



九州大学大学院農学
研究院生物機能科学部門
・准教授
博士（農学）
本城賢一

平成 2 年 九州大学農学部卒業
平成 4 年 九州大学大学院農学研究科修士
課程修了
平成 6 年 九州大学農学部助手
平成 17 年 九州大学大学院農学研究院
助教授（現職）

植物の耐凍性獲得に関わる新規抗酸化系酵素群の解析

はじめに

地球温暖化、それに基づき世界各地で頻発する異常気象は、将来、大きな食糧不足を引き起こすことが予想される。また、近年バイオ燃料が脚光を浴び、食糧用農地がその原料用農地へ転換されるという現象は、食料自給率がカロリーベースで40%にしかすぎず多くの食料を諸外国からの輸入に依存している我が国において、数多くの食品の価格高騰という新たな問題も引き起こしている。このような食糧問題を解決するためには環境変化に強い作物の作出、さらに作物の長期保蔵法の開発などの科学技術の向上が不可欠である。地球は温暖化の傾向にあるが、農作物を栽培できない寒冷地は広大で、農地として有効活用できれば、世界の食糧問題解決に大きく貢献する。これまで、私たちは、寒冷地の耕地化、農作物の低温貯蔵期間延長を目的として植物の耐凍性獲得機構の解明ならびに耐凍性付与に関する研究を進めてきた。

単細胞緑藻である *Chlorella vulgaris* C-27 は3、24時間の低温処理（ハードニング）により耐凍性を獲得する¹⁾。これまでにcDNAサブトラクション法により、耐凍性獲得時において特異的に発現する29種の遺伝子の部分断片をスクリーニングし、その発現量について検討した²⁾。その中で発現量が著しく増加する遺伝子の一つに葉緑体局在型NADPH依存型チオレドキシン還元酵素（NTRC）³⁾をコードするものを見出した。本酵素は、チオレドキシン蛋白質を介した過酸化物質除去酵素であるチオレドキシンペルオキシダーゼ（Peroxi redoxin; Prx）を活性化する役割を果たすと考えられている^{4,5)}。そこで、本研究では、本酵素遺伝子の全長cDNAを取得し、リアルタイムPCR法およびNorthern blot解析法を用いて、低温誘導性を調べた。また、NTRCを介したPrxを検索し、NTRCとの連携機構ならびに耐凍性獲得への関与について調べた。

組換え NTRC 蛋白質活性

まず、クロレラ由来 *NTRC* 遺伝子の全長 cDNA (*CvNTRC*) は、コードされる NTRC が葉緑体局在化するためのトランジットペプチド、NADPH 依存型チオレドキシ還元酵素 (NTR) ドメイン、ならびにチオレドキシ (Trx) ドメインをコードする領域を含んでいたため (図 1-A)、成熟型 *CvNTRC* (*mCvNTRC*) の部分だけを大腸菌の発現ベクターである pET-29b(+) に組み込み、大腸菌に導入し、発現を誘導した。*mCvNTRC* は、His-Tag との融合蛋白質として発現され、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した (図 1-B)。次に、この精製蛋白質を用いて、NTR 活性と Trx 活性を測定した。その結果、図 1-C に示すように、*mCvNTRC* 蛋白質は NTR 活性ならびに Trx 活性を有することを確認した。

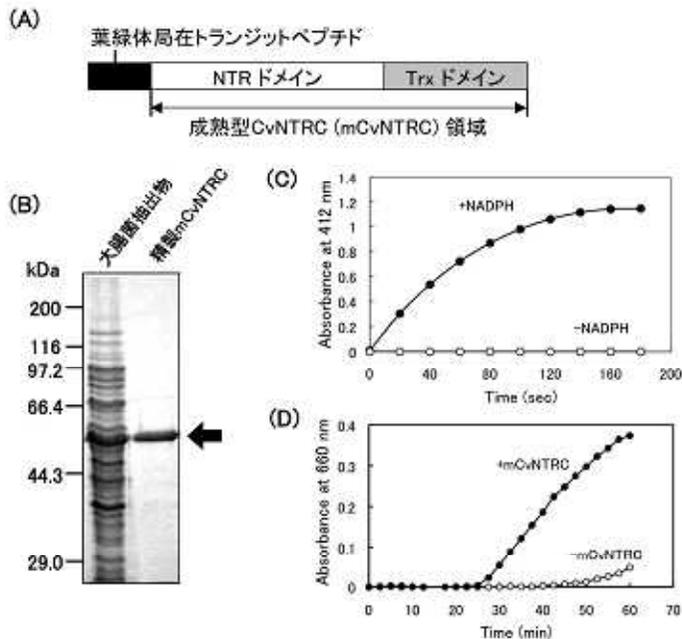


図1. 大腸菌で発現させた *mCvNTRC* の NTR および Trx 活性
(A) *CvNTRC* 蛋白質のドメイン、(B) 精製 *mCvNTRC* の SDS-PAGE、
(C) NTR 活性、(D) Trx 活性

ハードニング中の NTRC 蛋白質の発現量変化

ハードニング中の NTRC 蛋白質の発現量変化について、ウサギ抗 *mCvNTRC* 抗体を用いて、Western blot 解析を行った (図 2)。その結果、低温処理直後に一旦減少し、その後増加に転じることが明らかになった。この結果はクロレラの粗酵素液を用いた総 NTR 活性変化とも一致していた。低温処理による転写量の大幅な増大は確認されていたものの、蛋白質レベルでは大幅な増加がなかったことから、クロレラ NTRC は耐凍性獲得時に機能するためにその転写量を増加させ、低温処理中の分解や変性により減少した蛋白質量ならびに活性を一定に保っていることが推察された。

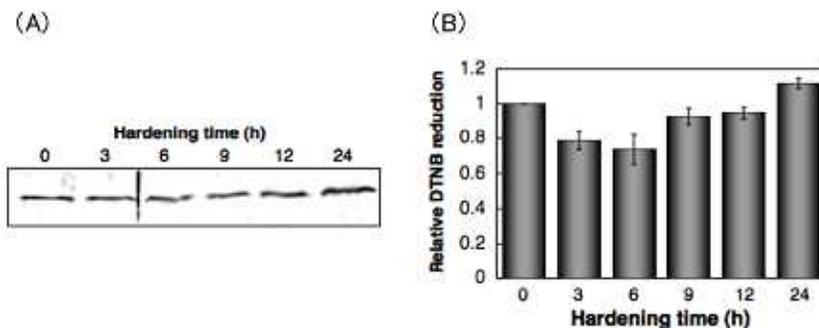


図2. (A)低温処理中のクロレラNTRC蛋白質質量変化と(B)クロレラ総NTR活性変化

In vitro pull-down assay を用いた Prx 蛋白質の単離

NTRC はその機能発現のために、共同して抗酸化に機能する Prx 蛋白質を必要とする。そのため、大腸菌で発現させた His-tag 融合 mCvNTRC 蛋白質を用いた *in vitro* pull-down assay⁶⁾ により、mCvNTRC と複合体を形成するクロレラ蛋白質の単離を試みた。その結果、図 3 で示すように、約 21.2 kDa 蛋白質が mCvNTRC と複合体形成する可能性が示された。本蛋白質の N 末端アミノ酸配列を解析した結果、植物由来の 2-Cys 型 Prx と高い相同性を示した (図 4)。また、その配列は、東京農業大学新村研究室で単離されたクロレラ 2-Cys Prx 遺伝子の推定アミノ酸配列と完全に一致し、クロレラにおける NTRC/Prx 抗酸化系の存在が示唆された。

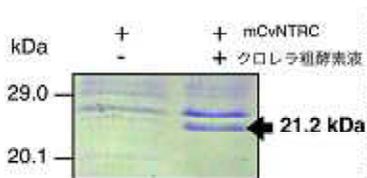


図3. *in vitro* pull-down assay 後の SDS-PAGE 写真



図4. 21.2 kDa蛋白質と他の生物の2-Cys Prxの N-末端アミノ酸配列比較

組換え蛋白質を用いた NTRC/Prx 抗酸化系の活性測定

同定した NTRC/Prx 抗酸化系の活性確認のために、mCvNTRC、成熟型 Prx (mCvPrx) 両蛋白質を大腸菌で発現精製後、過酸化物質に対する分解活性を調べた (図 5)。その結果、両蛋白質の存在下で、2 種の過酸化物質 (*tert*-butyl hydroperoxide および過酸化水素) に対する分解活性が確認され、クロレラ NTRC/Prx 抗酸化系の存在が明らかになった。

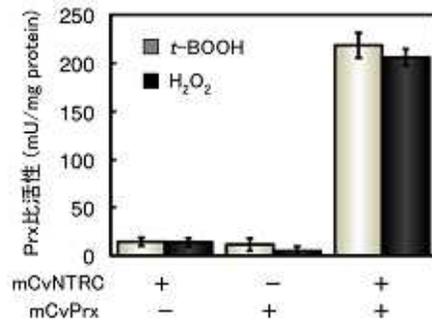


図5. mCvNTRCとmCvPrxの過酸化分解活性

mCvNTRC および *mCvPrx* の酵母での発現とストレス耐性

本抗酸化系のストレス耐性への関与を調べるために、*mCvNTRC*、*mCvPrx* 遺伝子を片方もしくは両方発現する酵母を作製した。両遺伝子の発現を Western blotting で確認後、形質転換酵母の耐凍性 (-20、24 時間) ならびに酸化ストレス耐性 (200 μ M メナジオン、30、3 時間) について調べた結果、*mCvNTRC* 発現酵母および *mCvNTRC/mCvPrx* 同時発現酵母においてストレス耐性向上が確認された (図 6)。また、メナジオン処理時の超酸化物アニオン (O_2^-) および過酸化物の細胞内蓄積量を蛍光試薬により検出した結果、本抗酸化系導入による O_2^- の増加抑制が認められた。 O_2^- は細胞内でペルオキシ亜硝酸 ($ONOO^-$) へと変換されることが知られており⁷⁾、Prx がその分解酵素として機能することが種々の生物において報告されている^{8,9)}。従って、本抗酸化系は O_2^- に由来する $ONOO^-$ の無毒化に機能し、クロレラの耐凍性獲得に寄与することが推察された。

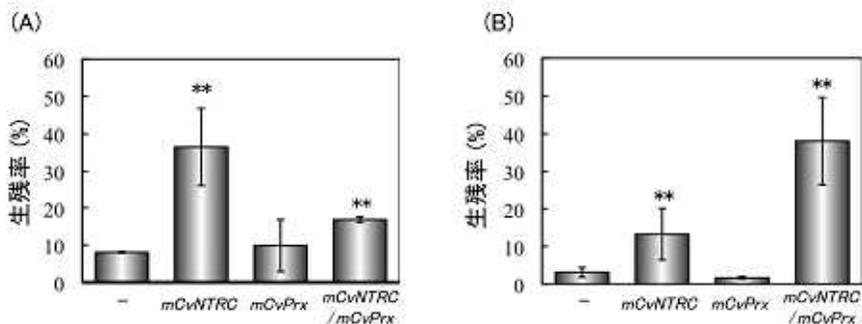


図6. *mCvNTRC*、*mCvPrx*発現酵母の耐凍性(A)と酸化ストレス耐性(B)
N=3, ** $p < 0.01$

まとめ

クロレラの耐凍性獲得時において特異的に発現する *CvNTRC* 遺伝子を大腸菌で発現させ、抗体作製後、蛋白質ならびに活性レベルでの解析を行った。その結果、*CvNTRC* 蛋白質はその機能維持のために一定に保たれていることを明らかにした。次に、*in vitro* pull-down assay

により CvNTRC と結合する CvPrx 蛋白質を単離同定した。さらに、大腸菌で発現させた両蛋白質を用いて、両蛋白質が同時に存在することで過酸化物の分解活性を示すことを明らかにした。最後に、CvNTRC ならびに CvPrx 遺伝子を同時に導入した酵母において、耐凍性ならびに酸化ストレス耐性が増強されることを示した。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase from *Chlorella vulgaris* functions as an antioxidant system with 2-Cys peroxiredoxin. Takeshi Machida, Akiko Ishibashi, Eri Kato, Jun-ichi Sato, Shinji Kawasaki, Youichi Niimura, Ken-ichi Honjoh and Takahisa Miyamoto, *The 5th International Joint Symposium between Japan and Korea. The Recent Status and Perspective of Food System, Agricultural Environment and Biology.*, pp. 340-351 (2008).
- 2) Expression pattern of a chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in *Chlorella vulgaris* and its interaction with 2-Cys peroxiredoxin. Takeshi Machida, Eri Kato, Akiko Ishibashi, Jun-ichi Sato, Shinji Kawasaki, Youichi Niimura, Ken-ichi Honjoh and Takahisa Miyamoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.

2. 学会発表

- 1) クロレラ低温誘導性 NTR-C は 2-Cys Prx の電子供与体として機能し過酸化物分解を促進する。町田豪, 加藤枝里, 石橋明子, 大橋直人, 佐藤純一, 川崎信治, 新村洋一, 本城賢一, 宮本敬久. 日本農芸化学会、名城大学、2008 年 3 月
- 2) クロレラ葉緑体局在 NADPH 依存型チオレドキシ還元酵素が関与する抗酸化システム。町田豪, 石橋明子, 加藤枝里, 佐藤純一, 川崎信治, 新村洋一, 本城賢一, 宮本敬久. 第 45 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場, 2008 年 7 月
- 3) Chloroplastic NADPH-dependent thioredoxin reductase from *Chlorella vulgaris* functions as an antioxidant with 2-Cys peroxiredoxin. Takeshi Machida, Akiko Ishibashi, Eri Kato, Jun-ichi Sato, Shinji Kawasaki, Youichi Niimura, Ken-ichi Honjoh and Takahisa Miyamoto. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, P09-102, Tampere, Finland, 2008 年 8 月
- 4) クロレラ葉緑体局在 NADPH 依存型チオレドキシ還元酵素は 2-Cys Prx と共同して過酸化物分解に機能する。石橋明子、町田豪、加藤枝里、佐藤純一、川崎信治、新村洋一、本城賢一、宮本敬久. 日本農芸化学会西日本支部大会、長崎大学、2008 年 9 月
- 5) Chloroplastic NADPH-dependent thioredoxin reductase from *Chlorella vulgaris* functions as an antioxidant system with 2-Cys peroxiredoxin. Takeshi Machida, Akiko Ishibashi, Eri Kato, Jun-ichi Sato, Shinji Kawasaki, Youichi Niimura, Ken-ichi Honjoh and Takahisa Miyamoto. The 5th International Joint Symposium between Japan and Korea, P6, Chungnam National University, Korea, 2008 年 11 月

参考文献

- 1) Development of frost hardiness of *Chlorella ellipsoidea* in synchronous culture. Hatano, S., Sadakane, H., Tutumi, M., and Watanabe, T. *Plant Cell Physiol.* **17**, 451-457 (1976).
- 2) Isolation of cDNAs for hardening-induced genes from *Chlorella vulgaris* by suppression subtractive hybridization. Machida, T., Murase, H., Kato, E., Honjoh, K., Matsumoto, K., Miyamoto, T., and Iio, M., *Plant Sci.* **175**, 238-246 (2008).
- 3) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. Serrato, A.J., Perez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C., and Cejudo, F.J. *J. Biol. Chem.* **279**, 43821-43827 (2004).
- 4) The C-type *Arabidopsis* thioredoxin reductase ANTR-C acts as an electron donor to 2-Cys peroxiredoxins in chloroplasts. Moon, J.C., Jang, H.H., Chae, H.B., Lee, J.R., Lee, S.Y., Jung, Y.J., Shin, M.R., Lim, H.S., Chung, W.S., Yun, D.J., Lee, K.O., and Lee, S.Y. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **348**, 478-484 (2006).
- 5) Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. Perez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M., and Cejudo, F.J. *Plant Cell* **18**, 2356-2368 (2006).
- 6) Analysis of phosphatase and tensin homolog tumor suppressor interacting proteins by *in vitro* and *in silico* proteomics. Crockett, D.K., Fillmore, G.C., Elenitoba-Johnson, K.S.J., and Lim, M.S. *Proteomics* **5**, 1250-1262 (2005).
- 7) The rate constant of the reaction of superoxide with nitrogen monoxide. Nausser, T., and Koppenol, W.H. *J. Phys. Chem. A* **106**, 4084-4086 (2002).
- 8) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. *Nature* **407**, 211-215 (2000).
- 9) Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. Sakamoto, A., Tsukamoto, S., Yamamoto, H., Ueda-Hashimoto, M., Takahashi, M., Suzuki, H., and Morikawa, H. *Plant J.* **33**, 841-851 (2003).