HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	クロロフィル分解に関するSGRとNYC1の協調的発現とその生理的役割
Author(s)	佐藤, 智亮
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13166号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13166
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70630
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoaki_Sato.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

クロロフィル分解に関する *SGR* と *NYC1* の協調的発現とその生理的役割

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
佐藤智亮

2018 年 3 月

目次

I. 要旨 1

II. 序論 4

III. 方法と材料 11

IV. 結果 16

V. 考察 48

VI. 結論 63

VII. 謝辞 67

VIII. 引用文献 68

I. 要旨

光合成生物はクロロフィルと呼ばれる緑色色素を用いて光エネルギーを受け取り光合成を行っている．陸上植物はクロロフィル *a* とクロロフィル *b* を持っており，成長期のクロロフィルはクロロフィル結合タンパク質に結合して存在・機能する他に，クロロフィル結合タンパク質の構造安定化に寄与している．老化期になるとクロロフィルは分解され，植物は光合成能を失う．クロロフィルの分解に伴ってタンパクの構造を維持出来なくなったクロロフィル結合タンパク質は分解される．分解されたタンパク質は新しい葉や種子・実といった次世代生産の窒素源となるため，クロロフィルの分解に伴うクロロフィル結合タンパク質の分解は植物にとって重要な過程である．クロロフィル結合タンパク質は炭素固定で働くルビスコと共に葉内の主要なタンパク質であり，地球上で総量が多いタンパク質である．そのため，クロロフィル分解に端を発する葉の老化は地球規模で起こる現象である．

クロロフィル代謝はクロロフィル合成・クロロイフィル *a* −クロロフィル *b* 相互転換・分解にわけられ，各反応の基質と酵素のほとんどが同定されていた．しかし，クロロフィル分解の初発反応であるクロロフィル *a* から中心金属の Mg^{2+}を取り除く酵素（Mg デケラターゼ）は長い間同定されていなかった．Mg デケラターゼが同定されたのは 2016 年であり，*Stay Green*（*SGR*）が Mg デケラターゼである（Shimoda et al.2016）こと，そして *SGR* はクロロフィル *a* のみに作用し，クロロフィル *b* を基質にしないことなどが明らかとなった（Matsuda et al.2016）．

興味深いことに，クロロフィル *b* を基質にしない *SGR* の発現を誘導するとクロロフィル *a* の分解に伴ってクロロフィル *b* の分解が起こることが明らかとなった（Shimoda et al.2016）．このことから，*SGR* がクロロフィル *b* 分解酵素と何らかの関係があること，そしてクロロフィル分解酵素は単独ではなく協調して働くことが示唆された．そこで，本研究では *SGR* と協調して働くクロロフィル *b* 分解酵素を明らかにすることと，クロロフィル分解酵素の協調的発現の生理的役割を明らかにすることを目的とした．クロロフィル *b* の分解には Non-Yellow coloring 1（NYC1）と NYC1 LIKE（NOL）が働くため，解析には野生型と *SGR* 過剰発現株を掛け合わせた系統（*SGR*/WT）の他にクロロフィル *b* 分解酵素欠損株を掛け合わせた系統（*SGR/nyc1*, *SGR/nol*, *SGR/nyc1 nol*）

を用いた.

解析の結果, 色素分析より *SGR* の発現後にクロロフィル *b* の分解が抑制されたのは *SGR/nyc1*, *SGR/nyc1 nol* であることが明らかとなった. 発現量を調べると *SGR* は DEX による発現誘導後 12 時間で発現量が 10 倍になった. *NYC1* は 24 時間後に増加し始め, 36 時間で 8 倍になった. *NOL* は発現量の変化がなかった. *SGR*, *NYC1*, *NOL* のタンパク質の蓄積を調べると, *SGR* は発現誘導後 12〜24 時間後, *NYC1* は 24 時間後に蓄積量増加が観察され, *NOL* の蓄積量の変化は観察されなかった. 以上のことから, *SGR* と協調して働くクロロフィル *b* 分解酵素は *NYC1* であることが明らかとなった. しかし, *SGR* は酵素であるため, *NYC1* の発現を直接誘導することができない. そこで *NYC1* の発現を誘導する転写因子について解析した. その結果, *SGR* を発現させてから 12〜24 時間後にジャスモン酸関連の転写因子 (*NAC019/055/072*) の発現量の増加が確認された. このことから, ジャスモン酸が retrograde signal として働き, *SGR* と *NYC1* の仲介をしていることが示唆された.

クロロフィルはクロロフィル結合タンパク質の安定化に寄与しているため, *SGR* によるクロロフィル *a* 分解によってクロロフィル結合タンパク質が分解されると考えてタンパク質の蓄積について解析した. *SGR*/WT では光化学系 I, II の反応中心と周辺集光アンテナの分解が確認された. *SGR/nyc1 nol* でも同様に光化学系 I・II の反応中心と光化学系 I の周辺集光アンテナが分解される一方, 光化学系 II の周辺集光アンテナの分解抑制が観察された. 健常葉の光化学系 II の周辺集光アンテナは 3 量体で存在･機能している. 分解されない *SGR/nyc1 nol* の光化学系 II の周辺集光アンテナがどのような状態で存在するかを調べるために, Green Gel 法によってクロロフィル結合タンパク質を分離した. その結果, 3 量体で存在することが確認された. これまでの *NYC1* 欠損株を用いた解析より, 老化期に光化学系 II の周辺集光アンテナのクロロフィル *a* が分解されないことが報告されている. 本研究では分解されない光化学系 II の周辺集光アンテナに *SGR* が作用できるか調べるために, *SGR* を発現させた *SGR/nyc1 nol* の光化学系 II 周辺集光アンテナを切り出してクロロフィル *a/b* 比を調べた. その結果, 健常葉で 1.4 あるクロロフィル *a/b* 比は 0.6 に減少していた. *SGR/nyc1 nol* はクロロフィル *b* 分解が起きないことから, クロロフィル *a/b* 比の減少はクロロフィル *a* の分解に起因する. このことから, *SGR* は *SGR/nyc1 nol* の光化学系 II 周辺集光アンテナのクロロフィル *a* を部分的に分解できることが明らかと

なった.

通常の老化は環境ストレスや月齢によって老化関連の植物ホルモンが合成され，クロロフィルやクロロフィル結合タンパク質の分解へと反応が進む．老化は植物にとって次世代を生産する重要な反応であり，老化が始まると CO_2 吸収量や蛍光収率などの減少が観察される．本研究で行った *SGR* の発現誘導は人為的に老化反応を誘導するが，CO_2 吸収量や蛍光収率の減少など，通常の老化と共通する現象がおこることが確認された.

電子顕微鏡によってクロロフィル *b* が分解されない *SGR/nyc1 nol* を観察すると，グラナの積層が確認された．*SGR/nyc1 nol* では 3 量体の光化学系 II の周辺集光アンテナが存在するため，*SGR* の発現によって光化学系 II の反応中心が分解されても光エネルギーを捕捉できる状態にあると考えられる．処理できない光エネルギーは活性酸素を生産させて細胞死を招きクロロフィル結合タンパク質の分解・転流が不完全になる．したがって，次世代生産の資源確保だけでなく，転流を確実に行うためにも周辺集光アンテナは反応中心と協調して分解されている必要がある.

以上より，*SGR* の発現の結果起こるクロロフィル *b* の分解は *NYC1* によって起こること，そしてクロロフィル *a* とクロロフィル *b* の分解は協調して行われることがが協調して分解されることが明らかになった．これはクロロフィル *a* とクロロフィル *b* の分解を協調させて行うことで，老化という次世代を生産するのに重要な現象を安全・確実に遂行するためであると考えられる.

II. 序論

II–1. 地球規模でおこる葉の色の変化

春に新しい芽を出した落葉樹や草本は秋に葉の緑色が変化し，冬になる前に葉の緑色は抜けて落葉もしくは枯死する．北海道大学構内の銀杏（図 1）は 4 月末から 5 月にかけて出た新芽は 9 月末から 10 月にかけて葉の緑色が抜け始め，11 月には葉は黄色になり，12 月には落葉する．植物の一年を通した循環は，地球規模のできごとであり（図 2），図 2 左の 2016 年 9 月のユーラシア大陸と北アメリカ大陸は 2 月になると緑色から白色に変化している．これは雪による白色のほかに葉の緑色が抜けていることを示している．



図1　葉の一年（北海道大学構内の銀杏）

植物の葉の色の移り変わりを北海道大学構内の銀杏を用いて示す．春に新芽を出した銀杏は夏に向けて葉を厚く広くしていき，より多くの光エネルギー受け取れるようにする．秋になるとクロロフィルを分解し始める．これは冬になって気温が低くなると光合成関連の酵素の活性が低下し，受け取る光エネルギーを処理しきれなくなり，活性酸素を発生しやすくなるためと考えられている．

植物は光エネルギーを葉の葉緑体に存在するクロロフィルで捕捉し，受け取った光エネルギーを化学エネルギーに変換して生存のためのエネルギーや成長する資源を生産している（et al. ）．陸上植物が持つクロロフィルはクロロフィル a と b であり，それぞれ 646nm，683nm に吸収ピークをもつ．種類の違う色素を持つことで，受け取れる光の波長域を広げて捕捉できるエネルギー量を増やしている．

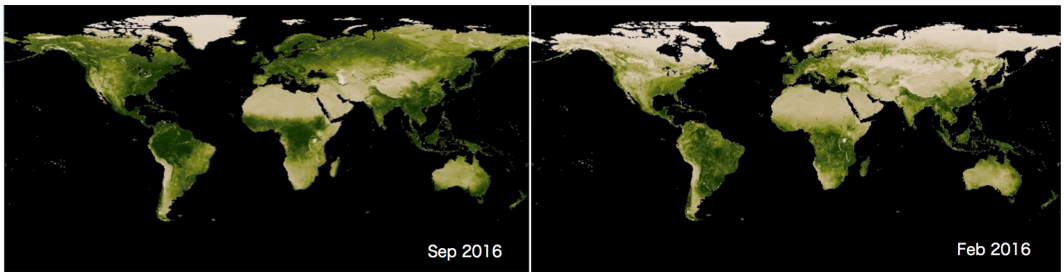


図2　地球規模で起こる植物の葉の緑色の移ろい

植物の葉の色の移ろいは地球規模で起こっている．春に出た新芽は夏にかけて大きく厚くなるよう成長する．熱帯以外の地域は秋になるとクロロフィルを始めクロロフィルタンパク等を分解して次世代の資源としたり，次の春に備えて葉を落とす．左図は9月の写真であり，ユーラシア大陸や北アメリカに緑の葉が多く存在していることを示している．また，アマゾン地域の緑色が濃くなっている．右図は2月の写真であり，ユーラシア大陸や北アメリカ大陸が白くなっており，アマゾン地域の緑色が９月の写真と比較すると薄くなっている．これは秋に落葉広葉樹や草本の葉の緑色が抜けていることを示している．

II–2．植物体内のクロロフィル

葉緑体内にはチラコイドと呼ばれる偏平な円盤状の内膜構造とストロマと呼ばれる可溶性部分に分けられる．ストロマは炭素固定を行う場であり，それに必要な水溶性の酵素が存在する．チラコイドには光合成に必須な膜タンパク質（クロロフィルタンパク質複合体等）が存在する．チラコイドが積み重なった領域をグラナラメラと呼び，ストロマに露出している領域をストロマラメラと呼ぶ．さらに，チラコイドの内側の空間をルーメンと呼ぶ（図 3）．

光合成は葉緑体内にある光化学系と呼ばれるクロロフィル結合タンパク質によって行われており，クロロフィルはクロロフィル結合タンパク質に結合している．光化学系には２種類あり（光化学系 I，II），光化学系 II では周辺集光アンテナとコアアンテナで捕捉した光エネルギーを用いて反応中心で水の分解を行う．水は電子とプロトン，そして酸素に分解され，電子はフェオフィチンに渡されてプラストキノン A，プラストキノン B へと渡されて行く．プラストキノン B は光化学系 II から電子を受け取る際にプロトンと結合する．電子がプラストキノン B からシトクロム b_6f 複合体へ伝達される際にプロトンはルーメンへ放出される．ルーメンにたまったプロトンは膜電位を作り，ATP の合成や過剰に受けた光エネルギーを熱として放散させる機構の調節に用いられる．プラストキノン B，シトクロム b_6f と移動した電子はプラストシアニンを経て光化学系 I 反応中心に渡される．光化学系 I から先はフィロキノン，鉄–硫黄タンパク質を経てフェレドキシンに電子が渡されて還元産物として NADPH が生産さ

れる．

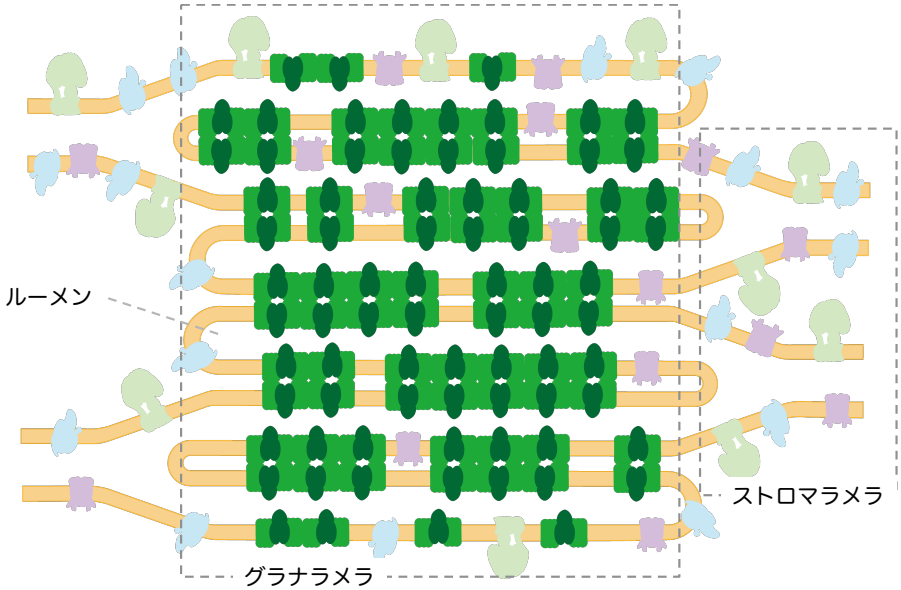


図3　葉緑体内の膜構造とクロロフィルタンパクの局在

葉緑体内にはチラコイド膜で出来た扁平な円盤状の袋（チラコイド）が多数存在する．チラコイド膜内部をルーメン，チラコイドが重なっている部分をグラナラメラ，重なっていない部分をストロマラメラ，チラコイドのふちをグラナマージンと呼ぶ．図中の濃い緑は光化学系IIの反応中心（PS II），黄緑は3量体の光化学系IIの周辺集光アンテナ（LHC II）を示す．これらはグラナスタックに局在しており，PS IIはチラコイド膜内に活性部位が突出している．赤はATP合成酵素，紫はシトクロームb_6f，青は光化学系I（PS I）を示しており，これらはストロマチラコイドに局在する．

クロロフィルで捕捉された光エネルギーが化学エネルギーに変換されずに余ると，酸素に受け渡されて活性酸素を生産する．活性酸素は細胞に障害を与えるため，光エネルギーを滞りなく処理する必要がる．光エネルギーの余剰は強光下でも起こり得るが，老化時に光化学系の反応中心と周辺集光アンテナの量比が崩れることでも起こる．そのため，植物にとって老化時に反応中心の分解と周辺集光アンテナの分解が同調して行われる必要がある．

光化学系 II は D1/D2（反応中心），CP43/CP47（中心集光装置）と Light harvesting protein complex II（LHC II，周辺集光アンテナ）で構成されている．LHC II はメジャーLHC と呼ばれる Lhcb1,2,3 とマイナーLHC と呼ばれる Lhcb4,5,6 から構成されており，メジャーLHC は 3 量体で存在・機能している．光化学系 II で捕捉された光エネルギーは光化学系 II の反応中心に運ばれる．光化学系 I は PsaA,B,C（反応中心）と Lhca1,2,3,4 で構成される周辺集光アンテナ（Light harvesting protein complex I：LHC I）で構成される．光化学系 II はグラナラメラに，光化学系 I はストロマラメラに存在している（図 3）．反応中心と中心集光装置は光化学系 I,II 共にクロロフィル *a* のみをもち，周辺集光アンテナはクロロフィル *a*,*b* を持っている．

クロロフィル代謝はクロロフィル合成経路とクロロフィル *a* − クロロフィル *b* 相互転換経路（クロロフィルサイクル），そして分解経路に分けることができる（図 4）．グルタミンから始まるクロロフィル合成は中間物質と反応に関わる酵素が同定されており，クロロフィル *a* はクロロフィライド *a* を基質に chlorophyll synthase（CS）が作用して合成される．そしてクロロフィル *b* は Chlorophyll a Oxygenase（CAO）の作用でクロロフィル *a* から合成される．クロロフィル *a*，*b* は共に中心金属として Mg を保持しているが，クロロフィル *b* の Mg はクロロフィル *a* よりも堅固にポルフィリン環に結合しており，クロロフィル *b* から Mg を酵素的に取り除くことはできない．そのため，クロロフィル *b* の分解は Non-YELLOW COLORING 1（NYC1）や NYC1 LIKE（NOL）によって C7 のアルデヒド基がヒドロキシメチル基に変換され，さらに HCAR によってクロロフィル *a* に変換される過程を指す．クロロフィル *a* は Mg デケラテースによって中心金属である Mg が脱離されフェオフィチン *a* に転換されて分解されていく．

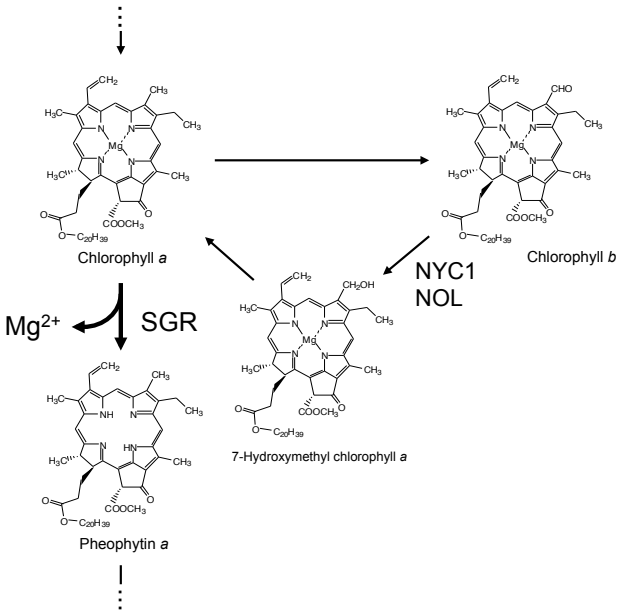


図4　クロロフィル分解経路

クロロフィルaはSGRによって中心金属のMg^{2+}を取り除かれ，フェオフィチンaになる．クロロフィルbはクロロフィルaから合成され，NYC1，NOL，HCARによってクロロフィルaに変換される．この反応ではアルデヒド基がメチル基に変換される．

II−3．Stay Green について

上述の通り，植物は冬支度としてクロロフィルを分解して次の春を迎えるが，葉の緑色を長く保つ形質を示す変異体が確認されており，Stay Green 形質と呼

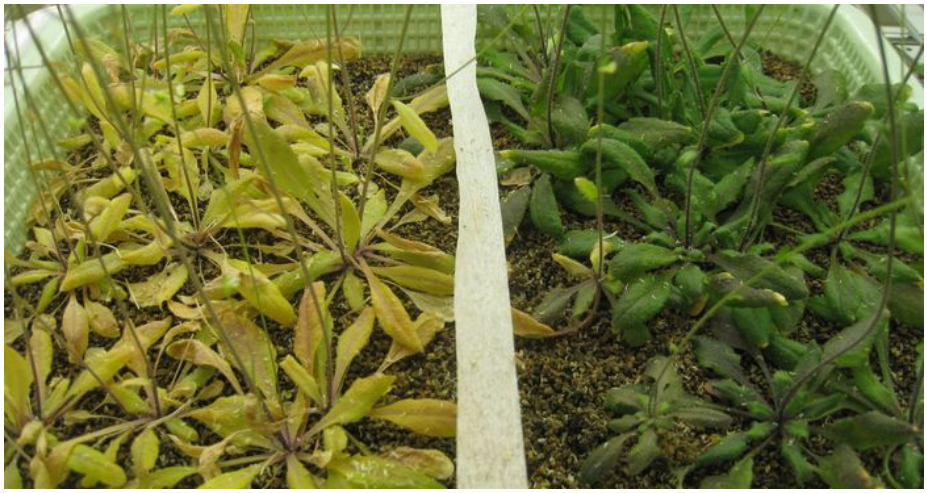


図5　Stay Green

播種後6週目の野生型（左）とStay Green（右）である．野生型が老化期に入りクロロフィルの分解をしてもStay Greenは葉の緑色を保持する．Stay Greenはクロロフィル分解異常の変異体であり，老化開始が遅い型や老化進行が遅い型など5つの型に分けることができる．光合成活性を保つ型は農業への応用に期待されており，光合成活性が減衰する型はポストハーベストや観葉植物への応用が考えられるなど，Stay Greenは有用な形質であると言える．

ばれる（図 5）．Stay Green 形質は機能的・非機能的 Stay Green に分類されるが，どちらもクロロフィル分解異常である（Park et al. 2007）．Stay Green 形質は図 6 のように 5 つの型に分類することができる（Howard et al. 2000）. type A は野生型に比べて老化開始が遅くなる型であり，type B は野生型よりも老化の進行が遅い型である．type E は老化の開始と進行は野生型と違いがないが，クロロフィル量が多いため，全てのクロロフィルを分解するのに時間がかかることで Stay Green 形質を示す．type C は色素分解が異常になる形質であり，type D は成長段階で葉が何らかの原因で死ぬことで分解過程に入らず，色素が分解されないため Stay Green 形質を示す．Stay Green は光合成活性を保持する機能的 Stay Green と光合成活性が減衰する非機能的 Stay Green に分けられる．老化の開始が遅くなる type A，老化の進行が遅い type B，クロロフィ量が多い type E の 3 つの型は光合成活性を長く保持するため，一生涯の総光合成量の増加によって個体成長量が大きくなると考えられている．このことから，type A，B，E に分類される機能的 Stay Green は農業への応用が期待される（Parry et al. 2009）．未報告であるが，私は type E の形質を示す Stay Green 変異体の選抜に成功した．その変異体は個体径が野生型よりも大きくなり，地上部のみならず地下部の生長量も野生型よりも大きくなる結果を示した．原因遺伝子の

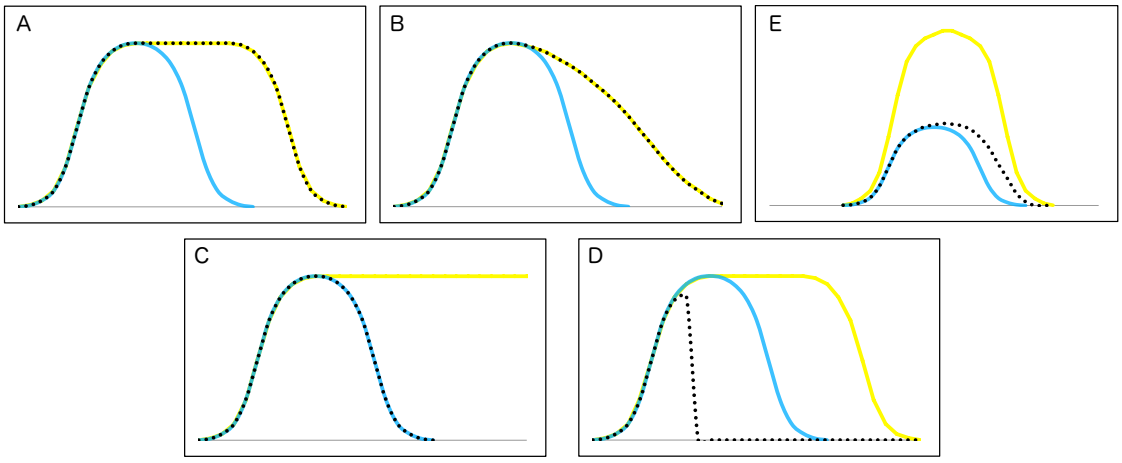


図6　Stay Greenの5つの型

Stay Greenには5つの型がある．水色は野生型の光合成活性とクロロフィル量を示し，野生型は光合成活性とクロロフィル量は同じ動態を示す．黄色はStay Greenのクロロフィル量，点線はStay Greenの光合成活性を示す．Aは老化の開始が遅くなる老化の進行は野生型と変わらない．Bは老化開始は野生型と変わらないが老化進行が遅くなる型である．Cは色素分解に異常をきたして色素分解がされないが光合成活性は低下する型である．Dは成長段階で細胞死をおこし，光合成活性がなくなるが色素分解が行われない型である．Eはクロロフィル量が多いために分解に時間がかかるために野生型よりも葉の緑色が長く保たれる型である．Stay Greenは光合成活性を保つ型を機能的Stay Greenとよび，光合成活性を保たない型を非機能的Stay Greenと呼ぶ．A，B，Eは野生型よりも光合成活性を長く保つため，野生型よりも光合成期間が長くなることで個体生長量が大きくなると考えられる．

特定に難航したため，最終的な結論は出ていないが，一生涯の光合成量の増加が個体生長量に寄与する可能性を示唆している．一方，葉の緑色は維持するが光合成活性は減衰する tyep C，D に分類される Stay Green（非機能的 Stay Green）は収穫後に緑色を保って農作物の品質を向上させる等のポストハーベストの分野や，観葉植物や芝生の緑色維持などに期待が出来る形質である．このように，クロロフィルの分解に関連している Stay Green 形質は有用な形質であり，その開発のためにはクロロフィルや光化学系の分解機構を解明する必要がある．

II−4．本研究の目的と SGR について

Mg デケラテースは *Stay Green*（*SGR*）や *NON YELLOW*（*NYE*）と呼ばれていたタンパク質であった．*SGR* はクロロフィル *a* のみに作用し，クロロフィル *b* には作用しないことが明らかとなった（Matsuda et al 2016, Shimoda et al 2016）．*SGR* は陸上植物と緑藻で存在が確認されており，顕花植物には *SGR1*（*At4g22920*），*SGR2*（*At4g11910*），*SGRL*(*At1g44000*)と 3 つの相同遺伝子が存在する．なかでも *SGR1* は発現量が多く老化期に働くことから，本研究は *SGR1* を対象遺伝子とした．先行研究において，恒常的な *SGR* の過剰発現は植

物にダメージを与える（Park et al.2007）ことがわかっている．そこで本研究では dexamethasone （DEX）を用いて SGR の発現を一過的に誘導して解析を行った．

上述の通り，*SGR* はクロロフィル *a* に作用して中心金属を取り除き，クロロフィル *b* に作用しないことが確認されている．しかし，*SGR* の発現を誘導するとクロロフィル *a* の分解に伴ってクロロフィル *b* の分解も始まることが明らかとなった（Shimoda et al. 2016）．本研究はこの現象の原因を明らかにすることを目的とし，Stay Green を農業分野へ応用するための基礎研究を行った．

III. 材料と方法

III−1. 試料

本研究では野生型（WT）にシロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）品種 Colombia ecotype を用いた. *NYC1* と *NOL* はそれぞれの欠損株(SALK_091664, 167A10）を用い，*NYC1 NOL* 欠損株（*nyc1 nol*）は SALK_091664，164A10 を掛け合わせた株を用いた（Horie et al.2008）. 野生型，*nyc1*，*nol*，*nyc1 nol* 株で *SGR* の発現を誘導するために，*SGR* 過剰発現株と掛け合わせ植物を用いた．植物は室温 23 度，24 時間連続光（50μmolE/m^2/s）環境下で 4 週間生育したものを実験に用いた.

SGR 過剰発現体は pOp6 ベクターを改良して *SGR1* を導入し，アグロバクテリウムを用いて植物に導入した（Shimoda et al.2017，Matsuda et al.2017）

III−2. 色素分析

試料は播種後 4 週間の植物の葉を 0.5 cm^2 の大きさにくり抜いて用いた. 抽出には 100%アセトン 200 μl とタングステンビーズを用い, シェイクマスター（バイオメディカルサイエンス）を用いて粉砕した．粉砕後残渣と抽出液を遠心分離（himac CF 15RX：日立製作所， ローター：41T15AP31）した．抽出液をカラム（Symmetry C8 Columns）に移し，色素分析機（島津製作所 SPD-M 10AVP）を用いて分析した. 展開液はメタノール : アセトニトリル : アセトン = 1 : 2 : 1 (v : v : v)の混合液（Zapata b, Zapata et al. 2000）を用い，展開時間を 5 分として 663 nm（クロロフィル *a*）と 646 nm（クロロフィル *b*）を検出波長とした．検出結果は葉面積（0.5 cm^2）で補正した.

III−3. Immunoblot

試料は DEX 処理を行った播種後 4 週間の葉を 0.5 cm^2 にくり抜いたものを用いた．サンプルバッファー（表 1）400 μl を入れて抽出を行う．タングステンビーズの場合は 2 ml チューブを用いる．より確実に破砕するためにグラスホモジナイザーを用いた．破砕したサンプル全量を遠心機（15000 rpm 5 分）にかけ，回収した上澄を泳動ゲル（表 2）に泳動する（200 V，60 分）. 泳動には ATTO AE-6500 を用い，泳動バッファーは表 3，電源は ATTO myPower II 300 AE-8135 を用いた. クロロフィルタンパク（PsaB, PsaC, Lhca1, D1, Lhcb1,

Lhcb４）は 10 µl，酵素（FLAG（SGR），NYC1，NOL）はと 20 µl 用いた．ブロッティングには 7×9 cm のろ紙（Toyo Roshi Kaisha ADVANTEC 400×400 mm）と PVDF 膜（NEF1002001PK）を用いた．使用前にろ紙と PVDF 膜はそれぞれ PBST（表 4）とメタノールに浸した．泳動槽（日本エイドー株式会社）に装填する際は赤いホルダー，ろ紙２枚，PVDF 膜，2%アクリルアミドゲル，ろ紙２枚，黒いホルダーの順にしてブロッティングバッファー（表 5）を用いてブロッティングする（40V 120 分）．スキムミルク（PBST 10 ml　スキムミルク 0.5 g）に浸して 1 時間震とうさせ，PBST で２度洗う．一次抗体は Canget signal 1（10 ml）に 1 µl 加え，二次抗体は Canget signal 2（10 ml）に 0.5 µl 加えた．それぞれ移行前に PBST で２度洗う．二次抗体を反応させた後に PBST で洗い，ECL を添加して 1 分経過した後に検出を行う．

表 1

サンプルバッファー

Sucrose	1g
0.5M Tris-HCl (pH6.8)	2.5ml
10% SDS	4ml
bromophenol blue	a little
water	10ml

表 2

Separation gel	
30% acrylamide stock solution	6ml
3M Tris-HCl(ph8.8)	1.9ml
TEMED	12µl
10% APS	125µl
50% glycerol	0.75ml
water	up to 15ml

Stacking gel	
30% acrylamide stock solution	0.75ml
0.5M Tris-HCl(ph6.8)	1.88ml
TEMED	6µl
10% APS	62.5µl
water	up to 7.5

表 3

泳動バッファー

10X Running buffer	100ml
10% SDS	10ml
water	900ml

表 4

PBS-T

10X PBS	50ml
10% Tween20	5ml
water	450ml

表 5

ブロッティングバッファー

10X blotting buffer	100ml
methanol	200ml
water	700ml

III−4. RNA 抽出と cDNA 合成

播種後 4 週目の植物の葉を 0.5 cm^2 にくり抜き，タングステンビーズと共に 2 ml チューブに入れて液体窒素で凍らせた．シェイクマスターで破砕した後，RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いて抽出を行った．抽出時にキットの RLT1ml に β メルカプトエタノール 10 µl 加えた．抽出した RNA はダブルビーム分光光度計 U-3310（日立製作所）を用いて濃度を計測し，100 ng を cDNA 合成に用いた．cDNA 合成には PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser（TaKaRa）を用いた．RNA 抽出と cDNA 合成は各キットの手引き通りの手順で利用した．

III–5. 発現量解析

半定量的リアルタイム PCR には SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad) と MyiQ2 (BioRad) を用いた. 得た結果は Actin2 (ACT2) で補正した. 使用した各プライマーを表 6 に示す.

表 6　real time PCR のプライマー

ACT2	Fw	CGT ACA ACC GGT ATT GTG CT	MYC2	Fw	TAT GAT TTC TCC GGC GCC TC
	RV	CAG TAA GGT CAC GTC CAG CA		RV	CGA ACT CGA TCT CCG TCT CG
SGR	Fw	CAT TGT CAC ATA AGC GGT GG	ABI5	Fw	GCG GAG TTG GAG AGG AAG AG
	RV	AGT TCC CAT CTC CAT GCA		RV	AAT GTC CGC AAT CTC CCG TT
NYC1	Fw	TTG ATG ACC AAG GAC GGG CGT TA	EEL	Fw	GGA GGC TAA AGG AGG TGG AG
	RV	GCT TTG TAA GAT GAT GAA AGC GCA		RV	GAA GCA GAG TTT GTT CGC CG
NOL	Fw	GCCGAGAGGCAATGAATATGAT	NAC019	Fw	CTC TCC AGC TCA TCG CCG AA
	RV	CCATATGCAGCAAATCTGGGTGTT		RV	ACC ATT CTT TTT CTC CAA ATA AT
EIN3	Fw	TGG ACA GAA GAT GAT CTC AG	NAC055	Fw	ACC AAG TAA GGC GTT ATT CGG T
	RV	TGG TTA TGG ACT GTG GGT TG		RV	AGG TCT TGA CCC GTT TGG AT
ORE1	Fw	ACG AGG CAT CAA GAA TCG TC	NAC072	Fw	CTG GTA GCC ATG GAA GCT CC
	RV	TCA CCA ATG GCA GTA GCA GA		RV	ACA GCT TGT TCT TGA GAT CCA G
ABF4	Fw	GCT CGA AAG CAG GCT TAT AC	NAC046	Fw	AAC AAG AAC GAG CCA TGG GA
	RV	CGC TTC GAC GTT TCT TTC AG		RV	TAC TTC CGA TCC CTC TGG CA

III–6. Native Green gel analysis と色素解析

播種後 4 週後の植物に DEX 処理を施し，5 枚の葉をグラスホモジナイザーで破砕した. 破砕時は 50mM Tris-HCl (pH7.5) 3mL と 5 mM の EDTA をあわせたバッファーを使用した. 破砕後遠心（10,000 *g*, 5 分, 4℃）して得たペレットを 5mM EDTA で 2 度洗浄する. 洗浄後水と同量の solubilizing buffer（0.6 M Tris-HCl [pH 8.8], 1% SDS, 20% [v/v] glycerol）を加えて遠心（10,000g, 1 分）し，上澄 10 µl をポリアクリルアミドゲル（8% アクリルアミド, 41 mM Tris-borate pH 8.64, 直径 5 mm）に泳動した. 泳動は室温 4 度の環境で交流電流 0.5 mA を 1.5 時間流して行った. 泳動には 0.1 % SDS を加えた 50 mM Tris-borate (pH 9.5)を陰極に用い，陽極に 0.1 % SDS を加えた 41 mM Tris-borate (pH 8.64) を用いた. 目的試料である光化学系 II の周辺集光アンテナの 3 量体を 5 mm 幅で切り出した. 切り出した試料を 41 mM Tris-borate (pH 8.64)バッファー中で破砕し，遠心（22,500g, 5 分）で光化学系 II の周辺集光アンテナの 3 量体を抽出した. 抽出液を HPLC にかけて色素分析を行った.

III−7. 電子顕微鏡観察

播種後 4 週後の植物を 2mm×4mm 程度の大きさに切り出して試料にした．その際に 3 枚程度のろ紙を土台にし, HEPES バッファー（60mM HEPES-NaOH, pH7.4，200 mM NaCl，4 mM $CaCl_2$）を含ませた状態で切片を作成した．切り出した試料をキムワイプでくるみ，一次固定液（2.5% グルタルアルデヒド：D.W：HEPES バッファー = 1：4：5）を入れたバイアルで保存した．一次固定に浸した試料は脱気した後に冷蔵庫で保存した．一次固定後 3 度 HEPES バッファーですすぎ, 二次固定に 1% OsO_4 を加えた HEPES バッファー（1% OsO_4：D.W：HEPES バッファー = 1：1：2 ）を用いた．二次固定後 D.W で 3 度洗浄した後にエタノールを使って脱水を行う．液量の半分を抜いてエタノール 0.5 mL を加え，エタノールの濃度を 50，75，87.5，93.8，96.8%にしていき，最終的に 100%エタノールで 3 回脱水する．各行程 15 分ずつ行う．次にエタノール：プロピレンオキサイド = 1：1 の混合液に 5 分浸し，100 % プロピレンオキサイド に 2 回各 5 分浸して透徹置換した．次にプロピレンオキサイド：EPON = 1：1 の混合液に 45 分浸した後 100% EPON に 3 回各 60 分浸して包埋した．3 回目に包埋板に移し，その後 60 度のオーブンで 48 時間加熱して重合した.

III−8. CO_2 吸収量計測

播種後 4 週間の SGR/WT を試料として LI 6400（LICOR inc., Lin-coln, NE, USA）を用いて計測した．計測時は LED ライト（10%Blue）を用い，光量を 100μmol/E とした．その他葉温を 25℃，リファレンス CO_2 濃度を 400ppm で計測した.

III−9. クロロフィル蛍光計測

播種後 4 週目の植物に DEX 処理を行った. 光合成最大光子収率（Fv/Fm）と熱放散（NPQ）の測定には PAM（ Plus amplitude modulated fluorometry ）-2000 を用いた. 計測する植物は計測前に 20 分間暗箱（ASKRE）に静置し， 3 個体について計測を行った.

IV. 結果

IV−1. *SGR* 誘導後のクロロフィル量の変化

SGR はクロロフィル *a* だけに作用する（Matsuda et al. 2016，Shimoda et al.2016）が，*SGR* の発現を誘導した植物ではクロロフィル *a* の分解とあわせてクロロフィル *b* の分解が観察された（Shimoda et al. 2016）．クロロフィル *b* の分解は *Non Yellow Coloring 1*（*NYC1*）と *NYC1 LIKE*（*NOL*）が関わる（Kusaba et al. 2007，Sato et al 2008 ）ため，*SGR* の発現が何らかの機構で *NYC1* や *NOL* の発現を誘導してクロロフィル *b* の分解が始まると考えた. 試料には野生型，*NYC 1* 欠損株（*nyc1*），*NOL* 欠損株（*nol*），*NYC1-NOL* 欠損株（*nyc1 nol*）と *SGR* 過剰発現株をかけあわせた株（*SGR*/WT，*SGR/nyc1*，*SGR/nol*，*SGR/nyc1 nol*）を用いて HPLC による *SGR* 誘導後のクロロフィル量の変化を解析した（図 7）．なお，試料は DEX によって *SGR* 誘導処理した植物を処理後 48 時間まで育成し，12 時間ごとに採取した．DEX 処理は界面活性剤を含む液体を噴霧するため，界面活性剤やスプレー刺激が植物の遺伝子発現やクロロフィル量の変化に影響するか検証するため，DEX を含まない Mock 処理を行った．図 7 は誤差範囲が大きいため，より傾向がわかるように散布図（図 8）もあわせて示す．

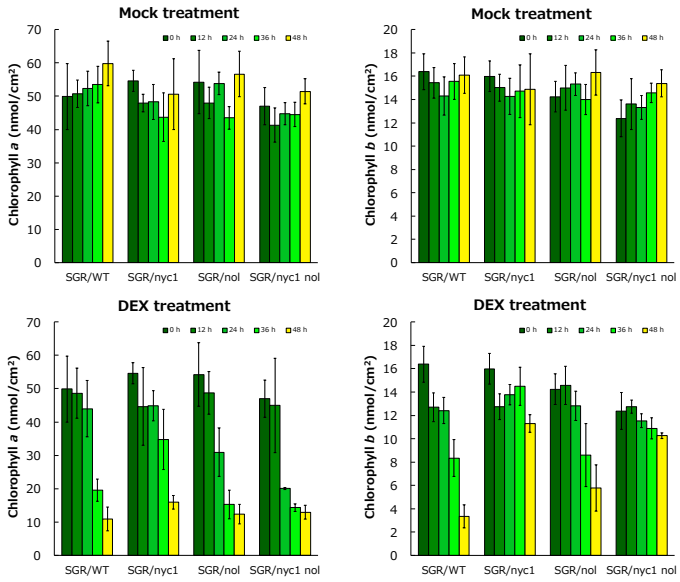


図7　SGR誘導した植物のクロロフィル量の推移

播種後4週目の植物にMock処理（上）・DEX処理（下）を行い，クロロフィル量の推移をHPLCによって計測した（n=3）．クロロフィル*a*（左）は全系統で48時間かけて減少した．クロロフィル*b*（右）はSGR/WTとSGR/nolで減少するが，SGR/nyc1とSGR/nyc1 nolで分解が抑制された．このことから，SGR誘導後にクロロフィル*a*の分解と共に起こるクロロフィル*b*の分解にはNYC1か関与することが明らかとなった．

図 7 と図 8 よりクロロフィル *a* はどの系統でも 20%程度まで減少した.一方でクロロフィル *b* の減少は系統ごとに違いが見られた．*SGR*/WT，*SGR/nol* では *SGR* の発現誘導後の時間経過に伴ってクロロフィル *b* の減少が見られるが，*SGR/nyc1* と *SGR/nyc1 nol* のクロロフィル *b* はほとんど減少しなかった．*NOL* 欠損株である *SGR/nol* はクロロフィル *b* の分解が抑制されず，*NYC1* 欠損株である *SGR/nyc1* でクロロフィル *b* の分解が抑制されることから，*SGR* 誘導後に起こるクロロフィル *b* の分解には *NYC1* の寄与が大きいことが明らかとなった.

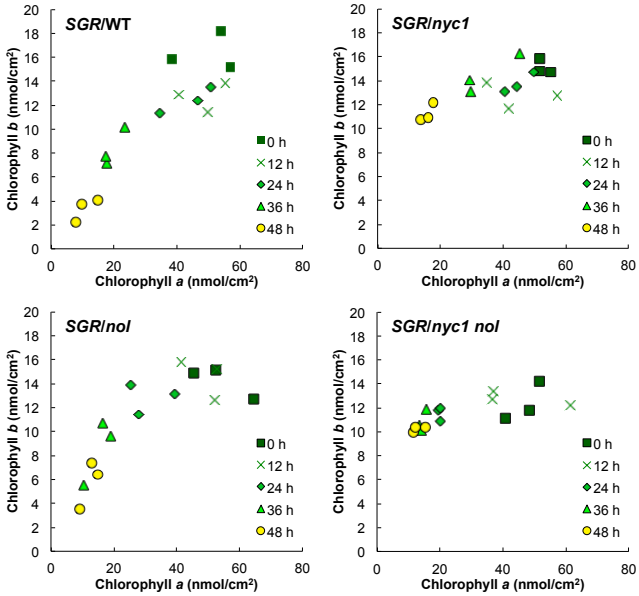


図8　SGR誘導後のクロロフィル量の推移（散布図）

DEX処理した播種後4週目の植物において，48時間でクロロフィル*a*,*b* がどのように推移していくのかを示す（横軸：クロロフィルa，縦軸：クロロフィルb）．*SGR*/WTと*SGR*/*nol*はクロロフィル*a*,*b* 共に減少するため，原点に向けて減少した．*SGR*/*nyc1*と*SGR*/*nyc1 nol* はクロロフィル*b*の減少が抑制されるため，縦軸の切片10に向けて推移していた.

また，クロロフィル *b* と *NYC1* の関係を暗処理で明らかにした先行研究があり(Horie et al. 2009)，本研究においても DEX による *SGR* 誘導と並行して暗処理によるクロロフィル *b* と *NYC1* の関係を検証する実験を行った（図 9）．試料には DEX 処理と同じように *SGR*/WT，*SGR/nyc1*，*SGR/nol*，*SGR/nyc1 nol* を用いた．9 日間暗処理した結果（図 10），クロロフィル *a* はどの系統でも減少していた.クロロフィル *b* はDEXによるSGRの発現誘導と同じように*SGR*/WTと *SGR/nol* で分解されていたが, *SGR/nyc1* と *SGR/nyc1 nol* で分解が抑制されていた．以上より，*SGR* の誘導によるクロロフィル *b* の分解には *NYC1* が大き

く寄与していることが明らかとなった.

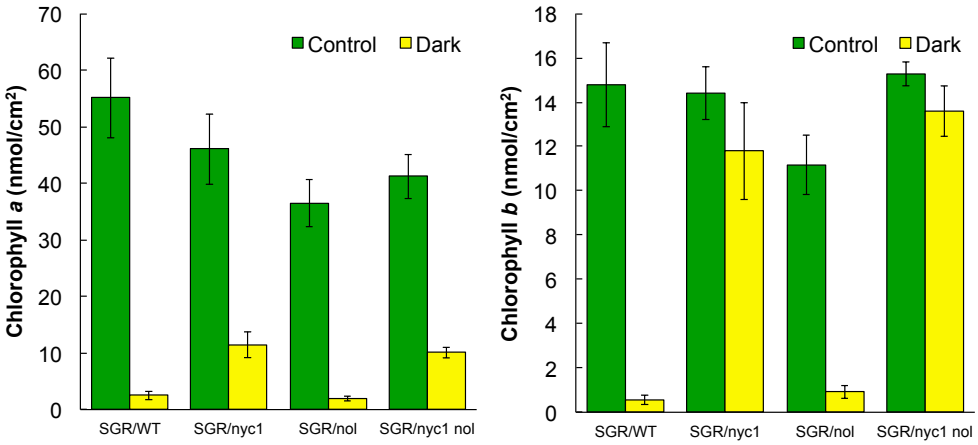


図9　暗処理によるクロロフィル分解

播種後4週目の植物の葉をくり抜き，9日間暗処理を行った（n=3）．その結果，クロロフィル*a*は全系統で暗処理後に減少しているが，クロロフィル*b*はSGR/nyc1とSGR/nyc1 nolで分解が抑制されていた．この結果はHorie(et al.2009)と一致しており，クロロフィルbの分解にはNYC1の寄与が大きいことが再確認され，本研究でのSGR誘導後にクロロフィルaの分解に伴って起こるクロロフィルbの分解にもNYC1が寄与することを裏付けることとなった．クロロフィル量を計測した結果，SGR/WTとSGR/nolはほとんどクロロフィルが検出されず，SGR/nyc1とSGR/nyc1 nolは未暗処理の試料とほぼ同じ量のクロロフィルが検出された．

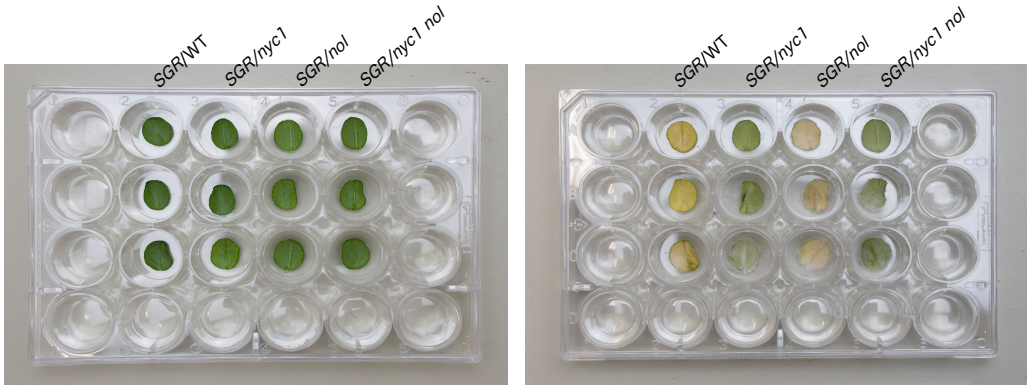


図10　暗処理前（左）と暗処理後（右）

左からSGR/WT, SGR/nyc1, SGR/nol, SGR/nyc1 nol．播種後4週目の植物を0.5cm2にくりぬき，9日間暗処理を行った．96穴プレートの葉を入れていないところに水をはり，乾燥対策を行った．水を入れたため，暗処理後はカビが発生している試料もあるが，クロロフィル量に影響しないと判断した．クロロフィル量を計測した結果，SGR/WT，SGR/nolはほとんどクロロフィルが検出されず，SGR/nuc1，SGR/nyc1 nolは未処理の試料とほぼ同じ量のクロロフィルbが検出された．

IV–2. DEX 処理後の SGR と NYC1 の発現

NYC1 はクロロフィル *b* 分解に寄与するため，成長期ではなく老化期に発現する．また，HPLC（図 7，8）より，*SGR* の発現誘導に伴って行われるクロロフィル *b* 分解には NYC1 が関わっていることが明らかとなった. これより, *SGR* 誘導後に *NYC1* の発現が誘導されると仮説をたてて，Immunoblot によるタンパク質の蓄積の確認（図 11）と real time PCR による遺伝子発現解析（図 12）を行った．なお，解析に用いる *SGR* の一次抗体は検出感度が低いため，*SGR* に付加した FLAG 配列を検出した. Immunoblot には *SGR*/WT と *SGR/nyc1 nol* を供試した．それぞれに DEX 処理と Mock 処理を行い，12 時間ごとに処理後 48 時間までを試料として採取した．real time PCR は *SGR*/WT を用い，DEX 処理と Mock 処理を施した植物を試料とした．試料は Immnuoblot と同様に 12 時間ごとに処理後 48 時間まで試料を採取した.

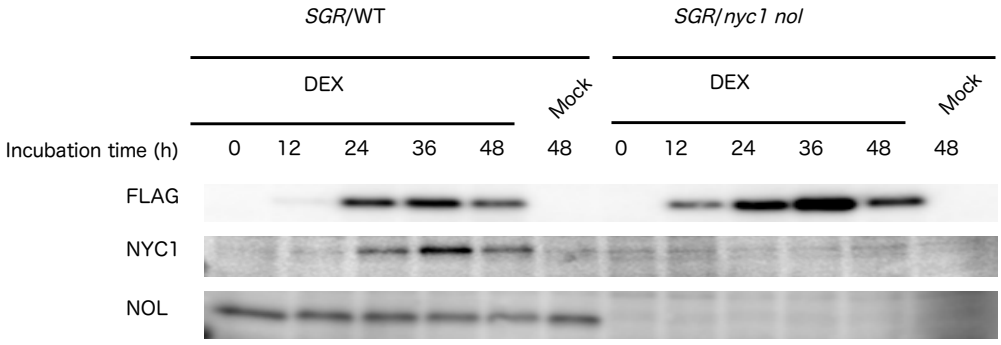


図11　DEX処理後のSGR,NYC1,NOLのタンパク蓄積

播種後4週目の植物（SGR/WT，SGR/nyc1 nol）にMock・DEX処理を施し，SGR,NYC1,NOLがそれぞれ処理後何時間後にタンパク質を蓄積し始めるのかをImmnoblotによって検証した．SGRの一次抗体は反応が弱く検出しにくいため，FLAG配列の一次抗体を用いてFLAG配列を検出対象とした．また，SGR/nyc1 nolはNYC1,NOLの欠損株なのでNYC1,NOLは検出されない．SGR/nyc1 nolにおいてDEX処理後12時間後にFLAGの蓄積が観察され，SGR/WTでは24時間後に蓄積が観察され,どちらも処理後36時間での蓄積が顕著であった．NYC1はDEX処理後24時間後から蓄積が観察され，36時間後に最も蓄積量が増えた．NOLは常に蓄積が検出された．SGR/WTにおいて，DEX処理後24時間後にFLAGとNYC1が検出されているが，FLAGの検出量が多いことから，FALG（SGR）の発現がNYC1の発現に寄与していると考えた.

Immnoblot の結果（図 11）より，*SGR/nyc1 nol* において *SGR*（FLAG）は DEX 処理後 12 時間後から検出され始め，36 時間で最も強く検出されることが明らかとなった．*SGR*/WT では 24 時間で検出されはじめ，*SGR/nyc1 nol* と同じように 36 時間後に最も強く検出される結果となった.

SGR/WT において，*NYC1* は DEX 処理後 24 時間後から検出されはじめ，36 時間後に最も強く検出された．また，*NOL* は DEX 処理による *SGR* 誘導で発現量が変わることはないことが明らかとなった．なお，*SGR/nyc1 nol* は *NYC1* と *NOL* の遺伝子が欠損しているため検出されない．

次に real time PCR によって *SGR*，*NYC1*，*NOL* の発現量を解析した（図 12）．規格化には *ACT2* を用いた．*SGR* は DEX 処理後 12 時間で 3 倍，24 時間で約 20 倍発現量が上がった．36 時間で最も発現量が増加するのは Immunoblot の結果と同じであった．*NYC1* は処理後 24 時間後に DEX 処理と Mock 処理で差が表れ始めた．また，36 時間で発現量が最も多くなり，*SGR* の発現誘導後 24 時間から 36 時間にかけて発現が上がる点が Immunoblot の結果と一致した．*NOL* は Immunoblot の結果と同じように DEX 処理をしても発現量に変化は見られなかった．mock 処理と比較して有意な差が現れたのは *SGR* が発現誘導後 36，48 時間，*NYC1* は 36 時間，*NOL* は 48 時間であった．

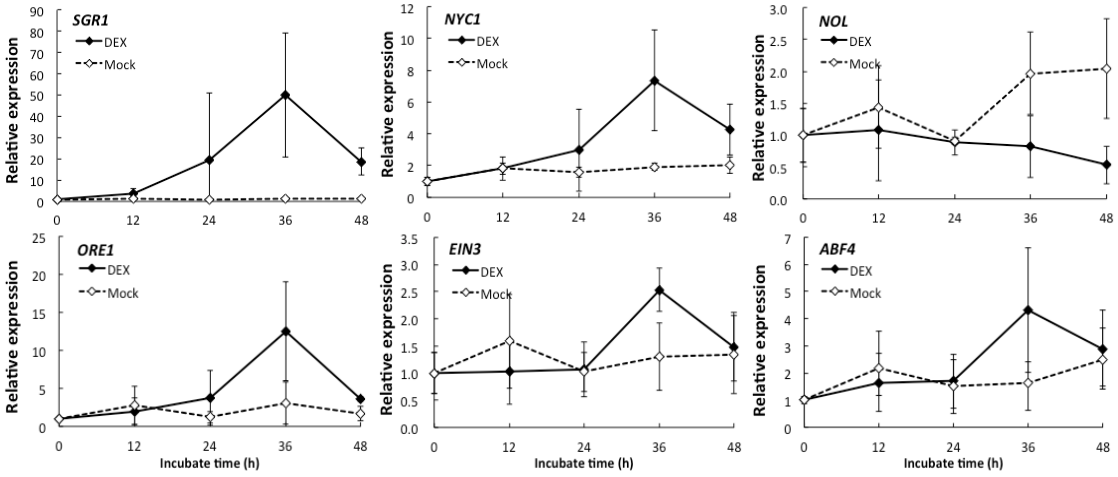


図12　SGR誘導後の遺伝子発現

播種後4週間後の植物（SGR/WT）にMock・DEX処理を行い，各遺伝（SGR,NYC1,NOL,ORE1,EIN3,ABF4）の発現解析を行った（n=3）．ORE1,EIN3,ABF4はSGRやNYC1の発現に関わる転写因子である．DEX処理後最大48時間育てた植物を12時間ごとに採取して供試した．SGRは処理後12時間までに発現量が増加し，処理後36時間でピークを迎えた．NYC1は処理後24時間後からMock処理との差が表れ，SGR同様処理後36時間で発現量はピークを迎えた．NOLはDEX処理後に発現量に変化はなく，Immnoblotと同じ結果となった．ORE1は処理後24時間ごろから発現量の差が観察され始めた．EIN3とABF4は処理後36時間後から発現に差が表れた．SGRがNYC1よりも早い時点で発現するのはImmnoblotの結果と一致した．転写因子のなかでORE1の発現がもっとも早かったことから，本研究でNYC1の発現に関与するのはORE1であると考えた．以上のことから，SGRの発現に影響すると考えられるORE1にSGRが影響し，ORE1からNYC1やEIN3の発現に関与すると考えた．

SGR は酵素であり，*NYC1* の発現を直接誘導することはできない．そこでまずは *NYC1* のプロモーターに結合して *NYC1* の発現に寄与する転写因子の中から *ORE1*（Qui et al.2015），*EIN3*（Qui et al.2015），*ABF4*（Nakajima et al.2014）

の発現量を解析した．解析の結果，*ORE1*，*EIN3*，*ABF4* はどれも 24 時間後から発現が上昇し，36 時間後に最も発現量が多くなった．mock 処理と比較して有意な差があるのは ORE1 が発現誘導後 48 時間，EIN3 は 36 時間であった．ABF4 は有意な差がある時間帯はなかった．

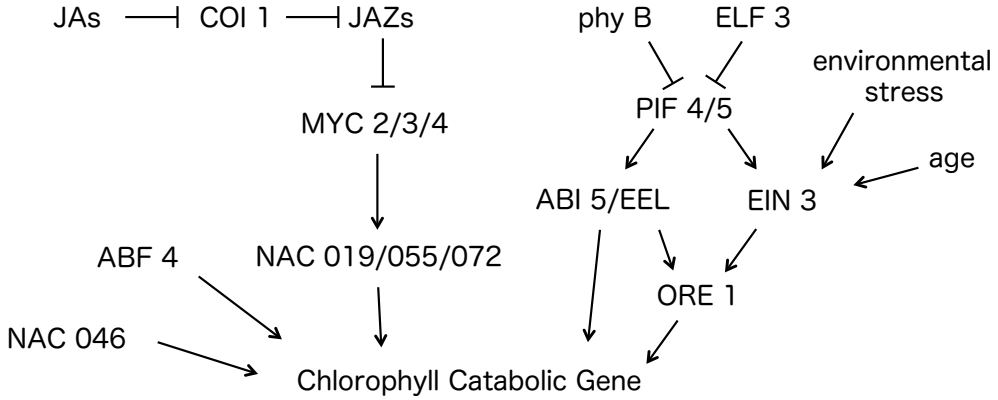


図13　発現量解析を行ったSGRやNYC1の上流にある転写因子

本研究で発現量解析を行ったSGRやNYC1の発現に関わる転写因子の関係図である．Chlorophyll Catabolic GeneにはSGRやNYC1といいたクロロフィル分解に関係する遺伝子が含まれる．発現量解析を行ったNAC019,055/072はMYC2の下流に位置し，ジャスモン酸によって発現が制御されている．ORE1はEIN3やABI 5/EELの下流に位置し，光ストレスや月齢などによって発現が誘導される． NAC046やABF4は老化によって発現が誘導される．

ORE1 の発現について，*SGR* の遺伝子発現誘導後 24 時間後に転写量が増えて 36 時間で発現量が最大となった． *ORE1* が *NYC1* の発現を誘導しているとすると *NYC1* の発現量が増加するまえに *ORE1* の遺伝子発現量が増加するはずである．そこで，新たに *NYC1* の発現に関わる他の転写因子（*MYC2*，*NAC019/046/055/072*，*ABI5/EEL*）の遺伝子発現量について real time PCR 法によって解析した（図 13~15）．*MYC2* はジャスモン酸によって誘導され，*NYC1* や *SGR* などのプロモーターに結合して直接発現を誘導する他に，*NAC 019/055/072* などの発現を誘導する(Zhu et al.2015)．*NAC 019/055/072* は *SGR* や *NYC1* などクロロフィル分解酵素の発現に寄与する(Zhu et al.2015)．*NAC046* は *SGR* や *NYC1* など植物の老化に関わる遺伝子の発現を促進させる(Yamamizo et al.2016)．*ABI5/EEL* はクロロフィル分解酵素を誘導し，*EIN3* と同じように *PIF4/5* の下流にあり，*ORE1* の発現に寄与する(Sakuraba et al.2014)．

それぞれの遺伝子の 0 時間の発現量と比較して解析した（図 14，15）．MYC2 は DEX 処理後 12，24 時間後に遺伝子発現量が 3 倍となった．*NAC019* は 12 時間後に 3 倍，18 時間後に 20 倍，24 時間後に最大の 40 倍となった．*NAC055*

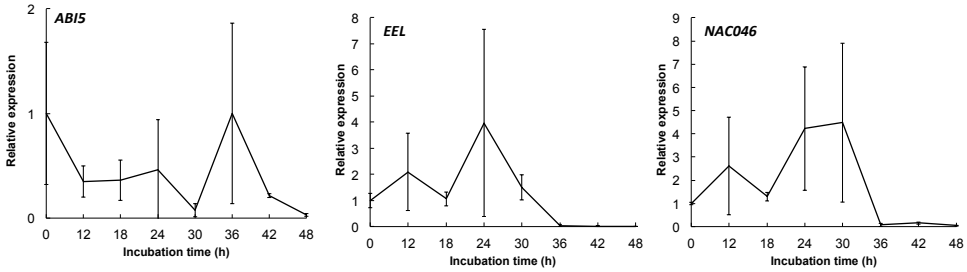


図14　SGR誘導後のNYC1発現にかかわる老化関連の転写因子の発現量変化

老化関連の転写因子とABI5, EEL, NAC046の発現量を解析した（n=3）．36時間で発現量はピークを迎えた．NOLはDEX処理後に発現量に変化はなく，Immnoblotと同じ結果となった．ABI5は増加が見られず，EELは処理後24時間で最大4倍になった．NAC046は処理後30時間後に最大5倍となった．ORE1の発現量が顕著に増加して降り，ORE1はSGR誘導後のNYC1の発現誘導に関与していることが示唆された．

は 12 時間後に 3 倍，18 時間後に最大の 85 倍，24 時間後に 47 倍，30 時間後に 45 倍となった．*NAC072* は 12 時間後に 2 倍，18 時間後に 4 倍，24 時間後に 12 倍，30，36 時間後に 13 倍となり，42 時間後に最大 50 倍になった．*ABI5* は 12，18，24 時間後に 0.4 倍，30 時間後に 0.08 倍となった．*EEL* は 12 時間後に 2 倍，18 時間後に 1 倍，24 時間後に最大の 4 倍，30 時間後に 2 倍となり，36 時間以降はほぼ発現していなかった．NAC046 は SGR の発現誘導後 24，30 時間に最大 5 倍となったが，36 時間以降はほぼ発現していなかった．各遺伝子で発現誘導後 0 時間と比較して有意な差があるのは MYC2 が 18, 30 時間, EEL が 36〜48 時間, NAC019 が 12, 18, 42 時間, NAC046 が 36〜48 時間, NAC072 が 42，48 時間，NAC055 は 18，42，48 時間であった．ABI5 は有意な差がな

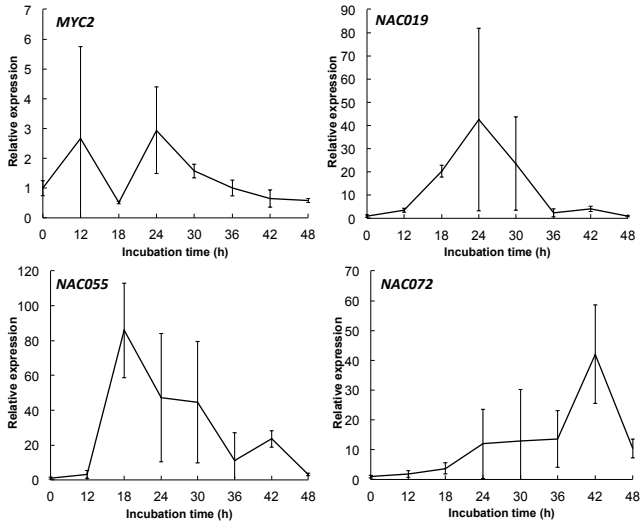


図15　SGR誘導後におこるNYC1発現にかかわるジャスモン酸関連の転写因子の発現量変化

ジャスモン酸関連のMYC2，NAC019/055/072発現量を解析した（n=3）．MYC2の発現量は最大で2倍であった．NAC019は処理後12時間から発現量が増加し，処理後24時間で最大40倍となった．055は処理後12時間以降に発現量が増加し，処理後18時間で最大80倍になった．072は処理後18時間以降から発現量が増加し，処理後42時間で最大40倍となった．MYC2の発現量の増加は小さかったが，NAC-19/055/072の発現量の増加が確認された．このことから，SGRの発現誘導後のNYC1の発現にはNAC019/055/072が関与していると考えられる．

かった.

以上より，*SGR* の発現誘導に伴って *NAC019/055/072* や *ORE1* の発現量が 10 倍以上に増加すること，そして *ORE1* や *NAC* といった転写因子の上流にある *MYC2* や *EEL* の発現量が *SGR* の発現誘導後に 3 倍程度に増加することが明らかとなった．特に *NAC019/055/072* の増加が *NYC1* の発現量増加前に起こることから, *NAC019/055/072* が *NYC1* の発現を誘導していることが示唆された.

IV−3. SGR 誘導後のクロロフィルタンパクの変化

クロロフィルはクロロフィル結合タンパクの構造安定化に関わるため，*SGR* によってクロロフィル *a* が分解されるとクロロフィル結合タンパクに変化があると考えた．そこで *SGR* の発現によるクロロフィル結合タンパク質の変化を抗体を用いて調べた（図 16）.

試料には DEX 処理によって *SGR* の発現を誘導した播種後 4 週間目の *SGR*/WT，*SGR/nyc1 nol* を用いた．また，*SGR* の発現誘導後の時間経過に伴う葉のタンパク質の蓄積量を調べるため，DEX 処理をしてから 12, 24, 36, 48 時間後の植物を供試した．なお，スプレーによる噴霧処理による影響を検証するため，Mock は界面活性剤と水の混合物を噴霧した.

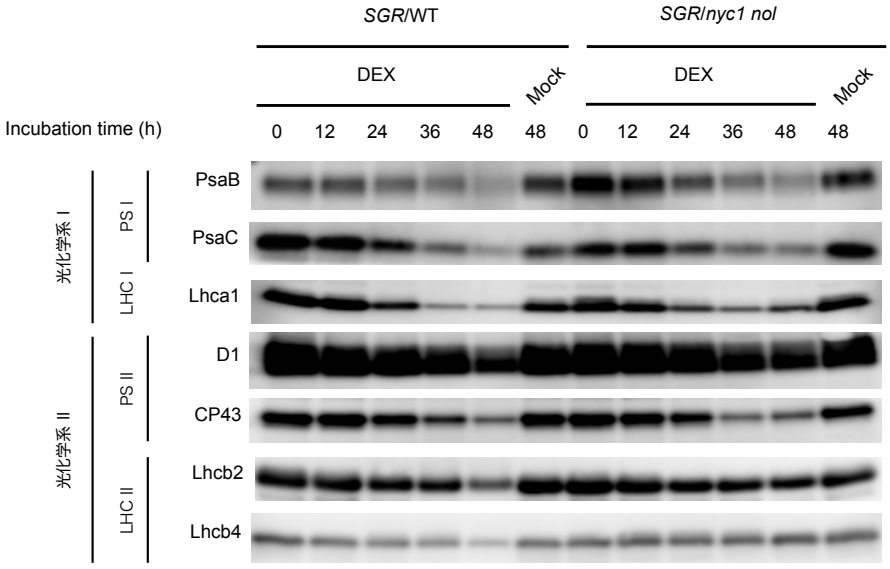


図16　SGR誘導後のクロロフィルタンパクの変化

播種後4週目の植物（SGR/WT,SGR/nyc1 nol）にMock・DEX処理を行い，SGRを誘導した植物のクロロフィルタンパクについて，12時間ごとの変化を追跡した．光化学系Ⅰ（PsaB,C,Lhca1）は両系統でも減少していた．光化学系Ⅱは反応中心複合体（D1,CP43）は両系統で減少していたが，LHCⅡ（Lhcb2,4）はSGR/nyc1 nolで分解が抑制されていた．クロロフィルbはLHCⅡに結合しており，LHCⅡの構造安定に寄与している．SGR/nyc1 nolはクロロフィルbの分解抑制によってLHCⅡの分解も抑制されていると考えた.

解析の結果，*SGR* の発現誘導後に光化学系 I の反応中心/中心集光装置である PsaB と周辺集光アンテナである Lhca1, そして色素を結合していないサブユニット PsaC は *SGR*/WT，*SGR/nyc1 nol* で分解されていた．光化学系 II では反応中心である D1 と中心集光装置 CP43 が光化学系 I と同様にどちらの植物でも分解された. しかし, 光化学系 II の周辺集光アンテナの分解に違いが見られた. 光化学系 II の周辺集光アンテナ（Light harvesting protein complex II：LHC II）はメジャーLHC とマイナーLHC に分けられる．*SGR* の発現誘導後に *SGR*/WT ではメジャーLHC の Lhcb2 とマイナーLHC Lhcb4 がどちらも分解されているが，*SGR/nyc1 nol* ではメジャー・マイナーLHC の分解が抑制されていた.

また, CBB 染色で全クロロフィルタンパクの動態を調べた（図 17）. *SGR*/WT と *SGR/nyc1 nol* 両系統で炭素固定に関わるルビスコ（RbcL）の分解が観察された. そして, Immnoblot 同様 *SGR*/WT では光化学系 II の周辺アンテナ（LHCII）の分解が見られ，*SGR/nyc1 nol* では LHC II の分解抑制が観察された.

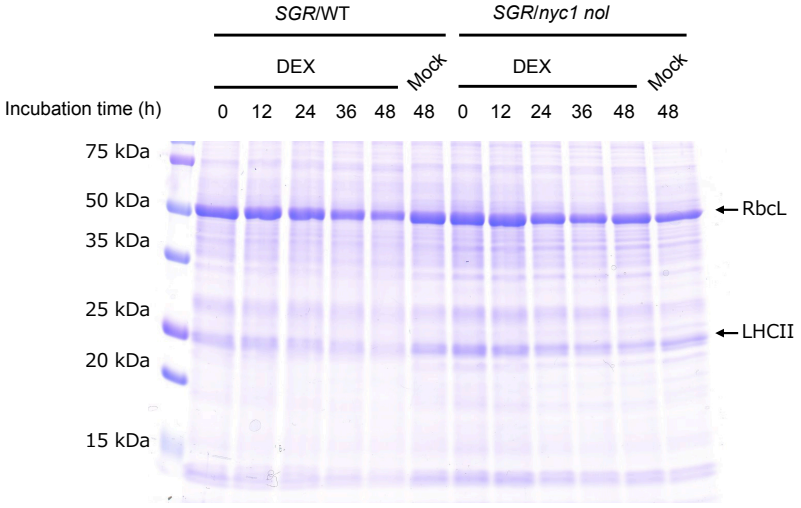


図17　SGR誘導した植物の全クロロフィルタンパクの変化

播種後4週目の植物（SGR/WT，SGR/nyc1 nol）にMock・DEX処理を行い，SGR誘導した植物の全クロロフィルタンパクをCBB染色によって確認した．その結果，ルビスコ（RbcL）は両系統で減少していた．光化学系IIの周辺集光アンテナ（LHC II）はSGR/WTで減少しており，SGR/nyc1 nolでは減少が抑制されていた．このことは図11の結果と一致する．Shimoda （et al.2016）ではルビスコの減少は見られなかった．これは試料の扱い方に違いがあるためと考えた．本研究は植物全体にDEX処理を行ったが，先行研究は切り取った葉にDEX処理していた．本研究はクロロフィルaの分解誘導による老化の開始によって転流が行われるためルビスコが分解され，先行研究は転流がおこなわれないためルビスコの分解が起こらないと考えられる.

IV−4．LCH II3 量体におけるクロロフィルの組成

Immunoblot 解析（図 16）より，*SGR/nyc1 nol* では *SGR* 誘導後に光化学系 II の周辺集光アンテナ（LHC II）の分解が抑制されていることが明らかとなった．健常葉では LHC II は 3 量体で存在・機能するため，*SGR/nyc1 nol* におい

て *SGR* 誘導後に残っている LHC II がどの状態で存在するかを Native Green Gel 法によって調べた（図 18）．クロロフィル–タンパク質複合体は乖離しやすいため，Native Green Gel 法を用いた．

図 18 より，*SGR* の発現を誘導した *SGR/nyc1 nol* では LHC II が 3 量体で存在していることが明らかとなった．

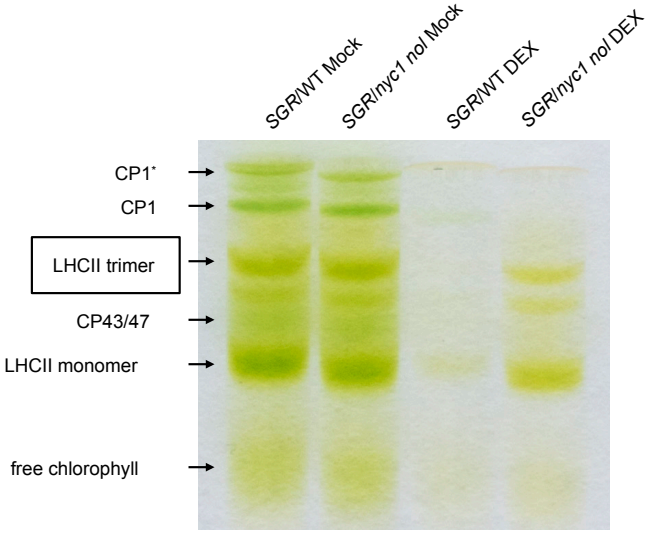


図18　LHC II trimerの存在確認

播種後4週目のSGR/nyc1 nolにDEX処理を行い，SGR誘導した後に周辺集光アンテナ（LHC II）を3量体（trimer）で保持しているかを検証した．LHC IIは健常葉でtrimerで存在・機能している．対照実験としてMock処理のSGR/WTとSGR/nyc1 nolのLHC IIの状態も検証した．SGR/nyc1 nol MockのLHC II trimer がSGR/WTのLHC II trimerよりも色が濃いのはクロロフィルタンパクの抽出・泳動による影響であると考えた．図中のCP1*は光エネルギーによって励起されたCP1を意味する．SGR誘導したSGR/nyc1 nolはLHC II trimerを保持していることが明らかとなった．CP1などのその他のクロロフィルタンパクは分解されており，図11のImmnoblotの結果と一致した．

LHC II はクロロフィル *a* と *b* を含んでおり，nyc1 では LHC II の 3 量体のクロロフィル *a* が分解されないことが明らかとなっている（Horie et al.2007）．そこで，*SGR* が LHC II の 3 量体のクロロフィル *a* を分解できるか否かを調べるために，*SGR/nyc1 nol* の LHC II 3 量体を切り出してクロロフィル *a/b* 比を調べた（図 19）．DEX 処理によって *SGR* の発現を誘導した場合，クロロフィル *a*，*b* 比は Mock 処理の半分程度に低下していた．健常葉の LHC II 単量体にはクロロフィル *a* が 8 個，クロロフィル *b* が 6 個含まれている（Standfuss et al.2005）．これより，健常葉の LHC II 単量体のクロロフィル *a/b* 比は 1.3 になる（式 1）．

$$\frac{クロロフィル\,a}{クロロフィル\,b} = \frac{8}{6} = 1.3 \qquad 式\ 1$$

これをもとに，図 17 より *SGR* を誘導した *SGR/nyc1 nol* のクロロフィルの量を推測した．*SGR/nyc1 nol* はクロロフィル *b* を分解しないことから，式 2 よりクロロフィル *a* の量を求めた．

$$\frac{クロロフィル\ a}{クロロフィル\ b} = \frac{クロロフィル\ a}{6} = 0.6 \qquad 式\ 2$$

式 2 よりクロロフィル *a* = 4.8 となり，健常葉の半分程度のクロロフィル *a* が分解されていることが明らかとなった．これより，*SGR* はクロロフィル *b* が分解されない条件で LHC II に含まれるクロロフィル *a* を分解できることが明らかとなった．分解されなかったクロロフィル *a* は，クロロフィル *b* の存在によって構造が安定化した LHC II 内部にあるクロロフィル *a* と考えられる．

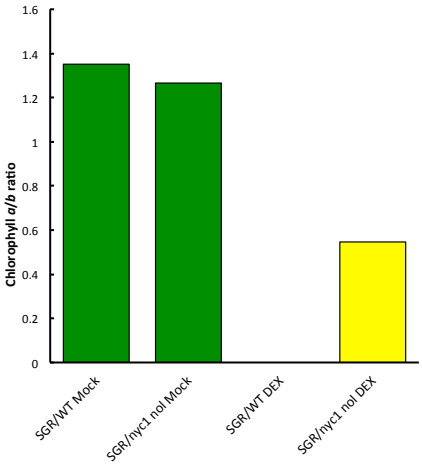


図19　SGR誘導後のLHC II trimerのクロロフィルa/b比

播種後4週目のSGR/nyc1 nolでSGRの発現を誘導させ，3量体で存在する光化学系IIの周辺集光アンテナ（LHC II）のクロロフィルa/b比を算出した．対照実験としてSGR/WT, SGR/nyc1 nolにMock処理を行った．HPLCを用いてクロロフィルa，bを定量して比を求めた結果，SGR/nyc1 nol DEXは0.8，SGR/WT Mockは1.4，SGR/nyc1 nol Mockは1.6であった．クロロフィルa/b比1.5前後であるMock処理に比べてDEX処理をしてSGRの発現を誘導後は約半分となっていた．単量体のLHC IIにはクロロフィルaが8つ，クロロフィルbが6つ結合していることから，SGR誘導後のLHC II単量体にクロロフィルa,bがそれぞれいくつ結合しているかを算出した．SGR/nyc1 nolではクロロフィルbはほとんど分解されない.クロロフィルa/b比が0.6であり，クロロフィルbが5であることから，クロロフィルaは3と求まる．このことから，単量体のLHC IIに７つあるクロロフィルaは，SGR誘導によって分解されるのは全体の半量であることが明らかとなった．これはLHC IIがグラナに存在し，SGRが作用しにくいことによるものと考えられる．

IV–5．SGR 誘導後の葉緑体内の膜構造

Immunoblot（図 16）より，*SGR/nyc1 nol* では *SGR* 誘導後に光化学系 II 周辺集光アンテナ（Lhcb2,4）は分解されないことが明らかとなった．葉緑体内には可溶性画分のストロマと膜画分のチラコイド膜に分けられ，チラコイド膜はさらにストロマに接しているストロマチラコイドとチラコイド膜が重なったグラナが存在する．光化学系 II はグラナに存在するため，*SGR* 誘導後の *SGR/nyc1*

nol ではグラナ構造が存在していることが考えられた．そこで，電子顕微鏡を用いて葉緑体の膜構造を調べた（図 20~44）．2000 倍と 5000 倍の倍率で観察し，各図のスケールバーは 1μm を示している．試料には播種後 4 週目の *SGR*/WT と *SGR/nyc1 nol* を用い，*SGR* の発現誘導後 0，12，18，24，48 時間のものを供試した．図 45~48 に供試した植物の写真と SPAD 値を示す．

SGR/WT について，*SGR* 発現誘導後 0 時間（図 20）では明瞭な包膜やストロマチラコイド，そしてグラナが観察された．健常な葉緑体はラグビーボールに似た形をしており，*SGR*/WT の SGR 発現誘導後 0 時間においてもラグビーボール型をしていることが観察された．また，ストロマチラコイドやグラナが葉緑体内を埋め尽くすように存在している様子が観察された．*SGR* 発現誘導後 12 時間（図 21,22）では 0 時間と似た葉緑体も観察されるが，包膜がいびつになり始めている葉緑体や，ストロマチラコイドが分裂したと思われる葉緑体も観察された．また，0 時間ではチラコイド膜は密集して存在しているが，12 時間になるとチラコイド膜の間隔が開き始めていることが観察された．18 時間の植物（図 23,24）ではグラナの減少や形がいびつになっている葉緑体が観察された. 0 時間の葉緑体ではストロマチラコイドが葉緑体の端から端まで存在しているのに対して，18 時間ではストロマチラコイドが葉緑体の端から離れているものが観察された．24 時間の植物（図 25~31）は包膜が分解されている葉緑体が観察された．また，グラナの減少は *SGR* 発現誘導後 18 時間の植物でも観察されたが，24 時間の植物では断片化したチラコイド膜が観察された．グラナが分解されてストロマチラコイドが観察される葉緑体もあれば，ストロマチラコイドが分解されてグラナが存在する葉緑体も観察された．*SGR* 発現誘導後 48 時間の *SGR*/WT の葉緑体は 2 つに大別された（図 32,33）. 包膜が分解されている葉緑体ではチラコイド膜が観察され，チラコイド膜が分解されているものでは包膜が観察された. また, 細胞外にデンプン粒や分解された葉緑体が観察され，転流と思われる現象が観察された.

次に *SGR/nyc1 nol* について, *SGR* 発現誘導後 0 時間の *SGR/nyc1 nol* は *SGR* 発現誘導後 0 時間の *SGR*/WT と同様にラグビーボール型の葉緑体が観察され，明瞭な包膜やストロマチラコイド，そしてグラナが観察された（図 34）. 12 時間の *SGR/nyc1 nol* ではストロマチラコイドの減少が観察された（図 35）. *SGR*/WT との共通点として, 包膜がいびつになっていた. 18 時間後の *SGR/nyc1 nol* では 12 時間の *SGR/nyc1 nol* と比較してグラナの幅が大きくなっている葉

緑体が観察された（図 36）．24 時間の *SGR/nyc1 nol* では包膜が分解されている葉緑体やグラナかストロマチラコイドか判別できないチラコイド膜の断片が存在する葉緑体が観察された（図 37~39）．*SGR* の発現誘導後 12 時間で包膜がいびつな形になること，そして 24 時間で分解が観察されることは *SGR*/WT と *SGR/nyc1 nol* で共通して観察された．48 時間の *SGR/nyc1 nol* ではグラナの積層が観察された（図 40~44）．積層したグラナから開裂したチラコイド膜が伸びている葉緑体が多く観察された．また，グラナから伸びたチラコイド膜は断片化しているものも観察された．

グラナは負の電荷をもつ光化学系 II 周辺集光アンテナと正の電荷をもつ Mg^{2+}の作用によって構造が作られている．クロロフィル *b* は周辺集光アンテナの安定性に寄与し（Horie et al. 2009），光化学系 II 周辺集光アンテナはグラナの安定に寄与し，イネの NYC1 欠損株では老化期にグラナが厚くなることが明らかとなっている（Kusaba et al. 2007）．Immunoblot や Green Gel の解析（図 16，18）より，*SGR/nyc1 nol* は光化学系周辺集光アンテナが 3 量体で存在していることが明らかとなっている．このことから，*SGR* を発現誘導させた *SGR/nyc1 nol* でグラナの積層が観察されるのは光化学系 II 周辺集光アンテナの作用によると考えられる．

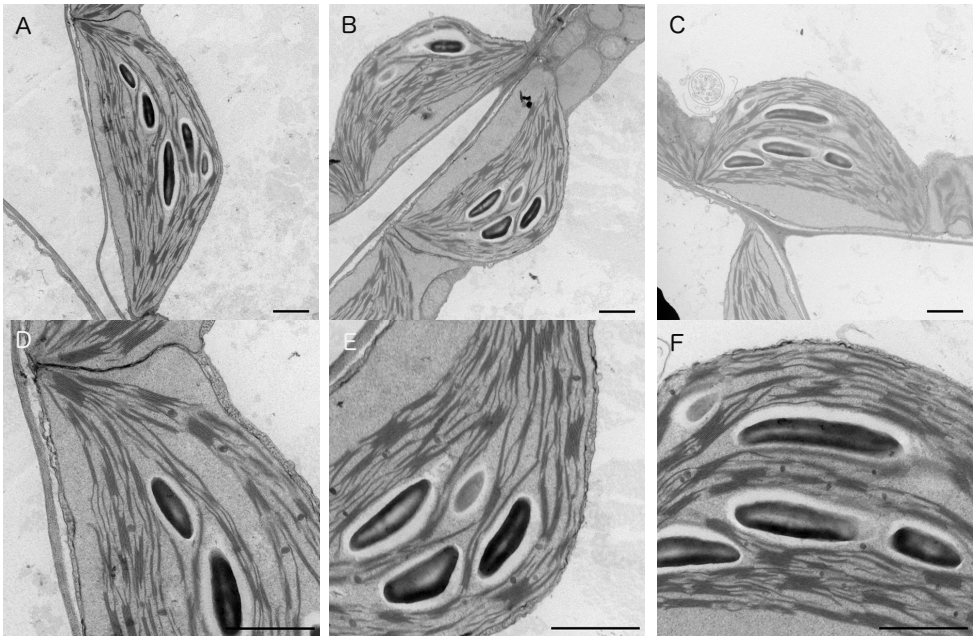


図20　SGR発現誘導後0時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して0時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後0時間では明瞭なグラナやストロマチラコイド，包膜が明瞭に観察された．葉緑体内に存在する黒く長細いものはデンプン粒である．

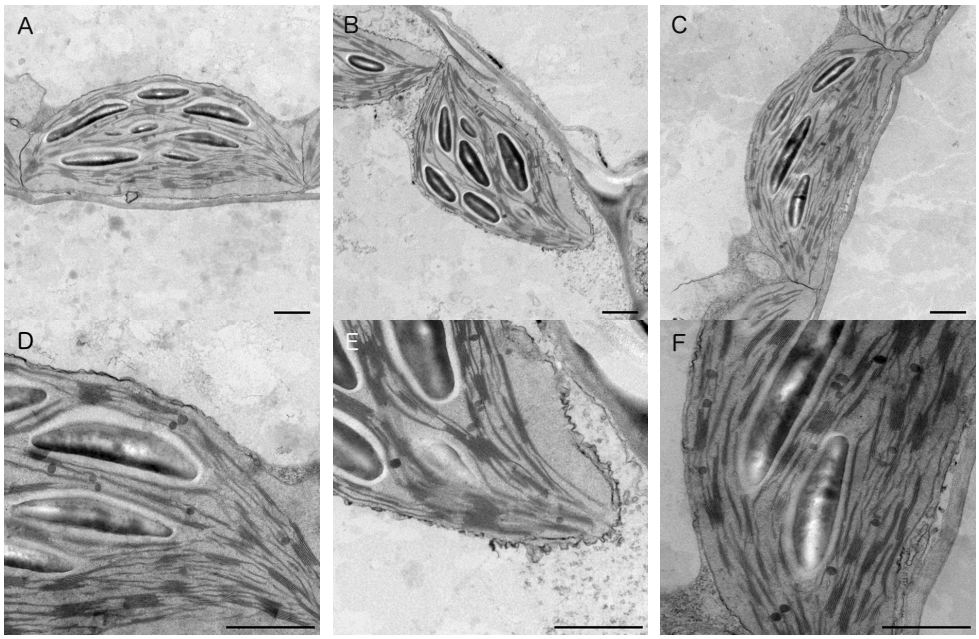


図21　SGR発現誘導後12時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して12時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後12時間では包膜の構造がいびつになっている葉緑体が観察された．これは包膜の分解が始まっているものと考えられる．ストロマチラコイドのが切れているように見受けられる葉緑体も観察された．

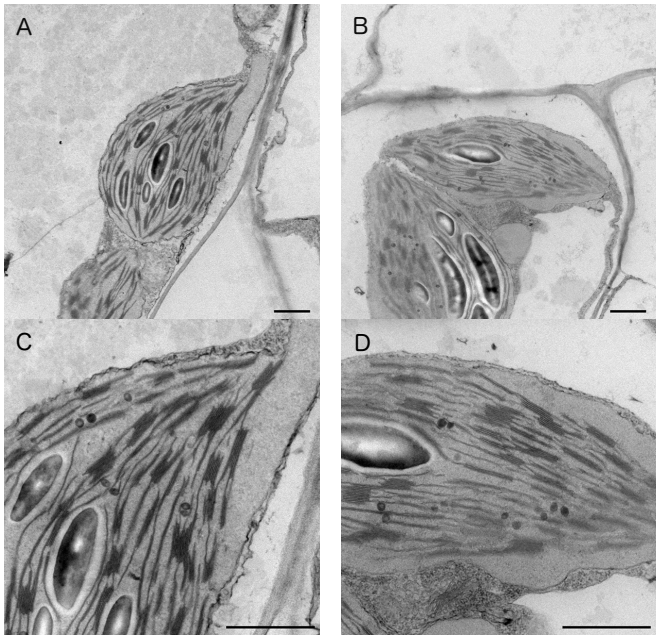


図22　SGR発現誘導後12時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して12時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A，Bは2000倍，C，Dは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後12時間では包膜の構造がいびつになっている葉緑体が観察された．これは包膜の分解が始まっているものと考えられる．ストロマチラコイドのが切れているように見受けられる葉緑体も観察された．

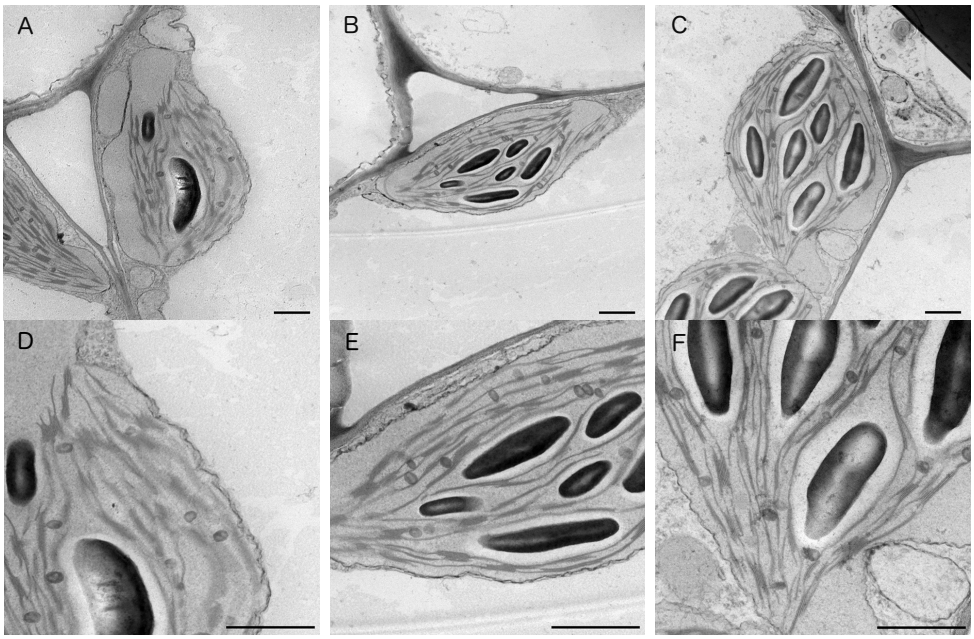


図23　SGR発現誘導後18時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して18時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後18時間では輪郭がいびつになっている葉緑体が観察された．SGR発現誘導後12時間のSGR/WTと比較するとグラナの数が減っている葉緑体が観察されるなど，葉緑体内のチラコイド膜の現象が観察された．

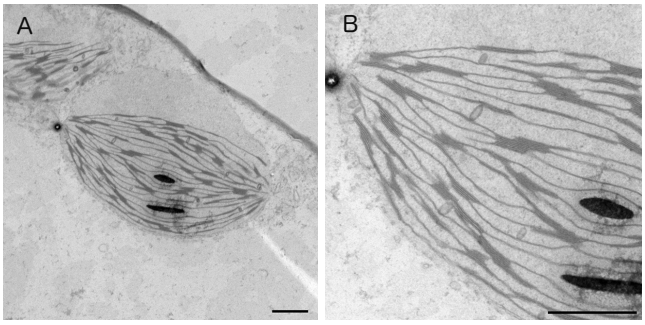


図24　SGR発現誘導後18時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して18時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．Aは2000倍，Bは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後18時間では輪郭がいびつになっている葉緑体が観察された．包膜が完全に分解されている葉緑体も観察された．

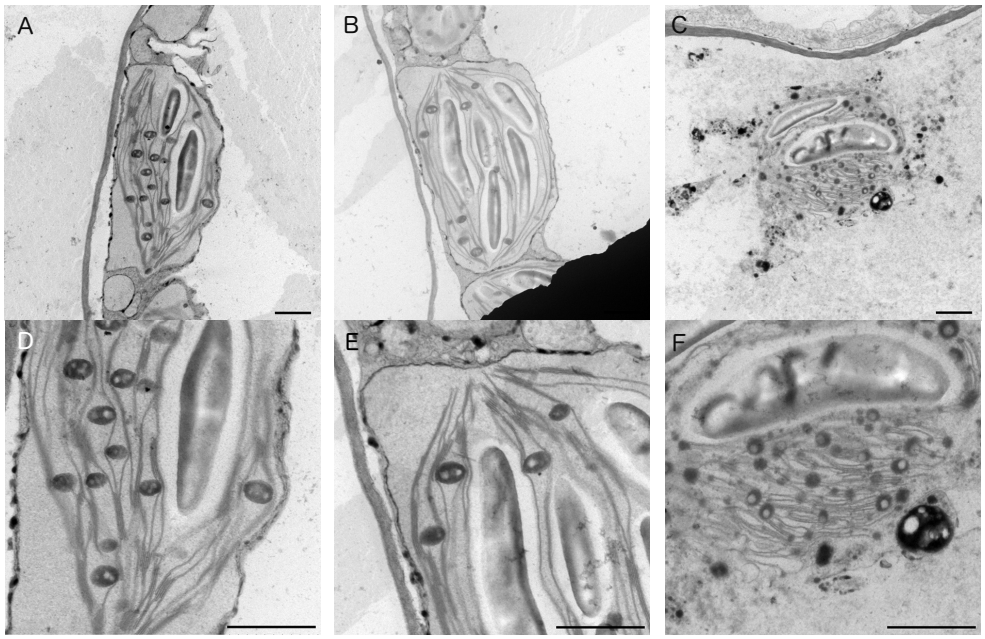


図25　SGR発現誘導後24時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導24時間ではチラコイド膜の分解が起こっている葉緑体と包膜の分解がおこっている葉緑体の２系統に分けられた．

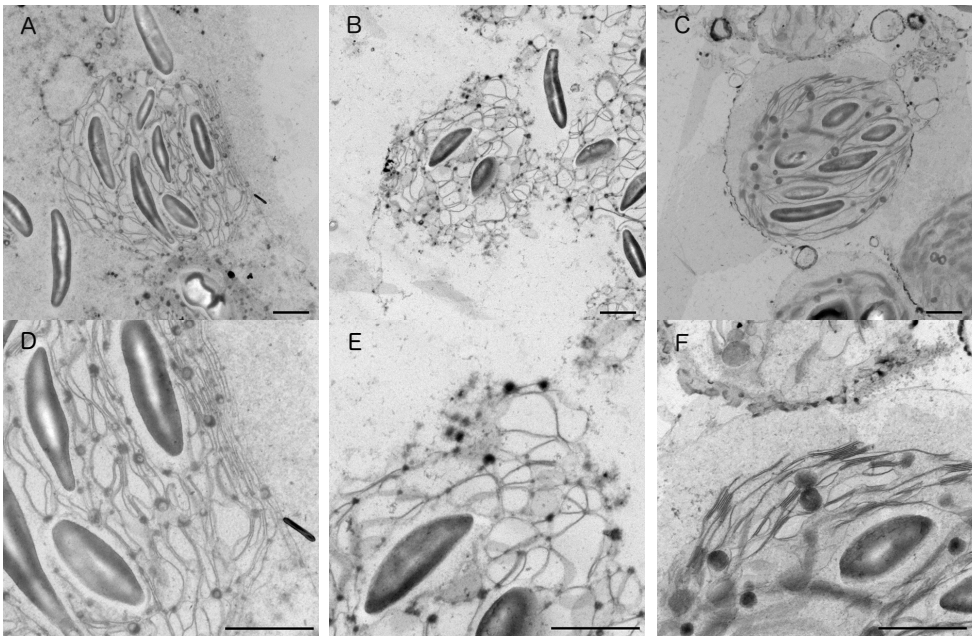


図26　SGR発現誘導後24時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後18時間の植物と比較すると包膜が分解されて輪郭をもたない葉緑体が多く観察された．包膜の分解が起こっている葉緑体ではチラコイド膜と思われる物質が観察された．

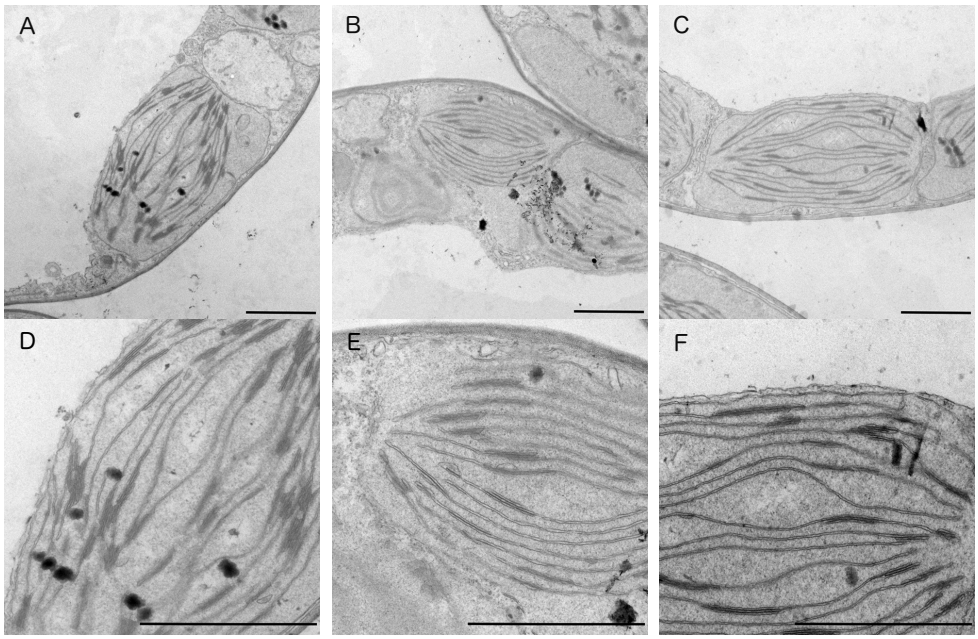


図27　SGR発現誘導後24時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．グラナの数が現象し，ストロマチラコイドが単層で葉緑体内にあることが観察された．

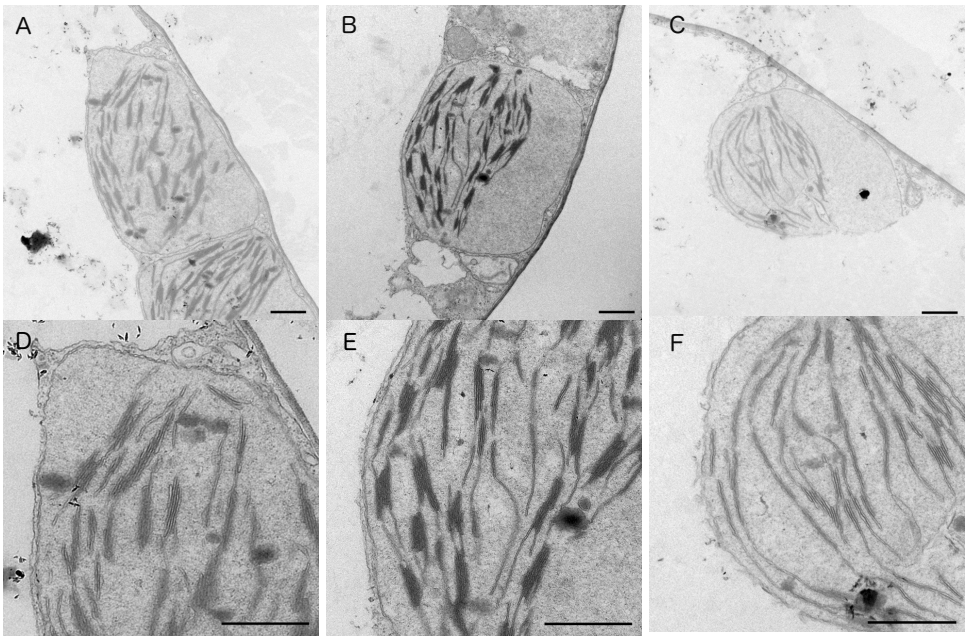


図28　SGR発現誘導後24時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．ストロマチラコイドが分解されてグラナのみで存在している葉緑体が観察された．グラナはSGR/nyc1 nolのようにグラナ同士が接着しているものが観察された．

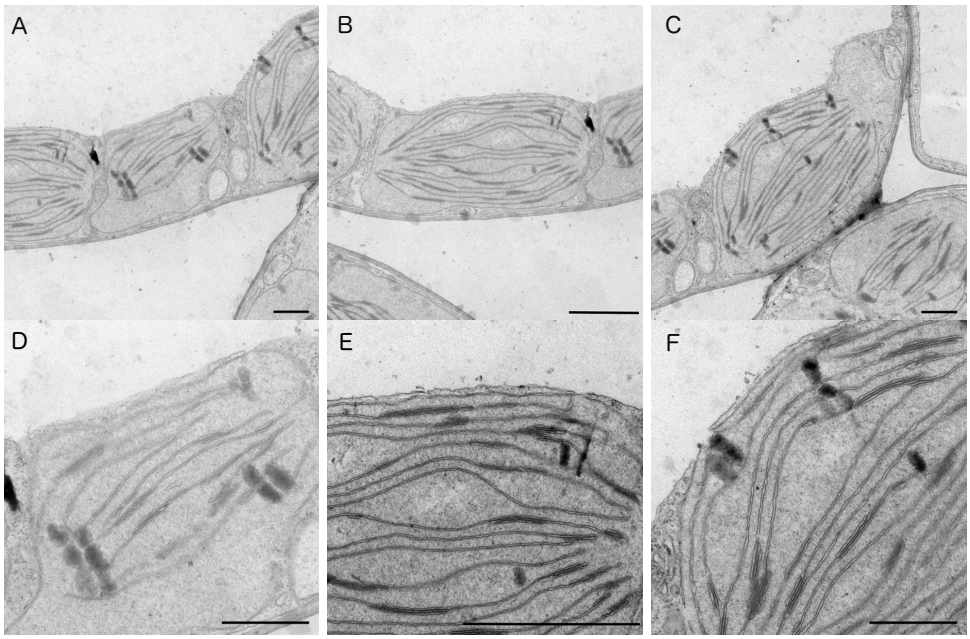


図29　SGR発現誘導後24時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．グラナの数が現象し，ストロマチラコイドが単層で葉緑体内にあることが観察された．

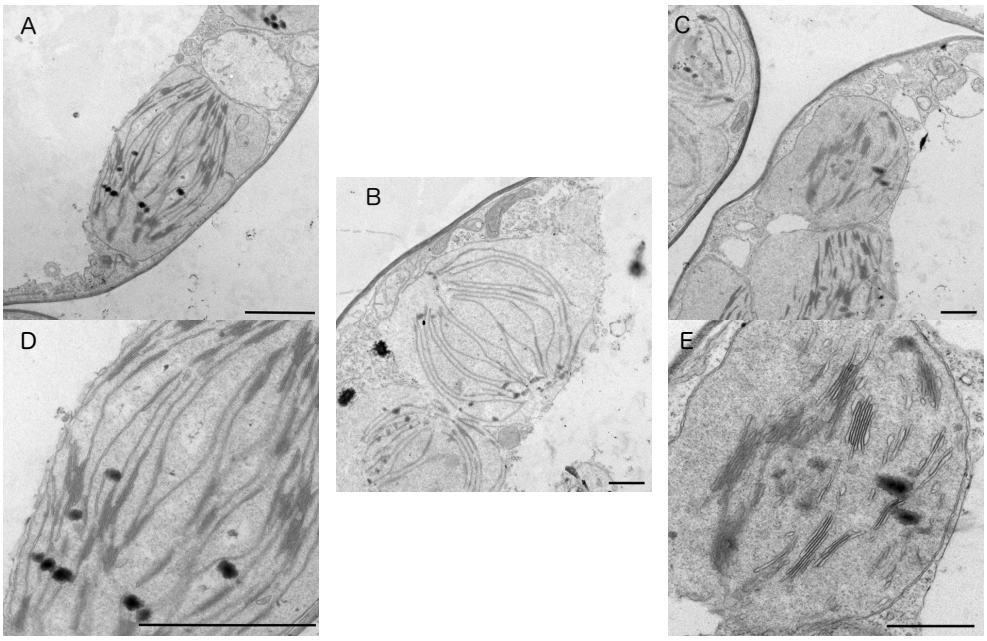


図30　SGR発現誘導後24時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D，Eは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．グラナが完全に分解され，ストロマチラコイドのみになっている葉緑体が観察された．チラコイド膜はグラナが減少しているか断片化している葉緑体が多い．

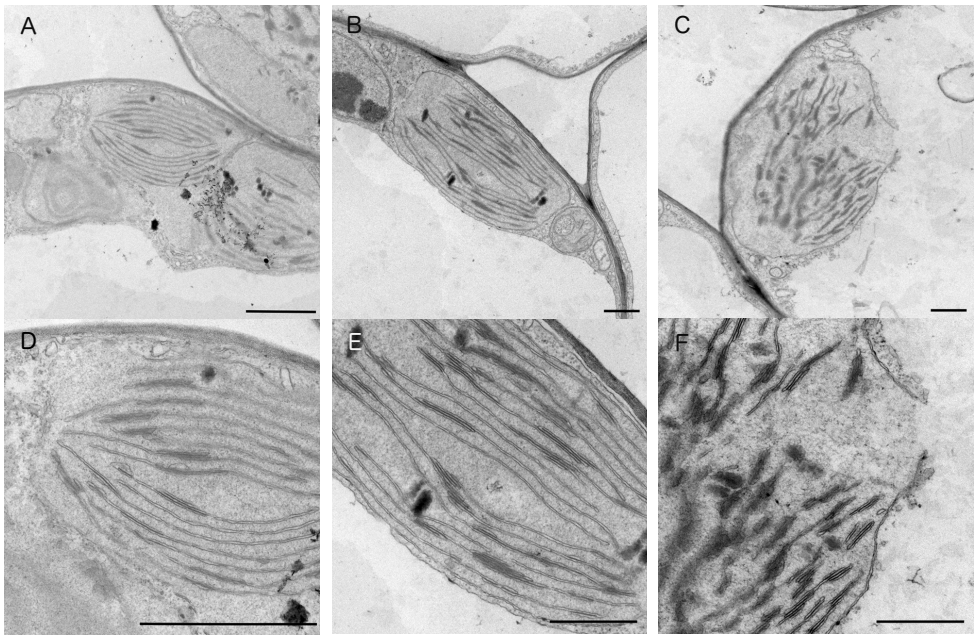


図31　SGR発現誘導後24時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．グラナが減りストロマチラコイドが大半を占めている葉緑体は包膜があり，チラコイド膜が断片化している葉緑体では包膜の分解が進んでいた．

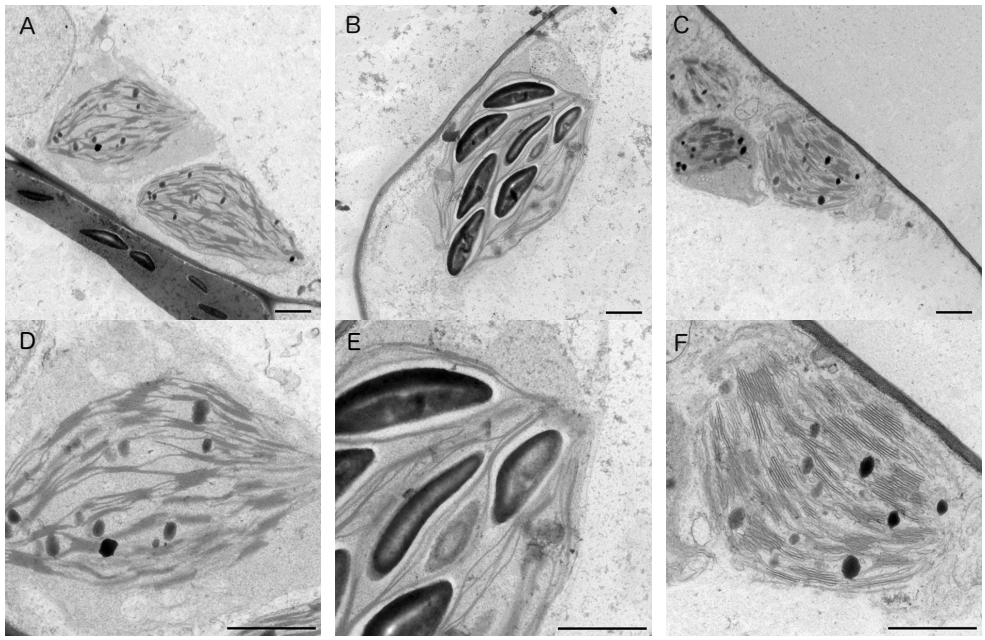


図32　SGR発現誘導後48時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して48時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後24時間の植物と同じようにチラコイド膜が分解されている葉緑体と包膜が分解されている葉緑体に大別された．包膜が分解されている葉緑体では，グラナが分解されてストロマチラコイドのみが残っているように観察された．

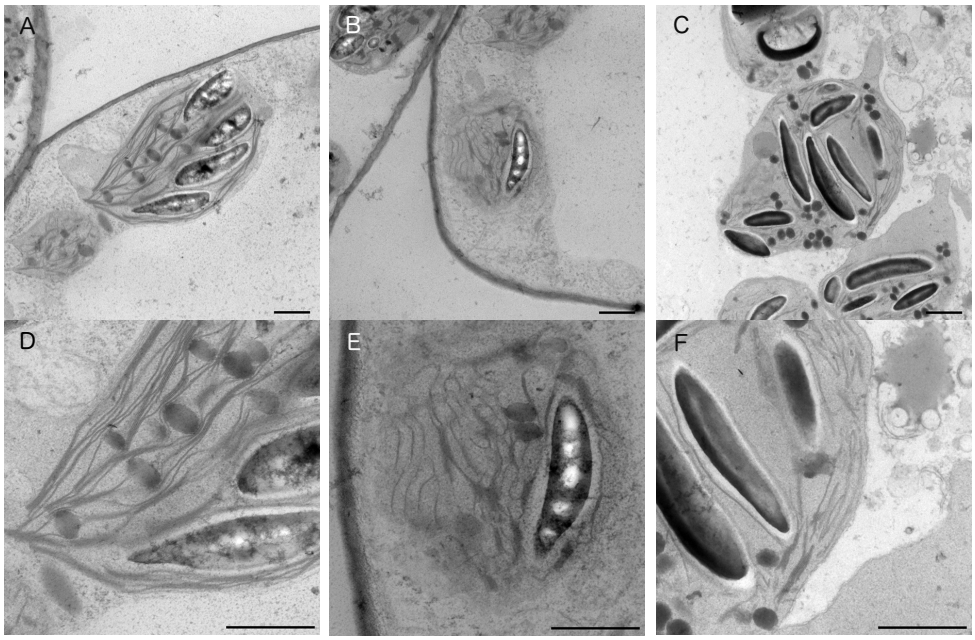


図33　SGR発現誘導後48時間のSGR/WTの葉緑体

SGRの発現を誘導して48時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後48時間の植物では包膜が分解されている葉緑体が多く，チラコイド膜はグラナが分解されてストロマチラコイドのみが残っているように観察された．

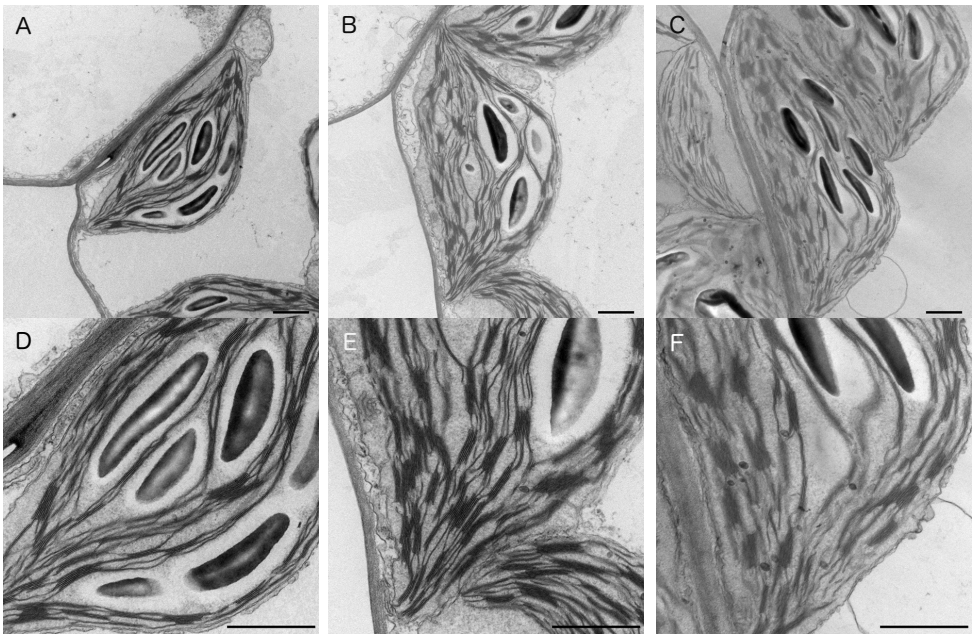


図34　SGR発現誘導後0時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導した播種後4週後のSGR/nyc1 nolの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後0時間ではSGR/WTと同様に明瞭なグラナやストロマチラコイド，包膜が観察された．

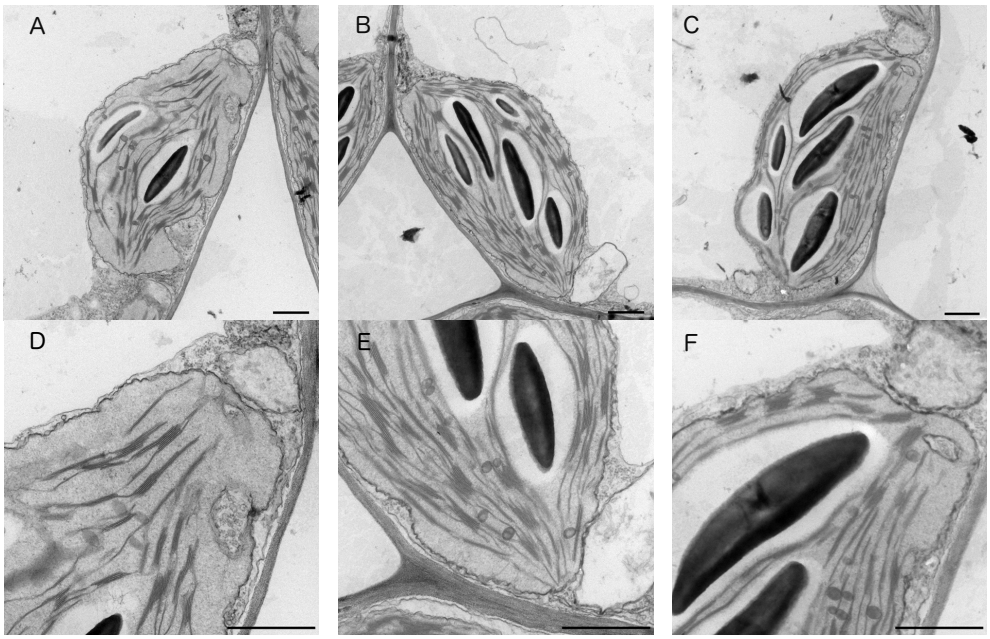


図35　SGR発現誘導後12時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して12時間の播種後4週後のSGR/nyc1 nolの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後12時間では同時間帯のSGR/WTと同様に包膜の構造がいびつになっている葉緑体が観察された．またストロマチラコイドについてもお同じように切れているように見受けられる葉緑体も観察された．

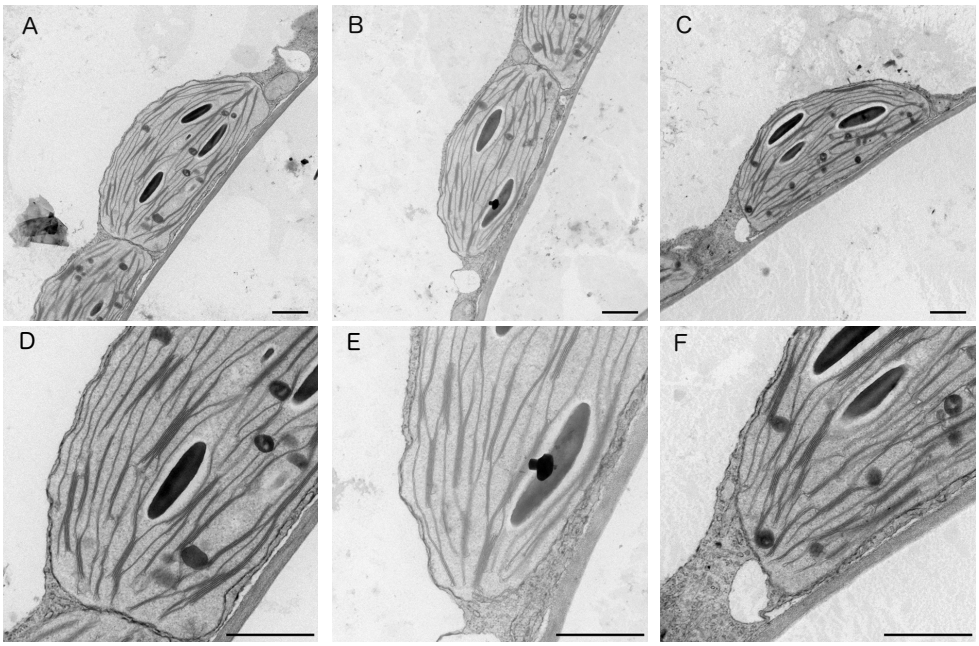


図36　SGR発現誘導後18時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して18時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．同時間帯のSGR/WTと同様に輪郭がいびつになっている葉緑体が観察された．チラコイド膜についてはSGR/WTと同じようにグラナの数が減少している反面，一つあたりの大きさが大きくなっている葉緑体が観察された．

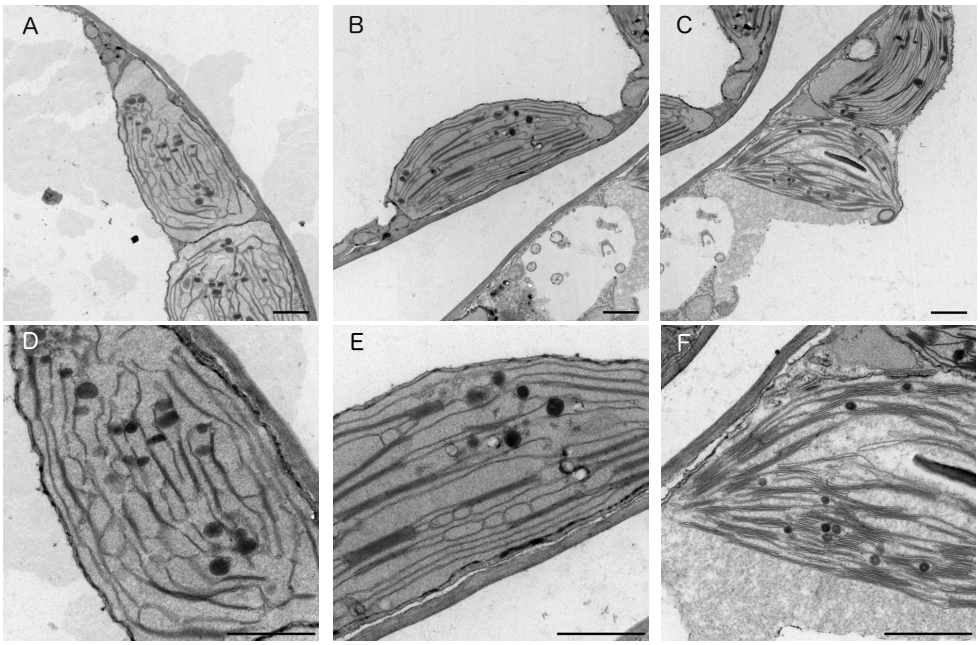


図37　SGR発現誘導後24時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/nyc1 nolの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後18時間のSGR/nyc1 nolと比較するとグラナの大きさがさらに大きくなっているように観察された．包膜が分解されている葉緑体が多く観察された．

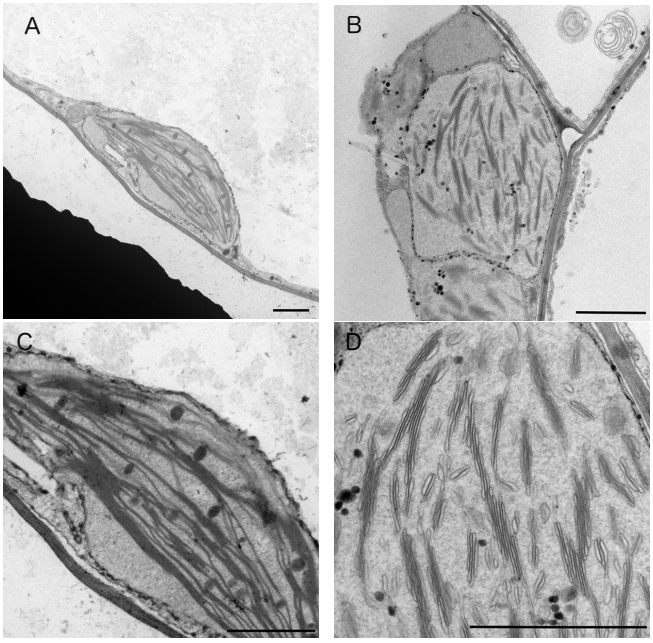


図38　SGR発現誘導後24時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/nyc1 nolの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後18時間のSGR/nyc1 nolと比較するとグラナの大きさがさらに大きくなっているように観察された．包膜が分解されている葉緑体が多く観察された．SGR発現誘導後24時間の植物ではチラコイド膜の断片が観察された．大きさが様々な断片が観察され，細かいものは膨らんでいた．

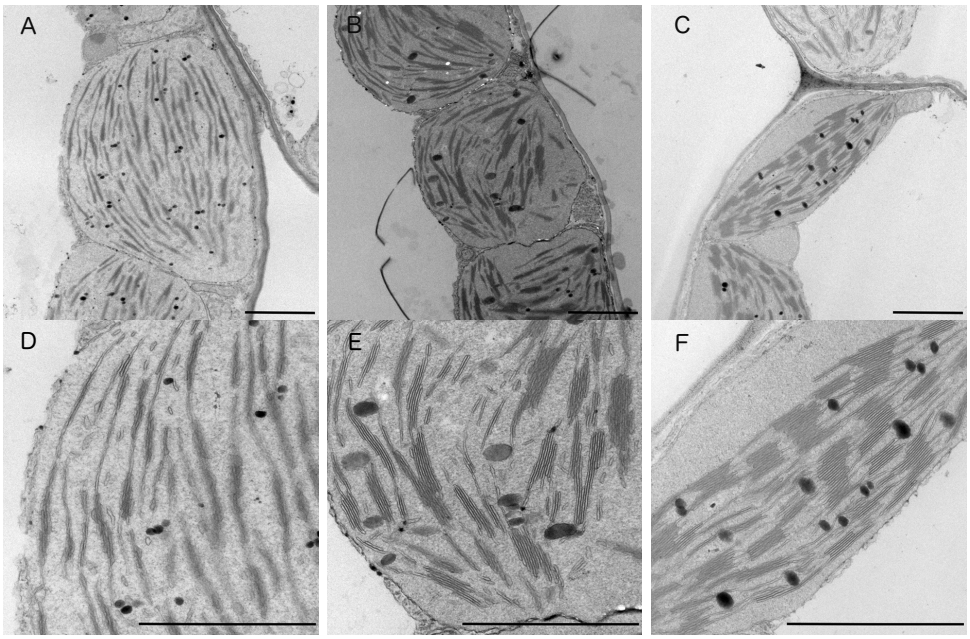


図39　SGR発現誘導後24時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して24時間の播種後4週後のSGR/nyc1 nolの葉緑体を観察した．A~C2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後24時間の植物ではチラコイド膜の断片が観察された．また，断片化したチラコイド膜の合流が観察された．

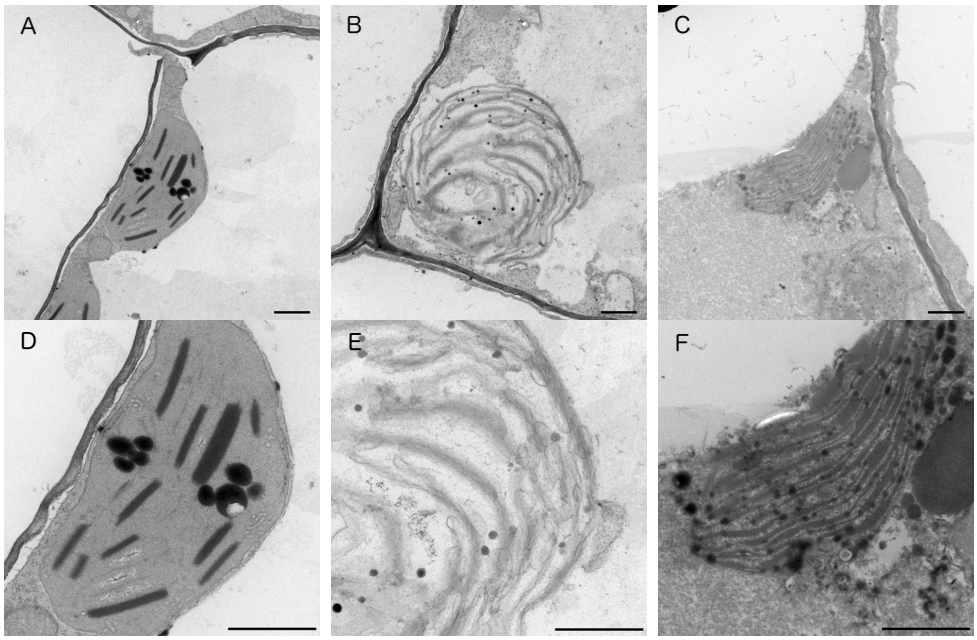


図40　SGR発現誘導後48時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して48時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後48時間ではグラナの積層が観察された．積層が観察された葉緑体ではストロマチラコイドは観察されなかった．一方で包膜が分解されている葉緑体ではグラナの積層は観察されないだけでなく，グラナが観察されなかった．

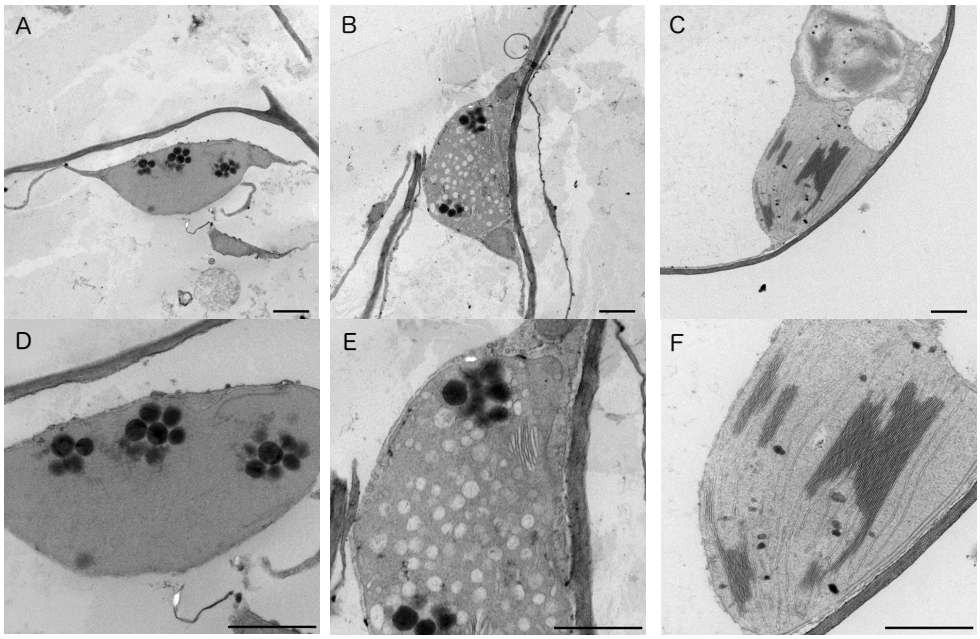


図41　SGR発現誘導後48時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して48時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後48時間ではグラナの積層が観察された．積層が観察された葉緑体ではストロマチラコイドは観察されなかった．一方で包膜が分解されている葉緑体ではグラナの積層は観察されないだけでなく，グラナが観察されなかった．

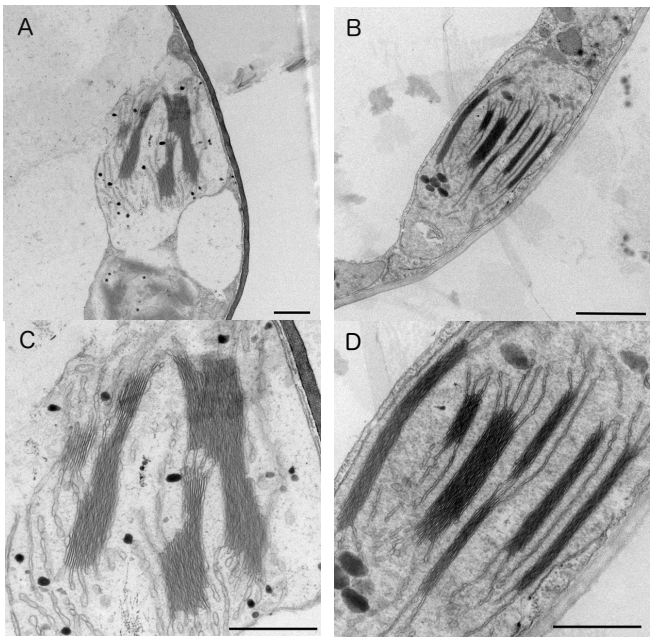


図42　SGR発現誘導後48時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して48時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A，Bは2000倍，C，Dは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後48時間ではグラナの積層が観察された．積層が観察された葉緑体ではストロマチラコイドは観察されなかった．積層しているグラナに繋がっているチライコイド膜は開裂しているものが観察された．また，チラコイド膜の断片が観察された．

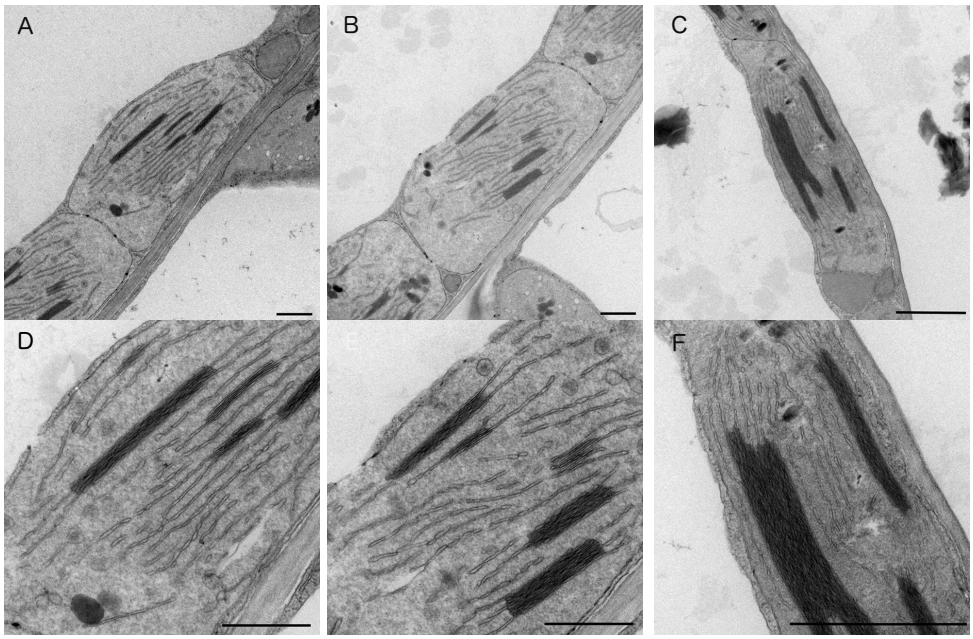


図43　SGR発現誘導後48時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して48時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後48時間ではグラナの積層が観察された．積層しているグラナには開裂したチラコイド膜が結合しており，チラコイド膜の断片も観察された．

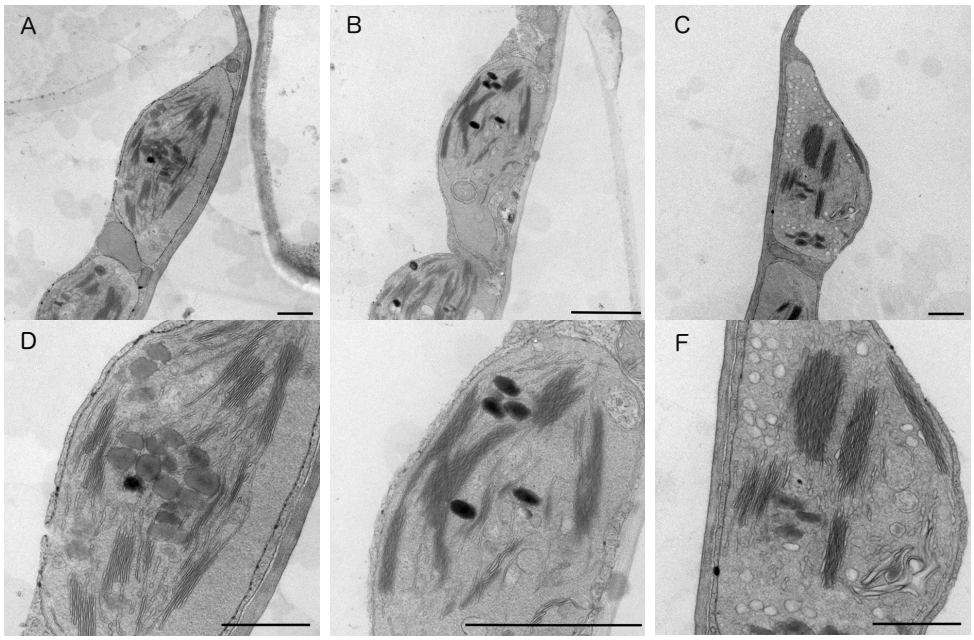


図44　SGR発現誘導後48時間のSGR/nyc1 nolの葉緑体

SGRの発現を誘導して48時間の播種後4週後のSGR/WTの葉緑体を観察した．A~Cは2000倍，D~Fは5000倍である．写真内のバーは1μmを表している．SGR発現誘導後48時間ではグラナの積層が観察された．積層しているグラナから開裂しているチラコイド膜積層が観察された．また，チラコイド膜の断片が観察された．

表 7　電子顕微鏡の各時間のまとめ

	共通点	相違点
0時間	・ ラグビーボールのような形の葉緑体 ・ 明瞭なストロマチラコイドとグラナが見られる	
12時間	・ ストロマチラコイドの減少	
18時間	・ グラナの減少	・SGR/WTは包膜の分解が始まっている葉緑体がある ・SGR/nyc1 nolは一つあたりのグラナが大きくなる
24時間	・ チラコイド膜が断片化する	・ SGR/WTでは包膜やチラコイド膜が分解されている葉緑体が観察され始める ・SGR/WTではチラコイド膜が分解されている葉緑体と包膜が分解されている葉緑体に分けられる
48時間		・ SGR/WTはチラコイド膜と包膜が分解されて形をなしてない葉緑体が多く観察された ・ SGR/nyc1 nolはグラナが厚くなっている葉緑体が多く観察された

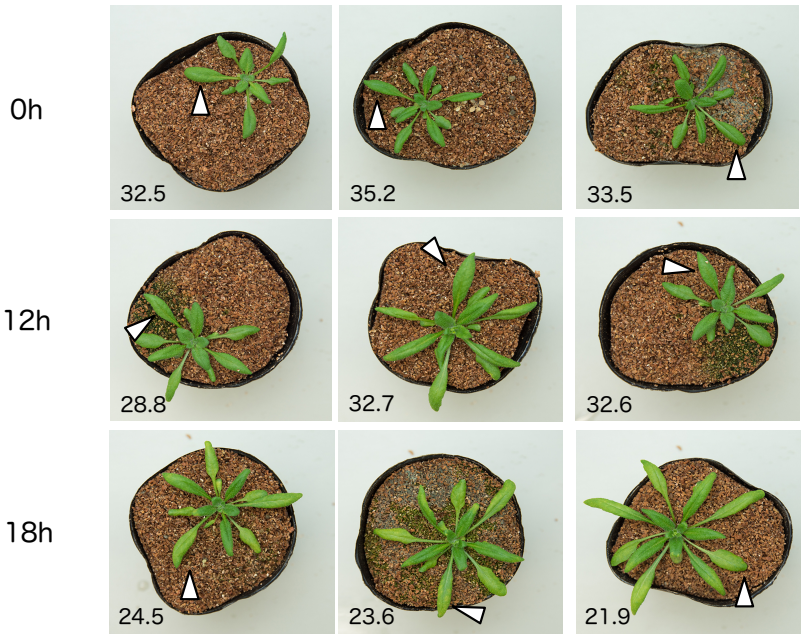


図45　電子顕微鏡観察に用いたサンプル

電子顕微鏡観察に用いたSGRの発現を誘導した播種後4週目のSGR/WT．写真内の数字はSPAD値を表している．

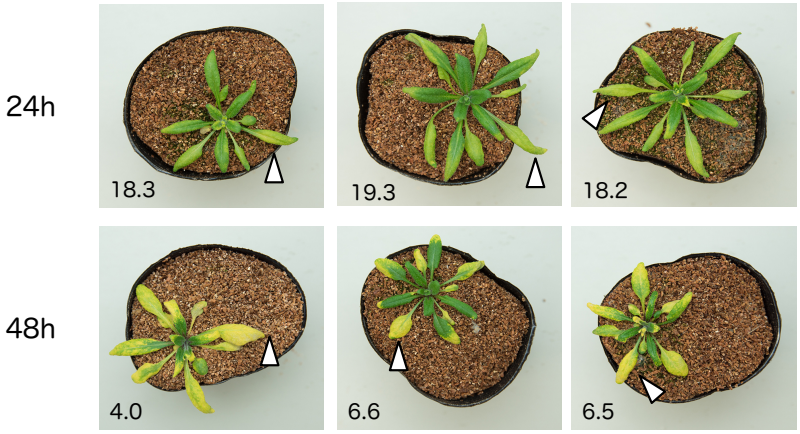


図46　電子顕微鏡観察に用いたサンプル

電子顕微鏡観察に用いたSGRの発現を誘導した播種後4週目のSGR/WT．写真内の数字はSPAD値を表している．

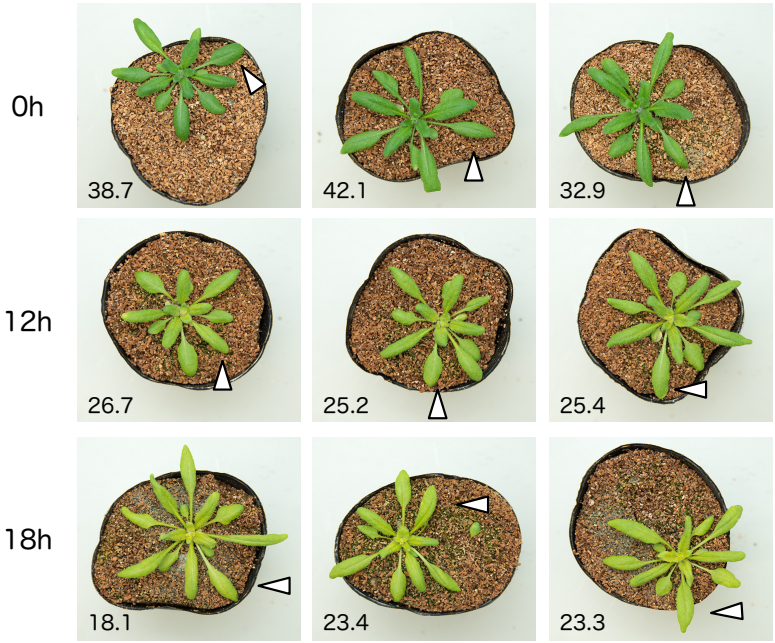


図47　電子顕微鏡観察に用いたサンプル

電子顕微鏡観察に用いたSGRの発現を誘導した播種後4週目のSGR/nyc1 nol．写真内の数字はSPAD値を表している．

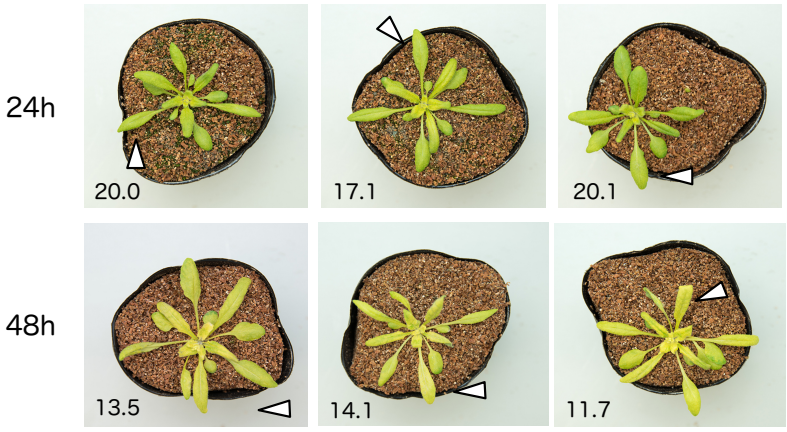


図48　電子顕微鏡観察に用いたサンプル

電子顕微鏡観察に用いたSGRの発現を誘導した播種後4週目のSGR/WT．写真内の数字はSPAD値を表している．

IV–6．SGR 発現誘導後の二酸化炭素吸収量の推移

光合成において，光エネルギーは光化学系 II によって化学エネルギーに変換され，二酸化炭素を固定する過程で化学エネルギーが消費される．*SGR* の発現誘導後のタンパク質の蓄積についての解析（図 16，17）より，光化学系 I，II やルビスコなど光合成関連のタンパクが分解されることが明らかとなった．光化学系が分解されることで電子伝達が正常に行われなくなること，そして炭素固定で働くルビスコが分解されるため，*SGR* の発現誘導後は光合成ができなくなると考えた．そこで，二酸化炭素の吸収量を指標にして *SGR* 発現誘導後の植物の光合成能を評価した（図 49）．試料には DEX 処理後 0，24，48 時間の *SGR*/WT を供試した．本実験は *SGR* の発現による影響を観察するため，*SGR/nyc1 nol* は供試していない．

DEX 処理後 0 時間の試料の二酸化炭素吸収量は 4μmolCO_2/m^2/s なのに対して，処理後 24 時間の試料の二酸化炭素吸収量は約 0.34μmolCO_2/m^2/s であり，0 時間の試料の 1/10 に減少していた．処理後 48 時間の試料の二酸化炭素吸収量は 0.12μmolCO_2/m^2/s であるが，24 時間後の試料と有意な差はみられなかった．図 50 は二酸化炭素吸収量を計測した葉のクロロフィルの総量を SPAD によって計測した結果である．DEX 処理後 0，24，48 時間の SPAD 値はそれぞれ 32，22，15 であり，時間の経過と共に総クロロフィル量は減少していた．葉の色について，24 時間後の試料は全体が黄緑色になっており，48 時間後の試料は全体が黄色くなっているものや，所々まばらに緑色が残っているものなどがあった．

48 時間後の二酸化炭素吸収量の誤差が大きいのは緑色の退色具合が不均一であったためだと考えられる.

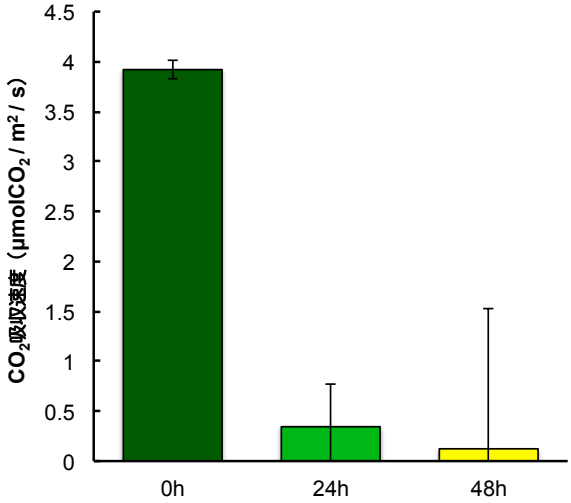


図49　SGRの発現誘導後の二酸化炭素吸収量の推移

Immnoblotによる解析から，SGRの発現を誘導するとクロロフィルタンパクやルビスコが分解されることが確認された（n=3）．電子伝達と炭素固定が機能しなくなり，SGRの発現誘導後は光合成能が落ちると考えて二酸化炭素吸収量を指標にDEX処理後の光合成能を評価した．試料には播種後4週間後のSGR/WTを用い、DEX処理後48時間、24時間と0時間を比較した。その結果、処理後24時間後で二酸化炭素吸収量は0時間の1/8に低下していた．このことは光合成能の低下を意味しており，SGRを発現させることで光合成が行われなくなっていくことが明らかとなった．処理後48時間は24時間よりも値が下がるが、24時間と48時間を比較して優位な差は観察されなかった。

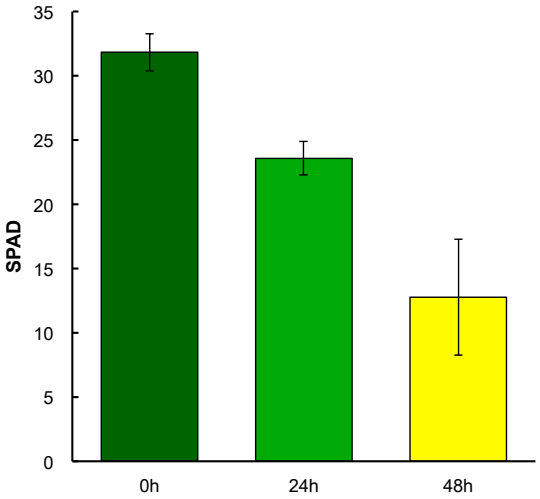


図50　SGRの発現誘導後の総クロロフィル量

SPADを用いてSGRの発現誘導後に二酸化炭素吸収量を計測した個体の総クロロフィル量を計測した（n=3）。SPADはクロロフィルaとクロロフィルbの総量を簡易的に計測できる方法である。DEX処理後24時間後の葉は全体が黄緑に変化しており、48時間後の葉は黄色と緑色がまだらに存在していた。色に対応して0時間のものよりも処理後24時間、48時間とSPAD値は下がっていた。二酸化炭素吸収量の計測結果と合わせて、SGRの発現誘導によってクロロフィル量の減少による電子伝達系の機能低下とそれにともなう炭素固定の機能低下が観察された。処理後48時間後の誤差範囲が0時間、24時間よりも大きいのは葉の色がまだらであるとこに影響されていると考えた。

以上より，DEX 処理によって *SGR* の発現を誘導すると処理後 24 時間までに著しく光合成能が減少することが明らかとなった．

IV−7．SGR の発現誘導後の光化学系 II の量子収率

Immnoblot の結果（図 16）より，DEX 処理による *SGR* の発現誘導後に光化学系 II の分解が起こることが明らかとなった．そのため，*SGR* の発現を誘導すると最大量子収率を指標とする光化学系 II の光合成能力や熱放散の量が低下するものと考えた．そこで，PAM を用いて光合成効率を表す光化学系 II の最大量子収率（Fv/Fm）と熱放散（NPQ）を計測した（図 51，52）．試料には播種後 4 週目の *SGR*/WT，*SGR/nyc1 nol* を用い，それぞれ DEX 処理を行って *SGR* の発現を誘導した．

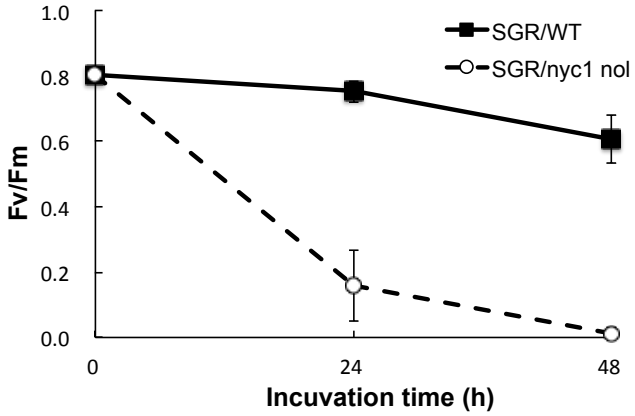


図51　SGRの発現誘導後の光化学系IIの量子収率

播種後4週間目の植物（SGR/WT、SGR/nyc1 nol）にDEX処理を行ってSGRの発現を誘導し、電子伝達の開始である光化学系IIの許容量がどのように推移するかを観察した（n=3）。 SGRの発現誘導後は光化学系IIの反応中心で働くクロロフィルaが分解されてしまうため、光化学系IIが壊れて受け取った光エネルギーを電気エネルギーに変換することができない。したがって時間の経過に従って値が下がっていくと仮説を立てた。処理後0時間は両系統で違いは見られず、どちらも仮説の通り値が小さくなっていったが、処理後24時間以降に差が表れた。SGR/nyc1 nolはクロロフィルbが分解できないため、光化学系IIの周辺集光アンテナを小さくできない。大きなアンテナで化学系IIの許容量を超えた多くの光を受け取るが，反応中心は壊れているので受けたエネルギーを解消する方法がなく活性酸素を生産してそのため、SGR/WTよりも早い段階で光化学系IIの機能が低下していったと考えた。

Fv/Fm の結果を図 51 に示す．健常葉の Fv/Fm は 0.78〜0.82 の間に収まる．*SGR*/WT，*SGR/nyc1 nol* 共に 0 時間は 0.8 を示した．*SGR*/WT は 24 時間後も 0.75 とほぼ正常域の値を示し，48 時間後には 0.6 となった．0 時間と 24 時間，24 時間と 48 時間それぞれに有意に差があった．光合成効率は受け取ったエネルギーの量のうちの処理できるエネルギーの量を表し，*SGR*/WT では SGR 誘導後 48 時間まで大きな変化はない．これはクロロフィル *a* 分解に伴ってクロロ

フィル b 分解が起こり，反応中心と周辺集光アンテナの量比に均衡が取れているためと考えられる．一方で *SGR/nyc1 nol* の Fv/Fm は 24 時間後で 0.2 を示し，光化学系 II の機能が著しく低下していることが明らかとなった．48 時間後には 0.01 となり，ほぼ機能していないことも明らかとなった．これは受け取ったエネルギーのうち処理できるエネルギーの均衡が崩れていることを意味する．0 時間と 24 時間には有意な差があったが，24 時間と 48 時間には有意な差はみられなかった．*SGR/nyc1 nol* は *SGR* の発現誘導後にクロロフィル *a* が分解されて反応中心が機能しなくなるが，クロロフィル *b* の存在によって周辺集光アンテナは分解されない．そのため，光を捕捉できるが処理できない状態となってダメージを受け，光化学系の機能が失われたものと考えられる．以上より，*SGR* の発現を誘導すると光化学系 II の機能が低下していくことが明らかとなり，クロロフィル *b* を分解できない *SGR/nyc1 nol* では光化学系 II の機能低下が顕著であることが明らかとなった．

次に図 52 に *SGR* を発現させた後の熱放散（NPQ）の推移を示す．

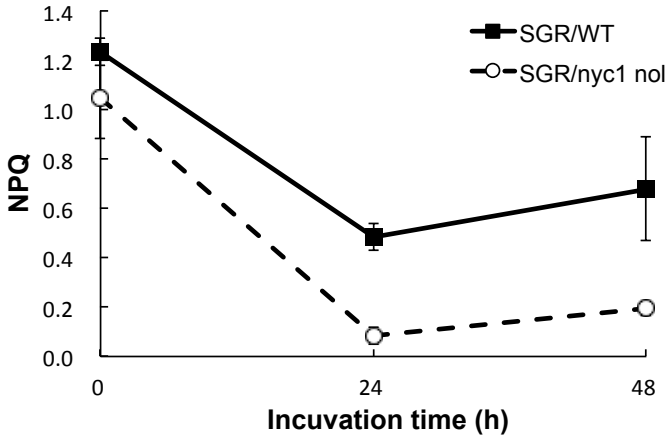


図52　SGRの発現誘導後の熱放散能の推移

播種後4週目の植物（SGR/WT,SGR/nyc1 nol）を用いて，熱放散能（NPQ）の推移を調べた（n=3）．SGR/WT，SGR/nyc1 nol共にSGR発現誘導後にNPQの低下が観察された．NPQはルーメン内の酸性化が条件である．電子伝達系では水の電気分解とプラストキノンがシトクロムb_6/fへ電子を渡す作用によってルーメン内のプロトンが増える．クロロフィルa分解による光化学系II反応中心の分解によって，水の分解が行われなくなることや光化学系IIからプラストキノンへ移動する電子が減ること，また光化学系Iの分解によってプラストキノンの電子の行き場がなくなることによってルーメン内へのプロトンの移動量が減少する．その結果，ルーメン内が酸性になりにくくなることが原因と考えられる．

植物は受容した光エネルギーを光合成で利用する他に熱として放出する．これは処理しきれない過剰な光エネルギーは活性酸素の生産につながるため,過剰なエネルギーを散逸するためである．実際，過剰な光エネルギーによって葉緑体内で発生した活性酸素は光化学系などに障害をおこし，光合成能の低下やさらなる活性酸素の発生を誘発する．熱放散や蛍光としては処理しきれない過剰

な光エネルギーを処理するのは光合成機能を保護するための防御機構である．

SGR/WT の NPQ は 0 時間で 1.2 あった．24 時間後には 0.5 を示し，NPQ 量は約半分になった．48 時間後は 0.7 を示し，24 時間後から 48 時間の間に増加していた．0 時間と 24 時間には有意な差があるものの，24 時間と 48 時間には有意な差はなかった. *SGR/nyc1 nol* では 0 時間で 1.1 であった NPQ は 24 時間後に 0.1 まで低下し, *SGR*/WT と同じように 48 時間後に増加し, 0.2 を示した. SGR/nyc1 nol は 0 時間と 24 時間，24 時間と 48 時間それぞれに有意な差があった.

以上より，*SGR* の発現誘導後に NPQ は低下するが，その後値が増加するする傾向を示した．NPQ の低下はクロロフィル *b* を分解できない *SGR/nyc1 nol* でその傾向が顕著であった.

V. 考察

V–1. *SGR* によるクロロフィル *a* 分解と葉の老化

V–1–A. 葉の老化

植物の老化は(1)プログラム細胞死 (2)器官の老化 (3)個体全体の老化の 3 つに分けることができる（テイツ/ザイガー 植物生理学・発生学 原著第 6 版 665 頁 第 22 章）. 葉の老化は，光合成によってエネルギー・成長資源を作り出す葉から成長過程の栄養器官や生殖器官へ栄養素を転流する特別なプログラム細胞死であるため，(1)プログラム細胞死と (2)器官の老化を横断する分野である. 葉の老化はルビスコや光化学系 II の周辺集光アンテナ（LHC II）という合計すると葉のタンパクの 7 割を占めるタンパクの分解とも言える. 表 8 に葉の老化の全体像示す.

表 8　植物の老化の全体像

開始期	窒素の”ソースからシンク”への変換
	光合成の低下
	初期シグナルの伝達
縮退期	細胞構成系の分解
	生体高分子の分解
終末期	細胞統合系の消失
	細胞死
	落葉

V–1–B. *SGR* によるクロロフィル分解と葉の老化

本研究では DEX 処理によって *SGR* の発現を誘導することで起こるクロロフィル *a* の分解と，それに引き続き起こるクロロフィル *b* やクロロフィルタンパク，そしてチラコイド膜の分解などを調べた. しかし，視点を葉の老化に移す

と，クロロフィルの分解は老化開始期の“光合成の低下”であり，チラコイド膜の分解は老化縮退期における“細胞構成系の分解”の初期であるといえる．したがって，本研究はクロロフィル *a* の分解に端を発する老化を観察していたと言える．

ここで Immunoblot などタンパク質の解析と電子顕微鏡による観察の結果，*NYC1* をもつ系統（*SGR*/WT）と *NYC1* を持たない系統（*SGR/nyc1 nol*）を比較して明らかとなったことをまとめる（表 9）．

表 9　SGR の発現誘導における NYC1 の有無による現象の比較

クロロフィルタンパク	
類似点	PS I，LHC I，PS II，ルビスコは分解していた
相違点	SGR/nyc1 nolではLHC IIの分解が抑制されていた

電子顕微鏡	
類似点	ストロマラメラが分解されていた
相違点	SGR/nyc1 nolはグラナが存在し，グラナの厚さが増していた

Immnoblot（図 16）と Green Gel 法（図 18）による解析では，光化学系 I,II の反応中心の分解と光化学系 I 周辺集光アンテナ（LHC I）の分解，そしてルビスコの分解が共通する現象として観察され，光化学系 II の周辺集光アンテナ（LHC II）の分解に相違がみられた．電子顕微鏡での観察ではストロマラメラの分解が共通する現象として観察され，グラナの存在と構造に違いがあった．

光化学系の反応中心にはクロロフィル *a* のみが結合し，周辺集光アンテナにはクロロフィル *a*，*b* が結合している．クロロフィル *b* が LHC II の構造の安定に寄与していることは本研究の HPLC と Immnoblot の結果や Horie et al.(2009)から明らかとなっており，クロロフィルを作れない変異体ではクロロフィルタンパクも作られないことから，クロロフィルタンパクの存在・安定にはクロロフィルの存在が重要である．

ルビスコの分解について，先行研究である Shimoda et al.（2016）と本研究では結果に相違点があり，Shimoda et al.（2017）ではルビスコは分解されていないが，本研究では分解されていた．これは SGR の発現誘導を行う植物の扱い

方に起因するものと考えられる．Shimoda et al. (2017) は成長した植物の葉を切除して DEX 処理による *SGR* の発現誘導を行っており，本研究では成長した植物体に DEX 処理を行って *SGR* の発現誘導を行っている．植物体に DEX 処理を行う場合，*SGR* の発現誘導によって老化が始まり，タンパクなどを新しい葉や種子・実といった次世代へ転流するためにルビスコが分解される．一方で切り取った葉では転流が行われないため，ルビスコの分解が起こらないと考えられる．このことから，ルビスコの分解は *SGR* の発現に支配される老化現象ではないことが明らかとなった．

V−1−C．*SGR* による光化学系 I の分解

Immunoblot による解析（図 16）によって，*SGR* の発現誘導後に光化学系 I 反応中心（PS I）と周辺集光アンテナ（LHC I）の分解が確認された．*SGR* は水溶性タンパク（Matsuda et al.2016）であり，膜貫通領域を持たないためストロマに存在すると考えられる．PS I と LHC I はストロマラメラに存在（図 3）することから，*SGR* は PS I，LHC I に容易に接触できる状態にある．*SGR* の発現によるクロロフィル *a* の分解によって，クロロフィル *a* のみが結合している PS I はタンパクの構造を維持することができなくなり，プロテアーゼ等の標的となって分解されたと考えられる．LHC I にはクロロフィル *a* の他にクロロフィル *b* も結合しているので，*SGR* の発現誘導によるクロロフィル *a* の分解だけで LHC I が完全に分解されるとは考えにくい．チラコイド膜の分解産物であるリノレン酸がジャスモン酸の前駆体になると考えられており（Teng et al.2016, Li et al.），*SGR* によるクロロフィル *a* の分解によって光化学系やチラコイド膜の分解が起こり，合成されたジャスモン酸によってクロロフィル *b* 分解酵素の NYC1 の発現が誘導されたと考えている．*NYC1* は膜貫通部位をもち，ストロマ側に活性部位を突出させている（Sato et al.2008）ため，ストロマチラコイドに存在する LHC I のクロロフィル *b* には *NYC1* が作用しやすいと考えられる．その結果クロロフィル *b* の分解がおこり，クロロフィルタンパクの構造の安定化に寄与するクロロフィルが分解されて構造を保てなくなった LHC I が分解されたと考えられる．

V−1−D．*SGR* による光化学系 II の分解

光化学系 II 反応中心（PS II）はグラナスタックに存在し（図 3），ストロマ

に存在する *SGR* が作用するのは容易でない．しかし，ストロマストロマチラコイドに存在する PS I や LHC I が分解されることでチラコイド膜が崩壊し，それまでグラナスタックに存在していた PS II がストロマに暴露されて *SGR* が PS II に接触できるようになると考えられる．また，グラナスタックにおいてチラコイド膜が湾曲している部分（グラナマージン）には光化学系 II 反応中心–周辺集光アンテナ複合体のような大きなクロロフィル結合タンパク複合体は存在しにくいと考えられているが，流動性のあるチラコイド膜を移動中にストロマにさらされるグラナマージン周辺に存在することがあると考えられる．グラナマージン近辺に存在する PS II はストロマに暴露されるので，*SGR* の PS II 接触が可能となり，クロロフィル *a* の分解によって PS II が分解されると考えられる．

Immunoblot の結果（図 16）より，*SGR* が発現すると光化学系 I が光化学系 II よりも早く分解される．これはクロロフィル分解酵素である *SGR* と *NYC1* が光化学系 II よりも光化学系 I に接触しやすいことが理由と考えられる．なぜなら，*SGR* は水溶性タンパクであるためストロマに存在すると考えられ，*NYC1* は膜貫通領域を持つためグラナに存在する光化学系 II に容易に近づけないからである．このことから，以下の流れで膜構造の分解が進むと考えることができる．

野生株では環境ストレスや内在的なプログラムなどに端を発する老化開始の刺激を受けると *SGR* や *NYC1* を発現させ，ストロマチラコイドに存在する PS I や LHC I のクロロフィル *a*，*b* の分解を開始する．クロロフィル *a*，*b* を分解された PS I，LHC I はタンパクの構造を維持出来なくなり，プロテアーゼ等の分解対象となって分解される．膜上にある大きなタンパク質複合体の分解によってストロマチラコイドの分解も始まり，それまでグラナスタックに存在していた PS II や LHC II がストロマに暴露される．ストロマに存在する *SGR* や膜貫通部位をもつ *NYC1* はグラナスタックに存在する PS II や LHC II に接触できなかったが，ストロマチラコイドの崩壊によって PS II や LHC II への接触が可能になり，PS II や LHC II に内包されるクロロフィル *a*，*b* の分解を開始する．PS I，LHC I 同様，クロロフィルの分解によってタンパク質の構造を維持できなくなった PS II や LHC II は崩壊する．それに伴って分解される PS II や LHC II が存在していたグラナスタックも分解される．外側のグラナ（チラコイド膜）が分解されることで次のグラナがストロマに暴露され，チラコイド膜上

にある PS II，LHC II の分解が始まるといった具合で老化反応を始めた葉内では次々とグラナスタックの分解が行われていくと考えられる．

植物にとって老化期は転流によって次世代に栄養を送る重要な期間である．したがって親個体内にある資源をより多く次世代へ送るためにはより安全に，より確実に転流を行う必要がある．*SGR/nyc1 nol* ではクロロフィル *b* が分解できないために *SGR* の発現誘導後にグラナの積層が起こっており，チラコイド膜やクロロフィル結合タンパク質などの貴重な資源を分解・転流できていない．したがってクロロフィル *a* を分解する *SGR* のみが働いても不十分な転流しか行えず，クロロフィル *b* を分解する *NYC1* の働きが必要であることが明らかとなった．このことから，*SGR* の発現誘導後に *NYC1* が発現するのは，反応中心と周辺集光アンテナの分解を調節して活性酸素など危険な物質の生産を抑制し，より多くの資源を確実に転流するために重要な協調的分解機構であることが明らかとなった．

V−1−E．SGR の発現とアンテナサイズの調節

植物は光化学系反応中心と周辺集光アンテナを用いて光合成し，生存のためのエネルギーと個体成長に用いる資源を生産している．しかし，強光により供給される光エネルギーの増加や光化学系の分解による光エネルギーの処理能力低下は，捕捉した光エネルギーの余剰を生んでしまう．余剰となった光エネルギーは酸素に渡されて活性酸素の生産につながるため，光合成は諸刃の刃であると言える．そこで，植物は余剰の光エネルギーを排出する機構のほかに，余剰の光エネルギーをうまない一つの方法として光化学系 II 周辺集光アンテナの大きさの調節を行っている（Sato et al.）．

光化学系 II 周辺集光アンテナにはクロロフィル a とクロロフィル b が結合しており，クロロフィル *b* は LHC II の安定に寄与（Horie et al.2009）し，LHC II はグラナスタックの安定に寄与する（Sato et al.2009）．光化学系 II はチラコイド膜が重なったグラナに存在し，グラナの重なりは負の電荷を帯びている光化学系 II 周辺集光アンテナと Mg^{2+}の相互作用でできている（McDonnel et al.1980，Kirchhoff et al.2003，Wan et al.2014）．Kusaba et al.（2007）は暗処理して老化誘導したイネの *NYC1* 欠損株で同様にグラナスタックの積層を観察している．以上のことから，周辺集光アンテナの大きさは *NYC1* によるクロロフィル *b* の分解によって調節されている．

電子顕微鏡による観察より，クロロフィル *b* を分解できない *SGR/nyc1 nol* ではグラナの積層が観察された．Immunoblot（図 16）や Fv/Fm（図 51），NPQ（図 52）の結果より，*SGR* が発現した *SGR/nyc1 nol* は *SGR*/WT と同様にクロロフィル *a* の分解によって光化学系が分解されており，電子顕微鏡による観察よりストロマチラコイドの分解が確認された（図 20~44）．*SGR* が発現して 48 時間の *SGR/nyc1 nol* でグラナの積層が観察されたのは，光化学系 I が存在するストロマチラコイドが分解される反面光化学系 II が存在するグラナは分解されないからである．負の電荷を持っている光化学系 II 周辺集光アンテナと Mg^{2+}と相互作用して周辺集光アンテナが集合してグラナの積層がおこる．その結果，*SGR/nyc1 nol* 内ではグラナの積層がおこる．健常葉において，光化学系 II 周辺集光アンテナは 3 量体で存在・機能している．Green Gel 法による解析より，*SGR/nyc1 nol* の光化学系 II 周辺集光アンテナは 3 量体で存在することが明らかとなり，*SGR/nyc1 nol* の光化学系 II 周辺集光アンテナは機能する周辺集光アンテナであると考えられる．一方で *SGR* の働きによってクロロフィル *a* が分解されているため，光化学系 II 反応中心は機能しなくなっている．したがって *SGR/nyc1 nol* 内では反応中心と周辺集光アンテナの大きさの均衡が崩れ，処理しきれない光エネルギーによって活性酸素が生産されていると考えられる．活性酸素は生体膜の酸化などを行い，細胞死を招く毒性のある分子である．したがってクロロフィル *b* が分解されない *SGR/nyc1 nol* では活性酸素による障害が起こっていると考えられる．このことから，クロロフィル分解は *SGR* によるクロロフィル *a* の分解だけでなく *NYC1* によるクロロフィル *b* の分解も行われる必要があり，*SGR* と *NYC1* の協調的発現が重要であると言える．

V−2．クロロフィル分解に関わる遺伝子の発現関係

V−2−A．*SGR* の発現に伴って発現が変わる遺伝子の関係

Shimoda et al. (2016)によって，クロロフィル *a* 分解酵素である *SGR* の発現誘導に伴ってクロロフィル *b* 分解が起こることが観察された．本研究はその機構を解明することを目的とし， HPLC による色素分析の結果（図 7，8）より *NYC1* の発現が関わることが示唆された． DEX 処理による SGR の発現誘導によって *NYC1* の発現増加が予想されたので，*SGR*/WT を試料として real time PCR と Immnoblot によって発現の順序を解析した（図 11，12）．その結果，

SGR の発現誘導後 12～24 時間目から *SGR* の発現量が増加し，24 時間後から *NYC1* の発現が増加することが明らかとなった．*NOL* 欠損株は HPLC による解析において野生型と同様にクロロフィル *a* の分解に伴ってクロロフィル *b* も分解された．また，mRNA の発現量とタンパク質の蓄積の解析の結果，*NOL* の mRNA とタンパクは共に変動しなかった．これらことから， *SGR* の発現誘導に伴って起こるクロロフィル *b* の分解は *NYC1* の作用であることが明らかとなった．NOL は mRNA の発現量とタンパク質の蓄積量が変化しないこと，また膜貫通領域を持たない（Sato et al.2009）ことから，可溶性画分のストロマに存在し，作りすぎたクロロフィル *b* の分解などに関与していることが考えられる．一方で NYC1 は NOL とは違い，SGR の発現による老化誘導で発現量が増加し，膜貫通領域を持つ（Kusaba et al.2007）ことから，チラコイド膜に存在して老化時の膜上のクロロフィル結合タンパク質が持つクロロフィル *b* の分解に関与していると考えられる．同じクロロフィル *b* 分解という機能を有していながら植物が NYC1 と NOL を持つことは，普段のクロロフィル *b* の分解と老化期のクロロフィル *b* の分解を区別していることが考えられる．

次に *NYC1* の発現誘導について，*SGR* は葉緑体内に存在する酵素なので，*SGR* が直接 *NYC1* の発現を誘導するとはできない．クロロフィル分解酵素は老化期におこる現象であり，エチレンやジャスモン酸など老化を促進させる植物ホルモンの合成量が増加し，老化関連遺伝子の発現を促進する．一方でオーキシンなど成長に作用する植物ホルモン合成量が減少することが知られている．Qui et al.(2015)より，*SGR* や *NYC1* などのクロロフィル分解酵素の発現には *EIN3*（エチレン伝達経路に関わる）と *ORE1*（老化に関わる転写因子）の関与が明らかとなっており，Nakajima et al.(2014)より *NYC1* の発現に *ABF4* が関与していることもわかっている．また，Zhu et al. (2015)より，*MYC2* がジャスモン酸に誘導され，*MYC2* の下流にある *NAC019/055/072* が *SGR* や *NYC1* の発現誘導に関わることや Yamamizo et al.（2016）より *NAC046* が老化に関わる遺伝子の発現を誘導すること, そして Sakuraba et al. (2014) より *ABI5/EEL* が直接クロロフィル分解を誘導することや *ORE1* の発現に関わっていることも明らかとなっている．これらの転写因子について，*SGR* の発現誘導後に発現量を調べると *NAC019/055/072* と *ORE1* の発現量が 10 倍以上増加していた（図 12，15）．

NYC1 の発現に寄与する転写因子について，*SGR* の発現誘導後に各転写因子

の発現量が最大になる時間帯は *NAC019* が 24 時間，*NAC055* が 18 時間，*NAC072* が 42 時間，*ORE1* が 36 時間である．ことから，*NAC* と *ORE1* で発現の時期が違い，*NAC019/055/072* が先に発現して *NYC1* の発現を誘導し，遅れて *ORE1* が寄与すると考えられる．なお，*NAC019/055/072* の発現の時間について，標準偏差の大きさや各時間での増加具合から，本研究で *NAC* の発現の順序は決められない． real time PCR の結果（図 15）より，SGR の発現誘導後の *MYC2* の発現量は 3 倍に増加している．3 倍の増加が *NAC019/055/072* の発現を誘導するのに十分な発現量であるかは定かではないが，*SGR* の発現によってジャスモン酸が合成されていることが考えられる．ジャスモン酸はチラコイド膜の分解産物であるリノレン酸が前駆体になると考えられる（Teng et al.2016，Li et al.2017）．チラコイド膜の分解はクロロフィル結合タンパク質が分解されることにより，リパーゼがチラコイド膜内に作用できるようになるためと考えられる．

次に ORE1 の発現について，*ORE1* の上流にある *EEL* の発現量が *SGR* の発現誘導後 24 時間で 0 時間の 4 倍に上がっている．4 倍の増加が *ORE1* の発現にどれほど寄与するはわからないが，*EEL* はアブシジン酸や環境ストレスに応答する転写因子である（Sakuraba et al.2014）ため，クロロフィル *a* やクロロフィル結合タンパク質の分解による光化学系の分解に伴う活性酸素によって発現が上がったと考えられる．また，*SGR* の発現誘導後は *NYC1* が発現するまで光化学系 II の周辺集光アンテナがほぼ分解されず，反応中心が分解されるため活性酸素種が合成されることが考えられる．活性酸素種は *ORE1* の発現に寄与するため，*SGR* の発現誘導後の *ORE1* の発現は活性酸素種が関わっていることが考えられる． *ORE1* はクロロフィル分解の他にも葉の老化を誘導する（Qui et al.2015）ため，*ORE1* を発現させることで葉内部の分解・転流が促進されるものと考えられる．

以上のことから，現在 *SGR* と *NYC1* をつなぐ経路について以下のように考えている．*SGR* が発現してクロロフィル *a* が分解されることでクロロフィル結合タンパク質が分解され，リパーゼがチラコイド膜内に作用してチラコイド膜が分解されてリノレン酸がジャスモン酸の前駆体となる．ジャスモン酸が *MYC2* を経由して *NAC019/055/072* の発現を誘導し，*NYC1* の発現につながる．

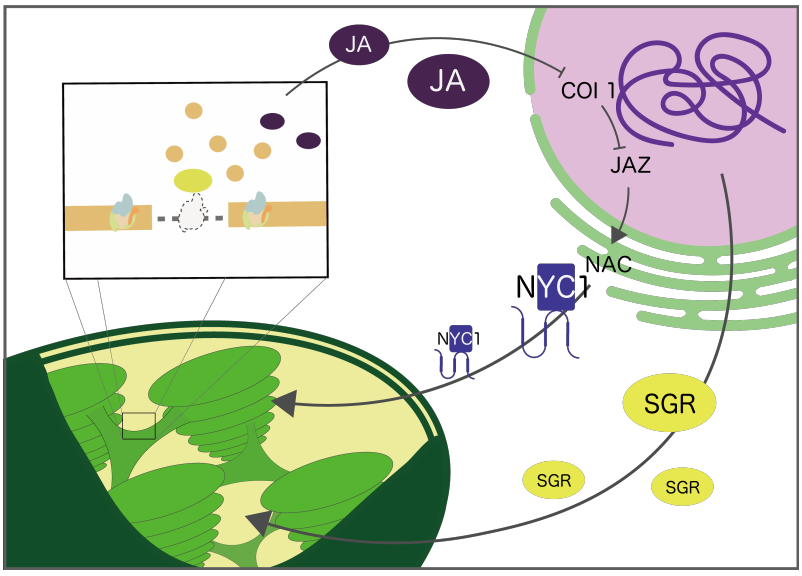


図53　SGRとNYC1の協調的発現とその役割

SGRは可溶性タンパク質であるため，発現後ストロマに局在する．ストロマチラコイドに局在する光化学系I は，SGRによってクロロフィル*a* が分解されると反応中心だけでなく周辺集光アンテナも分解される．分解されたところに穴があき，リパーゼが作用してリノレン酸ができ，リノレン酸を前駆体としてジャスモン酸が合成される．ジャスモン酸はretrograde signalとして働き，NACを介してNYC1の発現を誘導する．SGRとNYC1が協調的に働いてクロロフィルa，bを分解することで，反応中心と周辺集光アンテナの分解が均整を保つことで，活性酸素による細胞死を起こりにくくさせる．

V–2–B．環境ストレスと葉緑体の分解

植物が環境ストレスを受けると，葉緑体では核に向けてストレス応答のための信号（retrograde signal）を送る．例えば，塩ストレスによる過酸化水素が *ORE1* の発現を活性化することが明らかとなっている（Balazadeh et al.2010, Garapati et al.2015）．過酸化水素などの活性酸素種（reactive oxygen species：ROS）は呼吸や光合成といった代謝経路で副産物として生まれる細胞毒性のある分子である．活性酸素種は酸素の部分的還元で生産される反応性に富んだ分子であり，膜タンパクの酸化的損傷を引き起こす．光合成では光化学系 I と II それぞれで活性酸素種が作られる．

まず光化学系 II において，反応中心は周辺集光アンテナで集められた光エネルギーによって励起される．励起された光化学系 II 反応中心からプラストキノン A に電子が移動し，プラストキノン B へと移動するのが通常であるが，光化学系 II からプラストキノンへ電子が円滑に受け渡されない場合がある．本研究では *SGR* を発現させてクロロフィル *a* を分解させることで光化学系 II 反応中心の機能が低下していった．本来の老化であれば時間をかけて反応中心と周辺集光アンテナが秩序立って分解されるため，少し壊れたものから随時プロテアーゼで分解して反応中心と周辺集光アンテナの量の均整がとれる．しかし，本

研究では 2 日で老化を進めたことと，*SGR* の過剰発現によるクロロフィル *a* 分解の先行によって反応中心の分解が早いことから，反応中心と周辺集光アンテナの量比を制御することは難しいと考えられる．そのため，*SGR/WT* においても反応中心に対して周辺集光アンテナの量が多くなり，反応中心で処理しきれない量のエネルギーが捕捉されることが考えられる．光化学系 II の反応中心では P680 と呼ばれるクロロフィル *a* のスペシャルペアが移動してきたエネルギーによって励起され，フェオフィチンを経てプラストキノン A・B へ電子が移動して行く．プラストキノン A から B への電子の移動に時間がかかるため，A から B への移動よりも早い時間で P680 からプラストキノン A に電子が供給されると電子は行き場を失ってしまう．励起された状態は不安定なため，物質は励起される前の基底状態へ戻ろうとする．しかし，エネルギーを抱えたまま基底状態に戻ることはできないため，P680 は励起状態を長く続けることになり，その結果 3 重項クロロフィルが生まる．そして 3 重項クロロフィルが酸素と反応して活性酸素種の一つである一重項酸素（$^1O_2$）を作り出す．一重項酸素の発生は *EXECUTER1, 2*（*EX1, 2*）を介して核に酸化ストレスとして伝達される．核ではその信号を受けて遺伝子の発現に影響を与える（Prasad M et al.2015）．

次に光化学系 I でも同様に活性酸素種が発生する. 光化学系 I ではフェレドキシンに電子を渡す際に酸素に電子を渡してしまうことがあり，スーパーオキシドラジカル（O_2^-）が発生する．スーパーオキシドラジカルはそれ自身で酸化ストレスを与えることができるが，過酸化水素に変化する．過酸化水素は膜透過性をもつため，葉緑体外の細胞小器官に影響を与える．スーパーオキシドラジカルと過酸化水素は別の経路で核へ作用し，遺伝子発現に影響を与える．

植物の老化では，活性酸素は物理化学的な酸化的損傷よりも老化経路を活性化させるシグナルとして登場・作用することが多い．成長期であれば，光合成で発生する酸化力は還元力である NADPH やβカロテンで活性酸素を除去される．老化期は NADP 合成など活性酸素種除去能が低下する一方で，光化学系 II の周辺集光アンテナと反応中心の量比が崩れて光エネルギー処理能が低下した状態で光エネルギーを受け取ることや, 光化学系 I の分解で電子伝達が円滑に進まなくなることで酸化力が発生する頻度が上がることが考えられる．これらのことから，*SGR* が発現した個体では，クロロフィル *a* の分解によって反応中心が分解されて光合成機能が低下しているにもかかわらず，次々と光エネルギーを受け取るため活性酸素が増え，酸化ストレスによって *ORE1* の発現が誘導さ

れ，*NYC1* の発現につながったと考えた．

V–3．*SGR* の発現と光合成能の推移

光合成能を示す Fv/Fm（図 51）と NQP（図 52），そして CO_2 吸収量（図 49）の解析より，*SGR* の発現によって *SGR*/WT，*SGR/nyc1 nol* 両系統で光合成能が低下することが明らかとなった．

V–3–A．光合成と蛍光

光合成能を測定する際に用いられる蛍光は励起光の強さに比例し，励起光は３つのエネルギー（光合成に使われる光エネルギー，蛍光，熱放散）に変換される．そのため，熱や光合成に使われる割合が多くなると蛍光が弱くなる．光化学系 II で受け取った光エネルギーは水の分解に利用され，さらに電子伝達を駆動する．この電子がプラストキノンの還元を経てシトクロム b_6/f へ移動する．本研究で計測する光化学系 II の蛍光はプラストキノンの還元で発生する．プラストキノンが還元状態にあるときは電子が飽和状態にあって光合成が進まない．そのため光合成が行われないときは蛍光が強くなる．また，プラストキノンがシトクロム b_6/f に電子を渡した状態であれば，プラストキノンが光化学系 II から電子をもらって光合成を滞り無く駆動することができるため，酸化状態であれば励起光の蛍光の割合が低くなり蛍光は弱くなる．

V–3–B．光化学系 II の最大量子収率と SGR

Fv/Fm は光化学系 II の最大量子収率を示し，光化学系 II のフェオフィチンの還元状態に依存する．蛍光の量子収率とは，ある色素が光を吸収して蛍光を出す場合の吸収と発光の光数の比のことである（光合成の森 園池公毅 http://www.photosynthesis.jp/fluo1.html）．Fv/Fm と量子収率には比例関係にあり，量子収率の低下に伴って Fv/Fm は直線的に減少する．Fv/Fm の Fm は蛍光の最大値を意味し，Fv は Fm（蛍光の最大値）– Fo（蛍光の最小値）より算出される値である．蛍光は光合成に使われないエネルギーの放出であることから，光合成が行われる場合は蛍光の値が小さく，光合成が行われない場合は蛍光の値が大きくなる．光エネルギーはクロロフィル *a* とクロロフィル *b* を持つ周辺集光アンテナで受け取られ，そのエネルギーはクロロフィル *a* のみが結合している反応中心へ渡されていく．CP43/47 で受け取られた光エネルギーはほ

とんどが D1・2 へ渡されるが，一部は蛍光として放出される．蛍光計測は暗所においてプラストキノンが完全に酸化状態になった植物を用いるが，Fo は暗順応させた葉が出す弱い蛍光を計測したものである．葉が異常をきたすと Fo の値が高くなる．高等植物が最適条件で育った場合，Fv/Fm は 0.83 程度になる．

SGR が発現するとクロロフィル *a* の分解が始まり，*NYC1* によってクロロフィル *b* の分解も始まる（図 7）．Immunoblot の結果（図 16）より *SGR* が発現した植物では光化学系 II の反応中心と中心・周辺集光アンテナの分解が始まる．*SGR* の発現に伴って植物では光化学系反応中心と周辺集光アンテナが分解され，光合成が機能しなくなって量子収率が減少する．その結果，量子収率と比例関係にある Fv/Fm が減少する．*SGR*/WT では *SGR* の発現誘導後の時間経過に伴って Fv/Fm が減少するものの，その減少は緩やかである．これは *SGR* の発現後に *NYC 1* が発現することでクロロフィル *a*,*b* の分解の均衡がとれて反応中心と集光アンテナの分解が協調することで，DEX 処理 0，24，48 時間それぞれの時間にといてエネルギーの供給と処理の均衡がとれているからと考えられる．

V−3−C．SGR/nyc1 nol と光化学系 II の最大量子収率

SGR/nyc1 nol は *SGR*/WT よりも DEX 処理後 24 時間までの Fv/Fm の減少量が大きい．これはクロロフィル *b* 分解酵素である *NYC1* が機能しないことが大きく影響すると考えられる．通常，植物は強光環境下や老化期になって反応中心で処理しきれない量の光エネルギーが供給される場合，周辺集光アンテナの大きさを調節して受け取る光の量を調節している．これを実現させるため LHC II の安定に寄与するクロロフィル *b* を *NYC1* によって分解している．*NYC1* 欠損株ではクロロフィル *b* を分解することができないために周辺集光アンテナが分解されず，野生型よりも受け取る光の量が多くなる（Sato et al. 2014）．このことから *SGR/nyc1 nol* では反応中心に対して周辺集光アンテナが大きくなり，処理できない量のエネルギーが供給されていると考えられる．その結果，過剰なエネルギーは酸素に渡されて活性酸素が発生し，光化学系 II の反応中心に障害を与えたと考えられる．つまり，*SGR* の発現を誘導した *SGR/nyc1 nol* では，老化が始まっているにもかかわらず反応中心と周辺集光アンテナの均衡のとれた分解がおこなわれないため，通常の緩やかで秩序立った分解ではなく，活性酸素など反応性が高いものによる急激な老化が起こっていることが考えられる．また Immnoblot の結果より，*SGR*/WT と *SGR/ nyc1 nol*

で D1，CP43 の分解速度に差は見られなかった．D1，CP43 と関連する D2，CP47 は分解も関連することを踏まえ，D1，CP43 の分解速度に違いが見られないことと Fv/Fm の結果より，*SGR/nyc1 nol* は機能している D1，CP43 が少なかったことが考えられる．

V–3–D．光合成と NPQ

Pourtau et al.（2004）が報告しているように，葉は老化期に入ると Fv/Fm と NPQ が低下する．NPQ はクロロフィルで受容した過剰な光エネルギーを熱として放散する機構であるが，光が当たった直後には機能しない．NPQ の駆動には電子伝達による水分解やプロトンポンプの駆動によるチラコイド膜内部（ルーメン）の酸化が重要であり，pH の変化によってカロチノイドであるビオラザンチンがアントラザンチンを経てゼアザンチンになることで熱が放散される．光が当たった直後に NPQ が駆動しないのはルーメン内の pH が十分に低下していないこと，そのためカロチノイドの構造が変わらないことが原因である．

光化学系 II は受け取った光エネルギーを用いてルーメン側で水を電子とプロトンと酸素に分解する．プラストキノンは光化学系 II から電子をもらう際にストロマ側のプロトンと結合して還元産物となる．還元産物となったプラストキノンがシトクロム b_6f に電子を渡す際にプラストキノンに結合していたプロトンがルーメンに放出される．以上より，光化学系 II からそのシトクロム b_6f に電子が移動するまでにプロトンがルーメン内に増えて pH の低下が起こる．また，光があたって間もない時は光化学系 I で NADPH が作られるまでに電子の供給が過多となり，光エネルギーを光合成で利用して処理することができず，処理しきれないエネルギーを蛍光として放散する．以上より，ルーメン内の pH が十分に下がることと NADPH 合成が潤滑に機能するまでは蛍光の割合が多くなる．

V–3–E．NPQ と *SGR* によるクロロフィル *a* 分解

SGR/WT において，*SGR* を発現させると NPQ が低下することが明らかとなった（図 51）．*SGR* 発現誘導後 24 時間での NPQ の低下や 48 時間後の NQP の回復には反応中心と周辺集光アンテナや光化学系 II と光化学系 I の量比の変化が関係していると考えられる．

反応中心と周辺集光アンテナの量比について，*SGR* 発現誘導後の Immunoblot の結果（図 16）より *SGR* 発現誘導後は光化学系 II よりも光化学

系 I が先に分解される．電子伝達系において，電子は光化学系 II からプラストキノン，シトクロム *b*$_6$*f*，光化学系 I，ATP 合成酵素へと移動する．このとき，移動先の分解や移動先での電子の滞留があると電子を渡すことができない．したがって光化学系 II よりも先に光化学系 I が分解されるとプラストキノンは電子を渡すことができないため反応を進めることができない．熱放散にはルーメン内の酸性化が必要であるが，光化学系 II からプラストキノンへの電子の供給が止まるとプラストキノンがシトクロム *b*$_6$*f* で電子を渡す際にプロトンをルーメン内へ移動させる反応が止まる．この結果 NPQ が下がったと考えられる．
また，光化学系 II も *SGR* の発現によってクロロフィル *a* の分解に伴う反応中心の分解が起こる．一方で SGR の発現誘導後 24 時間では *NYC 1* の発現量が不十分であり（図 11，12），光化学系 II 周辺集光アンテナは分解されない．つまり，周辺集光アンテナによって光を集めることはできるが，反応中心が機能しなくなっている．熱放散にはルーメン内の酸性化が必要であるが，ルーメン内のプロトンは光化学系 II の水の電気分解やプラストキノンがシトクロム *b*$_6$*f* へ電子に渡す際にルーメン内へ移動で増加する．*SGR* を発現誘導した後は光化学系 II 反応中心の分解によって水を分解することができず，また，光化学系 II からプラストキノンへ電子を受けわたす量が減ることから，ルーメン内の pH を下げることができない．そのため，カロチノイドであるビオラザンチンをゼアザンチンに変換して熱を散逸することできず NPQ が下がる．つぎに，*SGR* 発現誘導後 48 時間では 24 時間よりも NPQ が増加している．これはまだ機能する光化学系 II で処理された光エネルギーが機能する光化学系 I へ運ばれて処理されることによると考えることができるが，48 時間後は光化学系 I，II 共に分解されている（図 16）．NPQ は単位面積あたりの機能する光化学系 I と光化学系 II を用いて求める値であるため，*SGR* の発現誘導後 48 時間の NPQ の値は意味を持たないと考える．

SGR/WT と *SGR/nyc1 nol* の NPQ の変化を比較すると，*SGR/nyc1 nol* の減少量が大きい．これは Fv/Fm の減少と同じようにクロロフィル *b* が分解されないことが原因だと考えられる．図 16 の Immunoblot より，*SGR/nyc1 nol* では *SGR*/WT よりも *SGR* 誘導後 24 時間から 36 時間にかけての光化学系 II（D1，CP43）の分解が進んでいることからもわかるように，*SGR/nyc1 nol* では反応中心に対して周辺集光アンテナが多くなることで反応中心が処理しきれない光エネルギーの捕捉が行われ，反応中心の分解がさらにすすむ．そのため NPQ が

働くのに必要なルーメン内の酸性化が十分に行われなかったと考えられる．

以上より，植物が受け取った余剰の光エネルギーを散逸するには光化学系 II のクロロフィル *a* が分解されないことが重要である．

V–3–F．*SGR* と CO_2 吸収

植物は老化が始まると CO_2 吸収量が低下する（Sakuraba et al.2012）．本研究においても，*SGR* を発現させて老化を誘導すると CO_2 吸収量が低下した．CO_2 は炭素固定反応であるカルビン・ベンソン回路でルビスコによって使われる．炭素固定は電子伝達系で作られた NADPH によって駆動する．

SGR の発現誘導を行った *SGR*/WT ではクロロフィル *a* の分解，それに伴って光化学系の分解が始まり，追って *NYC1* によるクロロフィル *b* の分解が始まる．Immunoblot や蛍光収率，そして熱放散の結果より *SGR* が発現すると光化学系 I，II の分解が行われ，電子伝達系が駆動しなくなっていると考えられる．したがって，炭素固定で必要な NADPH が生産されないため，CO_2 吸収量が減ったと考えられる．

SGR 発現誘導後 24 時間の Immnoblot の結果では光化学系 I，II の反応中心や周辺集光アンテナの蓄積量を誘導後 12 時間の蓄積量を比較すると，減ってはいるもののあまり差が見られない．しかし，*SGR* の発現誘導後 24 時間の CO_2 吸収量は 0 時間の 1/8 に低下している．このことから，CO_2 を吸収するための NADPH の生産や電子伝達系の駆動は量比の均整が取れていることが重要であると考えられる．

VI. 結論

陸上植物は Mg を中心金属としたクロロフィル *a* とクロロフィル *b* の 2 種類を光合成色素として用いている．クロロフィル分解酵素のなかで，クロロフィル *a* から Mg を取り除く酵素はながらく同定されていなかったが，2016 年に *Stay Green*（*SGR*）であることが明らかとなった（Shimoda et al.2016）．クロロフィル *b* の Mg は強固にクロリン環に結合おり，*SGR* で酵素的に取り除くことはできない. そのため, クロロフィル *b* の分解は *Non-Yellor Coloring 1*（*NYC1*）や *NYC1 LIKE*（*NOL*）によってクロロフィル *a* に変換することから始まる．

SGR はクロロフィル *b* を基質にしないが, *SGR* を過剰発現させた植物ではクロロフィル *a* の分解に伴ってクロロフィル *b* が分解されることが明らかとなった（Shimoda et al.2017）．*SGR* の発現後にクロロフィル *b* を分解する遺伝子の特定と協調的に働く意味を明らかとすることを目的とした本研究において，色素分解の解析より *SGR* を発現誘導した *NYC1* 欠損株でクロロフィル *b* の分解が抑制されることが明らかとなった．そして *SGR* の発現誘導後に *NYC1* の発現量やタンパク質の蓄積量に増加が見られることを明らかにした．以上より，*SGR* の発現に伴うクロロフィル *b* 分解は *NYC1* の作用であることが明らかとなった．

SGR の発現誘導後に *NYC1* が発現することについて，酵素である *SGR* が *NYC1* のプロモーターに結合して直接発現を誘導することはない. そこで *NYC1* の発現に関与する転写因子（*ORE1, EIN3, ABF4, MYC2, NAC 019/046/055/072, ABI 5/EEL*）の発現量の変化について調べた．その結果，*SGR* の発現誘導後に *NAC019/055/072* と *ORE1* の発現が増加していることが明らかになった．*NAC019/055/072* はジャスモン酸に応答する転写因子であり，SGR の発現誘導後 18～30 時間の間に発現が増加した．*ORE1* は老化に関わる転写因子であり，SGR の発現誘導後 36 時間後発現量が増加していた．

NAC019/055/072 の発現について，チラコイド膜を構成するリン脂質の分解産物（リノレン酸）がジャスモン酸の前駆体になると考えられる（Teng et al.2016, Li et al.2017）. *SGR* によってクロロフィル *a* が分解され, 光化学系 I, II の構造が不安定化して分解されてチラコイド膜に穴が開く．そこからリパーゼがチラコイド膜内に作用してチラコイド膜が分解され，分解産物であるリノレン酸を前駆体としてジャスモン酸が合成されると考えられる．ジャスモン酸

は retrograde signal として働き，*NAC019/055/072* を経由して *NYC1* の発現が誘導され，*SGR* と *NYC1* の発現後は数珠繋ぎに反応が進むと考えられる．

ORE1 について，*NYC1* と発現量が増加する時期が重なっていた．このことから，*ORE1* は初期の *NYC1* の発現にあまり寄与していないと考えられる．*ORE1* の上流に位置する *EEL* が *SGR* 発現誘導後 24 時間で発現量が 4 倍に増加している．*EEL* はアブシジン酸や環境ストレスに応答して発現することが明らかとなっている（Sakuraba et al.214）．このことから *ORE1* の発現は，*SGR* の発現による老化ストレスで誘導された *EEL* による経路が一つであると考えられる．また，反応中心と周辺集光アンテナの分解による量比の崩れなどによって処理できない光エネルギーは活性酸素を合成する．*ORE1* は老化系転写因子の他にも活性酸素によっても発現が誘導されるため，*ORE1* の発現には *EEL* のほかに活性酸素も関わっていると考えられる．

植物の自然老化は月齢や環境ストレスによる老化関連の植物ホルモンに端を発し，クロロフィル分解酵素によるクロロフィル分解などを初段階とする．クロロフィルはクロロフィル結合タンパク質の構造安定化に寄与しており，クロロフィル結合タンパク質はクロロフィルが分解されると構造を保てなくなり分解される．本研究において，クロロフィル結合タンパク質の分解について調べると，SGR の発現誘導後に光化学系 I が光化学系 II よりも早く分解されること，また，光化学系 I の反応中心と周辺集光アンテナ，光化学系 II の反応中心が分解されている点は *SGR*/WT と *SGR/nyc1 nol* に共通していた．相違点は *SGR*/WT では光化学系 II 周辺集光アンテナは分解される一方，クロロフィル *b* が分解されない *SGR/nyc1 nol* では光化学系 II 周辺集光アンテナが分解されないことであった．*SGR/nyc1 nol* のクロロフィル結合タンパク質を分離すると光化学系 II 周辺集光アンテナが 3 量体で存在していることが明らかとなった．切り出した 3 量体のクロロフィル *a/b* 比は 0.6 であり，健常葉のクロロフィル *a/b* 比と比較して半分程度低下していた．*SGR/nyc1 nol* はクロロフィル *b* が分解されないことから，クロロフィル *a/b* 比の減少はクロロフィル *a* の分解によるものである．以上より，*SGR* は光化学系 II 周辺集光アンテナ 3 量体のクロロフィル *a* に作用できることが明らかとなった．分解されないクロロフィル *a* はクロロフィル *b* によって安定化された光化学系 II 周辺集光アンテナ内部に存在し，*SGR* が作用できないからと考えられる．

電子顕微鏡での解析より，*SGR/nyc1 nol* においてグラナが厚くなる現象が観

察された．クロロフィル *b* は光化学系 II 周辺集光アンテナの構造安定に寄与しており，グラナは正・負両方の電荷を持つ光化学系 II 周辺集光アンテナどうしや周辺集光アンテナの負の電荷と Mg^{2+}の電気的相互作用で構造が作られている．このことから，*SGR/nyc1 nol* のグラナが厚くなる現象は分解されないクロロフィル *b* によって周辺集光アンテナが分解されないことに起因すると考えられる．

SGR を発現させると *SGR*/WT，*SGR/nyc1 nol* 共に CO_2 吸収量，光化学系 II の最大光子収率，熱放散が減少した．このことから，*SGR* の発現を誘導させておこる老化現象は自然老化とほぼ同じ老化であることが明らかとなった．CO_2 吸収量，光化学系 II の最大光子収率，熱放散の減少量は *SGR/nyc1 nol* のほうが大きかった．これは *SGR/nyc1 nol* はクロロフィル *b* が分解されないために周辺集光アンテナを分解できず，分解され始めた反応中心に供給されるエネルギー量が過剰になることが原因であると考えられる．

以上より，本研究ではクロロフィル *a* 分解酵素である *SGR* を発現させて起こるクロロフィル *b* 分解は *NYC1* の作用であることが明らかとなり，*SGR* と *NYC1* はジャスモン酸や活性酸素が橋渡ししていることが示唆された．*SGR* の発現誘導後，植物は様々な経路で *NYC1* の発現を誘導していた．老化時の植物体内では，ある現象を起こす遺伝子が他の反応にも作用し，数珠つなぎの老化関連の反応を複数動かすことで加速度的に，また安全に老化を進めていると考えられる．本研究では *SGR* がクロロフィル *a* を分解する反応を起点に，ジャスモン酸を介して *NYC1* によるクロロフィル *b* の分解など種々の反応を行なっていた．もし *SGR* と *NYC1* のどちらかの作用が先行してクロロフィルとクロロフィル結合タンパク質の分解が無秩序に行われると，反応中心と周辺集光アンテナの量比が崩れるなどしてエネルギーの処理が不十分となって活性酸素を生成してしまう．活性酸素は細胞内のタンパクなどを分解する前に細胞死を起こし，種子や実などの次世代の生産資源を無駄にしてしまう．そのため，*SGR* と *NYC1* を協調的に発現させるのは，クロロフィルとクロロフィル結合タンパク質の分解を秩序立って均整のとれたものにするためであると考えられる．生活環境を選べない植物にとって，生存に適さない環境では迅速に次世代を作る必要がある．植物は老化時に自己の組織や細胞成分を分解して次世代を生産するため，より確実に次世代を生産するには細胞成分などの分解や転流が不十分となる細胞死は避ける必要がある．そのため，上述の様に関連しあう様々な経路を用いて加速度的に老化を進めるのは，次世代をより多く，より確実に生産す

る一つの生存戦略であると考えられる．

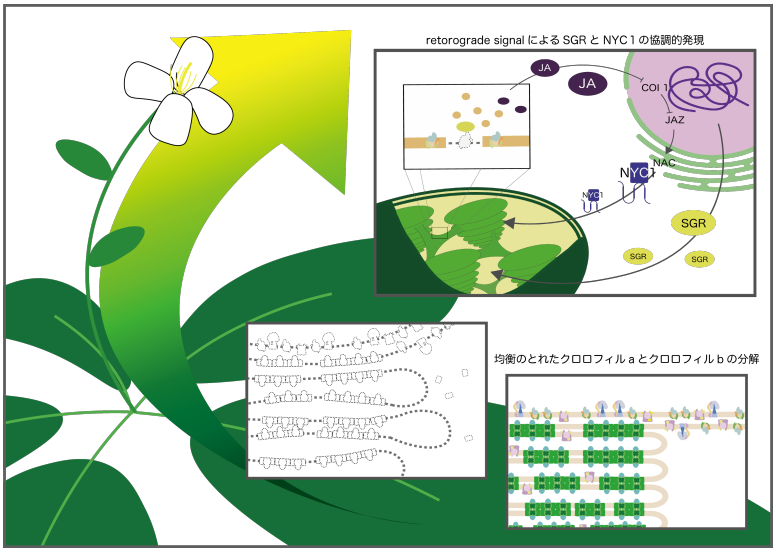


図53　SGRとNYC1の協調的発現とその役割

植物は老化期に細胞成分を分解して種子など次世代生産の資源とする．SGRのみが働くと，葉内の主要なタンパク質である光化学系II周辺集光アンテナが分解されず，次世代生産の資源が少なくなる．また，反応中心と周辺集光アンテナの量比が崩れ，処理できない光エネルギーによって活性酸素が発生すると考えられる．活性酸素は細胞死を招くため，細胞成分の分解や転流が不完全となり次世代生産に支障をきたす．そのため反応中心と周辺集光アンテナの分解は均整を保って行われる必要があり，SGRとNYC1の協調した働きが不可欠である．本研究では，SGRの発現後におこるクロロフィルb分解はNYC1の働きによることが明らかとなった．また，SGRの発現後にジャスモン酸が合成され，ジャスモン酸がretrograde signalとしてNYC1の発現を誘導することが示唆された．

VII. 謝辞

本研究を行うにあたり，生物適応研究室の田中歩教授と伊藤寿助教には手厚いご指導ご鞭撻をいただきました．こうして一つにまとめ上げられたこと，そして植物の老化という”小さい現象から大きな現象を扱い，遺伝子の相互作用を探求する”という進学当時からやりたい研究をやらせていただいたことにとても感謝しております．そして田中亮一准教授には研究室セミナーの際に本研究の精度上げるべく，ほころびやすい箇所を丁寧に質問していただけたことを感謝しております. 高林厚史助教には修士進学当時から面倒を見ていただき, PCRも知らない状態から今日までご指導いただけたことをとても感謝しております. そして学位論文を仕上げるにあたり，加藤敦之教授と藤田知道教授には本研究を客観的に見たご指摘をいただき，締りのある研究に仕上げられたことを感謝しております.

研究室では，岸本純子さんにはガラスナイフの作りかたを始め，電子顕微鏡の面白さを教えていただきました．自分の知らない世界への面白さを改めて感じられる体験をさせていただけたことをとても感謝しております．そして同期として入学試験からの付き合いの秋山雄希くんには，研究の理論的な面や実験方法で数多く相談に乗っていただきました．中間審査の前日に不安な部分を確認できたことはとても心強かったことを覚えていますありがとうございました. また，高橋小春さんをはじめ，研究室の後輩の方々と交流をもてたことも研究を進める上で大きな助けとなりました．ありがとうございました.

最後に，博士に進むことを快諾し，サポートし続けてくれた父母，そして兄にはいくら感謝してもし足りません．また，札幌での生活を支えてくれた妻にとても感謝しております．このほかにも多くの友人・知人に支えていただき，博士生活を送ることができました．札幌での生活に関わってくださった多くの皆様へに感謝しております.

VIII. 引用文献

Abdelrahmen M, El-Sayed M, Jogaiah S, Burritt J. D, Phan Tran L-S (2017) The "STAY GREEN" trait and phytohormone signaling networks in plants under heat stress. Plant Cell Rep **36**:1009-1025

Alawady AE, Grimm B (2005) Tobacco Mg protoporphyrin IX methyltransferase is involved in inverse activation of Mg porphyrin and protoheme synthesis. Plant J **41:** 282-290

Argyroudi-Akoyunoglou JH, Castorinis A (1980) Specificity of the chlorophyll-to-protein binding in the chlorophyll-protein complexes of the thylakoid. Arch Biochem Biophys **200:** 326-335

Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hörtensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L, Thomas A, Weeden N, Thomas H, King I (2006) From crop to model to crop: identifying the genetic basis of the staygreen mutation in the Lolium/Festuca forage and amenity grasses. New Phytol **172:** 592-597

Brzezowski P, Richter AS, Grimm B (2015) Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae. Biochim Biophys Acta **1847:** 968-985

Balazadeh S, Wu A, Muller-Roeber B(2010) Salt triggered expression of theANAC092-dependent senescence regulon in Arabidosis thaliana. Plnat Signaling & Behavior **5:6**,733-735

Chen J, Zhu X, Ren J, Qiu K, Li Z, Xie Z, Gao J, Zhou X, Kuai B (2017) Suppressor of Overexpression of CO 1 Negatively Regulates Dark-Induced Leaf Degreening and Senescence by Directly Repressing Pheophytinase and Other Senescence-Associated Genes in Arabidopsis. Plant Physiol **173:** 1881-1891

Craft J, Samalova M, Baroux C, Townley H, Martinez A, Jepson I, Tsiantis M, Moore I (2005) New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis. Plant J **41:** 899-918

Dekker P. J, Boekeme J. E (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. Biochimica et Biophysica Acta 1706: 12-39

Horie Y, Ito H, Kusaba M, Tanaka R, 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 (2009) Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. Trends Plant Sci **14:** 155-162

Hortensteiner S, Vicentini F, Matile P (1995) Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, Brassica napus L.: Enzymatic cleavage of phaeophorbide a in vitro. New Phytol **129:** 237-246

Jia T, Ito H, Hu X, Tanaka A (2015) Accumulation of the NON-YELLOW COLORING 1 protein of the chlorophyll cycle requires chlorophyll b in Arabidopsis thaliana. Plant J **81:** 586-596

Jibran R, Sullvian L. K, Crowhurst R, Erridge A. Z, Chagne D, McLachlan R.G. A, Brummell A. D, Dijkwel P. Pand Hunter A. D (2015) Staying greenpotshaevest: how three mutations in the Arabidopsis chlorophyll b reductase gene NYC1 delay degreening by distinct mechanisms. Journal of Experimental Botany **66**,6849-6862

Kusaba M, Ito H, Morita R, Iida S, Sato Y, Fujimoto M, Kawasaki S, Tanaka R, Hirochika H, Nishimura M, 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

Kusaba M, Tanaka A, Tanaka R (2013) Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. Photosynth Res **117:** 221-234

Liang C, Wang Y, Zhu Y, Tang J, Hu B, Liu L, Ou S, Wu H, Sun X, Chu J, Chu C (2014) OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. Proc Natl Acad Sci U S A **111:** 10013-10018

Lin Y-P, Wu M-C, Charng Y-y (2016) Identification of a Chlorophyll Dephytylase Involved in Chlorophyll Turnover in Arabidopsis. Plant Cell **28:** 2974-2990

Matsuda K, Shimoda Y, Tanaka A, Ito H (2016) Chlorophyll a is a favorable substrate for Chlamydomonas Mg-dechelatase encoded by STAY-GREEN. Plant Physiol Biochem **109:** 365-373

Meguro M, Ito H, Takabayashi A, Tanaka R, Tanaka A (2011) Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in Arabidopsis. Plant Cell **23:** 3442-3453

Nakajima S, Ito H, Tanaka R, Tanaka A (2012) Chlorophyll b reductase plays an essential role in maturation and storability of Arabidopsis seeds. Plant Physiol **160:** 261-273

Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II. Annu Rev Plant Biol **57:** 521-565

Oda-Yamamizo C, Mitsuda N, Sakamoto S, Ogawa D, Ohme-Takagi M, Ohmiya A (2016) The NAC transcription factor ANAC046 is a positive regulator of chlorophyll degradation and senescence in Arabidopsis leaves. Scientific Reports **6:** 23609

Park SY, Yu JW, Park JS, Li J, Yoo SC, Lee NY, Lee SK, Jeong SW, Seo HS, Koh HJ, Jeon JS, Park YI, Paek NC (2007) The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. Plant Cell **19:** 1649-1664

Pattanayak GK, Tripathy BC (2011) Overexpression of Protochlorophyllide Oxidoreductase C

Regulates Oxidative Stress in Arabidopsis. PloS one **6:** e26532

Pruzinska A, Tanner G, Anders I, Roca M, 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

Qin X, Suga M, Kuang T, Shen J-R (2015) Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. Science **348:** 989-995

Qiu K, Li Z, Yang Z, Chen J, Wu S, Zhu X, Gao S, Gao J, Ren G, Kuai B, Zhou X (2015) EIN3 and ORE1 Accelerate Degreening during Ethylene-Mediated Leaf Senescence by Directly Activating Chlorophyll Catabolic Genes in Arabidopsis. PLoS genetics **11:** e1005399

Rauf M, Arif M, Dortay H, Matallana-Ramirez P.L, Waters T. M, Gil Nam H, Lim P-O, Muller-Roeber B, Balazadeh S (2013) ORE1 balance leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. EMBO **14**: 382-388

Ren G, An K, Liao Y, Zhou X, Cao Y, Zhao H, Ge X, Kuai B (2007) Identification of a Novel Chloroplast Protein AtNYE1 Regulating Chlorophyll Degradation during Leaf Senescence in Arabidopsis. Plant Physiol **144:** 1429-1441

Rong H, Tang Y, Zhang H, Wu P, Chen Y, Li M, Wu G, Jiang H (2013) The Stay-Green Rice like (SGRL) gene regulates chlorophyll degradation in rice. J Plant Physiol **170:** 1367-1373

Saga Y, Tamiaki H (2012) Demetalation of Chlorophyll Pigments. Chemistry & Biodiversity **9:** 1659-1683

Sakuraba Y, Balazadeh S, Tanaka R, Mueller-Roeber B, Tanaka A (2012) Overproduction of chl b retards senescence through transcriptional reprogramming in Arabidopsis. Plant Cell Physiol **53:** 505-517

Sakuraba Y, Jeong J, Kang M-Y, Kim J, Paek N-C, Choi G (2014) Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in Arabidopsis. Nature Communications **5:** 4636

Sakuraba Y, Park S-Y, Kim Y-S, Wang S-H, Yoo S-C, Hörtensteiner S, Paek N-C (2014) Arabidopsis STAY-GREEN2 Is a Negative Regulator of Chlorophyll Degradation during Leaf Senescence. Mol Plant **7:** 1288-1302

Sakraba Y, Han S-Y, Lee S-H, Hortensteiner S, Paek N-C (2015) Arabidopsis NAC016 promotes chlorophyll breakdown by directry upregulating STAYGREEN1 transcription. Plant Cell Rep **35**: 155-166

Sato R, Ito H, Tanaka A (2015) Chlorophyll b regradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions. Photosynth Res **126**: 249-259

Sato Y, Morita R, Nishimura M, Yamaguchi H, Kusaba M (2007) Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. Proc Natl Acad Sci U S A **104:** 14169-14174

Schippers HM J (2015) Transcriptional networks in leaf senescence. Current Opinion in Plant Biology **27**:77-83

Schelbert S, Aubry S, Burla B, Agne B, Kessler F, Krupinska K, Hortensteiner S (2009) Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in Arabidopsis. Plant Cell **21:** 767-785

Schmied J, Hedtke B, Grimm B (2011) Overexpression of HEMA1 encoding glutamyl-tRNA reductase. J Plant Physiol **168:** 1372-1379

Shalygo N, Czarnecki O, Peter E, Grimm B (2009) Expression of chlorophyll synthase is also involved in feedback-control of chlorophyll biosynthesis. Plant Mol Biol **71:** 425-436

Shimoda Y, Ito H, Tanaka A (2016) Arabidopsis STAY-GREEN, Mendel's Green Cotyledon Gene, Encodes Magnesium-Dechelatase. Plant Cell **28:** 2147-2160

Tanaka R, Kobayashi K, Masuda T (2011) Tetrapyrrole Metabolism in Arabidopsis thaliana. The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists **9:** e0145

Teng K, Chang Z, Li X, Sun X, Liang X, Xu L, Chao Y, Han L (2016) Functional and RNA-Sequencing Analysis Revealed Expression of a Novel Stay-Green Gene from Zoysia japonica (ZjSGR) Caused Chlorophyll Degradation and Accelerated Senescence in Arabidopsis. Front Plant Sci **7**

Wielopolska A, Townley H, Moore I, Waterhouse P, Helliwell C (2005) A high-throughput inducible RNAi vector for plants. Plant Biotechnol J **3:** 583-590

Wu S, Li Z, Yang L, Xie Z, Chen J, Zhang W, Liu T, Gao S, Gao J, Zhum Y, Xin J, Ren G and Kuai B (2015) NON-YELLOWING2(NYE2) , a Close Paralog of NYE1, Plays a Positive Role in Chlorophyll Degradation in Arabidopsis. Molecular Plant **9**,624-627

Zhu X, Chen J, Xie Z, Gao J, Ren G, Gao S, Zhou X, Kuai B (2015) Jasmonic acid promotes degreening via MYC2/3/4- and ANAC019/055/072-mediated regulation of major chlorophyll catabolic genes. Plant J **84:** 597-610