

令和元年6月4日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07791

研究課題名(和文) 針葉樹における新たな光呼吸アンモニア同化モデルの構築

研究課題名(英文) A model construction for ammonia assimilation process in conifer photorespiration

研究代表者

宮澤 真一 (Miyazawa, Shin-Ichi)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：10578438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物の光合成は複雑な反応で、その中にはアンモニアを発生する“光呼吸”という代謝系が含まれます。定説では光呼吸において発生したアンモニアは、葉緑体にあるグルタミン合成酵素(GS2)によって直ちに同化され、グルタミンというアミノ酸になるとされています。一方で、このような知見は、作物や広葉樹など被子植物を用いた研究結果をもとにしており、裸子植物である針葉樹についてはよくわかっていませんでした。本研究によって、針葉樹の葉は、これまで必須と考えられてきたGS2は存在しないこと、さらに、針葉樹の葉は被子植物の葉に比べ、光呼吸で発生したアンモニアの同化効率が低いことが明らかとなりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の光合成は20種類以上の酵素からなる複雑な代謝反応です。本研究によって、針葉樹には光合成の一部である、“光呼吸”という代謝にかかわる重要な酵素が欠如していること、針葉樹と広葉樹とでは光呼吸の効率に違いがあることが明らかになりました。光合成のメカニズムは、針葉樹と広葉樹とで大きな違いはないと考えられてきましたが、今後、そのメカニズムの見直しが必要といえます。

研究成果の概要(英文)：Photosynthesis comprises a series of complex reactions, including the metabolic process known as “photorespiration” which produces ammonia. In the established theory, ammonia generated during photorespiration is immediately assimilated through catalysis by glutamine synthetase in chloroplasts (GS2) into an amino acid called glutamine. We tested for the presence or absence of GS2 in various conifer leaves, finding only the cytosolic glutamine synthetase isoform (GS1); GS2 was not detected. Furthermore, we found that leaves of conifers have very low assimilation efficiency of photorespiratory ammonia in comparison to leaves of crops and broadleaf trees.

研究分野：樹木分子生理

キーワード：光合成 光呼吸 針葉樹 被子植物 アンモニア 二酸化炭素 グルタミン合成酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

葉は大気中のアンモニア (NH<sub>3</sub>) を吸収・放出 (NH<sub>3</sub> ガス交換) を担う重要な器官である。NH<sub>3</sub> ガス交換速度は、大気中の NH<sub>3</sub> ガス濃度、気孔の開き具合 (気孔コンダクタンス)、NH<sub>3</sub> 補償点 (Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub>) の3つのパラメーターで決まる<sup>1</sup>。特に、Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> は植物の NH<sub>3</sub> の放出のしやすさを表わす重要なパラメーターである。草本植物であるインゲンの Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> 値は約 5 ppb であり、この値は葉に含まれる NH<sub>3</sub> 同化酵素 (Glutamine synthetase : GS) の NH<sub>3</sub> に対する親和性 (ミカエリス定数 : K<sub>m</sub>) を反映するといわれる<sup>1</sup>。Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> は植物の生育段階で変化するが、栄養成長期ではオオムギなど他の作物でも同程度の値を示す。一方、樹木の Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> に関する情報は少ない<sup>2</sup>。そこで、化学発光式 NH<sub>3</sub> 分析計を用い、落葉樹ポプラ、針葉樹スギ、インゲンについて Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> を計測し、比較した。

その結果、ポプラの Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> 値はインゲンと同程度であったが、スギの Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> 値は高い傾向が見られ、スギは NH<sub>3</sub> を放出しやすいことが示唆された。そこで、ポプラとスギの発現遺伝子情報 (EST 情報) をもとに、両樹種の葉に含まれる GS の分子種を調べ、比較した。GS は大きく分けて2種類存在する (GS1 と GS2)。一般的に、GS1 は維管束組織の細胞質に存在し、窒素転流やリグニン合成に関わる。一方、GS2 は葉緑体に局在し、光呼吸で発生した NH<sub>3</sub> の同化、再利用に必須といわれる<sup>3</sup>。ところが、ポプラはこの2種類を保有していたが、スギは GS1 のみを有し、GS2 をもたないことが明らかとなった (図1)。EST 情報が公開されているマツ科針葉樹の *Picea sitchensis* や *Pinus sylvestris*<sup>4</sup> についても同様であった。

今回の予備的知見から、マツとは系統的に離れたスギについても GS2 が存在しないことが判明し、GS2 が欠如する現象は針葉樹に特有である可能性が高まった。光呼吸は CO<sub>2</sub> 固定酵素である Rubisco が大気中の酸素と反応することで開始される (図2左)。光呼吸は葉に光が照射される昼間に生じ、CO<sub>2</sub> 放出を伴うため、植物の純 CO<sub>2</sub> 固定量に大きな影響を与える。GS2 を欠損したオオムギの突然変異体は、通常の大気 CO<sub>2</sub> 濃度下 (350 ppm) では生存できない<sup>3</sup>。これは GS2 が光呼吸に必須であることの証左とされる。しかし、GS2 を有しないスギに、このような既知のモデルは適用するとは考えにくく、針葉樹の光呼吸における NH<sub>3</sub> 同化メカニズムを再検証する必要が生じた。葉には GS 以外にも、Glutamate dehydrogenase (GDH) という NH<sub>3</sub> 同化酵素が存在する。NH<sub>3</sub> 親和性が低い GDH は光呼吸に関与しないことがシロイヌナズナの突然変異体の解析で既に明らかになっている<sup>5</sup>。一方、Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> 値が高く、NH<sub>3</sub> を放出しやすいスギは、GS2 ではなく GDH で NH<sub>3</sub> 同化を行っているのではないかという仮説をたてた。スギの光呼吸経路における NH<sub>3</sub> 同化酵素を特定し、あらたに針葉樹の光呼吸 NH<sub>3</sub> 同化モデルを提唱することを目的とする。

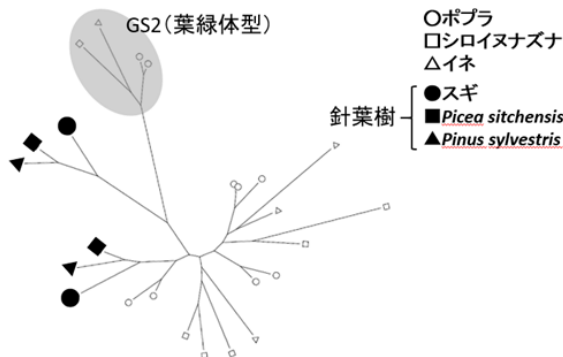


図1

アミノ酸配列から予測した GS の分子系統樹。それぞれのシンボルは GS の分子種を示す (Miyazawa et al. 2018 より図を改編)。

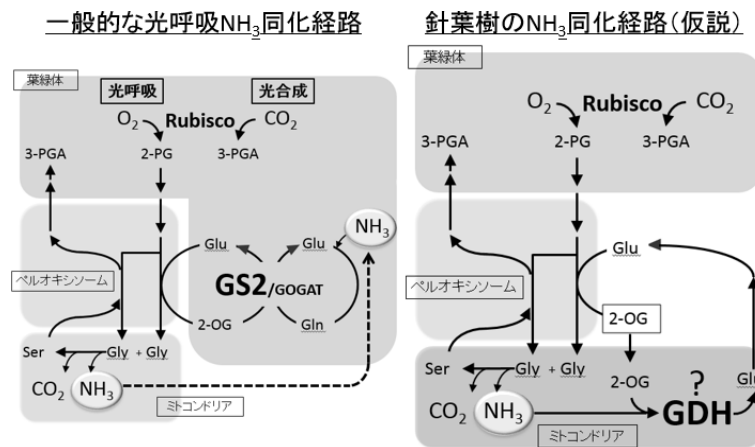


図2：一般的な光呼吸 NH<sub>3</sub> 同化経路の模式図 (左) と針葉樹の NH<sub>3</sub> 同化経路 (仮説; 右)。GOGAT, グルタミン酸合成酵素。3-PGA, 3-ホスホグリセリン酸。2-PG, 2-ホスホグリコール酸。Glu, グルタミン酸。Gln, グルタミン。2-OG, 2-オキソグルタル酸。Gly, グリシン。Ser, セリン。

(参考文献)

- 1, Farquhar G.D. et al. (1980) Plant Physiol. 60:180-.
- 2, Miyazawa S.-I. et al. (2014) Plant, Cell Physiol. 55:1582-.
- 3, Blackwell R.D. et al. (1987) J. Exp. Bot. 38:1799-.
- 4, Canton F.R. et al. (1993) Plant Mol. Bio. 22: 819-.
- 5, Somerville C.R. & Ogren W.L. (1980) Nature 286:257-.

2. 研究の目的

- (1) 様々な生活型の樹種を対象とし、GS2 を欠損する現象が針葉樹に特有かどうか検証する。
- (2) 光呼吸で発生した NH<sub>3</sub> の回収率を針葉樹と被子植物で比較する。
- (3) スギの光呼吸経路における NH<sub>3</sub> 同化酵素を特定し、針葉樹の光呼吸 NH<sub>3</sub> 同化モデルを提唱する。

3. 研究の方法

(1) 針葉樹 14 種類 (アカマツ、カラマツ、ヒマラヤスギ、クロベ、ネズ、ヒノキ、スギ、メタセコイア、コウヤマキ、イチイ、イヌガヤ、ウオレミア、アロウカリア) および被子植物 7 種 (シロイヌナズナ、ブナ、アオギリ、インゲンマメ、コブシ、ヤマグルワ) の葉を液体窒素によって磨砕し、抽出した水溶性タンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離した。その後、抗 GS 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、GS を検出した。また、針葉樹以外の裸子植物であるイチョウ、ソテツ類 (ソテツ)、グネツム類 (ウェルウィッチア、グネツム、マオウ) についても同様の解析を行った。

(2) 針葉樹であるスギおよびアカマツ、被子植物であるポプラおよびインゲンマメを材料とした。携帯式光合成測定装置 (LI-6400, Li-Cor 社) の個葉チャンバーに、これらの葉をはさみ、飽和光 ( $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を葉に照射して光合成をさせ、葉の純 CO<sub>2</sub> 固定速度を計測した。チャンバー内の CO<sub>2</sub> 濃度は光呼吸“促進”条件 (200 ppm CO<sub>2</sub>)、もしくは“抑制”条件 (800 ppm CO<sub>2</sub>) に制御した。これらの CO<sub>2</sub> 濃度で葉を 90 分間処理した後、液体窒素によって葉を凍結採取した。凍結した葉はギ酸で磨砕し、HPLC を用いて、葉に含まれるアンモニウムイオン (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 含量を測定した。光合成速度と葉のクロロフィル含量からクロロフィルあたりの光呼吸速度 (V<sub>o</sub>) を計算し、V<sub>o</sub> と葉のクロロフィルあたりの NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 含量との関係から、光呼吸で発生した NH<sub>3</sub> の回収率を推定した。

(3) 針葉樹であるスギおよびアカマツ、被子植物であるポプラおよびインゲンマメを材料とした。LI-6400 の個葉チャンバーに、これらの葉をはさみ、LI-6400 に接続した化学発光式 NH<sub>3</sub> 分析計 (Ecotech 社) を用いて、葉の NH<sub>3</sub> 放出速度を計測した。純度の高いボンベから LI-6400 に空気を供給することで、チャンバーに供給される空気の NH<sub>3</sub> 濃度をほぼゼロにした。Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> は NH<sub>3</sub> 放出速度と LI-6400 で計測した気孔コンダクタンスから求めた。スギと *Pinus sylvestris* における GS1 (GS1a と GS1b) および被子植物 (ポプラ、インゲンマメ、シロイヌナズナ、イネ) における GS2 のアミノ酸配列を比較した。

4. 研究成果

(1) GS2 の欠如はイチョウを除く、ソテツ類、グネツム類、針葉樹を含む裸子植物に普遍的な特徴であることを明らかにした。一方で、ゲノム情報や発現遺伝子情報をもとに、イチョウの GS2 のアミノ酸構造を詳しく解析したところ、イチョウの GS2 は被子植物の GS2 と異なり、基質親和性を制御するアミノ酸部位の変異や酸化還元調節を行うシステイン残基の欠如が生じていることを明らかにした。

(2) 針葉樹であるスギやアカマツの葉は被子植物であるポプラやインゲンの葉にくらべて、光呼吸代謝で発生した NH<sub>3</sub> の回収率が顕著に低く (図 3)、また、NH<sub>3</sub> の回収率と葉の NH<sub>3</sub> 放出能の指標である Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> との間には統計的に有意な相関関係があることを明らかにした。本研究によって針葉樹と被子植物における、このような生理学的差異が初めて明らかになった。

(3) スギとアカマツの Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> は、約 20 ppb であり、GDH の既知の K<sub>m</sub> 値 (10~50 mM) から推定される Γ<sub>NH<sub>3</sub></sub> よりもかなり低く、むしろ GS の K<sub>m</sub> 値に近いこと、針葉樹における GS1 の 1 種である GS1a が葉肉細胞で発現していること、さらに、GS1a は GS2 と類似したアミノ酸構造を有することがわかった。これらの結果から、針葉樹の光呼吸代謝で発生した NH<sub>3</sub> の同化酵素は GDH ではなく、GS1 の 1 種である GS1a である可能性が高い (図 4)。

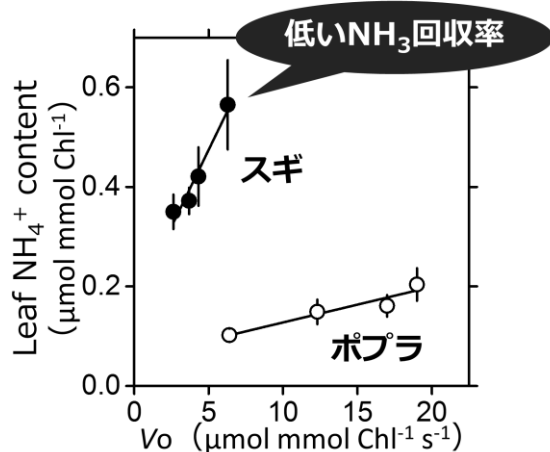
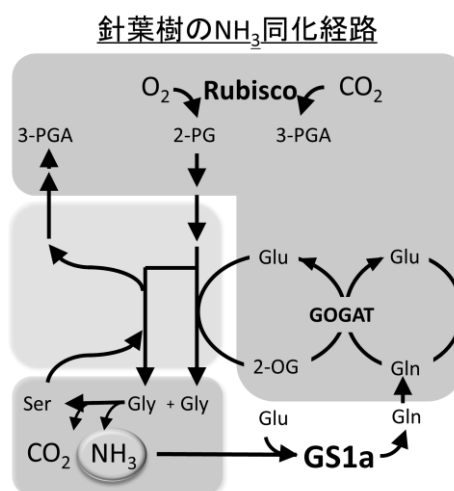


図 3

光呼吸速度 ( $V_o$ ) の変化に対する葉の  $\text{NH}_4^+$  含量の変化. スギは傾きが高く、これは  $\text{NH}_3$  の回収率が低いことを示す. アカマツはスギと同様、インゲンマメはポプラと同様な傾向を示した (Miyazawa et al. 2018 より図を改編).

図 4  
本研究から示唆された針葉樹の光呼吸における  $\text{NH}_3$  同化経路 (Miyazawa et al. 2018 より図を改編). 略称は図 2 を参照.



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Miyazawa Shin-Ichi, Nishiguchi Mitsuru, Futamura Norihiro, Yukawa Tomohisa, Miyao Mitsue, Maruyama Tsuyoshi Emilio, Kawahara Takayuki. Low assimilation efficiency of photorespiratory ammonia in conifer leaves. *Journal of Plant Research* 131:789-802. 2018.
- ② 宮澤真一. アンモニアの研究から見えてきた針葉樹の光合成の謎. 季刊森林総研 41:6-7. 2018. <https://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/kikan/documents/kikanffpri-41.pdf>

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 宮澤真一. 草本植物との比較から見えてくる、樹木の光合成系における窒素利用の特異性. 日本森林学会 (新潟). 招待講演. 2019 年 3 月.
- ② Miyazawa Shin-Ichi, Ihara Tokuko. Difference in assimilation efficiency of photorespiratory ammonia between angiosperm and gymnosperm leaves. *First European Congress in Photosynthesis Research* (国際学会). 2018 年 7 月.
- ③ Miyazawa Shin-Ichi, Nishiguchi Mitsuru, FUTAMURA Norihiro, YUKAWA Tomohisa, MIYAO Mitsue, Maruyama E. Tsuyoshi, KAWAHARA Takayuki. Low  $\text{NH}_3$  assimilation efficiency in conifer photorespiration: chloroplastic glutamine synthetase (GS2) as an adaptive trait to low  $\text{CO}_2$  environments on earth? グラハム・ファーカー教授 2017 年京都賞受賞記念ワークショップ (東京大学). 2017 年 11 月.

〔その他〕

ホームページ等

光合成の代謝系における針葉樹の特異性が明らかに

<https://www.ffpri.affrc.go.jp/research/saizensen/2018/20180709-01.html>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。