



光合成生物におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの発現調節機構と生理機能の解明

島根大学生物資源科学部生命工学科 助教授 石川 孝博

はじめに

活性酸素種 (ROS) は生体にとって毒性を有する反面、環境応答、プログラム細胞死などさまざまな生理作用の発現にシグナル分子として機能している。高等植物や藻類を含めた光合成生物は細胞内酸素濃度が非常に高いため、ROS が容易に生成しやすい。そのため、光合成生物は独自の ROS 代謝系を発達させることで、細胞内 ROS 濃度を厳密に調節している。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) は、細胞内で豊富に存在するアスコルビン酸を特異電子供与体とする H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝酵素であり、アスコルビン酸/グルタチオンサイクルの中心的役割を担っている。本研究では光合成生物の APX を遺伝子レベルで解析し、その生理機能の解明を行った。その結果、APX は抗酸化作用のみならず細胞内レドックス調節の鍵酵素として重要な機能を果たすことが明らかになった。以下にその概要を述べる。

1. 光合成生物におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの分布と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝

筆者らがユーグレナ APX を抗原として作製したモノクローナル抗体は、さまざまな光合成生物に由来するすべての APX に共通のエピトープを認識したことから、APX クローン化のための非常に有用なプローブとなった。その結果、光合成生物における APX の分布を遺伝子発現レベルで明らかにすることができた。APX はアスコルビン酸合成能を有する真核藻類と高等植物に広く局在していたが、アスコルビン酸を生成しないラン藻は APX 遺伝子をもたず、APX と共通の祖先タンパク質に由来するカタラーゼペルオキシダーゼが機能していた (図 1)。また真核藻類と高等植物で APX の細胞内局在性を比

較すると、両者の間に明確な違いが見られた。すなわち、高等植物では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成部位となる葉緑体、ミクロボディ、細胞質など細胞内コンパートメントに多数の APX アイソザイムが局在するのに対し、ほとんどの真核藻類ではアイソザイムの存在が認められず、ユーグレナやクロレラでは細胞質に、クラミドモナスでは葉緑体のストロマのみに局在が限られていた。藻類の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝を明らかにするため、光条件下のユーグレナを例として検討した。ユーグレナ葉緑体では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する顕著な光合成能の耐性が認められること、光照射後に葉緑体外へ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の拡散が観察されることから、藻類は光酸化ストレス下においても十分な光合成活性を維持しつつ、生成した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のオルガネラ外への移行も消去機構の一部として機能していることが考えられた。

2. アスコルビン酸ペルオキシダーゼの発現調節機構

1) ユーグレナ APX の構造と発現調節機構

カタラーゼをもたないユーグレナは、細胞質にのみ局在する APX が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝の中心的役割を果たしている。ユーグレナ APX の分子量は約 58 kDa であり、高等植物の細胞質型 APX に比べ約 2 倍の分子量に相当する。ユーグレナ APX の一次構造解析から、本酵素はポリペプチド鎖内で二つの相同な配列がタンデムに配置されており、結果としてこれまでに例のない分子内 2 量体構造をとることが明らかになった。

暗適応ユーグレナ細胞に光照射を行うと、光依存的に APX 活性が誘導される。このとき、APX タンパク質レベルは増加するが転写レベルは常に一定であること、葉緑体発達阻害剤処理により APX 活性の誘導が抑制されることから、ユーグレナ

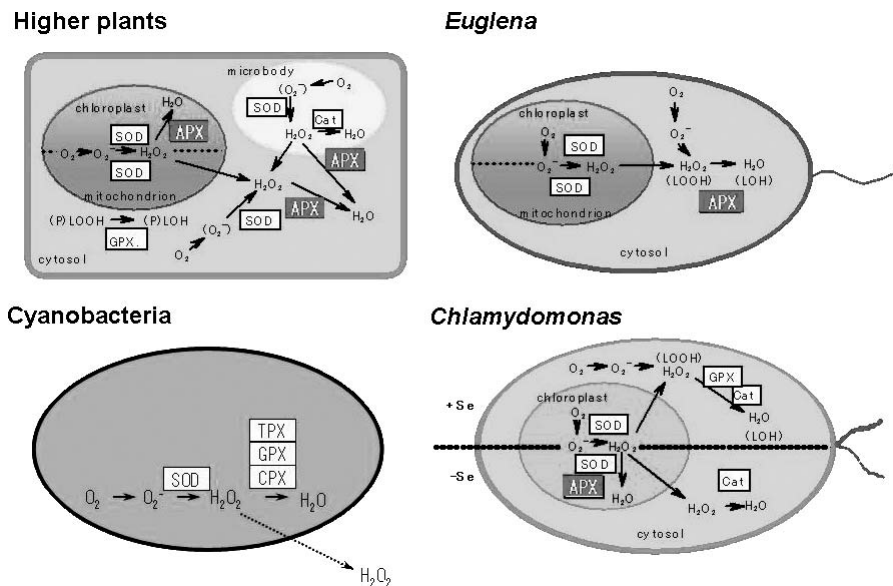


図 1 光合成生物間における APX の分布  
 APX: アスコルビン酸ペルオキシダーゼ, Cat: カタラーゼ, CPX: カタラーゼペルオキシダーゼ, SOD: スーパーオキシドディスムターゼ, GPX: グルタチオンペルオキシダーゼ, TPX: チオレドキシンペルオキシダーゼ

APX の発現は葉緑体の発達と協調して転写後調節により行われることが示された。またユーグレナ APX は、補欠分子族となる Fe イオンにより、酵素の活性化と転写後調節による 2 段階の発現調節を受け、ヘムの生合成段階も本酵素の転写後調節に影響を及ぼすことが示された。

2) 選択的スプライシングによる葉緑体型 APX 発現調節機構の発見

高等植物の葉緑体には、酵素学的性質が非常に類似したチラコイド膜結合型 APX (tAPX) およびストロマ可溶型 APX (sAPX) の二つのアイソザイムが局在している。前述のユーグレナ APX モノクローナル抗体を用いて、ホウレンソウより二つの細胞質型、ミクロボディ型および二つの葉緑体型 APX をコードする cDNA および遺伝子のクローン化に成功し、それらの分子特性を世界に先駆け明らかにした。非常に興味深いことに葉緑体型 APX アイソザイムは一つの遺伝子 (APXII) 上にコードされており、全 13 個の構成エクソンのうち、エクソン 1 から 11 には sAPX と tAPX の共通配列がコードされ、エクソン 12 および 13 にはそれぞれ sAPX の C 末端アミノ酸および tAPX のチラコイド膜結合領域がコードされていた (図 2)。さらに、ホウレンソウ葉の単離ポリゾームを用いた RT-PCR の結果、この選択的スプライシングにより 3' 末端構造の異なる 4 種類の成熟型 mRNA が生成することが示された。こ

れらはいずれもエクソン 11 以降の構成が異なっており、それぞれエクソン 12 のみが存在する sAPX-I、イントロン 11 以降がスプライシングを受けない sAPX-II、エクソン 12 以降がスプライシングを受けない sAPX-III、エクソン 13 のみが存在する tAPX-I であった。以上の結果から、二つの葉緑体型 APX アイソザイムは、3' 領域の選択的スプライシングによる発現調節を受けることで、細胞内局在性 (ストロマ, チラコイド膜) を変化させ、それぞれ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝に機能していることが明らかになった。

3. 形質転換植物を用いた環境ストレス応答時における APX 生理機能の評価

APX の形質転換植物を作出し、環境ストレス耐性能と環境ストレス応答時における APX アイソザイムの生理機能を解析した。tAPX 過剰発現タバコ (TpTAP-12) は、パラコートおよび強光照射による光・酸化ストレスに対して顕著な耐性能の増加が認められた。野生株と TpTAP-12 における光・酸化ストレス応答時の光合成や抗酸化パラメーターの解析により、葉緑体中のアスコルビン含量の低下と葉緑体型 APX の失活が光・酸化ストレス障害の初期要因となり、その結果蓄積した ROS がカルビンサイクル構成酵素の酸化失活を誘発することを証明した。TpTAP-12 の光・酸化ストレス耐性能は、この初期段階で失活した葉緑体型 APX の相補により得られたことが判明し

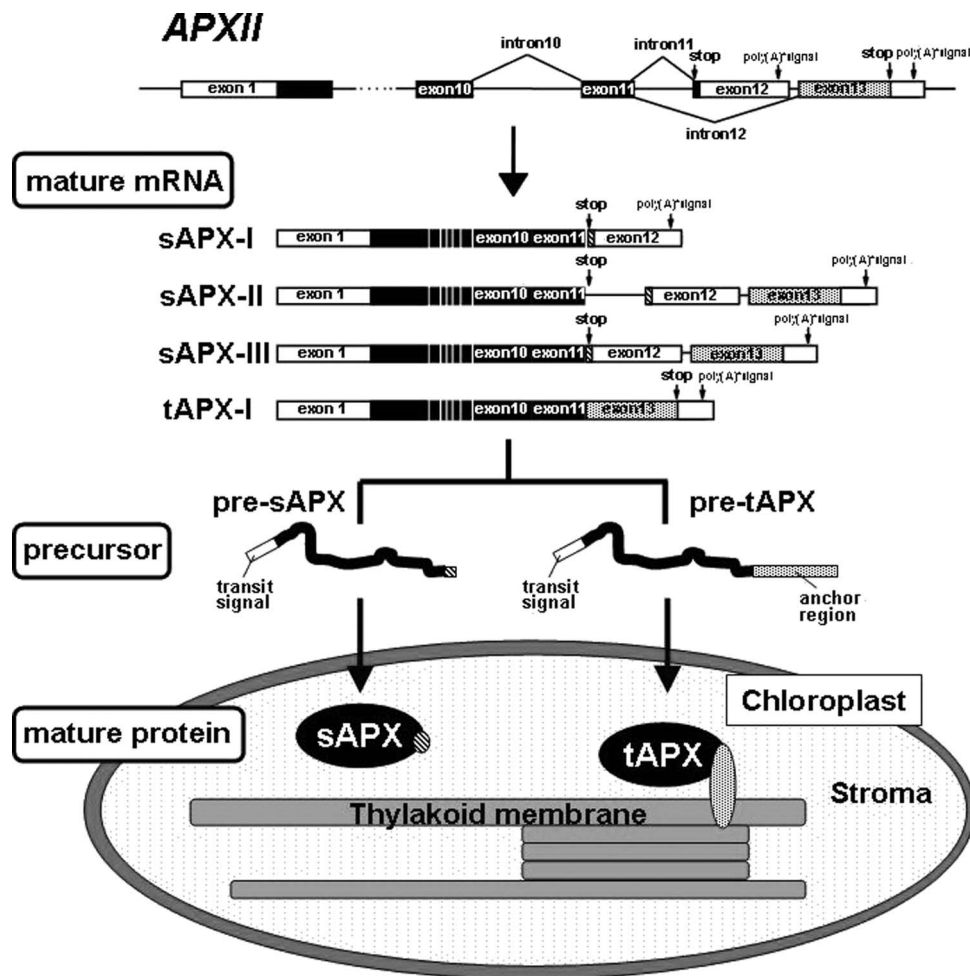


図 2 選択的スプライシングによる葉緑体型 APX の発現  
APXII より発現した前駆体 mRNA は、3' 末端領域の選択的スプライシングにより 4 種類の成熟型 mRNA に加工される。エクソン 12 にはストロマ型 APX (sAPX) の C 末端アミノ酸が、エクソン 13 にはチラコイド膜型 APX (tAPX) のための膜結合領域がそれぞれコードされている。

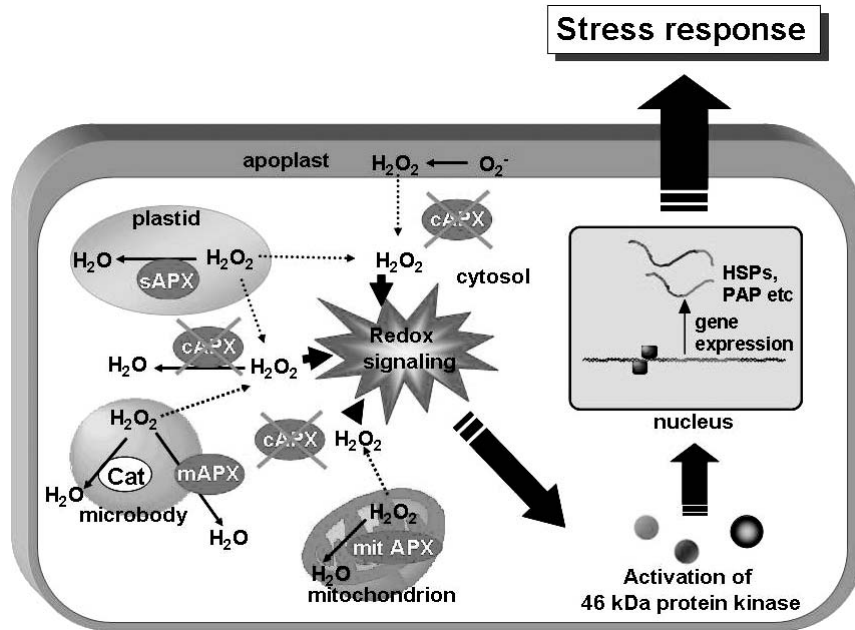


図3 細胞質型 APX を発現抑制したタバコ培養細胞におけるレドックス応答機構  
細胞質型 APX 発現抑制の結果、蓄積した ROS をトリガーとしたレドックスシグナルによりタンパク質キナーゼの活性化、環境ストレス応答関連遺伝子群の発現上昇が観察され、環境ストレス耐性能の増強が認められる。

た。

高等植物の APX アイソザイムのうち、細胞質型 APX は光や酸化ストレスに対して転写レベルで顕著な発現応答性を示すことから、ストレス応答時の重要な役割が示唆されていた。タバコ BY-2 細胞は、全 APX 発現量の約 80% を細胞質型 APX が占めることから、細胞質型 APX 機能解析に好都合であった。コサブレーションにより APX 活性を野生株の約 75% まで低下させた細胞質型 APX 発現抑制細胞 (cAPX-S3) は、野生型細胞に比べ熱や塩処理による環境ストレス耐性能の著しい増強が認められた。そこでこの機構を詳細に検討したところ、cAPX-S3 では細胞内 ROS レベルの上昇に伴う細胞内レドックス状態変化、HSP、DnaJ、NDPK などさまざまなストレス応答遺伝子の発現上昇、MAP キナーゼの顕著な活性化が観察された。以上の結果から、細胞質型 APX はストレス応答時の細胞内レドックスシグナル調節の中心的役割を担い、その後のストレス応答性に影響を及ぼすことを提唱した (図 3)。

おわりに

以上、APX 遺伝子の発現調節機構および光合成生物における本酵素の生理的役割と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝機構を明らかにできた。藻類と高等植物における APX 局在性の違いは、それぞれの生育環境が抗酸化系の発達にも影響を及ぼしたと考えられる。葉緑体型 APX アイソザイムの選択的スプライシング機構の発見は、高等植物における転写後調節機構の重要性を認識させ、筆者らのグループにおける現在の研究指針に大きな影響を与えてくれた。細胞質型 APX の発現抑制により、APX の新たな機能として環境応答時の細胞内レドックス調節への関与が示され、植物レドックス応答解析のためのモデル実験系の開発につなが

っている。今後、アスコルビン酸を含め他の抗酸化系とのクロストークを解明することで、レドックスによる光合成生物の環境応答機構の理解に役立つことが期待される。

本奨励賞にご推薦いただきました島根大学生物資源科学部教授 柴田 均先生ならびに日本農芸化学会中四国支部長 海老原 清先生をはじめご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。本研究は、近畿大学農学部食品栄養学科栄養化学研究室 (現 バイオサイエンス学科植物分子生理学研究室) および島根大学生物資源科学部生命工学科第 5 研究グループで行われたものです。本研究を行う機会を与えていただき、研究者としての礎とフィロソフィーを教授いただいた近畿大学農学部教授 重岡 成先生に心より感謝申し上げます。また共同研究者として多大なご協力をいただいた近畿大学農学部 藪田行哲博士、田茂井政宏博士、三枝尚洋博士、宮川佳子博士、武田 徹博士、現 中部大学応用生物学部 吉村和也博士、現 ハワイ大学 Rapolu Madhusudhan 博士に厚く感謝いたします。さらに本研究にかかわりこれまで支えてくれた島根大学および近畿大学の修了生、卒業生、ならびに両研究室の現研究員・大学院生・学部学生諸氏に改めて感謝いたします。長年にわたり激励をいただいた近畿大学名誉教授 光永俊郎先生、大阪府立大学名誉教授 北岡 正三郎先生に深く感謝いたします。最後に常日頃から数々の暖かいご助言を賜りました大阪府立大学農学部教授 中野長久先生、島根大学生物資源科学部教授 澤 嘉弘先生、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授 横田明穂先生、和歌山県立医科大学大学生化学教室教授 錦見盛光先生に心より厚く御礼申し上げます。