

<研究紹介>

強光ストレスとシアン耐性経路 – UWA での二年間 –

野口 航 (大阪大学・大学院理学系研究科・生物科学専攻)

植物のミトコンドリアは動物や細菌のミトコンドリアとは異なるいくつかの特徴が知られているが、興味深い特徴の一つがシアン耐性経路であろう。ここではシアン耐性経路に関する知見の簡単なまとめと、シアン耐性経路を生理生態学的な視点から調べている私の研究結果を紹介したい。

シアン耐性経路は **Alternative Oxidase (AOX)** という一つの酵素からなり、ミトコンドリア呼吸鎖においてユビキノンから電子を受け取り、酸素に渡す働きをする経路である。AOX は電子伝達のときに内膜を介した水素イオンの能動移動がなく ATP 合成とは共役しない。つまり AOX はエネルギー的には一見無駄とも言える経路である。AOX は約 36 kDa のタンパク質で内膜のマトリックス側に二量体として存在し、ジスルフィド結合によって分子間 S-S 結合している酸化型と、還元され SH となる還元型の二つの状態がある。還元型の方が活性が高く、ピルビン酸などの α ケト酸によってさらなる活性化を受ける。活性化された AOX はユビキノンからシトクロム経路と競合的に電子を奪うことができる。

シアン耐性経路そのものは古くから知られ、Genevois が 1929 年にスイートピーを使ってシアンに耐性のある呼吸を発見したのが最初である。その後 Van Herk と Badenhuisen (1934) が、サトイモ科肉穂花序の熱発生時に高いシアン耐性呼吸を示すことを報告した。シアン耐性経路がミトコンドリアに局在することが明らかになったのは、サトイモ科の肉穂花序から単離したミトコンドリアを使った James と Elliott(1955) の研究による。1971 年に Schonbaum らによりシアン耐性経路の特異的阻害剤(SHAM) が発見され、肉穂花序以外の植物組織におけるシアン耐性経路の役割についての生理的な研究が進められた。シアン耐性経路が AOX という 1 酵素からなることは、1986 年にサトイモ科肉穂花序からのタンパク質の部分精製によって明らかになった。その後 AOX タンパクの抗体の単離、Aox 遺伝子の塩基配列の決定といった研究を経て、現在多くの種から Aox 遺伝子が単離され、分子生物学的な研究が進んでいる。葉緑体チラコイド膜にも AOX と相同性の高いタンパク質があり、chlororespiration に働いていると考えられている。

なぜエネルギー的に不利なこの AOX を植物はもつのだろうか？現在、肉穂花序における熱発生以外の AOX の一般的な役割として、過還元状態のときに還元力の消去系として働いている可

能性が提唱されている。植物では活性酸素の発生の場として葉緑体がよく研究されるが、ミトコンドリアにおいても酸素に1つの電子だけ渡されれば、電子伝達系のどこからでも活性酸素が生じる。ATP利用が低い状態ではシトクロム経路はNADHのような還元力の消費を行うことができず、電子伝達系に電子が滞留し活性酸素が生じやすい。そのときAOXは過剰の還元力を消去し、活性酸素の発生を防ぐと考えられている。しかし非常に強いストレス条件下の植物を調べた研究がほとんどであり、実際、AOXが過剰の還元力の消去系として有効なのかどうかは分かっていない。

私がこのAOXと関わったのは、林床のような弱光下で生育する陰生植物について研究を始めた修士課程の頃からである。陰生植物は非常に薄暗い環境でも生育ができる植物を指し、葉の美しいものは良く観葉植物として利用されている。陰生植物は弱い光環境にうまく適応しており、その葉はいくつかの特徴を有している。陰生植物の葉は広く薄いために、弱い光でも多くの光量子を吸収できる。葉面積あたりのクロロフィル量が多く、光-光合成曲線の初期勾配の傾きが大きい。また呼吸速度も低い。この低い呼吸速度は光補償点を高くする（弱い光環境でも正の光合成生産にする）ために重要である。修士課程では、材料としてサトイモ科のクワズイモの葉を用いて、陰生植物の葉の呼吸速度が低い要因について研究を進めた。クワズイモ属の植物は葉に含まれる二次代謝産物量が少なく生化学実験が行いやすいため、光合成のsun/shadeの分野ではよく使われてきた材料として知られている。研究の結果、クワズイモの葉の呼吸速度が低いのは呼吸系酵素や光合成産物量が少ないのではなく、細胞内のATP利用速度が低く、adenylate limitationが起きているためであるということがわかった。

それでは陰生植物の葉では、エネルギー生産には不利なシアン耐性経路AOXは使われているのだろうか？すでにその当時からAOXのin vivoの速度を測定するには、阻害剤のみを用いた実験方法では誤りであることが指摘され、AOXとcytochrome c oxidase(COX)との間に酸素安定同位体分別の差があることを利用した実験方法を用いる必要性が指摘されていた。しかしその方法は当時世界的にも二つのグループでしか測定してされていなかった。博士課程のほとんどの時間を割き、さらに地球物理学の上田眞吾、吉成正両博士の協力を得て、ようやくクワズイモの葉のAOXの速度を測定することができた。その結果、通常の光環境のクワズイモの葉ではAOXをほとんど利用していないことがわかった。したがってクワズイモの葉では、低い呼吸速度ながらもエネルギー効率の高い状態が実現していた。

陰生植物クワズイモの葉にはAOXタンパクが少ないのだろうか？その疑問に答えるためには、葉からミトコンドリアを単離して調べるのが直接的である。しかし一人では葉からミトコンドリアを単離することができなかつたため、日本学術振興会の海外特別研究員に応募し、2年間オーストラリアのUniversity of Western Australia(UWA)のDavid Day教授のもとで実験を進めることにした。Day教授はUniversity of AdelaideのJoe Wiskich教授のもとで学位を取り、長年、植物のミトコンドリアの有機酸の輸送や電子伝達系について研究を進めていた。またUWAには植物の呼吸の生理生態学的な研究を行っているHans Lambers教授、ミトコンドリアタンパクの輸送やAOXの分子生物学をおこなっているJim Whelan博士、Day教授のもとで学位をとり植物ミトコンドリアのプロテオームを行っているHarvey Millar博士など植物の呼吸研究では著明な研究者が集まっており、恵まれた環境で実験を進めることができた。

Day教授の研究室では、まずクワズイモの葉からミトコンドリアを単離するところから始めた。オーストラリアでも日本で用いていた種と同じ種が手に入り、いくつかの試行錯誤を経て

活性の高いミトコンドリアを得ることができた。同時に呼吸速度の高いハウレンソウの葉からもミトコンドリアを単離し、両者を比較した。その結果、クワズイモの葉のミトコンドリアタンパク当たりの AOX 活性は低くはなく、DTT とピルビン酸で AOX を活性化するとハウレンソウと同程度の最大活性を示した。ミトコンドリアマーカ酵素であるフマラーゼを使って、葉の重さあたりに直して比較すると、クワズイモの方がハウレンソウよりも高い AOX 活性を示すことがわかった。また非常に薄暗い環境でクワズイモを栽培しても、明るい光環境で栽培したものと同じくらい高い AOX 活性を示した。Q 電極を使って測定すると、活性化されたクワズイモの葉の AOX はユビキノンの酸化還元状態が比較的酸化状態にあっても電子を受け取ることができ、COX と競合的に電子を奪えることがわかった。それでは、クワズイモの葉において高い活性を示す AOX は何に役に立っているのだろうか？またどのような制御を受けて弱光下では働かないようになっているのだろうか？

陰生植物を明るい光環境で栽培すると、慢性的に葉に光障害を受けることが知られている。実際にクワズイモを明るい光環境で栽培すると、葉の Fv/Fm は下がる。前述したように AOX が過還元状態のときの還元力の消去系として働くのなら、このような光傷害条件下ではクワズイモの葉の AOX は過剰の還元力の消去系として働いているのだろうか。AOX の酸化型（不活性型）と還元型（活性型）は分子量が異なるために、葉の膜画分を用いて SDSPAGE・western blotting をすることによって、in vivo における AOX の活性型と不活性型の割合を判別することができる。薄暗い環境で生育したクワズイモの葉では、AOX のほとんどは不活性型であったが、慢性的な光傷害がおこる光環境下の葉では、AOX のほとんどは活性型であった。また薄暗い環境から明るい光環境へ植物を移した場合にも、移行して 1 日後には Fv/Fm の減少とともに不活性型と活性型の AOX が 1:1 に変化していた。つまり強光ストレスが起こるような状態では、クワズイモの葉の AOX は活性型になり、過剰な還元力の消去系として働きうる可能性がある。クワズイモのような陰生植物は林床や林縁など薄暗い環境に生育するが、倒木により林冠にギャップが形成されると、強い光環境にさらされる。そのような環境では AOX が活性型に変化し、効率良く過剰な還元力を消去しているのかもしれない。この結果から、どのようなメカニズムが AOX の活性化・非活性化の制御を行っているのか、ATP 合成と共役しない他の電子伝達経路 (NAD[P]H dehydrogenase や UCP) はどのような調節を受けているのか、強光条件下のクワズイモの葉では AOX の in vivo の速度は高いのか、葉緑体の還元力は効率良くミトコンドリアに運ばれているのかというさらなる疑問も生じるが、UWA 滞在中に「陰生植物クワズイモの葉には AOX が少ないのだろうか」という当初の目的は果たせたと思う。

UWA で行った実験の成果を、今年の 7 月に UWA の近くの港町 Fremantle で開催された International Congress on Plant Mitochondria (ICPM) で口答発表する機会があった。ICPM は 国際光合成会議と比べると小さな学会だが、論文でしか知らなかった研究者とも知り合うことができ、個人的には学ぶことも多く、良い学会であった。ただ植物の呼吸の分野でも分子生物学・生化学の研究が多く、生態学的な視点から研究を行っている研究者は数少ない点が残念だった。

UWA が位置する西オーストラリア州のパースは、夏が乾燥すること、日射しが非常に強いことを除けば、冬も暖かく、犯罪発生率も低く、観光はともかく生活を営むには良い場所であった。またパース近郊は地中海性気候であることや土壌のリン酸濃度が非常に低いことにより、オーストラリアの他の州とも異なるユニークな植生・植物種が見られ、公園を散策するだけでも結構楽しかった。大変不得意な英語も、普通に日常生活を送りおおらかな Aussie に接しているだけなら、おおむね問題がなかった。しかし、一緒に行った修士課程の学生が足の骨を折っ

たという事態では、英会話が不得手なことは大変な障害となり、本当に困ってしまった。語学というのは、やはり英語圏で漫然と生活するだけで実践レベルまでレベルアップしていくわけではなかった。最後に UWA で二年もの間、研究する機会を与えてくれた日本学術振興会と理解のある上司に感謝の意を表したい