

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), フォスホリブプロキナーゼ (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

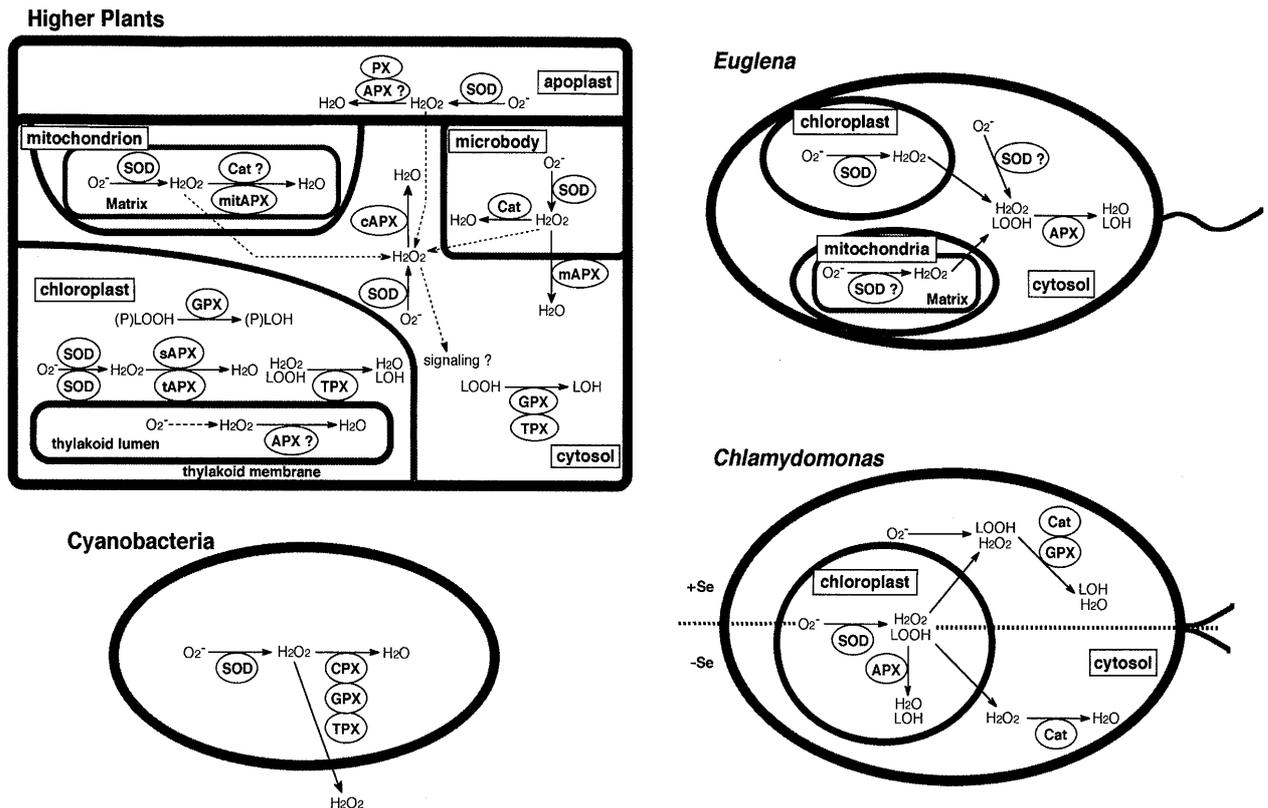


Fig. 1. Comparison of the distribution of antioxidative enzymes in photosynthetic organisms. The abbreviations are indicated in the text.

レドキシソ (Fdx) もモノデヒドロ AsA を還元する。このように葉緑体ではチラコイド膜とストロマに二重の防御系を発達させて、AOS による酸化ストレス障害を未然に防いでいる。最近、チラコイド膜ルーメン側にも APX の存在が示唆され、葉緑体で機能する新たな APX かどうか興味を持たれる。³⁾

葉緑体には APX 以外にも、動物などの主要な抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) とチオレドキシソペルオキシダーゼ (TPX) の存在が報告されている。植物 GPX はストロマに局在すると考えられており、動物のリン脂質ヒドロペルオキシド特異的 GPX (PHGPX) に相同性が認められるが、活性中心はセレンシステイン (Sec) ではなくシステイン (Cys) である。そのため植物 GPX の触媒作用は低く、シトラス GPX は動物 PHGPX 活性の 0.2% 程度であり、 H_2O_2 はほとんど基質にしない。⁴⁾ TPX はチオレドキシソ (Trx) と供役するペルオキシダーゼでペルオキシレドキシソとも呼ばれ、N 末端側と C 末端側に保存された 2 つの Cys 残基を持つ 2 Cys タイプと C 末端側の Cys 残基を欠く 1 Cys タイプが存在し、 H_2O_2 とアルキルヒドロペルオキシドを還元する。葉緑体には前者の TPX がチラコイド膜上のストロマ側に局在しており、Fdx/Trx を介し

た光合成電子伝達系とカップルして過酸化物を還元すると考えられている。⁵⁾ 植物 APX はアルキルヒドロペルオキシドを還元できないため、葉緑体では APX が H_2O_2 、GPX と TPX が脂質過酸化物の消去を役割分担して酸化ストレス防御に機能している。

ペルオキシゾームと発芽種子などの貯蔵組織に存在するグリオキシゾームはマイクロボディーと総称されている。マイクロボディーの H_2O_2 消去は、これまでカタラーゼ (Cat) が機能していると考えられてきたが、マイクロボディー型 APX (mAPX) の発見によって AOS 消去機構に新たな知見が加わった。mAPX はマイクロボディー膜に結合して細胞質側に局在し、 H_2O_2 の還元を行っていた。Cat は H_2O_2 に対する親和性 (K_m ; >100 mM) が低いため、mAPX (K_m ; $74 \pm 4.0 \mu M$) はマトリックス内の Cat と共同してオルガネラ外に漏出した H_2O_2 の消去に機能している。⁶⁾ マイクロボディー局在のペルオキシダーゼは植物以外には知られていない。

植物ミトコンドリアではマトリックス内の Mn 型 SOD 以外に、AOS 消去酵素の存在に関しては長らく不明であったが、最近ジャガイモ塊茎のミトコンドリアから APX (mitAPX) が精製された。⁷⁾ mitAPX はマトリックスもしくは内膜に結合した形で局在しているようであ

る。しかし、mitAPX の cDNA や遺伝子はまだ単離されていない。植物ミトコンドリア内膜には AsA 生合成の最終段階を触媒するガラクトノ- γ -ラクトン脱水素酵素が局在しており、⁸⁾ 今後 AsA/GSH サイクルを含めて植物ミトコンドリアの AOS 消去系の全貌が明らかになることが期待される。

細胞質には APX アイソザイム (cAPX) が通常 2 種類以上存在し、AsA/GSH サイクルを構成している。細胞質内における cAPX アイソザイムの局在性や生理的意義は明らかになっていないが、後述のように酸化ストレス応答に重要な役割を果たしていることが示唆される。また細胞質には GPX や 1 Cys タイプの TPX の存在も知られている。これら多数の抗酸化酵素や AsA/GSH サイクル構成酵素がアイソザイムとして細胞内の至る所に存在している事実は、植物細胞における酸化ストレス防御系の重要性を示している。

2. 植物におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼアイソザイムの特性

2.1. APX アイソザイムの特徴 APX の最も特筆すべき特徴として、AsA 非存在下での不安定性があげられる。これは APX の反応中間体 Compound I の H₂O₂ による失活に起因しており、充分量の AsA (20 μ M >) が存在しないとき、 μ M レベルの AsA の自動酸化で生成する mM レベルの H₂O₂ によって失活・分解する。¹⁾ 失活の半減期は cAPX および mAPX では数時間、葉緑体型 APX では 60 秒以内である。葉緑体に大腸菌由来のカタラーゼ (*KatE*) を導入した形質転換タバコを用いた研究から、葉緑体型 APX のこの不安定性が乾燥/強光の複合ストレスによる初期段階での酸化ストレス障害の一因であることが示された。⁹⁾ 葉緑体型 APX の不安定性が植物細胞内で生理的意義を持ちうるかは興味ある問題である。

2.2. APX アイソザイムのストレス応答 筆者らは、APX アイソザイムの酸化ストレス応答について検討した。ホウレンソウに様々なストレスを付与したとき、強光とパラコート条件下でのみ cAPX の発現が mRNA レベルで誘導されたが、他のアイソザイムの有意な変動は認められなかった。¹⁰⁾ シロイヌナズナ cAPX も、強光ストレスに対して迅速に発現応答する。¹¹⁾ 細胞内での AOS の生成の場を考慮すると、葉緑体型 APX ではなく cAPX が発現応答することの生理的意義はまだはっきりしない。しかし、細胞質は AOS 発生源である各オルガネラと核との唯一の情報伝達の間であるため、cAPX の

応答は、シグナルとしての H₂O₂ の機能と密接な関係があると思われる。興味深いことに、病原菌感染時のタバコでは cAPX の発現が翻訳レベルで一時的に抑制されており、結果として細胞内 H₂O₂ 濃度の上昇がもたらされ、プログラム細胞死を誘導するオキシダティブーストを導いていた。¹²⁾ したがって、APX は防御系としての役割のみならず、積極的に H₂O₂ 濃度をコントロールすることで、ストレス応答時の細胞内レドックス制御の鍵酵素としても機能していると考えられる。

2.3. 葉緑体型 APX の選択的スプライシング 最近、筆者らはホウレンソウ葉緑体型 APX が選択的スプライシングによって転写後調節されることを見いだした。¹³⁾ 葉緑体型 APX アイソザイムは単一の遺伝子 (*APX II*) にコードされており、選択的ポリアダニレーションと選択的スプライシングにより 3' 側の構造が異なる 3 種類の sAPX をコードする mRNA (sAPX-I, -II, -III) および 1 種類の tAPX をコードする mRNA (tAPX -I) が生成し、それぞれの mRNA から sAPX および tAPX タンパク質が合成されていた (Fig. 2)。sAPX と tAPX の相違点は C 末端側のチラコイド膜結合ドメインの有無のみであり、高等植物は選択的スプライシング機構により葉緑体型 APX アイソザイムの局在化を合理的に決定していたのである。高等植物では選択的スプライシングによる発現制御に関する情報は少なく、3' 末端エキソンの選択的スプライシングによって一つのオルガネラに局在性の異なるアイソザイムを発現し、それらの生理的役割が明確になっている例はほとんどない。ホウレンソウ葉緑体型 APX と同じ遺伝子構造はカボチャ、タバコ、耐塩性植物アイスプラントでも認められる。一方、シロイヌナズナの葉緑体型 APX アイソザイムは別々の遺伝子にコードされている。また、真核藻類クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の葉緑体には tAPX は存在せず、sAPX のみが認められている。生物間における葉緑体型 APX の発現機構の違いが活性酸素消去や環境適応能にどのような影響を与えているのか興味深い問題である。

3. 微細藻類の酸化ストレス防御系

3.1. 真核藻類の防御系 ユーグレナ (*Euglena gracilis*)、クラミドモナス、クロレラ (*Chlorella vulgaris*) などの真核藻類でも APX を中心とする AsA/GSH サイクルが存在しているが、それらの局在性や酵素学的性質に高等植物との違いがみられる (Fig. 1)。ユーグレナはカタラーゼを持たず、AsA/GSH サイクルは細胞質のみに局在し

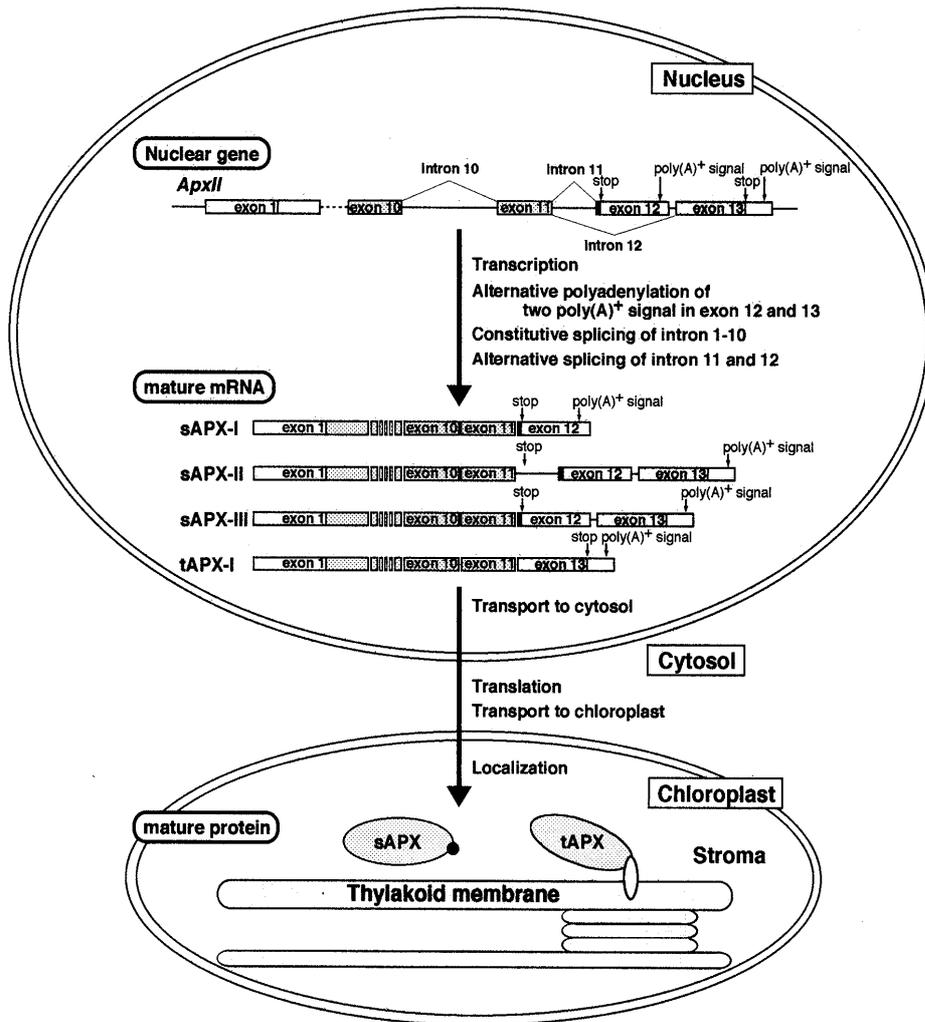


Fig. 2. Diagram of expression mechanism producing chloroplastic APX isoenzymes by alternative splicing. Exon regions are shown as boxes and introns as lines. The white box is the untranslational region. The shaded box is the common open reading frame in both sAPX and tAPX. The black and hatched boxes are the final codon for sAPX and transmembrane sequence for tAPX, respectively. Functional stop codons and polyadenylation signals for each mRNA variant are indicated by stop and poly(A)⁺ signal, respectively.

ている.¹⁴⁾一方、クラミドモナス APX は葉緑体のストロマにのみ存在する。¹⁵⁾ユーグレナとクラミドモナスの APX は、植物 APX と異なり、H₂O₂ に加え脂質過酸化物も還元する。興味深いことに、淡水性クラミドモナス (*C. reinhardtii* C9) ではセレン (Se) 添加により APX が消失し、新たに GPX が細胞質に発現誘導される。Se 誘導性 GPX は H₂O₂ と過酸化脂質を基質とし、酵素学的性質のみならず免疫学的性質も動物 GPX と類似している。最近、クラミドモナス [*C. reinhardtii* cw₁₅arg₇mt-(CC-325)] から GPX に相同性を持つ cDNA が単離されたが、植物 GPX と同様に活性中心は Sec ではなく Cys であった。¹⁶⁾クラミドモナスは環境条件に応じて APX と GPX を使い分けているようである。

3.2. 原核藻類の防御系 ラン藻 *Synechococcus* PCC-

7942 や *Synechocystis* PCC6803 には H₂O₂ 消去にカタラーゼペルオキシダーゼ (CPX) が機能しているが、¹⁷⁾*S.* 6803 の全ゲノム配列が明らかにされたことで、原核藻類の H₂O₂ 消去系に新たな知見が得られている。*S.* 6803 には APX の相同遺伝子は存在しなかったが、新たに TPX¹⁸⁾ と 2 種類の PHGPX¹⁹⁾ 相同遺伝子が見つかった。PHGPX 相同遺伝子の組換え体酵素の解析から、それらは電子供与体として GSH ではなく NADPH を特異的に利用して脂質過酸化物を還元する新規のペルオキシダーゼであることが示された。すなわち、ラン藻では AOS 消去機構として、光還元力を必要としない CPX と光合成電子伝達系とカップルしたペルオキシダーゼが機能していた (Fig. 1)。

3.3. 藻類の H₂O₂ 耐性機構 上述のように微細藻

類の H_2O_2 消去系の局在性は高等植物に比べて大きく異なっていた。 H_2O_2 の生成と消去系の場所を考えると、微細藻類の光合成器官周辺での H_2O_2 濃度は瞬時に mM オーダー以上になり、植物のケースでは光合成活性が瞬時に停止してしまう。この問題に対して微細藻類はどのように対応しているのだろうか。ユーグレナとクラミドモナスの葉緑体およびラン藻の光合成能 (CO_2 固定能) に対する H_2O_2 の影響を検討したところ、高濃度 (1 mM) の H_2O_2 に対して耐性を示すことがわかった。この原因を分子レベルで解析した結果、藻類のカルビン回路の構成酵素 (FBPase, GAPDH, PRK) は植物と異なり、光調節に関与する Cys 残基が欠損しているため、 H_2O_2 による酸化失活から免れ、耐性を示すことが明らかになった。²⁰⁾ H_2O_2 は安定なうえ、中性領域での pKa が 11.8 であり容易に生体膜を透過してオルガネラ間を移行できる。したがって藻類は、 H_2O_2 耐性能を獲得することで酸化ストレス下においても光合成活性を維持し、 H_2O_2 をオルガネラあるいは細胞外へ移行させた後、消去しているのであろう。

おわりに

APX を含めた AsA/GSH サイクルは、光合成生物の最も主要な酸化ストレス防御系として位置づけられる。移動の自由を持たない植物が、これらのサイクルを積極的に利用するシステムを発達させてきた事実は、植物に多く含まれる AsA の重要性を物語っている。APX の発現制御には、転写調節に加え選択的スプライシングや翻訳などの転写後調節も必要であり、巧妙な酸化ストレス応答機構の存在がうかがえる。一方、藻類では APX を含めた抗酸化酵素に加え、カルビン回路構成酵素の

H_2O_2 耐性機構も酸化ストレス防御系の一端として重要な役割を担っており、光合成生物の進化過程における防御機構の変遷を考える上で興味深い。今後の課題として、酸化ストレス応答時における APX など関連酵素の発現制御機構に加え、AsA と GSH の生合成、再還元、細胞内輸送機構の解明も含めた防御系ネットワークの総合的な理解が必要である。

文 献

- 1) Asada, K.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 601 (1999).
- 2) 重岡 成ら.: 蛋白質・核酸・酵素, **43**, 634 (1998).
- 3) Kieselbach, T. et al.: *FEBS Lett.*, **480**, 271 (2000).
- 4) Eshdat, Y. et al.: *Physiol. Plantarum*, **100**, 234 (1997).
- 5) Baier, M. and Dietz, K.-J.: *Trend. Plant Sci.*, **4**, 166 (1999).
- 6) Ishikawa, T. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **39**, 23 (1998).
- 7) Leonardis, S. D. et al.: *Plant Physiol. Biochem.*, **38**, 773 (2000).
- 8) Yabuta, Y. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **41**, 666 (2000).
- 9) Miyagawa, Y. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **41**, 311 (2000).
- 10) Yoshimura, K. et al.: *Plant Physiol.*, **123**, 223 (2000).
- 11) Karpinski, S. et al.: *Plant Cell*, **9**, 627 (1997).
- 12) Mittler, R. et al.: *Plant Cell*, **10**, 461 (1998).
- 13) 吉村和也ら: 化学と生物, **37**, 694 (1999).
- 14) Ishikawa, T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1290**, 69 (1996).
- 15) Takeda, T. et al.: *Plant Sci.*, **94**, 81 (1993).
- 16) Leisinger, U. et al.: *Plant Sci.*, **149**, 139 (1999).
- 17) Mutsuda, M. et al.: *Biochem. J.*, **316**, 251 (1996).
- 18) Yamamoto, H. et al.: *FEBS Lett.*, **447**, 269 (1999).
- 19) Gaber, A. et al.: *FEBS Lett.*, **499**, 32 (2001).
- 20) Tamoi, M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1383**, 232 (1998).

活性酸素消去系の酸化ストレス応答

森田 重人^{1,2*}・田中 國介^{1,2}

あらゆる好氣的生物は、活性酸素の毒性から自らを防御して生存している。特に植物においては、葉緑体において活発な電子伝達と酸素発生が共存しているため、光照射下では常に活性酸素の脅威に曝されている。 O_2^- , H_2O_2 およびこれらが反応して生じるヒドロキシラジカルなどの活性酸素は、細胞の構成成分を酸化することにより細胞に障害をもたらす。活性酸素の生成と消去のバランスが傾くことによって生じる、活性酸素の毒性によるストレスは酸化ストレス (oxidative stress) と呼ばれる。

植物においては、 O_2^- の消去にスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) が、また H_2O_2 の消去にはアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) およびカタラーゼが機能している。カタラーゼはその細胞内局在がミクロボディに限られているが、SOD と APX は細胞内局在の異なる複数のアイソザイムが存在しており、葉緑体、細胞質、ミトコンドリア、ミクロボディに存在している。また直接活性酸素の消去に関与しないが、アスコルビン酸、グルタチオンの還元状態の維持に関与する酵素群 (モノデ

*著者紹介 ¹ 京都府立大学農学部生活資源化学科 (助手) 〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5 TEL/FAX. 075-703-5675
² 京都府農業資源研究センター基礎研究部 (技師) 〒619-0244 京都府相楽郡精華町大字北稲八間小字大路74
 TEL. 0774-93-3526 FAX. 0774-93-3261 E-mail: shigeto@kab.seika.kyoto.jp
 (田中國介) E-mail: ktanaka@kab.seika.kyoto.jp