



Title	秋の紅葉とクロロフィルの分解
Author(s)	伊藤, 寿; Ito, Hisashi
Citation	低温科学, 83, 189-199
Issue Date	2025-03-29
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.189
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94806
Type	departmental bulletin paper
File Information	18_p189-199_LT83.pdf



秋の紅葉とクロロフィルの分解

伊藤 寿¹⁾

2024年11月27日受付, 2024年12月18日受理

秋の樹木の紅葉はクロロフィルが分解されることによってみられる現象である。秋になると気温が下がり光合成ができなくなるため、落葉樹はクロロフィルを分解する。このように、クロロフィルの分解は植物の発達段階の最後に見られる現象である。そのため、クロロフィルの分解自体には生理学的役割はないとも考えられる。しかし、クロロフィルの分解を抑制したり促進したりすると、光化学系の量が変動する。また、クロロフィルの分解は老化の進行に影響を与える。このように、クロロフィルの分解自体も細胞の機能や個体の成長に影響を与える。本稿ではクロロフィルの分解機構を概説し、その生理学的役割について論じる。

Autumn leaves and chlorophyll degradation

Hisashi Ito¹

The autumn color of trees is caused by the degradation of chlorophyll. In autumn, deciduous trees degrade chlorophyll as temperatures drop and photosynthesis is no longer possible. Thus, chlorophyll degradation is a process seen at the end of the plant developmental stage. Therefore, chlorophyll degradation itself may not have a physiological role. However, when chlorophyll degradation is suppressed or accelerated, the amount of photosystems changes. Chlorophyll degradation also affects the progression of senescence. Thus, chlorophyll degradation itself also affects cell function and plant growth. Here we summarize the mechanisms of chlorophyll degradation and discuss their physiological roles.

キーワード：クロロフィル分解, 植物ホルモン, 代謝系の進化, 葉の老化
chlorophyll degradation, leaf senescence, metabolic pathway evolution, plant hormone

1. 植物はなぜクロロフィルを分解するのか

自然界で緑色といえば植物の葉の色が代表的なものである。この緑色は光合成色素であるクロロフィル（葉緑素）の色である。植物はクロロフィルを使って太陽の光を吸収し、光エネルギーを化学エネルギーに変換する反応、つまり光合成をおこなっている。秋になり気温が下がる

と光合成ができなくなる。低温環境下では酵素反応が進みにくくなるためである。その結果、イチョウやカエデはクロロフィルを分解して紅葉する（図1A）。イネも秋の収穫前はクロロフィルを分解して葉が黄色くなる。この時、クロロフィルは「なんとなく」分解されるわけではない。エネルギーを使った酵素反応によって分解されている。つまり吸収した光エネルギーによってクロロフィル

連絡先
伊藤 寿
北海道大学 低温科学研究所
〒060-0819 札幌市北区北19条西8丁目
Tel: 011-706-5469
Email: ito98@lowtem.hokudai.ac.jp

1) 北海道大学 低温科学研究所
Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University,
Sapporo, Japan

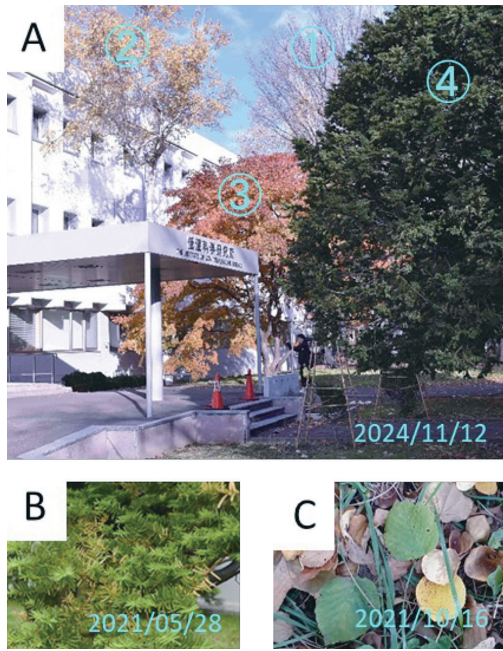


図1：秋の紅葉

(A) 秋の北海道大学低温科学研究所の正面玄関。①のハルニレは落葉を終え、②のシラカバは黄葉し落葉中である。③のカエデは紅葉し落葉が始まっている。④のイチイは常緑樹のため緑色の葉をつけている。(B) 初夏のイチイの葉。黄緑色の葉が新芽で、枯れた葉は黄色くなっている。常緑樹のイチイは新芽の伸びるこの時期に黄葉する。(C) 緑色のミヤマハンノキの落ち葉。ミヤマハンノキは根粒菌と共生し、窒素を十分に獲得できるため、落葉するときに葉の養分を回収する必要がない。そのためクロロフィルも分解せず緑色の葉を落葉する(黄色い葉はカツラ)。

は化学的に退色するのではなく、生物学的な過程を経て分解される。

植物は次のような理由でクロロフィルを分解する。植物が葉に蓄積している養分は、その葉が枯れるとき新しく展開する葉や種子に転流して再利用される。ここでいう養分とは、主にタンパク質を構成しているアミノ酸である。そのため、養分を運び出すまでは葉が健常で養分を運び出すという機能を維持しなければならない。このときクロロフィルが光を吸収すると活性酸素を生じ、細胞を傷つけてしまう恐れがある。そこで、細胞を守るためにあらかじめクロロフィルを分解しておく。また、クロロフィルはタンパク質と結合してクロロフィルタンパク質複合体を形成し、光合成をおこなっている。植物はこのタンパク質を分解してアミノ酸を養分として回収している(図2)。この時まずクロロフィルを分解しなければタンパク質の部分が分解できない。クロロフィルが複合体の表面に存在すると、タンパク質分解酵素がタンパク質に接触できないためである。このように、葉の養分を

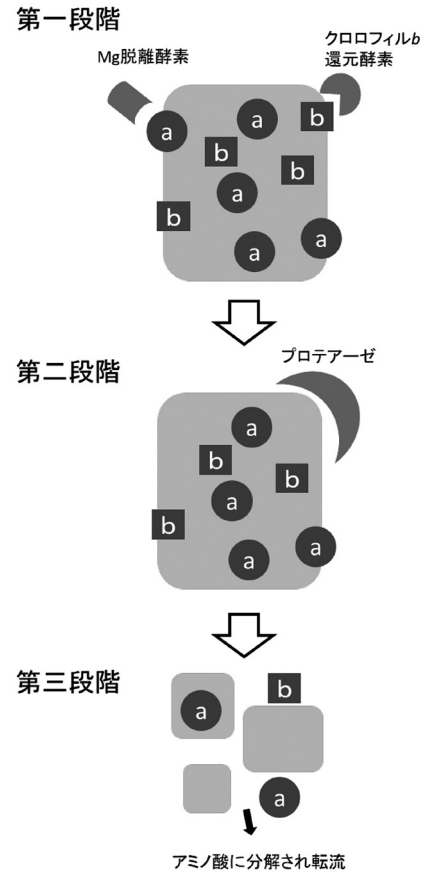


図2：クロロフィルタンパク質複合体の分解

クロロフィルタンパク質複合体は、クロロフィルがタンパク質部分をプロテアーゼから守っているため、プロテアーゼでは分解されない。そのためクロロフィルタンパク質複合体の分解は、まずクロロフィルの分解から始まる(第一段階)。クロロフィルaはMg脱離酵素、クロロフィルbはクロロフィルb還元酵素によって代謝され、複合体から外れる。その結果タンパク質部分にプロテアーゼがアクセスできるようになり、タンパク質部分の分解が進む(第二段階)。タンパク質がアミノ酸まで分解されると、そのアミノ酸は転流し再利用される(第三段階)。

回収し、それを次の世代に投資するために植物はクロロフィルを分解している。なお、初夏に新しい葉を作る常緑針葉樹は秋ではなく初夏に葉が枯れる。葉の養分を幹にためることなく直接新しい葉の形成に転流するためである(図1B)。また、落葉樹であっても根に根粒菌が共生し、窒素を比較的容易に獲得できるミヤマハンノキなどでは葉の養分を回収せず、緑色のまま落葉している(図1C)。つまり、葉の養分を回収する必要がない場合、クロロフィルを分解する必要もない。葉が枯れるときのクロロフィルの分解は視覚的に顕著であるが、クロロフィル分解は別の場面でも行われている。葉緑体内ではすべてのクロロフィルはタンパク質と結合してクロロフィルタンパク質複合体を形成している。遊離のクロロフィルは存在し

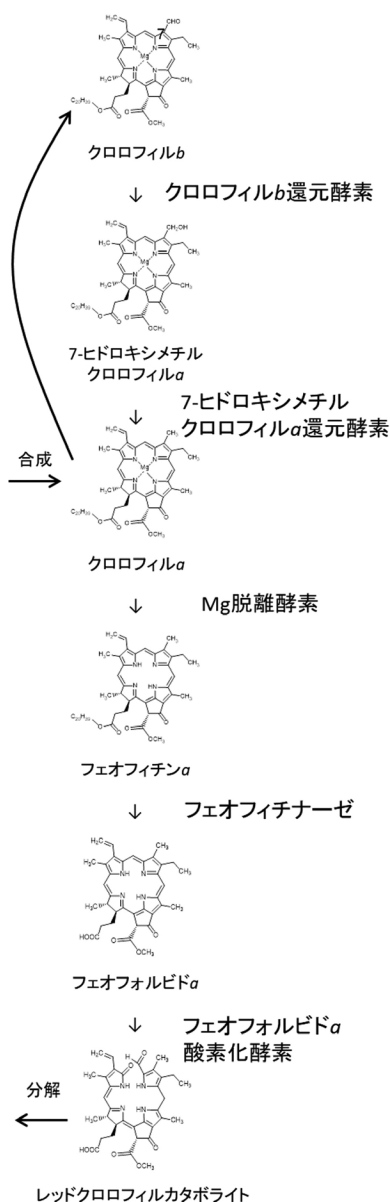


図3：クロロフィル分解経路

グルタミン酸から始まったクロロフィル合成経路はクロロフィルaで完成する。クロロフィルaの一部がクロロフィルbに変換される。植物はこのクロロフィルaとクロロフィルbを光合成色素として利用している。クロロフィルbはクロロフィルaに戻されてからクロロフィルaと同じ経路で分解される。クロロフィルbの段階でMgが外れることはない。この図で示した反応はすべて葉緑体内で行われている。

ない。遊離のクロロフィルは吸収した光エネルギーを光合成に使うことができず、活性酸素を生じてしまうためである。そのため、クロロフィルが結合するタンパク質に対してクロロフィルが過剰に合成された場合、クロロフィルを分解しなければならない。また、植物が強い光にさらされると集光性クロロフィルを減少させる。この

時もクロロフィルを分解しなければならない。このように、植物は発達段階や光環境に応じてクロロフィルを分解している。

2. クロロフィルの分解経路

クロロフィルの合成はグルタミン酸から始まり、十数段階の反応を経てクロロフィルaが合成される。クロロフィルbはクロロフィルaの7位のメチル基がフォルミル基に酸化されることによって合成される (Bryant et al. 2020)。クロロフィルbの分解は、まず7-ヒドロキシメチルクロロフィルaに還元され、さらにクロロフィルaに還元されてから、クロロフィルaと同じ経路で分解される。クロロフィルaの分解は最初に中心金属のマグネシウム (Mg) が外され、次に疎水性の側鎖のフィチル基が加水分解によって除かれる。その後フェオフォルビドa酸素化酵素によってテトラピロール環が開環し、還元反応を経て葉緑体外に運び出される。最終的には分解産物は液胞に運び込まれる (図3) (Tanaka and Ito 2024)。クロロフィル分解系において、テトラピロール環が開環した後の分子は検出が困難なことから、開環後の代謝系の詳細は不明な点が残されている。変異体の解析などから、開環した分子が還元されると光を吸収しても活性酸素を生じにくくなり、光障害という観点からは危険な分子ではないと考えられている。また、開環した代謝産物は葉緑体から運び出されたのち、水溶性を高めるため糖鎖の付加などの修飾を受ける。このようにしてクロロフィルは無毒化され貯蔵しやすい形態に加工される。なお、開環したテトラピロールの分解はそれ以上あまり進まないと考えられている。そのためピロール環に含まれる窒素など、クロロフィルの構成成分は養分としては回収されないまま液胞に残り、落葉や枯死によって失われると考えられている。ヒトもクロロフィルと似た構造のヘムを持つ。このヘムも開環後は分解が進まず、ビリルビンなどとして排出され回収されない。

クロロフィル分解の研究はモデル植物、特にシロイヌナズナを使ってすすめられた部分が多い。遺伝学的手法を利用しやすいためである。テトラピロール環の開環とそれに続く還元反応まではすべての植物で共通していると思われる。しかし、それ以降の代謝系については多様であり、未解明な点が多い。クロロフィルの分解産物は光障害を起こさず水溶性が高い分子でなければならない。種によってさまざまな分解産物を生じるとしても、この二つの条件を満たしているはずである。詳細なクロロフィ

ル分解の全体像やその制御については総説を参照していただきたい(Kuai et al. 2018; Tanaka and Ito 2024). 本稿では、クロロフィル a とクロロフィル b の分解について述べる。

3. クロロフィル a の分解

3.1 形質転換体の性質

すべての酸素発生型の光合成をおこなう生物はクロロフィル a を持つ。陸上植物のクロロフィル a の分解は中心金属のMgが外れることから始まる。この反応が陸上植物のクロロフィル分解の律速段階である。この反応はクロロフィルからMgを脱離する反応なので、この反応を触媒する酵素はMg脱離酵素と呼ばれている。なお、クロロフィル a の分解はMgが外れる前にクロロフィラーゼと呼ばれる酵素によってフィチル基が加水分解され、その後Mgが外れるという可能性もある。しかし変異体の解析などから、老化段階ではクロロフィラーゼは関与せず、Mg脱離酵素によってクロロフィル a は分解されていると考えられている。

Mg脱離酵素は*Stay-Green* (*SGR*) と呼ばれる遺伝子にコードされている。*SGR*遺伝子は枯れる時期になっても緑色を維持 (*stay green*) している変異体から同定されたためこの名がつけられている (Park et al. 2007)。なお、メンデルが遺伝の法則を確立するときに使った緑色のマメの原因遺伝子も*SGR*である (Sato et al. 2007)。Mg脱離酵素はすべてのクロロフィル a とクロロフィル b を持つ真核型光合成生物に見つかっている。被子植物だけがさらに*Stay-Green Like* (*SGRL*) と呼ばれるパラログを持つ。

Mg脱離酵素の欠損株は、クロロフィルが分解できないため、枯れる時期になっても葉が緑色のままである (図4A) (Chen et al. 2021)。しかし、細胞は老化し、Rubiscoなども減少しているため光合成は行っていない。クロロフィルタンパク質複合体については、光化学系Iのコア複合体とアンテナ複合体、光化学系IIのアンテナ複合体は老化しても分解されずに残存している。クロロフィルが分解されないと、タンパク質部分も分解できないためである (図2)。ただし、光化学系IIのコア複合体は分解される。この複合体は他のクロロフィルタンパク質複合体とは異なる方法で分解が制御されていると思われる。Mg脱離酵素を過剰発現すると、クロロフィルが分解され、葉が黄色くなる (Shimoda et al. 2016) (図4B)。Mg脱離酵素はクロロフィル a だけを代謝し、クロロフィル b は分解できない。そのため、Mg脱離酵素の過剰発現株ではクロロフィル b は分解されずに残るとも予想される。しかし、Mg脱離酵素

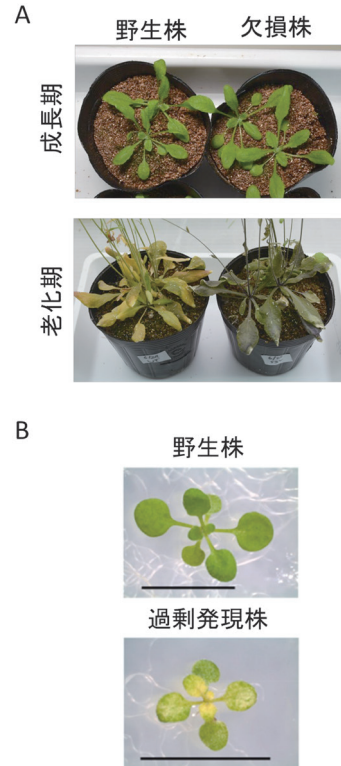


図4：Mg脱離酵素変異体のシロイヌナズナ

Mg脱離酵素を持たない変異体は老化が進み枯れる時期になってもクロロフィルを分解できないため緑色を維持 (*stay green*) している (A)。ただし、光合成は行っていない。逆に、Mg脱離酵素を過剰発現した植物は、クロロフィルを分解してしまうため、葉が緑色にならない (B)。

を過剰発現したことによりクロロフィル a が分解されるとジャスモン酸やエチレンが合成される (Ito et al. 2022; Ono et al. 2019)。その結果クロロフィル b を分解する遺伝子が誘導されてクロロフィル b も分解される (Sato et al. 2018)。結果的に、Mg脱離酵素を過剰に発現するとクロロフィル a 、クロロフィル b ともに分解されて光合成装置が分解される。

3.2 酵素の性質

クロロフィルのMgはピロール環の窒素と配位結合している。この配位結合は弱く、プロトンが豊富な酸性条件下ではプロトンが窒素と結合し、Mgは外れてしまう。つまりクロロフィルからのMgの脱離は酸性条件下でも非酵素的に進む反応である (Saga and Tamiaki 2012)。そのためMgを外す酵素は植物には必要ないという考えもあった。*SGR*の遺伝子が同定された時も、これがクロロフィルの分解にかかわる遺伝子であることは確かだが、クロロフィルを分解する酵素がどうかわからなかった (Park et al. 2007)。

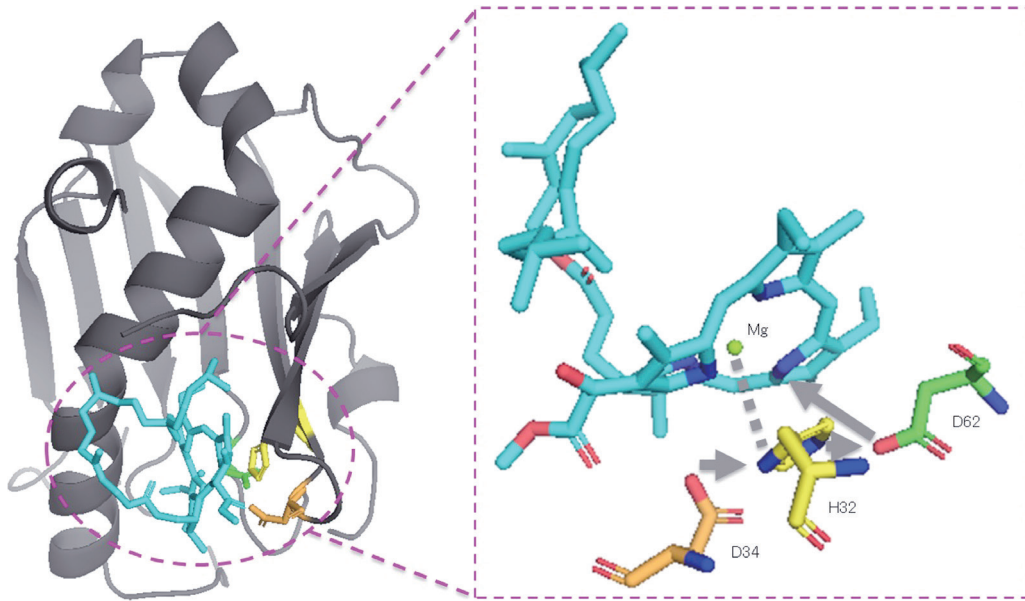


図5：Mg脱離酵素へクロロフィルが結合した予想図

灰色で示している構造がMg脱離酵素で、ドッキングシミュレーションにより水色のクロロフィルを結合させている。結合部分を角度を変えて右の四角の枠内に拡大している。オレンジ色、黄色、緑色の棒状の構造はD34、H32、D62である。D34は触媒部位の入り口にあり溶媒に接している。この模式図では、球で示されているクロロフィルのMgがヒスチジンの窒素と配位し、D34、H32、D62とプロトンが送られ、D62からテトラピロール環の窒素にプロトンが渡される仮説を示している。

実際、植物ホルモンの変異体などの中には、クロロフィルを分解できないものもある。最終的にはSGRの組み換えタンパク質がクロロフィルからMgを脱離することが示され、SGRがMg脱離酵素であることが確定した (Shimoda et al. 2016)。Mg脱離酵素はクロロフィルaからMgを外すことができるが、クロロフィルbやクロロフィルaの合成前駆体であるクロロフィリドのMgを外すことはできない。被子植物だけがSGRLと呼ばれるSGRと相同な遺伝子を持ち、その組み換えタンパク質はクロロフィリドのMgも外すことができる。

緑色植物の葉緑体内でのクロロフィルの合成、分解にかかわる酵素の遺伝子の中でMg脱離酵素が最後に同定された遺伝子である。クロロフィル合成系で、Mgが挿入されるまでの酵素反応はヘムの合成系と同じであり、大腸菌など非光合成生物の情報が遺伝子の同定に利用できた。Mg挿入以降もクロロフィルaまでは光合成細菌と合成系が同じであり、光合成細菌を利用して遺伝子が同定された。クロロフィル分解系の遺伝子は、クロロフィル分解中間体を蓄積し光障害を起こしやすい変異体などを利用して同定されていった。そうした中、Mg脱離酵素の遺伝子の同定が最後になってしまったのは、組み換えタンパク質を利用した酵素活性の検出が困難だったことも理由の一

つである。現在でも、植物のMg脱離酵素の組み換えタンパク質を大腸菌内で大量発現することには成功していない。

SGRと相同性の高い遺伝子が、緑色植物だけではなく、枯草菌などのバクテリアのゲノム上にも見つかった (Obata et al. 2019)。ただし、これらのバクテリアは光合成をせずクロロフィルを持っていない。光合成細菌からはこれまでのところSGRと相同な遺伝子は見つからない。バクテリアの中でSGRと相同な遺伝子の役割は不明である。しかし、このバクテリアの組み換えタンパク質はクロロフィルのMgを脱離する活性を持ち、大腸菌を利用して大量に調製することができる (Dey et al. 2022)。そのため、バクテリアの持つ遺伝子(ここではMg脱離酵素ホモログと呼ぶ)の組み換えタンパク質を利用してMg脱離酵素の性質が調べられた。Anaerolineaeの持つSGRホモログがバクテリアのSGRホモログの中でも植物とアミノ酸配列の相同性が高かったため、このバクテリアのSGRホモログが利用された。X線結晶構造解析によりMg脱離酵素ホモログの構造は明らかになっている (PDB Code: 7Y5Y)。コンピューターを利用した植物のMg脱離酵素の予測構造はバクテリアのMg脱離酵素ホモログとほぼ一致している。ただし、基質特異性は植物のMg脱離酵素とは異なる。植

物のMg脱離酵素はクロロフィルaのみを基質とし、SGRLはさらにクロロフィリドaも基質とする。それに対してバクテリアのMg脱離酵素ホモログはこれらの基質だけではなくクロロフィルbやクロロフィルcも基質にできる。人工基質を利用して基質特異性を詳細に調べたところ、基質に電子吸引性の側鎖があると酵素活性が低下することが明らかになった (Sato et al. 2024)。また大きな側鎖を導入しても酵素の基質になるが、A環と比べてB環に大きな側鎖を導入すると酵素活性が低下することが明らかになり、この結果から、B環のほうが触媒部位に深く入ると推測された。このような基質特異性の特徴は酵素と基質のドッキングシミュレーションの結果とも一致した。

SGRの遺伝子群のアミノ酸の保存性と立体構造を利用して、触媒にかかわると予想されるアミノ酸の変異体を作製した。その結果*Anaerolineae*のMg脱離酵素ホモログのH32をアラニンに、D34、D62をアスパラギンに置換すると活性が失われることがわかり、これらのアミノ酸が触媒にかかわることが示された (Dey et al. 2022) (図5)。Mg脱離酵素が二つのプロトンを供与することによって、Mgの脱離が起こると予想されていたので、Mg脱離酵素とクロロフィルのドッキングシミュレーションの結果も踏まえて、プロトンの供与体としてD62とH32が候補として挙げられた。D34は触媒部位の入り口近くにあるため、葉緑体内では脱プロトン化されていてプロトン供与体にはなれないと考えられる。それに対してH32はタンパク質の内部、D62はさらに奥にある。H32、あるいはD62が供与するプロトンはD34を介して溶媒から取り込まれている可能性がある。さらに、基質のクロロフィルを触媒部位に取り込む過程で、これらのアミノ酸がMgへの配位子として機能している可能性もある。なお、ヘムの分解経路においても中心金属の鉄が遊離する段階がある。しかし、ヘムの分解では鉄を結合した状態でテトラピロール環が開環し、その結果鉄が遊離する。そのため鉄を外すという特異的な反応は必要ない。それに対して植物のテトラピロール環を開環する酵素 (フェオフォルビドa酸化酵素) はMgが外れたものだけを基質とするため、クロロフィルの分解系ではあらかじめMgを外しておく必要がある。

4. クロロフィルbの分解

4.1 クロロフィルbの還元

クロロフィルbの分解経路においてクロロフィルbは二段階の還元反応を経てクロロフィルaに戻り、その後クロロフィルaと同じ経路で分解される。クロロフィルbがクロ

ロフィルaに戻される理由は、クロロフィルb特有の構造を維持した分解産物は、分解が途中で止まってしまうためである (Hörtensteiner et al. 1995)。具体的には、クロロフィルaはMg脱離酵素によってMgが外れたのちフィチル基が除かれ、酸化的に開環されるが、この反応を触媒するフェオフォルビドa酸化酵素がクロロフィルbのように7位にフォルミル基を持つ分子は代謝することができない。そのためクロロフィルbを分解するためにはクロロフィルaに戻す必要がある。また、クロロフィルaと比べてクロロフィルbの方が中心のMgがテトラピロール環に強く配位しているため外れにくい。そのためクロロフィルaに戻すことによってMg脱離酵素が働きやすくなる。

クロロフィルb還元酵素は、老化しクロロフィルを分解する段階になってもクロロフィルbを分解できない変異体の原因遺伝子 (*Non Yellow Coloring 1; NYC1*) として同定された (Kusaba et al. 2007)。さらに、クロロフィルb還元酵素には、*NYC1-Like (NOL)* と呼ばれるオルソログが存在する。緑藻から陸上植物まで、すべての光合成生物が両方の遺伝子を持つ。イネではNYC1とNOLの一方が欠損するとクロロフィルbの分解が抑制される (Sato et al. 2009)。それに対してシロイヌナズナではNYC1の欠損株はクロロフィルbの分解が抑制されるが、NOLの欠損はクロロフィルbの分解にはあまり影響を与えない (Horie et al. 2009)。また、シロイヌナズナではNYC1は老化段階で遺伝子の発現が誘導されるのに対して、NOLの遺伝子の発現量は生育期間を通して大きな変動はない。そのためシロイヌナズナではNYC1が老化段階では主要なクロロフィルbを分解する酵素であると考えられている。進化的には近傍のイネとシロイヌナズナでなぜこのような機能の分化が起きているか不明である。緑藻などのクロロフィルb還元酵素についてはまだ調べられていない。

クロロフィルb還元酵素の欠損株は、老化段階でもクロロフィルbを分解できないため集光性アンテナ複合体 (LHC) IIが分解されずに残る (Kusaba et al. 2007)。光化学系のコア複合体はクロロフィルbが結合していないため欠損株でも分解される。LHCIにはクロロフィルbが結合しているが、コア複合体に結合していない状態では安定に存在できないため分解される。クロロフィルb還元酵素の欠損株はLHCIIが残るため、老化した葉緑体を電子顕微鏡で観察するとグラナスのスタッキングが増加した構造が見られる。また、クロロフィルb還元酵素の欠損株では強光にさらされた時のクロロフィルbの分解も抑制される (Sato et al. 2015)。クロロフィルb還元酵素の過剰発現株はクロロフィルbの蓄積量が減少し、LHCIIも減少している (Jia et al.

2015). これらの結果はクロロフィル還元酵素がLHCIIの量の制御にかかわっていることを示している.

クロロフィル還元酵素のNYC1とNOLの構造上の違いは、NYC1が膜貫通ドメインを持つものに対してNOLは持たない点である。膜貫通ドメイン以外のアミノ酸配列は相同性が高いため、同じ触媒反応機構によりクロロフィルを還元していると思われる。NYC1は膜タンパク質であるため、大腸菌を利用した組み換えタンパク質の合成ができない。そのためNOLの組み換えタンパク質を利用して酵素の性質が調べられている (Horie et al. 2009)。NOLに対してはクロロフィル**b**だけではなくクロロフィル**d**も基質になり、NADPHが還元剤として利用されている。

4.2 7-ヒドロキシメチルクロロフィル**a**の還元

クロロフィル**b**の7位のフォルミル基がクロロフィル還元酵素により還元されるとヒドロキシメチル基になり、そのクロロフィルは7-ヒドロキシメチルクロロフィル**a**と呼ばれている。このヒドロキシメチル基はさらに7-ヒドロキシメチルクロロフィル**a**還元酵素によってメチル基に還元される。このような経路によりクロロフィル**b**はクロロフィル**a**に戻る。7-ヒドロキシメチルクロロフィル**a**還元酵素は7-ヒドロキシメチルクロロフィル**a**を蓄積するシロイヌナズナの変異体から同定された (Meguro et al. 2011)。7-ヒドロキシメチルクロロフィル**a**還元酵素は鉄硫黄クラスターとフラビンを補酵素として持つ。大腸菌により作製した組み換えタンパク質の解析からフェレドキシンを還元剤として利用することが明らかになっている。

7-ヒドロキシメチルクロロフィル**a**還元酵素の進化には興味深い点がある。クロロフィル**b**を蓄積するすべての緑藻や陸上植物はこの酵素を持っている。この酵素と相同な遺伝子がシアノバクテリアにも存在し、その遺伝子はクロロフィル**a**合成にかかわっている (Ito and Tanaka 2014; Suehiro et al. 2021)。具体的には、クロロフィル**a**合成過程で側鎖のビニル基をエチル基に還元している。シアノバクテリアが真核生物に共生して葉緑体になり、クロロフィル**b**を分解しなければならなくなった時、クロロフィル**a**合成に使っていた酵素をクロロフィル**b**の分解に転用したと思われる。そうしてこの酵素が行っていたビニル基からエチル基への還元反応は相同性のない別の遺伝子にコードされた酵素が行うようになった (Nagata et al. 2005)。実際、シアノバクテリアのビニル基をエチル基に還元する酵素は7-ヒドロキシメチルクロロフィル**a**を還元する活性も持っている。さらにシアノバクテリアの酵素はメタン産生古細菌の持つF420ヒドロゲナーゼ複合体とアミノ酸

配列や構造が似ている (Vitt et al. 2014)。シアノバクテリアはこの遺伝子をメタン産生古細菌から取り込んでクロロフィル合成に利用したと考えられる。つまり、メタン産生古細菌の遺伝子をシアノバクテリアが取り込んでクロロフィル合成に使い、緑色植物はこの遺伝子をクロロフィル分解に転用したと考えられる。

5. クロロフィルの分解制御とその生理学的な役割

5.1 葉, 果実, 胚でのクロロフィル分解

植物は成長段階で三度クロロフィルを分解する場面がある。一つ目は葉の老化段階である。これが最も目につき、クロロフィルの分解としては葉のクロロフィルの分解を想定することが多い。二つ目は果実のクロロフィルの分解である。トマトやバナナなど、農業上の有用性の観点から果実のクロロフィル分解の研究も盛んである。三つ目は胚のクロロフィルの分解である。これは目につきにくい現象だが、種子の品質に大きな影響を与える。植物は受精後の胚発生中に葉緑体を発達させ緑化する。胚の発生のためには多量のエネルギーが必要で、そのエネルギー源となる有機物は母体から供給されるが、それを呼吸によって分解しATPを合成するための酸素が足りない。この酸素を作るために胚でも光合成をおこなっていると考えられている (Rolletschek et al. 2002)。種子の成熟過程で胚のクロロフィルが分解されないと、その種子は品質が悪く発芽率が下がる (Li et al. 2017; Nakajima et al. 2012)。Mg脱離酵素欠損株は葉、果実、胚、すべてのクロロフィル分解が抑制されおむね同じ方法でクロロフィルを分解していると考えられる。しかし様々な変異体を調べた結果から、葉と胚に比べ、果実のクロロフィル分解はフィチル基の除去の方法など他の組織とは異なることが示唆されている (Guyer et al. 2014)。また、光化学系IIの反応中心は常に分解と再生を繰り返しているため一定量のクロロフィルが供給されなければならない。この時、分解された光化学系IIから供給されたクロロフィルがそのまま再利用されるのではなく、フィチル基がいったん取り除かれ、通常のクロロフィル合成系と同じ方法で新規に合成されたクロロフィルが光化学系IIに取り込まれるとする考えがある (Lin et al. 2016)。このように、再利用するためにクロロフィルを分解するときは、老化した葉とは異なった方法でクロロフィルを分解している可能性がある。

5.2 クロロフィル代謝系の局在

葉緑体のチラコイド膜構造は、グラナコア、マージン、

ストロマラメラに分類できる。グラナコアに光化学系IIが多くストロマラメラに光化学系Iが多いと考えられている。クロロフィル分解系の酵素はマージンに多く存在している (Fukura et al. 2021)。チラコイド膜が湾曲しているため、酵素が基質に近づきやすいためかもしれない。またクロロフィル分解系の酵素群が同じ場所に存在することで、分解中間体を速やかに次の酵素に渡すことができ、代謝系が効率よく進むと思われる。クロロフィル合成系の酵素もマージンに局在することが示されている (Wang et al. 2016)。マージンがクロロフィル代謝の場なのであれば、どのようにしてマージンに酵素や基質が局在するかが解明されなければならない。

5.3 クロロフィルの分解と老化の進行の関係

クロロフィルは老化段階で分解されるため、クロロフィル分解系は老化によって活性化されると考えられる。葉の老化をどのようにとらえるかはいろいろな観点がある。光合成という面からは、光合成を終え、葉緑体の内容物を分解して他の器官に転流し始めると老化が始まったとみなすことができる。ただし、この場合もどのようにして老化が始まるのかについて分子的な実体は不明な点が多い。そのような中で、ジャスモン酸やエチレンなど老化を促進する植物ホルモンがクロロフィル分解の誘導にかかわっているのは間違いないと思われる (Kuai et al. 2018)。クロロフィル分解系の遺伝子の中で、Mg脱離酵素、クロロフィル b 還元酵素、およびフェオフォルビド a 酸化酵素が老化段階で誘導される代表的な遺伝子であり、老化のマーカー遺伝子としても使われている。これらの遺伝子は植物ホルモンによってその発現が制御されている。クロロフィル a とクロロフィル b はそれぞれMg脱離酵素、クロロフィル b 還元酵素によって分解が始まるため、それぞれの分解は異なった制御が可能である。しかし、クロロフィル a の分解が誘導されるとクロロフィル b の分解も誘導される。クロロフィル a が分解されるとジャスモン酸やエチレンが誘導され、これらの植物ホルモンがクロロフィル b 還元酵素の遺伝子の発現を誘導するためである (Ito et al. 2022; Ono et al. 2019)。クロロフィル分解と植物ホルモンの合成は以下に述べるような関係を持つと考えている。クロロフィル a が分解されると光化学系複合体が分解されてチラコイド膜の分解も進み、その成分である脂肪酸が遊離してこれを原料にジャスモン酸を合成できる。また、老化促進にかかわるアブシジン酸も分解された光化学系から遊離したカロテノイドから合成できる。このようにクロロフィル分解によって引き起こされた光合成装置の

分解が、植物ホルモンの材料を提供していることになる。クロロフィル b はクロロフィル a に変換されてから分解されることも考えあわせ、クロロフィル分解の制御を理解するためには、Mg脱離酵素によるクロロフィル a の分解が重要になる。Mg脱離酵素の蓄積量の制御は、遺伝子の発現の調節だけではなく、Mg脱離酵素への制御タンパク質の結合による安定化やユビキチン化による分解制御が提案されている (Wang et al. 2020; Wei et al. 2023)。

6. 残された課題

最後に、クロロフィル分解について残された課題を挙げたい。

6.1 光化学系IIのフェオフィチンの合成

酸素発生型の光合成をおこなう生物はすべて光化学系IIの反応中心にフェオフィチンを持っている。フェオフィチンはクロロフィルからMgが外れることによって作られる。しかしシアノバクテリアはSGRと相同性のある遺伝子を持っていない。光合成細菌や、紅藻、珪藻、褐藻などもSGRと相同性のある遺伝子を持たないにもかかわらずMgの取り除かれた(バクテリオ)フェオフィチンを光化学系の成分として使っている。このフェオフィチンがどのようにして作られたか不明である。既知のクロロフィル合成経路の酵素の性質を考えると、Mgが一度も挿入されることなく既知のクロロフィル合成経路や類似の経路でフェオフィチンが合成されるとは想定しづらい。反応中心を構成するD1タンパク質がMgを取り除く活性があれば反応中心のフェオフィチンの存在が説明できる。しかし、光合成細菌を含めて反応中心はアミノ酸置換体などを使い精力的に調べられてきたにもかかわらず、フェオフィチンを特異的に合成できない変異体は知られていない。また、D1タンパク質にはMgを外すためのプロトン供与体となる酸性アミノ酸も見当たらない。そのためD1タンパク質がフェオフィチン合成に働く可能性は低いと思われる。光化学系IIのフェオフィチンの合成は、クロロフィル分解という範囲にとどまらず、光化学系の構築という観点からも、残された重要な課題である。

6.2 緑藻のクロロフィル分解

緑藻クラミドモナスはMg脱離酵素の遺伝子SGRと相同な遺伝子を持ち、その組み換えタンパク質はMg脱離活性を示し、植物に導入すると確かにクロロフィルを分解する (Matsuda et al. 2016)。しかし、クラミドモナスのこの

遺伝子の破壊株で窒素欠乏によりクロロフィル分解を誘導したところ、クロロフィルは正常に分解された (Chen et al. 2019)。この時クロロフィル分解にかかわるフェオフィトルビド *a* 酸化酵素の遺伝子は誘導されているが、Mg 脱離酵素の遺伝子は誘導されていない。このことは、クラミドモナスの Mg 脱離酵素がクロロフィル分解にはかかわっていないことを示唆している。この変異体は光化学系 II が少なくフェオフィチンの量が少ないことから、クラミドモナスでは Mg 脱離酵素は光化学系 II のフェオフィチン合成にかかわっていることが示唆された。その場合、緑藻では別の酵素がクロロフィルを分解していることになる。珪藻なども培養条件によってクロロフィルが分解されるが、上述のように SGR と相同性のある遺伝子は持っていない。クロロフィルを分解するための Mg 脱離酵素が SGR 以外に間違いなく存在すると思われるが、その実体は不明である。

6.3 LHCII のクロロフィル分解の開始

上述の通り、シロイヌナズナの Mg 脱離酵素欠損株、クロロフィル *b* 還元酵素欠損株のどちらにおいても LHCII は分解されない (Chen et al. 2021; Horie et al. 2009)。LHCII が分解されるためにはクロロフィルが外れてタンパク質分解酵素が LHCII のポリペプチドに接触できるようになる必要があるためである (図 2)。この時、Mg 脱離酵素欠損株はクロロフィル *b* 還元酵素を持つため、LHCII のクロロフィル *b* は分解されてもおかしくない。しかし、クロロフィル *a* だけではなくクロロフィル *b* も分解されず、LHCII は安定に残存する。クロロフィル *b* 還元酵素欠損株も同じである。クロロフィル *b* 還元酵素欠損株は Mg 脱離酵素を持つため一部のクロロフィル *a* は分解されているはずである。これらの結果から、どちらのクロロフィルも他のクロロフィルが分解されないとそれ以上はクロロフィルの分解が進まないという閾値があると思われる。もっとも単純な仮説は、LHCII のクロロフィル *a* とクロロフィル *b* が一分子ずつ分解された時だけさらにクロロフィルの分解が進むというものである。光化学系の安定性という観点からも、光化学系上のクロロフィルの分解の進行過程の解明は残された課題である。またこれと関連し、クロロフィル分解にかかわる多くの酵素は水溶性のタンパク質である。これらのタンパク質が疎水的な環境にある基質にどのようにアクセスするか不明である。特に Mg 脱離酵素とクロロフィル *b* 還元酵素の基質であるクロロフィル *a* とクロロフィル *b* は光化学系のタンパク質に強く結合し、また複合体の奥に埋もれている。クロロフィル分解にかかわる酵素の触

媒部位入り口周辺は疎水的なアミノ酸が多く、疎水的な環境にある基質にアクセスしやすいと思われる (Ando et al. 2024)。しかし、さらに何らかの補助的な因子や環境が酵素と基質の相互作用を促進している可能性がある。

6.4 バクテリア内での Mg 脱離酵素ホモログの機能

植物の Mg 脱離酵素の遺伝子はバクテリアから水平伝播したものと推測されている。またバクテリアの Mg 脱離酵素ホモログの組み換えタンパク質は確かに Mg をクロロフィルから外す活性を持つ (Obata et al. 2019)。しかし、バクテリア内での Mg 脱離酵素ホモログの機能が分かっていない。この遺伝子を持つものはバクテリアの中でも一部のものにすぎず、それらのバクテリアに共通した特徴は見当たらない。またゲノム上でこの遺伝子の前後の遺伝子を調べたところ、異なる種間で共通した遺伝子やこの遺伝子の機能を示唆する遺伝子は見つからない。バクテリアが餌として取り込んだクロロフィルを分解している可能性があるが、ヘムの分解と同じようにテトラピロール環を開環してしまえば Mg は自動的に外れる。そのため Mg を外すための特別な酵素を準備する価値は少ない。バクテリア内での Mg 脱離酵素ホモログの機能解明は植物のクロロフィル分解系の進化の理解にもつながると思われる未解決の問題である。

7. まとめ

クロロフィルの分解はクロロフィルタンパク質複合体のタンパク質部分を分解してアミノ酸を回収するために必要である。また、クロロフィル分解自体が植物ホルモンの合成を介して老化の進行に影響を与えていると考えられる。このように、クロロフィルは不要になったから分解されるだけではなく、クロロフィルの分解自体が生理学的な役割を担っている。葉緑体内でのクロロフィル分解にかかわる遺伝子はすべて同定された現在、クロロフィル分解の研究はその制御に焦点が移っている。これまでのところクロロフィル分解のフィードバック制御は報告されていない。また、タンパク質のリン酸化やレドックス制御、あるいは複合体の形成による活性制御についても顕著な例は知られていない。おおむね遺伝子の発現制御によってクロロフィル分解系は制御されていると考えられている。しかし変動する環境や葉緑体の複雑な内部構造を反映した分解制御が今後明らかになる可能性も考えられる。また、クロロフィル分解は養分の転流を通して植物の成長にもかかわっているはずだが、クロロフィ

ル分解と植物の成長をつなぐ研究は十分には進んでいない。今後はこれらを含めて包括的なクロロフィル分解の研究を進める必要がある。

参考文献

- Ando, S., Tanaka, R. and Ito, H. (2024) Activity examination of plant Mg-dechelatease and its bacterial homolog in plants and in vitro. *Plant Physiol. Biochem.* 215: 109073.
- Bryant, D.A., Hunter, C.N. and Warren, M.J. (2020) Biosynthesis of the modified tetrapyrroles-the pigments of life. *J. Biol. Chem.* 295: 6888-6925.
- Chen, Y., Shimoda, Y., Yokono, M., Ito, H. and Tanaka, A. (2019) Mg-dechelatease is involved in the formation of photosystem II but not in chlorophyll degradation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 97: 1022-1031.
- Chen, Y., Yamori, W., Tanaka, A., Tanaka, R. and Ito, H. (2021) Degradation of the photosystem II core complex is independent of chlorophyll degradation mediated by Stay-Green Mg²⁺ dechelatease in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* 307: 110902.
- Dey, D., Nishijima, M., Tanaka, R., Kurisu, G., Tanaka, H. and Ito, H. (2022) Crystal structure and reaction mechanism of a bacterial Mg-dechelatease homolog from the Chloroflexi Anaerolineae. *Protein Sci.* 31: e4430.
- Fukura, K., Tanaka, A., Tanaka, R. and Ito, H. (2021) Enrichment of chlorophyll catabolic enzymes in grana margins and their cooperation in catabolic reactions. *J. Plant Physiol.* 266: 153535.
- Guyer, L., Hofstetter, S.S., Christ, B., Lira, B.S., Rossi, M. and Hörtensteiner, S. (2014) Different Mechanisms Are Responsible for Chlorophyll Dephytylation during Fruit Ripening and Leaf Senescence in Tomato. *Plant Physiol.* 166: 44-56.
- Horie, Y., Ito, H., Kusaba, M., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2009) Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 284: 17449-17456.
- Hörtensteiner, S., Vicentini, F. and Matile, P. (1995) Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, *Brassica napus* L.: Enzymatic cleavage of phaeophorbide a in vitro. *New Phytol.* 129: 237-246.
- Ito, H., Saito, H., Fukui, M., Tanaka, A. and Arakawa, K. (2022) Poplar leaf abscission through induced chlorophyll breakdown by Mg-dechelatease. *Plant Sci.* 324: 111444.
- Ito, H. and Tanaka, A. (2014) Evolution of a New Chlorophyll Metabolic Pathway Driven by the Dynamic Changes in Enzyme Promiscuous Activity. *Plant Cell Physiol.* 55: 593-603.
- Jia, T., Ito, H. and Tanaka, A. (2015) The Chlorophyll b Reductase NOL Participates in Regulating the Antenna Size of Photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Procedia Chemistry* 14: 422-427.
- Kuai, B., Chen, J. and Hörtensteiner, S. (2018) The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *J. Exp. Bot.* 69: 751-767.
- Kusaba, M., Ito, H., Morita, R., Iida, S., Sato, Y., Fujimoto, M., et al. (2007) Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell* 19: 1362-1375.
- Li, Z., Wu, S., Chen, J., Wang, X., Gao, J., Ren, G., et al. (2017) NYEs/SGRs-mediated chlorophyll degradation is critical for detoxification during seed maturation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 92: 650-661.
- Lin, Y.-P., Wu, M.-C. and Charng, Y.-y. (2016) Identification of a chlorophyll dephytylase involved in chlorophyll turnover in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28: 2974-2990.
- Matsuda, K., Shimoda, Y., Tanaka, A. and Ito, H. (2016) Chlorophyll a is a favorable substrate for *Chlamydomonas* Mg-dechelatease encoded by STAY-GREEN. *Plant Physiol. Biochem.* 109: 365-373.
- Meguro, M., Ito, H., Takabayashi, A., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2011) Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 3442-3453.
- Nagata, N., Tanaka, R., Satoh, S. and Tanaka, A. (2005) Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of *Prochlorococcus* species. *Plant Cell* 17: 233-240.
- Nakajima, S., Ito, H., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2012) Chlorophyll b reductase plays an essential role in maturation and storability of *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* 160: 261-273.
- Obata, D., Takabayashi, A., Tanaka, R., Tanaka, A. and Ito, H. (2019) Horizontal Transfer of Promiscuous Activity from Nonphotosynthetic Bacteria Contributed to Evolution of Chlorophyll Degradation Pathway. *Mol. Biol. Evol.* 36: 2830-2841.

- Ono, K., Kimura, M., Matsuura, H., Tanaka, A. and Ito, H. (2019) Jasmonate production through chlorophyll a degradation by Stay-Green in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 238: 53-62.
- Park, S.Y., Yu, J.W., Park, J.S., Li, J., Yoo, S.C., Lee, N.Y., et al. (2007) The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell* 19: 1649-1664.
- Rolletschek, H., Borisjuk, L., Koschorreck, M., Wobus, U. and Weber, H. (2002) Legume embryos develop in a hypoxic environment. *J. Exp. Bot.* 53: 1099-1107.
- Saga, Y. and Tamiaki, H. (2012) Demetalation of chlorophyll pigments. *Chemistry & Biodiversity* 9: 1659-1683.
- Sato, R., Ito, H. and Tanaka, A. (2015) Chlorophyll b degradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions. *Photosynth. Res.* 126: 249-259.
- Sato, S., Hirose, M., Tanaka, R., Ito, H. and Tamiaki, H. (2024) In vitro demetalation of central magnesium in various chlorophyll derivatives using Mg-dechelatase homolog from the chloroflexi Anaerolineae. *Photosynth. Res.*
- Sato, T., Shimoda, Y., Matsuda, K., Tanaka, A. and Ito, H. (2018) Mg-dechelation of chlorophyll a by Stay-Green activates chlorophyll b degradation through expressing Non-Yellow Coloring 1 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 222: 94-102.
- Sato, Y., Morita, R., Katsuma, S., Nishimura, M., Tanaka, A. and Kusaba, M. (2009) Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J.* 57: 120-131.
- Sato, Y., Morita, R., Nishimura, M., Yamaguchi, H. and Kusaba, M. (2007) Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 14169-14174.
- Shimoda, Y., Ito, H. and Tanaka, A. (2016) *Arabidopsis* STAY-GREEN, Mendel's green cotyledon gene, encodes magnesium-dechelatase. *Plant Cell* 28: 2147-2160.
- Suehiro, H., Tanaka, R. and Ito, H. (2021) Distribution and functional analysis of the two types of 8-vinyl reductase involved in chlorophyll biosynthesis in marine cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 203: 3565-3575.
- Tanaka, A. and Ito, H. (2024) Chlorophyll Degradation and Its Physiological Function. *Plant Cell Physiol.*
- Vitt, S., Ma, K., Warkentin, E., Moll, J., Pierik, A.J., Shima, S., et al. (2014) The F420-reducing [NiFe]-hydrogenase complex from *Methanothermobacter marburgensis*, the first X-ray structure of a group 3 family member. *J. Mol. Biol.* 426: 2813-2826.
- Wang, L., Kim, C., Xu, X., Piskurewicz, U., Dogra, V., Singh, S., et al. (2016) Singlet oxygen- and EXECUTER1-mediated signaling is initiated in grana margins and depends on the protease FtsH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113: E3792-E3800.
- Wang, P., Richter, A.S., Kleeberg, J.R.W., Geimer, S. and Grimm, B. (2020) Post-translational coordination of chlorophyll biosynthesis and breakdown by BCMs maintains chlorophyll homeostasis during leaf development. *Nat. Commun.* 11: 1254.
- Wei, W., Luo, Q., Yang, Y.y., Wu, C.j., Kuang, J.f., Chen, J.y., et al. (2023) E3 ubiquitin ligase MaRZF1 modulates high temperature-induced green ripening of banana by degrading MaSGR1. *Plant, Cell & Environment.*