

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23658016

研究課題名（和文）

リンゴ酸バルブ増強による作物の窒素同化能および環境ストレス耐性能向上の試み

研究課題名（英文）

An attempt to improve nitrogen metabolism and environmental tolerance of crops by enhancement of the ability of malate valve

研究代表者

谷口 光隆 (TANIGUCHI MITSUTAKA)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：40231419

研究成果の概要（和文）：葉緑体からの還元力排出は、光阻害に対する防御および硝酸還元酵素への還元力供給に必須であり、2-オキソグルタル酸/リンゴ酸輸送体とリンゴ酸脱水素酵素アイソザイムからなるリンゴ酸バルブがその役割を担っている。このリンゴ酸バルブ能を増強させたシロイヌナズナ形質転換体では、光阻害を回避することによる環境ストレス耐性能の向上、および硝酸同化能の向上が見られた。これらの結果は、劣悪な環境条件にも耐え、少ない肥料投与で効率良く生育する作物開発のための足掛かりになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Export of reducing equivalents from chloroplasts is necessary to prevent photoinhibition and to supply reducing power to cytosolic nitrate reductase. The transport process is mediated by malate valve comprising 2-oxoglutarate/malate transporter (OMT) and malate dehydrogenase (MDH) isozymes. We produced *Arabidopsis* transformants overexpressing OMT and stromal NADP-MDH, and found that the tolerance to environmental stresses and the ability of nitrate assimilation are improved in the transformants. Therefore, malate valve would be a new target to improve environmental tolerance and nitrogen metabolism of crops.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：葉緑体・窒素同化・環境ストレス・輸送体・還元力・リンゴ酸バルブ・シロイヌナズナ・光阻害

1. 研究開始当初の背景

強光，乾燥，塩などの環境ストレス下の葉緑体では，CO₂固定反応が低下し，光化学反応で生じる還元力が過剰となる。過剰還元力蓄積は活性酸素生成を促し，光合成機能が低下する光阻害の原因となる。この光阻害を回避する機構の一つであるリンゴ酸バルブは，ストロマの還元力を排出する圧力弁として働いており，ストロマおよびサイトソルに局在するリンゴ酸脱水素酵素(MDH)アイソザ

イムおよび葉緑体内包膜中のリンゴ酸/オキサロ酢酸交換輸送体により構成される(Scheibe 2004 *Physiol. Plant.*) (図1)。我々はこの輸送体の候補として 2-オキソグルタル酸/リンゴ酸輸送体(OMT)を同定した(Taniguchi *et al.* 2002, 2004 *Plant Cell Physiol.*)。さらに，シロイヌナズナの OMT 遺伝子破壊株を用いて，実際に OMT が高親和性のオキサロ酢酸輸送体としてリンゴ酸バルブを構成していることを証明した

(Kinoshita *et al.* 2011 Plant J.). この遺伝子破壊株はストレス条件下で光阻害に陥りやすいだけでなく、通常生育条件下でも硝酸同化や炭素同化の活性低下が見られた。このことは、リンゴ酸バルブは過剰還元力排出のためだけでなく、ストロマ還元力をサイトソルの硝酸還元酵素(NR)に供給するためにも重要であることを示している。

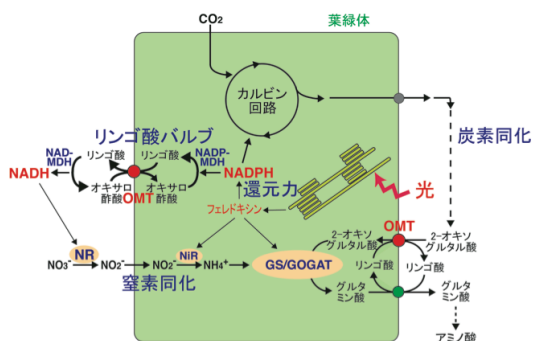


図1 葉緑体のOMTが関わる代謝経路
リンゴ酸バルブは光合成電子伝達系によって生じた還元力NADPHをサイトソルの硝酸還元酵素(NR)などに供給するだけでなく、環境ストレス下でストロマ内に蓄積する過剰還元力を排出する安全弁として機能している。また、OMTは炭素/窒素同化系のコミュニケーションを統御する上でも重要な役割を果たしている。

2. 研究の目的

上記の結果から我々は、逆に OMT 発現量を増やしてリンゴ酸バルブを増強すれば、硝酸同化能を増大させることができるのではないかと着想した。さらに、リンゴ酸バルブを増強することは、ストロマが過還元状態になることを防ぎ、光阻害回避にも貢献するであろうと考えられた。そこで、本研究では、OMT とストロマ MDH の活性を高めた形質転換植物を作製して、リンゴ酸バルブ増強による硝酸同化活性、光合成活性、環境ストレス耐性、生産性などに向上がみられるかどうかを調べることにした。その結果より、リンゴ酸バルブが環境ストレス耐性能や生産性の向上のための新たなターゲットとなりうるのかを明らかにすることを目的とした。

なお、この研究を進めるにあたっては、植物細胞においてサイトソル中の NADH 濃度が低いことが硝酸還元反応の律速要因の一つになっていること(Kaiser *et al.* 2000 Planta), NADPH を直接輸送するプラスチド包膜の輸送体は見出されておらず、ストロマ還元力はリンゴ酸バルブなどにより間接的に輸送されていること(Taniguchi and Miyake 2012 Curr. Opin. Plant Biol.), リンゴ酸バルブはストロマの還元状態が高まったときに活性化され、リンゴ酸バルブの律速段階はリンゴ酸/オキサロ酢酸交換輸送反応とストロマの NADP-MDH 反応であること(Heineke *et al.* 1991 Plant Physiol.)が報告されており、OMT とストロマ MDH の発現を増やしてリンゴ酸バルブを増強する我々

のアプローチは合理的であると考えられる。

3. 研究の方法

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下でシロイヌナズナ葉緑体局在性の NADP-MDH を高発現するコンストラクトを作製し、シロイヌナズナ Columbia 野生株および OMT 過剰発現株 (シロイヌナズナ OMT をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下で発現させる形質転換体) に導入した。野生株および組換え体を、短日条件 [明期:7.5 時間 ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 22°C ; 暗期:16.5 時間, 18°C] で生育し、実験に用いた。

各植物体のロゼット葉から単離した葉緑体を用いて、オキサロ酢酸依存的なリンゴ酸生成・排出量を測定し、リンゴ酸バルブ能を評価した。葉組織中のアミノ酸および有機酸を CE/MS (キャピラリー電気泳動/質量分析) を用いて定量した。植物体に強光 ($2,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射または NaCl 溶液 (150 mM , 2 週間) を与え、葉のクロロフィル蛍光を測定して光阻害に対する感受性を比較した。さらに、切り取り葉を $30 \text{ mM K}^{15}\text{NO}_3$ 溶液に挿し、光照射下でインキュベーション後、葉中の ^{15}N 標識グルタミンおよびグルタミン酸濃度を CE/MS を用いて測定した。

4. 研究成果

イネおよびシコクビエを対象として OMT および MDH コンストラクト遺伝子の導入を試みたが、OMT 輸送活性や MDH 活性が顕著に高まった組換え体を得るには至らなかった。そこで、OMT と葉緑体局在 NADP-MDH を過剰発現させたシロイヌナズナ形質転換体について、以下の点を明らかにした。

(1) 形質転換体のうち、葉中の NADP-MDH の mRNA 量および活性の高い組換え体ラインとして、MDH 過剰発現株 (M-4) および MDH/OMT 二重過剰発現株 (M/O-5) を得た。

(2) MDH/OMT 二重過剰発現株 (M/O-5) から単離した葉緑体のオキサロ酢酸依存的なリンゴ酸生成・排出能は野生株に比べて有意に高く、形質転換体ではリンゴ酸バルブ能が向上していると判断した。

(3) 過剰発現株の通常条件下での生育は野生株と比べて顕著な差は見られなかったが、二重過剰発現株において葉中のタンパク質含量の増大がみられた。また、M/O-5 の葉組織では、2-オキソグルタル酸およびグルタミン酸の増加がみられた。2-オキソグルタル酸は OMT によってサイトソルに取り込まれ、

GS/GOGAT 回路にてグルタミン酸合成に利用されている (図 1)。これら 2つの化合物の増加がみられたことから、M/O-5 では有機酸合成ならびに GS/GOGAT 回路に関わるアミノ酸合成が活性化されていると考えられた。

(4) 強光照射や塩ストレスに植物体をさらすと、光阻害の程度を示すクロロフィル蛍光パラメータ Fv/Fm 値が低下するが、過剰発現株ではその低下が野生株に比べ有意に抑えられていた (図 2)。したがって、過剰発現株では強光ストレスや塩ストレス障害を受けにくくなっていると考えられた。

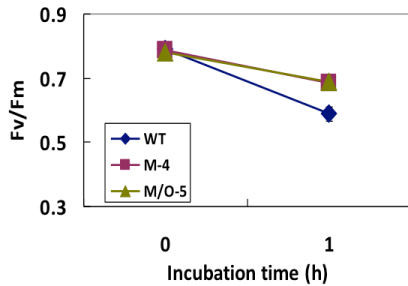


図2 強光照射に伴うFv/Fm値の変化
通常光で生育した植物体に強光を照射した。照射前および1時間後にロゼット葉のクロロフィル蛍光を測定し、Fv/Fm値を算出した。

(5) 硝酸同化能を評価するために、¹⁵N 硝酸溶液を切り取り葉に吸わせ、葉中の ¹⁵N 標識グルタミンおよびグルタミン酸含量の経時変化を調べた。その結果、二重過剰発現株において ¹⁵N 標識グルタミン含量が野生株より有意に高くなっており (図 3)、硝酸還元能が向上していると考えられた。

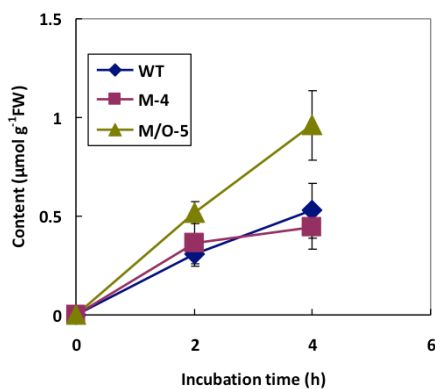


図3 硝酸還元能の比較
切り取り葉をK¹⁵NO₃溶液に挿し、明所下でインキュベーション後、¹⁵N標識グルタミン含量を測定した。

以上の結果より、NADP-MDH および OMT を二重過剰発現させることでリンゴ酸バルブ能が増強され、代謝機能の改変が起こることが明らかとなった。さらに、強光による光阻害が軽減し、塩ストレス下での光阻害も軽減される傾向がみられた。したがって、リンゴ酸バルブ能の増強が植物の環境ストレス耐性

の向上に結び付く可能性が示された。そのメカニズムにはリンゴ酸バルブによるサイトソルへの還元力排出が大きく関わると考えられるが、MDH/OMT の発現増強が環境ストレス下での光合成炭素固定と窒素同化への還元力配分や光阻害回避にどの程度効果的であるかは、今後さらに解析を進める必要がある。また、シロイヌナズナだけでなく、他の作物において検証することも課題として残されている。

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 13 件)

- ① Omoto, E., Nagao, H., Taniguchi, M. and Miyake, H. (2013) Localization of reactive oxygen species and change of antioxidant capacities in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize under salinity. *Physiologia Plantarum* (in press) (査読有)
- ② Taniguchi, M. and Miyake, H. (2012) Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: integration of intra- and extra-chloroplast metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 252-260 (査読有)
DOI:10.1016/j.pbi.2012.01.014
- ③ 谷口光隆 (2012) 植物の CO₂ 固定機能を高める C₄ 光合成の最近の話題. 日本の科学者, 47: 307-311 (査読有)
<http://www.jsa.gr.jp/04pub/index.html#nihonnokagakusya>
- ④ Maai, E., Shimada, S., Yamada, M., Sugiyama, T., Miyake, H. and Taniguchi, M. (2011) The avoidance and aggregative movements of mesophyll chloroplasts in C₄ monocots in response to blue light and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 62: 3213-3221 (査読有) DOI:10.1093/jxb/err008
- ⑤ Maai, E., Miyake, H. and Taniguchi, M. (2011) Differential positioning of chloroplasts in C₄ mesophyll and bundle sheath cells. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1111-1113 (査読無)
DOI:10.4161/psb.6.8.15809
- ⑥ 間合絵里, 三宅博, 谷口光隆 (2011) 青色光と ABA に応答した C₄ 植物の葉肉細胞

における葉緑体の運動. 光合成研究, 21: 16-19 (査読有)

<http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp/>

- ⑦ Kinoshita, H., Nagasaki, J., Yoshikawa, N., Yamamoto, A., Takito, S., Kawasaki, M., Sugiyama, T., Miyake, H., Weber, A.P.M. and Taniguchi, M. (2011) The chloroplastic 2-oxoglutarate/malate transporter has dual function as the malate valve and in carbon/nitrogen metabolism. *Plant Journal* 65: 15-26 (査読有)
DOI:10.1111/j.1365-313X.2010.04397.x

[学会発表] (計 14 件)

- ① 塚口駿貴, 大井崇生, 三宅博, 谷口光隆
葉肉葉緑体凝集運動の C₄ 植物における普遍性とその生理的意義. 日本作物学会第 235 回講演会, 2013 年 3 月 28~29 日 (川崎)
- ② 塚口駿貴, 間合絵里, 島田祥宇, 大井崇生, 三宅博, 谷口光隆 ABA と青色光に応答した葉肉葉緑体の凝集運動は C₄ 植物に共通した生理応答である. 日本作物学会第 234 回講演会, 2012 年 9 月 10~11 日 (仙台)
- ③ 谷口光隆, 塚口駿貴, 間合絵里, 島田祥宇, 三宅博 葉肉葉緑体の凝集運動は C₄ 植物に共通した生理応答である. 第 3 回

日本光合成学会, 2012 年 6 月 1~2 日 (横浜)

- ④ Maai, E., Miyake, H. and Taniguchi, M. Movement of chloroplasts in C₄ mesophyll cells in response to blue light and abscisic acid. The 7th Asian Crop Science Association Conference, 2011 年 9 月 27~30 日 (Bogor, Indonesia)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shigen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 光隆 (TANIGUCHI MITSUTAKA)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・
准教授

研究者番号 : 40231419

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし

(4) 研究協力者

三宅 博 (MIYAKE HIROSHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号 : 60134798