

CAM 植物における光合成炭素代謝酵素
の細胞内局在に関する研究

近 藤 歩

2000

①

CAM 植物における光合成炭素代謝酵素 の細胞内局在に関する研究

Studies on the intracellular localization of photosynthetic
enzymes in the carbon metabolism of CAM plants

鹿児島大学大学院連合農学研究科

近藤 歩

2000

略語表

AC: aerating canal 通気孔

ATP: adenosine triphosphate アデノシン三リン酸

BS: bundle sheath cell 維管束鞘細胞

C: chloroplast 葉緑体

CAM: crassulacean acid metabolism ベンケイソウ科型酸代謝

Cw: cell wall 細胞壁

F: fibre strand 繊維組織

M: mesophyll cell 葉肉細胞

MDH: malate dehydrogenase リンゴ酸脱水素酵素

ME: malic enzyme リンゴ酸酵素

mt: mitochondrion ミトコンドリア

N: nucleus 核

NAD: nicotinamide adenine dinucleotide ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、酸化型(NAD^+)、還元型(NADH)

NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸、酸化型(NADP^+)、還元型(NADPH)

P: plastoglobuli プラストグロビュール

PCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ

PEP: phosphoenolpyruvate ホスホエノールピルビン酸

PEPCase: phosphoenolpyruvate carboxylase ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ

3-PGA: 3-phosphoglyceric acid 3-ホスホグリセリン酸

PPDK: pyruvate, Pi dikinase ピルビン酸正リン酸ジキナーゼ

Rubisco: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ

S: starch grain デンプン粒

St: stoma 気孔

st: sieve tube 篩管

VB: vascular bundle 維管束

Vc: vesicle 小液胞

ve: vessel 導管

W: water storage tissue 貯水組織

目次

略語表	i
目次	iii
第1章 緒論	1
第2章 光合成炭素代謝機構との関連から見た CAM 植物における葉の内部構造	
1 緒言	7
2 材料および方法	8
3 結果	10
1) 光学顕微鏡による観察	10
2) 透過型電子顕微鏡による観察	15
4 考察	20
5 摘要	24
第3章 CAM 植物の葉肉細胞における炭酸固定酵素 PEPCase および Rubisco の局在	
1 緒言	25
2 材料および方法	26
3 結果	28
4 考察	29
5 摘要	36
第4章 CAM 植物の葉肉細胞における PPDK の局在様式とその多様性	
1 緒言	38
2 材料および方法	39
3 結果	43
4 考察	56
5 摘要	63
第5章 ベニベンケイ (<i>Kalanchoë blossfeldiana</i>) における CAM 活性の増大に伴う葉緑体型および細胞質型 PPDK の蓄積様式	
1 緒言	64
2 材料および方法	65
3 結果	67

4 考察	76
5 摘要	78
第6章 総合考察	79
要約	88
要約 (英文)	93
謝辞	97
引用文献	98

第1章 緒論

CAM は、Crassulacean Acid Metabolism の略であり、ベンケイソウ科 (Crassulaceae)等の多肉植物が持つ有機酸代謝を意味している。ある種の子肉植物が夜間に炭酸ガス(CO_2)を吸収することや、それらの葉で日周期的な有機酸合成が起こることは古くから知られていた(Heyne 1815)。1950年代になり、気孔の開閉に同調した有機酸合成の動態が解明され、CAM 代謝の基本機構が明らかとなった(Bruinsma 1958)。しかし、CAM が光合成の炭素代謝系のひとつとして注目されるようになったのは、 C_4 回路の発見に負うところが大きい。1965年 Kortschak によって C_4 ジカルボン酸回路の存在が示唆され(Kortschak et al. 1965)、ついで Hatch と Slack により当回路の全容が解明されるに至り(Hatch and Slack 1970)、CAM の炭素代謝経路と C_4 ジカルボン酸回路の類似性が明らかになった。すなわち、いずれも基本的な炭素の還元はカルビン回路で行われること、さらに C_4 回路と CAM では、大気 CO_2 はホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPCase)により C_4 ジカルボン酸として固定され、それを脱カルボキシル化することにより CO_2 を放出するという、いわゆるカルビン回路に対する CO_2 濃縮機構として機能している点で類似した生化学的基本機構が働いていると見ることができる。CAM 型光合成と C_4 型光合成の大きな違いは、 CO_2 濃縮機構とカルビン回路との間の炭酸固定に関わる分業が、 C_4 型光合成では葉内で空間的に分離されて行われること、すなわち葉肉細胞と維管束鞘細胞という2種類の光

合成細胞の分業により行われているが、CAM 型光合成では単一種の光合成細胞で昼と夜との間で時間的に分離されて行われていることにある。このような機能的な特徴から、CAM 型光合成は C_4 型光合成の変型とみなす研究者もいる (Cockburn 1985)。

CAM の際立った特性は、夜間にリンゴ酸が形成され、昼間にこれが消失するというリンゴ酸蓄積の日変化がみられることである。このような CAM の日変化は、CAM の炭酸固定を構成する 4 つのフェイズに区分することができる (Osmond 1978、野瀬 1992)。暗期であるフェイズ I では、気孔が開き外気から吸収された CO_2 が、解糖系から供給された PEP を基質とする PEPCase によって固定され、生じたオキサロ酢酸はリンゴ酸脱水素酵素によって還元されリンゴ酸となる。そして、生成したリンゴ酸は液胞内に蓄積される。フェイズ II は夜型のカルボキシル化反応から昼型のカルボキシル化反応の移行期であり、前半の CO_2 固定は PEPCase によって行われるが、時間の経過とともに PEPCase による CO_2 固定は漸減してゆき、それに変わってリブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(Rubisco)による CO_2 固定が活発になる。フェイズ III では完全に気孔が閉口し、夜間に蓄積されたリンゴ酸が脱炭酸され、生じた CO_2 が Rubisco によってカルビン回路に取り込まれる。フェイズ IV ではリンゴ酸の脱炭酸はほぼ終わり、葉内の CO_2 が枯渇する。このとき気孔が開き外気から CO_2 を吸収し始める。そして、主に Rubisco によって CO_2 固定が行われる。

さらに、このような CAM 経路はリンゴ酸の脱炭酸反応の違いにより、PCK 型と ME 型の 2 つの型に分類される(Dittrich 1973、1976)。ME 型では液胞から流出したリンゴ酸は、NADP-および NAD-リンゴ酸酵素(ME)により脱炭酸され、このとき CO_2 とともに生じたピルビン酸は、ピルビン酸正リン酸ジキナーゼ (PPDK) の働きにより PEP に変化し、解糖系を逆行してグルカンプールに至る。一方 PCK 型では、リンゴ酸はオキサロ酢酸に変化した後、PEP カルボキシキナーゼ (PCK) の作用で PEP と CO_2 とに分解し、この型では PPDK 活性を欠く (Winter and Smith 1996)。

CAM は少なくとも 33 科 328 属の植物に分布しており、その中でも CAM が数多く分布する科は、単子葉植物ではラン科、パイナップル科、ユリ科、双子葉植物ではサボテン科、ベンケイソウ科、ザクロソウ科、トウダイグサ科である (Smith and Winter 1996、野瀬 1996)。これらの科には分類学的な類縁関係はないが、いずれも熱帯かあるいは亜熱帯に起源しており、砂漠等の乾燥した場所を生育地とする共通した特徴がみられる (Kluge and Ting 1978)。これらの CAM 植物は、夜間は気孔を開き CO_2 を固定し、高温乾燥した昼間は気孔を閉じて体内水分の余分な蒸散を防ぐ。すなわち、 CO_2 固定と炭素還元反応を昼夜の間で時間的に分割することにより乾燥耐性を獲得しているものと考えられている。実際に、蒸散量に対する CO_2 吸収量を表す水利用効率で比較すると C_3 、 C_4 、CAM 植物でそれぞれ 0.5~1.5、1.0~2.0、4.0~10.0 mmol CO_2 /mol H_2O という値を示し (Nobel 1991)、CAM 植物が他の植物に比べ最小限に水の損失をおさえ、効率

良く CO_2 を固定していることがわかる。

このように CAM 植物は、昼と夜の時間差を設けて炭酸固定を行い、一般の緑色植物とは異なった炭素代謝機構によって、厳しい環境下でも生育できるという優れた適応性を示している。近年、地球規模での環境問題が議論される中、そのひとつとして砂漠化問題が取り立たされている(環境白書 1999)。1991 年の国連環境計画(UNEP)による砂漠化の現状等に関する調査によれば、砂漠化の影響を受けている土地の面積は地球上の全陸地の約 4 分の 1、耕地可能な乾燥地域の約 70% に当たる約 36 億 ha に達し、世界人口の約 6 分の 1、約 9 億人がその影響を受けている。このような深刻な問題に対し、緑地保全の重要な解決策の一つとして耐乾性植物の開発研究が進められており、CAM 植物が持つ炭素代謝機構が注目されている(鮫島 1994)。

これまで CAM 植物は、その生産性および作物学的な有益性の低さから他の植物と比べると関心が低く、また歴史的背景からわかるように C_4 植物の研究に付随して行われてきた面がある(野瀬 1992)。特に CAM の炭素代謝経路を裏付ける酵素の局在性に至っては、 C_4 植物の研究成果に依存するところが大きく、未だ明確にされていない点が多い(Osmond and Holtum 1981)。CAM 植物における炭素代謝酵素の細胞内分布については、これまで限られた植物について主にオルガネラの分画により行われてきた。この手法によれば、PEPCase のように活性測定の難しい酵素(O' Leary 1982)では、その細胞内局在を解析することは容易でなく、そのため研究者によって異なった結果が報告されている (Brandon

1967、Spalding et al. 1979、Schnarrenberger et al. 1980、Perrot-Rechenmann et al. 1982)。

近年、細胞内におけるタンパク質の局在を解析するうえで、免疫細胞化学的手法が広く用いられるようになってきた。その中でも特に、免疫電子顕微鏡法は細胞内のオルガネラにおけるタンパク質の局在について詳細に解析できるすぐれた手法である (Bendayan 1984、Herman 1988)。Ueno (1996)は、水陸環境の転換により C_3 型と C_4 型光合成を相互に転換稼働させる *Eleocharis vivipara* において、 C_4 型光合成の鍵酵素であるピルビン酸正リン酸ジキナーゼ(PPDK)が維管束鞘細胞と葉肉細胞の両葉緑体、さらには細胞質にも分布することを明らかにしている。このことは、免疫電子顕微鏡法が光合成酵素の細胞内局在性の同定に極めて有効な手法であることを示すとともに、同手法を用いて可変な代謝系として知られる CAM 型光合成における関連酵素の局在性についても再考を促すものである。さらに、CAM 型光合成における免疫電顕法による検討は従来ほとんど行われていない。

本研究では、さまざまな CAM 植物における光合成炭素代謝酵素の細胞内における局在部位を免疫電子顕微鏡法により明らかにし、それとともに CAM の炭素代謝経路について検討した。最近では、光合成酵素遺伝子の分子生物学的解析が進められてきており、それら遺伝子を導入した形質転換植物の作出が行われている。このような遺伝子工学的手法によって光合成酵素遺伝子を導入していく上でも、それらの酵素が本来細胞内のどの部位に局在して働いているのかを明らかにしておくことは重要である (Sheriff 1998)。

まず、CAM 植物における光合成炭素代謝酵素の細胞内局在を明らかにする上で、それが存在している葉組織がどのような構造をもっているのかを明らかにしておく必要がある。そこで最初に、数種の CAM 植物の葉内部構造について光学顕微鏡および透過型顕微鏡により調査した（第2章）。第3章では、CO₂ 固定の重要酵素である PEPCase と Rubisco の細胞内の局在を明らかにした。第4章では、フェイズ III で重要な役割を果たしている PPDK の細胞内の局在を調査した。PPDK については種によって局在性に変異が見出されたので、様々な分類群に属する CAM 植物について、PPDK の細胞内局在の多様性を検討した。同時にこれらの CAM 植物が実際に PPDK の活性を持っているのか、また PPDK の細胞内局在の違いとリンゴ酸の脱炭酸過程の間に相互に関連があるのかを明らかにするために、PPDK と3種の脱炭酸酵素の活性を測定した。第5章では、細胞質と葉緑体の両方に PPDK が局在しているベニベンケイを用いて、CAM 活性が増大したときに両 PPDK がどのように蓄積するのかを検討した。第6章の総合考察では、本論文で明らかにした知見に基づいて、ME 型 CAM のフェイズ III における炭素代謝経路の多様な変異について考察を加えた。また、ME 型 CAM 植物における葉緑体型と細胞質型 PPDK の発現様式について、分子生物学的な見地から考察した。

第2章 光合成炭素代謝機構との関連から見た CAM 植物における葉の内部構造

1. 緒言

トウモロコシなどの C_4 植物では、葉の内部構造は光合成機能と密接な関連を持つ(Hatch and Osmond 1976)。 C_4 植物に特有な光合成酵素は CAM 植物のなかにもその存在が認められており、両植物は似通った生化学的特性を持つ(Kluge and Ting 1978)。しかし、CAM 植物における一連の光合成炭素代謝は単一種の細胞の中で駆動しており、葉肉細胞と維管束鞘細胞という 2 種類の細胞が分業して光合成を行う C_4 植物とは明確に異なる(Osmond 1978)。このような点から、これまで CAM 植物は生理生化学的に解析は進められてきたが(Winter and Smith 1996)、 C_4 植物に比べると葉の解剖学的な研究はあまり行われていない。

本研究では、CAM 植物における葉の内部構造の特性および CAM 機能との関連を明らかにするために、単子葉植物の PCK 型であるパイナップル科のパイナップル、および双子葉植物の ME 型であるザクロソウ科のアイズプラントおよびベンケイソウ科のコダカラベンケイ、セイロンベンケイ、ベニベンケイを用い、光学顕微鏡および透過型顕微鏡により、CAM 植物の葉の内部構造を調査した。以上の 5 種の CAM 植物は、CAM 植物を多数含む代表的な科に属していること、加えて CAM の生理生化学的研究の材料としてこれまで頻繁に用いられている種であることを考慮して選出した。

2. 材料および方法

植物材料

供試材料には、パインアップル(*Ananas comosus* cv. smooth cayenne N67-10)、アイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*)、コダカラベンケイ(*Kalanchoë daigremontiana*)、セイロンベンケイ(*K. pinnata*)、ベニベンケイ(*K. blossfeldiana*)の5種のCAM植物を用いた。

パインアップルは、パミスサンドを詰めたポット（直径 22 cm、深さ 25 cm）に植え育成した。灌水は、土壌の乾き具合をみて適宜行った。施肥は、2週に1回の割合で市販の化成肥料（大塚ハウス 1 号）の 1000 倍希釈液を 1 ポット当たり 500 ml 与えた。実験には、生育 2 年目の植物を用いた。

コダカラベンケイ、セイロンベンケイは、バーミュキュライトを詰めたワグネルポット（1/5000a）に植え育成した。灌水は、土壌の乾き具合をみて適宜行った。施肥は、2週に1回の割合で市販の化成肥料（大塚ハウス 1 号+2 号）の 1000 倍希釈液を 1 ポット当たり 200 ml 与えた。

パインアップル、コダカラベンケイ、およびセイロンベンケイは、グロースチャンバーの中で一定の環境下（明期 14 時間／暗期 10 時間、昼温 25℃／夜温 20℃、光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ）に 2 週間以上置き、上部より 5 あるいは 6 番

目の完全展開葉を実験に使用した。

ベニベンケイは植物の枝先を土とバーミュキュライトを 1 : 1 の割合で詰めたワグネルポット (1/5000a) に植え、グロースチャンバーの中 (明期 14 時間 / 暗期 10 時間、明期 25℃ 暗期 20℃、光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) で灌水を十分に行って 4 ヶ月間育生した。施肥は 2 週に 1 回の割合でハイポネックスの 1000 倍希釈液を 1 ポット当たり 200 ml 与えた。その後、CAM を強く誘導するために、給水を停止し水ストレスを加えた短日条件区 (明期 10 時間 / 暗期 14 時間、明期 25℃ 暗期 20℃、光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) を設け、さらに 1 ヶ月間植物を育生した。この 1 ヶ月間は施肥は行わなかった。調査にはこれらの植物の上部から 3 番目 (長さ約 4 cm) の葉を用いた。

アイスプラントは、土とバーミュキュライトを 1:1 の割合で詰めたポット (直径 11 cm 深さ 10 cm) に植え、ガラスハウス内で育成した。発芽後 7 週間は、1 mM NaCl を含むホーグランド液の 5 倍希釈液を毎日十分に与えた。発芽後 8 ~ 12 週間は 350 mM NaCl を含むホーグランド液の 5 倍希釈液を 1 日置きに与え、CAM を誘導した。

試料は、すべて午前 9 時に採取した。

光学顕微鏡および電子顕微鏡による葉内部構造の観察

葉組織片は、3% (v/v) グルタルアルデヒド-50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) を用い 4 時間固定し、その後 50 mM リン酸緩衝液で洗浄した。さらに、2%

オスミウム酸-50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8)で2時間固定した。脱水は、アセトンシリーズ(10、30、50、70、95、100%)で各10分間行った。脱水終了後、葉組織片はSpurr樹脂とエタノールを1:1、および3:1の割合で含む混合液の中で各30分間ずつ置換した。この後、100% Spurr樹脂の中で5時間、さらに新しい樹脂に交換して一晩浸透させた。葉組織片は、樹脂を満たしたゼラチンカプセルの中で包埋し、10時間70℃で重合させた。脱水から包埋までの操作は、すべて室温で行った。

組織片を含むブロックから、ガラスナイフを装着したウルトラミクロトーム(Porter Blum MT2)を使用して葉の横断切片を作成した。準薄切片は、1% トルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡で観察した。超薄切片は、ホルムバル支持膜を張った100メッシュの銅グリッドに回収し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で2重染色した。染色後、切片は日立2000U透過型電子顕微鏡を使用し、加速電圧75 kvで観察した。

3. 結果

(1) 光学顕微鏡による観察

パインアップル

パインアップルの葉は厚膜の表皮をもち、向軸側、背軸側の表皮の内部にさらに厚膜の細胞が2層から3層重なって分布していた(図2-1)。向軸側表皮の層は、ほぼ平らであるが、背軸側表皮層は波形を示した。そして、その波形の層

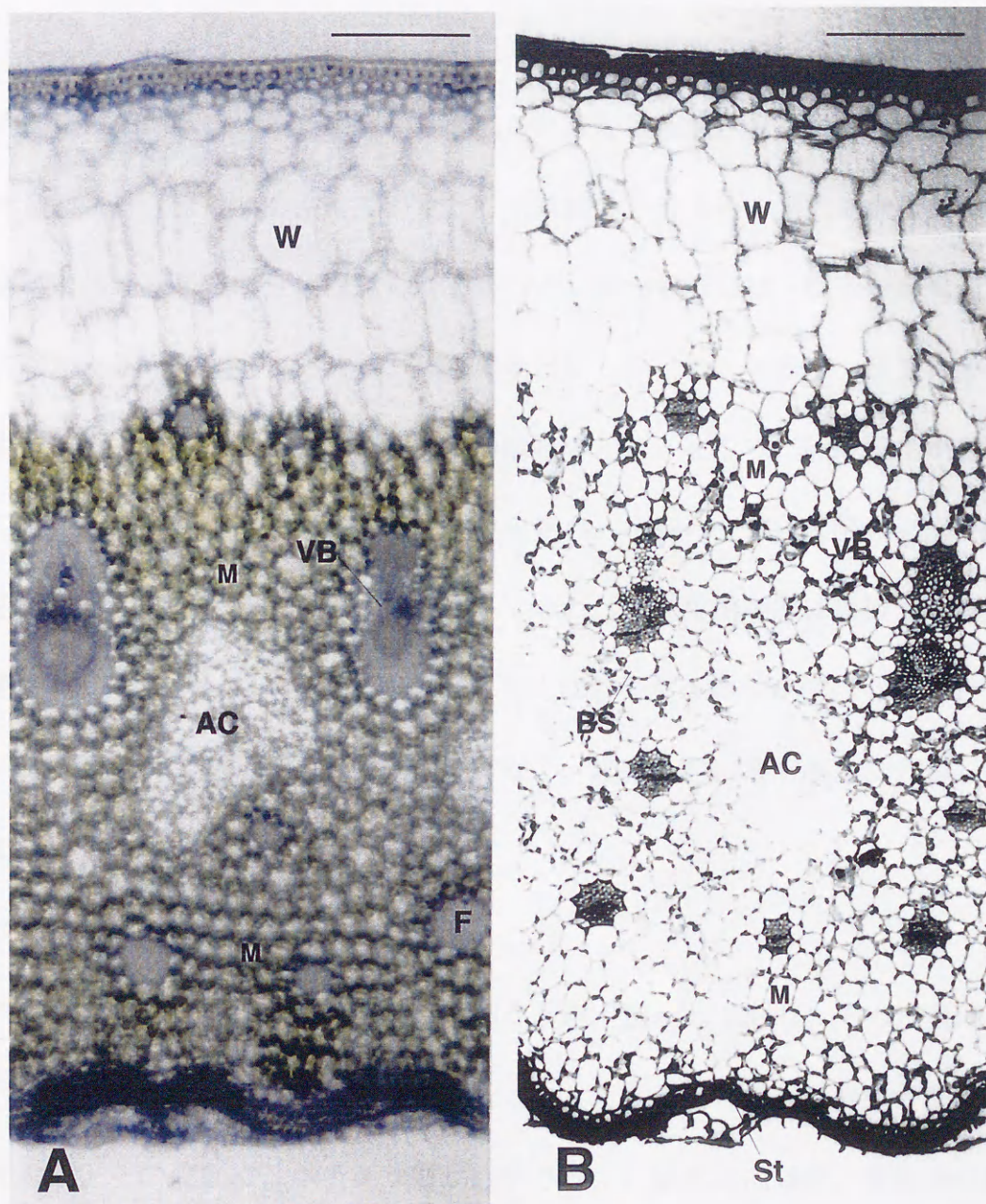


Fig. 2-1. Cross-sections of leaves of *Ananas comosus*. **A** shows a hand-cut section of fresh materials. **B** shows a section prepared from materials embedded in Spurr's resin and stained with toluidine blue O. Bars = 200 μm . AC, aerating canal; BS, bundle sheath cell; F, fibre strand; M, mesophyll cell; St, stoma; VB, vascular bundle; W, water storage tissue.

の窪みに気孔が分布していた(図 2-1B)。しかし、向軸側には気孔は観察されなかった。気孔の付近の葉肉組織には細胞間隙が見出された(図 2-1B)。向軸側表皮の下には葉緑体を欠いた細胞から構成された貯水組織がみられ、その領域は葉厚のおよそ 3 分の 1 を占めていた。貯水組織の下を占める葉肉組織には、柵状組織と海面状組織の分化は見られなかった。葉肉組織には、球形の膨潤した葉肉細胞が緻密に配列しており、細胞間隙は少なかった。しかし、通気孔と推測される大きな空隙が観察された。葉肉細胞のところどころに繊維組織が散在していた。維管束は葉肉組織の上部に見出され、木部の上部、師部の下部を繊維組織が半円状に取り囲むように分布していた。維管束鞘細胞は隣接する葉肉細胞と比べると、その大きさは同等かもしくは若干小さかった(図 2-1)。ほとんどの葉緑体は、細胞同士が接する面ではなく、細胞間隙に接する面に分布していた。

アイスプラント

アイスプラント葉の表皮は多数の透明な水泡で覆われており、その水泡は 1 つの大型の表皮細胞からできていた(図 2-2A)。表皮は一層の表皮細胞で構成されており、その表面にはクチクラ層が観察された。気孔は向軸側、背軸側の両方に存在していた。また、葉の葉肉組織には柵状組織と海綿状組織の明確な分化は見られず、膨潤した葉肉細胞が緻密に分布していた(図 2-2A)。葉の横断面のほぼ中央に維管束が観察された。葉緑体は細胞同士が接する面ではなく、細胞間隙に接する面に分布していた。

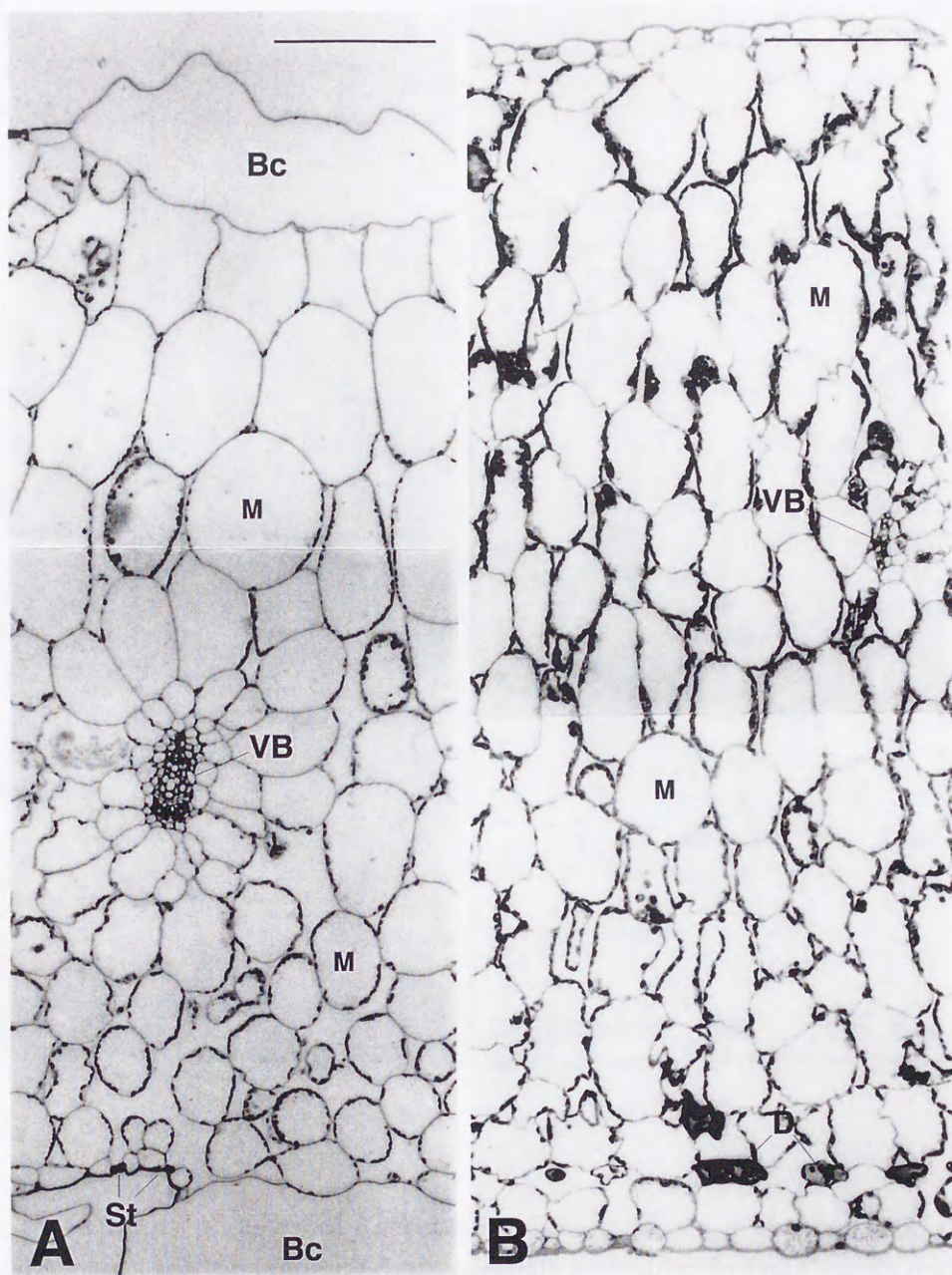


Fig. 2-2. Cross-sections of leaves of *Mesembryanthemum crystallinum* (A) and *K. pinnata* (B), which were prepared from materials embedded in Spurr's resin and stained with toluidine blue O. Bars = 200 μ m. Bc, bladder cell; D, cell containing dense material; M, mesophyll cell; St, stoma; VB, vascular bundle.

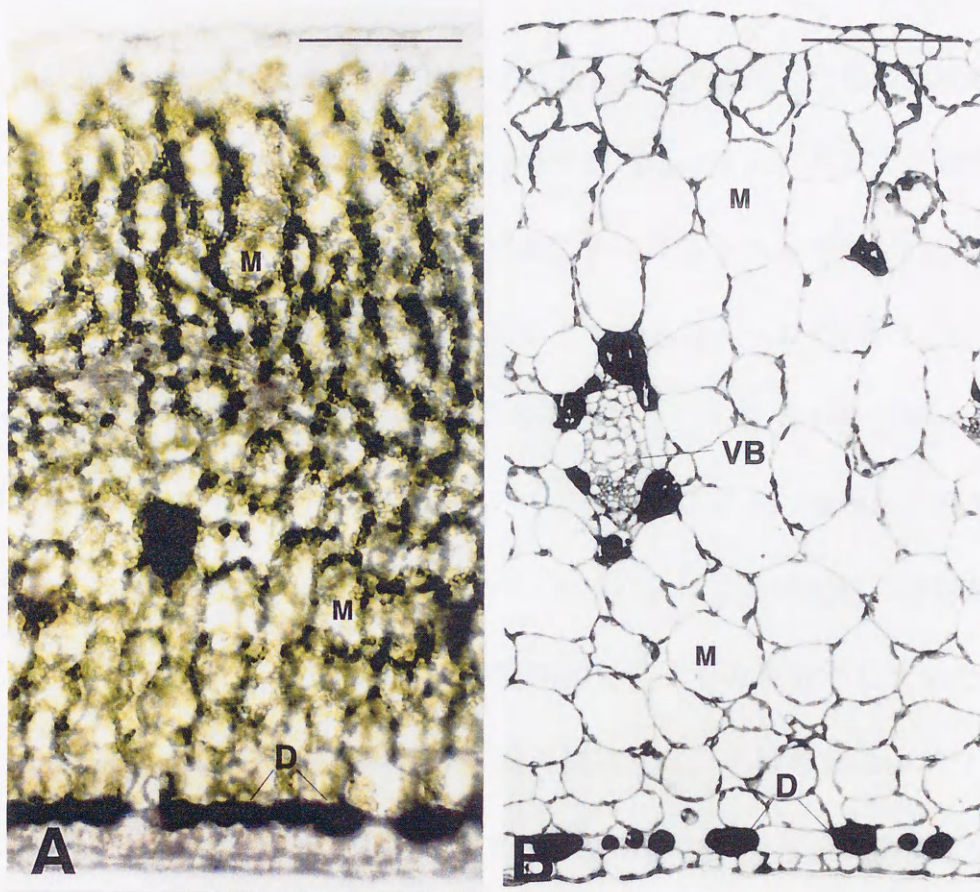


Fig. 2-3. Cross-sections of leaves of *Kalanchoë daigremontiana*. **A** shows a hand-cut section of fresh materials. **B** shows a section prepared from materials embedded in Spurr's resin and stained with toluidine blue O. Bars = 200 μ m. D, cell containing dense material; M, mesophyll cell; VB, vascular bundle.

コダカラベンケイ、セイロンベンケイ、およびベニベンケイ

表皮は一層の表皮細胞で構成されており、その表側細胞壁にはクチクラ層が観察された。気孔は向軸側、背軸側の両方に存在していた。また、葉の葉肉組織には柵状組織と海綿状組織の明確な分化は見られず、膨潤した葉肉細胞が緻密に分布していた(図 2-2B、図 2-3)。葉の横断面のほぼ中央に維管束が観察された。葉肉組織には、トルイジンブルーで濃紺色に染色される細胞が観察され、これはおそらく細胞内に分泌物を蓄積していたものと考えられた(図 2-2B、図 2-3)。一般に、背軸側表皮付近にこのような分泌物を含む細胞が多数配列する傾向があり、コダカラベンケイでは維管束の付近にもこれらの細胞が観察された(図 2-3)。コダカラベンケイとセイロンベンケイにおける葉肉細胞の葉緑体もまた、細胞同士が接する面ではなく、細胞間隙に接する面に分布していた(図 2-2B、図 2-3)。しかし、ベニベンケイの葉肉細胞では、多数の葉緑体が 1、2ヶ所に集合して分布することが見出された(図 2-4B、C)。一方、このような葉緑体の集合が、固定時の浸透圧の変化により人工的に生じた可能性も考えられる。そこで固定液を使用せず、生葉から徒手切片を作成後すぐに光学顕微鏡で観察したが、固定した葉組織の場合と同様に、葉緑体の集合が観察された。

(2) 透過型電子顕微鏡による観察

ベニベンケイを除く 4 種の CAM 植物葉のいずれにおいても、葉肉細胞の大部分は液胞が占めているために、細胞中のオルガネラは細胞壁の周辺に押し付

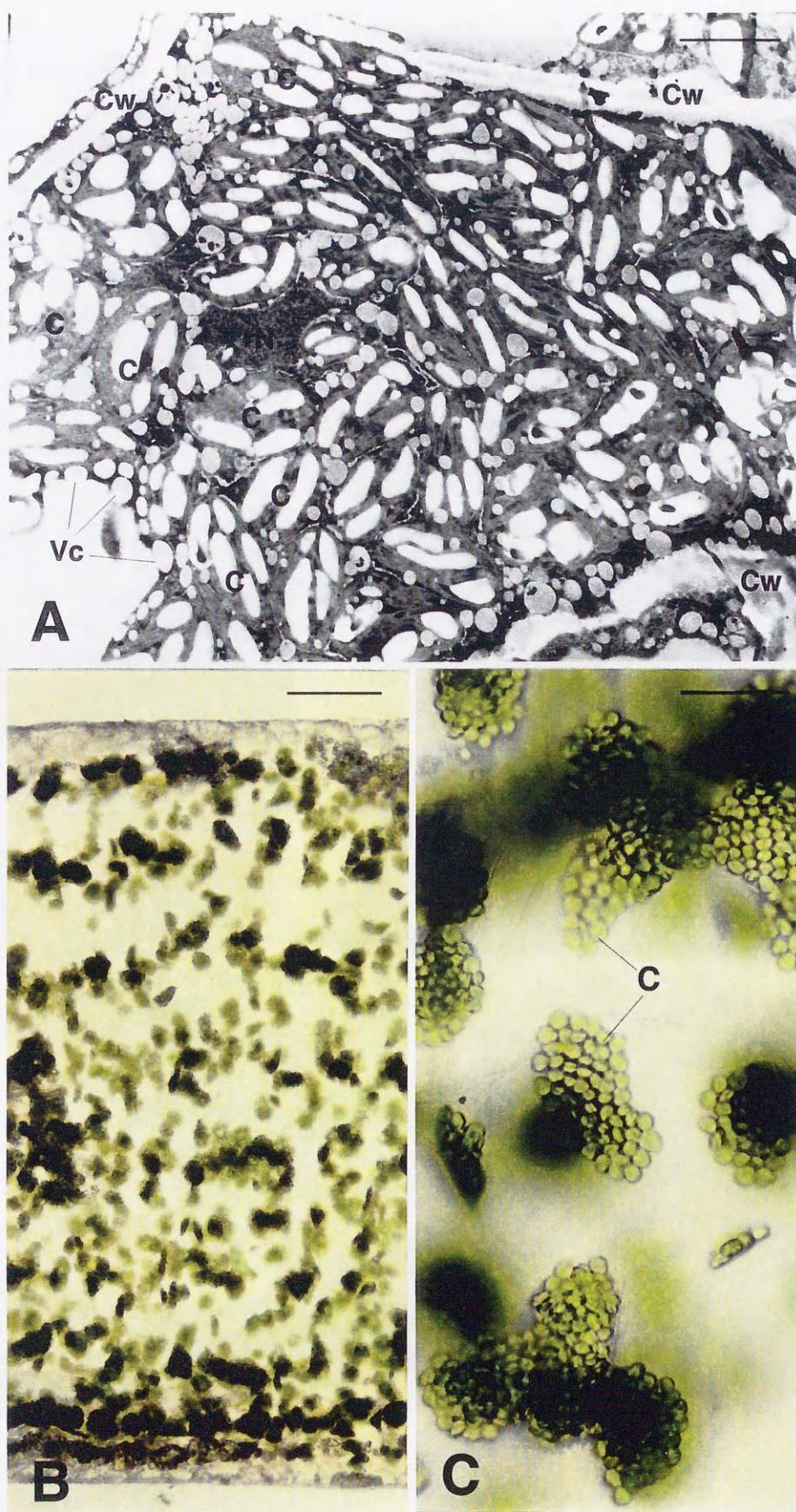


Fig. 2-4. Aggregation of chloroplasts in mesophyll cells of leaves of *K. blossfeldiana*. **A**, Ultrastructure of a mesophyll cell. **B**, A hand-cut section of leaf. **C**, Detail of aggregation of chloroplasts in mesophyll cells. C, chloroplast; Cw, cell wall; N, nucleus; Vc, vesicle. Bar in **A** = 5 μm . Bar in **B** = 200 μm . Bar in **C** = 50 μm .

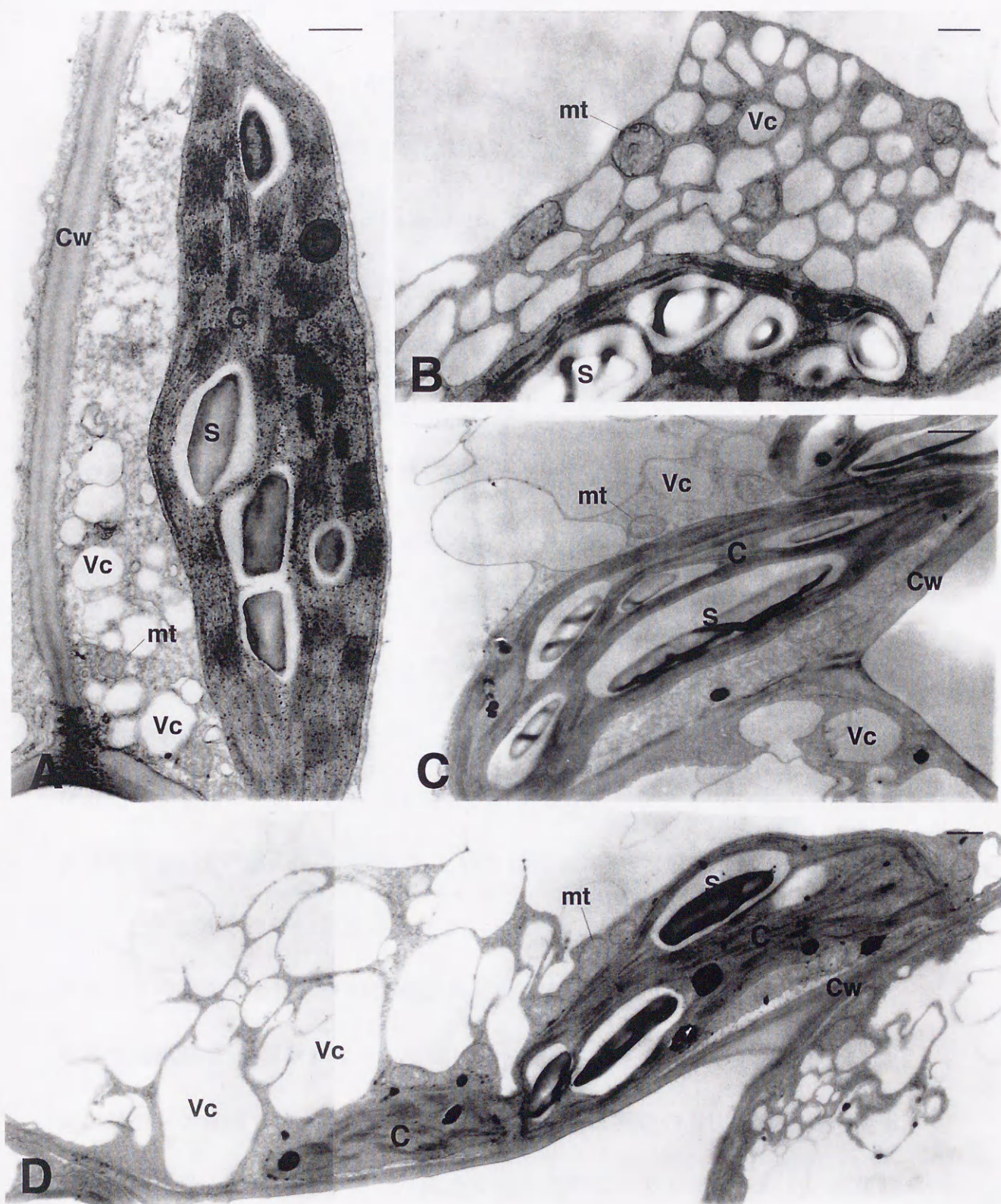


Fig. 2-5. Ultrastructure of mesophyll cells of CAM species. **A**, *A. comosus*. **B**, *M. crystallinum*. **C**, *K. daigremontiana*. **D**, *K. pinnata*. The cytosol contains vesicles of various sizes. Bars = 0.5 μ m. C, chloroplast; Cw, cell wall; mt, mitochondrion; P, plastoglobule; S, starch grain; Vc, vesicle.

けられるように分布していた(図 2-5)。実験した 5 種の CAM 植物のいずれにおいても葉緑体にはグラナが発達しており、デンプン粒と電子密度の高いプラストグロビュールが観察された(図 2-5)。C₃ 植物や C₄ 植物の葉緑体でしばしば観察される周辺網状構造(Peripheral reticulum)は、5 種いずれの葉緑体にも観察されなかった。葉肉細胞の細胞質には網目状の隔壁構造が観察され、1 つの細胞内でもその大きさにはかなりの変異が見られた。アイスプラントおよびベンケイソウ科の 3 種では隔壁構造の発達が顕著であり、液胞のかなり内部にまで陥入していた(図 2-4A、図 2-5)。パインアップル葉の葉肉細胞には原形質連絡が他の 3 種に比べ多数観察された。維管束は多種の細胞により構成されており、特にアイスプラントおよびベンケイソウ科の 3 種は、パインアップルと比較するとその構成はより複雑であった。パインアップルの維管束では、葉緑体を含む細胞は少なかった。一方、アイスプラントおよびベンケイソウ科の 3 種の維管束の場合、維管束柔細胞の中にもしばしば葉緑体を含むことが観察された(図 2-6)。しかし、それらの葉緑体の大きさは葉肉細胞の葉緑体に比べ小さく、チラコイドの発達の程度が低い傾向があった。実験した 5 種の CAM 植物の葉の維管束鞘細胞は C₄ 植物のように明確に特殊化しておらず、特にアイスプラントおよびベンケイソウ科の 3 種の葉の維管束鞘細胞は周辺の葉肉細胞と比べても発達程度は低く、葉緑体を欠いた維管束鞘細胞の切片像も観察された。表皮細胞には葉緑体は観察されなかった。

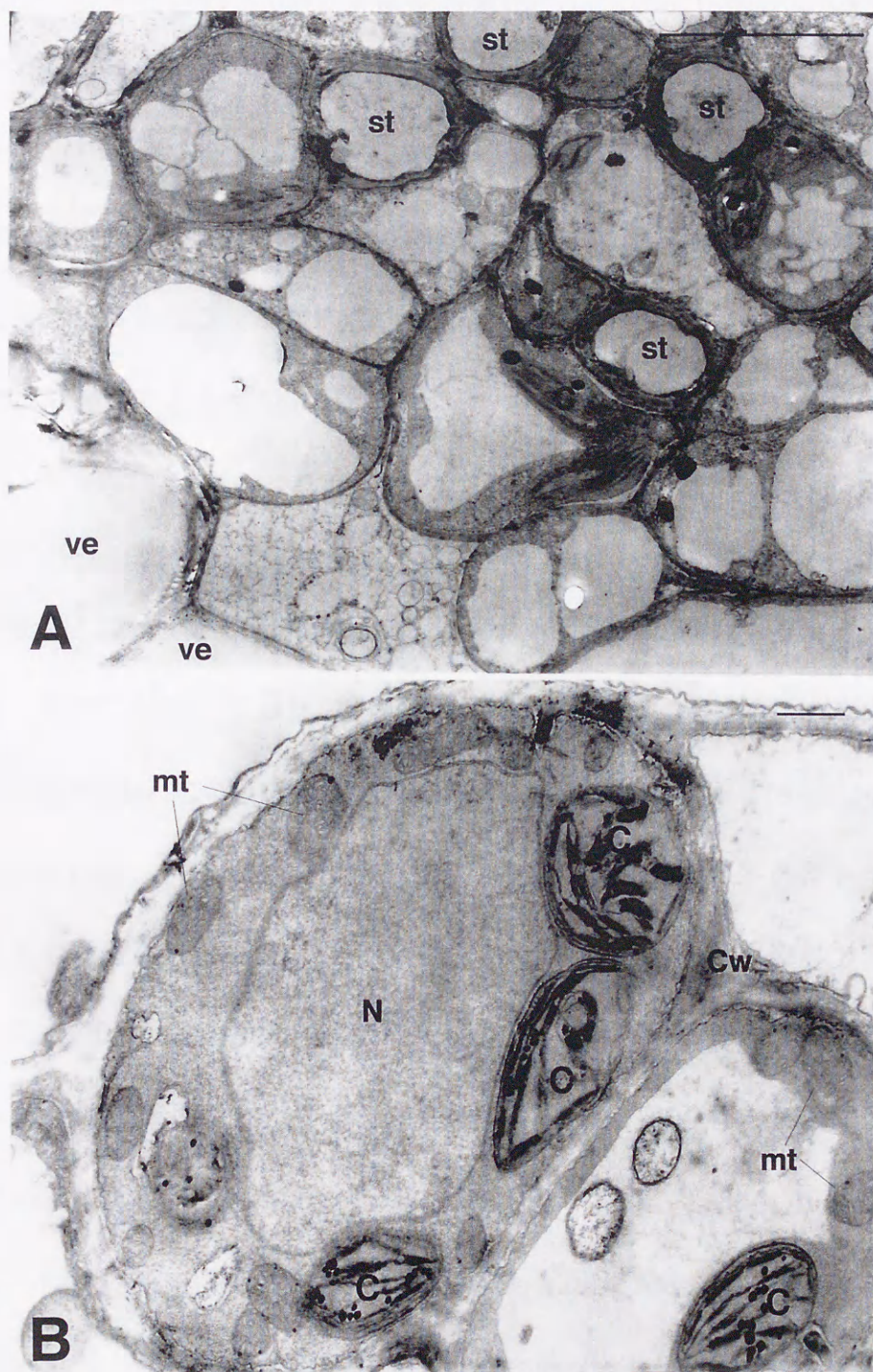


Fig. 2-6. Ultrastructure of vascular parenchyma cells in leaves of *K. pinnata* (A) and *M. crystallinum* (B). C, chloroplast; Cw, cell wall; mt, mitochondrion; N, nucleus; st, sieve tube; ve, vessel. Bar in A = 5 μm . Bar in B = 0.5 μm .

ベニベンケイの葉肉細胞内では、多数の葉緑体が1、2ヶ所に集合していた。(図2-4A)。それらの集合体では葉緑体の一部は細胞壁に密着し分布していたが、多くのものは細胞壁に接することなく、液胞の内部に小塊を形成していた。葉緑体の集合体の中にはミトコンドリアも観察されたが、葉肉細胞の他の部位にも散在しており、ミトコンドリアの集合分布は見られなかった。葉緑体の集合体の中には核が観察できるものもあった。

4. 考察

本研究で実験した CAM 植物の葉には、いずれも大型の液胞をもった膨潤した葉肉細胞が緻密に配列しており、細胞間隙は少なかった。CAM 植物の葉肉組織における細胞間隙は、 C_3 植物や C_4 植物と比べて少ない傾向にあり (Byott 1976, Smith and Heuer 1981)、このような葉内部構造が CAM 植物の葉の多肉性を特徴づけるものと考えられる。Löscher et al. (1984, 1987) は、ベンケイソウ科アエオニウム (*Aeonium*) 属の 8 種の植物について種による CAM 化の程度の違いを調査し、葉の多肉度 (単位葉面積当たりの水分含量; $\text{gH}_2\text{O dm}^{-2}$) が大きくなるにつれて、暗期での CO_2 吸収の割合が高くなることを見出している。また、Borland et al. (1998) は、湿度の高い熱帯雨林を生息地とする weak CAM-inducible の *Clusia aripoensis* と、乾燥した沿岸地を生息地とする constitutive CAM の *C. rosea* の葉構造を比較調査し、*C. rosea* は *C. aripoensis* に比べ葉組織における細胞間隙の割合が少なく葉肉細胞の占める割合が高いことを見出すとともに、多肉度が高

いことを明らかにした。そして、多肉性と CAM 機能の間には乾燥環境に対する適応としての密接な関連性があることを示唆している。

パインアップルの葉内部では、葉緑体を含む葉肉組織とは明らかに分離した非緑色の貯水組織が見出された。このような貯水組織の機能的な意義として、下層に分布している緑色組織を強光から保護する働きがあるという指摘もある(Eames et al. 1947)。また、生長段階および日照時間や温度などの環境要因によって葉内に占める貯水組織の割合は変動することが観察されている(Krauss 1949)。CAM の発現レベルも葉齢および環境要因によって調節されていることが知られているが(Winter and Smith 1996)、そのような形態的变化と CAM 機能とが相互に関係するか否かは明らかではない。C₃ 型光合成を営む *Peperomia obtusifolia* でも、葉内部に貯水組織が発達していることから(Ting 1985)、本研究で観察されたような貯水組織は CAM 機能に直接関わっているのではなく、むしろその他の生理生態学的な意味を強く持つのかかもしれない。

Peperomia 属の CAM 植物の葉では葉肉組織の中に形態的機能的分化がおこっており、表側柵状組織、中央柵状組織、および下部海面状組織という 3 種の葉肉組織がみられる。これらの組織の葉緑体では、それぞれ含まれるデンプン粒の量やグラナの発達程度が異なる(Gibeaut and Thomson 1989)。本研究で実験した CAM 植物の葉ではいずれも葉肉組織には柵状組織と海綿状組織の明確な分化はみられず、また含まれている葉緑体にも構造の違いは見られなかった。しかし、維管束および維管束鞘細胞に含まれている葉緑体は、葉肉細胞の葉緑体

と比べ小型であり、グラナの発達が低いものも観察された。

本研究で実験した 5 種の CAM 植物の内ベニベンケイを除く 4 種では、葉緑体は葉肉細胞の中でも細胞間隙に接した位置に配置される傾向があった。これは、 CO_2 の拡散に対する抵抗を小さくし、細胞間隙からの CO_2 の取り込みを容易にするためだと考えられる。一方、ベニベンケイの葉肉細胞内では、葉緑体の集合が見出された。葉緑体の細胞内における配置は、光により大きく影響され、光強度に応じて配列の向きを変化させる定位置移動が知られている(寺島 1999)。すなわち、光が弱いときには葉緑体は受光面積が大きくなるような場所に配列し、光が強いときには受光面積が小さくなるように配列する。オオカナダモの葉に強光を照射させると葉緑体は次第に集合しあい、およそ 150 分で細胞の側壁に大きな 1 個の集合体を形成することが報告されている(伴 1997)。この場合の現象も同様に、葉緑体の受光面積を少なくするように反応しているものと考えられている。

C_4 植物の場合、 C_4 ジカルボン酸の脱炭酸機構を異にする 3 つの C_4 サブタイプ (NADP-ME 型、NAD-ME 型、および PCK 型) の間で維管束鞘細胞内の葉緑体の配置が異なる (Gutierrez et al. 1974、Hatch et al. 1975)。NADP-ME 型と PCK 型では維管束鞘細胞内の葉緑体は維管束に対し遠心的に配置しているが、NAD-ME 型では求心的に配置している。また前二者では維管束鞘細胞の細胞壁にスベリン層と呼ばれるスベリンとろう質からなる膜構造を有している。NAD-ME 型では、維管束鞘細胞にスベリン層が存在しないため C_4 ジカルボン酸

の脱炭酸過程で放出された CO_2 が細胞外に漏れやすく、その漏れを防ぐために脱炭酸反応の場であるミトコンドリアを、 CO_2 固定の場である葉緑体が外側からとり囲み、しかも CO_2 の拡散距離を最大にするように両者が求心的に分布すると考えられている(Brown et al. 1972, Ellis 1977)。ベニベンケイは ME 型の CAM 植物であり、リンゴ酸の脱炭酸は細胞質に存在している NADP-ME とミトコンドリアの NAD-ME により行われているものと考えられている(Smith and Bryce 1992)。ベニベンケイで見い出された葉緑体の集合が CAM のこのような生化学的機能と直接関わっているのか否かは明らかでない。

Warmbrodt (1984) は、CAM を営むシダ植物 *Pyrrossia longifolia* において、葉肉細胞の細胞壁に沿って分布する細胞質に多数の小胞を観察している。また Balsamo と Uribe (1988a,b) は、コダカラベンケイの葉肉細胞では葉緑体周辺に多数の小胞が存在することを見出し、さらにそれらの小胞膜にも、中央液胞の液胞膜で働く ATPase 活性が存在することを報告している。つまり、それらの小胞膜でも液胞膜と同じようにリンゴ酸の輸送機能を持っていることを示唆している。本研究で調査した 5 種の CAM 植物の葉肉細胞では細胞質に網目状の小さな隔室構造が観察された。すべての葉緑体で観察されたわけではないが、このような構造物の多くは葉緑体を取り囲むように存在していた。また、次章で述べるように、PEPCase、PPDK の存在を表わす標識が隔室構造を成す細胞質でも、他の細胞質部分と同様に確認されている。このような隔室構造が液胞と同等のものとみなせるとすれば、この構造の形成は液胞膜の表面積を拡大し、

CAM の機能上必須な液胞と細胞質間におけるリンゴ酸の輸送をより効率的に行わせる役割があるのではないかと考えられる。

5. 摘要

本研究では、単子葉植物の PCK 型であるパイナップル科のパイナップル、および双子葉植物の ME 型であるザクロソウ科のアイズプラントおよびベンケイソウ科のコダカラベンケイ、セイロンベンケイ、ベニベンケイを用い、光学顕微鏡および透過型顕微鏡により CAM 植物の葉の内部構造を観察し、葉内部構造と CAM 機能との関連を検討した。5 種の CAM 植物の葉には、大型の液胞を持った葉肉細胞が緻密に分布しており細胞間隙は少なかった。葉肉細胞の葉緑体は、いずれもグラナが発達していた。維管束および維管束鞘細胞に含まれる葉緑体は、葉肉細胞の葉緑体と比べ小型であり、グラナの発達程度が低かった。また、葉肉細胞の細胞質には網目状の小さな隔室構造が発達していた。このような構造は液胞と細胞質間における代謝産物の輸送を効率的に行う役割があるものと考えられ、CAM 機能との関連が示唆された。ベニベンケイ葉の葉肉細胞では、他の CAM 植物と異なり葉緑体の集合が起こっていた。このような形態と CAM 機能との関連があるのか否かは、今後さらに調査する必要がある。

第3章 CAM植物の葉肉細胞における炭酸固定酵素 PEPCase および Rubisco の局在

1. 緒言

CAM植物の夜間における炭酸固定は PEPCase で行われる。PEPCase の活性は昼夜で大きく変動し、その原因としてリンゴ酸のフィードバック阻害に対する感受性の変化が知られている(Winter 1980)。すなわち、明期では PEPCase は少量のリンゴ酸によって大きな活性阻害を受けるが、暗期ではリンゴ酸による活性阻害は小さくなる。このような PEPCase のリンゴ酸感受性の変化は、CAMの代謝機構の日変化を解明する手がかりとして注目され、その活性調節について盛んに解析が進められてきた(Wu et al. 1985, Wedding et al. 1986, Nimmo 1990)。しかし、CAM植物における PEPCase が細胞内のどこで機能しているのかについては明確ではない。CAM植物の葉における PEPCase の細胞内分布については、これまで多くの報告がある。しかし、これらは細胞分画により得られた単離オルガネラについて生化学的に解析した結果に基づいたものである。CAM植物の PEPCase の場合、その酵素タンパク質を再現性よく抽出、精製することは容易でなく(O'Leary 1982)、その細胞内分布については研究者によって異なった結果が出されている(Brandon 1967, Spalding et al. 1979, Schnarrenberger et al. 1980, Perrot-Rechenmann et al. 1982)。

本研究では、PCK型に分類されるパイナップル (*Ananas comosus*)、並び

に ME 型に分類されるセイロンベンケイ (*Kalanchoe pinnata*)、コダカラベンケイ (*K. daigremontiana*) およびアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) の 4 種の CAM 植物を用い、炭酸固定にとって最も重要な酵素である PEPCase および Rubisco の細胞内における局在部位を金コロイド免疫電子顕微鏡法により検討した。

2. 材料および方法

植物材料

植物材料、およびその育成については、第 2 章と同様である。

抗血清

PEPCase に対する抗血清は、トウモロコシ葉より精製した PEPCase から作成したものを使用した。この抗血清は、松岡信博士 (名古屋大学) より提供を受けた。Rubisco の大サブユニット (LS) に対する抗血清は、ダイズ葉より精製した Rubisco (LS) から作成したものを使用した。これは、武藤尚志博士 (名古屋大学) より提供を受けた。

SDS-PAGE とウェスタンブロット

葉片 (0.5 g 生重) を抽出用緩衝液 1 ml [50 mM HEPES-KOH (pH 8.2)、5 mM DTT、0.2 mM Na₂-EDTA、1 mM PMSF、0.001 % (w/v) Leupeptin、および 1% (v/v) TritonX-100 を含む]、0.5 g の石英砂、および 25 mg の Polyclor AT とともに、氷

冷した乳鉢を用い磨砕した。磨砕液を 10 分間 4℃で遠心 (10 000g) し、その上澄みをタンパク質抽出液とした。タンパク質抽出液と、緩衝液 [75 mM Tris-HCl (pH 6.8)、8M 尿素、2.5%(w/v) SDS、および 7.5%(v/v) 2-メルカプトエタノールを含む] を 1:2 の割合で混合し、2 分間沸騰処理した。タンパク質の分離は、SDS を含む 12.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動によって行った。泳動終了後のゲル、ニトロセルロース膜 (0.45micron, BIO-RAD)、および濾紙 (10 cm × 10 cm) 8 枚をそれぞれ転写用緩衝液に 30 分間浸した。転写装置 (AE-6670P/N 型 ATTO) の下側の電極板 (マイナス側) 上に 4 枚の濾紙を重ね、さらにその上にニトロセルロース膜、ゲルを置いた。残り 4 枚の濾紙を最初の 4 枚と同様に重ね、上側の電極板 (プラス側) を取り付けた。10 V、100 mA で 80 分間転写した。転写後のニトロセルロース膜を 3%ゼラチンを含む 20 mM Tris (pH 7.5)-500 mM NaCl (TBS) 溶液でブロッキングした。そして、TBS-0.05% (v/v) Tween 20 (TTBS)溶液で 10 分間洗浄した後、抗血清と 1 時間反応させた。さらに、TTBS 溶液で 5 分間 2 回洗浄し、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (BIO-RAD) と標識反応させ、TTBS 溶液で 5 分間 2 回、TBS 溶液で 5 分間 1 回洗浄した。洗浄後、発色液 (AP color reagent, BIO-RAD) に入れ、膜上のバンドを特異的に発色させた。タンパク質量は、ブラッドフォード法 (Bradford 1976)に従って測定した。

免疫電子顕微鏡法

葉組織片は、3% (v/v) グルタルアルデヒド-50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8)を用い氷上で4時間固定した。その後、50 mM リン酸緩衝液で洗浄した。脱水は、エタノールシリーズ(30、50、80、95、100%)で各30分間行った。脱水終了後、葉組織片をLowicryl K4M とエタノールを1:2、1:1、および3:1の割合で混合した樹脂液中で各2時間ずつ置換した。次に、100% Lowicryl K4M 中で8時間、さらに樹脂を交換して一晩浸透させた。葉組織片は、樹脂を満たしたゼラチンカプセルに包埋し、24時間紫外線を照射し重合させた。

超薄切片は、ホルムバール支持膜を張った100メッシュのニッケルグリッドに回収した。グリッド上の切片は、0.5% 牛血清アルブミン (BSA)を含むPBS-T溶液[10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.2)、150 mM NaCl、0.1% Tween20]で30分間処理した後、0.5% BSA を含む PBS-T 溶液で希釈した抗血清と反応させた。それらのグリッドはPBS-T溶液で各10分間3回ずつ洗浄し、40倍に希釈した15 nm プロテイン A コロイド金粒子の懸濁液と30分間反応させた。その後、PBS-T溶液で各10分間4回、蒸留水で各5分間3回ずつ洗浄した。洗浄後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した。標本は日立 2000U 電子顕微鏡を使用し、加速電圧 75kV で観察した。

3. 結果

PEPCase、および Rubisco(LS)に対する抗血清と、葉から抽出した可溶性タンパク質との交差反応を、ウェスタンブロット法により調べた(図 3-1)。PEPCase と Rubisco(LS)に対する抗血清は、4 種の CAM 植物葉の PEPCase 及び Rubisco(LS)を認識することが確認され、各々強い 1 本のバンドを形成した。以上の結果は、これらの抗血清が CAM 植物の PEPCase と Rubisco(LS)を正確に認識し、免疫電子顕微鏡観察のプロープとして使用できることを示している。

免疫細胞化学に対する対照実験として、抗血清のかわりに非免疫血清で処理した組織切片の観察を行った。これらの組織切片では、ただ若干の非特異的な金コロイド粒子の標識しか観察されなかった。(図 3-2)。

ウェスタンブロット法により検定した抗体を用い、免疫電子顕微鏡法により CAM 植物葉における各光合成酵素の分布を調査した。Rubisco(LS)に対する金粒子の標識は、いずれの CAM 植物においても葉緑体のストロマに観察され、デンプン粒には観察されなかった(図 3-3)。PEPCase に対する金粒子の標識は、いずれの CAM 植物においても細胞質にだけ観察され、葉緑体やミトコンドリアなどのオルガネラには標識は見られなかった(図 3-4)。隔壁構造を成す細胞質でも他の細胞質部分と同程度の金粒子の標識が観察された(図 3-4D)。

4. 考察

PEPCase は、CAM 植物の夜間の炭酸固定に関わる重要な酵素であるが、その細胞内分布は明確にはされていない。例えば、Brandon (1967)は、*Bryophyllum*

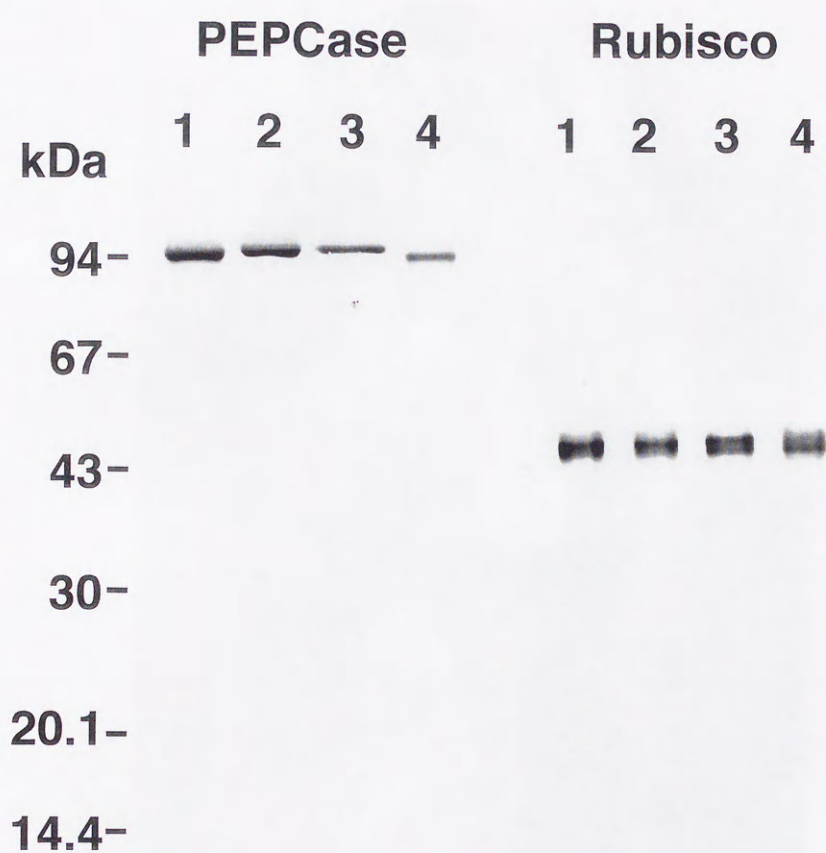


Fig. 3-1. Western blots of proteins extracted from leaves of *K. daigremontiana* (1), *K. pinnata* (2), *M. crystallinum* (3), and *A. comosus* (4). Total soluble protein (15 μ g for PEPCase, 1.5 μ g for Rubisco) was subjected to SDS-PAGE, blotting on nitrocellulose membranes, and identification with antisera against PEPCase and the large subunit of Rubisco.

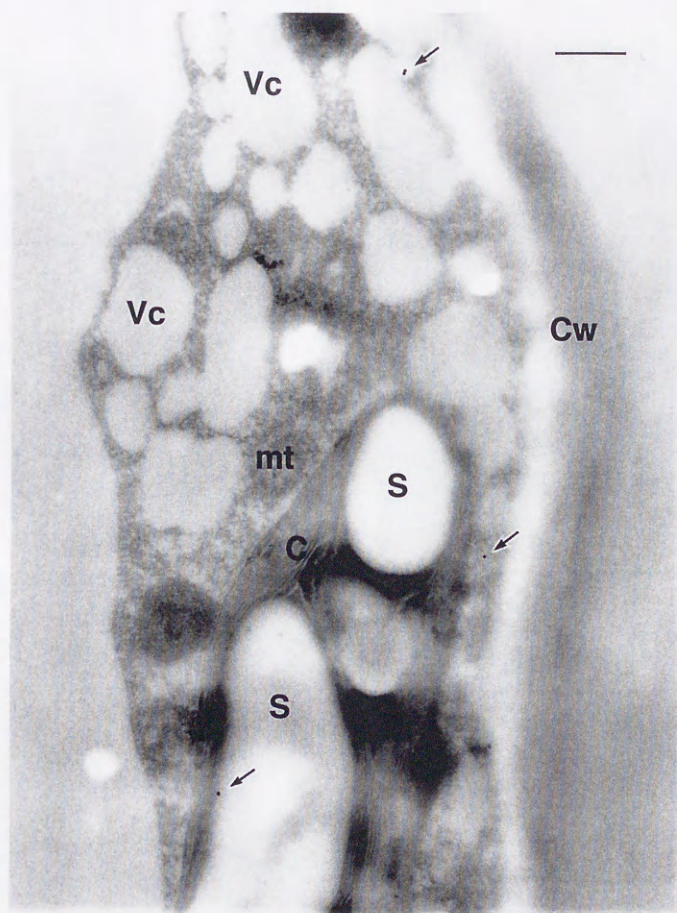


Fig. 3-2. Immunogold labeling of *K. daigremontiana* with non-immuno serum. Only non-specific labeling of gold particles (arrows) is present. Bar = 0.5 μ m. C, chloroplast; Cw, cell wall; mt, mitochondrion; S, starch grain; Vc, vesicle.

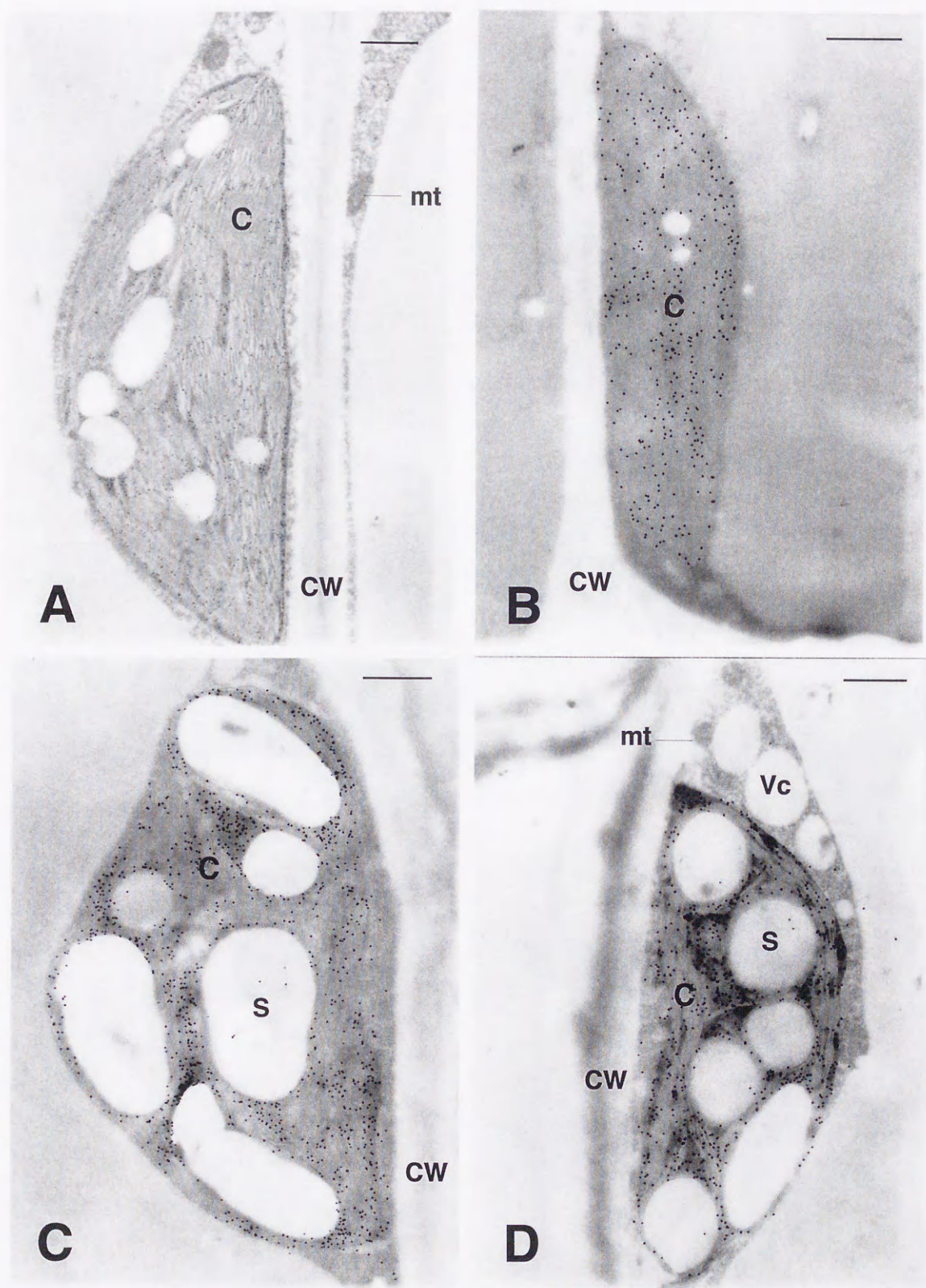


Fig. 3-3. Immunogold labeling of mesophyll cells of CAM species with antiserum to Rubisco. **A**, *Ananas comosus*. **B**, *Mesembryanthemum crystallinum*. **C**, *Kalanchoë daigremontiana*. **D**, *K. pinnata*. Bars = 0.5 μ m. C, chloroplast; CW, cell wall; mt, mitochondrion; S, starch grain; Vc, vesicle.

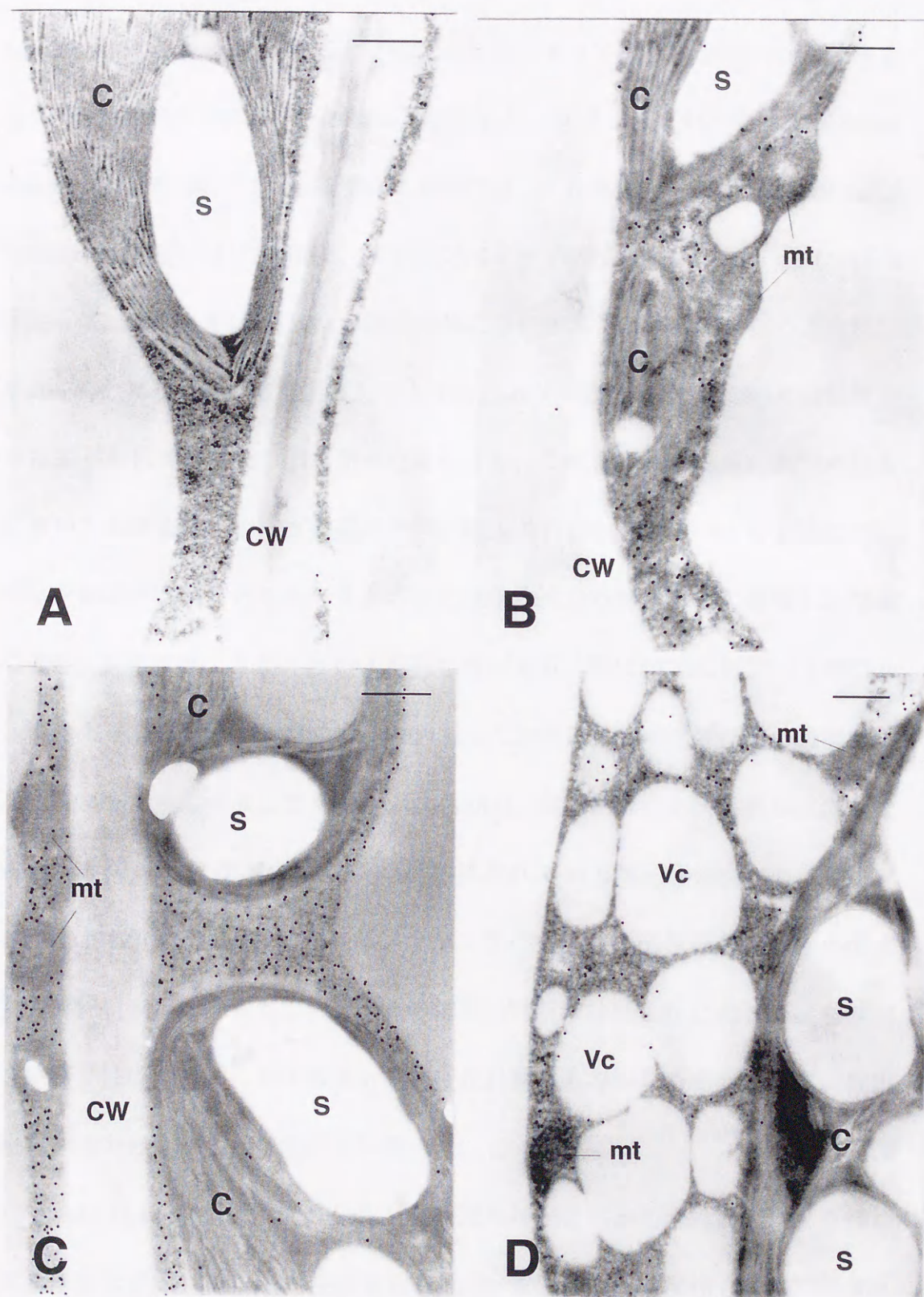


Fig. 3-4. Immunogold labeling of mesophyll cells of CAM species with antiserum to PEPCase. **A**, *Ananas comosus*. **B**, *Mesembryanthemum crystallinum*. **C**, *Kalanchoë daigremontiana*. **D**, *K. pinnata*. Bars = 0.5 μ m. C, chloroplast; CW, cell wall; mt, mitochondrion; S, starch grain; Vc, vesicle.

tubiflorum (= *Kalanchoë verticillata*) 葉のミトコンドリア画分に PEPCase が分布することを報告している。Dittrich (1979) は、コダカラベンケイ (*Kalanchoë daigremontiana*) 葉では細胞質に PEPCase が分布することを見出し、Schnarrenberger et al. (1980) は、セイロンベンケイ (*Kalanchoë pinnata*) と *Crassula lycopodioides* の葉では PEPCase は葉緑体に存在するとしている。このように、*Kalanchoë* 属の CAM 種で比較しても PEPCase の細胞内分布については相反する結果が報告されている。上述の結果を含め、これまで PEPCase の細胞内分布についての調査はほとんどが細胞分画法により行われてきた。この方法では、細胞が破壊されることに伴いさまざまな細胞内成分が酵素分子と接触し、酵素の変性、失活が起こり易いという不利な点がある。特に、CAM 植物の PEPCase はこのような影響を受けやすく、PEPCase の活性はタンパク質構造の時間的な変化によって変性することや (O' Leary 1982)、凍結乾燥した試料から抽出した PEPCase では活性が減少することが指摘されている (Buchanan-Bollig 1980)。Winter (1982) は、CAM 化したアイズプラントについて抽出後の PEPCase の酵素学的特性の変化を調査している。その結果、明期に抽出された PEPCase のリンゴ酸感受性は、PEP に対する K_m 値に変化は見られないにもかかわらず、抽出後急速に失われることを認めている。

Opuntia Ficus-indica では、単にショ糖密度の勾配分画から水性調製により得た葉緑体画分では PEPCase 活性は極めて低く、厳密な密度勾配遠心分離で精製された場合でのみ葉緑体画分にその活性が認められる (Mukerji and Ting 1968)。さ

らに、非水性溶媒調製と hexane-carbon tetrachloride 勾配により葉緑体を精製した結果、PEPCase は葉緑体の内部ではなく膜に局在するとしている(Mukerji and Ting 1968)。Crassula、Kalanchoë 葉の磨砕液を遠心(300g)した後、その沈殿物から PEPCase 活性は得られるが、上清液には活性がみられなかった。しかし、その沈殿物に TritonX-100 を加えることにより、かなりの PEPCase 活性が得られた(Wu 1985)。同様な結果は、近藤 (1996)、および徳田 (1996)の実験でも認められており、通常の抽出用緩衝液ではほとんど PEPCase 活性は得られない場合でも、TritonX-100 を添加することにより顕著な活性増大が認められた。これらの報告は、PEPCase は膜（おそらく葉緑体膜）に存在していることを示唆している。しかし一方で、いくつかの他の細胞質局在型酵素では抽出時にオルガネラの膜に結合することが見出されており(Jenkins et al. 1985、Moorhead and Plaxton 1988)、必ずしもこれらの結果から直ちに PEPCase が葉緑体膜に存在していると判断するのは難しい。Wu et al. (1992) は、トウモロコシ葉で精製された PEPCase は in vitro でトウモロコシ葉の葉緑体膜と結合し不活性化されることを見出している。これは、PEPCase が葉緑体膜、またはその膜に内在する不活性化タンパク質と結合することにより、PEPCase の 4 量体構造（活性型）の分離が引き起こされ、不活性型に変化するためだと考えている。このような現象が CAM 植物の PEPCase の抽出、精製段階でも生じ、葉緑体と同じ画分の中に葉緑体膜に結合した PEPCase が得られたのかもしれない。そして、TritonX-100 のような界面活性剤を処理することにより、膜から分離した PEPCase が活

性を表したと考えられることができる。

近年、細胞内におけるタンパク質の局在を解析するうえで、細胞分画法に代わり、免疫細胞化学的手法が広く用いられるようになってきた。これによれば、組織切片上でタンパク質の局在部位を検出することが可能であり、上に述べたような細胞の他のフラクションのコンタミネーションや酵素タンパク質の変性、結合等を考慮する必要がない。Perrot-Rechenmann et al. (1982)は蛍光抗体法を用い、CAM型のベニベンケイ (*Kalanchoë blossfeldiana*) 葉における PEPCase の局在を調査した。これによれば、蛍光標識は若干葉緑体にも観察されたが、大部分は細胞質に分布することを報告している。Taborsky et al. (1983)も同様に蛍光抗体法により、コダカラベンケイの葉では PEPCase は主に細胞質に分布することを示している。一方、このような蛍光抗体法では光学顕微鏡により組織切片を観察することから、細胞内の内部、すなわちオルガネラレベルでの標識の局在部位を正確に決めることは容易ではない。本研究で使用した手法によれば、電子顕微鏡下で抗原タンパク質の局在部位を観察することができ、このような欠点を補うことができる。金コロイド免疫電子顕微鏡法を用いた本研究の結果から、調査した4種のCAM植物葉のいずれにおいても、PEPCase は葉肉細胞の細胞質に、Rubisco は葉緑体に局在していることが明らかになった。このようなCAM植物における2種炭酸固定酵素の局在部位は、 C_4 植物におけるこれらの酵素の細胞内局在部位と同じである(Hatch and Osmond 1976)。しかし、前者では同一の細胞の内で場所を変えながら存在しているのに対し、後者では葉肉細胞

と維管束鞘細胞という 2 種類の細胞の間で、別々に分かれて存在している点で異なっている。

5. 摘要

CAM 植物の葉肉細胞における PEPCase の局在部位については、研究者により異なった結果が報告されており、必ずしも明確に決定されているわけではない。本研究では、単子葉植物の PCK 型であるパインアップル科のパインアップル、および双子葉植物の ME 型であるザクロソウ科のアイスプラントおよびベンケイソウ科のコダカラベンケイ、セイロンベンケイを用い、CAM 植物の葉肉細胞における炭酸固定酵素 PEPCase および Rubisco の局在を金コロイド免疫電子顕微鏡法により検討した。この結果、調査した CAM 植物すべてにおいて、PEPCase は細胞質に、Rubisco は葉緑体に局在することが明らかになった。このような 2 つの炭酸固定酵素の光合成細胞内における局在部位は C_4 植物の場合と同じであるが、CAM 植物では同一細胞の中で場所を変えて存在している点で、 C_4 植物とは異なっていた。

第4章 CAM植物の葉肉細胞におけるPPDKの局在様式と その多様性

1. 緒言

ピルビン酸正リン酸ジキナーゼ(PPDK)は、植物においてピルビン酸から PEP の生成反応を触媒する。 C_4 植物では、PPDK の触媒反応は、気孔から入った CO_2 の最初の固定酵素である PEPCase に対し、その基質である PEP を直接供給する役割を果たす(Hatch and Slack 1968)。CAM 植物では、ME 型に属する植物のなかで PPDK の活性が認められており(Kluge and Osmond 1971, Sugiyama and Laetsch 1975, Osmond and Holtum 1981)、PPDK の触媒反応は、リンゴ酸の脱炭酸後に生じたピルビン酸を代謝的に回収するためのグルコース新生の一端を担っていると考えられている(Osmond and Holtum 1981)。

C_4 植物の葉における PPDK の細胞内局在部位に関しては、PPDK は葉緑体に存在するという見解で一般化されており(Osmond and Holtum 1981, Edwards et al. 1985, Smith and Bryce 1992, Black et al. 1996)、CAM 植物でも一部の植物の調査によって、PPDK は葉緑体に存在することが報告されている(Spalding et al. 1979, Winter et al. 1982)。しかし、PPDK は C_4 、CAM 植物の葉の葉緑体に限定されるわけではなく、近年では C_3 植物であるイネやコムギの種子において細胞質に局在する PPDK が見出されている(Aoyagi and Bassham 1984, Aoyagi and Chua 1988, Moons et al. 1998)。また、生育条件により光合成型を C_3 型と C_4 型に変換する水

陸両生植物 *Eleocharis vivipara* では、光合成組織に葉緑体型と細胞質型の PPK が蓄積しており、この場合細胞質型 PPK は C_4 型の陸生型よりも C_3 型を示す水生型でより強く発現している (Ueno 1996, Agaric et al. 1997)。

C_4 植物の PPK に関する研究は、これまで多数報告されてきたのに対し、CAM 植物の PPK については極めて少ない。CAM 植物は、維管束植物の様々な系統の中に多数出現している。またある種の CAM 植物では環境条件によって C_3 様の光合成を営むことが知られており、CAM 植物の代謝は変異が著しい (Winter and Smith 1996)。このようなことから、CAM 植物における PPK の細胞内局在については種によって変異が起こっている可能性があり、種を広げて再検討する必要がある。

本研究では、CAM 植物における PPK の細胞内局在を明らかにするために、前章の実験でも用いたパインアップル、アイスプラント、コダカラベンケイ、セイロンベンケイの 4 種を含む、様々な分類群に属する 6 科 15 属 26 種の CAM 植物について、PPK の葉肉細胞内における局在を金コロイド免疫電顕法により検討し、PPK の局在には種間により変異があることを見出した。同時にこれらの CAM 植物について PPK や脱炭酸酵素の活性を測定し、葉緑体型および細胞質型 PPK の出現と脱炭酸酵素の活性レベルとの関係を検討した。

2. 材料及び方法

植物材料

本章で新たに実験に使用した 5 科 13 属 22 種の CAM 植物 を第 4-1 表に示す。この内、*Lithops*、*Schlumbergera*、*Crassula argentea*、*Sanseveria* は、園芸店より購入した。他の植物はすべて（財）進化生物学研究所（東京、世田谷）で育成しているものを使用した。これらの植物の枝先を、土とバーミュキュライトを 1:1 の割合で詰めたポット（直径 22 cm 深さ 25 cm）に植え、ガラス室の自然光下、日中 25℃ 夜間 20℃ で育生した。灌水は、土壌の乾き具合をみて適宜行った。施肥は、2 週に 1 回の割合でハイポネックスの 1000 倍希釈液を 1 ポット当たり 200 ml 与えた。

抗血清

PPDK に対する抗血清は、トウモロコシ葉より精製した PPDK から作成したものを使用した。この抗血清は、松岡信博士（名古屋大学）から提供を受けた。

SDS-PAGE とウェスタンブロット

SDS-PAGE とウェスタンブロットの方法は第 3 章と同様である。しかし、サボテン科の *Hylocereus guatemalensis*、*Nopalxochia ackermannii*、*Opuntia bergeriana* の 3 種の場合、供試組織は強い粘性を示し磨砕が困難であったため、組織を液体窒素により凍結粉碎し、その後緩衝液を入れ磨砕した。これら植物の磨砕方法は、以下の酵素活性の測定およびリンゴ酸の定量でも同様である。

免疫電子顕微鏡法

免疫電子顕微鏡法については、第3章と同様である。

金コロイド標識密度の測定

金コロイド標識密度の測定については、第3章と同様である。

酵素活性の測定

測定に使用する葉片または茎片は、晴天の日の午前11時から午後1時の間に採集した。採取後すばやく液体窒素で凍結させ、すぐに測定に用いた。

およそ0.5gの葉片または茎片を抽出用緩衝液1ml [50mM Hepes-KOH (pH8.0)、5mM DTT、0.2mM Na₂-EDTA (pH7.0)、2.5mM MgCl₂、2.5mM MnCl₂、1%(v/v) TritonX-100を含む]、0.5gの石英砂、5mgの牛血清アルブミン(BSA)、および25mgの Polyclor AT とともに氷冷した乳鉢を用い磨碎した。磨碎液を10分間4℃で遠心(10000g)し、その上澄みを酵素活性測定に用いた。すべての酵素活性の測定は(Ueno et al., 1988)で述べた分光光学的手法により25℃で行った。

PPDK 活性の反応液の組成は、50mM Tris-HCl (pH8.0)、5mM DTT、10mM MgCl₂、1.25mM ピルビン酸、0.25mM NADH、2.5mM NaHCO₃、2.5mM K₂HPO₄、1U MDH、0.2U PEPCase (Wako 166-14721)、30μl 酵素抽出液、1.25mM ATP とした。

NADP-ME 活性の反応液の組成は、25mM Tris-HCl (pH8.0)、0.2mM Na₂-EDTA、5mM リンゴ酸、5mM DTT、0.5mM NADP、10μl 酵素抽出液、10mM MgCl₂ とした。

NAD-ME 活性の反応液の組成は、25mM Hepes-KOH (pH7.2)、0.2mM Na₂-EDTA、5mM リンゴ酸、5mM DTT、2mM NAD、10μl 酵素抽出液、25μM NADH、1U MDH、4mM MnCl₂、0.15mM coenzyme A とした。

PCK 活性の反応液の組成は、50mM Hepes-KOH (pH7.0)、2.5mM MgCl₂、2.5mM MnCl₂、5mM DTT、4U pyruvate kinase、0.2mM ATP、1.2mM オキサロ酢酸、10μl 酵素抽出液とした。

葉緑素は 80%アセトンで抽出し、Arnon (1949)の方法に従って分析した。

リンゴ酸の定量

測定に使用した葉片あるいは茎片は、午前 5 時（朝方）と午後 5 時（夕方）に採集した。採取後すばやく液体窒素で凍結させ、-80℃で冷凍保存した。

およそ 0.2g の葉片または茎片を 5%(v/v) HClO₄ 5ml と 0.5g 石英砂とともに、氷冷した乳鉢を用い磨砕し、その磨砕液を 20 分間氷中に保った。その後磨砕液を 2M KOH により pH 5 に調整し、10 分間 4℃で遠心（10000g）した。沈殿物に 2ml の水を加え懸濁し、再度遠心(10000g)した。この上澄み液と先に得た上澄み液を合わせ、Mollering (1974)の手法に従ってリンゴ酸の定量を行った。

3. 結果

リンゴ酸の蓄積量の日変化

CAM 植物では、夜間外気から吸収された CO_2 がリンゴ酸の形で葉肉細胞の液胞に蓄積され、朝方はリンゴ酸の蓄積量が最大となる。日中には蓄積したリンゴ酸が脱炭酸され、夕方にはリンゴ酸の蓄積量は最低となる。このような昼夜におけるリンゴ酸の日変化は、他の緑色植物にはみられない CAM 植物に特有な特徴である (Osmond 1978)。そこで、調査に用いた CAM 植物が実際に本研究の育成条件下で CAM を遂行しているか否か確かめるために、これら植物の光合成組織内の朝方と夕方におけるリンゴ酸含量を測定した (表 4-1)。その結果、すべての植物で夕方に比べ朝方にリンゴ酸含量が高いことが確認された。夕方に対する朝方のリンゴ酸含量の比は 2.3~20.2 倍の値を示し、種によってかなりの幅があった。これらの結果から、調査したすべての植物で程度の差はあるものの CAM が稼働していることが確認された。

PPDK と脱炭酸酵素の酵素活性

CAM 植物はリンゴ酸の脱炭酸反応の違いにより、NADP-ME および NAD-ME が機能する ME 型と、PCK が機能する PCK 型の 2 つのサブタイプに分けられる (Dittrich 1973、1976)。また、PPDK 活性は PCK 型には見られず、ME 型には見出される (Winter and Smith 1996)。そこで、サブタイプを明確にするために、PCK 型に分類されることが知られるパインアップルを除いた CAM 植物につい

Table 4-1. Diurnal changes in the levels of malate in photosynthetic tissues of various CAM plants.
Data are means of three plants \pm SD.

Taxa	Level of malate ($\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight)		Ratio (night / day)
	End of night	End of day	
Dicotyledoneae			
Aizoaceae			
<i>Lithops</i> sp.	47.2 \pm 3.1	6.4 \pm 0.6	7.4
Cactaceae			
<i>Epiphyllum oxypetalum</i> (DC.) Haw.	26.3 \pm 1.0	3.8 \pm 0.6	6.9
<i>Hylocereus guatemalensis</i> (Eichl.) Br. et R.	52.3 \pm 1.3	22.9 \pm 4.4	2.3
<i>Nopalxochia ackermannii</i> Knuth.	20.5 \pm 2.1	4.6 \pm 0.8	4.5
<i>Opuntia bergeriana</i> Web.	96.6 \pm 5.8	7.3 \pm 1.3	13.2
<i>Pereskopsis velutina</i> Rose.	123.1 \pm 5.9	27.0 \pm 3.5	4.6
<i>Rhodocactus bleo</i> (H. B. K.) Knuth.	39.5 \pm 2.5	6.4 \pm 0.8	6.2
<i>Zygocactus truncatus</i> (Haw.) K. Sch. cv. Akane	24.5 \pm 1.1	2.8 \pm 0.9	8.8
Crassulaceae			
<i>Crassula arborescens</i> (Mill.) Willd.	41.8 \pm 5.9	8.3 \pm 1.7	7.1
<i>C. argentea</i> Thunb.	58.8 \pm 6.4	4.7 \pm 0.5	12.5
<i>C. lactea</i> Sol.	42.9 \pm 4.8	6.3 \pm 0.7	6.8
<i>Kalanchoë beharensis</i> Drake et Castillo (hairy form)	77.6 \pm 5.5	13.6 \pm 2.1	5.7
<i>K. fedtschenkoi</i> Ham. et Perr.	54.6 \pm 2.1	2.7 \pm 0.3	20.2
<i>K. hildebrandtii</i> Baill.	48.5 \pm 2.1	2.8 \pm 0.2	17.3
<i>K. miniata</i> Hilsenb. et Bojer	68.7 \pm 2.0	4.2 \pm 0.2	16.4
<i>K. orgyalis</i> Bak.	40.3 \pm 3.0	4.1 \pm 0.4	9.8
<i>K. prolifera</i> (Bowie) Ham.	49.5 \pm 2.3	3.8 \pm 0.5	13.0
<i>Sedum palmeri</i> S. Watsoson	30.3 \pm 1.3	3.2 \pm 0.3	9.5
<i>S. rubrotinctum</i> R.T. Clausen	32.0 \pm 3.3	7.6 \pm 2.9	4.2
Didieraceae			
<i>Alluaudia procera</i> Drake	57.6 \pm 1.8	4.3 \pm 0.8	13.4
Monocotyledoneae			
Dracaenaceae			
<i>Sansevieria trifasciata</i> Prain. cv. Hahnii	85.3 \pm 4.8	7.2 \pm 1.0	11.8
<i>S. zeylanica</i> Willd.	84.5 \pm 4.4	8.4 \pm 1.0	10.1

て、3種の脱炭酸酵素、NADP-ME、NAD-ME、PCKの酵素活性を測定した（表4-2）。調査したすべてのCAM植物でPCK活性は見出されなかったが、NADP-MEおよびNAD-MEの活性が認められた。また、PPDKの活性も、調査したすべての植物において認められた（表4-2）。以上の結果は、ここで調査に用いたCAM植物の内、パイナップル以外のCAM植物はすべてME型CAMであることを示している。

NADP-MEとNAD-ME活性を比較すると、ほとんどのCAM植物（25種の内17種）で、同等かあるいはNAD-ME活性が高い傾向が見出された（表4-2）。NADP-MEに比べNAD-ME活性が特に高い傾向を示したものは次の植物であった。*Lithops* sp. (NAD-ME / NADP-ME, 3.3)、*Opuntia bergeriana* (2.8)、*Peireskiopsis velutina* (4.7)、*Rhodocactus bleo* (2.2)、*Zygocactus truncatus* (3.2)、*K. daigremontiana* (2.2)、*K. fedtschenkoi* (2.2)、*K. prorifera* (1.8)、*Sedum rubrotinctum* (1.8)。しかしこれらの植物とは対照的に、アイスプラントおよび*Crassula*属の3種、*C. arborescens*、*C. argentea*、*C. lactea*ではNAD-MEに比べNADP-ME活性が高く、NAD-MEに対するNADP-ME活性の割合は、それぞれ2.5、3.0、3.3、2.8であった。

ウェスタンブロット法によるPPDKの検出

トウモロコシ葉のPPDKに対する抗体とCAM植物の光合成組織から抽出した可溶性タンパク質との交差反応をウェスタンブロット法により調査した。パ

Table 4-2. Enzyme activities in photosynthetic tissues of various CAM plants. Data are means of three plants \pm SD. PPK, pyruvate, Pi dikinase; NADP-ME, NADP-malic enzyme; NAD-ME, NAD-malic enzyme; PCK, PEP-carboxykinase; N.D., not detectable.

Taxa	PPDK	NADP-ME	NAD-ME	PCK
	($\mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$)			
Dicotyledoneae				
Aizoaceae				
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	11.8 \pm 1.6	93.4 \pm 5.7	37.8 \pm 3.0	N.D.
<i>Lithops</i> sp.	19.4 \pm 1.0	15.9 \pm 1.8	53.2 \pm 0.9	N.D.
Cactaceae				
<i>Epiphyllum oxypetalum</i>	8.5 \pm 0.6	31.9 \pm 2.9	22.4 \pm 1.7	N.D.
<i>Hylocereus guatemalensis</i>	10.8 \pm 0.5	30.4 \pm 0.7	27.9 \pm 3.4	N.D.
<i>Nopalxochia ackermannii</i>	30.4 \pm 5.4	17.9 \pm 5.9	19.4 \pm 1.1	N.D.
<i>Opuntia bergeriana</i>	14.5 \pm 0.9	17.3 \pm 0.6	49.0 \pm 2.1	N.D.
<i>Peresklopsis velutina</i>	9.8 \pm 0.4	10.1 \pm 0.1	48.1 \pm 7.5	N.D.
<i>Rhodocactus bleo</i>	7.7 \pm 1.4	5.2 \pm 1.0	11.3 \pm 0.7	N.D.
<i>Zygocactus truncatus</i>	15.3 \pm 1.1	11.9 \pm 0.5	38.5 \pm 1.1	N.D.
Crassulaceae				
<i>Crassula arborescens</i>	5.4 \pm 0.2	74.1 \pm 2.4	24.4 \pm 0.6	N.D.
<i>C. argentea</i>	7.9 \pm 1.8	56.8 \pm 3.8	17.1 \pm 3.2	N.D.
<i>C. lactea</i>	6.1 \pm 0.1	64.4 \pm 3.4	23.3 \pm 0.5	N.D.
<i>Kalanchoë beharensis</i>	13.6 \pm 1.2	43.6 \pm 2.8	44.6 \pm 3.3	N.D.
<i>K. daigremontiana</i>	10.6 \pm 0.6	29.1 \pm 3.3	64.3 \pm 3.2	N.D.
<i>K. fedtschenkoi</i>	22.0 \pm 1.5	41.4 \pm 1.2	90.9 \pm 1.4	N.D.
<i>K. hildebrandtii</i>	18.5 \pm 1.7	35.7 \pm 3.6	48.0 \pm 4.8	N.D.
<i>K. miniata</i>	7.7 \pm 0.7	15.7 \pm 3.1	21.1 \pm 1.5	N.D.
<i>K. orgyalis</i>	11.4 \pm 0.8	52.9 \pm 0.6	53.8 \pm 3.8	N.D.
<i>K. pinnata</i>	11.8 \pm 0.2	32.8 \pm 4.0	53.7 \pm 2.1	N.D.
<i>K. prolifera</i>	21.0 \pm 1.5	42.5 \pm 2.8	75.1 \pm 6.0	N.D.
<i>Sedum palmeri</i>	14.4 \pm 0.4	40.9 \pm 7.6	32.5 \pm 5.3	N.D.
<i>S. rubrotinctum</i>	9.3 \pm 0.3	24.9 \pm 1.6	43.9 \pm 3.6	N.D.
Didieraceae				
<i>Alluaudia procera</i>	18.1 \pm 6.7	30.7 \pm 8.4	35.6 \pm 9.8	N.D.
Monocotyledoneae				
Dracaenaceae				
<i>Sansevieria trifasciata</i>	10.0 \pm 0.7	23.0 \pm 3.4	19.1 \pm 3.7	N.D.
<i>S. zeylanica</i>	5.8 \pm 0.6	22.4 \pm 1.1	27.2 \pm 0.8	N.D.

インアップルでは、ニトロセルロース膜上にバンドが検出されなかったが(図 4-1)、他の CAM 植物では、本抗体によって PPKK が認識され、ニトロセルロース膜上に強いバンドを形成することが確認された(図 4-1、4-2)。 *Sedum rubrotinctum* と *Kalanchoë* 属のすべての種では、互いに隣接した 2 本のバンドが見出された(図 4-1、4-2)。それら 2 本のバンドの内、下位のバンドはほぼ 94kDa 付近に形成され、これは一本のバンドを示す CAM 植物の PPKK のサイズと類似していた。

PPKK に対する金コロイド標識の局在

ウェスタンブロットにより検定した抗体を用い、免疫電子顕微鏡法により CAM 植物の葉肉細胞内における PPKK の分布を調査した(図 4-3、4-4、4-5)。 PCK 型 CAM 種であるインアップルでは、PPKK の標識が観察されず(図 4-3A)、ウェスタンブロットの結果と一致した。他のすべての ME 型 CAM 種では、PPKK に対する金粒子の標識は、葉緑体および細胞質に、またはいずれか一方に見出された。核、ミトコンドリア、パーオキシゾーム等の葉緑体以外のオルガネラには有意な標識は見出されなかった。葉緑体と細胞質に対する PPKK の標識には種により著しい差が見出された。 PPKK に対する金粒子の標識密度を測定した結果、 PPKK の細胞内分布のパターンは大きく次の 3 つのタイプに分類された(表 4-3)。すなわち、標識が葉緑体に限定されるもの(Chlt 型)、葉緑体と細胞質の両方に分布するもの(Cyt -Chlt 型)、およびほとんど細胞質のみに分

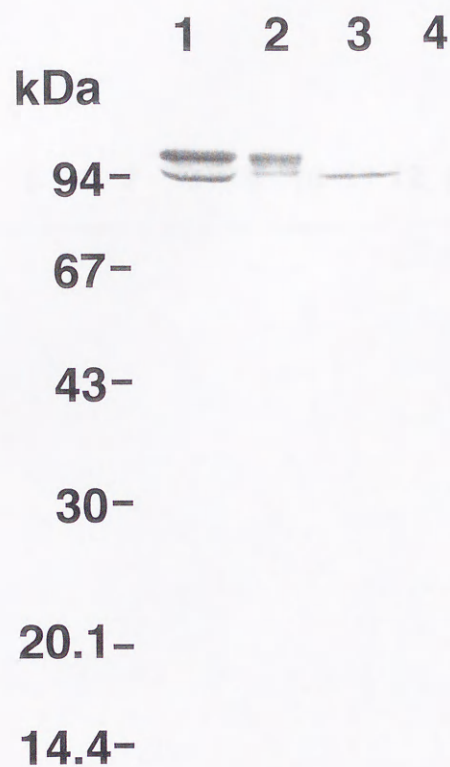


Fig. 4-1. Western blots of proteins extracted from leaves of *K. daigremontiana* (1), *K. pinnata* (2), *M. crystallinum* (3), and *A. comosus* (4). Total soluble protein (30 μ g) was subjected to SDS-PAGE, blotting on nitrocellulose membranes, and identification with antiserum against PPDK.

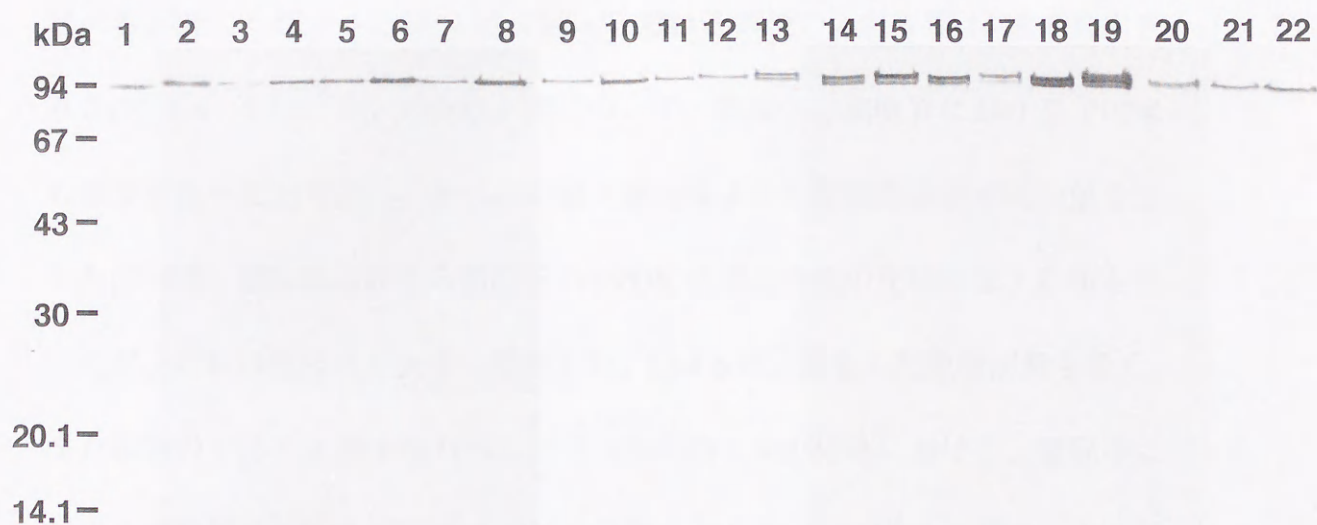


Fig. 4-2. Western blots of proteins extracted from photosynthetic tissues of 22 CAM species with antiserum against PPDK. Lane 1, *Lithops* sp.; 2, *Epiphyllum oxypetalum*; 3, *Hylocereus gluatemalensis*; 4, *Nopalxochia ackermanni*; 5, *Opuntia bergeriana*; 6, *Pereskopsis velutina*; 7, *Rhodocactus bleo*; 8, *Zygocactus truncatus*; 9, *Crassula arborescens*; 10, *C. argentea*; 11, *C. lactea*; 12, *Sedum palmeri*; 13, *Sedum rubrotinctum*; 14, *Kalanchoë beharensis*; 15, *K. fedtschenkoi*; 16, *K. hidebrandtii*; 17, *K. miniata*; 18, *K. orgyalis*; 19, *K. prorifera*; 20, *Alluaudia procera*; 21, *Sanseveria trifasciata*; 22, *Sanseveria zeylamica*. Total soluble protein (15 μ g) was load in each lane.

布するもの (Cyt 型) である (表 4-3)。

Chlt 型 は、アイスプラントおよびベンケイソウ科の クラスラ属の 3 種で見出された(図 4-3)。Cyt 型はサボテン科の 7 種で見出された(図 4-5C、D、E)。Cyt 型では、葉緑体の標識密度は他の細胞小器官より高いが、細胞質の標識密度に比べると著しく低かった(表 4-3)。Chlt-Cyt 型はその他の 4 科 5 属 14 種で見出された(図 4-4、4-5A、B)。Chlt-Cyt 型について、葉緑体と細胞質における PPKK の標識密度を比較すると、すべての種で葉緑体よりも細胞質の方が高い値を示した(表 4-3)。葉緑体に対する細胞質の PPKK の標識密度の比は 2 以上の値を示したが、これは種により大きく変異した。図 4-6 に、調査した種数が最も多く、また多数の Chlt-Cyt 型を含むベンケイソウ科の CAM 植物における、葉緑体に対する細胞質の PPKK 標識密度の比の変異を示した。 *Kalanchoe* 属の CAM 種は、2.0~4.8 倍を示したが、 *Sedum* 属の 2 種、*S. palmeri*、*S. rubrotinctum* は、それぞれ 7.7、8.6 倍という高い値を示した。一方 Chlt 型に区分される *Crassula* 属の 3 種では、その比は極めて小さく、他のベンソウ科の種とは明らかに PPKK の蓄積パターンが異なっていた。

なお、Cyt 型でも葉緑体に対する細胞質の PPKK 標識密度の比について見てみると、*Hylocereus glaucomaculatus* のように Cyt-Chlt 型の 2 種の *Sedum* の値に近いものもあった。しかし、すでに述べたように、前者の葉緑体の標識値は後者の 2 種に比べると明らかに低く、ここでは Cyt 型に分類した。このため、本来 Cyt 型と Cyt-Chlt 型は連続したものにとらえることができるかもしれない。

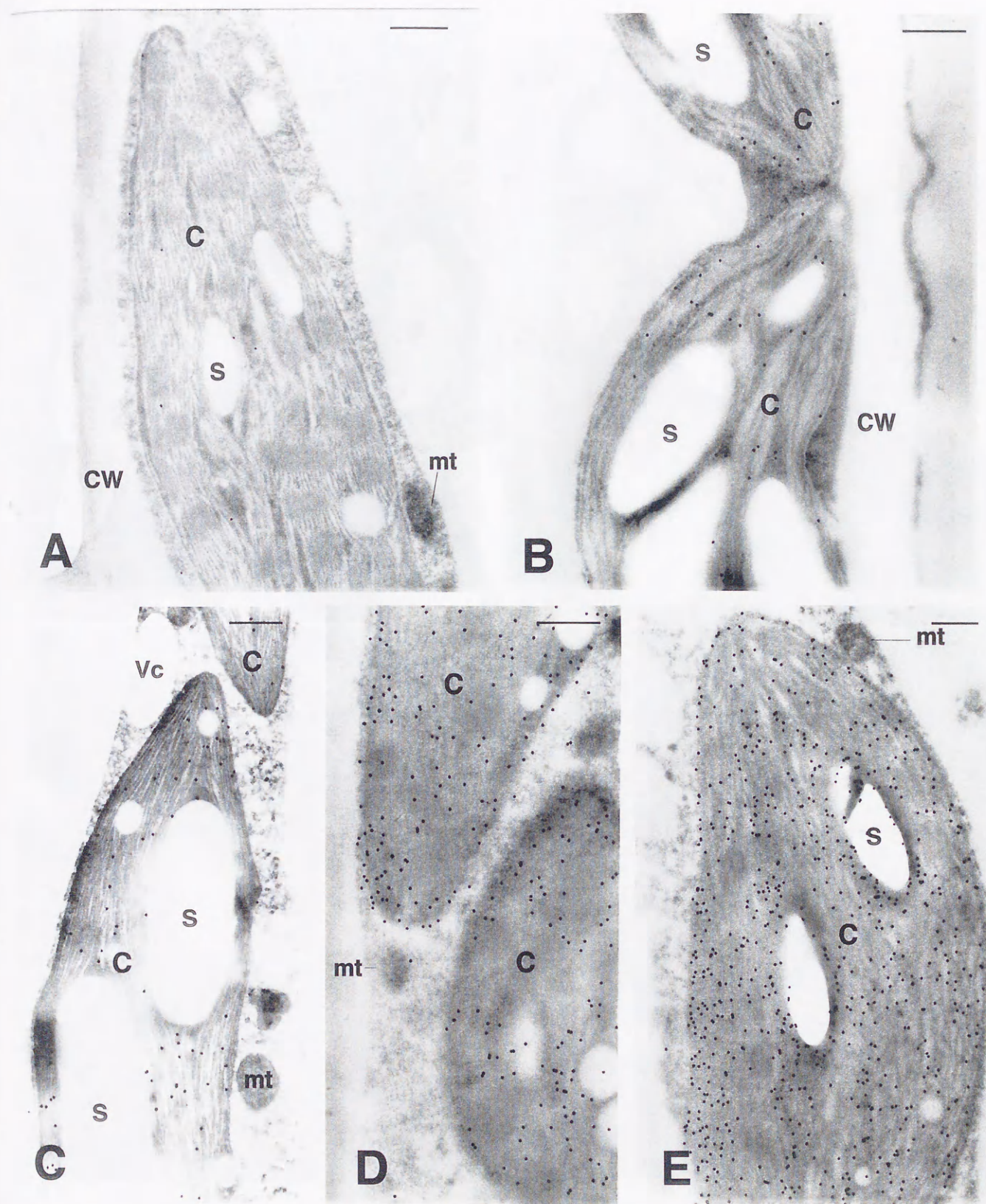


Fig. 4-3. Immunogold labeling of mesophyll cells of CAM species with antiserum to PPDK. **A**, *Ananas comosus*. **B**, *Mesembryanthemum crystallinum*. **C**, *Crassula lactea*. **D**, *C. argentea*. **E**, *C. arborescens*. Bars = 0.5 μ m. C, chloroplast; CW, cell wall; mt, mitochondrion; S, starch grain; Vc, vesicle.

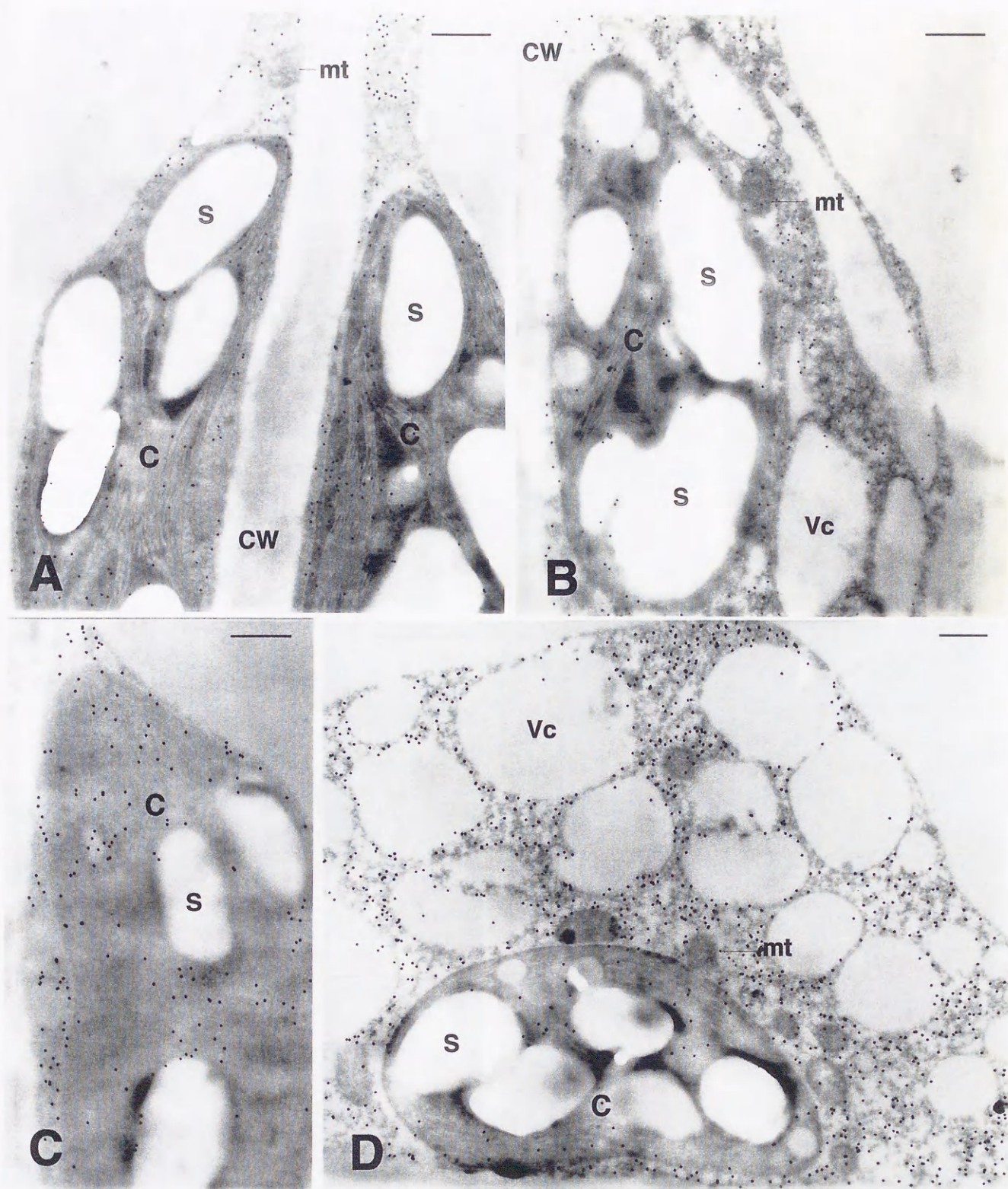


Fig. 4-4. Immunogold labeling of mesophyll cells of CAM species with antiserum to PPDK. **A**, *Kalanchoë daigremontiana* **B**, *K. pinnata* **C**, *K. beharensis*. **D**, *K. prolifera*. Bars = 0.5 μ m. C, chloroplast; CW, cell wall; mt, mitochondrion; S, starch grain; Vc, vesicle.

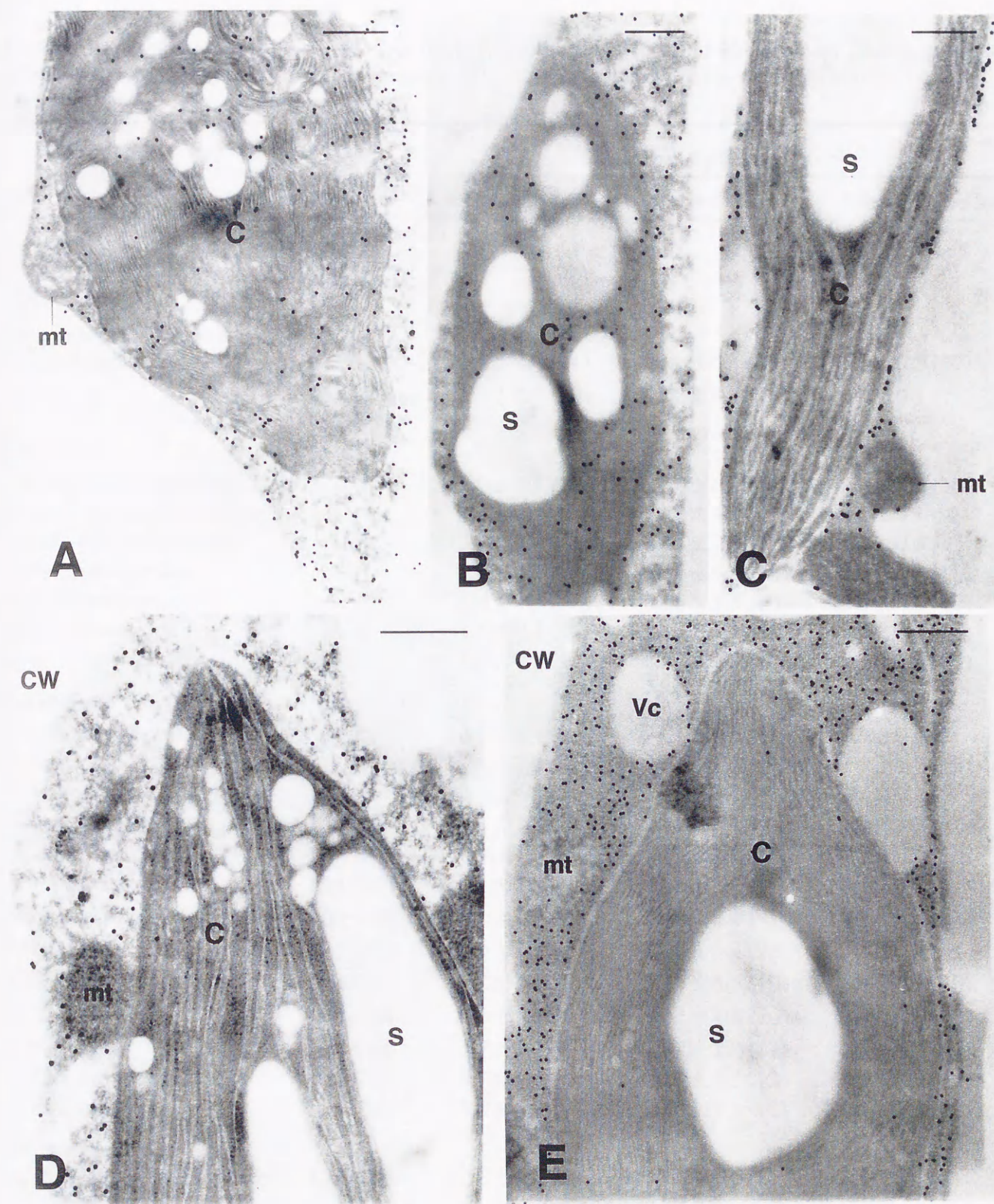


Fig. 4-5. Immunogold labeling of mesophyll cells of CAM species with antiserum to PPDK. **A**, *Sansevieria trifasciata* **B**, *Lithops* sp. **C**, *Rhodocactus bleo*. **D**, *Opuntia bergeriana*. **E**, *Zygocactus truncatus*. Bars = 0.5 μ m. C, chloroplast; CW, cell wall; mt, mitochondrion; S, starch grain; Vc, vesicle.

Table 4-3. Immunogold labeling of PPDK in photosynthetic cells of various CAM plants. Numbers of gold particles per unit area (μm^{-2}) are given as means \pm SD. Numbers in parentheses show the numbers of cell profiles examined.

Taxa	Type	No. of gold particles (μm ⁻²)		
		Chloroplasts	Cytosol	Other organelles
Dicotyledoneae				
Aizoaceae				
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Chlt	13.8 ± 1.4 (11)	0.1 ± 0.1 (10)	0.3 ± 0.5 (12)
<i>Lithops</i> sp.	Cyt-Chlt	12.1 ± 2.7 (10)	25.0 ± 4.1 (10)	0.1 ± 0.1 (11)
Cactaceae				
<i>Epiphyllum oxypetalum</i>	Cyt	2.0 ± 0.5 (10)	34.0 ± 5.7 (10)	0.3 ± 0.2 (10)
<i>Hylocereus guatemalensis</i>	Cyt	1.3 ± 0.4 (9)	12.0 ± 4.3 (9)	0.1 ± 0.1 (9)
<i>Nopalxochia ackermannii</i>	Cyt	2.3 ± 0.4 (12)	37.4 ± 2.1 (12)	1.2 ± 0.8 (13)
<i>Opuntia bergeriana</i>	Cyt	1.6 ± 0.3 (10)	33.1 ± 9.9 (10)	0.2 ± 0.1 (10)
<i>Pereskiaopsis velutina</i>	Cyt	1.0 ± 0.3 (12)	32.3 ± 3.5 (10)	0.5 ± 0.4 (10)
<i>Rhodocactus bleo</i>	Cyt	1.1 ± 0.7 (10)	47.2 ± 10.4 (10)	0.2 ± 0.2 (10)
<i>Zygocactus truncatus</i>	Cyt	1.3 ± 0.2 (12)	63.7 ± 2.5 (10)	0.9 ± 1.1 (14)
Crassulaceae				
<i>Crassula arborescens</i>	Chlt	30.9 ± 5.1 (9)	1.1 ± 0.6 (9)	0.5 ± 0.4 (9)
<i>C. argentea</i>	Chlt	33.6 ± 2.8 (11)	1.2 ± 0.2 (11)	1.1 ± 1.7 (12)
<i>C. lactea</i>	Chlt	23.2 ± 4.3 (10)	0.3 ± 0.2 (10)	0.2 ± 0.1 (10)
<i>Kalanchoë beharensis</i>	Cyt-Chlt	11.4 ± 1.3 (8)	25.1 ± 0.4 (8)	1.7 ± 1.3 (8)
<i>K. daigremontiana</i>	Cyt-Chlt	13.2 ± 1.2 (10)	26.6 ± 2.6 (10)	0.2 ± 0.6 (10)
<i>K. fedtschenkoi</i>	Cyt-Chlt	15.1 ± 2.8 (11)	33.6 ± 5.2 (11)	0.1 ± 0.1 (11)
<i>K. hildebrandtii</i>	Cyt-Chlt	16.1 ± 2.7 (9)	77.6 ± 9.1 (9)	0.2 ± 0.3 (9)
<i>K. miniata</i>	Cyt-Chlt	7.6 ± 2.0 (9)	28.6 ± 6.2 (9)	0.1 ± 0.1 (9)
<i>K. orgyalis</i>	Cyt-Chlt	10.2 ± 1.8 (10)	47.5 ± 5.5 (10)	0.1 ± 0.1 (10)
<i>K. pinnata</i>	Cyt-Chlt	8.0 ± 1.3 (10)	18.3 ± 1.5 (10)	0.4 ± 0.6 (10)
<i>K. prolifera</i>	Cyt-Chlt	7.7 ± 0.7 (12)	35.7 ± 2.0 (12)	2.1 ± 2.9 (15)
<i>Sedum palmeri</i>	Cyt-Chlt	3.7 ± 1.0 (12)	28.5 ± 5.2 (12)	0.2 ± 0.2 (13)
<i>S. rubrotinctum</i>	Cyt-Chlt	3.5 ± 0.7 (10)	30.4 ± 7.3 (10)	0.1 ± 0.1 (10)
Didieraceae				
<i>Alluaudia procera</i>	Cyt-Chlt	12.6 ± 2.1 (8)	31.4 ± 6.9 (8)	0.1 ± 0.1 (8)
Monocotyledoneae				
Dracaenaceae				
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Cyt-Chlt	11.9 ± 1.0 (12)	45.4 ± 5.5 (12)	1.8 ± 1.2 (12)
<i>S. zeylanica</i>	Cyt-Chlt	5.0 ± 1.3 (10)	21.4 ± 8.5 (10)	0.1 ± 0.1 (10)

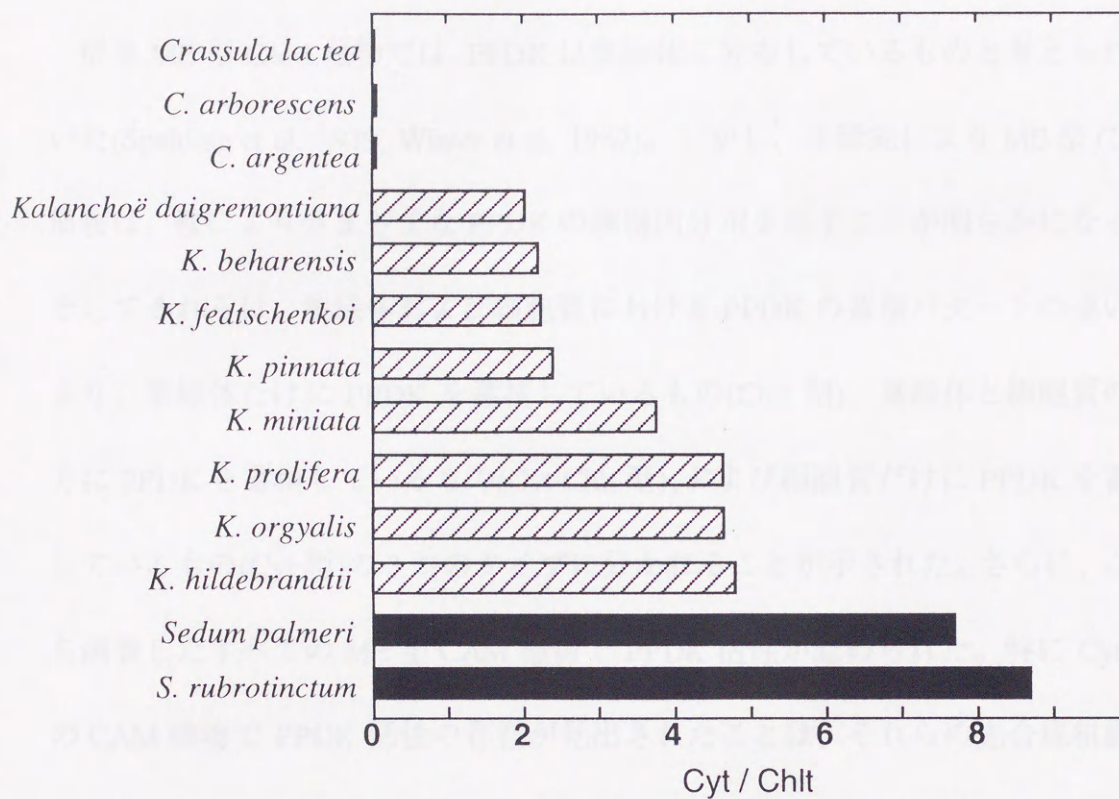


Fig. 4-6. Comparison of the ratio of the labeling density of cytosolic PPDK to that of chloroplastic PPDK (Cyt/Chlt) in Crassulaceae species.

4. 考察

CAM における細胞質型および葉緑体型 PPDK の存在とその機能的な側面

従来 ME 型 CAM 植物では、PPDK は葉緑体に分布しているものと考えられていた (Spalding et al. 1979, Winter et al. 1982)。しかし、本研究により ME 型 CAM 植物は、種によりさまざまな PPDK の細胞内分布を示すことが明らかになった。そしてそれらは、葉緑体および細胞質における PPDK の蓄積パターンの違いにより、葉緑体だけに PPDK を蓄積しているもの (Chlt 型)、葉緑体と細胞質の両方に PPDK を蓄積しているもの (Cyt-Chlt 型)、および細胞質だけに PPDK を蓄積しているもの (Cyt 型) の 3 つのタイプに分かれることが示された。さらに、これら調査したすべての ME 型 CAM 植物で PPDK 活性が認められた。特に Cyt 型の CAM 植物で PPDK 活性の存在が見出されたことは、それらの光合成組織の細胞質に蓄積している PPDK 蛋白質が活性型であり、機能的な役割を持っていることを示唆している。

C₃ 植物や C₄ 植物の種子などの非光合成組織の細胞質に局在する PPDK は、貯蔵タンパク質の合成に関与しているものと考えられている (Aoyagi and Bassham 1984, Aoyagi and Chua 1988)。また最近、イネの根でも細胞質型 PPDK が見出され、これは低酸素および水ストレスにより誘導されることが報告されている (Moons et al. 1998)。CAM 植物の PPDK に関しては、過去にコダカラベンケイが

調査されており、この PPDK は C_4 植物の PPDK と類似した光反応を示すことが報告されている (Sugiyama and Laetsch 1975)。Kore-eda et al. (1996) は、アイスプラントから得た無傷葉緑体を用い、光照射されたときのピルビン酸の取り込み活性は光照射されないときと比べ 5 倍以上に上昇することを見出し、葉緑体へのピルビン酸の取り込みは葉緑体中の PPDK の光活性化と関連していることを述べている。本研究により明らかとなった細胞質型の PPDK がどのような調節機能を持つのか、また細胞質に PPDK が局在することで代謝産物がどのような代謝経路をたどるのかは、CAM の炭素代謝機構を理解する上で興味深い問題である。

ME 型 CAM 植物では、リンゴ酸がどのような割合で NADP-ME と NAD-ME という 2 つの酵素によって脱炭酸されるのかは明らかでない (Smith and Bryce 1992, Winter and Smith 1996)。本研究では 25 種の ME-CAM 植物について NADP-ME および NAD-ME の活性を測定したが、この結果興味深い傾向が見出された。PPDK の局在タイプ別に NADP-ME 活性に対する NAD-ME 活性の比の平均を求めてみると、Chlt 型、Cyt-Chlt 型、および Cyt 型では、それぞれ 0.4、1.5、1.7 という値が得られた (表 4-4)。また、調査した 25 種の ME 型 CAM 植物すべてについて、葉緑体と細胞質における PPDK の標識密度の比 (Cyt/Chlt) と、NADP-ME 活性と NAD-ME 活性の比 (NAD-/NADP-ME) の関係を調べてみると、正の相関 ($r = 0.606$) が認められた (図 4-7)。すなわち、クラスラ属のように葉緑体に多量の PPDK を蓄積している種 (Chlt 型) では、NADP-ME 活性が NAD-ME

Table 4-4. Relationships between the intracellular localization of PPDK and activities of NAD-ME and NADP-ME in various CAM plants. Values of activities are given as means \pm SD.

Type	Number of species	NADP-ME ($\mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	NAD-ME ($\mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	NAD-ME / NADP-ME ratio
Chlt	4	72.2 \pm 15.8	25.7 \pm 8.7	0.4
Cyt-Chlt	14	32.3 \pm 11.2	47.4 \pm 20.3	1.5
Cyt	7	17.8 \pm 10.1	30.9 \pm 14.6	1.7

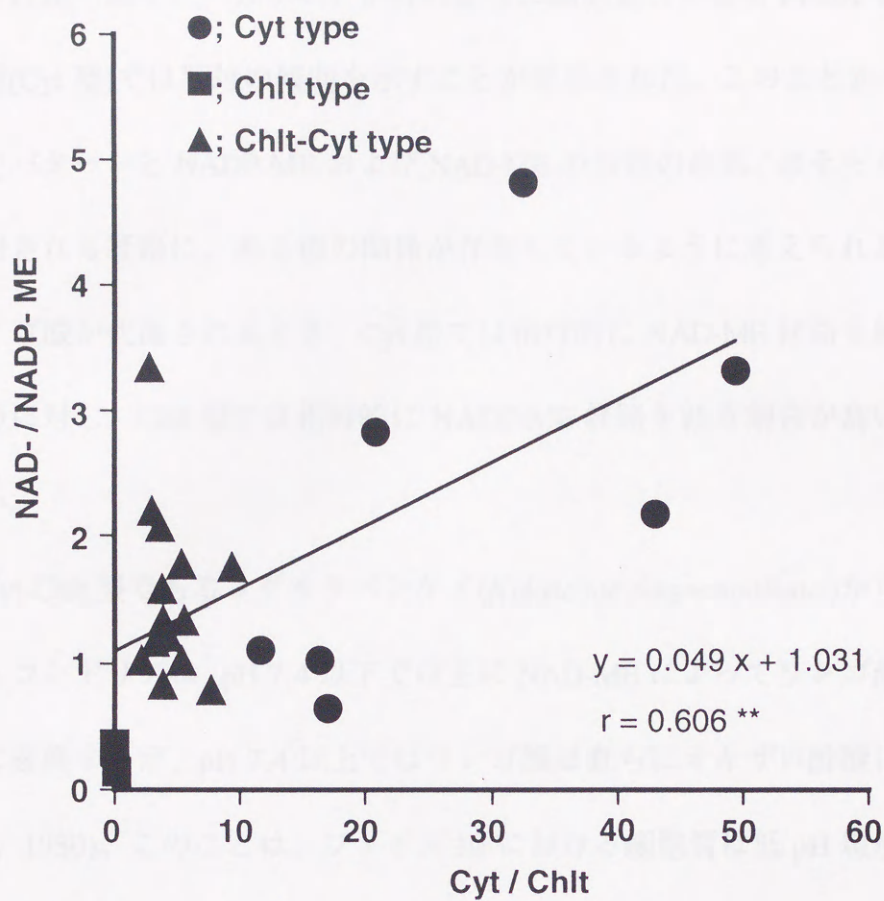


Fig.4-7. Relationship between the ratio of labeling density of cytosolic PPDK to that of chloroplastic PPDK (Cyt/Chlt) and the ratio of activity of NAD-malic enzyme to that of NADP-malic enzyme (NAD-/NADP-ME) in various CAM plants.

** indicates to be significant at 0.01 probability level.

活性に比べ高く、一方サボテン科のように細胞質に多量の PPDK を蓄積している種(Cyt 型)では反対の傾向を示すことが見出された。このことから、PPDK の局在パターンと NADP-ME および NAD-ME の活性の高低、おそらくリンゴ酸が代謝される経路に、ある種の関係が存在しているように考えられる。すなわち、リンゴ酸が代謝されるとき、Cyt 型では相対的に NAD-ME 経路を経る割合が高いのに対し、Chlt 型では相対的に NADP-ME 経路を経る割合が高いのかもしれない。

Cyt-Chlt 型であるコダカラベンケイ (*Kalanchoë daigremontiana*) から単離されたミトコンドリアは、pH 7.4 以下では主に NAD-ME によってリンゴ酸をピルビン酸に変換するが、pH 7.4 以上ではリンゴ酸は直ちにオキザロ酢酸に酸化される (Day 1980)。このことは、フェイズ III における細胞質は低 pH 環境であることから、この条件では NAD-ME が優先的に作用することを示唆している (Smith and Bryce 1992)。またコダカラベンケイ (Cyt-Chlt 型) では、葉の成長における CAM 活性の増大に伴い NADP-ME 活性は低下するが、NAD-ME 活性はむしろ増加する (Winter and Smith 1996)。Cyt-Chlt 型である *K. fedtschenkoi* では、昼間に単離された無傷ミトコンドリアは、夜間に単離された無傷ミトコンドリアに比べ、リンゴ酸をより急速にピルビン酸へと脱炭酸するとともに、NAD-ME の触媒特性が昼間と夜間で異なる (Cook et al. 1995)。一方 Chlt 型のアイスプラントでは、塩ストレスにより CAM が誘導される間、NADP-ME と NAD-ME の両活性がともに増加していくことが知られている (Holtum and Winter 1982)。しかし、昼間と夜

間に抽出された NAD-ME には、触媒特性には違いは見られなかった(Artus and Edwards 1985)。以上の報告を総合すると、細胞質における PPK の局在と NAD-ME 活性との間に、何らかの関係をうかがうことができる。

CAM における PPK の局在様式とその系統分類学的な関係

現在 CAM の出現が 33 科の 328 属で報告されているが(Smith and Winter 1996)、本研究で実験した CAM 植物はそれらの一部に過ぎない。このため、この結果だけから CAM 植物における PPK の局在型について、系統進化の全体像を議論することは難しい。しかし本研究において、(1) PPK の局在型は属のレベルで共通であること、(2) サボテン科は調べられた全種が Cyt type であること、の 2 つの傾向が見出された。

サボテン科は 122 属 1600 種から構成されたグループで、すべての属で CAM が認められている(Smith and Winter 1996)。サボテン科はコノハサボテン、ウチワサボテン、およびハシラサボテンという 3 亜科に分けられる(Kluge and Ting 1978)。本研究で調査した植物の内、*Rhodocactus bleo* はコノハサボテン亜科に、*Opuntia bergeriana*、*Peireskiopsis velutiana* はウチワサボテン亜科に、残りの 4 種はハシラサボテン亜科に分類される。この内、*Rhodocactus bleo*、*Peireskiopsis velutiana* は系統的には古い形質をとどめている。通常のスボテンとは異なり一般の樹木の形態に近く、刺とは別に葉を有している(Kluge and Ting 1978)。また調査した種の内、ハシラサボテン亜科の 4 種は樹上に生育する着生種である。

本研究においてベンケイソウ科には2つのPPDKの局在型が見出された。ベンケイソウ科は、6亜科35属1500種から構成される大きな科である。6つの亜科は、センペルビウム、セダム、クラスラ、カランコエ、コチレドン、エケベリアに大別される。各亜科との類似性、亜科内の形態的多様性、分布などを考慮して、クラスラ亜科を除く他の亜科は、セダム亜科から放散分化したものと考えられている(Pilon-Smith et al. 1996)。近年、ベンケイソウ科における葉緑体DNAの制限部位分析では、*Crassula*を含むクラスラ亜科は他の系統とは基本的に異なり、単一の系統を構成しているものと考えられている(van Ham and 't Hart 1998)。*Crassula*種はChlt typeであり、一方*Sedum*や*Kalanchoë*の種はCyt-Chlt typeであるという本研究の結果は、これらの系統分類学的な研究報告と一致している。本研究で実験した2種の*Sedum*は、PPDKに対するウェスタンブロットのパターンが互いに異なっていた。*Sedum*属は、人為的な分類群であると考えられており(van Ham and 't Hart 1998)、ウェスタンブロットのパターンの違いはこのことを反映しているのかもしれない。*Kalanchoë*属では、系統分類学的に、より原始的な分類群ほど優先的にC₃様の炭酸固定を行うCAM植物がみられ、より進化した分類群ほどobligate CAMの特性を持つ(Kluge et al. 1993)。本研究で実験された*Kalanchoë*の種は後者の分類群に属している。CAMは中間的な段階を経てC₃型光合成から進化したものと考えられている(Kluge et al. 1993, Pilon-Smith et al. 1996)。このようなC₃型からCAM型への進化に従って、細胞質と葉緑体におけるPPDKの蓄積パターンが、ある方向へと漸進的に変化するの否

かは明らかではない。

5. 摘要

本研究では、6 科 15 属 26 種の CAM 植物を対象として、葉肉細胞における PPDK の細胞内局在を金コロイド免疫電顕法により調査した。PCK 型 CAM 植物のパインアップルでは、PPDK の金コロイド標識は観察されなかった。一方、ME 型 CAM 植物における PPDK の局在には種により変異がみられ、その局在パターンは、葉緑体のみに局在するもの (Chlt 型)、細胞質のみに局在するもの (Cyt 型)、並びに細胞質と葉緑体の両方に分布するもの (Cyt-Chlt 型) という 3 つの型に分けられ、きわめて多様性に富むことが明らかとなった。また、それら PPDK の局在性を系統分類学的に比較すると、属のレベルでは共通であり、サボテン科の植物ではすべて Cyt 型に分類された。ME 型 CAM 植物について PPDK や脱炭酸酵素の活性を測定した結果、細胞質型 PPDK は活性を実際に持っており、CAM の中で機能的な役割を持っていることが示唆された。また PPDK の細胞内局在パターンの違いと NADP-ME および NAD-ME の活性の高低の間には、相関があることが見出された。すなわち、クラスラ属のように葉緑体に多量に PPDK を蓄積している種では、NADP-ME 活性が NAD-ME 活性に比べ高く、一方サボテン科のように細胞質に多量に PPDK を蓄積している種では反対の傾向が見出された。

第5章 ベニベンケイ (*Kalanchoë blossfeldiana*) における CAM 活性の増大に伴う葉緑体型および細胞質型 PPDK の蓄積様式

1. 緒言

前章では金コロイド免疫電顕法による解析によって、ME 型 CAM 植物における PPDK の局在様式には、アイスプラントのように PPDK を葉緑体に蓄積しているもの、*Kalanchoë* 属の CAM 種のように葉緑体と細胞質の両方に PPDK を蓄積しているもの、およびサボテン科の種のように細胞質にだけ PPDK を蓄積しているものが存在していることを明らかにした。この結果は、CAM 植物における PPDK の局在様式が著しく多様であることを示しているだけでなく、細胞質型 PPDK も CAM 機能に関わっている可能性を示唆している。前章で述べたように、 C_3 植物や C_4 植物の非光合成組織に見出される細胞質型 PPDK は、これまで光合成炭素代謝以外の反応に関与しているものと考えられており (Aoyagi and Bassham 1984, Aoyagi and Chua 1988, Moons et al. 1998)、CAM 機能に細胞質型 PPDK が実際に関わっているのか否かを明らかにすることは重要である。

アイスプラントのような facultative CAM 植物は、環境条件によって光合成型を C_3 型から CAM 型に変換することが知られている (Winter and Smith 1996)。葉緑体と細胞質に PPDK を蓄積する *Kalanchoë* 属の CAM 種の中にもこのような特徴を持つものがあり、ベニベンケイ (*Kalanchoë blossfeldiana*) は短日処理、乾燥ス

トレスによって容易に CAM が誘導される (Brulfelt et al. 1982, 1988)。本研究では、細胞質型 PPDK が CAM の中で葉緑体の PPDK と同様に機能的な役割を持っているのか否かを検討することを目的として、ベニベンケイの葉肉細胞において CAM 活性の増大に伴い葉緑体型および細胞質型 PPDK がどのように蓄積されるのかを免疫電顕法により解析した。もし、両者ともに CAM 機能に関わっているとすれば、連動した蓄積量の増大がおこるものと期待される。また、比較のために PEPCase と Rubisco の蓄積パターンも合わせて解析した。

2. 材料及び方法

植物材料

供試材料のベニベンケイ (*Kalanchoë blossfeldiana* Poelln) は園芸店から購入した。植物の枝先を、土とバーミュキュライトを 1:1 の割合で詰めたポット (3.7 L) に植え、長日条件のグロスチャンバー (LDw: 明期 14 時間/暗期 10 時間、明期 25℃、暗期 20℃、光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) の中で灌水を十分に行って 4 ヶ月間育生した。施肥は 2 週に 1 回の割合でハイポネックスの 1000 倍希釈液を 1 ポット当たり 200 ml 与えた。その後、給水を停止し水ストレスを加えた短日条件区 (SDd: 明期 10 時間/暗期 14 時間、明期 25℃、暗期 20℃、光強度 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) を設け、LDw 区と SDd 区で並行してさらに 1 ヶ月間植物を育生した。この 1 ヶ月間は施肥は行わなかった。調査にはこれらの植物の上部から 2 番目

(長さ約 3 cm)と 3 番目(長さ約 4 cm)の葉を用いた。

抗血清

PEPCase と Rubisco(LS)に対する抗血清は、第 3 章と同様である。PPDK に対する抗血清は、第 4 章と同様である。

SDS-PAGE とウェスタンブロット

SDS-PAGE とウェスタンブロットの方法は、第 3 章と同様である。

免疫電子顕微鏡法

免疫電子顕微鏡法については、第 3 章と同様である。

金コロイド標識密度の測定

金コロイド標識密度の測定については、第 3 章と同様である。

酵素活性の測定

酵素の抽出法並びに PPDK 活性の測定方法は、第 4 章と同様である。PEPCase 活性の測定に使用した反応液の組成は、25mM Tricine-KOH (pH8.3)、4mM DTT、5mM MgCl_2 、5mM NaHCO_3 、0.2mM NADH、2U malate dehydrogenase、20 μl 酵素抽出液、2.5mM PEP とした。

リンゴ酸の定量

測定に使用した葉片は、各条件区における暗期の終わりと明期の終わりに採集した。リンゴ酸の定量法は、第4章と同様である。

3. 結果

リンゴ酸の蓄積量の日変化と酵素活性

CAMの発現レベルを明らかにするために、それぞれの条件区植物葉の暗期の終わりと明期の終わりににおけるリンゴ酸含量を測定した(表5-1)。リンゴ酸含量は明期の終わりで $1.4 \sim 1.6 \mu\text{mol (g 生重)}^{-1}$ 、暗期の終わりで $9.0 \sim 67.6 \mu\text{mol (g 生重)}^{-1}$ を示し、両条件区植物で明期の終わりに比べ暗期の終わりのリンゴ酸含量が著しく高いことが確認された。この結果、明期の終わりに対する暗期の終わりのリンゴ酸含量の比は、LDw区で5.6(第2葉)、14.8(第3葉)、SDd区で38.3(第2葉)、45.1(第3葉)という値を示した。

SDd区植物の第2葉と第3葉についてPPDK活性とPEPCase活性を測定したところ、PPDKは第2葉と第3葉でそれぞれ $18.9, 36.9 \mu\text{mol (mg Chlorophyll)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、PEPCaseは第2葉と第3葉でそれぞれ $62.5, 172.3 \mu\text{mol (mg Chlorophyll)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ という値を示した。これらの結果から、本研究の育生条件下では両区の第2葉、第3葉ともにCAMが発現しているが、LDw区よりもSDd区で、また第2葉より第3葉で高いCAM活性を示すことが確認された。

Table 5-1. Diurnal changes in the levels of malate in leaves of *Kalanchoë blossfeldiana* grown under different environmental conditions. Leaves were numbered from the apex. LDw, well-watered conditions under long days; SDd, drought conditions under short days. Data are means of three experiments \pm SD.

	Leaf number	Malate content		Ratio (night / day)
		End of night ($\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight)	End of day	
LDw	2	9.0 ± 2.0	1.6 ± 0.8	5.6
	3	20.7 ± 1.7	1.4 ± 0.7	14.8
SDd	2	57.4 ± 2.8	1.5 ± 0.5	38.3
	3	67.6 ± 2.4	1.5 ± 0.3	45.1

PPDK、PEPCase、および Rubisco のウェスタンブロット法による検出

PPDK、PEPCase、および Rubisco(LS)に対する抗体と葉から抽出した可溶性タンパク質との交差反応をウェスタンブロット法により調査した(図 5-1)。また各々の酵素タンパク質の分子量、発現量を比較するための対照として、 C_4 植物のトウモロコシ葉の可溶性タンパク質も同時に実験した。これらの抗体は、ベニベンケイの葉の PPDK、PEPCase、および Rubisco(LS)を特異的に認識することが確認された。PPDK、PEPCase とともに LDw 区植物に比べ SDd 区植物で、また第 2 葉に比べ第 3 葉で強いバンドが検出された。PPDK については、両条件区の植物ともに常に 2 本のバンドが見出された。2 本のバンドのうち、下位のバンドはトウモロコシ葉の PPDK に対するバンド (94kDa) とほぼ同じ位置に形成された。Rubisco (LS)のバンドについては、条件区、葉位間でほとんど差がないか、あるいは幾分 LDw 区に比べ SDd 区で弱い傾向を示した。

PPDK、PEPCase、および Rubisco に対する金コロイド標識

金コロイド免疫電子顕微鏡法により両条件区の植物葉における PPDK(図 5-2)、PEPCase(図 5-3A、B)、および Rubisco(LS) (図 5-3C、D)の細胞内分布を調査した。さらに、それらの酵素に対する金粒子の標識密度を測定し、両条件区の植物葉の葉肉細胞における酵素タンパク質の蓄積量を比較解析した(表 5-2、図 5-4)。PPDK に対する金粒子の標識は、両条件区の植物ともに葉肉細胞の細胞質と葉

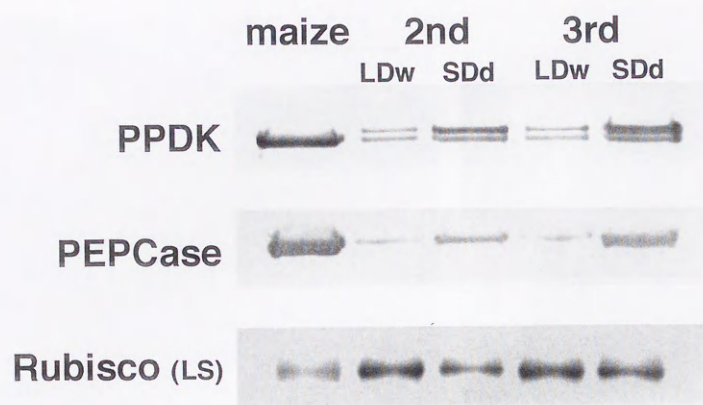


Fig. 5-1. Western blots of protein extracts from second and third leaves of *Kalanchoë blossfeldiana* and maize leaves. Total soluble protein ($15\mu\text{g}$ for PPDK, $60\mu\text{g}$ for PEPCase, $0.75\mu\text{g}$ for Rubisco) was subjected to SDS-PAGE, blotting on nitrocellulose membranes, and identification with antisera against PPDK, PEPCase, and Rubisco. Leaves were numbered from the apex. LDw, well-watered conditions under long days; SDd, drought conditions under short days.

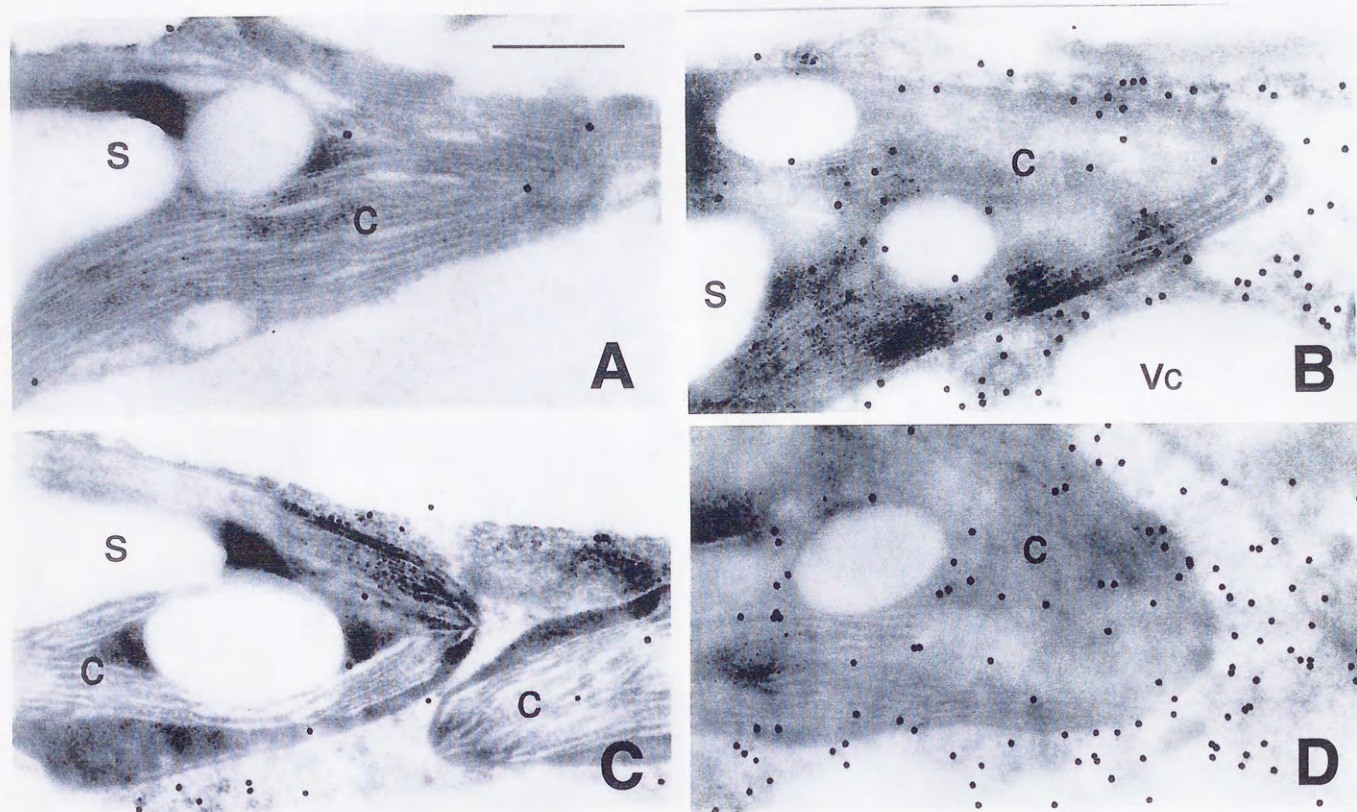


Fig. 5-2. Immunogold labeling of mesophyll cells of *Kalanchoë blossfeldiana* with antiserum to PPDK. **A** and **C**, Well-watered conditions under long days. **B** and **D**, Drought conditions under short days. **A** and **B**, 2nd leaf. **C** and **D**, 3rd leaf. Leaves were numbered from the apex. Bars = 0.5 μ m. C, chloroplast; S, starch grain; Vc, vesicle.

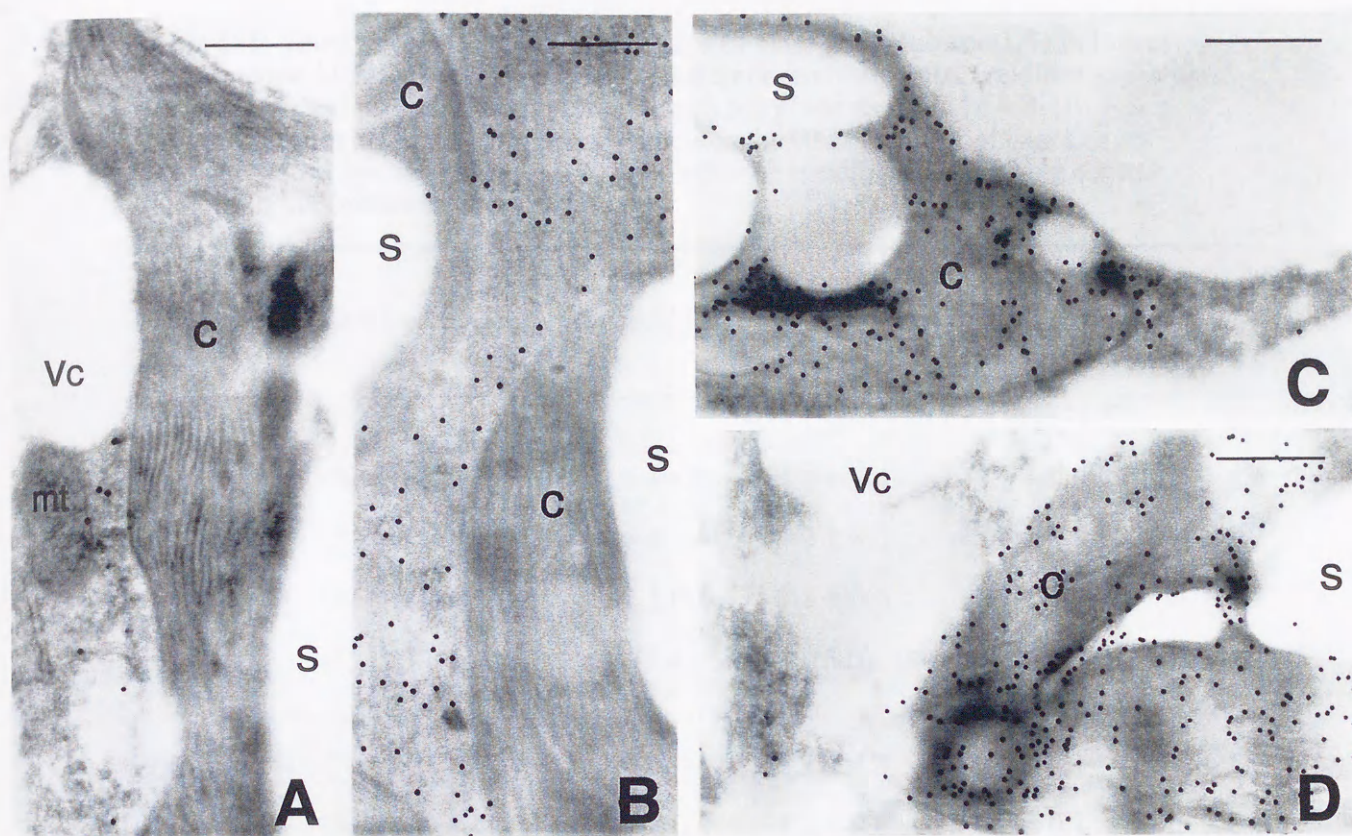


Fig. 5-3. Immunogold labeling of mesophyll cells of *Kalanchoë blossfeldiana*. **A** and **B**, Labeling of the 2nd leaf with antiserum to PEPCase. **C** and **D**, Labeling of the 3rd leaf with antiserum to Rubisco. **A** and **C**, Well-watered conditions under long days. **B** and **D**, Drought conditions under short days. Leaves were numbered from the apex. Bars = 0.5 μm . mt; mitochondrion. Other abbreviations as in Fig. 5-2.

Table 5-2. Immunogold labeling of PPDK, PEPCase, and Rubisco(LS) in leaves of *Kalanchoë blossfeldiana* grown under different environmental conditions. Numbers of gold particles per unit area (μm^{-2}) are given as \pm SD ($n = 8-10$). Cyt/Chlt ratio, ratio of labeling density in cytosol to that in chloroplasts. Leaves were numbered from the apex. LDw, well-watered conditions under long days; SDd, drought conditions under short days.

Enzyme	Cell fraction	Second leaf		Third leaf	
		LDw	SDd	LDw	SDd
No. of gold particles (μm ⁻²)					
PPDK	Chloroplasts	2.0 ± 1.0	14.8 ± 2.4	5.1 ± 0.5	15.6 ± 2.9
	Cytosol	4.8 ± 1.8	35.2 ± 8.8	15.4 ± 0.9	42.4 ± 9.2
	Other organelles	0.2 ± 0.1	1.1 ± 0.6	0.3 ± 0.2	1.1 ± 0.4
	(Cyt/Chlt ratio)	(2.4)	(3.0)	(2.4)	(2.7)
PEPCase	Cytosol	1.6 ± 0.6	25.1 ± 4.3	2.5 ± 1.1	52.6 ± 5.9
	Organelles	0.2 ± 0.1	1.2 ± 0.4	0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.6
Rubisco	Chloroplasts	79.0 ± 6.8	90.0 ± 9.2	92.6 ± 8.7	92.4 ± 3.1
	Cytosol + other organelles	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.5	0.3 ± 0.1	1.2 ± 0.6

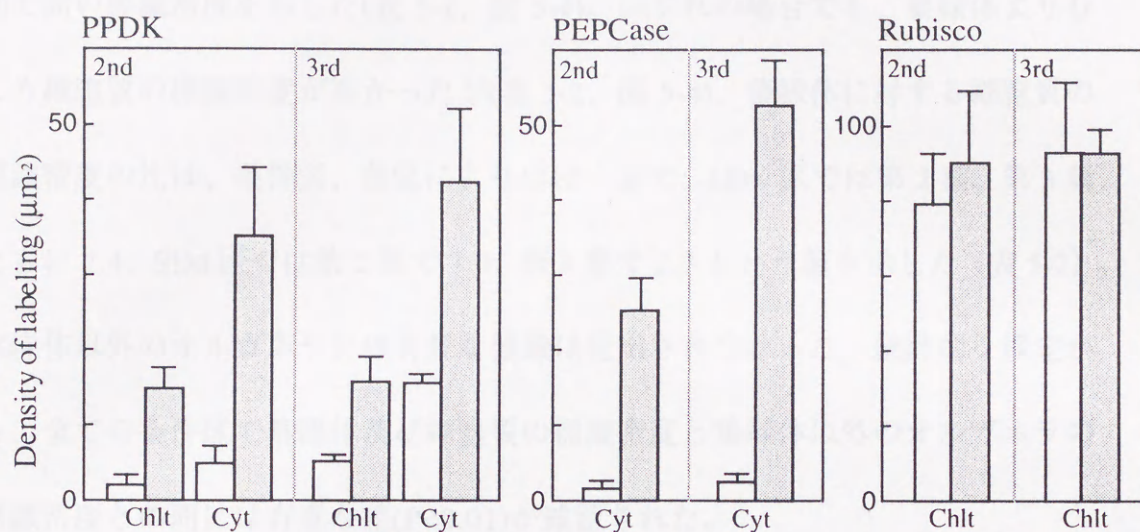


Fig.5-4. Densities of immunogold labeling of PPDK, PEPCase, and Rubisco(LS) in leaves of *Kalanchoë blossfeldiana* grown under different environmental conditions. Data from Table 5-2. Chl, chloroplast; Cyt, cytosol. 2nd, the 2nd leaf; 3rd, the 3rd leaf. Leaves were numbered from the apex. LDw, well-watered conditions under long days; SDd, drought conditions under short days.

□ LDw ■ SDd

緑体の両方に見出された(図 5-2)。PPDK に対する金粒子の標識密度は第 2 葉、第 3 葉ともに LDw 区(図 5-2A、C)に比べ SDd 区(図 5-2B、D)で著しく高かった(表 5-2、図 5-4)。また、葉位間の比較では第 2 葉(図 5-2A、B)より第 3 葉(図 5-2C、D)で高い標識密度を示した(表 5-2、図 5-4)。いずれの場合でも、葉緑体よりむしろ細胞質の標識密度が高かったが(表 5-2、図 5-4)、葉緑体に対する細胞質の標識密度の比は、条件区、葉位によりほぼ一定で、LDw 区では第 2 葉、第 3 葉ともに 2.4、SDd 区では第 2 葉で 3.0、第 3 葉で 2.7 という値を示した(表 5-2)。葉緑体以外のオルガネラには有意な標識は見出されなかった。統計的な検定から、全ての条件区で葉緑体及び細胞質の標識密度と葉緑体以外のオルガネラの標識密度との間には有意な差($P < 0.01$)が確認された。

PEPCase に対する金粒子の標識は、両条件区の植物ともに細胞質のみに観察された(図 5-3A、B)。PEPCase に対する金粒子の標識密度は、PPDK のそれと類似した傾向を示し、LDw 区(図 5-3A)に比べ SDd 区(図 5-3B)で、また第 2 葉よりも第 3 葉で高い値を示した(表 5-2、図 5-4)。葉緑体やミトコンドリアなどのオルガネラには有意な標識は見出されなかった(表 5-2)。統計的な検定から、全ての条件区で細胞質の標識密度とオルガネラの標識密度には有意な差($P < 0.01$)が確認された。

Rubisco(LS)に対する金粒子の標識は葉緑体にだけ観察され(図 5-3C、D)、その標識密度には条件区、葉位によりほとんど差は見られなかったが、LDw 区の第 2 葉では他と比べると幾分低い値を示した(表 5-2、図 5-4)。

4. 考察

長日条件のもとでは、ベニベンケイの若い葉は典型的な C_3 型のガス交換を示すが、葉齢の増加とともに CAM 活性の増大がみられる (Brulfelt et al. 1982)。短日条件下では、リンゴ酸の蓄積量、PEPCase 活性が長日条件下に比べさらに増大し、明確な CAM への変換が認められる (Queiroz and Morel 1974、Brulfelt et al. 1982)。またベニベンケイでは日長条件だけでなく、乾燥ストレスによっても CAM が誘導され、7 日間の処理により完全な CAM 型のガス交換に変わり、リンゴ酸の蓄積および PEPCase 活性は最大を示す (Brulfelt et al. 1988)。本研究では、このようなベニベンケイの特性を利用し、異なった CAM 活性を示す植物を得るために、短日処理に加えて、さらに水ストレスを加えることにより植物を育成した。この結果、リンゴ酸の蓄積量、PEPCase の活性およびタンパク質量の増減から判断して、これまでの報告で示されたように、処理区間や葉位によって異なった CAM 活性を示す植物を得ることができた。

本研究によりベニベンケイの葉肉細胞では、PPDK は葉緑体と細胞質の両方に蓄積することが明らかとなった。前章で述べられた 8 種の *Kalanchoë* 属の CAM 植物は、全て Cyt-Chlt type に分類されることが明らかになっており、ベニベンケイの結果も合わせると、PPDK のこの特徴は *Kalanchoë* 属植物全体にあてはまるものかもしれない。このような細胞質型 PPDK が CAM 機能においてどのような役割を演じているのかは興味深い問題である。

ベニベンケイでは CAM 活性の増大に伴い、PPDK タンパク質量および活性は増加した。このとき、PPDK に対する金粒子の標識密度の測定から示されたように、細胞質と葉緑体における PPDK の蓄積量はともに増大し(図 5-4)、それらの標識密度の比は、CAM 活性の違いに関係なくほぼ一定であった(表 5-2)。このことは、CAM 活性の増大に伴い、葉緑体型と細胞質型の PPDK の蓄積の増加が連動して起こっていることを示している。もし、細胞質型 PPDK が CAM と直接関わっていないならば、CAM 活性の増大に伴って細胞質型 PPDK の蓄積量の増加は起こらないものと考えられる。アイスパラントにおける C_3 型から CAM 型の誘導では、CAM 型に特異的な PEPCase isoform の発現量の増加がおこるが、 C_3 型の PEPCase isoform の発現量にはほとんど変化はない(Cushman et al. 1989, Höfner et al. 1989)。葉緑体型と細胞質型の PPDK に見られる厳密に連動した発現レベルの調節は、これら 2 つの PPDK が CAM 機能にともに関わっていることを示唆している。

PEPCase に対する金粒子の標識密度は、PPDK と同じように CAM 活性の増大に伴い増加したが、Rubisco に対する標識密度にはあまり大きな差は見られなかった。*Clusia* でも、葉齢および水ストレスによる CAM 活性の増大に伴って、PEPCase のタンパク質量の増加は見られるが、Rubisco タンパク質量にはほとんど変化は見られないことが報告されている(Borland et al. 1998)。

5. 摘要

短日や乾燥ストレスによって CAM が誘導することが知られているベニベンケイ (*Kalanchoë blossfeldiana*) の葉では、他の *Kalanchoë* 属と同じように、PPDK は葉肉細胞の葉緑体と細胞質の両方に蓄積していた。本研究ではベニベンケイを用いて、CAM 活性の増大に伴い葉緑体型と細胞質型の PPDK が、葉肉細胞内でどのように蓄積されるのかを免疫電顕法により検討した。日長 14 時間、灌水を十分に行った実験区 (LDw) と、日長 10 時間、給水を停止した水ストレス区 (SDd) で 1 ヶ月間育成した植物では、両区とも CAM が発現していたが、LDw 区よりも SDd 区で、また上位葉より下位葉で高い CAM 活性がみられた。葉緑体と細胞質における PPDK に対する金コロイド標識密度は、いずれも LDw 区に比べ SDd 区で、また上位葉より下位葉で高かったが、細胞質と葉緑体における標識密度の比はほぼ一定 (2.4~3.0) であった。細胞質における PEPCase の標識密度も PPDK と類似したパターンを示し、いずれも LDw 区に比べ SDd 区で、また上位葉より下位葉で高かった。葉緑体における Rubisco の標識密度には処理区、葉位による大きな違いは見られなかった。以上の結果は、CAM 活性の増大に伴い、葉緑体型と細胞質型の PPDK の蓄積量が連動して増大することを示しており、CAM 機能における両 PPDK の関与が示唆された。

第6章 総合考察

本研究は CAM 植物の光合成炭素代謝において、主要な役割を果たす酵素、PEPCase、Rubisco、および PPDK の細胞内局在を明らかにした。PEPCase および Rubisco は、CAM 植物葉の葉肉細胞の細胞質および葉緑体にそれぞれ局在した (第3章)。PPDK の場合、その局在には種による多様性が示されたが、それらの CAM 植物は、葉緑体および細胞質の PPDK の局在パターンの違いにより葉緑体(Chlt)型、細胞質-葉緑体(Cyt-Chlt)型、および細胞質(Cyt)型という 3 つの型に分けられた (第4章)。調査したいずれの ME 型 CAM 植物でも PPDK 活性があることが明らかになったが (第4章)、特に Cyt 型の植物で PPDK 活性が認められたことは、細胞質に局在する PPDK 蛋白質が機能的な役割を果たすことを意味している。さらに、Cyt-Chlt 型のベニベンケイでは、CAM 活性の増大に伴い、葉緑体型と細胞質型の PPDK の蓄積の増加が連動して起こっており、細胞質型 PPDK は、葉緑体型 PPDK 同様に CAM 機能に関連した働きを担っていることが考えられる (第5章)。これまで、 C_4 植物、CAM 植物においては PPDK は葉緑体のみに局在すると考えられており (Spalding et al. 1979, Schnarrenberger et al. 1980, Winter et al. 1982)、CAM 植物の光合成組織において葉緑体ばかりでなく細胞質にも PPDK が存在していることが明らかになったことは CAM 植物の代謝機能を考える上で重要である。

調査した ME 型 CAM 植物について PPK とともに脱炭酸酵素の活性を測定した結果、PPK の細胞内局在パターンの違いと NADP-ME および NAD-ME の活性の高低の間には相関があることが明らかとなった (第 4 章)。すなわち、葉緑体に多量に PPK を蓄積する種は NADP-ME 活性が NAD-ME 活性に比べ高く、一方細胞質に多量に PPK を蓄積している種では反対の傾向が見出された。このことから、リンゴ酸の脱炭酸から糖新生に至る一連の代謝機構には、PPK の細胞内局在と対応したいくつかの異なる炭素代謝経路の存在が予想される。

本章では、まず PPK の細胞内分布の違いに対応した炭素フローについて検討し、このような CAM 型光合成の炭素代謝機構の多様性について考察を加えた。次に、CAM 植物における葉緑体型および細胞質型 PPK の発現様式について分子生物学的な側面から考察した。

PPK の細胞内局在様式が異なった ME 型 CAM における炭素代謝経路

これまでに、アイスプラントや *Sedum praealtum* などの CAM 植物では、PPK は葉緑体に局在していることが報告されている (Spalding et al. 1979, Schnarrenberger et al. 1980, Winter et al. 1982)。このことから一般に ME 型 CAM 植物では、リンゴ酸の脱炭酸後に生じたピルビン酸は葉緑体に輸送され、葉緑体に局在する PPK の働きで PEP に変換されると考えられてきた (Osmond and Holtum 1981)。しかし、本研究の結果から明らかにされたように、種によって PPK は葉緑体だけでなく細胞質にも分布している。PPK の機能する場所が

異なれば、それに伴って一連の炭素代謝経路も異なることが予想される。そこで、ME 型 CAM 植物のフェイズ III における炭素代謝経路について、PPDK の細胞内の局在性と脱炭酸酵素活性の高低の違いから推察してみたい(図 6-1)。

まず、PPDK が葉緑体のみに分布する Chlt 型では、NAD-ME より NADP-ME の方が高い活性を示すことから(表 4-4)、夜間に蓄積されたリンゴ酸はミトコンドリアに存在している NAD-ME よりむしろ、細胞質に存在している NADP-ME によって脱炭酸され、生じたピルビン酸は葉緑体に輸送される。生成された PEP は葉緑体外に運び出され 3-PGA に変換される (Neuhaus 1988、Osmond and Holtum 1981)。次に、PPDK が葉緑体と細胞質の両方に分布する Cyt-Chlt 型では、NADP-ME と NAD-ME の活性にはあまり大きな違いはないことから(表 4-4)、リンゴ酸は細胞質の NADP-ME とミトコンドリアの NAD-ME の両方により脱炭酸された後、生成されたピルビン酸はそれぞれ細胞質型 PPDK および葉緑体型 PPDK によって PEP に変換される。葉緑体で生成された PEP は葉緑体外に運び出され、細胞質で生成された PEP と合流する。3 番目の、PPDK が細胞質に分布する Cyt 型では、NADP-ME よりも NAD-ME の活性の方が高いことから(表 4-4)、リンゴ酸は主としてミトコンドリアに存在している NAD-ME によって脱炭酸され、ピルビン酸が生成される。そして Chlt 型の経路とは対照的に、ピルビン酸から PEP を経て 3-PGA に至る反応はすべて細胞質で行われることになる。

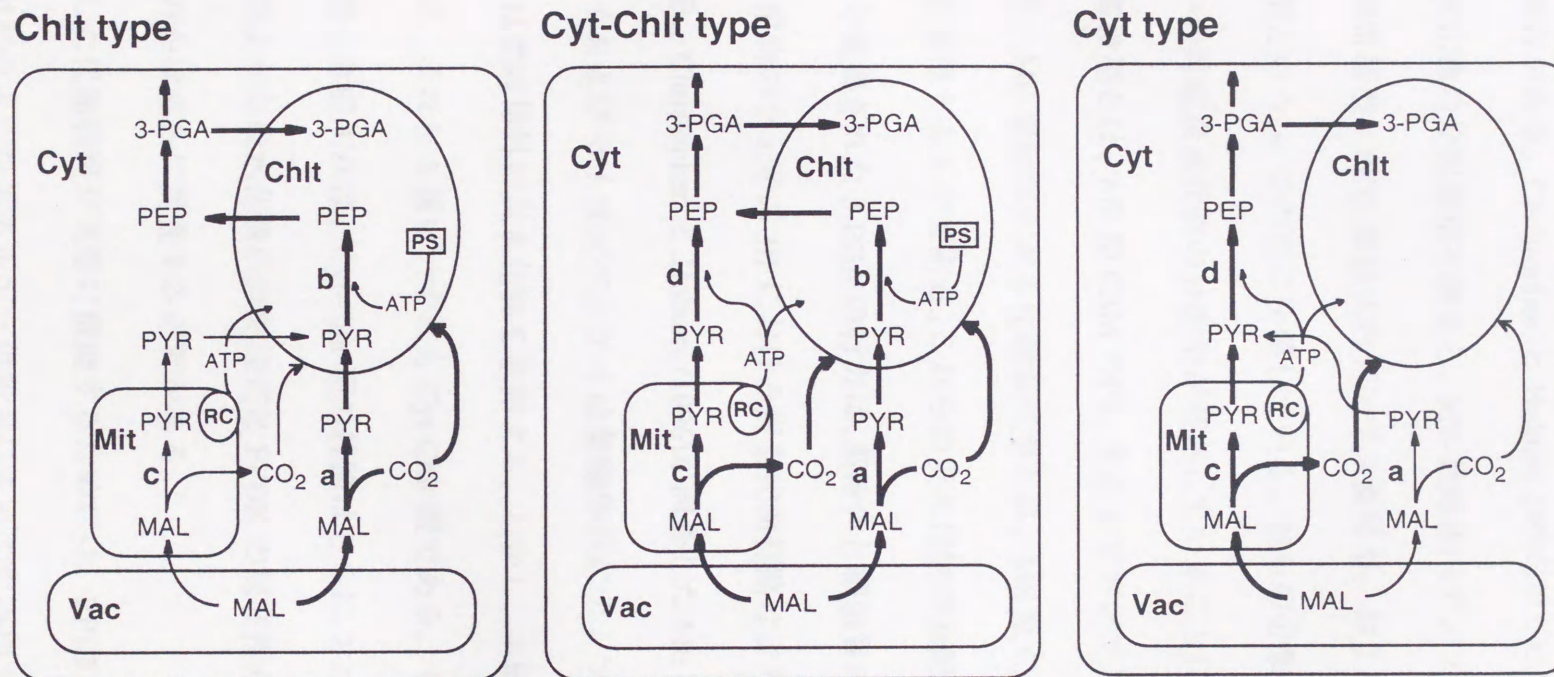


Fig. 6-1. Proposed schemes for carbon flow during phase III of the three ME-CAM groups. PPDK and decarboxylation enzymes are indicated: **a**, NADP-ME; **b**, chloroplastic PPDK; **c**, NAD-ME; **d**, cytosolic PPDK. Chlt, chloroplast; Cyt, cytosol; MAL, malate; Mit, mitochondrion; PYR, pyruvate; PS, photosystem; RC, respiratory chain; Vac, vacuole.

CAM 植物のフェイズ III における代謝経路については、炭水化物代謝と関連づけて検討した報告がある。Christopher と Holtum (1996) は、CAM 植物における主要な貯蔵炭水化物の分配蓄積を調査し、ME-葉緑体内デンプン蓄積型、ME-葉緑体外炭水化物蓄積型、PCK-葉緑体内デンプン蓄積型、および PCK-葉緑体外炭水化物蓄積型という 4 つの型に分類している。彼らの分類に従えば、ME 型 CAM には 2 つの貯蔵炭水化物の分配型が存在していることになる。ME-葉緑体内デンプン蓄積型とは、ME 型 CAM の内、主としてデンプンを葉緑体に蓄積するものであり、ME-葉緑体外炭水化物蓄積型とは、ME 型 CAM の内、葉緑体外に炭水化物を蓄積するものである。これらの炭水化物の分配様式によれば、細胞質で PEP から変換された 3-PGA の行方は、葉緑体と細胞質の 2 通りに分かれ、ME 型 CAM 植物のフェイズ III における炭素代謝経路はより多岐にわたっていることになる。Christopher と Holtum (1996) が調査した ME 型 CAM の内、コダカラベンケイおよびセイロンベンケイは葉緑体内にデンプンを蓄積し、*Sansevieria hahnii* は葉緑体外に炭水化物を蓄積する。しかし、本研究の PPDK の局在型から見れば、これら 3 種はいずれも Cyt-Chlt 型である。すなわち、貯蔵炭水化物の分配型も考慮すれば、Cyt-Chlt 型の経路はさらに 2 つに分けられることになる。このような炭水化物の分配様式と PPDK の局在性がどのような関連を持っているのかはさらに調査する必要がある。

本研究で提案した代謝経路が実際に機能するためには、PPDK の反応に必要なとされる ATP がどのようなエネルギー供給系によって生み出されるのかを考

慮しておく必要がある。葉緑体 PPK ではその触媒反応を起動させるために必要な ATP は葉緑体の光リン酸化反応により供給されと考えられているが (Kluge and Ting 1978)、細胞質型 PPK については明らかではない。

葉緑体を欠くコムギ種子の糊粉層には細胞質型の PPK が蓄積しているが、この場合必要とされる ATP はミトコンドリアから供給されるものと推定されている (Aoyagi and Chua, 1988)。NADPH は NADH に比べ、酸素分子により酸化されにくく、ほとんどの植物のミトコンドリアでは、細胞質に局在する NADP-ME の反応によって産出される NADPH によるよりはむしろ、ミトコンドリア内で生産された NADH を利用することにより呼吸鎖での酸化が行われている。まれな例ではあるが、Cyt-Chlt 型のコダカラベンケイや *Sedum praealtum*、ジャガイモの塊茎およびダイズ葉では、細胞質から外因的に供給された NADPH が、ミトコンドリアで酸化されることが見出されている (Arron et al. 1979, Day 1980)。しかし、この場合この過程で生じた ATP がミトコンドリアから細胞質へ放出された後、どこで消費されるかは分かっていない (Osmond and Holtum, 1981)。PCK 型の C_4 回路では、PCK 反応に必要な ATP はミトコンドリアから供給されることが知られており (Burnell and Hatch 1988, Leegood and Osmond 1990)、このような ATP の供給系が ME 型 CAM の細胞質型 PPK に対しても利用されているのかもしれない (図 6-1)。

細胞質型 PPDK と葉緑体型 PPDK の分子生物学的な側面

これまでに様々なバクテリアや植物から PPDK 遺伝子が単離され、それらの構造や発現様式が比較解析されている(Ku et al. 1996)。しかし、CAM 植物については現在のところ、アイスパラントの PPDK に対する cDNA が単離されているだけである(Fisslthaler et al. 1995, Cushman and Bohnert 1997)。これによれば、アイスパラントでは PPDK は単一の遺伝子によりコードされており、その転写産物は N-末端にトランヂットペプチドを持ち、合成されたタンパク質は葉緑体に蓄積される(Fisslthaler et al. 1995)。この場合、細胞質型 PPDK に対する cDNA は見出されておらず、本植物の CAM 型は PPDK を葉緑体のみに蓄積しているという結果と一致している(Winter et al. 1982)。

一方、単子葉 C_4 植物のトウモロコシでは少なくとも 2 つの PPDK 遺伝子が存在しており、そのうちの 1 つは細胞質型 PPDK をコードしているが、もう 1 つの遺伝子は 2 つのプロモーターにより発現調節を受けており、長さの異なる 2 種類の転写産物を生産する(いわゆる"dual-promoter system")。長い方の転写産物は葉緑体型 PPDK を、短い方の転写産物は細胞質型 PPDK をコードしている。そして、葉では葉緑体型の PPDK が多量に蓄積される(Glackin and Grula 1990, Sheen 1991)。単子葉 C_3 植物のイネでも、発現レベルに違いがあるものの、PPDK 遺伝子の発現調節機構は基本的にはトウモロコシの場合と同じである(Imaizumi et al. 1997)。双子葉 C_4 植物の *Flaveria trinervia* でも"dual-promoter system"により葉緑体型と細胞質型の PPDK が作られ、葉では前者が多量に蓄積される(Rosche

and Westhoff 1995)。この植物では、他の *Flaveria* の C_3 種や C_3 - C_4 中間種と同じように、PPDK は単一の遺伝子によってコードされている (Rosche et al. 1994, Usami et al. 1995, Rosche and Westhoff 1995)。もうひとつの特異な例、しかし本研究で明らかとなった PPDK の蓄積様式と類似した例が、生育環境の違いにより光合成型を C_3 型と C_4 型に変換する水陸両生植物 *Eleocharis vivipara* で見出されている (Ueno 1996, Agarie et al. 1997)。この植物では、光合成組織の葉緑体と細胞質の両者に PPDK を蓄積しており (Ueno 1996)、これらに対応する葉緑体型と細胞質型の PPDK 遺伝子が単離されている。この場合、それぞれの PPDK は別々の遺伝子にコードされている (Agarie et al. 1997)。

本研究で明らかとなった様々な ME-CAM 植物における PPDK の蓄積様式が、遺伝子レベルでどのように調節されているのかは、これから解明すべきもっとも興味深い課題である。PPDK に対するウェスタンブロットによれば、Cyt-Chlt 型の中でも *Lithops*、*Sedum palmeri*、*Alluaudia*、*Sanseveria* のように一本のバンドを形成するものと *Sedum rubrotinctum* や *Kalanchoë* のように 2 本のバンドを形成するものとが見出された。前者では単一の遺伝子から同じサイズの葉緑体型と細胞質型の PPDK が作られている可能性が考えられる。後者については、2 本のバンドが各々葉緑体と細胞質のどちらの PPDK に対応しているのかはまだ明らかではないが、異なった独立した遺伝子に由来しているのかもしれない。本研究の結果は、CAM における PPDK の分子進化が C_4 植物の場合以上に複雑であることを暗示している。ME-CAM 植物では NADP-ME は細胞質に局在して

要約

CAM は Crassulacean Acid Metabolism (ベンケイソウ科型酸代謝) の略であり、光合成炭素代謝機構の 1 つである。CAM を有する植物 (CAM 植物) は、乾燥地に分布するものが多く、乾燥環境に対する適応機構として注目されている。一方、CAM に関わる酵素の細胞内における局在部位や代謝経路については、十分に解明されていない点も多い。CAM 植物における炭素代謝酵素の細胞内分布については、これまで限られた植物種について、主にオルガネラの分画により行われてきた。この手法によれば、PEPCase のように活性測定の高い酵素では、その細胞内局在を解析することは容易でなく、そのため研究者によって異なった結果が報告されている。近年、細胞内におけるタンパク質の局在を解析するうえで、免疫細胞化学的手法が広く用いられるようになってきた。その中でも特に、免疫電子顕微鏡法はすぐれた手法である。本研究では、さまざまな CAM 植物における光合成炭素代謝酵素の葉肉細胞内における局在部位を金コロイド免疫電子顕微鏡法により明らかにした。それらの結果をもとに、ME 型 CAM のフェイズ III における炭素代謝経路について検討を加えた。また、ME 型 CAM 植物における葉緑体型および細胞質型 PPK 3 の発現様式について、分子生物学的な側面から考察した。

1. CAM 植物の葉内部構造

まず、光合成が機能する器官である葉の内部構造を明らかにするために、単子葉植物の PCK 型であるパインアップル科のパインアップル、双子葉植物の ME 型であるザクロソウ科のアイスプラントおよびベンケイソウ科のコダカラベンケイ、セイロンベンケイ、ベニベンケイの葉について、光学顕微鏡、並びに透過型電子顕微鏡により調査した。その結果、調査した CAM 植物の葉はいずれも大型の液胞を持った葉肉細胞が緻密に分布していることが認められた。葉肉細胞における葉緑体はいずれもグラナが発達しており、デンプン粒が観察された。また、葉肉細胞の細胞質には網目状に発達した多数の小胞がみられ、液胞と細胞質間における代謝産物の輸送を高める働きをもっているものと考えられた。ベニベンケイ葉の葉肉細胞では、他の CAM 植物と異なり葉緑体の集合が起こっていることが見出された。

2. 葉肉細胞における PEPCase および Rubisco の局在

CAM 植物の葉肉細胞における PEPCase の局在部位については、これまで異なった結果が報告されていることから、パインアップル、アイスプラント、コダカラベンケイ、およびセイロンベンケイの 4 種の CAM 植物を用い、葉肉細胞における PEPCase および Rubisco の局在を金コロイド免疫電子顕微鏡法により検討した。この結果、調査した CAM 植物すべてにおいて、PEPCase は細胞質に、Rubisco は葉緑体に局在することが明らかになった。このような 2 つの炭酸固定酵素の光合成細胞内における局在部位は C_4 植物の場合と同じであるが、CAM 植物では同一細胞の中で場所を変えて存在している点で、 C_4 植物とは異なってい

た。

3. 葉肉細胞における PPDK の局在様式とその多様性

6 科 15 属 26 種の CAM 植物を対象として、葉肉細胞における PPDK の細胞内局在を金コロイド免疫電顕法により調査した。PCK 型 CAM 植物のパイナップルでは、PPDK に対する金コロイド標識は観察されなかった。一方、ME 型 CAM 植物における PPDK の局在には種により変異がみられ、その局在パターンは、葉緑体のみに局在するもの (Chlt 型)、細胞質のみに局在するもの (Cyt 型)、並びに細胞質と葉緑体の両方に分布するもの (Cyt-Chlt 型) という 3 つの型に分けられることが明らかとなった。これらの ME 型 CAM 植物はいずれも PPDK 酵素の活性をもち、特に Cyt 型で PPDK 酵素の活性が認められたことから、細胞質型 PPDK が実際に酵素としての活性をもち、機能的な役割をもっていることが示唆された。

4. PPDK の局在様式と脱炭酸酵素活性との関係

これらの ME 型 CAM 植物について脱炭酸酵素の活性を測定した結果、PPDK の細胞内局在パターンの違いと NADP-ME および NAD-ME の活性の高低の間には相関があることが明らかとなった。すなわち、葉緑体に多量に PPDK を蓄積する種は NADP-ME 活性が NAD-ME 活性に比べ高く、一方細胞質に多量に PPDK を蓄積している種では反対の傾向があることが見出された。

5. CAM 活性の増大に伴う葉緑体型および細胞質型 PPDK の蓄積様式

短日や乾燥ストレスによって CAM が誘導することが知られているベニベンケイの葉では、他の *Kalanchoë* 属植物と同じように、PPDK は葉肉細胞の葉緑体と細胞質の両方に蓄積した。そこで、ベニベンケイを用いて、CAM 活性の増大に伴い葉緑体型と細胞質型の PPDK が、葉肉細胞内でどのように蓄積されるのかを金コロイド免疫電顕法により検討した。その結果、CAM 活性の増大に伴い、葉緑体型と細胞質型の PPDK の蓄積量が連動して増加することが見出され、細胞質型 PPDK も、葉緑体型 PPDK と同様に CAM 機能に関与していることが示唆された。

6. ME 型 CAM 植物のフェイズ III における炭素代謝経路

以上の結果をもとに、ME 型 CAM 植物のフェイズ III における炭素代謝経路について、PPDK の局在性と脱炭酸酵素活性の高低の違いから考察した。まず、PPDK が葉緑体のみに分布する Chlt 型では、夜間に蓄積されたリンゴ酸は NAD-ME よりむしろ NADP-ME の働きによって脱炭酸される。生じたピルビン酸は葉緑体に輸送され、葉緑体型 PPDK によって PEP に変換されるものと考えた。次に、PPDK が葉緑体と細胞質の両方に分布する Cyt-Chlt 型では、リンゴ酸は NADP-ME と NAD-ME の両方により脱炭酸された後、生成されたピルビン酸は細胞質と葉緑体とで、それぞれ細胞質型 PPDK および葉緑体型 PPDK によって PEP に変換されるものと推察した。最後に、PPDK が細胞質に分布する Cyt 型では、リンゴ酸は主として NAD-ME によって脱炭酸され、ピルビン酸が生成される。そして Chlt 型の経路とは対照的に、ピルビン酸から PEP を経て 3-PGA

に至る反応はすべて細胞質で行われるものと考えた。

7. 細胞質型 PPDK と葉緑体型 PPDK の分子生物学的な側面

PPDK に対するウェスタンブロットによれば、Cyt-Chlt 型の中でも *Lithops*、*Sedum palmeri*、*Allucardia*、*Sanseveria* のように一本のバンドを形成するものと *Sedum rubrotinctum* や *Kalanchoë* のように 2 本のバンドを形成するものとが存在することが見出された。前者では単一の遺伝子から同じサイズの葉緑体型と細胞質型の PPDK が作られており、後者では、2 本のバンドの内どちらが葉緑体と細胞質の PPDK に対応しているのかは明らかではないが、異なった独立した遺伝子に由来している可能性が考えられた。

Summary

Crassulacean acid metabolism (CAM) represents one of major photosynthetic modes in plants. Many CAM species are distributed in arid regions, so that CAM has been considered as an adaptive mechanism to dry environments. However, the intracellular localization of enzymes involved in CAM and the metabolic pathway have not been sufficiently elucidated. The subcellular localization of CAM enzymes has so far been analysed for a limited number of species by cell fractionation, and some conflicting results, such as in the subcellular localization of PEPCase, have been reported. Recently, immunocytochemical techniques have often been used for analyses of the subcellular localization of enzymes in plant cells. In this study, the intracellular localization of photosynthetic enzymes in the carbon metabolism was investigated for various CAM species by protein A-immunogold labeling and electron microscopy. Based on these results, new pathways of the carbon metabolism in phase III of ME-CAM were proposed. In addition, the molecular aspects of the expression patterns of cytosolic and chloroplastic PPKs were discussed.

1. Leaf inner structure of CAM plants.

The inner structure of leaves, which is the main photosynthetic organ, was observed for a monocot PCK-CAM species, *Ananas comosus*, and dicot ME-CAM species, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Kalanchoë blossfeldiana*, *K. daigremontiana*, and *K. pinnata* by light and electron microscope. These CAM species had succulent leaves, in which highly vacuolate mesophyll cells were densely packed. The chloroplasts of mesophyll cells had well-developed grana and accumulated starch grains. Many vesicles of various size were observed in the cytosol of mesophyll cells. It was suggested that the structure is responsible for efficient transport of metabolites between the cytosol and the vacuole. In the case of *K. blossfeldiana*, the aggregation of chloroplasts was observed in mesophyll cells.

2. The intracellular localization of PEPCase and Rubisco in mesophyll cells.

The intracellular localization of PEPCase and Rubisco in mesophyll cells was examined for CAM species, *A. comosus*, *M. crystallinum*, *K. daigremontiana*, and *K. pinnata* by an immunogold electron microscopic technique. In all CAM species examined, Rubisco and PEPCase were localized in the chloroplasts and cytosol, respectively. These results showed that the two carboxylases are compartmentalized between different subcellular sites in a single photosynthetic cell, contrasting with the case of C_4 plants, in which they occur separately in two cell types.

3. The species variation in the intracellular patterns of PPDK localization in mesophyll cells.

The intracellular localization of PPDK in mesophyll cells of 26 CAM species in 15 genera of 6 families was examined by an immunogold electron microscopic technique. In PCK-CAM species, *Ananas comosus*, no immunogold labeling for PPDK was found. With regard to the ME-CAM species, the species variation was found in the intracellular localization of PPDK. The pattern of intracellular localization of PPDK was divided into three types: Chlt, which accumulates PPDK only in the chloroplasts; Cyt-Chlt, which accumulates PPDK in both chloroplasts and cytosol; and Cyt, which accumulates PPDK predominantly in the cytosol. The photosynthetic tissues of all ME-CAM species, including the Cyt type, had substantial PPDK activity, suggesting that PPDK in the cytosol is active and probably plays a functional role.

4. Relationships between the intracellular patterns of PPDK localization and the activity of decarboxylation enzymes.

It was found that there is a correlation between the intracellular patterns of PPDK localization and activity ratios of NAD-ME and NADP-ME. In the species which more accumulated PPDK in the chloroplast, activity of NADP-ME was higher than that of NAD-ME, whereas in the species which more accumulated PPDK in the cytosol, a

contrary tendency was found.

5. The pattern of accumulation of the chloroplastic and cytosolic PPDKs during enhanced expression of CAM.

Kalanchoë blossfeldiana is known to change the expression level of CAM under different environmental conditions, and this species also accumulates PPDK in both chloroplasts and cytosol, as did other *Kalanchoë* species (Cyt-Chlt type). The pattern of accumulation of the chloroplastic and cytosolic PPDKs was investigated for *K. blossfeldiana* plants with different levels of CAM expression, using an immunogold electron microscopic technique. The increase in the chloroplastic PPDK was associated with that of the cytosolic PPDK during enhanced expression of CAM under drought conditions with short days. This fact suggested that the cytosolic PPDK is also involved in CAM function, as is the chloroplastic PPDK.

6. The carbon metabolic pathways in phase III of ME-CAM.

Based on the results of the intracellular patterns of PPDK localization and the activity of decarboxylation enzymes, possible carbon metabolic pathways in phase III of ME-CAM plants were proposed. In the Chlt type that accumulates PPDK only in the chloroplasts, malic acid accumulated at night is decarboxylated by NADP-ME rather than NAD-ME, and pyruvate generated is phosphorylated to PEP by catalysis of PPDK in the chloroplasts. In the Cyt-Chlt type that accumulates PPDK in both chloroplasts and cytosol, malic acid is decarboxylated by both NADP-ME and NAD-ME, and pyruvate generated is phosphorylated to PEP by catalysis of both chloroplastic and cytosolic PPDKs. In the Cyt type that accumulates PPDK only in cytosol, malic acid is decarboxylated predominantly by NAD-ME. In contrast with the pathway of Chlt type, all reactions from pyruvate through PEP to 3-PGA are performed in the cytosol.

7. Molecular aspects of the cytosolic and chloroplastic PPDKs.

The Western blots for PPDK of the Cyt-Chlt type species revealed that *Lithops*, *Sedum palmeri*, *Alluaudia*, and *Sansevieria* showed a single band, whereas *Sedum*

rubroinctum and *Kalanchoë* showed two bands. It was suggested that in the former, both the chloroplastic and cytosolic PPDs, which are the same molecular size, may be produced from a single gene, and in the latter, although it is not known which band corresponds with the chloroplastic and cytosolic PPDs, these isoforms may be encoded by different genes.

謝辞

本研究を実施するにあたり、終始懇親丁寧な御指導を賜りました佐賀大学農学部、柳田晃良教授に心から感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました佐賀大学農学部、野瀬昭博教授に心から感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、終始懇切な御指導と免疫電顕法をはじめとして実験解析を行うために必要な手法を教授していただきました農水省農業生物資源研究所生理機能部物質変換研究室室長、上野修博士に心から感謝申し上げます。第4章の研究においては、植物材料として多種にわたる貴重なCAM植物を提供して頂くとともに、有益な御助言を頂いた(財)進化生物学研究所主任研究員、湯浅浩史博士に心から感謝申し上げます。また、お忙しい中、本論文の校閲の労をとられた佐賀大学農学部、和佐野喜久生教授、鹿児島大学農学部、林満教授、琉球大学農学部、村山盛一教授に厚く御礼申し上げます。

なお、佐賀大学農学部、東江栄助教授ならびに佐賀大学農学部技官、大島建三氏には種々有益な御助言と御激励を頂き感謝の意を表します。さらに、研究遂行上労を惜しまず協力下さいました農水省農業生物資源研究所生理機能部物質変換研究室ならびに発生分化研究室の皆様には感謝の意を表します。

引用文献

- Agarie S, Kai M, Takatsuji H, Ueno O (1997) Expression of C_3 and C_4 photosynthetic characteristics in the amphibious plant *Eleocharis vivipara*: structure and analysis of the expression of isogenes for pyruvate, orthophosphate dikinase. *Plant Mol Biol* 34: 363-369.
- Aoyagi K, Bassham JA (1984) Pyruvate orthophosphate dikinase mRNA organ specificity in wheat and maize. *Plant Physiol* 76: 278-280.
- Aoyagi K, Chua N-H (1988) Cell-specific expression of pyruvate, Pi dikinase. *in situ* mRNA hybridization and immunolocalization labeling of protein in wheat seed. *Plant Physiol* 86: 364-368.
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24: 1-15.
- Arron GP, Spalding MH, Edwards GE (1979) Isolation and oxidative properties of intact mitochondria from the leaves of *Sedum praealtum*. *Plant Physiol* 64: 182-186
- Artus NN, Edwards GE (1985) Properties of leaf NAD-malic enzyme from the inducible crassulacean acid metabolism species *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Physiol* 26: 341-350.
- Balsamo RA, Uribe EG (1988a) Leaf anatomy and ultrastructure of the crassulacean-acid-metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana*. *Planta* 173: 183-189.
- Balsamo RA, Uribe EG (1988b) Plasmalemma- and tonoplast-ATPase activity in mesophyll protoplasts, vacuoles and microsomes of the crassulacean-acid-metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana*. *Planta* 173: 190-196.
- 伴 浩志, 池田 泰治 (1997) 光による葉緑体の定位運動とマイクロフィラメントの経時的変化. 日本植物学会第61回大会研究発表記録, p152.

- Bendayan M (1984) Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: methods, applications, and limitations. *J Electron Microsc Tech* 1: 243-270.
- Black CC, Chen J-Q, Doong RL, Angelov MN, Sung SJS (1996) Alternative carbohydrate reserves used in daily cycle of crassulacean acid metabolism. In: Winter K, Smith JAC (eds) *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution*. Springer, Berlin, pp 31-45.
- Borland AM, Tecsli LI, Leegood RC, Walker RP (1998) Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterisation and intracellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. *Planta* 205: 342-351.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brandon PC (1967) Temperature features of enzymes affecting crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 42: 977-984.
- Brown RH, Gracean VE (1972) Distribution of the post-illumination CO₂ burst among grasses. *Crop Sci* 12: 30-33.
- Brulfert J, Guerrier D, Queiroz O (1982) Photoperiodism and crassulacean acid metabolism. II. Relations between leaf aging and photoperiod in crassulacean acid metabolism induction. *Planta* 154: 332-338.
- Brulfert J, Kluge M, Güçlü S, Queiroz O (1988) Interaction of photoperiod and drought as CAM inducing factors in *Kalanchoë blossfeldiana* Poelln., cv. Tom Thumb. *J Plant Physiol*. 133: 222-227.
- Bruinsma J (1958) Studies on the crassulacean acid metabolism. *Acta Bot Neerl* 7: 531-588.

- Burnell JN, Hatch MD (1988) Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C_4 plant: Pathways of C_4 acid decarboxylation in bundle sheath cells of *Urochloa panicoides*. Arch Biochem Biophys 260: 187-199.
- Buchanan-Bollig IC, Kluge M, Lüttge U (1980) PEP-carboxylase activities and the regulation of CAM: Effects of extraction procedures and leaf age. Z Pflanzenphysiol 97: 457-470.
- Byott GS (1976) Leaf air space systems in C_3 and C_4 species. New Phytol 76: 295-299.
- Christopher JT, Holtum JAM (1996) Patterns of carbon partitioning in leaves of crassulacean acid metabolism species during deacidification. Plant Physiol 112: 393-399.
- Cockburn W (1985) Variation in photosynthetic acid metabolism in vascular plants: CAM and related phenomena. New Phytol 101: 3-24.
- Cook RM, Lindsay JG, Wilkins MB, Nimmo HG (1995) Decarboxylation of malate in the crassulacean acid metabolism plant *Bryophyllum (Kalanchoë) fedtschenkoi*. Role of NAD-malic enzyme. Plant Physiol 109: 1301-1307.
- Cushman JC, Meyer G, Michalowski CB, Schmitt JM, Bohnert HJ (1989) Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. Plant Cell 1: 715-725.
- Cushman JC, Bohnert HJ (1997) Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. Plant Physiol 113: 667-676.
- Day DA (1980) Malate decarboxylation by *Kalanchoë daigremontiana* mitochondria and its role in crassulacean acid metabolism. Plant Physiol 65: 675-679.
- Dittrich P, Campbell WH, Black CC (1973) Phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants exhibiting crassulacean acid metabolism. Plant Physiol 52: 357-361.

- Dittrich P (1976) Nicotinamide adenine dinucleotide-specific "malic" enzyme in *Kalanchoe daigremontiana* and other plants exhibiting crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 57: 310-314.
- Dittrich P (1979) Enzymes of crassulacean acid metabolism. In: Gibbs M, Latzko E (eds) *Photosynthesis II. Photosynthetic carbon metabolism and related processes*. Springer-Verlag, New York, pp 263-270.
- Eames AJ and MacDaniels LH (1947) *An Introduction to Plant Anatomy*. Mc Graw Hill Book, New York and London.
- Edwards GE, Nakamoto H, Burnell JN, Hatch MD (1985) Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C_4 photosynthesis: Properties and mechanism of light/dark regulation. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 255-286.
- Ellis RP (1977) Distribution of the Kranz syndrome in the southern African Eragrostoideae and Panicoideae according to bundle sheath anatomy and cytology. *Agroplantae* 9: 73-110.
- Fisslthaler B, Meyer G, Bohnert HJ, Schmitt JM (1995) Age-dependent induction of pyruvate, orthophosphate dikinase in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* 196: 492-500.
- Gibeaut DM, Thomson WW (1989) Leaf ultrastructure of *Peperomia obtusifolia*, *P. camptotoricha*, and *P. scandens*. *Botanical Gazette* 150, 108-14.
- Glackin CA, Grula JW (1990) Organ-specific transcripts of different size and abundance derive from the same pyruvate, orthophosphate dikinase gene in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3004-3008.
- Gutierrez M, Gracen VE, Edwards GE (1974) Biochemical and cytological relationships in C_4 plants. *Planta* 119: 279-300.
- Hatch MD, Slack CR (1968) A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem J* 106: 141-146.

- Hatch MD, Slack CR (1970) The C_4 -carboxylic acid pathway of photosynthesis. In: Reinhold L and Liwschitz Y (eds) Progress in photochemistry. Wiley-Interscience, London, pp 35-106.
- Hatch MD, Kagawa T, Craig S (1975) Subdivision of C_4 -pathway species based on differing C_4 acid decarboxylating systems and ultrastructural features. Aust J Plant Physiol 2: 111-128.
- Hatch MD, Osmond CB (1976) Compartmentation and transport in C_4 photosynthesis. In: Stocking CR, Heber U (eds) Encyclopedia of Plant Physiology Vol. III. Transport in plants. Springer-Verlag, New York, pp 144-184.
- Herman EM (1988) Immunocytochemical localization of macromolecules with the electron microscope. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39: 139-155.
- Heyne B (1815) On the deoxidation of the leaves of *Cotyledon calycina*. Trans Linn Soc Lond 11: 213-215.
- Höfner R, Vazquez-Moreno L, Abou-Mandour AA, Bohnert HJ, Schmitt JM (1989) Two isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol Biochem 27: 803-810.
- Holtum JAM, Winter K (1982) Activity of enzymes of carbon metabolism during the induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. Planta 155: 8-16.
- Imaizumi N, Ku MSB, Ishihara K, Samejima M, Kaneko S, Matsuoka M (1997) Characterization of the gene for pyruvate, orthophosphate dikinase from rice, a C_3 plant, and a comparison of structure and expression between C_3 and C_4 genes for this protein. Plant Mol Biol 34: 701-716.
- Jenkins JB, Kezdy FJ, Steck TL (1984) Association of phosphofructokinase and aldolase with the membrane of the intact erythrocyte. J Biol Chem 259: 9374-9378.
- 環境白書 (1999) 平成11年度版, 環境庁編, 大蔵省印刷局.

- Kluge M, Osmond CB (1971) Pyruvate, Pi dikinase in crassulacean acid metabolism. *Naturwissenschaften* 58: 414-415.
- Kluge M, Brulfert J, Lipp J, Ravelomanana D, Ziegler H (1993) A comparative study by ^{13}C -analysis of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Kalanchoë* (Crassulaceae) species of Africa and Madagascar. *Bot Acta* 106: 320-324
- Kluge M, Ting IP (1978) Crassulacean acid metabolism. Analysis of an ecological adaptation. Springer, Berlin.
- 近藤 歩 (1996) *Kalanchoë pinnata*, *K. daigremontiana* の CAM 型光合成における ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPCase) 特性に関する研究. 佐賀大学修士論文.
- Kondo A, Nose A, Ueno O (1998) Leaf inner structure and immunogold localization of some key enzymes involved in carbon metabolism in CAM plants. *J Exp Bot* 49: 1953-1961.
- Kondo A, Nose A, Yuasa H, Ueno O (1999) Pyruvate, Pi dikinase of CAM plants: species variation in the subcellular localization as revealed by immunoelectron microscopy. In: Garab G (ed) *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 3595-3598.
- 近藤 歩, 野瀬昭博, 上野 修 (1999) *Kalanchoë blossfeldiana* における CAM 活性の増加に伴う葉緑体型および細胞質型ピルビン酸Piジキナーゼ (PPDK) の蓄積. 日本植物学会第63回大会研究発表記録, p 203.
- Kondo A, Nose A, Yuasa H, Ueno O (2000) Species variation in the intracellular localization of pyruvate, Pi dikinase in leaves of crassulacean-acid-metabolism plants: an immunogold electron microscope study. *Planta*: in press.

- Kore-eda S, Yamashita T, Kanai R (1996) Induction of light dependent pyruvate transport into chloroplasts of *Mesembryanthemum crystallinum* by salt stress. *Plant Cell Physiol* 37: 257-262.
- Kortschak HP, Hartt CE, Burr GO (1965) Carbon dioxide fixation in sugar cane leaves. *Plant Physiol* 40: 209-213.
- Krauss BH (1949) Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. *Botanical Gazette* 110: 333-404
- Ku MSB, Kano-Murakami Y, Matsuoka M (1996) Evolution and expression of C_4 photosynthesis genes. *Plant Physiol* 111: 949-957.
- Leegood RC, Osmond CB (1990) The flux of metabolites in C_4 and CAM plants. In: Dennis DT, Turpin DH (eds) *Plant physiology, biochemistry and molecular biology*. Longman Scientific and Technical, Essex, pp 274-298
- Lösch R (1984) Species-specific responses to temperature in acid metabolism and gas exchange performance of Macaronesian Sempervivoideae. In: Margaritis NS, Arianoustou-Farragitaki M, Oechel WC (eds) *Being alive on land*. Junk, The Hague, pp 117-126.
- Lösch R (1987) Die Produktionsphysiologie von *Aeonium gorgoneum* und anderer nichtkanarischer Aeonien (Phanerogamae: Crassulaceae). *Cour Forschungsinst Senckenb* 95: 201-209.
- Möllering H (1974) Determination of malate dehydrogenase and glutamate-oxaloacetate transaminase. In: Bergmeyer HU (eds) *Methods of enzymatic analysis*, Vol.3. Academic Press, New York, pp1589-1593.
- Moons A, Valcke R, Van Montagu M (1998) Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C_3 plant. *Plant J* 15: 89-98.
- Moorhead GBG, Plaxton WC (1988) Binding of glycolytic enzymes to a particulate fraction in carrot and sugar beet storage roots. *Plant Physiol* 86: 348-351.

- Mukerji SK, Ting IP (1968) Intracellular localization of CO₂ metabolism enzymes in cactus phylloclades. *Phytochem* 7: 903-907.
- Neuhaus HE, Holtum JAM, Latzko E (1988) Transport of phosphoenolpyruvate by chloroplasts from *Mesembryanthemum crystallinum* L. exhibiting crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 87: 64-68.
- Nimmo HG (1990) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation in C₄ and crassulacean acid metabolism plants. *Curr Top Plant Biochem and Physiol* 9: 357-364.
- Nobel PS (1991) Achievable productivities of certain CAM plants: basis for high values compared with C₃ and C₄ plants. *New Phytol* 119: 183-205.
- 野瀬昭博 (1992) CAM型光合成の変異と制御. *日作紀* 61: 161-171.
- 野瀬昭博 (1996) CAM型光合成の進化的側面. *生物環境調節* 34: 97-104.
- O'Leary MH (1982) Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. *Ann Rev Plant Physiol* 33: 297-315.
- Osmond CB (1978) Crassulacean acid metabolism: a curiosity in the context. *Ann Rev Plant Physiol* 29: 379-414.
- Osmond CB, Holtum JAM (1981) Crassulacean acid metabolism. In: Hatch MD, Boardman NK (eds) *The Biochemistry of plants, Vol. 8, Photosynthesis*. Academic Press, New York, pp283-326.
- Perrot-Rechenmann C, Vidal J, Brulfelt J, Burlet A, Gadal P (1982) A comparative immunocytochemical localization study of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of higher plants. *Planta* 155: 24-30.
- Pilon-Smits EAH, 't Hart H, Van Brederode J (1996) Evolutionary aspects of crassulacean acid metabolism in the Crassulaceae. In: Winter K, Smith JAC (eds) *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution*. Springer, Berlin, pp 349-359.

- Queiroz O, Morel C (1974) Photoperiodism and enzyme activity: towards a model for the control of circadian metabolic rhythms in CAM. *Plant Physiol* 53: 596-602.
- Rosche E, Streubel M, Westhoff P (1994) Primary structure of the photosynthetic pyruvate orthophosphate dikinase of the C_3 plant *Flaveria pringlei* and expression analysis of pyruvate orthophosphate dikinase sequences in C_3 , C_3 - C_4 and C_4 *Flaveria* species. *Plant Mol Biol* 26: 763- 769.
- Rosche E, Westhoff P (1995) Genomic structure and expression of pyruvate, orthophosphate dikinase gene of the dicotyledonous C_4 plant *Flaveria trinervia* (Asteraceae). *Plant Mol Biol* 29: 663-678.
- 鮫島宗明 (1994) 環境ストレスによる炭酸固定機構の変換. 植物細胞工学 別冊1, 秀潤社, pp 127-133.
- Schnarrenberger C, Gross D, Burkhard CH, Herbert H (1980) Cell organelles from crassulacean acid metabolism (CAM) plants. *Planta* 147: 477-484.
- Sheen J (1991) Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes. *Plant Cell* 3: 225-245.
- Sheriff A, Meyer H, Riedel E, Schmitt JM, Lapke C (1998) The influence of plant pyruvate, orthophosphate dikinase on a C_3 plant with respect to the intracellular location of the enzyme. *Plant Science* 136: 43-57.
- Smith JAC, Heuer S (1981) Determination of the volume of intracellular spaces in leaves and some values for CAM plants. *Ann Bot* 48: 915-917.
- Smith JAC, Bryce JH (1992) Metabolite compartmentation and transport in CAM plants. In: Tobin AK (ed) *Plant organelles. Compartmentation of metabolism in photosynthetic tissue*. Cambridge University Press, Cambridge, pp141-167.
- Smith JAC, Winter K (1996) Taxonomic distribution of crassulacean acid metabolism. In: Winter K, Smith JAC (eds) *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution*. Springer, Berlin, pp 427-436.

- Spalding MH, Schmitt MR, Ku SB, Edwards GE (1979) Intracellular localization of some key enzymes of crassulacean acid metabolism in *Sedum praealtum*. Plant Physiol 63: 738-743.
- Sugiyama T, Laetsch WM (1975) Occurrence of pyruvate orthophosphate dikinase in the succulent plant, *Kalanchoë daigremontiana* Hamet. et. Perr. Plant Physiol 56: 605-607.
- Taborsky H, Muller D, and Kluge M (1983) Localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in the cytoplasm of crassulacean acid metabolism plant cells by means of a rapid immunohistochemical method. Physiol Veg 21: 1063-1068.
- 寺島一郎 (1999) 光環境と葉の光合成 -生態生理学からの視点-. 植物細胞工学シリーズ11, 秀潤社, pp 92-97.
- Ting IP (1985) Crassulacean acid metabolism. Ann Rev Plant Physiol 36: 595-622.
- 徳田康紀 (1996) *Ananas comosus* (パイナップル)のCAM型光合成におけるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPCase)特性に関する研究. 佐賀大学修士論文.
- Ueno O (1996) Immunocytochemical localization of enzymes involved in the C_3 and C_4 pathways in the photosynthetic cells of an amphibious sedge, *Eleocharis vivipara*. Planta 199: 394-403.
- Ueno O, Samejima M, Muto S, Miyachi S (1988) Photosynthetic characteristics of an amphibious plant, *Eleocharis vivipara*: Expression of C_4 and C_3 modes in contrasting environments. Proc Natl Acad Sci USA 85: 6733-6737.
- Usami S, Ohta S, Komari T, Burnell JN (1995) Cold stability of pyruvate, orthophosphate dikinase of *Flaveria brownii*. Plant Mol Biol 27: 969-980.
- van Ham RCHJ, 't Hart H (1998) Phylogenetic relationships in the Crassulaceae inferred from chloroplast DNA restriction-site variation. Amer J Bot 85: 123-134.

- Warmbrodt RD (1984) Structure of the leaf of *Pyrossia longifolia*-a fern exhibiting crassulacean acid metabolism. *Amer J Bot* 71: 330-347.
- Wedding RT and Black MK (1986) Malate inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula*. *Plant Physiol* 29: 385-392.
- Winter K (1980) Day/night changes in the sensitivity of phosphoenolpyruvate carboxylase to malate during crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 65: 792-796.
- Winter K (1982) Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in rapidly prepared, desalted leaf extracts of the crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* 154: 298-308.
- Winter K, Foster JG, Edwards GE, Holtum JAM (1982) Intracellular localization of enzymes of carbon metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* exhibiting C₃ photosynthetic characteristics or performing crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 69: 300-307.
- Winter K, Smith JAC (1996) Crassulacean acid metabolism: current status and perspectives. In: Winter K, Smith JAC (eds) *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution*. Springer, Berlin, pp 389-426.
- Wu MX, Wedding RT (1985) Diurnal regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula*. *Plant Physiol* 77: 667-675.
- Wu MX, Wedding RT (1992) Inactivation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by the binding to chloroplast membranes. *Plant Physiol* 100: 382-387.

