

## 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、同じ田畠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<sub>3</sub> 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<sub>4</sub> 植物と C<sub>3</sub> 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）。

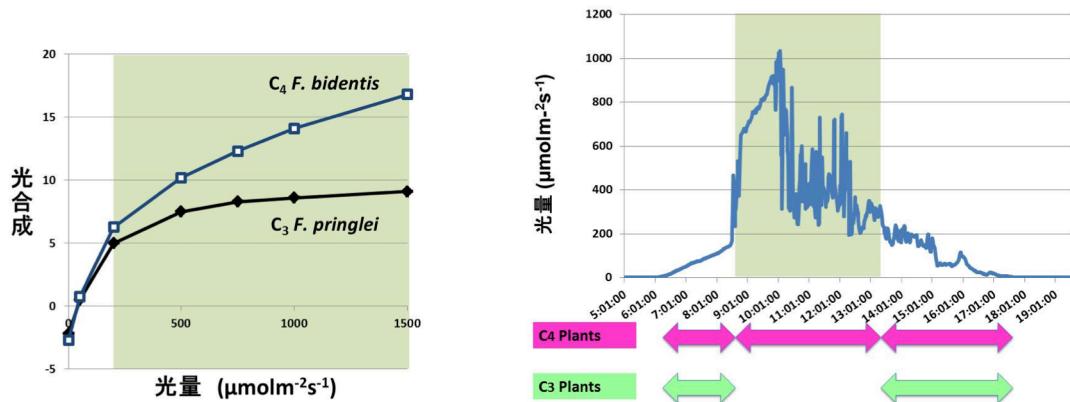


図 1 C<sub>4</sub> 植物と C<sub>3</sub> 植物の光量-光合成曲線(左)と野外の光量変化(右)。光量が  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  を超える領域を陰で示した。

C<sub>4</sub> 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<sub>3</sub> 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運動させる「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-リン酸デヒドログナーゼ (GAPDH), フルクトースビス fosfataーゼ (FBPase), セドヘプツロースビス fosfata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グナーゼ (NADP-MDH), グルコース-6-リン酸デヒドログナーゼ (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運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-Calcagno 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α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。

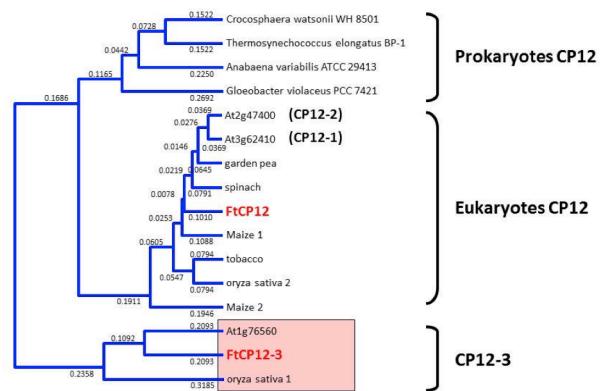


図2 CP12の分子系統樹

*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いての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性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「不活性状態の 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 の不活性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し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の抑制が遅延した。また、機能破壊株を恒常に明所において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つたが、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、今までにこれを示した論文報告はない。これまでには、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 が不活化を保たれ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 のホモテトラマ一構造をとるが、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

表 推定される機能別の高発現遺伝子の解析		
Clone	Annotation	Localization
1.葉緑体包膜タンパク質		
4-1	bile acid:sodium symporter family protein	Chl/Chl <sup>b</sup>
2-10	expressed protein	Chl/Chl
2. Photosystem I 関連タンパク質		
7-7	photosystem I subunit O (PSI-O)	Chl/Chl
9-12	PSI-D	Chl/Chl
2-12	chlorophyll A-B binding protein / LHCI type III	Chl/Chl
3.代謝酵素		
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
4.細胞壁合成酵素関連		
5-6	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	SP/no
6-13	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	PM/no
5.機能未知タンパク質		
6-19	translationally controlled tumor family protein	MB/no <sup>c</sup>
6-2	unknown protein	Mit/Chl
1-3	CP12 domain-containing protein (CP12-3)	Chl/no
6-9	auxin/aluminum-responsive protein, putative	MB/Chl
2-16	dormancy/auxin associated family protein	MB/Chl
5-3	lipid transfer protein (LTP) family protein	ER/no
4-3	expressed protein (unknown)	Cyt/no
6.タンパク翻訳関連		
5-4	translation initiation factor S11 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運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、こうした場合には、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-Calcagno 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.