植物の炭酸固定酵素, ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ, を特異的にリン酸化するプロテインキナーゼとその調節

Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in higher plants and its regulation

京都大学大学院生命科学研究科

*名古屋大学大学院理学研究科

泉井 桂 Katsura Izui

畑 信吾 Shingo HATA

古本 強 Tsuyoshi FURUMOTO

上野 宜久* Yoshihisa UENO

Key words: phosphoenolpyruvate carboxylase kinase; C₄-photosynthesis; root nodule; redox regulation; thioredoxin

1. PEPC の反応と生理的役割¹⁾

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC, EC 4.1.1.31) は, Mg^{2+} の存在下にホスホエノールピルビン酸 (PEP) に HCO_3^- を固定して, C₄-二塩基酸のオキサロ酢酸と Pi を生成する反応を不可逆的に触媒する. 本酵素は多くの細菌, 原生動物, すべての植物に分布するが, カビ, 酵母, 動物には存在しない. 本酵素は, 細胞質に存在し, 広く生合成およびエネルギー代謝を支えるいわゆるアナプレロティックな役割をもつ. 植物においては, さらに多様な生理的役割をもち, 特化した機能を担うアイソフォームも存在する. トウモロコシ・サトウキビなどの C₄ 植物やサボテン・カラコエ・パイナップルなどのいわゆる CAM 植物では, 光合成のための二酸化炭素を大気から捕集する役割をもつ. 一方, マメ科植物の根粒においては, 根粒内に共生する窒素固定細菌が炭素源として C₄-二塩基酸しか利用しないため, PEPC は高レベルに発現されてリンゴ酸 (MA) を供給する役割をもち, さらに, 細菌から供給された NH_3 をアミド化合物やウレイド化合物に変換するための炭素骨格を用意する役割をもつ.

2. PEPC 活性の調節^{1)~3)}

PEPC をめぐる調節は生物種によって多様である. 高等植物では, 遺伝子発現における調節に加えて, アロステリック効果とリン酸化による酵素活性の調節を受ける. 植物酵素は一般にグルコース 6-リン酸 (G6P) による活性化と MA またはアスパラギン酸 (Asp) によるフィードバック阻害を受ける. PEPC はさらに, リン酸化によって活性化さ

れる. すなわち, PEP や G6P に対する親和性が高くなり, MA や Asp に対する感受性が低くなる. C₄ 植物では C₄ 光合成に関与する PEPC (C₄ 型 PEPC) は, 光合成の盛んな昼間にリン酸化され, 夜間に脱リン酸化される. また, 根粒の PEPC は, 地上部での活発な光合成によってスクロースが葉から十分量転流されているときにリン酸化され, 暗期に入って転流量が不足すると脱リン酸化される.

リン酸化を受けるアミノ酸残基は, PEPC の N-末端近傍の 1 個の Ser であり⁴⁾, これが調節的リン酸化に必要な十分な残基である. 高等植物の PEPC においてこの領域のアミノ酸配列は, (Asp/Glu) (Lys/Arg) XaaXaaSerIle AspAlaGlnLeuArg (Xaa は不特定のアミノ酸残基) であり高度に保存されている⁵⁾. しかし, 下等植物の PEPC には存在せず, 細菌では欠損している. 一般に PEPC は分子量約 10 万のサブユニット四つからなる比較的大きな酵素であり, その立体構造は, 甲斐ら (阪大工) および筆者らの共同研究により, 大腸菌およびトウモロコシ酵素について最近解明された^{6), 7)}. しかし, リン酸化を受ける領域は一定の立体構造を与えず, おそらくフレキシブルなのであろうと推測される. リン酸化による活性化の分子機構としては, リン酸化により負電荷を帯びた N 末端ペプチドが, 正電荷を帯びた Asp 結合部位 (アロステリック阻害部位) 近傍に電気的に誘引されて滞留し MA や Asp の接近を妨げるのではないかと仮説が提唱されている⁶⁾. しかし, この仮説では説明できない実験事実もあり, 今後の検討が必要である.

3. PEPC のリン酸化酵素^{2), 8)}

PEPC のリン酸化状態は, 主としてプロテインキナーゼ (PK) の活性の変動によるとされている. この PK は当初, 植物特有の, カルモジュリン (CaM) 配列を分子内にもつ

Ca²⁺ 依存性 PK (CDPK) ではないかと考えられたが^{9), 10)}, そうではなく, Ca²⁺ 非依存性で分子量が約 3 万ないしは 3.7 万の PK でしかも PEPC にしか作用しない極めて特異性の高い PK (PEPC-PK) が主役であることがほぼ明らかにされた. PEPC-PK 活性の環境応答や本酵素の半減期などについて示唆的な知見はあるが, 調節の分子機構を解明するためには, その cDNA のクローニングおよび抗体の調製などが不可欠である.

4. PEPC-PK の精製と cDNA クローニングの顛末

PEPC-PK の cDNA クローニングは国際的な競争となり, 筆者らはショットガンのクローニングに失敗したのち, 正攻法に切り換えて PEPC-PK の精製から始めた. 酵素含量は極めて低く, 約 3 kg のトウモロコシ緑葉から 100 万倍以上精製して初めて均一標品を得たがその量は約 0.1 µg で 5 年前の技術では部分アミノ酸配列情報は得られなかった¹¹⁾. そうこうするうちに最初に成功したのは英国の Nimmo らであった. 彼らの方法はエレガントで一読に値するが, CAM 植物のカランコエから所期の cDNA クローンを得たのである¹²⁾.

後れをとった筆者らは, 彼らの配列を参考に, C₄ 植物のモデル植物であるキク科の *Flaveria trinervia* から C₄ 植物としては初めて cDNA クローニングに成功し¹³⁾, さらにマメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) から取得した¹⁴⁾. 現時点では, 10 生物種から 13 の cDNA 分子種が PEPC-PK に帰属され, データベースに登録されている. これらのうち実際に組換え体を調製して PEPC-PK 活性を証明したものは 4 種に過ぎず, 帰属の正否も確定的ではない.

5. PEPC-PK 遺伝子の発現

C₄ 光合成や根粒の代謝に関与する PEPC 遺伝子はハウスキーピング代謝の PEPC (C₃ 型 PEPC) 遺伝子とは別個に存在するが, PEPC-PK も同様にアイソフォームが存在するか否かはいまだ不明である. しかし, 筆者らが取得した *F. trinervia* の PEPC-PK の mRNA は緑葉において強く発現し, そのレベルは明暗に应答して顕著な増減を示すことから, 少なくとも C₄ 光合成に関与していると推察された¹³⁾. 一方, ミヤコグサの根粒における発現は, 光合成産物 (スクロース) の根への転流が枯渇すると低下することが示された¹⁴⁾. また, PEPC-PK の発現場所を *in situ* ハイブリダイゼーションによって調べると, 根粒形成の初期には, 発現は根粒感染領域の先端側に局在しており, 基部においてのみ強く見られる PEPC とは対照的である. しかし根粒が成熟するとこれらの発現部位は根粒全体に広が

り, 互いに一致した (図 1)^{14)~16)}. このような発生に伴う発現パターンの相違や変化はユニークであり, これを支配する地上部あるいは根粒菌からのシグナル伝達機構は極めて興味深い.

6. PEPC-PK の構造

cDNA から推測された一次構造は, PEPC-PK が約 280 残基からなり, 分子量は予想どおり約 3 万であることを示した. これは, 本酵素が PK のコア部分のみからなることを意味し, PK としては既知のものの中で最小である⁸⁾. 10 種の生物間で一次構造を CLUSTALW によって比較すると, アミノ酸残基の一致率は 24.6% で, 同類アミノ酸を含めた全体的な類似率も 43.1% となり, かなり低い. PK のドメイン VIII のいわゆる T-loop の自己リン酸化の有無については未だ実験的に検証されていない. アミノ酸残基が連続して 4 個以上一致する箇所は四つに過ぎないが, ドメイン I, VIB, VII, VIII, IX, および X において保存性が高く, かつ固有の配列や残基も見いだされる. コア部分の配列を用いて分子系統樹を作ると最も近縁なのは, CDPK となり, 動物由来の PK の中では CaM kinaseII (CaMKII) となるので, PEPC-PK は Ca²⁺ 関連 PK と進化的に近いといえる.

7. PEPC-PK 活性のレッドックス制御¹¹⁾

筆者らは上述したトウモロコシ PEPC-PK の精製実験の過程で本酵素がメルカプトエタノールなどの還元剤の非存在下では極めて速やかに不活化し, ジチオスレイトール (DTT) によって回復することを認めた. さらに酸化型グルタチオンによっても不活化され, DTT により回復するが, チオレドキシン (Trx) が電子供与体としては DTT より有効であることを見いだした. 葉緑体においては以前から NADP リンゴ酸脱水素酵素や Calvin 回路のフルクトースビスホスファターゼなど多くの酵素が Trx を介するレッドックス調節を受けることが知られており, Trx が酸化還元状態を知らせるシグナル伝達分子の一つであるとされている. 筆者らの PEPC-PK は, 酸化還元状態が葉緑体ほどに顕著には変動しないと推測される細胞質に局在するが, 絶えず変動する光合成条件や生存を脅かす酸化ストレスなどに应答して活性調節を受けるのではないかという作業仮説に基づいて現在研究を行っている (図 2). 実際, 酸化ストレスを受けるとされている低温明条件下で, PEPC のリン酸化の度合いは顕著に低下することを, リン酸化 PEPC 特異的抗体¹⁷⁾を用いて観察している (未発表).

図1 ミヤコグサ根粒における PEPC と PEPC-PK 遺伝子の発現

A～D, 成熟根粒; E～H, 形成途中の根粒. mRNA 発現部位をアンチセンスプローブで紫色として検出した (A, E は PEPC; C, G は PEPC-PK). 小さいパネルはセンスプローブを用いた対照実験の結果. スケールバー=200 μ m.

図2 C_4 光合成の PEPC-PK 活性のレドックス調節の作業モデル

図3 *Flaveria trinervia* の PEPC-PK の推定立体構造と Cys 残基の位置

すでに明らかにされた CaM kinase II の立体構造に PEPC-PK のポリペプチド鎖を上乗せして得られたもの [甲斐 泰, 松村浩由両氏 (阪大・工) のご厚意による].

8. おわりに

PEPC-PK は PK のコアドメインのみからなる疎水性の強い可溶性タンパク質であるが、cAMP 依存性 PK(PK-A) のように調節タンパクが存在する可能性も指摘されており¹⁸⁾、今後の研究が待たれる。PEPC-PK の極めて高い特異性はリン酸化部位周辺のアミノ酸配列のみならず、PEPC 分子の他の部分も認識されているからではないかと推測されているが、この分子機構の解明を目指して、両者の複合体の結晶構造解析および部位特異的変異導入による解析を阪大の甲斐研究室と共同で行っている。

PEPC-PK 活性のレドックス調節については、これが分子内のジスルフィド結合の生成・開裂によるのかどうか、よるとすればどの Cys 残基が関与するのかを *in vitro* の実験により明らかにしつつある。おそらくは、*F. trinervia* の PEPC-PK の場合、図 3 に示すように触媒部位近傍に位置すると予想される Cys 残基 (Cys26, 37, 90, 125) のうちの二つであろう。さらに、*in vivo* の実験としては、*C₄* 植物である *F. bidentis* の形質転換系を用いて、まず PEPC-PK の抑制株を作出して *C₄* 光合成活性への寄与を評価し、さらに、この抑制株にトウモロコシの PEPC-PK の野生型ならびにレドックス制御能の変異型をそれぞれ導入発現させてそれらの光合成能およびストレス応答能を比較することを計画している。これらの研究を通して、*C₄* 光合成におけるシグナル伝達の機構の一端が明らかになり、光合成能の増強や調節原理の応用などの道が拓けるであろう。

PK のレドックス調節はトピックスになりつつあり、これまでに動物では ASK1 (MAPKKK)¹⁹⁾ や PK-C²⁰⁾ が、最近はさらに PK-A の Cys199 のグルタチオニレーションによる不活化²¹⁾も報告されている。植物では、葉緑体のチラコイド膜タンパクをリン酸化する PK(LHCII-PK) の直接的なレドックス調節²²⁾および受精における自家不和合性に関与するレセプター様 PK の Trx を介する調節²³⁾などが報告されている。

1) R. Chollet, J. Vidal, and M. H. O'Leary: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 273-298 (1996).

- 2) J. Vidal and R. Chollet: *Trends Plant Sci.*, **2**, 230-237 (1997).
- 3) Y. Kai, H. Matsumura, and K. Izui: *Arch. Biochem. Biophys.*, in press (2003).
- 4) K. Terada, T. Kai, S. Okuno, H. Fujisawa, and K. Izui: *FEBS Lett.*, **259**, 241-244 (1990).
- 5) H. Toh, T. Kawamura, and K. Izui: *Plant Cell Environ.*, **17**, 31-43 (1994).
- 6) Y. Kai, H. Matsumura, T. Inoue, K. Terada, Y. Nagara, T. Yoshinaga, A. Kihara, K. Tsumura, and K. Izui: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 823-828 (1999).
- 7) H. Matsumura, Y. Xie, S. Shirakata, T. Inoue, T. Yoshinaga, Y. Ueno, K. Izui, and Y. Kai: *Structure*, **10**, 1721-1730 (2002).
- 8) H. G. Nimmo: *Trends Plant Sci.*, **5**, 75-80 (2000).
- 9) N. Ogawa, S. Okumura, and K. Izui: *FEBS Lett.*, **302**, 86-88 (1992).
- 10) N. Ogawa, N. Yabuta, Y. Ueno, and K. Izui: *Plant Cell Physiol.*, **39**, 1010-1019 (1998).
- 11) H. Saze, Y. Ueno, T. Hisabori, H. Hayashi, and K. Izui: *Plant Cell Physiol.*, **42**, 1295-1302 (2001).
- 12) J. Hartwell, A. Gill, G. A. Nimmo, M. B. Wilkins, G. I. Jenkins, and H. Nimmo: *Plant J.*, **20**, 1-10 (1999).
- 13) Y. Tsuchida, T. Furumoto, A. Izumida, S. Hata, and K. Izui: *FEBS Lett.*, **507**, 318-322 (2001).
- 14) T. Nakagawa, T. Izumi, M. Banba, Y. Umehara, H. Kouchi, K. Izui, and S. Hata: *Mol. Plant-Microbe Interact.*, in press (2003).
- 15) T. Nakagawa, K. Takane, T. Sugimoto, K. Izui, H. Kouchi, and S. Hata: *Mol. Genet. Genomics*, in press (2003).
- 16) S. Hata, K. Izui, and H. Kouchi: *Plant J.*, **13**, 267-273 (1998).
- 17) Y. Ueno, E. Imanari, J. Emura, K. Yoshizawa-Kumagaye, K. Nakajima, K. Inami, T. Shiba, H. Sakakibara, T. Sugiyama, and K. Izui: *Plant J.*, **21**, 17-26 (2000).
- 18) G. A. Nimmo, M. B. Wilkins, and H. G. Nimmo: *Planta*, **213**, 250-257 (2001).
- 19) M. Saitoh, H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono, and H. Ichijo: *EMBO J.*, **17**, 2596-2606 (1998).
- 20) J. A. Watson, M. G. Rumsby, and R. G. Wolowakz: *Biochem. J.*, **343** (Pt. 2), 301-305 (1999).
- 21) K. M. Humphries, C. Juliano, and S. S. Taylor: *J. Biol. Chem.*, **277**, 43505-43511 (2002).
- 22) D. Cabrillac, J. M. Cock, C. Dumas, and T. Gaude: *Nature*, **410**, 220-223 (2001).
- 23) E. Rintamaki, P. Martinsuo, S. Pursiheimo, and E. M. Aro: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **97**, 11644-11649 (2000).