

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570044

研究課題名（和文） 活性アルデヒドによる葉緑体タンパク質修飾：その酸化ストレス応答における意義

研究課題名（英文） Modification of chloroplast proteins with reactive aldehydes: its implication in the plant response to oxidative stress

研究代表者

真野 純一 (MANO JUNICHI)

山口大学・大学研究推進機構・教授

研究者番号：50243100

研究成果の概要（和文）：環境ストレス条件下で生成する活性アルデヒド（RAL）の生成と作用について、以下の成果を得た。(1) 根のアルミニウム障害，葉の強光障害に關与するRALを同定した。(2) 酸素発生系を失活させた光化学系IIの酸化側での光依存性の過酸化生成を立証した。(3) 塩ストレス初期のシロイヌナズナの葉でRALに修飾される標的タンパク質を同定した。(4) RALによるホスホリブロキナーゼ失活には，チオール基以外のアミノ酸の修飾が關与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We obtained following results about the action of lipid peroxide-derived reactive aldehydes (RAL) in plant responses to environmental stress: (1) The RAL species responsible for the aluminum-induced oxidative injury in roots and those for the strong-light-induced photooxidative injury in leaves identified. (2) Light-dependent formation of organic peroxides on the donor side of photosystem II that lacked the water-oxidizing complex was proven. (3) In NaCl-stressed plants, modification of proteins with RAL were increased. The modified targets were identified. (4) The target amino acid(s) in phosphoribulokinase that have primary importance in the sensitivity to acrolein was not the redox-regulated Cys.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：光合成，酸化ストレス，環境応答，アクロレイン，タンパク質修飾

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は光照射下で恒常的に活性酸素種

(ROS) を生成し，その生成は環境ストレスで増大する。細胞膜の不飽和脂肪酸は ROS に

より不可避免的に酸化され、過酸化脂質の分解によって毒性の高い α 、 β -不飽和アルデヒド（活性アルデヒド；RAL）が生成する。RALはMichael付加、Schiff塩基形成によりタンパク質を修飾する。動物ではRALによるタンパク質修飾とさまざまな疾病との関連が明らかになってきたが、植物の酸化ストレスではRALの毒性は認識されていなかった。研究代表者は、新規なRAL消去酵素2-alkenal reductaseをシロイヌナズナで発見し、これを過剰発現させたタバコの強光耐性・パラコート耐性から、植物の光酸素障害へのRALの関与を明らかにした。また、アクロレインなどのRALが単離葉緑体のカルビン回路酵素を不可逆的に失活させることを示した。さらに分担研究者の松井とともに植物のアルデヒド分析手法を確立し、葉緑体の不飽和脂肪酸から多種類のRALが生成することを明らかにした。一方、松井やFarmer（スイス）らは、植物の傷害応答や感染応答時の酸化的バーストで葉緑体脂質から生じるアルデヒド（RALを含む）が、防御遺伝子発現誘導のシグナルとなることを明らかにしてきた。このように、RALは、葉緑体の酸化ストレス/シグナル伝達において、ROSの下流で生理機能障害や防御応答調節に関わる重要な分子種であることが研究代表者らの一連の研究から明らかになってきた。

2. 研究の目的

上述のようなRALの正負両面の生理作用はいずれもタンパク質の修飾を介して発揮されると考えられる。本研究では、RALが作用する標的タンパク質の同定、その修飾機構、および修飾による生理的効果の解明を目的とした。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ個体にNaClストレスを与え、クロロフィル蛍光パラメータ（Fv/Fm）で葉の傷害を評価した。また、ストレス処理過程で蓄積するカルボニル種をHPLCにより同定し、タンパク質のカルボニル修飾は特異抗体で検出した。

カルボニル修飾を受けたタンパク質は、カルボニル基をビオチン標識し、ストレプトアビジンカラムで精製した。

2つの異なる植物から抽出したタンパク質の比較と同定はiTRAQ法を用いた。

タバコ個体へのアルミニウムストレス、タバコBY-2培養細胞への酸化ストレスで生じるRALはHPLCで測定した。

4. 研究成果

(1) 塩ストレスによりRALに修飾を受けやすいタンパク質の同定。塩ストレスを与えたシロイヌナズナの葉において、細胞障害（クロ

ロフィル蛍光のFv/Fm値低下）が生じる以前の初期イベントとしてタンパク質のRAL修飾が増大した。RAL抗体アフィニティー精製により被修飾タンパク質を精製し、プロテオーム解析により同定した。タンパク質品質管理に関わるタンパク質、ペルオキシソームの抗酸化酵素、細胞質のエネルギー代謝酵素などがRALに修飾されやすいことが分かった。これらの結果から、塩ストレスの初期に葉でプログラム細胞死と似た細胞死過程が進行していたことが示唆された。(2) ホスホリボキナーゼのアクロレインによる失活機構を解析し、酸化還元制御に関わるチオール基以外のアミノ酸の修飾が酵素失活に直接関与すると結論した。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計8件）

- ① Endo S., Fujimoto, A., Kumada, S., Matsunaga, T., Ohno S., Mano, J., Tajima, K., El-Kabbani, O., Hara, A. (2013) Modulation of activity and inhibitor sensitivity of rabbit aldose reductase-like protein (AKR1B19) by oxidized glutathione and SH-reagents. *Chem. Biol. Interact.* 202: 146-152. 査読有り
- ② Endo, S., Matsunaga, T., Kumada, S., Fujimoto, A., Ohno, S., El-Kabbani, O., Hu, D., Toyooka, N., Mano, J., Tajima, K. and Hara, A. (2012) Characterization of rabbit aldose reductase-like protein with 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 527: 23-30. 査読有り
- ③ Matsui, K., Sugimoto, K., Mano, J., Ozawa, R. and Takabayashi, J. (2012) Differential metabolism of green leaf volatiles in injured and intact parts of a wounded leaf meet distinct ecophysiological requirements. *PLoS One* 7: e36433. 査読有り
- ④ Mano, J. (2012) Reactive carbonyl species: their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. *Plant Physiol. Biochem.*, 59: 90-97. 査読有り
- ⑤ Khorobrykh, S. A., Khorobrykh, A. A., Yanykin, D. V., Ivanov, B. N., Klimov, V. V. and Mano, J. (2011)

Photoproduction of catalase-insensitive peroxides on the donor side of manganese-depleted photosystem II: evidence with a specific fluorescent probe. *Biochemistry*, 50:10658-10665. 査読有り

- ⑥ Koeduka, T., Watanabe, B., Suzuki, S., Hiratake, J., Mano, J. and Yazaki, K. (2011) Characterization of raspberry ketone/zingerone synthase, catalyzing the alpha,beta-hydrogenation of phenylbutanones in raspberry fruits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412: 104-108. 査読有り
- ⑦ Mano, J., Tokushige, K., Mizoguchi, H., Fujii, H. and Khorobrykh, S. (2010) Accumulation of lipid peroxide-derived, toxic α , β -unsaturated aldehydes (*E*)-2-pentenal, acrolein and (*E*)-2-hexenal in leaves under photoinhibitory illumination. *Plant Biotechnol.* 27: 193-197. 査読有り
- ⑧ Yin, L., Mano, J., Wang, S., Tsuji, W. and Tanaka, K. (2010) The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. *Plant Physiol.* 152: 1406-1417. 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

- ① 真野純一, 永田光曜, 岡村星多郎, 白矢武士, 三ツ井敏明: 塩ストレスにより活性カルボニル修飾を受けるタンパク質の同定. 第 54 回日本植物生理学会年会 (2013 年 3 月 21-23 日) 発表番号 2pH08, 岡山大学 (岡山市)
- ② Mano, J., Protein modification with reactive carbonyl species: its implication in the plant responses to environmental stress. 日本植物生理学会シンポジウム「Photo-oxidative stress on the chloroplasts and molecular dynamics of thylakoids」, 2013 年 3 月 22 日, 岡山大学 (岡山市)
- ③ 真野純一: ターゲットメタボロミクスとターゲットプロテオミクスによる植物ストレス傷害過程の解析. 山口大学大学研究推進機構第 1 回研究発表会 (2012 年 9 月 21 日), 山口大学 (山口市)
- ④ Biswas, Md. Sanullah, Mano, J.: Reactive carbonyl species induce programmed cell death in tobacco cells. 日本農芸化学会中四国支部第 34 回講演会 (2012 年 9 月 21, 22 日) 発表番号 B1-7,

山口大学工学部 (宇部市)

- ⑤ 石橋亜沙美, 永田光曜, 真野純一: 過酸化脂質由来活性カルボニル種のグルタチオンによる解毒. 日本植物学会第 76 回大会 (2012 年 9 月 15-17 日) 発表番号 2aB06, 兵庫県立大学 (姫路市)
- ⑥ 伊藤達也, 弘田智, 真野純一: 葉緑体ストロマ酵素の脂質由来カルボニル種に対する感受性の網羅的解析. 日本植物学会第 76 回大会 (2012 年 9 月 15-17 日) 発表番号 1aB, 兵庫県立大学 (姫路市)
- ⑦ 岡村星多郎, 永田光曜, 白矢武士, 三ツ井敏明, 真野純一: 塩ストレス下の葉で活性カルボニル種により修飾を受けるタンパク質の同定. 日本植物学会第 76 回大会 (2012 年 9 月 15-17 日) 発表番号 2aB0406, 兵庫県立大学 (姫路市)
- ⑧ 熊田翔, 藤本愛理, 遠藤智史, 松永俊之, 原明, 田島和男, 真野純一: ウサギのアルドース還元酵素類似タンパク質は 3β -ヒドロキシステロイド脱水粗酵素活性を示す. 第 76 回生化学会中部支部例会 (2012 年 5 月 26 日) 自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター (岡崎市)
- ⑨ 真野純一, Sergey A. Khorobrykh, Andrei A. Khorobrykh: 光化学系 II 酸化側での有機ペルオキシド生成. 第 53 回日本植物生理学会年会 (2012 年 3 月 16-18 日) 発表番号 2pA09 (0287), 京都大学 (京都市)
- ⑩ Mano, J.: Lipid peroxide-derived carbonyls mediate oxidative injury of plant cells in environmental stress. On *The 4th Asian Symposium on Plant Lipids*, 2-4 December, 香港 (中国)
- ⑪ 真野純一: 脂質由来強毒性ケトアルデヒド 4-oxo-2-hexenal の葉緑体での生成と光合成への影響. 第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月 21-24 日) 発表番号 2T9p-17, 国立京都国際会館, 京都
- ⑫ 真野純一, 弘田智, 永田光曜, 松井健二: リノレン酸過酸化由来ケトアルデヒド 4-oxo-4-hexenal による潜在的な光合成阻害とその消去. 第 52 回日本植物生理学会年会, 仙台 (2011 年 3 月 20-22 日)
- ⑬ Mano, J., Reactive carbonyl species as mediators of oxidative stress. On 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 5-8 July, 2011, ブダペスト (ハンガリー)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真野純一 (MANO JUNITCHI)

山口大学・大学研究推進機構・教授

研究者番号: 50243100

(2)研究分担者

松井健二 (MATSUI KENJHI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90199729

田中浄 (TANAKA KIYOSHI)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：50124350

(3)連携研究者

()

研究者番号：