

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14835

研究課題名(和文) アスパラギン酸輸送を介したC4光合成回路のクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between C4 photosynthetic cycles through aspartate transport

研究代表者

谷口 光隆 (Taniguchi, Mitsutaka)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：40231419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NADP-ME型C4回路とPCK型C4回路間のアスパラギン酸を介したクロストークの詳細を明らかにすることを目的とする。NADP-ME型C4植物のソルガムやエノコログサでは、葉組織中のPCK酵素活性が低く、葉緑体へのリンゴ酸輸送はアスパラギン酸により促進されなかった。よって、トウモロコシなどのPCK型回路をもつNADP-ME型C4植物において、リンゴ酸輸送が関わるC4回路の協調機構が確立されてきたと推察される。また、PCK酵素活性が顕著に高いイネ科ヒエ属NADP-ME型C4植物4種類を見出し、両C4回路の連携を明らかにするための格好の材料となることが期待された。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aim to clarify details of aspartate-mediated crosstalk between NADP-ME-type and PCK-type C4 cycles. In sorghum and green foxtail, NADP-ME-type C4 plants, there was no facilitative effect of aspartate on malate transport to chloroplasts and the PCK enzyme activity in leaf tissues was low. Therefore, it is inferred that the cooperative mechanism of the C4 cycle involving malate transport has been established in NADP-ME-type C4 plants having PCK-type C4 cycle such as maize. In addition, we found four kinds of Echinochloa C4 plants in Poaceae with markedly high PCK enzyme activity and they were expected to be good materials for clarifying the cooperation between both the C4 cycles.

研究分野：植物生化学

キーワード：C4光合成 葉緑体 トランスポーター アスパラギン酸 リンゴ酸 維管束鞘細胞 クロストーク ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

C<sub>4</sub>植物では、隣り合う2種の光合成細胞、葉肉細胞と維管束鞘細胞を一巡するC<sub>4</sub>回路がCO<sub>2</sub>濃縮ポンプとして働き、効率の良い光合成炭素同化を行っている。トウモロコシに代表されるNADP-マリックエンザイム(ME)型C<sub>4</sub>植物のC<sub>4</sub>回路(NADP-ME型回路)には、葉緑体包膜を横切るジカルボン酸輸送が3箇所組み込まれているが、その実体は明らかになっていなかった。申請者らはトウモロコシよりジカルボン酸輸送体の候補遺伝子を3種類(*OMT1*, *DCT1*, *DCT2*)同定し、遺伝子発現や組換えタンパク質の基質輸送特性を解析した(Taniguchi *et al.* 2004 *Plant Cell Physiol.* 45: 187-200)。その結果、*OMT1*と*DCT1*が葉肉細胞において、*DCT2*が維管束鞘細胞において、それぞれC<sub>4</sub>回路に関わっている可能性を提唱した。さらに、申請者は米国の研究者らと共同研究を行い、*DCT2*遺伝子にAcトランスポゾンが挿入されたトウモロコシ遺伝子破壊系統(*dct2*変異体)では、維管束鞘葉緑体へのリンゴ酸輸送能が低下しており、光合成代謝が抑制されることによって顕著な生育阻害が起こることを見出した。この結果から、C<sub>4</sub>回路における維管束鞘葉緑体へのリンゴ酸取り込みは*DCT2*が担っていると結論した(Weissmann *et al.* 2016 *Plant Cell* 28: 466-484) (図1)。

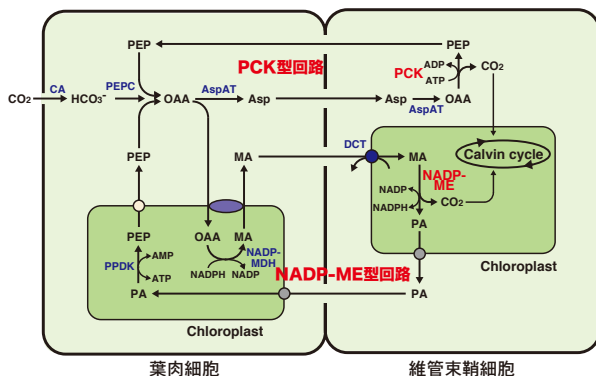


図1. C<sub>4</sub>植物におけるNADP-ME型回路とPCK型回路の協調的駆動。Asp, アスパラギン酸; MA, リンゴ酸; OAA, オキサロ酢酸; PA, ピルビン酸; PEP, ホスホエノールピルビン酸; AspAT, アスパラギン酸アミノ基転移酵素; CA, カルボキシアンヒドラーゼ; DCT, ジカルボン酸輸送体; ME, マリックエンザイム; MDH, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ; PCK, PEPカルボキシキナーゼ; PEPC, PEPカルボキシラーゼ; PPK, ピルビン酸リン酸シナーゼ

このようにしてC<sub>4</sub>回路の輸送体の一つを同定したが、維管束鞘葉緑体のリンゴ酸輸送に関しては解決すべき問題点が残されている。すなわち、このリンゴ酸輸送はジカルボン酸であるアスパラギン酸で促進されることから(Boag and Jenkins 1985 *Plant Physiol.* 79: 165-170), *DCT2*に加えて他の未知因子がリンゴ酸輸送を制御していると考えられる。我々は、まずアスパラギン酸が他の輸送体(Asp/Na<sup>+</sup>, Asp/H<sup>+</sup>共輸送体など)を介して葉緑体内に取り込まれた後、葉緑体内のアスパラギン酸と葉緑体外のリンゴ酸が*DCT2*を介して交換輸送されるのではないかと推察している。この仮説は、*dct2*変異体の葉緑体を用いた解析により検証できるのではないかと考えた。

ところで、トウモロコシにはNADP-ME型

C<sub>4</sub>回路に加えて、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PCK)型C<sub>4</sub>回路も機能している(図1)。リンゴ酸輸送を促進するアスパラギン酸はPCK型回路の中間代謝産物であり、NADP-ME型回路の中間体であるリンゴ酸の葉緑体輸送をアスパラギン酸が促進することは、両C<sub>4</sub>回路間にはアスパラギン酸を介したクロストークが存在し、協調的に機能していることが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、NADP-ME型回路とPCK型回路間のアスパラギン酸を介したクロストークの詳細を明らかにすることを目的とする。そのため、リンゴ酸輸送促進作用に関わるアスパラギン酸輸送体の同定を試みる。また、トウモロコシ以外のNADP-ME型C<sub>4</sub>植物におけるリンゴ酸輸送体とアスパラギン酸輸送体の協調性の有無やPCK型回路との関連性を調べ、アスパラギン酸を介したクロストークの詳細を明らかにする。これらの研究により、NADP-ME型C<sub>4</sub>植物になぜPCK型回路が必要なのか、NADP-ME型回路単独に比べて光合成効率に優位性があるのかなどを解明する足掛かりになると考えられる。一方、同じNADP-ME型C<sub>4</sub>植物であってもPCK活性が低い植物種も存在する。両C<sub>4</sub>光合成回路を保持することでトウモロコシが高い光合成能をもつように進化したのかといった作物学上からも重要な観点を解明できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 葉抽出液中のPCK酵素活性は、ホスホエノールピルビン酸 → オキサロ酢酸方向の反応を測定した。反応液に過剰量のリンゴ酸脱水素酵素(MDH)を共存させ、生じたオキサロ酢酸がリンゴ酸に変換する際のNADH酸化に伴う340 nmの吸光度変化を測定することで反応速度を求めた。既存の方法から改良を加え、葉組織の破碎をpH 9.0で、酵素反応測定をpH 6.0で行うとともに、3,3-Dichloro-2-dihydroxyphosphinoylmethyl-2-propenoate (DCDP)を添加(終濃度2 mM)し、PCKの最大酵素活性を測定した。

(2) 緑葉からの維管束鞘細胞群単離は、ポリトロンを用いた機械的破碎法により行った。さらに、維管束鞘細胞群からの葉緑体単離を以下のように行った。細胞群標品をセルラーゼ/マセラゼ消化して細胞壁を部分分解した後、溶液中の維管束鞘細胞群を穏やかに揺すって葉緑体を細胞外に遊離させた。次いで、得られた粗葉緑体標品をパーコール溶液上に重層し、遠心により無傷葉緑体のみパーコール層を通過させ沈殿させた。

(3) 維管束鞘細胞群標品にリンゴ酸を添加す

ると、葉緑体に取り込まれた後、NADP-MEにより脱炭酸反応が起こりピルビン酸が生じる。このピルビン酸生成速度は葉緑体へのリンゴ酸輸送速度と見なされるので、生成ピルビン酸を定量して反応速度を求めた。さらに、反応液中にアスパラギン酸を共存させてリンゴ酸輸送のアスパラギン酸による促進効果を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 精度の高いPCK酵素活性測定系を開発した。緑葉抽出液中には高活性のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) が共存するため、その影響を受けやすい (PEPCもホスホエノールピルビン酸を基質とする反応を行う)。そこで、PEPCの特異阻害剤DCDPを反応系に添加してPEPC活性を抑制するとともに、PCKの至適pHでの活性測定を行うなどの改良を加えることにより、PCKの最大酵素活性を測定できるようになった。

(2) トウモロコシ *dct2* 変異体緑葉から高純度かつ無傷性が高い維管束鞘葉緑体の単離を試みたが、複数回の基質輸送実験に供することができる量の標品を得ることはできず、*dct2* 変異体を用いた新規アスパラギン酸輸送体の探索はできなかった。そこで、維管束鞘細胞群を単離して、リンゴ酸輸送に対するアスパラギン酸促進効果の有無を調べた。その結果、トウモロコシ以外のNADP-ME型C<sub>4</sub>植物 (ソルガム, エノコログサ) では、アスパラギン酸による促進効果が見られなかった。また、維管束鞘細胞群におけるPCK酵素活性は、トウモロコシよりも低かった。これらの結果は、PCK型C<sub>4</sub>回路があまり駆動していないソルガムやエノコログサでは、リンゴ酸輸送に対するアスパラギン酸促進機構が備わっていないことを示唆している。言い換えれば、PCK型C<sub>4</sub>回路をもつトウモロコシにおいて、NADP-ME型C<sub>4</sub>回路とPCK型C<sub>4</sub>回路の協調機構が確立されてきたと推察される。

(3) PCK酵素活性が高いイネ科ヒエ属植物4種類 (ヒエ *Echinochloa esculenta*, イヌビエ *E. crus-galli*, インドビエ *E. frumentacea*, ワセビエ *E. colona*) を見出した。4種ともにNADP-ME型C<sub>4</sub>植物だとの報告はあるが、PCK型回路が駆動しているかについては報告がなかった。緑葉中のPCK活性を調べたところ、クロロフィルあたりのPCK活性はトウモロコシに比べて数倍高く、PCK型C<sub>4</sub>植物ローズグラス (*Chloris gayana*) の1/3~1/2程度の極めて高い活性を示した (図2)。また、PCK型C<sub>4</sub>回路に関与するアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AspAT) の活性も高かった。一方、4種のヒエのNADP-ME活性はトウモロコシと同程度に高かったことから、これらのヒエ属植物はNADP-ME型C<sub>4</sub>回路も駆動させていると考えられた。

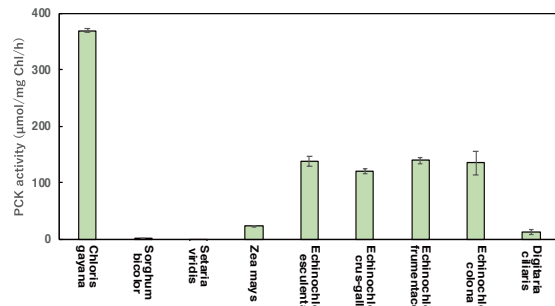


図2 各種C4植物の葉組織におけるPCK活性

したがって、これらのヒエ属植物はトウモロコシよりも高活性のPCK型C<sub>4</sub>回路をもつNADP-ME型C<sub>4</sub>植物であり、PCK回路とNADP-ME回路の連携を明らかにするための格好の材料となりえる。二つのC<sub>4</sub>回路が共存する生理的意義や進化様式は未だ解明されておらず、C<sub>4</sub>植物がもつ高生産性・環境適応性において重要な役割を担っている可能性がある。StittとZhu (2014 *Plant Cell Environ.* 37: 1985-1988) は、C<sub>4</sub>回路によるCO<sub>2</sub>濃縮を行うにあたって、NADP-ME型回路とPCK型回路の駆動率を変えて葉肉細胞と維管束鞘細胞内のATPとNADPHのバランスが大きく崩れないようにすることで両回路を駆動する優位性が生まれると述べている。実際に、NADP-ME型回路では、葉肉細胞でATPが消費され、還元力を葉肉細胞から維管束鞘細胞へ運んでいる (図1)。一方、PCK型回路に還元力は関係しないが、維管束鞘細胞でATPが消費される。この両回路の駆動バランスをどのように制御しているかにも興味をもたれ、アスパラギン酸を介した維管束鞘葉緑体へのリンゴ酸輸送がその制御ステップの一つかもしれない。

今回見出したPCK活性が高いヒエを解析することで、複数のC<sub>4</sub>回路駆動の意義・優位性を解明できると期待している。今後、ヒエにおいてPCK回路がどの程度C<sub>4</sub>光合成に寄与しているかを調べるとともに、PCK回路中間代謝産物のアスパラギン酸がNADP-ME型回路駆動を制御しているかを明らかにしていきたい。

#### 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2件)

- ① Yamane K., Oi T., Enomoto S., Nakao T., Arai S., Miyake H. and Taniguchi M. (2018) Three-dimensional ultrastructure of chloroplast pockets formed under salinity stress. *Plant, Cell & Environment* 41: 563-575 (査読有) DOI: 10.1111/pce.13115.
- ② Oi T., Enomoto S., Nakao T., Arai S.,

Yamane K. and Taniguchi M. (2017)  
Three-dimensional intracellular  
structure of a whole rice mesophyll cell  
observed with FIB-SEM. *Annals of  
Botany* 120: 21–28 (査読有) DOI:  
10.1093/aob/mcx036.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 大井崇生, 山根浩二, 谷口光隆 イネ科植物における維管束鞘葉緑体の細胞内配置と形状の三次元解析. 日本作物学会第 245 回講演会, 2018 年 3 月 29~30 日 (宇都宮)
- ② 山川早紀, 大井崇生, 谷口光隆 C<sub>4</sub> 植物葉肉葉緑体の凝集運動に伴う細胞内配置と形態の三次元解析. 日本作物学会第 245 回講演会, 2018 年 3 月 29~30 日 (宇都宮)
- ③ 加藤優太, 大井崇生, 谷口光隆 C<sub>4</sub> 植物における低 CO<sub>2</sub> 濃度により促進される葉肉葉緑体の凝集配置. 日本作物学会第 245 回講演会, 2018 年 3 月 29~30 日 (宇都宮)
- ④ 大瀧神奈, 大井崇生, 谷口光隆 トウモロコシの葉肉細胞と維管束鞘細胞における塩ストレスに応答した遺伝子発現の比較. 日本作物学会第 245 回講演会, 2018 年 3 月 29~30 日 (宇都宮)
- ⑤ 山川早紀, 大井崇生, 谷口光隆 C<sub>4</sub> 植物葉肉葉緑体の凝集運動に伴う配置変化の三次元観察の試み. 第 8 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 2017 年 5 月 27 日~28 日 (大津)
- ⑥ 大井崇生, 榎本早希子, 中尾知代, 荒井重勇, 山根浩二, 谷口光隆 イネ葉肉細胞の三次元構造解析: 塩ストレスに伴う葉緑体の形態変化. 第 8 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 2017 年 5 月 27 日~28 日 (大津)
- ⑦ 大井崇生, 榎本早希子, 中尾知代, 荒井重勇, 山根浩二, 谷口光隆 イネ葉肉細胞葉緑体の塩ストレスに伴う形態変化の三次元解析. 日本作物学会第 243 回講演会, 2017 年 3 月 29~30 日 (東京)
- ⑧ 大井崇生, 榎本早希子, 中尾知代, 荒井重勇, 山根浩二, 谷口光隆 三次元再構築法を用いた塩ストレスに伴うイネ葉肉細胞の微細構造変化の観察. 日本作物学会第 242 回講演会, 2016 年 9 月 10~11 日 (大津)
- ⑨ 大井崇生, 榎本早希子, 中尾知代, 山根浩二, 荒井重勇, 谷口光隆 FIB-SEM による植物試料観察: イネ葉肉細胞の三次元微細構造解析. 日本顕微鏡学会第 72 回学術

講演会, 2016 年 6 月 14~16 日 (仙台)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shigen/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 光隆 (TANIGUCHI, Mitsutaka)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号: 40231419

### (2) 研究協力者

大井 崇生 (OI, Takao)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号: 60752219