

論文内容の要旨

氏名	丸田隆典		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	農第134号		
学位授与の日付	平成21年3月21日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	Regulatory mechanism of cellular redox states by ascorbic acid in higher plants (高等植物におけるアスコルビン酸による細胞内レドックス状態の制御機構)		
論文審査委員(主査)	教授	重岡	成
	(副主査)	教授	内海龍太郎
	(副主査)	教授	深溝慶

結論

植物を取り巻く環境は、昼夜あるいは季節によって日々刻々と大きく変化している。植物は酸素発生型光合成を行うことで細胞内の酸素濃度が極めて高く、活性酸素種(ROS)を生成しやすい状況にある。ROSは強い酸化力を持つため、その蓄積はあらゆる細胞内成分に酸化的損傷をもたらす。特に、環境ストレス下ではエネルギー代謝のバランス崩壊により、ROSが過剰に生成される。したがって、環境ストレスによる障害の多くはROSによる酸化的損傷に起因しており、植物にとってROS消去系の発達は自然環境へ適応するために非常に重要であった。

一方、植物細胞でのROSのシグナリング因子としての機能が明らかになってきた。環境ストレス下におけるROSの生成はシグナルとして認知され、その場の環境に適した遺伝子の発現レベルの制御に機能している。また、包括的なトランスクリプトーム解析により、ROSの種類や生成部位によって酸化的シグナリングに特異性が生じることが明らかとされつつある。すなわち、環境ストレス応答は様々な酸化的シグナリングのクロストークによって制御されている。したがって、ROSの発生と抗酸化系のクロストークからなる細胞内のレドックス状態は時・空間的に厳密に制御されなければならない。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)は、アスコルビン酸(AsA)を電子供与体とする光合成生物に特有のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消去酵素である。APXを中心としたレドックス制御系は、種々のオルガネラに局在していることから、オルガネラから細胞レベルにおけるレドックス制御に深く関与すると考えられた。

ところで、高等植物において、AsAはD-フルクトース-6リン酸(Fru-6P)を初発物質として、D-マンノース-6リン酸(Man-6P)、L-galactose(L-Gal)、L-ガラクトノ-1,4-ラクトン(L-GalL)などを介した経路(D-Man/L-Gal経路)により合成される。これまでに、本経路を構成する酵素群の分子特性および遺伝子レベルでの発現調節に関する多くの研究が行われてきたが、その制御機構についてはこれまでに明確な解答が得られていないのが現状であった。

そこで、本研究では高等植物におけるAsAによる細胞内レドックス状態の制御機構の解明を目的として、まずAsA合成の分子機構およびその制御機構の解明を試みた。さらに、主要なROSの発生源である葉緑体に局在するAPX、そして顕著なストレス応答性を示す細胞質型APXに着目し、それらの細胞内レドックス制御および環境ストレス耐性/応答への関与について解析した。

1) ホスホマンノースイソメラーゼ1はAsA合成系の制御に関与する

高等植物のAsA合成系の第1段階として、ホスホマンノースイソメラーゼ(PMI)はFru-6PからMan-6Pへの反応を可逆的に触媒する。よって、PMIは炭素代謝からAsA合成への炭素分配を介して、AsA合成の制御に関与する可能性が考えられた。そこで、シロイヌナズナに存在する2つのPMI遺伝子(PMI1、2)のAsA合成系の制御への関与について解析した。

PMI1およびPMI2のリコンビナントタンパク質を製し、酵素学的性質について検討したところ、PMI1およびPMI2はMan-6Pに対して同等の触媒能(K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>値)を示した。興味深いことに、PMI1およびPMI2はAsAにより基質と拮抗的に阻害された。

シロイヌナズナにおいて、PMI1は顕著な光応答性を示した。また、PMI1の光応答性は光遮断あるいは光合成電子伝達系の阻害剤により顕著に抑制された。このときの総PMI活性およびAsAレベルは、PMI1の発現の挙動を反映していた。一方、PMI2は通常条件下ではほとんど発現しておらず、長期間の光遮断および光合成電子伝達系の阻害により誘導された。さらに、PMI1の発現抑制株ではAsAレベルが低下していたが、PMI2遺伝子破壊株では、AsAレベルに野生株との差は認められなかった。以上の結果から、PMI1はAsA合成に必須であり、AsA合成系の制御にも機能することが示された。

### 2) L-ガラクトノ-1,4-ラク톤のアスコルビン酸への変換は、光合成電子伝達系により調節される

D-Man/L-Gal 経路の最終段階である L-GalL から AsA への変換は、ミトコンドリアに局在する L-GalL デヒドロゲナーゼ (L-GalLDH) により触媒される。一方、上述のように AsA 生合成系は光により制御される。そこで、光、特に光合成電子伝達系の L-GalL から AsA への変換に及ぼす影響について解析した。

3 週齢のシロイヌナズナ葉を 10 mM L-GalL で処理したところ、光照射下において AsA レベルの著しい増加が認められた。一方、暗黒下では L-GalL 処理による AsA レベルの増加は認められなかった。さらに、光合成電子伝達系阻害剤処理は、L-GalL 処理による AsA レベルの増加を抑制した。

次に、細胞質画分で L-GalL を酸化できるラット由来の L-グルノ-1,4-ラクトンオキシダーゼ (GuLLO) を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナ (Ox-GuLLO) 株の葉を L-GalL で処理し、光照射下あるいは暗黒下に静置した。その結果、いずれの条件下においても野生株および Ox-GuLLO 株の AsA レベルに有意な差は認められなかった。したがって、光合成電子伝達系は *in vivo* における L-GalLDH の活性調節を介して L-GalL から AsA への変換を制御することが示唆された。

### 3) 葉緑体型 APX アイソザイムの光酸化的ストレス防御への関与

光合成の場である葉緑体は最も主要な ROS の発生源の 1 つである。それに対して葉緑体には、APX がstroma (sAPX) およびチラコイド膜上 (tAPX) に局在しており、葉緑体レドックスの制御に機能している。しかしながら、葉緑体型 APX の光酸化的ストレス防御への寄与については不明な点が多く残されている。そこで、sAPX あるいは tAPX を個々に破壊したシロイヌナズナ (KO-sAPX および KO-tAPX) を用いて解析した。

野生株、KO-tAPX 株および KO-sAPX 株に強光 (1,000  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$ ) を照射、あるいはパラコート処理 (25  $\mu\text{M}$ ) を行ったところ、全ての植物体で光合成電子伝達活性の抑制が認められたが、野生株および KO-sAPX 株よりも KO-tAPX 株において顕著な低下が認められた。また、酸化タンパク質の増加は KO-tAPX 株、KO-sAPX 株、野生株の順で顕著であった。さらに、このときの  $\text{H}_2\text{O}_2$  レベルは、野生株および KO-sAPX 株と比較して、KO-tAPX 株において顕著な増加が認められた。

以上の結果より、tAPX および sAPX は光酸化的ストレス防御に寄与しており、効果的な防御にはチラコイド膜上での迅速な  $\text{H}_2\text{O}_2$  消去が重要であることが示された。

### 4) チラコイド膜結合型 APX の酸化的シグナリングの調節への関与

tAPX は非常に不安定な酵素であり、深刻な環境ストレス下では容易に失活する。しかし、その不安定性は植物種を超えて広く保存されていることから、酸化的シグナリングとの関連性が示唆された。そこで、エストロゲン (Est) による一過的な tAPX 発現抑制系を構築し、tAPX の発現抑制の遺伝子発現に及ぼす影響について解析した。

tAPX の一過的発現抑制用株 (tAPX XR19 株) およびコントロール株に 100  $\mu\text{M}$  Est を噴霧した。その結果、tAPX XR19 株においてのみ、Est 処理 24 時間後に tAPX の転写レベルの著しい低下が認められ、48 時間後には tAPX タンパク質の減少および APX 活性の低下が認められた。しかし、tAPX の一過的抑制は光合成電子伝達活性および酸化タンパク質レベルに影響しなかった。一方、tAPX の一過的抑制に伴い、既知のいくつかの ROS 応答性遺伝子群の誘導あるいは抑制が認められた。そこで、Est 処理 48 時間後のコントロール株および tAPX XR19 株を用いてマイクロアレイを行った。その結果、tAPX 発現の抑制に伴いプログラム細胞死や老化に関与する遺伝子群の誘導、光合成や生長、発達に関与する遺伝子群の抑制が認められた。よって、光酸化的ストレス条件下において、tAPX の不安定性を介した葉緑体レドックス状態の変化はプログラム細胞死や老化の誘導に特異的に寄与している可能性が考えられた。

### 5) 光酸化的ストレス条件下における細胞質型 APX の誘導に関する 2 つの異なるレドックスシグナリング経路

APX アイソザイムの中で細胞質型 APX (cAPX) のみが強光照射やパラコート処理などの光酸化的ストレスに対して顕著な応答性を示す。よって、cAPX が細胞内レドックス制御に重要な機能を持つことが示唆された。そこで、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、あるいは ROS を生成させる薬剤、光合成電子伝達系阻害剤などを用いて、タバコにおける cAPX の発現への影響について解析したところ、タバコ cAPX の発現は  $\text{H}_2\text{O}_2$  レベルおよび PQ のレドックスによって制御されることが明らかになった。

そこで次に、光・酸化的ストレス時の主要な  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成部位である葉緑体内の  $\text{H}_2\text{O}_2$  消去能を向上させた形質転換タバコ TpTAP-12 および T43-1 を用いて検討した。強光下での野生株および形質転換株において、細胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  レベルおよび cAPX 発現の増加、そして PQ のレドックスを反映する  $q_p$  の低下が認められた。しかし、強光照射 2 時間後までの細胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  レベルの増加に、野生株と形質転換株に差が認められたのに対し、cAPX 発現の増加および  $q_p$  の低下に差は認められなかった。次に、野生株および形質転換株にパラコートを噴霧した。その結果、全ての植物で細胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  レベルおよび cAPX 発現の増加が認められたが、 $q_p$  に有意な変化は認められなかった。さらに、形質転換株における細胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  レベルおよび cAPX 発現の増加に、野生株と比較して明らかな遅延が認められた。以上の結果から、cAPX の強光応答は、初期段階では PQ のレドックスが関与し、その後、継続するストレスにより葉緑体で蓄積した  $\text{H}_2\text{O}_2$  もまた関与することが示唆された。

### 6) 細胞質型 APX は酸化的シグナリングの調節に必須である

ジャスモン酸 (JA) は植物の傷害ストレス応答に関与するホルモンである。JA は NADPH オキシダーゼの活性化を介して細胞外で ROS を生成させ、防御遺伝子を誘導する。しかし、ROS は強い酸化力を持つため、細胞外 ROS の機能発現制御には cAPX によるレドックス制御系が重要であることが示唆された。そこで、シロイヌナズナ cAPX (APX1) の遺伝子破壊株 (KO-APX1) を用いて、APX1 の JA を介した酸化的シグナリングへの影響について解析した。

まず、APX1 欠損の傷害ストレス耐性に及ぼす影響について解析した。野生株および KO-APX1 株の葉に傷害 (カット) を与えたところ、KO-APX1 株でのみ生育の遅延が認められた。傷害付与後の葉における  $\text{H}_2\text{O}_2$  の蓄積は、野生株では傷害部位でのみ認められたが、KO-APX1 株では広範囲に認められ、細胞死も増加した。さらに、野生株および KO-APX1 株を 10  $\mu\text{M}$  JA メチル (MeJA) を含む培地上で生育させると、KO-APX1 株において著しい生育障害、 $\text{H}_2\text{O}_2$  および酸化タンパク質レベルの顕著な増加が認められた。これらの結果から、傷害ストレス時において、APX1 の欠損は JA により細胞外で発生した  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する感受性を強めることが明らかになった。

そこで、野生株および KO-APX1 株に、MeJA (50  $\mu\text{M}$ ) を噴霧し、JA 応答性あるいはパラコート応答性遺伝子群の挙動を比較した。その結果、両株で JA 応答性遺伝子の誘導は認められた。一方、野生株では ROS 応答性遺伝子の誘導は認められなかったが、KO-APX1 株では誘導が認められた。以上の結果より、APX1 は酸化的シグナリングを介した細胞内のレドックス制御に大きく貢献していることが明らかになった。

## 論文審査結果の要旨

光や温度、水分などの環境の変化（ストレス）は植物の生産性に莫大な被害をもたらす。これらは植物細胞内における光合成や呼吸などのエネルギー代謝を崩壊させ、それにより活性酸素種（ROS）を増大させる。ROSは強い酸化力を持つため、その蓄積はあらゆる細胞内成分に酸化的損傷をもたらす、植物体を枯死させる。一方近年、ROSは環境ストレス応答においてシグナリング因子として機能することが明らかになってきた。したがって、植物の環境ストレス応答を理解するためには、ROSの生成と抗酸化系のクロストークからなる細胞内のレドックス状態の制御機構の解明が不可欠である。

アスコルビン酸（AsA）は高等植物において最も豊富に存在する抗酸化剤であり、自信の強い抗酸化活性に加え、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）の電子供与体としても機能する。AsAによるレドックス制御系は葉緑体、ミトコンドリア、マイクロボディ、細胞質に局在している。よって、AsAはオルガネラから細胞レベルにおけるレドックス制御に深く関与すると考えられた。

高等植物において、AsAはD-フルクトース-6リン酸（Fru-6P）を初発物質として、D-マンノース-6リン酸（Man-6P）、L-galactose（L-Gal）、L-ガラクトノ-1,4-ラクトン（L-GalL）などを介した経路（D-Man/L-Gal経路）により合成される。これまでに、AsAの合成の分子特性およびその制御機構は、国内外の研究グループにより盛んに解析されてきたが、これまでに明確な解答が得られていないのが現状であった。

そこで本論文では、高等植物におけるAsA合成系の制御機構および葉緑体あるいは細胞質型APXを介したレドックス制御系について解析された。

### 1) ホスホマンノースイソメラーゼ1はAsA合成系の制御に関与する

ホスホマンノースイソメラーゼ（PMI）は、AsA合成系の第1段階であるFru-6PからMan-6Pへの反応を可逆的に触媒する。しかし、その重要性にも関わらず植物では未同定であった。そこで、シロイヌナズナに存在する2つのPMI遺伝子（PMI1、2）のレコンビナントタンパク質を複製し、酵素学的性質について検討したところ、興味深いことに、PMI1およびPMI2はAsAにより基質と拮抗的に阻害された。

発現パターン解析より、PMI1は顕著な光応答性を示し、それは光遮断あるいは光合成電子伝達系の阻害剤により顕著に抑制されることを見出した。PMI1の発現は総PMI活性およびAsAレベルと相関関係を示したのに対し、PMI2は長期間の光遮断および光合成電子伝達系の阻害により誘導された。さらに、PMI1の発現抑制株ではAsAレベルが低下していたが、PMI2遺伝子破壊株では、AsAレベルに野生株との差は認められなかった。よって、PMI1はAsA合成に必須であるとともに、その酵素学的性質および発現様式からAsA合成系の制御にも機能することを明らかにした。

### 2) L-ガラクトノ-1,4-ラクトンのアスコルビン酸への変換は、光合成電子伝達系により調節される

DAAs合成系の最終段階であるL-GalLからAsAへの変換は、ミトコンドリアに局在するL-GalLデヒドロゲナーゼ（L-GalLDH）により触媒される。本章では、光、特に光合成電子伝達系のL-GalLからAsAへの変換に及ぼす影響について解析した。

光照射下において、L-GalL処理は葉のAsAレベルを著しく増加させたが、それは暗黒下あるいは光合成電子伝達系阻害剤処理では見られなかった。さらに、L-GalL処理は、細胞質画分でL-GalLを酸化できるラット由来L-グロノ-1,4-ラクトンオキシダーゼ（GuLLO）の過剰発現の影響を受けなかった。よって、光合成電子伝達系は*in vivo*におけるL-GalLDHの活性調節に機能することが示唆された。

### 3) 葉緑体型APXアイソザイムの光酸化的ストレス防御への関与

植物細胞内において、最も主要なROSの発生源の1つである葉緑体には、APXがストロマ（sAPX）およびチラコイド膜上（tAPX）に局在しており、レドックスの制御に機能している。本章では、sAPXあるいはtAPXを個々に破壊したシロイヌナズナ（KO-sAPXおよびKO-tAPX）を用いて解析した。

野生株、KO-tAPX株およびKO-sAPX株に強光を照射、あるいはバラコート処理（25 μM）を行ったところ、光合成電子伝達活性の抑制、酸化タンパク質の増加、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の蓄積はKO-tAPX株、KO-sAPX株、野生株の順で顕著であった。これらの結果より、tAPXおよびsAPXは光酸化的ストレス防御に寄与しており、効果的な防御にはチラコイド膜上での迅速なH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消去が重要であることが明らかになった。

### 4) チラコイド膜結合型APXの酸化的シグナリングの調節への関与

tAPXの酵素学的不安定の酸化的シグナリング制御への関与が示唆されていた。そこで、エストロゲン（Est）による一過的なtAPX発現抑制系を構築し、tAPXの発現抑制の遺伝子発現に及ぼす影響について解析した。

tAPXの一過的発現抑制用株（tAPX XR19株）へのEst処理は、tAPXの転写、タンパク質、活性レベルを抑制した。tAPXの一過的抑制は酸化的損傷を引き起こさなかったが、既知のいくつかのROS応答性遺伝子群の誘導あるいは抑制をもたらした。マイクロアレイ解析により、tAPXの不安定性を介した葉緑体レドックス状態の変化はプログラム細胞死や老化の誘導に特異的に寄与している可能性を示唆した。

### 5) 光酸化的ストレス条件下での細胞質型APXの誘導に関与する2つの異なるレドックスシグナリング経路

細胞質型APX（cAPX）は顕著な光酸化的ストレス応答性を示す。そこで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、あるいはROSを生成させる薬剤、光合成電子伝達系阻害剤などを用いて、タバコにおけるcAPXの発現への影響について解析したところ、タバコcAPXの発現はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>レベルおよびPQのレドックスによって制御されることが明らかになった。

さらに、光・酸化的ストレス時の主要なH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成部位である葉緑体内のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消去能を向上させた形質転換タバコTpTAP-12およびT43-1を用いて検討した結果、cAPXの強光応答は、初期段階ではPQのレドックスが関与し、その後、継続するストレスにより葉緑体で蓄積したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>もまた関与することが示唆された。

### 6) 細胞質型APXは酸化的シグナリングの調節に必須である

傷害ストレス応答に関するジャスモン酸（JA）はNADPHオキシダーゼの活性化を介して細胞外でROSを生成させ、防御遺伝子を誘導する。しかし、ROSは強い酸化力を持つため、細胞外ROSの機能発現制御にはcAPXによるレドックス制御系が重要であると考えられた。そこで、野生株およびシロイヌナズナcAPX（APX1）の遺伝子破壊株（KO-APX1）の葉に傷害（カット）を与えたところ、KO-APX1株でのみ生育の遅延が認められた。傷害付与後の葉におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の蓄積は、野生株では傷害部位でのみ認められたが、KO-APX1株では広範囲に認められ、細胞死も増加した。さらに、同様の現象がJA処理によっても認められ、傷害ストレス時において、APX1の欠損はJAにより細胞外で発生したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する感受性を強めることが明らかになった。

また、APX1の欠損はJA応答性遺伝子の発現の混乱を引き起こした。よって、APX1は酸化的シグナリングを介した細胞内のレドックス制御に大きく貢献していることが明らかになった。

以上本論文は、植物におけるAsA合成酵素の分子特性、AsA合成系の光による制御機構について詳細に解析されている。さらに、葉緑体および細胞質型APXの環境ストレス応答における役割を明確にしている。これらの成果は、AsAを介した植物のレドックス制御系による環境ストレス応答の分子機構の解明に大きく貢献した。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会などの所定の手続きを経たうえ、平成21年2月9日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。