

低温ストレスにおける脂質過酸化の小麦への影響

牧 久 惠^{*1} ニック・テイラー^{*2}

Cold stress- induced of lipid peroxidation in wheat

Hisae MAKI^{*1}, Nicolas L. TAYLOR^{*2}

Synopsis

Plants, by their nature of being embedded in soil, are unable to escape from various environmental stresses. For survival, they must respond to such stresses by adapting their cellular mechanisms. Accumulation of lipid peroxide-derived aldehydes and ketones is a ubiquitous event in oxidative stress. The toxicity of these carbonyls, especially the α, β -unsaturated carbonyls (reactive carbonyls; RCS), in environment-stressed plants has been demonstrated by several independent research groups. Lipid peroxidation, one of the consequences induced by stresses, yields cytotoxic lipid aldehydes, including 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), that reacts with specific sites in proteins, leading to diverse changes in protein function and/or stability. We have assessed the sensitivity of proteins to 4-HNE modification, using SDS-PAGE coupled to immunological detection. Immuno-blotting of proteins with antibodies against 4-HNE adducts, demonstrated the dynamic increase in 4-HNE modified proteins during cold exposure. The implications of these results as related to the response of plants to RCS are discussed.

I. 緒 言

植物は、自由に動くことができない。そのため、気温、光、水分や栄養分の変化による環境ストレスに適応することで生存している。その過程で、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) の生成が誘導されるが、良好な生育条件では、高等植物ではROSを除去する多量の抗酸化機構が働く。しかし、悪い生育環境が続くと抗酸化機構が作用できず、除去できなかったROSにより過酸化脂質由来のアルデヒドやケトン類が蓄積する。そのうち特に α, β -不飽和カルボニル化合物である活性カルボニル化合物種 (RCS) が生成され、それらは強い毒性を示す。

本研究は、脂質過酸化の指標としてRCSの一種である4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) に着目し、その修飾タンパク質の変化量をイムノプロット解析により検討した。小麦幼植物体に過酸化水素 (H_2O_2) を人為的に付加した酸化ストレスモデル系において、HNEが生成し、特定のタンパク質を修飾することを確認した。同植物体に外的環境ストレスとして4℃の低温ストレスを負荷するとHNE修飾タンパク質の発現量が増加すること

を明らかにした。また、RCSが植物のストレスにตอบสนองし、生存するための代謝系にどのように作用するのか考察した。

II. 材料および方法

1. 材 料

コムギ品種 *Triticum aestivum*

2. 植物体の育成

種子は発芽までの数日間、水分を保持した濾紙上で給水させ、暗所で発芽させた。

発芽後14日間は、堆肥、土壌、パーライト、パーミックスキュライトをそれぞれ4:4:1:1の比率で混合した土壌を用いて生育させた。この幼植物体を以下の実験に用いた。

コントロール植物体の育成は、通常25℃ (常温)、約 $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光条件下、1日あたり16時間明期/8時間暗期のサイクルで、60%の相対湿度に設定した恒温器 (Conviron, BDW80) 中で行った。

低温ストレス処理は、発芽後14日目の幼植物体を4℃に設定した植物育成室中で、温度条件以外はコントロー

*1 女子栄養大学短期大学部生化学研究室: Laboratory of Biochemistry, Department of Food and Nutrition, Junior College of Kagawa Nutrition University

*2 西オーストラリア大学植物エネルギー研究所: Australian Research Council Centre of Excellence in Plant Energy Biology, the University of Western Australia

ル植物体と同様に育成した。その他のストレス処理は、発芽後14日目の幼植物体に農薬の一種であるパラコート (662.5mg/L) 液または、過酸化水素水 (9% (w/v)) を植物体全体に噴霧することにより行った。ストレス処理した植物体は各々7日間、25°C (常温) で育成した。試料として育成条件ごとに葉を収穫し、生重量を測定後-80°Cに冷凍保存した。なお、1回の育成実験において、1処理あたり植物体6個体を採取した。それらを各々3回以上繰り返し実施した。

3. 試料抽出液の調製

冷凍保存した試料に抽出用緩衝液 (2% SDS, 62.5mM Tris-HCL (pH6.8), 10% (w/v) グリセロール, 25mM DTT, プロテアーゼインヒビター (x1)) を 2 mL/gfw で添加し、ホモジナイズし遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 15分間) 後、上清をフィルター (Amicon ULTRA, Merck) により濃縮し抽出液を得た。対照として、コントロールの試料抽出液に終濃度 700 μ M となるよう 4-HNE を添加したものを使用した。なお、試料は採取し冷凍保存したものを 3 サンプルずつ用いた。

4. イムノブロット解析

試料抽出液を、12% (w/v) ポリアクリルアミドを含むゲルで SDS-PAGE により分離後、ニトロセルロースメンブレンに転写し、メンブレンをブロッキングバッファー中、4°C で 1 時間、または一晩インキュベートし、抗 4-HNE 抗体 (Abcam) を吸着させた。膜は、ウェスタンブロットング検出試薬 (Amersham ECL Advance) で染色後、イメージアナライザー (ImageQuant RT ECL, GE Healthcare) により解析した。イムノブロット解析も 3 回以上繰り返し行った。

III. 結果

はじめに ROS である H_2O_2 や、農薬であり酸化ストレスを誘発するパラコートに対する植物体の生育への影響を調べた。発芽後14日目の幼植物体を、常温 (25°C) で 7 日間生育させた小麦幼植物体 (コントロール) に対し、パラコート処理した植物体の生育重量は 50% 以下となり、顕著な生育抑制が観察された。ROS である H_2O_2 処理した植物の生育重量はコントロール植物と同等であり、7 日間のストレス処理では生育には影響を与えなかった (図 1)。

さらに、脂質過酸化の指標として、RCS である 4-HNE 修飾タンパク質 (ペプチド) を解析するため、4-HNE 修飾タンパク質 (ペプチド) と反応するポリクローナル抗体を使用し、イムノブロット解析を行った (図 2)。小麦細胞内タンパク質の対照には、コントロール植物試料の抽出液に 4-HNE 標準物質を添加処理したものを使用した。解析の結果、小麦細胞内タンパク質の対照には 5 つのバンドが検出された (図 2 ④)。そのうち、約 23kDa と約 15kDa のバンドは、常温で生育させたコント

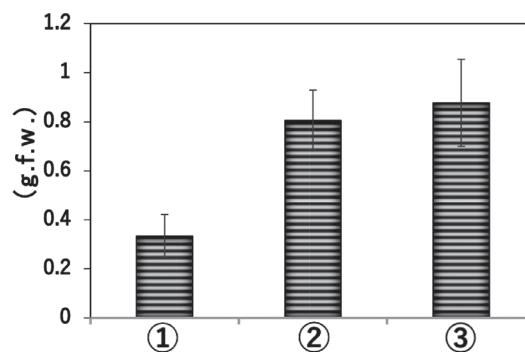


図 1 生育 7 日目の小麦幼植物体重量
①パラコート処理 ② H_2O_2 処理 ③コントロール
標準誤差 (n=18) を各々バーで示した

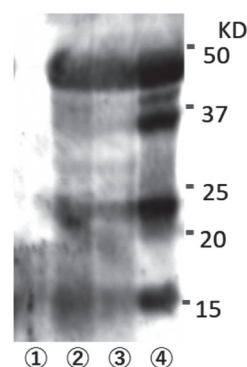


図 2 4-HNE 結合蛋白質のイムノブロット解析
①パラコート処理 ② H_2O_2 処理 ③コントロール
④コントロール+700 μ MHNE

ロール植物試料と、 H_2O_2 処理した試料においても検出された (図 2 ②③)。 H_2O_2 処理時に発現したこれら 2 種のバンドは、コントロール植物試料に比較して、各々若干量ではあるが発現量が多かった。パラコート処理した試料には、ほとんどバンドは検出できなかった。

次に、低温ストレスにおける 4-HNE の修飾タンパク質 (ペプチド) の生成に対する影響を調べた。発芽後14日目の幼植物体を、4°C の低温ストレス環境下で 7 日間生育させた。

さらに、低温処理期間中、経時的に植物体中の、4-HNE 修飾タンパク質 (ペプチド) の発現量をイムノブロット解析により調べた。その結果、 H_2O_2 処理の試料と同様に、低温処理における試料においても約 23kDa と約 15kDa にバンドが検出された。それらの発現量は、各々低温ストレス 7 日の間で数倍に増加した (図 4)。しかし、低温処理 7 日目で、その発現量は減少することが明らかとなった。

IV. 考察

環境ストレスは、生体の代謝、成長や発達に著しく影響を与える。作物に与える環境ストレスとして、湿度や気温によるストレス、高塩濃度、光ストレス、低酸素濃度などが含まれる。植物はこのような外的環境ストレス

に応答し生存するために、適応する必要がある。

外的環境ストレス下では、スーパーオキシドラジカル (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素 (1O_2) などの不安定なROSの生成が誘導される。脂質の中でも、生体内に多く含まれている多価不飽和脂肪酸は、一重項酸素による傷害を受けやすい分子種である。不飽和脂質は、生体内でROSによる一連の過酸化反応による酸化分解により、過酸化脂質を生じる。その過程で、反応性に富む多種のRCSが生成される。脂質過酸化の生成物であるカルボニル化合物種には、マロンジアルデヒド (MDA)、4-HNE、4-ヒドロキシヘキサナール (4-HHE)、アクロレインなどが知られている。RCSの一種である、4-HNEは、 ω 6系脂肪酸であるアラキドン酸やリノール酸などの分解によって生成される α 、 β -不飽和アルデヒドである¹⁾。共役二重結合を持ち、その反応性は非常に大きい。そのため細胞毒性も強くなると考えられ、細胞内のタンパク質、DNA、および脂質に損傷を与える可能性がある。ラットでは、農薬によりミトコンドリアのアルデヒドデヒドロゲナーゼが阻害されたことで、4-HNEが脳で増加し、パーキンソン病の発症に影響を及ぼすことが示されている²⁾。

本研究においてROSである H_2O_2 や、農薬であり酸化ストレスを誘発するパラコートに対する小麦への影響を調べた結果 (図1)、 H_2O_2 により*in vivo*で4-HNE量の増加が起こり、数種の4-HNE修飾タンパク質 (ペプチド)の生合成が促進されることが推測された。パラコートは、酸化ストレスを誘発し生体内の代謝系に悪影響を与えることが知られている。本研究においては、パラコートの毒性が強く生体内の基礎代謝に係る多く、タンパク質が分解、消失したため、4-HNEが修飾するタンパク質も検出できなかったものと考えられる。

H_2O_2 に耐性をもつ細胞において、4-HNEの代謝速度が促進され細胞内での分解が通常より非常に早く³⁾ H_2O_2 や4-HNEの濃度が致死量以下の場合、適応応答が誘導されることが報告されている⁴⁾。本研究においても、 H_2O_2 処理に対し生存状態を確保するために酸化ストレスを回避し、小麦生体内の代謝系に何らかの変化をもたらした、4-HNE修飾タンパク質の生合成が促進されたものと推察された。

次に、筆者らは外的環境ストレスとして、低温ストレスにおける小麦植物体への4-HNEの影響について着目した。致死となるほどの非常に大きな外的ストレスを与えられた場合、植物体は生存を脅かされることとなる。しかし、4°Cの低温処理期間中、小麦植物体は生重量や植物体の外観にほとんど変化はなく低温に適応し生存した (図3)。低温処理により、ROS処理時と同様の分子量を有する4-HNE修飾タンパク質 (ペプチド)の発現が増加した (図4)。このことは、それらの発現が低温ストレスに対する細胞の生体防御システムを作動させるためのシグナル伝達の手段となった可能性が推論できる。

ROSの標的としての重要な脂質として、細胞内の生体

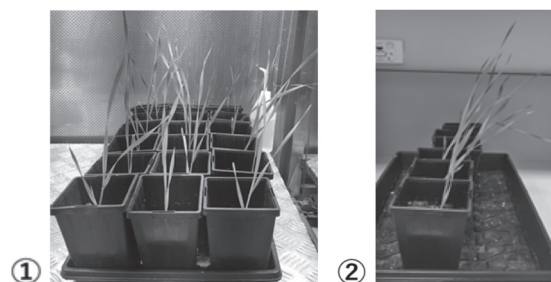


図3 小麦植物体

①コントロール ②低温 (4°C) 処理7日目

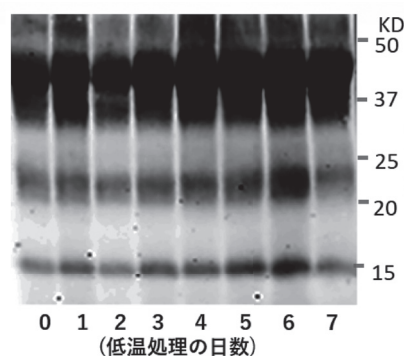


図4 低温 (4°C) 処理した植物体における4-HNE結合蛋白質のイムノプロット解析

膜系を構成する主要脂質であるリン脂質やコレステロール、コレステロールエステルや遊離脂肪酸などが考えられる。植物体中には、リン脂質を構成成分とする細胞膜、糖脂質を膜脂質の主な構成成分としている葉緑体、ミトコンドリアには、内膜に呼吸タンパク質複合体が存在する。それらは、ROSにより誘導されるRCSの潜在的な標的になる可能性は高いと考えられる。ジャガイモ、エンドウ、シロイヌナズナのミトコンドリアでは、ピルビン酸デヒドロゲナーゼが4-HNEの標的となることでエネルギー生成が抑制された⁵⁾。ミトコンドリアおよび葉緑体のATPシンターゼでも同様のことが明らかされている^{6,7)}。

高等植物においてRCSによりカパーゼ-3様プロテアーゼの活性化が誘導され⁸⁾、ROSによる脂質の一連の酸化分解反応を介したプログラムされた細胞死による生体防御反応が確認された⁹⁾。

このような高等植物における研究例は非常に少ない。本研究はまだ研究の初期段階ではあるが今後、低温ストレスに応答し一連の脂質酸化過程で生成されるRCS修飾タンパク質 (ペプチド)を単離し質量分析等による詳細な解析を行うことで、RCSが作用する生体防御システムについて明らかにしていきたいと考えている。小麦は、主要な食糧源のひとつである。このような研究を進展させ環境ストレスに耐性をもつ良質な作物の生産性の向上をはかることで、安定した食糧の供給に貢献できることを望んでいる。

本研究に関して利益相反は存在しない。

参考文献

- 1) Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol. Med.*, **11**, 81-128, 1991
- 2) Leiphon L.J., Picklo Sr. M.J.: Inhibition of aldehyde detoxification in CNS mitochondria by fungicides. *Neurotoxicology*, **28**, 143-149, 2007
- 3) Spitz D.R., Malcolm R.R., Roberts R.J.: Cytotoxicity and metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal and in H₂O₂-resistant cell-lines. *Biochem. J.*, **267**, 453-459, 1990
- 4) Chen Z.H., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N., Niki E.: Adaptive response induced by lipid peroxidation products in cell cultures. *FEBS Lett.*, **580**, 479-483, 2006
- 5) Millar A.H., Leaver C.J.: The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **481**, 117-121, 2000
- 6) Taylor N.L., Day D. A., Millar, A.H.: Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.*, **55**, 1-10, 2004
- 7) Zhong H., Yin H.: Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer, Focusing on mitochondria. *Redox Biol.*, **4**, 193-199, 2015
- 8) Biswas M.S., Mano J.: Reactive carbonyl species activate caspase-3-like protease to initiate programmed cell death in plants. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1432-1442, 2016
- 9) Torres M.A., Jones J.D., Dangl J.L.: Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.*, **37**, 1130-1134, 2005