

## 解説

## 葉緑体タンパク質の分解とオートファジー

東北大学大学院農学研究科

石田宏幸、和田慎也

## 1. はじめに

葉が老化するにつれて光合成能力は徐々に低下していく。これは、光合成を行うオルガネラである葉緑体自身の機能低下と細胞あたりの葉緑体数の減少によるものが大きい。C<sub>3</sub>型の草本植物では、葉の全窒素の実に75–80%が葉緑体に分配され、その大部分がタンパク質として主に光合成を担っている<sup>1)</sup>。中でも光合成の律速因子の1つであるRubiscoは単一タンパク質として葉の全窒素の何と12–30%を占めている。Rubiscoを含めた多くの葉緑体ストロマタンパク質は葉の老化時に盛んに分解され、それらを構成していた窒素は生長部位へ転流し再利用され、最終的には子実へ蓄えられる。またタンパク質の分解により派生するアミノ酸は呼吸に必要なエネルギー源として重要な炭素骨格を供給している。植物にとって葉緑体タンパク質の分解と窒素のリサイクルは土壌に不足しがちな窒素を有効利用し、生長の恒常性を確保するとともに、獲得した窒素を次世代へと引き継ぐ重要な機構である。

## 2. 1980年代のパイオニア研究—葉緑体と液胞の関係—

液胞は葉緑体とともに植物に特徴的なオルガネラである。葉などの栄養器官では液胞が細胞体積の80%以上を占めている。実際、顕微鏡を覗くと、葉肉細胞の体積の大半は液胞であり、それに追いやられるかのように周りを取りまく細胞質の大部分は葉緑体で埋め尽くされている。栄養器官型の液胞は、糖や重金属イオンなど様々な低分子の可溶性物質を貯蔵するとともに、プロテアーゼをはじめ種々の加水分解酵素を蓄積するのも特徴的である。

1980年代前半に、葉緑体タンパク質は、葉緑体ごと液胞に取り込まれ、分解、リサイクルされるという説が提唱された<sup>2)</sup>。その根拠は、細胞を分画してRubiscoに対する分解活性を測定すると、そのほぼ100%が液

胞に存在すること、葉の老化時に葉緑体数とタンパク質の減少が同時におこること、そして電顕によって葉緑体が液胞に取り込まれているような像がみられること、などである。しかし、葉の老化過程におけるRubisco量の減少と葉緑体数の減少の関係について詳細に調べると、両者は必ずしもパラレルに起こるわけではない(図1)<sup>3,4)</sup>。Rubiscoは、クロロフィルの分解が進み葉が黄色くなる、いわゆる「可視的老化」が起こる前に盛んに分解される。一方、この老化初期から中期にかけての時期には、葉緑体数の減少はわずかであり、細胞には光合成機能が低下した葉緑体が残ることとなる。葉緑体数の減少が著しいのは、大部分のRubiscoが分解された後の老化後期である。よって葉緑体「丸ごと」の分解だけではRubisco分解を説明できず、他にも葉緑体内での分解経路、あるいはタンパク質を特異的に葉緑体外に排出して分解する経路が存在すると考えら

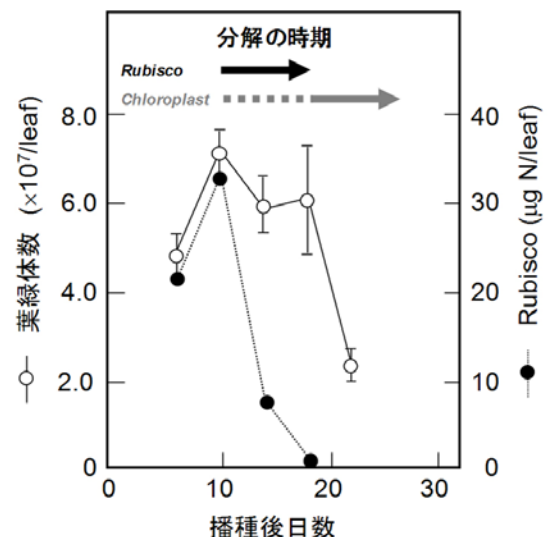


図1 コムギ第一葉における葉緑体数とRubisco量の変動の関係  
Mae et al. (1984)<sup>3)</sup>に基づき著者の許可を得て作図。

れてきた。これまでに葉緑体DNA結合性タンパク質、CND41が、Rubiscoを特異的に分解する葉緑体プロテアーゼとして同定されている<sup>5)</sup>。そしてごく最近のレビューでも、葉緑体内における特異的なRubisco分解経路の重要性が述べられている<sup>6)</sup>。

### 3. Rubisco-containing body (RCB)<sup>7)</sup>

それでは、Rubiscoが葉緑体外に排出されて分解される可能性についてはどうであろうか。この問題は長らく手付かずのまま残されていた。ダイズの老化葉においてplastoglobliが葉緑体包膜から排出される様子やクラミドモナスの葉緑体包膜の突出像を示す電顕像が発表されたことに刺激され、私達は免疫電顕で老化葉におけるRubiscoの細胞内局在性について調べることにした。その結果、コムギ老化葉では直径0.5-1 μmのRubiscoを含む構造体(Rubisco-containing body、RCBと命名)が細胞質や時には液胞に存在し、その数が老化初期に増加することを見出した。RCBにはRubiscoのほか同じくストロマに局在するグルタミン合成酵素も含まれていたが、チラコイド膜タンパク質については調べた限りで含まれていなかった。RCB内部の電子染色の強度は葉緑体ストロマのそれと酷似していることから、RCBにはおそらくストロマ成分が非選択的に取り込まれていると予想された(その意味ではRCBという名前は必ずしも適切でない)。また形態観察から、RCBは葉緑体包膜に由来すると思われる二重膜を持ち、さらに細胞質ではオートファゴソーム(自食胞、後述)によく似た電子密度の低い構造体に囲まれていることがわかった。この結果から、RCBとオートファジーの関連性が浮かび上がった。

### 4. オートファジーのメカニズム

オートファジーは出芽酵母の栄養飢餓時に誘導される、細胞内のバルクなタンパク質分解を担う経路であり、真核生物に普遍的に存在する。膜動態の違いから大きく分けて2つの経路が存在し、それらはマクロオートファジー、マイクロオートファジーと呼ばれる<sup>8)</sup>。マクロオートファジーでは、オルガネラを含めた細胞質成分が二重膜構造体、オートファゴソームに取り囲まれ、隔離される。オートファゴソームの外膜は液胞膜と融合し、液胞内部に放出された内膜とその内容物(合わせてオートファジックボディと呼ばれる)が

種々の加水分解酵素によって分解される。酵母のオートファジー変異株を用いた分子遺伝学的な解析から、これまでに多数のオートファジーの進行に必須な遺伝子、ATG群が同定されている。一方、マイクロオートファジーでは液胞膜が陥入することで直接的に基質を取り込み、液胞ルーメン内に放出、分解する。これら2つのオートファジーは形態学的には区別されるが、それらの進行過程に必要な遺伝子群は大部分重複している。

植物においても古くから、形態学的にオートファジーの存在が示唆されていた<sup>9)</sup>。そして、近年のゲノム解析の進展により、酵母で発見されたATG遺伝子群のホモログがモデル植物シロイヌナズナにも存在すること、そしてそれらの遺伝子群は植物においても酵母と同様に機能していることが明らかにされた<sup>10)</sup>。

### 5. RCBはオートファジーによって液胞に輸送される<sup>11)</sup>

前教授らは一貫してコムギを材料にRubisco分解機構の研究をしており、当然、石田(以下、私)もコムギ一筋であった。RCBも最初はコムギ老化葉で見つかった。次のステップとしてRCBとオートファジーの関係を明らかにしたいと思っていた私は、これまでの電顕観察と生化学的な解析に大きな限界を感じた。しかし私には華麗な遺伝学や細胞生物学のバックグラウンドは全くなかった。2002年に初めてモデル植物シロイヌナズナでATG遺伝子の欠損変異体に関する論文が、オートファジーの総本山である大隅研究室から発表された<sup>12)</sup>。タイミングが良いことに、基生研で院生向けのバイオサイエンストレーニングコース「オートファジーのモニタリング方法」が開かれることを知り、希望者殺到で助手の私は受講できないのでは、と不安な思いで応募した。しかし幸運なことに、このトレーニングコースへの参加が許され、様々な真核生物のオートファジーを、最新の可視化技術を使い自分自身の目でモニターすることが出来、非常に新鮮であった。意外にも、このトレーニングコースの純粋な応募者は私1人で、他の受講者は「格好がつかない」ということで呼ばれた北大の院生の方々であった(大隅先生、談)。さらに私が幸運だったのはこのトレーニングコースに参加した3ヶ月後、文科省の競争的奨学金により、留学の機会を与えられたことである。私は迷わず、GFPを使って植物のオルガネラ動態を解析した先駆者であ

る Hanson 教授にメールを打った。Hanson 研究室ではペチュニア花卉の老化に関わる遺伝子の研究に参画する傍ら、GFP のイロハを学ぶことができた<sup>13)</sup>。話がおおきく回顧録にそれてしまったが、こうした経緯で材料をコムギからナズナにかえて得られた結果が以下の通りである。

葉緑体ストロマに移行する GFP を発現する形質転換体の葉を、液胞の分解活性を抑制するため H<sup>+</sup>-ATPase の阻害剤、コンカナマイシン A を加え暗所で一晚インキュベートすると、液胞内に GFP 蛍光を持つ直径 1 μm 程度の小胞が蓄積した。この GFP 小胞はクロロフィル蛍光を持たず、また二重免疫電顕の観察から Rubisco を含むことが示された。また Rubisco を直接 GFP でラベルした場合にも液胞内に GFP 小胞の蓄積がみられた。よって生きた葉でも RCB を可視化できることがわかった (図 2)。この *in vivo* での RCB 可視化系を使い、いろいろ解析したところ、RCB は成熟葉や老化初期の葉では見られたが展開中の若い葉ではその蓄積量はわずかであった。そしてオートファジーに必須の遺伝子 *ATG5* の欠損変異体では葉齢に関わらず RCB が全く検出されなかった。またオートファゴソームのマーカール GFP-ATG8 と、葉緑体ストロマにターゲットされる赤色蛍光タンパク質 DsRed を両方発現す

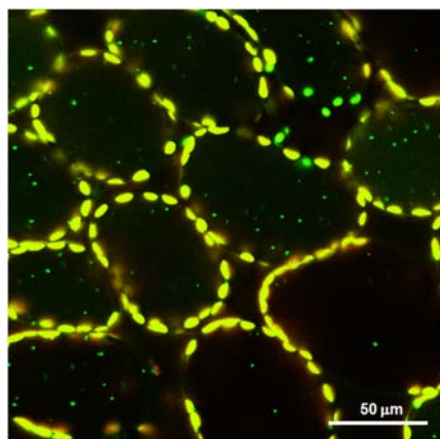


図 2 生葉で可視化された RCB  
葉緑体ストロマに移行する GFP を発現する形質転換体の葉をコンカナマイシン A の存在下で暗所、一晚インキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡で葉肉細胞を観察した。GFP は葉緑体に加えて、液胞内をランダムに動く小胞 (二重免疫電顕で RCB と判明) にも確認される。写真は GFP 蛍光を緑、クロロフィル自家蛍光を赤で示した際のマージ画像で、両蛍光を持つ葉緑体は黄色で示される。一方、RCB は GFP 蛍光のみを示し、葉緑体とは明確に区別される。

る形質転換体を作成したところ、両者の蛍光は液胞内の小胞において共局在した。すなわち RCB はオートファゴソームを介したマクロオートファジーによって液胞に輸送、分解されているものと結論された。

## 6. 個別暗処理葉では RCB に加え葉緑体のオートファジーが確認される<sup>14)</sup>

一般に、葉の老化は個体や切離葉を暗所におくと誘導されることがよく知られる。しかしシロイヌナズナにおいては着生葉を個別に暗処理した際には明確な老化誘導が起こるが、個体全体を暗処理した着生葉では逆に老化の進行が阻害される<sup>15)</sup>。また個別暗処理葉ではごく短期間に葉緑体のサイズと数の減少が起こることが確認されている<sup>16)</sup>。そこで和田は、老化のモデル系として個葉暗処理をシロイヌナズナ野生体とオートファジー変異体に施し、オートファジーと葉緑体分解の関係についてより詳しく検証した。個別暗処理葉では、野生体とオートファジー変異体の両方で、老化の遺伝子マーカーである *SAG12* や *SEN1* の発現が上昇し、また *RBCS* や *CAB* など光合成関連遺伝子の顕著な発現低下が確認された。また個別暗処理葉では、両植物で、全窒素、可溶性タンパク質、Rubisco、クロロフィルなどの量が対照に比べて大きく減少していた。よってオートファジー変異体においても野生体と同様に個葉の暗処理で老化が誘導されることが確認された。すでに報告されているように、野生体においては暗処理開始から 5 日間で葉緑体のサイズと細胞あたりの数の有意な減少が認められた。一方、オートファジー変異体では暗処理期間を通して葉緑体数は減少せず一定に推移した。また葉緑体サイズについても、処理後 1 日目でデンプン分解によると思われる急激な減少が見られたが、その後は一定に推移し、野生体とは有意な差が見られた。

葉緑体成分の液胞への移行を可視化するため、先に作成した葉緑体ストロマ移行型 DsRed を発現する形質転換体に個葉暗処理を施した。先の石田らの研究では、RCB を可視化するためにはコンカナマイシン A によって液胞の分解活性を抑制する必要がある。しかし個別暗処理葉では、阻害剤を加えずとも切離直後の葉で RCB が検出された。また液胞内部には一様に DsRed 蛍光がみられ、暗処理で葉緑体成分のオートファジーが活発に起こっていることが推察された。加えて、暗

処理3日目以降の葉では、液胞内に葉緑体が確認された。一方、オートファジー変異体ではRCB、ストロマ移行DsRed、葉緑体の液胞への蓄積は、いずれも全く確認されなかった。以上の結果は、これまで電顕観察から示唆されてきた葉緑体の液胞への移行を生葉で直接示すとともに、その経路がオートファジーによるものであることを明確に示すものである。同時にオートファジーにより葉緑体の一部が小胞RCBとして切り取られ分解されることが葉緑体サイズの縮小を引き起こしている可能性を示唆している(図3)。

酵母では核膜やERはオートファジーにより部分的に分解される例が知られるが、ミトコンドリアやペルオキシゾームなどの球形オルガネラは基本的には「丸ごと」分解されると理解されている<sup>17-19</sup>。葉緑体を「部分的」あるいは「丸ごと」に区別して分解する機構は、オートファジーというバルクの分解系を用いながら、非常にユニークな機構であるとも言える。これは植物の独立栄養性を支え、なおかつ光合成以外にも様々な代謝にかかわる葉緑体に特異なオートファジーの機構、なのかもしれない。

### 7. オートファジー能が欠損しても Rubisco 分解や窒素転流は正常に起こる

Rubiscoは、PSIIの反応中心を構成するD1タンパク質のように常に活発に代謝回転しているわけではなく、葉(葉緑体)の発達時に盛んに合成され、老化とともに分解が始まる<sup>20</sup>。そして、おそらく多くの光合成系ストロマトンパク質の代謝回転もRubiscoと同様であろう。ストロマトンパク質を一様に取り込み、液胞に輸送するRCB経路は、ストロマトンパク質のバルク分解を担うメカニズムとしてはかなり好都合のように思える。実際、オートファジー変異体では、自然老化過程において「可視的老化」、すなわちクロロフィルの分解が亢進される。また同変異体では窒素飢餓や個体全体の暗処理を長期間かけた際の生存率が大きく低下する。よって、オートファジーが葉の老化の正常な進行や飢餓条件下での葉緑体タンパク質のリサイクルに一定程度の貢献をしていることは間違いない。しかし期待に反して、オートファジー変異体におけるRubiscoの消長は、自然老化初期には野生体と比較して若干抑制がかかるものの、老化期全体を通せば大きな変化はない。また変異体では窒素の転流自体も阻害されない。

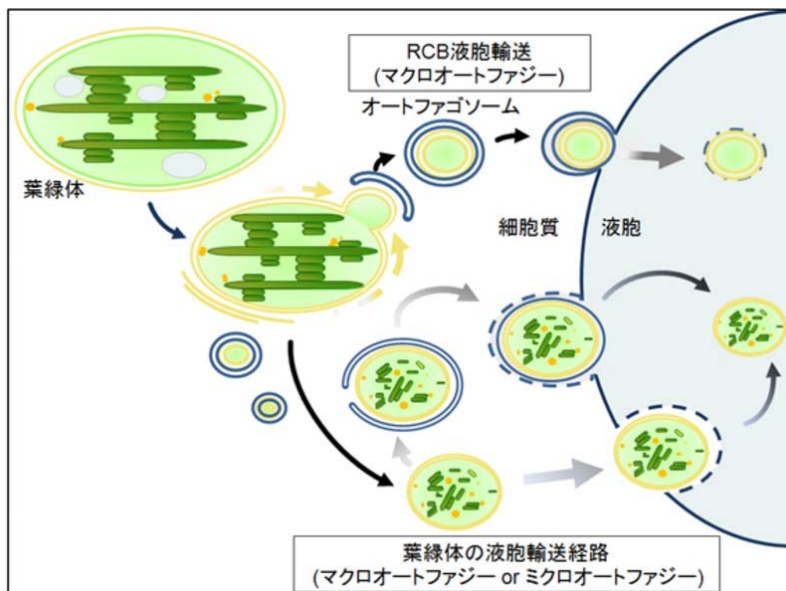


図3 個別暗処理葉におけるオートファジーを介した葉緑体とRCBの液胞への輸送モデル  
葉緑体は、RCBの形成に包膜を消費するため、サイズが減少していくと考えられる。また付随して、葉緑体は楕円形から球状に変形することから、内部の骨格となるデンプン顆粒や、チラコイド膜の分解が生じていると思われる。RCBは、細胞質においてオートファゴソームによって隔離され、マクロオートファジーによりすみやかに液胞内へ放出される。一方で葉緑体を液胞へ輸送する経路は、これまで観察されてきたオートファゴソームのキャパシティを考慮すると、収縮後の葉緑体であっても取り込みは難しいと考えられる。そのため、葉緑体の輸送は、マクロオートファジーの他に、液胞膜の陥入によるミクロオートファジーによる可能性が考えられる。

この結果は、野生体の自然老化葉における RCB 経路の寄与が、あるとしても非常に小さいか、あるいはオートファジーを欠損した変異体では、RCB 経路を補完する別の分解系が亢進されている、という2つの可能性を示唆している。

## 8. おわりに

葉の老化は遺伝的なプログラム (aging) のほかに、栄養飢餓、遮光、その他さまざまな外的要因に影響を受け進行する極めて複雑なプロセスである。現在、私たちは RCB/葉緑体のオートファジーに関わる分子実態をさらに詳細に解析すると同時に、様々な条件下における本経路の定量解析を進めている。しかし、結局のところ、葉緑体内の特異的な分解系を含めたすべての役者がそろって、どの経路がどれだけ葉緑体タンパク質のリサイクルを担っているのか、といった問いに答えることは難しい。せっかく見つけた RCB 経路を大切に思い、育てつつも、「葉の老化とタンパク質分解」の本質にせまる、新たな研究の展開が必要となろう。

本稿は、吉本光希博士 (理化学研究所)、大隅良典教授 (基礎生物学研究所)、Daniel Reisen 博士 (Bitplane AG)、Maureen Hanson 教授 (Cornell 大学)、西澤直子教授 (東京大学) ならびに東北大学植物栄養生理学研究室、千葉啓、泉正範、谷野祐一、牧野周教授、前忠彦名誉教授、各氏との共同研究の成果について解説したものである。

## 参考文献

- Makino, A., and Osmond, B. (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat, *Plant Physiol.* 96, 355-362.
- Wittenbach, V. A., Lin, W., and Herbert, R. R. (1982) Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves, *Plant Physiol.* 69, 98-102.
- Mae, T., Kai, N., Makino, A., and Ohira, K. (1984) Relation between ribulose biphosphate carboxylase content and chloroplast number in naturally senescing primary leaves of wheat, *Plant Cell Physiol.* 25, 333-336.
- Ono, K., Hashimoto, H., and Katoh, S. (1995) Changes in the number and size of chloroplasts during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions, *Plant Cell Physiol.* 36, 9-17.
- Kato, Y., Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., Yokota, A., and Sato, F. (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco, *Planta* 220, 97-104.
- Feller, U., Anders, I., and Mae, T. (2008) Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated, *J. Exp. Bot.* 59, 1615-1624.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N. K., Makino, A., and Mae, T. (2003) Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally-senescent leaves of wheat, *Plant Cell Physiol.* 44, 914-921.
- Klionsky, D. J., and Ohsumi, Y. (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 1-32.
- Moriyasu, Y., and Ohsumi, Y. (1996) Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation, *Plant Physiol.* 111, 1233-1241.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy, *Plant Cell* 16, 2967-2983.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M. R., and Mae, T. (2008) Mobilization of Rubisco and stromal-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagy process, *Plant Physiol.* 148, 142-155.
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., and Ohsumi, Y. (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene, *Plant Physiol.* 129, 1181-1193.
- Xu, Y., Ishida, H., Reisen, D., and Hanson, M. R. (2006) Upregulation of a tonoplast-localized cytochrome P450 during petal senescence in *Petunia inflata*, *BMC Plant Biol.* 6, 8.

14. Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., and Makino, A. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves, *Submitted*.
15. Weaver, L. M., and Amasino, R. M. (2001) Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves but inhibited in whole darkened plants, *Plant Physiol.* *127*, 876-886.
16. Keech, O., Pesquet, E., Ahad, A., Askne, A., Nordvall, D., Vodnala, S. M., Tuominen, H., Hurry, V., Dizengremel, P., and Gardestrom, P. (2007) The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in Arabidopsis leaves, *Plant Cell Environ.* *30*, 1523-1534.
17. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction, *J. Cell Biol.* *119*, 301-311.
18. Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M., and Goldfarb, D. S. (2003) Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell* *14*, 129-141.
19. Hamasaki, M., Noda, T., Baba, M., and Ohsumi, Y. (2005) Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast, *Traffic* *6*, 56-65.
20. Mae, T., Makino, A., and Ohira, K. (1983) Changes in the amounts of ribulose bisphosphate carboxylase synthesized and degraded during the life span of rice leaf (*Oryza sativa* L.), *Plant Cell Physiol.* *24*, 1079-1086.