活性窒素代謝—植物窒素代謝の新しい課題—

Reactive nitrogen metabolism, a new frontier in plant nitrogen metabolism

*広島大学大学院理学研究科

**科学技術振興機構 CREST プロジェクト

坂本 敦** Atsushi SAKAMOTO

松原 俊之** Toshiyuki MATSUBARA

高橋 美佐** Misa TAKAHASHI

森川 弘道** Hiromichi MORIKAWA

Key words: reactive nitrogen species; unidentified nitrogen; nitrogen metabolism; nitrosative stress; NO biology

はじめに

窒素は核酸やタンパク質をはじめとして数多くの生体物質に不可欠な構成元素であるが、生物界の有機態窒素のほとんどは植物の硝酸同化作用により得られたものである。したがって、土壤中の硝酸を主源として、この同化作用の基質となりうる無機窒素酸化物に対する植物代謝の意義は、一義的には同化的硝酸還元による生物界への有機還元態窒素の供給である。しかし、脱窒作用や大気汚染物質として知られる窒素酸化物ガス (NO_x) の同化を巡る最近の植物代謝研究の進展や、植物科学分野における NO バイオロジーの急速な浸透は、有機還元態窒素の供給とは全く別の観点で、植物における無機窒素酸化物代謝の研究に新知見をもたらしつつある。新しい局面に入りつつあるこの研究分野について、活性窒素をキーワードに筆者らの最近の成果を中心にその現状を紹介したい。

1. 植物に吸収された無機窒素酸化物の行方

成長した草本植物におけるおもな硝酸同化の場は緑葉であり、根から運ばれた硝酸は細胞質タンパク質である硝酸還元酵素 (NR) と葉緑体に局在する亜硝酸還元酵素 (NiR) の協同作用により亜硝酸を経てアンモニアに還元される ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$)¹⁾。NR 活性は、窒素源、光、概日リズムなど多様な因子に応答した転写調節やリン酸化を伴う翻訳後修飾により巧妙に制御されている。一方、光合成により獲得された豊富な還元力に支えられた NiR 活性は、基質に極めて親和性が高いことから NR 活性をはるかにしのぐので、通常は硝酸還元で生じた亜硝酸は蓄積しない。ゆえに植物に吸収された硝酸は、液胞にプールされ代謝経路から隔離されない限り、同化的硝酸還元経路とこれ

に連携したアンモニア同化経路 (グルタミン合成酵素/グルタミン酸合成酵素回路) によりアミノ有機化されると考えられてきた。

筆者らがこのような無機窒素酸化物の代謝観に本質的に疑問をもつようになったのは、植物における脱窒の検証や NO_x 同化の研究を通じてである²⁾。脱窒とは通常は微生物による異化的硝酸還元作用 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) を指すが、NO や N_2O のような脱窒ガスがマメ科植物から放出される現象は古くから知られていた³⁾。筆者らは N_2O が実際に植物から無菌的に発生することを初めて証明し、その生成は硝酸・亜硝酸に由来することを明らかにした⁴⁾⁵⁾。他方、植物による NO_x 同化 (NO_x は水に溶けて硝酸と亜硝酸を生じる) の研究過程で、植物が吸収した二酸化窒素 (NO_2) 由来の窒素の約 3 割が、Kjeldahl 法により回収される還元態窒素でも無機態窒素でもない未知の窒素 (Unidentified Nitrogen; UN) 化合物に変換されることを見いだした⁶⁾。UN 化合物は硝酸からも生成し、その分子論的実体は有機ニトロおよびニトロソ化合物を含む新規な植物代謝物質であると考えられる⁶⁾。これらの現象はシロイヌナズナやタバコなどの実験モデル植物のみならず、野菜や作物にも広く認められる普遍的な植物生理現象であることから^{4)~6)}、アミノ有機化による同化以外にも窒素酸化物を代謝する経路を植物が有することが強く示唆された。

2. 植物における“同化されない窒素”と活性窒素の生成

それではこれらの“同化されない窒素”は植物体内でどのように生じるのであろうか、興味深いことに N_2O の無菌的生成や UN 化合物の蓄積は、アンチセンス NiR cDNA を発現しその活性が野生型植物の 5% まで抑制された形質転換タバコで著しく増大する^{4)~6)}。この結果は亜硝酸の蓄積がこれらの現象に深く関与することを示唆する。一方、マメ科植物による NO や N_2O の放出は、その現象の

表 植物における酵素のおよび非酵素的な活性窒素代謝

	植物種	細胞内局在	基質	産物	関与する植物生理現象など*	文献
活性窒素生成						
硝酸還元酵素 (NR)	トウモロコシ	細胞質	亜硝酸	NO	アブシジン酸 (ABA) シグナリング; 病原性菌への感染応答・耐病性?	7
亜硝酸還元酵素 (NI-NOR)	タバコ	原形質膜	亜硝酸	NO	不明	9
NO 合成酵素 (iNOS)	タバコ, シロイヌナズナ	葉緑体?	L-Arg, O ₂	NO	病原性菌への感染応答・耐病性	10
NO 合成酵素 (AtNOS1)	シロイヌナズナ	不明	L-Arg, O ₂	NO	ABA シグナリング, 発生, 成長	11
(非酵素的プロセス)	オオムギ	アポプラスト	亜硝酸	NO	不明 (NO の生成には酸性 pH 下で フェノール化合物が必要)	12
ペルオキシダーゼ	西洋ワサビ	アポプラスト	亜硝酸	NO ₂	不明	14
ヘモグロビン	シロイヌナズナ	細胞質, 核?	亜硝酸	NO ₂	不明	15
活性窒素消去						
2-Cys ペルオキシレドキシシン	シロイヌナズナ	葉緑体	ONOO ⁻	亜硝酸	活性窒素ストレス耐性?	18
ホルムアルデヒド脱水素酵素	シロイヌナズナ	細胞質	GSNO	NH ₃	S-ニトロソ化合物の細胞内濃度調節・ 活性窒素ストレス耐性?	19

*NO 関与する植物生理現象について, 詳しくは文献 8 を参照されたい.

発見当初から NR 活性に依存することが知られていたが³⁾, その後, 亜硝酸を基質とした NR の触媒作用により植物に共通して NO が生成されることが示された (N₂O は NO の還元により生じると推定されるが, その経路は今のところ不詳である)⁷⁾. これらの事実から筆者らは, 亜硝酸を起源とした NO をはじめとする活性窒素の生成がその鍵を握る要因の一つと考えている^{2),6)}.

哺乳動物のシグナル因子として同定された NO が, 植物でも機能することが明らかになるにつれ⁸⁾, その生成機構の探索が進みこれまでに五つの異なる NO 生成経路が報告されている (表参照)^{7),9)~12)}. これらの NO 生成経路と, 確認された NO の植物機能調節作用の因果関係の解明は重要な研究課題であるが⁸⁾, ここで強調したいのはこのうち三つの NO 生成経路が亜硝酸を出発物質とすることである (他の二つは哺乳類と同様 L-Arg を基質とする酵素反応経路である). NO は活性酸素, ヘム酵素群, タンパク質を含めた生体チオール分子種などと速やかに反応し, より反応性の高い活性窒素種や多様な化合物を派生する¹³⁾. 例えば, NO とスーパーオキシドとの自発的反応により生じるペルオキシナイトライト (ONOO⁻) は強力な酸化剤・ニトロ化剤であり, タンパク質の酸化・ニトロ化や, 脂質の過酸化, DNA の突然変異誘発などにかかわるとされる¹³⁾. また, グルタチオンとの自発的反応により NO は S-ニトロソグルタチオン (GSNO) の形で貯蔵され, GSNO は生体 NO ドナーとして機能するといわれている¹³⁾. 筆者らは, 無機窒素酸化物に由来するこのような活性窒素がさらにさまざまな化合物を派生することが, “同化されない窒素” の物質化学的基盤を少なくとも部分的に説明するのではないかと考えている.

最近, 植物のペルオキシダーゼが亜硝酸を基質として NO₂ を生成することが報告され, 筆者らも植物に普遍的に存在する非共生型ヘモグロビンが同様な反応を行うことを示した (表)^{14),15)}. NO とともに NO_x の主要構成ガスである NO₂ は, ONOO⁻ と並ぶ強力なタンパク質ニトロ化剤としても知られ, 近年 NO や GSNO, ONOO⁻ に加えてその生理作用が注目されている活性窒素種である. 亜硝酸から NO₂ への酵素的変換は NO 生成とは別の活性窒素生成機構が植物に存在することを示唆するもので, その生理的意義や “同化されない窒素” との関連にも興味をもたれる.

3. 植物における活性窒素代謝

活性窒素の植物代謝機能は, ここで述べた無機窒素酸化物代謝を巡る未解決現象との関連のみならず, NO シグナリング制御や過剰生産された活性窒素の毒性からの防御など, NO バイオロジーの視点からも重要である. しかしその植物生化学的・分子生物学的知見はほとんどない. 近年, 感染病理学的見地から微生物を中心に活性窒素代謝の研究が進められ, ONOO⁻ や GSNO などの生理的重要性が指摘されている活性窒素種の代謝酵素の存在が明らかにされつつある^{16),17)}. 筆者らは, 大腸菌組換えタンパク質の解析および出芽酵母の活性窒素超感受性変異体を用いた遺伝子相補実験により, ONOO⁻ と GSNO をそれぞれ還元代謝する 2 種のシロイヌナズナ・タンパク質を同定した (表)^{18),19)}.

ONOO⁻ 還元酵素は, もともと感染性病原菌が呈する活性窒素耐性の必須因子として同定されたが, その実体はアルキル過酸化物や H₂O₂ を還元するチオール依存性ペルオキシダーゼの 1 種, 2-Cys ペルオキシレドキシシン (2CPRX)

- Planta*, **212**, 835-841 (2001).
- 10) M. R. Chandok, A. J. Ytterberg, K. J. van Wijk, and D. F. Klessig: *Cell*, **113**, 469-482 (2003).
- 11) F.-Q. Guo, M. Okamoto, and N. M. Crawford: *Science*, **302**, 100-103 (2003).
- 12) P. C. Bethke, M. R. Badger, and R. L. Jones: *Plant Cell*, **16**, 332-341 (2004).
- 13) M. Feelisch and J. S. Stamler (ed.): "Methods in Nitric Oxide Research" Wiley, Chichester, 1996.
- 14) Y. Sakihama, R. Tamaki, H. Shimoji, T. Ichiba, Y. Fukushima, S. Tahara, and H. Yamasaki: *FEBS Lett.*, **553**, 377-380 (2003).
- 15) A. Sakamoto, S.-H. Sakurao, K. Fukunaga, T. Matsubara, M. Ueda-Hashimoto, S. Tsukamoto, M. Takahashi, and H. Morikawa: *FEBS Lett.*, **572**, 27-32 (2004).
- 16) R. Bryk, P. Griffin, and C. Nathan: *Nature*, **407**, 211-215 (2000).
- 17) L. Liu, A. Hausladen, M. Zeng, L. Que, J. Heitman, and J. S. Stamler: *Nature*, **410**, 490-494 (2001).
- 18) A. Sakamoto, S. Tsukamoto, H. Yamamoto, M. Ueda-Hashimoto, M. Takahashi, H. Suzuki, and H. Morikawa: *Plant J.*, **33**, 841-851 (2003).
- 19) A. Sakamoto, M. Ueda, and H. Morikawa: *FEBS Lett.*, **515**, 20-24 (2002).
- 20) J. A. Kers, M. J. Wach, S. B. Krasnoff, J. Widom, K. D. Cameron, R. A. Bukhalid, D. M. Gibson, B. R. Crane, and R. Loria: *Nature*, **429**, 79-82 (2004).
-