

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03006

研究課題名(和文) 針葉樹の炭素固定量予測モデルの精緻化に向けた光呼吸代謝の解明

研究課題名(英文) Analyses of photorespiratory mechanisms of conifer leaves for improving the current biochemical-based photosynthesis model

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の光呼吸代謝は光合成の代謝の一部であり、植物のCO<sub>2</sub>吸収量に直接的な影響を与える重要な代謝である。一方で、樹木は裸子植物である針葉樹と被子植物である広葉樹など、進化的背景が大きく異なる植物群から構成されているにも関わらず、これまで同一の光呼吸代謝をもつと仮定され研究が進められてきた。本研究は、遺伝子データベース解析や炭素安定同位体を用いた代謝物のラベリング解析などによって、これまで同一とされてきた針葉樹と広葉樹の光呼吸代謝の違いを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球温暖化などによる地球環境の変化によって、樹木を含めた植物のCO<sub>2</sub>の吸収量が、どのような影響を受けるのかを定量的に予測することは重要である。このような植物のCO<sub>2</sub>の吸収量の変化は、光合成の生化学をベースにした数式モデル(光合成モデル)によって予測されている。しかしながら、現在の光合成モデルは、草本植物など被子植物の光合成の代謝をもとにしている。本研究によって、裸子植物である針葉樹の光合成の代謝が明らかになったことで光合成モデルの改良が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Photorespiration is a crucial metabolism associated with photosynthesis. However, it is currently assumed that conifer gymnosperms have an identical photorespiratory mechanisms to broad-leaf angiosperms, although two taxonomical groups have a different evolutionary background. In this research project, we revealed that conifers had different photorespiratory mechanisms from angiosperms through the analyses on the gene databases derived from various plant species as well as those on the differences in stable carbon isotope-labeled patterns of the leaf photorespiratory metabolites between conifers and angiosperms.

研究分野：植物生理生態学

キーワード：光呼吸 光合成 針葉樹 裸子植物 被子植物 カタラーゼ 細胞内局在性 過酸化水素

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

地球環境の変化が森林の  $\text{CO}_2$  固定量に与える影響は、生化学的な数理モデル(ファーカーモデル)で予測される。このモデルは被子植物の光合成経路をもとに作られ、経路を構成する代謝反応の中でも、アンモニア( $\text{NH}_3$ )を発生・同化する“光呼吸”が重要である。光呼吸は  $\text{CO}_2$  固定酵素であるルビスコが酸素と反応することで開始され、 $\text{NH}_3$  以外に  $\text{CO}_2$  も発生するためである。申請者の研究により、針葉樹の葉には光呼吸に必須とされる  $\text{NH}_3$  同化酵素の1種、葉緑体型グルタミン合成酵素が欠如していること、さらに、針葉樹は被子植物に比べ、葉の  $\text{NH}_3$  同化効率が低いことがわかってきた。また、針葉樹のルビスコの酵素学的性質に関する情報は乏しい。このように、本モデルを針葉樹に適用することに疑問が生じてきている。安定同位体を用いた代謝物動態解析や遺伝子組換えスギの作製と解析、ルビスコの酵素学的解析により、針葉樹の光呼吸の仕組みを解明し、 $\text{CO}_2$  固定量の予測精度の向上に貢献する。

## 2. 研究の目的

本研究は針葉樹の光呼吸経路の詳細と、針葉樹のルビスコの酵素学的性質を明らかにすることが目的である。これにより、被子植物の代謝経路がベースである生化学的な数理モデル(ファーカーモデル)を見直し、森林の  $\text{CO}_2$  固定量の予測精度の向上に貢献する。

## 3. 研究の方法

### (1) 針葉樹の光呼吸経路の解析

#### (1)-1 針葉樹と広葉樹の葉における光呼吸代謝物の比較解析

##### 材料

森林総合研究所樹木園に生育する広葉樹(被子植物)14種および、針葉樹(裸子植物)13種を用いた。2019年および2020年8月の晴天日に、これらの樹木の当年生シュートの葉を採取し、採取した葉は液体窒素を充填したデュワー瓶に浸し凍結した。採取した葉は実験室に持ち帰り、液体窒素によって乳鉢で磨砕して粉末状にし、 $-80$  の冷凍庫中に保存した。

##### 方法

粉末状にした葉を2mLチューブ中に採取秤量し、液体窒素で凍結したまま、ビーズクラッシャーを用いて粉砕した。粉砕後、メタノール:クロロホルム混液1mLをチューブに添加した。メタノール:クロロホルム混液を添加したチューブは、60分間、4の低温室内で暗黒の下、マイクロチューブ振とう器(MT-360; TOMY SEIKO)を用いて振とうさせることで葉に含まれる代謝物を抽出した。被子植物で明らかになった既知の光呼吸経路にかかわる代謝物9種類(グリコール酸、グリオキシル酸、グリセリン酸、2-オキソグルタル酸、セリン、グリシン、グルタミン酸、グルタミン、アンモニウムイオン)について、ガスクロマトグラフ型質量分析装置(7890B/5977A; Agilent) 高速液体クロマトグラフ(Agilent 1100; Agilent) 分光光度計(UV-1900; Shimadzu)、プレートリーダー(Varioscan LUX; Thermo Fisher Scientific)を用いて定量した。また、粉末状にした葉の一部は秤量し、葉に含まれるクロロフィル含量を分光光度計によって分析した。

#### (1)-2 炭素安定同位体( $^{13}\text{C}$ )標識セリン( $^{13}\text{C}$ -セリン)を用いた光呼吸代謝物の動態解析

##### 材料

人工気象器、もしくはガラス温室で育成したスギ(*Cryptomeria japonica*)およびポプラ(*Populus nigra*)の苗木を用いた。前日の夕方に実験室に苗木を移動させ、シュートをアルミホイルで包み、葉に光があたらないようにした。処理を開始する際は、アルミホイルで包んだシュートを植物体からハサミで切り離し蒸留水を入れた50mLファルコンチューブに挿した後、水切りをした。

##### 方法

水切りをしたシュートはアルミホイルを取り除き、人工気象器に入れ、光合成有効放射  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温  $25^\circ\text{C}$ のもとで30分間蒸留水を吸わせた。その後、炭素安定同位体( $^{13}\text{C}$ )標識セリン( $^{13}\text{C}$ -セリン; Millipore Sigma)を最終濃度が1.6mMもしくは3.2mMになるようにファルコンチューブに添加し、20分間または50分間、枝の切り口から $^{13}\text{C}$ -セリンを葉に与える処理を行った。処理を施した葉は液体窒素を用いて凍結採取し、ガスクロマトグラフ型質量分析装置によって $^{13}\text{C}$ で標識された光呼吸代謝物を検出した。

#### (1)-3 遺伝子データベースを用いたグリコール酸オキシダーゼおよび、カタラーゼの細胞内

## 局在解析

### 材料

公開されている遺伝子データベースをもとに被子植物 18 種類および、針葉樹 9 種類についてグリコール酸オキシターゼおよび、カタラーゼをコードする塩基配列をそれぞれ抽出し、カルボキシ末端に存在する細胞内での局在を制御するアミノ酸配列について解析を行った。

## (2) 針葉樹のルビスコの特性解析

### 材料

次の植物の葉を凍結採取した。被子植物である草本植物 9 種 (イネ、クロッカス、セイヨウタンポポ、シロツメクサ、ワスレナグサ、イカリソウ、シャガ、アブラナ、スズラン) および、針葉樹 8 種 (ヒノキ、モミ、ドイツトウヒ、ヒマラヤスギ、スギ、ブンゲンストウヒ、リキダマツ、ラクウショウ)。

### 方法

採取した葉を抽出バッファーによって磨砕後、ルビスコを抽出し、分光光度計によってルビスコの最大 CO<sub>2</sub> 固定速度を計測した。

## 4. 研究成果

### (1) 針葉樹の光呼吸経路の解析

葉に含まれる光呼吸にかかわる代謝物の含量を広葉樹と針葉樹で比較したところ、両者に大きな違いが見られた。その結果、グリコール酸、グリオキシル酸、グルタミン、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の含量は、広葉樹に比べて針葉樹の方が約 2 倍高かった (図 1)。これに対し、針葉樹のグリセリン酸や 2-オキシグルタル酸の含量は広葉樹の約 10 分の 1 程度しか含まれていなかった。一方、グリシンやセリン、グルタミン酸の含量については、針葉樹と広葉樹とで大きな違いは見られなかった。

次に、針葉樹の葉のグリセリン酸含量が顕著に低いことに着目し、その原因を調べることにした。一般的に、光呼吸経路ではグリセリン酸はセリンからヒドロキシピルビン酸を経て合成される。そこで、スギ (針葉樹) とポプラ (広葉樹) の切り枝を材料に、葉に光を照射して光合成を行わせながら、炭素安定同位体 (<sup>13</sup>C) で標識されたセリン溶液 (<sup>13</sup>C-セリン) を切り枝の茎断面から吸わせる処理を行った。一定時間処理した後、葉を液体窒素によって凍結採取し、<sup>13</sup>C で標識された光呼吸代謝物を検出した。その結果、ポプラではグリセリン酸とグリシンが <sup>13</sup>C によって顕著に標識されていたのに対し、スギではグリセリン酸とグリシンに加え、グリコール酸も顕著に標識されていた (図 2)。

グリコール酸は、セリンからグリセリン酸を合成する際の中間代謝産物であるヒドロキシピルビン酸が過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) によって脱炭酸されることで生じる。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は植物にとって有害となる活性酸素の 1 種であり、光呼吸経路でも大量に発生する。これは、細胞内小器官のひとつであるペルオキシソームに局在するグリコール酸オキシダーゼ (GLO) という酵素が、グリコール酸からグリオキシル酸を合成する際に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を発生するためである。一方で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は同じくペルオキシソームに局在するカタラーゼ (CAT) によってすぐさま消去されるといわれている。イネを用いた最近の研究によって、GLO と CAT はペルオキシソーム内で結合し、これによって H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が効率的に消去されるという報告がなされている ( )。

遺伝子データベースを使用して針葉樹を含めた様々な植物の GLO や CAT の塩基配列情報を抽出し、これらの酵素のカルボキシ末端に存在するペルオキシソームの局在性を制御するアミノ酸配列を調べた。その結果、針葉樹の CAT はペルオキシソームの局在性を左右するアミノ酸配列の一部に変異が生じており、ミトコンドリアなどペルオキシソーム以外の細胞内小器官に局在する可能性が示された。GLO についても同様にペルオキシソームの局在性を制御するアミノ酸配列を調べたが、被子植物と針葉樹の間で大きな違いは見られなかった。以上の結果から、針葉樹は

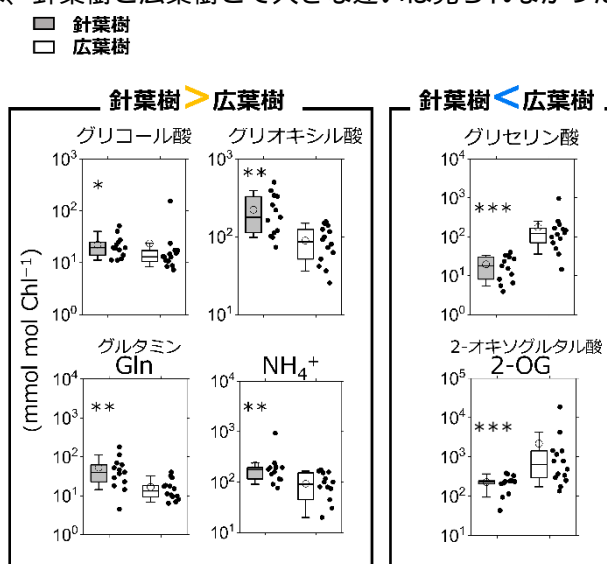


図 1 : 針葉樹と広葉樹の葉に含まれる光呼吸代謝物の含量の比較。代謝物の含量は葉のクロロフィル (Chl) 含量あたりで示す。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の働きによってセリンを脱炭酸し、グリコール酸を合成する新奇の光呼吸経路を有することが明らかとなった。さらに、このような新奇経路には CAT の細胞内局在性が関与することが示唆された。

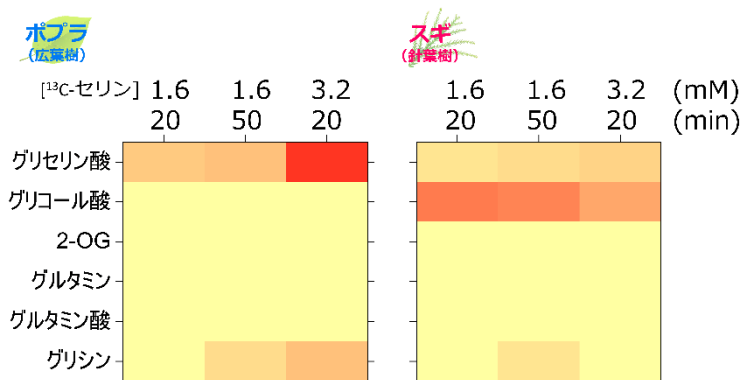


図 2 : 炭素安定同位体 (<sup>13</sup>C) で標識された光呼吸代謝物 . 赤色が濃いほど、より強く標識されたことを表す . 2-OG, 2-オキソグルタル酸 .

## (2) 針葉樹のルビスコの特性解析

様々な植物の葉からルビスコを抽出し、最大 CO<sub>2</sub> 固定速度を調べた。その結果、針葉樹のルビスコは被子植物のルビスコと比べ、最大 CO<sub>2</sub> 固定速度が高い傾向があることが明らかとなった。一般的に、最大 CO<sub>2</sub> 固定速度が高いルビスコは CO<sub>2</sub> に対する親和性 (CO<sub>2</sub> 親和性) が低いことが知られている。実際、先行研究においても針葉樹の 1 種であるメタセコイアやアロウカリアの葉から抽出したルビスコの結果についても同様の報告がなされている ( 、 )。本研究によって明らかになったセリンを脱炭酸する針葉樹の光呼吸経路は、このような CO<sub>2</sub> 親和性の低いルビスコに CO<sub>2</sub> を供給する役割があるのかも知れない。

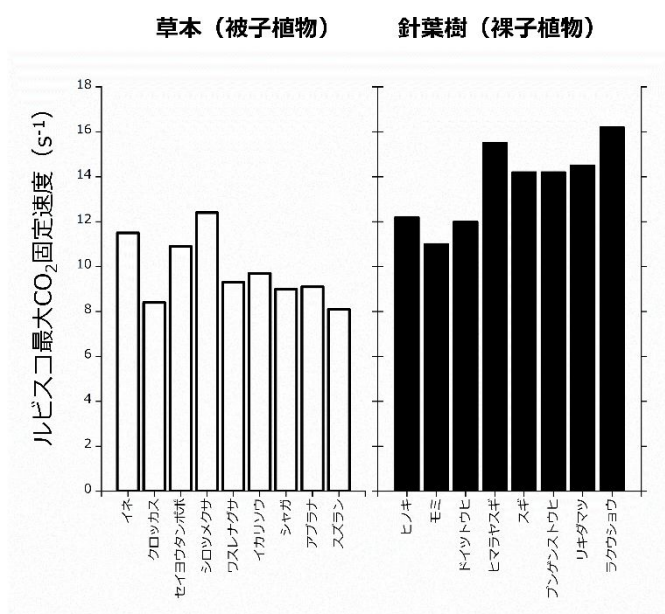


図 3 : 様々な植物の葉から抽出したルビスコの最大 CO<sub>2</sub> 固定速度の比較 .

## < 引用文献 >

- Zhang, Z., Xu, Y., Xie, Z., Li, X., He, Z.-H. & Peng, X.-X. (2016) Association-dissociation of glycolate oxidase with catalase in rice: a potential switch to modulate intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels. *Molecular Plant*, 9, 737–748.
- Galmés, J., Kapralov, M.V., Andralojc, P.J., Conesa, M.À., Keys, A.J., Parry, M.A.J. et al. (2014) Expanding knowledge of the Rubisco kinetics variability in plant species: environmental and evolutionary trends. *Plant, Cell & Environment*, 37, 1989–2001.
- Rivera, B.K. Sáez, P.L., Cavieres, L.A., Capó-Bauçà, S., Iñiguez, C., von Stowasser, E.S. et al. (2022) Anatomical and biochemical evolutionary ancient traits of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch and their effects on carbon assimilation. *Tree Physiology*, 42, 1957–1974.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyazawa Shin-Ichi、Tobita Hiroyuki、Ujino-Ihara Tokuko、Suzuki Yuji	4. 巻 133
2. 論文標題 Oxygen response of leaf CO2 compensation points used to determine Rubisco specificity factors of gymnosperm species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 205～215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-020-01169-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊原 徳子、飛田 博順、宮澤 真一	4. 巻 21
2. 論文標題 異なる二酸化炭素濃度で短時間処理したスギ針葉のトランスクリプトーム比較	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 森林総合研究所研究報告	6. 最初と最後の頁 207～216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20756/ffpri.21.3_207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮澤真一、深山貴文、田原恒、鈴木雄二、西口満
2. 発表標題 針葉樹は広葉樹とは異なる光呼吸代謝をもつ
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮澤真一、深山貴文、田原恒、鈴木雄二、西口満
2. 発表標題 代謝物解析による針葉樹の光呼吸経路の探索
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤口尚生、影山創大、宮澤真一、牧野周、鈴木雄二
2. 発表標題 6種の針葉樹におけるRubisco比活性の評価
3. 学会等名 日本土壌肥料学会東北支部講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyazawa Shin-Ichi、Miyama Takafumi、Tahara Ko、Ujino-Ihara Tokuko、Tobita Hiroyuki、Suzuki Yuji、Nishiguchi Mitsuru
2. 発表標題 Conifer photorespiration involves a substantial non-enzymatic decarboxylation reaction due to an imbalance between catalase and glycolate oxidase activities in the peroxisomes.
3. 学会等名 ISPR 2022 CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮澤真一	4. 発行年 2021年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 694
3. 書名 森林学の百科事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大宮 泰徳 (Ohmiya Yasunori)  (70360469)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等  (82105)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鈴木 雄二  (Suzuki Yuji)  (80374974)	岩手大学・農学部・准教授    (11201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関