

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770048

研究課題名（和文） プラスチド局在ピルビン酸輸送装置の分子実体の同定と生理解析

研究課題名（英文） Characterization of the plastidial pyruvate transporting mechanism

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（和文）：

細胞内のオルガネラ(ミトコンドリアやプラスチド)にはその内部での代謝に必要なピルビン酸輸送体の存在が示唆されているが、その分子実体は不明のままである。申請者は、C4植物においてプラスチドでのピルビン酸輸送活性が強化されているという既知の知見に基づき、C3植物種とC4植物種との間でのトランスクリプトーム解析によって、候補となる遺伝子 BASS2 と NHD1 を単離し、その生化学的活性を求めた。

研究成果の概要（英文）：

Pyruvate is an essential metabolite for multiple plastid-localized metabolic pathways of plants, including the C₄ photosynthetic CO₂-concentrating mechanism. Despite the crucial role of pyruvate import into plastids, the molecule mediating pyruvate transport is still unknown. Using differential transcriptome analyses of the C₃ and C₄ plants of the genus *Flaveria*, we have identified a novel plastid-localized transporter gene, named *BASS2*, for *bile acid:sodium symporter family protein 2*, the transcript of which is abundant in C₄ plants that have the sodium-dependent pyruvate transporter. Recombinant BASS2 shows sodium-dependent pyruvate uptake activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：C4光合成、フラベリア

1. 研究開始当初の背景

オルガネラに局在するピルビン酸輸送体は、例えばミトコンドリアであればトリカルボン酸回路への基質供給という糖代謝エネルギーへの炭素骨格の供給という極めて普遍的な機能を担っている。また植物のプラスチドでは、ピルビン酸が脂質代謝や分岐鎖ア

ミノ酸合成またイソプレノイド合成の初発物質となることが知られているが、その供給を支えるピルビン酸輸送機構については、分子レベルでは全く理解されていなかった。

2. 研究の目的

プラスチド局在のピルビン酸輸送機構を

分子レベルで理解するために、当該タンパク質をコードする遺伝子を同定することを目的とした。また、これを明らかにすることで、その分子がどのようにピルビン酸を輸送するのか、その輸送機構についても迫りたいと考えた。

3. 研究の方法

プラスチドのピルビン酸輸送機能は、C4植物という通常の植物から進化した高効率の光合成が行える植物において、高くなっていることが報告されている。C3植物とC4植物間での示差的遺伝子発現解析法によって、C4植物に多く発現する遺伝子を網羅的に解析し、中でも葉緑体への局在を示唆するものを探索した。植物材料としては、同属内にC3種とC4種を含むフラベリアという植物を用いた。

一連の遺伝子発現解析により、期待通りの光合成に即した発現を示す新規遺伝子を確認し、次に合成ペプチドに対する抗体を用いたタンパク質レベルでの研究を行った。この両者から期待通りの結果を得たので、大腸菌発現系によりその生化学的機能を解析した。

4. 研究成果

候補遺伝子として BASS2 と NHD1 の二つの遺伝子を単離した。NHD1 はプロトンとナトリウムの交換輸送機能を持つと推察されたが、一方で BASS2 の機能は未知であったので、これに着目した。抗体組織染色法により葉肉細胞葉緑体への局在を明示した(図1)。

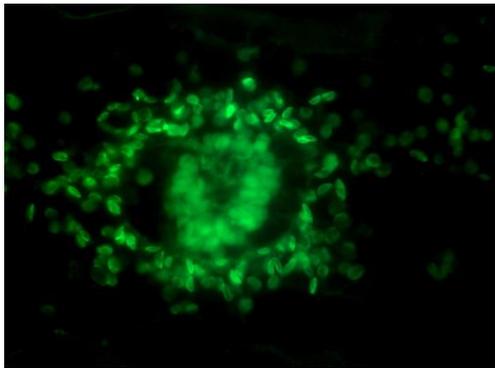


図1 蛍光抗体法による組織染色

交叉タンパク質の存在植物の範囲から、これがナトリウム依存性ピルビン酸輸送体である可能性が高まった(図2)ので、大腸菌での発現系を構築し、その生化学的輸送機能を確認した(図3)。

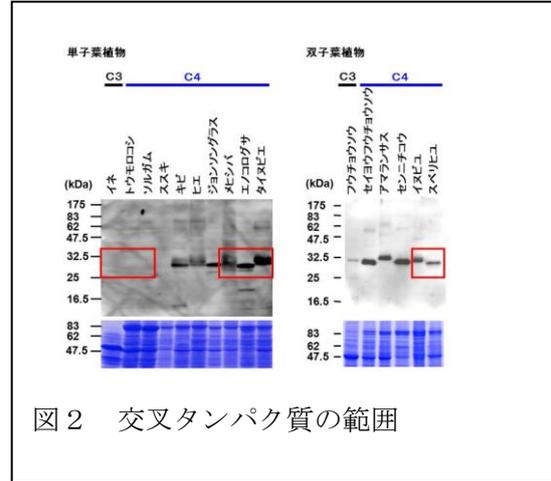


図2 交叉タンパク質の範囲

ナトリウム依存性ピルビン酸輸送活性を示すことが知られている植物に普遍的に存在した。

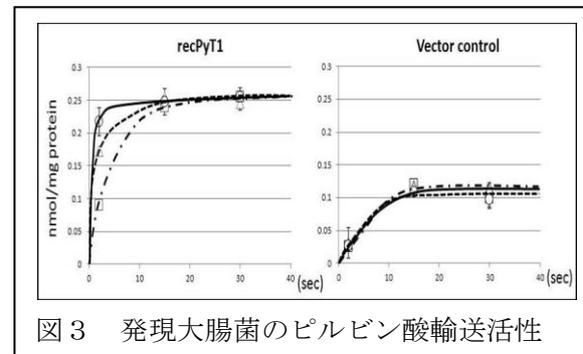


図3 発現大腸菌のピルビン酸輸送活性

期待通り、ナトリウム依存性の輸送機能を持つことを明らかにしたほか、NHD1 と共発現させることで、大腸菌膜を挟んで形成させたプロトン濃度勾配によってナトリウムをカップルさせたピルビン酸プロトンの共輸送系が形成されうること示した(図4)。

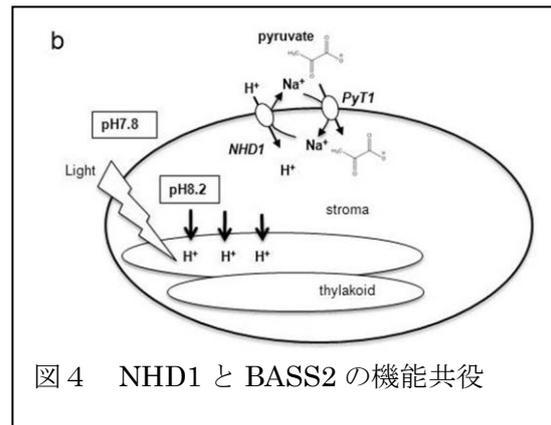


図4 NHD1 と BASS2 の機能共役

また、シロイヌナズナの遺伝子発現解析を行い、生育の初期において発現することを明らかにした(図5)。ついで、遺伝子破壊株において輸送機能が失われることを明らか

にした。



図5 プロモーター-GUS活性による発現解析

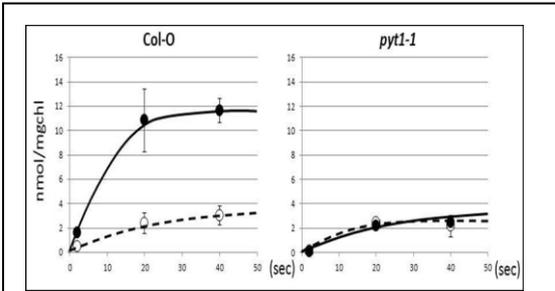


図6 シロイヌナズナ変異体でのピルビン酸輸送機能の喪失

最後に、遺伝子破壊株での機能喪失が明らかとなったので、どのような代謝に異常が生じているかを検討した。

イソペンティニルピロリン酸は、細胞質でのメバロン酸経路と葉緑体内でのピルビン酸を初発とする非メバロン酸経路の二つから合成される。二つの合成経路を持つために、通常片方の機能喪失では表現型を示さない。

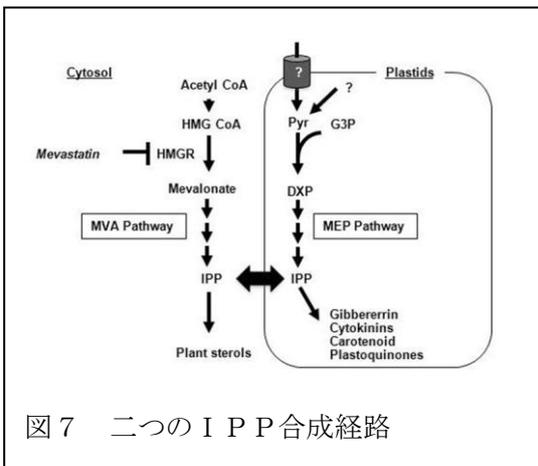


図7 二つのIPP合成経路

しかし、この輸送体機能が損なわれた変異体では、細胞質のメバロン酸経路を阻害する阻害剤（メバスタチン）処理によって、明らかな生育阻害を示した（図8）。これは、この輸送体機能が、葉緑体での非メバロン酸経路へのピルビン酸供給にあることを示している（図7）。

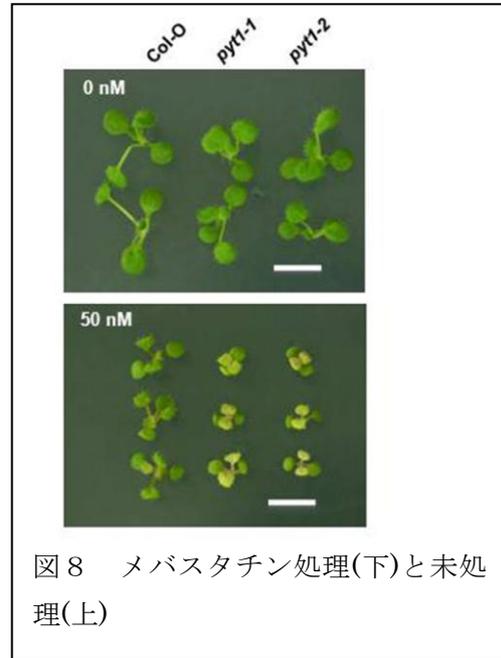


図8 メバスタチン処理(下)と未処理(上)

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1件）

1. Tsuyoshi Furumoto, Tepei Yamaguchi, Yumiko Ohshima-Ichie, Masayoshi Nakamura, Yoshiko Iwata, Masaki Shimamura, Junichi Ohnishi, Shingo Hata, Udo Gowik, Peter Westhoff, Andrea Bräutigam, Andreas P. M. Weber, Katsura Izui “Identification of a plastidial sodium-dependent pyruvate transporter” Nature, 査読あり, 2011 in press

〔学会発表〕（計4件）

1. Furumoto T “Identification of a plastid Na^+ dependent pyruvate transport system”, 2010 Carbon Concentrating Mechanism, (29th Aug-2nd Sep, 2010) Awaji, Japan
2. Furumoto T “Identification of a plastid Na^+ dependent pyruvate transport system in plants”, 2010

Symposium on C4 Plant Biology, (18-20 Aug, 2010) Shanghai, China

3. 古本 強「C4 回路で機能するナトリウム依存性ピルビン酸輸送機構の解明」第1回日本光合成学会公開シンポジウム「光合成のダイナミックス」-太陽光エネルギー利用の新しい試み-2010年6月4日東京大学駒場
4. Furumoto T “ Identification of a plastid Na⁺ dependent pyruvate transporter in plants, functioning C4 pathway and MEP pathway.” 理化学研究所セミナー2009年10月23日, 理化学研究所

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古本 強 (FURUMOTO TSUYSHI)

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

なし

(3) 連携研究者

なし