

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440146

研究課題名(和文) 二酸化炭素透過性アクアポリンの生理機能および分子機構の研究

研究課題名(英文) Physiological and molecular study of CO₂ permeable aquaporins

研究代表者

且原 真木 (Katsuhara, Maki)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：00211847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カーボニックアンヒドラーゼ(CA)を細胞質に恒常的に発現させて、アクアポリンによって細胞質にCO₂が供給されるとCAによって重炭酸イオンと水素イオンが生成されることによって細胞質pHが変化して生育に影響がでるように構築した酵母スクリーニング系を用いて、イネ、オオムギ、シロイヌナズナのアクアポリン全69種を調べた。CO₂透過性を有するアクアポリンの候補として18分子種を選抜した。そのうちの1つOsTIP2;2は葉緑体包膜およびミトコンドリアに存在して細胞内でCO₂を葉緑体に供給する機能を持つ。

研究成果の概要(英文)：We established yeast screening system to identify CO₂ permeable aquaporins. Among 69 aquaporins from rice, barley and Arabidopsis, 18 aquaporins were identified as putative CO₂ permeable aquaporins. One of these aquaporins, OsTIP2;2 was detected around chloroplasts and some organelles (possible mitochondria), and seemed to have a function to supply CO₂ intracellularly to inner chloroplast.

研究分野：生物学

キーワード：アクアポリン 植物生理 二酸化炭素 膜輸送

1. 研究開始当初の背景

水の蒸散と CO₂ の植物体への取り込みは、組織レベルでは気孔によって制御されているが、分子レベルでは生体膜上で膜タンパク質アクアポリンによって水透過と CO₂ 透過が制御されていることを申請者らは報告した (Hanba, Katsuhara ら, PCP 45:521 (2004 他)。すなわち本来は水輸送体であるアクアポリンのうちの一部の分子種が CO₂ 透過性も持っていることが明らかになってきた。このようなアクアポリンによって、葉内/葉肉細胞での CO₂ の透過性 (葉肉コンダクタンス (gm)) が決まっているのではないかという実験データが 2000 年代初め頃から蓄積されつつあるが、その分子種の特定には至っていない。このため、まず CO₂ 透過性機能を有するアクアポリンを特定し、その CO₂ 透過性を定量化する必要がある。葉内コンダクタンスは気孔コンダクタンスと同程度かそれ以上に CO₂ の透過性を決定する重要な要因の一つであるので、CO₂ 透過性アクアポリンの機能を増強すれば、葉肉コンダクタンスの向上によって RubisCO へ供給される CO₂ の濃度が増加し、より効率的に CO₂ 固定が行われることで植物の光合成能が高まる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、申請者のグループを含めて世界のいくつかのグループが相次いで報告したこれら CO₂ 透過性アクアポリンの生理機能と分子機構の解明を目的とする。具体的には (1) CO₂ 透過性アクアポリンにおいて CO₂ 透過を実現している分子構造と制御機構を解明し、水透過機構との違いを明らかにする。また (2) CO₂ 透過性アクアポリンが個体レベルにおいて光合成機能やストレス応答を含めた生育特性にどのような役割を果たしているかを形質転換イネを作出/解析して検証する。

3. 研究の方法

(1) 既知の CO₂ 透過型アクアポリンによる形質転換体の作成
CO₂ 透過性を持つ可能性が示されたイネおよびオオムギの原形質膜 (PIP) 型アクアポリン遺伝子による形質転換イネの作出を過剰発現には恒常発現プロモーター (ユビキチンプロモーター等) または緑葉で高発現するプロモーター (Cab プロモーター、RubisCO アクチベースプロモーター等) な

どいくつかのプロモーターを用いた複数の発現パターンを検討する。作出した個体について遺伝子発現レベル・タンパク発現レベルの確認により系統の選抜を進める。

(2) 新規 CO₂ 透過性アクアポリン分子種の選抜

イネは 33 個のアクアポリン遺伝子を持つ。そのうちのいくつかについては CO₂ 透過性を調査済みであるが、まだ検証していないアクアポリン分子種について酵母スクリーニング法および新規開発したアフリカツメガル卵母細胞を用いた定量的測定系によって解析して、新規 CO₂ 透過性アクアポリンの同定を目指す。またシロイヌナズナのアクアポリン分子種 (30 遺伝子程度) についても同様なスクリーニングを行う。

(3) 葉内/葉肉細胞の CO₂ 透過性測定系の確立

CO₂ 透過性アクアポリンを導入/発現させた形質転換体系統を確立して形質を測定する。ガス交換法による光合成測定 (LI7000 (LI-COR) など) を用いて測定) と、レーザー分光によるオンライン安定同位体比測定装置を用いて、CO₂ の同位体分別を測定することで計測する葉内/葉肉細胞の CO₂ 透過性 (gm 値) 測定を行う。

4. 研究成果

(1) 既知の CO₂ 透過型アクアポリンによる形質転換体の作成
CO₂ 輸送性が報告されていた 3 つのアクアポリン分子種 (*OsPIP2;1*、*HvPIP1;1*、*HvPIP2;1*、*HvPIP2;3*) およびアミノ酸置換変異アクアポリン遺伝子 *HvPIP2:4M126I* について、それぞれの遺伝子を恒常発現プロモーターおよび緑葉で高発現する RubisCO アクチベースプロモーター等の制御下でイネに導入して複数の形質転換イネ系統の T2 世代までを得た。また本研究の成果 (2) で新たに CO₂ 輸送性が見出された *OsTIP2;2* について、この遺伝子およびこの遺伝子と蛍光タンパク質 sfGFP の遺伝子を融合させものをそれぞれ RubisCO アクチベースプロモーター制御下で過剰発現させた形質転換イネ (T0) を作出した。TIP アクアポリンは、その遺伝子配列から液胞膜に発現するとされているが、CO₂ 輸送の生理学的意味を明らかにするために細胞内での発現部位を融合遺伝子による形質転換体で観察した (図 1)。

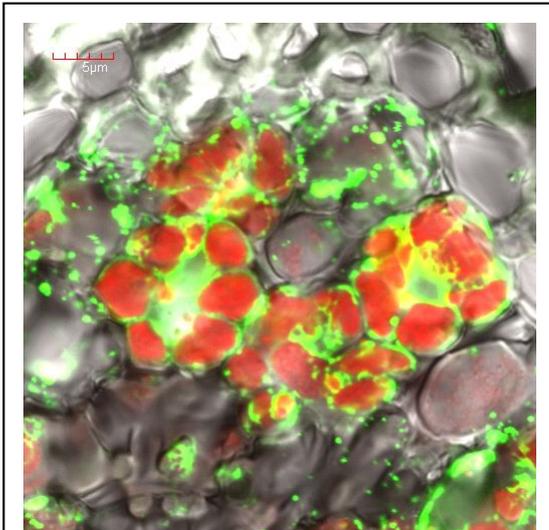


図1 OsTIP2;2-sfGFP 発現イネ葉の蛍光/明視野マージ画像 (赤: 葉緑体自家蛍光、緑: sfGFP 蛍光)

この結果、(A) OsTIP2;2 は葉緑体を取り囲む包膜および(B)細胞質の何らかのオルガネラにおいて発現していると考えられる。(B)については、ミトコンドリア膜または ER の 2 つの可能性について検討中である(図2も参照)。

(2)新規 CO₂ 透過性アクアポリン分子種の選抜

イネ、オオムギ、シロイヌナズナのアクアポリン全 69 分子種を酵母 (CA 株) を用いたスクリーニング系 CA 株で調査して、この方法で CO₂ 透過性を有するアクアポリン候補として以下の 18 分子種を選抜した。

イネ: OsTIP2;1、OsTIP2;2、OsTIP4;2、OsTIP5;1、OsNIP2;1、OsNIP3;2
 オオムギ: HvPIP2;5、HvTIP2;3、HvPIP1;2
 シロイヌナズナ: AtPIP1;2、AtPIP2;2、AtPIP2;3、AtPIP2;4、AtPIP2;7、AtTIP1;1、AtTIP2;1、AtTIP3;2、AtTIP4;1

オオムギの原形質膜型アクアポリン HvPIP2;5 の発現を間接蛍光抗体法で調べたところ、葉では表皮細胞、根組織では全体で発現していることが明らかになった。イネの OsTIP2;2 の細胞内局在については、前項で記載した通りである。

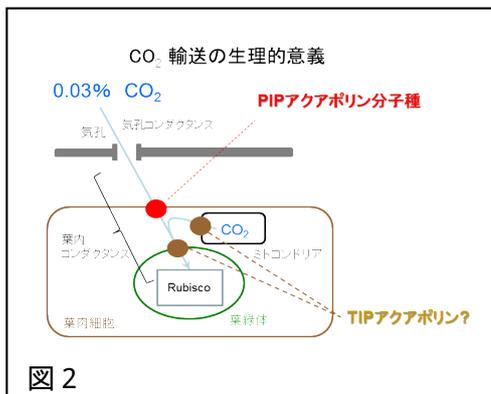


図2

CO₂ 透過性アクアポリンの生理的役割は図2のように、PIP 型は原形質膜において細胞外から細胞内への CO₂ 透過、TIP 型は細胞内において葉緑体への CO₂ 供給において機能していると考えられる。

(3) 葉内/葉肉細胞の CO₂ 透過性測定系の確立

CO₂ 透過性アクアポリンによる過剰発現イネについて gm と光合成活性測定を進めたが、測定装置が当初予定通りに改善できず、データ収集が間に合わなかった。

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 7 件)

Rhee J, Horie T, Sasano S, Nakahar Y, Katsuhara M. Identification of an H₂O₂ permeable PIP aquaporin in barley and a serine residue promoting H₂O₂ transport. *Physiologia Plantarum* 査読有 159: 120-128 (2017), doi: 10.1111/ppl.12508

Kaneko T, Horie T, Nakahara Y, Tsuji N., Shibasaka M., Katsuhara M. Dynamic Regulation of the Root Hydraulic Conductivity of Barley Plants in Response to Salinity/Osmotic Stress. *Plant Cell Physiology* 査読有 56: 875-882 (2015) doi:10.1093/pcp/pcv013

Mori, I.C., Rhee, J., Shibasaka, M., Sasano, S., Kaneko, K., Horie, T., Katsuhara, M. CO₂ transport by PIP2 aquaporins of barley. *Plant Cell Physiology* 査読有 55: 251-257 (2014) doi:10.1093/pcp/pcu003

[学会発表] (計 5 件)

内膜系におけるアクアポリンの輸送基質と機能 且原真木 第 19 回植物オルガネラワークショップ(鹿児島) 2017.3.15

出芽酵母を用いた CO₂ 輸送体スクリーニング法の開発 中原由揮、柴坂三根夫、且原真木 第 33 回イーストワークショップ (岡山)2015.11.13-14

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/MolecularPhysiology/aquaporin/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

且原 真木 (KATSUHARA, Maki)
岡山大学・資源植物科学研究所・教授
研究者番号:00211847

(2)研究分担者

谷口 洋二郎 (TANIGUCHI, Yojiro)
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合
研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究
員
研究者番号:50462560

児玉 直美 (KODAMA, Naomi)
独立行政法人農業環境技術研究所・任期付き
研究員
研究者番号:60594611

米村 正一郎 (YONEMURA, Sei-ichiro)
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合
研究機構・農業環境変動研究センター・主席研
究員
研究者番号:20354128

(3)連携研究者

森 泉 (MORI, Izumni)
岡山大学・資源植物科学研究所・准教授
研究者番号: 40379805

(4)研究協力者

該当なし