

学籍番号：1181028

*Flaveria* 属植物の C<sub>4</sub> 型光合成における  
光合成電子伝達反応によるエネルギー生産調節機構の解明

中村 有哉  
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・形態形成学研究室  
(横田 明穂 教授)

平成 26 年 3 月 12 日提出



所属 (主指導教員)	分化・形態形成学研究室 (横田 明穂 教授)		
氏名	中村 有哉	提出	平成 25 年 12 月 17 日
題目	<i>Flaveria</i> 属植物の C <sub>4</sub> 型光合成における 光合成電子伝達反応によるエネルギー生産調節機構の解明		

要旨

C<sub>4</sub> 型光合成は Calvin-Benson 回路と CO<sub>2</sub> 濃縮機構である C<sub>4</sub> 回路が統合した光合成様式であり、その炭素同化代謝は葉肉細胞と維管束鞘細胞間で協調的に行われている。C<sub>4</sub> 回路の駆動は、葉内 CO<sub>2</sub> 濃度が低下する環境での高い CO<sub>2</sub> 固定効率をもたらす。しかしながら、C<sub>4</sub> 型光合成を行う C<sub>4</sub> 植物は、C<sub>4</sub> 回路を有さない C<sub>3</sub> 型光合成を行う C<sub>3</sub> 植物に比べて、C<sub>4</sub> 回路の駆動のために、光合成反応においてより多く ATP を生産することを求められる。炭素同化代謝とそれに必要なエネルギー生産のバランスの不均衡は、光合成反応効率の低下のみならず、植物に酸化ストレスなどの深刻な障害を引き起こす。従って、両者間のバランスの制御は非常に重要であるが、C<sub>4</sub> 植物が C<sub>4</sub> 回路の駆動による ATP 要求量の増加をどのように解決しているかは明らかになっていない。

光合成において、炭素同化代謝に必要な ATP と NADPH は直鎖型電子伝達系と光化学系 I 循環型電子伝達系によって生産される。C<sub>3</sub> 植物では、循環型電子伝達系はチラコイド膜内外の ΔpH 形成を介して ATP 合成に寄与していることが示されており、chloroplast NADH dehydrogenase-like (NDH) 複合体が関わる経路と PROTON GRADIENT REGULATION (PGR)5/PGR5-Like (PGRL)1 複合体が関与する経路の 2 経路から成る。本研究で、私は光化学系 I 循環型電子伝達系が C<sub>4</sub> 回路の駆動のために必要となった ATP の生産に関与しているのではないかと推察して、C<sub>4</sub> 型光合成における光化学系 I 循環型電子伝達系の生理機能を解明することを目的とした。

*Flaveria* 属は、同属内に C<sub>3</sub> 種と C<sub>4</sub> 種に加えて C<sub>3</sub> 型光合成と C<sub>4</sub> 型光合成の中間の性質を示す C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種や光合成様式が C<sub>4</sub> 植物に近い C<sub>4</sub>-like 種を持つ。初めに、私は *Flaveria* C<sub>3</sub> 種、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種、C<sub>4</sub>-like 種そして C<sub>4</sub> 種からそれぞれ 2 つの種の計 8 種を使用して、C<sub>4</sub> 回路の駆動による炭素同化代謝に必要なエネルギー要求量の変化にตอบสนองして、光化学系 I 循環型電子伝達系の電子伝達活性が上昇しているのかを調査した。NDH 複合体のサブユニットである NDH-H タンパク質発現量は、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種から C<sub>4</sub> 種にかけて、C<sub>4</sub> 回路に関連する酵素タンパク質の発現増加に起因する C<sub>4</sub> 回路の構築度合いに従って維管束鞘細胞で増加していた。一方で、PGR5 と PGRL1 タンパク質は、C<sub>4</sub> 回路が実際に光合成反応で機能している C<sub>4</sub>-like *F. palmeri* と C<sub>4</sub> 種において葉肉細胞と維管束鞘細胞で発現増加していた。近赤外光照射による光化学系 I 反応中心 P700 の酸化速度から循環型電子伝達活性を見積もったとこ

ろ、循環型電子伝達活性はC<sub>3</sub>種と比較してC<sub>4</sub>種で上昇していた。また、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種とC<sub>4</sub>-like種の循環型電子伝達活性はC<sub>3</sub>種と比較してNDH-H、PGR5そしてPGRL1タンパク質の発現増加に伴って上昇していた。以上の結果から、循環型電子伝達系はC<sub>4</sub>回路の駆動による炭素同化代謝に必要なエネルギー要求量の変化に応答し、亢進していることが明らかになった。また、C<sub>4</sub>型光合成進化において、PGR5/PGRL1依存経路は、C<sub>4</sub>回路が完成されたC<sub>4</sub>-like *F. palmeri* とC<sub>4</sub>種でC<sub>4</sub>回路の駆動に必要なATP生産に関与している一方で、NDH依存経路はそれに加えてC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種でC<sub>4</sub>回路関連代謝酵素の発現増加に伴った葉緑体内の酸化還元バランスの調節にも関与していると考えられる。

次に、C<sub>4</sub>型光合成における循環型電子伝達系の生理機能を解明しようと考えた。C<sub>3</sub>植物では、PGR5/PGRL1依存経路が循環型電子伝達系の主経路であるとされている。そこで、形質転換方法が確立されている *Flaveria* C<sub>4</sub>種の *F. bidentis* へPGR5/PGRL1依存経路に関与するPGR5とPGRL1遺伝子をそれぞれ標的としたRNA interference (RNAi)コンストラクトを導入した。PGRL1-RNAi株では、PGRL1タンパク質と共にPGR5タンパク質はウエスタンブロットの検出限界以下まで減少していた。一方、PGR5-RNAi株では、PGR5タンパク質はウエスタンブロットの検出限界以下まで減少しており、PGRL1タンパク質量も野生型の蓄積量の5%程度に減少していた。単離チラコイド膜を用いて循環型電子伝達活性を測定したところ、PGRL1-RNAi株とPGR5-RNAi株のPGR5/PGRL1依存経路の電子伝達活性は完全に抑制されていた。光合成活性に対するPGR5/PGRL1依存経路の抑制の影響を調査するため、CO<sub>2</sub>濃度依存的な光合成活性測定を行った。その結果、WTと比較してPGRL1-RNAi株では、高CO<sub>2</sub>濃度(400-1500 μL L<sup>-1</sup>)における光合成活性が30%低下しており、またPGR5-RNAi株においても光合成活性が25%低下していた。高CO<sub>2</sub>濃度における光合成活性値はC<sub>4</sub>回路のphosphoenolpyruvateの再生速度およびCalvin-Benson回路のribulose-1,5-bisphosphateの再生速度に依存することが知られている。そして、その代謝反応にはATPが必要である。このことから、両RNAi株ではATP量の不足によりATPを必要とする代謝ステップが律速することで光合成活性が低下しており、PGR5/PGRL1依存経路が炭素同化代謝のためのATP生産に関与することが示唆された。C<sub>3</sub>植物では、PGR5/PGRL1依存経路の欠損は光化学系Iの光障害を引き起こし、結果として直鎖型電子伝達系によるATPとNADPHの生産が抑制される。そのため、PGR5/PGRL1依存経路が直接に炭素同化代謝へ影響するのか、それとも副次的な要因が影響するのかはこれまで判然としていなかった。しかしながら、今回、PGRL1-RNAi株では、光化学系Iの光障害は見受けられなかった。従って、PGR5/PGRL1依存経路の抑制によるATP生産量の低下が、PGRL1-RNAi株で見られた光合成活性の低下の直接の原因であると考えられる。

本研究によって、光化学系I循環型電子伝達系はC<sub>4</sub>回路の駆動による炭素同化代謝に必要なエネルギー要求量の増加に応答して活性上昇していること、PGR5/PGRL1依存経路の抑制は炭素同化代謝に直接に影響を及ぼすことが明らかになった。また、光化学系I循環型電子伝達系のうち少なくともPGR5/PGRL1依存の循環型電子伝達系はC<sub>4</sub>型光合成における炭素同化代謝とエネルギー生産の調整に関わる重要なものであることが明らかになった。

# 目次

## 第 1 章 緒論

## 第 2 章

*Flaveria* 属植物を用いた C<sub>4</sub> 型光合成進化における C<sub>4</sub> 回路の構築に伴う ATP 要求量の変化に対する光化学系 I 循環型電子伝達活性の応答

2-1. 序論

2-2. 材料と方法

2-3. 結果

2-4. 考察

## 第 3 章

*F. bidentis* *PGRL1* および *PGR5* 発現抑制株を用いた C<sub>4</sub> 型光合成における *PGR5*/*PGRL1* 依存的な光化学系 I 循環型電子伝達系の生理機能の解析

3-1. 序論

3-2. 材料と方法

3-3. 結果

3-4. 考察

## 第 4 章 総括

謝辞

参考文献

論文目録

図表



# 第 1 章

## 緒論

光合成は、光エネルギーを利用して有機化合物を合成することであり、地球生態系において生物の生命活動に必要な不可欠な物質を生産する極めて重要な化学反応である。その過程は、光エネルギーから ATP や NADPH といった化学エネルギーを合成する光合成電子伝達反応と、その化学エネルギーを利用して  $\text{CO}_2$  を有機物として固定する炭酸固定経路の Calvin-Benson 回路から成る (Eberhard et al., 2008)。地球上の陸地で光合成を行う陸上植物の内、被子植物は現在約 250,000 種存在しているが、それらは光合成反応の様式によって分類することができる。被子植物の 90 % 以上の種は  $\text{C}_3$  植物と呼ばれており、主要な作物としてイネやコムギがこれに含まれる。一方で、 $\text{C}_4$  植物と呼ばれているグループには身近な作物としてトウモロコシやサトウキビなどが含まれるが、 $\text{C}_4$  植物に分類される種は被子植物の 3 % にしか満たない (Sage, 2004)。しかしながら、 $\text{C}_4$  植物は  $\text{C}_3$  植物と比べて高温、乾燥地帯で高い光合成速度と生産能力を有し、 $\text{C}_4$  植物の光合成反応による有機物生産量は地球上で行われている光合成による総有機物生産量 (生態学分野では総一次生産量と呼ばれる) の実に 23 % を占めている (Lloyd and Farquhar, 1994; Brown, 1999; Sage, 2004)。この生産性の高さは、 $\text{C}_4$  植物が、 $\text{C}_3$  植物において光合成能力を制限している要因を解消するための  $\text{C}_4$  回路と呼ばれる炭素代謝経路を有していることに起因する。

$\text{C}_3$  植物は、炭酸固定経路において  $\text{CO}_2$  を固定して 3 炭素化合物を合成する  $\text{C}_3$  型光合成を行っている。 $\text{C}_3$  型光合成では、大気  $\text{CO}_2$  は、葉肉細胞葉緑体で、Calvin-Benson 回路の初発反応を担う Ribulose 1, 5-bisphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase (RuBisCO) によって RuBP に固定され、2 分子の 3-Phosphoglycerate (3-PGA) が生産される (Fig. 1)。3-PGA はその後、ATP によるリン酸化を受けた後、NADPH によって還元され、光合成初期産物糖であるトリオースリン酸を生じる。そのトリオースリン酸の一部はスクロースやデンプンの合成に利用され、残りは RuBP の再生反応に利用される。 $\text{C}_3$  型光合成において、その  $\text{CO}_2$  固定効率を制限している要因の一つに RuBisCO の酵素的性質が挙げられる (Farquhar et al., 1980; von Caemmerer, 2013)。RuBisCO は  $\text{CO}_2$  を固定するカルボキシラーゼ反応の他に、 $\text{O}_2$  を RuBP に固定するオキシゲナーゼ反応も触媒する。オキシゲナーゼ反応は、反応

産物として 3-PGA と 2-ホスホグリコール酸を 1 分子ずつ生産する。2 分子の 2-ホスホグリコール酸は光呼吸経路によって 1 分子の 3-PGA として Calvin-Benson 回路へ供給されるが、その過程でミトコンドリアにおいて 1 分子の  $\text{CO}_2$  が放出されてしまう。そのため、RuBisCO オキシゲナーゼ反応は、光合成の  $\text{CO}_2$  固定効率を低下させる原因となる。カルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応は RuBisCO の同一の触媒部位を利用して行われるため、両反応は競合関係にある(Ogren, 2003)。現在の大気条件は  $\text{CO}_2$  分圧(0.04 %  $\text{CO}_2$ )よりも  $\text{O}_2$  分圧(20.9%  $\text{O}_2$ )の方が高く、また大気と平衡状態にある 25 °C の溶液中の溶存  $\text{CO}_2$  濃度は 12  $\mu\text{M}$  であるのに対して溶存  $\text{O}_2$  濃度は 240  $\mu\text{M}$  であるため、カルボキシラーゼ反応 2 回あたり 1 回のオキシゲナーゼ反応が起こる。この両反応が起こる比率は、植物の環境に大きく左右される。例えば、乾燥環境では、植物は水分の蒸散を防ぐために気孔を閉鎖しようとするが、これは同時に葉内への  $\text{CO}_2$  流入量の低下を招き、葉内の  $[\text{CO}_2]/[\text{O}_2]$  率は低下する。また、高温環境においても、 $\text{CO}_2$  と  $\text{O}_2$  の水に対する溶解度の温度依存性の違いから、葉内の  $[\text{CO}_2]/[\text{O}_2]$  率は低下する。これらの葉内  $\text{CO}_2$  濃度が低下する環境ではオキシゲナーゼ反応が起こりやすくなり、 $\text{C}_3$  植物は Calvin-Benson 回路で固定した  $\text{CO}_2$  量の約 40 % を損失してしまう(Sage, 2004)。これに起因して、 $\text{C}_3$  植物は地球上の高緯度地帯の温暖湿潤な環境に広く分布している一方で、高温、乾燥環境の低緯度地帯ではほとんど見られない(Edward et al., 2010)。その RuBisCO が抱える酵素的性質の問題を打破し、 $\text{C}_3$  植物が自生するのに難しい高温、乾燥環境地帯に分布しているのが  $\text{C}_4$  植物である。

$\text{C}_4$ 植物は現在66系統に約7500種存在するが、それらは約3000万年から500万年前の間に複数の祖先 $\text{C}_3$ 植物から個別に進化したとされている(Sage et al., 2012)。 $\text{C}_4$ 植物が発生した当時の地球環境は、温暖湿潤な気候から寒冷でやや乾燥した気候への変化に伴い、大気 $\text{CO}_2$ 濃度が1000  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ から200  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ へ低下していた(Zachos et al., 2008)。その低い大気 $\text{CO}_2$ 濃度に適応するために $\text{C}_4$ 植物は、RuBisCOに高濃度の $\text{CO}_2$ を供給するための $\text{CO}_2$ 濃縮機構である $\text{C}_4$ 回路と、それを駆動するための葉緑体が発達した維管束鞘細胞を進化上獲得したと考えられている(Tipple and Pagani, 2007)。 $\text{C}_4$ 植物が行う $\text{C}_4$ 型光合成では、大気 $\text{CO}_2$ は葉肉細胞で初めにPhosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase (PEPC)によって固定され、4炭素化合物であるオキサロ酢酸が合成される(Fig. 2)。オキサロ酢酸は次に、より安定な $\text{C}_4$ 酸であるリンゴ酸若しくはアスパラギン酸へ置換され、隣接する維管束鞘細胞へ拡散する。ここで、 $\text{C}_4$ 酸は $\text{C}_4$ 植物の種類によって、NADP-malic enzyme (ME)、NAD-ME、PEP carboxykinaseの3種類の脱炭酸酵素のうちのどれか1つによって脱炭酸され、



C<sub>3</sub>酸のピルビン酸とCO<sub>2</sub>が生産される。CO<sub>2</sub>は維管束鞘細胞に局在するRuBisCOにより再固定され、Calvin-Benson回路が駆動される。一方、ピルビン酸は葉肉細胞へ拡散して戻り、葉緑体内でPyruvate orthophosphate dikinase (PPDK)によりPEPに再生される(Hatch, 1987; Sage, 1999)。このC<sub>4</sub>回路は、葉内CO<sub>2</sub>濃度が低下する乾燥、高温環境においてRuBisCOが局在する維管束鞘細胞内のCO<sub>2</sub>濃度を高く保つことができるため、RuBisCOオキシゲナーゼ反応は大きく抑制される。そのため、RuBisCOは高いCO<sub>2</sub>固定効率を発揮することができる。また、C<sub>4</sub>回路は気孔を閉じて蒸散量を最小限にした状態においても光合成を行うのに十分な量のCO<sub>2</sub>を光合成組織に供給できるため、C<sub>4</sub>植物はC<sub>3</sub>植物に比べて水分利用効率が高い(Long, 1999)。これらのC<sub>4</sub>回路による効果が、乾燥、高温環境におけるC<sub>4</sub>植物の高い光合成活性をもたらしている。しかしながら、そのC<sub>4</sub>回路の駆動はATPを必要とする。C<sub>3</sub>型光合成では、Calvin-Benson回路で1分子のCO<sub>2</sub>を固定するのに3分子のATPと2分子のNADPHを消費するのに対して、C<sub>4</sub>型光合成ではCalvin-Benson回路に加えてC<sub>4</sub>回路で1分子のCO<sub>2</sub>を固定するのに2分子のATPを必要とするので、全体で5分子のATPと2分子のNADPHを消費する(Kanai and Edward, 1999)。そのため、C<sub>4</sub>植物はC<sub>4</sub>回路を有さないC<sub>3</sub>植物に比べて、C<sub>4</sub>回路を駆動するために、光合成反応においてより多くATPを生産することを求められる。

光合成反応において、炭酸固定経路で消費されるATPとNADPHは光合成電子伝達反応によって生産される。その光合成電子伝達反応によるATPとNADPH合成の大部分を担っているのが、直鎖型電子伝達系である(Fig. 3)。直鎖型電子伝達系では、光エネルギーは光化学系IIと光化学系Iという2つのタンパク質複合体に結合している集光クロロフィルによって吸収される。吸収された光エネルギーによって光化学系IIで水の酸化分解反応が起こり、電子が引き抜かれる。電子はその後光化学系IIからプラストキノン、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体、プラストシアニン、光化学系Iそしてフェレドキシンへと伝達され、最終的に還元力であるNADPHが生産される。また、2つの光化学系の間にあるシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体ではQサイクルも機能し、電子伝達が行われると同時にストロマからチラコイドルーメンへのプロトンの輸送も行われている。光化学系IIの水酸化分解反応とシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体におけるプラストキノールの酸化に伴うプロトン輸送によって、チラコイド膜内外のプロトン濃度勾配( $\Delta$ pH)が形成される。この $\Delta$ pHを駆動力にしてATP合成酵素がATPを合成する。直鎖型電子伝達系による電子伝達反応で生産されるATP量とNADPH量の比(ATP/NADPH率)は1.29だとされている(Seelert et al., 2000; Allen, 2002; Allen, 2003)。これに対して、C<sub>3</sub>型光合成ではCalvin-Benson回路で1分子のCO<sub>2</sub>を固定する

のに必要な ATP と NADPH 量を ATP/NADPH 率で表すと、それは 1.5 となり、またそれに加えて光呼吸経路が働いた場合 1.66 となる。一方で、C<sub>4</sub> 型光合成では Calvin-Benson 回路と C<sub>4</sub> 回路で 1 分子の CO<sub>2</sub> を固定するのに必要な ATP/NADPH 率は 2.5 となる。従って、ATP 消費量が高くなっている C<sub>4</sub> 型光合成のみならず C<sub>3</sub> 型光合成においても、直鎖型電子伝達系が機能するだけでは炭酸固定経路で必要となる ATP 量を生産できない。光合成電子伝達反応では、直鎖型電子伝達系の他に光化学系 I 循環型電子伝達系と呼ばれる電子伝達経路が機能している (Fig. 4)。光化学系 I 循環型電子伝達系は、光化学系 I の電子受容体であるフェレドキシンからプラストキノンに電子を戻してシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体を再び通過させる電子伝達反応で、 $\Delta$ pH 形成に貢献していると考えられている (Bendall and Manasse, 1995)。この電子伝達は、光化学系 I の光化学反応のみを駆動力とし、NADPH の純生産を伴わずに  $\Delta$ pH を形成させ、ATP を合成できる。また、光化学系 I 循環型電子伝達系には 2 つの独立した経路が存在することが明らかとなっている (Shikanai, 2007)。1 つめの経路は、chloroplast NADH dehydrogenase-like (NDH) 複合体がフェレドキシンからプラストキノンへの電子伝達を仲介する NDH 依存経路である。NDH 複合体は、核ゲノムと葉緑体ゲノムにそれぞれコードされた 28 のサブユニットタンパク質で構成されている (Ifuku et al., 2011; Peng et al., 2011)。もう一方の経路では、PROTON GRADIENT REGULATION (PGR)5 と PGR5-Like (PGRL)1 タンパク質から成る PGR5/PGRL1 複合体がフェレドキシンからプラストキノンへの電子伝達を仲介しており、PGR5/PGRL1 依存経路と呼ばれている (Munekage et al., 2002; DalCorso et al., 2008)。C<sub>3</sub> 植物では、直鎖型電子伝達系に加えて、この光化学系 I 循環型電子伝達系による  $\Delta$ pH 形成を通じた ATP 生産が起こることで、炭酸固定経路の駆動に必要な ATP/NADPH 率を達成していると考えられており、葉緑体で生産される総 ATP 量の 10-15 % は光化学系 I 循環型電子伝達系によって形成された  $\Delta$ pH によって生産されることが示唆されている (Allen, 2002; Allen, 2003)。興味深いことに、これまでいくつかの C<sub>4</sub> 植物で光化学系 I 循環型電子伝達活性が C<sub>3</sub> 植物と比較して上昇していることが報告されている (Herbert et al., 1990; Asada et al., 1993)。このことから、C<sub>4</sub> 植物では、光化学系 I 循環型電子伝達系がその電子伝達活性を上昇させることで ATP 生産量を増やし、炭酸固定経路で消費される ATP 量と光合成電子伝達反応で生産される ATP 量のバランスを調整している可能性が考えられた。

そこで本研究では、C<sub>4</sub> 型光合成における光化学系 I 循環型電子伝達系の生理機能を解明することを目的として、同属内に C<sub>3</sub> 種と C<sub>4</sub> 種に加えて C<sub>3</sub>

型光合成と C<sub>4</sub> 型光合成の中間の性質を示す C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種や光合成様式が C<sub>4</sub> 植物に近い C<sub>4</sub>-like 種を含む *Flaveria* 属植物を用いて解析を行った。第 2 章では、*Flaveria* 属の C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種、C<sub>4</sub>-like 種を用いて、C<sub>4</sub> 回路の構築による炭酸固定経路で必要な ATP 要求量の変化に応答した光化学系 I 循環型電子伝達系の亢進の機構を解明し、第 3 章では、*Flaveria* C<sub>4</sub> 種の *F. bidentis* を用いて、PGR5/PGRL1 依存の循環型電子伝達系に関わる PGR5 と PGRL1 遺伝子の発現抑制形質転換体をそれぞれ作成し、光化学系 I 循環型電子伝達系による ATP 生産と C<sub>4</sub> 型光合成の CO<sub>2</sub> 固定効率との関連について解析した結果を報告する。これらの解析結果から、C<sub>4</sub> 型光合成の炭酸固定経路での ATP 消費と光合成電子伝達反応による ATP 生産とのバランス調節に対して、光化学系 I 循環型電子伝達系が果たす役割とその重要性について考察した。

## 第 2 章

### *Flaveria* 属植物を用いた C<sub>4</sub> 型光合成進化における

#### C<sub>4</sub> 回路の構築に伴う ATP 要求量の変化に対する

#### 光化学系 I 循環型電子伝達活性の応答

### 2-1. 序論

C<sub>4</sub> 型光合成の炭酸固定経路は、C<sub>3</sub> 型光合成のものと比較して、C<sub>4</sub> 回路を駆動するために、1 分子の CO<sub>2</sub> を固定するあたり 2 分子の ATP をより多く必要とする (Kanai and Edwards, 1999)。また、その ATP 要求量は葉肉細胞と維管束鞘細胞間で異なっている。C<sub>4</sub> 回路の C<sub>4</sub> 酸脱炭酸酵素として NADP-ME を用いる NADP-ME 型 C<sub>4</sub> 植物では、葉肉細胞と比較して維管束鞘細胞で ATP 要求量が高くなっている (Edwards and Voznesenskaya, 2011)。一方で、C<sub>4</sub> 酸脱炭酸酵素として NAD-ME を用いる NAD-ME 型 C<sub>4</sub> 植物では、ATP 要求量は維管束鞘細胞に比べ葉肉細胞で高くなっている。これまでに、C<sub>4</sub> 植物の葉肉細胞と維管束鞘細胞間で NDH 複合体タンパク質と PGR5 タンパク質の発現解析が行われている (Kubicki et al., 1996; Takabayashi et al., 2005)。NDH 複合体のサブユニットである NDH-H タンパク質は両細胞間で ATP 要求量の高い細胞に多く蓄積しており、NADP-ME 型 C<sub>4</sub> 植物では葉肉細胞と比較して維管束鞘細胞で、NAD-ME 型 C<sub>4</sub> 植物では維管束鞘細胞と比較して葉肉細胞で NDH-H タンパク質発現量は高くなっている。これに対して、PGR5 タンパク質は、NADP-ME 型と NAD-ME 型 C<sub>4</sub> 植物で共に、どちらの細胞にも同等のレベルで発現している。そのため、C<sub>4</sub> 型光合成において炭酸固定経路で消費される ATP の生産への NDH 依存経路の関与が示唆されている。

しかしながら、C<sub>3</sub> 植物から C<sub>4</sub> 植物への進化の過程で、循環型電子伝達活性が ATP 要求量に応答してどのように活性を上昇させたのか、また NDH 複合体タンパク質やそれに加えて PGR5、PGRL1 タンパク質の発現増加が起こっているのかは明らかではない。C<sub>4</sub> 植物を含むファミリーの中には、これを調査することに適した *Flaveria* 属植物が存在する。*Flaveria* 属植物は、C<sub>4</sub> 植物を含む最も若い系統の 1 つであるとされ、約 500 万年前に C<sub>4</sub> 植物への進化が起こったと考えられている (Sage et al., 2012)。そのため、*Flaveria* 属植物には C<sub>3</sub> 種と NADP-ME 型 C<sub>4</sub> 種に加えて、C<sub>3</sub> 種と C<sub>4</sub> 種の間に進化的な中間の種で、C<sub>3</sub> 型光合成と C<sub>4</sub> 型光合成の中間の性質を示す

C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種や光合成様式がC<sub>4</sub>植物に近いC<sub>4</sub>-like種が多く含まれている。そのため、*Flaveria* 属植物はC<sub>4</sub>型光合成の進化過程を解明する研究に広く用いられている(Monson and Moore, 1989)。 *Flaveria* 属のC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種とC<sub>4</sub>-like種を用いた解析から、C<sub>4</sub>型光合成の炭酸固定経路の成立は段階的に進んだとされている(Sage et al., 2004; Gowik and Westhoff, 2010; Sage et al., 2012)。その過程は以下のように要約される(Fig. 5)。1) 維管束鞘細胞のサイズが拡大し、葉緑体の数が増える(Brown and Hattersley, 1989; Sage et al., 2013)。これは、C<sub>4</sub>回路を構築する前にまず維管束鞘細胞を、光合成を行える状態にするために必要であったと考えられている。2) 光呼吸経路の代謝改変によりグリシンシャトルと呼ばれるCO<sub>2</sub>濃縮機構が構築される(Hylton et al., 1988; von Caemmerer and Hubick, 1989; Bauwe, 2011)。グリシンシャトルはC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種で見られるCO<sub>2</sub>濃縮機構で、葉肉細胞でRuBisCO オキシゲナーゼ反応により引き起こされる光呼吸の中間代謝産物であるグリシンを維管束鞘細胞へ輸送し、維管束鞘細胞のミトコンドリアでCO<sub>2</sub>を放出させRuBisCOに再固定させることで、光呼吸によるCO<sub>2</sub>固定効率の低下を抑えている(Fig. 6)。グリシンシャトルが機能しているC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種では、維管束鞘細胞葉緑体の周囲に多くのミトコンドリアが観察される(Brown and Hattersley, 1989)。3) PEPCが葉肉細胞と維管束鞘細胞の両方で非細胞選択的に発現増加する(Ku et al., 1983; Ku et al., 1991; Engelmann et al., 2003)。ただし、NADP-MEやPPDKの発現量が低いため、この段階ではC<sub>4</sub>回路は機能しない。4)他のC<sub>4</sub>回路に関わる酵素タンパク質が葉肉細胞と維管束鞘細胞の両方で非細胞選択的に発現増加する(Ku et al., 1983)。これによって、C<sub>4</sub>回路が部分的に機能する。5) PEPCが葉肉細胞に局在化し、C<sub>4</sub>回路が構築され完全に機能する(Cheng et al., 1988; Moore et al., 1989; Ku et al., 1991)。ただし、この段階ではRuBisCOが葉肉細胞にも存在するため、その存在量に依存してRuBisCOが大気CO<sub>2</sub>の一部を直接固定している。6) RuBisCOが維管束鞘細胞に局在化し、C<sub>4</sub>型光合成の炭酸固定経路が成立する(Peisker, 1986)。また、*Flaveria* 属のC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種とC<sub>4</sub>-like種の光合成電子伝達反応と葉緑体の構造を特徴づけた報告もいくつかある。葉緑体のチラコイド膜は、グラナと呼ばれるチラコイド膜が積み重なった領域とストロマラメラと呼ばれるチラコイド膜1層から成る領域に大別される。直鎖型電子伝達系で機能する光化学系IIはグラナの領域に局在するのだが、*Flaveria* C<sub>4</sub>種が属するNADP-ME型C<sub>4</sub>植物の維管束鞘細胞葉緑体では、グラナが減少しており、それに合わせて光化学系IIの水酸化分解反応の活性が低下している(Laetsch and Price, 1971; Sheen et al., 1987; Oswald et al., 1990; Hofer et al., 1992)。これは、光化学系IIの水

酸化分解反応の際に生産される  $O_2$  を減少させることで、RuBisCO のオキシゲナーゼ反応を抑制するためだと考えられている。従って、グラナの減少を伴う光化学系 II 活性の低下は、 $C_4$  回路による  $CO_2$  濃縮の効果を大きくすることに貢献しているといえる。興味深いことに、 $C_4$  回路が構築されていない *Flaveria*  $C_3$ - $C_4$  中間種と一部の  $C_4$ -like 種の維管束鞘細胞葉緑体では、発達したグラナが観察され、光化学系 II 活性の低下も起きていない (Holaday et al., 1984; Ketchner and Sayre, 1992)。このことは、光合成電子伝達反応の様式も  $C_4$  型光合成の進化過程で、 $C_4$  回路の構築と共に変化したことを意味している。

本章では、*Flaveria*  $C_3$  種、 $C_3$ - $C_4$  中間種、 $C_4$ -like 種そして NADP-ME 型  $C_4$  種からそれぞれ 2 つの種の計 8 種を使用して、 $C_3$ - $C_4$  中間種、 $C_4$ -like 種における光化学系 I 循環型電子伝達系の機能性を調査した。そして、本研究で得られたデータと過去の炭酸固定経路に関する知見を照らし合わせることで、 $C_4$  回路の駆動による炭酸固定経路に必要な ATP 要求量の上昇に応答して、光化学系 I 循環型電子伝達系が亢進しているのかを解析した。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 植物材料と栽培条件

*Flaveria* 属 (*Asteraceae* 科) 植物の *F. trinervia* (C<sub>4</sub>), *F. bidentis* (C<sub>4</sub>), *F. palmeri* (C<sub>4</sub>-like), *F. brownii* (C<sub>4</sub>-like), *F. ramosissima* (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>), *F. anomala* (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>), *F. pringlei* (C<sub>3</sub>), *F. robusta* (C<sub>3</sub>) を土(スーパーミックス A (株式会社サカタのタネ): バーミキュライト(ニッタイ株式会社)=3:1)に播種し、人工気象器環境条件下(光強度: 200~300  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、温度 24 °C、湿度 50 %、明期/暗期: 12/12 時間)で生育させた。灌水は、ポットの土が完全に乾燥したら行い、その際に 1000 倍希釈した液体肥料ハイポネックス®; N:P:K = 6:10:5 (株式会社ハイポネックスジャパン)を与えた。実験には播種後 6~8 週間目の完全展開した第 5 葉若しくは第 6 葉を使用した。

### 2-2-2. 光化学系 I 反応中心 P700 酸化レベルの測定

酸化型 P700 は 810 nm の波長の光を吸収するため、810 nm の吸光度変化を測定することで P700 の酸化レベルを見積もることができる。P700 酸化キネティクスは、1.5~2 時間暗順化させた植物の葉に近赤外光 (720 nm, 17.2  $\text{Wm}^{-2}$ )を照射し、810 nm の吸光度変化から P700 の酸化レベルをトレースすることで計測した。810 nm の吸光度変化は、PAM 101 fluorometer (Heinz-Walz, Effeltrich, Germany) 付属の emitter-detector unit ED700DW(Heinz-Walz)を用いて測定した。P700 最大酸化レベルは、近赤外光存在下で、xenon flash light (50 ms, 1500  $\text{Wm}^{-2}$ )を照射して測定した。電子伝達阻害剤 (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea(DCMU), 2,5-Dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-denzoquinone (DBMIB), methyl viologen(MV))処理では、1 時間暗順化させた植物体の葉から切り出したリーフディスクを、各電子伝達阻害剤を添加した溶液中に沈め、20 分間アスピレーターで減圧処理することで薬剤を葉内へ浸透させた。P700 酸化キネティクスの測定法は前述と同じである。

### 2-2-3. 葉タンパク質の可溶性画分および膜画分の調製

葉サンプルは液体 N<sub>2</sub> ですりつぶし、50 mL の抽出 buffer (50 mM Tris-HCl(pH8.0), 50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 錠の Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan))に溶解させた。膜画分と可溶性画分は、20,400  $\times g$ , 4 °C, 15 min の遠心で分離した(Munekage et al., 2010)。

#### 2-2-4. グラナチラコイドとストロマチラコイドの分離

葉サンプルを Polytron homogenizer で破砕し、その後単離チラコイド膜を 100 mM Tricine/NaOH buffer(pH7.8)(10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> を含む)に溶解させ、digitonin (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA)でインキュベートした。グラナチラコイドとストロマチラコイドは、10,000 ×g, 30 min, 4 °C の遠心で分離した。(Rumeau et al., 2005)

#### 2-2-5. 葉肉細胞と維管束鞘細胞の分離

葉肉細胞と維管束鞘細胞の分離は Hofer et al. (1992)の方法を一部改変して行った。以下の操作は全て 4 °C の低温室で行った。成熟葉は 2-3 mm<sup>2</sup> の大きさに細断し、50 mL の buffer (0.4 M sorbitol, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 0.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM L-cysteine, 2 mM Na-ascorbate, 44 mM Mes-KOH(pH 6.1), 1 錠の Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics)) 中で、Waring laboratory blender を用いて 8,400 rpm、10 s の条件で破砕した。破砕液は、ナイロンメッシュ(mean pore size; 37 μM)で濾過し、濾液を葉肉細胞画分とした。ナイロンメッシュに残った残渣は、Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets を抜いた上記の buffer に移し、Waring laboratory blender を用いて 15,600 rpm、3 min の条件で再度破砕した。破砕液を再びナイロンメッシュで濾過し、ナイロンメッシュに残った残渣を buffer で洗浄して、維管束鞘細胞画分とした。

#### 2-2-6. SDS-PAGE およびウエスタンブロット

可溶性タンパク試料を 12.5 %アクリルアミドゲルに、膜タンパク試料を 15 %アクリルアミドゲルに、それぞれアプライし、120 V の定電圧で 120 分間電気泳動した。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。SDS-PAGE で展開した膜タンパク質はブロッキング装置を用いて、Poly Vinylidene DiFluoride membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)に転写した。一次抗体処理は、抗 NDH-H 抗体(Horvath et al., 2000) を 3000 倍、抗 PGR5 抗体(Munekage et al., 2002)を 5000 倍、抗 PGRL1 抗体を 70 倍、抗 PsbO 抗体を 10000 倍、抗 PsaC 抗体を 10000 倍、抗 rbcL 抗体(Ogawa et al., 2009)を 3000 倍、抗 PEPC 抗体を 10000 倍、抗 Rieske 抗体(Sanda et al., 2011) を 50000 倍、抗 LHCb1 抗体と抗 AtpE 抗体を 10000 倍に希釈して用いた。二次抗体は Anti-IgG(H+L), Rabbit, Goat-Poly, HRP(Funakoshi Co., Ltd. Tokyo, Japan)を 50000 倍希釈して用いた。その後、membrane を発色液(ECL-PLUS, GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan)により反応後、LAS-4000UV mini



Win(FUJIFILM, Tokyo, Japan)によって検出した。その後、画像解析ソフト Multi Gauge ver.3.2.(FUJIFILM)を用いて、タンパク発現量の定量化を行った。

### 2-2-7. 免疫染色

成熟葉のサンプルは、固定 buffer (4 % (w/v) Paraformaldehyde, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM Pipes-NaOH (pH 7.2), 50 % (w/v) ethanol)を用いて、4 °C, 一晚で固定した。固定したサンプルは、エタノールシリーズで脱水し、t-butyl alcohol で透徹し、最後に Paraplast X-TRA (Sigma-Aldrich)に包埋した。包埋したサンプルから、ロータリーミクロトーム HM325(Carl Zeiss Japan, Tokyo, Japan)を使用して 10  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。組織染色は 1% トルイジンブルーO 溶液で行い、組織形態の観察は実体顕微鏡(Model Axiostar plus; Carl Zeiss)で行った。免疫染色では、切片を Blocking buffer( Tris-Buffered Saline (TBS), 0.1 % (w/v) Tween 20, 10 % (w/v) bovine serum albumin)でインキュベートした後、一次抗体として感作前血清抗体、抗 PEPC 抗体、抗 rbcL 抗体、抗 PGR5 抗体、抗 NDH-H 抗体で抗体反応させた。その後、二次抗体の anti-rabbit-IgG-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (Sigma-Aldrich)を用いて発色した。FITC 蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡(Model FV-1000; Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。

### 2-2-8. クロロフィル蛍光測定

クロロフィル蛍光パラメータは MINI-PAM portable chlorophyll fluorometer (Heinz-Walz)を用いて、1.5~2 時間暗順化させた植物の葉で測定した。測定光(655 nm, 0.1  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )を照射することで最小クロロフィル蛍光( $F_0$ )を測定した。最大クロロフィル蛍光( $F_m$ )は、飽和光(800 ms, 3000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )を照射して測定した。光合成中の定常クロロフィル蛍光は光合成誘導光(53  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )照射下で測定した。光化学系 II の最大量子収率( $F_v/F_m$ )は、 $(F_m - F_0)/F_m$  の式から求めた。

### 2-2-9. 透過型電子顕微鏡を用いたチラコイド膜の観察

試料の作製は、バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座の岩野恵助教、永井里奈博士に依頼した。植物葉は、固定液(0.1 M PBS(pH7.2), 70 % (w/v) グルタルアルデヒド、1 M  $\text{CaCl}_2$ )で 2 時間固定した後、エタノールシリーズで脱水し、プロピレンオキシドに置換した。そして、spurr 樹脂に浸透させ、包埋した。切片は 70 nm に切り出した。葉緑体構造の観察は、透過型電子顕微鏡(H-7100, HITACHI, Tokyo, Japan)で行った。チラコイド膜の長

さは、Image analysis software (WinROOF; Mitani Co., Tokyo, Japan)を用いて測定した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. *Flaveria* C<sub>3</sub>種, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種, C<sub>4</sub>-like種, C<sub>4</sub>種の光化学系 I 循環型電子伝達活性

*Flaveria* C<sub>3</sub>種から C<sub>4</sub>種への代謝転換に伴う光化学系 I 循環型電子伝達系の電子伝達活性の変化を調べるため、各 *Flaveria* 属植物の成熟葉に光化学系 I を主に励起する近赤外光を照射し、光化学系 I 反応中心 P700 の酸化速度を測定した (Fig. 7)。近赤外光照射下の P700 酸化速度は、光化学系 I 循環型電子伝達活性の上昇度合いに伴って、遅くなることが知られている (Asada et al., 1993; Joliot and Joliot, 2006; Okegawa et al., 2007)。

*Flaveria* C<sub>3</sub>種の *F. pringlei* と *F. robusta* において、P700 は近赤外光照射によって急速に酸化された ( $t = 2$  s;  $t$  は近赤外光照射によって、P700 が最大酸化レベルに到達するまでの時間)。一方で、*Flaveria* C<sub>4</sub>種の *F. bidentis* と *F. trinervia* の P700 酸化速度は、C<sub>3</sub>種と比較して著しく遅くなっていた ( $t = 17-19$  s)。また、C<sub>4</sub>種の P700 酸化曲線は二相性を示し、一相目は C<sub>3</sub>種と同等の酸化速度で、二相目は C<sub>3</sub>種と比較して著しく遅い酸化速度であった。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種と C<sub>4</sub>-like種の P700 は、C<sub>3</sub>種と C<sub>4</sub>種の値の範囲内で様々な酸化速度を示した。*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種の *F. anomala* では、P700 酸化曲線に小さな酸化速度の遅い相が現れ、これに起因して P700 酸化速度は C<sub>3</sub>種と比較してわずかに遅かった ( $t = 6$  s)。一方で、*F. anomala* と同じ C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種に分類される *F. ramosissima* では、P700 酸化曲線に酸化速度の遅い相が *F. anomala* と比較して大きく現れて、P700 酸化速度は C<sub>3</sub>種と C<sub>4</sub>種の値のほぼ中間であった ( $t = 10$  s)。*Flaveria* C<sub>4</sub>-like種の *F. brownii* では、P700 酸化速度は C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種の *F. ramosissima* と同等であった ( $t = 10$  s)。一方で、C<sub>4</sub>-like種の *F. palmeri* では、P700 の酸化速度と酸化曲線は C<sub>4</sub>種と同等であった ( $t = 16$  s)。

C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種、C<sub>4</sub>-like種そして C<sub>4</sub>種で見られた P700 の遅い酸化速度が光化学系 I 循環型電子伝達活性に起因しているのかを調査するため、各 *Flaveria* 属植物の成熟葉から得たリーフディスクへ光化学系 I からフェレドキシンへの電子伝達を阻害することで循環型電子伝達活性を抑制する Methyl viologen (MV) を減圧浸透させて、P700 酸化速度を測定した (Fig. 8 and 9)。その結果、コントロールとして H<sub>2</sub>O を減圧浸透させたリーフディスクでは P700 酸化速度の遅い相が見られたが、MV 処理を行った C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種、C<sub>4</sub>-like種、C<sub>4</sub>種のリーフディスクではその P700 酸化速度の遅い相が失われていた。従って、P700 酸化速度の遅い二相目が循環型電子伝達活

性を反映していると判断した。以上の結果から、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種の *F. ramosissima* と C<sub>4</sub>-like 種の *F. brownii* では、光化学系 I 循環型電子伝達活性が C<sub>3</sub> 種と比較して C<sub>4</sub> 種の値の半分程度に上昇しており、そして C<sub>4</sub>-like 種の *F. palmeri* と C<sub>4</sub> 種では、光化学系 I 循環型電子伝達活性が他の種と比較して著しく上昇していることが明らかになった。

*F. bidentis* (C<sub>4</sub>)のリーフディスクへプラストキノンをシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体への電子伝達を阻害する DBMIB を減圧浸透させた時、MV 処理の結果と同様に P700 酸化速度の遅い相は失われた (Fig. 8)。一方で、光化学系 II からプラストキノンを電子伝達を阻害する DCMU を減圧浸透させた時、P700 酸化速度の遅い相は見られたが、コントロールと比べて P700 酸化速度が速くなっていた。近赤外光は主に光化学系 I を励起するが、わずかに光化学系 II も励起する。この結果から、光化学系 I 循環型電子伝達活性は光化学系 II からの電子供与によって一部上昇していると考えた。

### 2-3-2. *Flaveria* C<sub>3</sub> 種, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種, C<sub>4</sub>-like 種, C<sub>4</sub> 種における PGR5, PGRL1 および NDH-H タンパク質の相対的発現量の変化

*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種、C<sub>4</sub>-like 種そして C<sub>4</sub> 種において、NDH 複合体のサブユニットの NDH-H そして PGR5 と PGRL1 タンパク質量が C<sub>3</sub> 種と比較して増加しているのかを調査するために、各 *Flaveria* 属植物から全膜タンパク質を抽出しウエスタンブロット分析を行った (Fig. 10A)。そして、画像解析装置 (LAS-4000 EPUV) を用いて、各タンパク質発現量をウエスタンブロット分析によるバンド強度から定量した (Fig. 10B)。

シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体のサブユニットである Rieske タンパク質発現量は、各 *Flaveria* 属植物間で差異は見られなかった (Fig. 10A)。光化学系 II のサブユニットである PsbO タンパク質発現量は、C<sub>3</sub> 種と比較して C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種、C<sub>4</sub>-like 種そして C<sub>4</sub> 種でわずかに減少していた。一方で、光化学系 I のサブユニットである PsaC タンパク質発現量は、C<sub>4</sub>-like 種の *F. palmeri* と C<sub>4</sub> 種の *F. bidentis* で他の種と比較してわずかに増加していた。

C<sub>4</sub> 種の *F. bidentis* における PGR5 タンパク質発現量は、C<sub>3</sub> 種と比較して約 3 倍増加していた (Fig. 10B)。また、PGRL1 タンパク質発現量も C<sub>3</sub> 種と比較して約 3 倍増加していた。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub>-like 種の *F. brownii* では、PGR5 と PGRL1 タンパク質量は共に C<sub>3</sub> 種と同等のレベルであった。これに対して、C<sub>4</sub>-like 種の *F. palmeri* における PGR5 と PGRL1 タンパク質の発現量は、C<sub>3</sub> 種と比較してそれぞれ 4 倍と 3 倍増加しており、その値は C<sub>4</sub> 種と同等であった。NDH-H タンパク質発現量は、C<sub>3</sub> 種と比較して C<sub>4</sub> 種の *F. bidentis* で 10 倍以上増加していた (Fig. 10B)。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub>-like 種に

における NDH-H タンパク質量の増加レベルは、C<sub>4</sub>代謝酵素タンパク質の発現増加レベルとよく一致していた(Fig. 11)。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種の *F. ramosissima*、C<sub>4</sub>-like 種の *F. brownii* そして *F. palmeri* の NDH-H 発現量は、C<sub>3</sub>種と比較してそれぞれ 2 倍、7 倍そして 10 倍以上に増加していた。NDH-H タンパク質量と NDH 活性に相関があるかを調べるために、各 *Flaveria* 植物の成熟葉を用いて光合成誘導光照射後のクロロフィル蛍光の一過的上昇から NDH 活性を見積もった(Fig. 12A and B)。その結果、NDH-H タンパク質発現量と相関して、NDH 活性は、C<sub>3</sub>種と比較して C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種の *F. ramosissima* から C<sub>4</sub>種の *F. bidentis* にかけて増加していた(Fig. 12C)。このことから、NDH-H タンパク質量は、機能的な NDH 複合体の量を反映していると考えた。

### 2-3-3. *Flaveria* C<sub>4</sub>種における葉肉細胞と維管束鞘細胞間の PGR5, PGRL1 および NDH-H タンパク質発現量の定量的な比較解析

*F. bidentis*(C<sub>4</sub>)の葉肉細胞と維管束鞘細胞間で、NDH-H、PGR5 そして PGRL1 タンパク質発現量を定量的に比較するため、葉肉細胞と維管束鞘細胞を分画して、ウエスタンブロット分析を行った(Fig. 13)。C<sub>4</sub>植物では、PEPC は葉肉細胞に、RuBisCO 大サブユニットである RbcL は維管束鞘細胞にそれぞれ局在している。そこで、両細胞画分から抽出した可溶性タンパク質を用いて PEPC と RbcL のウエスタンブロット分析を行い、両細胞画分の精製度を評価した(Fig. 13A)。葉肉細胞画分への維管束鞘細胞の混入率は 20 % 以下であり、一方で維管束鞘細胞画分への葉肉細胞の混入率は 2 % 以下であった。次に、両細胞画分から抽出した膜タンパク質を用いて PGR5、PGRL1、NDH-H そして Rieske タンパク質のウエスタンブロット分析を行った(Fig. 13B)。さらに、上記の両画分の混入率を考慮して、各タンパク質発現量の葉肉細胞と維管束鞘細胞間における相対量を算出した。その結果、Rieske タンパク質は、葉肉細胞と維管束鞘細胞に同程度の量で存在していた(Fig. 13B)。NDH-H タンパク質発現量は、葉肉細胞と比較して維管束鞘細胞で約 3 倍高かった。これに対して、PGR5 と PGRL1 タンパク質発現量は、葉肉細胞と維管束鞘細胞間で同程度のレベルであった。

### 2-3-4. *Flaveria* C<sub>3</sub>種と C<sub>4</sub>種における PGR5 の葉緑体チラコイド膜上での局在

PGR5タンパク質が葉緑体チラコイド膜上においてグラナとストロマラメラのどちらの領域に局在しているのかを明らかにするために、*F. pringlei* (C<sub>3</sub>)と *F. bidentis* (C<sub>4</sub>) から単離した葉緑体チラコイド膜をグラナとストロマ

ラメラに分画し、ウエスタンブロット分析を行った(Fig. 14)。SDS-PAGEの結果、*F. pringlei* (C<sub>3</sub>)では、これまでの報告通り(Eberhard et al., 2008)、ATP合成酵素 $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットは主にストロマラメラ画分に、光化学系IIの集光タンパク質複合体であるlight harvesting complex (LHC) IIはグラナ画分によく存在していた(Fig. 14A)。一方、*F. bidentis* (C<sub>4</sub>)で、LHC IIはC<sub>3</sub>種と比較してストロマラメラ画分にも多く存在していた(Fig. 14A)。ウエスタンブロット分析の結果、ATP合成酵素 $\epsilon$ サブユニットは*Flaveria* C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>種ともにストロマラメラ画分で主に検出されていた(Fig. 14B)。一方で、LHCIIのサブユニットであるLHCb1はC<sub>3</sub>種とC<sub>4</sub>種のグラナ画分で最も強く検出されたが、C<sub>4</sub>種のストロマラメラ画分においても検出された。しかしながら、グラナとストロマラメラの分画はできていると考えられる。PGR5は、*Flaveria* C<sub>3</sub>種、C<sub>4</sub>種ともにストロマラメラ画分で主に検出された(Fig. 14B)。これらの結果から*Flaveria* C<sub>3</sub>種、C<sub>4</sub>種において、PGR5はストロマラメラに局在することが明らかになった。

### 2-3-5. *Flaveria* C<sub>4</sub>-like種の葉肉細胞と維管束鞘細胞間でのPGR5とNDH-Hタンパク質量の比較解析

*Flaveria* C<sub>4</sub>-like種において、PGR5とNDH-Hタンパク質が葉肉細胞と維管束鞘細胞のどちらに多く存在するのかを明らかにするために、*F. bidentis* (C<sub>4</sub>)、*F. brownii*(C<sub>4</sub>-like)そして*F. palmeri*(C<sub>4</sub>-like)を用いてPGR5とNDH-Hタンパク質の*In situ*免疫染色を行った(Fig. 15 and 16)。葉組織構造を観察するために葉横断切片をトルイジンブルーOで染色したところ、全ての種の葉肉細胞と維管束鞘細胞で多くの葉緑体が観察された(Fig. 15A, 16A and C)。また、ネガティブコントロールとして感作前血清の抗体を用いた切片では、シグナルはほとんど検出されなかった(Fig. 15B, 16B and D)。

*F. bidentis* (C<sub>4</sub>)では、PEPCとRbcLのシグナルは、それぞれ葉肉細胞の細胞質と維管束鞘細胞葉緑体で特異的に検出された(Fig. 15C to F)。NDH-Hは、葉肉細胞葉緑体で弱いシグナルが確認されたものの、維管束鞘細胞葉緑体で非常に強いシグナルが確認された(Fig. 15G and H)。これに対して、PGR5のシグナルは、葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体で同程度の強度で検出された(Fig. 15I and J)。これらの結果は、Figure 13で示した葉肉細胞と維管束鞘細胞画分を用いたウエスタンブロット分析によるPGR5とNDH-Hタンパク質の発現解析の結果と一致する。

*F. palmeri* (C<sub>4</sub>-like)では、PEPCとRbcLのシグナルは*F. bidentis* (C<sub>4</sub>)と同様に、それぞれ葉肉細胞の細胞質と維管束鞘細胞葉緑体で検出された(Fig. 16E, F, I and J)。NDH-Hのシグナルは、葉肉細胞葉緑体と比較して、

維管束鞘細胞葉緑体で強く検出された(Fig. 16M and N)。一方で、PGR5のシグナルは、葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体で同程度の強度で検出された(Fig. 16Q and R)。

*F. brownii* (C<sub>4</sub>-like)では、PEPCのシグナルは葉肉細胞の細胞質で特異的に検出された一方で、RbcLについては、維管束鞘細胞葉緑体における強いシグナルに加えて、葉肉細胞葉緑体においても弱いシグナルが確認された(Fig. 16G, H, K and L)。この種では、RuBisCOの維管束鞘細胞への局在化は完了しておらず、RuBisCOが葉肉細胞にも存在することが報告されており(Cheng et al., 1988)、今回の結果はそれと一致する。NDH-Hは、*F. bidentis*(C<sub>4</sub>)と*F. palmeri*(C<sub>4</sub>-like)と同様に、維管束鞘細胞葉緑体で強いシグナルが確認された(Fig. 16O and P)。一方で、PGR5のシグナルは非常に弱くほとんど検出できなかった(Fig. 16S and T)。この原因は、*F. brownii*のPGRタンパク質発現量が*F. bidentis*(C<sub>4</sub>)と*F. palmeri*(C<sub>4</sub>-like)のものに比べて低いためであると考えられる(Fig. 10 A and B)。実際に、*F. pringlei*(C<sub>3</sub>)では、PGR5とNDH-Hのシグナルは、ほとんど検出できない程に弱かった(data not shown)。

以上の結果から、C<sub>4</sub>-like種の2種においてNDH-Hタンパク質は、葉肉細胞と比較して維管束鞘細胞に多く存在し、PGR5タンパク質は*F. palmeri*の葉肉細胞と維管束鞘細胞に同程度存在していることが明らかになった。

### 2-3-6. *Flaveria* C<sub>3</sub>種, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種, C<sub>4</sub>-like種, C<sub>4</sub>種の維管束鞘細胞葉緑体チラコイド膜構造の観察

NADP-ME型C<sub>4</sub>植物の維管束鞘細胞葉緑体で見られるグラナの減少が、C<sub>4</sub>型光合成の進化上どの段階の種から起こっているのかを調べるために、*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種、C<sub>4</sub>-like種そしてC<sub>4</sub>種の維管束鞘細胞葉緑体におけるグラナの発達度合いを調査した。その方法として、透過型電子顕微鏡を用いて各*Flaveria*属植物の葉肉細胞と維管束鞘細胞の葉緑体チラコイド膜構造を観察した(Fig. 17)。また、グラナの発達度合いを定量的に評価するために、葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体のグラナチラコイド膜とストロマチラコイド膜の長さをそれぞれ測定して(Fig. 18)、葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体のグラナ指数(グラナ指数(%) = グラナチラコイド膜の全長/全チラコイド膜の全長×100)を算出した(Fig. 19A)。

葉肉細胞葉緑体のグラナ指数は、全ての種で同等であった(Fig. 19A)。*Flaveria* C<sub>3</sub>種の*F. pringlei*と*F. robusta*の維管束鞘細胞には、細胞あたり2または3個の葉緑体が含まれていたが、その大きさは他の*Flaveria*属植物と比較して非常に小さかった(Fig. 17A and B)。また、それらの葉緑体は、

発達したグラナを持っていた。一方で、*Flaveria* C<sub>4</sub> 種の *F. bidentis* と *F. trinervia* の維管束鞘細胞葉緑体では、グラナが大きく減少していた(Fig. 17G and H)。*F. bidentis* と *F. trinervia* のグラナ指数は、それぞれ 15 % と 19 % であった(Fig. 19A)。これに対して、*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種である *F. anomala* と *F. ramosissima* では、グラナが発達した維管束鞘細胞葉緑体が観察された(Fig. 17C and D)。また、これらの種では、多くのミトコンドリアが維管束鞘細胞葉緑体に隣接していた。*F. anomala* と *F. ramosissima* のグラナ指数は、それぞれ 57 % と 63 % であった(Fig. 19A)。*Flaveria* C<sub>4</sub>-like 種の *F. brownii* では、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と同様に、グラナが発達した維管束鞘細胞葉緑体が観察され(Fig. 17E)、そのグラナ指数は 50 % であった(Fig. 19A)。これとは対照的に、C<sub>4</sub>-like 種の *F. palmeri* では、グラナは葉緑体の辺縁領域で見られたものの、中心部分では見られなかった(Fig. 17F)。グラナ指数は、C<sub>4</sub> 種の値と同等の 16 % であった(Fig. 19A)。ただし、*F. palmeri* と C<sub>4</sub> 種では、グラナあたりのチラコイド膜の層数が、C<sub>4</sub> 種と比較して *F. palmeri* で多かった(Fig. 19B)。C<sub>4</sub> 種では、グラナの 65-75 % はチラコイド膜 3-4 層で構成されており、10 層以上のチラコイド膜で構成されているグラナは全体の 1 % 未満であった。一方で、*F. palmeri* では、チラコイド膜 3-4 層で構成されるグラナは全体の 37 % で、10 層以上のチラコイド膜で構成されているグラナは全体の 15 % であった。



## 2-4. 考察

### 2-4-1. C<sub>4</sub>回路の構築に伴う光化学系 I 循環型電子伝達活性の上昇

*Flaveria* C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種、C<sub>4</sub>-like 種、そして C<sub>4</sub> 種における光化学系 I 循環型電子伝達系の機能性の比較解析の結果、C<sub>4</sub>回路の構築度合いと相関して、光化学系 I 循環型電子伝達活性が上昇していることが明らかになった。Figure 20 に、現在提唱されている C<sub>4</sub>型光合成の進化における炭素固定経路の構築過程と、本研究で明らかにした光化学系 I 循環型電子伝達系の亢進過程をまとめた。まず、本研究で用いた各 *Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub>-like 種の C<sub>4</sub>回路の構築度合いに対する光化学系 I 循環型電子伝達活性の変化の相関性を解説する。

*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種の *F. anomala* は、本研究で用いた C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub>-like 種の中で、最も光合成様式が C<sub>3</sub>植物に近い種である。この種では、PEPC タンパク質の発現量は C<sub>3</sub>種と比較してわずかに増加しており、大気 CO<sub>2</sub> の一部を PEPC が固定している(Ku et al., 1983)。しかしながら、NADP-ME と PPK 3 の発現量が低いために、C<sub>4</sub>回路は機能していない(Monson et al., 1986; von Caemmerer et al., 1989)。一方で、*F. anomala* ではグリシンシャトルが機能していると考えられており(von Caemmerer et al., 1989)、これは維管束鞘細胞葉緑体の周囲に多くのミトコンドリアが確認されたことから支持される(Fig. 17C)。しかしながら、C<sub>4</sub>回路とは異なり、そのグリシンシャトルが駆動しても ATP 要求量は上昇しないことが予想されている(von Caemmerer, 2000)。*F. anomala* では、P700 酸化速度から見積もられた循環型電子伝達活性は上昇していなかった(Fig. 7)。従って、*F. anomala* では炭酸固定経路に必要な ATP 要求量の上昇が起きていないため、循環型電子伝達系は亢進されていないと考える。

*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種に分類される *F. ramosissima* では、PEPC に加えて NADP-ME タンパク質量が C<sub>3</sub>種と比較して葉肉細胞と維管束鞘細胞の両方で増加しており、大気 CO<sub>2</sub> の 70% 近くを C<sub>4</sub>酸として固定している(Ku et al., 1983; Rumpho et al., 1984; Monson et al., 1986)。そのため、この種では機能的な C<sub>4</sub>回路が駆動している(Moore et al., 1988)。一方、*Flaveria* C<sub>4</sub>-like 種の *F. brownii* では、C<sub>4</sub>回路の構築度合いと C<sub>4</sub>回路の CO<sub>2</sub> 固定効率への効果は *F. ramosissima* に比べて大きい(Cheng et al., 1988; Ku et al., 1991)。*F. brownii* では、PEPC と NADP-ME タンパク質の発現量は、*F. ramosissima* に比べて増加しており、それら酵素タンパク質の葉肉細胞と維管束鞘細胞への局在化も進んでいる。そのため、大気 CO<sub>2</sub> の 80% が PEPC によって

C<sub>4</sub>酸として固定されている(Cheng et al., 1988)。 *F. ramosissima* と *F. brownii* の P700 酸化速度から見積もられた循環型電子伝達活性は、共に C<sub>3</sub>種と比較して上昇していた(Fig. 7)。両種の P700 が最大酸化レベルに達する時間は同等であったが、P700 酸化速度の遅い相は *F. ramosissima* に比べて *F. brownii* で早く現れた(Fig. 7)。MV 処理後の P700 酸化曲線では P700 酸化速度の遅い相が失われていたため(Fig. 9)、P700 酸化速度の遅い相が循環型電子伝達系によるフェレドキシンからプラストキノンを介した光化学系 I への電子伝達を反映していると考えられる。従って、機能的な C<sub>4</sub> 回路が駆動している *F. ramosissima* と *F. brownii* では、光化学系 I 循環型電子伝達系が亢進されており、特に P700 酸化速度の遅い相が早く現れた *F. brownii* の循環型電子伝達活性は、*F. ramosissima* よりも高いことが示唆される。

*Flaveria* C<sub>4</sub>-like 種の *F. palmeri* は、本研究で用いた C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub>-like 種の中で、最も光合成様式が C<sub>4</sub> 植物に近い種である。この種では、葉肉細胞において RuBisCO の活性が、維管束鞘細胞における活性値の 6%程残っている(Moore et al., 1989)。このため、大気 CO<sub>2</sub> の 9%が葉肉細胞で C<sub>3</sub>酸として固定されるが、大気 CO<sub>2</sub> の 91%は C<sub>4</sub>酸として固定されており、完全な C<sub>4</sub>回路が構築されている(Moore et al., 1989)。 *F. palmeri* の P700 酸化速度から見積もられる循環型電子伝達活性は、C<sub>4</sub>種と同等であり、他の C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種や C<sub>4</sub>-like 種と比較して最も高かった (Fig. 7)。従って、*F. palmeri* では、光化学系 I 循環型電子伝達系が C<sub>4</sub>種と同等に亢進されていることが示唆された。

以上の結果から、光化学系 I 循環型電子伝達系が C<sub>4</sub>回路を駆動するための ATP 生産に関与することが強く示唆された。

#### 2-4-2. *Flaveria* C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種, C<sub>4</sub>-like 種, C<sub>4</sub>種の解析結果から考えられる C<sub>4</sub>型光合成における NDH 依存経路と PGR/PGRL1 依存経路の機能

NADP-ME 型 C<sub>4</sub>植物において、葉肉細胞と維管束鞘細胞間の ATP 要求量は維管束鞘細胞で高くなっている(Edwards and Voznesenskaya, 2011)。NADP-ME 型 C<sub>4</sub>植物に分類される *F. bidentis* では、NDH-H タンパク質の発現量は葉肉細胞と比較して維管束鞘細胞で約 3 倍高かった (Fig. 13B)。これは、*F. bidentis* と同じ NADP-ME 型 C<sub>4</sub>植物である *Zea mays* において、NDH-H タンパク質が葉肉細胞よりも維管束鞘細胞に約 3 倍多く蓄積しているという過去の報告と一致する(Kubicki et al., 1996; Takabayashi et al., 2005)。よって、*F. bidentis* の NDH-H タンパク質の発現量は、両細胞間の ATP 要求量の違いに応答しているといえる。さらに、*Flaveria* C<sub>3</sub>種と比較して *Flaveria* C<sub>4</sub>種において、NDH-H タンパク質発現量は、10 倍以上増加

していた (Fig. 10B)。また、クロロフィル蛍光測定から見積もられた NDH 活性は、*Flaveria* C<sub>3</sub>種と比較して C<sub>4</sub>種で上昇していた (Fig. 12C)。従って、NDH 複合体量は、C<sub>4</sub>植物の2種類の細胞間の ATP 要求量の違いのみならず、C<sub>3</sub>種と C<sub>4</sub>種間の C<sub>4</sub>回路の駆動による ATP 要求量の上昇に対しても応答して増加していることが明らかになった。以上の結果から、C<sub>4</sub>植物において NDH 複合体は炭酸固定経路の駆動のために必要な ATP 生産に貢献していることが強く示唆された。

また、*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種と C<sub>4</sub>-like 種の結果から、NDH-H タンパク質発現量は、C<sub>3</sub>種と比較して C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種の *F. ramosissima* で約2倍、C<sub>4</sub>-like 種の *F. brownii* で約7倍増加していた (Fig. 10B)。これらの2種では C<sub>4</sub>回路が機能しており、その構築度合いは *F. ramosissima* に比べて *F. brownii* で高い (Ku et al., 1991)。従って、NDH-H タンパク質発現量は、C<sub>4</sub>回路が構築されるに従って、増加しているといえる。また、*F. ramosissima* と *F. brownii* では PGR5 および PGRL1 タンパク質の発現増加は見られなかったことから (Fig. 10B)、これら2種における循環型電子伝達活性の上昇は NDH 複合体量の増加によるものであることが示唆される。*F. ramosissima* と *F. brownii* における NDH 依存経路の機能は2つ考えられる。1つ目は、C<sub>4</sub>植物と同じく、炭酸固定経路の駆動のための ATP 生産である。2つ目は、葉緑体ストロマにおける酸化還元調節への関与である。*F. ramosissima* と *F. brownii* では、C<sub>4</sub>代謝酵素の NADP-ME の発現増加が起きており、そのタンパク質量は葉肉細胞と比較して維管束鞘細胞で高い (Cheng et al., 1988; Moore et al., 1988; Ku et al., 1991)。NADP-ME は、葉緑体内でリンゴ酸を脱炭酸してピルビン酸を生産する際に、CO<sub>2</sub>に加えて NADPH を産出する。また、*F. ramosissima* と *F. brownii* の維管束鞘細胞葉緑体では直鎖型電子伝達系の電子伝達活性は高く、それによっても NADPH が生産される (Ketchner and Sayre, 1992)。NADP-ME と直鎖型電子伝達系による NADPH 生産が同時に起こるとストロマの過還元が起こることが知られており、C<sub>3</sub>植物のイネの葉緑体で *Z. mays* 由来の NADP-ME を過剰発現させた形質転換体は、ストロマの NADPH レベルが上昇し光障害を引き起こす (Tsuchida et al., 2001)。従って、維管束鞘細胞葉緑体の直鎖型電子伝達活性が低下している C<sub>4</sub>種とは異なり、直鎖型電子伝達活性が高い *F. ramosissima* と *F. brownii* では、C<sub>4</sub>回路の駆動は CO<sub>2</sub>濃縮と同時に維管束鞘細胞葉緑体内の過還元を引き起こしているかもしれない。そして、NDH 依存経路はその過剰な還元力を電子伝達鎖に戻して  $\Delta$ pH を形成させ、ATP 合成を促し、かつ葉緑体ストロマの酸化還元状態を適正に保っていると考えられる。この考えは、NDH 依存経路が C<sub>3</sub>植物において、ストレス条件下でストロマの過還元回避の

ために働いているという知見に支持される (Endo et al., 1999; Joët et al., 2002)。また、*F. brownii* の *In situ* 免疫染色の結果、NDH-H は NADP-ME が多く存在する維管束鞘細胞に細胞選択的に蓄積していた (Fig. 16O and P)。

PGR5 と PGRL1 タンパク質は、*Flaveria* C<sub>4</sub> 種である *F. bidentis* の葉肉細胞と維管束鞘細胞間で同程度発現しており、その発現は両細胞間の ATP 要求量の違いに応答していなかった (Fig. 13B)。これは、以前の *Z. mays* の結果と一致する (Takabayashi et al., 2005)。しかしながら、*Flaveria* C<sub>3</sub> 種と C<sub>4</sub> 種間でタンパク質量を比較したところ、PGR5 と PGRL1 タンパク質発現量は C<sub>3</sub> 種と比較して C<sub>4</sub> 種で、共に 3 倍増加していた (Fig. 10B)。また、*Flaveria* C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と *Flaveria* C<sub>4</sub>-like 種の中で、C<sub>4</sub> 回路が完成されており光合成特性が最も C<sub>4</sub> 植物に近い *F. palmeri* において、PGR5 と PGRL1 タンパク質は、C<sub>3</sub> 種と比較して、それぞれ 4 倍と 3 倍発現増加していた (Fig. 10B)。従って、PGR5 と PGRL1 タンパク質の発現量は、C<sub>4</sub> 植物の 2 種類の細胞間の ATP 要求量の違いには応答しないものの、C<sub>3</sub> 種と C<sub>4</sub> 種間の C<sub>4</sub> 回路の駆動による ATP 要求量の上昇に対して応答していることが明らかになった。また、P700 酸化速度から見積もられる循環型電子伝達活性は、*Flaveria* C<sub>4</sub> 種と C<sub>4</sub>-like 種の *F. palmeri* で、他の種と比較して最も高かった (Fig. 7)。以上の結果から、PGR5 と PGRL1 タンパク質の発現増加は循環型電子伝達活性の上昇に必要であり、PGR5/PGRL1 依存経路は、C<sub>4</sub> 植物において炭酸固定経路の駆動のために必要な ATP 生産に貢献していると考えられる。

本研究の結果は、NDH 依存経路に加えて、これまで C<sub>4</sub> 型光合成において炭酸固定経路を駆動するための ATP 生産への関与が不明であった PGR5/PGRL1 依存経路も、その ATP 生産に貢献していることを示唆するものである。しかしながら、これらの結果だけでは、C<sub>4</sub> 型光合成において PGR5/PGRL1 依存経路が炭酸固定経路に必要な ATP 生産に貢献しているかどうかは結論付けられない。これを明らかにするためには、PGR5/PGRL1 の RNAi 発現抑制形質転換体を用いて、炭酸固定経路の CO<sub>2</sub> 固定効率への影響度を直接に調べる必要がある。この PGR5/PGRL1 の RNAi 発現抑制形質転換体を用いた解析結果については次章で報告する。

### 2-4-3. 維管束鞘細胞葉緑体のチラコイド膜構造の変化は、光化学系 I 循環型電子伝達活性の上昇に関与するのか？

P700 酸化速度から見積もられる循環型電子伝達活性は、*Flaveria* C<sub>4</sub> 種と C<sub>4</sub>-like 種の *F. palmeri* で、他の種と比較して最も高かった (Fig. 7)。*F. bidentis* (C<sub>4</sub>)、*F. trinervia* (C<sub>4</sub>) そして *F. palmeri* (C<sub>4</sub>-like) では、維管束鞘細胞葉緑体のグラナが、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種や C<sub>4</sub>-like 種の *F. brownii* と比較して大き

く減少していた(Fig. 17 and 19A)。このグラナの減少は、光化学系 II の水酸化分解反応の活性低下とよく相関することが報告されている(Sheen et al., 1987; Oswald et al., 1990)。実際に、*F. brownii* の維管束鞘細胞葉緑体の光化学系 II 活性は葉肉細胞葉緑体のものと比較して変化していないのに対して、*F. palmeri*、*F. bidentis* そして *F. trinervia* の維管束鞘細胞葉緑体の光化学系 II 活性は、葉肉細胞葉緑体の光化学系 II 活性値の 50 %程度に減少している(Hofer et al., 1992; Ketchner and Sayre, 1992)。*F. bidentis* と *F. trinervia* の維管束鞘細胞葉緑体のチラコイド膜構造の特徴として、グラナが減少することでグラナ間のストロマラメラの領域が著しく拡大していた(Fig. 17G, H)。またその特徴は *F. palmeri* でより顕著で、グラナあたりのチラコイド膜の層数は  $C_4$  種と比較して多かったが(Fig. 19B)、グラナが葉緑体の辺縁領域に寄っておりストロマラメラのチラコイド膜の長さが大きくなっていった(Fig. 17F)。ストロマラメラには PGR5 と NDH 複合体が局在しており(Fig. 14B; Rumeau et al., 2005)、また光化学系 I も局在している。そのため、光化学系 I 循環型電子伝達系はストロマラメラで機能していると考えられる。直鎖型電子伝達系と光化学系 I 循環型電子伝達系はプラストキノンからフェレドキシンまでの電子伝達鎖を共有しているため、直鎖型電子伝達系による光化学系 II からプラストキノンへ流入する電子と循環型電子伝達系によるフェレドキシンからプラストキノンへ流入する電子は競合する。従って、グラナの減少と光化学系 II の水酸化分解反応の低下が起こり、グラナ間のストロマラメラの領域が拡大している葉緑体チラコイド膜構造は、両者の競合を回避することで循環型電子伝達系が機能しやすい状態にあると考える。*Flaveria*  $C_4$  種と  $C_4$ -like 種の *F. palmeri* で見られた循環型電子伝達活性の上昇は、循環型電子伝達系関連タンパク質の発現増加のみならず、その葉緑体チラコイド膜構造の変化によっても引き起こされているのかもしれない。

## 第 3 章

### *F. bidentis* *PGRL1* および *PGR5* 発現抑制株を用いた $C_4$ 型光合成における *PGR5/PGRL1* 依存的な光化学系 I 循環型電子伝達系の生理機能の解析

#### 3-1. 序論

$C_4$  型光合成の炭酸固定経路は、 $C_3$  型光合成のものと比較して、 $C_4$  回路を駆動するために、1 分子の  $CO_2$  を固定するあたり 2 分子の ATP をより多く必要とする (Kanai and Edwards, 1999)。そのため、 $C_4$  型光合成の光合成電子伝達反応は、その炭酸固定経路を効率的に駆動させるために、 $C_3$  型光合成のものに比べて、より多くの ATP を電子伝達反応で生産しなければならない。過去の研究と合わせて前章の *Flaveira* 属植物を用いた解析結果から、光合成電子伝達反応において ATP 生産に関わっている光化学系 I 循環型電子伝達系の電子伝達活性が、 $C_3$  種と比較して  $C_4$  種で上昇しており、その上昇値は  $C_3$ - $C_4$  中間種と  $C_4$ -like 種における  $C_4$  回路の構築度合いと一致することが見いだされた。従って、 $C_4$  型光合成では、光化学系 I 循環型電子伝達系がその電子伝達活性を上昇させ ATP 生産量を増やすことで、 $C_4$  回路の駆動で上昇した炭酸固定経路に必要な ATP 要求量を賄っていることが強く示唆された。

光化学系 I 循環型電子伝達系は、今から 50 年以上前に Arnon らによって、酸素発生や酸化剤の還元を伴わずに光照射によって ATP を合成する電子伝達(cyclic phosphorylation)として発見された (Arnon et al., 1954; Arnon, 1956; Arnon et al., 1958)。後に、cyclic phosphorylation は、電子供与体としてフェレドキシンを必要とし、また antimycin A (AA) で阻害されることが分かり、AA-sensitive Ferredoxin-plastoquinone reductase (FQR) 経路と呼ばれるようになった (Tagawa et al., 1963; Shikanai, 2007)。近年、 $C_3$  植物である *Arabidopsis thaliana* を用いた分子遺伝学的解析から、FQR 経路に関与する *PGR5* と *PGRL1* の 2 つの葉緑体タンパク質が同定された (Munekage et al., 2002; DalCorso et al., 2008)。*PGRL1* タンパク質は膜貫通ドメインを持つチラコイド膜タンパク質で、*PGR5* はストロマ側に突出した *PGRL1* の N 末領域に結合することで複合体を形成していることが示唆されている (DalCorso et al., 2008)。それ故に、両者は互いのタンパク質の安定性に寄与していると考えられている (DalCorso et al., 2008; Nishikawa et al., 2012)。最近、*PGR5/PGRL1* 複合体によるフェレドキシンからプラストキノンへの

電子伝達機構が解明された(Hertle et al., 2013)。PGRL1 は酸化還元活性を持つシステイン残基のジスルフィド結合を利用してフェレドキシンからプラストキノンへ電子を伝達しており、一方で、PGR5 は還元型フェレドキシンがジスルフィド結合を還元して切断するのに関与していることが示唆されている。また、AA は PGR5/PGRL1 複合体によるフェレドキシンからプラストキノンへの電子伝達を阻害することも明らかとなっている(Hertle et al., 2013; Sugimoto et al., 2013)。そのため、FQR 経路は PGR5 と PGRL1 タンパク質を構成因子の一部として成り立っており、PGR5/PGRL1 複合体が、Arnon らが提唱した FQR の分子実態であるとされている。

*A. thaliana* の *pgr5*, *pgrl1* 変異体では、温室栽培条件の光照射下で、PSII が過剰に吸収した光エネルギーを熱として放散する熱散逸の誘導能が低下し、また PSI が光障害を起こす (Munekage et al., 2002; Munekage et al., 2004; DalCorso et al., 2008; Munekage et al., 2008)。これは、PGR5/PGRL1 依存経路の欠損による  $\Delta$ pH の減少と光合成電子伝達反応で生産される ATP と NADPH 量の ATP/NADPH 率が低下することに起因すると考えられている。一方で、光化学系 I 循環型電子伝達系には、AA に感受性を示さない NDH 依存経路も存在するが、*A. thaliana ndh* 変異体や *Nicotiana tabacum* の NDH 欠損株は温室栽培条件の光照射下で表現型を示さない。(Shikanai et al., 1998; Hashimoto et al., 2003; Munekage et al., 2008)。そのため C<sub>3</sub> 植物では、光合成定常状態において、NDH 依存経路の  $\Delta$ pH 形成への貢献度はほとんどなく、PGR5/PGRL1 依存経路が  $\Delta$ pH 形成を介した ATP 生産による ATP/NADPH 率の調整に貢献しているとされる。*A. thaliana* の *pgr5* 変異体を用いた解析から、葉緑体において生産される全 ATP 量の 13% 程度が、PGR5/PGRL1 依存経路によって形成される  $\Delta$ pH によって生産されると見積もられている(Avenson et al., 2005)。

一方で、これまで C<sub>4</sub> 植物では、PGR5 タンパク質は葉肉細胞と維管束鞘細胞間の ATP 要求量の違いに応答せず同等のレベルで発現していたことから、PGR5/PGRL1 依存経路が C<sub>4</sub> 型光合成の炭酸固定経路に必要な ATP の生産に関与しているかは明らかでなかった。しかしながら、前章の *Flaveira* 属植物を用いた解析結果から、PGR5 と PGRL1 タンパク質は、*Flaveria* C<sub>4</sub> 種の葉肉細胞と維管束鞘細胞間で同程度発現していたものの、C<sub>3</sub> 種と比較して C<sub>4</sub> 回路が構築され機能している C<sub>4</sub> 種と C<sub>4</sub>-like 種の *F. palmeri* で発現量が増加していることが見いだされた。また、それらの種における循環型電子伝達活性は、C<sub>3</sub> 種と比較して著しく上昇していた。このことから、PGR5/PGRL1 依存経路が C<sub>4</sub> 型光合成の炭酸固定経路に必要な ATP の生産に関与している可能性が示唆された。しかしながら、これらの

状況証拠だけでは、C<sub>4</sub>型光合成の光合成電子伝達反応による ATP 生産への、PGR5/PGRL1 依存経路の貢献度を判断することはできない。また、C<sub>4</sub>植物において PGR5/PGRL1 依存経路が、C<sub>3</sub>植物と同様に、ATP 合成を介した ATP/NADPH 率の調整だけでなく強光下での PSI の保護に関与しているのかは明らかとなっていない。

これらの事に対する明確な答えを得るためには、C<sub>4</sub>植物で *PGR5* と *PGRL1* 遺伝子の発現抑制形質転換体を作成し、その表現型を詳細に解析する必要がある。本研究で用いている *Flaveria* C<sub>4</sub>種 *F. bidentis* では形質転換方法が確立されている。これまでに、その *F. bidentis* を用いて、C<sub>4</sub>代謝酵素の carbonic anhydrase (Cousins et al., 2006)、NADP-malate dehydrogenase (Trevanion et al., 1997)、NADP-ME (Pengelly et al., 2012)、PPDK (Furbank et al., 1997)、Calvin-Benson 回路の RuBisCO (Furbank et al., 1996; von Caemmerer et al., 1997; Siebke et al., 1997)、PEPC の活性を制御する PEPC kinase (Furumoto et al., 2007)そして RuBisCO の活性化に必要な RuBisCO activase (von Caemmerer et al., 2005)の発現抑制形質転換体がそれぞれ作成されている。それらを用いた解析から、C<sub>4</sub>回路と Calvin-Benson 回路の各代謝反応速度が律速した場合に光合成活性が低下する葉内 CO<sub>2</sub> 濃度および光強度条件が明らかとなっている。本章では、*PGR5* と *PGRL1* 遺伝子をそれぞれ標的とする RNA interference (RNAi)コンストラクトを導入した *F. bidentis* *PGR5* 発現抑制体および *PGRL1* 発現抑制体を用いて、葉内 CO<sub>2</sub> 濃度依存的また光強度依存的な光合成活性を測定した。そして、その結果と過去の炭素同化代謝酵素の発現抑制体の知見とを照らし合わせることで、炭酸固定経路を駆動するための ATP 生産への PGR5/PGRL1 依存経路の関与とその貢献度を考察した。



## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 植物材料と栽培条件

*F. pringlei* (C<sub>3</sub>) と *F. bidentis* (C<sub>4</sub>) の wild type の種子は、MSO 培地(培地組成は Table I に記す)のプレートに無菌播種した。一方で、*PGRL1*-RNAi 形質転換株 # 22 と # 4、*PGR5*-RNAi 形質転換株 # 6 と # 7 は、T1 世代を用いたため、カナマイシン(終濃度 200 µg/ml)を添加した MSO 培地のプレートに無菌播種した。それらは、4 °C で 2 日間春化处理を行った後、Growth chamber (光強度: 30-60 µmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>、温度 24 °C、明期/暗期: 16/8 時間)内で、本葉が展開するまで生育した。その後、*F. pringlei* (C<sub>3</sub>)、*F. bidentis* (C<sub>4</sub>) の wild type、そして kanamycin 耐性を示した形質転換株を土(スーパーミックス A (株式会社サカタのタネ): バーミキュライト(ニッタイ株式会社)=3:1)に移し、人工気象器環境条件下(光強度: 200~300 µmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>、温度 24 °C、湿度 50 %、明期/暗期: 12/12 時間)で生育させた。灌水は、ポットの土が完全に乾燥したら行い、その際に 1000 倍希釈した液体肥料ハイポネックス®; N:P:K = 6:10:5 (株式会社ハイポネックスジャパン)を与えた。実験には播種後 10~12 週間目の完全展開した第 7 葉若しくは第 8 葉を使用した。

### 3-2-2. *Flaveria* 形質転換用 *PGRL1*-RNAi, *PGR5*-RNAi コンストラクトの作成

*PGRL1* の coding region は *F. bidentis* の cDNA を鋳型に、*PGR5A/B* の coding region は宗景ゆり博士が作成した全長の *PGR5A/BCDS* 配列が挿入された pDONR221 ベクターを鋳型に KOD plus (TOKOBO, Osaka, Japan)を用いた PCR 法により増幅した。センス鎖を増幅するために使用したプライマーには、サブクローニングの際に方向性を持たせるために 5'末端側に *XhoI* 認識配列を、3'末端側に *PGRL1* では *KpnI* 認識配列、*PGR5A/B* では *EcoRI* 認識配列を付加した。一方で、アンチセンス鎖を増幅するために使用したプライマーには、5'末端側に *XbaI* 認識配列を、3'末端側に *BamHI* 認識配列を付加した。以下に使用したプライマー配列を示す。

*FbPGRL1\_sense*, 5'-CCGctcgagTGTGGGAAGGAAGCAGTCTT-3'/5'-GGggtaccGCAATGTCATCAAGCGAGTG-3' (ctcgag: *XhoI* 認識配列, ggtacc: *KpnI* 認識配列)

*FbPGRL1\_antisense*, 5'-GCtctaga TGTGGGAAGGAAGCAGTCTT-3'/5'-CGgatcc GCAATGTCATCAAGCGAGTG-3'(tctaga: *XbaI* 認識配列, ggtacc:

*BamHI* 認識配列)

*FbPGR5A/B\_sense*, 5'-CCGctcgagGTTGGGAGACTTCCATTGCTG-3'/5'-CCGgaattcAGCTAGGAACCCAAGTCTTTC-3' (ctcgag: *XhoI* 認識配列, gaattc: *EcoRI* 認識配列)

*FbPGR5A/B\_antisense*, 5'-GCtctagaGTTGGGAGACTTCCATTGCTG-3'/5'-CGg gatccAGCTAGGAACCCAAGTCTTTC-3' (tctaga: *XbaI* 認識配列, ggatcc: *BamHI* 認識配列)

PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分離し、予測されるサイズの位置で検出された単一バンドを切り出した。ゲルからの DNA 断片の抽出および精製は MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN K.K.-Japan, Tokyo, Japan)を用いて、付属のプロトコルに従って行った。形質転換用プラスミドには古本強博士(龍谷大学)から供与して頂いた pART7/pART27 プラスミド系(Gleave, 1992)を用いた。これらのプラスミド系には、特筆すべき特徴として、マルチクローニングサイトに *F. trinervia* PPDK 遺伝子の第一イントロンを含み、そのイントロンを挟んでセンス方向・アンチセンス方向に目的遺伝子を挿入することで簡単にフライパン構造を持つ遺伝子発現系を構築でき、RNAi を利用した遺伝子発現抑制系プラスミドが簡便に用意できる点がある。プラスミド作製の概略として、まずコンストラクト作成用のプラスミド pART7 中に各標的遺伝子のセンス鎖とアンチセンス鎖を Ligation High (TOYOBO)を用いてライゲーション反応で組み込み、次にこれを形質転換用プラスミド pART27 に組み込んだ。以下にそれぞれの行程の詳細を述べる。

*PGRL1* (*PGR5A/B*)センス鎖の DNA 断片は、*XhoI/KpnI* (*XhoI/EcoRI*) (TAKARA BIO, Shiga, JAPAN)で消化し、同じく *XhoI/KpnI* (*XhoI/EcoRI*)で消化した pART7 のカリフラワーモザイクウイルス 35S(CaMV35S)プロモータと PPDK 第一イントロン間のマルチクローニングサイトの *XhoI* (*XhoI*)と *KpnI* (*EcoRI*)部位に挿入した。次に、*PGRL1* (*PGR5A/B*)アンチセンス鎖の DNA 断片は、*XbaI/BamHI* (*XbaI/BamHI*)で消化し、同じく *XbaI/BamHI* (*XbaI/BamHI*)で消化した PPDK 第一イントロンとオクトピン合成酵素のターミネータ配列(ocsT) 間のマルチクローニングサイトの *XbaI* (*XbaI*)と *BamHI* (*BamHI*)部位に挿入した。これら各標的遺伝子のセンス鎖とアンチセンス鎖を組み込んだプラスミド DNA を大腸菌(DH5 $\alpha$ )にヒートショック法で導入して形質転換体を得た。コロニーPCR および大腸菌から抽出したプラスミドを鋳型にした PCR 分析によって各標的遺伝子の coding region を含む pART7 を選抜し、ABI Bigdye ver. 3.1(applied biosystems<sup>TM</sup>, Osaka,

Japan)を用いたシーケンシングによって標的遺伝子の coding region が正しい方向でプラスミドに挿入されていることを確認した。

次いで、塩基配列の確認を行ったプラスミドを *NotI* で切り出し、同じく *NotI* で消化したカナマイシン耐性遺伝子を持つ形質転換用プラスミドである pART27 にライゲーションした。その pART27 プラスミドを大腸菌 (DH5  $\alpha$ ) にヒートショック法で導入して形質転換体を得た。コロニーPCR および大腸菌から抽出したプラスミドを鋳型にした PCR 分析によって各標的遺伝子の coding region を含む pART27 を選抜し、ABI Bigdye ver.3.1 (applied biosystems <sup>TM</sup>)を用いたシーケンシングによって標的遺伝子の coding region が正しい方向でプラスミドに挿入されていることを確認した。

### 3-2-3. アグロバクテリウムへの形質転換用プラスミドの導入

*Agrobacterium tumefaciens* の系統として AGL1(Lazo et al., 1991)を使用した。また、ベクターサイズが大きいこととプラスミド導入効率が良くないことから、エレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムへ pART27 プラスミドを導入し、28 °C で培養した。選抜にはカナマイシン(終濃度 50  $\mu\text{g/ml}$ )を用いた。

### 3-2-4. *Flaveria bidentis* への形質転換

アグロバクテリウム法による *F. bidentis* の形質転換は Chitty らの方法を参考に一部改変して行った(Chitty et al., 1994)。

粗を取り除いた種子を 1.5 ml エッペンチューブに入れ、種子を 30 秒間 70 %エタノールに浸した。次に種子を滅菌液(3 % (v/w)次亜塩素酸ナトリウム、0.05 % Tween 20)で 5 分間処理し、その後滅菌水で数回洗浄した。洗浄した種子を MSO 培地上に播種し、4 °C で 2 日間春化处理を行った後、Growth chamber (光強度: 30-60  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、温度 24 °C、明期/暗期: 16/8 時間)内で発芽させ、1 週間生育させた。

3-2-3 で得られた形質転換アグロバクテリウムを、カナマイシン(終濃度 50  $\mu\text{g/ml}$ )を添加した LB 液体培地で、28 °C で前培養した。次に、アグロバクテリウム培養液を  $\text{OD}_{600}=0.2$  になるように LBMG 液体培地で調整し、28 °C で  $\text{OD}_{600}=0.5$  になるまで数時間本培養した。その後、本培養したアグロバクテリウム培養液を終濃度が  $\text{OD}_{600}=0.2$  になるように再調整し、20 °C、3,300  $\times\text{g}$ 、10 min の条件で遠心することでアグロバクテリウムを集菌した。集菌したアグロバクテリウムを、アセトシリンゴン(終濃度 20  $\mu\text{g/ml}$ )を添加した CRM 液体培地(培地組成は Table I に記す)で懸濁し、感染用のアグロバクテリウム溶液とした。

感染用のアグロバクテリウム溶液を 50 mL ファルコンチューブに移し、その中に植物体から切り出した胚軸を入れ 20 分間振盪させることで、胚軸にアグロバクテリウムを感染させた。その胚軸を、アセトシリゴン(終濃度 20  $\mu\text{g/ml}$ )を添加した CRM 培地上に置き、3 日間暗所、24°C で共存培養した。その後、胚軸を深型シャーレに移して滅菌水でよく洗浄し、濾紙上で余分な水分を取り除いた後、カナマイシン(終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$ )と TIMENTIN (終濃度 200  $\mu\text{g/ml}$ )を添加した CRM 培地に移し、それを Growth chamber (光強度: 30-60  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、温度 24 °C、明期/暗期: 16/8 時間)内に静置し、カルス化を誘導すると共にカナマイシン耐性を示すシュートの再生を促した。

感染後 2-3 週間ほどで、実体顕微鏡下で再生芽を確認できるようになる。観察された再生芽をカルスから取り、カナマイシン(終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$ ) と TIMENTIN (終濃度 200  $\mu\text{g/ml}$ )を添加した SPM1 培地(培地組成は Table I に記す)に移した。再生芽を肉眼で観察できる大きさになるまで約 1 週間 Growth chamber 内で成長させ、これをカナマイシン(終濃度 50  $\mu\text{g/ml}$ ) と TIMENTIN (終濃度 200  $\mu\text{g/ml}$ )を添加した SPM2 培地(培地組成は Table I に記す)に移し生育させることで、カナマイシン耐性を示すシュートを選抜した。さらに約 2 週間、選抜したシュートが成長するのを待ち、その後 SPM3(培地組成は Table I に記す)に移して発根を促し、植物体を再生させた。再生した形質転換株は、土(スーパーミックス A (株式会社サカタのタネ): バーミキュライト(ニッタイ株式会社)=3 : 1)に鉢上げし、人工気象器環境条件下(光強度: 200~300  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、温度 24 °C、湿度 50 %、明期/暗期: 12/12 時間)で生育させた。

### 3-2-5. 導入遺伝子の確認

カナマイシン耐性を示した形質転換株に RNAi コンストラクトが導入されているかを確認するため、SPM3 培地で生育している段階の形質転換株の生葉を直接用いて、KOD FX NEO (TOYOBO)の付属のプロトコルに従って PCR 分析を行った。以下に、*PGR1-RNAi* および *PGR5-RNAi* 形質転換株にそれぞれ用いたプライマー配列を示す。

*FbPGR1\_cheak*, 5'-CAAAGCGCAAGATCTATC-3'/5'-GGGTACAATCAGTAAATTGAACGGA-3'

*FbPGR5\_cheak*, 5'-GTTGGGAGACTTCCATTGCTG-3'/5'-AGCTAGGAACCCAAGTCTTTC-3'.

### 3-2-6. Total RNA の抽出

Total RNA は、RNA すいすい-P(リーゾ株式会社、茨城)を用いて、付属のプロトコルに従って抽出した。続いて Total RNA を DNase I (FPLC pure, Amersham) で 37 °C, 30 min 処理し、NucleoSpin® RNA Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany)を用いて精製した。Total RNA の濃度測定は、NANODROP 2000C (Thermo scientific, MA, USA)を使用して行った。

### 3-2-7. Real-time PCR 分析

Total RNA 0.5 µg を鋳型に ReverTraAce (TOYOBO)を用いて、10 µl の反応系で逆転写反応を行い、cDNA を合成した。逆転写反応液は H<sub>2</sub>O で 50 倍希釈した。合成した cDNA 5 µl を鋳型に、SYBR® PreMix ExTaq™ II (Tli RNaseH Plus) (TAKARA BIO)を用いて 20 µl の反応系で Real-time PCR 分析を行った。Real-time PCR 分析では、Light Cycler® 96 (Roche Diagnostics) を使用した。以下が使用したプライマー配列になる。

*FsPGRL1*, 5'-GCTATACCATTCATATTATGGTTATC-3'/5'-CAAAGAATGAA GTATTCTCTGTTCC-3'

*FsPGR5A*, 5'-TGCATCATCACTACCTGCAAC-3'/5'-TTCCCGACTCGAACCC GGGC-3'.

*FsPGR5B*, 5'-TTTTGATGGCAATATCATCAGTTA-3'/5'-TTCTCGACTCGAGC CACGTT-3'.

*FsPGR5C*, 5'-GGCATCTTTGCTCCATTAGTC-3'/5'-CCCTATGGATTTACAAA ACTCGT-3'.

*FsActin7*, 5'-CCGTATGAGCAAAGAAATCACCG-3'/5'- GTGCTGAGAGATG CAAGGATTG-3'.

### 3-2-8. 葉タンパク質の可溶性画分および膜画分の調製

第 2 章の 2-2-3 の方法に従って、行った。

### 3-2-9. 葉肉細胞と維管束鞘細胞の分離

第 2 章の 2-2-5 の方法に従って、行った。

### 3-2-10. SDS-PAGE およびウエスタンブロット

第 2 章の 2-2-6 の方法に従って、行った。

### 3-2-11. チラコイド膜の単離

以下の作業は全て、氷上もしくは 4 °C で行った。各植物の成熟葉を 50 ml

の buffer I (0.33 M sorbitol, 20 mM Tricine/NaOH (pH 7.5), 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 % (w/v) BSA, 330 mg/L ascorbate Na)中で破碎し、ミラクロスで濾過後、5 min, 3000×g で遠心した。次に、ペレットを 3 ml の buffer II (0.33 M sorbitol, 20 mM Hepes/NaOH (pH 7.6), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM EDTA)に懸濁し、5 min, 3000×g で遠心した。最後に、ペレットを 200 μl の buffer II に再懸濁し、サンプルとした。

### 3-2-12. *in vitro* Fd-dependent PQ reduction 測定

3-2-11 の方法で単離した単離チラコイド膜(10 μg chlorophyll/mL)を測定用低張液(50 mM HEPES/NaOH (pH 7.6), 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 30 mM KCl, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)に入れ、電子供与体として 0.25 mM NADPH を加えて、続けて 0.05 mM フェレドキシン (spinach 由来, sigma aldrich)を加えた。プラストキノンの還元に伴うクロロフィル蛍光の上昇は、MINI-PAM portable chlorophyll fluorometer (Heinz-Walz)を用いて、測定光 (0.5 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)照射下で測定した。NADPH とフェレドキシン添加後のクロロフィル蛍光の上昇値は、測定光照射による最小クロロフィル蛍光値と飽和光(800 ms, 3000 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)照射による最大クロロフィル蛍光値で補正した。

### 3-2-13. クロロフィル蛍光測定

第 2 章の 2-2-8 の方法に従って行った。

### 3-2-14. 光合成活性、電子伝達速度(electron transport rate, ETR)、非光化学的消光(non-photochemical quenching, NPQ)の同時測定

光合成活性測定(ガス交換測定)は、LI-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA)を使用して、各植物体の生葉を用いて行った。ETR と NPQ は、光合成活性測定と同時に LI-6400-40(LiCor Inc.)を用いて、クロロフィル蛍光測定を行い、そのパラメータから算出した。植物を光合成活性測定の直前に 5 分間暗所に置いた後、飽和光(800 ms, 3000 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)を照射することで最大クロロフィル蛍光( $F_m$ )を測定した。光合成反応中の最大クロロフィル蛍光( $F_m'$ )は、光合成誘導光(50-1000 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)の存在下で、植物に飽和光を照射して測定した。光合成定常状態中のクロロフィル蛍光( $F_s$ )は、光合成誘導光の照射下で測定した。これらのクロロフィル蛍光パラメータから、ETR と NPQ は以下の式で算出した。ETR = light intensity × ( $F_m' - F_s$ )/ $F_m'$ . NPQ = ( $F_m - F_m'$ )/ $F_m'$ . 測定条件は、21 % O<sub>2</sub>, 温度 25 °C, 湿度 50 %に設定した。

### 3-2-15. 光化学系 I 反応中心 P700 酸化レベルの測定

酸化型 P700 は 810 nm の波長の光を吸収する。P700 の酸化レベルは、810 nm の吸光度変化を、PAM 101 fluorometer (Heinz-Walz) 付属の emitter-detector unit ED700DW(Heinz-Walz)を用いて測定した。P700 最大酸化レベル( $\Delta A_{max}$ )は近赤外光 (720 nm,  $17.2 \text{ Wm}^{-2}$ )の照射下で、xenon flash light (50 ms,  $1500 \text{ Wm}^{-2}$ )を照射して測定した。光合成定常状態中の P700 酸化レベル( $\Delta A$ )は光合成誘導光( $200\text{-}1500 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )の照射下で測定した。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. *F. bidentis* *PGRL1*-RNAi および *PGR5*-RNAi 形質転換株における *PGRL1*, *PGR5A*, *B*, *C* 遺伝子の mRNA 蓄積量

次世代シーケンサーによる、*F. robusta* (C<sub>3</sub>)と *F. bidentis* (C<sub>4</sub>)の全ゲノム解析の結果、*Flaveria* 属植物では、*PGR5* タンパク質は *PGR5A*, *B* そして *C* の3つの遺伝子によってコードされており、*PGRL1* タンパク質は単一の遺伝子によってコードされていることが明らかになった(Munekage et al., unpublished data)。*Flaveria* C<sub>3</sub>種と C<sub>4</sub>種の *PGR5A*, *B*, *C* タンパク質の内、*A. thaliana* *PGR5* タンパク質との相同性が最も高いのは C<sub>3</sub>種と C<sub>4</sub>種で共に *PGR5A* で、C<sub>3</sub>種の *PGR5A* は 79 %の、C<sub>4</sub>種の *PGR5A* は 76 %の相同性を示した(Fig. 21)。一方で、*Flaveria* C<sub>3</sub>種と C<sub>4</sub>種の *PGRL1* タンパク質は、*A. thaliana* *PGRL1A*, *B* タンパク質に対して、それぞれ 67 %と 70 %の相同性を示した(Fig. 22)。また、*Flaveria* C<sub>3</sub>種と C<sub>4</sub>種の *PGRL1* タンパク質は *A. thaliana* *PGRL1A*, *B* タンパク質と同じく2つの膜貫通ドメインを有しており、フェレドキシンからプラストキノンへ電子伝達を行うのに必要な6つのシステイン残基(Hertle et al., 2013)が保存されていた。

*Flaveria* C<sub>4</sub>種である *F. bidentis* の形質転換は、*F. bidentis* の胚軸に *PGRL1* 遺伝子、*PGR5A/B* 遺伝子をそれぞれ標的とした RNA interference (RNAi)ベクター(Fig. 23A)を持つ *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 菌株を感染させることを行い、*PGRL1*-RNAi は 22 系統、*PGR5*-RNAi は 15 系統の形質転換体を得た。形質転換株の解析では、T0 世代の *PGRL1*-RNAi の系統 #4 と #22、*PGR5*-RNAi の #6 と #7 の次世代の種子をカナマイシン添加培地に播種し、カナマイシン耐性を示した T1 世代の *PGRL1*-RNAi (*PGRL1i*) #4 および #22 の形質転換株そして *PGR5*-RNAi (*PGR5i*) #6 および #7 の形質転換株を用いた。*PGRL1i* 形質転換株と *PGR5i* 形質転換株において標的遺伝子の mRNA 蓄積量が RNAi によって減少しているのかを確認するため、各遺伝子の特異的に認識するプライマーを作成し、Real-time PCR 分析を行った(Fig. 23B)。

*PGRL1i* 株 #22 および #4 において、*PGRL1* 遺伝子の mRNA 蓄積量は、wild type(WT)における蓄積量の、それぞれ 10 %と 4 %に減少していた。一方で、*PGR5A*, *B*, *C* 遺伝子の mRNA 蓄積量は、個体間でややばらつきはあるものの、WT と *PGRL1i* 形質転換株間で顕著な差は見られなかった。

*PGR5i* 株 #6 および #7 における *PGR5A* 遺伝子の mRNA 蓄積量は、共に WT の蓄積量の 5 %に、*PGR5B* 遺伝子の mRNA 量は 15 %に減少していた。



また、今回作成した *PGR5*-RNAi コンストラクトは *PGR5A* と *B* 遺伝子で保存されている配列を用いて作製しているが、*PGR5C* 遺伝子の mRNA 蓄積量についても、WT の蓄積量の 3 % に減少していた。また、*PGRL1* 遺伝子の mRNA 蓄積量は、個体間でばらつきはあるものの、WT と *PGR5i* 形質転換株間で顕著な差は見られなかった。これらのことから、*PGRL1i* と *PGR5i* 形質転換株では、それぞれ標的とした *PGRL1* または *PGR5A, B, C* mRNA に対して RNAi が起こっていることが確認された。

### 3-3-2. *PGRL1i* および *PGR5i* 形質転換株における *PGRL1* と *PGR5* タンパク質の蓄積量

*PGRL1i* と *PGR5i* 形質転換株において *PGRL1* と *PGR5* タンパク質が減少しているかどうかを調べるために、WT と各形質転換株の成熟葉から全膜タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット分析を行った (Fig. 24)。各サンプル間で膜タンパク質量が揃っていることを評価するためにシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体サブユニットの Rieske タンパク質のウエスタンブロット分析を行ったところ、Rieske タンパク質量は、WT と各形質転換株間で差異が見られなかった。*PGRL1i* 株# 22 および# 4 では、*PGRL1* タンパク質のバンドは検出されなかった。また、*PGRL1i* 形質転換株では、*PGRL1* と同様に *PGR5* タンパク質のバンドも検出されなかった。一方で、*PGR5i* 株# 6 および# 7 では、*PGR5* タンパク質のバンドは検出されなかった。また、*PGR5i* 形質転換株では *PGRL1* タンパク質量が、WT におけるタンパク質量の 1/16 以下に減少していた。これらの結果から、*PGRL1i* および *PGR5i* 形質転換株では、*PGR5* と *PGRL1* タンパク質が共に著しく減少していることが明らかになった。

### 3-3-3. *PGRL1i* および *PGR5i* 形質転換株における *PGR5/PGRL1* 依存の循環型電子伝達活性の測定

*PGRL1i* と *PGR5i* 形質転換株において *PGR5/PGRL1* 依存の循環型電子伝達活性が抑制されているかどうかを調べるために、単離チラコイド膜を用いた Fd-dependent PQ reduction 測定により、光化学系 I 循環型電子伝達活性を評価した。Figure 25 に Fd-dependent PQ reduction 測定の原理を示した。この系では、低張液に懸濁した単離チラコイド膜に、電子供与体として NADPH とフェレドキシンを加え、暗条件下でプラストキノンの還元を調べている。NADPH は FNR によりフェレドキシンに還元力を与える。循環型電子伝達系によってフェレドキシンからプラストキノンへ電子が伝達されるとプラストキノンは還元され、クロロフィル蛍光レベルが上昇する。

これを弱い測定光( $0.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )照射下で測定した(Mills et al., 1979)。これまでに、*A. thaliana* の *pgr5* 変異体ではそのクロロフィル蛍光レベルが減少することが報告されている(Munekage et al., 2002; Munekage et al., 2004)。

WT, *PGRL1i* そして *PGR5i* 形質転換株の成熟葉から、それぞれチラコイド膜を単離し、Fd-dependent PQ reduction 測定を行った(Fig. 26 and 27)。WT では、単離チラコイド膜に NADPH を添加した時のクロロフィル蛍光レベルの上昇はほとんど見られなかった。しかしながら、NADPH に続いてフェレドキシンを単離チラコイド膜に添加するとクロロフィル蛍光レベルは急激に上昇した。これは、循環型電子伝達系の PGR5/PGRL1 複合体と NDH 複合体の電子供与体が NADPH でなくフェレドキシンであることに起因すると考えられている(Munekage et al., 2004; Yamamoto et al., 2011; Hertle et al., 2013)。一方で、*PGRL1i* 株# 22 と *PGR5i* 株# 7 では、NADPH とそれに続くフェレドキシン添加後のクロロフィル蛍光レベルの上昇速度は WT よりも遅く、またクロロフィル蛍光の最大レベルも WT と比較して低かった(Fig. 26)。このことから、これらの形質転換株では循環型電子伝達活性が低下していると判断した。

次に、*PGRL1i* 株# 22 と *PGR5i* 株# 7 で見られた循環型電子伝達活性の低下が PGR5/PGRL1 依存経路の抑制によるものであるかどうかを調べるために、PGR5/PGRL1 依存経路の循環型電子伝達活性を特異的に阻害する antimycin A を単離チラコイド膜に添加して、Fd-dependent PQ reduction 測定を行った(Fig. 26)。WT では antimycin A 存在下で、フェレドキシン添加後のクロロフィル蛍光の上昇速度が遅くなり、また最大クロロフィル蛍光レベルも低下した。そのクロロフィル蛍光の上昇パターンは、形質転換株のパターンと酷似していた。これに対して、*PGRL1i* 株# 22 と *PGR5i* 株# 7 では、antimycin A 存在下のクロロフィル蛍光の上昇速度および最大クロロフィル蛍光レベルは、antimycin A 非存在下と比較してほとんど変化していなかった。*PGRL1i* 株# 22 と *PGR5i* 株# 7 で見られた結果は、*PGRL1i* 株# 4 と *PGR5i* 株# 6 においても見られた(Fig. 27)。これらの結果から、*PGRL1i* および *PGR5i* 形質転換株では、PGR5/PGRL1 依存の電子伝達活性が完全に抑制されていることが明らかとなった。

### 3-3-4. *PGRL1i* および *PGR5i* 形質転換株における NDH 複合体量と NDH 活性

光化学系 I 循環型電子伝達系では、PGR5/PGRL1 依存経路に加えて、NDH 依存経路が機能している。そこで、*PGRL1i* と *PGR5i* 形質転換株において、

その NDH 依存経路が影響を受けているかどうかについて解析した。まず、WT と *PGRL1i* 株# 22 の成熟葉から抽出した全膜タンパク質を用いて、NDH-H のウエスタンブロット分析を行った (Fig. 28)。その結果、NDH-H タンパク質の蓄積量は WT と *PGRL1i* 株# 22 間で変化していなかった。次に、WT と *PGRL1i* 株# 22 の成熟葉を用いて光合成誘導光照射後のクロロフィル蛍光の一過的上昇を指標に、NDH 活性を測定した (Fig. 29)。NDH-H タンパク質量の結果と同様に、NDH 活性についても WT と *PGRL1i* 株# 22 間で変化していなかった。このことから、*PGRL1i* および *PGR5i* 形質転換株において、NDH 依存経路の電子伝達活性は影響を受けていないと考えられた。

### 3-3-5. PGR5/PGRL1 依存経路の抑制が光合成活性に与える影響

*PGRL1i* と *PGR5i* 形質転換株において、PGR5/PGRL1 依存の循環型電子伝達活性の抑制が C<sub>4</sub> 型光合成の CO<sub>2</sub> 固定効率に影響を与えるのかについて調査するために、光強度依存的 (Fig. 30) また葉内 CO<sub>2</sub> 依存的 (Fig. 32 and 33) な光合成活性測定を行った。

初めに、WT と *PGRL1i* 株# 22 を用いて、大気条件下 (400  $\mu\text{L L}^{-1}$  CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>) で光強度依存的な光合成活性を測定した (Fig. 30)。WT の光合成活性と、光化学系 II における電子伝達速度を表す relative ETR は光強度に依存して上昇し、1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の光強度条件においても飽和しなかった (Fig. 30A and B)。また、光強度が 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の時、光合成活性値は 23  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  であった。これに対して、*PGRL1i* 株# 22 の光合成活性と relative ETR は 500  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の光強度条件で飽和し、それ以上光強度を大きくしても光合成活性と relative ETR は上昇しなかった。光強度が 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の時、*PGRL1i* 株# 22 の光合成活性値は 14  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  で、WT と比較して 37 % 低下していた。 $\Delta\text{pH}$  形成によって誘導される熱散逸のレベルを表す NPQ の測定は、*F. bidentis* (C<sub>4</sub>) の WT と *PGRL1i* 株# 22 に加えて、*Flaveria* C<sub>3</sub> 種の *F. pringlei* についても行った。*F. pringlei* (C<sub>3</sub>) において、NPQ は光強度に依存してほぼ直線的に上昇した (Fig. 30C)。一方で、*F. bidentis* (C<sub>4</sub>) の WT において、NPQ は光強度が 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の弱光下で一度強く誘導され、500  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  以上の光強度で光強度に依存して値が上昇するという 2 相性を示した。これに対して、*PGRL1i* 株# 22 における NPQ は、光強度が 50 から 400  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  までは WT と比較して差異は見られなかったが、500  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  以上の光強度で、WT と比較して低下していた。これらの結果から、PGR5/PGRL1 依存経路の電子伝達活性の抑制は、500  $\mu\text{mol}$

photons  $m^{-2}s^{-1}$  以上の光強度条件において、光合成活性に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、光合成測定の前後で、光化学系 II の最大活性の指標となる最大量子収率を表す  $F_v/F_m$  の値は WT と *PGRLli* 株# 22 間で差異はなかったことから (Fig. 30D)、1000  $\mu\text{mol photons } m^{-2}s^{-1}$  の強光を照射しても光化学系 II は光障害を起こしていないと判断した。

光強度依存的な光合成活性測定の結果から、WT と形質転換体間の光合成活性の差異は 1000  $\mu\text{mol photons } m^{-2}s^{-1}$  の光強度で最も大きく、また光化学系 II の光障害も引き起こされていないことが分かったため、その光強度条件における WT と各形質転換株を用いた葉内  $\text{CO}_2$  濃度依存的な光合成活性測定を 21 %  $\text{O}_2$  濃度で行った (Fig. 32 and 33)。 $\text{CO}_2$  固定効率に対する  $\text{C}_4$  回路の効果は、 $\text{CO}_2$  濃度依存的な光合成活性に大きく反映される。Figure 31 には、*Flaveria*  $\text{C}_4$  種の *F. bidentis* と  $\text{C}_3$  種の *F. pringlei* における  $\text{CO}_2$  濃度依存的な光合成活性の典型的なパターンを示した。 $\text{C}_3$  植物の光合成活性は、葉内  $\text{CO}_2$  濃度が 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  の低  $\text{CO}_2$  濃度条件では、光合成による  $\text{CO}_2$  固定速度よりも光呼吸による  $\text{CO}_2$  排出速度の方が速いためマイナスの値を示す。また、光合成活性は葉内  $\text{CO}_2$  濃度が 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  の高  $\text{CO}_2$  濃度条件下で最大値を示し飽和する。一方で、 $\text{C}_4$  植物では  $\text{C}_4$  回路が機能することにより光合成活性は、葉内  $\text{CO}_2$  濃度が 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  の低  $\text{CO}_2$  濃度条件ですでに 5  $\mu\text{mol CO}_2 m^{-2} s^{-1}$  あり、葉内  $\text{CO}_2$  濃度が 350  $\mu\text{L L}^{-1}$  の時には最大光合成活性を示し飽和する。

*F. bidentis* ( $\text{C}_4$ ) の WT と各形質転換株の葉内  $\text{CO}_2$  濃度依存的な光合成活性を比較した時、両者の光合成活性の差異は葉内  $\text{CO}_2$  濃度が 350  $\mu\text{L L}^{-1}$  以上における最大光合成活性値に現れた (Fig. 32A and 33A)。低葉内  $\text{CO}_2$  濃度 ( $C_i < 100 \mu\text{L L}^{-1}$ ) 下において *PGRLli* 株と WT 間で光合成活性値に大きな差異は見られなかったが、葉内  $\text{CO}_2$  濃度が 350  $\mu\text{L L}^{-1}$  の時、WT の光合成活性値が 23  $\mu\text{mol CO}_2 m^{-2} s^{-1}$  であったのに対して、*PGRLli* 株# 4 および# 22 の光合成活性値はそれぞれ 17  $\mu\text{mol CO}_2 m^{-2} s^{-1}$  と 14  $\mu\text{mol CO}_2 m^{-2} s^{-1}$  であった (Fig. 32A)。この WT と *PGRLli* 株間の光合成活性値の差は葉内  $\text{CO}_2$  濃度の上昇に伴って大きくなり、高葉内  $\text{CO}_2$  濃度 ( $C_i$ , 800-1300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) において *PGRLli* 株# 4 と# 22 の光合成活性値は WT と比較して、それぞれ 30 % と 40 % 低下していた。*PGRLli* 株の relative ETR は、WT と *PGRLli* 株で光合成活性の差異が見られなかった低葉内  $\text{CO}_2$  濃度 ( $C_i < 100 \mu\text{L L}^{-1}$ ) を含めた全ての葉内  $\text{CO}_2$  濃度条件で WT と比較して低下していた (Fig. 32B)。WT の NPQ は、葉内  $\text{CO}_2$  濃度が 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  以下の条件で大きく誘導され、その値は 1.6 であった (Fig. 32C)。これに対して、*PGRLli* 株の NPQ 値は、葉内  $\text{CO}_2$  濃度が 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  以下において 0.75 で、WT の 50 % に低下していた。

*PGRL1i*株と同様に、低葉内 CO<sub>2</sub>濃度(Ci < 100 μL L<sup>-1</sup>)下では、WTと*PGR5i*株間で光合成活性値の差異は見られなかったが、葉内 CO<sub>2</sub>濃度が 350 μL L<sup>-1</sup>の時、WTの光合成活性値が 22 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>であったのに対して、*PGR5i*株# 6と# 7の光合成活性値はそれぞれ 17 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>と 16 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>であった(Fig. 33A)。この WTと*PGR5i*株間の光合成活性値の差は葉内 CO<sub>2</sub>濃度の上昇に伴って大きくなり、高葉内 CO<sub>2</sub>濃度(Ci, 800-1300 μL L<sup>-1</sup>)において*PGR5i*株# 6と# 7の光合成活性値は WTと比較して、それぞれ 24%と 26%低下していた。relative ETRは、WTと比較して*PGR5i*株において、全ての葉内 CO<sub>2</sub>濃度条件下で低下していた(Fig. 33B)。また、葉内 CO<sub>2</sub>濃度が 100 μL L<sup>-1</sup>以下における WTの NPQ値は 0.61であったのに対して、*PGR5i*株の NPQ値は 0.4で、WTと比較して 25%低下していた(Fig. 33C)。以上の結果から、PGR5/PGRL1依存経路の電子伝達活性の抑制は、350 μL L<sup>-1</sup>以上の高 CO<sub>2</sub>濃度条件下において、最大光合成活性に影響を及ぼすことが明らかになった。全ての形質転換株で光合成測定前後の Fv/Fmの値は WTと比較して差異はなかったことから(Fig. 32D and 33D)、光合成活性測定中に光化学系 IIの光障害は起きていないと判断した。また、WTと*PGRL1i*株# 22から抽出した全可溶性タンパク質を用いて SDS-PAGEを行ったところ、WTと*PGRL1i*株# 22間で PEPC、PPDK、NADP-ME、RuBisCOといった主要な代謝酵素タンパク質量に変化はなかった(Fig. 34)。このことから、各形質転換株で見られた光合成活性の低下は、少なくともそれら代謝酵素タンパク質量が減少したことに由来するものではないと言える。

### 3-3-6. PGR5/PGRL1 依存経路の抑制が強光下での光化学系 I の光保護に与える影響

*PGRL1i*と*PGR5i*形質転換株において、PGR5/PGRL1依存経路の電子伝達活性の抑制が強光下で光化学系 Iの光障害を引き起こすかどうかを調査するため、光強度依存的な光化学系 I反応中心 P700の酸化レベルの測定(Fig. 35)と光化学系 Iの強光に対する感受性の試験(Fig. 36)を行った。

まず、植物の生葉に、白色光を照射して光強度依存的な光化学系 I反応中心 P700の酸化レベル( $\Delta A / \Delta A_{max}$ )を測定した。P700の酸化レベルは、光強度依存的に上昇する。これは、光強度が強くなると光化学系 Iの光化学反応が上昇し、より多くの電子が P700から光化学系 Iの下流の光合成電子伝達鎖へ流れるためである。*F. bidentis*の WTにおいて、P700は光強度依存的に酸化レベルが上昇した(Fig. 35A)。これに対して、*PGRL1i*株# 22の P700酸化レベルは、光強度が 250 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>以下では WTと比較して差異は見られなかったが、500と 1000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の光強度

下では WT と比較して低下していた(Fig. 35A)。ただし、*PGRL1i* 株# 22 の P700 は WT に比べて酸化レベルは低いものの、光強度依存的に酸化レベルが上昇していた。*PGRL1i* 株# 22 と同様に、*PGR5i* 株# 6 および# 7 の P700 酸化レベルは、500 と 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光強度下で WT と比較して低下していたが、P700 酸化レベルは光強度依存的に上昇していた(Fig. 35B)。

次に、形質転換株で見られた 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光強度下での P700 酸化レベルの低下が、強光による光化学系 I の損傷(光化学系 I の光障害)に起因しているのかどうかを調べるため、WT、*PGR5i* 株# 6 および# 7 の植物体に 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光強度の白色光を 30 分間照射し、照射前後の P700 最大酸化レベル( $\Delta A_{\text{max}}$ )の差から光化学系 I が光障害を受けた度合いを評価した(Fig. 36)。*F. bidentis* の WT において、光障害を受けた光化学系 I は全体の 6 %程度であった(Fig. 36)。一方で、*PGR5i* 株# 6 および# 7 において、光障害を受けた光化学系 I は WT と比較して増加していたが、それは全体の 15 %未満だった。以上の結果から、*PGRL1i* および *PGR5i* 株において、PGR5/PGRL1 依存経路の電子伝達活性が抑制されても大部分の光化学系 I は光障害から回避されていることが明らかとなった。

### 3-4. 考察

#### 3-4-1. PGR5/PGRL1 依存の循環型電子伝達経路の抑制は C<sub>4</sub> 型光合成の CO<sub>2</sub> 固定効率に影響する

本研究の結果から、PGR5/PGRL1 依存の光化学系 I 循環型電子伝達活性の抑制は最大光合成活性の低下を引き起こすことが明らかとなった。低葉内 CO<sub>2</sub> 濃度(Ci < 100 μL L<sup>-1</sup>)下での光合成活性値を決定しているのは PEPC のカルボキシラーゼ活性である (von Caemmerer, 1997; von Caemmerer, 2000; von Caemmerer, 2013)。その葉内 CO<sub>2</sub> 濃度下において、*PGRL1i* および *PGR5i* 株の光合成活性値は共に WT と比較して差異は見られなかった (Fig. 32A and 33A)。従って、PGR5/PGRL1 依存経路の抑制は PEPC 活性には影響せず、また ATP 量が光合成活性を律速する葉内 CO<sub>2</sub> 濃度条件ではないため、光合成活性の低下は起きないと考えられる。一方で、光合成活性が飽和する 350 μL L<sup>-1</sup> 以上の特に高葉内 CO<sub>2</sub> 濃度(Ci, 800-1300 μL L<sup>-1</sup>)下で光合成活性値を決定している要因は、PEPC の基質である PEP の再生速度と RuBisCO の基質である RuBP の再生速度だと考えられている (Berry and Farquhar, 1978; von Caemmerer and Furbank, 1999; von Caemmerer, 2013)。PEP の再生は、葉肉細胞葉緑体内で PPDK によって触媒されるピルビン酸のリン酸化反応によって行われるが、その反応には補因子として ATP が必要である。また、維管束鞘細胞葉緑体内で RuBP の再生を行う phosphoribulokinase の触媒反応にも ATP が必要である。そのため、高葉内 CO<sub>2</sub> 濃度下では光合成電子伝達反応による ATP 生産量が光合成活性値を決定している。*PGRL1i* および *PGR5i* 株における光合成活性値の低下は、光合成活性が飽和する 350 μL L<sup>-1</sup> 以降の葉内 CO<sub>2</sub> 濃度下で見られ、高葉内 CO<sub>2</sub> 濃度(Ci, 800-1300 μL L<sup>-1</sup>)において *PGRL1i* と *PGR5i* 株の光合成活性値は WT と比較して、それぞれ 30 %と 25 %低下していた (Fig. 32A and 33A)。従って、*PGRL1i* および *PGR5i* 株で見られた高葉内 CO<sub>2</sub> 濃度下における光合成活性値の低下は、PGR5/PGRL1 依存経路の抑制による ATP 生産量の減少が、PEPC の基質である PEP の再生速度と RuBisCO の基質である RuBP の再生速度の低下を引き起こしたことが原因であると考えられる。この考えは、光強度依存的な光合成活性測定の結果からも導きだされる。500 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 以上の光強度下で光合成活性値を決定している要因は、PEPC のカルボキシラーゼ活性と PEP の再生速度に依存した RuBisCO への CO<sub>2</sub> の供給効率であることが示されている (von Caemmerer, 2000)。*PGRL1i* 株 # 22 では、光合成活性は WT と比較して弱い光強度 (500 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)

で飽和し、 $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の光強度下で光合成活性値が WT と比較して 37 % 低下していた (Fig. 30A)。従って、光強度依存的な光合成活性の場合、PGR5/PGRL1 依存経路の抑制による ATP 生産量の減少が PEP の再生速度を低下させ、副次的に基質として PEP を必要とする PEPC のカルボキシラーゼ活性が低下することで、RuBisCO への  $\text{CO}_2$  供給量が律速するために光合成活性が低下したと考えられる。以上の光強度依存的そして葉内  $\text{CO}_2$  濃度依存的な光合成活性測定の結果から、 $\text{C}_4$  型光合成において PGR5/PGRL1 依存の光化学系 I 循環型電子伝達系は、PEPC の基質である PEP や RuBisCO の基質である RuBP の再生速度が光合成活性を律速するような炭酸固定経路の代謝速度が増し代謝反応に必要な ATP/NADPH 率が上昇する条件で、高い光合成活性を維持するのに貢献していることが強く示唆された。

一方で、 $300 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  以下の弱い光強度下では、WT と *PGRL1i* 株# 22 間で光合成活性値の差異は見られなかった (Fig. 30A)。弱い光強度下での光合成活性値を決定している要因は炭酸固定経路の代謝速度ではなく光合成電子伝達速度であるため、炭素代謝の駆動に必要な ATP/NADPH 率は比較的低くなっている。従って、弱い光強度下で *PGRL1i* 株# 22 の光合成活性が低下していなかったのは、直鎖型電子伝達系による NADPH と ATP 生産に加えて、*PGRL1i* 株# 22 では NDH 活性は正常であったことから (Fig. 29)、NDH 依存経路による ATP 生産によって、炭酸固定経路の駆動に必要な ATP/NADPH 率を賄っていることが要因だと考えられる。 $300 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  以下の弱い光強度下では relative ETR の値は WT と *PGRL1i* 株# 22 間で差異がなかったことも (Fig. 30B)、炭酸固定経路に必要な ATP/NADPH 率が保たれていることを示唆している。

これまでに *A. thaliana* の *pgr5* 変異体を用いた解析から、 $\text{C}_3$  型光合成において PGR5/PGRL1 依存の光化学系 I 循環型電子伝達経路の欠損は、RuBP の再生速度が光合成活性を律速する高い光強度条件で光合成活性を 15 % 程度低下させることが報告されている (Munekage et al., 2008)。しかしながら、*pgr5* 変異体では強光に曝されると 60 % 以上の光化学系 I が光障害を起こすことも報告されている (Munekage et al., 2002; Munekage et al., 2008)。光化学系 I は直鎖型電子伝達鎖で機能しているため、光化学系 I の光障害は直鎖型電子伝達系の電子伝達活性を抑制し ATP と NADPH 生産量の低下を引き起こす。そのため、*pgr5* 変異体で見られた光合成活性の低下は、PGR5/PGRL1 依存経路の欠損による ATP 生産量の低下と光化学系 I の光障害の双方に起因すると考えられる (Munekage et al., 2008)。これに対して、*PGRL1i* および *PGR5i* 株では、 $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の光強度下で光合成



活性が 37 % 低下していたが(Fig. 30A)、光化学系 I の光障害はほとんど(15 %未満)起きていなかった(Fig. 36)。加えて、光化学系 II についても光合成活性測定の前後も光障害は起きていなかった(Fig. 30D, 32D, 33D)。従って、光合成活性測定で *PGRL1i* と *PGR5i* 株に見られた ETR の低下(Fig. 30B, 32B, 33B)は、光化学系 II や光化学系 I の光障害によるものではなく、PGR5/PGRL1 依存経路の電子伝達活性が抑制されたことで NADPH/ATP 率が上昇し、直鎖型電子伝達系の最終電子受容体である NADP<sup>+</sup>が欠乏することで、直鎖型電子伝達系の電子伝達速度が低下したことに起因すると考えられる。これらのことから、*PGRL1i* および *PGR5i* 株で見られた光合成活性の低下は、PGR5/PGRL1 依存経路の電子伝達活性の抑制による ATP 生産量の減少によって引き起こされており、PGR5/PGRL1 依存経路の炭素同化経路に必要な ATP 生産への貢献度は C<sub>3</sub> 植物と比較して C<sub>4</sub> 植物で高くなっていることが明らかになった。

### 3-4-2. PGR5/PGRL1 依存の循環型電子伝達経路が抑制されても光化学系 I は光障害を受けない

これまでに、*A. thaliana* の *pgr5*, *pgr11* 変異体や *O. sativa* の *PGR5* 発現抑制体の解析から、C<sub>3</sub> 植物では PGR5/PGRL1 依存経路が欠損すると強光下で光化学系 I が光障害を起こすことが明らかになっている(Munekage et al., 2002; DalCorso et al., 2008; Munekage et al., 2008; Nishikawa et al., 2012)。この原因は、PGR5/PGRL1 依存経路の欠損により、ストロマの ATP/NADPH 率が低下し NADPH の量が増えることで NADP<sup>+</sup>が欠乏するため、電子伝達鎖の中で行き場を失った電子が P700 へ逆流する charge recombination と呼ばれる現象が起きるためだと考えられている(Munekage et al., 2002; Shikanai, 2007; DalCorso et al., 2008)。この charge recombination が起こり P700 に過剰な電子が蓄積した状態で、さらに光化学系 II から光化学系 I へ電子が伝達され、かつ光化学系 I に光が照射され続けると光障害が起こる。今回、C<sub>4</sub> 植物である *F. bidentis* の *PGRL1i* および *PGR5i* 株では、PGR5/PGRL1 依存経路の電子伝達活性が抑制されていたにも関わらず、強光下で光化学系 I はほとんど光障害を受けていなかった(Fig. 35 and 36)。また、光化学系 I の P700 酸化レベルの測定に使用した 810 nm の波長の光は集光クロロフィルによって吸収されないため(Klughhammer and Schreiber, 1994)、向軸側から背軸側までの全ての細胞の吸光度変化を捉えることができる。従って、P700 最大酸化レベル( $\Delta A_{max}$ )は葉肉細胞と維管束鞘細胞両方の P700 の状態を反映していると言えるため、光化学系 I の光障害は葉肉細胞と維管束鞘細胞両方で起きていないと考えられる。光化学系 I の

光障害が起きていない要因は 2 つ考えられる。1 つ目は、維管束鞘細胞における NDH 依存経路の寄与である。*Flaveria* C<sub>4</sub> 種では、NDH 複合体量は *Flaveria* C<sub>3</sub> 種と比較して C<sub>4</sub> 種で 10 倍以上増加しており (Fig.10B)、また維管束鞘細胞に多く存在していた (Fig. 13)。このことから、C<sub>3</sub> 植物と比較して C<sub>4</sub> 植物では、NDH 依存経路の  $\Delta$ pH 形成への貢献度は高くなっていると考えられる。また、*PGRL1i* および *PGR5i* 株では NDH 活性が WT と比較して変化しておらず NDH 依存経路は正常に機能していた (Fig. 29)。そのため、PGR5/PGR1 依存経路の電子伝達活性の抑制によって  $\Delta$ pH の低下が起きても NDH 依存経路が機能することである程度  $\Delta$ pH を形成させ ATP/NADPH 率を整えることで P700 への電子の逆流を防いでいると考えられる。2 つ目は、葉肉細胞における C<sub>4</sub> 型光合成の炭素代謝経路の特殊性が挙げられる。C<sub>4</sub> 植物の葉肉細胞では、RuBisCO のオキシゲナーゼ反応を初発反応とする光呼吸経路が駆動しないため、ATP/NADPH 率は常に 1.5 に保たれており、比較的 ATP を必要としない状態にあると考えられる。ATP 要求量が低い状態では NADPH/ATP 率が高くなり ATP 合成の駆動力となるチラコイド膜内外の  $\Delta$ pH は高くなる。そのため、C<sub>4</sub> 植物の葉肉細胞葉緑体では常に  $\Delta$ pH が高く保たれていると考えられる。実際に、主に葉肉細胞からのシグナルを捉えているとされるクロロフィル蛍光測定において、C<sub>4</sub> 植物である *F. bidentis* の WT と *PGRL1i* #22 では、 $\Delta$ pH 形成によるルーメンの酸性化で誘導される NPQ が 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の弱い光強度で上昇しており、それは C<sub>3</sub> 植物の *F. pringlei* では見られなかった (Fig. 30C)。また、ルーメンの酸性化はシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体におけるプラストキノールの再酸化率を低下させ、光化学系 II から光化学系 I への電子伝達を抑制することが報告されている (Rott et al., 2011)。従って、葉肉細胞葉緑体では常に  $\Delta$ pH とルーメンの酸性化による NPQ の誘導やシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体における電子伝達の抑制が起こりやすい状態にあり、PGR5/PGR1 依存経路が抑制されても光化学系 II から光化学系 I への電子伝達を抑制することで光化学系 I を保護していると予想される。

## 第 4 章

### 総括

本研究では、炭酸固定経路で消費される ATP 量が上昇している C<sub>4</sub> 型光合成において、光化学系 I 循環型電子伝達系がその ATP 生産に関与しているのかについて調査した。*Flaveria* 属植物を用いて、C<sub>3</sub> 植物から C<sub>4</sub> 植物への進化の過程における光化学系 I 循環型電子伝達活性の挙動を調べたところ、循環型電子伝達活性は *Flaveria* C<sub>3</sub> 種と比較して C<sub>4</sub> 種で著しく上昇しており、その上昇値は C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub>-like 種における C<sub>4</sub> 回路の構築度合いと一致することが見いだされた。この結果は、光化学系 I 循環型電子伝達系が C<sub>4</sub> 回路を駆動するための ATP 生産に関与することを強く示唆している。

また、NDH 依存経路に関与する NDH 複合体量は、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種から C<sub>4</sub> 種にかけて C<sub>4</sub> 回路の構築度合いに従って維管束鞘細胞で増加しており、NDH 複合体は葉肉細胞と維管束鞘細胞間および C<sub>3</sub> 種と C<sub>4</sub> 種間の ATP 要求量の変化に対して発現量が応答していることが明らかになった。これに対して、PGR5/PGRL1 依存経路に関わる PGR5 と PGRL1 タンパク質の発現量は葉肉細胞と維管束鞘細胞間の細胞選択性はないものの C<sub>4</sub> 回路が完成している C<sub>4</sub>-like *F. palmeri* と C<sub>4</sub> 種において増加しており、PGR5 と PGRL1 タンパク質は C<sub>3</sub> 種と C<sub>4</sub> 種間の ATP 要求量の変化に対して発現量が応答していることが明らかになった。このことから、NDH 依存経路に加えて、これまで C<sub>4</sub> 型光合成において炭酸固定経路を駆動するための ATP 生産への関与が明らかでなかった PGR5/PGRL1 依存経路も、その ATP 生産に関与していることが示唆された。そこで、*Flaveria* C<sub>4</sub> 種である *F. bidentis* の *PGRL1-RNAi* および *PGR5-RNAi* 形質転換体を用いて光合成活性測定を行い、炭酸固定経路を駆動するための ATP 生産への PGR5/PGRL1 依存経路の関与とその貢献度を調査した。その結果、PGR5/PGRL1 依存経路の抑制は、光合成電子伝達反応による ATP 生産量が光合成活性を律速する条件で、光合成活性の低下を引き起こした。従って、PGR5/PGRL1 依存の光化学系 I 循環型電子伝達系は、炭酸固定経路の代謝速度が増し代謝反応に必要な ATP/NADPH 率が上昇する条件で、高い光合成活性を維持するのに貢献していることが強く示唆された。C<sub>3</sub> 植物の *A. thaliana* の *ogr5* 変異体では、PGR5/PGRL1 依存経路の欠損と光化学系 I の光障害の 2 つの要因によって最大光合成活性が 15 % 低下することが報告されている。これに対して *F.*

*bidentis* の *PGRL1*-RNAi および *PGR5*-RNAi 形質転換体では、光化学系 I の光障害は見受けられず、*PGR5*/*PGRL1* 依存経路の抑制のみによって最大光合成活性が 37% 低下していた。このことから、 $C_3$  植物と比較して  $C_4$  植物では、*PGR5*/*PGRL1* 依存経路の炭酸固定経路を駆動するための ATP 生産への貢献度は高くなっていることが明らかになった。

その一方で、*PGRL1*-RNAi および *PGR5*-RNAi 形質転換体では、*PGR5*/*PGRL1* 依存経路は葉肉細胞と維管束鞘細胞の両方で抑制されているため、両細胞間における *PGR5*/*PGRL1* 依存経路の ATP 生産への貢献度を評価することは難しい。また、 $C_4$  植物における NDH 依存経路の生理機能も未だ明らかとなっていない。これらについては、維管束鞘細胞で特異的に発現する *GLDPA* プロモータ (Engelmann et al., 2008; Wiludda et al., 2012; Schulze et al., 2013) の支配下に置いた RNAi コンストラクトを導入した形質転換体や *NDH*-RNAi 形質転換体を用いて、今後解析してゆく必要がある。

本研究によって、 $C_4$  型光合成では、NDH 複合体および *PGR5*/*PGRL1* 複合体の発現増加に伴って光化学系 I 循環型電子伝達系がその電子伝達活性を上昇させ ATP 生産量を増やすことで、 $C_4$  回路の駆動で上昇した炭酸固定経路に必要な ATP 要求量を賄っていることが強く示唆された。そして、光化学系 I 循環型電子伝達系のうち少なくとも *PGR5*/*PGRL1* 依存の循環型電子伝達系は、炭酸固定経路での ATP 消費量と光合成電子伝達反応による ATP 生産量のバランスを調整し、 $C_4$  型光合成の高い  $CO_2$  固定効率を発揮するための重要な機構であることが明らかになった。

## 謝辞

私は、これまで、ほんとうに多くの方々に助けていただき、そして支えられながら本研究に取り組んできました。

私が光合成研究の世界に足を踏み入れる機会を与えてくださり、研究の厳しさとそれ以上の楽しさを教えてくださった横田明穂教授に深く感謝を申し上げます。横田研で研究するために、奈良先端大に入学して本当によかったです。そして、私の至らない部分をカバーし、5年間根気よく指導してくださった宗景ゆり助教に厚く御礼申し上げます。宗景先生の下に就けたから私は博士後期課程に進学して、研究を今日まで続けることができました。現在神戸大学、ならびに鳥取大学でご活躍なさっている蘆田弘樹准教授と明石欣也准教授には多くの有益な御助言をいただきました。心より感謝いたします。

PEPC 抗体を古本強教授(龍谷大学)に、PGRL1 抗体を久堀徹教授(東京工業大学)に、PsbO 抗体を故 渡辺昭氏に、そして NDH-H 抗体を Dominique Rumeau 博士(Université de la Méditerranée, France)より、ご親切に分与して頂きました。奈良先端科学技術大学院大学、バイオサイエンス研究科、細胞間情報学講座の岩野恵助教には透過型電子顕微鏡の試料作製を行って頂きました。Peter Westhoff博士と Udo Gowik博士(Heinrich Heine University, Germany)には、*F. bidentis* と *F. robusta* のゲノム解析を行って頂きました。以上の方々に心より感謝いたします。

分化・形態形成学講座に在籍していた多くの先輩、同輩、後輩の皆様には本当にお世話になりました。特に、同輩の河野卓成さんとは研究分野が少し離れてはいましたが、それでも5年間同じ研究室に同期がいたことは本当に心強かったです。ありがとう。また、小川太郎博士は大先輩ですが、時には兄のように、また時には友のように接して頂きました。磯の上で釣り糸を垂らしながら行う研究のディスカッションは最高でした。本当にありがとうございました。研究員の方々、技術補佐の方々、そして秘書の原田麻記さんにも大変お世話になりました。横田研最後の年は、学生数が少ないこともあり、皆さんの負担は大きかったかと思います。ですが、学生は皆様のおかげで毎日心地よく研究生活を送ることができました。心より感謝いたします。

最後に、この5年間自分の好きなこととして親不孝なことしてきた私を温かく見守ってくれた家族と、私たちの研究にその身を捧げてくれた *Flaveria* 属植物たちに、心の底から感謝します。

## 参考文献

Allen, J.F. (2002). Photosynthesis of ATP-electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell* 110, 273-276.

Allen, J.F. (2003). Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci.* 8, 15-19.

Arnon, D.I., Allen, M.B., Whatley, F.R. (1954). Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* 174, 394-396.

Arnon, D.I. (1956). Phosphorus metabolism and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 7, 325-354.

Arnon, D.I., Allen, M.B., Whatley, F.R. (1958). Assimilatory power in photosynthesis. *Science* 127, 1026-1034.

Asada, K., Heber, U., and Schreiber, U. (1993). Electron flow to the intersystem chain from stromal components and cyclic electron flow in Maize chloroplasts, as detected in intact leaves by monitoring redox change of P700 and chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Physiol.* 34, 39-50.

Avenson, T.J., Cruz, J.A., and Kramer, D.M. (2005). Regulating the proton budget of higher plant photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 9709-9713.

Bauwe, H. (2011). Photorespiration: the bridge to C<sub>4</sub> photosynthesis. In C<sub>4</sub> photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. Edited by Raghavendra, A.S., and Sage, R.F. (Springer Verlag, Heidelberg-Berlin in press, Netherlands), pp. 81-108.

Bendall, D.S., and Manasse, R.S. (1995). Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 23-28.

Berry, J.A., and Farquhar, G.D. (1978). The CO<sub>2</sub> concentrating function of C<sub>4</sub>

photosynthesis: a biochemical model. In The proceeding of the fourth international congress on photosynthesis. Edited by Hall, D., Coomds, D., and Goodwin, T. (Biochemical Society of London, London), pp. 119-131.

Brown, R.H., and Hattersley, P.W. (1989). Leaf Anatomy of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> species as Related to Evolution of C<sub>4</sub> Photosynthesis. *Plant Physiol.* 91, 1543-1550.

Brown, R.H. (1999). Agronomic implications of C<sub>4</sub> photosynthesis. In C<sub>4</sub> plant biology. Edited by Sage, R.F., and Monson, R.K. (Academic Press, San Diego), pp. 473-507.

von Caemmerer, S., and Hubick, K.T. (1989). Short-term carbon-isotope discrimination in C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species. *Planta* 178, 475-481.

von Caemmerer, S., Millgate, A., Farquhar, G.D., and Furbank, R.T. (1997). Reduction of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by antisense RNA in the C<sub>4</sub> plant *Flaveria bidentis* leads to reduced assimilation rates and increased carbon isotope discrimination. *Plant Physiol.* 113, 469-477.

von Caemmerer, S., and Furbank, R.T. (1999). Modeling of C<sub>4</sub> photosynthesis. In C<sub>4</sub> plant biology. Edited by Sage, R.F. and Monson, R.K. (Academic Press, San Diego), pp. 173-211.

von Caemmerer, S. (2000). Models of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate photosynthesis. In *Biochemical models of leaf photosynthesis*. (CSIRO publishing, Collingwood, Australia), pp. 123-139.

von Caemmerer, S., Hendrickson, L., Quinn, V., Vella, N., Millgate, A.G., and Furbank, R.T. (2005). Reductions of Rubisco activase by antisense RNA in the C<sub>4</sub> plant *Flaveria bidentis* reduces Rubisco carbamylation and leaf photosynthesis. *Plant Physiol.* 137, 747-755.

von Caemmerer, S. (2013). Steady-state models of photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 36, 1617-1630.

Cheng, S.H., Moore, B.D., Edwards, G.E., and Ku, M.S.B. (1988).

Photosynthesis in *Flaveria brownii*, a C<sub>4</sub>-like Species. Leaf anatomy, characteristics of CO<sub>2</sub> exchange, compartmentation of photosynthetic enzymes, and metabolism of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* 87, 867-873.

Chitty, J.A., Furbank, R.T., Marshall, J.S., Chen, Z., and Taylor, W.C. (1994). Genetic transformation of the C<sub>4</sub> plant, *Flaveria bidentis*. *Plant J.* 6, 949-956.

Cousins, A.B., Badger, M.R., and von Caemmerer, S. (2006). Carbonic anhydrase and its influence on carbon isotope discrimination during C<sub>4</sub> photosynthesis. Insights from antisense RNA in *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.* 141, 232-242.

DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schunemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., and Leister, D. (2008). A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132, 273-285.

Eberhard, S., Finazzi, G., and Wollman, F.A. (2008). The dynamics of photosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 42, 463-515.

Edwards, E.J., Osborne, C.P., Strömberg, C.A., Smith, S.A., C<sub>4</sub> Grasses Consortium. (2010). The origins of C<sub>4</sub> grasslands: integrating evolutionary and ecosystem science. *Science* 328, 587-591.

Edwards, G.E., and Voznesenskaya, E.V. (2011). C<sub>4</sub> photosynthesis: kranz forms and single-cell C<sub>4</sub> in terrestrial plants. In C<sub>4</sub> photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. Edited by Raghavendra, A.S., and Sage, R.F. (Springer Verlag, Heidelberg-Berlin in press, Netherlands), pp. 29-61.

Endo, T., Shikanai, T., Takabayashi, A., Asada, K., and Sato, F. (1999). The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection. *FEBS letter* 457, 5-8.

Engelmann, S., Bläsing, O.E., Gowik, U., Svensson, P., Westhoff, P. (2003). Molecular evolution of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in the genus *Flaveria*- a gradual increase from C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> characteristics. *Planta* 217, 717-725.



Engelmann, S., Wiludda, C., Burscheidt, J., Gowik, U., Schlue, U., Koczor, M., Streubel, M., Cossu, R., Bauwe, H., and Westhoff, P. (2008). The gene for the P-subunit of glycine decarboxylase from the C<sub>4</sub> species *Flaveria trinervia*: Analysis of transcriptional control in transgenic *Flaveria bidentis* (C<sub>4</sub>) and *Arabidopsis* (C<sub>3</sub>). *Plant Physiol.* 146, 1773-1785.

Farquhar, G.D., von Caemmerer, S., and Berry, J.A. (1980). A biochemical-model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149, 78-90.

Furbank, R.T., Chitty, J.A., von Caemmerer, S., and Jenkins, C.L.D. (1996). Antisense RNA inhibition of *RbcS* gene expression reduces Rubisco level and photosynthesis in the C<sub>4</sub> plant *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.* 111, 725-734.

Furbank, R.T., Chitty, J.A., Jenkins, C.L.D., Taylor, W.C., Trevanion, S.J., von Caemmerer, S., Ashton, A.R. (1997). Genetic manipulation of key photosynthetic enzymes in the C<sub>4</sub> plant *Flaveria bidentis*. *Aust J. Plant Physiol.* 24, 477-485.

Furumoto, T., Izui, K., Quinn, V., Furbank, R.T., and von Caemmerer, S. (2007). Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase is not essential for high photosynthetic rates in the C<sub>4</sub> species *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.* 144, 1936-1945.

Gleave, A.P. (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organizational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* 20, 1203-1207.

Gowik, U., and Westhoff, P. (2010). The Path from C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> Photosynthesis. *Plant Physiol.* 155, 56-63.

Hashimoto, M., Endo, T., Peltier, G., Tasaka, M., Shikanai, T. (2003). A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 36, 541-549.

Hatch, M.D. (1987). C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895, 81-106.

Herbert, S.K., Fork, D.C., and Malkin, S. (1990). Photoacoustic measurement *in Vivo* of energy storage by cyclic electron flow in algae and higher plants. *Plant Physiol.* 94, 926-934.

Hertle, A.P., Blunder, T., Wunder, T., Pesaresi, P., Pribil, M., Armbruster, U., and Leister, D. (2013). PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. *Molecular Cell* 49, 511-523.

Hofer, M.U., Santore, U.J., and Westhoff, P. (1992). Differential accumulation of the 10-, 16- and 23-kDa peripheral components of the water-splitting complex of photosystem II in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the dicotyledonous C<sub>4</sub> plant *Flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr. *Planta* 186, 304-312.

Holaday, A.S., Lee, K.W., Chollet, R. (1984). C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species in the genus *Flaveria*: leaf anatomy, ultrastructure, and the effect of O<sub>2</sub> on the CO<sub>2</sub> compensation concentration. *Planta* 160, 25-30.

Horvath, E.M., Peter, S.O., Joet, T., Rumeau, D., Cournac, L., Horvath, G.V., Kavanagh, T.A., Schafer, C., Peltier, G., and Medgyesy, P. (2000). Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tabacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol.* 123, 1337-1350.

Hylton, C.M., Rawsthorne, S., Smith, A.M., Jones, D.A., Woolhouse, H.W. (1988). Glycine decarboxylase is confined to the bundle sheath cells of leaves of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species. *Planta* 175, 452-459.

Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T., and Aro, E.M. (2011). Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-Like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiol.* 52, 1560-1568.

Joët, T., Cournac, L., Peltier, G., and Havaux, M. (2002). Cyclic electron flow

around photosystem I in C<sub>3</sub> plants. In vivo control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiol.* 125, 1919-1929.

Joliot, P., and Joliot, A. (2006). Cyclic electron flow in C<sub>3</sub> plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 362-368.

Kanai, R., and Edwards, G.E. (1999). The biochemistry of C<sub>4</sub> photosynthesis. In *C<sub>4</sub> plant biology*. Edited by Sage, R.F. and Monson, R.K. (Academic Press, San Diego) pp. 49-87.

Ketchner, S.L., and Sayre, R.T. (1992). Characterization of the expression of the photosystem II-oxygen evolving complex in C<sub>4</sub> species of *Flaveria*. *Plant Physiol.* 98, 1154-1162.

Klughammer, C., and Schreiber, U. (1994). An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700<sup>+</sup>-absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192; 261-268.

Ku, M.S.B., Monson, R.K., Littlejohn, R.O., Nakamoto, H., Fisher, D.B., and Edward, G.E. (1983). Photosynthetic characteristics of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate *Flaveria* species I. Leaf anatomy, photosynthetic responses to O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, and activities of key enzymes in the C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> pathways. *Plant Physiol.* 71, 944-948.

Ku, M.S.B., Wu, J., Dai, Z., Scott, R.A., Chu, C., and Edward, G.E. (1991). Photosynthetic and photorespiratory characteristics of *Flaveria* species. *Plant Physiol.* 96, 518-528.

Kubicki, A., Funk, E., Westhoff, P., Steinmüller, K. (1996). Differential expression of plastome-encoded *ndh* genes in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of C<sub>4</sub> plant *Sorghum bicolor* indicates that the complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase is involved in cyclic electron transport. *Planta* 199, 276-281.

Laetsch, W.M., and Price, I. (1971). Development of the dimorphic chloroplasts of sugar cane. *American Journal of Botany* 56, 77-87.

Lazo, G.R., Stein, P.A., and Ludwig, R.A. (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology* 9, 963-967.

Lloyd, J., and Farquhar, G. (1994).  $^{13}\text{C}$  discrimination during  $\text{CO}_2$  assimilation by the terrestrial biosphere. *Oecologia* 99, 201-215.

Long, S.P. (1999). Ecology of  $\text{C}_4$  photosynthesis. Environmental Response. In  *$\text{C}_4$  plant biology*. Edited by Sage, R.F. and Monson, R.K. (Academic Press, San Diego), pp. 215-249.

Mills, J.D., Crowther, D., Slovacek, R.E., Hind, G., and McCarty, R.E. (1979). Electron transport pathway in spinach chloroplasts. Reduction of the primary acceptor of photosystem II by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in the dark. *Biochim. Biophys. Acta* 547, 127-137.

Monson, R.K., Ku, M.S.B., and Edward, G.E. (1986). Co-function of  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  photosynthetic pathways in  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  and  $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$  intermediate *Flaveria* species. *Planta* 168, 493-502.

Monson, R.K., and Moore, B.D. (1989). On the significance of  $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$  intermediate photosynthesis to the evolution of  $\text{C}_4$  photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 12, 689-699.

Moore, B.D., Monson, R.K., Ku, M.S.B., and Edward, G.E. (1988). Activities of principal photosynthetic and photorespiratory enzymes in leaf mesophyll and bundle sheath protoplasts from the  $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$  intermediate *Flaveria ramosissima*. *Plant Cell Physiol.* 29, 999-1006.

Moore, B.D., Ku, M.S.B., and Edwards, G.E. (1989). Expression of  $\text{C}_4$ -like photosynthesis in several species of *Flaveria*. *Plant, Cell and Environment* 12, 541-549.

Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., Shikanai, T. (2002). PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential

for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110, 361-371.

Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429, 579-582.

Munekage, N.Y., Genty, B., and Peltier, G. (2008). Effect of PGR5 important on photosynthesis and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49, 1688-1698.

Munekage, Y.N., Eymery, F., Rumeau, D., Cuine, S., Oguri, M., Nakamura, N., Yokota, A., Genty, B., and Peltier, G. (2010). Elevated expression of PGR5 and NDH-H in bundle sheath chloroplasts in C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Cell Physiol.* 51, 664-668.

Nishikawa, Y., Yamamoto, H., Okegawa, Y., Wada, S., Sato, N., Taira, Y., Sugimoto, K., Makino, A., and Shikanai, T. (2012). PGR5-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the redox homeostasis in chloroplasts rather than CO<sub>2</sub> fixation and biomass production in rice. *Plant Cell Physiol.* 53, 2117-2126.

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

Ogren, W.L. (2003). Affixing the O to rubisco: discovering the source of photorespiratory glycolate and its regulation. *Photosynthesis Research* 76, 53-63.

Okegawa, Y., Long, T.A., Iwano, M., Takayama, S., Kobayashi, Y., Covert, S.F., and Shikanai, T. (2007). A balanced PGR5 level is required for chloroplast development and optimum operation of cyclic electron transport around photosystem I. *Plant Cell Physiol.* 48, 1462-1471.

Oswald, A., Streubel, M., Ljungberg, U., Hermans, J., Eskins, K., and Westhoff,

P. (1990). Differential biogenesis of photosystem-II in mesophyll and bundle-sheath cells of 'malic' enzyme NADP<sup>+</sup>-type C<sub>4</sub> plants. *European Journal of Biochemistry* 190, 185-194.

Peisker, M. (1986). Models of carbon metabolism in C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate plants as applied to the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 9, 627-635.

Peng, L., Yamamoto, H., Shikanai, T. (2011). Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 945-953.

Pengelly, J.J.L., Tan, J., Furbank, R.T., and von Caemmerer, S. (2012). Antisense reduction of NADP-malic enzyme in *Flaveria bidentis* reduces flow of CO<sub>2</sub> through the C<sub>4</sub> cycle. *Plant Physiol.* 160, 1070-1780.

Rott, M., Martins, N.F., Thiele, W., Lein, W., Bock, R., Kramer, D.M., and Schöttler, M.A. (2011). ATP synthase repression in tobacco restricts photosynthetic electron transport, CO<sub>2</sub> assimilation, and plant growth by over acidification of the thylakoid lumen. *Plant Cell* 23, 304-321.

Rumpho, M., Ku, M.S.B., Cheng, S.H., and Edwards, G.E. (1984). Photosynthetic characteristics of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate *Flaveria* species. III. Reduction of photorespiration, by a limited C<sub>4</sub> pathway of photosynthesis in *Flaveria ramosissima*. *Plant Physiol.* 75, 993-996.

Rumeau, D., Linka, N.B., Beyly, A., Louwagie, M., Garin, J., and Peltier, G. (2005). New subunits NDH-M, -N, and -O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell* 17, 219-232.

Sage, R.F. (1999). Why C<sub>4</sub> photosynthesis? In *C<sub>4</sub> plant biology*. Edited by Sage, R.F. and Monson, R.K. (Academic Press, San Diego), pp. 3-14.

Sage, R.F. (2004). The evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *New Phytologist* 161, 341-370.

Sage, R.F., Sage, T.L., and Kocacinar, F. (2012). Photorespiration and the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 19-47.

Sage, T.L., Busch, F.A., Johnson, D.C., Friesen, P.C., Stinson, C.R., Stata, M., Sultmanis, S., Rahman, B.A., Rawsthorne, S., and Sage, R.F. (2013). Initial events during the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in C<sub>3</sub> species of *Flaveria*. *Plant Physiol.* 163, 1266-1276.

Sanda, S., Yoshida, K., Kuwano, M., Kawamura, T., Munekage, Y.N., Akashi, K., Yokota, A. (2011). Response of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficient in wild watermelon. *Physiologia Plantarum* 142, 247-264.

Schulze, S., Mallmann, J., Burscheidt, J., Koczor, M., Streubel, M., Bauwe, H., Gowik, U., and Westhoff, P. (2013). Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*: Establishment of a photorespiratory CO<sub>2</sub> pump. *Plant Cell* 25, 2522-2535.

Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H., and Müller, D.J. (2000). Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* 405, 418-419.

Sheen, J.Y., Sayre, R.T., and Bogorad, L. (1987). Differential expression of oxygen-evolving polypeptide genes in maize leaf cell types. *Plant Mol. Biol.* 9, 217-226.

Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K., and Yokota, A. (1998). Directed disruption of the tobacco *ndhB* genes impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9705-9709.

Shikanai, T. (2007). Cyclic electron transport around photosystem I: Genetic approaches. *Ann. Rev. Plant Biol.* 58, 199-217.

Siebke, K., von Caemmerer, S., Badger, M., and Furbank, R.T. (1997). Expressing an *RbcS* antisense gene in transgenic *Flaveria bidentis* leads to an

increased quantum requirement for CO<sub>2</sub> fixed in photosystem I and II. *Plant Physiol.* 115, 1163-1174.

Sugimoto, K., Okegawa, Y., Tohri, A., Long, T.A., Covert, S.F., Hisabori, T., Shikanai, T. (2013). A single amino acid alteration in PGR5 confers resistance to antimycin A in cyclic electron transport around PSI. *Plant Cell Physiol.* 54, 1525-1534.

Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y., Arnon, D.I. (1963). Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49, 567-572.

Takabayashi, A., Kishine, M., Asada, K., Endo, T., and Sato, F. (2005). Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO<sub>2</sub>-concentration mechanism in C<sub>4</sub> photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16898-16903.

Tipple, B.J., and Pagani, M. (2007). The early origins of terrestrial C<sub>4</sub> photosynthesis. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 35, 435-461.

Trevanion, S.J., Furbank, R.T., and Ashton, A.R. (1997). NADP-malate dehydrogenase in the C<sub>4</sub> plant *Flaveria bidentis*. Cosense suppression of activity in mesophyll and bundle-sheath cells and consequences for photosynthesis. *Plant Physiol.* 113, 1153-1165.

Tsuchida, H., Tamai, T., Fukayama, H., Agarie, S., Nomura, M., Onodera, F., Ono, K., Nishizawa, Y., Lee, B.H., Hirose, S., Toki, S., Ku, M.S.B., Matsuoka, M., and Miyao, M. (2001). High level expression of C<sub>4</sub>-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a C<sub>3</sub> plant, rice. *Plant Cell Physiol.* 42, 138-145.

Wiludda, C., Schulze, S., Gowik, U., Engelmann, S., Koczor, M., Streubel, M., Bauwe, H., and Westhoff, P. (2012). Regulation of the photorespiratory *GLDPA* gene in C<sub>4</sub> *Flaveria*: An intricate interplay of transcriptional and posttranscriptional processes. *Plant Cell* 24, 137-151.



Yamamoto, H., Peng, L., Fukao, Y., and Shikanai, T. (2011). An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 1480-1493.

Zachos, J.C., Dickens, G.R., and Zeebe, R.E. (2008). An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. *Nature* 451, 279-283.

## 論文目録

Munekage, N.Y., Eymery, F., Rumeau, D., Cuine, S., Oguri, M., Nakamura, N., Yokota, A., Genty, B., and Peltier, G. (2010). Elevated expression of PGR5 and NDH-H in bundle sheath chloroplasts in C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Cell Physiology* 51, 664-668.

Nakamura, N., Iwano, M., Havaux, M., Yokota, A., and Munekage, N.Y. (2013). Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*. *New Phytologist* 199, 832-842.

## 图表

Table I. *F. bidentis* の形質転換で用いた各培地の組成表

Component	MSO	CRM	SPM1	SPM2	SPM3
<b>Salts</b>	MS* <sup>1</sup>	MS* <sup>1</sup>	MS* <sup>1</sup>	MS* <sup>1</sup>	MS* <sup>1</sup>
<b>B5 Vitamin (1000×) (ml/L)</b>	1	1	1	1	1
<b>Myo-inositol (mg/L)</b>	100	100	100	100	100
<b>Sucrose (g/L)</b>	30	30	30	30	30
<b>MES buffer (mg/L)</b>	-	500	-	-	-
<b>Kinetin (mg/L)</b>	-	4.2	0.5	0.2	-
<b>Adenine (mg/L)</b>	-	20	5	-	-
<b>IAA (mg/L)</b>	-	1	0.05	0.05	-
<b>GA3 (mg/L)</b>	-	-	0.05	0.05	-
<b>PP333 (mg/L)</b>	-	-	0.5	0.2	-
<b>pH</b>	5.8	5.8	6.0	6.0	6.0
<b>Gelling agent (g/L)</b>	8	8	2.8	2.8	2.8

\*1 Murashige and Skoog (MS)培地用混合塩類(和光純薬、大阪)を使用した

\*2 B5 vitamin (1000×) は次の組成で作成した。1 g/L Nicotinic Acid, 1 g/L Pyridoxine HCL, 10 g/L Thiamine HCL

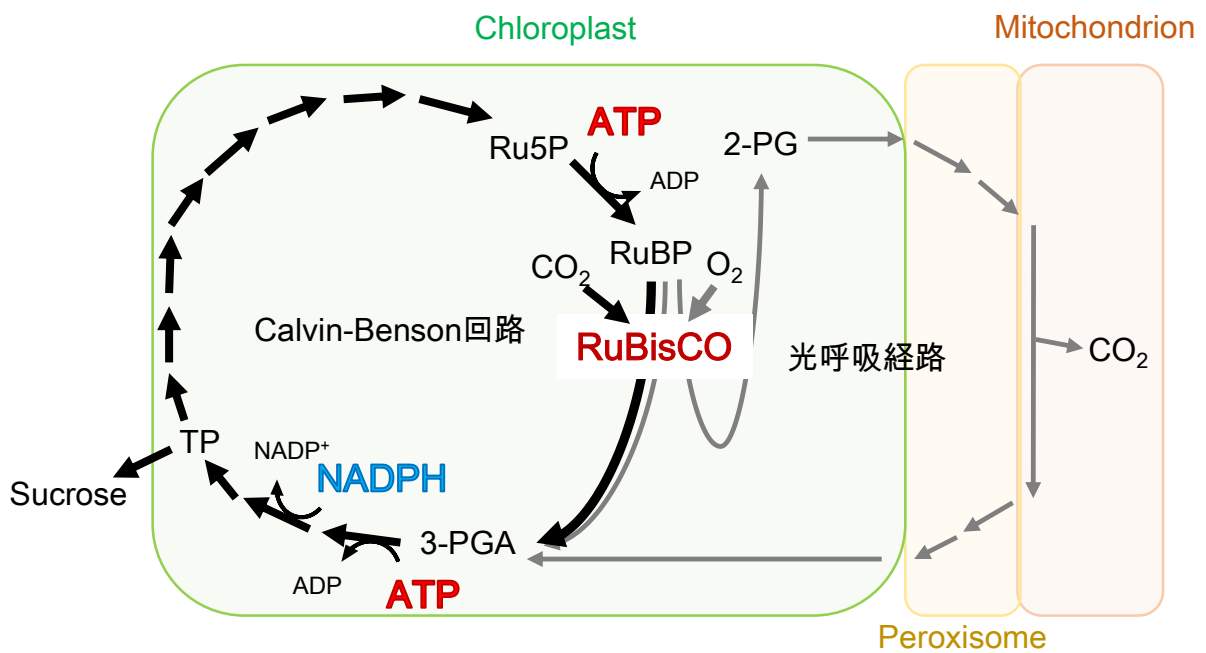
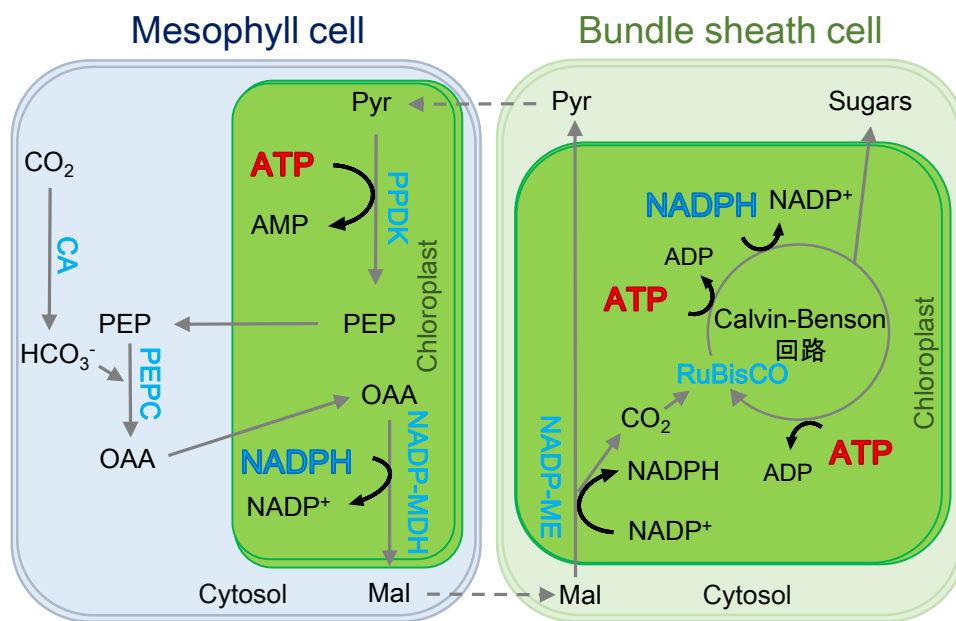


Figure 1. C<sub>3</sub>型光合成の炭酸固定経路の模式図

Calvin-Benson回路は、葉緑体ストロマで行われている。一方で、光呼吸経路は、葉緑体、ペルオキシソーム、ミトコンドリアの3つのオルガネラに渡っており、ミトコンドリアにおいてCO<sub>2</sub>が放出される。Calvin-Benson回路の代謝の流れは黒色の矢印で、光呼吸経路の代謝の流れは灰色の矢印で示した。枠線の緑は葉緑体、黄はペルオキシソーム、茶はミトコンドリアを示す。

Ru5P, ribulose 5-phosphate; RuBP, ribulose 1, 5-bisphosphate; 2-PG, 2-phosphoglycolate; 3-PGA, 3-phosphoglycerate; TP, triose phosphate



NADP-ME型C<sub>4</sub>植物

Figure 2. C<sub>4</sub>型光合成のC<sub>4</sub>回路の模式図

C<sub>4</sub>植物は、C<sub>4</sub>酸の脱炭酸酵素の種類によって、NADP-ME型、NAD-ME型、そしてPEPCK型の3つのサブタイプに分類される。本研究で用いている *Flaveria* C<sub>4</sub>種はNADP-ME型C<sub>4</sub>植物に分類されているため、今回はNADP-ME型C<sub>4</sub>植物のC<sub>4</sub>回路の代謝経路のみを示す。代謝酵素は水色の文字で、代謝産物は黒色の文字で示した。

CA, carbonic anhydrase; NADP-MDH, NADP-malate dehydrogenase; NADP-ME, NADP-malic enzyme; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; PPDK, pyruvate orthophosphate dikinase; RuBisCO, ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase.

Mal, malate; OAA, oxaloacetate; PEP, phosphoenolpyruvate; Pyr, pyruvate.

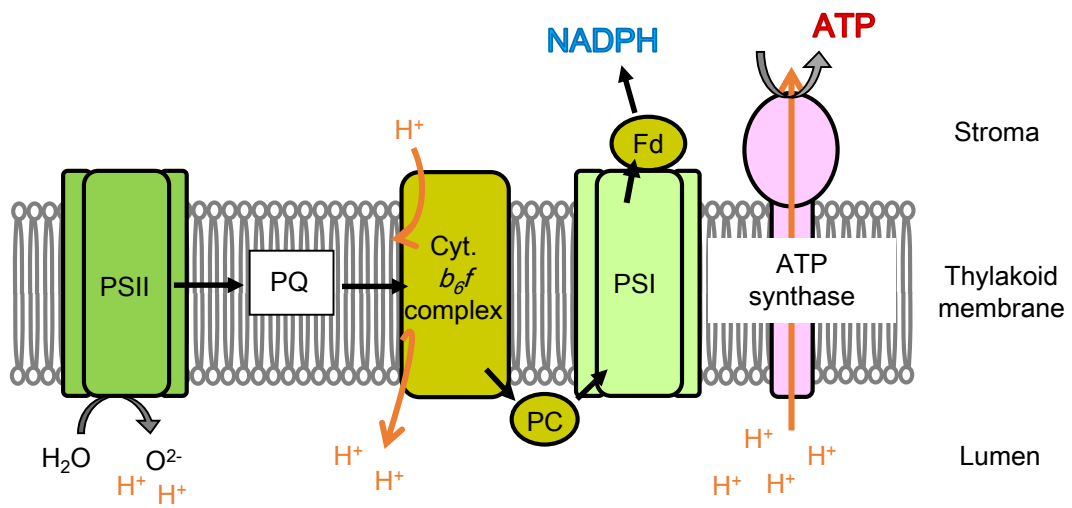


Figure 3. 直鎖型電子伝達系の模式図

電子の流れは黒色の矢印で、プロトンの流れは橙色の矢印で示した。

Cyt. *b<sub>6</sub>f* complex, cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex; Fd, ferredoxin; PC, plastocyanine; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; PQ, plastoquinone

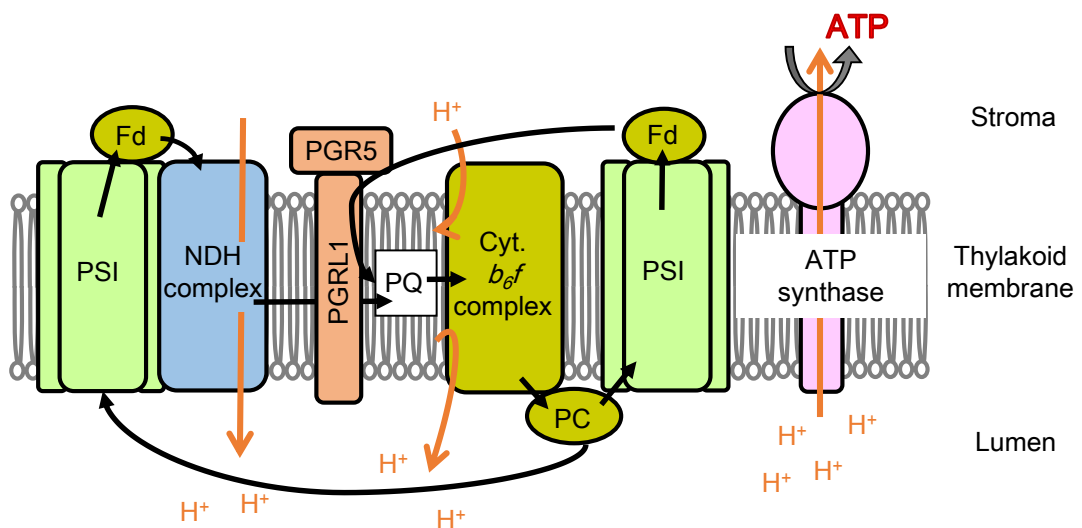


Figure 4. 光化学系I循環型電子伝達系の模式図

電子の流れは黒色の矢印で、プロトンの流れは橙色の矢印で示した。

Cyt. *b<sub>6</sub>f* complex, cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex; Fd, ferredoxin; NDH complex, chloroplast NADH dehydrogenase-like complex; PC, plastocyanine; PGR5, PROTON GRADIENT REGULATION 5; PGR1, PGR5-Like 1; PSI, photosystem I; PQ, plastoquinone



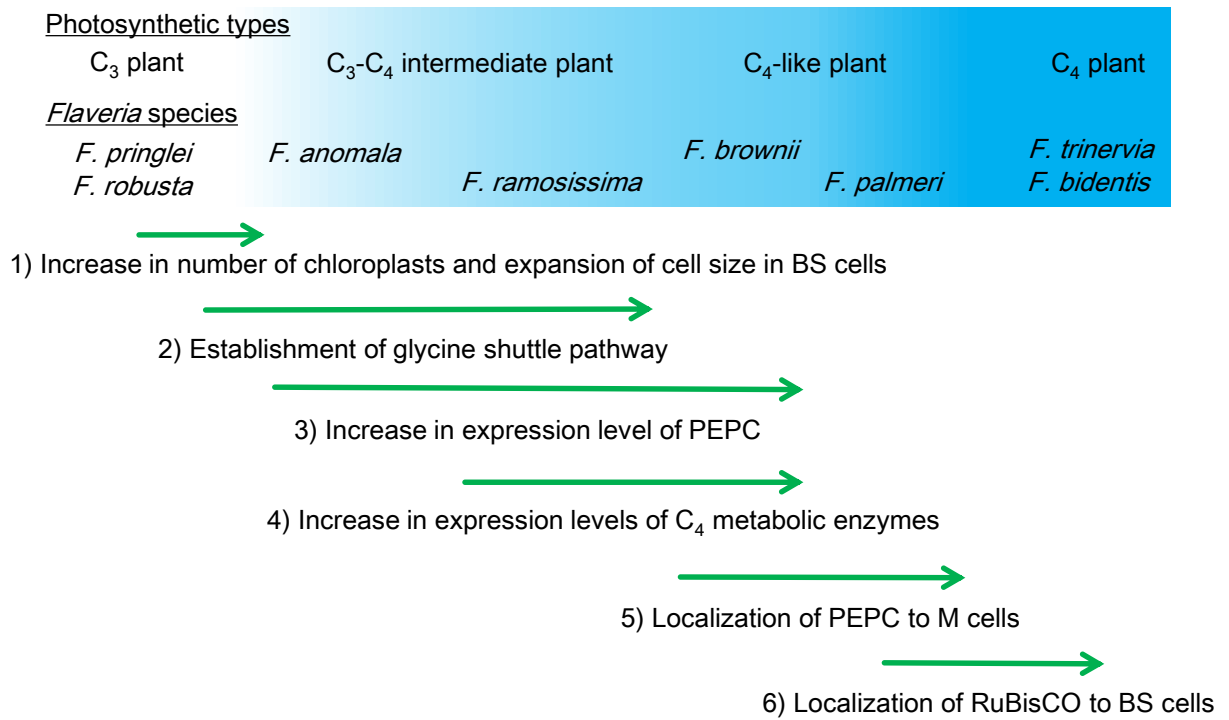


Figure 5. C<sub>4</sub>型光合成進化における炭酸固定経路の構築過程のモデル

本論文で示したモデルは、Sage (2004, 2012)とGowik and Westhoff (2010) を参考にして作成した。

BS cells, bundle sheath cells; M cells, mesophyll cells

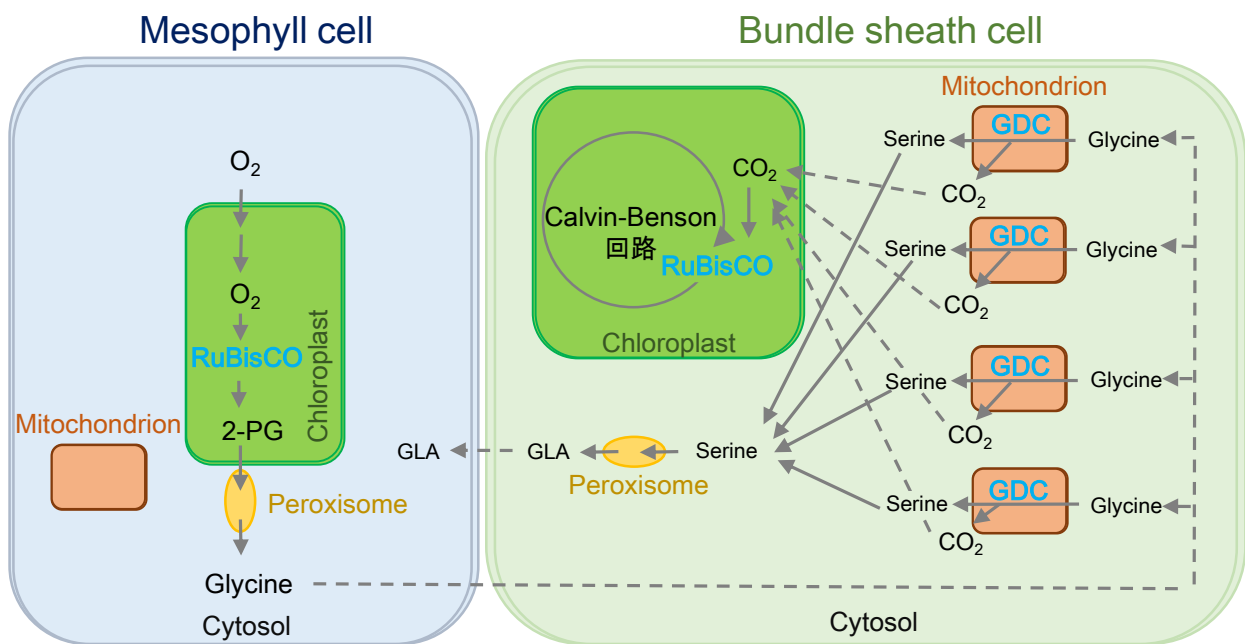


Figure 6. グリシンシャトル経路の模式図

代謝酵素は水色の文字で、代謝産物は黒色の文字で示した。

GDC, glycine decarboxylase; GLA, glyceric acid; 2-PG, 2-phosphoglycolate

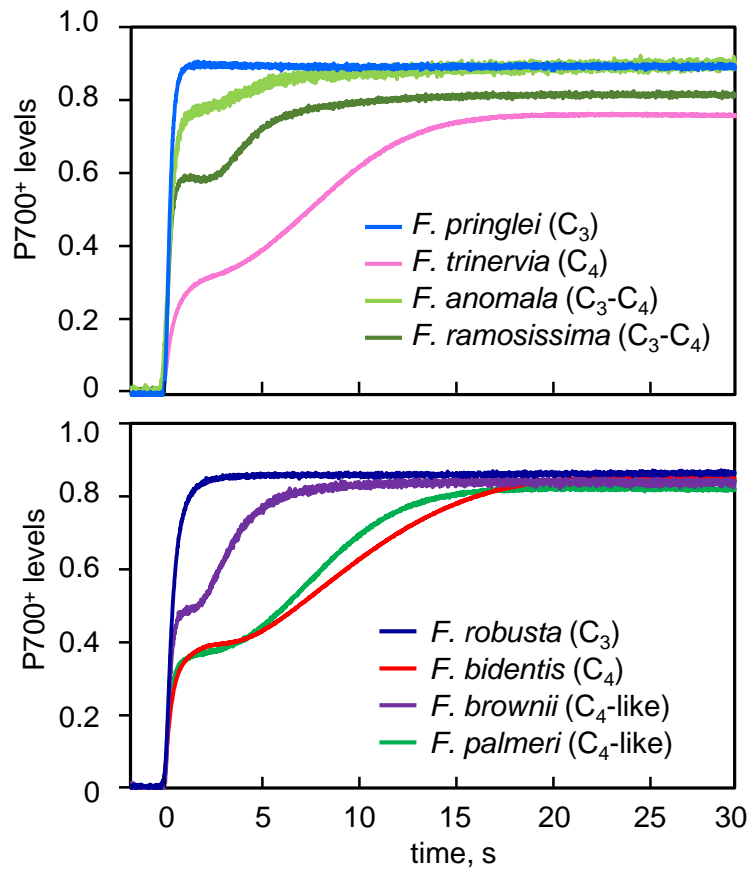
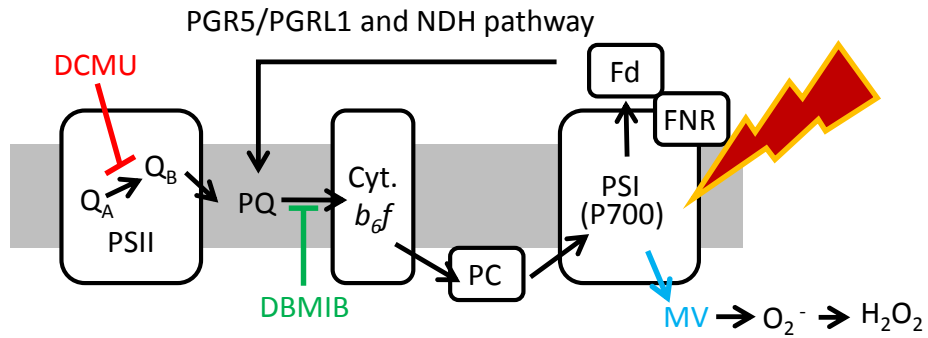


Figure 7. *Flaveria* C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>-like, C<sub>4</sub> 種を用いた光化学系I循環型電子伝達活性の *In vivo* 測定

各*Flaveria*属植物の生葉へ近赤外光(720 nm, 17.2 Wm<sup>-2</sup>)を照射した時の光化学系I反応中心P700の酸化速度を測定した。P700の酸化率は、近赤外光存在下でxenon flash飽和光(50 ms, 1500 Wm<sup>-2</sup>)を照射した時のP700最大酸化レベルで補正した。データは3個体の平均値を示す。

(A)



(B)

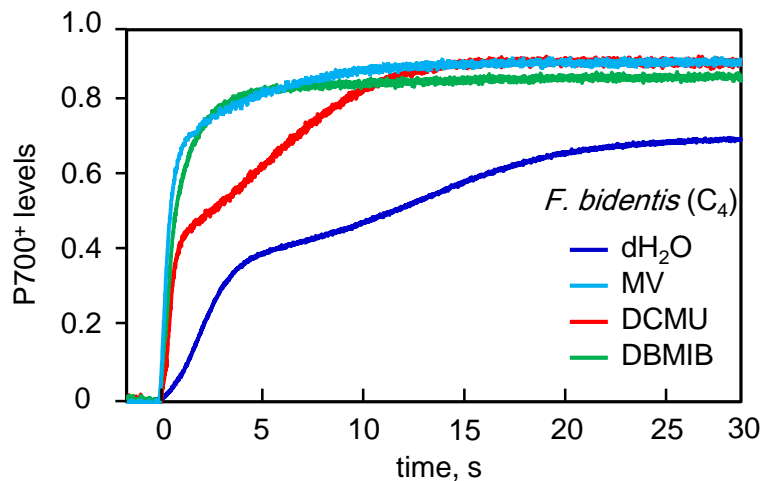


Figure 8. 光合成電子伝達阻害剤が与える*F. bidentis* ( $C_4$ )のP700酸化速度への影響

(A)各光合成電子伝達阻害剤の作用点。methyl viologen(MV)は、P700からフェレドキシンへの電子伝達を阻害するため、P700からフェレドキシンへの電子伝達を阻害する。dichlorophenyl dimethylurea (DCMU)は、光化学系II内でキノン化合物の $Q_A$ から $Q_B$ への電子伝達を阻害する。dibromomethylisopropyl benzoquinone (DBMIB)は、プラストキノンからシトクロム $b_6f$ 複合体への電子伝達を阻害する。(B)各光合成電子伝達阻害剤を*F. bidentis* ( $C_4$ )のリーフディスクへ減圧浸透させた時の、P700酸化速度。dH<sub>2</sub>O(コントロール), 50  $\mu$ mol MV, 50  $\mu$ mol DCMU, 100  $\mu$ mol DBMIBは、近赤外光照射前に*F. bidentis* ( $C_4$ )のリーフディスクへ減圧浸透させた。データは、3回の平均値を示す。

Cyt.  $b_6f$ , cytochrome  $b_6f$  complex; Fd, ferredoxin; FNR, ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase; PC, plastocyanine; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; PQ, plastoquinone.

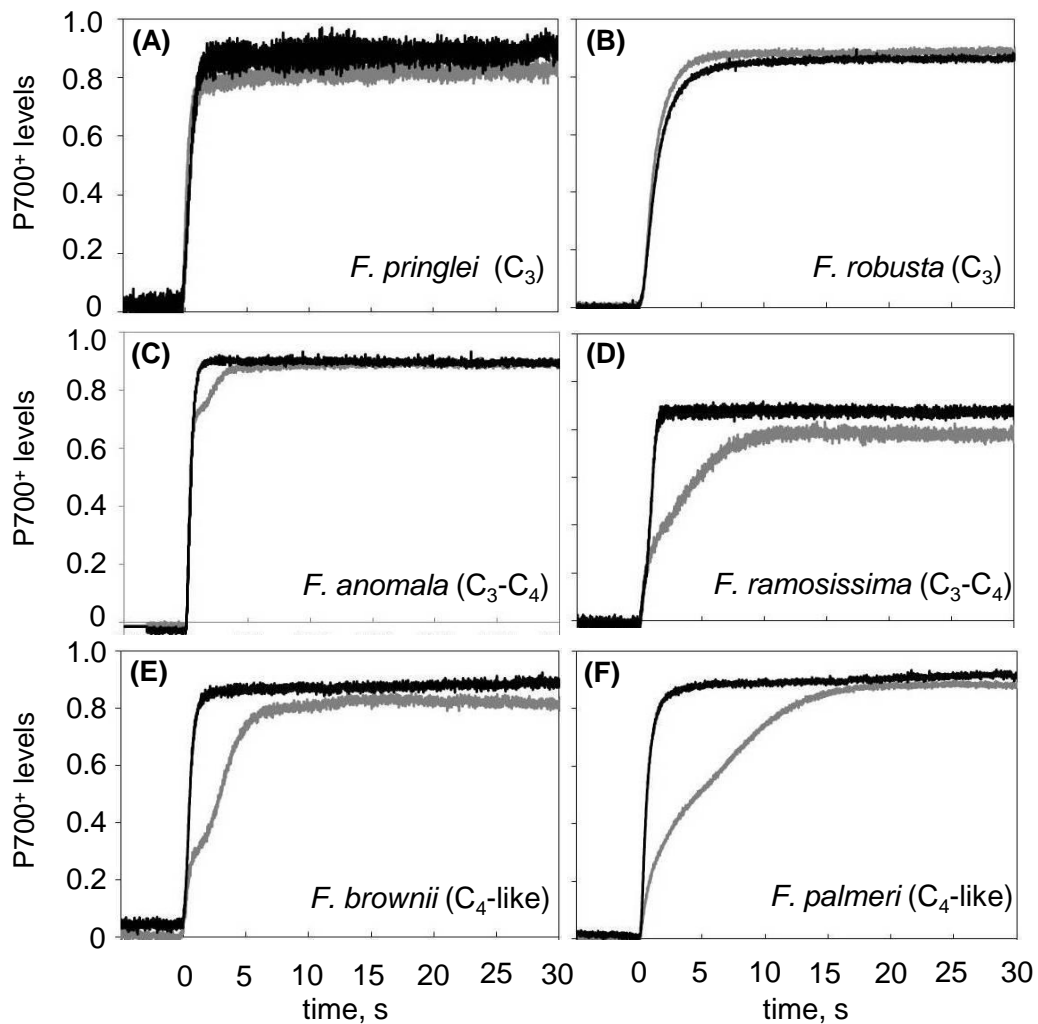


Figure 9. MVが与える*Flaveria* C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>-like種のP700酸化速度への影響

dH<sub>2</sub>O (コントロール), 50 μmol MVは、近赤外光照射前に(A) C<sub>3</sub> *F. pringlei*, (B) C<sub>3</sub> *F. robusta*, (C) C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> *F. anomala*, (D) C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> *F. ramosissima*, (E) C<sub>4</sub>-like *F. brownii*, (F) C<sub>4</sub>-like *F. palmeri* のリーフディスクへ減圧浸透させた。データは、3回の平均値を示す。

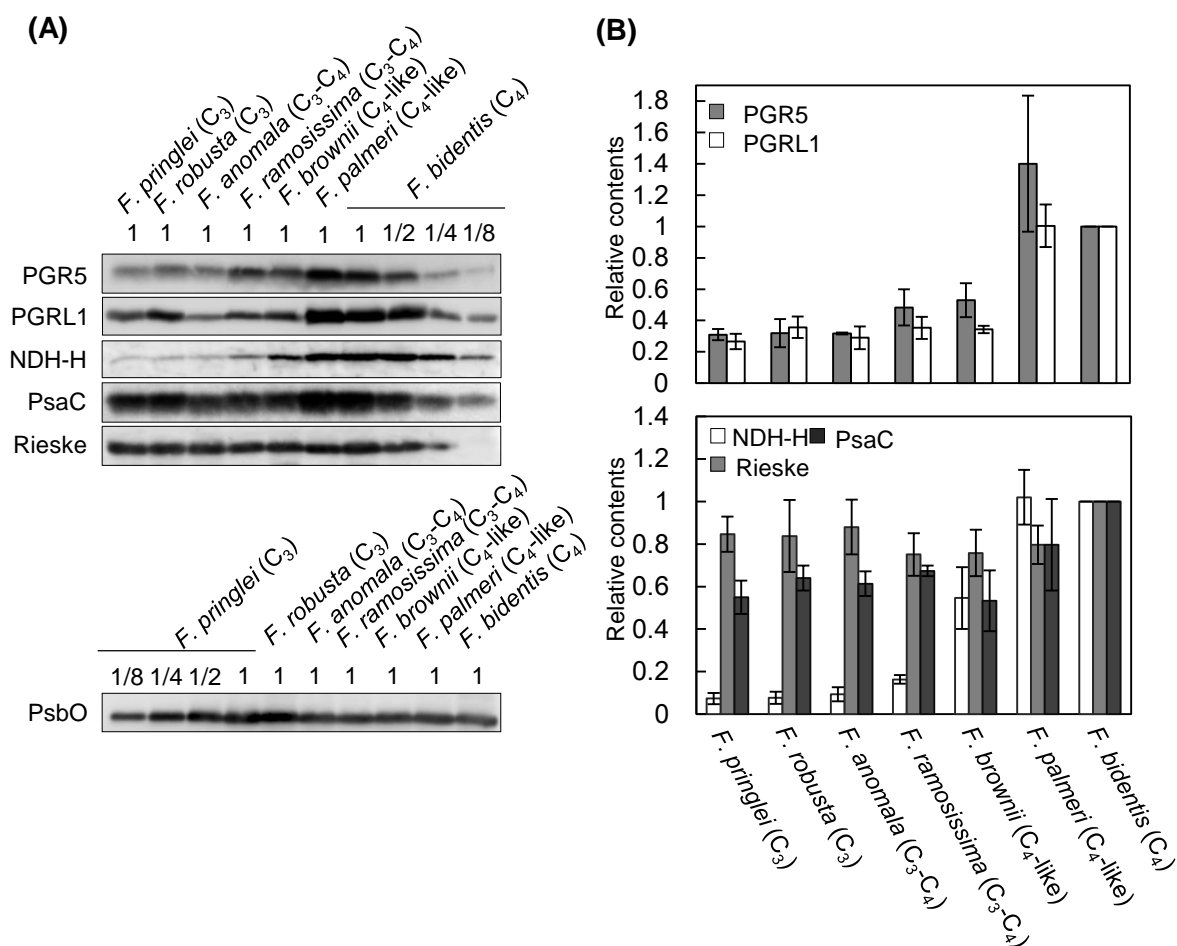


Figure 10. *Flaveria* C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>-like, C<sub>4</sub>種におけるPGR5, PGRL1, NDH-H, PsaC, Rieske, PsbOタンパク質の相対的発現量

(A)各*Flaveria*属植物から抽出した全膜タンパク質を用いたウエスタンブロット分析。PGR5, NDH-HそしてRieskeは20 μg、PsaCは10 μg、PGRL1とPsbOは5 μgのタンパク質を泳動し、それらのタンパク質量を1として*F. bidentis* (C<sub>4</sub>)では1/8量までの希釈系列を作成した。

(B) *Flaveria* C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>-like, C<sub>4</sub>種におけるPGR5, PGRL1, NDH-H, PsaC, Rieskeタンパク質の相対的発現量。イメージング解析ソフト(LAS-4000)を用いて、ウエスタンブロット解析で検出されたバンド強度からタンパク質発現量を定量した。データは3回の平均値とその標準偏差を示し、*F. bidentis* (C<sub>4</sub>)の値を1とした時の各種の相対値を示す。

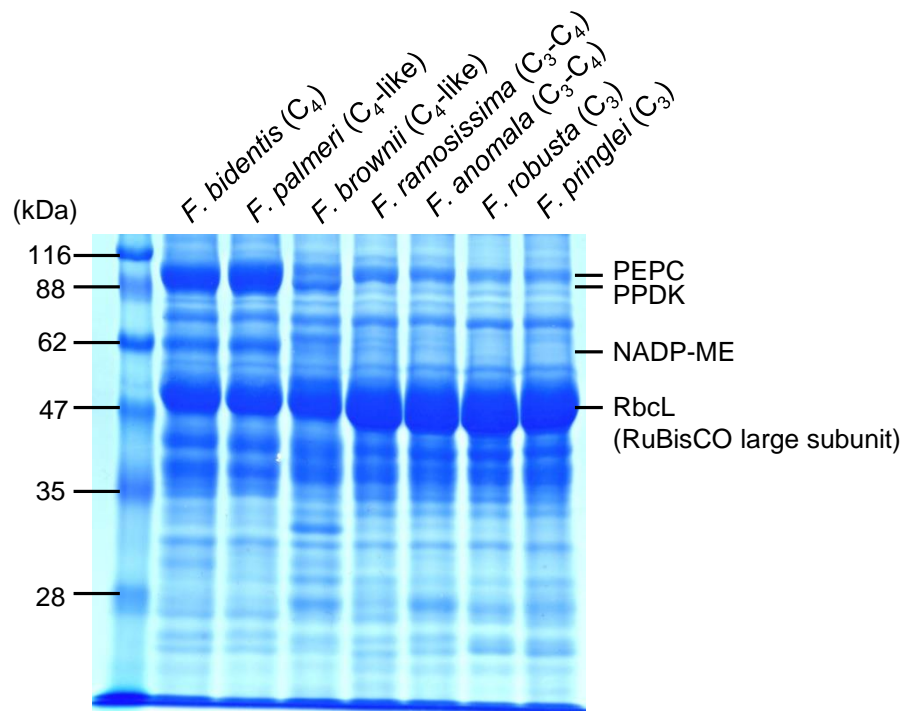


Figure 11. *Flaveria* C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>-like, C<sub>4</sub>種の可溶性タンパク質を用いた SDS-PAGE

各*Flaveria*属植物から抽出した全可溶性タンパク質(20 μg)は、12.5 %アクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、Coomassie brilliant blue R-250で染色した。

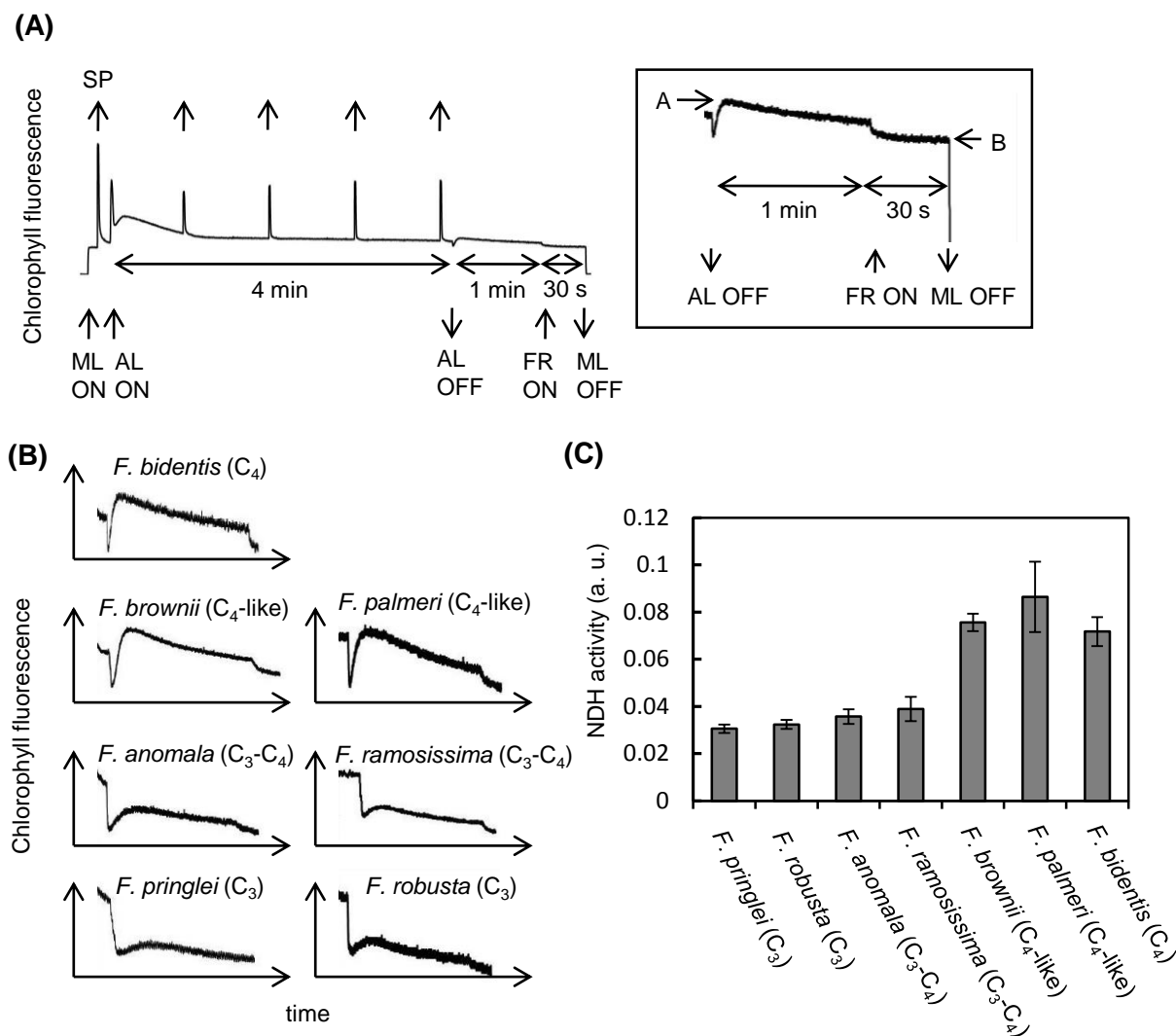


Figure 12. *Flaveria*  $C_3$ ,  $C_3$ - $C_4$ ,  $C_4$ -like,  $C_4$ 種のNDH活性

(A) 光合成誘導光照射下での *F. bidentis* ( $C_4$ ) のクロロフィル蛍光曲線(左図)。植物を2時間暗所に置き、その後、生葉に光合成誘導光(AL;  $53 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )を4分間照射した。MLはmeasuring light(測定光)を、SPはsaturating pulse light(飽和光)を、FRはfar-red light(近赤外光)を意味する。AL消光後のクロロフィル蛍光の一過的上昇は、NDH活性に由来する。右の図は、左の図のクロロフィル蛍光の一過的上昇の部分拡大したものになる。右の図のAの矢印はクロロフィル蛍光の一過的上昇の最大値を、Bの矢印は最小値を示している。

(B) 各 *Flaveria* 属植物のAL消光後のクロロフィル蛍光の一過的上昇の拡大図。クロロフィル蛍光のレベルは、飽和光を照射した時の最大クロロフィル蛍光値で補正した。  
 (C) AL消光後のクロロフィル蛍光の一過的上昇の振り幅から算出したNDH活性値。NDH活性値は次の式から算出した。NDH活性 = (A-B)/最大クロロフィル蛍光値。データは3個体の平均値とその標準偏差を示している。



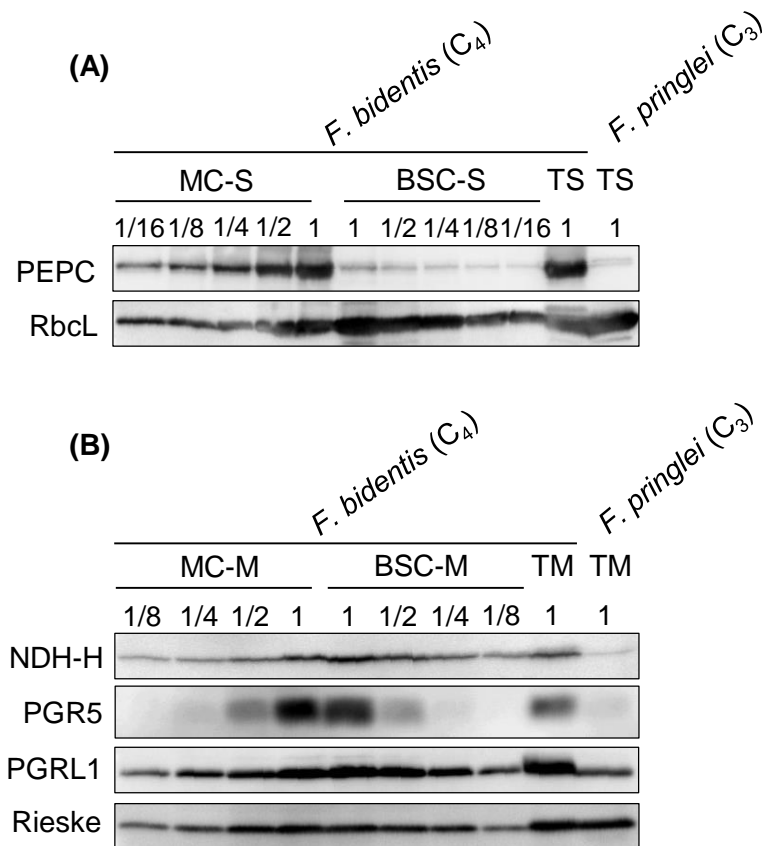


Figure 13. *F. bidentis* (C<sub>4</sub>)の葉肉細胞と維管束鞘細胞間での、PGR5, PGRL1, NDH-Hタンパク質発現の細胞選択性

(A) *F. bidentis* (C<sub>4</sub>) の葉肉細胞と維管束鞘細胞画分から抽出した可溶性タンパク質を用いた、PEPC, RbcLのウエスタンブロット分析。PEPCとRbcLは、それぞれ葉肉細胞と維管束鞘細胞のマーカとして使用した。葉肉細胞画分から抽出した可溶性タンパク質(MC-S)、維管束鞘細胞画分から抽出した可溶性タンパク質(BSC-S)そして全葉から抽出した全可溶性タンパク質(TS)は、5 μg泳動した。5 μgのタンパク質量を1として、1/16量までの希釈系列を作成した。

(B) *F. bidentis* (C<sub>4</sub>) の葉肉細胞と維管束鞘細胞画分から抽出した膜タンパク質を用いた、PGR5, PGRL1, NDH-H, Rieskeのウエスタンブロット分析。葉肉細胞画分から抽出した膜タンパク質(MC-M)、維管束鞘細胞画分から抽出した膜タンパク質(BSC-M)そして全葉から抽出した全膜タンパク質(TM)を使用した。PGR5、NDH-HそしてRieskeは20 μg、PGRL1は5 μgのタンパク質を泳動した。それらのタンパク質量を1として、1/8量までの希釈系列を作成した。

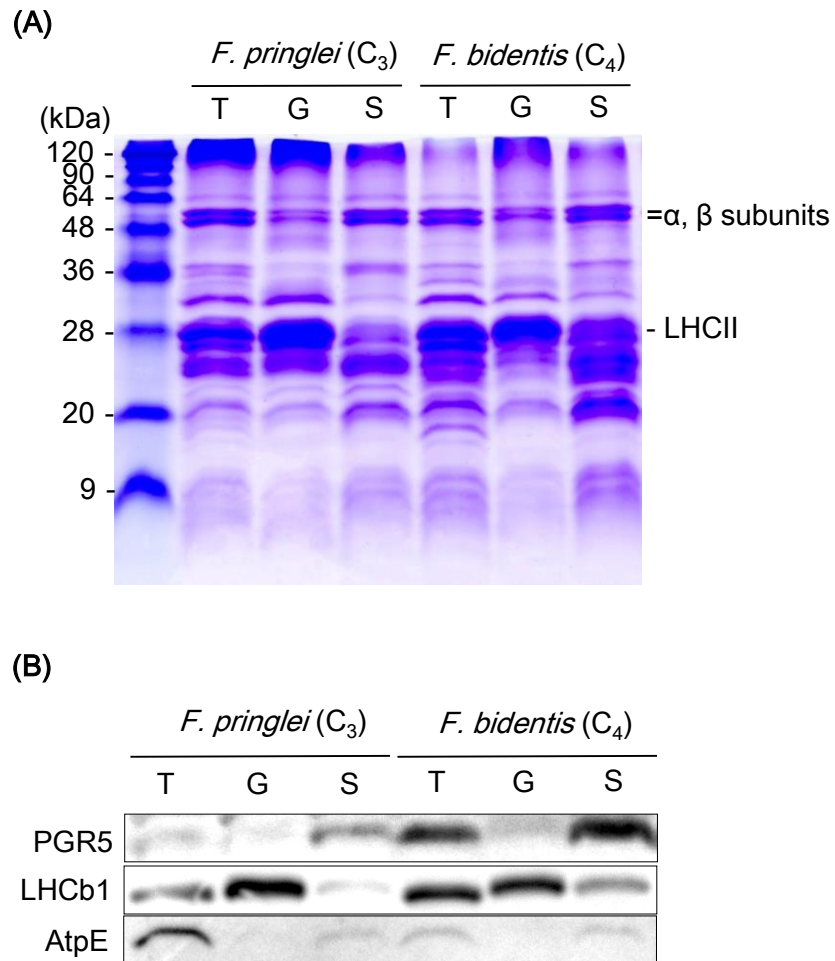


Figure 14. *F. bidentis* (C<sub>4</sub>)と*F. pringlei* (C<sub>3</sub>)の葉緑体チラコイド膜上におけるPGR5タンパク質の分布

(A)全チラコイド膜画分(T)、グラナチラコイド画分(G)、ストロマチラコイド画分(S)からそれぞれ抽出した膜タンパク質を用いたSDS-PAGE。各画分から抽出した膜タンパク質の10 μgを泳動した。

(B)PGR5, LHCb1, AtpEのウエスタンブロット分析。PGR5は20 μg、LHCb1とAtpEは5 μgのタンパク質を泳動した。

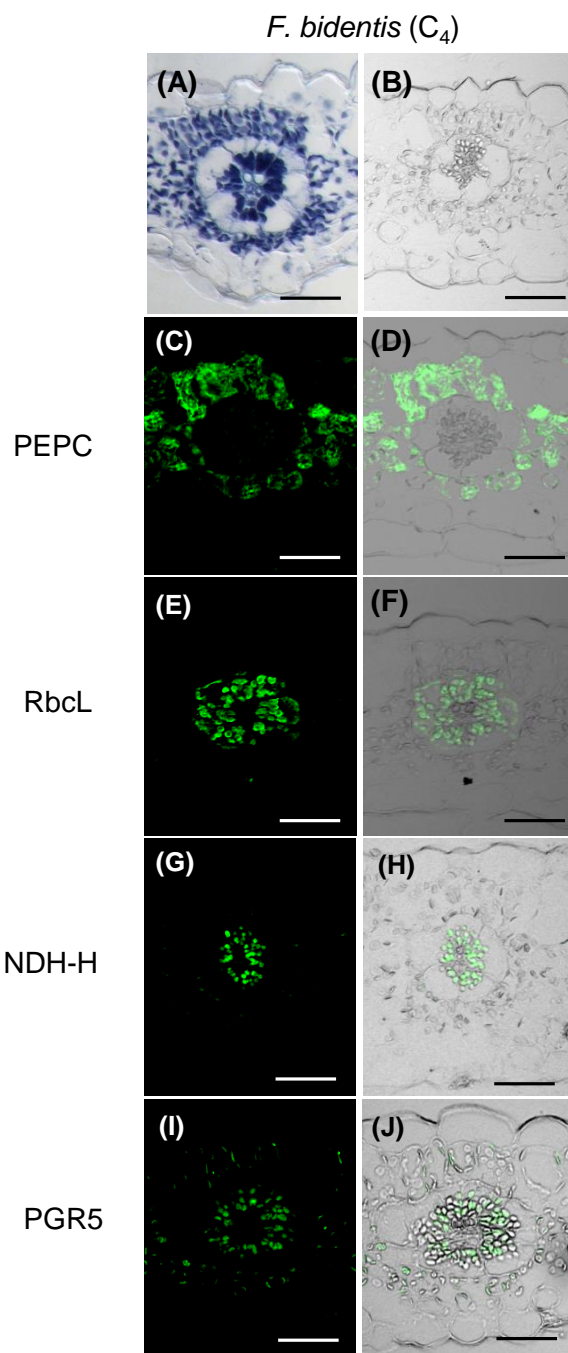


Figure 15. *F. bidentis* (C<sub>4</sub>)におけるPEPC, RbcL( RuBisCO large subunit), PGR5, NDH-HのIn situ 免疫染色

葉横断切片は、組織形態観察のためにトルイジンブルーO (A)で染色し、また、各タンパク質の細胞局在性を確認するために感作前血清抗体(B)、抗PEPC抗体 (C and D)、抗RbcL抗体(E and F)、抗NDH-H抗体(G and H)、抗PGR5抗体(I and J)でそれぞれ抗体反応を行った。

(C, E, G, I)の写真はFITCシグナルのみを示し、(D, F, H, J)の写真はFITCシグナルと明視野像を統合したものである。Barは50 μmを示す。

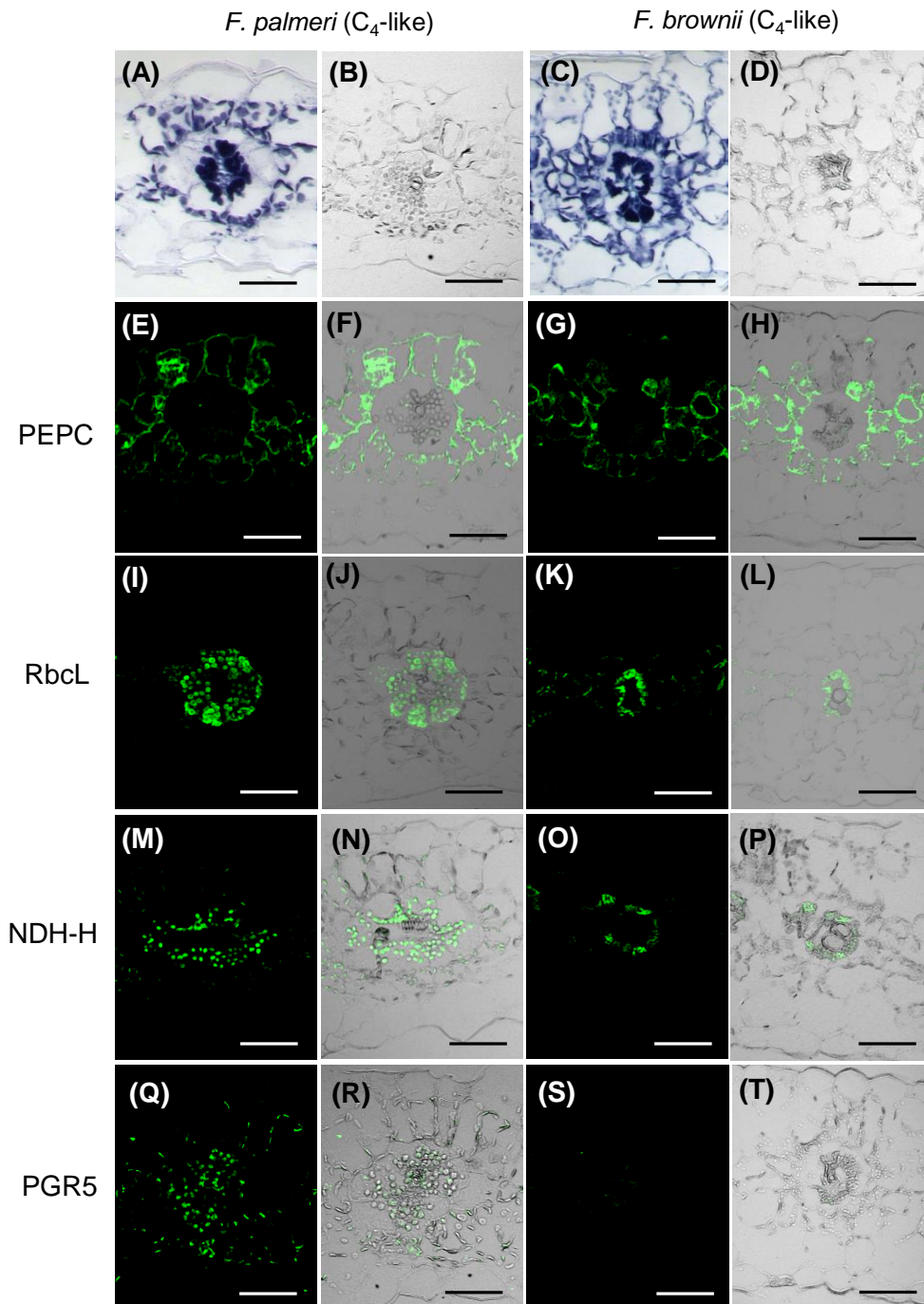


Figure 16. *F. palmeri* (C<sub>4</sub>-like)と*F. brownii* (C<sub>4</sub>-like)におけるPEPC, RbcL, PGR5, NDH-Hの*In situ* 免疫染色

葉横断切片は、組織形態観察のためにトルイジンブルーO (A and C)で染色し、また、各タンパク質の細胞局在性を確認するために感作前血清抗体(B and D)、抗PEPC抗体(E to H)、抗RbcL抗体(I to L)、抗NDH-H抗体(M to P)、抗PGR5抗体(Q to T)でそれぞれ抗体反応を行った。

(E, G, I, K, M, O, Q, S)の写真はFITCシグナルのみを示し、(F, H, J, L, N, P, R, T)の写真はFITCシグナルと明視野像を統合したものである。Barsは50 μmを示す。

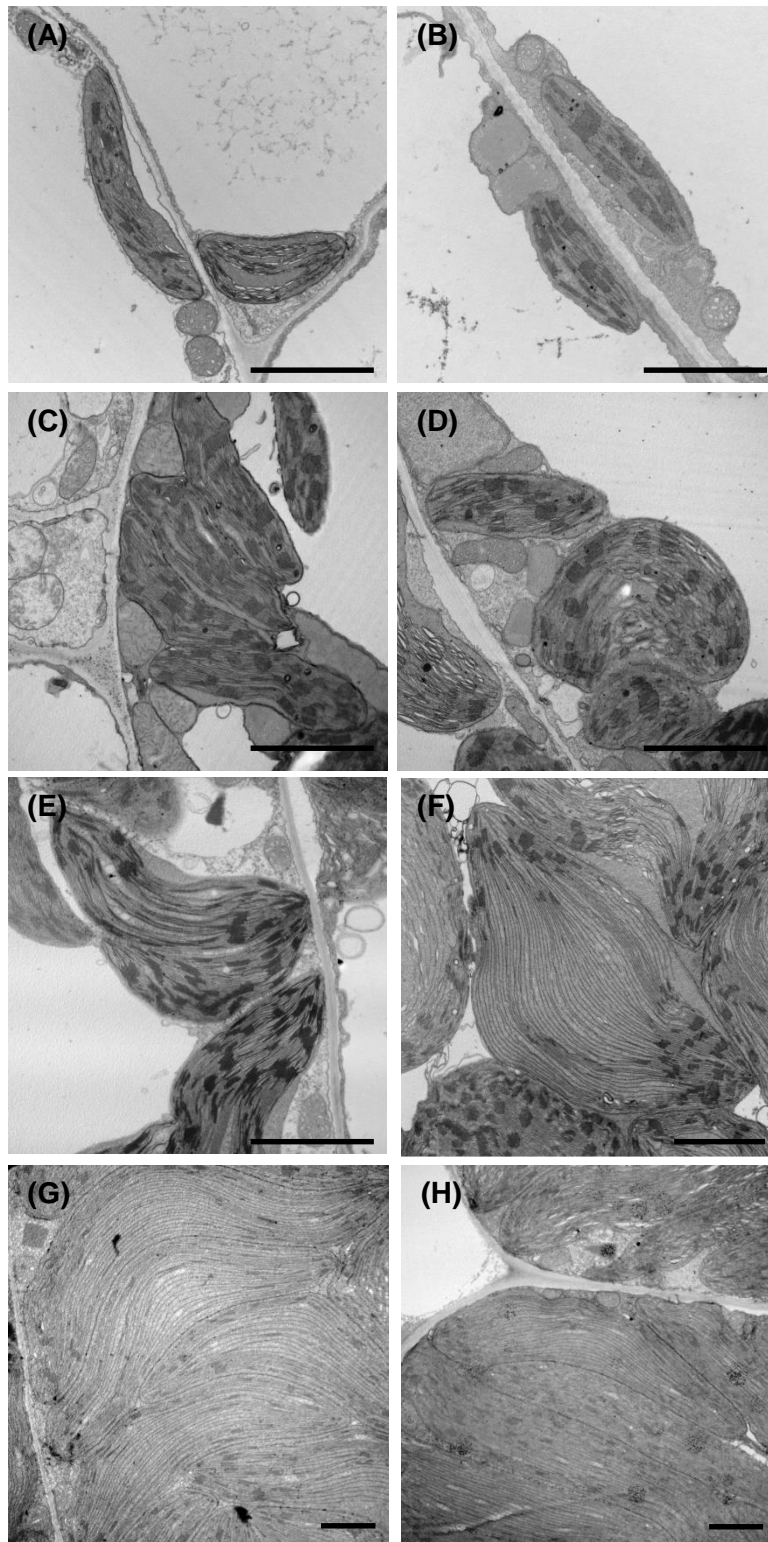


Figure 17. *Flaveria* C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>-like, C<sub>4</sub>種の維管束鞘細胞葉緑体のチラコイド膜構造

チラコイド膜構造の観察は透過型電子顕微鏡を用いて行った。(A) C<sub>3</sub> *F. pringlei*, (B) C<sub>3</sub> *F. robusta*, (C) C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> *F. anomala*, (D) C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> *F. ramosissima*, (E) C<sub>4</sub>-like *F. brownii*, (F) C<sub>4</sub>-like *F. palmeri*, (G) C<sub>4</sub> *F. bidentis*, (H) C<sub>4</sub> *F. trinervia*. Barは2.5 μmを示す。

Bundle sheath chloroplasts

Mesophyll chloroplasts

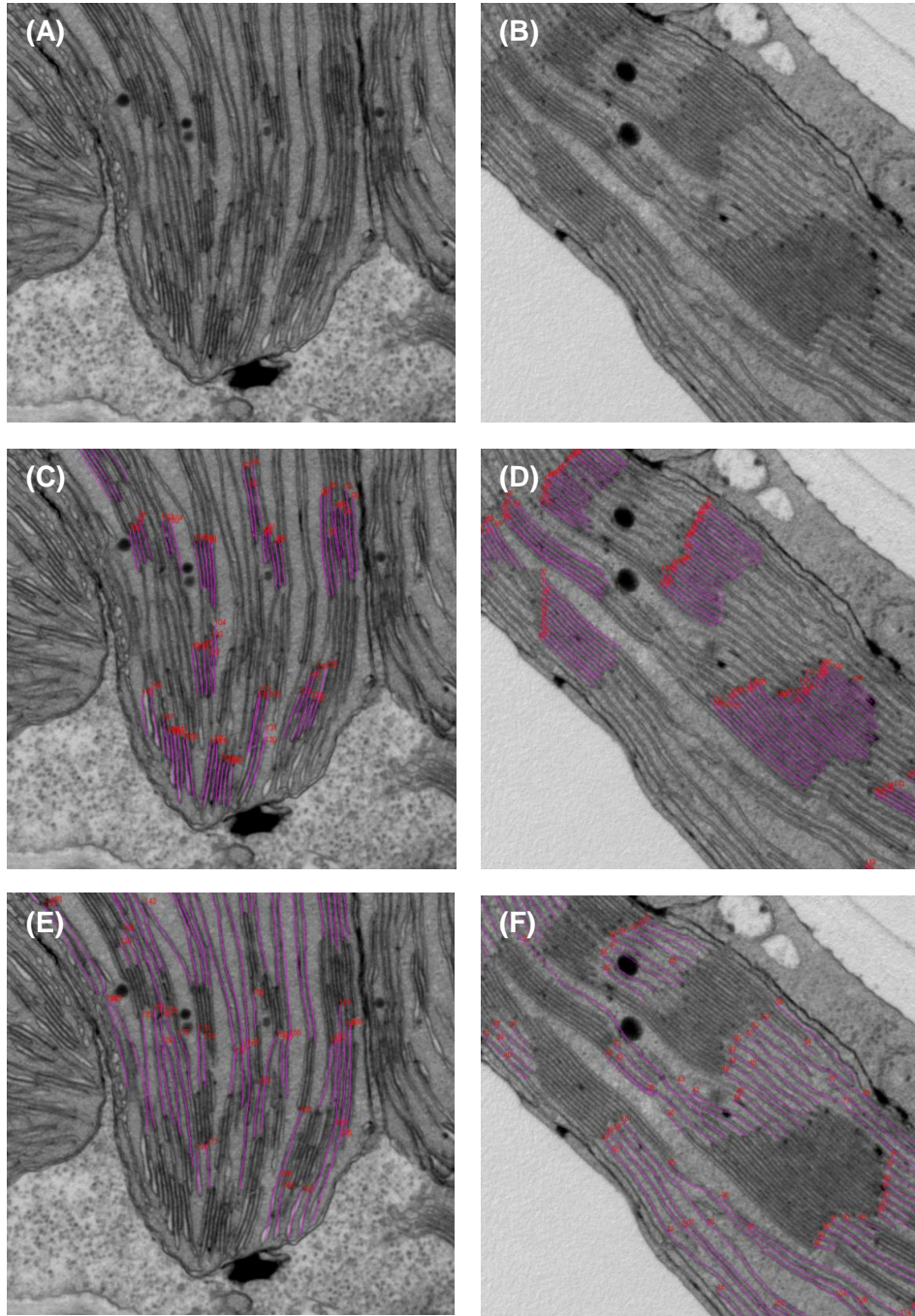


Figure 18. 維管束鞘細胞葉緑体と葉肉細胞葉緑体におけるチラコイド膜長の測定

維管束鞘細胞葉緑体(A, C, E)と葉肉細胞葉緑体(B, D, F)の透過型電子顕微鏡写真を用いて、チラコイド膜の長さを測定した。測定には、画像解析ソフト(WinROOF)を用いた。(C)と(D)のピンクの線はグラナチラコイドを、(E)と(F)のピンクの線はストロマチラコイドをなぞって、その長さを測定したものである。

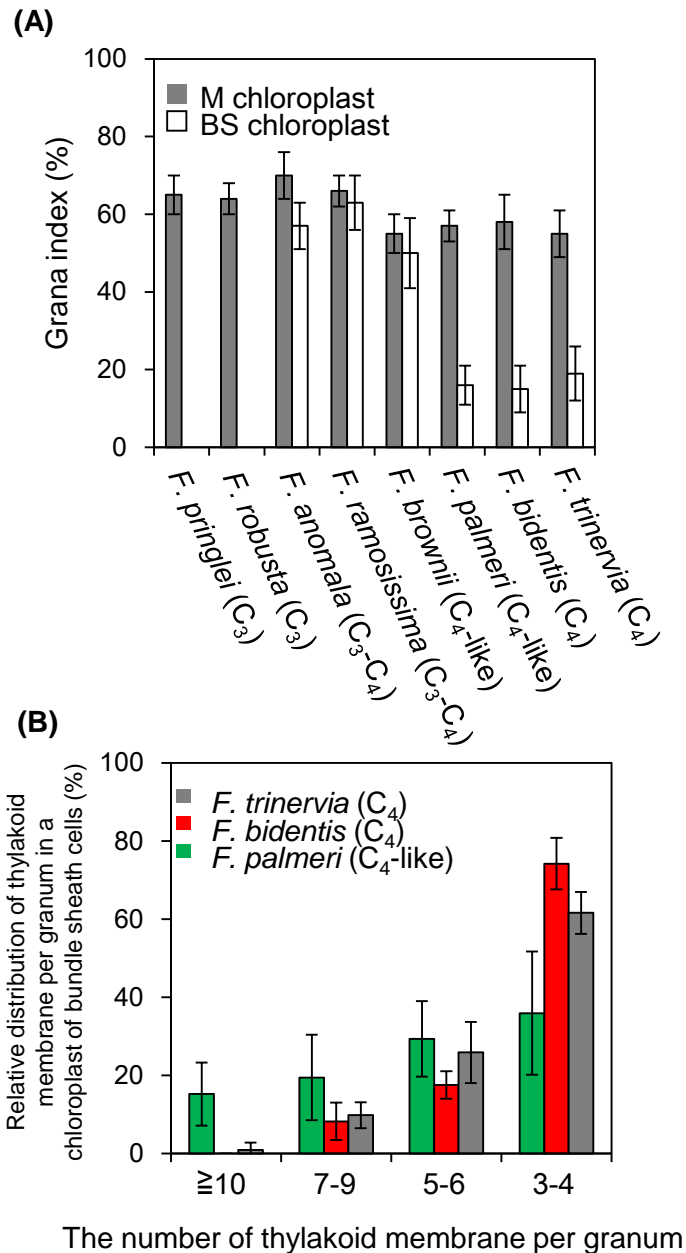


Figure 19. *Flaveria* C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>-like, C<sub>4</sub>種の葉肉細胞と維管束鞘細胞における葉緑体グラナの発達度合い

(A) 各*Flaveria*属植物の葉肉細胞葉緑体(M chloroplast; gray bar)と維管束鞘細胞葉緑体(BS chloroplast; white bar)におけるグラナ指数。グラナ指数(%)は、次の式から求めた。グラナ指数(%) = グラナチラコイド膜の全長/全チラコイド膜の全長×100。データは15個の葉緑体から求めた値の平均値とその標準偏差を示す。

(B) *F. bidentis* (C<sub>4</sub>), *F. trinervia* (C<sub>4</sub>), *F. palmeri* (C<sub>4</sub>-like) の維管束鞘細胞葉緑体におけるグラナあたりのチラコイド膜層数。データは5個の葉緑体から求めた値の平均値とその標準偏差を示す。

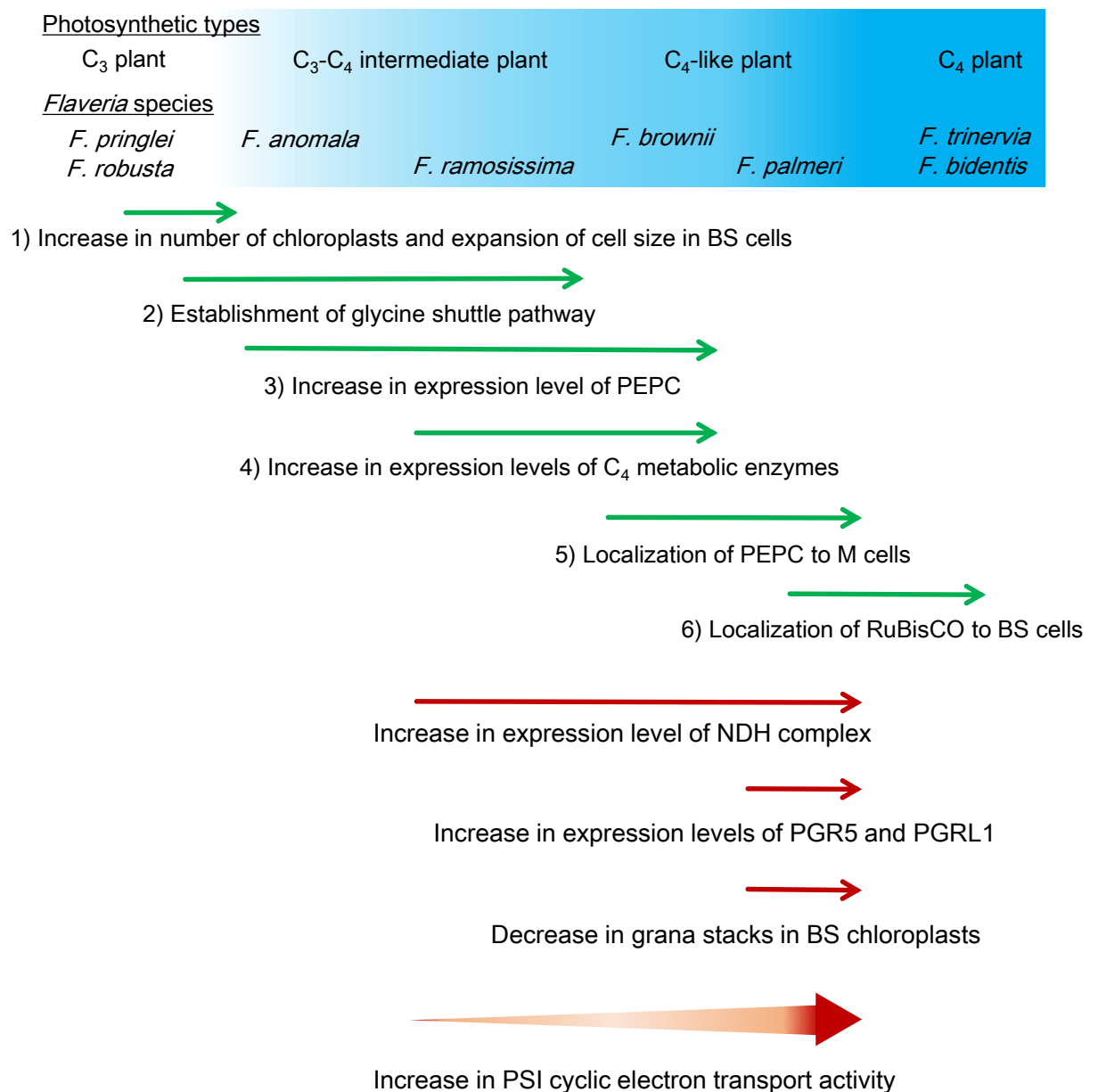


Figure 20. C<sub>4</sub>型光合成進化における炭酸固定経路の構築過程と光化学系I 循環型電子伝達系の充進過程の比較

炭酸固定経路の構築過程のモデルは、Sage (2004, 2012)とGowik and Westhoff (2010) を参考にして作成した。

BS cells, bundle sheath cells; BS chloroplasts, bundle sheath chloroplasts; M cells, mesophyll cells



ATPGR5	1	MAAASISAIGCNQTLIGTSFYGGWSSISGEDYQTMLSKTVAPPQARVSRKAIRAVPMM	60
FbPGR5A	1	-----MAASSLPATGFSSSFHGSWGTSIAGEDYSTMMVKT--AP-ARVRVG-KPLRSGPMM	52
FbPGR5B	1	-----MAISSVTATGFSSSFHGSWETSITAGEEYSTMVART--TP-NVARVE-KPLRSGPMM	52
FbPGR5C	1	---MAASSITPTATVLSSTFSGSWGTAITAGQDYSTMLSKT--AP-AWVKVG-KPLIRYGPMM	54
FroPGR5A	1	-----MAASSLPATGLSSSFHGSWGTSITAGQDYSTMLAKT--APPARVRVG-KPLRSGPMM	53
FroPGR5B	1	-----MAISSVTATGFSSSFHGSWGTSITAGEEYSTMVART--TP-NVVRVG-KPLRSGPMM	52
FroPGR5C	1	-----MAASFASASALSSTFSGSWGTAITAGQDYSTMLAKT--AP-AWVKVG-KPLIRYGPMM	52
ATPGR5	61	KNVNEGKGLFAPLVVTRNLVGGKRFNQLRGKAIALHSQVITEFCKSIGADAKQRQGLIR	120
FbPGR5A	53	GNINEGKGLFAPLVVTRNII GKKRFNQLRGKAIALHSQVITEFCKSIGADAKQRQGLIR	112
FbPGR5B	53	GNVNDGKGVFAPLVVTRNIVGKKRFNQLRGKAIALHSQVITDFCKSIGADSKQRQGLIR	112
FbPGR5C	55	GNINEGKGLFAPLVVTRNIVGKKRFNQLRGKAIALHSQVINEFCKSIGADSKQRQGLIR	114
FroPGR5A	54	GNVNEGKGLFAPLVVTRNII GKKRFNQLRGKAIALHSQVITEFCKSIGADAKQRQGLIR	113
FroPGR5B	53	GNVNEGKGVFAPLVVTRNIVGKKRFNQLRGKAIALHSQVITEFCKSIGADSKQRQGLIR	112
FroPGR5C	53	GNINEGKGLFAPLVVTRNIVGKKRFNQLRGKAIALHSQVINEFCKSIGADSKQRQGLIR	112
ATPGR5	121	LAKKNGERLGFLA	133
FbPGR5A	113	LAKKNGERLGFLA	125
FbPGR5B	113	LAKKNGERLGFLA	125
FbPGR5C	115	LAKKNGERLGFLA	127
FroPGR5A	114	LAKKNGERLGFLA	126
FroPGR5B	113	LAKKNGERLGFLA	125
FroPGR5C	113	LAKKNGERLGFLA	125

Figure 21. *Flaveria* C<sub>3</sub>種、C<sub>4</sub>種および*A. thaliana*のPGR5タンパク質のアミノ酸アライメント

*Arabidopsis thaliana* (AT), *Flaveria* C<sub>4</sub>種の*F. bidentis* (Fb), C<sub>3</sub>種の*F. robusta* (Fro)由来の各PGR5のアミノ酸配列をGENETIXを用いて解析した。*Flaveria*属では、PGR5タンパク質は3つの遺伝子(PGR5A, B, C)によってコードされている。相同配列を黒色、類似配列を灰色で示した。TargetPおよびChloroPソフトにより予測される葉緑体ターゲット配列は緑色のボックスで囲んだ。



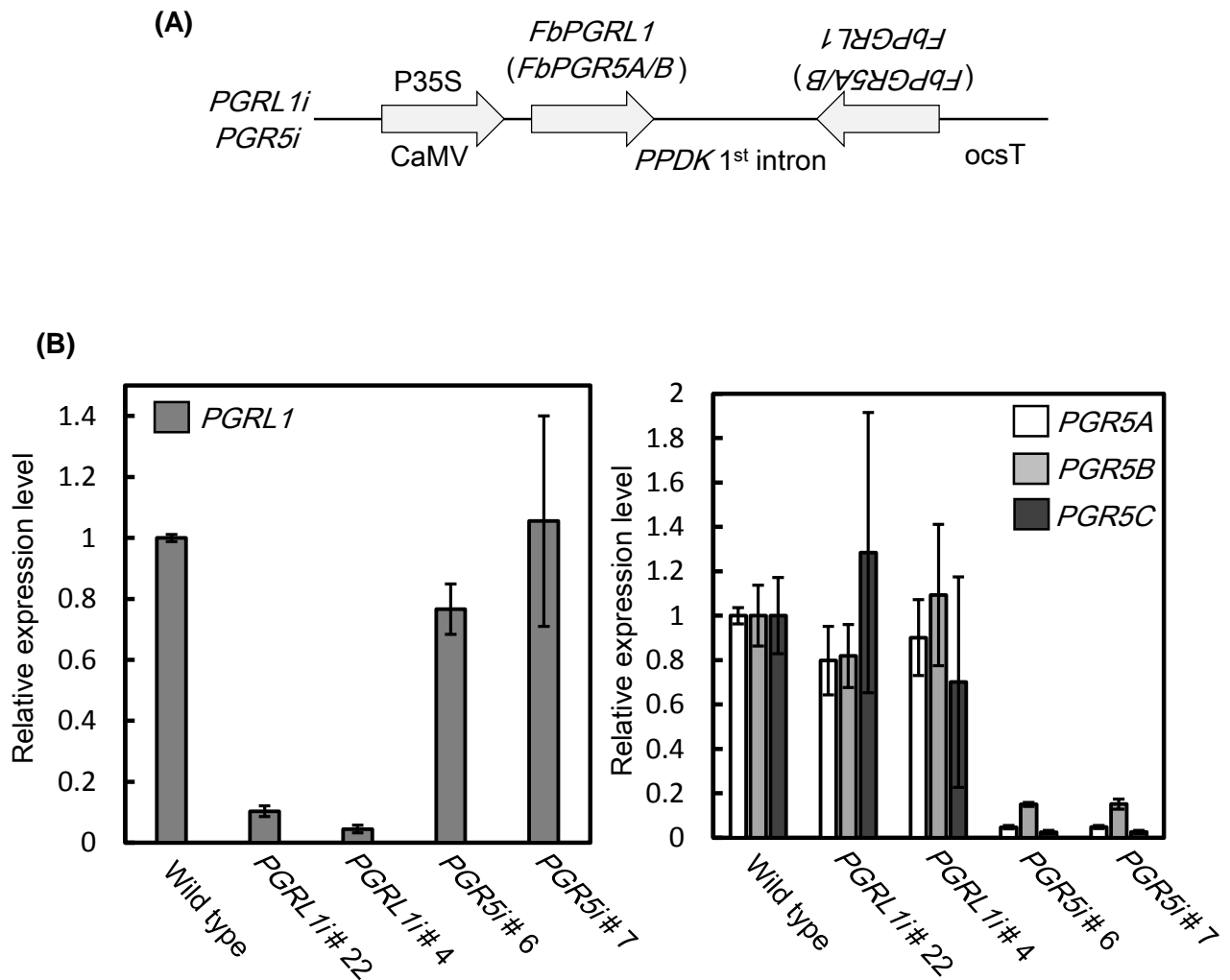


Figure 23. *F. bidentis* *PGRL1*-RNAi (*PGRL1i*)と*PGR5*-RNAi (*PGR5i*)形質転換株における*PGRL1*, *PGR5A*, *B*, *C* mRNA蓄積量

(A) *F. bidentis* *PGRL1*遺伝子と*PGR5A/B*遺伝子をそれぞれ標的としたRNA interference (RNAi) ベクターコンストラクト。標的遺伝子のセンス配列とアンチセンス配列は、*PPDK* 1<sup>st</sup> intron配列を間に挟んでつないだ。プロモータとターミネータは、cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter と octopine synthase (ocs) terminatorをそれぞれ使用した。

(B)*PGRL1*, *PGR5A*, *B*, *C*遺伝子のmRNA蓄積量。wild type(WT)と各形質転換株の第7葉もしくは第8葉からtotal RNAを抽出し、各遺伝子の特異的プライマーを使用してreal-time PCR分析を行った。*PGRL1*, *PGR5A*, *B*, *C*遺伝子の発現量は、*ACTIN7*遺伝子の発現量で補正した。データは、WTの発現量を1とした時の相対値を示している。また、WTでは3個体、*PGRL1* # 4, *PGR5i* # 6, # 7では4個体、*PGRL1i* # 22では7個体の平均値とその標準偏差を示す。

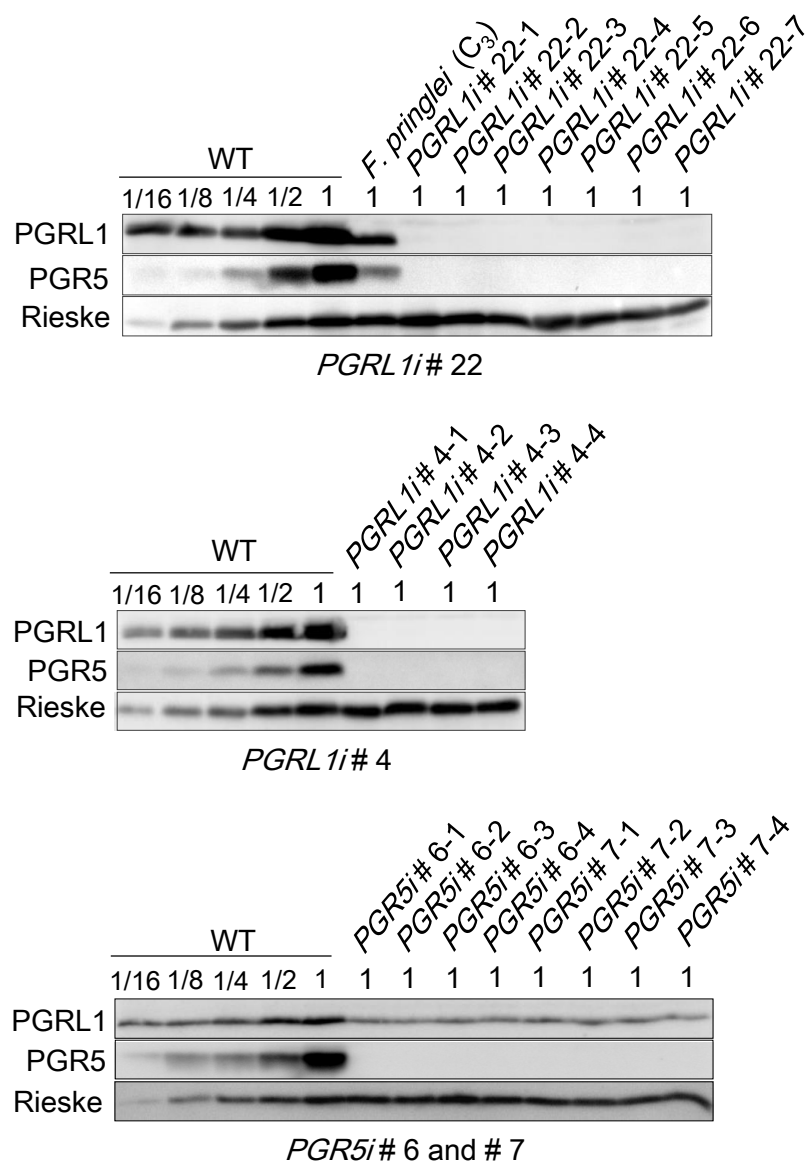


Figure 24. *F. bidentis* *PGRL1i*と*PGR5i* 形質転換株におけるPGRL1とPGR5タンパク質の蓄積量

wild type(WT)と各形質転換株の第7葉もしくは第8葉から全膜タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット分析を行った。PGRL1とRieskeは10  $\mu$ g、PGR5は20  $\mu$ gのタンパク質を泳動した。それらのタンパク質量を1として、WTで1/16量までの希釈系列を作成した。

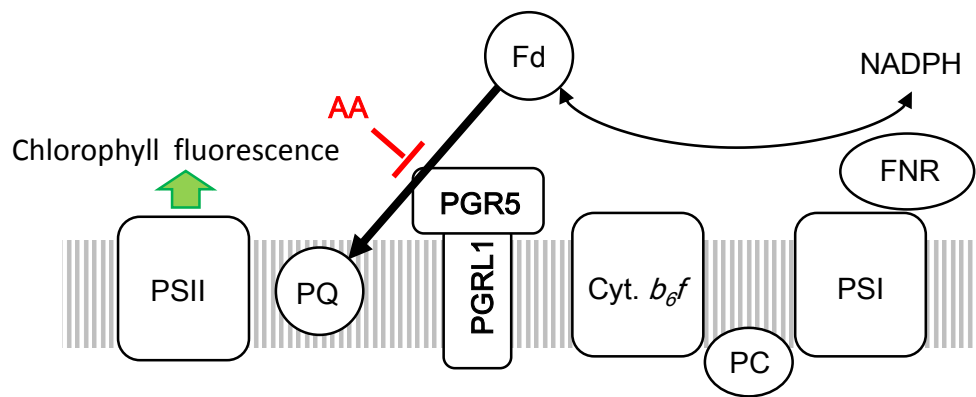


Figure 25. Fd-dependent PQ reduction測定におけるPGR5/PGRL1複合体を介したフェレドキシンからプラストキノンへの電子伝達の模式図

AA, antimycin A; Cyt. *b<sub>6</sub>f*, cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex; Fd, ferredoxin; FNR, ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase; PC, plastocyanine; PQ, plastoquinone; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II

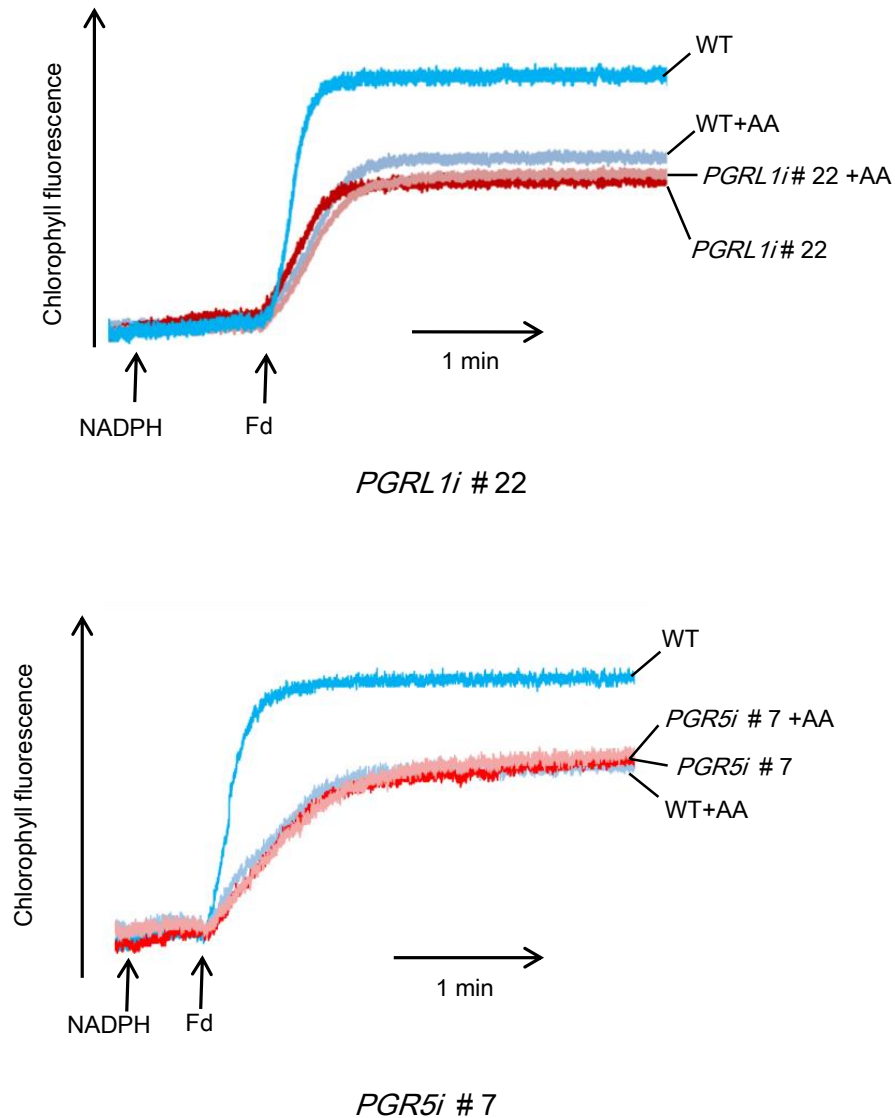


Figure 26. *F. bidentis* *PGRL1i*と*PGR5i* 形質転換株を用いたFd-dependent PQ reduction測定

Wild type (WT)と各形質転換株から単離したチラコイド膜 (10  $\mu\text{g}$  Chlorophyll/ml)に、測定光(0.5  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )照射下で、NADPH (0.25 mM)とFd (0.05 mM)を添加し、クロロフィル蛍光の上昇を測定した。+AAはantimycin A (AA)の添加を示しており、AA (3  $\mu\text{M}$ )は測定前に添加した。

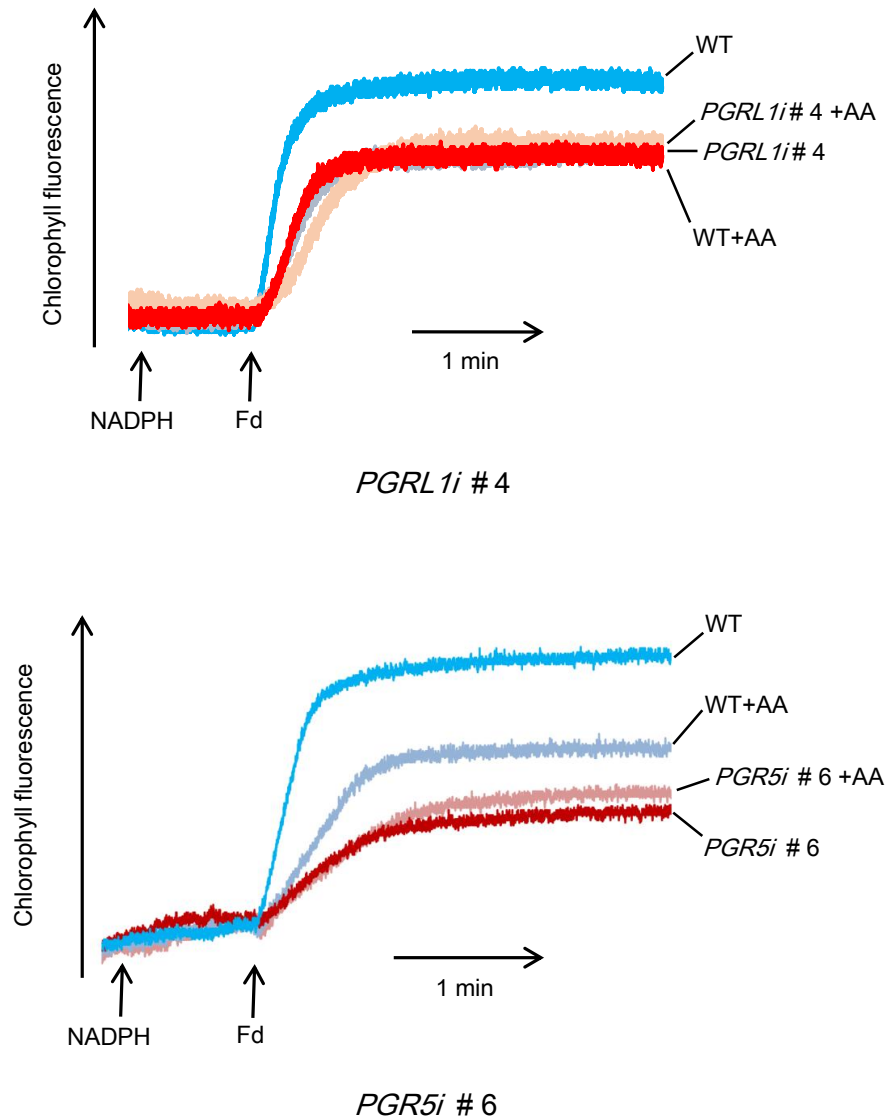


Figure 27. *F. bidentis* *PGRL1i*と*PGR5i* 形質転換株を用いたFd-dependent PQ reduction測定

実験条件については、Figure 26を参照。

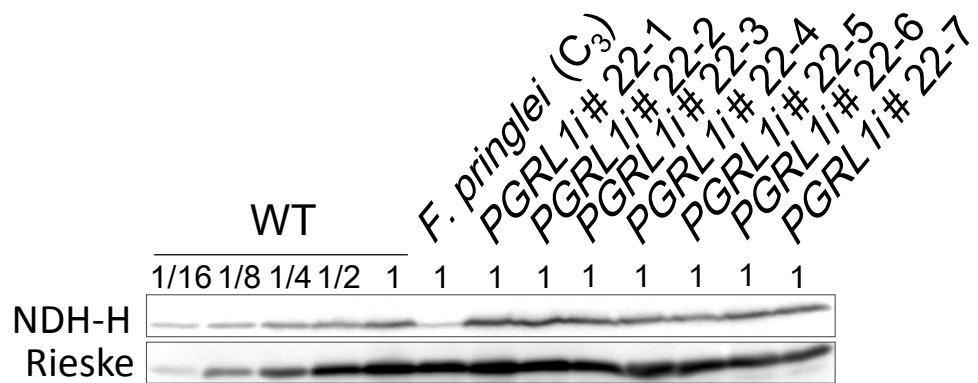


Figure 28. *F. bidentis* *PGRL1i* #22におけるNDH-Hタンパク質蓄積量

wild type(WT)と*PGRL1i* #22の第7葉もしくは第8葉から抽出した全膜タンパク質を用いて、ウエスタンブロット分析を行った。Rieskeは10 μg、NDH-Hは20 μgのタンパク質を泳動した。それらのタンパク質量を1として、WTで1/16量までの希釈系列を作成した。



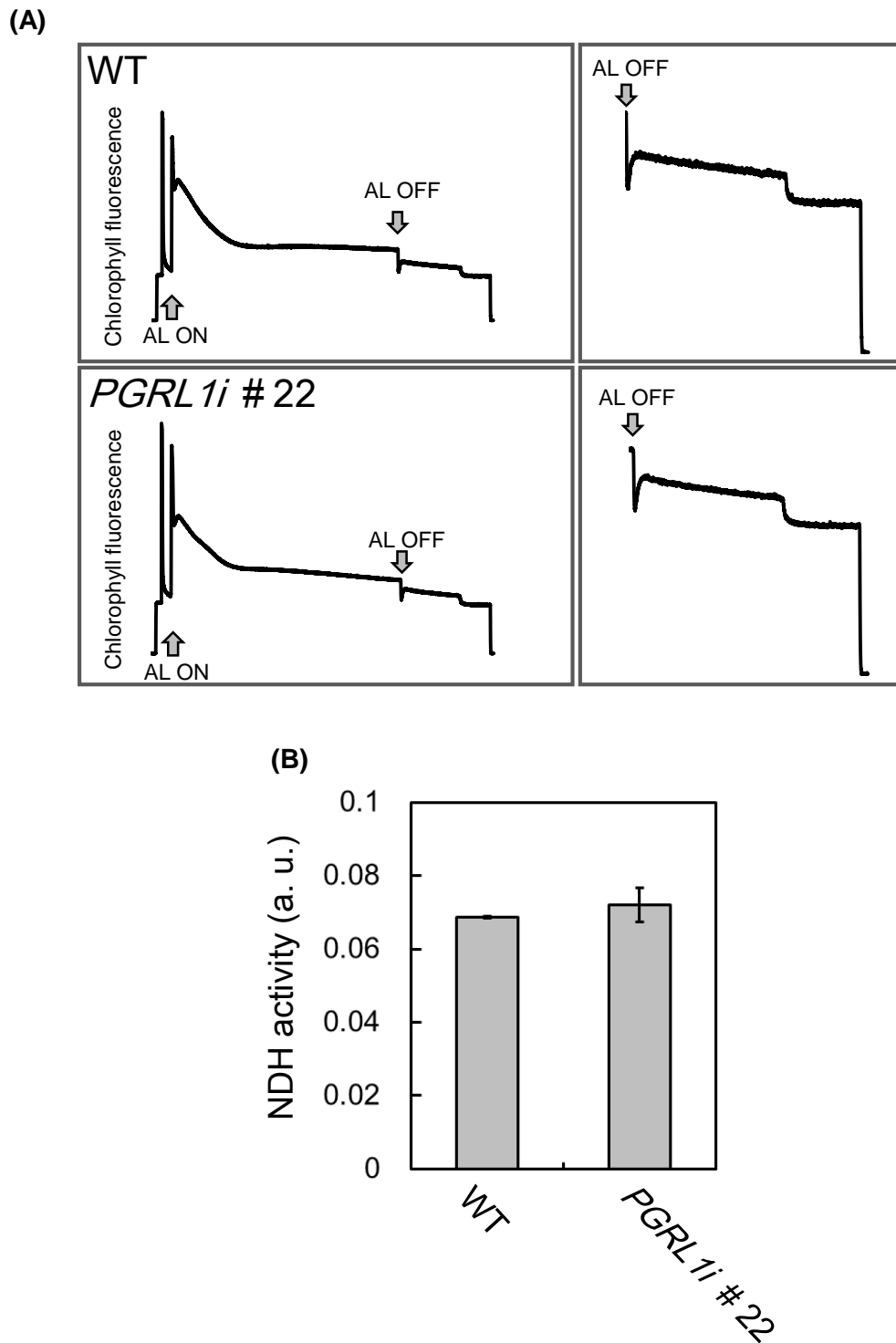


Figure 29. *F. bidentis* *PGRL1i* #22におけるNDH活性

(A) Actinic light (AL)消光後のクロロフィル蛍光の一過的上昇。各植物の生葉にAL( $53 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )を4分間照射し、AL消光後のクロロフィル蛍光の一過的上昇を測定した。クロロフィル蛍光曲線はWTと*PGRL1i* #22の代表的な結果を示している。右の図はクロロフィル蛍光の一過的上昇の部分拡大したものになる。

(B) NDH活性。クロロフィル蛍光の一過的上昇値からNDH活性値を算出した。算出方法はFigure 12を参照。データは、WTでは3個体、*PGRL1i* #22では5個体の平均値とその標準偏差を示している。

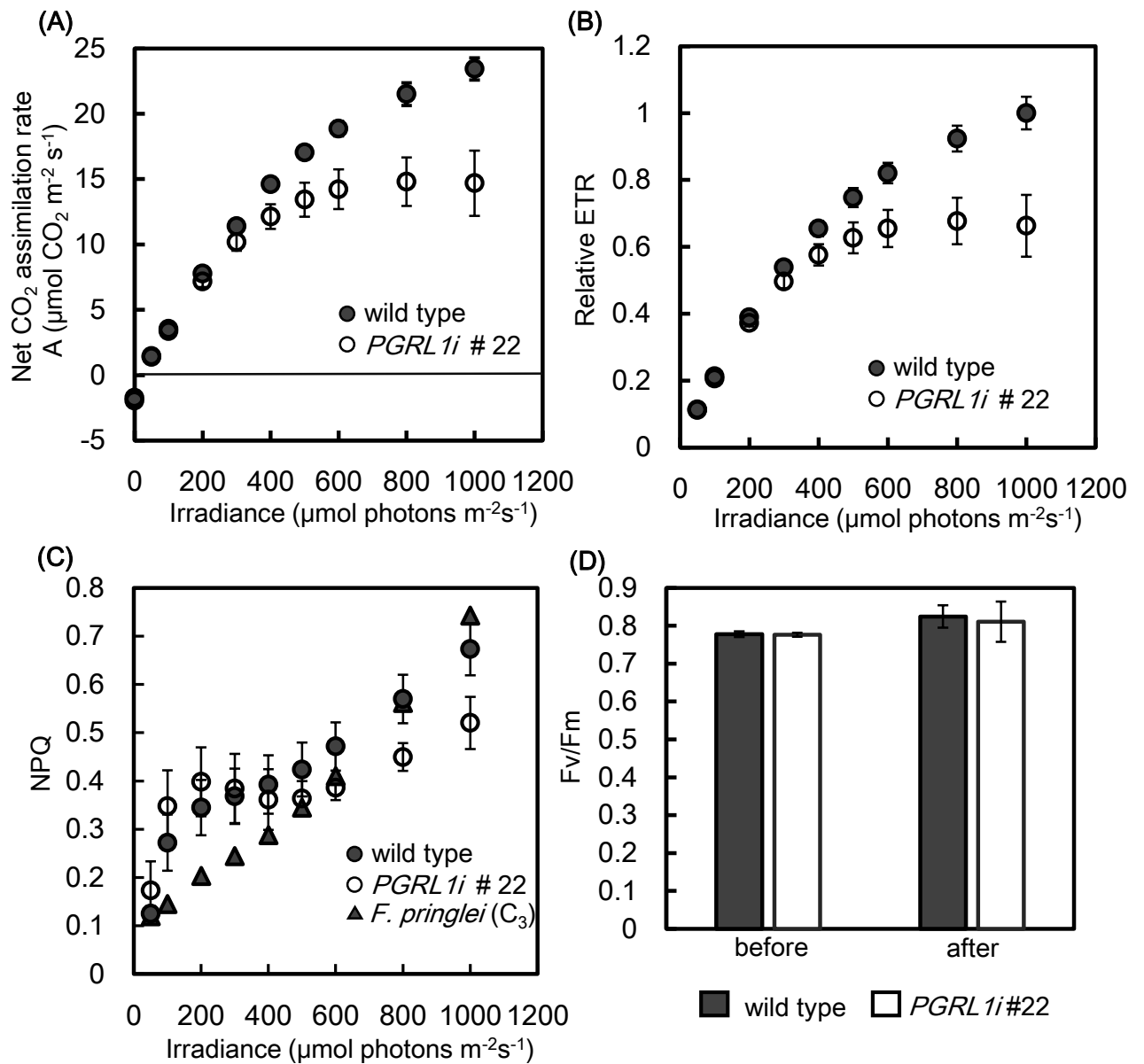


Figure 30. *F. bidentis* *PGRL1i* # 22 における光合成活性(A)、Relative electron transport rate (Relative ETR)、non photochemical quenching (NPQ)の光強度依存性

(A) 光合成活性 (A, Net CO<sub>2</sub> assimilation rate), (B) 相対的電子伝達速度(Relative ETR, relative electron transport rate); WTの最大ETR値(光強度が1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の時の値)を1とした時の、各光強度における各種の相対値, (C) 非化学的消光(NPQ, non-photochemical quenching). (D) 光合成活性測定前(before)と測定後(after)の光化学系IIの最大量子収率(Fv/Fm). *F. bidentis*のWT (closed circle)と*PGRL1i* # 22 (open circle)を用いて測定した。尚、NPQのグラフ(C)では、*Flaveria* C<sub>3</sub>種である*F. pringlei* (closed triangle)の1個体のデータも示している。測定は、CO<sub>2</sub>濃度を400  $\mu\text{L L}^{-1}$ , O<sub>2</sub>濃度を21%, 温度を25°C, 湿度を50%の条件で行った。各データは、WTでは3個体、*PGRL1i* # 22では7個体の平均値とその標準偏差を示している。

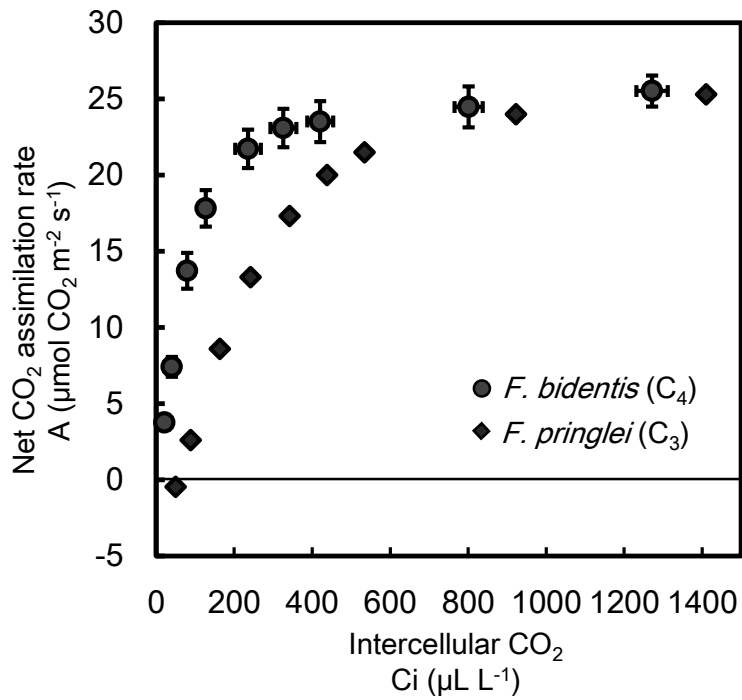


Figure 31. C<sub>4</sub>植物とC<sub>3</sub>植物における光合成活性の葉内CO<sub>2</sub>濃度依存性の違い

C<sub>4</sub>植物の*F. bidentis* (closed circle)とC<sub>3</sub>植物の*F. pringlei* (closed diamond)を用いて測定した。測定は、O<sub>2</sub>濃度を21 %、光強度を1000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、温度を25 ° C、湿度を50 %の条件で行った。*F. bidentis*のデータは3個体の平均値とその標準偏差を示しており、*F. pringlei*のデータは1個体の結果を示している。

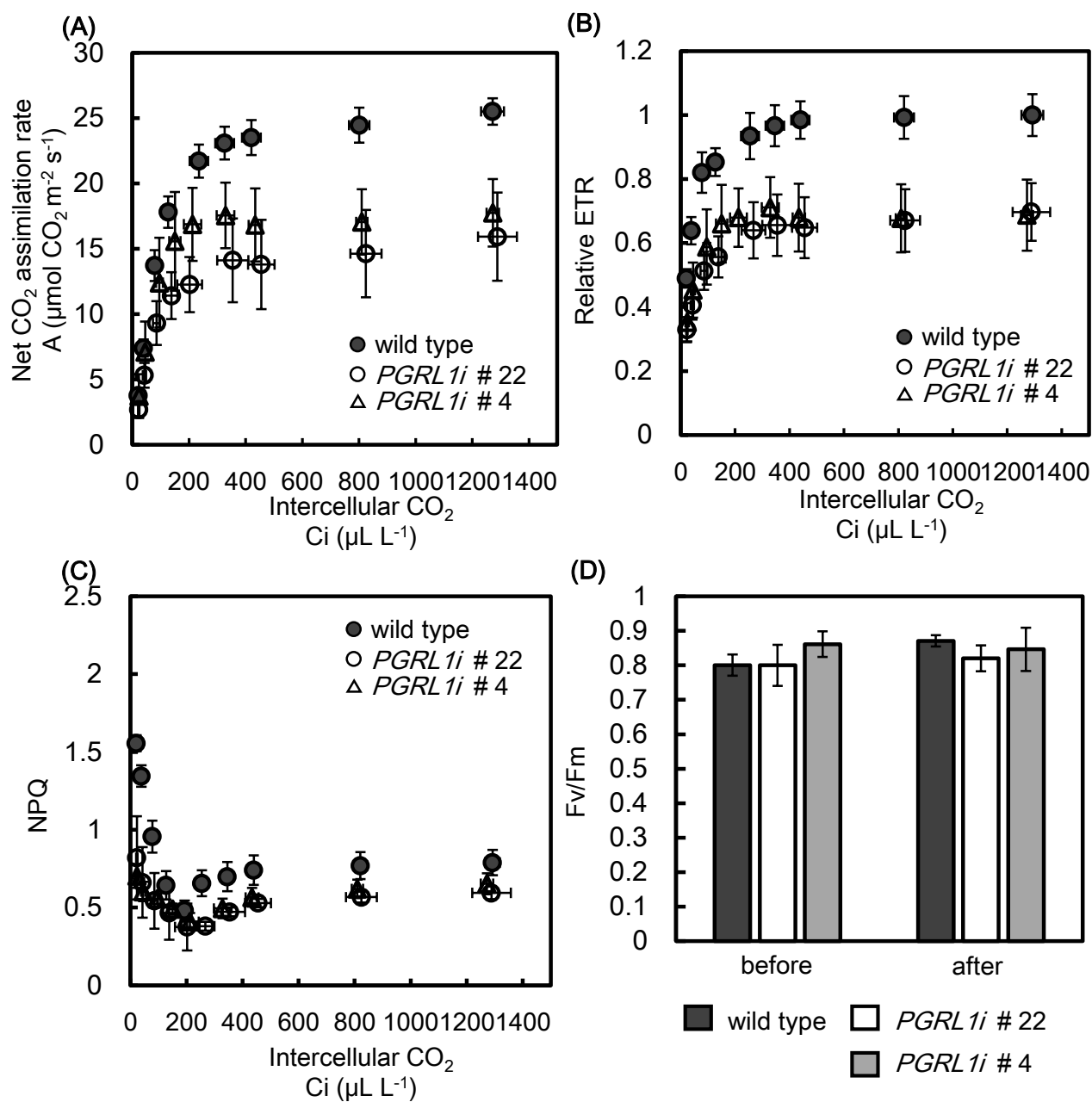


Figure 32. *F. bidentis* *PGRL1i* 形質転換株 における光合成活性(A)、Relative electron transport rate (Relative ETR)、non photochemical quenching (NPQ)の葉内 CO<sub>2</sub>濃度依存性

(A) 光合成活性 (A, net CO<sub>2</sub> assimilation rate), (B)相対的電子伝達速度(Relative ETR, relative electron transport rate); WTの最大ETR値(葉内CO<sub>2</sub>濃度が1200 μL L<sup>-1</sup>の時の値)を1とした時の、各光強度における各種の相対値, (C)非化学的消光(NPQ, non-photochemical quenching). (D) 光合成活性測定前(before)と測定後(after)の光化学系IIの最大量子収率(Fv/Fm). *F. bidentis*のWT (closed circle), *PGRL1i* # 4 (open triangle), # 22 (open circle) を用いて測定した。測定は、O<sub>2</sub>濃度を21%, 光強度を1000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 温度を25 °C, 湿度を50%の条件で行った。各データは、WTでは6個体、*PGRL1i* # 4では4個体、# 22では7個体の平均値とその標準偏差を示している。

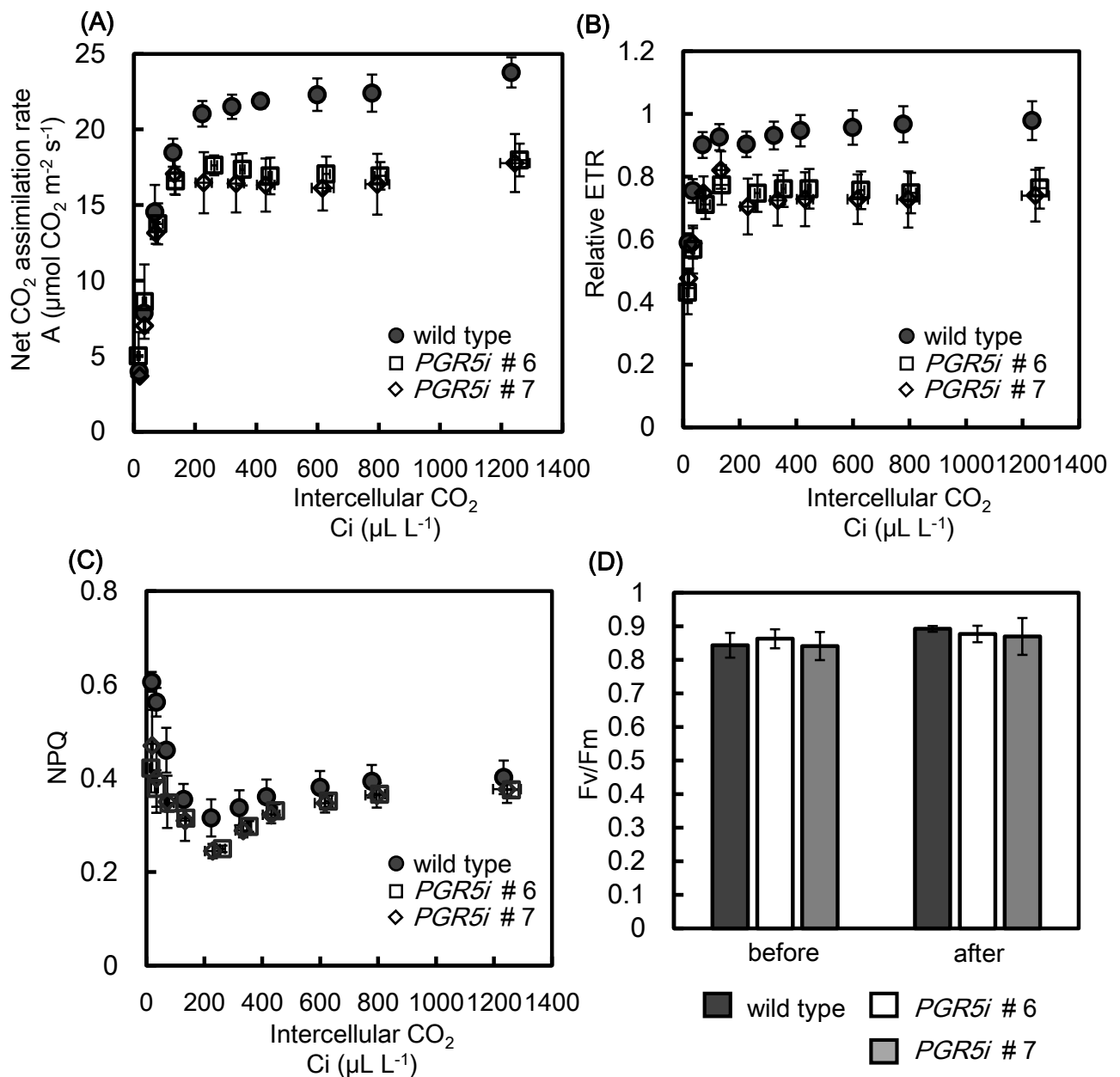


Figure 33. *F. bidentis* *PGR5i* 形質転換株における光合成活性(A)、Relative electron transport rate (Relative ETR)、non photochemical quenching (NPQ)の葉内CO<sub>2</sub>濃度依存性

(A) 光合成活性 (A, net CO<sub>2</sub> assimilation rate), (B)相対的電子伝達速度(Relative ETR, relative electron transport rate); WTの最大ETR値(葉内CO<sub>2</sub>濃度が1200 μL L<sup>-1</sup>の時の値)を1とした時の、各光強度における各種の相対値, (C)非化学的消光(NPQ, non-photochemical quenching). (D) 光合成活性測定前(before)と測定後(after)の光化学系IIの最大量子収率(Fv/Fm). *F. bidentis*のWT (closed circle), *PGR5i* # 6 (open square), # 7 (open diamond) を用いて測定した。測定は、O<sub>2</sub>濃度を21%, 光強度を1000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 温度を25 °C, 湿度を50%の条件で行った。各データは、WT, *PGR5i* # 6, # 7でそれぞれ4個体の平均値とその標準偏差を示している。

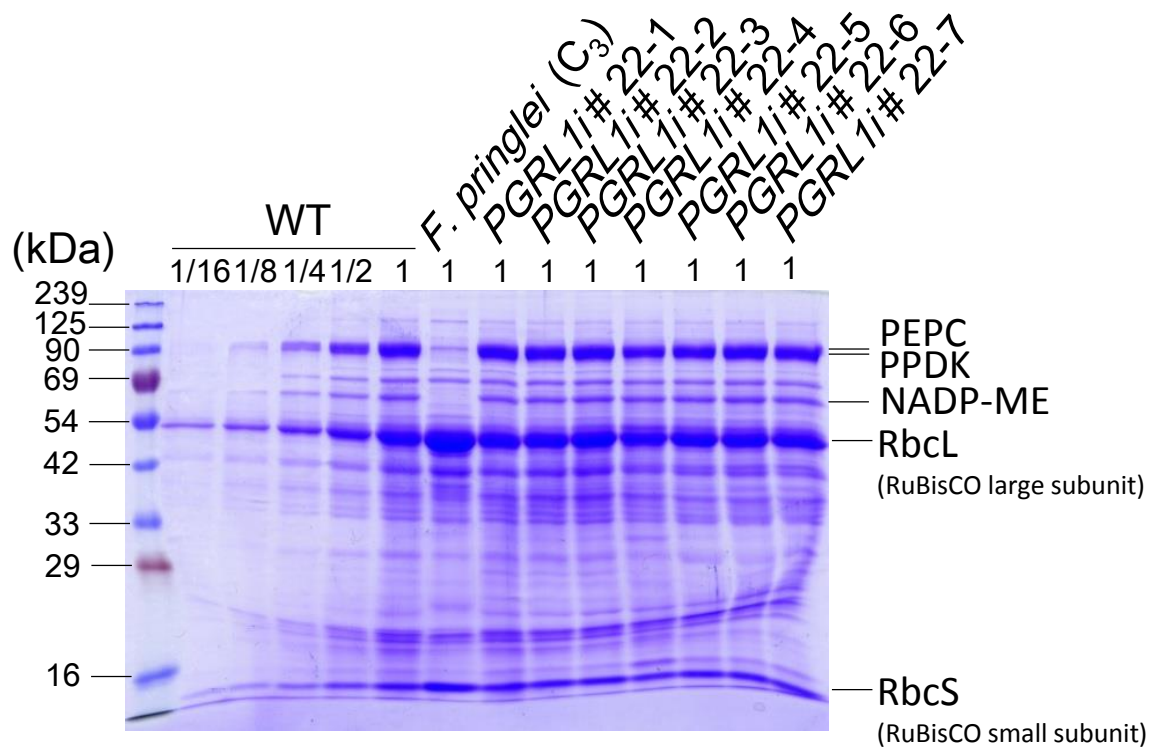


Figure 34. *F. bidentis* *PGRL1i* # 22におけるC<sub>4</sub>代謝酵素タンパク質とRuBisCO蓄積量

wild type(WT)と*PGRL1i* #22の第7葉もしくは第8葉から抽出した全可溶性タンパク質(10 μg)は、12.5 %アクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、Coomassie brilliant blue R-250で染色した。

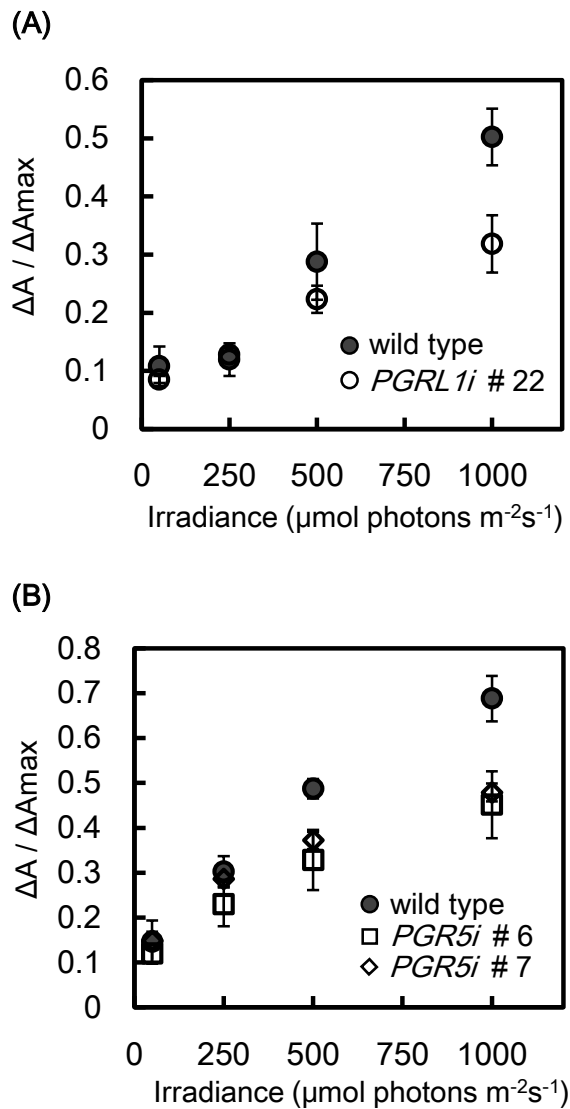


Figure 35. *F. bidentis* *PGRL1i* と *PGR5i* 形質転換株における光強度依存的な P700酸化レベルの測定

wild type, *PGRL1i* (A), *PGR5i* (B)形質転換株における光化学系I反応中心P700酸化レベル ( $\Delta A / \Delta A_{\text{max}}$ )の光強度依存性。10分間暗所に置いた植物の生葉に、光化学系Iの光化学反応を誘導する近赤外光照射下で飽和光を照射し最大P700酸化レベル( $\Delta A_{\text{max}}$ )を測定した。次に、白色光を光強度50, 250, 500, 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の順に連続して5分間ずつ照射し、各光強度下におけるP700酸化レベル( $\Delta A$ )を測定した。そして、それぞれの $\Delta A$ の値を $\Delta A_{\text{max}}$ の値で割ることで、各白色光照射下でのP700酸化レベル( $\Delta A$ )の割合 ( $\Delta A / \Delta A_{\text{max}}$ )を算出した。データは、3個体の平均値とその標準偏差を示している。

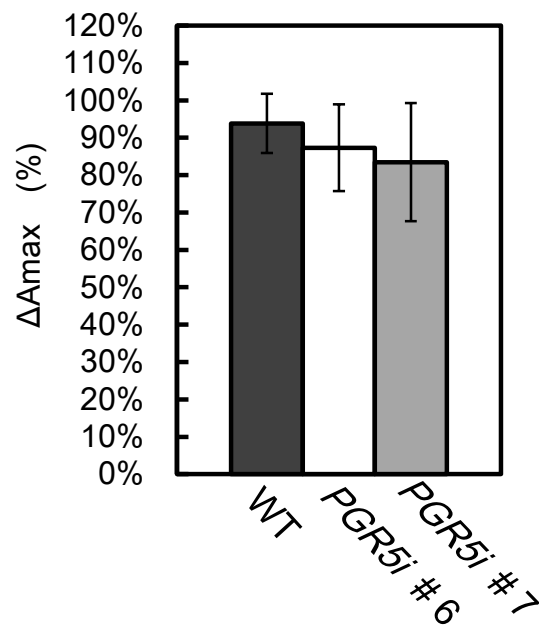


Figure 36. *F. bidentis* *PGR5i* 形質転換株における光化学系Iの強光に対する感受性

wild typeと*PGR5i* # 6, # 7の植物体を1時間、暗所に置き、その後光強度1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光を30分間、照射した。白色光照射前の光化学系I反応中心P700の最大酸化レベル( $\Delta A_{\text{max}}$ )に対する、白色光照射後の $\Delta A_{\text{max}}$ の値を百分率で示した。データは3個体の平均とその標準偏差を示す。