等植物におけるミトコンドリア形成の分子的機構を考察するために、その内膜に局在するチトクロムcオキシダーゼ (*cytochrome c: oxygen oxidoreductase*, EC 1.9.3.1) の生合成機構を解明することを目的とした。

動植物を問わず生物は生命を維持するために酸素を必要とする。その酸素の大部分は生体エネルギーを生産するために、チトクロムcオキシダーゼによって消費される。本酵素は化学的な意味での生物と外界の接点に位置しているといえる。サツマイモ塊根組織に切断傷害を与えると、ミトコンドリアの新形成に伴い本酵素の活性も増加するので、この糸を利用して本酵素の生合成および形成の機構について研究した。

まず、サツマイモ塊根組織から本酵素を精製し、その構造と諸性質を検討し、次に本酵素に対する抗体マタンパク質合成阻害剤を用いて活性増加の機構を検討した。

サツマイモ塊根のミトコンドリア膜画分から、デオキシコール酸とKClにより本酵素を可溶化し、さらに、*diethylaminoethyl*-セルロースカラムクロマトグラフィー、硫酸塩析そしてショ糖密度勾配遠心によって均一に逆精製した。高等植物においては初めての例である。サツマイモのチトクロムcオキシダーゼは、分子量の異なる5種のサブユニット (I:39,000; II:33,500; III:26,000; IV:20,000; V:5,700)

から成っていた。5種のサブユニットが1個ずつ(サブユニットVは複数含まれるかも知れない)会合し、これにヘムa₂分子と銅原子2個が加わり活性型酵素を構成しているものと考えられる。ヘムaは特定のサブユニット(Ⅲ, V)に結合しているらしい。他の玉物のチトクロムc₁オキシナーゼと比較した場合のサツマイモ酵素の特徴は、サブユニット数が5種であること(他の多くの生物では7種)、還元型吸収スペクトルのr-吸収帯が他の生物の酵素に比べて数mm短波長側に移っていること、そして至適pHがpH7.0~7.5にある点(他の多くはpH6.0付近)であった。

本酵素はミトコンドリア内膜を貫通した形で存在し、高濃度の界面活性剤によって可溶化された。本酵素を膜からはずし、精製することにより酵素活性は低下し、精製標品にリン脂質を加えると活性は回復した。このことは、本酵素が実際にはリン脂質-酵素複合体として存在していることを示している。非イオン性界面活性剤であるTween 80は脂肪酸残基をもつためリン脂質の代用となり得、一方、TriconX-100は流動的で可塑的な疎水環境を形成することができず、かえって活性を強く阻害する。

一般に膜酵素の活性の温度依存性は膜のリン脂質の流動性の変化の反映であるといわれている。この点に関して、Arrheniusプロットをとることによって検討した。本酵素のArrheniusプロットは15~17°C付近に折れ曲り点をもつが、精製標品に相転移温度が20数度異なる合成リン脂質

2種を添加しても、プロットに大きな変化は生じなかった。したがって、本酵素の場合、活性の温度依存性に与えるリン脂質の影響は必ずしも決定的なものではないと考えられる。

次に本酵素に対する抗体を調製し、これを用いて生合成の機構について検討した。酵母等のチトクロムcオキシダーゼは、細胞質のリボソーム上で合成されるサブユニットとミトコンドリアのリボソーム上で合成されるサブユニットから成り、いずれの合成系を阻害しても活性増加はみられなくなる。しかし、サツマイモ塊根の傷害組織における酵素活性の増加には、細胞質での合成系は必ずしも必要ではなく、酵母等とは異なった機構により活性が増加するものと推察された。実験の結果次のことが明らかになった。

まず、傷害組織での活性増加は、健全組織の酵素と全く同じものが量的に増すためであることがわかった。その際すべてのサブユニットが合成されるのではなく、ミトコンドリア由来と思われるサブユニット(I, II, III)のみが合成された。他のIVとVのサブユニットは前駆体として健全組織の細胞内に貯えられていると考えられる。本研究では、その前駆体と思われるタンパク質がミトコンドリア内膜に弱く結合していることを見出した。このタンパク質はチトクロムcオキシダーゼ活性を示さずヘムaも含まないが、本酵素に対する抗体と反応し、免疫学的に本酵素と類似していることを示した。このタンパク質を phenyl-Sepharose カラムクロマトグラ

フィーとポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。その分子量は57,000であり、本酵素のサブユニットに相当するタンパク質は含んでいなかった。さらに、このタンパク質は組織切断後の時間経過に伴ってその量が減少した。以上の結果から、今回見いだされたタンパク質が、チトクロムcオキシダーゼの細胞質由来のサブユニットのみを含む前駆体である可能性があると推察された。

このことが事実であるならば、傷害組織における本酵素の活性増加は次のように説明される。本酵素のサブユニットⅠ～Ⅲはミトコンドリアで合成され、ⅣとⅤは分子量57,000の前駆体として合成されてミトコンドリア内膜上に貯えられる。健全組織におけるこれらの合成・分解はゆっくりしたものである。ここに傷害刺激が与えられると、サブユニットⅠ～Ⅲの合成は促進され、前駆体はサブユニットⅣとⅤへプロセッシングされる。各サブユニットはヘムaおよび銅原子と共に酵素分子を形成して内膜に組込まれ、これが活性増加として観察される。残された課題として、この前駆体がサブユニットⅣとⅤへプロセッシングされることを証明する必要がある。このような前駆体は酵母の酵素についても報告されているが、反論する研究者も多く、論争中である。

酵母のようにチトクロムcオキシダーゼ活性が数時間で数十倍に増加する系と、サツマイモ塊根の傷

倍組織のように2日間で2倍にしか増加しない系とでは、酵素の生合成・形成の機構に違いがあっても不思議ではない。本酵素の役割の重要性から考えて、細胞質由来のサブユニットを前駆体として、ある程度の量を健全組織のミトコンドリア内膜に貯え、異常状態に備えることは必ずしも不合理ではないと考えられる。