

< 研究紹介 >

巨大化した葉緑体を持つシロイヌナズナ *crumpled leaf* 変異体の解析

吉岡 泰 (名古屋大学大学院・理学研究科)

シロイヌナズナの *crumpled leaf (crl)* は核ゲノムにコードされる遺伝子の変異体であり、シワシワした葉をもつ矮性の系統として単離された。*crl* 変異体では子葉が3枚になったり、ごくまれに1本の胚軸の先端に2つの茎頂分裂組織が存在すると思われるような個体も現れる。茎頂分裂組織が2つに増える変異体というのは珍しいので、*crl* 変異体は既知の遺伝子変異体とは異なる新奇な変異体であると思われた。現在では *CRL* 遺伝子がプラスチドの何らかの機能に関与する事がわかっているが、当時は *CRL* 遺伝子の機能がプラスチドに関与している等という事は全く考えもしなかった。葉緑体に局在するタンパク質が植物の形態形成、特に葉肉細胞の発達に重要である事を示す論文は当時すでにいくつか出ていたのだが、植物の形態形成を研究している研究者の間で葉緑体の働きが注目される事は あまりない様に思う。おそらくこれは葉緑体の機能が植物細胞の生存にきわめて重要であるため、葉緑体の機能が損なわれれば細胞が死んでしまうか、死なないまでもヨレヨレになる、そして、細胞が重篤な障害を受ければ植物の形態がおかしくなるのはある意味当然だろうと多くの人々が考えているからではないだろうか。

様々な器官の組織学的な解析によって *crl* 変異体では茎頂・根端分裂組織、胚を含む植物体全体で細胞分裂の方向が異常になっている事がその後明らかとなった。*crl* 変異体では本来細胞の伸長方向に対して垂直に分裂するはずの細胞、例えば茎頂分裂組織の L1、L2 層や根の皮層、内皮細胞等で斜め方向や細胞の伸長方向と平行な分裂が起こっていたのである。細胞分裂面に影響を与える原因としては、膜輸送、細胞壁構成成分の生合成、細胞骨格等の異常が考えられる。*CRL* 遺伝子もそのあたりに関係しているのかなとこの時分には考えていた。

ところが、ある日 *crl* 変異体の気孔孔辺細胞を観察していた学生が細胞全体を埋め尽くすほど大きな構造体が葉肉細胞の中に存在している事に気がついた。あまりに巨大すぎてそれが葉緑体であるとはにわかに信じがたかったのだが、クロロフィルの自家蛍光を観察してみると確かに葉緑体であった。岡山大学の坂本亘先生、北京大学の蘇先生との共同研究等によって、*crl*

変異体では葉緑体に限らず、プロプラスチドも含めたあらゆるプラスチドの分裂が阻害されている事が現在では明らかとなっている。葉肉細胞を埋め尽くす位に葉緑体が大きくなっているのならば何故もっと早い時期にそのことに気づかなかったのかと思われるかもしれない。実際に我々が それまでに作製した多数の組織切片の写真には大きな葉緑体がある所に写っていた。しかし、組織の固定処理によってクロロフィルが葉緑体から失われていた ために細胞中の大きな構造体が葉緑体である事に長い間我々は気づかなかった。あまりに大きすぎるために我々は *crl* 変異体の巨大化した葉緑体をずっと細胞質だと思い込んでいたのだ。

我々が調べた限り植物細胞の分裂方向のおかしくなる変異体でプラスチド分裂が阻害されているようなものは知られていない。逆に遺伝学的に同定された葉緑体が大きくなる *arc* 変異体において植物の形態が顕著に変化するという記述はない。また、*ftsZ*、*minD* といった大腸菌の分裂に関与する遺伝子の植物ホモログの発現をアンチセンスや過剰発現によって乱した植物体においても葉緑体が大きくなるが、そのいずれの場合も植物の形態には顕著な変化が見られない。すなわち、*crl* 変異体はプラスチドの分裂と植物細胞の分裂方向とに影響をあたえる、これまでに知られていない新しいタイプの遺伝子変異体である。しかし、いったい植物の細胞分裂とプラスチドの分裂との間にどのような関係があるのだろうか？

遺伝子をクローニングしてもその答えは得られなかった。*CRL* 遺伝子は機能未知の新奇なタンパク質をコードしていたのだ。意味のありそうなアミノ酸配列のモチーフも見当たらない。しかし、シダを含む様々な植物に *CRL* と高い類似性を示す遺伝子が保存されていたので、植物

にとって *CRL* が重要な遺伝子である事は想像できた。いくつかの実験によって *CRL* タンパク質が葉緑体の包膜に存在している事、および、*CRL* タンパク質の局在が細胞分裂時にも変化しない事も確かめられた。*CRL* がプラスチドにしか局在しないという結果は *crl* 変異体が示した表現型の原因がプラスチドにあるという事を明らかにしたが、それでもどのようにしてプラスチドにあるタンパク質が植物の細胞分裂に影響するのかという事はわからなかった。

CRL の機能を推定する手がかりは全く別の実験から得られた。我々は *crl* 変異体の根のプラスチドが大きくなっているかどうかを調べる為に、*crl* 変異体にプラスチド局在シグナル配列と GFP とを融合したタンパク質(ptGFP)を導入する実験を行っていた。この ptGFP を染色体上に持つ *crl* 変異体の根で GFP 蛍光の細胞内局在を調べたところ、ptGFP タンパク質がプラスチドへ正常に輸送されていなかったのである。*crl* 変異体において見られるプラスチドへのタンパク質輸送の阻害は、極めて限られた領域でしか観察されない。根冠細胞を除く根の先端部分と発生初期の葉原基のみである。展開した葉や根の先端部以外ではプラスチドへの ptGFP の輸送は野生型と同じであった。しかしこの結果は *CRL* タンパク質がプラスチドへのタンパク質輸送に関与する事を強く示唆している。

プラスチドへのタンパク質輸送が *CRL* の機能だと考えるとプラスチドの分裂阻害はうまく説明できる。*crl* 変異体では葉原基や根の先端といったプラスチドが盛んに分裂していると考えられる細胞において、プラスチド分裂に必要なタンパク質（大部分が核ゲノムにコードされている）がプラスチドへ輸送されない。そして、その結果としてプラスチドの分裂が阻害されるのではないだろうか。それではプラスチドへのタンパク質輸送が阻害されると細胞分裂方向に影響が出るのはなぜか？これに対するうまい説明は今のところない。しかし、プラスチドがサイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、ジャスモン酸といった植物ホルモンの合成にとって重要な働きをしている事や、脂質合成にも重要である事を考えると、*crl* 変異体ではこれらの生合成に必要なタンパク質のプラスチドへの輸送がおかしくなり、その結果、脂質、植物ホルモンの内生量が変化して、植物細胞の分裂に影響が出ているのかもしれない。あるいは、本来プラスチドへ輸送されるはずのものが細胞質に蓄積してしまい、それが植物の細胞分裂方向に影響を及ぼしている可能性もあるだろう。

CRL が実際にプラスチドへのタンパク質輸送に関与しているのかどうかを明らかにする実験はまだ進行中である。予備的な結果は今のところ *CRL* タンパク質がプラスチドへのタンパク質輸送へ関与しているという考えを支持しているように思える。もし、*CRL* タンパク質がプラスチドへのタンパク質輸送に本当に関与しているのであれば、次の課題は、どのようなタンパク質がどの組織でプラスチドに輸送されない事が植物の細胞分裂方向の異常およびプラスチドの分裂阻害を引き起こすのかを明らかにする事だと考えている。また、我々は *CRL* タンパク質がこれまで未同定のプラスチドタンパク質輸送経路を構成しているのではないかと考えているがその可能性についても検討している。