

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 A Study on Mechanism of Red Leaf Formation in *Amaranthus tricolor* (ハゲイトウの赤色葉形成機構に関する研究)

氏名 岩本 訓知

#### 序論

われわれが目にする植物のほとんどは、光合成に不可欠な色素であるクロロフィルによって緑色を基調とする体色を示す。しかしながら、植物はときとして緑色以外の様々な色彩を呈する。花卉や萼などの花器官が典型的な例であるが、その色彩は多くの場合アントシアニンやカロチノイドをはじめとした色素を体内に蓄積することによって実現される。一方で、それらの器官は、クロロフィルを蓄積しない、または蓄積量が極端に少ないという共通した特徴をもつ。このことがより鮮やかな色彩を発現させるために重要な役割を担っていると言えるが、現在のところ、そうしたクロロフィル蓄積の抑圧機構についての知見は乏しい。

ハゲイトウ (*Amaranthus tricolor* L. *tricolor*) は、発芽後、普通の緑色葉を生じながら成長するが、ある時期より赤色葉を形成しはじめる (図 1)。赤色葉は、緑色葉に較べて数十分の一程度のクロロフィルしか蓄積しない。つまり、ハゲイトウは、同じ普通葉でありながらクロロフィル含量の異なる 2 種類の葉を形成する。私は、この植物の赤色葉が、植物におけるクロロフィル蓄積の抑圧機構を解析するための最も単純化したモデルになると考えた。修士課程においては、ハゲイトウの日長応答性などの基本的な性質を明らかにした。また、この性質を利用して、赤色葉を成長や花成と切り離して制御できる実験系を構築し (図 2)、赤色葉形成とクロロフィル合成との関連を検討した。本研究では、赤色葉形成に関わる日長感受の機構、色素体の微細構造、クロロフィル合成系の代謝活性と遺伝子発現を詳細に解析することで、ハゲイトウの赤色葉形成についてはクロロフィルの蓄積抑圧の分子メカニズムの解明を目指した。

#### 結果と考察

##### 1. 赤色葉形成の日長応答性に関する解析

日長によってハゲイトウの赤色葉形成は制御されるが、このような日長応答現象に関する報告は花芽形成を除いてはあまり多くない。そこで、赤色葉の誘導メカニズムについてより多くの情報を得るために、以下の実験を行った。まず、長日 (非誘導) 条件下に置いた植物体の子葉および葉を被覆することによって部分的な短日 (誘導) 刺激を与え、その時の赤色葉の形成時期を調べた (図 3)。その結果、子葉および葉に短日処理を施すことによって赤色葉の形成時期が早まり、また、短日処理を行う葉が多くなるほどその傾向が強くなった。この結果は、1) 日長刺激が葉で感受されること、2) 葉より茎頂に送られ赤色葉形成を促す何らかのシグナルが存在すること、そして 3) その量が短日処理を受ける葉の面積に応じて増えることを示唆している。次に、生育の様々な時期に、長日から短日条件下に、あるいは、短日から長日条件下に植物体を移動した場合の、赤色葉の形成時期を調べた (図 4)。前者の場合、いずれも短日条件下に移してから 25 - 30 日程度で赤色葉の形成が見られた。また、後者の場合は、短日処理を 20 日間以上行った後に長日条件に移した個体で赤色葉形成が見られた。

## 2. 葉における色素体の形態観察と機能の解析

電子顕微鏡を用いて、緑色葉および赤色葉の色素体の微細構造の比較を行った (図 5)。赤色葉の色素体は全体的に球形に近く、緑色葉の色素体に見られる発達したグラナスタックやデンプン粒は観察されなかったが、層状のチラコイド膜が認められ、細胞質も密であった。また、色素体の数も緑色葉と赤色葉間で大きな違いは見られなかった。これより、葉緑体のバイオジェネシスの活性低下が、直接の赤色葉形成の要因となっているのではないと考えられた。次に、光合成に関与する遺伝子の発現を RNA ゲルブロット解析により調べた (図 6)。その結果、核コードの 3 種の *cab* 遺伝子の mRNA は、いずれも赤色葉において蓄積量が少なかったが、色素体コードの *rbcl* 遺伝子の発現量には、緑色葉および赤色葉間で大きな差が見られないことから、赤色葉における色素体の転写装置は十分な機能を保持していることが分かった。

## 3. クロロフィル合成系に関する解析

ハゲイトウの葉の色彩は、遅くとも葉が展開をはじめる前には決定されていることから、赤色葉においてクロロフィル含量が少ないのは、いったん合成されたクロロフィルが分解されるためではなく、もともとその合成が行われないうちに起因していると予想された。そこで、本研究ではクロロフィル合成系に関する詳細な解析を進めた。

緑色葉および赤色葉におけるクロロフィル合成系の酵素活性を 2 つの方法により比較した。まず、ヘム合成と、クロロフィル合成系の後半の反応を阻害する 2,2'-dipyridyl を各葉に投与した (図 7)。すると、緑色葉では protoporphyrin および Mg-protoporphyrin (monomethyl ester) が蓄積した (図 8)。また、赤色葉においても同様に dipyridyl 処理を行うことで、protoporphyrin および Mg-protoporphyrin (monomethyl ester) の高いレベルでの蓄積が検出された。次に、各葉から調製した粗抽出液に、クロロフィル合成系の中間体である porphobilinogen を基質として添加してインキュベートしたところ、いずれの葉においてもそれ以降のクロロフィル合成系の中間体である uroporphyrinogen および coproporphyrinogen が生成し、その蓄積量は緑色葉よりむしろ赤色葉由来の試料中で多くなっていた (表 1)。以上の結果は、クロロフィルの蓄積量の少ない赤色葉においても、クロロフィル合成系のうち少なくとも Mg-protoporphyrin (monomethyl ester) までを合成する高い酵素活性を保持していることを示している。

クロロフィルの合成に関与する酵素の遺伝子計 13 種類をハゲイトウより単離し、それらをプローブとした発現解析を行った (図 9)。その結果、NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (POR) を除くクロロフィル合成に関わる酵素の遺伝子は、緑色葉だけでなく赤色葉においても相当量の発現を保っていた。一方、POR をコードする 2 つの遺伝子 *POR1* および *POR2* のみは、赤色葉において顕著な低発現を示すことが分かった。ハゲイトウの 2 つの *POR* 遺伝子のゲノムサザン解析の結果から、ハゲイトウにはこの 2 種の *POR* 遺伝子しか存在しないと考えられた (図 10)。また、抗 *POR* 抗体を用いた免疫ブロット解析により、*POR* タンパク質の蓄積量も、mRNA と同様に赤色葉で非常に少なくなっていることが分かった (図 11)。これらの結果は、*POR* mRNA の蓄積量の著しい低さが、赤色葉におけるクロロフィルの低蓄積の鍵ステップになっていることを明示した。

そこで、次に緑色葉および赤色葉における *POR* mRNA の転写調節に関して解析を行うこととし、各葉における同遺伝子のプロモーター活性を比較した。*POR1* および *POR2* 遺伝子の上流域に *GUS* 遺伝子を繋いだコンストラクトを作製し、アグロバクテリウムを介してハゲイトウの葉に導入した。遺伝子導入後、植物体内で一過的に発現する *GUS* 活性を測定した結果、*POR* 遺伝子のプロモーターは、赤色葉において緑色葉より高い転写活性を示すことが分かった (図 12)。このことから、赤色葉においても *POR* 遺伝子の転写装置は活性化された状態で維持されていることが示された。また、Transcriptional run-on アッセイにより得られた結果も、赤色葉における *POR* 遺伝子の高い転写速度を示していた (図 13)。したがって、赤色葉における *POR* mRNA の低い蓄積は、同 mRNA の転写後調節に起因するものと考えられた。

## まとめ

1. ハゲイトウの赤色葉形成は、約 20 日間の短日処理を葉に与えることで誘導される。この日長刺激によって葉で生じ、茎頂に送られる赤色葉形成シグナルの存在が示唆され、その量は刺激を受けた葉の枚数に依存して増えると考えられた。
2. 赤色葉においては、色素体のバイオジェネシスも転写機能も顕著には阻害されていないことが示された。
3. 赤色葉においても、少なくとも Mg-protoporphyrin (monomethyl ester) の生成までに関与する、クロロフィル合成系の酵素活性は高いレベルで維持されている。一方、クロロフィル合成系酵素の遺伝子のうち、2 種の *POR* 遺伝子の mRNA および *POR* タンパク質の蓄積量が赤色葉で著しく低いことから、*POR* mRNA の低蓄積が赤色葉形成の原因であることが示された。これらの結果とプロモーター解析から、赤色葉における *POR* mRNA の蓄積量の低下は、同 mRNA の転写後調節によって起こることが示唆された。

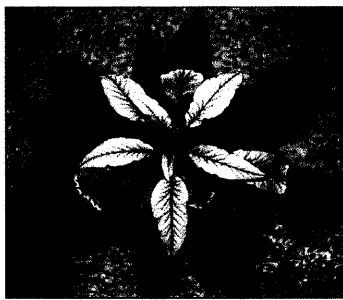


図1 ハゲイトウ (Earlysplendor 種)

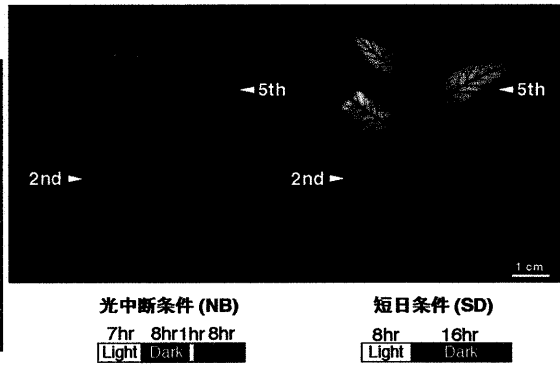


図2 本研究に供した植物体  
光中断 (NB) または短日 (SD) 条件下で育てた植物体の第 5 葉は、それぞれ、緑色葉または赤色葉となり、色は異なるがほぼ同齢・同サイズである。また、第 2 葉はいずれも緑色葉である。本研究では多くの実験にこれらの葉を用いて比較を行った。

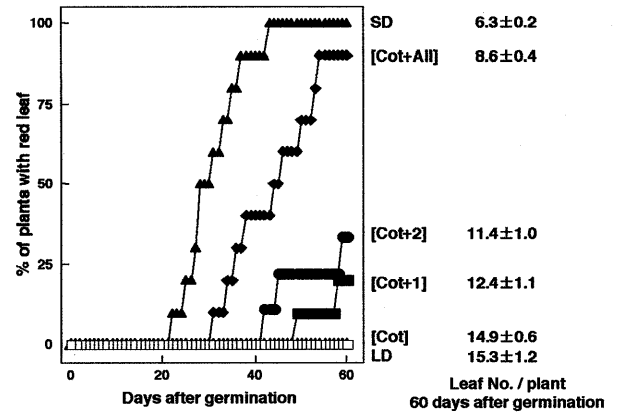


図3 葉および子葉の部分被覆が赤色葉形成と成長に与える影響  
長日条件下で育てた植物体の、赤色葉の形成時期および各個体の葉の数を示した。ただし [Cot] は子葉を、[Cot+1] は子葉と 1 枚の葉を、[Cot+2] は子葉と 2 枚の葉を、そして、[Cot+All] は子葉および生じたすべての葉に覆いをするので、部分的な短日処理を与えた。対照として、発芽後より短日 (SD) または長日 (LD) 条件下で育てた個体についても観察を行った。

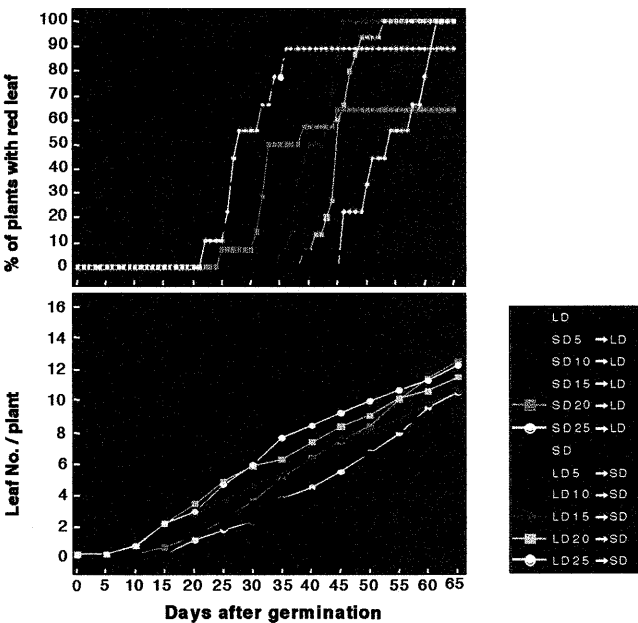


図4 日長条件の変更が赤色葉形成と成長に与える影響  
長日 (LD) および短日 (SD) 条件下で育てた植物体、および、発芽後 5、10、15、20 または 25 日目に短日から長日あるいは長日から短日条件下に移した植物体における、赤色葉形成時期と葉の数を示した。

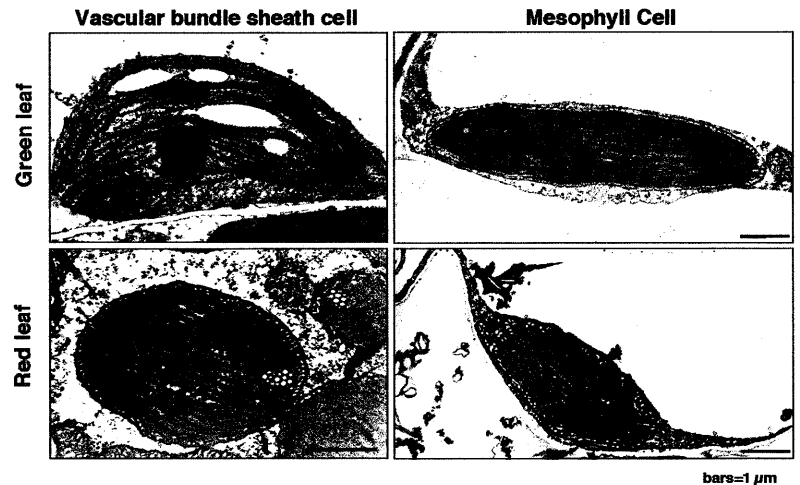


図5 葉における色素体の形態  
緑色葉および赤色葉における維管束鞘細胞 (Vascular bundle sheath cell) および葉肉細胞 (Mesophyll cell) 内の色素体の構造を電子顕微鏡を用いて観察した。矢印は赤色葉の色素体に見られる層状の膜構造を示す。

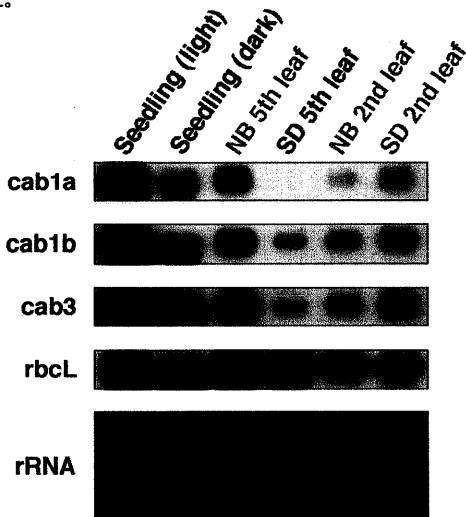


図6 光合成関連遺伝子の RNA ゲルブロット解析  
7 日間暗黒下で育てた後に 24 時間光照射を行った芽生え、8 日間暗黒下で育てた黄化芽生え、および図 2 で示した緑色葉と赤色葉における各遺伝子の発現量を比較した。最下段にエチジウムブロミドによるゲル染色像を示した。

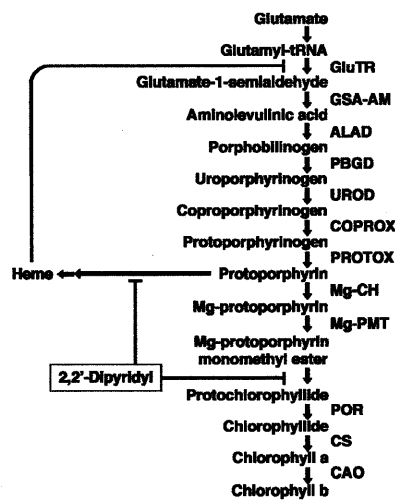


図7 クロロフィル合成および 2,2'-dipyridyl の作用機序  
同経路に關する酵素名は簡略化のため略記した。Protoporphyrin までクロロフィルと共通の経路により合成される heme は、合成の上流をフィードバック調節している。Dipyridyl は鉄をキレートすることにより heme 合成を抑制すると同時に、Mg-protoporphyrin から protochlorophyllide への変換も阻害する。従って、緑色組織に同薬剤を投与すると、Mg-protoporphyrin (monomethyl ester) や protoporphyrin が蓄積する。

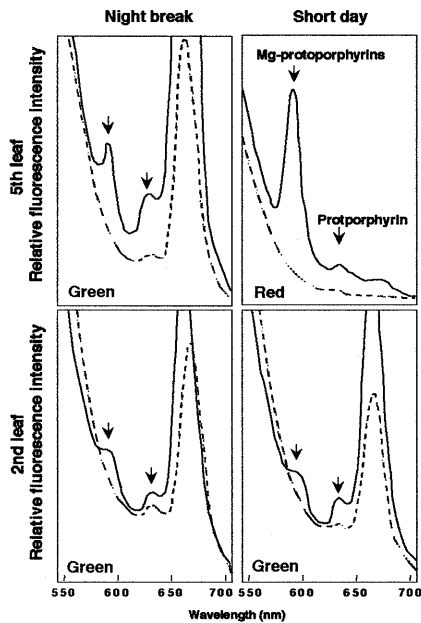


図 8 各葉におけるクロロフィル合成系中間体含量に対する 2,2'-dipyridyl の影響  
 図 2 で示した緑色葉および赤色葉を試料として用いた。1 mM dipyridyl (実線) あるいは対照として純水 (点線) 中でインキュベートした各葉から、アセトン/NH<sub>4</sub>OH 混液を用いてクロロフィル合成系中間体を抽出した。図は、抽出液を 419 nm の波長の光で励起したときの蛍光スペクトルを示している。本実験条件下では protoporphyrin は 633 nm に、Mg-protoporphyrins (Mg-protoporphyrin および Mg-protoporphyrin monomethyl ester) は 595 nm に蛍光極大をもつ。

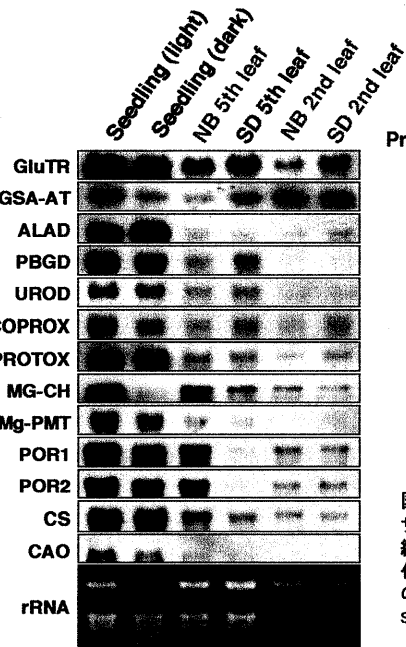


図 9 クロロフィル合成系遺伝子の RNA ゲルブロット解析  
 7 日間暗黒下で育てた後に 24 時間光照射を行った芽生え、8 日間暗黒下で育てた黄化芽生え、および図 2 で示した緑色葉と赤色葉における各遺伝子の発現量を比較した。最下段にエチジウムブロミドによるゲル染色像を示した。

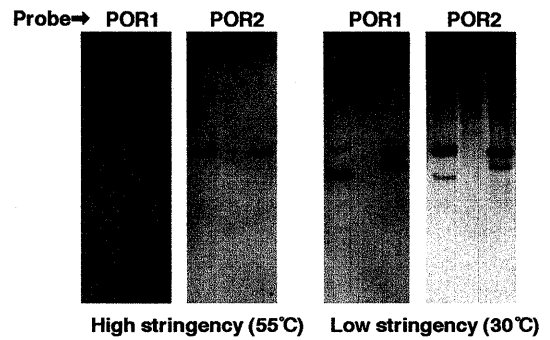


図 10 *POR1* および *POR2* 遺伝子をプローブとしたゲノムザン解析  
 緑色葉より単離した全 DNA を、図中に示した各制限酵素で消化し解析に用いた。ハイブリダイゼーションおよびプローブの洗浄は 55°C (high stringency) または 30°C (low stringency) で行った。

表 1 クロロフィル合成中間体の合成活性

Culture condition	Leaf position	Leaf color	Porphyrinogens formed (pmol mg protein <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		
			Urogen	Coprogen	Protozen
Night break	5th	Green	40.4	4.3	ND
Short day	5th	Red	89.4	22.3	ND
Night break	2nd	Green	16.5	1.7	ND
Short day	2nd	Green	17.3	2.0	ND

ND: not detected.

図 2 で示した各葉から 10% Triton X-100 を含むトリス緩衝液を用いて調製した粗酵素抽出液に、0.2 mM porphobilinogen を加えてインキュベートした。反応液中に生じる uroporphyrinogen (Urogen)、coproporphyrinogen (Coprogen) および protoporphyrinogen (Protozen) の生成速度を示した。

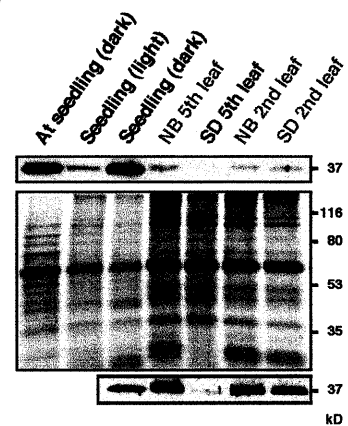


図 11 抗 *POR* 抗体を用いた免疫ブロット解析  
 本実験には抗シロイヌナズナ *PORA* 抗体を用いた。発芽後 7 日目のシロイヌナズナの黄化芽生え、7 日間暗黒下で育てた後に 24 時間光照射を行った芽生え、8 日間暗黒下で育てた黄化芽生え、および図 2 で示した緑色葉と赤色葉における *POR* タンパク質の蓄積量を示している。中段はポリアクリルアミドゲルの CBB 染色像。下段は長時間の露光を行ったときの X 線フィルム像を示すが、ハゲイトウの黄化芽生え (最左列) については他の 1/10 量のタンパク質をブロットした。

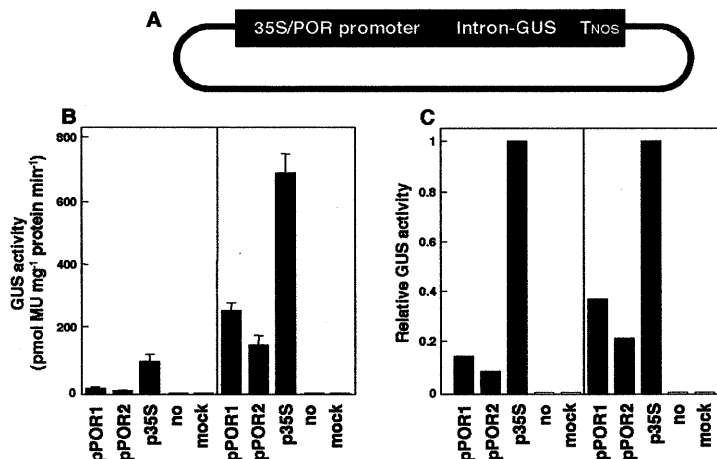


図 12 一過的な遺伝子導入系を用いた *POR* プロモーター活性の比較  
*POR1* および *POR2* プロモーターまたは 35S プロモーターに繋いだ intron-GUS を、緑色葉および赤色葉に遺伝子導入した (A)。各葉におけるそれぞれの GUS 活性 (B) と、緑色葉または赤色葉において 35S プロモーターによってドライブされた GUS 活性を 1 としたときの、相対的な GUS 活性を示している (C)。ネガティブコントロールとして、プロモーターをもたない intron-GUS (no) および、アグロバクテリウムを含まない懸濁用緩衝液 (mock) を植物体に注入した。

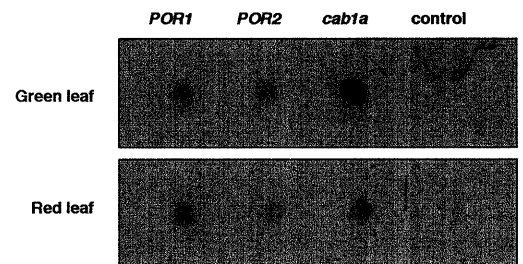


図 13 *POR* および *cab* 遺伝子の転写速度の比較  
*AttPOR1*、*AttPOR2* および *cab1a* 遺伝子について、緑色葉および赤色葉から調製した核を用いて transcriptional run-on アッセイを行った。