

# 通性 CAM 植物アイスプラントの乾燥耐性獲得に伴う葉緑体機能転換の分子機構

## Molecular mechanism for the conversion of chloroplast functions during CAM induction in ice plant.

プロジェクト代表者: 是枝 晋 (科学分析支援センター)  
Shin Kore-eda (Molecular Analysis and Life Science Center)

### 1. 研究の背景と目的

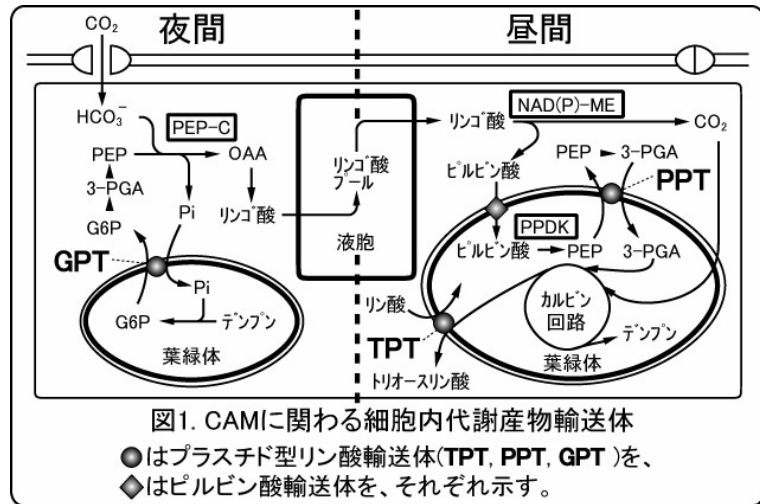
乾燥地域の植物の多くは、多肉植物型酸代謝 (CAM) を発達させ、光合成の水利用効率を上げることで、乾燥耐性を獲得している。CAM では蒸散の少ない夜間に気孔を開き  $\text{CO}_2$  を葉内に取り込み、リンゴ酸のカルボキシル基として固定し液胞内に蓄える (図1)。このときの  $\text{CO}_2$  受容体・ホスホエノールピルビン酸 (PEP) は、葉緑体内に大量に蓄積したデンブンを分解して得られる。一方、昼間気孔を閉じたままこの

リンゴ酸を脱炭酸することで  $\text{CO}_2$  を取り出しカルビン回路で同化する。この脱炭酸の結果ピルビン酸を生じるが、これは葉緑体内のピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK) でリン酸化され PEP となり、サイトゾルに出され、糖新生経路とカルビン回路を経てデンブんに戻る。

以上がマリックエンザイム型 CAM の概略である。CAM 植物葉緑体は  $\text{C}_3$  植物葉緑体よりも大量のデンブンを蓄えられ、デンブン代謝能も高く、光エネルギーでピルビン酸を取り込みリン酸化できるという、特殊な機能を持つ。CAM 経路のうち、昼間のトリオースリン酸の輸送には、 $\text{C}_3$  植物葉緑体の場合と同じく、プラスチド型リン酸輸送体の一つ、トリオースリン酸/リン酸輸送体 (TPT) が関与している。一方、CAM 植物葉緑体は、 $\text{C}_3$  植物葉緑体では非常に活性の低い G6P/Pi 輸送体 (GPT) と PEP/リン酸輸送体 (PPT) の活性が高く、夜間のグルコース 6-リン酸 (G6P) 輸送と昼間の PEP 輸送とにそれぞれ関与している。このように、CAM 植物の葉緑体の機能を考える上で、個々の代謝産物輸送体の特性を明らかにすることは大変重要である。

通性 CAM 植物アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は、水が十分に利用できる条件下では  $\text{C}_3$  光合成を行うが、乾燥ストレスにさらされると CAM 経路を誘導し (CAM 化)、乾燥ストレスに対抗して継続的に光合成を行うことができるようになる。これまでの研究で、アイスプラントが CAM 化するとき、リン酸輸送体アイソザイムの発現応答の仕方が互いに異なっていることが分かってきた。また CAM 化に伴い、機能不明の新規の葉緑体包膜タンパク質をコードする遺伝子 (*McNBT1*) の転写産物量も増加することが分かっている。しかし、このようなストレスに応じた葉緑体の代謝産物輸送特性の変化は、これまであまり研究が進んでいない。

高等植物のプラスチド型リン酸輸送体には、基質特異性に対応して、TPT、PPT、GPT、ヘキソースリン酸/リン酸輸送体 (XPT) の4つのタイプが知られており、多くの  $\text{C}_3$ 、 $\text{C}_4$  植物から遺伝子や cDNA が単離されている。一方、CAM 植物でリン酸輸送体の cDNA が単離されたのは唯一アイスプラントだけで、ドイツの Häusler らが TPT1、PPT1、GPT1 の cDNA を、さらに我々がもう一つ GPT (GPT2) の cDNA をクローン化した (Häusler et al. 2000, Kore-eda et al. 2005)。これら4つのアイスプラント・リン酸輸送体は、他の植物のリン酸輸送体に対するアミノ酸配列上の類似性に基づき、基質特異性のタイプ分けがされている。しかしこのタイプ分けはあくまでも類似性に基づく予想であり、これらの生理的な役割を議論するためには、これらが実際にリン酸輸送体を持つことや輸送基質に対する特異性を、実験的・定量的に確かめなければならない。そこで本研究ではこれらの輸送体タンパク質を酵母細胞内で発現させ、精製後、輸送活性の速度論的解析を行うことを目標としている。さらに、これらの輸送体の発現調節機構を明らかにするため、これらの遺伝子のプロモーター領域のクローン化を目指す。



## 2. 方法

### a) アイスプラント・リン酸輸送体の酵母細胞内での発現

前年度までに、アイスプラント・プラスチド型リン酸輸送体のうち2つ(TPT1とGPT2)の遺伝子(それぞれ、*McTPT1*と*McGPT2*)の ORF 全長を含む cDNA 断片を、酵母発現ベクター pYES2 に挿入し、酵母細胞内で発現させ以下のような予備的な結果を得ていた。

①予想通り TPT1 と GPT1 はともに無機リン酸を輸送し、前者は G6P を輸送せず後者は輸送した。

②TPT1とGPT2ともに無機リン酸に対する  $K_m$  値は約 1 mM で、他の植物で報告されている値とほぼ同じであった。

しかし、この実験で人工リン脂質膜(リポソーム)に組み込んだのは精製タンパク質ではなく、酵母細胞からの粗膜画分であったため、酵母細胞に由来すると思われるわずかなリン酸輸送活性がバックグラウンドとしてみられ、基質特異性の精密な比較が困難であった。

そこで本年度は、酵母細胞で発現させた輸送体タンパク質を精製後、リポソームに組み込むため、pYES263(図2)を酵母発現ベクターとして用いた。この発現ベクターのクローン化部位(*NcoI* 認識部位-*EcoRI* 認識部位間)に目的タンパク質を挿入することで、ヒスチジン(His)タグおよびグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)タグを目的タンパク質の N 端に融合させて発現することができ、抗 His タグ抗体もしくは抗 GST 抗体を用いることで容易に精製できる。さらに、精製された融合タンパク質を TEV プロテアーゼで処理することでタグ部分を切り離し、タグ部分による二次的な影響を最小限にとどめることができる。

本年度はまず、CAM 化で転写産物量がもっとも顕著に増加する GPT2 と、全く増加しない TPT1 について融合タンパク質発現プラスミドを作成することとした。そのためにこれらのタンパク質をコードする ORF 全体を含む cDNA 断片を、アイスプラント total RNA を鋳型として RT-PCR 法で増幅し、通常の大腸菌ベクター pT7Blue に組み込みクローン化し、塩基配列を調べた。

プラスチド型リン酸輸送体は *in vivo* では、N 末端に 70~90 アミノ酸残基のシグナルペプチドが付加された形で翻訳され、プラスチド包膜に組み込まれたあと、シグナルペプチドが切り離され成熟タンパク質となり、輸送体として機能する。そこで、酵母発現ベクターに挿入する cDNA 断片として、上記のクローン化した完全長 cDNA のうち、成熟タンパク質部分をコードする領域のみを PCR 法で増幅した。なお、アイスプラント輸送体のシグナルペプチド切断部位は明らかになっていないので、実験的に切断部位が明らかになっているエンドウマメとホウレンソウの TPT との amino 酸配列と比較することで切断部位を予測した。

### b) アイスプラント・リン酸輸送体遺伝子の単離

現在我々はアイスプラントの TPT1、PPT1、GPT1、GPT2 輸送体の遺伝子、*McTPT1*、*McPPT1*、*McGPT1*、*McGPT2* を、その上流域を含めてクローン化し、その構造を明らかにしつつある。前年度までに *McGPT2* の転写領域の塩基配列を決定しイントロン/エクソン構造を明らかにしたので、今年度はそれと比較するため、*McGPT1* の転写領域を、その cDNA 塩基配列に基づき設計したプライマーを用い、アイスプラントゲノム DNA を鋳型として PCR 法で増幅し、塩基配列を調べた。さらに、CAM 化で転写産物量がもっとも顕著に増加する *McGPT2* の遺伝子上流領域を PCR 法を応用した Cassette-ligation mediated PCR 法(Isegawa, *et al.* 1992)により単離した。

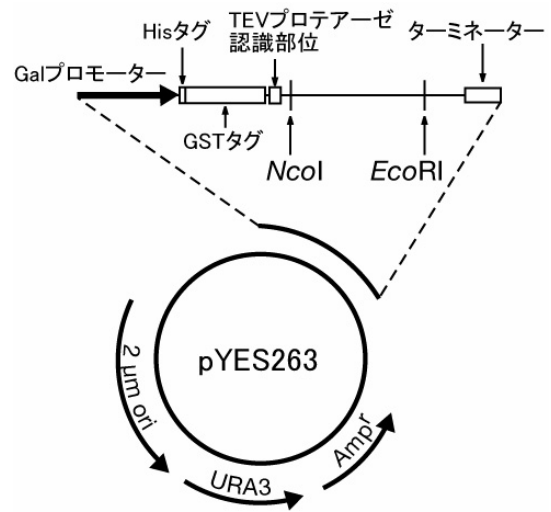


図2. pYES263の構造

### 3. 今年度の成果

#### a) アイスプラント・リン酸輸送体の酵母細胞内での発現

まず、アイスプラント TPT1 と GPT2 の ORF 全体を含む cDNA 断片を、total RNA を鋳型として増幅しクローン化した。これらの cDNA 断片の塩基配列を調べたところ、既知の配列と完全に一致し、変異がないことが確かめられた。

次に、実験的に切断部位が明らかになっているエンドウマメとホウレンソウの TPT とアイスプラントの 4 つのプラスチド型リン酸輸送体のアミノ酸配列を比較したところ、アイスプラント輸送体のシグナルペプチド切断部位は図3に示すような位置であると予測した。そこで、アイスプラント TPT1 と GPT2 の、それぞれ 78 番目と 69 番目のアラニン残基 (A) 以降をコードする cDNA 領域を、上記のようにしてクローン化した cDNA 断片を鋳型として増幅した。

		▽	
<i>PsTPT</i>	67	L-----LRPCPATAG-GNDSAGEEKVAPVGVFFSRYPALTTGFFFFTWYFLNVIFNILNKKIYNYFPYP	128
<i>SoTPT</i>	68	CSRREKTA---VQPCRAAS--G--SSGE---AKTGFLKYPALVTGSFFFMWYFLNVIFNILNKKIYNYFPYP	130
<i>McTPT1</i>	66	S-RKESTA---VQPCRAAAE-GSDSAGE---AKVGFLLQKYPALVTGFFFFMWYFLNVIFNILNKKIYNYFPYP	130
<i>McPPT1</i>	74	LISRKRSDDGVVVVKATSVPEAGADE----APKAGGIGKLELGLLFGFWYLFNIYFNIYKQVLLKVFHYH	142
<i>McGPT1</i>	63	GLLRERKP---LIKCEAYEADGSEPIKPEPVPVPIGGEAARKVKIGIYFAVWWALNVVFNINKKVNLNAFPYP	132
<i>McGPT2</i>	57	-LLKPRKH---LVECNAYEANRSQPLDINIELPSVKSETAKRVKIGIYFATWWALNVVFNINKKVNLNAFPYP	125
		· * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

図3. シグナルペプチド切断部位の予測

エンドウマメ、ホウレンソウ、アイスプラントの TPT 遺伝子 (それぞれ *PsTPT*, *SoTPT*, *McTPT1*) とアイスプラント PPT と GPT 遺伝子 (*McPPT1*, *McGPT1*, *McGPT2*) のコードするタンパク質アミノ酸配列のアライメントを ClustalW で作成し、シグナルペプチド切断部位付近のみを示した。逆三角はエンドウマメとホウレンソウ TPT で明らかになっているシグナルペプチド切断部位。6 つの配列で同一のアミノ酸は \* で、似たアミノ酸は · でそれぞれ示す。

現在、これらの cDNA 断片を酵母発現ベクター pYES263 に挿入したプラスミドを作成している。

#### b) アイスプラント・リン酸輸送体遺伝子の単離

まず、*McGPT1* の転写領域をアイスプラントゲノム DNA を鋳型として増幅し、塩基配列を決定したところ、図4に示すように *McGPT1* と同様、4 つのイントロンを持ち、イントロンの挿入されている位置もすべて同一であることが分かった。アラビドプシスとイネにも GPT 遺伝子がそれぞれ 2 つずつ見つかったので、これらとも比較したところ、いずれの場合も翻訳領域は 4 つのイントロンで分断されており、それらの位置はアイスプラントの場合と同一であった。ただし、イネの *OsGPT1* のみは翻訳開始コードのすぐ上流にイントロンがもうひとつ (Intorn 0) 挿入されていた。

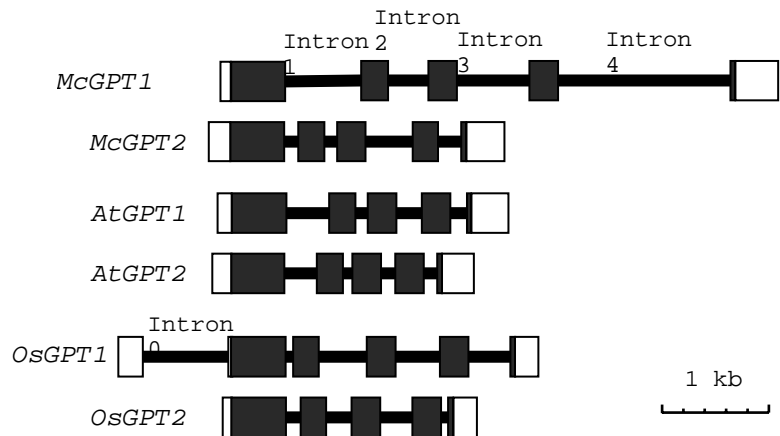


図4. GPT 遺伝子のイントロン/エクソン構造の比較  
アイスプラント (*Mc*)・アラビドプシス (*At*)・イネ (*Os*) の GPT 遺伝子の転写領域のイントロンとエクソンをそれぞれ太線と四角で示した。エクソンのうち翻訳領域を黒で塗りつぶしてある。

さらに、*McGPT2* の遺伝子上流領域については、翻訳開始コードから約 2.5 kb 上流まで増幅することができている。PCR 法により遺伝子上流域の増幅する場合、通常の PCR 法に比べ標的配列に対する特異性が原理的に劣っており、誤った領域を増幅する可能性が高い。そこでこの領域の塩基配列を部分的に決定したところ、下流端に確かに転写領域の 5' 非翻訳領域を含んでおり、正しい領域が増幅されたことを確認できた。今後この領域の塩基配列をすべて決定し、既知のアイスプラント遺伝子上流域と比較すると同時に、その下流にレポーター遺伝子を連結してアイスプラント細胞内に導入し、プロモーター活性を持つことを確認する予定である。