

# CAM 植物・プラスチド型リン酸輸送体遺伝子の発現調節機構

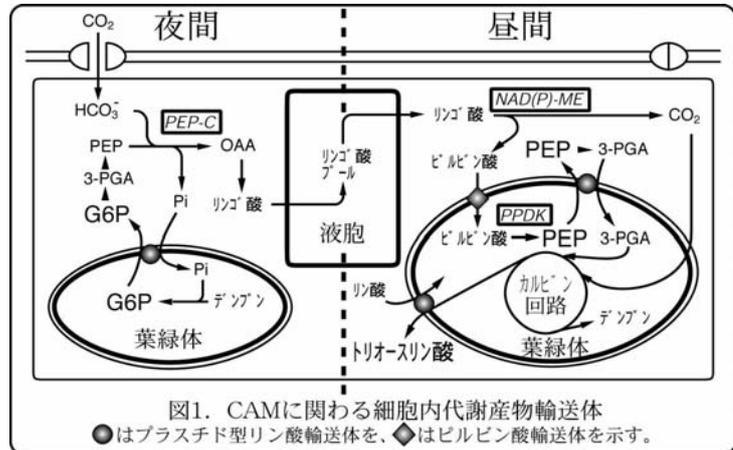
## Transcriptional regulation mechanism of plastidic phosphate translocators in a CAM plant

プロジェクト代表者: 是枝 晋 (科学分析支援センター・講師)

Shin Kore-eda, Molecular Analysis and Life Science Center, Lecturer

### 1. 序

乾燥地域の植物の多くは、多肉植物型酸代謝 (CAM) を発達させて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。通性 CAM 植物アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は、好適な条件では C3 光合成を行うが、数百 mM の NaCl を与えられると CAM 経路を誘導させる (CAM 化)。高濃度の塩は乾燥と同じく渇水ストレスを引き起こすが、アイスプラントは CAM 化することで、この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。CAM 型アイスプラントでは、蒸散の低い夜間に気孔を開き CO<sub>2</sub> を葉内に取り込み、リンゴ酸の形で一時的に液胞内に蓄える (図1)。このときの CO<sub>2</sub> 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プンを分解して得られる。一方、昼間は気孔を閉じたままこのリンゴ酸を脱炭酸することで CO<sub>2</sub> 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プンに戻る。



植物細胞のプラスチドはそれぞれ独自の代謝経路を備えており、それに応じてプラスチド包膜上には様々な基質特異性を持つ多種の輸送体が存在する。その1つにプラスチド型リン酸輸送体があり、トリオースリン酸をはじめとするリン酸エステルや無機リン酸を基質として厳密な1:1の交換輸送をおこなっている。このリン酸輸送体には、基質特異性に対応して、トリオースリン酸/リン酸輸送体 (TP/Pi 輸送体)、PEP/リン酸輸送体 (PEP/Pi 輸送体)、グルコース6-リン酸/リン酸輸送体 (G6P/Pi 輸送体)、ヘキソースリン酸/リン酸輸送体の4つのサブファミリーが知られている。アイスプラントにも TP/Pi 輸送体と PEP/Pi 輸送体の遺伝子が一つずつ (*McTPT1* および *McPPT1*) と、2つの G6P/Pi 輸送体遺伝子 (*McGPT1* および *McGPT2*) の cDNA が見いだされている。我々は、C3 型アイスプラントの葉では普通の C3 植物と同様、*McTPT1* 以外のリン酸輸送体はわずかしか発現していないが、CAM 型アイスプラントの葉では *McTPT1* の発現量は C3 型とあまり変わらないのに対して、*McPPT1*、*McGPT1*、*McGPT2* は著しく発現が高まっていることを確かめた (文献1)。これら *McPPT1* 遺伝子と二つの G6P/Pi 輸送体遺伝子 (*McGPT1*、*McGPT2*) の産物は、それぞれ、CAM により葉緑体内で作られた PEP とグルコース6-リン酸 (G6P) をサイトゾルに輸送するために関わっていると推測している。

本プロジェクトでは、まず、4つのアイスプラント・リン酸輸送体タンパク質が予想される基質特異性を伴った輸送活性を持つことを確かめる。さらに、通常の C3 植物では非光合成器官で発現している PEP/Pi 輸送体や G6P/Pi 輸送体の遺伝子が CAM 型アイスプラントではどのような機構で葉でも発現するようになっているのかを解明するため、アイスプラント・リン酸輸送体の遺伝子構造とプロモーター領域の配列を明らかにし、プロモーターの機能解析を行うことを目標として進めている。

### 1. プラスチド型 G6P/リン酸輸送体 *McGPT2* 遺伝子領域の単離と遺伝子構造の解明

アイスプラントのリン酸輸送体遺伝子として、*McTPT1*、*McPPT1*、*McGPT1* の3つは従来から知られていたが、2つめの G6P/Pi 輸送体遺伝子・*McGPT2* は、我々が新たに発見したものである (文献1)。そこで、この遺伝子についてまず調べることにした。

#### 1-A) *McGPT2* のコピー数

アイスプラント・ゲノム中の *McGPT2* のコピー数を調べるため、*McGPT2* cDNA の5'端約 0.8 kb をプローブとし、制限酵素 *Bam*HI、*Sac*I、*Hind*III のそれぞれで切断したゲノム DNA に対しサザンブロット解析を行った。その結果、それぞれで一つずつバンドが検出され、*McGPT2* は1コピーしか存在しないことが示唆された (図2)。

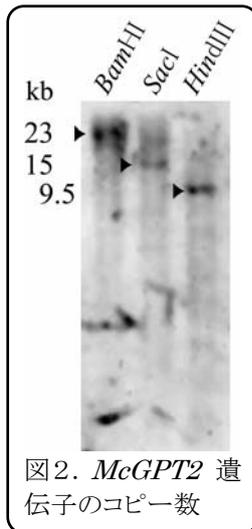


図2. *McGPT2* 遺伝子のコピー数

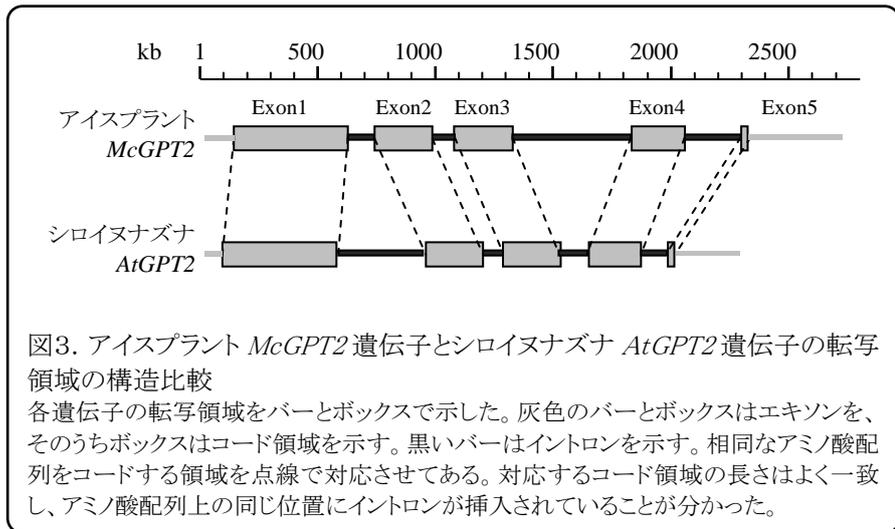


図3. アイスプラント *McGPT2* 遺伝子とシロイヌナズナ *AtGPT2* 遺伝子の転写領域の構造比較  
各遺伝子の転写領域をバーとボックスで示した。灰色のバーとボックスはエクソンを、そのうちボックスはコード領域を示す。黒いバーはイントロンを示す。相同なアミノ酸配列をコードする領域を点線で対応させてある。対応するコード領域の長さはよく一致し、アミノ酸配列上の同じ位置にイントロンが挿入されていることが分かった。

### 1-B) *McGPT2* のイントロン

Inverse PCR 法はゲノム DNA 上の塩基配列の分かっている領域に隣接する未知領域の単離には非常に有効な手段であるが、PCR による大変感度の高い方法を用いるため、配列が似ているが無関係な DNA 断片を増幅してしまう危険がある。そこで、標的となる DNA 断片の長さがある程度予想しておくことは、正しい断片を得るのに有効である。そのためには、遺伝子内部に挿入されているイントロンの位置と塩基配列を知る必要がある。*McGPT2* cDNA の塩基配列に基づいて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 *McGPT2* のゲノム DNA 断片を増幅したところ、この遺伝子は 135 bp、132 bp、472 bp、272 bp の4つのイントロンを持っていることが分かった(図3)。これらのイントロンの挿入位置はアラビドプシスの2つの G6P/Pi 輸送体遺伝子(*AtGPT1* と *AtGPT2*)と全く同じであった。このことはこれらのイントロンが、アイスプラントとアラビドプシスが種分化する以前から G6P/Pi 輸送体遺伝子に存在していたことを示唆している。

### 1-C) *McGPT2* 遺伝子上流領域の単離

Inverse PCR 法により *McGPT2* 遺伝子上流領域を単離するため、A と B の2セットのプライマーを設計した。セット A を用い *PstI* で切断したゲノム DNA を鋳型として Inverse PCR 法を行った場合(実験 A)には約 0.5 kb 以上の断片が、セット B を用い *SacI* で切断したゲノム DNA を鋳型とした場合(実験 B)には約 0.6 kb 以上の断片がそれぞれ増幅されるはずである。これまでのところ、実験 A で 0.7 kb の断片が、実験 B で 1.0 kb と 1.3 kb の二種類の断片が増幅されている。現在これらの断片の塩基配列を調べ、目的とする *McGPT2* 遺伝子上流域を含むかどうか調べている。

## 2. 酵母内で発現させたアイスプラント・プラスチド型リン酸輸送体の輸送特性

これまでのところ、アイスプラントの4つのリン酸輸送体遺伝子(*McTPT1*, *McPPT1*, *McGPT1*, *McGPT2*)のコードするタンパク質(それぞれ TPT1 輸送体、PPT1 輸送体、GPT1 輸送体、GPT2 輸送体とする)がリン酸輸送体活性を持つことは、他の植物のリン酸輸送体に対するアミノ酸配列上のホモロジーから予測しているだけである。今後、これらの遺伝子の生理的機能について研究を進めていくためには、これらが実際にリン酸化合物を輸送し、予想された基質特異性を備えていることを実験的に証明しておく必要がある。そこで、本研究当初の計画には含まれていなかったが、以下のようにしてこれらの遺伝子産物の輸送活性を実験的に確かめることとした。

### 2-A) アイスプラント・GPT2 輸送体と TPT1 輸送体の基質特異性

4つのアイスプラント・リン酸輸送体遺伝子の cDNA 断片を PCR 法で増幅し、酵母発現用ベクター上の *GAL4* プロモーターの下流に挿入した。得られたプラスミドで出芽酵母 INVSc1 を形質転換したところ、*McTPT1*、*McGPT1*、*McGPT2* については形質転換体を得られた。*McPPT1* については現在までのところ形質転換体は得られていない。得られた形質転換体3種にガラクトースを与えて目的タンパク質を誘導発現させた後、細胞を破碎して細胞粗抽出液を調製した。粗抽出液中の膜タンパク質を、大豆由来の L- $\alpha$ -フォスファチジルコリンで作成したリポソームに、凍結融解法により組込んで再構成させた。植物のプラスチド型リン酸輸送体は基質分子を1:1で交換輸送をするので、内部に基質となる物質がなければ、リポソーム外から基質となる物質を加えてもリポソーム内に取り込まれない。そこで、再構成の際、リポソーム内にはあらかじめ輸送体の交換基質を

内部基質として封入しておき、外部基質として $[^{32}\text{P}]$ 無機リン酸を加えて取り込み反応を開始させた。一定時間反応後、タンパク質修飾剤 (pyridoxal 5'-phosphate と mersalyl) で反応を止め、イオン交換カラムに通して外部基質を取り除き、内部基質と交換にリポソーム内に取り込まれたリン酸量を測定した。このとき、酵母に由来する輸送体の働きで、 $[^{32}\text{P}]$ 無機リン酸が交換輸送でなく、一方的に取り込まれてしまう可能性も考えられたので、その程度を見積もるため内部基質の代わりにリン酸輸送体の基質とはならない KCl を封入しておき、コントロールとした。

表1にアイスプラント・リン酸輸送体 cDNA を導入した酵母細胞由来のタンパク質をリポソームへ再構成し、5分間に取り込まれた $[^{32}\text{P}]$ 無機リン酸量を示す。挿入断片を持たないベクターのみ (pYES2) を導入した細胞に由来する膜タンパク質を組み込んだリポソームでは、植物のプラスチド型リン酸輸送体の基質とはならない KCl を内部に封入した場合にも若干の取り込みが見られ、酵母輸送体によるリン酸取り込みがわずかに見られた。この取り込み量は、内部基質の種類により大きな差はなく交換輸送は起きないと思われた。pGPT2 および pTPT1 の場合、無機リン酸を内部基質とすると、pYES2 に比べ5-7倍の高い取り込みが見られ、リン酸輸送体が発現していることが示唆された。この取り込み量はそれぞれ KCl を内部基質としたときの 3.4 倍の取り込み量であることから、内部基質との交換輸送が起きていることが示唆された。一方、pGPT1 を導入した場合の取り込み量は、pYES2 の場合とほとんど同じ程度で、酵母細胞内で正常なアイスプラント GPT1 が発現していないようであった。

表1. 酵母形質転換体の膜タンパク質を再構成したリポソームへの $[^{32}\text{P}]$ リン酸の取り込み活性

ベクター・pYES2 と McGPT1, McGPT2, McTPT1 の cDNA を挿入したプラスミド (それぞれ pGPT1, pGPT2, pTPT1) を導入した酵母細胞から抽出した膜タンパク質をリポソームへ再構成し、5分間に取り込まれた無機リン酸を測定した。内部基質として、無機リン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸 (三炭糖リン酸の一つ、DHAP)、PEP、G6P を用いた。

内部基質	5 分間の $[^{32}\text{P}]$ リン酸取り込み量			
	nmol/mg protein			
	pYES2	pGPT1	pGPT2	pTPT1
KCl	0.79	0.55	2.22	3.39
無機リン酸	1.60	0.95	7.48	11.4
DHAP	1.23	1.07	5.86	8.58
PEP	0.61	1.25	2.07	0.87
G6P	1.10	0.95	7.21	5.80

表2. 酵母細胞内で発現させたアイスプラント GPT2 と TPT1 によるリン酸取り込み量の相対値

内部基質	リン酸取り込み量の相対値 %	
	GPT2	TPT1
KCl	24	27
無機リン酸	100	100
DHAP	79	75
PEP	25	3
G6P	104	48

次に、アイスプラント GPT2 輸送体および TPT1 輸送体による輸送量を見積もるため、pGPT1 および pTPT1 を導入した場合のそれぞれの内部基質での取り込み量から、pYES2 を導入した場合の同じ内部基質での取り込み量を差し引き、さらに無機リン酸を内部基質とした時を 100% として取り込み量の相対値を計算した (表2)。G6P を内部基質とした場合、GPT2 はリン酸を内部基質とした場合と同じ程度の取り込みが見られ、アイスプラント GPT2 は効率よく G6P を輸送することが分かった。一方、TPT1 はリン酸を内部基質とした場合の半分程度しか取り込まず、G6P の輸送能に関して量に大きな差があることが分かった。このことは GPT2 は G6P/Pi 輸送体であり、TPT1 は TP/Pi 輸送体であることを示唆している。しかし、GPT2、TPT1 ともに本来基質とはしないと思われる KCl をリポソーム内に封入したときもリン酸を封入した場合の 1/4 程度の取り込みが見られること、TPT1 では PEP を封入した場合の取り込み量が KCl を封入した場合よりもむしろ小さくなってしまったことから、実験条件をさらに検討する必要があると思われる。

## 2-B) アイスプラント・GPT2 輸送体と TPT1 輸送体の無機リン酸への親和性

酵母細胞内で発現させた輸送体が正常な輸送特性を持っているかどうかを判断する指標のひとつとして、無機リン酸への親和性を調べ、植物組織から単離された輸送体タンパク質の場合 (文献値) と比較した。2-A の時と同様にしてアイスプラント・GPT2 輸送体と TPT1 輸送体を発現している酵母細胞の膜タンパク質をリポソームに再構成し、無機リン酸を内部基質として 0.01 mM から 0.1 mM の $[^{32}\text{P}]$ リン酸の輸送活性を測定した。このデータに基づき基質親和性を示す  $K_m$  値を算出した (表3)。

その結果、GPT2 輸送体、TPT1 輸送体のいずれも無機リン酸に対する  $K_m$  はそれぞれ文献に近い値を取ることが分かった。このことは、酵母細胞内で発現させたアイスプラント・リン酸輸送体は、無機リン酸に対して十

分な親和性を持っていることを示しており、正常な高次構造を保っている可能性が高いことを示唆している。今後、トリオースリン酸や G6P など、その他のリン酸エステルに対する親和性も調べる必要がある。

表3. アイスプラント・リン酸輸送体 GPT2 と TPT1 のリン酸に対する  $K_m$  値

	$K_m$ (mM)	文献
アイスプラント GPT2	1.5±0.1	
エンドウ根 G6P/Pi 輸送体	1.1±0.1	Kammerer <i>et al.</i> 1998 (文献2)
アイスプラント TPT1	0.8±0.1	
ハウレンソウ TP/Pi 輸送体	1.0±0.3	Flügge <i>et al.</i> 1989 (文献3)

### 3. 今後の課題

アラビドプシスやイネでは TP/Pi 輸送体遺伝子は一つ、PEP/Pi 輸送体や G6P/Pi 輸送体の遺伝子はそれぞれ複数存在していて、各々発現制御が異なり、別々の生理的役割を担っていると考えられている。アイスプラントにも G6P/Pi 輸送体と思われる遺伝子は二つあり、葉では両者とも CAM 化により転写産物量が顕著に増加する一方、根では *McGPT1* の転写産物量は非常に多いが *McGPT2* はほとんど発現していないことが分かっている(文献1)。この二つの遺伝子の役割の違いを明らかにするためには、1) 発現調節機構の違いを明らかにすると同時に、2) これらの遺伝子産物である G6P/Pi 輸送体にどのような機能的な違いがあるのか調べることも、重要なテーマであると考えている。前者については、本プロジェクトの当初からの目標であり、*McTPT1*、*McPPT1* も含めてプロモータ領域の単離と機能解析を中心にして取り組んでいきたい。今回、酵母細胞で発現させたアイスプラント・リン酸輸送体は正常に近い高次構造を保っていて、輸送活性の特性を調べるのに十分な性質を備えていることが示唆された。後者のテーマについても、酵母細胞で発現させた輸送体タンパク質を精製しリポソームへ再構成することで、より精密な輸送特性に関するデータを得ることを目標として進めていきたい。

文献 1 Kore-eda, S., Noake, C., Ohishi, M., Ohnishi, J. and Cushman, J. C. (2005) Transcriptional profiles of organellar metabolite transporters during induction of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Functional Plant Biology*, **32**: 451-466.

文献 2 Kammerer B., Fischer K., Hilpert B., Schubert S., Gutensohn M., Weber A. and Flügge U.-I. (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *The Plant Cell* **10**: 105-117.

文献 3 Flügge U.-I., Fischer K., Gross A., Sebald W., Lottspeich F. and Eckerskorn C. (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts. *The EMBO Journal* **8**: 39-46.

#### 学会発表

野明 千雪, 是枝 晋, 大西 純一, 通性 CAM 植物アイスプラントにおけるプラスチド型リン酸輸送体の輸送活性. 第 46 回植物生理学会年会 (新潟, 2005 年 3 月) ポスター発表 (PB022)