

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570042

研究課題名(和文)クロロフィル分解経路の全体像の解明

研究課題名(英文)Towards a comprehensive understanding of the chlorophyll breakdown pathway

研究代表者

田中 亮一(Tanaka, Ryouichi)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20311516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：植物のクロロフィル分解経路の全容を解明することを目的として、100年前に発見されたクロロフィル分解活性を持つ酵素、クロロフィラーゼ(CLH)の局在と機能を研究した。CLHは液胞膜および小胞体に局在することが明らかとなった。また、生細胞内のクロロフィル分解には関与せず、昆虫の幼虫などが細胞を破壊した際に、活性を示し、植物の防御応答に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：For better understanding of the chlorophyll breakdown pathway in plants, we investigated the function of chlorophyllase, a common plant enzyme that catalyzes the cleavage of chlorophyll to form chlorophyllide and phytol. We found that this enzyme is localized in the endoplasmic reticulum and the tonoplast. This enzyme actively catalyzes chlorophyllide formation only when cells are disrupted. Arabidopsis leaves with genetically enhanced CLH activity exhibit toxicity when fed to Spodoptera larvae, an insect herbivore. Purified chlorophyllide partially suppresses the growth of the larvae. We showed that chlorophyllase and chlorophyll form a two-component defense system against chewing herbivores.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：クロロフィル

1. 研究開始当初の背景

植物は、老化やストレス応答（生育環境の変化、病原菌感染など）の際に大量のクロロフィルを分解する。クロロフィル分解に異常があると、これらの老化、種子形成、病原菌応答などに異常が現れることが知られており、クロロフィル分解は植物にとって重要なプロセスであることが明らかになっている。

研究開始当初、クロロフィル分解に関する酵素が次々に同定され、これらの結果をもとにスイスの Hörtensteiner らによって、植物におけるクロロフィル分解経路の経路が提唱された。しかし、これらの経路の中に 100 年前に存在が確認されたクロロフィラーゼ（クロロフィルのフィトール側鎖を分解する酵素；略称、CLH）は入っておらず、この酵素が関与する新規のクロロフィル分解経路があるのではないかと予想された。

2. 研究の目的

本研究では、植物のクロロフィル分解経路の全体像を理解するために、特に、クロロフィル分解活性の高い CLH に焦点をあて、CLH が触媒するクロロフィル分解経路があるのではないかと仮説のもと、研究をおこなった。特に、CLH がどのような条件下で、クロロフィル分解に影響を与えるか、CLH は細胞内でどこに局在するか、という点の検証を端緒に新規のクロロフィル分解経路の発見を目指した。

また、研究を進めて行く中で、CLH は実は、インタクトな細胞内でクロロフィルを分解しているのではなく、細胞が破壊された際にクロロフィルを分解していることがわかってきた。そこで、なぜ、細胞が破壊された際にクロロフィルを分解するのか、という点についても、研究を進めた。

3. 研究の方法

まず、CLH がクロロフィル分解にどのような影響を与えるのかを調べるために、CLH を欠く、シロイヌナズナの変異体 (*clh1*, *clh2* および *clh1/clh2*) において、クロロフィル分解の様子をストレス条件下（すなわちメチルジャスモン酸処理条件下）において解析した。

また、CLH の細胞内局在を明らかにするために、CLH と green fluorescent protein（具体的には eYFP）の融合タンパク質を細胞内で発現した。

また、細胞をスクロース密度勾配遠心法などによって可溶性画分、膜画分に分画した。さらに、膜画分を界面活性剤で可溶化し、細胞膜、小胞体膜、液胞膜、チラコイド膜などに分画し、抗 CLH 抗体を用いてイムノプロットングによって、どの細胞の画分に CLH が存在するのかを調べた。

さらに、研究を進める中で、CLH が昆虫の幼虫などに対する防御に関与しているという可能性が考えられたことから、CLH を過剰発現する形質転換シロイヌナズナをハスモ

ンヨトウの幼虫に投与することによって、CLH の防御活性（昆虫に対する毒性）を調べた。

4. 研究成果

CLH-eYFP をシロイヌナズナで過剰発現したところ、細胞内の網目状の構造に eYFP のシグナルが観察されたことから、CLH は液胞、または小胞体に局在すると考えられた。さらに、スクロース密度勾配遠心法による細胞分画によって、やはり、CLH は液胞および小胞体膜に局在することが明らかとなった。

また、CLH を欠くシロイヌナズナの変異体では、老化やストレス条件下（メチルジャスモン酸処理）においたところ、野生型とこれらの変異体の間に、クロロフィル分解の程度に差は見られなかった。

さらに、CLH の反応産物である Chlorophyllide の生成を、生葉を破碎した場合と、凍結葉を破碎した場合で比較した場合、生葉を破碎した場合でのみ、chlorophyllide の生成が見られることがわかった（図 1）。これらの結果は、葉を破碎する前には chlorophyllide は蓄積しておらず、葉を破碎する際に、酵素活性によって、chlorophyllide がせいせいすることを示している。これらの結果から、CLH は細胞内でのクロロフィルの分解には関与しておらず、葉の細胞が破壊されたときに活性を示すと

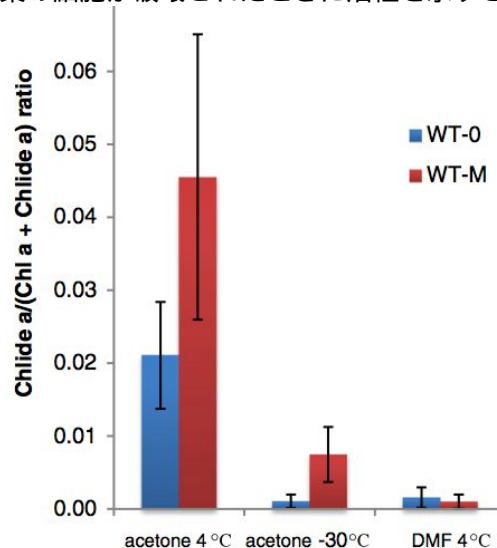


図 1 シロイヌナズナ生葉と凍結葉の抽出液における、chlorophyllide 生成レベルの比較。野生型 (WT)シロイヌナズナの葉 (0 と記載されているサンプルは、メチルジャスモン酸処理なし、M と記載されているサンプルはメチルジャスモン酸処理あり) 4度でのアセトンでの抽出、-30度でのアセトンでの抽出、ジメチルフォルムアミド (DMF) での抽出の 3 種類の方法を比較。

考えられた。

そこで、CLH は葉の細胞を破壊するタイプの草食昆虫に対する防御応答に関わっているのではないかと仮説をたて、CLH を過剰発

現するシロイヌナズナをハスモンヨトウの幼虫に投与したところ、成長の抑制と殺虫活性を示した。また、精製した chlorophyllide をハスモンヨトウの幼虫に投与したところ、同様に殺虫活性をしめした。これらの結果から、CLH は細胞外で、細胞が破壊されたときにクロロフィルを分解し、その反応産物である chlorophyllide が昆虫に対する殺虫活性を示すことが明らかとなった。これは、100年前の発見以来、不明であった CLH の生物学的役割を明らかにするとともに、クロロフィル分解の活性が植物の防御応答にも関与することを示す、画期的な発見である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)すべて査読あり

1. Takahashi K, Takabayashi A, Tanaka A, and Tanaka R (2014) Functional analysis of light-harvesting-like protein 3 (LIL3) and its light-harvesting chlorophyll-binding motif in Arabidopsis. *J Biol Chem* 289: doi:987-999 10.1074/jbc.M113.525428

2. Hu X, Tanaka A, and Tanaka R (2013) Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. *Plant Methods* 2013, 9:19 doi:10.1186/1746-4811-9-19

3. Kusaba M, Tanaka A and Tanaka R (2013) Stay-Green Plants: What do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynth Res* Published Online DOI: 10.1007/s11120-013-9862-x

4. Tanaka R, Takabayashi A, Ito H, Tanaka A (2012) "Chlorophyll metabolism in photosynthetic organisms." in Handbook of Porphyrin Science, edited by Karl M Kadish, Kevin M Smith and Roger Guilard, Word Scientific, Singapore 20: 213-242

5. 伊藤寿、田中歩、田中亮一 (2012) クロロフィル合成系の多様性はいかにして生まれたか? 光合成研究 22: 98-105 <http://photosyn.jp/journal/sections/kaiho64-6.pdf>

6. Sakuraba Y, Balazadeh S, Tanaka R, Mueller-Roeber B and Tanaka A. Overproduction of chlorophyll b retards senescence through transcriptional re-programming in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 53: 505-517 doi:

10.1093/pcp/pcs006

[学会発表](計 8件)

1. Xueyun Hu, Masanori Oshiai, Tohru Tsuchiya, Stefan Hortensteiner, Ayumi Tanaka, Ryouichi Tanaka; Possible involvement of chlorophyllase in a plant defense system, 第54回日本植物生理学会、2013年3月22日、岡山大学、岡山市

2. Ryouichi Tanaka; Seeking the true function of chlorophyllase after one hundred years of discovery, , Second International Symposium on Biosynthesis of Tetrapyrroles (BSTP12), December 1, 2012, Ritsumeikan University, Minami-Kusatsu, Japan

3. 田中亮一; 植物のテトラピロール代謝、植物電子顕微鏡サマーセミナー、2012年8月3-4日、帝京大学バイオサイエンス学科棟、宇都宮市

4. Hu X, Tsuchiya T, Hörtensteiner S, Tanaka A, Tanaka R, Chlorophyllase1 is not involved in chlorophyll breakdown during methyl-jasmonate-induced senescence in *Arabidopsis thaliana*. 第53回日本植物生理学会年回 2012.3.118. 京都産業大学、京都市

5. Tanaka R, Modification of chlorophyll metabolism stays plants green through transcriptional re-programming. Japan-Australia Symposium on Plant Sciences for Agriculture. 2012.1.19-20. 北海道大学、札幌

6. Hu X, Tsuchiya T, Hörtensteiner S, Tanaka A, Tanaka R, Chlorophyllase1 is not involved in chlorophyll breakdown during methyl-jasmonate-induced programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. Japan-Australia Symposium on Plant Sciences for Agriculture. 2012.1.19-20. 北海道大学、札幌

7. 田中亮一、遺伝学、逆遺伝学、バイオインフォマティクス、複合体プロテオミクスの手法を利用したテトラピロール代謝研究、ラン藻の分子生物学 2011、2012.12.2、かずさDNA研究所、木更津市

8. Tanaka R. Identification of cyanobacterial enzymes involved in tetrapyrrole metabolism reveals convergence and divergence of tetrapyrrole metabolism. Bionational Seminar Germany-Japan, 2011.10.31, Schloss Reinach, Freiburg, Germany

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ 等 :
<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantadapt/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 亮一(TANAKA, Ryouichi)
北海道大学・低温科学研究所・准教授
研究者番号：20311516

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：