

Flaveria 属植物の解析から見える C₄ 型進化モデル

宗景 ゆり, 谷口 幸美

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

〒630-0192 生駒市高山町 8916-5

Evolutionary model of C₄ photosynthesis in genus *Flaveria*Key words: C₄ photosynthesis, evolution, genus *Flaveria*,

Yuri N. Munekage & Yukimi Y. Taniguchi

Graduate School of Biological Sciences,

Nara Institute of Science and Technology

8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

1. はじめに

C₄型植物は、C₃型植物と異なり葉肉細胞と維管束鞘細胞の二種類の細胞を使って代謝経路を動かし、維管束鞘細胞へCO₂を濃縮するC₄型光合成を行っている。C₄型光合成では、気孔から入ってきたCO₂は、葉肉細胞で一旦C₄酸の形で固定された後、維管束鞘細胞へ運ばれ、脱炭酸酵素により維管束鞘細胞でCO₂が放出される。ここで生成したC₃酸は再び葉肉細胞に運ばれ再度CO₂固定反応に使われる基質となる。このC₄回路と呼ばれる代謝経路により、維管束鞘細胞のCO₂分圧を高めることができる。一方、C₃型光合成において葉肉細胞でCO₂固定を行っているリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) は、C₄型植物では、発現領域が維管束鞘細胞へ限定化される。従って、C₃型光合成では光呼吸によって光合成効率が20%–50%低下するが、C₄型光合成では光呼吸による光合成効率の低下を防ぐことができる。このため、C₄型光合成は、高温や水分欠乏環境により葉内のCO₂濃度が低下する条件下で、C₃型光合成より有利に働く(Long 1999)。

地球上には19の属にわたる約7500種のC₄型植物が存在する。系統学解析により、それらは66系統の独立のC₃型祖先種から発生したと考えられている(Sage 2012)。また、C₃-C₄中間型に分類される植物が21系統存在し、このうち12系統においてC₃-C₄中間種とC₄種が共通の祖先を持つことが報告されている(Christin et al. 2011, Sage et al. 2011)。このことから、C₄型光合成は、C₃-C₄中間型を経て発生したと考えられている。C₃-C₄中間型光合成では、光呼吸で生じたグリシンを維管束鞘細胞へ運んでCO₂を放出する“グリシンシャトル”によってCO₂の濃縮を行う。この“グリシンシャトル”ではC₄回路と同様に葉肉細胞と維管束鞘細胞の二種類の細胞を使ってCO₂を濃縮することから、C₃-C₄中間型では、C₄型光合成の準備段階の形態や代謝経路が構築されていると考えられる。本稿で紹介するキク科*Flaveria*属植物には、C₃種、C₄種だけでなく、C₃-C₄中間種とC₄様種が多数存在する。これら進化的に近く同じゲノム背景をもつ種の比較解析から、近年遺伝子レベルで様々な現象がわかりつつある。

本稿では、*Flaveria* 属植物をモデルとし、段階的に進んだ C₄ 型光合成成立までの進化過程について考察する。

2. キク科 *Flaveria* 属植物の起源と分類

C₄ 型植物が地球上に出現したのは約 3300 万年であると推測されている (Sage et al. 2012)。これに対し *Flaveria* 属の C₄ 系統は進化的に新しく、約 300 万年前に出現したと推測されている (Christin et al. 2011)。 *Flaveria* 属の多くはアメリカ合衆国の南部、メキシコおよび西インド諸島に分布しており、現在 C₃ から C₄ 種を含めて 23 種存在することが確認されている (Powell 1978, McKown et al. 2005)。系統学的解析により、これらは C₃ 種で構成される基底群, Clade A, Clade B に分類される (ここでは我々が解析に使用した 8 種のみを示す, 図 1)。また、この解析から *Flaveria* 属では、C₃ 種から C₃-C₄ 中間種が発生した後、2 つの Clade に分かれて C₄ 化が進んだことがわかる (McKown et al. 2005)。Clade A には C₃-C₄ 中間型, C₄ 様型, C₄ 型種が含まれるのに対し、Clade B で最も C₄ 化した種は、C₄ 様種の *F. brownii* のみである。

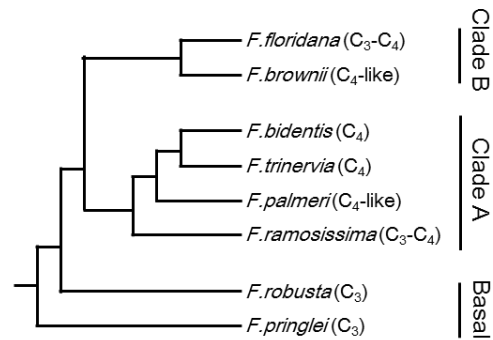


図1. *Flaveria* 属植物の系統図 (McKown., 2005より改変)

C₃ から C₄ 型までの光合成タイプは、それらの植物がもつ CO₂ 補償点と、オキシゲナーゼ反応による光合成低下率 (O₂ inhibition, %) によって分けられており、C₃ 型は約 50 μl/l, C₃-C₄ 中間型は 30-10 μl/l, C₄ 様型は 10-5 μl/l, C₄ 型は 5 μl/l 以下の CO₂ 補償点を示す (Ku et al. 1991)。ただし C₃-C₄ 中間種や C₄ 様種において、それらの C₄ 化度合 (どれだけ C₄ 型に近い性質をもつかどうか) は種によって様々である。

3. 葉の形態と Kranz 構造の発達

Flaveria 属植物において、C₃ 種と C₄ 種では幅の広い葉が形成されるのに対し、C₃-C₄ 中間種の一部や C₄ 様種は細長い葉が形成される (図 2) ことから、葉の形は C₄ 型と関係しないと考えられる。一方、各 *Flaveria* 種の葉脈パターンを観察すると、C₃ 型では、葉脈間距離が広いのに対し、C₃-C₄ 中間種ではやや狭く、C₄ 様種および C₄ 種では最も狭くなっている (図 3, Mckwon & Dengler 2007)。このような維管束密度の上昇は、葉肉細胞と維管束鞘細胞を 1 : 1 で配置させるために重要であることが報告されている (Dengler and Nelson 1999)。 *Flaveria* 属植物では、C₃ 型から C₃-C₄ 中間型, C₄ 様型への進化の過程で、段階的に維管束密度が上昇していることがわかる。

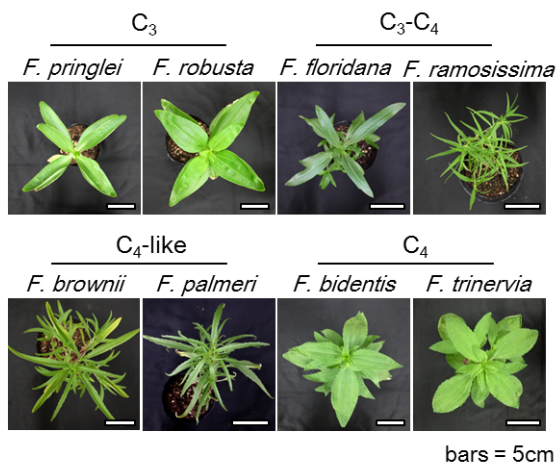


図2. *Flaveria* 属植物各種の表現型

C₄型植物では、一般に花環を意味する Kranz 構造とよばれる葉の内部の組織形態が観察される。Kranz 構造の定義はあいまいであるが、1) 葉肉細胞に対して維管束鞘細胞が大きく肥大化する。上記の維管束密度の上昇により 2) 葉肉細胞(M)が維管束鞘細胞(BS)に隣接して同心円状に 1 : 1 で配置され、vein-BS-M-M-BS-vein パターンを形成する。3) 維管束鞘細胞において葉緑体の数や大きさが増大し、それらが維管束に対し求心的または遠心的に配置される。という形態変化が含まれる (Dengler and Nelson 1999)。双子葉植物では維管束は複雑に走るため、完全な vein-BS-M-M-BS-vein パターンを形成しないが、類似した形態が見られる。*Flaveria* 属植物各種の葉横断切片を観察すると、C₃型種では維管束鞘細胞は葉肉細胞に対して小さいが、C₃-C₄ 中間種では、維管束鞘細胞と葉肉細胞は同じ大きさであり、C₄ 様種や C₄ 種では維管束鞘細胞の方が葉肉細胞よりも大きく、葉組織構造が段階的に変化している様子が見られる (図 4)。また、C₃-C₄ 中間種では、C₃ 種と比較して維管束鞘細胞の葉緑体やミトコンドリアの数が増加し、それらの多くは求心的位置に配置される。C₄ 様種や C₄ 種では、維管束鞘細胞における葉緑体の数がさらに増え、葉緑体の大きさも増大する (図 4, Nakamura et al. 2013)。このような、C₃-C₄ 中間種から見られる維管束鞘細胞におけるオルガネラの発達は、葉肉細胞と維管束鞘細胞の二つの細胞を使った代謝経路の発達と密接に関係していると考えられる。

4. グリシンシャトルの発達と C₄ 回路の獲得

C₃-C₄ 中間種の葉肉細胞では、C₃ 種と同様に RuBisCO が存在し、C₃ 回路が回っている。C₃-C₄ 中間種では、グリシンシャトルによる CO₂ 濃縮機能が働くため、C₃ 種よりも低い CO₂ 補償点を持つことが報告されている (Bauwe 2011, Keerberg et al. 2014)。葉肉細胞で RuBisCO のオキシゲナーゼ反応により生じたグリシンは、維管束鞘細胞へ運ばれ、そこでの脱炭酸反応により CO₂ が放出される (図 5)。維管束鞘細胞の葉緑体はミトコンドリアの近傍に位置し、ミトコンドリアで放出された CO₂ を葉緑体が効率よくトラップできる。脱炭酸の際に生じたセリンは、逆に葉肉細胞へ運ばれる。C₃ 型光合成から C₃-C₄ 中間型のグリシンシャトルが獲得される過程は、比較的シンプルな変化で説明されている。重要なポイントは、ミトコンドリアで脱炭酸反応を行うグリシンデカルボキシラーゼ (GDC) の発現領域が、維管束鞘細胞に

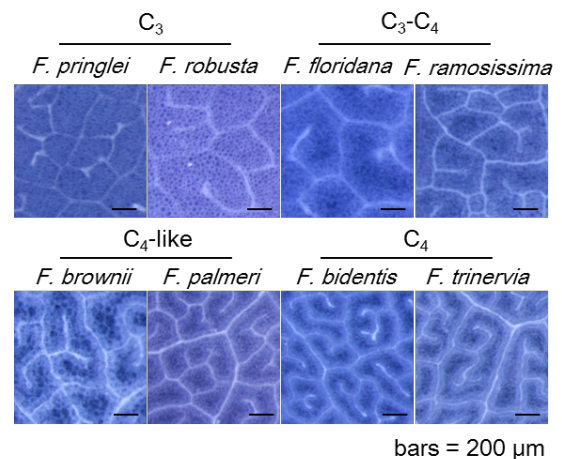


図3. *Flaveria*属植物各種の葉脈パターン

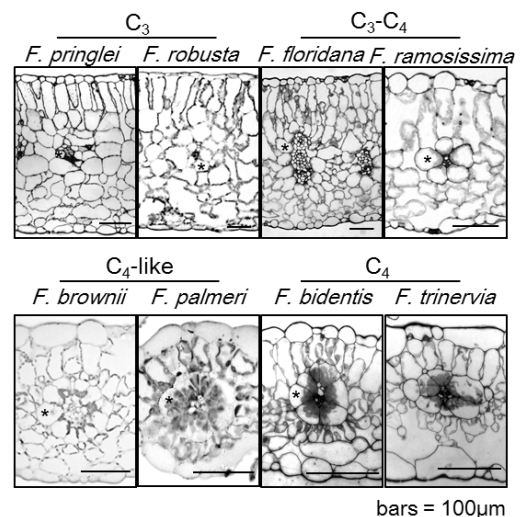


図4. *Flaveria*属植物各種の葉の横断切片
*で示した細胞を含む維管束を取り囲む一層が維管束鞘細胞

限定されることあり、代謝産物の移動は濃度依存的に起こると考えられている (Engelmann et al. 2008, Sage et al. 2013)。グリシンシャトルの獲得により、植物は葉肉細胞と維管束鞘細胞の二つの細胞を使った代謝経路を駆動することとなる。C₃-C₄ 中間種ではこの経路の獲得と共に維管束鞘細胞でのオルガネラの蓄積が促されたと考

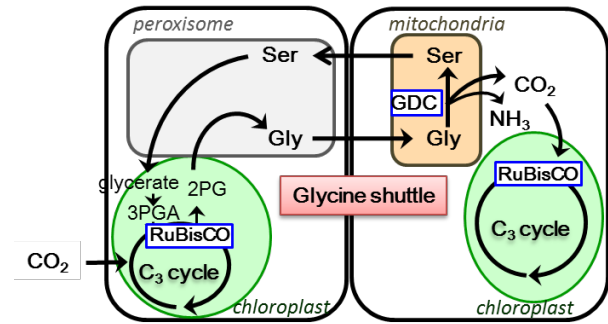


図5. グリシンシャトル経路の模式図

えられる。グリシンシャトルをもつ C₃-C₄ 中間型からどのように C₄ 回路が発達するのは、まだ解明されていないが、*Flaveria* 属植物を用いた比較解析から興味深い事象が明らかになっている。グリシンシャトルを持つ C₃-C₄ 中間種の多くは、機能的な C₄ 回路を持たないことが報告されている (Bauwe 2011) が、*Flaveria* C₃-C₄ 中間種では、¹⁴CO₂ の C₄ 酸への取り込みが低いレベルで観察されている (Monson et al. 1986)。また、*Flaveria* C₃-C₄ 中間種では、C₄ 回路で働く酵素群、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK)、NADP-マリックエンザイム (NADP-ME) やアラニンアミノトランスフェラーゼの発現が、C₃ 種と比較して高いことが報告されている (Mallmann et al. 2014)。これらの事象は中間種においても、C₄ 代謝酵素を使った代謝経路が部分的に機能することを連想させる。Mallmann らは、グリシンシャトルで二酸化炭素と共に放出されるアンモニアを代謝するために、C₄ 代謝酵素群が使われた可能性を指摘している。実際に、RuBisCO の発現が葉肉細胞に残る C₄ 様種 *F. brownii* では、グリシンシャトルに加え機能的な C₄ 回路が働くことが報告されており (Cheng et al. 1988, Monson et al. 1988, Shulze et al. 2013, Sage 2014)。グリシンシャトルに依存した CO₂ 濃縮から C₄ 回路による CO₂ 濃縮へ段階的に移行した可能性が考えられる。

5. C₄ 型光合成の成立と光合成反応の最適化

C₄ 光合成の成立には、代謝酵素群の発現上昇だけでなく、それらの発現領域が葉肉細胞または維管束鞘細胞へ限定化されることが重要なステップとなる。この局在化のステップもまた、C₃-C₄ 中間型から C₄ 様型、C₄ 型への進化過程で段階的に進む (Taniguchi et al. in preparation)。*Flaveria* 属植物には PEPC をコードする遺伝子が、6 種存在するが、それらのうち *PPCA* の発現のみが C₃ 種から C₃-C₄ 中間種、C₄ 様種、C₄ 種において段階的に上昇する。一方、発現領域を調べると、*PPCA* は、C₃-C₄ 中間種 *F. floridana* では、葉肉細胞と維管束鞘細胞の双方で発現しているのに対し、C₄ 様種 *F. brownii* では、*PPCA* の発現は葉肉細胞で強く維管束鞘細胞で弱い (Taniguchi et al. in preparation)。また、C₄ 種 *Flaveria* では、*PPCA* 発現領域は完全に葉肉細胞に限定化される。*PPCA* の葉肉細胞特異的な発現は、*PPCA* のプロモーター上に存在する MEM1 と呼ばれるシス配列が関与することが報告された (Akyildiz et al. 2007)。しかしながら、Clade B に属する *F. floridana* と *F. brownii* 間では、MEM1 配列に差異がなく、またこれらの交雑 F₂ 集団を用いた、表現型と遺伝子型の連鎖解析から、*PPCA* の局在化にプロモーター配列が関与しないことが明らかとなった (Munekage et al. in preparation)。従って、*PPCA*

の局在化は、トランス因子によって引き起こされた可能性も考えられる。PEPC だけでなく、PPDK、NADP-ME の発現領域も mRNA レベルで制御され、中間型から C₄ 様型への進化の過程で細胞特異性が獲得される (Taniguchi et al. in preparation)。C₄ 代謝酵素群の発現領域が限定化される種と、機能的な C₄ 回路が働くことが報告されている種が一致することから、発現領域の限定化が、C₄ 回路を駆動する一つの要因であると考えられる (図 6)。一方、RuBisCO の発現領域もまた、段階的に、維管束鞘細胞へ限定化されることが、*Flaveria* 属植物の解析から明らかになっている (Moore et al. 1988, Moore et al. 1989)。C₃-C₄ 中間種では、RuBisCO は葉肉細胞と維管束鞘細胞の双方で発現するのに対し、C₄ 様種では、葉肉細胞での発現が大きく抑制され、C₄ 種では完全に維管束鞘細胞へ限定化される。RuBisCO の発現領域が完全に維管束鞘細胞へ限定化されることで、葉肉細胞でのオキシゲナーゼ反応が抑制され、低い CO₂ 補償点をもつ C₄ 型光合成が成立する (図 6)。RuBisCO の発現には、構成サブユニットである核にコードされる RBCS と葉緑体にコードされる RBCL の両方の転写および転写後制御機構が関与することが知られている (Patel and Berry 2008)。C₄ 種 *Flaveria bidentis* では RBCS の 5' UTR および 3' UTR 配列が維管束鞘細胞への発現領域の限定化に大きくかかわることが報告されている (Patel et al.

2006)。 *Flaveria* 属植物を含め、様々な植物において、RBCS は複数の遺伝子にコードされていることが報告されており、その発現量も一遺伝

子に依存しない。このように複数の遺伝子座にコードされるファミリー遺伝子発現を抑制するためには、UTRs を使った mRNA レベルでの制御が有効であると考えられる。

C₄ 型光合成は、CO₂ 濃縮機構を獲得したことにより、C₃ 光合成よりもより多くのエネルギーをその代謝反応を駆動するために必要とする。1 分子の CO₂ 固定に、C₃ 型光合成では 3 分子の ATP と 2 分子の NADPH が必要であるのに対し、C₄ 型光合成では 5 分子の ATP、2 分子の NADPH が必要である。この ATP 合成を補うために、葉緑体循環型電子伝達が機能することが示唆された (Kanai and Edwards 1999)。 *Flaveria* 属植物では、循環型電子伝達活性は、C₄ 回路が機能している C₄ 様種と C₄ 種で飛躍的に高くなり、また C₄ 様 *F. palmeri* および C₄ 種では維管束鞘細胞の葉緑体のチラコイド膜構造が大きく変化し、光化学系 II が局在するグラナ構造が減少する (図 7, Nakamura et al. 2013)。維管束鞘細胞では、ATP と NADPH の双方を生産する直鎖型電子伝達活性が抑制され、逆に ATP のみの

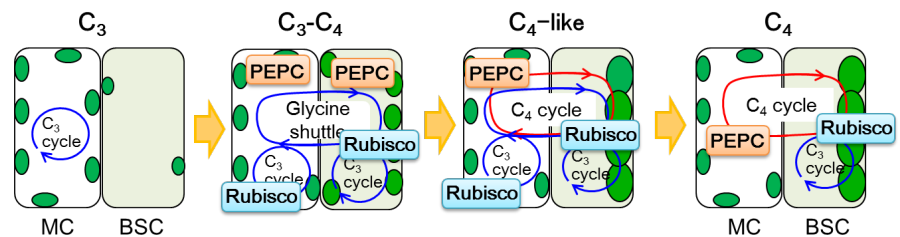


図6 *Flaveria*属植物におけるC₄進化モデル

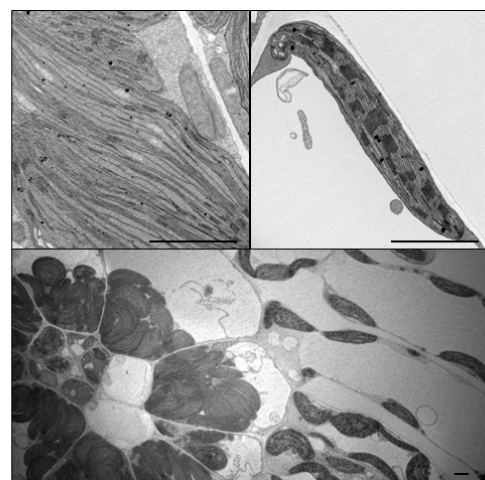


図7. C₄種 *F. bidentis* の葉切片の電子顕微鏡写真
 左上: 維管束鞘細胞葉緑体
 右上: 葉肉細胞葉緑体

生産に寄与する循環型電子伝達活性が促進されることで、 C_4 型光合成に必要なエネルギー需給バランスが保たれると考えられる。ただし、 C_4 種 *Flaveria* では、PEPC に固定されたオキサロ酢酸の一部がアスパラギン酸へ変換され、リンゴ酸とアスパラギン酸の双方が維管束鞘細胞へ運ばれることが報告されている (Moore and Edwards 1986, Meister et al. 1996)。維管束鞘細胞でアスパラギン酸からリンゴ酸への返還に NADPH が必要であるため、トウモロコシやソルガムと比較して C_4 種 *Flaveria* では、維管束鞘細胞葉緑体のグラナ構造は完全には消失しておらず光化学系 II 活性が残されており、直鎖電子伝達が働くことが示唆されている (Meister et al. 1996)。このように、電子伝達反応は代謝反応と連動して制御を受け、光合成反応の最適化が行われている。

6. おわりに

C_4 型光合成は被子植物の多岐にわたる属で獲得されていることから、被子植物が高温や半乾燥条件に適応していく過程で引き起こされた収斂進化形の一つであると考えられる。従って C_4 型への進化は、何か C_3 型植物が共通してもつシステムを利用して引き起こされた可能性が考えられるが、この進化に関わるキーとなる因子は明らかになっていない。*Flaveria* 属は比較的多くの中間型種が現存しており、過去の生理学的・生化学的解析、組織学的解析、そして近年飛躍的に進んだ遺伝子レベルでの解析により C_4 型進化における様々な過程が明らかになりつつある。今後、ゲノムレベルでの解析が進むことで、進化の軌跡が明らかとなることを期待する。

7. 謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、先端研究助成基金助成金、最先端・次世代研究開発支援プログラム (GS019) およびゲノム支援 MEXT KAKENHI (No. 221S0002) の支援を得て遂行した。

8. 引用文献

- Akyildiz M, Gowik U, Engelmann S, Koczor M, Streubel M, Westhoff P. 2007. Evolution and function of a cis-regulatory module for mesophyll-specific gene expression in the C_4 dicot *Flaveria trinervia*. *Plant Cell*. 19: 3391-402.
- Bauwe H. 2011. Photorespiration: the bridge to C_4 photosynthesis. In: Raghavendra AS, Sage RF, eds. *C_4 photosynthesis and related CO_2 concentrating mechanisms*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 81-108.
- Christin P-A, Osborne CP, Sage RF, Arakaki M, Edwards EJ. 2011. C_4 eudicots are not younger than C_4 monocots. *J Exp Bot* 62: 3171-81.
- Cheng SH, Moore BD, Edwards GE, Ku MS. 1988. Photosynthesis in *Flaveria brownii*, a C_4 -like species. Leaf anatomy, characteristics of CO_2 exchange, compartmentation of photosynthetic enzymes, and metabolism of $^{14}CO_2$. *Plant Physiology* 87: 867-873.
- Dengler NG and Nelson T 1999. Leaf structure and development in C_4 plants. In: Sage RF, Monson RK, eds. *C_4 Plant Biology*. San Diego, USA: Academic Press, 133-172.
- Engelmann S, Wiludda C, Burscheidt J, Gowik U, Schlue U, Koczor M, Streubel M, Cossu R, Bauwe

- H, Westhoff P. 2008. The gene for the P-subunit of glycine decarboxylase from the C₄ species *Flaveria trinervia*: analysis of transcriptional control in transgenic *Flaveria bidentis* (C₄) and *Arabidopsis* (C₃). *Plant Physiol*, 146: 1773-85.
- Kanai R, Edwards GE. 1999. The biochemistry of C₄ photosynthesis. In: Sage RF, Monson RK, eds. *C₄ Plant Biology*. San Diego, USA: Academic Press, 215-249.
- Keerberg O, Pärnik T, Ivanova H, Bassünner B, Bauwe H. 2014. C₂ photosynthesis generates about 3-fold elevated leaf CO₂ levels in the C₃-C₄ intermediate species *Flaveria pubescens*. *J Exp Bot* 65: 3649-56
- Ku MSB, Wu J, Dai Z, Scott RA, Chu C, Edward GE. 1991. Photosynthetic and photorespiratory characteristics of *Flaveria* species. *Plant Physiology* 96: 518-528.
- Long SP. 1999. Environmental Responses. In: Sage RF, Monson RK, eds. *C₄ Plant Biology*. San Diego, USA: Academic Press, 215-249.
- Mallmann J, Heckmann D, Bräutigam A, Lercher MJ, Weber AP, Westhoff P, Gowik U. 2014. The role of photorespiration during the evolution of C₄ photosynthesis in the genus *Flaveria*. *eLife* 3, e02478.
- Mckown, A. D., Moncalvo, J. M. and Dengler N. G. 2005. Phylogeny of *Flaveria* (Asteraceae) and inference of C₄ photosynthesis evolution. *American Journal of Botany* 92: 1911–1928.
- McKown AD, Dengler NG. 2007. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C₄ vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 94: 382–399.
- Meister M, Agostino A, Hatch MD 1996. The roles of malate and aspartate in C₄ photosynthetic metabolism of *Flaveria bidentis* (L.) *Planta* 199: 262-269
- Monson RK, Teeri JA, Ku MS, Gurevitch J, Mets LJ, Dudley S. 1988. Carbon-isotope discrimination by leaves of *Flaveria* species exhibiting different amounts of C₃- and C₄-cycle co-function. *Planta* 174: 145-51.
- Monson RK, Moore Bd, Ku MSB, Edward GE. 1986. Co-function of C₃- and C₄-photosynthetic pathways in C₃, C₄ and C₃-C₄ intermediate *Flaveria* species. *Planta* 168: 493-502.
- Moore BD and Edwards GE 1986. Photosynthetic induction in a C₄ dicot, *Flaveria trinervia* *Plant Physiol*. 81: 663-668
- Moore Bd, Ku MSB, Edwards GE. 1989. Expression of C₄-like photosynthesis in several species of *Flaveria*. *Plant, Cell & Environment* 12: 541-549.
- Moore Bd, Monson RK, Ku MSB, Edwards GE. 1988. Activities of principal photosynthetic and photorespiratory enzymes in leaf mesophyll and bundle sheath protoplasts from the C₃-C₄ intermediate *Flaveriaramosissima*. *Plant Cell Physiology* 29: 999-1006.
- Nakamura, N., Iwano, M., Havaux, M., Yokota, A., Munekage, Y.N. 2013. Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type C₄ photosynthesis in the genus *Flaveria*. *New Phytologist*. 199: 832-842
- Patel M and Berry JO. 2008. Rubisco gene expression in C₄ plants. *J Exp Bot*. 59: 1625-34.
- Patel M, Siegel AJ, Berry JO. 2006. Untranslated regions of *FbRbcS1* mRNA mediate bundle sheath cell-specific gene expression in leaves of a C₄ plant. *J Biol Chem*. 281: 25485-91.

- Powell, A. M. 1978. Systematics of *Flaveria* (Flaveriinae–Asteraceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65: 590–636.
- Sage, T.L., Busch, F.A., Johnson, D.C., Friesen, P.C., Stinson, C.R., Stata, M., Sultmanis, S., Rahman, B.A., Rawsthorne, S., & Sage, R.F. 2013. Initial events during the evolution of C₄ photosynthesis in C₃ species of *Flaveria*. *Plant Physiol*, 163: 1266-1276.
- Sage RF, Christin PA, Edwards EJ. 2011. The C₄ plant lineages of planet Earth. *Journal of Experimental Botany* 62: 3155-3169.
- Sage RF, Khoshravesh R and Sage TL 2014. From proto-Kranz to C₄ Kranz: building the bridge to C₄ photosynthesis *J Exp Bot.* 65: 3341-56.
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar K. 2012. Photorespiration and the evolution of C₄ photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 63: 19-47.
- Schulze S, Mallmann J, Burscheidt J, Koczor M, Streubel M, Bauwe H, Gowik U, Westhoff P. 2013. Evolution of C₄ photosynthesis in the genus *Flaveria*: establishment of a photorespiratory CO₂ pump. *Plant Cell.* 25: 2522-35.