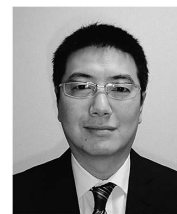


植物における光酸化的ストレス応答のシグナル伝達に関する研究



鳥取大学農学部生物資源環境学科 准教授 藪田 行 哲

はじめに

植物は酸素発生型の光合成を行うため、酸素の過還元による活性酸素種 (ROS) の生成は不可避である。さらに、光合成では消費しきれない強光による過剰な光エネルギーや、高温による光合成装置の異常などにより ROS の生成量は増大し、“光酸化的ストレス”と呼ばれる酸化傷害を引き起こす。それに対して植物は、様々なタンパク質の活性化/不活性化、新規タンパク質の発現誘導などを通じて種々の代謝をダイナミックに変化させることにより応答している。通常、このような代謝変化の制御には転写因子を含めた様々なシグナル伝達因子が関与するが、光酸化的ストレス応答に関わる因子やそれらによるシグナル伝達機構に関しては不明な点が多く残されている。光酸化的ストレスは植物が自然界で遭遇する機会が多く、その応答機構の解明は生物が多様かつ巧妙に発達させてきたシグナル伝達機構の理解に知見を与えるだけでなく、食糧増産や環境問題の解決にも繋がると考え、以下の研究を行った。

1. 光酸化的ストレス応答の制御に関わる因子の単離

光酸化的ストレスに応答したシグナル伝達機構に関わる因子を同定するため、サブトラクション法によりシロイヌナズナから強光に応答して発現誘導される遺伝子を単離した。それらには熱ショック転写因子 (*HsfA2*)、NAC転写因子 (*ANAC078*) および、シグナル伝達に関わる *Sgt1a* などの遺伝子が含まれており、それらの光酸化的ストレス応答への関与が示唆された。また、多数の熱ショックタンパク質遺伝子 (*Hsp*) が含まれ、光酸化的ストレス下でのタンパク質の修復に機能していると考えられた。次いで種々の代謝に関わる酵素遺伝子が含まれ、光酸化的ストレス下でのダイナミックな代謝変化が示唆された。これらの発現は、先に挙げた *HsfA2*、*ANAC078* あるいは *Sgt1a* により制御されていると考えられた。そこで、これら転写因子やシグナル伝達因子の光酸化的ストレス応答における役割を明らかにすることを試みた。

2. *HsfA2* は光酸化的ストレス応答のキーレギュレーターとして機能する

HsfA2 は光酸化的ストレスにより僅か 15分以内で発現誘導されていた。過剰発現株を用いたマイクロアレイ解析により、*HsfA2* は *Hsp* だけでなく、ROS代謝の鍵酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ2 (*APX2*) や、ラフィノース属オリゴ糖 (RFOs) 合成の律速段階を触媒するガラクトキノール合成酵素1 (*GolS1*) の発現誘導に関わることが明らかになった。また、*HsfA2* 過剰発現シロイヌナズナは非常に厳しい光酸化的ストレスに対して耐性を示した。これらのことから、本転写因子は光酸化的ストレス応答の発端を担うキーレギュレーターであると考えられた (図1)。また、これら標的遺伝子の発現はプロモーター中に存在する熱ショックエレメント (HSE) を *HsfA2* が直接認識することにより制御されていた。また、*Hsp90* とプ

ロテアソーム活性が *HsfA2* の発現制御に関与すること、*HsfA2* プロモーター中の HSE が *HsfA2* の発現誘導に重要であることを見出した。さらに CRES-T ラインおよび T-DNA 挿入遺伝子破壊株を用いた解析やレポーターアッセイにより、*HsfA2* の発現は *HsfA1d* および *HsfA1e* (*HsfA1d/A1e*) が *HsfA2* プロモーター中の HSE を介して制御していることを明らかにした (図1)。さらに *HsfA1d/A1e* 二重遺伝子破壊株の解析により、*HsfA1d/A1e* は *HsfA2* に加え、*HsfA7a* や *HsfB1* など多くの *Hsf* の発現も誘導する、“Hsf シグナリングネットワーク”を形成し、光酸化的ストレスを含む様々な環境ストレス応答の中心的役割を果たしていることが示唆された (図2)。

3. *Sgt1a* は *Hsp* の発現を制御する

シロイヌナズナには2つの *Sgt1* ホモログ (*Sgt1a* と *Sgt1b*) が存在し、*Sgt1b* はイネ *Sgt1* と同様に、病原菌感染応答のシグナル伝達に関わるが、*Sgt1a* の機能は不明であった。そこで両遺伝子の過剰発現株および破壊株の種々のストレスに対する耐性を評価した。その結果、*Sgt1a* 遺伝子破壊株のみが顕著な熱ストレス耐性能の低下を示した。また、*Sgt1a* 遺伝子破壊株でのみ、熱ストレス下でのいくつかの *Hsp* の発現が野生株と比較して顕著に低下していた。以上の結果より、*Sgt1a* は *Hsp* の発現制御を介して熱ストレス応答に関わっていることが明らかになった。

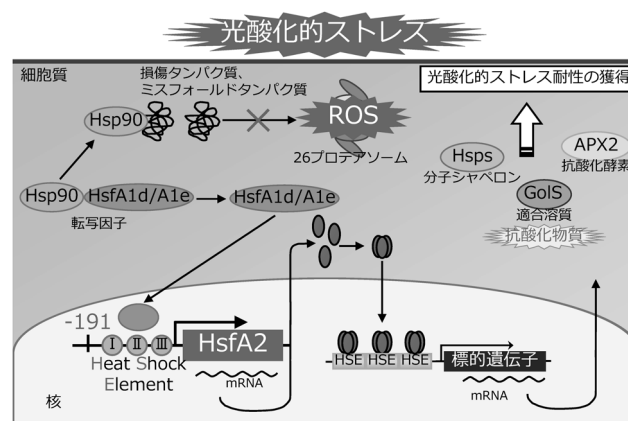


図1 *HsfA2* を介した光酸化的ストレス応答機構

通常条件下では *HsfA1d/A1e* は *Hsp90* と結合し、細胞質に留まっている。しかし、ストレス下では蓄積した ROS によりプロテアソームは阻害を受け、損傷タンパク質などが蓄積し、それらを修復するために、*Hsp90* は *HsfA1d/A1e* から解離する。フリーとなった *HsfA1d/A1e* は核へと移行し、*HsfA2* の発現を誘導する。*HsfA2* は標的遺伝子である *Hsp* や *APX2* および *GolS* の HSE に結合し、発現を誘導することで光酸化的ストレスに耐性を獲得し、ストレスに応答・適応する。

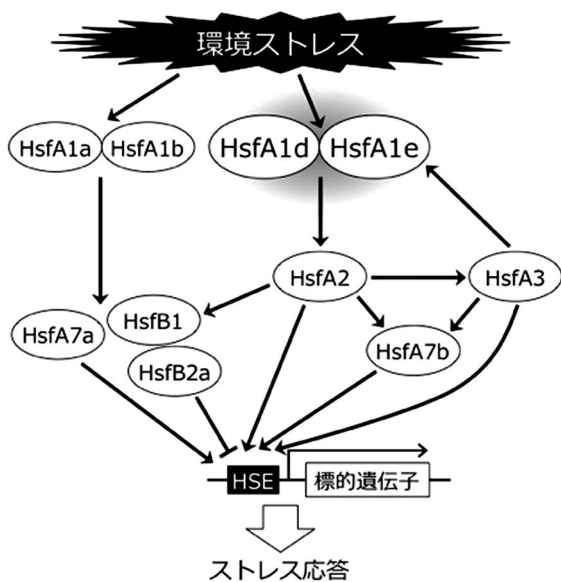


図2 環境ストレス応答における Hsf シグナリングネットワークのモデル図

4. ANAC078 はフラボノイド合成とプロテアソーム活性の制御に機能する

過剰発現株を用いたマイクロアレイ解析により、ANAC078の標的遺伝子の同定を行った。その結果、本転写因子はフラボノイド合成関連遺伝子やプロテアソームを構成するサブユニット遺伝子の発現誘導に関わることが明らかになった。実際に、ANAC078遺伝子破壊株ではフラボノイド合成に関わる酵素遺伝子やその制御に関わる複数の転写因子のストレス応答性が低下しており、過剰発現株ではその逆であった。また、フラボノイドの一種であるアントシアニンレベルもそれらの発現と同様の挙動を示した。さらに、ANAC078過剰発現株では、強光ストレス下でプロテアソームタンパク質が顕著に蓄積しており、26Sプロテアソーム活性の上昇が認められた。さらに、過剰発現株の強光ストレス耐性能は向上していた。以上より、ANAC078はフラボノイド合成とプロテアソーム活性の制御を介して光酸化的ストレス応答に関与していることが明らかになった。

5. ラフィノース属オリゴ糖 (RFOs) は抗酸化物質としても機能する

RFOsは適合溶質として機能し、乾燥耐性に重要である。しかし、乾燥を伴わないパラコート処理などの光酸化的ストレス下でもRFOs合成に関わる*GolS1*が発現誘導されていたことから、同ストレス下でのRFOsの新規の機能が示唆された。パラコート処理もしくは強光ストレス下での全ての*GolS*およびラフィノース合成酵素 (*RS*) アイソザイムの発現を解析した結果、それらの多数が発現誘導されており、ガラクトキノールおよびラフィノースも蓄積していた。また、*GolS*過剰発現株は光酸化的ストレス耐性を示した。さらに、ガラクトキノールおよびRFOsはアスコルビン酸やグルタチオンに匹敵する抗酸化能力を示した。以上の結果より、植物は抗酸化物質としてガラクトキノールおよびRFOsを蓄積し、光酸化的ストレスに応答していることが示唆された。

6. 光合成電子伝達系およびROSは光酸化的ストレス応答の

シグナルである

細胞質型APXの発現は光酸化的ストレスにより迅速に誘導される。そこで細胞質型APXの光酸化的ストレス応答に関わるシグナル伝達経路について解析した。その結果、本遺伝子の発現は光酸化的ストレスの初期段階では光合成電子伝達系のレドックス状態により、後期ではストレスに伴う H_2O_2 レベルの上昇により制御されていることを明らかにした。また、APXの基質であり、抗酸化物質として植物の光酸化的ストレス応答に重要なアスコルビン酸は明/暗条件に応答して増加/減少する。そこで、同条件下でのアスコルビン酸合成に関わる酵素遺伝子の発現を解析したところ、律速段階を触媒することが知られている*VTC2*を含む3つの酵素遺伝子の発現が明条件下で顕著に発現誘導された。さらに、光合成電子伝達阻害剤処理により明条件下でもこれらの発現が低下したことから、アスコルビン酸レベルもまた光合成電子伝達系のレドックス状態により制御を受けていることが明らかになった。

おわりに

以上より、植物は光酸化的ストレスに対してHsfA2やANAC078などの複数の転写因子やSgt1aに関わるシグナル伝達経路を介して、種々の*Hsp*、*APX*や*GolS*などストレス耐性や多様な代謝に関わる遺伝子の発現を誘導することによって応答していることが明らかになった。一方、植物の光酸化的ストレスの認知に関して、細胞内レドックス変化やカルシウムイオンなどの関与が示唆されているが、その詳細な分子機構については不明な点が多く残されており、植物の光酸化的ストレス応答を理解する上で今後の重要な課題となると思われる。

謝辞

本研究は、近畿大学農学部バイオサイエンス学科植物分子生理学研究室 (旧食品栄養学科栄養化学研究室および食品分子生理学研究室) および鳥取大学農学部生物資源環境学科において行われたものです。本研究を行う機会を与えていただくとともに、厳しく且つ熱心にご指導、ご鞭撻をいただき、研究の道へ導いて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、常日頃より、数々の激励と温かいご助言を賜りました鳥取大学農学部教授 渡邊文雄先生、大阪府立大学名誉教授 中野長久先生 (現大阪女子短期大学学長)、大阪府立大学名誉教授 和田野 晃先生、奈良先端科学技術大学院大学名誉教授 横田明穂先生に心より感謝いたします。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 横井 (西澤) 彩子博士 (現農業生物資源研究所)、田茂井政宏博士、三枝尚洋博士 (現大日本明治製糖株式会社)、田部記章博士、森下輝之博士、作山治美女史、鳥根大学生物資源科学部 石川孝博教授、丸田隆典博士、中部大学応用生物学部 吉村和也博士に感謝いたします。さらに、本研究に関わりこれまで支えてくれた鳥取大学農学部および近畿大学農学部の修士修了生、卒業生ならびに現院生、学部学生諸氏に感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中四国支部長・稲垣賢二先生 (岡山大学大学院環境生命科学研究科教授) ならびにご支援を賜りました中四国支部の諸先生方に厚く御礼申し上げます。