

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title       | Studies of Adenosine 5'-phosphosulfate Reducing Enzymes in Higher Plants( Abstract_要旨 )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Author(s)   | Ara, Takeshi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation    | Kyoto University (京都大学)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Issue Date  | 1998-09-24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| URL         | <a href="http://hdl.handle.net/2433/182418">http://hdl.handle.net/2433/182418</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Right       | This article is derived, in part, from an article published in Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry on 1997, available online: <a href="http://dx.doi.org/10.1271/bbb.61.621">http://dx.doi.org/10.1271/bbb.61.621</a> ; This article is derived, in part, from an article published in Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment. Volume 78 of the series Developments in Plant and Soil Sciences on 1997.9, available online: <a href="http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-0047-9_276">http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-0047-9_276</a> |
| Type        | Thesis or Dissertation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Textversion | ETD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|          |                                                                                                                                     |                 |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 氏名       | あら<br>荒                                                                                                                             | たけし<br>武        |
| 学位(専攻分野) | 博士(農学)                                                                                                                              |                 |
| 学位記番号    | 農博第1020号                                                                                                                            |                 |
| 学位授与の日付  | 平成10年9月24日                                                                                                                          |                 |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第1項該当                                                                                                                        |                 |
| 研究科・専攻   | 農学研究科農芸化学専攻                                                                                                                         |                 |
| 学位論文題目   | Studies of Adenosine 5'-phosphosulfate Reducing Enzymes in Higher Plants<br>(高等植物の adenosine 5'-phosphosulfate の還元酵素に関する研究)<br>(主査) |                 |
| 論文調査委員   | 教授 關谷次郎                                                                                                                             | 教授 大山莞爾 教授 佐藤文彦 |

### 論文内容の要旨

硫酸還元同化経路は、硫酸イオンからAPS (adenosine 5'-phosphosulfate), 亜硫酸イオン, 硫化物イオンを経てL-システインを生成する重要な経路である。この経路は原核生物の大部分と真核生物の植物に存在している。この経路中、APSから亜硫酸イオンの生成は、大腸菌や酵母ではAPSキナーゼとPAPS (3'-phospho APS) レダクターゼによって行われる。一方、アマノリやユーグレナなどの真核藻類ではAPSスルホトランスフェラーゼによる経路で亜硫酸イオンが生成すると報告されている。高等植物ではPAPSを経ずにAPSスルホトランスフェラーゼによってAPSから直接亜硫酸イオンを生成するといわれているが、その詳細は不明である。本論文では、高等植物に存在するAPSから亜硫酸イオンを生成する酵素の精製とその性質を明らかにするとともに、APSから亜硫酸イオンを生成するAPS還元経路の分子進化について考察することを目的とした。本論文の主な内容は以下のとおりである。

1. これまでAPSスルホトランスフェラーゼの活性測定には放射性標識化合物を、基質とする方法が用いられていたが、放射性標識基質の合成が複雑であること、および測定に時間がかかることなどの問題点があった。APSスルホトランスフェラーゼ反応はDTT存在下で遊離亜硫酸イオンを生成することから、この亜硫酸イオンを定量する方法について検討した。亜硫酸イオンは、NADPH依存性亜硫酸還元酵素とシステイン合成酵素を共役させてシステインに変換し、これを比色定量した。この反応系で1~300 nmolの亜硫酸イオンに対して定量性を得た。この活性測定法を用いて数種の植物のAPSスルホトランスフェラーゼ活性を測定したところ、従来報告されていた値とほぼ一致する結果を得た。これらの結果から、本法がAPSスルホトランスフェラーゼの新規活性測定法として有効であることを確認した。
2. イオウ欠乏処理ダイズにおいて、主要なイオウ化合物である硫酸イオンおよびホモグルタチオン含量は大幅に減少したが、タンパク態イオウの減少はわずかであった。しかしAPSスルホトランスフェラーゼ活性は対照区の1/2に減少した。一方、10~25 mMの硫酸アンモニウムで1時間処理したダイコン幼苗ではAPSスルホトランスフェラーゼ活性は2倍に上昇した。以上の結果、高等植物のAPSスルホトランスフェラーゼ活性はイオウ栄養によって制御されていることが示唆された。
3. ダイコン幼苗からAPSスルホトランスフェラーゼの精製を試みた。硫酸分画、DEAEセルロース、AMPセファロース、フェニルセファロースカラムクロマトグラフィーを用いて、収率20%、10,000倍に精製し、高等植物よりはじめて電気泳動的に単一のAPSスルホトランスフェラーゼを得た。本酵素(分子量225,000)は、分子量58,000のサブユニットからなるホモ4量体であり、これまでに報告されたアマノリやユーグレナからの酵素とは分子量とサブユニット構成が異なっていた。本酵素はAPSを基質としたが、PAPSは基質としなかった。APSに対するKm値は41 μMであった。AMPの添加は酵素活性を完全に阻害した。また0.5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を添加するとAPSスルホトランスフェラーゼ反応は促進された。
4. APS還元経路の酵素(APSキナーゼとPAPSレダクターゼ系、APSスルホトランスフェラーゼあるいはPAPSレダクターゼ系)の遺伝子の分子進化について、新規に作成した配列解析プログラム(MOTIFVIEW)などにより解析を行った。データベースの配列から推定したAPSおよびPAPSの結合モチーフを全ゲノム配列の決定された生物種に適用し、APSキナーゼ、

APSレダクターゼ、PAPSレダクターゼ遺伝子の存在を推定した。また枯草菌などのPAPSレダクターゼにチオレドキシニンなどに存在するredox-activeモチーフがあることを見いだした。データベースから得られるAPS還元経路酵素の遺伝子について解析したところ、生物種によってredox-activeモチーフを持つものと持たないものの2グループに分類されることを見いだした。これらの結果とドメイン解析などから、APS還元経路の酵素の遺伝子はグラム陰性細菌から、グラム陽性細菌を経て高等植物へ進化したと推定した。

## 論文審査の結果の要旨

高等植物の硫酸還元同化経路のうちAPSから亜硫酸イオンへ至る経路の酵素はその詳細が不明である。大腸菌や酵母ではAPSキナーゼとPAPSレダクターゼによる経路、アマノリ、ユーグレナなどの真核藻類ではAPSスルホトランスフェラーゼによる経路が確認されている。本研究では、APSから亜硫酸イオンの生成を触媒する酵素を高等植物から精製し、その性質を明らかにするとともに、APSから亜硫酸イオンの生成に関与している酵素の分子進化について、DNAデータベースの配列解析から考察した。本研究の成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. APSスルホトランスフェラーゼの活性測定は、放射性基質の調製など煩雑な操作を含んでいたため、本酵素の研究は遅れていた。APSスルホトランスフェラーゼ反応の生成物である亜硫酸イオンを亜硫酸還元酵素とシステイン合成酵素を共役させて定量する活性測定法を検討し、簡易で迅速なAPSスルホトランスフェラーゼの活性測定法を確立した。
2. ダイズおよびダイコンを用いて、APSスルホトランスフェラーゼの活性がイオウ栄養によって影響されることを明らかにした。
3. 高等植物のAPSスルホトランスフェラーゼはこれまで均一な標品が得られていなかったが、ダイコンを材料として高等植物よりはじめてAPSスルホトランスフェラーゼを精製し、分子量、基質特異性、阻害剤などの生化学的性質の一端を明らかにした。これまで報告されていた藻類のAPSスルホトランスフェラーゼと分子量などに違いがあることを見いだした。
4. APS還元経路の酵素のAPSおよびPAPS結合モチーフを、新規に作成した配列解析プログラム (MOTIFVIEW) などを用いて推定した。このモチーフを用いて全ゲノム配列の決定した生物種のデータベースを解析し、これらのゲノム中にAPSの還元に関与する酵素の遺伝子が存在することを推定した。また枯草菌等のPAPSレダクターゼに高等植物のAPSレダクターゼやチオレドキシニンに見られるredox-activeモチーフが存在することを明らかにした。このモチーフを基にして、APSキナーゼ、APSレダクターゼ、PAPSレダクターゼはそれぞれ2つのグループに分類されることを見いだした。これらの結果などから、APS還元経路の酵素の遺伝子は、グラム陰性細菌からグラム陽性細菌を経て高等植物へ進化したと推定した。

以上のように、本論文は、高等植物の硫酸還元同化経路中のAPSスルホトランスフェラーゼの新規な活性測定法を確立し、その精製ならびに生化学的解析を行うことによって本酵素に関する新たな知見を得るとともに、高等植物のAPSの還元酵素系に関する分子進化について考察したもので、植物栄養学、植物生化学に寄与するところが大きい

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成10年7月27日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。