

「C4回路で機能するナトリウム依存性ピルビン酸輸送機構の解明」 にまつわる話[‡]

広島大学大学院 理学研究科 生物科学専攻
古本 強

1. 序

2010年の6月に東京大学駒場キャンパスにて第一回光合成学会が開催されました。この記念すべき学会のシンポジウムに光栄にも招かれ、そこで「C4回路で機能するナトリウム依存性ピルビン酸輸送機構の解明」と題した講演を行いました。この講演内容は、プラスチド局在型のナトリウム依存性ピルビン酸輸送体の単離と解析について近年著者が行っている実験結果を報告したものです。そして、この講演内容を本欄において紹介することが流れ上求められているのですが、実はこの原稿を書いている時点においてまだ論文文化にいたっておらず、研究内容を公表する事態は避けねばならないこととなっています。シンポジウムを企画された埼玉大学の西田先生は、この事態を想定されており、こうした場合には周辺の話題提供でかまいませんと、とても親切な提案をくださいました。ここではそのお言葉に甘えて、当該輸送体の単離・解析に至るまでの道のりの中でも論文では触れななさそうな話題、とくに研究背景について記述しようと思います。

2. 「ピルビン酸輸送体を単離してみたい」と思ったきっかけ

そもそもピルビン酸輸送体を単離してみたいと思ったいきさつは何だったのか、それを思い出してみるところから始めようと思います。筆者は、10年以上も前に京都大学農学部の泉井桂研究室でトウモロコシの初期炭酸固定酵素「ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)」のリン酸化を介した活性制御機構の解明を研究テーマに卒業研究に取り組んでいました。その当時は、植物にカルシウム依存性プロテイン

キナーゼ (CDPK) が存在するという発見が Nature 誌に報告されるなど、リン酸化シグナルカスケードやプロテインキナーゼやらといった言葉が各ジャーナルをにぎわせており、また PCR の開発がノーベル賞の対象になるなど、分子生物学が盛んになりつつある状況でした。トウモロコシ PEPC もリン酸化により生化学的性状が変わるのでこれに関わるキナーゼ分子を同定するべく、日夜 PCR をしていました。この実験過程で、本来の目的とは異なるのですが、CDPK に類似したプロテインキナーゼを単離することに成功しました。その生化学的特徴が一風変わっていると確認できましたので、これをネタに、ゴードン会議という国際会議に出かけました¹⁾。これが私の学会デビューでした。

その会場で、当時名古屋大学におられた榊原さん（現在、理化学研究所）と谷口さん（現在、名古屋大学農学部）に出会いました。そして「君の単離した遺伝子はトウモロコシの葉肉細胞、それとも維管束鞘細胞、どちらに発現しているの？」と質問されたのです。実は、それまでトウモロコシを育てたこともなく、二つの細胞で光合成がなされるというC4光合成の基礎すら理解していませんでした。泉井教授の植物生理学の授業では聴いていたに違いないのですが、自分の実験とどうつながるか考えたこともなかった、というのが正直な気持ちでした。もちろん返答できません。榊原さんは、さらにいくつかの質問の後、そんな私を指して「Kanai & Edward も知らないなんて、泉井先生、この学生は勉強不足です。」と今から思えば極めて的を得た指摘をくださいました。

Kanai & Edward²⁾とは、この光合成学会の皆様なら

[‡] 解説特集「最新の光合成研究と未来」

* 連絡先 E-mail: tfurumoto@hiroshima-u.ac.jp

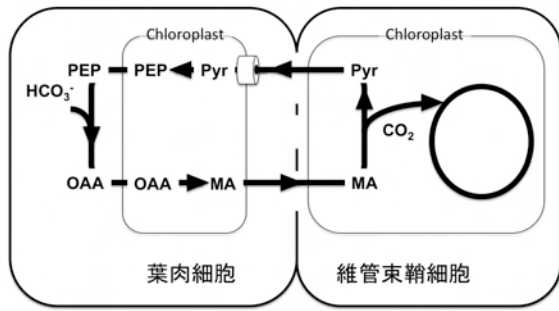


図1 トウモロコシにおけるC4光合成炭素代謝回路の模式図とピルビン酸輸送体の位置

ホスホエノールピルビン酸 (PEP)、ピルビン酸 (Pyr)、オキサロ酢酸 (OAA)、リンゴ酸 (MA)。簡略化のためカルビン回路は丸で示している。

きっとご存知の論文かもしれません。1973年にPlant Physiology誌に記載された金井龍二先生の論文のことです。この論文ではC4植物において葉肉細胞と維管束鞘細胞の二つを分離する技術を確認したことが報告されています。この論文の後、この技術を元にそれぞれの細胞での代謝酵素の偏りが広く調査され、現在のC4光合成炭素代謝回路の理解が飛躍的に進歩しました。なお、金井先生はその手法を確認された後、葉肉細胞葉緑体の包膜にピルビン酸輸送活性があることを突き止められました(図1)。さらに、それがC4光合成の重要な輸送機能を担っていることを明らかにされ、この性状解析を行われました。輸送体の解析は一般にとっても難しいです。膜に正確に配置されてこそ輸送活性を示しうるということは、単離・精製を中心とする生化学的解析には持ち込みにくいことを意味しています。結果、現在のこのポストゲノムの時代にあっても、植物を含むヒト・酵母・線虫・昆虫のミトコンドリアやプラスチドなどの細胞内オルガネラに存在するピルビン酸輸送体は、その重要性にもかかわらずいまだに同定されていません。

分子生物学的手法には習熟していた私は、mRNAの配列から攻めれば生化学的な難しさを回避してC4回路上で機能する葉緑体ピルビン酸輸送体の分子実体に近づけるのではと考えました。これはかっこよく表現しただけで、本当は、前述のKanai & Edwardの論文に刺激され、この技術と自分の分子生物学的手法を組み合わせれば何か出るかも、と思ったにすぎません。その「何か」のうちの一つにC4光合成で機能するピルビン酸輸送体ははいっているかとも思いました。

トウモロコシの葉肉細胞と維管束鞘細胞を分離し、

各々からmRNAを回収します。そしてこれを鋳型に放射標識すると、葉肉細胞あるいは維管束鞘細胞に発現するmRNAの質および量を表したプローブができます。これをトウモロコシ全葉から調製したcDNAライブラリーに対してハイブリダイズさせ、シグナル強度を比較すれば二つの細胞種で発現量が異なる遺伝子を探することができます。当時、泉井研究室の助教授であった畑信吾先生(現在名古屋大学 農学部)の授業で習ったディファレンシャルスクリーニング(plus/minus)法の原理に基づいた方法です。「きっとピルビン酸輸送は葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体とで向きが違っているから異なる分子によってコードされているに違いない」として「きっと高発現しているに違いない」、この二つの仮説が満たされるのであれば、「とれる」と考えました。

このディファレンシャルスクリーニングは、半分期待通りに機能しました³⁾。そして、私がドクターを修了するに十分な全くその存在を予期しなかった遺伝子(ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PCK))の発見⁴⁾に結びつきました(図2)。後にわかったことですが、トウモロコシPCKは失活しやすいタンパク質で、維管束鞘細胞の調製の際に部分的に不活性化されている可能性が考えられました。それで酵素活性を主とするそれまでの解析からはトウモロコシ中に高発現するとは考えられないでいた訳です。つまり、不活性化しやすいタンパク質についてもmRNAから攻めれば単離できることがわかりました。ここで明らかになったトウモロコシにおいて二つの脱炭酸酵素(NADP依存性リンゴ酸酵素とPCK)が機能する理由については、未だにわかっていません。また、こうした成果の一方で、結局ピルビン酸輸送体の候補遺伝子を発見するには至りませんでした。

3. 転機

博士課程修了後、東京大学に職を得ました。シロイヌナズナの葉の糖代謝調節について研究した後⁵⁾、一年半後には再び京都に戻りました。その頃の泉井研究室の研究状態は大きな転機を迎えていました。PEPCの結晶構造解析と生化学的解析という研究テーマについては独自性を保てていましたが、もう一つの中心的研究テーマだったPEPCリン酸化酵素遺伝子の探索がついにイギリスのNimmo博士によってなされ⁶⁾、長らく競争していた案件が終了していたのです。PEPC-PK

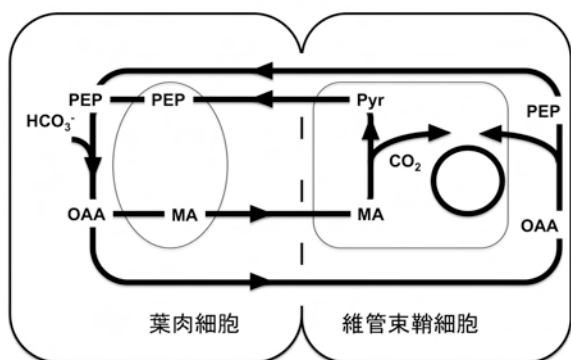


図2 トウモロコシにおけるNADPリンゴ酸酵素による代謝回路（内側）とPCKによる代謝回路（外側）の存在を示した模式図

グループ出身の私には、とてもショックな出来事でした。

その当時、泉井研究室ではフラベリア属の植物を扱い始めていました。この属の植物では、つい最近C4化への進化が始まったとされ、典型的なC4種以外にもC3種が存在するほか、なんと中間的な性状を示す種までが存在します⁷⁾。「つい最近」というのがみそで、それぞれの種間での遺伝的背景が近く、遺伝子配列は各々の遺伝子で酷似しています。また*Flaveria bidentis*という種では比較的容易な形質転換法が確立されており⁸⁾、次世代のモデルC4植物ともくされてきました。話が若干ずれますが、この形質転換が容易という特徴を生かし、C4植物種 (*F. bidentis*) からPEPC-PK遺伝子を単離し、この機能抑制植物を作成するために、オーストラリアに渡りました。形質転換植物の後代について生理解析を行い、その結果については論文にしましたが⁹⁾、これはずいぶん後の話です。いずれにしても私が泉井研究室に赴任する前に、すでにフラベリアという植物を扱う研究土壌が泉井研究室には用意されており、赴任後にはこのフラベリアなる植物をうまく研究にいかせないかと考えていました。

これまではKanai & Edwardの論文に影響されて、葉肉細胞と維管束鞘細胞のDifferenceに着目し、その観点から離れることができないでいましたが、ある日、C3種とC4種間での発現比較はどうだろうと思ひ立ちました。今回のこの寄稿を機にノートを見直したところ、このアイデアの元となるメモがあり、「教授室で議論の際に」という一文が添えられていました。これまで長らく自分だけの思いつきとっていたのですが、泉井先生との会話の中でたアイデアというのが

本当のようです。このアイデアの骨子は、フラベリア属植物の遺伝的背景の近さを利用してC4種フラベリアに高発現する遺伝子を探すというものです。C4光合成関連の既知の遺伝子はすべてC4植物に高発現していますから、C4光合成に関連する輸送体も同様に高発現している可能性があります。

この考えに同調し、研究テーマをかえたのがその当時修士の学生だった山口君（現在UCバークレイでポスドク）でした。そして100個ほどのC4種フラベリアに高発現する遺伝子クローンのなかから、新規輸送体候補を見つけたのです。解析を始めてから比較的日の浅いときでした。その後、8年ほどの時間を要した一連の解析を経て（ここは論文の肝なので、略します）、この遺伝子がプラスチド局在型のナトリウム依存性ピルビン酸輸送体の分子実体であるとわかったのです。

4. 結び

「犬も歩けば棒に当たる」を体現するかのような、まさに人にあたりながら意見をもらいながらの輸送体の探索でした。もっともはじめのアイデア時点での失敗もあり、時間もかかりました。それらの失敗からめげずに次のアイデアを考えて、そしてやっこのことでピルビン酸輸送体の候補を見つけることができました。ここでは記述できなかったその機能証明にも、多くの人に教えてもらいまた多くの失敗を重ねました。でもなにかを探すというのはこういうことなのかもしれません。最近、また違う研究テーマに出会い、また別の歩き方をしてみたくなっているので、引き続き犬のように歩いて棒にあたってみようと思います。今回は研究に至る背景について記述したために、発見に際して感じたことを述べることはできませんでした。別の機会があれば、そこで述べることにします。

Received March 17, 2011, Accepted March 26, 2011,
Published April 30, 2011

参考文献

1. Furumoto, T., Ogawa, N., Hata, S., and Izui, K. (1996) Plant calcium-dependent protein kinase-related kinases (CRKs) do not require calcium for their activities,

- FEBS Lett.* 396, 147-151.
2. Kanai, R., and Edwards, G. E. (1973) Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies, *Plant Physiol.* 51, 1133-1137.
 3. Furumoto, T., Hata, S., and Izui, K. (1999) cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase, a bundle sheath cell-specific enzyme, *Plant Mol. Biol.* 41, 301-311.
 4. Furumoto T., Hata S., and Izui K. (2000) Isolation and characterization of cDNAs for differentially accumulated transcripts between mesophyll cells and bundle sheath strands of maize leaves, *Plant Cell Physiol.* 41, 1200-1209.
 5. Furumoto T., Teramoto M., Inada N., Ito M., Nishida I., and Watanabe A. (2001) Phosphorylation of a bifunctional enzyme, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase, is regulated developmentally in rosette leaves of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 42, 1044-1048.
 6. Hartwell J., Gill A., Nimmo G.A., Wilkins M.B., Jenkins G.I., and Nimmo H.G. (1999) Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression, *Plant J.* 20, 333-342.
 7. Ku M. S, Wu J., Dai Z., Scott R. A., Chu C., and Edwards G. E. (1991) Photosynthetic and photorespiratory characteristics of flaveria species, *Plant Physiol.* 96, 518-28.
 8. Chitty J. A., Furbank R. T., Marshall J. S., Chen Z. H., and Taylor W. C. (1994) Genetic transformation of the C₄ plant, *Flaveria bidentis*, *Plant J.* 6, 949-956.
 9. Furumoto T., Izui K., Quinn V., Furbank R. T., and von Caemmerer S. (2007) Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase is not essential for high photosynthetic rates in the C₄ species *Flaveria bidentis*, *Plant Physiol.* 144, 1936-1945.

An Accompanying Story for
"Identification of a Plastidial Sodium-Dependent Pyruvate Transporter"

Tsuyoshi Furumoto *

Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University