

今回、高等植物や微細藻類のAOS代謝に関して、国内外で先進的な研究をされている若い研究者の方々に執筆をお願いした。したがって、本会員の方々が、各稿それぞれの現状と今後の展望を理解していただき、この分

野に少しでも興味を抱かれ、今後のご研究の参考になれば、この特集の目的を果たす。ご一読後、ご意見やご質問をメールを介してそれぞれの執筆者に戴ければ幸いです。

植物オルガネラにおける活性酸素生成

嶋岡 泰世¹・三宅 親弘²

植物は動物と異なり、光合成により自ら酸素を発生する。そのため、植物細胞内の酸素濃度は非常に高い。また、植物は光エネルギーを吸収することができ、細胞内に高い還元力が存在する。このようなことから想像できるように植物は非常に高い活性酸素生成能力をもつ生物である。実際、植物において活性酸素は乾燥、強光、低温などのさまざまな環境ストレス条件下で生成されるのはもちろんのこと、通常の生理条件下においても多く生成されている。中でも、葉緑体は活性酸素の生成速度が大きい。本稿では、植物細胞内、特に活性酸素生成量の多い葉緑体とその他のオルガネラとしてミクロボディー、ミトコンドリアを挙げ、それらのオルガネラにおける活性酸素生成メカニズムについて述べる。

1. 葉緑体における活性酸素生成

1.1. 葉緑体で生成される活性酸素種とその生成機構

葉緑体は植物細胞内で最も活性酸素が生成されるオルガネラである。葉緑体に光が照射されると、光化学系IIにおいて、水の光酸化が起こり、電子が生じる。この電子は光合成電子伝達系を流れ、最終的にはフェレドキシンNADP⁺レダクターゼ(FNR)からNADP⁺に渡される。ここで生じたNADPHはCO₂固定、光呼吸、硝酸還元に使われるが、これらの代謝系によって電子が完全に消費されないと、光化学系IIで1重項酸素(¹O₂)が生じる。^{1,2)} 1重項酸素はPSIIのD1タンパク質の分解を引き起こし、これにより植物は光阻害を受ける。光阻害を防ぐために、植物葉緑体ではこの過剰な電子を酸素に渡すことにより消費している(Fig. 1)。このとき、O₂⁻が生成されるが、電子を酸素に渡すメディエーターとして機能しているタンパク質はいまだ同定されていない。現在までのところ、フェレドキシン、FNR、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(MDAR)といったフラビンタンパク質がその候補として考えられている。³⁻⁵⁾ O₂⁻はO₂⁻ジスムターゼ(SOD)によってH₂O₂に分解された後、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ

(APX)によって水に分解される。APX反応で酸化されたアスコルビン酸(AsA)もまた、水の光酸化により生じた電子の一部を使ってAsAに再還元される。⁶⁾ このように、葉緑体では過剰な電子は水から水への電子伝達反応(water-water cycle)によって消費される。water-water cycleでは活性酸素が生成するが、これらの活性酸素はwater-water cycleを構成する酵素群により速やかに分解されるため、通常の生理条件下では細胞に傷害を与えることはない。

1.2. アスコルビン酸再生系が葉緑体での活性酸素生成に及ぼす影響 APX反応でAsAは酸化され、モノデヒドロアスコルビン酸(MDA)ラジカルに酸化される。MDAはMDARや還元型フェレドキシンによって、AsAに再還元される。また、一部のMDAは自発的不均化により、AsAとデヒドロアスコルビン酸(DHA)に変換される。DHAはデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(DHAR)とグルタチオンレダクターゼ(GR)の共役反応により、AsAに再還元される。これらのAsA再生反応もまたwater-water cycleの一部であり、MDAやDHAからAsAへの再還元はいずれの場合も光化学系IIでの水の光酸化により生じた電子を用いることにより行われる(Fig. 1)。⁶⁾ 通常の自然環境条件では、光化学系Iにおいて酸素に伝達される電子は光合成電子伝達系を流れる全電子の約10%である。water-water cycleのストイキオメトリー(Fig. 1)からAsA再生に使われる電子もまた、光合成電子伝達系を流れる全電子の約10%であると考えられる。つまり、AsA再生系への電子の流れは、葉緑体での活性酸素生成に密接に関与していると考えられる。しかし、AsA再生を担うタンパク質が単離されておらず、AsA再生と葉緑体での活性酸素生成の関係は明らかにされていない。最近、著者らはAsAの再生に不可欠なDHARをハウレンソウ葉緑体から単離精製した。⁷⁾ ここで、ハウレンソウ葉緑体DHARの酵素化学的性質と葉緑体がもつDHAR活性からDHARと活性酸素生成の関係について議論することにする。

著者紹介 ¹(財)地球環境産業技術研究機構植物分子生理研究室(研究員) 〒619-0292 京都府相楽郡木津町木津川台9-2

TEL. 0774-75-2307 FAX. 0774-75-2320 E-mail: taisse@rite.or.jp

²九州大学大学院生物資源環境科学府植物機能利用学講座(助教授) 〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

TEL/FAX. 092-642-4424 E-mail: cmiiyake@brs.kyushu-u.ac.jp

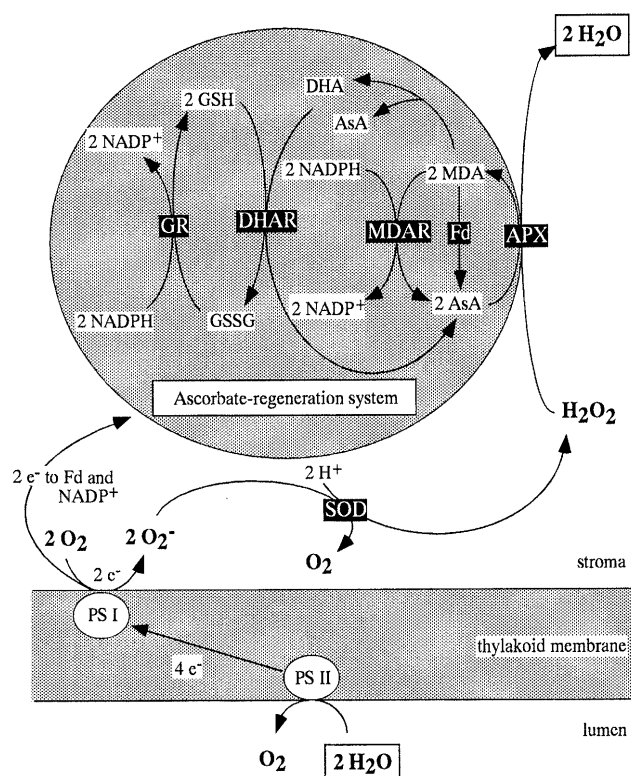


Fig. 1. Generation of active oxygen species and the scavenging system in chloroplasts (water-water cycle). SOD, superoxide dismutase; APX, ascorbate peroxidase; Fd, ferredoxin; MDAR, monodehydroascorbate reductase; DHAR, dehydroascorbate reductase; GR, glutathione reductase; AsA, ascorbate; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; PS I, photosystem I; PS II, photosystem II.

ハウレンソウ葉緑体における DHAR の最大活性は $75 \mu\text{mol/mg Chl/h}$ と見積もられた。⁷⁾ この DHAR 活性は著者らがボツワナ原産の野生種スイカを用いた解析から見積もられた DHA の最大生成速度の半分であった。葉緑体では大部分の MDA は MDAR や還元型フェレドキシンによって AsA に還元されると考えられているため、MDA の 10% が不均化により DHA に変換されるとすると、葉緑体での DHA 生成速度は $15 \mu\text{mol/mg Chl/h}$ 程度と見積もることができ、これはハウレンソウ葉緑体に含まれる DHAR 活性の 20% に相当する。つまり、葉緑体 DHAR は通常の生理条件では十分量存在すると考えられる。著者らは葉緑体 DHAR の機能について、より詳細な解析を行うために、ハウレンソウ葉緑体 DHAR の反応機構の解析を行った (Fig. 2)。定常状態での反応速度論解析から、ハウレンソウ葉緑体 DHAR の活性が AsA によって阻害されることが分かった (Shimaoka *et al.* unpublished)。DHAR 活性は 1 mM GSH , 0.1 mM DHA に 10 mM AsA が存在する場合で

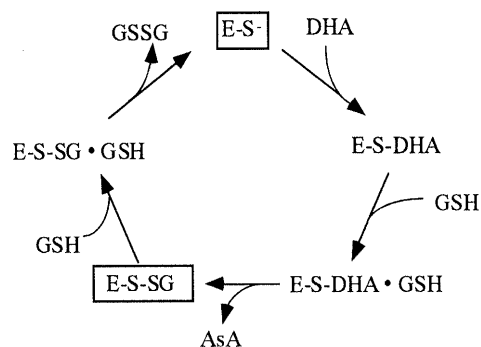


Fig. 2. Catalytic mechanism of chloroplast DHAR from spinach leaves. E-S- is the reduced form of the enzyme and E-S-SG is the oxidized form of the enzyme. GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione.

約 30%, 20 mM AsA 存在下では約 60% 低下した。葉緑体内には $12\text{--}25 \text{ mM}$ の AsA が存在することから、この AsA による DHAR の活性阻害は無視できない。先に述べた葉緑体における DHAR 活性から考えると、通常の生理条件では仮に DHAR 活性の 60% が阻害されたとしても問題はない。しかし、酸化ストレスなどにより DHA の生成速度が上昇すると、DHAR によって DHA を完全に AsA に再生することができなくなると考えられる。そのような場合、DHA は光合成を行っている葉緑体ストロマの pH (約 8) では容易に分解されるため、葉緑体内での AsA プールが減少すると考えられる。葉緑体内の AsA 濃度が低下すると、APX が機能できなくなる。そのことにより、葉緑体内の H_2O_2 濃度が上昇し、 H_2O_2 に対して感受性の高い APX は失活することになる。APX の失活は MDAR、フェレドキシン、DHAR, GR からなる AsA 再生系への電子の流れを遮断することになり、結果として、通常の生理条件では AsA 再生系によって消費されていた電子が余剰となると考えられる。この余剰となった電子が活性酸素生成に用いられ、より活性酸素生成速度が大きくなることが予想される。

2. ミクロボディーでの活性酸素生成

2.1. ペルオキシソームでの活性酸素生成 植物にはペルオキシソームとグリオキシソームの 2 つの機能的に異なるミクロボディーが存在する。ペルオキシソームは葉緑体、ミトコンドリアと連携して光呼吸系を構成している。光呼吸では、葉緑体で生成されたグリコール酸はペルオキシソームに移行し、そこで、グリコール酸オキシダーゼの触媒によって、グリオキシル酸に変換される (Fig. 3)。この反応において H_2O_2 が生じる。⁸⁾ このと

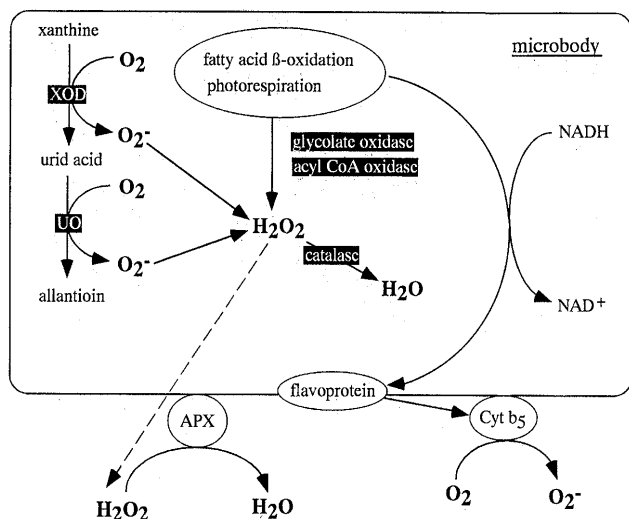


Fig. 3. Generation of active oxygen species in microbody. XOD, xanthine oxidase; UO, urate oxidase.

き生じた H_2O_2 はペルオキシソーム内に多量に存在するカタラーゼによって分解される。ペルオキシソームには膜に結合した APX が存在することが報告されているが、この APX は細胞質側に露出しており、ペルオキシソーム内での H_2O_2 の分解には寄与しておらず、ペルオキシソームから漏れ出してきた H_2O_2 を分解していると考えられている。⁹⁾ ここで述べたペルオキシソームにおける H_2O_2 生成もまた、通常の生理条件下では細胞に傷害を与えることはないと考えられる。むしろ、光呼吸は葉緑体での water-water cycle と同様に過剰な光エネルギーを散逸するには欠かせない代謝系と考えられている。

また、ペルオキシソームのマトリックスと膜では O_2^- が生成される (Fig. 3)。ペルオキシソームの可溶性画分にはキサンチンオキシダーゼ活性が存在することから、マトリックスに存在するキサンチンオキシダーゼにより、 O_2^- が生成されることが考えられる。また、膜画分では O_2^- の不均化により生じたと考えられる NADH に依存した H_2O_2 生成が見られ、この O_2^- はペルオキシソームの膜に存在するシトクロム b_5 を介して生成されることが考えられている。

2.2. グリオキシソームでの活性酸素生成 グリオキシソームでは脂肪酸の β 酸化に関与しているアシル CoA オキシダーゼの反応において H_2O_2 が生成される。⁸⁾ この H_2O_2 もまた、カタラーゼにより分解される (Fig. 3)。

グリオキシソームでもまた、 O_2^- が生成される。スイカの子葉のグリオキシソームを用いた実験において、キ

サンチンに依存した H_2O_2 生成 (これは O_2^- の不均化により生じると考えられている) が認められている。また、そこにはキサンチンオキシダーゼ活性が存在することから、キサンチンオキシダーゼの触媒により、 O_2^- が生成されることが明らかとなっている。また、マイクロボディには尿酸オキシダーゼが存在することから、尿酸オキシダーゼの触媒によっても O_2^- が生成されることが考えられる。

3. ミトコンドリアにおける活性酸素生成

ミトコンドリアはエネルギー代謝には欠かせないオルガナラである。ミトコンドリアでの活性酸素生成はミトコンドリアの呼吸鎖において起こる。ミトコンドリアの呼吸鎖で消費される酸素の 2% 程度が O_2^- に変換される。 O_2^- は SOD や自発的不均化により H_2O_2 に変換される。

ミトコンドリアでの主な O_2^- の生成部位は呼吸鎖の complex I (NADH デヒドロゲナーゼ複合体) と complex III (シトクロム bc_1 複合体) である。complex III での O_2^- 生成はプロトン勾配が大きく、呼吸速度が ADP によって律速されているときに生じるユビセミキノンから酸素に電子が伝達されることにより起こる。エンドウマメの茎から単離したミトコンドリアにおいて、complex I や complex II (コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体) の基質であるリンゴ酸とグルタミン酸やコハク酸の酸化が植物ミトコンドリアでの H_2O_2 生成 (これらの H_2O_2 は O_2^- の不均化により生じたものである) に関与していることが報告されている。¹⁰⁾ コハク酸の酸化に依存した H_2O_2 生成速度はリンゴ酸とグルタミン酸の酸化に依存した H_2O_2 生成よりも 1 オーダー高く、コハク酸の酸化に依存した H_2O_2 生成は complex III のレベルで起こっていると考えられている。また、リンゴ酸とグルタミン酸の酸化に依存した H_2O_2 生成は、non-coupled respiration によって抑制される。non-coupled respiration では、ビルビン酸によって活性化されたミトコンドリア内膜に存在する alternative オキシダーゼが酸素を消費するために活性酸素の生成が抑制されることが考えられる。さらに、complex II でのコハク酸の酸化に依存した H_2O_2 生成は non-coupled respiration と uncoupled respiration の両方によって抑制されることが考えられている。uncoupled respiration ではミトコンドリアの呼吸速度が上昇し、そのことによりユビセミキノンの寿命が低下し、complex III でのユビセミキノンから酸素への電子伝達が抑制されるため、活性酸素生成が減少するものと考えられている。¹¹⁾

おわりに

活性酸素は植物のさまざまなオルガネラにおいて生成される。これらの活性酸素は植物が乾燥や強光、低温、高温といった環境ストレスにさらされたときには当然、多く生成され、速やかに消去されないと、細胞に傷害を与える。しかし、通常の生理条件下においても、本稿で述べたように活性酸素は生成されている。そのような通常の生理条件下で生じる活性酸素は植物がもつ活性酸素消去系により速やかに分解され、細胞に傷害を与えることはない。むしろ、通常の生理条件下での活性酸素生成は植物にとってプラスの効果をもたらすものと考えられる。実際、葉緑体の water-water cycle やペルオキシソームのグリコール酸経路は過剰な電子を散逸するのに欠かすことができない代謝系である。

このように、植物における活性酸素生成系は両刃の剣であり、現在盛んに研究が行われている酸化ストレス耐性植物の作製では活性酸素生成のプラスの効果とマイナ

スの効果のバランスをうまく取ることを考えていく必要があるだろう。

文 献

- 1) Hideg, É. *et al.*: *Photosynth. Res.*, **39**, 191 (1994).
- 2) Mishra, N. P. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1186**, 81 (1994).
- 3) Furbank, R. T. and Badger, M. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 400 (1983).
- 4) Goetze, D. C. and Carpentier, R.: *Can. J. Bot.*, **72**, 256 (1993).
- 5) Miyake, C. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **39**, 821 (1998).
- 6) Asada, K.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 601 (1999).
- 7) Shimaoka, T. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1110 (2000).
- 8) Río, L. A. *et al.*: *Free Radical Bio. Med.*, **13**, 557 (1992).
- 9) Yamaguchi, K. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **36**, 1157 (1995).
- 10) Braidot, E. *et al.*: *FEBS Lett.*, **451**, 347 (1999).
- 11) Kowaltowski, A. J. *et al.*: *FEBS Lett.*, **425**, 213 (1998).

光合成生物の酸化ストレス防御系

石川 孝博¹・吉村 和也²

酸素発生型光合成生物の細胞内酸素濃度 (250 μ M 以上) は、哺乳動物のミトコンドリア内の酸素濃度 (0.1 μ M) と較べてもはるかに高いため、活性酸素種 (AOS) が容易に生成しやすい状況にある。さらに植物は移動の自由がないため、時々刻々と変動する環境条件や、強光、低/高温、乾燥などのさまざまな環境ストレスにより AOS の生成が増大した時、酸化ストレスによる細胞障害から身を守るためにきわめて巧妙な防御システムを発達させている。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) は、西洋ワサビペルオキシダーゼに代表される典型的な植物ペルオキシダーゼと異なり、細胞内に多量に存在するアスコルビン酸 (AsA) を特異的に利用する抗酸化酵素であり、酸化ストレス防御系の中心として機能している。また、APX への安定した還元力供給のため、反応の結果生成する酸化型 AsA のグルタチオン (GSH) を利用した再還元系 (AsA/GSH サイクル; モノデヒドロ AsA 還元酵素, デヒドロ AsA 還元酵素, GSH 還元酵素) の存在も重要である。微細藻類では APX を含めた AOS 消去機構に加え、光合成炭素還元系が H₂O₂ 耐性を示すことで酸化ストレス下においても正常な光合成能力を維持している。本稿では、光合成生物の酸化ストレ

ス防御系について AOS 消去機構を中心に紹介する。

1. 高等植物の酸化ストレス防御系

高等植物では、酸化ストレス防御系として AOS 発生源となる各オルガネラや細胞質に AOS 消去機構が発達している。葉緑体の H₂O₂ 生成速度は約 2.1 mM/s と見積もられており、低濃度 (10 μ M) の H₂O₂ はカルビン回路を構成するフルクトース-1,6-ビスフォスファターゼ (FBPase), グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH), フォスホリブロキナーゼ (PRK) などのチオール酵素を酸化し、光合成活性を約 50% 失活させるため、防御系がすぐに機能しないとただちに光合成はストップし、植物にとって死活問題となる。このため葉緑体には、APX アイソザイムがチラコイド膜上とストロマに存在している (Fig. 1).^{1,2)} 光化学系 I (PSI) で生成した O₂⁻ は、PSI 複合体と接着した Cu/Zn 型 SOD によって H₂O₂ に変換され、チラコイド膜に結合した APX (tAPX) によって安全な水へと還元される。ストロマでは、SOD とストロマ型 APX (sAPX) を含めた AsA/GSH サイクルが O₂⁻ と H₂O₂ を消去する。葉緑体では AsA/GSH サイクルに加え、チラコイド膜上のフェ

著者紹介 ¹ 島根大学生物資源科学部生命工学科 (助教授) 〒690-8504 松江市西川津町1060

TEL. 0852-32-6580 FAX. 0852-32-6092 E-mail: ishihawa@life.shimane-u.ac.jp

² 近畿大学農学部食品栄養学科 (研究員) 〒631-8505 奈良市中町3327-204

TEL. 0742-43-7273 (内線 3417) FAX. 0742-43-2252 E-mail: gs996003@nara.kindai.ac.jp