

<研究紹介>

環境ストレスと光合成の修復

西山佳孝（愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター）

はじめに

雨風にさらされて傷んだ建物を改修しなければならないように、細胞の中も修復という作業が営まれている。ただ、建物の場合、何年もの歳月を経たあと傷んだ部分を修復するのに対し、細胞は分単位や秒単位で損傷を受けては修復を進めている。つまり細胞の中では、つねに損傷と修復が同時に進行し、ある瞬間の細胞の状況はその両者のバランスあるいは平衡の上にあるといえる。

この平衡状態に大きく影響をあたえるのが、環境ストレスである。一般に環境ストレスによる負荷がかかると、平衡が負に傾いて細胞の諸機能は抑えられてしまう。とくに光化学系 II は環境ストレスにセンシティブであり、種々の環境ストレスによって容易に活性が低下してしまう。光化学系 II というかくも重要な機能がもつ脆弱性ゆえに、環境ストレスと光化学系 II の関係には昔から多くの関心が集中してきた。

その歴史的経緯をたどると、光化学系 II を一つの装置としてとらえ、チラコイド膜や光化学系 II 標品を取り出してはストレスを与えるという研究が主流であったといえる。これらの研究から、環境ストレスが光化学系 II の損傷を導くという趣旨で数多くの仮説が提唱されてきた。しかしながら、こうした生化学的研究では装置の損傷という静的な側面しか見ることができない。そこで私たちは、損傷と修復という二つの動きを見ながら、あらためて環境ストレスの作用を検討した。その結果、従来の説とは異なり、多くの環境ストレスが光化学系 II の修復を阻害することによって活性を低下させていることを見出した。この起稿では私たちの発見の過程をエッセイ風に綴ってみたい。

光化学系 II の修復

私が光化学系 II の修復の様子を初めて目の当たりにしたのは、基礎生物学研究所の村田紀夫教授の研究室であった。90年代の前半、研究室では脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子を破壊したラン藻を使って低温耐性の研究が行われていた。多価不飽和脂肪酸の割合が低下すると低温耐性が低下し、逆に遺伝子操作で多価不飽和脂肪酸の割合を増やすと低温耐性が増大する。この現象は細胞の生育状況でも見られるが、光化学系 II では顕著にあらわれる。その原因を探っていくと、不飽和脂質が低温下での光化学系 II の修復を促進していることがわかった。

ラン藻の細胞に $2 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ほどの強光を照射すると、1時間もしないうちに光化学系 II の活性は 20%程度まで低下するが（光阻害という）、 $70 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ほどの弱光のもとに戻すと徐々に活性は回復してゆき、2時間ほどでもとのレベルまでに達する。この修復の様子を初めて見たとき、美しいと思った。生き物の真摯な営みをかいま見たようだった。

損傷と修復は同時に進行するので、損傷のプロセスだけを見るにはクロラムフェニコールなどのタンパク質合成阻害剤を使って修復を止めてやればよい。こうして光化学系 II の損傷のプロセスを見ると、不飽和脂質の存在も、さらには低温そのものも光化学系 II の光による損傷には影響を与えないことがわかった。すなわち、低温ストレスは光化学系 II の修復を阻害し、不飽和脂質はその阻害を緩和するのである。

酸化ストレスと光化学系 II の修復阻害

私が酸化ストレスにかかわるようになったのは、スペインに出張していた村田教授からの一通のファックスによる。世の中では活性酸素が光化学系 II を壊すということになっているが、そうではなく、活性酸素も修復を阻害するのではないか、という趣旨だった。90年代も終わろうとするころだった。光阻害と活性酸素の関係は定説になっていただけに、私はこの案を半信半疑で受け止め、実験に着手した。

実験はきわめて単純で、ラン藻の細胞にメチルビオロゲンや過酸化水素をかけ、修復が機能している状態とクロラムフェニコールで止めた状態での光化学系 II の光阻害を見ることであった。最初はこの手の生理学的実験の常で、どっちつかずの曖昧な結果が出て悩ましかったが、何度も繰り返すうちに、スーパーオキシドや過酸化水素の最初の作用が修復阻害だという確かな手応えを得るようになった。ここは定説を覆す重要なところだけに、納得がいくまで何回この単純な実験を繰り返したかわからない。

もちろんこの手のぶっかけ実験はアーティフィシャルなところがあって確証はもてない。そこで、山本宏氏に活性酸素消去系酵素の欠損株を作ってもらい、よりネイティブな実験系で証明した。この欠損株は野生型に比べ光阻害にセンシティブであるが、光化学系 II の損傷だけを

見ると野生型と変わらないことから、確かに修復の阻害が光阻害に対する感受性の原因になっていることがわかる。

つぎに、過酸化水素による修復阻害のメカニズムの解明に挑んだ。光化学系 II の修復で中心的な役割を担っているのが、反応中心の D1 タンパク質である。そこで、D1 タンパク質の新規合成をパルスラベル法で解析したところ、過酸化水素は D1 タンパク質の新規合成を阻害することがわかった。また、過酸化水素は D1 タンパク質のみならず、ほとんどすべてのタンパク質の新規合成を阻害することがわかった。

D1 タンパク質をコードする *psbA* 遺伝子の発現から成熟体タンパク質の蓄積に至るプロセスの中で、過酸化水素により阻害される過程を調べた。その結果、*psbA* mRNA が翻訳される過程が特異的に阻害されることが明らかになった。さらに、ポリソームの解析により、翻訳過程の中でペプチド鎖伸長のステップが過酸化水素の主なターゲットになっていることが明らかになった。

ここまでの結果は、悪戦苦闘したあと何とか論文にすることができた。過酸化水素やスーパーオキシドなどの活性酸素を対象にしているうちは認めてくれるのだろう。問題は一重項酸素である。一重項酸素こそ光阻害の元凶だというのが多数派の拠り所である。

私たちは、ローズベンガルなどの光増感剤を使って一重項酸素を細胞の中で発生させ、光化学系 II の損傷と修復への影響を詳細に調べた。その結果、一重項酸素も光化学系 II に損傷を与えるのではなく、光化学系 II を修復するプロセスを阻害することがわかった。さらに、過酸化水素と同様、修復阻害が D1 タンパク質の新規合成の阻害に起因し、翻訳のペプチド伸長過程が最初のターゲットになっていることを明らかにした。この結果も論文にまとめたが、頑強な抵抗に会い一年以上におよぶ苦戦をしいられたが、ようやく受け入れられそうだ。

光による光化学系 II の損傷

それでは、いったい何が光化学系 II の光損傷の原因なのか。照射光の光強度と光化学系 II の損傷の初速度をプロットしてみると、両者はきれいな正比例の関係にあることがわかった。つまり、受け取るフォトンの数に比例して光化学系 II が壊れている。この比例関係は DCMU で電子伝達を止めても、まったく影響されない。これらの結果は、一重項酸素を原因としているアクセプターサイド光阻害説などの諸説では説明できない。さらに、この比例関係は、ローズベンガルで一重項酸素を過剰に発生させても、細胞を嫌気状態においてもまったく変わらない。このことから光損傷と酸素は関係ないことがわかる。

フィンランドの Esa Tyystjärvi は、光化学系 II の光損傷について新たな説を提唱している。この説によれば、光損傷の最初のターゲットはマンガクラストで、受け取る光子の数に比例してマンガクラストが崩壊する。その結果、水からの電子供与が止まるため P680⁺ がその状態で停滞し、その強い酸化力でもって D1 タンパク質などに損傷を与える。現在、私たちは、光損傷の作用ペクトルが紫外領域にピークをもつという結果も得ており、マンガクラストを光損傷の最初のターゲットとする説を支持している。

損傷誘導型の環境ストレスと修復阻害型の環境ストレス

このように光は光化学系 II に損傷を与えるストレスである。ストレスというよりも、光による損傷は光化学系 II の潜在的な性質であり、宿命といったほうがいいかもしれない。一方、低温や酸化は光化学系 II の 修復を阻害するストレスである。塩ストレスは修復阻害型のストレスであり、修復のプロセスの中で遺伝子の転写と翻訳の双方を阻害することがわかっている。高温ストレスも、比較的マイルドなものは修復阻害型のストレスであるようだ。このように環境ストレスは損傷誘導型と修復阻害型の 2 つのタイプに分類できる ことがわかった。

これらの環境 ストレスは相乗効果をもつ。たとえば、自然界でよく起こりうることだが、低温下の強光という条件では、損傷誘導と修復阻害が同時に起こり、その阻害効果は 甚大となる。また派生効果も合わせもつ。強光や低温ストレスのもとでは活性酸素が誘発されて酸化ストレスが派生する。

今後の展望

修復阻害型 ストレスによる阻害の主なターゲットは翻訳装置や転写装置になっているようだ。したがって、修復阻害型ストレスの影響は、光合成にかぎらずすべての生物機能 に及ぶことが考えられる。このような重要な部分がストレスで抑制されてしまうことは、何か生物学的な意味があるのかもしれない。過度のストレスがかかると 生物は諸機能を抑えて、まずはじっと耐えているのかもしれない。そういうコンテキストでは、環境ストレスに対する応答は翻訳系や転写系の感受性で大きく制 御されているといえる。ただ、最近行ったマイクロアレイ解析の結果から、シグマ因子やリボソームタンパク質の遺伝子発現が修復阻害型ストレスにより促進される ことがわかっており、生物はストレスを受けながら翻訳装置や転写装置そのものを修復して諸機能を回復させていくようだ。

酸化ストレスの場合、ターゲットが翻訳装置の中のペプチド鎖伸長に関わる部分と、かなり限定されていることがわかった。近年、大腸菌の翻訳系の酸化傷害を研究しているグループがEF-Gが活性酸素にきわめてセンシティブだと報告している。また、別のグループの仕事で、大腸菌のすべてのタンパク質の中で最も酸化されやすいタンパク質を探していると、EF-Gがヒットしてきた。ラットではEF-2が酸化されやすいと報告されている。こうした状況をみると、私たちの発見もかなり正鵠を射ていると思われる。今後はEF-Gに的を絞って、酸化ストレスによる阻害の分子メカニズムを明らかにしていきたい。

最後に、ここで紹介した研究の中で私の寄与は酸化ストレスにかかわる仕事の一部であり、大半の仕事は村田教授をはじめ、和田元、Zoltán Gombos、Suleyman Allakhverdiev、山本宏、鈴木石根、兼崎友の諸氏など村田研究室で仕事をした多数の人によるものである。感謝を申し上げます。

参考文献

1. Gombos, Z., Wada, H., and Murata, N. (1994). The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8787-8791.
2. Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S.I., Inaba, M., Yokota, A. and Murata, N. (2001) Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J.*, 20: 5587-5594.
3. Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Miyairi, S., Yamamoto, H., Inagaki, N., Kanasaki, Y. and Murata, N. (2002) Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of *psbA* genes in *Synechococcus*. *Plant Physiol.*, 130: 1443-1453.