

博士(生命科学) 長根智洋

学位論文題名

クロロフィル分解経路の解析

学位論文内容の要旨

高等植物においてクロロフィル *a* はグルタミン酸から約 15 段階の酵素反応を経て合成される。クロロフィル代謝系における中間体は活性酸素を誘導するため、また、光化学系の形成に必要なクロロフィルを過不足なく供給するため、その合成は厳密に制御されている。この制御は、酵素遺伝子の発現、酵素タンパク質の安定化、フィードバック機構により活性調節など、様々な機構によって行われている。

クロロフィル *a* は 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* を経てクロロフィル *b* に転換され、クロロフィル *b* は再び 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* を経てクロロフィル *a* に戻る。この相互転換系はクロロフィルサイクルと呼ばれている。葉の老化時において、クロロフィル *b* はクロロフィル *a* に転換された後、数種の中間体を経て液胞に輸送され分解すると考えられている。このような意味で、クロロフィル *b* からクロロフィル *a* への変換は、クロロフィル分解の最初の反応である。しかし、クロロフィル合成系と異なり、クロロフィルサイクル及びクロロフィル分解経路においては、酵素や調節因子など未解明な部分が多く残されており、その実態は明らかになっていない。

そこで、本研究ではクロロフィルサイクルおよびクロロフィル分解経路に関する新たな知見を得ることを目的とし、光合成色素が野生株と異なる蓄積パターンを示すシロイヌナズナエチルメタン硫酸塩(EMS)処理株を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりスクリーニングした。その結果、クロロフィルサイクルの中間体である 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* を蓄積する変異株を単離することができ、*hmc1* (7-hydroxymethyl chlorophyll *a* accumulation) と名付けた。

hmc1 変異株の表現型を解析した結果、*hmc1* 変異株は野生株と比べて植物体が小さく、成長遅延がみられた。また、HPLC による色素解析の結果、*hmc1* 変異株では野生株に比べて 10 倍以上の 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* が生育初期段階から蓄積していることがわかった。クロロフィル *b* が分解されない *nyc1* との 2 重変異体 *hmc1/nyc1* を解析した結果、この変異体では 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* は蓄積しなかった。このことによって、*hmc1* 変異株において蓄積した 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* はクロロフィル *b* からクロロフィル *a* への転換で蓄積したことがわかった。また、生育 4 週間後、暗所で 5 日間老化誘導を行うと、7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* に加えクロロフィル分解の中間体であるフェオホルビド *a* を蓄積することがわかった。

hmc1 変異株ではフェオホルビド *a* の蓄積に伴い、細胞死が誘導され、葉緑体が崩壊し、内部に大量の小胞が蓄積していることが光学顕微鏡及び電子

顕微鏡により観察された。また、*hmc1* 変異株では老化誘導を行うと、光化学系 I 及び光化学系 II の中心集光タンパク質の分解が野生型に比べて早く、クロロフィル分解に関わるタンパク質の蓄積が多いことがわかった。

マッピングにより、*hmc1* 変異株の原因遺伝子はシロイヌナズナ第 4 染色体上の At4g04770 であることがわかった。この原因遺伝子(NAP1)は NAP6、NAP7 と複合体を形成し、葉緑体内における鉄硫黄クラスター形成に関わることがこれまでに報告されている。EMS 処理による 1 塩基置換により、238 番目のアミノ酸がプロリンからロイシンに置換していた。このアミノ酸置換により、タンパク質の高次構造が変化したことが予測される。NAP1 の T-DNA 挿入株を解析した結果、種子の段階で致死であることがわかった。

以上の結果より、*hmc1* 変異株において 7-ヒドロキシメチルクロロフィル a とフェオホルビド a の蓄積は鉄硫黄クラスターの供給がうまくいかなくなつたために起きたことが予測された。しかし、PaO (フェオフォルビド a 酸素添加酵素) 及び HAR (7-ヒドロキシメチルクロロフィル a 還元酵素) それぞれの酵素反応に必要な還元力である Fd は内部に鉄硫黄クラスターを配位するが、ウエスタンブロッティングの結果、タンパク質の蓄積量に大きな変化はみられなかつた。また、PaO も内部に鉄硫黄クラスターを配位するが、タンパク質の蓄積量に大きな変化はみられなかつた。

NAP6 遺伝子の 3'-utr に T-DNA が挿入された変異株を解析した結果、*hmc1* 変異株と同じように植物体が小さく、成長遅延がみられ、クロロフィル量が低下していることがわかった。しかし、*hmc1* 変異株で特異的に蓄積する 7-ヒドロキシメチルクロロフィル a 及びフェオホルビド a の蓄積はみられなかつた。これらのことから *hmc1* 変異株におけるクロロフィル中間色素の蓄積は鉄硫黄クラスターの供給とは関連がないことが示唆された。

さらに NAP1 遺伝子は複合体因子である NAP6、NAP7 と発現パターンが異なり、老化誘導後に mRNA の発現が上昇することがわかった。ウエスタンブロッティングの結果からも NAP1 は老化誘導後に蓄積が増加していた。以上の結果より NAP1 は鉄硫黄クラスター形成以外に独自の機能を有している可能性が示唆された。

hmc1/nyc1 の二重変異体を老化誘導すると、*hmc1* で蓄積するフェオホルビド a の蓄積がみられなくなることがわかった。また、共焦点顕微鏡の観察の結果、*hmc1* 変異株において老化誘導時に小胞が観察された。

以上の結果から *hmc1* 変異株においては、現在広く受け入れられている経路以外の経路でクロロフィルの分解が起こり、その結果、フェオホルビド a が蓄積したことが示唆された。

本研究において、NAP1 がクロロフィル分解経路に関わっていること、またクロロフィル分解経路が複数存在することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　田　中　歩
副　查　教　授　山　口　淳　二
副　查　教　授　内　藤　哲

学　位　論　文　題　名

クロロフィル分解経路の解析

クロロフィルは、光合成において、光捕集や電子伝達など、中心的な役割を果たすテトラピロール化合物である。植物のクロロフィル代謝は、植物の生育や環境適応とも密接に関係しており、クロロフィル代謝に対する理解を深めることは、植物の代謝を理解する上で欠かすこととはできない。近年、クロロフィルの生合成については、分子レベルでの詳細な理解が進み、クロロフィル生合成経路に関与する酵素なども、ほぼすべて同定された。一方で、クロロフィルの分解経路や、また、クロロフィルサイクル（植物が持つ2種類のクロロフィル、chlorophyll *a* と chlorophyll *b* を相互転換する経路）については、まだ、酵素や経路の同定など、多くの課題が残されている。

著者は、クロロフィル生合成経路とクロロフィルサイクルについての理解を深めるために、これらの経路に異常のあるシロイヌナズナの変異体、*hmc1* の解析を進めた。著者は、まず、*hmc1* 変異体では、クロロフィルサイクルの中間体 7-hydroxymethyl chlorophyll (HMChl) が蓄積していることを見いだした。さらに、*hmc1* 変異体では、葉の老化時にクロロフィル分解の中間体、pheophorbide *a* が蓄積していることを見いだした。これらの結果は、*hmc1* 変異の原因遺伝子が HMChl と pheophorbide *a* という 2種類の化合物の代謝に何らかの形で関与していることを示している。

続いて、著者は、*HMC1* 遺伝子のクローニングに成功した。*HMC1* 遺伝子は、NAP1 とよばれる、鉄硫黄合成に必須の Suf 複合体のサブユニットをコードする遺伝子のホモログであった。*hmc1* 変異体においては、この NAP1 タンパク質の 238 番目のプロリンがロイシンに置換していると考えられた。著者は続いて、Suf 複合体の別なサブユニットの変異体の解析も行ったが、これ

らの変異体では、HMChl と pheophorbide *a* の蓄積は見られなかった。この結果は、NAP1 が、ほかのサブユニットとは異なる独自の役割を、クロロフィル代謝において果たしていることを示している。

著者は、クロロフィル代謝に関するさらなる知見を得るために、さらに、*hmc1* 変異体とほかのクロロフィル代謝の変異体 (chlorophyll *b* から HMChl に変換する反応に異常のある変異体 *nyc1*、また、chlorophyll のフィトール側鎖を切断する酵素の変異体 *c1h*) を掛け合わせることによって、以下の 2 つの事実を発見した。(1) *hmc1* 変異体における pheophorbide *a* 蓄積に、chlorophyll *b* を HMChl に代謝する反応が必須である。(2) 同様に、chlorophyll 的フィトール側鎖を切断する反応も必要である。これらの知見は、まず、第一に、*hmc1* 変異体における HMChl の蓄積が、HMChl から chlorophyll *b* への反応 (クロロフィルサイクルの最後の反応) の阻害によることを示している。第 2 に、*hmc1* 変異体において chlorophyll *b* を起点とし、chlorophyll のフィトール側鎖を経由する経路において、pheophorbide *a* が蓄積していることを示唆している。このような経路は、従来、考えられてきたクロロフィル分解経路とは異なっており、これまでに報告のない未知のクロロフィル分解経路であると考えられる。

著者は、さらに、*hmc1* 変異体の共焦点顕微鏡による観察を行い、*hmc1* 変異体において、pheophorbide *a* ではないかと思われる色素を持つ小胞が、葉緑体外に多数発生していることを見いだした。この結果は、上記の未知のクロロフィル分解経路が葉緑体外に存在することを示唆すると思われる。著者は、過去の報告などをもとに、この未知のクロロフィル代謝経路が、植物のウイルス感染や細菌感染の際に誘導される、緊急的なクロロフィル分解経路ではないかという仮説を提唱している。

これらの結果を要するに、著者は、未知のクロロフィル代謝経路に存在に関する新知見を得たものであり、これらの知見は、植物のテトラピロール研究に対して、非常に大きな貢献である。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認め
る。