

植物の活性アルデヒド解毒代謝機構の解明

Detoxification Mechanisms of Reactive Aldehydes in Plants

(日本植物生理学会推薦)

代表研究者	山口大学	真野 純一	Yamaguchi University	Jun'ichi MANO
協同研究者	山口大学	松井 健二	Yamaguchi University	Kenji MATSUI
	ゲント大学	INZÉ, Dirk	Universiteit Gent	Dirk INZÉ

Antioxidative defense in cells is of critical importance in the plant protection against environmental stress. We have recently identified in *Arabidopsis thaliana* a novel enzyme 2-alkenal α,β -hydrogenase (ALH) that catalyzes the reduction of the α,β -unsaturated bond of 2-alkenals, potent cytotoxins produced from lipid peroxides. In this study, we aimed at verifying a possible involvement of the lipid peroxide-derived 2-alkenals (reactive aldehydes) in the environmental stress-induced damages of plants. When *A. thaliana* leaves were oxidatively stressed, production of crotonaldehyde and acrolein was enhanced. Unlike the case for oxidatively stressed animal cells, malondialdehyde was not a major product. Thus, the metabolism of lipid peroxides differs between plants and animals. Acrolein and crotonaldehyde inhibited CO_2 -fixation in isolated chloroplasts strongly, but did not affect the photosynthetic electron transport activity. Thus the reactive aldehydes specifically inhibit Calvin cycle activity, causing photoinhibition. We constructed three transgenic tobacco lines that overproduced the *A. thaliana* ALH. The transgenic plants exhibited higher tolerance to methyl viologen and to intense light, indicating that ALH protected leaf cells from oxidative stress. These results altogether indicate the involvement of the reactive aldehydes in the photooxidative injury and the significant contribution of ALH to the antioxidative defense in leaves.

研究目的

植物の成育に不可欠な光は、生体分子を励起することのできる高いエネルギーをもつため、潜在的に細胞成分を損傷する危険性をもっている。乾燥や低温、紫外線、オゾンなどの「環境ストレス」は、とくに強い太陽光との組合わせで、葉緑体での活性酸素生成を増大させ、細胞に酸化的損傷を与える。活性酸素を消去する細胞の抗酸化能は環境ストレス防御の要であり、植物は多種多様な抗酸化低分子、活性酸素消去酵素を豊富に含んでいる。代表研究者らは、シロイヌナズナ cDNA ライブラリの機能スクリーニングから新たに見いだされた抗酸化因子 P1 の生化学機能を追求し、P1 タンパク質が、過酸化脂質から生ずる毒性の強い α,β -不飽和アルデヒド（活性アルデヒド）の α,β -不飽和結合を還元し低毒化する新規酵素 2-alkenal α,β -hydrogenase (ALH) であることを発見した。本研究課題では、植物の環境ストレス傷害における活性アルデヒドの関与と活性アルデヒド消去のストレス防御への寄与を検証することを目指した。

研究経過

1. 酸化的ストレスによる葉での活性アルデヒドの増大

過酸化脂質からは結合の飽和度と炭素鎖長の異なる種々のアルデヒドが生成する。酸化的ストレス下で葉に蓄積するアルデヒドの分子種を特定するため、生葉からアルデヒドを抽出し、ジニトロフェニルヒドラジンによる誘導体化ののち HPLC によって同定・定量する方法を確立した。ストレスを与えていないシロイヌナズナ葉では、*n*-hexanal, 2-hexenal, 3-hexenal といった植物に典型的な C6 アルデヒドが主要なものであった。葉緑体の活性酸素生成を増大させるメチルビオローゲン (MV) を与え酸化的ストレス処理をおこなったシロイヌナズナ葉では、これらの C6 アルデヒドはほとんど増大しないのに対し、C3 および C4 活性アルデヒドであるアクロレインとクロトンアルデヒドの含量が増大した。一方、動物細胞において過酸化脂質分解の主要生成物とされるマロンジアルデヒドは MV 処理葉でもほとんど生成しなかった。すなわち、植物と動物では過酸化脂質分解経路は明らかに異なっており、植物では酸化的ストレスによって C3, C4 短鎖活性アルデヒドが主に蓄積することが明らかになった。

2. 活性アルデヒドによる光合成阻害

活性アルデヒドは強い求電子性をもち、チオール基やアミノ基に結合して酵素を阻害することがある。また、植物のミトコンドリアに存在するグリシンデカルボキシラーゼなどの活性中心のリボ酸に結合し、活性を阻害する。葉緑体で光合成反応に関与する酵素・タンパク質にも活性アルデヒドの潜在的ターゲットと考えられるものがあるが、光合成に対する活性アルデヒドの影響はほとん

ど研究されていなかった。ホウレンソウから葉緑体を単離し、アクロレインまたはクロトンアルデヒドを加え、数分間インキュベートしたのち、光合成活性を測定すると、炭酸固定活性が阻害されていた。一方チラコイド膜の NADP^+ 光還元活性はこれらのアルデヒドによって全く影響を受けなかった。すなわち、活性アルデヒドは葉緑体のカルビン回路を特異的に阻害した。葉緑体を $\text{C3} \sim \text{C9}$ のアルデヒド 2 mM で 8 分間処理したとき、炭酸固定の阻害率はアクロレインでは 100% 、次いで HNE, 2-nonenal で 70% 、そして炭素鎖長 $4 \sim 6$ の活性アルデヒドでは 50% であった。同じ炭素鎖長では飽和アルデヒドより活性アルデヒドのほうが明らかに強い阻害効果を示し、反応性の高い活性アルデヒドが葉緑体に対しても強力な毒物として作用することがわかった。

カルビン回路には、酵素タンパク質上のチオール/ジスルフィド変換を介して活性制御される酵素がいくつか存在する。しかし、アクロレインによって葉緑体のカルビン回路活性を完全に失活させても、チオール制御酵素であるグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ、フルクトースビスホスファターゼの失活は最大 50% であった。また、カルビン回路の鍵酵素であるリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼはアクロレインの影響を受けなかった。カルビン回路の停止を説明できない。活性アルデヒドによって失活しカルビン回路活性を制限する第一ターゲットの酵素を究明する必要がある。

3. ALH による光酸素ストレス防御の証明

シロイヌナズナ ALH は活性アルデヒドの α, β -不飽和結合を還元するが、アルデヒド基とは反応しないため、反応生成物として飽和アルデヒドが残る。植物の抗酸化防御にとってこの酵素反応は有意義だろうか？これを検証するためにシロイヌナズナ ALH 遺伝子を過剰発現するタバコを作成した。タバコに強光またはメチルピオローゲンによって光酸素傷害をあたえると、光合成活性が不可逆的に失われる。非組換え体に比べ、ALH 活性が $100 \sim 250$ 倍高い ALH 過剰発現タバコは、この光合成失活が軽微であった。すなわち活性アルデヒドの α, β -不飽和結合を還元する ALH 活性は光酸素傷害防御に寄与した。このことから、葉の光酸素ストレスにおいて活性アルデヒドが生成し、それが細胞傷害因子として作用することが示された。シロイヌナズナ ALH は細胞質に局在することが、緑色蛍光タンパク質融合 ALH のタバコ細胞での発現部位解析からわかった。ALH は細胞質で活性アルデヒドを解毒し、細胞を光酸素傷害から防御したと考えられる。

考察

従来、植物の光酸素傷害の主因は活性酸素種であるとされてきたが、本研究の結果から、活性アルデヒドもまた潜在的な光酸素傷害要因であること、その消

去能が植物の環境ストレス防御機構の重要な構成要素であることが示された。動物細胞の研究から、過酸化脂質分解では主にマロンジアルデヒドが生ずると従来考えられていた。本研究では酸化ストレスを与えた植物には主にクロトンアルデヒド、アクロレインが蓄積するという予想外の結果が得られた。さらにこれらの短鎖活性アルデヒドは葉緑体のカルビン回路を特異的に阻害することを発見した。植物研究においては過酸化脂質分解産物の細胞毒性はほとんど認知されていなかったが、葉への酸化的ストレスによって生ずる過酸化脂質由来のアルデヒドが細胞機能を障害することがこれらの結果から明確に示された。環境ストレス条件下で葉緑体内で活性アルデヒド濃度が上昇すれば、CO₂ 固定能力が失われ、ストロマは過還元状態となり、光化学系 I 末端でのスーパーオキシド生成・光化学反応中心での一重項酸素生成が促進され、光阻害がもたらされることになる。どのような環境条件で、どのようなアルデヒド分子種が増大するか、その生成機構とあわせて今後詳しく究明する必要がある。

ALH 過剰発現タバコでは、野生株に比べ 100 倍以上もの ALH 活性が発現していたにも拘わらず、光酸素傷害に対し部分的な防御効果しか得られなかった。この理由としては、活性アルデヒドだけでなく活性酸素種の直接作用も傷害の原因であったこと、活性アルデヒドがおそらく葉緑体で生成したのに対して細胞質に局在する ALH は間接的な消去効果しか発揮できなかったことなどが考えられる。また、活性アルデヒドが ALH によって還元されても飽和アルデヒドが残るため、その毒性によって細胞に傷害がもたらされた可能性もある。実際、飽和アルデヒドをカルボン酸に酸化し解毒するアルデヒドデヒドロゲナーゼ

(ALDH) が植物には存在し、ALDH を過剰発現させた植物は種々の酸化的ストレス処理に対して耐性を示すと報告されている。興味深いことにシロイヌナズナ ALDH は α,β -不飽和結合をもつ活性アルデヒドを基質としない。したがって植物細胞内では、活性アルデヒドは ALH によって飽和アルデヒドに還元され、これが ALDH によってカルボン酸へと酸化されるという活性アルデヒド解毒代謝経路が機能しているかもしれない。動物細胞での研究結果によれば、これらの酵素の他にもアルデヒドを消去する酵素や低分子が存在する。植物細胞のアルデヒド消去成分を洗い出し、それぞれの組織分布、細胞内局在性、ストレス誘導性などを解析することで植物の活性アルデヒド解毒機構の全体像を明らかにしていきたい。

機能未知の抗酸化遺伝子 P 1 に端を発した研究から、植物の環境ストレス下での傷害要因となる活性アルデヒドの発見にいたった。強い光合成阻害作用をもつ活性アルデヒドが植物のストレス因子としてこれまで認知されていなかったのは、植物の活性アルデヒド消去システムがきわめて効率よくはたらいっているためだとも考えられる。今後も植物ゲノムの探索から、植物の環境ストレス防

御機構の新たな側面がつぎつぎと明らかにされるに違いない。

研究発表

口頭発表

1. 真野純一，鳥居義光，滝本晃一，Dirk Inze，浅田浩二；「活性アルデヒドを消去する新規酵素アルケナール α,β -ヒドロゲナーゼによる酸化ストレス耐性」日本植物生理学会 2003 年度年会（東大阪，2003）
2. 真野純一；「活性アルデヒド解毒酵素アルケナール α,β -ヒドロゲナーゼの過剰発現による強光耐性」，日本植物生理学会 2004 年度年会（八王子，2004）
3. 真野純一；「活性アルデヒド消去酵素：植物のもうひとつの抗酸化防御系」，かずさ DNA 研究所セミナー（木更津，2004）
4. 真野純一；「不良環境耐性作物の開発 ― 植物の抗酸化防御とストレス耐性」，山口大学研究推進体公開シンポジウム「植物の潜在機能の開拓と新たな食料生産技術への応用」（山口，2005）