

アズキ品種のアスコルビン酸ペルオキシダーゼの比較

小嶋道之、齋藤優介、山下慎司

(受理：2006年4月28日)

A comparison of ascorbate peroxidases from varieties of Adzuki bean

Michiyuki Kojima, Yusuke Saito and Shinji Yamashita

摘要

アズキ (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et H. Ohashi : 品種はエリモシヨウズ) に含まれるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) をコードする cDNA の塩基配列を決定した。APX はアスコルビン酸を基質として細胞毒である過酸化水素を水に無毒化する酵素である。アズキ APX 遺伝子の塩基数は 1,076bp で、予想されるタンパク質のアミノ酸数は 250、分子量は約 27,000Da であった。アズキ APX のアミノ酸配列は、ササゲ、ダイズおよびエンドウのそれらと高い相同性を示し、順に 98%、95% および 92% であった。また、アズキ 5 品種の初生葉から APX をコードする cDNA を調製して、塩基配列を比較した。その結果として、(1) エリモシヨウズの APX 遺伝子 ORF から 6-10 番目の塩基配列は “TGCTA” であったが、他の 4 品種のそれは “AGTAC” であること、(2) APX 遺伝子 ORF から 61 番目の塩基はエリモシヨウズ、斑小粒系-1 およびトヨミダイナゴンでは “T” であったが、アカネダイナゴンおよびサホロシヨウズでは “C” であることを明らかにした。

キーワード：アスコルビン酸ペルオキシダーゼ，アスコルビン酸，cDNA，アズキ

緒言

アズキ (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et H. Ohashi) は冷害に弱く、低温障害を受けやすい植物で、種子の品質や収量は、その年の気象および生育環境に大きく左右される¹⁾。北海道におけるアズキ栽培の安定化や市場競争力強化の面から耐冷性品種の育成が強く望まれている。そのためにはアズキ低温障害の発生機構を明らかにする必要があり、育種選抜の指標が求められている。高等植物の多くは 10°C から 35°C の範囲に最適生育温度を持っている。最適生育温度の上限または下限を超える温度環境下では植物細胞の生理機能が損なわれて、著しい細胞障害を受ける²⁾。低温下では、代謝活動の低下にも関わらず太陽エネルギー流入量が同じであればエネルギー過剰となり、それが活性酸素を作り生理障害・構

造障害を引き起こす原因となる^{3, 4)}。しかし、生物は進化の過程でこれらの活性酸素に対する防御機構を獲得しており、アスコルビン酸-グルタチオンサイクル⁵⁻⁹⁾は植物における活性酸素除去機構の一つとして存在する。植物内で発生したスーパーオキシドアニオンは、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) により過酸化水素となり、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) またはカタラーゼ (CAT) によって水に無毒化される。APX は基質としてアスコルビン酸が必要であり、酸化されたアスコルビン酸はグルタチオンにより、また酸化されたグルタチオンは NADPH により、それぞれ還元されて再利用される。しかし、細胞が持つ活性酸素消去能力以上の過剰な活性酸素が生じたときには、一部の細胞構成成分が酸化され、生理機能の異常が起きる¹⁰⁾。

帯広畜産大学畜産科学科食料生産科学講座食品栄養科学

Laboratory of Food Nutritional Science, Department of Food Production Science, School of Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, (Hokkaido, 080-8555,) Japan

アズキはマメ科植物の中でも低温に弱い植物であり、圃場の観察から品種やそれらの生育段階により低温耐性能に差が認められる。例えば、「アカネダイナゴン」は出芽直後の耐冷性が強いが、「斑小粒系-1」は弱い品種であることが報告されている¹⁾。また、インキュベーターを用いた実験室レベルの実験で、アズキ初生葉に顕著な低温ストレスを与えると、葉が黄変したり枯死する「斑小粒系-1」の葉に含まれるAPX, SODおよびCAT活性は、「アカネダイナゴン」のそれらの活性よりも低いことを明らかにした¹¹⁾。また、シンビジウム、サツマイモおよびシロイヌナズナなどの葉は低温ストレスを受けると抗酸化酵素の活性が上昇することや、低温耐性のコムギCAT遺伝子をイネに導入した形質転換体は、非形質転換体イネに比べて耐冷性が増加することが報告されている¹²⁻¹⁵⁾。アズキの耐冷性と抗酸化酵素との関連性を検討する研究の一環として、今回、これまでに明らかにされていないアズキ(エリモショウズ)APX遺伝子の特徴と、圃場において出芽期の耐冷性に差が認められているアズキ5品種のAPX遺伝子5'側の塩基配列の違いを明らかにした。

実験方法

1. アズキの全RNA抽出とcDNA作製

アズキ材料としては、「エリモショウズ」、「アカネダイナゴン」、「斑小粒系-1」、「サホロショウズ」、「トヨミダイナゴン」の5品種を用いた。各種子はバーミキュライトに播種し、25°Cで出芽させた。出芽直後(出芽後1~2日)の初生葉を採取して直ちに用いた。全RNAの抽出は、Plant RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて行った。抽出した全RNAはRNase free水で30倍に希釈し、260nmおよび280nmの吸光度を測定して、 $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$ であるRNA溶液の濃度を求め使用した。cDNAの作製は、3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen)を用いて行った。全RNA(1~5 μ g)に、RNase free水を加えて11 μ lとし、1 μ lの10 μ M adapter primerを加えて70°Cで15分間加熱変性させた。氷上で急冷後(1分間)、2 μ lの10 \times PCR buffer、2 μ lの25mM MgCl₂、1 μ lの10mM dNTP mix、2 μ lの0.1M DDTを添加して42°Cで5分間プレインキュベートした。1 μ lの

SuperScript II RTを加え、42°Cで50分間逆転写反応させた後、70°C(15分間)で反応停止させた。氷上で急冷し、1 μ lのRNase Hを加えて37°Cで20分間反応させcDNAを調製した。

2. アズキ APX 遺伝子断片の増幅

PCRチューブに1 μ lのcDNA溶液と、48.75 μ lのPCR溶液(最終濃度は10mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP mix, 0.5 μ Mセンスプライマー, 0.5 μ Mアンチセンスプライマー)、および0.25 μ lのEx-Taq polymerase (5U/ μ l, TaKaRa)を加え混合した。プライマーは、報告されている他のマメ類APX配列¹⁶⁻¹⁸⁾を参考に作成した(Table 1.)。PCRの条件は、94°Cで3分間処理後、{(94°C, 30秒) → (45°C, 30秒) → (72°C, 30秒)}を35サイクル行った後、72°Cで7分間維持してPCR産物を調製した。

3. PCR産物の精製

PCR産物は2%アガロースゲル(1 \times TAE)を用いた電気泳動に供した。電気泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、紫外線(312nm)照射により増幅遺伝子断片を切り出した。切り出したゲルは、GENECLEAN KIT(Q-BIOgene)を用い、重量の3倍容のNaIを加え50°Cで完全にゲルを溶かし、よく懸濁したEZ-GLASS MILKを5 μ l加えて5分間攪拌後、10,000rpm(5秒間)の遠心で沈殿を得た。500 μ lのNEW WASHを加えて完全に溶かした後、10,000rpm(5秒間)で遠心した。これを合計3回繰り返して得られた沈殿物は、遠心エバポレータで乾固し、11 μ lの滅菌水を加えて懸濁後、13,000rpm(2分間)で得られた遠心上清を精製PCR産物とした。

4. 形質転換およびスクリーニング

pGEM[®]-T Easy Vector System(Promega)を用いてAPX遺伝子断片をベクタープラスミドに挿入した。すなわち、3 μ lの精製PCR産物をPCRチューブに入れ、最終的に30mM Tris-HCl(pH7.8), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 10% polyethylene glycol(MW8000, ACSgrade), 5ng/ μ l vector, 0.3 Weiss unit/ μ l T4 DNA Ligaseになるように反応液を加え、16°Cで1時間ライゲーション反応を行

A comparison of ascorbate peroxidases from varieties of Adzuki bean

った。反応後、2.5 μ lのベクター溶液を50 μ lのE. coli DH 5 α Competent Cell (TaKaRa)に加え、30分間氷上に静置した。42°Cで45秒間のヒートショックを与え、直ちに氷上で1分間冷却し、500 μ lのSOC溶液を加えて37°Cで1時間振盪培養した。培養菌液は10,000rpm(30秒間)で遠心して集菌し、菌体を再懸濁し、アンピシリン、X-Gal、IPTGを含むLB固体培地に菌液を広げた。37°Cで16時間培養後に白いコロニーを選び、新しいアンピシリン含有のLB固体培地に再び植菌した。

5. サブクローニングとシーケンシング

APX遺伝子断片を含むプラスミドを導入した大腸菌は、50 μ g/mlアンピシリン含有のLB液体培地で37°C、16時間振盪培養した。培養した大腸菌からFlexiPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech)を用いてプラスミドを回収した。すなわち、培養液は13,000rpm(30秒間)で集菌し、菌体に200 μ lのSolution Iを加えて沈殿を溶解した。200 μ lのSolution IIを加えて軽く混和後、200 μ lのSolution IIIを加えて再び混和した。13,000rpmで12分間遠心して得られた上清に400 μ lの2-プロパノールを加え混和後、13,000rpmで25分間遠心して沈殿を得た。沈殿に150 μ lのSephaGlas™ FPを加え、1分間vortex後、13,000rpmで20秒間遠心して上清を除去した。沈殿は200 μ lのWash Buffer、300 μ lの70% EtOHを加えて順次洗浄し、得られた沈殿に52 μ lのDNase free水を加えて溶解した。シーケンシングは北海道システム・サイエンス社に依頼して行った(以下同様)。

6. 3' RACE法および5' RACE法による塩基配列の解析

得られた塩基配列より、GSP (Gene specific primer)を設計し(Table 1.)、それを用いてcDNAを調製して3' RACE法によりAPXの3'末端をクローニングした。3' RACE法は3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen)を用いた。PCRは、94°Cで3分間加熱後、{(94°C, 30秒) → (63°C, 30秒) → (72°C, 1分)}を35サイクル行い、72°Cで5分間保持の条件で行った。3' RACE法の場合と同様にして、アンチセンスのGSP1を設計した(Table. 1)。まず、全RNAを逆転写してアズ

キAPX遺伝子の5'末端までのcDNAを作製し、精製したcDNAにdC-tail付加を行った。このcDNAを用いAPXの5'末端側のクローニングを行った。続いてGSP2でdC-tailed cDNAのPCRを行い、さらにGSP3を用いてnested PCRを行った。5' RACE法は、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen)を用いて行った。PCRは94°Cで3分間加熱後、{(94°C, 30秒) → (55°C, 30秒) → (72°C, 1分)}を35サイクル行い、72°Cで5分間保持の条件で行った。

7. アズキ品種間の遺伝子配列およびアミノ酸配列の解析

アズキ5品種からAPX遺伝子を含むcDNAを調製し、転写開始点より上流の5'側塩基配列を比較検討した。5'側末端の塩基配列はTable 1.に示したプライマーを用いて5' RACE法により求めた。日本DNAデータバンク (DDBJ)が運営するBLASTおよびClustalWや京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンターが運営するMOTIFなどを用いてAPX遺伝子のホモロジー検索やアミノ酸配列の解析を行った。また、ササゲ (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.)、エンドウ (*Pisum sativum* L.)、イチゴ (*Fragaria \times magna* Thuill.)、キュウリ (*Cucumis sativum* L.)、トウガラシ (*Capsicum annuum* L.)、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.)、ミドリムシ (*Euglena gracilis*)、アルカン資化性酵母 (*Yarrowia lipolytica*)のタンパク質の一次構造に基づいて近隣結合法 (NJ法)により分子系統樹を作成した。

結果及び考察

1. アズキAPXの全cDNA塩基配列とタンパク質のアミノ酸配列

RACE法によりアズキAPXの全塩基配列を決定した (Fig. 1)。アズキ (エリモシヨウズ)から調製したAPXの全塩基数は、polyA tailを除いて1,076bpであった。されるアミノ酸数は250、分子量は27,045Daである。APXは、主にシグナル配列の違いから、細胞質型、葉緑体型、ペルオキシソーム型、新型に分類される¹⁹⁾が、

```

1 CTGGGGCTCGTGGTCTGCTCGTGTCACTAGGGTTAACATTCTATTTCTTCTCCAGTTCCA 60
61 AGGTTTCGTTAGCCGGAATCTTTCTCGAAAAATTGATCGTAAGCCATGGGAAATCTTACC 120
      M G K S Y 5

121 CAACCGTCAGCGCCGATTACCAAAAAGGCCTTTGAGAAGGCAAAGAAGAAGCTTAGAGGTT 180
      6 P T V S A D Y Q K A F E K A K K K L R G 25

181 TCATCGCCGAGAAGAGATGCGCTCCTCTGATGCTCCGTTTGGCATGGCACTCTGCTGGTA 240
      26 F I A E K R C A P L M L R L A W H S A G 45

241 CCTTTGATGTTAGCACCAAGACCGGTGGTCCCTTGGGAACCATCAAGCACTCTGCTGAAC 300
      46 T F D V S T K T G G P F G T I K H S A E 65

301 TCGCTCAGGTGCCAACACGGTCTTGATATTGCTGTCACTTTTAGAGCCAATCAAAG 360
      66 L A H G A N N G L D I A V R L L E P I K 85

361 CGGAGTTTCTATCTTGAGCTACGCAGATTCTACCAGTTGGTGGGTTGTGCGAGTTG 420
      86 A E F P I L S Y A D F Y Q L A G V V A V 105

421 AGATAACTGGTGGACCCGAAGTTCCTTTTACCCGGGCAGAGAGACAAGCCAGAACCAC 480
106 E I T G G P E V P F H P G R E D K P E P 125

481 CTCCAGAGGGTCGCTTGCCTGATGCAACCAAGGGTCTGATCACCTTAGGGATGTGTTG 540
126 P P E G R L P D A T K G S D H L R D V F 145

541 GCAAGGCTATGGGCTTAGTGATCAGGATATTGTTGCTCTATCTGGTGGTCACACCATTG 600
146 G K A M G L S D Q D I V A L S G G H T I 165

601 GAGCGGCACACAAGGAGCGATCAGGATTTGAGGGTCCCTGGACCTCAAATCCTTATTT 660
166 G A A H K E R S G F E G P W T S N P L I 185

661 TTGACAACTCATACTTTAAGGAGTTGTTGAGTGGTGAAAAGGAAGTCTCCTTCAGCTGC 720
186 F D N S Y F K E L L S G E K E G L L Q L 205

721 CTTCTGACAAGGCACCTTTTGTGAGATTCCGTATTCCGCCCTCTGTTGAAAAATATGCAG 780
206 P S D K A L L S D S V F R P L V E K Y A 225

781 CGGACGAAGATGCATTTTTTGTGATTACGCAGTTGCTCACAAAAGCTTTCCGAGCTTG 840
226 A D E D A F F A D Y A V A H Q K L S E L 245

841 GGTTCGCTGAAGCCTAATCAACATATAGGCAGTTGGAGATCTAGAAAACAAAAGAAGTGG 900
246 G F A E A *

901 TTTTAAATTCGATGTGAGGATGTGTTTTGTCCCCCTTTATTTTACCATTGGCAAGT 960
960 TGGATTGTTTTTCTTTGTTGTGGTTGATCCTTTTGTAAATAACATTGCTAAGATGC 1020
1021 TAAGAGTAAATGGTTGAACTCATTGGGACCTCACGTTTCTTACGTGCCTACTGGTA 1076

```

Fig. 1 アズキ APX をコードする cDNA の塩基配列とアミノ酸配列 (品種: エリモシヨウズ)

A comparison of ascorbate peroxidases from varieties of Adzuki bean

Adzuki bean	1	MGKSYPTVSADYQKAFKAKKLRGFIAEKRCAPLMRLAWHSAGTFDVS	50
Cowpea	1	MGKSYPTVSADYQKAIEKAKKLRGFIAEKRCAPLMRLAWHSAGTFDVS	50
Soybean	1	MGKSYPTVSADYQKAVEKAKKLRGFIAEKRCAPLMRLAWHSAGTYDVS	50
Pea	1	MGKSYPTVSPDYQKAIEKAKKLRGFIAEKRCAPLMRLAWHSAGTFDVS	50
Adzuki bean	51	TKTGGPFGTIKHSAELAHGANGLDIAVRLLEPIKAEFPLSYADFYQLA	100
Cowpea	51	TKTGGPFGTIKHPAELAHGANGLDIAVRLLEPIKAEFPLSYADFYQLA	100
Soybean	51	SKTGGPFGTIKHPSELAHGANGLDIAVRLLEPLKAEFPLTYADFYQLA	100
Pea	51	TKTGGPFGTIKHQAELAHGANGLDIAVRLLEPIKEQFPVSYADFYQLA	100
Adzuki bean	101	GVVAVEITGGPEVPFHPGREDKPEPPPEGRLPDATKGSDDLDRDVFVKAMG	150
Cowpea	101	GVVAVEITGGPEVPFHPGREDKPEPPPEGRLPDATKGSDDLDRDVFVKAMG	150
Soybean	101	GVVAVEITGGPEVPFHPGREDKPEPPPEGRLPDATKGSDDLDRDVFVKAMG	150
Pea	101	GVVAVEITGGPEVPFHPGREDKPEPPPEGRLPDATKGSDDLDRDVFVKAMG	150
Adzuki bean	151	LSDQDIVALSGGHTIGAAHKERSGFEGPWTSNPLIFDINSYFKELLSGEKE	200
Cowpea	151	LSDQDIVALSGGHTIGAAHKERSGFEGPWTSNPLIFDINSYFKELLSGEKE	200
Soybean	151	LSDRDIVALSGGHTIGAAHKERSGFEGPWTSNPLIFDINSYFKELLSGEKE	200
Pea	151	LSDQDIVALSGGHTIGAAHKERSGFEGPWTSNPLIFDINSYFTELLTGEKD	200
Adzuki bean	201	GLLQLPSDKALLSDSVFRPLVEKYAADEDAFFADYAVAHQKLSLGFVFAEA	250
Cowpea	201	GLLQLPSDKALLSDPVFRPLVEKYAADEDAFFADYAVAHQKLSLGFVFAEA	250
Soybean	201	GLLQLPSDKALLSDPVFRPLVEKYASDEDAFFADYAEAHQKLSLGFVFAEA	250
Pea	201	GLLQLPSDKALLTDSVFRPLVEKYAADEDAFFADYAEHLKLSLGFVFAEA	250

Fig. 2 4種類のマメ科植物 APX のアミノ酸配列

Adzuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et H. Ohashi, アズキ), Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., ササゲ, 16), Soybean (*Glycine max* (L.) Merr., ダイズ, 17), Pea (*Pisum sativum* L., エンドウ, 18)を用いた。

翻訳領域(ORF)は750bpで、非翻訳領域は5'側に105bp, 3'側に222bp含まれていた。アズキAPXの予想アズキAPX遺伝子の一次配列を他の植物のAPXと比較したところ、ササゲ、ダイズおよびエンドウのAPX¹⁶⁻¹⁸⁾とそれぞれ98%, 95%および92%の相同性が見られた(Fig. 2)。これらのAPX遺伝子はすべて細胞質型であることから、アズキAPXも細胞質型と推定している。また、マメ科植物以外では、バラ科のイチゴ、ウリ科のキュウリ、ナス科のトウガラシ、アカザ科のハウレンソウなどのAPX²⁰⁻²³⁾とアズキAPXは80%以上の高い相同性が認められた。さらに単細胞藻類のミドリムシや菌類の酵母のAPX^{24, 25)}とは、それぞれ50%および48%の相同性が認められた。これらの生物のAPX遺伝子を使用した進化系統樹をFig.

3に示した。アズキAPXはマメ科植物APXグループに属し、最もササゲに近いことが示された。アズキはササゲと同じササゲ属に属し、遺伝的背景が類似しているが、原産地や生育北限地、種子の臍形状などの違いから区別されている²⁶⁾。また、APX遺伝子の33番目から44番目付近のアミノ酸配列はこれまで報告のある全ての植物においてよく保存された領域で、アズキAPXにもこの保存領域が認められた。この塩基配列部分は、ペルオキシダーゼの活性中心に関連のあることが報告されている^{27, 28)}。また、APXは植物に特有の遺伝子と考えられているが、植物のAPX保存塩基配列部分を持つ動物の遺伝子も見つかっており²⁹⁾、今後の展開に期待される。

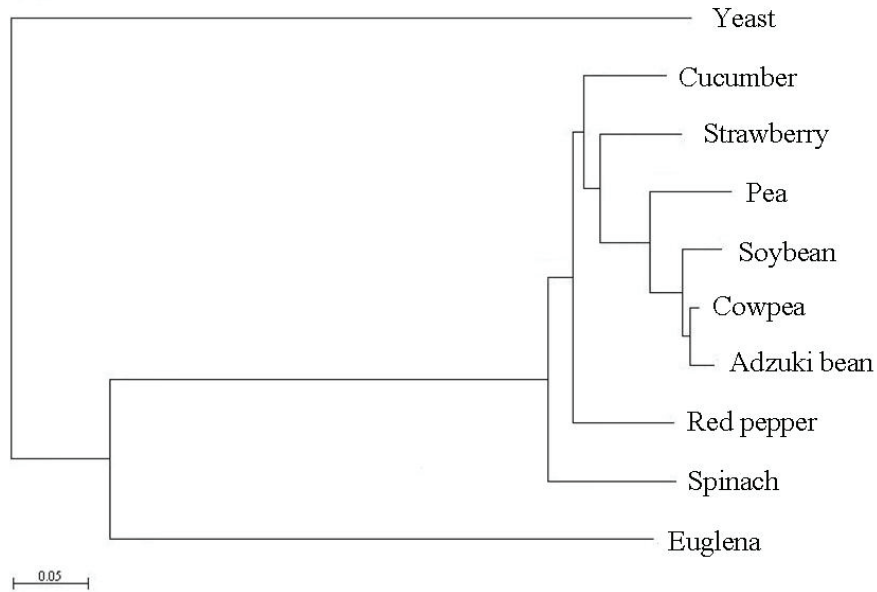


Fig. 3 10種類の植物APXアミノ酸配列に基づく近隣結合法 (NJ法) による分子系統樹

4種類のマメ科植物; Adzuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et H. Ohashi, アズキ), Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., ササゲ, 16), Soybean (*Glycine max* (L.) Merr, ダイズ, 17), Pea (*Pisum sativum* L., エンドウ, 18), 他は1種類ずつでバラ科; Strawberry (*Fragaria × magna* Thuill., イチゴ, 20), ウリ科; Cucumber (*Cucumis sativum* L., キュウリ, 21), ナス科; Red pepper (*Capsicum annum* L., トウガラシ, 22), アカザ科; Spinach (*Spinacia oleracea* L., ホウレンソウ, 23), ユーグレノゾア; Euglena (*Euglena gracilis*, ミドリムシ, 24), 真菌類; Yeast (*Yarrowia lipolytica*, アルカン資化性酵母, 25) を用いた。

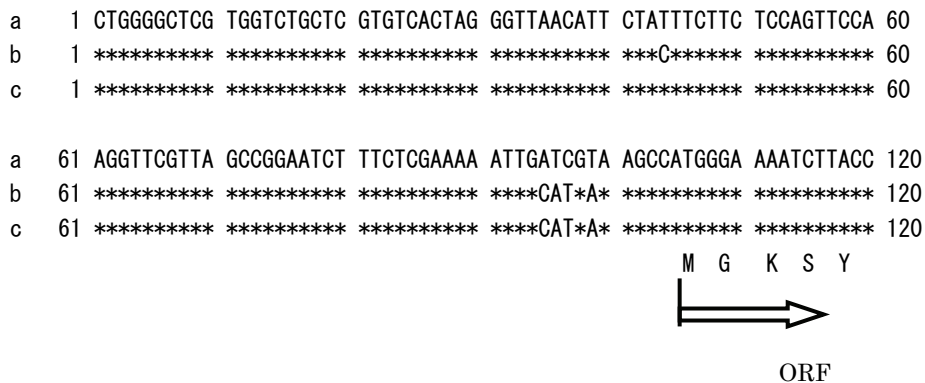


Fig. 4 アズキ 5 品種の APX 遺伝子を含む cDNA5' 上流域の塩基配列

a: エリモシヨウズ, b: アカネダイナゴンおよびサホロシヨウズ, c: 斑小粒系-1 およびトヨミダイナゴン

A comparison of ascorbate peroxidases from varieties of Adzuki bean

2. アズキ品種間の APX 転写制御領域の比較

細胞質型APXにはAPX₁とAPX₂が存在し、シロイヌナズナやイネAPX₁の転写領域にはHSF (heat shock factor) 結合モチーフが存在すること^{30, 31)}や同植物のAPX₂は光ストレスやH₂O₂により誘導される^{32, 33)}ことが報告されている。船附らは、数種類のダイズ品種に含まれるAPXを比較してAPX₁の欠失した品種のあることやその品種の耐冷性が強いことを報告している³⁴⁾。しかし、品種間でのAPX転写領域配列の特徴については調べていない。

現在広く栽培されている「エリモショウズ」、比較的耐冷性の強い品種である「アカネダイナゴン」と「サホロショウズ」、および耐冷性の弱い品種の「斑小粒系-1」、その中間の耐冷性である「トヨミダイナゴン」のアズキ5品種のAPX転写制御領域を含むORF上流側の配列を比較したところ、品種間における転写制御領域の配列は95%以上が相同であった(Fig. 4)。しかし、エリモショウズのAPX遺伝子ORFから5'末端側6-10番目の塩基配列は“TGCTA”であったが、その他の4品種の配列は“AGTAC”で異なっていた。また、エリモショウズ、斑小粒系-1およびトヨミダイナゴンのAPX遺伝子ORFから5'末端側61番目の塩基は“T”であったが、アカネダイナゴンおよびサホロショウズのそれは“C”と異なっていた。エリモショウズとそれ以外の品種間や、出芽期の耐冷性の強い品種とそれ以外の品種間にAPX遺伝子5'末端側塩基の一部に違いが見られたが、この塩基配列の違いはアズキ品種の個性を示すことに関係しているのかもしれない。

今回単離したアズキAPXは、APX₂型と相同性が高く生育環境因子により発現誘導に違いが期待されることから、各品種におけるAPXのmRNA発現量の違いについても今後検討したい。

謝辞：この研究は日本豆類基金協会の資金援助を受け、帯広畜産大学21世紀COEプログラム研究の一環として行った。また、アズキ品種は、北海道立十勝農業試験場小豆・菜豆科より分譲していただき、APX遺伝子の解析は、北海道農業研究センター、地域基盤研究部の船附秀行氏および佐藤裕氏にご教授いただきました。ここに深

く感謝いたします。

引用文献

1. 村田吉平(1997) 小豆の耐冷性育種の成果と展望. *北海道立農業試験場資料* 第27号 48-56.
2. 新免輝夫(1991) 現代植物生理学 環境応答.
3. 寺島一郎(1992) 低温による光合成器官の損傷及び修復. *植物細胞工学会誌* 4 : 311-318.
4. 佐藤直樹(1994) 低温適応の分子機構と耐低温性植物の作出. *植物細胞工学会誌* 6 : 12-17.
5. Foyer, C. H., Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133 : 21-25.
6. Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22 : 867-880.
7. Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase — a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85 : 235-241.
8. Jimenez, A., Hernandez, J. A., Del Rio, L. A., Sevilla, F. (1997) Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiol.* 114 : 275-284.
9. Asada, K. (1999) THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygen and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 : 601-639.
10. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*(Second Edition).
11. 何寧, 太野友和, 小嶋道之 (2005) 低温と光がアズキ実生の抗酸化酵素活性に与える影響. *帯広畜産大学学術研究報告* 26 : 21-25.
12. 李進才, 松井鑄一郎 (2001) 低温処理が *cattleya* と *cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性に及ぼす影響. *園学雑誌* 70 : 360-365.
13. 瓜谷郁三 (2001) ストレスの植物生化学・分子生物学.

14. Kudo, A., Aono, M., Nakajima, N., Saji, H., Tanaka, K., Kondo, N. (1999) Differential Responses in Activity of Antioxidant Enzyme to Different Environmental Stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **112** : 279-290.
15. Matsumura, T., Tabayashi, N., Kamagata, Y., Souma, C., Saruyama, H. (2002) Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Physiologia Plantarum* **116** : 317-327.
16. Mittler, R., Zilinskas, B. A. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS* **289** : 257-259.
17. Ferrari-Iliou, R., Zuily-Fodil, Y., D'Arcy-Lameta, A., Pham Thi, A. T. (1996) DDBJ accession No. U61379.
18. Caldwell, C. R., Turano, F. J., McMahon, M. B. (1998) Identification of two cytosolic ascorbate peroxidase cDNAs from soybean leaves and characterization of their products by functional expression *E. coli*. *Planta* **204** : 120-126.
19. Teixeira, F.K., Menezes-Benaventa, L., Galvao, V.C., Margis, R. and Margis-Pinheiro, M. (2006) Rice Ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* **6** : 1-15.
20. Kim, I. J., Lee, B.H., Jo, J., Chung, W. I. (2001) Sequence variability of nine cytosolic ascorbate peroxidases in polyploid strawberry. *DNA Seq.* **11** : 475-484.
21. Amako, K., Sano, S., Miyake, C., Cao, W., Asada, K. (1996) DDBJ accession No. D88649-1.
22. Yoo, T.H., Park, C.-J., Lee, G.-J., Shin, R., Yun, J.-H., Kim, K.-J., Rhee, K.-H., Paek, K.-H. (2002) A hot pepper cDNA encoding ascorbate peroxidase is induced during the incompatible interaction with virus and bacteria. *Mol. Cells* **14** : 75-84.
23. Webb, R. P., Allen, R. D. (1995) Isolation and Characterization of a cDNA for Spinach Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *Plant Physiol.* **108** : 1325.
24. Ishikawa, T., Rapolu M. (2002) DDBJ accession No. AB077953-1
25. Genoscope (2004) DDBJ accession No. CR382130-174.
26. 海妻矩彦, 喜多村啓介, 酒井真次 (2003) 食用マメ類の科学 現状と展望.
27. Patterson, W. R., Poulos, T. L. (1995) Crystal Structure of Recombinant Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *Biochemistry* **34** : 4331-4341.
28. Zhang, H., Wang, J., Nickel, U., Allen, R. D., Googman H.M. (1997) Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology* **34** : 967-971.
29. Wada, N., Kinoshita, S., Matsuo, M., Amako, K., Miyake, C., Asada, K. (1998) Purification and molecular properties of ascorbate peroxidase from bovine eye. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **242** : 256-261.
30. Storozhenko, S., Pauw, P.D., Montagu, M.V., Inze, D., and Kushnir, S. (1998) The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis* APX1 gene promoter. *Plant Physiol.* **118** : 1005-1014.
31. Sato, Y., Murakami, T., Funatsuki, H., Matsuba, S., Saruyama, H. and Tanida, M. (2001) Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedling. *J. Exp. Bot.* **354** : 145-151.
32. Karpinski, S., Reynolds, H., Karoinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. and Mullineaux, P. (1999) Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284** : 654-657.
33. Morita, S., Kaminaka, H., Masumura, T., and Tanaka, K. (1999) Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling. *Plant. Cell Physiol.*, **40** : 417-422.
34. Funatsuki, H., Kurosaki, H., Murakami, T., Matsuba, S., Kawaguchi, K., Yumoto, S. and Sato, Y. (2003) Deficiency of a cytosolic ascorbate peroxidase associated with chilling tolerance in soybean. *Theor. appl. Genet.* **106** : 494-502

ABSTRACT

The nucleotide sequence was determined for a cDNA encoding Adzuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) et H. Ohashi; var. Erimoshouzu] ascorbate peroxidase (VaAPX). VaAPX detoxifies peroxide, a cytotoxin, using ascorbate as a substrate. The VaAPX open reading frame was 1,076bp, from which the number of amino acids and the molecular weight were inferred to be 250 and ca. 27,000Da, respectively. The Adzuki bean APX had 98% amino acid homology with cowpea, 95% with soybean, and 92% with pea. In addition, cDNAs coding for APX were prepared from initial leaves of five different varieties of Adzuki beans were compared. The result revealed the following: (1) the sequence of var. Erimoshouzu at bases 6-10 upper from the Open Reading Frame (ORF) of APX gene was "TGCTA", whereas those of the other four varieties were "AGTAC" and (2) vars. Erimoshouzu, Buchisyouryukei-1, and Toyomidainagon had a "T" at base 61, whereas vars. Akanedainagon and Sahoroshouzu had a "C".

Keyword : Ascorbate peroxidase(APX), Ascorbie acid,cDNA,
Adzuki bean