

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18370022
 研究課題名（和文） 葉緑体局在性ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの機能解析
 研究課題名（英文） FUNCTIONAL ANALYSIS OF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE TARGETED TO THE CHLOROPLAST
 研究代表者
 徳富 光恵（宮尾光恵）（TOKUTOMI MITSUE）
 独立行政法人農業生物資源研究所・光環境応答研究ユニット・ユニット長
 研究者番号：70181980

研究成果の概要：イネ特有の代謝酵素である葉緑体局在性ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）は、無機窒素を有機物に取り込む際に必要な炭素化合物（有機酸）を作る働きをもつこと、イネはこの酵素が関与する独自の代謝経路をもち、この経路が水田のような湛水環境での無機窒素の利用に重要な役割を担うことが明らかにされた。葉緑体局在性 PEPC は、光合成で固定された炭素の代謝と無機窒素の取り込みという、生産性に関わるふたつの過程をつなぐ鍵酵素であり、本酵素の関与する代謝経路の全容を理解することによって、イネの生産性の決定要因が明らかにされるものと期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物生理・分子

キーワード：ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、葉緑体、有機酸、窒素同化、イネ

1. 研究開始当初の背景

- (1) PEPC は、ホスホエノールピルビン酸（PEP）と炭酸水素イオンからオキサロ酢酸（OAA）と無機リン酸を生成する反応を触媒する酵素で、すべての光合成生物、細菌、原生動物に広く存在する。これまでに知られている PEPC はすべて細胞質局在性であった。
- (2) イネゲノムデータベースの検索によりイネは葉緑体局在性 PEPC をコードする遺伝子をもつこと、この遺伝子のトランジット配列が葉緑体ターゲットシグナルとして機

能すること、および、イネ緑葉から単離した葉緑体が PEPC タンパク質をもつことを確認していた。

2. 研究の目的

- (1) イネにおける葉緑体型 PEPC 遺伝子の発現様式を明らかにする。
- (2) 葉緑体型 PEPC の酵素特性を明らかにする。
- (3) イネの代謝における葉緑体型 PEPC の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 日本型イネ (*Oryza sativa* L.; 品種, 日本晴) を材料として用いた。
- (2) RT-PCR 法で遺伝子発現の器官特異性を、プロモーター::GUS 解析により遺伝子発現の細胞/組織特異性を調べた。
- (3) 大腸菌内で発現させたリコンビナントタンパク質を用いて酵素特性を調べた。
- (4) RNAi 法で葉緑体型 PEPC の発現を抑制した形質転換イネを作製した。発現抑制イネと非形質転換イネとを比較することにより、葉緑体型 PEPC の機能を検討した。

4. 研究成果

イネは 6 種類の PEPC 遺伝子をもつ。そのうちひとつは細菌型酵素 (*Osppc-b*) を、他の 5 種類は植物型酵素 (*Osppc1, 2a, 2b, 3, 4*) をコードしている。葉緑体型 PEPC (*Osppc4*) の解析に当たっては、*Osppc4* 同様にイネ緑葉で高い発現を示す細胞質型 PEPC (*Osppc2a*) を対照として用いた。

(1) *Osppc4* の発現様式の解析

RT-PCR 法で *Osppc* 遺伝子の発現様式を調べた。*Osppc4* の発現はすべての器官 (葉身、葉鞘、根、穎花) で認められたが、葉身での発現がもっとも強かった。*Osppc2a* もすべての器官で発現したが、葉鞘でもっとも強い発現を示した。葉身での *Osppc2a* の発現は、窒素源である硝酸の添加あるいはリン酸欠乏で誘導されることがわかっている。*Osppc4* では、硝酸添加、リン酸欠乏による発現誘導は認められなかった。

プロモーター::GUS 解析の結果、*Osppc4* はすべての器官の緑色柔細胞で発現することがわかった。葉身と葉鞘では葉肉細胞でのみ発現し、維管束と気孔では発現は認められなかった (図 1)。また、子房の横細胞 (クロロフィルを含む緑色細胞) でも発現が認められた (図 1)。一方、*Osppc2a* は、葉身と葉鞘の葉肉細胞に加え、維管束柔細胞と気孔でも発現することがわかった。

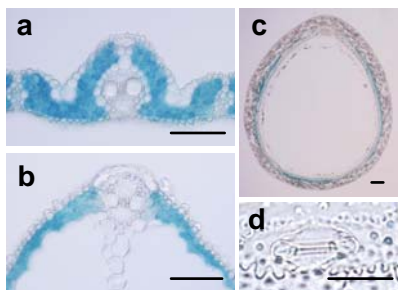


図 1. *Osppc4* プロモーター::GUS の発現 (a) 葉身横断面; (b) 葉鞘横断面; (c) 子房横断面; (d) 葉身表皮の気孔。スケールバー, 100 μm (a-c); 20 μm (d)。

RNAi 法で *Osppc4* あるいは *Osppc2a* の発現を抑制した形質転換イネ葉身の PEPC 活性を測定し、PEPC タンパク質含量を推定した。*Osppc4*、*Osppc2a* の発現を抑制すると、緑葉の全 PEPC 活性 (活性化剤グルコース 6-リン酸存在下で測定) がそれぞれ約 1/3、約 1/2 に低下することがわかり、*Osppc4*、*Osppc2a* 含量はそれぞれ全 PEPC タンパク質の約 1/3、約 1/2 であることがわかった。

Osppc4 は N 末端以外にもプロセッシング部位近傍にメチオニン残基をもつことから、オルタナティブ転写の可能性を検討した。5'RACE で転写開始点を調べたところ、転写は 1 箇所 (最初の ATG の 51 塩基上流) から始まることがわかり、オルタナティブ転写の可能性は否定された。

(2) *Osppc4* の酵素特性の解析

His タグをつけた *Osppc4* 成熟タンパク質と *Osppc2a* タンパク質の酵素特性を調べた (表 1)。*Osppc4* の最大活性 (V_{max}) は他の細胞質型酵素とほぼ同じだった。基質である PEP に対する親和性とアロステリック阻害剤であるリンゴ酸に対する感受性は、 C_3 型、根型酵素より低く、 C_4 型酵素と同程度だった。一方、阻害剤であるアスパラギン酸 (Asp) とグルタミン酸 (Glu) に対する感受性は既知の細胞質型酵素に比べかなり低いこと、活性化剤グルコース 6-リン酸に対する親和性も低いことがわかった。

表 1. リコンビナント PEPC タンパク質の酵素特性

Protein	V_{max} (unit mg^{-1})		K_m (PEP) (mM)		I_{50} (malate) at pH 7.3 (mM)	Inhibition / activation at pH 7.3 (fold)		
	pH 7.3	pH 8.0	pH 7.3	pH 8.0		Asp	Glu	Glu6P
<i>Osppc2a</i>	16.9	21.0	0.16	0.04	0.06	0.07	0.07	2.51
<i>Osppc4</i>	18.0	19.1	2.00	1.03	0.7	0.86	0.71	1.17
Maize root type	21.8	28.3	0.05	0.04	0.24	-----	-----	1.08
Maize C_4 type	18.2	23.0	1.48	0.59	0.82	-----	-----	2.44
<i>Flaveria C_3</i> type	-----	27	-----	0.06	0.08 ^a	-----	-----	-----
<i>Flaveria C_4</i> type	-----	29	-----	0.65	1.2 ^a	-----	-----	-----

^a Measured at pH 7.6.

(3) *Osppc4* の機能解析

Osppc4 の発現を抑制した形質転換イネと非形質転換イネを比較して、*Osppc4* の機能を検討した。

① 生育に対する発現抑制の効果

Osppc4 の発現を抑制すると、抑制の程度にもなつてイネの生育が阻害された。生育阻害の様相を詳細に調べるため、アンモニアあるいは硝酸を窒素源としてイネを水耕栽培し、成長解析を行った。

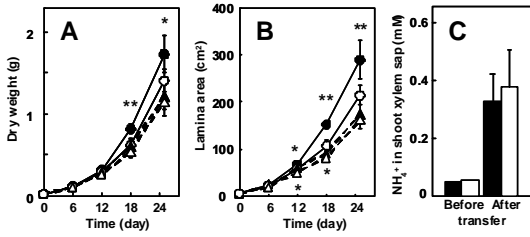


図 2. 成長と地上部導管液のアンモニア濃度 (A, B) 非形質転換イネと *Osppc4* 発現抑制イネ (4i-2) をアンモニア (●, ○) あるいは硝酸 (▲, △) を窒素源として水耕栽培した. 6-7 日おきに植物体をサンプリングし, 個体乾物重 (A) と総葉面積 (B) を測定した. (●, ▲) 非形質転換イネ; (○, △) 4i-2. (C) アンモニアで育成したイネを午前 11 時にアンモニアを含む新しい水耕液に移し, 光照射した. 光照射前 (Before) および光照射 6 時間後 (After) に地上部を切り取り, 切り株から滲出した導管液を採種し, アンモニアを定量した. (■) 非形質転換イネ; (□) 4i-2.

Osppc4 の発現を抑制すると, 硝酸での生育はあまり阻害されなかったが, アンモニアでの生育が顕著に阻害された (図 2A; 個体乾物重). この生育阻害の特徴は総葉面積の減少で, 個体乾物重より大きい減少率を示した (図 2B). 一方, 葉身の光合成速度と様々な光合成特性は, 発現抑制の影響をまったく受けなかった. また, クロロフィル含量と水溶性タンパク質含量も変化しなかったことから, *Osppc4* の発現抑制による生育阻害は, 葉身の光合成特性ではなく, 総葉面積の低下に起因することがわかった.

一般的に, 吸収された無機窒素の多くは光合成装置の構築に使われるため, 光合成器官である葉は高い窒素含量を示す. そこで, 発現抑制による生育阻害が窒素吸収あるいは窒素同化の抑制に起因する可能性を検討した. 個体全体の窒素吸収能 (個体の窒素含量の増加率) は発現抑制で低下したが, 根の窒素吸収/同化能 (地上部導管液のアンモニア濃度から推定; 図 2C) は影響を受けなかったことがわかった. これらの結果から, 発現抑制イネの生育阻害は地上部での窒素同化の抑制に起因することが明らかにされた.

②葉身メタボロームに対する発現抑制の効果
アンモニアで水耕栽培したイネ葉身のメタボロームを比較した. 発現抑制により, (i) シキミ酸経路に関連する二次代謝中間体が増加すること, (ii) 有機酸が減少すること, (iii) GS/GOGAT (グルタミン合成酵素/グルタミン酸合成酵素) サイクルの窒素同化に関与するグルタミン酸 (Glu) が減少し逆にグルタミン (Gln) が増加すること, (iv) 光呼吸の代謝中間体が増加することがわかった (図 3).

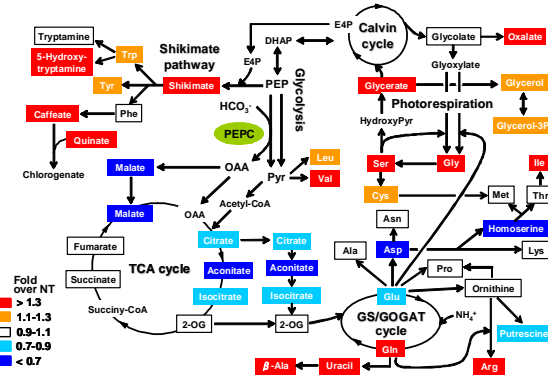


図 3. イネ葉身のメタボロームに対する *Osppc4* 発現抑制の効果

アンモニアで水耕栽培したイネの葉身を晴天日の正午に採取し, GC-TOF/MS によりメタボローム解析を行った. 枠内は同定, 定量できた代謝物. 色付けしたものは, 非形質転換イネ (NT) に比べ, *Osppc4* 発現抑制イネ 2 系統 (4i-2, 4i-10) での有意差 ($P < 0.05$) を示した代謝物. 植物細胞では, GS/GOGAT サイクルで使われる 2-オキソグルタル酸 (2-OG) は細胞質でクエン酸 (citrate) から合成される. Malate, リンゴ酸; aconitate, アコニット酸; isocitrate, イソクエン酸; fumarate, フマル酸; succinate, コハク酸.

二次代謝中間体の増加は, シキミ酸合成の前駆体であり PEPC の基質でもある PEP が減少したことを示している. 有機酸のうちリンゴ酸の減少がもっとも顕著で, リンゴ酸含量は約半分に低下した. これは PEPC の反応産物である OAA が減少したことを示している (葉緑体内で OAA は速やかにリンゴ酸に還元される). クエン酸, アコニット酸, イソクエン酸も減少したが, フマル酸とコハク酸の含量は変わらなかった. これらの結果は, リンゴ酸から 2-オキソグルタル酸 (2-OG) にいたる有機酸の流れが発現抑制で大きく低下したことを示している.

Gln, Glu はそれぞれ GOGAT の基質と産物であることから, 発現抑制で引き起こされた Gln の増加と Glu の減少は, GOGAT 反応が抑制されたことを示している. 2-OG が GOGAT のもうひとつの基質であることから, 2-OG の供給量の低下が反応抑制の主要因と考えられる. アミノ酸合成の初期産物であるアスパラギン酸 (Asp) も, 発現抑制により大きく減少した.

GS/GOGAT サイクルによる窒素同化とそれに引き続くアミノ酸合成には, 炭素骨格として有機酸が使われる. 本研究の結果は, 窒素同化とアミノ酸合成に使われる有機酸が葉緑体型 PEPC を経由して合成されること, 葉緑体型 PEPC の反応がこの有機酸合成系を律速すること示している. このことはまた, 解糖系に加え, イネは葉緑体型 PEPC を経由する独自の有機酸合成系をもつことを示唆している (図 4).

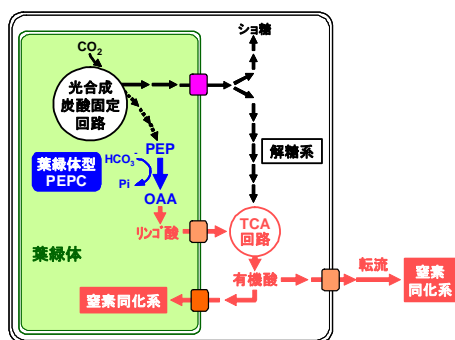


図 4. 葉緑体型 PEPC を経由するイネ独自の有機酸合成系

通常有機酸は、光合成産物から解糖系と TCA 回路を経て合成される。イネは葉緑体型 PEPC が関与する独自の有機酸合成系をもち、本経路が窒素同化のための主要な有機酸供給系として働いている。

(4) 他の植物の葉緑体型 PEPC 遺伝子の検索データベース検索では、日本型イネ(日本晴)以外ではトランジット配列をもつ PEPC 遺伝子は見つからなかった。そこで、イネ科植物の緑葉より全 RNA を抽出し、5'RACE 法でトランジット配列をもつ PEPC 遺伝子があるか調べた。オオムギとトウモロコシでは該当する PEPC 遺伝子は検出できなかったが、解析した 4 種類の *Oryza* 属植物すべて、すなわち、インド型イネ *Kasalath* (*O. sativa*; AA ゲノム) と 3 種類の野生イネ [*O. rufipogon* (AA), *O. eichingeri* (CC), *O. rhizomatis* (CC)] で、トランジット配列をもつ PEPC 遺伝子が得られた。これらの遺伝子は *Osppc4* と非常に高い相同性を示すことから、葉緑体型 PEPC をコードすると考えられる。また、葉身から葉緑体を単離しウェスタンブロットティング法で PEPC の有無を調べた実験で、水田雑草であるコナギが葉緑体型 PEPC をもつことがわかった。

土壌に投入された窒素肥料は、畑作環境では硝酸に、水田のような湛水環境ではアンモニアに変換される。葉緑体型 PEPC の存在が確認された植物はすべて、湛水環境で生育する植物である。このことは、葉緑体型 PEPC は主要窒素源がアンモニアである湛水環境に適応するための酵素であることを示唆している。

本研究の結果から、イネは湛水環境での生育に適した独自の有機酸合成系をもつこと、この経路が窒素同化のための主要な有機酸供給系として働くことが明らかにされた。現時点では、葉緑体型 PEPC の働きで合成された有機酸がどこの窒素同化系で使われるのか、具体的には、緑葉葉肉細胞の葉緑体内で使われるのか、あるいは、リンゴ酸として他の組織/器官(緑葉維管束あるいは根)に転流して使われるのかは未解決である(図 4 参照)。葉

緑体型 PEPC は窒素同化とアミノ酸合成の初期産物である Asp と Glu で阻害されにくいこと(表 1)から、有機酸は葉緑体に再び取り込まれて窒素同化に使われるものと考えている。

植物の生産性は、光合成による炭素同化能だけではなく、窒素同化能にも大きく依存する。無機窒素の供給量が植物の栄養状態ひいては生産性を決定するという考えがあるが、本研究の結果から、少なくともイネでは、炭素化合物である有機酸の合成量が窒素同化を制限することが明らかにされた。葉緑体型 PEPC は炭素同化と窒素同化をつなぐ鍵酵素と考えられ、本酵素の関与する代謝経路の全容を理解することによって、イネの生産性の決定要因が明らかにされるものと期待される。

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 5 件)

- ① Masumoto, C., Miyazawa, S., Ohkawa, H., Fukuda, T., Taniguchi, Y., Murayama, S., Saito, K., Kusano, M., Fukayama, H. and Miyao, M. Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 5226-5231 (2010) 査読有り
- ② Fukayama, H., Fukuda, T., Masumoto, C., Taniguchi, Y., Sakai, H., Cheng, W., Hasegawa, T. and Miyao, M. Gene expression profiling in leaves of rice grown under elevated CO₂. *Plant Sci.* 177: 203-210 (2009) 査読有り
- ③ Taniguchi, Y., Ohkawa, H., Masumoto, C., Fukuda, T., Tamai, T., Lee, K., Sudoh, S., Tsuchida, H., Sasaki, H., Fukayama, H. and Miyao, M. Overproduction of C₄ photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C₄-like photosynthetic pathway into rice. *J. Exp. Bot.* 59: 1799-1809 (2008) 査読有り
- ④ Fukayama, H., Tamai, T., Taniguchi, Y., Sullivan, S., Miyao, M. and Nimmo, H.G. Characterization and functional analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in rice. *Plant J.* 47: 258-268 (2006) 査読有り
- ⑤ Rao, S.K., Fukayama, H., Reiskind, J., Miyao, M. and Bowes, G. Identification of C₄ responsive genes in the facultative C₄ plant *Hydrilla verticillata*.

Photosynth. Res. 88: 173-183 (2006) 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

- ① 増本千都, 宮澤真一, 宮尾光恵. 窒素同化におけるイネ葉緑体型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の役割. 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 21 日, 熊本
- ② 宮澤真一, 増本千都, 宮尾光恵. イネ葉身のアンモニア同化における細胞質型と葉緑体型 PEPC の役割. 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 21 日, 熊本
- ③ 増本千都, 宮澤真一, 福田琢哉, 宮尾光恵. 葉緑体型 PEPC 発現抑制イネの生理解析. 日本作物学会第 228 回講演会, 2009 年 9 月 30 日, 静岡
- ④ Masumoto, C., Miyazawa, S., Fukuda, T. and Miyao, M. Chloroplastic phosphoenolpyruvate carboxylase of rice plays an important role in the nitrogen assimilation. *Plant Biology* 2009, 2009 年 7 月 18-22 日, ホノルル
- ⑤ 増本千都, 谷口洋二郎, 福田琢哉, 大河浩, 佐々木治人, 深山浩, 宮尾光恵. 4 種類の C₄ 光合成関連酵素を高発現する形質転換イネの生理解析. 日本作物学会第 226 回講演会, 2008 年 9 月 25 日, 神戸
- ⑥ Miyao, M. Metabolic consequences of transgenic rice overproducing four C₄ enzymes. 2008 Gordon Research Conference on "CO₂ Assimilation in Plants: Genome to Biome," 2008 年 8 月 21 日, ビデフォード(米国)
- ⑦ Masumoto, C., Ohkawa, H., Taniguchi, Y., Fukuda, T., Fukayama, H. and Miyao, M. Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) targeted to the chloroplast of rice. 2008 Gordon Research Conference on "CO₂ Assimilation in Plants: Genome to Biome," 2008 年 8 月 19 日, ビデフォード(米国)
- ⑧ 増本千都, 大河浩, 谷口洋二郎, 福田琢哉, 深山浩, 徳富(宮尾)光恵. イネ葉緑体型 PEPC の発現様式と機能の解析. 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 20 日, 札幌
- ⑨ Masumoto, C., Ohkawa, H., Taniguchi, Y., Fukuda, T., Fukayama, H. and Miyao, M. A novel phosphoenolpyruvate carboxylase targeted to the chloroplast of rice. 14th International Congress of Photosynthesis, 2007 年 7 月 23 日, グラスゴー
- ⑩ Miyao, M., Taniguchi, Y., Fukuda, T., Masumoto, C., Ohkawa, H., Fukayama,

H. and Sasaki, H. Introduction of C₄-like photosynthetic pathway into rice: possibilities and limitations. C₄ and CAM: from molecular diversity to ecological convergence, 2007 年 7 月 19 日, ケンブリッジ

- ⑩ 徳富(宮尾)光恵, 大河浩, 谷口洋二郎, 深山浩. ゲノムから見た炭素代謝関連遺伝子. 日本植物学会第 70 回大会, 2006 年 9 月 30 日, 熊本

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

- Faculty of 1000 Biology 選出 (計 1 件)
雑誌論文①, 2010 年 3 月 24 日
<http://f1000biology.com/article/id/2478959>
- プレスリリース (計 1 件)
窒素の有効利用のためのイネ独自のしくみを発見ーイネの生産性向上に期待ー, 2010 年 3 月 25 日
<http://www.nias.affrc.go.jp/press/20100325/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳富 光恵 (宮尾光恵)

(TOKUTOMI MITSUE)

独立行政法人農業生物資源研究所・

光環境応答研究ユニット・上級研究員

研究者番号: 70181980

(2) 研究分担者

深山 浩 (FUKAYAMA HIROSHI)

神戸大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号: 60373255

(平成 18~19 年度)

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

増本 千都 (MASUMOTO CHISATO)

独立行政法人農業生物資源研究所・

光環境応答研究ユニット・特別研究員

研究者番号: 60462561

宮澤 真一 (MIYAZAWA SHIN-ICHI)

独立行政法人農業生物資源研究所・

光環境応答研究ユニット・特別研究員

研究者番号: 10578438