

## 解説

## 活性酸素は生体分子にどう作用するか？－酸化シグナルを伝える活性カルボニル種の生成と作用<sup>‡</sup>

山口大学 大学研究推進機構 総合科学実験センター  
真野 純一\*

活性酸素種 (ROS) は、植物の環境ストレス傷害、ホルモン応答、発生、老化などさまざまな局面で細胞の運命を決定づける因子である。傷害因子としてまたシグナル因子として、ROSはどの生体分子にどう作用するのだろうか？ROSは細胞内では膜脂質を酸化し過酸化脂質をつくる。過酸化脂質の酸化分解によって生成する多様なカルボニル化合物は、タンパク質に結合する性質をもっている。筆者は、環境ストレスを受けた植物の組織において反応性の高い「活性カルボニル種 (RCS)」が増大し、その特異的消去酵素を過剰発現させると植物の環境ストレス耐性が強まることを見いだした。さらに、*in vivo*でRCSに特異的に修飾される標的タンパク質を複数同定した。これらの結果は、ROSの下流で生じるRCSこそが酸化シグナルを担う作用分子であることを示している。

### 1. はじめに

酸素分子が還元されまたは励起されて生じる活性酸素種 (ROS) は、植物の環境ストレス傷害、ホルモン応答、発生、老化などさまざまな局面で細胞の運命を決定づける因子である。故浅田浩二先生は京都大学食糧科学研究所で1970年代から四半世紀にわたって「葉緑体での活性酸素の生成と消去」を追究し、葉緑体の活性酸素消去酵素系であるWater-water cycleを確立された。この代謝系は現在ほとんどの植物生理学の教科書に記載されている。日本の研究が植物生理学に本質的な貢献をおこなった好例だとおもう。筆者は浅田研究室に大学院生、助手として11年間在籍し、Water-water cycleが構築される過程を間近で見てきた。この過程の回顧は別の形でまとめた（光合成学会ウェブサイト「私の論文」）。本稿では、ROSの副産物である過酸化脂質由来「活性カルボニル種」の生理作用について筆者が近年行ってきた研究を紹介したい。

### 2. 研究の背景ときっかけ

ROSが細胞毒性をもつという理解が植物生理学者の間に広まったのは1990年代で、これに大きく貢献したのはゲント大学のProf. Marc van MontaguとProf. Dirk

Inzéのグループである。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を過剰発現した植物の環境ストレス耐性を示した彼らの一連の研究成果 (1992年に総説<sup>1)</sup>) によって「環境ストレス傷害の原因は活性酸素」という理解が広まった。彼らはAsada and Takahashi (1987)の総説「Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis」<sup>2)</sup>に触発されてSODの実験を始めたと聞いている。この組換え植物実験の成果から、それまで着実に実証データが積み重ねられてきた葉緑体活性酸素消去系の重要性が広く認められるようになった。

「活性酸素＝毒物」という図式は広まったが、細胞の酸化傷害プロセスの生化学はそれほど単純ではなく、現在もその究明が進められている。一方ROS研究の先端は90年代にはROSのシグナル作用に移っていた（謎だった血管拡張因子の正体がNO・フリーラジカルであるという1987年の発見<sup>3)</sup>がこのトレンドをつくった）。ROSのシグナル伝達（「酸化ストレス応答」）機構の研究は動物や微生物の研究者が先行し、植物研究者はそれに追従するかたちだった。Montagu研のポストクのDr. Sergei KushnirとDr. Elena Babychuk夫妻は、植物の酸化ストレス応答機構解明の目的で、次のような実験を行った。出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の*yap1*-株（酸化ストレス応答転写因子Yap1

<sup>‡</sup> 解説特集「浅田先生を偲んで」

\* 連絡先 E-mail: mano@yamaguchi-u.ac.jp

を欠損し酸化ストレスに弱い) にシロイヌナズナ cDNA を発現させ、この株の酸化ストレス耐性スクリーニングから、酵母の酸化ストレス応答シグナルを回復させるシロイヌナズナ遺伝子を同定しようとしたのである。この結果得られた新規遺伝子 P1, P2, P3, P4 のコードするタンパク質は、彼らの期待とは違い、そのアミノ酸配列からいずれも NAD(P)H 依存の酸化還元酵素と予測された<sup>4)</sup>。このうち P1 遺伝子 (*At5g16970*) は、シロイヌナズナの地上部で発現し、植物体への酸化ストレス処理により発現誘導されることから、葉で抗酸化機能を担う新規酵素をコードすると考えられた。Dr. Inzé から浅田先生にこの P1 タンパク質の性質解明の依頼があり、当時浅田研で助手を務めていた筆者がその任に当たることになった。

新規酵素 2-アルケナルレダクターゼ

P1 タンパク質の生理的基質を解明すれば植物の新しい抗酸化防御機構の発見になる。大いに期待して研究を始めたが、答は簡単には見つからなかった。アミノ酸配列からはキノンレダクターゼと予測でき、実際にいくつかの人工物キノンが基質となった。しかしプラストキノンやフィロキノンなど植物の主なキノンは基質にならない。Babiychuk らが遺伝子スクリーニングのさい酵母にストレスを与えるのに用いた酸化剤 diamide (図1) を還元する活性も見つかったが、この化合物も人工物である。手探り状態のなかで、2つ幸運があった。まず京大・化研(当時)の中村薫先生が diamide の構造からの類推でメチルビニルケトン(図1) が基質となることを見つけて下さった。筆者はこの新たに見つかった基質が脂質代謝物に似ていると感じ、山口大の松井健二さんに相談すると、類似構造をもつ (E)-2-ヘキセナールという過酸化脂質分解産物アルデヒドを提示してくれた。この化合物が P1 タンパク質の電子受容体として還元されたのである(図1)。これが生理的基質の発見であった。2001年の10月30日のことで、P1 タンパク質の実験を始めた1995年9月25日から6年もかかってしまった。

この(E)-2-ヘキセナールは過酸化脂質の酵素分解産物のひとつだが、毒性をもつ。P1 タンパク質はこの化合物以外にも、共役二重結合をもつアルデヒドまたはケトンを選

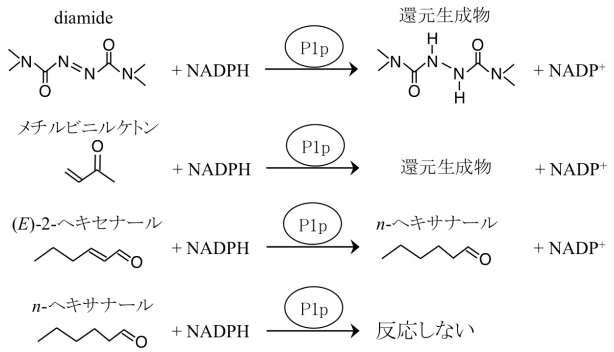


図1 P1タンパク質 (P1p) の触媒する酸化還元反応

元した。さらに基質特異性の解析から、このP1タンパク質はアルデヒドを還元するのではなく、アルデヒドの C=O 結合に共役した -C=C- 二重結合を特異的に還元することが分かった(図1)。共役二重結合があるとカルボニル化合物の反応性は約10倍大きくなることが in vitro 実験から知られており、細胞毒性も強くなる(これを「活性カルボニル種; RCS」と定義した(図2))。P1タンパク質の生理機能はこのRCSの還元解毒であると説明できる。新規抗酸化酵素の発見である。やや興奮気味に4ヶ月程度でドラフトを書き(筆者にしては最速)、2002年の *Plant Cell Physiol.* に掲載された<sup>5)</sup>。実はこの論文執筆中に全く同じ反応を触媒するラット由来酵素の報告を見つけ(2001年11月の *J. Biol. Chem.* 掲載<sup>6)</sup>。一年遅れだった)、世界初の発見にはならなかった。それでも独自の発見であることを何か残そうと新規酵素名を IUBMB の命名委員会に申請し、ラットの酵素と並んで新規酵素番号 EC 1.3.1.74 として登録された。推奨名は 2-alkenal reductase とな

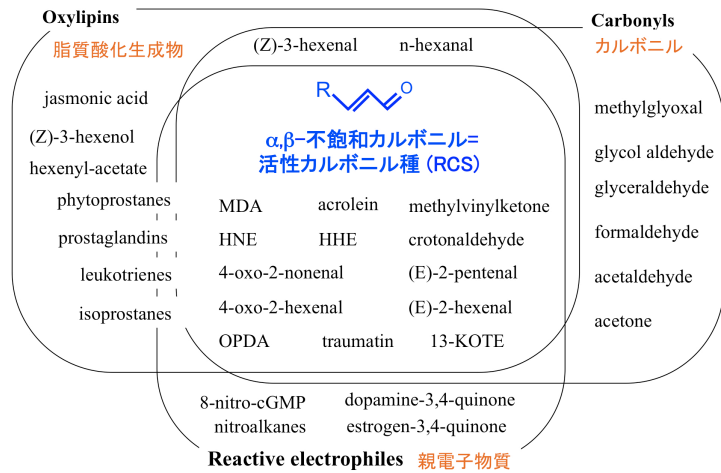


図2 活性カルボニル種 (RCS) とその関連化合物群  
脂質酸化分解産物のうち共役二重結合をもつカルボニル化合物を RCS と定義した。RCS は求電子性の高い「親電子物質 (RES)」にも分類される。

り、現在はこの酵素名と略称「AER」（Eはalkenalの不飽和結合を表すeから）を用いている。

**AERは植物の環境ストレス耐性を強める**

AERは酵母の酸化ストレス耐性を高めるが、植物でストレス耐性に役立つのだろうか？Inzéのグループは1997年にすでにシロイヌナズナP1タンパクを過剰発現させたタバコを作成しており、それがパラコート耐性を示すという結果も得ていたが、当時は耐性機構が説明できなかつたため投稿論文は却下されていた。P1タンパクのAER活性でこの耐性メカニズムが説明できるようになった。強光耐性のデータも新たに加え、最初の遺伝子単離から10年がかりでようやく植物での新しい酸化ストレス防御能の論文がアクセプトされた<sup>7)</sup>。この論文は浅田先生も共著者であり、筆者としては、やっと（先生が京都大から福山大に移られて8年で）浅田研時代からの課題を解決し、助手の務めを果たした思いがした。これが結果として浅田先生との共著論文では最後のものになった。なお、この頃にはAERの他にもアルデヒドデヒドロゲナーゼやアルド=ケトレダクターゼといったカルボニル解毒酵素でも過剰発現植物の環境ストレス耐性が報告され、環境ストレス傷害とカルボニル化合物の毒性との関係に注目する研究者が少しずつ増えてきていた（表1）。

**活性カルボニル種（RCS）のストレス傷害への関与**

AERが植物のストレス防御に寄与することがわかったので、植物の環境ストレスにおけるRCSの重要性評価を研究の新たな目的とした。これには解明すべき課

題が3つあった。すなわち、(1) 環境ストレスによって植物体内でどのようなRCSが増えるかというRCS生成について、(2) AER過剰発現株ではRCS増大が少ないか？というRCSと傷害との因果関係について、そして(3) RCSはどのように植物細胞に障害をもたらすかという作用メカニズムについてである。

動物に関しては1980年代からRCSの生体内での生成と毒性が研究されており、1991年のEsterbauerらの総説以降、4-hydroxy-(E)-2-nonenal (HNE) が過酸化脂質分解産物の主要な毒物として認識されるようになっていた。AERは他のカルボニル解毒酵素よりHNEに対する特異性が高かつた<sup>5)</sup>ので、AER過剰発現株ではHNE含量が低くなっているはずである。ただRCSにはHNE以外に何種類もの化合物がある。このため、RCSを網羅的に定量するHPLC解析法を開発することにした。2004年の卒論生から始め、卒論生3人が引継ぎ、学振外国人特別研究員のDr. Sergey A. Khorobrykhの援軍も得て、4年がかりでカルボニルの抽出／誘導体化／高分離溶離／定量法を完成した。細胞に存在する20種以上のカルボニル種を網羅的に定量することができ、いまのところ他所では得られないユニークな結果を生み出す強力な武器になっている。

この解析法によって、植物には猛毒であるアクロレインやHNEなどのRCSが数μMレベルで含まれていることがわかった。これらのRCSはストレスをかけた植物で増大し、ストレス耐性のあるAER過剰発現株では増大しないはずである。しかし葉のカルボニルレベルはばらつきが大きく、またストレスによって減ってしまうなど、思ったような結果が得られない。結

表1 カルボニル消去酵素の過剰発現組換え植物のストレス耐性<sup>14)</sup>  
ALDH, アルデヒドデヒドロゲナーゼ; AKR, アルド=ケトレダクターゼ

酵素	遺伝子源	組換え宿主	耐性を示したストレス	発表年
ALDH	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	NaCl, 重金属, MV, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2001
		ダイズ	NaCl, 乾燥, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2006
	タバコ	NaCl, 乾燥, MV		
	トウモロコシ	タバコ	NaCl, 乾燥, CuSO <sub>4</sub>	2008
AKR	アルファルファ	タバコ	乾燥	2000
		イネ	タバコ	UV-B, MV
			低温, カドミウム	2004
			高温, MV	2011
AER	シロイヌナズナ	タバコ	MV, 強光	2005
			アルミニウム	2010
		シロイヌナズナ	NaCl	2008

局、期待したストレスとRCSとの相関性は、葉ではなく根で最初に認められた。これは植物の酸化ストレス耐性研究を行っていた鳥取大農学部（当時）の田中淨先生がAER過剰発現タバコで行った根のアルミニウムストレス実験である。Alイオンによる根の伸長阻害は、伸長領域のミトコンドリアでのROS発生促進である。タバコ芽生えにAlストレスを与えると、根ではHNE、アクロレイン、マロンジアルデヒドなどの数種類のRCSと、ホルムアルデヒド、*n*-ヘキサナルなどのカルボニルが増大した。一方、AER過剰発現株はAlを加えてもカルボニル種の増大が小さく、そしてAl耐性を示したのである。重要なのは、Al耐性を示すAER過剰発現株も感受性の野生株も、根に同じだけAlを蓄積し、同じだけ活性酸素を生成していたことである。これは、AER過剰発現株のAl耐性がカルボニル消去能に帰因できるという理想的な結果であった。厳しいレフリーに再実験も求められながらも、田中研の博士課程の股侖那さんはほぼ一人ですべての実験をやり遂げ、学位請求期限の一週間前によく論文が受理された<sup>8)</sup>。同じ頃、葉で苦勞していたカルボニルの解析でも、強光照射により増大し、AER株では増大しないRCSとしてアクロレインと(*E*)-2-ペンテナールを同定できた<sup>9)</sup>。

### RCSの標的は何か？

RCSが増大すれば組織傷害が生じる。では、細胞内では何がRCSの標的なのか？動物細胞ではHNEに阻害される標的としてミトコンドリアのリポ酸酵素などが90年代末には知られており、植物でもオーストラリアのA. H. Millarのグループが単離ミトコンドリアとHNEを用いて同様の結果を得ていた<sup>10,11)</sup>。葉緑体へのRCSの影響を評価するため、ハウレンソウから葉緑体を単離し、様々なカルボニルを加え、光合成の部分活性測定をおこなった。2004年卒論生の平岡英司くんが始め、2005年卒論生の宮武史尊くんが熱意を持って取り組んだこの研究では、ストロマのチオール制御酵素、とくにホスホリブロンキナーゼがRCSによって敏感に失活するのに対しチラコイド電子伝達系はRCSに強いこと、そしてストロマのグルタチオンがRCSに対する第一の防御としてはたらくこと（一方、アスコルビン酸はRCS消去に役立たない）が明らかになった。田茂井政宏さん（近畿大）から貴重な基質をいただき、SBPaseも標的として失活することを確かめた。この結

果をまとめた宮武君の2006年の植物生理学会年会での発表にはかなりの反響があったが、投稿論文は4つのジャーナルにつぎつぎと却下された。この論文投稿時には、まだ上述した植物でのカルボニル定量結果がなく、RCSがストレス傷害因子であることを審査員に納得させることが難しかったのである。徹底的に書き直して2009年によくやうやく*Planta*に受理された<sup>12)</sup>。その後ある論文<sup>13)</sup>で、この*Planta*論文を根拠として「植物に対するカルボニルの毒性は確立されている」と書いてあるのを見つけた。これは結構うれしかった。

上述の実験はしかし、単離葉緑体を用いたin vitroの「ぶっかけ実験」であった。RCSが光合成を阻害するポテンシャルをもつことは示したが、葉の中で生じたRCSによって本当にストロマ酵素が失活するのか？という疑問は解決しない。まずin vivoでRCSに修飾される標的タンパク質の同定が必要である。しかしRCS修飾タンパク質の同定には精度の高い二次元電気泳動/イムノブロットング検出とプロテオーム解析という2つのテクニカルな関門があり簡単には始められない。2011年の生化学会大会でポスターが隣同士になった新潟大（当時）の白矢武士さんが、iTRAQという定量的差分プロテオーム解析を発表されていた。RCS修飾タンパク質をRCS抗体カラムで集め、このiTRAQ解析を行えば、二次元電気泳動を必要としない。白矢さんと上司の三ツ井敏明先生のご好意により、たいへん高価な標識試薬を使うこの解析を共同研究で進めてもらえることになった。問題は必要とされるタンパク量である。RCS修飾されるタンパクは、ストレスによって増えるとはいえ、細胞内のタンパク質の数パーセントに過ぎない。修士課程院生の永田光曜くんはシロイヌナズナを大量に均一に育て、塩ストレス処理を行い、HNE修飾されたタンパクをHNE抗体アフィニティビーズで集め、なんとかiTRAQ分析できるタンパク量を集めた。甲斐あってHNEに修飾されやすい17種のタンパク質が同定され、この成果は最近*Plant Cell Physiol.*に掲載された<sup>14)</sup>。塩ストレス条件でHNE修飾を受ける標的は葉緑体ストロマ酵素が多いはずと私たちは予測していたが、細胞質、ペロキシソームのタンパク質の方が多かった（図3）。さらに意外なことにアポプラストのタンパク質もHNE修飾を受けていたのである。これは「塩ストレス→葉緑体での光過剰→葉緑体とペロキシソームの活性酸素増大」というスキームでは説明できない。塩ストレスで活性化される細胞膜の

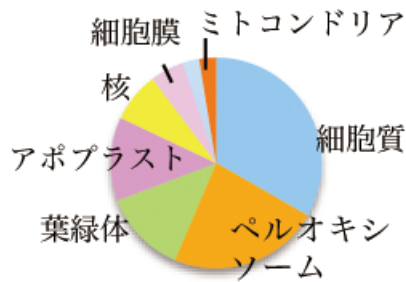


図3 シロイヌナズナの葉で塩ストレス時にRCS修飾が増大するタンパク質の細胞内分布

NADPHオキシダーゼがROS生成、脂質酸化に関わっているのではないかと考えている。標的タンパク質のRCS修飾と失活との関係は、今後詳細な解析が必要である。

#### 活性カルボニル種が酸化シグナルを伝える

以上のように、植物の酸化ストレス時に生成するRCSを同定し、それらの光合成に対する効果を評価し、植物の環境ストレス耐性に対するRCS除去能の意義を示すことができた。最初のAER酵素活性の発見から10年かけて、これで「活性酸素の下流で生じるRCSは植物のストレス障害要因のひとつである」と確信がもてるようになった。幸い機会を得て、この見解を総説としてまとめた<sup>15)</sup>。

さて、「ROS → RCS → タンパクへの作用」という図式を敷衍すると、環境ストレス傷害だけでなくROSの関わる他の生理現象にもRCSが関与すると考えられないだろうか？つまり「RCSは傷害因子というより酸化シグナル物質である」という説である。バングラデシュからの留学生Md. Sanullah Biswasくんはこのテーマに取り組み、タバコ培養細胞で酸化刺激によって始まるプログラム細胞死にRCSがシグナルとして作用することを証明した。紙面の都合で詳細は書かないが、特異的なRCS除去剤で細胞内のRCSレベルを抑制すると、酸化刺激でも細胞死は起こらないのである（投稿準備中）。さらにいくつかの植物ホルモンのシグナル伝達にもRCSが関与する証拠を最近得つつある。ROSがシグナルとしてはたらく現象は、他にも感染応答や導管要素形成などがあり、これらにもRCSが関与する可能性は高いと考えている。植物でのRCSの重要性の理解は次第に広がっており（「reactive electrophile species; RES」とも称される）<sup>16)</sup>、ROSと同程度の生理的広がりをもつ化合物群であるとの展望がはっきりし

てきたと感じている。とはいえ、カルボニルの生理生化学は生成、作用、消去のいずれに関してもほとんど未解明である。光合成に対するカルボニルの作用については山内靖雄さん（神戸大・院・農）<sup>17)</sup>、三宅親弘さん（神戸大・院・農）<sup>18)</sup>がそれぞれ先見性のある独自研究を展開されている。「カルボニルの伝道師」を自認する（？）筆者としては、もっと多くの方にカルボニル研究に参入していただき、日本の研究で世界をリードするようになればと願っている。

#### 3. おわりに

浅田先生はご自分の研究を「葉緑体での活性酸素の生成と消去」とまとめられ、ROSの作用機構をあえて追究しないというスタンスだった。筆者が推定するに、ROSと生体分子との反応に関する膨大なin vitroデータが当時すでに蓄積されていて、しかもそれは植物特有の生化学現象ではないと判断されたのではなかろうか。しかし筆者は（勉強不足だったからなのだが）活性酸素の有害性にいまひとつ得心がいかず、活性酸素除去系の重要性をイメージできなかったため、浅田研在籍中、除去系研究にはほとんど携わらなかった。浅田先生が活性酸素の作用の例に引くのは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を葉緑体に加えたときの光合成炭酸固定の失活<sup>19)</sup>であった。しかしそれはカルビン回路チオール制御酵素の可逆的酸化で、葉緑体にとって致命的な障害とはいえないのでは？と筆者はいつも疑問に思っていた。その後出会ったRCS研究によって、ROSの作用メカニズムに関し発展的な知見を提供できるようになってきた。この研究の機会を与えてくださったのは浅田先生であり、先生にはRCS研究の見通しがつくところまでなんとか見届けてもらうことができた。長い間成果を出さない弟子に対して苦言もおっしゃらず、ただ見守ってくださったことに深く感謝し、ご冥福を祈りたい。

Received July 15, 2014, Accepted July 23, 2014, Published December 31, 2014

#### 参考文献

1. Bowler, C., van Montagu, M. and Inzé, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116.
2. Asada, K. and Takahashi, M. (1987) Production and

- scavenging of active oxygen in photosynthesis, in *Photoinhibition* (Kyle, D.J., Osmond, C.B. and Arntzen, C.J., Eds.) pp 227-287, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
3. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. and Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9265-9269.
  4. Babiychuk, E., Kushnir, S., Belles-Boix, E., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1995) *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *J. Biol. Chem.* 270, 26224-26231.
  5. Mano, J., Torii, Y., Hayashi, S., Takimoto, K., Matsui, K., Nakamura, K., Inzé, D., Babiychuk, E., Kushnir, S. and Asada, K. (2002) The NADPH:quinone oxidoreductase P1- $\zeta$ -crystallin in *Arabidopsis* catalyzes the  $\alpha,\beta$ -hydrogenation of 2-alkenals: detoxication of the lipid peroxide-derived reactive aldehydes. *Plant Cell Physiol.* 43, 1445-1455.
  6. Dick, R.A., Kwak, M.-K., Sutter, T.R. and Kensler, T.W. (2001) Antioxidative function and substrate specificity of NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 276, 40803-40810.
  7. Mano, J., Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Inzé, D., Torii, Y., Hiraoka, E., Takimoto, K., Slooten, L., Asada, K. and Kushnir S. (2005) Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiol.* 139, 1773-1783.
  8. Yin, L., Mano, J., Wang, S., Tsuji, W. and Tanaka, K. (2010) The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. *Plant Physiol.* 152, 1406-1417.
  9. Mano, J., Tokushige, K., Mizoguchi, H., Fujii, H. and Khorobrykh, S. (2010) Accumulation of lipid peroxide-derived, toxic  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes (*E*)-2-pentenal, acrolein and (*E*)-2-hexenal in leaves under photoinhibitory illumination. *Plant Biotechnol.* 27, 193-197.
  10. Millar, A.H. and Leaver, C.J. (2000) The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 481, 117-121.
  11. Taylor, N.L., Day, D.A. and Millar, A.H. (2002) Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 277, 42662-42668.
  12. Mano, J., Miyatake, F., Hiraoka, E. and Tamoi, M. (2009) Evaluation of the toxicity of stress-related aldehydes to photosynthesis in chloroplasts. *Planta* 230, 639-648.
  13. Stitti, N., Adewale, I.O., Petersen, J., Bartels, D. and Kirch, H.-H. (2011) Engineering the nucleotide coenzyme specificity and sulfhydryl redox sensitivity of two stress-responsive aldehyde dehydrogenase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 434, 459-471.
  14. Mano, J., Nagata, M., Okamura, S., Shiraya, T., and Mitsui, T. (2014) Identification of oxidative-modified proteins in salt-stressed *Arabidopsis*: a carbonyl-targeted proteomics approach. *Plant Cell Physiol.* 55, 1233-1244.
  15. Mano, J. (2012) Reactive carbonyl species: their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. *Plant Physiol. Biochem.* 59, 90-97.
  16. Farmer, E. E. and Mueller, M. J. (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 429-450.
  17. Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Mizutani, M. and Sugimoto, Y. (2012) Chloroplastic NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase contributes to the detoxification of reactive carbonyls produced under oxidative stress. *FEBS Lett.* 586, 1208-1213.
  18. Takagi, D., Inoue, H., Odawara, M., Shimakawa, G. and Miyake C. (2014) The Calvin cycle inevitably produces sugar-derived reactive carbonyl methylglyoxal during photosynthesis: a potential cause of plant diabetes. *Plant Cell Physiol.* 55, 333-340.
  19. Kaiser, W.M. (1979) Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145, 377-382.

### How do ROS act on biomolecules?

– Critical involvement of reactive carbonyl species as oxidative signal agents

Jun'ichi Mano\*

Science Research Center, Yamaguchi University