

## 葉緑体学事始

～植物研究が開拓する「細胞とオルガネラの間」の新境地を目指して～

### オーガナイザー

丸山 真一郎<sup>1,2</sup>, 柘宜 淳太郎<sup>3</sup>, 西村 芳樹<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 東北大学大学院生命科学研究所

〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

<sup>2</sup> お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系

〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1

<sup>3</sup> 九州大学大学院理学系研究科

〒819-0395 福岡市西区元岡 744

<sup>4</sup> 京都大学大学院理学研究科

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

## **Dawn of Chloroplastology: On the Frontiers between Cell and Organelle Where Plant Science Pioneers to Find New Homes for Biologists**

Shinichiro Maruyama<sup>1,2</sup>, Juntaro Negi<sup>3</sup>, Yoshiki Nishimura<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Ecological Developmental Adaptability Life Sciences, Graduate School of  
Life Sciences, Tohoku University,

6- 3 Aramaki-aza-Aoba, Aobaku, Sendai 980-8578, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University, 2-1-1 Otsuka,  
Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University,  
744 Motoooka, Nishi-Ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

<sup>4</sup>Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University  
Oiwake-cho, Kita-Shirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.12a1.00194

### 1. はじめに

葉緑体（色素体）は、最も明確に植物を特徴付けるオルガネラ（細胞小器官）である。光合成や脂質合成などの様々な機能を持つだけでなく、発生パターン、組織ごとの機能分化、分解制御などの多様な性質も、葉緑体の進化の過程で生まれてきた。それらは現在でも最先端の植物科学に発見と感動を供給し続ける宝の山であり、親しみがあるようでよく分かっていない山、「ドラえもん」に出てくる学校の裏山のような場所である、と言えなくもないかもし

れない。

コロナ禍の 2020 年 9 月、植物学会としては初めてオンラインで行われた第 84 回名古屋大会において、「葉緑体学事始 ～植物研究が開拓する「細胞とオルガネラの間」の新境地を目指して～」と題したシンポジウムを開催した。様々な切り口でオリジナリティ溢れる葉緑体研究を行っている研究者が一堂に会し、バーチャルな「堂」の中で、最新の研究成果と共に、植物の持つ、生き物としての純粋な面白さを伝える場を提供することができた、と自負している。我々が掲げた「植物学が先導する形で、生物全般に普遍的な現象や進化の仕組みなど、新しい発見を広く発信していく学問を創出する」という大目標は本当に遠く、今回のシンポジウムはそのための本当に小さな一步だったが、それでも「とにかく一步を踏み出そう！」という当初の目的が達成できた充足感は大きかった。本総説集は、このシンポジウムで講演して頂いた研究者の方々からのご寄稿により構成されている。

生物学はある意味で、「間」を極める学問だという見方もできる。個体から一段下がった階層として器官が認識され、その下に組織が、そして細胞が、というように、各階層とその「間」の働きは生物学の主要な研究対象であり続けてきた。こうした視点は、全体を維持するための部分「間」の関係や働きを探究するという、より一般化された視点を生み、様々な分野の生物学者が共通認識を育む一助となってきたとも言えよう。それは生態系や集団、あるいは細胞や分子のレベルでも同様である。例えば細胞を全体、オルガネラを部分として見たときに、オルガネラ同士がどのように相互作用することで、全体の調和が生まれるのか？部分を見ていただけでは分からない何かを、どうやったら知ることができるのか？今回ご寄稿頂いた方々の最先端の葉緑体研究は、まさにその「外側との関わり」に光を当てるものだった。

そもそも、オルガネラの機能がその内部だけで完結することはない。オルガネラとその外側との関わり、つまり「メタオルガネラ」とも言うべき時空間的に変動する関係性が、一つのまとまりとして捉えられるならば、その重ね合わせこそが細胞内における機能的な実体であり、それを「メタオルガネラネットワーク／Meta-Organellar Network (MONet)」と呼ぶこともできよう。奇しくも同じ綴りを持つ画家のモネ (Claude Monet) らをはじめとする印象派の芸術家たちが、明確な輪郭の把握に基づく旧来の美術的観念を塗り替え、光の濃淡に基づく全く新しい世界観を確立したように、MONet のような細胞観・オルガネラ観が、全く新しい生物学の素地となることもあり得るだろう。葉緑体学事始と題した企画が、生物学全体に波及効果をもたらす糸口も、こうした「境界の探究」にあるのかもしれない、それが「植物学から発信する新しい生物学」に続く道だとしたら、シンポジウムがその旅の餞、本総説集が道標となることを願って止まない。

最後に、本総説集の刊行にご尽力頂いた全ての方々、またシンポジウム共催としてご支援頂いた新学術領域研究「新光合成:光エネルギー変換システムの再最適化」に御礼申し上げます。本総説集が読者の皆様にとって、新しい生物学の開拓を志す研究者たちの挑戦に目を向け、同じ想像に浸る楽しみを味わって頂けるきっかけとなれば幸いです。のび太くんが孤独を求めて登った学校の裏山にも、いつしか仲間が集まっているように。

## 色素体核様体の構造と分裂機構

西村芳樹, 田草川真理  
京都大学大学院理学研究科植物分子遺伝学研究室  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

### The division cycle of chloroplast nucleoids

Yoshiki Nishimura, Mari Takusagawa  
Laboratory of Plant Molecular Genetics, Department of Botany, Graduate School of Science,  
Kyoto University

Oiwake-cho, Kita-Shirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Keywords: chloroplast nucleoids, Holliday junction resolvase

DOI: 10.24480/bsj-review.12a2.00195

#### 1. はじめに

葉緑体／色素体は 10 億年以上前に現在のシアノバクテリアに類縁の原核生物が細胞内共生したことで誕生したといわれる。その進化的背景を反映するように、色素体には独自のゲノム「色素体ゲノム」が存在している。色素体ゲノムは光合成や色素体生合成に必須な遺伝子をコードし発現することで色素体の機能を支えている。色素体ゲノムは多コピーであり、一つの色素体には約 100 コピーのゲノムが存在する。一細胞に複数の色素体を有する陸上植物では、一細胞に数千コピーもの色素体ゲノムが存在する場合もある。この大量の色素体ゲノムは DNA 分子単体で色素体内に浮遊して存在するわけではない。DNA に特異的に結合する DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) などの蛍光色素を用いて色素体 DNA を可視化してみると、色素体 DNA は膜に結合した小さな輝点として観察される。色素体核様体と呼ばれるこの構造は、色素体 DNA が RNA 分子や多様なタンパク質と複合体を形成したものであり、藻類や植物において普遍的に観察される構造体である (Kuroiwa, 1991)。核様体における DNA 分子はコンパクトに折りたたまれていると考えられる。試みに 10 塩基対を 34 Å とした単純計算をすれば、色素体核様体において二本鎖 DNA は約 1/1000 のサイズまで圧縮されていることになる。このような密な状態にあっても、色素体核様体は DNA 複製・遺伝子発現・遺伝の中核として機能し、光合成をはじめとする葉緑体／色素体機能を支えている。本稿では、色素体における染色体とも称される色素体核様体の構造と、そのダイナミックな分裂制御について、近年明らかになってきた色素体 DNA の構造制御機構を中心に俯瞰してみる。

#### 2. 色素体核様体のタンパク質構成とその進化

色素体核様体は、多くの場合、蛍光顕微鏡で直径 0.2 μm ほどの微細な球状の輝点として観察される。1980 年代より、この「形」に注目して色素体核様体を生化学的に精製する試みが、日本を中心として精力的に行われてきた (Sato and Kuroiwa, 1991)。まず細胞から色素体を精

製し、穏やかな界面活性剤処理 (Nonidet P-40 など)によって色素体を破碎、スペルミジンやシヨ糖を含むバッファーを用いるなどして核様体の形状を保ちつつ精製した。その形状を精製の各ステップで注意深く確認しながら精製された色素体核様体は、DNA 複製活性や遺伝子転写活性まで保持していた (Sakai et al., 1991)。こうして精製された色素体核様体の生化学的解析を起点として、いくつかの色素体核様体タンパク質が同定されてきた (Nemoto et al., 1988)。エンドウマメの葉緑体核様体の主要構成タンパク質として同定された亜硫酸還元酵素(Sulfite Reductase: SiR) (Sato et al., 2001)、プロテアーゼ活性を有し、葉の老化や転流に関わるとも推定される Chloroplast Nucleoid DNA binding protein (CND) 41 (Nakano et al., 1997; Murakami et al., 2000; Nakano et al., 1993)、膜にアンカーするタンパク質といわれている Plastid-envelope DNA-binding protein (PEND)などである (Sato et al., 1998, 1993)。

2000年代になり、ゲノム情報が利用できるようになってくると、細菌の核様体タンパク質の配列情報との比較解析などにより、色素体核様体タンパク質の探索や進化過程の考察が可能となった。そこで葉緑体核様体の精製技術とゲノム情報(Matsuzaki et al., 2004)を基盤として、紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* において細菌の主要核様体タンパク質の一つである Heat unstable (HU)の相同遺伝子が葉緑体核様体の構成因子をコードしていることが証明された (Kobayashi et al., 2002)。後の逆遺伝学的解析により、HUは緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* においても葉緑体核様体の主要構成因子であることが示された (Karcher et al., 2009)。しかし一方、車軸藻クレブソルミディウム *Klebsormidium flaccidum*、苔類ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* や陸上植物において HU 遺伝子は検出されなかった。クレブソルミディウムは陸上でも湿度の高い環境であれば群生し、ゼニゴケは基部陸上植物として植物の陸上化初期の状態をよく反映しているといわれる。植物の陸上化前後で細菌由来の HU は葉緑体核様体から失われ、真核生物由来の核様体因子に置き換わっていった可能性がある (Kobayashi et al., 2016b)。

SiR については、その後 *in vitro* 解析により可逆的な DNA 分子の折りたたみ活性があること、転写抑制能があることが証明された (Sekine et al., 2002)。しかしその色素体核様体への局在については、エンドウマメやゼニゴケにおいて確認されたものの、シロイヌナズナやトウモロコシでは確認されず、植物種によってまちまちであった。そこで様々な植物種の SiR のアミノ酸配列を多重配列整列によって解析したところ、葉緑体核様体局在すると報告された SiR には C 末端に約 50 アミノ酸程度の短い領域 C-terminally encoded peptide (CEP) が特異的に存在することが明らかになったことから、CEP の有無が SiR の色素体核様体への局在を決定すると考えられた。そこで葉緑体核様体非局在型のシロイヌナズナ SiR にゼニゴケの CEP を融合したキメラ SiR を発現させたところ、予想通り葉緑体核様体への局在が確認され、CEP が色素体核様体局在に重要であることが示された (Kobayashi et al., 2016a)。

こうした流れと併行して、欧米では色素体の「転写機構」に注目し、転写活性を示す色素体 DNA-RNA-タンパク質複合体を Plastid Transcriptionally Active Chromosome (pTAC)として生化学的に精製し解析する研究が行われてきた (Hallick et al., 1976; Melonek et al., 2016; Pfalz and Pfannschmidt, 2015)。色素体における転写装置は大きく2つに分けられる。1つは Plastid-encoded RNA polymerase (PEP)と呼ばれる細菌型 RNA ポリメラーゼである。この酵素のコアサブユニットは色素体ゲノムにコードされているが、細胞核にコードされるシグマ因子によってプロ

モーター選択性の制御を受ける。もう一つは、Nuclear-encoded plastid RNA polymerase (NEP)と呼ばれるバクテリオファージ型 RNA ポリメラーゼであり、細胞核にコードされている。これらの酵素により転写される色素体遺伝子の発現様式は複雑であり、多くはポリシストロニックに転写された後、5'/3'末端のプロセッシング、ステムループ構造の形成、様々な RNA 結合タンパク質 (Pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質など) による安定化を経て、成熟した mRNA となる。そして一方、mRNA の不安定化は 3' 端のポリ(A)鎖付加によって引き起こされる (Stern et al., 2010; Komine et al., 2002; Nishimura et al., 2004)。これ以外にも、DNA ジャイレースが関与する DNA の超らせん構造度の変化なども色素体遺伝子転写制御に介在すると言われる (Salvador et al., 1998)。pTAC 解析は、こうした複雑で多岐にわたる色素体遺伝子の転写制御因子群を、網羅的に同定しようとする野心的試みであり、質量分析法の飛躍的進歩にもなって現実に可能となった。

単離された pTAC 画分は色素体 DNA を含んでおり、それを鋳型とした転写活性を示す (Hallick et al., 1976; Pfalz et al., 2006)。実際、電子顕微鏡で pTAC 画分を観察すると、部分的に解けた色素体 DNA がタンパク質によって折りたたまれている様子が観察された (Briat et al., 1982)。つまり pTAC 画分には色素体転写装置だけでなく、色素体 DNA の折りたたみ、複製や修復を担う因子群も数多く含まれていた。そのため色素体核様体の「形」と「転写装置」という二つの異なる動機を源とする研究の流れは、色素体における DNA 複製・修復・転写・翻訳の中核としての色素体核様体の実像を捉えるという一つのゴールに向けて合流していくこととなる。

2006 年に発表された Pfalz らによるシロイヌナズナとマスタードをもちいた pTAC 解析では、18 のタンパク質 (pTAC1-18) が同定された (Pfalz et al., 2006)。そのうち pTAC1 として同定されたタンパク質は、もともと細胞核の転写因子として同定された異色の背景をもつ色素体核様体タンパク質である。そのプロペラ状の構造から Whirly (渦巻き様) と名付けられたこのタンパク質は、一本鎖(ss)DNA への結合能を示す。当初はシロイヌナズナにおいて病原菌に応答する転写因子 (AtWHY1) として同定され (Desveaux et al., 2002)、またテロメアの制御因子として機能するという報告があった (Yoo et al., 2007)。しかし蛍光タンパク質をもちいた細胞内局在解析により、シロイヌナズナにコードされる 3 つの相同遺伝子のなかで AtWhy1 と 3 は色素体、AtWhy2 はミトコンドリアに局在することが示され (Krause et al., 2005)、2008 年にはトウモロコシにおいて Whirly は色素体遺伝子 *atpF* のグループ II イントロンのスプライシングに関わる因子として同定された (Prikryl et al., 2008)。2009 年にはシロイヌナズナにおいて色素体ゲノムの安定性制御に貢献していることが示される (Maréchal et al., 2009)。Whirly は色素体あるいは細胞核においてかなり多様な役割を果たしていると推定され、さらには葉緑体から細胞核への酸化還元状態に応じたシグナル分子として機能するという仮説も提唱されている (Foyer et al., 2014)。pTAC3 として同定されたタンパク質は、興味深いことに光依存的に PEP と相互作用してその活性を制御することにより、色素体遺伝子の光応答性発現誘導に関わることを示されている (Yagi et al., 2012)。

2012 年には、トウモロコシの色素体核様体の粗精製画分と、さらに既知の色素体核様体構成タンパク質 (ZmWHY1) に対する免疫沈降をおこなって精製した色素体核様体画分をもちい

て色素体核様体の網羅的なプロテオーム解析が行われた (Majeran et al., 2012)。この解析において、既知の色素体核様体タンパク質群に加え、DNA 複製や修復に関わる DNA ジャイレースや、転写や転写後制御に関わる RNA ポリメラーゼ、PPR タンパク質群、翻訳などに関わるリボソームやリボソームアッセムブリ因子など、多岐にわたるタンパク質群が色素体核様体の構成因子として同定され、色素体核様体が色素体におけるこれらのプロセスの機能的な中枢であることが、分子レベルで裏付けられることとなった。

そして2012年、MelonekらはpTACのプロテオーム解析から、色素体核様体の「コア因子」としてSWIBドメインタンパク質群を報告した (Melonek et al., 2012)。SWIBドメインタンパク質はミトコンドリア核様体にも局在し、ミトコンドリアの機能やゲノム安定性を保障していると考えられる (Blomme et al., 2017)。SWIBドメインは、もともと細胞核の染色体リモデリング因子のドメイン (SWI/SNF)として同定されたものであり (Bennett-Lovsey et al., 2002)、緑藻などの色素体核様体では検出されない。やはり色素体核様体のコア因子は、植物の進化のなかで、HUなどの細菌由来のタンパク質から、真核生物由来のSWIBタンパク質などへと、徐々に置き換えられてきたのかもしれない (Melonek et al., 2012; Kobayashi et al., 2016b)。

### 3. 色素体核様体のかたちの制御機構：核様体形態とDNA分子構造の「境界」を探る

これまでの研究から、色素体核様体は色素体におけるDNA複製/修復・転写・転写後制御や翻訳の中枢であり、多様な機能をもつタンパク質の複

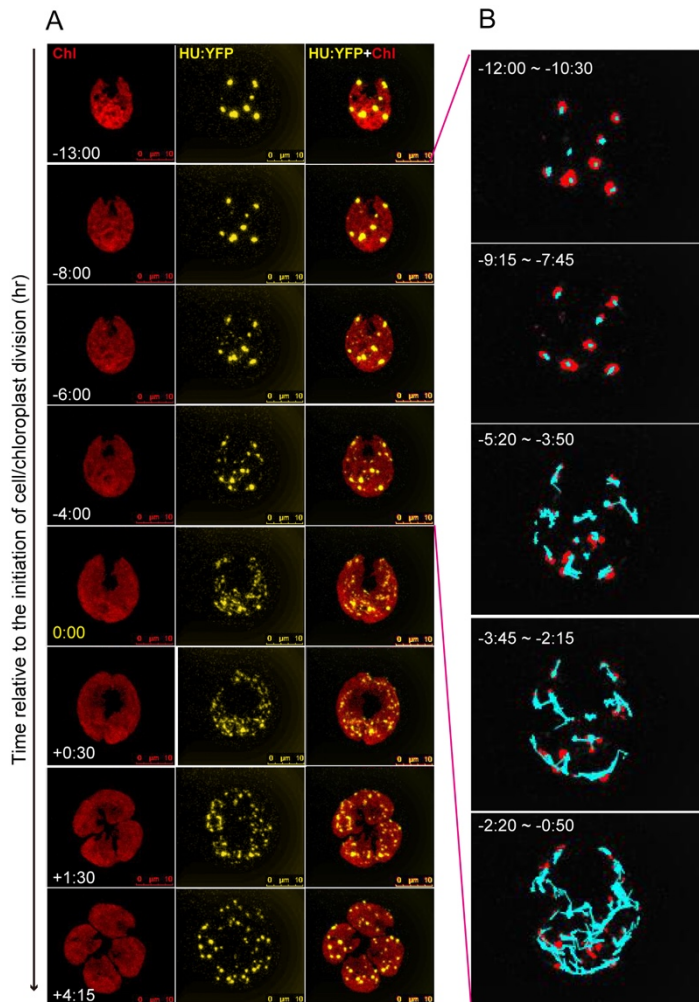


図1 ライブイメージングにより捉えられた葉緑体分裂における葉緑体核様体の解体と再構築。(A)赤はクロロフィル自家蛍光で、葉緑体の概形を示す (CHL)。黄色は YFP で標識された葉緑体核様体 (HU:YFP)。右カラムは重ね合わせ画像 (CHL+HU:YFP)。時間は葉緑体分裂開始を00:00(HH:MM)とした相対時間を示してある。分裂に先立ち、葉緑体核様体が解体され拡散し、分裂完了後に球状構造が再構築される。(B)粒子トラッキング解析。葉緑体核様体 (赤) と、左上の時間枠 (90分間) で記録された運動の軌跡 (水色)。

Kamimura et al., *Comms Biol* 2018 より改変

合体であることが明らかになってきた。しかしその複雑な分子構成にも関わらず、色素体核様体は色素体分裂や分化などにもなってダイナミックにその数、分布、形状を変化させる (Kuroiwa, 1991)。緑藻 *C.reinhardtii* には、1つの葉緑体あたり約 80 コピーの葉緑体ゲノム (約 205 kbp) が存在し (Gallaher et al., 2018), それらが間期には 5-10 個ほどの球状の葉緑体核様体としてまとめられている。しかし細胞周期のさまざまな時点で葉緑体核様体の形を比較すると、それらの数や形状が大きく異なっていた (Ehara et al., 1990)。

葉緑体核様体の動態をライブイメージングで捉えるには、まず鞭毛で泳ぎ回る緑藻細胞を、顕微鏡対物レンズの焦点面に生きたまま長時間にわたって固定する必要があった。このため、我々は透明な樹脂で形成された狭いギャップに細胞を挟み込みつつ、新鮮な培地を常時供給できる「マイクロ流体デバイス」を採用することにした。さらに、生きた細胞で葉緑体核様体を長時間追跡する上で、従来用いられてきた生細胞透過性の DNA 特異的蛍光色素 SYBR Green I は退色しやすく、また細胞核やミトコンドリア核様体まで同時に染色してしまうため、葉緑体核様体を識別しにくいという問題点があった。そこで前述した *C.reinhardtii* の葉緑体核様体の主要コア因子 HU (Karcher et al., 2009) を蛍光タンパク質 (YFP) で標識することでこの問題を克服した。これらの結果、生きた細胞における葉緑体核様体の分裂過程を捉えることに世界で初めて成功した。間期には直径 0.2  $\mu\text{m}$  ほどの球状構造で、おそらくチラコイド膜にアンカーされているため、ほとんど動きをみせない葉緑体核様体が、葉緑体分裂に先立って徐々に解体され、微小な粒状構造が飛び出し、それらが粒子状構造同士をつなぐように葉緑体全体に広がっていき、分裂直前には葉緑体全体に広がるネットワーク状へと拡散した (図 1)。そしてそのネットワーク状構造は、分裂完了とともに球状構造へとすみやかに再構築された (Kamimura et al., 2018)。同様の形態変化は陸上植物にも共通する普遍的な現象であると考えられるが (Terasawa and Sato, 2005), こうした「球状→ネットワーク状→球状」という葉緑体核様体の解体/再構築サイクルが、どのような分子機構に支えられているのか、またその生物学的意義については謎であった。

この疑問に対し有力な手がかりを与える変異体があった。緑藻クラミドモナスの *monokaryotic chloroplast (moc)* 変異体である (Misumi et al., 1999)。この変異体では、葉緑体核様体が 1つの塊に凝集しており、「球状→ネットワーク状→球状」という葉緑体核様体の分裂サイクルが阻害されていた。そしてその結果葉緑体核様体は分裂の際に娘葉緑体に不均等に

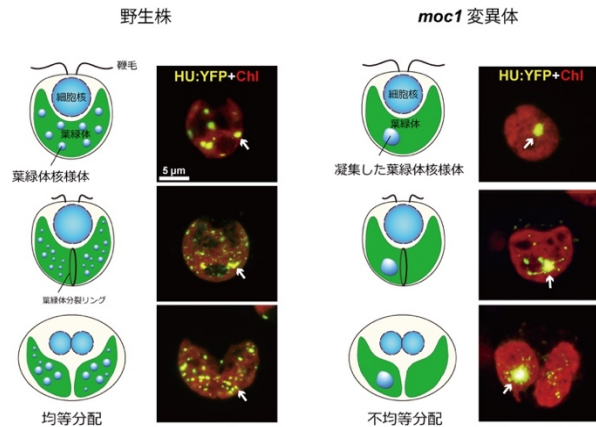


図 2 野生株と *moc1* 変異体の葉緑体分裂時の葉緑体核様体の比較。野生株では球状の葉緑体核様体が分裂に先立って解体され、葉緑体全体に拡散することで、娘葉緑体への均等分配が実現される。それに対し、*moc1* 変異体では、葉緑体核様体が凝集してしまうために不均等分配が引き起こされる。Kamimura et al., *Comms Biol.* 2018 より改変。

分配されてしまっていた。裏返せばこのことは、葉緑体核様体の解体／再構築が、葉緑体分裂の際に葉緑体核様体を娘葉緑体に均等分配するために必要であることを示唆している。この変異体で破壊されていた *MOC1* 遺伝子について、組換えタンパク質をもちいた生化学的解析と DNA オリガミ技術と高速原子間力顕微鏡による解析をおこなった結果、*MOC1* タンパク質が DNA 相同組換え中間体であるホリデイジャンクション(HJ)特異的に切断する HJ 解離酵素 ( Holliday Junction

*Resolvase: HJR*)であることが証明された (Kobayashi et al., 2017)。すなわち、球状葉緑体核様体の解体は、HJR による DNA 一本鎖切断 (single strand break: SSB)と Holliday junction の解離、それによる葉緑体 DNA 分子同士の「絡み」の解消、および「DNA スーパーコイル構造」の解体によって引き起こされている可能性が考えられる (図3)。

葉緑体における HJR が同定されたのはこれが初めての報告であった。その後の構造解析により、葉緑体型 HJR (*MOC1*) は、アミノ酸配列レベルではほとんど相同性がないにも関わらず、細菌型の HJR と構造的に非常に似通っていることが示された (Yan et al., 2020; Lin et al., 2019)。さらに *MOC1* は、藻類や苔類においては葉緑体のみならずミトコンドリアゲノムの安定性制御に貢献していることが示されており (Kobayashi et al., 2020), その重要性がますます注目を集めている。

#### 4. おわりに

色素体核様体の構成因子の理解は、質量分析法の進歩とともに飛躍的に進み、それが色素体における DNA 複製・修復・転写・翻訳・遺伝の機能的中枢であることが証明されてきた。しかし色素体分裂や色素体分化、または光／栄養環境の変化にともなう色素体核様体のダイナミックな形態・局在変化の制御機構については未だ謎が多い。これまでの研究から、核様体の形態と DNA 分子構造の間には強い相関関係が認められており (Odahara et al., 2016), 藻類に限らずシロイヌナズナでも DNA gyrase (Cho et al., 2004; Itoh et al., 1997)や RNaseH 変異体 (Yang et al., 2020)において色素体核様体の形態異常が報告されている。今後さらに色素体核様

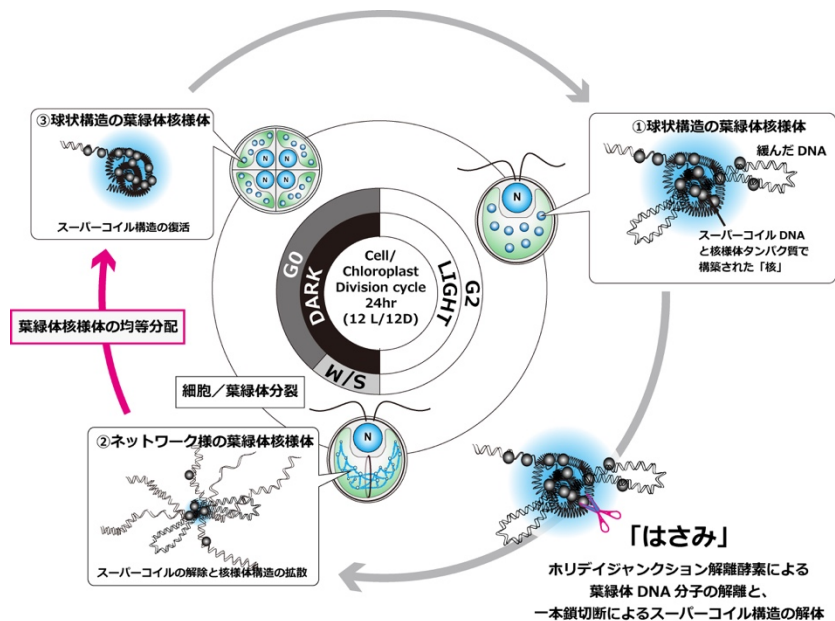


図3 DNA supercoil 制御を基盤とする葉緑体核様体の分裂サイクル仮説。葉緑体核様体は葉緑体 DNA の Supercoil 構造をその核としており、Supercoil 構造が *MOC1* タンパク質 (=ホリデイジャンクション解離酵素) による一本鎖 DNA 切断で解消されることで、葉緑体核様体の球状構造が可逆的に解体されると考えられる。



体の形態異常変異体の探索, および個々の構成因子の分子機能を解析していくことにより, 色素体における DNA 複製・修復・遺伝の詳細な分子機構などにも迫ることができるだろう。とくに色素体 DNA 修復機構について, その理解が進めば, より高ストレス環境での色素体ゲノムの安定化や, より高効率の色素体ゲノム改変技術の開発にむけた重要な糸口となるかもしれない。

## 謝辞

本研究は, 科研費 (18H02460) および公益財団法人三菱財団の基礎研究助成 (201910032) の支援を得て遂行された。

## 引用文献

- Bennett-Lovsey, R., Hart, S.E., Shirai, H., and Mizuguchi, K. 2002. The SWIB and the MDM2 domains are homologous and share a common fold. *Bioinformatics* 18: 626–630.
- Blomme, J. et al. 2017. The Mitochondrial DNA (mtDNA)-Associated Protein SWIB5 Influences mtDNA Architecture and Homologous Recombination. *Plant Cell* 29: tpc.00899.2016.
- Briat, J.F., Gigot, C., Laulhere, J.P., and Mache, R. 1982. Visualization of a Spinach Plastid Transcriptionally Active DNA-Protein Complex in a Highly Condensed Structure. *Plant Physiol.* 69: 1205–1211.
- Cho, H.S., Lee, S.S., Kim, K.D., Hwang, I., Lim, J.-S., Park, Y.-I., and Pai, H.-S. 2004. DNA gyrase is involved in chloroplast nucleoid partitioning. *Plant Cell* 16: 2665–82.
- Desveaux, D., Allard, J., Brisson, N., and Sygusch, J. 2002. A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nat. Struct. Biol.* 9: 512–517.
- Ehara, T., Ogasawara, Y., Osafune, T., and Hase, E. 1990. Behavior of chloroplast nucleoids during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) in synchronized culture. *J phycol* 26: 317–323.
- Foyer, C.H., Karpinska, B., and Krupinska, K. 2014. The functions of WHIRLY1 and REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 in cross tolerance responses in plants: a hypothesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369: 20130226.
- Gallaher, S.D., Fitz-Gibbon, S.T., Strenkert, D., Purvine, S.O., Pellegrini, M., and Merchant, S.S. 2018. High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved de novo assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *Plant J.* 93: 545–565.
- Hallick, R.B., Lipper, C., Richards, O.C., and Rutter, W.J. 1976. Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Biochemistry* 15: 3039–3045.
- Itoh, R., Takahashi, H., Toda, K., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. 1997. DNA gyrase involvement in chloroplast-nucleoid division in *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur J Cell Biol* 73: 252–258.
- Kamimura, Y., Tanaka, H., Kobayashi, Y., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2018. Chloroplast nucleoids as a transformable network revealed by live imaging with a micro fluidic device. *Commun. Biol.*: 1–7.

- Karcher, D., Köster, D., Schadach, A., Klevesath, A., and Bock, R. 2009. The chlamydomonas chloroplast HLP protein is required for nucleoid organization and genome maintenance. *Mol. Plant* 2: 1223–1232.
- Kobayashi, T., Takahara, M., Miyagishima, S.Y., Kuroiwa, H., Sasaki, N., Ohta, N., Matsuzaki, M., and Kuroiwa, T. 2002. Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 14: 1579–1589.
- Kobayashi, Y., Misumi, O., Odahara, M., Ishibashi, K., Hirono, M., Hidaka, K., Endo, M., Sugiyama, H., Iwasaki, H., Kuroiwa, T., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2017. Holliday junction resolvases mediate chloroplast nucleoid segregation. *Science* 356: 631–634.
- Kobayashi, Y., Ohadara, M., Sekine, Y., Hamaji, T., Fujiwara, S., Nishimura, Y., and Miyagishima, S. 2020. Holliday junction resolvase MOC1 maintains plastid and mitochondrial genome integrity in algae and bryophytes. *Plant Physiol.* in press.
- Kobayashi, Y., Otani, T., Ishibashi, K., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2016a. C-terminal region of sulfite reductase is important to localize to chloroplast nucleoids in land plants. *Genome Biol. Evol.* 8: evw093.
- Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Harada, N., Fukao, Y., Yamaoka, S., Kohchi, T., Hori, K., Ohta, H., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2016b. Eukaryotic components remodeled chloroplast nucleoid organization during the green plant evolution. *Genome Biol. Evol.* 8: 1–16.
- Komine, Y., Kikis, E., Schuster, G., and Stern, D. 2002. Evidence for in vivo modulation of chloroplast RNA stability by 3'-UTR homopolymeric tails in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 4085–4090.
- Krause, K., Kilbiński, I., Mulisch, M., Rödiger, A., Schäfer, A., and Krupinska, K. 2005. DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Lett.* 579: 3707–3712.
- Kuroiwa, T. 1991. The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *Int. Rev. Cytol.* 128: 1–60.
- Lin, H., Zhang, D., Zuo, K., Yuan, C., Li, J., Huang, M., and Lin, Z. 2019. Structural basis of sequence-specific Holliday junction cleavage by MOC1. *Nat. Chem. Biol.* 15: 1241–1248.
- Majeran, W., Friso, G., Asakura, Y., Qu, X., Huang, M., Ponnala, L., Watkins, K.P., Barkan, A., and van Wijk, K.J. 2012. Nucleoid-Enriched Proteomes in Developing Plastids and Chloroplasts from Maize Leaves: A New Conceptual Framework for Nucleoid Functions. *Plant Physiol.* 158: 156–189.
- Maréchal, A., Parent, J.-S., Véronneau-Lafortune, F., Joyeux, A., Lang, B.F., and Brisson, N. 2009. Whirly proteins maintain plastid genome stability in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 14693–14698.
- Matsuzaki, M. et al. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428.
- Melonek, J., Matros, A., Trosch, M., Mock, H.-P., and Krupinska, K. 2012. The Core of Chloroplast Nucleoids Contains Architectural SWIB Domain Proteins. *Plant Cell* 24: 3060–3073.

- Melonek, J., Oetke, S., and Krupinska, K. 2016. Multifunctionality of plastid nucleoids as revealed by proteome analyses. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1864: 1016–1038.
- Misumi, O., Suzuki, L., Nishimura, Y., Sakai, A., Kawano, S., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. 1999. Isolation and phenotypic characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants defective in chloroplast DNA segregation. *Protoplasma* 209: 273–282.
- Murakami, S., Kondo, Y., Nakano, T., and Sato, F. 2000. Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS Lett* 468: 15–18.
- Nakano, T., Murakami, S., Shoji, T., Yoshida, S., Yamada, Y., and Sato, F. 1997. A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 9: 1673–1682.
- Nakano, T., Sato, F., and Yamada, Y. 1993. Analysis of Nucleoid-Proteins in Tobacco Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 34.
- Nemoto, Y., Kawano, S., Kondoh, K., Nagata, T., and Kuroiwa, T. 1988. Studies on Plastid-Nuclei (Nucleoids) in *Nicotiana tabacum* L. III. Isolation of Chloroplast-Nuclei from Mesophyll Protoplasts and Identification of Chloroplast DNA-Binding Proteins. *Plant Cell Physiol.* 29: 167–177.
- Nishimura, Y., Kikis, E.A.A., Zimmer, S.L.L., Komine, Y., Stem, D.B. 2004. Antisense transcript and RNA processing alterations suppress instability of polyadenylated mRNA in *chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Cell* 16: 2849–2869.
- Odahara, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2016. Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Physiol.* 172: 2337–2346.
- Pfalz, J., Liere, K., Kandlbinder, A., Dietz, K.-J., and Oelmüller, R. 2006. pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* 18: 176–197.
- Pfalz, J. and Pfannschmidt, T. 2015. Plastid nucleoids: evolutionary reconstruction of a DNA/protein structure with prokaryotic ancestry. *Front. Plant Sci.* 6: 2014–2016.
- Prikryl, J., Watkins, K.P., Friso, G., van Wijk, K.J., and Barkan, A. 2008. A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 36: 5152–5165.
- Sakai, A., Yamashita, H., Nemoto, Y., Kawano, S., and Kuroiwa, T. 1991. Transcriptional Activity of Morphologically Intact Proplastid-Nuclei (Nucleoids) Isolated from Tobacco Cultured Cells. *Plant Cell Physiol.* 32: 835–843.
- Salvador, M.L., Klein, U., and Bogorad, L. 1998. Endogenous fluctuations of DNA topology in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7235–7242.
- Sato, N., Albrieux, C., Joyard, J., Douce, R., and Kuroiwa, T. 1993. Detection and characterization of a plastid envelope DNA-binding protein which may anchor plastid nucleoids. *EMBO J.* 12: 555–561.
- Sato, N., Nakayama, M., and Hase, T. 2001. The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase. *FEBS Lett.* 487: 347–350.

- Sato, N., Ohshima, K., Watanabe, A., Ohta, N., Nishiyama, Y., Joyard, J., and Douce, R. 1998. Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. *Plant Cell* 10: 859–872.
- Satoh, M. and Kuroiwa, T. 1991. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 196: 137–140.
- Sekine, K., Hase, T., and Sato, N. 2002. Reversible DNA compaction by sulfite reductase regulates transcriptional activity of chloroplast nucleoids. *J. Biol. Chem.* 277: 24399–24404.
- Stern, D.B., Goldschmidt-Clermont, M., and Hanson, M.R. 2010. Chloroplast RNA metabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 125–155.
- Terasawa, K. and Sato, N. 2005. Visualization of plastid nucleoids in situ using the PEND-GFP fusion protein. *Plant Cell Physiol.* 46: 649–660.
- Yagi, Y., Ishizaki, Y., Nakahira, Y., Tozawa, Y., and Shiina, T. 2012. Eukaryotic-type plastid nucleoid protein pTAC3 is essential for transcription by the bacterial-type plastid RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 7541–7546.
- Yan, J., Hong, S., Guan, Z., He, W., Zhang, D., and Yin, P. 2020. Structural insights into sequence-dependent Holliday junction resolution by the chloroplast resolvase MOC1. *Nat. Commun.* 11: 1–10.
- Yang, Z., Li, M., and Sun, Q. 2020. Arabidopsis Chloroplast Genome Maintenance Article for Arabidopsis Chloroplast Genome Maintenance. *Cell Rep.* 30: 243–256.
- Yoo, H.H., Kwon, C., Lee, M.M., and Chung, I.K. 2007. Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in Arabidopsis. *Plant J.* 49: 442–451.

## 光合成における光防御反応

得津 隆太郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>基礎生物学研究所

〒444-0874 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

### Protective responses of photosynthesis

Ryutaro Tokutsu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute for Basic Biology, 38 Nishigo-Naka, Miyodaiji, Okazaki, Aichi, 444-0874, Japan

Keywords: Photoprotection, Non-Photochemical-Quenching (NPQ), Green algae

DOI: 10.24480/bsj-review.12a3.00196

#### 1. はじめに

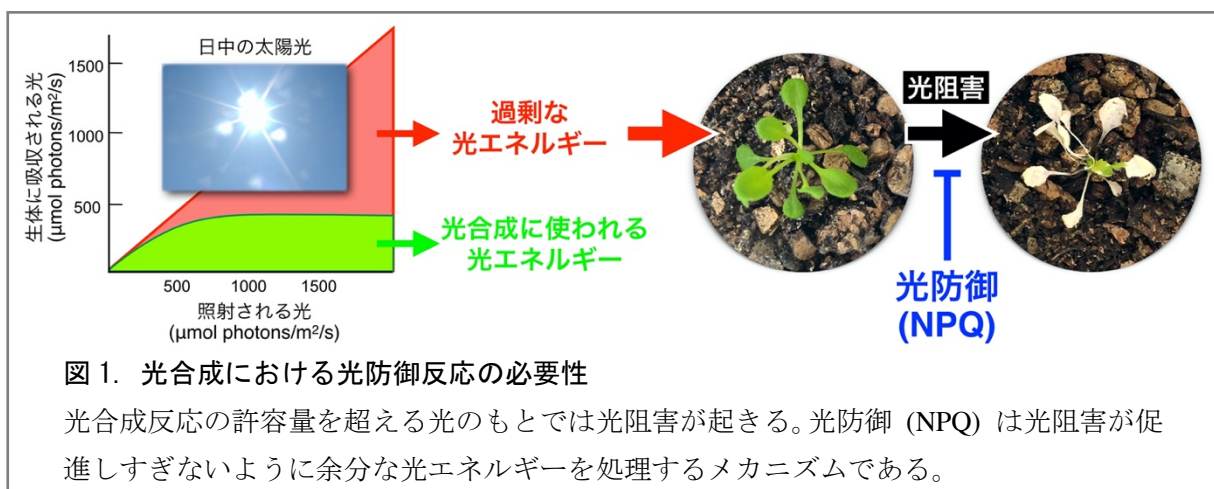
周知の事実として植物は光を利用して光合成反応を駆動している。しかし、自然界で植物が浴びている太陽光の全てが光合成に利用されているわけではない。実のところ、光合成反応にも律速があり、日中の太陽光はその律速を大きく超える光エネルギーを含んでいる。では、この過剰な光エネルギーは植物にとって問題ないのだろうか？ 否、強すぎる光は、光合成反応を過剰に駆動させることで様々な酸化ストレスを誘起し、光合成反応の基幹部ともいえる光化学系の失活・破壊を引き起こしてしまう。もしそうなれば、光合成依存的に成長する植物はその成長動態を支える生体エネルギーを作ることができなくなり、やがては枯死してしまうだろう。しかし、回りを見ればアスファルトを割って成長する道草や、刈っても刈っても伸びてくる庭の芝など、例を挙げればキリがないほど植物たちは旺盛に繁茂している。陸上の植物だけではなく、海や湖沼などでも赤潮、グリーンウォーター、水面を覆い尽くすほどの浮草を目にすることからも、彼らが太陽の光に屈しているようには見えない。それは、地球の光合成生物は光防御と呼ばれる強光適応メカニズムを備えており、光環境に応じて適切な光合成効率を維持しているためである。本稿では、筆者がこれまで研究材料としてきた単細胞緑藻を中心として光防御機構を紹介しつつ、今後の研究展望を考えたいと思う。

#### 2. 光合成において光を捨てる

酸素発生型光合成は、おおよそ 28 億年前に誕生したと考えられている。その反応の根幹は、光エネルギーを利用した光化学反応であり、二つの光化学系複合体 (Photosystem [PS] I および PSII) で駆動される。光化学反応を開始するための光捕集過程では、光エネルギーを吸収したクロロフィル分子の励起がおき、クロロフィル結合型タンパク質内、タンパク質間を跨いだクロロフィル同士の励起エネルギー伝達が発生する。最終的には光化学系の反応中心に位置する特別なクロロフィル分子へとエネルギーが受け渡されることで、以降の光化学反応

が進む。

光化学反応のターンオーバーが間に合う程度の光エネルギー受容、励起エネルギー伝達であれば問題はないが、一つのクロロフィル分子が他のクロロフィル分子へと励起エネルギーを受け渡すよりも早くに光を受け取ると、クロロフィルは基底状態へと回帰することができずに過剰励起状態に陥ってしまう。過剰励起状態では、一重項酸素の発生を誘起し、クロロフィル分子が結合するタンパク質そのものを破壊しかねない。特に、光合成系の中でも脆いと言われる PSII は過剰な光のもとで破壊されやすく、修復が間に合わないレベルで壊されると光合成の反応系が崩壊し (通称 “光阻害” (Takahashi and Murata 2008)), 最終的には細胞死に繋がる。植物や藻類は、このようなクロロフィルの過剰励起を抑制するために、非光化学的消光 (Non-Photochemical Quenching, 通称 NPQ) と呼ばれる光防御機構 (図 1) を備えている (Horton, Ruban, and Walters 1996; Niyogi 1999)。



NPQの詳細な分子機構については2016年に寄稿した光合成研究(得津 2016)に譲り、ここではその大枠を記載するにとどめておく。NPQは、クロロフィルが過剰励起状態に陥った際(あるいは寸前)に、その励起エネルギーを何らかの形で安全な熱エネルギーへと変換するメカニズムとして知られている。このメカニズムにより、光合成生物は強すぎる光のもとでも余分な光エネルギーを処理し、必要な分だけ光エネルギーを利用して効率的な光合成反応を実現している。

### 3. NPQに関わる因子

NPQは光合成の生理活性を示す代表的パラメータの一つとして認識されている。現在までに、多くの植物学者がクロロフィル蛍光測定法を使ってラン藻や真核藻類、陸上の植物においてNPQを評価しており (Demmig-Adams and Adams 1992; El Bissati et al. 2000; Wilson et al. 2006; Peers et al. 2009; Bailleul et al. 2010; Alboresi et al. 2010), 光合成生物に普遍的な光環境適応メカニズムであることが分かっている。本項では、主に緑色系の真核光合成生物である緑藻と陸上植物のNPQに関わる因子を紹介する。

1990年代後半に入り、分子遺伝学の驚異的な発展に伴い、モデル植物 (*Arabidopsis thaliana*) を使ったランダム変異体スクリーニングが実施され (Niyogi, Grossman, and Bjorkman 1998), PsbS と呼ばれるチラコイド膜局在タンパク質を欠損した植物ではNPQが正常に駆動しない

ことが世界で初めて報告された (Li et al. 2000)。今日までに、PsbS の詳細な分子機能は未だ議論が尽くされていないものの、多くの先行研究により PsbS はチラコイド膜ルーメン側の酸性化を感知し、NPQ の活性化をサポートすると考えられている。

PsbS は緑色系の光合成生物に広く保存されており、単細胞緑藻やコケ植物にも保存されている (Alboresi et al. 2008; Bonente et al. 2008)。しかしこれらの生物種において PsbS は、維管束植物のそれよりも NPQ への寄与は小さいようである (Bonente et al. 2008; Tibiletti et al. 2016; Alboresi et al. 2010)。では、緑藻やコケ植物ではどのような因子が NPQ の活性化を担っているのだろうか？ 2009 年に緑藻クラミドモナスで (Peers et al. 2009)、2010 年にヒメツリガネゴケで (Alboresi et al. 2010) 相次いで発見されたのが、LHCSR と呼ばれる NPQ 因子である。LHCSR は PsbS と同様チラコイド膜局在タンパク質であり、緑藻には LHCSR1 と LHCSR3、ヒメツリガネゴケには LHCSR1 と LHCSR2 が存在する。ちなみに、ヒメツリガネゴケの LHCSR1 と緑藻の LHCSR1 は遺伝子・アミノ酸配列、分子機能等において関係性が高いわけではなく、あくまでヒメツリガネゴケの 2 つの LHCSR が LHCSR1 と LHCSR2、緑藻の 2 つの LHCSR が LHCSR1 と LHCSR3 と名づけられただけである (Alboresi et al. 2008)。読み進めていく上で混乱を招くかもしれないが、本稿においても光防御の研究分野で使われている表記を踏襲したいと思う。話を戻すと、緑藻ではいずれの LHCSR を欠損した場合でも NPQ の活性化に顕著な影響が出るのに対し (Peers et al. 2009; Allorent et al. 2016)、ヒメツリガネゴケでは LHCSR1 がより顕著に NPQ 活性化に影響することが報告されている (Alboresi et al. 2010)。

興味深いことに LHCSR は緑藻類、コケ植物に保存されている一方、維管束植物からは見つからない (Alboresi et al. 2008; Niyogi and Truong 2013)。緑藻とコケ植物が PsbS と LHCSR の両方を持っていることを考えると、進化的には現存する維管束植物の誕生以前に LHCSR が失われたのだと想像できる (図 2)。また、ラン藻は LHCSR も PsbS も有しておらず、全く異なる因子 (Orange Carotenoid Protein, OCP) が NPQ に寄与することがわかっている (Wilson et al. 2006; Wilson et al. 2007)。これらのことから、一次共生に伴う緑色系の真核光合成生物の誕生時点で PsbS および LHCSR を用いた NPQ 活性化機構の雛形が確立され、陸上への進出に伴い最終的に PsbS 依存の NPQ 活性化機構を発達させたのだと思われる。

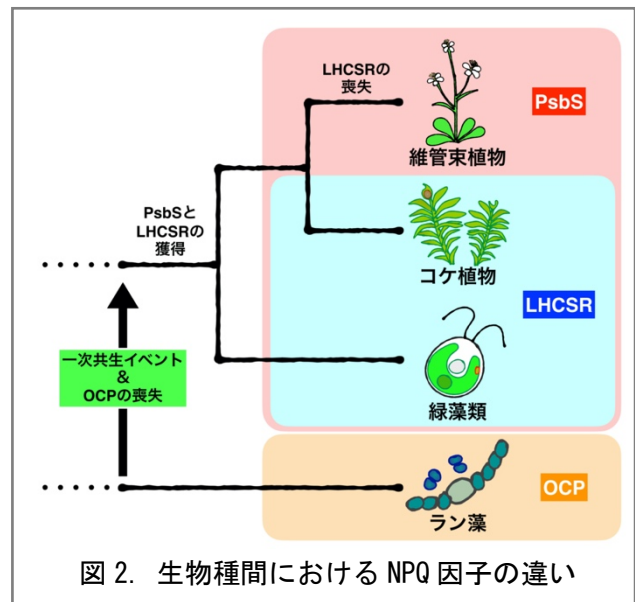


図 2. 生物種間における NPQ 因子の違い

#### 4. 光の情報を利用した NPQ 因子の発現

前項に示したように、緑色系の光合成生物の NPQ を担う因子として、PsbS と LHCSR が存在する。本項では、(最終的に単細胞緑藻の特徴を紹介することになるが) これらの NPQ 因子の発現について紹介したい。

これまでの先行研究から、維管束植物やコケ植物における PsbS は“恒常的に”発現していることが分かっている (Li et al. 2000; Alboresi et al. 2010)。また、コケ植物の LHCSR も“恒常的に”発現している (Alboresi et al. 2010)。その一方で緑藻では PsbS も LHCSR も光によって誘導されることが分かっている (Allorent and Petroustos 2017)。

緑藻を弱い光の下で培養すると NPQ 因子は発現せず、これに伴って NPQ の活性化も起きない。しかし、ひとたび強光に晒すと NPQ 因子の転写活性が上昇し、結果として実験的に検出可能なレベルでタンパク質が蓄積する (Peers et al. 2009; Maruyama, Tokutsu, and Minagawa 2014)。このように強光によって発現誘導される緑藻の NPQ 因子であるが、近年になり「どのような強光 (光情報)」が関与しているのかが明らかになってきた。具体的には、LHCSR のうちのひとつ LHCSR3 は主に青色光による Phototropin 依存シグナル伝達と (赤色光でも促進される) 光合成依存のシグナル伝達がきっかけとなり発現誘導される (Petroustos et al. 2016)。一方の LHCSR1 や PsbS は可視光よりも主に紫外光に反応して発現誘導され、その細胞内シグナル伝達には紫外光受容体である UVR8 が寄与している (Allorent et al. 2016; Tokutsu et al. 2019b)。このように、いずれの NPQ 因子の発現も特定の光受容による細胞内シグナル伝達の活性化が鍵となっており (図 3)、葉緑体を含めた複数のオルガネラ境界を跨いだ細胞全体のネットワークを駆使した応答であることが予想された。

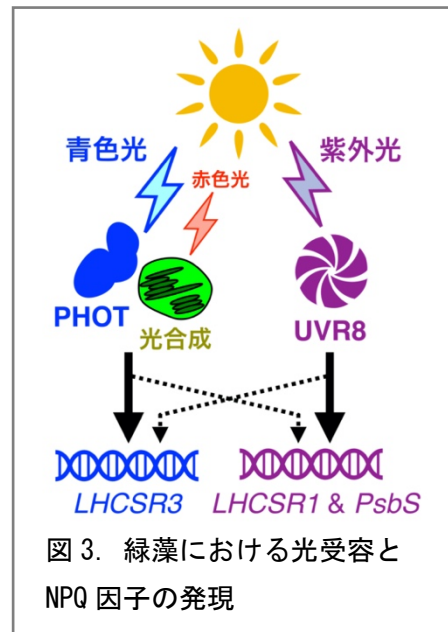


図 3. 緑藻における光受容と NPQ 因子の発現

実際に、ごく最近筆者らはこれらの NPQ 因子の発現は、被子植物の花成タイミングを制御する CONSTANS や真核生物に保存される転写因子 Nuclear Transcription Factor Y からなる転写因子複合体にコントロールされていることを発見した (Tokutsu et al. 2019a)。これに加えて、光受容と転写因子複合体の活性化は E3 ユビキチンリガーゼ複合体によって負に制御されることを明らかにした (詳細は光合成研究への寄稿記事 (得津 2020) を参照していただければと思う)。詳細はさておき、このように一口に強光誘導性と言っても実際には青色光特異的であったり、強光でも可視光でもない弱い紫外光によって発現誘導される、という緑藻特有の興味深い光応答が浮き彫りになってきた。過剰な光から光合成系を保護するために必要な NPQ 因子の発現を、葉緑体のみならず細胞質の光受容体による光質の選別も併せて全身的に制御する様子は、単細胞の緑藻自身がまさに「メタオルガネラ」機能を体現しているとも言える。

ちなみに、なぜ緑藻の LHCSR だけが明確な光誘導性を持つのかは明らかでない。陸上の植物である維管束植物と比べて、水の中に生息する緑藻類は比較的強い光に晒されにくいという環境要因が関係しているのかもしれない。今後は陸上植物と緑藻の光応答について、細胞内シグナリングのみならず、それによって制御される表現型の共通性と特異性を調べていくことで、今日の緑色系の光合成生物の進化過程が紐解かれていくことを期待したい。



## 5. 光防御反応の活性化

光防御反応, つまり NPQ は地球の光合成生物に保存されている環境適応戦略でありながら, その詳細な分子機構には未だ謎が残されている (大まかに共通する NPQ 作用機序については, 筆者が寄稿した光合成研究 (得津 2016) を参照していただければと思う)。例えば, 維管束植物では PsbS が NPQ 活性化に重要な役割を担うことがわかっているが (Li et al. 2000; Li et al. 2004), PsbS そのものが NPQ 反応場であるのか, あるいは PsbS 以外の NPQ 反応場が存在するのか, その議論は未だ尽きていない。現在のところ, PsbS はチラコイドルーメン側の酸性化を感知し, チラコイド膜内の macro organization を変化させることで, 集光アンテナタンパク質 (LHCII) の凝集に伴う NPQ 反応を誘導するとい説が唱えられている (Li et al. 2004; Kiss, Ruban, and Horton 2008; Kereiche et al. 2010; Goral et al. 2012)。ただし, どの LHCII が NPQ を担っているのかや, 実際に *in vivo* において PsbS が LHCII の凝集を引き起こすのか, LHCII の凝集が NPQ に必須なのか, 多くの点については直接的な観察報告はないため, 引き続きライブセルイメージング, *in vitro* におけるチラコイド膜再構成, 精製タンパク質の生物物理的特性の精査を通して, 維管束植物における「NPQ の実体」を捉えるような研究展開が期待される。

維管束植物の NPQ 研究と比べて, コケ植物の NPQ に関する研究の歴史は長くはないが, 最近では NPQ の実体を捉えた研究結果が報告されつつある。例えば, コケ植物の NPQ を担う LHCSR1 は, 維管束植物の PsbS とは違い, それ単体で NPQ 活性を持つことが報告されている (Kondo et al. 2019; Kondo et al. 2017)。これらの報告では, 光合成タンパク質に対する 1 分子分光測定・解析を駆使しており, (誰にでも簡単にできることではないが) 今後の *in vitro* 系 NPQ 評価法の指針となるのではないかと期待している。このように, コケ植物の NPQ に必須である LHCSR1 は, それ自身が NPQ 能を持つことが示唆されている。

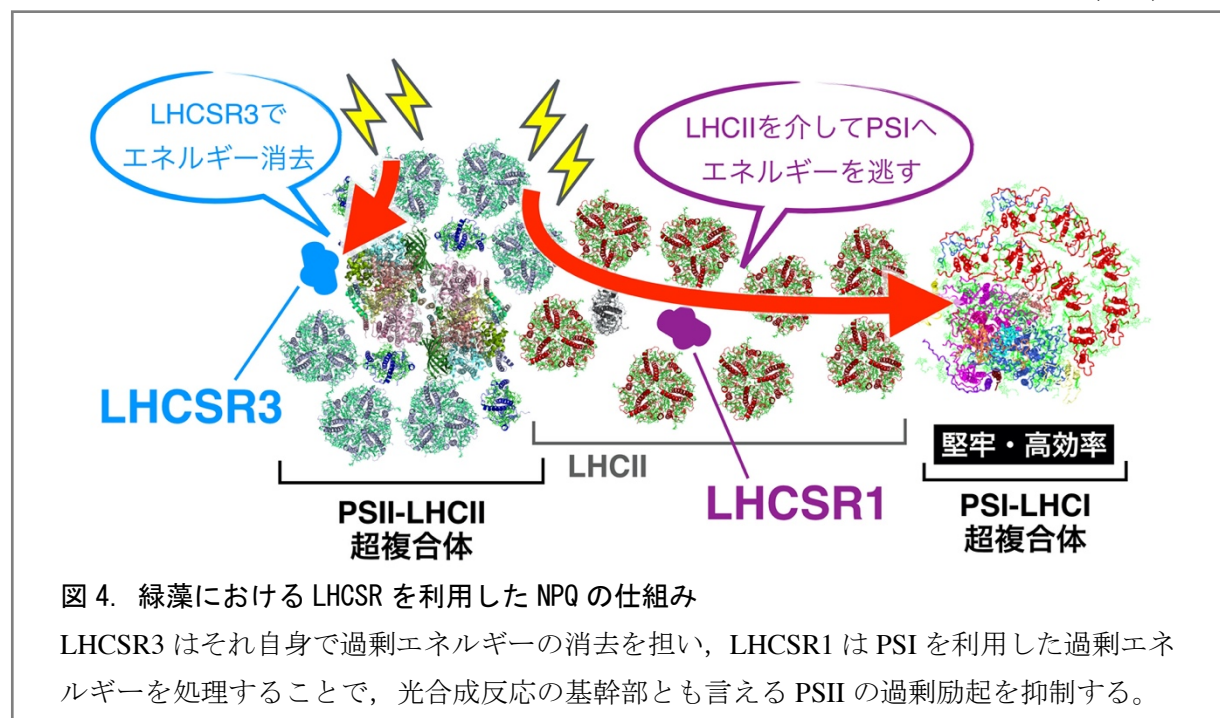
では, 緑藻の LHCSR はどうだろうか? LHCSR3 を *in vitro* 再構成し, その分子機能を解析した先行研究がある。これらの先行研究では, *in vitro* においてクロロフィルを含む複数の色素分子を大腸菌に発現させた LHCSR3 と再構成することで, LHCSR3 単体が NPQ を駆動し得ることを報告している (Bonente et al. 2011; de la Cruz Valbuena et al. 2019)。ごく最近, コケ植物の LHCSR1 を調べた時と同様の実験系を利用し, 大腸菌で発現した緑藻の LHCSR3 に関する NPQ 評価について, プレプリント報告されている (Troiano et al. 2020)。いずれの報告においても, LHCSR3 はそれ自身が NPQ 反応場として機能することを示唆している。

これらの先行報告に加えて, 2013 年に筆者らはチラコイド膜における LHCSR3 の局在, 分子機能解析を行った (Tokutsu and Minagawa 2013)。その結果, LHCSR3 は光化学系の中でも PSII に結合し, PSII-LHCSR3 超分子複合体を形成することで NPQ を駆動することを見出した。筆者らが精製した PSII-LHCSR3 超分子複合体内において, LHCSR3 がどのように NPQ に寄与するのかいまだはっきりとしていないものの, Bonente らによる報告 (Bonente et al. 2011) と併せて考えると, PSII-LHCSR3 超分子複合体内においても過剰な励起エネルギーが LHCSR3 へと伝達されることで安全に消光されているものと予想できる。昨今の構造生物学的解析手法の著しい発展を考えると, 今後は PSII-LHCSR3 超分子複合体の構造知見の蓄積が進み, LHCSR3 依存的な NPQ 分子機構の完全理解が期待される。

ところで、緑藻は紫外光の受容によって PsbS と LHCSR1 を、そして青色光の受容によって LHCSR3 を発現させて NPQ を活性化させるが、なぜ異なる色の光を利用する必要があるのだろうか？ いずれの NPQ 因子も、クロロフィル蛍光測定で観察可能なアウトプットである NPQ 現象に貢献することは間違いない。この謎の一端を説明できそうな研究報告がある。(何を隠そう筆者が所属する研究グループの成果であるが) LHCSR1 と LHCSR3 の分子機能は、どうやら異なるようだ。

筆者らは、LHCSR3 が PSII に結合することを見出した後、LHCSR1 についても同様の解析を行った。その結果、LHCSR1 はいずれの光化学系にも強固に結合しておらず、LHCSR1 を核とした NPQ の実体を捉えることは出来なかった。そこで筆者らは、光合成非依存的に培養可能な緑藻の利点を活かし、PSI および PSII をそれぞれ、あるいは両方欠損させた変異体を用いて LHCSR1 依存的な NPQ を評価した (Kosuge et al. 2018)。すると驚くことに、PSI を持たない変異株では、野生株や PSII のみを欠損した変異株と比べて、顕著に NPQ 活性が低下していることが明らかになった。これは「LHCSR1 依存の NPQ は PSI を足場として発生している」ことを示唆している。

この一連の研究の中で、筆者らが LHCSR1 を内包する単離チラコイド膜を用いて NPQ 活性化条件下で時間分解クロロフィル蛍光解析を行ったところ、PSII の集光アンテナ (LHCII) から PSI へとエネルギー伝達が促進されていることを見出した。この現象は、LHCSR1 を欠損した変異株のチラコイド膜では観察されなかったことから、LHCSR1 特異的な NPQ 機構であることが浮き彫りとなった。PSI が必要であること、PSII の集光アンテナから PSI へと励起エネルギー移動が起きること、PSI は PSII よりもエネルギー変換効率が良く堅牢な光化学系複合体であること (Krieger-Liszky 2005; Savikhin 2006; Croce and van Amerongen 2013)、この3点を考慮すると「LHCSR1 は LHCII で生じた励起エネルギーをあえて堅牢な PSI へと受け渡し、脆弱な PSII におけるクロロフィルの過剰励起を抑制する」と結論づけるに至った (図 4)。



## 6. 終わりに

本稿で述べたように維管束植物、コケ植物、そして緑藻といった緑色系統の光合成生物は、LHCSR や PsbS を利用した NPQ 機構を備えているが、NPQ の仕組み自体は異なっており、その仕組みも完全には解明されていない。特に、上述した生物種全てに保存されている PsbS の分子機能は未だ謎に包まれており、その機能に関する議論の完全決着が今後の課題であろう。一方で LHCSR に関しても、コケ植物の LHCSR と緑藻の LHCSR (この中でも LHCSR1 と LHCSR3 も) の分子機能は異なっており、一つ一つの分子の機能多様性に驚かされる。これらに加えて、最近の NPQ 研究の動向は、光化学系 II 周辺のみならず光化学系 I のエネルギー変換効率の高さを利用した NPQ 機構も着目されつつある (Ballottari et al. 2014; Pinnola et al. 2015; Tian et al. 2017; Girolomoni et al. 2019)。また、現在のところ NPQ 因子の発現に関する細胞内シグナル伝達、つまり「NPQ に関するメタオルガネラネットワーク」の研究は単細胞緑藻で進み始めたばかりであり、コケ植物や維管束植物についての知見は極めて限定的である。このように、一言で NPQ と言ってもその作用機序や活性化に至る細胞内シグナル伝達機構は様々かつ未開拓であり、現時点で地球に溢れる多様な光合成生物における「普遍的」あるいは「特異的」な光防御反応を見出すことは非常に困難であろう。しかし、逆に言えば「博物学的観点からはまだまだ手付かずの材料 (生物) が多い」とも考えることができる。今後、この研究分野が「既知の NPQ 機構を利用した応用技術の開発」に重点を置くのか、「博物学的な NPQ 機構の知見の拡張」に重きを置くのか、そしてそこから切り拓かれる植物学の未来がどのように展開していくのか、その行く末を見守りたいと思う。

## 引用文献

- Alboresi, A., S. Caffarri, F. Nogue, R. Bassi, and T. Morosinotto. 2008. In *silico* and biochemical analysis of *Physcomitrella patens* photosynthetic antenna: identification of subunits which evolved upon land adaptation, *PLoS One*, 3: e2033
- Alboresi, A., C. Gerotto, G. M. Giacometti, R. Bassi, and T. Morosinotto. 2010. *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107: 11128-11133
- Allorent, G., L. Lefebvre-Legendre, R. Chappuis, M. Kuntz, T. B. Truong, K. K. Niyogi, R. Ulm, and M. Goldschmidt-Clermont. 2016. UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113: 14864-14869
- Allorent, G., and D. Petroutsos. 2017. Photoreceptor-dependent regulation of photoprotection, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 37: 102-108
- Bailleul, B., A. Rogato, A. de Martino, S. Coesel, P. Cardol, C. Bowler, A. Falciatore, and G. Finazzi. 2010. An atypical member of the light-harvesting complex stress-related protein family modulates diatom responses to light, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107: 18214-18219
- Ballottari, M., M. J. Alcocer, C. D'Andrea, D. Viola, T. K. Ahn, A. Petrozza, D. Polli, G. R. Fleming, G. Cerullo, and R. Bassi. 2014. Regulation of photosystem I light harvesting by zeaxanthin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111: E2431-2438
- Bonente, G., M. Ballottari, T. B. Truong, T. Morosinotto, T. K. Ahn, G. R. Fleming, K. K. Niyogi, and

- R. Bassi. 2011. Analysis of LhcSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *PLoS Biol.*, 9: e1000577
- Bonente, G., F. Passarini, S. Cazzaniga, C. Mancone, M. C. Buia, M. Tripodi, R. Bassi, and S. Caffarri. 2008. The occurrence of the *psbS* gene product in *Chlamydomonas reinhardtii* and in other photosynthetic organisms and its correlation with energy quenching, *Photochem. Photobiol.*, 84: 1359-1370
- Croce, R., and H. van Amerongen. 2013. Light-harvesting in photosystem I, *Photosynth. Res.*, 116: 153-166
- de la Cruz Valbuena, Gabriel, Franco V. A. Camargo, Rocio Borrego-Varillas, Federico Perozeni, Cosimo D'Andrea, Matteo Ballottari, and Giulio Cerullo. 2019. Molecular Mechanisms of Nonphotochemical Quenching in the LHCSR3 Protein of *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Phys. Chem. Lett.*, 10: 2500-2505
- Demmig-Adams, B., and W. W. Adams, 3rd. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 599-626
- El Bissati, K., E. Delphin, N. Murata, A. Etienne, and D. Kirilovsky. 2000. Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1457: 229-242
- Girolomoni, L., S. Cazzaniga, A. Pinnola, F. Perozeni, M. Ballottari, and R. Bassi. 2019. LHCSR3 is a nonphotochemical quencher of both photosystems in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 116: 4212-4217
- Goral, T. K., M. P. Johnson, C. D. Duffy, A. P. Brain, A. V. Ruban, and C. W. Mullineaux. 2012. Light-harvesting antenna composition controls the macrostructure and dynamics of thylakoid membranes in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 69: 289-301
- Horton, P., A. V. Ruban, and R. G. Walters. 1996. Regulation of light harvesting in green plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 655-684
- Kereiche, S., A. Z. Kiss, R. Kouřil, E. J. Boekema, and P. Horton. 2010. The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts, *FEBS Lett.*, 584: 759-764
- Kiss, A. Z., A. V. Ruban, and P. Horton. 2008. The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes, *J. Biol. Chem.*, 283: 3972-3978
- Kondo, T., A. Pinnola, W. J. Chen, L. Dall'Osto, R. Bassi, and G. S. Schlau-Cohen. 2017. Single-molecule spectroscopy of LHCSR1 protein dynamics identifies two distinct states responsible for multi-timescale photosynthetic photoprotection, *Nat. Chem.*, 9: 772-778
- Kondo, Toru, Jesse B. Gordon, Alberta Pinnola, Luca Dall'Osto, Roberto Bassi, and Gabriela S. Schlau-Cohen. 2019. Microsecond and millisecond dynamics in the photosynthetic protein LHCSR1 observed by single-molecule correlation spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 116: 11247
- Kosuge, K., R. Tokutsu, E. Kim, S. Akimoto, M. Yokono, Y. Ueno, and J. Minagawa. 2018. LHCSR1-dependent fluorescence quenching is mediated by excitation energy transfer from LHCII to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 115: 3722-3727

- Krieger-Liszkay, A. 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis, *J. Exp. Bot.*, 56: 337-346
- Li, X. P., O. Bjorkman, C. Shih, A. R. Grossman, M. Rosenquist, S. Jansson, and K. K. Niyogi. 2000. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting, *Nature*, 403: 391-395
- Li, X. P., A. M. Gilmore, S. Caffarri, R. Bassi, T. Golan, D. Kramer, and K. K. Niyogi. 2004. Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein, *J. Biol. Chem.*, 279: 22866-22874
- Maruyama, S., R. Tokutsu, and J. Minagawa. 2014. Transcriptional regulation of the stress-responsive light harvesting complex genes in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Physiol.*, 55: 1304-1310
- Niyogi, K. K. 1999. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 333-359
- Niyogi, K. K., A. R. Grossman, and O. Bjorkman. 1998. Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion, *Plant Cell*, 10: 1121-1134
- Niyogi, K. K., and T. B. Truong. 2013. Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 16: 307-314
- Peers, G., T. B. Truong, E. Ostendorf, A. Busch, D. Elrad, A. R. Grossman, M. Hippler, and K. K. Niyogi. 2009. An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis, *Nature*, 462: 518-521
- Petroutsos, D., R. Tokutsu, S. Maruyama, S. Flori, A. Greiner, L. Magneschi, L. Cusant, T. Kottke, M. Mittag, P. Hegemann, G. Finazzi, and J. Minagawa. 2016. A blue-light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis, *Nature*, 537: 563-566
- Pinnola, A., S. Cazzaniga, A. Alboresi, R. Nevo, S. Levin-Zaidman, Z. Reich, and R. Bassi. 2015. Light-Harvesting Complex Stress-Related Proteins Catalyze Excess Energy Dissipation in Both Photosystems of *Physcomitrella patens*, *Plant Cell*, 27: 3213-3227
- Savikhin, A. 2006. Ultrafast optical spectroscopy of photosystem I, *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*, 24: 155-175
- Takahashi, S., and N. Murata. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition?, *Trends Plant Sci.*, 13: 178-182
- Tian, L., P. Xu, V. U. Chukhutsina, A. R. Holzwarth, and R. Croce. 2017. Zeaxanthin-dependent nonphotochemical quenching does not occur in photosystem I in the higher plant *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 114: 4828-4832
- Tibiletti, T., P. Auroy, G. Peltier, and S. Caffarri. 2016. *Chlamydomonas reinhardtii* PsbS protein is functional and accumulates rapidly and transiently under high light, *Plant Physiol.*, 171: 2717-2730
- 得津隆太郎. 2016. 光合成における強光順化メカニズム研究の新展開, *光合成研究*, 第 26 巻, 第 1 号 (通巻 75 号) : 36-42
- 得津隆太郎. 2020. 光合成の防御反応における細胞内シグナル伝達, *光合成研究*, 第 30 巻, 第 2 号 (通巻 88 号) : 73-83
- Tokutsu, R., K. Fujimura-Kamada, T. Matsuo, T. Yamasaki, and J. Minagawa. 2019a. The CONSTANS flowering complex controls the protective response of photosynthesis in the green alga

*Chlamydomonas*, *Nat. Commun.*, 10

- Tokutsu, R., K. Fujimura-Kamada, T. Yamasaki, T. Matsuo, and J. Minagawa. 2019b. Isolation of photoprotective signal transduction mutants by systematic bioluminescence screening in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Sci. Rep.*, 9
- Tokutsu, R., and J. Minagawa. 2013. Energy-dissipative supercomplex of photosystem II associated with LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110: 10016-10021
- Troiano, Julianne M., Federico Perozeni, Raymundo Moya, Luca Zuliani, Kwangryul Baek, EonSeon Jin, Stefano Cazzaniga, Matteo Ballottari, and Gabriela S. Schlau-Cohen. 2020. Identification of parallel pH- and zeaxanthin-dependent quenching of excess energy in LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*, *bioRxiv*: 2020.2007.2010.197483
- Wilson, A., G. Ajlani, J. M. Verbavatz, I. Vass, C. A. Kerfeld, and D. Kirilovsky. 2006. A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria, *Plant Cell*, 18: 992-1007
- Wilson, A., C. Boulay, A. Wilde, C. A. Kerfeld, and D. Kirilovsky. 2007. Light-induced energy dissipation in iron-starved cyanobacteria: roles of OCP and IsiA proteins, *Plant Cell*, 19: 656-672

## 脂質代謝が印す葉緑体の進化と多様性

小林 康一<sup>1</sup>, 吉原 晶子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大阪府立大学・高等教育推進機構

<sup>2</sup>大阪府立大学・自然科学類・生物科学課程

〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1

### Evolution and diversity of chloroplasts from the viewpoint of lipid metabolism

Koichi Kobayashi<sup>1</sup>, Akiko Yoshihara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Liberal Arts and Sciences, Osaka Prefecture University,

1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, School of Science, Osaka Prefecture University,

1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

Keywords: Chloroplast, Cyanobacteria, Endosymbiosis, Glycolipid

DOI: 10.24480/bsj-review.12a4.00197

#### 1. はじめに

細菌から原生生物, 植物, 動物に至るまで, 全ての生物の細胞は膜で覆われており, 真核生物では, 細胞の中にも, 核や小胞体, ミトコンドリアなど, 膜で区画化されたオルガネラが数多く存在している。生物が生物として成り立つためには, 自己が膜によって外界と区切られている必要があり, オルガネラがオルガネラとして存在するためには, (液滴は例外として) 固有の区画が「境界」である膜によって他の区画と隔てられている必要がある。生体膜を構成する主成分は, 両親媒性の極性脂質である。極性脂質は水溶液中で脂質二重層を形成し, その層にタンパク質などが結合することで, 機能的な生体膜が作り上げられる。このことから, 脂質二重層を主とした生体膜による境界作りが, 生物やオルガネラの発生と維持の要であると言え, それらを構成する脂質分子もまた, 生命やオルガネラの起源と密接に関わっているのは間違いない。さらに, 生物種を問わず, 脂質二重層は単に境界として働くだけでなく, さまざまな反応の場として機能することもよく知られており, 生命の根源を成す要素の一つであると言える。

シアノバクテリアと植物の葉緑体は, 片や自律的に生存する原核生物であり, 片や真核細胞のオルガネラということで, 本来であれば異なる階層に位置するが, 細胞内共生説の立場からみれば, これらは親戚関係にあり, 光合成の研究面からみれば, 同じ酸素発生型光合成を行う反応系ということで, 同列で語られることも多い。それでは, 生物やオルガネラの境界を作る, 膜脂質の視点からみるとどうであろうか。本稿では, 膜を作る脂質の合成系や役割, 進化といった視点から, 生物であるシアノバクテリアとオルガネラである葉緑体の「間」に

何が存在するのかをみていきたい。

## 2. 葉緑体脂質の特殊性

生物はさまざまな脂質分子種を合成し利用するが、多くの生物に共通するのは、リン脂質を生体膜の主要構成成分として用いる点である。植物細胞も、古くさかのぼれば動物細胞と同一の祖先に由来し、植物細胞の細胞膜やミトコンドリア膜は、動物細胞と同様にリン脂質を主成分とする(図1)。しかし、植物独自のオルガネラである葉緑体(色素体)は例外であり、膜脂質のほとんどを糖脂質が占める(図1)。

色素体は外包膜と内包膜の二重の膜で包まれており、葉緑体はさらに、光合成反応の場であるチラコイド膜を内部に形成する。チラコイド膜の脂質の約50%は、ジアシルグリセロール(DAG)にガラクトースが1分子結合した、モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)である(図2)。また、ガラクトースを2分子もつジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)も多く、チラコイド膜の脂質の約80%はこれらの2種のガラクト脂質で作られている。それらに加え、スルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)という硫黄を含む糖脂質が約10%あり、リン脂質は、残りの10%を占める程度である。そのリン脂質の大部分はホスファチジルグリセロール(PG)であり、この脂質も他の生体膜ではマイナーな存在である。このように、チラコイド膜は非常にユニークな脂質で構成されており、植物細胞の他の生体膜と大きく異なる。また、葉緑体の包膜も、チラコイド膜にはないホスファチジルコリンが多く存在する以外は、チラコイド膜と似たような脂質組成となっており、非光合成組織の色素体の膜脂質組成も同様である(図1)。

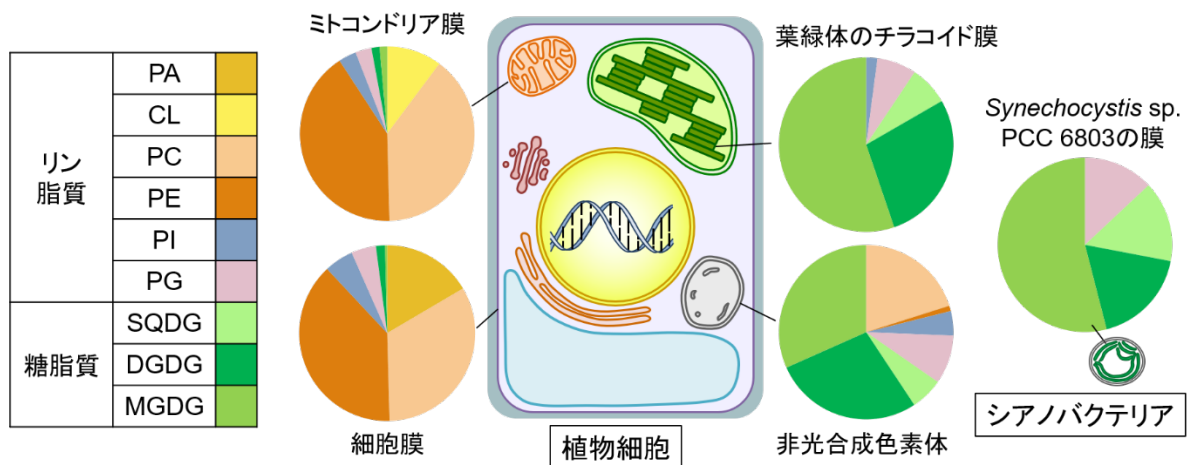


図1. 植物のオルガネラとシアノバクテリアの膜の脂質組成の比較

ホウレンソウから単離された葉緑体のチラコイド膜 (Dorne *et al.*, 1990), カリフラワー花芽の色素体包膜 (Alban *et al.*, 1998), シロイヌナズナのミトコンドリア膜 (Jouhet *et al.*, 2004) およびリュウクトウの細胞膜 (Yoshida & Uemura, 1986), シアノバクテリアの *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Wada & Murata, 1989) の脂質組成を示す。PA; ホスファチジン酸, CL; カルジオリピン, PC; ホスファチジルコリン, PE; ホスファチジリエタノールアミン, PI; ホスファチジルイノシトール, PG; ホスファチジルグリセロール, SQDG; スルホキノボシルジアシルグリセロール, DGDG; ジガラクトシルジアシルグリセロール, MGDG; モノガラクトシルジアシルグリセロール。



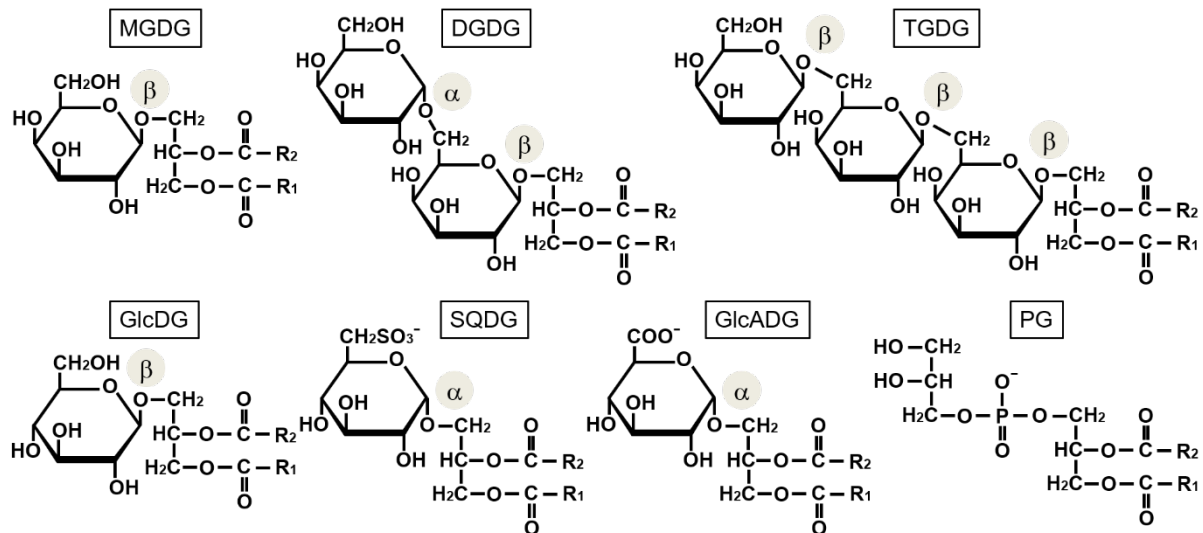


図 2. 葉緑体に特徴的な脂質の構造

R1, R2; 炭素長 15 もしくは 17 のアルキル鎖。α; α配位, β; β配位。

このように、色素体は非常にユニークな脂質で構成されており、植物細胞の他の生体膜と大きく異なる。なぜ、植物細胞内で、色素体だけがこのような特殊な脂質組成をもつのだろうか。その疑問に対する答えを葉緑体の細胞内共生起源に求める向きも多いが、次章でみるように、そのような単純な話ではないことが分かっている。

### 3. 葉緑体とシアノバクテリアの糖脂質合成における共通点と相違点

シアノバクテリアのチラコイド膜は、MGDG, DGDG, SQDG, PG の 4 つの脂質で構成されており、その割合は植物のチラコイド膜に近い (図 1)。葉緑体の起源は細胞内共生したシアノバクテリアであるとする考えが広く浸透しており、同様に、葉緑体特有の脂質組成も、シアノバクテリアに由来すると考えるのが自然であろう。もし、葉緑体脂質の合成を担う植物の酵素遺伝子がシアノバクテリアの一次共生由来であれば、それを強く裏付けることとなり話は簡単なのだが、実際は、かなり異なることが明らかになっている。

まず、MGDG の合成経路が、植物とシアノバクテリアで違う。シアノバクテリアは、UDP-グルコースと DAG からモノグルコシルジアシルグリセロール (GlcDG, 図 2) を最初に作り、その極性頭部のグルコースをガラクトースに異性化することで、MGDG を合成する (図 3)。この糖転移反応と異性化反応は、それぞれ MgdA と MgdE という二つの酵素により行われる (Awai *et al.*, 2014, 2006)。一方で、植物は、糖の供与体として UDP-ガラクトースを用いることで、一段階の反応で MGDG を合成する (図 3)。そのため、植物は、シアノバクテリアの MgdA とは起源のまったく異なる酵素 (MGD1) を糖転移反応に用いる (Shimajima *et al.*, 1997)。また、植物は MgdA も MgdE も持たない。分子系統樹解析によると、植物の MGD1 遺伝子は緑色光合成細菌の持つ遺伝子に由来し、進化距離の推定から、一次共生のおこる以前に、植物はすでにこの遺伝子を獲得していたと推測されている (Sato, 2020)。藻類や植物は、緑色光合成細菌のものと同様した遺伝子を MGD1 の他にも数多く持っているが、それらの遺伝子をどのように獲得したのか、植物の進化を考えるうえで興味深い点である。

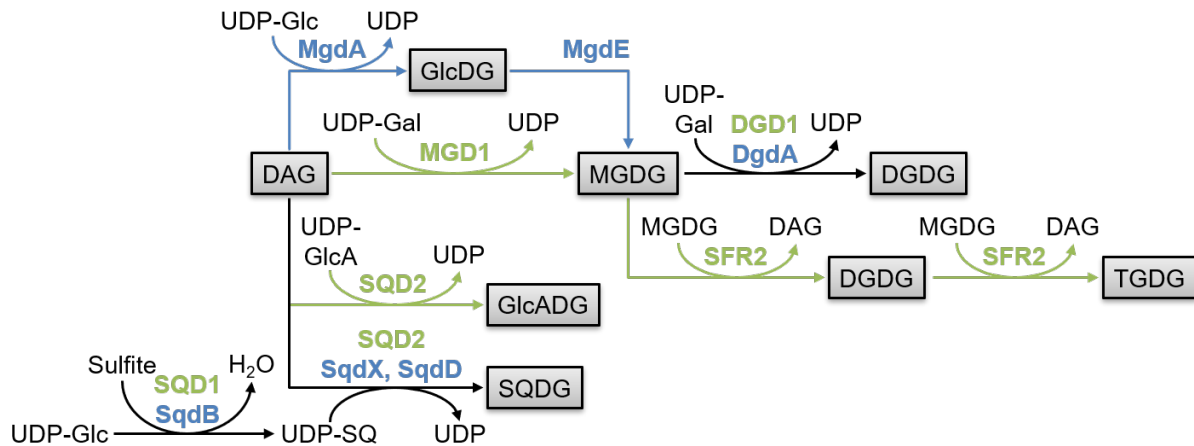


図 3. 植物とシアノバクテリアの糖脂質合成経路とそれに関わる酵素

植物に固有の経路を緑矢印で、シアノバクテリア固有の経路を青矢印で、両者に共通する経路を黒矢印で示す。また、植物の酵素を緑文字で、シアノバクテリアの酵素を青文字で表す。脂質の中間体や最終産物は灰色のボックスで示す。Glc; グルコース, Gal; ガラクトース, SQ; スルホキノボース, GlcA; グルクロン酸。

DGDG の合成に関しては、植物でもシアノバクテリアでも、MGDG の極性頭部にガラクトースをもう 1 分子転移することで行われる (図 3)。つまり、どちらの生物も同じ反応により DGDG を合成するが、それを触媒する DGDG 合成酵素遺伝子の起源はシアノバクテリア (*dgdA*) と陸上植物 (*DGD1*) とで異なる (Awai *et al.*, 2007; Dörmann *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 2007)。シアノバクテリアは植物タイプの *DGD1* を持っておらず、陸上植物や緑藻はシアノバクテリアタイプの *dgdA* を持っていない。植物の用いる *DGD1* の起源は他のバクテリア由来である可能性が高い (Sato, 2020) (図 4)。興味深いことに、陸上植物と同じアーケプラスチダに属する原始紅藻と灰色藻はどちらも、植物タイプの *DGD1* を持たない。原始紅藻はシアノバクテリア由来の *dgdA* を葉緑体ゲノムにコードし、灰色藻は核ゲノムにコードする (粟井, 2015)。一方、海産の紅藻類は緑藻や陸上植物と同様に植物タイプの *DGD1* のみを核に持つことから、紅藻の祖先、もしくはもっと以前の藻類共通の祖先は、シアノバクテリア由来の *dgdA* と他のバクテリア由来の *DGD1* を重複して持っていた可能性が考えられる (Sato, 2020)。

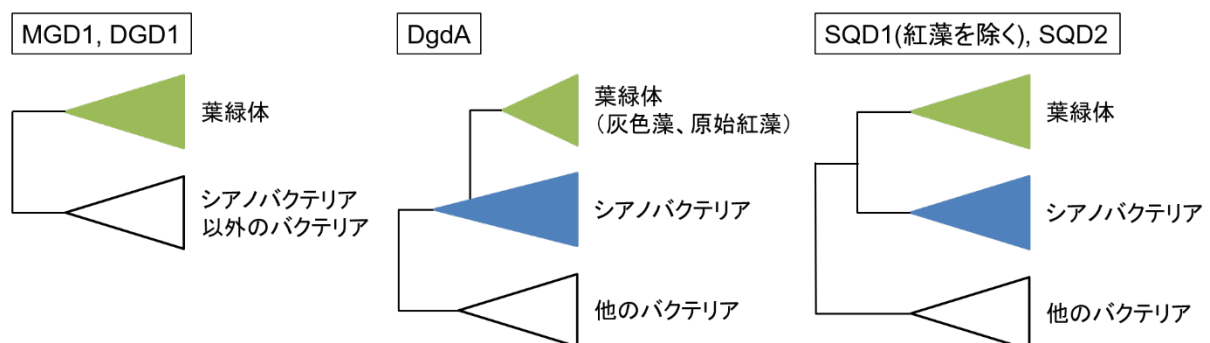


図 4. 植物とシアノバクテリアの糖脂質合成酵素の系統関係

シアノバクテリアの SQD1 と SQD2 のホモログはそれぞれ SqdB と SqdX である。紅藻の SQD1 は、緑藻や植物の SQD1 とは遠く離れた枝に位置する (Sato, 2020)。シアノバクテリアの一部は、SqdX とは別の SqdD という酵素を SQDG 合成に用いるが、SqdD のホモログは植物には存在しない。

最後に, SQDG の合成においては, UDP-スルホキノボースの合成を行う酵素 (SQD1/SqdB) と, そこからスルホキノボースを DAG に転移する酵素 (SQD2/SqdX, SqdD) が関与する。植物の用いる SQD1 や SQD2 はそれぞれシアノバクテリアの SqdB や SqdX と共通の起源をもつが, シアノバクテリアのクレードとは姉妹群を形成するため (図 4), 一次共生由来ではないと思われる (Sato, 2020)。実際, 進化距離の計算から, SQD1 遺伝子は微妙であるが, SQD2 遺伝子は一次共生より以前に獲得された可能性が指摘されている。

以上のように, シアノバクテリアと植物では, チラコイド膜脂質の組成は非常によく似るが, MGDG の合成経路は両者で異なり, また, 植物が DGDG や SQDG の合成に用いる酵素遺伝子は, シアノバクテリアの一次共生由来ではないと推測される。さらに, 同様のことが PG の合成経路においても示唆されている (Sato, 2020)。遺伝子が発現することにより脂質が合成されるという順序を考えると, 果たして葉緑体に特徴的な脂質組成は, 一次共生に由来すると言えるのだろうか。特に考慮すべきは, 植物の祖先細胞が, シアノバクテリアの一次共生より前に MGD1 や SQD2 を獲得していた可能性である。つまり, シアノバクテリアとの一次共生は, あらかじめ別のバクテリアからこれらの糖脂質合成酵素遺伝子を獲得していた真核細胞との間で起こった, という道筋も十分あり得るのである。もしそうであるなら, 共生以前からすでに糖脂質を利用していた真核細胞だからこそ, シアノバクテリアとの共生に成功した, という考え方も可能であろう。現時点では一つの大胆な仮説に過ぎないが, 今後の研究の進展により, 新たな知見が得られることを期待したい。

#### 4. チラコイド膜において各脂質が担う役割

前章では, 葉緑体の脂質合成に関わる遺伝子が一次共生起源では無い可能性について議論した。しかし, たとえそうだったとしても, 現存する藻類や植物の葉緑体は, シアノバクテリアと同様の脂質によりチラコイド膜を構築し, シアノバクテリアと同様の酸素発生型の光合成を行う。そして, 各脂質が光合成において担う役割も, 両者でおおよそ共通しているようにみえる。

葉緑体においてもシアノバクテリアにおいても, チラコイド膜脂質で最も多いのは, MGDG である。他のチラコイド膜脂質と異なる MGDG の重要な特徴として, 極性頭部がガラクトース 1 分子と小さいため, 単独ではラメラ構造を形成できず, 代わりに逆ヘキサゴナル相とよばれる非ラメラ構造を形成する点が挙げられる (Shipley *et al.*, 1973)。MGDG が局所的に作る非ラメラ構造がチラコイド膜の機能に重要であると示唆されており (Garab, 2014; Murphy, 1982), 葉緑体とシアノバクテリアに共通して MGDG が多いのは, そのような非ラメラ脂質としての必要性が共通しているからかもしれない。実際, MGDG の合成が部分的に阻害された植物では光合成の機能が低下し (Aronsson *et al.*, 2008; Fujii *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013), さらに MGDG 合成のほとんどを欠損したシロイヌナズナ変異体では, 光合成電子伝達の活性が完全に消失することが分かっている (Kobayashi *et al.*, 2013, 2007)。しかし, ここで注意すべき点は, MGDG は DGDG 合成の基質でもあるため, MGDG 合成の欠損は同時に DGDG の合成にも影響を与えることである。また, 葉緑体の膜脂質の大部分を欠くことになるため, チラコイド膜や葉緑体, さらに植物体そのものの発達が大きな阻害を受けることとなり

(Kobayashi *et al.*, 2007), 光合成における MGDG の直接的な役割を明らかにするのは容易ではない。同じことがシアノバクテリアでも言え、MGDG 合成を欠損したシアノバクテリアはおそらく致命的なため、そのような変異体は得られていない。以上のことから、現時点において、光合成における MGDG 分子の詳細な機能はほとんど分かっていない。一方で、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の GlcDG 異性化酵素 (MgdE) の欠損変異体の解析から、興味深い結果が報告されている (Awai *et al.*, 2014)。この *mgdE* 変異体は、GlcDG を MGDG に変換できないため MGDG と DGDG を共に欠くが、代わりに、野生株にはほとんど見られない GlcDG を高蓄積する。この変異体は、光合成活性や増殖にある程度の阻害を示すが、チラコイド膜を形成し光独立的に生育できることから、ガラクト脂質が無くても、GlcDG を合成できれば光合成や生育を行えることが明らかである。GlcDG も極性頭部がグルコース 1 分子のみと小さいため、非ラメラ脂質としての MGDG の役割を代替できるのかもしれない。

DGDG に関しては、植物でもシアノバクテリアの *Synechocystis* sp. PCC 6803 でも、その合成を失うと光合成の活性や光化学系への障害に対する耐性が低下するが (Dörmann *et al.*, 1995; Hölzl *et al.*, 2009; Mizusawa *et al.*, 2009; Sakurai *et al.*, 2007), 生育自体は可能である。ただし、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 では DGDG が生育に必須であることが示されており (Maida & Awai, 2016), その要求性は種によって異なる。シロイヌナズナの DGDG 欠損変異体は、野生株と同様に発達したグラナを含むチラコイド膜を形成することができるが、チラコイド膜の著しい湾曲がおこるため、この脂質がチラコイド膜の正常な形態維持に必須であるのは間違いない (Dörmann *et al.*, 1995; Hölzl *et al.*, 2009)。一方、SQDG 合成の欠損は、シロイヌナズナのチラコイド膜の形成に明らかな影響を与えない (Yu & Benning, 2003)。しかし、緑藻のクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) では、SQDG の欠損によりチラコイド膜の異常な湾曲が起こることが報告されている (Sato *et al.*, 1995)。また、DGDG と同様、シアノバクテリアにおいては SQDG を必須とする種 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) (Aoki *et al.*, 2004) と、しない種 (*S. elongatus* PCC 7942 や *Thermosynechococcus elongatus* BP-1) (Endo *et al.*, 2016; Güler *et al.*, 1996) がおり、さらに原始的なシアノバクテリアに近いとされる *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 はそもそも SQDG をもたないことから (Selstam & Campbell, 1996), SQDG がどれほど生育に重要かは種によってさまざまである。

DGDG や SQDG と異なり、PG は、これまで調べられたすべての種において、光合成や生育に必須であることが示されている (Kobayashi, 2016)。葉緑体の PG 合成を欠損したシロイヌナズナ変異体では光合成電子伝達活性が大幅に低下するが、それと同時に、チラコイド膜の形成自体が著しく損なわれるため、PG が光合成に必須であるのは確かであるが、二次的な影響も大きく、光合成の各反応に直接的にどのように関与するのかは定かでない。一方、シアノバクテリアは培地に与えた PG を細胞内に取り込むことができるため、PG 欠損変異体を PG を含む培地で育てたのちに、培地から PG を取り除くことで、細胞内の PG が減少していく際の光合成活性の変化などが詳細に調べられてきた。その結果、特に光化学系における PG の機能が数多く明らかになった。光化学系の反応機構は植物とシアノバクテリアでかなり共通しているため、PG の機能の多くは、植物においても保存されていると考えられている。光合成における PG の機能の詳細については、遠藤ら (2015) の総説などを参考にされたい。

この章の最後に、植物とシアノバクテリアに共通する、PG と SQDG の相補的な関係について述べたい。リン脂質である PG と糖脂質である SQDG はともに負に帯電した極性頭部を持ち、酸性脂質に分類される。先に述べたように、シロイヌナズナや *S. elongatus* PCC 7942 は SQDG を欠損しても特に生育に明らかな影響をみせず、クラミドモナスや *T. elongatus* BP-1 は光合成活性にある程度の影響を示すものの、生育が大きく阻害されることはない。これらの SQDG 欠損変異体に共通するのは、SQDG が減少している代わりに、PG の割合が増加している点である (Endo *et al.*, 2016; Güler *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2002)。このことから、同じ酸性脂質である PG が SQDG の減少分を補い、酸性脂質の総量を一定に保っていると考えられる。実際、SQDG 合成の欠損変異に加え、点突然変異により葉緑体の PG 合成活性が低下したシロイヌナズナの二重変異体では、生育が著しく阻害されることが分かっており (Yu & Benning, 2003)、PG と SQDG が相補的に働くことは確かなようだ。また、*T. elongatus* BP-1 を用いた結晶構造解析から、光化学系 II 複合体内の SQDG が占めていた場所を、SQDG 欠損変異体では代わりに PG が占めている可能性が示されている (Nakajima *et al.*, 2018)。このような相補的な関係は、遺伝子改変のような人工的な状況下だけでなく、実際の自然条件でも働くことが分かっており、その代表例が、硫黄欠乏やリン欠乏条件である。硫黄欠乏時には SQDG の分解が促進されるが、それに伴い PG の含量が増加し、結果として酸性脂質の総量は保たれることが、クラミドモナスを用いた研究により報告されている (Sugimoto *et al.*, 2008)。また、それとは逆に、リン欠乏時にはリン脂質である PG の含量が減少するが、その減少分を補うように、SQDG の含量が増加する。この応答は、陸上植物、藻類、シアノバクテリアで広く見られ、SQDG 合成を欠損したクラミドモナスやシアノバクテリアはリン欠乏条件下で野生株よりも生育が悪くなることから、SQDG による PG の相補が、リン欠乏時のこれらの生物の生育に重要であることが確かめられている (Endo *et al.*, 2016; Güler *et al.*, 1996; Riekhof *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2002)。ここで一つ強調したいのは、SQDG が相補できる PG の機能は限られる点である。これは、上述のように、PG 合成を欠損した光合成生物がすべて致死的事であることから明らかである。また、チラコイド膜をほとんど形成できないシロイヌナズナの PG 合成欠損変異体をリン欠乏条件下で育てたところ、SQDG やガラクト脂質の含量が増加しチラコイド膜が形成されたことから、これらの糖脂質、特におそらく SQDG が、チラコイド膜形成における PG の役割を相補したと考えられるが、光合成活性は回復するどころか、むしろさらに減少してしまった (Kobayashi *et al.*, 2015)。この結果から、SQDG はチラコイド膜形成における PG の役割は相補できても、光合成反応においてはできないことを示している。

## 5. 植物にみられる多様な糖脂質代謝

ここまで見てきたように、糖脂質を主成分とする葉緑体の脂質組成はシアノバクテリアとよく似ており、また、そのような組成は植物細胞の他の膜系では見られないことから、糖脂質の役割は、葉緑体や光合成の機能と関連付けて考えられることが多かった。しかし以下で紹介するように、近年、糖脂質が葉緑体の内外で光合成以外にも様々な役割を担うことが明らかになってきている。

### 5-1. DGDG によるリン脂質の代替

リン欠乏時には SQDG の合成量を増やし PG の減少を補う仕組みが、シアノバクテリアから藻類、陸上植物に広く共通して存在することを第 4 章で説明した。さらに植物では、リン欠乏時に DGDG の合成量も顕著に増加することが知られている。酸性の SQDG が同じ葉緑体の酸性脂質である PG を相補するのに対し、DGDG は葉緑体（色素体）外で減少したリン脂質を補うと考えられている。実際、シロイヌナズナにおける実験から、リン欠乏時には葉緑体以外の膜における DGDG の含量が大幅に増加することが示され (Härtel *et al.*, 2000), さらに、シロイヌナズナの培養細胞を用いた解析から、通常はほとんどミトコンドリア膜に存在しない DGDG が、リン欠乏後にはその全脂質の約 20%を占めることが報告された (Jouhet *et al.*, 2004)。また、リン欠乏条件下で育てられた 4 週目のオートムギでは、シュートから得られた細胞膜の全グリセロ脂質のうち約 50%が、根の細胞膜では約 70%が DGDG で占められることも明らかになった (Andersson *et al.*, 2003)。類似した結果がインゲンマメの根でも見られていることから (Russo *et al.*, 2007), これらの現象は、少なくとも被子植物に広く共通するものと思われる。これらの種では、DGDG の増加に対してリン脂質は種類を問わず全般的に減少していることから、DGDG は特異的にどれか 1 つのリン脂質を代替するというよりは、脂質二重層の主要な構成要素として膜を全体的に支えているのだろう。

このような DGDG による膜脂質転換の重要性は、シロイヌナズナの MGDG 合成酵素遺伝子の変異体解析から明らかになった。シロイヌナズナの *MGDI* (*AtMGDI*) のホモログである *AtMGD2* と *AtMGD3* はリン欠乏時に特異的に発現上昇するのだが (Kobayashi *et al.*, 2004), これらの遺伝子の二重変異体では、リン欠乏時に見られる根での DGDG 含量の増加がほとんど起こらなかった (Kobayashi *et al.*, 2009)。*AtMGD2* と *AtMGD3* の欠損は MGDG の含量には影響しなかったため、これらのホモログは、MGDG を膜構成要素としてではなく、リン欠乏時の DGDG 合成の基質として供給していると思われる。さらに重要な発見として、*AtMGD2* と *AtMGD3* の二重変異体では、リン欠乏時の植物の成長が野生株よりも悪いことが明らかになった (Kobayashi *et al.*, 2009)。この結果から、リン欠乏時にこれらの酵素を介して合成される DGDG は、おそらくリン脂質を代替することで植物の成長を助けられていると考えられる。

### 5-2. 生殖器官におけるガラクト脂質の役割

リン欠乏時の DGDG 合成に寄与することが分かったシロイヌナズナの *AtMGD2* と *AtMGD3* であるが、これらの遺伝子のプロモーター解析を行ったところ、リン欠乏時以外にも、葯や花粉、さらには受粉後に柱頭内を伸びた花粉管の中で強い発現を示すことが明らかになった (Kobayashi *et al.*, 2004)。シロイヌナズナの花粉は小さく脂質分析は困難なため、テッポウユリの花粉管を *in vitro* で伸長させその脂質組成を調べたところ、花粉管伸長後に MGDG や DGDG の含量が増加することが判明した (Nakamura *et al.*, 2009)。さらに、DGDG に対する抗体を用いた免疫蛍光解析から、伸びたシロイヌナズナ花粉管の細胞膜に DGDG が蓄積することも示された (Botté *et al.*, 2011)。上述の *AtMGD2* と *AtMGD3* の二重変異体は花粉管伸長に影響を示さなかったが、主要な MGDG 合成酵素遺伝子である *AtMGDI* も花粉である程度発現するため、*AtMGDI* が *AtMGD2* や *AtMGD3* の花粉での機能を相補したと考えられる。実際、MGDG

合成酵素に対する特異的阻害剤を用いた研究から、MGDG 合成を全体的に阻害するとシロイヌナズナの花粉管伸長も阻害されることが示されており (Botté *et al.*, 2011), 花粉管伸長におけるガラクト脂質合成の重要性が確かめられている。花粉管伸長時には花粉細胞から非常に長い膜を伸ばさなければならないため、ガラクト脂質が細胞膜の伸長に一役買っているのかもしれない。

シロイヌナズナの *AtMGD2* と *AtMGD3* の遺伝子欠損は生殖過程に明らかな負の影響を与えなかったが、イネでは、それらのオルソログである *OsMGD2* 遺伝子の欠損により、植物の成長や葉のクロロフィル含量に軽微な影響を与えることが報告されている (Basnet *et al.*, 2019b)。さらに注目すべき結果として、*OsMGD2* は葍や胚乳で高い発現を示し、その遺伝子の機能欠損変異は結実率の低下を引き起こすことが明らかにされた。イネには、葍で特異的に高発現する DGDG 合成酵素遺伝子のホモログ (*OsDGD2β*) も存在する。ゲノム編集によりその遺伝子を破壊した株では、花粉の発達が阻害され、雄性不稔となることが示された (Basnet *et al.*, 2019a)。ペチュニアの解析からも、雄ずいや雌ずいなどの生殖器官にガラクト脂質が高蓄積するという報告がなされている (Nakamura *et al.*, 2009)。これらの結果は、葉緑体の発達しない生殖器官でもガラクト脂質が盛んに合成され、重要な役割を果たしていることを示している。

### 5-3. オリゴガラクト脂質とストレス応答

MGDG や DGDG に加え、さらに多数のガラクトースが結合したオリゴガラクト脂質がさまざまな植物サンプルから検出されることが、古くから知られていた (Gasulla *et al.*, 2019; Kelly & Dörmann, 2004)。その機能や合成経路は長らく分かっていなかったが、2010 年に、凍結耐性が低下した変異体 *sfr2* (*sensitive to freezing 2*) の原因遺伝子が、オリゴガラクト脂質を合成する酵素 (galactolipid:galactolipid galactosyltransferase, GGGT) をコードすることが明らかになり (Moellering *et al.*, 2010), 理解が急速に進んでいる。

MGDG 合成酵素は、最初のガラクトースを  $\beta$  配位で導入する。DGDG 合成酵素は、そこに 2 つ目のガラクトースを  $\alpha$  配位で結合するが、GGGT は MGDG を基質に、 $\beta$  配位でガラクトースを 2 つ ( $\beta\beta$  配位の DGDG), 3 つ (trigalactosyldiacylglycerol, TGDG), 4 つ (tetragalactosyldiacylglycerol, TeGDG) と付加していくため (図 3), 結合したガラクトースはすべて  $\beta$  アノマーという特徴がみられる (図 2)。至適条件下で育ったシロイヌナズナには、GGGT が合成した  $\beta\beta$  型の DGDG はほとんどなく、TGDG や TeGDG も検出されない。しかし、凍結ストレスにさらされたシロイヌナズナでは DGDG 含量が増え、TGDG や TeGDG の蓄積がみられる (Moellering *et al.*, 2010)。GGGT は MGDG を基質に使うため、オリゴガラクト脂質の蓄積に伴い MGDG 含量は減少する。結果として、ラメラ構造を取りづらい MGDG の割合を減らすとともに、水との親和力が強いオリゴガラクト脂質を増やすことで、GGGT は凍結による葉緑体膜へのダメージを防ぐと推測されている。

シロイヌナズナの凍結感受性変異体の原因遺伝子として見つかった *SFR2* であるが、凍結耐性の有無にかかわらず、陸上植物は普遍的にこの遺伝子のホモログを持つことが知られている (Gasulla *et al.*, 2019)。それでは、そもそも凍結耐性を有しない植物では、*SFR2* はどのような役割を担っているのだろうか。その 1 つの答えがトマトの研究により示された。凍結耐性

を持たないトマトでは、乾燥や塩ストレスを受けたときにオリゴガラクト脂質が蓄積することが分かり、また、トマトの *SFR2* 発現抑制株では、その蓄積がほとんど起こらず、乾燥や塩ストレスに弱くなった (Wang *et al.*, 2016)。シロイヌナズナの凍結時と同じように、トマトでは、おそらく MGDG の減少とオリゴガラクト脂質の増加により、脱水や浸透圧変化による葉緑体膜の不安定化を防止しているのだろう。興味深いことに、シロイヌナズナでは *SFR2* は乾燥や塩ストレス時には働かない (Wang *et al.*, 2016)。どのようなときに *SFR2* が働くかは、その種がどのような環境で進化してきたのかによって異なるのだろう。*SFR2* は、コケ植物から被子植物まで広く保存されており、緑藻と陸上植物の中間に位置する車軸藻植物門の *Klebsormidium nitens* (以前は *K. flaccidum* と同定されていた) のゲノムからも見つかっている (Hori *et al.*, 2016)。陸上で生きるには、乾燥や大幅な温度変化、塩濃度や浸透圧の変化など、様々なストレスに適応する必要がある。こういった背景から、*SFR2* は植物の陸上化に関与する遺伝子の一つであると推測されている。

このように、GGGT 活性を担う酵素とそれをコードする *SFR2* 遺伝子の解析により、 $\beta$  配位で結合したオリゴガラクト脂質については、その合成経路や役割が分かっている。一方で、ジャガイモの塊茎やイネの種子などの多くの植物組織から、 $\alpha$  配位のガラクトースを含むオリゴガラクト脂質が発見されている (Gasulla *et al.*, 2019; Kelly & Dörmann, 2004)。それらの脂質は GGGT の活性によるものではないと思われ、その合成経路や機能について、今後の研究が待たれるところである。

#### 5-4. グルクロノシルジアシルグリセロールの合成と役割

植物の SQDG 合成は、SQD1 による UDP-スルホキノボースの合成と、SQD2 による DAG へのスルホキノボース転移反応によって行われる (図 3)。シロイヌナズナではどちらの酵素遺伝子もシングルコピーのため、*SQD1* も *SQD2* も、ノックアウト変異体は SQDG をまったく合成できない。にもかかわらず、リン欠乏条件下では、*sqd1* 変異体よりも *sqd2* 変異体の方がより強い生育阻害を示す (Okazaki *et al.*, 2013)。それはなぜか。その疑問を解く鍵は、シロイヌナズナで新たに発見されたグルクロノシルジアシルグリセロール (GlcADG) という酸性の糖脂質にあった。Okazaki *et al.* (2013) は、シロイヌナズナ野生株はリン欠乏時に SQDG のほかに GlcADG を蓄積すること、*sqd1* 変異体も野生株と同様に GlcADG を蓄積するが、*sqd2* はしないことを明らかにした。このことから、*sqd2* 変異体は SQDG だけでなく GlcADG も欠損した結果、リン欠乏下での生育が *sqd1* よりも強く阻害された可能性が指摘された。SQDG と GlcADG は、スルホ基とカルボキシル基という違いはあるものの、どちらも極性頭部のグルコースの 6 位に酸性の官能基を持つことから、SQD2 はスルホキノボース転移に加え、UDP-グルクロン酸を基質に、DAG へのグルクロン酸転移反応も触媒するという仮説が提唱されている。リン欠乏に応答した GlcADG の蓄積は、イネやトマト、ダイズでも確認されているので (Okazaki *et al.*, 2015)、被子植物に広く共通する仕組みだと考えられる。前述のように、分子進化解析から、SQD2 は一次共生以前から植物の祖先細胞に備わっていたと推測されている。そうだとすると、GlcADG を合成する活性はいつ頃獲得したのだろうか。SQD2 による GlcADG 合成活性の直接的な証拠はまだ得られていないことから、GlcADG を合成する種の



分布の解明に加え、それを担う酵素の生化学的な解析も重要となるだろう。

## 6. おわりに

藻類や植物の葉緑体はシアノバクテリアとよく似た特徴的な脂質をもつことから、そのような脂質組成は一次共生に由来するだろうという考えが一般的で、筆者らもそう考えていた。しかし、葉緑体やシアノバクテリアの脂質合成に関わる遺伝子が突き止められ、その分子系統関係が明らかになった今、その考えをもう一度見直す時期に来ているように思う。もし Sato (2020) で提唱されているように、*MGDI* や *SQD2* が一次共生の前、つまり葉緑体を獲得する以前にすでに植物の祖先となる細胞に備わっていたとすれば、それらの遺伝子は葉緑体や光合成とは無関係に働いていたはずである。例えば、リン欠乏時にリン脂質を糖脂質で置き換えられる利点は光合成生物に限った話ではなく、実際、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* / *Rhizobium radiobacter*) はリン欠乏に応答して GlcDG や、DGDG, GlcADG など複数種の糖脂質を合成することが知られている (Semeniuk *et al.*, 2014)。同様に、一次共生以前の植物の祖先細胞においても、*MGDI* や *SQD2* による糖脂質合成系は、リン欠乏応答におけるリン脂質の代替を主な機能としていたかもしれない。また、事前にそのような代謝系を持っていたからこそ、植物の祖先細胞はシアノバクテリアと共生することができたのかもしれない。タイムマシンでもできない限り、これらの想像に対する直接の証拠が得られることはないが、現存するアーキアの解析から真核生物の起源が少しずつ明らかになってきているように、今後多種多様な生物の研究から、新たな情報をもたらされることだろう。

最後に、特に強調したい点は、現在の植物においても、糖脂質の役割を葉緑体の機能に限定する必要は無い、ということである。*MGDG* や *DGDG* は光合成器官だけでなく、生殖過程でも重要な働きをしており、また、リン欠乏時には根でもリン脂質の代替という役割を担う。これまで、このような知見を紹介する際には、「植物はシアノバクテリアの一次共生により獲得した糖脂質合成系を、光合成や葉緑体の機能以外に用いるように進化したのだろう」と説明することもあったが、これも今後再考する必要があるだろう。同様に、*SQDG* や *GlcADG* も、葉緑体以外で重要な役割を担っていても、不思議ではない。さらに、陸上植物は、*MGDG* を材料にオリゴガラクト脂質を合成する代謝経路も獲得している。*SFR2* によるオリゴガラクト脂質合成経路の獲得が凍結や乾燥などへの耐性を高め、植物の陸上進出を可能にしたのかもしれない。*SFR2* が担う  $\beta$  アノマー型のオリゴガラクト脂質以外にも多様なガラクト脂質が植物で見つかっており、それらの合成経路や機能の解明に向けた、さらなる研究の進展にも期待したい。

## 謝辞

本稿を作成するにあたり貴重なご助言を賜った佐藤直樹博士に御礼申し上げます。

## 引用文献

- Alban, C., Joyard, J., & Douce, R. 1988. Preparation and characterization of envelope membranes from nongreen plastids. *Plant Physiol.* 88: 709–717.
- Andersson, M.X., Stridh, M.H., Larsson, K.E., Liljenberg, C., & Sandelius, A.S. 2003. Phosphate-

- deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* 537: 128–132.
- Aoki, M., Sato, N., Meguro, A., & Tsuzuki, M. 2004. Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria. *Eur J Biochem.* 271: 685–693.
- Aronsson, H., Schöttler, M.A., Kelly, A.A., Sundqvist, C., Dörmann, P., Karim, S., *et al.* 2008. Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves. *Plant Physiol.* 148: 580–592.
- Awai, K., Kakimoto, T., Awai, C., Kaneko, T., Nakamura, Y., Takamiya, K., *et al.* 2006. Comparative genomic analysis revealed a gene for monoglucosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis. *Plant Physiol.* 141: 1120–1127.
- Awai, K., Ohta, H., & Sato, N. 2014. Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111: 13571–13575.
- Awai, K., Watanabe, H., Benning, C., & Nishida, I. 2007. Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation. *Plant Cell Physiol.* 48: 1517–1523.
- 栗井光一郎. 2015. 光合成生物におけるガラクト脂質合成経路の分布と進化. 光合成研究 25: 143-150.
- Basnet, R., Hussain, N., & Shu, Q. 2019a. *OsDGD2β* is the sole digalactosyldiacylglycerol synthase gene highly expressed in anther, and its mutation confers male sterility in rice. *Rice.* 12: 66.
- Basnet, R., Zhang, J., Hussain, N., & Shu, Q. 2019b. Characterization and mutational analysis of a monogalactosyldiacylglycerol synthase gene *OsMGD2* in rice. *Front Plant Sci.* 10: 992.
- Botté, C.Y., Deligny, M., Roccia, A., Bonneau, A.-L., Saïdani, N., Hardré, H., *et al.* 2011. Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Chem Biol.* 7: 834–842.
- Dörmann, P., Balbo, I., & Benning, C. 1999. *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science* 284: 2181–2184.
- Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I., & Benning, C. 1995. Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell.* 7: 1801–1810.
- Dorne, A.J., Joyard, J., & Douce, R. 1990. Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 71–74.
- Endo, K., Kobayashi, K., & Wada, H. 2016. Sulfoquinovosyldiacylglycerol has an essential role in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 under phosphate-deficient conditions. *Plant Cell Physiol.* 57: 2461–2471.
- 遠藤嘉一郎, 小林康一, 和田元. 2015. 光合成タンパク質複合体と脂質. 光合成研究 25: 116-125.
- Fujii, S., Kobayashi, K., Nakamura, Y., & Wada, H. 2014. Inducible knockdown of

- MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE1* reveals roles of galactolipids in organelle differentiation in *Arabidopsis* cotyledons. *Plant Physiol.* 166: 1436–1449.
- Garab, G. 2014. Hierarchical organization and structural flexibility of thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1837: 481–494.
- Gasulla, F., García-Plazaola, J.I., López-Pozo, M., & Fernández-Marín, B. 2019. Evolution, biosynthesis and protective roles of oligogalactolipids: Key molecules for terrestrial photosynthesis? *Environ Exp Bot.* 164: 135–148.
- Güler, S., Seeliger, A., Härtel, H., Renger, G., & Benning, C. 1996. A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *J Biol Chem.* 271: 7501–7507.
- Härtel, H., Dörmann, P., & Benning, C. 2000. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 10649–10654.
- Hölzl, G., Witt, S., Gaude, N., Melzer, M., Schöttler, M.A., & Dörmann, P. 2009. The role of diglycosyl lipids in photosynthesis and membrane lipid homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 150: 1147–1159.
- Hori, K., Nobusawa, T., Watanabe, T., Madoka, Y., Suzuki, H., Shibata, D., *et al.* 2016. Tangled evolutionary processes with commonality and diversity in plastidial glycolipid synthesis in photosynthetic organisms. *Biochim Biophys Acta.* 1861: 1294–1308.
- Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J., & Block, M.A. 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol.* 167: 863–874.
- Kelly, A.A., & Dörmann, P. 2004. Green light for galactolipid trafficking. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 262–269.
- Kobayashi, K. 2016. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res.* 129: 565–580.
- Kobayashi, K., Awai, K., Nakamura, M., Nagatani, A., Masuda, T., & Ohta, H. 2009. Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant J.* 57: 322–331.
- Kobayashi, K., Awai, K., Takamiya, K., & Ohta, H. 2004. *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol.* 134: 640–648.
- Kobayashi, K., Fujii, S., Sato, M., Toyooka, K., & Wada, H. 2015. Specific role of phosphatidylglycerol and functional overlaps with other thylakoid lipids in *Arabidopsis* chloroplast biogenesis. *Plant Cell Rep.* 34: 631–642.
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., & Ohta, H. 2007. Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 17216–17221.
- Kobayashi, K., Narise, T., Sonoike, K., Hashimoto, H., Sato, N., Kondo, M., *et al.* 2013. Role of galactolipid biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 73: 250–261.
- Maida, E., & Awai, K. 2016. Digalactosyldiacylglycerol is essential in *Synechococcus elongatus* PCC

- 7942, but its function does not depend on its biosynthetic pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1861: 1309–1314.
- Mizusawa, N., Sakurai, I., Sato, N., & Wada, H. 2009. Lack of digalactosyldiacylglycerol increases the sensitivity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light stress. *FEBS Lett*. 583: 718–722.
- Moellering, E.R., Muthan, B., & Benning, C. 2010. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* 330: 226–228.
- Murphy, D.J. 1982. The importance of non-planar bilayer regions in photosynthetic membranes and their stabilisation by galactolipids. *FEBS Lett*. 150: 19–26.
- Nakajima, Y., Umena, Y., Nagao, R., Endo, K., Kobayashi, K., Akita, F., *et al.* 2018. Thylakoid membrane lipid sulfoquinovosyl-diacylglycerol (SQDG) is required for full functioning of photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*. *J Biol Chem*. 293: 14786–14797.
- Nakamura, Y., Kobayashi, K., & Ohta, H. 2009. Activation of galactolipid biosynthesis in development of pistils and pollen tubes. *Plant Physiol Biochem*. 47: 535–539.
- Okazaki, Y., Nishizawa, T., Takano, K., Ohnishi, M., Mimura, T., & Saito, K. 2015. Induced accumulation of glucuronosyldiacylglycerol in tomato and soybean under phosphorus deprivation. *Physiol Plant*. 155: 33–42.
- Okazaki, Y., Otsuki, H., Narisawa, T., Kobayashi, M., Sawai, S., Kamide, Y., *et al.* 2013. A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion. *Nat Commun*. 4: 1510.
- Riekhof, W.R., Ruckle, M.E., Lydic, T.A., Sears, B.B., & Benning, C. 2003. The sulfolipids 2'-O-Acyl-sulfoquinovosyldiacylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol are absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deleted in *SQD1*. *Plant Physiol*. 133: 864–874.
- Russo, M.A., Quartacci, M.F., Izzo, R., Belligno, A., & Navari-Izzo, F. 2007. Long- and short-term phosphate deprivation in bean roots: Plasma membrane lipid alterations and transient stimulation of phospholipases. *Phytochemistry*. 68: 1564–1571.
- Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H., & Sato, N. 2007. Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Plant Physiol*. 145: 1361–1370.
- Sato, N. 2020. Complex origins of chloroplast membranes with photosynthetic machineries: multiple transfers of genes from divergent organisms at different times or a single endosymbiotic event? *J Plant Res*. 133: 15–33.
- Sato, N., Tsuzuki, M., Matsuda, Y., Ehara, T., Osafune, T., & Kawaguchi, A. 1995. Isolation and characterization of mutants affected in lipid metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*. 230: 987–993.
- Selstam, E., & Campbell, D. 1996. Membrane lipid composition of the unusual cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* sp. PCC 7421, which lacks sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Arch Microbiol*. 166: 132–135.
- Semeniuk, A., Sohlenkamp, C., Duda, K., & Hözl, G. 2014. A bifunctional glycosyltransferase from *Agrobacterium tumefaciens* synthesizes monoglucosyl and glucuronosyl diacylglycerol under phosphate deprivation. *J Biol Chem*. 289: 10104–10114.
- Shimajima, M., Ohta, H., Iwamatsu, A., Masuda, T., Shioi, Y., & Takamiya, K. 1997. Cloning of the

- gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci*. 94: 333–337.
- Shipley, G.G., Green, J.P., & Nichols, B.W. 1973. The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *Biochim Biophys Acta*. 311: 531–544.
- Sugimoto, K., Midorikawa, T., Tsuzuki, M., & Sato, N. 2008. Upregulation of PG synthesis on sulfur-starvation for PS I in *Chlamydomonas*. *Biochem Biophys Res Commun*. 369: 660–665.
- Wada, H., & Murata, N. 1989. *Synechocystis* PCC6803 mutants defective in desaturation of fatty acids. *Plant Cell Physiol*. 30: 971–978.
- Wang, K., Hersh, H.L., & Benning, C. 2016. SENSITIVE TO FREEZING2 aides in resilience to salt and drought in freezing-sensitive tomato. *Plant Physiol*. 172: 1432–1442.
- Wu, W., Ping, W., Wu, H., Li, M., Gu, D., & Xu, Y. 2013. Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in tobacco inhibits the cytochrome  $b_6/f$ -mediated intersystem electron transport process and affects the photostability of the photosystem II apparatus. *Biochim Biophys Acta*. 1827: 709–722.
- Yoshida, S., & Uemura, M. 1986. Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol*. 82: 807–812.
- Yu, B., & Benning, C. 2003. Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *Plant J*. 36: 762–770.
- Yu, B., Xu, C., & Benning, C. 2002. *Arabidopsis* disrupted in *SQD2* encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 5732–5737.

## 気孔細胞に存在する葉緑体の成り立ちとその機能

衞 淳太郎, 小畑 智暉, 宋 普錫  
九州大学 大学院 理学研究院  
〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

### A new perspective on the feature and function of guard cell chloroplasts

Juntaro Negi, Tomoki Obata, Boseok Song  
Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University,  
744 Motoooka, Nishi-Ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

Keywords: Arabidopsis, Guard cell chloroplasts, Lipid metabolism, Stomatal movement

DOI: 10.24480/bsj-review.12a5.00198

#### 1. はじめに

陸上植物は組織・細胞ごとに、それぞれ異なる特徴を持つ葉緑体を保持しており、葉肉細胞の葉緑体は、植物の光合成において中心的な役割を果たしている。一方、植物のガス交換を担う気孔（孔辺）細胞にも葉緑体が存在するが、その機能については1世紀以上、研究者の間で議論されているものの結論が出ておらず (Zeiger *et al.* 2002)、また成り立ちに関しては全くわかっていない。最近、筆者らは気孔細胞の葉緑体が欠失したシロイヌナズナ変異体を単離し、その変異体の解析から、気孔葉緑体はCO<sub>2</sub>や光などの環境情報感知に必須であることを明らかにした (Negi *et al.* 2018)。また気孔葉緑体は葉肉細胞の葉緑体とは異なる独自の脂質代謝バランスを維持しており、そのことが気孔葉緑体の形成に寄与していることを明らかにした。本稿では、これらの研究成果および、これまでに行われてきた気孔葉緑体研究を概説し、なぜ気孔細胞は葉緑体を保持するのか？ その生理学的意義について議論する。

#### 2. 気孔葉緑体の特徴

ランの一種であるパフィオペディラム (*Paphiopedilum*) を除いて、ほとんどの植物種において気孔細胞には葉緑体が存在する。気孔細胞に含まれる葉緑体の数は植物種によって大きく異なるが、平均10-15個程度である。気孔葉緑体は、葉肉葉緑体と比較して1) サイズが一回り小さく、2) チラコイド膜が発達しておらず、3) デンプンを高蓄積するといった形態的特徴を持つ (図1)。また、気孔葉緑体が示すユニークな性質として、葉肉葉緑体は光が当たるとデンプンを蓄積し、暗闇になると分解するのに対し、気孔葉緑体は暗闇でデンプンを蓄積し、光が当たると分解する (Willmer & Fricker 1996)。また、葉肉葉緑体の集光アンテナタンパク質LHCPIIは光が当たるとリン酸化され、暗闇で脱リン酸化されるが、気孔葉緑体のLHCPIIは真逆の反応を示す (Kinoshita *et al.* 1993)。またCO<sub>2</sub>固定の主要酵素であるルビスコの活性が気孔葉緑体では葉肉葉緑体と比較して低いことが報告されている (Gotow

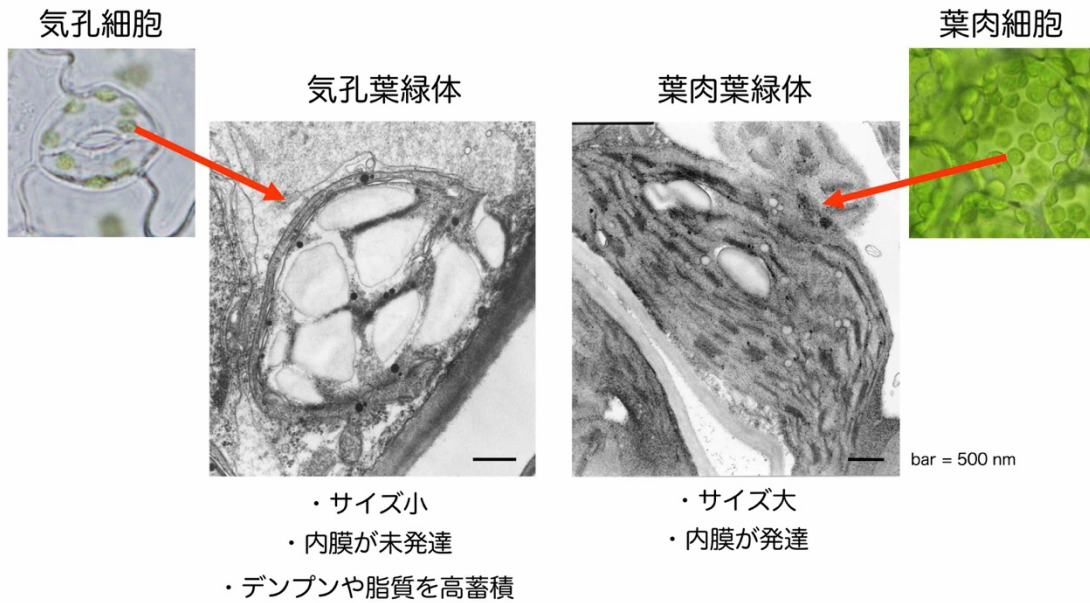


図1 気孔葉緑体と葉肉葉緑体の構造的な違い

シロイヌナズナの気孔葉緑体及び葉肉葉緑体を電子顕微鏡で観察した際の画像。白く抜けている構造体は貯蔵デンプン。図の一部はNegi *et al.* (2018)から転載

*et al.* 1988)。これらの特徴から、気孔葉緑体は葉肉葉緑体とは異なる機能を有し、独自の形成メカニズムが存在すると推察される。これまで、気孔葉緑体は光合成装置としての機能に着目した研究が主におこなわれており、気孔葉緑体は蓄積したデンプンや光合成産物を、リンゴ酸やショ糖に変換することで気孔細胞の浸透圧を上昇させ、気孔開口を促進すると考えられている (Willmer & Fricker 1996, Horrer *et al.* 2016)。また同時に、気孔開口を駆動する細胞膜型 H-ATPase (プロトンポンプ) に ATP を供給し (Tominaga *et al.* 2001)、青色光に対する気孔開口応答にも関与している (Suetsugu *et al.* 2014) と考えられている。このように、気孔葉緑体は気孔の開口に関与していることが示唆されているが、具体的にどのように機能しているのか、また気孔細胞に葉肉葉緑体とは異なる葉緑体がどのように形成されるのかについては不明な点が多いのが現状である。

### 3. 気孔葉緑体の特異的に喪失した変異体の単離

気孔は植物の体表面に分布し、体内と大気環境とをつなぐゲートとして、植物がガス交換をおこなうための必須の器官である。気孔が開くと CO<sub>2</sub> 取り込みが促進され、光合成効率が上昇する一方、水分の喪失や外敵の侵入というリスクを伴う。よって気孔開閉は外部環境に鋭敏に対応し制御されなければならない。そのため、気孔は、CO<sub>2</sub>、光、乾燥ストレス、植物病原菌刺激などの外部環境情報と、全身の代謝バランスなどの生体情報の集積地となっている。植物個体の成長や生存のために最適な体内環境を維持するように、気孔はこれらの情報を統合し、そのガス交換効率を最適化する情報処理システムを備えていると考えられる。筆者らはこの情報処理システムに着目し、これまで、ハイスループットサーマルイメージングの技法を用いたシロイヌナズナ変異体スクリーニングを精密に制御された CO<sub>2</sub> 環境下で遂行し、気孔の機能、情報制御システムに係る分子素子の探索を精力的に行ってきた (Negi *et al.* 2008, 2013, 2014)。それらの研究の中から、気孔の葉緑体特異的にクロロフィル自家蝕

光が観察されない *gles1* (*green less stomata 1*) 変異体が単離された (Negi *et al.* 2018, 図 2)。電子顕微鏡を用いてプラスチドの状態を観察すると, *gles1* 変異体は, 葉肉細胞の葉緑体は正常であるが, 気孔細胞の葉緑体はチラコイド膜がほとんど観察されず, 気孔細胞特異的に葉緑体を喪失した変異体であることが判明した。気孔における葉緑体の役割を明らかにするために, *gles1* 変異体を用いてさまざまな環境シグナルに対する気孔開閉の応答を調べた結果, *gles1* 変異体では光に対する気孔開口応答が低下していた。また高 CO<sub>2</sub> による気孔閉鎖応答も阻害され, 気孔閉鎖を駆動する S 型陰イオンチャネルの CO<sub>2</sub> による活性制御が損なわれていた。つまり, 気孔葉緑体は気孔が開く応答のみならず, CO<sub>2</sub> によって気孔が閉じる反応にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 4. 気孔葉緑体はユニークな脂質代謝バランスを保持している

*gles1* 変異体の原因遺伝子は, 葉緑体包膜上の脂質輸送体 TGD (trigalactosyldiacylglycerol) 複合体のサブユニットの一つである TGD5 をコードしていた。葉緑体膜を構成する脂質は葉緑体形成に必須であり, これらは色素体経路と小胞体経路と呼ばれる 2 つの経路から合成される (Somerville & Browse 1996, Benning *et al.* 2006)。色素体経路は色素体内で脂質合成が完結する経路であるが, 小胞体経路は色素体で合成された脂質が一度色素体から出て, 小胞体を経由して, また色素体に戻る脂質合成経路である (図 3)。TGD 複合体は, 小胞体経路において小胞体から葉緑体への脂質輸送を担っていると考えられている (Roston *et al.* 2012, Fan *et al.* 2015)。この TGD 複合体は気孔細胞, 葉肉細胞の両細胞で発現しており, なぜ *gles1* 変異により気孔細胞のみ葉緑体形成が阻害されたのかは不明であった。その原因を探るべく, 葉肉細胞と気孔細胞の脂質組成の違いを明らかにすることにした。具体的には, 植物の葉から高純度かつ大量の孔辺細胞プロトプラストと葉肉細胞プロトプラストを単離した後, 脂質を抽出し, LC-MS/MS システムにより脂質組成解析をおこなった。その結果, 気孔細胞では, 葉肉細胞と比較して色素体経路由来の脂質が減少しており, 一方で小胞体経路から合成され

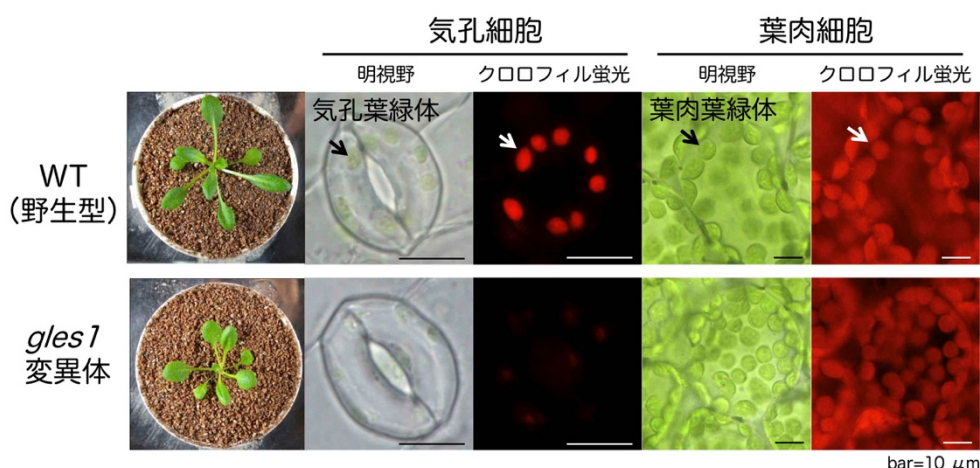


図 2 *gles1* 変異は気孔葉緑体を特異的に欠損させる

野生株の植物では, 気孔細胞、葉肉細胞ともに葉緑体の自家蛍光 (クロロフィル蛍光) が観察されるが, *gles1* 変異体では気孔細胞の葉緑体のみクロロフィル蛍光がほとんど観察されない。図の一部は Negi *et al.* (2018) から転載



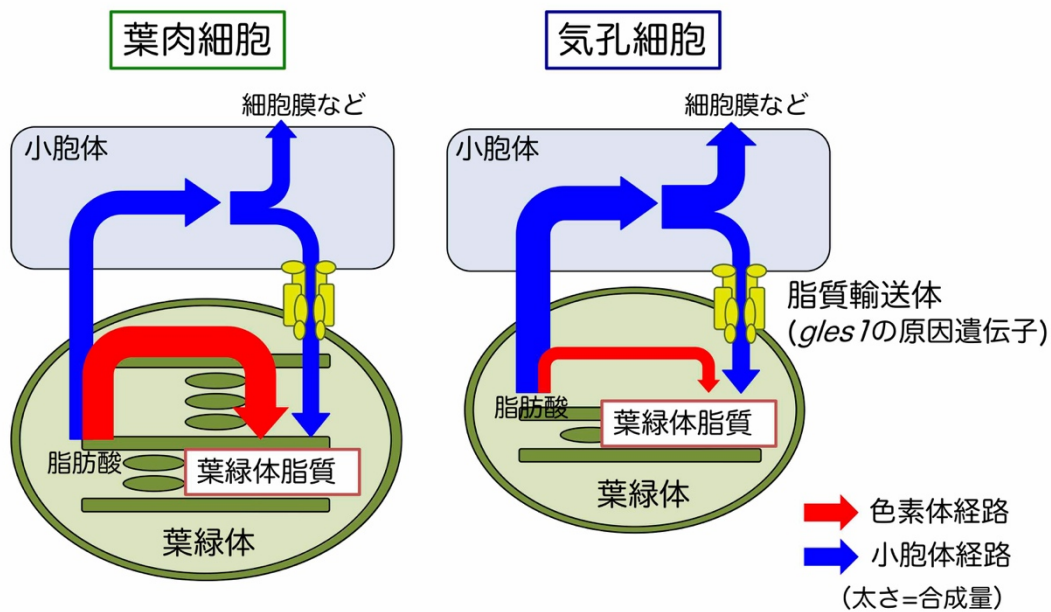


図3 気孔細胞が持つ特徴的な脂質代謝バランス

陸上植物の葉緑体膜脂質は、色素体経路（赤矢印）と小胞体経路（青矢印）の2つの経路から合成される。気孔細胞では葉肉細胞と比較して色素体経路が退化しており、小胞体経路が気孔細胞の葉緑体形成に中心的な役割を果たしている。

る脂質が増加していた（図3）。つまり気孔細胞と葉肉細胞では2つの脂質経路に対するバランスが異なり、気孔細胞では色素体経路が退化しており、その代わりに小胞体経路が中心となって、葉緑体脂質を合成していることが分かった（Negi *et al.* 2018）。したがって、小胞体経路が遮断された *gles1* 変異体では、気孔細胞において葉緑体形成が阻害されたと考えられる。現在のところ、気孔細胞が小胞体経路優位な脂質代謝バランスを保持する生理学的な意味は不明である。小胞体経路から作られる貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールは気孔開口時に分解され、気孔開口に必要な ATP を供給すると報告されている（McLachlan *et al.* 2016）。気孔細胞は小胞体経路への脂質投資を増やすことで、迅速な気孔開閉調節を可能とする細胞内環境を構築しているのかもしれない。また最近、筆者らは気孔細胞の他に根組織でも小胞体経路が優位になっており、*gles1* 変異体では地上部切除により誘導される根の葉緑体形成も阻害されることを見出した（Obata *et al.* 2021）。この結果は、気孔細胞同様、根細胞でも葉緑体形成が小胞体経路から供給される脂質に依存することを示唆している。

## 5. 今後の展望

気孔葉緑体は葉肉葉緑体とは異なる独自の脂質代謝バランスを保持しており、また気孔の開閉に必須であることが分かってきた。しかし、このような特殊な気孔葉緑体はどのように形成されるのか、また気孔葉緑体はどのような分子メカニズムで気孔開閉を制御しているのか、大きく2つの謎が残されている。

まず、最初の疑問に関して筆者らは、気孔葉緑体と葉肉葉緑体に違いを生み出す分子的なメカニズムがあるのではないかと予想している（図4A）。そこで、新たな順遺伝学的アプローチから、特殊な機能を持った気孔葉緑体の形成メカニズムの一端を明らかにしようと試み

ている。具体的には、化学変異処理したシロイヌナズナ M2 植物約 1 万個体から、気孔葉緑体のクロフィル蛍光の有無に着目した目視によるスクリーニングを行い、*gles1* 変異体と同様に気孔細胞特異的に葉緑体形成が阻害された変異体を新たに 4 つ単離し、*achs* (*achlorophyllous stomata*; *achs1-achs4*) と命名した (Song *et al.* 投稿準備中)。これらの変異体はいずれも光や CO<sub>2</sub> に対する気孔応答性が低下しており、気孔開閉調節における気孔葉緑体の重要性が再確認された。今後、*achs* 変異体の原因遺伝子の機能解析から、気孔葉緑体の分化制御を統括する因子を同定し、気孔細胞と葉肉細胞の葉緑体に違いを生み出す仕組みに迫りたいと考えている。

また、これまで筆者らは気孔葉緑体が気孔閉鎖を駆動する細胞膜型アニオンチャンネルの活性制御にも関わることを明らかにした (Negi *et al.* 2018)。この結果は、気孔葉緑体から細胞膜へ何らかの情報伝達があることを示唆している。そこで、2 つ目の疑問に関して筆者らは、気孔葉緑体には光、CO<sub>2</sub>、乾燥など各種環境シグナルを感知するセンサーが存在し、これらの情報を統合し、気孔の開閉の要となるイオンチャンネルやポンプに未知の葉緑体シグナルを伝えるという仮説をたてている (図 4B)。この可能性を検証するために、筆者らは高純度の無傷気孔葉緑体を大量に単離精製する技法を開発中であり、気孔葉緑体の成り立ちや機能をより深く知る上で有用なツールになると考えられる。

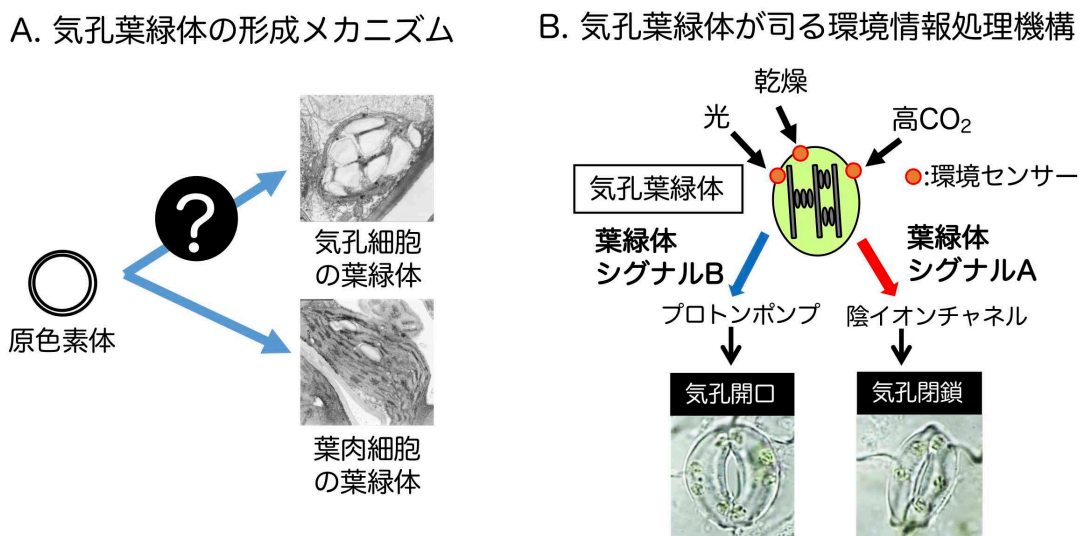


図 4 気孔葉緑体研究における今後の課題

気孔葉緑体と葉肉葉緑体の違いを生み出す仕組み(A)、気孔葉緑体が気孔の開閉を制御する分子メカニズム(B)については未解明である。これまでの研究を踏まえて立てた仮説を図示した。気孔葉緑体形成を統括する因子や気孔葉緑体が発信するシグナルが存在するかもしれない。

葉緑体は光合成をおこなう細胞小器官として認知されているが、これまでの研究に鑑みると、気孔葉緑体は単なる光合成装置ではなく、環境を感知し指示を出す、いわば司令塔として機能するのではないかと考えられる (本シンポジウム企画で提案されたオルガネラとその外側との積極的な関わりの一例)。気孔は葉肉細胞の光合成に必要な CO<sub>2</sub> の取り込みを担うバルブである。葉肉葉緑体の CO<sub>2</sub> 要求性にすばやく答えるため、気孔葉緑体には環境変化を感知する役割が付与され、光合成に最適な開度調節を実現しているのかもしれない。今後、気

孔葉緑体が担う環境情報処理システムを分子解明することで、なぜ気孔細胞は葉緑体を保持するのか？植物科学の長年の謎に決着をつけることができると期待される。

## 謝辞

九州大学理学研究院の射場教授をはじめ、カリフォルニア大学 SD 校の Schroeder 教授、岡山大学農学部宗正准教授に感謝申し上げます。本研究は、内藤記念科学奨励金、住友財団基礎科学研究助成、日本学術振興会・科学研究費補助金 基盤研究 C (18K06293)、特別研究員奨励費 (20J13660) の支援を受けた。

## 引用文献

- Benning, C., Xu, C., & Awai, K. 2006. Non-vesicular and vesicular lipid trafficking involving plastids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 241–247.
- Fan, J., Zhai, Z., Yan, C., & Xu, C. 2015. *Arabidopsis* TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to facilitate lipid transfer from the endoplasmic reticulum to plastids. *Plant Cell* 27: 2941–2955.
- Gotow, K., Taylor, S., & Zeiger, E. 1988. Photosynthetic carbon fixation in guard cell protoplasts of *Vicia faba*: evidence from radiolabel experiments. *Plant Physiol.* 86: 700–705.
- Horrer, D., Flütsch, S., Pazmino, D., Matthews, J.S., Thalmann, M., Nigro, A., Leonhardt, N., Lawson, T., & Santelia, D. 2016. Blue light induces a distinct starch degradation pathway in guard cells for stomatal opening. *Curr. Biol.* 26: 362–70.
- Kinoshita, T., Shimazaki, K., & Nishimura, M. 1993. Phosphorylation and dephosphorylation of guard-cell proteins from *Vicia faba* L. in response to light and dark. *Plant Physiol.* 102: 917–923.
- McLachlan, D.H., Lan, J., Geilfus, C.M., Dodd, A.N., Larson, T., Baker, A., Hōrak, H., Kollist, H., He, Z., Graham, I., et al. 2016. The breakdown of stored triacylglycerols is required during light-induced stomatal opening. *Curr. Biol.* 26: 707–712.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., & Iba, K. 2008. CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483–486.
- Negi, J., Moriwaki, K., Konishi, M., Yokoyama, R., Nakano, T., Kusumi, K., Hashimoto-Sugimoto, M., Schroeder, J.I., Nishitani, K., Yanagisawa, S. et al. 2013. A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 23: 479–484.
- Negi, J., Hashimoto-Sugimoto, M., Kusumi, K., & Iba, K. 2014. New approaches to the biology of stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol.* 55:241–250.
- Negi, J., Munemasa, S., Song, B., Tadakuma, R., Fujita, M., Azoulay-Shemer, T., Engineer, C.B., Kusumi, K., Nishida, I., Schroeder, J.I. et al. 2018. Eukaryotic lipid metabolic pathway is essential for functional chloroplasts and CO<sub>2</sub> and light responses in *Arabidopsis* guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115: 9038–9043.

- Obata, T., Kobayashi, K., Tadakuma, R., Akasaka, T., Iba, K., & Negi, J. 2021. The endoplasmic reticulum pathway for membrane lipid synthesis has a significant contribution toward shoot-removal-induced root chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab009>
- Roston, R.L., Gao, J., Murcha, M.W., Whelan, J., & Benning, C. 2012. TGD1, -2, and -3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 287: 21406–21415.
- Somerville, C., & Browse, J. 1996. Dissecting desaturation: Plants prove advantageous. *Trends Cell Biol.* 6: 148–153.
- Suetsugu, N., Takami, T., Ebisu, Y., Watanabe, H., Iiboshi, C., Doi, M., & Shimazaki, K. 2014. Guard cell chloroplasts are essential for blue light-dependent stomatal opening in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9: e108374.
- Tominaga, M., Kinoshita, T., & Shimazaki, K. 2001. Guard-cell chloroplasts provide ATP required for H<sup>+</sup> pumping in the plasma membrane and stomatal opening. *Plant Cell Physiol.* 42: 795-802.
- Willmer, C.M., & Fricker, M.D. 1996. *Stomata* 2nd edition-Chapman & Hall, London.
- Zeiger, E., Talbott, L.D, Frechilla, S., Srivastava, A., & Zhu, J. 2002. The guard cell chloroplast: A perspective for the twenty-first century. *New Phytol.* 153:415–424.

# 光環境への適応における葉緑体光定位運動の役割

後藤 栄治

九州大学 大学院農学研究院

〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

## Role of chloroplast movement in adaption to ambient light environment

Eiji Gotoh

Faculty of Agriculture, Kyushu University

744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

Keywords: chloroplast movements, light adaptation, photoprotection, phototropin, plant biomass production

DOI: 10.24480/bsj-review.12a6.00199

地に根を張り移動能力を欠く植物は、周囲の光環境を感知し、最適な応答をすることで、変動する光環境に対して光合成を最適化することができる。葉緑体光定位運動は、植物の光環境への適応機構の一つであり、植物の生存において重要な役割を担う。本稿では、モデル植物における葉緑体光定位運動の生理学的意義に加えて、野外環境で生育する野生植物における葉緑体光定位運動の意義について解説する。

### 1. 葉緑体光定位運動の生理学的意義

葉緑体光定位運動は、光合成の場である葉緑体が光に応じて細胞内でその位置を変える応答であり、藻類から種子植物に至る多様な植物種にみられる生理現象である (Senn 1908)。葉緑体は、弱光下ではより明るい光を受けた場所に集まる (集合反応) が、強光下では強光を避けるように細胞の縁へ移動する (逃避反応) (図 1)。多くの植物種において、葉緑体光定位運動は青色光により誘導され、植物特有の青色光受容体フォトトロピン (phototropin) が機能する (Kong & Wada 2016)。一般に種子植物のフォトトロピンには 2 つの分子種 (phot1 と phot2) があり、集合反応は phot1 と phot2 により、逃避反応は主に phot2 により誘導される (Sakai et al. 2001, Jarillo et al. 2001, Kagawa et al. 2001, Ishishita et al. 2016, Shang et al. 2019)。フォトトロピンは主に細胞膜に局在するが、一部は葉緑体外膜にも局在する (Kong et al. 2013, Kodama 2016, Ishishita et al. 2020)。細胞膜に局在するフォトトロピン (phot1 と phot2) は集合反応を誘導し、

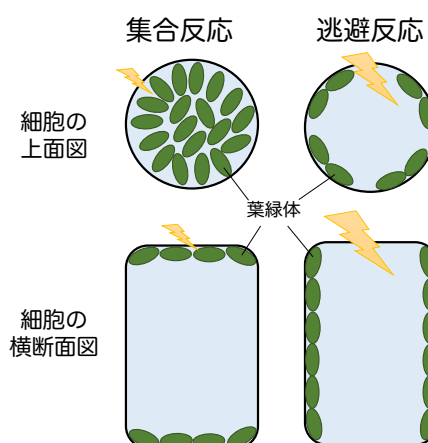


図 1 葉緑体光定位運動の模式図

葉緑体が細胞膜と接する部位の細胞膜および葉緑体外膜に局在するフォトトロピン (*phot2*) は逃避反応を誘導する (Preuten et al. 2015, Ishishita et al. 2020)。フォトトロピンによる光受容から葉緑体が動くまでのシグナル伝達の分子機構については、他の総説を参考にされたい (末次&和田 2013, Wada & Kong 2018)。

葉緑体光定位運動は、葉における光の吸収に影響を及ぼす (Inoue & Shibata 1973, Davis et al. 2011, Davis & Hangarter 2012, Gotoh et al. 2018b) (図 2)。弱光下では集合反応により葉緑体が細胞表面に集まるので、光の吸収量は増加する。一方、強光下では逃避反応により葉緑体が入射光に平行な細胞側壁に移動するので光の吸収量は減少する。フォトトロピンの変異株 (*phot1 phot2* 二重変異体) では葉緑体光定位運動が完全に欠損しているため、光に応答した光吸収量の変化はみられない (図 2)。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の変異株を用いた解析により、葉緑体光定位運動による光の吸収量の調節が植物の生育にとって重要な役割を担うことが明らかになった。*phot2* 変異株は逃避反応を欠損しているが、*phot1* による集合反応が誘導されるため、強光下でも葉緑体は細胞表面に集合し、直接強光を受け続け、重大な光障害を生じて最終的に枯死する (Kasahara et al. 2002, Gotoh et al. 2018b)。逆に、集合反応を欠損した *jac1* (*J-domain protein required for chloroplast accumulation response 1*; Suetsugu et al. 2005) 変異株は、

弱光環境においても葉緑体が表面および底面に集まらず細胞の側面に定位しているため、光合成に有効な光の吸収量が低下し、光合成活性が減少して植物のバイオマス量は減少する (Gotoh et al. 2018b)。つまり、固着生活を営む植物において、葉緑体光定位運動は変動する光環境で光の吸収量を調節し最適な光合成を行うために必須である。

葉緑体光定位運動における集合反応から逃避反応への切り替えは、青色光の光強度依存的に制御されているが、逃避反応が誘導される光強度は植物種によって異なる (Königer & Bollinger 2012)。シロイヌナズナにおいては、葉緑体集合反応は光補償点付近の非常に弱い光の下で最大となり、光補償点を超える強さの光では弱いながら逃避反応が誘導され始める (Gotoh et al. 2018b)。従って、光合成反応速度が光強度によって制限される光環境では、葉緑体は集合反応と逃避反応の中間のような配置を示す。弱光の下でも逃避反応が誘導される理由の一つとして、林床での木漏れ日のように不意に起こる突然の強光照射に対する安全弁として働くことが考えられる (Gotoh et al. 2018b)。植物は集合反応と逃避反応を緻密に制御す

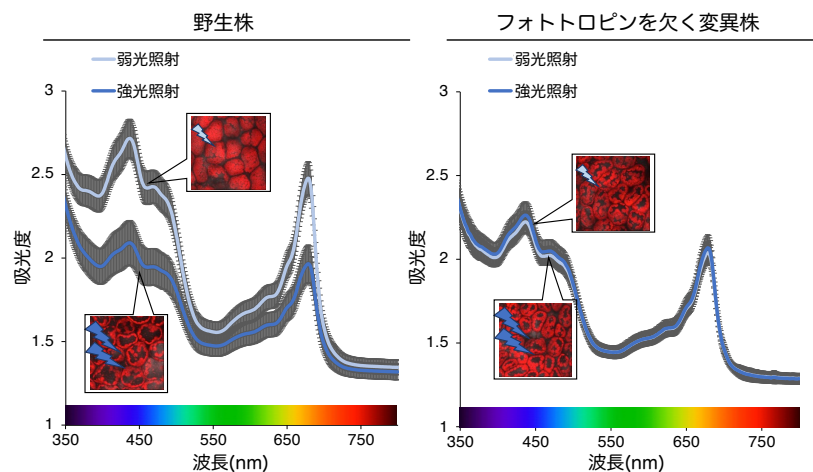


図 2 葉緑体光定位運動による光吸収量の変化

シロイヌナズナの野生株とフォトトロピンを完全に欠く (*phot1 phot2*) 変異株に弱青色および強青色光を照射した時の葉の光吸収スペクトル。吹き出し内の画像は、光照射時の葉肉細胞表面における葉緑体の分布を示す。

ることにより、植物の生育において重要な光阻害の回避と植物の生産性向上のトレードオフを実現していると考えられる。

## 2. 異なる光環境に生育する植物の葉緑体光定位運動

19世紀後半に葉緑体光定位運動が初めて発見されて以来、多岐にわたる野外環境に生育する植物種で現象の観察が行われてきた。特に、Gustav Senn 博士(1875-1945)は野外に生育する藻類、コケ植物、シダ植物、種子植物における葉緑体の様々な細胞内配置を調べ、強光および弱光照射下での葉緑体の細胞内配置変化を記述した(Senn 1908)。その後、ポーランドやドイツのグループによって葉緑体光定位運動の研究は続行されてきたが、現象の観察に留まっており、詳しい経時的な葉緑体の分布変化については解析されなかった。このような背景の中、日本のグループにより、葉緑体の細胞内分布の変化が葉の赤色光吸収量の変化によって間接的に評価できることが見出され、葉緑体光定位運動のレベルや変化を経時的に検出できるようになった(Inoue & Shibata 1974)。現在は赤色光の吸収量ではなく、赤色光の透過率によって葉緑体の分布変化を検出するのが一般的になっている(Augustynowicz & Gabryś 1999, DeBlasio et al. 2003, Wada & Kong 2011)。弱光照射下で集合反応が誘導されると、細胞表面に集まった葉緑体のクロロフィルにより赤色光が吸収される結果、葉における赤色光の透過率が低下する。集合反応を起こした葉に強光を照射すると逃避反応が誘導され、葉緑体が細胞の縁に逃避するためクロロフィルによる光の吸収量が減り、葉の透過率は上昇する。この一連の赤色光の透過率変化を測定することにより、間接的ではあるが葉緑体光定位運動を定量的に評価することができる。赤色光の透過率変化による解析は、コケ植物から種子植物の多岐にわたる植物種の葉緑体光定位運動を簡便に測定できる(Zurzycki 1961, Inoue & Shibata 1974, Augustynowicz & Gabryś 1999, DeBlasio et al. 2003, Wada & Kong 2011)。

Inoue & Shibata は、赤色光の吸収量の変化を指標に、単子葉 8 種(トウモロコシ(*Zea mays*), パンコムギ(*Triticum aestivum*)など)と双子葉 9 種(ホウレンソウ(*Spinacia oleracea*), ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolacca americana*)など)の葉緑体光定位運動を解析し、16 種において明らかな葉緑体光定位運動を検出したがイネ(*Oryza sativa*)では検出できなかった(Inoue & Shibata 1974)。しかし最近、イネにおいても葉の透過率変化の解析により葉緑体光定位運動が検出された(Kihara et al. 2020)。栽培イネと様々な野生種の *Oryza* 属における葉緑体運動を調べたところ、水田のような直射日光による強光環境で生育する栽培イネに比べて、林床のような弱光環境で生育する種の方が葉緑体光定位運動の運動性が高いことがわかった(Kihara et al. 2020)。 *Oryza* 属以外の植物種においても、強光環境で生育する植物に比べて弱光環境で生育する植物の方が、葉緑体光定位運動の運動性は高い(Inoue & Shibata 1974, Bruognoli & Björkman 1992, Park et al. 1996, Trojan & Gabryś 1996, Higa & Wada 2016)。一方、一部のシダ植物においては、弱光環境で生育する植物に比べて、幅広い光環境に生育する種の方が葉緑体光定位運動の程度が大きいことがわかっている(Augustynowicz & Gabryś 1999)。生育する光環境の違いによって生じる種子植物における葉緑体光定位運動の程度の差は、柵状組織細胞の形状と関係がある(Davis et al. 2011, Kihara et al. 2020)。柵状組織細胞の形状は光強度に影響される。一般的に強光下で生育する植物の柵状組織細胞は細長い円柱形になる

が、弱光環境下で生育した植物の柵状組織細胞は立方体に近い形状を示す (Terashima & Saeki 1983, Terashima et al. 2006, López-Juez et al. 2007, Kozuka et al. 2011) (図 3)。柵状組織細胞が立方体である細胞よりも、細長い円柱形の細胞の方が、葉緑体が集合しうる細胞上面のスペースが小さい。例えば、シロイヌナズナの葉の細胞の形状に異常をきす *an*

(*ANGUSTIFOLIA*) 変異株では、同一栽培条件においても、細長い円柱形細胞では葉緑体光定位運動がほとんど起きない (Gotoh et al. 2018a)。つまり、生育光環境における葉緑体光定位運動の程度の差異は、葉緑体運動の能力の違いよりも、葉緑体が動きうるスペースの大小に起因している (Higa & Wada 2016, Gotoh et al. 2018a)。

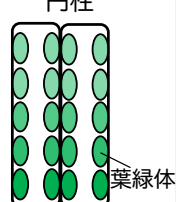
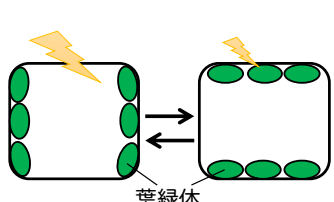
生育する光環境	常に強光	強光と弱光が頻繁に変わる
柵状組織細胞の横断面	細長い円柱 	立方体 
葉緑体光定位運動の運動性	運動性低	運動性高

図 3 生育光環境と柵状組織細胞の形状の模式図

つる植物やサバクオモト (*Welwitschia mirabilis*) のように

常に太陽光が直接あたるような強光環境に葉を展開する植物は、集合反応をほとんど示さず、常に逃避反応のような葉緑体の分布を示す (Higa & Wada 2016, Ishishita et al. 2016)。これらの植物の葉緑体は、常に柵状組織細胞の側壁に配置されているため、光は葉の深い部位まで届き得る (Vogelmann 1993, Terashima & Hikosaka 1995, Kume 2017)。また、細長い円柱形の細胞を密に詰めることで、葉の単位面積あたりの細胞膜の総面積は増加し、葉緑体は必ず細胞膜に接しているため、結果的には単位面積当たりの葉緑体数は増加する (Terashima & Hikosaka 1995, Higa & Wada 2016, Kume 2017)。さらに、表皮に密着した柵状組織細胞の上面ではなく、細胞の側面に葉緑体を配置することで、光合成の基質である  $\text{CO}_2$  をより多く、また迅速に葉緑体に供給することができる (Terashima & Hikosaka 1995, Terashima et al. 2006)。つまり、葉緑体を細胞の側面に配置することは、葉全体とすれば、多くの葉緑体が光を吸収することができ、さらに光合成の基質である  $\text{CO}_2$  が豊富に存在する環境で光合成を営むことができることである。常に強い光が照射される環境は強光に適応した植物にとっては理想的である。

### 3. まとめ

モデル植物シロイヌナズナを用いた変異株解析により、葉緑体光定位運動が植物の生存やバイオマスの制御に関わる現象であることが明らかにされてきた。その一方で、実際の野外に生育する植物の葉緑体光定位運動の運動性は様々であり、生育光環境によって大きく異なる (Williams et al. 2003)。野外で生育する植物にとって、葉緑体光定位運動が有効なのは、木漏れ日などによって光の強弱が頻繁に起こる林床環境である。光強度が比較的安定した環境で生育する植物にとって、葉緑体の局在を逐一変化させることはエネルギーを無駄に消費す



るので、メリットはあまりないと考えられる。実際に、強光環境で生育する植物は葉緑体光定位運動をほとんど行わず、その代わりに個葉レベルで光の吸収および光合成反応が最適になるように葉緑体を配置している。常に弱光環境で育つ植物はどのように葉緑体を配置しているのかについては、解析されている植物種が少ないため、よく分かっていない。今後、様々な光環境に適応・進化した植物を一つ一つ解析していくことで、我々がまだ知らない植物の光環境適応戦略がみつかるかもしれない。

## 謝辞

本稿を作成するにあたり貴重なご助言を賜った和田正三博士と末次憲之博士に御礼申し上げます。

## 引用文献

- Augustynowicz, J., & Gabryś, H. 1999. Chloroplast movements in fern leaves: correlation of movement dynamics and environmental flexibility of the species. *Plant Cell Environ* 34: 2047-2059.
- Brugnoli, E., & Björkman, O. 1992. Chloroplast movements in leaves: Influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance changes related to  $\Delta pH$  and zeaxanthin formation. *Photosynth Res* 32: 23-35.
- Davis, P.A., Caylor, S., Whippo, C.W., & Hangarter, R.P. 2011. Change in leaf optical properties associated with light-dependent chloroplast movements. *Plant Cell Environ* 34: 2047-2059.
- Davis, P.A., & Hangarter, R.P. 2012. Chloroplast movement provides photoprotection to plants by redistributing PSII damage within leaves. *Photosynth Res* 112: 153-161.
- DeBlasio, S.L., Mullen, J.L., Luesse, D.R., & Hangarter, R.P. 2003. Phytochrome modulation of blue-light-induced chloroplast movement in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133: 1471-1479.
- Gotoh, E., Suetsugu, N., Higa, T., Matsushita, T., Tsukaya, H., & Wada, M. 2018a. Palisade cell shape affects the light-induced chloroplast movements and leaf photosynthesis. *Sci Rep* 8: 1472.
- Gotoh, E., Suetsugu, N., Yamori, W., Ishishita, K., Kiyabu, R., Fukuda, M., Higa, T., Shirouchi, B., & Wada, M. 2018b. Chloroplast accumulation response enhances leaf photosynthesis and plant biomass production. *Plant Physiol* 178: 1358-1369.
- Higa, T., & Wada, M. 2016. Chloroplast avoidance movement is not functional in plants grown under strong sunlight. *Plant Cell Environ* 39: 871-882.
- Inoue, Y., & Shibata, K. 1973. Light-induced chloroplast rearrangements and their action spectra as measured by absorption spectrophotometry. *Planta* 114: 341-358.
- Inoue, Y., & Shibata, K. 1974. Comparative examination of terrestrial plant leaves in terms of light-induced absorption changes due to chloroplast rearrangement. *Plant Cell Physiol* 15: 717-721.
- Ishishita, K., Higa, T., Tanaka, H., Inoue, S., Chung, A., Ushijima, T., Matsushita, T., Kinoshita, T., Nakai, M., Wada, M. et al. 2020. Phototropin2 contributes to the chloroplast avoidance response at the chloroplast-plasma membrane interface. *Plant Physiol* 183: 304-316.
- Ishishita, K., Suetsugu, N., Hirose, Y., Higa, T., Doi, M., Wada, M., Matsushita, T., & Gotoh, E. 2016. Functional characterization of blue-light-induced responses and *PHOTOTROPIN 1* gene in

*Welwitschia mirabilis*. *J Plant Res* 129: 175-187.

- Jarillo, J.A., Gabryś, H., Capel, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., & Cashmore, A.R. 2001. Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410: 952-954.
- Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., & Wada, M. 2001. Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291: 2138-2141.
- Kasahara, M., Kagawa, T., Oikawa, K., Suetsugu, N., Miyao, M., & Wada, M. 2002. Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 420: 829-832.
- Kihara, M., Ushijima, T., Yamagata, Y., Tsuruda, Y., Higa, T., Abiko, T., Kubo, T., Wada, M., Suetsugu, N. et al. 2020. Light-induced chloroplast movement in *Oryza* species. *J Plant Res* 133: 525-535
- Kodama, Y. 2016. Time gating of chloroplast autofluorescence allows clear fluorescence imaging *in planta*. *PLOS ONE* 11: e0152484.
- Kong, S.G., Suetsugu, N., Kikuchi, S., Nakai, M., Nagatani, A., & Wada, M. 2013. Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant Cell Physiol* 54: 80-92.
- Kong, S.G., & Wada, M. 2016. Molecular basis of chloroplast photorelocation movement. *J Plant Res* 129: 159-166.
- Königer, M., & Bollinger, N. 2012. Chloroplast movement behavior varies widely among species and does not correlate with high light stress tolerance. *Planta* 236: 411-426.
- Kozuka, T., Kong, S.G., Doi, M., Shimazaki, K., & Nagatani, A. 2011. Tissue-autonomous promotion of palisade cell development by phototropin 2 in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 3684-3695.
- Kume, A. 2017. Importance of the green color, absorption gradient, and spectral absorption of chloroplasts for the radiative energy balance of leaves. *J Plant Res* 130: 501-514.
- López-Juez, E., Bowyer, J.R., & Sakai, T. 2007. Distinct leaf developmental and gene expression responses to light quantity depend on blue-photoreceptor or plastid-derived signals, and can occur in the absence of phototropins. *Planta* 227: 113–123.
- Park, Y.I., Chow, W.S., & Anderson, J.M. 1996. Chloroplast movement in the shade plant *Tradescantia albiflora* helps protect photosystem II against light stress. *Plant Physiol.* 111: 867-875.
- Preuten, T., Blackwood, L., Christie, J.M., & Fankhauser, C. 2015. Liquid anchoring of Arabidopsis phototropin 1 to assess the functional significance of receptor internalization: should I stay or should I go? *New Phytol* 206: 1038-1050.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., & Okada, K. 2001. Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6969-6974.
- Senn, G. 1908. Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzen-Chromatophoren. Engelmann, Stuttgart.
- Shang, B., Zang, Y., Zhao, X., Zhu, J., Fan, C., Guo, X., & Zhang, X. 2019. Functional characterization of GhPHOT2 in chloroplast avoidance of *Gossypium hirsutum*. *Plant Physiol Biochem* 135: 51-60.
- Suetsugu, N., Kagawa, T., & Wada, M. 2005. An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139: 151-162.

- 末次憲之 & 和田正三 2013. 陸上植物の光応答戦略 –陸上植物における葉緑体の運動メカニズムの新機軸– 植物科学最前線 4: 45.
- Trojan, A., & Gabryś, H. 1996. Chloroplast distribution in *Arabidopsis thaliana* (L) depends on light conditions during growth. *Plant Physiol* 111: 419-425.
- Terashima, I., Hanba, Y.T., Tazoe, Y., Vyas, P., & Yano, S. 2006. Irradiance and phenotype: Comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO<sub>2</sub> diffusion. *J Exp Bot* 57: 343-354.
- Terashima, I., & Hikosaka, K. 1995. Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant Cell Environ* 18: 1111-1128.
- Terashima, I., & Saeki, T. 1983. Light environment with a leaf 1. Optical properties of paradermal sections of *Camellia* leaves with special reference to differences in the optical-properties of palisade and spongy tissues. *Plant Cell Physiol* 24: 1493-1501.
- Vogelmann, T.C. 1993. Plant tissue optics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 231-251.
- Wada, M., & Kong, S.G. 2011. Analysis of chloroplast movement and relocation in *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* 774: 215-234.
- Wada, M., & Kong, S.G. 2018. Actin-mediated movement of chloroplasts. *J Cell Sci* 131: jcs210310.
- Williams, W.E., Gorton, H.L., & Witiak, S.M. 2003. Chloroplast movement in the field. *Plant Cell Environ* 26: 2005-2014.
- Zurzycki, J. 1961. The influence of chloroplast displacement on the optical properties of leaves. *Acta Soc Bot Pol* 30: 503-527.

# 葉緑体プロテアーゼによるオルガネラ恒常性と細胞内情報伝達の制御

西村 健司

関西学院大学理工学部生命科学科  
〒669-1337 兵庫県三田市学園 2-1

## Chloroplast proteolysis - between organellar homeostasis and cellular signaling

Kenji Nishimura

Department of Bioscience, School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University,  
2-1 Gakuen, Sanda, Hyogo 669-1337, Japan

Keywords: chloroplast, homeostasis, peptide, protease, signaling

DOI: 10.24480/bsj-review.12a7.00200

### 1. はじめに

葉緑体は光合成だけでなく、色素合成やアミノ酸合成、脂肪酸合成など様々な代謝反応が行われるオルガネラである。こうした反応を触媒・制御するのは、延べ 3000 種類にも上る葉緑体タンパク質であるが、これらが種々の環境変化によって不要になった場合や高次構造の形成・維持に異常が現れた場合は、速やかに分解・除去される必要がある。この機能を担うのが、これまでに 20 種類以上存在することが知られている葉緑体プロテアーゼである。特に AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) ファミリーに属する Clp, FtsH, Lon は、細菌から真核生物のオルガネラまで進化的に高度に保存され、ATP 依存的な基質の構造変化と共役したタンパク質分解活性を備えたプロセッシブプロテアーゼとして、葉緑体タンパク質の量的制御と品質管理において中心的な役割を果たすと考えられている。本稿では、これら葉緑体プロセッシブプロテアーゼの基本的な構成や特性について概説するとともに、オルガネラ恒常性における役割、そして近年注目されつつあるこれらプロテアーゼの細胞内シグナル伝達への関わりについて紹介したい。

### 2. 葉緑体プロセッシブプロテアーゼ概論

プロセッシブプロテアーゼの基本構造は、AAA+型シャペロンドメインとプロテアーゼドメインからなる(Gottesman, 1996; Gottesman and Maurizi, 1992) (図 1A)。シャペロンドメインにおいて認識された基質は、ATP 依存的に高次構造が解かれながら、プロテアーゼドメイン上部の小孔から内腔へと取り込まれる。プロテアーゼ内腔には、複数の触媒部位が存在しており、その空間位置に依存して基質配列内の複数箇所においてエンド型の切断反応が多発的に起こる(プロセッシブ分解)。その結果、多数のペプチド鎖へと断片化して分解される。生成されたペプチド断片は最終的にプロテアーゼチャンバーから外部に放出されるが、切断途中の基質タンパク質の放出は起きない。このようにプロセッシブプロテアーゼでは、触媒部位がプロテアーゼ内部に隔離されることで分解反応が区画化し、不必要なタンパク質分解が抑えられる。それと同時にシャペロンドメインで基質選別を行うことで選択的なタンパク質分解が

可能となっている。またプロセッシブ分解とは、プロテアーゼの内部に到達した基質配列から順次断片化が進行し、切断可能な箇所が全て切断されたのちペプチド断片の放出が行われることを指すことから (Thompson et al., 1994), シャペロン機能は必ずしもこれに結びついているわけではない。実際、非常に短いペプチドの分解にはシャペロン機能は必要ない。また、ある程度のサイズのタンパク質の分解については ATP の加水分解エネルギーが必須となるが、比較的短いポリペプチド鎖に関しては、ATP の結合のみで分解できる。

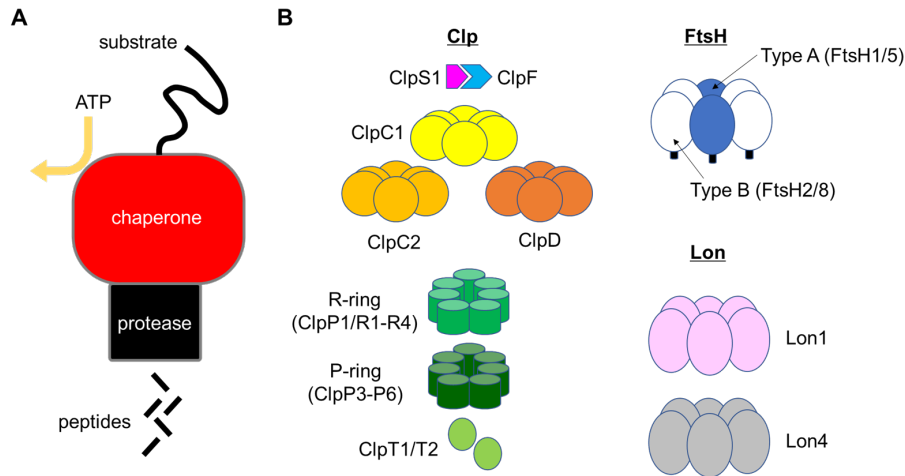


図 1. 葉緑体プロセッシブプロテアーゼ  
A. プロセッシブプロテアーゼの作用機構  
B. 代表的な3つの葉緑体プロセッシブプロテアーゼ複合体の構成

プロセッシブプロテアーゼの代表的なものとして、細菌と真核細胞のオルガネラに存在する Clp, FtsH, Lon, 及び古細菌や真核生物の細胞質などに存在するプロテアソームが挙げられる。葉緑体には細菌を起源とする3つのタイプのプロセッシブプロテアーゼ、すなわち Clp, FtsH, Lon が存在するが、その構成や特性は細菌がもつプロトタイプのプロセッシブプロテアーゼと比較して複雑・多様化している。

## 2-1. Clp

Clp は ATP 依存的なセリンプロテアーゼ活性を示す多量体構造として機能しており、シャペロンドメインとプロテアーゼコアドメインが独立の複合体として存在する点において FtsH や Lon とは異なる (図 1 B)。またバクテリア Clp のシャペロンとプロテアーゼコアが各々単一サブユニットからなるホモ複合体であるのに対し、シアノバクテリアや葉緑体ではいずれもヘテロ複合体を形成している (Nishimura and van Wijk, 2015)。さらに葉緑体の場合は、コア構造の形成・維持あるいは基質認識制御を担う固有のサブユニットを獲得している。

葉緑体 Clp シャペロンは、ClpC1/ClpC2/ClpD の3つのサブユニットで構成されており、それぞれがホモ 6 量体として存在することが示唆されている (Nishimura and van Wijk, 2015)。これら3つのシャペロンサブユニットのうち ClpC1 のみ機能欠損によって生育遅延を引き起こすことから、同サブユニットが主要な構成成分と考えられる。Clp シャペロンはそれ自身で基質の認識が可能である。しかしその制御には進化的に保存されている ClpS1 及びこれと相互作用する葉緑体特異的な ClpF の2つのアダプタータンパク質からなるバイナリーモジュールが関与しており、ClpS1/F 複合体が基質を直接認識し、相互依存的に基質タンパク質を Clp

シャペロンに供給することが示唆されている (Nishimura et al., 2013, 2015)。細菌の ClpS は単独で基質認識制御を行っているが、特にタンパク質の N 末端アミノ酸残基とそのタンパク質の安定性を関連付ける N-end rule 経路に関与することが知られている (Varshavsky, 2011)。N-end rule 経路において、タンパク質の不安定化を引き起こす N 末端アミノ酸残基を N-degron と呼ぶが、細菌の ClpS はこれを直接認識することができる。葉緑体においても類似した N-end rule 経路の存在が示唆されており (Bouchnak and van Wijk, 2019)、実際細菌 ClpS が認識する N-degron のいくつかは葉緑体 ClpS1 も認識することができる (Colombo et al., 2018; Montandon et al., 2019)。ClpS/F の欠損変異体はいずれも野生型と同等の生育であることから、両者およびこれらの関与が示唆される葉緑体 N-end rule 経路は植物の通常生育には必須ではないと考えられる (Nishimura et al., 2015)。

Clp プロテアーゼコアは、ClpP3/ClpP4/ClpP5/ClpP6 の 4 つのサブユニットが 1:2:3:1 の化学量論比で配位した P リングと、ClpP1/ClpR1/ClpR2/ClpR3/ClpR4 が 3:1:1:1:1 の比率で構成される R リングからなるヘテロ 14 量体を形成する (Olinares et al., 2011)。このうち ClpP1 は Clp で唯一葉緑体ゲノムにコードされるサブユニットである (Shikanai et al., 2001)。各 ClpP/R サブユニットの欠損変異体の表現型は、生育の遅延や停止、胚性致死など異なるが、サブユニットの存在比と相関する (Nishimura and van Wijk, 2015)。ここで、ClpP サブユニットの配列上には、セリン-ヒスチジン-アスパラギン酸の 3 アミノ酸残基からなる活性部位があるのに対し、ClpR サブユニットはこの部位が欠失しているため触媒能がない。したがって、葉緑体 Clp のプロテアーゼコア内には都合 10 箇所の活性部位が存在している。2 つの非対称な P/R リングの会合及び安定化には、植物特異的な 2 つのアクセサリタンパク質である ClpT1/T2 が関わる (Clarke, 2012; Kim et al., 2015; Sjögren and Clarke, 2011)。すなわち、単量体 ClpT1 が P リングに結合して複合体を形成し、これが単量体 ClpT2 と結合することで R リングと結合でき、安定化すると考えられている。一方 Clp シャペロンは P リングではなく R リングに結合すると考えられる。シャペロンとプロテアーゼコアがどのように連結しているかは明らかではないが、ClpT サブユニットはシャペロンサブユニットとも結合できることが知られている (Colombo et al., 2014)。

## 2-2. FtsH

FtsH は ATP 依存性の亜鉛 (Zn) 配位型メタロプロテアーゼ複合体として機能し、N 末端側に膜貫通ドメインがあるのが特徴である。また細菌の FtsH が単一サブユニットで構成されているのに対して、植物では遺伝子重複により 12 種類のホモログが存在し、このうち FtsH1/2/5/6/7/8/9/11/12 の 9 種類が葉緑体、残り 3 種類がミトコンドリアにそれぞれ局在する (Sakamoto et al., 2003)。葉緑体 FtsH のうち、FtsH1/2/5/8 はチラコイド膜、FtsH7/9/11/12 は包膜に存在することが確認されているが、FtsH6 については不明である (Nishimura et al., 2017)。

チラコイド FtsH を構成する 4 つの FtsH サブユニットはその機能的互換性からタイプ A (FtsH1/5) とタイプ B (FtsH2/8) に分類され (Yu et al., 2004, 2005; Zaltsman et al., 2005)、それぞれ 2:4 の化学量論比でヘテロ 6 量体を形成する (Moldavski et al., 2012) (図 1 B)。これら FtsH サブユニットの N 末端側にはチラコイド膜にアンカーするための一回膜貫通ドメインが存在し、6 量体形成時にはタンデムに並んだシャペロンドメインとプロテアーゼドメインはスト

ロマ側に配向している (Nishimura et al., 2017)。FtsH5 と FtsH2 の機能欠損変異体は、いずれも斑入り表現型を示すことからそれぞれ *yellow variegated1/2 (var1/var2)* と呼ばれる (Kato and Sakamoto, 2018)。一方 FtsH1 と FtsH8 の場合は野生株と同等の表現型を示すが、これはサブユニットの存在量を反映しているとされる。遺伝学的解析から、*var1* または *var2* 変異体の斑入り表現型を抑圧する変異体が多数単離された (Putarjuna et al., 2013)。その多くは葉緑体 Clp サブユニットあるいは葉緑体コードの ClpP1 の発現に影響を与えうる変異体であったことから、Clp-FtsH の機能的関連性が示唆される。FtsH の安定性は、細菌から真核生物まで高度に保存される GTPase ファミリータンパク質の 1 つである EngA が制御している (Kato et al., 2018)。EngA は FtsH5/2 のシャペロンドメインを介して直接相互作用する。また EngA の遺伝子欠損株は胚性致死であるのに対して、過剰発現体は FtsH 欠損変異体と同様に斑入り表現型を示し、かつ FtsH サブユニットの過剰蓄積と高分子量 FtsH 複合体の安定化が引き起こされる。EngA を介した機能不全 FtsH 複合体の分解制御モデルが提唱されている。また FtsH5/2 サブユニットは複数のサイトでリン酸化制御を受けることが知られており、FtsH 複合体の形成や安定化に関わることが示唆されている (Kato and Sakamoto, 2019)。

包膜 FtsH11 は他の包膜 FtsH とは複合体を形成しないことからホモ複合体として存在することが示唆されている (Adam et al., 2019)。またストロマの CPN20 シャペロンと相互作用することから、内包膜上でストロマ側に配向すると考えられる。FtsH7 と FtsH9 は高い相同性を示すことから、同一のヘテロ複合体を形成すると予測されているが (Wagner et al., 2012)、詳細は不明である。興味深いことに、FtsH12 は内包膜において、典型的な FtsH の活性部位が欠失した FtsHi1/2/4/5 タンパク質及びこれらと共通の進化的起源をもつ Ycf2 タンパク質、そして NAD 型リンゴ酸脱水素酵素からなる 2-MD のヘテロ複合体を形成し、内包膜の 1-MD 輸送装置である TIC 複合体と相互作用することで ATP 依存的な膜輸送モーターとして機能することが明らかとなった (Kikuchi et al., 2018)。FtsH12 の Zn 配位モチーフに点変異を導入することでメタロプロテアーゼ活性を消失させても膜輸送効率には影響しないことから、当該サブユニットが輸送基質の牽引に寄与していることが示唆される。他方もう一つの FtsHi ファミリータンパク質である FtsHi3 は、Ycf2/FtsHi 複合体や TIC 複合体とは独立して、内包膜上で 1-MD の高分子複合体を形成して輸送基質と相互作用することから、膜輸送モーターとして機能すると考えられている。

### 2-3. Lon

Lon は ATP 依存性のセリンプロテアーゼ複合体である (Pinti et al., 2016)。細菌から真核生物オルガネラいずれにおいてもホモ多量体として存在し、6 量体構造をとる (図 1 B)。一般に Lon タンパク質は 2 つのタイプに分類され、細菌及び真核生物のミトコンドリアと葉緑体をもつ LonA はシャペロンドメイン上流の N 末端に基質結合領域があるのに対し、古細菌の LonB はシャペロンドメイン内部に膜貫通領域があるのが特徴である (Rotanova et al., 2004)。

葉緑体には 2 種類の Lon (Lon1/4) が存在する (Rigas et al., 2014)。シアノバクテリアには全長 Lon プロテアーゼに相当する遺伝子はなく、代わりに LonA の N 末端ドメイン配列だけからなるタンパク質がコードされている。この Lon の N 末端ドメインのみからなるタンパク質はシロイヌナズナゲノム上にも 4 種類存在し、そのうち少なくとも 3 種類は葉緑体局在であ

る (van Wijk, 2015)。Lon1/4 については、いずれもミトコンドリアに共局在することから、太古の  $\alpha$  プロテオバクテリアの Lon に由来すると考えられる。Lon1/4 の葉緑体内での正確な存在箇所は明らかではない。また葉緑体の Lon1 の機能欠損が生育遅延を引き起こすことは知られているが、Lon4 欠損の生理的影響については分かっていない (Daras et al., 2014)。

### 3. オルガネラの恒常性における役割

これまでの遺伝学的・生化学的解析などから、葉緑体プロテアーゼによるタンパク質の生合成、あるいは量的制御や品質管理に関する様々な分子メカニズムが報告されている (図 2)。これらは複数のプロテアーゼにより段階的または協調的に行われるものや、環境因子や補助因子などを介したものなど多岐にわたり、オルガネラの機能維持に不可欠である。本項ではその事例をいくつか紹介する。

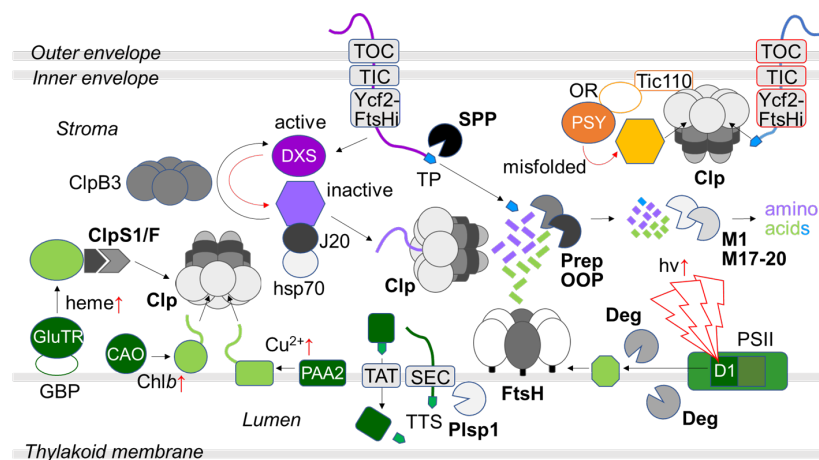


図 2. 葉緑体プロテアーゼによるオルガネラ恒常性の制御メカニズム  
プロセッシングプロテアーゼである SPP/Plsp1 は前駆体タンパク質の成熟化を担う。一方、プロセッシングプロテアーゼの Clp/FtsH は代謝環境や栄養状態の変動によるタンパク質の量的制御やストレスなどによる異常タンパク質の品質管理を行う。これらプロテアーゼの分解反応の結果生じるペプチドは、オリゴペプチダーゼ OOP/PreP とアミノペプチダーゼ M1/M17-20 の協調的な働きにより、アミノ酸にまで分解する。

葉緑体内に存在する数千種類のタンパク質の大部分は核ゲノムにコードされ、細胞質で N 末端側に葉緑体移行シグナル (TP) をもつ前駆体として合成された後、葉緑体外包膜の TOC 複合体により認識され、内包膜の TIC-Ycf2/FtsHi を介してストロマに輸送される (Thomson et al., 2020)。ストロマの Zn 結合エンド型ペプチダーゼである SPP は、こうした前駆体タンパク質を認識して TP を切断 (プロセッシング) する (Teixeira and Glaser, 2013)。TP を切り離されたタンパク質はここで解離するが、TP はその後も SPP 内に留まって C 末端側をトリミングされた後ストロマに放出される (Richter and Lamppa, 1999, 2002)。SPP 発現抑制株は生育遅延と発達異常を引き起こし、欠損変異体は胚性致死を示す (Trösch and Jarvis, 2011; Zhong et al., 2003)。SPP 過剰発現体は野生株と同等の生育であるが、興味深いことに核コードの光化学系 II (PSII) アンテナ複合体 (LHCII) サブユニットの遺伝子発現が 10 倍以上上昇し、逆に発現抑制株では低下する (Yue et al., 2010)。一方チラコイド膜内腔 (ルーメン) 局在タンパク質では、TP の下流に輸送シグナル (TTS) が存在し、TAT 依存経路によって高次構造を保持した状態、または SEC 依存経路によって折りたたみが解かれた状態でルーメン内に移行する



(Jarvis and Lopez-Juez, 2013)。この TTS はチラコイド膜局在のセリンプロテアーゼである Plsp1 によってプロセッシングされる (Midorikawa et al., 2014; Shipman and Inoue, 2009)。Plsp1 は酸化還元制御を受けており、ルーメン側の 2 つのシステイン残基間のジスルフィド結合により活性化する (Midorikawa et al., 2014)。Plsp1 欠損株では SEC 依存的に輸送される光化学系複合体サブユニットのプラストシアニンや PsbO がプロセッシング途中の状態ではチラコイド膜内に留まって蓄積してしまう (Frielingsdorf and Klösgen, 2007; Midorikawa and Inoue, 2013; Shackleton and Robinson, 1991)。一方 TAT 基質である PsbP の場合は、TTS 切断サイトを消失させると、恐らく TAT 透過装置内に留まった状態で、チラコイド膜で検出されるが、Plsp1 を欠損するとプロセッシング中間体がモノマー状態でストロマに蓄積する (Frielingsdorf and Klösgen, 2007; Midorikawa and Inoue, 2013; Shipman-Roston et al., 2010)。

代謝産物や無機栄養の合成や恒常性に関わる酵素は、葉緑体内の代謝・栄養環境の変化によってタンパク質分解を介した量的制御を受ける。クロロフィル b (Chlb) を合成するクロロフィリド a オキシゲナーゼ (CAO) は、生成物である Chlb 量の上昇に応答して Clp によって分解制御される (Nakagawara et al., 2007; Yamasato et al., 2005)。CAO の N 末端領域には短鎖長の分解シグナルが存在しており、恐らくこれが Chlb のない状態では CAO 構造の内部に位置しているが、Chlb の蓄積に伴って CAO が構造変化することで外部に露出するため ClpC シャペロンにより認識されて分解されると考えられている (Sakuraba et al., 2007, 2009)。また同じテトラピロール合成経路のグルタミル tRNA 還元酵素 (GluTR) は、ヘム蓄積量が上昇すると ClpS1/F 依存的に分解される (Richter et al., 2019)。通常 GluTR は N 末端領域と GluTR 結合タンパク質 (GBP) との相互作用を介してチラコイド膜上に係留している (Czarnecki et al., 2011)。しかし GBP はヘム結合タンパク質でもあり、ヘム存在下では GBP-GluTR 複合体の形成が阻害される (Richter et al., 2019)。したがってヘム蓄積量の上昇により、N 末端領域から GBP が解離し、同領域がストロマに露出する。この領域は ClpS1 によっても認識されることから、GBP から遊離した GluTR は Clp により分解される。さらに、チラコイド膜局在の銅トランスポーター PAA2 は、ルーメンのプラストシアニンに銅イオンを供給するが、葉緑体内の銅イオン濃度が過剰になると Clp によって分解制御される (Tapken et al., 2015)。この銅濃度依存的な PAA2 の分解に ClpS1 は必要ないことから、ClpC シャペロンが直接認識すると考えられる。詳細な基質認識機構は不明であるが、PAA2 の N 末端側には金属結合モチーフがあるため、これが銅濃度の上昇により構造変化を引き起こし、CAO の場合と同様に Clp による認識を促すと考えられている。

光合成など葉緑体の代謝系を正常に維持するためには、葉緑体タンパク質の大部分を占める核コードタンパク質の輸送や各種代謝酵素群自体の品質管理が重要となる。Clp の大部分はストロマに存在するが、一部は Tic110 と呼ばれる足場タンパク質を介して内包膜に局在している (Flores-Pérez et al., 2016; Sjögren et al., 2014)。前駆体タンパク質が膜輸送中に輸送チャネル内で凝集や停滞した際、あるいは TIC 複合体から解離後のプロセッシングや高次構造形成に不具合が生じた際に分解排除することで、膜輸送の円滑化と品質管理に寄与することが示唆されている (Flores-Pérez et al., 2016)。カロテノイド生合成経路のフィトエン合成酵素 (PHY) は、Tic110 を介して葉緑体内包膜に係留する DnaJ 様シャペロンの ORANGE (OR) タ

ンパク質と結合することで、その高次構造と酵素活性が維持されているが (Welsch et al., 2018; Yuan et al., 2020), 高次構造の形成異常を引き起こした PHY は ClpS1/F や ClpC/D を介して分解制御を受ける (Welsch et al., 2018)。イソプレノイド合成系のメチルエリスリトール 4-リン酸 (MEP) 経路の主要な律速酵素であるデオキシキシロース 5-リン酸合成酵素 (DXS) の品質管理は, J20 アダプタータンパク質と Hsp70 シャペロンを介して ClpB3 依存のリフォールディング活性または Clp 依存の分解活性により制御されている (Pulido et al., 2016)。高次構造の形成異常あるいは凝集により不活性化した DXS は, Hsp40/DnaJ タンパク質である J20 により認識されて Hsp70 シャペロンに引き渡される。これにより不活性化 DXS は, Hsp70 及び ClpB3 による協調的なリフォールディング反応を通じた再活性化, あるいは Hsp70 から ClpC1 への基質輸送を伴う分解制御を受ける。この不活性化 DXS の運命決定は, ClpB3 と ClpC1 の相対的な量により決まると考えられている。Hsp70 から ClpC1 への基質輸送は直接または他の制御因子の介在が推察されている。Hsp70 と Clp はいずれも酸化ストレス障害を受けたタンパク質の品質管理に関与することも示唆されている (Pulido et al., 2017)。過剰な光照射により活性酸素種が発生すると光合成装置が光障害を被るが, その主要なターゲットは PSII の反応中心 D1 タンパク質である (Kato and Sakamoto, 2018)。光障害を受けた PSII 複合体はグラナからストロマチラコイドに移動し, ここで部分的に解離することで D1 タンパク質が外部に露出する。その際に D1 はチラコイドルーメンとストロマにそれぞれ複数存在するセリントタイプのエンドペプチダーゼである DEG によって部分切断されて断片化し, その後 FtsH によりペプチドへとさらに分解されて除去される。その後葉緑体内で新規合成された D1 が PSII に挿入され, 再会合してグラナに移動する。この光障害を受けた PSII の修復には可逆的なリン酸化修飾が関与しており, リン酸化の標的として PSII コアタンパク質の D1/D2 や CP43, PsbH が, またリン酸化酵素と脱リン酸化酵素として STN8 と PBCP がそれぞれ知られている (Kato and Sakamoto, 2014; Puthiyaveetil and Kirchhoff, 2013; Samol et al., 2012)。STN8 は DEG 依存的な D1 断片化を抑制し, PBCP は D1 分解を促進するが, 詳細なメカニズムは不明である。

上述した SPP により輸送前駆体から切断された TP や Clp/FtsH により分解されたタンパク質由来ペプチドは, ストロマ局在の Zn 結合型エンドペプチダーゼファミリーに属する 3 つのオリゴペプチダーゼ PreP1/2 と OOP がさらに断片化する (Kmiec et al., 2014)。TP のサイズは概ね 26~146 aa であり (Zybailov et al., 2008), 一般的な Clp と FtsH の分解産物はそれぞれ 5~12 aa と 10~20 aa の短鎖ペプチドである (Choi and Licht, 2005; Ito and Akiyama, 2005) のに対して, PreP1/2 と OOP はそれぞれ 10~65 aa 及び 8~23 aa のペプチド断片を分解するため (Kmiec et al., 2014; Moberg et al., 2003; Ståhl et al., 2005), これらペプチドを分解できる。一方 PreP/OOP 依存的に分解されたペプチドは, 3~4 aa 程度となるもののアミノ酸への分解には至らない。PreP/OOP の下流では, 2 つの金属結合性アミノペプチダーゼである M1 と M17-20 が TP などに由来する数アミノ酸程度のペプチドをさらに分解して遊離アミノ酸を生成すると考えられている (Teixeira et al., 2017)。

#### 4. 細胞内シグナル伝達との関係

葉緑体タンパク質分解と共役した細胞内情報伝達経路の例が最近いくつか報告されている。

これらはシグナル伝達関連因子の分解制御や分解装置自体の損傷により誘導されるストレス応答機構、そして分解産物の蓄積が誘導する新たな細胞応答機構など幅広い。

葉緑体から核へのシグナル (レトログレードシグナル) の伝達機構において中心的役割を果たすストロマ局在シグナル統合因子として知られる GENOME UNCOUPLED1 (GUN1) は Clp による分解制御を受ける (Wu et al., 2018)。GUN1 はストロマに局在するペンタトリコペプチドリピート (PPR) タンパク質の一種である。GUN1 は通常生育環境下では Clp 依存的な分解により極めて低い蓄積量に抑えられているが、レトログレードシグナルが駆動されるストレス環境下では分解速度が低下し、ストレス応答が引き起こされる。特にレトログレードシグナルを駆動する薬剤であるリンコマイシン (LIN) などにより葉緑体の翻訳を阻害した場合は GUN1 の顕著な蓄積量の上昇が見られるが、このとき葉緑体コードの ClpP1 サブユニットの発現量の低下も観察されている。Clp がどのように GUN1 を認識しているかは明らかではないが、GUN1 の安定性には PPR モチーフが関与することが示唆されている。また GUN1 はヘム結合タンパク質であることも示されている (Shimizu et al., 2019)。一方、活性酸素種 (ROS) の一種である一重項酸素 ( $O_2$ ) が引き起こすレトログレードシグナル伝達経路では、チラコイド膜局在の FtsH とグラナ周縁部に局在する  $O_2$  センサーである EXECUTER1 (EX1) が協調して機能する (Dogra et al., 2017; Wang et al., 2016)。すなわちグラナ周縁部の  $O_2$  が増大すると EX1 の特徴的なトリプトファン残基が酸化修飾されることで FtsH による EX1 分解が引き起こされ、結果として核コードのストレス応答遺伝子の発現が誘導される (Dogra et al., 2017, 2019a)。

真核生物オルガネラ内のタンパク質恒常性に異常があると、オルガネラ局在のシャペロンやプロテアーゼ等をコードする核遺伝子の発現が誘導される。この現象は小胞体ストレス応答 (unfolded protein response) と呼ばれ、酵母や動物の小胞体 (UPR) やミトコンドリア (UPRmt) で見られる (Haynes et al., 2013; Walter and Ron, 2011)。緑藻や植物の葉緑体においても、RNAi や LIN を利用した Clp の発現低下により核コードの ClpB3 をはじめとするシャペロン群等の発現上昇及び葉緑体タンパク質の恒常性の回復などが観察され、葉緑体の UPR の存在が示唆されている (cpUPR) (Llamas et al., 2017; Ramundo et al., 2014)。この cpUPR の誘導は GUN1 非依存的なシグナル伝達経路であり、転写因子である HsfA2 が関与すると考えられている (Llamas et al., 2017)。一方、チラコイド FtsH の欠失により PSII などの葉緑体タンパク質の恒常性に異常が生じた場合は、シャペロンやプロテアーゼ、ROS 消去系酵素などのタンパク質品質管理関連因子の蓄積が上昇することが観察されている (Dogra et al., 2019b)。これら因子の蓄積上昇は転写レベルで制御されており、この現象は上述の UPR と類似していることから UPR 様応答、あるいは酸化修飾を受けた損傷タンパク質が蓄積していることから損傷タンパク質応答 (damaged protein response, DPR) と呼ばれる。また欠失とは異なるチラコイド FtsH の機能損傷、すなわちシャペロンドメインの変異によって基質のアンフォールド活性のみを損なった異常な FtsH が存在する場合は、完全欠失したときにも見られた PSII タンパク質の恒常性障害だけでなく、サリチル酸 (SA) 応答性遺伝子の発現上昇を伴う特徴的なストレス応答を示す (Duan et al., 2019)。このストレス応答には、葉緑体で合成される SA による核遺伝子の発現制御、すなわちレトログレードシグナルとしての役割が示唆されている。他

方 SA 合成を担うイソコリスミ酸経路酵素群と FtsH 機能との関係についても興味もたれる (Dogra and Kim, 2019)。

オリゴペプチダーゼ PreP/OOP を欠損した 3 重変異体では TP 由来ペプチド及びその下流の機能性領域に由来する分解産物の蓄積が確認されている (Kmicic et al., 2018)。分解産物の蓄積が検出されたタンパク質は, Rubisco の大サブユニットや Rubisco アクチベース, LHCII, D1, CP47, プラストシアニンなど存在量が比較的多いものであった。興味深いことに, この 3 重変異体は病原菌に感染していないにも関わらず, 病害ストレス応答関連遺伝子の発現上昇が観察されている。このことから, 蓄積したペプチドが病原性エフェクターとして細胞内の防御応答シグナル伝達経路を活性化していることが示唆されるが, 葉緑体タンパク質由来ペプチドがどこで蓄積し, どのように感知・伝達されているかは明らかではない。一方ヒメツリガネゴケにおいて生体内ペプチドの網羅的解析が行われており, 葉緑体タンパク質由来ペプチドが細胞内だけでなく細胞外においても多数検出されている (Fesenko et al., 2015; Mamaeva et al., 2020)。

## 5. おわりに

葉緑体プロセッシングプロテアーゼは, 細菌由来の分子装置から派生しているものの, 共生進化の過程で多様化・高度化することで独自の分解システムを構築し, 葉緑体タンパク質分解において中心的な役割を果たすようになった。実際, 植物の代謝環境や栄養状態等の変化に応じたオルガネラの恒常性維持機構やストレス下における細胞内情報伝達系での機能は多岐にわたり, かつ複数の介助因子等を巻き込んだ複雑な分解制御系を形成している。そのためプロテアーゼ機能の障害は代謝環境やシグナル伝達系に甚大な影響を引き起こす。そのようなことから, 葉緑体プロテアーゼはオルガネラ恒常性と細胞内シグナル伝達のあいだ, あるいはその境界において両者を統合制御する存在と言えるのではないだろうか。一方, オリゴペプチダーゼ変異体の解析等により分解産物ペプチドが新たな役割を果たす可能性も出てきた。これはプロテアーゼが, 単に役目を終えたタンパク質を除去しているのではなく, 不要タンパク質を短鎖ペプチドという新たな機能分子種に再生していることを意味しているのかもしれない。ヒト小胞体膜上には TAP (transporter associated with antigen processing) と呼ばれるペプチドトランスポーターが存在し, ウィルス感染等に由来する病原体タンパク質の分解産物ペプチドを細胞質から小胞体内に取り込む (Parcej and Tampé, 2010)。これにより小胞体ルーメン内の MHC (major histocompatibility complex) クラス I 分子がペプチドと結合し, ゴルジ体を経て感染細胞表層に移行すると, 当該ペプチドを異物として抗原提示して免疫応答が引き起こされる。また線虫ミトコンドリアの UPR<sub>mt</sub> では, Clp 依存的に分解されたマトリックスタンパク質の断片が HAF-1 と呼ばれる包膜局在のペプチドエクスポーターによって放出される (Haynes and Ron, 2010)。興味深いことに, シロイヌナズナゲノム上にはヒト TAP や線虫 HAF-1 のホモログをコードする遺伝子が 2 つ存在し, その 1 つはプロテオーム解析により葉緑体包膜において検出されている (Huang et al., 2013)。この TAP ホモログの解析を通じて, 葉緑体タンパク質分解に由来するペプチド断片がその後辿る運命や果たす役割, あるいはオルガネラ恒常性と細胞内シグナル伝達との関係についての理解に繋がるかもしれない。

## 謝辞

本研究は JSPS 科研費 (課題番号 19K23734) の助成を受けて行われた。

## 引用文献

- Adam, Z., Aviv-Sharon, E., Keren-Paz, A., Naveh, L., Rozenberg, M., Savidor, A., and Chen, J. (2019). The Chloroplast Envelope Protease FTSH11 – Interaction With CPN60 and Identification of Potential Substrates. *Front. Plant Sci.* *10*, 428.
- Bouchnak, I., and van Wijk, K.J. (2019). N-Degron Pathways in Plastids. *Trends Plant Sci.* *24*, 917–926.
- Choi, K.H., and Licht, S. (2005). Control of peptide product sizes by the energy-dependent protease ClpAP. *Biochemistry* *44*, 13921–13931.
- Clarke, A.K. (2012). The chloroplast ATP-dependent Clp protease in vascular plants - new dimensions and future challenges. *Physiol. Plant.* *145*, 235–244.
- Colombo, C. V., Ceccarelli, E.A., and Rosano, G.L. (2014). Characterization of the accessory protein ClpT1 from *Arabidopsis thaliana*: oligomerization status and interaction with Hsp100 chaperones. *BMC Plant Biol.* *14*, 228.
- Colombo, C. V., Rosano, G.L., Mogk, A., and Ceccarelli, E.A. (2018). A Gatekeeper Residue of ClpS1 from *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts Determines its Affinity Towards Substrates of the Bacterial N-End Rule. *Plant Cell Physiol.* *59*, 624–636.
- Czarnecki, O., Hedtke, B., Melzer, M., Rothbart, M., Richter, A., Schröter, Y., Pfannschmidt, T., and Grimm, B. (2011). An *Arabidopsis* GluTR Binding Protein Mediates Spatial Separation of 5-Aminolevulinic Acid Synthesis in Chloroplasts. *Plant Cell* *23*, 4476–4491.
- Daras, G., Rigas, S., Tsitsekian, D., Zur, H., Tuller, T., and Hatzopoulos, P. (2014). Alternative Transcription Initiation and the AUG Context Configuration Control Dual-Organellar Targeting and Functional Competence of *Arabidopsis* Lon1 Protease. *Mol. Plant* *7*, 989–1005.
- Dogra, V., and Kim, C. (2019). Chloroplast protein homeostasis is coupled with retrograde signaling. *Plant Signal. Behav.* *14*, 1656037.
- Dogra, V., Duan, J., Lee, K.P., Lv, S., Liu, R., and Kim, C. (2017). FtsH2-Dependent Proteolysis of EXECUTER1 Is Essential in Mediating Singlet Oxygen-Triggered Retrograde Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* *8*, 1145.
- Dogra, V., Li, M., Singh, S., Li, M., and Kim, C. (2019a). Oxidative post-translational modification of EXECUTER1 is required for singlet oxygen sensing in plastids. *Nat. Commun.* *10*, 2834.
- Dogra, V., Duan, J., Lee, K.P., and Kim, C. (2019b). Impaired PSII proteostasis triggers a UPR-like response in the var2 mutant of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *70*, 3075–3088.
- Duan, J., Lee, K.P., Dogra, V., Zhang, S., Liu, K., Caceres-Moreno, C., Lv, S., Xing, W., Kato, Y., Sakamoto, W., et al. (2019). Impaired PSII Proteostasis Promotes Retrograde Signaling via Salicylic Acid. *Plant Physiol.* *180*, 2182–2197.
- Fesenko, I.A., Arapidi, G.P., Skripnikov, A., Alexeev, D.G., Kostyukova, E.S., Manolov, A.I., Altukhov, I.A., Khazigaleeva, R.A., Seredina, A. V., Kovalchuk, S.I., et al. (2015). Specific pools

- of endogenous peptides are present in gametophore, protonema, and protoplast cells of the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* *15*, 87.
- Flores-Pérez, Ú., Bédard, J., Tanabe, N., Lympieropoulos, P., Clarke, A.K., and Jarvis, P. (2016). Functional Analysis of the Hsp93/ClpC Chaperone at the Chloroplast Envelope. *Plant Physiol.* *170*, 147–162.
- Frielingsdorf, S., and Klösgen, R.B. (2007). Prerequisites for Terminal Processing of Thylakoidal Tat Substrates. *J. Biol. Chem.* *282*, 24455–24462.
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* *30*, 465–506.
- Gottesman, S., and Maurizi, M.R. (1992). Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* *56*, 592–621.
- Haynes, C.M., and Ron, D. (2010). The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J. Cell Sci.* *123*, 3849–3855.
- Haynes, C.M., Fiorese, C.J., and Lin, Y.-F. (2013). Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond. *Trends Cell Biol.* *23*, 311–318.
- Huang, M., Friso, G., Nishimura, K., Qu, X., Olinares, P.D.B., Majeran, W., Sun, Q., and Van Wijk, K.J. (2013). Construction of plastid reference proteomes for maize and arabidopsis and evaluation of their orthologous relationships; The concept of orthoproteomics. *J. Proteome Res.* *12*, 491–504.
- Ito, K., and Akiyama, Y. (2005). Cellular Functions, Mechanism of Action, and Regulation of FtsH Protease. *Annu. Rev. Microbiol.* *59*, 211–231.
- Jarvis, P., and López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 787–802.
- Kato, Y., and Sakamoto, W. (2014). Phosphorylation of photosystem II core proteins prevents undesirable cleavage of D1 and contributes to the fine-tuned repair of photosystem II. *Plant J.* *79*, 312–321.
- Kato, Y., and Sakamoto, W. (2018). FtsH Protease in the Thylakoid Membrane: Physiological Functions and the Regulation of Protease Activity. *Front. Plant Sci.* *9*, 855.
- Kato, Y., and Sakamoto, W. (2019). Phosphorylation of the Chloroplastic Metalloprotease FtsH in Arabidopsis Characterized by Phos-Tag SDS-PAGE. *Front. Plant Sci.* *10*, 1080.
- Kato, Y., Hyodo, K., and Sakamoto, W. (2018). The Photosystem II Repair Cycle Requires FtsH Turnover through the EngA GTPase. *Plant Physiol.* *178*, 596–611.
- Kikuchi, S., Asakura, Y., Imai, M., Nakahira, Y., Kotani, Y., Hashiguchi, Y., Nakai, Y., Takafuji, K., Bédard, J., Hirabayashi-Ishioka, Y., et al. (2018). A Ycf2-FtsHi Heteromeric AAA-ATPase Complex Is Required for Chloroplast Protein Import. *Plant Cell* *30*, 2677–2703.
- Kim, J., Kimber, M.S., Nishimura, K., Friso, G., Schultz, L., Ponnala, L., and van Wijk, K.J. (2015). Structures, Functions, and Interactions of ClpT1 and ClpT2 in the Clp Protease System of Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Cell* *27*, 1477–1496.
- Kmiec, B., Teixeira, P.F., and Glaser, E. (2014). Shredding the signal: Targeting peptide degradation in mitochondria and chloroplasts. *Trends Plant Sci.* *19*, 771–778.

- Kmiec, B., Branca, R.M.M., Berkowitz, O., Li, L., Wang, Y., Murcha, M.W., Whelan, J., Lehtio, J., Glaser, E., and Teixeira, P.F. (2018). Accumulation of endogenous peptides triggers a pathogen stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *96*, 705–715.
- Llamas, E., Pulido, P., and Rodriguez-Concepcion, M. (2017). Interference with plastome gene expression and Clp protease activity in *Arabidopsis* triggers a chloroplast unfolded protein response to restore protein homeostasis. *PLoS Genet.* *13*.
- Mamaeva, A., Taliansky, M., Filippova, A., Love, A.J., Golub, N., and Fesenko, I. (2020). The role of chloroplast protein remodeling in stress responses and shaping of the plant peptidome. *New Phytol.* *227*, 1326–1334.
- Midorikawa, T., and Inoue, K. (2013). Multiple fates of non-mature luminal proteins in thylakoids. *Plant J.* *76*, 73–86.
- Midorikawa, T., Endow, J.K., Dufour, J., Zhu, J., and Inoue, K. (2014). Plastidic type I signal peptidase 1 is a redox-dependent thylakoidal processing peptidase. *Plant J.* *80*, 592–603.
- Moberg, P., Ståh, A., Bhushan, S., Wright, S.J., Eriksson, A.C., Bruce, B.D., and Glaser, E. (2003). Characterization of a novel zinc metalloprotease involved in degrading targeting peptides in mitochondria and chloroplasts. *Plant J.*
- Moldavski, O., Levin-Kravets, O., Ziv, T., Adam, Z., and Prag, G. (2012). The hetero-hexameric nature of a chloroplast AAA+ FtsH protease contributes to its thermodynamic stability. *PLoS One* *7*, e36008.
- Montandon, C., Dougan, D.A., and van Wijk, K.J. (2019). N-degron specificity of chloroplast ClpS1 in plants. *FEBS Lett.* *593*, 962–970.
- Nakagawara, E., Sakuraba, Y., Yamasato, A., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2007). Clp protease controls chlorophyll b synthesis by regulating the level of chlorophyllide a oxygenase. *Plant J.* *49*, 800–809.
- Nishimura, K., and van Wijk, K.J. (2015). Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plastids. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1847*, 915–930.
- Nishimura, K., Asakura, Y., Friso, G., Kim, J., Oh, S.-h., Rutschow, H., Ponnala, L., and van Wijk, K.J. (2013). ClpS1 Is a Conserved Substrate Selector for the Chloroplast Clp Protease System in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *25*, 2276–2301.
- Nishimura, K., Apitz, J., Friso, G., Kim, J., Ponnala, L., Grimm, B., and van Wijk, K.J. (2015). Discovery of a Unique Clp Component, ClpF, in Chloroplasts: A Proposed Binary ClpF-ClpS1 Adaptor Complex Functions in Substrate Recognition and Delivery. *Plant Cell* *27*, 2677–2691.
- Nishimura, K., Kato, Y., and Sakamoto, W. (2017). Essentials of Proteolytic Machineries in Chloroplasts. *Mol. Plant* *10*, 4–19.
- Olinares, P.D.B., Kim, J., Davis, J.I., and van Wijk, K.J. (2011). Subunit Stoichiometry, Evolution, and Functional Implications of an Asymmetric Plant Plastid ClpP/R Protease Complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *23*, 2348–2361.
- Parcej, D., and Tampé, R. (2010). ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 572–580.

- Pinti, M., Gibellini, L., Nasi, M., De Biasi, S., Bortolotti, C.A., Iannone, A., and Cossarizza, A. (2016). Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1857*, 1300–1306.
- Pulido, P., Llamas, E., Llorente, B., Ventura, S., Wright, L.P., and Rodríguez-Concepción, M. (2016). Specific Hsp100 Chaperones Determine the Fate of the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway for Either Refolding or Degradation by the Stromal Clp Protease in Arabidopsis. *PLOS Genet.* *12*, e1005824.
- Pulido, P., Llamas, E., and Rodríguez-Concepción, M. (2017). Both Hsp70 chaperone and Clp protease plastidial systems are required for protection against oxidative stress. *Plant Signal. Behav.* *12*, e1290039.
- Putarjunan, A., Liu, X., Nolan, T., Yu, F., and Rodermel, S. (2013). Understanding chloroplast biogenesis using second-site suppressors of *imm1* and *var2*. *Photosynth. Res.* *116*, 437–453.
- Puthiyaveetil, S., and Kirchhoff, H. (2013). A phosphorylation map of the photosystem II supercomplex C2S2M2. *Front. Plant Sci.* *4*, 459.
- Ramundo, S., Casero, D., Mühlhaus, T., Hemme, D., Sommer, F., Crèvecoeur, M., Rahire, M., Schroda, M., Rusch, J., Goodenough, U., et al. (2014). Conditional depletion of the chlamydomonas chloroplast ClpP protease activates nuclear genes involved in autophagy and plastid protein quality control. *Plant Cell* *26*, 2201–2222.
- Richter, S., and Lamppa, G.K. (1999). Stromal Processing Peptidase Binds Transit Peptides and Initiates Their Atp-Dependent Turnover in Chloroplasts. *J. Cell Biol.* *147*, 33–44.
- Richter, S., and Lamppa, G.K. (2002). Determinants for Removal and Degradation of Transit Peptides of Chloroplast Precursor Proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 43888–43894.
- Richter, A.S., Banse, C., and Grimm, B. (2019). The GluTR-binding protein is the heme-binding factor for feedback control of glutamyl-tRNA reductase. *Elife* *8*, e46300.
- Rigas, S., Daras, G., Tsitsekian, D., Alatzas, A., and Hatzopoulos, P. (2014). Evolution and significance of the Lon gene family in Arabidopsis organelle biogenesis and energy metabolism. *Front. Plant Sci.* *5*, 145.
- Rotanova, T. V., Melnikov, E.E., Khalatova, A.G., Makhovskaya, O. V., Botos, I., Wlodawer, A., and Gustchina, A. (2004). Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur. J. Biochem.* *271*, 4865–4871.
- Sakamoto, W., Zaltsman, A., Adam, Z., and Takahashi, Y. (2003). Coordinated Regulation and Complex Formation of Yellow Variegated1 and Yellow Variegated2, Chloroplastic FtsH Metalloproteases Involved in the Repair Cycle of Photosystem II in Arabidopsis Thylakoid Membranes. *Plant Cell* *15*, 2843–2855.
- Sakuraba, Y., Yamasato, A., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2007). Functional analysis of N-terminal domains of Arabidopsis chlorophyllide a oxygenase. *Plant Physiol. Biochem.* *45*, 740–749.
- Sakuraba, Y., Tanaka, R., Yamasato, A., and Tanaka, A. (2009). Determination of a Chloroplast Degron in the Regulatory Domain of Chlorophyllide a Oxygenase. *J. Biol. Chem.* *284*, 36689–36699.



- Samol, I., Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Fucile, G., Crèvecoeur, M., Vener, A. V., Rochaix, J.-D., and Goldschmidt-Clermont, M. (2012). Identification of a Photosystem II Phosphatase Involved in Light Acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 2596–2609.
- Shackleton, J.B., and Robinson, C. (1991). Transport of proteins into chloroplasts. The thylakoidal processing peptidase is a signal-type peptidase with stringent substrate requirements at the -3 and -1 positions. *J. Biol. Chem.* 266, 12152–12156.
- Shikanai, T., Shimizu, K., Ueda, K., Nishimura, Y., Kuroiwa, T., and Hashimoto, T. (2001). The chloroplast clpP gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 42, 264–273.
- Shimizu, T., Kacprzak, S.M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Watanabe, S., Shimada, T., Tanaka, K., Hayashi, Y., Arai, M., Leister, D., et al. (2019). The retrograde signaling protein GUN1 regulates tetrapyrrole biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 24900–24906.
- Shipman-Roston, R.L., Ruppel, N.J., Damoc, C., Phinney, B.S., and Inoue, K. (2010). The Significance of Protein Maturation by Plastidic Type I Signal Peptidase 1 for Thylakoid Development in *Arabidopsis* Chloroplasts. *Plant Physiol.* 152, 1297–1308.
- Shipman, R.L., and Inoue, K. (2009). Suborganellar localization of plastidic type I signal peptidase 1 depends on chloroplast development. *FEBS Lett.* 583, 938–942.
- Sjögren, L.L.E., and Clarke, A.K. (2011). Assembly of the Chloroplast ATP-Dependent Clp Protease in *Arabidopsis* Is Regulated by the ClpT Accessory Proteins. *Plant Cell* 23, 322–332.
- Sjögren, L.L.E., Tanabe, N., Lymperopoulos, P., Khan, N.Z., Rodermel, S.R., Aronsson, H., and Clarke, A.K. (2014). Quantitative Analysis of the Chloroplast Molecular Chaperone ClpC/Hsp93 in *Arabidopsis* Reveals New Insights into Its Localization, Interaction with the Clp Proteolytic Core, and Functional Importance. *J. Biol. Chem.* 289, 11318–11330.
- Ståhl, A., Nilsson, S., Lundberg, P., Bhushan, S., Biverstahl, H., Moberg, P., Morisset, M., Vener, A., Måler, L., Langel, U., et al. (2005). Two Novel Targeting Peptide Degrading Proteases, PrePs, in Mitochondria and Chloroplasts, so Similar and Still Different. *J. Mol. Biol.* 349, 847–860.
- Tapken, W., Kim, J., Nishimura, K., van Wijk, K.J., and Pilon, M. (2015). The Clp protease system is required for copper ion-dependent turnover of the PAA2/HMA8 copper transporter in chloroplasts. *New Phytol.* 205, 511–517.
- Teixeira, P.F., and Glaser, E. (2013). Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 360–370.
- Teixeira, P.F., Kmiec, B., Branca, R.M.M., Murcha, M.W., Byzia, A., Ivanova, A., Whelan, J., Drag, M., Lehtiö, J., and Glaser, E. (2017). A multi-step peptidolytic cascade for amino acid recovery in chloroplasts. *Nat. Chem. Biol.* 13, 15–17.
- Thompson, M.W., Singh, S.K., and Maurizi, M.R. (1994). Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 269, 18209–18215.
- Thomson, S.M., Pulido, P., and Jarvis, R.P. (2020). Protein import into chloroplasts and its regulation by the ubiquitin-proteasome system. *Biochem. Soc. Trans.* 48, 71–82.

- Trösch, R., and Jarvis, P. (2011). The Stromal Processing Peptidase of Chloroplasts is Essential in Arabidopsis, with Knockout Mutations Causing Embryo Arrest after the 16-Cell Stage. *PLoS One* 6, e23039.
- Varshavsky, A. (2011). The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci.* 20, 1298–1345.
- Wagner, R., Aigner, H., and Funk, C. (2012). FtsH proteases located in the plant chloroplast. *Physiol. Plant.* 145, 203–214.
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081–1086.
- Wang, L., Kim, C., Xu, X., Piskurewicz, U., Dogra, V., Singh, S., Mahler, H., and Apel, K. (2016). Singlet oxygen- and EXECUTER1-mediated signaling is initiated in grana margins and depends on the protease FtsH2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E3792–E3800.
- Welsch, R., Zhou, X., Yuan, H., Álvarez, D., Sun, T., Schlossarek, D., Yang, Y., Shen, G., Zhang, H., Rodriguez-Concepcion, M., et al. (2018). Clp Protease and OR Directly Control the Proteostasis of Phytoene Synthase, the Crucial Enzyme for Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis. *Mol. Plant* 11, 149–162.
- van Wijk, K.J. (2015). Protein Maturation and Proteolysis in Plant Plastids, Mitochondria, and Peroxisomes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 75–111.
- Wu, G.-Z., Chalvin, C., Hoelscher, M., Meyer, E.H., Wu, X.N., and Bock, R. (2018). Control of Retrograde Signaling by Rapid Turnover of GENOMES UNCOUPLED1. *Plant Physiol.* 176, 2472–2495.
- Yamasato, A., Nagata, N., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2005). The N-Terminal Domain of Chlorophyllide a Oxygenase Confers Protein Instability in Response to Chlorophyll b Accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 1585–1597.
- Yu, F., Park, S., and Rodermel, S.R. (2004). The Arabidopsis FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J.* 37, 864–876.
- Yu, F., Park, S., and Rodermel, S.R. (2005). Functional Redundancy of AtFtsH Metalloproteases in Thylakoid Membrane Complexes. *Plant Physiol.* 138, 1957–1966.
- Yuan, H., Pawlowski, E.G., Yang, Y., Sun, T., Thannhauser, T.W., Mazourek, M., Schnell, D., and Li, L. (2020). Arabidopsis ORANGE protein regulates plastid preprotein import through interacting with Tic proteins. *J. Exp. Bot. (in press)*, <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa528>.
- Yue, R., Wang, X., Chen, J., Ma, X., Zhang, H., Mao, C., and Wu, P. (2010). A Rice Stromal Processing Peptidase Regulates Chloroplast and Root Development. *Plant Cell Physiol.* 51, 475–485.
- Zaltsman, A., Ori, N., and Adam, Z. (2005). Two Types of FtsH Protease Subunits Are Required for Chloroplast Biogenesis and Photosystem II Repair in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 2782–2790.
- Zhong, R., Wan, J., Jin, R., and Lamppa, G. (2003). A pea antisense gene for the chloroplast stromal processing peptidase yields seedling lethals in Arabidopsis : survivors show defective GFP import in vivo. *Plant J.* 34, 802–812.

Zybaïlov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., and van Wijk, K.J. (2008). Sorting Signals, N-Terminal Modifications and Abundance of the Chloroplast Proteome. PLoS One 3, e1994.

## 葉緑体オートファジーの研究展開：植物を超えた議論の発展を目指して

中村咲耶<sup>1</sup>, 泉正範<sup>1</sup>

<sup>1</sup>理化学研究所 環境資源科学研究センター  
〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

### Study on chloroplast autophagy for the development of cell biology

Sakuya Nakamura<sup>1</sup> & Masanori Izumi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Sustainable Resource Science (CSRS), RIKEN

2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

Keywords: autophagy; chlorophagy; chloroplasts, organelle dynamics, ubiquitination

DOI: 10.24480/bsj-review.12a8.00201

#### 1. はじめに

葉緑体は、光合成真核生物に特徴的なオルガネラであり、光合成を中心に様々な代謝反応を担っている。陸上植物は、葉の老化過程や栄養欠乏時に葉緑体タンパク質を活発に分解し、派生するアミノ酸などの栄養成分を何度もリサイクルしながら成長していく。近年、我々を含む複数の研究グループにより、真核生物に保存される細胞内自己分解システム・オートファジーが葉緑体分解を担うことが明らかにされ、さらにその詳細な分子機構の解明が進められている。

植物は、多量の栄養素を葉緑体に投資しているため、その分解機構は、派生する大量の栄養成分の体内再利用効率に深く関わる。また葉緑体分解は必然的に光合成活性を低下させるため、植物の炭素同化効率にも作用する現象である。ゆえに葉緑体分解機構は、複数の局面で植物の生き様、作物の生産性と密接に関わっており、その詳細な理解は植物科学研究の重要課題の一つであると言える。

しかしながら我々は、葉緑体分解の研究には、植物の枠に収まらずに、より広範な生物学分野の研究者にまで訴えかけることのできる強い魅力があると確信している。その研究展開を通して、植物の生き様の理解に加え、広範な生物学研究の発展にまで寄与することができれば、研究自体の学術的意義と、シンプルなおもしろさがより増すのではないかと。2020年9月に行われた日本植物学会第84回大会において、「植物学が先導する形で、生物全般に普遍的な現象や進化の仕組みなど、新しい発見を広く発信していく学問を創出するための一歩を踏み出す」ことを目指し「葉緑体学事始」と銘打って行われたシンポジウムに基づき執筆する本稿においては、上述のような幅広い生物学、特に複数の生物種における細胞生物学研究の知見とも比較しながら、最新の葉緑体分解機構の成果、今後の方向性を議論させていただきたい。

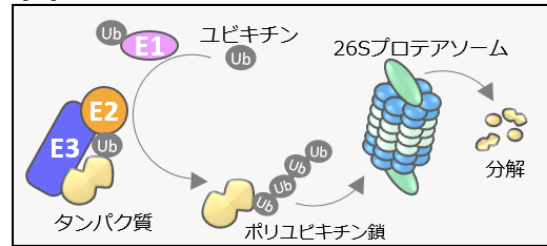
## 2. 葉緑体オートファジーにおけるユビキチン化の役割

### 2-1. ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー

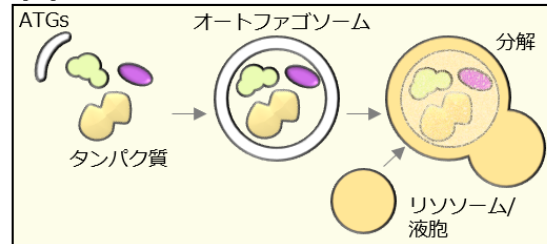
ユビキチン・プロテアソーム系は、真核生物に保存される主要な細胞内分解系であり、オートファジーと並ぶ二大分解系と称されることも多い (図 1; Dikic, 2017)。ユビキチン・プロテアソーム系に関する成果が 2004 年にノーベル化学賞を、オートファジーの成果が 2016 年にノーベル生理学・医学賞を受賞していることから、これら細胞内分解系の研究が学問の発展に大きく寄与してきたことが分かる。典型的なオートファジー経路である「マクロオートファジー」では、新生二重膜小胞であるオートファゴソームが細胞質の一部を隔離し、酸性オルガネラである液胞 (植物や酵母) あるいはリソソーム (動物細胞) に運んで分解する (図 1B; Nakatogawa, 2020)。一方のユビキチン・プロテアソーム系では、分子量 8.6 kDa ほどの小さなタンパク質ユビキチンが、ユビキチン活性化酵素 E1, ユビキチン結合酵素 E2, ユビキチン転移酵素 E3 の働きによって分解対象タンパク質のいわば「目印」として付与される (図 1A)。現在ではユビキチン化はタンパク質分解に限らず複数の細胞内現象を励起するシグナルになることが分かっているが、特にユビキチン自身の 48 番目のリシンを介して多数のユビキチンが連結するポリユビキチン鎖が形成されたタンパク質は、細胞質のタンパク質分解複合体である 26S プロテアソームにより分解される (Chau et al., 1989)。一般的に、生物は極めて多様なユビキチン転移酵素を有しており、それぞれが特異的なユビキチン化ターゲットを持つため、ユビキチン・プロテアソーム系は非常に基質特異性の高いタンパク質分解が可能とされている (Dikic, 2017)。この点において、細胞質の一部やオルガネラを「まとめて運んで分解する」オートファジーとは対照的な分解系であり、特性の異なる両分解系がそれぞれの役割を担うことにより、様々な生命機能を支えているものと考えられる。

一方で、特に哺乳類細胞における細胞内分解システム研究の進展により、ユビキチン化さ

#### (A) ユビキチン・プロテアソーム系



#### (B) マクロオートファジー



#### (C) ユビキチン化による選択的マイトファジー

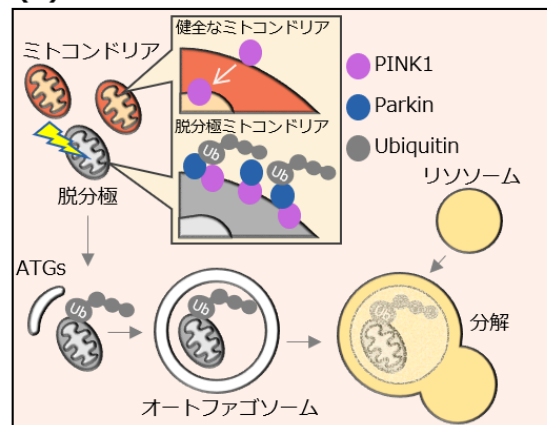


図 1. ユビキチン・プロテアソーム系, マクロオートファジー, マイトファジーの概要図

(A) ユビキチン・プロテアソーム系では、ユビキチン活性化酵素 E1, ユビキチン結合酵素 E2, ユビキチン転移酵素 E3 の働きにより、ユビキチンが分解対象タンパク質に付与される。48 番目のリシンを介してポリユビキチン鎖が付与されたタンパク質は 26S プロテアソーム複合体により分解される。

(B) マクロオートファジーでは、オートファジー関連タンパク質 (ATG タンパク質) の働きにより、新生二重膜小胞オートファゴソームが形成され、それにより隔離された細胞質成分が液胞/リソソームに運ばれる。外膜が液胞膜/リソソーム膜と融合し、内膜構造 (オートファジックボディ) が分解される。

(C) 哺乳類細胞で起こる PINK1/Parkin 型マイトファジーでは、脱分極したミトコンドリア外膜にミトコンドリア移行キナーゼ PINK1 が蓄積し、細胞質に存在する E3, Parkin によるミトコンドリアのユビキチン化を促進する。ユビキチンが蓄積したミトコンドリアは、オートファゴソームの選択的分解基質となる。

れた基質がオートファジーの分解対象となる例が知られるようになった (Shaid et al., 2013)。特に研究が盛んにおこなわれてきた例が、哺乳類細胞において脱分極した故障ミトコンドリアを除去するオートファジーである PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/Parkin 型マイトファジーである (図 1C; Pickles et al., 2018)。この経路については極めて多数の学術論文が発表されており、本稿ではその説明は概要のみにとどめる。ミトコンドリアに移行するキナーゼ PINK1 は、正常なミトコンドリアではミトコンドリア内部にまで移行しプロテアーゼの作用で分解されるが、脱分極しエネルギー生産ができなくなったミトコンドリアでは、PINK1 がミトコンドリア外膜に蓄積し、細胞質の E3 である Parkin によるミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化を促進する。ユビキチン化したミトコンドリアはオートファゴソームの分解基質となり速やかに除去される。この過程で、PINK1 によるユビキチンのリン酸化が重要なトリガーとなること、分解対象とオートファゴソーム膜の橋渡しを担う「オートファジー受容体」がユビキチン鎖と結合することでオートファゴソームがミトコンドリアを隔離すること、などが明らかにされている (Koyano et al., 2014; Lazarou et al., 2015)。

## 2-2. ユビキチン化とクロロファジー

ミトコンドリアと同じく電子伝達鎖を介したプロトン勾配を利用して ATP を生産する葉緑体においても、機能破綻、ユビキチン化、オートファジー誘導という分解現象が起こることは多くの研究者がイメージしていたかもしれない。そして私たちは、シロイヌナズナにおいて、強い可視光や紫外線による光障害時に、葉緑体が丸ごと液胞に除去されるオートファジー・クロロファジーが起こることを発見した (Izumi et al., 2017)。さらにこの経路は、主に包膜障害が生じた葉緑体を選び取って除去するオルガネラ選択的オートファジーであることも示した (図 2A; Nakamura et al., 2018)。一方、これら成果に先んじて、活性酸素の一種、一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) が過剰蓄積した葉緑体が、細胞質局在の E3 である PLANT U-BOX4 (PUB4) によりユビキチン化された後に消化される経路の存在が提唱された (図 2B; Woodson et al., 2015)。これらの発見により、PUB4 によるユビキチン化がクロロファジーのトリガーとなる可能性が想起された。

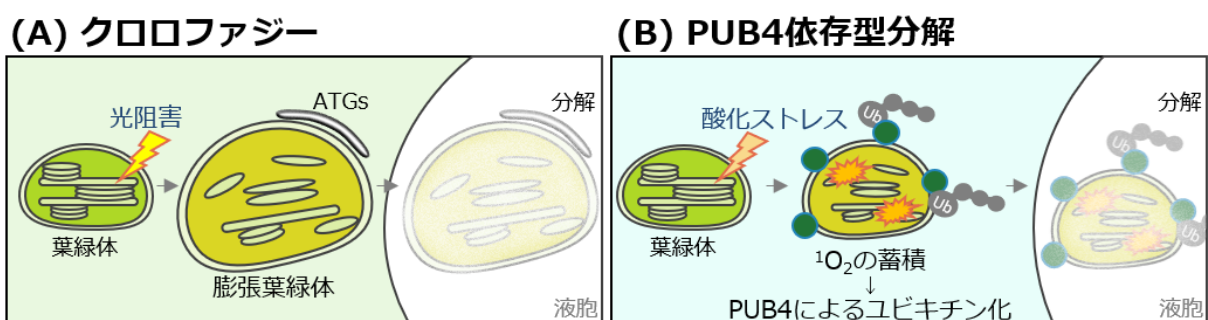


図 2. 葉緑体分解を担うクロロファジーと PUB4 によるユビキチン化の概要図

(A) 障害葉緑体を除去するクロロファジーの模式図。強い可視光による光障害にさらされると、一部の葉緑体が膜障害により膨張する。そのような葉緑体は、オートファジー関連タンパク質の働きにより液胞内部へ除去される。

(B) PUB4 が誘導する葉緑体分解のモデル図。一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) が過剰蓄積した葉緑体は細胞質の E3, PUB4 によるユビキチン化を受け、最終的に液胞で消化される。この経路は、一重項酸素の一過剰な過剰蓄積を誘起できる FERROCHELATASE 2 変異株 (*fc2*) において活発に起こることが報告されている。

そこで我々は、PUB4による葉緑体ユビキチン化を見出したグループとも協力し、PUB4のシロイヌナズナ点変異株 *pub4-6* を用いてクロロファジー活性の定量評価を行った (Kikuchi et al., 2020)。まず光障害処理を施したシロイヌナズナ生葉の共焦点レーザー顕微鏡観察において、*pub4-6* 変異株でクロロファジーが通常に起こることを確認した (図 3A)。生化学的な分解活性評価も、*pub4-6* 変異株でも野生株と同様にクロロファジーが起きていることを支持した (Kikuchi et al., 2020)。また、葉緑体タンパク質のユビキチン化を担う別の E3 として Suppressor of PPI1 locus 1 (SP1) も報告されていたが (Ling et al., 2012), *sp1* 変異株, *sp1 pub4-6* 二重変異株においても、クロロファジー活性が低下することは無かった。これらの成果から、PUB4 含む既知の葉緑体ユビキチン化はクロロファジーの誘導トリガーではないことが示された (Kikuchi et al., 2020)。現状、植物オートファジー研究においては、先行している哺乳類や酵母での成果を参考にしたトピック性をもって研究が発表されることも多いが、今回の我々の解析は、クロロファジーと PUB4 の関係性は、哺乳類ミトファジーと Parkin の関係性とは異なることを証明した。

上述した葉緑体に関わる 2 つの E3 のうち、SP1 は、葉緑体のタンパク質輸送装置 Translocon on the outer chloroplast membrane (TOC) サブユニットのユビキチン化、26S プロテアソームによる分解を担うことが明らかにされている (Ling et al., 2012; Ling et al., 2019)。一方で、PUB4 の具体的な機能は不明瞭である。そこで我々は PUB4 とオートファジーの関係性をより多角的に検証するため、*pub4-6* とオートファジー関連遺伝子 *AUTOPHAGY5* (*ATG5*) の二重変異株を作成し、表現型解析を行った (Kikuchi et al., 2020)。その結果、二重変異株は、複数の局面

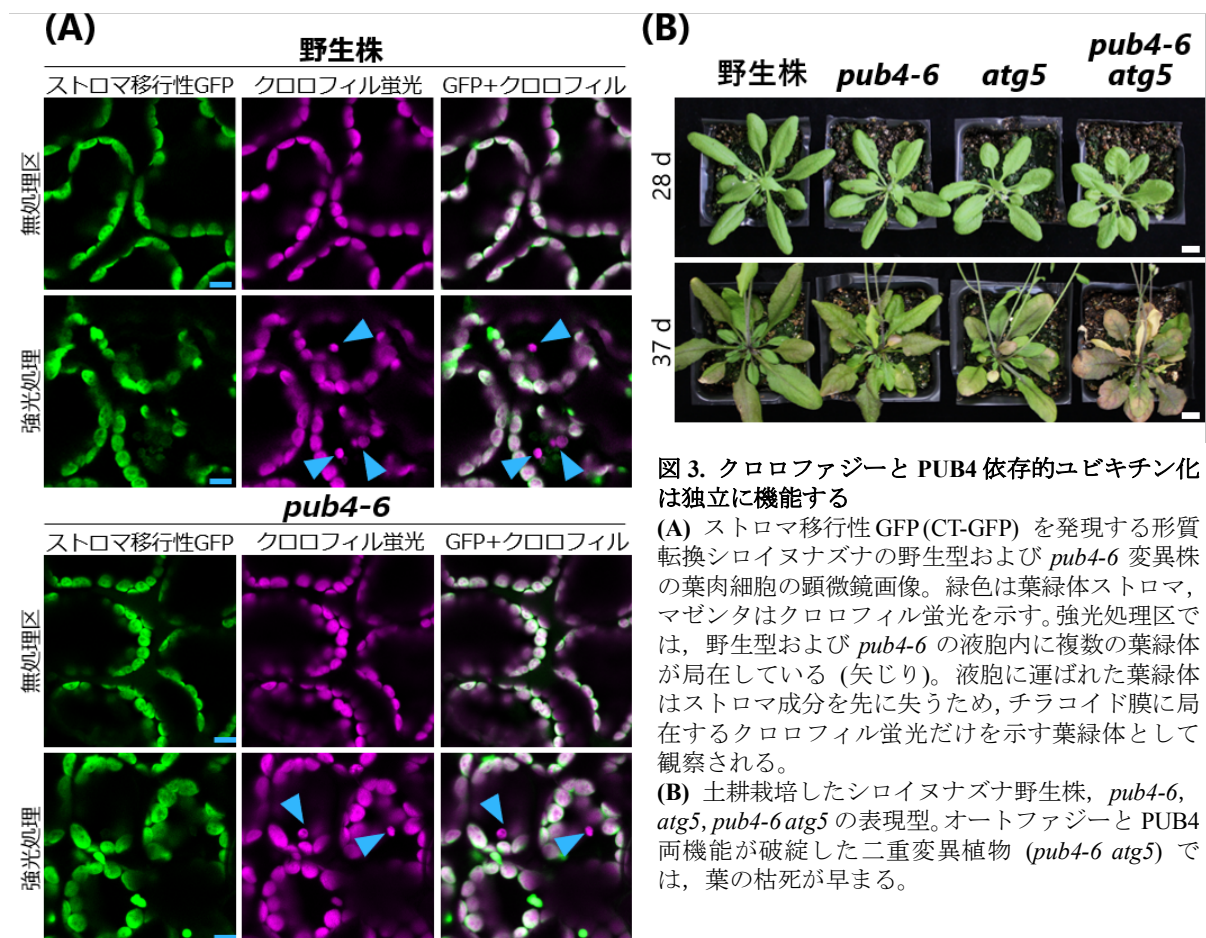


図 3. クロロファジーと PUB4 依存的ユビキチン化は独立に機能する

(A) ストロマ移行性 GFP (CT-GFP) を発現する形質転換シロイヌナズナの野生型および *pub4-6* 変異株の葉肉細胞の顕微鏡画像。緑色は葉緑体ストロマ、マゼンタはクロロフィル蛍光を示す。強光処理区では、野生型および *pub4-6* の液胞内に複数の葉緑体が局在している (矢じり)。液胞に運ばれた葉緑体はストロマ成分を先に失うため、チラコイド膜に局在するクロロフィル蛍光だけを示す葉緑体として観察される。

(B) 土耕栽培したシロイヌナズナ野生株, *pub4-6*, *atg5*, *pub4-6 atg5* の表現型。オートファジーと PUB4 両機能が破綻した二重変異植物 (*pub4-6 atg5*) では、葉の枯死が早まる。

で一重変異体よりもシビアな表現型を示すことが分かった。例えば土耕 (富栄養条件) で栽培した際には、二重変異体の葉でより活性酸素が蓄積し、黄化 (クロロシス) が促進した (図 3B)。また種子の形成不全も観察された。そして、タンパク質分解による栄養素リサイクルが活性化される窒素欠乏、あるいは炭素欠乏 (暗所) 条件においては、葉・植物体の枯死が野生株、それぞれの一重変異株よりも早く起こった。これら二重変異による相加的な表現型は全て、オートファジーと PUB4 依存的ユビキチン化が独立に機能しており、その両者が共に機能不全となることで植物の成長や飢餓適応がより強く阻害されたことを示している。

以上、我々の研究成果は、PUB4 によるユビキチン化とクロロファジーはそれぞれ独立に機能していることを強く支持した。残念ではあるが「では何がクロロファジーのトリガー分子なのか」という質問に答える成果を今は持ち合わせていない。未知の E3 によるユビキチン化が関わっている可能性も残っているし、オートファジー受容体の関与も想定される。そのような因子を今後着実に同定していくことで、ミトファジーとクロロファジーの類似性、差異、生物種をまたいだオルガネラ・オートファジーの保存性についてより深く正確な議論を進めていきたいと考えている。

### 3. ミクロオートファジーの作動機構

「オートファジー」という言葉が示す現象の意味は拡大している。いわゆる典型的なオートファジーとして研究が進められてきた「マクロオートファジー」以外の複数のオートファジー経路の研究も盛んに行われるようになってきている。その中でも、古くからその存在が示唆されていたにも関わらず、明瞭な仕組みや定義が未だ確立されていない現象が「ミクロオートファジー」である。マクロオートファジーでは二重膜小胞オートファゴソームが分解対象を隔離するが、液胞・リソソームの膜自身が分解対象の隔離に関わることがミクロオートファジーの特徴である (Oku and Sakai, 2018)。マクロオートファジーに必要なオートファジー関連遺伝子群 (ATG 遺伝子群) が必要なタイプのミクロオートファジーと、ATG 遺伝子を必要とせず、主に Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) 因子が必要とされるタイプのミクロオートファジーがあることが報告されており (図 4A, B), 分解経路とし

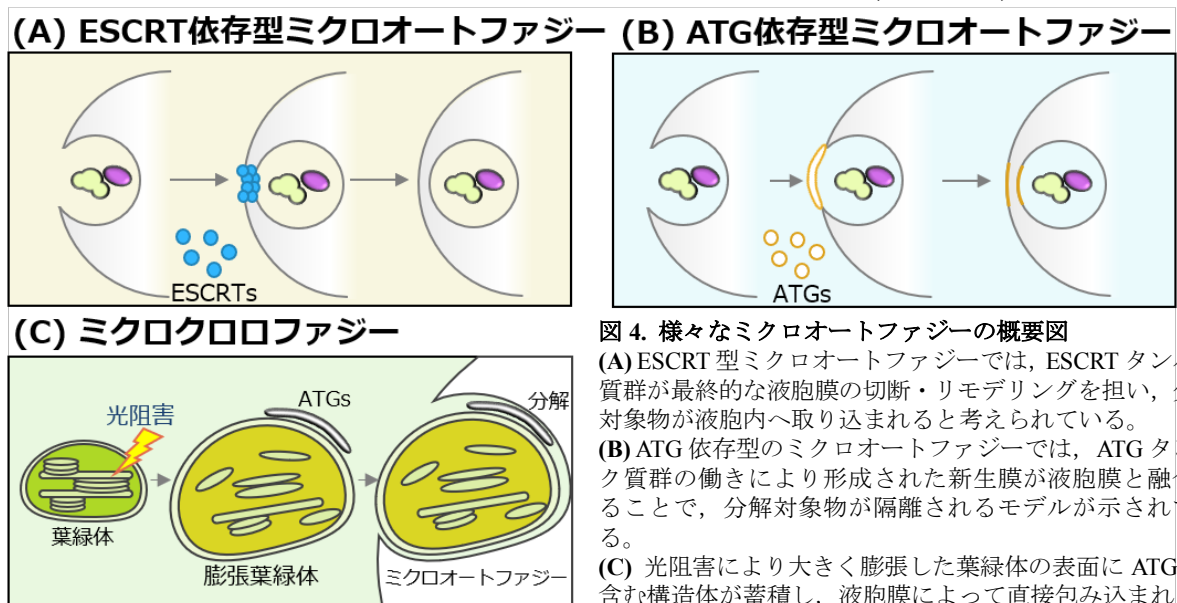


図 4. 様々なミクロオートファジーの概要図

(A) ESCRT 型ミクロオートファジーでは、ESCRT タンパク質群が最終的な液胞膜の切断・リモデリングを担い、分解対象物が液胞内へ取り込まれると考えられている。

(B) ATG 依存型のミクロオートファジーでは、ATG タンパク質群の働きにより形成された新生膜が液胞膜と融合することで、分解対象物が隔離されるモデルが示されている。

(C) 光阻害により大きく膨張した葉緑体の表面に ATG8 を含む構造体が蓄積し、液胞膜によって直接包み込まれる。この過程で ATG8 構造体が膜の閉じ込みを担っているか、あるいは別の役割を持つかははっきりしていない。



ての統一見解の構築に至っていない現状がある (Schuck, 2020)。なお、特に植物においては「マクロオートファジー」と「ミクロオートファジー」という呼称は混乱を呼ぶことが多い。それは、植物細胞では一般的に「液胞サイズ>オートファゴソムのサイズ」であることが主要因だと考えられる。これは、最初にミクロオートファジーという現象が示された哺乳類の細胞においては「オートファゴソムのサイズ>リソソムのサイズ」であったために「ミクロ」という言葉が使われ、その名称が現在まで使用されているという経緯があるようである。

我々は、障害葉緑体を除去するクロロファジーが、液胞膜が葉緑体の隔離に関わるミクロオートファジー動態を経ることを明らかにしている (Nakamura et al., 2018)。この経路は、オートファゴソム膜の伸長過程で起こる ATG8 とリン脂質 Phosphatidylethanolamine (PE) 結合反応に必要な遺伝子 *ATG5*, *ATG7* 等の欠損により起こらなくなることから、*ATG* 遺伝子を必要とするタイプのミクロオートファジーである。クロロファジーの過程で緑色蛍光タンパク質 (GFP)-ATG8 でラベルされた大きな構造体が分解対象の葉緑体表面に局在する様子を捉えており (Nakamura et al., 2018)、これらオートファジー膜構造が分解対象の認識や隔離において必須の機能を担っていると考えられるが、その詳細な機能の同定には至っていない (図 4C)。*ATG* 遺伝子依存型ミクロオートファジーとして明確に確立されてきたのは、メタノール資化性酵母でおこるペルオキシソーム分解・ペキソファジー (Oku and Sakai, 2018) など一部に限られているため、今後クロロファジーに必要な遺伝子群を同定していくことで、ミクロオートファジーの駆動の仕組みの解明、生物種を超えた議論を進展させていくための新たな知見を得ることができると期待される。

#### 4. 葉緑体部分分解オートファジーの局所分裂の仕組み

これまでは、光障害時に起こる障害葉緑体の全分解・クロロファジー について主に述べてきたが、葉緑体の一部を分解するピースミールタイプのオートファジーが起こることが複数のグループにより示されている。特に我々は、葉緑体ストロマと包膜の一部を含む小胞 Rubisco-containing body がオートファゴソムの積荷として運ばれるマクロオートファジー経路が、光合成阻害時のストロマトンパク質分解、アミノ酸再利用に寄与することを報告してきた (Ishida et al., 2008; Izumi et al., 2015; Hirota et al., 2018)。特に本経路は切離葉を暗所でインキュベートした際に活性化し、その際、液胞型 H-ATPase の阻害剤である Concanamycin A を添加し液胞分解活性を阻害すると、CO<sub>2</sub>固定酵素 Rubisco を含む 1 μm 程度のオートファジー小胞が液胞内に蓄積する様子を観察することが出来る (図 5A)。クロロファジーという葉緑体を丸ごと分解するオートファジーと、全体は維持しつつ中身だけを部分的に分解するオートファジーの両者が存在することが、環境変化や成長段階に応じて葉の光合成機能・栄養利用を適切にコントロールしている可能性があり、両者の作動原理の違いは非常に興味深いポイントである。

一方、ここで再び酵母・哺乳類マイトファジーの知見に目を向けると、マイトファジーにおいてもミトコンドリアの一部がオートファゴソムの発達に応じて「ちぎり取られる」こ

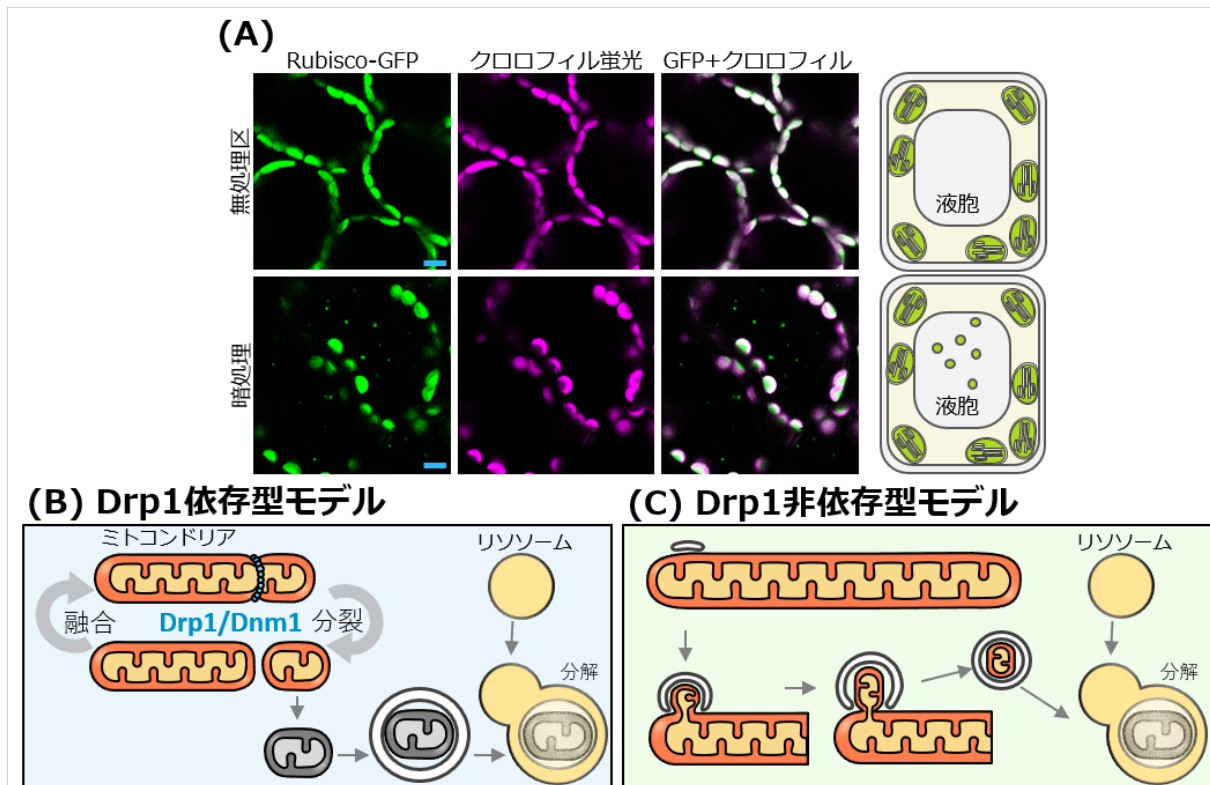


図 5. 二重膜オルガネラの局所分裂機構

(A) GFP でラベルした Rubisco (Rubisco-GFP) を発現するシロイヌナズナ形質転換体の葉肉細胞の顕微鏡画像。緑色は Rubisco-GFP 蛍光、マゼンタはクロロフィル蛍光を示す。暗処理による炭素飢餓条件、液胞型  $H^+$ -ATPase の阻害剤 concanamycin A 存在下では、液胞内に Rubisco-GFP をもつオートファジックボディが多数蓄積する。(B, C) Drp1 依存・非依存型マイトファジーの想定モデル図。哺乳類細胞や出芽酵母においては、ミトコンドリア分裂に関わる Drp1 欠損により巨大ミトコンドリアが生じる細胞においても、マイトファジーが起こることから、オートファジーと協調して働く分裂機構の存在が示唆されている。

とが報告されている (Yamashita et al., 2016)。マイトファジーのモデルとしては、「ミトコンドリアは融合・分裂を繰り返しており、障害を受けたミトコンドリアは断片化して取り残され、マイトファジーの分解基質となる」という概念が示されていたが (図5B; Twig and Shirihai, 2011), ミトコンドリア分裂に必要な因子 DRP1 (Dynamin-related protein 1) が欠損したヒト細胞においても、分裂異常により巨大化したミトコンドリアの一部がオートファゴソームの伸長に伴いちぎり取られる様子が観察され、同様の現象は野生株 Hela 細胞でも検出された (Yamashita et al., 2016)。これらの現象は、マイトファジーと同調して起こるミトコンドリア分裂機構が存在することを示唆している (図5C)。なお、表題2で述べた PINK1/Parkin 型マイトファジーは脱共役剤による脱分極時に活性化するが、ここで述べたマイトファジーは、酸素欠乏 (Hypoxia) や、鉄キレート剤添加による鉄欠乏で活性化する経路である。このような経路では、ミトコンドリア外膜に局在するタンパク質 FUN14 domain-containing protein 1 (FUDC1), あるいは、B-cell lymphoma 2 (BCL2) ファミリータンパク質である BCL2 / adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP3), BNIP3L / Nix 等が、オートファジー受容体として機能することが報告されている (Bellot et al., 2009; Liu et al., 2012)。よって上述のようなストレス時には、PINK1 / Parkin 型マイトファジーとは異なるタイプのマイトファジーが起きているものと考えられる。

我々も、シロイヌナズナ生葉における葉緑体部分分解オートファジーのライブセルイメー

ジング解析を進めており、上述のマイトファジー同様に、葉緑体表面でオートファゴソーム膜が発達し、それに伴い葉緑体の一部が Rubisco-containing body として小胞化する様子を予備的に捉えている。よって、葉緑体においても、ピースミールなオートファジーと協調して葉緑体を局所的に分裂させる仕組みが備わっている可能性が高いと考えている。その仕組みに詳しく迫っていくことで、葉緑体とミトコンドリアの部分分解の仕組みの共通性、両二重膜オルガネラを対象とするオートファジー機構について、新たな知見を得ていきたい。

## 5. おわりに

以上、本稿では、我々の葉緑体オートファジー研究に関する最近の知見と、関連する他の生物種での知見を組みあわせ、植物科学の枠をこえた議論を展開した。現実的には、未発表のデータについて本稿で詳細に触れることが難しいこともあり、「広範な生物学研究への貢献」という目標には程遠い小さな議論になってしまっているが、このような場での議論を一つのきっかけとし、自分たちの研究を整理し意見を頂戴しながら、更なる発展につなげていきたい。また我々の場合、「オートファジー」という様々な生物種に保存されていることが分かっている現象に着目していることから、生物種をまたいだ議論がしやすいという点が現実にある。しかしながら、各々が非常におもしろい生命現象に着目している植物科学者達が、それぞれ自分の誇れる現象・要素を植物の枠を超えて発信していくことが、植物科学の更なる発展にも役立つのではないかと若輩者ながら感じている。我々もそのような植物科学の発展の一助となることを目指し、さらなる研究発展に取り組んでいきたい。

## 謝辞

本稿で紹介した研究は、JSPS 科学研究費補助金(課題番号 JP17H05050・代表:泉, JP19H04712・代表:泉, JP20H04916・代表:泉, JP20K21322・代表:泉, JP19J01681・代表:中村, JP20K15501・代表:中村, JP20H05352・代表:中村)の支援を得て遂行した。また本稿で示したデータに使用した、ストロマ移行 GFP 発現シロイヌナズナ, *atg5* 変異株, *pub4-6* 変異株は、それぞれ Cornell 大学・Maureen R. Hanson 博士, 明治大学・吉本光希博士, Arizona 大学・Jesse D. Woodson 博士から分与いただいたものである。

## 引用文献

- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., Mazure, N.M. 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol.* 29: 2570–2581
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., Varshavsky, A. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science.* 243: 1576–1583
- Dikic, I. 2017. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem.* 86: 193–224
- Hirota, T., Izumi, M., Wada, S., Makino, A., Ishida, H. 2018. Vacuolar protein degradation via autophagy provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 59:1363–1376

- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R., Mae, T. 2008. Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.* 148: 142–155
- Izumi, M., Hidema, J., Wada, S., Kondo, E., Kurusu, T., Kuchitsu, K., Makino, A., Ishida, H. 2015. Establishment of monitoring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of chloroplasts and root plastids during energy limitation. *Plant Physiol.* 167: 1307–1320
- Izumi, M., Ishida, H., Nakamura, S., Hidema, J. 2017. Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. *Plant Cell.* 29: 377–394
- Kikuchi, Y., Nakamura, S., Woodson, J.D., Ishida, H., Ling, Q., Hidema, J., Jarvis, R.P., Hagihara, S., Izumi, M. 2020. Chloroplast Autophagy and Ubiquitination Combine to Manage Oxidative Damage and Starvation Responses. *Plant Physiol.* 183: 1531–1544
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E.A., Trempe, J.F., Saeki, Y., Tanaka, K., Matsuda, N. 2014. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature.* 510: 162–166
- Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., Sarraf, S.A., Wang, C., Burman, J.L., Sideris, D.P., Fogel, A.I., Youle, R.J. 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* 524: 309–314
- Ling, Q., Broad, W., Trosch, R., Topel, M., Demiral Sert, T., Lymperopoulos, P., Baldwin, A., Jarvis, R.P. 2019. Ubiquitin-dependent chloroplast-associated protein degradation in plants. *Science.* 363: eaav4467
- Ling, Q.H., Huang, W.H., Baldwin, A., Jarvis, P. 2012. Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science.* 338: 655–659
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., Chen, Q. 2012. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 14: 177–185
- Nakamura, S., Hidema, J., Sakamoto, W., Ishida, H., Izumi, M. 2018. Selective elimination of membrane-damaged chloroplasts via microautophagy. *Plant Physiol.* 177: 1007–1026
- Nakatogawa, H. 2020. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21: 439–458
- Oku, M., Sakai, Y. 2018. Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries. *Bioessays.* 40: e1800008
- Pickles, S., Vigie, P., Youle, R.J. 2018. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr Biol.* 28: R170–R185
- Schuck, S. 2020. Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *J Cell Sci.* 133: jcs246322
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., Dikic, I. 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* 20: 21–30
- Twig, G., Shirihai, O.S. 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid*

*Redox Signal.* 14: 1939–1951

Woodson, J.D., Joens, M.S., Sinson, A.B., Gilkerson, J., Salome, P.A., Weigel, D., Fitzpatrick, J.A., Chory, J. 2015. Ubiquitin facilitates a quality-control pathway that removes damaged chloroplasts. *Science.* 350: 450–454

Yamashita, S.I., Jin, X., Furukawa, K., Hamasaki, M., Nezu, A., Otera, H., Saigusa, T., Yoshimori, T., Sakai, Y., Mihara, K., Kanki, T. 2016. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol.* 215: 649–665