植物における活性窒素ストレス (Nitrosative stress) 応答

～タンパク質のニトロ化修飾の影響～

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学 植木達也

1. はじめに

活性窒素は活性酸素と同様に細胞内で生成され、核酸やタンパク質、脂質などの細胞構成成分を酸化またはニトロ化することにより、細胞機能障害の原因となる。近年、ストレス環境下において植物細胞内で活性窒素が発生し、ニトロ化タンパク質が増加することが報告されているが、ニトロ化の標的タンパク質やニトロ化されることによりその機能がどのように変化するかについての報告は限られており不明な点が多い。ストレス負荷環境における活性窒素およびニトロ化タンパク質の挙動を知ることは、植物のストレス応答機構を理解する上で非常に重要である。そこで本研究では、アカビートおよびテンサイの芽生えを用いて、ストレス負荷によってニトロ化のターゲットとなるタンパク質を同定し、その活性変化を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

アカビートおよびテンサイ芽生えに亜硝酸ストレス負荷処理を行い、抗ニトロチロシン抗体を用いたウェスタンブロッティング解析によりニトロ化タンパク質を検出した。また、クローニングしたアカビートメチオニンシンターゼ cDNA およびシロイヌナズナのメチオニンシンターゼ cDNA を大腸菌に組み込み、大量発現させた。得られた組換えタンパク質を、ペルオキシナイトライト (ONOO⁻) でニトロ化し、それぞれの活性を CH₃-H₄PteGlu₁ を基質とした比色法で測定した。

3. 結果と考察

コントロール条件下においてアカビートおよびテンサイから複数のニトロ化タンパク質のバンドが検出され、亜硝酸ストレス処理によってそれぞれシグナル強度の上昇が見られた。中でも85 kDa 付近のシグナルが変化が最も大きく、ストレス処理日数によるニトロ化の経時変化を調べた結果、処理3日目でコントロールに対し有意にニトロ化シグナルが増加していた。また、このニトロ化タンパク質を二次元電気泳動にて分離後、PMF (peptide mass fingerprinting) 解析によりメチオニンシンターゼ (MS) と同定した。大腸菌で発現させた組換えアカビートMSの活性は0.31 nkat/mg proteinで比較対照としたシロイヌナズナMSの0.30 nkat/mg proteinと同等であった。しかし、1 mM ONOO⁻処理によってアカビートMSはコントロールの半分の活性を保持している一方、シロイヌナズナMSは活性が検出できなかった。両種のメチオニンシンターゼアミノ酸配列を比較したところ、アカビートMSはチロシン残基が1つ多く、またN末端に9、C末端に20アミノ酸残基長くなっており、この配列の違いがアカビートとシロイヌナズナのONOO⁻に対する耐性の違いに影響していると考えられた。

4. おわりに

本研究より、アカビートおよびテンサイのメチオニンシンターゼは亜硝酸ストレス処理に敏感であり、優先的にニトロ化されることが分かった。また、チロシン残基のニトロ化によってアカビートおよびシロイヌナズナのメチオニンシンターゼの活性が著しく低下することを *in vitro* で初めて明らかにした。