

## C4 光合成研究の新展開 (New Era of C4 Photosynthesis)

オーガナイザー

古本 強<sup>1</sup>, 榊原 均<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 龍谷大学 農学部 植物生命科学科

〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5

<sup>2</sup> 理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22

1950年代後半から1960年代にかけての黎明期を経て、C4光合成研究は勃興し、1970年以降には完成期を迎えた。C4光合成の大気中二酸化炭素を濃縮する機構に学び、C3光合成を行うイネにこの代謝機能を付加しようという試みは、なお多くの研究者の興味をひいてやまない。

発見からの時間的経過の長さから、すでによく理解されていると思われがちなC4光合成研究ではあるが、実のところ「細胞分化のメカニズム」などこれまでに解決されてこなかった課題は残されたままで、これらの未解決の課題は、応用研究の実現性を妨げ続けている。他方で、地球レベルでの人口増加の勢いは止まらず、「第二の緑の革命」が必要とされている現在、このC4光合成研究に再び焦点を当て、最新の技術を適用することで、先に指摘した複数の課題を超えることができないか、そしてその基礎研究をもとにイネに機能付与できないか、と期待する世界的な風潮が認められている。こうした背景の中、日本においても機能付与のための実装研究や輸送体分子の同定、電子伝達の機能分化研究、これまで十分に検討されてこなかった環境応答機構、次世代シーケンス技術を駆使した網羅的発現解析、最新研究のためのプラットフォーム構築など、従来にはなかったC4光合成研究が展開されつつある。

本稿では、こうした新たな展開を見せようとしているC4光合成研究を紹介できる一助となればと、2014年9月に開催された日本植物学会 第78回大会において開催されたC4光合成研究をリードする研究者によるシンポジウムの内容を再構成した。

シンポジウム開催にあたり大変お世話になった大会実行委員会の先生方、レビュー執筆の機会を与えてくださった広報委員の先生方に深くお礼申し上げます。

## C<sub>4</sub>植物におけるストレス応答の細胞特異性

谷口光隆, 三宅博

名古屋大学大学院生命農学研究科

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

Cell specificity of stress responses in C<sub>4</sub> plants

Key words: abscisic acid, C<sub>4</sub> plant, chloroplast, environmental stress, reactive oxygen

Mitsutaka Taniguchi & Hiroshi Miyake

Graduate School of Bioagricultural Sciences

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan

### 1. はじめに

C<sub>4</sub>植物の葉組織では、維管束の周りを維管束鞘細胞が取り囲み、さらにその外側を葉肉細胞が取り巻いており、CO<sub>2</sub>濃縮回路であるC<sub>4</sub>回路はその両細胞にまたがって駆動している。C<sub>4</sub>植物は優れた光合成能と環境耐性能を発揮することから、その回路をC<sub>3</sub>植物に導入して生産性の向上した植物を開発しようとする研究が行われている。しかし、単にC<sub>4</sub>回路を構成する酵素遺伝子を導入するだけでなく、回路の活性調節機構や代謝産物輸送機構、さらには葉肉および維管束鞘細胞の構造と機能の分化ならびにその分化制御機構を解明して導入していくことが重要である。

我々は葉肉細胞および維管束鞘細胞の環境ストレスに対する応答を細胞内構造の面から比較し、その応答性や耐性が両細胞間で分化していることを明らかにしてきた。本稿では、環境ストレスに応答した葉緑体の傷害発現ならびに細胞内配置変動が両光合成細胞間で異なる事例について紹介する。

### 2. 環境ストレスに伴う細胞特異的な葉緑体傷害

#### 2-1. 葉緑体傷害発現の細胞特異性

C<sub>4</sub>植物の葉肉細胞と維管束鞘細胞には発達した葉緑体が多数存在するが、中に含まれる代謝酵素やタンパク質には顕著な差異が見られ、機能分化が起こっている (Majeran & Wijk 2009, Zhao et al. 2013)。葉緑体構造にも差異が見られ、特にトウモロコシなどのNADP-マリックエンザイム (ME) 型 C<sub>4</sub>植物では、維管束鞘葉緑体チラコイドのグラナ形成が抑制されている (三宅 1999)。強光、乾燥、塩などの環境ストレス下の葉緑体では、CO<sub>2</sub>固定反応が低下して光化学反応で生じる還元力が過剰となり、活性酸素生成が促進され、光合成機能が低下する光阻害を引き起こす。環境ス

トレスに伴う光化学系 II の光阻害はトウモロコシの葉肉細胞および維管束鞘細胞のチラコイドで同程度であるにもかかわらず (Pokorska and Romanowska 2007), 葉肉葉緑体の方が傷害を受けやすいことを我々は見出した (Hasan et al. 2005)。すなわち, 塩ストレスに伴い葉肉葉緑体のチラコイドの膨潤, グラナの積み重なり減少, 包膜の崩壊が顕著になるが, 維管束鞘葉緑体の構造に変化は見られなかった。この葉肉細胞特異的なストレスに伴う葉緑体傷害はトウモロコシ以外の NADP-ME 型 C<sub>4</sub> 植物 (Omoto et al. 2009) ならびに NAD-ME 型 C<sub>4</sub> 植物およびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PCK) 型 C<sub>4</sub> 植物においても確認されている (Omoto et al. 2010)。また, NADP-ME 型 C<sub>4</sub> 植物の維管束鞘細胞においては, 抑制されていたグラナ形成が塩ストレスに伴い発達する (グラナの積み重なりが増える) 現象が起こり (Hasan et al. 2006, Omoto et al. 2009), 環境ストレスに対する応答性や耐性が葉肉細胞と維管束鞘細胞間で分化していることが判明した。ところで, C<sub>3</sub> 植物のイネにおいては, むしろ維管束鞘葉緑体の方がストレス傷害を受けやすく (Yamane et al. 2003), C<sub>3</sub> 植物と C<sub>4</sub> 植物の葉緑体の環境適応機構には多様性があり, その分子機構の解明が新たなストレス耐性植物開発に重要であると考えられる。

## 2-2. 葉緑体傷害の分子機構

前述の環境ストレスに伴う葉緑体傷害は光依存的であり, 葉組織への Na<sup>+</sup> イオンの過剰蓄積が直接的な原因ではなく, ストレス下で生じる活性酸素が葉緑体傷害を引き起こしていることをイネおよびトウモロコシにおいて明らかにしている (Mitsuya et al. 2003, Yamane et al. 2004a, 2004b, Hasan et al. 2005)。そこで, ストレス下での活性酸素種の細胞内局在についてトウモロコシの葉肉細胞と維管束鞘細胞を比較したところ, 傷害を受けやすい葉肉葉緑体内に活性酸素 (スーパーオキシド O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 過酸化水素 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の蓄積が検出された (Omoto et al. 2013)。さらに, 塩ストレスを受けたトウモロコシ葉より両葉緑体を単離し, 活性酸素消去系酵素の活性を調べた結果, O<sub>2</sub><sup>-</sup>を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に変換するスーパーオキシドジスムターゼ活性は塩ストレスにより両葉緑体で増加したが, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を水に変換して無毒化するアスコルビン酸ペルオキシダーゼおよびアスコルビン酸再生に関わるデヒドロアスコルビン酸レダクターゼの両活性は維管束鞘葉緑体においてのみ増加が見られた (Omoto et al. 2013)。したがって, 塩ストレスに伴い生成する活性酸素に対して, 維管束鞘葉緑体では活性酸素消去系の酵素活性を増大させて対処するが, 葉肉細胞では十分な対処がなされないため活性酸素が過剰蓄積し傷害が誘発されることが考えられる。そもそも, トウモロコシの維管束鞘葉緑体には光化学系 II が少なく, 酸素発生が起こりにくい。そのため, 活性酸素の生成が低く抑えられており, ストレスに応答した活性酸素消去系の活性化と相まって, 維管束鞘葉緑体では積極的なストレス防御機構が働いていると考えられる。この維管束鞘葉緑体特異的な活性酸素消去能の活性化 (あるいは遺伝子発現の増大) は他の C<sub>4</sub> サブタイプ種でも共通なのか, また, 葉肉葉緑体の活性酸素消去能が維管束鞘葉緑体並みに進化の過程で発達しなかった理由を今後解明し

ていく必要がある。

### 3. 環境ストレスに伴う細胞特異的な葉緑体運動

#### 3-1. 葉肉葉緑体特異的な凝集運動

C<sub>4</sub>植物の両光合成細胞内の葉緑体は異なる細胞内配置をとり、葉肉葉緑体が細胞周縁部に散在している。一方、維管束鞘葉緑体は種によって維管束側あるいは葉肉細胞側に局在しており、その葉緑体局在配置をそれぞれ求心的配置、遠心的配置とよんでいる。我々は、NAD-ME型C<sub>4</sub>植物シコクビエの葉に極強光(3,000~4,000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光)を照射すると、葉肉葉緑体が維管束鞘細胞側に移動することを見出した(Yamada et al. 2009)(図1)。

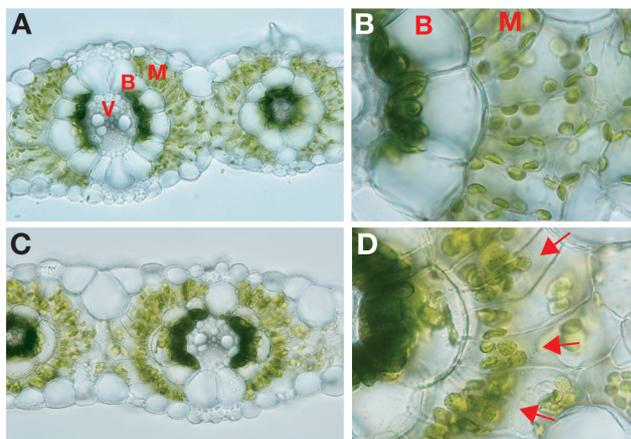


図1. C<sub>4</sub>植物の葉肉細胞における極強光にตอบสนองした葉緑体凝集運動

シコクビエ葉身に通常光(250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 白色光)(A, B)または極強光(4,000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 白色光)(C, D)を向軸側(図の上側)から2時間照射した。強光照射により葉肉葉緑体の凝集運動が見られたが(図中の矢印)、維管束鞘葉緑体の求心的配列に変化は見られなかった。図BおよびDは、それぞれ図AおよびCの一部を拡大したものである。B: 維管束鞘細胞, M: 葉肉細胞, V: 維管束

葉緑体が光にตอบสนองして移動する現象は“葉緑体光定位運動”としてC<sub>3</sub>植物を対象とした研究が進んでいる(末次&和田2013)。すなわち、弱光下での葉緑体は光の入射方向と垂直な細胞面に集まる“集合運動”を起こしてなるべく光を捕集しようとする(図2)。一方、強光下では葉緑体が光の入射方向と平行な細胞壁側へ移動する“逃避運動”を起こして強光ストレスを低減させようとする。我々は、シコクビエで見出された葉肉葉緑体の維管束鞘細胞側への移動を“凝集運動”と命名して集合・逃避運動と区別し、その生理的役割と分子機構の解明を目指すこととした。なお、維管束側に片寄った求心的配置をとるシコクビエの維管束鞘葉緑体は、長時間の強光照射によってもその位置を変化させず(図1)、両細胞の葉緑体は細胞内配置においても異なるストレス応答戦略を用いていると考えられる。

C<sub>4</sub>植物の葉肉葉緑体が凝集運動を起こすことは乾燥ストレスを受けたトウモロコシ(Lal & Edwards 1996) やスベリヒユ(Guralnick et al. 2002)において既に報告がある。そこで、強光以外

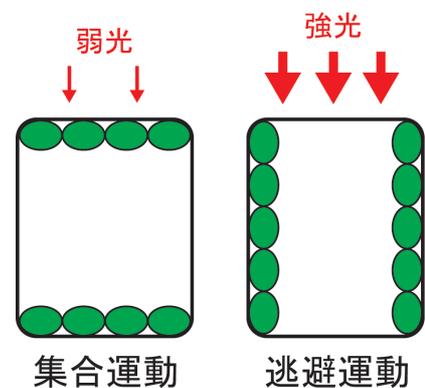


図2. C<sub>3</sub>植物の葉緑体における集合運動と逃避運動

模式図はC<sub>3</sub>植物葉肉細胞の側面図であり、緑色の楕円は葉緑体を示す。

他のストレスへの応答をシコクビエを用いて調べたところ、乾燥、塩、あるいは浸透圧ストレスを植物体を受けると、通常光 ( $250\sim 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 下でも葉肉葉緑体の凝集運動が起こることが判明した (Yamada et al. 2009)。また、乾燥ストレスにより葉肉葉緑体の凝集運動が見られたシコクビエに再び水を与えたところ、葉肉葉緑体が半日以上かけてゆっくりと元のバラバラな配置に戻っていく様子が観察された。したがって、葉肉葉緑体の凝集運動は、環境ストレスに応答した可逆的な生理応答であるといえる。根から吸収した水が葉細胞に行きわたり、凝集運動を誘起していたストレス状態から回復することで、元の葉緑体配置へ戻ったと考えられる。このような葉肉葉緑体の凝集運動は、真夏の炎天下の乾燥した圃場で生育中のシコクビエやトウモロコシでも観察されたことから、過酷かつ複合的な自然環境下で生育する  $C_4$  植物において通常起きている現象だと考えられる。

### 3-2. 凝集運動の分子機構

$C_3$  植物であるシロイヌナズナの葉緑体集合・逃避運動は、フォトトロピンによる青色光受容により誘起され、アクチン繊維を介して運動が起こる (末次&和田 2013)。実は、この葉緑体の集合および逃避運動は  $C_4$  植物においても観察されている (Inoue & Shibata 1974, Taniguchi et al. 2003)。また、シコクビエの葉片に青色光を照射すると一部の葉緑体が逃避運動を起こすが、葉組織内にアブシジン酸 (ABA) を減圧浸透させてから青色光照射すると葉緑体は凝集運動を起こすことが見出された (間合ら 2011, Maai et al. 2011b) (図3)。なお、赤色光下では葉緑体凝集運動は起こらなかった。以上のことより、 $C_4$  植物も  $C_3$  植物と同じく集合・逃避の葉緑体運動機構をもつが、それに加えて  $C_4$  植物は葉緑体を凝集運動させる分子機構も合わせもち、ABA は青色光で誘導される逃避運動を凝集運動へとシフトさせる誘導因子となっていると考えられる。そして、環境ストレスを植物が感知すると葉内の ABA 含量が増大して情報伝達がおき、凝集運動が誘導される

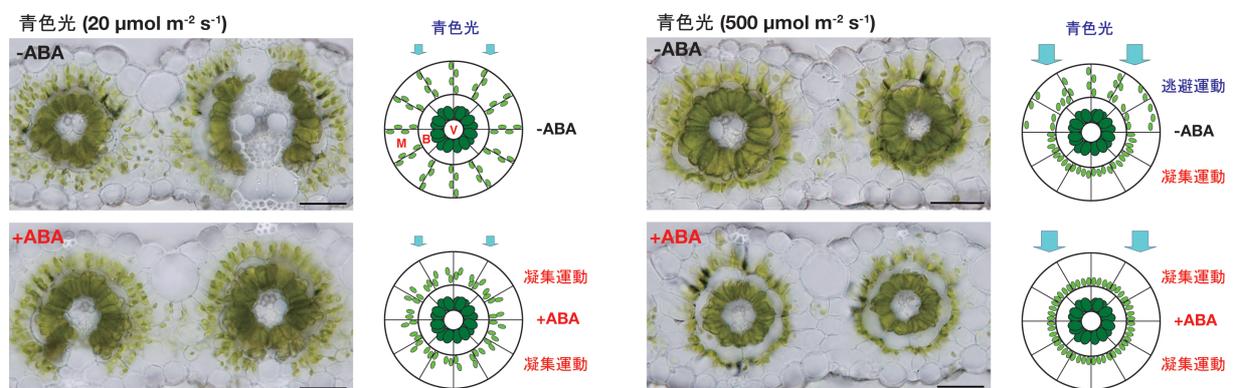


図3. 青色光および ABA に応答したシコクビエ葉緑体の細胞内配置の変化

シコクビエの葉身葉片に  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (左写真と模式図) または  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (右写真と模式図) の青色光を向軸側 (図の上側) から 8 時間照射後、横断切片を作製して光学顕微鏡観察した。上段は ABA 非処理、下段は  $30 \mu\text{M}$  ABA 溶液を葉内に減圧浸透後、光照射を行っている。B: 維管束鞘細胞, M: 葉肉細胞, V: 維管束

と推察される。実際、ストレスに伴う葉内 ABA 含量の増大と葉肉葉緑体の凝集配置の増大には正の相関があることを我々は確認している（未発表データ）。一方、C<sub>3</sub> 植物葉緑体の集合・逃避運動に植物ホルモンが関与するという報告はなく、ストレスに応答した C<sub>4</sub> 葉肉葉緑体の凝集運動に特異的であると考えられる。

環境ストレスや ABA で誘導される葉肉葉緑体の凝集運動は暗所では起こらず光依存的であることから、光化学系で生成した活性酸素が凝集運動の誘導シグナルになっている可能性が考えられた。実際、C<sub>3</sub> 植物シロイヌナズナの葉緑体逃避運動は、過酸化水素の共存で促進されるという報告がなされている（Wen et al. 2008）。そこで、シコクビエ葉片に ABA と過酸化水素を浸透後に暗所下でインキュベートしたが、葉肉葉緑体の凝集運動は誘導されなかった。また、明所下での ABA に応答した凝集運動は、活性酸素スカベンジャーを共存させても阻害されなかった（Maai et al. 2011b）。したがって、C<sub>3</sub> 植物と異なり、C<sub>4</sub> 植物の凝集運動に対して活性酸素は関与していないと考えられた。

C<sub>3</sub> 植物の葉緑体運動を引き起こすアクチン繊維の動態や運動制御に関わるタンパク質因子が明らかになりつつある（末次&和田 2013）。一方、C<sub>4</sub> 植物の葉緑体運動については、アクチン繊維が凝集運動に関与していることを阻害剤実験により確認しているが（Yamada et al. 2009）、制御因子は不明であり、今後の研究課題である。葉緑体の運動方向制御についても興味もたれる。すなわち、凝集運動において葉肉葉緑体は維管束鞘細胞側へ動き同心円状に集合するが、逃避運動での葉緑体の移動方向は光の入射方向と平行な細胞壁側であり、隣接する葉肉細胞側への動きである。したがって、葉緑体を維管束鞘細胞側に向かわせる凝集運動機構が存在しており、維管束鞘細胞から何らかのシグナルが放出され、それを葉肉細胞が感知して方向性をもった葉緑体運動が引き起こされている可能性も考えられる。なお、環境ストレスに応答した凝集運動は葉緑体特異的であり、核やミトコンドリアの細胞内移動は見られなかった（Yamada et al. 2009）。一方、C<sub>3</sub> 植物においては葉緑体とともに核やミトコンドリアも逃避運動することが報告されており（Iwabuchi et al. 2007, Tsuboi et al. 2007, Islam et al. 2009）、C<sub>4</sub> 葉肉葉緑体の凝集運動に特異的な制御機構が存在すると推定される。

以上のように、C<sub>4</sub> 葉肉細胞は、C<sub>3</sub> 植物でみられる葉緑体逃避運動に加えて、ストレスシグナル ABA により誘導される葉緑体凝集運動機構をもつことが明らかとなった。しかし、ストレスに応答して葉内で ABA がどのように蓄積され、その ABA を葉肉細胞がどのように検知して葉緑体凝集運動を引き起こすのか、葉緑体をどのようにして維管束鞘細胞側へ移動させているのかといった情報伝達や運動制御の詳細は解明できていない。また、凝集運動の生理的役割も証明できていない。このような未解明点を明らかにするには、凝集運動を起こさない変異体を用いた解析が有効であるが、そのような変異体は見出されておらず、自ら単離する必要がある。変異体が単離できたならば、凝集運動変異体と野生体の間で環境ストレス感受性や光合成能を比較することで、

凝集運動の生理的役割が明らかになるであろう。また、変異体の原因遺伝子の同定を行い、コードタンパク質の機能を明らかにすることで、凝集運動の分子機構が解明されると考えられる。我々は、今後の C<sub>4</sub> モデル植物と目されるエノコログサ (*Setaria viridis*) を研究対象に定め、現在、凝集運動変異体の探索を行っている。

### 3-3. 凝集運動の普遍性

植物体をストレスにさらすと、C<sub>4</sub> 光合成のサブタイプに関わらず調べたすべての単子葉 C<sub>4</sub> 植物において葉肉葉緑体の凝集運動が観察された。しかし、その凝集運動の程度には種間差が見られ、NADP-ME 型 C<sub>4</sub> 植物 (トウモロコシ, ソルガムなど) では凝集運動よりも逃避運動が顕著に起こる場合が多い (Yamada et al. 2009)。一方、NAD-ME 型 C<sub>4</sub> 植物 (シコクビエ, キビなど) では維管束間の葉肉葉緑体が一部逃避運動しているものの、凝集運動が強く現れる。PCK 型 C<sub>4</sub> 植物のギニアグラスでは弱い凝集運動しか起こらないが、ローズグラスでは強い凝集運動が見られた。また、環境ストレスに伴う葉緑体凝集運動の応答性を単子葉 C<sub>4</sub> 植物と双子葉 C<sub>4</sub> 植物間で比較したところ、単子葉 C<sub>4</sub> 植物の方が顕著な応答性が見られた。したがって、ストレスに応答した葉肉葉緑体の凝集運動は C<sub>4</sub> 光合成のサブタイプに関わらず多くの C<sub>4</sub> 植物で誘導されるが、その程度は植物種によって異なることが明らかとなった。C<sub>4</sub> 植物種によってストレスに対する応答・耐性の程度ならびに対応戦略が異なり、凝集運動の発現にも差異が生じると考えられる。凝集運動の程度を葉構造、供試植物が属する系統グループ、維管束鞘葉緑体の細胞内配置やグラナの発達度、維管束鞘細胞からの CO<sub>2</sub> の漏出率などと比較したが、明白な関連性は見いだせず、凝集運動の程度差を導く要因の解明は今後の課題である。

葉片に ABA 溶液を浸透後、青色光を照射すると葉肉葉緑体の凝集運動が引き起こされる応答反応について、イネ科植物を主とする様々な植物について比較した (Maai et al. 2011b)。その結果、調べた単子葉 C<sub>4</sub> 植物および双子葉 C<sub>4</sub> 植物の全てにおいて凝集運動が観察された (未発表データ)。一方、C<sub>3</sub> 植物の葉肉葉緑体で凝集運動は観察されず、強光に応答した逃避運動のみが見られた。パニカム属 (単子葉類イネ科) やフラベリア属 (双子葉類キク科) 植物には、C<sub>3</sub> 型、C<sub>4</sub> 型、および C<sub>3</sub> 型から C<sub>4</sub> 型への進化途上と考えられる C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型の植物種が存在するので、ABA と青色光に応答した葉肉葉緑体凝集運動を両属の様々な植物種で比較した。その結果、C<sub>3</sub> 型種では逃避運動のみが見られた一方、C<sub>4</sub> 型種では凝集運動が見られた。また、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型種では弱い凝集運動が見られる種と、見られない種があった。以上の結果より、C<sub>4</sub> 植物は ABA と青色光に応答した凝集運動機構を普遍的に有しており、逃避運動機構をもつ C<sub>3</sub> 植物から C<sub>4</sub> 植物が分岐進化する過程で、C<sub>4</sub> 植物特有の細胞内構造や代謝様式の獲得とともに葉緑体凝集運動機構も獲得してきたと推察される。

### 3-4. 凝集運動の生理的役割

集合運動は弱光の効率的捕集を、逃避運動は強光からの回避をそれぞれ担うという明確な生理的役割が見出されている（末次&和田 2007）。一方、 $C_4$ 植物の凝集運動の生理的役割は明らかになっていない。推定される役割として、(1) 葉緑体の相互被陰による強光ストレス障害からの防御、(2) 維管束鞘細胞から漏出した  $CO_2$  の再捕捉促進（ストレス下ではカルビン回路による  $CO_2$  固定能が低下するので、脱炭酸された  $CO_2$  が Rubisco で固定されず葉肉細胞に漏出しやすくなる）、(3) ストレス下での  $C_4$  回路駆動の維持（葉肉葉緑体が維管束鞘細胞側へ凝集することで  $C_4$  光合成中間代謝産物の細胞間移動距離が減少することになり、ストレス下でも  $C_4$  回路駆動を高活性のままに維持しようとする）などが考えられる（図4）（Maai et al. 2011a）。

シコクビエを乾燥ストレスまたは塩ストレスにさらすと徐々に光合成速度、気孔コンダクタンスおよび蒸散速度が低下するが、それらの低下と葉肉葉緑体の凝集配置の程度には相関が見られた。したがって、凝集運動は、環境ストレスによって引き起こされる光合成活性低下に先んじる積極的な防御機構というよりは、光合成代謝の変動と連動した何らかの生理的役割があるのではないかと推察される。一方、環境ストレスに応答して葉肉葉緑体が凝集運動する  $C_4$  植物の生理応答は  $C_3$  植物には見られないものであることから、高温、強光、乾燥などの過酷な環境下でも生育する  $C_4$  植物が獲得した生存戦略の一つである可能性もあり、ストレス耐性の視点からも凝集運動の役割を解析する必要があるだろう。

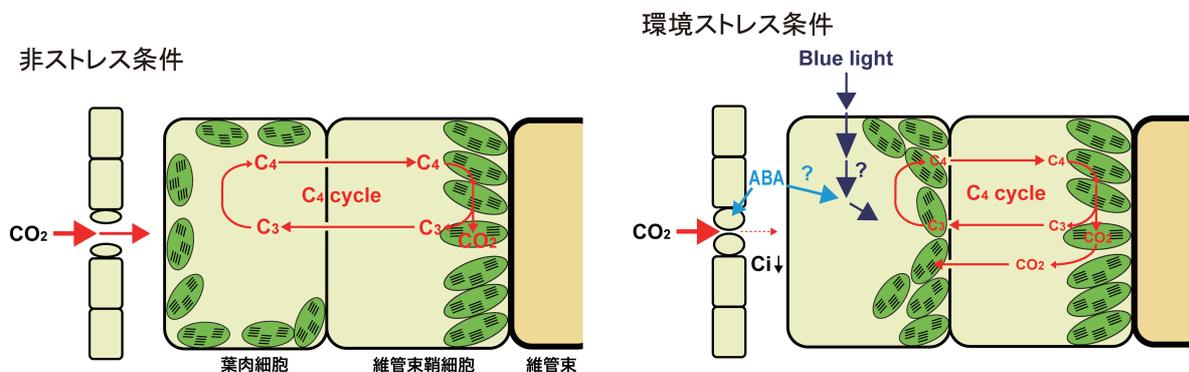


図4. 環境ストレスに応答した  $C_4$  植物特異的な葉肉葉緑体凝集運動

維管束鞘葉緑体が求心的配置をとる  $C_4$  植物（シコクビエなど）の葉身組織の模式図。非ストレス条件下では、葉肉葉緑体は細胞周縁部にバラバラに存在している。強光、乾燥、塩などの環境ストレスに応答して葉内の ABA 含量が増大し、気孔の閉鎖や葉肉葉緑体の凝集運動が起こる。

## 4. おわりに

隣り合う細胞でありながら葉肉細胞と維管束鞘細胞は構造および機能が分化しており、両葉緑体のグラナ構造、光化学系含量、細胞内配置の違いのみならず、環境ストレス応答・耐性も両葉緑体で異なることを示してきた。環境ストレスに応答して維管束鞘葉緑体をより優先的に傷害か

ら防御することは、維管束鞘葉緑体に局在するカルビン回路の活性維持に重要なのであろうか。通常は細胞周縁部に分散して配置しているが環境ストレスに応答して細胞内での位置を変える葉肉葉緑体と、細胞の成熟途中で獲得した細胞内局在を維持しようとする維管束鞘葉緑体 (Kobayashi et al. 2009) はストレスに対する耐性戦略が異なり、両細胞での代謝の分業と深く関わっていることが予想される。

このような C<sub>4</sub> 植物の細胞特異的なストレス応答を解析することは、葉肉および維管束鞘細胞のストレス耐性機構の分化ならびに C<sub>3</sub> 植物から C<sub>4</sub> 植物への進化を研究する上での新しい知見を提供できると考えられる。また、一般に C<sub>4</sub> 植物が C<sub>3</sub> 植物に比べて環境ストレス耐性能が高いと言われる要因を、葉緑体の活性酸素消去系や細胞内配向性から解明していくことができるかもしれない。細胞特異的なストレス応答・耐性のメリットと分子機構を解明できれば、C<sub>4</sub> 植物の更なる機能改良や C<sub>3</sub> 植物の C<sub>4</sub> 化を行うにあたっての新たな分子基盤を提供できるかもしれないと考え、研究を進めている。

## 引用文献

- Guralnick, L.J., Edwards, G., Ku, M.S.B., Hockema, B., & Franceschi, V.R. 2002. Photosynthetic and anatomical characteristics in the C<sub>4</sub>-crassulacean acid metabolism-cycling plant, *Portulaca grandiflora*. *Funct. Plant Biol.* 29: 763–773.
- Hasan, R., Ohnuki, Y., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. 2005. Differential sensitivity of chloroplasts in mesophyll and bundle sheath cells in maize, an NADP-malic enzyme-type C<sub>4</sub> plant, to salinity stress. *Plant Prod. Sci.* 8: 567–577.
- Hasan, R., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. 2006. Salinity stress induces granal development in bundle sheath chloroplasts of maize, an NADP-malic enzyme-type C<sub>4</sub> plant. *Plant Prod. Sci.* 9: 256–265.
- Inoue, Y. & Shibata, K. 1974. Comparative examination of terrestrial plant leaves in terms of light-induced absorption changes due to chloroplast rearrangements. *Plant Cell Physiol.* 15: 717–721.
- Islam, M.S., Niwa, Y., & Takagi, S. 2009. Light-dependent intracellular positioning of mitochondria in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* 50: 1032–1040.
- Iwabuchi, K., Sakai, T., & Takagi, S. 2007. Blue light-dependent nuclear positioning in *Arabidopsis thaliana* leaf cells. *Plant Cell Physiol.* 48: 1291–1298.
- Kobayashi, H., Yamada, M., Taniguchi, M., Kawasaki, M., Sugiyama, T., & Miyake, H. 2009. Differential positioning of C<sub>4</sub> mesophyll and bundle sheath chloroplasts: recovery of chloroplast positioning requires the actomyosin system. *Plant Cell Physiol.* 50: 129–140.
- Lal, A., & Edwards, G.E. 1996. Analysis of inhibition of photosynthesis under water stress in the C<sub>4</sub> species *Amaranthus cruentus* and *Zea mays*: electron transport, CO<sub>2</sub> fixation and carboxylation capacity. *Aust. J.*

*Plant Phys.* 23: 403–412.

- 間合絵里, 三宅博, 谷口光隆 2011. 青色光と ABA に応答した C<sub>4</sub> 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.
- Maai, E., Miyake, H., & Taniguchi, M. 2011a. Differential positioning of chloroplasts in C<sub>4</sub> mesophyll and bundle sheath cells. *Plant Signal. Behav.* 6: 1111-1113.
- Maai, E., Shimada, S., Yamada, M., Sugiyama, T., Miyake, H., & Taniguchi, M. 2011b. The avoidance and aggregative movements of mesophyll chloroplasts in C<sub>4</sub> monocots in response to blue light and abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 62: 3213-3221.
- Majeran, W. & van Wijk, K.J. 2009. Cell-type-specific differentiation of chloroplasts in C<sub>4</sub> plants. *Trends Plant Sci.* 14: 100-109.
- Mitsuya, S., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. 2003. Light dependency of salinity-induced chloroplast degradation. *Plant Prod. Sci.* 6: 219-223.
- 三宅博. 1999. C<sub>4</sub> 光合成と作物. *日本作物学会紀事* 68: 1-9.
- Omoto, E., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. 2009. Salinity induces granal development in bundle sheath chloroplasts of NADP-malic enzyme type C<sub>4</sub> plants. *Plant Prod. Sci.* 12: 199–207.
- Omoto, E., Nagao, H., Taniguchi, M., & Miyake, H. 2013. Localization of reactive oxygen species and change of antioxidant capacities in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize under salinity. *Physiol. Plant.* 149: 1-12.
- Omoto, E., Taniguchi, M., & Miyake, H. 2010. Effects of salinity stress on the structure of bundle sheath and mesophyll chloroplasts in NAD-malic enzyme and PCK type C<sub>4</sub> plants. *Plant Prod. Sci.* 13: 169-176.
- Pokorska, B., & Romanowska, E. 2007. Photoinhibition and D1 protein degradation in mesophyll and agranal bundle sheath thylakoids of maize. *Funct. Plant Biol.* 34: 844–852.
- 末次憲之, 和田正三 2007. 光環境と光ストレスに対する葉緑体光定位運動による適応. *蛋白質核酸酵素* 52: 587-593.
- 末次憲之, 和田正三 2013. 陸上植物の光応答戦略 –陸上植物における葉緑体の運動メカニズムの新機軸–. *植物科学最前線* 4: 45.
- Taniguchi, Y., Taniguchi, M., Kawasaki, M., & Miyake, H. 2003. Strictness of the centrifugal location of bundle sheath chloroplasts in different NADP-ME type C<sub>4</sub> grasses. *Plant Prod. Sci.* 6: 274-280.
- Tsuboi, H., Suetsugu, N., Kawai-Toyooka, H., & Wada, M. 2007. Phototropins and neochrome1 mediate nuclear movement in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell Physiol.* 48: 892–896.
- Wen, F., Xing, D., & Zhang, L.R. 2008. Hydrogen peroxide is involved in high blue light-induced chloroplast avoidance movements in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 59: 2891-2901.
- Yamada, M., Kawasaki, M., Sugiyama, T., Miyake, H., & Taniguchi, M. 2009. Differential positioning of

- C<sub>4</sub> mesophyll and bundle sheath chloroplasts: Aggregative movement of C<sub>4</sub> mesophyll chloroplasts in response to environmental stresses. *Plant Cell Physiol.* 50: 1736-1749.
- Yamane, K., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. 2003. Differential effect of NaCl and polyethylene glycol on the structure of chloroplasts in rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 160: 573-575.
- Yamane, K., Rahman, M.S., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. 2004a. Pretreatment with antioxidants decreases the effects of salt stress on chloroplast ultrastructure in rice leaf segments (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* 7: 292-300.
- Yamane, K., Rahman, M.S., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. 2004b. Pretreatment with a low concentration of methyl viologen decreases the effects of salt stress on chloroplast ultrastructure in rice leaves (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* 7: 435-441.
- Zhao, Q., Chen, S. & Dai, S. 2013. C<sub>4</sub> photosynthetic machinery: insights from maize chloroplast proteomics. *Front. Plant Sci.* 4: 85.

## CP12 分子の機能の総括

### —C<sub>4</sub> 植物種フラベリアに高発現する CP12-3 の機能解析をめざして—

古本 強<sup>1,3</sup> 玉井 鉄宗<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> 龍谷大学 農学部 植物生命科学科

<sup>2</sup> 龍谷大学 農学部 資源生物科学科

<sup>3</sup> 龍谷大学 文学部

〒520-2194 大津市瀬田大江町横谷 1-5

Review of physiological function of CP12

Key words: C<sub>4</sub> photosynthesis, Light fluctuation, Metabolic regulation

Tsuyoshi Furumoto, Tesshu Tamai

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, Department of Plant Life Science,

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Department of Bioresource Science,

<sup>3</sup> Faculty of Letters

Ryukoku University

1-5 Yokotani, Seta-Ooe, Otsu, Shiga 520-2194, Japan

#### 1. はじめに

植物は絶え間なく変化する複数の環境要素に囲まれて生活しており、時々刻々と変化する各々の環境要素に適切に対応しなければならない。古くは「リービッヒの最小律」に説明されるように、複数想定される環境要素の中でも最も条件の悪い要素（制限要素）によって植物の成長は制限される。この制限要素は、同じ植物においてもたとえば生育段階の違いで変わりうるし、また、次に説明するように、特定の植物間で大きく変化しうる。本稿では、C<sub>4</sub> 植物と C<sub>3</sub> 植物との間での制限要素の変化とその制限要素への応答機構を CP12 という 80 アミノ酸ほどの低分子ポリペプチドの機能を基礎に考察する。

畑や水田で育てられるイネなどの C<sub>3</sub> 植物に分類される「作物」では、「日当たり」や「施肥」、「水分」などは農業従事者によって十分に保証されていると考えられ、多くの場合大気中の CO<sub>2</sub> 濃度が生育のスピードを制限する主要因となっている。一方で、同じ田畑に生育する植物でも、特に夏期に生育が盛んな C<sub>4</sub> 型光合成を行う雑草は、CO<sub>2</sub> 濃縮機能を持つために大気中の CO<sub>2</sub> 濃度は制限要素とはならず、「光量」がその制限要素となっている。これは光量依存性の光合成曲線からも明らかで、C<sub>3</sub> 植物の曲線は高光量領域で飽和する一方で、C<sub>4</sub> 植物のそれは高光量領域においても光量の上昇に応じて光合成活性は上昇し続ける（図 1 左）。これは、C<sub>4</sub> 植物においては、日中の雲などの被陰による光量変動が光合成活性量に反映され

ることを意味している。一方で  $C_3$  植物では、朝と夕方の低光量の時間帯を除く日中の光量はおおむね飽和しており、飽和光量以上での光量変動は光合成活性には大きな影響を与えない。この点は、 $C_4$  植物と  $C_3$  植物の間での光量環境適応上の大きな違いである（図 1 右）。

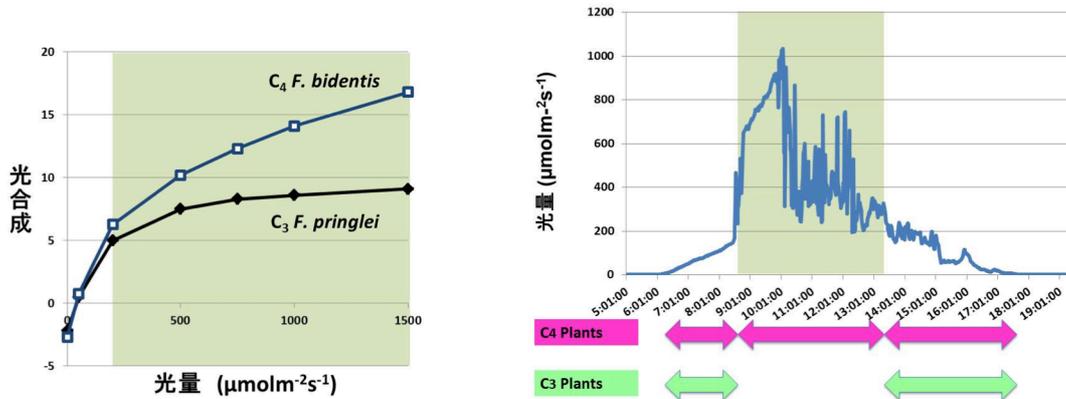


図1  $C_4$ 植物と  $C_3$ 植物の光量－光合成曲線(左)と野外の光量変化(右)。光量が  $200 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  を超える領域を陰で示した。

$C_4$ 植物の光量に応じた光合成代謝調節の機構は、どこまで明らかにされているのであろうか。 $C_3$ 植物のそれとはどのような違いがあるのであろうか。これまで植物の光合成関連の代謝制御において明らかにされている光量変動への応答機構の代表例は、光量と直接的に関連する光化学系によって産出される還元力をモニターし、いくつかの酵素活性と連動させる「酸化還元制御」が主である。

## 2. 代謝酵素の酸化還元制御と CP12

光合成代謝に関係する複数の酵素が細胞内のレドックス状況に応じて制御される現象を確立したのは Bob. B. Buchanan である (Buchanan et al. 2012)。現在では、高等植物ではグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、フルクトースビスフォスファターゼ (FBPase)、セドヘプツロースビスフォスファターゼ (SBPase)、ホスホリブロキナーゼ (PRK)、NADP 依存性リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (NADP-MDH)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) の 6 種類の代謝酵素において、各々のポリペプチド鎖内の 2 つのシステイン残基の側鎖の SH 基が酸化還元に応じて S-S 結合を分子内あるいは分子間で可逆的に生じることが知られている。中でも暗所で活性化する G6PDH 以外の 5 つの酵素については、還元型が活性型であり、酸化型が不活性型である。光合成が盛んな光環境下において光化学系が十分に働くことで葉緑体内の還元力が高まり、これらの光合成代謝関連の酵素が協調的に活性化されていることは、光化学系と光合成炭素代謝をスムーズに連動させ駆動する上で重要なことである。

1997年に Wedel らは、還元的ペントースリン酸回路 (カルビン・ベンソン回路) のメンバーである GAPDH と PRK のタンパク質分子間でおよそ 80 アミノ酸のポリペプチドである CP12 を介した複合体形成が起こることを見出した (Wedel et al. 1997)。この複合体形成は、

暗所におかれた植物において5分以内に起こる比較的素早い反応であり、光量変化に対して変化する光合成速度とPRKの複合体形成の間で強い相関性を示すことから、光合成活性を調節する新たなメカニズムとして注目されている(Howard et al. 2008)。Wedelらの発見に引き続き、複数の研究者らによって、CP12について分子系統学的解析や生化学的解析、生理学的解析、結晶構造解析など多角的な解析がなされている(López-Calcano et al. 2014)。ここでは、それぞれの解析結果を簡単に紹介する。

## 2-1 「分子系統解析」

これまでにゲノム配列の明らかにされているシロイヌナズナを含む高等植物では、CP12-1、CP12-2、CP12-3の3分子種の存在が示されている。前2者は互いに98%もの同一性を示すが、CP12-3は前2者とはそれぞれ41%、48%の同一性しか示さない。しかし、CP12-3は、CP12分子種間によく保存されている4つのシステイン残基の配置などの共通性やシステイン残基のS-S結合によって生じるループの長さ、ループ間に位置する $\alpha$ ヘリックス構造、N末端側の荷電領域など、CP12に特徴的な構造を保持している。近年のゲノム情報等を統合し作成された分子系統樹からは、解析プログラムによってはCP12-3がより原核生物等のもつCP12分子に近いものであることが示されるが、異なるプログラムによってはその系統位置が変化するなど分子系統上の関係性は必ずしも明瞭ではない。ただし、CP12-3がCP12-1およびCP12-2とは異なるクレードを形成していることは明瞭である(Groben et al. 2010)(図2)。さらに126種ものシアノバクテリアのゲノム配列の中から、CP12と類似した構造を持つアミノ酸配列が複数見いだされ、システイン残基の保存性に多様性が見いだされたほか、他のタンパク質と融合した新規分子種などが見いだされた(Stanley et al. 2013)。これらの多くはゲノム配列からの推定であり、これらの生化学的機能は明らかではない。

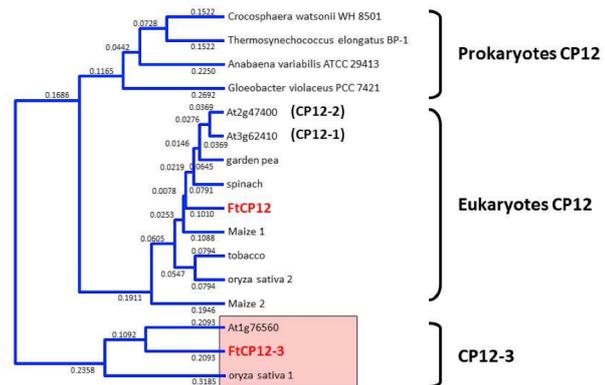


図2 CP12の分子系統樹

*F. trinervia* から単離したCP12とCP12-3を赤字で示している。

## 2-2 「生化学的解析」

これまでに明瞭に示されているCP12による酵素活性調節は、前述した通り還元的ペントースリン酸回路のメンバーであるGAPDHとPRKとの間での異種酵素タンパク質複合体形成における介在タンパク質としての機能である。高等植物においては、CP12-1とCP12-2の機能として明らかにされており、高等植物におけるCP12-3の機能は明らかにされていない。著者は、後述する通りC<sub>4</sub>植物に高発現する遺伝子としてCP12-3を見出しており、CP12-3の機能がC<sub>4</sub>植物に特化している可能性を追求している。したがって、本稿では「CP12-1およびCP12-2」と「CP12-3」の機能の違いに注意を払いつつ議論したいので、これ以降、ここで

は CP12-1 および CP12-2 を CP12-1/2 と記述し、CP12-3 と区別して記述することにする。CP12-1/2 は、初期の *in vitro* の実験において、酸化型の GAPDH および PRK と NAD 存在下において結合し、還元型のチオレドキシン (Trx) や、NADP の添加によってこの複合体が解離することが明らかにされた (Wedel et al. 1997)。Howard らのより注意深い実験によって還元型の PRK は複合体にとどまり不活化状態を維持することが示され、Trx 添加によって初めて高活性型の酵素として複合体から解離して機能することが明らかにされた。一連の解析から、「Trx を介して CP12-1/2 に伝達された還元状態が、PRK と GAPDH の解離と同時に活性化を引き起こす」ことが提唱されている (Howard et al. 2008)。これは CP12-1/2 の機能が「不活化状態の GAPDH と PRK の保持」という役割だけでなく、「還元環境が整った場合に両酵素が足並みをそろえて活性化される」ことにも機能することを示している。これらの CP12-1/2 の生化学的機能を要約すると結合相手である GAPDH と PRK の不活化と活性化の両方の状態を決め、光合成炭素代謝の開始時にこれらの酵素活性を同期させる「スイッチ」としての役割が強く推定されると表現することができる。

### 2-3 「生理的解析」

機能未知のタンパク質の生理的役割を解析する手段として、順遺伝学や逆遺伝学などの遺伝学的解析は極めて有効である。シアノバクテリア (Tamoi et al. 2005) とタバコ (Howard et al. 2011) において、それぞれ機能破壊株と機能抑制型の形質転換体が作出され、機能評価がなされた。Tamoi らの結果では、シアノバクテリアの CP12 ホモログの結合相手はこれまで調査されてきた高等植物と同様に GAPDH と PRK であり、遺伝子欠損株では、明所から暗所に環境が変化した場合の光合成反応に異常が認められ、暗所で速やかに抑制されるはずの酸素発生抑制が遅延した。また、機能破壊株を恒常的に明所においた場合には生長量に野生株との差がないが、明暗を繰り返す環境下では遺伝子破壊株において生育の遅延が観察された。これはシアノバクテリアにおいて CP12 が明暗に応答する際に光合成を調節し、その欠損は生育差に現れるほどに重要な機能を担っていることを示している (Tamoi et al. 2005)。高等植物では、タバコを研究材料にアンチセンス法によって CP12-1/2 タンパク質が 10% から 40% までに低下した複数の形質転換植物が得られた (Howard et al. 2011a)。10% にタンパク質蓄積レベルが低下した植物では、PRK の活性に有意な低下が認められたが、40% 程度の低下では酵素活性への影響は著しくはなかった。光合成活性への影響も同様で、光合成への寄与は大きくないと表現されている。不思議なことに光合成速度や GAPDH や PRK などの結合相手となる酵素の活性には大きな影響は与えなかったが、一方で直接結合することが示されていない NADP-MDH において活性の低下が認められた。また、葉の発達や光合成によって固定された炭素の分配等にも異常が認められるなど多面的な効果が見いだされている。NADP-MDH への影響が、CP12-1/2 の直接的な結合によるものか、あるいは間接的な効果によってもたらされたものかは明らかにされていない (Howard et al. 2011a)。タバコにおける光合成代謝への評価の結果にはさまざまな解釈も可能であろうが、葉の形態形成への異常を呈してしまった時点で正確な光合成測定が難しくなっており、この点も生理評価を難しくしているのではないかと個人的には考える。

## 2-4 「結晶構造学的解析」

PRK と GAPDH, そして CP12-1/2 の 3 つのタンパク質の形成する複合体はどのような構造をとっているのかはまさに結晶構造解析によって解かれるべき課題である。PRK は動物には存在しない酵素であり, 現時点ですべての生物において結晶構造情報はない。従って, PRK を含むタンパク質複合体の結晶構造解析はより挑戦的で, 現在までにこれを示した論文報告はない。これまでは, シアノバクテリア由来の GAPDH と CP12 による二つのタンパク質間での結晶構造解析が Matsumura らによってなされた (Matsumura et al. 2011)。この報告では GAPDH と結合状態にある CP12 の半分程度の構造が読み解かれた。残りは結晶構造には現れず, この条件下では決まった構造をとっていないと考えられる。Matsumura らの詳細な解析によって, NAD の存在条件で結合し NADP の存在下で複合体の解離が起こる現象について, NADP 分子内のリン酸基の位置が結合部位付近のアミノ酸残基と反発しうることからうまく解説された。今後, PRK を含めた 3 つのタンパク質間での複合体の結晶構造について, 解析結果が待たれる。前述した複合体内で還元型の PRK が不活化を保持しているメカニズムや, 解離と同時に両酵素を活性化させるメカニズムについて構造上からの情報は有力であると想像する。

## 2-5 「普遍性」

PRK と GAPDH の複合体形成状態を調査して, 複合体形成の普遍性が調査されている。これによると暗処理の最後に抽出した粗タンパク質抽出液中の複合体状態は, 調査された 9 種類の植物間で多様性を示した。しかし, 複合体形成を促す作用のある NAD を抽出液に添加することによって複合体形成を回復する種も多く, これを含めると多くの種で複合体形成については認められたといえる。GAPDH は A2B2 ヘテロテトラマーあるいは A4 のホモテトラマー構造をとるが, 植物種間でのその多様性にも影響されているようである (Howard et al. 2011b)。

## 3. C<sub>4</sub> 植物と CP12-3

著者らは, C<sub>4</sub> 植物に高発現する遺伝子を網羅的に解析することに成功した。*Flaveria* 属に含まれる植物種には, 近年になって C<sub>4</sub> 植物への進化が始まり, 同属内に C<sub>3</sub> 植物種から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種, C<sub>4</sub> 様植物種, C<sub>4</sub> 植物種までの複数の異なる光合成を行う種が存在する (Dengler et al. 1999)。この *Flaveria* 属の種間で発現している mRNA の比較ができれば, C<sub>4</sub> 植物種に高発現する mRNA を網羅的に調べることが原理的

Clone	Annotation	Localization
<b>1. 葉緑体包膜タンパク質</b>		
4-1	bile acid:sodium symporter family protein	Chl/Chl <sup>b</sup>
2-10	expressed protein	Chl/Chl
<b>2. Photosystem I 関連タンパク質</b>		
7-7	photosystem I subunit O (PSI-O)	Chl/Chl
9-12	PSI-D	Chl/Chl
2-12	chlorophyll A-B binding protein / LHCl type III	Chl/Chl
<b>3. 代謝酵素</b>		
3-5	carbonic anhydrase 1	Chl/Chl
4-12	5-adenylylsulfate reductase	Chl/Chl
4-14	triosephosphate isomerase, cytosolic, putative	Cyt/no
6-4	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	Mit/Mit
<b>4. 細胞壁合成酵素関連</b>		
5-6	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	SP/no
6-13	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	PM/no
<b>5. 機能未知タンパク質</b>		
6-19	translationally controlled tumor family protein	MB/no <sup>c</sup>
6-2	unknown protein	Mit/Chl
1-3	<b>CP12 domain-containing protein (CP12-3)</b>	Chl/no
6-9	auxin/aluminum-responsive protein, putative	MB/Chl
2-16	dormancy/auxin associated family protein	MBC/Chl
5-3	lipid transfer protein (LTP) family protein	ER/no
4-3	expressed protein (unknown)	Cyt/no
<b>6. タンパク翻訳関連</b>		
5-4	translation initiation factor SUII homolog	Cyt/no
9-13	60S ribosomal protein L23A	Cyt/no

に可能である。そこで、C<sub>4</sub>植物種 *F. trinervia* と C<sub>3</sub>植物種 *F. pringlei* の間でディファレンシャルスクリーニング（プラスマイナス）法を行い、C<sub>4</sub>植物種 *F. trinervia* に高発現する mRNA 分子を調べた（表 1）。

推定機能別にリスト化した表から、葉緑体への移行シグナルをもつ複数の遺伝子を見いだすことに成功した。これらのうち、膜タンパク質であると推定された Bass2 が C<sub>4</sub>回路中でこれまで明らかにされていなかった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証明できた（Furumoto et al. 2011）。この結果は、このスクリーニング方法が C<sub>4</sub>光合成に関与する新規因子を探索するのに有効であることを示している。同様の単離過程で見いだされた他の葉緑体に移行すると思われる分子種の中に、機能未知タンパク質に分類される CP12 と類似の配列を持つ分子 CP12-3（クローン番号 1-3; CP12 domain-containing protein）を見いだした。

この CP12-3 の生化学的あるいは生理的機能は、前述してきた通り現時点では不明である。C<sub>4</sub>植物に高発現したことは、この機能を解明する上で大きなヒントとなる。上述したように、CP12-3 は一次配列上 CP12-1/2 と異なるが、これはこの違いによって結合タンパク質に多様性が生じている可能性を示唆する。C<sub>4</sub>光合成関連の代謝酵素との結合の可能性や、たとえ CP12-1/2 と同じく PRK と GAPDH との結合であったとしても結合の際に何か一次配列に由来する結合の仕方への変化が起こっていると期待できる。さらに、冒頭に説明したように、C<sub>3</sub>植物と C<sub>4</sub>植物の光環境応答は、大きく異なり、日中の高光量領域での光量変動に C<sub>4</sub>植物は適応する必要があるため、CP12-3 の機能もこれと関連したものとなることが期待される。CP12-1/2 と同様に標的タンパク質との結合がその生化学的特徴であるならば、その標的タンパク質の同定が次の課題であると考えている。

#### 4. おわりに

CP12-3 の解析を進めてゆくうえで、もっとも重要なことの一つは、「標的タンパク質」の同定である。結合しうるタンパク質を探索する試みは、CP12-1/2 を用いてなされている（Erales et al. 2008）。CP12-1/2 を固定したカラムに対して結合性を示したタンパク質を探索するもので、この方法で既知の PRK と GAPDH に加えて、アルドラーゼが新規な結合タンパク質の候補として見出された。*in vivo* での結合を示すための抗 CP12 抗体を用いた免疫沈降でもこれを支持する結果を得ており、結合タンパク質として考慮するに値する。この方法に従い、CP12-3 に対して結合性を示すタンパク質を探索することが一つの挑戦である。しかし、結合に必要な補因子（CP12-1/2 であるならば NAD のような）の有無など CP12-3 で明らかにされていないこともあり、この点には注意が必要である。

C<sub>4</sub>種 *F. bidentis* は形質転換の比較的容易な植物であり、この特性を活かして機能抑制株を作出しこれを利用して結合タンパク質を探索することも現実的な探索法の一つである。光合成特性を調査することで、生理機能へも言及できると推定される。

C<sub>4</sub>光合成の一つの特徴は、高光量領域での光量と連動する光合成活性の調節にある。しかし、研究室レベルでこの分子機構を追うことには若干の技術的難しさがある。それは、植物の育成システムにある。高光量下での育成を達成するには、特殊な人工気象器が必要であり、そうした場合には、植物を育成させるスペースに問題が生じる。こうした技術的な問題点も、

これまでこの大切なはずの光環境応答機構への切り込みを妨げる要因だった可能性がある。

CP12-3 が C<sub>4</sub> 植物の光環境応答の鍵因子であるかどうか、今後さらなる丁寧な検討が必要であるが、検討するに値する因子ではないかと考えている。

## 5. 謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、科研費（若手研究 19770034 および 17770034）の支援を得て遂行した。また、*Flaveria* 属植物の光合成活性は、奈良先端科学技術大学院大学（現 関西学院大学）の宗影ゆり博士の協力により行った。

## 6. 引用文献

- Buchanan BB, Holmgren A, Jacquot JP, Scheibe R. 2012. Fifty years in the thioredoxin field and a bountiful harvest. *Biochim Biophys Acta*. 1820:1822-9.
- Dengler NG and Nelson T 1999. Leaf structure and development in C<sub>4</sub> plants. In: Sage RF, Monson RK, eds. *C<sub>4</sub> Plant Biology*. San Diego, USA: Academic Press, 133-172.
- Erales J, Avilan L, Lebreton S, Gontero B. 2008. Exploring CP12 binding proteins revealed aldolase as a new partner for the phosphoribulokinase/glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/CP12 complex-purification and kinetic characterization of this enzyme from *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS J*. 275:1248-59.
- Furumoto T, Yamaguchi T, Ohshima-Ichie Y, Nakamura M, Tsuchida-Iwata Y, Shimamura M, Ohnishi J, Hata S, Gowik U, Westhoff P, Bräutigam A, Weber AP, Izui K. 2011. A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature*. 476:472-5.
- Groben R, Kaloudas D, Raines CA, Offmann B, Maberly SC, Gontero B. 2010. Comparative sequence analysis of CP12, a small protein involved in the formation of a Calvin cycle complex in photosynthetic organisms. *Photosynth Res*. 103:183-94.
- Howard TP, Metodiev M, Lloyd JC, Raines CA. 2008. Thioredoxin-mediated reversible dissociation of a stromal multiprotein complex in response to changes in light availability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:4056-61.
- Howard TP, Fryer MJ, Singh P, Metodiev M, Lytovchenko A, Obata T, Fernie AR, Kruger NJ, Quick WP, Lloyd JC, Raines CA. 2011a. Antisense suppression of the small chloroplast protein CP12 in tobacco alters carbon partitioning and severely restricts growth. *Plant Physiol*. 157:620-31.
- Howard TP, Lloyd JC, Raines CA. 2011b. Inter-species variation in the oligomeric states of the higher plant Calvin cycle enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoribulokinase. *J Exp Bot*. 62:3799-805.
- López-Calcano PE, Howard TP, Raines CA. 2014. The CP12 protein family: a thioredoxin-mediated metabolic switch? *Front Plant Sci*. 5:1-9
- Matsumura H, Kai A, Maeda T, Tamoi M, Satoh A, Tamura H, Hirose M, Ogawa T, Kizu N, Wadano A, Inoue T, Shigeoka S. 2011. Structure basis for the regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity via the intrinsically disordered protein CP12. *Structure*. 19:1846-54.
- Stanley DN, Raines CA, Kerfeld CA. 2013. Comparative analysis of 126 cyanobacterial genomes

reveals evidence of functional diversity among homologs of the redox-regulated CP12 protein. *Plant Physiol.* 161:824-35.

Tamoi M, Miyazaki T, Fukamizo T, Shigeoka S. 2005. The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions. *Plant J.* 42:504-13.

Wedel N, Soll J, Paap BK. 1997. CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10479-84.

*Flaveria* 属植物の解析から見える C<sub>4</sub> 型進化モデル

宗景 ゆり, 谷口 幸美

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

〒630-0192 生駒市高山町 8916-5

Evolutionary model of C<sub>4</sub> photosynthesis in genus *Flaveria*Key words: C<sub>4</sub> photosynthesis, evolution, genus *Flaveria*,

Yuri N. Munekage &amp; Yukimi Y. Taniguchi

Graduate School of Biological Sciences,

Nara Institute of Science and Technology

8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

## 1. はじめに

C<sub>4</sub>型植物は、C<sub>3</sub>型植物と異なり葉肉細胞と維管束鞘細胞の二種類の細胞を使って代謝経路を動かし、維管束鞘細胞へCO<sub>2</sub>を濃縮するC<sub>4</sub>型光合成を行っている。C<sub>4</sub>型光合成では、気孔から入ってきたCO<sub>2</sub>は、葉肉細胞で一旦C<sub>4</sub>酸の形で固定された後、維管束鞘細胞へ運ばれ、脱炭酸酵素により維管束鞘細胞でCO<sub>2</sub>が放出される。ここで生成したC<sub>3</sub>酸は再び葉肉細胞に運ばれ再度CO<sub>2</sub>固定反応に使われる基質となる。このC<sub>4</sub>回路と呼ばれる代謝経路により、維管束鞘細胞のCO<sub>2</sub>分圧を高めることができる。一方、C<sub>3</sub>型光合成において葉肉細胞でCO<sub>2</sub>固定を行っているリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) は、C<sub>4</sub>型植物では、発現領域が維管束鞘細胞へ限定化される。従って、C<sub>3</sub>型光合成では光呼吸によって光合成効率が20%–50%低下するが、C<sub>4</sub>型光合成では光呼吸による光合成効率の低下を防ぐことができる。このため、C<sub>4</sub>型光合成は、高温や水分欠乏環境により葉内のCO<sub>2</sub>濃度が低下する条件下で、C<sub>3</sub>型光合成より有利に働く(Long 1999)。

地球上には19の属にわたる約7500種のC<sub>4</sub>型植物が存在する。系統学解析により、それらは66系統の独立のC<sub>3</sub>型祖先種から発生したと考えられている(Sage 2012)。また、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型に分類される植物が21系統存在し、このうち12系統においてC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種とC<sub>4</sub>種が共通の祖先を持つことが報告されている(Christin et al. 2011, Sage et al. 2011)。このことから、C<sub>4</sub>型光合成は、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型を経て発生したと考えられている。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型光合成では、光呼吸で生じたグリシンを維管束鞘細胞へ運んでCO<sub>2</sub>を放出する“グリシンシャトル”によってCO<sub>2</sub>の濃縮を行う。この“グリシンシャトル”ではC<sub>4</sub>回路と同様に葉肉細胞と維管束鞘細胞の二種類の細胞を使ってCO<sub>2</sub>を濃縮することから、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型では、C<sub>4</sub>型光合成の準備段階の形態や代謝経路が構築されていると考えられる。本稿で紹介するキク科*Flaveria*属植物には、C<sub>3</sub>種、C<sub>4</sub>種だけでなく、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種とC<sub>4</sub>様種が多数存在する。これら進化的に近く同じゲノム背景をもつ種の比較解析から、近年遺伝子レベルで様々な現象がわかりつつある。

本稿では、*Flaveria* 属植物をモデルとし、段階的に進んだ C<sub>4</sub> 型光合成成立までの進化過程について考察する。

## 2. キク科 *Flaveria* 属植物の起源と分類

C<sub>4</sub> 型植物が地球上に出現したのは約 3300 万年であると推測されている (Sage et al. 2012)。これに対し *Flaveria* 属の C<sub>4</sub> 系統は進化的に新しく、約 300 万年前に出現したと推測されている (Christin et al. 2011)。 *Flaveria* 属の多くはアメリカ合衆国の南部、メキシコおよび西インド諸島に分布しており、現在 C<sub>3</sub> から C<sub>4</sub> 種を含めて 23 種存在することが確認されている (Powell 1978, McKown et al. 2005)。系統学的解析により、これらは C<sub>3</sub> 種で構成される基底群, Clade A, Clade B に分類される (ここでは我々が解析に使用した 8 種のみを示す, 図 1)。また、この解析から *Flaveria* 属では、C<sub>3</sub> 種から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種が発生した後、2 つの Clade に分かれて C<sub>4</sub> 化が進んだことがわかる (McKown et al. 2005)。Clade A には C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型, C<sub>4</sub> 様型, C<sub>4</sub> 型種が含まれるのに対し、Clade B で最も C<sub>4</sub> 化した種は、C<sub>4</sub> 様種の *F. brownii* のみである。

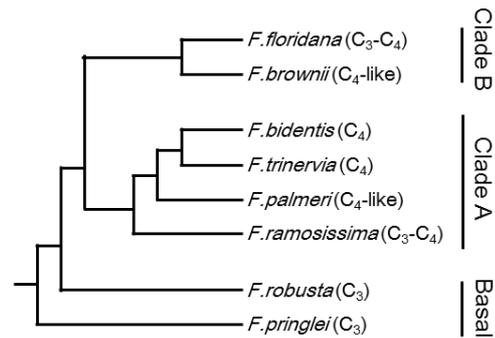


図1. *Flaveria* 属植物の系統図 (McKown., 2005より改変)

C<sub>3</sub> から C<sub>4</sub> 型までの光合成タイプは、それらの植物がもつ CO<sub>2</sub> 補償点と、オキシゲナーゼ反応による光合成低下率 (O<sub>2</sub> inhibition, %) によって分けられており、C<sub>3</sub> 型は約 50 μl/l, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型は 30-10 μl/l, C<sub>4</sub> 様型は 10-5 μl/l, C<sub>4</sub> 型は 5 μl/l 以下の CO<sub>2</sub> 補償点を示す (Ku et al. 1991)。ただし C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種や C<sub>4</sub> 様種において、それらの C<sub>4</sub> 化度合 (どれだけ C<sub>4</sub> 型に近い性質をもつかどうか) は種によって様々である。

## 3. 葉の形態と Kranz 構造の発達

*Flaveria* 属植物において、C<sub>3</sub> 種と C<sub>4</sub> 種では幅の広い葉が形成されるのに対し、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種の一部や C<sub>4</sub> 様種は細長い葉が形成される (図 2) ことから、葉の形は C<sub>4</sub> 型と関係しないと考えられる。一方、各 *Flaveria* 種の葉脈パターンを観察すると、C<sub>3</sub> 型では、葉脈間距離が広いのに対し、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種ではやや狭く、C<sub>4</sub> 様種および C<sub>4</sub> 種では最も狭くなっている (図 3, Mckwon & Dengler 2007)。このような維管束密度の上昇は、葉肉細胞と維管束鞘細胞を 1 : 1 で配置させるために重要であることが報告されている (Dengler and Nelson 1999)。 *Flaveria* 属植物では、C<sub>3</sub> 型から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型, C<sub>4</sub> 様型への進化の過程で、段階的に維管束密度が上昇していることがわかる。

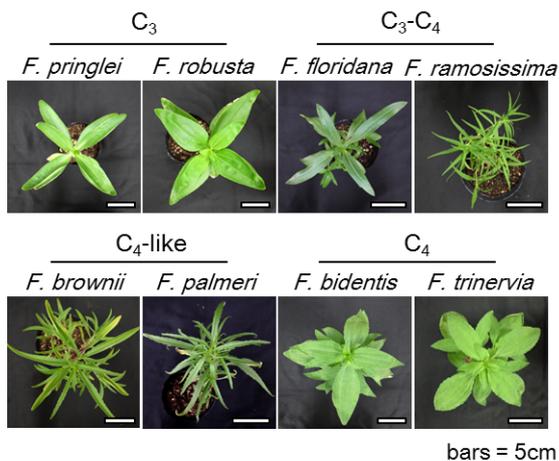


図2. *Flaveria* 属植物各種の表現型

C<sub>4</sub>型植物では、一般に花環を意味する Kranz 構造とよばれる葉の内部の組織形態が観察される。Kranz 構造の定義はあいまいであるが、1) 葉肉細胞に対して維管束鞘細胞が大きく肥大化する。上記の維管束密度の上昇により2) 葉肉細胞(M)が維管束鞘細胞(BS)に隣接して同心円状に 1 : 1 で配置され、vein-BS-M-M-BS-vein パターンを形成する。3) 維管束鞘細胞において葉緑体の数や大きさが増大し、それらが維管束に対し求心的または遠心的に配置される。という形態変化が含まれる (Dengler and Nelson 1999)。双子葉植物では維管束は複雑に走るため、完全な vein-BS-M-M-BS-vein パターンを形成しないが、類似した形態が見られる。*Flaveria* 属植物各種の葉横断切片を観察すると、C<sub>3</sub>型種では維管束鞘細胞は葉肉細胞に対して小さいが、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種では、維管束鞘細胞と葉肉細胞は同じ大きさであり、C<sub>4</sub>様種や C<sub>4</sub>種では維管束鞘細胞の方が葉肉細胞よりも大きく、葉組織構造が段階的に変化している様子が見られる (図 4)。また、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種では、C<sub>3</sub>種と比較して維管束鞘細胞の葉緑体やミトコンドリアの数が増加し、それらの多くは求心的位置に配置される。C<sub>4</sub>様種や C<sub>4</sub>種では、維管束鞘細胞における葉緑体の数がさらに増え、葉緑体の大きさも増大する (図 4, Nakamura et al. 2013)。このような、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種から見られる維管束鞘細胞におけるオルガネラの発達は、葉肉細胞と維管束鞘細胞の二つの細胞を使った代謝経路の発達と密接に関係していると考えられる。

#### 4. グリシンシャトルの発達と C<sub>4</sub>回路の獲得

C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種の葉肉細胞では、C<sub>3</sub>種と同様に RuBisCO が存在し、C<sub>3</sub>回路が回っている。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種では、グリシンシャトルによる CO<sub>2</sub>濃縮機能が働くため、C<sub>3</sub>種よりも低い CO<sub>2</sub>補償点を持つことが報告されている (Bauwe 2011, Keerberg et al. 2014)。葉肉細胞で RuBisCO のオキシゲナーゼ反応により生じたグリシンは、維管束鞘細胞へ運ばれ、そこでの脱炭酸反応により CO<sub>2</sub>が放出される (図 5)。維管束鞘細胞の葉緑体はミトコンドリアの近傍に位置し、ミトコンドリアで放出された CO<sub>2</sub>を葉緑体が効率よくトラップできる。脱炭酸の際に生じたセリンは、逆に葉肉細胞へ運ばれる。C<sub>3</sub>型光合成から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型のグリシンシャトルが獲得される過程は、比較的シンプルな変化で説明されている。重要なポイントは、ミトコンドリアで脱炭酸反応を行うグリシンデカルボキシラーゼ (GDC) の発現領域が、維管束鞘細胞に

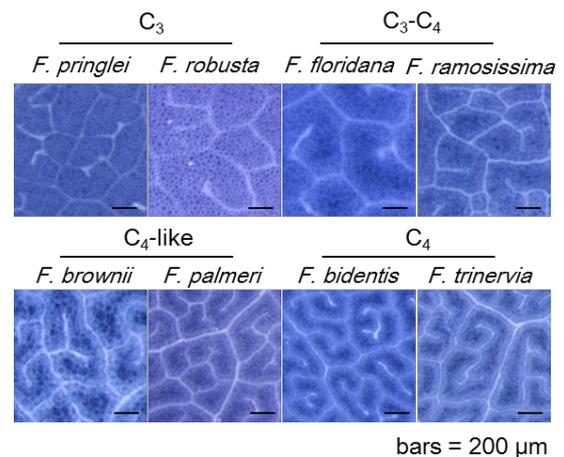


図3. *Flaveria*属植物各種の葉脈パターン

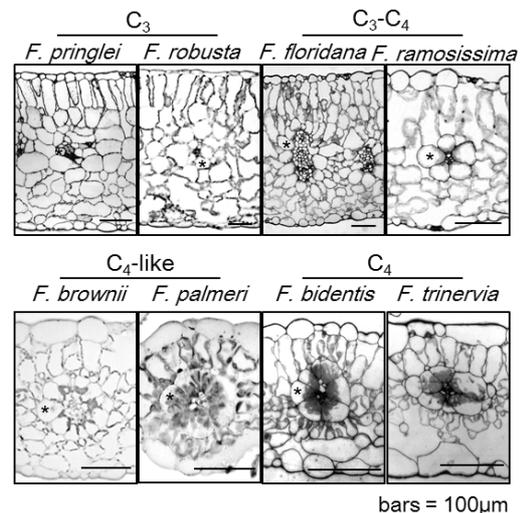


図4. *Flaveria*属植物各種の葉の横断切片  
\*で示した細胞を含む維管束を取り囲む一層が維管束鞘細胞

限定されることあり、代謝産物の移動は濃度依存的に起こると考えられている (Engelmann et al. 2008, Sage et al. 2013)。グリシンシャトルの獲得により、植物は葉肉細胞と維管束鞘細胞の二つの細胞を使った代謝経路を駆動することとなる。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種ではこの経路の獲得と共に維管束鞘細胞でのオルガネラの蓄積が促されたと考

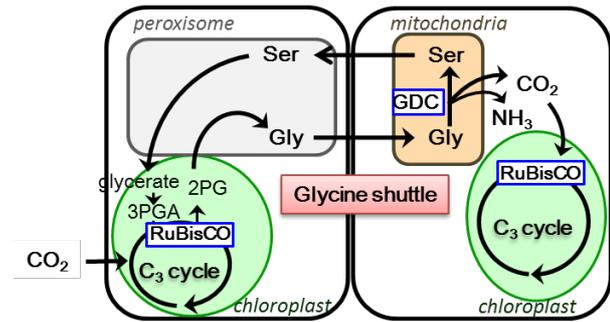


図5. グリシンシャトル経路の模式図

えられる。グリシンシャトルをもつ C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型からどのように C<sub>4</sub> 回路が発達するのは、まだ解明されていないが、*Flaveria* 属植物を用いた比較解析から興味深い事象が明らかになっている。グリシンシャトルを持つ C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種の多くは、機能的な C<sub>4</sub> 回路を持たないことが報告されている (Bauwe 2011) が、*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種では、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の C<sub>4</sub> 酸への取り込みが低いレベルで観察されている (Monson et al. 1986)。また、*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種では、C<sub>4</sub> 回路で働く酵素群、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK)、NADP-マリックエンザイム (NADP-ME) やアラニンアミノトランスフェラーゼの発現が、C<sub>3</sub> 種と比較して高いことが報告されている (Mallmann et al. 2014)。これらの事象は中間種においても、C<sub>4</sub> 代謝酵素を使った代謝経路が部分的に機能することを連想させる。Mallmann らは、グリシンシャトルで二酸化炭素と共に放出されるアンモニアを代謝するために、C<sub>4</sub> 代謝酵素群が使われた可能性を指摘している。実際に、RuBisCO の発現が葉肉細胞に残る C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* では、グリシンシャトルに加え機能的な C<sub>4</sub> 回路が働くことが報告されており (Cheng et al. 1988, Monson et al. 1988, Shulze et al. 2013, Sage 2014)。グリシンシャトルに依存した CO<sub>2</sub> 濃縮から C<sub>4</sub> 回路による CO<sub>2</sub> 濃縮へ段階的に移行した可能性が考えられる。

## 5. C<sub>4</sub> 型光合成の成立と光合成反応の最適化

C<sub>4</sub> 光合成の成立には、代謝酵素群の発現上昇だけでなく、それらの発現領域が葉肉細胞または維管束鞘細胞へ限定化されることが重要なステップとなる。この局在化のステップもまた、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型から C<sub>4</sub> 様型、C<sub>4</sub> 型への進化過程で段階的に進む (Taniguchi et al. in preparation)。*Flaveria* 属植物には PEPC をコードする遺伝子が、6 種存在するが、それらのうち *PPCA* の発現のみが C<sub>3</sub> 種から C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種、C<sub>4</sub> 様種、C<sub>4</sub> 種において段階的に上昇する。一方、発現領域を調べると、*PPCA* は、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種 *F. floridana* では、葉肉細胞と維管束鞘細胞の双方で発現しているのに対し、C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* では、*PPCA* の発現は葉肉細胞で強く維管束鞘細胞で弱い (Taniguchi et al. in preparation)。また、C<sub>4</sub> 種 *Flaveria* では、*PPCA* 発現領域は完全に葉肉細胞に限定化される。*PPCA* の葉肉細胞特異的な発現は、*PPCA* のプロモーター上に存在する MEM1 と呼ばれるシス配列が関与することが報告された (Akyildiz et al. 2007)。しかしながら、Clade B に属する *F. floridana* と *F. brownii* 間では、MEM1 配列に差異がなく、またこれらの交雑 F<sub>2</sub> 集団を用いた、表現型と遺伝子型の連鎖解析から、*PPCA* の局在化にプロモーター配列が関与しないことが明らかとなった (Munekage et al. in preparation)。従って、*PPCA*

の局在化は、トランス因子によって引き起こされた可能性も考えられる。PEPC だけでなく、PPDK、NADP-ME の発現領域も mRNA レベルで制御され、中間型から C<sub>4</sub> 様型への進化の過程で細胞特異性が獲得される (Taniguchi et al. in preparation)。C<sub>4</sub> 代謝酵素群の発現領域が限定化される種と、機能的な C<sub>4</sub> 回路が働くことが報告されている種が一致することから、発現領域の限定化が、C<sub>4</sub> 回路を駆動する一つの要因であると考えられる (図 6)。一方、RuBisCO の発現領域もまた、段階的に、維管束鞘細胞へ限定化されることが、*Flaveria* 属植物の解析から明らかになっている (Moore et al. 1988, Moore et al. 1989)。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種では、RuBisCO は葉肉細胞と維管束鞘細胞の双方で発現するのに対し、C<sub>4</sub> 様種では、葉肉細胞での発現が大きく抑制され、C<sub>4</sub> 種では完全に維管束鞘細胞へ限定化される。RuBisCO の発現領域が完全に維管束鞘細胞へ限定化されることで、葉肉細胞でのオキシゲナーゼ反応が抑制され、低い CO<sub>2</sub> 補償点をもつ C<sub>4</sub> 型光合成が成立する (図 6)。RuBisCO の発現には、構成サブユニットである核にコードされる RBCS と葉緑体にコードされる RBCL の両方の転写および転写後制御機構が関わることが知られている (Patel and Berry 2008)。C<sub>4</sub> 種 *Flaveria bidentis* では RBCS の 5' UTR および 3' UTR 配列が維管束鞘細胞への発現領域の限定化に大きくかかわることが報告されている (Patel et al.

2006)。 *Flaveria* 属植物を含め、様々な植物において、RBCS は複数の遺伝子にコードされていることが報告されており、その発現量も一遺伝

子に依存しない。このように複数の遺伝子座にコードされるファミリー遺伝子発現を抑制するためには、UTRs を使った mRNA レベルでの制御が有効であると考えられる。

C<sub>4</sub> 型光合成は、CO<sub>2</sub> 濃縮機構を獲得したことにより、C<sub>3</sub> 光合成よりもより多くのエネルギーをその代謝反応を駆動するために必要とする。1 分子の CO<sub>2</sub> 固定に、C<sub>3</sub> 型光合成では 3 分子の ATP と 2 分子の NADPH が必要であるのに対し、C<sub>4</sub> 型光合成では 5 分子の ATP、2 分子の NADPH が必要である。この ATP 合成を補うために、葉緑体循環型電子伝達が機能することが示唆された (Kanai and Edwards 1999)。 *Flaveria* 属植物では、循環型電子伝達活性は、C<sub>4</sub> 回路が機能している C<sub>4</sub> 様種と C<sub>4</sub> 種で飛躍的に高くなり、また C<sub>4</sub> 様 *F. palmeri* および C<sub>4</sub> 種では維管束鞘細胞の葉緑体のチラコイド膜構造が大きく変化し、光化学系 II が局在するグラナ構造が減少する (図 7, Nakamura et al. 2013)。維管束鞘細胞では、ATP と NADPH の双方を生産する直鎖型電子伝達活性が抑制され、逆に ATP のみの

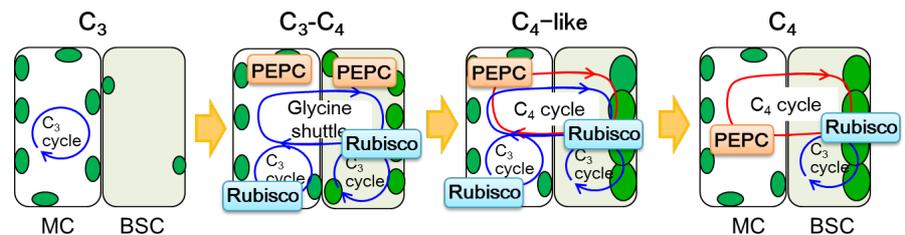
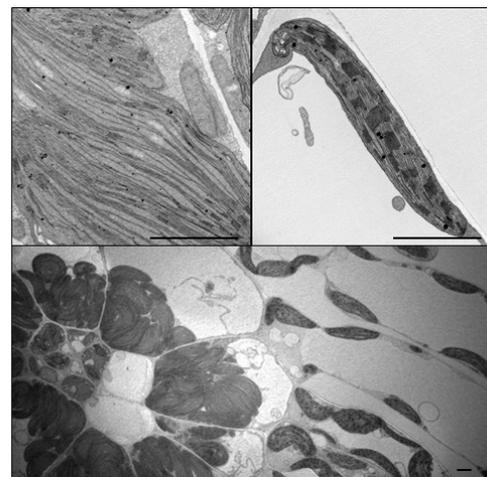


図6 *Flaveria*属植物におけるC<sub>4</sub>進化モデル



bars = 2 μm

図7. C<sub>4</sub>種 *F. bidentis* の葉切片の電子顕微鏡写真  
左上: 維管束鞘細胞葉緑体  
右上: 葉肉細胞葉緑体

生産に寄与する循環型電子伝達活性が促進されることで、 $C_4$ 型光合成に必要なエネルギー需給バランスが保たれると考えられる。ただし、 $C_4$ 種 *Flaveria* では、PEPC に固定されたオキサロ酢酸の一部がアスパラギン酸へ変換され、リンゴ酸とアスパラギン酸の双方が維管束鞘細胞へ運ばれることが報告されている (Moore and Edwards 1986, Meister et al. 1996)。維管束鞘細胞でアスパラギン酸からリンゴ酸への返還に NADPH が必要であるため、トウモロコシやソルガムと比較して  $C_4$ 種 *Flaveria* では、維管束鞘細胞葉緑体のグラナ構造は完全には消失しておらず光化学系 II 活性が残されており、直鎖電子伝達が働くことが示唆されている (Meister et al. 1996)。このように、電子伝達反応は代謝反応と連動して制御を受け、光合成反応の最適化が行われている。

## 6. おわりに

$C_4$ 型光合成は被子植物の多岐にわたる属で獲得されていることから、被子植物が高温や半乾燥条件に適応していく過程で引き起こされた収斂進化形の一つであると考えられる。従って  $C_4$ 型への進化は、何か  $C_3$ 型植物が共通してもつシステムを利用して引き起こされた可能性が考えられるが、この進化に関わるキーとなる因子は明らかになっていない。*Flaveria* 属は比較的多くの中間型種が現存しており、過去の生理学的・生化学的解析、組織学的解析、そして近年飛躍的に進んだ遺伝子レベルでの解析により  $C_4$ 型進化における様々な過程が明らかになりつつある。今後、ゲノムレベルでの解析が進むことで、進化の軌跡が明らかとなることを期待する。

## 7. 謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、先端研究助成基金助成金、最先端・次世代研究開発支援プログラム (GS019) およびゲノム支援 MEXT KAKENHI (No. 221S0002) の支援を得て遂行した。

## 8. 引用文献

- Akyildiz M, Gowik U, Engelmann S, Koczor M, Streubel M, Westhoff P. 2007. Evolution and function of a cis-regulatory module for mesophyll-specific gene expression in the  $C_4$  dicot *Flaveria trinervia*. *Plant Cell*. 19: 3391-402.
- Bauwe H. 2011. Photorespiration: the bridge to  $C_4$  photosynthesis. In: Raghavendra AS, Sage RF, eds.  *$C_4$  photosynthesis and related  $CO_2$  concentrating mechanisms*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 81-108.
- Christin P-A, Osborne CP, Sage RF, Arakaki M, Edwards EJ. 2011.  $C_4$  eudicots are not younger than  $C_4$  monocots. *J Exp Bot* 62: 3171-81.
- Cheng SH, Moore BD, Edwards GE, Ku MS. 1988. Photosynthesis in *Flaveria brownii*, a  $C_4$ -like species. Leaf anatomy, characteristics of  $CO_2$  exchange, compartmentation of photosynthetic enzymes, and metabolism of  $^{14}CO_2$ . *Plant Physiology* 87: 867-873.
- Dengler NG and Nelson T 1999. Leaf structure and development in  $C_4$  plants. In: Sage RF, Monson RK, eds.  *$C_4$  Plant Biology*. San Diego, USA: Academic Press, 133-172.
- Engelmann S, Wiludda C, Burscheidt J, Gowik U, Schlue U, Koczor M, Streubel M, Cossu R, Bauwe

- H, Westhoff P. 2008. The gene for the P-subunit of glycine decarboxylase from the C<sub>4</sub> species *Flaveria trinervia*: analysis of transcriptional control in transgenic *Flaveria bidentis* (C<sub>4</sub>) and *Arabidopsis* (C<sub>3</sub>). *Plant Physiol*, 146: 1773-85.
- Kanai R, Edwards GE. 1999. The biochemistry of C<sub>4</sub> photosynthesis. In: Sage RF, Monson RK, eds. *C<sub>4</sub> Plant Biology*. San Diego, USA: Academic Press, 215-249.
- Keerberg O, Pärnik T, Ivanova H, Bassüner B, Bauwe H. 2014. C<sub>2</sub> photosynthesis generates about 3-fold elevated leaf CO<sub>2</sub> levels in the C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species *Flaveria pubescens*. *J Exp Bot* 65: 3649-56
- Ku MSB, Wu J, Dai Z, Scott RA, Chu C, Edward GE. 1991. Photosynthetic and photorespiratory characteristics of *Flaveria* species. *Plant Physiology* 96: 518-528.
- Long SP. 1999. Environmental Responses. In: Sage RF, Monson RK, eds. *C<sub>4</sub> Plant Biology*. San Diego, USA: Academic Press, 215-249.
- Mallmann J, Heckmann D, Bräutigam A, Lercher MJ, Weber AP, Westhoff P, Gowik U. 2014. The role of photorespiration during the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*. *eLife* 3, e02478.
- Mckown, A. D., Moncalvo, J. M. and Dengler N. G. 2005. Phylogeny of *Flaveria* (Asteraceae) and inference of C<sub>4</sub> photosynthesis evolution. *American Journal of Botany* 92: 1911–1928.
- McKown AD, Dengler NG. 2007. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C<sub>4</sub> vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 94: 382–399.
- Meister M, Agostino A, Hatch MD 1996. The roles of malate and aspartate in C<sub>4</sub> photosynthetic metabolism of *Flaveria bidentis* (L.) *Planta* 199: 262-269
- Monson RK, Teeri JA, Ku MS, Gurevitch J, Mets LJ, Dudley S. 1988. Carbon-isotope discrimination by leaves of *Flaveria* species exhibiting different amounts of C<sub>3</sub>- and C<sub>4</sub>-cycle co-function. *Planta* 174: 145-51.
- Monson RK, Moore Bd, Ku MSB, Edward GE. 1986. Co-function of C<sub>3</sub>- and C<sub>4</sub>-photosynthetic pathways in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate *Flaveria* species. *Planta* 168: 493-502.
- Moore BD and Edwards GE 1986. Photosynthetic induction in a C<sub>4</sub> dicot, *Flaveria trinervia* *Plant Physiol*. 81: 663-668
- Moore Bd, Ku MSB, Edwards GE. 1989. Expression of C<sub>4</sub>-like photosynthesis in several species of *Flaveria*. *Plant, Cell & Environment* 12: 541-549.
- Moore Bd, Monson RK, Ku MSB, Edwards GE. 1988. Activities of principal photosynthetic and photorespiratory enzymes in leaf mesophyll and bundle sheath protoplasts from the C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate *Flaveriaramosissima*. *Plant Cell Physiology* 29: 999-1006.
- Nakamura, N., Iwano, M., Havaux, M., Yokota, A., Munekage, Y.N. 2013. Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*. *New Phytologist*. 199: 832-842
- Patel M and Berry JO. 2008. Rubisco gene expression in C<sub>4</sub> plants. *J Exp Bot*. 59: 1625-34.
- Patel M, Siegel AJ, Berry JO. 2006. Untranslated regions of *FbRbcS1* mRNA mediate bundle sheath cell-specific gene expression in leaves of a C<sub>4</sub> plant. *J Biol Chem*. 281: 25485-91.

- Powell, A. M. 1978. Systematics of *Flaveria* (Flaveriinae–Asteraceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65: 590–636.
- Sage, T.L., Busch, F.A., Johnson, D.C., Friesen, P.C., Stinson, C.R., Stata, M., Sultmanis, S., Rahman, B.A., Rawsthorne, S., & Sage, R.F. 2013. Initial events during the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in C<sub>3</sub> species of *Flaveria*. *Plant Physiol*, 163: 1266-1276.
- Sage RF, Christin PA, Edwards EJ. 2011. The C<sub>4</sub> plant lineages of planet Earth. *Journal of Experimental Botany* 62: 3155-3169.
- Sage RF, Khoshravesh R and Sage TL 2014. From proto-Kranz to C<sub>4</sub> Kranz: building the bridge to C<sub>4</sub> photosynthesis *J Exp Bot.* 65: 3341-56.
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar K. 2012. Photorespiration and the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 63: 19-47.
- Schulze S, Mallmann J, Burscheidt J, Koczor M, Streubel M, Bauwe H, Gowik U, Westhoff P. 2013. Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*: establishment of a photorespiratory CO<sub>2</sub> pump. *Plant Cell.* 25: 2522-35.

## C<sub>3</sub> 植物の C<sub>4</sub> 化 : Rubisco だけでも役に立つ?

深山浩

神戸大学大学院 農学研究科 資源植物生産学分野

〒657-8501 神戸市灘区六甲台町

From C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> photosynthesis: Can the introduction of C<sub>4</sub> Rubisco alone be effective for the improvement of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants?

Key words: C<sub>4</sub> photosynthesis; elevated CO<sub>2</sub>; gene engineering; rice (*Oryza sativa*); Rubisco; sorghum (*sorghum bicolor*)

Hiroshi Fukayama

Graduate School of Agricultural Sciences, Kobe University

Kobe, 657-8501, Japan

### 1. C<sub>3</sub> 植物のイネへの C<sub>4</sub> 光合成回路の導入の試み

C<sub>4</sub> 植物は C<sub>3</sub> 植物に比べて光合成能力が高く、生長速度も速い。それは、なぜなのだろうか？ 光合成 CO<sub>2</sub> 固定の初発反応を触媒するリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ オキシゲナーゼ (Rubisco) は、触媒反応速度が極端に遅いこと、O<sub>2</sub> をも基質として光呼吸を起こすことから、光合成の主な律速因子となっている。C<sub>4</sub> 植物は進化の過程で CO<sub>2</sub> 濃縮に働く C<sub>4</sub> 光合成回路を獲得し、Rubisco の触媒部位での CO<sub>2</sub> 濃度を高めて光呼吸を抑制することに成功した。C<sub>4</sub> 光合成回路を駆動させるには ATP が余分に必要となるが、光呼吸が促進される高温や強光下では、C<sub>4</sub> 植物の方が C<sub>3</sub> 植物よりも有利となる。

このような C<sub>4</sub> 植物の光合成システムは、C<sub>3</sub> 植物の光合成能力を改良する上で有効と考え、世界中で C<sub>3</sub> 植物に C<sub>4</sub> 光合成回路を付与する取り組みが行われてきた (Hibberd et al. 2008, Miyao et al. 2011)。私自身も農業生物資源研究所に所属していた際に、C<sub>3</sub> 植物のイネにトウモロコシ型の C<sub>4</sub> 光合成回路を導入するプロジェクトに参加した。トウモロコシ型 C<sub>4</sub> 光合成回路を構成する酵素は、基本的にホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、NADP-リンゴ酸酵素、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK) の4つと少ないが、特に PEPC と PPDK は C<sub>4</sub> 植物において非常に高発現しており、C<sub>3</sub> 植物内で同レベルに高発現させることは困難であった。我々は、プロモーター、エキソン、イントロン、ターミネーターを含めたトウモロコシ由来の PEPC 遺伝子と PPDK 遺伝子をそのままイネに導入するという手法により、これらの酵素をトウモロコシ以上に高発現させることに成功した (Fukayama et al. 2001, Ku et al. 1999)。そして、C<sub>4</sub> 光合成回路に必要な

H. Fukayama-1

4つの酵素全てを高発現する4重形質転換イネを作成した (Taniguchi et al. 2008)。PEPCを単独で高発現させた形質転換イネでは、呼吸が促進されることから光合成速度が低下した (Fukayama et al. 2003)。しかし、4重形質転換イネではPEPCの高発現の効果が打ち消され、光合成速度が非形質転換イネのレベルに回復した (Taniguchi et al. 2008)。この現象がどのようなメカニズムによって起こるのかは明確ではないが、少なくとも4つの酵素を高発現させただけでは、光合成能力を大幅に促進するほどにC<sub>4</sub>光合成回路を駆動することはできないと考えられた。他のグループを含めても、今のところC<sub>4</sub>光合成回路の導入により光合成能力の改良に成功した例はない。

## 2. C<sub>4</sub>植物のRubisco

C<sub>3</sub>植物は全窒素の約30%をRubiscoに投資しているが、C<sub>4</sub>植物は10%以下である (Makino et al. 2003, Sage et al. 1987)。C<sub>4</sub>植物は、なぜ少ないRubiscoで高い光合成能力を達成できるのだろうか？ Rubiscoの欠点として触媒速度が他の酵素に比べて低いことは既に述べたが、触媒速度には種間差があり、C<sub>3</sub>植物では特に低く、CO<sub>2</sub>濃縮回路を持つC<sub>4</sub>植物では2倍ほど高いことが知られている (Sage 2002, Seemann et al. 1984)。C<sub>4</sub>植物は触媒速度の高いRubiscoを獲得することにより、Rubisco含量を減らすことが可能となり、光合成の窒素利用効率を高めていると考えられる (図1)。しかし、Rubiscoの触媒速度とCO<sub>2</sub>親和性の間にはトレードオフの関係があり、C<sub>3</sub>植物のRubiscoは触媒速度は遅いがCO<sub>2</sub>に対する親和性 (CO<sub>2</sub>に対するミカエリス定数  $K_c$  は低い) は高い (Tcherkez et al. 2006)。このようなC<sub>3</sub>植物のRubiscoの特性は、産業革命以前の250 ppm程度の低いCO<sub>2</sub>濃度において光呼吸を抑制するように進化・適応した結果といえる。現在の地球環境を見ると、大気CO<sub>2</sub>濃度は増加の一途をたどっており、2050年には600 ppm程度にまで増加すると予想されている。そのような大気条件下では光呼吸はおのずと抑制されることから、今後はC<sub>3</sub>植物もC<sub>4</sub>植物のような高活性型Rubiscoを持ちRubiscoへの窒素の投資を減らすことが、光合成や生産性の高い作物の開発につながると考えられる。

## 3. C<sub>4</sub>植物の高活性型RubiscoのC<sub>3</sub>植物への導入

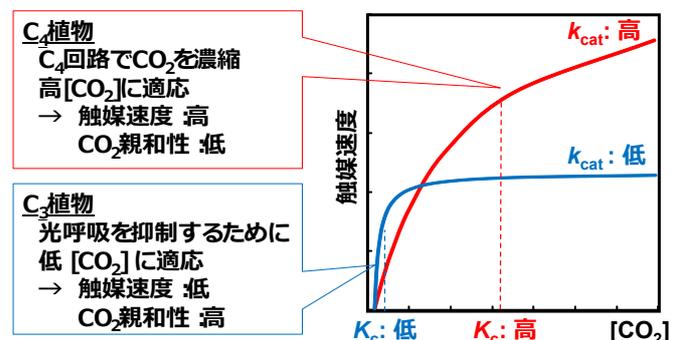


図1 C<sub>3</sub>植物とC<sub>4</sub>植物のRubiscoの酵素特性の比較  
 $k_{cat}$ , 触媒速度;  $K_c$ , CO<sub>2</sub>に対するミカエリス定数。

我々は光合成能力を改良するために、 $C_3$ 植物に $C_4$ 植物の高活性型 Rubisco を導入することを試みた。イネ、ムギ類、ジャガイモ、ダイズなど主要な作物の多くは $C_3$ 植物であるが、その中でもイネの Rubisco の触媒速度は低いことがわかっていた (Sage 2002)。そこで我々は、イネを実験材料とすることに決め、その光合成能力の改良のために適した触媒速度の高い Rubisco を進化的に近いイネ科植物の中で探索した (Ishikawa et al. 2009)。解析したイネ科 $C_4$ 植物の Rubisco の触媒速度は、全てイネよりも高かったが、ソルガムの Rubisco は触媒速度が高く、かつ  $CO_2$  に対する親和性も比較的高いため、イネの光合成の改良に最も有効と考えられた。Rubisco は RbcL と RbcS の2種類のタンパク質によって構成されており、触媒作用を示す  $L_8S_8$  構造を取るまでに多数の分子シャペロンとの相互作用を受ける必要がある (深山 2013)。よって導入する遺伝子は出来る限りイネの遺伝子と相同性が高いことが望ましい。そこで触媒部位が存在する RbcL のアミノ酸配列についても比較を行ったが、ソルガムを含めイネ科植物内では相同性が非常に高く、どの種の遺伝子を導入しても大差はないものと考えられた (Ishikawa et al. 2009)。RbcL は葉緑体ゲノム、RbcS は核ゲノムに多重遺伝子族として存在する。そこで、RbcL はパーティクルガンを利用した相同組換えによる葉緑体形質転換法、RbcS はアグロバクテリウム法によりイネの核への遺伝子導入を行った (図2)。イネの葉緑体形質転換は技術的に確立されておらず、我々も RbcL の導入に関しては今のところ成功していない。一方、ソルガム RbcS の高発現には成功し、驚くべきことに、触媒反応においてそれほど重要と考えられていなかった RbcS を導入するだけで Rubisco の触媒速度が約 50% 高まることが明らかとなった (Ishikawa et al. 2011)。形質転換イネの Rubisco の触媒速度はソルガムに比べると低いが、イネの光合成能力の改良に十分有効であることが、光合成速度のシミュレーションからわかっている。

#### 4. 形質転換イネにおける Rubisco 含量の最適化

ソルガム RbcS を高発現する形質転換イネでは Rubisco の触媒速度が増加したが、光合成速度にはどのような効果をおよぼすのだろうか？ 残念ながら形質転換イネの光合成速度は高

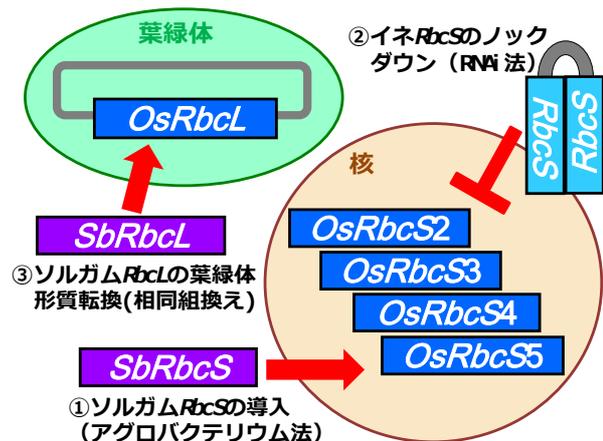
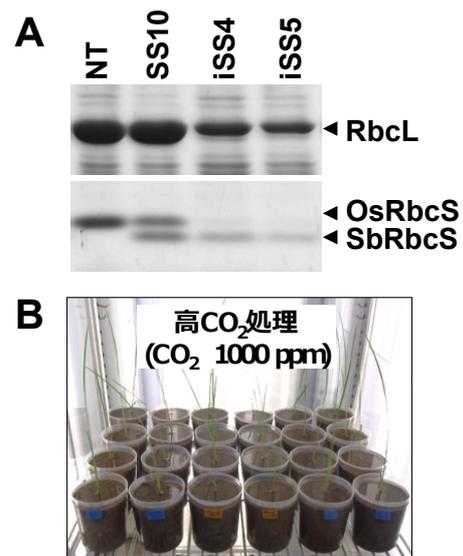


図2  $C_4$ 植物ソルガムが持つ高活性型Rubiscoのイネへの導入

Rubiscoを構成するRbcLは葉緑体ゲノムに、RbcSは各ゲノムの多重遺伝子族によりコードされている。①まず、ソルガムRbcS (*SbRbcS*) をアグロバクテリウム法によりイネの核に遺伝子導入する。ソルガムRbcSを導入するだけでRubiscoの触媒速度が増加することがわかっている (Ishikawa et al. 2011)。しかし、これだけではRubiscoが過剰になってしまうので光合成速度は増加しない。②そこで、イネRbcS (*OsRbcS2-5*) に対してRNAi法によるノックダウンを行い、Rubisco含量を適度に減少させる。③イネにおける葉緑体形質転換が可能となれば、ソルガムRbcL (*SbRbcL*) についても遺伝子導入する。

CO<sub>2</sub> 条件で測定した場合も増加することはなかった (Ishikawa et al. 2011)。形質転換イネではイネの *RbcS* を残したままソルガム *RbcS* を導入しているために Rubisco が過剰発現しており、Rubisco 含量が増加していた。高 CO<sub>2</sub> 条件では Rubisco が光合成の律速因子ではないので、Rubisco の触媒速度と含量が増加しても光合成速度が変化しないのは当然である。C<sub>4</sub> 植物が行っているように Rubisco 含量を少なくして窒素利用効率を高めることが (Sage et al. 1987)、光合成能力の改良につながると考えられる。実際に、高 CO<sub>2</sub> 条件では非形質転換イネにおいても Rubisco の能力は過剰であり、アンチセンス形質転換イネを用いた解析から、非形質転換イネの 65% 程度の Rubisco 含量が最適であると見積もられている (Makino et al. 1997)。高活性型となったソルガム *RbcS* 形質転換イネの Rubisco では、さらに 50% 以下にまで Rubisco 含量を減少させることが可能と予想される。形質転換イネの Rubisco を適切に減少させることができれば、その分の窒素は他の光合成関連タンパク質に分配されると考えられることから、高 CO<sub>2</sub> 条件での光合成能力のポテンシャルを高めることができるはずである。

したがって次に、ソルガム *RbcS* 高発現イネにおいて Rubisco を RNAi 法によりノックダウンすることを試みた。イネは 5 つの *RbcS* (*OsRbcS1-5*) を持ち、そのうちの *OsRbcS1* は葉身でほとんど発現していない。そして残りの 4 遺伝子 (*OsRbcS2-5*) の塩基配列は非常に相同性が高い。一方、*OsRbcS2-5* とソルガム *RbcS* の塩基配列はコード領域の 3' 側が比較的異なっている。そこで、できる限りイネ *RbcS* のみをノックダウンするように、イネで最も発現が高い *OsRbcS3* の 3' 側コード領域をトリガーとした RNAi コンストラクトをソルガム *RbcS* 高発現イネに導入した。この戦略は機能し、Rubisco 含量が減少しイネ *RbcS* の発現がほとんど認められない 2 重形質転換イネが得られた (図 3)。2 重形質転換イネで発現する、ソルガム *RbcS* とイネ *RbcL* のハイブリット Rubisco は、親系統で発現するイネ *RbcS* とソルガム *RbcS* のキメラとなった Rubisco に比べて、さらに触媒速度が高くなった。大気条件下での光合成速度は 2 重形質転換イネで低くなったが、高 CO<sub>2</sub> 条件では同程



**図3** C<sub>4</sub>植物ソルガム*RbcS*を高発現しイネ*RbcS*をノックダウンした2重形質転換イネ  
A. 可溶性タンパク質のSDS-PAGE解析。葉身の可溶性タンパク質をSDS-PAGEで分離してクマシーブリリアントブルーで染色した。*RbcL*と*RbcS*を含む領域のみ示した。非形質転換イネ (NT) ではイネ*RbcS* (*OsRbcS*) のみが発現している。ソルガム*RbcS*高発現イネ (SS10) では*OsRbcS*とソルガム*RbcS* (*SbRbcS*) の両方が同レベルで発現している。イネ*RbcS*をノックダウンした2重形質転換イネでは、ほぼ全てが*SbRbcS*となり、*RbcL*のバンドの量からRubisco含量が減少しているのがわかる。  
B. 2重形質転換イネの高CO<sub>2</sub>条件下での生育。現在、2重形質転換イネを異なるCO<sub>2</sub>濃度条件下で育成して生育特性、光合成特性を解析している。

度となった。しかし、窒素あたりの光合成で見ると、2重形質転換イネは非形質転換イネよりも高い値を示した。2重形質転換イネの Rubisco 含量は非形質転換イネの 20-35%であり、触媒速度が増加したとはいえ多少含量が少なすぎると考えられる。今後、RNAi のトリガー配列の特異性を高めるなどの改良を行い、Rubisco 含量を非形質転換イネの 40-50%程度に調節することができれば、より明確に光合成能力を改良できると考えている。

## 5. イネが持つ *RbcS* 様遺伝子 *OsRbcS1*

これまでの研究で、*RbcS* が Rubisco の触媒能力の改良における重要なターゲットと成り得ることがわかった。植物において *RbcS* は多重遺伝子族によりコードされている。そこで次に、植物が持つ *RbcS* ホモログに着目することにした。先に述べた通りイネは 5 つの *RbcS* 遺伝子を持ち、そのうちの 1 つ *OsRbcS1* は、主要な光合成器官である葉身で発現していない。さらに *OsRbcS1* は、他の *RbcS* との推定アミノ酸配列の相同性が 55.4%と低い (*OsRbcS2-5* 間は 100%)、葉緑体移行シグナル配列が不明確などの興味深い特徴を持つ。*OsRbcS1* オーソログはトマト、ミヤコグサなどイネ以外の植物においても存在しており、植物において光合成で働く通常の *RbcS* と異なる機能を有していることが予想された。我々は *OsRbcS1* に着目して詳細な発現解析、形質転換体を用いた生理機能解析を行った (Morita et al. 2014)。その結果、*OsRbcS1* は実際に葉緑体 (プラスチド) に局在し、*RbcL* と正常に会合して Rubisco のサブユニットとして機能していることがわかった。しかし、*OsRbcS1* は光合成活性のある緑色組織では発現しておらず、葉鞘や稈の維管束周辺で発現していた。*OsRbcS1* を通常発現していない葉身で高発現させ、Rubisco 活性への効果を解析したところ、*OsRbcS1* が組み込まれた Rubisco は触媒速度が増加することがわかった。触媒速度への効果はソルガム *RbcS* と同程度であり、*OsRbcS1* も高 CO<sub>2</sub> 環境下での光合成能力の改良に有効であると考えられた。

現在、*OsRbcS1* の機能を明らかにするために、RNAi ノックダウン形質転換イネを用いたメタボローム解析やトランスクリプトーム解析を進めている。通常の光合成とは異なる Rubisco の代謝機能として、維管束周辺での C<sub>4</sub> 光合成的な CO<sub>2</sub> 固定 (Hibberd and Quick, 2002)、脂質合成で生じた CO<sub>2</sub> の再固定 (Schwender et al, 2004) が報告されている。このような代謝に *OsRbcS1* が関係している可能性も考えられるが、この場合はいずれも広義での光合成に当たり、光エネルギーを利用することで代謝が進行する。緑色組織で発現していない *OsRbcS1* の発現パターンを考えると、*OsRbcS1* は今までに報告のない代謝機能を担っている可能性があると考えている。

## 6. おわりに

C<sub>3</sub>植物のC<sub>4</sub>化は、我々光合成研究者の夢である。近年、C<sub>4</sub>化の実現のための最も重大な障壁となっていたクランツ構造の分化に関する分子メカニズムの手がかりが得られている (Slewiniski, 2013)。しかし、完全なC<sub>4</sub>化の実現には、まだまだ時間が必要と考えられる。Rubiscoの触媒能力の改良も非常に困難であり、長年にわたり実用可能なレベルでの成功例がなかった。我々はC<sub>4</sub>植物の*RbcS*をC<sub>3</sub>植物に導入するという比較的簡単な手法により、Rubiscoの触媒特性を高活性型に変換することに成功した。現在、Rubisco含量の最適化に取り組んでいるが、それが成功すれば必ずや光合成能力の改良につながるものと期待している。ソルガム*RbcS*は遺伝的に遠い双子葉植物には適用できないと予想されるが、C<sub>4</sub>植物は広範囲な植物種において独立して分化しており、双子葉植物においても多くの種にC<sub>4</sub>植物が存在する (Sage et al. 2011)。イネ以外にも重要な作物の多くはC<sub>3</sub>植物であり、最適なC<sub>4</sub>植物の*RbcS*を選ぶことによって様々な作物の光合成能力の改良に、今回紹介した戦略が適用できるものと考えている。

本論文のタイトルは「C<sub>3</sub>植物のC<sub>4</sub>化：Rubiscoだけでも役に立つ？」であったが、私はさらに「*RbcS*だけでも役に立つ！」と言いたい。

## 引用文献

- 深山浩 2013. 高CO<sub>2</sub>環境に適したRubiscoの導入によるイネの光合成能力の改良. 光合成研究 (23) : 24-32.
- Fukayama, H., Hatch, M.D., Tamai, T., Tsuchida, H., Sudoh, S., Furbank, R.T. & Miyao, M. 2003. Activity regulation and physiological impacts of maize C<sub>4</sub>-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. *Photosynth. Res.* 77: 227-239.
- Fukayama, H., Tsuchida, H., Agarie, S., Nomura, M., Onodera, H., Ono, K., Lee, B.H., Hirose, S., Toki, S., Ku, M.S., Makino, A., Matsuoka, M. & Miyao, M. 2001. Significant accumulation of C<sub>4</sub>-specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C<sub>3</sub> plant, rice. *Plant Physiol.* 127: 1136-1146.
- Hibberd, J.M. & Quick, W.P. 2002. Characteristics of C<sub>4</sub> photosynthesis in stems and petioles of C<sub>3</sub> flowering plants. *Nature* 415: 451-454.
- Hibberd, J.M., Sheehy, J.E. & Langdale J.A. 2008. Using C<sub>4</sub> photosynthesis to increase the yield of rice-rationale and feasibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 228-231.
- Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S. & Fukayama, H. 2009. Screening of high kcat Rubisco among Poaceae for improvement of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in rice. *Plant Prod. Sci.* 12: 345-350.
- Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S., Miyake, C. & Fukayama, H. 2011. Functional incorporation of sorghum small subunit increases the catalytic turnover rate of Rubisco in transgenic rice. *Plant Physiol.* 156: 1603-1611.
- Ku, M.S., Agarie, S., Nomura, M., Fukayama, H., Tsuchida, H., Ono, K., Hirose, S., Toki, S., Miyao, H. Fukayama-6

- M. & Matsuoka, M. 1999. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat. Biotechnol.* 17: 76-80.
- Makino, A., Sakuma, H., Sudo, E. & Mae, T. 2003. Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant Cell Physiol.* 44: 952-956.
- Makino, A., Shimada, T., Takumi, S., Kaneko, K., Matsuoka, M., Shimamoto, K., Nakano, H., Miyao-Tokutomi, M., Mae, T. & Yamamoto, N. 1997. Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisense *RbcS* lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO<sub>2</sub> and light in rice plants? *Plant Physiol.* 114: 483-491.
- Miyao, M., Masumoto, C., Miyazawa, S. & Fukayama, H. 2011. Lessons from engineering a single-cell C<sub>4</sub> photosynthetic pathway into rice. *J. Exp. Bot.* 62: 3021-3029.
- Morita, K., Hatanaka, T., Misoo, S. & Fukayama, H. 2014. Unusual small subunit that is not expressed in photosynthetic cells alters the catalytic properties of rubisco in rice. *Plant Physiol.* 164: 69-79.
- Sage, R.F. 2002. Variation in the  $k_{cat}$  of Rubisco in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. *J. Exp. Bot.* 53: 609-620.
- Sage, R.F., Christin, P.A. & Edwards, E.J. 2011. The C<sub>4</sub> plant lineages of planet Earth. *J. Exp. Bot.* 62: 3155-3169.
- Sage, R.F., Pearcy, R.W. & Seemann, J.R. 1987. The nitrogen use efficiency of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. III. Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium Album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). *Plant Physiol.* 85: 355-359.
- Seemann, J.R., Badger, M.R. & Berry, J.A. 1984. Variations in the specific activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase between species utilizing differing photosynthetic pathways, *Plant Physiol.* 74: 791-794.
- Slewinski, T.L. 2013. Using evolution as a guide to engineer kranz-type C<sub>4</sub> photosynthesis. *Front. Plant Sci.* 4:212.
- Schwender, J., Goffman, F., Ohlrogge, J.B. & Shachar-Hill, Y. 2004. Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature* 432: 779-782.
- Taniguchi, Y., Ohkawa, H., Masumoto, C., Fukuda, T., Tamai, T., Lee, K., Sudoh, S., Tsuchida, H., Sasaki, H., Fukayama, H. & Miyao, M. 2008. Overproduction of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C<sub>4</sub>-like photosynthetic pathway into rice. *J. Exp. Bot.* 59:1799-1809.
- Tcherkez, G.G., Farquhar, G.D. & Andrews, T.J. 2006. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 7246-7251.

## C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> 光合成型相互転換植物 *Eleocharis vivipara* を用いた

### C<sub>4</sub> 光合成を成立させる遺伝子の網羅的探索

原田大士朗<sup>1</sup>, 坂本智昭<sup>2</sup>, 倉田哲也<sup>2</sup>, 大和勝幸<sup>1</sup>, 泉井桂<sup>3</sup>, 秋田 求<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>近畿大学大学院・生物理工学研究科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930  
<sup>2</sup>奈良先端大・バイオ・植物グローバル, 〒630-0192 奈良県生駒市 高山町 8916-5  
<sup>3</sup>近畿大学・先端技術総合研究所, 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

Search of the C<sub>4</sub> photosynthesis establishment genes using the C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> photosynthesis interconversion plant *Eleocharis vivipara*

Key words: *Eleocharis vivipara*, next generation sequencer, transcriptome analysis

Daijiro Harada<sup>1</sup>, Toshiaki Sakamoto<sup>2</sup>, Tetsuya Kurata<sup>2</sup>, Katsuyuki Yamato<sup>1</sup>, Katsura Izui<sup>3</sup>,  
Motomu Akita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kinki University, Dept. Biotech. Sci. 930, Nishimitani, Kinokawa 649-6493, Japan

<sup>2</sup>Plant Global Education Project, Nara Institute of Science and Technology. 8916-5,  
Takayama, Ikoma 630-0192, Japan

<sup>3</sup>Kinki University, Institute of Advanced Technology Department of Biotechnological Science.  
14-1 Akasaka, Kainan 642-0017, Japan

#### 1. はじめに

陸上植物種の9割以上はC<sub>3</sub>光合成をおこなうC<sub>3</sub>植物であるが、これに対し、約3%程度がC<sub>4</sub>光合成をおこなうC<sub>4</sub>植物種である。一方で、C<sub>4</sub>植物は、陸上植物全体のバイオマス生産量の約25%を占めると考えられている (Langdale 2011)。C<sub>4</sub>植物の炭酸同化能はC<sub>3</sub>植物より個葉レベルで1.5~2倍、栽培面積あたりの生産性でも2~3倍と高く、また水の利用効率も高い (Black 1973)。これはC<sub>4</sub>植物が二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) を捕集・濃縮し、カルビン・ベンソン回路にCO<sub>2</sub>を供給するC<sub>4</sub>代謝経路をもつことと、種類の異なる細胞 (葉肉細胞と維管束鞘細胞) が機能を分担していることに基づいている。特にこの発達した維管束鞘細胞の周りを葉肉細胞が取り囲んだ葉内の組織構造は *Kranz* 構造と呼ばれ、C<sub>4</sub>植物に特徴的である。

C<sub>3</sub>植物にC<sub>4</sub>光合成代謝経路を獲得させ高い光合成活性を付与させる (C<sub>4</sub>化する) ことで、作物収量を増加し将来的な食糧危機への打開策にすることが期待されている。この発想を現実的に進めるために、たとえばC<sub>3</sub>植物のイネにこれまでに同定されたC<sub>4</sub>光合成関連酵素の遺伝子を単独または複数の組み合わせでイネに導入する試みがなされたが、C<sub>4</sub>光合成は駆動されず収量も増加しなかった (Ku *et al.* 1999, Taniguchi *et al.* 2008)。C<sub>3</sub>植物をC<sub>4</sub>化するためには主要なC<sub>4</sub>光合成関連酵素の遺伝子を高発現させるだけでなく、C<sub>4</sub>光合成を成立させる全

D. Harada, T Sakamoto, T Kurata, K. Yamato, K. Izui, M. Akita-1

ての遺伝子を  $C_3$  植物で適切に発現させる必要があるのかもしれない。トウモロコシの葉において SCARECROW が *Kranz* 構造の形成に関係しているという報告がなされた (Slewiniski *et al.* 2012)。また、*Kranz* 構造の形成には SCARECROW の他に SHORTROOT が関係しており、複数の転写因子の制御を受けている可能性が示唆されている (Wang *et al.* 2013)。しかし、SCARECROW や SHORTROOT はシロイヌナズナなどの  $C_3$  植物にも存在しており、転写制御機構も完全には解明されていない。 $C_4$  光合成の成立に必須である遺伝子群の全容はいまだ解明されているとは言えず、例えば  $C_4$  植物の葉の細胞分化を誘導する遺伝子も完全には解明されていない。

すでにゲノムが解明されている  $C_4$  植物のトウモロコシやソルガムと  $C_3$  植物のイネやシロイヌナズナなどの遺伝子発現プロファイルを比較することができればよいが、各々の種に特異的な配列をもつ遺伝子が多く存在するため、 $C_4$  特異的遺伝子のみを特定することは困難である。この問題を回避するために、 $C_3$  光合成と  $C_4$  光合成を行う同属の異なる2つの種を用い、遺伝子の発現パターンを比較するなどの研究が行われてきた。実際、*Flaveria* 属の *F. trinervia* や *F. bidentis* ( $C_4$ ) と *F. pringlei* ( $C_3$ ) 間や、*Cleome* 属の *Tarenaya hassleriana* ( $C_3$ ) と *Gynandropsis gynandra* ( $C_4$ ) 間でも遺伝子発現比較解析が行われている (Udo *et al.* 2011, Canan *et al.* 2014)。しかし、これら種間の比較においてもまだ種固有の遺伝子を排除できず、 $C_4$  光合成を成立させる全遺伝子を絞り込むためには課題が残されている。

## 2. $C_3/C_4$ 光合成切り替え植物 *Eleocharis vivipara*

単子葉植物のカヤツリグサ科には、 $C_3$  植物と  $C_4$  植物が混在している。この科に属するハリイ属 (*Eleocharis*) は約 200 種の湿生植物からなるグループで、数種類の  $C_4$  植物を含んでいる。*E. vivipara* は北米フロリダ州南東部の湿原地帯に自生している。フロリダでの自生植物の採集と生態調査から、クリークや池の水際に陸生状態、半水生を経て、水深約 50 cm の水中に没した状態まで連続して生育していることが確認された (Ueno *et al.* 1988)。

陸生型は固い直立した葉身(葉肉は退化しており、厳密には稈にあたる)をもっているが、水生型では糸状の柔らかい葉身をもち、外見的にも大きく異なる。陸生型の葉は、葉緑体やミトコンドリアを大量に含んだ大型の維管束鞘細胞をもち、その外側を放射状に配列した葉肉細胞が取り囲む *Kranz* 構造を示す。これは  $C_4$  植物に特徴的な葉構造である。一方、水生型の葉では陸生型と大きく異なり、表皮の内側に大型の発達した葉肉細胞をもち、また維管束鞘細胞は著しく小型となり、これにはわずかな小型の葉緑体やミトコンドリアしか含まれない。水生型の葉は典型的な  $C_3$  植物の葉の構造的特徴を示す。そして *E. vivipara* は、陸生型においては NAD 依存性リンゴ酸酵素 (NAD-ME) 型の  $C_4$  光合成を行い、水生型においては  $C_3$  光合成を行うことが見出された (Ueno *et al.* 1988)。この陸生型と水生型の相互転換には植物ホルモンが関わっており、水生型の植物にアブシジン酸 (ABA) を与えると  $C_4$  型の葉構造の、陸生型の植物にジベレリン (GA) を与えると  $C_3$  型の葉構造の特徴を示すようになる (Ueno 2001)。

*Eleocharis* 種には *E. vivipara* と同様に水生条件と陸生条件とで形態や生化学的特徴が変化するものがある。例えば *E. baldwinii* や *E. retroflexa* の環境変化に対する環境応答を観ると、

発現の仕方はそれぞれに異なる。*E. baldwinii* の場合、陸生条件では *E. vivipara* と同じく *Kranz* 構造を形成し、 $C_4$  光合成を活発に行う。しかし、水生のときは、クランツ構造はとらないものの維管束鞘細胞には様々なオルガネラが存在する。また、陸生型のときと比べると NAD-ME 活性は減るものの、NADP 依存性リンゴ酸酵素 (NADP-ME) 活性はわずかながらに増える。実際に  $^{14}C$  pulse- $^{12}C$  chase パターンを調査すると水生型のときは  $C_4$  代謝と  $C_3$  代謝の中間体である事が分かった (Ueno 2001)。このことにより、*E. baldwinii* は水生型のときでも一部  $C_4$  代謝を行っていると考えられる。*E. retroflexa* の場合では、さらに *E. vivipara* とは発現の仕方が異なり、水中型では、維管束鞘細胞のオルガネラの数は減るものの、クランツ様構造をとり、 $C_4$  代謝を行っている。 $^{14}C$  pulse- $^{12}C$  chase パターンからも、 $C_4$  代謝を行っていた (Ueno 2001)。

このように *Eleocharis* 種のなかでも  $C_3$  代謝と  $C_4$  代謝の移り変わりの程度が種により異なり、生化学的特徴だけでなく構造的特徴まで  $C_3/C_4$  光合成の相互転換が可能な植物は *E. vivipara* を除いて報告されていない。すなわち *E. vivipara* では、同一ゲノムから生育環境に応じて  $C_3$  および  $C_4$  光合成の遺伝子が発現するので、両光合成を行っているときの遺伝子発現を調査する際に「種の違い」を考慮する必要が無く、 $C_4$  光合成を成立させる遺伝子の網羅的な解析を行うには格好の材料であると考えた。このことから *E. vivipara* を用いて、 $C_3$  光合成から  $C_4$  光合成への代謝変化の過程を調べ、分子機構により切り換わり、その切り換わりに何が必要とされるかを明らかにするうえで、重要な研究試料となりうると考えられる。

### 3. *E. vivipara* を用いた $C_4$ 光合成成立遺伝子の探索

#### 3-1. 本研究の目的と *E. vivipara* の研究状況

本研究は植物の  $C_4$  化に必要な要件を分子レベルから明らかにしようと考えて始められた。 $C_4$  光合成に直接関係するもの以外にも  $C_4$  光合成を成立させるために必要な遺伝子があると考えられる。我々は究極的には、*Kranz* 構造の形成なども含めた  $C_4$  光合成の成立に必要な全ての遺伝子を  $C_3$  植物に導入することで  $C_4$  化がなされるのではないかと考えている。

現状では  $C_4$  光合成の成立に必要な遺伝子の種類や数は完全には解明されていない。これらを見出すためには、示差的な方法による時系列的、網羅的なスクリーニングが必要である。しかし、極めて興味深い特性を持っているにもかかわらず、*E. vivipara* のゲノム配列情報や遺伝子発現プロファイルはまだ十分には解明されていない。

以前に *E. vivipara* の陸生型と水生型における遺伝子発現をサブトラクション解析で調査したという報告がなされた (Chen *et al.* 2011)。しかし、この際 *E. vivipara* とされた植物は、形態が酷似している *E. baldwinii* であることが判明し、後に訂正された (Chen *et al.* 2012)。その後、次世代シーケンサーを用いた *E. baldwinii* の陸生型 ( $C_4$ ) と水生型 ( $C_3$ - $C_4$  中間) のトランスクリプトーム解析がなされた (Chen *et al.* 2014)。しかし、前述のとおり *E. baldwinii* の  $C_3/C_4$  光合成切り替えは不完全であり  $C_4$  光合成成立遺伝子の探索に十分であるとは言えない。

#### 3-2. *In vitro* 条件での材料作成

*E. vivipara* は、農業生物資源研究所の上野修氏(現・九州大学農学研究院)より、陸生型のものを供与していただいた。これをプランターに植えて、通常のガラス温室、自然光下で維持した(図1)。また、同温室に透明アクリル水槽を設置し、24時間流水下で水生型を栽培維持した。



図1 陸生型 *Eleocharis vivipara*

我々は *E. vivipara* の稈先端部のメリステムを出発材料として無菌培養系を確立し、増殖とカルス誘導に最適な植物ホルモン条件を確定することから始めた。さらに、*in vitro* 条件下で沈水することで陸生型(C<sub>4</sub>)を水生型(C<sub>3</sub>)に形態と生理学的特性を含めて切り替えできることを証明した。また、*in vitro* 条件下で ABA 処理することにより沈水条件下でも維管束鞘細胞が発達した陸生型の形態をとる植物(ABA型)となることを明らかにした。

しかし、*in vitro* 条件下で誘導させた ABA 型において C<sub>4</sub> 光合成の重要な酵素である PEPC の活性が水生型より低下し、陸生型でみられる PEPC のリン酸化が ABA 型では見られない一方、RubisCO 活性は水生型と同様に上昇している事を発見した。これは、ABA 型では葉の組織形態のみが陸生型に変化している可能性を示す。

### 3-3. *De novo* 参照配列の作成

陸生型、水生型全株からそれぞれ cDNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサー (Illumina Hiseq2000) の解析に供し、トランスクリプトームデータを得た。国立遺伝学研究所が提供する DDBJ Read Annotation Pipeline の Preprocessing プログラムを用いて、トランスクリプトームデータから低クオリティのリードを除去した。その後、ショートリードアセンブラー Trinity を用いてアセンブリをおこない、*de novo* 参照配列を作成した(図2)。Trinity はアルゴリズムに *de Bruijn Graph* を使用しておりアセンブリの際に複数の配列候補が算出される。

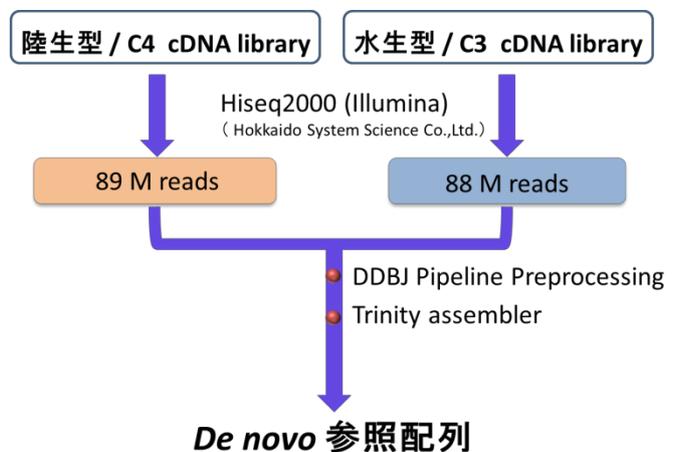


図2 *De novo* 参照配列の作成スキーム

そこで、クラスタリングソフトの CD-HIT を用いて類似した配列を除去し transcript candidate を選出した。データベース EBI Uniref 100 に対して BlastX で相同配列を検索しアノテーション付けをおこなった。結果、29,727 本の重複のない遺伝子配列 (unigene) が決定できた。これらのうち約 38.1%が機能がすでに明らかにされている既知の遺伝子と、約 27.3%がデータベース上に記載があるものの機能未知の遺伝子と類似しており、残り 34.6%がデータベース

上に記載がなかった。

### 3-4. 遺伝子発現量解析

*in vitro* 培養の陸生型, 水生型, ABA 型の全稈から作成した cDNA ライブラリーと, 先端部成長点を含む未分化な細胞のみから作成した cDNA ライブラリーを次世代シーケンサー (Illumina GaIIX) により配列解析し, それぞれのデータを上記で作成した *de novo* 参照配列へマッピングソフト Bowtie を用いてマッピングした。マッピング結果は, 解析ソフト「R」の統計解析パッケージである *De seq* で正規化された (図 3)。



図 3 遺伝子発現プロファイルの比較

これらの一連の解析の結果, 水生型と比べて, 陸生型と ABA 型で共に 2 倍以上高発現していた遺伝子数は 1,195 個, 共に低発現していた遺伝子数は 2,642 個だった。高発現していた遺伝子の中には *Kranz* 構造の形成に関わるとされている *SCARECROW* や *SHORTROOT* の遺伝子も含まれていた。しかし, に *PEPC* や *PPDK* などの葉肉細胞で働く  $C_4$  光合成酵素の遺伝子は, 陸生型のみで高発現し, ABA 型では発現していなかった。このことは, 前述したとおり, 我々が以前に ABA 型における *PEPC* 活性を調査した結果と一致していた。一方で維管束鞘細胞で働く *NAD* 依存性リンゴ酸脱水素酵素 (*NAD-MDH*) や *NAD-MDH* などの  $C_4$  光合成酵素の遺伝子は陸生型, ABA 型で共に高発現していた。

陸生型と ABA 型で共に高発現していた遺伝子について以前に発表された *Flaveria* (Udo *et al.* 2011) と *Cleome* (Canan *et al.* 2014) の遺伝子発現プロファイルと比較したところ, 陸生型と ABA 型, さらに *F. bidentis* ( $C_4$ ) と *Gynandropsis gynandra* ( $C_4$ ) で共通に高発現している遺伝子を約 100 個, 共通して低発現している遺伝子を約 20 個, 絞り込むことが出来た。高発現している遺伝子のなかには, 約 40 個の機能未知の遺伝子が含まれていた。また,  $C_4$  光合成に関係があると報告されている遺伝子や, 細胞構築や細胞壁の分化に関係する遺伝子が複数含まれていた。我々は, これらの絞り込んだ遺伝子の中に  $C_4$  構造に関わる遺伝子が含まれている可能性があると考えている。

## 4. 今後の展望

現在, 我々は *E. vivipara* の遺伝子組換え植物の作成実験系の確立を試みている。これを利用して, 現在までに絞り込んだ, 細胞の分化に関わると予想される遺伝子群について, 陸生型 ( $C_4$ ) でノックダウンまたはノックアウトさせ, 植物体の成長速度, 光合成組織の構造, 遺伝子発現, 各種光合成酵素の活性を調べる予定である。予想通りであれば光合成細胞の分化が抑制されるはずであり, 今まで全容が解明されていなかった  $C_4$  光合成の構造分化機構の解明が大きく進むと期待される。

## 5. 謝辞

貴重な植物体を供与していただきました上野修教授（九州大学農学研究院）に厚く御礼申し上げます。本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究費（No.10-I-3）の助成を受けた。次世代シーケンサーの解析については NAIST バイオサイエンス研究科植物グローバル教育プロジェクトの支援を受けた。

## 6. 引用文献

- Black, C.C.Jr. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to Net CO<sub>2</sub> Uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 253-286.
- Chen, T., Ye, R., Fan, X., LI, X., Lin, Y., 2011. Identification of C<sub>4</sub> photosynthesis metabolism and regulatory-associated genes in *Eleocharis vivipara* by SSH. *Photosyn.Res.* 108: 157-70.
- Chen, T., Zhu, X.G., Lin, Y., 2014. Major alterations in transcript profiles between C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> and C<sub>4</sub> photosynthesis of an amphibious species *Eleocharis baldwinii*. *Plant Mol Biol.* 86: 93-110.
- Gowik, U., Braütigam, A., Weber, K.L., Weber, A.P.M., Westhoff, P., 2011. Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*: How many and which genes does it take to make C<sub>4</sub>? *Plant Cell.* 23: 2087-105.
- Ku, S.B.M., Agarie, S., Nomura, M., Fukuyama, H., Tsuchida, H., Ono, K., Hirose, S., Toki, S., Miyao, M., Matsuoka, M., 1999. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nature Biotech.* 17: 76-80.
- Külahoglu, C., Denton, K.A., Sommer, M., Maß, J., Schliesky, S., Wrobel, T.J., Berckmans, B., Gongora-Castillo, E., Buell, C.R., Simon, R., Veylder, L.D., Brautigam, A., Weber, A.P.M., 2014. Comparative transcriptome atlases reveal altered gene expression modules between two Cleomaceae C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant species. *Plant Cell.* 26: 3243-60.
- Langdale, J.A. 2011. C<sub>4</sub> cycles: past, present, and future research on C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant Cell.* 23: 3879-92.
- Slewinski, T.L., Anderson, A.A., Zhang, C., Turgeon, R., 2012. Scarecrow Plays a Role in Establishing Kranz Anatomy in Maize Leaves. *Plant and Cell Physiol.* 53: 2030-2037
- Taniguchi, Y., Ohkawa, H., Masumoto, C., Fukuda, T., Tamai, T., Lee, K., Sudoh, S., Tsuchida, H., Sasaki, H., Fukayama, H., Miyao, M., 2008. Overproduction of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C<sub>4</sub>-like photosynthetic pathway into rice. *J. Exp. Bot.* 59: 1799-1809
- Ueno, O. 1988. Induction of kranz anatomy and C<sub>4</sub>-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid. *Plant cell.* 10: 571-84.
- Ueno, O., Samejima, M., Muto, S., Miyachi, S., 1988. Photosynthetic characteristics of an amphibious plant, *Eleocharis vivipara*: Expression of C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> modes in contrasting environments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 6733-7.

- Ueno, O. 2001. Environmental regulation of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*. *Plant Physiol.* 127: 1524-32.
- Wang, P., Kelly, S., Fouracre, P.J., Langdale, J.A., 2013. Genome-wide transcript analysis of early maize leaf development reveals gene cohorts associated with the differentiation of C<sub>4</sub> Kranz anatomy. *The Plant Journal.* 75: 656-670

## C<sub>4</sub>モデル植物 *Setaria viridis* の研究ツールの整備

榊原 均, 木羽隆敏

理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Research tools of *Setaria viridis*, a model C<sub>4</sub> plant

Keywords: C<sub>4</sub> plant, genome, *Setaria viridis*, transcriptome, transformation

Hitoshi Sakakibara & Takatoshi Kiba

RIKEN Center for Sustainable Resource Science

1-7-22, Suehiro, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan

### 1. はじめに

C<sub>4</sub>光合成の研究はこれまで生化学的・細胞生物学的な手法を中心に行なわれ、CO<sub>2</sub>濃縮回路の特徴付けや、窒素同化、硫黄同化における維管束鞘細胞と葉肉細胞間での機能分化のしくみなどが研究されてきた。また、C<sub>4</sub>光合成成立に必要な遺伝子の探索については、近年、フラベリア属植物やエレオカリス属植物をもちいた比較ゲノミクスや、比較トランスクリプトミクスが盛んに行なわれ、鍵遺伝子のマイニングが試みられている。ただし、これらはいずれも逆遺伝学的なアプローチであるため、異なる側面からのアプローチが必要であることも指摘されていた。また、順遺伝学的な変異体のスクリーニングにはCO<sub>2</sub>濃度制御下で生育させるなどの必要もあり、トウモロコシのような大型のC<sub>4</sub>植物を利用することは困難であった。本稿では、近年、特にC<sub>4</sub>植物研究のモデルとして注目されているエノコログサ (*Setaria viridis*) について、その研究ツール整備の現状と可能性について概説する。

### 2. エノコログサの特徴

エノコログサ (*Setaria viridis*, 慣用英語名 green foxtail) はイネ科エノコログサ属の1年生草本で、春から秋にかけて身近に見かける我々になじみの深い植物である (図1)。いわゆる雑草であるが、穀物のアワ (*Setaria italica*, 慣用名 foxtail millet) の原種とされており、両者間では交雑も起こる。図2に主な作物との比較系統樹を示すが、スイッチグラス、ギニアグラスなどのエネルギー作物と近縁である (Li and Brutnell, 2011)。C<sub>4</sub>光合成のサブタイプはトウモロコシ、ソルガム、サトウキビなどと同じNADP マリックエンザイム (NADP-ME) 型である。

H. Sakakibara & T. Kiba-1

図1 エノコログサ (*Setaria viridis*)

図3にゲノム解析がされている主なイネ科植物の特徴を比較した。エノコログサはゲノムサイズが約510 Mbp, 世代時間が約6~8週間である。花成の日長感受性が高く, 短日条件下で出穂が誘導される。そのため, 生育環境をコントロールすれば4週間ほどで種子の収穫も可能である。ただし栄養成長期が

短いほど一穂あたりの穎花数も少なくなるため, 目的によって生育条件を選択することが賢明である。気温25℃程度の自然光温室または人工気象器があれば栽培可能で, 草丈も30 cm以下であることから, 実験材料として扱いやすい植物である。

米国USDAのNational Plant Germplasm Systemには77アクセッションが登録されているが (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?430573>), 研究用の標準アクセッションとしてA10.1が広く使用されている。このアクセッションは元株のA10から8世代自殖を繰り返したものであり, ゲノム解読にも用いられている。

### 3. ゲノム情報の整備

*S. viridis* のゲノム配列は米国のThomas Brutnellらを中心としたコンソーシアムにより解析が進められている。理研ではPacBio RS IIによる*de novo* ゲノムシーケンシングや, 遺伝子予測のためにRoche GS FLX+による完全長cDNAシーケンシングを行い, コンソーシアムのゲノム解読に貢

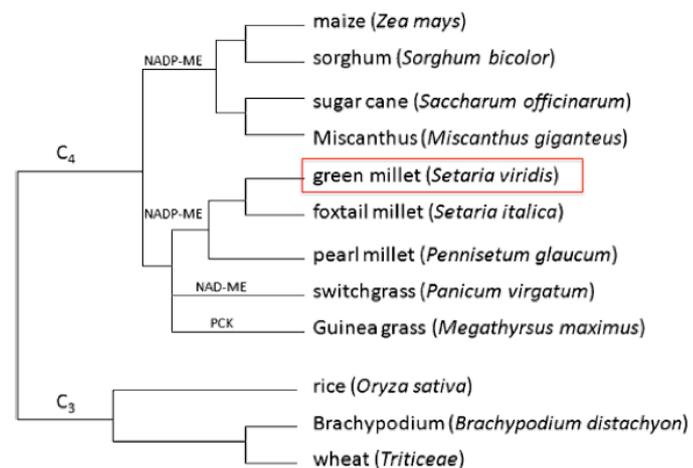


図2 主なイネ科植物の系統発生関係  
Li & Brutnell (2011)を改変

献している。PacBio RS IIによる解析では, 平均長6.6 kb, ゲノムサイズの約23倍のデータを取得している。米国でも複数の次世代シーケンシングプラットフォームによる解読が完了している。現在それらのデータのアセンブリーの最終段階であり, ゲノム配列情報は近いうちに公開される予定である。

栽培種のアワ (*S. italica*) のゲノム配列はすでに公開されている (<http://www.phytozome.net/foxtailmillet.php>) (Bennetzen *et al.*, 2012)。

	C <sub>4</sub> エノコログサ <i>S. viridis</i> (A10.1)	C <sub>4</sub> トウモロコシ <i>Z. mays</i>	C <sub>4</sub> ソルガム <i>S. bicolor</i>	C <sub>3</sub> ミナトカモジグサ <i>B. distachyon</i>	C <sub>3</sub> イネ <i>O. sativa</i>
ゲノムサイズ (Mbp)	510	2400	700	270	430
染色体数(2n)	18	20	20	10	24
自殖	○	×	○	○	○
形質転換技術	○	○	○	○	○
掛け合わせ	可	易	易	難	易
ゲノムシーケンス	進行中	利用可	利用可	利用可	利用可
世代時間(週)	6	< 12	< 12	6	< 12
植物サイズ(cm)	10-30	~250	~500	10-20	120-200

図3. ゲノム解析がされている代表的な単子葉研究植物の特徴

完全長 cDNA 配列データについては、器官別と、温度、塩、乾燥および窒素欠乏などのストレス処理をした実生の地上部と地下部から、CAP-trapper 法を用いて均一化完全長 cDNA ライブラリーを作製し、5'および3'末端からの配列を Roche GS FLX+ で解析した。総計 5.6 million reads のデータを取得し、その約半分が完全長であると予測されている。このデータの活用により、より正確な遺伝子予想が可能になることが期待される。

#### 4. 形質転換

エノコログサの形質転換方法は、イネと同様に成熟種子から誘導したカルスにアグロバクテリウム感染を介して外来遺伝子を導入する方法が用いられている。種子からのカルス誘導に 8 週間、感染とシュート再分化に 5 週間、根の誘導に 3 週間、鉢上げから種子収穫に約 4 週間の計約 5 ヶ月で T1 世代の種子が得られる。ただし、その効率については、イネなどに比べまだまだ低いといわざるを得ない。はじめに報告された方法(Brutnell *et al.*, 2010)では形質転換効率が極めて低く、実際の使用に耐えないというのが大きな問題であった。そこで私たちの研究グループでは、カルス培養培地などの条件を改変した結果、5-10% (感染したカルスあたり) の効率で形質転換体を得ており、遺伝子導入実験が現実的に可能なレベルに達している。この方法については近く公表する予定である。また、他の研究グループによる改良版も報告されている (Van Eck and Swartwood, 2015)。

#### 5. 掛け合わせ

順遺伝学的な解析を進める上で、掛け合わせによる交雑は欠くことのできない技術で

ある。エノコログサの穎花は非常に小さいものの、掛け合わせは可能である。方法は 48 °C の温浴で数分処理することで、花粉を不活性化（除雄）させ種子親とし、花粉親と交雑させる。これにより一穂当たり数個の掛け合わせ種子が得られる。詳細についてはビデオジャーナルに報告されている(Jiang *et al.*, 2013)。

## 6. 種子休眠

エノコログサは雑草であることから、種子休眠が深く、採取した直後の種子を播種しても発芽率は 5% に満たず、数ヶ月保存しないと発芽率は上昇しない。それでは実験には不向きであるので、休眠を打破するための工夫が試みられている。最も効果的と思われるのがリキッドスモーク処理である (Sebastian *et al.*, 2014)。リキッドスモークは燻製風味をつけるために使う調味料であり、燻煙の濃縮液である。有効成分は未同定ではあるが、この濃縮液中におそらく発芽誘導物質として知られる Karrikin に似た物質が含まれており、これが休眠打破に働くのではないかと考えられる。5%濃度のリキッドスモーク処理により、採取後一週間程度の種子でも発芽率を 90%程度にまで上昇させることが可能である。また、休眠打破に働く植物ホルモンとして知られるジベレリン処理によっても発芽率が上昇することも報告されている (Sebastian *et al.*, 2014)。

## 7. 変異体リソース

順遺伝学的なアプローチをするためには、変異体のリソースの整備は欠かせない。米国では化学変異源である NMU (N-nitroso-N-metylurea)を用いた変異体ライブラリーを作製している (Brutnell *et al.*, 2015)。理研では、仁科加速器センターの阿部知子博士の協力を得て、重イオンビーム照射変異体ライブラリーの作出に取り組んでいる。すでに照射条件を検討し、大量の種子に炭素イオンを照射しており、名古屋大学の谷口教授らと共同で、3年以内に約 10,000 ラインを整備することを目標に、変異率の評価と増殖を行っている。

## 8. おわりに

エノコログサの研究ツール整備はまだ十分とはいえないが、従来の生化学的な解析が中心であった C<sub>4</sub> 植物研究に、分子遺伝学を導入するためには、エノコログサの一連の研究基盤を確立する意義は大きい。また、エノコログサは単に C<sub>4</sub> 光合成回路を持つ植物というだけでなく、乾燥耐性や窒素利用効率など、植物の生産性向上を考える上で様々な特徴のある形質を備えている。シロイヌナズナなどのモデル植物研究者が研究材料として手軽に扱えるような基盤環境が整備でき、多くの研究者が利用することを期待している。

## 9. 引用文献

- Bennetzen JL, Schmutz J, Wang H, Percifield R, Hawkins J, Pontaroli AC, Estep M, Feng L, Vaughn JN, Grimwood J, Jenkins J, Barry K, Lindquist E, Hellsten U, Deshpande S, Wang X, Wu X, Mitros T, Triplett J, Yang X, Ye CY, Mauro-Herrera M, Wang L, Li P, Sharma M, Sharma R, Ronald PC, Panaud O, Kellogg EA, Brutnell TP, Doust AN, Tuskan GA, Rokhsar D, Devos KM. 2012. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nature Biotechnology* 30:555-561.
- Brutnell TP, Bennetzen JL, Vogel JP. 2015. *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis*: Model Genetic Systems for the Grasses. *Annual Review of Plant Biology* 66:465-485.
- Brutnell TP, Wang L, Swartwood K, Goldschmidt A, Jackson D, Zhu XG, Kellogg E, Van Eck J. 2010. *Setaria viridis*: a model for C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant Cell* 22: 2537-2544.
- Jiang H, Barbier H, Brutnell T. 2013. Methods for performing crosses in *Setaria viridis*, a new model system for the grasses. *Journal of Visual Experiments* 80: e50527.
- Li P, Brutnell TP. 2011. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. *Journal of Experimental Bototany* 62: 3031-3037.
- Sebastian J, Wong MK, Tang E, Dinneny JR. 2014. Methods to promote germination of dormant *Setaria viridis* seeds. *PLoS One* 9: e95109.
- Van Eck J, Swartwood K. 2015. *Setaria viridis*. *Methods in Molecular Biology* 1223: 57-67.