
トピックス

植物の光ストレス順応における葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの位置付け**The role of chloroplastic ascorbate peroxidases in plant acclimation to light stress**

光合成を唯一のエネルギー源とする植物にとって、光はもっとも重要な環境要因のひとつである。光エネルギーは反応中心クロロフィルを励起し、光合成電子伝達系を駆動する。光化学系 II から流れる電子は光化学系 I を経て、最終的に NADP^+ の還元に使われる。また、この過程でチラコイド膜内外に pH 勾配が形成され、ATP 合成に利用される。生成された NADPH と ATP を利用して、カルビン回路が二酸化炭素を固定する。自然界において植物に降り注ぐ光の強度は季節や天候、周辺環境の影響を大きく受ける。光合成のキャパシティを超える強い光の下では、NADPH の生成速度が消費量を上回ることで電子伝達系の過還元状態が生じる。その結果として、光化学系 I 近傍で酸素分子が還元(メーラー反応)され、活性酸素種(ROS)の生成が促進される¹⁾。カルビン回路の構成酵素の一部は ROS に感受性であるため容易に酸化失活を受け、これがさらに電子伝達系の過還元状態と ROS 生成を助長しうる。このように植物にとって光は諸刃の剣であり、光合成反応を効果的かつ安全に駆動するためには、不可避的に生じる光酸化的ストレスへの対応が不可欠である。

アスコルビン酸の蓄積は光酸化的ストレス防御への有効な手段である²⁾。アスコルビン酸は優れた抗酸化剤であるとともに、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)への電子供与体として機能する。この酵素は光合成真核生物に特有であり、アスコルビン酸依存的な H_2O_2 の効果的な消去を可能にする。緑藻の葉緑体にはストロマ型(sAPX)のみが存在するのに対し、陸上植物と車軸藻クレブソルミディウム(淡水性真核藻類)のそれには sAPX とチラコイド膜結合型(tAPX)が存在する³⁾。これらはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)と共役し、光化学系 I で生じたスーパーオキシドラジカルを水にまで無毒化する¹⁾。しかし、葉緑体型 APX は極めて不安定な酵素であり、アスコルビン酸の非存在下ではわずか数十秒で活性を失う。そのため、この酵素は過度な酸化ストレス条件では容易に失

活してしまう³⁾。この弱点を補うために、 H_2O_2 消去酵素を葉緑体内で過剰発現させることで、植物の強光ストレス耐性能は飛躍的に向上する⁴⁾。これらの理由から、葉緑体型 APX は植物の光酸化的ストレス防御の鍵酵素であり、その遺伝的な欠損は致命的な影響をもたらすとさえ信じられていた。しかし逆遺伝学的な解析から、葉緑体型 APX のノックアウトや発現抑制はシロイヌナズナやイネの強光耐性能にほとんど影響しないことが複数のグループから相次いで報告されたことで⁵⁾⁻⁹⁾、その生理学的重要性は不明瞭なものになった。

同時に、葉緑体におけるさまざまな ROS 生成回避機構の存在が示されてきた。例えば、チラコイド膜内外の pH 勾配に依存的な電子伝達系の精密制御である、pH 勾配形成、すなわちチラコイド膜内腔(ルーメン)の酸性化によって qE クエンチングと呼ばれる機構が活性化され、受容した光エネルギーを熱として放散する¹⁰⁾。また、ルーメンの酸性化によって光化学系 II から I への電子伝達が下方制御を受けることで、スーパーオキシドラジカル生成の起こる光化学系 I の過還元を防ぐことができる¹¹⁾。これらの仕組みにより電子伝達系の電子渋滞を緩和し、ROS 生成を回避することができる。このように、植物は複数の防御機構を相互補完的に利用することで、極めて頑健な光酸化的ストレス耐性能を作り上げていると考えられる。そして、このことが葉緑体型 APX の欠損/発現抑制株が明確なストレス感受性を示さない要因であると考えられるが、複数の防御機構の相互関係を遺伝学的に解析した例は少なく、詳細は不明であった。そこで、Kameoka ら¹²⁾は葉緑体型 APX と pH 勾配依存システムの相互補完性について解析した。

チラコイド膜内外の pH 勾配形成には proton gradient regulation 5 (PGR5) タンパク質が重要な役割を担っている¹³⁾。そのため、シロイヌナズナの葉緑体型 APX の二重変異株(*sapx tapx*)と *pgr5* 変異株を掛け合わせ、*sapx pgr5* および *tapx pgr5* の二重変異株、そして *sapx*

tapx pgr5 三重変異株が作出された。これらの株を弱光条件 ($50 \sim 80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で 3 週間栽培した後、強光 ($1,500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を 24 時間照射した。このストレス処理では、野生株および *sapx tapx* 株で明確なストレス障害 (葉のブリーチングなど) は起こらなかった。*pgr5* 株では 24 時間後に古い葉で部分的な白色化が生じ、同程度の障害が *sapx pgr5* および *tapx pgr5* 二重変異株でも観察された。一方、三重変異株では 12 時間後から顕著な葉の白色化が生じ、24 時間後には個体全体で劇的な細胞死がみられた¹²⁾。各変異株における強光感受性の度合いは、光化学系 II の最大量子収率 (F_v/F_m 値: クロロフィル蛍光測定により算出されるパラメータであり、光合成損傷の指標となる) の値と一致した。

次に細胞内レドックス状態について検討した結果、強光照射に伴う H_2O_2 レベルおよび酸化型グルタチオンの蓄積が三重変異株のみで顕著にみられた¹²⁾。また、野生株や *sapx tapx* 株では強光照射後にアスコルビン酸の増加が起こるのに対し、*pgr5* 株や *sapx tapx pgr5* 株では逆に減少し、その度合いは三重変異株でより顕著

であった。加えて、強光条件の葉を用いたトランスクリプトーム解析の結果、野生株と比較して *sapx tapx* 株、*pgr5* 株または三重変異株では、それぞれ 11、113 および 408 遺伝子が有意 (2 倍以上, $P < 0.01$) に発現上昇することが分った。*pgr5* 株および三重変異株で発現上昇した遺伝子には 90 個の重複があったが、その多くは *pgr5* 株よりも三重変異株で高い発現を示した。三重変異株で発現上昇した遺伝子の多くは酸化ストレス誘導性遺伝子であった¹²⁾。三重変異株でみられたレドックス異常や発現遺伝子のパターンは、典型的な酸化ストレスモデル変異株であるカタラーゼ欠損株で報告されているもの¹⁴⁾と類似した。したがって、葉緑体型 APX と PGR5 の同時欠損は H_2O_2 蓄積および酸化損傷を引き起こし、その結果として劇的な細胞死を生じると結論づけられた。

以上の結果より、葉緑体型 APX は防御酵素として機能的であることが遺伝学的な見地からも支持され、同酵素と PGR5 (pH 勾配) 依存システムの相互補完的なはたらきが光酸化ストレス防御に不可欠であることが初めて明らかになった¹²⁾。光合成の精密制御に関与

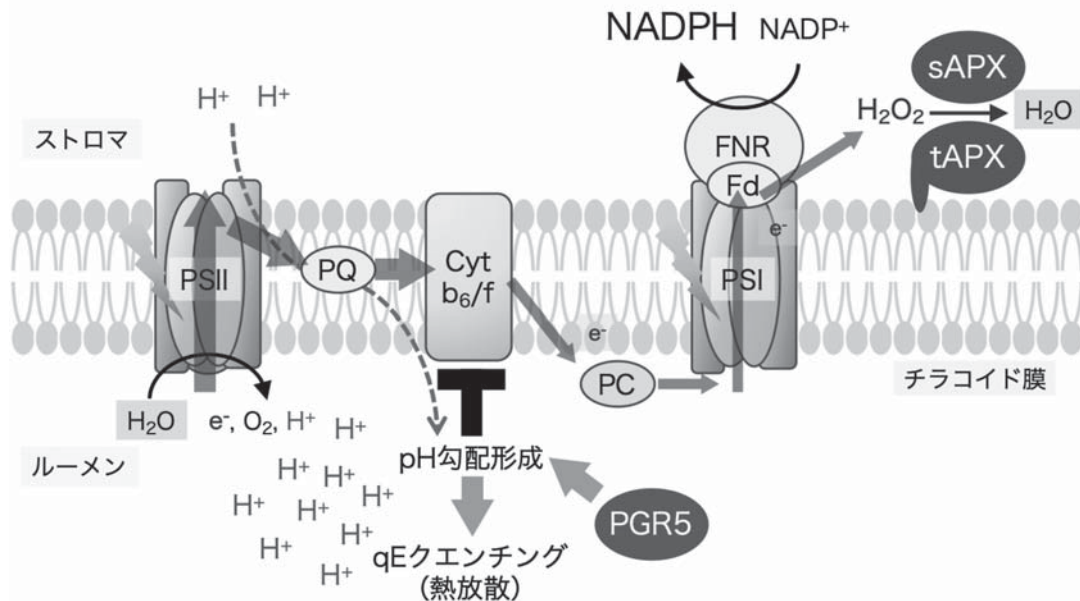


図1 光合成による ROS 生成と防御機構

光合成電子伝達系の模式図を示す。電子は光化学系 II (PSII) から PSI を経て NADP^+ の還元利用される。この過程でストロマからルーメンへとプロトンが輸送され、チラコイド膜内外での pH 勾配が形成される。PSI からの電子漏洩により酸素分子が還元され、スーパーオキシドラジカルが生じる (表示なし)。その後の不均化反応により生成された H_2O_2 は、ストロマ型およびチラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (それぞれ sAPX および tAPX) によって水へと還元される。Proton gradient regulation 5 (PGR5) タンパク質は pH 勾配形成に必要なタンパク質である。ルーメンの酸性化に伴って qE クエンチングが起こり、光エネルギーが熱として放散される。同時に、PSII から PSI への電子伝達が下方制御され、PSI の過還元および活性酸素種生成が抑制される。Cyt b₆/f, シトクロム b₆/f 複合体; Fd, フェレドキシン; FNR, フェレドキシン- NADP^+ レダクターゼ; PQ, プラストキノン。

する仕組みや APX 以外の葉緑体型ペルオキシダーゼは他にもまだ複数存在する。さらに、光受容を制限する仕組みとして葉緑体の逃避運動(葉緑体を細胞側面に移動させる)やアントシアニン蓄積による遮光効果がある。このように、植物はさまざまな防御機構をふんだんに活用することで、時々刻々と変動する光環境に対応し、効果的な光合成反応を実現しているのだろう。葉緑体型 APX 欠損株の表現型は筆者を長らく困惑させてきたが、植物の方が一枚も二枚も上手だったのである。実験室内では単一強度の光をストレス源として用いることが多いが、自然界では雲などの影響により光強度が著しく変動する。このような変動光環境では、光化学系 I が主に損傷を受け、その結果として ROS 生成が飛躍的に高まることが分ってきた¹¹⁾。今後、自然環境またはそれに近い環境で研究を進めることで、葉緑体型 APX の重要性がより明確になると期待される。

Key words :Ascorbate peroxidase, light stress, reactive oxygen species, photosynthesis, plants

Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, 1060 Nishikawatsu, Matsue, Shimane 690-8504, Japan

Takumi Iwagami, Takanori Maruta
〒 690-8504 島根県松江市西川津町 1060
島根大学生物資源科学部
岩上 拓己, 丸田 隆典

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2022.1.6 受付)

文 献

- Asada K (1999) THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 601-639
- 丸田隆典 (2021) ビタミン C 代謝と植物の環境ストレス順応. *ビタミン* **95**, 405-412
- Maruta T, Sawa Y, Shigeoka S, Ishikawa T (2016) Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: More than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiol* **57**, 1377-1386
- Shikanai T, Takeda T, Yamauchi H, Sano S, Tomizawa KI, Yokota A, Shigeoka, S. (1998) Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Lett* **428**, 47-51
- Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, van Wijk KJ (2007) Arabidopsis thaliana deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol Biol* **65**, 627-644
- Kangasjarvi S, Lepisto A, Hannikainen K, Piippo M, Luomala EM, Aro EM, Rintamaki E (2008) Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochem J* **412**, 275-285
- Maruta T, Tanouchi A, Tamoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S (2010) Arabidopsis chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. *Plant Cell Physiol* **51**, 190-200
- Maruta T, Noshi M, Tanouchi A, Tamoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S (2012) H₂O₂-triggered retrograde signaling from chloroplasts to nucleus plays specific role in response to stress. *J Biol Chem* **287**, 11717-11729
- Caverzan A, Bonifacio A, Carvalho FE, Andrade CM, Passaia G, Schunemann M, Maraschin FDS, Martins MO, Teixeira FK, Rauber R, Margis R, Silveira JA, Margis-Pinheiro M (2014) The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice. *Plant Sci* **214**, 74-87
- Li XP, Bjorkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**, 391-395
- Suorsa M, Jarvi S, Grieco M, Nurmi M, Pietrzykowska M, Rantala M, Kangasjarvi S, Paakkarinen V, Tikkanen M, Jansson S, Aro EM (2012) PROTON GRADIENT REGULATION5 is essential for proper acclimation of Arabidopsis photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions. *Plant Cell* **24**, 2934-2948
- Kameoka T, Okayasu T, Kikuraku K, Ogawa T, Sawa Y, Yamamoto H, Ishikawa T, Maruta, T (2021) Cooperation of chloroplast ascorbate peroxidases and proton gradient regulation 5 is critical for protecting Arabidopsis plants from photooxidative stress. *Plant J* **107**, 876-892
- Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis. *Cell* **110**, 361-371
- Kerchev P, Waszczak C, Lewandowska A, Willems P, Shapiguzov A, Li Z, Alseekh S, Muhlenbock P, Hoerberichts FA, Huang J, Van Der Kelen K, Kangasjarvi J, Fernie AR, De Smet R, Van de Peer Y, Messens J, Van Breusegem F (2016) Lack of GLYCOLATE OXIDASE1, but not GLYCOLATE OXIDASE2, attenuates the photorespiratory phenotype of CATALASE2-deficient Arabidopsis. *Plant Physiol* **171**, 1704-1719