

2008年12月2日
独立行政法人 理化学研究所

葉緑体の活性酸素の除去に必須な2つの酵素遺伝子を発見

- 植物に有害な活性酸素を消す、スーパーオキシドディスムターゼの新たな機能を解明 -

◇ポイント◇

- ・鉄イオンを含む活性酸素除去酵素の *FSD2* と *FSD3* 遺伝子は葉緑体形成に必須
- ・葉緑体の核様体に複合体で共局在し、活性酸素から核様体を保護
- ・活性酸素が原因で起こる光合成能力の低下を防ぐ新技術の開発に貢献

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、シロイヌナズナ^{*1}の植物体に有害な活性酸素^{*2}の除去に関与する「*FE SUPEROXIDE DISMUTASE2 (FSD2)*」と「*FSD3*」の2つの遺伝子がヘテロ複合体^{*3}を形成し、活性酸素から葉緑体核様体^{*4}を防御していることを初めて明らかにしました。植物に必須な葉緑体が発達していく初期に欠かせないメカニズムとなります。これは、理研植物科学研究センター（篠崎一雄センター長）機能開発研究グループの明賀史純研究員と国立大学法人東京大学（小宮山宏学長）、国立大学法人静岡大学（興直孝学長）、学校法人日本女子大学（後藤祥子理事長）などとの共同研究による成果です。

植物は、光合成^{*5}で常に発生し、さらに生物学的・非生物学的ストレスにより細胞内に大量に発生する有害な活性酸素を除去するための抗酸化防御機能を備えています。スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）は、抗酸化酵素の1つであり、活性酸素（スーパーオキシド）を無毒化する反応の第1段階目の役割を担っている重要な酵素です。これまでに、植物体内でのSODの活性酸素除去反応の研究やSOD遺伝子を高発現させた形質転換植物体^{*6}の活性酸素除去能力の向上などと、有害な活性酸素を取り除く研究には数多くの報告がありました。しかし、酵素活性の中心となっている金属イオンが異なる3つのSOD^{*7}（銅の2価イオンと亜鉛の2価イオンを持つCu/ZnSOD、またはマンガンの3価イオンを持つMnSODや鉄の3価イオンを持つFeSOD）の各遺伝子の機能や活性酸素除去反応以外の役割は分っていませんでした。

研究グループは、シロイヌナズナ突然変異体を用いた解析から、葉緑体の発達に必須な2つのFeSOD遺伝子の「*FSD2*」と「*FSD3*」を同定しました。これらの変異体では、葉の色が薄緑色になり、活性酸素の除去能力が低下すること、光酸化ストレスに感受性であることを明らかにしました。また、この遺伝子の機能解析を行い、葉緑体内で2つのFeSODの複合体が、葉緑体核様体とともに局在し、活性酸素から核様体を保護している可能性を初めて明らかにしました。さらに、2つのFeSODを強発現させた植物体は、活性酸素を発生させる薬剤の存在下で光合成の低下を抑制する機能を持つことを突き止めました。

今後、葉緑体核様体を持つ活性酸素からの防御機構の研究や活性酸素による葉緑体遺伝子の発現制御の研究が進むものと期待されます。また、これらの遺伝子の機能を制御することで、さまざまなストレス処理により発生する活性酸素への耐性を示す作物の開発へ応用することが可能になります。本研究成果は、米国の科学雑誌『*The Plant Cell*』オンライン版（11月7日付け）に掲載されました。

1. 背景

活性酸素種 (ROS; Reactive Oxygen Species) は、乾燥・塩害・強光などの環境ストレス (非生物ストレス) や病虫害などによる生物学的ストレスにより細胞内に多く作られ、核酸 (DNA) へのダメージやタンパク質の酸化、脂質の過酸化を引き起こします。そのため、植物は、よく発達した ROS に対する防御システムを持っています。スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は、ROS を無害化するための抗酸化酵素の 1 つで、活性酸素 (スーパーオキシド) と水を過酸化水素と酸素分子に転換する働きを持っています (図 1)。ほとんどの植物は、多くの SOD アイソザイム^{*8}を持っており、シロイヌナズナのゲノムでは、少なくとも 7 つの SOD の遺伝子が存在していることが分かっています (図 2)。3 つの *FeSOD* 遺伝子 (*FSD1*, *FSD2*, *FSD3*) と 3 つの *CuSOD* 遺伝子 (*CSD1*, *CSD2*, *CSD3*) と 1 つの *MnSOD* 遺伝子 (*MSD1*) です。これらのうち、FSD タンパク質と CSD2 タンパク質は葉緑体、CSD1 タンパク質は細胞質、CSD3 タンパク質はペルオキシソーム、MSD1 タンパク質はミトコンドリアでそれぞれ働いていると考えられています。これは、スーパーオキシドが発生する植物細胞内小器官それぞれの場で、発生を効率的に消去する機能を発揮させるためであると推察されています。

SOD は、植物体内で生じた活性酸素を除去する第 1 段階の反応を担うことが古くから知られていましたが、FeSOD の各アイソザイムの機能分化やオルガネラ内局在部位、葉緑体内での核様体の活性酸素への保護機構についてはこれまで知られていませんでした。

2. 研究手法と成果

研究チームは、作製した *Ds* タグライン^{*9}を用いた表現型スクリーニングにより、葉が薄緑色の突然変異体を単離し、これが *FSD2* 遺伝子へトランスポゾン *Ds* が挿入したことにより生じたとの発見を手がかりに、この遺伝子の葉緑体内での役割を明らかにしていきました。

シロイヌナズナの FeSOD のほかの 2 つのメンバーである *FSD1* と *FSD3* 遺伝子の変異体の表現型を調べたところ、*FSD3* 遺伝子の突然変異体も *FSD2* 遺伝子の突然変異体と同様に薄緑色になるのに対し、*FSD1* 遺伝子の突然変異体は野生型と比べて変わらないことが分かりました (図 3)。また、*FSD2*, *FSD3* 遺伝子の薄緑色変異体では葉緑体の発達に異常が見られ、活性酸素の除去能力が低下しているため、光酸化ストレスに対して感受性を示すことも判明しました。さらに、*FSD1*, *FSD2*, *FSD3* タンパク質と蛍光色素 GFP とを連結した融合タンパク質をタバコの葉に一過的に発現させる実験から、*FSD1* は細胞質に、*FSD2* と *FSD3* は葉緑体に局在しており、特に *FSD3* は葉緑体の核様体と共局在することが分かりました (図 4)。これらの結果から、*FSD2* と *FSD3* は正常な葉緑体の発達に必須であり、葉緑体核様体で有害な活性酸素を除去していることが明らかとなりました。

FSD2, *FSD3* 遺伝子の変異体では、葉緑体 DNA にコードされている葉緑体遺伝子の内、PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase)^{*10}により転写される遺伝子の発現が低下しており、葉緑体転写システムが異常になっていることが分かりました。また、*FSD2* と *FSD3* は葉緑体内でヘテロ複合体を形成し、そのためどちらか片方の機能が失われると葉緑体の発達が異常になることも判明しました。さらに、*FSD2*

と *FSD3* の 2 つの遺伝子を高発現させた高発現植物体は、活性酸素を大量に発生させる薬剤の存在下においても光合成の活性低下が抑制されることを突き止めました。これらの結果から、*FSD2* と *FSD3* のヘテロ複合体は、葉緑体核様体での *PEP* による発現を *ROS* から保護し、光合成反応へのダメージを防ぐ役割を担っていることが明らかとなりました (図 5)。

3. 今後の期待

今回の研究成果は、光合成により発生した *ROS* から、葉緑体の発達初期に葉緑体核様体を保護するという活性酸素除去酵素 *FSD2* と *FSD3* の新規の役割を明らかにしました。さらに、*FSD2* と *FSD3* の複合体は、強光や乾燥などの厳しい環境条件化で発生する *ROS* のダメージが原因のストレスに、耐性を持つ植物体を改良するための標的となる可能性が期待できます。今後、活性酸素除去酵素の葉緑体内での機能解析を進め、厳しい環境ストレス条件下でも光合成能力の低下を引き起こさない植物の作出への応用を目指します。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

植物科学研究センター センター長

機能開発研究グループ グループディレクター

篠崎 一雄 (しのざき かずお)

Tel : 045-503-9579 / Fax : 045-503-9580

研究員 明賀 史純 (みょうが ふみよし)

Tel : 045-503-9625 / Fax : 045-503-9584

横浜研究推進部 企画課

Tel : 045-503-9117 / Fax : 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 シロイヌナズナ

学名は *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. アブラナ科一年生草本植物。双子葉植物のモデル植物として 2000 年にゲノム解読が行われ、ゲノムサイズは約 1.3 億塩基対、全遺伝子数は約 30,000 個であることが判明している。

※2 活性酸素

酸素は酸素分子の O_2 では比較的安定であるが、電荷が不安定で化学的に活性になったものが活性酸素。非常に強い酸化力を持ち、細胞膜のリン脂質を酸化させたり、タンパク質や DNA に酸化障害を与えたりするなどして植物体に悪影響を与える。スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、一重項酸素の大きく 4 種類の化合物が知られている。活性酸素は乾燥や低温などの環境ストレスや病害虫による感染や光合成などにより植物細胞内で多く作り出される。

※3 ヘテロ複合体

異なるタンパク質とタンパク質が結合して複合体を形成したもの。細胞内のタンパクの中にはホモ（同じタンパク質との結合）あるいはヘテロ（異なる 2 つのタンパク質との結合）のタンパク質複合体を形成し、機能を発揮する例が多く知られている。

※4 葉緑体核様体

葉緑体の DNA は DNA 結合タンパク質によって大きな複合体を形成し、葉緑体核様体と呼ばれる。細胞核の染色体と同様、葉緑体核様体は葉緑体 DNA の複製、転写、分配といった機能的な単位となっている。ただし、ヒストンは含まれない。

※5 光合成

植物においては、光エネルギーから変換した化学エネルギーを使って、水と空気中の二酸化炭素から炭水化物（糖類：例えばショ糖やグルコースやデンプン）と酸素を合成する反応。緑色植物ではこの反応は葉緑体で行われる。

※6 形質転換植物体

植物体の遺伝子の機能の探索や有用な植物体を作成する目的で、遺伝子工学的手法を用いて外来遺伝子を導入した植物体。植物体によく用いられている形質転換法の 1 つとして、アグロバクテリウムを用いて遺伝子を導入する方法がある。例えば、発現抑制遺伝子カセット、過剰発現遺伝子カセットなどを含むバイナリーベクターを用いてアグロバクテリウムによる形質転換で遺伝子を植物体に導入し、野生型よりも遺伝子の発現が低下した植物体を作り出したり、逆に遺伝子の発現を向上させた植物体を作り出すことができる。

※7 金属イオンが異なる 3 つの SOD

活性中心に銅(II)イオンと亜鉛(II)イオン (Cu/ZnSOD)、またはマンガン(III)イオン (MnSOD) や鉄(III)イオン (FeSOD) をもつ SOD。

※8 アイソザイム

酵素としての活性がほぼ同じでありながら、塩基配列がわずかに異なる遺伝子にコードされ、アミノ酸配列の一部が異なるタンパク質。このような同じ酵素活性

を持つ一群の酵素を言う。

※9Ds タグライン

遺伝子の機能探索を行うためのリソースとして、理研植物科学研究センターで作製した約 12,000 ラインの突然変異体のコレクション。シロイヌナズナゲノムの色々な位置に *Ds* トランスポゾンと呼ばれる転移因子が挿入しており、特に遺伝子の内部に *Ds* が挿入した変異体は、その遺伝子の機能が失われることになる。

※10PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase)

植物細胞の中で、葉緑体やミトコンドリアは固有のゲノムを持ち、それぞれ転写・翻訳されタンパク質を作っている。葉緑体 DNA には約 80 種のタンパク質コード遺伝子がある。高等植物の葉緑体では、葉緑体 DNA にコードされているバクテリア型 RNA ポリメラーゼ (PEP) と、核 DNA にコードされているファージ型 RNA ポリメラーゼ (NEP) の働きにより、DNA から RNA への転写が起こる。葉緑体分化過程において、これら 2 種の RNA ポリメラーゼの内、最初に NEP が活性化され、引き続いて PEP の活性化が起こり、葉緑体 DNA の転写パターンが著しく変化している。



図 1 SOD(スーパーオキシドディスムターゼ)の働き

SOD は、植物体で発生するスーパーオキシドを過酸化水素と酸素にする反応を担っている。スーパーオキシドは、生物学的・非生物学的ストレスなどにより大量に植物細胞中に蓄積する。SOD は、これを消去することができる。

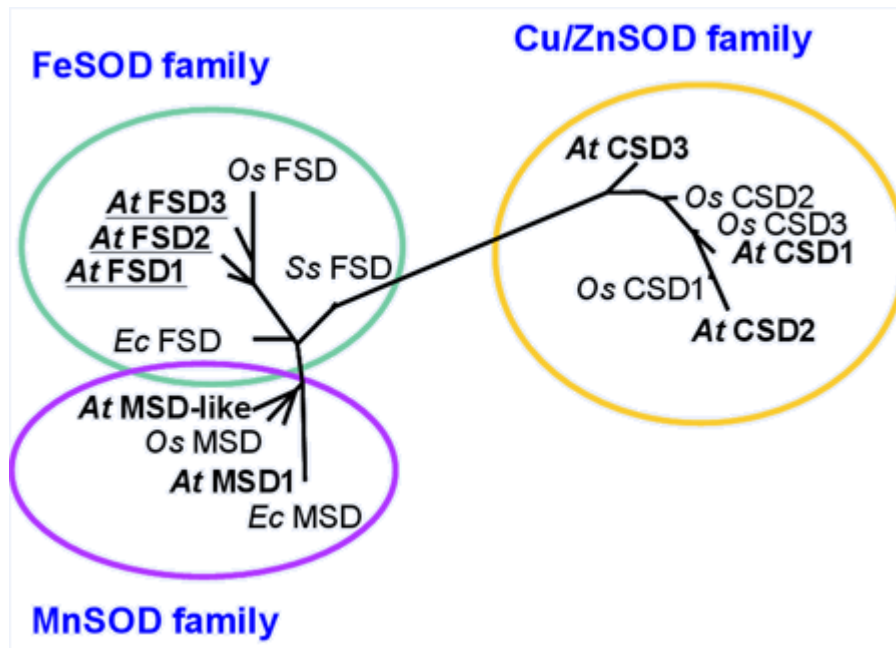


図 2 シロイヌナズナと異なる種の SOD 遺伝子ファミリーの系統樹

SOD は内部に配位する金属によって、鉄イオンを含む FeSOD、銅や亜鉛イオンを含む Cu/ZnSOD、マンガンイオンを含む MnSOD、の 3 つに分けられる。系統樹は、シロイヌナズナとほかの生物の SOD 遺伝子の完全長 cDNA の塩基配列を使って Neighbor-joining 法で作製したもの。At、Ec、Os、Ss の各遺伝子は、それぞれシロイヌナズナ、大腸菌、イネ、ラン藻にコードされていることを示す。



図 3 野生型と *FSD* 遺伝子変異体の表現型

2つの生態型(エコタイプ)が異なる野生型植物体と3つの *FSD* 遺伝子 (*FSD1*, *FSD2*, *FSD3*) の異常変異体および *FSD2* と *FSD3* の両方の遺伝子が異常になっている変異体の写真。*FSD1* 遺伝子の変異体は野生型と比べて変化は見られないが、*FSD2* と *FSD3* 遺伝子の変異体は薄緑色になっている。さらに *FSD2* と *FSD3* の2つの遺伝子がともに異常になっている変異体は、葉の色がさらに白色化している。このことから、*FSD2* 遺伝子と *FSD3* 遺伝子の両方が正常な葉緑体の発達に必須であることが分かる。

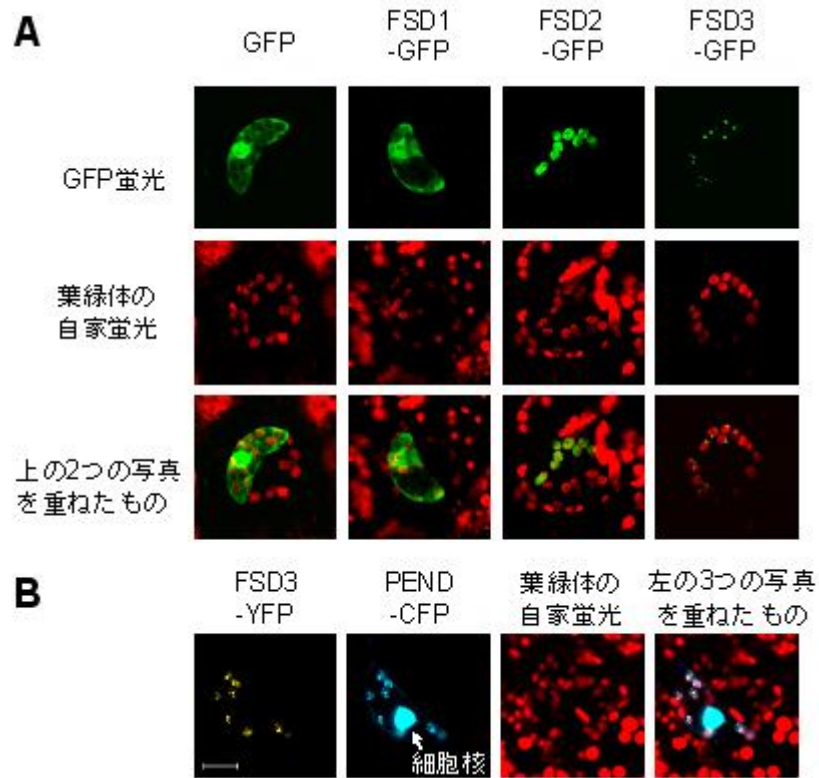


図4 FSD1, 2, 3 タンパク質の細胞内局在

A: FSD1、FSD2、FSD3 と蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質をタバコ表皮細胞中で大量に発現させ、蛍光顕微鏡で観察したもの。これにより GFP と融合させたタンパク質の細胞内での局在を調べることができる。融合していない GFP だけを発現させた蛍光シグナルをコントロールにしている。GFP と FSD1-GFP は、葉緑体の自家蛍光 (赤) 以外の核と細胞質に GFP 蛍光 (緑) が見られる。一方、FSD2-GFP と FSD3-GFP は葉緑体の自家蛍光と重なっている。このことから、FSD2 と FSD3 は葉緑体に局在していることが分かる。

B: FSD3-YFP の蛍光 (黄) は、細胞核を除いて PEND-CFP の蛍光 (青) と一致している。PEND は、葉緑体 DNA 結合タンパク質として知られ、このことから、FSD3 は葉緑体核様体と共局在することが分かる。

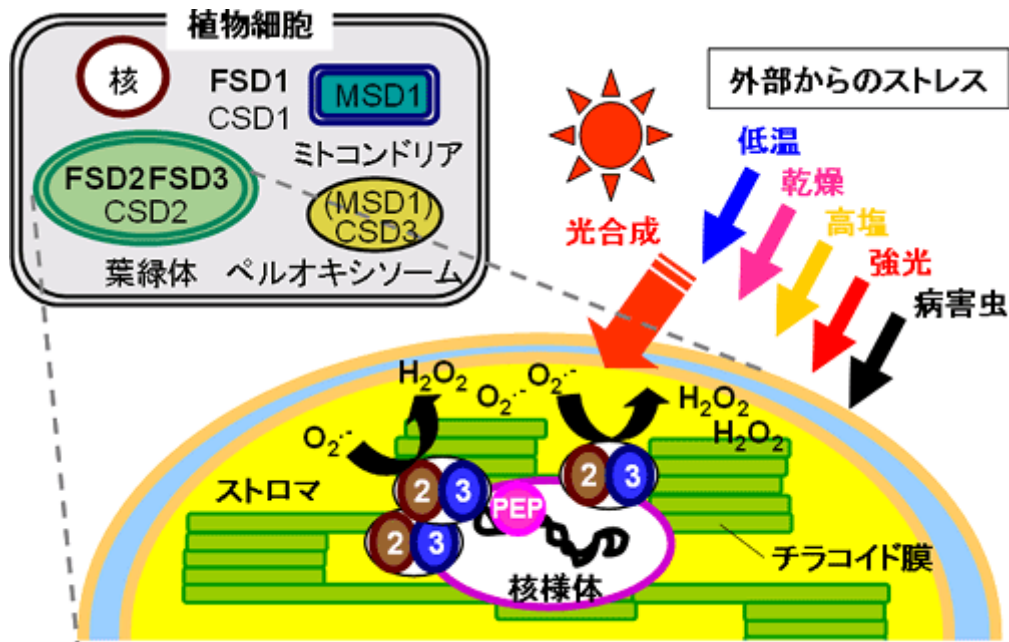


図5 FSD2と3タンパク質の葉緑体内での役割のモデル

FSD2 と FSD3 はヘテロ複合体を形成し、核様体に共局在していることが明らかになった。FSD2 と FSD3 のヘテロ複合体は、CSD2 と共に光合成で作られるスーパーオキシドを過酸化水素に変換して、スーパーオキシドの葉緑体内での蓄積を防いでいる。また、外部からのさまざまなストレスで大量に発生するスーパーオキシドを消去している。これにより、FSD2 と FSD3 は、核様体で行われる PEP による RNA の転写機能を有害な活性酸素から防御し、光合成の低下を防いでいると考えられる。