今日の話題

新気孔シグナル分子 8-ニトロ-cGMP

気孔は植物葉表面に存在する小さな孔で、この孔を通して光合成に必要な二酸化炭素が取り入れられる一方、水分と酸素が放出される。このように植物の生存を左右する気孔の開閉は極めて巧緻に制御されている。さまざまなシグナル分子が気孔閉鎖をもたらすことが知られているが、そのなかでも一酸化窒素は近年注目されているものの一つである。一酸化窒素は細胞膜透過可能な活性ラジカルで動物では数多くの研究がなされ、1998年にはその生体機能の発見者にノーベル賞が授与されている。植物の一酸化窒素研究の歴史は動物に比べ10年の遅れはあるが、根の伸長、細胞壁のリグニン化、セネッセンス、葉緑素合成、病害抵抗性誘導、気孔閉鎖などに一酸化窒素が関与していることが次々と明らかにされつつある⁽¹⁾。

しかし、一酸化窒素が植物体で作用していることに疑義を唱える人もいないわけではない。その理由は、第一に、信頼のおける一酸化窒素測定法がないことである。動物では通常グリース法が用いられるが、これは一酸化窒素が酸化されて生じる亜硝酸と硝酸を測定する方法であり植物では使えない。植物は肥料として硝酸を大量に吸収し還元酵素によって亜硝酸もまた多く生成するためバックグラウンドが高くなってしまふ。また、ある処理で硝酸が増加したとしても、一酸化窒素発生によるものか硝酸吸収能が増強したものかの区別ができない。電極法は感度が低く培養細胞を別にすれば使いづらい。蛍光色素の DAF (Diaminofluorescein) を使う測定法もあるが、特異性はそれほど高くない。第二に、一酸化窒素合

成酵素が植物ではいまだ発見されていない。第三に、動物一酸化窒素シグナル伝達経路の主要なメンバーである cGMP 依存性タンパク質キナーゼが未確認である、等々。2002年に、一酸化窒素がアブシジン酸による気孔閉鎖のセカンドメッセンジャーとして働いていることが報告⁽²⁾されたが、ここでも矛盾する結果が報告されている。cGMP 合成酵素であるグアニレートシクラーゼの阻害剤は気孔閉鎖を阻害するのに、その産物の cGMP は気孔を閉鎖しない。それどころか、暗所下での気孔開口を促進してしまう。この矛盾は10年以上の永きにわたって未解決のままであり、一酸化窒素が実際に植物でセカンドメッセンジャーとして機能しているのかと疑われる一因となっている。このたび、筆者らは、酵素は必須なのにその産物は機能しないというこの謎を解明する手がかりを得たので紹介したい⁽³⁾。

筆者らは、まず、グアニレートシクラーゼが気孔閉鎖に関与しているかを調べてみた。本酵素の阻害剤である ODQ と LY83586 はともにアブシジン酸と一酸化窒素によって誘導されるシロイヌナズナの気孔閉鎖を阻害する。また、本酵素の欠損変異体でも気孔閉鎖は起こらない。すなわち、本酵素が気孔閉鎖のシグナル伝達に関与していることを示している。前述したように、この酵素の産物である cGMP 単独では気孔閉鎖を起こさないが、cGMP にアブシジン酸あるいは一酸化窒素を同時に投与すると気孔は閉鎖する。さらに、そこに一酸化窒素消去剤を添加すると気孔閉鎖は阻害される。すなわち、cGMP と一酸化窒素が同時に存在すれば閉鎖シグナルは

伝達されていく。

cGMP, 一酸化窒素 → → 気孔閉鎖

これには、いくつかの可能性が考えられる。①cGMP経路と一酸化窒素経路が並行に走っていて、それぞれの下流のシグナル分子がともに存在したときに気孔は閉じる。②cGMPと一酸化窒素とが反応しその産物がシグナル分子として機能するなどの可能性が考えられる。

cGMPのグアニル基がニトロ化された8-ニトロ-cGMPが動物一酸化窒素シグナル伝達分子として機能していることが、2007年澤らによって示された⁽⁴⁾。植物でも一酸化窒素依存性のcGMPニトロ化が起こり、その産物である8-ニトロ-cGMPが閉鎖シグナル分子として機能している可能性（前述の可能性②）を検討してみることにした。まず、cGMPのニトロ化は植物細胞でも起きるのか？ 筆者らは2つの手法を用いて、8-ニトロ-cGMPが植物孔辺細胞に存在すること明らかにした。まず、シロイヌナズナ葉抽出液の質量分析を行うと8-ニトロ-cGMP標品と同じプリカーサーイオンとプロダクトイオンを示す化合物が検出できた。また、8-ニトロ-cGMPに対するモノクローナル抗体を用いて蛍光免疫染色すると、アブシジン酸や一酸化窒素処理した孔辺細胞中に本化合物が存在することを確認することができる。

次に8-ニトロ-cGMP生成パターンを調べた。蛍光免疫染色法を利用して各種処理による孔辺細胞中の8-ニトロ-cGMP含量の変化を見てみた。アブシジン酸および2種の一酸化窒素発生剤で処理すると孔辺細胞の蛍光強度は約2倍となり、一酸化窒素吸収剤や一酸化窒素合成酵素阻害剤を同時に投与すると蛍光強度は減少した。また、グアニレートシクラーゼ阻害剤をアブシジン酸や一酸化窒素と同時に与えても蛍光強度は減少するが、そこにcGMPを加えると今度は蛍光強度が増大する。すなわち、一酸化窒素およびcGMP依存的に本化合物の合成が起こっている。これらの結果はすべてアッセイの結果と一致する。つまり、8-ニトロ-cGMP生成の条件と気孔閉鎖の条件は同じなのである。LC-MS/MSを利用したMRM (multiple reaction monitoring mode) 法を用いて8-ニトロ-cGMP生成のタイムコースを調べた。そうすると、アブシジン酸処理5分後に8-ニトロ-cGMP含量増加が認められ、15分でピークに達した。筆者らのアッセイ条件下では気孔は15分程度で閉鎖を始めるから、気

孔閉鎖前に本化合物が生成されていることになる。

一酸化窒素依存的にcGMPがニトロ化されると述べたが、一酸化窒素単独ではグアニル基をニトロ化することは難しく、何らかの形で一酸化窒素が酸化されることが必要である。一酸化窒素と活性酸素が反応してできるパーオキシナイト (ONOO⁻) がグアニンをニトロ化することは以前から知られており⁽⁵⁾、8-ニトロ-cGMPの生合成に一酸化窒素とともに活性酸素が関与していることは容易に想像できる。活性酸素は酸素の還元された一連の活性分子で生体に非特異的な損傷をもたらすことからしばしば悪玉として扱われるが、必ずしもそうではなく各種シグナル伝達経路の一員として生命維持に極めて重要な役割を果たしている。植物でも活性酸素は根の発達、根の重力屈性、種子発芽や病害抵抗性誘導発現に重要な因子として働いている。気孔シグナル伝達においても同様で、アブシジン酸、ジャスモン酸、UV、暗黒、二酸化炭素などによる気孔閉鎖にも活性酸素が関係している。しかも、いずれの場合も一酸化窒素の発生を伴っている。アブシジン酸処理孔辺細胞での活性酸素と一酸化窒素の発生をモニターすると、活性酸素は処理後3分以内に発生が増加し5分でピークに達する。一酸化窒素も同じく3分以内に発生が増加し、その後、ゆっくりと増加していく。活性酸素と一酸化窒素の発生時期はほぼ一緒であり、しかも、8-ニトロ-cGMP生成に先立って発生する。各種活性酸素発生阻害剤はアブシジン酸による活性酸素発生を抑制し、かつ、アブシジン酸による8-ニトロ-cGMP生成を抑制する。しかも、活性酸素の一種、過酸化水素は8-ニトロ-cGMPの生成を誘発することから、活性酸素も一酸化窒素と同様に8-ニトロ-cGMPの合成に関与していることは明らかである。従来、一酸化窒素シグナルと活性酸素シグナルとはクロストークしていると予想されていたが、その関係は不明であった。しかし、この結果から、活性酸素シグナルと一酸化窒素シグナルは8-ニトロ-cGMP合成で出会い統合されることが示された (図1)。

さて、今までの結果で、8-ニトロ-cGMP生成のパターンはアブシジン酸シグナル伝達カスケードの一員として備えるべき性質をもっていることは示されたが、シグナル伝達因子として欠かせない重要なもう一つの性質は、8-ニトロ-cGMPは気孔を閉じるか？ ということである。実際、表皮組織を溶液中に浮かべ8-ニトロ-cGMPを添加してみると気孔を閉じる。今まで述べてきた結果

図1 ■ 8-ニトロ-cGMP孔辺細胞シグナル伝達モデル

は、本化合物がシグナル伝達因子として備えるべき性質を備えていることを示しており、8-ニトロ-cGMPをアブシジン酸／一酸化窒素／活性酸素シグナル伝達因子として結論づけることができる。8-ニトロ-cGMPの下流には、カルシウムとスロータイプのアニオンチャンネルが位置していることを、阻害剤および突然変異体を用いて明らかにした(図1)。また、暗所でサイトカイニン、オーキシンや利尿ペプチドは一酸化窒素非依存性のグアニレートシクラーゼを活性化してcGMP合成を誘発するが、この条件下では一酸化窒素発生が抑制されcGMPのグアニル化は起こらず、裸のcGMPが気孔開口を誘発することが知られている。8-ニトロ-cGMPには気孔閉鎖能力はあるが気孔開口能力はなく、植物は、この2つの類縁体を全く正反対の作用に使い分けている。cGMPのグアニル基のニトロ化反応は気孔を開口から閉鎖へと切り替える重要なスイッチと考えられる。Neillらによって10年以上前に提出された謎は筆者らの今回の報告によって解決されたものと思われる。また、cGMPのグアニル化は一酸化窒素依存的に生成されるので、今回の結果は、一酸化窒素が植物でセカンドメッセンジャーとして機能していることをも示すものでもある。

ここでは、ニトロcGMPの気孔シグナルとしての役割を紹介したが、一酸化窒素と活性酸素がともに発生する

各種シグナル伝達経路においては、本化合物が生成、機能している可能性があり、今後、その方面の研究が進展することを願っている。

- 1) L. Lamattina, C. García-Mata, M. Graziano & G. Pagnussat : *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**, 109 (2003).
- 2) S. J. Neill, R. Desikan, A. Clarke & J. Hancock : *Plant Physiol.*, **128**, 13 (2002).
- 3) T. Joudoi, Y. Shichiri, N. Kamizono, T. Akaike, T. Sawa, J. Yoshitake, N. Yamada & S. Iwai : *The Plant Cell*, **25**, 558 (2013).
- 4) T. Sawa, M. Zaki, T. Okamoto, T. Akuta, Y. Tokutomi, S. Kim-Mitsuyama, H. Ihara, A. Kobayashi, M. Yamamoto, S. Fujii *et al.* : *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 727 (2007).
- 5) V. Yermilov, J. Rubio, M. Becchi, M. D. Friesen, B. Pignatelli & H. Ohshima : *Carcinogenesis*, **16**, 2045 (1995).

(岩井純夫, 鹿児島大学農学部)

プロフィール

岩井 純夫 (Sumio IWAI)

＜略歴＞1971年九州大学農学部農芸化学学科卒業／1973年同大学農学研究科農芸化学専攻修了／同年日本専売公社(現 日本たばこ産業株式会社)入社／1997年同社退社／同年鹿児島大学農学部教授、現在に至る＜研究テーマと抱負＞気孔のシグナル伝達、植物の環境応答＜趣味＞とりたててありませんが、休日は読書と庭仕事と温泉で過ごしています