



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	クロロフィルタンパク質複合体の構築と分解に関する研究
Author(s)	下田, 洋輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11405号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11405
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56591
Type	doctoral thesis
File Information	Yousuke_Shimoda.pdf



平成 25 年度
博士論文

クロロフィルタンパク質複合体の構築と分解
に関する研究

北海道大学
大学院生命科学院
生命システム科学コース
生物適応機構学研究室

下田 洋輔

目次

目次		P.2
要旨		P.3-5
第 1 章	序論	P.6-9
	材料と方法	P.10-17
	結果	P.18-24
	考察	P.25-32
	図	P.33-44
第 2 章	序論	P.45-47
	材料と方法	P.48-51
	結果	P.52-54
	考察	P.55-56
	図	P.57-64
謝辞		P.65
参考文献		P.66-75

要旨

クロロフィル (Chl) は、光合成において中心的な役割を果たしており、その代謝は植物の発育と密接な関係を持っている。発芽後は、植物の成長とともに Chl は活発に合成される。合成された Chl は、タンパク質に取り込まれ、光合成装置が形成される。生育ステージが進み葉の老化の段階を迎えると、葉緑体の中の窒素を回収し、成長組織に転流するため、Chl は活発に分解される。Chl の合成と分解は厳密に制御されなくてはならない。制御に失敗した場合、遊離の Chl や Chl 合成と分解中間体が蓄積し、細胞死や葉の枯死が引き起こされるためである。

Chl 代謝に関する研究は、多くの研究者によって活発に行われて、現在までに Mg-dechelatase を除くすべての Chl 代謝酵素が同定され、Chl 代謝経路の全容は、一部を除いて明らかになっている。しかしながら、Chl *b* 分解経路については不明な点が残されており、Chl *b* 分解経路は未確定である。また、光合成装置である Chl-タンパク質複合体の構築と分解過程については、理解が進んでいない。特に、Chl 代謝と共役した Chl-タンパク質複合体の構築と分解に関しては、ほとんど研究が行われていないのが現状である。そこで次の Chl 代謝研究として、Chl 代謝と協調した Chl-タンパク質複合体の構築と分解過程が位置づけられると考えた。そのためには、まず Chl 代謝経路の全容を明らかにする必要がある。また、Chl-タンパク質複合体の構築や分解過程の全容を明らかにする必要がある。以上のような観点より、私は、Chl *b* 分解経路を確定すると同時に、特に Chl-タンパク質複合体のひとつである光化学系 II の構築に焦点を絞り、Chl が光化学系に組み込まれてから、光合成色素として機能するまでの過程を、明らかにすべく以下の研究を行った。

第 1 章では、Chl 分解に関する研究を行った。Chl *a* 分解に関する研究は、多くの研究グループによって活発に行われ、現在までに Mg-dechelatase を除くすべての Chl 分解酵素が同定され、Chl *a* の分解経路が確定された。一方、Chl *b* の分解経路については、未解決な点が残されている。Chl *b* は、Chl *b* 還元酵素 (CBR) により、7 位のフォルミル基がヒドロキシメチル基に還元され、7-hydroxymethyl chlorophyll *a* (HMChl *a*) に変換される。さらに HMChl *a* 還元酵素(HCAR)により、ヒドロキシメチル基がメチル基に還元され、最終的に Chl *a* に変換されて分解が進むと考えられている。しかしながら、CBR は、Chl *b* だけでなく葉緑体で存在しうる、中央金属の Mg を失った pheophytin (Phein) *b* やさらにフィチル基を失った pheophorbide (Pheide)

*b*などの Chl *b* 派生物のフォルミル基を還元し、幅広い基質の特異性を示すことから、複数の Chl *b* 分解経路が提案された。しかし、実際の経路で Chl *b* が分解されるのかに関しては、実験的な証拠はなかった。

本研究では①Chl *b* 分解経路を確定すること、および②植物がその経路を採用した理由を解明することを目的として、以下の実験を行った。

① Chl *b* 分解経路の確定

Chl *b* 分解経路を決定するための鍵は、HCAR の基質特異性にある。そこで、まず HCAR の組み換えタンパク質を用いて、基質特異性を調べた。その結果、HCAR は、HMChl *a* を基質にするが、中心金属の失った HMPhein *a* と HMPheide *a* を基質にすることができなかった。CBR と HCAR タンパク質の共存下で、Chl *b* を基質にした場合は、Chl *a* へ転換された。このとき、HMChl *a* の蓄積がほとんどみられなかった。さらに、Chl *b* が結合しているアンテナタンパク質である Light-harvesting complex II (LHCII) を基質にした場合は、HMChl *a* の蓄積がほとんどなく、LHCII の Chl *b* は全て Chl *a* へ転換された。これらの結果から、フォルミル基のメチル基への転換において、Chl *b* → HMChl *a* → Chl *a* が唯一の経路であることが示された。

② 植物はなぜこの分解経路を採用したか

この点を解明するため、Chl *b* が通常の経路では分解されない形質転換体を利用した。シアノバクテリア *Prochlorothrix hollandica* の Chl *b* 合成酵素 PhCAO を導入したシロイヌナズナは、通常は Chl *b* が結合しない光化学系 I や光化学系 II のコアアンテナにも、Chl *b* が取り込まれる。in vitro の分解実験で、コアアンテナに取り込まれた Chl *b* は、CBR によって効率よく触媒されないことが分かった。そのため、形質転換植物に蓄積した Chl *b* の相当量が通常の分解経路では分解されないことが考えられた。Chl *b* がコアアンテナに取り込まれた形質転換植物を暗所に置き Chl の分解を誘導したところ、Chl *b* が正常な分解経路を取らず、CBR の代わりに Mg-dechelatase が先に働き、HMPheide *a* や Pheide *b* を蓄積した。その結果、蓄積した HMPheide *a* や Pheide *b* が細胞死を誘導した。

これらの結果から、(1) Chl *b* の分解経路は、LHCII-Chl *b* → HMChl *a* → Chl *a* の順に還元され、そのあとに Mg の離脱が起こること、(2) それ以外の経路で分解されると細胞死が誘導されることが明らかになった。

第 2 章では、Chl-タンパク質複合体の構築機構、特に光化学系 II の構築に関する研

究を行った。Chl-タンパク質複合体には、光化学系 I と光化学系 II、そして周辺アンテナである Light-harvesting complexes (LHCs) の 2 種類がある。アンテナに結合した Chl により光エネルギーが捕集され、反応中心の Chl *a* が電荷分離し、電子伝達系が駆動される。結晶構造解析の結果、光化学系 I、光化学系 II そして LHCs の立体構造が明らかになっている。このように、生理的そして構造的に Chl-タンパク質複合体の理解が進んでいるが、Chl-タンパク質複合体の構築機構については、研究は遅れている。特に、Chl が光化学系へ組み込まれる過程については、全く明らかになっていない。Chl 合成が Chl-タンパク質複合体のアポタンパク質の合成と協調して、いかにして Chl-タンパク質複合体が構築されていくのかについては、不明である。高等植物の場合、光化学系 I や光化学系 II のような Chl-タンパク質複合体欠損体はアルビノ、あるいは致死を示すため、研究が遅れていると考えられる。本研究では、Chl-タンパク質複合体の中から光化学系 II に焦点を絞り、Chl が光化学系に組み込まれてから、光合成色素として機能するまでの過程の解明することを最終目的とした。光化学系 II への Chl の組みの制御因子や光化学系 II 構築に関与する因子を同定することで、Chl 代謝と協調した光化学系 II 構築の全容を明らかにしようとした。

そこで、独立栄養性を示す緑藻クラミドモナスを用いた光化学系 II 異常変異体のスクリーニングを行った。glass bead 法を用いて、タグを挿入したクラミドモナス変異体プールを作製した。Chl 蛍光を指標として、約 7 万の変異体プールから光化学系 II 異常変異体を多数単離した。次に、TAIL-PCR によって網羅的に光化学系 II 異常変異体のタグの挿入位置を決定した。最終的に、相補テストを行うことで、3 つの光化学系 II 異常変異体について新規の原因遺伝子を同定することができた。

本研究では、陸上植物の Chl *b* 分解経路を確定することができた。その結果として、陸上植物における Chl 代謝の全容が明らかになった。また、緑藻から光化学 II 異常変異体を多数単離し、その中から 3 つの光化学系 II 構築に関与する新規因子を同定することができた。今後の新規因子の解析を通じて、Chl 代謝と協調した光化学系 II 構築の全容が明らかにされることが期待される。

第 1 章

1. 序論

クロロフィル (Chl) は、光合成において中心的な役割を果たしており (Nelson and Yocum, 2006)、その代謝は植物の発育と密接な関係を持っている。発芽後は、植物の成長とともに Chl は活発に合成される (Tanaka and Tsuji, 1985)。合成された Chl は、タンパク質に取り込まれ、光合成装置が形成される (Shimada et al., 1990)。生育ステージが進み、葉の老化の段階を迎えると、葉緑体の中の窒素を回収し、成長組織に転流するため、Chl は活発に分解される (Makino et al., 2003)。Chl と Chl 代謝中間体は、光毒性をもつため、Chl の合成と分解は厳密に制御されなくてはならない。制御に失敗した場合、遊離の Chl や Chl 合成と分解中間体が蓄積し、細胞死や葉の枯死が引き起こされるためである (op den Camp et al., 2003)。

1.1 Chl と光合成

Chl は 4 個のピロール環を基本構造とするテトラピロール分子である。一部の細菌を除いて、基本的に環の中心には Mg イオンが配位し、そのうち 1 つのクロリン環にはフィトールがエステル結合している。フィチル基により、Chl に疎水性が付与される。植物には、C7 位にメチル基を持つ Chl *a* と C7 位にフォルミル基を持つ Chl *b* という 2 種類の Chl が存在する。Chl *b* は長波長の領域においては Chl *a* よりも吸収波長が短く、短波長の領域においては Chl *a* よりも吸収波長が長い。2 種類の Chl を利用することで、植物はより広範囲の光を吸収することができる。

Chl は、チラコイド膜上で Chl-タンパク質複合体を形成して存在している (Markwell et al., 1979)。Chl-タンパク質複合体には、コアアンテナである光化学系 I の CP1、光化学系 II の CP43 と CP47、そして周辺アンテナである Light-harvesting complexes (LHCs) の 2 種類が存在する (Barber et al., 2000)。Chl *a* は光化学系 I の CP1、光化学系 II の D1、D2、CP43 と CP47、及び LHCs に結合しており、一方 Chl *b* は LHC にのみ結合している。LHCs は、光化学系 I と光化学系 II に結合し、周辺アンテナとして機能する (Jansson et al., 1997)。高等植物の場合、LHCII には Chl *a* と Chl *b* が 1:1 の割合で結合している (Liu et al., 2004)。

LHCII に結合した Chl が光エネルギーを吸収して、光化学系 II の反応中心の Chl *a* に伝達し、電荷分離が引き起こされる。電子が光化学系 II、光化学系 I を移動し、NADP⁺

に電子が流れ、NADPH が産生される。また、プロトンがチラコイドのルーメン側に取り込まれ、ルーメンとストロマの間にできるプロトン濃度勾配を駆動力として、ATP 合成酵素により ATP が合成される。このようにして生じた NADPH と ATP をエネルギー源として、次いでストロマで行なわれるカルビンベンソン回路が機能する。

1.2 老化と Chl 分解

葉の老化は、発達において最終段階であり、Chl が活発に分解される結果、カロテノイドが表在化することで、葉は緑色から黄色に変化する (Hortensteiner, 2006)。また、葉の老化時には、細胞内のタンパク質をはじめとして、DNA や膜脂質が活発に分解される (Hortensiteiner and Feller, 2003)。葉の老化は、組織間の再転流を行う栄養素の再分配システムを担っている (Makino et al., 2003)。葉では、葉緑体は全タンパク質の 75%を占める (Peoples and Dalling., 1988)。CO₂ 固定に関与する Rubisco が 27%を、次に Chl-タンパク質複合体のアポタンパク質が主要な割合を占める。特に、LHCII は、全 Chl-タンパク質複合体の約 70%の割合を占める (Hortensiteiner and Feller, 2003)。老化の際には、Chl 分解は厳密に制御されなければならない。Chl と Chl 分解中間体は、光毒性をもち、活性酸素を産出する性質を持っている。また、Chl 分解中間体が蓄積すると、細胞死や葉の枯死を引き起こす (Gray et al., 2002; Pruzinska et al., 2007; Hirashima et al., 2009; Meguro et al., 2011)。Chl 分解の制御に失敗した場合、細胞死や葉の枯死が引き起こされ、窒素源の転流を失敗してしまう。窒素源の転流を保証するためには、Chl は厳密な制御され、分解されていく必要がある。

1.3 クロロフィル分解経路

Chl 分解の研究は、多くの研究者によって活発に行われて、Chl *a* から Mg イオンを脱離させる酵素 Mg-dechelataase (MDC) を除いて、Chl 分解経路の主要な酵素はすべて同定された (Hortensteiner, 2006; Hortensteiner and Krautler, 2011)。また、Chl 分解経路は、一部の点を除いて、全体像が確立されている。2009 年に、Chl *a* 分解経路が確立された (Schelbert et al., 2009)。Chl *a* 分解の最初のステップは、MDC による Chl *a* から中心金属の Mg イオンの脱離である。Chl *a* から Mg イオンが脱離され、pheophytin (Phein) *a* が生成される。Phein *a* は、pheophytinase (PPH) によりフィトール基が加水分解されて、pheophorbide (Pheide) *a* に変換される (Schelbert et

al., 2009)。Pheide *a* は、pheophorbide *a* oxygenase (PAO) により酸化的に開環され (Pruzinska et al., 2003)、さらに red chlorophyll catabolite reductase (RCCR) により還元され、primary fluorescent chlorophyll catabolite (pFCC) に変換される (Wuthrich et al., 2000)。その後、pFCC は、葉緑体外に排出されて、異なる 2 つの分解経路を経て、最終的に液胞に蓄積する。一つ目は、小胞体上で CYP89A9 により C5 位が脱フォルミル基され、液胞へ輸送される。液胞内の酸性 pH により異性化された結果、最終分解産物である nonfluorescent dioxobilin-type chlorophyll catabolites (NDCCs) が生成される (Chirst et al., 2013)。もう 1 つ目は、細胞質内で MES16 により C13 位が脱メチル化され、液胞内へ輸送される。液胞内の酸性 pH により異性化された結果、最終分解産物である nonfluorescent chlorophyll catabolites (NCCs) に変換される (Chirst et al., 2012)。このような Chl 分解過程で、蛍光 Chl から非蛍光 Chl という安全な分子に変換される (Hortensteiner, 2006)。

一方、Chl *b* の分解経路については、未確定である。Chl *b* は、Chl *b* 還元酵素 (CBR) により、NADPH を還元剤として 7 位のフォルミル基がヒドロキシメチル基に還元され、7-hydroxymethylchlorophyll *a* (HMChl *a*) に変換される (Ito et al., 1996)。イネとシロイヌナズナでは、2 つの CBR のアイソザイムである、Non-Yellow Coloring 1 (NYC1) と NYC1 like (NOL) が存在している (Kusaba et al., 2007; Horie et al., 2009; Sato et al., 2009)。HMChl *a* 還元酵素 (HCAR) により、ferredoxin を還元剤としてヒドロキシメチル基がメチル基に還元され、最終的に Chl *a* に変換されて (Meguro et al., 2011)、Chl *a* 分解経路に合流して分解される。しかしながら、Chl 分解酵素の基質から Chl *b* 分解経路は複数存在するのではないかと提案する論文が、複数報告されている。中心金属とフィチル基を失った Pheide *b* は、hydroxymethyl Pheide *a* に還元されたと報告していることから (Scheumann et al., 1996)、中心の Mg が脱離されてもヒドロキシメチル基の還元は起きるのでないかと考えられる。また、NOL 組み換えタンパク質は、Chl *b* だけでなく葉緑体で存在しうる、中央金属の Mg を失った pheophytin *b* (Phein *b*) やさらにフィチル基を失った pheophorbide *b* (Pheide *b*) などの Chl *b* 派生物のフォルミル基を還元し、幅広い基質の特異性を示した (Horie et al., 2009)。しかし、実際の経路で Chl *b* が分解されるのかに関しては、未だに不明である。

チラコイド膜上のすべての Chl は、Chl-タンパク質複合体と結合している (Markwell et al., 1979)。LHCII に結合した Chl *b* は、LHCII アポタンパク質が分解

することなく、NOLにより HMChl *a*に変換されることから、NOLはLHCsと相互作用し、LHCs分解の最初のステップに関与していると考えられている (Horie et al., 2009)。この考えは、老化時に *nol/nyc1* 変異体では LHCII が分解されないことから、支持される (Horie et al., 2009)。仮に LHCII のアポタンパク質分解が先行し、CBRにより遊離した Chl *b*が触媒されるならば、*nol/nyc1* 変異体では、LHCII タンパク質が残存しないはずである。しかしながら、Chl *b*が LHCII に存在した場合に、Chl *b*が適切に分解されるかどうかについては不明である。

本研究では①Chl *b*分解経路を確定すること、および②植物がその経路を採用した理由を解明することを目的として、以下の実験を行った。Chl *b*分解経路を確定するために、最初に HCAR の基質特異性を調べた。NOL とは対照的に、HCAR は、7-hydroxymethyl Phein *a* (HMPhein *a*) と 7-hydroxymethyl Pheide *a* (HMPheide *a*) ではなく、HMChl *a*のみを還元したことから、Chl 分解の最初のステップは、Chl *b*から Mg の脱離ではなく、CBR による HMChl *a*の変換であることが示唆された。しかしながら、in vitro の実験で、NOLはコアアンテナ複合体である CP1 に組み込まれた Chl *b*を、すべて触媒できなかった。また、CP1 に Chl *b*が存在した場合、Pheide *b*と HMPheide *a*が暗処理時に蓄積し、さらに葉に細胞死が引き起こされた。この結果から、LHCs とは別の Chl-タンパク質複合体に Chl *b*が存在する場合は、Chl *b*は適切に分解されないと示唆された。これらの結果を踏まえて、Chl *b*分解の重要性とメカニズムについて考察する。

2. 材料と方法

2.1 植物材料

野生型(WT)として、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)品種 Columbia を供試した。原核緑藻である *Prochlorothrix hollandica* の Chl *b* 合成遺伝子を過剰発現させた形質転換体 (PhCAO) (Hirashima et al., 2006) を供試した。

2.2 育成方法

2.2.1 土壌栽培

WT と PhCAO の種子を三共園芸培土(北海三共)と太平洋バーミライト(太平洋石炭販売輸送)を混合したものに播種した後、4 °C 暗黒下で 2 日間静置して休眠打破処理とし、その後、23 °C、70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色連続光条件下で育成した。

2.2.2 老化誘導

植物を 23 °C の暗所に置くことで、植物に老化を誘導した。暗処理は、播種後 4-5 週間程度の植物をダンボール製の暗箱(ASKRU)に 5 日間入れ、遮光することで行った。ダンボール箱内の湿度の過剰な上昇を防ぐため、植物育成用の容器中の余分な水分を捨ててから、暗処理を行った。

2.3 NOL と HCAR の組み換えタンパク質の発現と精製

2.3.1 NOL と HCAR の組み換えタンパク質の発現

CBR のアイソザイムとして、NOL を酵素反応に用いた。NOL (Horie et al., 2009) と HCAR (Meguro et al., 2011) の組み換えタンパク質発現用プラスミドを、タンパク質発現用コンピテントセル BL21 にそれぞれに形質転換した。kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) を含んだ 2 ml の Luria-Bertani 培地での前培養をオーバーナイトで行った。これらを、kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) を含んだ 250 - 1000 ml の Luria-Bertani 培地にそれぞれ植え継いで 37 °C で振盪培養した。NOL の発現では、600 nm の吸光度が 0.5 - 0.7 前後の段階で、あるいは HCAR の発現では 600 nm の吸光度が 1.3 前後の段階で、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside を終濃度 0.2 mM になるように加えて、さらに 3 時間振盪培養した。HCAR の発現では、ammonium ferric citrate を終濃度 100 μM になるように加えた。その後、4 °C、4800 g、5 分間遠心し、上清を捨て、ペレットを -30 °C で保

存した。

2.3.2 NOL と HCAR の組み換えタンパク質の精製

2.3.2.1 大腸菌の破碎

2.2.1 で得られたペレットに、Binging buffer (5 mM imidazole、500 mM NaCl、20mM Tris-HCl, pH 7.9) 10 ml を加え、ボルテックスにかけて溶解した後、ソニケーター(BRANSON SONIFIER)で output 4 70% 1 分の超音波破碎を 3 回、氷上で行った。その後 4 °C、21600 g、15 分間遠心し、上清を 0.2 µm フィルター (東洋濾紙) で濾過し、濾液をサンプルとした。

2.3.2.2 ニッケルカラムによる精製

NOL と HCAR の組換えタンパク質を、His binding kit (Novagen) によって精製した。精製は kit の手順に従ってサンプルを resin に吸着させた。その後、resin の 2 倍量の Binging buffer を通し、そして、2 倍量の Wash buffer (60 mM imidazole、500 mM NaCl、20mM Tris-HCl, pH 7.9) で余分なタンパク質を溶出させ、Elution buffer (500 mM imidazole、250 mM NaCl、10 mM Tris-HCl, pH 7.9) で目的のタンパク質を溶出した。

2.3.2.3 NOL 精製タンパク質の脱塩と濃縮

Green gel blot 分析では、上記の溶出バッファーに含まれる imidazole を取り除くため、精製した NOL タンパク質を、Mini Trap G-25 (GE ヘルスケア) を用いて脱塩した。このとき、Reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0、100 mM NaCl) に置換した。手順は Mini Trap G-25 の推奨手順に従った。

脱塩した精製した NOL タンパク質を VIVASPIN 500 (sartorius stedim biotech) で濃縮し、Green gel blot 分析のための反応に用いた。

2.3.2.4 NOL と HCAR の精製タンパク質量の定量

タンパク質の濃度測定を、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)を用い、595 nm の吸光度を測定することで行った。検量線には 0.1 %BSA 溶液を用いた。

2.4 Chl 誘導体の調整

2.4.1 HMChl *a* の調整

Chl *b* の 7 位の フォルミル基を NaBH_4 により ヒドロキシメチル基に還元することで、HMChl *a* を調整した。Chl *b* を methanol に溶かし、21600 g で 5 分間遠心した。上清を回収し、methanol に溶かした 100 mM NaBH_4 を加え、室温で数分反応させた。この Chl 水溶液に、等量の hexane と 4 倍量の飽和食塩水を加えてボルテックスし、4 °C、21600 g、5 分間で遠心した。上清を回収して窒素ガスで乾燥させ、HMChl *a* として使用した。

2.4.2 Chlide *b* と HMChlide *a* の調整

Chlide *b* と HMChlide *a* は、chlorophyllase により Chl *b* と HMChl *a* のフィチル基を加水分解することにより調整した。大腸菌で発現させた chlorophyllase タンパク質、20 mM phosphate-Na, pH 7.0、33 mM octylglucoside、Chl *b* あるいは HMChl *a*、20 % acetone (v/v) になるようにそれぞれ加え、室温で 1 時間反応させた。0.5 ml の反応液に、acetone を 0.5 ml、hexane を 1.0 ml、3 M Tris-HCl (pH9.0) を 50 μ l を加え、激しく攪拌した。室温、4800 g、10 分間遠心し、水層を回収した。飽和食塩水 4 ml と diethyl ether 1 ml を加え、4 °C、4800 g、10 分間遠心し、上層を回収した。窒素ガスで乾燥させ、Chlide *b* と HMChlide *a* として使用した(Tsuchiya et al., 1997)。

2.4.3 Phein *b* と Pheide *b* の調整

Phein *b* と Pheide *b* は、Chl *b* と Chlide *b* を酸処理することで、中心金属の Mg を脱離させることにより調整した。Chl *b* と Chlide *b* を Reaction buffer (80 % (v/v) acetone、25 mM HCl) 2 ml に溶解した。色素が変色した後、飽和食塩水 5 ml、diethyl ether 1 ml 加え 4 °C、4800 g、10 分間遠心し、上層を回収した。窒素ガスで乾燥させ、Phein *b* と Pheide *b* として使用した。

2.4.4 HMPhien *a* と HMPhide *a* の調整

HMPhien *a* と HMPhide *a* は、上記の Phein *b* と Phide *b* の調整と同様にして、HMChl *a* と HMChlide *a* を酸処理することで、中心金属の Mg を脱離させることにより調整した。HMChl *a* と HMChlide *a* を Reaction buffer (80 % (v/v) acetone、25

mM HCl) 2 ml に溶解した。色素が変色した後、飽和食塩水 5ml、diethyl ether 1ml 加え 4 °C、4800 g、10 分間遠心し、上層を回収した。窒素ガスで乾燥させ、HMPhein *a* と HMPheide *a* として使用した。

2.5 LHCII と PSI 粒子の単離と精製

WT と PhCAO からショ糖密度勾配遠心により LHCII と PSI 粒子をそれぞれ精製した。ロゼッタ葉を刈り取りブレンダーに入れ、Isolation buffer (50 mM Tricine-NaOH, pH8.0、5 mM EDTA、0.35 M sucrose) を加えて破碎し、ミラクロスで濾過した。上清を遠心チューブに入れ 4 °C、9900 g、10 分間遠心した。上清を捨て、ペレットに 5 mM EDTA を加え洗浄し、4 °C、9900 g、10 分間遠心した。ペレットを Chl の最終濃度が 0.8 mg /ml になるように超純水で調整した。Triton X-100 を最終濃度 0.8 % になるように加え、氷上で 2 分 30 秒間攪拌し、4 °C、35000 g、15 分間遠心した。上清を 0.1-0.7 M sucrose gradient(0.08 % Triton X-100)の上へのせ、超遠心機(HITACHI CP70G)で 4 °C、100000 g、14 時間遠心した。PSI を、赤い蛍光を出さない緑色のペレットとして得た。PSI に Solubilized buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0、100 mM NaCl、0.8 % Triton-X100) を加え、氷上で 10 分間静置した。その後、4 °C、21600 g、10 分間遠心し、上清を PSI 粒子として使用した。UV をあて赤い蛍光を出すバンドを注射器で回収し、KCl と MgCl₂ をそれぞれ最終濃度が 100 mM と 10 mM になるように加え、静かに攪拌し、0.5 M sucrose cushion へのせ、4 °C、2500 g、10 分間遠心した。ペレットを蒸留水で懸濁し、LHCII として使用した。

2.6 色素分析

2.6.1 色素の抽出

ロゼッタ葉を切り取り、生重量を測定した。2 mL エッペンドルフチューブに入れ、タングステンビーズ(バイオメディカルサイエンス)と生重量の 20 倍量の 100 % acetone を加えてシェイクマスター(バイオメディカルサイエンス)で 1 分間×2 回の破碎を行った。その後ピンセットでタングステンビーズを取り出し、4 °C、21600 g、15 分間の遠心を行い、上清をサンプルとした。

2.6.2 色素の分析

Zapata ら(Zapata et al. 2000)の方法を参考にし、抽出した色素の分析を行った。HPLC は LC-10AT chromatograph system (島津)を用い、カラムは Symmetry™ C8 Columns (Waters)を用いた。溶媒組成と条件は表 I に示した。

2.7 酵素活性の測定

2.7.1 HMChl *a* と HMChl *a* 誘導体を用いた HCAR の活性測定

反応液 (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 100 mM NaCl) 100 μ l に対して、50 mM NADPH を 3 μ l、spinach ferredoxin NADPH reductase (FNR) (0.1 mg/ml)を 2 μ l、spinach ferredoxin (Fd) (2.2 mg/ml) を 2 μ l、10 % Triton X-100 を 1 μ l を加えた。HCAR タンパク質濃度は 3.27 μ M になるように反応液に加えた。また、色素を 0.375 mM になるように acetone に溶解し、反応液に 2 μ l 加えた。37 $^{\circ}$ C で反応させた。反応を停止させるために、4 倍量の acetone を加えて、ボルテックスし、4 $^{\circ}$ C、21600 g、15 分間遠心した。上清を HPLC で解析した。溶媒組成と条件は 2.2.6 に準ずる。

2.7.2 Chl *b* と Chl *b* 誘導体を用いた NOL と HCAR の組み合わせによる活性測定

反応液 (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 100 mM NaCl) 100 μ l に対して、50 mM NADPH を 3 μ l、spinach FNR (0.1 mg/ml)を 2 μ l、spinach Fd (2.2 mg/ml) を 2 μ l、10 % Triton X-100 を 1 μ l を加えた。NOL と HCAR タンパク質と濃度は 3.27 μ M になるように反応液に加えた。また、色素を 0.375 mM になるように Acetone に溶解し、反応液に 2 μ l 加えた。37 $^{\circ}$ C で反応させた。反応の停止と色素の解析は、上記の 2.7.1 に準ずる。

2.7.3 LHCII を基質としたときの NOL と HCAR の組み合わせによる活性測定

反応液 (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 100 mM NaCl) 100 μ l に対して、50 mM NADPH を 3 μ l、spinach FNR (0.1 mg/ml)を 2 μ l、spinach Fd (2.2 mg/ml) を 2 μ l、10 % Triton X-100 を 1 μ l を加えた。NOL と HCAR タンパク質と濃度は 3.27 μ M になるように反応液に加えた。また、LHCII の Chl 濃度が 0.03 mg/ml になるように反応液に加えた。37 $^{\circ}$ C で反応させた。反応の停止と色素の解析は、上記の 2.7.1 に準ずる。

2.7.4 PSI と LHCII を基質としたときの NOL の活性測定

反応液 (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 100 mM NaCl) 150 μ l に対して、50 mM NADPH

を 4.5 μ l、10 % Triton X-100 を 1.5 μ l を加えた。NOL のタンパク質と濃度は 15.3 μ M になるように反応液に加えた。また、PSI と LHCII の Chl *b* 濃度が 5.0 μ g/ml になるようにそれぞれ反応液に加えた。25 $^{\circ}$ C で反応させた。反応の停止と色素の解析は、上記の 2.7.1 に準ずる。

また、Green-native Gel 分析では、反応液 (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 100 mM NaCl) 50 μ l に対して、50 mM NADPH を 1.5 μ l、10 % Triton X-100 を 1.5 μ l を加えた。NOL のタンパク質と濃度は 90 μ M になるように反応液に加えた。また、PSI と LHCII の Chl *b* 濃度が 0.08 mg/ml になるようにそれぞれ反応液に加えた。25 $^{\circ}$ C で 3 時間反応させた。

2.8 Green-native Gel 分析

7.95 %アクリルアミドのディスクゲルを用いた Green-native Gel で LHCII と PSI を分離した。LHCII または PSI を含む反応液に、Solubilized buffer (0.6 M Tris-HCl, pH8.8, 20 % v/v glycerol) を 1:1 で混合し、4 $^{\circ}$ C、18800 g、1 分間遠心した。緑色の上清をサンプルとし、暗所で 4 $^{\circ}$ C、7 mA、75 分間電気泳動を行った。

泳動後に色素解析のサンプルは分離したバンドを切り出し、Extraction buffer (41 mM Tris-Borate, pH 8.64) を加え破碎し、4 $^{\circ}$ C、21600 g、10 分間遠心し、上清を回収した。上清に 100 % acetone を最終濃度 80 % になるように加えた。色素の解析は、上記の 2.7.1 に準ずる。

2.9 イオン漏出量

暗処理前と暗処理後の植物を、イオン漏出量の測定に用いた。2 ml の超純水の入った 2 ml チューブに、ロゼッタ葉を浸した。サンプルを 4 $^{\circ}$ C で 2 時間ロータリーシェーカーにより攪拌した。TWIN compact conductivity meter (HORIBA) を用いて溶液の電気伝導度 A を測定した。サンプルを 100 $^{\circ}$ C、15 分間加熱し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間ロータリーシェーカーにより攪拌した。再度、同様に溶液の電気伝導度 B を測定した。葉のイオン漏出量を、電気伝導度 $A/B \times 100$ として算出した。

2.10 葉緑体の分画

2.10.1 葉緑体の単離と分画

WT からシヨ糖密度勾配遠心により葉緑体からストロマ、チラコイド膜、エンベロープ膜を分画した。8-10 週齢の WT からロゼッタ葉を刈り取りブレンダーに入れ、Isolation buffer (20 mM Tricine-NaOH, pH8.0、10 mM EDTA、0.1 % (w/v) BSA、1 mM NaHCO₃、0.45 M sorbitol) を加えて破碎し、ミラクロスで濾過した。上清を遠心チューブに入れ 4 °C、2000 g、5 分間遠心した。遠心したペレットを回収し、Wash buffer (20 mM MOPS-NaOH, pH 7.6、0.33 M sorbitol、5 mM MgCl₂、2.5 mM EDTA) で懸濁した。懸濁後、40 % Percoll (40 % (v/v) Percoll、20 mM MOPS-NaOH, pH 7.6、0.33 M sorbitol、5 mM MgCl₂、2.5 mM EDTA)、80 % Percoll (80 % (v/v)、20 mM MOPS-NaOH, pH 7.6、0.33 M sorbitol、5 mM MgCl₂、2.5 mM EDTA) を重ねた層の上に懸濁液を乗せて、4 °C、2500 g、10 分間遠心した。遠心後、40% Percoll と 80% Percoll の間の層に移動した無傷葉緑体を回収した。単離した無傷葉緑体に wash buffer を加えて懸濁後、4 °C、2500 g、10 分間遠心した。上清を捨て、再度 wash buffer を加え、4 °C、2500 g、10 分間遠心した。ペレットを Swelling buffer (10 mM MOPS-NaOH, pH 7.6、4 mM MgCl₂) で懸濁し、氷上で 10 分間静置した。Swelling buffer-0.3 M sucrose、Swelling buffer-0.6 M sucrose、Swelling buffer-0.93 M sucrose を重ねた層の上に懸濁液を乗せて、4 °C、70000 g、1 時間超遠心した。遠心後、Swelling buffer-0.3 M sucrose の上層に移動したストロマ画分を回収した。同様に、Swelling buffer-0.6 M スクロースと Swelling buffer-0.93 M sucrose の間の層に移動したエンベロープ膜分画を回収した。ペレットとしてチラコイド膜画分を回収した。単離したチラコイド膜、エンベロープ膜に Swelling buffer を加えて懸濁し、4 °C、70000 g、1 時間超遠心をしてペレットをチラコイド膜、エンベロープ膜として回収した。

2.10.2 葉緑体分画のタンパク質の定量

タンパク質の濃度測定を、Bio-Rad DC-Protein assay kit (Bio-Rad)を用い、750 nm の吸光度を測定することで行った。検量線には0.1 %BSA溶液を用いた。手順はBio-Rad DC Protein assay kit の推奨手順に従った。

2.11 ウェスタンブロット

葉緑体から分画したタンパクを、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって分離した。電気泳動は、ゲル 1 枚につき 25 mA、250 V、75 分間、ミニゲル

で行った。SDS-PAGE を行った後、タンパク質を PVDF メンブレン（GE ヘルスケア バイオサイエンス）に転写するため、40 V で 120 分間のブロッキングを行った。メンブレンを 5 % skim milk-PBS-T に浸けて 60 分間振盪してブロッキングとした。PBS-T で洗浄し、一次抗体を Can Get Signal solution 1（東洋紡）で希釈した液に浸けて 60 分間振盪した。NOL 抗体では 2000 倍、HCAR 抗体では 10000 倍、PAO 抗体では 5000 倍、Rubisco L 抗体では 20000 倍、LHCB1 抗体では 4000 倍、Tic110 抗体では 2000 倍、に希釈した。PBS-T で洗浄、次いで Can Get Signal solution 2（東洋紡）で希釈した液に浸けて 60 分間振盪した。このとき、二次抗体のウサギ抗体は、20000 倍に希釈した。PBS-T で洗浄後、バンド検出のための発光試薬には ECL-plus（GE ヘルスケアバイオサイエンス）を用い、化学発光検出解析装置 Lumi Vision PRO（アイシン精機）で解析した。

表 1 HPLC のタイムプログラム

A 液はメタノール：アセトニトリル：0.25M ピリジン溶液 (2 : 1 : 1)

B 液はメタノール：アセトニトリル：アセトン (1 : 3 : 1)

時間 (min)	A 液 (%)	B 液 (%)
0.01	100	0
2	60	40
8	5	95
13	5	95
15	100	0
20	100	0

3. 結果

3.1 Chl 分解経路の確定

Chl *a* 分解の研究は、多くの研究者によって精力的に行われており、Chl *a* 分解経路は確立された。一方、Chl *b* 分解経路については、未確定である。それは、Chl 分解系酵素が幅広い基質特異性をもつため、Chl *b* 分解経路が複数存在する可能性があるためである。例えば、PPH は、Phein *a* と Phein *b* 共にフィトール鎖を加水分解し、Pheide *a* と Pheide *b* をそれぞれ生成する (Schelbert et al., 2009)。また、NOL は Chl *b*、Chlide *b*、Phien *b*、そして Pheide *b* の 7 位のフォルミル基をヒドロキシメチル基に還元できる (Horie., et al 2007)。chlorophyllase は、葉の老化時における葉緑体での Chl 分解に関与しないと報告されているため (Schenk et al., 2007)、chlorophyllide (Chlide) *a* は老化時の葉では生成されないと考えられる。これらの知見をもとに、2 つの Chl *b* 分解経路が提案されている (図 1) (Horie., et al 2007)。一つ目は、CBR が最初に Chl *b* を触媒し、HMChl *a* を経由する経路である。もう一つ目は、MDC により最初に Chl *b* の中心金属 Mg イオンが脱離し、Phein *b* を経由する経路である。

3.1.1 HCAR の基質特異性

HCAR の基質特異性を決定は、Chl *b* がどの経路で分解されるかを検証するうえで鍵となる。この目的のため、HCAR の組み換えタンパク質を大腸菌で発現させ、精製した。Ferredoxin の存在下で、精製した HCAR 組み換えタンパク質を、HMChl *a*、HMChlide *a*、HMPhein *a*、そして HMPheide *a* と反応させた (図 2)。反応後の色素を、HPLC により分析を行った。HMChl *a* と HMChlide *a* を基質とした場合には、反応後にはほとんどすべての色素が、それぞれ Chl *a* と Chlide *a* に変換されていた。一方、HMPhein *a* と HMPheide *a* を基質とした場合には、反応後にはどちらの色素の場合でも、それぞれ Phein *a* と Pheide *a* には変換されなかった。Chlide *b* は葉緑体では生成されないことと (Schenk et al., 2007)、これらの結果から、Chl *b* は、CBR により変換される HMChl *a* を経由するする単一の経路で分解されることが示唆された。この考えは、WT の老化時の葉では HMPhein *a* と HMPheide *a* が検出されないという結果 (Meguro et al., 2011) からも支持される。

3.1.2 NOL と HCAR の組み合わせによる、Chl *b* と Chl *b* 派生物の還元

HCAR の基質特異性の結果から、Chl *b* は、最初に CBR により HMChl *a* に、次に HCAR により Chl *a* に変換されて、Chl *a* 分解経路に合流して分解されていくことが示唆された。Chl *b* から HMChl *a* を経由して Chl *a* への変換を調べるため、また酵素の基質特異性を確認するため、CBR と HCAR の組み換えタンパク質の共存下で、Chl *b* と Chl *b* 派生物との反応を調べた。このとき、CBR のアイソザイムである NOL を用いた。Feredoxin と NADPH の存下で、NOL と HCAR の組み換えタンパク質を、Chl *b*、chlorophyllide *b* (Chlide *b*)、Phein *b*、そして Pheide *b* と反応させた (図 3)。また、反応液中には NOL と HCAR が等量 mol にした。Chl *b* を基質とした場合、反応後には中間体である HMChl *a* はほとんど蓄積せずに、NOL と HCAR により Chl *b* は Chl *a* へと効率的に変換された。対照的に、Chlide *b* を基質にした場合、反応後には HMChlide *a* と Chlide *a* が蓄積していたことから、Chlide *b* は、HMChlide *a* を経由して、Chlide *a* に変換されたことと考えられる。中間体である HMChlide *a* が多量に蓄積していたことから、HMChlide *a* は効率よく Chlide *a* に変換されないと考えられる。Phein *b* と Pheide *b* を基質とした場合には、反応後には HMPhein *a* と HMPheide *a* がそれぞれ蓄積したが、Phein *a* と Pheide *a* は蓄積しなかった。これは、NOL は Phien *b* と Pheide *b* を HMPhein *a* と HMPheide *a* にそれぞれ変換することができたが、一方 HCAR は HMPhein *a* と HMPheide *a* を Phien *a* と Pheide *a* に変換できなかったためであると考えられる。これらの結果から、NOL/HCAR 経路では、Phien *b* と Pheide *b* ではなく、Chl *b* を基質とすることが示唆された。また、NOL/HCAR 経路では、中間体である HMChl *a* は蓄積せずに、Chl *b* から Chl *a* へと効率よく変換されることが示唆された。

3.1.3 NOL と HCAR における基質特異性の比較

NOL と HCAR の組み換えタンパク質の共存化において、Chlide *b* を基質とした場合には、中間体である HMChlide *a* が蓄積された。これは、NOL と HCAR 間での酵素活性の不釣り合いであると考えられた。Chl *b* と Chlide *b*、あるいは HMChl *a* と HMChlide *a* の 2 つの基質の混液下で、NOL と HCAR 活性をそれぞれ調べた (図 4)。NOL を Chl *b* と Chlide *b* とともに同一の反応液で反応させたところ、Chlide *b* では反応後 1 分以内に、ほぼすべての Chlide *b* が HMChlide *b* に変換された。対照的に、Chl *b* を基質とした場合には、HMChl *a* にゆっくりと変換され、反応 60 分後には、すべての

Chlide *b*がHMChlide *a*へ変換された。これらの結果から、酵素的観点においては、NOLにとってChl *b*よりもChlide *b*の方が基質として優れていることが示唆された。HCARの酵素的性質は、NOLとは全く異なったものになった。HCARをHMChl *a*とHMChlide *a*ともに同一の反応液で反応させたところ、HMChl *a*からChl *a*への変換速度は、HMChlide *a*からChlide *a*へのものよりも、わずかに高かった。反応後に、Chlide *a*量は、反応液に加えた基質であるHMChlide *a*量の約60%であった。この不一致は、反応液中でのChlide *a*、あるいはHMChlide *a*の不安定さのためであると考えられる。これらの結果から、フィトール基を有する基質の場合は、HCAR活性は、NOL活性よりも高いことが示された。HMChl *a*に変換するNOLの反応初速度とChl *a*に変換するHCARの反応初速度は、それぞれ0.19と1.66 $\mu\text{M}/\text{分}$ であった。NOLとHCARの酵素学的な性質から、NOLとHCARの等量molの共存化では、Chl *b*を基質とした場合に中間体であるHMChl *a*が蓄積せずに、Chl *a*に効率よく変換されることが示唆された。

3.1.4 NOLとHCARの組み合わせによる、LHCIIに結合したChl *b*の還元

葉緑体の中で、Chl *b*は、LHCに結合した状態で存在している。LHCIIに結合したChl *b*は、NOLによってHMChl *a*に変換されることが報告されている (Horie et al., 2009)。in vitroでの組み換えタンパク質を用いた実験結果から、LHCIIに結合したChl *b*がNOL/HCAR経路の本当の基質であると示唆されている。そこで、NOLとHCAR組み換えタンパク質の共存下で基質として精製したLHCIIとの反応を調べた (図5)。NOLとHCARの組み換えタンパク質の共存化では、反応後にはChl *b*量は減少し、それに付随してChl *a*量は増加した。このときに、中間体であるHMChl *a*はほとんど蓄積しなかった。これらの結果から、Chl *b*は、LHCIIに結合した状態で分解が始まり、最初にNOLによってChl *b*がHMChl *a*に変換され、次にHCARによってHMChl *a*がChl *a*に変換されることが示唆された。

3.2 植物はなぜCBR/HCARによるChl *b*分解経路を採用したか

in vitroの結果から、Chl *b*は、最初にMgイオンが脱離するのではなく、NOLによってChl *b*がHMChl *a*に変換され、次にHCARによってHMChl *a*がChl *a*に変換され、Chl *a*分解経路に合流して分解されていくことが示唆された。Chl *a*分解経路では、

MDC による Chl *a* から Mg イオンの脱離が最初のステップであり、そのとき Phein *a* が生成される。では、なぜ Chl *b* 分解において、先に Mg イオンの脱離が先行してはいないのだろうか。また、Chl *b* 分解が、NOL/HCAR 経路を経て分解されなければならないのだろうか。もし、MDC により最初に Chl *b* から Mg イオンを脱離したならば、Chl *b* は Phein *b* に変換される。NOL の幅広い基質特異性から Phein *b* の 7 位のフォルミル基はハイドロキシメチル基に変換されるため、Phein *b* の一部は、HMPhein *a* が生成される可能性がある。しかしながら、HCAR は、in vitro の結果から HMPhein *a* のハイドロキシメチル基をメチル基に還元することができず、Phein *a* を生成することができない。PPH は、Phein *a* と Phein *b* とともにフィチル基を加水分解することができる (Schelbert et al., 2009) ため、PPH は HMPhein *a* のフィチル基を加水分解し、HMPheide *a* が生成することが示唆された。したがって、MDC により Chl *b* から Mg イオンが脱離すれば、HMPheide *a* が最終産物であると考えられる。HMPheide *a* は毒性の有する分子であり、細胞死を誘導する可能性があるため、Mg イオンが脱離する前に、NOL によって LHC の Chl *b* は HMChl *a* へ効率的に変換されることによって、HMPheide *a* の生成は、避けなければならない。

3.2.1 NOL による Chl-タンパク質複合体に結合した Chl *b* の還元

NOL が LHC と特異的に相互作用するように進化してきたという推定のもと、LHC とコアアンテナ複合体との構造的な違いのために、NOL は Chl *b* を HMChl *a* に効率的に変換できないのではないかと考えた。この可能性を調べるために、原核緑藻である *Prochlorothrix hollandica* の chlorophyllide *a* oxygenase を発現させたシロイヌナズナの形質転換体 (PhCAO) (Hirashima et al., 2006) を用いた。PhCAO では、Chl *b* の光化学系への分配が WT と異なっている。WT では LHC のみに Chl *b* が組み込まれるのに対して、PhCAO では LHC だけではなく、PSI と PSII のようなコアアンテナ複合体へ Chl *b* が組み込まれる (Hirashima et al., 2006)。LHCII に結合した Chl *b* のすべては、NOL によって HMChl *a* に変換されることが報告されている (Horie et al., 2009)。NOL はコアアンテナ複合体に結合した Chl *b* を効率的に HMChl *a* に変換することができるかどうかを調べるために、ショ糖密度勾配遠心により WT と PhCAO から LHCII と PSI を精製し、NOL と反応させた (図 6)。WT と PhCAO の LHCII の Chl *a*/Chl *b* 比は、それぞれ 1.25 と 0.91 であったことから、PhCAO では Chl *b* の大部分は、LHCII

に結合していると考えられた。WT と PhCAO から精製した LHCII を基質にした場合、反応後 WT と PhCAO の LHCII に結合した Chl *b* 量は同様のパターンで減少していき、45 分後には Chl *b* 量は、0 になった。この結果から、NOL により WT と PhCAO の LHCII に結合した Chl *b* は、すべて HMChl *a* に変換されたことを意味する。また、NOL による Chl *b* から HMChl *a* への変換速度は、WT と PhCAO の LHCII の違いは見られなかったことから、PhCAO では、LHCII に過量に Chl *b* が結合していたとしても、Chl *b* は WT と同様に効率よく HMChl *a* 変換されていくと考えられた。WT と PhCAO から精製した PSI の Chl *a*/Chl *b* 比は、それぞれ 9.35 と 1.90 であった。WT の PSI を基質とした場合、反応とともに Chl *b* 量は減少していき、反応 60 分後には Chl *b* 量は、全 Chl *b* 量の約 5% になった。このときの WT の PSI の Chl *a*/Chl *b* 比は 174 であったことから、反応後には PSI に結合した Chl *b* がほぼすべて変換されたと考えられた。対照的に、PhCAO の PSI を基質とした場合、反応とともに Chl *b* 量は減少していったが、反応 60 分後には Chl *b* 量は、全 Chl *b* 量の約 20% になった。このとき、WT の PSI の Chl *a*/Chl *b* 比は 9.44 であったことから、反応後には PSI には相当量の Chl *b* が存在していると考えられた。また、LHCII を基質とした場合と比較して、Chl *b* 減少率が低かったことから、NOL は PSI に結合した Chl *b* よりも、LHCII に結合した Chl *b* のほうが基質としやすいことが考えられた。

3.2.2 Chl-タンパク質複合体の Green gel 分析

次に、NOL と反応後に Chl-タンパク質複合体が存在しているかどうかを調べた (図 7)。WT と PhCAO の LHCII と PSI をそれぞれ NOL と反応させ、Green-native gel 電気泳動により Chl-タンパク質複合体を調べた。NOL と反応をさせなかった場合には、WT と PhCAO の LHCII ともに、LHCII の trimer と monomer のバンド、そして遊離した Chl のバンドが分離された。NOL と反応させた場合、WT と PhCAO の LHCII ともに、すべての LHCII のバンドが消失し、遊離した Chl のみがみられた。PSI を Green gel により分離を行った場合、2 つのバンドがみられた。一つは、CP1 と呼ばれるコアアンテナであり、もう一方は遊離した Chl である。NOL と反応させた場合とさせなかった場合ともに、また WT と PhCAO の PSI を基質とした場合ともに、PSI コア複合体のバンドパターンは変化していなかった。電気泳動後に、WT と PhCAO の PSI と LHCII の緑色のバンドを切り出し、色素を HPLC により分析した。NOL との

反応後、WT の PSI コアアンテナ複合体の Chl *a*/Chl *b* 比は 102.9 だったことから、WT の PSI コアアンテナ複合体には Chl *b* 量は、極めて低いと考えられた。PSI コアアンテナ複合体には、おおよそ 100 分子の Chl が結合していることから (Amunts et al., 2007)、NOL と反応後には PSI コアアンテナ複合体には平均 1 以下の Chl *b* が結合していると考えられる。しかしながら、NOL との反応後、PhCAO の PSI コアアンテナ複合体の Chl *a*/Chl *b* 比は 4.49 だったことから、PhCAO の PSI コアアンテナ複合体には相当量の Chl *b* が残存していると考えられた。また、PSI を Green native gel 電気泳動により分離したところ、NOL との反応させなかった場合には、Chl *b* は CP1 と遊離した Chl のバンドで存在していた。一方、NOL と反応させた場合には、PSI コアアンテナ複合体には Chl *b* が存在しているにもかかわらず、Chl *b* は遊離した Chl では存在せずに、CP1 のバンドにのみ存在していた。PSI コアアンテナの周辺にゆるく結合した Chl は、界面活性剤の影響によりアポタンパク質から遊離し、電気泳動中にフリーの Chl として移動する可能性がある。NOL は、PSI コアアンテナ複合体の周辺に結合した Chl *b* を、HMChl *a* に変換していると考えられた。残りの Chl *b* はタンパク質に安定的に包埋され、電気泳動中に遊離しないのではないかと考えられた。これらの結果から、PhCAO の PSI コアアンテナ複合体に結合した一部の Chl *b* は、NOL によって直接的に触媒されず、他のメカニズムによって代謝されるのではないかと考えられた。

3.2.3 暗処理による PhCAO における異常 Chl 分解産物の蓄積

in vitro の結果から、PhCAO のコアアンテナ複合体に組み込まれた Chl *b* が異なった分解経路に分解されるのではないかと考えられた。通常は、Chl *b* は、CBR により最初にフォルミル基がヒドロキシメチル基に変換され分解されていくのに対して、PhCAO の Chl *b* の一部は、最初に MDC により Mg イオンが脱離され、Phein *b* が生成し、最終的に HMPheide *a* や異常な分解中間体が蓄積するのではないかと考えられた。この可能性を調べるため、葉の老化を誘導するために暗処理を PhCAO に行い、色素を HPLC により分析した (図 8)。暗処理前には、WT と PhCAO とともに、Chl 分解物は検出されなかった。暗処理後、WT では Chl *a* と Chl *b* とともに減少したが、Chl 分解物は検出されなかった。このことは、WT では Chl が適切に分解されていることを示している。一方、PhCAO では、暗処理後に WT にはみられない新たなピークが検出された。HPLC の保持時間と吸収スペクトルから、ピークはそれぞれ HMPheide *a*、Pheide

b、そして Pheide *a* であった。PhCAO では Chl *b* が適切に代謝されずに、HMPheide *a* や Pheide *b* に変換されたと考えられた。

3.2.4 暗処理による PhCAO 植物における細胞死の表現型

暗処理後 5 日目では、PhCAO では Pheide *a* が相当に蓄積され、また葉の一部には壊死が見られた (図 9)。この表現型は、Pheide *a* を蓄積して細胞死を引き起こされる、*pao* 変異体に類似していた。暗処理時に PhCAO では細胞死が引き起こされるかどうかを調べるために、葉のイオン漏出量を測定した。WT と PhCAO では、Chl 分解を誘導するために 5 日間暗処理を行った (図 9)。WT では、暗処理前後においてイオン漏出量は低かった。対照的に、PhCAO では暗処理前ではイオン漏出量が低いのにに対して、暗処理後にはイオン漏出量が著しく増加していた。これより、PhCAO における葉の細胞では、暗処理により膜強度が低下することが示唆された。これらの結果から、PhCAO における葉の細胞では、暗処理により細胞死が引き起こされることがわかった。

3.3 クロロフィル分解酵素群の局在

クロロフィル分解酵素群の葉緑体での局在を調べるために、無傷葉緑体を単離し、さらにショ糖密度勾配遠心によりストロマ、チラコイド膜、エンベロップ膜の 3 つに分画した。その後、クロロフィル分解酵素群の特異的な抗体を用いたウエスタンブロットを行った (図 10)。このとき、各分画のタンパク質量が等量になるようにした。また、ストロマのマーカーとして Rubisco L、チラコイド膜のマーカーとして Lhcb1、エンベロップ膜のマーカーとして Tic55 の抗体を用いた。NYC1 では、特異的なバンドが検出されなかった。NOL と PAO では、ともにエンベロップ膜とチラコイド膜に特異的なバンドが検出された。一方、HCAR では、ストロマとエンベロップ膜において検出された。エンベロップ膜は葉緑体全タンパク質の 2% を占める (Salvi et al., 2011) ことと、これらの結果から NOL と PAO の大部分はチラコイド膜に局在し、HCAR はストロマに局在すると考えられた。

4. 考察

4.1 CBR/HCAR 経路での Chl *b* から Chl *a* への効率的変換

Chl 合成経路の中間体分子は活性酸素種を発生し、多量に活性酸素が蓄積すると壊死が引き起こされる (Meskauskienė et al., 2001)。また、Chl 分解中間体の中には、同様に毒性あるものがある。例えば、Pheide *a* は、光依存的と光非依存的に細胞死を引き起こす (Gray et al., 2002; Hirashima et al., 2009)。HMChl *a* から Chl *a* への変換能の欠損した *hcar* 変異体では、HMChl *a* が蓄積する (Meguro et al., 2011)。*hcar* 変異体では HMChl *a* のほかに、Pheide *a* が蓄積し、その結果細胞死が引き起こされる。しかしながら、*hcar* 変異体において Pheide *a* が蓄積するメカニズムについては、不明である。ただ、*hcar* 変異体ではタンパク質レベルで PAO が蓄積していたことと *nyc1/nol/hcar* 三重変異体では HMChl *a* が蓄積しないことから、HMChl *a* とその派生物が、PAO 活性を阻害し、その結果 Pheide *a* が蓄積するのではないかと考えられる (Meguro et al., 2011)。HMChl *a* の蓄積と細胞死を防ぐために、CBR と HCAR は、直ちに HMChl *a* を Chl *a* へ変換するため協調しなければならない。NOL と HCAR が等量 mol 存在した場合にはフリーの Chl *b* と LHClI に結合した Chl *b* ともに、中間体である HMChl *a* がほとんど蓄積することなく、Chl *a* に変換されたことから、Chl *b* から Chl *a* へ効率的に変換されたといえる。対照的に、Chlide *b* を基質にした場合は、中間体である HMChlide *a* が多量に蓄積し、Chlide *a* に変換されたことから、HCAR により HMChlide *a* は非効率的に Chlide *a* に変換されたといえる。HMChlide *a* が蓄積する理由は、2 つ考えられる。1 つ目は、NOL と HCAR 間での基質に対して活性の違いである。NOL では、Chl *b* を基質にした場合よりも、Chlide *b* を基質にした場合の方が、速やかに変換された。一方、HCAR では、HMChl *a* と HMChlide *a* を基質にした場合ともに、ほぼ同じスピードで変換された。したがって、Chlide *b* を基質にした場合、HCAR は、NOL 活性と協調されず、中間体である HMChlide *a* が蓄積したのではないかと考えられる。対照的に、Chl *b* を基質にした場合は、HMChl *a* に対する HCAR 活性は、Chl *b* に対する NOL 活性よりも高いため、中間体である HMChl *a* が蓄積しないのではないかと考えられた。もう一つは、フィトール鎖の有無によって、NOL と HCAR 間で反応産物を受け渡しができるかどうかである。例えば、NOL と HCAR 間で直接的な相互作用することで、NOL が効率的に HMChl *a* を HCAR へ受け渡せるが、HMChlide *a* のときは、HCAR に効率的に受け渡せないということである。どちらの場

合においても、葉緑体内では Chl *b* は、Chlide *b* よりも中間体を蓄積しないという点で優れた基質である。この考えは、葉緑体内には chlorophyllase が存在しないために、Chl *b* から Chlide *b* が生成されないため (Schenk et al., 2007)、理にかなっている。

2. LHCII に結合した Chl *b* の適切な分解

Chl-タンパク質複合体の分解メカニズムには、2 つの仮説がある。1 つ目の仮説では、Chl 結合タンパク質であるアポタンパク質が最初にプロテアーゼにより分解され、遊離した Chl が Chl 分解経路によって分解される。2 つ目の仮説では、Chl 分解酵素が最初に、Chl-タンパク質に包埋された Chl を分解し、それからアポタンパク質が分解される。LHCII 量は、プロテアーゼにより調節されているという報告があり、LHCII の分解に関与する FtSH をはじめとして複数のプロテアーゼが提案されている (Yang et al., 1998; Lensch et al., 2001; Zelisko et al., 2005)。NOL が LHCII に結合した Chl *b* を還元できることと、CBR 活性が欠損している *nyc1/nol* 二重変異体では LHCII が分解されないことから (Horie et al., 2009)、LHC タンパク質は、2 つ目の仮説のように分解されていると考えられている。また、本研究行った精製してきた LHCII と NOL/HCAR の組み換えタンパク質を用いた *in vitro* の実験で、LHCII に結合した Chl *b* は、中間体である HMChl *a* を蓄積することなく Chl *a* に変換されたことから、2 つ目の仮説が支持される。

WT では、ほぼすべての Chl *b* は、LHCII に存在しており (Tanaka et al., 1987; Satoh et al., 2001)、Chl 分解が活発に引き起こされる暗処理時において HMChl *a* とその派生物は蓄積しない (Meguro et al., 2011)。この結果から、LHC に結合した Chl *b* は Chl *a* への効率的に変換されるといえる。PhCAO 植物では、多量の Chl *b* が、LHCs だけでなくコアアンテナ複合体にも存在する。PhCAO 植物を暗処理したところ、Chl *b* は CBR/HCAR による通常の分解経路を経ずに、Pheide *b* と HMPheide *a* が蓄積した。理論上、PhCAO 植物において Chl *b* から HMPheide *a* が生成する経路は、次のように 2 つ考えられる ; (1) Chl *b* → HMChl *a* → HMPhein *a* → HMPheide *a*、と (2) Chl *b* → Phein *b* → HMPhein *a* (あるいは Pheide *b*) → HMPheide *a*。WT でみられたように HCAR は CBR と協調し、HMChl *a* から Chl *a* に効率的に変換されるため、(1) の経路は、可能性としては低い。Pheide *b* の蓄積したことから、(1) の経路では矛盾する。(2) の経路では、Chl *b* から Mg イオンの脱離が最初のステップであり、このとき

に Phein *b* を生成する。それから、Phein *b* は、CBR によりフォルミル基が還元されて HMPheide *a*、あるいは PPH によりフィトール基が加水分解され Pheide *b* に変換される。HMPhein *a* は、HCAR の基質特異性の結果から、Phein *a* に変換されないが、PPH は幅広い基質特異性をもつため、HMPheide *a* へ変換される。このようにして、PhCAO 植物では、Pheide *b* と HMPheide *a* が蓄積すると考えられる。興味深いことに、PhCAO 植物では、暗処理時に Pheide *a* も蓄積することから、PAO 活性が下方調整されていると示唆される。Pheide *a* の大部分は、光化学系に結合した Chl *a* と Chl *b* から CBR/HCAR により変換された Chl *a* から生成した可能性がある。Pheide *b* が PAO 活性を阻害することから (Hortensteiner et al., 1995)、構造的に HMPheide *a* も PAO 活性を阻害するのではないかと推定される。Pheide *a* の蓄積することで細胞死を引き起こされることから、Pheide *b* や HMPheide *a* を生成しないために、Chl *b* から先に Mg イオンが脱離することは避けなければならない。

なぜ LHCII に結合した Chl *b* は、MDC ではなく CBR により優先的に触媒されるのだろうか。上述したように、*nyc1/nol* 二重変異体では老化時に Chl *b* と LHCII は分解されないが、一方ではほかの光化学系複合体は完全に分解される (Horie et al., 2009)。イネの *nyc1* 変異体とシロイヌナズナの *nyc1/nol* 二重変異体では Phein *b* は蓄積しないことから (Kusaba et al., 2007)、LHCII に結合した Chl *b* の場合は、MDC により先に Mg が脱離できず、CBR と HCAR のみが Chl *b* から Chl *a* へ変換することが可能ではないかと考えられる。酸条件下では、Chl *b* の脱 Mg 化速度は、Chl *a* と比較して約 26 倍遅いという報告があり (Hirai et al., 2009)、この性質から Chl *b* から Mg の脱離が起こりにくい (Hirai et al., 2011)。まとめると、Chl *b* の脱 Mg 化が起こりにくい理由が、2 つ挙げられる。1 つは、Chl *b* は CBR により触媒されるまでは、LHCII に結合しており、このとき MDC は Chl *b* から Mg を脱離することができないためである。もう 1 つは、Chl *b* のフォルミル基の影響で脱 Mg 化が起こりにくいためである。

なぜコアアンテナ複合体に結合した Chl *b* では、MDC により Mg イオンが脱離し、Phein *b* が生成されるのか。in vitro の実験では、PSI に結合した Chl *b* のすべては、NOL により触媒されず、一部の Chl *b* は PSI 複合体に残存していた。この結果から、PSI に結合した Chl *b* の一部は、プロテアーゼ、あるいは他のメカニズムによりアポタンパク質から遊離して、Chl 分解経路を経ると考えられる。この場合、MDC と CBR により、フリーの Chl *b* は競合的に触媒され、その結果として一部の Chl *b* は MDC に

より Phe α b へと変換される。

仮に LHCII のタンパク質分解が先行すると、Chl b が遊離して、フリーの Chl b から Phe α b へ変換される可能性があるために、Chl b 分解は、LHCII 分解に先行しなければならない。よって、LHCII は、プロテアーゼにより最初に分解されるのではなく、最初に CBR により Chl b を還元することで、LHCII 分解を制御しているのではないかと考えられる。

本研究では、NOL/HCAR により毒性のある中間体 HMChl a を蓄積せずに、LHCII に結合した Chl b から Chl a へ変換されるが、一方コアアンテナ複合体に結合した Chl b の場合は、通常の CBR/HCAR 経路により分解されないことを示した。この結果から、Chl b 分解は、LHCs に特化した形で進化してきたと考えられる。陸上植物では、知り限りほぼすべての Chl b は、LHCs に存在していることから、このメカニズムは理にかなっている。対照的に、Chl a 分解の最初のステップは、MDC による Mg イオンの脱離である。現在までに、MDC が、アポタンパク質を分解することで遊離したフリーの Chl a 、あるいはアポタンパク質に結合した Chl a から Mg を脱離するのかは、不明である。仮に、MDC がコアアンテナと LHCs に結合した Chl a から Mg を脱離すると、MDC は Chl a と同様に Chl b からも Mg イオンを脱離できると考えられる。その場合、Chl b が適切に分解されずに、細胞死が引き起こされることになる。コアアンテナに結合した Chl a 分解の場合は、プロテアーゼによりタンパク質複合体のアポタンパク質の分解が先行し、遊離してきた Chl a が MDC により分解されるという仮説として挙げられる。この仮説を証明するため、MDC の同定することが重要である。

本研究では、LHCs とコアアンテナである CP1 では、Chl は別々のメカニズムによって分解調節されている、と提案する。分解調節メカニズムが異なることで、植物にとって光環境の適応時に有利である。陸上植物では、LHCs の合成と分解を調節することで、様々な光環境の適応を行っている (Tanaka and Melis, 1999)。光環境の適応時に、周辺アンテナ量のみを調節するためには、LHCs の分解メカニズムが、コアアンテナのものとは別々に独立していなければならないためである。LHCs の分解過程は部分的に明らかになったが、コアアンテナ複合体の分解過程は、不明である。LHCs とコアアンテナ複合体の分解過程を明らかにすることで、葉の老化時や光環境適応時における光化学系のダイナミックな応答を理解することができることが期待される。

4.3 LHCII 分解過程

これまでの知見をもとに、LHCII 分解過程について考えていきたい。LHCII は、①チラコイド膜の構造的な変化、あるいは LHCII の光化学系 II からの脱離とストロマチラコイドへの移動、②CBR による LHCII に結合した Chl *b* 分解、③プロテアーゼによる LHCII アポタンパク質の分解、という 3 つのステップを経て分解されていくと考えられる。

LHCII が分解されるには、Chl 分解酵素やプロテアーゼなどの分解酵素群が物理的に LHCII にアクセスできるかどうか重要である。光合成において通常 LHCII はチラコイド膜で光化学系 II と結合し、光捕集の役割を担っている。チラコイド膜には、膜小胞が規則正しく多重層を形成するグラナチラコイドとグラナ間を連結する単層のストロマチラコイドによって構成されている (Dekker and Boekema ., 2005)。光化学系 I と II は、チラコイド膜で不均等に分布している。光化学系 II は、グラナチラコイドに、一方光化学系 I は、ストロマチラコイドやグラナチラコイドの重層されていない表面部に多く占める。このように、光化学系 II がグラナチラコイドに分布されているため、通常グラナチラコイドでは光化学系 II 分解時には分解酵素群が物理的にアクセスすることが難しい。光合成の際、光酸化ストレスは必ず伴い、特に光化学系 II の D1 タンパク質はダメージを受ける (Melis., 1999)。このとき、ダメージを受けた D1 を取り替え、分解するために、ダメージを受けた光化学系 II は、グラナチラコイドからストロマチラコイドに移動し、D1 が取り替えられ、分解される (Kato and Sakamoto., 2009)。同様に、LHCII 分解が分解される際には、チラコイド間の移動、あるいはグラナチラコイドの構造的な変化が、必要であると考えられる。

葉の老化時に、LHCII がグラナチラコイドからストロマチラコイドに移動する、あるいはグラナチラコイドの構造的な変化というような知見は、調べた限りでは得られなかった。しかしながら、ステート遷移と呼ばれる現象が、上記の LHCII の移動に類似していると考えられる。植物は、常に変動する光環境の中で、光合成を行わなければならない。ステート遷移とは、LHCII アンテナを光化学系 I と II 間でやりとりすることで、その光環境に応じた光化学系に最適化することである (Minagawa et al., 2011)。具体的には、光化学系 II を過励起すると、光化学系 II から LHCII が脱離し、光化学系 I に LHCII が結合する。その結果、光化学系 II の光アンテナは縮小し、一方光化学系 I の光アンテナは拡大する。ステート遷移の際に、グラナチラコイドに存在する光化

学系 II から脱離した LHCII は、ストロマチラコイドに存在する光化学系 I に移動することになる。ステート遷移の引き金は、*stn7* による LHCII のリン酸化である (Bellafigliore et al., 2005; Bonardi et al., 2005)。LHCII がリン酸化されることで、光化学系 II から LHCII が脱離すると考えられている (Iwai et al., 2009)。LHCII のリン酸化により、LHCII の膜での流動性が増加する (Iwai et al., 2013)。一方、チラコイド膜の構造的な変化は、光化学系 II のコアアンテナのリン酸化によって引き起こされると報告されている (Fristedt et al., 2008)。*stn8* により光化学系 II の D1、D2、CP43 のようなコアアンテナがリン酸化される (Vainonen et al., 2005)。光化学系 II のコアアンテナがリン酸化されることで膜小胞が負に帯電し、グラナチラコイドの膜小胞間隔がゆるみ、その結果チラコイド膜の構造的な変化が引き起こされる (Fristedt et al., 2008; Samol et al., 2012)。興味深いことに、LHCII のリン酸化に関与する *stn7* と光化学系 II のコアアンテナのリン酸化に関与する *stn8* の発現パターンを公開マイクロアレイデータベースで調べたところ、*stn7* は、老化時に発現が上昇し、一方 *stn8* は、老化時に発現量が減少していた。このことは、葉の老化時にチラコイド膜の構造的な変化ではなく、リン酸化を介した LHCII のストロマチラコイド側への移動が引き起こされるのではないということが示唆される。

上述したように、ストロマチラコイドに移動した LHCII は、CBR により Chl *b* 分解がされ、LHCII のアポタンパク質の構造が変化する。そしてプロテアーゼにより分解されるのではないかと考えられる。実際の LHCII 分解メカニズムの詳細を明らかにするために、今後の研究の発展が望まれる。

4.4 Chl 合成と分解の場合

本研究では、シロイヌナズナにおいて Chl 分解酵素群の葉緑体内での局在を明らかにした。NOL と PAO はチラコイド膜に大部分が局在し、エンベロープ膜に一部が局在すること、また HCAR はストロマに局在することが明らかになった。これまでの報告では、イネでは、NYC と NOL はチラコイド膜に局在しており (Sato et al., 2009)、オオムギではエンベロープ膜で PAO 活性が検出されたこと (Matile and Schellenberg, 1996) から、PAO の局在はエンベロープ膜であると考えられてきた。これらの結果は、NOL の局在を除いて、本研究の結果と一致していた。Chl 分解の最初のステップを担う NOL の一部が、エンベロープ膜に局在していたことは、一つの問いを生じさせる。

それは、なぜ Chl が存在しないエンベロップ膜上に Chl 分解酵素群が存在するのか、ということである。(a) Chl を含有する小胞を介した Chl 分解経路と (b) エンベロップ膜上での Chl 合成の場の存在という 2 つの可能性が考えられる。

(a) については、ダイズにおいて葉の老化時にチラコイド膜から遊離した Chl-タンパク質複合体を含有するプラストグロビュールと呼ばれる小胞が形成され、エンベロップ膜を突き破り、細胞質に放出され (Guamet et al., 1999)、液胞内で Chl が分解される。また、タバコでは老化時の葉において、Chl を含有する senescence-associated vacuole と呼ばれる小胞が形成されるという報告もある (Martinez et al., 2008)。プラストグロビュールや senescence-associated vacuole がエンベロップ膜に突き破るときに、同時にエンベロップ膜上の Chl 分解酵素群を取り組み、そして取り込まれた Chl 分解酵素群によって、Chl が分解されるのではないかと考えられる。しかしながら、senescence-associated vacuole には、RuBisCO や glutamine synthetase 含まれているが、Chl-タンパク質複合体のアポプロテインである D1 や LHCII などが含まれていない (Martinez et al., 2008)。このことは、senescence-associated vacuole に含有した Chl は分画時に混入したのではないかと考えられる。senescence-associated vacuole は、シロイヌナズナで報告されているオートファジーに介して RuBisCO が分解される RuBisCO Body と呼ばれる小胞 (Ishida et al., 2009) ではないかと思われる。そのため、仮に小胞を介した Chl 分解経路が存在したとしても、葉緑体内での Chl 分解経路とは別の経路で分解されるのではないかと考えられる。

(b) については、Chl 合成酵素群の局在からエンベロップ膜上で Chl 合成が行われているのではないかと考えられる。そして、合成された余分な Chl 合成中間体がエンベロップ膜で分解しているのではないかと考えられる。Chl 合成において porphyrin に Mg イオンが挿入以降に関与する酵素のうち、プロテオーム解析の結果、chlorophyll synthase を除いて、Mg-protoporphyrin IX methyltransferase、Mg-protoporphyrin IX cyclase、8-divinyl protochlorophyllide reductase と NADPH : protochlorophyllide oxidoreductase は、チラコイド膜とエンベロップ膜の両方に局在している (Joyard et al., 2009)。また、量的制御ドメインを取り除いた chlorophyllide a oxygenase (CAO) も同様に、チラコイド膜とエンベロップ膜の両方に局在している (Yamasato et al., 2005)。しかしながら、通常植物では、CAO の量的制御を受けているため (Yamasato et al., 2005)、量的制御ドメインを取り除いた CAO の局在は変更されている可能性が

ある。このように、Chl 合成系酵素群がエンベロープに局在していることから、エンベロープにおいて Chl 合成が行われていると考えられる。なぜ、チラコイド膜とエンベロープの 2 カ所で Chl 合成が行われる必要があるのだろうか。Chl-タンパク質複合体のアポタンパク質の種類によって、下記のような理由で Chl の供給の場がチラコイド膜とエンベロープで異なっているのではないかと推測される。Chl-タンパク質複合体のアポタンパク質は、周辺アンテナ LHC とコアアンテナ CP1、CP43 と CP47 がある (Barber et al., 2000)。周辺アンテナには、Chl *a* と Chl *b* が結合しており、一方コアアンテナには、Chl *a* のみが結合している。LHC は核コードであり (Cashmore et al., 1984)、CP1、CP43 と CP47 は葉緑体コードである (Shinozaki et al., 1986)。LHC は Tic-Toc 輸送複合体により葉緑体に輸送される。このときに、エンベロープ膜で LHC のポリペプチドに Chl *a* と Chl *b* が組み込まれ、チラコイド膜に挿入されると考えられる。一方、葉緑体コードである CP1、CP43、と CP47 は、葉緑体内のポリペプチドが合成されるため、チラコイド膜で Chl *a* が組み込まれると考えられる。このように、エンベロープ膜とチラコイド膜の 2 カ所で Chl 合成経路が存在することで、Chl-タンパク質複合体のアポタンパク質に応じてそれぞれの Chl の分配させることが可能であるのではないかと考えられる。また、本研究よりコアアンテナ CP1 に Chl *b* が組み込まれた場合に、植物は Chl *b* をうまく代謝できないことがわかっており、コアアンテナに Chl *b* を組み込まないような上記のような仕組みがあるのではないかと考えられる。老化時にはチラコイド膜では Chl 分解酵素群により、Chl-タンパク質複合体に結合した Chl が分解されることが考えられる。一方、緑化時にはエンベロープ膜では Chl 分解酵素群により Chl 合成時にできた余分な Chl が分解されることが考えられる。このように、葉緑体の中では、2 つの合成と分解の場をもつことで、適切な Chl 代謝を可能にしていると考えられる。

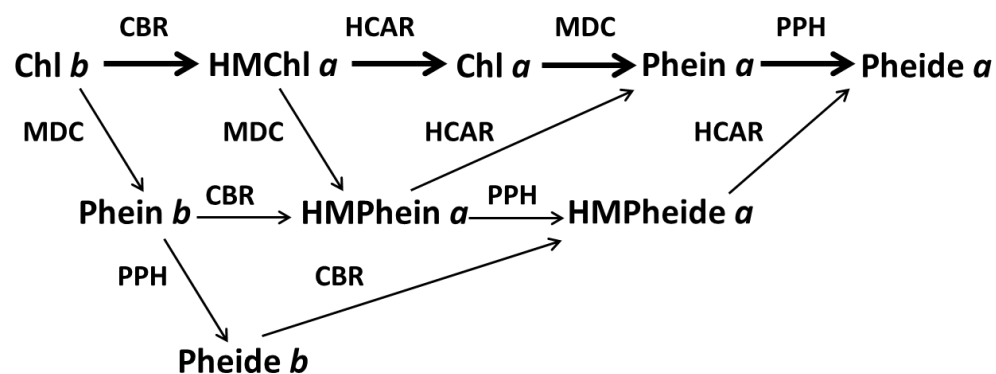


図 1 Chl *b* 分解経路

CBR と PPH の基質特異性に基づき、複数の Chl *b* 分解経路が予想される。太線は、本研究で実証された Chl *b* 分解経路を示している。

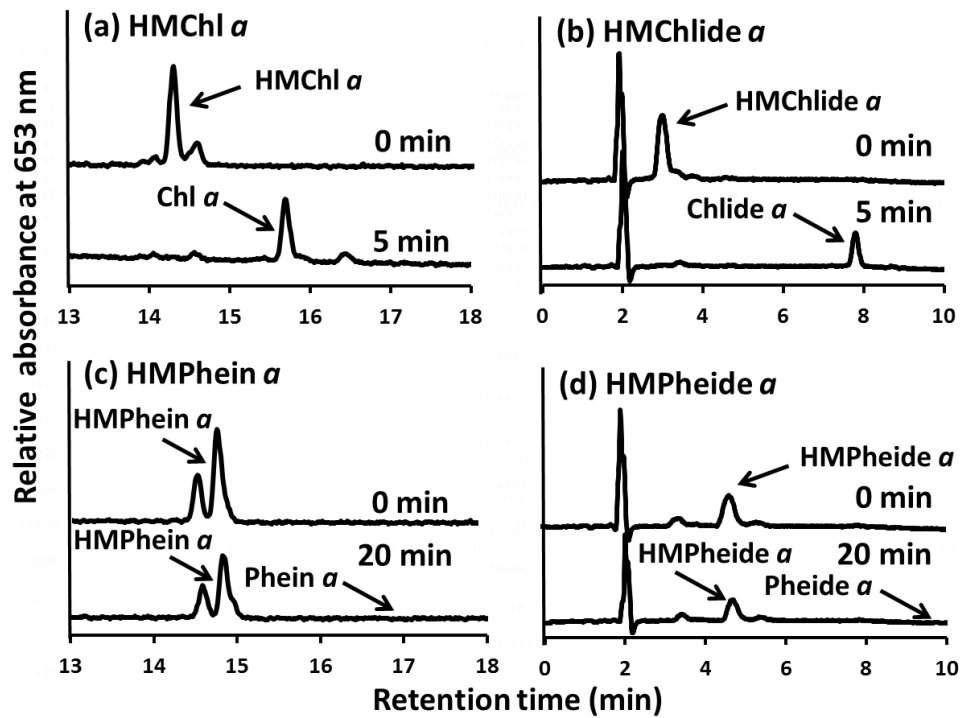


図2 HCARの基質特異性

NADPH、FNRそしてFdの存在下で、HMChl *a*とHMChl *a*派生物（HMChlide *a*、HMPhein *a*、HMPheide *a*）をHCARの組み換えタンパク質と5分間あるいは20分間反応させた。反応後、色素組成をHPLCにより分析した。溶出した色素を吸光度653nmでモニタリングした。(a) HMChl *a*、(b) HMChlide *a*、(c) HMPhein *a*、そして(d) HMPheide *a*を基質とした場合を示している。

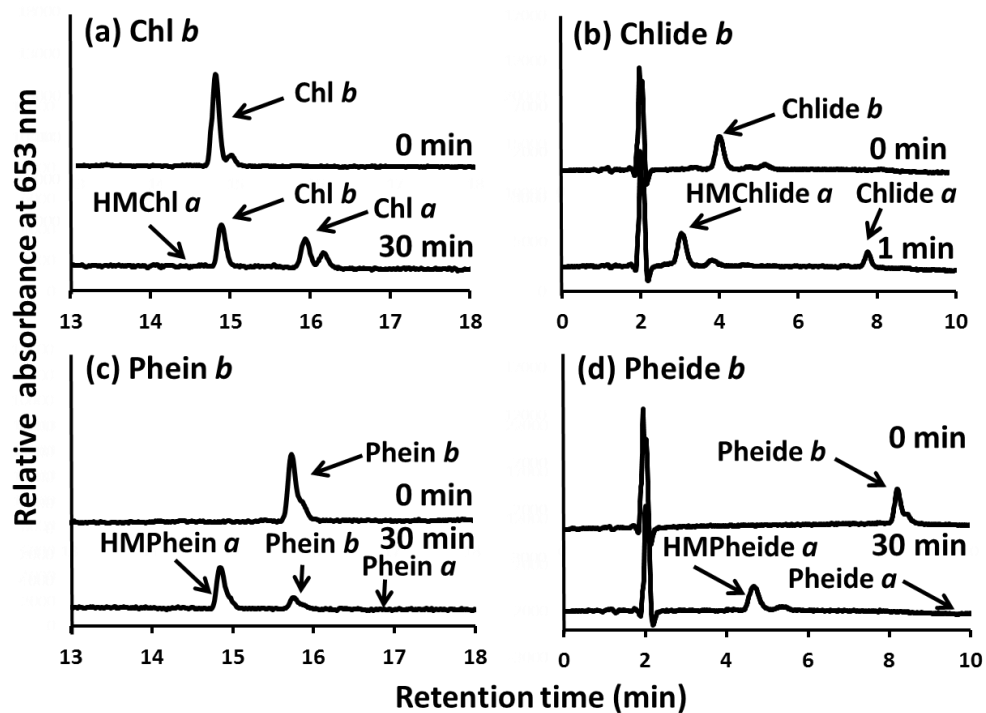


図3 NOL と HCAR の組み合わせによる、Chl *b* と Chl *b* 派生物の還元
NADPH、FNR そして Fd の存在下で、Chl *b* と Chl *b* 派生物 (Chlide *b*、Phein *b*、Pheide *b*) を NOL と HCAR の組み換えタンパク質の混合液で 1 分間あるいは 30 分間反応させた。反応後、色素組成を HPLC により分析した。溶出した色素を吸光度 653nm でモニタリングした。(a) Chl *b*、(b) Chlide *b*、(c) Phein *b*、そして (d) Pheide *b* を基質とした場合を示している。

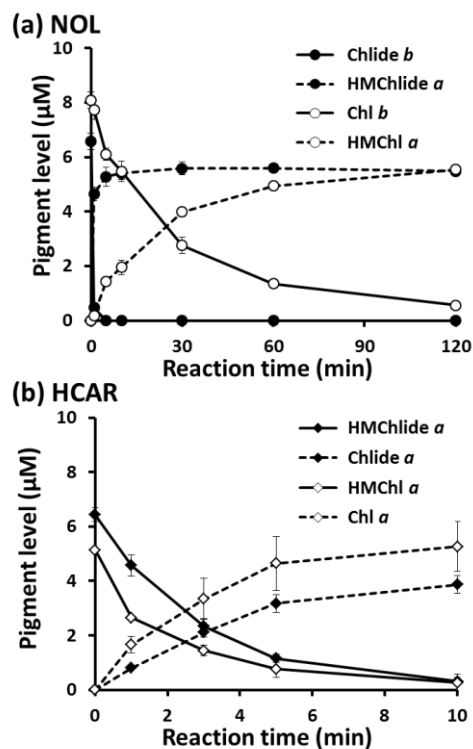


図4 NOL と HCAR における基質特異性の比較

(a) Chl *b* と Chlide *b* の還元における NOL 活性。Chl *b* と Chlide *b* の混合液を、NOL の組み換えタンパク質と 1、5、10、30、60、120 分間反応させた。反応後、色素組成を HPLC により分析した。エラーバーは、標準偏差を示している (n=3)。

(b) HMChl *a* と HMChlide *a* の還元における HCAR 活性。HMChl *a* と HMChlide *a* の混合液を、HCAR の組み換えタンパク質と 1、3、5、10 分間反応させた。反応後、色素組成を HPLC により分析した。エラーバーは、標準偏差を示している (n=3)。

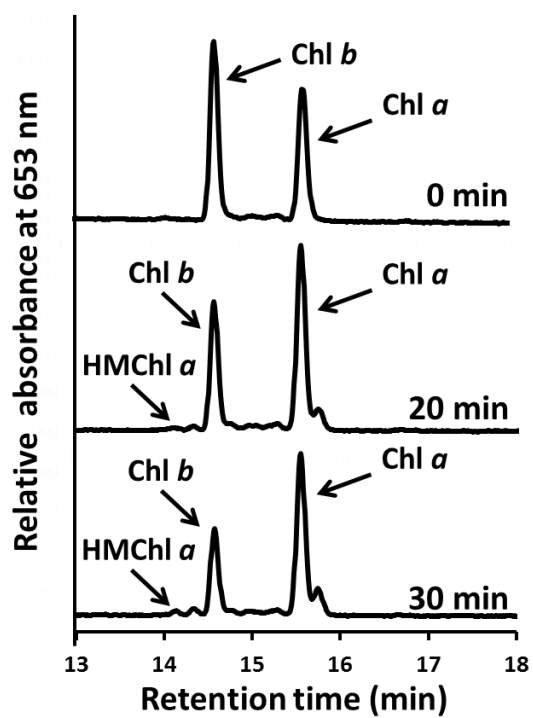


図5 NOL と HCAR の組み合わせによる、LHCII に結合した Chl *b* の還元

NADPH、FNR そして Fd の存在下で、LHCII 三量体 Chl *b* を NOL と HCAR の組み換えタンパク質の混合液で 20、30 分間反応させた。反応後、色素組成を HPLC により分析した。溶出した色素を吸光度 653nm でモニタリングした。

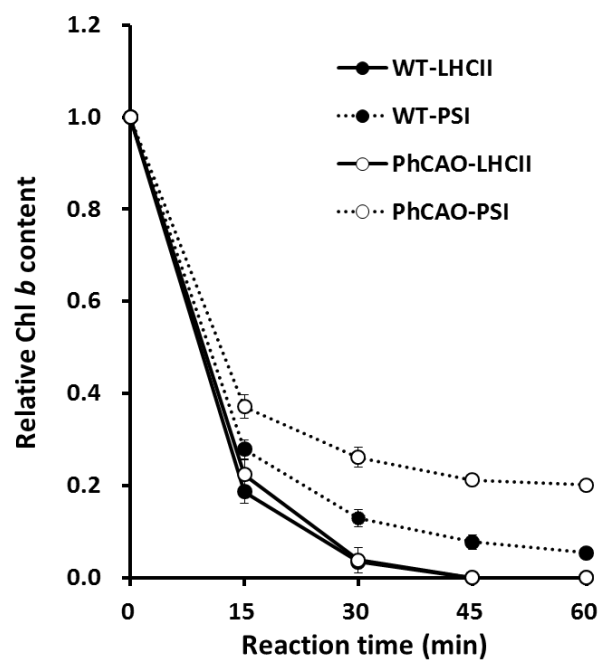


図6 NOLによるChl-タンパク質複合体に結合したChl *b*の還元

精製してきたWTのLHCII三量体、WTのPSI、PhCAOのLHCII三量体、そしてPhCAOのPSIを基質として、NOLの組み換えタンパク質と15、30、45、60分間反応させた。反応後、色素組成をHPLCにより分析した。溶出した色素を吸光度653nmでモニタリングした。エラーバーは、標準偏差を示している (n=4)

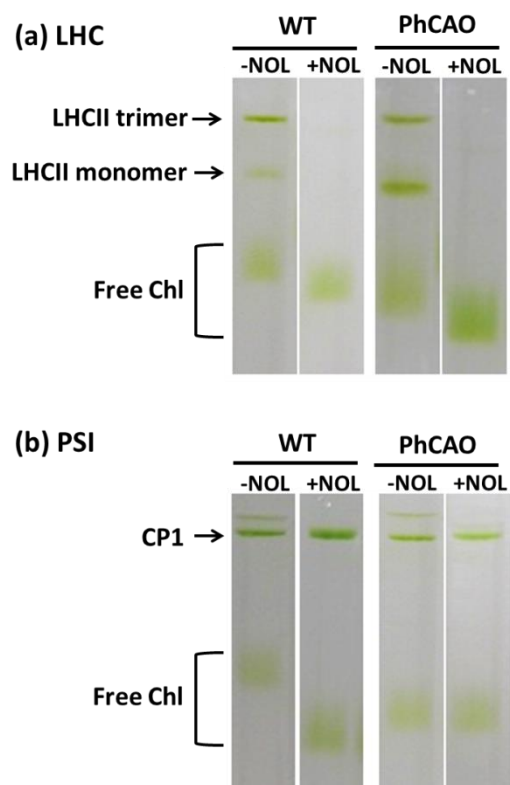


図 7 Chl-タンパク質複合体の Green gel 分析

精製してきた WT の LHCII 三量体、WT の PSI、PhCAO の LHCII 三量体、そして PhCAO の PSI を基質として、NOL の組み換えタンパク質と 3 時間反応させた。反応後、LHCII と PSI を、Green native gel 電気泳動で分離した。CP1 は、P700-Chl *a*-タンパク質複合体を示している。

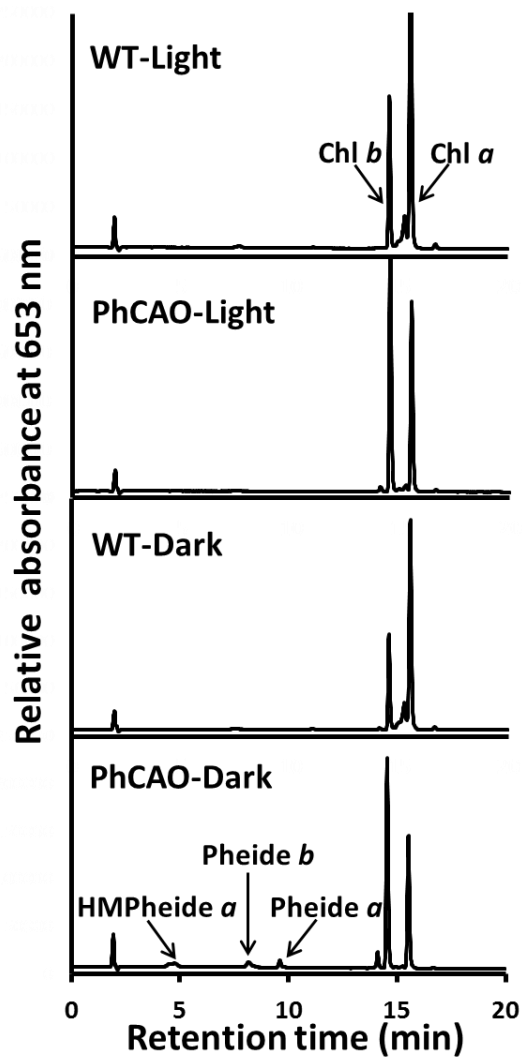


図 8 暗処理時における Chl の HPLC プロファイル

WT と PhCAO を連続光下で 4-5 週間生育させ、その後、暗処理の有無で 5 日間行った。Chl を抽出し、HPLC により分析した。溶出した色素を吸光度 653nm でモニタリングした。

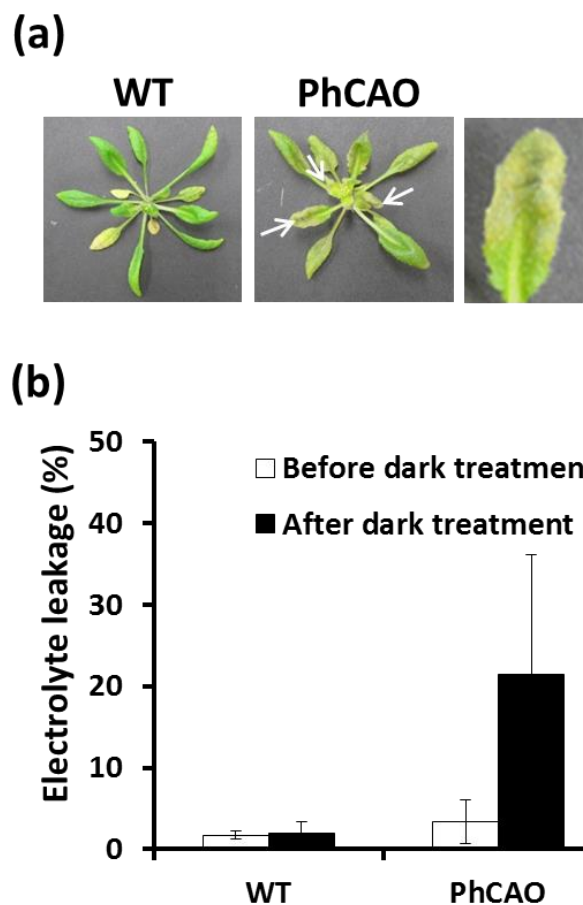


図 9 暗処理による PhCAO 植物における細胞死の表現型

(a) 暗処理後の WT と PhCAO 植物の比較。WT と PhCAO 植物を、5 日間暗処理した。白い矢印は、萎れた部分を示している。PhCAO 植物の萎れた部分を拡大した。

(b) WT と PhCAO 植物のイオン漏出量。暗処理前と後に、植物の葉を刈り取り、イオン漏出量を測定した。エラーバーは、標準偏差を示している (n=14-28)。

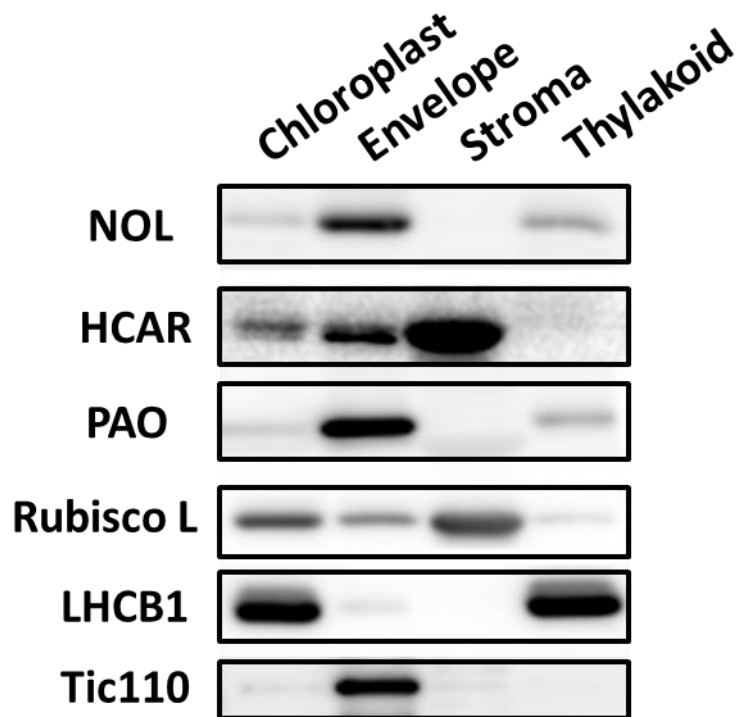


図 10 Chl 分解酵素群の葉緑体内での局在

約 8-10 週齢の WT の葉から葉緑体を単離し、ショ糖密度勾配遠心でエンベロップ膜、ストロマ、チラコイド膜を分画した。各分画を SDS-PAGE で分離し、イムノブロット分析した。NOL 抗体、HCAR 抗体、PAO 抗体、そして Tic110 抗体においては各レーンにつき 10 μ g で分析した。また、Rubisco 抗体と LHCB1 抗体においてはタンパク質 2 μ g で分析した。Rubisco 抗体をストロمامーカー、LHCB1 抗体をチラコイド膜マーカー、Tic110 抗体をエンベロップ膜マーカーとして用いた。

表 1 NOL による反応後の Chl-タンパク質複合体の Chl *a*/Chl *b* 比の変化

Chl-protein complex	Reaction time (min)				
	0	15	30	45	60
WT LHCII	1.25±	6.92±	39.17±		
	0.12	0.83	10.61	*	*
WT PSI	9.35±	34.56±	75.87±	128.61±	173.74±
	0.24	2.74	10.49	21.35	2.86
PhCAO LHCII	0.91±		53.11±		
	0.03	3.89±0.53	44.98	*	*
PhCAO PSI	1.90±	5.17±	7.50±	9.44±	9.44±
	0.01	0.36	0.68	0.03	0.03

図 6 における反応液の Chl 含量を、HPLC により分析した。エラーバーは、標準偏差を示す (n=4)。

表 2 NOL 反応後に Green natative gel 電気移動により分離した Chl-タンパク質複合体の Chl *a*/Chl *b* 比の変化

Chl-protein complex	Compositon	WT		PhCA0	
		-NOL	+NOL	-NOL	+NOL
PSI	CP1	11.8	102.9	2.51	4.49
	Free Chl	5.40	*	1.23	*
LHCII	Trimer	1.37		0.79	
	Monomer	1.33		0.79	
	Free Chl	1.64	*	0.64	*

図 7 における緑色のバンドから Chl を抽出し、HPLC により分析した。*は、Chl *b* が検出されなかったことを示している。

第 2 章

1. 序論

Chl は、光合成において中心的な役割を果たしており (Nelson and Yocum, 2006)、その合成は植物の発育と密接な関係を持っている。発芽後は、植物の成長とともに Chl は活発に合成される (Tanaka and Tsuji., 1985)。合成された Chl は、タンパク質に取り込まれ、光合成装置が形成される (Shimada et al., 1990)。光合成装置には、光化学系 I と光化学系 II がある (Nelson and Yocum, 2006)。光合成の際に、光化学系 II と光化学系 I が直列することで電子伝達系を駆動し、光エネルギーを ATP や NADPH などの化学エネルギーに変換することができる。

1.1 光化学系 II の役割

光化学系 II は、シアノバクテリアや葉緑体の中のチラコイド膜上に存在する Chl-タンパク質複合体である。LHCs に結合した Chl が光エネルギーを吸収し、反応中心に伝達される。反応中心の Chl が電荷分離することで、電子伝達系を駆動する。同時に光化学系 II では水を分解し、酸素と電子を産出し、この電子は PSII の反応中心の Chl へ伝達される。

光化学系 II は、一部の違いを除いて、シアノバクテリアから高等植物にかけて広く保存されている。光化学系 II は、反応中心にエネルギーを伝達するコアアンテナ、電荷分離が行われる反応中心、そして酸素発生部位である酸素発生系から成る (Shi and Schroder, 2004)。光化学系 II は、分子量は 350KDa であり、少なくとも 20 タンパク質サブユニット、Chl 35 分子、pheophytin *a* 2 分子、 β -carotene 11 分子、plastoquinone 2 分子、heme 1 分子、 Mn_4CaO_5 クラスターで構成されている (Nschelsen and Rengstl., 2013)。2011 年に、シアノバクテリアにおける光化学系 II の全体構造の X 線構造解析が成功し、分子立体構造が明らかになった (Umena et al., 2011)。

光化学系 II は、多サブユニットのタンパク質で構成されている。反応中心は、D1、D2、cytochrome *b*559、そして PsbI で構成されている。反応中心には、光捕集タンパク質である CP43 と CP47 が結合している。さらに、光化学系 II は、光捕集タンパク質 LHCs の LHCII と結合することで、光化学系 II-LHCII 複合体を形成する。

1.2 光化学系 II の構築

光化学系 II に関する機能や構造については、活発に多くの研究が行われ、理解が進んでいる。一方、光化学系 II の構築に関しては、理解が遅れている。光化学系 II の構築に関する研究は、近年シアノバクテリアで、光化学系 II 構築の研究が先行し、光化学系 II 構築の順序については決定された (Komenda et al., 2012)。光化学系 II 構築は、最初に D1、D2、cytochrome b559、PsbI から反応中心が構成される。反応中心に CP47 が結合し、最後に CP43 が結合することで光化学系 II が構築される。この際には、複数の因子の補助を受けることで光化学系 II 構築されていく。現在までに、光化学系 II 構築に関与する複数の因子が同定されている (Nschelsen and Rengstl., 2013)。このように、光化学系 II 構築の順序については、研究が展開され、理解が進んできた。しかしながら、光化学系 II 構築の際に、Chl の光化学系 II へ組み込みに関する研究は、全く行われていない。

1.3 Chl 合成を介した光化学系の構築

Chl 合成経路については、1950 年代から現在まで活発に研究が行われ、Chl 合成経路は確立され、Chl 合成酵素はすべて同定された (Tanaka R and Tanaka, 2007)。しかしながら、Chl 合成と協調した光化学系の構築に関しては、全く理解されていない。Chl が、光化学系構築のどの段階で組み込まれるのかについては不明である。また、Chl 合成は、光化学系の Chl-タンパク質複合体を構成するアポタンパク質合成とどのように協調しているのか、言い換えれば、アポタンパク質の新生ペプチドに合成された Chl が結合するのか、あるいは新生ペプチドの上で Chl 中間体を取り込まれて、Chl 合成されるか、についても不明である。さらに、そのような Chl の取り組みを制御する因子についても未同定である。

Chl が光化学系に組み込まれる過程を研究するうえで、高等植物では難しいと考えられる。Chl の光化学系への組み込みに異常が生じた変異体においては、光化学系が構築されず、光合成ができずに致死になる可能性がある。また、Chl や Chl 合成中間体は、光毒性をもち、活性酸素を発生する性質を有する (Meskauskiene et al., 2001)。高等植物では光依存的に Chl 合成されるため、この変異体では遊離 Chl と Chl 合成中間体が蓄積することで、酸化的に細胞死や枯死が引き起こされ则认为られている。このように、高等植物を利用した場合、Chl の光化学系への組み込みの研究は難しいと考えられる。

問題の打開策として、緑藻クラミドモナスの利用が挙げられる。クラミドモナスは、単細胞の光合成真核生物である。クラミドモナスは光独立栄養と従属栄養の2つの側面をもつため、仮に光化学系に異常が生じたとしても、生育することができる (Dent et al., 2005)。また、クラミドモナスは裸子植物を除いた高等植物とは異なり光依存的、あるいは光独立的に Chl を合成することができるため (Cahoon and Timko, 2000)、Chl と Chl 中間体の光毒性の問題も解決される。2007年にゲノム解読され (Merchant et al., 2007)、核や葉緑体ゲノム形質転換体の作出法の確立されている (Boynton et al., 1988; Kindle., 1990)。さらに、半数体だから変異体のスクリーニングが楽である。

そこで、本研究では Chl が光化学系に組み込まれてから、光合成色素として機能するまでの過程の解明することを最終目的とした。Chl-タンパク質複合体のなかで光化学系 II に着目して、光化学系 II への Chl の取り組みの制御因子を単離するために、光化学系 II 構築に必要な新規の遺伝子の同定に取り組んだ。クラミドモナス変異体プールを作製し、光化学系 II 異常変異体を単離した。相補テストを行うことで、その原因遺伝子を決定し、光化学系 II の構築に必要な遺伝子を同定することに成功した。

2. 材料と方法

2.1 株とプラスミド

Chlamydomonas Genetic Center から譲り受けた野生型(WT)として、クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)株 *arg7/cw15* を供試した。この株は、arginine 要求性かつ、細胞壁欠損の性質を示す。変異体プールの作製には、*Chlamydomonas* Genetic Center から譲り受けた pSI103 プラスミド (Sizova et al., 2001) を用いた。また、相補テストには pChlamy プラスミド (invitrogen) を用いた。

2.2 培養条件

クラモドモナスは、Tris-Acetate-Phosphate (TAP) 培地で培養した (Harris., 1989)。窒素源として NH_4Cl を含み、炭素源として酢酸、そして常に $200\text{ }\mu\text{M}$ arginine を加えた。光照射下、 $23\text{ }^\circ\text{C}$ で培養した。

2.3 形質転換体の作製

薬剤耐性遺伝子をタグとして、ランダムに核ゲノムに挿入したクラミドモナス変異体プールを作製した。形質転換は、Kindle., 1990 の glass bead 方法によって行った。1 L フラスコでクラミドモナスを対数増殖期まで培養し、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 、 700 g 、10 分間遠心して集藻した。1.5 ml の TAP 培地 ($200\text{ }\mu\text{M}$ arginine を含む) にペレットを懸濁した。このクラミドモナス培養液 $500\text{ }\mu\text{l}$ を 15 ml チューブに移し、さらに 20 %polyethylene glycol (分子量 6000) を $167\text{ }\mu\text{l}$ 、500 μg のガラスビーズ (直径 200-300 μm 、エムエス機器)、制限酵素 SacI、あるいは KpnI により線状下した pSI103 を $2\text{ }\mu\text{g}$ 加えて、15 秒間激しく攪拌した。その後、TAP 培地 ($200\text{ }\mu\text{M}$ arginine を含む) で 2 回洗浄することにより polyethylene glycol を洗い流した。15ml の TAP 培地 ($200\text{ }\mu\text{M}$ arginine を含む) で 弱光照射下 ($5\text{-}10\mu\text{E}$)、 23°C で 24 時間静置し、薬剤耐性遺伝子 AphVIII タンパクの発現をさせた。その後、終濃度 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ になるよう paromomycin を添加した TAP 寒天培地 ($200\text{ }\mu\text{M}$ arginine を含む) にまき、弱光下、14-18 日間程度、静置培養しコロニーを形成させて形質転換体を生育させた。

2.4 光化学系 II 異常変異体の単離

弱光照射下、 $23\text{ }^\circ\text{C}$ で培養すると、14-18 日でコロニーが十分な大きさに成長する。

一枚のプレートに、約 20-100 コロニーが生じた。FluorCam (PSI) を用いることで Chl 蛍光をイメージ化して、光化学系 II 活性の指標である Fv/Fm 値の低いコロニーを選抜した。この際、Fv/Fm 値 0-0.5 で、光化学系 II に異常を示していると考えた。光化学系 II 異常変異体を、paromomycin を含む TAP 培地 (200 μ M arginine を含む) に移し、成長させた。次に、PAM クロロフィル蛍光測定装置 (WALS) を用いて、再度単離した光化学系 II 異常変異体の Fv/Fm 値を測定することで、光化学系 II 異常変異体を選抜した。なお、FluorCam を用いたスクリーニングと同様に、Fv/Fm 値 0-0.5 で選抜した。

2.4 タグの挿入部位の決定

2.4.1 ゲノム抽出

Pramomycin を含む TAP 培地 (200 μ M arginine を含む) で育成させた光化学系 II 異常変異体のコロニーをとり、DNA extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5、1 M KCl、10 mM EDTA) 50 μ l の中で懸濁した。95°C、10 分間インキュベートし、その後 vortex により激しく攪拌した。4°C、12,000g、5 分間遠心して、上清を新しいチューブに移しかえた。超純水で 5 倍希釈し、これをゲノム抽出液とした。

2.4.2 Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR)

TAIL-PCR により、核ゲノムに挿入された薬剤耐性遺伝子のゲノム上の位置を決定した。反応条件は、Matsuo et al., 2008 の方法に従った。PCR 酵素には、KOD FX Neo (東洋紡) を用いた。2nd PCR と 3rd PCR の際には、1st PCR 産物と 2nd PCR 産物をそれぞれ 250 倍に希釈したものを鋳型として用いた。

3rd PCR 後に、2.5 %アガロース電気泳動を行い、増幅されたバンドを切りだし、Gel/PCR extraction kit (日本ジェネテックス) を用いて精製した。DNA 濃度を測定するために、精製した PCR 産物を再度アガロース電気泳動を行った。この際に、バンドが複数本見えた場合は、TA-cloning を行った。塩基配列の決定は、TAKAR に委託した。また一部においては、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行い、ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) により塩基配列を決定した。公開データベースである Phytozome で BLAST 検索をした。なお、TAIL-PCR とシーケンスに用いたプライマーは、表 II に

示した。

2.5 相補テスト

2.5.1 コンストラクトの作製

光化学系 II 異常の原因遺伝子と推定される *Cre02.g105650*、*Cre02.g109950*、*Cre10.g440450* の full length cDNA を PT-PCR により増幅し、pChlamy プラスミドに in-fusion (Takara) に導入した。増幅プライマーは、表Ⅲに示した。塩基配列を確認後、ScaI、あるいは PvuI によりプラスミドを線状化した。

2.5.2 相補テスト

光化学系 II 異常の原因遺伝子と決定するために、相補テストを行った。光化学系 II 異常変異体の形質転換は、上述した形質転換の方法に従った。ただし、形質転換体の選抜の際には、終濃度 10 µg/ml になるよう hygromycin を添加した TAP 寒天培地 (200 µM arginine を含む) にまき、弱光下、14-18 日間程度、静置培養しコロニーを形成させて形質転換体を生育させた。その後、FluorCam で Fv/Fm 値が回復しているものを選抜し、hygromycin と paromomycin を含む TAP 培地 (200 µM arginine を含む) に移し変えた。その後、ゲノム PCR で形質転換の成功の可否を確認するとともに、PAM クロロフィル蛍光測定装置で Fv/Fm 値を測定した。PCR 酵素には、KOD FX Neo (東洋紡) を用いた。ゲノム PCR に用いたプライマーは、表Ⅳに示した。

表 II TAIL-PCR とシーケンスに用いたプライマーリスト

primer name	配列 (5'→3')
RMD227	NTCGWGWTSNAGC
RMD228	WGNTCWGNCANGCG
SacI-UP1	CTGGTTTGGCTGCGCTCCTTCTG
SacI-UP2	TTTATACCGGATGGGTGCCGCCAG
SacI-UP3	AGCCCGCCAAATCAGTCCTGTAG
SacI-seq-UP4	ACGCACCAATCATGTCAAGCCTCAG
KpnI-UP1	TTTACCGGCTGTTGGACGAGTTCTT
KpnI-UP2	CTTCTGAGGGACCTGATGGTGTGGTG

KpnI-UP3	GCGCTCGTTGATCTGAGCCTTGC
KpnI-seq-UP4	AACGGCGGTGGATGGAAGATACTG

表 III 相補テストのコンストラクト作製に用いたプライマーリスト

primer name	配列 (5'→3')
Cre02.g109950-fw	CACTCAACATCTTA _c CTCACCACCCAAACAGAGAAGGAGG
Cre02.g109950-rv	TCATATGGCGGCCGCATCGCTTTTATGTTACATACCGGGC
Cre02.g105650-fw	TCACTCAACATCTTA _c GTAGTGTGCTTACATTTGCTGATT
Cre02.g105650-rv	TCATATGGCGGCCGCCTGGTGCCAGATGGTAAAAGTGCGCG
Cre10.g440450-fw	CACTCAACATCTTA _c CCAATTGAGAACGACTGACACTACA
Cre10.g440450-rv	TCATATGGCGGCCGCCTACCGTGCACGTGCATTTACACGTT

表 IV ゲノム PCR に用いたプライマーリスト

primer name	配列 (5'→3')
dc-Cre02.g109950-fw	ACCACCCTACAAAGATGTCCAC
dc-Cre02.g109950-rv	GCTAAAACTCACCCCTTGAAACG
dc-Cre02.g110250-fw	ATCCTGAAAGATGCGGAGAGAC
dc-Cre02.g110250-rv	CACCACGTCGTAGGTACACACA
dc-Cre02.g105650-fw	TCCAGAGTATTGTAGCCACACG
dc-Cre02.g105650-rv	CAGCGTCCAGATGAAGTAGATG
dc-Cre02.g105500-fw	GCCGCTGCGCATCCGCCGCATCTC
dc-Cre02.g105500-rv	GTGTTGAAGTGCAGAACCAGCT
dc-Cre10.g440450-fw	GCGGTGAGCTTTCTTCTGTAGT
dc-Cre10.g440450-rv	CATGTTGAACTTGGCCTCAAT
dc-Cre10.g440440-fw	AACCCTGACATTTGGAAGAAGC
dc-Cre10.g440440-rv	GCATCCATACCTAAACCCAAGC
pChlamy-fw	AGCCAAACCAGGATGATGTT
pChlamy-rv	AAGCATCATCGGTGTTGCATG

3. 結果

3.1 光化学系 II 異常変異体の単離

クラミドモナスの *arg7/cw15* 株のゲノムに、薬剤耐性遺伝子 *aphVII* を持つ pSI103 プラスミドをランダムに挿入し、クラミドモナス変異体プールを作製した。

まず、pSI103 プラスミドを 2 種類の制限酵素 *SacI* と *KpnI* でそれぞれ処理し、線状化した。*SacI* 処理により薬剤耐性遺伝子のプロモーター上流域を、*KpnI* 処理により薬剤耐性遺伝子の 3'-UTR 下流域を切断した。*SacI* 処理した場合の方が、*KpnI* 処理した場合よりもクラモドモナスの形質転換効率が高かったため (data not shown)、*SacI* 処理した pSI103 プラスミドで形質転換を行い、クラミドモナス変異体プールを作製した。

クラミドモナスと線状化した pSI103 を、polyethylene glycol を含む溶液中でガラスビーズとともに激しく攪拌することによってクラミドモナスに傷がつき、そこから pSI103 プラスミドが侵入し、クラミドモナスのゲノム上にランダムに挿入される。ガラスビーズによって効率よく pSI103 プラスミドを入れるために、細胞壁欠損のクラモドモナスを用いた。pSI103 が挿入された形質転換体は、paromomycin の薬剤耐性を示すため、paromomycin を含む TAP 培地で成育するものをスクリーニングした。

光化学系 II 異常変異体のスクリーニングには、Chl 蛍光を指標として行った (図 11)。FluorCam で Chl 蛍光をイメージ化して、光化学系 II 活性を示す Fv/Fm 値の低いものを、選抜した。WT では、Fv/Fm 値が 0.6-0.7 を示した。72000 コロニーのクラモドモナス変異体プールの中から、FluorCam によって Fv/Fm 値が 0-0.5 を示す約 200 コロニーを選抜した。選抜したコロニーを、paromomycin を含む TAP 培地に移し変え、成育させた。次に PAM 光合成測定装置によって、再度 Fv/Fm 値が 0-0.5 を示すコロニーを選抜した。最終的に、Fv/Fm 値が 0-0.5 を示す光化学系 II 異常変異体を 132 株単離した (表 3)。

3.2 TAIL-PCR によるゲノム上のタグの挿入位置の決定

単離した光化学系 II 異常変異体におけるゲノム上のタグの挿入位置を、TAIL-PCR によって決定した。TAIL-PCR とは、特殊な温度条件で、ゲノムの中の適当な位置にアニーリングするランダムプライマーと、タンデムに設計した 3 つの特異的プライマーで行う nested-PCR する方法である (Liu et al., 1995)。今回、薬剤耐性遺伝子のプロモーター領域でタンデムに設計した特異的なプライマーを作成し、薬剤耐性遺伝子のプロ

モーターの 5'上流側のクラミドモナスのゲノム配列を、TAIL-PCR により増幅した。光化学系 II 異常変異体の TAIL-PCR を行い、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で行った。増幅された PCR 産物の塩基配列を決定し、公開データベース Phytozome で BLAST 検索を行い、ゲノム上のタグの挿入位置を決定した。その結果、光化学系 II 異常変異体 88 株については、ゲノム上のタグの挿入位置を決定することができた。Glass bead 法で形質転換を行う場合、タグの挿入部位の近接領域でクラミドモナスのゲノムの一部が欠損することが報告されている (Kirst et al., 2012; Nishimura et al., 2012)。既報で報告されている光化学系 II 異常変異の原因遺伝子の位置付近にタグの挿入が確認された。また、タグの挿入位置が近接しているものが複数株あり、タグの近接付近にはこれまでに報告されている光化学系 II 異常に関する遺伝子が確認できなかった株が 21 株あった。その中で、光化学系 II 異常に関する独立した 8 つの遺伝子座があった。これらの株において、光化学系 II 異常に関する新規な遺伝子があると考えられた。

3.3 光化学系 II 異常に関する原因遺伝子の決定

光化学系 II 異常に関する独立した 3 つの遺伝子座について、さらに解析を行った。Glass bead 法により形質転換を行った際に、タグの挿入付近のクラミドモナスのゲノムの一部が欠損されることが知られていることから、光化学系 II 異常変異に関する原因遺伝子は、タグの挿入による遺伝子破壊、あるいはタグの挿入による遺伝子の欠損の 2 つの可能性が考えられた。タグの挿入付近に近接する遺伝子から、TargetP や ChloroP による局在、高等植物の相同性、そして高等植物の公開マイクロアレイデータベースや共発現データベース ATEED-II の参考にして、3 つの遺伝子座について光化学系 II 異常に関する原因遺伝子の候補を、それぞれ *Cre02.g109950*、*Cre02.g105650*、*Cre10.g440450* に絞った。

次に、光化学系 II 異常に関する原因遺伝子を確定するために、相補テストを行った。まず、光化学系 II 異常変異体のそれぞれの株において、原因候補遺伝子 *Cre02.g109950*、*Cre02.g105650*、*Cre10.g440450* が欠損しているかどうか確認するために、ゲノム PCR を行った。光化学系 II 異常変異体のそれぞれの株において、それぞれの原因候補遺伝子が欠損していることが確認できた (図 12-14)。次に、それぞれの原因候補遺伝子の Full length cDNA を含むコンストラクトを作製した。そして、glass bead 法で、光化学系 II 異常変異株においてそれぞれ形質転換を行うことで、相補テストを行った。そ

それぞれの光化学系 II 異常変異体の形質転換体を、FlourCam により Fv/Fm 値を測定したところ、Fv/Fm 値が WT と同様の値を示す株が、複数得られた (表 4-6)。また、ゲノム PCR により形質転換体の作出の成功の可否を調べたところ、目的とする原因候補遺伝子のバンドが確認された (図 12-14)。これより、*Cre02.g109950*、*Cre02.g105650*、*Cre10.g440450* は、光化学系 II 構築に関する原因遺伝子であると決定された。

4. 考察

4.1 クラミドモナスから光化学系 II 異常変異体の単離

本研究では、クラミドモナス変異体プールからの光化学系 II 異常変異体のスクリーニングを行い、光化学系 II 異常変異体を 132 株単離した。光化学系 II 異常変異体について網羅的に TAIL-PCR によりゲノム上のタグの挿入位置を決定した結果、88 株についてタグの挿入に位置を決定できた。その結果、既報の光化学系 II 構築に関与する遺伝子の付近においてタグの挿入を確認できた。一方、タグの挿入位置の付近に光化学系 II 構築に関与する遺伝子が確認できなかった株が 21 株得られ、光化学系 II 異常に関する独立した 8 つの遺伝子座があった。3 つ遺伝子座については相補テストを行うことで、光化学系 II 構築に関する新規遺伝子 *Cre02.g105650*、*Cre02.g109950*、*Cre10.g440450* を同定することができた。

光化学系 II 異常をきたす、つまり光化学系 II 構築ができない要素として、(a) 光化学系 II 構成要素、(b) 光化学系 II 構成に関与する因子、(c) 光化学系 II 構成要素の翻訳制御因子の 3 つが考えられる。今回の光化学系 II 異常変異体のスクリーニングでは、(a) - (c) の要素に関与する因子の遺伝子の付近にタグの挿入を確認できた。(a) については、光化学系 II の酸素発生系の構成因子が挙げられる。酸素発生系の構成因子である PsbO と PsbQ の付近にタグの挿入位置を確認できた (Nelson and Yocum, 2006)。(b) については、光化学系 II の安定性に関与する PsbH の翻訳制御に関与する HCF107 (Sane et al., 2005) の付近にタグの挿入位置を確認できた。(c) については、光化学系 II 構成に関与する因子である LPA1 (Peng et al 2006 ; Park et al., 2007; Dewez et al., 2009) と LPA19 (Wei et al., 2010) の付近にタグの挿入位置を確認できた。このことから、本研究で行ったスクリーニングでは、効率よく光化学系 II 異常変異体を単離できたと考えられる。

クラミドモナスの光化学系 II 異常変異体は、高等植物のものよりも、生化学的な解析の点において優れていると考えられる。高等植物の場合、重度の光化学系 II 異常変異体は、致死やアルビノの表現型を示すため、生化学的な解析を行えず、個々の遺伝子の機能解析は困難である。対照的に、クラミドモナスの場合は、重度の光化学系 II 異常変異体でさえも、独立栄養性の性質をもつために致死にならない (Dent et al., 2005)。そのため、サンプルの大量調整による生化学的な解析が可能となり、遺伝子の機能解析が可能になる。これより、光化学系 II 構築の研究においては、クラミドモナスは最適

な実験材料であると考えられる。

4.2 光化学系 II 構築に關与する新規遺伝子

(1) Cre02.g105650

Cre02.g105650 は、シアノバクテリアや高等植物において相同性を示すものがなかったが、緑藻間では広く保存されていた。Cre02.g105650 変異体では、Fv/Fm 値が 0-0.1 を示した。予備的な実験結果から、Cre02.g105650 変異体では、D1、CP47、LHCII、と CP1 が蓄積するのに対して、CP43 は蓄積しなかった。また、D1/D2/CP47 の PSII 中間複合体が蓄積していた。このことから、Cre02.g105650 は、光化学系 II 構築において CP43 の組み込みに關与しているのではないかと考えている。

(2) Cre02.g109950

Cre02.g109950 は、高等植物において One-helix protein1 (OHP1) と相同性を示すと同時に、シアノバクテリアから高等植物まで広く保存されていた。OHP1 は、光捕集タンパク質である LHC に共通する LHC モチーフをもつ LHC like protein のひとつであり、LHC タンパク質の共通祖先であると考えられている。これまでに、高等植物では、シロイヌナズナにおいて色素欠損体として単離されていたが、機能は不明である。

(3) Cre10.g440450

Cre10.g440450 は、シアノバクテリアの Psb28 ホモログであり、緑藻や高等植物において幅広く分布している。シアノバクテリアでは、*Psb28* 欠損体は、光化学系 II タンパク質の組成や光化学系 II 活性に異常は示さない (Dobakava et al., 2009)。面白いことに、シアノバクテリアの *Psb28* 欠損体では、ProtoIX などの Chl 合成中間体が蓄積することが報告されている (Dobakava et al., 2009)。現在のところ、*Psb28* の機能は不明である。一方、緑藻や高等植物では Psb28 ホモログに關する研究は、現在までに行われていない。今回クラミドモナスから単離した *Psb28* 欠損体は、光化学系 II 異常を示すことから、シアノバクテリアとは機能が異なる可能性が考えられる。

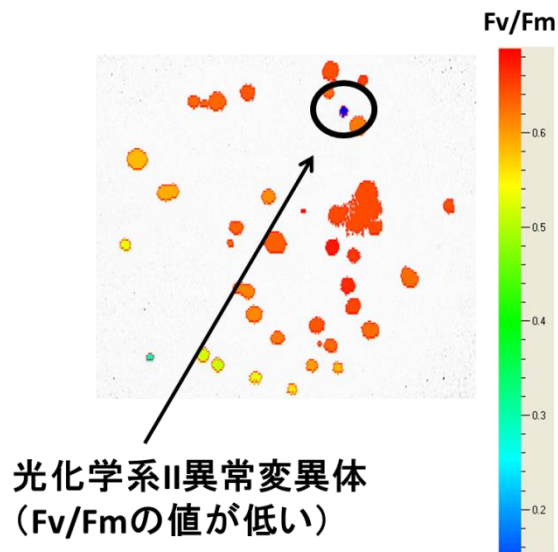


図 11 光化学系 II 異常変異体のスクリーニング

Glass bead 法により、クラミドモナスの変異体プールを作製した。FluorCam により、クラミドモナス変異体の Chl 蛍光をイメージ化して、Fv/Fm 値を算出した。赤色では正常な Fv/Fm 値を示し、青色では異常な Fv/Fm を示す。

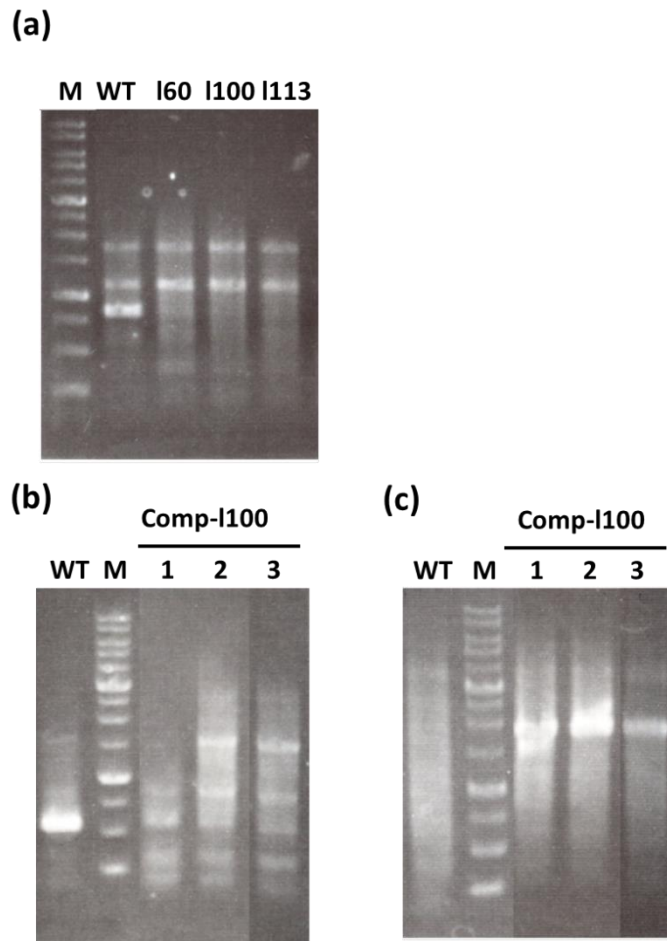
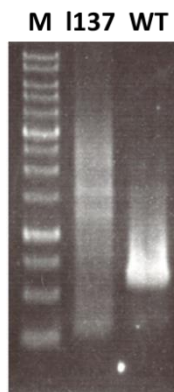


図 12 *Cre02.g105650* に関するゲノム PCR

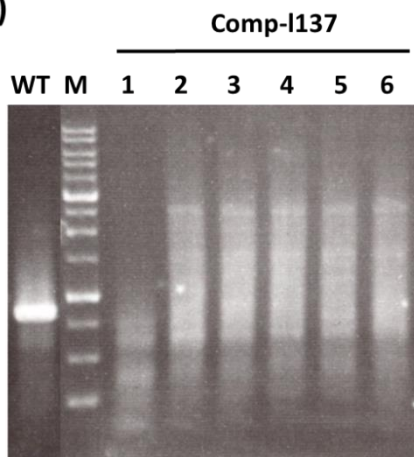
(a) *Cre02.g105650* 遺伝子の欠損の確認。WT は、*arg7/cw15* を示している。l60、l100、l113 は、独立した光化学系 II 異常欠損体の株を示している。

(b)、(c) l100 を親株とした *Cre02.g105650* 遺伝子を過剰発現する形質転換体の作出の成功の可否の確認。WT は、*arg7/cw15* を示している。Comp-l100 は、l100 をバックグラウンドとした *Cre02.g105650* 遺伝子形質転換体を示し、番号 1、2、3 は独立した株を示している。(b) *Cre02.g105500* 遺伝子の欠損の確認を、(c) pChlamy-*Cre02.g105650* ベクター内の配列によるゲノム PCR により *Cre02.g105650* 遺伝子形質転換体の作出の成功の可否の確認を示している。

(a)



(b)



(c)

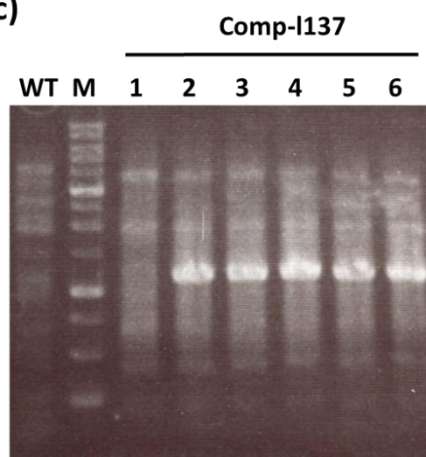
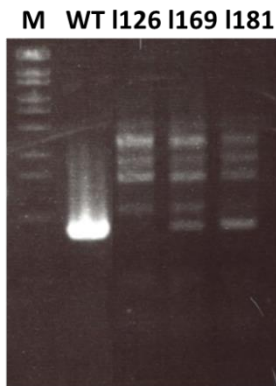


図 13 *Cre02.g109950*に関するゲノム PCR

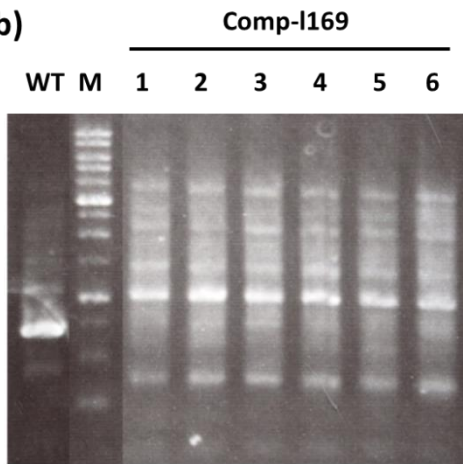
(a) *Cre02.g109950* 遺伝子の欠損の確認。WT は、*arg7/cw15* を示している。l137 は、光化学系 II 異常欠損体の株を示している。

(b)、(c) l137 をバックグラウンドとした *Cre02.g109950* 遺伝子を過剰発現する形質転換体の作出の成功の可否の確認。WT は、*arg7/cw15* を示している。Comp-l137 は、l137 をバックグラウンドとした *Cre02.g109950* 遺伝子形質転換体を、番号 1-6 は独立した株を示している。(b) *Cre02.g110250* 遺伝子の欠損の確認を、(c) pChlamy-*Cre02.g1109950* ベクター内の配列におけるゲノム PCR による *Cre02.g105650* 遺伝子形質転換体の作出の成功の可否の確認を示している。

(a)



(b)



(c)

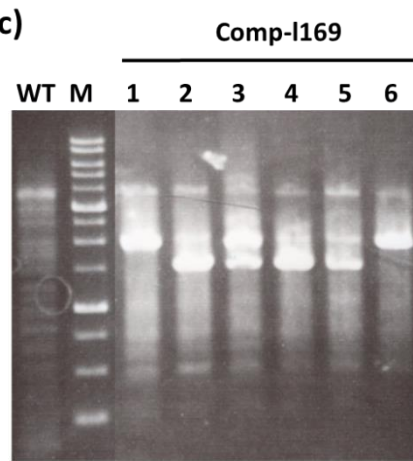


図 14 *Cre10.g440450*に関するゲノム PCR

(a) *Cre10.g440450* 遺伝子の欠損の確認。WT は、*arg7/cw15*を示している。l126、l169、l181 は、光化学系 II 異常欠損体の株を示している。

(b)、(c) l169 を親株とした *Cre10.g440450* 遺伝子を過剰発現する転換体の作出の成功の可否の確認。WT は、*arg7/cw15*を示している。Comp-l169 は、l169 をバックグラウンドとした *Cre10.g440450* 遺伝子形質転換体を、番号 1-6 は独立した株を示している。(b) *Cre10.g440450* 遺伝子の欠損の確認を、(c) pChlamy- *Cre10.g440450* ベクター内の配列におけるゲノム PCR による *Cre02.g105650* 遺伝子形質転換体の作出の成功の可否の確認を示している。

表 3 単離した光化学系 II 異常変異体の株数

Fv/Fm	株数
0-0.1	51
0.1-0.2	17
0.2-0.3	23
0.3-0.4	17
0.4-0.5	24

表 4 *Cre02.g105650* 遺伝子の相補株における Fv/Fm 値

株	Fv/Fm
WT	0.685
l60	-0.073
l00	-0.006
l113	-0.045
Comp-l110-1	0.497
Comp-l110-2	0.720
Comp-l110-3	0.738

WT は、*arg7/cw15* を、l60、l100、l113 は、独立した *Cre02.g105650* 遺伝子欠損体の株を示している。また、Comp-l100 は、l100 をバックグラウンドとした *Cre02.g105650* 遺伝子形質転換体を、番号 1-3 は独立した株を示している。

表 5 *Cre02.g109950* 遺伝子の相補株における Fv/Fm 値

株	Fv/Fm
WT	0.685
l137	0.176
Comp-l137-1	0.269
Comp-l137-2	0.576
Comp-l137-3	0.648
Comp-l137-4	0.600
Comp-l137-5	0.538
Comp-l137-6	0.507

WT は、*arg7/cw15* を、l137 は、独立した *Cre02.g109950* 遺伝子欠損体の株を示している。また、Comp-l137 は、l137 をバックグラウンドとした *Cre02.g109950* 遺伝子形質転換体を、番号 1-6 は独立した株を示している。

表 6 Cre10.g440450 遺伝子の相補株における FvFm 値

株	Fv/Fm
WT	0.685
l126	0.105
l169	0.282
l181	0.289
Comp-l169-1	0.673
Comp-l169-2	0.653
Comp-l169-3	0.711
Comp-l169-4	0.660
Comp-l169-5	0.666
Comp-l169-6	0.67

WT は、*arg7/cw15* を、l126、l169、l181 は、独立した *Cre10.g440450* 遺伝子欠損体の株を示している。また、Comp-l169 は、l169 をバックグラウンドとした *Cre10.g440450* 遺伝子形質転換体を、番号 1-6 は独立した株を示している。

謝辞

博士課程からの本研究室へ所属を快諾し、本論文を作成するにあたり多くのご指導をいただきました、本学田中歩教授に感謝いたします。本研究を行うにあたり多くの助言をいただいた、本学田中亮一准教授に感謝いたします。本研究を行うにあたりその手法、原理を丁寧にご指導していただき、その後も多くのご助言をいただきました、本学伊藤寿助教に感謝いたします。本研究を行なうにあたりご助言をいただくと同時に、普段から有意義なディスカッションの相手となってくださった、本学高林厚史助教に感謝いたします。TAIL-PCRに関して、ご助言をいただいた名古屋大学松尾拓哉助教に感謝いたします。クラミドモナスに関して、ご助言をいただいた岡山大学黒田洋詩博士と岡山大学兒玉なつ美氏に感謝いたします。研究という枠を越えて様々な面でお世話になりました生物適応研究室のスタッフと院生に感謝いたします。そして、これまでの研究を陰で支えてくれた両親に感謝の意を表し、謝辞にかえさせていただきます。

参考文献

Barber, J., Morris, E. and Buchel, C. (2000)

Revealing the structure of the photosystem II chlorophyll binding proteins, CP43 and CP47. *Biochim Biophys Acta*, 1459, 239-247.

Bellafigliore, S., Barneche, F., Peltier, G., and Rochaix, J.D. (2005).

State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 433, 892-895.

Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P., and Leister, D. (2005).

Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature*, 437, 1179-1182.

Boynton JE., Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, et al. (1988)

Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240, 1534-1538.

Cahoon AB., Timko MP. (2000)

yellow-in-the-dark mutants of *Chlamydomonas* lack the CHLL subunit of light-independent protochlorophyllide reductase. *Plant Cell*, 4, 559-568.

Cashmore, A. R. (1984)

Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2960-2964

Christ B., Schelbert S, Aubry S, Süßenbacher I, Müller T, Kräutler B, Hörtensteiner S. (2012)

MES16, a member of the methylesterase protein family, specifically demethylates fluorescent chlorophyll catabolites during chlorophyll breakdown in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2012 Feb;158, 628-641.

Christ B., Süßenbacher I, Moser S, Bichsel N, Egert A, Müller T, Kräutler B, Hörtensteiner S. (2013)

Cytochrome P450 CYP89A9 is involved in the formation of major chlorophyll catabolites during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25, 1868-1880.

Dekker, J.P., and Boekema, E.J. (2005).

Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1706,12-39.

Dent RM, Haglund CM, Chin BL, Kobayashi MC, Niyogi KK. (2005)

Functional genomics of eukaryotic photosynthesis using insertional mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 137, 545-556.

Dewez D., Park S, Garcia-Cerdan JG, Lindberg P, Melis A. (2009)

Mechanism of REP27 protein action in the D1 protein turnover and photosystem II repair from photodamage. *Plant Physiol*, 151, 88–99.

Dobáková M., Sobotka R, Tichý M, Komenda J. (2009)

Psb28 protein is involved in the biogenesis of the photosystem II inner antenna CP47 (PsbB) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol*, 149, 1076-1086.

Fristedt, R., Willig, A., Granath, P., Crevecoeur, M., Rochaix, J.D., and Vener, A.V. (2009).

Phosphorylation of photosystem II controls functional macroscopic folding of photosynthetic membranes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21,3950-3964.

Gray, J., Janick-Buckner, D., Buckner, B., Close, P.S. and Johal, G.S. (2002)

Light-dependent death of maize *lls1* cells is mediated by mature chloroplasts. *Plant Physiol*, 130, 1894-1907.

Guamet JJ, Pichersky E, Noode'n LD. (1999)

Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 40, 986-992.

Harris EH. (1989)

The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press, San Diego

Hirai, Y., Kashimura, S. and Saga, Y. (2011)

Demetalation Kinetics of Chlorophyll Derivatives Possessing Different Substituents at the 7-Position Under Acidic Conditions. *Photochem Photobiol*, 87, 302-307.

Hirai, Y., Tamiaki, H., Kashimura, S. and Saga, Y. (2009)

Demetalation kinetics of natural chlorophylls purified from oxygenic photosynthetic organisms: effect of the formyl groups conjugated directly to the chlorin [small pi]-macrocycle. *Photochem Photobiol Sci*, 8, 1701-1707.

Hirashima, M., Satoh, S., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2006)

Pigment Shuffling in Antenna Systems Achieved by Expressing Prokaryotic Chlorophyllide a Oxygenase in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 281, 15385-15393.

Hirashima, M., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2009)

Light-independent cell death induced by accumulation of pheophorbide a in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 50, 719-729.

Horie, Y., Ito, H., Kusaba, M., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2009)

Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 284, 17449-17456.

Hortensteiner, S. (2006)

Chlorophyll degradation during senescence. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 55-77.

Hortensteiner, S. and Krautler, B. (2011) Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochim Biophys Acta*, 1807, 977-988.

Hortensteiner S., Feller U. (2002)

Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot*, 53, 927-937.

Hortensteiner, S., Vicentini, F. and Matile, P. (1995)

Chlorophyll Breakdown in Senescent Cotyledons of Rape, Brassica-Napus L - Enzymatic Cleavage of Pheophorbide-a in-Vitro. *New Phytol*, 129, 237-246.

Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T. (2008)

Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol*, 148, 142-155.

Ito, H., Ohtsuka, T. and Tanaka, A. (1996)

Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll. *J Biol Chem*, 271, 1475-1479.

Iwai M, Pack CG, Takenaka Y, Sako Y, Nakano A. (2013)

Photosystem II antenna phosphorylation-dependent protein diffusion determined by fluorescence correlation spectroscopy. *Sci Rep*, 3, 2833.

Iwai, M., Takahashi, Y., Minagawa, J. (2008)

Molecular remodeling of photosystem II during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 20, 2177-2189.

Jansson, S., Stefansson, H., Nystrom, U., Gustafsson, P. and Albertsson, P.A. (1997)

Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochim Biophys Acta*, 1320, 297-309.

Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., and Rolland, N. (2009)

Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol. Plant*, 2, 1154-1180.

Kato Y, Sakamoto W. (2009)

Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *J Biochem*, 146, 463-469.

Kindle K L. (1990)

High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1228–1232.

Kirst H, García-Cerdán JG, Zurbriggen A, Melis A. (2012)

Assembly of the light-harvesting chlorophyll antenna in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* requires expression of the TLA2-CpFTSY gene. *Plant Physiol*, 158, 930-945.

Komenda J, Sobotka R, Nixon PJ. (2012)

Assembling and maintaining the Photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 245-51.

Kusaba, M., Ito, H., Morita, R., Iida, S., Sato, Y., Fujimoto, M., Kawasaki, S., Tanaka, R., Hirochika, H., Nishimura, M. and Tanaka, A. (2007)

Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell*, 19, 1362-1375.

Lensch, M., Herrmann, R.G. and Sokolenko, A. (2001)

Identification and characterization of SppA, a novel light-inducible chloroplast protease complex associated with thylakoid membranes. *J Biol Chem*, 276, 33645-33651.

Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. (1995)

Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*. 8, 457-463.

Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., and Chang, W. (2004)

Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428, 287–292.

Makino, A., Sakuma, H., Sudo, E. and Mae, T. (2003)

Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant Cell Physiol*, 44, 952-956.

Markwell, J.P., Thornber, J.P. and Boggs, R.T. (1979)

Higher plant chloroplasts: Evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll—protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 1233-1235.

Martinez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui MS, Guamet JJ. (2008)

'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J*, 56, 196-206

Matile, P., Schellenberg, M., and Peisker, C. (1992).

Production and release of a chlorophyll catabolite in isolated senescent chloroplasts. *Planta*, 187,230-235.

Matsuo T, Okamoto K, Onai K, Niwa Y, Shimogawara K, Ishiura M. (2008)

A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes Dev* 22, 918-930

Meguro, M., Ito, H., Takabayashi, A., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2011)

Identification of the 7-Hydroxymethyl Chlorophyll a Reductase of the Chlorophyll Cycle in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23, 3442-3453.

Melis, A. (1999)

Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage ? Trends Plant Sci, 4, 130-135.

Merchant SS., Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L, Marshall WF, Qu LH, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen CL, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernández E, Fukuzawa H, González-Ballester D, González-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riaño-Pachón DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martínez D, Ngau WC, Otilar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR. (2007)

The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science, 318, 245-250.

Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F., op den Camp, R. and Apel, K. (2001)

FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 12826-12831.

Minagawa, J. (2011)

State transitions - The molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. Biochim. Biophys. Acta, 1807, 897-905.

Nelson, N. and Yocum, C.F. (2006)

STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYSTEMS I AND II. Annu Rev Plant

Biol, 57, 521-565.

Nickelsen J, Rengstl B. (2013)

Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annu Rev Plant Biol*, 64, 609-635.

Nishimura Y, Shikanai T, Nakamura S, Kawai-Yamada M, Uchimiya H. (2012)

Gsp1 triggers the sexual developmental program including inheritance of chloroplast DNA and mitochondrial DNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 24, 2401-2414.

op den Camp, R.G., Przybyla, D., Ochsenein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Gobel, C., Feussner, I., Nater, M. and Apel, K. (2003)

Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15, 2320-2332.

Park S., Khamai P, Garcia-Cerdan JG, Melis A. (2007)

REP27, a tetratricopeptide repeat nuclear-encoded and chloroplast-localized protein, functions in D1/32-kD reaction center protein turnover and photosystem II repair from photodamage. *Plant Physiol*, 143,1547-1560.

Peng L., Ma J, ChiW, Guo J, Zhu S, et al. (2006)

LOWPSII ACCUMULATION1 is involved in efficient bassembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 18, 955-969.

Pruzinska A., Anders I, Aubry S, Schenk N, Tapernoux-Luthi E, Muller T, Krautler B, Hortensteiner S. (2007)

In vivo participation of red chlorophyll catabolite reductase in chlorophyll breakdown. *Plant Cell*, 19,369-387.

Pruzinska, A., Tanner, G., Anders, I., Roca, M. and Hortensteiner, S. (2003)

Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15259-15264.

Salvi, D., Moyet, L., Seigneurin-Berny, D., Ferro, M., Joyard, J., and Rolland, N. (2011)

Preparation of envelope membrane fractions from *Arabidopsis* chloroplasts for

proteomic analysis and other studies. *Methods Mol Biol* 775, 189–206

Samol I, Shapiguzov A., Ingelsson B, Fucile G, Crèvecoeur M, Vener AV, Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont M. (2012)

Identification of a photosystem II phosphatase involved in light acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24, 2596-2609.

Sane AP., Stein B, Westhoff P. (2005)

The nuclear gene HCF107 encodes a membrane-associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial *psbH* gene in *Arabidopsis*. *Plant J*, 42, 720-730.

Sato, Y., Morita, R., Katsuma, S., Nishimura, M., Tanaka, A. and Kusaba, M. (2009)

Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J*, 57, 120-131.

Satoh, S., Ikeuchi, M., Mimuro, M. and Tanaka, A. (2001)

Chlorophyll b expressed in cyanobacteria functions as a light-harvesting antenna in photosystem I through flexibility of the proteins. *J Biol Chem*, 276, 4293-4297.

Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K. and Hortensteiner, S. (2009)

Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 767-785.

Schenk, N., Schelbert, S., Kanwischer, M., Goldschmidt, E.E., Dormann, P. and Hortensteiner, S. (2007)

The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 581, 5517-5525.

Scheumann, V., Ito, H., Tanaka, A., Schoch, S. and Rudiger, W. (1996)

Substrate specificity of chlorophyll(ide) b reductase in etioplasts of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Eur J Biochem*, 242, 163-170.

Shi, L.X., and Schroder, W.P. (2004)

The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1608, 75–96.

Shimada, Y., Tanaka, A., Tanaka, Y., Takabe, T., Takabe, T. and Tsuji, H. (1990)
Formation of chlorophyll-protein complexes during greening 1. Distribution of newly synthesized chlorophyll among apoproteins. *Plant Cell Physiol*, 31, 639-647.

Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M. (1986)

The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J*, 5, 2043-2049.

Sizova I, Fuhrmann M, Hegemann P. (2001)

A *Streptomyces rimosus* aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 277, 221-229.

Tanaka, A. and Melis, A. (1997)

Irradiance-dependent changes in the size and composition of the chlorophyll a-b light-harvesting complex in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant Cell Physiol*, 38, 17-24.

Tanaka, A., Tanaka, Y. and Tsuji, H. (1987)

Resolution of chlorophyll a/b-protein complexes by polyacrylamide gel electrophoresis: Evidence for the heterogeneity of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes. *Plant Cell Physiol*, 28, 1537-1545.

Tanaka, A. and Tsuji, H. (1985)

Appearance of Chlorophyll-Protein Complexes in Greening Barley Seedlings. *Plant Cell Physiol*, 26, 893-902.

Tanaka R and Tanaka A. (2007)

Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol*, 58, 321-346

Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T. and Takamiya, K. (1999)

Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96,

15362-15367.

Umena Y, Kawakami K, Shen JR, Kamiya N. (2011)

Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å .
Nature, 473, 55-60.

Vainonen, J.P., Hansson, M., and Vener, A.V. (2005).

STN8 protein kinase in *Arabidopsis thaliana* is specific in phosphorylation of
photosystem II core proteins. J. Biol. Chem, 280, 33679-33686.

Wei L., Guo J, Ouyang M, Sun X, Ma J, Chi W, Lu C, Zhang L. (2010)

LPA19, a Psb27 homolog in *Arabidopsis thaliana*, facilitates D1 protein precursor
processing during PSII biogenesis. J. Biol. Chem, 285, 21391-21398.

Wuthrich KL, Bovet L, Hunziker PE, Donnison IS, Hörtensteiner S (2000)

Molecular cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase
involved in chlorophyll catabolism. Plant J, 21,189-198.

Yamasato A, Nagata N, Tanaka R, and Tanaka A. (2005)

The N-Terminal Domain of Chlorophyllide a Oxygenase Confers Protein Instability
in Response to Chlorophyll b Accumulation Plant Cell, 17, 1585-1597

Yang, D.H., Webster, J., Adam, Z., Lindahl, M. and Andersson, B. (1998)

Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of
photosystem II in response to elevated light intensities. Plant Physiol, 118, 827-834.

Zapata, M., Rodríguez, F. and Garrido, J.L. (2000)

Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new
HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile
phases. Mar Ecol Prog Ser, 195, 29-45.

Zelisko, A., Garcia-Lorenzo, M., Jackowski, G., Jansson, S. and Funk, C. (2005)

AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during
high-light acclimation and senescence. Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 13699-13704.