

解説

ミトコンドリアによる葉緑体の強光防御機構

大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻
吉田啓亮

1 はじめに

葉緑体は光合成を行うオルガネラであり、ミトコンドリアは好気呼吸を行うオルガネラである。このように光合成と呼吸はそれぞれ異なるオルガネラで起こり、見かけ上のガス交換も逆であるため、独立した反応として考えられる傾向が強かった。しかし近年、実は光合成系と呼吸系は相互作用しているとの報告がなされている¹⁾。比較的良好に知られている光呼吸経路の他にも、いくつかの相互作用が提唱されている。例えば、光照射直後の暗呼吸速度が光合成産物の蓄積により一過的に増加するLight Enhanced Dark Respiration (LEDR) と呼ばれる現象が知られており、この現象も広義では相互作用の1つと考えることができる²⁾。相互作用の形式は幅広いが、本稿では話題を「光照射下の葉における呼吸系の役割」に限定し、その中でも「過剰還元力散逸系としての呼吸系の機能」を重点的に紹介したい。最も強調したい点は、(1) 葉緑体で生じる過剰還元力はミトコンドリアへ輸送されること、(2) ミトコンドリアへ輸送されてきた還元力の散逸に、ATP合成と共役しない呼吸経路が重要であること、の2点である。

2 植物のミトコンドリア電子伝達鎖 (呼吸鎖)

多くの生物に共通の好気呼吸の一連の流れは、サイトソルの解糖系やミトコンドリアマトリックスのTCA サイクルによって炭水化物を分解し、これらの反応によって生じる還元力 (NADH) をミトコンドリア電子伝達鎖 (呼吸鎖) で酸化してATPを生産するというものである。呼吸によって生産されたATPは、細胞構造 (原形質、細胞壁など) や細胞成分 (核酸、タンパク質、脂質など) の合成や物質の吸収など、細胞の様々なプロセスに用いられる。このように細胞内代謝において呼吸系によるATP生産は不可欠なものであり、ATPを生産するミトコンドリアは「細胞の発電所」と例えられる。

炭水化物の分解によって生じたNADHは呼吸鎖で酸化され、NADHデヒドロゲナーゼ (複合体I) ⇒ ユビキノロン ⇒ シトクロムbc₁複合体 (複合体III) ⇒ シトクロムc ⇒ シトクロムcオキシダーゼ (COX、複合体IV) ⇒ 酸素、と電子が伝達される (図1)。その際にミトコンドリア内膜を介してH⁺勾配 (Δμ_{H⁺}) が形成され、それを駆動力としてATPが合成される。この電子伝達経路は動植物を含む全ての好気性生物に共通の

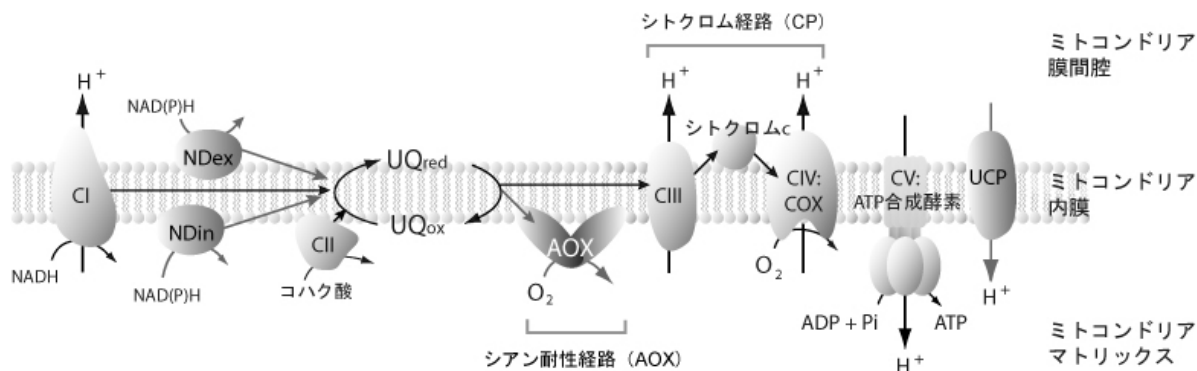


図1 ミトコンドリア電子伝達鎖 (呼吸鎖) 模式図

AOX : alternative oxidase、COX : cytochrome c oxidase、CI-CV : 複合体I-V、NDex : external NAD(P)H dehydrogenase、NDin : internal NAD(P)H dehydrogenase、UCP : uncoupling protein、UQ : ユビキノロン

ものである。この経路に加え、植物、藻類、および一部の菌類などには、 $\Delta\mu_{H^+}$ 形成およびATP合成と共役しない電子伝達経路が存在する（図1、以後、非共役経路）。ロテノン耐性経路（external NAD(P)H dehydrogenase: NDex, internal NAD(P)H dehydrogenase: NDin）は複合体Iをバイパスしており、シアン耐性経路（alternative oxidase: AOX）は複合体IIIとIVをバイパスしている³⁻⁵。これらの経路はATP合成と共役しないため、一見無駄な呼吸経路のように見える。また、 $\Delta\mu_{H^+}$ を解消するuncoupling protein (UCP)もATPの産生には不利である⁶（ちなみにUCPは動物にも存在する）。なぜ植物や藻類はこのような無駄な経路を持っているのだろうか？後述するように、これらの経路は葉緑体で生じる過剰還元力の散逸に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

3 葉緑体からの還元力輸送

植物の葉は、しばしば自身の光合成容量を上回る光エネルギーを受ける。ストロマへの還元力（NADPH）の蓄積は、光合成電子伝達鎖を過還元状態にし、電子伝達効率の低下や活性酸素種（ROS）の生成を引き起こす。つまり過剰に生成されたNADPHは速やかに酸化された方がよい。光化学系Iサイクリック電子伝達やwater-water cycleなどは、NADPHを生成しない電子伝

達経路なので、ストロマの過還元の回避やATP/NADPH生成比の最適化に機能している^{7,8}。

その他に、NADPHを葉緑体外へ輸送するシャトル機構が存在する⁹（図2）。最も主要なシャトルとして考えられているリンゴ酸/オキサロ酢酸（Mal/OAA）シャトル¹⁰の場合、ストロマに局在するNADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（NADP-MDH）が、オキサロ酢酸とNADPHを基質とし、リンゴ酸を合成する。リンゴ酸はリンゴ酸バルブによって葉緑体外に輸送される。つまり、光化学反応から生成された還元力はリンゴ酸の形で葉緑体外へ輸送されることになる。NADP-MDHはチオレドキシシンによって還元され活性化状態となるので、還元力の輸送活性は光合成電子伝達鎖のレドックス状態をモニターしながら調節されると考えられる。その他、NADP-MDHを増加させると光化学系I下流が酸化することや、High CO₂下で生育させるとNADP-MDHの活性が低下することがR. Scheibeのグループによって示されている^{11,12}。これらも過剰な電子の受容体としてMal/OAAシャトルが機能することを裏付けている。

最近、リンゴ酸バルブとして機能していると考えられている2-オキソグルタル酸/リンゴ酸輸送体（OMT）を破壊した場合、ストレス下で顕著に光阻害を受けることや光合成特性に大きな影響を及ぼすことが示されている^{13,14}。このことから葉緑体からの還

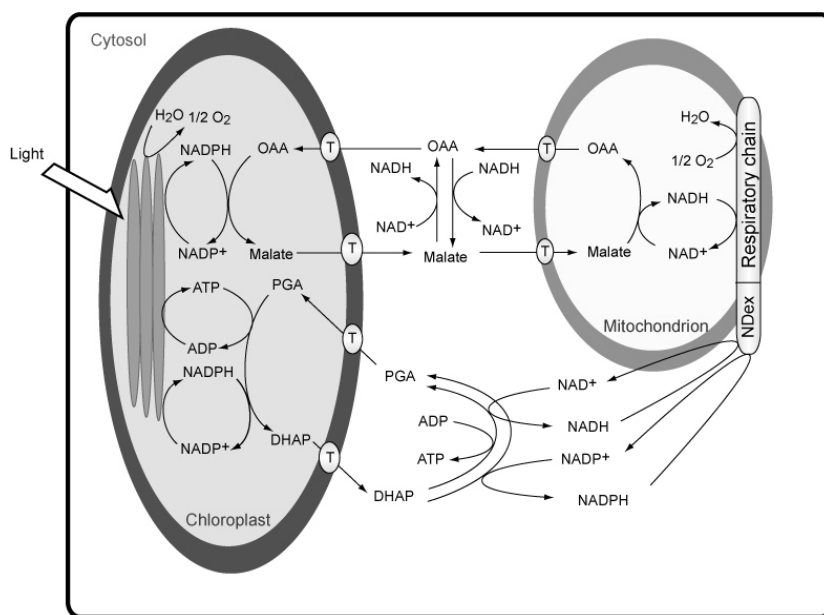


図2 シャトル機構による葉緑体からの還元力輸送
DHAP: ジヒドロキシアセトンリン酸、Malate: リンゴ酸、OAA: オキサロ酢酸、
PGA: ホスホグリセリン酸

元力輸送の重要性が示唆されるが、OMT破壊株は光呼吸で生じるアンモニアのリサイクルにも支障がある（「6 その他の光照射下における呼吸系の機能」参照）。このため、OMTが真にリンゴ酸バルブとして葉緑体からの還元力輸送に関わっているのかを調べるには、飽和CO₂の下で生育や実験を行うことが必要ではないかと思われる（名古屋大・谷口先生と、呼吸系も絡めた研究を立ち上げ中）。

Mal/OAA シャトルの他にもトリオースリン酸によるシャトルも存在している（図2、このシャトルも還元力輸送に働かうものだが、本当に寄与しているのかについてはあまり分かっていない。反応にATPも関わるため、純粋に還元力輸送に寄与しているかは不明確である）。これらのシャトル機構による還元力の輸送は、葉緑体内の過還元を防ぐだけでなく、それ以外のコンパートメントにエネルギーを供給するのにも役立つ。

4 還元力の行き先

葉緑体から排出された還元力は、Mal/OAA シャトルによってサイトソルだけでなくペルオキシソームやミトコンドリアにも輸送される。これらの還元力は、呼吸鎖で酸化されるだけでなく、様々な反応のエネルギーとして有効に用いられている（図3）。

サイトソルでこの還元力が使われる場合、硝酸還元酵素（NR）のエネルギー源として、また、サイトソルに局在するチオレドキシ還元酵素の基質として用いられる。また、ペルオキシソームでは、光呼吸経路で

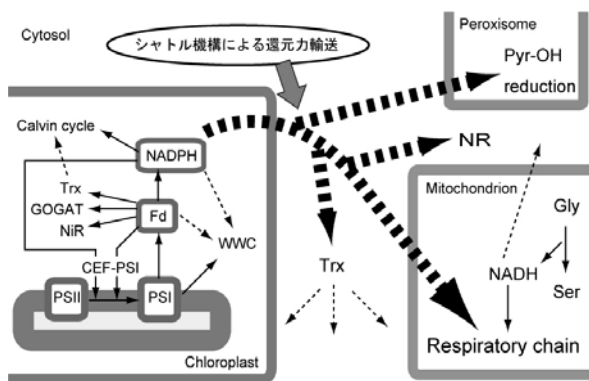


図3 光照射下の細胞内における還元力の利用

CEF-PSI：光化学系Iサイクリック電子伝達、Fd：フェレドキシン、GOGAT：グルタミン酸合成酵素、NiR：亜硝酸還元酵素、NR：硝酸還元酵素、Pyr-OH：ヒドロキシピルビン酸、Trx：チオレドキシ、WWC：water-water cycle

ヒドロキシピルビン酸の還元が起こる。この反応も還元力を必要とするので葉緑体の光化学反応で生じる還元力のシンクとして機能できる。また、光呼吸が起こっているときは、ミトコンドリアのグリシン酸化によっても多量の還元力が生じる。その還元力もこれらの還元力消費反応のエネルギーとして用いられる¹⁵⁾。

5 呼吸鎖による過剰還元力の散逸

過剰に存在する還元力は、ミトコンドリアに輸送され、呼吸鎖により酸化される。その場合、エネルギー源としてATPを生産することも可能だが、むしろ非共役経路による“散逸”のほうが光環境下では起こりやすいようである。

5-1 非共役経路による散逸の有利点

前述したように、植物ミトコンドリアにはATP合成と共役しない呼吸経路がある（図1）。これらは一見、エネルギー生産工場としての本来のミトコンドリアの機能を放棄した無駄な経路のように見える。しかし、これらの経路は、 $\Delta\mu_{H^+}$ による電子伝達の律速を受けずに、効率よく還元力を酸化できる経路であるとも考えることができる。つまり、光環境下で光合成系から還元力が大量に運ばれてくる場合、非共役経路がそれらを散逸することによって、光防御に極めて重要な機能を果たすのではないかということが示唆される。実際にその可能性を裏付けるような研究例も、近年盛んに報告されている。

5-2 還元力散逸に関わる第一の経路、AOX

非共役経路の1つがシアン耐性呼吸経路であり、それを触媒しているのがalternative oxidase (AOX)である^{3,4)}。植物の場合、ユビキノンの電子の行き先は枝分かれしており、一方が動物と共通でATP合成と共役するシトクロム経路、もう一方が植物などに特有でATP合成と共役しないAOXとなる（図1）。シトクロム経路はシアンで電子伝達が阻害される一方、AOXは阻害されないためシアン耐性呼吸経路と呼ばれている。

AOXは複合体IIIとIVの2つの $\Delta\mu_{H^+}$ 形成部位をバイパスするので、非共役経路の中でも最も還元力を効率よく酸化できる経路と考えられる。これまでの研究から、強光下でAOXのタンパク量や活性、AOXへの電子分配速度が増加することが報告されている^{16,17)}。これらの結果はAOXが過剰還元力のシンクとしてup-regulationされている可能性を示唆している。また、

AOXを阻害したときの光合成系を分析したところ、光合成速度の低下、光合成電子伝達鎖の過還元が観測されており¹⁸⁾、この結果もやはりAOXの還元力シンクとしての可能性を示唆している(図4)。

しかし、これまでの研究では、AOXのup-regulationが葉緑体内の還元力の蓄積やその輸送活性とリンクしているかどうかは調べられていない。これが一因となって、AOXが葉緑体で生じる還元力のシンクとして機能しているかどうかは結論づけられていないのが現状である。現在我々は、光合成電子伝達、ストロマへの還元力蓄積、その葉緑体外への輸送活性、および呼吸鎖の特性(特にAOX活性)について統合的な分析を進めている。異常なATP/NADPH生成比によってストロマに還元力の蓄積する光化学系Iサイクリック電子伝達の変異株 *pgf5* (九州大・鹿内先生より提供)では、輸送活性やAOX活性も増加していた(未発表データ)。AOXは葉緑体で生じる還元力のシンクとして機能していることを強く示す結果と言える。

5-3 その他の非共役経路は?

AOX以外の非共役経路も還元力散逸系として機能できる候補である。NDinやNDexも、AOXと同様に、光環境下で発現が誘導されることが示されている¹⁹⁾。AOXが呼吸鎖の出口であるとするならば、これらの酵素は入り口にあたる非共役経路であり、複合体Iに代わってNAD(P)Hを酸化する働きを持つ(図1)。 $\Delta\mu_{H^+}$ を形成せずに還元力を酸化できる経路であるが、

NADHに対する親和性は低く、 K_m は複合体Iより1桁大きい値であるということも一方で知られている²⁰⁾。NDinやNDexによる *in vivo*でのNAD(P)Hの酸化速度の評価は難しいということもあり、これらが還元力散逸に実際に機能しているのかは未だ知られていない。

もう1つの候補が、呼吸鎖電子伝達を $\Delta\mu_{H^+}$ による律速から脱共役する働きを持つUCPである⁶⁾。この酵素も、呼吸鎖の過還元を防いだり、NADHを素早くターンオーバーすることによってTCAサイクルの炭素代謝を維持したりするという意味ではAOXなどと働きは似ている。しかし光合成系と絡めた研究例はなく、光合成におけるUCPの働きは未知数である。呼吸鎖でROSが生成されると膜の不飽和脂肪酸が過酸化され、4-hydroxy-2-nonenal (HNE)が生成される。UCPはHNEで活性化される一方²¹⁾、AOXは不活化することが知られており²²⁾、AOXとUCPの抗酸化機能における兼ね合いなどは非常に面白い問題である。

6 その他の光照射下における呼吸系の機能

呼吸系の光合成系への寄与は過剰還元力の散逸だけでなく、以下の機能も提唱されている。

6-1 スクロース合成のためのATP供給系

光合成による炭素固定が正常に行われるには、その後のカルビンサイクルでの炭素代謝やサイトソルでのスクロース合成が滞りなく進行することが必要である。ミトコンドリアが生産するATPは、光照射下でのスク

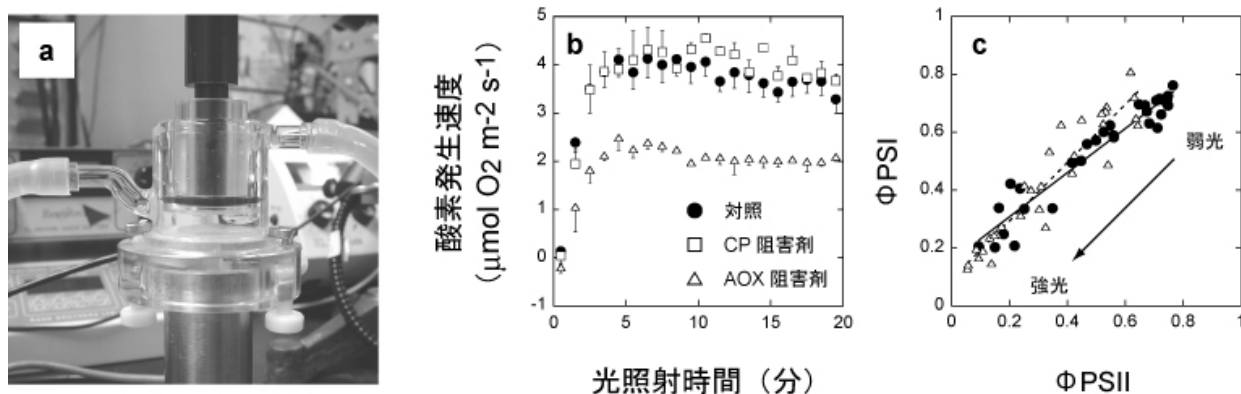


図4 a: 自作のChl蛍光・P700同時測定型液相酸素電極。葉の状態呼吸鎖を阻害し、そのときの光合成系を分析できる。b: ソラマメ葉の呼吸鎖阻害時の酸素発生速度。シトクロム経路(CP)阻害剤(アンチマイシンA)とAOX阻害剤(*n*-propyl gallate)は、単離葉緑体の光合成に作用しない濃度で与えた。測定光強度は $100 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 。この光強度では、AOXの阻害のみが光合成速度を低下させている。c: ソラマメ葉のAOX阻害時の2つの光化学系の量子収率バランス。AOXを阻害したとき、幅広い光環境で量子収率の不均衡が起こっている。Yoshida et al. (2006)¹⁸⁾を改作。

ロース合成にも必要になる (図5)。

光環境下で呼吸系のシトクロム経路やATP合成酵素を阻害すると細胞内ATP/ADP比が減少する^{23,24)}。そのとき、スクロース合成の中間代謝産物である糖リン酸の蓄積やスクロース合成の鍵酵素であるスクロースリン酸シンターゼ (SPS) の活性低下が起こり、光合成速度も低下することが示されている²³⁻²⁵⁾。このことは、非共役経路のみならず、ATP合成と共役する呼吸経路もスクロース合成に必要なATPを供給することによって光合成系に貢献していることを示している。しかし、C₃光合成モデルの視点から考えると、スクロース合成で光合成が律速を受ける状況はHigh CO₂, High PPFDの下でトリオースリン酸が多くサイトソルに輸送されるときのみなので、野外でこの機構がどのくらい働いているのかは疑問が残る。

6-2 アミノ酸合成に必要な炭素骨格の供給

過剰還元力散逸系としての機能もATP供給系としての機能も、呼吸鎖による光合成系への寄与を表しているが、ミトコンドリアマトリックスにおける炭素代謝も光合成に重要な働きを持っている。光照射下では、葉緑体内でアンモニア同化系 (glutamine synthetase-glutamate synthase: GS-GOGAT系) によるアミノ酸合成が起こる (図6)。その際に炭素骨格として2-オキソグルタル酸が必要であり、この有機酸はミトコンドリア内のTCAサイクルから供給される^{1,2)}。2-オキソグルタル酸はOMTを介して葉緑体に取り込まれる。OMT破壊株では、炭素骨格が葉緑体内で枯渇するために光照射下でアンモニアの蓄積やアミノ酸組成の変化が起こり、結果として生長も阻害される¹⁴⁾。この炭素骨格の供給という機能は、葉緑体内のアミノ

酸合成に必須だけでなく、アンモニアや還元型のフェレドキシンを消費して葉緑体を守る意味でも役立つ。

7 おわりに

本稿では、還元力の散逸に機能する非共役経路 (特に AOX) の重要性について議論してきた。しかし、まだまだ解決されるべき問題は山積みである。

第一に、光呼吸系との分離がまだ十分にできていないことである。光照射下でのミトコンドリアには、グリシンの脱炭酸により生じるNADHも多量に存在し、その散逸にAOXが機能するとの報告がある²⁶⁾。High CO₂下でAOXを阻害しても光合成速度が低下すること^{18,24)}や、Mal/OAAシャトルによる還元力輸送活性の増加と同調的にAOXが発現すること (未発表データ) は、「ストロマからの還元力輸送⇒AOXによる散逸」という構図が少なくとも部分的には存在することを示しているが、光呼吸で生じる還元力の散逸に対してもAOXが寄与しているのかどうかは明らかではない。

第二に、葉緑体内が過還元になったときにAOX発現を引き起こしているメッセンジャーは何か、という問題である。葉緑体を持たない培養細胞を用いた研究から、AOXの発現に関しての最も強いメッセンジャーは呼吸鎖で生じるROSであると提案されている²⁷⁾。しかし光照射下においては、ROSは葉緑体やペルオキシソームでも多量に発生する。これらのコンパートメントで生成されるROSがAOX発現に関与するのかを調べることにより、細胞内クロストークにおけるAOXの役割について重要な知見が得られるだろう。

最後に、AOXによる還元力の散逸はどのくらい光防御に重要なかが定量的に分析されていないことであ

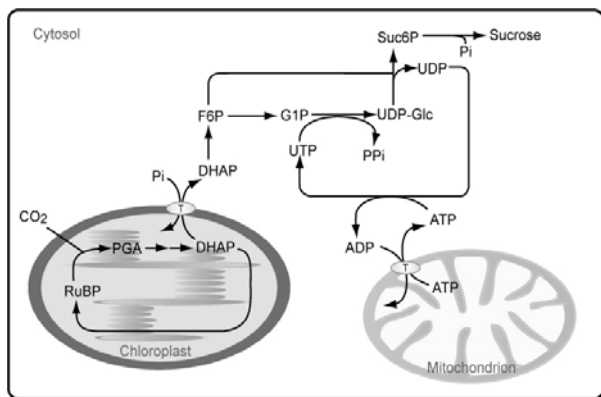


図5 スクロース合成のためのATP供給系としての呼吸系の機能

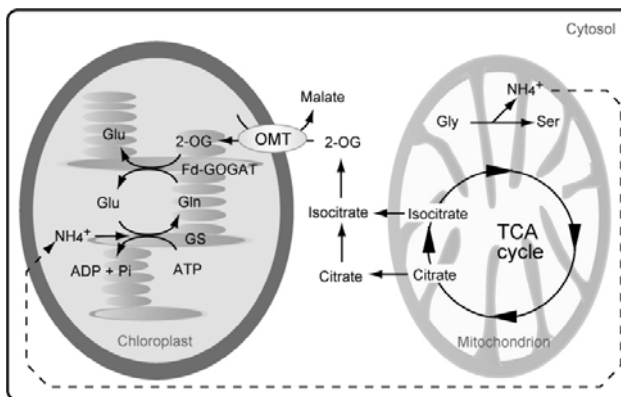


図6 アミノ酸合成のための炭素骨格の供給系としての呼吸系の機能

る。このことに関しては、どのくらいの還元力が葉緑体から輸送され、そのうちどのくらいの還元力が呼吸鎖で酸化されているのか、さらに呼吸鎖に入った還元力のうちどのくらい AOX に流れているのかを分析しなければならない。光ストレスを受けてからの時間やストレス強度によって、他の防御機構とどのように相互作用しているのかについても興味深い問題である。葉緑体内でも様々な光防御手段は存在するが、それでも植物は野外で光阻害を被る。一見無駄に見える非共役経路は、より柔軟な光防御機構を植物に与えることで、適応的な意義を持っているのではないかと思われる。その意義を比較生態生理学的に理解するためにも、非共役経路の光防御における有効性は定量的に解決されるべきである。

謝辞

本稿を作成するにあたって、谷口光隆、寺島一郎、野口航の各氏に適切な御助言を頂いた。

引用文献

- Raghavendra, A.S. and Padmasree, K. (2003) *Trends Plant Sci.* **8**: 546-553.
- Atkin, O.K., Millar, A.H., Gardeström, P. and Day, D.A. (2000). *Photosynthesis: Physiology and Metabolism* (Kluwer Academic Publishers): 153-175.
- Vanlerberghe, G.C. and Ordog, S.H. (2002) *Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism* (Kluwer Academic Publisher): 173-191.
- 野口航 (2003) *日本生態学会誌* **53**: 71-75.
- Rasmusson, A.G., Soole K.L. and Elthon T.E. (2004) *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 23-39.
- Vercesi, A.E., Borecký, J., Maia, I.G., Arruda, P., Cuccovia, I.M. and Chaimovich, H. (2006) *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 383-404.
- Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K.-I., Endo, T., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2004) *Nature* **429**: 579-582.
- Asada, K. (1999) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601-639.
- Heineke, D., Riens, B., Grosse, H., Hoferichter, P., Peter, U., Flügge, U.-I. and Heldt, H.W. (1991) *Plant Physiol.* **95**: 1131-1137.
- Scheibe, R. (2004) *Physiol. Plant.* **120**: 21-26.
- Backhausen, J.E., Emmerlich, A., Holtgreffe, S., Horton, P., Nast, G., Rogers, J.J.M., Müller-Röber, B. and Scheibe, R. (1998) *Planta* **207**: 105-114.
- Backhausen, J.E. and Scheibe, R. (1999) *J. Exp. Bot.* **50**: 665-675.
- Taniguchi, M., Taniguchi, Y., Kawasaki, M., Takeda, S., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Miyake, H. and Sugiyama, T. (2002) *Plant Cell Physiol.* **43**: 706-717.
- Schneiderei, J., Häusler, R.E., Fiene, G., Kaiser, W.M. and Weber A.P.M. (2006) *Plant J.* **45**: 206-224.
- Krömer, S. (1995) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 45-70.
- Ribas-Carbo, M., Robinson, S.A., González-Meler, M.A., Lennon, A.M., Giles, L., Siedow, J.N. and Berry, J.A. (2000) *Plant Cell Environ.* **23**: 983-989.
- Noguchi, K., Taylor, N.L., Millar, A.H., Lambers, H. and Day, D.A. (2005) *Plant Cell Environ.* **28**: 760-771.
- Yoshida, K., Terashima, I. and Noguchi, K. (2006) *Plant Cell Physiol.* **47**: 22-31.
- Svensson, A.S. and Rasmusson, A.G. (2001). *Plant J.* **28**: 73-82.
- Day, D.A., Millar, A.H. and Whelan, J. (2004) *Plant Mitochondria: From Genome to Function* (Kluwer Academic Publisher) 1-12.
- Smith, A.M.O., Ratcliffe, R.G. and Sweetlove, L.J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**: 51944-51952.
- Winger, A.M., Millar, A.H. and Day, D.A. (2005) *Biochem. J.* **387**: 865-870.
- Krömer, S., Malmberg, G. and Gardeström, P. (1993) *Plant Physiol.* **102**: 947-955.
- Padmasree, K. and Raghavendra, A.S. (1999a) *Physiol. Plant.* **105**: 546-553.
- Padmasree, K. and Raghavendra, A.S. (1999b) *Photosyn. Res.* **62**: 231-239.
- Igamberdiev, A.U., Bykova, N.V. and Gardeström, P. (1997) *FEBS Lett.* **412**: 265-269.
- Maxwell, D.P., Wang, Y. and McIntosh, L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8271-8276.