

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：85301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21780061

研究課題名（和文） グルタチオンにおけるカルビン回路制御における標的因子の同定と
その分子機構の解明研究課題名（英文） Study on molecular mechanisms for glutathione-dependent regulation
of the Calvin cycle

研究代表者

岩崎（葉田野） 郁（HATANO-IWASAKI AYA）

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・流動研究員

研究者番号：40443593

研究成果の概要（和文）：本研究では、光合成・カルビン回路でのグルタチオンの標的因子の同定とその制御機構を明らかにすることを目的にシロイヌナズナを用いて解析をおこなった。カルビン回路酵素であるグルタチオン結合性アルドラーゼを過剰発現した植物の解析から、アルドラーゼ活性が二酸化炭素固定の律速となりうること、そのアルドラーゼ活性制御にグルタチオンが重要であることを明らかにした。また、グルタチオンの外生投与は、葉内の窒素、クロロフィル、ルビスコ量を増加させ、窒素施肥とは異なる効果で二酸化炭素固定能を高めることがわかった。

研究成果の概要（英文）： We have studied on glutathione-dependent regulation mechanism on the Calvin cycle using *Arabidopsis*. The results obtained from transgenic plants with increased accumulation of a plastidic aldolase undergoing glutathionylation indicated that FBA activity is a limiting factor for photosynthetic CO₂ assimilation and that it is likely to be regulated by glutathione. We found that glutathione feeding by subirrigation increased N, chlorophyll and Rubisco protein contents, and promoted CO₂ assimilation rate in a manner different from conventional nitrogen fertilizer effects.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：グルタチオン・カルビン回路・二酸化炭素固定・光合成・ルビスコ・アルドラーゼ

1. 研究開始当初の背景

グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドで、抗酸化作用をもつ物質として知られている。植物では、細胞、特に葉緑体に多量に

存在し、アスコルビン酸-グルタチオン回路のような活性酸素消去系で重要な役割を果たすほか、グルタチオン-S-トランスフェラーゼによる異物の解毒などにも機能する。グルタチオンについての研究の多

くは、このような抗酸化作用あるいは解毒作用に注目したものである。一方、研究代表者が所属する研究グループでは、抗酸化物質として注目されることの多かったグルタチオンが、発芽や花成、細胞分化など植物の生長制御に関わることを明らかにしてきた。

研究代表者が所属する研究グループでは、すでにグルタチオン化タンパク質のひとつとして、カルビン回路酵素のひとつである葉緑体型フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ (FBA) を同定していた。これまでに研究代表者がおこなった、内生グルタチオン量が増加または低下した植物での予備的な解析結果とも考え合わせると、グルタチオンが光合成・カルビン回路の制御に関わると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、光合成・カルビン回路において、グルタチオンによって影響を受ける因子を同定し、その制御のメカニズムを明らかにすることで、グルタチオンによる光合成活性制御の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

グルタチオンの標的因子のひとつグルタチオン結合性アルドラーゼ (FBA1) のカルビン回路における機能とグルタチオンとの関係を明らかにするため、シロイヌナズナ野生型 (Columbia-0) にグルタチオン結合性葉緑体型アルドラーゼ (FBA1) 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター制御下で発現させた形質転換植物 (35S-FBA1) を作出した。内生グルタチオン量が低下した植物として、*cad2-1* および *pad2-1* 変異体を用いた。

またグルタチオン外生投与の光合成における効果を明らかにするため、シロイヌナズナ野生型 (Columbia-0) に、播種後 1 週間目から 5 週間目まで、1 週間に 1 回、1 ポット 3 個体あたり 25mL、1mM 酸化型グルタチオン (GSSG) および 2mM 還元型グルタチオン (GSH) 溶液を底面灌水で施用した植物を用いて解析をおこなった。対照として水のみで栽培した植物を用いた。また、グルタチオンの窒素施用以外の効果を明らかにするため、硝安をグルタチオンと窒素当量で同量となる 3mM を施肥した植物との比較もおこなった。

これらの植物を用いて、光合成活性、光合成構成要素の組成、カルビン回路酵素の活性を調べることにより、グルタチオンによって、どのような光合成に関わ

る因子がどのような影響を受けるかを解析した。

4. 研究成果

(1) グルタチオン結合性アルドラーゼ FBA1 の解析

グルタチオン結合性である葉緑体型アルドラーゼ FBA1 の光合成における機能とグルタチオンとの関係を明らかにするため、FBA1 蓄積量が増加した形質転換植物 (35S-FBA1) を用いて、解析をおこなった。

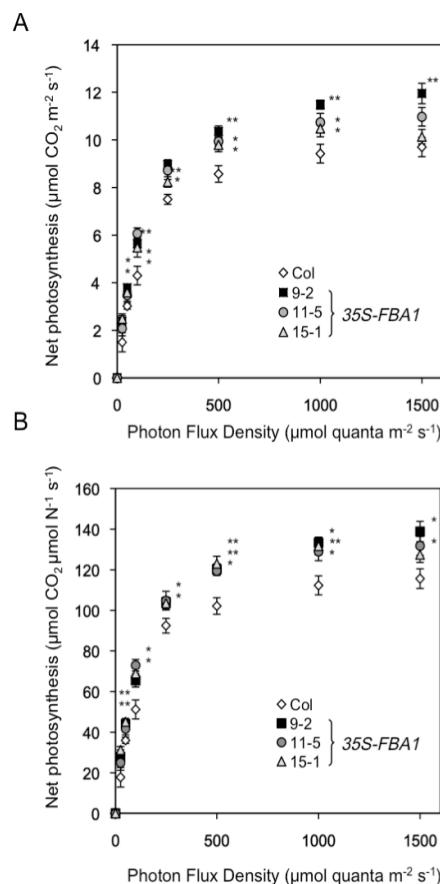


図 1. 野生型および 35S-FBA1 植物の光-光合成曲線。(A)葉面積あたりの二酸化炭素固定速度。(B)葉内窒素あたりの二酸化炭素固定速度。

播種後 4 週間目の植物を用いて、二酸化炭素固定速度の測定をおこなった。野生型植物と比較して、35S-FBA1 植物では葉面積あたり (図 1A) および葉内窒素量あたり (図 1B) の二酸化炭素固定速度が高いことがわかった。

図 1 で用いた異なる FBA1 蓄積量を示す 35S-FBA1 植物 3 ラインと野生型植物における、葉面積あたりの二酸化炭素固定速度と

FBA 活性との関係を調べた。FBA 活性は二酸化炭素固定速度と正の相関を示し、より高い光強度での二酸化炭素固定速度との相関が高いことがわかった。FBA1 タンパク蓄積量と FBA 活性とも高い相関が認められた(図 2 B)。

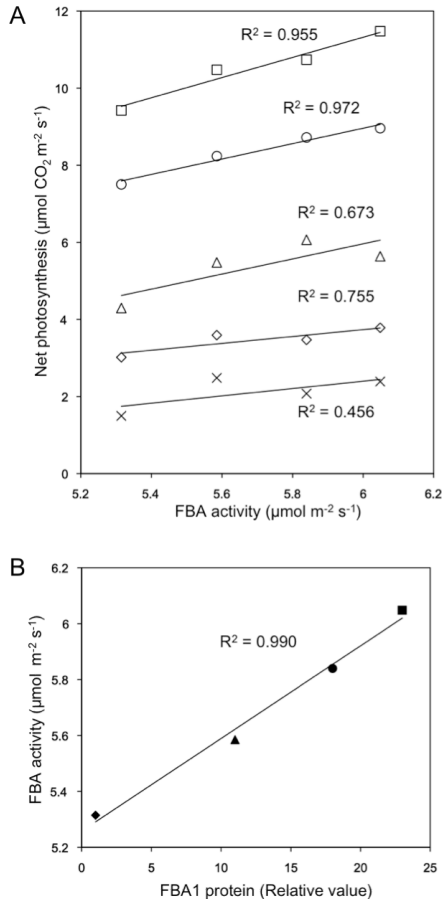


図 2. FBA 活性、FBA1 タンパク量と光合成との関係。野生型および 35S-FBA1 植物における FBA 活性と異なる光強度における二酸化炭素固定速度(A)および FBA1 タンパク量と FBA 活性(B)との関係。

グルタチオン合成は、生育する光強度に依存することがわかっている。そこで、光合成・二酸化炭素固定と FBA 活性、グルタチオン量との関係を明らかにするため、内生グルタチオン量がそれぞれ野生型植物の 60%と 50%に低下した変異体 *cad2-1* および *pad2-1* を用いて解析をおこなった。

これらの変異体の二酸化炭素固定速度は野生型と比較して低く(図 3A)、アルドラーゼ活性が低下していることがわかった(図 3B)。グルタチオン結合性アルドラーゼ FBA1 と他 2 つの葉緑体型アルドラーゼアイソザイム(FBA2, FBA3)のタンパク量は、野生型植物とに差は認められなかった(図 3C)。変異体の低

下したアルドラーゼ活性は、GSH を添加することで野生型の活性まで回復したが、強い還元試薬であるジチオスレイトール(DTT)の添加ではそのような活性の回復は認められなかった(図 3B)。

35S-FBA1 植物および *cad2-1*, *pad2-1* 変異体における葉内窒素、クロロフィル、Rubisco 量、および Rubisco 活性を調べた。その結果、35S-FBA1 植物および *cad2-1*, *pad2-1* 変異体のどちらにおいても、葉内窒素、クロロフィル、Rubisco 量に野生型植物との差は認められなかった。また、250 μE m⁻² s⁻¹の光強度での Rubisco 活性も野生型植物との差は認められなかった。Rubisco 活性化率(initial 活性/total 活性)はおおよそ 100%であったことから、この条件下では 250 μE m⁻² s⁻¹の光強度で Rubisco が完全に光活性化されることがわかった。

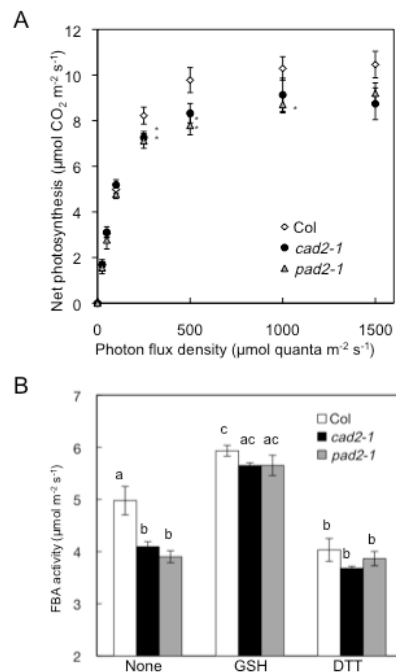


図 3. 野生型植物と内生グルタチオン量が低下した変異体における光合成と FBA 活性。(A)葉面積あたりの二酸化炭素固定速度。(B)無添加(左)、2.5mM GSH 添加(中)、20mM DTT 添加(右)における FBA 活性。

以上の結果から、Rubisco が完全に活性化される条件下でも、FBA1 遺伝子導入によって上昇した FBA 活性の分だけ、最大二酸化炭素固定速度が高まり、FBA 活性がカルビン回路の律速となりうることが示唆された。またグルタチオンがその FBA 活性に重要であることが明らかとなった。

(2) グルタチオン外生投与の光合成における効果

グルタチオン外生投与の光合成における効果を明らかにするため、シロイヌナズナ野生型(Columbia-0)に底面灌水で GSSG または GSH 溶液を施用した植物、また、グルタチオンの窒素施用以外の効果を明らかにするため、硝安をグルタチオンと窒素当量で同量を投与した植物を用いて解析をおこなった。

播種 5 週間目の植物の二酸化炭素固定速度の測定をおこなった。その結果、GSSG または GSH を投与した植物では、無施用植物と比較して、二酸化炭素固定速度が高いことがわかった (図 4)。一方、硝安を施用した植物では無施用植物とに差は認められなかった (図 4)。

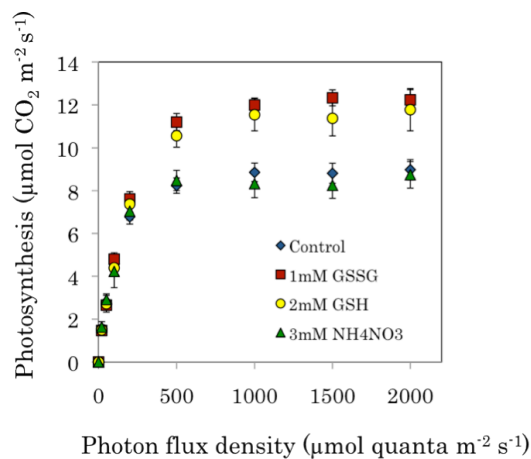


図 4. 無施用、グルタチオン施用および硝安施用植物の光-光合成曲線。

これらの植物の葉内窒素、Rubisco タンパク、クロロフィル量を調べたところ、GSSG または GSH を施用した植物では、無施用植物と比較して、葉内窒素、クロロフィル、Rubisco タンパク量が増加していることがわかった (図 5)。一方、硝安を施用した植物では無施用植物とに差は認められなかった (図 5)。

以上の結果から、グルタチオンの外生投与によって、葉内の窒素、クロロフィル量、Rubisco 量を増加させることによる二酸化炭素固定能を高めることができることがわかった。またその効果は、窒素施肥とは異なる効果であることが明らかとなった。

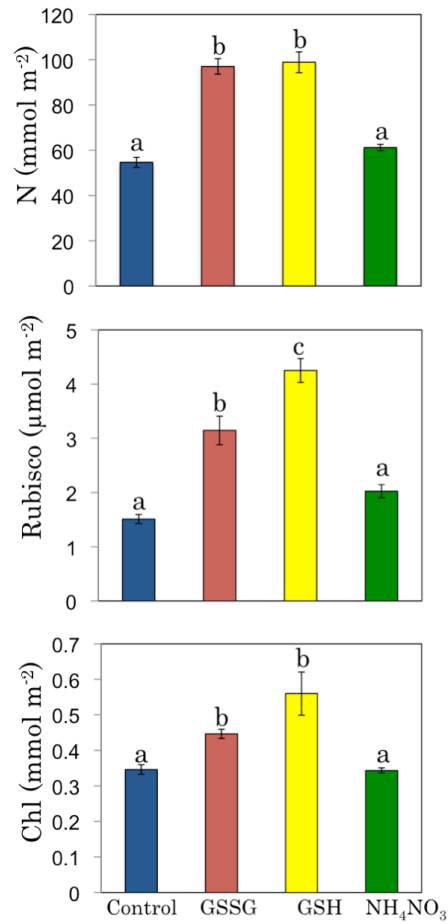


図 5. 無施用、グルタチオン施用および硝安施用植物の葉内窒素 (上)、Rubisco タンパク (中)、クロロフィル量 (下)。

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 2 件)

① Hatano-Iwasaki A. and Ogawa K (2012) Overexpression of *GSH1* gene mimics transcriptional response to low temperature during seed vernalization treatment of *Arabidopsis*. *Plant Cell and Physiology* (査読有) 53: in press
DOI: 10.1093/pcp/pcs075

② Hatano-Iwasaki A. and Ogawa K (2012) Biomass production is promoted by increasing an aldolase undergoing glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Developmental Biology* (査読有) 7: in press

〔学会発表〕(計7件)

- ① 岩崎(葉田野)郁, 逸見健司, 小川健一. グルタチオンのシロイヌナズナに対する効果-硝安施用との比較. 第53回日本植物生理学会年会. 2012年3月16日, 京都
- ② 逸見健司, 岩崎(葉田野)郁, 小川健一. グルタチオンのシロイヌナズナに対する効果-成長解析法による評価. 第53回日本植物生理学会年会. 2012年3月16日, 京都
- ③ 濃野絢, 岩崎(葉田野)郁, 小川健一. グルタチオンのシロイヌナズナに対する効果-CO₂の取込み. 第53回日本植物生理学会年会. 2012年3月16日, 京都
- ④ 逸見健司, 岩崎(葉田野)郁, 小川健一. グルタチオンのシロイヌナズナに対する効果(1) 個体の生長. 第52回日本植物生理学会年会. 2011年3月, 仙台
- ⑤ 岩崎(葉田野)郁, 逸見健司, 小川健一. グルタチオンのシロイヌナズナに対する効果(2) 個葉の光合成. 第52回日本植物生理学会年会. 2011年3月, 仙台
- ⑥ 小川健一, 岩崎(葉田野)郁. グルタチオンのシロイヌナズナに対する効果(3) Seed germination and vernalization. 第52回日本植物生理学会年会. 2011年3月, 仙台
- ⑦ 岩崎(葉田野)郁, 前田貴史, 郷達明, 山里明弘, 深城英弘, 小川健一. 葉緑体におけるグルタチオン結合性アルドラーゼFBA1の機能. 第51回日本植物生理学会年会. 2010年3月, 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎(葉田野) 郁

(HATANO-IWASAKI AYA)

岡山県農林水産総合センター
生物科学研究所・流動研究員

研究者番号: 40443593