

## 葉緑体DNA分解による種子植物のリン再利用戦略

坂本 亘, 高見 常明

### 1. はじめに

陸上植物の光合成は細胞内の葉緑体で行われ、光エネルギー転換反応とCO<sub>2</sub>の固定による植物の成長をつかさどるとともに、我々の大気環境を支えている。葉緑体における酸素発生型光合成や脂質組成は光合成細菌（シアノバクテリア）と共通点が多いことに加え、葉緑体にはDNAがあり、「葉緑体がシアノバクテリアの細胞内共生に由来する」という共生説の強い根拠になっている<sup>1,2)</sup>。ミトコンドリアも同様に $\alpha$ プロテオバクテリアの共生由来と考えられている。オルガネラに残ったDNAとその転写・翻訳系によるタンパク質合成は真核細胞の生育に不可欠だが、葉緑体ではゲノムのコピー数が非常に多く、かつDNA量の変動することが報告されており、この現象の解釈について長らく議論が続いていた<sup>3,4)</sup>（図1A）。共生オルガネラには、どうして一部のDNAが維持され、しかも大量に存在するのだろうか。DNAが分解されることはあるのだろうか。本稿では、筆者らが最近明らかにしたオルガネラDNA分解システムを解説するとともに、これらの分解現象を通したオルガネラDNAの存在意義について、新たな視点で考察する。なお、本稿では主にシロイヌナズナなど種子植物の葉緑体について言及し、藻類などには一般化できないこともある点を留意いただきたい。

### 2. 葉緑体DNAの謎

オルガネラゲノムの解析は、単離して精製されたゲノムサイズが小さいことから、1970年代の分子生物学とDNA解析の隆盛期に先駆的な植物ゲノム研究として着手され、1980年代に全ゲノム配列が相次いで決定された<sup>5)</sup>。核のゲノムが続々と解読される2000年代の10年以上前のことで

ある。葉緑体DNAは植物種で異なるものの、約150kb程度のサイズで100個ほどの遺伝子があり、転写翻訳、光合成に関わるタンパク質が合成される。しかし、葉緑体を構成するタンパク質は3000以上あり、残りのタンパク質を作る遺伝子は、共生進化の過程ですべて染色体DNAに移行し、自律性を失ったと考えられる。その代わり、一部を核ゲノムの遺伝子として発現させることで、細胞と協調して葉緑体の機能が分化するようになった<sup>6)</sup>。では、なぜ全部の遺伝子を核に転移せず、一部の遺伝子をプラスチドに残す必要があったかという疑問が残る。たとえば、Allenは、光阻害やレドックス制御を受ける光合成反応に関わる遺伝子は迅速なタンパク質合成に適応するために葉緑体に維持されている、という仮説を提唱している<sup>7)</sup>。また、ミトコンドリアDNAの例では、植物種により核に転移した遺伝子、あるいは転移に失敗したと考えられる偽遺伝子が見つかったので、現在のオルガネラゲノムは核に移行する途上にある、と考えることもできる。どちらにしても、DNAをオルガネラに維持することの必要性は一つの謎である。

葉緑体DNAのもう一つの謎として、ゲノムサイズが小さいのに、細胞あたりのゲノムコピー数が非常に多いことがあげられる。シロイヌナズナ成熟葉の葉肉細胞では、細胞に80~120個の葉緑体が存在し、コピー数は1000コピー以上になる<sup>8)</sup>。一方で二倍体植物であれば、核ゲノムは2コピーしかない。つまり、葉緑体は遺伝子数が圧倒的に少ないのとは対照的に、量が多く、全DNA量の30%以上を占めることもある。また、器官や組織、発生段階でプラスチドDNAを定量すると、細胞あたりのコピー数が増動している。なぜ、葉緑体にこれほどDNAを蓄積させているのだろうか。

### 3. DPD1によるDNA分解現象の発見

オルガネラDNAは、固定した組織の薄切片をDNA特異的蛍光色素で染色することで主に顆粒状の構造として観察できる（図1B）。この構造は核様体と呼ばれるタンパク質との複合体で、それらの形状が組織や器官により変化することもわかっていた<sup>9)</sup>。興味深いことに、発生の進んだ成熟葉や花粉ではオルガネラDNAがほとんど観察されない例が報告され、オルガネラDNAが何らかの理由で組織特

岡山大学資源植物科学研究所（〒710-0046 岡山県倉敷市中央2-20-1）

**Degradation of chloroplast DNAs as an efficient strategy for phosphorus recycling in seed plants**

Wataru Sakamoto and Tsuneaki Takami (Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, 2-20-1 Chuo, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910785

© 2019 公益社団法人日本生化学会

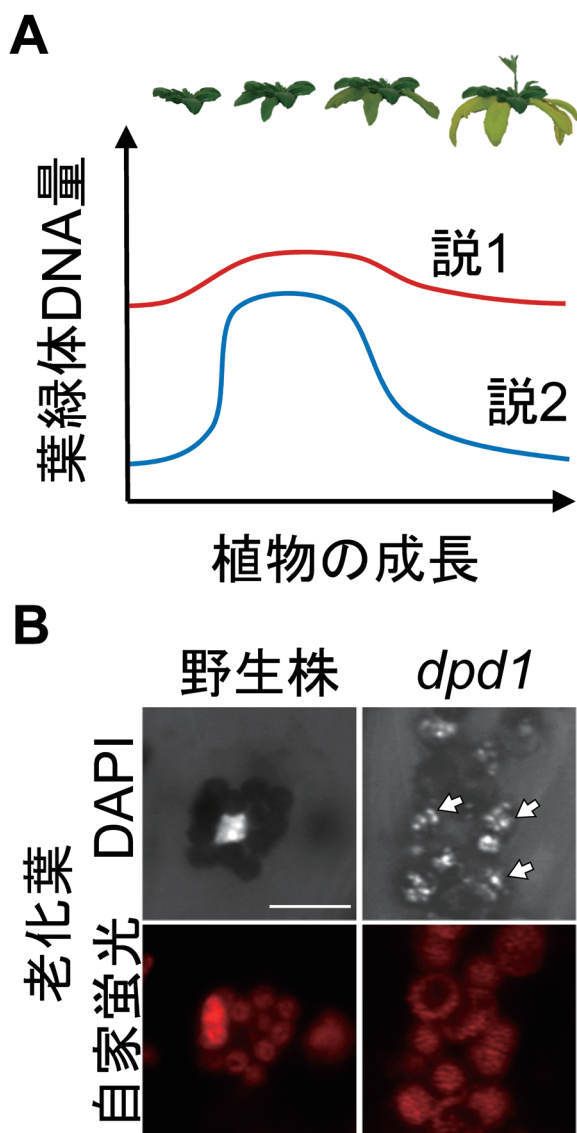


図1 葉における葉緑体DNA量が変動する現象の論争と *dpd1* 変異体

(A) 葉緑体DNA量の変動に関するモデルの模式図。植物における葉の成熟と老化の過程を横軸、葉緑体DNA量を縦軸に示すと、説1では成長過程でDNA量はほぼ一定に保たれており、説2では葉の成熟化とともにDNA量は増加するが、成熟後は分解される。組織染色による観察、qPCRなどによる観察結果の不一致から意見が対立していた。(B) 老化葉におけるDNAの組織化学的検出 (DAPI)。野生株では核DNAのシグナルのみが顕著に検出されるが、*dpd1* 変異体では、クロロフィルの自家蛍光と共局在するDNA (矢印) が検出される (Bar = 10  $\mu$ m)。

異的に分解されることがBendichらにより提唱された<sup>10)</sup>。ところが、これらの分解現象は最近の定量的PCR実験が確立されるまで否定的に解釈されたので、葉緑体やミトコンドリアのDNAが分解されるかどうか、については長らく論争が続いていた<sup>3,4)</sup> (図1A)。

筆者らは、この疑問に明確な答えを得るため、アブラナ科のモデル植物シロイヌナズナで調べることにした<sup>11)</sup>。被

子植物の花粉は、成熟すると例外なくオルガネラDNAが蛍光色素で検出できなくなるので、変異体をスクリーニングしたところ、DNAが残存する変異体を単離することができた (図1B)。突然変異の原因を調べたところ、DPD1と名づけたExoドメインを持ったタンパク質の欠損であることがわかった<sup>11)</sup>。DPD1遺伝子は花粉と老化葉 (後述) で強く発現していて、DPD1タンパク質のN末端側にはこのタンパク質をプラスチドとミトコンドリアの両方に輸送するシグナル配列が存在していた。DPD1を試験管内で発現させると、DNAの3'末端を認識して連続的に分解するエキソヌクレアーゼ活性を持つこともわかった<sup>12)</sup> (図2)。興味深いことに、DPD1は大腸菌のDNAポリメラーゼIIIの複製間違いを訂正する機能を持つDnaQサブユニットによく似ているが、シアノバクテリアには同じ遺伝子が見つからない。加えて、藻類やコケ類にもDPD1が見つからず、被子植物・裸子植物のみに存在する。DPD1はシアノバクテリアの共生以降、植物の陸上進化の過程で獲得した機能のようであった。葉緑体DNAは環状構造であると長く考えられてきたが、最近の研究では、一部が切断されたり、直鎖状の不均一な構造であることもわかってきたので、エキソヌクレアーゼ活性を持つDPD1のみでも、おそらくDNAを分解できると考えられた。

DPD1が見つかった当初の研究では、上に述べたように花粉における分解に着目したが、その後の研究により、DPD1は成熟した葉が老化により枯れていく過程でも誘導されていることが明らかになった。野生型植物から切除した葉を暗黒に置くと葉の老化が誘導され、5日程度で黄化する<sup>12)</sup>。この老化過程で葉緑体DNAの量を調べると、1000コピー程度あるDNAが5日目には100コピー以下になり、花粉と同じように分解されることが実証された。一方、同じ実験を*dpd1* 変異体で試みると、葉緑体DNAの分解はほとんど進まない (図1B)。以上の結果から、オルガネラDNAがDPD1により分解されることが証明され、論争には決着をつけることができた。次に、この分解には何らかの生理的な意義があるかが提起される。

#### 4. DNA分解の意義

筆者らは葉でのDNA分解について掘り下げてみることにした。葉の老化と養分の再利用には深い関係がある。動物のように動いて自分の栄養を探して摂取することができない植物は、地に根を張って養分を吸収し、光合成で成長しながら陸上で進化してきた。そこで不足する養分に応答するため、種々の環境適応機能を発達させている。「葉の老化」は、そのようなプログラムの一つで、自分が光合成などに使った高分子化合物を分解して転流させ、再利用している。たとえば、実りの秋の田んぼが一斉に黄金色に

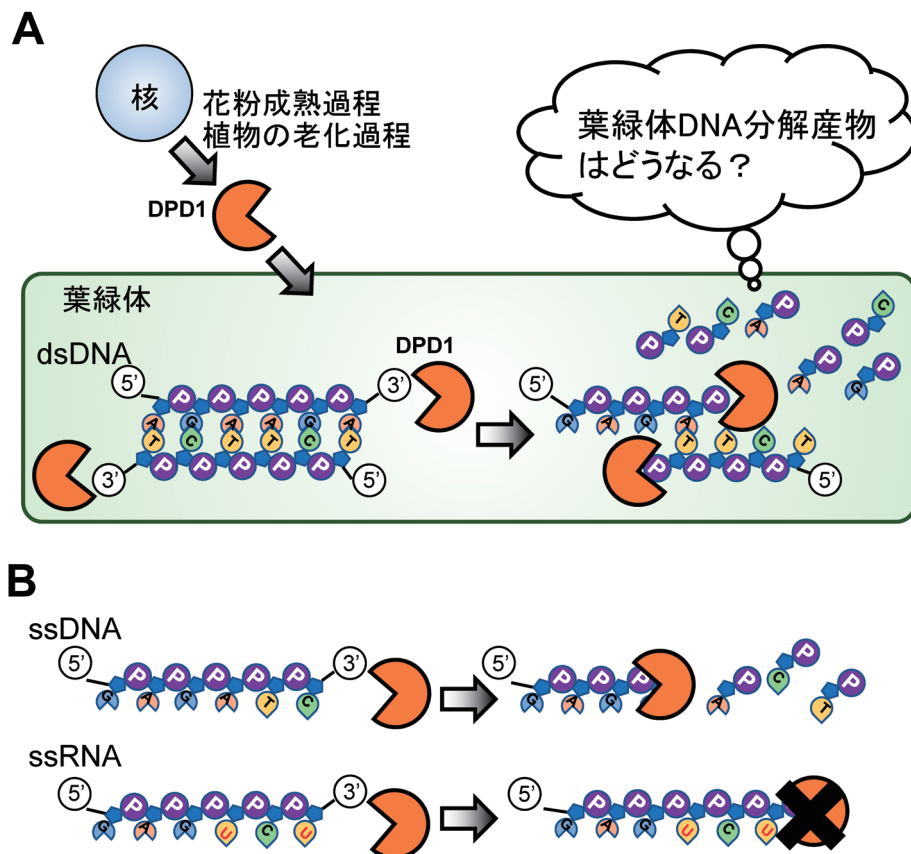


図2 オルガネラヌクレアーゼDPD1の性質 (模式図)

(A) DPD1は花粉や葉の老化で誘導され、二本鎖DNA (dsDNA) の3'末端を認識してモノヌクレオチドに分解する。(B)大腸菌で融合タンパク質として精製されたDPD1は、Mg依存的に二本鎖あるいは一本鎖DNA (ssDNA) を分解するが、RNAは分解しない。すなわちDPD1はMg依存性のDNaseであることがわかった。

なり、稲穂がこうべを垂れるのは、葉の老化で葉緑体の養分が効率よく稲穂に転流して使われるためである<sup>13)</sup>。葉緑体DNAが分解されるのもこの再利用の一過程であると考えた。DNA分解と養分の再利用、特に、DNAがリンを多く含むことを考えると、リン栄養の供給に関係することが予想された (図3)。生体内でリンを最も多く含む高分子は膜を構成するリン脂質やリボソームを構成するRNAやDNAなどの核酸であり、植物細胞の全リン量の50%が核酸に含まれることもある<sup>14)</sup>。葉緑体DNAは、全核酸の6~9%近くを占め、かつ余剰に存在するので、分解されて再分配されれば、リンの効率利用に寄与することが推察される。

これらの可能性を実験的に調べるために、シロイヌナズナをリン欠乏させた状態で水耕栽培した。すると、DNA分解が起こらない *dpd1* 変異体は典型的なリン欠乏症状になってアントシアニンを蓄積するとともに、野生型と比べて生育が悪くなった<sup>12)</sup>。同様な実験で窒素欠乏にしたときは、*dpd1* 変異体と野生型の双方ともに窒素欠乏症状を示すが、有意な違いはみられなかった。リン欠乏条件で

栽培を続けると *dpd1* 変異体ではさやあたりの種子量が低下し、リンの下部組織から上部組織への移動も減少することがわかった (図3)。以上の結果、葉緑体DNA分解がリンの再利用に寄与することが実験的に証明された。興味深いことに、リン欠乏時に誘導される遺伝子応答反応を調べてみると、*dpd1* 変異体ではリン酸の取り込みや脂質のリモデリングを活性化する遺伝子の発現が低下していた<sup>12)</sup>。したがって、オルガネラDNAは、リン貯蔵物質として機能していることに加え、分解産物が、リン欠乏応答のシグナルとして機能する可能性が示唆された。

次に、シロイヌナズナでの結果が一般化できるかを、野外での実験でも試みた。広葉落葉樹のポプラは、春に若葉を形成して光合成を活性化し、秋に老化して落葉する。落葉の過程では、葉の全リン量の約60%が幹に取り込まれるので、葉のリン移動とオルガネラDNA分解の関連を調べるよい実験系であると考えた。春から秋にかけてサンプリングした葉の葉緑体DNA量を定量すると、予想どおり、落葉に向けてDNA分解が促進されており、*DPD1* 遺伝子が落葉前に著しく活性化されることがわかった<sup>12)</sup>。

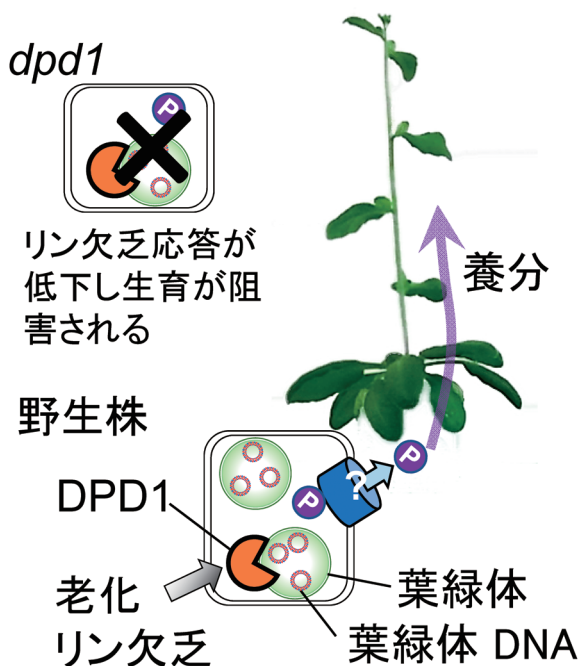


図3 DPD1による葉緑体DNAの分解とリン欠乏応答（模式図）  
DPD1によるDNA分解は、分解産物の転流により、リン栄養の効率的利用に寄与している。dpd1変異体では、DNA分解が阻害される結果、植物体をリン欠乏条件にさらすと、典型的なリン欠乏症状を示す。

最近、イネを用いた実験でも、老化葉におけるDNA分解とDPD1の関連性を示唆するデータが得られつつあり、少なくとも葉緑体では、多量に存在するDNAを分解することでリンの転流に寄与するリザーバー機能を担っている可能性が明らかになった。

#### 5. おわりに——葉緑体DNAのリン貯蔵モデル——

以上、オルガネラDNAがDPD1ヌクレアーゼにより分解される現象について、葉緑体での知見を中心に紹介した。種子植物では、DPD1によってオルガネラDNAが分解され、主にリンの養分として再利用されている、という「DNAのリン貯蔵モデル」である。

1953年にワトソンとクリックがDNAの二重らせん構造を解明し、DNAが遺伝情報物質であることが証明され、DNA研究があらゆる分野で進んでいるのは周知のとおりである。しかし、実はこれらの発見に遡る1860年代に、ドイツ・チュービンゲン大学の化学者フリードリヒ・ミーシャーが、患者の膿の細胞からDNAに相当する物質を初めて単離し、「ヌクレイン」と名づけている<sup>15)</sup>。ミーシャーは、ヌクレインがタンパク質とは異なり多量のリンを含む物質であることを見だし、リンの細胞内貯蔵に関わる可能性を述べている。今回の研究は、細胞内共生に

より維持される葉緑体DNAに限った例だが、ミーシャーが当初考えたような、リン貯蔵の機能がある可能性を示している。さらに、細胞内共生による進化とDNAの問題にも一つの答えを提示している。DNAの一部を残すことで、葉緑体に大きな核酸のプールを形成し、リン貯蔵の役割を担わせることで、リン栄養の枯渇に備えた生存戦略を持たせている、とも考えることができる。シロイヌナズナdpd1変異体におけるリン移動の低下と欠乏応答の低下により現れるリン欠乏症状は、これらの結果を強く支持している。

今回の研究では、DNAが分解して再利用されることを明らかにした一方で、さまざまな疑問も提起している。まず、リンとして再利用される分解産物が何かを今後調べる必要がある。葉緑体包膜にはヌクレオチドあるいはリン酸の輸送体が報告されているので、このどちらかの可能性が高い。また、これらの分解産物がリン利用効率を活性化させることも、今後、検証する必要がある。さらに、オルガネラDNAのコピー数制御については、DNA分解だけでなく合成の制御も検討する必要がある。DPD1と同様に、オルガネラDNAポリメラーゼは葉緑体とミトコンドリアで共有されており、シアノバクテリアとは生化学的性質が明らかに異なり共生由来とは考えにくい。本研究ではオルガネラDNAダイナミクスの一端を分解機構から明らかにしたが、細胞レベルでのコピー数制御については、今後の研究の発展を期待したい。

#### 文 献

- 1) 林純一, 杉山康雄, 坂本亘, 田中寛, 正木春彦編 (2006) 二層膜オルガネラの遺伝学, 共立出版。
- 2) 佐藤直樹 (2018) 細胞内共生の謎, 東京大学出版会。
- 3) Golczyk, H., Greiner, S., Wanner, G., Weihe, A., Bock, R., Born-er, T., & Herrmann, R.G. (2014) Chloroplast DNA in mature and senescing leaves: a reappraisal. *Plant Cell*, **26**, 847–854.
- 4) Oldenburg, D.J., Rowan, B.A., Kumar, R.A., & Bendich, A.J. (2014) On the fate of plastid DNA molecules during leaf development: response to the Golczyk et al. *Plant Cell*, **26**, 855–861.
- 5) Sugiura, M. (2003) History of chloroplast genomics. *Photosynth. Res.*, **76**, 371–377.
- 6) Kleine, T., Maier, U.G., & Leister, D. (2009) DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 115–138.
- 7) Allen, J.F. (2015) Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: Colocalization for redox regulation of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10231–10238.
- 8) Sakamoto, W. & Takami, T. (2018) Chloroplast DNA dynamics: copy number, quality control and degradation. *Plant Cell Physiol.*, **59**, 1120–1127.
- 9) Kuroiwa, T. (2010) 100 years since the discovery of non-Mendelian plastid phenotypes. *J. Plant Res.*, **123**, 125–129.
- 10) Oldenburg, D.J. & Bendich, A.J. (2015) DNA maintenance in

- plastids and mitochondria of plants. *Front. Plant Sci.*, **6**, 883.
- 11) Matsushima, R., Tang, L.Y., Zhang, L., Yamada, H., Twell, D., & Sakamoto, W. (2011) A conserved,  $Mg^{2+}$ -dependent exonuclease degrades organelle DNA during *Arabidopsis* pollen development. *Plant Cell*, **23**, 1608–1624.
  - 12) Takami, T., Ohnishi, N., Kurita, Y., Iwamura, S., Ohnishi, M., Kusaba, M., Mimura, T., & Sakamoto, W. (2018) Organelle DNA degradation contributes to the efficient use of phosphate in seed plants. *Nat. Plants*, **4**, 1044–1055.
  - 13) Gregersen, P.L., Culetic, A., Boschian, L., & Krupinska, K. (2013) Plant senescence and crop productivity. *Plant Mol. Biol.*, **82**, 603–622.
  - 14) Veneklaas, E.J., Lambers, H., Bragg, J., Finnegan, P.M., Lovelock, C.E., Plaxton, W.C., Price, C.A., Scheible, W.R., Shane, M.W., White, P.J., et al. (2012) Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phytol.*, **195**, 306–320.
  - 15) Dahm, R. (2010) From discovering to understanding. Friedrich Miescher's attempts to uncover the function of DNA. *EMBO Rep.*, **11**, 153–160.

## 著者寸描

### ●坂本 亘 (さかもと わたる)



岡山大学資源植物科学研究所教授。農学博士。

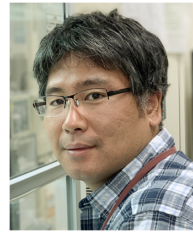
■略歴 1963年大阪に生れる。85年東京大学農学部卒業。90年同大学院農学系研究科博士課程修了。日本学術振興会特別研究員、米国コーネル大学ポスドク、岡山大学資源植物科学研究所助手、助教授を経て2003年より現職。

■研究テーマと抱負 光環境適応研究グループを主宰し、光合成と葉緑体分化が示す環境応答と植物の作用について、様々な手法で研究を行なっている。細胞内共生に由来する葉緑体が持つユニークな機能を、一つ一つ掘り下げて明らかにしたい。

■ウェブサイト <http://www.rib.okayama-u.ac.jp/saka/>

■趣味 テニス、スポーツ観戦。

### ●高見 常明 (たかみ つねあき)



岡山大学資源植物科学研究所技術専門職員。博士（農学）。

■略歴 2003年国立長岡工業高等専門学校専攻科卒業。10年九州大学大学院生物資源環境科学府博士課程修了。九州大学理学研究院ポスドクを経て12年より岡山大学資源植物科学研究所技術職員。

■研究テーマと抱負 オルガネラDNA分解とその生理的な意義を色々な角度から研究している。光合成を行う植物特有のオルガネラである葉緑体を中心に植物が備えている様々な能力を解き明かしていきたい。

■ウェブサイト <http://www.rib.okayama-u.ac.jp/saka/>

■趣味 読書、家族との散歩。