

【背景】

光合成時に Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)は、Ribulose 1,5-bisphosphate に CO₂を固定し、2分子の 3-phosphoglycerate を生成する。光合成炭素代謝回路（カルビン回路）において鍵酵素として働く RuBisCO についての理解は、将来的に植物の光合成能力の改善、穀物の収量やバイオマスの増大につながると考えられる。RuBisCO は核遺伝子 *rbcS* によってコードされる small subunit (SS) と葉緑体遺伝子 *rbcL* によってコードされる large subunit (LS) から構成されており、ストロマ内で SS 8分子、LS 8分子の 16量体として存在する。それぞれ異なるゲノムにコードされる遺伝子が、最終的に葉緑体内で会合して機能発現することから、その発現機構を解析することは重要であると考えられる。

これまでに *rbcS*、*rbcL* 間の発現調節機構に関する報告として、「タバコにアンチセンス *rbcS* を導入し、内在性 *rbcS* の発現を構成的に抑制した場合、SS、LS 共に同じ割合で蓄積量が減少する。このとき *rbcL* mRNA の蓄積量は変化しないが LS の翻訳量が低下する」ことが示されている。このような報告から、LS の翻訳には SS が必要だと考えられていた。一方で、構成的に *rbcS* の発現を抑制することで同時に光合成能力も低下することが上記の実験系では問題となる。光合成能力の低下は *rbcL* を含む光合成関連の遺伝子発現に影響を及ぼすと考えられ、実際に薬剤によってカルビン回路を阻害すると、LS の翻訳量が低下することが報告されている。従って、構成的な *rbcS* の発現抑制による LS の翻訳量の低下は、新規に合成される SS 量の減少が直接の原因なのか、光合成能力の低下による二次的な影響によるものなのかが不明であった。

そこで本研究では RuBisCO の発現調節機構、特に *rbcS* と *rbcL* の発現が互いどのように協調しているのかについてより詳細に解析するために、光合成能力を損なうことなく *rbcS* の発現を抑制できる実験系の確立と、その系を用いて解析を行うことで LS の翻訳調節に関わる機構について明らかにすることを目的とした。そのために dexamethasone (DEX)誘導発現系を利用し、任意の時期に DEX 処理を行うことでアンチセンス *rbcS* mRNA を発現させ、内在性 *rbcS* mRNA の蓄積量を減少させることができる形質転換タバコを作出した。このタバコでは、RuBisCO が十分に蓄積した状態で時期特異的に *rbcS* mRNA の蓄積量を減少させることで、光合成が正常に行われている状態での *rbcL* の発現が解析可能である。また、DEX 処理を行わずに生育させることで野生株同様の生長が見られ種子を取得することができる。この T₂ 世代の形質転換タバコを用い、LS の翻訳調節機構を解析した。

【結果と考察】

○DEX 誘導発現系の評価と DEX 処理後の形質転換タバコ植物体の特徴

最初に T₂ 世代の形質転換タバコを用い、DEX 誘導発現系が期待通りに働くことを確認した。タバコは播種から 35 日目まで水耕栽培で生育させたものを用いた。その結果、DEX を水耕液に添加してから 48 時間後にはノザン解析で検出不可能なレベルまで内在性 *rbcS* mRNA の蓄積量が低下した。一方で対照 (DEX の溶媒である DMSO を水耕液に添加した形質転換タバコ、および DEX 処理を行った野生株) では内在性 *rbcS* mRNA の蓄積量に変化は見られなかった。次に DEX 処理によるタバコ植物体への生長への影響を調べるために、形質転換タバコを播種から 35 日目まで水耕栽培で生育させ、その後水耕液に DEX を添加してさらに 14 日間生育させた。それぞれの葉でサイズ (横幅)、色、クロロフィル含有量、光合成速度 (CO₂ 吸収量)、葉緑体構造について調べた。このように生育させたタバコの葉には大きく分けて 2 種類の表現型が見られた。一つは DEX 処理時にすでに展開していた葉に見られる表現型で、この葉では *rbcS* mRNA の蓄積量が著しく減少していること以外は対照の葉と比べて変化が見られなかった。もう一つは DEX 処理後に新しく展開した葉に見られる表現型で、この葉ではサイズの減少、黄化、クロロフィル含有量の減少、光合成速度の低下が見られ、葉緑体の発達も不十分であった。これら 2 種類の表現型を示す葉を対象に、以下の解析を行った。

○光合成が正常に行われている葉での SS 量の減少が与える LS 翻訳量への影響
上記の実験で得られた 2 種類の葉で *rbcL* mRNA、RuBisCO (SS、LS) の蓄積量と SS、LS の翻訳量について調べた。その結果、DEX 処理時にすでに展開していた葉では *rbcL* mRNA、RuBisCO の蓄積量は変化していなかった。³⁵S メチオニンの取り込み実験によって SS、LS の翻訳量を調べると、SS のバンドが検出されなかったのに対して、LS については対照のものと同様の強さのバンドが検出された。さらに、*rbcL* mRNA に結合するリボソーム量をポリソーム解析で調べることで LS の翻訳量を対照と比較したが、この実験でも LS の翻訳量に変化は見られないことが示された。このことは新規に合成される SS の量に関係なく、LS の翻訳が行われていることを示している。一方、DEX 処理後に新しく展開した葉を用いた実験では過去の報告と同様に、*rbcL* mRNA の蓄積量は変化しないが、RuBisCO の蓄積量および SS、LS の翻訳量は減少するということが示された。従来、このような LS の発現調節において考えられる機構としては、SS が LS の翻訳促進に働いている説と、RuBisCO に会合できない余剰 LS が自身の翻訳を抑制している説が挙げられていたが、本研究の結果から、少なくとも光合成を正常に行っている展開葉では SS は LS の発現調節に関与しないことが明らかとなった。

目次

略語	5
1.序論	6
2.材料と方法	12
2-1. 材料	12
2-2. 培地・培養条件	12
2-2-1. タバコリーフディスク	12
2-2-2. タバコ植物体	12
2-2-3. 大腸菌	13
2-2-4. アグロバクテリウム	13
2-3. 大腸菌を用いた遺伝子操作法	13
2-4. ベクターの構築	13
2-4-1. 使用プライマー	13
2-4-2. 塩基配列の決定	13
2-4-3. <i>rbcS</i> の単離	14
2-4-4. 構築	14
2-4-5. 誘導発現用ベクターの構築	14
2-5. アグロバクテリウムの形質転換	14
2-5-1. コンピテントセルの作製	14
2-5-2. 形質転換	15
2-6. タバコ形質転換	15
2-6-1. pTGV4 導入株の作出	15
2-6-2. pTGV2-ArbcS 導入株の作出	15
2-7. DEX 処理	15
2-8. ノザン解析	16
2-8-1. タバコ植物体からの RNA の抽出	16
2-8-2. ノザン解析	16
2-9. タンパク質の検出	17
2-9-1. タバコ植物体からのタンパク質抽出	17
2-9-2. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)	17
2-9-3. CBB 染色	17
2-9-4. ウェスタン解析	17

2-10. クロロフィル含有量の測定	17
2-11. 光合成速度の測定.....	17
2-12. 電子顕微鏡観察	18
2-13. <i>In vivo</i> パルスラベル実験.....	18
2-14. ポリソーム解析	18
2-15. mRNA の <i>in vitro</i> 合成.....	19
2-16. 定量 RT-PCR.....	19
3.結果	21
3-1. DEX 誘導発現系の動作確認	21
3-2. 時期特異的な <i>rbcS</i> のノックダウンがタバコ植物体の生長に与える影響	21
3-3. DEX 処理時に展開していた葉は正常な葉と同様の光合成能力を示す	22
3-4. DEX 処理後に新しく展開した葉では RuBisCO の蓄積量と LS の翻訳量が著しく減少する	23
3-5. 展開葉では新規に合成される SS の量は LS の翻訳量に関与しない	25
4.考察	47
4-1. 展開葉における LS の翻訳調節機構.....	47
4-2. 近年における LS の翻訳調節機構に関する研究.....	48
4-3. No.7 の葉の評価	49
4-4. No. 12 の葉の評価	49
謝辞	52
参考文献.....	53

略語

ATA ; Aurintricarboxylic Acid

BAP ; benzylamino purine

bp ; base pair

CaMV35S ; cauliflower mosaic virus 35S

CBB ; coomassie brilliant blue

cDNA ; complementary DNA

DMSO ; dimethylsulfoxide

DNA ; deoxyribonucleic acid

DNaseI ; deoxyribonuclease I

EDTA ; ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA ; ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

MS ; Murashige and Skoog

NAA ; α -naphthaleneacetic acid

mRNA ; messenger RNA

PBS ; phosphate buffered saline

PCR ; polymerase chain reaction

PMSF ; phenylmethylsulfonyl fluorid

RNA ; ribonucleic acid

RT-PCR ; reverse transcription- PCR

SDS ; sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE ; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SSC ; sodium chloride-sodium citrate buffer

Tris ; tris (hydroxymethyl) methylglycine

1.序論

葉緑体内では光合成に関わる様々な種類のタンパク質複合体（光化学系、シトクロム b_6/f 複合体など）が働いている。これらのタンパク質複合体は2~数十種類のサブユニットから構成されており、それらをコードする遺伝子の発現が厳密に協調することで最終的なサブユニット間の量比が調節されている。特に葉緑体コードの遺伝子の場合には転写レベルよりも翻訳、翻訳後レベルで調節を受けることが知られている（Choquet and Wollman 2002）。例えば、タンパク質複合体を構成するサブユニットのどれか一つが欠失すると、おなじ複合体内の他のサブユニットが自身の翻訳を抑制する、もしくは余ったサブユニットが分解されることでサブユニット間の量比を調節される機構が提唱されている。この中で自身の翻訳を抑制する機構は「control by epistasy of synthesis (CES)」と呼ばれている。このような機構はクラミドモナスのシトクロム b_6/f 複合体で詳しく研究されており、シトクロム b_6/f 複合体の場合は、*petB* にコードされるシトクロム b_6 もしくは *petD* にコードされる subunit IV が欠失すると、*petA* にコードされるシトクロム f (Cyt f) の翻訳が抑制される。これはシトクロム b_6/f 複合体に会合できない余剰 Cyt f が自身の mRNA の 5'非翻訳領域 (5'UTR) に結合し、翻訳が抑制される機構によって説明されている (Fig. 1)。また、シトクロム b_6 が欠失した場合は、会合できなかった subunit IV が分解されることで、シトクロム b_6/f 複合体のサブユニット間の量比が調節されていることも報告されている (Kuras and Wollman 1994, Choquet et al. 1998, Choquet et al. 2003)。この他、光化学系 II および I、ATP 合成酵素複合体についても同様の現象が見られることが報告されている (Bennoun et al. 1986, Erickson et al. 1986, Girard-Bascou et al. 1987, Drapier et al. 1992)。ATP 合成酵素複合体についての最近のクラミドモナスを用いた研究では、3種類のサブユニット α 、 β 、 γ の間での発現調節機構について報告されている。 α サブユニット、 β サブユニットは葉緑体遺伝子 *atpA*、*atpB* にそれぞれコードされており、 γ サブユニットは核遺伝子 *ATPC* にコードされている。基本的には、それぞれのサブユニットのどれかが欠失すると残りのうちの片方、もしくは両方のサブユニットの蓄積量、翻訳量が減少するが、 α サブユニットが欠失したときのみ、 β サブユニットの翻訳量が増大することが明らかになっている。これら3者間での翻訳調節機構はシトクロム b_6/f 複合体で見られるものよりさらに複雑で、例えば、 γ サブユニットが欠失したときは、 β サブユニットの翻訳は CES による調節を受けるが、翻訳の抑制には余剰の β サブユニット単独では不十分で、 α サブユニットとともに $\alpha_3\beta_3$ 複合体を形成していることが必要であることが示されている。また、 α サブユニットに関しては CES による調節は行われておらず、 β

サブユニットが直接的もしくは間接的に翻訳促進因子として機能していることが報告されている (Drapier et al. 2007) (Fig. 2)。

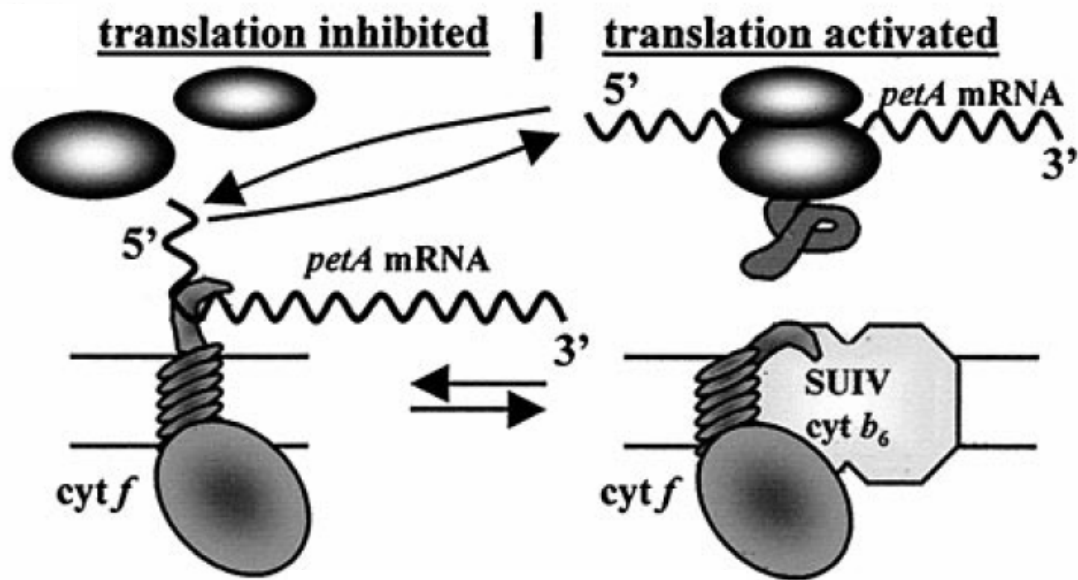
光合成時に Ribulose 1,5-bisphosphate に CO₂ を固定し、2 分子の 3-phosphoglycerate を生成する Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) も葉緑体内でタンパク質複合体として機能している。光合成炭素代謝回路 (カルビン回路) において鍵酵素として働く RuBisCO についての理解は、将来的に植物の光合成能力の改善、穀物の収量やバイオマスの増大につながると考えられる。RuBisCO は核遺伝子 *rbcS* にコードされる small subunit (SS) と葉緑体遺伝子 *rbcL* にコードされる large subunit (LS) から構成されている。細胞質ゾル内で翻訳された SS 前駆体はストロマに輸送され、8 分子の SS が 8 分子の LS と会合して 16 量体のホロ酵素となる。両遺伝子は発現様式 (*rbcS*; 真核生物様式、*rbcL*; 原核生物様式)、コピー数、存在する場所がそれぞれ異なる。このように異なる 2 種類の遺伝子が、最終的に葉緑体内で会合して機能発現することから、その発現機構を解析することは RuBisCO を理解する上で重要であると考えられる。これまでに *rbcS*、*rbcL* 間の発現調節機構に関しても、葉緑体で働く他のタンパク質複合体の場合と同様に、翻訳、翻訳後のレベルで厳密に協調していることを示唆する報告がある。構成発現プロモーター (CaMV35S プロモーター) の下流にアンチセンス *rbcS* を連結したものをタバコに導入した実験では、内在性 *rbcS* の発現が構成的に抑制され、SS と LS の蓄積量が同じ割合で減少する。このとき *rbcL* mRNA の蓄積量は変化しないが LS の翻訳量が減少することが示されている (Rodermel et al. 1988, Rodermel et al. 1996)。クラミドモナスにおいても、*rbcS* をノックアウトした場合、LS の蓄積量、翻訳量が共に減少することが示されている (Khrebtukova and Spreitzer 1996)。SS の蓄積量の減少が LS の翻訳量の減少 (翻訳抑制) を引き起こすことから、LS の翻訳には SS が必要だと考えられていた。

一方で、構成的に *rbcS* の発現を抑制することで同時に光合成能力も低下することがこれらの実験系では問題となる。光合成能力の低下は *rbcL* を含む光合成関連の遺伝子発現に影響を及ぼすと考えられ (Long and Humphries 1994)、実際にカルビン回路で働く酵素の一つであるホスホリブロキナーゼの働きを、その阻害剤であるグリコールアルデヒドによって阻害すると、カルビン回路が抑制され、LS および他の光合成関連遺伝子にコードされるタンパク質の翻訳量が減少することが、クラミドモナスを用いた実験で報告されている (Takahashi and Murata 2005)。また、光合成が正常に行われない状態での LS の翻訳抑制についてもいくつかの報告がされている。例えば、チラコイド膜を挟んだプロトン勾配が消失すると LS の翻訳伸長が抑制されることが大麦の葉緑体を用い

た実験で示されている (Muhlbauer and Eichacker 1998)。クラミドモナスでは強光 (過剰光) 下で LS の翻訳が抑制されることが示されている (Shapira et al. 1997)。ただし、これらの報告からは確かに *rbcS* の発現とは無関係に LS の翻訳抑制が行われているように考えられるが、SS が関与していないことが直接的に証明されているわけではなく、翻訳抑制に至る経路の途中で SS が関与している可能性を否定できていない。

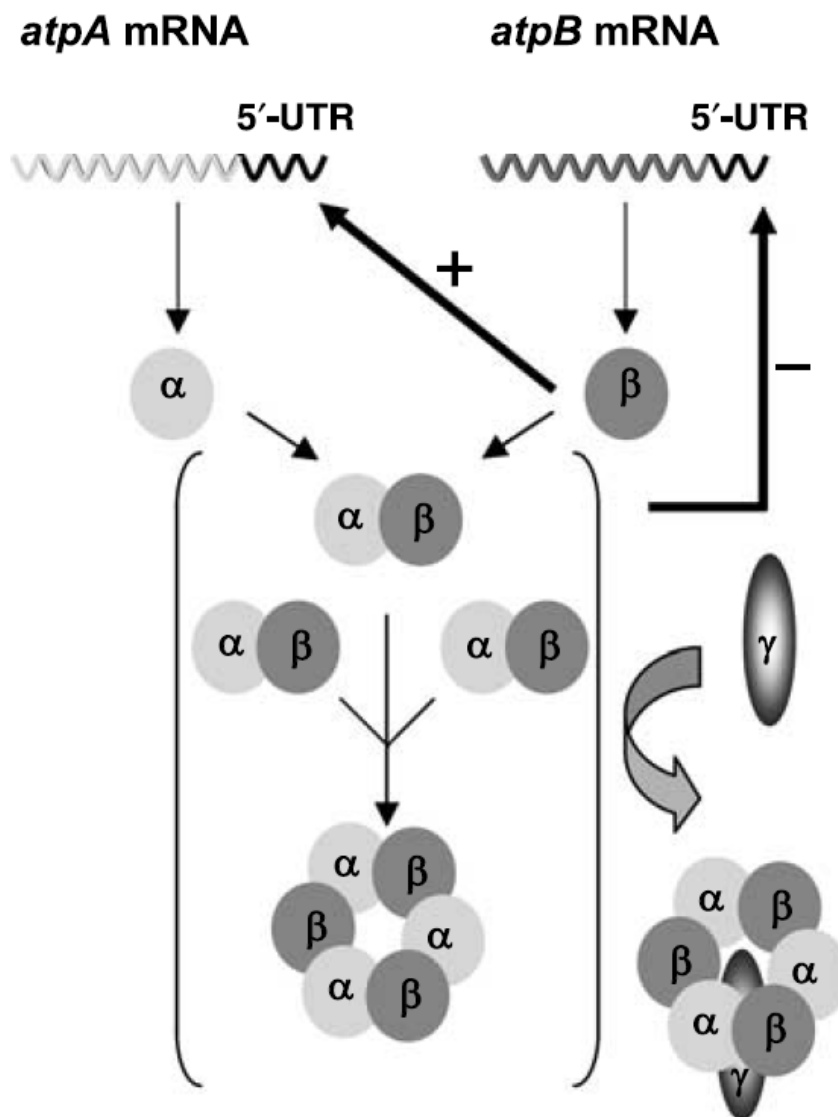
以上のことから構成的な *rbcS* の発現抑制による LS の翻訳量の減少は、以下の二つの原因が考えられる。1、SS が直接的もしくは何らかの因子を介して間接的に LS の翻訳促進に働いており、SS の減少に比例して LS の翻訳量も低下する。2、RuBisCO の蓄積量の減少により結果的にカルビン回路が抑制された状態になり、その二次的な影響で LS の翻訳が抑制される。しかし、実際には LS の翻訳調節に働いている機構は不明である。

そこで本研究では RuBisCO の発現調節機構、特に *rbcS* と *rbcL* の発現がお互いどのように協調しているのかについてより詳細に解析するために、光合成能力を損なうことなく *rbcS* の発現を抑制できる実験系の確立と、その系を用いて解析を行うことで LS の翻訳調節に関わる機構について明らかにすることを目的とした。そのために本研究では dexamethasone (DEX) 誘導発現系 (Aoyama and Chua 1997, Bohner et al. 1999, Bohner and Gatz 2001) を利用した形質転換タバコ植物体を作成した。このタバコには DEX 誘導発現系の下流にアンチセンス *rbcS* を連結したものが導入されており、DEX の存在下でアンチセンス *rbcS* mRNA の転写が誘導され、内在性 *rbcS* mRNA の蓄積量が減少する。このタバコでは内在性 *rbcS* mRNA の蓄積量を時期特異的に減少させることができるため、以下に述べる二つの利点が挙げられる。一つは RuBisCO を十分に蓄積している葉と、RuBisCO を蓄積していない葉での *rbcL* の発現をそれぞれに解析できる点である (Fig. 3)。例えば、すでに展開して RuBisCO を十分に蓄積している葉では、DEX 処理によって *rbcS* の発現を抑制した後の *rbcL* の発現を、正常に光合成が行われている状態で調べることができると考えられる。一方で、DEX 処理後に新しく展開した葉は *rbcS* の発現を構成的に抑制した葉と同様の表現型を示すことが期待できる。もう一つの利点は DEX 処理を行わずに生育させた場合、この形質転換タバコは野生株同様に生長し、種子を取得することが期待できる点である。そのため、T₁、T₂ 世代の形質転換体を用いた解析が容易になると考えられる。本研究では、アンチセンス *rbcS* の発現を誘導した後、形質転換タバコの異なる生長段階の葉で *rbcS* と *rbcL* の発現について解析した。



Choquet et al. 1998

Fig. 1 A hypothetical mechanism for the CES behavior of Cytf. C terminal domain of Cytf directly interacts with the *petA* 5'UTR.



Drapier et al. 2007

Fig. 2 A model for intertwining CES regulations controlling ATP synthase biogenesis. Subunit β transactivates initiation of translation of subunit α by a presently unknown mechanism. Heteromers of subunits α and β assemble in a γ -binding competent form. When accumulating in excess of the stoichiometry required for functional assembly with subunit γ , a negative feed-back loop prevents further translation of subunit β , which in turn deactivates translation of subunit α .

It is expected to independently analyze the LS expression in ...

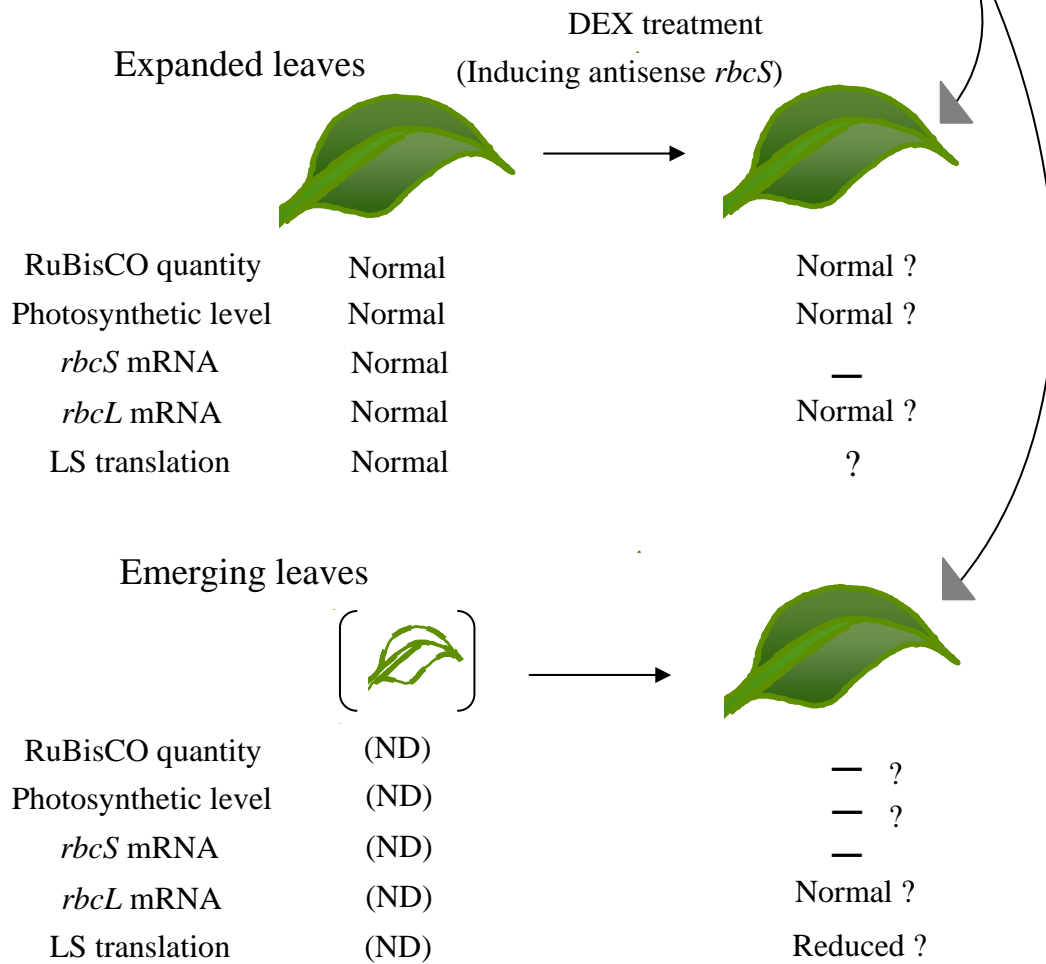


Fig. 3 An advantage of using DEX-inducible gene expression system.

2.材料と方法

2-1. 材料

大腸菌	<i>Escherichia coli</i> DH5 α
アグロバクテリウム	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105
タバコ	<i>Nicotiana tabacum</i> L.cv.Petit habana SR1 (野生株)
ベクター	pUC118 (宝酒造)、pTGV2 (Bohner et al. 1999, Bohner and Gatz 2001)、pTGV4 (Bohner et al. 1999, Bohner and Gatz 2001)

2-2. 培地・培養条件

2-2-1. タバコリーフディスク

タバコの形質転換用リーフディスクの培養には MS 培地*を用いた。用途に合わせ、培地に終濃度 100 μ g/ml となるようにカナマイシンもしくはスペクチノマイシンを、終濃度 1 μ g/ml となるようにピアラホスを、終濃度 250 μ g/ml となるようにカルベニシリンを添加した。また、必要に応じて植物ホルモンである NAA および BAP を MS 培地に添加し、カルス培地**、シュート形成培地***をそれぞれ作製した。培養は 25°C、暗所 8 時間、明所 16 時間で行った。

*MS 培地 (1 L)

NH₄NO₃ 1650 mg、KNO₃ 1900 mg、CaCl₂·2H₂O 440 mg、MgSO₄·7H₂O 370 mg、KH₂PO₄ 170 mg、H₃BO₃ 6.2 mg、MnSO₄·4H₂O 22.3 mg、ZnSO₄·7H₂O 8.6 mg、KI 0.83 mg、Na₂MoO₄·2H₂O 0.25 mg、CuSO₄·5H₂O 0.025 mg、CoCl₂·6H₂O 0.025 mg、Na₂-EDTA 37.3 mg、FeSO₄·7H₂O 27.8 mg、Thiamine-HCl 10 mg、Prydoxal hydrochloride 1 mg、Nicotinic acid 1 mg、Myo-inositol 100 mg、Sucrose 30 g

NaOH で pH5.8 に調整後、3 g/l のゲランガムを加え、オートクレーブを行う。

**カルス培地 (1 L)

MS 培地 1 L に対し NAA 2 mg、BAP 0.2 mg を加える。

***シュート形成培地 (1 L)

MS 培地 1 L に対し NAA 20 μ g、BAP 1 mg を加える。

2-2-2. タバコ植物体

タバコ植物体は人工気象器内で発芽させ 2 週間から 4 週間生育させた。人工

気象器内は 25°C、明所 16 時間 (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 暗所 8 時間の条件に設定し、水耕栽培を行った。水耕液の組成は 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM MgCl_2 , 3 mM KNO_3 , 1 mM MgSO_4 , 0.5 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM $\text{Na}_2\text{-Fe-EDTA}$ 、さらに、微量元素については Randall らの論文を参考にした (Randall and Bouma 1973)。実験に使用するタバコは少なくとも 1 週間以上は温室の環境に適応させ、その後に DEX もしくは DMSO 処理を行った。

2-2-3. 大腸菌

大腸菌の液体培養には 2×YT 培地 (Maniatis et al. 1989)、平板培養には 1.5% の寒天を含む LB 培地 (Maniatis et al. 1989) を用いた。そして用途に合わせ、それぞれの培地に終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ となるようにアンピシリン、カナマイシンもしくはスペクチノマイシンを添加した。培養は 37°C で行った。

2-2-4. アグロバクテリウム

アグロバクテリウムの液体培養には LB 培地、平板培養には 1.5% の寒天を含む LB 培地を用いた。用途に合わせ、それぞれの培地に終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ となるようにカナマイシンもしくはスペクチノマイシンを添加した。培養は 30°C で行った。

2-3. 大腸菌を用いた遺伝子操作法

DNA の制限酵素消化、アガロースゲル電気泳動ならびにゲルからの DNA 回収、ライゲーション、形質転換、プラスミドの抽出等の操作は、以下に特記しない限り従来の遺伝子操作法 (Maniatis et al. 1989) に従った。制限酵素および修飾酵素は、東洋紡、宝酒造、NEB のものをそれぞれ使用書に従って使用した。

2-4. ベクターの構築

2-4-1. 使用プライマー

TrS5U2

5'-TTGGAAGTTAAAGGAAAAGAGAGAAAGAGA-3'

TrS3Sac

5'-ATGAGCTCTATTAGTAGCCTTCTGGCTTGT-3'

2-4-2. 塩基配列の決定

ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin

Elmer) を用い、使用書に従って試料を調製し、その試料を ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) を用いて解析した。

2-4-3. *rbcS*の単離

タバコの葉由来の cDNA を鋳型とし、プライマーとして TrS5U2 および TrS3Sac を用いて PCR を行い、*rbcS* の開始コドンから上流 50 塩基分の 5'UTR と、終始コドンの下流 5 塩基の位置に *SacI* の制限酵素切断部位を持つ断片を増幅した。得られた PCR 産物を pUC118 にサブクローニングし、その塩基配列を決定した後、得られた断片が NCBI のデータベース上のタバコの *rbcS*(X02353) と同一の塩基配列を持つことを確認した (*SacI* の制限酵素切断部位とその周囲 2 塩基分は除く)。

2-4-4. 構築

上記の PCR 産物を pUC118 にサブクローニングして得られたプラスミドで、pUC118 の *XbaI* 制限酵素切断部位に対し *rbcS* の 3'側が隣接しているものを pUC118ArbcS と名付けた。

2-4-5. 誘導発現用ベクターの構築

pUC118ArbcS を *XmaI* と *HindIII* で切断し、pTGV2 の *XmaI* と *HindIII* 制限酵素切断部位に挿入したものを pTGV2-ArbcS と名付けた。

2-5. アグロバクテリウムの形質転換

2-5-1. コンピテントセルの作製

アグロバクテリウム単一コロニーを 5 ml の YEB 培地に植菌し、28°C で 1 晩振盪培養した。この培養液を、500 ml の YEP 培地に植菌し、600 nm における濁度が 0.5 になるまで 28°C で振盪培養した。培養液を遠心分離 (5000 rpm、10 min、4°C; BECKMAN JLA-10,500 ローター) により集菌して上清を捨て、菌体を洗浄するため 500 ml の滅菌水を加えて懸濁し、再度遠心分離 (5000 rpm、10 min、4°C; BECKMAN JLA-10,500 ローター) により集菌して上清を捨てた。この操作を 2 回繰り返した後、沈殿に 20 ml の冷却した滅菌 10% Glycerol を加えて懸濁した。チューブに移し遠心分離 (5000 rpm、10 min、4°C; BECKMAN JA-20 ローター) により集菌して上清を捨てた。沈殿に 3 ml の冷却した滅菌 10% Glycerol を加えて懸濁し、40 μ l ずつチューブに分注して、液体窒素で凍結させてから -80°C で保存した。

2-5-2. 形質転換

コンピテントセルを氷中で解凍後、1~2 μ l の DNA 溶液を加え、氷令した 2 mm キュベットに移した。エレクトロポレーター (BIO RAD、Gene Pulser) により電気パルス (2.5 KV、25 μ F、400 Ω) を与え、DNA を導入した。1 ml の SOC 培地を加え、28°C で 1 時間振盪培養した後、遠心分離により上清を大部分除き、残った培地に菌体を懸濁して適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に広げ、28°C で 2 晩培養した。pTGV4 を導入した株はアグロバクテリウム (pTGV4)、pTGV2-ArbcS を導入した株はアグロバクテリウム (pTGV2-ArbcS) と名付けた。

2-6. タバコ形質転換

2-6-1. pTGV4 導入株の作出

pTGV4 導入株の作出はリーフディスク法により行った。無菌タバコの葉部を、葉脈を含まないように 1 cm \times 1 cm 程度の大きさに切り取り、滅菌水が入ったシャーレに葉の裏面が上になるように置き、100 μ g/ml のカナマイシンを含む LB 培地で 2 晩培養したアグロバクテリウム (pTGV4) 懸濁液をシャーレに注いで 3~5 分間浸した。リーフディスクを取り出し、余分な菌液を滅菌キムタオルで拭き取り、カルス培地に置床して 25°C で培養した。2~3 日後、アグロバクテリウム (pTGV4) を培地上で見ることができるようになったら、リーフディスクを 50 ml チューブに移し、滅菌水で 5 回洗浄した後、カルス培地 (カルベニシリン、カナマイシンを添加) に置床し、1~2 週間 25°C で培養した。リーフディスクが最初に比べて丸まり、表面に凹凸が生じたら、シュート形成培地 (カルベニシリン、カナマイシンスを添加) に移した。さらに 2~3 週間後、茎葉部の発達したシュートを切り取って、MS 培地 (カルベニシリン、カナマイシンを添加) に移し培養した。この形質転換体の種子から得られた T₁ 植物体は以下に述べる pTGV2-ArbcS 導入株の作出に用いた。

2-6-2. pTGV2-ArbcS 導入株の作出

pTGV2-ArbcS 導入株の作出は pTGV4 導入株と同様にリーフディスク法により行った。T₁pTGV4 導入株から得られたリーフディスクをアグロバクテリウム (pTGV2-ArbcS) 懸濁液に浸し、形質転換体の選抜にはカナマイシンとピアラホスを用いた。得られた形質転換タバコは IArbcS と名付け、種子を取得するために鉢植えにした。

2-7. DEX 処理

DEX (SIGMA-Aldrich, MO, USA) は終濃度 300 mM となるように DMSO

に溶かして 4°C で保存した。使用時には終濃度 30 μ M となるように水耕液に添加した。コントロールには等量の DMSO を形質転換体の水耕液に添加した。DEX もしくは DMSO を添加した水耕液は 3 日ごとに交換した。

2-8. ノザン解析

2-8-1. タバコ植物体からの RNA の抽出

ATA 法 (Gonzalez et al. 1980) を一部改変して行った。切り取った葉を液体窒素で凍らせ乳鉢ですり潰して粉末にした。粉末 (約 300 μ l) を 1 ml の RNA 抽出用 Extraction buffer* に懸濁し、終濃度 0.37 M になるように KCl を加え、vortex を用いてよく混合した。これを氷中に 15 分間放置し、遠心分離 (6000 g、5 min、4°C) を行って、その上清を別のチューブにうつし終濃度 4 M になるように LiCl を加え氷上で一晩放置した。遠心分離 (20000 g、20 min、4°C) を行い、得られた沈殿を滅菌水に溶解し、フェノール/クロロホルム抽出を 2 回、クロロホルム抽出を 1 回行い、エタノール沈殿後、沈殿物を滅菌水に溶解して RNA 溶液とした。

*RNA Extracion buffer (100 ml)

1 M Tris-HCl (pH 8.0) 5 ml、5 M NaCl 1 ml、0.5 M EDTA、10% SDS 20 ml、100 mM ATA (EtOH stock) 2 ml、TINS 2 g、DW

使用前に終濃度 0.1% (V/V) となるように 98% 2-メルカプトエタノールを加える。

2-8-2. ノザン解析

精製した RNA (1 μ g) を 1.5% アガロースホルムアミドゲルで電気泳動を行った。泳動後トランスイルミネーターで、エチジウムブロマイドにより染色された RNA の存在を確認した後、RNA をナイロン膜 (Hybond-N+) に転写し紫外線照射によりメンブレンに固定した。プローブは、*rbcS* の遺伝子領域および隣接する 50 bp の 5'UTR、*rbcL*、18SrRNA、16SrRNA の遺伝子領域 500 bp、*petA* の遺伝子領域 460 bp を BcaBestTM (宝酒造) を用いて [α -³²P] dCTP で標識し、ProbeQuant G-50 マイクロカラム (Pharmacia Biotech LTD) により精製した。ハイブリダイゼーションは Church らの方法 (Church and Gilbert 1984) に従って行った。メンブレンの洗浄は、2 \times SSC (standard saline citrate)、0.1% SDS 混合液を用い、室温で 10 分、65°C で 15 分行った。その後メンブレンをラップで包み IP プレートを感光させ、BAS2500 (Fuji, Tokyo, Japan) を用いて解析した。また、X 線フィルムを感光させ現像を行った。

2-9. タンパク質の検出

2-9-1. タバコ植物体からのタンパク質抽出

タバコの葉から作製した直径 8 mm のリーフディスクを、液体窒素で凍らせ乳鉢ですり潰して粉末にした。リーフディスク一枚分の粉末に対して 1.5 ml の 80% (v/v) アセトンを追加し、チューブに移した後、遠心分離 (20000 g、5 min、4°C) を行って上清を取り除いた。この上清はクロロフィル含有量の測定に用いた。沈殿はアセトンで 2 回洗浄し、200 μ l の Tris-glycerol-SDS バッファーを加えて超音波破碎を行った。続いて煮沸 (95°C、5 min) 後、遠心分離 (20000 g、5 min、4°C) を行って得られた上清をタンパク質溶液とした。

2-9-2. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli の方法 (Laemmli 1970) に従い、LS は 10%、SS および Cytf は 15% のポリアクリルアミドゲル濃度で SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行いタンパク質を分離した。

2-9-3. CBB染色

SS と LS を検出するために、CBB によってゲルを染色した。

2-9-4. ウェスタン解析

Maniatis らの方法 (Maniatis et al. 1989) に従い、ウェスタンブロッティングを行った。SS の検出は抗 SS 抗体、Cytf の検出は抗 Cytf 抗体 (東北大 牧野博士より分与していただいた) をそれぞれ一次抗体として用いた。

2-10. クロロフィル含有量の測定

各リーフディスクから得られた 80%アセトン溶液中のクロロフィル含有量 (μ g/ml) は Porra の方法 (Porra et al. 1989) に従い、以下の式で算出した。

$$8.02 (\text{abs}663 - \text{abs}720) + 20.2 (\text{abs}645 - \text{abs}720)$$

abs663; クロロフィル b の吸光度

abs645; クロロフィル a の吸光度

2-11. 光合成速度の測定

CO₂ の固定量 (μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹) は山本らの方法 (Yamamoto, et al., 2006) に従い、infrared gas analyzer (LI-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, USA) を用いて測定した。測定は全て、葉が植物体についたままで 6 cm² 以上の面積のものを用いて行った。

2-12. 電子顕微鏡観察

葉を切り取った後、固定液 (2.5% glutaraldehyde in 50 mM PBS *pH 7.2) の入った試料ビンに入れた。4°Cで2時間静置した後、100 mM PBS で洗浄し、1% osmium in 50 mM PBS 中に4°Cで一晩静置して後固定した。室温に2時間静置した後、プロピレンオキサイドに室温で浸漬させて置換操作を行った。脱水させた組織は Spurr 樹脂 (TAAB Laboratories, Berkshire, U.K.) に包埋した。ULTRACUT UCT ミクロトーム (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用い、ダイヤモンドナイフで切片を作製した後、電顕観察用グリッドに乗せた。サンプルは uranyl acetate と lead citrate で染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7100, Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

*PBS

137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄

2-13. *In vivo* パルスラベル実験

タバコの葉の全タンパク質の *in vivo* パルスラベル実験は Cohen らの方法 (Cohen et al. 2006) を一部改変して行った。1 mM の NaHCO₃ と 0.25% (v/v) の Silwet-L77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA) を添加した 500 μl のゲランガムを含まない MS 培地に、4枚のリーフディスク (直径 8 mm) を浸した。40 μCi の ³⁵S メチオニン を MS 培地に添加し、その後 90 秒間真空ポンプを用いて ³⁵S メチオニンを組織内に染み込ませた。サンプルを光強度 25 μmol m⁻² s⁻¹ の白色光下に 40 分間静置した後、リーフディスクをチューブに移し 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) で 3 回洗浄した。液体窒素で凍らせた後、0.1 M NaCl、5 mM EDTA、10 mM β-メルカプトエタノール、2.5 mM PMSF を添加した 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加え、チューブの中ですり潰した。スピンドウンによって細胞残渣を取り除いた後、上清に Tris-Glycerol-SDS バッファーを加え煮沸し (95°C、5min)、タンパク質溶液を調製した。SS と LS は 15% のポリアクリルアミドゲル濃度で SDS-PAGE を行いタンパク質を分離した。ゲルは乾燥させた後、BAS2500 フィルム (Fuji) を用いてシグナルを検出した。

2-14. ポリソーム解析

ポリソームは Davies らの方法 (Davies and Abe 1995) を一部改変したショ糖密度勾配遠心法によって分別した。切り取った葉を液体窒素で凍らせ乳鉢ですり潰して粉末にした。葉から得られた粉末は 1.5 ml のバッファー U* の中でホモジェナイズし、遠心分離 (15,000 g、10 min、4°C) を行って上清を得た。

上清はバッファーB**の中で形成した 4.6 ml の 15-60%のショ糖密度勾配液の上に重層し、超遠心を行った (55,000 rpm、50 min、4°C ; BECHMAN SW55 ローター)。溶液はプラスチックポンプで吸い出し、8 つのフラクションに分別して 650 μ l ずつチューブに移した。同時に UV モニター (Monitor UV-1, GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, England) で 254 nm の吸光を測定した。各チューブに終濃度 5.1–5.5 M となるように Guanidine hydrochloride を加えた。そのとき同時に *in vitro* で合成した cap 構造と poly A を付加した 5 ng の *Renilla luciferase* mRNA も加えた。*Renilla luciferase* mRNA は続いて行われる RNA の単離と定量 RT-PCR でのサンプルの補正を行うために使用した。チューブにはさらに 100%エタノールを加え-20°Cで一晩静置した。遠心分離 (20000 g、40 min、4°C) で得た沈殿 80%エタノールで洗浄した後、RNeasy キット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて RNA を精製した。このとき同時に DNaseI 処理も行った。精製した RNA は引き続いて定量 RT-PCR に使用した。

*バッファーU

200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 100 μ g ml⁻¹ heparin, 2% polyoxyethylene 10-tridecyl ether, and 1% sodium deoxycholate

**バッファーB

50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM KCl, and 10 mM MgCl₂

2-15. mRNAの*in vitro*合成

Cap 構造と poly A を付加した *Renilla luciferase* mRNA の合成には mMMESSAGE mMACHINE T3 transcription kit (Ambion) を用い、添付されたプロトコルに従った。合成された RNA はキットに付属の DNaseI で処理した。合成された RNA の精製は LiCl 沈殿およびエタノール沈殿により行い、付属の RNase-free 水で溶解した。RNA 濃度は分光光度計を用いて測定した。RNA の品質は 1.5%アガロースホルムアミドゲル電気泳動により検定した。

2-16. 定量RT-PCR

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) と anchored-oligo (dT) プライマーを用い、各フラクションから調製した RNA 溶液を等量ずつ使用して、一本鎖 cDNA を合成した。一本鎖 cDNA 溶液は LightCycler 480 System (Roche Applied Science) による

定量 RT-PCR のテンプレートとして用いた。PCR は 10 μ l の系で行い、LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science) と各遺伝子に特異的なプライマーを用いた。同時に SYBR Green I による蛍光を測定した。データの解析は LightCycler Data Analysis Software (Roche Applied Science) を用いて行った。各遺伝子に特異的なプライマーは以下のものを用いた。

rbcL

TrbcL1556 (5'-TTGTGAAGTATGGAAAGAGATCGT-3')

TrbcL1625 (5'-TTCCTGCTAATTTATCTGCTAATGTC-3')

actin

Tactin262 (5'-TGGCATCATAACATTTTACAACGA-3')

Tactin310 (5'-AGGTGCTTCAGTGAGTAGTACAGG-3')

petA

TpetA313 (5'-AACGTGGGGGCTGTTCTTAT-3')

TpetA367 (5'-TTTCATCTCGGGAGAAATACG-3')

Renilla luciferase

RLUC_for (5'-GAATAACTTCTTCGTGGAAACCAT-3')

RLUC_back (5'-TGCTGCAAATTCTTCTGGTTC -3)

また、各プライマーが目的とする cDNA のみを認識することを確認するために、PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行った。*rbcL* mRNA、*actin* mRNA、*petA* mRNA の各フラクションから得られた値は、それぞれ *Renilla luciferase* mRNA の各フラクションから得られた値で補正した。補正後の各フラクションの値は 8 つのフラクションの総和に占める割合 (%) でグラフに表示した。

3.結果

3-1. DEX誘導発現系の動作確認

本研究では DEX 誘導発現系を導入した形質転換タバコを作出し、IArbcS と名付けた。このタバコは、DEX 処理によりアンチセンス *rbcS* mRNA の転写を誘導し、内在性の *rbcS* mRNA の蓄積量を時期特異的に減少させることができる。DEX 誘導発現系は転写因子 TGV と tet オペレーター配列 (6×tetOp) から構成されている。転写因子 TGV は tetracycline repressor DNA-binding domain、rat glucocorticoid receptor hormone-binding domain、および transcriptional activation domain of Herpes simplex viral protein の 3 種類のサブユニットから構成されるキメラタンパク質であり、DEX の存在下では 6×tetOp と結合する (Fig. 4)。その結果、6×tetOp の下流に連結されたアンチセンス *rbcS* mRNA の転写が開始される。DEX 処理を行っていない IArbcS タバコは野生株同様に生長し、種子を得ることができたため、実験には T₂ 世代のタバコ植物体を使用した。

この発現系が期待通りに働くことを確かめるため、T₂ 世代の IArbcS タバコ植物体を播種から 35 日間水耕栽培し、続いて水耕液に DEX を添加した後に内在性 *rbcS* mRNA の蓄積量を調べた。その結果、DEX 処理を行った IArbcS タバコでは 48 時間後にはノザン解析では検出不可能なレベルまで *rbcS* mRNA の蓄積量が減少した。一方、DEX の溶媒である DMSO で処理した (DEX 処理を行わない) IArbcS タバコでは *rbcS* mRNA の蓄積量は変化しなかった。また、野生株に対しても同様に DEX 処理を行い、DEX そのものが *rbcS* mRNA の蓄積量に影響を与えないことを確認した (Fig. 5)。以後の実験には全て T₂ 世代のタバコ植物体を使用した。

3-2. 時期特異的な *rbcS* のノックダウンがタバコ植物体の生長に与える影響

構成的に *rbcS* をノックダウンしたタバコ植物体では、ソース能力 (炭水化物の生産能力) の低下により、生長パターンの変化、葉の枚数増加、生長初期での節の長さの減少、最終的な丈の長さの減少など、が見られることが報告されている (Tsai et al. 1997)。本研究でも *rbcS* を時期特異的にノックダウンした場合、同じくソース能力の低下によりタバコ植物体の生長パターンが変化する可能性が考えられる。そこでまず、DEX 処理を行うタイミングがその後のタバコの生長に与える影響を調べるため、播種後 25 日、30 日、35 日、39 日経過したタバコに対してそれぞれ DEX 処理を行い、その後の生長パターンを観測した。

播種後 25 日、30 日目に DEX 処理を行い、播種から数えて 54 日目まで栽培した IArbcS タバコは DMSO 処理を行った IArbcS タバコ (Fig. 6D) に比べて生長が非常に遅く、最終的なサイズも小さなままだった (Fig. 6A and B)。また、一部の葉は黄化していた。一方で播種後 39 日目に DEX 処理を行った IArbcS タバコは、54 日目まで栽培した時点で DMSO 処理を行った IArbcS タバコと同様の生長パターンを示した。このタバコでも一部の葉が黄化していた (Fig. 6C)。

3-3. DEX処理時に展開していた葉は正常な葉と同様の光合成能力を示す

播種後 35 日目に DEX 処理を行った IArbcS タバコについてはさらに詳細に表現型を調べた。Fig. 7 は播種後 35 日目の IArbcS タバコ (A, B) と野生株 (C) を示している。これらの植物体を DEX もしくは DMSO を添加した水耕液でさらに 13 日間栽培した。その結果、DEX 処理を行った IArbcS タバコ (D) は対照のタバコ [DMSO 処理を行った IArbcS タバコ (E)、および DEX 処理を行った野生株 (F)] と比較して、一部の葉に黄化が認められたが同じ数の葉をつけた。Fig. 7D、Fig. 7E で示されているタバコの葉にはそれぞれ下から順番に 1 から 12 までの番号をつけ、Fig. 8A、Fig. 8B にそれぞれ示すような No. 7 から No. 12 の葉を以後の解析に用いた (Figs. 8A and B)。野生株の葉についても同様に番号をつけ、解析に用いた。

播種後 35 日目に DEX 処理を行った IArbcS タバコと対照のタバコとの生長パターンの差を調べるために、最初に DEX 処理を行う直前、播種から 35 日目に達した時点で IArbcS タバコが野生株と同様の生長 (葉の幅) を示していることを確認した (Fig. 9A)。次に DEX もしくは DMSO 処理後 13 日経過したタバコを用い、No. 7 から No. 12 の葉の幅 (cm) を測定することで、対照のタバコの葉と大きさを比較した。DEX 処理後に新しく展開した葉 (No. 10、11、12) と DEX 処理時にすでに存在し、DEX 処理後に展開した葉 (No. 9) は対照と比べて小さかった。一方で DEX 処理前からすでに展開していた葉 (No. 7、8) は対照とほぼ同じ大きさであった (Fig. 9B)。一部の葉 (No. 9、10、11、12) で黄化が見られるため、DEX 処理から 14 日経過した葉のそれぞれで、単位面積あたりのクロロフィル含有量を調べたが、見た目どおりに緑色の葉にはクロロフィルが多く含まれ、黄化している葉ではわずかな量しか含まれていなかった (Fig. 10)。No. 9 の葉は先端部が緑色であるのに対し、他の部位は黄化していたので、それぞれの部位を No. 9 (g)、No. 9 (y) (Fig. 8C) と名付け、個別に解析した。

葉内のクロロフィル含有量は光合成や葉緑体の発達の状態と関わりがあるということが知られている (Eckhardt et al. 2004)。そこで No. 7 の葉と No. 12

の葉で光合成速度と葉緑体構造を調べた。No. 7の葉はDEX処理時にすでに展開を終えていた葉、No. 12の葉はDEX処理後に展開した葉としてそれぞれ扱った。光合成速度はCO₂の吸収量 ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) によって評価した。No. 7の葉の光合成速度に関しては、若干の減少は見られるものの正常に光合成が行われていた (Table. 1)。また、葉緑体構造に関しては対照のものと差は見られなかった (Fig. 11A and B)。一方で、No. 12の葉では光合成速度は呼吸速度を下回るレベルにまで減少していた (Table. 1)。葉緑体構造に関しては、葉緑体への分化は見られたものの十分な発達は見られず、対照と比較してグラナ構造やデンプン粒も見られなかった (Fig. 11F and G)。No. 9 (g) では葉緑体構造はNo. 7のものと同様の特徴を示していたが、光合成速度がNo. 7のものに比べて劣るためか、デンプン粒は観察されなかった (Table. 1, Figs. 11C, 11E)。No. 9 (y) の葉緑体構造はNo. 12のものと同様の特徴を示し、光合成速度は呼吸速度を下回っていた (Table. 1, Fig. 11D)。葉の横幅、クロロフィル含有量は植物体間、葉間で一元分散分析を行った (Sokal and Rohlf 1995) (Figs. 12-14)。

これらの結果をまとめると、播種から35日目にDEX処理を行いさらに13日 (もしくは14日) 経過したタバコの葉の表現型は次に示す2種類のタイプに分かれた (Table. 2)。一つはDEX処理時にすでに展開を終えていた葉 (No. 7) の表現型で、大きさ、色、クロロフィル含有量、光合成速度、葉緑体構造に関して、対照と差が見られなかった。つまりこの葉は *rbcS* mRNA 量が非常に減少しているが、正常な葉と同様に光合成を行い、葉緑体内の環境も通常と変わりはないと考えることができる。もう一つはDEX処理後に展開した葉 (No. 12) の表現型で、これらの葉は対照と比べて小さく、黄化していた。クロロフィル含有量、光合成速度も低下し、葉緑体構造も十分に発達していなかった。従って、この葉は構成的にアンチセンス *rbcS* を発現させた植物体の葉に相当するものと考えられる。ただし、いくつかの表現型については過去にアンチセンス *rbcS* を構成的に発現しているタバコで報告されている表現型よりも変化が大きかった (Jiang and Rodermel 1995, Tsai et al. 1997, Schoefs et al. 2001)。

このように、光合成能力を損なうことなく *rbcS* の発現を抑制できる実験系が確立できたため、以下、DEX処理後に新しく展開した葉とDEX処理時にすでに展開していた葉を区別して解析を行った。

3-4. DEX処理後に新しく展開した葉ではRuBisCOの蓄積量とLSの翻訳量が著しく減少する

播種後35日目から49日目までDEX処理を行ったタバコを用い、時期特異的に内在性 *rbcS* mRNA の蓄積量を減少させたときの *rbcL* の発現について調べた。

DEX 処理後に新しく展開した葉 (No. 10, 11, 12) を解析した結果、mRNA の蓄積量に関しては *rbcS* mRNA はノザン解析で検出不能なレベルまで減少していたが、*rbcL* mRNA の蓄積量は対照と比べて大きな差は見られなかった (Fig. 15)。18rRNA と 16SrRNA をそれぞれ核遺伝子の発現のコントロールおよび葉緑体遺伝子の発現のコントロールとしてノザン解析を行ったが、それぞれの転写産物の蓄積量は DEX 処理を行った IArbcS タバコと対照で差は見られなかった (Fig. 15)。次に RuBisCO の蓄積量を調べるために、それぞれの葉から抽出したタンパク質溶液を SDS-PAGE で分離した後、CBB でゲル中のタンパク質を染色した。その結果、No. 9 (y)、10, 11, 12 の葉では SS、LS 共にほとんど蓄積していないことが示された (Fig. 16)。No. 11, 12 のレーンでは SS とほぼ同じ移動度を示すタンパク質のバンドが見られるが (Fig. 16; asterisks)、抗 SS 抗体を用いたウェスタン解析でこれらのバンドは SS ではないことを確認した (Fig. 17)。

LS の翻訳量の変化を調べるために、No. 12 の葉を用いて ³⁵S メチオニンによる 40 分間の *in vivo* パルスラベル実験を行った。その結果、SS および LS で ³⁵S メチオニンはほとんど取り込まれていないことが示された (Fig. 18B)。続いて、*rbcL* mRNA に結合するリボソーム量を調べるポリソーム解析を行うことで、LS の翻訳量を対照と比較した。No. 12 の葉から抽出した mRNA を 15%-60% のショ糖密度勾配を利用してリボソームが結合している量に従って分離し、各フラクションに含まれる *rbcL* mRNA の量を定量 RT-PCR (qRT-PCR) によって測定した。DEX 処理を行った IArbcS タバコの No. 12 の葉では、ポリソーム画分に存在する *rbcL* mRNA の割合が対照と比べて減少していた (Fig. 19)。No. 12 の葉では全 *rbcL* mRNA の蓄積量は IArbcS タバコと対照で差は見られないため、Fig. 18 と Fig. 19 の結果は DEX 処理後に展開した葉では、*rbcS* mRNA が減少した場合新規に合成される LS の量が減少することによって、最終的な LS の蓄積量の調節が行われていることを示唆していると考えられる。

また、葉緑体遺伝子のコントロールとして *petA* について、ノザン解析により *petA* mRNA の蓄積量を (Fig. 15)、ウェスタン解析により Cytf の蓄積量を (Fig. 20)、ショ糖の密度勾配によって RNA を分離した後 qRT-PCR によって各画分に存在する *petA* mRNA の量を (Fig. 19) それぞれ調べたが、それぞれの実験で DEX 処理を行った IArbcS タバコと対照で大きな差は見られなかった。一方で、*in vivo* パルスラベル実験では DEX 処理を行った IArbcS タバコの No. 12 の葉でのシグナルは全体的に弱かった (Fig. 18)。しかし、ポリソーム解析で 254 nm での吸光を調べると、ポリソーム画分の mRNA が減少しているので、この葉では全体的に翻訳活性が低下していると考えられる (Fig. 21)。実際に核遺伝子のコントロールであるアクチンの翻訳量は DEX 処理を行った IArbcS タ

バコの No. 12 の葉で減少していた (Fig. 19)。以上の実験結果から、DEX 処理後に新しく展開した葉では過去の報告 (Rodermel et al. 1988, Khrebtukova and Spreitzer 1996, Rodermel et al. 1996) と同様に、LS の翻訳量の減少により、SS と LS の蓄積量が協調して減少すると考えられる。

3-5. 展開葉では新規に合成されるSSの量はLSの翻訳量に関与しない

播種後 35 日目から 49 日目まで DEX 処理を行ったタバコについて、DEX 処理時にすでに展開していた葉 (No. 7) を解析した結果、*rbcS* mRNA 量は他の葉と同様にノザン解析で検出不能なレベルまで減少していた (Fig. 15)。No. 7 の葉では *rbcS* mRNA の蓄積量が減少することで新規に合成される SS の量が減少するため、DEX 処理以降は RuBisCO の蓄積量が減少することが予想された。しかし CBB 染色の結果、No. 7 の葉では SS、LS 共に DEX 処理を行った IArbcS タバコと対照で差は見られないことがわかった (Fig. 16)。また、*rbcL* mRNA の蓄積量に関しても差は見られなかった (Fig. 15)。この結果は光合成速度の解析結果と一致する (Table. 1)。また、*petA* の発現についても、対照と差は見られなかった (Figs. 15, 19, 20)。上で述べたように DEX 処理を行った IArbcS タバコの No. 7 の葉は *rbcS* mRNA を蓄積していないが、対照と同様のレベルで光合成を行い、正常な葉緑体内の環境を維持していると考えられる。

この葉で LS の翻訳量を調べるために *in vivo* パルスラベル実験を行ったところ、DEX 処理を行った IArbcS タバコの葉では SS のバンドが検出されなかった。一方で LS のバンドは対照と同様の強さで検出された (Fig. 18A)。長期間の DEX 処理による二次的な影響も考慮し、RuBisCO の蓄積量と LS の翻訳量を播種から 38 日目の IArbcS タバコ (DEX もしくは DMSO を水耕液を添加してから 3 日経過) の No. 7 の葉で調べた。その結果、これらの葉でも播種から 49 日経過したタバコの No. 7 の葉を用いた実験と同様の結果が見られた (Fig. 22)。またポリソーム解析の結果から、*rbcL* mRNA に結合するリボソームの量も対照と差が見られず、actin と Cytf の翻訳量も変化は見られなかった (Fig. 19)。これら結果は、少なくとも正常に光合成を行っている展開葉では SS は LS の翻訳調節に関与しないことを示している。

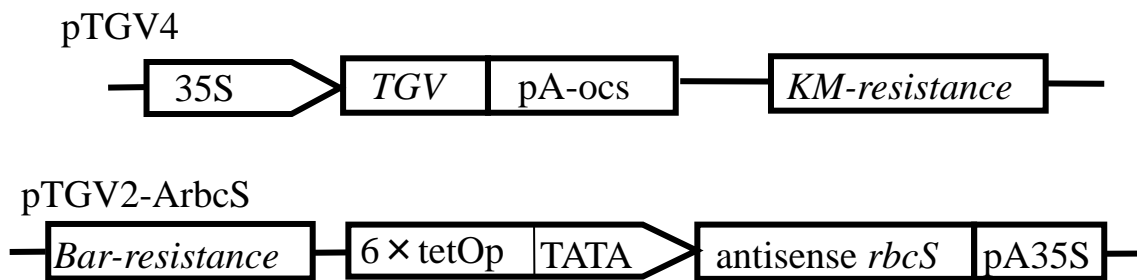


Fig. 4 DEX-inducible antisense *rbcS* gene expression. Structure of the DEX-inducible gene expression system. pTGV4: The DNA fragment encoding the chimeric transcriptional activator TGV protein is placed between a CaMV35S promoter (35S) and an octopine synthase polyadenylation signal (pA-ocs). *KM-resistance* is the kanamycin resistance gene. pTGV2-ArbcS: The antisense *rbcS* gene is placed between a synthetic promoter consisting of six tet operators (6×tetOp) upstream of a TATA-box and a 35S polyadenylation signal (pA35S). *Bar-resistance* is the bialaphos resistance gene.

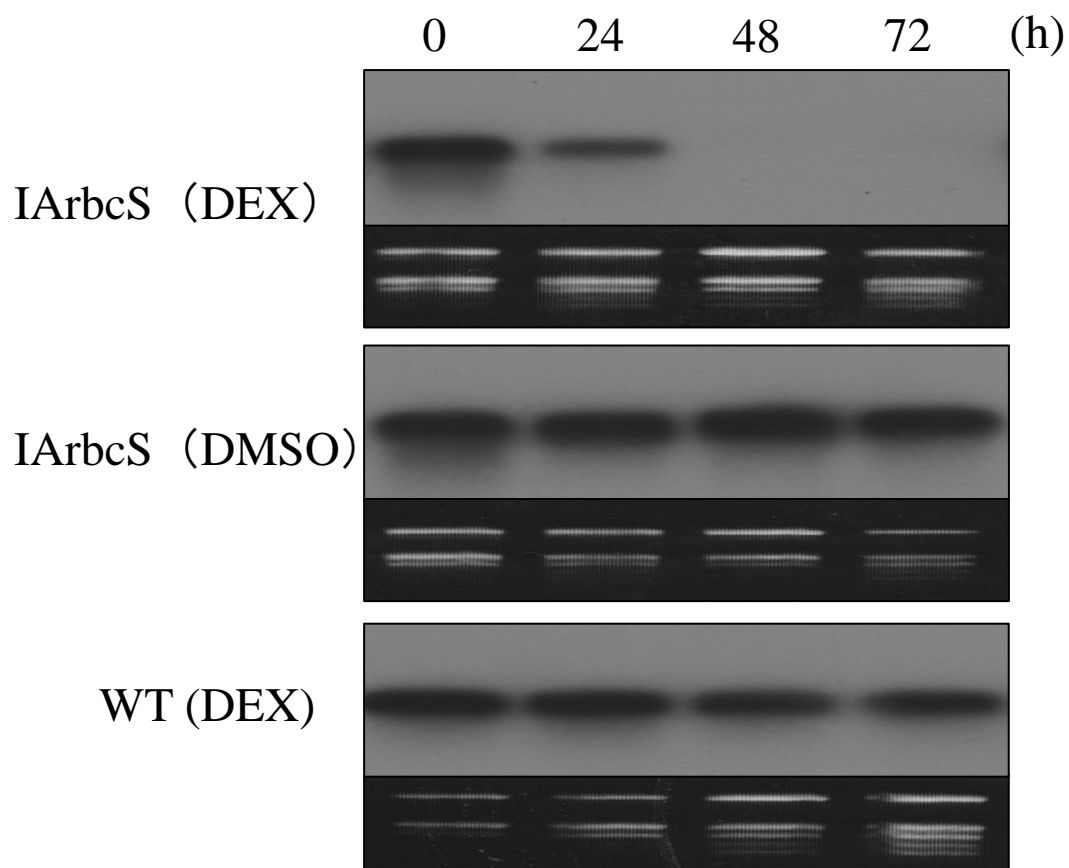


Fig. 5 A time course (0, 24, 48, and 72 h) of *rbcS* mRNA reduction after DEX treatment in the expanded leaves. Northern hybridization experiments were performed with 1 μ g of total RNA extracted from the leaves of one of the following plants: DEX-treated transgenic plants, IArbcS (DEX); DMSO-treated transgenic plants, IArbcS (DMSO); and DEX-treated wild-type plants, WT (DEX). The membranes were probed with the *rbcS* fragment. The ethidium bromide stain is shown as a loading control.



Fig. 6 The growth of IArbcS plants after DEX treatment. 54-day-old DEX-treated or DMSO (no DEX)-treated IArbcS plants. (A) DEX-treated from 25-days-old. (B)DEX-treated from 30-days-old. (C) DEX-treated from 39-days-old. (D) Cultivated in DMSO-containing hydroponic medium.

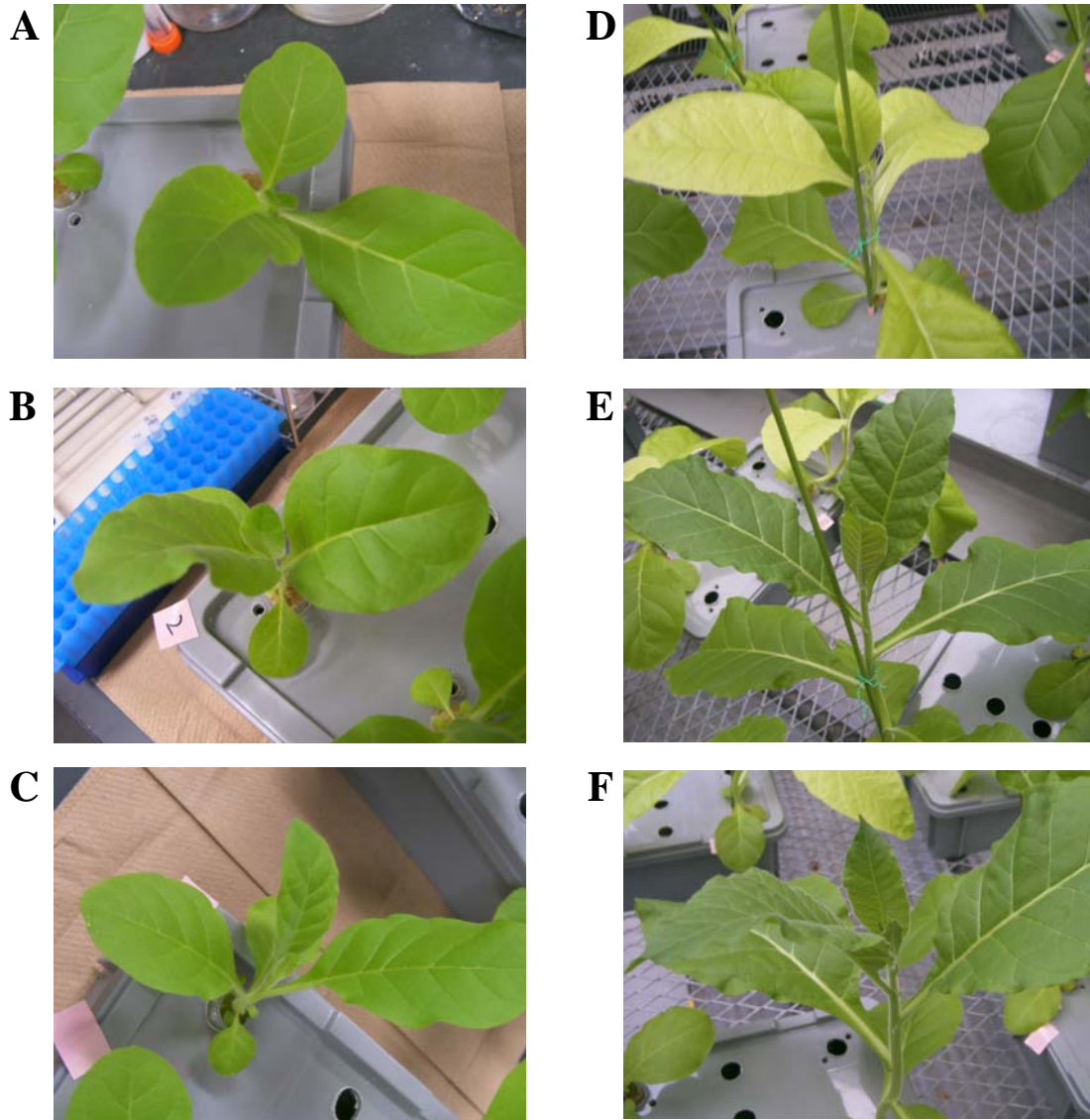


Fig. 7 The growth of IArbcS plants after DEX treatment. (A, B) Thirty-five-day-old IArbcS plant prior to DEX treatment. (C) Wild-type plant at 35-days-old. (D) Forty-eight-day-old IArbcS plants after DEX treatment from 35-days-old. (E) Forty-eight-day-old IArbcS plants after DMSO treatment from 35-days-old. (F) Forty-eight-day-old wild-type plants after DEX treatment from 35-days-old.



Fig. 8 The leaves of IArbcS plants after DEX or DMSO treatment. (A, B) Detached leaves from the plant shown in Figures 4D and 4E, respectively. Leaves were numbered from 1 to 12 from the bottom. The leaves from Nos. 7 to 12 are shown. (C) The No. 9 leaf of the plant shown in Figure 4D. No. 9 (g) and No. 9 (y) are the green and pale green parts, respectively, of the No. 9 leaf from a DEX-treated IArbcS plant.

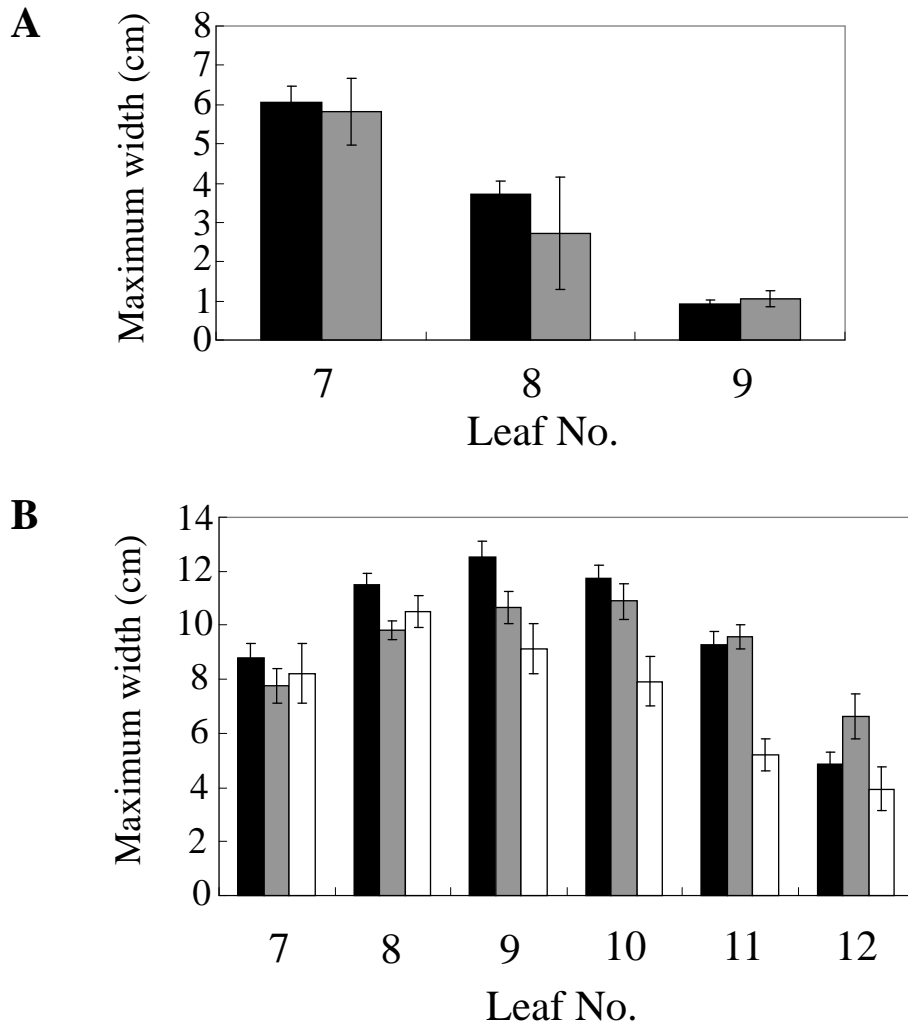


Fig. 9 Leaf size of IArbcS and wild-type plants. (A) The maximum width (cm) of each leaf from wild-type plants (black bars) and IArbcS plants (gray bars) prior to DEX treatment (at 35-days-old). (B) The maximum width (cm) of each leaf from DEX-treated IArbcS plants (white bars) and control plants (black bars, DEX-treated wild-type plants; gray bars, DMSO-treated IArbcS plants) corresponding to the leaves in Figures 4D-F. The values are the averages of four plants, and the bars represent the standard deviation (SD) of four plants.

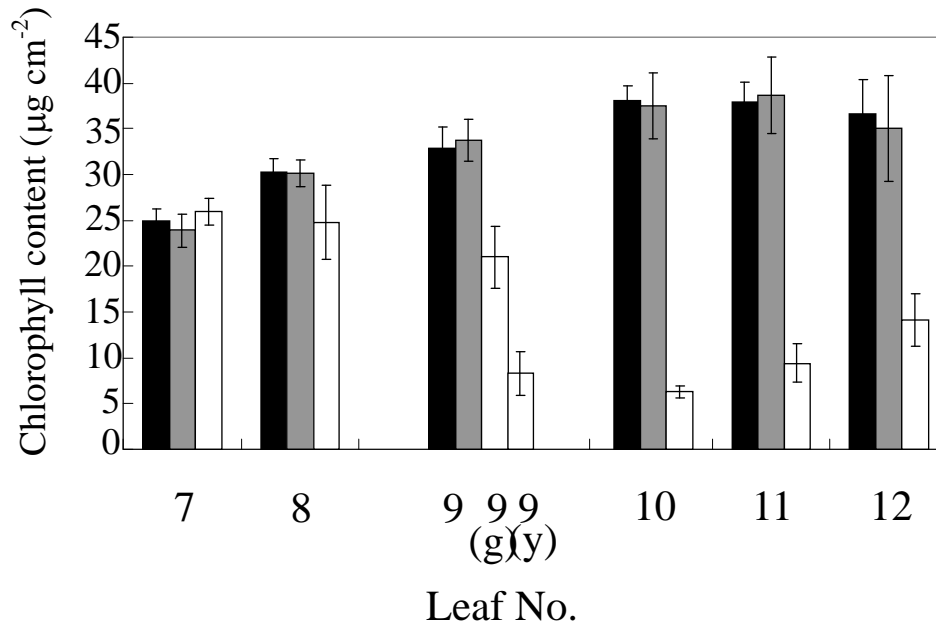


Fig. 10 Chlorophyll content per area ($\mu\text{g cm}^{-2}$) of each leaf from DEX-treated IArbcS plants (white bars) and control plants (black bars, DEX-treated wild-type plants; gray bars, DMSO-treated IArbcS plants) corresponding to the leaves in Figures 4D-F. The values are the averages of four plants, and the bars represent the standard deviation (SD) of four plants.

	No. 7	No. 9	No. 12
IArbcS (DEX)	5.6	0.5(g) -0.4(y)	-0.2
IArbcS (DMSO)	5.7	8.5	8.1

Table. 1 Photosynthetic levels in the Nos. 7 and 12 leaves from DMSO-treated IArbcS plants and DEX-treated IArbcS plants, which correspond to the leaves in Figures 4D and 4E. The photosynthetic level was estimated in CO₂ fixation (μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹).

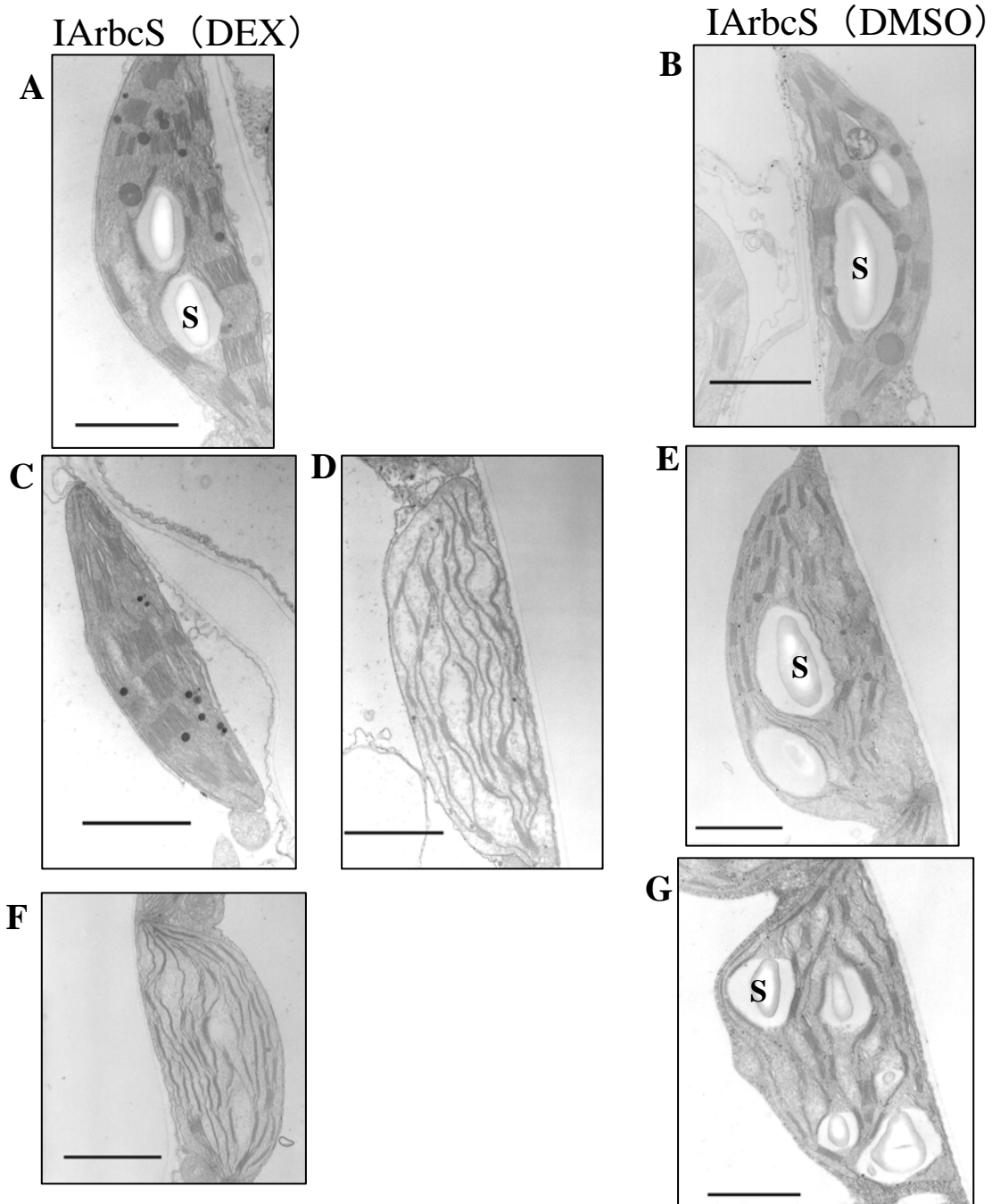


Fig. 11 Chloroplast ultrastructure. (A) The No. 7 leaf from a DEX-treated IArbcS plant. (B) The No. 7 leaf from a DMSO-treated IArbcS plant. (C) The No. 9 (g) leaf. (D) The No. 9 (y) leaf. (E) The No. 9 leaf from a DMSO-treated IArbcS plant. (F) The No. 12 leaf from a DEX-treated IArbcS plant. (G) The No. 12 leaf from a DMSO-treated IArbcS plant. These leaves correspond to the leaves in Figures 2E-G. S; starch granule. Scale bar = 1 μ m.

Leaf No.	Plants	7		8		9	
		W	I	W	I	W	I
7	W						
	I	**					
8	W		*				
	I	**	**				
9	W	**	**	**	*		
	I	**	**	*			

Fig. 12 The maximum leaf widths were statistically compared between plants and among their leaves by one-way ANOVA. For data presented in the table, a post hoc Tukey's HSD test was carried out on the ground means. W, wild type; I, IArbcS. Symbols denote significant differences (*, $P > 0.01$; **, $P > 0.05$).

Leaf	Plants	Plants			Plants			Plants			Plants			Plants			Plants	
		WT	Idx	Idm	WT	Idx	Idm	WT	Idx	Idm	WT	Idx	Idm	WT	Idx	Idm		
7	WT																	Idm
	Idx																	
	Idm																	
8	WT																	
	Idx																	
	Idm																	
9	WT																	
	Idx																	
	Idm																	
10	WT																	
	Idx																	
	Idm																	
11	WT																	
	Idx																	
	Idm																	
12	WT																	
	Idx																	
				*														

Fig. 13 The maximum leaf widths were statistically compared between plants and among their leaves by one-way ANOVA. For data presented in the table, a post hoc Tukey's HSD test was carried out on the ground means. W, wild type; Idx, IArbcS (DEX); Idm, IArbcS (DMSO). Symbols denote the existence of significant differences (*, $P > 0.01$).

Leaf No.	Plants	7			8			9			10			11			12			
		WT	Idx	Idm	WT	Idx	Idm	WT	Idx(g)	Idx(y)	Idm	WT	Idx	Idm	WT	Idx	Idm	WT	Idx	Idm
7	WT																			
	Idx																			
	Idm																			
8	WT																			
	Idx																			
	Idm																			
9	WT	*		**		*														
	Idx(g)				**		**	**												
	Idx(y)	**	**	**	**	**	**	**	**											
	Idm	**	*	**		**			**	**										
10	WT	**	**	**	*	**	*		**	**										
	Idx	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**								
	Idm	**	**	**		**			**	**			**							
11	WT	**	**	**	*	**	*		**	**			**							
	Idx	**	**	**	**	**	**	**	**			**	**	**	**					
	Idm	**	**	**	*	**	**		**	**	**		**			**				
12	WT	**	**	**		**			**	**			**							
	Idx	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**		**	**		
	Idm	**	**	**		**			**	**	**		**			**			**	**

Fig. 14 The chlorophyll content of leaves was statistically compared between plants and among their leaves by one-way ANOVA. For data presented in the table, a post hoc Tukey's HSD test was carried out on the ground means. W, wild type; Idx, IArbcS (DEX); Idm, IArbcS (DMSO). Symbols denote the existence of significant differences (*, $P > 0.01$; **, $P > 0.05$).

	The expanded leaves prior to DEX treatment (leaf No. 7)	The emerging leaves following DEX treatment (leaf No. 12)
The amount of <i>rbcS</i> mRNA	↓	↓
Size	→	↓
Color	→	Pale green
Chlorophyll content	→	↓
Photosynthetic level	→	↓
Chloroplast ultrastructure	→	Not developed

(→; Not changed, ↓; Reduced)

Table. 2 The phenotypes of two kind of leaves from 48- or 49-days-old IArbcS plant treated with DEX from 35-days-old. Leaf No. 7 shows the phenotype similar to those of control (or normal) leaves except for the reduction of *rbcS* mRNA amounts. Leaf No. 12 shows more sever phenotype than those of leaves from the tobacco plants constitutively expressing the antisense *rbcS* gene previously reported.

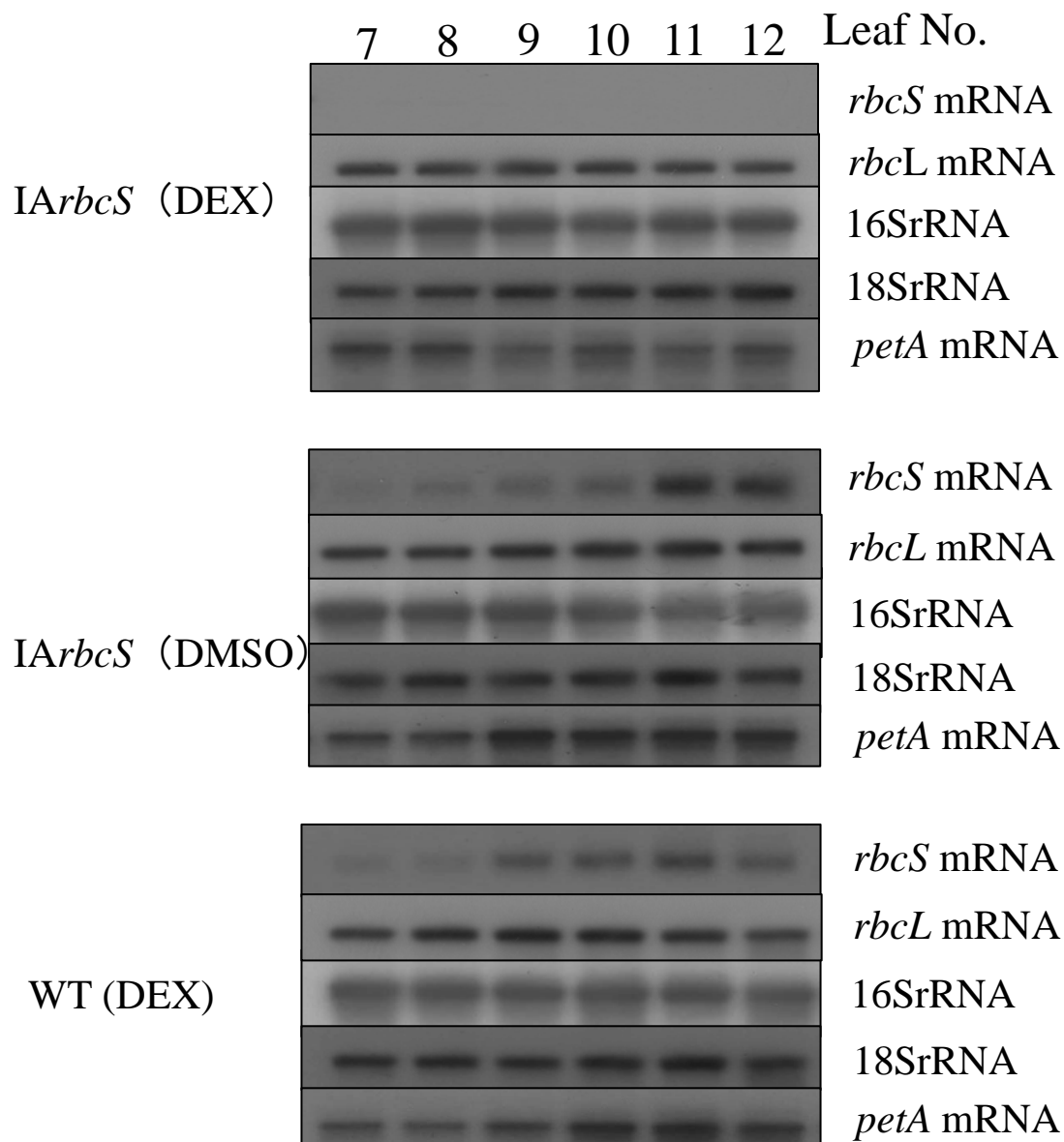


Fig. 15 The amounts of *rbcS* and *rbcL* mRNA. Northern hybridization experiments were performed with 1 μ g of total RNA extracted from the leaves of the following plants: DEX-treated transgenic plants, IArbcS (DEX); DMSO-treated transgenic plants, IArbcS (DMSO); and DEX-treated wild-type plants, WT (DEX). The membranes were probed with *rbcS*, *rbcL*, 18SrRNA, 16SrRNA, and *petA* fragments.

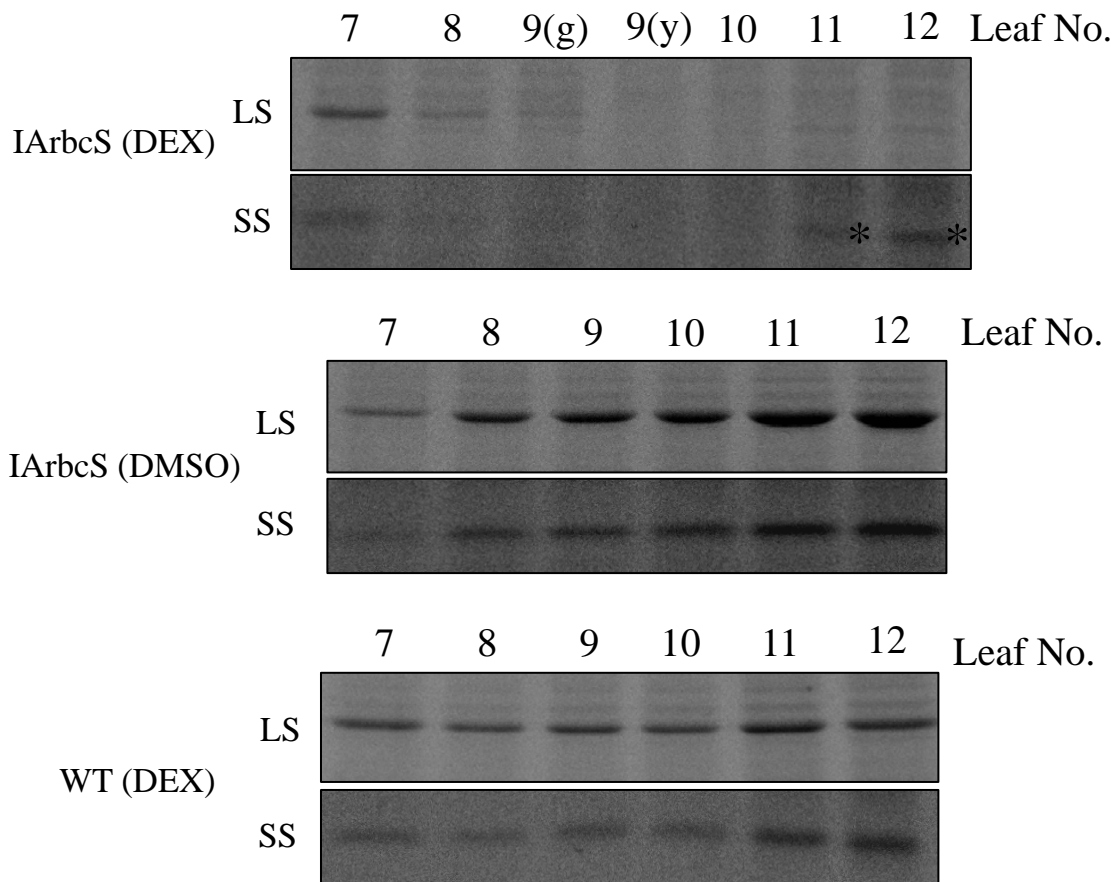


Fig. 16 The amounts of SS and LS proteins. Protein solutions were prepared from leaf discs from the following plants: DEX-treated transgenic plants, IArbcS (DEX); DMSO-treated transgenic plants, IArbcS (DMSO); and DEX-treated wild-type plants, WT (DEX). Equal volumes of protein solution were loaded and electrophoresed through 10% (for the LS) or 15% (for the SS) SDS-polyacrylamide gel. Gels were then stained with CBB. Asterisks (*) indicate bands of the same mobility as SS proteins in the lane of Nos. 11 and 12.

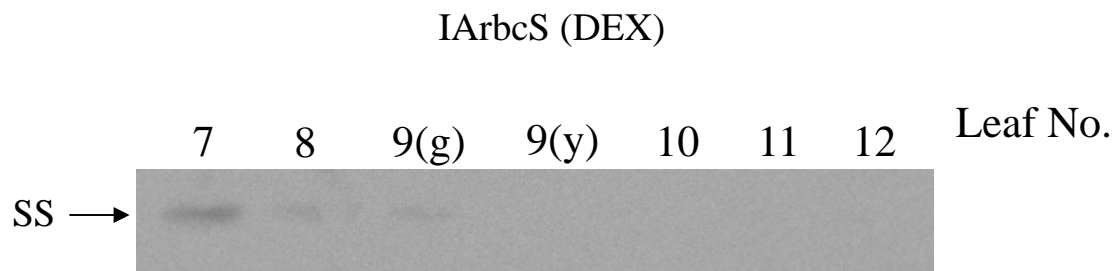


Fig. 17 The amounts of SS proteins. Protein solutions were prepared from leaf discs from DEX-treated transgenic plants, IArbcS (DEX). Equal volumes of protein solution were loaded and electrophoresed through 15% SDS-polyacrylamide gels. The gels were analyzed by transfer to nitrocellulose membranes for western blotting using an α -SS antibody.

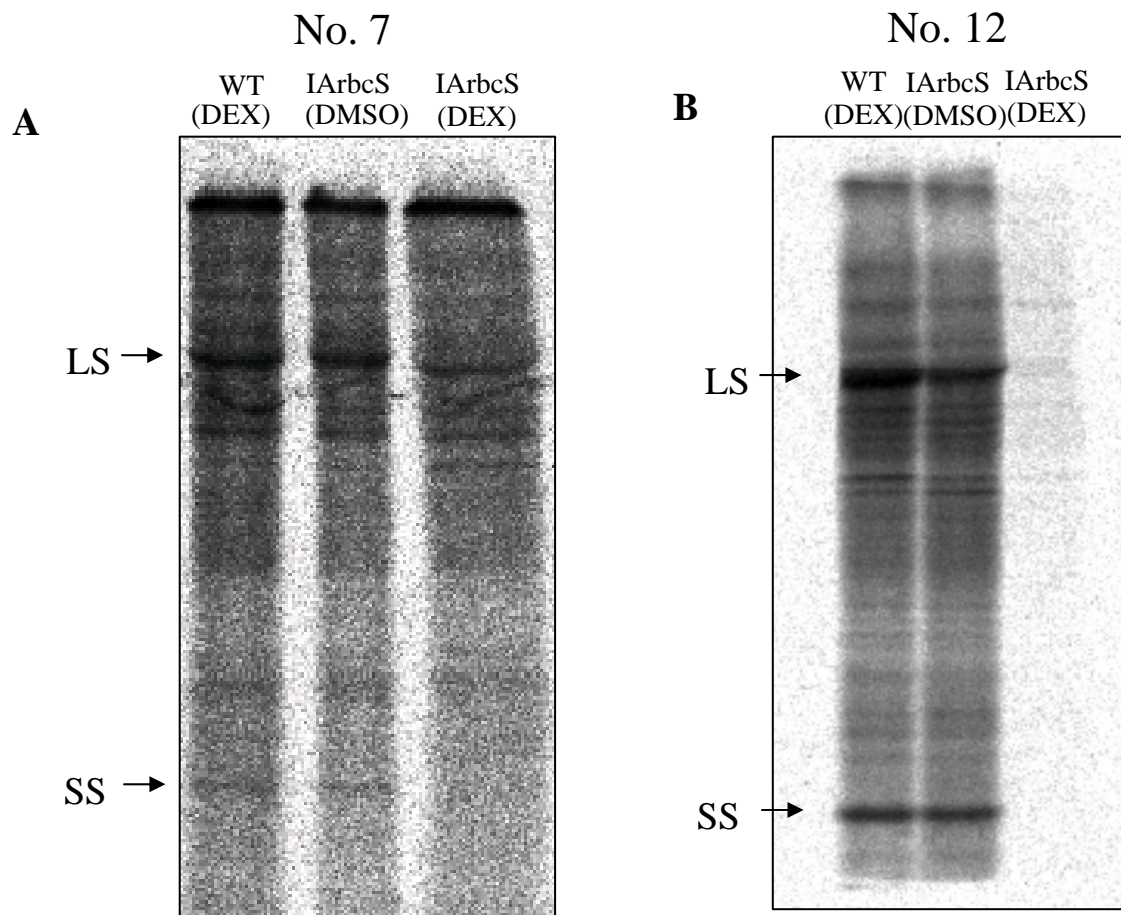


Fig. 18 *De novo* synthesis of the SS and the LS. (A, B) We incubated leaf discs from the Nos. 7 or 12 leaves from the following plants in [³⁵S]methionine mixed MS medium: DEX-treated transgenic plants, IArbcS (DEX); DMSO-treated transgenic plants, IArbcS (DMSO); and DEX-treated wild-type plants, WT (DEX). After 40 min, proteins were isolated and electrophoresed through 15% SDS polyacrylamide gels. The gels were dried and analyzed on BAS2500 film.

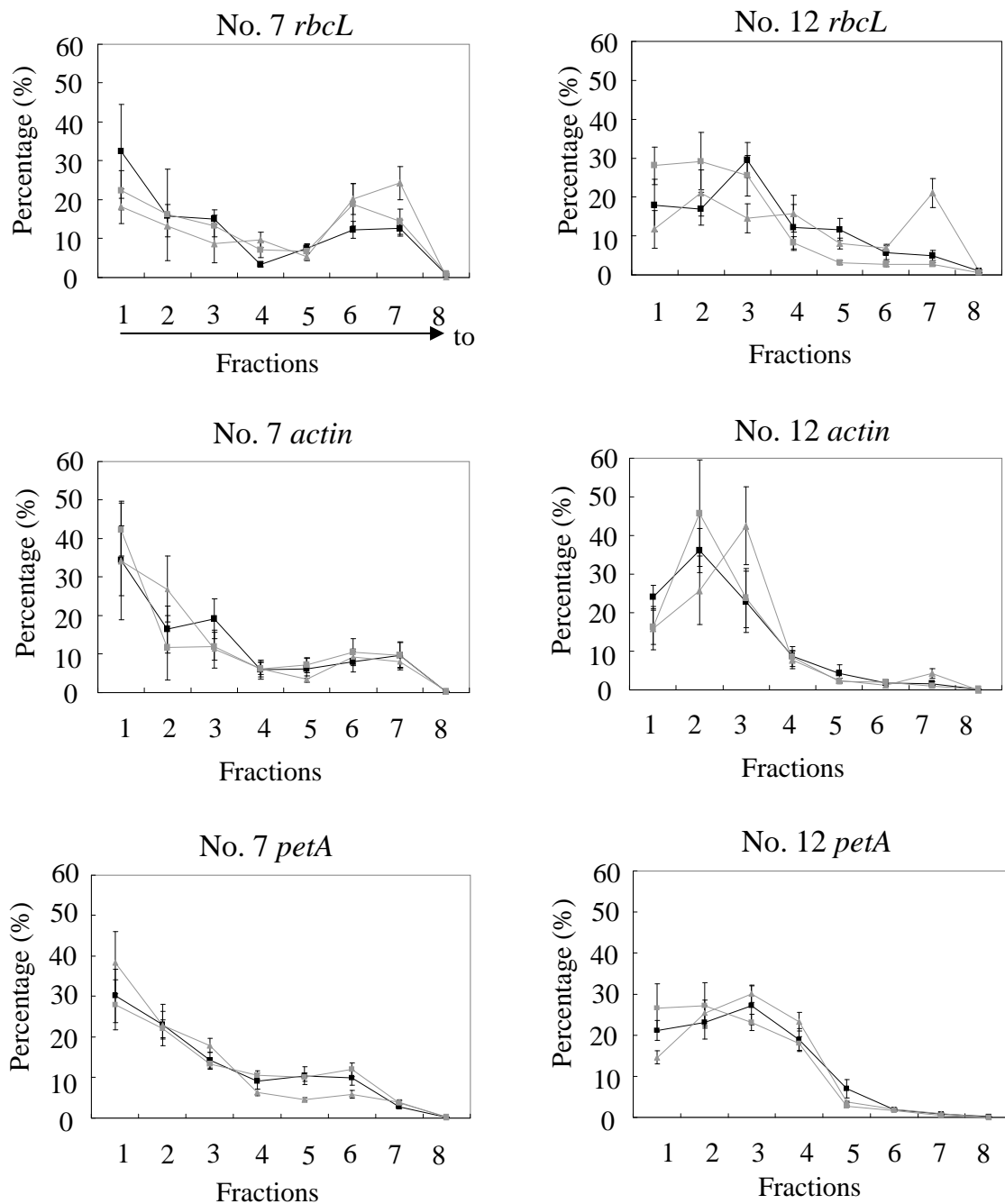


Fig. 19 Polysome distribution. Quantification of mRNA encoding the LS, actin, and Cytf in individual fractions by real-time PCR. The distribution of each mRNA across the eight fractions is shown on a percentage scale. The values of each mRNA are corrected by those of *Renilla* luciferase mRNA. The bars represent the SD of three samples. Black square, DEX-treated wild-type plants; gray square, DMSO-treated IArbcS plants; gray triangle, DEX-treated IArbcS plants.

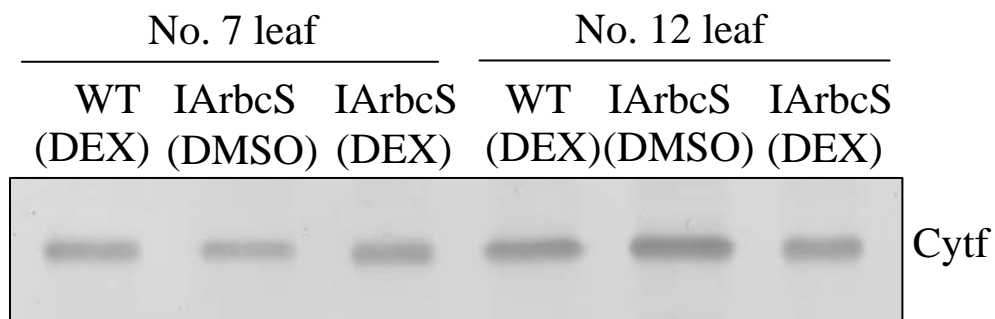


Fig. 20 The amounts of Cytf proteins. Protein solutions were prepared from leaf discs from the following plants: DEX-treated transgenic plants, IArbcS (DEX); DMSO-treated transgenic plants, IArbcS (DMSO); and DEX-treated wild-type plants, WT (DEX). Equal volumes of protein solution were loaded and electrophoresed through 15% SDS-polyacrylamide gels. The gels were analyzed by transfer to nitrocellulose membranes for western blotting using an α -Cytf antibody.

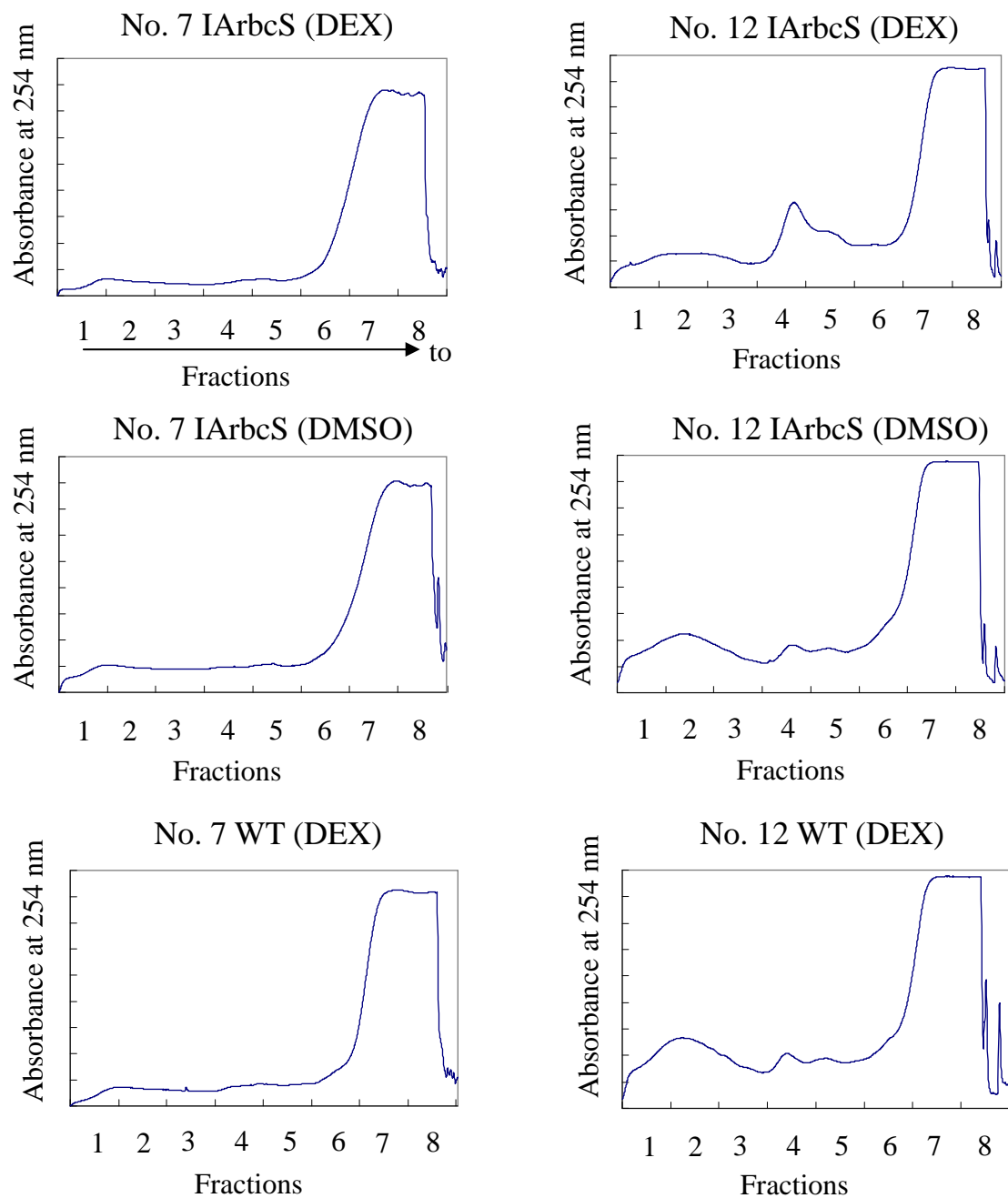


Fig. 21 Polysome distribution. Representative ultraviolet absorbance profiles for total RNA from the Nos. 7 and 12 leaves of DEX-treated IArbcS plants and DMSO-treated IArbcS plants fractionated on 15%-60% sucrose density gradients.

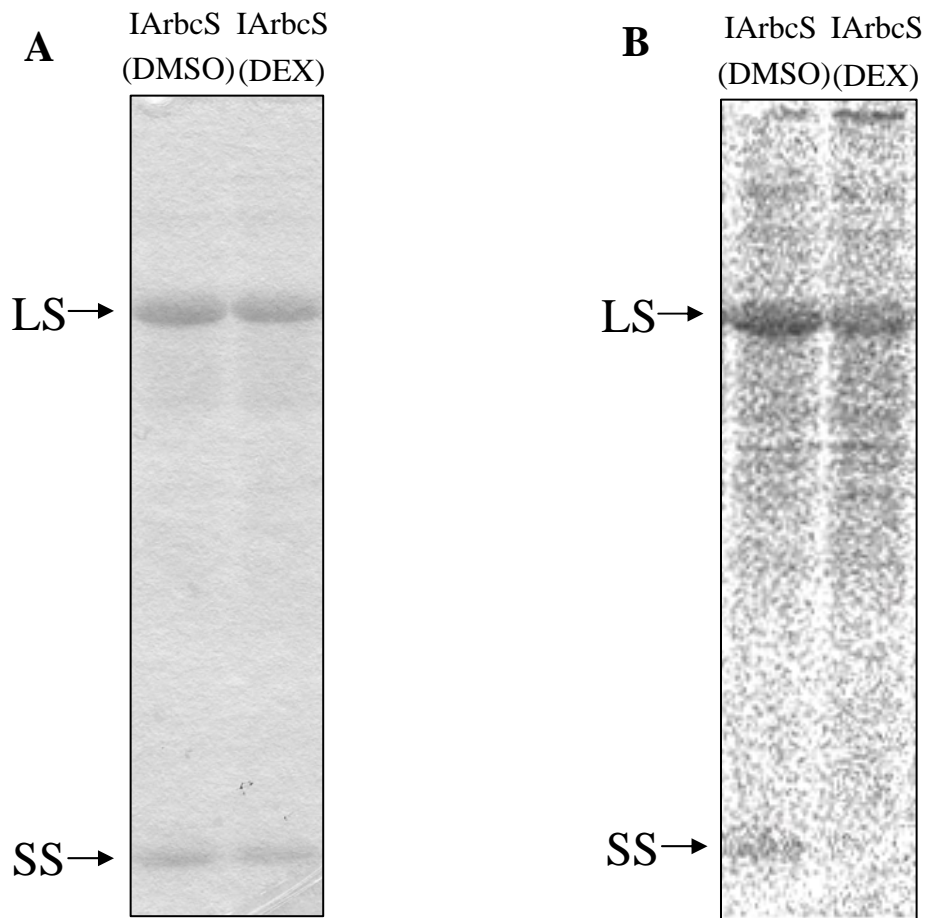


Fig. 22 RuBisCO expression in No. 7 leaves from 38-day-old plants. Protein solutions were prepared from leaf discs from the following plants: DEX-treated transgenic plants, IArbcS (DEX) and DMSO-treated transgenic plants, IArbcS (DMSO). (A) The amounts of SS and LS proteins. Equal volumes of protein solution were loaded and electrophoresed through 15% SDS-polyacrylamide gel. Gels were then stained with CBB. (B) *De novo* synthesis of the SS and the LS. We incubated leaf discs in [³⁵S]methionine mixed MS medium. After 40 min, proteins were isolated and electrophoresed through 15% SDS polyacrylamide gels. The gels were dried and analyzed on BAS2500 film.

4. 考察

本研究では LS の翻訳調節機構についてより詳細に理解をするために、正常に光合成が行われている葉での、*rbcS* の発現を抑制したときに LS の翻訳がどのように変化するのかを調べた。この目的のために DEX 誘導発現系を利用し、内在性 *rbcS* mRNA の蓄積量を時期特異的に減少させることができる形質転換タバコ (IArbcS タバコ) を作出した。T₂ 世代の IArbcS タバコを水耕栽培で 35 日間生長させた後、DEX を添加した水耕液でさらに栽培を続けると、約 48 時間後にはノザン解析で検出不可能なレベルまで内在性 *rbcS* mRNA の蓄積量が減少した (Fig. 5)。さらに詳細に解析をするため、播種から 35 日目の IArbcS タバコに DEX 処理を行い、さらに 13 日 (もしくは 14 日) 経過した後、表現型を調べたところ、そのタバコの葉は大きく分けて 2 種類の表現型を示した。一つは DEX 処理時にはすでに展開していた葉の表現型、もう一つは DEX 処理後に新しく展開した葉の表現型である。

4-1. 展開葉におけるLSの翻訳調節機構

No. 7 の葉のように DEX 処理時にすでに展開していた葉では *rbcS* mRNA はほとんど蓄積しておらず、新規に合成される SS もほとんど存在しなかった (Figs. 15 and 18A)。しかし、葉の色、大きさ、クロロフィル含有量、葉緑体構造、RuBisCO の蓄積量、光合成速度は対照のものと差は見られなかった (Figs. 7-11, 16)。従って、この葉では *rbcL* をはじめとする光合成関連遺伝子の発現について調べるときに問題となる要因—過剰光、酸化ストレス、スクロースなどが排除されていると考えられる。序論で述べたように、カルビン回路の一部を阻害するような薬剤により光合成暗反応を抑制すると、LS を含む光合成関連遺伝子にコードされるタンパク質の翻訳が抑制される。従って構成的な *rbcS* のノックダウンによって RuBisCO の蓄積量が減少したときも、同様の現象が起こる可能性が考えられる。しかし、本研究のようにすでに RuBisCO が十分に蓄積している状態で *rbcS* の発現を抑制することで、光合成能力の減少が光合成関連遺伝子の発現に与える影響を回避できると考えられる。また、外部からスクロースを与えることで光合成関連遺伝子の発現が抑制されることも知られている (Koch 1996)。*rbcS* の発現を構成的に抑制したタバコの場合、栽培のために培地にスクロースを添加する必要があるため、スクロースが光合成関連遺伝子の発現に与える影響を考える必要がある。しかし、IArbcS タバコを播種から 35 日経過した後、DEX を添加した水耕液でさらに栽培すると、その時点ですでに展開していた葉は野生株とほぼ変わらない光合成速度を示すため (Table. 1)、

このタバコは外部からスクロースを添加することなく栽培することができる。

このように、LSの発現に影響を与える他の要因をできる限り排除した状態で、内在性 *rbcS* の発現を抑制したときの LS の翻訳への影響を調べると、上で述べたように、新規に合成される SS の有無に関わらず LS の翻訳量は変化しないという結果になった (Figs. 18 and 19)。すなわち、この結果は正常に光合成を行っている展開葉では、新規に合成される SS の量は LS の翻訳調節には関与していないことを示している。従来、RuBisCO サブユニット間の発現調節について、*rbcS* の発現を抑制したときに LS の翻訳が抑制される機構として 2 つの説が考えられていた。一つは SS が直接的もしくは間接的に LS の翻訳促進因子として働いている説、もう一つは LS が負のフィードバック機構によって自身の翻訳を抑制するという説である。また、光合成能力の減少によるその他の二次的な影響も考えられるが、実際にどのような機構が働いているのかは不明であった。今回の研究では、正常に光合成を行っている展開葉では SS は LS の翻訳促進には働いていないということが明らかになった。

4-2. 近年におけるLSの翻訳調節機構に関する研究

この数年で、クラミドモナスやタバコで LS の翻訳もシトクロム b_6/f 複合体の例に見られるように CES によって調節されることを示唆する研究がされている。クラミドモナスからの抽出液を用いた UV-クロスリンク実験では、酸化的環境下で LS は *rbcL* mRNA や他の RNA と結合することと、LS の翻訳が抑制されることを示している。また、LS の結晶構造解析により N 末側に RNA 結合ドメインと推定される構造が確認されている (Yosef et al. 2004)。このようなクラミドモナスで見られる LS の特徴は、紅色非硫黄細菌、シアノバクテリア、タバコ、ホウレンソウなどの異なる種で広く保存されていることも示されている (Cohen et al. 2006)。さらに、タバコでも CES によって LS の翻訳が調節されていることを示唆する報告がある (Wostrikoff and Stern 2007)。この報告では、翻訳された後にすぐに分解される不安定な LS (unstable LS) を発現するタバコを作出しており、このタバコを基本に 3 種類の形質転換体の未成熟葉で LS の翻訳調節機構について調べている。これらのタバコでは、*rbcS* がノックダウンされた変異体では従来の研究どおり LS の翻訳量が減少したのに対し、unstable LS を発現する変異体と、unstable LS を発現し、*rbcS* がノックダウンされた二重変異体では LS の翻訳量が増大した。この実験結果に対して、「本来は RuBisCO に会合できなかった LS が自身の翻訳を抑制するが、不安定な LS を発現するタバコ植物体内では LS はその機能を果たすことができず、LS は翻訳されたままになる」という説明がされている。

4-3. No.7 の葉の評価

本研究での成熟葉 (No. 7) を用いた *in vivo* パルスラベル実験やポリソーム解析の結果は、RuBisCO と会合できない余剰 LS が存在しているにも関わらず、LS の翻訳が抑制されていないことを示している (Figs. 18 and 19)。この結果は余剰 LS が自身の翻訳を抑制するという説と一見矛盾するよう見えるが、その理由として以下の可能性が考えられる。野生株の展開葉ではすでに生じた余剰 LS がある程度 LS の翻訳を抑制しており、*rbcS* のノックダウンによって新たに余剰 LS が生じても、それらの LS はさらに LS の翻訳を抑制することができないという可能性である。成熟葉では未成熟葉と変わらないレベルの *rbcL* mRNA が蓄積しているが、*rbcS* mRNA に関しては成熟葉で非常に減少している (Fig. 15)。さらに No. 7 の葉では *rbcS* mRNA や新規に合成される SS の有無に関わらず、RuBisCO の蓄積量が変わらないため (Fig. 16)、展開を終えた成熟葉では RuBisCO の代謝が遅く、新規に合成された LS は RuBisCO にほとんど会合しないことが考えられる。実際、展開を終えてから老化に至るまでの段階の葉で RuBisCO の合成量が急激に減少することがイネを用いた実験で報告されている (Mae et al. 1983)。従って、展開を終えた成熟葉ではこれらの RuBisCO に会合していない余剰 LS が、すでに LS の翻訳量を最低限のレベルまで抑制していると考えられる (Fig. 23)。

4-4. No. 12 の葉の評価

No. 12 の葉のように DEX 処理後に新しく展開した葉では、SS の蓄積量、翻訳量の減少と LS の蓄積量、翻訳量の減少は協調的に起こっており (Figs. 15 and 18B)、過去に行われた *rbcS* をノックダウンしたクラミドモナスや構成的にアンチセンス *rbcS* を発現させたタバコと同様の表現型を示している (Rodermel et al. 1988, Khrebtukova and Spreitzer 1996, Rodermel et al. 1996)。一方で一部の表現型に関しては、葉の色は黄化がより進み、光合成速度は呼吸速度を下回る (Table. 1, Figs. 7 and 8) という、構成的にアンチセンス *rbcS* を発現させたタバコよりもより顕著な表現型が見られた (Jiang and Rodermel 1995, Tsai et al. 1997)。原因としては RuBisCO の蓄積量の違いが挙げられる。過去の実験では RuBisCO が野生株のものに比べて 20%~60% は蓄積しており (Rodermel et al. 1988)、葉緑体の構造も正常なままであった (Schoefs et al. 2001)。一方、本研究で用いたタバコでは RuBisCO はほとんど蓄積しておらず、葉緑体も未発達のままであった (Figs. 11D and 15)。このことから、極度の *rbcS*

の発現抑制や RuBisCO の蓄積量の減少によって、葉緑体の発達に何らかの影響を現れたことが考えられる。また、この葉での LS の翻訳調節については光合成能力が著しく損なわれているため、SS が翻訳促進因子として関与しているのか、CES が働いているのかは本研究の結果からは不明のままである。

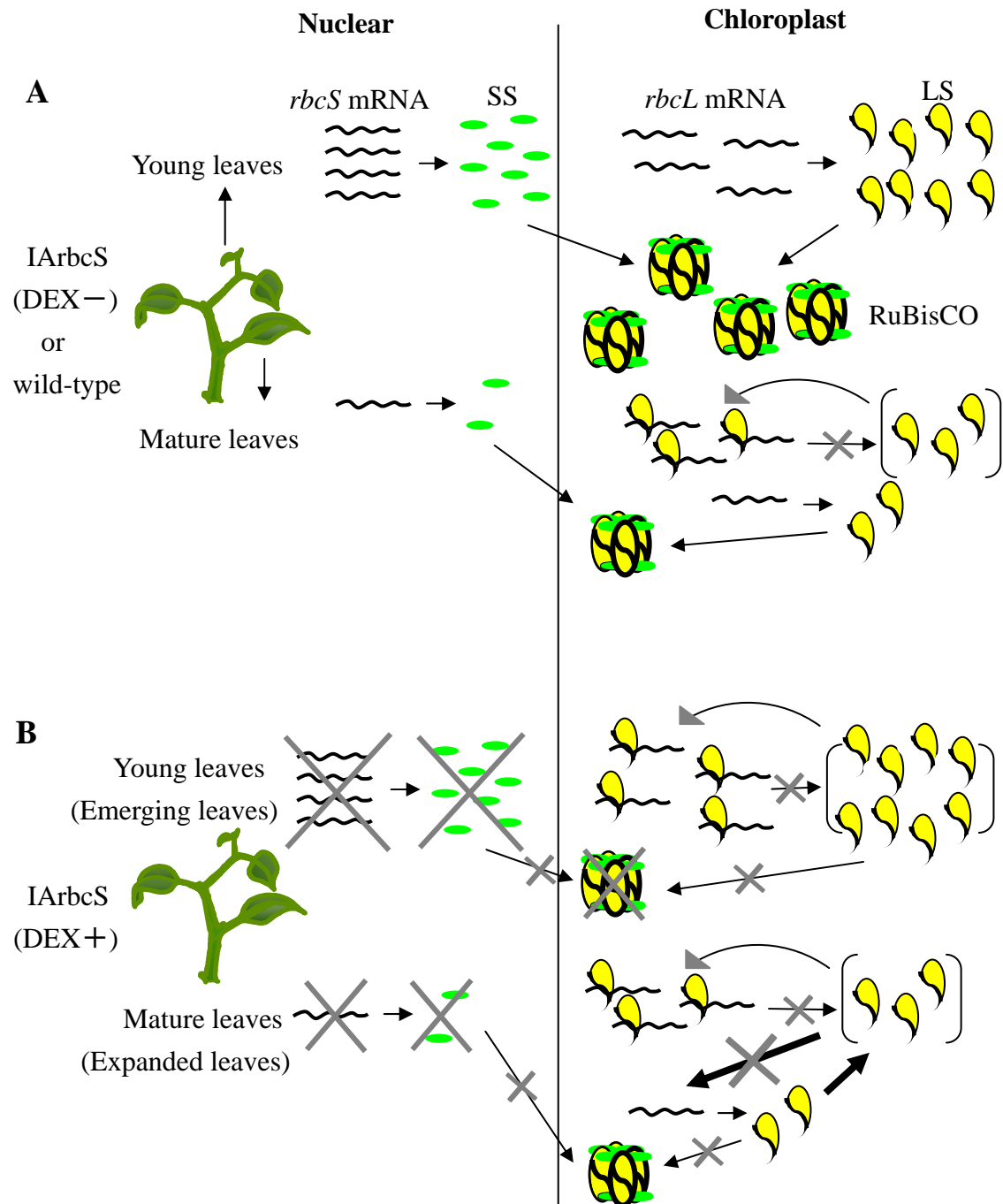


Fig. 23 A hypothetical mechanism for the regulation of LS translation in young and mature leaves from (A) DMSO treated IArbcS or wild-type plant and (B) DEX treated IArbcS plant.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました新名惇彦教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、懇切なる御指導を賜りました加藤晃助教に厚く御礼申し上げます。

本研究に対して適切な御助言と御配慮を賜りました吉田和哉准教授、関根政実准教授、仲山英樹助教に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、**RuBisCO**に関する多くの有益な御助言を賜りました横田明穂教授（奈良先端科学技術大学院大学）に厚く御礼申し上げます。光合成時におけるガス交換測定について、適切な御助言ならびに御指導を賜りました三宅親弘博士（**RITE**）に厚く御礼申し上げます。免疫組織学的手法について、適切な御助言ならびに御指導を賜りました岩野恵助教（奈良先端科学技術大学院大学）に厚く御礼申し上げます。抗体を供与して下さった牧野周准教授（東北大学）に厚く御礼申し上げます。

日々の研究に多方面からの御協力をいただきました河村和恵博士、児玉悠一博士、松浦秀幸氏、平野博人氏をはじめ、植物代謝調節学講座の皆様に感謝申し上げます。

最後に、精神的ならびに経済的に支えて頂いた、両親と家族に感謝します。

参考文献

Aoyama, T. and Chua, N.H. (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* 11: 605-612.

Bennoun, P., Spierer-Herz, M., Erickson, J., Girard-Bascou, J., Pierre, Y., Delosme, M. and Rochaix, J-. (1986) Characterization of photosystem II mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the psbA gene. *Plant Mol. Biol.* 6: 151-160.

Bohner, S. and Gatz, C. (2001) Characterisation of novel target promoters for the dexamethasone-inducible/tetracycline-repressible regulator TGV using luciferase and isopentenyl transferase as sensitive reporter genes. *Mol. Gen. Genet.* 264: 860-870.

Bohner, S., Lenk, I., Rieping, M., Herold, M. and Gatz, C. (1999) Technical advance: transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. *Plant J.* 19: 87-95.

Choquet, Y., Stern, D.B., Wostrickoff, K., Kuras, R., Girard-Bascou, J. and Wollman, F.A. (1998) Translation of cytochrome f is autoregulated through the 5' untranslated region of petA mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4380-4385.

Choquet, Y. and Wollman, F.A. (2002) Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett* 529: 39-42.

Choquet, Y., Zito, F., Wostrikoff, K. and Wollman, F.A. (2003) Cytochrome f translation in *Chlamydomonas* chloroplast is autoregulated by its carboxyl-terminal domain. *Plant Cell* 15: 1443-1454.

Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995.

Cohen, I., Sapir, Y. and Shapira, M. (2006) A conserved mechanism controls translation of Rubisco large subunit in different photosynthetic organisms. *Plant Physiol.* 141: 1089-1097

Davies, E. and Abe, S. (1995) Methods for isolation and analysis of the cytoskeleton. *Methods Cell Biol.* 50: 223-236

Dean, C., Eran, P. and Pamela, D. (1989) STRUCTURE, EVOLUTION, AND REGULATION OF *RbcS* GENES IN HIGHER PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 40: 415-439.

Drapier, D., Girard-Bascou, J. and Wollman, F.A. (1992) Evidence for Nuclear Control

of the Expression of the *atpA* and *atpB* Chloroplast Genes in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 4: 283-295.

Drapier, D., Rimbault, B., Vallon, O., Wollman, F.A. and Choquet, Y. (2007) Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits. *EMBO J.* 26: 3581-3591.

Eckhardt, U., Grimm, B. and Hortensteiner, S. (2004) Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 56: 1-14.

Erickson, J.M., Rahire, M., Malnoe, P., Girard-Bascou, J., Pierre, Y., Bennoun, P. and Rochaix, J.D. (1986) Lack of the D2 protein in a *Chlamydomonas reinhardtii* *psbD* mutant affects photosystem II stability and D1 expression. *EMBO J.* 5: 1745-1754.

Girard-Bascou, J., Choquet, Y., Schneider, M., Delosme, M. and Dron, M. (1987) Characterization of a chloroplast mutation in the *psaA2* gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 12: 489-495.

Gonzalez, R.G., Haxo, R.S. and Schleich, T. (1980) Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein--nucleic acid interactions. *Biochemistry* 19: 4299-4303.

Hartman, F.C. and Harpel, M.R. (1994) STRUCTURE, FUNCTION, REGULATION, AND ASSEMBLY OF D -RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 197-234.

Jiang, C.Z. and Rodermel, S.R. (1995) Regulation of Photosynthesis during Leaf Development in RbcS Antisense DNA Mutants of Tobacco. *Plant Physiol.* 107: 215-224.

Khrebtukova, I. and Spreitzer, R.J. (1996) Elimination of the Chlamydomonas gene family that encodes the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13689-13693.

Koch, K.E. (1996) CARBOHYDRATE-MODULATED GENE EXPRESSION IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540.

Kuras, R. and Wollman, F.A. (1994) The assembly of cytochrome b6/f complexes: an approach using genetic transformation of the green alga Chlamydomonas reinhardtii. *EMBO J.* 13: 1019-1027.

Leammli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Long, S.P. and Humphries, S. (1994) PHOTOINHIBITION OF PHOTOSYNTHESIS IN NATURE. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 633-662.

Mae, T., Makino, A. and Ohira, K. (1983) Changes in the amounts of ribulose biphosphate carboxylase synthesized and degraded during the life span of rice leaf (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* 24: 1079-1086.

Maniatis, T., Fritsh, E.F. and Shamrock, J. (1989). *Molecular Cloning*.

Muhlbauer, S.K. and Eichacker, L.A. (1998) Light-dependent formation of the photosynthetic proton gradient regulates translation elongation in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 273: 20935-20940.

Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Bioch. Biophys. Acta* 975: 384-394

Randall, P.J. and Bouma, D. (1973) Zinc Deficiency, Carbonic Anhydrase, and Photosynthesis in Leaves of Spinach. *Plant Physiol.* 52: 229-232.

Rodermel, S., Haley, J., Jiang, C.Z., Tsai, C.H. and Bogorad, L. (1996) A mechanism for

intergenomic integration: abundance of ribulose biphosphate carboxylase small-subunit protein influences the translation of the large-subunit mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3881-3885.

Rodermel, S.R., Abbott, M.S. and Bogorad, L. (1988) Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense gene inhibits ribulose biphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell* 55: 673-681.

Schneider, G., Lindqvist, Y. and Branden, C. (1992) RUBISCO: Structure and Mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 119-143

Schoefs, B., Darko, E. and Rodermel, S. (2001) Photosynthetic pigments, photosynthesis and plastid ultrastructure in RbcS antisense DNA mutants of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Z. Naturforsch.* 56: 1067-1074.

Shapira, M., Lers, A., Heifetz, P.B., Irihimovitz, V., Osmond, C.B., Gillham, N.W. and Boynton, J.E. (1997) Differential regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* during photoacclimation: light stress transiently suppresses synthesis of the Rubisco LSU protein while enhancing synthesis of the PS II D1 protein. *Plant Mol. Biol.* 33: 1001-1011.

Sokal, R.R and Rohlf, F.J. (1995) *Biometry*, 3rd edn. Freeman, New York.

Spreitzer, R.J. (1993) GENETIC DISSECTION OF RUBISCO STRUCTURE AND FUNCTION. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 411-434.

Takahashi, S. and Murata, N. (2005) Interruption of the Calvin cycle inhibits the repair of Photosystem II from photodamage. *Biochim. Biophys. Acta.* 1708: 352-361.

Tsai, C.H., Miller, A., Spalding, M. and Rodermel, S. (1997) Source Strength Regulates an Early Phase Transition of Tobacco Shoot Morphogenesis. *Plant Physiol.* 115: 907-914.

Wostrikoff, K. and Stern, D. (2007) Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 6466-6471.

Yamamoto, H., Kato, H., Shinzaki, Y., Horiguchi, S., Shikanai, T., Hase, T., Endo, T.,

Nishioka, M., Makino, A., Tomizawa, K. and Miyake, C. (2006) Ferredoxin limits cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in higher plants--stimulation of CEF-PSI enhances non-photochemical quenching of Chl fluorescence in transplastomic tobacco.

Plant Cell Physiol. 47: 1355-1371.

Yosef, I., Irihimovitch, V., Knopf, J.A., Cohen, I., Orr-Dahan, I., Nahum, E., Keasar, C. and Shapira, M. (2004) RNA binding activity of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 279: 10148-10156.