

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770047

研究課題名(和文) もう一つのC4高発現輸送体PyT2の機能解析

研究課題名(英文) Molecular analyses of an alternative C4 abundant transporter, BASS4

研究代表者

古本 強 (Tsuyoshi, Furumoto)

龍谷大学・文学部・教授

研究者番号：30313208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：トウモロコシなどの行うC4光合成は、イネなどで機能するC3光合成と比較して、約2倍の高い光合成活性を発揮する。その特徴は、葉肉細胞と維管束鞘細胞間において分業された二酸化炭素濃縮代謝の進化的な獲得にある。この代謝を完全に理解することでC4光合成を模した回路を導入することや、あるいはC4光合成を行う雑草種を駆逐する新薬開発などに寄与できる。もっとも理解の進んでいない代謝ポイントは葉緑体包膜に局在する輸送システムである。申請者が成功した葉肉細胞葉緑体でのピルビン酸輸送分子の同定と同系列の実験において、BASS4と名付けた新規因子を見出している。本研究ではこの新規輸送因子の機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In the C₀2-concentration mechanism, performed at several C₄ plants, there are a little information on the metabolic transporters located at chloroplasts. During the identification of a pyruvate transporter, BASS2, located at mesophyll cell plastids, we also found an alternative transporter gene, BASS4, which was highly expressed at C₄ Flaveria species in comparison with at C₃ Flaveria. To identify the physiological importance, we tried to make transgenic Flaveria, in which Bass4 gene is knocked down. These Bass4-KD plants showed growth defect under the ambient C₀2 condition and this difection was complemented under the high C₀2 condition, indicates its significant function in the C₀2-concentration mechanism.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物生理学

キーワード：C4光合成 葉緑体 ピルビン酸

1. 研究開始当初の背景

細胞質とプラスチド間での物質輸送は、プラスチドで行われる植物特有の代謝を支える重要な機能を果たしている。バイオマスの増産や植物機能の増強を目指すうえで、この輸送機能の完全な理解は必須であるにも関わらず、多くの輸送機能はその責任分子すら同定されないでいる。これは、膜タンパク質全般に当てはまる事情であるが、「膜にうまく配置されてその機能を果たすため活性測定系を構築することが困難であること」そして、「各々の輸送体において生化学的特徴が異なるために輸送物質の検定のためにそれぞれに特殊化した実験系を必要とすること」の二つの理由に加え、「ある一つの輸送体についてその基質候補を想定することは極めて難しい」ことに由来する。

申請者は、植物の持つプラスチド機能に着目し、新規なプラスチド局在性の輸送体を単離し、そしてその機能を同定する戦略を考え付いた。それは植物の機能的変化に基づき、輸送物質を予想できる状況のうえで候補遺伝子を単離し、そして輸送物質を同定するというものである。

具体的には C3 植物と C4 植物の機能的違いに着目した。C4 植物には葉肉細胞と維管束鞘細胞の葉緑体の間に、C3 植物のそれには存在しない、ピルビン酸輸送体と、リンゴ酸輸送体、そしてピルビン酸排出輸送体の 3 種類の輸送体が存在する。これら 3 種のタンパク質をコードする mRNA 分子種は、C4 光合成を支える他の酵素遺伝子と同じく極めて高い発現レベルにあると想像される。したがって、C4 植物と C3 植物の間での直接的なトランスクリプトーム解析ができれば、C4 光合成のマーカー遺伝子なみに高発現する未知の輸送体遺伝子を探し出せるに違いない。キク科フラベリア属の植物では、近年になって C4 光合成植物種が進化的に出現し、いまだ進化途上の中間的光合成を示す種 (C3-C4 中間種) のほかに典型的な C4 種と C3 種が存在する。これらの遺伝学的背景は近く、相当の遺伝子を比較するとコード領域においてはほとんど変わらないことが判明している。この C3 種と C4 種を用いてトランスクリプトーム解析を行い、C4 種に高発現する 125 遺伝子を見出した。この 125 遺伝子について、それらがコードする遺伝子を解析し、2 種類のプラスチド局在性を推察させる遺伝子 PyT1、PyT2 (のちの論文に際して BASS2、BASS4 と名称変更) の単離に成功した。実は申請者の成功に刺激され、ドイツの Andreas Weber と Peter Westhoff イギリスの Julian Hibberd らの研究グループも同様の実験を規模を拡大し 454 ピロシークエンス法を採用した網羅的な解析に

よって行い、ほぼ同様の結果を得ている(近く共同発表の予定)。彼らはさらにフラベリアとは異なるクレオメ属の C3 種と C4 種植物間にも同じ試みを用いている。

クレオメ属の C4 光合成植物とフラベリア属の C4 植物は、異なる C4 サブタイプに分類され、維管束鞘細胞での脱炭酸酵素に違いが認められる。面白いことに、クレオメとフラベリアでのトランスクリプトーム解析を組み合わせることで、より一歩進んだ生化学的な基質の推定が可能となった。ともに共通して高発現した遺伝子は BASS2(PyT1)であり、(BASS4)PyT2 はフラベリアにのみ特異的に高発現していた。この両種に共通した BASS2(PyT1)は、共通して機能するピルビン酸輸送体をコードする可能性が高い。そこでまずは PyT1 に着目し、その機能解析を試みた。ペプチド抗体を準備し、タンパク質レベルでの C4 種での高発現を確認した。ついで、C4 植物間での普遍性を調査した結果、ナトリウム依存性ピルビン酸輸送活性を示すことが明らかな植物に共通し、この普遍性も BASS2(PyT1)がナトリウム依存性ピルビン酸輸送体をコードすることを支持していた。このように、オルガネラ局在性を示す初めてのピルビン酸輸送体候補遺伝子を同定できた。

2. 研究の目的

上述したように、BASS2(PyT1)と同様の実験経緯から BASS4(PyT2)を単離している。これは何を輸送するのであろうか。フラベリアとクレオメを比較した場合、フラベリアに特異的であったことからその機能はフラベリアに特化していると考えられる。図に示した通り、両種の違いは、維管束鞘細胞内での脱炭酸方法にあり、フラベリアでは葉緑体での NADP-リンゴ酸酵素の機能を支えるため葉緑体へのリンゴ酸の流入と脱炭酸後に生じたピルビン酸を排出する輸送機能が必要となる。どちらの輸送体も分子実体は示されていないので、BASS4(PyT2)の機能はこのどちらかではないかと想像される。本申請では、この仮説に基づき、BASS2(PyT1)にならって大腸菌発現系を用いることで BASS4(PyT2)の輸送基質を同定することを試みる。

3. 研究の方法

BASS2(PyT1)の解析方法に準じ、BASS4(PyT2)の生化学的機能を同定する。

(1) ペプチド抗体を準備し、その普遍性を調査する。また、免疫組織染色を行い、組織特異性のほか細胞内局在性を検討する。

(2) 次に、大腸菌発現系を構築する。ついで、発現条件を検討し、実験に用いる条件を定める。放射性標識されたリンゴ酸、ピルビン酸、そして類縁化合物の取り込み活性を求める。

(3) さらに BASS4(PyT2)の機能を抑制する形質転換植物を作成する。機能抑制植物の光合成活性を測定することで C4 光合成への寄与を証明する。フラベリアは形質転換が比較的容易で、申請者は他の酵素遺伝子で経験済みである(Furumoto T et al., Plant Physiol. 144, 1936-1945 (2007))。

4. 研究成果

新規葉緑体局在性輸送体(PyT1, PyT2)については、すでにシロイヌナズナのゲノム配列解析から登録されているホモログに与えられている名称(BASS2, BASS4)に改名し、以後、用いることとした。

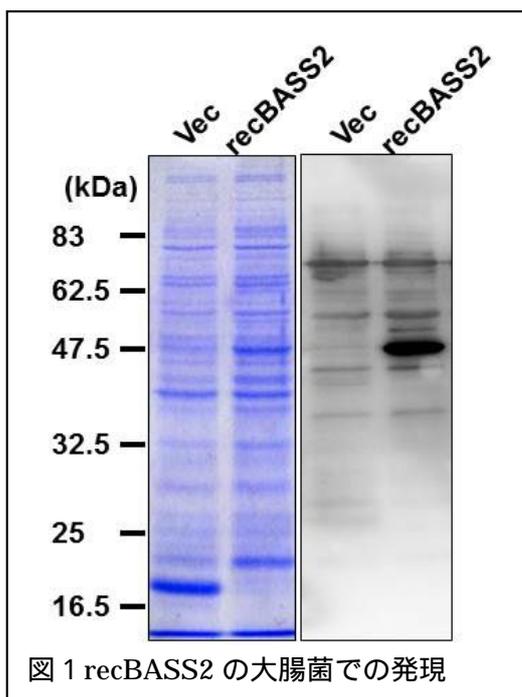


図1 recBASS2 の大腸菌での発現

BASS2 はナトリウム依存性ピルビン酸輸送体の責任分子と考えられたが、長らく活性を検出できないでいた。この問題点を解決するため、大腸菌での異種発現系において、BASS2 の機能タンパク質を発現させることに成功し(図1) その大腸菌を用いて、シリコン重層法により確認した。同手法により分離可能な、2秒後において、外液に構築したナトリウムイオン濃度勾配に従ったピルビン酸輸送の活性差を見出すことに成功し、このことから、BASS2 が、責任分子であることの証明に成功した(図2)。

同系列の単離過程で同定された BASS4 とともに、フラベリア形質転換を行い、機能破壊植物の作出を試みた。BASS2 に関しては、生育初期に異常を呈し、生体を得ることはできなかった。C4 回路にのみ機能する場合、外気の CO₂ 濃度を高めることで C4 回路の機能欠損を相補できることが知られているが、2000ppm CO₂ 下でも生育は回復しなかった。生育初期に必要な、イソプレノイド関連の代謝異常によって生育阻害が生じている可能性を示唆する。

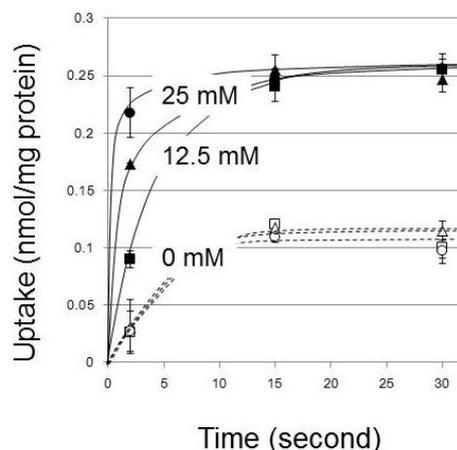


図2 ナトリウム依存性ピルビン酸輸送活性の測定結果

一方、BASS4 の機能破壊株は、通常大気中では生育異常を呈したが、2000ppm でその異常は回復した。この結果から、次の二つの結論を導くことができる。(1) さきの BASS2 の場合とは異なり、BASS4 の機能は C4 回路に限定的であること、そして(2) BASS4 は C4 回路の構成因子であること、である。

逆遺伝学的に同定された初めての C4 関連因子であると表現できる。

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2件)

- (1) Miura K and Furumoto T. "Cold Signaling and Cold Response in Plants" Int. J. Mol. Sci., 14, 5312-5337 (2013) (査読有) DOI:10.1038/nature10250
- (2) Furumoto T., Yamaguchi T., Ohshima-Ichie Y., Nakamura M., Iwata Y., Shimamura M., Ohnishi J., Hata S., Gowik U., Westhoff P., Bräutigam A., Weber A., Izui K. "Identification of a plastidial sodium-dependent pyruvate transporter." Nature 476, 472-475 (2011) (査読有) DOI:10.3390/ijms14035312

[学会発表](計8件)

- (1) Furumoto T. Identification of plastidial pyruvate transporter and hypothesis of its transporting mechanism. International Workshop of Plant Membrane Biology 2013年3月28日倉敷 岡山
- (2) 古本 強 「C4植物とC3植物のプラスチドの機能的差から見出された新規因子について」植物生理学会サテライトミーティング第15回オルガネラワークショップ 2013年3月20日 岡山

- (3) 古本 強「植物に温度センサーはあるか？ - シロイヌナズナとトウモロコシの温度応答から学ぶ」新学術領域テクニカルワークショップ 公開セミナー
2012年10月18日 基礎生物学研究所
- (4) 古本 強「C4回路上の最後の未知因子、ピルビン酸輸送の分子実態の同定」トランスporter研究会九州部会 2012年9月1日 福岡歯科医師会館
- (5) 古本 強「プラスチド局在ナトリウム依存性ピルビン酸輸送体の同定とその後」日本農薬学会 第37回大会「新農薬創生への展望」シンポジウム 2012年3月15日 岡山大学
- (6) 古本 強「プラスチドで機能するナトリウム依存性ピルビン酸輸送体の分子機構」酵母細胞シンポジウム 2012年3月9日 広島大学
- (7) 古本 強「色素体包膜でのピルビン酸の輸送分子機構」ストレス科学研究シンポジウム 2012年3月8日 岡山大学資源植物科学研究所
- (8) 古本 強「冬季栽培性植物に認められる温度感受性についてシロイヌナズナから迫る」第6回ムギ類研究会 2011年11月26日 木原生物学研究所

〔図書〕(計1件)

- (1) Furumoto T. Identification of the sodium-dependent pyruvate transporter located in plastid envelopes (Vision for next-generation pesticides) Journal of Pesticide Science 37, 381-385 (2012)(査読付)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古本 強 (FURUMOTO, Tsuyoshi)

龍谷大学・文学部・教授

研究者番号：30313208