植物は、なぜ糖尿病を患わないのか？

植物の光合成との戦い：見えてきた、活性カルボニル化合物の植物特有の性質と解毒システム、その進化

三宅親弘

神戸大学大学院農学研究科，科学技術振興機構CREST

はじめに

本記事では、「糖」という甘い言葉が，細胞の生命活動を脅かす危険な側面をあわせもつというを紹介する．ヒトを含め従属栄養生物は，光合成生物がCO₂を光合成により固定し有機物化した糖をエネルギー源として生きている．糖からエネルギーを得る最も重要な代謝系である解糖系では，反応性に富むカルボニル化合物（reactive carbonyls; RCs）が不可避免的に生成する．第1に，ジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）およびグリセルアルデヒド3-リン酸（GAP）の平衡反応を触媒するトリオースリン酸イソメラーゼ（triose phosphate isomerase; TPI）では，その平衡反応の副産物として，RCsであるメチルグリオキサル（MG）およびグリオキサル（GLO）が生成する⁽¹⁾．第2に，DHAPとGAPは，非酵素的に反応しMGおよびGLOを生成する．第3に，アルデヒド基をもつ糖は自動酸化し，活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）であるスーパーオキシドラジカル（O₂⁻）を生成する⁽²⁾．O₂⁻は，過酸化水素（H₂O₂）および水へ不均化する．O₂⁻およびH₂O₂は，遷移金属（Fe, Cuなど）があるとフェントン反応により最も反応性に富むROSであるヒドロキシルラジカル（ $\cdot$ OH）を生成する．これらROSは，細胞内のフリーな脂肪酸あるいは膜脂質を酸化し，脂質由来のRCs（hydroxynonenal, acroleinなど）を生成する．第4に，糖

のもつアルデヒド基は，遊離アミノ酸あるいはタンパク質を構成するアミノ酸のアミノ基と Schiff 塩基を形成後，アマドリ転移反応を得て，RCs（MG, GLO and 3-deoxyglucosone (3-DG)）生成に至る．このように，RCsの主な生成起源は，従属栄養生物が分解・エネルギー獲得するときの糖である⁽³⁾．

RCsは，細胞内構成成分との反応性が高く，それらの成分はRCsにより修飾され，生理機能を失う．糖由来RCsであるMGおよびGLOは，塩基性アミノ酸（Arg, Lys, His）との反応性が高く，タンパク質アミノ酸（Arg, Lys, His）残基を糖化修飾する⁽⁴⁾．たとえば，MG, GLOおよび3-DGは，それらのアミノ酸と反応し，carboxymethyl-Lys（CML）, carboxylethyl-Lys（CEL）, GLO-Arg, GLO-His, 3DG-Hisの修飾アミノ酸を生成する．さらに，これら修飾されたアミノ酸は，タンパク質内で架橋し，タンパク質二量体，三量体の高分子化（GOLD:GLO-derived lysine dimer, MOLD:MG-derived lysine dimer, DOLD:3DG-derived lysine dimer）を引き起こす⁽⁴⁾．これらタンパク質の最終糖化産物（advanced glycation endo-products; AGEs）は，本来の生理機能を失っているものが多い．これらAGEsは，ヒト糖尿病患者に多く認められ，糖尿病の合併症である網膜症，腎症，神経障害，動脈硬化症，心不全とのかかわりが指摘されている⁽⁵⁾．

また，脂質由来RCsであるアクロレイン，ヒドロキ

シノネナールなど α/β -位不飽和カルボニル化合物は、糖由来RCsと同様にタンパク質アミノ酸の修飾あるいはDNA分子の修飾を引き起こし、それらの機能を失くす。たとえば、ヒト・グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の修飾失活を引き起こす⁽⁶⁾。また、細胞膜である脂質膜そのものの酸化分解を促進する。

ヒトを含めた哺乳類では、細胞機能に障害をもたらすRCsに対する防御機構をもち、細胞内でAGEsを生成するRCsの蓄積を抑えている。糖由来RCsに対しては、アルドケトレダクターゼ (aldo-keto reductase; AKR)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (aldehyde dehydrogenase; ALDH)、グリオキサラーゼ (glyoxalase) システムをもつ⁽⁷⁻⁹⁾。AKRは、NADPHを電子供与体とし、RCsを還元無毒化する。ALDHは、 NAD^+ を電子受容体としてアルデヒドを酸化する。グリオキサラーゼシステムは、グリオキサラーゼIおよびIIから構成される。このシステムではグルタチオン (GSH) が不可欠であり、MGを特異的に消去している。GSHは、非酵素的にMGと反応し、ヘミチオアセタール (HA) を生成する。HAは、グリオキサラーゼIにより、ラクトイルグルタチオンへ変換される。ラクトイルグルタチオンは、グリオキサラーゼIIにより乳酸へ変換されるとともに、GSHが再生する。また、脂質由来RCsに対しては、2011年に、Shenらのグループが、NADPHを電子供与体として α/β -位不飽和カルボニル化合物であるアクロレイン、アルケナールを還元無毒化するアルケナール/オン酸化還元酵素 (alkenal/one oxidoreductase; AOR) が機能することを報告している⁽¹⁰⁾。

われわれは、ヒトを含め従属栄養生物と異なり、植物に代表される光合成を営む独立栄養生物は、どのようにRCsの脅威を払拭しているのか？ つまり、「なぜ、植物は糖尿病を患わないのか？」という疑問を抱いた。植物は、光合成による CO_2 固定の結果、細胞内に数百mMに達するほどの糖をため込む。つまり、糖由来のRCs生成、活性酸素生成の脅威は、従属栄養生物と比べはるかに大きいと考えられる。このような疑問を抱いているなか、2008年アメリカのHuberのグループが、高 CO_2 環境にさらされた植物生葉内で糖化されたタンパク質が蓄積することを報告した⁽¹¹⁾。彼らは、当初、光合成が促進される高 CO_2 環境では、葉緑体での活性酸素の生成が抑制されるので、糖化タンパク質の蓄積は予想していなかった。光合成をしている葉緑体では、つねに、チラコイド膜光合成電子伝達系で O_2 が一電子還元され、ROSが生成する。 O_2 の還元は、光化学系Iでの

NADP^+ 光還元と拮抗するので、光合成が促進する環境下ではROSの生成は抑制される。この光合成電子伝達反応でのROS生成とその解毒システムはThe Water-Water Cycle (活性酸素消去系) と呼ばれ、京都大学名誉教授である浅田浩二先生により1998年に明らかにされたものである⁽¹²⁾。Huberグループによる報告の翌年2009年に、イギリスThornalleyのグループにより、植物生葉内でAGEsが初めて検出された⁽¹³⁾。多くのAGEsは、植物が光合成を営む昼間、あるいは呼吸活動がメインとなる夜間それぞれで増減を示した。これらの結果から、われわれは一つの仮説に至った。つまり、高等植物を含む光合成生物の細胞内での炭素代謝の営みは、つねにRCsの生成を伴う。とくに、光合成が促進される高 CO_2 環境あるいは強光環境では、光合成生物でも糖尿病を患う危険性が高まる。

高等植物でも、また、哺乳動物と同様に、RCs無毒化酵素をもつことが明らかにされつつある。光合成が抑制されるストレス環境下でRCs無毒化酵素の生理的役割が提唱されてきた。糖由来RCsを無毒化するグリオキサラーゼおよびAKRの遺伝子発現が、塩、浸透圧あるいは熱ストレスで促進される^(14, 15)。

乾燥ストレス下、AKR活性が増大する⁽¹⁶⁾。また、これら酵素を生葉細胞に過剰発現させた植物は、上記ストレスに対して耐性を示すことが示された⁽¹⁷⁾。また、脂質由来RCsを無毒化する酵素が見いだされ、金属ストレス耐性を示すことも示された⁽¹⁸⁻²²⁾。

われわれは、光合成生物でのRCs代謝の全容を明らかにすべく研究を行っている。本記事では、高 CO_2 環境にさらされた植物生葉内で糖化タンパク質の蓄積を引き起こす糖由来および脂質由来RCsの光合成生物特有の代謝・反応性の解明を行い、その研究成果を紹介する。さらに、AKRはスーパーファミリーを形成しているが、高等植物で糖由来RCsを消去無毒化するAKR4Cサブファミリーの全容とその高 CO_2 応答を明らかにしたので紹介する。さらに、われわれは、光合成生物の進化において、葉緑体の祖先とされる原核藻類ランソウに着目した。高等植物への進化において、安全な光合成の営みの確立は必然であったことは疑いようがない。われわれは、ランソウにおいて、すでにRCs解毒システムは確立されていたという仮説のもとで研究を行い、そのシステムの存在を解明したので紹介する。

高等植物葉緑体での、新規な糖由来RCs代謝：解毒システムと、植物特有の活性酸素生成反応

上述したように、われわれは、光合成生物である植物

もまたヒトと同様に、糖由来RCsの解毒酵素をもつと考えた。とくに、光合成によりCO₂を糖へ同化する葉緑体ではRCsによる細胞障害の危険性が高いと考えられる。そこで、われわれは、高等植物生葉から葉緑体を単離し、AKRによるMG還元無毒化活性を評価した。その結果、葉緑体の可溶性画分であるストロマにAKR活性を見いだした。ストロマは、光合成においてカルビン回路が機能しCO₂を同化する場所であり、光合成に伴い糖由来RCsが生成すると考えられる⁽²³⁾。これに対して、光合成電子伝達反応が機能するチラコイド膜にはAKR活性は検出されなかった。

われわれは、さらに、葉緑体でのAKR反応の性質を解明することを試みているとき、当初の予想とは異なる反応を見いだした。酵素AKRは、以下の反応を触媒する。

細胞内でAKRがMGを消去し続けるためには電子供与体であるNADPHが供給され続ける必要がある。NADPHは、光合成電子伝達系の光化学系IでNADP⁺の光還元反応で生成する。したがって、葉緑体でAKR反応によりMGが解毒代謝されるのであれば、光合成電子伝達反応が進行することが予想される。

そこで、われわれは、葉緑体レベルでAKR反応の検出を試みるべく、クロロフィル蛍光解析法によりMG代謝を調べた。葉緑体へ光照射した後に、AKRの基質であるMGを添加するとクロロフィル蛍光レベルの低下が観測される⁽²³⁾ (図1)。これは、光合成電子伝達反応で光エネルギーが利用されたことを示す。われわれは、MG添加によりAKR反応が進行し、光合成電子伝達系で光エネルギーがNADPH再生に利用されたと考えた。しかしながら、さらなる研究で、この反応が嫌気条件で進行しないことを見いだした。つまり、MG添加での光エネルギー利用は酸素を要求する反応であった。

われわれは、次に、光エネルギーがMGを介して酸素へ流れている可能性を検討すべく、葉緑体でのMGに依存した反応と酸素の収支を調べた。葉緑体に光を照射するとチラコイド膜光化学系Iでの酸素還元反応(メーラー反応)により酸素の吸収が観測される。光照射停止とともにカタラーゼを反応系に加えると酸素の発生が認められる。つまり、光照射中に還元された酸素は過酸化水素に変換され蓄積されていることがわかる。一方、MG存在下では、酸素吸収反応が促進され、光照射後多量の過酸化水素が蓄積することが明らかになった。そして、このMGに依存した酸素吸収反応は、光合成電子伝達反応の阻害剤であるDCMUおよびDBMIBにより抑

図1 ■ MGがクロロフィル蛍光に与える影響

ホウレンソウから抽出した葉緑体に、光照射下、MGを添加した。縦軸は、クロロフィル蛍光強度(相対値)測定光(ML)照射による最小蛍光強度(Fo)を得た後に、飽和パルス光(SP)を照射し、最大蛍光強度(Fm)を得た。その後、光合成電子伝達系を駆動させるために、作用光(AL)を照射した。また、AL照射とともに、SPを定期的に照射した。チラコイド膜光化学系II(PSII)の電子伝達反応速度は、PSII量子収率($Y(II) = (Fm' - Fs) / (Fm' - Fo)$)として表される。 $Y(II)$ の値が大きいほど、電子伝達反応の速度が大きいことを反映する。データは文献22から抜粋。

制された。DCMUは、チラコイド膜光合成電子伝達系の光化学系IIでの電子伝達反応を、DBMIBは、シトクロム b_6/f 複合体での電子伝達反応を阻害する。つまり、MGは、光化学系Iで酸素光還元反応を促進していることが考えられた⁽²³⁾。

MGによる酸素還元の初発生成物を明らかにすべく、光に依存した酸素吸収反応でシトクロム c の還元反応を調べた。シトクロム c 存在下、葉緑体から調整したチラコイド膜に光を照射するとシトクロム c が還元された。このとき、MGを共存させると、その還元反応が顕著に促進された。そして、この反応は、スーパーオキシドラジカル(O_2^-)を消去する酵素スーパーオキシドディスムターゼ(superoxide dismutase; SOD)により阻害された。これらの結果から、MGは、葉緑体チラコイド膜光化学系Iで光還元され、酸素を一電子還元し、 O_2^- を生成していることが明らかとなった。この O_2^- が、シトクロム c のヘム Fe^{3+} をヘム Fe^{2+} へ還元する⁽²³⁾。

MGは、酸化還元電位 -330 mVをもち、一電子還元されMGラジカルとなる。一方、チラコイド膜光化学系I電子伝達成分の酸化還元電位は以下のとおりである：

フィロキノン, -800 mV ; Fx, -705 mV ; FA, -520 mV ; FB, -580 mV ; フェレドキシン, -430 mV . したがって, 光照射中, より高い酸化還元電位をもつMGは, これらの電子伝達成分により還元され, MGラジカルが生成する. MGラジカルは O_2 を一電子還元し, O_2^- 生成を促進する. この生理反応は, 葉緑体での糖代謝が葉緑体での活性酸素生成を光に依存して促進するという, 光合成生物・植物特有の新規な反応であり, ROS生成反応の発見である⁽²³⁾. つまり, 光合成にとって糖由来RCs生成は不可避であり, そしてROS生成も不可避であるということを示す. 植物光合成の場合は, 非常に危険なものであることが理解できる.

ここで, 一つの疑問点に至る. 葉緑体に存在するAKRは, MGを還元無毒化できないのであろうか? 上述したように, 葉緑体で生成するMGは, 光化学系IでROSの生成を触媒する. その反応の K_m 値は約 $100\text{ }\mu\text{M}$ である. 一方, AKR反応のMGに対する K_m 値は約 7 mM と70倍ほど大きい. これゆえに, 葉緑体に添加されたMGは, AKRにより消去されずROS生成を促進すると考えられる. 植物細胞内MG濃度が $100\text{--}200\text{ }\mu\text{M}$ であることを考えると, 光照射中の葉緑体ではROS生成にMGが使われている可能性が高い. 現段階では, AKRは, 細胞質あるいは葉緑体内での夜間の糖代謝で不可避的に生成するMGの無毒化に貢献していると考えられ, 植物細胞内での機能は今後明らかにしていかなければならない課題である.

高等植物葉緑体および原核藻類ランソウでの, 脂質由来RCsによる光障害誘導: 光に依存した光合成生物特有の活性カルボニル障害反応

次に, 糖代謝がもたらす脂質由来RCsによる植物特有の細胞障害を紹介する. ここでは, 植物光合成の場合は, 非常に危険なものであることがさらに理解できる. 培養中のランソウ (*Synechocystis* sp. PCC 6803, (S. 6803)) 細胞をサンプリングし, 脂質アルデヒドを調べてみると, アクロレイン, プロピオンアルデヒドなどの脂質由来RCsである α/β -位不飽和カルボニル化合物が実際に検出され, アクロレイン濃度は約 $3\text{ nmol (mg Chl)}^{-1}$ に達する⁽²⁴⁾. われわれは, ランソウ細胞に与えるアクロレインの影響を明らかにするために, S. 6803生育中にアクロレインを添加した. その結果, 無添加区と比べ, アクロレイン処理区は速やかに生育抑制が生じた⁽²⁴⁾.

生育抑制のメカニズムを明らかにするために, ランソウ細胞の光合成へ与えるアクロレインの影響を解析し

図2 ■ アクロレインがランソウ *Synechocystis* sp. PCC6803 の光合成活性に及ぼす影響

対数増殖期のランソウを異なるアクロレイン濃度条件下, それぞれ明条件 (○) あるいは暗条件 (●) で1時間インキュベートした後, 洗浄した細胞の光合成速度 (O_2 発生速度) を測定した. *, 統計的に有意差 (5%) あり. データは文献24から抜粋.

た. 対数増殖期の細胞へアクロレインを種々の濃度で添加し, 光合成能を評価した. その結果, アクロレイン濃度が増大するとともに, CO_2 依存の酸素発生速度の低下が認められた (図2). 約 $100\text{ }\mu\text{M}$ アクロレインで光合成能は50%へ低下した. 酸素発生能の低下の原因を明らかにすべく, アクロレイン処理の細胞を用いて, チラコイド膜光化学系 II (PSII) 依存の酸素発生活性を評価したところ, CO_2 依存の酸素発生と同様にPSII依存の酸素発生活性が低下していた. この結果は, アクロレインがPSIIの障害をもたらしていることを示す.

さらに, アクロレイン障害がPSIIを含むチラコイド膜のどの部位で生じているかを明らかにすべく, クロロフィル蛍光解析を行ったところ, PSII還元側での電子伝達反応の抑制が生じていた. そしてその影響は, 光合成電子伝達反応での光化学系Iへの電子の流れの抑制に現れていた⁽²⁴⁾.

このアクロレインによる CO_2 依存の酸素発生およびPSII障害は, 光を要求すること, そして細胞の呼吸反応へは影響を与えないことが見えてきた. これらは, 当初の予測とは反するものであり, われわれを驚かせた. 従来明らかにされてきた脂質由来RCsは, タンパク質, 脂質, DNAなどを修飾し, それらの機能を失活させる. とくに, タンパク質アミノ酸残基: リシン, アルギニン, ヒスチジンはアクロレインにより修飾されやすく, この修飾は試験管内で起こる反応である. これは, 光合成生物に限らず, 動物, ヒト細胞でも一般に理解されていることである. したがって, 光を要求しないはずである. たとえば, 暗条件下, ホウレンソウ葉緑体にアクロ

レインなどの脂質由来RCsを添加する *in vitro* の実験系において、CO₂ 依存の酸素発生が抑制される⁽²⁵⁾。このとき、カルビン回路酵素であるグリセルアルデヒドリンリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、ホスホリブロンキナーゼ (PRK) などが、失活しており、これが葉緑体光合成能低下の一因となっている。つまり、アクロレインは、光に依存しないでカルビン回路酵素を失活させている。この事実は、われわれが明らかにした結果と異なるものであった。暗条件下でのアクロレイン処理では、ランソウ細胞のCO₂ 依存の光合成およびカルビン回路酵素の失活は明らかに認められない。これは、おそらく、高等植物葉緑体を構成するカルビン回路酵素のアミノ酸配列がランソウのものと異なることが原因であろうと考えられる。

脂質由来RCsによるランソウ光合成能の低下は、光を要求するチラコイド膜PSIIの機能障害であり、高等植物葉緑体でも生じる⁽²⁴⁾、つまり、光合成生物特有の新規なものであることが明らかとなった。アクロレインによるPSII障害の分子メカニズムとして、われわれは、以下のモデルを提唱した⁽²⁴⁾。アクロレイン (CH₂=CHCHO) は、ヒドロキシルラジカル (HO•) と反応し、アクロレインラジカル (CH₂=CHC•O) を生成することが知られている⁽²⁶⁾。

ヒドロキシルラジカルは、光照射中のPSII還元側で生成する。光合成電子伝達反応が進行すると、PSII一次電子受容体であるQ_Aが一電子還元され、二次電子受容体でQ_Bへ電子を渡す。Q_Bは、チラコイド膜プラストキノン (PQ) との交換反応によりPSII複合体から遊離拡散し、電子伝達複合体であるシトクロム *b*₆/*f* 複合体へ電子を与える。Q_Aは、酸化還元平衡にあり、光合成が低CO₂環境で抑制されるあるいは強光環境条件で、還元型Q_Aの割合が増大する。還元型Q_Aは、大気中あるいは水溶液中に豊富にあるO₂分子を還元し、PSIIでのヒドロキシルラジカル生成を促進する。つまり、光照射下では、その量には大小あるが、つねにヒドロキシルラジカルが生成していると言っても過言ではない。おそらく、アクロレインは、このヒドロキシルラジカルと反応することにより、PSII障害を誘導していると考えられる。われわれが、新たに提唱したこのモデルを立証するためには、アクロレイン・ラジカル検出などの物的証拠が不可欠である。

以上、脂質由来RCsアクロレインによるランソウ光合成の光阻害を述べてきたが、一方でラン藻はアクロレインを還元無毒化する活性 (NADPH依存アクロレイン還元活性; NAR活性) をもつことが明らかとなった⁽²⁴⁾。アクロレインに対するK_m値は約500 μMである。今回の研究では、細胞の外から与えられたアクロレインは無毒化されていない。実際、細胞内でのアクロレイン生成速度は、おそらく、細胞障害が発症しない程度に小さく抑えられているのであろう。

高等植物での、糖由来RCs解毒酵素アルドケトレダクターゼの性質と、高活性基質の発見

多くの生物が、RCsを還元無毒化する酵素アルドケトレダクターゼ (aldo-keto reductase; AKR) をもち、スーパーファミリーを形成している⁽²⁷⁾。とくに、高等植物では、糖由来RCsを無毒化する酵素としてAKR4CサブファミリーがSimpsonらにより見いだされた⁽¹⁹⁾。シロイヌナズナAKR4Cサブファミリーは、4つの酵素よりなる: AKR4C8 (At2g37760), AKR4C9 (At2g37770), AKR4C10 (At2g37790), AKR4C11 (At3g53880)。

われわれは、大気CO₂/O₂条件で生育させたシロイヌナズナをCO₂濃度2,000 ppmの高CO₂環境に移すと、AKR4Cサブファミリーの遺伝子発現が促進されることを見いだした⁽²⁸⁾。この結果は、Huberらが、高CO₂環境にさらされたシロイヌナズナ生葉でカルボニル化タンパク質が増加する生理現象と相関するものである。つまり、光合成が促進される環境下でAKR4Cサブファミリーの遺伝子発現が要求されることを初めて見いだした。さらに、AKR4Cサブファミリーの遺伝子発現が促進される事実は、光強度を増加させ光合成が促進される環境に移しても認められた⁽²⁸⁾。

これらの新規な事実を得たのち、それまで未知であったAKR4C10およびAKR4C11の酵素学的性質の解明をわれわれは行った⁽²⁸⁾。SimpsonらがすでにAKR4C8およびAKR4C9のタンパク質立体構造および酵素学的性質を明らかにしていた。糖由来RCsのなかで、AKR4C9はMGに対する親和性が高い。このことが、糖由来RCs解毒酵素と提唱されている理由である。われわれは、まず、AKR4C9の立体構造をモデルにして、AKR4C10およびAKR4C11のタンパク質立体構造予測を行った (図3)。すべてのAKR4Cサブファミリーに共通して、8つのα/β-バレル構造を認めることができ、それらの立体配置は非常に類似している。

一方、RCsに対する基質特異性にかかわる3つのループ構造 (Loop A, B, and C) も認められる。しかしなが

図3 ■ AKR4Cサブファミリーの立体構造予測

Swiss モデルを使用し、AKR4Cサブファミリーの立体構造を予測した。データは文献27から抜粋。

ら、それらの構造はAKR4Cサブファミリー間で非常に異なっていた。つまり、AKR4C10およびAKR4C11の酵素学的特徴は、すでにSimpsonらが報告しているAKR4C8およびAKR4C9のものと異なる可能性がある。その結果、MGに対するミカエリス定数 K_m 値が最も低かったのはAKR4C10であった。また、触媒定数 k_{cat} が最も大きかったのはAKR4C9であった。そして、低濃度の基質に対する触媒能力を反映する指標 k_{cat}/K_m の値は、AKR4C10とAKR4C9はほぼ同じであった。 k_{cat} および K_m の違いにかかわるアミノ酸の情報は、今後、明らかにしていかなければならない。AKR4C9の K_m 値を下げる、あるいはAKR4C10の k_{cat} を上げることができれば、両酵素の k_{cat}/K_m の値をさらに大きくすることができ、優れたRCs解毒酵素の活用を図れると考える。

その後の研究で、われわれは、糖由来RCsである3-DGがMGに代わり高活性を示す基質であることを発見した⁽²⁹⁾。すべてのAKR4Cサブファミリーで3-DGに対する K_m 値は、数十 μ Mのオーダーであり、これまで測定されてきたさまざまな基質の中で最高の親和性を示す値であった。さらに、AKR4C9の k_{cat}/K_m の値は23,000

に達し、MGに対して12倍大きい活性を示す優れた基質であることを見いだした⁽²⁹⁾。現在、植物での3-DG検出とAKR4Cサブファミリーの関係、とくに生理的役割を明らかにすべく研究を行っている。われわれは、AKR4Cサブファミリーの真の基質として3-DGを提唱する。

次に、われわれは、AKR4Cサブファミリーの温度耐性を評価した。地球温暖化に見られる大気CO₂濃度の増大は、気温の上昇を伴う。AKR4C9およびAKR4C10の両酵素と比べ、AKR4C8およびAKR4C11は僅か1時間の高温(35℃)処理で活性が低下あるいは完全に消失した⁽²⁸⁾。最近の日本の夏の気温は35℃を超える日々が続くことはわれわれが経験するところであり、さらに40℃に達する勢いである。地面近くで生活をしなければならない植物にとって、この高温は死活問題である。AKR4C8およびAKR4C11と比べてAKR4C9およびAKR4C10が高温耐性をもつ分子メカニズムを明らかにすることは、植物が安全に光合成を営むために、細胞内のRCs解毒能を維持させるためにも重要なことである。このメカニズムを明かにすることは、AKR4C8および

図4 ■ 高等植物におけるRCs生成経路と消去システム

AKR4C11の高温耐性付与を可能にすると考える。

RCsによる細胞障害を解明するとき、RCsのターゲットであるタンパク質を明らかにすることは重要な要因である。これまで、AKR4Cサブファミリーの性質を明らかにしてきた。つまり、糖由来RCs解毒酵素という立場から解析してきた。三宅・浅田は、葉緑体活性酸素消去系を解明する過程で、 H_2O_2 消去の鍵となる酵素（アスコルビン酸ペルオキシダーゼ；APX）が基質である H_2O_2 自身により酸化失活することを見だし、その分子メカニズムを明らかにしてきた⁽³⁰⁾。この発想をAKR4Cサブファミリーに適用したところ、これら解毒酵素が、基質RCsにより失活を被ることを見だした⁽²⁸⁾。糖由来RCsであるMGは、AKR4Cサブファミリーの活性を約8割へ低下させた。一方、脂質由来RCsであるアクロレインは、AKR4C9およびAKR4C10が基質として無毒化するが、AKR4C8およびAKR4C11の基質とならない。アクロレインに対して耐性をもつのはAKR4C9およびAKR4C10であった。一方、AKR4C8およびAKR4C11は、アクロレインにより4割へと失活する。失活の分子メカニズムの解明は今後の課題である。今回の研究は、RCsによる細胞障害の原因として、RCs自身の解毒酵素が失活することが、その一因かもしれないということを提唱するものである。

高等植物での細胞内RCs代謝制御モデル

細胞内RCs濃度は、その生成速度と消去速度により決定される。細胞内でのRCs生成経路は、代謝的経路

とROS経路に分けられる（図4）。代謝的経路では、解糖系およびカルビン回路において糖由来RCsであるMG、GLOそして3-DGが生成する。ROS経路では、糖の自動酸化、葉緑体チラコイド膜光化学系Iでの O_2 光還元反応が含まれる。ROSは、糖と反応し糖由来RCsあるいは遊離の脂肪酸・膜脂質と反応し脂質由来RCsである α/β -位不飽和カルボニルを生成する。生成した糖由来RCsは、AKR4Cサブファミリーあるいはグリオキサラゼにより消去解毒される。脂質由来RCsは、AORにより解毒される。これらRCs消去システムの*in vivo*での詳細な役割は、今後、各酵素の（多重）欠損あるいは（多重）過剰発現植物の解析により明らかにしていく予定である。

ランソウでの、糖および脂質由来RCs解毒システムの発見

高等植物葉緑体は、光合成生物の進化において、原核藻類であるランソウが従属栄養生物に共生することで生まれてきた、つまり葉緑体の祖先はランソウと考えられている。ランソウでは、高等植物と異なり、細胞内代謝が区画化されていない。RCsを生成する光合成および呼吸の炭素代謝が細胞質で同時進行する。これは、高等植物以上にランソウはRCsによる毒性にさらされていること示す。そこで、われわれは、仮説「光合成生物の進化において、ランソウはすでにカルボニル化合物の解毒システムを備えていたはずである」を検証した。

高等植物AKR4Cサブファミリーのなかで、3-DGの解毒能が最も強いAKR4C9のアミノ酸配列に高い相同

性を示す遺伝子産物 (Slr0942) をゲノム配列が明らかな *Synechocystis* sp. PCC6803 に見いだした⁽²⁹⁾。Slr0942 は、AKR4C サブファミリーに共通に見られる NADPH 結合に必須のアミノ酸を、さらに AKR モチーフ配列を保持していた。基質 RCs への特異性を決定する3つのループ構造は、高等植物のものとそれぞれ異なった。実際、Slr0942 は、MG に対して最も親和性が高く、 K_m は AKR4C9 の5分の1、 k_{cat}/K_m の値は AKR4C9 の約2倍であった。一方、3-DG に対する k_{cat}/K_m は AKR4C9 の約50分の1であった。このことは、高等植物 AKR4C サブファミリーが、いかに3-DG 解毒へ特化して進化していったのか伺える。一方、ランソウにおいては、MG 解毒能が優先されているのかもしれない。

われわれは、高等植物で NADPH を電子供与体とし、RCs を還元する short-chain/medium-chain アルデヒド・デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ (SDR (At3g04000)/MDR (At3g19450, At4g34230)) のアミノ酸配列に高い相同性を示す遺伝子産物 (Slr0315 and Slr1192) をそれぞれ見いだした⁽²⁹⁾。これらランソウ SDR および MDR のアミノ酸配列には、NADPH 結合にかかわる Rossmann-fold モチーフが共通に見いだされる。Slr0315 は、MG のみを基質とし、その K_m 値は Slr0942 の約20倍であり、 k_{cat}/K_m は約6分の1であった。一方、Slr1192 は糖および脂質由来 RCs をともに還元した⁽²⁹⁾。Slr1192 の MG に対する K_m および k_{cat}/K_m は、Slr0942 のともに約2倍であった。Slr1192 の際立った特徴として、脂質由来 RCs に対する解毒能力に優れ、アクロレイン、プロピオンアルデヒドおよびクロトンアルデヒドに対する K_m 値は μM のオーダーであり、 k_{cat}/K_m は、高等植物で見いだされている AER/AOR の約60~200倍に達する⁽²⁹⁾。

このことは、ランソウ細胞内は、高等植物と比べものにならないくらいに脂質アルデヒド毒性の脅威にさらされていることを示している。

次に、われわれは、高等植物がもつグリオキサラーゼシステムの存在を検証した。シロイヌナズナは、11個のグリオキサラーゼ I (GLXI) および5つのグリオキサラーゼ II (GLXII) をもつ⁽³¹⁾。GLXI のうち At1g11840 のアミノ酸配列と相同性を示す遺伝子産物 (Slr0381) を *Synechocystis* sp. PCC6803 に見いだした⁽²⁹⁾。

Slr0381 は、活性発現にかかわるグリオキサラーゼ I-1 および I-2 モチーフ、金属結合配列をシロイヌナズナ同様にもっていた。一方、GLXII2 のうち At3g10850 のアミノ酸配列と相同性をもつ遺伝子産物 (Slr1019) を見いだした⁽²⁹⁾。Slr0381 と同様に、Slr1019 は、活性発現にかかわるグリオキサラーゼ II (メタロ- β -ラクタマーゼ) モチーフ、金属結合配列をシロイヌナズナ同様にもっていた。*Synechocystis* sp. PCC6803 の GLXI および GLXII のヘミチオアセタールおよびラクトイルグルタチオンに対する K_m および k_{cat} の値は、これまで報告されている植物、大腸菌、酵母の値とほぼ同じであった⁽³²⁻³⁶⁾。

以上の結果は、光合成生物の進化において、ランソウ *Synechocystis* sp. PCC6803 はすでにカルボニル化合物の解毒システムを備えていたことを示し (図5)、われわれの仮説を支持する。そこでは、糖および脂質由来 RCs の解毒能が高等植物の酵素よりも優れた性質をもつものが見いだされた。これは、原核生物であるランソウが、オルガネラ分化が発達した真核生物である高等植物よりも RCs に対する危険性が高いことを反映しているのだろうか？ オルガネラ分化は、RCs によるストレスを緩和したのであろうか？ 本研究で、糖由来 RCs

図5 ■ ランソウ RCs 解毒システム

であるMGに対しては、アルドケトレダクターゼおよびグリオキサラーゼシステムの二重の解毒システムが存在することを明らかにした。これらシステムの細胞内における役割分担、その生理学的意義は、今後解明しなければならない問題である。そして、これらが、高等植物へ進化する過程で、どのようにオルガネラへ局在化していくのかということ、その選択の必然性の理由は興味が尽きない問題である。脂質由来RCsに対しては、高等植物のAER/AORよりも非常に優れた解毒能をもつ酵素(Sll1192)が存在することを見いだした。この触媒能が、高等植物の酵素へ引き継がれなかった生理学的理由も未解決の問題である。

おわりに

われわれは、生命活動のために糖を分解しエネルギーを得ている。つまり、植物がCO₂にエネルギーを注ぎ込んで作り上げた糖をわれわれは利用していることになる。したがって、必然的に、糖はエネルギーをもっており、代謝過程の中で生成する副産物は反応性に富み、そのエネルギーが細胞に障害（植物糖尿病）をもたらすことは十分にありうる。われわれの研究は、光合成という営みのなかで細胞内に高蓄積せざるをえない糖を抱え込む植物・ランソウなどの光合成生物のRCs制御戦略を明らかにするものである。この戦略の解明は、高CO₂濃度下、生育抑制されずに、健全に生育する植物・作物の育成、またCO₂資源化を光合成による炭素化合物に求めるとき、植物・作物の安全な光合成とその生育を可能にすることに大きく貢献するものである。たとえば、高等植物よりも優れたRCs解毒能をもつランソウ酵素遺伝子の高等植物への導入利用などの人為的改変も植物・作物の分子育種の戦略の一つかもしれない。

謝辞：本稿は、文部科学省科学研究費補助金（新学術領域）およびCREST研究領域「二酸化炭素排出抑制に資する革新的技術の創出」の支援を得た。記して感謝する。

文献

- 1) J. P. Richard : *Biochemistry*, **30**, 4581 (1991).
- 2) S. P. Wolf & R. T. Dean : *Biochem. J.*, **245**, 243 (1987).
- 3) P. J. Thornalley, A. Langborg & H. S. Minhas : *Biochem. J.*, **344**, 109 (1999).
- 4) P. J. Thornalley, S. Battah, N. Ahmed, N. Karachalias, S. Agalou, R. Babaei-Jadidi & A. Dawnay : *Biochem. J.*, **375**, 581 (2003).
- 5) P. J. Thornalley : "Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases," John Wiley & Sons, 2006, p. 681.
- 6) M. Ray, N. Basu & S. Ray : *Mol. Cell. Biochem.*, **177**, 21 (1997).

- 7) O. A. Baraski, S. M. Tipparaju & A. Bhatnagar : *Drug Metab. Rev.*, **40**, 553 (2008).
- 8) A. Yoshida, A. Rzhetsky, L. C. Hsu & C. Chang : *Eur. J. Biochem.*, **251**, 549 (1998).
- 9) P. J. Thornalley : *Biochem. J.*, **269**, 1 (1990).
- 10) Y. Shen, L. Zhonga, S. Johnsonb & D. Cao : *Chem. Biol. Inter.*, **191**, 192 (2011).
- 11) Q-S. Qiu, J. L. Huber, F. L. Booker, V. Jain, A. D. B. Leakey, E. L. Fiscus, P. M. Yau, D. R. Ort & S. C. Huber : *Photosynth. Res.*, **97**, 155 (2008).
- 12) C. Miyake, H. Hormann, U. Schreiber, S. Sano & K. Asada : *Plant Cell Physiol.*, **39**, 1104 (1998).
- 13) U. Bechtold, N. Rabbani, P. M. Mullineaux & P. J. Thornalley : *Plant J.*, **59**, 661 (2009).
- 14) I. Gavidia, P. Pérez-Bermúdez & H. U. Seitz : *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2842 (2002).
- 15) C. Paulus, B. Köllner & H-J. Jacobsen : *Planta*, **189**, 561 (1993).
- 16) S. G. Mundree, A. Whittaker, J. A. Thomson & J. M. Farrant : *Planta*, **211**, 693 (2000).
- 17) S. L. Singla-Pareek, M. K. Reddy & S. K. Sopory : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14672 (2003).
- 18) A. Oberschall, M. Deak, K. Torok, A. Sass, I. Vass, I. Kovacs, A. Feher, D. Dudits & G. V. Horvath : *Plant J.*, **24**, 437 (2000).
- 19) P. J. Simpson, C. Tantitadapitak, A. M. Reed, O. C. Mather, C. M. Bunce, S. A. White & J. P. Ride : *J. Mol. Biol.*, **392**, 465 (2009).
- 20) R. Narawongsanont, S. Kabinpong, B. Auiyawong & C. Tantitadapitak : *Protein J.*, **31**, 35 (2012).
- 21) J. Mano, S. Torii, K. Hayashi, K. Takimoto, K. Matsui, D. Nakamura, D. Inze, S. Babyichuk, S. Kushnir & K. Asada : *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1445 (2002).
- 22) Y. Yamauchi, A. Hasegawa, A. Taninaka, M. Mizutani & Y. Sugimoto : *J. Biol. Chem.*, **286**, 6999 (2011).
- 23) R. Saito, H. Yamamoto, A. Makino, T. Sugimoto & C. Miyake : *Plant Cell & Environ.*, **34**, 1454 (2011).
- 24) G. Shimakawa, T. Iwamoto, T. Mabuchi, R. Saito, H. Yamamoto, K. Amako, T. Sugimoto, A. Makino & C. Miyake : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1655 (2013).
- 25) J. Mano, F. Miyatake, E. Kitaoka & M. Tamoi : *Planta*, **230**, 639 (2009).
- 26) I. Magneron, R. Thévenet, A. Mellouki, G. LeBras, G. K. Moortgat & K. Wirtz : *J. Phys. Chem. A*, **106**, 526 (2002).
- 27) J. M. Jez, M. J. Bennett, B. P. Schlegel, M. Lewis & T. M. Penning : *Biochem. J.*, **326**, 625 (1997).
- 28) R. Saito, G. Shimakawa, A. Nishi, T. Iwamoto, K. Sakamoto, H. Yamamoto, K. Amako, T. Sugimoto, A. Makino & C. Miyake : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
- 29) G. Shimakawa, M. Suzuki, R. Saito, E. Yamamoto, A. Nishi, K. Sakamoto, H. Yamamoto, A. Makino & C. Miyake : in press.
- 30) C. Miyake & K. Asada : *Plant Cell Physiol.*, **37**, 423 (1996).
- 31) A. Mustafiz, A. K. Singh, A. Pareek, S. K. Sopory & S. L. Singla-Pareek : *Funct. Integr. Genomics*, **11**, 293 (2011).
- 32) E. Marmstål, A. C. Aronsson & B. Mannervik : *Biochem. J.*, **183**, 23 (1979).
- 33) M. W. Crowder, M. K. Maiti, L. B. Christopher & C. A. Makaroff : *FEBS Lett.*, **418**, 351 (1997).
- 34) S. L. Clugston, J. F. J. Barnard, R. Kinach, D. Miedema, R. Ruman, E. Daub & J. F. Honek : *Biochemistry*, **37**, 8754

- (1998).
- 35) M. Skipsey, C. J. Andrews, J. K. Townson, I. Jepson & R. Edwards: *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 261 (2000).
- 36) E. M. Frickel, P. Jemth, M. Widerstem & B. Mannervik: *J. Biol. Chem.*, **276**, 1845 (2001).

プロフィール

三宅 親弘 (Chikahiro MIYAKE)

＜略歴＞1993年京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻修了／日本学術振興会特別研究員／九州大学大学院・生物資源環境科学府・助教授／地球環境産業技術研究機構・副主席研究員／神戸大学大学院農学研究科・准教授，現在に至る＜研究テーマ＞（1）植物はなぜ糖尿病にならないのか？（2）植物はなぜ日射病にならないのか？＜趣味＞TENKARA