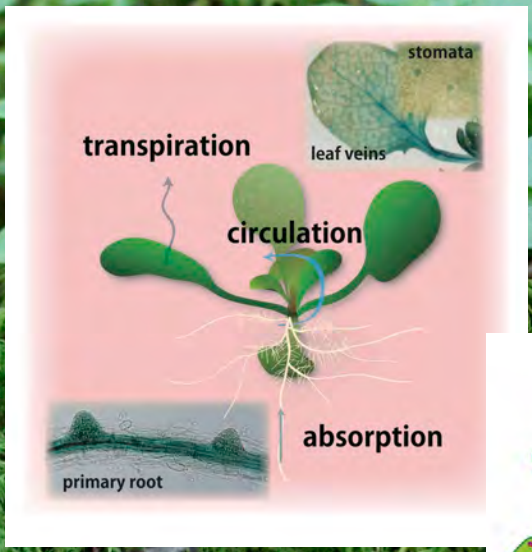
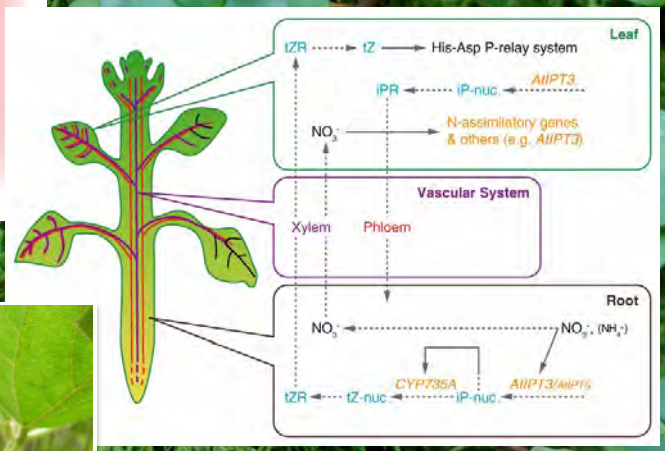
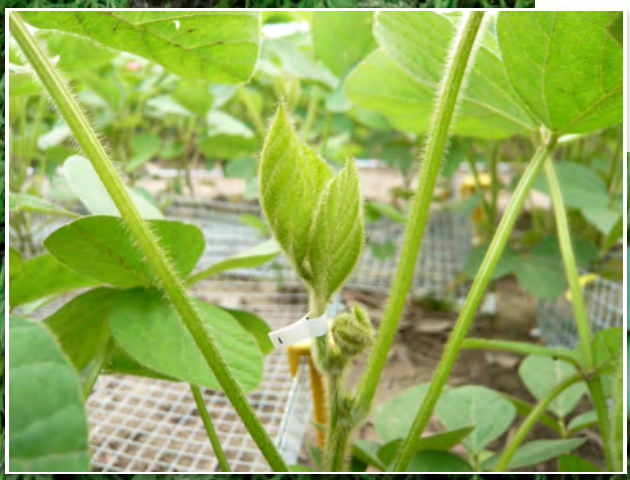
ニュースレターVol. 6
2012年 7月

CO2 Response

植物高CO_2応答







新学術領域研究
「植物生態学・分子生理学コンソーシアムによる
陸上植物の高CO_2応答の包括的解明」

目次

Contents

巻頭言：後半戦を楽しみましょう　1

新学術領域研究班からの論文紹介　2

新学術研究領域　公募班の概要　4

研究班紹介

三ツ井班　イネ澱粉集積抑制酵素変異体における高二酸化炭素・高温応答メカニズムの解明　8

花田班　高二酸化炭素条件下で変動する遺伝子群とその進化起源解析　10

早川班　高CO_2環境下のイネの炭素・窒素栄養バランス高次統御に関わる窒素情報伝達系の解明　12

若手研究者研究紹介　14

酵素から生理学へ　21

アウトリーチ活動　31

新学術領域総括班からの案内　32

表紙について：
林床植物たちは限られた環境で生きています（撮影：アメリカ）

著作権は執筆者本人にございますので、複製・転載の場合は各執筆者にご確認ください。

巻頭言：後半戦を楽しみましょう

Announce

東京大学　大学院理学系研究科　寺島一郎

「植物高CO_2応答」新学術領域も後半戦、あと2年間となりました。新たな公募班を多数迎えて後半戦に臨むつもりでしたが、公募研究の応募総数が少なかったため、採択数の上限を厳しく制限されました。残念ながら継続して採択できなかった班もあり、申し訳なく思っております。新たに参画してくださる研究班は、大阪大学理学研究科の高木慎吾さんのグループと岡山大学資源植物科学研究所の森泉さんのグループの2つです。そのかわりといっては何ですが、採択された公募班には、目一杯、研究費をつけることができました。それでも1億円あった公募班用の予算を、ずいぶん使い残しました。この研究費は応募数が多かった領域に回されるのだそうです。悔しい話です。

高木さんのテーマは、「葉緑体分布パターン決定におけるCO_2の役割」です。1908年刊行のSennのモノグラフ「Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzen-Chromatophoren（植物色素体の形状と位置の変化、とでも訳すのでしょうか）」には、葉緑体が細胞間隙に沿って、あたかもCO_2を吸収しやすいように並ぶことが記載され、配置におよぼすCO_2の影響を調べた実験結果もいくつか示されています。しかし、CO_2 taxisの実態は、まだ誰も知りません。高木さんにはこの難題を是非解決していただきたいと思います。

また、森さんの研究テーマは、「高CO_2環境下におけるCO_2透過性アクアポリンの活性制御」です。私は、2001年、国際光合成会議で基調講演を行った際に、インゲンの葉柄から蒸散流を介して$HgCl_2$液を与えると、細胞間隙から葉緑体までのCO_2拡散コンダクタンスが低下するデータを示し、アクアポリンのCO_2拡散への関与の可能性を議論しました（論文は、Terashima and Ono 2002）。講演後は質問者の人垣ができました。私の研究で、こんなに反響があったのは初めてでした。その後も、私の研究室では、CO_2拡散における葉肉コンダクタンスは大きなテーマで、現在は、D2の溝上祐介君が鋭意取り組んでくれています。また、私のところでポスドクだった半場祐子さん（現、京都工芸繊維大学）が、旦原真木さん（岡山大学資源植物科学研究所）や前島正義さんとの共同研究で、CO_2透過性のアクアポリンの研究を発展させてくれています（最初の論文がHanba et al., 2004、 2006年のPCP論文賞受賞）。また、私は、アクアポリン（aqua = water、porin = pore protein）というのはCO_2チャネルには適さないので、コーポリン （cooporin）という名前も提唱しました（Terashima et al. 2006）。これは、coo = CO_2と、炭酸脱水素酵素carbonic anhydraseとcooperateしているはずである、というのをかけた駄洒落です。この名前には人気がなく、私の研究室でも使ってくれない人がいますが、私は、まだしつこく用いています。何かの学会でDarmstadt工科大学のKaldenhoff教授に会った際、彼らがある論文でcooporinという用語を使ってくれたことに対して礼を述べたら、「お前がrefereeではなかったのか？しつこく使うように要求されたので、（仕方なく）使ったのだ。」と言われました。私は、その論文は審査していなかったのですが・・・。ともかく、森さんの参画により、cooporinの制御の実態が明らかになることを祈っています。

なお、今年度、東北大学・西谷和彦さんが研究代表の「植物細胞壁の情報処理システム」が新学術領域研究に採択されました。馳澤盛一郎さんは西谷新学術領域の計画研究班代表者なので、われわれの領域へは公募班として参画できなくなりましたが、今後も、総括班連携研究者（班友）としてご協力いただけるそうです。領域内で共同研究が多数展開していますので、心強く思います。有り難うございます。

今回のニュースレターには、昨年10月の支笏湖畔の若手の会で行われた杉山達夫先生の講演を再現しました。先生には、講演原稿をニュースレター用にわかりやすい原稿にしていただきました。有り難うございます。領域内では「お互いを先生と呼ばない」ことにしていますが、こういう場合には、やはり「先生」を使ってしまいますね。

秋の若手の会までまだ時間があります。東京方面にご用の折は、東大のわれわれの研究室に立ち寄って、最近の成果を教えてください。また、どんどん共同研究の輪を広げてくださるようお願いいたします。

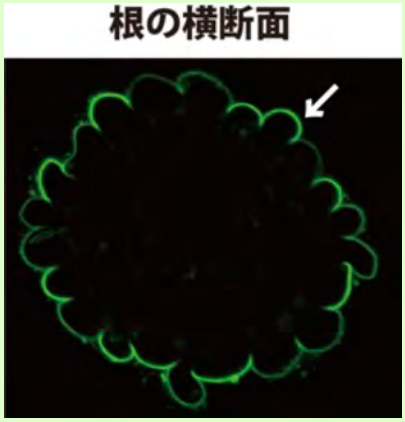
新学術領域研究班からの論文紹介

Research manuscripts

新学術領域研究班が最近発表した論文の一部をご紹介します。

超低濃度の硝酸態窒素栄養を効率よく吸収する仕組みを解明

窒素は、植物の成長や農作物の生産に欠かせない必須栄養素です。多くの植物は、硝酸イオンを主要な窒素栄養として利用しますが、自然界では植物の生育に十分な硝酸イオンが存在することは稀です。そのため、植物は低窒素環境下で生き抜くために、効率よく窒素栄養を吸収する仕組みを備えていると考えられます。本研究では、もともと植物が持っているとされる硝酸イオンを効率良く吸収する仕組みを、実験モデル植物であるシロイヌナズナを用いて研究しました。低窒素環境下で発現が増える硝酸イオンの輸送タンパク質NRT2.4に注目し、詳細な発現分布や その役割について調べました。その結果、*NRT2.4*遺伝子は土と直接接する側根の表皮細胞で発現することや、NRT2.4タンパク質が表皮細胞内で土と接する側に偏って分布し（図）、土壌から効率よく硝酸イオンを取り込むのに都合の良いように配置されていることが分かりました。また、*NRT2.4*遺伝子を破壊したシロイヌナズナでは、超低濃度の環境下だけで、硝酸イオンの吸収能が低下することを突き止めました。これらの結果から、NRT2.4が超低濃度の環境での硝酸イオンの効率的な吸収を担っていることが分かりました。

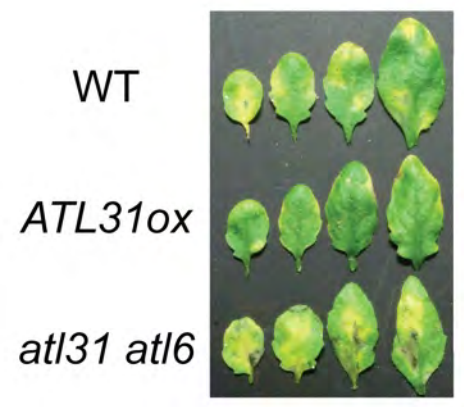


NRT2.4タンパク質は表皮細胞内で土と接する側に偏って分布するため、根の横断面を見ると、根の外周がNRT2.4タンパク質で覆われているように見える（緑色はNRT2.4タンパク質、矢印は根の表面の位置を示す）

Kiba T, Feria-Bourrellier A-B, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Brehaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H, Krapp A (2012) The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of Nitrogen-starved plants. *Plant Cell* 24: 245-258.

C/N制御ユビキチンリガーゼATL31とATL6は植物の防御応答も制御する

糖（炭素源，C）と窒素（N）の代謝はクロストークしており，環境や生育段階に応じて両者の量的バランス（C/N）を適切に制御することが，植物の健全な生育に重要です。私たちは，これまでにシロイヌナズナを用いて，C/N制御因子であるユビキチンリガーゼATL31と，ATL31に相同性の高いATL6との機能解析を行ってきました（Sato et al., Plant J. 2009, 2011）。ATLファミリー遺伝子はシロイヌナズナで約80種ありますが，その多くが防御応答に機能することが報告されていました。そこで，私たちはATL31とATL6（ATL31/6）の防御応答に関する解析を行いました。その結果，*ATL31/6*はともに，病原体由来の分子パターンであるMAMPs処理により発現が大きく誘導されました。さらに*ATL31/6*両過剰発現体は野生型よりも病害抵抗性が増大しており，逆にこれらの遺伝子を破壊した*atl31atl6*では減少していることが分かりました（図）。加えて，防御応答に関わる遺伝子の発現が，植物の生育C/N条件に応じて変動することが分かりました。以上のことから，ATL31/6がC/N応答だけでなく防御応答をも制御していることが明らかになりました。それと共に，ATL31/6は，病原体感染に応答して細胞内C/Nを制御することによって，防御応答にも寄与していることが示唆されました。



***Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000**
感染後7日目の表現型

Maekawa S, Sato T, Asada Y, Yasuda S, Yoshida M, Chiba Y, Yamaguchi J (2012) The Arabidopsis ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the C/N response. *Plant Molecular Biology* 79: 217-227.

低養分条件で育成したグイマツ雑種F_1の高CO_2に対する応答

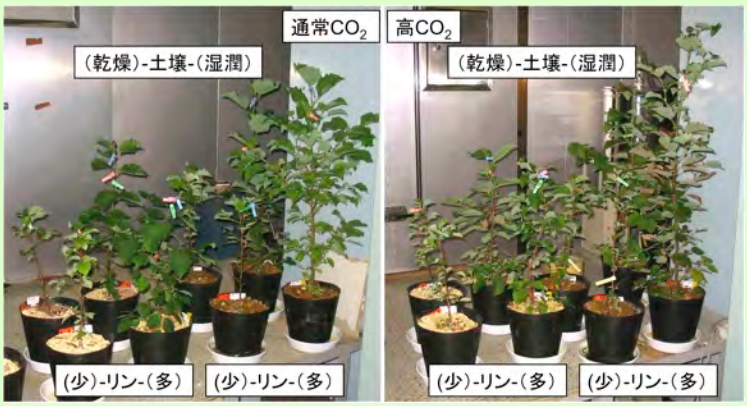
グイマツ雑種F_1（グイマツ×ニホンカラマツ）は高い木部比重を持つためCO_2貯留能が従来のカラマツより20%あまり高く、再造林に有望な造林樹種です。本研究では、収穫後放置されて溶脱のために貧栄養になった立地を想定して、グイマツ雑種F_1苗の成長・光合成に対する高CO_2の影響を調べました。2段階のCO_2環境（360と720　ppm）でグイマツ雑種F_1苗を栽培し、処理開始から約4か月後における針葉の光合成能を評価したところ、高CO_2環境でも純光合成速度の増加が見られませんでした。高CO_2環境では針葉の窒素含量の低下や光合成への窒素利用効率が低下しており、それらが純光合成速度の増加しなかった要因と考えられました。また光合成への窒素利用効率が低下した要因として、窒素以外の養分（リンやカリウム）の欠乏や細胞壁への窒素分配量の増加などが考えられました。このような光合成の負の制御が起こったにも関わらず、高CO_2環境では個体の成長は増加しました。これは同時枝と呼ばれる枝の増加に伴う針葉量の増加が起こり、個体全体としての光合成速度が増加したためでした。さらに現実的な窒素沈着（30 kg ha^{-1} $year^{-1}$）が光合成の負の制御を緩和するかについても調べましたが、土壌への窒素処理によって成長は増加したものの、高CO_2に対する応答は変化しませんでした。本研究の結果から、将来の高CO_2環境ではグイマツ雑種F_1の光合成能力の低下が起こるものの生産性は増加すると結論付けられました。

異なるCO_2濃度で栽培したグイマツ雑種F_1の様子
高CO_2条件では葉の色が黄色くなり光合成能力の低下が起こりました。

Watanabe M, Watanabe Y, Kitaoka S, Utsugi H, Kita K, Koike T (2011) Growth and photosynthetic traits of hybrid larch F_1 (*Larix gmelinii* var. *japonica* X *L. kaempferi*) under elevated CO_2 concentration with low nutrient availability. *Tree Physiology* 31: 965-975.

共生的窒素固定能をもつケヤマハンノキの高CO_2に対する光合成・成長応答に及ぼす土壌養分・水分条件の影響

高CO_2下で樹木の成長促進を維持するためには、土壌の窒素供給量の維持が必要と考えられています。フランキアと共生する窒素固定樹種の高CO_2応答は、温帯から冷温帯域の森林生態系における窒素供給源という観点から注目されています。窒素固定では光合成生産物をエネルギー源として利用するため、窒素固定樹種の高CO_2応答の解明には、光合成活性に影響を及ぼす環境要因との複合効果を考慮する必要があります。本論文では窒素固定樹種のケヤマハンノキの光合成・成長特性の高CO_2応答に対する土壌条件（窒素、リン酸、水分）の効果を調べました。自然光型ファイトトロンを用いた２つの実験結果から、リン酸供給量の影響が窒素供給量や土壌乾燥より顕著であることがわかりました。リン酸供給量が多い場合、土壌の乾湿に関わらず、高CO_2下で、生育環境のCO_2濃度での光合成速度が上昇し、成長量も増加しました。しかし、リン酸不足により、特に湿潤条件で、明瞭な光合成のダウンレギュレーションを示し、成長量も促進されないことが明らかになりました。また、高CO_2に対する樹体内の窒素配分の反応を調べた結果、バイオマス配分と異なる反応を示す場合があることがわかりました。ケヤマハンノキの窒素固定能の高CO_2応答を評価する際に、窒素配分の考慮が必要であることが示唆されました。



自然光型ファイトトロン内で育てたケヤマハンノキ
ケヤマハンノキの高CO_2応答はリン酸供給量に左右され、リン酸が不足する場合、高CO_2下で光合成活性・成長量が促進されませんでした。

Tobita H, Uemura A, Kitao M, Kitaoka S, Maruyama Y, Utsugi H (2011) Effects of elevated atmospheric carbon dioxide, soil nutrients and water conditions on photosynthetic and growth responses of *Alnus hirsuta*. *Functional Plant Biology* 38: 702-710.

新学術領域研究　公募班の概要

Outline

今年度から2年間、新しく12の公募班を迎えることになりました。ここでは各班の概要をご紹介します。

イネのシンク生成能の遺伝的変異がCO_2応答性に及ぼす影響の解明とそのモデル化

研究代表者： 酒井 英光（農業環境技術研）
連携研究者： 長谷川 利拡（農業環境技術研）

コンソーシアムにおける役割：開放系大気CO_2増加（Free-Air CO_2 Enrichment; FACE）実験施設を用いて、イネの特定形質の遺伝的変異がCO_2応答に及ぼす影響を個体・圃場レベルで明らかにします。高CO_2応答に関する分子生理的な知見が、フィールドレベルでどのように現れるかを確かめる実験プラットホームとしての役割を担います。

目的：高CO_2に対する応答が品種間で有意に異なることなどが明らかになってきましたが、どのような遺伝的形質がCO_2応答性に関与しているかについては明らかではありません。本研究では、CO_2応答性の遺伝的変異のメカニズムに関与する形質として考えられるシンク生成能に焦点を当てます。すなわち、遺伝的背景がほぼ同質であり1穂モミ数のみが異なるCSSL（染色体断片置換系統）やNIL（準同質遺伝子系統）などの遺伝材料を用い、FACEにおいて成長・収量の高CO_2応答性の差異の検証を行います。これにより、イネのシンク生成能の遺伝的変異がCO_2応答性に与える影響を実験的に明らかにすることを目的とします。さらに、シンク生成能の遺伝的変異とCO_2応答性の関係を作物モデルにより検証・改良し、高CO_2環境が将来のコメ生産に及ぼす影響の予測精度の向上に資することを目的とします。

葉緑体分布パターン決定における二酸化炭素の役割

研究代表者：高木慎吾（阪大・理）

コンソーシアムにおける役割：プロトプラスト内の葉緑体が細胞外CO_2濃度の高い場所に移動する反応を定量的に解析し、この反応が植物の高CO_2応答過程にどれだけ寄与するかを検証することのできる実験系を確立します。

目的：光合成を担うオルガネラ葉緑体は、外部環境の変化に応じて細胞内での分布パターンを変え、光合成の最適化に寄与します。私たちはCO_2が葉緑体の分布パターンを制御する重要な要因の一つではないかと予想し、個葉レベルで細胞間隙のCO_2濃度を調節する、プロトプラストの外側のCO_2濃度を調節する手法により、その可能性の検証に取り組んでいます。ガス交換システムなどの協力を得て、定量的な証明を目指します。また、もう一つの重要な要因である光とのクロストークについて解析します。

高CO_2環境における光合成誘導反応の生化学的・気孔的制限とその生態学的意義

研究代表者：唐 艷鴻（国立環境研）
連携研究者： 深山 浩（神戸大・理）・冨松 元（国立環境研）

コンソーシアムにおける役割：光強度が変動する条件下での光合成の高CO_2応答の測定と解析、その応答が陸上植物の炭素収支に及ぼす影響の評価 をします。

目的：高CO_2環境下では、光強度の変動に対する植物の光合成応答特性とメカニズムを明らかにすることが主な目的です。特に光強度の上昇に応答する光合成誘導反応の気孔影響に注目し、気孔開閉特性の異なるポプラ2種、シロイヌナズナの野生株と気孔が開いたままの株、及び蘚苔類について、光合成誘導反応プロセス、気孔応答及びRubisco等の生化学的要因に及ぼす高CO_2環境の影響に関する測定と解析を行います。また、将来の高CO_2環境下で植物のダイナミック光合成を予測するためのデータを提供します。

高CO_2応答に関与する炭水化物シグナルの同定

研究代表者：宮尾 光恵（徳富 光恵）（農業生物資源研）

コンソーシアムにおける役割：高CO_2環境シグナルの作用点を特定するとともにシグナル伝達物質を同定し、高CO_2応答に関与する炭水化物シグナルに関する情報をコンソーシアムに提供します。

目的：イネ葉の高CO_2応答を生化学的・形態学的に解析し、様々な高CO_2応答それぞれについて高CO_2環境シグナルの作用点を決定します。ひき続き、作用点での遺伝子発現の網羅的解析とシグナル候補物質の添加実験等により、高CO_2環境シグナルの実体を明らかにするとともに、シグナル伝達メカニズムを検討します。特に、炭水化物がシグナルとして働く可能性に着目して解析を行います。

シロイヌナズナの糖転流経路と二次原形質連絡形成に対する高CO_2環境の影響

研究代表者：西田 生郎（埼玉大・理工）
研究分担者：森安 裕二・藤木 友紀（埼玉大・理工）

コンソーシアムにおける役割：高CO_2環境に応答したシロイヌナズナの二次原形質連絡形成および糖転流経路構築に関して、メカニズムを解明し、高CO_2環境における植物の糖転流経路の拡幅と光合成機能の向上をめざして研究を推進します。

目的：シロイヌナズナの糖転流経路の全体像を明らかにするため、シンプラスト経路の構築に働くペクチン酸リアーゼRESTRICTED SUCROSE EXPORT1（RSX1）の発現組織特異性を明らかにし、アポプラスト経路で働くショ糖トランスポーターとの関係を明らかにします。また、RSX1が制御する篩管経路を解析し、高CO_2濃度環境下での二次原形質連絡形成のレベルと、糖転流効率の変化を評価します。これらの知見を総合し、高CO_2環境での生育に適する糖転流経路の拡幅を可能にするバイオテクノロジーの創出に挑戦します。

高二酸化炭素条件下で変動する遺伝子群とその進化起源解析

研究代表者：花田 耕介（理研・植物科学）
連携研究者：樋口 美栄子（理研・植物科学）

コンソーシアムにおける役割：高CO_2環境下の植物の組織・器官間でのC/Nバランス統御機構の理解に向けて、利用可能な体内窒素の検知・情報伝達に関する分子基盤情報を提供します。

目的：植物の代表的なモデル生物種であるシロイヌナズナやイネにおいて、高CO_2条件下で発現する遺伝子群で同定し、それらの情報を本学術領域の　メンバーが閲覧可能なデータベース構築を行っています。それと同時に、他の植物種のゲノムデータも利用し、単子葉特異的、双子葉特異的およびその二つの祖先植物よりも古い進化起源をもつ遺伝子を分子系統解析で推定し、どの陸上植物種にまで類似した高CO_2応答を持つ遺伝子が存在するかを推測します。このようなインフォマティクス解析を行う一方で、高CO_2で応答し、種子植物で保存されている短い遺伝子に関しては、形質転換体を作製し、新規の高CO_2応答メカニズムを発見することを目指します。このように、三つの研究を並行して進めています。

高CO_2環境下のイネの炭素・窒素栄養バランス高次統御に関わる窒素情報伝達系の解明

研究代表者：早川 俊彦（東北大・農）

コンソーシアムにおける役割：高CO_2環境下の植物における組織・器官間でのC/Nバランス統御機構の理解と生産性向上に向けて、利用可能な体内窒素の検知・情報伝達に関する分子基盤情報を提供します。

目的：高CO_2環境下の植物のバイオマスや種子収量の増加には、光合成産物の増加に伴い、利用可能な体内窒素とその同化量の増加が重要です。しかし、高CO_2環境下での有用な投資窒素形態とされるアンモニウムの高濃度供給は植物に有害です。一方、好アンモニウム性作物イネの根でのアンモニウム吸収・同化系と関連炭素代謝系の鍵遺伝子の発現は、GlnまたはGln代謝産物を介した情報伝達系により制御されます。OsACTPK1とOsACR9は、この情報伝達系に関わる因子の候補です。本研究では、OsACTPK1とOsACR9に着目して、イネの根でのアンモニウム吸収・同化調節に関わる情報伝達系の分子実体の解明を目指すとともに、それらの高CO_2環境下でのイネの成育とC/Nバランス統御における機能を評価します。

気孔開閉調節分子と特定アクアポリンの高濃度CO_2への応答とCO_2供給系の理解

研究代表者：前島 正義（名古屋大・生命農学）
連携研究者：土平 絢子（名古屋大・生命農学）

コンソーシアムにおける役割：アクアポリンの機能測定、発現変動、タンパク質構造-機能協関に関する実験への協力を行います。

目的：気孔開閉調節に関わるタンパク質PCaP1およびCO_2透過性アクアポリンPIP1に焦点を当て、CO_2供給システムにおける役割とそれに関わる量的・機能的調節を解明します。新規のCa結合タンパク質であるPCaP1は細胞膜に局在し、情報伝達に関わるカルモジュリンおよびホスファチジルイノシトールリン酸（PtdInsPs）と結合します。PCaP1は孔辺細胞にも発現し、その遺伝子欠失株の葉では気孔の閉口に障害があります。一方、多様なアクアポリン分子種の中でも細胞膜局在性のPIP1はCO_2透過性が、そしてPIP2は高い水透過性が認められています。それぞれの遺伝子破壊株の解析を通し生理的役割を明らかにします。また、CO_2濃度の影響が高温環境で変化するか否かも解析します。

イネデンプン集積抑制酵素発現制御体の高CO_2応答に関する研究

研究代表者：三ツ井 敏明（新潟大・自然科学）
連携研究者：金古 堅太郎・和田 楓（ 新潟大・自然科学）

コンソーシアムにおける役割：高CO_2・高温下におけるイネ澱粉代謝関連酵素の機能発現、糖代謝、澱粉集積並びに澱粉顆粒形成の変化を調査し、結果を提供します。バイオトロンを用いた実験協力も予定しています。

目的：糖タンパク質として知られているイネ澱粉集積抑制酵素のプラスチド局在化機構、特に、葉緑体糖タンパク質のN-グライコーム、ゴルジ小胞のプラスチド包膜の透過機構、プラスチド局在化シグナル（PT）の特性、並びにプラスチド局在化機構に関わる分子装置の解明を進めます。加えて、高CO_2・高温下における野生型および澱粉集積抑制酵素の発現制御体の形質調査で得られた知見を基に、高CO_2・高温下におけるイネ澱粉集積強化法を探ります。

高CO_2順化に必須の、糖アルデヒド・毒性化合物による細胞障害防御機構の全容解明

研究代表者：三宅 親弘（神戸大・農）

コンソーシアムにおける役割：光合成に伴い生成するアルデヒド化合物（糖・脂質アルデヒド）による酸化ストレス解析を行うことにより、光合成を中心とした高CO_2順化に必須の分子メカニズムを解明します。

目的：高CO_2環境下では、光合成促進で糖が細胞内に高蓄積し、糖代謝副産物としてのアルデヒド化合物（糖・脂質アルデヒド）の生成が促進されることが予想されます。これらの蓄積は、DNAあるいはタンパク質に酸化障害を与え、細胞機能を損失させます(この酸化障害を植物の糖尿病と定義)。高CO_2下、シロイヌナズナ野生株および生育が抑制される変異株を用いて、分子遺伝学・生理生化学的解析により、糖・脂質アルデヒドによる酸化障害・防御メカニズムを解明します。

高二酸化炭素環境下における二酸化炭素透過型アクアポリンの活性制御

研究代表者：森 泉（岡山大・植物研）

連携研究者：且原 真木（ 岡山大・植物研）・白武勝裕（名古屋大・生命農学）

コンソーシアムにおける役割：CO_2透過型アクアポリンの高CO_2環境下における活性制御を明らかにします。

目的：シロイヌナズナのPIP2型アクアポリンの一種がCO_2を透過することを発見し、葉緑体に至るCO_2輸送における役割を解析しています。特に、高CO_2環境下においてCO_2透過型PIP2アクアポリンの活性がどのように制御されているかを明らかにするとともに、その生理学的役割を解明します。

ユビキチンカスケードが関わるC/Nバランスと高CO_2応答の全容解明

研究代表者： 山口 淳二 （北大・理）

連携研究者：佐藤 長緒 （北大・理）・ 松倉 千昭（ 筑波大・遺伝子実験センター）

コンソーシアムにおける役割： C/N及びCO_2/N応答に関与する分子の同定とその機能解明、細胞内物質分配とソース・シンク制御の解明、各種形質転換植物の作製とその供給、オーム解析と生理実験協力、タンパク質相互作用解析、各種分子生物学・生化学実験に関する協力などを行います。

目的： 陸上植物の高CO_2応答の分子基盤の一つは、細胞内のC/Nバランス感知・シグナル統合装置（C/Nバランサー）にあります。私たちは、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学解析から、C/N耐性変異体の単離とその原因遺伝子としてユビキチンリガーゼATL31を同定しました。このような研究背景に基づき、UPSが関与する高CO_2条件下における植物の成長制御の分子機構の全容解明を目指します。まずは、細胞内C/Nバランサー構成因子の検証を最優先させます。さらに、オーム解析、14-3-3機能解析、膜交通解析等多角的な研究手法を並行して実施することにより、高CO_2条件下における器官間の代謝産物分配（ソース・シンク）制御というよりマクロな視点における分子基盤の解明も目指しています。

研究班紹介

Research group

研究班の研究内容を紹介します。本号では三ツ井班・花田班・早川班の研究内容を紹介します。

イネ澱粉集積抑制酵素変異体における高二酸化炭素・高温応答メカニズムの解明

研究代表者：三ツ井 敏明　連携研究者：金古 堅太郎、和田 楓

気候温暖化は、我が国においても深刻な環境問題の１つとなってきています。最も主要な温室効果ガスであるCO_2の大気中濃度は1760年代頃までは280　ppmでしたが、それ以降増加し始め、20世紀後半から増加傾向が急速に高まり、2005年には379　ppmに達しています。大気中CO_2濃度は今後さらに増加し、2100年には現在の1.5～2倍に上昇するものと予測されています。気候温暖化は我が国の作物生産にも大きな影響を及ぼしています。ここ30年間の夏季の平均気温を調査したところ2℃以上上昇している地域も見られます。イネ登熟期の異常高温は玄米に白濁、充実不足や胴割れを多発させ、収量減とともに玄米品質の低下そして一等米比率を低下させます。これは農家の収入に影響を及ぼすことのみならず、産地のブランドイメージを壊すことになりかねず、生産現場では極めて深刻な問題となっています。

光合成によるCO_2の糖への固定、そしてその蓄積は植物自身を含め地球上のすべての生物の生命活動にとって必要不可欠な太陽エネルギーの変換、集積システムと考えられます。地球環境におけるCO_2循環システムの中核を担っているのは植物であり、大気中のCO_2環境バランス維持のために植物のCO_2吸収・固定化能力を利用することは極めて自然な発想と考えられます。私たちは、イネ澱粉代謝酵素の発現制御体におけるショ糖・澱粉集積に及ぼす高CO_2・高温環境の影響を解析し、ショ糖・澱粉代謝という観点からイネの高CO_2・高温応答を理解し、得られた知見を基に高CO_2・高温環境下における高効率なショ糖・澱粉集積イネ品種の開発などの応用研究につなげることを考えています。

植物細胞における澱粉生合成は葉緑体やアミロプラストに代表されるプラスチドというオルガネラで行われます。また、緑葉等の生細胞の澱粉分解の場もプラスチド内です。私たちは、イネにおける澱粉生合成の基質となるADP-グルコースを加水分解するヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼ（NPP1）および澱粉分解酵素のα-アミラーゼI-1

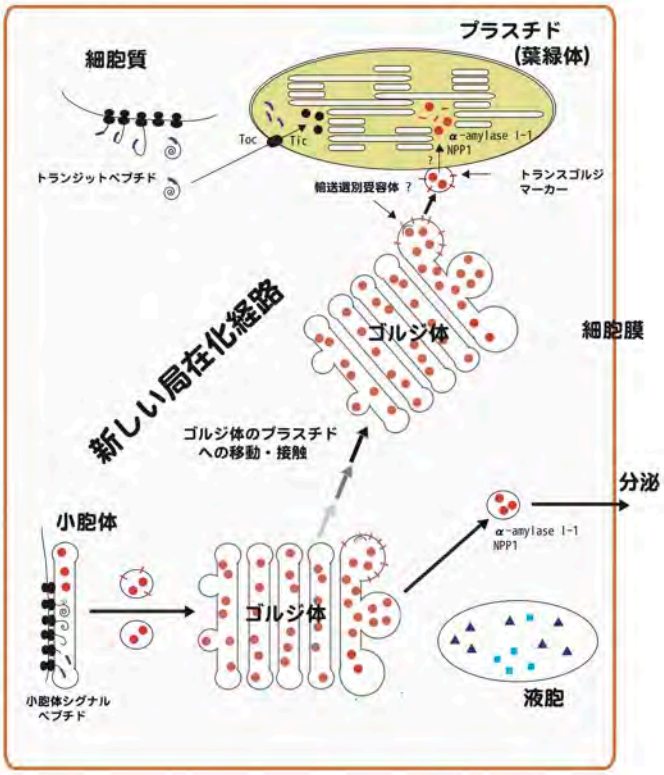


図1　澱粉代謝関連糖タンパク質のプラスチド局在化機構
AmyI-1やNPPは分泌経路からプラスチドに輸送、局在化し、機能する。

（AmyI-1）を主要な研究対象としています。これまでの研究から、NPP1およびAmyI-1はともにN-結合型糖鎖を有する糖タンパク質であり、分泌経路からゴルジ装置を介してプラスチドに輸送、局在化することを見いだしました（図1）。さらに、最近の研究でプラスチドNPP1のN-結合型糖鎖構造をグライコブロッティング／質量分析法を用いて調べたところ、フコースやキシロース残基を含む複合型糖鎖が約80％を占めることが分かりました。フコースやキシロース残基の付加はゴルジ装置トランス区画で起こることから、NPP１糖タンパク質のプラスチドターゲティングにトランスゴルジが深く関与することが

推察されました。続いて、トランスゴルジマーカーST-mRFPをイネに導入し、その挙動を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、NPP1強発現下でST-mRFP標識膜小胞が活発に葉緑体に取り込まれる様子を捉えることができました。また、抗GFP抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析により、ST-GFP標識された小胞がプラスチド内に高頻度に検出されました。これらの結果から、私たちは、NPP1糖タンパク質のプラスチド局在化機構にトランスゴルジ体－プラスチド間の膜交通が重要な役割を果たしていると結論しました。しかし、分泌経路からのプラスチドへの輸送・局在化機構の解明は研究の途についたばかりであり、今後、(1) 葉緑体糖タンパク質N-グライコーム、(2) ゴルジ小胞のプラスチド包膜の透過機構、(3) プラスチド局在化シグナル（PT）の特性、並びに (4) プラスチド局在化機構に関わる分子装置の解明などの研究を進める予定です。

ADP-グルコース加水分解型NPP (NPP1および6) は澱粉集積に対して抑制的に作用することが明らかになっています。植物CO_2インキュベーターを用いて*Tos17*挿入変異体*npp1*（日本晴）の初期成長期（10～17 d）の生重量と澱粉蓄積量に及ぼす高CO_2濃度（1,200 ppm）、高温（昼12 h, 33℃、夜12 h, 28℃）の影響を調べたところ、*npp1*変異体シュートにおいては、対照条件（CO_2濃度：400 ppm、温度：昼12 h, 28℃、夜12 h, 23℃）から高CO_2濃度条件に移すと顕著な生重量と澱粉蓄積量の増加が観察されました。さらに、高CO_2・高温条件に置くと増加傾向がより高まることが見いだされました。この*npp1*変異体の高CO_2応答機構を探るために、iTRAQ標識法を用いた定量的ショットガンプロテオミクス解析を試みました。高CO_2濃度条件下において*npp1*変異体のタンパク質発現は野生型に比べて大きく変動することが観察され、*npp1*変異体が高CO_2に敏感に応答しているものと考えられました。*npp1*変異体の高CO_2・高温条件における澱粉蓄積促進効果と相関性が見られるタンパク質発現パターンを示すものとしてスクロースシンターゼ、サッカラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ-2がリストアップされ、これらはショ糖－澱粉変換に関わる酵素であることから本酵素が*npp1*変異体の高CO_2濃度条件下における澱粉蓄積促進をもたらす要因の１つであると推察しています。引き続き、野生型および*npp1*におけるショ糖・澱粉蓄積が最大となるCO_2濃度、温度、光、湿度並びに窒素添加条件を探索しています。また、平成24年10月に稼働予定の新潟大学刈羽村先端農業バイオ研究センターのバイオトロン群（L4.5 x W4.5 x H1.8～2.2m: CO_2濃度制御型４基、日長制御型２基、通常型１基；L4.5 x W9 x H1.8～2.2m: 通常型１基）（図２）を用いてスケールアップして調査研究を進める予定です。加えて、*npp1*変異体のCO_2応答に関する細胞内情報分子の探索も進めたいと考えています。

図2　新潟大学刈羽村先端農業バイオ研究センターのバイオトロン群
平成24年10月稼働予定。

高二酸化炭素条件下で変動する遺伝子群とその進化起源解析

研究代表者：花田 耕介　連携研究者：樋口 美栄子

産業革命以降、石油や石炭を始めとした化石燃料の使用により、急速にCO_2濃度が増加しています。これらの解決策を考えるためにも、本学術領域で行なっているように様々な分野の研究者と協力し合い、植物の高CO_2応答への理解を深める研究を推進することは重要です。しかし、全ての植物種で詳細な高CO_2への応答機構を明らかにするのは現実的ではありません。そこで、分子レベルでの高CO_2下の応答をモデル生物種で明らかにし、他の植物種ではその応答機構の違いを調べることが確実に研究を進める方法の一つであると思います。

私たちは、植物の代表的なモデル生物種であるシロイヌナズナやイネにおいて、高CO_2条件下で発現する遺伝子群で同定すると共に、それらの情報を本学術領域のメンバーが閲覧するデータベース構築を担当しています。それと同時に、他の植物種のゲノム配列を利用し、単子葉特異的、双子葉特異的およびその二つの祖先植物よりも古い進化起源をもつ遺伝子を分子系統解析で推定し、どの陸上植物種にまで類似した高CO_2応答を持つ遺伝子が存在するかを推測します。このようなインフォマティクス解析を行う一方で、高CO_2で応答し、種子植物で保存されている短い遺伝子に関しては、形質転換体を作製し、新規の高CO_2応答メカニズムを発見することを目指します。このように、三つの研究を並行して進めています（図1）。

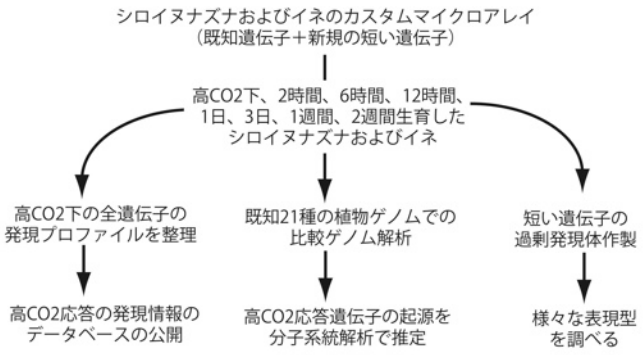


図1　研究の流れ

高CO_2条件下で発現する遺伝子群を同定するためには、シロイヌナズナあるいはイネに存在する全遺伝子を把握する必要があります。この二つのモデル生物種では、高精度のゲノムが決定されており、既に国際コンソーシアムによって、ゲノム上の遺伝子の位置が明らかにされています。しかしながら、未だ同定されていない遺伝子が、数多く存在するということが分かってきました。特に、短い遺伝子は、遺伝子として同定されていない傾向にあります。それにも関わらず、これらの短い遺伝子からコードされるペプチドには、細胞外に分泌しシグナルを伝えるホルモン様の機能を示すものが存在することが最近の研究から明らかにされてきました。

そのような背景の中、私たちは、短い遺伝子を推定することに特化した方法を開発し、植物のモデル生物種であるシロイヌナズナおよびイネで、多数の短い遺伝子を新規に推定する研究を推進してきました。また、既知の全遺伝子および新規の短い遺伝子で、遺伝子発現を確認できるマイクロアレイも開発し、様々な発生段階と様々な環境ストレス条件下での発現プロファイルを構築しています。

本研究プロジェクトでも、この開発されたマイクロアレイを用いて、高CO_2に応答する全遺伝子を同定する予定です。はじめに、シロイヌナズナに着目し、高CO_2（790　ppm）に2時間、6時間、12時間、1日間、3日間、7日間、2週間で暴露した条件下と、通常CO_2環境下 (390 ppm) で2週間育成した条件下で発現プロファイルを構築しました。これらの複数のトランスクリプトームデータを既にコンソーシアムのメンバーには提供しています（図2）。しかし、比較ゲノム解析によると高CO_2応答機構に大きな違いがあるという報告もあります。そのため、単子葉のモデル植物種であるイネにおいても、高CO_2下でのトランスクリプトームデータを構築し、シロイヌナズナとイネの比較トランスクリプトーム解析から、植物種の違いによる高CO_2応答を調べることを予定しています。

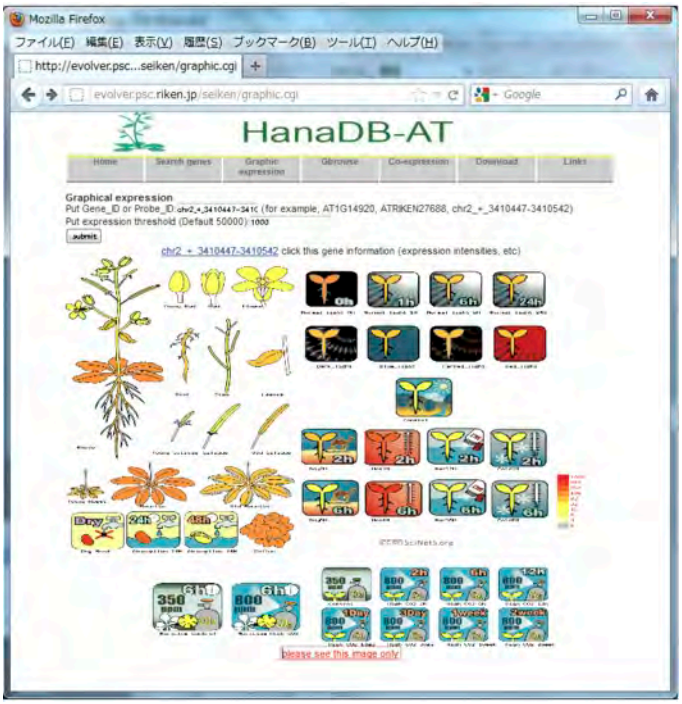


図2　トランスクリプトームのデータベース

別の研究プロジェクトでは、様々な発生段階と様々な環境ストレス条件下で発現している短い遺伝子を同定し、発現が確認された遺伝子の中でも、複数の植物種で保存性が高い短い遺伝子の過剰発現体をシロイヌナズナで構築しています。その結果、形態形成の異常あるいはストレス（乾燥、高温、高塩）耐性を示す多数の遺伝子を見出しています。このように、各現象に関係する遺伝子を同定するためには、その現象に対応するトランスクリプトームデータを構築することは重要になります。つまり、高CO_2下でのトランスクリプトームデータを構築することは、CO_2応答メカニズムを理解することに繋がり、本学術の目的の一つである高CO_2適応植物の創出に大きく貢献すると期待できます。

そこで、複数の植物種で保存性が高い短遺伝子の内、高CO_2下で発現が変動する遺伝子の過剰発現体をシロイヌナズナで作成しました。現在までの段階で、複数の過剰発現体で、葉の形態形成が著しく変化しているものを同定しています（図3）。CO_2は植物の成長に必須であるため、CO_2応答に関係するペプチドを異常に蓄積することで、葉の形態に異常を引き起こしている可能性もあります。今後は、これらの過剰発現体の高CO_2下での植物体の重さ、クロロフィル量、光合成活性および気孔密度を調べ、CO_2シグナルで重要な働きをする短い遺伝子の同定を試みています。このように、形態形成も含めて何らかの表現型が現れたものは、対象遺伝子の詳細な遺伝子機能の解析を推進する予定です。

短い遺伝子は様々な生理活性に関与することが予想されます。シロイヌナズナの短い遺伝子を網羅的にスクリーニングするなどの興味があるかたは、花田までご連絡してください。

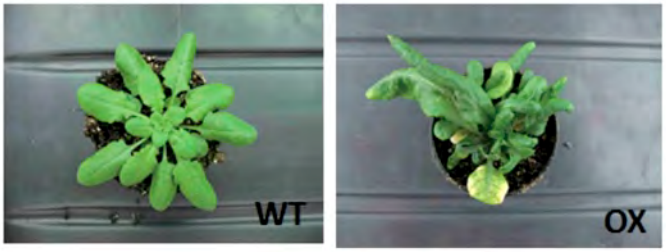


図3　過剰発現体（ox）と野生型（wt）の表現型の比較

高CO_2環境下のイネの炭素・窒素栄養バランス高次統御に関わる窒素情報伝達系の解明

研究代表者：早川 俊彦

高CO_2環境下の植物の収量増加には、光合成産物の増加に伴い、利用可能な体内窒素（N）とその同化量の増加が重要です（Miyagi et al. 2007 Global Change Biol）。共生N固定するマメ科植物等を除き、植物は、土壌中の無機態Nである硝酸イオン（NO_3^-）とアンモニウムイオン(NH_4^+）を主な外来N源として利用します。根で吸収されたNO_3^-の多くは、葉に転送後、光合成由来の還元力を用いて還元・同化されますが、高CO_2環境下の葉では、光合成由来の還元力がカルビン回路のCO_2固定反応に主に供給され、硝酸同化量が減少します（Bloom et al. 2002 PNAS; 2010 Science）。Bloomらは、高CO_2環境下では、NO_3^-よりもNH_4^+の方が優位な投資N形態であると提案しましたが、高濃度NH_4^+供給は、種々の植物に障害を引き起こします（Kronzucker et al. 2001 Trends Plant Sci.）。

嫌気的な水田で栽培されるイネは、主にNH_4^+を利用します（Yoshida 1981 Fundamentals of Rice Crop Science）。外来NH_4^+供給後のイネの根の表層細胞群（表皮・外皮・厚膜組織）では、NH_4^+吸収に関わるアンモニウム輸送担体1;2（AMT1;2）や、NH_4^+のグルタミン（Gln）やグルタミン酸（Glu）への初期同化に関わるサイトゾル型グルタミン合成酵素1;2 （GS1;2）とNADH依存性グルタミン酸合成酵素1 （NADH-GOGAT1）、及びGOGAT反応へ炭素（C）骨格である2-オキソグルタル酸を供給するNAD-イソクエン酸脱水素酵素（IDH）の各遺伝子が短時間で高発現し、これらのタンパク質・酵素群が、イネ根のNH_4^+吸収・同化で重要であると考えられています（図1; Tabuchi et al. 2007 J. Exp. Bot.）。しかし、イネ根のNH_4^+過剰摂取抑制の分子機構の詳細は不明です。また、AMT1（北大山口淳二博士ら, Sonoda et al. 2003 Plant Cell Physiol.）やNADH-GOGAT1（筆者ら, Tabuchi et al. 2007 J. Exp. Bot.）、及びGOGAT反応へ2-オキソグルタル酸を供給するC代謝経路上の数種の酵素（未発表）の遺伝子発現は、Glnまたはその代謝産物により正または負に制御されることが示唆されていますが、この情報伝達系の分子実体も不明です。

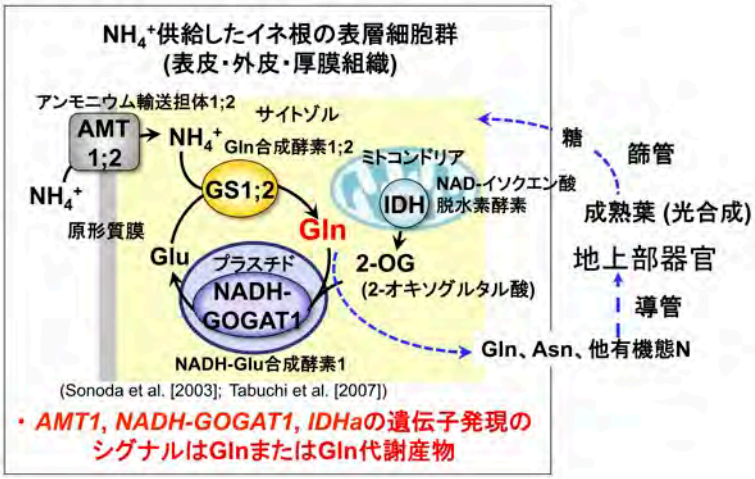


図1　イネの根におけるNH_4^+吸収・同化のモデル

私たちの研究班では、好NH_4^+性植物イネの根のNH_4^+吸収・同化調節に関わる分子実体を解明し、それらの高CO_2環境下でのイネの成育とC/Nバランス統御における寄与を評価することで、植物の高CO_2応答の理解を目指します。私たちは、微生物GlnセンサーGlnDのGln感知に重要なACTドメイン（Zhang et al. [2010] J. Bacteriol.）と相同なドメインを有する新規なタンパク質リン酸化酵素（OsACTPK1）をGln（またはGln代謝産物）情報伝達系構成因子候補として解析を進めてきました。

*OsACTPK1*遺伝子のmRNAと翻訳産物は、充足濃度のNH_4^+が供給されたイネ幼植物根で顕著に発現・蓄積し、また、OsACTPK1-sGFP融合タンパク質のタマネギ表皮細胞及びイネ培養細胞中での一過的発現解析から、OsACTPK1のサイトゾルと核への両局在が示唆されました。この結果から、OsACTPK1が外来NH_4^+充足条件下のイネ根で機能すると考えられます。次に、イネにおけるOsACTPK1の生理学的機能を直接的に解析するため、レトロトランスポゾン*Tos17*挿入*OsACTPK1*遺伝子破壊イネ系統群（*OsACTPK1*-KO）及び同様な遺伝背景の*OsACTPK1*遺伝子に*Tos17*が挿入されていない分離系統群（対照系統）を獲得しました。*OsACTPK1*遺伝子のmRNAと翻訳産物は、外来NH_4^+充足下の対照系統の根で蓄積し、*OsACTPK1*-KO の根では検出されません。*OsACTPK1*-KO幼植物では、対照系統と比較して、外来NH_4^+充足下で、根の伸長抑制と地上部の成長促進、全N・遊離アミノ酸（特にGlnとアスパラギンAsn）含量増加、及び、根のNH_4^+蓄積量とNH_4^+吸収速度の増加が認められました。この際、*OsACTPK1*-KOでは、対照系統と比較して、根でのGln応答性遺伝子を含めたNH_4^+吸収・同化系遺伝子のmRNAの発現・蓄積に顕著な差異はありませんが、根のNH_4^+初期同化を担うGS1とNADH-GOGAT1のタンパク質含量が増加しました。さらに、大腸菌内発現組換えOsACTPK1精製標品がMn^{2+}依存性の自己・他タンパク質リン酸化活性を有すことを確認しました。以上から、NH_4^+供給充足下のイネ幼植物根で、OsACTPK1がNH_4^+吸収・同化の負の制御に関わることが示唆されます（図2; 投稿準備中）。

現在、N情報やC/N情報の感知機能の観点から、OsACTPK1のリン酸化活性への遊離アミノ酸や有機酸の添加効果を解析しています。また、OsACTPK1の組織分布解析や標的被リン酸化タンパク質の探索も進めています。CO_2濃度制御可能なグロースチャンバーを用いた通常大気CO_2濃度と高CO_2濃度の条件下のイネ栽培系も確立できましたので、今後、高CO_2環境下のイネにおけるOsACTPK1やその被リン酸化タンパク質のN吸収・同化上の機能解析と成育や体内C/Nバランス調節上の重要性の評価を進める予定です。

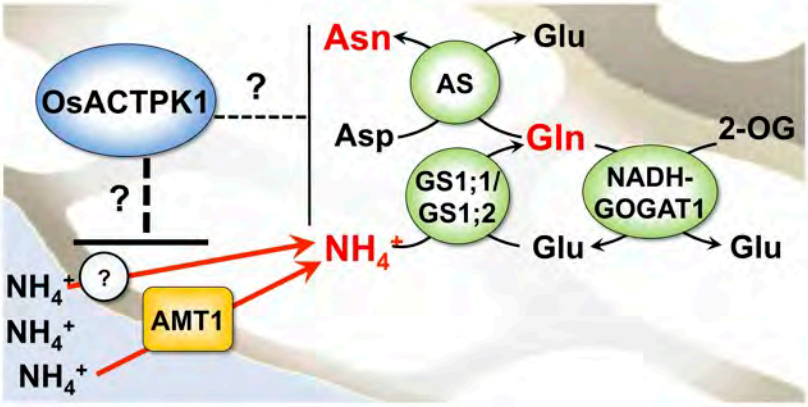


図2　イネの根におけるOsACTPK1の機能モデル
OsACTPK1は、外来NH_4^+充足条件のイネ根において、NH_4^+吸収・同化の抑制に関わる。AMT1: アンモニウム輸送体1，GS1: サイトゾル型グルタミン合成酵素1，NADH-GOGAT1: NADH依存性グルタミン酸合成酵素1，AS: アスパラギン合成酵素.

若手研究者研究紹介

Young researcher

本領域に関連して研究している若手研究者の研究内容を紹介します。本号では、榊原班の信定知江さん、前島班の土平絢子さん、廣瀬班の及川真平さんを紹介します。

信定知江　Tomoe Kamada-Nobusada

（理研・植物科学センター・研究員）

本領域での担当

本領域において、私は理研・榊原班で担っている高CO_2環境への馴化応答における植物ホルモンの役割を明らかにする研究のうち、イネを用いた解析を担当します。イネなどの農作物の収穫量は、温度、光合成環境、栄養など様々な環境条件に影響を受けますが、特に環境中で欠乏しやすい窒素栄養は農業上重要な環境因子の１つです。植物の生長を制御する植物ホルモンの１種サイトカイニンは、根圏の窒素栄養によって植物内での蓄積が誘導されます。このことから、サイトカイニンは根圏の窒素栄養状態を地上部へと伝える窒素栄養情報伝達物質の１つとしても機能することが古くから示唆されています（図1）。私はイネを用いて窒素栄養に応じたサイトカイニン蓄積機構について研究を行ってきました。窒素栄養と炭素栄養の代謝系は植物内で相互に密接な調節関係にあることから、サイトカイニンの蓄積量は炭素栄養によっても制御されるかどうか興味深い問題です。そこで本領域での研究を通じて、CO_2環境、窒素栄養、サイトカイニンの3者の関係が植物（イネ）の生育に与える影響を明らかにしたいと考えています。

過去・現在の研究内容

私の研究生活は光合成タンパク質からスタートしました。光合成タンパク質複合体の機能をみる仕事から、オルガネラ機能へ、さらに栄養・植物ホルモンによる植物の生育へと研究分野を広げて現在に至ります。

1. 光化学系II反応中心D1タンパク質の機能に重要なアミノ酸残基の探索

シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803株を用い、光合成の初反応を担う光化学系II反応中心D1タンパク質にランダムなアミノ酸置換を導入した多くの変異株を作出し、光化学系II機能の解析を行いました。そのうちの１つ272番目のヒスチジン(272His)がリジン(Lys)に置換した変異株は、酸素発生活性が失われており、熱発光、EPR、電子伝達阻害剤などを用いた光化学系IIの機能解析から、この１つのアミノ酸変異の影響は光化学系II複合体の酸化側（水から引きぬいた電子を伝達するチラコイド膜外側）、還元側（水を分解して酸素を発生させるチラコイド膜内腔側）双方の機能不全を引き起こしていることが分かりました。このことから272Hisが光化学系II複合体全体の機能的構造維持に重要であることを示しました。

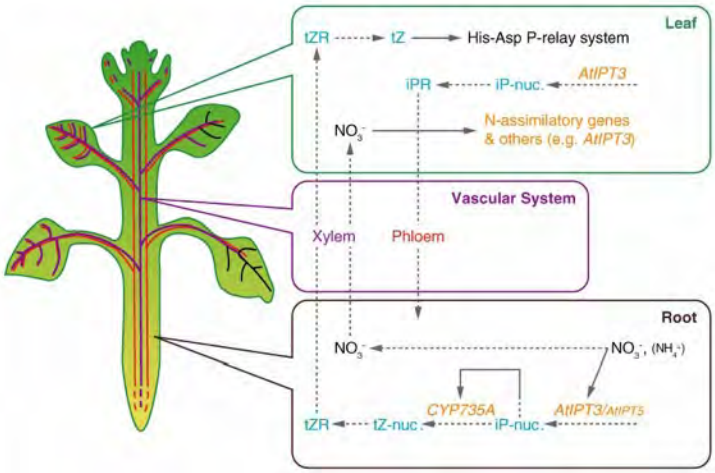


図１　窒素に応答したサイトカイニン合成

シロイヌナズナでは、硝酸イオンに応答して根でサイトカイニン合成酵素*AtIPT3*遺伝子の発現が誘導され、合成されたサイトカイニンは根から地上部へと運ばれて、地上部で様々な遺伝子発現変化を引き起こし、地上部の生育を促進する。（Sakakibara 2006. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:431-49）

2. マイクロアレイを用いたペルオキシソーム未同定機能の探索

ペルオキシソームは真核生物が普遍的にもつオルガネラの１つです。私は植物のペルオキシソームの未同定機能を明らかにするため、ペルオキシソーム局在が予測されるタンパク質の遺伝子発現を網羅的に解析しました。その結果、シロイヌナズナの根においてポリアミンオキシダーゼと予測されるタンパク質の遺伝子（*AtPAO4*）が強く発現していることを見いだしました（Kamada et al. 2003, *Plant Cell Physiology*）。AtPAO4タンパク質は*in vitro*でポリアミンの一種、スペルミンをスペルミジンへと代謝する活性をもっており、AtPAO4機能欠損株では野生株に比べてスペルミン量が増加し、スペルミジン量が減少していたことから、AtPAO4によるスペルミン代謝経路が実際に植物体内でポリアミン蓄積量調節に重要であることがわかりました（Kamada-Nobusada et al. 2008, *Plant Cell Physiology*）。

3. 窒素栄養に応答したサイトカイニン合成機構の研究

植物とくに農作物にとって環境中の窒素栄養は生育に重要な環境因子の１つであり、植物はその存在状態を常に感知し、代謝レベル、形態形成レベルで応答しています。植物ホルモンの１種であるサイトカイニンは、根圏の窒素栄養に応答して植物内の蓄積量が増加することから、根圏の窒素栄養状態を地上部へと伝える窒素栄養情報伝達物質としての機能をもつことが示唆されています。私たちの研究室ではシロイヌナズナを用いた実験から、窒素栄養に応答したサイトカイニン蓄積が、サイトカイニン合成酵素遺伝子*AtIPT3*の窒素栄養による発現誘導によって担われていることを明らかにしました（Takei et al. 2004, *Plant Cell Physiology*）。この研究を基に、私は日本の重要な作物の１つであるイネに対象を移して、研究を行っています。

イネおいては、*OsIPT4*と*OsIPT5*が根圏の窒素栄養に応答して発現誘導されており、この発現誘導は硝酸イオンよりもアンモニウムイオンに、より強く応答していました。これは硝酸イオン特異的に発現誘導される*AtIPT3*遺伝子とは異なる点であり、イネは他の植物に比べてアンモニウムイオンを効率的に利用する機構をもつということとよく合っていました。

アンモニウムイオンへの*OsIPT4*遺伝子発現誘導はグルタミン合成酵素阻害剤の前処理によってなくなりますが、アンモニウムイオンの代わりにグルタミンを窒素栄養として与えた場合には発現誘導がおこります。このことから、*OsIPT4*遺伝子の窒素栄養による発現誘導は、グルタミンまたはその関連する代謝産物がシグナルとなっていると考えられます（図2）。窒素制限状態で生育させた後、根圏に窒素を与えると、導管液のサイトカイニン含量の増加が見られますが、*OsIPT4*遺伝子発現抑制イネではこれが見られなくなることから、根圏の窒素栄養に応答したサイトカイニン含量の増加に*OsIPT4*が重要な働きを担っていることがわかりました。

4. 低／高CO_2環境によるイネの生育とサイトカイニン機能

植物内では、窒素代謝と炭素代謝は密接に関係しており、相互に調節がなされることが知られています。興味深いことに上述の*OsIPT4*遺伝子は、根圏へ窒素栄養と同時にスクロースを添加すると窒素栄養のみの場合よりも強い発現誘導がみられました。低CO_2環境に比べて、高CO_2環境下ではイネの光合成が盛んになり、炭素源が多く蓄積していると考えられます。実際に低CO_2または高CO_2環境下で生育させたイネを用いて、窒素栄養に応答した*OsIPT4*遺伝子発現を比べてみると、わずかながらも高CO_2環境下で生育させたイネの方で強く発現誘導されていました。*OsIPT4*遺伝子発現抑制イネでは野生株に比べて生育不良がみられますが、前述の*OsIPT4*遺伝子発現パターンから、野生株と*OsIPT4*遺伝子発現抑制イネの生育の差は、高CO_2環境下で生育させた方がより大きいことが予測されます。しかし、プレリミナリーな結果では、その差はむしろ低CO_2環境下で生育させた場合に顕著に出ました。この結果は、窒素充分かつ高CO_2環境でのイネの生育において、サイトカイニンによる生長への貢献度が他の生長因子に比べて低いことを示唆しているのかもしれません。

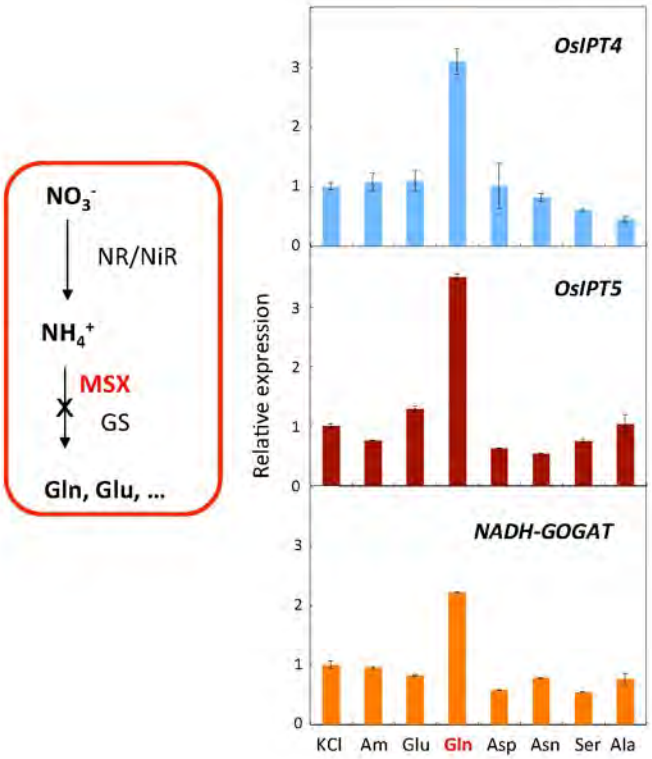
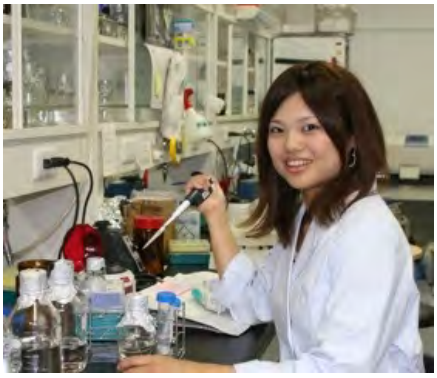


図2. グルタミン合成酵素阻害剤（MSX）の影響

窒素欠乏状態で生育させたイネを1 mMのMSXで2時間処理した。その後コントロールとしてKCl, 窒素源としてアンモニウムイオン（Am, 1 mM）または様々なアミノ酸（各50 mM）を与えて2時間後の遺伝子発現量を調べた。

土平絢子　Ayako Tsuchihira

（名大・院・農・博士研究員）



本領域での担当

私は、本領域において、アクアポリンの高CO_2環境への応答について研究を行っています。近年、アクアポリンの水チャネルとしての機能に加え、CO_2輸送における機能も注目されており、植物の一部のアクアポリンがCO_2透過性を示すことも報告されています。本研究では、アクアポリンのCO_2輸送機能に関するより生理学的な理解を深め、高濃度CO_2環境での植物の生理応答の解明に貢献したいと考えています。

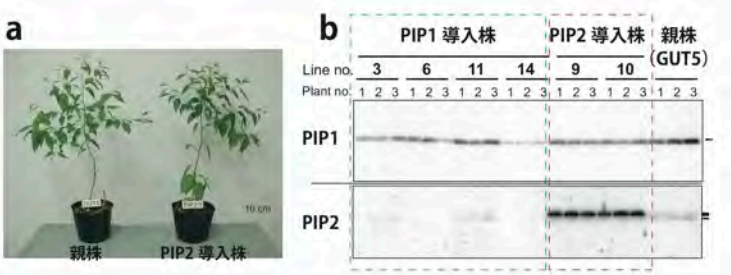
過去・現在の研究内容

アクアポリンは、細胞膜やオルガネラ膜において水や他の電荷をもたない小分子の透過性を促進するチャネルタンパク質です。単純拡散による水の膜透過性は極めて低いため、生体内を水がスムースに移動するにはアクアポリンが必要不可欠であるといえます。ヒトを含む動物、植物、菌類など多様な生物で高度に保存されているアクアポリンですが、植物には他の生物よりもはるかに多量でかつ多様なアクアポリンが存在しています。私は、植物が様々な環境でみせる生理応答について、『アクアポリン』をキーワードに研究を進めています。そして、水分生理を司るアクアポリンが、植物の環境応答にどのように関わっているのかを分子レベルで理解していきたいと考えています。

1. ユーカリにおけるアクアポリンの生理機能解析

ユーカリは成長性や材質に優れた有用材であることから、環境保全やパルプ工業での需要が大きい樹木です。しかし、未だ全ゲノム情報が得られていないことから、分子生物学的な研究はあまり進められていません。そこで当研究室では、遺伝子情報や抗体などの分子生物学的な研究ツールが整っていたダイコンを用いて、ダイコンアクアポリン形質転換ユーカリを作出することで、ユーカリにおけるアクアポリンの生理学的機能を解析しました。

植物の細胞膜に局在するアクアポリンには、PIP1とPIP2の2種類があります。このうち、PIP2グループに含まれるアクアポリンが水チャネルとして機能し、PIP1グループのアクアポリンは水透過性を示さないことがわかっています（Suga and Maeshima 2004）。PIP2を遺伝子導入したユーカリでは、ダイコンのPIP2を高蓄積する形質転換体が得られ、この株では非形質転換体に比べてCO_2固定速度が30%増大し、枝葉の成長も顕著に促進されました（図1）。一方、PIP1を遺伝子導入したユーカリでは、ダイコンのPIP1を高蓄積する形質転換体ではなく、逆にユーカリが本来もつ内在性のアクアポリン量までもが減少している株が得られました。これは、co-suppressionの結果としてPIPのmRNAと翻訳産物が著しく減少したと考えられます。そして、このアクアポリン量が減少したユーカリでは、CO_2固定速度や成長が著しく低下していることがわかりました。以上の結果から、ユーカリの成長におけるアクアポリンの重要性を示すことができたともに、PIP2の増強がユーカリの生育にプラスの効果をもたらすことを明らかにし、有用樹木におけるアクアポリンの形質転換が成長性の向上に有効であることを示した最初の研究例となりました（Tsuchihira et al. 2010）。



c

Line	Photosynthesis (μmol m^{-2} s^{-1})	Transpiration (mmol m^{-2} s^{-1})	WUE (mmol mol^{-1})	Shoot growth (cm)
親株 (GUT5)	25.5	3.04	8.88	7.8
PIP1 導入株	13.1*	2.95	4.43*	1.7*
PIP2 導入株	34.1*	2.57	13.3*	11.2

*P<0.05

図1　ダイコンアクアポリン形質転換ユーカリ

(a) PIP2導入株（右）と非形質転換体である親株のGUT5（左）。(b) 形質転換ユーカリの幼葉におけるアクアポリンタンパク質含量の比較。PIP1導入株では内在性のPIP2含量も減少している。PIP2導入株では、PIP2の高蓄積が確認できる。(c) 形質転換ユーカリにおける生理機能評価。PIP1導入株では光合成機能および生育の顕著な低下がみられる一方、PIP2導入株では光合成速度および生育ともに向上した。

2. シロイヌナズナにおけるアクアポリンの高温ストレス応答解析

シロイヌナズナではアクアポリンの研究も盛んに行われており、シロイヌナズナにある35種のアクアポリンについて、個々の分子機能や性質が明らかになってきています。しかし、アクアポリンの機能の多様性から、いまだ研究されていない環境応答も多く残されています。

【高温ストレス応答性アクアポリン：PIP2;3】

本研究では温度ストレスに注目しました。温度は、植物の成長・発達に重要な環境因子のひとつで、高温・低温は固着生活を送る植物にとっては避けることのできない環境ストレスです。低温ストレスに対するアクアポリンの応答についてはすでに報告がありましたが、高温ストレス応答との関係についてはこれまでに報告がありませんでした。

本研究では、細胞間の水の移動に大きく関与している細胞膜型のアクアポリンPIPに焦点を当てました。興味深いことに、シロイヌナズナにある13種のPIPのうち、PIP2;3のみが唯一高温ストレスに顕著に応答することを見出しました。日周変化とは独立した現象であることも証明しています。これまでに報告されているアクアポリンのストレス応答性は、いくつかのアクアポリン分子種が同時に応答するものでした。これは、植物に多様に存在するアクアポリンが機能重複していることを示唆するものです。しかし、本研究で見出されたPIP2;3の高温応答性は13種あるPIPのなかで唯一PIP2;3のみにみられた特徴であり、アクアポリンの機能分担を鮮明に示す結果であるといえます。

【*PIP2;3*の高温ストレス応答メカニズム】

*PIP2;3*の高温応答は36℃の高温ストレスに曝されてから30分以内には発現が誘導されはじめ、ストレス開始から2時間でピークを迎えてコントロールの30倍以上まで発現が誘導されます。しかし、その後は発現が元のレベルまで減少する一過的な高温誘導性です。このような一過的な発現誘導は、転写因子による巧妙な転写調節によるものと推測されますが、*PIP2;3*のプロモーター領域には既知の高温応答配列（HSE: 5'-AGAAnnTTCT-3'）に相当するモチーフが存在しません。現在、*PIP2;3*の高温ストレスによる転写調節メカニズムの解明に向けて研究を進めています。

【PIP2;3の高温ストレス応答の生理学的意義】

*PIP2;3*のプロモーターGUS解析から、*PIP2;3*は高温ストレスによって根や胚軸の中心柱や葉脈などの維管束組織、および気孔で発現が増大することがわかりました。これらの組織は、植物において水の主要な通路であることから、高温ストレスに曝された植物でPIP2;3が水透過性を促進する重要な役割を果たしていることが示唆されました。

さらに、野生株では高温ストレス後に蒸散が活発になるのに対し、*PIP2;3*欠損株（*pip2;3*株）では高温ストレス後に気孔の閉鎖が促進され、蒸散が抑えられていることが明らかになりました。また、*pip2;3*株では野生株に比べ、高温ストレス後の葉温が高くなっていることがわかりました。

ヒトは、高温環境下で体温の上昇を抑えるために発汗し、それに伴って多量に水分を摂取します。植物でも、高温環境下では蒸散が盛んになり、根からの水の吸収が高まるとともに体内の水循環が重要となるのではないかと考えられます（図3）。本研究では、シロイヌナズナにおいてPIP2;3が高温ストレス時の植物の水透過性促進に重要であることを示すことができました（投稿準備中）。

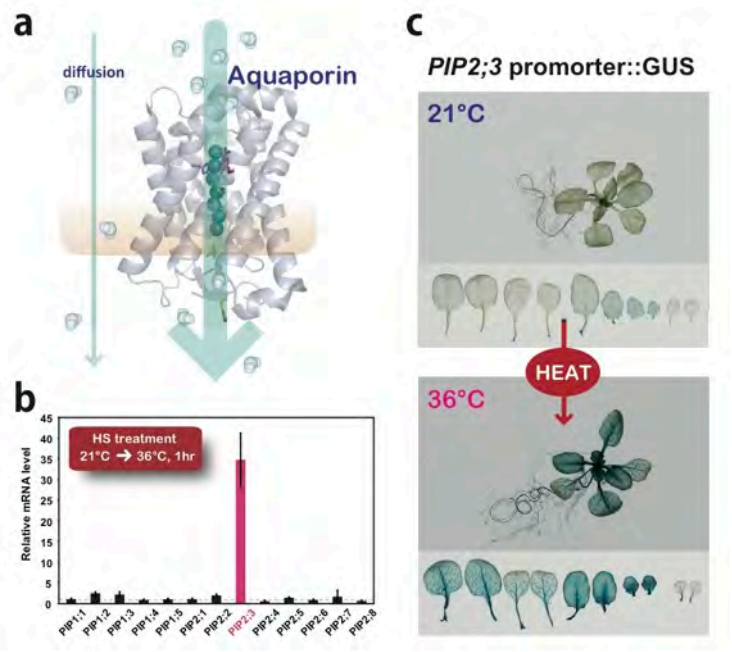


図2　高温ストレスで顕著に発現誘導されるアクアポリン

(a) アクアポリンのモデル図。水や他の非荷電小分子は、アクアポリンによって膜を介した輸送が促進される。(b) シロイヌナズナのPIP13種の高温ストレスによるmRNA量の変化。PIP2;3のみが36℃の高温ストレスで30倍以上も発現が誘導される。(c) PIP2;3プロモーターGUS活性の高温応答解析。高温ストレス後には、PIP2;3の発現が植物体全体で顕著に増大している。

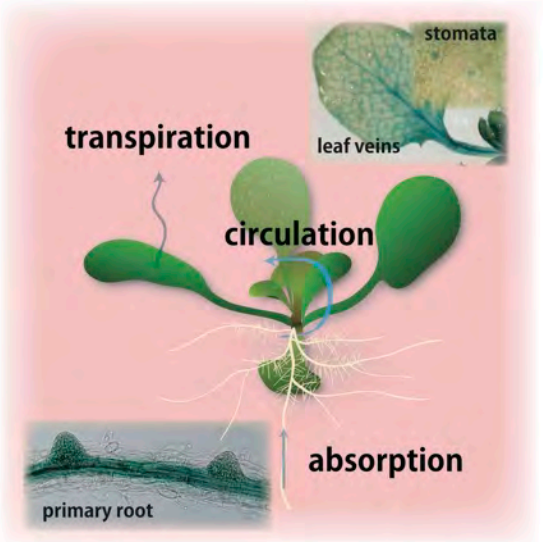


図3　高温環境下におけるPIP2;3の機能モデル

シロイヌナズナのPIP2;3は、高温ストレスに応答して根や胚軸の維管束組織、葉脈、気孔のような水の主要な通り道で発現が誘導される。水チャネルであるPIP2;3は、根や植物体内における水透過性や蒸散の促進に寄与することで、葉温あるいは植物体の過熱を防いでいると考えられる。

3. シロイヌナズナにおけるCO_2透過型アクアポリンの探索と高CO_2応答解析

植物には30種以上ものアクアポリンが存在しますが、水透過性を示すことが明らかとなっているアクアポリンはごく一部です。細胞膜型アクアポリンPIPのなかには、CO_2を透過する分子があることが報告されています（Flexas et al. 2006, Hanba et al. 2004, Heckwolf et al. 2011）。また、葉の内部組織におけるCO_2の拡散にアクアポリンが重要であるとも考えられており（Terashima and Ono 2002）、CO_2透過におけるアクアポリンの役割を明確にすることは、植物の高濃度CO_2に対する応答を理解する上で重要であるといえます。これまでに、いくつかのPIPの一遺伝子破壊株を用いて高CO_2環境での生育の違いを検証し、大気中のCO_2濃度の変化が一部のPIP遺伝子破壊株の生育に影響があることが少しずつ見出されてきました。今後は、これらの遺伝子破壊株を掛け合わせ、PIPの複数の遺伝子を欠損した植物を作出することで、CO_2透過に関わるPIP分子種を同定したいと考えています。

及川真平　Shimpei Oikawa

（東京農業大・博士研究員）

これまでの研究

1. 葉はどうして枯れるのか？

植物は茎・枝を伸長させながら新しい葉を作り葉群を形成します。葉群が大きくなるにつれ、光環境の良い葉群の外側には若い葉が、暗い内側には古い葉が配置されるようになります。葉群がさらに成長すると、古い葉は枯れ落ちていきます。葉の役割は光エネルギーを用いて炭素を有機物に固定する（光合成する）ことなので、古くなり光環境が悪化した葉が枯れ落ちるのは当然のことかもしれません。

私がはじめに研究対象としたのはワラビでした。ワラビは牧草地などの明るい所に生育する落葉性のシダ植物で、春から晩秋にかけて連続的に葉を作ります。葉軸にラベルを着けて2週間毎にその生死を観察してみると、より後に作られた葉ほど生存期間（葉寿命）が短いことがわかりました。しかもこれらの葉は光合成能力も低い。なぜそんな生産的でなさそうな葉を作るのだろうと不思議に思いました。葉の純炭素獲得量は、光合成によって獲得した炭素と、葉を作り維持するために消費した炭素のかねあいで決まります。葉を作るのに要した炭素コスト（構成コストと呼びます）を測ってみると、より後に出現した葉ほど“安価”であり、光合成能力に対する構成コストの比は葉寿命に比例して低下していました（Oikawa et al. 2004）。つまり、より後に作られた葉はその短い生存期間にも関わらず、構成に要したコストを光合成によって償却していた可能性が示唆されます。これは、短い期間であっても炭素獲得に少しでも貢献があるなら葉を作るという、ワラビの貪欲な戦略なのだろうと考えました。

葉が枯れるのは、光合成できなくなったときなのだろうか？この疑問について検証実験をしたいと思っていましたが、時々刻々と変化する葉の光環境や生理的性質をどう把握すれば良いのか悩んでいました。あるとき門司・佐伯の葉群光合成モデルについて書かれた論文を読み、このモデルを応用できるかもしれない考え、その正統である東北大の廣瀬・彦坂研究室を訪ねました。この研究室で古くから使われていたオオオナモミを栽培し、全ての葉にマーキングしてその生死を調べる追跡調査と葉群光合成モデルを組み合わせました。この調査から、葉の生産には窒素の可給性が、葉の枯死には窒素の可給性と葉群内の光環境の両方が関与していること（Oikawa et al. 2005）、枯死直前の葉の日光合成速度は窒素を十分に与えた場合はゼロだが、窒素が不足する場合にはまだ光合成が可能な葉でも枯死すること（Oikawa et al. 2006）、それは個体の光合成速度の増加と関係していること（Oikawa et al. 2008）などが分かりました。

2. CO_2濃度上昇と窒素固定が葉群動態に与える影響

根粒は植物から供給される同化産物をエネルギー源として空気中のN_2を固定します。そこで、高[CO_2]下で植物の光合成速度そして根粒への同化産物の輸送が増加すると、根粒からの窒素供給が増えます。東北農業研究センターの岡田益己先生（現岩手大学）と共に、根粒を形成する通常のダイズ品種と、根粒

非着生ミュータントを使った実験を行い、CO_2と窒素固定の相互作用がダイズの収量に及ぼす影響を解析しました（Oikawa et al. 2010）。現在、これらの植物の葉群動態を、窒素獲得・利用と絡めて解析しています。

3. その他の研究

青森県八甲田山系において、標高の違いが常緑性植物と落葉性植物の成長、窒素獲得・利用に与える影響について研究を行っています。また、イリノイ大学のFACE施設を用いて、対流圏オゾン濃度の上昇がダイズの生産構造、窒素獲得と群落光合成に与える影響を調べています。

本領域での担当

農業環境技術研究所によってつくばみらい市に設置されたFACE（開放系大気CO_2暴露実験）施設において、大気CO_2濃度と窒素の可給性がイネの葉群動態に及ぼす影響を調べています（写真1）。ここで葉群動態とは、葉の生産と枯死、それに伴う窒素の吸収、器官間の転流と体外への損失を指します。この動的な過程の結果として葉群が持つ葉面積量と窒素量が決まります。また、CO_2濃度や施肥量の変化はこれらの過程を通して環境にフィードバックします。野外におけるCO_2付加実験と室内のそれとでは、植物特性の応答の大きさが異なる場合があります。例えば、CO_2付加によるダイズの地上部の純生産量と収量の増加は、過去に行われたチャンバー実験で得られた値の平均値よりも、野外（FACE）で得られた値のほうが小さいという報告があります（Morgan et al. 2005）。こうした相違の原因として、両実験間の生育期間の違いや、CO_2以外の環境（根圏の制約に起因する無機栄養塩の可給性の違い等）との相互作用が考えられています。これが他の植生にもあてはまるかどうかはまだ分かりませんが、野外での調査は、将来の作物や自然植生の変化についての予測が容易ではないことを認識させてくれます。

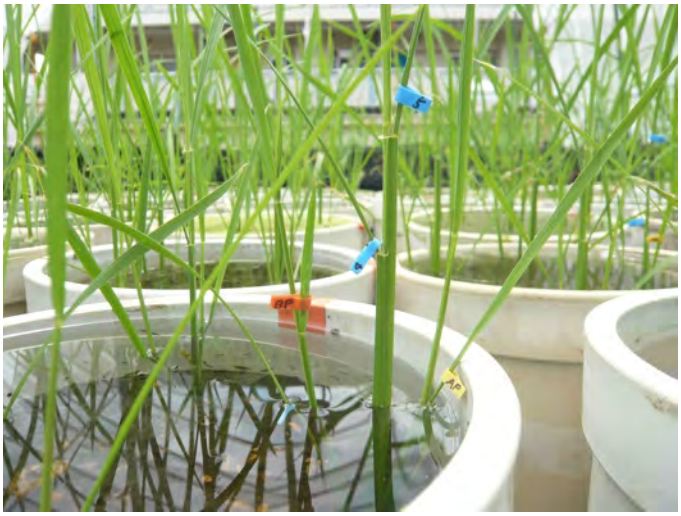
（写真1）つくばみらいFACEにおける調査風景。水田を囲むチューブの小穴から高濃度CO2ガスが風にのせて放出される。

この実験について廣瀬・彦坂両先生からお誘いを頂いたとき、難しそうだなと思いました。葉群動態を調査するときには、定期的に新しく生まれた葉と枯れ落ちた葉、それらのサイズ等を調査するのですが、イネ科植物がどのように成長し、葉を展開したり落葉するのかを全く知らなかったからです。オオオナモミやダイズの場合、1本の茎が垂直方向に伸びその先端に新しい葉芽が出来、それが少しずつ開いていくので、葉が生まれ成長する過程を視覚的に認識することができます（写真2）。葉が枯れたときは、茎上の葉柄痕を指でたどれば何番目の葉が枯れたのかがほぼ正確に分かります。こうした追跡調査は労力がかかりますが、葉や枝の出所や成長が目に見えるため混乱することはあまりありません。しかしイネの場合、ダイズなどとは様子がだいぶ違います。まず、写真を探してきてじっくり見てみると、何本もの茎（稈）が地際から束のようになってでています。しかも水面下にある基部側の数センチはよく見えません。葉柄は無く、葉芽らしきものも見当たらないので、いつどこにラベルしていいのかわかりません。明瞭な葉柄痕があるようにも見えません。春になって実験圃場で1本のイネの苗をポットに植えてみると、たった1週間の間に分げつ（稈（母稈）の各節につく葉の葉腋から伸びる分枝のことを、イネでは分げつと呼びます）の数が6~7本、葉の枚数は20数枚に増えていました。この間に枯死した葉や分げつがあるなら、実際にはもっと多く生産されているはずです。どれが新しく作られた分げつ・葉で、これらはどこから出てきたのか、何が枯れてなくなってしまったのか、一見しても分からず、思わず匙を投げたくなったのを覚えています。

（写真2）展開中のダイズの葉にラベリングした様子。葉柄が長く丈夫な植物なので、見やすい大きめのラベルを貼付けることができる。

幸いイネの構造や成長に関しては山ほど知見が集積しています。そのひとつである「イネの成長」（星川清親著）をテキストに、イネの解剖と観察を繰り返しました。そこで得た知識のひとつに「同伸葉同伸分げつ理論」があります。これは、主稈のある葉が抽出した（葉が、ひとつ下位の葉の葉鞘よりも長く

なり、その先端が外部から見えるようになった）とき、その3枚下の葉の節から発生した分げつの葉が同時に抽出する、というルールです。例えば、第1葉が抽出途中の分げつを見つけたとき、以下のように同定できます：主稈において抽出中の葉についているラベルを読み、それが第6葉ならば、その分げつは主稈の第3（=6-3）節から発生したもので、抽出途中の葉はその第1葉である。このとき、主稈の第7葉、分げつの第2葉はそれぞれの下位の葉の葉鞘中で伸長を始めています。これは分げつと、そこから発生した分げつ（2次分げつ）の間にも成り立つので、主稈の葉さえしっかり同定しておけば（写真3）、子分げつ・孫分げつの全ての葉が同定できることになります。ルールが厳密に成り立たないこともありますが、慣れてくると分げつの開度、葉の形やサイズに関する他のルールと併せて考えることで識別できます。いろいろな情報を並べて推理するというこの作業は、謎解きのようで、やりながら一人悦に入ることもあります。寺島先生の研究室を訪ねたとき、イネについて分かっていることを勉強するのは植物全般の成長を理解するうえで大切、あれだけ詳細に調べられていろいろなことが分かっている植物はない、とおっしゃられていたのが印象に残っています。この経験が今後の研究にも活きることを期待しつつ、FACEでの実験に取り組んでいます。長谷川利拡博士、酒井英光博士をはじめとする農環研のFACEメンバー、東京農業大学の皆様のサポートに感謝申し上げます。



（写真3）イネの葉にラベリングした様子。ラベルを葉身に密着させると葉身が変形してしまうことがある。しかしラベルが葉からずり落ちると、葉鞘をかきわけて現われてくる新しい分げつにラベルが移動してしまったり、分げつの成長を妨げたりする。葉身に軽く貼付けるのがこつ。

酵素から生理学へ

Review

名古屋大学 名誉教授　杉山 達夫

飢餓体験により植物科学研究の道を選び、代謝反応の秩序を守る“酵素”と“生理学”の接点を模索したわが研究の遍歴を、折々の植物科学の状況や背景を交えて紹介する。

【プロローグ】

大戦の直前・直後での食糧難による飢餓を体験し、これが進路決定に大きな影響を与えました。学部・修士時代の専攻は農芸化学科の“植物栄養及び肥料学”でした。４年時に卒論生としての研究題目は「水稲幼根NH_4^+呼吸に及ぼす陰イオンの共存効果について」で、気圧の変動に左右されながらワールブルグ呼吸測定器によるNH_4^+吸収に伴う呼吸量測定に明け暮れたことが記憶に残っています。修士に進学し、指導教授（五島善秋教授）から最初に与えられたテーマは「植物種による養分吸収の差異について」であり、“葉菜はイネなどの穀類に比べ養分の吸収力が高い。その要因は何か？”という問答からはじまりました。どこから取り付いてよいものか大いに迷ったあげく、本題から派生して、植物でのK^+の生理作用に焦点をあてた研究を始めました。その頃目に止まったのがスウェーデンの生化学者Jens Christian　SkouによるNa^+/K^+-ATPase（赤血球Na^+/K^+ポンプ）発見の論文でした。この酵素は細胞内でのATPの加水分解と共役して細胞内からNa^+を汲みだし、K^+をとり込む動物の膜タンパク質で、強心性ステロイドによって阻害されます。この酵素が植物細胞にもあるかも知れないと考え、それら2つのイオン環境が動物細胞に近いとのことで、アオサを材料にして、ステロイドによるK^+吸収の阻害を目安にして調べました。アオサを得るために、当時知多半島の新舞子にありました東京大学付属水族館で実験もしましたが、思いつきの仮説を支持する結果は得られず、悪戦苦闘の中で、修士時代を過ごしました。当時、生化学が台頭し始めた頃でした。折しも、静的な天然物生物化学を経て、代謝を中心にしたダイナミックな生化学が台頭し、これに心惹かれました。とはいえ、動的生化学の知見のほとんどは微生物や動物でえられたものでした。ですから、大学院の生物化学の演習で与えられたテーマも“植物でのTCAサイクル存在は実証されるか否か”であり、このサイクルメンバーの酵素活性の植物での検出すら当時は不完全でした。

幸か不幸か、新しい研究に少し触れたばかりに、施肥の技術が中心の肥料学は農業生産の現場に即してはいるが、古典的な生理学を超えていないということで、満足感はありませんでした。大学内で研究室を変えるということは道義的になかなか難しいことでしたから、自分の将来進みたい生化学の手習いのため、一年間休学を決心し、創設間もないフィリッピンの国際イネ研究所（IRRI）の生化学部（ヘッドは赤沢堯名古屋大農学部助教授）に留学しました。研究テーマは“登熟イネ種子でのデンプン合成”で、研究室には先輩の南川隆雄さん（東京都立大学名誉教授）と村田孝雄さん（岩手大学名誉教授）が熱い雰囲気で研究をしていました。彼らは、L. Leloir教授（1970年ノーベル化学賞受賞）らによって予測されていたデンプン合成の基質ADP-glucoseがイネの種実に実在することを突き止めたところで、新入りの私は彼らと一緒にADP-glucoseの合成経路を明らかにすることができました。^{14}C-ADP-glucoseを譲渡いただいた縁でその後Leloir教授の研究室と親交を得ることになりました。

その余話をひとつ。1989年12月でした。学術振興会の日・アルゼンチン学術協定への準備をかねて、クリスマス休暇直前に、Buenos AiresのLeloir研究所（カンポマール基金生化学研究所）とRosario大学を訪ねました。ニューヨーク経由で、冬から真夏へと急変する長旅で疲れ果てた末、Buenos Airesに到着しました。日程が込んでいましたからその日の午後にLeloir研究所でセミナーが組まれていました。ところが、スライドを詰め込んだ荷物が届かないまま、セミナーをする羽目になりました。Leloir教授は2年ほど前に心臓発作で亡くなっていましたが、先生の生前の慣習であったそうですが、ランチをお弟子さん達と円卓で済ませた後、その場でセミナーをしました。資料不足（提示できるもの、実際には皆無）の上、長旅と時差によるひどい疲れで話は惨憺たるものでしたが、親切なもてなしを受けたことを今も忘れていません。その後協定が実施され、Leloir教授の高弟のひとりEnrico　Cabib博士の名古屋訪問を受けました。IRRIでの研究の折に貴重な標識化合物^{14}C-ADP-glucoseを譲り受けたことに話がおよび、謝辞を述べたところ、“あれは私が合成したものです”と言われ、30年近くも経た当時の話題を互いに懐古しました。

IRRIでの“月月火水木金金”の一年間の研究生活を終え博士課程に復学した後、しばらくは植物でのK^+の役割について研究しました。それは、炭水化物代謝におけるK^+の生理作用でした。シュガー・ビートの可溶性糖含量とK^+濃度の関係を追って、還元性単糖類からのショ糖合成および解糖の2つの過程でK^+の効果が大きいとの判断を得ました。そこで解糖に着目

し、K^+欠乏で生育するオオムギでこのイオンをコファクターとするpyruvate kinaseの活性が増大することを見つけました。その結果、代謝調節の一端を垣間見ることができ、生化学の教科書に動物を主体に書かれた“Homeostasis”を植物で実感することになりました。その内容は自身による英文での処女論文（Plant Phys, 1968）となり、今でも忘れられない論文の一つとなりました。これを区切りに、植物栄養及び肥料学研究室での博士課程を中退し、1966年4月に新設の名古屋大学農学部付属生化学制御研究施設（現生物機能開発利用研究センターの前身）の助手となりました。

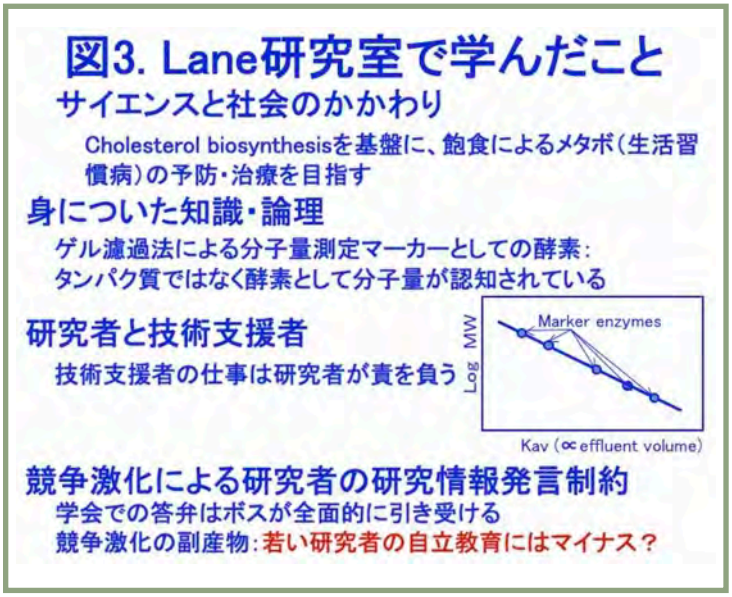
この研究施設が目指す理念は「高等生物（植物および動物）のもっている生命活動の法則性を解明し、生物のもつ未発見の諸性質を最大限に開発、利用する」であり、その神髄は間もなく50年を経る現在でも変わることなく生き続ける植物科学のモットーでもあると思います。師である赤沢堯助教授（現名古屋大学名誉教授）がIRRIで手掛けられたイネ緑葉の主要タンパク質Fraction-I proteinの構造と機能解析に取り組みました（図1）。このタンパク質がRubiscoと呼ばれ始めたのは後になってからで、当時はCarboxydismutaseとよばれていたこの酵素とFraction-I proteinが同一なものかどうか決めかねている状況でした。Fraction-I proteinは、当時の電気泳動（1930年代にティセリウスによって開発された水溶液を用いる無担体電気泳動）により緑葉のタンパク質が２つの主要成分に分かれ、そのうち大きな分子量の量的にも多い成分の名称です。低い分離解像力故に、複数のタンパク質の混合物であると考えた研究者がいたのは不思議ではありません。このタンパク質にはオーキシン結合能があるなどとした高名な研究者もいましたし、いくつかの酵素の複合体であると考えた研究者もいました。“酵素は極微量の存在なり”という当時の生化学的常識を破ってそれら2成分は同一であるとの結論にわれわれは到達しました。この結論を起点に、各種の光合成生物の酵素動力学とそれらのサブユニット構造の比較を進めました。その間、名古屋市立大医学部の村地孝教授（後京大医学部教授）、京大食研の森田雄平教授、阪大蛋白質研の松尾壽之博士（後宮崎大学長）らの研究室でタンパク質化学の指南を受け、RubiscoのLSに触媒機能があり、アミノ酸組成は種の特異性を示さないのに対し、SSには種の特異性があることを明らかにしました。当時の手段では、Rubisco構造の全貌捉えがたく、まさに巨象を手探るに精一杯でしたが、これらの研究は1968年に提出した学位論文「Biochemical Studies on Plant Leaf Proteins」の主要部分となりました。

酵素の研究を目指しながらも、消化不良を痛感しつつ、Johns Hopkins大医学部のDaniel Lane教授研究室に留学することになりました（図2）。Lane教授は脂肪酸合成酵素の複合体の解明でノーベル賞受賞者のLynen教授の弟子で、Acetyl-CoA CarboxylaseやRuDP carboxylase (Rubiscoの別名。当時RuBP, ribulose bisphoshphateはRuDP, ribulose diphosphateと呼ばれていた)など炭酸固定酵素を手掛ける気鋭の酵素化学者でした。私に与えられたテーマはコレステロール生合成に関与する２つの酵素（HMG-CoA synthaseとAcetoacetyl-CoA thiolase）の構造と機能解明でした。それは飽食の所産ともいうべく今日でいうメタボの予防・治療を目指したもので、米国の社会では深刻化し始めた生活習慣病を標的にしたものでした。この留学は将来の研究方向を考える機会でもありました。外国で過ごすと多少ナショナリズムを感じることがあります。アジア人としては飽食のケアよりはいかにして食糧を得るかの方が重要であると、特に幼少時の飢餓やIRRIでの体験が頭をもたげました。決定的であったのは、ボスから“君の酵素材料は今使っているトリ肝臓よりも脳がより適しているから、ヒトの脳に替えないか？”と云われたことです。治安の悪いスラム街に病院を抱えており、ヒトの脳の入手は比較的簡単であるとは云っても、深夜低温室でそれをホモジナイザーで摩砕する姿を想像し、生理的な拒否感を覚えました。

Baltimoreでの研究に区切りをつけたいと心に決めました

が、Lane研究室で学んだことは貴重なことでした（図3）。まず、サイエンスと社会のかかわりです。人に資するサイエンスを強く自覚しました。科学的な知識や論理が身についたものでなければということも教えられました。その一例は、手がけた酵素のゲル濾過による分子量推定の実験の折でした。ご存知のように、その原理は酵素とともに分子量既知のいくつかのマーカー酵素をゲル濾過し、溶出ボリュームを実測するものです。私は活性測定の手間をはぶくべく、マーカーのひとつを酵素活性ではなく280nmの吸光度で測定し、その溶出ボリュームを検量直線上にプロットしました。これについてLane教授のお叱りを受けました。“マーカーの分子量は酵素、すなわち活性としてオーソライズされている。だから、タンパク質としてではなく、酵素活性を指標にしなければいけない。君の測定したマーカーは例えば重合などして酵素活性を失っていたかも知れないではないか？”彼の言葉に思わずはっとし、研究での基本は何かを痛感しました。また、私たちの酵素精製には、ドイツのテクニシャン養成高校を出た優秀なスタッフがカラムやバッファーの調製などの技術支援をしてくれていました。私と相棒の大学院生で医学クリニックコース取得のため研究室を離れるJoel Mossは、深夜に1週間以上かけて集めた酵素抽出液を巨大なDEAE-セルロースカラムにかけ、明け方から溶出液の目的とする酵素の活性測定を始めました。ところが、想定される溶出位置にその活性は全く認められませんでした。不安に思い、溶出液のpHをチェックするとなんと強いアルカリ性でした。酵素は展開中に失活していたわけです。この失敗を招いた最も可能性の高い原因は、アルカリ処理後のカラム調製にテクニシャンが使用バッファーによる平衡化を怠ったことです。Joeが明け方テクニシャンに電話をかけ、たたき起こし、即刻ラボにくるようにと怒鳴っていました。われわれとテクニシャンが揉めているところに、Lane教授が出てきてさわぎの顛末を理解したようでした。ボスは、“カラム調製にミスがあったのであろうが、君たちは研究者だ。多くの時間と資材を費やす大切なサンプルをかける前になぜ調製済みであるとの確認をしなかったのか”と云い、これを契機に研究室全員にpH簡便試験紙が配られました。技術支援者の仕事は研究者が責任を負うべきであることと、ボスの指導者としての一面を痛感しました。留学中学んだことは必ずしも良い点ばかりではありませんでした。学会発表になると、研究室の発表者全員に“質疑は自分で答えないように。私が全部答える”とボスがいいました。この外部発言の禁止は機密保持の面からは納得いくものでしょうが、若い研究者の教育にはマイナスでしょう。

余話です。Lane研究室では、先に述べたように、ホウレンソウRuDP carboxylaseの研究もしていました。当時、この研究にあたっていたのはPhD学生のMarvin Siegelでした。有機化学を専攻してきた彼はこの酵素の反応機構に取り組んでいました。研究室では毎週lunch seminarを開き、室員が交互に研究進展を詳細に報告していました。あるとき、Marvinが担当し、酵素に

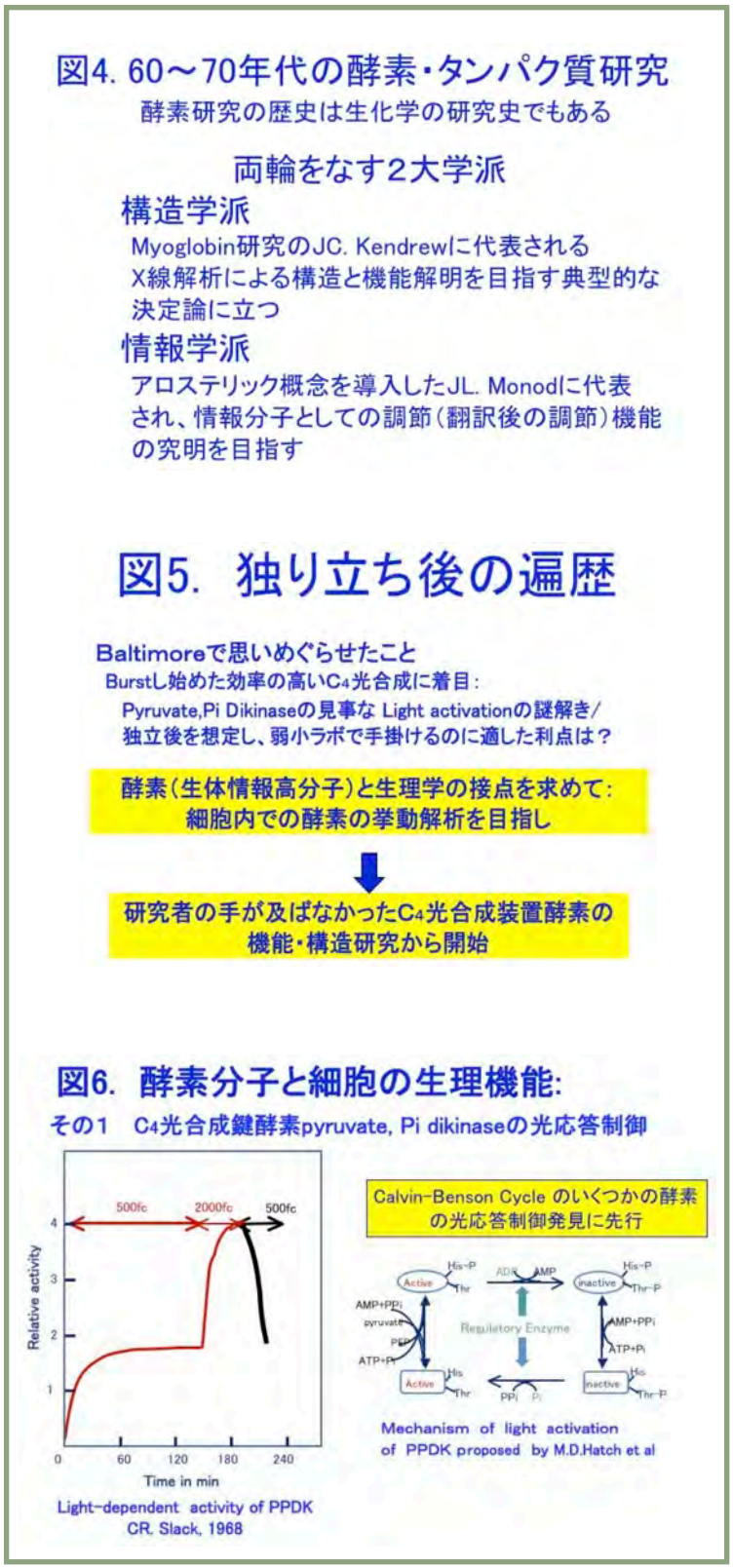


CO_2が取り込まれる遷移過程の反応を提唱しました。私はCO_2に替わってO_2が基質になりうるのではと思い、彼に、質問しました。少し間をおいて彼は“それは可能だ”と言いました。このヤリトリを早速名古屋に手紙で書き送りました。でも、反応はありませんでした。帰国してから知ったことですが、その頃（1972年）イリノイではW. OgrenらがRuDP carboxylaseにoxygenation（酸素添加）機能があることを明らかにしました。

新発見へのめぐり合わせには研究の視野が重要であろうと思います。その視野は研究者自身の志向とこれに基づく情報のとらえ方に大きく左右されます。RuDP carboxylaseのもう一つの触媒能力であるRuDP oxygenaseの発見については、1976年九州大学で行われた植物生理学会のシンポジウム「光合成機能をめぐるC_3,C_4植物」で座長の宮地重遠教授（当時東京大学応用微生物研究所）の発言を思い出します。このシンポジウムで私は“RuDP carboxylase”とトウモロコシの“C_4 PEP carboxylase”の比較を話題提供していました。その折、宮地教授は“RuDP oxygenaseの発見を逸したのは杉山の責任である”という趣旨の発言をされました。具体的にどのように回答したか記憶していませんが、Lane研究室でのM. Siegelのランチセミナーでの質疑のことを話したことは覚えています。帰路に宮地教授と車中で話し合ったことは今も忘れてはいません。彼らもRuDP carboxylaseが酸素で阻害されることを見つけていたことを知りました。ところが、彼らはそれ以上この阻害について酵素化学的な追及はしなかったとのことでした。また、私自身は酸素で光合成が阻害されるいわゆるワールブルグ効果という生理学上重要な現象を知らなかったことがLane研究室での情報を活かせなかった要因ではないかというのが２人の理解であったように思います。蛇足ながら、Lane研究室でもワールブルグ効果についての認識があったとは思えません。RuDP oxygenaseの発見には酵素化学に加えて生理学的という少なくとも２つの視点が重要であったと云えましょう。M. Calvinらによる炭素同化サイクル解明の実験はご存知のように酸素フリーのCO_2条件下で行わ

れました。もしこの気相のベースに大気が使われていたら、カルビン―ベンソン―バッシャム回路の解明が遅れ、一方RuDP oxygenaseとそれに続く光呼吸経路の発見は早まっていたかもしれません。研究の歴史から学ぶ一例でありましょう。

さて、多忙なLane教授とは多くの場合、研究の進め方については夜更けに電話で話あうことが多かったように思います。彼の研究指向は“酵素を細胞に返す”、つまり、細胞生物学であったように見受けました。ここで、酵素化学研究の1960～70年代の動向を振り返ってみましょう（図4）。構造学派と呼ばれ、myoglobin研究のJC. Kendrew教授に代表され、X線解析による構造と機能解明を目指す典型的な決定論に立つ学派がありました。また、情報学派と呼ばれる研究者がありました。アロステリック概念を導入したJL. Monod教授に代表され、情報分子としての調節機能の究明を目指していました。Lane教授の指向はこの情報学派に近く、私も同様なことを求めていました。



【独り立ち後の遍歴】

Lane教授のポストドック期間延長の誘いを断り、名古屋大学に復職しました（図5）。米国留学に先立ちFraction-I protein研究の継続は当時教務員の中山典子さん（御茶ノ水大名誉教授）と高倍鉄子さん（名古屋大名誉教授）、それに院生の西村幹夫さん（基礎生物学研教授）にバトンタッチしていましたし、幸いにも、上司から独立して研究を進めてよいとのお許しを得ました。かねてBaltimoreで思いめぐらせていた帰国後の研究は植物科学への復帰でした。そのため、週末の夜にホームウッドキャンパスの図書館に出向き、植物関係の雑誌で動向を調べることにしました。目立ったのは、burstし始めたC_4光合成の研究の展開でした。なかでも興味をひいたのは、Pyruvate-Pi dikinase（PPDK）の見事な光応答の活性制御を報じたR. Slackの論文でした。これは、光効率の高いC_4光合成の仕組みと大いに関係すると考え、この酵素の光活性化の謎解きから始めようと、帰国後の研究標的を心に決めていました。まずPPDKを単離し、そのin vitro研究から始めようとしました。それには、細胞壁の強靭な維管束鞘細胞の破壊し難さや多量のフェノール物質ゆえに取扱いの難しいC_4植物を対象に、光合成炭素同化酵素は研究者の手が及び難いとの思惑も私を後押しました。なかでも、維管束鞘細胞破壊の難しさという点では、Hatch達も初期の時代に、C_4植物にはRuDP carboxylaseは無いと考えた時がありました。維管束鞘細胞を充分破壊できなかったためです。

案の定、PPDKの取扱いにはまず光という点で手を焼きました（図6左図）。名古屋大学では手近に材料のトウモロコシ葉を得る手立てが当時なく、郊外にある大学農場から入手しました。収穫後の葉を車に積み込んで実験室に運び、屋上で陽にあて、PPDKを活性化してブレンダーで抽出する作業をしました。In vivo でのこの酵素活性はまるで照度計のようで、光量に完全に依存し、室内での照明下ではほとんど活性がなくなります。この酵素の活性は後でわかったことですが、翻訳・翻訳後と2通りの光制御を受けますが、分単位でのこの活性変動は翻訳後の活性調節によるものです。したがって、通常の照明下にある室内で抽出をすれば、酵素活性はほとんど検出できなくなります。また、長雨の梅雨時には光量の不足により翻訳段階でブレーキがかかり、PPDKをはじめ多くのC_4酵素の量は低下

します（このことは後に分かったことですが）。植物酵素の光による制御はthioredoxinを介したカルビン―ベンソン―バッシャムサイクルのいくつかの酵素で後に発見されましたが、PPDKの光制御機能の発見はそれらに先行し、植物らしいその挙動は私にとって大きな魅力でした。研究を進めるうちに、葉を暗処理して得られる不活性型PPDKと活性型の相互転換する修飾酵素を発見し、ADPやPiがコファクターとして関与することを突き止めました。名古屋大赤沢研での研究はここで終止符をうち、静岡大学に転出することになりました。

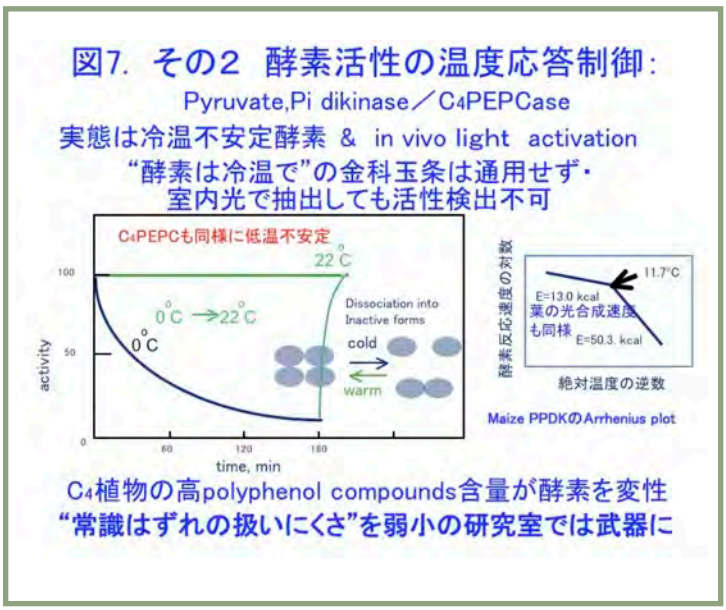
新天地の研究環境、なかでも設備は異動前には想像もつかないものでした。広い実験室には使い古した銅製の蒸留器しかありませんでした。当面の実験に必要な高速遠心機や分光光度計は学科共通のものを使用し、蒸留水は他学部（教育学部の八木達彦研）でもらい水、フラクションコレクターは“手ラコレ”と称し、人力でという研究生活がしばらく続きました。とはいえ、この厳しい状況で研究室（とは言え、私と院生2人）が一丸となるというメリットが得られ、それは大きな力となりました。イオン交換水ではなく蒸留水に固執したのは、イオン交換樹脂にはフタル酸エステルが含まれ、それが酵素の変性を助長することを名古屋でのPPDK精製時に体験していたからです。手始めの研究対象はトウモロコシ葉のphosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)でした。着任早々でしたから栽培が間に合わず、トウモロコシ葉は富士山麓の農家から入手して、ほとんどすべての機材は借用して苦闘の日々が続きました。院生上段公二さんの日夜を問わない努力で単離に成功しました。研究室の整備が遅々としていましたが、整うにつれて院生の白橋賢二、早川忍さんらを中心にPPDKとPEPCの低温不安定性の構造解析と生理機能とのかかわりを明らかにすべく研究に着手しました。また、PPDKの光活性制御の研究には院生の仲本準さん（現埼玉大准教授）や山崎健一さん（現北海道大准教授）を中心に、研究を進めました。Gerry Edwards（当時Wiskonsin-Madison大教授）とRobert Kiyoshi Togasaki （当時Illinois-Bloomington大教授）が日米共同研究プロジェクトの客員教授として時をたがえ研究室に滞在していたのはそのころでした。

その頃、MD. HatchからPPDKの光活性調節の仕組み解明に向けて共同研究の提案がありました。当時彼らはC_3とC_4植物の選択的除草剤の開発研究をしており、PPDKの光制御を標的にすれば、それはC_4植物の高い特異性であろうと考えていたようでした。彼らはこの活性化の仕組みがPPDKのSH基の酸化・還元によると考え、論文にもそのように記述していました。これに対し、私たちが得ていた暗処理して得られる不活型PPDKの活性化機構の知見は次のようでした。

$$\text{PPDK-X(不活型)} + P_i \rightarrow \text{PPDK} + \text{X-P}$$

この反応は分子量約88,000のタンパク質が触媒し、Xは多分nucleotide diphosphate であろうと考えました（Plant Physol, 1982）。数年にわたり、講義のない春休みや夏休みを利用し、キャンベラに出向き共同研究を重ね、後一歩で突き止められるというところで帰国しました。その直後、ウィスコンシンのGerald E. Edwards研にてPhD取得後英国でポストドックを終え静岡時代にPPDKの活性化を手掛けてくれた仲本準さんが、Hatchらによるその仕組解明が完了したとの風聞を知らせてくれました。数週間後に彼らによる仕組みの全貌を論文で確認することになりました（図6右図）。核心となるアイデア（少なくとも一部）を共有することになる共同研究の難しさを痛感し、まるで恋人と離別をしいられたような気分で、しばらく仕事に手がつかない日々でした。

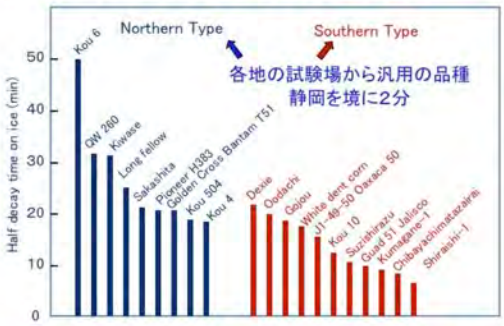
トウモロコシPPDKとC_4 PEPCは、金科玉条であった“酵素は冷温で扱え”が該当しない酵素です（図7）。氷冷下で処理すればその活性はほとんど検出されない有様です。それは両酵素とも冷温不安定酵素であるためです。冷温失活は可逆的で常温に戻せば復活しますが、粗抽出液中ではこの可逆性は不完全です。これらの酵素は分子量約10万のサブユニットの4つが一平面に近い配列をとるために不安定で、冷温により速やかに2量体、さらには単量体に解離し、活性を失います。酵素活性のアレニウスプロットに見られるように、およそ12℃を境にそれ以下の温度では反応の活性化エネルギーは増大します。トウモロコシ葉の光合成速度のアレニウスプロットも同じような温度で不連続性を示しますから、PPDKやC_4 PEPCは冷温下でのC_4光合成の急激な低下の原因の一つであろうと考えました。



そこで、PPDKについて、国内の各地に所在する試験場から汎用のトウモロコシ品種の種子を提供していただき、一定条件下で栽培した幼苗の葉から得た粗抽出液の酵素活性の温度特性を比較しました（図8）。静岡以北から得た品種をNorthern type、以南の品種をSouthern typeと便宜上2分したところ、傾向として北型に属する品種のPPDKの方が冷温耐性は強いとの結果を得ました。そこで、“In vitroでの酵素特性は細胞内の挙動を反映する”との信念を支えに、C_4光合成駆動部装置（PPDK

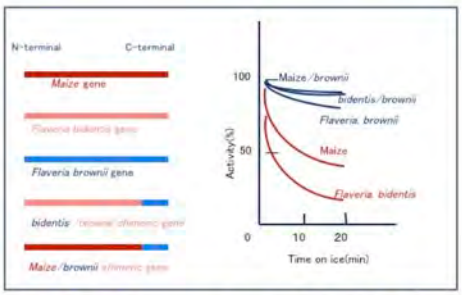
とC_4 PEPC）は冷温でのアキレスであると考えました。PPDKの冷温不安定性はおそらく遺伝的なものであろうと予測されましたが、これについては名古屋大に赴任後、私の研究室に客員として滞在したJim Burnell（Hatchの元共同研究者、現James Cook大教授）が冷温耐性の異なるPPDK遺伝子のキメラ遺伝子を使い後に分子遺伝学的に証明しました（図9）。かつて、Hatch研での滞在中、かれらがC_4光合成に特異的な除草剤の開発に精を出していたころ、“C_4殺すには薬はいらぬ。低温で”と冗談を飛ばしたものです。”常識的な酵素抽出法では検出が難しいPPDKの活性をHatchらが検出できたのは何故か？”この疑問は彼らの実験現場を目撃して氷解しました。彼らは酵素抽出をグリーンハウス内で、しかも氷冷せずに行っていたのです。“常識は嘘であることもある”の一例です。

図8. “In vitroでの酵素特性は細胞内の挙動を反映する”という考えを支えた実験事実



PPDK、PEPC の温度特性は冷温での光合成速度を規定
C_4光合成駆動部装置（ PPDK、PEPC ）は低温のアキレス

図9. C_4PPDKの冷温不安定性は遺伝的



客員研究員James Burnellが帰国後発表

図10. その3 N-代謝との接点にあるC4光合成炭素代謝酵素（AlaAT・AspAT）の構造・機能研究

Isoformsの同定、特異的抗体、cDNAクローニング

AlaAT・AspATの発現は強く窒素源に依存

C/N制御を視野に、発現の窒素依存性に焦点を置き、GS・GOGATにも研究拡大

名古屋大にUターン後、C_4 PEPCについては名古屋大客員教授として来訪中のSteven C. Huberさん（現University of Illinois/USDA 教授）が研究に参画し、翻訳後の光活性制御として、リンゴ酸による阻害制御にC_4 PEPC分子の修飾がかかわることを見出しました。PPDKについては、Hatch研以外のいくつかの研究室で研究の対象となり始めました。その頃この酵素の精製法習得のために、まだ名古屋での研究室が整備されない状態でしたが、2人の研究者を迎えました。一人はカリフォルニア大バークレー校のJames Bassham教授のもとに留学しPhDの研究を始めた青柳和子さんです。彼女とは忘れがたいやりとりがありました。来訪前に何通かの質問状がおくられてきました。返信用に切手まで添えて。その内容の多くは精製の過程で生じた問題の解決であったように記憶します。やがて彼女から、われわれ手持ちの精製酵素を欲しいとの申し出がありました。私自身も名古屋に赴任した直後でしたからその申し出を受けるわけにいかず、“貴女がこちらに来ていただけるのなら一緒に精製をしてそれをお持ち帰りになったらいかがでしょうか？”と返信しました。夏の真っ盛りでした。彼女はわれわれの研究室にやってきました。トウモロコシも自分たちで栽培できるようになり、2人の卒論学生と一緒にPPDKを精製し、短期間のうちに彼女は目的を達しバークレーに戻ることができました。後年バークレーに立ち寄った時、Bassham教授は青柳さん受け入れのお礼を兼ねて、彼女の娘さんとともに、ヨセミテに泊まりがけの行楽案内をしていただきました。2人目の来訪者は学位取得後農水省の鮫島研に職を得た松岡信さん（現名古屋大教授）でした。彼の目的はトウモロコシPPDK抗体の取得であったように記憶しますが、これを機会に農水省の“C_4光合成プロジェクト”に加えていただき、不足の研究費が潤ったことは幸運でした。

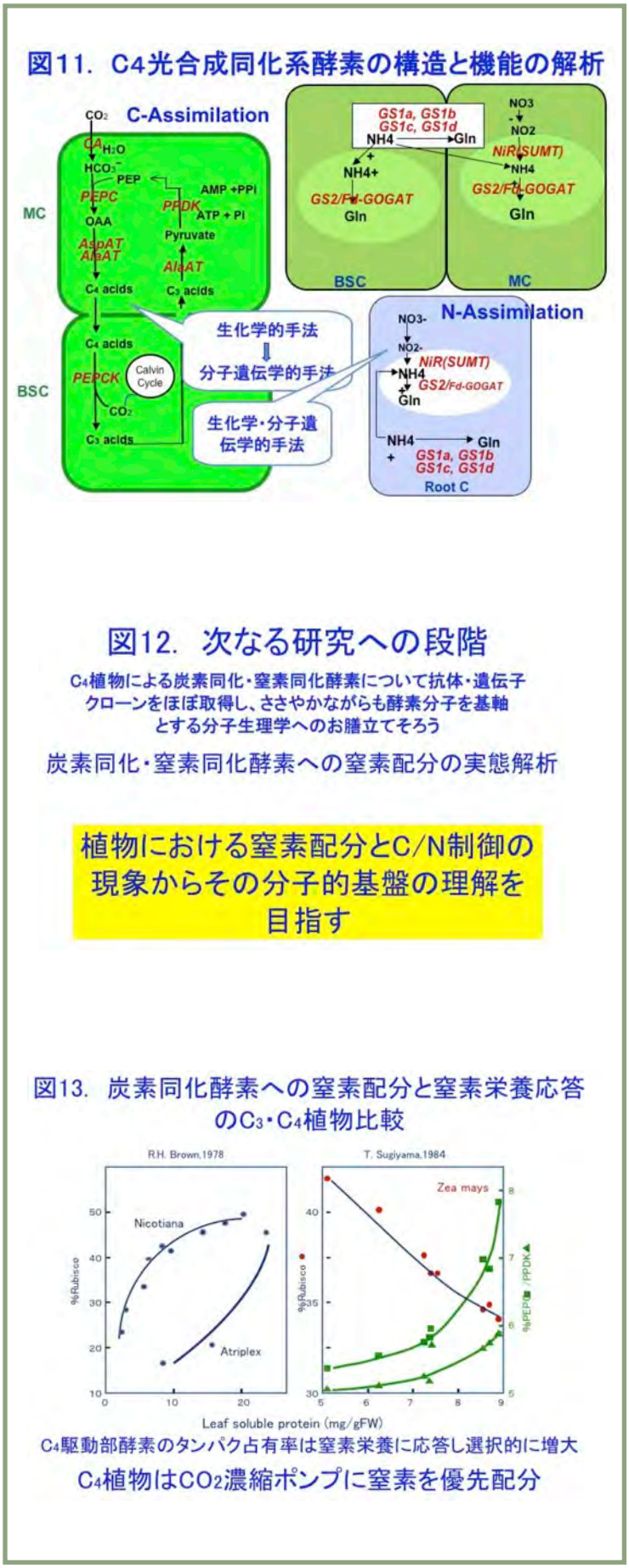
学生とスタッフが整い始め、当時助手の笹川英夫さん（現岡山大名誉教授）の支援もあり、PPDKやC_4 PEPCに加え、院生の谷口光隆さん（現名古屋大准教授）や韓国からの留学院生Son Daeyoungさん（現Gyeongsang National University教授）らが中心に、院生の山田茂裕さんらも加わり、C_4光合成炭素代謝の酵素分子alanine aminotransferase (AlaAT)、asparagine aminotransferase (AspAT)、phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK）の構造と機能の研究も始めました（図10）。その主たる視点はisoformの同定、特異抗体の調製、それに可能になり始めたcDNAのクローニングでした。この一連の研究は、C_4光合成炭素代謝酵素への窒素配分を理解するための初段階に位置づけていましたから、AlaAT、AspAT、PEPCKなどの発現やその窒素依存性を調べる道具立ての調製です。また、養分吸収の潜在力を決めると考え、我々の研究戦略にやが

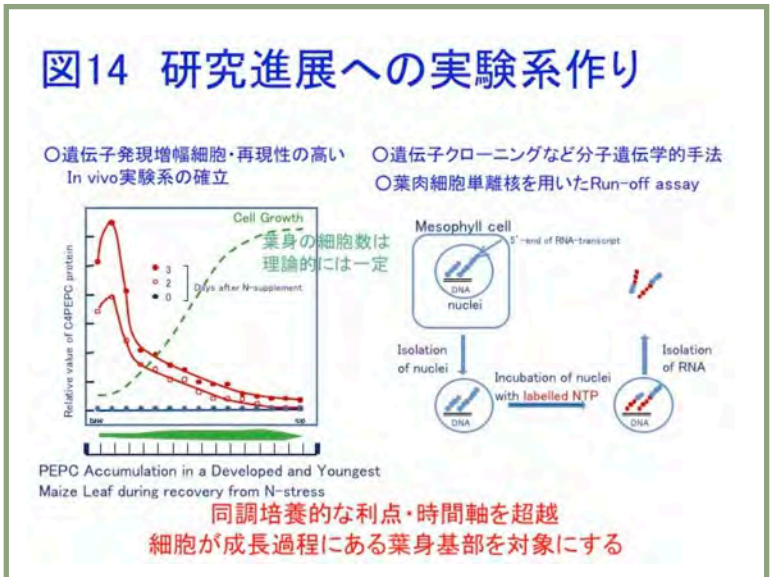
て必要となるであろうと考え、院生の長尾敏弘さんを中心にしてトウモロコシ細胞質膜のH^+-ATPase抗体を調製しました。この抗体はわれわれの当時の研究には威力を発揮しませんでしたが、後に細胞質膜のマーカーとして多くの研究者に活用されました。なお、PEPCKの研究は、当時農水省生物資源研からの客員研究員鮫島宗明さん（元衆議院議員）や院生の沼沢達夫さんらが進めていました。さらに、“C_4光合成の窒素利用効率はC_3光合成よりも高い”ということで、私たちはその核心となるC_4光合成のC/Nの実態とその制御の仕組み解明を目指していましたから、研究の視野を窒素同化に拡大し、炭素同化との接点であるGS/GOGAT (Glutamin-Synthetase/ Glutamin-Oxoglutarate-Aminotransferase)の研究はもっぱらトウモロコシを中心に進めました。新たに着手したこれら窒素同化酵素の研究には助教授として赴任直後の長谷俊治さん（現大阪大蛋白研教授・所長）の協力を仰ぎ、院生から助手になった榊原均さん（理研植物科学研究センターグループディレクター）をはじめ、院生の光部篤人さん・川端史郎さん・渡邊満さんらが進め、トウモロコシ両酵素の構造と機能、それにそれらのアイソフォームの同定と局在性を明らかにしました。手がけたC_4光合成同化系酵素の構造と機能解析を一括してみます（図11）。このうちGS1については、2006年に長谷さんらとの共同研究で、結晶構造が解明されています。

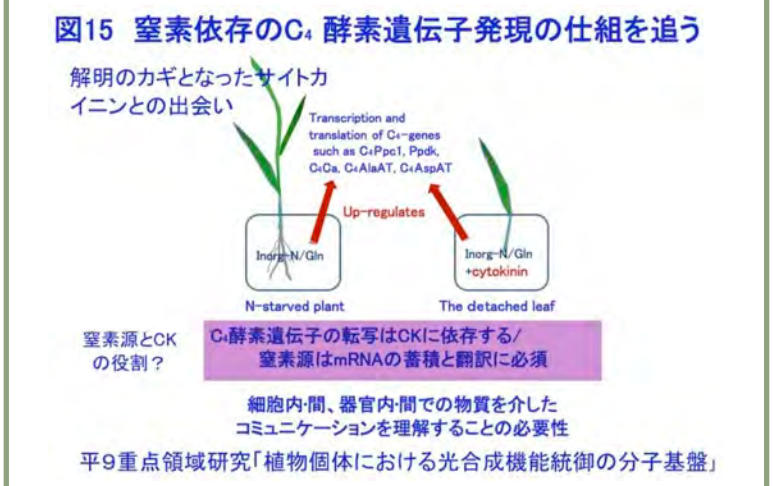
【展開期での徘徊】

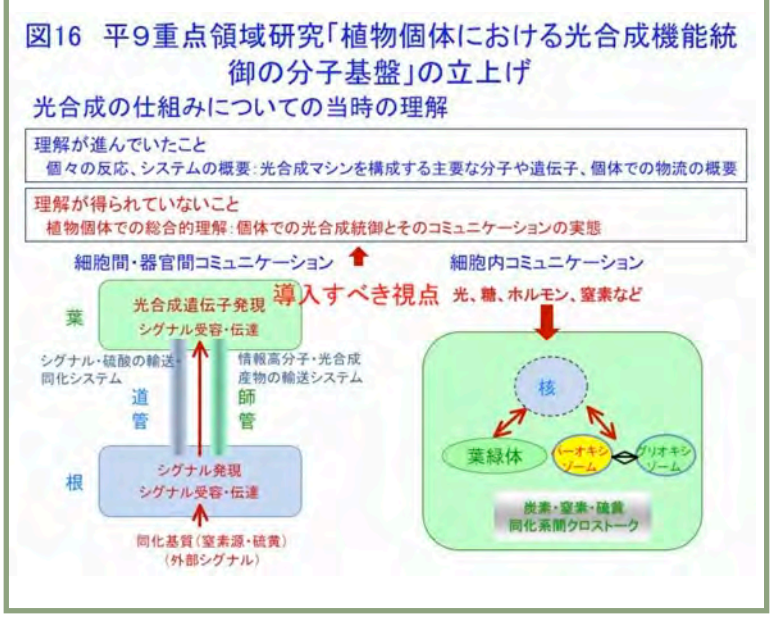
C_4植物における窒素配分とC/N制御の分子基盤の理解へと主な道具立てが整いましたから、本題の研究を進めました（図12）。初期にはインドネシアからの留学生Bambang Sugiharto さん（現Jember University 教授）が活躍してくれました。炭素同化酵素への窒素栄養応答のC_3-C_4植物の比較をしてみます（図13）。既に記載されているタバコやアカザ（C_3植物）ではRubiscoのタンパク占有率は窒素栄養に応答し増大します。ところが、トウモロコシではRubisco占有率は葉の窒素量に応答して低下するのに対し、C_4 PEPCとPPDK占有率はC_3のRubiscoと同様に、葉の窒素量に応答して増大することがわかりました。このことはC_4植物ではCO_2濃縮ポンプに窒素が優先して配分されることを意味しています。また、栄養要因として貴重な窒素を優先投資することはこの植物にとってCO_2濃縮ポンプ機能が生育を律する重要な代謝要因であることを意味するものと思います。この特性はトウモロコシとは代謝型の異なるC_4植物*Panicum miliaceum*や*Eleusine coracana*などでも共通したものでした。

トウモロコシにおけるこの窒素制御の仕組み解明にアプローチするために、より確かな実験系を組むことが重要であると考えました（図14）。すなわち、従前のように葉全体、それも令の異なる葉を対象にすれば、分析値は平均化されてしまいますから、確度の高い、しかも精密な実験結果を得るのは困難で









す。そこで、まず一定の個葉に着目し、その部位に応じた窒素配分の動向をみることにしました。そのため、窒素欠乏ストレス下で生育した幼植物の完全に展開した最も若い葉の細胞増殖の方向に沿って基部から葉端でのC_4 PEPCが窒素ストレスからの回復過程でどのように変動するのかを調べました。明らかになったことは、葉の基部（成熟途中の細胞）で酵素量の増加が最も増幅されるということでした。単子葉植物での細胞の成長は基部から先端にかけて進みます。ですから、基部から先端への距離は、単細胞の増殖曲線における時間軸に相当します。言い換えれば、この葉での細胞成長は単細胞生物の経時的な培養曲線と同じ様相にあります。以後、この葉の基部を選んで解析に供することにしました。この実験系に加え、解析の道具立てとなる当時少しずつルーティン化し始めた遺伝子クローニングなどの分子遺伝学的手法、それに葉肉細胞単離核を用いたrun-off assay法を確立しました。これらの研究には当時学生であった鈴木石根さん（現筑波大教授）とパリ南大学のPierre Gadal研からの客員研究員Claude CretinさんとBambangさんらが、また、C_4- carbonic anhydrase遺伝子についてはHatch研にいた客員研究員James Burnellさんが進めていました。

窒素依存のC_4酵素遺伝子発現の仕組みを追う上で、重要な発見は窒素欠乏切り取り葉での窒素回復過程を調べることによってもたらされました。それは、「窒素ストレス下にある個体では無機窒素またはglutamineを加えれば、PPDK/PEPCをはじめC_4遺伝子の転写・翻訳は正に制御されますが、切取り葉ではこれら窒素源に加えサイトカイニンがないとこれらの遺伝子の発現は起きない」ということでした。窒素源とサイトカイニンの役割の実態は鈴木石根さんやCretinさんが突きとめました。注目のC_4酵素遺伝子の転写はサイトカイニンに依存し、窒素源はmRNAの蓄積と翻訳に必須であるということがわかりました。この結末に向けての研究の引き金を引いたBambangさんによって、意外にもホルモンであるサイトカイニンとの出逢いが始まりました（図15）。

当時、サイトカイニンは根で合成され、地上部に運ばれるというのが定説でした。とすれば、C_4光合成はサイトカイニンを介し細胞内・間、器官内・間でのコミュニケーションが必要であるとの推論に到達しました。これを契機に、1997年に重点領域研究「植物個体における光合成機能統御の分子基盤」を立ち上げることになりました（図16）。光合成の仕組みについての当時の理解で進んでいたことは“個々の反応、システムの概要、すなわち、光合成マシンを構成する主要な分子や遺伝子、個体での光合成産物の物流”であり、一方、理解が届かなかったのは、“植物個体での統合的理解、つまり、その基となる個体でのコミュニケーションの実態”でした。この状況を踏まえ、この重点領域研究では「器官間コミュニケーション」と「細胞内コミュニケーション」の班立で、図に見られる各テーマの研究を進めました。私たちの研究室では、外部シグナルとして同化基質窒素源が受容・伝達され、いかにして光合成遺伝

子発現をもたらすかに焦点をあてた研究を進めました。

その一段として、サイトカイニンへの初期応答遺伝子の探索を試みました。その結果、発見された遺伝子は*ZmRR1*でした（図17）。このトウモロコシ遺伝子は、サイトカイニン初期応答植物遺伝子として最初に同定されたものですから、Cytokinin Inducible Protein 1 (Cip1) として当初名付けました。面白いことに、この遺伝子のホモログがほぼ同じ頃、Joseph Kieberらによってシロイヌナズナからも同定されました。*ZmRR1*の遺伝子産物の正体はバクテリアの情報伝達系として知られているHis-Asp phosphorelay transduction（2成分情報伝達系）のresponse regulatorのホモログであることがわかりました。このことに速やかに気づくことができたのは、同僚であり、バクテリア2成分系の生みの親である水野猛さん（名古屋大学教授）のおかげでした。この遺伝子の誘導はサイトカイニンに特異的で、根で窒素源によって誘導されたサイトカイニンが導管を運ばれ、葉でC_4遺伝子を発現誘導することがわかりました。

葉で誘導される*ZmRR1*が本当に根で窒素源によって誘導・合成されるサイトカイニンによって起きるのかどうか慎重に確かめることにこだわりました。そのため、窒素欠乏のトウモロコシ個体に窒素を補てんしたものとしないものからそれぞれ導管液を採取し、各々に窒素欠乏個体の切取葉に与えました（図18）。その結果、この遺伝子の誘導はサイトカイニンに特異的で、根で窒素源によって誘導されたこのホルモンが導管を運ばれ、葉で発現誘導されることがわかりました。

この一連の研究はトウモロコシで進めるとともに、水野猛さんと協力し、シロイヌナズナでも並行して進めました。その結果、バクテリアの2成分情報伝達系が植物でも機能していることが分かりました。図19はトウモロコシで私たちが同定したHis-Asp-relay 成分の一覧です。サイトカイニンレセプターやHis-containing phosphotransfer (HP)はサイトカイニンとは無関係に恒常的に発現していますが、response regulatorはサイトカイニンで誘導されるものとされないものに二分されます。

これら一連の成果をもとに、C_4 PEPCやPPDKなどのC_4光合成酵素遺伝子発現の窒素による制御のしくみを解析し、“サイトカイニンは窒素栄養の根から葉への内部シグナルである”と結論し、図20にある新しい概念を提唱しました。“酵素研究の果てにサイトカイニンとの出会いがあった、あるいは、たどりついた”ことになります。

さて、“C_4植物がCO_2濃縮ポンプに優先して窒素配分する”（図13参照）ことに話を戻しましょう。タンパク質への窒素配分には転写と翻訳が両輪となります。C_4光合成遺伝子の発現量はバルキーなるがゆえにその翻訳には多量の窒素源とエネルギーが必要です。窒素栄養の内部シグナル・サイトカイニンの役割は、C_4光合成遺伝子の転写をオンにし、同時にその翻訳に必要な窒素源とエネルギーの供給が開始されることを葉肉細胞に伝えることにもなります。それは産業社会で設備投資における電子マネーや為替の役割にも似ているようです。図20で描いた概念は“C_4光合成酵素への窒素優先配分がどのような仕

図17 “サイトカイニン初期応答遺伝子”の発見

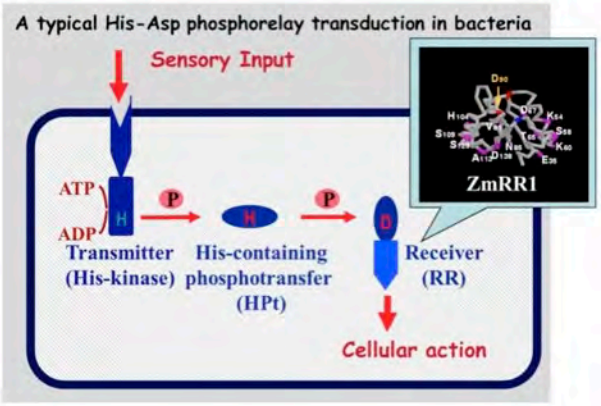
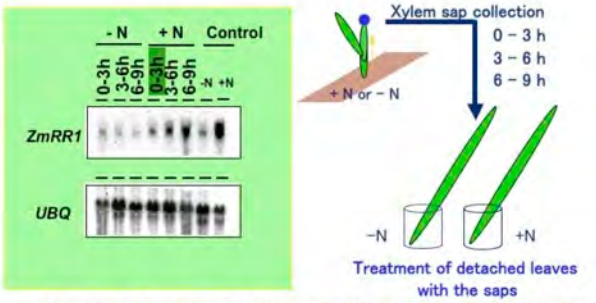
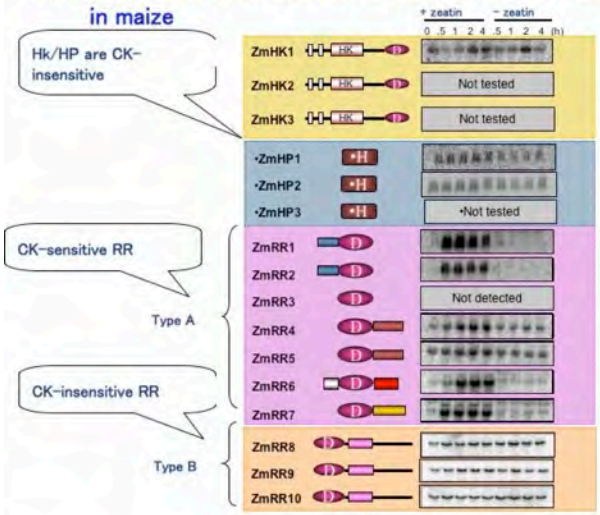


図18 *ZmRR1* is induced specifically by CKs in xylem sap



Preliminarily treatment of the saps with anti-CK antibodies causes loss of function in the saps (data not shown).

図19 Isolation and identification of His-Asp P-relay components in maize



組みを介して行われるのか？”という疑問に対して解へと導く一つの入り口にたどり着いたのであろうと考えます。その分子機構を追及することによって何がもたらされるのでしょう。私が期待するのは、サイトカイニンで誘導されるC_4光合成酵素への窒素優先配分の仕組み解明によって、これを活用し植物での酵素配分を変え得るアベニューが見出されるのではないかということです。若返ることができるのなら、是非とも追求したい課題です。

さて、サイトカイニンとの出会いの後、忘れえぬことは、このホルモンの合成系酵素の探索に学位取得を賭け粘り強く頑張った当時院生の武井兼太郎さんとそれを後押した当時の助手榊原均さんの努力です。多くの研究者が手を尽くした挙句にその初発合成酵素すら検出できないということで、”植物はサイトカイニンを合成しないのでは？”と考える人も出始めたにもかかわらず、isopentenyltransferase遺伝子をシロイヌナズナで同定することに成功しました。私の研究生活は実質的にこのあたりで終止符をうつわけですが、サイトカイニンを巡るその後の著しい研究の展開は皆さんがご存知と思います。

【明日を拓く皆さんへの期待】

最後に、明日を拓く皆さんへのエールを述べさせていただきます。“下手な考え休むに似たり”は日本人が好む言葉ですが、研究（すべての知的な活動）ではそれは充分考えつくした後の言葉ではないでしょうか？　和田昭允理研ゲノム総合科学研究センター初代センター長は中国の春秋時代から戦国時代に書かれた“孫氏の兵法・謀攻篇”にある「彼を知り己を知れば、百戦して殆からず。彼を知らずして己を知れば、一勝一負し、彼を知らず己を知らざれば戦う毎に殆し」を研究者にも実践を勧めておいでです。全く同感です。研究情報は確かに重要ですが、情報は見方によって様々です。明確な使途がないままに多くの情報に接すると主体性を失い、研究では単に流行の追従に陥りがちです。“行き先を決めるために情報を集めるのではなく、行く先を決めてから情報を集める”ことが肝要ではないでしょうか？皆さんにはアイデンティティーの高い、世界に一歩先んじる研究を期待します。また、化学、物理学、数学と連携し、植物に学びその機能を活用していただくよう願っています。

さて、皆さんの同意が得られると思いますが、酵素やタンパク質は互いに補完しつつ生命体を作っています。本プロジェクトに共通テーマである植物の高CO_2応答でも、補完機能が在るはずです。その実態はどのようなものでしょうか？それを理解する一つの手段は、植物が低CO_2の状態から高CO_2への状態に遷移する過程を解析することであろうかと思います。生命の補完機能の視点で、植物の高CO_2応答の輪郭が見えてくるのではと期待されます。

追記　この稿は昨年（'11年10月9日）支笏湖で行われた本新学術領域研究第２回若手の会にて講演した内容に若干手を加えたものです。上記の研究において述べた指導を賜った方々ならびに共同研究者以外にも枚挙の暇がないほど多くの方々の指導と協力を仰ぎました。皆様に感謝いたします。

アウトリーチ活動

Outreach

秋田県立横手高等学校

東京大学　野口　航

まだ寒い春先の平成24年3月24日に秋田県立横手高等学校の高校1年生11名が研究室見学に来てくれました。当大学の理学部や生物学科の紹介をした後、新学術領域研究で行っている植物の高CO_2応答の研究について説明しました。また、植物の葉で光合成反応が行われているときに、葉の中でCO_2がどのように移動して吸収されるかについて説明し、研究室で行っているCO_2ガス交換測定の見学をしてもらいました。当研究室の大学院生の溝上祐介君からのCO_2ガス交換装置の説明には、高校生からも熱心な質問がありました。

宮城県立仙台第三高等学校

東北大学　彦坂幸毅

平成24年5月25日に宮城県立仙台第三高等学校にて進学説明会を行い、東北大学理学部と理学部生物学科の紹介に加え、研究内容ということで「地球環境変化と植物」と題し、地球環境変化の様子、植物の高CO_2応答研究の現状、高CO_2環境での植物の進化について講演を行いました。写真は講演終了後に感想を書いていただいているところです。

愛知工業大学名電高等学校

中部大学　愛知真木子

平成24年6月14日に、イチロー選手の母校愛知工業大学名電高等学校でキャリア教育の一環として模擬講義を行いました。「東海丘陵湧水湿地に自生する食虫植物トウカイコモウセンゴケの保全に向けた生態学と分子生物学融合による取り組み」と題して、二酸化炭素濃度およびNOx濃度の上昇に伴う植物の応答の話をしました。「CO_2濃度が上昇していることは知っていたけど、夏と冬でCO_2濃度が違うことにびっくりしました。」「植物もCO_2濃度の影響を受けるのかと驚きました。」等の感想が寄せられました。

新学術領域総括班からの報告

Information

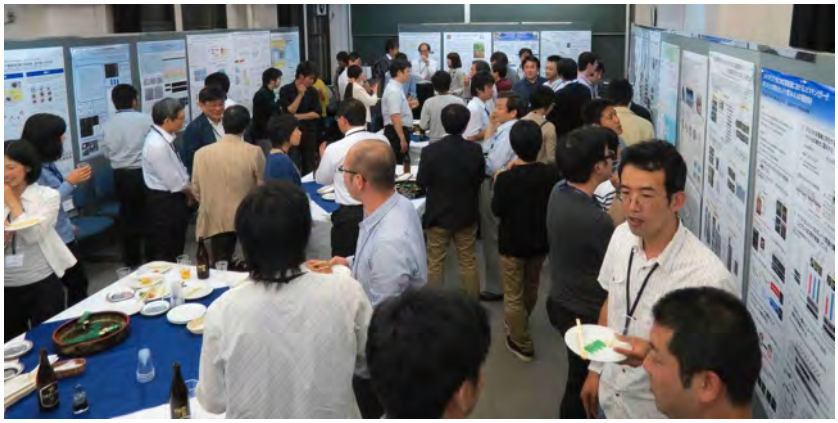
第５回班会議

雪がちらつく仙台で本領域の第5回班会議が、2012年1月21日（土）朝から22日（日）夕方まで、東北大学　大学院農学研究科・農学部　講義棟にて開かれました。会議では寺島領域代表の挨拶の後、計画班9班、公募班16班、班友1班の計26班の各班が、23年度の研究成果を発表し、活発な議論が行われました。新学術領域研究がスタートして3年目、公募班を迎えて2年目を終え、各班ではさまざまな研究成果が発表されました。また各班の発表から、各レベルにおける研究やレベルを超えた共同研究が活発に行われていることがわかりました。

本会議は、東北大の牧野班を中心にして開催されました。お忙しい中、ご尽力ありがとうございました。

第６回班会議

新たに公募された12班を迎えた本領域の第6回班会議が、2012年5月19日（土）午後から20日（日）夕方まで、東京大学理学部2号館講堂にて開かれました。この班会議では、本領域研究の最後の2年間の計画を中心に、各班が発表しました。



第６回総括班会議　議事録

日時：2012年1月21日（日）12:00～13:15

場所：東北大学　大学院農学研究科・農学部　講義棟

出席者：寺島一郎（代表者），及川武久，杉山達夫，山谷知行，和田英太郎（以上，評価委員），豊島崇徳，真野昌二（以上，学術調査官），各計画班代表者，彦坂幸毅（広報誌編集委員長），楠見健介（HP管理者），野口航総括班班員

議題　寺島領域代表の挨拶に続いて，以下の審議を行った。

1. 中間評価について

寺島領域代表から、今年度9月に実施された中間評価の結果について紹介が行われた。結果について、豊島・真野両学術調査官、各評価委員から意見が出された。レベルの異なる分野間の連携がうまくいき始めてきているが、外部へのアピールやアウトリーチ活動を行うことが大事であることなどアドバイスがあった。

2. 次回班会議と若手の会、勉強会の開催時期と場所について

来年度からは、新規の公募班が参加する予定なので、スタートアップの班会議を5月19日（土）―20日（日）に東京大学で（寺島班担当）、若手の会を10月6日（土）―8日（月）に鎌倉周辺で（伊藤班担当）、成果報告を行う班会議を2012年1月26日（土）―27日（日）に九州大学で（射場班担当）開催することとした。若手の会の期間に、伊藤班と射場班が担当して「気孔応答」の勉強会を開くことになった。

3. 国際シンポジウム・アウトリーチ活動の開催について

一般向けの記事としてのアウトリーチ活動として、和文誌「化学と生物」に植物の高CO2応答に関する連載記事を申し込むことが決まった。またこの新学術領域が終了し、成果が出たときに、和文誌での特集記事（「遺伝」が候補となっている）と英文での特集記事をまとめることとなった。

講演としてのアウトリーチ活動として、2013年に札幌で開催される予定の日本植物学会と日本植物分子細胞生物学会において、一般向けのシンポジウムを申請することとした。また2012年度に東京大学で中・高校生向け（もしくは中学校・高等学校の先生向け）に講演会を開催することとした。

2013年度に植物生理生態学の分野で国際シンポジウムを開催することとした。FACEを行っているイリノイ大学の研究者との日米二国間会議などが提案された。

4. その他

山谷評価委員からJSTの事業との連携の重要性、杉山評価委員からアウトリーチ活動の重要性についてアドバイスがあった。

第７回総括班会議　議事録

日時：2012年5月20日（日）12:30～13:10

場所：東京大学　大学院理学系研究科　理学部2号館221号室

出席者：寺島一郎（代表者），及川武久，山谷知行，和田英太郎（以上，評価委員），真野昌二（以上，学術調査官），各計画班代表者，彦坂幸毅（広報誌編集委員長），野口航総括班班員

議題　寺島領域代表の挨拶に続いて，以下の審議を行った。

1. PCP special issueについて

本新学術領域研究が終わる年度の2014年1月から3月にPlant and Cell Physiology誌に本領域研究の内容の特集号を組むことについて議論した。PCPの編集実行委員の榊原班員の他に、寺島領域代表と柳澤班員がguest editorとして参画することとなった。編集を担当する3名で、特集号の内容や執筆者の選定を行うこととなった。

2. 次回班会議と若手の会

伊藤班の研究員の飯尾班員から若手の会（2012年10月6日（土）―8日（月））の計画について、説明がなされた。今年度の報告班会議を射場班が担当として、九州大学で2013年1月26日（土）―27日（日）に開催されることも確認された。来年度の若手の会は廣瀬班、報告班会議は小俣班が担当することが決定された。

3. 国際シンポジウム・アウトリーチ活動の開催について

野口班員から、昨年度2012年3月に東京大学理学部2号館において、高校生11名の研究室見学の際に、本新学術領域研究の内容説明がなされたことが報告された。真野学術調査官からそのような活動もアウトリーチ活動と見なせる旨の説明があり、今後、高校などへの出前授業や研究室見学の際に、本新学術領域研究と関連のある話題を提供したときには、アウトリーチ活動として見なし、広報誌やHPでアピールしていくこととなった。

その他、一般向けの講演活動として、総括班で2件開催することとなった。来年度夏に札幌で開催される日本植物分子細胞生物学会における一般向けシンポジウムは、山口班員と相談し、開催する準備を進めることにした。また、来年度5月の東京大学五月祭のときにも、理学部2号館講堂でも一般向けのシンポジウムを開催することとなった。

彦坂班員から、「化学と生物」に植物の高CO_2応答に関する連載記事の申込み手続きを行った旨説明がなされた。

来年度、日米二国間会議などの国際シンポジウムを伊藤班が中心となって計画を進めることとなった。

4. その他

真野学術調査官から、次期新学術領域研究についての文部科学省で審議されている内容について紹介がなされた。

領域からの案内

第3回 若手ワークショップ

日時：2012年１0月6日 (土)　～　8日(月)

場所：マホロバ・マインズ三浦（三浦半島・三浦海岸）

http://www.maholova-minds.com/biz/index.html

第7回 班会議

日時：2013年１月26日 (土)　～　27日(日)

場所：九州大学

記事募集

ニュースレターは年2回の発行となります。計画研究や、公募研究の内容紹介、そして領域の大きな目標の一つである若手研究者育成のため、若手の自己紹介を積極的に行っていく予定です。さらに、研究成果の紹介も行いたいと思います。記事の寄稿をお願いいたします。

掲載を希望される方は編集委員会の彦坂幸毅または愛知真木子までお気軽にご連絡ください。掲載希望がない場合は、編集委員会が人選し、記事執筆を依頼します。その際には是非ともお引き受けくださいますよう、よろしくお願いいたします。

植物高CO_2応答ニュースレター　6号

2012年7月発行

発行人　寺島 一郎

編集委員会　野口 航・種子田 春彦・愛知 真木子・楠見健介・彦坂 幸毅（編集長）

表紙　安立美奈子

連絡先　彦坂 幸毅　hikosaka@mail.tains.tohoku.ac.jp

愛知 真木子　makiko@isc.chubu.ac.jp

植物高CO_2応答ニュースレター　第6号