

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名	林 欽
題 目	<p style="text-align: center;">高夜温が二種の CAM 植物パインアップル(<i>Ananas comosus</i>) および <i>Kalanchoë pinnata</i> の CAM 型光合成に及ぼす影響 (High night temperature effects on the mechanism of Crassulacean Acid Metabolism (CAM) photosynthesis in pineapple (<i>Ananas comosus</i>) and <i>Kalanchoë pinnata</i>)</p>
<p>本研究は、CAM型光合成における液胞膜の役割を明らかに目的であった。つまり、高夜温における二種のCAM植物パインアップル(<i>Ananas comosus</i>)および <i>Kalanchoë pinnata</i> の代謝特性に及ぼす影響について調査した。</p> <p>まず、昼温を30℃に固定した時の夜温の変化がCAM植物パインアップルとセイロンベンケイソウのガス交換および有機酸の蓄積に及ぼす影響について調査した。その結果、夜温が上昇すると両植物でガス交換は減少した。37℃の夜温下で、セイロンベンケイソウでは夜間のCO<sub>2</sub>吸収が完全に消失した。暗期の終わりのリンゴ酸の蓄積は夜温の上昇に伴って両植物で減少したが、明期の終わりのリンゴ酸レベルは影響を受けなかった。次に、高夜温の条件下で(昼/夜、30℃/37℃)、CAM型光合成に関連する代謝中間産物の日変化を比較検討した。パインアップルではCAM植物特有のリンゴ酸含量の日変化を示したが、セイロンベンケイソウでは夜間のリンゴ酸の蓄積は認められなかった。グルコース-6-リン酸(G-6-P)、フラクトース-6-リン酸(F-6-P)、グルコース-1-リン酸(G-1-P)含量は両植物で日変化を示さなかった。オキザロ酢酸(OAA)の含量はいずれの植物でも夜の始めに上昇し、昼間に漸減した。ホスホエノールピルビン酸(PEP)の含量は両植物で昼夜にわたって高いレベルに維持されていた。このことは PEP からリンゴ酸への合成経路が阻害されていたことが推測される。次に、PEPCのK<sub>i</sub>/malateはセイロンベンケイソウでは昼間に3.7mM、夜間に2.0mMに対してパインアップルでは昼間1.2mM、夜間0.7mMであった。20℃夜温の結果と比べ、パインアップルではK<sub>i</sub>/malateにはほとんど変化がなかったが、セイロンベンケイソウでは昼間では約4倍増加し、夜間では約3倍減少していた。また、NAD-MDHの活性は温度の上昇に伴い高くなった。以上の結果より、高夜温下でもパインアップルのPEPCのリン酸化の昼夜変化が生じていないことが示唆され、PEPCのリン酸化・脱リン酸化が必ずしもCAM型光合成の主要な制御部ではないことが示唆された。また、セイロンベンケイソウにおいては高夜温下でPEPCのリン酸化が阻害され、このことが夜間におけるCO<sub>2</sub>吸収とリンゴ酸の蓄積の消失をもたらしたものと考えられる。</p> <p>昼温を30℃に維持、夜温を20℃から37℃に上昇した時、液胞膜内のリン質とタンパク質の比率は、パインアップルにおいて1.82から1.21に減少し、セイロンベンケイソウでは2.63から1.53に減少したことが分かった。減少率はパインアップルには33.5%、セイロンベンケイソウには42.9%であった。液胞膜にあるそれぞれの飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の合わせるパーセンテージ量には、夜温の変化にかかわらず、パインアップルには41.5%と58.5%に維持していたが、セイロンベンケイソウでは52.1%と47.9%からそれぞれ46.4%と53.6%に変化した。また、パインアップルでは、個々の脂肪酸のパーセンテージ量が殆ど変化しなかった。しかし、夜温の変化につれてセイロンベンケイソウの個々の脂肪酸パーセンテージ量は増加もしくは減少を変化した。二次元電気泳分析の結果によると、温度に対するタンパクの分布は夜温の変化に影響を受けないことが分かった。夜温20℃の結果と比較すると、パインアップル液胞膜のタンパク質の数は37℃の条件で43個増加した。しかし、セイロンベンケイソウは数の変化はなかった。</p> <p>以上のことから、夜温の変化に関わらず、パインアップルの液胞膜はセイロンベンケイソウより硬い状態に維持されたことが分かった。つまり、液胞膜の流動性が低かったことで、膜のリンゴ酸の保持能力がパインアップルのほうが高いことが示唆された。リンゴ酸を液胞への輸送するエネルギー源と見られたATPaseの活性は、夜温20℃と37℃とも、パインアップルがセイロンベンケイソウより高いと示したことにしたがって、パインアップルの液胞膜はセイロンベンケイソウよりも高いリンゴ酸の輸送能力を持っていたことが示された。</p>	

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名	LIN QIN
題 目	<p style="text-align: center;">High night temperature effects on the mechanism of Crassulacean Acid Metabolism (CAM) photosynthesis in pineapple (<i>Ananas comosus</i>) and <i>Kalanchoë pinnata</i>                  (高夜温が二種の CAM 植物パインアップル(<i>Ananas comosus</i>)                  および <i>Kalanchoë pinnata</i> の CAM 型光合成に及ぼす影響)</p>
<p>The purpose of this study is to understand the role of tonoplast on the CAM photosynthesis mechanism. In other words, the effects of high night temperature on the metabolism properties of the two kinds of crassulacean acid metabolism (CAM) plants, <i>K. pinnata</i> and pineapple were studied.</p> <p>Under a fixed day-temperature condition of 30°C, the CO<sub>2</sub> exchange rate decreased in both species, and <i>K. pinnata</i> completely lost nocturnal CO<sub>2</sub> uptake under a high night temperature (30/37°C in day/night) condition (HNT) with the increase of the night temperature. Diurnal changes of ten kinds of metabolites were investigated under HNT. Pineapple accumulated a large amount of nocturnal malate under HNT, but <i>K. pinnata</i> did not. Four kinds of hexose-phosphate (hexose-P) were accumulated at the same levels during the day/night cycle under HNT in both plant species. Nocturnal accumulation of oxaloacetate (OAA) was observed but phosphoenolpyruvate (PEP) was kept at a high level both in day and night under HNT in both plant species. The concentrations of malate required for 50% inhibition of the activities of day and night forms of PEP carboxylase (PEPC) from the pineapple leaves were 1.2 and 0.7 mM, respectively, whereas those from the <i>K. pinnata</i> leaves were 3.7 and 2.0 mM, respectively. In both plants, NAD-MDH activity in vitro increased with increasing temperature. It is therefore suggested that under HNT, phosphorylation may not be the major factor controlling PEPC activity in pineapple, and therefore CAM mode in pineapple was maintained under HNT. The nighttime phosphorylation of PEPC in <i>K. pinnata</i> would disappear under HNT leading to the loss of nocturnal malate accumulation.</p> <p>Effects of high night temperature on the lipid and protein compositions in the tonoplasts isolated from the leaves pineapple and <i>K. pinnata</i> were studied. The results showed that the phospholipids/protein ratios in the tonoplasts isolated from pineapple and <i>K. pinnata</i> leaves decreased from <math>1.82 \pm 0.05</math> to <math>1.21 \pm 0.08</math> and <math>2.63 \pm 0.13</math> to <math>1.50 \pm 0.12</math>, respectively as the night temperature increased from 20 to 37 °C. Under high night temperature, relative amount of total unsaturated fatty acids in <i>K. pinnata</i> was increased by 6 %, which was mainly caused by increased C18:2 and C18:3, whereas unsaturated fatty acids, C18:2 and C18:3 in pineapple did not show significant change. The distribution patterns of tonoplast proteins in the two CAM species were different between normal and high night temperature. In <i>K. pinnata</i>, especially those with molecular mass ranging from 66.2 to 97.4 KDa. Compared with normal night temperature, more than 43 proteins were found in pineapple, but no difference was found in <i>K. pinnata</i>. Thus, above result indicated that the pineapple tonoplasts could keep higher rigidity under high night temperatures compared to the <i>K. pinnata</i>. It is suggest that pineapple has lower tonoplast fluidity than <i>K. pinnata</i>, so the tonoplast of pineapple could keep stronger preveribility of malate in the vacuole and higher transfer ability of malate into the vacuole.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	林 欽
審査委員	主査 佐賀大学 教授 野瀬 昭博
	副査 佐賀大学 助教授 東江 栄
	副査 琉球大学 教授 石嶺 行男
	副査 鹿児島大学 教授 富永 茂人
	副査 宮崎大学 教授 杉本 安寛
審査協力者	
題 目	<p>High night temperature effects on the mechanism of Crassulacean Acid Metabolism (CAM) photosynthesis in pineapple (<i>Ananas comosus</i>) and <i>Kalanchoë pinnata</i></p> <p>(高夜温が二種のCAM植物パイナップル(<i>Ananas comosus</i>)および <i>Kalanchoë pinnata</i>の CAM型光合成に及ぼす影響)</p>
<p>本研究は、CAM型光合成における液胞膜の役割を明らかにする目的で、高夜温条件下における代謝及び液胞膜特性を2種のCAM植物パイナップル(<i>Ananas comosus</i>)およびセイロンベンケイソウ(<i>Kalanchoë pinnata</i>)を用いて調査したものである。</p> <p>まず、昼温を30℃に固定した時の夜温の変化がパイナップルとセイロンベンケイソウのガス交換、有機酸及びCAM型光合成関連代謝中間体の日変化に及ぼす影響について調査している。その結果、夜温が上昇すると両植物で夜間のCO<sub>2</sub>吸収が減少することを認め、特に37℃の夜温下で、セイロンベンケイソウでは夜間のCO<sub>2</sub>吸収が完全に消失し、リンゴ酸の夜間における蓄積も生じず、光合成型がCAM型からC<sub>3</sub>型へ移行することを明らかにしている。しかし、パイナップルでは、高夜温条件下においてもCAM型光合成が維持された。この原因として、夜間におけるCO<sub>2</sub>吸収・固定の鍵酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)のリンゴ酸による活性阻害感受性(Ki/malate)が、セイロンベンケイソウでは高夜温下で高くなり、パイナップルでは通常夜温(20℃)下と殆ど変化しないこと、また、Ki/malateの程度も両植物では明らかに異なることを示している。PEPCのKi/malateの増大が、PEPCタンパクのリン酸化の間接的指標となることから、セイロ</p>	

ンベンケイソウでは高夜温条件下において PEPC タンパクのリン酸化の阻害が CAM 型光合成消失の主な原因となっていること示唆し、パインアップルでは PEPC タンパクのリン酸化・脱リン酸化を介した CAM の制御が必ずしも十分に機能していないことを推論している。

次に、昼温を30℃に維持し、20℃と37℃の夜温下に一定期間(1~2週間)置いたときの液胞膜特性について、液胞膜ATPase及びPPase活性、さらには脂質とタンパク質組成について調査している。37℃夜温に置いた場合、液胞膜の脂質とタンパク質の比率は、パインアップルでは1.82から1.21に減少し、セイロンベンケイソウでは2.63から1.53に減少した。その減少率はパインアップルでは33.5%、セイロンベンケイソウでは42.9%であった。液胞膜の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の構成割合については、夜温の変化にかかわらずパインアップルではそれぞれ41.5%と58.5%に維持されていたが、セイロンベンケイソウでは20℃夜温下で飽和脂肪酸52.1%と不飽和脂肪酸47.9%という構成割合が、37℃夜温下ではそれぞれ46.4%と53.6%に変化した。また、パインアップルでは、脂肪酸の構成割合も殆ど変化しなかったのに対し、セイロンベンケイソウでは37℃夜温下において不飽和脂肪酸の構成割合が増大した。二次元電気泳動分析による液胞膜のタンパク質組成については、夜温20℃の結果と比較すると、37℃夜温下においたパインアップルでは43個のタンパク質が新たに発現していることが観察された。セイロンベンケイソウでは数の変化はなかった。以上のことから、20℃と37℃の夜温下で、パインアップルの液胞膜はセイロンベンケイソウより堅い状態に維持されていることを示唆している。このようなパインアップルにおいて液胞膜の流動性が低いことは、液胞膜のリンゴ酸の保持能力がパインアップルで高いことを示唆している。また、リンゴ酸を液胞へ輸送する駆動力をもたらすATPase活性は、20℃と37℃の両夜温下でパインアップルがセイロンベンケイソウより明らかに高いことも観察している。これらの結果は、セイロンベンケイソウに比べ、パインアップルの液胞膜がより高いリンゴ酸輸送力を有していることを示唆している。

以上の結果は、パインアップルのCAM型光合成において液胞膜特性がその制御に密接に関わっていることを示唆し、現在基本的なCAM型光合成制御メカニズムと認識されているPEPCタンパクのリン酸化・脱リン酸化の昼夜変化が、パインアップルのCAM型光合成では必ずしも機能していないことを示すもので、CAM型光合成制御メカニズムにおける新たな知見を提供している。以上の成果について、本審査委員会は、学位論文として十分な価値を持つものと判断した。

## 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏 名	林 欽		
審査委員	主査	佐賀大学	教授 野瀬 昭博
	副査	佐賀大学	助教授 東江 栄
	副査	琉球大学	教授 石嶺 行男
	副査	鹿児島大学	教授 富永 茂人
	副査	宮崎大学	教授 杉本 安寛
審査協力者			
実施年月日	平成 19 年 1 月 10 日		
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）		<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査の5名は、平成19年1月10日（水）の公開審査会において、学位申請者に対して学位論文について説明を求め、その内容および関連事項について試問をおこなった。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者として十分な学力ならびに見識を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに足る資格をもつものと判定した。</p>			

学位申請者  
氏 名

林 欽

質疑・応答の経過

質問 1: 夜の温度が上がると、脂質とタンパク質が低下していますが、パインアップルの収量や味に影響が考えられますか？

答: ガス交換の結果からすると 28℃以上の夜温では収量が低下する可能性があります。

質問 2: 日本では、パインアップルは沖縄でしか栽培がありませんが、沖縄の夜の温度はパインアップルの栽培にとって適温ですか？

答: 夜温に関しては、適していると推測されます。

質問 3: この研究から、沖縄のパインアップル栽培にアドバイスできることはありますか？

答: ハウスパインにおいては、夜温が上がりすぎないような管理が必要だと思います。

質問 4: パインアップルとベンケイソウで液胞に溜まる有機酸、リンゴ酸、クエン酸、イソクエン酸の量が種によって特徴的に異なっていますが、その原因についてどのように考えますか？TCA サイクルの酵素特性になにか原因があるのでしょうか？

答: コダカラベンケイソウはクエン酸を蓄積します。スライド 00' で説明したように、クエン酸を液胞に蓄積するエネルギー収支は効率がよく、炭素固定としては効率的なメカニズムですが、CAM 植物は基本的にリンゴ酸を多量に蓄積します。ご指摘の点は、今後の課題だと考えています。

質問 5: 図 6 の明暗の表示が逆になっています。訂正してください。

答: ありがとうございます。訂正します。

質問 6: まとまって良い論文だと思います。ひとつだけ、PEPC のリン酸化と脱リン酸化がパインアップルにおいて CAM 制御の主要な部分ではないということは、新たな発見だと思います。そこで、パインアップルでは、どのような制御系が働いていると考えていますか？

答: 液胞膜の高い ATPase 活性で効率よくリンゴ酸を細胞質から液胞へ取り込み、堅い液胞膜でリンゴ酸の漏れを防ぎ、細胞質のリンゴ酸濃度を低く維持するようにして、PEPC のリンゴ酸による阻害を回避していると考えています。

質問 7: パインアップルでは液胞にリンゴ酸を効率よく溜めて、細胞質にリンゴ酸を残さないようにしているということが重要な点ですよね。しかし、ベンケイソウでは細胞質のリンゴ酸濃度が高い。とすれば、29 番目のスライドのリンゴ酸感受性は、逆になるのではないですか？そして、パインアップルのリンゴ酸感受性は高いのではないですか？

答: リンゴ酸阻害の指標として示した  $K_i/\text{malate}$  は、50%の活性阻害が生じるリンゴ酸濃度を示しています。したがって、セイロンベンケイソウの高夜温下で  $K_i/\text{malate}$  が低くなる結果は、PEPC がリンゴ酸によって阻害されやすくなっているということです。パインアップルの PEPC は、20℃でも 37℃の夜温でリンゴ酸による阻害が基本的に生じやすい特性が認められ、これはセイロンベンケイソウと異なる特性です。その特性を、先程の液胞膜の特性が補っていると考えています。

質問 8: パインアップルの味に対する夜温の影響はどうですか？

答: この研究は、葉について行ったもので、果実での糖代謝や有機酸代謝まで拡大できるか、自信がありません。

質問 9: ベンケイソウで昼夜: 30/20℃を 3 日間、次に昼夜: 30/37℃を 3 日間、さらに昼夜: 30/20℃を 3 日間にする、ガス交換の形が、CAM から C3、さらに CAM とすぐに変化するわけですが、そのことを総合考察に述べてあるメカニズムからどのように説明できますか？また、気孔の関与はありませんか？

答: 基本的にこの研究で認められたセイロンベンケイソウでの高夜温下での光合成型の変換は、遺伝子の発現が関与した光合成型の変換ではなくて、PEPCタンパクのリンゴ酸阻害によってもたらされていると考えています。そのために、夜温を 37℃から 20℃へ戻すとすぐに CAM 型へ戻るものと考えられます。