

シロイヌナズナ DEAD-box タンパク質を介した葉緑体リボソーム RNA への
hidden break 導入による翻訳制御

西村 健司

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22年8月6日提出

目次

1. 序論	4
2. 材料と方法	8
2.1 植物材料と生育条件	
2.2 変異体スクリーニング	
2.3 RuBisCO活性測定	
2.4 クロロフィル定量	
2.5 SDS-PAGEとウェスタン解析	
2.6 ノザンブロットと半定量的RT-PCR解析	
2.7 マップベースクローニング	
2.8 PCRジェノタイピングとシーケンス解析	
2.9 GFP 融合タンパク質の一過的発現系を用いた RH39 の細胞内局在解析	
2.10 細胞分画法による RH39 の細胞内局在解析	
2.11 ポリソーム解析	
2.12 <i>in vivo</i> パルスラベリング実験	
2.13 リコンビナント RH39 タンパク質の発現と精製	
2.14 RNA ゲルシフトアッセイ	
3. 結果	15
3.1 <i>nara12-1</i> 変異体は葉緑体23S rRNAのhidden break導入に異常がある	
3.2 <i>NARA12</i> 遺伝子は葉緑体局在のDEAD-boxタンパク質RH39をコードする	
3.3 <i>NARA12</i> 遺伝子は正常な発達に必須である	
3.4 RH39は配列依存的にhidden break導入部位近傍の23S rRNAへ結合できる	
3.5 hidden break導入に異常のある <i>nara12-1</i> 変異体は葉緑体の翻訳伸長効率が低下している	
3.6 プラスチドリボソームは23S rRNAプロセッシングを介してその構造をダイナミックに変化させる	
4. 考察	27
4.1 高等植物葉緑体におけるhidden break導入のプロセッシングスキーム	
4.2 <i>nara12-1</i> 変異体における23S rRNAプロセッシングの異常	
4.3 hidden break導入におけるRH39の役割	
4.4 hidden breakの生理的意義	
4.5 今後の展望	

5. 謝辞	40
6. 参考文献	41
7. 論文目録	54
8. 図表	55

1. 序論

葉緑体は光合成をはじめとする植物の生育に不可欠な代謝反応が行なわれる重要な細胞内小器官である。高等植物の葉緑体は、シアノバクテリアを起源とするオルガネラであると考えられており、光合成CO₂固定酵素Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) の大サブユニットをはじめ、チラコイド膜上の光化学系IやII (PSI and PSII) の反応中心、あるいはシトクロム *b₆/f* 複合体 (Cyt *b₆/f*) やATP合成酵素 (ATPase) の各複合体を構成する重要なサブユニット遺伝子を含む約100個程度の遺伝子をコードする独自のゲノムDNAをもつ。それら葉緑体ゲノムコードのタンパク質は、バクテリアと類似した構造の葉緑体リボソームによって合成される。リボソームは、地球上のすべての生物種に共通して存在する高分子リボヌクレオタンパク質複合体で、メッセージRNA (mRNA) の情報に基づいてタンパク質の合成を行う。またリボソームは大小2種類のサブユニットから構成され (Figure 1)、大サブユニットはペプチジルトランスフェラーゼ反応を触媒することによってペプチド鎖の伸長反応を担い、小サブユニットはコドンとアンチコドンの塩基対をモニタリングすることで翻訳の厳密性を保証している (Ramakrishnan, 2002)。近年のX線結晶構造解析によってリボソームの詳細な触媒反応機構が明らかにされ、ペプチジルトランスフェラーゼ反応はリボソーム大サブユニットを構成するリボソームRNA (rRNA, Figure 2) により触媒されることが証明された。すなわち、リボソームとは、"リボザイム"である (Nissen et al., 2000)。

葉緑体リボソームは、16S rRNAと20数個のリボソームタンパク質が構成されるリボソーム30S小サブユニットと、23S、4.5S、5S rRNAと30数個のリボソームタンパク質で構成される50S大サブユニットからなる70S型リボソームを形成している (Yamaguchi et al., 2000; Yamaguchi and Subramanian, 2000; Yamaguchi and Subramanian, 2003; Yamaguchi et al., 2003; Sharma et al., 2007)。葉緑体の4つのrRNAは、2つの転移RNA (tRNA) とともに、葉緑体ゲノム上でオペロン (*rrn*) を形成している (Kössel et al., 1982; Harris et al., 1994)。この葉緑体rRNAは、まず *rrn* オペロンからポリシストロニックなrRNA前駆体として発現する。続いてこの前駆体は、一連のエンドヌクレアーゼ反応により、tRNA が切除され、16S 及び 5S の各前駆体と、ジシストロニックな 23S-4.5S中間体を生成する。その後のエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼ反応により、これら前駆体のプロセシングが起こるが、23S-4.5S rRNA前駆体の切断はリボソーム上で起こると考えられている。興味深いことに、こうして生成されたインタクトな全長23S rRNA は、その後更なるプロセシングを受けることによって、最終的にスプリ

ットした不連続なrRNA分子種として生成される。(Leaver, 1973; Rozier et al., 1979; Bellaoui et al., 2003; Bisanz et al., 2003; Bollenbach et al., 2005)。

このようなりボソームの触媒中心である大サブユニットのrRNAのプロセッシングは、植物葉緑体に限らず、多くのバクテリアや昆虫、殆どの原口動物、一部の哺乳動物やある種の生理条件下のヒト由来細胞においても観察されており(Houge et al., 1995; Melen et al., 1999; Evguenieva-Hackenberg, 2005)、種々の様式でプロセッシングを受けることが古くから知られている (Figures 3 and 4)。このプロセッシングを受けたリボソーム大サブユニットのrRNAは生物種固有の特定の位置で解裂する結果、ギャップを有する不連続なRNA分子種として生成される。したがって、非変性条件下でこれら生物から抽出したrRNAはプロセッシングされていないものと同等の挙動を示すのに対して、変性条件下ではその高次構造を維持できずに複数の分子種へと解離するため、短いRNA断片として検出される。本論では、特にこのプロセッシング反応を断片化プロセッシングと呼ぶ。このようなりボソーム大サブユニットのrRNAに生じる裂け目構造は、一般に”hidden break”と呼ばれる。

ところがこの hidden break は、リボソームの構成成分として rRNA が見つかった間もない1960年代中頃には既に発見されていたものの、これが生理的にどのような意味をもつのか、あるいはどのような分子メカニズムにより hidden breakが生じるかについては、葉緑体に限らず全ての生物種を通じて殆ど分かっていない (Melen et al., 1999)。葉緑体23S rRNAのプロセッシングに関しては、モデル植物を用いた解析から幾つかの因子がこれに関わることが推察されている。例えば、大腸菌3'→5'エキソ型リボヌクレアーゼ (RNase) である, polynucleotide phosphorylase (PNPase) とRNase Rファミリータンパク質のRNR1の各変異体は23S rRNA のプロセッシングパターンに異常がある (Walter et al., 2002; Bollenbach et al., 2005)。同じく葉緑体局在の3'→5'エキソ型RNaseであるpolyribonucleotide phosphorylase RIF10も23S rRNAの3'末端トリミングに関わることが知られている (Sauret-gueto et al., 2006)。また緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*の70Sリボソームのプロテオーム解析からもホモログが同定されており、シロイヌナズナ葉緑体リボソームと相互作用するエンドリボヌクレアーゼである2つのCSP41、斑入り変異体var2のサプレッサーとして単離された葉緑体局在のpseudouridine synthaseであるSVR1や、葉の緑化が遅延した変異体からも単離された葉緑体ClpP/RプロテアーゼのサブユニットであるClpR1/SVR2も、rRNAのプロセッシングに関わると考えられる (Koussevitzky et al., 2007; Beligni and Mayfield, 2008; Yu et al., 2008)。しかしこれら因子が、どのようにhidden breakの生成に関わるかについてはこれまでのところ分かっていない。また、関与する因子についての知見があまりにも乏しいため、その分子メカニズムを理解するには程遠いのが現状である。

本研究では、葉緑体タンパク質合成の制御メカニズムについての新たな知見を得るために、葉緑体タンパク質の主要構成成分であるRuBisCOをモデルタンパク質として、その合成システムに異常があるシロイヌナズナ*nara*変異体 (*the gene necessary for the achievement of RuBisCO accumulation*) を単離してきた。高等植物の葉緑体でのタンパク質の合成量は非常に高く、一般的なバクテリア細胞内のタンパク質濃度が210 mg / mlであるのに対して、葉緑体ではストロマ画分だけでも400 mg / mlのタンパク質が存在している (Yokota and Shigeoka, 2008)。中でもRuBisCOは光合成のカルビン・ベンソン回路における二酸化炭素固定反応を担う重要な酵素であるが、その触媒効率が非常に低いため、高等植物ではその劣悪な酵素特性を補うかのように、緑葉可溶性タンパク質の約50%、ストロマタンパク質のおよそ70%にまで多量に合成・蓄積する (Nishimura et al., 2008)。バクテリアと類似したタンパク質合成装置を用いているにも関わらず、これだけ多くのタンパク質を合成できることから、高等植物の葉緑体には独自のタンパク質合成を可能にするシステムが存在することが示唆されるが、その詳細な制御メカニズムについては殆ど明らかにされていない。他方、高等植物のゲノム情報に基づいた*in silico*解析から、葉緑体内には約2,000個もの核ゲノムコードの葉緑体タンパク質が存在すると見積もられている (Abdallah et al., 2000; Peltier et al., 2006)。近年のモデル植物を用いた遺伝的・生化学的解析から、これら核コードの葉緑体タンパク質の中には、高等植物に特異的な因子が数多く存在し、葉緑体タンパク質の合成制御において重要な役割を果たすことが徐々に明らかにされているが、その大部分の分子機能は殆ど分かっていない (Gupta et al., 2002; Stöckel and Oelmüller, 2004; Lima et al., 2006; Shikanai, 2006; Asakura and Barkan, 2007; Schult et al., 2007)。当研究室では、これまでに単離してきた幾つかの*nara*変異体の解析を通じて、葉緑体タンパク質合成は、ゲノム複製や転写、転写後、翻訳といった多くのステップで複雑な制御を受けていることを見出してきた。その変異体スクリーニングの原理を以下に示す (Figure 5) : RuBisCOのオキシゲナーゼ反応を初発段階とする光呼吸代謝系により生成されるNH₃は葉緑体に局在するグルタミンシンターゼ2 (GS2) により固定される。このGS特異的阻害剤であるL-methionine sulfoximine (MSX) により処理した植物体では、NH₃が高蓄積するためその毒性により枯死に至る。一方、RuBisCO量が低下した変異体では、野生株が枯死するようなMSX濃度下においてもNH₃の合成・蓄積量が比較的低いいため耐性を示す。

本研究ではこの変異体スクリーニングの過程で、葉緑体23S rRNAの断片化プロセス、すなわちhidden breakの導入に異常が見られる変異体が単離された。その変異体*nara12*の原因遺伝子は葉緑体に局在するDEAD-box RNA helicases RH39をコードしていた。DEAD-box RNA helicasesは、多くの生物種に広く存在

し、RNAメタボリズムにおいて非常に重要な役割を果たすタンパク質ファミリーである。ところが、高等植物のDEAD-boxタンパク質に関する知見は極めて乏しく、また高等植物のオルガネラに局在するDEAD-boxタンパク質の生理機能はこれまで全く明らかにされてこなかった (Wang et al., 2000; Matthes et al., 2007)。しかも、リボソーム大サブユニットのrRNAの断片化プロセッシングへのDEAD-boxタンパク質の関わりについては全生物を通じてこれまで全く報告がない。本論文では、高等植物のDEAD-boxタンパク質RH39が葉緑体23S rRNAのhidden breakの導入に必須であること、そして高等植物葉緑体における断片化プロセッシングのメカニズムとhidden breakの生理的意義について報告する。

2. 材料と方法

2.1 植物材料と生育条件

Arabidopsis thaliana Columbia (Col-0) の野生株と *nara9*, *nara10*, *nara11*, *nara12* (*nara12-1*)、*nara12-1*; 35S:RH39-6×His と Table 3 に記載の T-DNA 挿入変異体を解析した。植物体は、大気中で光強度 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (明期 16 時間 / 暗期 8 時間)、温度 23°C 、3% ショ糖含有の Murashige and Skoog (MS) 培地上で生育させた。特に断りがない限り、生育日数は 17 日間に固定した。また土壌での生育比較解析と器官別遺伝子発現解析に用いた植物体は、大気中、光強度 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の連続照射下、温度 23°C の条件の土壌 (Metro-Mix 350、Scot Sierra) で 7 週間生育させた。黄化子葉は上記 MS 培地上で 4 日間暗所生育後に採取した。

2.2 変異体スクリーニング

Ogawa et al. (2009) に従って行った。選抜には、MS培地成分から 20 mM NH_4NO_3 、19 mM KNO_3 、26 mM glycineを除き、50 μM MSX (SIGMA)、30 mM L-glutamine、19 mM KClを加え、pH 5.7に調整した選抜培地を用いた。EMS種子 (Mutated M2 Seeds, LEHLE SEEDS) を高 CO_2 条件 (0.3% CO_2 、光強度30-50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (連続照射)、温度 23°C 、湿度60%) の人工気象器 (BIOTRON NC350、株式会社 日本医科器械製作所) 内で14日間生育させた後、強光条件 (大気、光強度120-140 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、連続照射) の人工気象器 (BIOTRON、同上) 内に5日間置き、MSX耐性を示す突然変異株 (MSX耐性株) を選抜した。選抜したMSX耐性株は上述した選抜培地からMSXを除いた組成の培地に移し、高 CO_2 条件下で数週間生育させた後、土壌に植え替えた。

2.3 RuBisCO活性測定

-80°C で凍結保存しておいた植物体地上部を抽出バッファー中で破碎し、細胞粗抽出液を得た。抽出バッファーの組成は、100 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1 mM MgCl_2 、2 mM dithiothreitol (DTT)、1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) とした。その後 4°C 、 $18,000\times g$ で10秒間遠心し、得られた上清を可溶性画分とした。可溶性画分中のタンパク質量は、標準タンパク質として bovine serum albumin (BSA) を用いて Bradford 法 (Bradford, 1976) により定量した。

活性測定は、Sharkey et al. (1991) によるカップリング酵素を用いたRuBisCOカルボキシラーゼ活性の分光学的測定法に準じ、一部改変して行った。抽出直

後の可溶性画分を用いて測定した活性を初期活性、活性化処理を行った可溶性画分を用いて測定した活性を総活性とした。活性化処理は、終濃度がともに20 mM となるようにNaHCO₃とMgCl₂を可溶性画分に加え、室温で10 min静置して行った。酵素反応は、25 °Cの条件下、可溶性画分を反応液中に加えることで開始した。反応液は、100 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、1 mM EDTA、20 mM MgCl₂、0.3 mM NADH、1 mM ATP、5 mM phosphocreatine、10 mM NaHCO₃、3 mM RuBP、25 unit creatine phosphokinase (SIGMA、以下カップリング酵素はすべてSIGMA社から購入した)、22.5 units 3-phosphoglycerate kinase、20 units glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase、56.5 units triosephosphate isomerase、19.5 units glycerol 3-phosphate dehydrogenase として。RuBisCO活性は、可溶性タンパク質量あたり反応開始後1分間に消費されるNADHの量から算出した。NADH消費量は340 nmの吸光度の時間変化量を測定することで見積もった。吸光度の測定には日立分光光度計U-3300を用いた。また活性化率は、初期活性/総活性の百分率として算出した。

2.4 クロロフィル定量

採取した植物体地上部を100% methanolで破碎後、卓上遠心機で室温にて3分間フルスピンド、得られた上清の吸光度 (653、666、750 nm) を測定した。クロロフィル量は、これら測定値から Porra et al. (1989) に基づいて算出した。

2.5 SDS-PAGEとウェスタン解析

*nara10*の植物体地上部を抽出バッファー (100 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、1 mM EDTA、1 mM MgCl₂、2 mM DTT、1 mM PMSF) 中で破碎し、4 °C、18,000 ×gで10 s遠心して得られた上清を可溶性画分とした。可溶性画分中のタンパク質量は、標準タンパク質としてbovine serum albumin (BSA) を用いてBradford法により定量した。不溶性画分のタンパク質試料の調製はEZ法に従って行った (Martinez-Garcia et al., 1999)。不溶性タンパク質は、BSAを標準タンパク質に用いたLowry法により定量した (Lowry et al., 1951)。定量にはDc Protein Assay Kit (BioRad) を用いた。*nara12*の解析では、液体窒素で凍結保存した植物体地上部からMartinez-Garcia et al. (1999) の方法によりtotal proteinサンプルを調製した。タンパク質量の定量は、Lowry 法に基づき、Dc protein assay (Bio-Rad) キットを用いて行った。37°Cで15分インキュベートして調製したタンパク質は、12.5 %または 10 %のポリアクリルアミドゲルまたは5–20% precast e-PAGEL gels (ATTO) を用いたSDS-PAGEにより分離した後、PVDF膜に転写した。RuBisCO大サブユニット (RbcL) (1:2,000)、PSIIのD1サブユニット (1:10,000)、PSIIのD2サブユニット (1:10,000)、Cyt *b₆/f*のCyt *b₆*サブユニット(1:10,000)、PSIのPsaAサ

βサブユニット (1:10,000)、ferredoxin NAD(P)H oxidoreductase (FNR) (1:5,000)、fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) (1:5,000)、Rieske FeS タンパク質 (1:10,000)、葉緑体ATPaseのγサブユニット (γ-ATPase) (1:2,000)、DEAD-box RNA helicase39 (RH39) (1: 10,000)の検出にはウサギ抗体を、α-Tubulin (1:2,000) の検出にはラット抗体をそれぞれ用いた。シグナルの検出には、ウサギ抗体ではECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham)、ラット抗体ではAttoPhos AP Fluorescent Substrate System (Promega) を用いた。

2.6 ノザンブロットと半定量的RT-PCR解析

Total RNA は RNAeasy kit (QIAGEN)を用いて植物体地上部から抽出した。得られた RNA は、等量のサンプルバッファー (95% (v/v) Formamide, 3% (v/v) SYBER Green I, 2% (v/v) loading dye) を加えて熱変性した後、1%アガロースゲルにて分離し、Hybond N+ (Amersham Bioscience) メンブレンにアルカリトランスファーバッファー (1M ammonium acetate, 20 mM NaOH) 中でブロットした。その後メンブレンは、UV クロスリンキングし、チャーチバッファー中で30分以上プレハイブリダイズした後、放射ラベルしたプローブ DNA を加えて60°Cで一晩インキュベートした。プローブの作製に用いたプライマーの配列は、Table 1 に示した。鋳型は total RNA からランダムプライマーと ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて調整した cDNA を使ったが、全長 23S rRNA に関しては genomic DNA を鋳型として用いた。プローブは Prime-It® II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) を用いて[α-³²P]-ATP で放射ラベルした。シグナルの検出には BAS2500 (Fujifilm) を用いた。

RT-PCR 解析に用いる一本鎖 cDNA は、0.5 μg の total RNA から上述の方法により合成し、Ex taq polymerase (TaKaRa) を用いて PCR により増幅した。プライマーセットは *RH39* には 5'-CGATCTTACTAGAGAGGCTTAGG-3' と 5'-CATCAGCTGAACAATAGGCAA-3' を、*ACT8* には 5'-ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA-3' と 5'-TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC-3' を、*LHCBI* には 5'-GTCAAGTACTTGGG TCCATTC-3' と 5'-TTCCGTTCTTGAGCTCCTT-3' を、*GLURS* には 5'-TACTCTTG GGGATTTTGTGG-3' と 5'-CCACTTTTGTGACACGTTTC-3' をそれぞれ用いた。得られた PCR 産物は 2%アガロースゲルにて分離し、エチジウムブロマイドにて検出した。

2.7 マップベースクローニング

nara10、*nara12-1*変異はゲノムDNA上のCAPS (Konieczny and Ausubel, 1993) と SSLP (Bell and Ecker 1994) の情報に基づいて作製された分子マーカーを用いてマップした。分子マーカーは本学の形質発現植物学講座の管理運営する

NARAMAPから提供して頂いた。ゲノムDNAはColumbiaバックグラウンドの変異体とLandsberg *erecta*バックグラウンドの野生株との交配で得られたF2植物体から抽出した。各変異遺伝子は、RuBisCO量が減少した淡緑色のF2植物体から抽出したゲノムDNAを鋳型として、Ex taq DNA polymerase (TaKaRa) を用いてPCR増幅した。得られたPCR産物はDye terminator cycle sequencing kit version 3 とABI prism3100 sequencer を用いてダイレクトシーケンスした。

*nara12-1*変異の相補試験のために、RIKENのcDNAライブラリー (Seki et al., 1998) から取得したAt4g09730 cDNA (pda13720) のORFをPCR増幅した。このPCR産物をGATEWAY クローニングシステムを用いて、島根大学の中川強博士から頂いたpGWB2ベクターにクローニングした (Nakagawa et al., 2007)。得られたベクターは、*Agrobacterium tumefaciens* MP90株に導入し、その後*nara12-1*変異株にフローラルディップ法により形質転換した (Clough and Bent 1998)。

2.8 PCRジェノタイピングとシーケンス解析

*nara10*の変異は5'-ATGGCCAACCCGTTT-3'と5'-CCAAGATCCTCGAGTGT-3'、*nara12-1*の変異は5'-TGGTGTAGAGGAAGAGAGTAG-3'と5'-CGCCATGTCATACATTACTCGAA-3'を用いてPCRを行い、得られたゲノムDNA断片に対して*nara10*では*ScfI*、*nara12-1*では*Taq I*でそれぞれ制限酵素処理して電気泳動することで確認した。一方、T-DNA遺伝子破壊株のジェノタイピングに用いた遺伝子特異的プライマーとT-DNAのレフトボーダープライマーは、Table 1に記載した。T-DNAの挿入位置は、レフトボーダープライマーと遺伝子特異的な片側プライマーを用いて増幅したPCR産物のダイレクトシーケンスにより確認した。

nara12-1; 35S:RH39-6×Hisのトランス遺伝子の確認には5'-CATCTCCTCCAGAGAAATCTTC-3'と5'-CATCATCATCATCATCATGCTTAG-3'のプライマーを用いたゲノムPCRにより確認した。

2.9 GFP融合タンパク質の一過的発現系を用いたRH39の細胞内局在解析

予測されるトランジットペプチドの領域を含む、RH39のN末端の1-113アミノ酸に相当する配列を、PCRにより増幅し、35Sプロモーター制御下でC末端にEGFPが融合したタンパク質を発現するように設計されたpTH2XAベクターに導入した (Kohchi et al., 2001; Nanasato et al., 2005; Takahara et al., 2005)。クローニング用プライマーセットはRH39-N (5'-CACGCGGGGCCCTATGGTAGGAGCTTCA-3')とRH39-C113 (5'-ATTCTCGAGAATTCTCAACTAACTTCTTA-3')を用いた。得られたプラスミドは、Yoo et al. (2007) に準じてシロイヌナズナのプロトプラストにPEG法で導入、または定法に従って金粒子にコーティングした後、パーティクルボンバードメント法によりシロイヌナズナの生葉、タバコSR-1

の生葉、あるいはタマネギの表皮に導入した。その後、暗所で一晚インキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) により GFP 蛍光とクロロフィルの自家蛍光を観察した。

2.10 細胞分画法によるRH39の細胞内局在解析

Yoo et al. (2007) に準じてシロイヌナズナのプロトプラストを調製し、これを 10 μm ϕ のナイロンメッシュに3回通して得た破碎液からWang and Portis (2007) の方法に従って無傷葉緑体とその可溶性画分とペレット画分を調整した。RH39 のウェスタンブロットは上述した通り行った。

2.11 ポリゾーム解析

ポリゾーム解析はBarkan (1998) の方法を一部改変して行なった。15-55%のシヨ糖密度勾配 (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 20 mM KCl, and 10 mM magnesium acetate) は、Stone (1974) に従って調製した。ポリゾーム抽出バッファの組成は200 mM Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM KCl, 35 mM MgCl_2 , 25 mM EGTA, 200 mM sucrose, 2% polyoxyethylene-10-tridecyl ether, 1% Triton X-100, and 1% RNasin Plus RNase Inhibitorとした。また超遠心後、回収した各画分 (320 μl) に50 μl の5% SDS、0.2 M EDTAを加えた後、フェノール/クロロフォルム抽出とエタノール沈殿によりRNAを単離した。その後のRNAゲルブロット解析は上述の通り行なった。

2.12 *in vivo* パルスラベリング実験

シヨ糖含有のMS培地上で12日間生育させた野生株及び*nara12-1*の各植物体の若い葉からleaf discを作製した。これを1 mM KH_2PO_4 , pH 6.3, 0.1% (w/v) Tween 20, 50 μCi methionine/cysteine (EXPRE³⁵S³⁵S Protein Labeling Mix; Perkin Elmer) を含むバッファ 30 μl に浮かべ、30秒間減圧吸引させた後、光強度50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下に10分間置いた。その後、200 μl のwash buffer (1 mM KH_2PO_4 , pH 6.3, 0.1% (w/v) Tween 20) で2回洗浄したのち、液体窒素で凍結した。凍結したleaf discs (3枚) は、上述のEバッファ中で破碎し、55°Cで15分間熱変性した後、18,000 $\times g$ で15分室温で遠心後、得られた上清にZバッファを加えて全タンパク質を抽出した。このタンパク質サンプルの放射線量はBarkan (1998) の方法に準じて定量し、等量のカウント数 (dpm) に相当する全タンパク質試料を5–20% precast e-PAGEL gels (ATTO) に供し、SDS-PAGEを行った。泳動後、ラベルされたRbcLとD1タンパク質のシグナルはBAS-2500 (Fuji Film) システムを用いて検出した。

2.13 リコンビナント RH39 タンパク質の発現と精製

抗RH39ペプチド抗体の評価をするために、トランジットペプチドを除いたRH39 (47-621 a.a.) に相当するcDNA断片を5'-CTTCCCGGGGCCCGCAACAACTTC-3'と5'-TGTGAGCTCAGAGGCTCTTGCCGAAG-3'のプライマーセットでPCR増幅し、*SmaI*と*SacI*で制限酵素処理した後 pET50bの*SmaI/SacI*サイトにクローニングして6×His-NusA-6×His-RH39-S・Tagハイブリッドタンパク質を発現するベクターを構築した。このベクターを、シャペロンプラスミドpG-KJE8 (Takara) を持つBL21(DE3)へheat shock法にて形質転換し、overnight express autoinduction system 1 (Merck) を用いて、Luria-Bertani 培地で37°C、10時間培養してタンパク質を発現させた。また、次項で詳述するRNAゲルシフトアッセイのために、トランジットペプチドを除いたRH39に相当するcDNA断片を5'-CTTCATATGGCCCGCCGCAACAAC -3'と5'-TGTCTCGAGAGAGGCTCTGCGCAA -3'のプライマーセットでPCR増幅し、*NdeI*と*XhoI*で制限酵素処理した後 pET21bの*NdeI/XhoI*サイトにクローニングしてRH39のC末端側に6×histidine tag (6×His) が融合した組換えタンパク質 (rRH39) を発現するプラスミドを作製した。このプラスミドを大腸菌Rosetta 2 (DE3) 株 (Novagen) にエレクトロポレーション法により形質転換した。タンパク質の誘導は1 mM IPTG 存在下、21°Cで3時間培養して行った。回収した菌体は50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5% (w/v) Triton X-100 (rRH39の場合のみ添加した), 1× protease inhibitor cocktail Complete Mini EDTA-free (Roche) を含むバッファー中で超音波破碎した。得られた細胞抽出液を遠心したのち、His-Bind Resin (Novagen) を用いてRH39のリコンビナントタンパク質を精製した。精製はレジンに添付のマニュアルに従った。目的のリコンビナントタンパク質は、50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 M imidazole, 500 mM NaCl and 50% glycerol (rRH39の場合のみ添加した) で溶出した。精製度はSDS-PAGEにより確認した。またタンパク質の濃度はBradford法により行った。

2.14 RNAゲルシフトアッセイ

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) とコンペティションアッセイはWilliams-Carrier et al. (2008) に準じて行った。解析に用いたオリゴRNAの配列は以下の通りである: RNA25-2, 5'-CACCGUAAAGCACGCAAAAACAAAA-3' (Du et al., 2002); S1+5', 5'-CCGUAACUUCGGGAGAAGGGGUCCUCCU-3'; S2+3', 5'-AGGGGUGCGCAGUGACCAGGCCCGGGCG-3'; S1, 5'-CCUCCU-3'。RNAは $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ と T4 polynucleotide kinase (Toyobo) で末端標識し、MicroSpin G-25 column (GE Healthcare) に通して未反応のATPを除いたのち、90°Cで3分間熱変性させて直ぐ氷上に移して急冷させることで1本鎖RNAを調製した。rRH39は溶出バッファーで希釈したのち、5 μl のタンパク質試料を15 μl のバッファーに加

えた。最終の反応系 (20 μ l) の組成は50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 4mM DTT, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 22.5% glycerol, 10 units RNasin (Promega), 0.5 mg/ml heparin, 3 nM RNAとし、rRH39の濃度は200 nMとした。またコンペティションアッセイには5倍または50倍のモル濃度の過剰な非標識RNAを反応系に加え、25°Cで30分間インキュベートした。反応終了後、サンプルは5% ポリアクリルアミドゲルを用いて解析した。

3. 結果

本研究では、Ogawa et al. (2009) の方法に従い、Ethyl methanesulfonate (EMS) により変異処理したシロイヌナズナのM2種子約6,400粒から、RuBisCO量と活性が低下した4系統の劣性変異体 *nara9*, *nara10*, *nara11*, *nara12* (*nara12-1*) を単離した (Table 3)。このうち*nara9*変異体は光呼吸変異体様の表現型、すなわち光呼吸が盛んな大気下では植物体の外観が退色して枯死するが、光呼吸が抑えられる高CO₂条件下ではその表現型が緩和されるという、CO₂濃度依存的な条件致死性を示したため、解析から除外した。またRuBisCOが野生株の約60%に減少した*nara10*変異体はマッピングの結果、オルガネラ局在のGlutamyl-tRNA synthetase (GluRS) をコードする遺伝子At5g64050に一塩基置換が生じていた (Figure 6; Ogawa et al., 2009)。GluRSはバクテリアから植物まで幅広く存在するタンパク質で、その生成物であるGlutamyl-tRNAは、翻訳の際ペプチド鎖の伸長とクロロフィルの合成に用いられる。*nara10*変異はGLURS遺伝子の発現量には影響しなかったが、アミノ酸置換が生じる310番目のserineは生物間で高く保存されており、重要なアミノ酸残基であると考えられる (Figure 7)。実際、*nara10*変異体では葉緑体ゲノムにコードされるRuBisCO大サブユニットタンパク質 (RbcL) の合成量の減少やクロロフィル含量の著しい低下、及びクロロフィル量の減少に付随したチラコイド膜のアンテナ複合体のアポタンパク質light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCP) の減少を引き起こしていた (Figure 8B and 8C)。しかし葉緑体タンパク質合成におけるGluRSの機能に関しては既に明らかであるため、解析はここまでで一旦停止した。一方、*nara11*変異体はRuBisCO量が野生株の40%程度に減少していたが、解析が途中段階であるため本稿では触れない。本研究では、RuBisCO量が野生株の20%以下という、取得した変異体の中で最も減少していた*nara12-1*変異体の解析を行った。

3.1 *nara12-1*変異体は葉緑体23S rRNAのhidden break導入に異常がある

*nara12-1*は葉緑体機能の低下した変異体に典型的なクロロフィル量が減少したペールグリーンの葉を有し、その生育は3%ショ糖含有のMS培地においても野生株と比較して遅延していた (Figure 9A and 9D)。また*nara12-1*は土壌でも生存可能であるが、その生育の遅延はショ糖添加培地上に比べてより顕著であった (Figure 10)。

*nara12-1*変異体は、生体内で実際に働いているRuBisCOの活性を反映している初期活性が野生株の約50%、またRuBisCOの総量を示す総活性が野生株の23%に低下していた (Figure 9B)。さらにこれらの値から算出したRuBisCOの活性化率、

すなわち生体内で実際に働いているRuBisCOの割合が野生株の約2倍にまで上昇していた (Figure 9B)。 *nara12-1*変異体におけるRuBisCO活性化率の上昇は、タバコのRuBisCO 小サブユニット (RbcS) 遺伝子 *RbcS* のアンチセンス植物体のような、RuBisCO量が減少した植物においても観察されている (Quick et al., 1991)。 *nara12-1* 変異体の全タンパク質をSDS-PAGEにより分離し、Coomassie 染色により検出したところ、野生株と比較して変異体のRuBisCOの大小サブユニットの蓄積量が共に著しく減少していることが観察された (Figure 9C)。このことから、RuBisCO活性の低下はRuBisCOタンパク質量の減少に起因していることが分かった。

*nara12-1*変異がRuBisCO以外の葉緑体タンパク質の蓄積量に及ぼす影響を解析するために、細胞質局在の α -tubulinを内部標準として葉緑体局在のタンパク質に対する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行なった。その結果、*nara12-1*変異体は葉緑体ゲノムにコードされるPSIIのサブユニットであるD1及びD2の蓄積量が著しく減少していることが分かった (Figure 11)。同様に、葉緑体コードのPSI のコンポーネントであるPsaAの蓄積量も大きく減少していた。また葉緑体コードのCyt *b₆/f*複合体を構成するcyt*b₆*の蓄積量も減少していた。一方、核ゲノムにコードされ、葉緑体コードのサブユニットと複合体を形成するようなATPaseの γ サブユニットやCyt *b₆/f*複合体のRieskeタンパク質の減少も観察された。葉緑体チラコイド膜上に存在するこれら複合体は、ひとつのコンポーネントが欠けると、複合体全体の安定性が低下して、その他のサブユニットの減少を引き起こすことが知られている (Barkan et al., 1995)。したがってこれら核コードのサブユニットの減少は葉緑体コードのタンパク質の減少に付随したためであると推察された。実際、葉緑体コードのタンパク質とは独立に存在している核コードの葉緑体局在のタンパク質であるFructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) や Ferredoxin NAD(P)H oxidoreductase (FNR)の蓄積量は減少していなかった。したがって*nara12-1*変異により、RuBisCOの大サブユニットをはじめとする葉緑体ゲノムコードの広範なタンパク質の蓄積量が低下することが明らかとなった。

*nara12-1*変異体におけるこれら複数の葉緑体ゲノムコードのタンパク質の減少が遺伝子発現レベルの異常であるかどうかを明らかにするために、葉緑体にコードされる遺伝子の発現量をノザンブロットにより解析した (Figure 12)。その結果、葉緑体コードの*rbcL*、*psbA* (D1)、*psaA*の転写産物量の減少は観察されなかった (Figure 12A)。また葉緑体内でポリシストロニックに転写される*psbD* (D2) や *petB* (Cyt *b₆*) の発現パターンも野生株とほぼ同等であった。さらに、核コードの遺伝子 (*RbcS* for RuBisCO small subunits, *PetC* for Rieske, *AtpC* for γ -ATPase) についてもノザン解析を行ったが、遺伝子発現量の低下は観察されな

かった (Figure 12B)。以上のことから、葉緑体内での転写やmRNAの安定性の異常が葉緑体コードのタンパク質量が減少した要因ではないと考えられた。

ところがここで、total RNAをアガロースゲル電気泳動により分離したのち、SYBER Green染色を行なうことでrRNAを検出したところ、興味深いことに *nara12-1*変異体において野生型では見られないrRNAパターンがみられた。すなわち、野生株ではFigure 13AのLeft panelに示されるように、高分子量側から、細胞質の25S (3.2-kb) と18S (1.8-kb) のrRNA、そして葉緑体の16S rRNA (1.6-kb) と、23S rRNAの3つの成熟型断片 (1.3-, 1.1- and 0.5-kb) にそれぞれ対応する6本のメインバンドが検出されたが、*nara12-1*変異体は、野生株とは異なり、25Sと18S rRNAの間の新たな2つのRNAバンドが存在し、それと同時に、*nara12-1*変異体では葉緑体23Sの3つの断片のうちの1.3-kbと1.1-kbの2分子種が著しく減少していることが分かった。このことから、*nara12-1*変異体では葉緑体23S rRNAのプロセッシングに異常があることが示唆された。一方、25Sと18S rRNAに関しては野生株と変異株で違いは見られなかったこと (Figure 13A) から、*nara12-1*変異体は細胞質のrRNAの成熟化については正常であると考えられた。

23S rDNAの全長に相当する配列をプローブに用いて変性条件下でノザンブロットを行なうと、23S rRNAは全長に相当するサイズでは殆ど存在せず、大部分は複数の断片化された分子種として生成されるため、複雑なバンドパターンとして検出される (Kössel et al., 1985; Kishine et al., 2004; Bollenbach et al., 2005)。*nara12-1*変異体で観察された葉緑体23S rRNAの成熟化の異常をより詳細に解析するために、その発現パターンをノザンブロットにより解析した (Figure 13A)。その結果、上述のSYBER Green染色像でも観察されたように23S rRNAの成熟型断片である1.3-kbと1.1-kbの分子種が著しく減少していることが確認された。また、それ以外に1.8-kbの断片の減少も観察された。さらに、著しい減少が観察された1.3-kbと1.1-kbの断片の前駆体に相当する2.9-kbの前駆体と2.4-kbの中間体の2つの分子種が劇的に増加していることが観察された。これら2つの分子種が、Figure 13Aの変異体のSYBER Green像において25Sと16S rRNAの間に出現した高分子量のバンドに相当すると考えられる。一方、0.5-kbの断片や4.5S、5S rRNAへの影響は比較的軽微であった。また、16S rRNAに関しても成熟型分子種が僅かに減少しているに過ぎなかった。以上の結果から、*nara12-1*変異体は葉緑体23S rRNAのプロセッシングにおいて、2.9-kb及び2.4-kbの各前駆体から、1.8-kb、1.3-kb、及び1.1-kbの3つの断片を生成するステップ、すなわち23S rRNAのhidden break導入に異常があることが明らかとなった。

上述したように、葉緑体の23S rRNAがプロセッシングされて複数の不連続な断片を生じることは古くから知られていた現象である (Leaver, 1973)。ところがこれらRNA断片がどのようにして生成されるかについてははっきりしない。そこ

で、全長23S rRNAの5'側、中間領域、3'側の各領域をとらえる3種類のプローブ (Probes 1, 2 and 3 in Figure 13B) を用いてノザンブロットを行い、23S rRNAの断片化様式を詳細に検証した (Figure 13B)。その結果、0.5-kbの断片はProbe 1でのみ検出できるのに対して、2.4-kbの分子種はProbe 1では検出できないことから、0.5-kbの断片は2.9-kb前駆体の5'側に由来し、その生成に付随して2.4-kb中間体が生じることが分かった。また1.1-kbの断片がProbe 2とProbe 3の両方で検出できるのに対して、1.3-kbの断片はProbe 2でしか検出されないことから、2.4-kb中間体はその3'側に由来する1.1-kb断片と、その5'側 (全長2.9-kb前駆体では中間部分) に由来する1.3-kb断片に解裂することが分かった。興味深いことに、Probe 1とProbe 2では検出された1.8-kb断片は、Probe 3では検出できないことから、1.1-kb断片は2.9-kb前駆体から1.8-kb断片が解裂した場合も生成することが分かった。したがって1.1-kb断片は、2.4-kb中間体から1.3-kb断片が生成する場合と、2.9-kb前駆体から1.8-kb断片が生成する場合の2通りがあることが明らかとなった。また*nara12-1*変異体では、1.8-kbと1.3-kbと1.1-kbの3つの断片が減少しているが、0.5-kbの分子種は野生株とほぼ同程度に蓄積し、かつこれらの前駆体である2.9-kbと2.4-kbの両分子種が増加していた。以上のことから、23S rRNAは2カ所のプロセシング部位で切断されること、そして*nara12-1*変異体はこのうち3'側の切断に異常があるため、2.9-kb前駆体から1.8-kbと1.1-kbの断片の生成と、2.4-kb中間体から1.3-kbと1.1-kbの断片の生成が滞っていることが示唆された。

3.2 *NARA12*遺伝子は葉緑体局在のDEAD-boxタンパク質RH39をコードする

*nara12-1*の変異遺伝子座を決定するために、Columbiaバックグラウンドの*nara12-1*とLandsberg *erecta*の野生株との交配により得られた736個体のF₂植物を用いてマッピングを行なった。その結果、*NARA12*遺伝子座は、4番染色体上腕のBACクローンT25P22上のSSLPマーカー (4個体の組換え体) とBACクローンF17A8上のCAPSマーカー (9個体の組換え体) で挟まれる領域にマップされた (Figure 14)。この領域 (124 kbp) 内の25個のOpen reading frame (ORF) のうち22個についてダイレクトシーケンスを行った結果、At4g09730のORF上に一塩基置換を見出した。このGからAへの塩基置換により、142番目のグリシンがグルタミン酸にアミノ酸置換を起こす。

At4g09730が原因遺伝子であることを確認するために、アグロバクテリウムを介した形質転換法により、この遺伝子のcDNAをカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター制御下で発現するコンストラクトを*nara12-1*変異体に導入した。その結果、得られたT₂植物体は野生株と同様の緑色の外観を示した (Figure 15A)。またRuBisCOの蓄積量と23S rRNAのプロセシングパターンも野生株と同等に回復した (Figure 15C, 15D and 15E)。このことから、At4g09730

が*NARA12*遺伝子であると結論付けた。

*NARA12*遺伝子であるAt4g09730は、The Arabidopsis Information Resource (TAIR)においてシロイヌナズナに57個存在するDEAD-box RNA helicasesのひとつであるRH39をコードする遺伝子としてアノテーションされていた。RH39は機能未知のタンパク質であった。またRH39は全長621個のアミノ酸からなり、分子質量は68.9 kDaであると見積もられた。

DEAD-boxタンパク質は、ATPの加水分解によるエネルギーを用いて2本鎖RNA、あるいはRNAに結合したタンパク質の解離を行なう酵素と考えられており、アーキアからバクテリア、酵母、ヒト、植物に至るまで様々な生物種に幅広く保存されている (Rocak and Linder, 2004)。主に酵母を中心とした遺伝学的、生化学的解析から、DEAD-box タンパク質は核内での転写やRNAスプライシング、リボソーム生合成、あるいはRNAの核外輸送、また細胞質ではmRNAの翻訳や分解等の様々な細胞内プロセスに関わることが知られている (Cordin et al., 2006)。RH39の全長をクエリにBLAST検索を行なった結果、高い相同性を示すホモログが、トウモロコシ、イネ、ソルガム、ブドウ、ポプラにおいて見つかり、やや低い相同性を示すものとしてヒメツリガネゴケのホモログが見出された (Figure 16)。一方、RH39とその他のシロイヌナズナDEAD-boxタンパク質との相同性は低く、最も高い相同性を示したのはRH50 (34%) であったが、その機能は不明であった。

DEAD-boxタンパク質は、その一次配列上に特徴的な9つの保存モチーフ (motifs Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI) を有しており (Rocak and Linder, 2004; Linder, 2006)、“DEAD-box”という名前は、motif IIのアミノ酸配列が一文字表記で、“D-E-A-D”となることに由来する。これまでに9つの保存モチーフの機能が明らかにされており、motifs Q、I、IIはATPの結合、motifs Ia、Ib、IV、VはRNAへの結合、motif IIIはATPの加水分解、motif VIはATPの加水分解とRNAの巻き戻しにそれぞれ関与する (Cordin et al., 2006; Figure 17A)。コンセンサス配列と完全に一致しているわけではなかったが、RH39はこれら全てのモチーフを保存していた (Figure 17B)。これら9つの保存モチーフを含むコアドメイン領域 (114-464a.a. for Arabidopsis RH39) は上述の植物ホモログ間で極めて保存性が高かった (Figure 16)。一方、RH39のC末端側はSerine-richな配列であった (Figure 16)。

*nara12-1*変異によるアミノ酸置換はmotifs QとIの間のグリシン残基に生じており、この残基は上記4種の植物のRH39ホモログすべてにおいて高度に保存されていた (Figure 16)。この変異RH39タンパク質の性質 (安定性) を知るために、RH39のN末端配列 (103-113a.a.) と相同な合成ペプチド鎖を抗原とした抗RH39ペプチド抗体を作製した。この抗体はリコンビナント6×His-NusA-6×

His-RH39-S・Tagハイブリッドタンパク質を認識し、かつシロイヌナズナの葉の全タンパク質中に含まれる目的の分子量サイズのコピーを検出したことから、内在のRH39タンパク質を検出できていると考えられる (Figure 18)。この抗体を用いて、RH39タンパク質の蓄積量を野生株と比較すると、*nara12-1*変異体はその蓄積量が減少していることが明らかとなった。よって、*nara12-1*変異はRH39タンパク質量を減少させることが分かった (Figure 18)。

ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)、PCLR (<http://www.andrewschein.com/pclr/>)、WolfPSORT (<http://wolfpsort.org/>) による *in silico*解析の結果、RH39はN末端配列にはトランジットペプチドを有し、葉緑体に局在することが予測された。そこで、RH39タンパク質の葉緑体局在を確認するために、CaMVの35Sプロモーター制御下で全長RH39のC末端側にレポータータンパク質であるEGFPを融合したハイブリッドタンパク質を発現するコンストラクトを作製し、アグロバクテリウム法により *nara12-1*変異株を形質転換した。ところが機能的に相補された形質転換植物は得られなかった。またトランジェントアッセイ用に作製した全長RH39-GFP融合コンストラクトをPEG法によりシロイヌナズナのプロトプラスト、またはパーティクルボンバードメント法によりタバコSR-1の生葉に導入したが、いずれの場合もGFP蛍光は観察されなかった。このことから、RH39タンパク質全長とGFPの融合タンパク質は植物細胞内では発現しないことが推察された。そこで、予測されるトランジットペプチド配列を含むRH39のN末端113アミノ酸とGFPを融合したフュージョンタンパク質 (RH39N-GFP) をPEG法によりシロイヌナズナプロトプラストに一過的に発現させた (Figure 19A)。その結果、ハイブリッドタンパク質由来のGFP蛍光は、主に葉緑体と重なるドット状のシグナルと、葉緑体全体に広がる弱い蛍光シグナルとして観察された。一方、GFPのみを単独でプロトプラストに導入すると、細胞質と核に蛍光シグナルが観察された。またパーティクルボンバードメント法によりシロイヌナズナの生葉に同じコンストラクトを導入した場合も、ドット状のGFP蛍光が葉緑体において検出された (Figure 19B upper panels)。さらにこのコンストラクトをパーティクルボンバードメント法でタバコ生葉に導入した場合はタバコの孔辺細胞に存在する葉緑体全体から検出された (Figure 19B middle panels)。またタマネギの表皮細胞に対して、同じコンストラクトを導入した場合は、プラスチドからGFPハイブリッドタンパク質由来の蛍光シグナルが検出された (Figure 19B lower panels)。このことから、RH39のN末端配列はトランジットペプチドとして機能し、植物細胞内で葉緑体に移行する性質があることが分かった。実際、細胞分画法により単離したシロイヌナズナの葉緑体に対して、抗RH39ペプチド抗体を用いたウェスタン解析を行ったところ、RH39は、チラコイド膜タンパク質であるLHCPが存在する葉緑体の膜画分において濃

縮されて検出された (Figure 20)。またThe Plastid Proteome Database (PPDB, <http://ppdb.tc.cornell.edu/>) によると、シロイヌナズナの葉のプロテオーム解析の結果、RH39は葉緑体画分で検出されることが示されている (Zybailov et al., 2008)。以上のことから、RH39はシロイヌナズナの葉緑体内において機能することが示唆された。

RH39遺伝子の空間的な発現パターンを知るために、器官別の遺伝子発現を半定量的RT-PCRにより解析した。その結果、RH39遺伝子は黄化芽生えでは発現量が低いものの、葉、花茎、地下根、花弁いずれの器官においても発現していることが分かった (Figure 21)。次に、RH39遺伝子と協調して発現制御されている遺伝子をATTED-II (<http://www.atted.bio.titech.ac.jp>) を用いて探索した。その上位10遺伝子程度をTable 4に示した。それらはすべて葉緑体に局在することが予測または実験的に示されているものばかりであった。またその中には葉緑体リボソームの構成成分 (small ribosomal protein S6) やプラスチドの転写活性画分 (plastid Transcriptionally Active Chromosomes, pTAC) の構成成分 (PFKB1, GyrB) が含まれていた。特にpTACの構成成分は葉緑体内でドット状のGFPシグナルとして検出されることが知られている (Myouga et al., 2008; Arsova et al., 2010) が、この点においてRH39の局在パターンと類似していた (Figure 19A)。pTACではrRNAの合成や光合成関連遺伝子の転写反応だけでなく、RNAのプロセッシング反応のような転写後反応も起こっていることが示唆されている (Pfalz et al., 2006)。

ここでFigure 19に関連して、興味深いことに、シロイヌナズナのプロトプラストにRH39N-GFP融合タンパク質を発現させると、葉緑体の外側にもGFPシグナルが見られる (Figure 19A)。またタバコの孔辺細胞においても葉緑体の外側に低いGFP蛍光シグナルが検出された (Figure 19B middle panels)。さらにタマネギの表皮細胞ではプラスチドよりも小さい区画にもシグナルが検出された (Figure 19B lower panels)。タマネギで見られたこの小さな区画は、そのサイズと数から恐らくミトコンドリアであると推察される。実際、*nara12-1*変異体ではミトコンドリアに存在する3種類のrRNA (18S、26S、5S) のうち、5S rRNAの発現量の減少が観察された (Figure 22)。ミトコンドリアの5S rRNAは18S rRNAとともに共転写され、18S-5S rRNAとして発現した後、遺伝子間配列内で切断され、さらに末端がトリミングされて成熟型となる (Perrin et al., 2004)。したがって、RH39はミトコンドリアでも機能し、5S rRNAの成熟化に関わる可能性が考えられる。この点に関しては今後更なる解析が必要である。

3.3 NARA12遺伝子は正常な発達に必須である

NARA12遺伝子の機能を完全に欠損したときの表現型を解析するために、SALK の T-DNA 挿入 ライン の コレクション

(<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>; Alonso et al., 2003) から、*NARA12* 遺伝子のノックアウトアレルを検索した。それらT-DNA挿入ラインのひとつである SALK_090774は、*NARA12*遺伝子の第7エキソンにT-DNAが挿入されていることをシーケンス解析により確認した (Figure 23A)。以下、このラインを*nara12-2*と呼称する。

*nara12-2/NARA12*ヘテロ植物体の自家受粉により取得された種子を3%ショ糖含有のMSプレート上に播種し、得られた植物体約41個体についてPCRによりジェノタイプを決定した。その結果、野生型あるいは*nara12-2/NARA12*ヘテロ接合体のみで、*nara12-2*変異のホモ接合体はひとつも存在しなかった。このことから、*NARA12*遺伝子を破壊すると植物体は胚性致死を引き起こすと考えられた。一方、*nara12-2/NARA12*ヘテロ植物体の見た目の表現型は野生株と同等であった。*nara12-2/NARA12*ヘテロ植物体と*nara12-1*変異体の交配により得られた40個体のF1個体の表現型は野生型が21個体と変異型が19個体のほぼ同数ずつ得られた。PCRジェノタイプを行なったところ、変異表現型を示した植物体はすべて*nara12-1/nara12-2*接合体であった。また*nara12-1/nara12-2*変異体は*nara12-1*変異体よりも生育が遅延しており、葉緑体23S rRNAのプロセッシングパターンやミトコンドリア5S rRNAの発現量、RuBisCOとD1タンパク質の蓄積量についても異常が見られた (Figure 24)。このことから、*nara12-1*は*nara12-2*変異と同一の遺伝子座の変異遺伝子であり、leakyな対立遺伝子であることが分かった。

*NARA12*遺伝子の機能欠損による植物体への影響をより詳細に解析するために、成熟した*nara12-2/NARA12*ヘテロ植物体の緑色長角果 (silique) を切開して光学顕微鏡を用いて観察した。その結果、鞘の中には野生株と同様の正常な緑色で球状の若い種子が見られたが、それ以外に白色で小さい発達異常の種子が存在した (Figure 23B upper panels)。またsilique内の緑色の正常な種子は成熟化してライトブラウンの種子に移行するが、これら白色の未発達種子は徐々に収縮して茶褐色の異常な種子となった。成熟化したひとつのsilique内に含まれていた正常な種子と異常な種子をFigure 23B lower panels に示す。これら異常な種子は、ひとつのsiliqueに占める全ての種子当たり約25%の頻度で存在していたことから、単一の遺伝子座の変異に起因する表現型であると考えられた。恐らくこの萎んだ異常な種子が*nara12-2*ホモ接合体に由来すると考えられる。以上の解析から、*NARA12*遺伝子すなわちRH39の機能は植物の生存に必須の遺伝子であることが示唆された。なお、葉緑体に局在予測される他のDEAD-boxファミリータンパク質はRH39以外に15個存在する (Table 2)。興味深いことに、その約半数に相当する8遺伝子 (RH3/EMB1138, RH9/PMH1, RH22, RH26, RH31, RH33, RH37 and RH58) について遺伝子欠損変異体をストックセンターから取得して、PCRジェノタイピングを行ったところ、RH9/PMH1以外のすべてのラインについて

RH39の場合と同様にT-DNAが挿入されたホモ個体を取得することができなかった (Figure 25A)。

3.4 RH39は配列依存的にhidden break導入部位近傍の23S rRNAへ結合できる

Figure 13Bの解析から、23S rRNAは2カ所のプロセシング部位で切断され、RH39はこのうち3'側の切断に関与することで、2.9-kb前駆体から1.8-kbと1.1-kbの断片の生成と、2.4-kb中間体から1.3-kbと1.1-kbの断片の生成を担うことが示唆される。hidden breakの導入位置については、トウモロコシの23S rRNAにおいて既に同定されており (Kössel et al., 1985)、この位置はシロイヌナズナの23S rRNAの配列上でも保存され、かつ*nara12-1*変異体において異常が見られた3'側の切断部位である。また、この切断位置近傍はステムループを形成しており、断片化プロセシング後はそのループ部分が切断除去される。これまでの変異体解析から、RH39は生体内において23S rRNAを標的として3'側の断片化プロセシングに関与している可能性が考えられる。そこで、まずRH39がRNA分子自体に直接作用し得るかどうかを評価するために、真核細胞のDEAD-boxタンパク質の生化学的解析において基質として用いられた前例があるRNA配列 (RNA25-2) (Du et al., 2002; Marsden et al., 2006) とC末端に6×Hisが融合したりコンビナントタンパク質 (rRH39) を用いたゲルシフトアッセイにより、RH39のRNA結合能を解析した (Figure 26)。ここで、野生型RH39のC末端に6×Hisを融合したコンストラクトを導入した*nara12-1*変異体は、その変異表現型が野生株と同等にまで回復すること (Figure 27) から、C末端に6×Hisが融合したRH39タンパク質は機能的であると考えられる。RNA25-2のゲルシフトアッセイの結果、rRH39はRNA自体に直接結合する性質を有することが明らかとなった (Figure 26C)。次に、RH39が実際に23S rRNAをリガンドとして直接的に作用しうるかどうかを解析するために、hidden break導入部位周辺の23S rRNAの配列に対して同様のゲルシフトアッセイを行った。その結果、rRH39はhidden break導入部位の上流配列、すなわち5'側ステム形成配列とその更に5'側の配列からなる1本鎖オリゴRNA (S1+5') についてはRNA25-2と同様に結合した (Figure 26C)。ところが、驚くべきことに、5'側ステム形成配列 (S1) と、hidden break導入部位の下流配列、つまり3'側ステム形成配列とその更に3'側の領域を含むRNA配列 (S2+3') には殆ど結合しなかった (Figure 26C)。さらにrRH39が結合したS1+5'配列のコンペティションアッセイを行ったところ、S1+5'及びRNA25-2では結合阻害が見られたが、S1やS2+3'では阻害の程度が緩やかであった (Figure 26D)。このことから、RH39タンパク質は、配列依存的なRNA結合親和性を有することが示唆された。そこで、rRH39が結合したS1+5'とRNA25-2の1次配列を比較したところ、興味深いことに、両者の間には6塩基からなる共通のRNA配列 (5'-CCGUAA-3') が存在

することが明らかとなった (Figure 26E)。この配列は、23S rRNAの配列上では、hidden breakが導入されるステムループに隣接するhelix (cH62) 内に存在していた (Figure 26A)。したがって、RH39はhidden breakが導入されるステムループに非常に近接した隣の5'側helixに結合することが示唆された。

3.5 hidden break導入に異常のある*nara12*変異体は翻訳伸長効率が低下している

*nara12-1*変異体はhidden breakの導入に異常があるため葉緑体リボソームが不完全な状態で存在することを見出した。次はそのような不完全なリボソームが翻訳にどのような影響を及ぼすかについて解析を行った。

翻訳は大きく3つの段階に分類され、標的mRNAとリボソームからなる翻訳複合体の形成 (翻訳開始)、ペプチド鎖の伸長 (翻訳伸長)、そして翻訳複合体の解離 (翻訳終結) の各段階からなる。これら翻訳段階の異常は、植物細胞破碎液中のポリソームをショ糖密度勾配遠心法により分画後、各画分からRNAを抽出してノザン解析を行い、ショ糖密度勾配中のmRNAの分布によって評価できる。例えば翻訳開始段階の異常は、ポリソーム形成ができないため、mRNAのシグナルが低密度画分に検出されることが知られている (Barkan, 1993)。また、翻訳終結に異常がある場合は複合体の解離ができないために、リボソームがmRNA上に留まり、結果としてmRNAのシグナルが高密度側にシフトすることが報告されている (Motohashi et al., 2007)。翻訳のいずれかの段階に異常があるかを特定するために、*nara12-1*変異体におけるリボソームとmRNAの会合状態を野生株と比較した。その結果、*rbcL*及び*psbA*のいずれの場合も、ショ糖密度勾配中のmRNAの分布は野生株と変異体で大きな違いは観察されなかった (Figure 28A)。このことから、*nara12-1*変異体は、ポリソーム形成自体は正常に行なわれており、翻訳開始及び終結の両段階は正常であることが示唆された (Barkan, 1993; Motohashi et al., 2007)。またポリソーム形成とmRNAの安定性との間には密接な関係があり、翻訳開始あるいは終結に異常がある変異体では、*rbcL* mRNAの安定性が低下するため、その蓄積量が減少することが報告されているが、*nara12-1*変異体では*rbcL* mRNAの蓄積量は野生株と同等であった (Figure 12)。このことから、*nara12-1*変異体は翻訳複合体の形成及び解離の両段階は正常であることが支持される。そこで次に葉緑体内でのmRNAの翻訳伸長段階に異常があるかどうかを検証するために、細胞質の翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド存在下で³⁵S-methionine/cysteineを用いた*in vivo*タンパク質ラベリング実験を行い、葉緑体コードのRbcLとD1タンパク質の翻訳効率を野生株と比較した。シクロヘキシミド存在下でタンパク質をラベリングすると、葉緑体ストロマの主要タンパク質であるRbcLと葉緑体チラコイド膜タンパク質の中で最も合成が盛んなD1タンパク質がメインバンドとして検出される (Wostrikoff and

Stern, 2007)。パルスラベルの結果、*nara12-1*変異体におけるRbcLとD1の単位時間当たりの合成量は野生株に比べて低下していることが明らかになった (Figure 28B)。ここでWostrikoff and Stern (2007) によると、RbcLのfolding/assemblyに関わるBSD2の発現抑制変異体ではRbcLのsteady-state levelの減少と翻訳促進が観察されている。これはRbcLの翻訳後段階の異常は、RbcLの分解促進と翻訳亢進を引き起こすことを示唆している。しかし*nara12-1*変異体ではこうしたRbcL合成の促進は観察されていないため、翻訳後プロセスは正常だと推察される。また、*nara12-1*変異体と野生株のD1タンパク質の安定性には大きな違いは観察されなかった (data not shown)。以上のことから、*nara12-1*は葉緑体の翻訳伸長効率が低下していることが示唆された。

*nara12-1*変異体では標的mRNAは十分量存在し、かつそれらに対して一様にリボソームが結合してポリソームを形成できている。それにも拘らず、変異体の翻訳効率の低下が観察されている。そこでこの翻訳効率の低下と23S rRNAの断片化プロセシングの異常との関連性について知るために、ポリソーム画分の23S rRNAのパターンを野生株と変異体で比較した (Figure 28A)。野生株では、ポリソームの存在する高密度画分には1.8-kb、1.3-kb、1.1-kb、0.5-kbの4つの断片が大部分を占めていた。ところが興味深いことに、*nara12-1*変異体の場合はこれら4つの断片だけでなく、その前駆体である2.9-kbと2.4-kbの両分子種が高密度画分に強く検出しており、23S rRNAに由来する分子種の構成比率が変動していた。変異株において、23S rRNA前駆体がポリソーム画分において検出されたことから、これら前駆体は翻訳中の50Sリボソームの構成成分として取り込まれていることを示唆している。この結果と変異体の翻訳効率が低下していたことから、断片化される前の23S rRNAによって構成される50Sリボソームはペプチド鎖の伸長反応の触媒能に障害があることが示唆される。

以上の解析から、*nara12-1*変異体はリボソームと標的mRNAとの複合体は正常に形成できているにも関わらず、23S rRNAの断片化プロセシングの異常により、葉緑体リボソームの機能的な触媒中心の形成が阻害されたため、ポリソーム全体に占める機能的なリボソームの比率が低下した結果、翻訳効率の低下、ひいてはRuBisCOをはじめとする葉緑体ゲノムにコードされるタンパク質の合成量が低下したと考えられた。

3.6 プラスチドリボソームは23S rRNAプロセシングを介してその構造をダイナミックに変化させる

植物には緑葉の葉緑体以外に、非緑色器官のプラスチドとして、黄化子葉のエチオプラスト、あるいは根と花卉の2種類のロイコプラストが存在する。これら非緑色器官のプラスチドは形態的にも機能的にも葉緑体と大きく異なっ

おり、光合成反応は行われていない。プラスチドゲノム上に存在する遺伝子の大半は光合成関連のタンパク質であることから、これら非光合成器官のプラスチド内のタンパク質合成量は低い。このことから、これらのタンパク質合成は葉緑体とは明らかに異なる様式で行われていると考えられる。特に暗所芽生えに見られるエチオプラストは、光が照射されることによって葉緑体へと分化するが、このときプラスチドの翻訳量は劇的に増大することが知られている (Marín-Navarro et al., 2007; Kanervo et al., 2008)。興味深いことに、これら非光合成器官のプラスチドにおける23S rRNAのプロセッシングパターンをノザンブロットにより解析したところ、いずれのプラスチドタイプにおいても葉緑体とは大きく異なっていることが明らかとなった (Figure 29)。特に、エチオプラストのプロセッシングパターンは、前駆体である2.9-kbや2.4-kbの分子種が多くを占めるのに対して、緑葉の葉緑体ではこれら前駆体は非常に少なく、断片化された成熟型分子種が大部分を占める (Figure 29A)。一方、根と花弁のプラスチドは同じロイコプラストに分類されるが、根のロイコプラストでは23S rRNAの大部分がその前駆体である3.1-kbのジシストロニックな23S-4.5S rRNAの状態が存在していたのに対して (Figures 29B and 30)、花弁のロイコプラストは、1.8-kbと1.1-kbの2分子種がメインシグナルとして検出され、それぞれ異なる転写後制御を受けていることが分かった (Figure 29B)。

以上のことから、23S rRNAはプラスチドのタイプと翻訳要求量に依存して、プロセッシングパターンを劇的に変動させることで、プラスチドの翻訳装置であるリボソームをダイナミックに編成していることが明らかとなった。

4. 考察

DEAD-box RNA helicaseは細菌から酵母、動植物に至る殆どすべての生物種に存在するユビキタなタンパク質で、しばしばタンパク質ファミリーを形成している。なかでも植物は最も多くのファミリータンパク質を有し、その機能的多様性に興味を持たれる。この植物におけるDEAD-boxタンパク質の多様性を生む要因の1つは、植物固有のオルガネラである葉緑体であると考えられる。ところが、この葉緑体内で機能する、植物において独自に進化したDEAD-boxタンパク質の分子機能はこれまで殆ど明らかにされていない。それどころか、高等植物のDEAD-boxタンパク質の解析自体がまだまだ始まったばかりである。様々な外的ストレスにより遺伝子発現が変動するなどの理由から、DEAD-boxタンパク質とストレス耐性との関連性についての報告が最近幾つかなされているものの、どのような細胞内プロセスに寄与するかに関してはほとんど明らかにされていない (Gong et al., 2002; Gong et al., 2005; Vashisht and Tuteja, 2006, Kant et al., 2007, Li et al., 2008)。また植物のオルガネラに局在するDEAD-boxタンパク質の生理機能についてはさらに知見が乏しい。最近RH9/PMH1とRH53/PMH2という2つのDEAD-boxタンパク質がミトコンドリア内でRNAを含む高分子量の複合体として存在し (Matthes et al., 2007)、PMH2はイントロンスプライシングに関わることが示唆されている (Köhler et al., 2009)。一方、PMH1はその欠損株*pmh1-1*の外観は野生株と同等であることが本研究 (Figure 25B)とKöhler et al., 2010で見出されたが、これはPMH1と74%の相同性を示すPMH2がリダンドに働いているためだと考えられているが、その詳細な機能は明らかではない (Köhler et al., 2010)。そして、植物の葉緑体に局在するDEAD-boxタンパク質で唯一解析されているタバコVDL (Variegated and Distorted Leaf) の遺伝子破壊株は、葉の発達や組織形成、そして葉緑体の分化に異常が観察されているが、葉緑体においてどのような細胞内プロセスに関わるかについては未だ明らかにはされていない (Wang et al., 2000)。本研究は高等植物葉緑体におけるDEAD-box RNA helicaseの生体内機能を初めて明らかにするとともに、リボソーム大サブユニットのrRNAの断片化プロセシングにこのファミリータンパク質が関わるということを他生物に先駆けて高等植物の葉緑体において見出した。

4.1 高等植物葉緑体におけるhidden break導入のプロセシングスキーム

Figure 13Bの23S rRNAのフラグメントパターンによると、1.3-kbの断片は2.4-kb中間体から生成する場合と1.8-kb断片から生成する2つの場合が存在することが分かる。このことを踏まえて葉緑体23S rRNAの断片化プロセシングスキ

ームを図式化するとFigure 31のようになる。すなわち、2.9-kbの23S rRNAがまず5'側で1カ所切断されて0.5-kbと2.4-kbの2つの断片が生じた後、3'側が切断されて、0.5-kbと1.3-kbと1.1-kbの3つの断片が生じる経路 (A) と、先に3'側の切断が起こって1.8-kbと1.1-kbを生じた後に、5'側が切断されて3つの成熟型断片が生成する経路 (B) からなるスキームである。このモデルスキームにおいてRH39は経路 (A) と経路 (B) の3'側の断片化プロセッシングに関わると考えられる。実際 *nara12-1* 変異体では、経路 (A) の2.4-kb前駆体が蓄積し、かつ1.3-kbと1.1-kbの断片が減少していた。また経路 (B) の2.9-kb前駆体が蓄積するとともに1.8-kbと1.1-kbの断片が減少していた。一方、0.5-kbの断片が *nara12-1* 変異体では野生株とほぼ同等に存在していたことと、2.9-kb分子種に対する2.4-kb前駆体の存在比が変異体で増大していたことから、5'側の断片化プロセッシングは正常に進行していると考えられる。ここで、変異体の0.5-kb断片の存在量が野生株と同程度であったことから、この断片の生成は主に経路 (A) に由来しており、経路 (B) の5'側プロセッシングの寄与は比較的小さいのかもしれない。この5'側のプロセッシングに関与する因子については、恐らくシロイヌナズナに2コピー存在するCSP41に関わると推測される。なぜならBeligni and Mayfield (2008) によると、CSP41遺伝子の二重欠損変異体は、本研究における0.5-kbと1.3-kbの分子種に相当する断片の減少、及び2.9-kbと1.8-kbの分子種の上昇が観察されているためである。また彼らの解析では、1.1-kb断片に相当する分子種は検出されていなかったが、1.8-kbに相当する分子種がCSP41遺伝子の二重欠損変異体において増大していた。この結果と野生株でも1.8-kbの断片が安定に存在することから、5'側のプロセッシングサイトでの切断反応は3'側の切断反応に必要なわけではないことが分かる。また *nara12-1* 変異体において0.5-kbの断片が正常に生成されることから、3'側の切断反応もまた5'側の切断反応に必要なわけではないことが分かる。したがって2つの経路の各々において、2つのプロセッシングサイトでの切断反応は独立に進行すると考えられる。

興味深いことに、シロイヌナズナと同様に葉緑体遺伝子発現の遺伝学的解析が精力的に行われている単子葉植物のトウモロコシの葉における葉緑体23S rRNAは断片化プロセッシングを受けるものの、そのパターンはシロイヌナズナとは異なり、5'側に由来する1.8-kbと3'側に由来する1.2-kbの2つの断片しか生成しない単純なものである (Barkan, 1993)。トウモロコシの1.8-kbと1.1-kbの各断片はシロイヌナズナの1.8-kbと1.1-kbの分子種に相当することから、シロイヌナズナの1.8-kbのフラグメントは成熟型分子種として機能すると考えられる。実際、1.8-kbの分子種は野生株のノザンブロットにおいてメインシグナルのひとつとして検出され、かつ他の3つの成熟型分子種である1.3-kb、1.1-kb、0.5-kbの断片と共に野生型ポリソーム画分において検出されている (Figure 28)。またこのこ

とは、上述したように経路 (B) における5'側のプロセッシング、すなわち1.8-kbの解裂反応が比較的低頻度で起こることとも一致する。

トウモロコシの断片化プロセッシングをシロイヌナズナで樹立したモデルスキームに当てはめると、RH39の関与する3'側のプロセッシングのみで、5'側のプロセッシングは起こらない、つまり経路 (B) の第1段階までで23S rRNAのプロセッシングが終了することが分かる。このことと一致するかのよう、トウモロコシゲノム上にRH39オーソログが存在する一方で、5'側のプロセッシングに関わると考えられるCSP41遺伝子は、既に述べたようにシロイヌナズナでは2コピーであるのに対し、トウモロコシでは1コピーしかない。シロイヌナズナCSP41はマルチターゲットタンパク質である (Bollenbach et al., 2009) ため、トウモロコシのCSP41オルソログは、この23S rRNA以外のRNAのメタボリズムに関わると予測される。いずれにせよ、RH39が関わる3'側のプロセッシングは双子葉植物と単子葉植物の両方に共通して保存される現象だと考えられる。

4.2 *nara12-1*変異体における23S rRNAプロセッシングの異常

葉緑体rRNAの損傷は多面的な影響が現れることが知られている (Barkan, 1993)。23S、4.5S、5S rRNAと同様に*rrn*オペロン上に存在する16S rRNAの成熟化に損傷がある*hcf7*変異体のノザン解析の結果、23S-4.5S rRNAに相当する前駆体とさらに高分子の23S rRNAの配列を含む前駆体の蓄積と、全長及びフラグメント化された23S rRNAの減少が観察される (Barkan, 1993; Watkins et al., 2007)。また、5S rRNAの前駆体の増加と成熟型の減少、及び成熟型4.5Sの蓄積量の減少が観察されている。同じく*rrn*オペロン上に存在するtRNAである*trnI*と*trnA*のイントロンスプライシングを担うRNC1の変異体 (*rnc1-2/-3*) は、*hcf7*変異体と同様に23S-4.5S rRNA前駆体とそれよりさらに高分子量の23S rRNAを含む前駆体が増加し、全長及び断片化した23S rRNAの減少が観察されている。また4.5Sと5Sの成熟化についても*hcf7*と同様の影響が現れている (Watkins et al., 2007)。ところが、*nara12-1*変異体で観察された23S rRNAのパターンは、*hcf7*や*rnc1-2/-3*変異体とは異なり、全長に相当する2.9-kb及びそれがプロセッシングされてできた2.4-kbの中間体の蓄積量は減少しておらず、むしろ高蓄積していた (Figures 13)。したがって*nara12-1*変異体で観察された23S rRNAの断片化プロセッシングパターンの異常は、同じオペロン上に存在する16S rRNAのプロセッシングやtRNAのスプライシングの損傷により引き起こされる二次的な影響ではないと考えられる。

リボソームに結合する2つのCSP41は23S rRNAのプロセッシングに関わることが示唆されている (Beligni et al., 2008)。またSVR1/pseudouridine synthaseやClpプロテアーゼのサブユニットである*clpR1*、*clpR2*、*clpC1*が正常な23S rRNAのプロセッシングに必須である (Koussevitzky et al., 2007; Yu et al., 2008; Zybailov

et al., 2009)。Koussevitzky et al. (2007) によって rRNA プロセシングに必須の因子は Clp 活性によって制御されていることが示唆されている。実際、Clp プロテアーゼ変異体の 23S rRNA のプロセシングパターンは RNR1 変異体と類似している (Koussevitzky et al., 2007; Yu et al., 2008; Bollenbach et al., 2005)。それでもなお、これら因子がどのように 23S rRNA をプロセシングするのか、またどのような現象がこのプロセシングに関わっているかについては未だ明らかにされていない。

Barkan (1993) が指摘するように、rRNA のプロセシングの異常は、リボソームの形成や翻訳に primary defect がある変異体においても観察されている (Figure 32)。例えば PPR4 はリボソーム小サブユニットの構成成分の遺伝子 *rps12* のトランススプライシング因子であるが、その変異体はリボソームの会合が正常に進行しないため、23S rRNA のプロセシングに異常が生じる (Schmitz-Linneweber et al., 2006)。また翻訳に必須の *trnG-UCC* の前駆体を安定化する PPR5 の変異体では成熟型の *trnG-UCC* が枯渇して翻訳に損傷が見られるが、この変異体の 23S rRNA のプロセシングにも異常が生じる (Beick et al., 2008)。さらに *why1* 変異体は、リボソーム大サブユニットの構成成分をコードする遺伝子の発現の異常、またはリボソームの会合の不具合に起因して 23S rRNA のプロセシングに異常が引き起こされている (Prikrý et al., 2008)。DAL タンパク質もまたリボソームの会合に必須の因子と考えられているが、その欠損変異体は 23S rRNA のプロセシングに影響する (Bisanz et al., 2003)。これら変異体に共通しているのが、断片化前の 23S rRNA (2.9-kb) 及び 23S rRNA の断片の減少である。興味深いことに、*nara12-1* 変異体では断片化された 23S rRNA の減少は見られるものの、インタクトな全長 23S rRNA の減少は見られず、むしろ著しく高蓄積していた (Figures 13)。また GluRS に変異があり翻訳伸長に異常のある *nara10* 変異体は rRNA のプロセシングパターンに変化が見られないことから (Figure 33)、比較的緩やかな翻訳異常は必ずしも 23S rRNA のプロセシング損傷には繋がらないと考えられる。また *nara12-1* 変異株において、23S rRNA 前駆体がポリソーム画分において検出されたことから (Figure 28)、これら前駆体は翻訳中の 50S リボソームの構成成分として取り込まれていることを示唆している。つまり、プロセシングの異常とは独立してポリソーム形成、及びリボソームの会合が、正常に進行していることが示唆された。このことは、*rbcL* と *psbA* の mRNA のポリソーム形成が正常であること (Figure 28)、そして *rbcL* mRNA が安定に存在していること (Figure 12) からも支持される。さらに、23S-4.5S rRNA の分断及び 23S rRNA の断片化はリボソーム上で起こることが知られているが、*nara12-1* 変異体では成熟型 4.5S rRNA が正常に蓄積していることから、少なくとも 23S-4.5S rRNA の分断までのプロセスは正常、つまりその前段階のリボソ

ームの会合も正常だと考えられる。したがって *nara12-1* 変異体に見られる 23S rRNA の断片化プロセッシング異常は、リボソームの会合や翻訳の損傷によるものでもないと考えられる。

4.3 hidden break導入におけるRH39の役割

それではRH39は23S rRNAの断片化にどのように関わるのだろうか？ Figure 26から、RH39はhidden break導入部位の存在するステムループの5'側に隣接するhelix内の配列に結合することが示唆された。この配列は立体的にもhidden break導入部位に極めて近い位置に存在している (Figure 34)。このことから、RH39はhidden breakの導入に直接的に作用しうることが示唆される。一方、*in silico*解析では、RH39タンパク質の一次構造内にはRNaseドメインの存在は予測されなかったことから、恐らくRNase活性は有していないと考えられる。したがって、この部分の切断には別なRNaseの関与が予想される。DEAD-boxファミリータンパク質の酵素学的性質 (Cordin et al., 2006) を考えると、Pertschy et al. (2009) が述べるように、RH39はRNA構造を変化させることでRNaseのプロセッシング領域へのアクセスを円滑にする、もしくは解裂反応が進みやすいような基質へと変換しているのかもしれない。あるいは単に、RNA/タンパク質複合体のリモデリング、またはプロセッシングされる領域近傍に結合した阻害タンパク質を除去する分子活性を利用して、ステムループ上のRNaseの配置を最適にすることでプロセッシング反応を効率化しているのかもしれない。バクテリアのhidden breakの導入には2本鎖RNA分解酵素であるRNase IIIが関与することが知られている (Evguenieva-Hackenberg, 2005)。Watkins et al. (2007) はバクテリアのRNase IIIのイネとシロイヌナズナの葉緑体ホモログを幾つか予測している。このホモログタンパク質がループ部分を直接的に切断する候補として期待される (Figure 35A, Model 1)。このRNase IIIホモログとRH39との機能的関係性について興味を持たれる。

一方、近年の遺伝学的解析からエキソ型のRNA分解反応もhidden breakの導入に寄与することが示唆されている。エキソ型RNaseであるPNPaseとRNR1の各変異体は葉緑体rRNAのプロセッシングにprimary defectが見られる (Walter et al., 2002; Kishine et al., 2002; Bollenbach et al., 2005; Yu et al., 2008)。両者は23S rRNAのプロセッシングに異常が見られ、特に*rnr1*変異体では23S rRNAの断片化に著しい損傷を受けている (Bollenbach et al., 2005, Figure 32)。また両変異体のダブルノックアウト株はadditiveな表現型を示す。バクテリアにおいて、PNPaseまたはRNRタンパク質はDEAD-box RNA helicaseとエンド型RNaseであるRNase E上で複合体を形成してdegradosomeとしてRNAプロセッシングや分解に機能することが知られている (Carpousis, 2007)。このRNase Eのホモログは植物葉緑体内にも

存在する (Bollenbach et al., 2008; Mudd et al., 2008; Schein et al., 2008)。ところが残念ながら、葉緑体RNase Eはexoribonucleasesと会合するための足場として機能するC末端領域を欠落しており、かつPNPaseがホモオリゴマーとして機能していることから、一般に葉緑体ではバクテリアのようなdegradosomeは存在しないと考えられている (Baginsky et al., 2001)。

他方、酵母のミトコンドリアにはエキソ型RNaseとDEAD-box RNA helicaseの2つのコンポーネントからなるdegradosomeが存在し、rRNAのメタボリズムに関わることが知られている (Dziembowski et al., 2003; Hoffmann et al., 2008)。興味深いことに、分裂酵母のミトコンドリアのdegradosomeにおいてこのRNA helicaseは、特定のRNA配列に結合することでこの部分をRNaseの攻撃から保護し、分解領域を規定する役割を果たすと考えられている (Hoffmann et al., 2008)。植物の葉緑体ではRNR1やRIF10などのエキソ型RNaseとRH39で構成される2成分系が、分裂酵母のミトコンドリアに存在するdegradosomeと類似したシステムにより、ループ部分を除去してhidden breakを導入しているかもしれない。興味深いことに、ATTED-IIによるとこのRIF10とRH39は協調的に発現していることが分かる (Table 4)。このRIF10の欠損株は葉緑体23S rRNAの3'末端トリミングに異常があることが知られている。さらにDEAD-boxファミリーのRH22やRH26も遺伝子発現パターンが類似していることが分かった。これら因子とRH39との機能的関連性についても興味を持たれる。またKishine et al. (2004) はRNR1は酵母ミトコンドリアのdegradosome様の複合体として機能することを示唆し、さらにBollenbach et al. (2005) はRNR1を制御するアクセサリータンパク質の候補としてDEAD-box RNA helicaseを挙げている。RNase Rは高次構造を形成したRNAの分解も可能であり、また最近の研究からこの活性に必須なArg残基がバクテリアで同定された (Vincent and Deutscher, 2009)。この残基はRNR1にも保存されていることから、RNR1がループだけでなくステム構造を形成したRNAに対してもアタックしてしまう。したがってRH39はRNR1による3'→5'エキソヌクレアーゼ反応の更なる進行を妨げることでステム部分の不必要な分解の回避にも寄与しているかもしれない。

上述のようなRNase Rによるエキソ型RNA分解機構が働くには、3'側に1本鎖の突出末端が必須である (Cheng and Deutscher, 2005)。3'突出末端の生成には、ステムループ構造内 (恐らくFigures 34 and 35B のA1756残基の5'側) においてエンド型リボヌクレアーゼによる切断反応が必要であると予想される (Figure 35A, Model 2)。最近、ヘアピン構造内のステム部分に切れ込みを入れるエンドリボヌクレアーゼが酵母において同定された。そのエンドリボヌクレアーゼ Nob1タンパク質は、rRNA前駆体のステム部分を構成するRNA鎖の特定のサイトで解裂反応を触媒する (Pertschy et al., 2009)。しかもNob1はある種のRNA

helicaseと協調的にプロセシング反応を触媒している。すなわち、プロセシング部位に近接した領域にRNA helicaseが結合して前駆体rRNAの構造をリモデリングすることでNob1がプロセシング部位にアクセスしやすくすることで切断を促していると考えられている (Bohnsack et al., 2009; Pertschy et al., 2009)。RH39はこのような高次構造を形成したRNA内へのエンド型リボヌクレアーゼ反応の効率的な進行にも関わると期待される (Figure 35A, Model 2)。Nob1に類似した活性を有するRNaseが葉緑体に存在するのか、あるいは既知の他の葉緑体RNaseがこのエンド型RNA分解反応に関与するかについては今後の更なる解析が必要である。また最近、葉緑体にも存在することが分かった5'→3'エキソリボヌクレアーゼのRNase Jは、枯草菌においてエンド型RNaseとしても機能することが知られている (Pfalz et al., 2009)。葉緑体RNase Jがこのエンド型・エキソ型両方の機能を用いてhidden breakの導入に関与する可能性も考えられる。RH39とこれらプロセシング因子の、23S rRNAの断片化における機能的役割と関係性について興味を持たれる。

4.4 hidden breakの生理的意義

*nara12-1*変異体では、hidden breakを有する正常なリボソームだけでなく、hidden breakを持たない異常なリボソームも、標的mRNAと共にポリソーム画分で検出された(Figure 28A)。このことから、変異体はリボソームの会合過程、及び翻訳開始や終結の各段階のようにポリソーム形成に影響を及ぼすプロセスは正常に進行していること、そしてmRNA上にhidden breakを有する正常なリボソームとhidden breakを持たない異常なリボソームが共存した状態で翻訳伸長反応を行っていることが明らかとなった。しかしその翻訳伸長速度は、正常なリボソームのみの場合 (野生株) に比べて著しく低下していた (Figure 28B)。このことからhidden breakを持たないリボソームは翻訳の伸長効率が低下していることが示唆される。翻訳が盛んなポリソーム形成時はリボソーム同士が極めて密にmRNA上に分布している(Brandt et al., 2009)。そのため、*nara12-1*変異体のポリソーム内には正常なリボソームが存在するにも拘らず、hidden breakを持たない伸長効率の悪いリボソームによってその動きが制限されてしまい、結果的に、翻訳全体のパフォーマンスが損なわれてしまったと考えられる。このような不完全なhidden breakの導入が実際に翻訳効率にドミナントな影響を及ぼすかどうかについては、今後葉緑体形質転換法を用いてhidden break近傍に部位特異的に変異導入する、あるいはRNAiを用いて段階的にRH39遺伝子の発現を抑制することで、hidden breakをもたない変異リボソームを持つ植物体、あるいはhidden breakをhidden breakの導入効率が異なる種々の形質転換体を作成して、それらの翻訳効率を評価する必要がある。いずれにせよ、上述の解析結果からhidden breakの

導入は葉緑体リボソームの効率的な翻訳伸長反応に重要な役割を果たすことが示唆された。しかも興味深いことに、翻訳活性が低いエチオプラストに光が照射されて、翻訳活性が非常に盛んな葉緑体へと分化すると、23S rRNAの断片化が促進されることが明らかとなった (Figure 29A)。このことから、プラスチドはその翻訳要求量に応じて、23S rRNAのhidden breakの導入効率をスイッチングしている可能性が示唆された。以上のことから、hidden breakは、プラスチドリボソームの翻訳伸長効率を制御するコントロールモジュールとして機能していると考えられる。

翻訳伸長はペプチジルトランスフェラーゼ反応とmRNA上の移動 (トランスロケーション) を交互に繰り返すことで進行している (Ramakrishnan, 2002)。hidden breakが生じる部位は、バクテリア23S rRNAにおけるドメインIV内の1,707-1,751に相当し、ペプチジルトランスフェラーゼの反応中心であるドメインVとは異なる (Kössel et al., 1985; Nissen et al., 2000)。またトランスロケーションを触媒するelongation factor Gの結合ドメイン (1,054-1,081) にも位置していない (Skold, 1983; Agrawal et al., 1998)。このことから、hidden breakは全く未知の新規な翻訳伸長の促進制御メカニズムに寄与しているのではないかと期待される。hidden breakがどのように翻訳伸長に関わるかについては今後の更なる解析が必要である。

プラスチドリボソームは、そのhidden breakの数と有無により4つのFormに分類できる。すなわち、hidden breakを持たないForm I、5'側に1箇所のhidden breakを持つForm II、3'側に1箇所のhidden breakを持つForm III、そして2つのhidden breakを持つForm IVである (Figure 31)。興味深いことに、花卉の23S rRNAのプロセッシングパターンから、花卉のロイコプラストでは葉緑体に比べて、経路 (B) の第1段階のみにより生成される1.8-kbと1.1-kbで形成される1カ所切断のForm IIIリボソームの割合が、経路 (A) により生成される1.3-kbと1.1-kbと0.5-kbで構成される2カ所切断のForm IVリボソームよりも多くなっていることが分かる (Figure 29B)。このことはこれら2種類のリボソームの存在比を変えることがプラスチドにとって何か意味がある、言い換えればこの2種類のリボソームは機能的に異なる性質を有することを暗に意味しているのかもしれない。上述した断片化プロセッシングと翻訳効率の関連について考慮すると、もしかすると、両者の翻訳速度に違いがあり、その存在比を変えることで翻訳効率を絶妙にコントロールしているのかもしれない。あるいはこれら2種類のリボソームは、翻訳するmRNAに幾分かの違いがあり、分業しているのかもしれない。これに関連して、トウモロコシではシロイヌナズナとは異なり、2箇所切断のForm IIIリボソームを有していないが、同時にそのプラスチドゲノム上には、脂肪酸代謝酵素であるアセチルCoAカルボキシラーゼ複合体のサブユニットAccDや機能未知のYcfI

及びYcf2の各遺伝子が欠落している。また高等植物には他にもう2つ別なリボソームが存在する。ひとつは完全長のインタクトな23S rRNAをもつForm Iリボソーム、もうひとつは5'側が1カ所切断されたForm IIリボソームである。シロイヌナズナにおいて両者の存在量は少ないが、シアノバクテリアにおいてはForm IIに類似したタイプのリボソームが主要な割合を占めている (Doolittle, 1973)。大腸菌 (Form I)、シアノバクテリア (Form II)、トウモロコシ葉緑体 (Form III)、そしてシロイヌナズナの葉の葉緑体 (Form IV)、それぞれのリボソームの詳細な比較解析により、これらリボソームの機能的な違いや2つのhidden breakの差異についての新たな知見が得られると考えられる。また根のロイコプラストにおいて23S rRNAは、ジシストロニックな23S-4.5S rRNAの状態で作る制御を受けていることが分かった (Figures 29 and 30)。このジシストロニックな産物は23Sと4.5Sがスペーサー配列で仕切られた構造をしている (Harris et al., 1994)。4.5S rRNAはバクテリアの23S rRNAの3'側の配列に相当することから、23S-4.5S rRNAの構造は、丁度バクテリア23S rRNA全長にスペーサーが挿入されたものと捉えることができる。このスペーサーRNAはイントロン配列を類推させることから、このジシストロニックな23S rRNA分子種は不活性化状態、言い換えれば23S-4.5S rRNAを有するリボソームは翻訳の触媒能は有していないプロトタイプのリボソームであると推測される。その存在意義に関しては今後更なる解析が必要である。

RH39遺伝子欠損変異体は胚性致死であったことから、RH39タンパク質の機能、ひいては葉緑体23S rRNAの断片化プロセッシングは植物の正常な発達に不可欠な現象であることが推察された (Figure 23)。実際、タバコ葉緑体形質転換法を用いた遺伝子破壊実験から、葉緑体ゲノム上には、チラコイド膜上に存在する光合成装置のコンポーネントのように、半独立栄養条件下では必ずしも必須でない遺伝子の他に、光合成植物の生存に必須の遺伝子が数多く存在することが分かってきている (Rogalski et al., 2008)。例えば、ヘテロオリゴマーとして葉緑体に存在するClpプロテアーゼの触媒ドメインを構成するサブユニットの遺伝子 *clpP* (Shikanai et al., 2001)、脂肪酸代謝酵素であるアセチルCoAカルボキシラーゼ複合体のサブユニット遺伝子 *accD* (Kode et al., 2005)、それから機能未知遺伝子である *ycf1* 及び *ycf2* が挙げられる (Drescher et al., 2000)。また葉緑体30Sリボソームを構成するRps2、Rps4、Rps8をコードする *rps2*、*rps4*、*rps8* の各遺伝子、そして50SリボソームのサブユニットであるRpl20をコードする *rpl20* 遺伝子も生育に必須である (Rogalski et al., 2006; Rogalski et al., 2008)。*nara12-2* よりも弱い表現型を示す *nara12-1* 変異体において、葉緑体rRNAの断片化プロセッシングに異常が観察されたことから、恐らく *nara12-2* ホモ接合体では葉緑体の翻訳装置そのものが完全に機能しなくなったために、結果として上で挙げたような葉緑体ゲノ

ム上の必須遺伝子を十分発現できずに死に至ったのかもしれない。実際、葉緑体23S rRNAのプロセッシングに関わるRNR1とPNPaseの二重変異体は致死であることが報告されている (Bollenbach et al., 2005)。なぜ大腸菌のようなバクテリアの23S rRNAは断片化されないインタクトな状態でも機能的であるにも拘らず、高等植物の葉緑体の23S rRNAは断片化プロセッシングされなければ正常に機能できないかについては、今後更なる解析が必要であるが、本研究により、23S rRNAの断片化プロセッシングにより生じるhidden breakの生理的重要性が初めて示唆されたことは特筆すべき点であろう。

4.5 今後の展望

リボソーム大サブユニットのrRNAへのhidden breakの導入は、関わる因子についての知見が依然として乏しいため、未だその分子メカニズムの確立には至っていない。本研究によりこのプロセスに関わる因子として初めて見出されたDEAD-boxタンパク質が、hidden breakの導入メカニズムの全容解明のためのbreakthroughとして、今後このフィールドを大きく進展させると期待される。上述したように、高等植物葉緑体はバクテリアを起源とするオルガネラであり、かつ核コードの遺伝子産物により制御されていることから、バクテリアと高次の多細胞生物のシステムの両方をもつと考えられる。したがって高等植物葉緑体において、hidden breakの導入にDEAD-boxタンパク質が関与することが見出されたことは、バクテリアだけでなく動物や昆虫など多様な生物種のhidden break導入のメカニズムを知る上で非常に意義深い。高等植物を用いた葉緑体hidden breakの研究は、多生物種のhidden break導入メカニズムを理解するためのモデルケースとして、大きく貢献できると期待される。またhidden breakの導入は、特に標的をrRNAに限定した場合の、RNA切断プロセッシングの1つの呼び名である。したがって、このhidden breakの導入機構の解析を通じて得られた知見は、数多く存在する前駆体RNAをターゲットとした、一般のRNA切断反応の分子メカニズムの理解にも繋がると期待される。

今後は、RH39が葉緑体23S rRNAの断片化プロセッシングにどのように関わるのかを決定するために、既に同定されている因子とどのように関連して機能しているのか、あるいは未知なる相互作用因子を同定してその機能を解明する必要がある。例えば上述したようなエキソ型・エンド型RNasesとの物理的相互作用の有無を*in vitro* pull down assay等で解析し、かつ*in planta*での相互作用をAgroinfiltration法による免疫共沈降実験等により解析する必要がある。また未知なるインタラクターを探索するために、size exclusion chromatographyとimmunoprecipitationを組み合わせた複合体精製やyeast two hybrid法による解析も興味深い。またRH39タンパク質量の減少した*nara12-1*変異体をショ糖密度勾配

遠心法により細胞分画してRH39が存在する画分をプロテオーム解析して野生株とタンパク質組成を比較する解析も、新規因子探索法として有効かもしれない。これらの解析によりhidden breakの導入をコントロールする制御因子を特定できると期待される。

上述したように、RH39やRNR1の両変異体と類似した葉緑体23S rRNAのプロセシングパターンを示す変異体として、葉緑体Clpプロテアーゼ複合体のClpR1サブユニットの欠損株が知られている (Koussevitzky et al., 2007; Yu et al., 2008)。またClpプロテアーゼの別なサブユニットであるClpR2の欠損変異体において23S rRNAのメタボリズムの異常と葉緑体局在のRH3のタンパク質量の上昇が観察されている (Zybailov et al., 2009)。興味深いことに、Clpプロテアーゼはセリンタイプのプロテアーゼであるが、RH3とRH39のC末端配列にはともにセリンリッチな領域が存在する (TAIR, Figure 16)。またClpプロテアーゼは構造的に26Sプロテアソームと類似していることから、両者は進化的関連性があると考えられているが (Sakamoto, 2006)、最近酵母の26Sプロテアソームとリボソームが複合体として存在し、かつその複合体内にはRNA helicaseが存在することが知られている (Sha et al., 2009)。これらのことから、葉緑体Clpプロテアーゼを介したDEAD-boxタンパク質の量的な制御メカニズムの存在が推察される。そこで*clpR1*変異体におけるRH39の存在量への影響やRH39とClpプロテアーゼサブユニットとの物理的相互作用等の解析により、RH39のturnover/recyclingを規定する量的制御メカニズムについての興味深い知見が得られると期待される。またこれにより、DEAD-boxタンパク質を仲介したClpプロテアーゼによる葉緑体リボソーム、ひいては葉緑体タンパク質合成の制御メカニズムについて興味深い知見が得られるだろう。

黄化芽生えのエチオプラストや緑色器官の葉緑体、花卉のロイコプラストの23S rRNAの断片化プロセシングパターンに見られるように、hidden breakの導入は外的要因・空間的要因によって異なる制御を受けていることが分かる。これら外的・内的環境に応答したhidden breakの導入パターンの制御を司るシグナル伝達・統御システムにも興味をもたれる。そのシグナルパスウェイとRH39や上述の解析により同定された因子との結び付きを明らかにすることで、これら因子を介した、環境シグナル依存的なhidden breakの導入、及びそれをトリガーとしたプラスチドの分化システムの包括的な理解が期待できる。

本研究から、RH39は葉緑体23S rRNAを直接のリガンドとしていることが示された。しかもミトコンドリアの5S rRNAも標的の可能性が示唆された。このことから、RH39のリガンドが多数存在する可能性が考えられる。そこでRH39のリガンドを包括的に探索することで、RH39が関与する細胞内プロセスをより広く理解することができる。そのために葉抽出物に対する抗RH39抗体を用い

た免疫共沈降、あるいはシロイヌナズナプロトプラストにエピトープタグを融合した RH39 を一過的に発現させ、その免疫共沈降で濃縮回収された RNA 画分に対してオルガネラゲノムのタイリングアレイを行うことで、*in vivo* における RH39 のリガンド探索を行うのも興味深い。これにより、RH39 を介した葉緑体タンパク質合成とカップルした細胞内プロセスを特定でき、複数の生体プロセスを統合する制御システムの理解に繋がるかもしれない。

PPDB によると、葉緑体ストロマ画分には RH39 の他にも RH3/EMB1138、RH22、RH26、RH50 が存在することが報告されている。このうち RH3 の遺伝子欠損変異体 (*emb1138*) は致死であることが報告されている (SeedGenes Project, <http://www.seedgenes.org>; Figure 24)。また、RH22 と RH26 の遺伝子欠損株には、PCR ジェノタイプを行ったが双方ともホモ接合体は得られなかった。これら 3 つの DEAD-box タンパク質が機能欠損した表現型は、RH39 の場合と類似していた。特に RH22 と RH26 は ATTED-II により RH39 と協調的に遺伝子発現することからも機能的な関連性が期待される。さらに RH50 は RH39 と最も相同性が高かったホモログであり、その機能に興味を持たれる。一方、複数の局在予測プログラムを用いた *in silico* 解析から、シロイヌナズナのゲノム上には葉緑体に局在する DEAD-box タンパク質はこれら以外にあと 10 個存在することが予測された。RH39 と上述の葉緑体局在の DEAD-box タンパク質、そしてこれら葉緑体に移行することが予測されるものとの間の機能的関連性、及び関わる細胞内プロセスについて興味を持たれる。これら DEAD-box タンパク質の発現抑制体・過剰発現体における葉緑体遺伝子発現等の解析は、DEAD-box タンパク質の葉緑体内での機能を知る上で非常に有意義であり、葉緑体内の DEAD-box タンパク質の機能ネットワークの理解に繋がると考えられる。

以上の解析により、DEAD-box タンパク質を介した葉緑体 23S rRNA の断片化プロセシングの分子メカニズムと制御ネットワーク、ひいては葉緑体タンパク質合成及びそれとリンクした細胞内プロセスの協調的なレギュレーションシステムの全貌が明らかになると考えられる。そして得られた知見を他の生物種におけるリボソーム大サブユニットの rRNA の断片化プロセシングにも応用することによって、そのシステムの理解に貢献できると期待される。また今後、葉緑体タンパク質合成の全容をより理解するためには、今回行った RuBisCO 蓄積量の減少を指標とするスクリーニング法だけでなく、これとは異なる新たな系を確立する必要がある。例えば合成の各ステップが亢進したような変異体は、葉緑体タンパク質の存在量を規定するファクターを同定するために重要であるが、本研究で用いたスクリーニング系では取得できない。また葉緑体タンパク質の多くはチラコイド膜上に正しくソーティングされ、高分子複合体を形成し、しかもその化学量論比は厳密に制御されている。この一連のメカニズムを理解

するためには、そのバランスが崩れた変異体を取得する必要があるが、葉緑体タンパク質の減少には必ずしも結びつかないためこの系では取得しにくい。今後、シロイヌナズナの葉緑体形質転換法が可能になるなどすることで、葉緑体ゲノム内にレポーター遺伝子を導入した形質転換植物体に変異原処理して遺伝学的解析ができるようになれば、合成が亢進した変異体は目的のプロセスとモデル基質を選定してレポーター分子の活性上昇や蓄積量の増大を視覚的に検出することで選抜でき、またソーティングや複合体の形成状態に異常がある変異体も、2種類のモデルタンパク質と蛍光タンパク質を使った FRET 法を応用してスクリーニングできると期待される。これらプロセスはチラコイド膜構造の発達、ひいてはプラスチドの発達と密接に結びついている。本研究の解析から、プラスチドの発達とリボソームの構造変化を介した翻訳制御の関連性が示唆されたことから、今後これら一連のプロセスが相互に結びつき連動する分子メカニズムに興味を持たれる。

5. 謝辞

本研究は多くの方々のご指導、ご協力に支えられて行われてきました。まず、本研究に取り組む機会を与えて頂き、ご指導くださった横田明穂教授に感謝申し上げます。横田教授からは研究に取り組む姿勢や科学者としてどうあるべきかについて学ばせて頂きました。御礼申し上げます。そして蘆田弘樹助教のご理解とご助言により、思うように研究に取り組むことができました。感謝致します。また明石欣也助教からは研究の鋭い指摘を頂きました。宗景ゆり助教にはシロイヌナズナ研究の基礎を教えて頂き、議論や相談にも乗って頂き、その都度貴重な助言を頂きました。感謝申し上げます。石川県立大学の竹村美保准教授には本講座在籍中、実験とラボ生活での多くの面でお世話になりました。感謝申し上げます。また本講座の先輩、後輩、技術補佐、OB・OGの方々にもお世話になりました。さらに *nara* 変異体選抜法を確立し、同じチームで研究の苦楽を理解し、議論してくれた小川太郎博士に御礼申し上げます。

本研究の副査を担当して頂き、貴重なアイデアを頂きました植物分子遺伝学講座の島本功教授、研究の方針・展開の仕方を指導して頂きました形質発現植物学講座の田坂昌生教授、実験系の組み立て方と妥当性を議論・評価し指導して頂きました同講座の森田美代准教授、本研究の今後の展開に繋がる重要な助言を頂きました原核生物分子遺伝学講座の真木寿治教授に心より厚く御礼申し上げます。特に遺伝子同定には本学の NARAMAP から提供されるゲノム情報と遺伝子材料が不可欠でしたが、その運営管理されている形質発現植物学講座の田坂昌生教授と森田美代准教授には重ねて深く感謝申し上げます。また植物代謝調節学講座の加藤晃助教には SW-55Ti を快く貸して頂きました。植物遺伝子機能学講座の加藤壮英助教にはマッピングを一から教えて頂きました。塚本潤子技官には N 末端アミノ酸配列を解読して頂きました。動物細胞工学講座の門倉広博士と柳谷耕太博士には投稿論文のカバーレター作成の際に貴重な資料を提供して頂き、また楽しく議論して頂きました。心より深く御礼申し上げます。

抗体を分与して下さった東京工業大学の久掘徹教授 (γ -ATPase)、大阪大学の長谷俊治教授 (FNR) に深く感謝致します。またオレゴン大学の Alice Barkan 教授は私の拙い英語に耳を傾け有意義な議論をしてくださいました。本研究は Barkan 教授らの研究の影響を受けており、この場を借りて御礼申し上げます。また、本研究に興味と関心を持って頂いた方々、ご助言・ご指摘くださった方々に心より御礼申し上げます。

長くなりましたが最後に、長い学生生活を応援し、支えてくれた両親と弟、祖父母、叔父、親戚、友人に心から感謝申し上げます。

6. 参考文献

Abdallah, F., Salamini, F., and Leister, D. (2000). A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 5, 141–142.

Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A., and Frank, J. (1998). Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6134-6138.

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653–657.

Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustün, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W., and Börnke, F. (2010). Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell.* 22, 1498-1515.

Asakura, Y., and Barkan, A. (2007). A CRM domain protein functions dually in group I and group II intron splicing in land plant chloroplasts. *Plant Cell.* 19, 3864-3875.

Asakura, Y., Bayraktar, O.A., and Barkan, A. (2008). Two CRM protein subfamilies cooperate in the splicing of group IIB introns in chloroplasts. *RNA* 14, 2319-2332.

Baginsky, S., Shteiman-Kotler, A., Liveanu, V., Yehudai-Resheff, S., Bellaoui, M., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Schuster, G., and Gruissem, W. (2001). Chloroplast PNPase exists as a homo-multimer enzyme complex that is distinct from the *Escherichia coli* degradosome. *RNA* 7, 1464-7145.

Barkan, A. (1993). Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism. *Plant Cell* 5, 389–402.

Barkan, A. (1998). Approaches to investigating nuclear genes that function in

chloroplast biogenesis in land plants. *Methods Enzymol.* 297, 38–57.

Barkan, A., Voelker, R., Mendel-Hartvig, J., Johnson, D., and Walker, M. (1995). Genetic analysis of chloroplast biogenesis in higher plants. *Physiol. Plant* 93, 163-170.

Beick, S., Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., Jensen, B., and Barkan, A. (2008). The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Mol. Cell Biol.* 28, 5337-5347.

Beligni, M.V., and Mayfield, S.P. (2008). *Arabidopsis thaliana* mutants reveal a role for CSP41a and CSP41b, two ribosome-associated endonucleases, in chloroplast ribosomal RNA metabolism. *Plant Mol. Biol.* 67, 389-401.

Bell, C.J., and Ecker, J.R. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19, 137-144.

Bellaoui, M., Keddie, J.S., and Gruissem, W. (2003). DCL is a plant-specific protein required for plastid ribosomal RNA processing and embryo development. *Plant Mol. Biol.* 53, 531-543.

Bisanz, C., Bégot, L., Carol, P., Perez, P., Bligny, M., Pesey, H., Gallois, J-L., Lerbs-Mache, S., and Mache, R. (2003). The *Arabidopsis* nuclear *DAL* gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation. *Plant Mol. Biol.* 51, 651–663.

Bohnsack, M.T., Martin, R., Granneman, S., Ruprecht, M., Schleiff, E., and Tollervey, D. (2009). Prp43 bound at different sites on the pre-rRNA performs distinct functions in ribosome synthesis. *Mol. Cell* 36, 583-592.

Bollenbach, T.J., Lange, H., Gutierrez, R., Erhardt, M., Stern, D.B., and Gagliardi, D. (2005). RNR1, a 3'-5' exoribonuclease belonging to the RNR superfamily, catalyzes 3' maturation of chloroplast ribosomal RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 33, 2751-2763.

- Bollenbach, T.J., Sharwood, R.E., Gutierrez, R., Lerbs-Mache, S., and Stern, D.B. (2009). The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 69, 541-552.
- Bradford, M.M. (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.
- Carpousis, A.J. (2007). The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 71-87.
- Cheng, Z.F., and Deutscher, M.P. (2005). An important role for RNase R in mRNA decay. *Mol. Cell* 17, 313-318.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17-37.
- Doolittle, W.F. (1973). Postmaturational cleavage of 23s ribosomal ribonucleic acid and its metabolic control in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 113, 1256-1263.
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T., Jr., Carrer, H., and Bock, R. (2000). The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J.* 22, 97-104.
- Du, M.X., Johnson, R.B., Sun, X-L., Staschke, K.A., Colacino, J., and Wang, Q.M. (2002). Comparative characterization of two DEAD-box RNA helicases in superfamily II: human translation-initiation factor 4A and hepatitis C virus non-structural protein 3 (NS3) helicase. *Biochem. J.* 363, 147-155.
- Dziembowski, A., Piwowarski, J., Hoser, R., Minczuk, M., Dmochowska, A., Siep, M., van der Spek, H., Grivell, L., and Stepień, P.P. (2003). The yeast mitochondrial

degradosome. Its composition, interplay between RNA helicase and RNase activities and the role in mitochondrial RNA metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 1603-1611.

Evguenieva-Hackenberg, E. (2005). Bacterial ribosomal RNA in pieces. *Mol. Microbiol.* 57, 318-325.

Fujiwara, H., and Ishikawa, H. (1986). Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: implication based on structural studies. *Nucleic Acids Res.* 14, 6393-6401.

Gong, Z., Dong, C.H., Lee, H., Zhu, J., Xiong, L., Gong, D., Stevenson, B., and Zhu, J.K. (2005). A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 256-267.

Gong, Z., Lee, H., Xiong, L., Jagendorf, A., Stevenson, B., and Zhu, J.K. (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11507-11512.

Gupta, R., Mould, R.M., He, Z., and Luan, S. (2002). A chloroplast FKBP interacts with and affects the accumulation of Rieske subunit of cytochrome *bf* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15806-15811.

Harris, E.H., Boynton, J.E., and Gillham, N.W. (1994). Chloroplast ribosomes and protein synthesis. *Microbiol. Rev.* 58, 700-754.

Hoffmann, B., Nickel, J., Speer, F., and Schafer, B. (2008). The 3' ends of mature transcripts are generated by a processosome complex in fission yeast mitochondria. *J. Mol. Biol.* 377, 1024-1037.

Houge, G., Robaye, B., Eikhom, T.S., Golstein, J., Mellgren, G., Gjertsen, B.T., Lanotte, M., and Døskeland, S.O. (1995). Fine mapping of 28S rRNA sites specifically cleaved in cells undergoing apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 15, 2051-2062.

Kanervo, E., Singh, M., Suorsa, M., Paakkarinen, V., Aro, E., Battchikova, N., and Aro, E.M. (2008). Expression of protein complexes and individual proteins upon transition of etioplasts to chloroplasts in pea (*Pisum sativum*). *Plant Cell Physiol.* 49, 396-410.

Kant, P., Kant, S., Gordon, M., Shaked, R., and Barak, S. (2007). *STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1* and *STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2*, two DEAD-box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. *Plant Physiol.* *145*, 814-830.

Kishine, M., Takabayashi, A., Munekage, Y., Shikanai, T., Endo, T., and Sato, F. (2004). Ribosomal RNA processing and an RNase R family member in chloroplasts of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* *55*, 595-606.

Kode, V., Mudd, E.A., Iamtham, S., and Day, A. (2005). The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *Plant J.* *44*, 237-244.

Kohchi, T., Mukougawa, K., Frankenberg, N., Masuda, M., Yokota, A., and Lagarias, J.C. (2001). The *Arabidopsis* *HY2* gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* *13*, 425-436.

Köhler, D., Schmidt-Gattung, S., and Binder, S. (2010). The DEAD-box protein PMH2 is required for efficient group II intron splicing in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* *72*, 459-467.

Konieczny, A., and Ausubel, F.M. (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* *4*, 403-410.

Kössel, H., Edwards, K., Koch, W., Langridge, P., Schiefermayr, E., Schwarz, Z., Strittmatter, G., and Zenke, G. (1982). Structural and functional analysis of an rRNA operon and its flanking tRNA genes from *Zea mays* chloroplasts. *Nucleic Acids Symp. Ser. II*, 117-120.

Kössel, H., Natt, E., Strittmatter, G., Fritzsche, E., Gozdicka-Jozefiak, A., and Przybyl, D. (1985). Structure and expression of rRNA operons from plastids of higher plants. In *Molecular Form and Function of the Plant Genome*, van Vloten-Doting, L., Groot, G.S.P., Hall, T.C., eds. (New York: Plenum Press), pp. 183-198.

Koussevitzky, S., Stanne, T.M., Peto, C.A., Giap, T., Sjögren, L.L., Zhao, Y., Clarke, A.K., and Chory, J. (2007). An *Arabidopsis thaliana* virescent mutant reveals a role for

ClpR1 in plastid development. *Plant Mol. Biol.* *63*, 85-96.

Leaver, C.J. (1973). Molecular integrity of chloroplast ribosomal ribonucleic acid. *Biochem. J.* *135*, 237-240.

Li, D., Liu, H., Zhang, H., Wang, X., and Song, F. (2008). OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress. *J. Exp. Bot.* *59*, 2133-2146.

Lima, A., Lima, S., Wong, J.H., Phillips, R.S., Buchanan, B.B., and Luan, S. (2006). A redox-active FKBP-type immunophilin functions in accumulation of the photosystem II supercomplex in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 12631-12636.

Linder, P. (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4168-4180.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265-275.

Marín-Navarro, J., Manuell, A.L., Wu, J.P., and Mayfield, S. (2007). Chloroplast translation regulation. *Photosynth. Res.* *94*, 359-374.

Marsden, S., Nardelli, M., Linder, P., and McCarthy, J.E. (2006). Unwinding single RNA molecules using helicases involved in eukaryotic translation initiation. *J. Mol. Biol.* *361*, 327-335.

Martínez-García, J.F., Monte, E., and Quail, P.H. (1999). Simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. *Plant J.* *20*, 251-257.

Matthes, A., Schmidt-Gattung, S., Köhler, D., Forner, J., Wildum, S., Raabe, M., Urlaub, H., and Binder, S. (2007). Two DEAD-box proteins may be part of RNA-dependent high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Physiol.* *145*, 1637-1646.

Melen, G.J., Pesce, C.G., Rossi, M.S., and Kornblihtt, A.R. (1999). Novel processing in

a mammalian nuclear 28S pre-rRNA: tissue-specific elimination of an 'intron' bearing a hidden break site. *EMBO J.* *18*, 3107-3118.

Motohashi, R., Yamazaki, T., Myouga, F., Ito, T., Ito, K., Satou, M., Kobayashi, M., Nagata, N., Yoshida, S., Nagashima, A., Tanaka, K., Takahashi, S., and Shinozaki, K. (2007). Chloroplast ribosome release factor 1 (AtcpRF1) is essential for chloroplast development. *Plant Mol. Biol.* *64*, 481-497.

Mudd, E.A., Sullivan, S., Gisby, M.F., Mironov, A., Kwon, C.S., Chung, W.I., Day, A. (2008). A 125 kDa RNase E/G-like protein is present in plastids and is essential for chloroplast development and autotrophic growth in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *59*, 2597-2610.

Myouga, F., Hosoda, C., Umezawa, T., Iizumi, H., Kuromori, T., Motohashi, R., Shono, Y., Nagata, N., Ikeuchi, M., and Shinozaki, K. (2008). A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* *20*, 3148-3162.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and 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.

Nanasato, Y., Akashi, K., and Yokota, A. (2005). Co-expression of cytochrome *b₅₆₁* and ascorbate oxidase in leaves of wild watermelon under drought and high light conditions. *Plant Cell Physiol.* *46*, 1515-1524.

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

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* *289*, 920-930.

Ogawa, T., Nishimura, K., Aoki, T., Ashida, H., and Yokota, A. (2009). A phosphofructokinase B-type carbohydrate kinase family protein, NARA5, for massive expressions of plastid-encoded photosynthetic genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *151*,

114-128.

Peltier, J.B., Cai, Y., Sun, Q., Zabrouskov, V., Giacomelli, L., Rudella, A., Ytterberg, A.J., Rutschow, H., and van Wijk, K.J. (2006). The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 114-133.

Perrin, R., Lange, H., Grienemberger, J.M., and Gagliardi, D. (2004). AtmtPNPase is required for multiple aspects of the 18S rRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 32, 5174-5182.

Pertschy, B., Schneider, C., Gnädig, M., Schäfer, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (2009). RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J. Biol. Chem.* 284, 35079-35091.

Pfalz, J., Liere, K., Kandlbinder, A., Dietz, K.J., and 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, O.A., Prikryl, J., and Barkan, A. (2009). Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J.* 28, 2042-2052.

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

Prikryl, J., Watkins, K.P., Friso, G., van Wijk, K.J., and Barkan, A. (2008). A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 36, 5152-5165.

Quick, W.P., Schurr, U., Scheibe, R., Schulze, E.D., Rodermeil, S.R., Bogorad, L., and Stitt, M. (1991). Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" *rbcs*. I. Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. *Planta.* 183, 542–554.

- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* *108*, 557-572.
- Rocak, S., and Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 232-241.
- Rogalski, M., Ruf, S., and Bock, R. (2006). Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4537-4545.
- Rogalski, M., Schöttler, M.A., Thiele, W., Schulze, W.X., and Bock, R. (2008). Rpl33, a nonessential plastid-encoded ribosomal protein in tobacco, is required under cold stress conditions. *Plant Cell* *20*, 2221-2237.
- Rozier, C., Rocipon, M., and Mache, R. (1979). Post-maturation of the plastid ribosomal RNA in the plant kingdom. *J. Mol. Evol.* *13*, 271-279.
- Sakamoto, W. (2006). Protein degradation machinery in plastids. *Annu. Rev. Plant Biol.* *57*, 599-621.
- Sauret-Güeto, S., Botella-Pavía, P., Flores-Pérez, U., Martínez-García, J.F., San Román, C., León, P., Boronat, A., and Rodríguez-Concepción, M. (2006). Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *141*, 75-84.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R.E., Williams-Voelker, P.M., Kroeger, T.S., Vichas, A., and Barkan, A. (2006). A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA. *Plant Cell* *18*, 2650-2663.
- Seki, M., Carninci, P., Nishiyama, Y., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (1998). High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *Plant J.* *15*, 707-720.
- Sha, Z., Brill, L.M., Cabrera, R., Kleifeld, O., Scheliga, J.S., Glickman, M.H., Chang, E.C., and Wolf, D.A. (2009). The eIF3 interactome reveals the translasome, a

supercomplex linking protein synthesis and degradation machineries. *Mol. Cell* *36*, 141-152.

Sharkey, T.D., Savitch, L.V., and Butz, N.D. (1991). Photometric method for routine determination of k_{cat} and carbamylation of rubisco. *Photosynth. Res.* *28*, 41-48.

Sharma, M.R., Wilson, D.N., Datta, P.P., Barat, C., Schluenzen, F., Fucini, P., and Agrawal, R.K. (2007). Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 19315-19320.

Schein, A., Sheffy-Levin, S., Glaser, F., and Schuster, G. (2008). The RNase E/G-type endoribonuclease of higher plants is located in the chloroplast and cleaves RNA similarly to the *E. coli* enzyme. *RNA* *14*, 1057-1068.

Shikanai, T., Shimizu, K., Ueda, K., Nishimura, Y., Kuroiwa, T., and Hashimoto, T. (2001). The chloroplast *clpP* gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol.* *42*, 264-273.

Shikanai, T. (2006). RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. *Cell Mol. Life Sci.* *63*, 698-708.

Schult, K., Meierhoff, K., Paradies, S., Töller, T., Wolff, P., and Westhoff, P. (2007). The nuclear-encoded factor HCF173 is involved in the initiation of translation of the *psbA* mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *19*, 1329-1346.

Sköld, S.E. (1983). Chemical crosslinking of elongation factor G to the 23S RNA in 70S ribosomes from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* *11*, 4923-4932.

Stöckel, J., and Oelmüller, R. (2004). A novel protein for photosystem I biogenesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 10243-10251.

Stone, A.R. (1973). A simplified method for preparing sucrose gradient. *Biochem. J.* *137*, 117-118.

Takahara, K., Akashi, K., and Yokota, A. (2005). Purification and characterization of glutamate *N*-acetyltransferase involved in citrulline accumulation in wild watermelon. *FEBS J.* 272, 5353-5364.

Vashisht, A.A., and Tuteja, N. (2006). Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. *J. Photochem. Photobiol. B.* 84, 150-160.

Vincent, H.A., and Deutscher, M.P. (2009). Insights into how RNase R degrades structured RNA: analysis of the nuclease domain. *J. Mol. Biol.* 387, 570-583.

Wang, Y., Duby, G., Purnelle, B., and Boutry, M. (2000). Tobacco *VDL* gene encodes a plastid DEAD box RNA helicase and is involved in chloroplast differentiation and plant morphogenesis. *Plant Cell* 12, 2129-2142.

Wang, D., and Portis, A.R. Jr. (2007). A novel nucleus-encoded chloroplast protein, PIFI, is involved in NAD(P)H dehydrogenase complex-mediated chlororespiratory electron transport in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 144, 1742-1752.

Walter, M., Kilian, J., and Kudla, J. (2002). PNPase activity determines the efficiency of mRNA 3'-end processing, the degradation of tRNA and the extent of polyadenylation in chloroplasts. *EMBO J.* 21, 6905-6914.

Watkins, K.P., Kroeger, T.S., Cooke, A.M., Williams-Carrier, R.E., Friso, G., Belcher, S.E., van Wijk, K.J., and Barkan, A. (2007). A ribonuclease III domain protein functions in group II intron splicing in maize chloroplasts. *Plant Cell* 19, 2606–2623.

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

Williams-Carrier, R., Kroeger, T., and Barkan, A. (2008). Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA* 14, 1930-1941.

Yamaguchi, K., and Subramanian, A.R. (2000). The plastid ribosomal proteins.

Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J. Biol. Chem.* 275, 28466-28482.

Yamaguchi, K., and Subramanian, A.R. (2003). Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit. *Eur. J. Biochem.* 270, 190-205.

Yamaguchi, K., von Knoblauch, K., and Subramanian, A.R. (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J. Biol. Chem.* 275, 28455-28465.

Yamaguchi, K., Beligni, M.V., Prieto, S., Haynes, P.A., McDonald, W.H., Yates, J.R. 3rd, and Mayfield, S.P. (2003). Proteomic characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ribosome. Identification of proteins unique to the 70 S ribosome. *J. Biol. Chem.* 278, 33774-33785.

Yokota, A., and Shigeoka, S. (2008). Engineering of photosynthetic pathways. In *Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathways*, Vol. 1, Bohnert, H.J., Nguyen, H., and Lewis, N.G., eds. (Elsevier: Oxford), pp 81–105.

Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565-1572.

Yu, F., Liu, X., Alsheikh, M., Park, S., and Rodermel, S. (2008). Mutations in *SUPPRESSOR OF VARIEGATION1*, a factor required for normal chloroplast translation, suppress *var2*-mediated leaf variegation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 1786-1804.

Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292, 883-896.

Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., and van Wijk, K.J. (2008). Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* 3, e1994.

Zybaïlov, B., Friso, G., Kim, J., Rudella, A., Rodríguez, V.R., Asakura, Y., Sun, Q., and van Wijk, K.J. (2009). Large scale comparative proteomics of a chloroplast Clp protease mutant reveals folding stress, altered protein homeostasis, and feedback regulation of metabolism. *Mol. Cell Proteomics* 8, 1789-1810.

7. 論文目録

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

Nishimura, K., Ashida, H., Ogawa, T., Yokota, A. (2010). A DEAD-box protein is required for formation of a hidden break in Arabidopsis chloroplast 23S rRNA. *Plant J.* 63, 766-777.

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

8. 図表

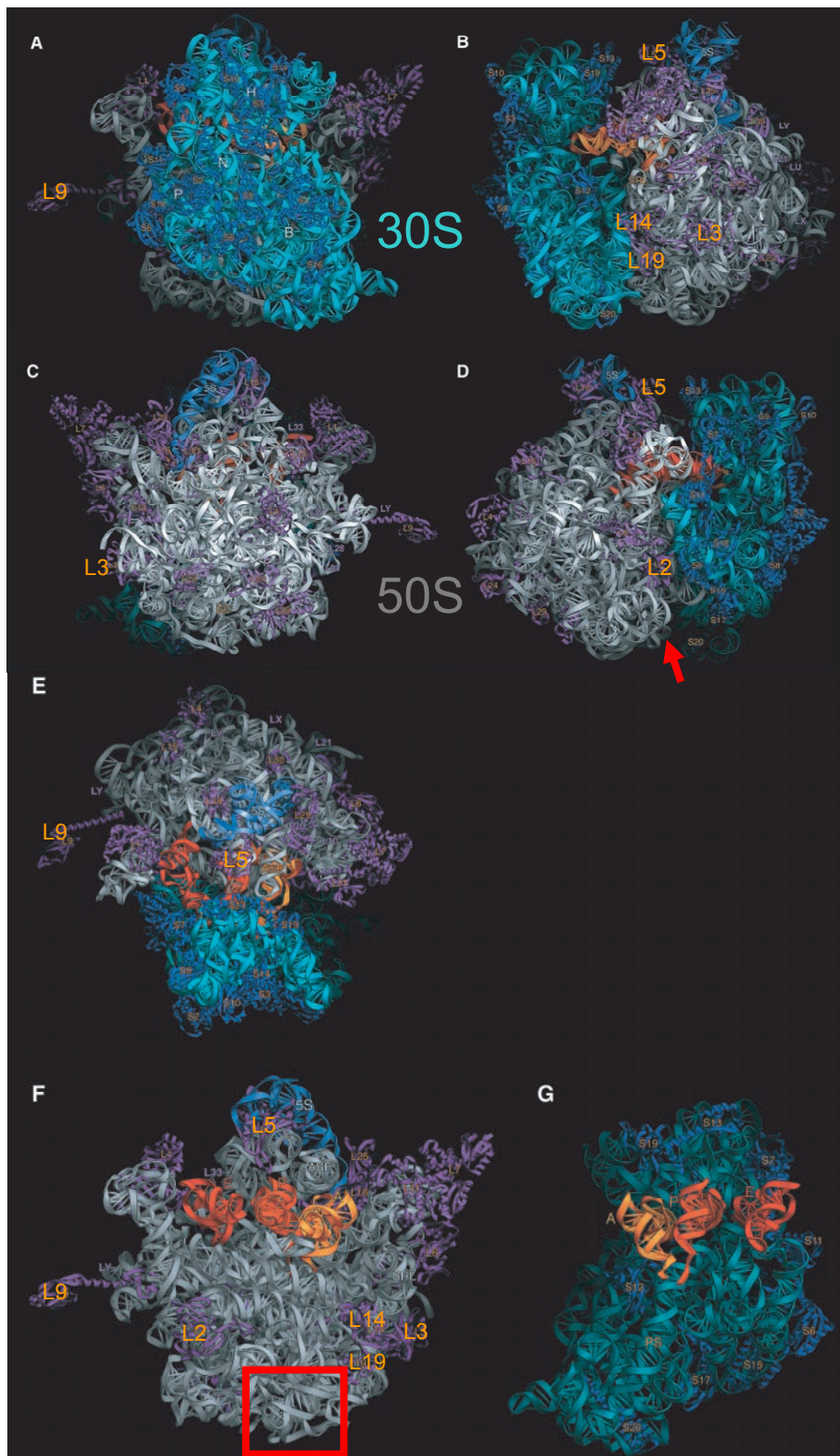


Figure 1. バクテリア70Sリボソームの結晶構造

Yusupov et al. (2001) から図を転載し、一部改変して作成した。青緑色が16S rRNA、ダークブルーが30Sのリボソームタンパク質、ライトブルーが5S rRNA、灰色が23S rRNA、紫色が50Sのリボソームタンパク質を示し、A site、P site、E siteの各tRNAは黄色、オレンジ、赤色で色分けしている。

A. 30Sからのトップビュー。

B. A siteからのサイドビュー。

C. 50Sからのトップビュー。

D. E siteからのサイドビュー。植物葉緑体においてhidden breakが導入される位置に相当する大体の位置を赤矢印で示した。

E. 5S側からのサイドビュー

F. 50Sの内側。植物のhidden breakが起こるステムループに相当する部分を赤色の枠で囲んだ。

G. 30Sの内側。

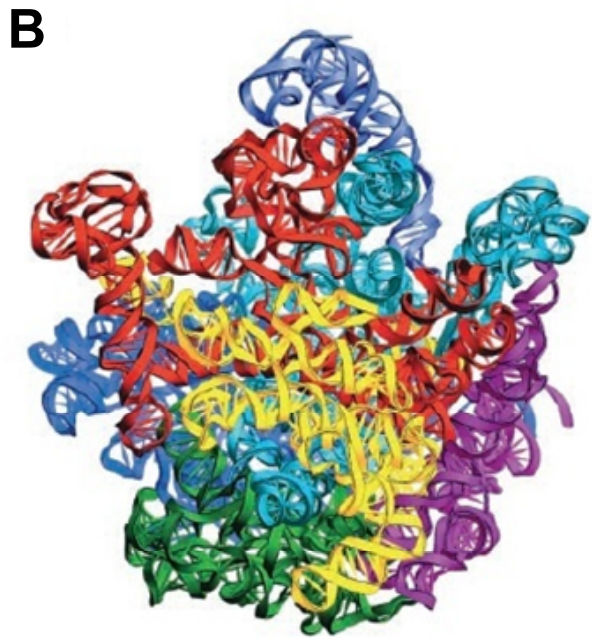
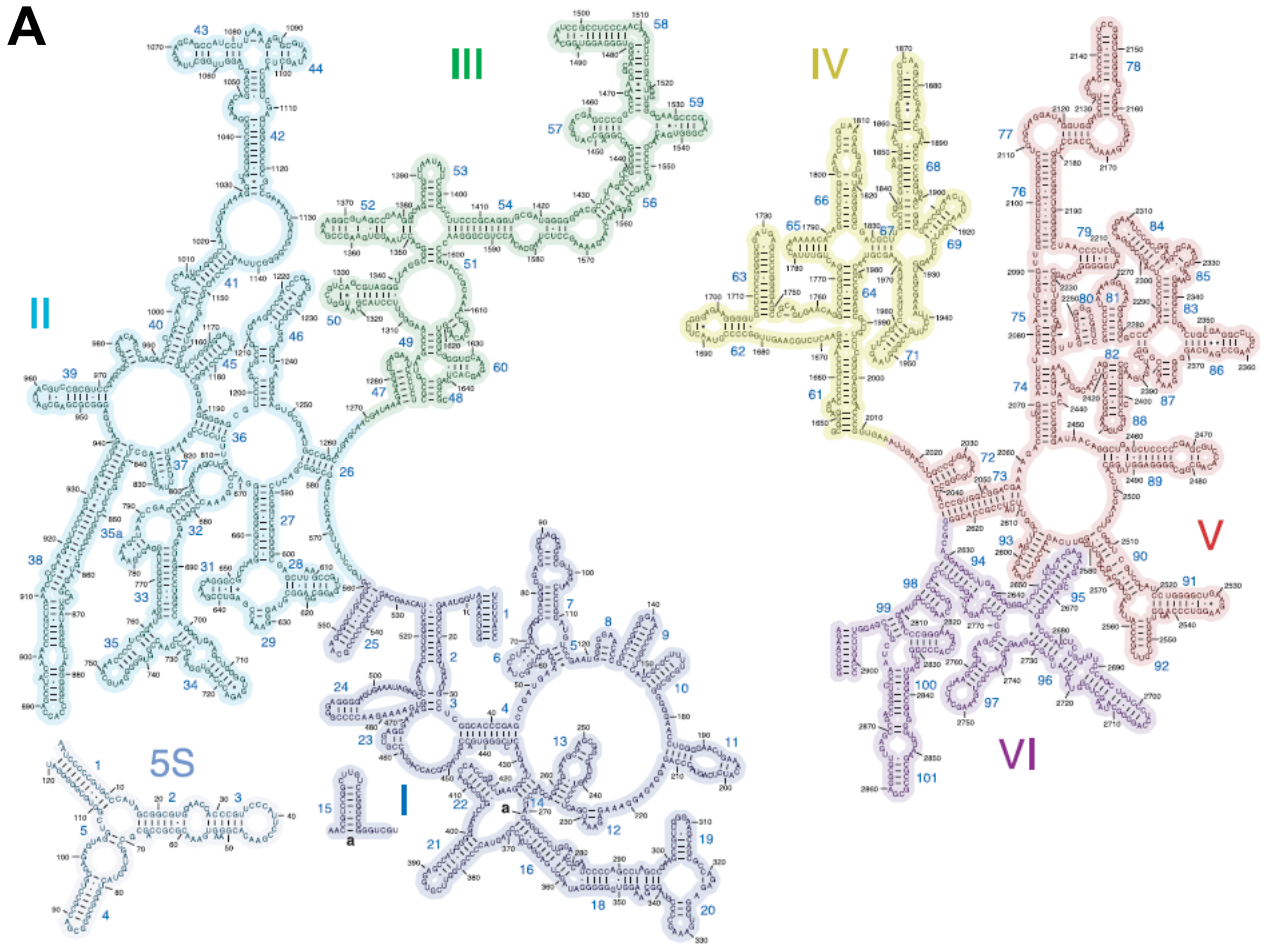


Figure 2. バクテリアの50Sリボソームを構成するrRNAの二次構造と三次構造。

Yusupov et al. (2001) から図を転載し、改変した。

A. *T. thermophilus* 23Sと5S rRNAsの二次構造。23S rRNAの4つのドメイン、domains I (青色), II (青緑色), III (緑色), IV (黄色), V (赤色), VI (赤紫色) を色分けして示している。rRNAの塩基番号は*E. coli* に準じている。

B. 23S, 5S rRNAの三次構造。色分けはAと同様である。

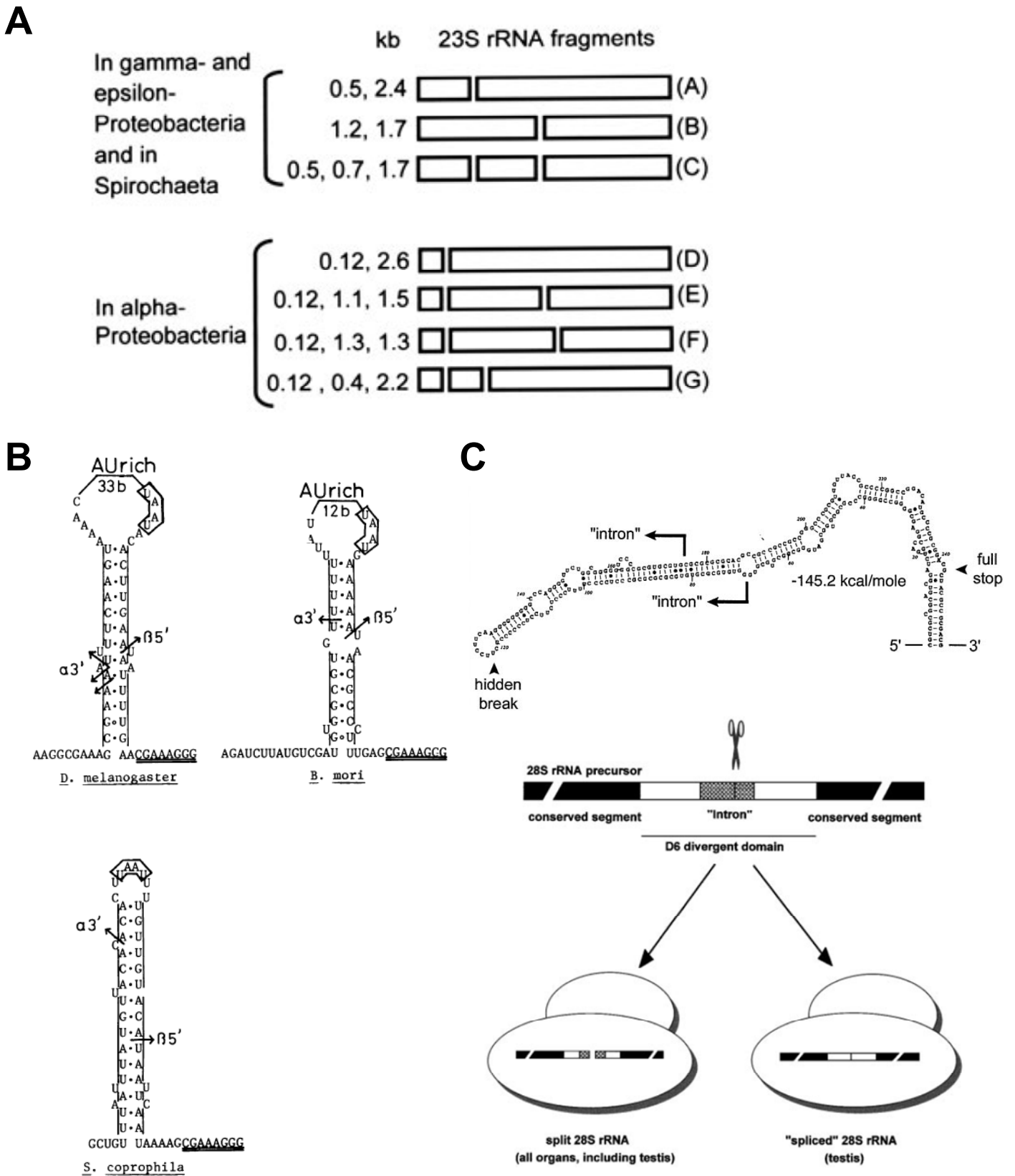


Figure 3. Hidden breakの導入様式

A. 多様なバクテリアのhidden break導入様式。図はEvguenieva-Hackenberg (2005) から転載した。
 B. 昆虫のhidden break。矢印はプロセシング部位を指し、解裂により生成される3'端と5'端を記している。図はFujiwara and Ishikawa (1986) から引用・一部改変した。
 C. ある種のげっ歯類に見られる28S rRNAのイントロンへのhidden break導入。精巣ではこの領域内においてスプライシング反応も起こる。図はMelen et al. (1999) から転載し、一部改変した。

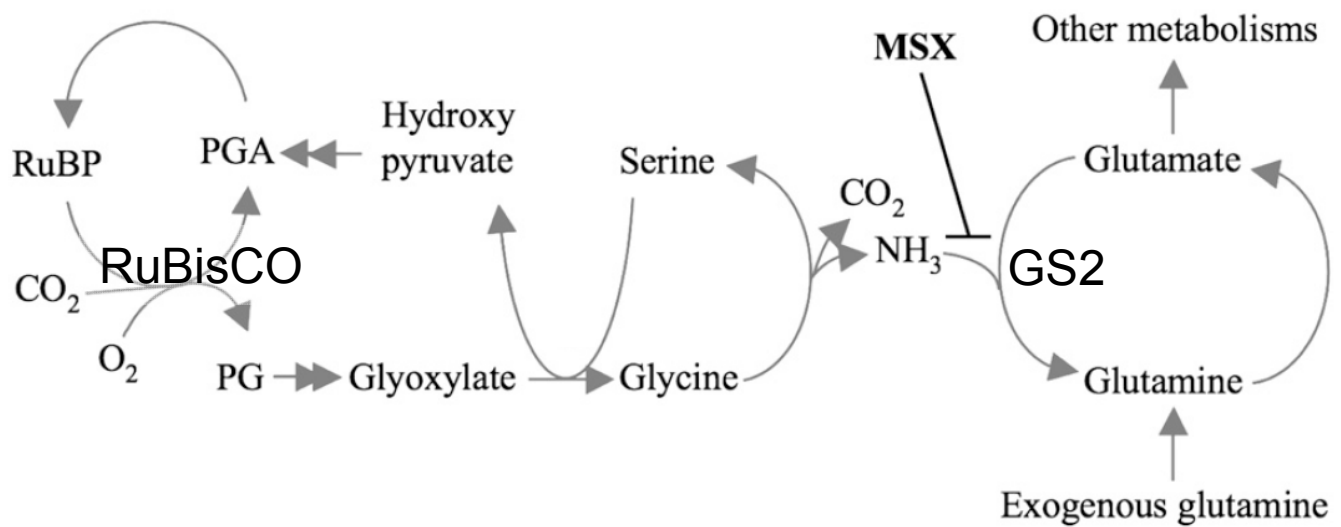


Figure 5. *nara*変異体のスクリーニング法

RuBisCOの触媒するオキシゲナーゼ反応を初発反応とする光呼吸経路により生じるアンモニアは葉緑体グルタミン合成酵素 (GS2) により固定される。このGS特異的阻害剤であるMSXを植物体に作用させることで、RuBisCOの量や活性に依存して有毒なアンモニアが細胞内に蓄積する。グルタミンを単一窒素源としてMSXを植物体に作用させ、アンモニアの蓄積量による植物体への生育阻害効果を野生株と比較することでRuBisCOの量/活性が低化した変異体を選抜できる。カルビン回路及び光呼吸経路の主要中間代謝産物を記している。図はOgawa et al. (2009)を一部改変した。

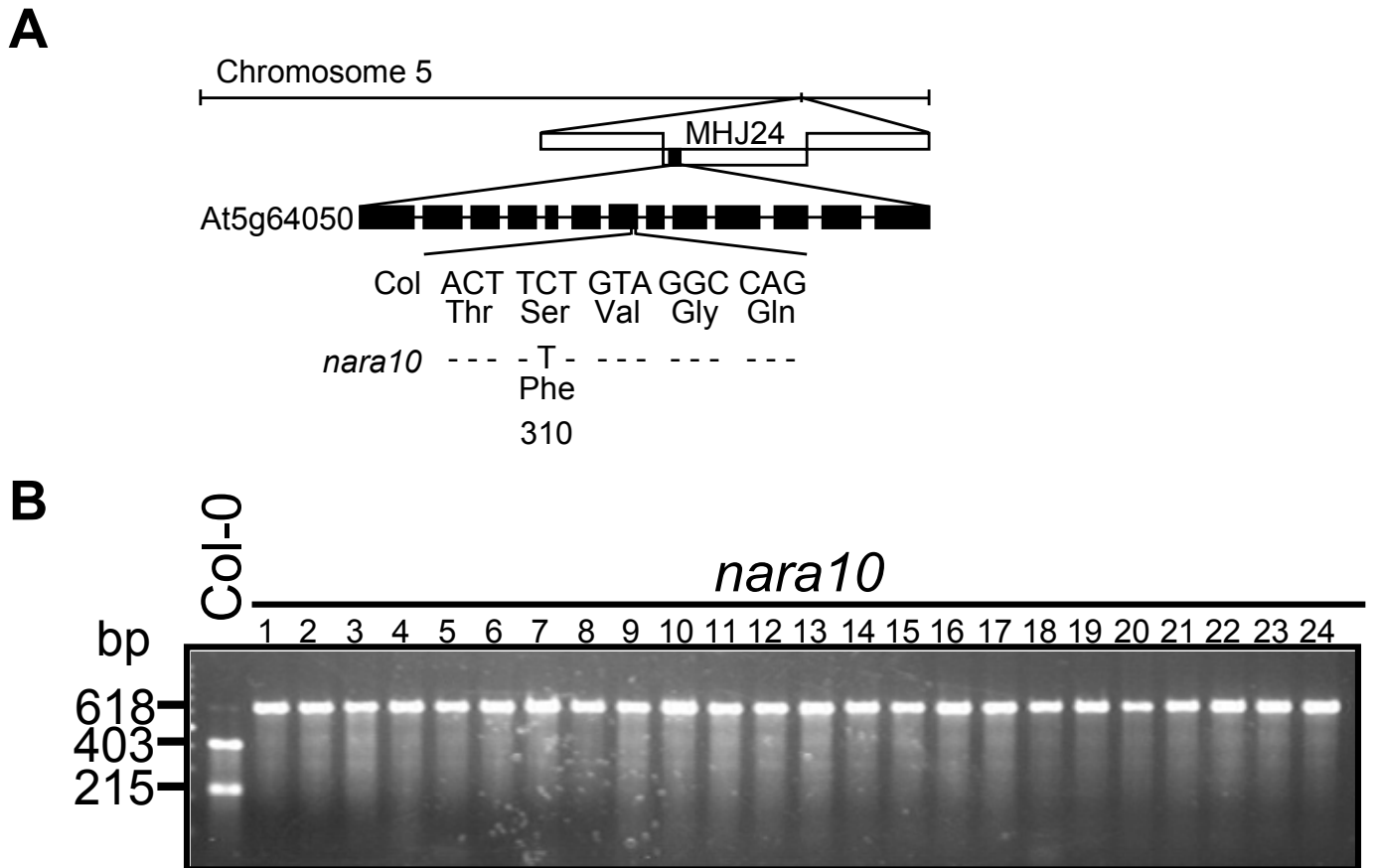


Figure 6. NARA10遺伝子座

A. *nara10* 変異のマッピング。*nara10* 変異は5番染色体の下腕、27 Mbp近傍の約84 kbpの領域にマップされた。配列解析の結果、BACクローンMHJ24上の遺伝子At5g64050の第7エクソンに一塩基置換を見出した。これにより310番目のセリンがフェニルアラニンにアミノ酸置換される。白色のボックスがBACクローン、エクソンとイントロンはそれぞれ黒色のボックスと実線で示している。

B. *nara10* 変異体の遺伝子型解析。野生株と、マッピングに用いた変異表現型を示す複数のF2世代に対してゲノムPCRを行い、SfiIにより制限酵素処理を行った。野生型のゲノム断片に存在するSfiIサイトは*nara10*変異により消失するため、野生株では403 bpと215 bpの2つのバンドが検出されるが、*nara10* 変異を有する植物個体ではインタクトな618 bpのPCR断片が検出される。

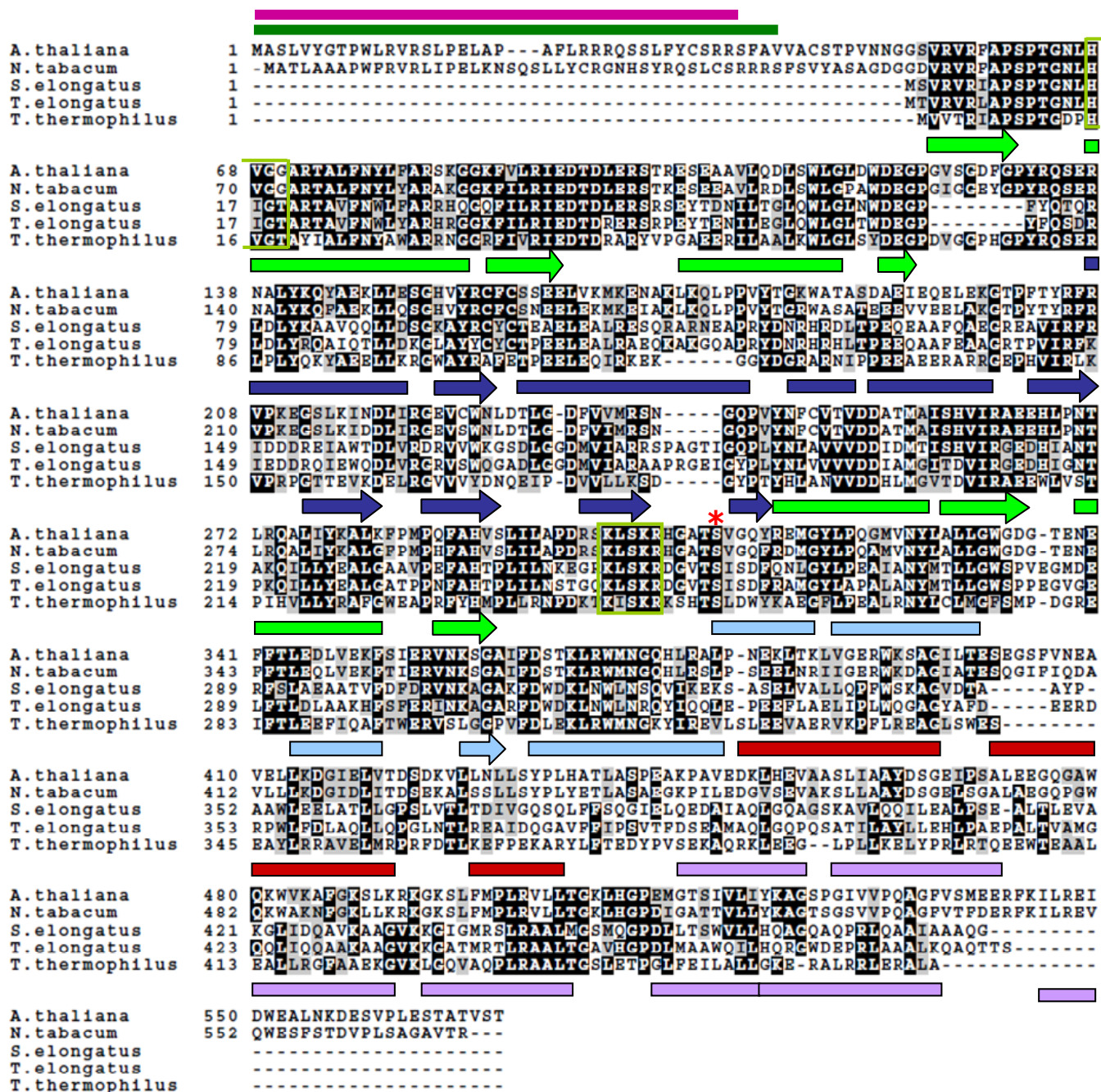


Figure 7. 多様な生物種に由来するGluRSのマルチプルシーケンスアラインメント

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、ラン藻 (*Synechococcus elongatus*)、好熱ラン藻 (*Thermosynechococcus elongatus*)、好熱菌 (*Thermus thermophilus*) 由来の各 GluRS 配列を ClustalW1 により解析した。相同配列を黒、類似配列を灰色で示した。また GluRS の 2 次構造を配列の下段に示した。ボックスが α -helix、ブロック矢印が β -sheet を示し、各ドメインは Rossmann-fold を緑色、connective-peptide を青色、stem-contact を水色、anticodon-binding 1 と 2 をそれぞれ赤色と紫色で色分けしており、ATP 結合モチーフは緑色で囲んだ。TargetPI により予測されるミトコンドリアターゲット配列をピンク色のバーで、ChloroPI により予測される葉緑体ターゲット配列を緑色のバーでそれぞれ示す。*nara10* 変異は赤のアスタリスクにより記している。

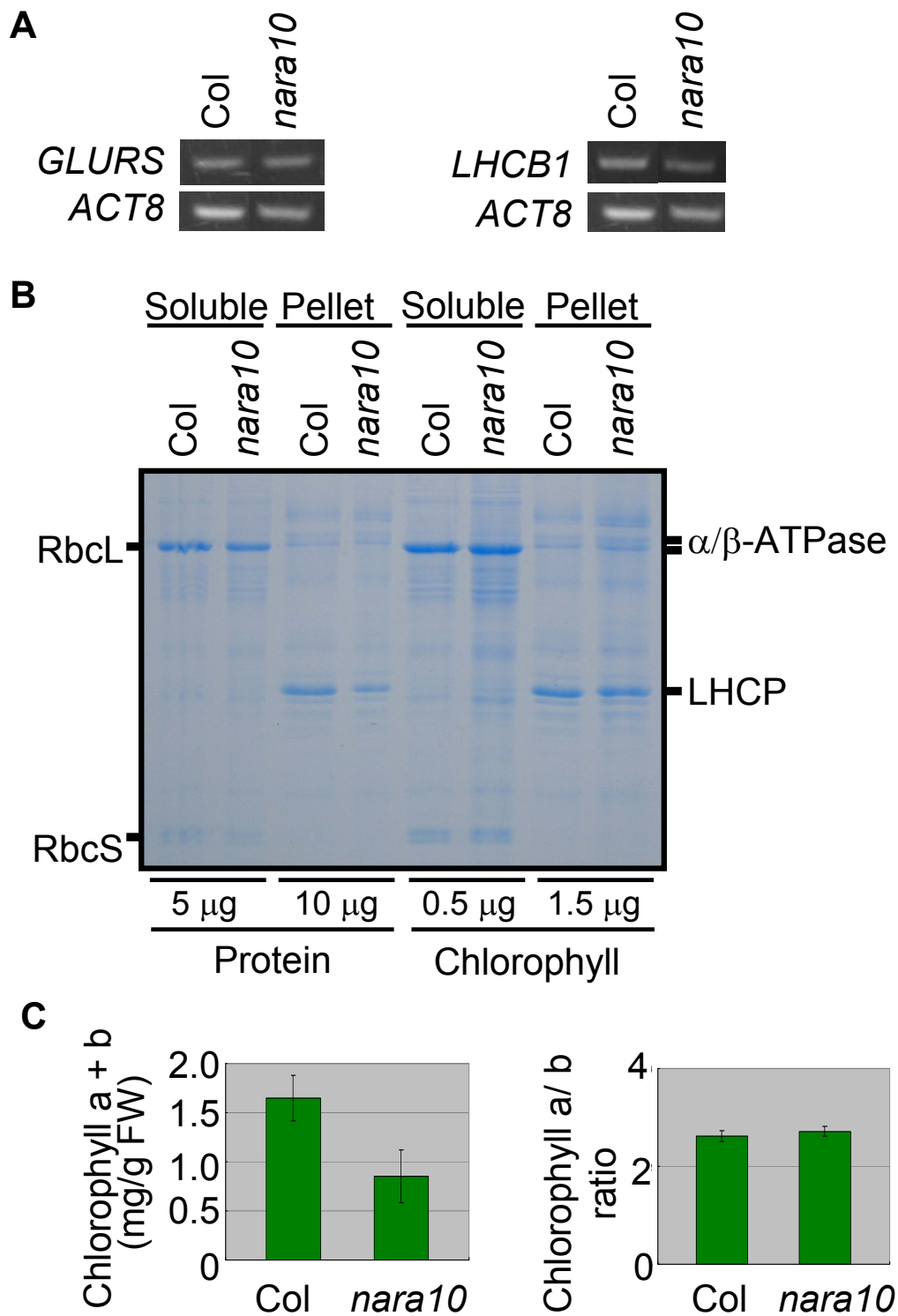


Figure 8. *nara10*変異体における葉緑体コードタンパク質とクロロフィルの蓄積

A. 半定量的RT-PCRによる*nara10*変異体の*GLURS*、*LHCb1*遺伝子の発現量解析。内部標準は*ACT8*を用いた。
 B. *nara10*のSDS-PAGE解析。植物体を可溶性画分とペレット画分に分離したのちタンパク質を抽出し、タンパク質量またはクロロフィル量でロード量を合わせて電気泳動に供した。ゲルの染色はコライドルCBBを用いた。タンパク質とクロロフィルの各アプライ量を下段に記載した。また葉緑体コードの可溶性タンパク質のRbcLと不溶性タンパク質のATP合成酵素の α/β サブユニット (α/β -ATPase)、核コードの可溶性タンパク質のRbcSと不溶性タンパク質のLHCPの各バンド位置を示した。
 C. *nara10*におけるクロロフィル含量の解析。クロロフィルaとbの総量と比率を定法に従って定量した。データは3個体の平均値±標準誤差で示した。

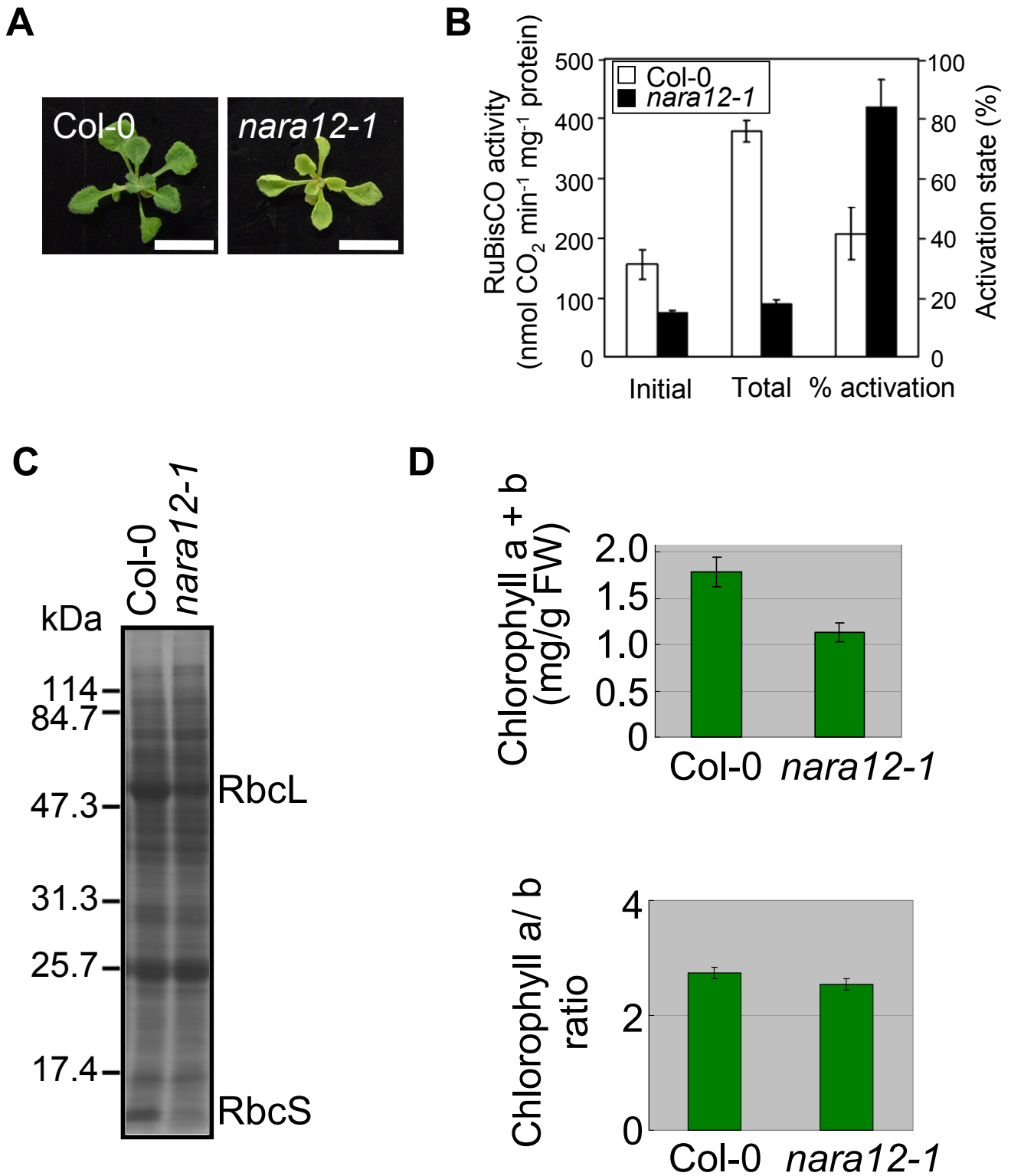


Figure 9. *nara12-1*変異体の表現型

A. ショ糖含有のMS培地上で生育させた植物体の生育比較。Bars = 1 cm

B. *nara12-1*変異体の RuBisCO活性と活性化率。植物体地上部の粗抽出液中の活性を分光学的に測定した。活性化率は初期活性と総活性から算出した。野生株は白色、変異体は黒色でそれぞれ示した。データは3個体の平均値±標準誤差で示した。

C. *nara12-1*変異体のSDS-PAGE解析。植物体から抽出した等量の全タンパク質 (50 μ g) を各レーンにアプライした。ゲルはCBBで染色した。

D. *nara12-1*変異体のクロロフィル含量。

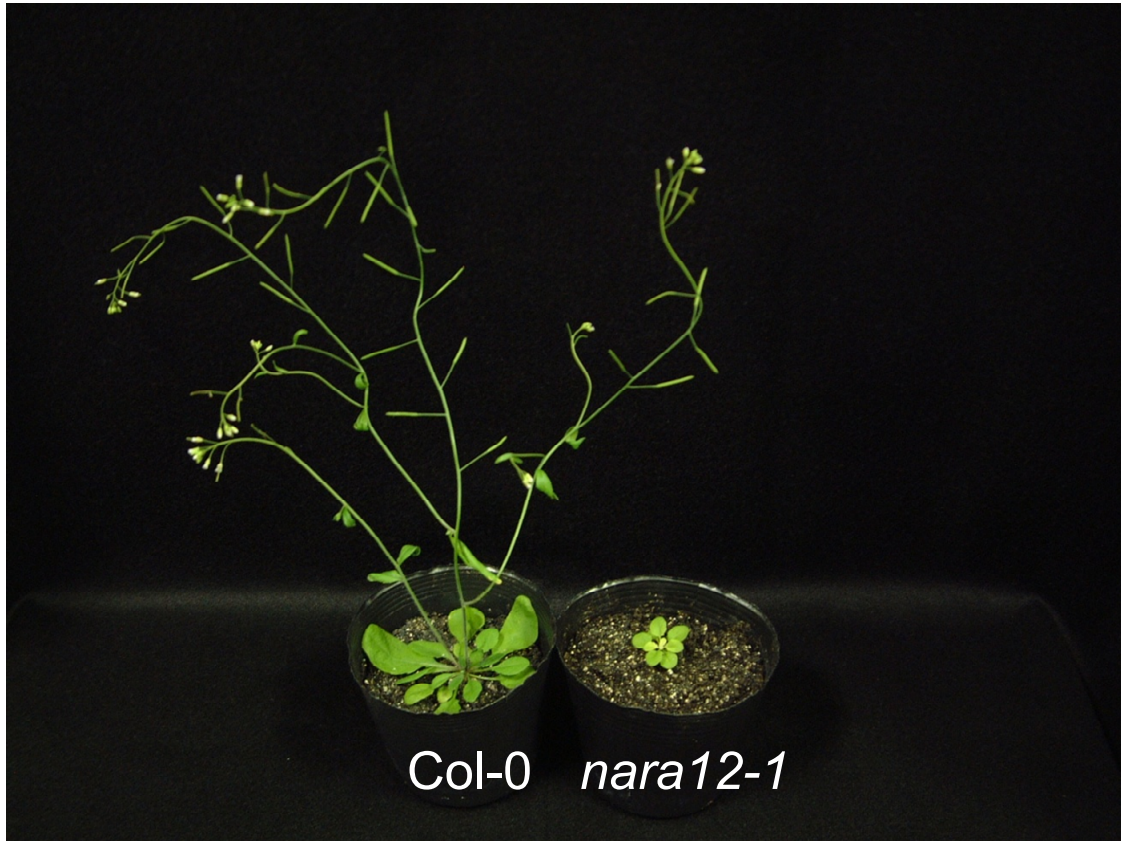


Figure 10. 土壌での*nara12-1* の生育

7週間土壌生育させた植物体の典型例を示す。*nara12-1* 変異体は土壌でも生育可能であるが、その生育は野生株と比べて著しく遅延する。

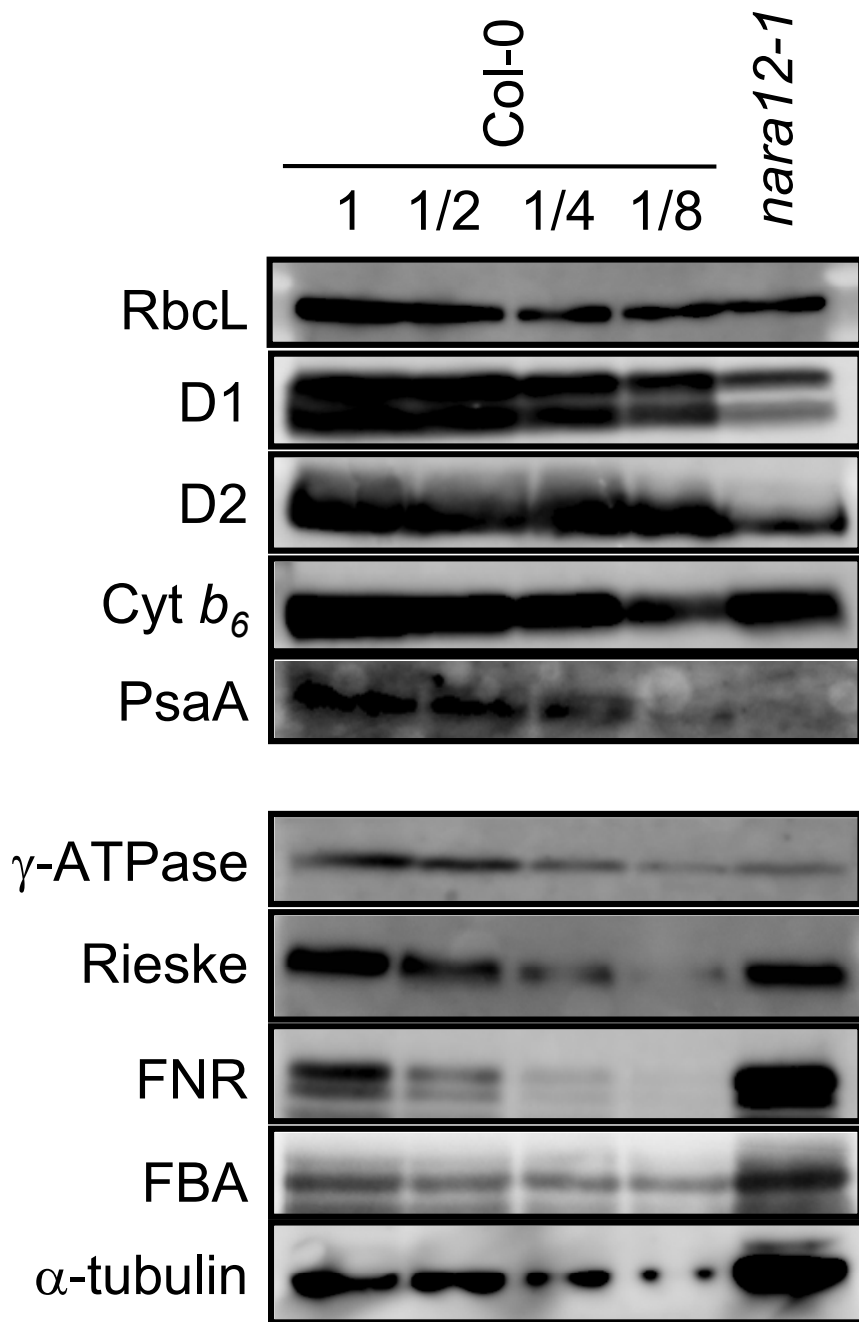
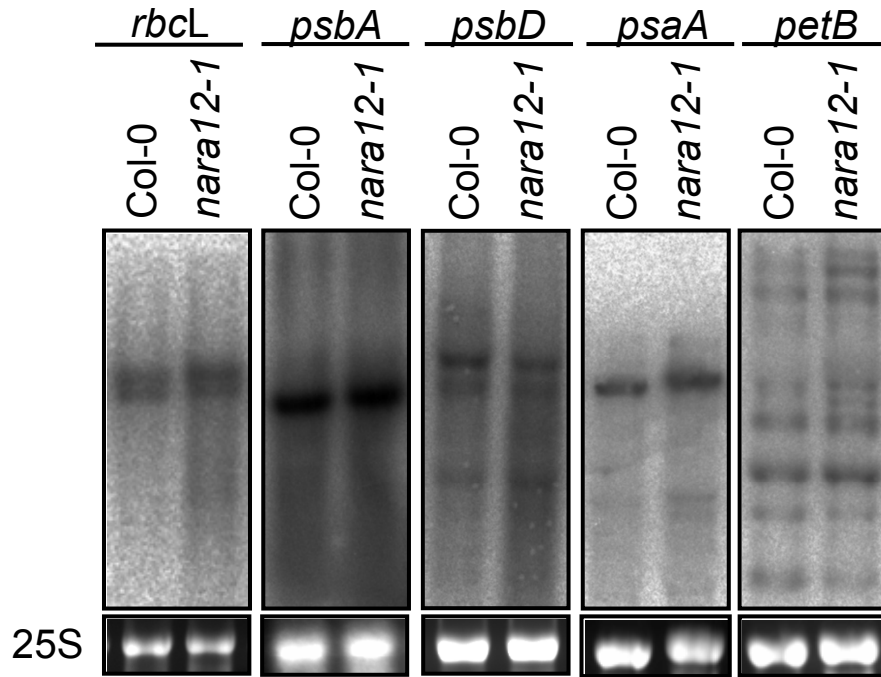


Figure 11. *nara12-1* 変異体のタンパク質組成

ウェスタン解析には、RuBisCO大サブユニットRbcLのほか、光合成タンパク質として光化学系IIの反応中心タンパク質であるD1とD2、光合成電子伝達鎖複合体シトクロム b_6/f 複合体のサブユニットシトクロム b_6 (Cyt b_6)、Rieske FeS タンパク質 (Rieske)、光化学系I複合体サブユニットPsaA、葉緑体ATP合成酵素の γ サブユニット (γ -ATPase)、カルビン回路酵素であるフルクトースビスリン酸アルドラーゼ (FBA)、フェレドキシン:NAD(P)H酸化還元酵素 (FNR) 及び細胞質の α -tubulinの各抗血清を用いた。上段パネルは葉緑体ゲノムコードのタンパク質、下段パネルは核コードタンパク質を示す。等量の全タンパク質を用いて野生株と変異株のタンパク質組成を比較した。野生株のタンパク質試料を用いた希釈系列も示した。

A



B

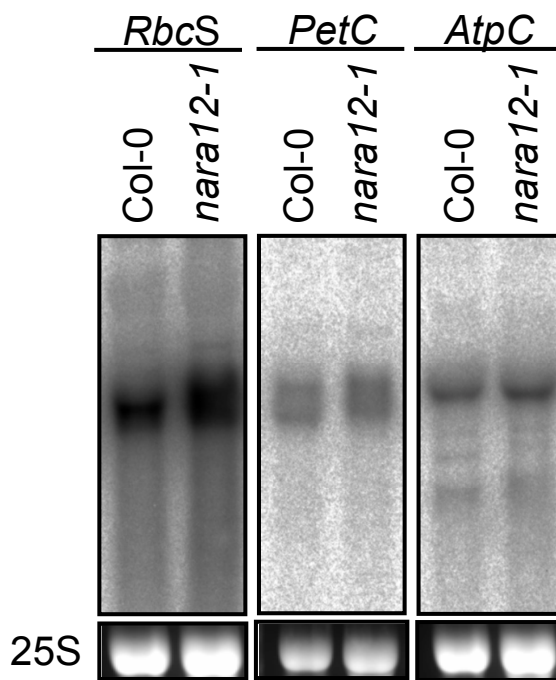


Figure 12. *nara12-1* 変異体における光合成遺伝子の発現

植物体地上部の全RNA (5 μ g) を各レーンにアプライした。A は葉緑体コード遺伝子、B は核コード遺伝子のプローブを用いて検出した。*RbcS*と*rbcL*はそれぞれRuBisCO小サブユニットと大サブユニットの各遺伝子、*PetC*はRieskeタンパク質、*AtpC*は γ -ATPase、*psbA*と*psbD*はそれぞれD1とD2、*petB*はCyt b_6 をそれぞれコードしている。各ノザンデータの下には細胞質25S rRNAのSYBER Green像をローディングコントロールとして示した。

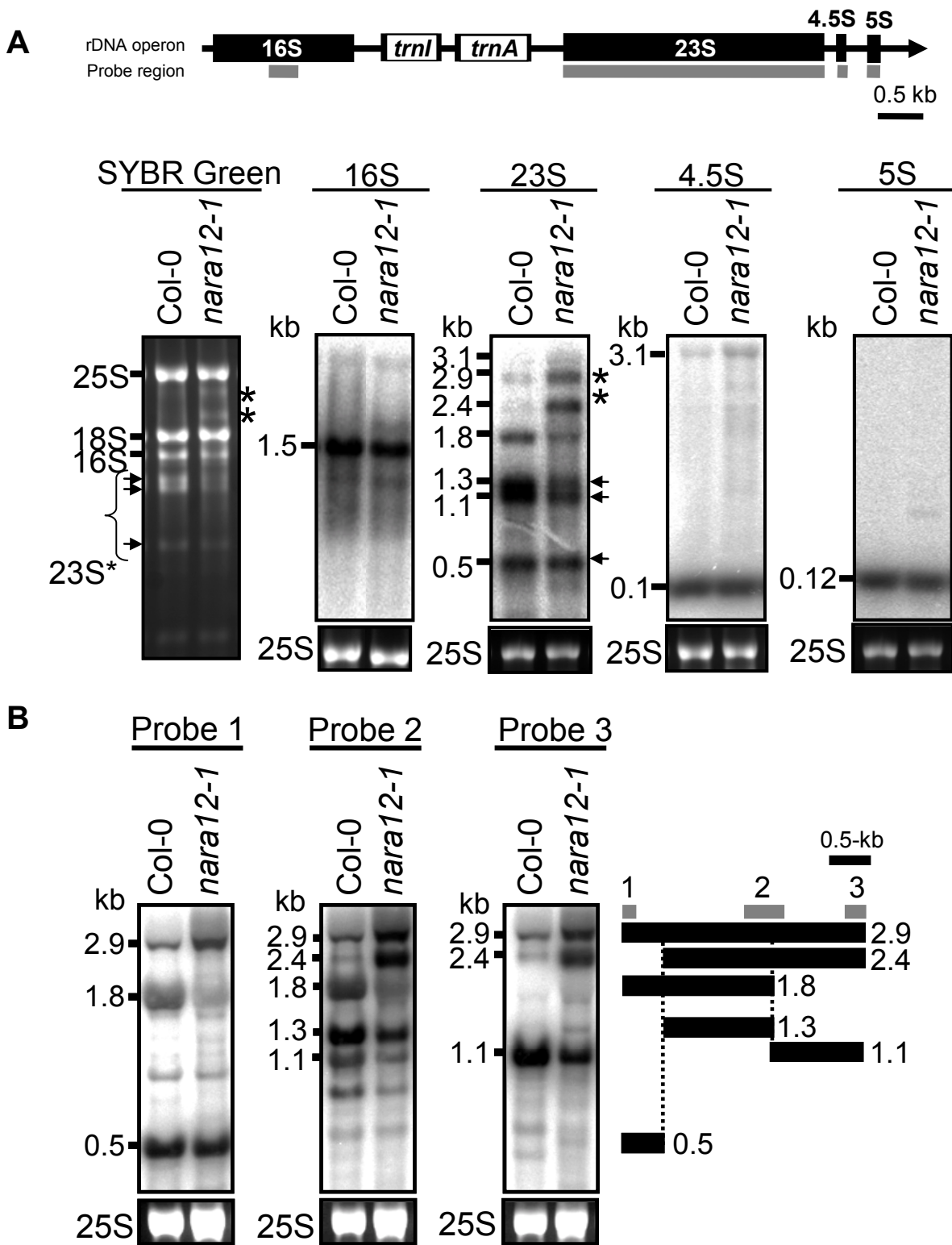


Figure 13. *nara12-1*変異体における葉緑体23S rRNAの断片化プロセッシングの異常

A. 葉緑体rRNAの発現解析。上段パネルは葉緑体rRNAオペロンの構造の模式図を示している。エクソンとイントロンはそれぞれ黒と白のボックスで示している。灰色のバーはノザン解析で用いたプローブの領域を指す。葉緑体rRNAのSYBR Green像とノザンデータを下段に示している。SYBR Green染色した全RNA (2 μ g) を1%アガロースゲルにて分離したのちナイロンメンブレンに転写し、16S、23S、4.5S、5Sの各rDNAプローブとハイブリダイズさせた。矢印は成熟型23S rRNA断片、アスタリスクは*nara12-1* 変異体において著しく蓄積していたバンドをそれぞれ示す。各ノザンデータの下には細胞質25S rRNAのSYBR Green像をローディングコントロールとして示した。SYBR Green像のrRNAはSvedberg単位で示した。またノザン像のrRNAはkbの分子サイズで示した。

B. 23S rRNAフラグメントパターンの詳細な解析。全RNA (2.5 μ g) を異なる3つのプローブ (Probe 1, 2, 3) を用いてノザンプロットした。各プロットパネルは同じフィルターに由来する。検出されたそれぞれのバンドの由来とサイズを右側に記載した。プローブに用いた23S rRNAの領域をグレーのバーで示した。

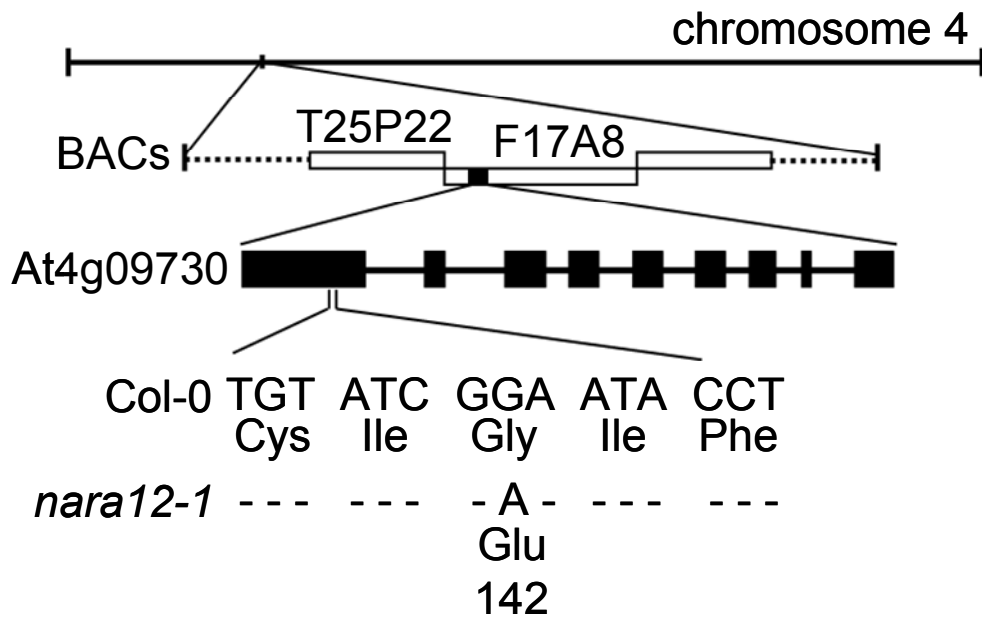


Figure 14. *nara12-1* 変異のマッピング

nara12-1 変異は4番染色体の上腕、5 Mbp近傍のBACクローンT25P22とF17A8に存在する2つに分子マーカーに挟まれる約124 kbpの領域にマップされた。配列解析の結果、変異はAt4g09730の第一エクソンに生じており、これにより142番目のグリシンがグルタミンに置換される。

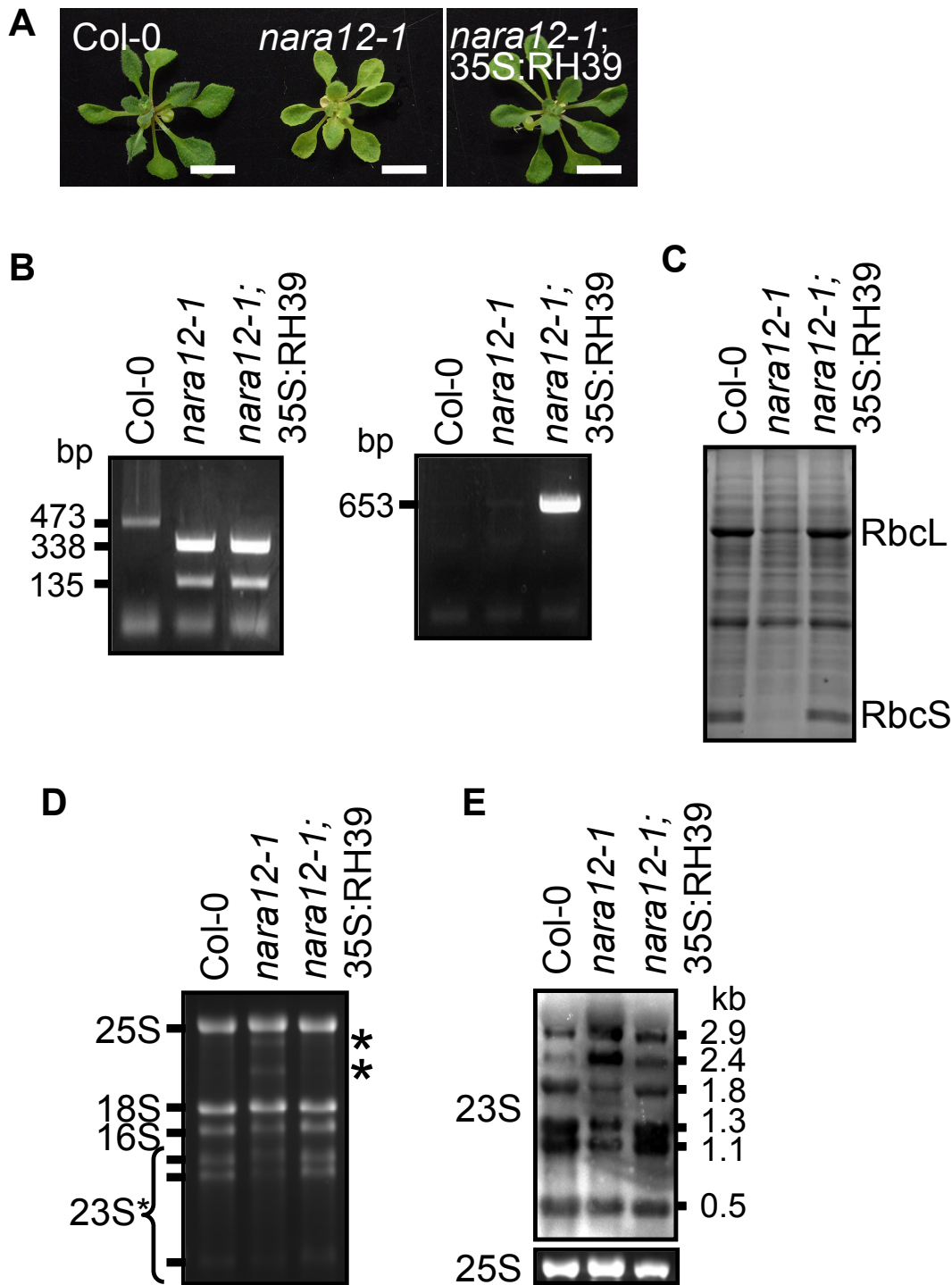


Figure 15. *nara12-1* の相補性試験

A. 相補株の見た目の表現型。CaMV 35S プロモーター制御下で野生型RH39遺伝子のcDNAを発現するコンストラクトを*nara12-1* 変異体に導入した形質転換植物(35S:RH39;*nara12-1*)と野生株及び*nara12-1*変異株をシヨ糖含有MS培地で生育させた。Bars = 1 cm。

B. 解析した植物の遺伝子型。*nara12-1* 変異により野生型のゲノムには存在しないTaq Iサイトが生じる。したがってこの部位を含む領域をゲノムPCRしたのち、Taq Iで処理すると、野生株のPCR産物は473 bpのインタクトな状態だが、変異体では338 bpと135 bpの2つのバンドが検出される(左側パネル)。なお、リバースプライマーを第1イントロンで作製しているため、相補株ではインタクトなPCR産物は検出されない。相補株の導入遺伝子の確認はトランス遺伝子特異的な領域でのPCRにより確認した(右側パネル)。

C. 相補株のRuBisCO蓄積量。30 μ gの全タンパク質をSDS-PAGEにより解析した。ゲルはCBBにより染色した。

D. 相補株のrRNAパターン。2 μ gの全RNAを1%アガロースゲルにて展開し、rRNAはSYBER Greenにより可視化した。

E. 相補株の葉緑体23S rRNAのプロセシングパターン。2 μ gの全RNAに対して23S rDNAプローブを用いてノザン解析を行った。

Predicted Chloroplast Transit peptide

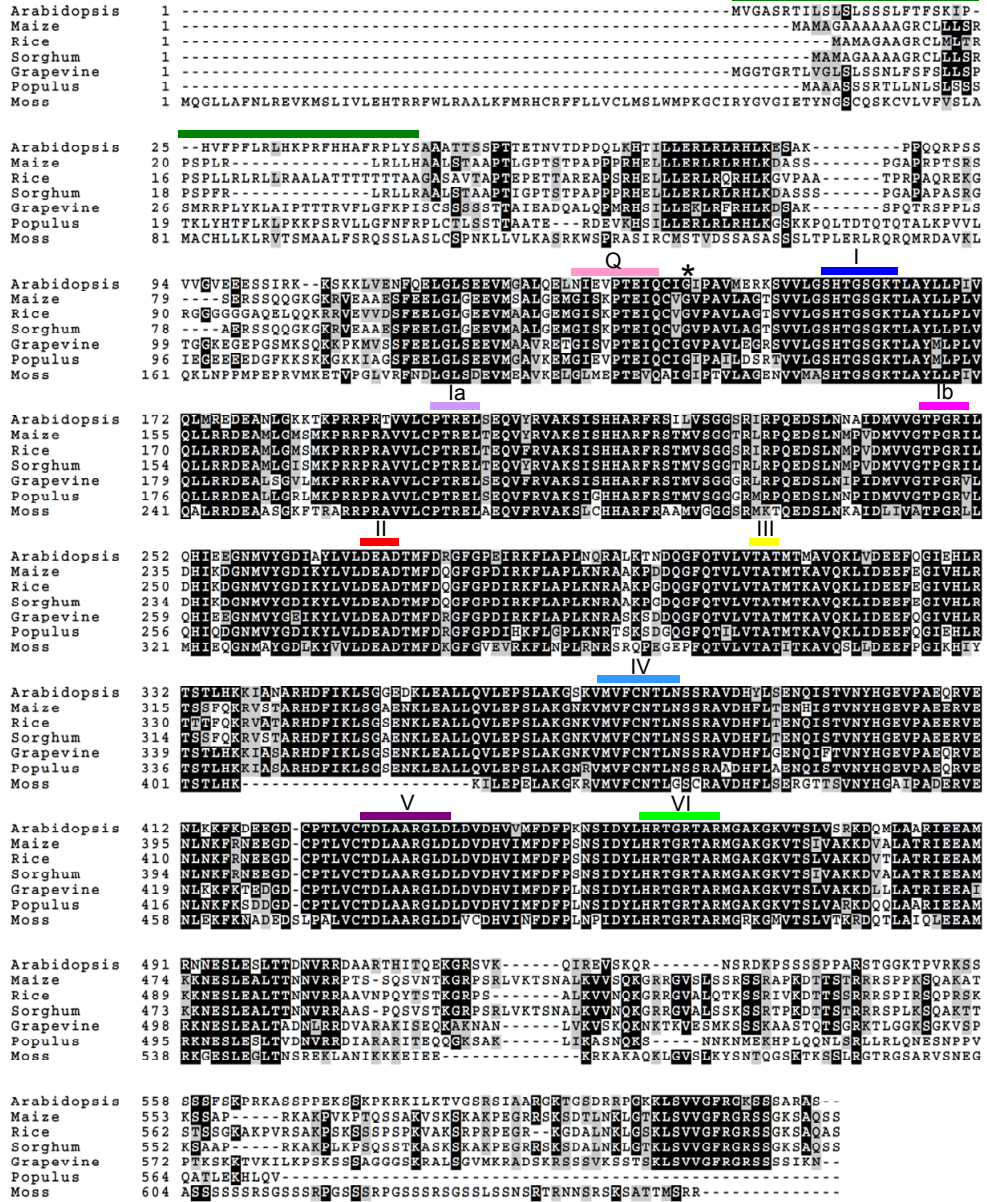


Figure 16. 各種植物のRH39ホモログのマルチプルアラインメント

シロイヌナズナRH39とトウモロコシ、イネ、ソルガム、ワイングレーブ、ポプラ、ヒメツリガネゴケのRH39ホモログ間で相同な残基を黒で、類似した残基をグレーでそれぞれ示した。またnara12-1変異はアスタリスクで示した。DEAD-boxタンパク質の9つの保存モチーフを名称込みで配列上部に色分けした太線で示した。特にモチーフIIIはアミノ酸一字表記でD-E-A-Dとなり、このモチーフを持つタンパク質はDEAD-boxファミリータンパク質として分類される。ChloroPにより予測されるRH39の葉緑体トランジットペプチドを緑色の太線で示す。

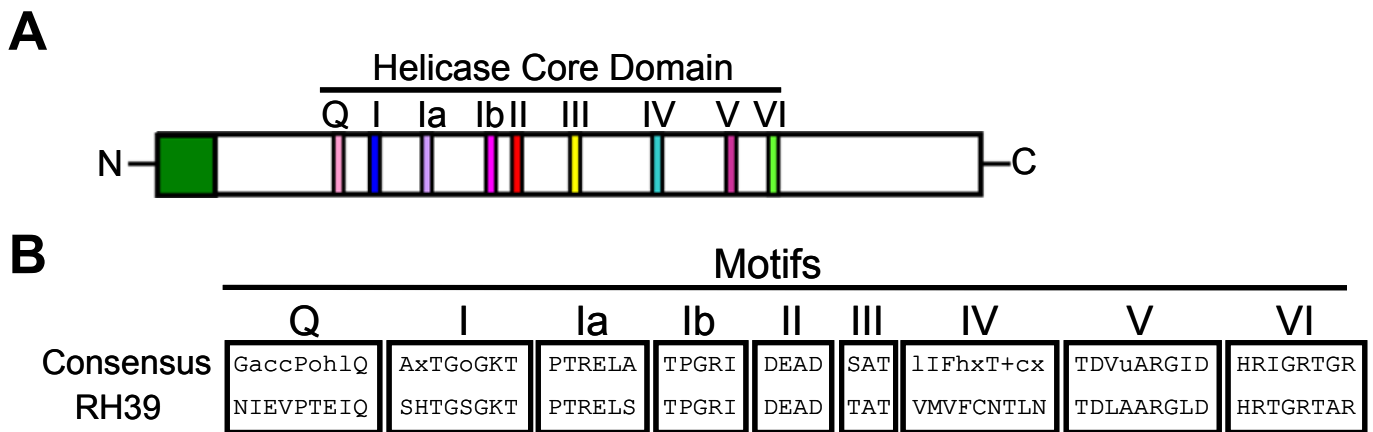


Figure 17. シロイヌナズナRH39のタンパク質の構造と保存モチーフ

A. シロイヌナズナRH39タンパク質の構造

B. RH39のヘリカーゼコアドメイン内の保存モチーフとコンセンサス配列との比較。コンセンサス配列はCordin et al. (2006) から引用した。使用したシンボルは以下の通りである: o, S/T; l, I/L/V; x, any residue; a, F/W/Y; c, D/E/H/K/R; h, A/F/G/I/L/M/P/V/W/Y; +, H/K/R; u, A/G。

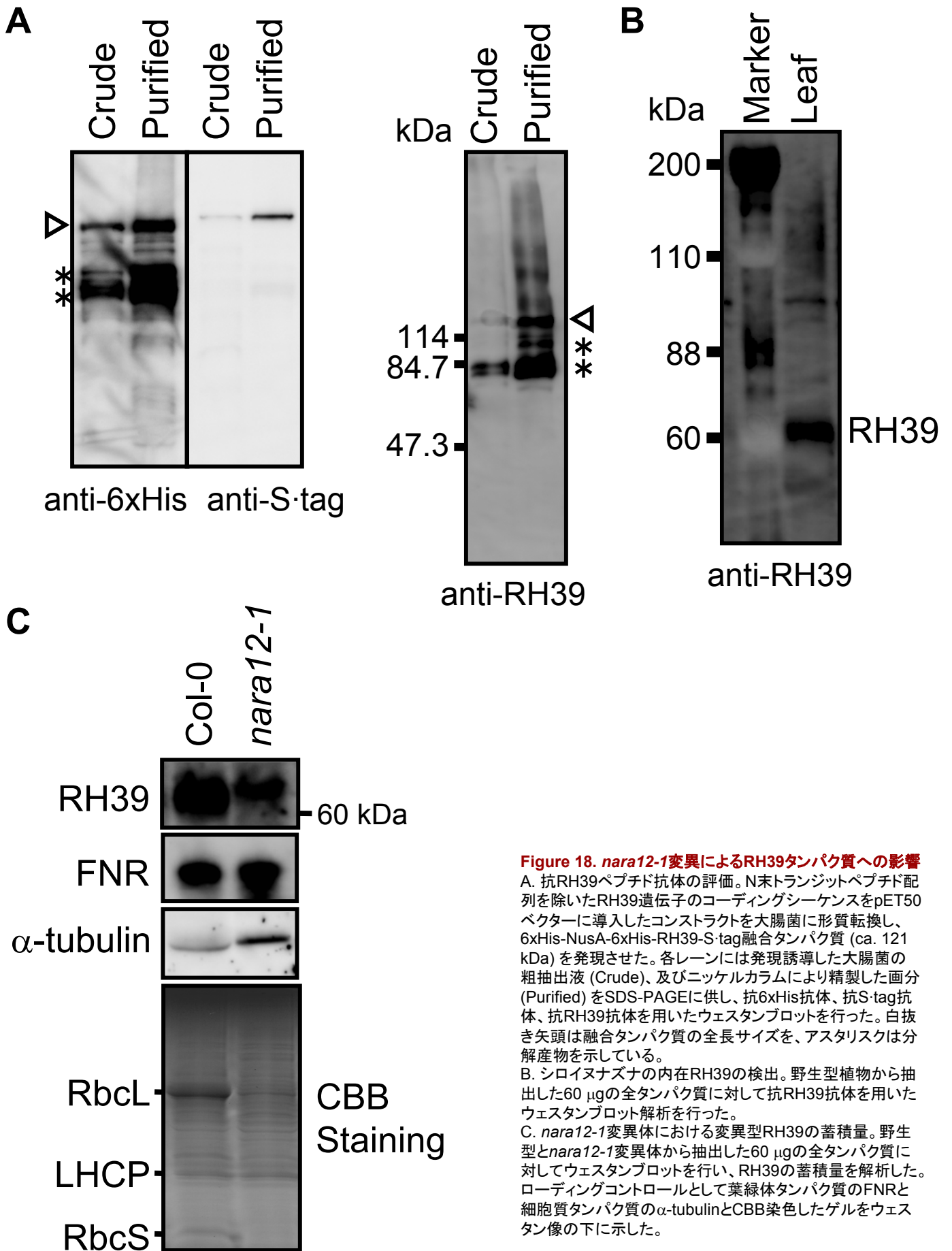


Figure 18. *nara12-1*変異によるRH39タンパク質への影響

A. 抗RH39ペプチド抗体の評価。N末トランジットペプチド配列を除いたRH39遺伝子のコーディングシーケンスをpET50ベクターに導入したコンストラクトを大腸菌に形質転換し、6xHis-NusA-6xHis-RH39-S-tag融合タンパク質 (ca. 121 kDa) を発現させた。各レーンには発現誘導した大腸菌の粗抽出液 (Crude)、及びニッケルカラムにより精製した画分 (Purified) をSDS-PAGEに供し、抗6xHis抗体、抗S-tag抗体、抗RH39抗体を用いたウェスタンブロットを行った。白抜き矢頭は融合タンパク質の全長サイズを、アスタリスクは分解産物を示している。

B. シロイヌナズナの内在RH39の検出。野生型植物から抽出した60 μ gの全タンパク質に対して抗RH39抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

C. *nara12-1*変異体における変異型RH39の蓄積量。野生型と*nara12-1*変異体から抽出した60 μ gの全タンパク質に対してウェスタンブロットを行い、RH39の蓄積量を解析した。ローディングコントロールとして葉緑体タンパク質のFNRと細胞質タンパク質の α -tubulinとCBB染色したゲルをウェスタン像の下に示した。

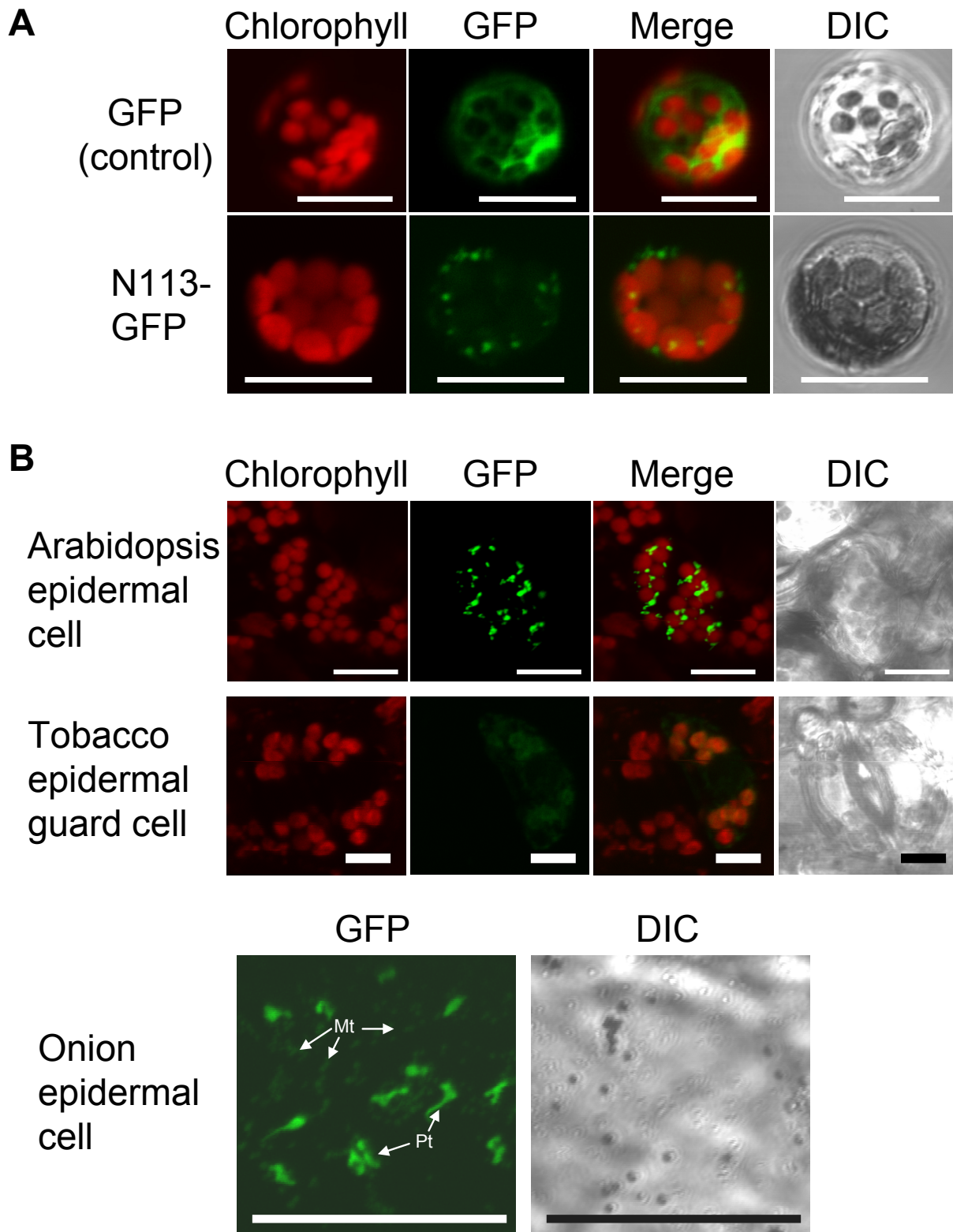


Figure 19. RH39-GFP融合タンパク質を用いた一過的発現系による*in planta*でのRH39の局在解析。

CaMV 35S プロモーター制御下で葉緑体トランジットペプチドを含むRH39のN末端領域 (1-113 a.a.) のC末端側にGFPを連結した融合タンパク質を各種植物材料に一過的に発現させてそのGFP蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。クロロフィル由来の葉緑体自家蛍光 (Chlorophyll) とGFP蛍光 (GFP)、及びそれらを重ね合わせた像 (Merge) と明視野像 (DIC) を示した。

A. PEG法によりシロイヌナズナプロトプラストに遺伝子導入した。GFPのみのコントロールを上段に示す。Bars = 20 μ m

B. パーティクルボンバードメント法によりシロイヌナズナ生葉 (upper panels)、タバコ生葉 (middle panel)、タマネギ表皮 (lower panel) にそれぞれ遺伝子導入して観察した。Asakura et al. (2008) に基づいて蛍光シグナルのサイズと形態から葉緑体 (cp) またはミトコンドリア (mit) と判断されるものを一部指し示した。Bars = 20 μ m (upper and middle panels) or 50 μ m (lower panels)

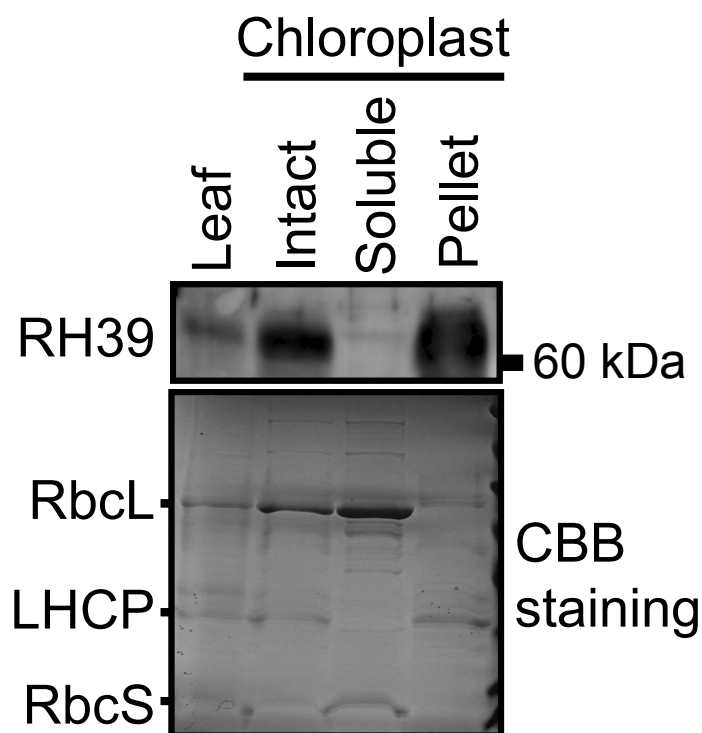


Figure 20. 細胞分画とウェスタンブロットによるシロイヌナズナRH39の細胞内局在解析

シロイヌナズナの葉 (Leaf) からプロトプラスト調製し、これをナイロンメッシュ (10 μm ϕ) に通過させることで得られた破碎液をPercoll密度勾配遠心して無傷葉緑体 (intact) を単離した。これを高浸透圧下で破碎した後、遠心して可溶性画分 (Soluble) とペレット画分 (Pellet) に分画した。調製した各画分30 μg を用いてウェスタンブロットを行った。またコントロールとして、各レーン15 μg のタンパク質を用いてSDS-PAGEを行いCBB染色したゲルを下段に示した。葉緑体可溶性画分にはstromaタンパク質であるRbcLとRbcSが、一方葉緑体ペレット画分にはチラコイド膜タンパク質であるLHCPが共に葉の全タンパク質に比べて濃縮して検出されている。

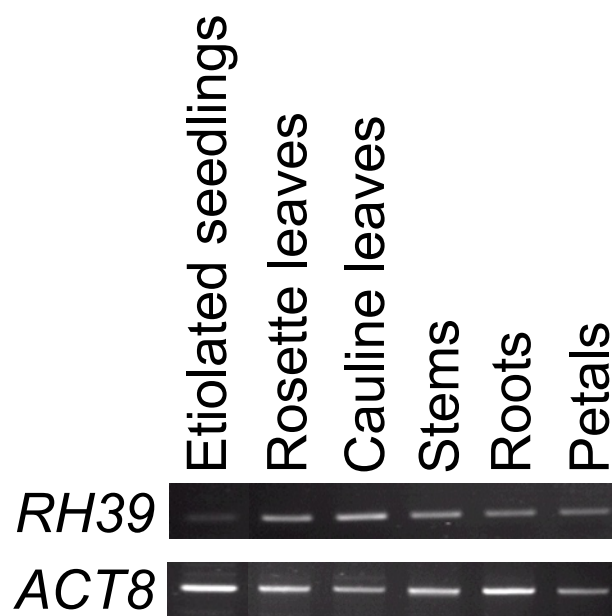


Figure 21. *RH39*遺伝子の空間的な発現パターン

半定量的RT-PCRによる*RH39*遺伝子の器官別発現解析を行った。記載した器官から抽出した全RNA (0.5 μg) から合成したcDNAを鋳型として、*RH39*と内部標準の*ACT8*に特異的なプライマーセットを用いてPCR反応を26サイクル行った。

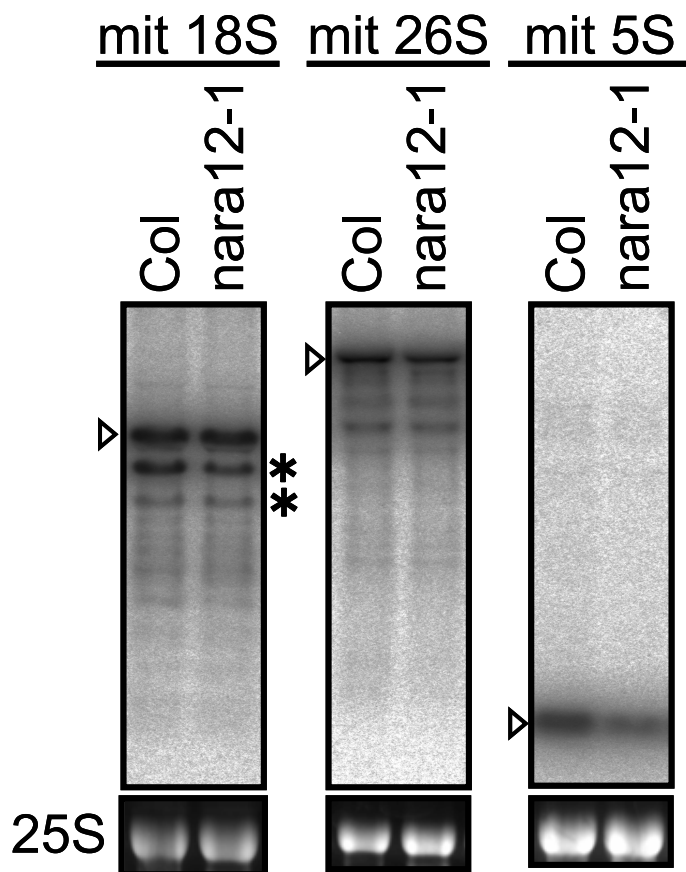
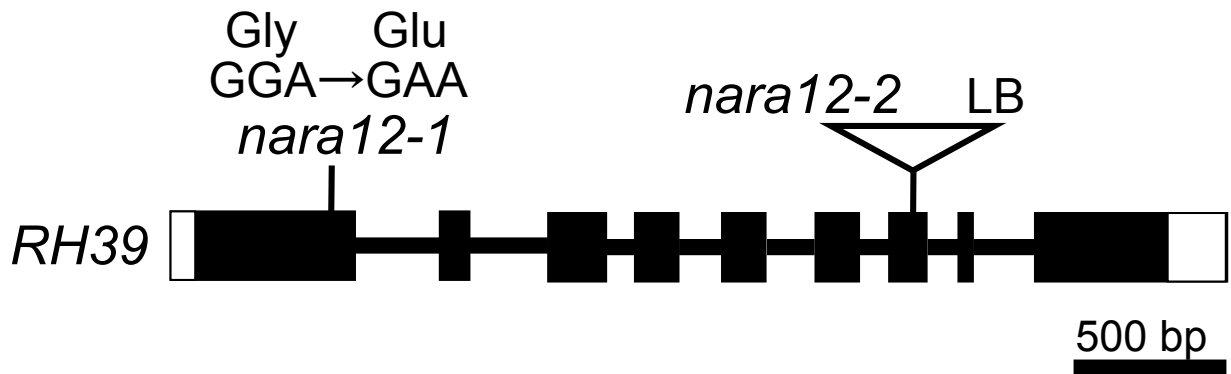


Figure 22. ミトコンドリアrRNAの発現解析

ミトコンドリアrRNAのノザンブロット。ミトコンドリア18S (mit 18S)、26S (mit 26S)、5S (mit 5S) それぞれの標的遺伝子産物を白抜き矢頭で示している。またアスタリスクは非特異バンドを示す。各レーンには等量の全RNAをアプライした。これまで同様コントロールの25S rRNAのSYBER Green像を下段に示している。

A



B

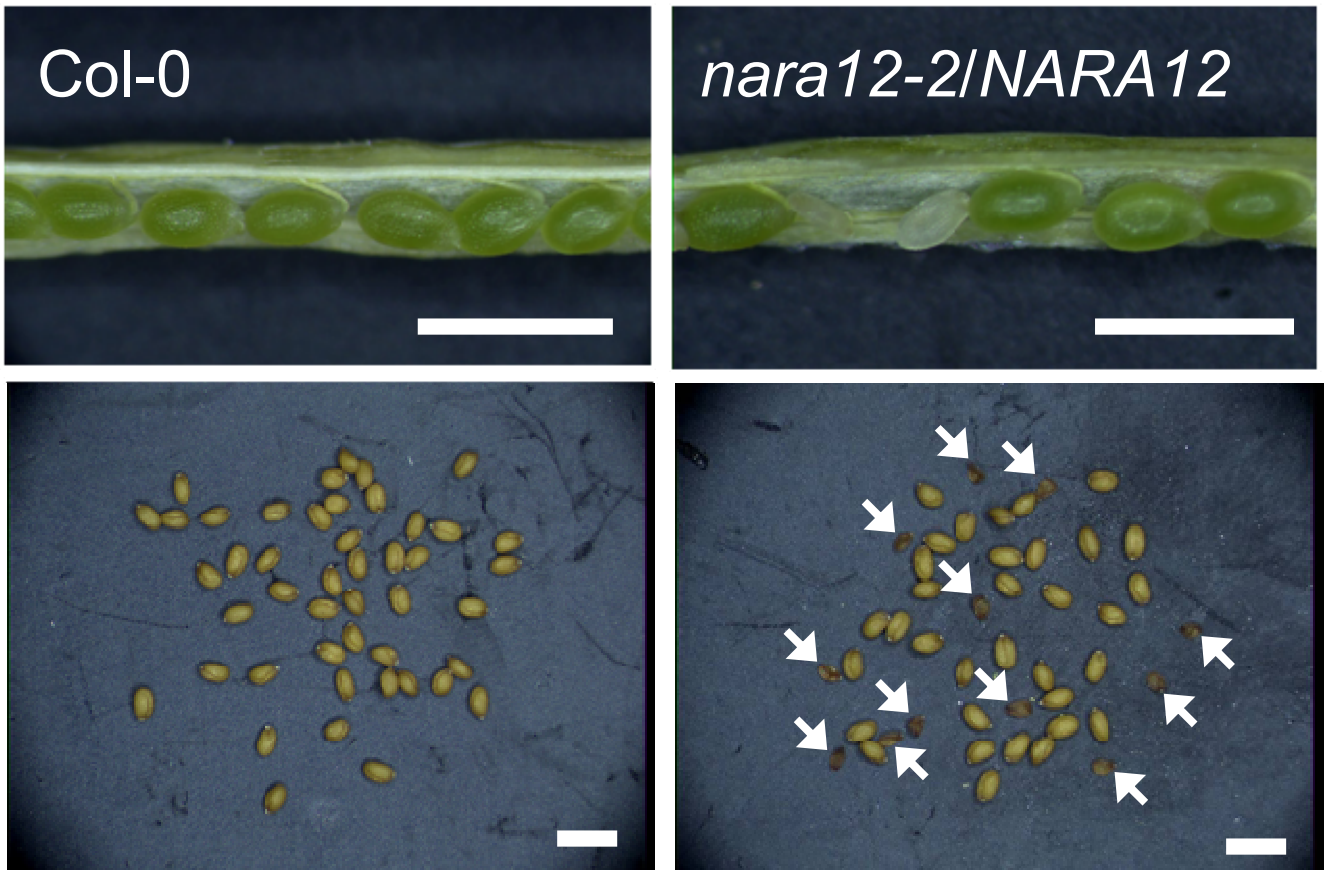


Figure 23. RH39遺伝子のT-DNA挿入変異体 *nara12-2* の解析

A. RH39遺伝子へのT-DNAの挿入位置。エキソンとイントロンをそれぞれ黒色ボックスと実線でそれぞれ示す。白いボックスは非翻訳領域を示す。T-DNAの挿入位置を白い三角マークで示している。LB, T-DNAレフトボーダー。

B. *nara12-2/NARA12* ヘテロ植物体の表現型。若い鞘を切開した像を上側パネルに示す。鞘の中には正常な種子以外に白い種子が観察された。また完全に成熟したひとつの鞘から取り出した全種子を下段パネルに示す。茶褐色の異常な種子を白矢印で示す。

Bars = 1 mm

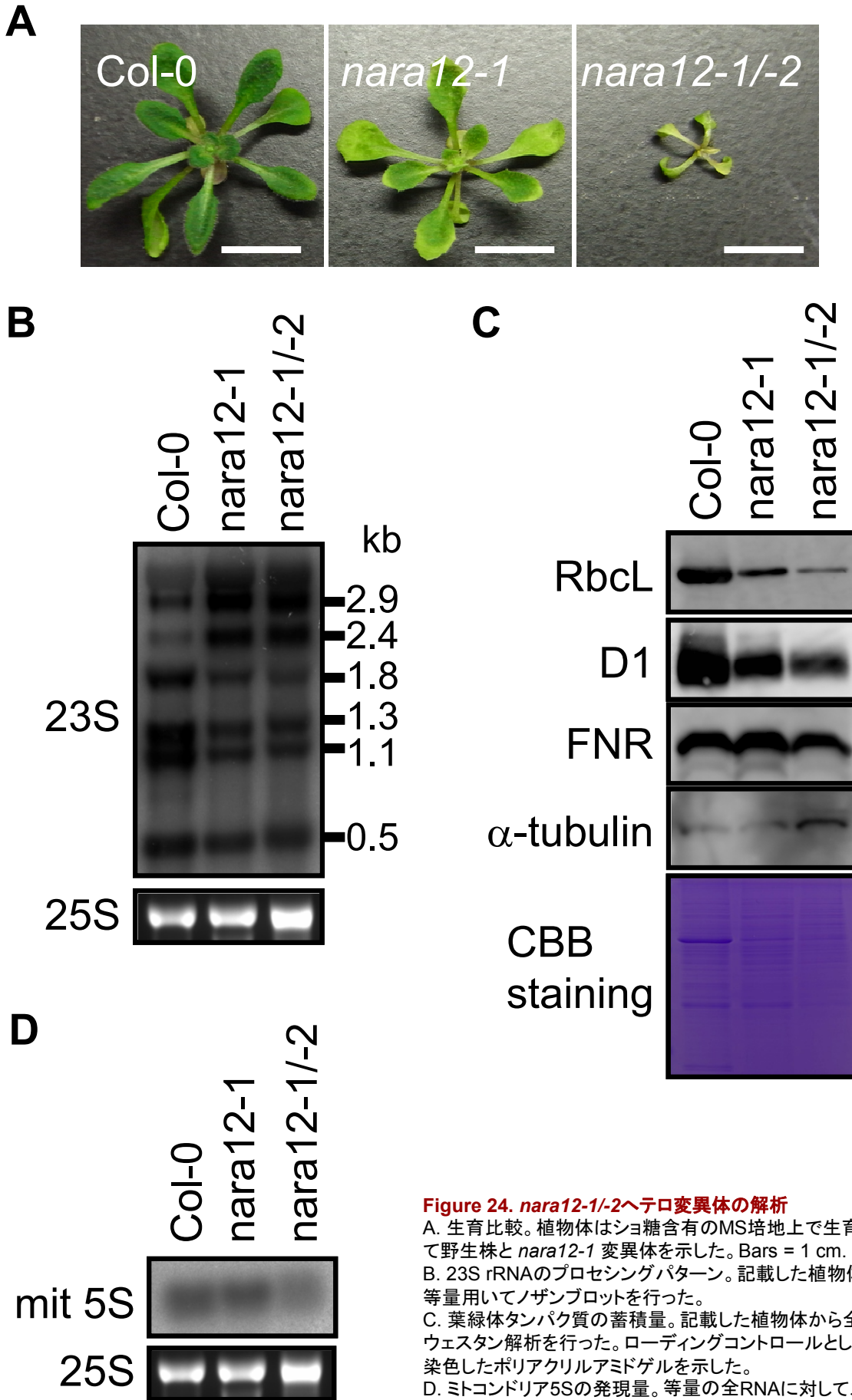


Figure 24. *nara12-1/-2*ヘテロ変異体の解析

A. 生育比較。植物体はショ糖含有のMS培地上で生育させた。コントロールとして野生株と *nara12-1* 変異体を示した。Bars = 1 cm.

B. 23S rRNAのプロセッシングパターン。記載した植物体から抽出した全RNAを等量用いてノザンプロットを行った。

C. 葉緑体タンパク質の蓄積量。記載した植物体から全タンパク質を抽出してウェスタン解析を行った。ローディングコントロールとしてFNRと α -tubulinとCBB染色したポリアクリルアミドゲルを示した。

D. ミトコンドリア5Sの発現量。等量の全RNAに対してノザン解析を行った。

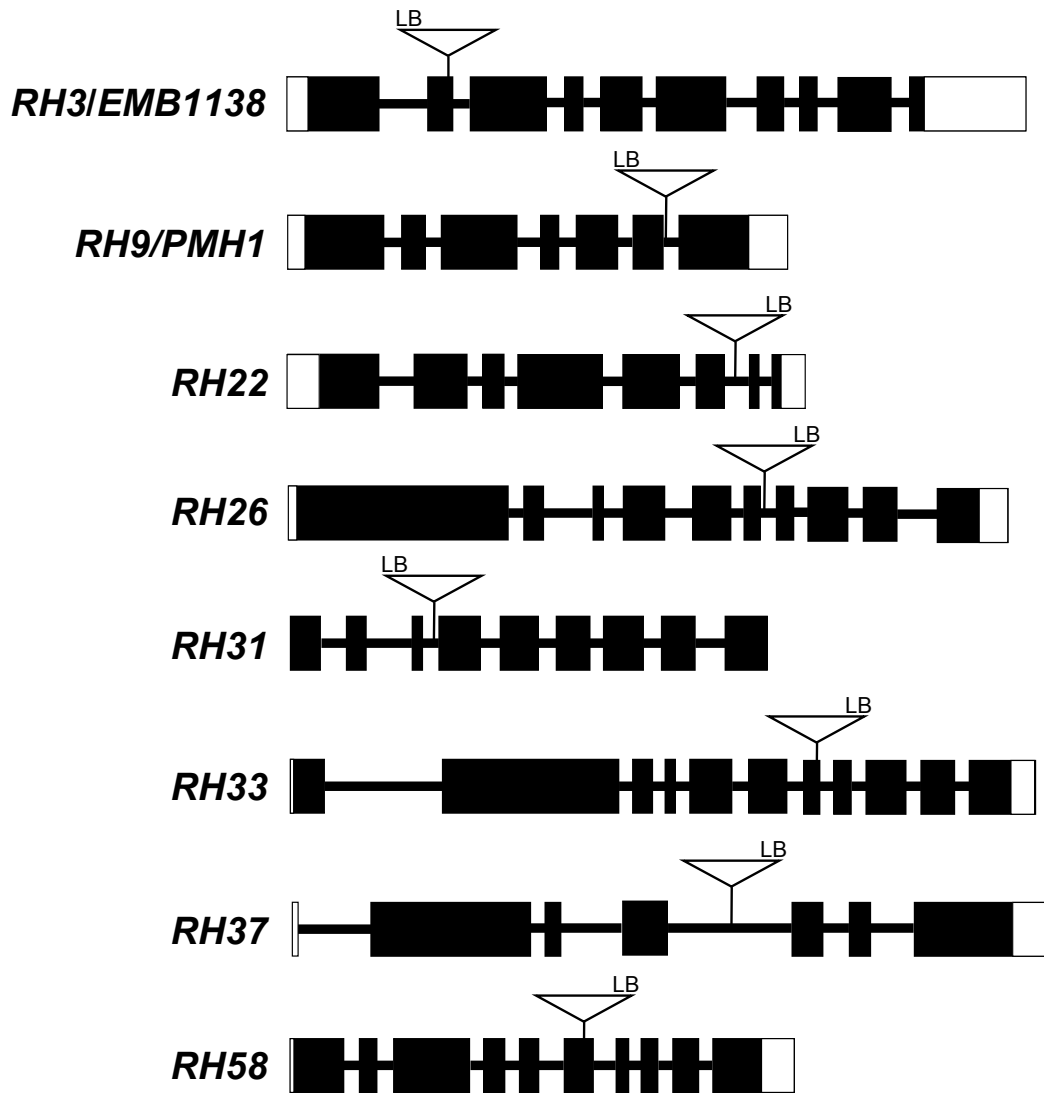
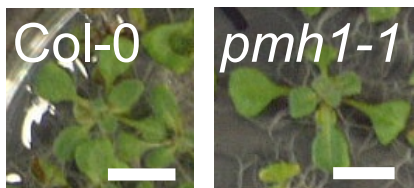
A**B**

Figure 25. シロイヌナズナ葉緑体に局在することが予測されたDEAD-boxファミリータンパク質のT-DNA挿入変異体の解析

A. 解析したDEAD-boxタンパク質ファミリーのタグライン。*RH9/PMH1*の欠損変異体以外すべてホモ接合体が得られなかった。*RH3/EMB1138*はSeedGenes (<http://www.seedgenes.org/>) に報告があった。エキソンとイントロンをそれぞれ黒色ボックスと実線で、白いボックスは非翻訳領域をそれぞれ示す。またT-DNAの挿入位置は白三角マークで示した。LB, T-DNAレフトボーダー。
 B. *RH9/PMH1*遺伝子を欠損した*pmh1-1*ホモ接合体の表現型。植物体はショ糖含有のMS培地上で生育させた。Köhler et al. (2009)の報告と同様に外観は野生株と同等であった。Bar = 1 cm

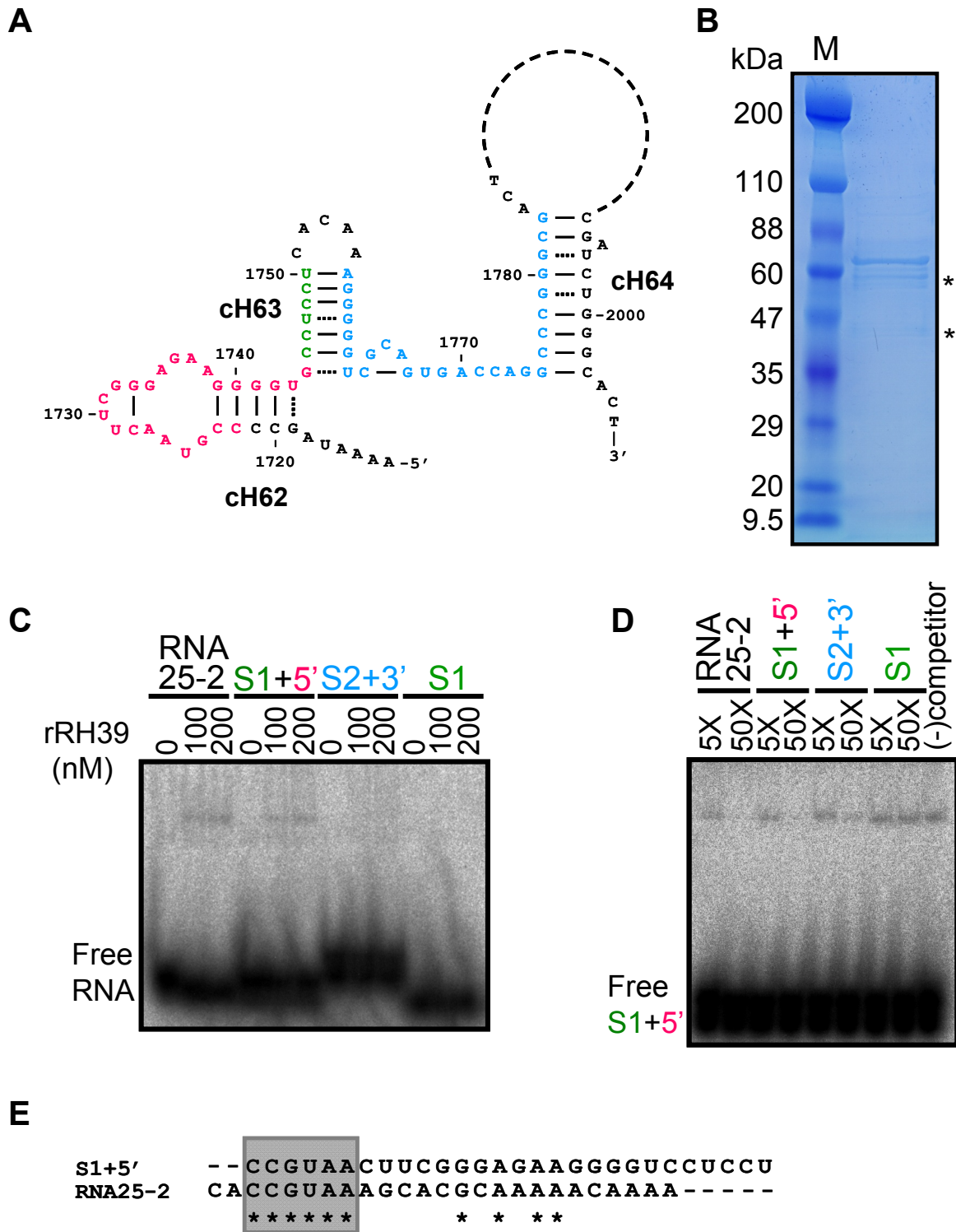


Figure 26. Hidden break導入部位近傍のRNA配列へのrRH39の結合親和性

A. EMSAに用いた合成オリゴRNA配列。オリゴRNAの配列を色分けした: S1+5' (赤色+緑色)、S2+3' (青色)、S1 (緑色)
 B. 精製rRH39のSDS-PAGE像。rRH39 (ca. 64.7 kDa) のニッケルカラム精製画分 (1.3 μ g) をアプライした。抗6xHis抗体により確認したrRH39の分解産物をアスタリスクで示す。ゲルはコロイダルCBBにより染色した。M, プロテインサイズマーカー
 C. 5'末端を 32 Pでエンドラベルした合成オリゴRNAとrRH39を用いたEMSA解析。反応系に3 nM RNAと記載した濃度のrRH39を加えて結合アッセイを行った。タンパク質の結合の有無はnative PAGEにより解析した。
 D. コンペティションアッセイ。反応系には3 nM S1+5' RNAと200 nM rRH39、そして5倍または50倍のモル濃度の過剰な非標識RNAを共存させて行った。非標識RNAを含まないコントロールを(-) competitorとした。
 E. S1+5'とRNA25-2のペアワイズアラインメント。両者間で同一のヌクレオチド塩基をアスタリスクで示した。また共通のRNA配列を灰色のボックスで示した。

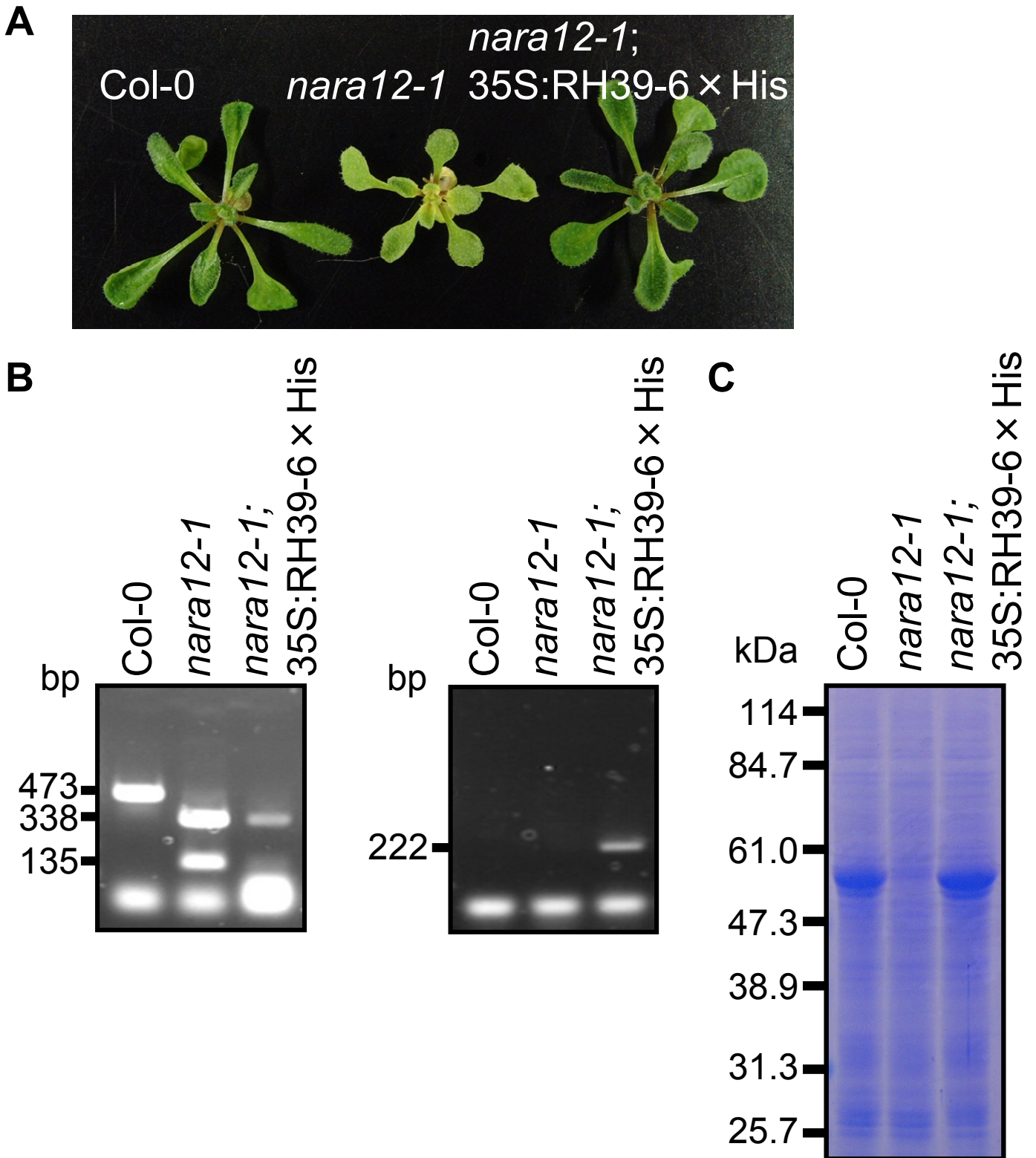


Figure 27. RH39-6xHis融合遺伝子による*nara12-1*変異体の相補試験

A. 植物体の外観。植物体はショ糖含有のMS培地上で生育させた。

B. 相補株の遺伝子型。遺伝子型の解析に関してはFigure 15 (B)に準ずる(左)。トランスジーン特異的な領域でのPCRにより導入遺伝子の有無を確認した(右)。

C. 相補株のRuBisCO含量。等量の全タンパク質をSDS-PAGEにより分離し、CBB染色によりバンドを可視化した。

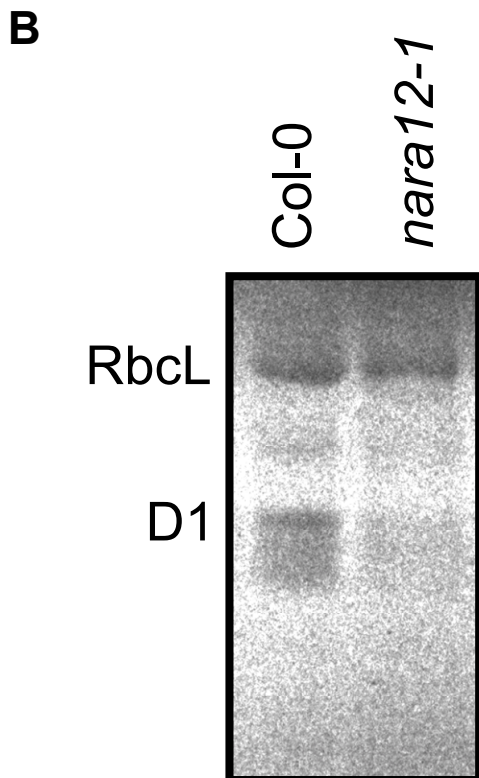
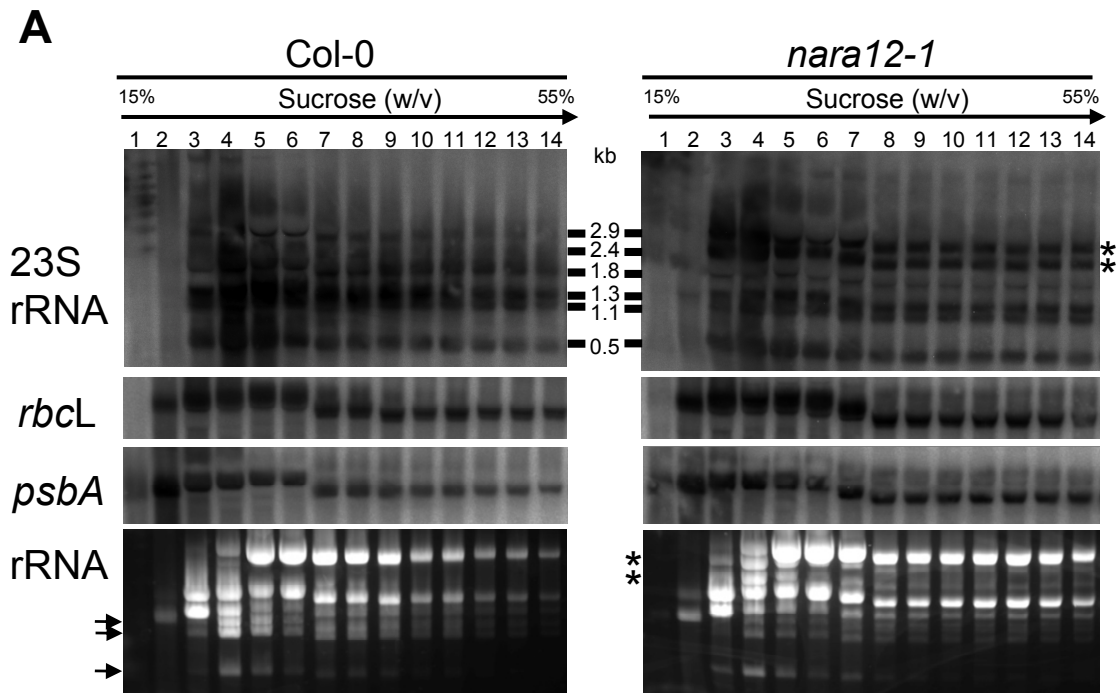


Figure 28. hidden breakの異常がリボソームの翻訳に及ぼす影響

A. ポリソーム解析。15–55% ショ糖密度勾配遠心法により分画した葉細胞からRNAを抽出して23S、*rbcL*、*psbA*の各プローブを用いて行ったノザンプロット像を示す。また細胞質のrRNAを可視化するためにSYBR Green染色も最下段に示す。23S rRNAの成熟型断片を矢印で、変異体において蓄積していた高分子量の23S rRNAをアスタリスクでそれぞれ示した。

B. パルスラベリング実験。タンパク質のラベリングは $[^{35}\text{S}]$ -Met/Cysを取り込ませた葉に10分間白色光を照射して行った。等量のdpmに相当する全タンパク質をSDS-PAGEに供し、ラベルされたRbcLとD1タンパク質はオートラジオグラフィーにより検出した。

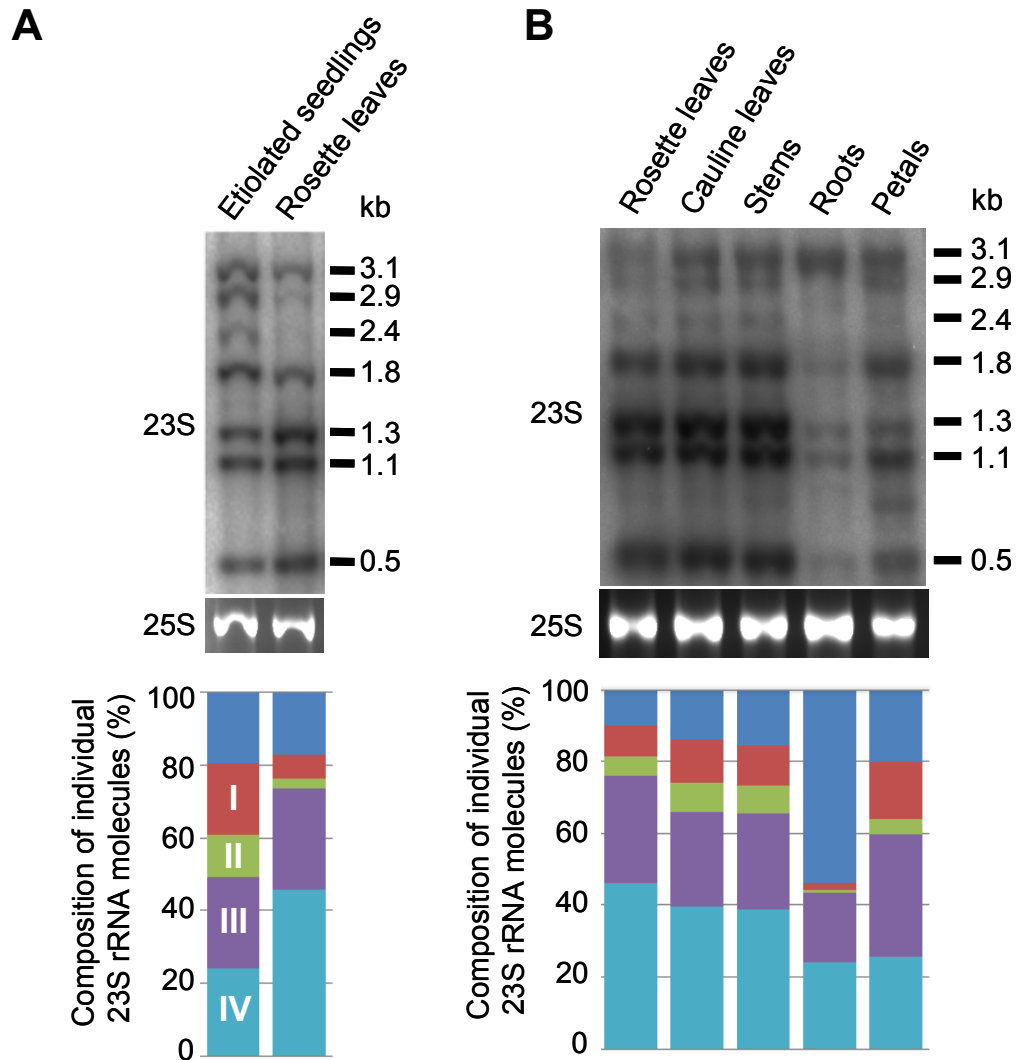


Figure 29. プラスチドタイプに依存した23S rRNAのプロセッシングパターン

A. エチオプラストから葉緑体に分化するに従って変化する23S rRNAのフラグメントパターン。暗所で4日間シヨ糖含有のMS培地で生育させた黄化芽生え(etiolated seedlings)と土壌で6週間生育させた野生型植物体から抽出した全RNA (0.1 μ g) に対して23S rRNAプローブを用いてノザンブロットを行った。内部標準として細胞質の25S rRNAを用いた。プラスチドリボソームは、そのhidden breakの数と有無により4つのFormに分類できる; hidden breakを持たないForm I、5'側に1箇所のhidden breakを持つForm II、3'側に1箇所のhidden breakを持つForm III、そして2つのhidden breakを持つForm IVである。Form I からForm IV の量はそれぞれのFormに特徴的な2.9-、2.4-、1.8-、1.3-kb の各バンド強度から見積もることができる。3.1-kb (青色)、2.9-kb (Form I, 赤色)、2.4-kb (Form II, 緑色)、1.8-kb (Form III, 紫色)、1.3-kb (Form IV, 水色) の個々のバンド強度はこれら5種のバンドの合算値の百分率として見積もった。バンド強度はNIH ImageJ software (<http://rbs.info.nih.gov/ij/>) により定量した。

B. 23S rRNAのプロセッシングを介したプラスチドリボソームの再編成。6週間土壌で生育した野生型植物の各器官から抽出した全RNA (1 μ g) に対して23S rRNAプローブを用いてノザンブロットを行った。

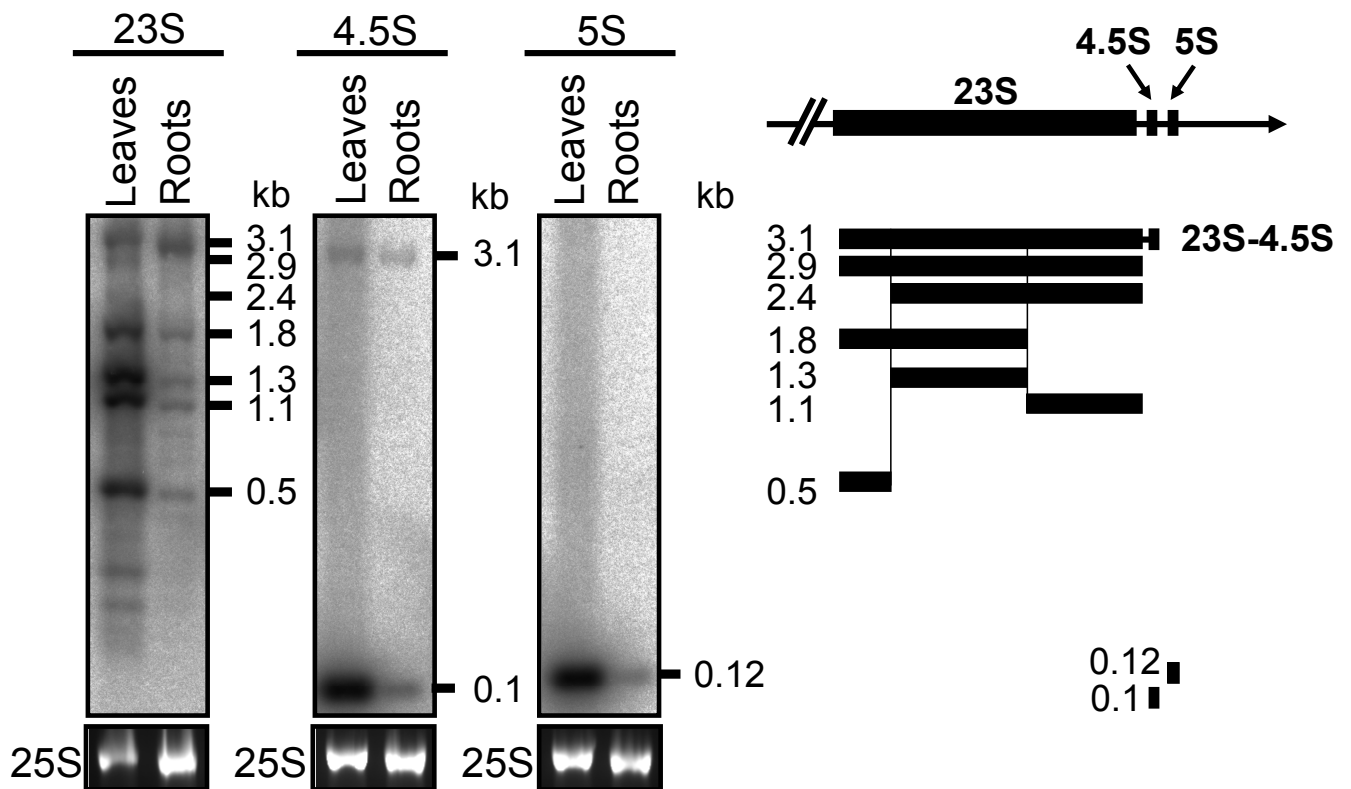


Figure 30. 3.1-kb前駆体の構成

6週間土壌生育した野生型植物のロゼット葉と地下根から抽出した全RNAに対して、23S、4.5S、5S rRNAの各プローブを用いてノザンプロットを行った。検出されたそれぞれのバンドの由来とサイズを右側に記載した。23Sと4.5Sのプローブを用いたときのみ3.1-kbのバンドが検出された。

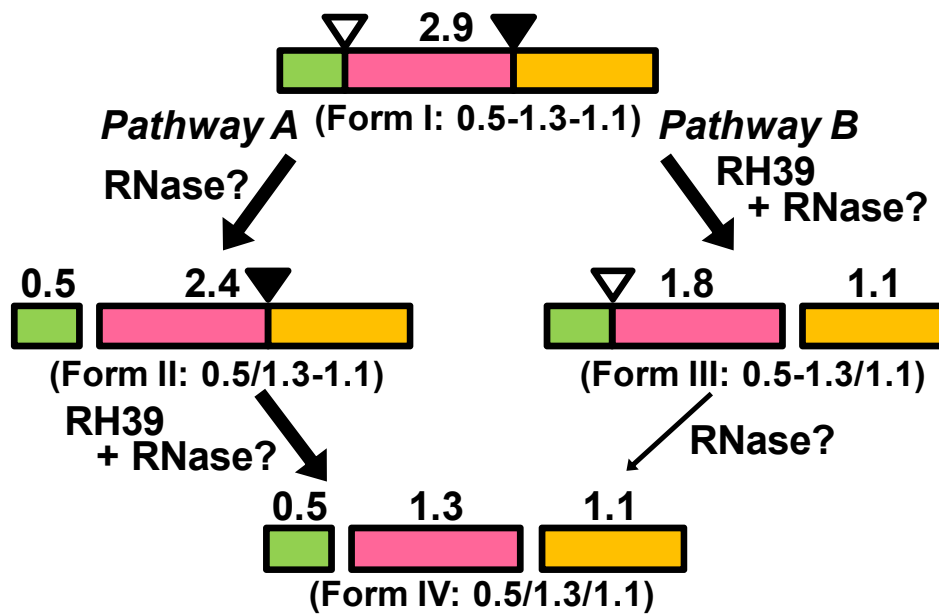


Figure 31. シロイヌナズナにおけるプラスチド23S rRNAの断片化プロセッシングの分子メカニズム

全長のインタクトな23S rRNAを3つの断片に分けて色分け (グリーン、ピンク、イエロー) した。これらはpathway AまたはBを介したプロセッシング反応により、それぞれ0.5-、1.3-、1.1-kbの分子種に断片化される。どちらの経路においてもRH39は3'側の断片化 (黒矢頭) に必須である。3'側と5'側 (白矢頭) の解裂反応には未知のRNaseが必須であろうが、5'側は恐らくCSP41が関わると思われる (本文参照)。各分子種の上にはそれぞれのRNA鎖長 (kb) を記載した。23S rRNAの断片化プロセッシングのパターンに応じて、リボソーム大サブユニットをForm I からform IV に分類している: Form I (0.5-1.3-1.1)、Form II (0.5/1.3-1.1)、Form III (0.5-1.3/1.1)、Form IV (0.5/1.3/1.1)。ここで、ハイフンはプロセッシング無し、スラッシュはプロセッシング有りをそれぞれ示している。

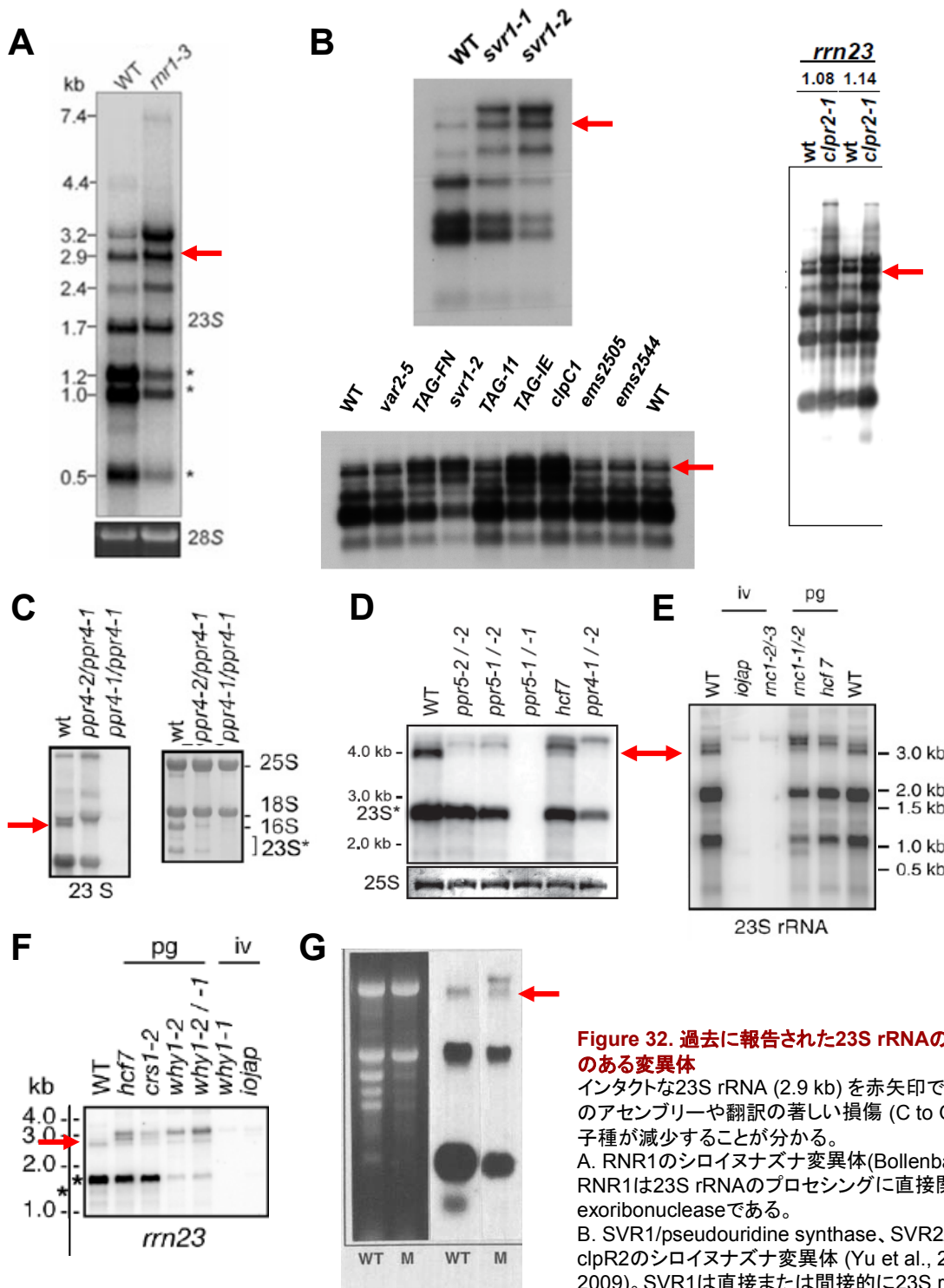


Figure 32. 過去に報告された23S rRNAのプロセッシングに異常のある変異体

インタクトな23S rRNA (2.9 kb) を赤矢印で示した。リボソームのアセンブリーや翻訳の著しい損傷 (C to G) はこの2.9-kbの分子種が減少することが分かる。

A. RNR1のシロイヌナズナ変異体 (Bollenbach et al., 2005)。RNR1は23S rRNAのプロセッシングに直接関わる3'→5'方向のexoribonucleaseである。

B. SVR1/pseudouridine synthase、SVR2/clpR1、clpC1、clpR2のシロイヌナズナ変異体 (Yu et al., 2008; Zybailov et al., 2009)。SVR1は直接または間接的に23S rRNAのプロセッシングに関わると考えられている。一方Clpプロテアーゼは23S rRNAのプロセッシングに必須の因子を制御していると考えられている。

C. PPR4のトウモロコシ変異体 (Schmitz-Linneweber et al., 2006)。PPR4はリボソーム小サブユニットの構成成分の遺伝子 *rps12* のトランスプライシング因子である

D. PPR5のトウモロコシ変異体 (Beick et al., 2008)。PPR5は翻訳に必須の *trnG-UCC* の前駆体を安定化するため翻訳異常の変異体である。論文中のマーカーの位置は記載ミスと思われる。

E. RNC1のトウモロコシ変異体 (Watkins et al., 2007)。RNC1は *rps12* と *trnI* と *trnA* のイントロンスプライシングを担うため、リボソームアセンブリーと翻訳に異常がある。

F. WHY1のトウモロコシ変異体 (Prikrýl et al., 2008)。WHY1変異体はリボソーム大サブユニットの構成成分をコードする遺伝子の発現の異常、またはリボソームのアセンブリーに異常がある。

G. DALのシロイヌナズナ変異体 (Bisanz et al., 2003)。DALはリボソームのアセンブリーに必須の因子と考えられている。

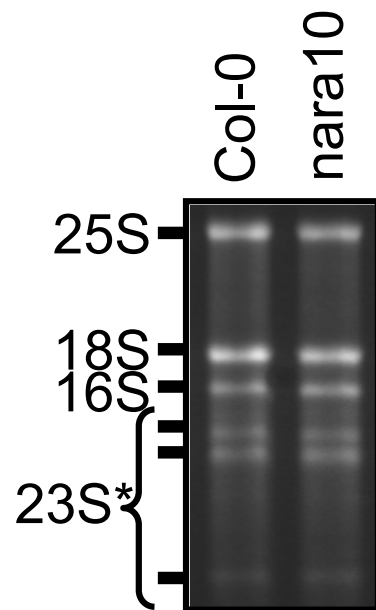


Figure 33. *nara10*変異体のrRNAの発現

*nara10*から抽出した全RNAを1%アガロースゲルにて分離してSYBER Green染色により可視化した。

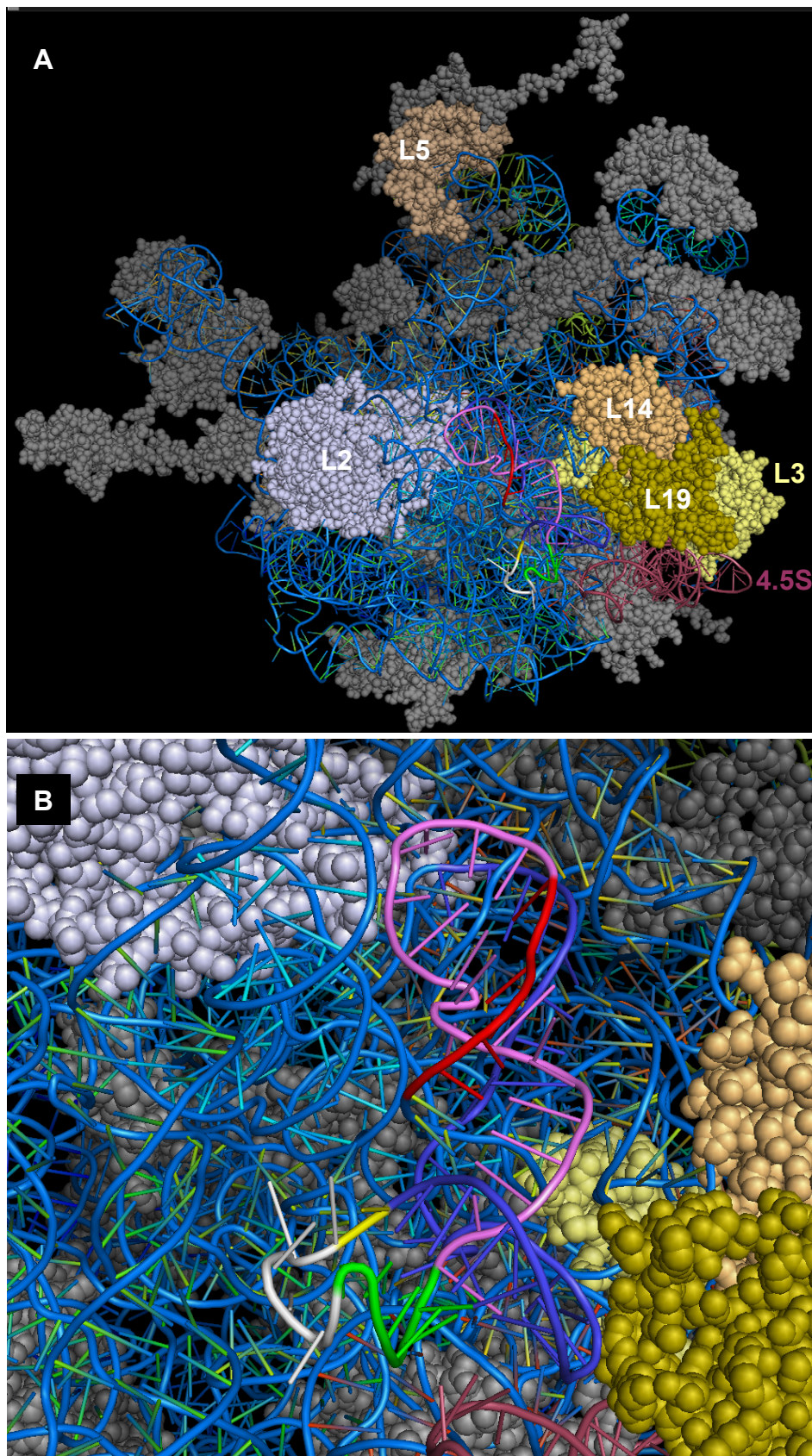
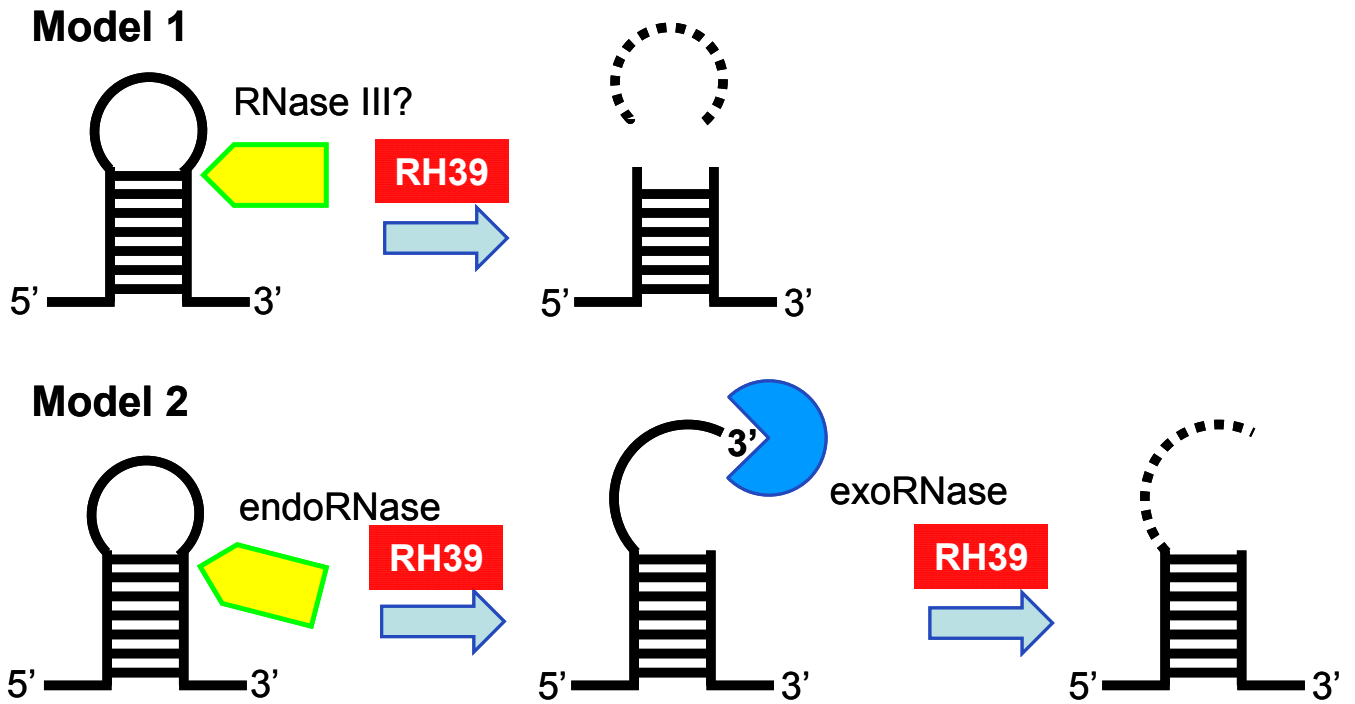


Figure 34. RH39の結合領域とhidden break導入部位の三次元的な位置関係

A. 50Sリボソームの内側を見たときのRH39の結合部位。RH39の結合配列を赤色で示した。またhidden breakが導入されるループ部位を白色、5'側のステム部分を緑色、その5'側領域をピンク色、3'側ステムとその下流の配列を群青色、RNAの切断反応が起これられるA1756塩基を黄色でそれぞれ示した。さらに4.5Sと5Sの各rRNA、及び代表的なリボソームタンパク質であるL2、L3、L5、L14、L19を色分けした。

B. Hidden break導入部位近傍の拡大図。RH39の結合部位とA1756を含むhidden break導入部位の3'側配列は立体的に非常に近接している。

A



B

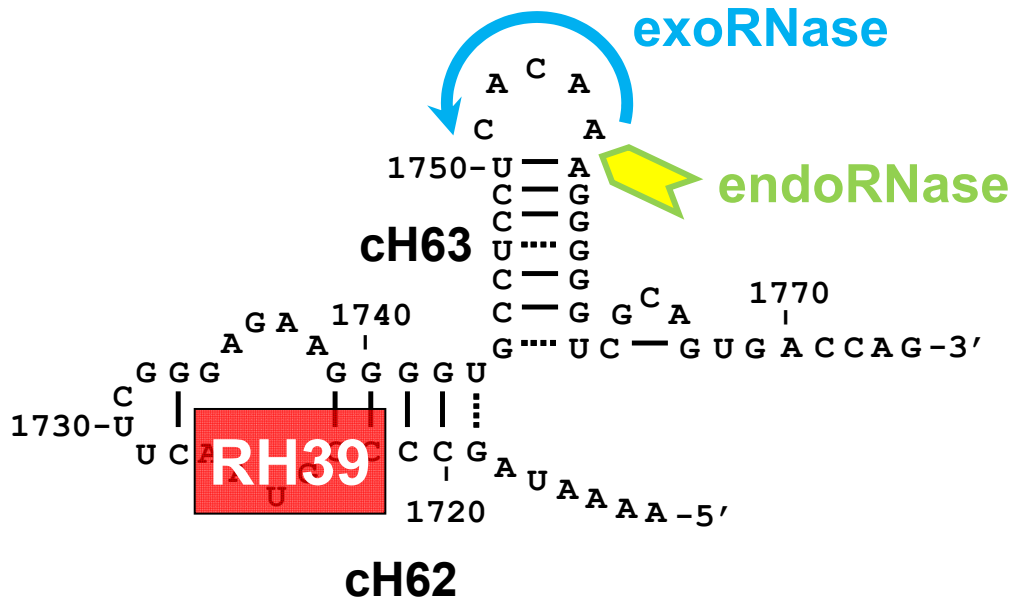


Figure 35. 植物葉緑体におけるRH39依存的な23S rRNAのhidden break導入モデル

A. 2つのHidden break導入モデル。Model 1はRH39のRNA/タンパク質複合体のリモデリング活性を利用してエンド型RNaseが適切に断片化プロセシングサイトにリクルートされることでループ部分を除去され、hidden breakが導入されるモデル。Model 2はRH39のRNA/タンパク質複合体リモデリング活性を利用して、エンド型RNaseが適切に配置されてループの根元部分をカットすることで3'突出末端が生じ、続いてexoRNaseがこの突出末端を3'→5'方向にトリミングすることでhidden breakの導入が起こるモデル。RH39はこれら2つのRNasesの片方または両方の反応を円滑に進めていると考えられる。

B. Model 2の詳細な作用機構。RH39はcH62内の配列に結合する。RH39の働きによって、未知のエンド型RNaseによるA1756の5'側での切断が促され、これにより生じた3'突出末端からエキソヌクレアーゼのRNR1が3'→5'側にループをトリミングすることでhidden breakが導入されると考えられる。

Table 1. 本論文で用いた遺伝子特異的プライマー

Gene	Sense Primer	Antisense Primer
RNA gel blot analysis		
<i>rbcL</i>	AAGTGTGGGGTTCAAAGCTG	GGCCATCTAATTTATCGATGGT
<i>psbA</i>	TGATGATCCCTACCTTATTGACC	GTTACCAAGGAACCATGCATAG
<i>psbD</i>	AATTAGGTGGTCTATGGGCTTT	ACTACTCCAAGAGCACTCATC
<i>psaA</i>	ACACAACGTGCATTGTTACACAC	GCTACGAGCAAATAGAACACCT
<i>petB</i>	ATTGTCTAGGCGGAATTACCC	CCAGAAATACCTTGCTTACGTATC
16S	GCGTTATCCGGAATGATTGGG	GCGGGATACTTAACGCGTTAG
23S Full length	TTCAAACGAGGAAAGGCTTACGGTG	AGGAGAGCACTCATCTTGGGGTGG
23S Probe 1	CGAGGAAAGGCTTACGGTGGATAC	AAGATGTTTCAGTTCGCCAGGTTG
23S Probe 2	CCTGTACTACCCTTGTTGGTC	CCTGTCATCAGGTCACCAACT
23S Probe 3	GTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTCGG	AGGAGAGCACTCATCTTGGGGTGG
4.5S	GACGAGCCGTTTATCATTACGATAG	TTCAAGTCTACCGGTCTGTTAGG
5S	TTCTGGTGTCTAGGCGTAGAGGAA	TTTCCGCAGGACCTCCCCTACA
<i>RbcS</i>	ATGGCTTCCTCTATGCTCT	TGTCGAATCCGATGATCCT
<i>PetC</i>	AAGCTTGAGACCATAACCCTT	CACAACACATCCAAGATGAGTG
<i>AtpC</i>	TCCTTATCATTCCGATCTGTTCTC	TCTTTAGCCGTAGGTAAAGTTCC
mit 18S	GCCCTTATGGGCTGGGCCACAC	GGATTCAATCCAGCCACAGGTTG
mit 26S	GTACACGAAAGTGACGAAGTTGCTTTG	GGTCAGTTCACCGGGAGGATCGC
mit 5S	AAACCGGGCACTACGGTGAGAC	TCACCGGGCTTGGACCATGTC
T-DNA insertion		
<i>RH3</i>	GAAGAGAGCTGTGTTGGTACCTG	AAGGCAAGCATAGGAAAGCGT
<i>RH9</i>	GATGTTGCTGCCCGTGGACTT	GCCTGAACCAAAGCTTCCGAAAC
<i>RH22</i>	TGGTGTCTTTGTTTGCACTGA	CTCTTCCTGCTGAATGCAGTT
<i>RH26</i>	GAAAACACTTCTGGATTCGCAA	TGACACATCAGGGTAATCCAC
<i>RH31</i>	ACTGTTGTTTCAAGGAAGCTACT	TCTCGTACCTCCAATCACAAC
<i>RH33</i>	GTCTTGATATCTCCTTTGACGCTT	TGTACATCAGTGATGTTACCATAACC
<i>RH37</i>	TAGCTCTTGATGAGGCCGATAG	TCAGAGTCAAGGACAAACTCAAC
<i>RH39</i>	AGGGATAGAGCATTTGCGTACA	GCGATGAAGGTAGTCAATCTAAGG
<i>RH58</i>	GTCACATGCTAGAAAAGCACA	GCTTGTTTGTCTTCTCACACA
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	
LB3	TAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGATACAC	

Table.2 DEAD-box ファミリータンパク質の *in silico* 局在予測と解析に用いた T-DNA 挿入ライン

RH	AGI	germplasm	ChloroPI	PSORT	mitoplast	PCLR	Predotar	PSORT	TargetP
1	At4g15850		-	-	0.0742	not Chl	-	cytoplasm	0.032
2	At3g19760		-	-	0.0896	not Chl	-	cytoplasm	0.052
3	At5g26742	SALK_024866	Chl	Chl	0.2684	Chl	Chl	cytoplasm	0.969
4	At3g13920		-	-	0.0576	not Chl	-	cytoplasm	0.146
5	At1g31970		-	-	0.0029	not Chl	-	Nuc	0.35
6	At2g45810	SAIL_849_H06	Chl	-	0.0158	Chl	-	cytoplasm	0.242
7	At5g62190		-	-	0.0474	not Chl	-	Nuc	0.075
8	At4g00660		-	-	0.1906	not Chl	-	cytoplasm	0.043
9	At3g22310	SALK_035421C	Chl	Mit	0.9552	Chl	Mit	Mit	0.771
10	At5g60990		-	-	0.0822	not Chl	-	Nuc	0.171
11	At3g58510	none	-	-	0.0529	Chl	-	microbody	0.722
12	At3g61240		-	-	0.0418	not Chl	-	cytoplasm	0.045
13	At3g16840		-	-	0.0198	not Chl	-	Nuc	0.229
14	At3g01540		-	-	0.375	not Chl	-	Nuc	0.093
15	At5g11170		-	-	0.0018	not Chl	-	cytoplasm	0.109
16	At4g34910		-	-	0.0781	not Chl	-	Nuc	0.091
17	At2g40700	SALK_076414	-	-	0.3127	not Chl	-	Nuc	0.353
18	At5g05450		-	-	0.2618	not Chl	-	Nuc	0.082
19	At1g54270		-	-	0.0873	not Chl	-	cytoplasm	0.139
20	At1g55150		-	-	0.4479	not Chl	-	Mit	0.087
21	At2g33730		-	-	0.548	not Chl	-	Nuc	0.588
22	At1g59990	SALK_032399	Chl	Mit	0.6898	Chl	Chl	Mit>Chl	0.804
23	At1g72730		-	-	0.0393	not Chl	-	cytoplasm	0.117
24	At2g47330		-	Mit	0.1722	not Chl	-	Nuc	0.162
25	At5g08620		-	-	0.0117	not Chl	-	microbody	0.226
26	At5g08610	SAIL_1260_H03	Chl	Mit	0.9128	Chl	Mit	Nuc>Mit	0.413
27	At5g65900		-	-	0.0056	not Chl	-	Nuc	0.169
28	At4g16630		-	-	0.0435	not Chl	-	Nuc	0.118
29	At1g77050		-	-	0.0341	not Chl	-	Nuc	0.081
30	At5g63120	NA	-	-	0.3183	Chl	-	microbody	0.109
31	At5g63630	SALK_090068	Chl	Mit	0.6257	Chl	Mit	cytoplasm	0.327
32	At5g54910		-	-	0.3471	not Chl	-	Nuc	0.08
33	At2g07750	SALK_119725	Chl	Mit	0.9959	Chl	Chl	Mit	0.902
34	At1g51380		-	-	0.0067	not Chl	-	cytoplasm	0.033
35	At5g51280		-	-	0.0703	not Chl	-	cytoplasm	0.131
36	At1g16280		-	-	0.0167	not Chl	-	Nuc	0.206
37	At2g42520	SALK_017310	Chl	-	0.0097	Chl	-	Chl	0.956
38	At3g53110	NA	-	-	0.1785	not Chl	-	Chl	0.384
39	At4g09730	SALK_090774	Chl	Mit	0.9851	Chl	Mit	Mit/Nuc	0.284
40	At3g06480		-	-	0.1197	not Chl	-	Nuc	0.175
41	At3g02065		-	-	0.0048	not Chl	-	Nuc	0.115
42	At1g20920		-	-	0.0336	not Chl	-	Nuc	0.078
43	At4g33370		-	-	0.0243	not Chl	-	Plasma	0.211
44	At1g28180		-	-	0.3373	not Chl	-	Nuc	0.124
45	At3g09620		-	-	0.0177	not Chl	-	Nuc	0.299
46	At5g14610		-	-	0.1441	not Chl	-	Nuc	0.187
47	At1g12770		-	Mit	0.9253	not Chl	Mit	Mit	0.099
48	At1g63250		-	-	0.9665	not Chl	Mit	Mit	0.125
49	At1g71370		-	-	0.2197	not Chl	-	Nuc/ER	0.182
50	At3g06980	NA	Chl	Chl	0.8651	not Chl	Mit	cyt	0.46
51	At3g18600		-	-	0.2501	not Chl	-	cyt/Mit	0.147
52	At3g58570	NA	-	-	0.0316	Chl	-	Micro/Chl	0.776
53	At3g22330		-	Mit	0.9822	not Chl	Mit	Mit	0.098
54									
55	At1g71280		-	-	0.1283	not Chl	-	Nuc/ER	0.207
56	At5g11200		-	-	0.0018	not Chl	-	cyt>micro>Mit	0.109
57	At3g09720		-	Mit	0.0444	not Chl	-	Nuc>mic>Mit	0.125
58	At5g19210	SAIL_726_D10	Chl	Chl	0.8332	Chl	Chl	Nuc/Chl	0.678

シロイヌナズナのDEAD-boxタンパク質は全部で57個存在する。RH54が欠番であるため最後にRH58となっている。ウェブ上で一般公開されている7つの局在予測ツールのうち、どれか1つのサイトにおいて葉緑体局在が予測されたものをグリーンで、ミトコンドリアに予測されたものをピンクでそれぞれ示した。また解析に用いた遺伝子破壊株を黄色で示した。NA, not analyzed

Table 3. *nara* 変異体のRuBisCO量、活性、活性化率

line	amount ^a	initial activity	total activity	activation state ^b
	% of Control	nmol CO ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein		% activation
Col-0	100	155 ± 25	378 ± 17	41.2 ± 8.7
<i>rca</i>	NA	76.8 ± 2.2	372 ± 20	20.7 ± 1.6
<i>nara9</i>	40.3 ± 1.8	110 ± 17	196 ± 45	57.0 ± 4.5
<i>nara10</i>	57.9 ± 1.8	97.0 ± 9.2	244 ± 28	39.7 ± 3.5
<i>nara11</i>	39.3 ± 1.5	73.1 ± 12.6	252 ± 39	29.4 ± 6.0
<i>nara12</i>	17.6 ± 0.3	73.5 ± 5.1	88.4 ± 6.6	83.5 ± 9.4

^aNative PAGEにより可溶性タンパク質を分画した後、RuBisCOホロ酵素をCBB染色により検出した。RuBisCO量は、ホロ酵素のバンド強度を定量し、野生株との相対値として百分率換算した。NA, not analyzed

^b初期活性/総活性の百分率として算出した。

Table 4. ATTED-II*を用いたRH39遺伝子と協調して発現する遺伝子の検索結果

correl	locus	target**	function ((alias))
0.820	At3g17170	(Chl,Chl)	ribosomal protein S6 family protein (RFC3)
0.817	At2g39670	(Chl,Chl)	radical SAM domain-containing protein
0.814	At2g33430	Chl	plastid developmental protein DAG, putative
0.812	At1g69200	Chl	pfkB-type carbohydrate kinase family protein (PFKB1)***
0.806	At1g59990	Chl	DEAD/DEAH box helicase, putative (RH22)
0.802	At1g79560	Chl	FtsH protease (FtsH12)
0.789	At3g03710	Chl	3'-5' exoribonuclease RIF10
0.789	At3g10270	Chl	DNA topoisomerase, ATP-hydrolyzing, putative / DNA topoisomerase II, putative / DNA gyrase, putative (GyrB)***
0.787	At1g10522	Chl	expressed protein
0.787	At4g31210	(Chl,Chl)	DNA topoisomerase family protein
0.782	At5g08610	Chl	DEAD box RNA helicase (RH26)

* ATTED-II は以下のリンクから無料で利用可能である (<http://www.atted.bio.titech.ac.jp/>)。

** 実験的に葉緑体局在が明らかなものはChlと記載し、そうでないものはTargetPとWoLF PSORTを用いて予測し、()内に記した。

*** pTAC 画分のMS解析 (Pfalz et al., 2006) により同定された因子を赤色で記した。