

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450077

研究課題名(和文)葉緑体CemA2の機能と栄養環境変化における役割

研究課題名(英文)Function of chloroplast CemA2 and its role under nutritional environmental change

研究代表者

大河 浩(Ohkawa, Hiroshi)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：70436012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体は光合成反応や脂質合成などの代謝経路において重要な役割を持っており、膜を通して様々な物質のやりとりをしているがその全容解明には至っていない。AtCemA2は葉緑体に局在し、AtCemA2機能欠損ホモ系統およびコントロール野性個体から単離した無傷葉緑体緩衝液懸濁液を用いた解析から、AtCemA2は光照射後のプロトン放出活性に関与していることが示唆された。これらのことから未解明であった葉緑体包膜プロトン輸送に関する分子実体の1つはAtCemA2であると結論づけた。

研究成果の概要(英文)：Chloroplasts have important roles in photosynthesis reactions and metabolic processes including the biosynthesis of fatty acids. They exchange various materials through the envelopes, however it does not lead to whole aspect elucidation.

Our results show that AtCemA2, one of the candidate proteins, was localized in the chloroplast. In an attempt to dissect the function of the AtCemA2, we have isolated intact chloroplasts from control and knockout mutant leaves, respectively, and have analyzed proton transport activity under various conditions. These results suggested that AtCemA2 was related in proton efflux activity after the light irradiation. We concluded that AtCemA2 was one of the molecular proteins, which have the function of chloroplast envelope proton transport.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：葉緑体 プロトン 環境応答

1. 研究開始当初の背景

植物の葉緑体は光合成ばかりでなく、窒素同化反応、脂肪酸合成、分枝アミノ酸合成など生育に重要な諸反応が行われる場であり、関連遺伝子の機能同定が行われてきている。しかしながら、非常に重要な働きをするにもかかわらず長年不明であった葉緑体包膜局在のピルビン酸輸送体の実体が最近ようやく同定されるなど特に輸送体について十分に理解されていないことも多い。物質は包膜を介して輸送されることになるが、プロトン勾配や pH 維持のためのプロトン輸送が同時に想定されている。この反応は、物質の輸送活性ばかりでなく、炭素固定反応などストロマ内の諸反応全体に影響を及ぼす重要な反応であるが、生理生化学的知見はあるものの、その分子実体を明確に証明した報告例はなかった。

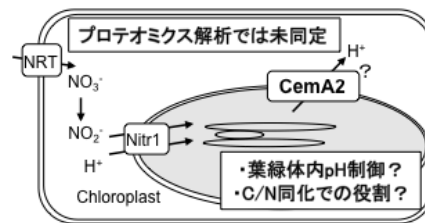
一方で、申請者らはラン色細菌の無機炭素輸送欠損株のスクリーニングから葉緑体内包膜局在性の機能未知遺伝子 *cemA* と相同性を持つ *pxcA* 遺伝子を単離し、酸性での CO_2 輸送活性への間接的な寄与および光依存性のプロトン放出に寄与していることを明らかにしてきた。これらの結果から、*CemA* も同様の機能をしていると推定されているが実質的な証拠は今まで報告にない。*PxcA* の配列構造は *CemA* と比べ保存された領域の他に N 末端側に長くなっており、*CemA* を用いての相補試験では *PxcA* 変異株の機能が回復しないことから、同じ機能を有していないと推察している。また今までに葉緑体包膜を介したプロトン輸送に関わる幾つかの報告がある。例えば植物葉緑体の炭素固定反応に伴う葉緑体外部アルカリ化とそれに続く酸性化である。しかしながら関与する分子実

体は明らかにされていない。分子実体も同定されていないので推論の域を超えていない。

塩基配列情報から *CemA* (以下 *CemA1*) と比べ N 末端が長い *CemA* パラログ (以下 *CemA2*) がシロイヌナズナやイネなどで見つかり、未解明であった葉緑体包膜プロトン輸送に関与する分子実体の 1 つである可能性が考えられた。

2. 研究の目的

葉緑体は光合成、脂質合成など重要な諸反応が行われる場であり、膜を通して様々な物質のやりとりをしているが全容解明には至っていない。申請者はラン色細菌の pH ホメオスタシスに関与する *PxcA* 同定等から、植物の機能未知 *CemA* パラログである *CemA2* が、未解明であった葉緑体包膜プロトン輸送に関与する分子実体の 1 つは *CemA2* であり、植物の代謝等に関与する役割を担っている。という仮説に行き着いた。本研究では、*CemA2* 機能欠損体葉緑体の生理解析や発現解析等を通して、*CemA2* が未解明であった現象の分子実体の 1 つであることを明らかにし、植物における *CemA2* の生理学的役割を分子レベルで検証することを目指した。



3. 研究の方法

(1) *AtCemA2* の発現様式の解析

器官特異性及び生育条件による遺伝子発現様式の解析

AtCemA2 遺伝子発現の器官特異性を RT-PCR により解析を行った。ロゼット葉および根、その他の器官 (茎、花など) について検討した。また、*AtCemA1* 発現様式も同様に調べ役割分担の可能性について検討

した。また、明期暗期条件、窒素欠乏状態から窒素添加による硝酸応答性を検討するために、窒素欠乏状態から窒素添加後による発現誘導性を窒素応答性遺伝子等と対比させながら経時的な変動を解析した。

組織・細胞特異性遺伝子発現の解析

AtCemA2 遺伝子の発現様式を組織・細胞レベルで明らかにする。5' 上流配列下流にレポーター遺伝子 (GUS) を連結した CemA2::GUS キメラ遺伝子を含むバイナリーベクターの作製をし、シロイヌナズナへの遺伝子導入を行った。得られた形質転換シロイヌナズナで GUS 活性の発現を組織学的に調べ、遺伝子発現の細胞特異性を明らかにする。

(2) AtCemA2 細胞内局在性の解析

AtCemA2 の細胞内での局在性を調べるために、35S プロモーター配列下流に ChloroP で推定された *cemA2* コード配列前半の葉緑体移行配列と推定される領域と *sGFP* 遺伝子を付加したコンストラクトをパーティクルガンによって植物細胞内に導入し、GFP の一過的発現を観察した。

また、タンパク質発現量の比較および膜局在性を明らかにするために、LCemA 特異的抗体を作製する。LCemA タンパク質は疎水領域も多いため膜から露出していると推定される N 末端側の親水性領域を抗原とする。作製した特異的抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った

(3) AtCemA 機能解明へ向けた形質転換植物の作成・選抜

AtCemA の機能を明らかにするために、AtCemA2 遺伝子領域(イントロンおよびプロモーター領域)に T-DNA が挿入された 2 系統から、遺伝子発現が完全に抑制されているホモ系統選抜を行った。

(4) AtCemA2 機能欠損させた単離葉緑体のプロトン吸収・放出反応解析

CemA2 は光照射後のプロトン吸収放出

諸反応に関与している可能性が高いと考えられた。そこで、これらの諸反応に寄与するのかどうかを明らかにするために、コントロール個体および AtCemA2 機能欠損系統から、それぞれ無傷葉緑体を単離し、マイクロ pH 電極を用いて光照射による葉緑体プロトン吸収放出反応の測定をする。AtCemA2 機能欠損形質転換シロイヌナズナ葉緑体において、特に Na⁺もしくは K⁺依存的にプロトン放出反応が阻害されるなどコントロールと異なる挙動を示すかどうか、また電子伝達阻害剤なども用いながら検討する。

4. 研究成果

(1) GFP の一過的発現系による AtCemA2 細胞内局在性の解析

AtCemA2 の細胞内での局在性を調べるために、35S プロモーター配列下流に ChloroP で推定された *cemA2* コード配列前半の葉緑体移行配列と推定される領域と *sGFP* 遺伝子を付加したコンストラクトをパーティクルガンで孔辺細胞に導入し、GFP の一過的発現を観察した。GFP の蛍光は孔辺細胞の葉緑体で認められ、葉緑体のクロロフィル蛍光とも一致した。このため、AtCemA2 は細胞内で葉緑体局在であることが示された。また、AtCemA2 に特異的なポリクローナル抗体を作製し、同様に局在性の確認を試みたが、検出には至らなかった。このことは多量に存在するタンパク質ではないためであると考えられたが、さらに検討を重ねる必要がある。

(2) RT-PCR による発現解析

器官レベルでの *AtcemA2* 発現量の違いを調べるために、葉、茎、根、花、さやのそれぞれの器官から全 RNA を抽出し、RT-PCR で *AtcemA2* 発現量の比較を行った。その結果、葉で特に *AtcemA2* の強い発現を示した。根でも比較的強い発現を示し、茎、花、さやでは弱く発現していた。光合成器官で特に強い発

現を示したことから、*AtcemA2* が光により発現応答をする可能性があるか検討するため、明期、暗期に順応した葉で比較した結果、*AtcemA2* と *cemA* 共に明期暗期で発現量に違いは見られず、*AtcemA2* は光による発現制御は受けていなかった。

また、硝酸濃度上昇時に葉緑体内に亜硝酸が積極的に取り込まれる際にはプロトンの共輸送が増加することによりストロマ pH の低下する事が考えられる。MGRL 培地で水耕栽培 3 週間の個体を 48 時間硝酸フリーの培地に移し、その後硝酸 5mM を含む 1/2 MS 培地に移し 3 時間、6 時間で *cemA2* と硝酸同化経路に関連する遺伝子 *NIR1* 等の発現変化をみた結果、硝酸応答性があることが知られている *NIR1* と同様に、*AtcemA2* さらに葉緑体包膜局在性亜硝酸輸送体遺伝子や細胞膜局在の高親和性硝酸輸送体遺伝子 *NRT2.1* の発現が誘導されていた。しかしながら *cemA* は誘導されていなかった。葉において、リアルタイム PCR により更に詳しく発現量を見たところ *AtcemA2* および *NRT2.1* は硝酸処理 6 時間で発現量が 2 倍に、*NIR1* は 8.5 倍にそれぞれ発現量が上昇していた。このように硝酸濃度上昇に伴い、葉緑体内へと亜硝酸が輸送されていく際に、他の関連遺伝子の発現上昇と同様に *AtcemA2* が発現応答を示すことが示された。

しかしながら、窒素源が十分量の培地と窒素源を制限した培地で生育比較したが、コントロールとの違いは観察されなかった。そのため、*AtCemA2* だけでは直接的に植物個体の生育には寄与しないことが明らかとなった。

(3) GUS レポーター遺伝子による *cemA2* 組織特異性発現解析

AtcemA2 の詳しい組織特異性発現を調べるために、GUS レポーター遺伝子上流に *AtcemA2* コード配列より上流の約 1.5 kb のプロモーター領域を組み込んだコンストラク

トを、アグロバクテリウムを介したフローラルディップ法によりシロイヌナズナに導入した。得られた後代の T2 世代でホモ系統を選抜し、この系統の T3 世代ホモ系統の個体を GUS レポーター遺伝子発現の観察に用いた。GUS レポーター遺伝子は、葉、特に葉肉細胞で強い発現を示し、茎、花、さやでは弱く発現していた。根では、中心柱および根の先端部で特に発現していた。*AtcemA2* は主に光合成器官で発現あり、根でも発現が見られたことから葉緑体だけではなく、根のプラスチドでも発現していることが明らかになった。

(4) 光照射による葉緑体プロトン交換活性の測定

直接的に *AtCemA2* が輸送能に関与するのか生理学的な証拠はない。光照射後の一過的な酸性化は WT に比べ KOの方が明らかに低下していた。コントロールである Col-0 と T-DNA ノックアウト系統の葉から無傷葉緑体を抽出し、光照射による無傷葉緑体プロトン交換活性を測定した。その結果、光照射後の一過的な酸性化は比較してノックアウト系統の方が明らかに低下しており、光照射後の懸濁液 pH 低下が炭素源・窒素源非存在下では 1/2 程度まで減少した。炭酸固定及び窒素同化が行えるような、より生理的な環境に近い条件として、炭素源および窒素源の存在条件下においても測定を試みた。その結果、1/3 程度までその活性が減少していた。また、光化学系の阻害剤である DCMU を加え測定を行ったところ、光照射後のプロトン放出がコントロールと *AtCemA2* ノックアウトの葉緑体どちらも検出できなかった。緩衝液の K⁺塩を Na⁺塩に置き換えた条件でも測定を行ったが、活性に差は見られなかった。以上の結果から *AtCemA2* ノックアウトにより、光照射時の葉緑体からのプロトン放出活性が減少することが示され、炭素源及び窒素源を供給した条件でよりその減少率が高くなることが示さ

れた。この光照射後に見られるプロトンの放出活性は光依存的なものであることが示唆された。また完全に活性が阻害されなかったことから、さらに炭素源・窒素源存在下において光合成電子伝達に依存しない葉緑体包膜を介したプロトン吸収活性の存在が示唆された。ホモログ遺伝子と考えられるシアノバクテリアの *pxcA-K0* 株では細胞外の酸性化は完全に起こらなくなり、葉緑体での阻害の程度と明らかに異なっていた。

プロトン吸収・放出に影響を及ぼしていれば、葉緑体で初めて直接的に関与分子が証明されたことになる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

貝塚亮、田中康史、大河浩、葉緑体プロトン放出能への *CemA2* の寄与、第 4 回東北植物学会大会、2014 年 12 月 13 日～2014 年 12 月 14 日、山形大学(山形)

田中康史、貝塚亮、石間森人、大河浩、プラスチド局在性 *cemA2* プロトン放出機構と役割、第 78 回大会日本植物学会、2014 年 9 月 12 日～2014 年 9 月 14 日、明治大学(神奈川)

田中康史、大河浩、プラスチド局在性 *cemA2* の発現特性と役割、日本植物学会、2013 年 9 月 13 日～2014 年 9 月 15 日、北海道大学(札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6．研究組織

(1)研究代表者

大河 浩(OHKAWA, Hiroshi)