

TOPICS

植物の葉に起こる斑入り ～分子遺伝学的アプローチ～

岡山大学 資源生物科学研究所

三浦栄子・加藤裕介・坂本 亘

1. 葉の斑入りについて

「斑入り」とは、観葉植物に見られるような緑色組織に縞や斑点などの様々な模様が入ることを指す。斑入り植物は人為的に園芸品種として選抜されてきたものだけではなく、自然界にもしばしば見つけることができる。しかし、メンデルの遺伝法則が再発見された20世紀初めに遺伝形質として報告されているにも関わらず、原因となる遺伝子の同定や詳しい解析がなされ始めたのは最近になってからである¹⁾。また、今現在においても、どのように斑入りが形成されるのかについては不明の点が多い。斑入り植物は、全ての細胞が同じ遺伝的背景を持つにも関わらず葉緑体への分化レベルが異なる細胞を同一の葉に共存させており、葉緑体分化を研究するための有効な解析ツールともなりうる。本稿では、私たちの研究室で扱うシロイヌナズナ斑入り変異体 *var* (*yellow variegated1* (*var1*) および2 (*var2*)) の原因遺伝子とその働きを概説し、三浦が中心に行っている斑入り抑制変異体 *fu-gaeri1* (*fug1*) の解析を通じた植物が斑入りを形成するメカニズムやその意義についての考察を紹介してみたい。

2. 斑入り変異体 *var* の原因遺伝子 *FtsH*

var1 および *var2* は単一劣性の斑入り突然変異で、その緑色セクターではプラスチド（葉緑体発達前の構造物をこう呼ぶ）が正常に葉緑体へと発達している一方、白色セクターのプラスチドは発達が途中で停止した未分化の状態であることが最近の私たちの研究から示唆されている²⁾。これまでの研究から、原因遺伝子 *VARI1* と *VARI2* はそれぞれ、チラコイド膜上で異なる *FtsH* メタプロテアーゼ (*FtsH2* と *FtsH5*) をコードしていることが明らかとなっている³⁻⁵⁾。シロイヌナズナは12個の *FtsH* ホモログを持っており、*FtsH2* と *FtsH5* を含

む9個が葉緑体局在する⁶⁾。斑入り表現型は *FtsH2* と *FtsH5* の欠損に特異的で、他の *FtsH* 遺伝子のノックダウンでは何も表現型は現れない⁶⁾。これは、*FtsH2* と *FtsH5* が葉緑体型 *FtsH* の中でも最も多く、かつ恒常的に発現しているためだと考えられる。*FtsH2* と *FtsH5* は～400kDaの主要な *FtsH* ヘテロ複合体を形成しており、*FtsH1/FtsH5* と *FtsH2/FtsH8* のペアに代表されるように、葉緑体型 *FtsH* にはよく似ているが2つのタイプが存在し、ペア内では高発現による機能の相互置換が可能と考えられ、Adamらによりタイプ A/B モデルとして提唱されている⁶⁻⁸⁾。現在 *FtsH* は、葉緑体におけるプロテアーゼとしての役割である光化学系の品質管理（主に PSII 反応中心である光障害を受けた D1 タンパク質の分解）と、まだ定義されていない機能を通じたチラコイド膜の形成・発達に関与していると推測されている^{2,3,4,9)}。

3. *var2* の斑入り抑制変異体 *fug1 var2* の単離¹¹⁾

葉緑体分化に関わる因子およびメカニズムを解明する目的で、*var2* の斑入りを抑制することが可能なセカンドサイトミュレーションの発見を試みた。*var2* 抑制変異体のスクリーニングは実は他のグループによって成功しており¹⁰⁾、いくつかの劣性変異で斑入りは回復することは予想されていた。

まず私たちは T-DNA 挿入変異体である *var2-6* に EMS で突然変異処理した M2 世代を作成し、その M2 種子を MS 培地のプレートに播種し、斑入りが抑制された個体をスクリーニングした。約 10,000 個体の M2 個体を試験した中で、約 20 個体の推定の斑入りが抑制された植物を単離した (図1参照)。単離した変異体は *fu-gaeri* (斑返り) と名づけ、その1系統 (以下、変異体名を *fug1 var2* と表記する) に焦点を当てて解析を進

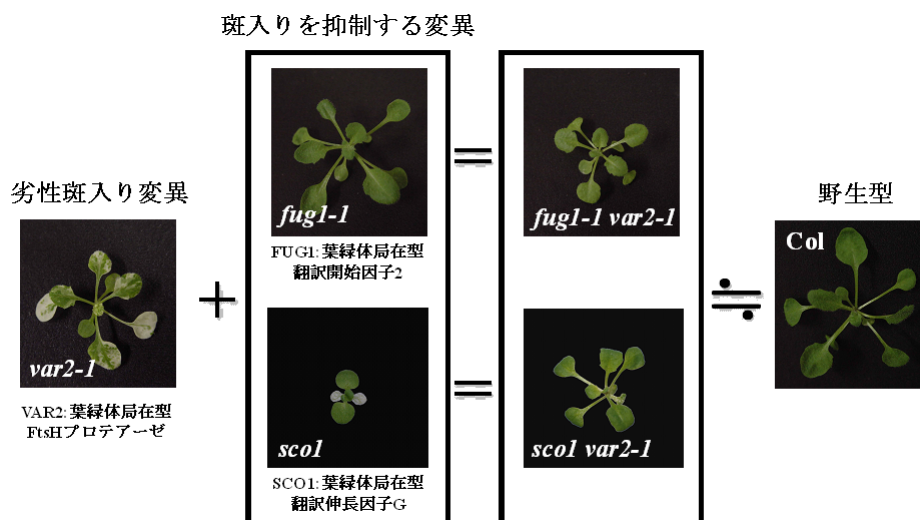


図1 シロイヌナズナ斑入り変異*var2*の斑入りを抑制する劣性変異*fug1*と*scol*
葉緑体タンパク質の分解を担うプロテアーゼであるVAR2の欠損により引き起こされる斑入り表現型は、葉緑体タンパク質の合成に関わる因子の機能低下によって抑制される。

めた。葉の組織の縦断切片からは、*fug1 var2* は野生型に比べて成長が遅いため個々の細胞は小さく見えるが、表皮や葉肉細胞は正常に組織化されていた。透過型電子顕微鏡を用いた観察では、*fug1 var2* のグラナスタックの発達を伴う葉緑体の構造は野生型と同等であると思われた¹¹⁾。

4. *fug1* の原因遺伝子は cpIF2 をコードしていた

fug1 は遺伝解析の結果、核の単一劣性変異であったためマップベースクローニングを行ったところ、原核生物型翻訳開始因子2 (IF2) をコードする遺伝子に単一のアミノ酸置換を発見した¹¹⁾。葉緑体やミトコンドリアが持つ独自のゲノムの翻訳には、細胞質で行われる核ゲノムの真核生物型翻訳機構とは異なり、原核生物型の翻訳機構が用いられており、IF2は、30S リボソームと fMet-tRNA^{met}、mRNA からなる開始複合体にリボソーム大サブユニットを GTP 依存的に呼び込む役割を持つ¹²⁻¹⁴⁾。シロイヌナズナゲノムには原核生物型 IF2 ホモログをコードする遺伝子が2つ存在し、GFP を用いた局在解析の結果、一つはミトコンドリアに、もう一つ (FUG1) は葉緑体に移行することが示唆された (以下、FUG1 を指す IF2 を cpIF2 と表記する)。また T-DNA 挿入変異体の解析によって、cpIF2 タンパク質が生存に必須であり、完全欠損すると胚性致死となることも明らかにした。さらに、cpIF2 の RNAi による

var2 の斑入り抑制実験や、IF2 欠損大腸菌株による相補性検定により、*fug1* の原因遺伝子が実際に cpIF2 であることを証明した¹¹⁾。

5. *fug1* では葉緑体タンパク質合成能が低下する

cpIF2 タンパク質は翻訳開始因子であるため、*fug1* における葉緑体タンパク質の合成量が低下しているかを調べる目的で、³⁵S 標識したメチオニンに葉に直接取り込ませ、光照射開始から一定時間ごとにチラコイド画分を抽出し、SDS-PAGE により分離し、BAS1000 により検出した。確認できたバンドの中から D1 と LHCII を同定して、その輝度を数値化シグナグラフを作成した結果、核コードの遺伝子である LHCII の合成量には差がみられなかった。一方、葉緑体ゲノムにコードされた D1 の蓄積量は異なっており、最も差が現れたのは5、10分後のサンプルで、野生型に対し *fug1* では約30%の合成量の減少を示した。この結果から *fug1* における cpIF2 の発現量低下は葉緑体タンパク質合成 (特に初期段階) に影響することが示唆された¹¹⁾。

6. *var2* の強光感受性も *fug1 var2* では抑制される

FtsH は PSII 修復サイクルにおける主要なプロテアーゼであると考えられており、*var2* における FtsH2 の欠損は光障害を受けた光化学系タンパク質 (特に D1) の蓄積を引き起こすと予想される。このような修復サ

イクルの異常が、結果的に光化学系の電子伝達に影響を及ぼすため、*var2* の緑色組織は強光ストレスに順化できず、強光条件で系 II における光化学収率（クロロフィル蛍光による *Fv/Fm* 値）が著しく低下する。また、このような強光障害後の光化学収率の回復も野生型に比べて遅く、かつ完全に回復しないことが知られている^{5,15)}。しかし、*var2* と *fug1* が共存した抑制変異体の PSII 活性の低下は野生型と同レベルであった¹¹⁾。また、MS 寒天培地で生育させた *fug1* は定常状態ですでに *Fv/Fm* を指標とした PSII 活性の低下を示したが、土植えた成熟葉を使用したときの PSII レベルは Col に匹敵していた。この結果は、葉緑体における翻訳は比較的若い葉の最初の生合成に重要な影響を及ぼすことを意味するのかもしれない。対照的に、成熟葉では、翻訳は PSII の修復といったむしろ葉緑体のメンテナンスに重要な役割を持つのかもしれない。

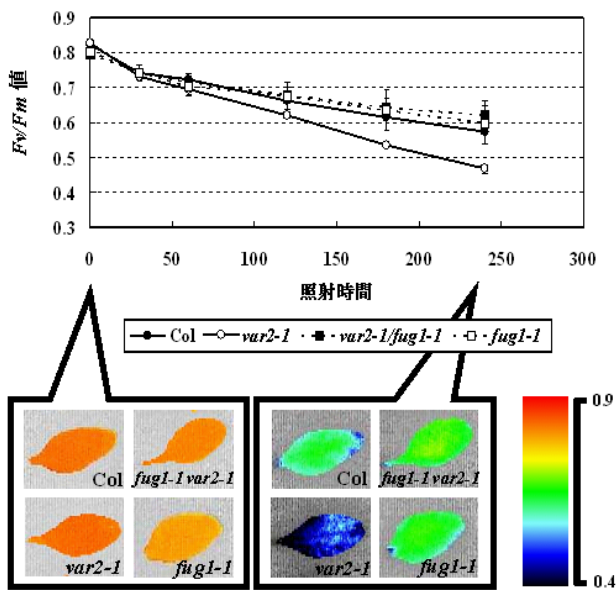


図2 斑入り変異*var2*の強光感受性も*fug1 var2*では抑制される

土植えた成熟葉に $800 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の強光を 2 時間照射した。各 *Fv/Fm* 値は 10 分間の暗順化後に測定した。グラフの下には葉の *Fv/Fm* 値を擬似カラーで示した。

7. *fug1* の斑入り抑制効果

交配実験の結果、*fug1* は *var2* とは別の FtsH ホモログが欠損した *var1* 変異体 (弱い斑入り表現型) や *var1 var2* 二重変異体 (アルビノに近い斑入り表現型) の斑

入りも回復させることがわかった¹¹⁾。これらの結果は *fug1* が特異的な FtsH においてではなく、FtsHs の欠損全体に影響することを示唆している。*var1 var2* 二重変異体では白色組織の割合が高く、個体が弱勢で、種子を得ることができないが、*fug1* を導入した三重変異体 *fug1 var1 var2* ではごく弱い斑は見られるものの、植物の生育も回復し種子が得られるようになる。ここで用いた変異は全て劣性で、それぞれが少なからず光合成の活性低下を引き起こす変異であるにも関わらず、それらの組み合わせによって斑入りが変化し、植物の成長にも大きな影響を与えることは、自然界にある多様な斑入りとその進化を考えると興味深い知見といえる。

8. *var2* の斑入りは別の翻訳変異体 *sco1* でも抑制される

私たちは、*var2* に見られる斑入り抑制が cpIF2 に特化したものではなく、葉緑体の翻訳活性が低下した結果、起こったのではないかと仮説を立てた。そこで cpIF2 と同様に、葉緑体の翻訳に関与する遺伝子に変異を持った *snowy cotyledon 1 (sco1)* 変異体に *var2* を交配し二重変異体 *sco1 var2* の作製を試みた。*sco1* は名前が示すように子葉のみが白くなる変異体として単離され、葉緑体で唯一の翻訳伸長因子 (cpEF-G) にアミノ酸置換を持つことが Albrecht らにより明らかにされている。葉緑体翻訳伸長時における cpEF-G の実際の役割にはまだ不明の点が多いが、*sco1* におけるアミノ酸置換は cpEF-G とリボソーム複合体との結合機能に影響すると予測されている¹⁶⁾。交配の結果、*sco1 var2* 二重変異体では子葉が白い表現型を示すが、本葉での斑入りを抑制することが明らかとなった。これらの結果により、当初予想したように、葉緑体タンパク質の翻訳活性低下が斑入りと関係していることが強く示唆された。

9. 正常な葉緑体への分化には葉緑体内タンパク質の合成と分解のバランスが重要

FtsH は様々な葉緑体タンパク質 (Rieske FeS¹⁷⁾, LHCII¹⁸⁾, D1^{15,19,20)} を含む) の ATP 依存的分解に関与する。それらと私たちが遺伝学的に明らかにした結果から、葉緑体タンパク質の合成と分解のバランスは、少なくとも *var* 変異体のケースにおいては、斑入りを引き起こす決定因子の一つであると現在のところ考えら

れている。一般化できるかどうかはわからないが、斑入りがおこる分子メカニズムを明らかにできた最初の例といえる。

バランスには閾値が存在すると仮定すると、閾値以上をバランスがとれた状態と考えることができる。閾値以上では細胞は正常に見える葉緑体への分化を運命づけられるが、閾値以下である細胞は葉緑体分化が不可逆的に抑制され、白色セクターを形成すると考えられる。一枚の斑入り葉における白色セクターの面積は後期葉ほど減少していくことから、この閾値はおそらく植物個体の生育や環境条件に依存して変化していくのであろう。完全な葉緑体の機能を阻害するように働く *fug1* におけるタンパク質合成の減少は、おそらく閾値のラインを下げ、多くの細胞が正常な葉緑体に発達するようにさせているのではないかと予想される。

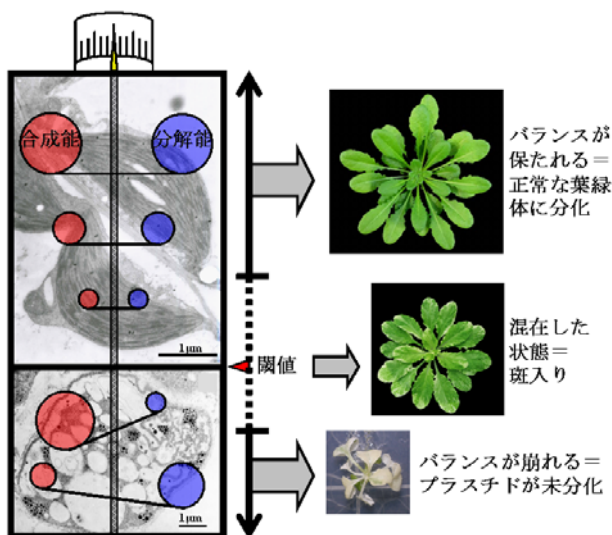


図3 植物の葉に斑入りを起こす閾値モデル

左側には葉緑体タンパク質の合成能力と分解能力が釣り合った正常な葉緑体（上）と不釣り合いな *var2* 白色セクターの異常なプラスチド（下）の電子顕微鏡写真を示した。

10. おわりに

本研究を通して、斑入り形成に関わる新規の制御因子や経路を同定することはできなかったが、抑制変異体候補を多数単離できたことからわかるように、*var* における葉の斑入り抑制は種々の要因で起こるのであろう。また、劣性変異体を用いた最近の研究からも、葉の斑入りは様々な原因を通して起こりうる事が明

らかになりつつある。自然界において私たちは、遺伝学的な変異だけではなく、病原菌の感染や除草剤散布などの外的要因によっても葉の斑入りを観察することもあるので、斑入りという表現型は植物にとって厳しい環境条件下で生き残る生存戦略の一つなのかもしれない。そのような観点からも今後研究を進めたいと考えている。

最後に本稿は、2007年5月に開催された第7回光合成研究会シンポジウムにおいて三浦が発表し、ポスター賞を頂いた発表内容を中心に紹介したもので、受賞とこのような話題提供の機会を下さった伊藤会長と編集幹事の野口先生にこの場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

1. Sakamoto, W. (2003) Leaf-variegated mutations and their responsible genes in *Arabidopsis thaliana*, *Genes Genet. Syst.* 78, 1–9.
2. Kato, Y., Miura, E., Matsushima, R., and Sakamoto, W. (2007) White leaf sectors in *yellow variegated 2* are formed by viable cells with undifferentiated plastids, *Plant Physiology* 144, 952–960.
3. Chen, M., Choi, Y., Voytas, D. F., and Rodermel, S. (2000) Mutations in the *Arabidopsis VAR2* locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease, *Plant J.* 22, 303–313.
4. Takechi, K., Sodmergen, Murata, M., Motoyoshi, F., and Sakamoto, W. (2000) The *YELLOW VARIEGATED (VAR2)* locus encodes a homologue of FtsH, an ATP-dependent protease in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.* 41, 1334–1346.
5. Sakamoto, W., Tamura, T., Hanba-Tomita, Y., and Murata, M. (2002) The *VARI* locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles, *Genes Cells* 7, 769–780.
6. Sakamoto, W., Zaltsman, A., Adam, Z., and Takahashi, Y. (2003) Coordinated regulation and complex formation of *YELLOW VARIEGATED1* and *YELLOW VARIEGATED2*, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes, *Plant Cell* 15, 2843–2855.
7. Yu, F., Park, S., and Rodermel, S. R. (2004) The

- Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: Interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes, *Plant J.* 37, 864–876.
8. Zaltsman, A., Ori, N., and Adam, Z. (2005) Two types of FtsH protease subunits are required for chloroplast biogenesis and Photosystem II repair in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 17, 2782–2790.
 9. Sakamoto, W. (2006) Protein degradation machineries in plastids, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 599–621.
 10. Park, S., and Rodermel, S. R. (2004) Mutations in ClpC2/Hsp100 suppress the requirement for FtsH in thylakoid membrane biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12765–12770.
 11. Miura, E., Kato, Y., Matsushima, R., Albrecht, V., Laalami, S., and Sakamoto, W. (2007) The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in *Arabidopsis yellow variegated* mutants, *Plant Cell* 19, 1313–1328.
 12. Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation, *Cell* 108, 557–572.
 13. Manuell, A., Beligni, M. V., Yamaguchi, K., and Mayfield, S. P. (2004) Regulation of chloroplast translation: Interactions of RNA elements, RNA-binding proteins and the plastid ribosome, *Biochem. Soc. Trans.* 32, 601–605.
 14. Laursen, B. S., Sorensen, H. P., Mortensen, K. K., and Sperling-Petersen, H. U. (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 101–123.
 15. Bailey, S., Thompson, E., Nixon, P. J., Horton, P., Mullineaux, C. W., Robinson, C., and Mann, N. H. (2002) A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair cycle *in vivo*, *J. Biol. Chem.* 277, 2006–2011.
 16. Albrecht, V., Ingenfeld, A., and Apel, K. (2006) Characterization of the *snowy cotyledon 1* mutant of *Arabidopsis thaliana*: The impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality, *Plant Mol. Biol.* 60, 507–518.
 17. Ostersetzer, O., and Adam, Z. (1997) Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: The possible role of the FtsH protease, *Plant Cell* 9, 957–965.
 18. Želisko, A., Garcia-Lorenzo, M., Jackowski, G., Jansson, S., and Funk, C. (2005) AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13699–13704.
 19. Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A. B., Adam, Z., and Andersson, B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein, *Plant Cell* 12, 419–431.
 20. Komenda, J., Barker, M., Kuviková, S., de Vries, R., Mullineaux, C. W., Tichy, M., and Nixon, P. J. (2006) The FtsH protease, slr0228, is important for quality control of photosystemtwo in the thylakoid membrane of *Synechocystis* PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 281, 1145–1151.