

光合成 CO<sub>2</sub> 固定酵素 RuBisCO の高蓄積を担う  
NARA 遺伝子の分子遺伝学的解析

小川 太郎  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 分化・形態形成学講座  
(横田 明穂 教授)

平成 21 年 8 月 10 日提出



## 目次

<b>第 1 章 諸論</b>	<b>--- 4</b>
<u>RuBisCO を焦点とした</u> <u>植物光合成遺伝子の大規模発現の生理学的意義と分子機構</u>	
<b>第 2 章</b>	<b>-- 16</b>
<u>正の遺伝学的手法による RuBisCO 高蓄積を担う NARA 遺伝子の同定</u>	
2-1. 序論	-- 16
2-2. 材料と方法	-- 17
2-3. 結果	-- 21
2-4. 考察	-- 34
<b>第 3 章</b>	
<u>第 1 本葉における光合成遺伝子発現を担う NARA4 の分子遺伝学的解析</u>	
3-1. 序論	-- 38
3-2. 材料と方法	-- 40
3-3. 結果	-- 43
3-4. 考察	-- 58
<b>第 4 章</b>	
<u>プラスチドの光合成遺伝子の大規模発現を担う NARA5 の分子遺伝学的解析</u>	
4-1. 序論	-- 61
4-2. 材料と方法	-- 63
4-3. 結果	-- 65
4-4. 考察	-- 78
<b>第 5 章 結論</b>	<b>-- 80</b>
<b>謝辞</b>	<b>-- 82</b>
<b>参考文献</b>	<b>-- 83</b>
<b>論文目録</b>	<b>--- 100</b>

# 第1章

## 諸論

### RuBisCO を焦点とした

#### 植物光合成遺伝子の大規模発現の生理学的意義と分子機構

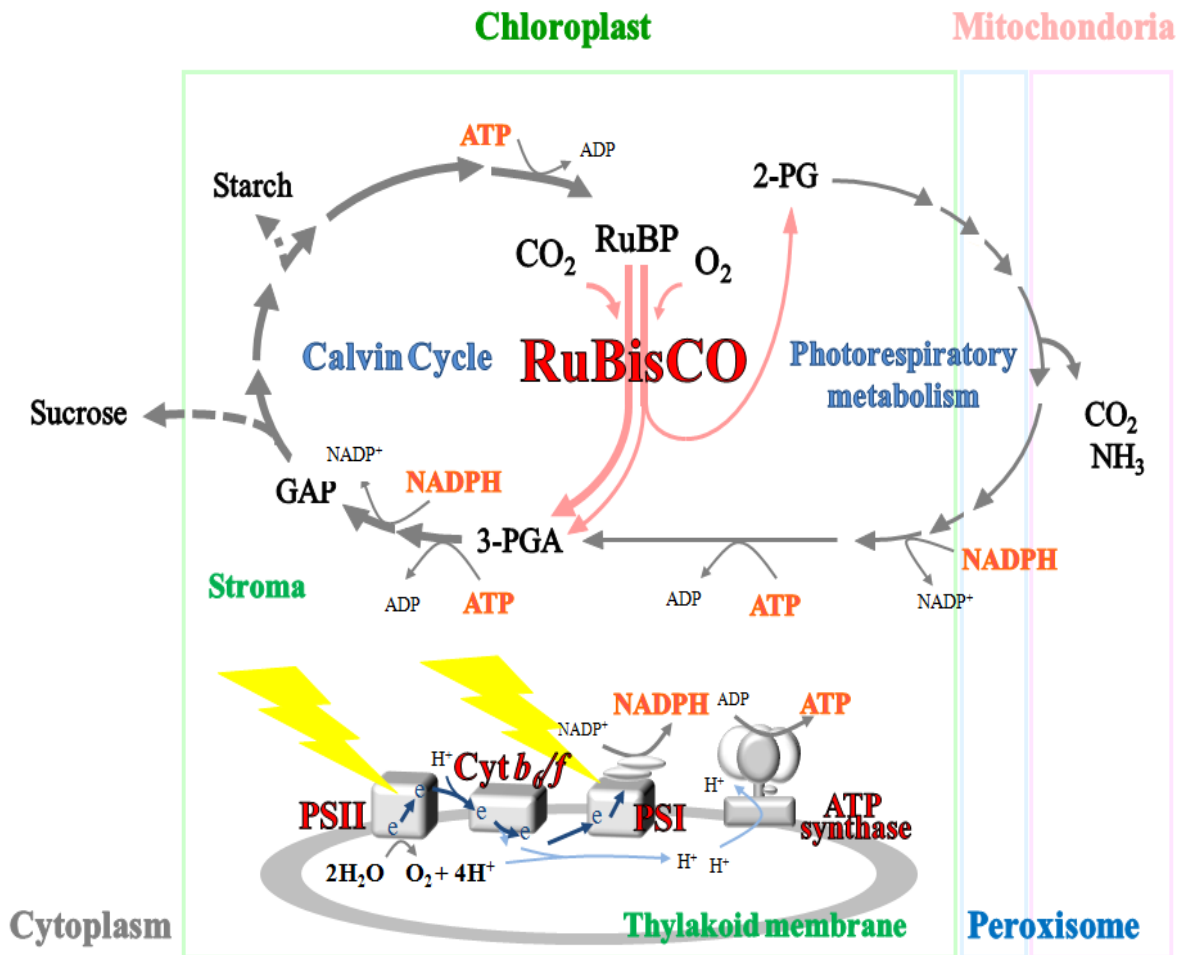
地球上の大気、海洋、陸地では、酸素(O<sub>2</sub>)と二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>)の大規模な吸収と排出の循環が起こっており(Field et al., 1998; Denman et al., 2007; Mikhailov et al., 2008)、これは我々の様に好気呼吸を行う生物と光合成を行う植物との共生の証の1つである。人間(動物を含む)の呼吸は、年間約20 GtのO<sub>2</sub>を消費しているが、これは年間約300 GtのO<sub>2</sub>を発生する陸上植物の光合成に大きく支えられている。逆に生物の呼吸に加え近年の化石燃料の消費によって年間約400 GtのCO<sub>2</sub>が大気中に排出されるが、地球上の全ての光合成生物がそれと同等に近い量のCO<sub>2</sub>を同化し生長の糧としている。また生長した植物は、様々な場面で、我々の生活を支える糧となっている。すなわち、この様な地球生態系において、光合成は生物の生命活動に不可欠な物質を生産する極めて重要な化学反応系である。

光合成は、光エネルギーを利用して有機化合物を合成することであり、光エネルギーから ATP や NADPH を合成する過程(電子伝達系と ATP 合成系)と、CO<sub>2</sub>を有機物として固定する過程(CO<sub>2</sub>同化系)に大別される(Leister and Schneider, 2003; Eberhard et al., 2008)。光合成の様式や光合成タンパク質の構成は生物種によって異なっているが、藍藻や陸上植物の葉緑体で見られる高度に進化した酸素発生型光合成の内容は以下のように要約される(Fig. 1-1)。葉緑体のチラコイド膜に局在する直鎖型の電子伝達系では、まず光により励起された Photosystem (PS) II が水から電子を引抜き、O<sub>2</sub>と H<sup>+</sup>をチラコイド膜内腔(ルーメン)に発生する。電子は PSII、Plastoquinone (PQ)、Cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex (Cyt *b<sub>6</sub>/f*)、Plastocyanin、Photosystem I (PSI)を経て Ferredoxin に渡るが、この過程で H<sup>+</sup>がストロマからルーメンへ輸送される。電子は Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductases (FNR)によって NADP<sup>+</sup>に授与され、最終産物として NADPH が生産される。ATP 合成系では、ATP synthase が電子伝達反応の過程で形成されたチラコイド膜内外の H<sup>+</sup>の電気化学的ポテンシャルを利用して ATP を合成する。一方の葉緑体ストロマに局在する CO<sub>2</sub>同化系は、11種の Calvin-Benson-Bassham cycle (Calvin 回路)の酵素から成り、電子伝達系と ATP 合成系により生産された NADPH と ATP を駆動力にしている。この Calvin 回路の初発段階では、Ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP)に CO<sub>2</sub>が固定され 3-Phosphoglycerate (3-PGA)が2分子生成される。このような光合

成初期産物が 3 炭素化合物である植物グループは、 $C_3$  植物と呼ばれ、大部分の作物がこれに属している。この回路ではその後 Glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) などの糖リン酸が生成され、その一部はショ糖やデンプンの合成に、大部分が RuBP の再生に用いられる(Fig. 1-1)。

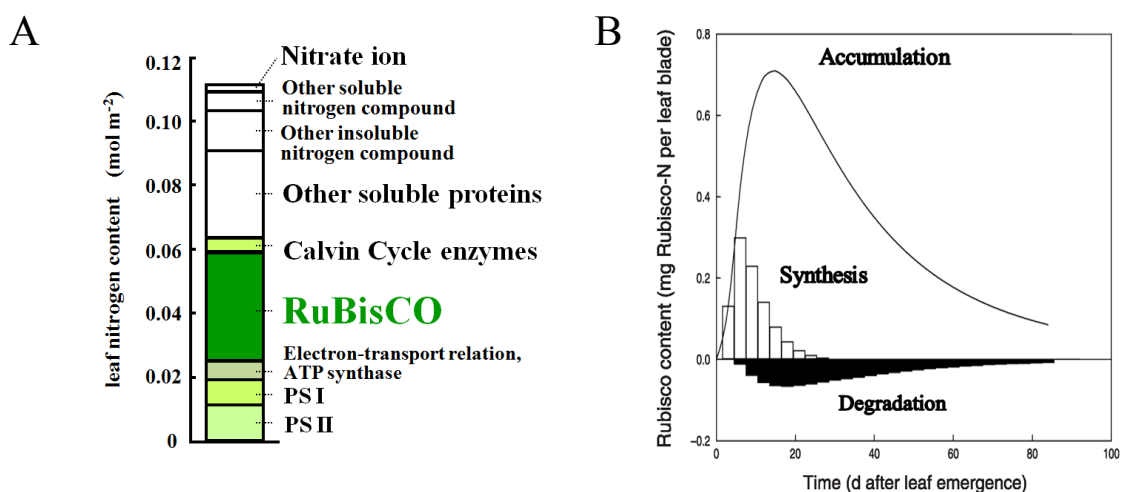
Calvin 回路の初発段階であるカルボキシラーゼ反応は、Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)が触媒している。RuBisCO は、Wildman らによって 1947 年に“Fraction I protein”として単離・命名された酵素であり、その後の 62 年間長きに渡る研究史において、酵素学的諸性質と生理学的重要性などが次々と明らかにされた(Portis and Parry 2007)。近年では光合成エンジニアリング(Yokota and Shigeoka, 2008)、光合成進化(Ashida et al., 2005)、そして以下に述べる様に葉緑体タンパク質の生合成モデルの 1 つとしてさらに脚光を浴びている。なおこの酵素の名称は、当初の Fraction I protein から carboxydismutase、RuBP carboxylase など様々なものに変化したが、1979 年の Wildman 退官講演にて Eisenberg がジョークとして呼んだ“RuBisCO”という愛称で定着した(Wildman et al., 2002)。

光合成速度は、光強度や温度などの様々な外的要因によって変動するが、 $C_3$  植物の個葉光合成モデル (Farquhar et al. 1980; Sharkey 1985)によると、現在の地球環境である大気  $CO_2$  分圧(0.038%  $CO_2$ )・強光条件下における光合成速度は、RuBisCO が触媒するカルボキシラーゼ反応によって律速されている。その原因として以下の 2 つが挙げられる。1 つ目は、RuBisCO のカルボキシラーゼ反応速度が( $C_3$  植物 RuBisCO の  $k_{cat}$  ( $CO_2$ )は 3.3/active site/s)、一般の酵素のそれと比べると極端に低いことである(Woodrow and Berry, 1988; Bowes, 1991)。2 つ目の理由は、RuBisCO オキシゲナーゼ反応によるカルボキシラーゼ反応の拮抗阻害である(Ogren, 2003)。オキシゲナーゼ反応は、RuBP に  $O_2$  を固定し 3-PGA と 2-phosphoglycolate (2-PG)を生成する反応であるが(Fig. 1-1)、RuBisCO の同一部位でカルボキシラーゼ反応と競合して起こる。現在の大气組成は  $O_2$  に富んでいるため、カルボキシラーゼ反応 2 回当たり 1 回のオキシゲナーゼ反応が起こる。2 分子の 2-PG は光呼吸代謝経路を経て 1 分子の PGA としてカルビン回路にリサイクルされるが、その過程で 1 分子の  $CO_2$  がミトコンドリア内に放出されてしまう。これは  $C_3$  植物で大規模に起こっている光呼吸という現象であり、固定した  $CO_2$  量の 25%を放出してしまう。以上の酵素特性の問題から、強光下の光合成は RuBisCO により律速されるが、対照的に、Calvin 回路を駆動するエネルギーが不足している弱光下では、光合成速度は RuBP の再生速度に律速される。



**Figure 1-1** 電子伝達系、ATP 合成系、CO<sub>2</sub> 同化系の共役から成り立つ光合成の模式図  
 葉緑体のチラコイド膜で、電子伝達系と ATP 合成系により生成された NADPH と ATP は、Calvin 回路と光呼吸経路の駆動力となる。Calvin 回路の代謝産物は、葉緑体のデンプン合成や細胞質におけるショ糖合成に用いられる。なお光呼吸代謝経路は、葉緑体・ペルオキシゾーム、ミトコンドリアの 3 区画に渡っており、光呼吸では CO<sub>2</sub> と同量の NH<sub>3</sub> がミトコンドリア内に放出される。枠線の緑は葉緑体、青はペルオキシゾーム、赤はミトコンドリアを示す。

強光条件下で生育した高い光合成活性を示す  $C_3$  植物葉では、RuBisCO を含めたカルビン回路酵素、PSI や PSII といった光化学系タンパク質、葉緑体 ATP synthase が大量に蓄積している(Fig. 1-2)。その程度は著しく、葉の全窒素量の約 60 % を占める。中でも、RuBisCO は、葉窒素量の 20-35 % (Evans, 1989)、葉可溶性タンパク質量では 25-60 % を占めるため(Ku et al., 1979)、世界で一番存在量が多いタンパク質としてみなされている(Ellis, 1979)。また  $C_3$  植物における RuBisCO 蓄積量は、*Zea mays* (*Z.mays*) などの  $C_4$  植物と比較して 2~5 倍、ラン藻や緑藻の 4~6 倍と多い(Ku et al., 1979; Yokota and Calvin, 1985, Makino et al., 2003)。このような RuBisCO を含めた光合成タンパク質の高蓄積を阻害した場合、植物の生長に甚大な負の影響を及ぼす。例えば、人為的に RuBisCO 蓄積量を減少させた *Nicotiana tabacum* (*N. tubucum*) では、その減少の程度に比例して光合成活性の低下、窒素量やアミノ酸レベルなどの低下を伴い、結果的に生育が抑制されてしまう(Hudson et al., 1992; Matt et al., 2002)。また *Cyt b6/f* の Rieske FeS subunit やカルビン回路酵素である GAPDH の量を大きく減少させた場合も、同様の生育阻害が起こる(Ruuska et al., 2000)。従って、RuBisCO を含めた光合成タンパク質の莫大な蓄積は、第一に光合成活性を最大限に発揮することに意義がある。RuBisCO に関しては高蓄積の第二の重要性として、窒素貯蔵が知られている(Feller., 2008)。例えば、高窒素条件下の *Malus domestica* Borkh は、RuBisCO を必要量以上に蓄積しており(Cheng and Fuchigami, 2001)、また *N. tubucum* 葉の老化時期では葉緑体タンパク質の中でも RuBisCO が先立って分解され、その産物は新しい器官形成に有効利用されることが示唆されている(Kato et al., 2004)。



**Figure 1-2.  $C_3$  植物における光合成タンパク質の大規模蓄積**

- A. *Chenopodium album* 葉における窒素の分配 (彦坂, 1999 より改変)。  
 B. *Oryza sativa* (*O.sativa*) 葉の一生における RuBisCO 合成量・分解量・蓄積量の推移 (Irving and Robinson, 2006 より改変)。

植物の光合成タンパク質の蓄積は、RuBisCO をモデルに、葉の成長や葉緑体の発達と関連付けて解析されている(Mullet, 1988, 1993; Sasaki et al.,1985; 1987; Irving and Robinson, 2006)。 *O.sativa* 葉の一生におけるその蓄積量は、葉原基からの葉の成長過程で徐々に増加し、葉の完全展開点の直前で最大値を示す(Fig. 1-2)。葉の成長過程では RuBisCO の分解活性が低く、この高蓄積は生合成の能力に大きく依存している。また葉緑体は、光合成機能を獲得したプラスチドの一形態であるが、プロプラスチド（あるいはエチオプラスチド）からの葉緑体への分化過程では光合成遺伝子の大規模な発現が起こり、その産物の蓄積が促進される。つまり植物、特に C<sub>3</sub> 植物は、葉緑体における RuBisCO を含めた光合成タンパク質の高蓄積を達成するために、光合成遺伝子発現の能力を進化の過程で強大に発達させてきたことが考えられる。

植物では、緑藻などと同様に、光合成装置といった葉緑体タンパク複合体を構成するサブユニットの遺伝子は、核と葉緑体のゲノムに分布している(Leister and Schneider, 2003)。本論で取り扱う *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*)を例にあげると、核には葉緑体移行シグナル（予測）を有する遺伝子が約 3100 あるが、葉緑体ゲノムには主に転写・翻訳系の基本要素と光合成に関連した遺伝子が 130 しか存在しない(Table. 1-1)。 RuBisCO は、大小のサブユニット 8 個ずつからなるヘテロ 16 量体(L8S8)で機能するが、葉緑体ゲノムに大サブユニット(LSU)をコードする遺伝子(*rbcL*)が、核ゲノムに小サブユニット(SSU)をコードする遺伝子(*RbcS*)ファミリーが存在している (*A.thaliana* は 4 個)。従って、後述する複雑な光合成遺伝子の大規模発現システムは、核、細胞質、葉緑体に亘る様々な細胞内機構の協調的な働きによって支持されおり(Fig. 1-3)、それは膨大な数の核遺伝子の機能によって制御されている。そして、それらによる遺伝子発現機構の活性化が、光合成タンパク質の高蓄積を促していると考えられる。

**Table 1-1.** *A.thaliana* の葉緑体遺伝子 (López-Juez and Pyke, 2005 より改変)

Functional Class	Representative Gene (Protein)	Number of Gene
<i>Transcription/translation</i>		
RNA polymerase	<i>rpoA</i> (RpoA), <i>rpoB</i> (RpoB)	4
Ribosomal protein	<i>rps16</i> (RPS16), <i>rpl22</i> (RPL22)	26
rRNA, tRNA	<i>rrn16</i> , <i>trnA</i>	8, 37
<i>Photosynthesis</i>		
RuBisCO	<i>rbcL</i> (LSU)	1
PSI, PSII, Cytob 6/f	<i>psaA</i> (PsaA), <i>psbA</i> (D1), <i>petD</i> (Cyt b6)	7, 15, 5
ATP synthase	<i>atpA</i> (ATP $\alpha$ ), <i>atpF</i> (ATPase subunit I)	7
<i>Others</i>		
NADH complex	<i>ndhA</i> (NdhA)	12
Protease	<i>clpP</i> (ClpP)	1
Lipid biosynthesis	<i>accD</i> (AccD)	1
Various	<i>ycf1</i> (FtsH?), <i>ycf2</i> (ABC?)	6



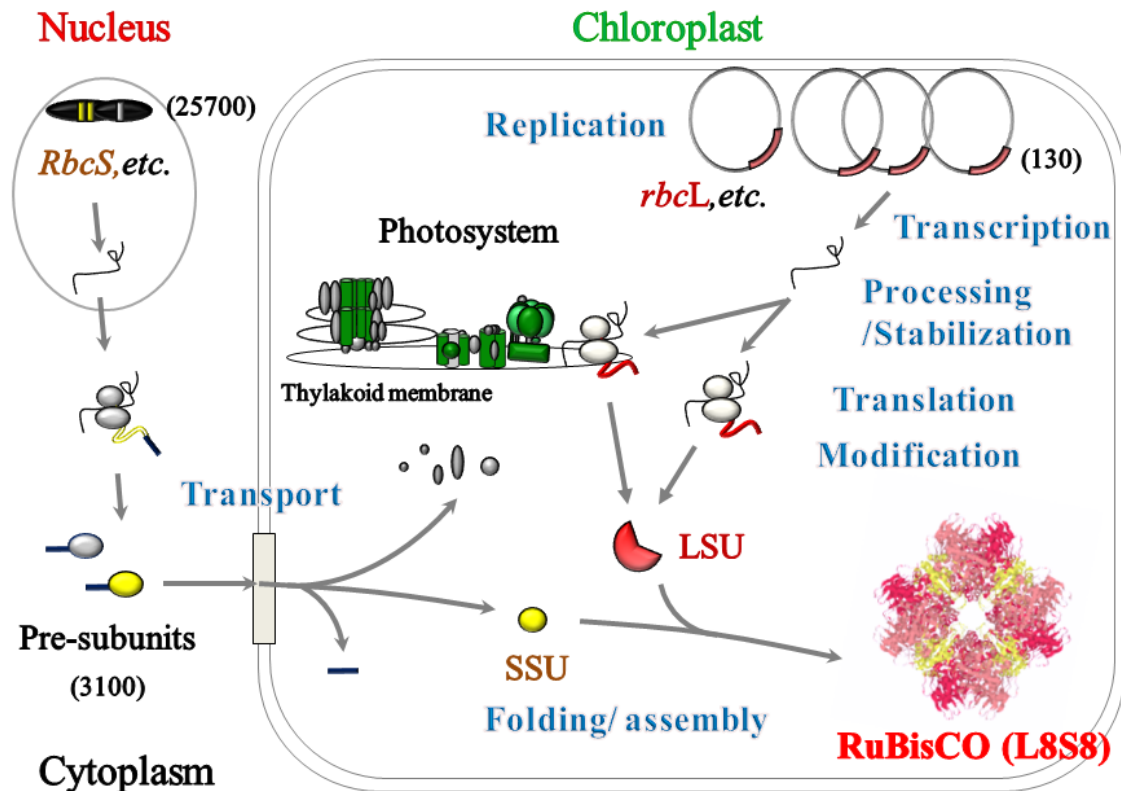


Figure 1-3. 植物の光合成遺伝子発現システムの基本概念図

光合成遺伝子発現システムは、核・細胞質・葉緑体の3区画に亘る。葉緑体ゲノムは一細胞当たり数千コピー存在し、若い組織では葉緑体内包膜に局在している。光合成遺伝子はモノあるいはポリシストロニックの単位で転写される。*rbcL*はモノシストロニックに転写される。光合成遺伝子のRNAの多くは、切断、スプライシング、エディティングなどプロセッシング過程を経て成熟型となる。植物の*rbcL*には、イントロン、エディティング部位は無い(一部の*Anthoceros formosae*の*rbcL*にのみエディティング部位が存在している(Freyer et al., 1997)ことを除く)。mRNAは、安定に葉緑体内に蓄積し、その後ストロマあるいはチラコイド膜に結合した70S ribosomeによってタンパク質に翻訳される。D1などの膜タンパク質はチラコイド膜で、LSUはチラコイド膜とストロマに局在する70S ribosomeの両者によって翻訳される。一方、核の光合成遺伝子の転写に由来するmRNAは、細胞質の80S ribosomeによって、葉緑体移行シグナル付属(N末端に)のタンパク質前駆体に翻訳される。前駆体は葉緑体内のストロマあるいはチラコイド膜などの局在場所に輸送されるが、その間にシグナルは除去される。後に葉緑体のサブユニットと順次複合体を形成し、高分子量の光合成装置を完成させる。またその過程で、様々なアミノ酸修飾を受ける。なお留意点として、この概念は、光合成遺伝子の発現に限定されるものではなく、ほとんどの葉緑体タンパク質の発現に適用される。

Figure 1-3 に示すように、植物の光合成遺伝子の発現システムに関わる研究は幅広く、核の光合成遺伝子の転写機構を除けば(e.g. Tyagi and Gaur, 2003)、葉緑体の遺伝子発現システムに研究の重点が置かれている(Mullet, 1993; Barkan and Goldschmidt-Clermont, 2000; Leister and Schneider, 2003; López-Juez and Pyke, 2005)。RuBisCO の場合、*rbcL* と *RbcS* 遺伝子の転写(Manzara and Gruissem, 1988; Shiina et al., 2005)、*rbcL* の翻訳(Zerges, 2000; Marin-Navarro et al. 2007)、SSU 前駆体の葉緑体膜輸送(Kessler and Schnell, 2006; Jarvis et al., 2008)、フォールディングと会合(Roy and Andrews, 2000)、LSU と SSU 翻訳後修飾(Houtz and Portis, 2003; Houtz et al., 2008)という過程に焦点を当てた研究が盛んである。このような発現段階は、光合成遺伝子発現が盛んな緑化過程などの時期において、光、葉緑体の発達、植物ホルモンなどの様々なシグナルによって活性化されていることが知られている。一般的に光は、プロプラスチド（あるいはエチオプラスチド）から葉緑体への分化に必須であるが、*RbcS* と *rbcL* といったいくつかの光合成遺伝子の転写を活性化し(Klein 1991; Kim et al., 2002)、またそれらの mRNA の翻訳を正に調節していることが報告されている(Kim and Mullet., 2003; Tang et al., 2003)。葉緑体の発達シグナルは、葉緑体が核の光合成遺伝子発現を同調させることに必要であり、様々なシグナル経路が想定されている(Gray et al., 2002; Kleine et al., 2009)。また葉緑体の発達は mRNA の安定性を向上させるが、葉緑体 mRNA の半減期は長く、特に *psbA* は 40 時間以上、*rbcL* は 15 時間であり、*E.coli* の mRNA の平均的な半減期が分単位であることと比べると格段に高いことが報告されている(Kim et al., 1993)。さらに発達した葉緑体では、光合成タンパク質前駆体の輸送に特異性を示す葉緑体外包膜輸送装置が大規模に構築される(Kubis et al., 2003; López-Juez and Pyke, 2005)。サイトカイニンは、細胞分裂の促進など様々な作用を示す植物ホルモンの一種であり、葉緑体光合成遺伝子の転写活性化(Zubo et al., 2008)、光合成色素の合成促進(Yaronskaya et al., 2006)、また PSII の集光装置である light-harvesting complex II (LHCP) の mRNA の安定性の向上に寄与することなどが知られている(Flores and Tobin, 1988)。これらの事例に加え、光合成の電子伝達活性に依存したチラコイド膜内外でのプロトン勾配の形成が光合成タンパク質の翻訳を促進することなどが報告されている(Muhlbauer and Eichacker, 1998)。また一方では、葉緑体ゲノムは、成熟した葉緑体当たりでは約 30~100 コピー、細胞あたりでは 1000~10000 コピー存在するため(Bowman et al., 1986, Zoschke et al., 2007)、光合成遺伝子の発現レベルの高維持にある程度貢献していると想定される。総合すると、植物は、光合成遺伝子の大規模発現を達成するために、環境や植物体の発達時期に合わせて、遺伝子発現の様々な段階を活性化しうる複雑な分子メカニズムを獲得していることが考えられる。

近年、光合成遺伝子の発現に関わる多くの核遺伝子が同定され、変異体

を用いて生体内の機能が調査された。そのいくつかは植物以外の他の生物にも普遍的に存在する遺伝子であったが、中には葉緑体に独特とも言える遺伝子もあった。例えば、葉緑体のmRNAの安定性やプロセッシング、エディティングに関わるPentatricopeptide repeat (PPR)タンパク質は、原核生物ではほとんど存在せず、*Homo sapiens*(*H.sapiens*)だと6個だが、陸上植物では450個(うち葉緑体に約100個)も存在する(Lurin et al., 2004; O'Toole et al., 2008; Pfalz et al., 2009)。これから非常に高度な転写後調節機構の存在が想定される。さらに興味深いことに、同定された核遺伝子は、葉緑体タンパク質の合成に普遍的に関与するもののみではなく、多くが以下の様な標的タンパク質への選択性や特異性を示すものであった。葉緑体の転写では、plastid-encoded RNA polymerase (PEP)が主に*rbcL*を含む光合成遺伝子全体と*rrn16*などの翻訳系の一部の遺伝子を転写するが、一方のnuclear-encoded RNA polymerase (NEP)は翻訳系の一部の遺伝子(PEPとある程度重複)と転写装置や光合成以外の代謝に関わる遺伝子の転写を担っている(Shiina et al., 2005)。また葉緑体の転写後段階では、*rbcL*ではほぼ不明だが、主に電子伝達系の遺伝子について、葉緑体RNAのプロセッシングやスプライシング、翻訳に様々な因子が特異的に作用することが明らかにされている(Barkan and Goldschmidt-Clermont, 2000; Marin-Navarro et al. 2007)。さらに葉緑体の包膜輸送においても、Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts (Toc)が複数のアイソザイムを用いて、主に光合成タンパク質の輸送と非光合成タンパク質の輸送を分別して行っていることが報告されている(Kubis et al., 2003; Kessler and Schnell, 2006)。従って植物は、個々の遺伝子を特異的、選択的、あるいは全体的に制御することで、実に複雑な光合成遺伝子の発現システムを構築しているものと想像される。

一方、RuBisCO高蓄積に関わる因子に焦点を当てると(Table. 1-2; 1-3)、翻訳後段階に関わる遺伝子の同定例は他の光合成タンパク質と比べて比較的多いが、*rbcL*の転写・転写後段階に関わる因子の同定例は少ない傾向にある。また同定された因子のほとんどが、RuBisCOに特異性を示さず、葉緑体の発達あるいは光合成に関連した他のタンパク質の発現にも必要とされる選択的または普遍的因子といえるものであった。唯一、Bundle sheath defective 2(BSD2)のみがLSUのフォールディングに関わる特異的シャペロンとして報告されている(Brutnell et al., 1999; Wostrikoff and Stern 2007)。すなわち現在の知見では、RuBisCO遺伝子の発現は、他の光合成遺伝子あるいは葉緑体関連遺伝子の発現システムと大部分が共通したシステムによって行われていると想定されている。しかしながら、これらの因子の知見のみでは、RuBisCOの高蓄積、およびその背景にある大規模発現システムを説明することはできない。近年報告されたRuBisCO高蓄積に関与するいくつかの機能未知なタンパク質の存在(Table. 1-3)、未だその関与が不明な

因子の存在(Table. 1-4)などを考慮すると、RuBisCOの遺伝子発現、あるいはRuBisCO遺伝子と他の光合成遺伝子の共発現に関わる分子機構は、想像以上に壮大であるものと推定される。従って、RuBisCOを含めた光合成タンパク質の大規模発現に関わる機構を包括的に理解するためには、今後より多くの制御因子を同定し、それが高蓄積にどの程度貢献しているのかを調べる必要がある。

そこで本研究では、RuBisCO高蓄積の達成に必要な遺伝子 (*genes necessary for the achievement of RuBisCO accumulation*, NARAと命名) の同定を通じて、RuBisCOを含めた光合成タンパク質の大規模発現に関わる新たな知見を得ることを目的に、RuBisCO高蓄積機構の正の遺伝学的解析を行った。第2章では、RuBisCO蓄積量が低下した*A.thaliana*の*nara*変異体の選抜法を確立した。さらにその方法で選抜した変異体の解析より、RuBisCO高蓄積に関わる新規遺伝子*NARA4*, *NARA5*を同定した。第3章、4章では、それぞれ*NARA4*と*NARA5*の遺伝子破壊株や形質転換体を用いて、RuBisCOを含めた葉緑体光合成遺伝子の大規模発現機構における*NARA4*と*NARA5*の生理学的重要性を示した。以上のことから、RuBisCO高蓄積機構におけるNARAタンパク質の機能的関連性を考察した。

Table 1-2. 高等植物 RuBisCO 高蓄積に寄与する遺伝子発現関連因子

Name	Annotation and/or Function	RuBisCO-related phenotype in mutant (or Feature) <sup>a</sup>	Reference
<b>Transcription</b>			
PEP( $\alpha\beta\beta'$ )	Plastid-encoded RNA polymerase.	<i>rbcL</i> mRNAが 検出限界以下	Allison et al, 1996 Hajdukiewicz et al, 1996
Sig6	Sigma factor 6 PEP systemの 認識特異性を決定	若子葉でのみ <i>rbcL</i> mRNA, 及びRuBisCO量の激減	Ishizaki et al., 2006
HY5, LAF1, HFR1	フィトクロム下流の Positive regulator	<i>RbcS</i> 転写の光誘導異常 ( <i>RbcS</i> プロモータに結合)	Chattopadhyay et al., 1998 Jang et al., 2007
<b>Translation</b>			
70S ribosome (e.g. L11, RPS17)	葉緑体Ribosome	RuBisCO量の減少	Pesaresi et al., 2001 Schultes et al., 2000
80S ribosome	細胞質Ribosome	(細胞質翻訳阻害剤で SSUの合成阻害、等)	Criddle et al., 1970
APG3	Ribosome release factor 1 葉緑体翻訳の遊離因子	RuBisCO量が 検出限界以下	Motohashi et al., 2007
<b>Transport</b>			
TOC components			
TOC33	光合成タンパク質 前駆体のレセプター	RuBisCO量が減少	Kubis et al., 2003
TOC159	光合成タンパク質 前駆体の膜輸送	RuBisCO量が 検出限界以下	Bauer et al., 2000
TIC components			
Tic21	内膜系の膜輸送	RuBisCO量が減少	Teng et al., 2006
Tic110	膜輸送チャネル	欠損株は胚致死 機能低下株では RuBisCO量が激減	Inaba et al., 2007
<b>Folding/assembly</b>			
Cpn60	葉緑体タンパク質の フォールディングと会合	アルビノ・奇形 (葉緑体翻訳系でRuBisCO 会合への関与を証明)	Cannon et al., 1986 Hubbs and Roy., 1993 Apuya et al., 2001
BSD2	RuBisCOLSU 特異的分子シャペロン	RuBisCO量が 検出限界以下	Brutnell et al., 1999 Wostrikoff and Stern., 2007
CYO1	葉緑体タンパク質の 分子シャペロン	子葉でのみRuBisCO 量が検出限界以下	Shimada et al., 2007
<b>Post-translational modification</b>			
SPP	葉緑体移行シグナル のペプチダーゼ	Antisense linesにて葉 緑体発達異常や致死 (pre-SSUを切断)	Zhong et al., 2003 Richter et al., 1998

<sup>a</sup> RuBisCOの高蓄積に寄与すると判断した欠損株(T-DNA挿入株)の表現型、またはその因子の特徴を示す。変異体のRuBisCO量に関して、WTの約30%だと減少、10%以下だと激減、0%だと検出限界以下と表記している（しかし定量的でなかったものに関しては、目視によるおおよその程度を示した）。

**Table 1-3. 高等植物 RuBisCO の高蓄積に寄与しているが、機能が未証明の因子**

Name	Annotation /Putative Function	RuBisCO-related phenotype in mutant <sup>a</sup>	Reference
<b>Transcription</b>			
pTAC2, 6, 12	PPR protein or 機能未知因子 (葉緑体遺伝子の転写?)	RuBisCO量の激減 <i>rbcL</i> mRNAの激減、	Pfalz et al, 2006
<b>Processing/ Stabilization (or transcription)</b>			
DAL	葉緑体の機能未知因子 (葉緑体mRNAの蓄積? 葉緑体rRNAプロセッシング?)	<i>rbcL</i> mRNA量の激減	Bisanz et al., 2003
CRS1	<i>atpF</i> RNAのイントロンスプライシング因子。(また葉緑体タンパク質の翻訳にも関与?)	RuBisCO量の減少 <i>rbcL</i> mRNAの翻訳異常	Till et al., 2001
PAC protein	葉緑体の機能未知因子 (葉緑体RNAの成熟化?)	<i>rbcL</i> mRNA量の激減	Meurer et al., 1998
<b>Translation</b>			
SCO1	Elongation factor G (葉緑体の翻訳伸長因子?)	幼苗でのみ RuBisCO量の激減	Albrecht et al., 2006
SecY	Translocon (チラコイド膜輸送に加え 翻訳にも関わる?)	RuBisCO量の激減	Roy and Barkan., 1998 Zhang et al., 2001
APG6	Hsp101 homolog (葉緑体タンパク質の翻訳?)	RuBisCO量の激減	Myouga et al., 2006
V2	Guanylate Kinase (葉緑体タンパク質の翻訳?)	RuBisCO量の激減	Sugimoto et al., 2004 Sugimoto et al., 2007
DCL	葉緑体の機能未知因子 (葉緑体rRNAプロセッシング?)	RuBisCO量の減少	Bellaoui et al., 2003

<sup>a</sup> RuBisCOの高蓄積に寄与すると判断した欠損株(T-DNA挿入株)の表現型、または点変異による機能低下株 (V2, SCO1)の表現型を示す。  
また変異体のRuBisCO量の減少に関しては、Table IIと同様に減少の程度を表記した。

Table 1-4. 高等植物 RuBisCO の高蓄積に寄与すると期待される因子の例

Name	Function	Reason <sup>a</sup>	Reference
<b>Genome replication</b>			
POP	Chloroplast DNA polymerase I	葉緑体に局在 複製に関与?	Mori et al., 2005
GDHs	葉緑体 DNA helicase	葉緑体に局在 複製に関与?	Tuteja et al., 2003.
GYRs	Chloroplast DNA gylase	葉緑体に局在 複製に関与?	Cho et al., 2004
RPA 70a	葉緑体Replication protein	葉緑体に局在 複製に関与?	Ishibashi et al., 2006
<b>Transcription</b>			
Sig1, 2, 3	PEP Systemの特異性決定	<i>In vitro</i> で、 <i>rbcL</i> プロモーターに結合	Hakimi et al., 2000 Privat et al., 2003
CDF1	遺伝子未決定 <i>rbcL</i> のトランス因子	<i>rbcL</i> プロモーターに結合	Lam et al, 1988
RLPB	遺伝子未決定 <i>rbcL</i> のトランス因子	光依存的に <i>rbcL</i> プロモーターに結合	Kim et al, 2002
pTACs (eg. pfkB)	機能未知因子	葉緑体転写活性画分に局在 PEPと相互作用	Pfalz et al, 2006 Suzuki et al., 2004
<b>Processing/ Stabilization (or translation)</b>			
cpRNPs	葉緑体RNA 結合タンパク質	<i>rbcL</i> mRNAと相互作用 <i>psbA</i> mRNAの安定化	Nakamura et al., 1999, 2001, 2004
p47	遺伝子未決定 <i>rbcL</i> 5'UTR 結合タンパク質	光依存的に5'UTRに結合	McCormac et al., 2001
DG1	PPR protein (葉緑体遺伝子の転写? 葉緑体mRNAの安定化?)	変異体において 葉緑体光合成遺伝子 のmRNA量の多くが減少	Chi et al., 2008
<b>Transport</b>			
Other TOC /TIC components (e.g. TOC75, TIC20)	トランスロコン	巨大な輸送装置を構築。	McCormac et al., 2001
<b>Folding and Assembly</b>			
<i>rbcX</i>	RuBisCO特異的 会合シャペロン	一部の藍藻変異株で RuBisCO量の減少	Onizuka et al., 2004 Saschenbrecker et al., 2007

<sup>a</sup> RuBisCOの高蓄積に寄与すると期待される理由を述べた。

## 第2章

### 正の遺伝学的手法による RuBisCO 高蓄積を担う NARA 遺伝子の同定

#### 2-1. 序論

植物におけるRuBisCOを含めた光合成遺伝子の大規模発現に関わる核遺伝子の同定は、1980年中盤に穏やかに始まり、1990年代後半からその報告数が劇的に増えた (Table 1-2, 1-3, 1-4)。これは、これまでに行われていた生化学的研究手法に加え、*A.thaliana*における遺伝学的解析の研究基盤が強大になったことに大きく起因している。その時代背景には、2000年の*A.thaliana*全ゲノム配列の決定、DNAマーカーやEST情報の蓄積、総合データベースやT-DNA挿入システムなどのリソースセンターの完備などが貢献している (Sato, 2001)。1990年代から現在までにおける光合成遺伝子発現の遺伝学的解析は、生化学的アプローチから同定された遺伝子、あるいは他の生物種のホモログに相当する遺伝子のT-DNA挿入等による遺伝子破壊株を用いた逆遺伝学的な解析と、光合成遺伝子の発現段階に異常を示す変異体を用いた正の遺伝学的解析に分けられる。特に正の遺伝学的解析は、主に、葉色の異常 (黄化、白色化、斑入り)、成長遅延といった視覚的な植物体の表現型に加え、クロロフィル蛍光観察やいくつかの特別な方法によって検出された植物体の表現型に着目し、それに関わる遺伝子座を同定したものである (Leister, 2003; Leister and Schneider, 2003)。中でもクロロフィル蛍光解析は、生葉を用いて光合成電子伝達系の酸化還元状態を評価することが可能であるため、電子伝達系で機能する光合成タンパク質やその遺伝子発現制御に関わる遺伝子の植物変異体を能率よく単離することに大きく利用された (Miles., 1980; Meurer et al., 1996; Nyogi et al., 1998; Shikanai., et al., 1999)。また同定された遺伝子には機能未知のものが多く含まれていた (Table, 1-3)。この事実は、逆遺伝学的な視点からでは機能の予測が困難な遺伝子の単離とその生体内における役割を知る上で、正の遺伝学的手法が強力な研究手法の1つであることを意味している。

一方、現在のRuBisCOの遺伝子発現制御に関わる因子の同定は、生化学、逆遺伝学、また上記の様なRuBisCOに非特異的な正の遺伝学的アプローチによる研究の成果であり、これまでにRuBisCO高蓄積機構に焦点を当てた正の遺伝学的解析は行われていない。それ故に、RuBisCO高蓄積に寄与すると証明された新規遺伝子の数は少ないのが現状である (Table. 1-3)。そこで本章では、RuBisCO高蓄積機構の新たな知見を得ることを目的に、RuBisCO高蓄積に異常を示す *A.thaliana* 変異体の選抜法の確立と単離、変異遺伝子座の同定という正の遺伝学的解析を行い、RuBisCO高蓄積に寄与するNARA遺伝子を同定した。



## 2-2. 材料と方法

### ・試薬

購入会社を特に規定していない試薬は、Nakalai (Tokyo, Japan)より購入した。

### ・植物材料

*A. thaliana* Columbia (Col-0)、*rca* 変異体 (Somerville et al., 1982; Orozco et al., 1993)、*nara3*, -4, -5, -7 変異体、T-DNA タグラインである *AtCrsl-1*(Asakura and Barkan, 2006; SALK\_026861.48.35.x)、またトランスポゾンタグラインである *atpD* (JIC SM line Stock # CS175097)および T-DNA タグライン *AtpC1* (GABI-KAT line ID 837B04)を用いた。*AtpD* が Ler バックグラウンドであることを除き、これらの株は全て Col-0 バックグラウンドである。*nara* の変異型、T-DNA あるいはトランスポゾンタグラインの遺伝子型に関しては、全てホモ接合体のものを用いた。バッククロスに関して、他で特に規定していなければ、*nara* 変異体は3回、それ以外は1回行ったものを用いた。T-DNA とトランスポゾンのタグラインは、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)より購入した。*rca* 変異体は、Archie R. Portis, Jr 博士 (University of Illinois) より分与頂いた。

### ・生育条件

植物体生育用の培地には、図のレジェンドで特に規定していなければ、Murashige and Skoog (MS) 培地用混合塩類 (和光純薬, 大阪), 3 % (w/v) sucrose, 43 mM MES (pH 5,7), 0.8  $\mu$ M nicotinic acid, 0.4  $\mu$ M pyridoxine hydrochloride, 2.4  $\mu$ M thiamine hydrochloride, 553  $\mu$ M myo-inositol, 0.8 % (w/v) agar の組成の MS 培地を用いた。

植物体の生育環境は、他で特に規定していなければ、大気、弱光条件 50  $\mu$ mol photons  $m^{-2} s^{-1}$  (light 20 h/ dark 4 h)、24°C に設定した。

### ・変異体スクリーニング

EMS により突然変異誘起処理した *A. thaliana* の変異体 M2 種子(Lehle Seeds, TX, USA) を、選抜培地 [ 20 mM  $NH_4NO_3$  と 19 mM  $KNO_3$  を除いた Murashige and Skoog (MS) 培地用混合塩類, 50  $\mu$ M MSX, 30 mM Glutamine, 3 % (w/v) sucrose, 43 mM MES (pH 5,7), 0.8  $\mu$ M nicotinic acid, 0.4  $\mu$ M pyridoxine hydrochloride, 2.4  $\mu$ M thiamine hydrochloride, 553  $\mu$ M myo-inositol, 0.8 % (w/v) agar ] に播種した。種子は 1 plate (90 $\phi$ ×20 mm)当たり、40~50 粒 を均一に播種した。植物体は初めに、5%  $CO_2$ 、弱光 50  $\mu$ mol photons  $m^{-2} s^{-1}$  (白色灯)、光周期 20 h/4 h、23°C の環境条件(プレ選抜条件)で2~3週間生育させた。後に plate を、大気下、強光 130~190  $\mu$ mol photons  $m^{-2} s^{-1}$  (白色灯)、連続照射下の環境条件(選抜条件)下に移し、MSX 耐性を示す個体を選抜した。その際、同条件下で生育させた *rca* 変異体の外観を、MSX 耐性と判断する指標

とした。MSX 耐性株はその後、MSX を除いた選抜培地で生育させ、後に土 (Metro-Mix 350, Scot-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, OH, USA) に移植し自植種子を回収した。

#### ・ $\text{NH}_4^+$ の定量

植物体地上部における生重量当たりの  $\text{NH}_4^+$  の蓄積量は、De Block et al. 1987 の方法を用いて測定した。材料には、プレ選抜条件下において、選抜培地で 2 週間(0 h)生育した野生株と *rca* 変異体の地上部、及びそれら植物体を選抜条件下に 20 h, 50 h 静置した植物体の地上部を用いた。

#### ・ RuBisCO 活性と RuBisCO 量の測定

液体窒素で凍結した植物体地上部を乳鉢で破碎し、抽出バッファー[50 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1mM DTT, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , and 2mM PMSF] に溶解した。粗抽出液中の RuBisCO 活性は、Sharkey et al (1991)の方法に従い、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と phosphoglycerate kinase (PGK)を用いた RuBisCO 活性と NADH の酸化反応を共役した酵素カップリング法により定量した。測定条件は以下のように変更した。酵素反応液は、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2 mM RuBP, 0.2 mM NADH, 1 mM ATP, 5 mM creatine phosphate, 10 U creatine kinase, 40 U PGK, and 40 U GAPDH の組成で調製した。RuBisCO initial activity は、粗抽出液を 4°C、18800g で 10 秒間遠心分離を行うことで得られた上清を用いて測定した。活性値は、反応開始後 30 秒間における NADH の消費速度から算出した。RuBisCO total activity は、上清を 20 mM  $\text{MgCl}_2$  と 20mM  $\text{NaHCO}_3$  と室温で 10 分間インキュベートし、得られた活性型 RuBisCO を用いて測定した。タンパク質定量は、Bradford 法(Bradford,1976)で行い、牛血清アルブミンをスタンダードとして用いた。

RuBisCO ホロ酵素を定量するために、液体窒素で凍結した植物体地上部を乳鉢で破碎し、抽出バッファー[50 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1mM DTT, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , Protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Mannheim, Germany)]に溶解した。細胞破碎液を 4°C、18800g で 20 分間遠心分離を行った。上清のタンパク質を Bradford 法で定量し、2  $\mu\text{g}$  の可溶性タンパク質を 4°C、3-10%グラジエントゲル(PAGEL NPG-310L, ATTO Co, Tokyo, Japan)で分離し、Coomassie brilliant blue R-250 により染色した。RuBisCO LSU に相当する 53 kDa のバンド強度を NIH image (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)を用いて定量した。求めた値は、野生株を 100%とした時の相対値で示した。

#### ・ *nara* のマップベースクローニング

*nara* 劣勢変異体を異なるエコタイプである Landsberg *erecta* (Ler)に外部交配し、F1 個体を得た。その F1 個体の自植により得られた F2 子孫において、野生型の表現型を示した株及び、それぞれの *nara* 変異体の見かけの表現型 (*nara3* 変異体; 矮小・斑入り、*nara5* 変異体;

矮小・黄化、*nara7* 変異体; 矮小・黄化、*nara10* 変異体; 矮小・黄化) を示した株の個体数を調べ、分離比を求めた。これらの F2 個体の芽生えから、簡易 DNA 抽出法(Edwards et al., 1991)によりゲノム DNA を抽出し、PCR の鋳型として用いた。変位部位のマッピングは、*nara3* 変異体の F2 子孫 571 個体、*nara4* 変異体の F2 子孫 840 個体、*nara5* 変異体の F2 子孫 557 個体、*nara7* 変異体の F2 子孫 789 個体を用いて行った。マッピングに用いたプライマーは、本学の形質発現植物学講座より、マッピング支援データベースシステム、NARAMAPS に登録されている Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLP) と Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)プライマーを分与頂いた。*nara3* 遺伝子座は、5 番染色体の分子マーカーF1N13 と T21H19 に挟まれた 42kbp のゲノム領域にマップされた。この領域に存在する 4 つの遺伝子(*At5g16130*, *At5g16140*, *At5g16150*, *At5g16180*)に対する特異的プライマーを作製し、シーケンスにより変異を同定した。*nara4* 遺伝子座は、1 番染色体の分子マーカーT23E23 と F3I6 に挟まれた 56 kbp のゲノム領域にマップされた。この領域に存在する 27 の遺伝子(*Atlg23990*, *Atlg24000*, *Atlg24010*, *Atlg24020*, *Atlg24030*, *Atlg24040*, *Atlg24050*, *Atlg24060*, *Atlg24070*, *Atlg24090*, *Atlg24105*, *Atlg24100*, *Atlg24110*, *Atlg24120*, *Atlg24130*, *Atlg24140*, *Atlg24150*, *Atlg24160*, *Atlg24170*, *Atlg24180*, *Atlg24190*, *Atlg24200*, *Atlg24210*, *Atlg24230*, *Atlg24240*, *Atlg24250*, *Atlg24260*) に対する特異的プライマーを作製し、シーケンスにより変異を決定した。*nara5* 遺伝子座は、4 番染色体の分子マーカーM4I22 と T27E11 に挟まれた約 120 kbp のゲノム領域にマップされた。この領域に存在する 5 つの遺伝子(*At4g27340*, *At4g27440*, *At4g27585*, *At4g27600*, *At4g27670*)に対するプライマーを用いたシーケンス解析により、*At4g27600* 上の変異を同定した。*nara7* 遺伝子座は、2 番染色体の分子マーカーF14P14 と T22C12 に挟まれた 1.3Mbp のゲノム領域にマップされた。この領域に存在する遺伝子、*At2g13360* に対する特異的プライマーを作製し、シーケンスにより変異を同定した。

#### ・遺伝子のシーケンス

*nara* 変異体地上部から DNeasy Plant Mini Kit™(QIAGEN)を用いてゲノム DNA を精製し、遺伝子配列特異的プライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物をエタノール沈澱により精製し、Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) と ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。各方法は付属のプロトコールに従って行った。

#### ・RNA 抽出

発芽後 14 日目の野生株地上部から、RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を用いて、Total RNA を調整した。続いて Total RNA を DNase I (FPLC pure, Amersham)で 37 °C、30 min 処理し、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱により精製した。

#### ・半定量的 RT-PCR

Total RNA 0.5 µg を鋳型に ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。逆転写反応のプライマーは、核遺伝子のみを調べる場合では Oligo-dT primer を用いて行い、葉緑体遺伝子の転写産物量も調べる場合には Random primer (Toyobo) を用いた。合成した cDNA を 1µl を鋳型に以下のプライマーを用いて PCR を行った。

*AtCRS1*, 5'-TTGTGAGGTCTTTGTTCTGCTCT-3'/5'-ACACAACCAAGCCTCCAGTC-3'.

*rbcL*, 5'-TGACCGAGATCTTTGGAGATGA-3'/5'-CAAGATCACGTCCCTCATTACG-3'.

*atpF*, 5'-AACCGATTCTTTTCGTTTACTTGGG-3'/5'-TCCTATAGCTCCTTGTAAGCTTG-3'.

*Act8*, 5'-GACATCGTTTCCATGACGGGATCA-3'/5'-CGCTGTAACCGGAAAGTTTCTCAC-3'.

PCR 反応のサイクル数は、*AtCRS1* が 30 Cycles、*rbcL* が 20 Cycles、*atpF* が 30 Cycles、*Act8* が 26 Cycles で行った。その後、PCR 反応液をアガロースゲルに同量アプライし、増幅断片を電気泳動により分離後に Ethidium Bromide で染色した。

#### ・ウエスタンブロッティング

液体窒素で凍結した植物体地上部を乳鉢で破碎し、抽出バッファー [50 mM Hepes-KOH (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2 mM PMSF] に溶解した。粗抽出液を 4°C、18800g で 30 分間遠心分離を行い、得られた上清を可溶性タンパク質とした。沈澱を抽出バッファーで懸濁後に遠心分離を再度行う洗浄操作を 2 回繰り返す、Buffer E [125 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>] に溶解したものを不溶性タンパク質とした。可溶性タンパク質は Bradford 法で定量し、不溶性タンパク質は EZ 法 (Martínez-García et al., 1999) によって定量した。可溶性及び不溶性タンパク質を 12.5% SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan) にゼミドライ式ブロッティング装置 (NA-1512, Nihon-Eido, Tokyo, Japan) を用いて転写した。一次抗体に関して、可溶性タンパク質には anti-RuBisCO LSU、不溶性タンパク質には anti-ATP gamma subunit を用いた。二次抗体には goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Funakoshi, Tokyo) を用いた。検出は、ECL-Plus Kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) で付属のプロトコールに従って行った。

## 2-3. 結果

### ・ RuBisCO 蓄積量が低下した *A. thaliana* 変異体の選抜法の確立

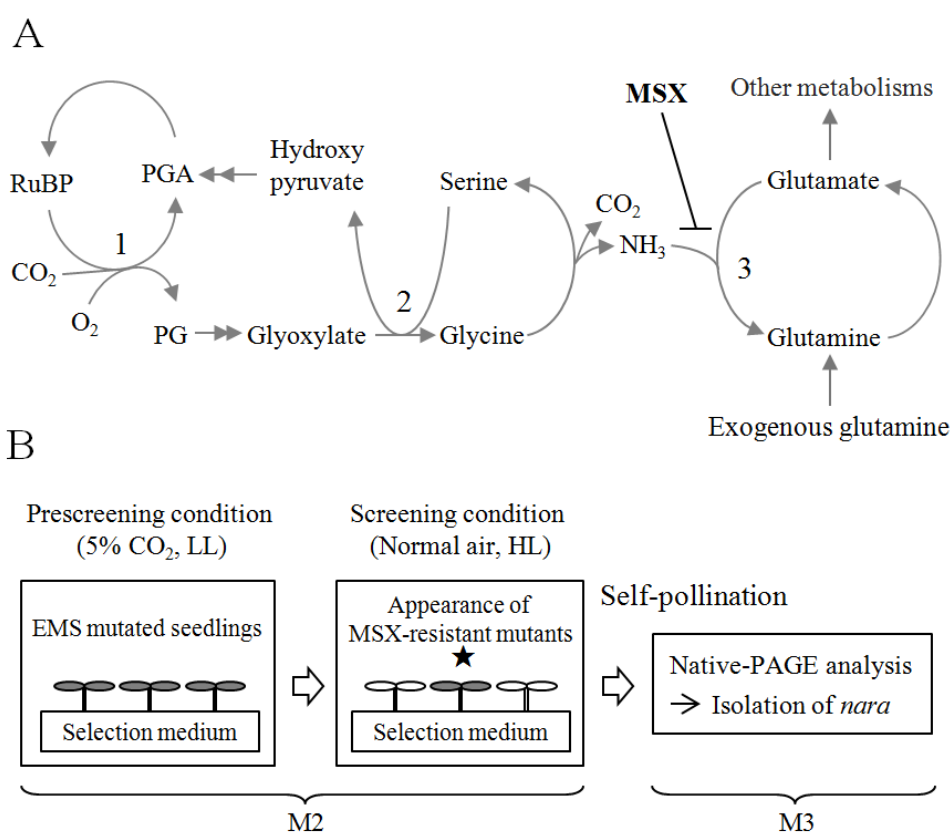
RuBisCO 蓄積量が低下した変異体の効率的な選抜には、RuBisCO 蓄積量の低下を簡便にモニターできる実験系が望ましい。そこで本論では、窒素代謝の鍵酵素 Glutamine synthetase(GS)の特異的阻害剤 Methionine sulfoximine(MSX)に対する植物の耐性を指標とした RuBisCO 蓄積量低下株のポジティブ選抜法を策定した(Fig. 2-1)。

本法は以下のような光呼吸窒素代謝の生理と植物生育への MSX の阻害作用に基づいている(Fig. 2-1A)。RuBisCO オキシゲナーゼ反応を初発とした光呼吸では、CO<sub>2</sub> と同時に膨大量の NH<sub>3</sub> が放出される。この光呼吸は植物葉内の最も規模の大きい NH<sub>3</sub> 生成源として知られる(Keys et al.,1978; Frantz et al., 1982)。高濃度の NH<sub>3</sub> とそのイオン化形態である NH<sub>4</sub><sup>+</sup>は植物の生育に有害であるため(van der Eerden, 1982; Britto and Kronzucker 2002)、光呼吸由来の NH<sub>3</sub> は GS によってグルタミン酸に速やかに再同化され、生成したグルタミンは様々な代謝反応に用いられる。また GS は、この光呼吸 NH<sub>3</sub> の再同化以外に、光呼吸の次に規模が大きい NH<sub>3</sub> 放出源である亜硝酸還元由来の NH<sub>3</sub> のグルタミン酸への同化も担っている。以上を踏まえて、培地中の栄養源から硝酸といった無機窒素を除き、代替窒素源としてグルタミンを添加した限定条件下を設定すると、細胞内に放出される NH<sub>3</sub> の大部分が RuBisCO オキシゲナーゼ活性に依存する光呼吸に由来すると想定される。さらにこの条件下にて、光呼吸 NH<sub>3</sub> の GS による再固定反応を MSX により阻害した場合、細胞内に光呼吸 NH<sub>3</sub> が RuBisCO オキシゲナーゼ活性依存的に蓄積すると予想される(Fig. 2-1A)。すなわち、この条件下では、大量に RuBisCO を含む野生株は、光呼吸 NH<sub>3</sub> の過剰蓄積を引き起こし枯死に至るが、RuBisCO 量や活性が低下した変異体は、RuBisCO 活性の低下に起因して光呼吸 NH<sub>3</sub> の生成量が低下するため、MSX 耐性を示すと考えられる。これらの仮説が正しい場合、RuBisCO オキシゲナーゼ活性を CO<sub>2</sub> 分圧の変化によって制御することで、植物成長に対する MSX の阻害的効果を条件的に付与することが可能な選抜系を確立できるはずである(Fig. 2-1B)。

選抜法の実現可能性を検証するために、まず 5% CO<sub>2</sub> 及び 0.037%CO<sub>2</sub> (大気)条件下、50 μM MSX と 30 mM Glutamine を含有した培地 (選抜培地) における野生株の生育を観察した。なお 5% CO<sub>2</sub> 条件下では、CO<sub>2</sub> による拮抗阻害により、RuBisCO のオキシゲナーゼ反応がほぼ完全に抑制される。5% CO<sub>2</sub> 下では、光条件に関係なく、野生株の生育に MSX の阻害効果は全く見られなかった(Fig. 2-2 left, 2-3A)。これは高 CO<sub>2</sub> 濃度によって RuBisCO のオキシゲナーゼ活性が抑制されると、植物の生育に MSX が阻害的な影響を示さないことを示唆している。

それとは対照的に、大気・強光下（選抜条件）にそれらに移した時、野生株の葉が約 100 時間後にクロロシスを示した(Fig. 2-2, 2-3A)。一方、弱光下に設定した選抜条件下では生育が阻害されるものの、枯死には至らなかった(Fig. 2-3B)。これは光強度が強いほど RuBisCO 活性が高い値を示すことに起因していると考えられ(Salvucci et al.,1985)、*A.thaliana* に MSX の阻害的効果を付与するには、ある程度の強い光強度が必要なことがわかった。

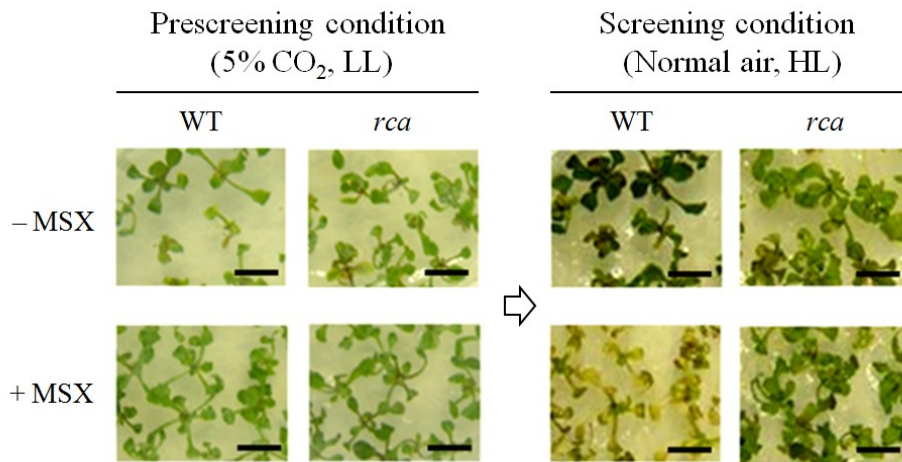
以上から、光強度と CO<sub>2</sub> 分圧の調節することで、野生株への MSX の致死的效果を制御できることが示された。



**Figure 2-1. NARA 変異体選抜法の基本概念図**

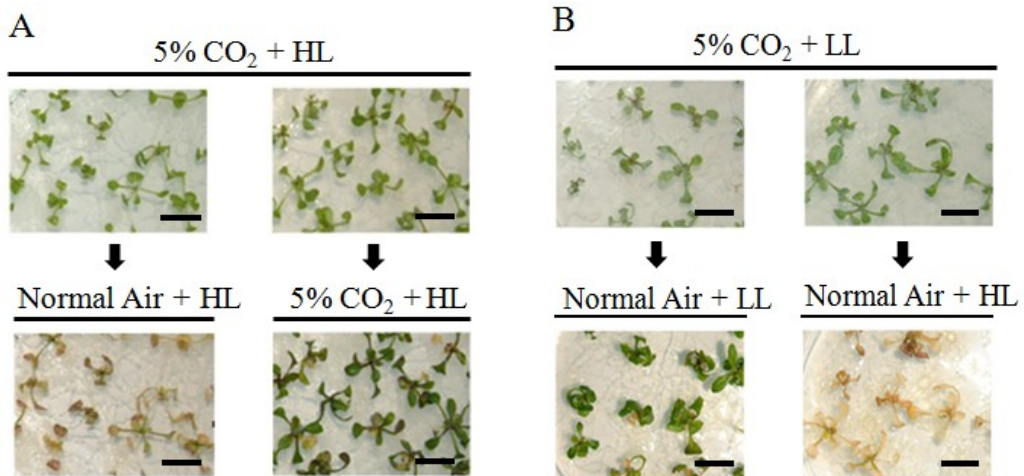
A. 選抜条件下における光呼吸窒素代謝のスキーム。外部からの無機素源の供給を断ち Glutamine を窒素栄養とした条件下、光呼吸（青）由来の NH<sub>3</sub> の同化経路を MSX（赤）で阻害すると RuBisCO のオキシゲナーゼ反応を初発とする光呼吸依存的に NH<sub>3</sub> が蓄積する。番号は、本論における主要酵素 1. RuBisCO, 2. AGT1, 3. GS の触媒段階を示す。B. NARA 変異体選抜の作業工程。変異体を選抜培地に播種し、プレ選抜条件下で 2 週間～3 週間生育させる。選抜条件下に移し、100～150 時間置いた後に、MSX 耐性を示した変異体を選抜する。次世代株を用いて RuBisCO 量を解析する。HL は High light, LL は Low light, Normal air は大気条件を示す。

A



**Figure 2-2. RuBisCO オキシゲナーゼ活性に依存した MSX の致死効果**

MSX を非含有(上)、含有(下)の選抜培地において、プレ選抜条件下で野生株と *rca* 変異体を 2 週間生育させ(左)、それを大気・150  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (High Light, HL) 条件下に移し、100 時間静置した(右)。



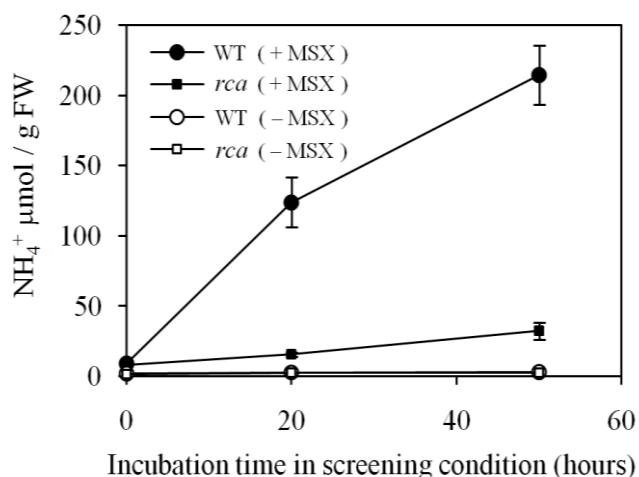
**Figure 2-3. CO<sub>2</sub> 濃度及び光強度に依存した植物生育に対する MSX の阻害作用**

A. CO<sub>2</sub> 濃度に依存した MSX の阻害作用。5% CO<sub>2</sub>・HL で 2 週間生育させた野生株を、大気・HL あるいは 5% CO<sub>2</sub>・HL に 120 時間置いた。B. 光強度に依存した MSX の阻害作用。5% CO<sub>2</sub>・LL で 2 週間生育させた野生株を、大気・LL あるいは大気・HL に 120 時間置いた。

選抜条件下において、RuBisCO 活性が低下した変異体が MSX 耐性を示すかどうか検証するために、ポジティブコントロールとして *rca* 変異体への MSX の影響を観察した(Fig. 2-2)。*rca* 変異体は、RuBisCO 特異的活性化因子 RuBisCO activase の欠損株である(Somerville et al., 1982)。通常、光強度の上昇に伴って、野生株では RuBisCO activase の作用により RuBisCO が高い活性値を示すが、この変異体ではこの活性化因子が存在しないため、低い活性値を示す。結果、選抜培地において、RuBisCO オキシゲナーゼ反応が抑制されるプレ選抜条件では、野生株と同様に *rca* 変異体の生育に MSX の阻害的な影響は全く見られなかった(Fig. 2-2. left)。一方、RuBisCO オキシゲナーゼ反応が起こる選抜条件では、野生株は枯死に至るのに対し、*rca* 変異体は生存していた(Fig. 2-2. right)。この結果は、生体内の RuBisCO 活性の低下が、*A.thaliana* に MSX 耐性を付与することを実証している。

選抜条件下において、上述した仮説通りに、NH<sub>3</sub> 蓄積量が RuBisCO 活性に依存して変化するかどうか検証した。そこで野生株と *rca* 変異体をプレ選抜条件下で 2 週間生育させ(0 h)、それらを選抜条件に 20、50 時間 (20, 50 h) 移した時の地上部の NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 蓄積量を酵素学的手法により測定した(Fig. 2-4)。プレ選抜条件下では、各植物体の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>蓄積量が約 5 μmol gFW<sup>-1</sup> と低かった。一方、各植物体を選抜条件に 50 時間曝すと、野生株の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>蓄積量は約 210 μmol gFW<sup>-1</sup> に増加したが、*rca* 変異体の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>蓄積量は約 30 μmol gFW<sup>-1</sup> とわずかにしか増加しなかった。生育条件はやや異なるが、この NH<sub>4</sub><sup>+</sup>蓄積量の減少率は、Salvucci et al (1985) により調べられた野生株の RuBisCO 活性に対する *rca* 変異体の RuBisCO 活性の減少率とほぼ一致した。さらに、この大気下における野生株の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>蓄積速度は約 4 μmol (g fresh weight)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> であり、これは *A.thaliana* 葉ディスクで見積もられた光呼吸速度 6.5 μmol (g fresh weight)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> と近い値であった(Sweetlove., 2006)。従ってこの結果は、本選抜条件では RuBisCO オキシゲナーゼ活性に依存して細胞内に NH<sub>3</sub> が高蓄積することを示している。

**Figure 2-4.**  
選抜条件下に 0, 20, 50 時間置いた時の野生株と *rca* 変異体の地上部における NH<sub>4</sub><sup>+</sup>蓄積量の推移  
データは 3 サンプル (2~5 個の地上部) の平均±標準偏差を示した

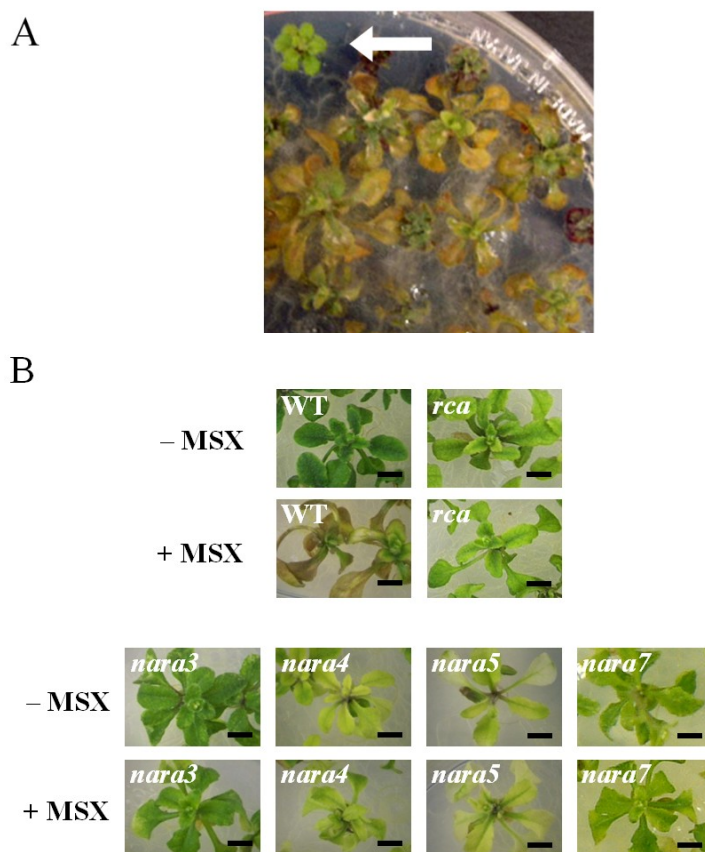




### ・ RuBisCO 蓄積量が低下した NARA 変異体の選抜

RuBisCO 蓄積量が低下した変異体の候補を選抜するために、およそ 13,000 粒の *A.thaliana* の EMS 突然変異 M2 種子を選抜培地に播種し、選抜条件で MSX 耐性を示す変異体を単離した(Fig. 2-5)。MSX 耐性株の出現頻度はおよそ 1~2 個/1000 個体であったが、多数が自植種子の取得を目的としたその後の土壌での生育過程で枯死、あるいは不稔性を示した。この原因の 1 つとして、これらの株は、多くが矮小・黄化という表現型を示したため、光独立栄養成長を要求される土壌では生育することができなかつたのかもしれない。この点に関しては、従属栄養条件で種子を取得するなどの改良の余地がある。

最終的に、8 個の MSX 耐性株の自植種子を取得し、M3 子孫を用いて MSX 耐性の再現性を確認した(Fig. 2-5)。



**Figure 2-5. NARA 変異体の選抜。**

写真は、選抜条件下にて 120 時間静置した代表的な *nara* 変異体を示す。

A. M2 世代における MSX 耐性株の選抜の例。矢印は MSX 耐性株。

B. M3 世代における *nara3*, *nara4*, *nara5*, *nara7* の MSX 耐性。Bars = 3mm。

本論では、見かけの変異形質 (*nara3*, 矮少・斑入り ; *nara4*, 矮小・黄化 ; *nara5*, 矮小・黄化 ; *nara7*, 矮小・黄化) が(Fig. 2-5)、全子孫において一様に安定して観察された4つのMSX耐性株に関して、詳細に解析を行った。これらの耐性株は、Lerとの外部交配より得られたF2子孫の分離比が野生型3:変異体1であったため、1つの核遺伝子座に変異を有する劣性変異体であることが示唆された(Table. 2-1)。これらの変異体表現型とMSX耐性の関連を知るために、変異体地上部の生重量とRuBisCO L8S8の蓄積量を解析し野生株と比較した(Fig. 2-6)。その結果、4つの変異体全てが、生重量が低下し、RuBisCO L8S8の量が約15~60%に低下していた。さらにこれらの変異体とは別に、劣性変異体ではなかった他の4つのMSX耐性株も同様にRuBisCO量が減少していた(data not shown)。一方、これらの変異体のRuBisCO活性化率は、*rca*変異体の様に大きく低下していないことがわかった。以上のことは、これらの変異体がRuBisCO蓄積量の低下が原因でMSX耐性を示したことを示唆している。またこれらの変異体はRuBisCO高蓄積に必要な遺伝子に変異を有していることが考えられる。そこで、これらの変異体を、RuBisCO高蓄積に必要な遺伝子 *gene necessary for the achievement of RuBisCO accumulation (NARA)*に変異を有する *nara* 変異体と命名した。

Figure 2-6.

***nara* 変異体(M3世代)の表現型**

材料はMS培地で2週間生育させた植物体の地上部を用いた。

A. 生重量 (n = 10)

値は野生株の生重量を100%とした時の相対値を示す。

B. RuBisCO L8S8量と活性化率

(n = 3). 全L8S8量の値は、野生株を100%とした時の相対値を示す。

活性化率は、RuBisCOの  
Initial activity/ Total activity

から求めた。活性化率は、  
全RuBisCO L8S8量(Total)の中で、  
活性化されているRuBisCO L8S8  
量(Active)の割合を示している。

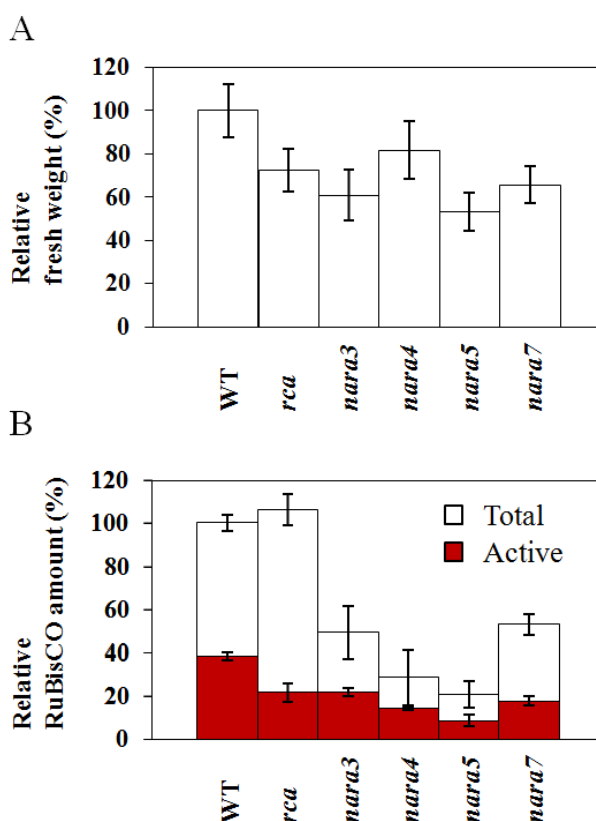


Table 2-1. F<sub>2</sub> 子孫における *nara* 変異体の分離比。

Name	Numbers of F <sub>2</sub> seedlings			$\chi^2$ value <sup>a</sup>
	WT	Mut	Total	
<i>nara3</i>	375	117	492	0.39 <sup>b</sup>
<i>nara4</i>	388	117	505	0.93 <sup>b</sup>
<i>nara5</i>	418	128	546	0.71 <sup>b</sup>
<i>nara7</i>	412	149	561	0.93 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $\chi^2$  values were calculated based on the expected ratio of 3:1 segregation.

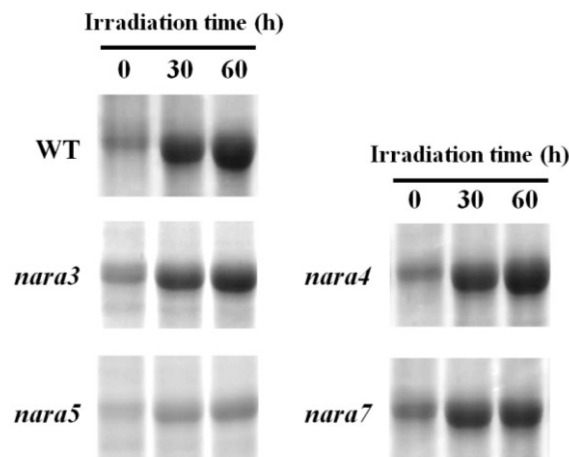
<sup>b</sup>: P > 0.05.

### ・ *nara* 変異体における RuBisCO 蓄積パターン

*nara* 変異体の生育過程において、RuBisCO 蓄積量がどのような経緯で減少したのかを知るために、*nara3*, -4, -5, -7 変異体の暗所芽生え(子葉)に光を照射し、その緑化過程における RuBisCO LSU の蓄積パターンを調査した(Fig. 2-7)。野生株の LSU の蓄積量は緑化過程で著しく増加したが、変異体における LSU の蓄積パターンは以下の用に様々であった。野生株と比較して、*nara3* 変異体では光照射後に LSU 蓄積量が低下し、*nara4* 変異体では大きな異常が観察されず、*nara5* 変異体では暗所芽生え及びその緑化過程で常に LSU 蓄積量が低下し、*nara7* では光照射後 60 時間経過してから LSU 蓄積量が低下するという傾向にあった。このような異なる RuBisCO 蓄積パターンは、これらの *nara* 変異体における RuBisCO 蓄積量の低下の原因が異なる遺伝子座の変異とその影響の仕方にあることを示唆している。なお植物生体内では、RuBisCO の LSU と SSU の量比は厳密に制御されており、LSU は葉緑体で過剰に合成されないように翻訳段階で調節され、L8S8 複合体以外の余った SSU は速やかに分解されることが知られている(Rodermel et al., 1999)。*nara* 変異体においても、サブユニット量比の異常は全く見られなく(data not shown)、この LSU 量の低下は RuBisCOL8S8 量の変化を反映しているものとみなされる。

Figure 2-7. *nara* 変異体の子葉の緑化過程における RuBisCO 蓄積パターン

写真は RuBisCO LSU のバンドを示す。発芽後 4 日目の暗所芽生えに光を 0, 30, 60 時間照射し、植物体地上部から可溶性タンパク質を抽出した。10  $\mu$ g タンパク質を、SDS-PAGE で分離し CBB で染色した。植物は 1 回戻し交配したものをを用いた。



### ・NARA 遺伝子座のマップベースクローニング

RuBisCO 高蓄積にどのような遺伝子が寄与しているのか、またどのような遺伝子変異が MSX 耐性に関わっているのかを理解するために、RuBisCO 蓄積量がそれぞれ 50, 30, 15, 60 % と減少し、また異なる蓄積パターンを示した *nara3*, -4, -5, -7 変異体の変異部位の同定を試みた。

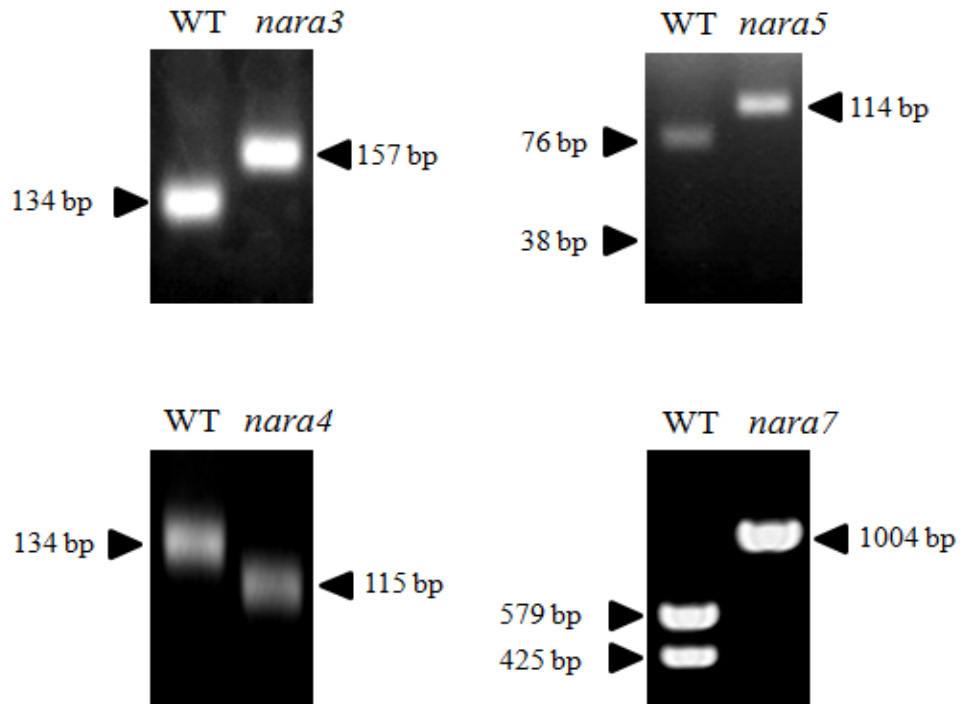
*nara3* 遺伝子のマップベースクローニングにより、*At5g16180* coding sequence (CDS) の +2047 に位置する T が C に置換されていることが判明した (Fig. 2-8)。この変異により、アミノ酸配列上の 683 番目の Gln のコドンが終止コドンに置換される。*At5g16180* は、葉緑体 *atpF* RNA のイントロンスプライシングに必須な Chloroplast RNA splicing 1 (AtCRS1) をコードしている。

*nara4* 遺伝子のマップベースクローニングにより、*At1g24090* の CDS の +888 に位置する G が C に置換されていることが明らかとなった (Fig. 2-8)。*At1g24090* は機能が不明な RNase H domain containing protein をコードしているため、*NARA4* と命名した。この RuBisCO 高蓄積に関わる新規タンパク質である *NARA4* の解析については第 3 章で述べた。

*nara5* 変異体は著しく RuBisCO 蓄積量が低下した変異体であり、RuBisCO 高蓄積に大きく寄与している因子の異常が予想される。そこで *nara5* 遺伝子座のマップベースクローニングを行ったところ、*At4g27600* CDS の +626 に位置する G が A に置換されていることが明らかとなった (Fig. 2-8)。この一塩基置換により 209 番目に位置する Gly が Glu に置換される。*At4g27600* は、機能未知の phosphofructokinase B (pfkB)-type carbohydrate kinase family protein をコードしている。本論では、この機能未知タンパク質を *NARA5* と称し、その詳細については第 4 章で述べた。

*nara7* 遺伝子のマップベースクローニングにより、*At2g13360* の CDS 上において、+1156 に位置する G が A に塩基置換されていることが判明した (Fig. 2-8)。この変異により、386 番目の Ala が Thr に置換される。*At2g13360* は、光呼吸経路において Serrine : glyoxylate Aminotransferase 反応を触媒する酵素 Alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT1) をコードしている。

以上の解析から、*nara3*、*nara7* はそれぞれ既知の遺伝子、AtCRS1 と AGT1 の変異体であり、*nara4* と *nara5* は機能未知遺伝子、*NARA4* と *NARA5* の変異体であることがわかり、それぞれの遺伝子が RuBisCO 高蓄積及び MSX 耐性に寄与していることが示唆された。



**Figure 2-8. NARA 遺伝子の変異の確認**

*nara* 変異体における各遺伝子上の変異の存在は、以下のプライマーセットを用いて PCR 増幅した変異を含む各遺伝子断片が、制限酵素により切断されるか否かによって確認した。*nara3* の場合、変異によって PCR 増幅断片中の *BsrDI* の認識部位が消失するため、野生株ゲノム由来の PCR 増幅断片は *BsrDI* によって消化されるが、*nara3* 変異体のゲノム由来の PCR 増幅断片は切断されない。同様に、*nara4* と *nara5* では、それぞれが変異により *Tsp509I* と *MnII* の切断部位が消失する。*nara7* では、逆に *PvuII* の認識部位が変異により形成される。使用したプライマーと変異体における制限酵素断片長のパターンを以下に示す。

*nara3*, 5'-TGGAGTACTAATCTCAATCG-3'/5'-TGGAGTACTAATCTCAATCG-3': 157 bp

*nara4*, 5'-CACTTTCTGAGAAACAACA-3' /5'-ACATACCCTTAGTACATGAC-3': 114 bp

*nara5*, 5'-AACACTTTAGTTGCTCTCGC-3'/5'-GTACCCGTA AAAAGCTACCG-3': 1004 bp

*nara7*, 5'-CGGTCTTAGAGCTGCTCTTG-3'/5'-ACTTCATACCGCGAAATGGG-3': 115, 19 bp

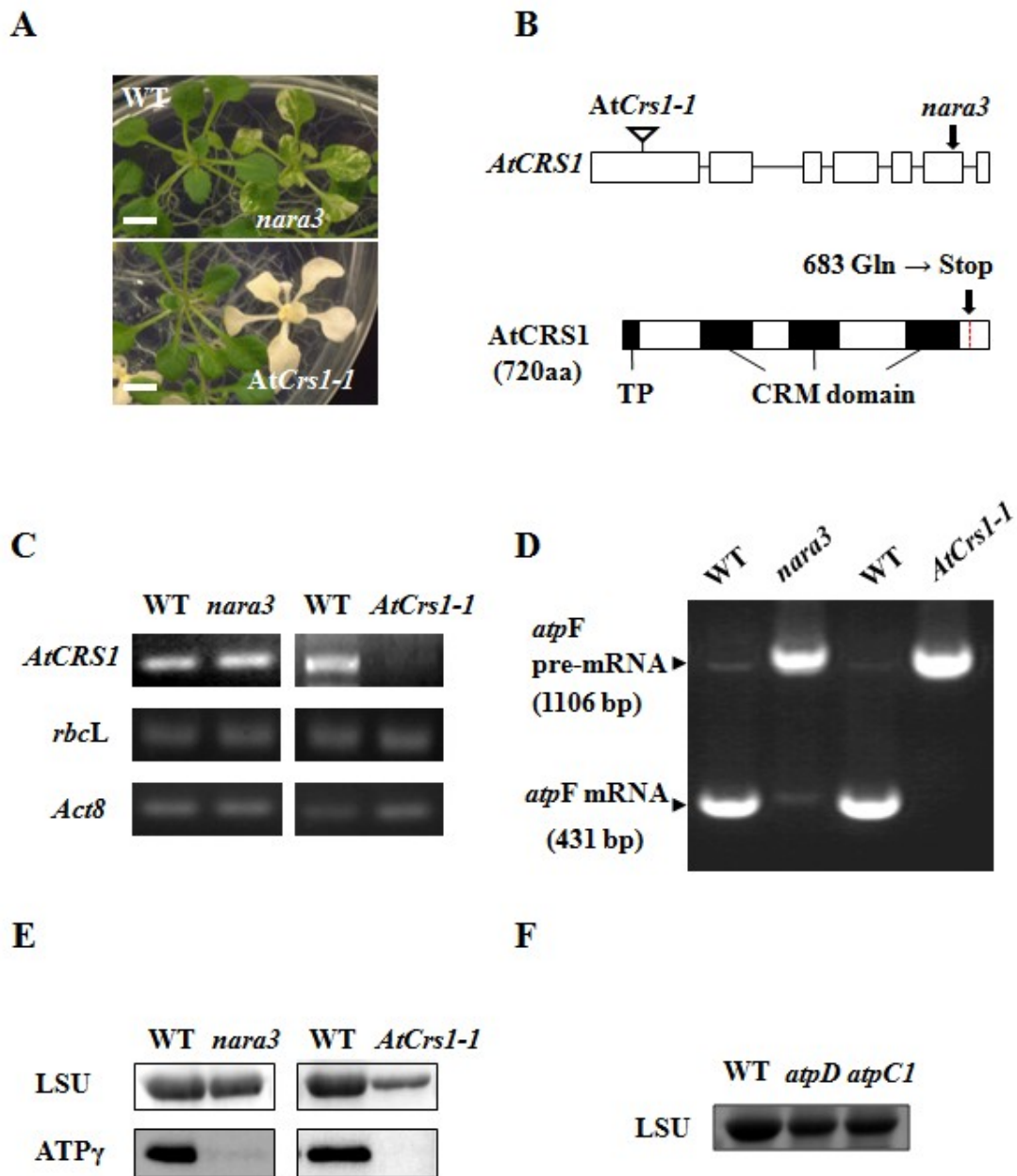
### ・ *nara3* と *nara7* の表現型解析

*nara4* 変異体と *nara5* 変異体の変異が NARA4、NARA5 の発現あるいは機能に影響していることは 3 章と 4 章で述べるが、ここでは *nara3* 変異体と *nara7* 変異体に関して、それぞれの変異遺伝子、AtCRS1 と AGT1 の発現あるいは機能への変異の影響を調査した。

CRS1 は、2001 年に *Z.mays* の薄緑色の葉を示す変異株を用いた遺伝学的解析により、葉緑体 *atpF* RNA のグループ II イントロンのスプライシングのみに必須な特異的因子として同定されたが、さらに RuBisCO LSU を含めた葉緑体タンパク質の翻訳にも関わる未知の機能を有することが示唆された(Till et al.,2001)。2006 年には *A.thaliana* においても AtCRS1 遺伝子破壊株(*AtCrs1-1* 株)の解析により、AtCRS1 が *atpF* RNA のイントロンスプライシングに必須であること、また AtCRS1 欠損株では RuBisCO LSU の蓄積量が約 3 割に低下することが報告された(Asakura and Barkan., 2006)。一方、*nara3* 変異体は、CRS1 では初めての点変異体であり、720 アミノ酸からなる AtCRS1 の 683 番目の位置、すなわち 3 番目の Chloroplast RNA splicing and ribosome maturation (CRM) domain の後方の位置にストップコドンを生じるナンセンス変異が存在している(Fig. 2-9B)。CRM ドメインは、*atpFRNA* のイントロンに特異的に結合する RNA 結合ドメインである(Ostersetzer et al., 2005)。しかしながら、このナンセンス変異の AtCRS1 の機能への影響は不明瞭である。そこで、この変異による AtCRS1 の機能および RuBisCO を含めた光合成タンパク質への影響を理解することを目的に、*nara3* 変異体と *AtCrs1-1* 株の表現型を解析した。各植物体を MS 培地で生育させたところ、AtCRS1 の第 1 エキソンに T-DNA が挿入された *AtCrs1-1* 株はアルビノ形質として知られているが、*nara3* 変異体は白と緑の斑入りの葉を示す変異体であった(Fig. 2-9A)。この様な葉の斑入り形質は、第六エキソンの T-DNA 挿入変異体アリルでも、*nara3* 変異体よりもその程度は厳しいが観察されている(Asakura and Barkan., 2006)。変異の CRS1 の遺伝子発現への影響を知るために RT-PCR 解析を行ったところ、AtCRS1 の転写産物量は *AtCrs1-1* 株では欠損していることが確認されたが、*nara3* 変異体では変異型 mRNA が野生株と同等に蓄積していることが判明した(Fig. 2-9C)。変異の AtCRS1 活性への影響を調べるために、*atpF* RNA の唯一のイントロンを挟み込む形でプライマーを設計し、発芽後 14 日目の変異体地上部における *atpF* RNA のイントロンがどの程度スプライシングされているのかを RT-PCR 解析により調査した。その結果、*AtCrs1-1* 株では *atpF* mRNA の前駆体の異常蓄積が観察され *atpF* mRNA 自体は検出されなかったが、*nara3* 変異体ではその前駆体の異常蓄積が観察されたが *atpF* mRNA 量もわずかに検出された。以上の解析より、*nara3* 変異体は、ナンセンス変異により AtCRS1 の量あるいは活性が著しく低下した AtCRS1 の漏出突然変異体であることがわかつ

た。次に、このスプライシング異常が葉緑体 ATP synthase の蓄積にどう影響するかを調べるために、葉緑体 ATP synthase 複合体の構成因子である ATP synthase  $\gamma$  subunit (Atp  $\gamma$ ) の量をウエスタンブロッティングにより調べた。その結果、*AtCrs1-1* 株では Atp  $\gamma$  が欠損していることが確認されたが、*nara3* 変異体では非常に少量の Atp  $\gamma$  が検出された。Atp  $\gamma$  は、葉緑体 ATP synthase の核コンポーネントであり、その欠損は葉緑体 ATP synthase の複合体全体量の著しい低下を伴うことが知られている(Bosco et al., 2004)。従って、*nara3* 変異体では葉緑体 ATP synthase の量が著しく減少し、それに伴って ATP synthase 活性も大きく低下していることが考えられた。次に本条件下における *AtCrs1-1* 株と *nara3* 変異体における変異の RuBisCO 遺伝子発現への影響を確認した。各変異体において *rbcL* mRNA の発現量に異常はなかったが、RuBisCO LSU の蓄積量は *AtCrs1-1* 株では野生株の約 30%、*nara3* 変異体では約 50%であった。これは、RuBisCO の高蓄積に CRS1 の活性が重要であることを示している。しかしながら、CRS1 の 2 つの機能、すなわち葉緑体タンパク質の翻訳に関わる機能と *atpF* RNA のイントロンスプライシングに関わる機能のどちらが RuBisCO の高蓄積に重要であるのかは明確ではない。葉緑体 ATP synthase が生産する ATP は、葉緑体タンパク質の転写や翻訳などの段階において、エネルギーや材料の供給という観点から RuBisCO 遺伝子の発現に寄与している可能性がある。そこで葉緑体 ATP synthase の RuBisCO 高蓄積への寄与を調べるために、葉緑体 ATP synthase の  $\gamma$  subunit および  $\delta$  subunit の遺伝子、それぞれ *AtpC1* (*At4g04640*) と *AtpD* (*At4g09650*) の遺伝子破壊株における RuBisCO LSU の蓄積量を調べた。その結果、これらの遺伝子破壊株では RuBisCO LSU 蓄積量が *nara3* 変異体に類似して約 50%に低下していた。これから、*nara3* 変異体の RuBisCO 蓄積量の低下は、葉緑体 ATP synthase の量的低下が原因であると考えられた。これに関連して、*nara3* のナンセンス変異が AtCRS1 活性の 1 つである *atpF* RNA イントロンスプライシングを仲介する機能には影響するが、もう一つの AtCRS1 の翻訳に関わる機能にはあまり影響していないことが予想されるが、その詳細を理解するにはさらなる解析が必要とされる。また AtCRS1 の機能に関して、*AtCrs1-1* 株の RuBisCO 量が野生株の 30%、葉緑体 ATP synthase の遺伝子破壊株の RuBisCO 量が 50%ということ踏まえると、AtCRS1 の翻訳に関わる機能のみならず、AtCRS1 の *atpF* RNA のイントロンスプライシングを担っている機能が、葉緑体 ATP synthase の蓄積を介して RuBisCO の高蓄積に重要であることがわかった。



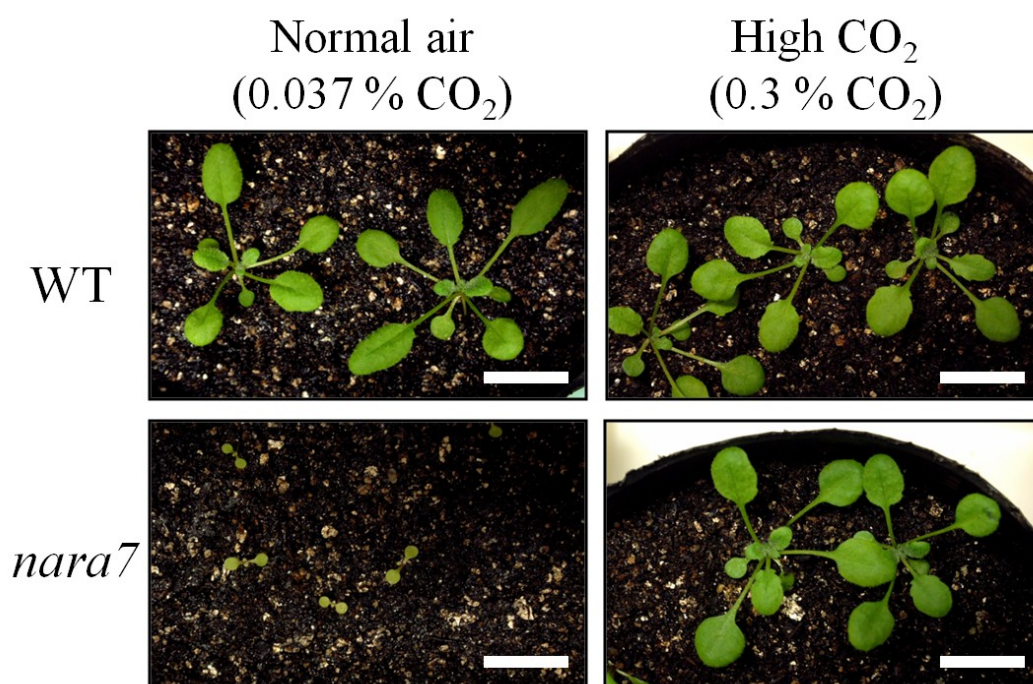


**Figure 2-9. *nara3* 変異体、*AtCrsl-1* 株、葉緑体 ATP synthase 遺伝子破壊株の表現型**

A. 発芽後 14 日目の *nara3* 変異体と *AtCrsl-1* 株。Bar = 5 mm。 B. ATCRS1 の遺伝子(上)とタンパク質(下)の構造。各矢印は、T-DNA の挿入部位あるいは *nara3* 変異体の変異部位を示す。 C. *AtCRS1* と *rbcL* の RT-PCR 解析。 D. *atpF* RNA イントロンスプライシングの RT-PCR 解析。 E. RuBisCO LSU と ATP  $\gamma$  subunit のイムノブロット解析。 F. 葉緑体 ATP synthase  $\delta$  subunit および  $\gamma$  subunit の遺伝子破壊株における RuBisCO LSU の蓄積量。図は CBB 染色像。E と F では、野生株と変異体のタンパク質をそれぞれ同量アプライしている。



一方、*nara7* 変異体において、変異の AGT1 活性への影響を調べるために、*nara7* 変異体の生長への CO<sub>2</sub> の影響を調べた。1982 年に光呼吸変異体として単離された AGT1 欠損株は(Somerville and Ogren., 1982)、大気において土壌では子葉の段階で枯死に至るが、High CO<sub>2</sub> 条件下で光呼吸を抑制すると野生株と同等に生育するという光呼吸変異体に特徴的な表現型を示すことが知られている(Liepman and Olsen., 2001)。そこで *nara7* 変異体を大気下の土壌で生育させたところ AGT1 欠損株で知られている様に子葉の段階で枯死に至った。一方、High CO<sub>2</sub> で生育させるとそれは野生株と同等に生育することができた。従って、*nara7* 変異体の矮小な表現型や RuBisCO 高蓄積が AGT1 の変異に由来することが示唆された。またこの変異部位である Ala は、他生物種の AGT1 にも高度に保存されていることから(Liepman and Olsen., 2001)、AGT1 活性に重要であることが示唆された。



**Figure 2-10.** 外気 CO<sub>2</sub> 濃度に対する *nara7* 変異体の生長変化  
*nara7* 変異体を土壌において、大気条件下 (左) あるいは 0.3% CO<sub>2</sub> 条件下 (右) で 2 週間生育させた。Bar = 1 cm。

## 2-4. 考察

本章では、正の遺伝学的アプローチにより RuBisCO 高蓄積に寄与する NARA 遺伝子を単離することを目的に、RuBisCO 蓄積量が低下した *nara* 変異体を体系的に取得する方法として、*A.thaliana* の MSX 耐性を指標にした選抜法を確立した。この方法は、外環境の CO<sub>2</sub> 濃度と光強度を調節することで植物体に MSX の致死効果を任意に付与することができる。またそのような致死条件では、RuBisCO 活性化率や蓄積量が低下した変異体が MSX 耐性を示すことを、*rca* 変異体の MSX 耐性試験と *nara* 変異体の選抜により実証した。その原理は光呼吸窒素代謝とその MSX の阻害作用に基づいていると解釈される。MSX は、窒素代謝の鍵酵素 GS の不可逆的拮抗阻害剤であり(Gill and Eisenberg, 2001)、MSX を処理された植物は、外来の無機窒素の同化反応及び光呼吸といった代謝経路由来の NH<sub>3</sub> の再同化反応が阻害されるため、グルタミンなどの窒素化合物の枯渇、NH<sub>3</sub> の高蓄積を伴って枯死に至ることが知られている(Lea and Ridley., 1989)。そこで本選抜系では、MSX 存在下におけるグルタミンなどの窒素化合物の枯渇を防止することを目的に、NO<sub>3</sub> と NH<sub>3</sub> の代替窒素源としてグルタミンを添加した(Fig. 2-1)。グルタミンと MSX を含有した選抜培地において、5% CO<sub>2</sub> 条件下では、野生株は通常の MS 培地で生育させたものと同様に大きく生育し、またその生育に対する MSX の阻害効果は全く見られなかった(Fig. 2-2)。これは、MSX 存在下でもグルタミンが野生株の細胞内に安定に供給され有効利用されていることを示している。また RuBisCO のオキシゲナーゼ反応が抑制されているこの条件下では、MSX の除草剤としての効果が無効化されていることがわかった。これは MSX の致死効果が、C<sub>3</sub> 植物最大の NH<sub>3</sub> 放出源である RuBisCO オキシゲナーゼ反応を初発とした光呼吸に起因するという事を示唆している。一方、5% CO<sub>2</sub> から大気に、弱光から強光に生育条件を変えた時、選抜培地で生育した野生株は NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の高蓄積を伴って約 100 時間後に枯死に至った(Fig. 2-2)。この様な CO<sub>2</sub> 濃度および光条件に依存し、膨大な NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の高蓄積を伴って現れる MSX の致死効果は、光呼吸 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の高蓄積による毒性効果が原因であることを示している。実際、本選抜条件下における植物の NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の蓄積速度は、既知の光呼吸 NH<sub>3</sub> の放出速度とおおよそ一致している。また RuBisCO 活性が低下した *rca* 変異体では NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の高蓄積を伴わず MSX 耐性を示すこと、光呼吸変異体である *nara7* 変異体が MSX 耐性を示したことなどがこれを支持している。

MSX 耐性株の選抜当初、RuBisCO の高蓄積には様々な細胞内機構が寄与していることが考えられたため、本選抜法により RuBisCO 蓄積量が低下した多数の変異体が取得できることが予期された。しかしながら本選抜法が、RuBisCO 蓄積量が低下した変異体を特異的に選抜できるかどうかという点に関しては、

不明瞭であった。なぜなら、*in vivo*における RuBisCO オキシゲナーゼ反応の速度は、RuBisCO の蓄積量以外の要因にも大きく依存しているからである。そのような要因は、RuBisCO の基質である RuBP の再生、RuBisCO 触媒段階以降の光呼吸代謝反応などが例として挙げられる。すなわち、これらに大きく関わっている光合成の電子伝達系、カルビン回路、光呼吸代謝酵素の変異体なども MSX 耐性を示す可能性がある。しかし興味深いことに、二次選抜として行った RuBisCO 蓄積量の定量では、本論で単離された 8 個の MSX 耐性株に加えて本研究室の西村より単離された 4 個の MSX 耐性株 (Nishimura et al., unpublished)、計 12 個の MSX 耐性株の全てが野生株と比較して全て約 15~60%に RuBisCO 蓄積量が低下していた。この理由は、RuBisCO 蓄積量やその原因遺伝子を関連付けて以下の様に 2 つの場合に分けて説明できるかもしれない。

Table 2-2. 本選抜法により同定された NARA 遺伝子

Gene	Protein	Function	Localization	Reference
<i>NARA3</i>	Chloroplast RNA splicing factor 1	Splicing of <i>atpF</i> RNA, chloroplast translation	Chloroplast	Asakura and Barkan, 2006
<i>NARA4</i>	RNase H domain containing protein, NARA4	第3章	第3章	
<i>NARA5</i>	PfkB-type carbohydrate kinase family protein, NARA5	第4章	第4章	
<i>NARA7</i>	Alanine:Glyoxylate aminotransferase	Photorespiratory metabolism	Peroxisome	Liepman and Olsen, 2001
<i>NARA10*</i>	Glutamyl-tRNA synthetase	Synthesis of Glu-tRNA	Chloroplast Mitochondria	Duchene et al., 2005
<i>NARA12*</i>	RNA helicase 39, NARA12	Maturation of rRNA?	Chloroplast	

\**NARA10*, *NARA12* は同講座の西村健司より拝借した(Nishimura et al., unpublished)。

まず 50~60%という RuBisCO 量の比較的穏やかな低下を示した変異体は、RuBisCO 遺伝子発現に直接的に貢献する遺伝子の機能に影響する変異か、あるいは RuBisCO の高蓄積に間接的に影響する遺伝子に変異を有していると思われる。例えば前者の考えは、変異の遺伝子機能への影響の程度やその遺伝子の RuBisCO 高蓄積への貢献度合いにも依存するだろうが、西村により単離された *nara10* 変異体が該当していると思われる(Table 2-2)。これは遺伝子欠損すると胚

致死を引き起こすことが知られている葉緑体のタンパク質翻訳段階の必須因子 Glutamyl-tRNA synthetase (GluRS) に点変異を有している。従って、GluRS 活性への致命的とはならない程度の変異の負の影響によって、葉緑体における RuBisCO LSU の翻訳阻害が起こり、結果として変異体における RuBisCO 量の低下に繋がっていると考えられる。一方、後者の考えに関しては、RuBisCO の高蓄積に負の影響を与える変異の二次的な影響が考えられる。これには *AtCRS1* に変異を有する *nara3* や光呼吸変異体である *nara7* 変異体、また既知の光合成電子伝達系に関わる因子のアンチセンス植物体などの例が該当すると思われる。*nara3* 変異体の RuBisCO 蓄積量の低下は (Fig. 2-9)、*AtCRS1* の変異による葉緑体 *atpF* RNA のイントロンスプライシング異常によって引き起こされた葉緑体 ATP synthase 量の著しい低下が原因であることがわかった。今までに葉緑体 ATP synthase の RuBisCO 高蓄積への貢献度は解析されていなかったため、本論の解析によりこれらの関係が明確となった。それは *nara3* 変異体の子葉の緑化過程における RuBisCO 蓄積パターンと総合すると (Fig. 2-7)、葉緑体の発達過程において葉緑体 ATP synthase は、RuBisCO 高蓄積に必要な ATP を供給しており、それが絶たれると RuBisCO 蓄積量が半分程度に低下するということである。一方、*nara7* 変異体に関して、RuBisCO 蓄積量の低下の根本的な原因は不明であるが、その低下は緑化の初期では起こらず、後期 (照射後 60 時間) において起こる (Fig. 2-7)。*AtAGT1* はペルオキシゾームに局在する光呼吸代謝酵素であるため、この変異体における RuBisCO 蓄積量の低下も、光呼吸経路の異常に起因した二次的な影響によるものと思われる。またこの様な 2 次的な影響に関してさらに言及すると、RuBisCO 遺伝子発現システム以外のいくつかの細胞内機構や代謝と RuBisCO 高蓄積との関連を解析した研究結果が少数報告されている。光合成電子伝達反応の必須因子である Rieske FeS protein の量が極度に減少したアンチセンス *N. tubucum* では RuBisCO total activity が約 50% 低下するという報告から (Ruuska et al., 2000)、電子伝達活性も何らかの形で RuBisCO の高蓄積にやや貢献しているものと思われる。また、葉緑体の分裂に異常を有し、葉緑体の数が著しく減少する accumulation and replication of chloroplasts (*arc*) 変異体シリーズにおいても、同程度の RuBisCO 量の減少が報告されている (Pyke and Leech, 1992; Austin and Webber, 2005)。これに関して、分裂が阻害された葉緑体は肥大化するため、葉緑体分裂の異常のみでは RuBisCO 高蓄積を劇的に阻害する要因にはならないように見える。一方、RuBisCO 高蓄積にほとんど影響を与えない重要な表現型として、多くの *nara* 変異体の外観と類似して、矮小で斑入りの表現型を示す葉緑体 Chaperonin 60  $\beta$  subunit の欠損株や (Ishikawa et al., 2003)、矮小かつ黄化した外観を示す葉緑体 Hsp100 の変異体では RuBisCO 蓄積量が減少しないことが報告されている (Sjögren et al., 2004)。つまり、植物体の黄化や矮小といった

表現型は、必ずしも RuBisCO 蓄積量の低下を引き起こすわけではないと考えられる。またカルビン回路酵素である GAPDH のアンチセンス *N. tubucum* は、GAPDH 活性と共に CO<sub>2</sub> 固定速度が著しく低下しても RuBisCO の高蓄積にはほとんど影響しない(Ruuska et al., 2000)。これは RuBisCO と同じくカルビン回路で機能する遺伝子の異常は、RuBisCO 高蓄積に大きく関係してこないことを意味している。以上のことから、RuBisCO 蓄積量が約半分に低下した変異体では、二次的な影響も含めて多様な方面から、変異が RuBisCO の遺伝子発現あるいは分解速度に影響し、RuBisCO の高蓄積に負の影響を与えているものと考えられる。また *nara3* 変異体は RuBisCO 蓄積量の低下と ATP 合成酵素の蓄積異常が、また *nara7* 変異体は RuBisCO 蓄積量の低下というよりもむしろ光呼吸代謝段階の異常が、結果的に光呼吸 NH<sub>3</sub> の低下を導き MSX 耐性へと繋がっていると思われる。

これらとは対照的に、0~30 %という RuBisCO 量の大きな低下を示した変異体は、RuBisCO 遺伝子発現に大きく寄与する遺伝子の著しい機能低下、あるいは欠損を伴っていることが支配的である傾向にある。その様な遺伝子は、Table 1-2 と Table 1-3 に示した様に、機能未知因子も含まれるが、RuBisCO を含めた光合成遺伝子の大規模発現システムで機能している遺伝子と定義される場合が非常に多い。従って、このような劇的な RuBisCO 蓄積量の低下を示した *nara4* 変異体と *nara5* 変異体、そして西村により単離された *nara12* 変異体は(Table 2-2)、それぞれ原因遺伝子の機能は未知であるが、RuBisCO を含めた光合成遺伝子の大規模発現システムで機能している可能性が高いと考えられる。また緑化過程における RuBisCO 蓄積パターンを見ると、NARA5 遺伝子はプロプラスチド（あるいはエチオプラスチド）及び葉緑体における遺伝子発現システムで機能し、一方の NARA4 遺伝子は子葉の緑化とは異なる時期において主に機能していることが予想される。

以上のことから、本論では、RuBisCO 蓄積量が低下した変異体の選抜法を確立し、RuBisCO 高蓄積に関わる 2つの新規遺伝子、*NARA4* と *NARA5* を同定することができた。これらの遺伝子の解析は、RuBisCO の高蓄積、およびその背景にある大規模な遺伝子発現システムを総合的に理解する上で大きく貢献できると期待される。

## 第3章

### 第1本葉における光合成遺伝子発現を担う NARA4 の分子遺伝学的解析

#### 3-1. 序論

生物に共通して、生命を維持するためのタンパク質を合成する際に、その設計図となる mRNA が合成される。この設計図を正しく、かつ必要量を作製するためには、ゲノム複製、転写、RNA のプロセッシングや安定性などが極めて大事な段階である。諸論で述べたように、光合成タンパク質の高蓄積の達成には、光合成遺伝子の mRNA が大規模に合成されることが一つの要因にある。実際、核と葉緑体の両者において、光合成遺伝子の mRNA が低下した場合、それは光合成タンパク質量の低下を引き起こす報告が多くある。核の方では、*RbcS* のアンチセンス *N. tubucum* が *RbcS* mRNA の減少の程度と類似して RuBisCO SSU のタンパク質量の低下を示す(Rodermel, 1999)。葉緑体では、転写かあるいは mRNA の安定性に異常を有する変異体の多くが(Table I, II)、*rbcL* を含めた光合成遺伝子の転写産物の蓄積量の低下と共に、RuBisCO LSU といった光合成タンパク質量の低下を示す。従って、光合成遺伝子の mRNA の増産を担うと考えられる葉緑体のゲノム複製、転写、RNA のプロセッシングや安定性に関わる分子機構の理解は、光合成タンパク質の高蓄積機構を知るための1つの課題である。

第2章の研究から、*nara4* 変異体は、機能未知の RNase H domain containing protein、NARA4 の遺伝子に変異を有することが明らかとなり、RNase H domain containing protein の機能が RuBisCO 高蓄積に必要とされることが示唆された。TAIR データベースを検索するとこの様な名称の遺伝子は *A.thaliana* ゲノム上に5個存在するが、それらの機能は全く明らかでない。RNase H (EC. 3. 1. 26. 4) は、RNA/DNA 鎖の RNA 鎖を特異的に分解する生物普遍的な酵素であり、中でも *E.coli* RNase H がよく研究されている。*E.coli* RNase H の生理学的な機能は、ゲノム複製の際の岡崎フラグメントの RNA 鎖の分解(岡崎, 2002)、本来の複製起点 *oriC* 以外からの R-loop 依存のゲノム複製開始反応の抑制(Kogoma., 1997)、遺伝子の転写時に形成された R-loop による転写阻害の抑制(Drolet, 2006)などが知られている。つまり、RNase H はゲノム複製の制御や遺伝子の転写を円滑に進めるための重要な因子の1つとして位置づけられている。他の生物種の RNase H とは異なり、植物 RNase H の生理学的重要性に関わる知見は非常に乏しいのが現状である。1978年にニンジンの根由来の培養細胞にて初めて植物 RNase H の活性が測定され酵素学的な解析がなされた(Sawai et al., 1978; 1979)。それから、対数増殖期の細胞における RNase H 活性と DNA polymerase 活性の上昇パター

ンが類似していたため、植物 RNase H も他の生物と同様に DNA 複製に関与することが予想された。しかしながら、これらの知見のみでは、植物 RNase H の機能を完全に理解したとは言えない。

本論では、NARA4 がどのように RuBisCO 高蓄積に関わるのかを理解するために、*nara4* 変異体やその遺伝子破壊株を解析し、NARA4 が第一本葉における RuBisCO を含めた光合成遺伝子産物の高蓄積に寄与していることを明らかにした。これは、植物 RNase H の新しい生理学的重要性を示唆していると考えられる。また、NARA4 が RNase H ドメインを介してゲノム複製や RuBisCO 遺伝子の転写に関わることを考察した。

## 3-2. 材料と方法

### • 植物材料

*A. thaliana* Columbia (Col-0)、*nara4-1* 変異体、*nara4-2* 変異体 (SAIL line: Stock No CS872915)、また本章で作製した形質転換体と相補系統である、Pro<sub>35S</sub>: NARA4/WT, Pro<sub>35S</sub>: NARA4/*nara4-1*, Pro<sub>35S</sub>: NARA4/*nara4-2*、Pro<sub>35S</sub>: NARA4-His/*nara4-1*, Pro<sub>35S</sub>: NARA4-FLAG/*nara4-1*, Pro<sub>35S</sub>: NARA4-4Myc/*nara4-1*, Pro<sub>35S</sub>: NARA4-sGST/*nara4-2* を用いた。これらの株は全て Col-0 バックグラウンドである。*nara4-1* の変異型、*nara4-2* の T-DNA 挿入型に関しては、全てホモ接合体のものを用いた。バッククロスに関して、3 回行ったものを用いた。形質転換体は T2 あるいは T3 世代を用いた。*nara4-2* 変異体は、ABRC より購入した。

### • 生育条件

植物体は、土壌 (Metro-Mix 350, Scot-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, OH, USA) で生育させた。生育環境は、大気、弱光(50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )の連続照射下、23-24°C である。生育日数は各図のレジェンドに記した。

### • 完全長 NARA4 cDNA の取得

発芽後 14 日目の植物体地上部から、Total RNA を 2 章で記載した方法に従い抽出した。ReverTra Ace  $\alpha$ - (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて、付属のプロトコールに従い、Total RNA から以下の RACE 法に用いる cDNA を調整した。この時の逆転写のプライマーは、5'RACE では 5'末端リン酸化プライマー(5'-TTGACTGTACAA-3')を、3'RACE では *NotI*-d(T)<sub>18</sub> primer (5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCCGCAGGAAT18-3')を用いた。5'RACE は、5'-Full RACE Core Set (TaKaRa, Shiga, Japan)を用い、方法は説明書のプロトコールに従って行った。5'UTR を含む *NARA4* の配列は、以下のプライマーを用いた 2 段階 PCR により増幅した。*NARA4* a set: 5'-CTCTCTTCTGTTGGGTTGAA-3'/ 5'-ACACACTACTCACAGCTACA-3'、*NARA4* b set: 5'-TGTTGGGTTGAAGAAACCAC-3'/5'-ACACACTACTCACAGCTACA-3' 3'RACE では、3'UTR を含む *NARA4* の配列を、*NotI*(5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCCGC-3')/ *NARA4c* (5'-ATGAACTGTCTGTCTCATGCGGTTTCATAC-3')と *Not2* (5'-GAAGAATTCGCGGCCCGCAGG-3')/ *NARA4c* を用いた 2 段階 PCR により増幅した。これらの RACE 法によって得られた遺伝子断片は、pGEM<sup>®</sup>-T easy vector system (Promega, Madison, WI, USA)を用いて、付属のプロトコールに従い pGEM<sup>®</sup>-T easy vector にクローニングし、2 章で記載した方法に従い遺伝子配列を決定した。

### • DNA コンストラクトの構築と植物の形質転換



遺伝子のクローニングは、Invitrogen (<http://www.invitrogen.co.jp/>)の遺伝子部位特異的組換え反応を利用した Gateway® Technology を用いて行った。方法はホームページに添付されているマニュアルに従った。部位特異的組換え用の attB 配列を付加した NARA4 cDNA は、NARA4 cDNA を鋳型に以下のプライマーセットを用いて増幅した。

gNARA4: 5'-AAAAAGCAGGCTATGAACTGTCTGTCTCATGCG-3'/

5'-AGAAAGCTGGGTCTGTTTCGATATAAAATTTACGCGCTGA-3'.

また各種タグ(His, FLAG, 4MYC, GST)との融合用の NARA4 cDNA の増幅には、

NARA4-Ctag:5'-AAAAAGCAGGCTTAATGAACTGTCTGTCTCATGCG/

5'-AGAAAGCTGGGTTCGCCACCTCAACTTCTCCTTC-3' のプライマーを用いた。

これらの増幅断片を、pDONR™221 へのサブクローニングし、発現ベクターである pGWB2, -8, -11, -17, -24 に導入した。pGWB Binary vectors は(Nakagawa et al., 2007)、中川強博士 (島根大学) より分与頂いた。これらの pGWB Binary vectors をエレクトロポレーション法により *Agrobacterium tumefaciens* MP90 に導入し、floral dip 法により植物体に導入した。

#### • RT-PCR

Total RNA の抽出法と cDNA の合成は 2 章に記載した方法により行った。以下のプライマーセットを用いて cDNA を鋳型に PCR を行った。各 PCR 反応は、29Cyc 行った。

Set A, 5'-ATGCGCGTTCATACATTGCCT-3'/5'-CAACTTGAGCCTGACAATCACTCA-3',

Set B, 5'-AGCTATGTCAGTTCTATTCCGT-3'/5'-AACAGACTCTTAAGGCCAAA-3',

Set C, 5'-GCAGCAGAATACCATGCGTT-3'/5'-AATTAGCCTTCACGCCACCT-3',

Set D, 5'-AAGGTGACTCCAAGCTGGTC-3'/5'-CGCTGTAACCGGAAAGTTTCTCAC-3',

Set E, 5'-CTTGATCCAGCTGAATCGGTGACT-3'/5'-GCACGCAGTAACTTCATCGG-3',

#### • Quantitative RT-PCR (real-time PCR)

Quantitative RT-PCR は、ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, California, USA)を用いて、付属の説明書に従い行った。サンプルの cDNA は、2 章に記載した方法で調製した。PCR 反応は、32 倍あるいは 64 倍希釈した 1 µl cDNA、25 ul of Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)と以下の遺伝子特異的プライマー0.2 uM の混合液を用いて行った。反応のサイクルは 50°C, 2 min と 95°C, 10 min を各 1 Cyc、95°C, 15 sec と 60°C, 1 min を 40 Cyc 行った。反応には以下の遺伝子特異的プライマーを用いた。

NARA4: 5'-AGTGAAAGGTGACTCCAAGCTG-3'/5'-TTTTGCTTCCTTGTGGAGCTTTG-3',

rbcL: 5'-TGACCGAGATCTTTGGAGATGA-3'/5'-CAAGATCACGTCCCTCATTACG-3',

RbcS: 5'-CCGCTCAAGTGTGGAAGGAAG-3'/5'-GGCTTGTAGGCAATGAACTGA-3',

petB: 5'-AGTGCTAGTGTGACAAATCCAC-3'/5'-AGGGACCAGAAATACCTTGCTTAC-3',

rpl22: 5'-TAGCGTTCGCTGCAGCAGAA-3'/5'-CTGCCATAAAGCACGGAGAGT-3',

Act2:5'-ACCTTGCTGGACGTGACCTTACTGAT-3'/5'-GTTGTCTCGTGGATTCCAGCAGCTT-3

, *Act8*, 5'-GACATCGTTTCCATGACGGGATCA-3'/5'-CGCTGTAACCGGAAAGTTTCTCAC-3'。なおこの *RbcS* プライマーは *A.thaliana* に存在する 4 つの *RbcS*-1A, -1B, -2B, -3B に共通した配列を増幅するように設計した。*psaA*, *clpP*, *rpoB*, *Sig6*, *RpoTP*, *RpoTmp* は Ankele et al. (2007)、*psbA* は Loschelder et al. (2006)、*Rpl23* は Volkov et al. (2003)、*Lhcb1.1* は Panchuk et al. (2005) に記載されたプライマーを用いた。それぞれのプライマーに対して検量線を作製し、PCR 産物の指数関数的増幅領域で Ct 値を求めた。測定した標的遺伝子の転写産物量は、特にレジェンドで規定していなければ、*Act2* の転写産物量で標準化し、相対値として示した。

#### ・遺伝子量の測定

*nara4* 変異体第 1 本葉から DNeasy Plant Mini Kit™(QIAGEN)を用いて、付属のプロトコルに従い全ゲノム DNA を精製した。精製ゲノムを鋳型に、以下のプライマーセットを用いて real-time PCR により各遺伝子量を測定した。PCR 反応は上記と同じ反応条件で行った。

*g-rbcL*: 5'-GGCATATGCCTGCTTTGACC-3'/5'-AGCTTGTACACATGCTTCCAGA-3',

*g-PetC*: 5'-AGGGAGATCCGACTTACCTAGT-3'/5'-GTTCCATGGCACAACACATCC-3',

検量線は、*rbcL* と *PetC* の既知濃度の PCR 増幅断片を用いて作製した。

#### ・ウエスタンブロッティング

液体窒素で凍結した葉を乳鉢で破碎し、EZ 法(Martínez-García et al., 1999)により Total Protein の定量と調整を行った。材料に用いた葉に関しては、各図のレジェンドに記載した。タンパク質の電気泳動とウエスタンブロッティングは、2 章に記載した方法により行った。一次抗体には、anti-RuBisCO LSU, anti-D1, anti-D2, anti-Cyt *b*<sub>6</sub>, anti-FNR, anti-COXII 抗体を用いた。anti-D1, anti-D2, anti-Cyt *b*<sub>6</sub>, anti-COXII 抗体は Agrisera (<http://www.agrisera.com/>)より購入した。anti-FNR 抗体は長谷俊治教授 (大阪大学) より分与頂いた。NARA4-4Myc の検出には、c-Myc 抗体(Santa Cruz Biotechnology; catalog no. sc-789)を用いた。

#### ・クロロフィル蛍光解析

クロロフィル蛍光は、IMAG-MAX/GS, LED-Array Illumination Unit, CCD-Camera を備え付けた IMAGING-PAM chlorophyll Fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany)を用いて測定し、Fm/Fv のイメージング画像を得た。10 分間暗順化した植物体を材料に、大気・室温下にてパルス飽和光 3,000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  を用いて測定した。測定は付属の説明書に従った。

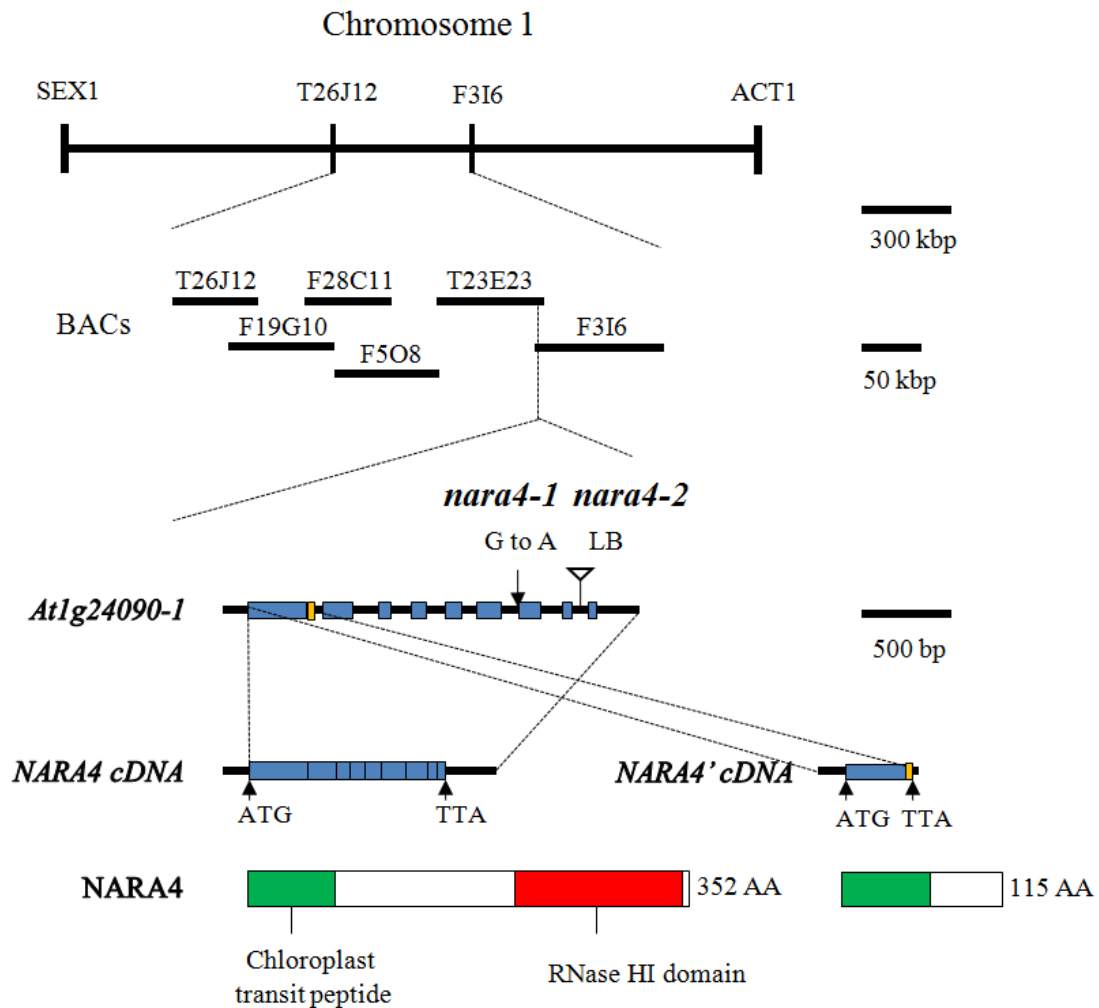
#### ・葉緑体の単離

葉緑体は、Rensink et al., (1998)に記載された 40-50-70 % (v/v) Percoll 密度勾配遠心法を用いて単離した。単離した葉緑体は、破碎バッファー(50 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1mM DTT, 1mM MgCl<sub>2</sub>, Protease inhibitor cocktail tablets )に懸濁し、氷上で破碎させた。その後 18,800g, 4°C で 20 分間遠心分離を行い、上清をストロマ画分、沈澱を膜画分とした。

### 3-3. 結果

#### ・NARA4 遺伝子の特徴付け

第二章における *nara4* 遺伝子のマップベースクローニングにより *Atlg24090* の Coding sequence の+888 (第7エクソン) に位置する G が C に置換されていることがわかった。*A.thaliana* の総合データベース The Arabidopsis Information Resource (TAIR) に登録されていた cDNA の Reference Sequence (Refseq)を参照すると、この遺伝子変異は Gln のコドンを用いた他の Gln のコドンに置換するという同義置換であった。しかしながら、TAIR では NARA4 cDNA の一部の断片しか登録されていないため、提示されている cDNA の Refseq が正しいのかどうか不明である。加えて、その Refseq は UTR の領域をカバーしていない。そこで、野生株の地上部における NARA4 cDNA の全長配列を 5'-及び 3'-RACE 法により決定した(Fig.3-1)。その結果、長さの異なる 2 種の NARA4 cDNA が存在することがわかった(Fig.3-2)。そこで、RNase H domain を含んだ 1,771 bp の長い方を NARA4 cDNA と、818 bp と短い方を NARA4' cDNA と命名した。また前者の NARA4 cDNA の配列は、以下の 3 つの重要な違いを除いて、データベースで登録されていた Refseq と一致していた。3 つの重要な違いに関して、1 つ目は *nara4* 変異体における変異部位が第7エクソン内ではなく第6イントロンの末端に存在することである。2 つ目はデータベースに登録されている機能未知の保存配列 COG 3011 を含んだ領域(COG 領域)に相当する第9、10、11 エクソンが、NARA4 cDNA には無いことである。3 つ目は、NARA4 cDNA では、*Atlg24090* の Refseq でイントロンとされていた配列に、終始コドンを含んだ真の第9エクソンが存在することである。そこで Fig.3-1 には、この NARA4 cDNA をコードする遺伝子領域を *Atlg24090-1* という名で表記した。



**Figure 3-1. 決定した NARA4 の遺伝子構造**

NARA4 は、1 番染色体の BAC, T23E23 に位置する *Atlg24090-1* にコードされる。この遺伝子では、選択的スプライシングにより、2 種の mRNA が生産される。遺伝子上のバーは、黒が UTR 及びイントロン、青はエキソン、黄は選択的スプライシングによって生じたエキソンを示す。また *nara4-1* 変異体の変異部位及び *nara4-2* 変異体の T-DNA の挿入位置を矢印で示した。NARA4 が有する葉緑体移行シグナル(TP)と RNase HI ドメインをそれぞれ緑と赤で示した。

A

NARA4 cDNA

CAAAACTCCCATTGACCCTAACTTTTGAGGATTGAGACCAAACCAGCTTAAACCCACCG  
AGTGGGTTCGTCTTCCTTCTTCACCGGCAAGTTCTCACAAATTAATCGAGAGATTACAGTCTC  
TGTGCTTCGTAAGATTTTAATTTGACTCTACTAATCAGTTTTTTACTCATTTTCATCAGTCCTCT  
GGTTTTCATTTTCTGTTTTGTTTCGCCGTCGAGAAATTTCACTTTATCCGCTTCAATCATAGATA  
CCCAGATTACGAATTCTGCGAAAGTGTTAAACTTTTCAACTTTGATTTTCATGTTTGTAATTTGA  
CATTTGTTCTTGAATCTCTGAAGCTTATCTAAAGTTGTGCGTGTGTTTTTTTTTGTGTGATAAAT  
CTCAGTGTGTGGTGACTTACATTGTAATGAACTGTCTGTCTCATGCGCGTTCATACATTGCCTT  
GGGACTGCTTAAGAGATCAAGCTATGTCAAGTTCTATTCCGTGGAATGAATGTTTCTTCTATATG  
CCTTCAAATCATGTTTAAAGCCTGTAGCTGTGAGTAGTGTGTTTGAATCTGTAGTGTTTCATT  
CTTATTCCTCAAGATCAAAGGCTGTTAAATCAAAGATGTTATCATCAACCGTTGTTTCGGCTGT  
GGATAAAGAAAAGGACGCCTTTTTCGTTGTTTCGGAAGGGTGATGTTATTGGAATTTATAAGGA  
TTTGAGTGATTGTCAGGCTCAAGTTGGATCTTCGGTGTGTTGATCTTCCGGTTAGTGTTTATAAG  
GGATACTCTTTCCTAAAGACACTGAGGAATATCTCTCTTCTGTTGGGTTGAAGAAACCACTAT  
ATAGTTTAAAGAGCTTCAGATTTGAAAGATGATATGTTTGGTGCTCTTACACCATGTCTTTTCCA  
GGAGCCAGCTCCTTGTACAGTCAAAGTATCTGAAGATGAGACTACCTCAGAGACGAAGTCAA  
AAGATGACAAAAAGATCAACTTCCTTCACTTCTATATCTTATGATCCTTTGGAAAAGCTTTC  
AAAGGTGGAGCCATCTGCTTATATATCAGACGAACTTGCTTTATCGAGTTTGACGGTGCATCA  
AAGGGAAATCCCGTCTCTCCGGCGCAGCAGCGTACTGAAAACCTGAGGACGGGAGCTTGA  
TTTGAGAGTGCCTCAAGGTTTGGGAATTGCCACAAACAATGCAGCAGAATACCATGCGTTAA  
TCCTAGGATTGAAGTATGCTATTGAGAAAAGTTACAAGAATATAAAGTGAAAGGTGACTCCA  
AGCTGGTCTGTATGCAGATTAAAGGTCAATGGAAGGTAAACCATGAGGTACTCGCAAAGCTCC  
ACAAGGAAGCAAACTACTTTGCAACAAATGTGTCTCTTTTGAGATCAGTCATGTACTAAGGA  
ATTTAAATGCTGATGCGGATGAGCAGGCAAACTTGCTGTCCGTCTTCCCGAAGGAGAAGTT  
GAGGTGGCGTGAAGGCTAATTATCGATGAACTAATATAAAGATCCGGGAGTTACACACTAGCG  
ACTAGCCACTAGAACTGGTGAAGAACCAGAATGAGCACAGAGAATTCTCTGTCAGATCTCA  
CAGAGAACAGCAGAACTGACTCATCATTTGTCTTCTCTTTACTTCAGATGATATTTGCGCGC  
GTTCTAACGTTTTATTTGCTTTGCTCTTACACTAGAACAGTTATATTGAAAATCTTTTTGTAC  
CATTAGGAAGTGAATAACATGCGCTTCCGTGAGCGCGTGAAATTTTATATCGAAACAG

B

NARA4' cDNA

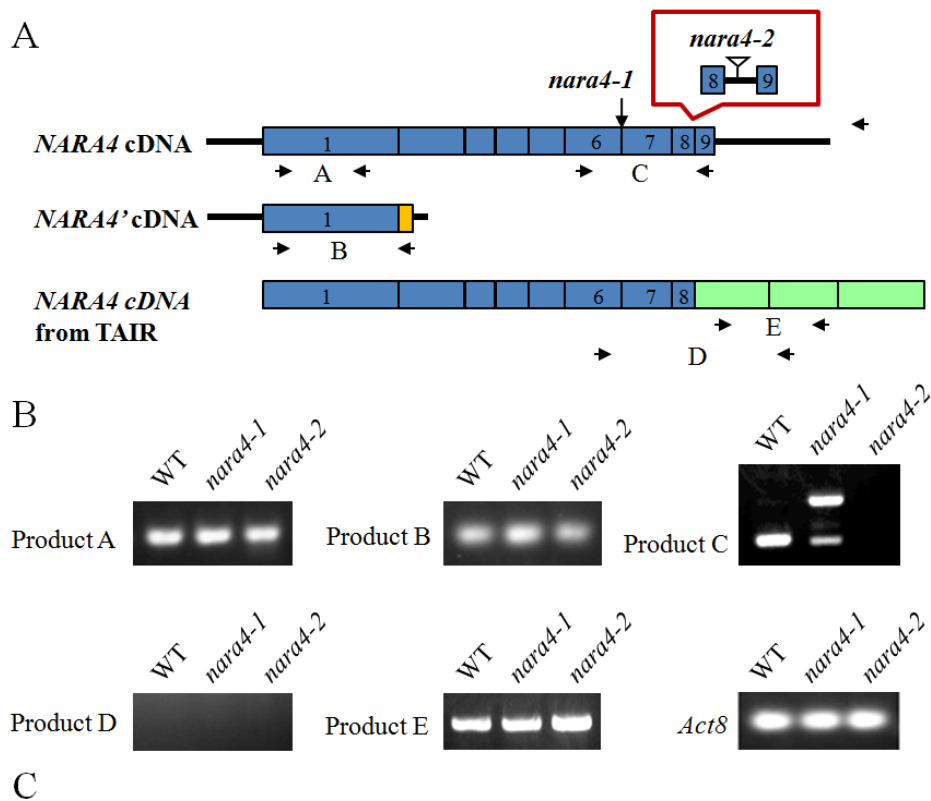
CAAAACTCCCATTGACCCTAACTTTTGAGGATTGAGACCAAACCAGCTTAAACCCACCG  
AGTGGGTTCGTCTTCCTTCTTCACCGGCAAGTTCTCACAAATTAATCGAGAGATTACAGTCTC  
TGTGCTTCGTAAGATTTTAATTTGACTCTACTAATCAGTTTTTTACTCATTTTCATCAGTCCTCT  
GGTTTTCATTTTCTGTTTTGTTTCGCCGTCGAGAAATTTCACTTTATCCGCTTCAATCATAGATA  
CCCAGATTACGAATTCTGCGAAAGTGTTAAACTTTTCAACTTTGATTTTCATGTTTGTAATTTGA  
CATTTGTTCTTGAATCTCTGAAGCTTATCTAAAGTTGTGCGTGTGTTTTTTTTTGTGTGATAAAT  
CTCAGTGTGTGGTGACTTACATTGTAATGAACTGTCTGTCTCATGCGCGTTCATACATTGCCTT  
GGGACTGCTTAAGAGATCAAGCTATGTCAAGTTCTATTCCGTGGAATGAATGTTTCTTCTATATG  
CCTTCAAATCATGTTTAAAGCCTGTAGCTGTGAGTAGTGTGTTTGAATCTGTAGTGTTTCATT  
CTTATTCCTCAAGATCAAAGGCTGTTAAATCAAAGATGTTATCATCAACCGTTGTTTCGGCTGT  
GGATAAAGAAAAGGACGCCTTTTTCGTTGTTTCGGAAGGGTGATGTTATTGGAATTTATAAGGA  
TTTGAGTGATTGTCAGGCTCAAGTTGGATCTTCGGTAATTATGTTTTGGCCTTAAGAGTCTGTT  
GTGTATAATAGATACTCTTTTATGATGGGAATATAAGAGCTTTCTTAATAA

Figure 3-2. 2種のNARA4 cDNA配列

A. NARA4 cDNA の塩基配列。 B. NARA4' cDNA の塩基配列。 黒と赤は、TAIR に登録されている Refseq と実験で単離した cDNA 配列をもとに予想した UTR 配列と ORF を示す。

上記した NARA4 cDNA の情報が正しいかどうかの裏付けを取るために、野生株、*nara4* 変異体 (*nara4-1* 変異体)、加えて NARA4 の第 8 イントロンに T-DNA が挿入された NARA4 遺伝子破壊株 (*nara4-2* 変異体)における *Atlg24090* の遺伝子産物の RT-PCR 解析を行った(Fig. 3-3)。PCR のプライマーには、以下の cDNA 断片を増幅可能な A, B, C, D, E, F と名付けたプライマーセットを用いた(Fig. 3-3A)。セット A は、NARA4 cDNA と NARA4' cDNA に共通した領域、セット B は、NARA4' cDNA のみに存在する領域、セット C は、NARA4 cDNA のみに存在する領域、セット D は、NARA4 cDNA+COG 領域にのみ存在する領域、セット E は、COG 領域に相当する cDNA のみに存在する領域をそれぞれ増幅するように設計した。野生株地上部由来の cDNA を用いた PCR の結果、セット D 以外の全てのセットで cDNA 断片の増幅が確認された。このことは、本研究の RACE 法で決定された cDNA に対応する 2 種の mRNA が発現していることを示している。またこれは、このサンプルの中には、TAIR Refseq の NARA4 cDNA+COG 領域に相当する mRNA が存在しないか、あるいは検出限界以下の量であることを示している。一方、*nara4-1* 変異体の RT-PCR の結果、セット C の増幅断片が、野生株とは異なる長さの 2 つのバンドとして検出された。そこでこの 2 つの増幅断片の塩基配列を決定したところ、長い方は第六イントロンがスプライシングされていない NARA4cDNA 断片、短い方が NARA4 第六イントロンのミススプライシングにより生じた産物であることが判明した(Fig. 3-3C)。これらの変異に由来するスプライシング異常は、結果として cDNA 配列上のフレームシフトを起こし、新たな終始コドンを出現させるため、これらの *nara4*cDNA の遺伝子産物は第 7 エキソン以降の領域が欠損したタンパク質しか生産できないと考えられる。*nara4-2* 変異体の RT-PCR の結果、セット C の増幅断片は検出されなかったが、セット E の増幅断片は野生株と同等量検出された。このことは *nara4-2* 変異体では T-DNA の挿入により NARA4 mRNA のみの発現が欠損しており、また COG 領域に相当する遺伝子が NARA4 遺伝子とは独立に発現する遺伝子単位であることを示している。後者は COG 領域のみをカバーした cDNA 配列が TAIR で登録されていることとも一致する。

以上のことを総合すると、データベースに登録されている *Atlg24090* は、NARA4 遺伝子と COG 領域に相当する遺伝子という 2 つ遺伝子をコードしており、前者の NARA4 遺伝子は NARA4 cDNA と NARA4' cDNA に相当する 2 種の mRNA を生産していることが明らかとなった。また *nara4-1* 変異体および *nara4-2* 変異体では、それぞれ点変異によるスプライシング異常と T-DNA の挿入により、RNase H domain を含む完全長 NARA4 mRNA のみが欠損していることがわかった。よって本論で記載した NARA4 とは、この NARA4 cDNA にコードされているタンパク質のことを意味している。



• Product C from WT

ATGCAGGTTTCGTCAATTAACGTTATATATTTTTGTGCAACTAGGTAAGTTTAATGAATCATATACGCTT  
TTATCTTCTCACTTTCTCAACACTTTCTGAGAAACAACA **G**ATTAAGGTCAATGGTCAATGGAAGGTAA

• Upper band of Product C from *nara4-1*

ATGCAGGTTTCGTCAATTAACGTTATATATTTTTGTGCAACT **A**GGTAAGTTTAATGAATCATATACGCTT  
TTATCTTCTCACTTTCTCAACACTTTCTGAGAAACAACA **A**ATTAAGGTCAATGGTCAATGGAAGGTAA

• Lower band of Product C from *nara4-1*

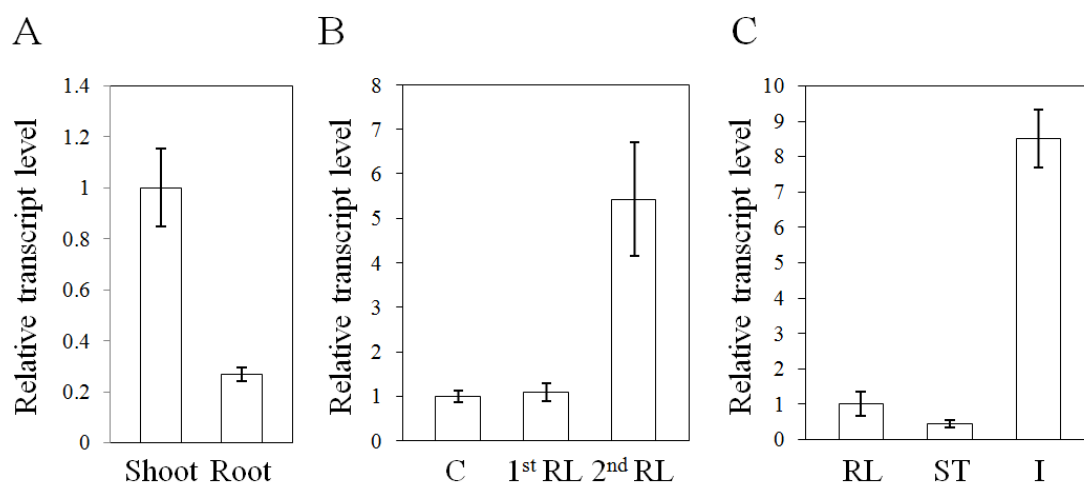
ATGCAGGTTTCGTCAATTAACGTTATATATTTTTGTGCAACTAGGTAAGTTTAATGAATCATATACGCTT  
TTATCTTCTCACTTTCTCAACACTTTCTGAGAAACAACA **A**ATTAAGGTCAATGGTCAATGGAAGGTAA

**Figure 3-3. 野生株と *nara4* 変異体アレルにおける NARA4 遺伝子の RT-PCR 解析**

A. NARA4 cDNA と NARA4' cDNA、TAIR に記載されている NARA4 cDNA + COG 領域を含んだ cDNA の構造。緑バーは COG 領域を示し、それ以外の色や矢印は Figure 3-1 のレジェンドで言及した。また *nara4-2* 変異体ゲノムにおける T-DNA が挿入されたイントロンの部位を赤枠で示す。cDNA の下位に位置する矢印はプライマーを示しており、それぞれ A, B, C, D, E, F の 6 種類の cDNA 断片を増幅できる。B. A で記載したプライマーセットを用いた RT-PCR 解析。PCR 反応は 29 サイクル行った。C. *nara4* RNA 上のミスプライミング部位。配列は、野生株由来の Product C と *nara4-1* 変異体に由来する長短 2 種の Product C の塩基配列を示す。青はエキソン、黒はイントロン、赤は変異部位、緑は終始コドンを示す。

### ・ *A.thaliana* における *NARA4* の遺伝子発現パターン

*NARA4* の遺伝子発現が活発な組織を知るために、*NARA4* cDNA の配列に特異的なプライマーを作製し、Quantitative RT-PCR により様々な器官における *NARA4* の転写産物の蓄積量を定量した(Fig. 3-4)。まず発芽後 8 日目の WT における地上部、根での *NARA4* 遺伝子の発現量を比較したところ、地上部での蓄積量が多かった。次に、発芽後 9 日目の子葉、第一本葉、第二本葉における *NARA4* 遺伝子の転写産物量を比較したところ、第二本葉で最も多かった。発芽後 28 日目のロゼット葉、茎葉、茎、花序では、花序において著しく高い値を示した。以上から *NARA4* は、地上部の若い器官で高発現していることが示唆された。



**Figure 3-4. 野生株の組織別における *NARA4* の遺伝子発現パターン**

各器官における *NARA4* の転写産物量は、*Act8* の転写産物量で標準化し、A では野生株の地上部、B では子葉、C ではロゼット葉の値を 1 とした時の相対値を示した。データは、3 サンプル(各組織 1~5 個)の平均±標準偏差を示す。A. 土壌で 8 日間生育した野生株の地上部と根における遺伝子発現パターン。 B. 土壌で 9 日間生育した野生株地上部の子葉 (C)、第一本葉 (1<sup>st</sup> RL)、第二本葉 (1<sup>st</sup> RL)における遺伝子発現パターン。 C. 土壌で 5 週間生育した野生株のロゼット葉 (1<sup>st</sup> RL)、茎 (ST)、花序 (I)における遺伝子発現パターン。花序は、茎頂分裂組織と花芽と花を含む。



### ・ NARA4 タンパク質の特徴付け

*NARA4* は、353 アミノ酸からなる機能未知の RNase H domain containing protein, *NARA4* をコードしている。*NARA4* の情報を整理するために、まず NCBI Blast により *NARA4* の完全長アミノ酸配列と相同性を示すタンパク質を検索した。*NARA4* の全長に関しては、相同性が約 50%以上のタンパク質が様々な高等植物に存在していたが、いずれも機能未知であった。その中で *A.thaliana* においては *NARA4* と高い相同性を示す 2 つの RNase H domain containing protein, AT3G01410 と AT5G51080 が存在していることが分かった。

それらのタンパク質と *NARA4* の構造を部分的に見てみると、N 末端側のおおよそ 70 番目までは保存性がほぼ無い。しかし、82~132 番目は TAIR にて Ribosomal protein L9, N-terminal (InterPro ID: IPR009027) という保存領域が登録されていた。これは、Ribosomal protein L9 の 23S rRNA 結合部位に類似しており、酵母やヒトといった真核生物 RNase H ではこの領域が DNA/RNA との結合や RNase H 活性を高めるのに必要な hybrid binding domain (HBD) であることが報告されている (Cerritelli and Crouch, 2009)。一方、N 末端側 70 アミノ酸に細胞内局在シグナルがある可能性があるため、TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), Wolf PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>), ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) という局在予測ツールにより、その様なシグナルがあるかどうか *NARA4* 全長配列をクエリーに調べた。その結果、N 末端の 65 アミノ酸が葉緑体移行シグナルであり、*NARA4* が葉緑体に局在することが予想された。*NARA4* ホモログである AT3G01410 と AT5G51080 の局在性に関しては、AT3G01410 が核あるいは不明と予想され、AT5G51080 が葉緑体またはミトコンドリアと予想された。

一方、これらのタンパク質を含め *NARA4* の C 末端側 (219 番目のアミノ酸以降) には、RNase H domain (NCBI Conserved Domain Database ID: cd06222) という保存領域が存在している。RNase H には配列と構造が異なる RNase HI (Type I), -HII (Type 2), -HIII (Type 2) があるが、*NARA4* はバクテリアから動物まで生物普遍的に存在している RNase HI とおおよそ 20~30%の相同性を示した。この様な RNase HI を有する RNase H domain containing protein は、TAIR database では 5 つ登録されており、うち 3 因子 (*NARA4*, AT3G01410 と AT5G51080) が上記の様に長い N 末端を有していた。またこの 3 因子は、*A.thaliana* ゲノム上において、機能と構造がよくわかっている *E.coli* の RNase HI (Sigrell et al., 1998) と最も高い相同性を示すタンパク質であった。そこで、*NARA4* が有する RNase HI ドメインの情報を整理するために、*E.coli* RNase HI と これら 3 つの RNase H domain containing protein のアライメントを作製した (Fig. 3-5)。その結果、全体の相同性は約 20%と低いが、*E.coli* RNase HI の活性部位を形成する必須アミノ酸や金属

結合部位は完全に NARA4 で保存されており、また RNA/DNA の結合に関わるアミノ酸残基も高度に保存されていた。一方、*A.thaliana* ゲノム上には *E.coli* RNase HIII と RNase HIII に高相同性の遺伝子が 1 つ (At2g25100) あったが、それは Wolf PSORT により核局在と予想された。

以上を総合すると NARA4 (または AT5G51080) が、葉緑体の RNase HI として機能していることが示唆された。これを検証するために現在、リコンビナント NARA4 の精製にとりかかっている。

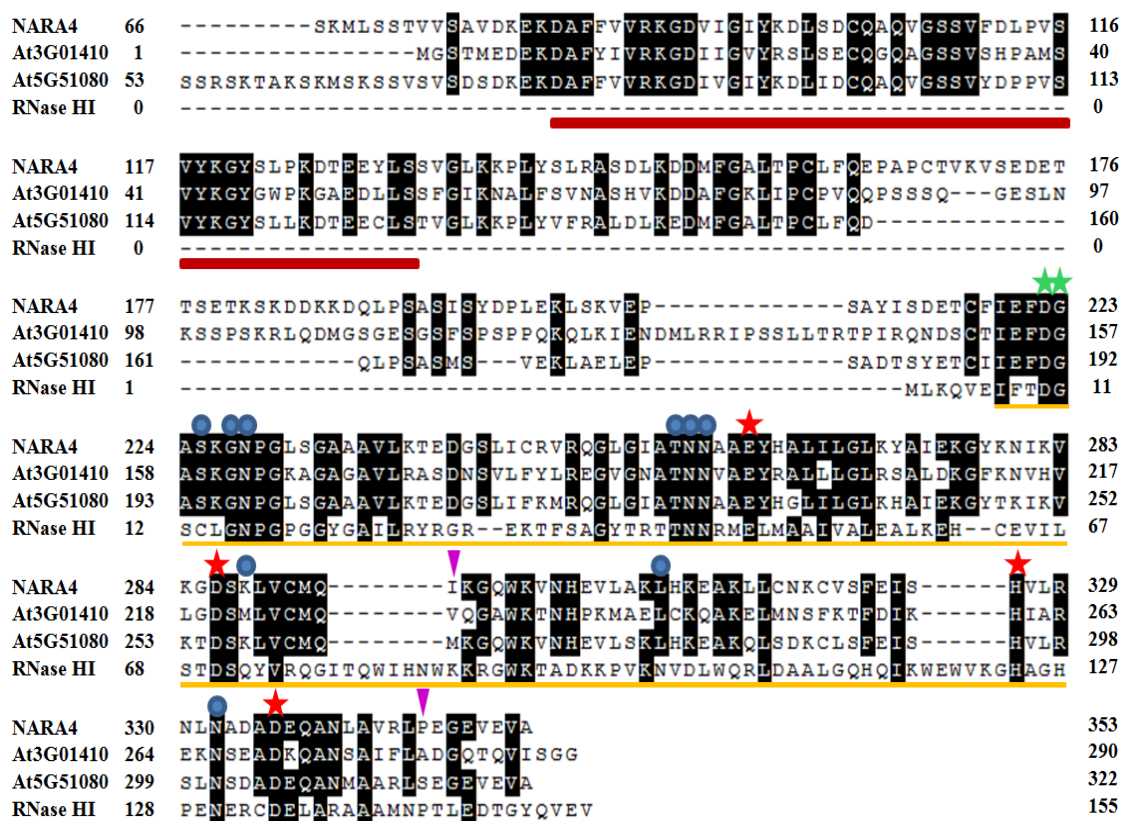


Figure 3-5. NARA4と*E.coli* RNase HIのアミノ酸配列の部分アライメント

シグナルと予想される低保存性のN末端領域は排除した。これらのタンパク質に共通したモチーフとして、赤線は“Ribosomal protein L9, N-terminal”、黄色線はRNase HI domainを示す。また紫の矢じりで示したアミノ酸よりもC末端側の構造は、上からそれぞれ、*nara4-1*の変異と*nara4-2*のT-DNAの挿入によって破壊される。また*E.coli* RNase HIの構造情報をもとに、赤星はRNase HIの活性部位を構成するアミノ酸、緑星は金属結合に関わるアミノ酸残基、青は基質であるRNA/DNAに結合するアミノ酸の位置を示した。

・ *nara4* 変異体アリの表現型解析と相補試験

NARA4 の生体内における機能を理解するために、*nara4-1* 変異体と *nara4-2* 変異体の表現型を解析した。*nara4-1* 変異体では NARA4 の RNase HI ドメインの領域が変異により破壊されている (Fig. 3-5)。また *nara4-2* 変異体では、T-DNA の挿入が RNase HI ドメインをコードしている遺伝子領域よりも後方で起こっているが (Fig. 3-6)、完全長 *NARA4* mRNA の欠損している。これらの変異体を 9 日間土壌で生育させたところ、矮小・黄化した外観を示し、その様子は両者極めて類似していた。またそれは子葉ではあまり異常がみられず、それよりも上位の葉、特に第 1 本葉が比較的厳しく黄化するという珍しい表現型を示した (Fig. 3-6)。従って、NARA4 は本葉の葉緑体に関連した葉の生長に重要であり、両変異体は NARA4 の機能が同程度に低下した変異体であることが示唆された。

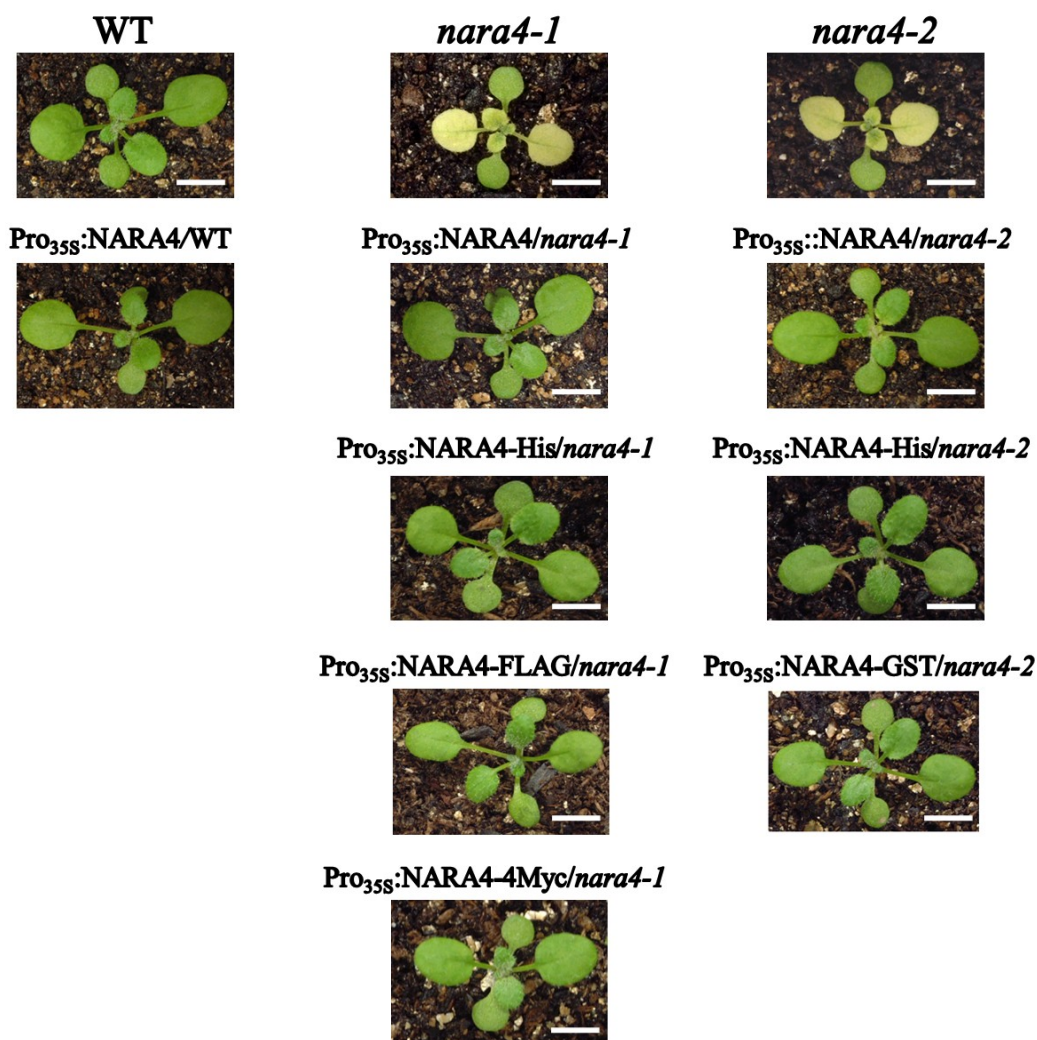
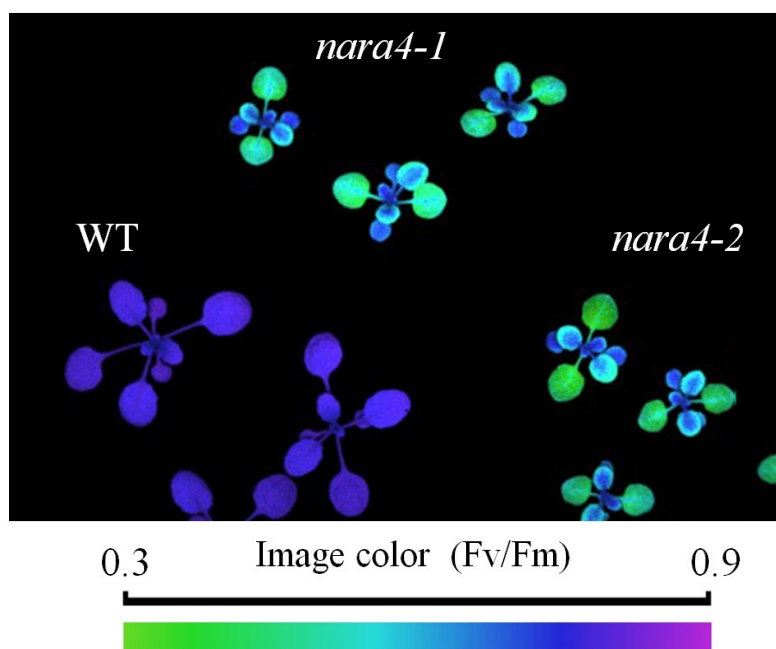


Figure 3-6. *nara4* 変異体アリとそれらの相補系統の表現型

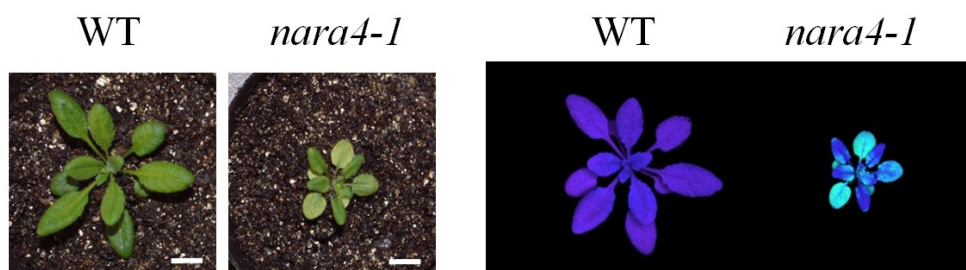
各植物体は土壌で9日間生育させた。 Bars = 0.5cm

*nara4* 変異体アリルにおける本葉の著しい黄化は、写真では判別しにくいがよく見るとやや斑にみえた。またこの黄化から、光化学系の機能の低下が予測された。そこで *nara4* 変異体アリルの葉のどの領域が特に異常を有するのか明確にするために、二次元クロロフィル蛍光解析を行い PSII の最大量子収率である Fm/Fv の値を求め、イメージ映像として可視化した(Fig. 3-7)。Fm/Fv は、PSII に光量子があたったときの光化学反応が起こる確率を示している。9 日目の植物体を調べた結果、本葉の特に第一葉において Fm/Fv の顕著な低下が見られ、子葉では大きな異常は見られなかった。24 日目の *nara4-1* 変異体では、9 日目の植物体よりも全体的に Fm/Fv の若干の回復が見られたが、第 1 葉でやはり顕著な低下が観察された。以上のことから、NARA4 は本葉の特に第 1 葉における光化学反応の最大化に必要であることが示唆された。

A



B



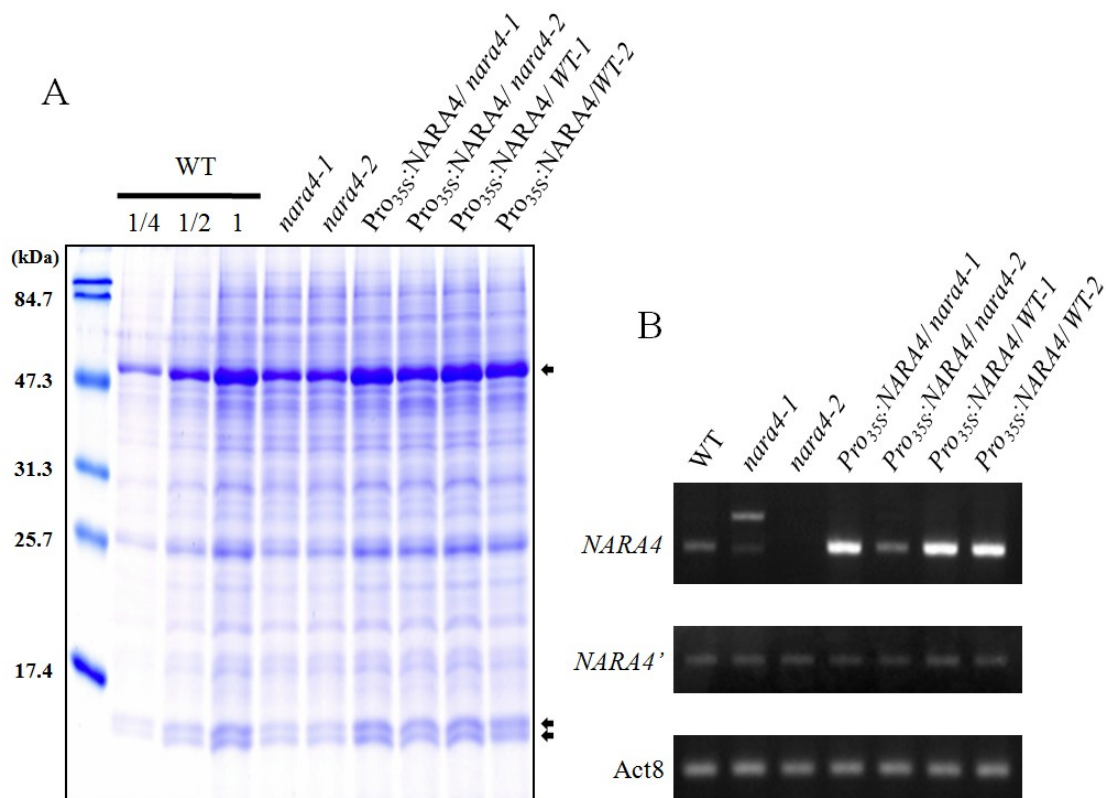
**Figure 3-7. *nara4*変異体アリルにおけるFm/Fvのイメージング**

A. 発芽後9日目の植物体。Fm/Fv値のカラーイメージは下のバーに示した。

B. 発芽後25日目の植物体。左はデジタルカメラで別に撮影したもの。Bars = 1cm。



*nara4-2* 変異体が *nara4-1* 変異体と同様に RuBisCO の蓄積量が低下しているかどうか知るために、SDS-PAGE により RuBisCO 蓄積量を解析した(Fig. 3-8)。その結果、*nara4-2* 変異体においても RuBisCO 蓄積量が約 3~4 割に低下していた。次に、これらの表現型が NARA4 の欠損に起因しているかどうかを明らかにするために、*nara4* 変異体アレルに CaMV 35S プロモーター制御下で野生型 NARA4 cDNA を発現させた。その結果、変異体における矮小・黄化といった外観の異常に加え、RuBisCO 蓄積量の回復が見られた(Fig. 3-6; 3-8)。また NARA4 の C 末端に各種タグ(His, FLAG, 4Myc, GST)を連結した融合タンパク質を発現させた形質転換体においても表現型の回復が見られた(Fig. 3-6)。RT-PCR 解析により、導入した NARA4 及び内在性の NARA4' の転写産物量を測定したところ、NARA4 の転写産物のみの増加が観察された。以上のことから、NARA4 が RuBisCO の高蓄積に重要であることが明らかとなった。

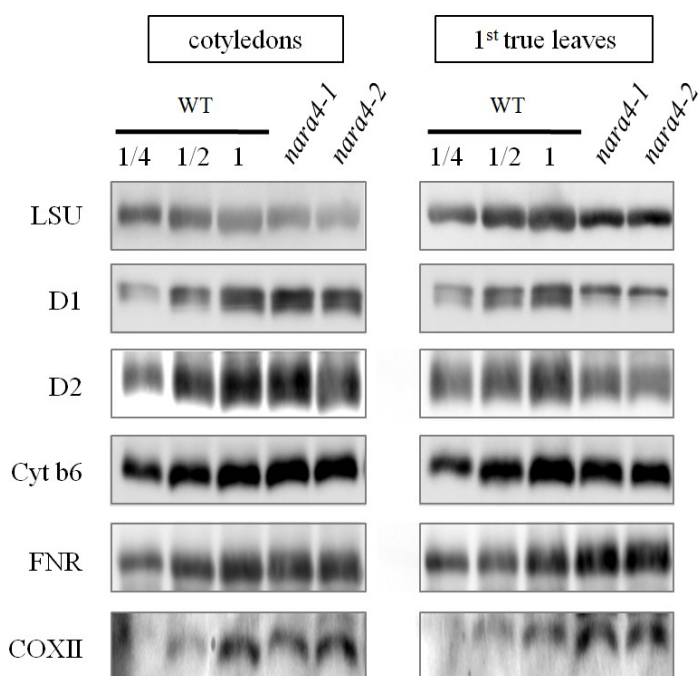


**Figure 3-8. *nara4*変異体アレルにおけるRuBisCO蓄積量とその相補試験**

サンプルは発芽後9日目の植物体地上部を用いた。A. Total proteinのCBB染色像。野生株は左から2.5  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g、それ以外の植物は10  $\mu$ gのTotal proteinを泳動した。B. NARA4とNARA4'のRT-PCR解析。Act8は内部標準として用いた。矢印はそれぞれRuBisCO LSUとSSUsを示す。

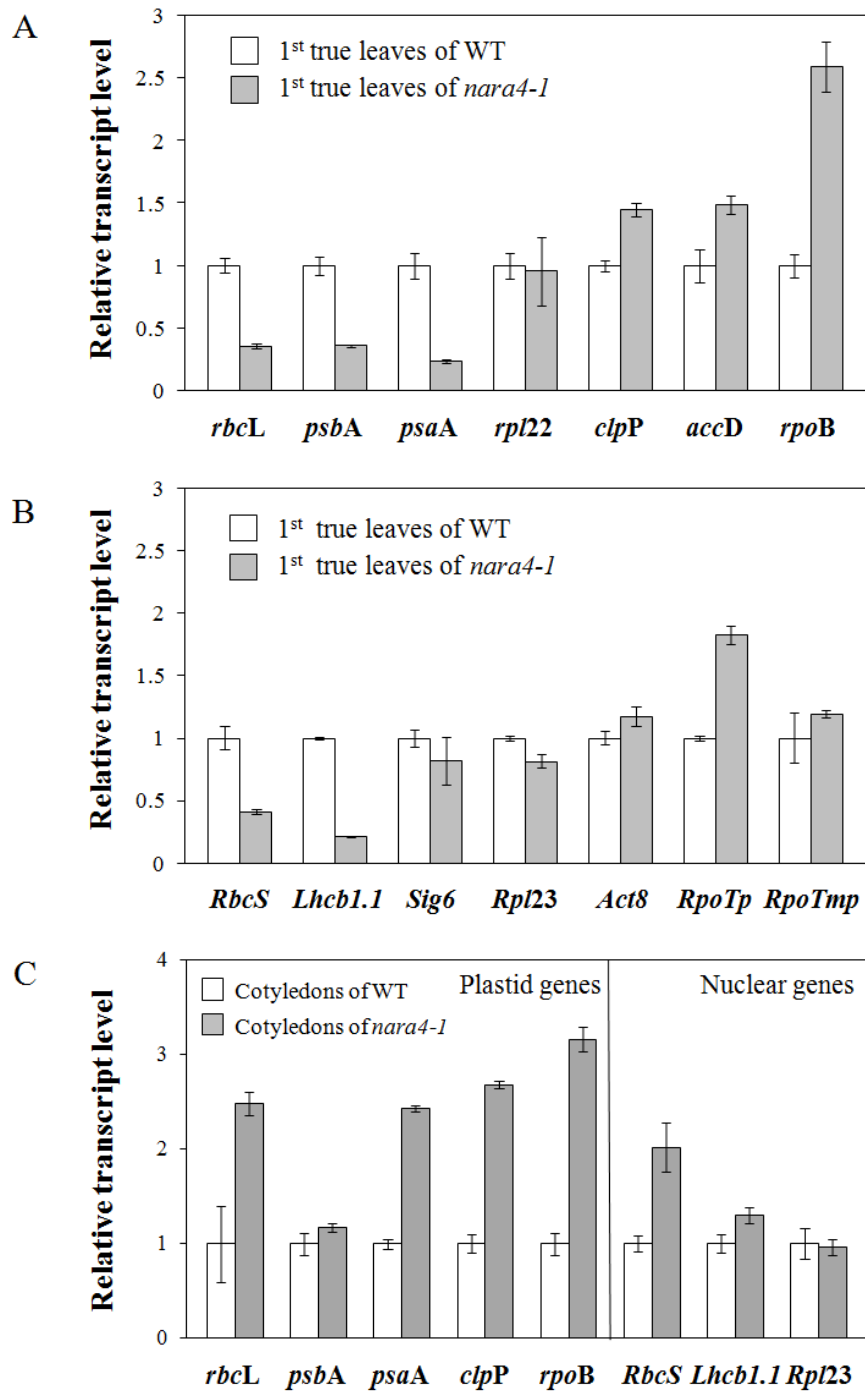
### ・ *nara4* 変異体アリの第 1 本葉における光合成遺伝子の発現異常

*nara4-1* 変異体の子葉の緑化過程において RuBisCO 蓄積量の低下が見られなかったこと (Fig 2-7)、また *nara4* 変異体アリの本葉が著しい黄化や PSII の最大量子収率の低下を示すことを考慮すると、NARA4 が特に第 1 本葉で RuBisCO および他の光合成タンパク質の蓄積に関わっていることが予想された。そこでこの仮説を検証するために、*nara4* 変異体アリの子葉と第 1 本葉における光合成タンパク質のイムノブロット解析を行った (Fig. 3-9)。その結果、子葉では光合成タンパク質の蓄積には大きな異常が見られなかった。一方の本葉では、プラスチド遺伝子にコードされる PSII 複合体の核である D1 と D2 タンパク質、加えて Cyt *b<sub>6</sub>/f* 複合体の核コンポーネントの 1 つである Cyt *b<sub>6</sub>* の量が、RuBisCO LSU の量とおおよそ同程度に約 3~4 割に減少していた。さらに、これらのサブユニットは、それぞれの光化学系膜タンパク質複合体の蓄積量を反映する鍵コンポーネントであるため、同複合体を構成する他のサブユニットも減少していることが示唆された。これとは対照的に、核遺伝子にコードされる光合成タンパク質である FNR やミトコンドリア遺伝子にコードされるミトコンドリア局在の Cytochrome oxidase subunit II (COX II) は全く減少していなかった (Fig. 3-9)。これらの結果は、NARA4 の機能が、子葉よりも第一本葉において、プラスチド遺伝子にコードされる光合成タンパク質の高蓄積に必要とされることを示している。



**Figure 3-9.** *nara4* 変異体アリにおける光合成タンパク質の蓄積異常  
発芽後 9 日目の子葉 (左) と第 1 本葉のイムノブロット像を示す。

*nara4*変異体における光合成タンパク質量の低下の原因を追究するために、*nara4-1*変異体の子葉と第1本葉における核とプラスチドの光合成遺伝子の転写産物量をReal-time PCRにより定量し、野生株と比較した。また様々な非光合成遺伝子の転写産物量も測定した。まず第1本葉におけるプラスチド遺伝子にコードされる光合成遺伝子の転写産物量を比較すると(Fig. 3-10A)、*rbcL*、*PsaA*をコードする*psaA*、D1をコードする*psbA*の遺伝子発現量が約3~4割に低下していた。一方、非光合成遺伝子であるRibosomal protein L22をコードする*rpl22*、Clp proteaseをコードする*clpP*、acetyl-CoA carboxylase  $\beta$  subunitをコードする*accD*、PEP  $\beta$  subunitをコードする*rpoB*の転写産物量は変化しないかあるいは増加する傾向にあった。次に、第1本葉における核ゲノムに存在する光合成遺伝子の転写産物量を比較すると(Fig. 3-10B)、*RbcS*と*Lhcb1.1*の発現量が、プラスチドの光合成遺伝子と同程度に低下していた。なおこの*RbcS*は*A.thaliana*に存在する4つの*RbcS*の転写産物の総量を示している。一方、葉緑体の転写に関連した遺伝子、*Sig6* (gene of SIG6) , *RpoTp* (one of NEP gene), *RpoTmp* (one of NEP gene)は、変化しないかあるいは増加する傾向にあり、細胞質のタンパク質をコードする遺伝子*Act8* (gene of Actin 8), *Rpl23* (gene of L23 ribosomal protein)は変化しなかった。以上のことは、NARA4が本葉における光合成遺伝子産物の高蓄積に選択的に必要とされることを示唆している。一方、子葉では、プラスチドの光合成遺伝子と核光合成遺伝子の両者は、変化しないかあるいは増加する傾向にあった(Fig. 3-10C)。この子葉における転写産物の増加の原因はよくわからない。しかし、この子葉の段階では、NARA4が光合成タンパク質の遺伝子発現に必要とされていないことがわかった。



**Figure 3-10. *nara4-1*変異体の第一本葉における光合成遺伝子の発現異常**

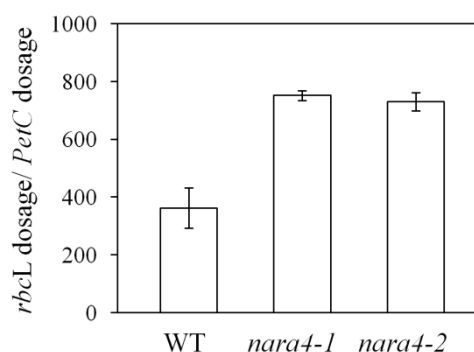
発芽後9日目の変異体を用いた。データは、3個体平均±標準偏差であり、野生株の値を1とした時の相対値を示した。A. 第1本葉における葉緑体光合成遺伝子の転写産物量の比較。B. 第1本葉の核光合成遺伝子の転写産物量の比較。C. 子葉における葉緑体及び核光合成遺伝子の転写産物量の比較。



RNase HI はゲノムの複製や遺伝子の転写に関わることや、植物では葉緑体ゲノム数が非常に多く存在するということを考慮すると、*nara4* 変異体における光合成遺伝子産物量の低下は、それらの遺伝子量の低下に起因していることが予想される。そこで予備的な実験ではあるが、Real-time PCR により、変異体の第 1 葉におけるプラスチドの光合成遺伝子 *rbcL* の遺伝子量と核の光合成遺伝子 *PetC* の遺伝子量を測定した(Fig. 3-11)。その結果、変異体において *rbcL/PetC* の値がおよそ 2 倍に増加していた。これは予想に反して、変異体では葉緑体ゲノムのコピー数の増加と共に *rbcL* 遺伝子量が増加した可能性を示唆している。

**Figure 3-11. *nara4*変異体アレルにおける *rbcL/PetC*遺伝子量の比較**

発芽後9日目の変異体第1本葉における *rbcL* 遺伝子量と *PetC* の遺伝子量の比を示した。データは、3個体平均±標準偏差である。

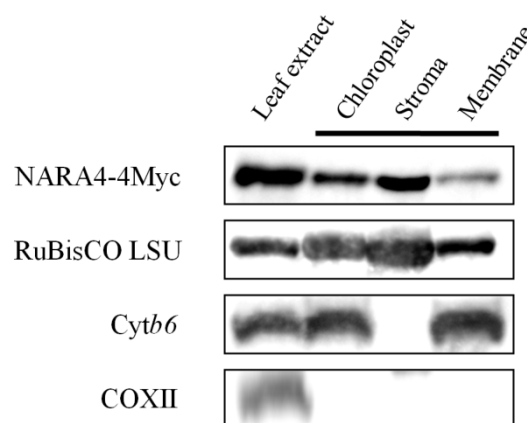


#### ・NARA4 の細胞内局在解析

*In Silico* の局在予測の結果と一致して NARA4 が葉緑体に局在するかどうか検証した。まず NARA4 に対するペプチド抗体、及び NARA4-His、NARA4-FLAG、NARA4-GST、NARA4-4Myc 融合タンパク質の各種タグに対する抗体を用いて、野生株あるいは NARA4-Tags 形質転換体を材料に NARA4 タンパク質の検出を試みたが、NARA4-4Myc 以外を検出することはできなかった(data not shown)。Pro<sub>35S</sub>NARA4-4Myc/*nara4-1* から葉緑体を単離し、anti-Myc 抗体を用いたイムノブロット解析を行った(Fig. 3-12)。その結果、NARA4 が葉緑体ストロマで検出された。これは NARA4 の葉緑体局在を示唆している。しかし、他の光合成タンパク質である LSU や *Cytb6* とは異なり NARA4-Myc のバンドが葉緑体画分に濃縮されなかったため、NARA4 が葉緑体以外の場所にも局在しているか、あるいは NARA4 遺伝子の過剰発現がこの解析に害を及ぼしているという疑問が残った。

**Figure 3-12. NARA4の局在解析**

発芽後21日目のPro<sub>35S</sub>NARA4-4Myc/*nara4-1*の葉抽出液、葉緑体、ストロマ画分と膜画分におけるanti-Myc, anti-RuBisCO LSU, anti- *Cyt b<sub>6</sub>*, anti-COXII 抗体を用いたイムノブロット解析結果を示す。各レーンには等量のタンパク質をアプライしており、それは上図から下図へ、それぞれ 50 µg、10 µg、10 µg、25 µgである。



### 3-4 考察

本論では、植物において初めて RNaseHI ドメインを含むタンパク質の生理学的重要性を示した。それは、NARA4 が第 1 本葉における光合成遺伝子の転写産物量の増加に関わることで、RuBisCO を含めた光合成タンパク質の高蓄積に貢献しているということである。

NARA4 遺伝子の構造に関して、RACE 法と RT-PCR 解析により、新規な NARA4 cDNA の構造を決定した(Fig. 3-1, -2)。一方、TAIR に記載されている COG 領域を含む *Atlg24090* の転写産物は検出されなかった(Fig. 3-3)。現在のところ、同定した NARA4cDNA の部分配列に相当する cDNA や EST 情報、ペプチド情報はわずかに存在するが (data from TAIR and AtProteome)、NARA4 と COG 領域の連結部分をカバーした情報は存在していない。そのため、NARA4+COG 領域という遺伝子単位が存在するかどうかは不明瞭である。いずれにせよ、単離した NARA4 cDNA に相当する NARA4 mRNA のみが *nara4* 変異体アリルでは欠損し RuBisCO 蓄積量が低下すること(Fig. 3-3, -8)、また NARA4 cDNA の導入がこれらの変異表現型を完全に相補したことを踏まえると(Fig. 3-5, -6)、本実験により解析した NARA4 変異株の表現系は、COG 領域を含まなく、かつ RNase HI ドメインを有する NARA4 の機能に起因すると結論できる。

*nara4*変異体アリルでは、子葉では大きな異常が見られず本葉の特に第1葉が顕著に黄化し、光合成遺伝子の発現量が低下するという珍しい表現型を示した(Fig. 3-6, -7, -9, -10)。これに類似した外観を示す変異体として、*A.thaliana*の変異体である *cls8*変異体が知られている(Garton et al., 2007)。この変異体は、deoxyribonucleoside diphosphates合成酵素である Ribonucleotide reductase (RNR)の機能低下株であり、葉緑体ゲノム/核ゲノムの量比が低下する変異体としても知られている。これらの表現型の根本的な原因は明らかでないが、*nara4*変異体アリルにおける *rbcl/PetC*の量比の増加ということを含めて考慮すると(Fig. 3-9)、葉緑体ゲノムの複製の異常がこの様な表現型に結びつく可能性がある。あるいはNARA4ホモログ遺伝子による機能重複の結果として本葉以外では表現型が見られなかったことも考えられる。一方、子葉と本葉の性質の違いを示している興味深い変異体として、*Cyo1*変異体と *Sco1*変異体がある(Table 1-2, 1-3)。これらは葉緑体分子シャペロンCYO1と葉緑体翻訳伸長因子cpEF-Gである SCO1の変異体であり、*nara4*変異体とは逆に、子葉はRuBisCO蓄積量の低下を伴うアルビノ形質を示すが、本葉は野生株と同じく緑の葉が生えてくるという表現型を示す。特にCYO1が若い時期に特異的に発現しているタンパク質であるということから、子葉と本葉における葉緑体の遺伝子発現機構は異なるタンパク質によって構成されていることが示唆される。

*nara4*変異体アリルでは、プラスチドゲノムにコードされる光合成タンパク質や、またそれらと複合体構造を形成している光合成タンパク質複合体のサブユニットの蓄積には異常が見られるが、一方の核の光合成遺伝子由来のFNRやFBAといったタンパク質の蓄積には異常を示さない(Fig. 3-9)。この表現型は、葉緑体の遺伝子発現システムの異常に起因していることが考えられる。これに類似して、上述した*Cyo1*変異体や、チラコイド膜の形成に異常を有する*CpftsY-1*変異体や*alb3*変異体では、チラコイド膜の光合成タンパク質量が著しく低下するが、FNRなどは全く低下しないことが報告されている (Shimada et al., 2007; Asakura et al., 2008)。従って、NARA4が葉緑体で、光合成タンパク質の蓄積に寄与していることが示唆される。これは、NARA4が葉緑体に局在することが示唆されたこと(Fig3-12)、*nara4*変異体アリルにおける*rbcL/PetC*の量比の増加によってNARA4が葉緑体ゲノムの複製に関与することが示唆されたこと(Fig. 3-11)によって支持される。さらにFigure 3-10では、*nara4*変異体アリルにおける核及び葉緑体の光合成遺伝子産物の量が同程度に低下している。これは、以下の理由から、葉緑体の光合成遺伝子発現異常に起因すると考えられる。葉緑体の転写といった遺伝子発現機構に異常を有し葉緑体の光合成遺伝子産物が低下する場合は、その異常が葉緑体から核へプラスチドシグナルとして伝達され、核の光合成遺伝子の転写産物量が同様に低下することが知られている(Rapp and Mullet, 1991; Gray et al., 2002)。一方、核の光合成遺伝子発現量が低下した場合、*RbcS*のアンチセンス*N. tubucum*の表現型を例に挙げると、それは*rbcL* mRNAの減少を全く伴わない。*RbcS* mRNAの減少によりRuBisCO SSU量が低下すると、RuBisCO サブユニットの量比を揃えるために、RuBisCO LSUは葉緑体の翻訳段階で合成が抑制されることが知られている(Rodermel, 1999)。このようなサブユニット量を調節するための会合に依存した各サブユニットの合成調節は、Control by epistasy of synthesis (CES process)と呼ばれる制御機構であり、PSII, PSI, Cyt *b*<sub>6</sub>, ATP synthaseの場合においても見られる(Choquet and Wollman, 2002; Wobbe et al., 2008)。故に、これらの核の光合成遺伝子発現の異常は、葉緑体の光合成遺伝子産物量に影響は与えないと考えられる。以上を総合すると*nara4*変異体では葉緑体の遺伝子発現システムに異常を有しており、これからNARA4がこのシステム機能を最大限に発揮するために必要な因子であると結論した。

では、どのようにNARA4が葉緑体光合成遺伝子の転写産物の蓄積に関与しているのだろうか？葉緑体におけるNARA4の機能を、*nara4*変異体の表現型と他生物種のRNase Hの機能と関連させて考えると、NARA4が葉緑体ゲノムの過剰複製の抑制および葉緑体光合成遺伝子の転写の円滑化に寄与しているという仮説が立てられる。*E. coli* RNaseH欠損株では、通常用いられる複製起点である*OriC*とは別の*OriK*にてR-loop依存のconstitutive stable DNA replication (構成的安

定DNA複製が起こることが知られている(Kogoma, 1997)。R-loopは、RNA鎖が二本鎖DNAの片方の相補的なDNAに結合することで形成されたRNA/DNAハイブリット鎖の構造であり、これはRNA polymeraseによる転写時に形成される(Kogoma, 1997)。すなわち*E.coli* RNase Hは通常条件下では起こらない場所で形成されたR-loopの分解を通じて、異常部位からのゲノム複製反応を抑制するという生理学的機能を持っている。一方、これらの複製に関わる作用とは異なり、R-loopの形成は、遺伝子の転写反応における1つの弊害としても知られている。遺伝子上に不必要に形成されたR-loopはRNA polymeraseの伸長反応を阻害することが報告されている(Drolet, 2006)。それを防ぐべくして、生物はRNase Hを保有しているし、またDNA二重らせん構造の巻き戻しや、転写中のRNA鎖を転写後で働くタンパク質で包みこむかスプライグすることで、R-loopの形成を抑制していると考えられている(Li and Manley et al., 2005; Drolet, 2006)。一方、植物の葉緑体ではR-loopの解析は行われていないが、分子量が小さい葉緑体ゲノムが多量に存在すること、また光合成遺伝子の転写も大規模に起こることを考慮すると、葉緑体はR-loop形成の危険に非常にさらされていると予想される。つまり*nara4*変異体では、R-loop形成によりゲノム複製の暴走や光合成遺伝子の転写阻害が併発している可能性がある。NARA4は、RNaseHI活性によるR-loopの分解を通じて、RuBisCO高蓄積に貢献しているのかもしれない。

NARA4 遺伝子の転写産物量が多かった第2葉や花序と(Fig3-4)、*nara4* 変異体アリの表現型が最も顕著に見える第1葉の間には、発現量と変異表現型に関する時間や部位のずれが生じている。この原因は2つの可能性があり、1つは、変異体の第1葉以外の葉においてNARA4 ホモログである At5g51080 などの機能によってNARA4 機能低下が相補されていることが考えられる。またもう1つの可能性としては、NARA4 が上記の様な R-loop の分解を通じて転写の円滑化やゲノムの過剰複製の抑制に関与していた場合、変異体では転写異常に起因して光合成タンパク質量が低下し第1葉における黄化がその外観に現れるが、後者のゲノム過剰複製の抑制に関わる表現型はその外観に現れていないだけの可能性がある。葉緑体ゲノムの複製は葉原基を含む茎頂分裂組織や若い葉組織で盛んであり(Baumgartner et al., 1988)、*A.thaliana* の葉緑体 DNA polymerase I など同等の部位で発現量が高いことが知られている(Mori et al., 2005)。NARA4 の遺伝子発現パターンはこれらにおおよそ近い様に見える。つまり、葉緑体ゲノムの過剰複製の抑制にはより多くの NARA4 が必要とされているのかもしれない。

以上から、NARA4 が葉緑体 RNase HI であることを想定すると、植物 RNase H が光合成タンパク質の高蓄積を介して、光合成の最適化に寄与しているという新概念が生み出される。今後、NARA4 のさらなる生理学的重要性を知るためには、葉緑体ゲノムの複製と転写、R-loop 形成、NARA4 の関連性を調べる必要がある。

## 第4章

### プラスチドの光合成遺伝子の大規模発現を担う NARA5 の分子遺伝学的解析

#### 4-1. 序論

プロプラスチドから葉緑体への分化は、光合成という観点から説明すると、豊富な光合成タンパク質または機能的な光合成システムを備えたオルガネラへの形質変化とみなせる。これは、Mullet (1993)が提唱した単子葉の葉緑体分化モデルに従うと、葉の生長と関連付けて、いくつかの段階におおまかに分けて説明される。まず葉原基のプロプラスチド（あるいはエチオプラスト）にて、プラスチドゲノムの複製が活性化される。プラスチドゲノムには、ゲノム複製に関わる遺伝子が無いため、これは核遺伝子によって制御されているが、*in vivo*におけるその分子機構の詳細はよくわかっていない (Sato, 2003; 2005)。次に葉の生長過程において、まずプラスチドゲノム上の転写・翻訳系に関わる遺伝子の発現が活性化される。この活性化は、T7 Phage-type RNA polymerase である NEP 転写システムによる（ただし翻訳系の一部は PEP 転写システムによる）の活性化に起因している (Shiina, 2006)。続いてすぐ様、プラスチドゲノム上の光合成遺伝子の転写が活性化される。これは、Eubacterial-type RNA polymerase である PEP による転写の活性化に大きく依存している (Shiina, 2006)。その後葉緑体が発達していくと、大半の光合成遺伝子の転写活性は低下するが、光合成遺伝子の中でも D1 や D2 タンパク質のサブユニット遺伝子の発現は高いままで維持される。これは光化学系 II が光阻害を受けやすいため、壊れた光化学系 II を素早くターンオーバーするために必要とされる。またこのようなプラスチド遺伝子の遺伝子発現と期を合わせて、核における光合成遺伝子などの葉緑体機能に関連した遺伝子群の発現が促進される。

このような葉緑体の分化過程において、光合成タンパク質の高蓄積を達成するためには、NEP 及び PEP 転写システムの活動が 1 つの鍵段階となっている。NEP 転写システムの構成や活性制御に関わる研究は PEP のそれよりも遅れているが、いくつかの転写関連因子と共に働くことや、PEP 転写システムで転写された Glu-tRNA が NEP 活性を抑制することで分化過程における NEP から PEP 転写システムへのスイッチングが行われるというモデルなどが報告されている (Liere and Maliga, 2001; Hanaoka et al., 2005; Shiina, 2006)。一方、光合成遺伝子、または翻訳に関わる一部の遺伝子を転写する PEP 転写システムは、そのプロモーターの認識に必要な Sigma factors (SIGs) と複合体を形成して機能することが知られている (Allison et al., 1996; Kanamaru et al., 2001; Ishizaki et al., 2005)。その活性調節に関しては、光による SIGs の発現レベルの増大や、光や Redox signal

を介した Sigma factors (SIGs)のリン酸化と脱リン酸化を通じた調節機構などが報告されている(Shiina, 2006; Lysenko, 2007)。また SIGs は *A.thaliana* において 6 つ存在し(AtSig1~At Sig 6)、それぞれが異なるプラスチド遺伝子セットの転写に必要とされることがわかっている(Tozawa et al., 2007)。

第 2 章の研究から、*nara5* 変異体は、機能未知の pfkB-type carbohydrate kinase (pfkB-CK) family protein、NARA5 の遺伝子に変異を有することが明らかとなった。*nara5* 変異体は、単離した *nara* 変異体の中で最も RuBisCO 蓄積量が低下した株であるため、NARA5 が RuBisCO 高蓄積に大きく貢献していることが予想される。pfkBs-CK は、主に核酸や糖代謝で機能する Ribokinase (RK), Adenosine kinase (ADK), Guanosine/inosine kinase (GSK), Fructokinase, Minor 6-phosphofructokinase, Tagatose-6-phosphate kinase, 2-dehydro-3-deoxygluconokinase といった多数の carbohydrate kinase を含む大きな kinase family の 1 つである(Wu et al., 1991; Bork et al., 1993)。一方、植物のゲノム上にはこれらと類似したアミノ酸配列を有する pfkB-CK family protein がいくつか存在し、*A.thaliana* では NARA5 を含め 17 個存在する。しかしながら、それらの機能は全く明らかになっていない。

本章では、生体内における NARA5 と RuBisCO 高蓄積の関連を理解するために、*nara5* 変異体やその遺伝子破壊株の遺伝学的解析を行った。その解析を通じて、プラスチド及び葉緑体への分化過程において、NARA5 がプラスチドの光合成遺伝子の転写産物、特に *rbcL* の転写産物の高蓄積に、また翻訳に必須な rRNA の高蓄積に不可欠であることを明らかにした。これは、NARA5 が PEP 転写システムに関わることで RuBisCO 高蓄積に貢献しているということを示唆しており、pfkB-CK family protein の生体内の新しい生理学的重要性を示していると考えられる。

## 4-2. 材料と方法

### • 植物材料

*A thaliana* Columbia (Col-0)、*nara5-1* 変異体、*nara5-2* 変異体 (GABI-KAT line: ID 718C05)、本章で作製した形質転換体と相補系統である Pro<sub>35S</sub>: NARA5/WT, Pro<sub>35S</sub>: NARA5/*nara5-1*, Pro<sub>35S</sub>: NARA5-sGFP/*nara5-1*, Pro<sub>35S</sub>: NARA5-His/*nara5-2*, Pro<sub>35S</sub>: NARA5-sGFP/*nara5-2* を用いた。これらの株は全て Col-0 バックグラウンドである。*nara5-1* の変異型、*nara5-2* の T-DNA 挿入型に関しては、全てホモ接合体のものを用いた。バッククロスに関して、*nara5-1* 変異体が 3 回、*nara5-2* 変異体が 2 回行ったものを用いた。*nara5-2* 変異体は、ABRC より購入した。

### • 生育条件

植物体の生育に用いた MS 培地の組成は 2 章に記載した。生育環境は、大気、弱光条件[ 50  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (light 18 h/ dark 6 h) ], 23°C である。生育日数は各図のレジェンドに記した。

### • DNA コンストラクトの構築と植物の形質転換

遺伝子のクローニングは、第 3 章に記載した NARA4 のクローニングと同様に行った。attB サイトを付加した NARA5 cDNA は、発芽後 14 日目の植物体地上部の cDNA から以下のプライマーを用いて増幅した。

5'-AAAAAGCAGGCTCCATGGCGTTCTCCCTCCTCTC-3'/

5'-AGAAAGCTGGGTCGAGGTTTCATCAAGACCCAACATCT-3'.

また His タグ及び sGFP と融合するための NARA5 cDNA の増幅用プライマーには、

5'-AAAAAGCAGGCTCCATGGCGTTCTCCCTCCTCTC-3'/

5'-AGAAAGCTGGGTCGAGGTTTCATCAAGACCCAACATCT-3'を用いた。

発現ベクターは pGWB2, -5, -8 を用いた。

### • Quantitative RT-PCR (real-time PCR)

3 章に記載した方法に従って行った。付加的な RT-PCR プライマーは以下のものを用いた。

*NARA5*, 5'-TGAATTCATACAAGTCCATGCTAAT-3'/5'-TCATCCACAACCTCCAGAGAAATC-3';

*psbD* は Ankele et al. (2007)で使用されたものを用いた。また測定した各遺伝子の転写産物量は、特にレジェンドで規定していなければ、*Act2* の転写産物量で標準化して、相対値として示した。

#### ・ウエスタンブロッティング

レジェンドで特に規定していないものに関しては、液体窒素で凍結した植物体地上部を乳鉢で破碎し、EZ 法(Martínez-García et al., 1999)により Total Protein の定量と調整を行った。

タンパク質の電気泳動とウエスタンブロッティングは、2章に記載した方法により行った。一次抗体は3章に記載したものに加え、anti-PsaA と anti-ATP $\gamma$ の抗体を用いた。PsaA に対する抗体は Agrisera (<http://www.agrisera.com/>)より購入した。anti-ATP $\gamma$ 抗体は久堀徹教授(東京大学)より分与頂いた。

#### ・顕微鏡観察

LSM510 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss Microimaging, Jena, Germany)を用いた。励起光源(488 nm)はアルゴンレーザーを用いた。sGFPシグナルは500 to 530 nmのバンドパスフィルターで、クロロフィルの自家蛍光はLP 650 (> 650 nm) optical filterを用いて検出した。測定は付属の説明書に従った。

#### ・クロロフィル蛍光解析

クロロフィル蛍光パラメータは Munekage らの方法に準じ、MINI-PAM portable chlorophyll fluorometer(Walz, Effeltrich, Germany)で測定した(Munekage et al., 2001)。植物体の暗順化は少なくとも 10 分間行い、Fm の測定には 800 ms のパルス飽和光 3,000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  を用い、Ft の測定には 5 分間の励起光 120  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  を用いた。

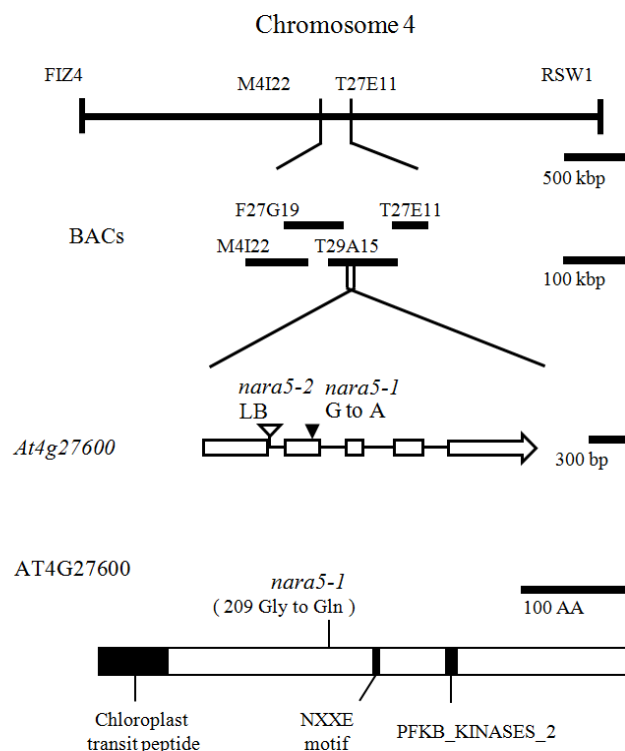


### 4-3. 結果

#### NARA5 遺伝子の特徴付け

NARA5は、471アミノ酸からなるタンパク質であり、4番染色体のBAC, T29A15に位置するAt4g27600にコードされる。NARA5のN末端には葉緑体移行シグナル(TP)の存在が予測されると、TAIRにて記載されている。

**Figure 4-1. NARA5の遺伝子座**  
染色体上のNARA5遺伝子座の位置を示した。*nara5-1*変異体の変異部位と*nara5-2*変異体のT-DNAの挿入位置を矢じりで示した。また、NARA5が有するTPとpfbK-CKに保存された2つのモチーフを示した。



NARA5の特徴を解析するために、NCBI Blastによりゲノムデータベースの中からNARA5の完全長アミノ酸配列と相同性を示すタンパク質を検索した。植物において、*Vitis vinifera*, hypothetical protein (GB: CAN82032)、*O. sativa*, hypothetical protein (GB: NP\_001065468)、*Physcomitrella patens*, predicted protein (GB: XP\_001764628) が、それぞれ 67.1%, 60.7%, 51.4% と高い相同性を示した (Fig. 4-2)。しかしいずれも機能が不明であった。

一方、バクテリアやヒトを含む様々な生物種において、NARA5と約10~20%と低い相同性を示すホモログが多数発見された。その中の大半は機能が不明な pfbK-type carbohydrate kinase family proteinであったが、中には、RK, ADK, GSKと機能が同定・予測されているタンパク質が多く存在した。そこで機能と結晶構造が明らかになっている*E.coli* RK (GB: NP290391)、Human ADK (GB: AAA97893)とNARA5のアミノ酸配列のアライメントをClustal Wのアルゴリズムに従い作製した (Fig. 4-2)。

<i>A. thaliana</i> NARA5	1	-----MAFSLLSPIPTSASLFFTLAITASNNASSSLSRLYSLYHPKGLTRT	48
<i>V. vinifera</i> CAN82032	1	-----MSFTGTMS---FSILPPTSX-PCTTTKLS-----	25
<i>O. sativa</i> NP001065468	1	-----MALASSRLLHRFSSSSLPSPCRRRVPRP-----	31
<i>P. patens</i> XP001764515	1	MAAIAANLPSLTPGGLVQESAVVGGKKKTWTRTDFAVAASASLSSSLSASLKWGR--RR	58
<i>E. coli</i> RK	0	-----	0
<i>H. sapiens</i> ADK	0	-----	0
▼			
<i>A. thaliana</i> NARA5	49	RTATSFFGASGNLRIVSMAENRQLVCRIGGGAGAE LDDMDEGEIQRIGNEDEDDDEFIQV	108
<i>V. vinifera</i> CAN82032	26	-----GGGE-----DDEDE-----DEDEDGEVAEK	46
<i>O. sativa</i> NP001065468	32	HSRFVVRWEHRAAAVVLLLLPRALLGGGFQDADAESDDEEEDAHGVLRPLDADDVNLDL	91
<i>P. patens</i> XP001764515	59	NYGSGNSSLQGDRAVPFMIQELACVCNRDRKLLQLVCNAADKGEISGSOVHGEAQRTEE	118
<i>E. coli</i> RK	0	-----	0
<i>H. sapiens</i> ADK	1	-----MAAAEEPKP	10
<i>A. thaliana</i> NARA5	109	HANNS-SAASERWDVVLGLQAMVDFSGVDDDFLKKLGLERKGTTRRLINHEERGRKILQAM	167
<i>V. vinifera</i> CAN82032	47	EEMG--ASVVPRWDVVLGLQAMVDFSGVDDDFLERLGLERKGTTRRVNHEERGRVILQAM	104
<i>O. sativa</i> NP001065468	92	HAPP---SGERWDVVLGLQAMVDFSGVDDDFLHRLGIQKGTTRRVNHEERGRVIRAM	147
<i>P. patens</i> XP001764515	119	QPYGIPDKEVPRWDVVLGLQAMVDFSGVDDDFLEELGLVKGTRRVVGHHEERGRVIRL	178
<i>E. coli</i> RK	1	-----MQNAGSLVVLGSLNADHILNLQSEFPPG-----ETV	31
<i>H. sapiens</i> ADK	11	KKLKVEAPQALRENILFGMNPFLIISAVVDKDELDKYSLKPNQI LAEDKHKELFDELV	70
<i>A. thaliana</i> NARA5	168	DGCSYKPAAGGSLSNLVAIARLGS-QSICDRPINVMAGSFGGDFLGSFYCTKILRRANV	226
<i>V. vinifera</i> CAN82032	105	DGCSYKPAAGGSLSNLVAIARLGS-RSISGGPPINVMAGSFGSDFLGSFYRDKILRRANV	163
<i>O. sativa</i> NP001065468	148	DGCSYKPAAGGSLSNLVAIARLGSRSRSTNYPELRIMAGSFGSDFLGSFYRAKILRRANL	207
<i>P. patens</i> XP001764515	179	DGRHYKLSAGGSLSNLVAIARLGF-GSSQNSAQNVMITGSGVSDALGDFYRDKILRRANV	237
<i>E. coli</i> RK	32	IGNHVVAEFGKGANQAVAGRSGA-----NIDFIACDSDSICEVSRQCLATDNI	82
<i>H. sapiens</i> ADK	71	KKFKVEYHGGSTQNSIKVAQWMIQ-----QPHKAATFFGCIQIDKKEILKRAAEAV	125
<i>A. thaliana</i> NARA5	227	NFLSAFKIDG--TTGTIVLVTTPDAQRTMIAVYQGSISVVNYDSOLASL----IAKTNVFWV	281
<i>V. vinifera</i> CAN82032	164	NFLSAFKIDG--TTGTIVLVTTPDAQRTMIAVYQGSISVVDYDACLAST----ISKTNILWV	218
<i>O. sativa</i> NP001065468	208	HFLSKPVKIDG--TTGTIVLVTTPDAQRTMIAVYQGSISLSDYDCLASL----VSRSNVWV	262
<i>P. patens</i> XP001764515	238	HFLSQFVVEG--TTGTIVLVTTPDAQRTMISYQGMSSIVNEDSALANA----ISKSRVLWV	292
<i>E. coli</i> RK	83	DITPVSNIKGESTGVALIFVNGEENVIGIHACANAALSPALVEAQ-----RERIANA	135
<i>H. sapiens</i> ADK	126	DAHYYEQNEQ--ETGTCACITIGDNRSLIANLAAANCYKKEKHLDLERNMVLVEKARVCYI	184
<i>A. thaliana</i> NARA5	282	EGYLFELPDTIRTITKRAQCEBAHRNGALVAVTASDVSCIERHDDFWDIIGNYADLWFANS	341
<i>V. vinifera</i> CAN82032	219	EGYLFELPDTIRTITKRAQCEBAHRNGSLVAVTASDVSCIERHDDFWDIIGNYAGLWFANS	278
<i>O. sativa</i> NP001065468	263	EGYLFELPHTIBAIKRAQCEBAHRNGSLVAVTASDVSCIERHDDFWDIIGNYADLWFANA	322
<i>P. patens</i> XP001764515	293	EGYLWEINQTIIBAIKRAQCEBAHQCVLVALTASDVSCVTRHQQFWDMCQSTDLWFANA	352
<i>E. coli</i> RK	136	SALIMQIE SPLSSVMBAKIAHQNKTIIVLNPAPARELPDELLALVDIITPN----ETEAE	191
<i>H. sapiens</i> ADK	185	AGFFLTVSP--ESVLKVAHEPSENRIFTLNLS--APPISQFYKESLMKVMVYVDIIEGNE	241
<i>A. thaliana</i> NARA5	342	DEARALCHFSAEES-----DISATRYMSHFVPLVSVTDGINGSYI GVKGEAVYI PP	392
<i>V. vinifera</i> CAN82032	279	DEARALCHFSKES-----PASATRYLSHFVPLVSVTDGPRGSIYI GIKGEAVYI PP	329
<i>O. sativa</i> NP001065468	323	NEARALCELSSTDS-----PMSAARYLSHFVPLVSVTDGVEGSIYI GVKGEAVYI PP	373
<i>P. patens</i> XP001764515	353	DEARALCAFGDDST-----PEQATKHLNQFPLVSVTDGPRGSIYI GLRGEVVFYI PP	403
<i>E. coli</i> RK	192	EKLGTIRVENDEDA-----AKAAQVLHEKGI RYVLLITLCSRFVWASVNGEGQRVEG	242
<i>H. sapiens</i> ADK	242	DEATFAREQGFETKDIKEIAKTKQALPRMNSKRQRIVLFTQGRDDTIMATESEVTAFAV	301
<i>A. thaliana</i> NARA5	393	S---PCVPVDTGAGDAYASGILY GILRGSDDLKGMGMATAAATVVGQQTRELRVQDA	449
<i>V. vinifera</i> CAN82032	330	S---PCVPVDTGAGDAYASGILY SELRCVSDVKGMTLPAKVAATVVRQQTRELSVHDA	386
<i>O. sativa</i> NP001065468	374	P---PCVPVDTGAGDAYASGILY GILRGSDDLRSIGLLASRVAAVVAQQTRELRVQDA	430
<i>P. patens</i> XP001764515	404	A---PCVPVDTGAGDAYASGVLY GILRGSDDLKGMGDLARVAATVVGQQTREKKEEA	460
<i>E. coli</i> RK	243	F---RVQAVDTIAGDTFNALITALLEKPLPEAIREPHARALIATVTRKGAQPSVQWR	298
<i>H. sapiens</i> ADK	302	LDQDQKEI IDTNGAGDAFVCGFSLSQLVSDKP-LTECIRAGHYAASI IIRRTGCTFPEKPD	360
<i>A. thaliana</i> NARA5	450	VELRSHAFR---LNG-----SGVRIDVGS-----	471
<i>V. vinifera</i> CAN82032	387	VELRESFAFH---LNS-----SAIRSDIGSDHISSL-----	414
<i>O. sativa</i> NP001065468	431	DRLESFTLH---LDN-----LEFCSDIETHVSNF-----	458
<i>P. patens</i> XP001764515	461	LELESVNSLSDLLDNRIMELMGMKDEVVSERISSV	496
<i>E. coli</i> RK	299	EEIDAFLDRQR-----	309
<i>H. sapiens</i> ADK	361	FH-----	362

Figure 4-2. NARA5, 植物のNARA5ホモログ、*E. coli* RK, *H. sapiens* ADKのアミノ酸配列のアライメント 矢じりはTargetPにより予測されたTPの切断部位、星印はnara5変異体における変異部位、下線は上からNXXE motif (Maj et al., 2002) とPFKB\_KINASES\_2 (PROSITE: S00584)をそれぞれ示している。後者の配列は[DNSK]-[PSTV]-X-[STAG](2)-[GD]-D-X(3)-[SAGV]-[AG]-[LIVMFY]-[LIVMSTAP]である。

これらの生物の pfkB-CK において、NARA5 の変異部位である Gly 209 は完全に保存されていた。これは Gly 209 が NARA5 を含め、このファミリーのタンパク質の高次構造または触媒に重要であることを示唆している。また NARA5 は、これらの pfkB family に共通した 2 つの短い高度保存配列モチーフを保有していた(Fig. 4-2)。1 つ目は NXXE motif であり、これは RK や ADK, GSK 活性に重要な  $Mg^{2+}$  と  $PO_4^{2-}$  の結合に関わっている(Maj et al.,2002)。2 つ目は PFKB\_KINASES\_2 というモチーフであり、これは ATP に結合する配列の一部やリン酸基転移に重要な Asp 残基を含んでいる(Schumacher et al. 2000)。しかしながら、これらの pfkB-CK 活性に重要なアミノ酸、例えば RK や ADK のそれぞれの基質である Ribose や Adenosine、または反応に必要な ATP などの結合に関わるアミノ酸は、NARA5 や NARA5 ホモログではあまり保存されていなかった。この結果は、NARA5 がこれらの pfkB-CK とは異なる機能を有していることを示唆している。

NARA5 の系統学的位置付けを明確にするために、Clustal W のアルゴリズムを用いて、機能が同定されている様々な生物種の RK, ADK, GSK と NARA5 ホモログのアミノ酸配列を用いて系統樹を作製した(Fig. 4-3)。この際に、*A.thaliana* ゲノムにおいて NARA5 と最も高い相同性を示した pfkB-CK family protein, At1G19600(16.6 %)とそのホモログ、AtADK2(14.6 %; Moffatt et al., 2000)、および本論で後述する 2 つの pfkB-CK family protein, AT1G69200 と AT3G54090 を系統樹に含めた。興味深いことに NARA5 は、藍藻や高等植物における高相同性の機能未知タンパク質と共に、既知の pfkB-CK とは異なる分岐に位置した。以上のことは、NARA5 がこれらの pfkB-CK とは異なる機能を有しているという仮説を支持している。

一方、NARA5 がこれらの pfkB-CK 活性を有するかどうかを判断するために、*E.coli* 由来の His-tag 融合 NARA5 (TP に相当する 64 残基を除去したもの)を精製し、その後に His-tag を切断除去した NARA5 を用いて、ATP 依存の GK, RK, ADK 活性を測定したが、活性を検出することはできなかった(data not shown)。

以上から、NARA5 が既知の pfkB-CK とは異なる機能を獲得していることが示唆された。

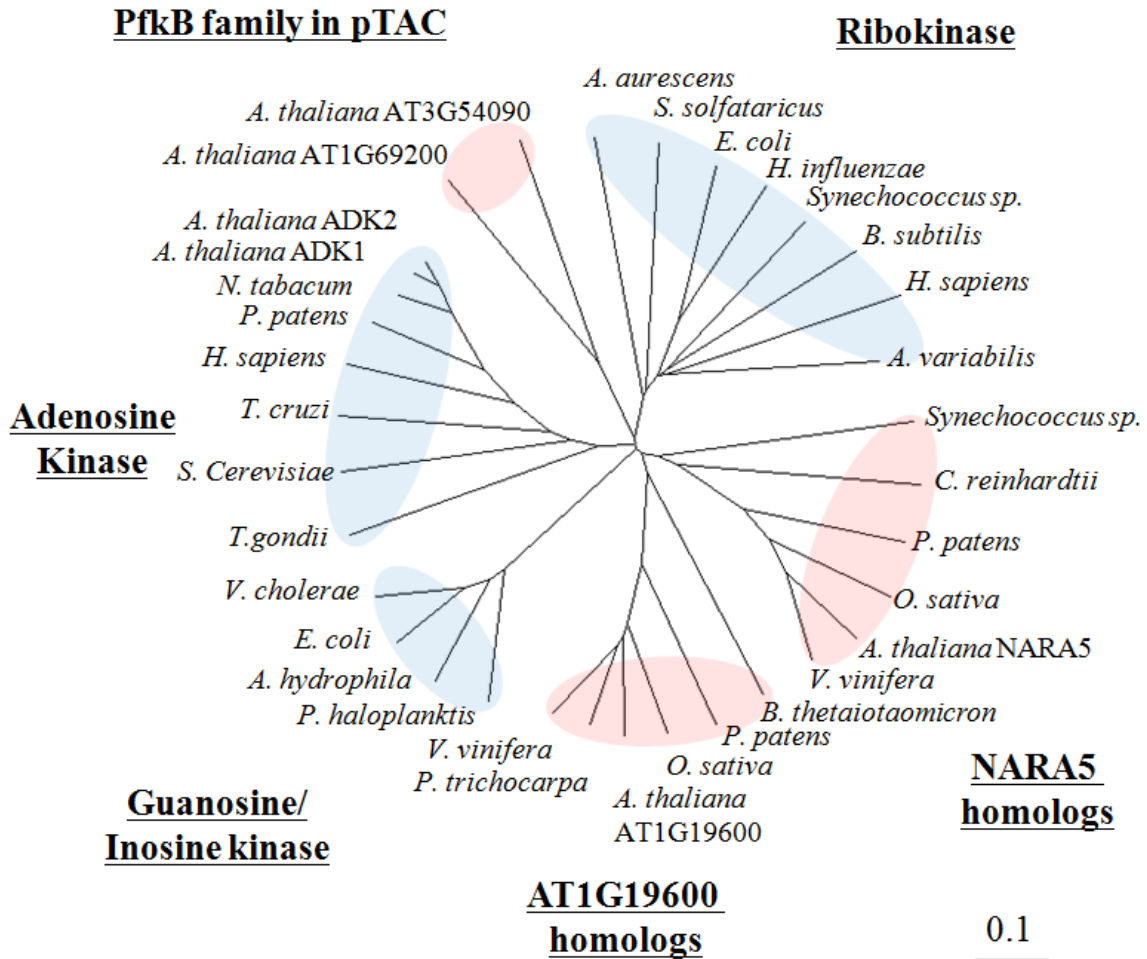
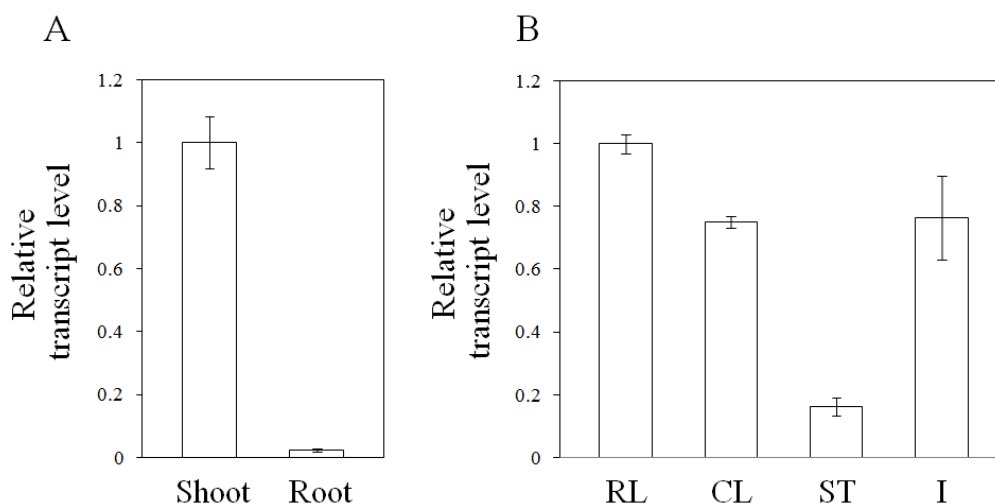


Figure 4-3. NARA5 を含めた機能未知の pfkB-CK family protein と機能が同定されている pfkB-CK のアミノ酸配列系統樹 機能が、未知なものは赤で、既知なものは青で示した。NARA5, RK, ADK のアミノ酸配列のアライメントは ClustalW のアルゴリズムに従い作製し、系統樹の作画には TreeView を用いた。スケールバーは 0.1 substitutions/site を示す。

### ・ *A.thaliana* における *NARA5* の遺伝子発現パターン

*NARA5* の遺伝子発現が活発な時期や組織を知るために、Quantitative RT-PCRにより様々な器官や暗所芽生えの緑化過程における *NARA5* の転写産物を定量した(Fig. 4-4, 4-5)。

発芽後 8 日目の WT における地上部、根での *NARA5* 遺伝子の転写産物量を比較したところ、*NARA5* が主に地上部で高発現していることがわかった(Fig. 4-4A)。そこで、地上部における遺伝子発現パターンを知るために、発芽後 28 日目のロゼット葉、茎葉、茎、花序において、転写産物を定量した(Fig. 4-4B)。その結果、*NARA5* 遺伝子はロゼット葉、茎葉、花序において比較的発現量が高く、茎では発現量が低い事がわかった。このような各器官における *NARA5* の遺伝子発現パターンは植物における RuBisCO 遺伝子の発現パターンとおおよそ一致していた(Manzara and Gruissem, 1988)。



**Figure 4-4. 野生株の組織別における *NARA5* の遺伝子発現パターン**

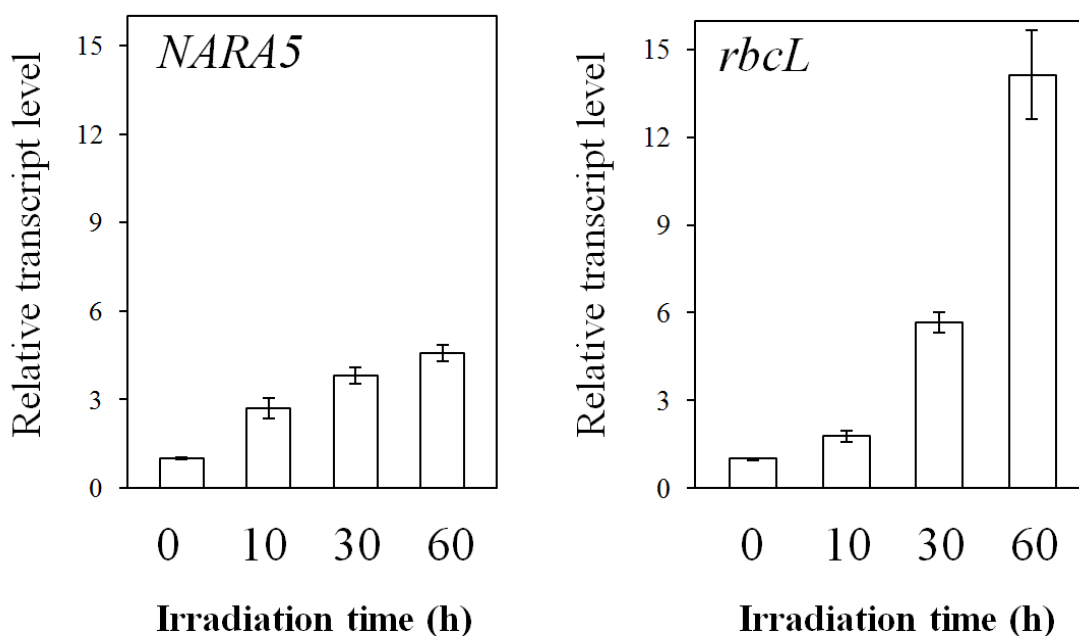
各器官における *NARA5* の転写産物量は、*Act8* の転写産物量で標準化し、野生株の地上部 (A) あるいはロゼット葉 (B) の値を 1 とした時の相対値を示した。

A. MS 培地で 8 日間生育した野生株の地上部と根における遺伝子発現パターン。

B. 土壌で 5 週間生育した野生株のロゼット葉 (RL)、茎葉 (CL)、茎 (ST)、花序 (I) における遺伝子発現パターン。データは、3 サンプル(各組織 1~5 個)の平均±標準偏差を示す。



第二章で記載したように *nara5* 変異体暗所芽生えの緑化過程における RuBisCO 蓄積量が常に低下しているため、NARA5 がこの時期に RuBisCO 高蓄積に寄与していることが予想される。そこで発芽後 4 日目の暗所芽生えの緑化過程における植物体の NARA5 転写産物量と RuBisCO LSU の遺伝子である *rbcL* の転写産物量を定量し、比較した(Fig. 4-5)。その結果、NARA5 は暗所芽生えでも発現しており、その発現量は緑化過程で大きく増加した。またその増加は、*rbcL* よりもやや先立って起こることがわかった。これは葉緑体の分化過程において、RuBisCO の遺伝子発現が起こる直前で、NARA5 が必要とされることを示唆している。



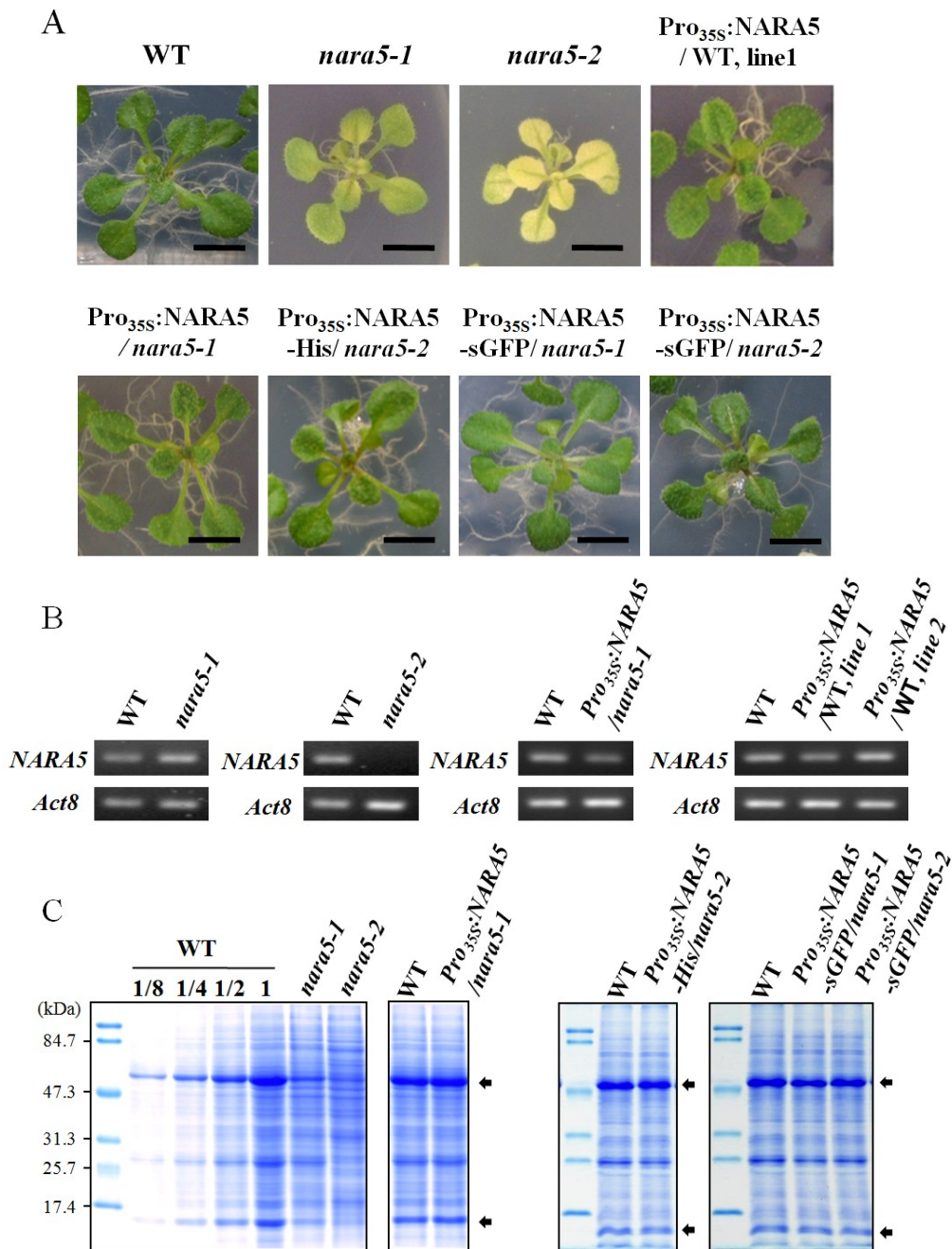
**Figure 4-5.** 暗所芽生えの緑化過程における *NARA5* と *rbcL* の遺伝子発現パターン  
 発芽後 4 日目の暗所芽生え(0 h) に光を 10、30、60 時間照射した後に、植物体から Total RNA を抽出し、Quantitative RT-PCR により各転写産物量を定量した。  
 データは、3 サンプル(各少なくとも 10 個体を含む)の平均±標準偏差であり、暗所芽生えを 1 とした時の相対値を示す。

### ・ *NARA5* 変異体の表現型解析と相補試験

*NARA5* の生体内における機能を理解するために、第二章で単離した点変異体である *nara5* 変異体に加えて、*NARA5* の第一イントロン(Coding sequence の +393)に T-DNA タグが挿入されている *NARA5* 遺伝子破壊株を解析した。この T-DNA 挿入株は、*nara5* 変異体よりも顕著に黄化した外観を示し(Fig. 4-6A)、シヨ糖を含有した MS 培地という従属栄養条件下でないと生育することはできなかった。また *nara5* 変異体は、野生型と *NARA5* 遺伝子破壊株の中間の外観を示すことから、*NARA5* の漏出変異体であることが示唆された。RT-PCR 解析により、*NARA5* 遺伝子破壊株は *NARA5* の転写産物が欠損していることがわかった(Fig. 4-6B)。それとは対照的に *nara5* 変異体では *nara5* の転写産物の量が野生型とほぼ同等であったことから、*nara5* の変異がその遺伝子発現には影響していないことが示唆された。一方、*E.coli* *NARA5* リコンビナントタンパク質を認識できる *NARA5* のペプチド抗体を作製し、野生株や変異体における *NARA5* タンパク質の検出を試みたが、*NARA5* タンパク質を検出することはできなかった(data not shown)。次に、*NARA5* 遺伝子の欠損による RuBisCO 高蓄積への影響を知るために、*NARA5* 遺伝子破壊株における RuBisCO 蓄積量を調べたところ、12.5% 以下と著しく低下していた(Fig. 4-6C)。

これらの植物体における表現型が *NARA5* の点変異や欠損に起因していることを証明するために、CaMV 35S プロモーター制御下で完全長 *NARA5* を *nara5* 変異体と *NARA5* 遺伝子破壊株で発現させた(Fig. 4-6)。その結果、これらの相補株では、*NARA5* 遺伝子が過剰発現されていなかったが、それらの矮小・黄化といった外観と *NARA5* の RuBisCO 蓄積量が野生型レベルにまで回復した。従って、*nara5* 変異体アリの表現型が *NARA5* 活性の低下あるいは欠損に起因していることがわかった。そこでこれらの *nara5* 変異体アリル、*nara5* 変異体と *NARA5* 遺伝子破壊株を、それぞれ *nara5-1* 変異体と *nara5-2* 変異体と命名した。一方、*NARA5* の C 末端に His-tag あるいは sGFP を連結した融合タンパク質、*NARA5*-His と *NARA5*-sGFP を変異体に導入した相補株においても、表現型の完全な回復が見られた。このことは、これらの融合タンパク質が機能的であることを示している。一方、野生型をバックグラウンドに *NARA5* の過剰発現体の作製を試みたが、以上の株と同様に *NARA5* が過剰発現した株は得られなかった(Fig. 4-6B)。

以上の解析から、*NARA5* が *A.thaliana* の RuBisCO 高蓄積に大きく貢献しており、またそれは植物体の光独立栄養生長に不可欠であることが明らかとなった。



**Figure 4-6. *nara5* 変異体アリルとその相補系統の表現型**

A. 発芽後 14 日目の *nara5* 変異体アリルとその相補系統の表現型。Bars = 0.5 cm

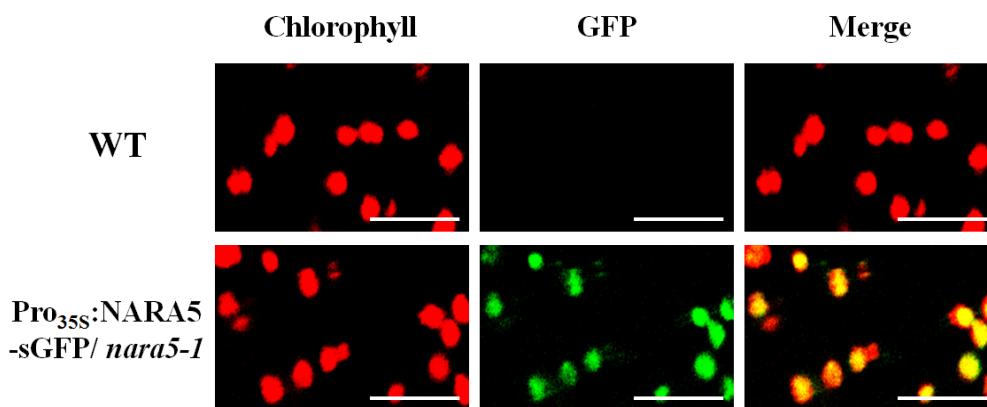
B. A で示した植物体地上部における *NARA5* の転写産物量の RT-PCR 解析像。

C. A で示した植物体地上部における Total proteins の CBB 染色像。各レーンには、野生株は左から 1.25  $\mu$ g、2.5  $\mu$ g、5  $\mu$ g、10  $\mu$ g、変異体や相補系統は 10  $\mu$ g のタンパク質をアプライした。矢印はそれぞれ RuBisCO の大小のサブユニットを示す。



## NARA5 の細胞内局在性

NARA5 は、葉緑体移行の予測シグナルを有することから、葉緑体で機能していることが考えられる。そこで、NARA5-sGFP 融合タンパク質を発現した *nara5-1* 変異体相補株の蛍光顕微鏡観察により、NARA5 が葉緑体に局在するかどうか検証した(Fig.4-7)。観察材料に関して、この形質転換体の sGFP シグナルの強度が弱かったことに加え、葉緑体の自家蛍光が sGFP シグナルの蛍光波長にやや重なってくるため、若い芽生えの胚軸に存在する自家蛍光の低い葉緑体における sGFP 蛍光を観察した。その結果、葉緑体の自家蛍光と sGFP 蛍光の像が重なったことから、NARA5 が葉緑体に局在することが示唆された。これを支持して 4 つの局在予測アルゴリズム、Target P, Wolf PSORT, ChloroP, PREDOTAR (<http://www.inra.fr/predotar/>)の全てが、高スコアで NARA5 が葉緑体に局在することを示した。



**Figure 4-7. sGFP を用いた NARA5 の局在解析**

Pro<sub>35S</sub>:NARA5-sGFP/ *nara5-1* の暗所芽生えに光を 4 時間照射し、その後に胚軸のフック周辺を共焦点蛍光顕微鏡により観察した。赤は葉緑体の自家蛍光、緑は sGFP 蛍光、黄色はそれらが重なりあった領域を示す。Bar = 15 mm。

### ・ *NARA5* 変異体における光合成タンパク質の蓄積異常

*NARA5* が RuBisCO 以外の葉緑体タンパク質の高蓄積に関与するか調べた。

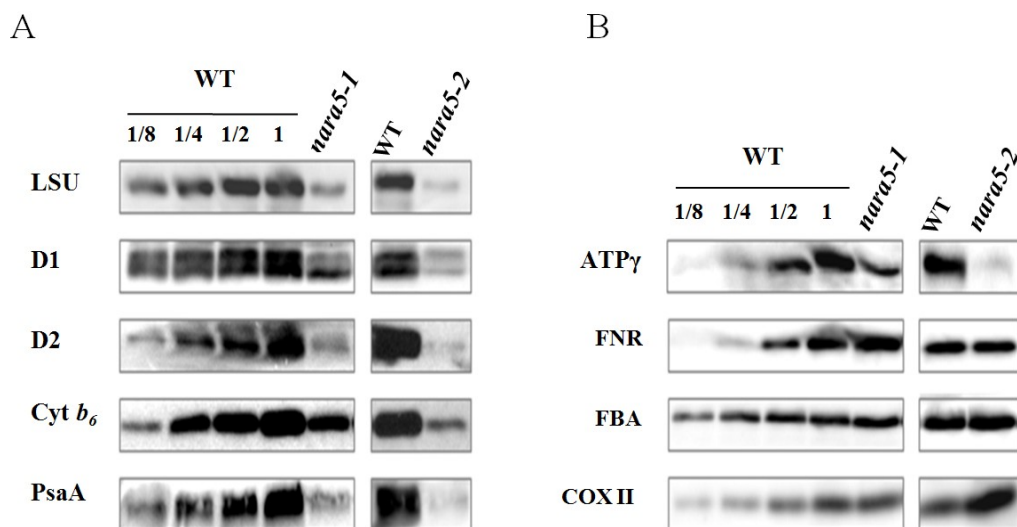
まず *nara5* 変異の光合成能力への影響を調べるために、野生株と *nara5-1* 変異体のクロロフィル蛍光パラメータを比較した(Table 4-1)。PSII の最大量子収率である Fv/Fm に加え、PSII の量子収率ΦII が著しく低下していた。また、Q<sub>A</sub> の還元レベルを示す 1-qP が高い値を示していた。これらの結果は、*nara5-1* 変異体では、PSII 活性の低下、および PSII 以降の電子伝達反応が停滞していることを示している。これより RuBisCO 以外の光合成タンパク質量が著しく低下していることが予想された。

**Table 4-1.** *nara5-1* 変異体のクロロフィル蛍光パラメータ.

Plant	Chlorophyll a fluorescence parameters <sup>a</sup>		
	Fv/Fm	ΦII	1-qP
WT	0.81 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.18 ± 0.01
<i>nara5-1</i>	0.42 ± 0.07	0.13 ± 0.03	0.70 ± 0.10

<sup>a</sup> Data represent means ± SD (*n* = 3).

そこで *NARA5* 変異の RuBisCO 以外の光合成タンパク質の高蓄積への影響を調べるために、発芽後 14 日目の *nara5* 変異体アリルを用いてウエスタン解析を行った(Fig. 4-8)。プラスチド遺伝子に由来する光化学系タンパク質である D1、D2、Cyt *b*<sub>6</sub>、PsaA は全て著しく低下し、それらは *nara5-1* では約 25% 以下に、*nara5-2* では約 12.5% 以下に減少していた。また核の光合成遺伝子にコードされる ATPγ も同程度に低下していた。ATPγ の低下は、プラスチド遺伝子にコードされる他の葉緑体 ATP synthase のサブユニット量の低下に伴って起こったものと予想された。またこのような劇的な光合成タンパク質量の減少は、*N. tubucum* *rbcL* 欠損株では見られないため(Allahverdiyeva et al., 2005)、RuBisCO 活性の低下に起因した 2 次的な影響ではない。一方、核遺伝子にコードされるカルビン回路酵素の FBA や光合成関連タンパク質である FNR、またミトコンドリア局在の COX II は全く減少していなかった。これらの結果は、*NARA5* が、プラスチド遺伝子にコードされる光合成タンパク質の高蓄積に不可欠であることを示唆している。



**Figure 4-8. *nara5*変異体アリルにおける光合成タンパク質のイムノプロット解析**

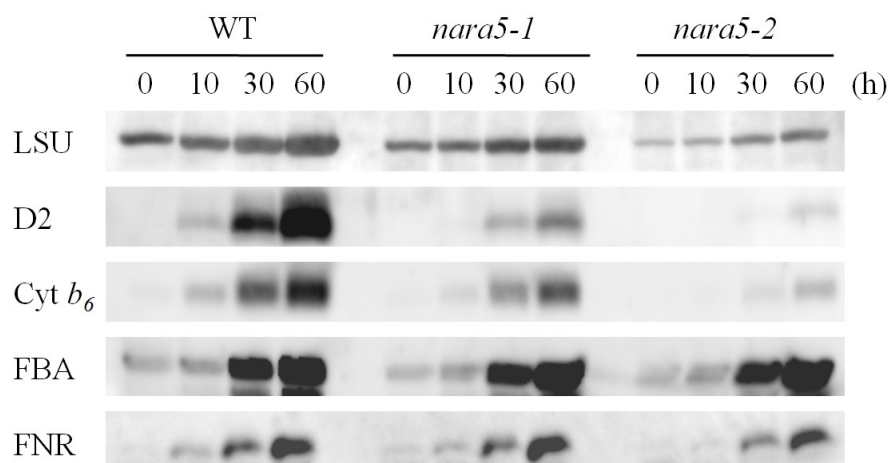
材料には、発芽後 14 日目の *nara5-1* 変異体、かつ発芽後 21 日目の *nara5-2* 変異体の地上部を用いた。野生株は左から 2.5, 5, 10, 20  $\mu$ g Total protein を、変異体では 20  $\mu$ g Total protein を各レーンにアプライした。A. プラスチド遺伝子にコードされる光合成タンパク質のイムノプロット像。B. 核遺伝子にコードされる光合成タンパク質のイムノプロット像。

#### ・ *nara5* 変異体の緑化過程におけるプラスチド光合成遺伝子の発現異常

暗所芽生えの緑化過程における、*nara5-1*変異体のRuBisCO LSUの蓄積異常 (Fig. 2-7)、*NARA5*の転写産物の増加(Fig. 4-5)、それに加えて発芽後2,3週間目の *nara5*変異体アリルにおけるRuBisCO以外の光合成タンパク質の量の著しい低下 (Fig. 4-8)を総合すると、*NARA5*がプラスチドから葉緑体への発達時期に、RuBisCOを含めた光合成タンパク質の大規模発現に寄与していることが予想される。そこでこの時期における*NARA5*の役割を明確にすることを目的に、*nara5*変異体アリルの緑化過程における光合成遺伝子の発現量を、プラスチドの光合成遺伝子を中心に解析した。

まず*nara5*変異体アリルの緑化過程におけるRuBisCO LSU、D2、Cyt *b*<sub>6</sub>、FBA、FNRの量的推移をウエスタンブロッティングにより調べた(Fig. 4-9)。その結果、*nara5-1*変異体よりも程度が厳しく、*nara5-2*変異体の暗所芽生えとその緑化過程においてRuBisCO LSU量の著しい低下が観察された。これより*NARA5*は、プロプラスチドから葉緑体に至るまでの全ての過程において、RuBisCOの高蓄積に大きく寄与していることがわかった。また電子伝達系タンパク質であるD2とCyt *b*<sub>6</sub>は、野生株の緑化に伴って劇的に蓄積していくが、*nara5*変異体アリルの緑化時期ではそのような高蓄積は見られなかった。これらとは対照的に、この時期の変異体におけるFBA、FNRの蓄積にはほとんど異常が見られなかった。以上のこ

とから、*nara5*変異体アリルでは、葉緑体の発達に伴って、核と細胞質そして葉緑体の2重包膜の輸送段階といった光合成遺伝子の発現システムは正常に構築されるが、葉緑体における光合成遺伝子の発現システムは正常に構築されないことが示唆された。

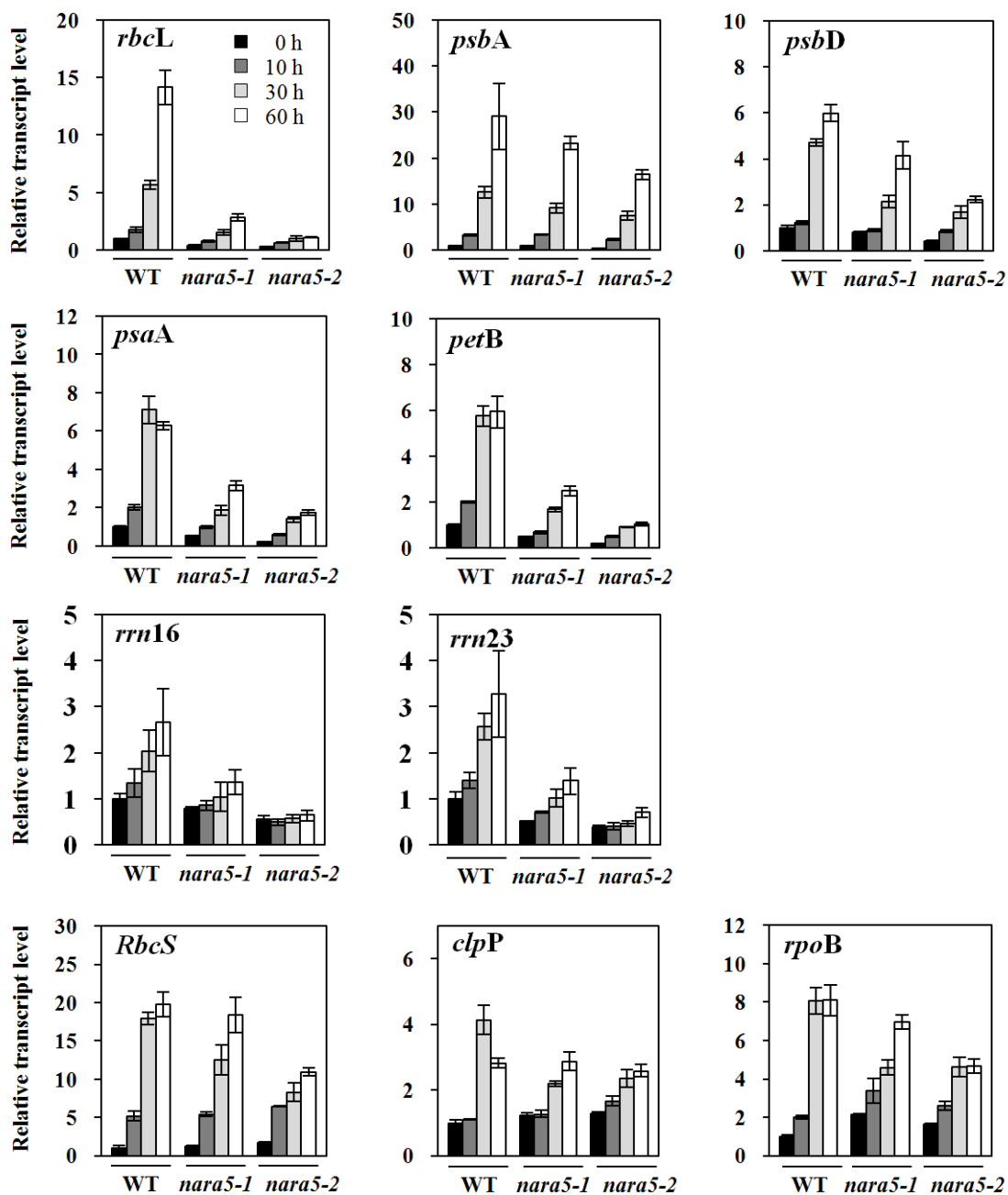


**Figure 4-9. *nara5*変異体アリルの緑化過程における光合成タンパク質の蓄積異常**

材料には、発芽後4日目の*nara5*変異体アリルの暗所芽生え(0 h)、および光を10、30、60時間照射した芽生え全体を用いた。各レーンに同量にアプライしたタンパク質の組成と量に関して、RuBisCO LSUとFBAは可溶性タンパク質を5 μg、D2とCyt *b*<sub>6</sub>は不溶性タンパク質を5、10 μg、FNRは全タンパク質10 μg用いた。

*nara5*変異体アリルにおける光合成タンパク質量の低下の原因を追究するために、*nara5*の暗所芽生え、及びその緑化過程における光合成遺伝子の転写産物量の変化をreal-time PCRにより追跡した(Fig. 4-10)。プラスチドゲノムにコードされる光合成遺伝子 *rbcL*, *psaA*, *psbA*, *psbD* (gene of D2 protein), *petB* (gene of Cyt *b*<sub>6</sub>)の転写産物量は、*nara5*の暗所芽生え及びその緑化過程において常に減少していた。さらにポリシストロニックに転写される*rrn16*, *rrn23*の遺伝子産物である16S rRNAと23SrRNAの蓄積量も低下していた。これらの遺伝子の中で、*rbcL*の転写産物量が*nara5-2*変異体の光照射60時間において、野生株の7.8%と最も低下していた。*rbcL*と同等量存在することで知られる*psbA*の転写産物は(Rapp et al., 1992)、半分程度にしか低下していなかった。以上の遺伝子は主にPEPにより転写される。一方、NEPによって転写される*rpoB*や、PEPとNEP両者によって転写される*clpP*、そして核の*RbcS*の転写産物量は、光照射後の初期段階(<30 h)では野生株と同等かそれ以上であるが、後期(>30 h)においてわずかに減少し始めた。よってこれは、3章の考察で述べたように、葉緑体の遺伝子発現の異常に伴う二次的な影響であると思われる。従って、NARA5の機能は、主にPEPによ

り転写される光合成遺伝子の転写産物の高蓄積と16S, 23S rRNAの高蓄積に重要であり、特に*rbcL*の遺伝子産物の高蓄積に大きく貢献することが明らかとなった。



**Figure 4-10. *nara5*変異体の緑化過程におけるプラスチド遺伝子産物の蓄積異常**

植物材料は、Figure 4-5, -9と同じものを用いた。*RbcS*のみが核の光合成遺伝子である。データは、3サンプル(各少なくとも10個体を含む)の平均±標準偏差であり、野生株の値を1とした時の相対値を示した。

#### 4-4. 考察

本論では NARA5 が、*A.thaliana* の暗所芽生えの緑化過程、すなわちプロプラステド（あるいはエチオプラスト）から葉緑体への分化過程において、*rbcL* を中心とした光合成遺伝子の転写産物および 16S, 23S rRNA の量の増加に必要とされることを明らかにした。これは、葉緑体における RuBisCO を含めた光合成タンパク質の高蓄積、および植物体の光独立栄養生長に不可欠な現象である。また以上のことは、*pfkB-CK family protein* が生体内において光合成遺伝子発現に寄与していることを示した初めての報告である。

NARA5 は、2つの短いモチーフを除けば ADK や RK, GSK といった既知の *pfkB-CK* と重要な配列相同性を示さず(Fig. 4-2)、系統解析では光合成生物の NARA5 ホモログと共にこれらとは分岐した 1つのクラスターを形成している(Fig. 4-3)。NARA5 のホモログは、陸上植物に普遍的に存在し、相同性は低いが生体シアンバクテリアや緑藻種にもそのホモログは存在している。これは、他の生物の核酸合成や糖代謝経路で機能する *pfkB-CKs* とは異なり、植物が光合成遺伝子発現のために特化した機能を有する *pfkB-CK family protein* である NARA5 を獲得していることを示唆している。

*A.thaliana* には 17 個の *pfkB-CK family protein* が存在するが、うち NARA5 を含め 8 個が Target P あるいは PSORT によって葉緑体に移行すると予測される。実際、本論より NARA5 が葉緑体に局在することが示唆された(Fig. 4-7)。また The Plastid Proteome Database (<http://ppdb.tc.cornell.edu/default.aspx>)では他の 2つの *pfkB-CK family protein* (At1G66430 AT4G28706)が葉緑体ストロマで検出されたことが登録されている。さらに注目すべきタンパク質として、NARA5 との相同性は低いが生体、AT1G69200 と AT3G54090 という *pfkB-CK family protein* がある(Fig. 4-3)。これらは *A.thaliana* や *Sinapis alba* の葉緑体画分から分離された PEP を含む葉緑体の転写活性画分(pTAC)に含まれるタンパク質の MS 解析によって検出されていた(Pfalz et al., 2006)。pTAC には Table 1-3 に記載した RuBisCO 高蓄積に大きく貢献する機能未知因子 pTAC2, -6, -12 も含まれている。また *N. tubucum* において、AT3G54090 のホモログタンパク質が、アフィニティ精製された PEP 複合体に含まれることが報告された(Suzuki et al. 2004)。これらのタンパク質の解析は行われていないが、以上の知見から、*pfkB-CK family proteins* が生体内で PEP 転写システムと共に機能していることが示唆される。

本論では NARA5 自身の機能は明らかにできなかったが、これらの知見と NARA5 変異体アレルの表現型から、NARA5 も PEP 転写システムで機能していることが予想される。NARA5 変異体アレルでは、その暗所芽生えや緑化過程において、PEP に転写される光合成遺伝子の転写産物のみが全体的に減少してい

る傾向にあったことがこの仮説を支持している(Fig. 4-10)。また野生株では、緑化過程でプラスチドの光合成遺伝子や PEP  $\beta$  subunit の遺伝子 *rpoB* の転写産物量が著しく増加することに類似して、NARA5 の転写産物量が増加することがわかった(Fig. 4-6; -10)。以上から、緑化過程における光合成遺伝子の発現量の増加には、NARA5 による PEP 転写システムの正の調節が必要であることが推定される。このような変異体の表現型や遺伝子発現のパターンは、若い子葉の時期に PEP 転写システムに必要とされる AtSIG6 の欠損株の表現型や、野生株において光誘導的に増加するこの AtSIG6 の遺伝子発現のパターンとも類似している(Ishizaki et al., 2006)。異なる点として、この欠損株は生育過程でその表現型が回復することが知られているが、これは SIG6 よりも遅れて発現する他の SIGs による機能相補の結果であると解釈されている。一方、*N. tubucum* の PEP 欠損株ではそのような回復はみられず、アルビノ形質であることが知られている(Allison et al., 1996)。NARA5 と高い相同性を示すタンパク質は *A.thaliana* ゲノムに存在してなく、NARA5 変異体アリの表現型も生育過程で回復しないため、NARA5 の機能は唯一のものであると考えられる。また注目すべき点として、NARA5 変異体アリルでは、PEP により転写されるプラスチド遺伝子の中でも特に *rbcL* の転写産物量が顕著に低下していた(Fig. 4-10)。この結果から、NARA5 が *rbcL* の転写に比較的強く関わっていることが考えられる。現在、PEP の転写遺伝子の特異性は 6 種の SIG によって決定されていると考えられている。それぞれの *A.thaliana* の SIG 欠損株に関して、Sig2 では tRNA の量が顕著に低下し、同様に Sig3 では *psbN* が、Sig4 では *ndhF* が、Sig5 では *psbD* が、一方 Sig6 では PEP により転写されるプラスチド遺伝子の転写産物量が全て減少するという表現型を示している(Kanamaru et al., 2001; Zghidi et al., 2006; Favory et al., 2005; Tsunoyama et al., 2004; Ishizaki et al., 2005)。SIG1 に関しては、*O.sativa* の *OsSig1* 欠損株が *PsaA* operon の特異的な発現量の低下という表現型を示す(Tozawa et al., 2007)。興味深いことに、これらの SIGs の欠損株において *rbcL* mRNA が優先的に低下するという現象は観察されていない。このことから、SIGs による PEP 転写システムの標的特異性の制御とは別に、NARA5 が PEP 転写システムの *rbcL* への特異性を強めるために機能している可能性がある。

一方、mRNA の安定性も、葉緑体 mRNA の蓄積量を決定する要因であるため、NARA5 が主に *rbcL* mRNA などの光合成遺伝子の転写産物の安定化に寄与している可能性がある。しかしながら、これを支持する他の重要な知見は無い。

2つのうちどちらの可能性が正しいのかわからないが、少なくとも NARA5 は、葉緑体の分化過程における *rRNA* の転写産物の増加による翻訳装置の増大、かつ光合成遺伝子、特に *rbcL* の転写産物量の増加に関わることで、RuBisCO を含めた光合成タンパク質の高蓄積に寄与していると結論される。

## 第5章

### 結論

植物は、RuBisCO を含めた光合成タンパク質の高蓄積を達成することで、最大限の光合成反応を行うことができる。本研究では、RuBisCO を中心とした光合成タンパク質の高蓄積と、その背景にある光合成遺伝子の大規模発現機構に関する新たな知見を得ることを目的に、RuBisCO 蓄積量が低下した *A.thaliana* 変異体の選抜法を確立した。この方法は、RuBisCO オキシゲナーゼ反応を初発とした光呼吸と植物生長に対する MSX の阻害効果に基づいている。MSX と単一窒素源として Glutamine が存在する栄養培地では、大気・強光下において、RuBisCO 蓄積量が多い植物体は光呼吸 NH<sub>3</sub> の高蓄積を伴って枯死に至るが、RuBisCO 蓄積量が低下した変異体は生存することができる。実際に、この系により多数の RuBisCO 蓄積量が低下した *nara* 変異体の単離が可能であることを示した。この系は、植物の種子を選抜培地プレートに播種し、そのプレートを異なる環境下のチャンバーに移すという操作のみで、RuBisCO 蓄積量が低下した *nara* 変異体を選抜できるという簡便性が最大の利点である。さらに西村と共に、計 6 系統の *nara* 劣性変異体の原因遺伝子を決定したところ、RuBisCO 高蓄積に不可欠な新規遺伝子 NARA4, NARA5, NARA12 を発見することができた。以上の成果は、本選抜系の有効性を示しており、これは RuBisCO 高蓄積に関わる更なる新規因子の同定に今後大いに有効利用できると考えられる。

興味深いことに、RuBisCO 蓄積量がやや低下した *nara* 変異体は既知の遺伝子の変異体であったが、RuBisCO 蓄積量が大きく低下した *nara* 変異体は全て機能未知遺伝子の変異体であった。このことは、高等植物の RuBisCO 高蓄積に関わる分子機構は未だその一端しか理解されていなく、かつ膨大な数の核遺伝子が多角的に作用する実に巧妙な光合成遺伝子の大規模発現機構の存在を想像させる。この考えを支持するように、RuBisCO を除く光合成遺伝子の転写後研究が比較的進んでいる緑藻の *Chlamydomonas reinhardtii* では、*psaA* RNA のトランススプライシングに少なくとも 14 の遺伝子が関与することがわかっている (Goldschmidt-Clermont, 1998; Barkan and Goldschmidt-Clermont, 2000)。これから、葉緑体の遺伝子発現には数百の遺伝子が関与すると想像されている。また Table 1-3 に挙げた例のように、未だその関与が明らかでない RuBisCO 高蓄積に関わる因子が高等植物には多く存在すると思われる。それらの大半は、今までの知見をもとに考えると、RuBisCO を含めた光合成タンパク質の遺伝子発現段階に普遍的あるいは選択的に作用すると思われるが、中には BSD2 の様に RuBisCO



の合成に特異的に作用する因子がある可能性もある。*Chlamydomonas reinhardtii* の 76-5EN 変異株の表現型は、*rbcL* の転写が特異的にほぼ欠損していることが報告されている(Hong and Spreitzer.,1994)。この変異部位は同定されていないが、この変異体の存在は、高等植物においてもこの様な RuBiCO 合成に特異的な因子が存在することを示唆しているのかもしれない。

RuBiCO を含めた光合成タンパク質の高蓄積には、それらの遺伝子発現のための装置のみならず、装置を活性化するためのシグナル、駆動力、または核酸やアミノ酸などの材料の大規模な合成、そして光合成遺伝子の高発現に伴う弊害の打破が必要であると考えている。活性化シグナルとしては、諸論で述べたように光やサイトカニンなどの重要性が知られている。駆動力や材料に関しては、2章で示した NARA3 や葉緑体 ATP synthase が RuBiCO 高蓄積に必要な ATP の生産に必要であったことが例として挙げられる。また3章で述べた核酸合成経路で働く RNR の変異体表現型もその重要性を示している(Garton et al., 2007; Yoo et al., 2009)。大規模発現に伴う弊害の打破の例としては、葉緑体の包膜輸送装置である TOC complex が、TOC のアイソザイムを使い分けて、光合成タンパク質と非光合成タンパク質を分別して輸送していることが挙げられる(Kubis et al., 2003; López-Juez and Pyke, 2005)。これは多量に存在する光合成タンパク質が、微量なハウスキーピングタンパク質の輸送を阻害しないようにするために必要な機構であると考えられている。3章では、NARA4 が第1本葉における光合成遺伝子の大規模発現に寄与することを明らかにし、これは転写時に形成される転写阻害という弊害を引き起こす R-loop を NARA4 の RNaseHI 活性によって抑制しているという仮説を提唱した。これに関しては今後のさらなる検証が必要であるが、仮にこの仮説が正しいとするならば、これは光合成遺伝子の大規模発現に伴う弊害の打破の一例として挙げられるだろう。第4章では、NARA5 が、葉緑体の分化過程において、rRNA の増加、または *rbcL* を中心とした光合成遺伝子の転写産物の増加に寄与していることを明らかにしたが、これは葉緑体の翻訳装置の増大に加え、RuBiCO を含めた光合成タンパク質の高蓄積に必要な mRNA という設計図の大量生産に、NARA5 が不可欠であることを示していると考えられる。

以上より、本論文では、RuBiCO 高蓄積機構の正の遺伝学的解析により、新規因子である NARA4 と NARA5 を同定し、それらが RuBiCO を含めた光合成遺伝子の大規模発現を通じて、植物の光合成能の最適化に貢献していることを明らかにした。

## 謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分化形態形成学講座、および地球環境産業技術研究機構 (RITE) 植物研究グループにて、横田明穂教授のご指導のもと、平成 14 年 9 月から平成 21 年の 9 月までの 7 年間にわたって行われました。そして研究は多くの人々に支えられました。

本学では、横田明穂教授が研究の楽しさと喜び、そして厳しさといった研究の心と論理、そして Rubiscology を伝授してくださいました。蘆田弘樹助教が、最も長時間にわたって面倒を見て下さり、また研究に対する鋭くかつ独創的な視点と姿勢、また思いやりを教えてくださいました。明石欣也助教は、研究に関する国際的な作法と分子生物学的手法をご指導してくださいました。宗景ゆり助教は、光化学系の研究手法をご指導くださいました。また河内孝之準教授と竹村美保助手から様々な温かいご助言を承りました。藍原真弓研究助手が、研究材料の管理や実験のお手伝いをしてくださいました。先輩では、Sandhya Mehrotra 研究員、吉村和也研究員、稲井康二研究員、七里吉彦研究員、高原健太郎研究員、斎藤洋太郎研究員といった様々な方々にお世話になりました。特に、高原健太郎さんは研究生生活に関して素晴らしい知恵と勇気を授けてくださり、斎藤洋太郎さんは追い込みの精神と粘度の高い議論の方法をご指導くださいました。同期生の新井伸吾とは、共に RITE 兄弟の地位を確立しました。後輩では、同研究グループの西村健司と青木武彦が、共に実験を行い、共に歌い、研究生生活の楽しさを共感してくれました。また様々な研究室の仲間達に支えられ、励まされました。他の講座では、形質発現植物学講座の森田美代准教授が NARAMAPS の使用法をご教授下さり、また多くの先生方が親切に研究に関するご意見をくださいました。以上の方々に、深い敬意と感謝の意を申し上げます。

RITE では、研究の前半 2 年間を中心に、富沢健一主席研究員が研究発表の論法をご指導くださいました。高瀬尚文主任研究員には、温かいご助言と安らぎ、そして膨大量の飲料水を御馳走していただきました。三宅親弘主任研究員には、深く厳しい研究の見方を学びました。また岩前智子研究助手には、RITE での礼儀作法と植物への愛情の注ぎ方を教わりました。また兵頭秀樹研究員、足立崇研究員、嶋岡泰世研究員、北島佐紀人研究員、奥村暁研究員に実験手法を学びました。以上の方々に、尊敬と感謝の意をこめて御礼を申し上げます。

学外では、*rca* 変異体を Archie R Portis Jr (University of Illinois) より、ATP $\gamma$  抗体を久堀徹教授(東京工業大学)に、FNR 抗体を長谷俊治教授 (大阪大学) より、ご親切に分与頂きました。ここに厚くお礼を申し上げます。

最後に、長きにわたり私の心を支えて下さいました 父、母、姉、親戚、友人、犬、鳥、植物に、心より感謝申し上げます。ありがとうございました。

## 参考文献

Allahverdiyeva Y, Mamedov F, Mäenpää P, Vass I, Aro EM (2005) Modulation of photosynthetic electron transport in the absence of terminal electron acceptors: characterization of the *rbcl* deletion mutant of tobacco. *Biochim Biophys Acta* **1709**: 69-83.

Albrecht V, Ingenfeld A, 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.

Allison A, Simon D, Maliga P (1996) Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J* **15**: 2802-2809.

Ankele E, Kindgren P, Pesquet E, Strand Å (2007) In vivo visualization of Mg-ProtoporphyrinIX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast. *Plant Cell* **19**: 1964-1979.

Apuya NR, Yadegari R, Fischer RL, Harada JJ, Zimmerman JL, Goldberg RB (2001) The *Arabidopsis* embryo mutant *schlepperless* has a defect in the *chaperonin-60alpha* gene. *Plant Physiol* **126**: 717-730.

Asakura Y and Barkan A (2006) *Arabidopsis* orthologs of maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiol*. **142**: 1656-1663.

Asakura Y, Kikuchi S, Nakai M (2008) Non-identical contributions of two membrane-bound cpSRP components, cpFtsY and Alb3, to thylakoid biogenesis. *Plant J* **56**: 1007-1017.

Ashida H, Saito Y, Nakano T, de Marsac NT, Sekowska A, Danchin A, Yokota A (2008) RuBisCO-like proteins as the enolase enzyme in the methionine salvage pathway: functional and evolutionary relationships between RuBisCO-like proteins and photosynthetic RuBisCO. *J Exp Bot* **59**:1543-1554.

Austin J, Webber A (2005) Photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced chloroplast number. *Photosynth Res* **85**: 373-384.

- Barkan A, Goldschmidt-Clermont M (2000) Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* **82**: 559-572.
- Bauer J, Chen K, Hiltbunner A, Wehrli E, Eugster M, Schnell D, Kessler F (2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* **403**: 203-207.
- Baumgartner BJ, Rapp JC, Mullet JE (1989) Plastid Transcription Activity and DNA Copy Number Increase Early in Barley Chloroplast Development. *Plant Physiol* **89**: 1011-1018.
- Bellaoui M, Gruissem W (2003) Altered expression of the *Arabidopsis* ortholog of *DCL* affects normal plant development. *Planta* **219**: 819-826.
- Berg M, Rogers R, Muralla R, Meinke D (2005) Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for gametogenesis and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J* **44**: 866-878.
- Bisanz C, Begot L, Carol P, Perez P, Bligny M, Pesey H, Gallois JL, Lerbs-Mache S, Mache R (2003) The *Arabidopsis* nuclear *DAL* a which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for differentiation. *Plant Mol Biol*, **51**: 651-663.
- Bork P, Sander C, Valencia A (1993) Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: The hexokinase, ribokinase and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci* **2**: 23-40.
- Bowes G (1991) Growth at elevated CO<sub>2</sub>: photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant Cell Environ* **14**: 795-806.
- Bowman CM, Dyer TA (1986) The location and possible evolutionary significance of small dispersed repeats in wheat ctDNA. *Curr Genet* **10**: 931-941.
- Bosco CD, Lezhneva L, Biehl A, Leister D, Strotmann H, Wanner G, Meurer J (2004) Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 1060–1069.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Britto DT, Kronzucker HJ (2002)  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* **159**: 567-584.

Brutnell TP, Sawers RJ, Mant A, Langdale JA (1999) BUNDLE SHEATH DEFECTIVE2, a novel protein required for post-translational regulation of the *rbcL* gene of maize. *Plant Cell* **11**: 849-864

Cannon S, Wang P, Roy H (1986) Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase assembly by antibody to a binding protein. *J Cell Biol* **103**: 1327-1335.

Cerritelli SM, Crouch RJ (2009) Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J* **276**: 1494-1505.

Chattopadhyay S, Ang LH, Puente P, Deng XW, Wei N (1998) Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant cell* **10**: 673-683.

Cheng L, Fuchigami LH (2000) Rubisco activation state decreases with increasing nitrogen content in apple leaves. *J Exp Bot* **51**: 1687-1694.

Criddle RS, Dau B, Kleinkopf GE, Huffaker RC (1970) Differential synthesis of ribulose diphosphate carboxylase subunits. *Biochem Biophys Res Commun* **41**: 621-627.

Cho HS, Lee SS, Kim KD, Hwang I, Lim JS, Park YI, Pai HS (2004) DNA Gyrase Is Involved in Chloroplast Nucleoid Partitioning. *Plant Cell* **16**: 2665-2682.

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

De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Rao V, Movva N, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* **6**: 2513-2518.

Denman KL, Brasseur G, Chidthaisong A, Ciais P, Cox PM, Dickinson RE, Hauglustaine D, Heinze C, Holland E, Jacob D, Lohmann U, Ramachandran S, Da Silva Dias PL, Wofsy SC, Zhang X (2007) Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. In *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report*

of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt K B, Tignor M, Miller HL, eds. (Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA), pp 501-587.

Drolet, M (2006) Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* **59**: 723-730.

Duchene AM, Giritch A, Hoffmann B, Cognat V, Lancelin D, Peeters NM, Zaepfel M, Marechal-Drouard L, Small ID (2005) Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*, *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 16484-16489.

Eberhard S, Finazzi G, Wollman FA (2008) The Dynamics of Photosynthesis. *Annu Rev Genet* **42**: 463-515.

Kato Y, Murakami S, Yamamoto Y, Chatani H, Kondo Y, Nakano T, Yokota A, Sato F (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* **220**: 97-104.

Ellis RJ (1979) The most abundant protein in the world. *Trends Biochem Sci* **4**: 241-244

Evans JR (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* **78**: 9-19.

Farquhar GD, Caemmerer von S, Berry JA. 1980. A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C3 species. *Planta* **149**: 78-90.

Favory JJ, Kobayahi M, Tanaka K, Peltier G, Kreis M, Valay JG, Lerbs-Mache S (2005) Specific function of a plastid sigma factor for *ndhF* gene transcription. *Nucleic Acids Res* **33**: 5991-5999.

Feller U, Anders I, Mae T (2008) Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J Exp Bot* **59**:1615-1624.

Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson J T, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**: 237-240.

Flores S, Tobin EM (1986) Benzyladenine modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast proteins in *Lemna gibba*. Apparent post-transcriptional regulation *Planta* **168**: 340-349.

Frantz TA, Peterson DM, Durbin RD (1982) Sources of Ammonium in Oat Leaves Treated with Tabtoxin or Methionine Sulfoximine. *Plant Physiol* **69**: 345-348.

Garton S, Knight H, Warren GJ, Knight MR, Thorlby GJ (2007) *crinkled leaves 8-a* mutation in the large subunit of ribonucleotide reductase-leads to defects in leaf development and chloroplast division in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **50**: 118-127.

Gill HS, Eisenberg D (2001) The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic inhibition. *Biochemistry* **40**: 1903-1912.

Goldschmidt-Clermont M (1998) Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int Rev Cytol* **177**: 115-180.

Gray JC, Sullivan JA, Wang J, Jerome CA, Maclean D (2002) Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 135-145.

Hakimi MA, Privat I, Valay JG, Lerbs-Mache S (2000) Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma(70)-type transcription factors between plants and bacteria. *J Biol Chem* **275**: 9215-9221.

Hajdukiewicz PTJ, Allison LA, Maliga P (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J* **16**: 4041-4048.

Hanaoka M, Kanamaru K, Fujiwara M, Takahashi H, Tanaka K (2005) Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase usage during chloroplast biogenesis. *EMBO Rep* **6**: 545-550.

Hong S, Spreitzer RJ (1994) Nuclear mutation inhibits expression of the chloroplast gene that encodes the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol* **106**: 673-678.

Houtz RL, Magnani R, Nayak NR, Dirk LM (2008) Co- and post-translational modifications in Rubisco: unanswered questions. *J Exp Bot* **59**: 1635-45.

Houtz RL, Portis AR Jr (2003) The life of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase - posttranslational facts and mysteries. *Arch Biochem Biophys* **414**: 150-158.

Hubbs AE, Roy H (1993) Assembly of *in vitro* synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase; formation and discharge of an L8 like species. *J Biol Chem* **268**: 13519-13525.

Hudson GS, Evans JR, von Caemmerer S, Arvidsson YBC, Andrews TJ (1992) Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* **98**: 294-302.

Inaba T, Alvarez-Huerta M, Li M, Bauer J, Ewers C, Kessler F, Schnell DJ (2005) Arabidopsis tic110 is essential for the assembly and function of the protein import machinery of plastids. *Plant Cell* **17**:1482-96.

Ishibashi T, Kimura S, Sakaguchi K (2006) A higher plant has three different types of RPA heterotrimeric complex. *J Biochem* **139**: 99-104.

Ishikawa A, Tanaka H, Nakai M, Asahi T (2003) Deletion of a chaperonin 60 $\beta$  gene leads to cell death in the *Arabidopsis lesion initiation 1* mutant. *Plant Cell Physiol* **44**: 255-261.

Irving LJ, Robinson D (2006) A dynamic model of Rubisco turnover in cereal leaves. *New Phytol* **169**: 493-504.

Jang IC, Yang SW, Yang JY, Chua NH (2007) Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochrome A signaling. *Genes Dev* **21**: 2100-2111.

Jarvis P (2008) Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol* **179**: 257-85.

Ishizaki Y, Tsunoyama Y, Hatano K, Ando K, Kato K, Shinmyo A, Kobori M, Takeba G, Nakahira Y, Shiina T (2005) A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J* **42**: 133-44.



- Kanamaru K, Nagashima A, Fujiwara M, Shimada H, Shirano Y, Nakabayashi K, Shibata D, Tanaka K, Takahashi H (2001) An Arabidopsis sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **42**: 1034-1043.
- Kessler F, Schnell DJ (2006) The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. *Traffic* **7**: 248-257.
- Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrove RM, Mifflin BJ (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741-743.
- Kim JW, Park JK, Kim BH, Lee JS, Sim WS (2002) Molecular analysis of the accumulation of the transcripts of the large subunit gene of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by light. *Mol cell* **14**: 281-287.
- Kim MK, Christopher DA, Mullet JE (1993) Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Mol Biol* **22**: 447-463.
- Kim J, Mullet JE (2003) A mechanism for light-induced translation of the *rbcL* mRNA encoding the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in barley chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **44**: 491-499.
- Klein RR (1991) Regulation of light-induced Chloroplast transcription and translation in eight-day-old dark-grown barley seedlings. *Plant Physiol.* **97**: 335-342.
- Kogoma T (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 212-238.
- Ku MSB, Schmitt MR, Edwards GE (1979) Quantitative determination of RuBP carboxylase -oxygenase protein in leaves of several C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *J Exp Bot* **30**: 89-98.
- Kubis S, Baldwin A, Patel A, Razzaq A, Dupree P, Lilley K, Kurth J, Leister D, Jarvis P (2003) The Arabidopsis *ppil* mutant is specifically defective in the expression, chloroplast import, and accumulation of photosynthetic proteins. *Plant Cell* **15**: 1859-1871.
- Lam E, Hanley-Bowdoin L, Chua NH (1988) Characterization of a chloroplast sequence-specific DNA binding factor. *J Biol Chem* **263**: 8288-8293.

Lea PJ, Ridley SM (1989) Glutamine synthetase and its inhibition. In AD Dodge, ed, *Herbicides and Plant Metabolism*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 137-170.

Leister D (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* **19**: 47-56.

Leister D, Schneider A (2003) From genes to photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Int Rev Cytol* **228**: 31-83.

Li X, Manley JL (2005) Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* **122**: 365-378.

Liere K, Maliga P (2001) Plastid RNA polymerases in higher plants. In EM Aro, B Andersson , eds, *Regulation of photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 29-49.

Liepmann AH, Olsen LJ (2001) Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **25**: 487-498.

López-Juez E, Pyke KA (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol* **49**: 557-577.

Loschelder H, Schweer J, Link B, Link G (2006) Dual temporal role of plastid sigma factor 6 in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* **142**: 642-650.

Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L, Small I (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**: 2089-103.

Lysenko EA (2007) Plant sigma factors and their role in plastid transcription. *Plant Cell Rep* **26**: 845-859.

Maj MC, Singh B, Gupta RS (2002) Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition, *Biochemistry* **41**: 4059-4069.

- Manzara T, Gruissem W (1988) Organisation and expression of the genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in higher plants. *Photosynth Res* **16**: 117-139.
- Marin-Navarro J, Manuell AL, Wu J, P Mayfield S (2007) Chloroplast translation regulation. *Photosynth Res* **94**: 359-374.
- Makino A, Sakuma H, Sudo E, Mae T (2003) Differences between Maize and Rice in N-use Efficiency for Photosynthesis and Protein Allocation. *Plant Cell Physiol* **44**: 952-956.
- Martínez-García JF, Monte E, Quail PH (1999) A simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. *Plant J* **20**: 251-7.
- Matt P, Krapp A, Haake V, Mock HP, Stitt M (2002) Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. *Plant J* **30**: 663-677.
- McCormac DJ, Litz H, Wang J, Gollnick PD, Berry JO (2001) Light-associated and processing-dependent protein binding to 5' regions of *rbcl* mRNA in the chloroplasts of a C<sub>4</sub> plant. *J BioChem* **276**: 3476-83.
- Meurer J, Grevelding C, Westhoff P, Reiss B (1998) The PAC protein affects the maturation of specific chloroplast mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Mol gen genet* **258**: 342-51.
- Meurer J, Meierhoff K, Westhoff P (1996) Isolation of highchlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and Northern hybridisation. *Planta* **198**:385-396.
- Mikhailov AI, Ivanov VF, Shilova IA, Kozlovskii AA, Veselov VS, Razumov VF (2008) Photosynthesis of Oxygen in the Forest Ecosystem and Its Albedo as Major Factors of Prevention of Current Civilization from the Oxygen and Freshwater Disaster. *High Energy Chem* **42**: 251-254.
- Miles D (1980) Mutants of higher plants: maize. *Methods Enzymol* **69**: 3-23.
- Moffatt BA, Wang L, Allen M, Stevens Y, Qin W, von Schwartzberg K (2000) Adenosine kinase of *Arabidopsis thaliana*: kinetic properties and gene expression. *Plant Physiol* **124**: 1775-1785.

Motohashi R, Yamazaki T, Myouga F, Ito T, Ito K, Satou M, Kobayashi M, Nagata N, Yoshida S, Nagashima A, Tanaka K, Takahashi S, Shinozaki K (2007) Chloroplast ribosome release factor 1 (AtcpRF1) is essential for chloroplast development. *Plant Mol Biol* **64**: 481-97.

Mori Y, Kimura S, Saotome A, Kasai N, Sakaguchi N, Uchiyama Y, Ishibashi T, Yamamoto T, Chiku H, Sakaguchi K (2005) Plastid DNA polymerases from higher plants, *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* **334**: 43-50.

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

Mullet JE (1988) Chloroplast development and gene expression. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**: 475-602.

Mullet JE (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol* **103**: 309-313.

Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* **110**: 361-371.

Myouga F, Motohashi R, Kuromori T, Nagata N, Shinozaki K (2006) An *Arabidopsis* chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *Plant J* **48**: 249-260.

Nakamura T, Ohta M, Sugiura M, Sugita M (1999) Chloroplast ribonucleoproteins are associated with both mRNAs and intron-containing precursor tRNAs. *FEBS Lett* **460**: 437-441.

Nakamura T, Ohta M, Sugiura M, Sugita M (2001) Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome-free mRNAs in the stroma. *J Biol Chem* **276**: 147-152.

Nakamura T, Schuster G, Sugiura M, Sugita M (2004) Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins. *Biochem Soc Trans* **32**: 571-574.

Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**: 34-41.

Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* **10**:1121-1134.

Ogren WL (2003) Affixing the O to rubisco: discovering the source of photorespiratory glycolate and its regulation. *Photosynth Res* **76**:53-63.

Onizuka T, Endo S, Akiyama H, Kanai S, Hirano M, Yokota A, Tanaka S, Miyasaka H (2004) The *rbcX* gene product promotes the production and assembly of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of *Synechococcus sp. PCC7002* in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol* **45**:1390-1395.

Orozco BM, McClung CR, Werneke JM, Ogren WL (1993) Molecular Basis of the Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activase Mutation in *Arabidopsis thaliana* Is a Guanine-to-Adenine Transition at the 5[prime]-Splice Junction of Intron 3. *Plant Physiol* **102**: 227-232.

O'Toole N, Hattori M, Andres C, Iida K, Lurin C, Schmitz-Linneweber C, Sugita M, Small I (2008) On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol* **25**: 1120-1128.

Ostersetzer O, Watkins K, Cooke A, Barkan A (2005) CRS1, a chloroplast group II intron splicing factor, promotes intron folding through specific interactions with two intron domains. *Plant Cell* **17**: 241-255.

Panchuk II, Zentgraf U, Volkov RA (2005) Expression of the Apx gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **222**: 926-932.

Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz KJ, Oelmüller R (2006) pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* **18**: 176-197.

Pfalz J, Bayraktar OA, Prikryl J, Barkan A (2009) Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J* **28**: 1989-90.

Pesaresi P, Varotto C, Meurer J, Jahns P, Salamini F, Leister D (2001) Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in *Arabidopsis*: effects on mRNA translation and photosynthesis. *Plant J* **27**:

179-189.

Richter S, Lamppa GK (1998) A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7463-7468.

Portis AR Jr, Parry MAJ (2007) Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynth Res* **94**: 121-143.

Privat I, Hakimi MA, Buhot L, Favory JJ, Mache-Lerbs S (2003) Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol Biol* **51**: 385-399.

Pyke K, Leech R (1992) Chloroplast division and expansion is radically altered by nuclear mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **99**: 1005-1008.

Rapp JC and Mullet JE (1991) Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently. *Plant Mol Biol* **17**: 813-823.

Rensink WA, Pilon M, Weisbeek PJ (1998) Domains of a transit sequence required for *in vivo* import in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Physiology* **118**, 691-700.

Rodermel S (1999) Subunit control of Rubisco biosynthesis - a relic of an endosymbiotic past? *Photosynthesis Research* **59**: 105-123.

Roy H, Andrews TJ (2000) Rubisco: assembly and mechanism. In RC Leegood, TD Sharkey, S von Caemmerer, eds, *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 53-83.

Roy LM, Barkan A (1998) A SecY homologue is required for the elaboration of the chloroplast thylakoid membrane and for normal chloroplast gene expression. *J Cell Biol* **141**: 385-395.

Ruuska SA, Andrews TJ, Badger MR, Price GD, von Caemmerer S (2000) The role of chloroplast electron transport and metabolites in modulating Rubisco activity in tobacco. Insights from transgenic plants with reduced amounts of cytochrome b/f complex or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiol* **122**: 491-504.

Salvucci ME, Portis AR Jr, Ogren WL (1986) Light and CO<sub>2</sub> response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **80**: 655-659.

Saschenbrecker S, Bracher A, Rao KV, Rao BV, Hartl FU, Hayer-Hartl M (2007) Structure and Function of RbcX, an Assembly Chaperone for Hexadecameric Rubisco. *Cell* **129**: 1189-1200.

Sasaki Y, Tomoda Y, Tomi H, Kamikubo T, Shinozaki K (1985) Synthesis of ribulose bisphosphate carboxylase in greening pea leaves. Coordination of mRNA level of two subunits. *Eur J Biochem* **152**: 179-186.

Sasaki Y, Nakamura Y, Matsuno R (1987) Regulation of gene expression of ribulose bisphosphate carboxylase in greening pea leaves. *Plant Mol Biol* **8**: 375-382.

Sato N (2005) Structure, replication and dynamism of chloroplast nucleoids. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **50**: 1838-1842.

Sato N, Terasawa K, Miyajima K, Kabeya Y (2003) Organization, developmental dynamics and evolution of the plastid nucleoid. *Int Rev Cytol* **232**: 217-262.

Sato S, Tabata S (2001) The complete genome sequence of *Arabidopsis thaliana*. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **46**: 61-61.

Sawai Y, Sugano N, Tsukada K (1978) Ribonuclease H activity in cultured plant cells. *Biochim Biophys Acta* **518**: 181-185.

Sawai Y, Uchida S, Saito J, Sugano N, Tsukada K (1979) Two Ribonucleases H from Cultured Plant Cells. *J Biochem* **85**: 1301-1308.

Schultes NP, Sawers RJ, Brutnell TP, Krueger RW (2000) Maize high chlorophyll fluorescent 60 mutation is caused by an Ac disruption of the gene encoding the chloroplast ribosomal small subunit protein 17. *Plant J* **21**: 317-27.

Schumacher MA, Scott DM, Mathews II, Ealick SE, Roos DS, Ullman B, Brennan RG (2000) Crystal structures of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding. *J Mol Biol* **298**: 875-893.

- Sharkey TD (1985) Photosynthesis in intact leaves of C<sub>3</sub> plants: physics, physiology and rate limitations. *Bot Rev* **51**: 53-105.
- Sharkey TD, Savitch LV, Butz ND (1991) Photometric method for routine determination of *K<sub>cat</sub>* and carbamylation of Rubisco. *Photosynth Res* **28**: 41-48.
- Shiina T, Tsunoyama Y, Nakahira Y, Khan MS (2005) Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *Int Rev Cytol* **244**: 1-68
- Shimada H, Mochizuki M, Ogura K, Froehlich JE, Osteryoung KW, Shirano Y, Shibata D, Masuda S, Mori K, Takamiya K (2007) Arabidopsis cotyledon-specific chloroplast biogenesis factor CYO1 is a protein disulfide isomerase. *Plant Cell* **19**: 3157-69.
- Shikanai T, Munekage Y, Shimizu K, Endo T, Hashimoto T (1999) Identification and characterization of *Arabidopsis* mutants with reduced quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Physiol* **40**: 1134-1142.
- Sigrell JA, Cameron AD, Jones TA, Mowbray SL (1998) Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution. *Structure* **6**: 183-193.
- Sjögren LL, MacDonald TM, Sutinen S, Clarke AK (2004) Inactivation of the *clpC1* gene encoding a chloroplast Hsp100 molecular chaperone causes growth retardation, leaf chlorosis, lower photosynthetic activity, and a specific reduction in photosystem content. *Plant Physiol* **136**: 4114-4126.
- Somerville CR and Somerville WL (1980) Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2684-2687.
- Somerville CR, Portis AR, Ogren WL (1982) A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of Rubp carboxylase *in vivo*. *Plant Physiol* **70**: 381-387.
- Sugimoto H, Kusumi K, Tozawa Y, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Iba K (2004) The *virescent-2* mutation inhibits translation of plastid transcripts for the plastid genetic system at an early stage of chloroplast differentiation. *Plant Cell Physiol* **45**: 985-996.



Sugimoto H, Kusumi K, Noguchi K, Yano M, Yoshimura A, Iba K (2007). The rice nuclear gene, *VIRESCENT 2*, is essential for chloroplast development and encodes a novel type of guanylate kinase targeted to plastids and mitochondria. *Plant J* **52**: 512-527.

Suzuki JY, Ytterberg AJ, Beardslee TA, Allison LA, van Wijk KJ and Maliga P (2004) Affinity purification of the tobacco plastid RNA polymerase and in vitro reconstitution of the holoenzyme. *Plant J* **40**: 164-172.

Sweetlove LJ, Lytovchenko A, Morgan M, Nunes-Nesi A, Taylor NL, Baxter CJ, Eickmeier I, Fernie AR (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 19587-19592.

Tang L, Bhat S, Petracek ME (2003) Light control of nuclear gene mRNA abundance and translation in tobacco. *Plant Physiol* **133**: 1979-1990.

Teng YS, Su YS, Chen LJ, Lee YJ, Hwang I, Li HM (2006) Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Cell* **18**: 2247-57.

Tozawa Y, Teraishi M, Sasaki T, Sonoike K, Nishiyama Y, Itaya M, Miyao A, Hirochika H (2007) The plastid sigma factor SIG1 maintains photosystem I activity via regulated expression of the *psaA* operon in rice chloroplasts. *Plant J* **52**: 124-132.

Tuteja N (2003) Plant DNA helicases: the long unwinding road. *J Exp Bot* **54**, 2201-2214.

Tyagi, AK, Gaur T (2003) Light regulation of nuclear photosynthetic genes in higher plants. *Critic Rev Plant Sci* **22**: 417-452.

Till B, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A (2001) CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *RNA* **7**: 1227-1238.

Tsunoyama Y, Ishizaki Y, Morikawa K, Kobori M, Nakahira Y, Takeba G, Toyoshima Y, Shiina T (2004) Blue light- induced transcription of plastid-encoded *psbD* gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3304-3309.

van der Eerden LJM (1982) Toxicity of ammonia to plants. *Agri Environ* **7**: 223-235.

Wobbe L, Schwarz C, Nickelsen J, Kruse O (2008) Translational control of photosynthetic gene expression. *Physiol Plant* **133**: 507-513.

Volkov RA, Panchuk II, Schöffl F (2003) Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *J Exp Bot* **54**: 2343-2349.

Wildman SG (2002) Along the trail from Fraction I protein to Rubisco (ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase). *Photosynth Res* **73**:243-250.

Woodrow IE, Berry JA. (1988) Enzymatic regulation of photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation in C<sub>3</sub> plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 533-594.

Wostrikoff K, 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.

Wu L, Reizer A, Reizer J, Cai B, Tomich JM, Saier MH Jr (1991) Nucleotide sequence of the *Rhodobacter capsulatus fruK* gene, which encodes fructose-I-phosphate kinase: Evidence for a kinases uperfamily including both phosphofructokinases of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 3117-3127.

Yang KS, Kim HS, Jin UH, Lee SS, Park JA, Lim YP, Pai HS (2007) Silencing of NbBTF3 results in developmental defects and disturbed gene expression in chloroplasts and mitochondria of higher plants. *Planta* **225**:1459-69.

Yaronskaya E, Vershilovskaya I, Poers Y, Alawady AE, Averina N, Grimm B (2006) Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta* **224**: 700-709.

Yokota A and Canvin DT (1986) Changes of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase content, ribulose biphosphate concentration, and photosynthetic activity during adaptation of high-CO<sub>2</sub> grown cells to low-CO<sub>2</sub> conditions in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.* **80**: 341-345.

Yokota A, Shigeoka S (2008) Engineering of photosynthetic pathways. In HJ Bohnert, H Nguyen, NG Lewis, eds, *Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathways*. Vol1. Elsevier, Oxford, UK, pp 81-105.

Yoo SC, Cho SH, Sugimoto H, Li J, Kusumi K, Koh HJ, Iba K, Paek NC (2009) Rice *virescent3* and *stripe1* encoding the large and small subunits of ribonucleotide reductase are required for chloroplast biogenesis during early leaf development. *Plant Physiol* **150**: 388-401.

Zerges W (2000) Translation in chloroplasts. *Biochimie* **82**: 583-601.

Zghidi W, Mrendino L, Cottet A, Mache R, Lerbs-Mache S (2006) Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the *psbN* gene in plastids. *Nucleic Acids Res* **35**: 455-464.

Zhang L, Paakkari V, Suorsa M, Aro EM (2001) A *secY* homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis. *J Biol Chem* **276**: 37809-37814.

Zhong R, Wan J, Jin R, Lamppa GK (2003) A pea antisense gene for the chloroplast stromal processing peptidase yields seedling lethals in *Arabidopsis*: survivors show defective GFP import *in vivo*. *Plant J* **34**: 802-812.

Zoschke R, Liere K, Börner T (2007) From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *Plant J* **50**: 710-722.

Zubo YO, Yamburenko MV, Selivankina SY, Shakirova FM, Avalbaev AM, Kudryakova NV, Zubkova NK, Liere K, Kulaeva ON, Kusnetsov VV, and Börner T (2008) Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. *Plant Physiol* **148**:1082-93.

岡崎恒子(2002) 岡崎フラグメントと不連続複製機構. *生化学* **74**: 103-117.

彦坂幸毅 (1999) 植物の窒素利用. 渡邊昭, 篠崎一雄, 寺島一郎編, 植物細胞工学シリーズ **11** 環境応答 植物の生存戦略とその分子機構, 秀潤社, pp 160-170.

## 論文目録

Ogawa T, Nishimura K, Aoki T, Takase H, Tomizawa K, Ashida H, Yokota A (2009) pfkB-type carbohydrate kinase family protein, NARA5, for massive expressions of plastid-encoded photosynthetic genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **151**: 114-128.

Ogawa T, Nishimura K, Ashida H, Yokota A (2008) Isolation and characterization of genes necessary for the achievement of RuBisCO accumulation in *Arabidopsis thaliana*. In Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B, eds, *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, Springer, Dordrecht, pp 1111–1114.

Nishimura K, Ogawa T, Ashida H, Yokota A (2008) Molecular mechanisms of RuBisCO biosynthesis in higher plants. *Plant Biotech* **25**: 285–290.