

2017年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 小川敬子 (理工学研究科宗景研究室)

研究課題 C₄光合成を可能にしたプロトン駆動力制御の進化の解明

研究期間 2017年4月1日～2018年3月31日

研究成果概要 (日本文(全角)の場合は2,500字程度、英文(半角)の場合は90字×65行程度)

C₄型植物が行うC₄型光合成は、光合成機能を分業する二種類の細胞、すなわち葉肉細胞と維管束鞘細胞との間でC₄代謝産物を輸送するC₄回路を使い、維管束鞘細胞に二酸化炭素を濃縮する。このようなC₄型光合成は陸上植物が獲得した収斂進化形の一つであり、乾燥・高温・強光環境下でC₃型光合成よりも有利に働く。その一方で、C₄型光合成ではC₄回路の駆動のためにC₃型光合成よりも多くのエネルギーが必要となる。C₄型光合成において必要とされるエネルギー需給バランスには、維管束鞘細胞における光合成サイクリック(循環型)電子伝達の活性の促進が寄与していると考えられる。本研究では、同属内にC₃種およびC₄種の植物が現存するキク科 *Flaveria* 属植物を用い、C₄化に伴い獲得された二酸化炭素濃縮機能を支える細胞特異的なエネルギー獲得制御システムに重要なサイクリック電子伝達に着目して解析を行う。

NDH 依存、PGR5/PGRL1 依存のサイクリック電子伝達経路の寄与の解析

C₃型植物におけるサイクリック電子伝達には少なくとも2つの経路が存在することが報告されており、それぞれNDH 脱水素酵素 (NDH) 複合体、PROTON GRADIENT REGULATION 5 (PGR5) およびPGR5-LIKE PHOTOSYNTHETIC PHENOTYPE 1 (PGRL1) が関与している。当研究室では、C₄種 *Flaveria bidentis* (*F. bid*) のこれら2つの各サイクリック電子伝達に関わるNDH-O とPGR5、PGRL1の各ノックダウン株の解析から、C₄種 *F. bid* の二酸化炭素固定には主にNDH 依存経路が寄与しており、PGR5/PGRL1 依存経路の寄与は部分的であることを明らかにしている。

C₄種 *F. bid* において、2つのサイクリック電子伝達経路であるNDH 依存とPGR5/PGRL1 依存それぞれの電子伝達活性を調べるため、各サイクリック電子伝達経路の抑制株の葉を破碎し単離した葉緑体チラコイド膜に人工的に電子供与体を添加してNDH あるいはPGR5/PGRL1 を経由したチラコイド膜上のプラストキノンの還元速度を評価した。その結果、プラストキノンの還元速度はNDH-O ノックダウン株、PGR5 ノックダウン株、PGRL1 ノックダウン株の全てで野生株よりも有意に低下していることが分かった。さらにNDH-O ノックダウン株におけるプラストキノン還元速度は、PGRL1 ノックダウン株に比べ有意に遅かった。このことから、C₄種 *F. bid* におけるサイクリック電子伝達によるプラストキノンの還元についてはPGR5/PGRL1 依存経路よりもNDH 依存経路の寄与が大きいことが考えられる。また、PGR5/PGRL1 依存経路を阻害するアンチマイシンAの添加によりNDH-O ノックダウン株においてサイクリック電子伝達によるプラストキノンの還元がほとんど見られなくなることに加え、NDH-O とPGRL1 の二重抑制株ではサイクリック電子伝達によるプラストキノンの還元が完全に抑制されることから、C₄種 *F. bid* においてサイクリック

電子伝達経路はこれまで C₃種で報告されている NDH 依存と PGR5/PGRL1 依存の 2 経路であることが考えられる。

さらに C₄種 *F. bid* に加え、C₄種 *Flaveria trinervia*、および C₃種である *Flaveria pringlei*、*Flaveria robusta* についても葉緑体チラコイド膜を単離し同様の解析を行ったところ、C₃種と C₄種との間でプラストキノンの還元速度に有意な差は見られなかった。一方で、アンチマイシン A の添加により PGR5/PGRL1 依存経路を阻害した時のプラストキノン還元速度の低下が C₄種 *Flaveria* と比較し C₃種 *Flaveria* で有意に大きかったことから、C₄種 *Flaveria* 属植物におけるサイクリック電子伝達経路は PGR5/PGRL1 依存経路の寄与が C₃種より小さく、C₄種 *Flaveria* 属植物においては主に NDH 依存経路が寄与していることが考えられる。今後、C₄種 *F. bid* の各サイクリック電子伝達経路の抑制株を用い、単離チラコイド膜における ATP 合成に利用されるプロトン濃度勾配の形成を測定することで、各サイクリック電子伝達経路の ATP 生成への寄与を調べる必要がある。

葉肉細胞、維管束鞘細胞におけるサイクリック電子伝達の寄与の解析

葉肉細胞あるいは維管束鞘細胞におけるサイクリック電子伝達の寄与を調べるため、葉肉細胞あるいは維管束鞘細胞特異的に発現するプロモーターを利用し RNAi 法により各細胞特異的に *NDH-O* 発現を抑制した C₄種 *F. bid* の解析を行った。ウェスタンブロッティングにより NDH タンパクの蓄積量を調べたところ、葉肉細胞特異的発現抑制株では野生株の 16 分の 1 以下、維管束鞘細胞特異的発現抑制株では野生株の 8 分の 1~4 分の 1 程度まで NDH タンパク量が減少していた。C₄種 *F. bid* では、維管束鞘細胞に局在する NDH タンパク量は葉肉細胞の 3 倍である [Nakamura et al. (2013) *New Phytologist* 199: 832-842] ことが報告されていることから、細胞特異的抑制株では細胞特異的に *NDH-O* の発現が抑制された場合に予想される以上に NDH タンパク量が減少していることが分かった。そこで免疫染色により NDH 複合体タンパクの局在を調べた結果、細胞特異的抑制株において葉肉細胞と維管束鞘細胞の両方で、完全または部分的に NDH 蓄積が抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、*F. bid* において細胞特異的に遺伝子発現を抑制させる手法として RNAi 法は適していないと考えられる。よって今後は、CRISPR/Cas9 システムにより *PGRL1* あるいは *NDH-O* をノックアウトした株と、細胞特異的に *PGRL1* あるいは *NDH-O* を発現させた株を交配させることにより、細胞特異的に各サイクリック電子伝達経路がノックアウトされた株を作出し、各細胞におけるサイクリック電子伝達の寄与を解析する。

在職期間中の学会発表

1. ○小川敬子、小林加奈、谷口幸美、宗景ゆり

「単離葉緑体における C₄種および C₃種 *Flaveria* の光化学系 I サイクリック電子伝達の解析」

第 59 回日本植物生理学会年会 (札幌コンベンションセンター)、2018 年 3 月