

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770034
 研究課題名 (和文) C4 植物に特化した CP12L を介した光量依存的カルビン回路活性調節機構の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of the CP12L function as a new Calvin Cycle regulatory factor, functioning in C4 plants
 研究代表者
 古本 強 (FURUMOTO TSUYOSHI)
 広島大学・大学院理学研究科・准教授
 研究者番号：30313208

研究成果の概要：

C4 植物特有の明期における光律速光合成特性に必要な新しいカルビン回路制御に、新規に単離した CP12L を介した NADP 依存的な GAPDH・PRK 複合体形成が関与している可能性が考えられ、その検証を行った。In vitro 複合体再構成に成功し、これらの 3 つの因子が複合体形成をなしえることを証明し、さらに暗処理した葉の抽出液中においても同様の複合体の存在を認めた。これは in vivo においてもこれらの複合体が行われておることを強く示唆するデータである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：環境応答

1. 研究開始当初の背景

近年 C3 植物において、CP12 と呼ばれる小さな葉緑体局在タンパク質による、代謝酵素超高分子複合体形成とこれによるカルビンサイクルの代謝制御機構が盛んに論じられ、従来の個々の代謝酵素の活性調節という概念に加えて異なる酵素が巨大複合体を形成することでダイナミックに代謝が調節されるというまったく新しい考えが受け入れられつつある。我々は、C4 代謝酵素の制御機構に関わる新規因子を探索する目的で、キク科フラベリア属の C3 植物種/C4 植物種を用いたディファレンシャルスクリーニングを行い、C4 植物に高発現しオルガネラ局在性を推定させる新規タンパク質をコードする遺伝子を多数見出した。その中に CP12 と高いホモロジーを有

する新規遺伝子 (CP12L) を見出した。フラベリアの CP12 そのものとの発現比較解析から、CP12L が CP12 とは異なる発現を示し、C4 光合成と強く関連して発現していることを明らかにした。

2. 研究の目的

この CP12L を介した新奇複合体形成が、どのような複合体構成をとまって、代謝制御を行っているかを知るためには、複合体構成要素を同定する必要がある。In vitro 複合体再構成により、構成因子を単離し、その要素がなにものかを同定することを目的とした。ついで、どのような生化学的条件下でこの複合体が形成されるのかを調査し、生化学的特徴づけを行うことを目的とした。これらの実験結果を検討することにより、実

際に生理的に寄与しうるものかどうかを考察することにした。

3. 研究の方法

(1) 発現組織を解析することは、結合相手を知る上でとても大きな情報となる。そこで、組織免疫法による、組織局在および細胞内局在性を検討した。用いた抗体は、CP12L に特異的なペプチド領域を抗原にしたペプチド抗体である。

(2) 組換え体タンパク質を pET システムにより作出し、発現系の構築をおこなった。

(3) In vitro 複合体再構成法による結合因子の探索と、葉抽出液中における複合体形成の様子を抗原抗体法および、銀染色法により、可視化した。実験手順については図 1 に模式化して示す。

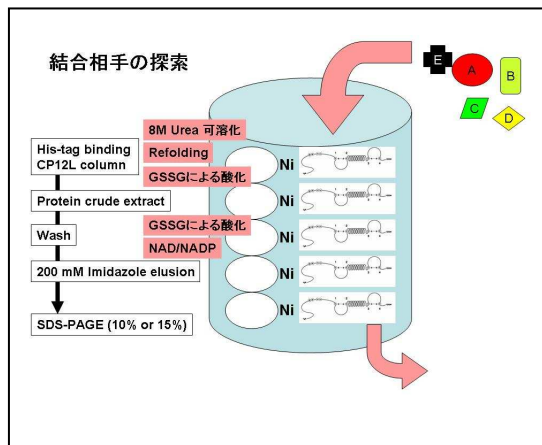


図1 in vitro 複合体形成実験の模式図

4. 研究成果

(1) 組織免疫法による組織局在および細胞内局在

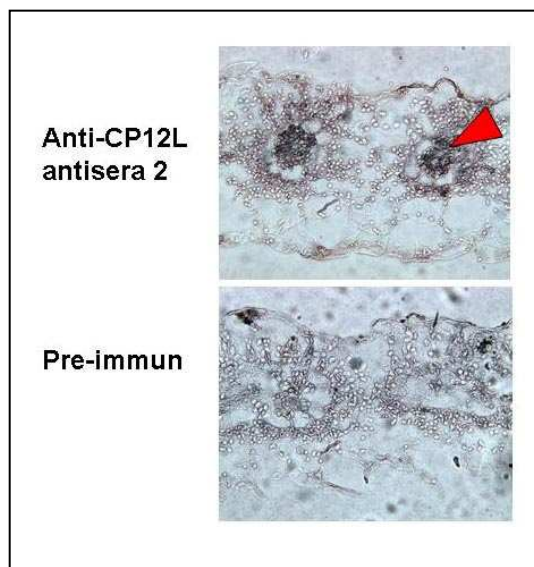


図2 CP12L の局在

図2に示したとおり、CP12L ペプチド抗体と交叉性を示すタンパク質は、維管束鞘細胞の葉緑体に存在した。これは、CP12L タンパク質のみならず、その結合相手が、この部位に存在することを示している。

(2) 組換え体タンパク質の調製

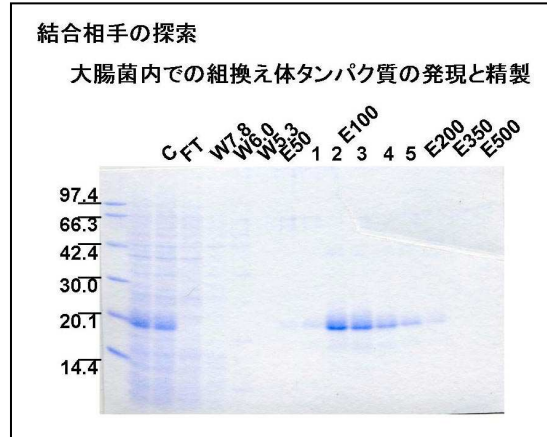


図3 組換え体タンパク質の発現と精製

図3に示すように、pET システムにより、CP12L を高発現させることに成功した。発現させた CP12L タンパク質は、ニッケルキレートカラムによるアフィニティー精製を行い、100mM イミダゾール溶出画分として精製した。これを濃縮し、つぎの複合体再構成実験に用いた。

(3) In vitro 複合体再構成法による結合因子の探索とその条件検討

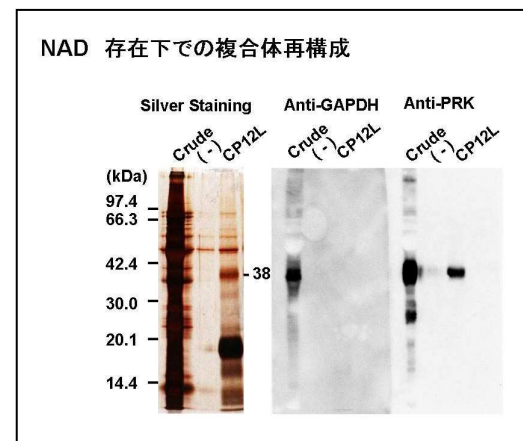


図4 in vitro 複合体再構成実験(1)

すでに既知の CP12 の場合、PRK と GAPDH との複合体形成には、補因子として NAD を要求する。NAD と類似の化合物である NADP はこの複合体構成を破壊することが知られている。そこでまずは、NAD 存在下での複合体再構成実験を行った。左側パネルは銀染色像を示している。明瞭

な結合タンパク質は、38kDaあたりに検出された。このタンパク質がなにか検討するために、CP12 において既知の複合体構成因子である GAPDH および PRK のそれぞれの抗体の交叉性を調査した。右側 2 枚のパネルに示したとおり、PRK がその結合タンパク質であった。これはそのサイズから考えられる位置と矛盾しない。

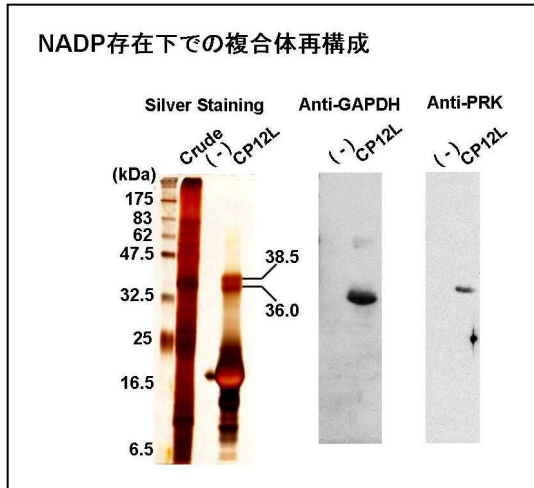


図5 in vitro 複合体再構成実験(2)

ところで、C4 光合成において NADP はよい光合成速度の指標となる。これは、この物質の生産の有無がすなわち光合成電子伝達系の速度を反映しているからである。そこで、NADP の存在下においても同様の実験を行った。その結果、意図しなかったことに、銀染色において明瞭に 2 本のバンドが認められ、さらにそれらは GAPDH と PRK そのものであることが、示された。これは、CP12 が NADP 依存的に PRK および GAPDH との間で複合体形成を行っていることを示すものである。これまでに知られていた CP12 とは補因子を異にしており、CP12 とは異なり NADP を補因子とすることを見出した。

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 3 件)

1. Endo T, Mihara Y, Furumoto T, Matsumura H, Kai Y, Izui K. "Maize C4-form phosphoenolpyruvate carboxylase engineered to be functional in C3 plants: mutations for diminished sensitivity to feedback inhibitors and for increased

substrate affinity." *Journal Exp. Bot.* 59, 1811-1818 (2008) 査読有

2. Tazoe Y, Hanba Y-T, Furumoto T, Izui K, Noguchi K, Terashima I. "Light response of C4 photosynthesis in *Amaranthus cruentus*: The relationship between CO2 leakiness and in vivo activities of C4 photosynthetic enzymes" *Plant Cell Physiol.* 49, 19-29 (2008) 査読有
3. Furumoto T, Izui K, Quinn V, Furbank RT, von Caemmerer S. "Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase is not essential for high photosynthetic rates in the C4 species *Flaveria bidentis*" *Plant Physiol.* 144, 1936-1945 (2007) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Furumoto T, Yamaguchi T, Ichie Y, Takahashi Y, Izui K. "Identification of a plastid pyruvate transporter" International Symposium "The Ins and Outs of Chloroplasts" Icho-Kaikan, Osaka University October 14th-15th, 2008
2. Furumoto T, Yamaguchi T, Ichie Y, Takahashi Y, Izui K. "Identification of a plastid Na⁺ dependent pyruvate transporter in plants" C4 and CAM satellite meeting of the 14th International Congress of photosynthesis, Cambridge, UK (17-20, July 2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：葉緑体ピルビン酸輸送体タンパク質およびそれをコードする遺伝子

発明者：古本 強

権利者：同上

種類：遺伝子特許

番号：特願 2007-185699

出願年月日：2007 年 7 月 19 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古本 強 (FURUMOTO TSUYOSHI)
広島大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：30313208

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者