

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名            朴 養 虎

植物では2-4mMのアスコルビン酸が細胞内外に存在し、特に葉緑体には25mM程度の高い濃度で存在している。またアスコルビン酸は植物の中で三つの形で存在し、多くは還元型(AsA)で、残りは酸化型(DHA)で存在し、その中間形(モノデヒドロアスコルビン酸、MDHA)はごくわずかに存在している。アスコルビン酸は植物の中でこれらの形態変化により、抗酸化作用等の役割を果たしている。植物での硝酸還元過程は硝酸が硝酸還元酵素によって細胞質で亜硝酸に還元され、この亜硝酸は葉緑体に移行し、亜硝酸還元酵素によってアンモニアに還元される。最近、亜硝酸が細胞質において硝酸還元酵素によって一酸化窒素に還元されることも報告されている。この様に植物細胞内で硝酸還元と亜硝酸還元が行われているオルガネラとアスコルビン酸が多く存在しているところが一致していることで、アスコルビン酸が硝酸還元過程になんらかの影響しているのではないかと考えた。しかしこれまではこのことについての研究報告はなく、本研究論文は、ホウレンソウ葉断片による亜硝酸還元へのアスコルビン酸の効果(第2章)、葉抽出液による硝酸、亜硝酸の還元へのアスコルビン酸の効果(第3章)、再構成系による亜硝酸還元へのアスコルビン酸の効果(第4章)の解析を行なった報告である。

第1章では、研究の背景と目的を述べている。

第2章の解析では、ホウレンソウ葉断片に5mMのAsAを与えた場合には与えないときと比べて葉内亜硝酸濃度の減少が大きく、同時に還元型アスコルビン酸(AsA)が酸化型のDHAに変化していた。また<sup>15</sup>N標識亜硝酸を添加して、<sup>15</sup>Nの還元体窒素への取り込みの比をみたところ、添加AsAが多い程、還元体窒素への<sup>15</sup>Nの取り込み比が高かった。またアンモニアのみを集め、<sup>15</sup>Nの取り込み比を調べたところ同じ結果を得た。

第3章ではハウレンソウ葉抽出液による硝酸、亜硝酸の還元へのAsAの効果を解析した。AsAは一般に硝酸還元酵素の活性を測定する時用いられる電子供与体NADHの効果の10分の1程度の硝酸を亜硝酸に還元する活性を認めた。硝酸還元酵素による一酸化窒素の生成へのAsAの効果は認められなかった。暗条件下で、AsAが亜硝酸還元反応への電子供与体となるかを調べた。葉抽出液にAsAとフェレドキシン(Fd)の両者を添加して亜硝酸還元をみたところ、Fdだけを添加した場合より亜硝酸の還元量が多くなった。AsAのみの添加では亜硝酸還元が認められなかった。この結果からAsAから直接亜硝酸還元酵素に電子が供与されるのではなくFdを経て亜硝酸還元酵素に電子が供与されると考えた。

第4章では亜硝酸還元過程に関わるタンパク質の単品を用いた再構成系によるAsAの効果を解析した。第3章の実験結果と同じくFdとAsAの個々の添加による亜硝酸還元は極わずかであり、FdとAsA両者が存在する場合亜硝酸還元が認められた。この場合AsA濃度10mMまでは亜硝酸還元が多くなった。ハウレンソウ葉抽出液を再構成された亜硝酸還元系に添加すると加えてない場合に比べてAsA-Fdによる亜硝酸還元が多くなった。このようにAsAからFdへの電子の移行を促進する植物因子が存在することを示唆した。<sup>15</sup>N標識亜硝酸を利用した結果AsAとFdによる亜硝酸の還元では<sup>15</sup>Nアンモニアが生成された。さらに葉抽出液を添加すると植物因子によってアンモニア生成量が増加した。

第5章では、これまで考えられていた暗条件下での亜硝酸への電子供与システムであるNADPH-FNR-Fdに対して本研究で発見したAsA-Fdによる電子供与の重要性を考察している。

以上本論文は切断葉、葉抽出液そして再構成系を用いて還元型アスコルビン酸からフェレドキシンを介して亜硝酸還元反応に電子が供与され、亜硝酸がアンモニアに還元されることを初めて示したもので、学術上応用上寄与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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。