

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580023

研究課題名(和文)CAM型光合成における解糖系及びミトコンドリア呼吸の関与について

研究課題名(英文)Studies on involvements of glycolysis and mitochondrial respiration to CAM photosynthesis

研究代表者

野瀬 昭博 (NOSE, AKIHIRO)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：80045137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：パイナップル及びデンドロビウムを用い解糖系及びミトコンドリア呼吸のCAM型光合成制御への関与を検討した。

ピルビン酸正リン酸シキナーゼの細胞内局在位置が昼間のミトコンドリア電子伝達系におけるシトクロームCオキシダーゼ(COX)への電子の流れを制御していることが明らかになった。また、解糖系酵素遺伝子発現の日変化は、夜のCO<sub>2</sub>吸収に関与するグループ、昼のリンゴ酸脱炭酸に関与するグループ、日変化を示さないグループの3種類に分類され、特にグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH)がCAM型光合成の特異的なガス交換の日変化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using Ananas comosus and Dendrobium phalaenopsis, involvements of glycolysis and mitochondrial respiration to CAM photosynthesis were studied. It was appeared that the distribution of pyruvate Pi dikinase (PPDK) in the cell regulated the electron flow in the mitochondrial respiration to cytochrome C oxidase. In addition, diurnal changes of glycolysis gene expression were classified to three groups, relating to CO<sub>2</sub> fixation in night and decarboxylation of malate in day, and not showing the diurnal changes of CAM. Especially, it was suggested that the diurnal change of glyceraldehyde 3-phosphate (GAPDH) dehydrogenase gene expression related to the diurnal gas exchange of CAM photosynthesis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：CAM パイナップル デンドロビウム ミトコンドリア 解糖系 PPDK 遺伝子発現 日変化

### 1. 研究開始当初の背景

CAM 植物の光合成でみられる夜に CO<sub>2</sub> を吸収し、昼はガス交換を停止するという通常の植物とは逆転したガス交換の日変化は、時計遺伝子に支配されたホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) のリン酸化と脱リン酸化を介したリンゴ酸感受性の日変化によってもたらされるものと教科書では解説される。しかし、代表的な CAM 植物であるパイナップルでは、PEPC のリン酸化・脱リン酸化は、その特異的なガス交換の日変化が説明できない。また、昼間のリンゴ酸の脱炭酸にミトコンドリアが関与しないとされてきたホスホエノールカルボキシキナーゼ (PCK) 型 CAM において、パイナップルのミトコンドリアでは、リンゴ酸のオキサロ酢酸 (OAA) への変換が細胞質における PCK 反応の基質としての OAA 供給を補い、ミトコンドリア電子伝達系における電子の流れがシトクローム c オキシダーゼ (COX) へ傾き、ATP 合成が活発に行われ PCK 反応に供給されることが明らかになった。さらには、リンゴ酸酵素 (ME) 型 CAM とされるデンドロビウム CAM が PCK 型 CAM のパイナップルと同様に低酸素による抑制を受けないことも明らかになった。また、CAM 型光合成の CO<sub>2</sub> 固定の基質供給とリンゴ酸の脱炭酸の結果生じる C<sub>3</sub> 化合物の糖への転換については、Osmond (1978) によって示唆されながら殆ど検討が加えられてこなかった。また、ME 型 CAM ではリンゴ酸の脱炭酸の結果生じるピルビン酸の糖新生系への転換に係るピルビン酸正リン酸ジキナーゼ (PPDK) の細胞内分布が種変異を示すものの、局在性のもつ機能的な意味が不明のままとなっている。

### 2. 研究の目的

CAM 型光合成における夜間の CO<sub>2</sub> 吸収の基質である PEP は、解糖系によって供給され、昼間のリンゴ酸脱炭酸の結果生じる C<sub>3</sub> 化合

物 (ピルビン酸、PEP) の糖への転換は糖新生系によって行われる。また、昼間のリンゴ酸の脱炭酸プロセス及び糖新生系では、多量の ATP が必要とされ、そのミトコンドリア電子伝達系の関与が考えられる。本研究では、まず (1) ME 型 CAM のデンドロビウムの CAM における低酸素による抑制欠如の原因について、ミトコンドリア電子伝達系による ATP 供給特性に検討を加えた。次に、パイナップルの CAM 型光合成の日変化の制御対する (2) 解糖系・糖新生系酵素遺伝子の発現の日変化特性、さらには、遺伝子発現の結果として生じる (3) 解糖系・糖新生系の代謝中間体の日変化について検討を行い、CAM 型光合成における解糖系及びミトコンドリア呼吸の関与について明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 供試材料は *Dendrobium phalaenopsis* var. *Brana pink* , および *Crassula argentea* である。ガラス室内で育成し、実験に先立ち 12 時間日長、明 / 暗の温度を 35 / 30、湿度 70%、及び最上位葉の光量子束密度を 320-360 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> に調節した人工気象室で、10 日間馴化させた。無傷ミトコンドリアはパーコール密度勾配法で単離した。ミトコンドリアの呼吸による酸素消費速度は液相型酸素電極 (CB1-D3, Hansatech Instruments Ltd) を用い測定し、COX の阻害剤であるシアン化カリウム (KCN) を用い、ミトコンドリアの呼吸鎖における電子伝達の偏りを検討した。*D. phalaenopsis* の PPDK の局在は免疫電子顕微鏡法によって調査した。

(2) 供試材料はパイナップル (*Ananas comosus*) である。ガラス室内で育成し、12 時間日長、明 / 暗の温度を 30 / 25、湿度 70%、最上位葉の光量子束密度を 400-450 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> に調節した人工気象室で、10 日間馴化させた植物の D 葉から試料の採取を行った。全 RNA は AGPC 法で抽出した。RT-PCR 法によって抽出した全 RNA から cDNA を合成した。

PK(Pyruvate kinase), Hexokinase(HK), Phosphoglucose isomerase(PGI), Diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase(PFP), Fructose 1,6-bisphosphate aldolase (Aldolase), Triose-phosphate isomerase(TPI), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Phosphoglycerate kinase(PGK)の8種のプライマーを作成してPCRを行った。PCRは、前処理95 2分の後、95 30秒、58 30秒、72 1分を27サイクル、後処理72 5分の条件で行った。PCR産物をエチジウムブロマイド染色した1.2%アガロース/TAEゲルで電気泳動を行い、UV照射によるバンド検出を行った。ゲルの解析は画像解析ソフトウェアImage J(アメリカ国立衛生研究所)を用いて行い、RNA発現強度を決定した。リファレンス遺伝子にはActinを用いた。

(3) 供試材料は、パインアップル(*Ananas comosus*)である。植物はガラス室で育成し、実験に先立ち12時間日長、明/暗の温度を30/25℃、湿度70%、最上位葉の光量子束密度を400-450  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に調節した人工気象室で、10日間馴化させた植物のD葉から試料の採取を行った。採取時間は、CAM型光合成のフェイズに相当する8:00、phase 3に相当する11:00、phase 4に相当する15:00、phase 1の始め20:00、中間の0:00である。サンプルの抽出・調整は、ブライ・ダイアー法(Jensen, 2008)を用いて、メタノール、水、クロロホルムの混合液の水相画分を取り出すことにより、水溶性代謝物質の回収と脂質およびタンパク質の除去を行った。その後、キャピラリー電気泳動質量分析計(7100CE、6224 TOF LC/M: Agilent Technologies)を用いて分析をおこなった

#### 4. 研究成果

(1) リンゴ酸を基質とし、NAD-MEの活性化剤であるCoA,  $\text{MnCl}_2$  および補酵素である

NADを同時に添加した時のKCNによる呼吸阻害率(%)は、*D. phalaenopsis*で $77.0 \pm 3.4\%$ 、*C. argentea*で $2.8 \pm 4.3\%$ であり、*D.*

*phalaenopsis*で高いKCN感受性を示した。この結果は、NAD-MEによる脱炭酸の際に生じるNADHは、*D. phalaenopsis*ではシトクロム経路、*C. argentea*ではオルタナティブ経路によって主に処理されている事を示している。

NAD(P)Hを基質とした呼吸にピルビン酸を添加すると、*D. phalaenopsis*では呼吸速度、RCR、ADP/O比およびKCN添加直後(KCN添加後1-2分後)の呼吸阻害率において、有意な変化が見られなかったのに対し、*C. argentea*は呼吸速度が有意に増加し、RCR、ADP/O比ならびにKCN添加直後の呼吸阻害率が有意に減少した(図1-1)。一方、KCN添加後30分以降の呼吸阻害率はピルビン酸を添加することで2種の植物共に有意に減少した(図1-2)。この結果は、*C. argentea*はピルビン酸添加によってオルタナティブ経路へ電子を伝達するようになるが、*D. phalaenopsis*ではピルビン酸添加に加えKCNによるCOXの阻害がオルタナティブ経路へ電子を伝達するようになるために必要であることを示している。このようなピルビン酸感受性の違いが、NAD-MEによって生じる呼吸における電子伝達経路の違いをもたらしていると考えられる。またこれらの結果から、*D. phalaenopsis*はピルビン酸が存在したとしてもCOXが阻害されない限りシトクロム経路へ電子を伝達する固定的な電子伝達経路が存在する可能性が示唆された。

また*C. argentea*のPPDKは葉緑体のみが存在しているのに対し、*D. phalaenopsis*のPPDKは細胞質のみが存在している事が明らかとなった(図1-3)。このようにChlt型である*C. argentea*は、オルタナティブ経路へ電子を多く伝達し、Cyt型である*D. phalaenopsis*シトクロム経路へ電子を多

く伝達していることから、*D. phalaenopsis* は細胞質 PDK に ATP を供給するためにシトクロム経路へ電子を多く伝達しているものと考えられる。

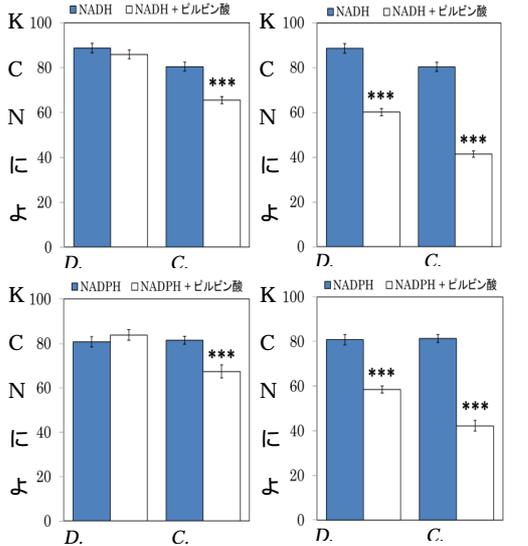


図 1-1. NAD(P)H を基質とした呼吸における KCN 添加後 30 分以降の呼吸阻害率にピルビン酸が与える影響。縦棒は SD (n=4-7) を表し、アスタリスクは NAD(P)H のみを添加した場合と比べ有意差 (t test, \*\*\*P<0.0001) があることを示している。

図 1-2. NAD(P)H を基質とした呼吸における KCN 添加後 30 分以降の呼吸阻害率にピルビン酸が与える影響。縦棒は SD (n=4-7) を表し、アスタリスクは NAD(P)H のみを添加した場合と比べ有意差 (t test, \*\*\*P<0.0001) があることを示している。

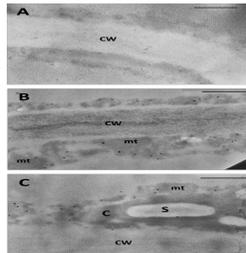


図 1-3. *D. phalaenopsis* の葉肉細胞における PDK の局在。(Bars=0.5 $\mu$ m) (A) コントロール (非免疫血清による標識), (B) (C) PDK タンパク質に対する金コロイド標識。C: 葉緑体, Cw: 細胞壁, mt: ミトコンドリア, S: 澱粉粒

(2) 調査した 8 種類の解糖系酵素の mRNA 発現の日変化 (図 2-1) は、CAM 型光合成の特性と照らして 3 種類のグループに分けることができた。ひとつは、夜間の CO<sub>2</sub> 固定の基質となる PEP を生成する解糖系方向の制御として、昼の後半 (phase 4) からリンゴ酸生成が活発になる夜 (phase 1) の前半に発現が増大するもので、従来から解糖系の律速部とされてきたヘキソキナーゼ (HK)、フルクトース 1,6 ニリン酸ホスホトランスフェラーゼ (PFK)、ピルビン酸キナーゼ (PK) であっ

た。特に HK と PFK は、一日を通して発現レベルが低かった。さらに、PK の発現増大は、phase 1 の CO<sub>2</sub> 固定の基質である PEP をピルビン酸へ転換するため CAM 型 CO<sub>2</sub> 固定にとっては不利な現象であるが、CE・MS の調査では、TCA 回路の活性化を示すクエン酸含量の対応する増大が認められなかった。このことは、生成されるピルビン酸を基質としたピルビン酸カルボキシラーゼによる夜間の CO<sub>2</sub> 固定が示唆され、パイナップルにおいて新たな夜間の CO<sub>2</sub> 固定の存在を示唆するもので、今後の検討が待たれる。

第二のグループは、解糖系方向の反応と昼間にリンゴ酸の脱炭酸の結果生じる PEP を糖へ転換・回収する糖新生系の反応に係ると考えられるものでグルコースリン酸イソメラーゼ (PGI)、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) である。これら 3 種類の酵素の mRNA 発現は、phase 1 の後半から phase 2 の始めにかけて低下し、その後増大、phase 3, 4 そして phase 1 の前半で高い発現を維持するというものであった。特に、GAPDH は、phase 3 の後半に発現ピークを示した後、phase 4 の始めに発現が急減し、その後は緩やかな発現が回復するという推移を示し、CAM 型光合成において最大の謎である解糖系の昼夜逆転の制御に関与することを示唆する日変化を示した。

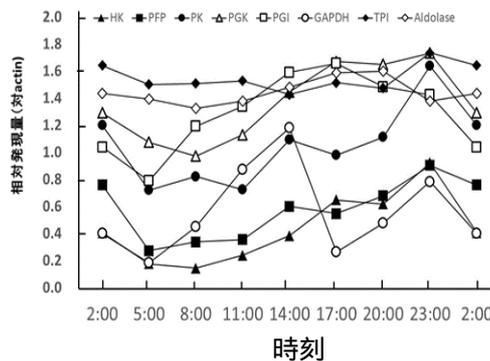


図 2-1 解糖系・糖新生系酵素遺伝子の発現の日変化

第 3 のグループは、一日を通して高い発現レベルを維持するもので aldolase とトリオ

ースリン酸イソメラーゼ (TPI) であった。

(3) CEMS による解糖系代謝中間体の日変化(図 3-1)については、フルクトース 1,6 ニリン酸 (F16BP) 含量が phase 1 に上昇するもの一日を通して最も低く推移し、PFP 発現レベルの低さと日変化に対応するもので、解糖系方向の制御が PFP の部分で生じている可能性を強く支持するものであった。また、一日を通して発現レベルが低く解糖系方向の律速部となっていると考えられた HK によって生成されるグルコース 6 リン酸 (G6P) レベルは、夜間に高く、昼間に低下するという CAM 型 CO<sub>2</sub> 固定と連動するに日変化を示した。このような生成物と遺伝子発現の相違は、パインアップルにおいては、今回設計した HK にアイソザイム変異が存在していることを示唆するものである。

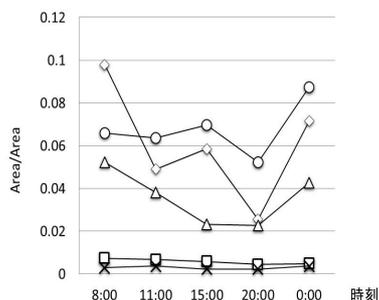


図3-1 解糖系における同定した中間代謝産物含有量の日変化

◇グルコース6リン酸 □ピルビン酸 △フルクトース1,6リン酸 ×フルクトース1,6リン酸 ○クエン酸

## 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0件)

〔学会発表〕(計2件)

### 1. 畠山友翔・野瀬昭博

リンゴ酸酵素 (ME) 型 CAM 植物に属する *Dendrobium phalaenopsis* var. *Brana pink* および *Crassula argenticia* におけるミトコンドリア電子伝達特性の比較とピルビン酸正リン酸ジキナーゼ (PPDK) の局在位置による電子伝達制御の可能性

日本作物学会紀事 82(2) : 156 - 157 (2013)

2013年9月10・11日 鹿児島大学農学部

### 2. 畠山友翔・野瀬昭博

ME 型 CAM 植物 *Dendrobium phalaenopsis* のミトコンドリアにおける電子伝達特性について

日本作物学会紀事 81(別 1) : 152 - 153 (2012)

2012年3月29・30日 東京農工大学農学部  
〔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〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野瀬 昭博 (NOSE AKIHIRO)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号 : 80045137

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :