

<研究紹介>

レドックス制御と光合成

酸素への電子の流れに秘められた生理的な意義を考える

小川健一 (RIBS Okayama 岡山県生物科学総合研究所)

はじめに

酸素発生型の光合成生物の出現により地球の酸素分圧は劇的（推定では1万倍）に上昇した。酸素は生物にとって毒であるが、その毒性の正体は酸素から生じる活性酸素である。好気性生物はその活性酸素を解毒する機構を発達させることで酸素を利用できると最近まで理解されてきた。さらに最近の研究では、好気性生物は酸素ばかりでなく、活性酸素も含めて利用していることが分かってきた。私の研究室では、まさに植物における活性酸素の積極的な利用について研究を行っている。本稿では、植物は光合成で生成させた酸素を如何に巧妙に利用しているのかを考察したい。ここでは私が現在の研究室でこの研究を始めることになった動機も含めて少々エッセイ風に話を進めることにする。

活性酸素消去系酵素のマイクロコンパートメンテーション

高校の教科書にも出てこなかった「活性酸素」という言葉を知ったのは大学2年生のころ、どちらかという植物個体の生理や生態に興味があったころである。京都大学理学部植物園の生態研究施設で「イネの水中芽生え」に関する研究が辻英夫先生の下で行われていた。それまで、酸素は呼吸に必要であるという漠然とした知識しか持っていなかった私にとって、水中（空気中に比べ酸素濃度が低い）で発芽した芽生えが空気中に適応するには、酸素から生じる活性酸素に対する解毒機構が重要であるという話はたいへんショッキングで興味深かった。その後数年間にわたり、私が活性酸素の毒性以外の側面を考えることはなかった。

「活性酸素の効率的な消去」ということに興味を持った私は辻英夫先生の退官時期の前後から、京大・食糧科学研究所の浅田浩二先生にお世話になることになった。ここで、活性酸素消去系酵素が活性酸素の生成場所に精巧に局在していることを見出すことになる(Ogawa et al. 1995)。当時すでに活性酸素消去に関する酵素は同定され、スーパ

ーオキシドジスムターゼ (SOD) に関する研究も精力的に行われていたので、周囲にはそれらの酵素のミクロな局在を決定するという課題は残り少ない問題としか思えなかったかもしれない。しかし、その課題は現在の私の研究にとって重要な位置を占める。免疫電顕法を改良して決定した葉緑体型 CuZn-SOD の局在は、その SOD が可溶性であるにも関わらず、スーパーオキシドの生成部位である P S I の分布と一致していた。つまり、スーパーオキシドはその SOD が溶液中に均一に存在すると仮定した場合よりも極めて効果的に過酸化水素と水へと不均化されている。この SOD をアンチセンス法で抑制したタバコは光に弱くなるが、そのタバコの葉緑体に外来の Mn-SOD を過剰発現させてもその表現型は回復しなかった。このことから、SOD のミクロな局在はスーパーオキシドの効率的な不均化に必要不可欠であると考えられた。

一方、細胞質型 CuZn-SOD についても面白いことが分かった。「細胞質型」というのは「葉緑体外」という意味であったが、まさかアポプラスト (細胞外) に存在する SOD だとは思わなかったのである (Ogawa et al. 1996, 1997)。この SOD はリグニン合成に必要な過酸化水素を供給するという機能があることが分かったが、スーパーオキシドはアポプラストなどの pH の低い場所では自己不均化が早く SOD は必要の無いように思われた。しかし、実際には過酸化水素の生成は SOD を阻害すると抑制されることから、その不均化反応には SOD が必須であることが分かり、同時に生体にはスーパーオキシドをトラップするような分子が多量に存在することが理解できた。つまり、SOD はスーパーオキシドの生成部位に局在してはじめて機能するのである。

活性酸素生成と個体の死

ここで疑問が生じる。植物は活性酸素を巧みに利用できるシステムを持っているのに、葉緑体で生じた活性酸素は単に消去されるだけなのか？このような疑問のおかげで、さらに活性酸素が植物の成長を制御すること (Ogawa and Iwabuchi 2001)、その制御にはグルタチオンが関わること (Henmi et al. 2001, Ogawa et al. 2001) などを見出すことになった。葉緑体内での活性酸素の生成の意義についての疑問は、三宅さんの発見で説明されたように思えた：モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼのようなフララビン酵素が P S I から酸素への電子の流れを促進し、その最大速度は光合成の電子伝達速度に匹敵するというものである (Miyake et al. 1998) (この電子の流れは、過剰な電子を捨てるという意味では重要であると考えられ、後述する水-水回路の提唱へつながった)。しかし、研究を進めるに従い、当初の疑問はますます強くなっていった。

植物で生成する過酸化水素はアスコルビン酸—グルタチオン回路で消去されるとされ、ストレスなどによってその生成速度が消去能力を超えると個体は死に至ると考えられている。しかし、グルタチオン合成の抑制はむしろストレスによる植物の老化を遅延させ、個体の死も抑制するという結果を得た (Yanagida, M. and Ogawa, K, unpublished). 確かにグルタチオン合成の抑制によって細胞内の活性酸素量および脂質過酸化物は上昇することが確かめられた(Yanagida et al. 2004)ので、グルタチオンが活性酸素消去に寄与していることは確かである。つまり、このことが意味するのは、ストレス時の活性酸素の定常濃度は細胞を死に至らしめるには十分なレベルではないということである。同時に、アスコルビン酸—グルタチオン回路は単なる活性酸素消去のためだけに存在しておらず、むしろ植物の積極的な老化・死に機能するということである。この現象を意義付けるように、私達はグルタチオンが植物の花成に関わることを見出した (Ogawa et al. 2001, 2004, Yanagida et al. 2004). 以上をまとめて考えると、植物は子孫を残すためにストレスを感知しストレスが過剰となる前に、グルタチオンに関わる生殖成長のスイッチをONにしているのだと理解できる。葉緑体でのSODのマイクロコンパートメンテーションの意義は当初、活性酸素の効率的消去にあり、生じる活性酸素は過剰電子の逃げ場と考えられたが、研究の進展に伴い、P S I から酸素へ流れる電子の量に応じて植物は個体の生存戦略上重要な決定をくだしているというさらに積極的な面が明らかになってきた。

特別な輸送のメカニズムは明らかにされていないが、グルタチオンは還元型では葉緑体膜を通過しにくく、酸化型が通過しやすい。アスコルビン酸—グルタチオン回路の回転がストレスによるP S I での活性酸素生成で速められることで酸化型グルタチオンの生成も増す。このことでグルタチオンは葉緑体外へ移動し、核への情報伝達に関わるというストーリーが現在の私達の仮説である。今後、この仮説を裏付ける因子の単離は重要な課題である。その手がかりとしてグルタチオンの結合タンパク質は興味深い (Ito et al. 2003)

水—水回路とATP生産

P S I 近傍にはSODばかりでなく、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) も存在し生じた過酸化水素を効果的に消去できることから、P S I から酸素分子への電子の流れが生じて、生じる活性酸素は効果的に水へと解毒できる。つまり、P S I I で水から引き抜かれた電子はP S I で再び酸素を還元し水になるのである。これが浅田

先生が提唱したいわゆる「水-水回路」である(Asada 1999). その回路のストレス回避における意義については現時点でも議論されているところである. 一方, 上記のような意義とは別にこの回路が光合成開始時の $\Delta p H$ の生成と A T P 合成にあることを牧野さんと三宅さんが見出した (Makino et al. 2004). この発見は, 現在の私たちの研究にとって非常に興味深いものであった.

カルビン回路はチオレドキシニンによってレドックス制御(酵素のシステイン残基の酸化還元状態の制御)されていることが知られているが, 我々は, チオレドキシニンや D T T では活性化されず, グルタチオンによってのみ活性化されるカルビン回路酵素アルドラーゼを同定したからである (Matsumoto et al. 2005). この酵素は p H 7 では活性が低く, 還元型グルタチオンで活性が抑制される. 一方, p H 8 では構造変化を伴って 10 分以上かけて活性されるが, 還元型グルタチオンはその活性化を 20 倍以上短縮する. これとは別に, グルタチオン合成のキーステップを触媒する酵素, γ -グルタミルシステインシンセターゼ (γ -E C S) は還元状態で A T P ase 活性をもち, この酵素の変異体 *cad2-1* は野生株の 2 倍の A T P 量を示す一方, 集光装置に欠損のある *ch 1* 変異体は野生型に比べ 3 分の 1 の A T P 量を示し, *cad2-1* 変異体と同様にグルタチオン量の減少と前駆体のシステインの蓄積が認められた (Ogawa et al. 2004). つまり光合成による A T P の供給が γ -E C S の活性を律速しているのである. これらの私達の話は, 牧野さんたちの発見とぴったりとつじつまが合う: 水-水回路によって作られた A T P および $\Delta p H$ はグルタチオン合成を介してアルドラーゼの活性を ON にするのに機能すると考えられるのである.

おわりに

P S I からの酸素へ電子の流れには, 上述以外にも意義はあるかもしれない. しかし, その意義を考える上でグルタチオンは重要な位置を占めるように思われる. 硫酸イオンの還元活性から考えると硫黄同化速度は最大でも二酸化炭素固定速度の 1 割程度であるが, 1 分子の γ -グルタミルシステインの合成に何分子の A T P の浪費が必要かを明らかにできれば, 光合成の定常状態においても P S I から酸素へ電子が流れる生理的意義が新たに見出されるかもしれない. *cad2-1* 変異体の表現型から考えて, 少なくとも γ -E C S の活性が半分になるだけで細胞内の A T P 量が 2 倍になる程度の浪費であり, 単純計算はできないが, 炭素固定に利用する A T P 量を考えれば, その浪費量は膨大である.

また、P S I で生じた活性酸素はシグナル分子として機能する可能性があるが、これまでに見出されてきた活性酸素の関わる現象が、上記に述べた仮説（グルタチオンの関与する制御）で説明可能かどうかは今後の課題であろう。

本研究を支えていただいた多くの先生方、同僚であった皆さん、今の研究室の皆さんに感謝いたします。特に、若い私に研究の場を与えてくださった辻先生、それ以来一貫して面倒を見ていただいた浅田先生にはこの場を借りて深く感謝いたします。

- Asada, K. (1999) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601–639.
- Ito, H., Iwabuchi, M. and Ogawa, K. (2003) *Plant Cell Physiol.* 44: 655–660.
- Henmi, K., Tsuboi, S., Demura, T., Fukuda, H., Iwabuchi, M. and Ogawa, K. (2001) *Plant Cell Physiol.* 42: 673–676
- Makino, A., Miyake, C. and Yokota, A. (2004) *Plant Cell Physiol.* 43: 1017–1026.
- Matsumoto, M., Ito, H. and Ogawa, K. (2005) *Antioxid. Cell Signal.* in press.
- Miyake, C., Schreiber, U., Hormann, H., Sano, S. and Asada, K. (1998) *Plant Cell Physiol.* 38: 821–829.
- Ogawa, K. and Iwabuchi, M. (2001) *Plant Cell Physiol.* 42: 286–291.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., Takabe, K. and Asada, K. (1995) *Plant Cell Physiol.* 36: 565–573.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., and Asada, K. (1996) *Plant Cell Physiol.* 37: 790–799.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., and Asada, K. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38: 1118–1126.
- Ogawa, K., Tasaka, Y., Mino, M., Tanaka, Y. and Iwabuchi, M. (2001) *Plant Cell Physiol.* 42: 524–530.
- Ogawa, K., Hatano-Iwasaki, A., Yanagida, M. and Iwabuchi, M. (2004) *Plant Cell Physiol.* 45: 1–8.
- Yanagida, M., Mino, M., Iwabuchi, M. and Ogawa, K. (2004) *Plant Cell Physiol.* 45: 129–137.