

葉緑体 NDH を介した  
光化学系 I 循環的電子伝達経路が  
C<sub>4</sub> 光合成で果たす役割についての生理学的解析

石川 規子



# 目次

要旨

略語

序論 -----1

第1章 NDH 循環的電子伝達経路を抑制した C<sub>4</sub> 植物の作成-----11

第2章 NDH 循環的電子伝達経路の抑制が C<sub>4</sub> 光合成に及ぼす影響-----27

まとめ -----50

参考文献 -----51

謝辞

学術雑誌に発表した論文



## 要旨

葉緑体 NAD(P)H デヒドロゲナーゼ複合体 (NDH) はチラコイド膜に局在し、光化学系 I (PS I) の電子受容体である ferredoxin (Fd) からプラストキノンへの電子伝達を仲介する。この NDH を介した光化学系 I 循環的電子伝達経路 (NDH 経路) では NADPH を生成することなく ATP の生成に必要なプロトン駆動力 (proton motive force: *pmf*) を発生させることが可能である。そのため NDH 経路は光合成電子伝達で生成される ATP/NADPH 比の調節に寄与すると考えられており、タバコ、シロイヌナズナ、イネなどの C<sub>3</sub> 植物では強光や高温ストレス下での光合成の維持に NDH 経路が重要となることが知られている。しかしこれらの植物では NDH 経路とは別に PROTON GRADIENT REGULATION5 (PGR5) 等に依存した光化学系 I 循環的電子伝達経路 (PGR5-PGRL1 経路) が主に機能しており、NDH 経路の役割は補助的なものであると考えられている。一方、トウモロコシ、ソルガムなどの C<sub>4</sub> 植物は大気中の CO<sub>2</sub> を濃縮して炭酸固定をおこなうため、C<sub>3</sub> 植物に比べて光合成電子伝達でより多くの ATP を生成する必要がある。C<sub>4</sub> 植物では NDH の蓄積が C<sub>3</sub> 植物に比べて大きく上昇していることから、C<sub>3</sub> 植物では補助的な役割しかもたない NDH 経路が C<sub>4</sub> 植物では光合成の維持により本質的な役割を果たしている可能性が提唱されてきた。そこで本研究では NDH 経路が C<sub>4</sub> 光合成で果たす機能について明らかにするために葉緑体 NDH の活性を抑制した C<sub>4</sub> 植物を作成し、光合成に及ぼす影響について生理学的な解析をおこなった。

第 1 章では形質転換可能なキク科 NADP-malic enzyme (NADP-ME) 型の C<sub>4</sub> 植物 *Flaveria bidentis* を材料に葉緑体 NDH の活性維持に必須なサブユニットをコードする *NdhN* を標的とした RNAi およびアンチセンス法により NDH 抑制株の作出をおこなった。得られた *NdhN* 発現抑制株で NDH を介した電子伝達が著しく低下することをクロロフィル蛍光測定により確認した。またこれらの株ではチラコイド膜における葉緑体 NDH の蓄積が著しく減少することを示した。以上の結果より C<sub>4</sub> 光合成における NDH 経路の機能解析に必要な NDH 活性を抑制した C<sub>4</sub> 植物を得られたと結論した。

第 2 章では得られた NDH 抑制株を用いて光合成活性の解析をおこなった。NDH 抑制株では光化学系 II (PS II) の電子伝達速度に低下は見られなかったが、PS I への電子供与が抑制されることを示した。また NDH 抑制株では、チラコイド膜間でのプロトン勾配の発生をトリガーとするフィードバック熱放散に由来した non-photochemical quenching (NPQ) の誘導が抑制されることを示した。これらの結果から NDH の抑制によってチラコイド膜間での

プロトン輸送能が低下することが示唆された。そこでNDH抑制株で *pmf* の生成能を測定し、NDH経路が *pmf* の生成を通じて C<sub>4</sub>植物で ATP生成に寄与することを明らかにした。更にNDH抑制株ではATP生成速度が律速となる弱光-中光条件においてCO<sub>2</sub>吸収速度およびCO<sub>2</sub>濃縮効率の指標となる炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) の値が低下することを示し、NDH経路が正常に機能せずATPの生成が抑制されるとC<sub>4</sub>光合成における炭酸固定能も低下することを明らかにした。また、こうした炭酸固定能の低下は特に弱光条件下において植物の著しい生育遅延を引き起こすことを示した。一方、もう一つの光化学系I循環的電子伝達経路であるPGR5-PGRL1経路の活性はNDH抑制株でも維持されており、C<sub>4</sub>光合成におけるNDH経路の機能はPGR5-PGRL1経路だけでは完全に補うことはできないことも明らかとなった。

上記の結果により、NDH経路がATPの生成に機能することによって特に弱光条件下でのC<sub>4</sub>光合成の維持に不可欠な役割を果たすことを明らかにした。これらの結果と既知のC<sub>3</sub>植物におけるNDH経路の役割を比較し、C<sub>4</sub>化による炭酸固定系の進化とそれに伴うATP要求性の変化に対してNDH経路が果たす役割について、PGR5-PGRL1経路との違いもふまえて考察した。

## 略語

3-PGA 3-phosphoglycerate

Act actin

AL actinic light

Ala alanine

Asp aspartate

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

BSC bundle sheath cell

CBB Calvin-Benson-Bassham

CET cyclic electron transport

Cyt $b_6$  cytochrome  $b_6$

ECS electrochromic shift

Fd ferredoxin

Flv flavodiiron protein

FNR ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase

GUS  $\beta$ -glucuronidase

LET linear electron transport

Lhca light harvesting complex a

MC mesophyll cell

NAD-ME NAD-malic enzyme

NADP-MDH NADP-malate dehydrogenase

NADP-ME NADP-malic enzyme

NCBI The National Center for Biotechnology Information

NDH NAD(P)H dehydrogenase complex

NPQ non-photochemical quenching

OAA oxaloacetate

PEP phosphoenolpyruvate

PEPC phosphoenolpyruvate carboxylase

PEP-CK phosphoenolpyruvate carboxykinase

PGR5 PROTON GRADIENT REGULATION5

PGRL1 PGR5-Like1

*pmf* proton motive force

PnsB photosynthetic NDH subcomplex B

PnsL photosynthetic NDH subcomplex L

PPDK pyruvate orthophosphate dikinase

PS I photosystem I

PS II photosystem II

Pyr pyruvate

qRT-PCR quantitative reverse transcription-PCR

RACE-PCR rapid amplification of cDNA ends-PCR

RbcL ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit

RNAi RNA interference

RT-PCR reverse transcription-PCR

Rubisco ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

SRA Sequence Read Archive

TP triose phosphate

TTBS Tris buffered saline with Tween-20

X-gluc 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide

# 序論

## 葉緑体 NDH を介した光化学系 I 循環的電子伝達経路

光合成は光エネルギーを利用して有機化合物を生成する反応として定義される。人類は食糧をはじめとした生存に不可欠な有機化合物の生産を植物のおこなう光合成に依存しているが、光合成ではまず光エネルギーが光合成電子伝達によって生命に利用可能な ATP、NADPH といった化学エネルギーに変換される。次にこれらの ATP と NADPH を駆動エネルギーとして、Calvin-Benson-Bassham (CBB) サイクルにおける炭酸同化や窒素同化、硫黄同化などにより有機化合物が生成される。光合成電子伝達における ATP と NADPH の生成は主に Z スキームと呼ばれる直線的電子伝達経路 (linear electron transport: LET) によって説明される (Fig. 0-1)。直線的電子伝達経路における電子伝達は光励起された光化学系 (photosystem: PS) I および II から電子が放出されることによって始まる。この時、PS II から放出された電子はプラストキノン、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体、プラストシアニンを経て PS I へと伝達される。電子は PS I から ferredoxin (Fd) を経て ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase (FNR) により NADP<sup>+</sup> へと伝達され、NADPH が生成される。一連の電子伝達では水分解反応によるルーメンでのプロトン (H<sup>+</sup>) の発生と NADPH の生成によるストロマでのプロトンの消費がおこる。これらに加えてシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体の Q サイクルにより、Q<sub>o</sub> サイトではプラストキノール酸化反応に伴ってルーメンへプロトンが放出され、Q<sub>i</sub> サイトではプラストキノンの還元によってストロマからのプロトンの取り込みがおこる。これらの 4 つの反応によって直線的電子伝達経路ではチラコイド膜を介したプロトン駆動力 (proton motive force: *pmf*) が生じ、それを利用して ATP 合成酵素により ATP が生成される。

光合成電子伝達は電子の受容体や CBB サイクルのキャパシティに応じて制御される必要があり、光強度の増大に伴って際限なく光化学系を励起させると過剰な励起エネルギーが細胞に有害な活性酸素の生成を誘導してしまう。このため光合成電子伝達では PS II 反応中心の過剰励起を防ぐための PS II アンテナフィードバック熱放散や、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体の Q<sub>o</sub> サイトでの電子伝達制御など、電子伝達に伴うルーメン側の酸性化を引き金として電子伝達をダウンレギュレーションする機構が存在する。また water-water サイクルでは PS I の電子受容体側で発生した過剰な還元力を O<sub>2</sub> に伝達し、最終的に H<sub>2</sub>O へ還元することで活性酸素を消去する (Rochaix 2011、Tikhonov 2013、Roach and Krieger-Liszkay 2014)。これらに加え、光合成電子伝達では生成される ATP と NADPH の比率を調節するための機構も存在する。炭酸同化をはじめとした同化反応を駆動するために必要な ATP と NADPH の比率

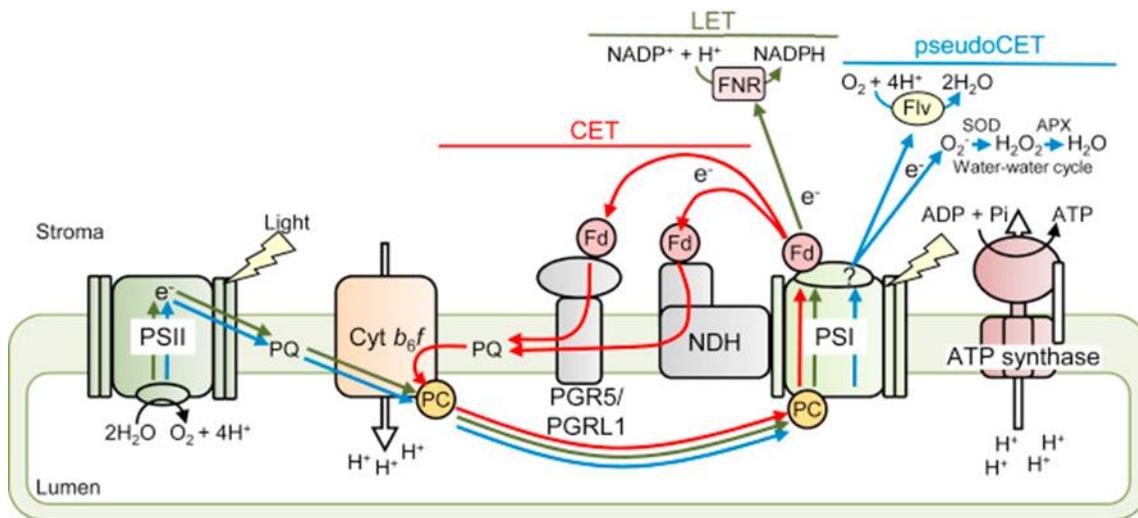
は反応ごとに様々であるが、直線的電子伝達経路では  $\text{NADP}^+$  への電子伝達とルーメンへのプロトン輸送がカップリングされているため ATP と NADPH を一定の比率でしか生成することができない。そのため光合成電子伝達には NADPH を蓄積させることなく *pmf* を発生させて ATP を生成することのできる代替経路が存在し、これらの経路が直線的電子伝達経路と共に稼働することで ATP と NADPH の生成比を調節していると考えられている。上述の water-water サイクルも NADPH ではなく  $\text{H}_2\text{O}$  を電子伝達の最終産物とすることから、こうした ATP/NADPH 生成比の調節に働く可能性が指摘されているが、被子植物ではその寄与はかなり小さく (Badger et al. 2000、Driever and Baker 2011、Shirao et al. 2013)、光化学系 I 循環的電子伝達経路 (cyclic electron transport: CET) が主にその役割を担っていると考えられている (Johnson 2011、Kramer and Evans 2011、Suorsa 2015、Yamori and Shikanai 2016、Shikanai and Yamamoto 2017)。

光化学系 I 循環的電子伝達経路では電子は PS II を経由せず、PS I の電子受容体側にある Fd からプラストキノンへ伝達される。プラストキノンを還元した電子はシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体の Q サイクル、プラストシアニンを経て再び PS I へと伝達される。これにより光化学系 I 循環的電子伝達経路では NADPH を生成することなく電子を伝達して *pmf* を生じさせ、ATP のみを生成することが可能となる (Fig. 0-1)。また電子伝達によるルーメンの酸性化によって光化学系 I 循環的電子伝達経路は PS II アンテナフィードバック熱放散の誘導にも寄与する (Johnson 2011、Suorsa 2015、Yamori and Shikanai 2016、Shikanai and Yamamoto 2017)。種子植物では電子伝達経路を部分的に共有する2つの循環的電子伝達経路、葉緑体 NAD(P)H dehydrogenase complex (NDH) を介した経路 (NDH 経路) と2つのチラコイド膜タンパク質 PROTON GRADIENT REGULATION5 (PGR5) および PGR5-Like1 (PGRL1) に依存した経路 (PGR5-PGRL1 経路) が主に稼働している (Burrows et al. 1998、Shikanai et al. 1998、Munekage et al. 2002、Munekage et al. 2004、Dalcorso et al. 2008、Hertle et al. 2013)。しかし、コショウランやクロマツといった一部の種子植物や、クラミドモナス、シズンなどの藻類では NDH 遺伝子が欠損していることが知られており (Wakasugi et al 1994、Ohta et al. 2003、Rumeau et al. 2005、Chang et al. 2006)、一方、シアノバクテリアでは *PGRL1* ホモログが保存されていないことが報告されている (Peltier et al. 2010、Allahverdiyeva et al. 2015)。

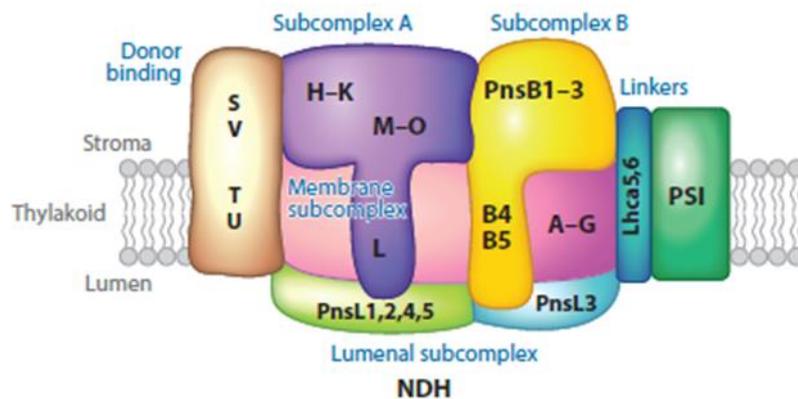
PGR5-PGRL1 経路に特異的に寄与するタンパク質がこれまでのところ PGR5 と PGRL1 の2種類しか種子植物では同定されていないのに対し、種子植物の NDH は葉緑体と核の両ゲノムにコードされた遺伝子に由来する、30以上のサブユニットで構成される (Fig. 0-2)。

このうち葉緑体ゲノムに存在する遺伝子にコードされた 11 のサブユニット (NdhA-K) はバクテリアおよびミトコンドリアの複合体 I でメンブレンドメインおよび結合ドメインを形成するコアサブユニットと相同性を示す。これらは葉緑体 NDH でもメンブレンサブコンプレックス (NdhA-G) とサブコンプレックス A の一部 (NdhH-K) を形成し、プラストキノンへの電子伝達とチラコイド膜間でのプロトンの輸送を担うと考えられている (Friedrich et al. 1995、Peltier et al. 2016)。しかし、葉緑体 NDH には複合体 I の NADH 結合ドメインと相同なサブユニットは存在せず (Grohmann et al. 1996)、電子供与体結合部位をはじめとした葉緑体 NDH の未知のサブユニットを同定する試みが、複合体を直接精製する生化学的手法に加え、遺伝学、プロテオミクス、バイオインフォマティクスなどによるアプローチを駆使しておこなわれた。その結果、Fd 結合モチーフをもつサブユニット (NdhS) が同定され、葉緑体 NDH ではこれを中心とした核コードの遺伝子に由来するサブユニットが電子供与体結合サブコンプレックス (NdhS-NdhV) を形成し、NADH や NADPH ではなく Fd から電子を受け取っていることが強く示唆された (Yamamoto et al. 2011、Fan et al. 2015)。この他にも核コードの遺伝子に由来する 15 以上のサブユニットが同定され、それらはサブコンプレックス A の一部 (NdhL-O)、サブコンプレックス B (photosynthetic NDH subcomplex B: PnsB1-5)、高等植物の PS II 酸素発生系タンパク質の相同タンパク質を中心に形成されたルーメンサブコンプレックス (photosynthetic NDH subcomplex L: PnsL1-5)、NDH と PS I の結合に特異的に働く PS I 集光アンテナタンパク質からなるリンカー (light harvesting complex a: Lhca5、6) を構成することが明らかとなった。しかし、シアノバクテリアのゲノムにはサブコンプレックス B、ルーメンサブコンプレックス、リンカーおよび NdhS 以外の電子供与体結合サブコンプレックスを構成するサブユニットをコードする遺伝子は保存されておらず、ゼニゴケにもルーメンサブコンプレックスの一部 (PnsL1-4) とリンカーをコードする遺伝子は存在しないことが明らかとなり、葉緑体 NDH の構造は進化の過程でその起源であるシアノバクテリアの NDH-1 から徐々に複雑化していったと考えられた (Peng et al. 2008、Ifuku et al. 2011、Peng et al. 2011、Peltier et al. 2016)。核コードの NDH 遺伝子は mRNA のレベルで協調的に発現していることがシロイヌナズナの共発現解析によって示されており、複雑化する巨大複合体の生合成を mRNA レベルで包括的に制御する機構が存在することが示唆されている (Takabayashi et al. 2009)。またこの協調的発現を利用して多数の新規 NDH 遺伝子の同定もおこなわれた (Ishihara et al. 2007、Ishikawa et al. 2008b、Ishida et al. 2009、Takabayashi et al. 2009、Yabuta et al. 2010)。

サブユニット構成が複雑化する一方で、種子植物（シロイヌナズナやタバコなど C<sub>3</sub> 植物）のチラコイド膜に蓄積する NDH の分子数は、PS II の約 1%、PS I および PGRL1 の数%程度と、非常に少ないことが示唆されている (Burrows et al. 1998、Peng et al. 2008、Hertle et al. 2013)。こうした蓄積量の少なさを反映してか、PGR5-PGRL1 経路を欠損したシロイヌナズナでは定常状態の光合成においてフィードバック熱放散や *pmf* の生成が抑制されるのに対し (Munekage et al. 2002、Dalcorso et al. 2008、Wang et al. 2015)、NDH 経路のみを欠損したシロイヌナズナ、タバコ、イネでは強光、弱光、乾燥、高温、低温など強いストレス条件下でしか表現型が見られない (Burrow et al. 1998、Endo et al. 1999、Horváth et al. 2000、Li et al. 2004、Wang et al. 2006、Ishikawa et al. 2008a、Yamori et al. 2011、Yamori et al. 2015)。また PGR5-PGRL1 経路は変動光下での PS I の光防御に重要な役割を果たすが、NDH 経路の寄与はそれに比べるとかなり小さい (Suorsa et al. 2012、Kono et al. 2014、Yamori et al. 2016)。しかし PGR5-PGRL1 経路および NDH 経路の両方を欠く二重変異シロイヌナズナでは非ストレス条件下でも光合成機能の著しい低下と深刻な生育障害が見られることから、NDH 経路は PGR5-PGRL1 経路の欠損した際にはそれを補う機能を持っていると考えられている (Munekage et al. 2004)。しかし、なぜ二つの部分的に機能重複した光化学系 I 循環的電子伝達経路が存在するのか、また NDH 経路の寄与が PGR5-PGRL1 経路に比べて小さいのは、単に蓄積量の差を反映したものなのか、それとも両経路には明確な機能分担があるのか、といった問題は明らかにされておらず、今後の光化学系 I 循環的電子伝達経路研究における重要な課題の一つと考えられた。



**Fig. 0-1** 光合成電子伝達の諸反応 (Shikanai and Yamamoto 2017 より引用)。緑色の矢印は直線的電子伝達経路 (linear electron transport: LET)、赤色は循環的電子伝達経路 (cyclic electron transport: CET)、青色は偽循環的電子伝達経路を表す。偽循環的電子伝達経路のうち、flavodiiron protein (Flv) に依存する経路は被子植物には存在しない (Allahverdiyeva et al. 2015)。



**Fig. 0-2** 種子植物の葉緑体 NDH の構造 (Peltier et al. 2016 より引用)。種子植物の葉緑体 NDH はその起源であるシアノバクテリアの NDH-1 には存在しない多数のサブユニット (NdhT-V、PnsB 1-5、PnsL 1-5、Lhca 5、6) を構成要素に持つ。

## 光化学系 I 循環的電子伝達経路と C<sub>4</sub> 光合成

NDH 経路を欠損した C<sub>3</sub> 植物では強光、乾燥、高温といったストレスへの耐性が低下するが、これらの条件では光呼吸が促進される。光呼吸では CO<sub>2</sub> と同時に遊離したアンモニウムイオンを再同化する際と、ホスホグリコール酸として失われた炭素基質を再び CBB サイクルに取り込み、リブローズ 1,5-ビスリン酸を再生する際に ATP と NADPH が必要となる。このため光呼吸が発生する条件下では C<sub>3</sub> 光合成に必要な ATP/NADPH 比は光呼吸が生じない場合に比べて高くなる (光呼吸なし: ATP/NADPH = 1.5、光呼吸あり: ATP/NADPH = 1.51~1.67) (Evans and Kramer 2011、Fig. 0-3)。これらのことから、C<sub>3</sub> 植物における NDH 経路の機能の一つとして、光合成電子伝達で要求される ATP/NADPH 生成比が高くなり、PGR5-PGRL1 経路だけではその要求を満たすことができなくなった時に必要な ATP の生成に働く可能性が提唱されている (Horváth et al. 2000、Rochaix 2011、Shikanai 2014、Yamori and Shikanai 2016)。

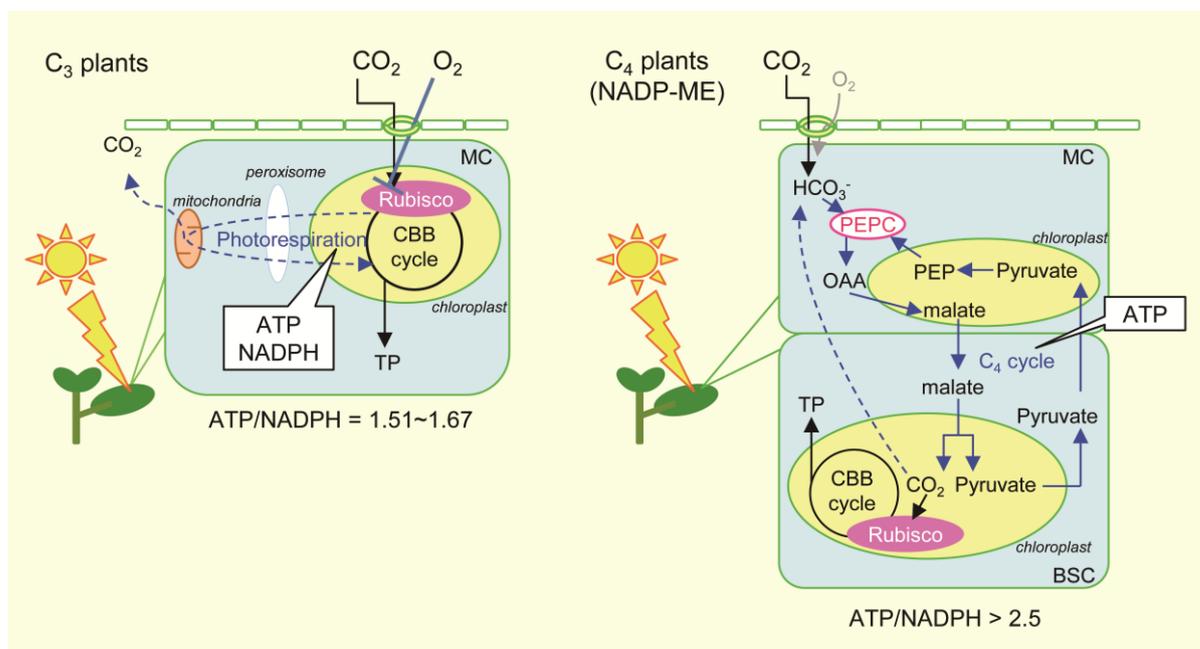
では炭酸固定に必要な ATP/NADPH 比がより高い植物では NDH 経路の寄与はより大きくなるのだろうか。C<sub>4</sub> 植物は一般に、クランツ構造と呼ばれる維管束鞘細胞の発達した特殊な構造の葉をもち、まず葉肉細胞で酸素と親和性を持たない phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) が炭酸固定をおこない、C<sub>4</sub> 化合物であるオキサロ酢酸を生じる。オキサロ酢酸はリンゴ酸、アスパラギン酸に変換されるなどして、維管束鞘細胞に拡散/輸送され、脱炭酸により ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) に CO<sub>2</sub> を供給する。この C<sub>4</sub> 経路と呼ばれる代謝経路により C<sub>4</sub> 植物では Rubisco 近傍の CO<sub>2</sub> 分圧を高め、光呼吸を抑制して効率のよい炭酸固定 (C<sub>4</sub> 光合成) をおこなうことができる。その一方で、C<sub>4</sub> 経路の駆動には PEPC の基質であるホスホエノールピルビン酸を再生産するために ATP が必要となる。1 分子の CO<sub>2</sub> の固定に C<sub>4</sub> 経路では 2 分子の ATP が消費され、これに加えて CBB サイクルで 3ATP、2NADPH を消費するため C<sub>4</sub> 光合成に必要な ATP/NADPH 比は 2.5 となる。これは上述の光呼吸活性条件下での C<sub>3</sub> 光合成に必要な ATP/NADPH 比よりも遥かに高い値である。*In vivo* では C<sub>4</sub> 経路から供給された CO<sub>2</sub> の一部が Rubisco に固定されずに葉肉細胞に漏れ出し、再び PEPC に固定されて C<sub>4</sub> 経路へ戻る、いわゆる“CO<sub>2</sub> の漏れ”が生じるため、実際に C<sub>4</sub> 光合成で必要となる ATP/NADPH 比は更に高くなることが指摘されている (Kanai and Edwards 1999、Amthor 2010、Fig. 0-3)。

C<sub>4</sub> 植物の 3 つのサブタイプのうち、phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEP-CK) 型では主

に呼吸電子伝達によって C<sub>4</sub> 経路に必要な ATP を供給しているが、NAD-malic enzyme (NAD-ME) 型および NADP-malic enzyme (NADP-ME) 型では光合成電子伝達が主に寄与していると考えられている (Edwards and Walker 1983, Hatch 1987, Burnell and Hatch 1988, Hatch et al. 1988, Carnal et al. 1993)。トウモロコシやソルガムなど NADP-ME 型の単子葉の C<sub>4</sub> 植物では、維管束鞘細胞の葉緑体に PS II 活性はほとんど見られず、NADPH はリンゴ酸の脱炭酸によって供給される。このため、これらの植物の維管束鞘細胞では ATP の要求性が非常に高く、直線的電子伝達経路よりもむしろ光化学系 I 循環的電子伝達経路による光合成電子伝達がおこなわれていると考えられている (Edwards and Walker 1983, Hatch 1987)。また、これらの植物では葉肉細胞に比べて維管束鞘細胞における NDH の蓄積も増大することが知られている (Kubicki et al. 1996, Takabayashi et al. 2005, Majeran et al. 2008, Friso et al. 2010, Fig. 0-4)。一方、維管束鞘細胞よりも葉肉細胞で ATP 要求性の高い NAD-ME 型の C<sub>4</sub> 植物ではむしろ NDH の発現は葉肉細胞の葉緑体で多くなることが報告されており、C<sub>4</sub> 植物の光合成組織における NDH の蓄積と ATP 要求性の間には正の相関があることが示されている (Takabayashi et al. 2005, Offerman et al. 2015, Fig. 0-4)。これらに加えて、NDH の蓄積は NAD-ME 型および NADP-ME 型の C<sub>4</sub> 植物で C<sub>3</sub> 植物の 10 倍以上に増加していることも明らかとなっている (Takabayashi et al. 2005, Munekage et al. 2010, Nakamura et al. 2013)。このような C<sub>4</sub> 植物にみられる NDH の蓄積の増大は mRNA レベルですべてのサブユニット遺伝子について包括的に引き起こされていることが様々な C<sub>4</sub> 植物において示唆されている (Kubicki et al. 1996, Takabayashi et al. 2005, Li et al. 2010, Bräutigam et al. 2011, Gowik et al. 2011)。これに対し、PGR5-PGRL1 経路に必須なタンパク質である PGR5 と PGRL1 の C<sub>4</sub> 植物における蓄積と ATP 要求性にはそれほど明確な相関は見られず、C<sub>3</sub> 植物と比べてもその蓄積は 1~3 倍程度と、NDH のような劇的な増大は見られない (Takabayashi et al. 2005, Majeran et al. 2008, Friso et al. 2010, Nakamura et al. 2013)。

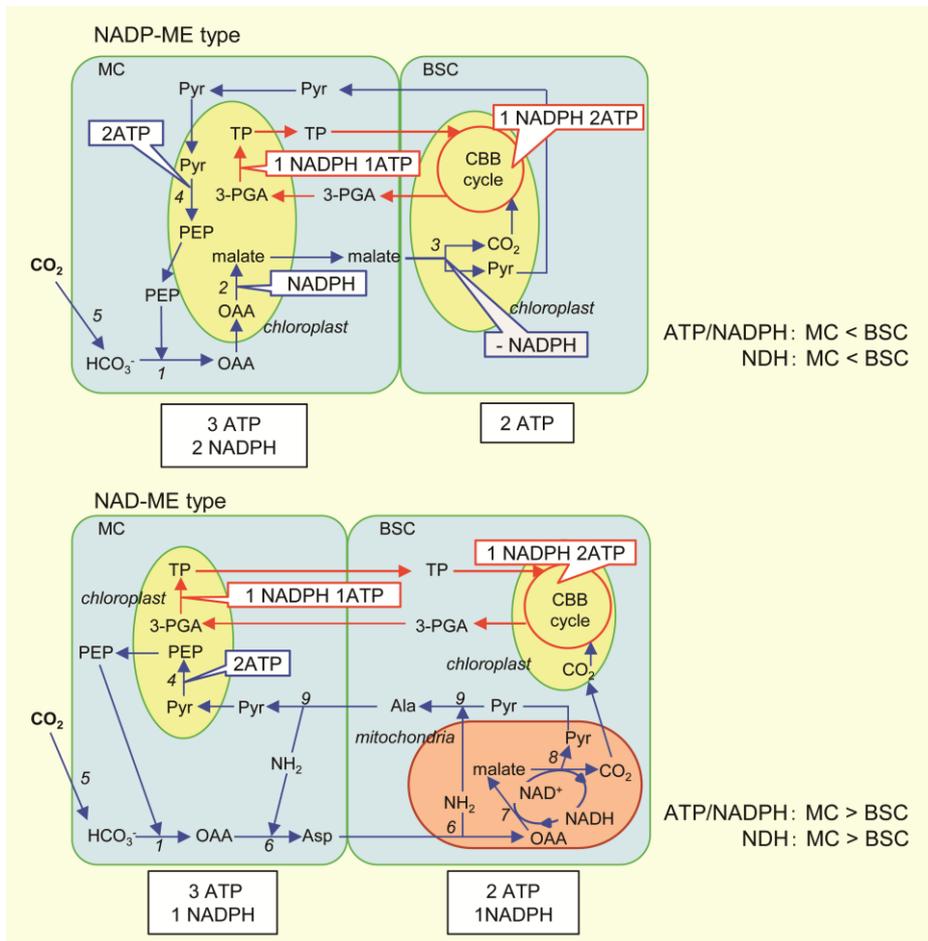
以上のような先行研究により、C<sub>3</sub> 植物では補助的な役割しかもたない NDH 経路が C<sub>4</sub> 植物では光合成の維持に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆されてきた。そこで本研究では C<sub>4</sub> 光合成における NDH 経路の寄与について明らかにするために同経路を抑制した C<sub>4</sub> 植物を作成し、C<sub>4</sub> 光合成に及ぼす影響について生理学的な解析をおこなうこととした。本論文では第 1 章において NDH 経路における電子伝達で中心的な役割を担う葉緑体 NDH を抑制した C<sub>4</sub> 植物を作出した。材料には形質転換体の報告例が最も多い C<sub>4</sub> 植物の一つである *Flaveria bidentis* (キク科、NADP-ME 型) を用い、NDH 活性の維持に必須なサブユニット

をコードする *NdhN* を標的として RNA interference (RNAi) およびアンチセンス法により遺伝子の発現を抑制した形質転換植物を作出した。その結果、*NdhN* 抑制株では NDH のチラコイド膜への蓄積が著しく減少し、NDH 経路における電子伝達が抑制されることが示された。第 2 章では NDH 抑制株における CO<sub>2</sub> 吸収速度や電子伝達活性、異なる光条件下での植物の生育などについて解析した。その結果、NDH 抑制株では弱-中光下での CO<sub>2</sub> 吸収速度に低下が見られ、特に弱光条件下での生育が著しく阻害されることが明らかとなった。NDH 抑制株におけるこれらの表現型は NDH 経路の抑制によって ATP 生成能が低下し、C<sub>4</sub> 経路による CO<sub>2</sub> 濃縮が上手く機能しなくなったためであることが電子伝達活性測定の結果などから示唆された。まとめでは C<sub>3</sub> 植物と C<sub>4</sub> 植物における炭酸固定様式の違いに起因する ATP 要求性の違いと、それに応じて NDH 経路が果たす役割について考察した。



**Fig. 0-3** C<sub>3</sub>光合成およびC<sub>4</sub>光合成の概要と光合成経路の駆動に必要なATP/NADPH比。

BSC: bundle sheath cell、CBB cycle: Calvin-Benson-Bassham cycle、MC: mesophyll cell、OAA: oxaloacetate、PEP: phosphoenolpyruvate、PEPC: phosphoenolpyruvate carboxylase、Rubisco: ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase、TP: triose phosphate。CBB サイクルに必要な ATP、NADPH に加えて、C<sub>3</sub> 光合成では光呼吸で ATP と NADPH が、C<sub>4</sub> 光合成では C<sub>4</sub> 経路で ATP が必要となる。



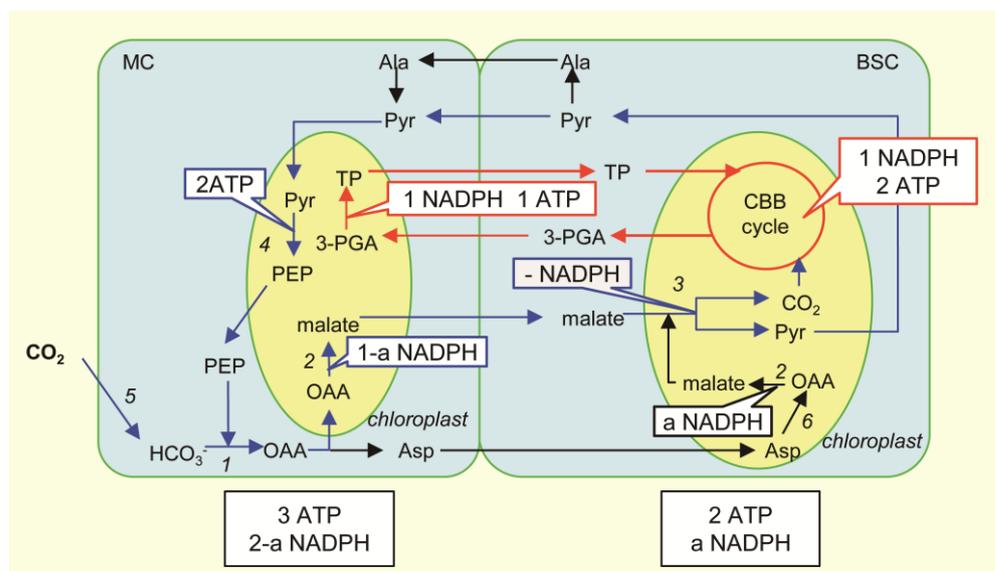
**Fig. 0-4** NADP-ME 型および NAD-ME 型  $C_4$  光合成の葉肉細胞、維管束鞘細胞における ATP、NADPH 要求性と NDH の発現 (Ishikawa et al. 2016 より一部改変して引用)。3-PGA: 3-phosphoglycerate、Ala: alanine、Asp: aspartate、CBB cycle: Calvin-Benson-Bassham cycle、OAA: oxaloacetate、PEP: phosphoenolpyruvate、Pyr: pyruvate、TP: triose phosphate。1: phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)、2: NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH)、3: NADP-malic enzyme (NADP-ME)、4: pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK)、5: carbonic anhydrase、6: aspartate aminotransferase、7: NAD-malate dehydrogenase、8: NAD-malic enzyme (NAD-ME)、9: alanine aminotransferase。青い矢印は  $C_4$  経路、赤い矢印は CBB サイクルを表す。ATP/NADPH 要求性が維管束鞘細胞 (bundle sheath cell: BSC) で高い NADP-ME 型では NDH の蓄積も維管束鞘細胞で高く、ATP/NADPH 要求性が葉肉細胞 (mesophyll cell: MC) で高い NAD-ME 型では NDH は葉肉細胞に多く蓄積する。また、炭酸固定系全体での ATP および NADPH の要求性は NADP-ME 型、NAD-ME 型のいずれにおいても 5ATP、2NADPH となる (ただし維管束鞘細胞からの  $CO_2$  の漏れにより必要となる ATP については考慮していない)。

## 第1章 NDH 循環的電子伝達経路を抑制した C<sub>4</sub> 植物の作成

NDH 経路の C<sub>4</sub> 光合成における寄与を生理学的に明らかにするために本章では C<sub>4</sub> 植物 *F. bidentis* を材料に用いて NDH 活性の維持に必須な NdhN サブユニットの mRNA を標的に RNAi およびアンチセンス法によって NDH 経路を抑制した C<sub>4</sub> 植物の作出をおこなった。

C<sub>4</sub> 植物では、C<sub>3</sub> 植物におけるシロイヌナズナやイネなどのように、ゲノムが広く公開され、かつ形質転換が容易におこなえる (あるいは豊富な変異体リソースが容易に入手可能な) モデル植物は確立されていない (Brown et al. 2005)。このため本研究では、形質転換体の作出が比較的容易という利点をもつ *F. bidentis* を材料に選択した。*F. bidentis* はフロリダ～中南米に自生するキク科一年草の雑草で、二倍体 ( $n=18$ )、自家受粉で種子をつけることができ、半年～一年で次世代を収穫できる (Powell 1978)。*F. bidentis* の C<sub>4</sub> 光合成のサブタイプは NADP-ME 型に分類されるが、一部 NAD-ME 型様の代謝経路も稼働しており、維管束鞘細胞の葉緑体でも NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH) によって NADPH を駆動エネルギーとしたリンゴ酸生成反応がおこなわれるという特徴をもつ (Meister et al. 1996、Gowik et al. 2011、Fig. 1-1)。このため *F. bidentis* では、トウモロコシなど NADP-ME 型の単子葉の C<sub>4</sub> 植物とは違って維管束鞘細胞の葉緑体においても PS II の蓄積と活性が認められ、直線的電子伝達経路による ATP と NADPH の供給がおこなわれていると考えられている (Ketchner and Sayre 1992、Meister et al. 1996)。しかし、*F. bidentis* の C<sub>4</sub> 経路で生成されるリンゴ酸のうち維管束鞘細胞葉緑体で生成されるものは全体の 40%程度で (Meister et al. 1996)、それを考慮したとしても *F. bidentis* における ATP 要求性は維管束鞘細胞の方で葉肉細胞よりも高く (Ishikawa et al. 2016)、NDH も維管束鞘細胞葉緑体により多く蓄積することが報告されている (Nakamura et al. 2013)。また、*Flaveria* 属には C<sub>3</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate、C<sub>4</sub>-like といった光合成型の異なる種が存在するため C<sub>4</sub> 進化を調べるのに適しており (Powell 1978、Ku et al. 1991)、そのうち C<sub>4</sub> 種の *F. bidentis* と C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate 種の *F. pubescens* の 2 種についてアグロバクテリウムを用いた形質転換法が確立されている (Chitty et al. 1994、Chu et al. 1997)。*Flaveria* 属のゲノムは公開されていないが、光合成特性の異なる *Flaveria* 属の植物 (C<sub>3</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate、C<sub>4</sub> 種) を材料とした比較トランスクリプトーム解析がおこなわれ、次世代シーケンサーによって解読された cDNA 断片が The National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Sequence Read Archive (SRA) に登録されている (Gowik et al. 2011、<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?view=announcement>)。比

較トランスクリプトーム解析の結果から、*Flaveria* 属の C<sub>4</sub> 種では C<sub>3</sub> 種に比べて *NDH* 遺伝子の発現が包括的に上昇していることが明らかとなっており (Gowik et al. 2011)、また、*NDH* のタンパク質レベルでの蓄積も C<sub>4</sub> 種では C<sub>3</sub> 種の 10 倍以上に増大することが報告されている (Nakamura et al. 2013)。



**Fig. 1-1** *F. bidentis* の C<sub>4</sub> 経路と葉肉細胞、維管束鞘細胞における ATP、NADPH の要求性。

*F. bidentis* では典型的な NADP-ME 型 C<sub>4</sub> 経路 (青矢印) に加えて一部、NAD-ME 型様の C<sub>4</sub> 経路 (黒矢印) が稼働している。赤い矢印は CBB サイクルを表す。3-PGA: 3-phosphoglycerate、Ala: alanine、Asp: aspartate、CBB cycle: Calvin-Benson-Bassham cycle、OAA: oxaloacetate、PEP: phosphoenolpyruvate、Pyr: pyruvate、TP: triose phosphate。1: phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)、2: NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH)、3: NADP-malic enzyme (NADP-ME)、4: pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK)、5: carbonic anhydrase、6: aspartate aminotransferase。“a” は葉肉細胞 (mesophyll cell: MC) で生成されたオキサロ酢酸のうちアスパラギン酸に変換される割合を示し、 $a = 0.35 \sim 0.4$  と見積もられている (Meister et al. 1996)。 $a = 0.4$  とした場合でも、ATP/NADPH 要求比率は葉肉細胞で ATP/NADPH = 1.88、維管束鞘細胞 (bundle sheath cell: BSC) で ATP/NADPH = 5.0 となり、典型的な NADP-ME 型と同様、維管束鞘細胞における ATP 要求性が高くなる。また光合成系全体での ATP および NADPH の要求性は、維管束鞘細胞からの CO<sub>2</sub> の漏れを考慮しない場合、5ATP、2NADPH となり典型的な NADP-ME 型および NAD-ME 型の C<sub>4</sub> 光合成における値と変わらない (Ishikawa et al. 2016)。

遺伝子抑制の標的とした *NdhN* は核にコードされた NDH のサブユニット遺伝子の中でも最も初期に同定されたものの一つで、*NdhN* はチラコイド膜上において NDH の構造を安定化させる役割を果たし、その欠損により NDH 経路が機能しなくなることがシロイヌナズナを用いた先行研究において報告されている (Rumeau et al. 2005)。また、*NdhN* は葉緑体 NDH の起源であるシアノバクテリアの NDH-1 にも保存されていることから (Peltier et al. 2016)、NDH の基本構造を構成する重要なサブユニットの一つと考えられた。これらの理由から *NdhN* をコードする mRNA を NDH 経路抑制のための標的として選定した。

## [方法]

### **Fb*NdhN* の cDNA およびゲノム配列の同定**

発現抑制の標的とした *F. bidentis* の *NdhN* (Fb*NdhN*) の cDNA 配列を同定するために *F. bidentis* 野生株の上位展開葉から RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) を用いて total RNA を単離した。Total RNA 1 µg から Super Script III reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて cDNA を作成し、degenerate PCR によって Fb*NdhN* の部分配列をクローニングした。この部分配列をもとに GeneRacer<sup>TM</sup> Kit (Invitrogen) を用いて rapid amplification of cDNA ends-PCR (RACE-PCR) をおこない、Fb*NdhN* の cDNA 配列を得た。また reverse transcription-PCR (RT-PCR) などをおこなう際のコントロール遺伝子としてアクチン (Fb*Act*) の配列も同定した。Fb*NdhN* のゲノム配列の同定は、*F. bidentis* 野生株の上位展開葉からゲノム DNA を単離し (Edwards et al.1991)、これをテンプレートとした PCR によりおこなった。PCR に用いたプライマーの配列は Table 1-1 に示した。

**Table 1-1 FbNdhN および FbAct のクローニングに用いたプライマー**

プライマー配列	
A forward primer for degenerate PCR cloning FbNdhN	5'- CCICAYGARGGIGGITAYGA -3'
A reverse primer for degenerate PCR cloning FbNdhN	5'- CCARTTICCRCAAYTCIGCIAT -3'
A nested forward primer for degenerate PCR cloning FbNdhN	5'- CAYGARGGIGGITAYGARGG -3'
A nested reverse primer for degenerate PCR cloning FbNdhN	5'- TTICCRCAAYTCIGCIATIAC -3'
A forward primer for RACE-PCR cloning FbNdhN	5'- TTTGGACCTATCGGCTCGGGGTCT -3'
A reverse primer for RACE-PCR cloning FbNdhN	5'- TGGGCCGGAGTGTAGGAAGCAG -3'
A nested forward primer for RACE-PCR cloning FbNdhN	5'- CGGGGTCTAGGTGACCCGGAGA -3'
A nested reverse primer for RACE-PCR cloning FbNdhN	5'- GCAGTTCTGCTTTGGAGAGAACCCTTGG -3'
A forward primer for degenerate PCR cloning FbAct	5'- CAACTGGGACGACATGGAGA -3'
A reverse primer for degenerate PCR cloning FbAct	5'- GATCCACATCTGCTGGAAGG -3'
A forward primer for RACE-PCR cloning FbAct	5'- TCACACACGGTCCCAATTTA -3'
A reverse primer for RACE-PCR cloning FbAct	5'- CTCTCAGGAGGAGCAACCAC -3'
A nested forward primer for RACE-PCR cloning FbAct	5'- GTCCCAATTTATGAAGGTTATGC -3'
A nested reverse primer for RACE-PCR cloning FbAct	5'- AGGAGGAGCAACCACCTTG -3'
A forward primer for genomic PCR cloning FbNdhN	5'- ACCATTCAGCCCTTGTACG -3'
A reverse primer for genomic PCR cloning FbNdhN	5'- GCTAGTATATGATTGCAGGCATTG -3'

### FbNdhN 発現抑制コンストラクトの作成

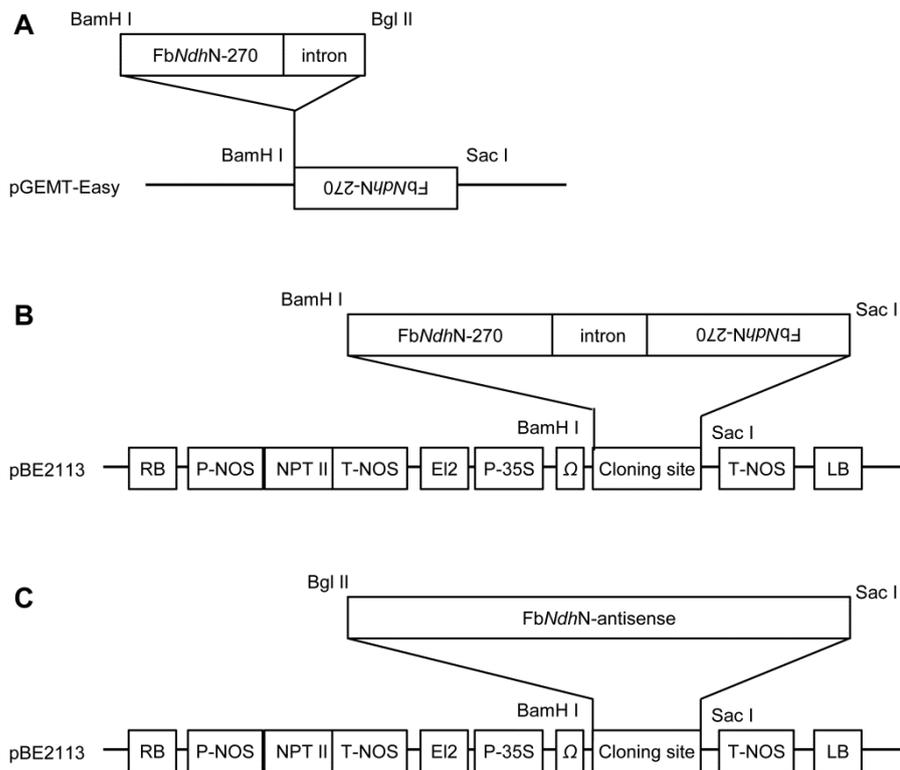
RNAi により FbNdhN の発現抑制を誘導するために、FbNdhN の第一エクソン中の標的配列 (270 bp) を FbNdhN の第一イントロンを挟んでインバーテッドリピートに配したコンストラクトを作成した。まず、5'末端に BamH I サイト、3'側に Bgl II サイトをそれぞれ付加した、標的配列と第一イントロンからなる DNA 断片 (FbNdhN-270 + intron) を *F. bidentis* 野生株のゲノムをテンプレートに PCR によって増幅した。次に 5'末端に Sac I サイト、3'側に

BamH I サイトをそれぞれ付加した標的配列の DNA 断片 (Fb*NdhN*-270) を同様に増幅した。各 DNA 断片を pGEM-T Easy vector (Promega) にサブクローニングしたのち、Fb*NdhN*-270 + intron 断片を BamH I と Bgl II によって切り出し、Fb*NdhN*-270 配列の 3'側 (Fb*NdhN*-270 アンチセンス配列の 5'側) の BamH I サイトにインバーテッドリピート配列を形成するようにライゲートした (Fig. 1-2A)。得られたインバーテッドリピート配列を BamH I、Sac I で切り出し、バイナリーベクター pBE2113 (Mitsuhara et al.1996) に導入して RNAi コンストラクトを作成した (Fig. 1-2B)。アンチセンスコンストラクトは 5'末端に Bgl II サイト、3'末端に Sac I サイトを持つ、Fb*NdhN* コーディング領域中の配列 (537 bp) のアンチセンス配列 (Fb*NdhN*-antisense) を pBE2113 のクローニングサイト (BamH I-Sac I 間) に導入して作成した (Fig. 1-2C)。PCR に用いたプライマーの配列は Table 1-2 に示した。

**Table 1-2 Fb*NdhN* 発現抑制コンストラクトの作成に用いたプライマー**

プライマー配列	
A forward primer for amplifying Fb <i>NdhN</i> -270 + intron fragment	5'- <u>GGATCC</u> <sup>1</sup> ATGAAA ACTAAGTACCGTAAAGGA -3'
A reverse primer for amplifying Fb <i>NdhN</i> -270 + intron fragment	5'- <u>AGATCT</u> <sup>2</sup> CCTGCATTACGTATATAAAGTACG -3'
A forward primer for amplifying Fb <i>NdhN</i> -270	5'- <u>GAGCTC</u> <sup>3</sup> ATGAAA ACTAAGTACCGTAAAGGA -3'
A reverse primer for amplifying Fb <i>NdhN</i> -270	5'- <u>GGATCC</u> <sup>1</sup> CAGGACAAACTGGATGAAGC -3'
A forward primer for amplifying antisense fragment of Fb <i>NdhN</i>	5'- <u>AGATCT</u> <sup>2, 4</sup> TCATTGGCAAGATAAACCAG -3'
A reverse primer for amplifying antisense fragment of Fb <i>NdhN</i>	5'- <u>GAGCTC</u> <sup>3</sup> ATGAAA ACTAAGTACCGTAAAGGA -3'

<sup>1</sup>BamH I サイト、<sup>2</sup>Bgl II サイト、<sup>3</sup>Sac I サイト、<sup>4</sup>アンチセンス標的配列中に BamH I サイトが存在したため Bgl II サイトを付加した。



**Fig. 1-2 FbNdhN 発現抑制コンストラクトの作成。** (A) FbNdhN 中の RNAi 標的配列 270 bp (FbNdhN-270) のアンチセンス配列の 5'側に RNAi 標的配列と FbNdhN 第一イントロンを挿入して FbNdhN の発現を抑制するインバーテッドリピート配列を作成した。(B)、(C) バイナリーベクター pBE2113 (Mitsuhara et al. 1996) のクローニングサイトに FbNdhN-270 のインバーテッドリピート配列もしくは FbNdhN のアンチセンス配列をそれぞれ導入して RNAi コンストラクトおよびアンチセンスコンストラクトを作成した。

### ***F. bidentis* の形質転換**

RNAi およびアンチセンスコンストラクトをアグロバクテリウム (AGL-1) にエレクトロポレーションにより導入した。これを *F. bidentis* の播種後 7 日目の無菌実生から切り出した胚軸に感染させ、シュートを再分化させることで形質転換体を得た (Chitty et al. 1994)。シュートの再分化は、アグロバクテリウムに感染させた胚軸を callus regeneration medium (Chitty et al. 1994) 上で遮光し、25°C で 4 週間培養して誘導した。再分化したシュートは shoot proliferation medium (Chitty et al. 1994) に移植し、16 時間明期/8 時間暗期、50~100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、25°C で培養した。シュートの発根がなかなか見られない場合は培地に IBA

( $1 \times 10^{-6}$  M) を添加して発根を促した。ベクターコントロールには RNAi およびアンチセンス誘導配列の代わりに  $\beta$ -glucuronidase (GUS) または sGFP 配列を導入した pBE2113 を用いた。また、形質転換体を選抜するためにシュートの誘導および培養に用いたすべての培地にはカナマイシン ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) を添加した。発根したシュートは育苗用培養土 (土太郎: スミリン農産工業株式会社) とバーミキュライトの混合土 (1:1) に移植した。まずは混合土をアグリポットに入れて  $121^\circ\text{C}$ 、20 分オートクレーブした滅菌環境でシュートを生育させ、その後、非滅菌環境に移し、16 時間明期/8 時間暗期、 $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、 $27^\circ\text{C}/23^\circ\text{C}$  で栽培した。

### RT-PCR および quantitative RT-PCR (qRT-PCR) による *FbNdhN* 発現抑制の評価

形質転換体における *FbNdhN* の発現抑制を評価するために、*FbNdhN* の RNAi 誘導配列導入株、アンチセンス配列導入株およびベクターコントロール株の上位展開葉から上述の方法で total RNA を単離して cDNA を作成し、RT-PCR および qRT-PCR をおこなった。RT-PCR は、初期熱変性を  $95^\circ\text{C}$ 、2 分おこなった後、熱変性  $95^\circ\text{C}$ 、30 秒、アニーリング  $55^\circ\text{C}$ 、30 秒、伸長  $72^\circ\text{C}$ 、1 分を 30 サイクル繰り返し、最終伸長を  $72^\circ\text{C}$  で 5 分間おこなった。qRT-PCR は反応液に iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を用い、CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) で増幅シグナルを検出した。内在コントロール遺伝子には *F. bidentis* のアクチン (*FbAct*) を用いた。RT-PCR および qRT-PCR に用いたプライマーの配列は Table 1-3 に示した。

**Table 1-3 RT-PCR および qRT-PCR に用いたプライマー**

	プライマー配列
A forward primer for RT-PCR amplifying <i>FbNdhN</i>	5'- ATGAAACTAAGTACCGTAAAGGA -3'
A reverse primer for RT-PCR amplifying <i>FbNdhN</i>	5'- TCATTGGCAAGATAAACCAG -3'
A forward primer for RT-PCR amplifying <i>FbAct</i>	5'- TCACACACGGTCCCAATTTA -3'
A reverse primer for RT-PCR amplifying <i>FbAct</i>	5'- GATCCACATCTGCTGGAAGG -3'
A forward primer for qRT-PCR amplifying <i>FbNdhN</i>	5'- ACCATTTTCAGCCCTTGTACG -3'
A reverse primer for qRT-PCR amplifying <i>FbNdhN</i>	5'- GTCCGAAACTCTCGAGCAC -3'
A forward primer for qRT-PCR amplifying <i>FbAct</i>	5'- TGCTGACCGTATGAGCAAAG -3'
A reverse primer for qRT-PCR amplifying <i>FbAct</i>	5'- CTCTCAGGAGGAGCAACCAC -3'

## GUS 染色

材料には GUS 形質転換株 (T<sub>1</sub> 世代) および野生株の週齢 8 週目の上位展開葉から切り出した数 mm 幅の葉片もしくは週齢 4 週目の実生を用いた。サンプルに真空ポンプで染色液 (1.9 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-gluc) 、 1.5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>、 1.5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>、 0.9% (v/v) Triton-X、 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH (pH 7.0)) を吸引させ、 37°C、 72 時間の酵素反応の後、 70% (v/v) エタノールに 48 時間浸して葉の内在色素を除去した。

## クロロフィル蛍光による NDH 活性測定

*In vivo* における NDH 活性はクロロフィル蛍光計 (PAM-101、 Walz) を用いて検出した。植物の上位展開葉に光合成作用光 (50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を 5 分照射し、消光直後にクロロフィル蛍光測定光 (2  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 照射下で観察されるクロロフィル蛍光の一過的上昇を NDH 活性として検出した (Shikanai et al. 1998)。

## 抗 NdhH 抗体を用いたイムノプロット解析

粗チラコイド画分の単離操作はすべて氷上でおこなった。形質転換体のよく展開した上位葉を液体窒素中で乳棒と乳鉢を用いてよく磨砕し、氷冷した thylakoid isolation buffer (0.3 M sucrose、 50 mM HEPES-NaOH (pH7.6) 、 5 mM MgCl<sub>2</sub>、 2 mM EDTA、 10 mM NaCl) 10 mL に懸濁した。懸濁液は二重にしたミラクロス (CALBIOCHEM) で濾した後、 4°C、 2300  $\times$ g で 10 分遠心した。ペレットは thylakoid isolation buffer および sucrose-free buffer (50 mM HEPES-NaOH (pH7.6) 、 5 mM MgCl<sub>2</sub>、 2 mM EDTA、 10 mM NaCl) 20 mL で 1 回ずつ洗浄した。sucrose-free buffer による洗浄後、懸濁液を 4°C、 2300  $\times$ g で 10 分遠心してペレットを得た。ペレットを sucrose-free buffer で懸濁した後、等量の 2  $\times$  SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH6.8) 、 5% (w/v) SDS、 20% (w/v) glycerol、 5% (v/v) 2-mercaptoethanol) を加えて 37°C で 1 時間インキュベートし、膜タンパク質を可溶化した。

12.5% アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE (Laemmli 1970) をおこない、粗チラコイド画分を分子量に応じて分離して Immobilon-P PVDF membranes (Millipore) に転写した。メンブレンは抗 NdhH 抗体 (Takabayashi et al. 2005) または抗 cytochrome *b*<sub>6</sub> (Cyt*b*<sub>6</sub>) 抗体 (Agriseria; AS03 034) と反応させた後、二次抗体 (horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-rabbit IgG、 GE Healthcare) と反応させた。メンブレンは更に EzWestLumi plus (Atto) と反応させ、化学発光法により得られたシグナルを ImageQuant LAS 4010 (GE Healthcare) を用

いて検出した。

### **T<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>世代の栽培**

T<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>世代の種子は70% (v/v) エタノールおよびアンチホルミン (有効塩素濃度1% (w/w)) で滅菌した後、1% (w/v) agar (Bacto)、1% (w/v) sucrose、50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin を添加したMS + B5 ビタミン培地 (Chitty et al. 1994) に播種し、16時間明期/8時間暗期、80 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、25°Cで栽培した。播種後3~4週間経過したカナマイシン耐性個体を育苗用培養土 (土太郎: スミリン農産工業株式会社) とバーミキュライトの混合土 (1:1) を入れた直径9 cm のポリポットに移植し、人工気象器内で16時間明期/8時間暗期、400 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、27°C/23°C (中光条件) で生育させ、週に一度、水道水で1000倍に希釈した液肥 (ガーデンマイスター: ハイポネックス) を与えた。

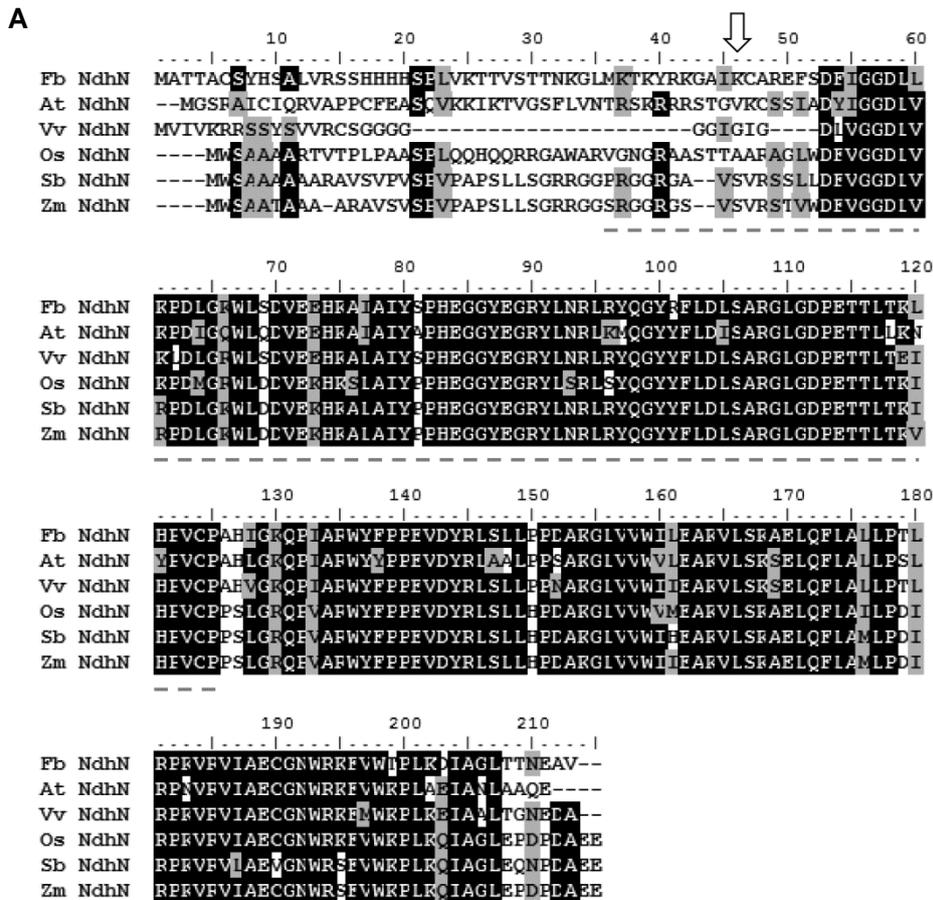
## [結果と考察]

### FbNdhN 配列の同定

NDH 抑制の標的とした FbNdhN の cDNA 配列を degenerate PCR および RACE-PCR によって決定した。これまでに機能解析が進められているシロイヌナズナを含む、他の被子植物とのアミノ酸配列の比較から、53 番目のアスパラギン酸から 207 番目のロイシンまでの領域の保存性が高いことが示された。また葉緑体移行シグナル予測プログラム ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) により 46 番目のリジンまでのアミノ酸配列が葉緑体移行ペプチドとして機能している可能性が示唆された (Fig. 1-3A)。得られた cDNA 配列をクエリとして NCBI の SRA に登録された *F. bidentis* の転写産物配列を相同検索したところ、他の配列は検出されなかったことから *F. bidentis* の光合成組織では主に 1 分子種のみが発現していると推定した。ゲノミック PCR をおこなった結果、FbNdhN は 4 エキソン 3 インtron からなることが明らかとなった (Fig. 1-3B)。

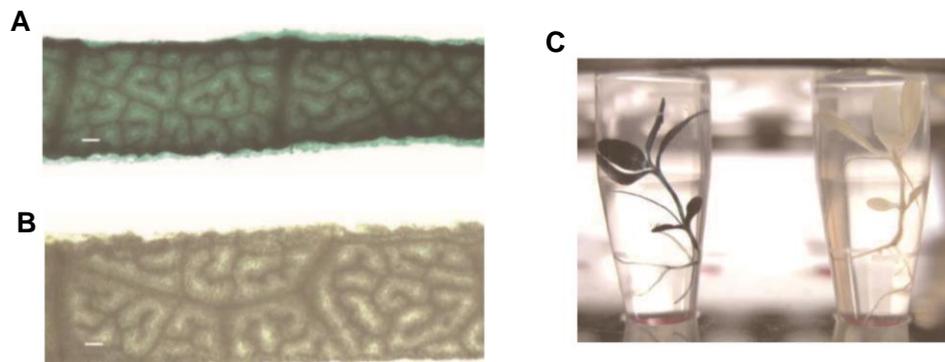
### FbNdhN 抑制株の作成

*F. bidentis* の NDH 抑制株を作成するために FbNdhN の第一エキソンの内の配列 (270 bp) を 2 本鎖 RNA として発現させる RNAi コンストラクトを作成した (Fig. 1-2A, B)。NCBI の SRA に登録された *F. bidentis* の転写産物配列を検索したところ、FbNdhN 以外に RNAi ターゲット配列と 21 bp 以上連続して一致する配列は検出されず、この RNAi コンストラクトによって非特異的発現抑制が引き起こされる可能性は低いことを確認した。この他に FbNdhN コーディング領域内の配列 (537 bp) をターゲットとしてアンチセンスコンストラクトを作成した (Fig. 1-2C)。バイナリーベクターには pBI121 の 35S プロモーターの 5'側に E12 エンハンサー、3'側に  $\Omega$  配列を付加してプロモーター活性を強化した pBE2113 を用いた (Mitsuhara et al. 1996)。35S プロモーターが *F. bidentis* の全ての組織で機能することは確認されていたが、E12 エンハンサーと  $\Omega$  配列を付加した場合の発現についての報告はなかった (Chitty et al. 1994)。そこで pBE2113 を用いて GUS を導入した形質転換体 (T<sub>1</sub> 世代) で組織化学的 GUS 染色をおこない、このプロモーターが *F. bidentis* の全組織で機能することを確認した (Fig. 1-4)

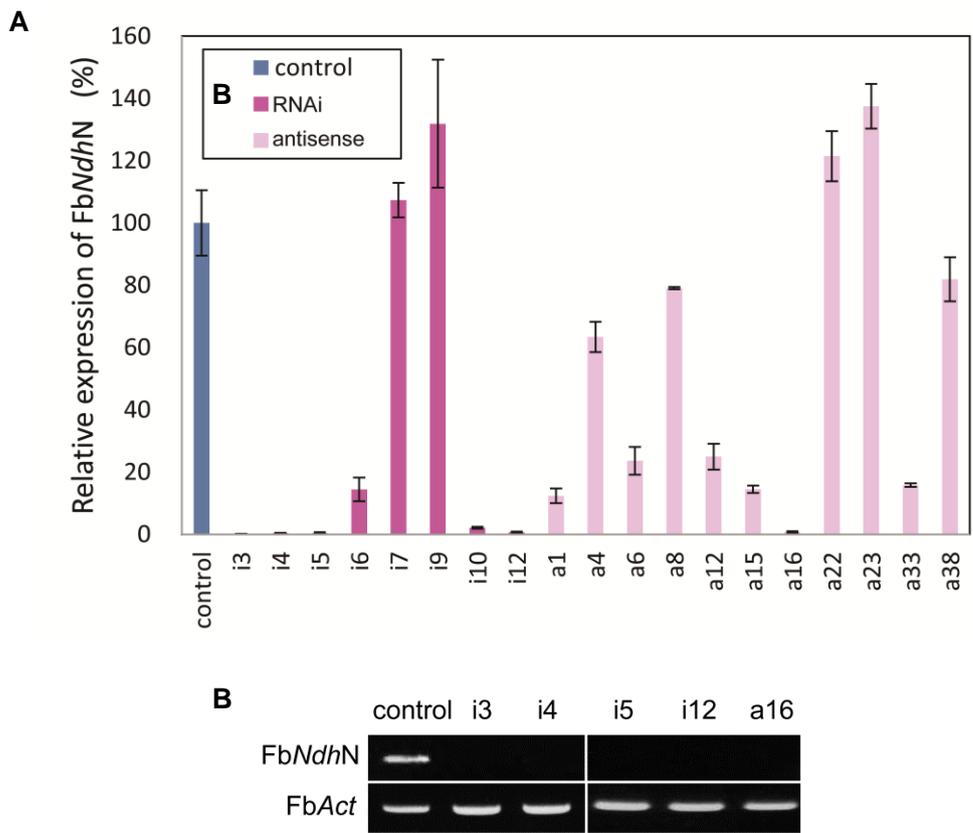


**Fig. 1-3 FbNdhN 配列の同定。** (A) 被子植物の NdhN マルチプルアライメント。At: *Arabidopsis thaliana*、Vv: *Vitis vinifera*、Os: *Oryza sativa*、Sb: *Sorghum bicolor*、Zm: *Zea mays*。各植物の NdhN 配列は The National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)) において FbNdhN の cDNA 配列をクエリとした blastx による相同検索をおこなって得た。葉緑体移行シグナル予測プログラム ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) により FbNdhN の 46 番目のリジン (白矢印) までのアミノ酸配列が葉緑体移行シグナルとして機能していることが示唆された。グレーの破線部は RNAi のターゲット配列がコードするアミノ酸配列に相当する。(B) FbNdhN のエキソン-イントロン構造。FbNdhN は 4 エキソン、3 イントロンからなる。

*F. bidentis* の播種後 7 日目の実生にアグロバクテリウムを感染させて形質転換をおこなった。シュートの誘導および培養に用いた培地にはすべて、カナマイシン ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) を添加して形質転換体の選抜をおこなった。また、アグロバクテリウム未感染の胚軸およびシュートはこの濃度のカナマイシン培地では生育できないことを確認した。13 回の形質転換の結果、RNAi 誘導配列導入株は切り出した 1464 本の胚軸に対し 8 ライン、アンチセンス配列導入株は胚軸 3188 本に対し 11 ラインのカナマイシン耐性シュートを鉢上げすることができた。鉢上げ後、各ラインの上位展開葉から RNA を単離して qRT-PCR をおこない、*FbNdhN* のベクターコントロール株に対する相対発現量を見積もったところ、*FbNdhN* の発現がベクターコントロール株の 1% 以下に低下したものが RNAi 誘導配列導入株で 4 ライン (i3、i4、i5、i12)、アンチセンス配列導入株で 1 ライン (a16) 得られた (Fig. 1-5A)。これらのラインについて RT-PCR をおこなったところ、30 サイクルの反応条件では *FbNdhN* に相当するバンドを検出することはできなかった (Fig. 1-5B)。以上の結果から、上記 5 ラインで *FbNdhN* の発現が著しく抑制されていることを確認した。



**Fig. 1-4** EI2 エンハンサーと  $\Omega$  配列を付加した 35S プロモーター制御下での *F. bidentis* における *GUS* 遺伝子の発現。(A) *GUS* 染色された *F. bidentis* *GUS* 株 ( $T_1$  世代) および (B) 野生株の葉片。左下の白線は  $100 \mu\text{m}$  を示す。(C) *GUS* 染色された週齢 4 週目の実生。左: *GUS* 株、右: 野生株

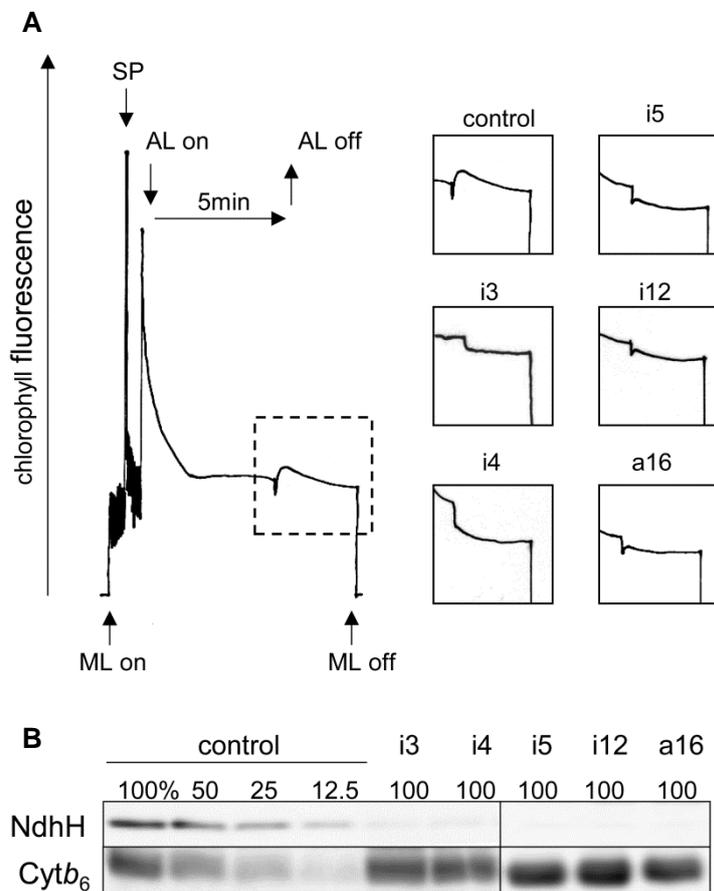


**Fig. 1-5** *FbNdhN* RNAi 株およびアンチセンス株における *FbNdhN* の相対発現量。(A) qRT-PCR により *FbNdhN* の相対発現量を見積もった。グラフは技術的の反復実験 ( $n = 3$ ) の平均値と標準偏差 (エラーバー) を表す。(B) RT-PCR による *FbNdhN* 転写産物の検出。反応は 30 サイクルでおこなった。qRT-PCR、RT-PCR のいずれも actin 遺伝子 (*FbAct*) を内在コントロールに用いた。

### *FbNdhN* 抑制株における NDH 活性の評価

*FbNdhN* の発現が抑制された形質転換植物 5 ラインで NDH 活性が抑制されていることを確認するためにクロロフィル蛍光を用いて NDH 活性測定をおこなった。葉緑体 NDH からプラストキノンへの *in vivo* における電子伝達活性は、光合成作用光を消光した直後のクロロフィル蛍光の一過的上昇として検出されるが (Shikanai et al. 1998)、*FbNdhN* 抑制株ではこの蛍光の上昇がほとんど見られなかった (Fig. 1-6A)。次に *FbNdhN* 抑制株から粗チラコイド画分を単離し、活性型 NDH の蓄積の指標として使われる NdhH サブユニット (Kotera et al. 2005) の相対蓄積量をイムブロット解析によって見積もった。その結果、*FbNdhN* 抑制株では NdhH の蓄積がコントロール株の 12.5% 未満に低下していることが示された (Fig. 1-6B)。

以上のことから *FbNdhN* の発現を抑制した  $C_4$  植物 *F. bidentis* ではチラコイド膜における活性型 NDH の蓄積が著しく減少し、葉緑体 NDH を介したプラストキノンへの循環的電子伝達活性も抑制されることを確認した。こうした葉緑体 NDH の蓄積の減少と活性の喪失は  $C_3$  植物シロイヌナズナの *NdhN* 欠損株でも報告されていることから (Rumeau et al. 2005)、*NdhN* サブユニットが葉緑体 NDH の構造や活性の維持に果たす機能に  $C_3$  植物と  $C_4$  植物で本質的な違いは見られないことが示唆された。また、これまでのところ  $C_3$  植物、 $C_4$  植物のいずれかに特有なサブユニットの存在は報告されておらず (Friso et al. 2010、Ifuku et al. 2011)、 $C_3$  植物と  $C_4$  植物で NDH の構造に大きな違いはないと考えられた。

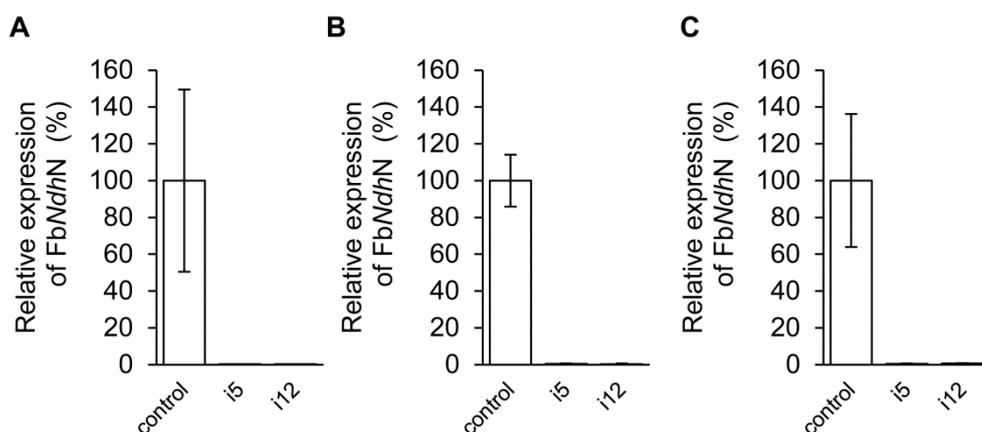


**Fig. 1-6** *FbNdhN* 抑制株 ( $T_0$  世代) における NDH 活性と活性型 NDH の蓄積。(A) クロロフィル蛍光による *in vivo* NDH 活性測定。AL: 光合成作用光 ( $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )、ML: 測定光、SP: 飽和パルス。光合成作用光消光後のクロロフィル蛍光の一過的上昇 (破線部) を NDH 活性として検出した。(B) 抗 *NdhH* 抗体を用いたイムノブロット解析。各レーンには  $30 \mu\text{g}$  タンパク質相当量の粗チラコイド画分およびその希釈系列をロードした。コントロールとして抗 *Cytb<sub>6</sub>* 抗体を用いた。

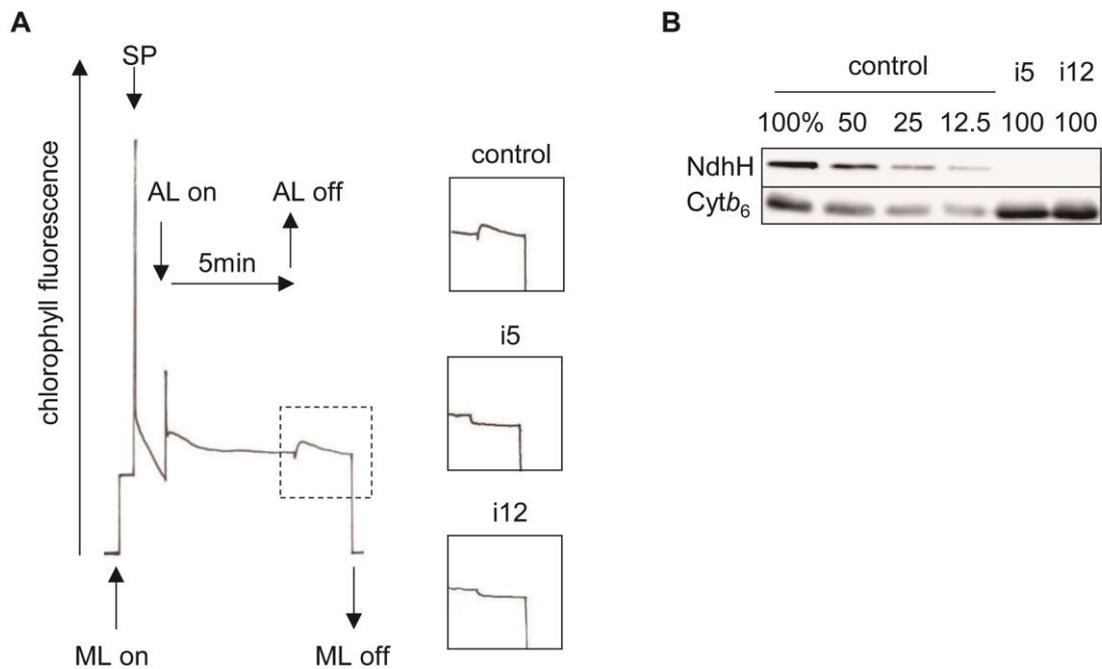
## T<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>世代におけるNDH抑制の確認

T<sub>0</sub>世代においてNDHの抑制が確認されたFb*NdhN*抑制株のうち、鉢上げの早かった2ライン(i5, i12)についてT<sub>1</sub>世代の種子を採取した。これらの種子をカナマイシン(50 mg L<sup>-1</sup>)選抜培地に播種し、カナマイシン耐性を示した実生を播種後3~4週間で鉢上げし、16時間明期/8時間暗期、400 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、27°C/23°Cで栽培した。週齢6週目のカナマイシン耐性個体からRNAを単離してqRT-PCRをおこない、Fb*NdhN*の発現がベクターコントロール株の1%以下に抑制されていることを確認した(Fig. 1-7A)。また、カナマイシン添加培地で生育中の週齢3週目の実生および鉢上げ後の週齢8週目の植物についてもqRT-PCRをおこない、異なる生育段階においてもFb*NdhN*の発現が安定して抑制されることを確認した(Fig. 1-7B, C)。次にこれらFb*NdhN*抑制株のT<sub>1</sub>世代では、T<sub>0</sub>世代同様、NDH活性が抑制され、チラコイド膜における活性型NDHの蓄積も減少することを確認した(Fig. 1-8A, B)。更に鉢上げが最も早かったi5株についてはT<sub>2</sub>種子を採取してこれをカナマイシン選抜培地に播種し、すべてのT<sub>2</sub>個体でカナマイシン耐性が見られるラインを選抜した。このラインにおいてもqRT-PCRによりFb*NdhN*の発現が抑制されていることを確認した(Fig. 1-9)。

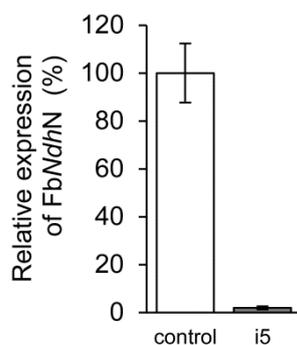
第2章ではこれらの主にT<sub>1</sub>世代の植物を用いてNDHの抑制がC<sub>4</sub>光合成に及ぼす影響について解析をおこなった。



**Fig. 1-7** 生育段階ごとのT<sub>1</sub>世代におけるFb*NdhN*発現抑制の確認。(A) 週齢6週目、(B) 週齢3週目、(C) 週齢8週目のT<sub>1</sub>世代におけるFb*NdhN*の相対発現量。グラフは生物学的回復実験((A): n ≥ 20、(B)、(C): n = 3~4)の平均値と標準偏差(エラーバー)を表す。



**Fig. 1-8 FbNdhN 抑制株 (T<sub>1</sub> 世代) における NDH 抑制効果の確認。** (A) クロロフィル蛍光による *in vivo* NDH 活性測定。AL: 光合成作用光 ( $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )、ML: 測定光、SP: 飽和パルス。光合成作用光消光後のクロロフィル蛍光の一過的上昇 (破線部) を NDH 活性として検出した。(B) 抗 NdhH 抗体を用いたイムノブロット解析。各レーンには  $30 \mu\text{g}$  タンパク質相当量の粗チラコイド画分およびその希釈系列をロードした。コントロールとして抗 Cytb<sub>6</sub> 抗体を用いた。NDH 活性の測定および粗チラコイド画分の単離には、週齢 7~8 週目の植物 (T<sub>1</sub> 世代) を用いた。



**Fig. 1-9 T<sub>2</sub> 世代における FbNdhN 発現抑制の確認。**  
週齢 10 週目の T<sub>2</sub> 世代における FbNdhN の相対発現量。グラフは生物学的反復実験 ( $n = 4$ ) の平均値と標準偏差 (エラーバー) を表す。

## 第2章 NDH 循環的電子伝達経路の抑制が C<sub>4</sub> 光合成に及ぼす影響

第1章で作成した NDH 活性が著しく抑制された C<sub>4</sub> 植物 *F. bidentis* の形質転換体を用いて NDH 経路が C<sub>4</sub> 光合成で果たす機能について生理学的な解析をおこなった。C<sub>4</sub> 光合成における炭酸固定速度は、光合成に利用可能な光強度が十分でない弱光条件では光合成電子伝達による ATP と NADPH の生成速度に主に律速されるが、光強度が強い場合には、光合成電子伝達による ATP や NADPH の生成速度は十分に大きくなるため、Rubisco など炭酸固定系の酵素の反応速度が律速要因となる (Hatch 1970、Yin and Struik 2012)。NDH 経路は光合成電子伝達において ATP の生成に寄与することから、本章では特に光条件に応じた表現型の違いに着目して NDH の抑制が C<sub>4</sub> 光合成に及ぼす影響について解析をおこなった。

### [方法]

#### 植物の栽培

解析には第1章で作成した *FbNdhN* 抑制株のうち、鉢上げ時期の早かった i5 および i12 ライン (特に記述のない場合は T<sub>1</sub> 世代) を用いた。また、コントロール株には GUS 遺伝子を導入した形質転換株を用いた。種子の播種および中光条件 (400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) における植物の栽培は第1章の記述に従っておこなった。弱光条件において植物を栽培する際は光強度を 50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に変更した。自然光下での栽培は 2014 年 8 月と 9 月に京都大学北部キャンパス農場 (京都市左京区北白川追分町) にある形質転換体栽培用特定網室にておこない、播種後 3~4 週間の植物を網室で 6 週間栽培した。栽培期間中は網室の気温が 30°C を超えないようにエアコンによる温度制御をおこなった。

#### RT-PCR、qRT-PCR および抗 *NdhH* 抗体を用いたイムノプロット解析

第1章の記述に従っておこなった。

#### 成長解析

週齢 8 週目 (中光栽培)、11 週目 (弱光栽培) および 9~10 週目 (自然光栽培) の植物について植物高を測定した。中光栽培および自然光栽培の植物については第4葉直上の茎の太さの測定もおこなった。その後、植物の地上部を刈り取り、100°C で 2 時間、更に 65~70°C で 2 晩乾燥させて乾燥重量を測定した。

### クロロフィル濃度の測定

週齢8週目 (中光栽培) および11週目 (弱光栽培) の植物の完全展開した最上位葉の中央部分からサンプリングしたリーフディスク (0.33 cm<sup>2</sup>) を N,N-dimethylformamide 1 mL に浸し、遮光して4°Cで一晩静置し、クロロフィルを抽出した。抽出液の 646.8 nm、663.8 nm の吸光度を測定し、以下の計算式でクロロフィル濃度を求めた (Porra et al. 1989)。

$$\text{Chl (a + b)} = 19.43 A_{646.8} + 8.05 A_{663.8}$$

$A_{646.8}$ : 646.8 nm の吸光度、 $A_{663.8}$ : 663.8 nm の吸光度 (750 nm における吸光度をゼロとした)

### 全葉タンパク質の抽出

週齢8週目 (中光栽培) および11週目 (弱光栽培) の植物の完全展開した最上位葉の中央部分からリーフディスク (0.33 cm<sup>2</sup>) 1~2 枚をサンプリングして液体窒素中で磨砕した。磨砕サンプルに 2 × SDS sample buffer と sucrose-free buffer (50 mM HEPES-NaOH (pH7.6) 、5 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM EDTA、10 mM NaCl) を等量加えて 65°C で 20 分インキュベートし、タンパク質を可溶化した。可溶化したサンプルを室温、10000 ×g で 3 分遠心し、葉に蓄積したデンプンなどを除いた上清を全葉タンパク質サンプルとした。タンパク質濃度は RC DC プロテインアッセイキット (Bio-Rad) を用いて測定した。

### 炭素、窒素量および炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) の測定

葉の炭素、窒素量および  $\delta^{13}\text{C}$  は東京薬科大学 野口航教授の協力を得て測定した。週齢8週目 (中光栽培) および11週目 (弱光栽培) の植物の完全展開した最上位葉を 65~70°C で 2 晩以上乾燥させ、ペッスルで磨砕した。このサンプルを、安定同位体比質量分析装置 (IsoPrime) を接続した元素分析計 (Vario Micro、Elementar) に供し、葉の炭素、窒素量および炭素安定同位体比を測定した (Tazoe et al. 2008、Wang et al. 2014)。

### 光合成関連タンパク質のイムノブロット解析

抽出した全葉タンパク質を SDS-PAGE (Laemmli 1970) により分子量に応じて分離した。

PEPC、pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) の検出には 7.5%、Cytb<sub>6</sub>、NdhH、PGRL1、PsbP、PsbS、Rubisco large subunit (RbcL) の検出には 12.5%、PGR5 の検出には 15% のアクリルアミド濃度 (いずれも (w/v)) のゲルを用いた。メンブレンへの転写、抗体反応およびシ

グナルの検出は第 1 章の記述に従っておこなった。イムノブロット解析に用いた一次抗体とその希釈倍率は Table 2-1 に示した。

**Table 2-1** イムノブロット解析に用いた一次抗体とその希釈倍率

一次抗体 <sup>a</sup>	希釈倍率 <sup>b</sup>	備考 (入手先など)
抗 Cytb <sub>6</sub> 抗体	10,000 倍	Agrisera 社より購入 (AS03 034)
抗 NdhH 抗体	1,000 倍	本研究室で作成 (Takabayashi et al. 2005)
抗 PEPC 抗体	10,000 倍	Agrisera 社より購入 (AS09 458)
抗 PGR5 抗体	1,000 倍	京都大学鹿内利治教授より分与 (Munekage et al. 2002)
抗 PGRL1 抗体	2,000 倍	東京工業大学久堀徹教授より分与
抗 PPK3 抗体	10,000 倍	名古屋大学谷口光隆教授より分与 (Sugiyama et al. 1984)
抗 PsbP 抗体	10,000 倍	本研究室で作成 (Ifuku and Sato 2001) Can Get Signal (TOYOBO) に希釈
抗 PsbS 抗体	2,000 倍	Agrisera 社より購入 (AS09 533)
抗 RbcL 抗体	40,000 倍	本研究室で作成 (Kato et al. 2004)

<sup>a</sup>一次抗体はすべてウサギ由来。

<sup>b</sup>特に記述のない抗体は Tris buffered saline with Tween-20 (TTBS: 20 mM Tris-HCl (pH7.6) 、137 mM NaCl、0.1% (v/v) Tween-20) で希釈した。

### CO<sub>2</sub> 吸収速度の測定

CO<sub>2</sub> 吸収速度の測定は赤外線ガスアナライザー GFS-3000 (Walz) を用いて、25°C (キュベット温度) 、相対湿度 70%、CO<sub>2</sub> 濃度 380 ppm の条件でおこなった。ガスアナライザーの流速は 750 μmol s<sup>-1</sup> に設定した。週齢 8 週目の植物 (中光栽培) の完全に展開した最上位葉にまず青赤色光 25 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> を照射し、CO<sub>2</sub> 吸収速度が定常状態に達するのを待って測定をおこなった。その後、光強度を段階的に増大させて 1800 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> までの各光強度における定常状態の CO<sub>2</sub> 吸収速度を測定した。

### クロロフィル蛍光および P700 吸光度測定

クロロフィル蛍光の測定は PAM-101 クロロフィル蛍光計 (Walz) を用いて、大気条件でお

こなった。測定には 30 分間暗順応させた週齢 8 週目の植物 (中光栽培) の完全展開した最上位葉を用いた。光合成作用光を各光強度について 5 分ずつ照射した後、飽和パルス照射して最大蛍光レベルを得た。PS II の量子収率 ( $\phi_{II}$ ) および non-photochemical quenching (NPQ) は以下の式で求めた。

$$\phi_{II} = (F_m' - F_s) / F_m' \text{ (Genty et al. 1989)}$$

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m' \text{ (Bilger and Björkman 1990)}$$

$F_m$ : 暗順応時の最大蛍光レベル、 $F_m'$ : 光合成作用光下での最大蛍光レベル、 $F_s$ : 光合成作用光下での蛍光レベル

NPQ のうちフィードバック熱放散に由来する成分 (qE) は光合成作用光を照射して NPQ を測定した後、暗黒下で 3 分間静置した植物に再び飽和パルス照射し、NPQ の解消をモニターすることで見積もった (Quick and Stitt 1989)。In vivo での NDH 活性の測定は第 1 章の記述に従っておこなった。

P700 の吸光度変化は PAM-101 クロロフィル蛍光計に ED-P700DW ユニット (Walz) を接続し、860 nm に対する 810 nm の吸光度変化として検出した。測定は週齢 8 週目の植物 (中光栽培) を用いて大気条件でおこなった。まず、2 時間暗順応させた植物の完全展開した最上位葉に近赤色光 (> 720 nm、17 W m<sup>-2</sup>) を照射して最大酸化時の P700 の吸光度 ( $\Delta A_{max}$ ) を求めた。その後、強度を段階的に増大させながら光合成作用光を照射して各光強度における定常状態の P700 の吸光度 ( $\Delta A$ ) を求め、 $\Delta A / \Delta A_{max}$  を P700 の相対酸化レベルとして算出した (Klughammer and Schreiber 1994、Munekage et al. 2002、Dalcorso et al. 2008)。

### Electrochromic shift (ECS) 測定

ECS シグナルは DUAL-PAM-100 クロロフィル蛍光計に P515/535 emitter-detector モジュール (いずれも Walz) を接続し、550 nm に対する 515 nm の吸光度変化として検出した。測定は週齢 8 週目の T<sub>2</sub> 世代の植物 (中光栽培) を用いて大気条件でおこなった。30~60 分間暗順応させた植物の完全展開した最上位葉に光合成作用光を 3 分照射し、消光後 500 ミリ秒以内に見られる ECS シグナルの速い減衰を ECS<sub>t</sub> として検出した (Sacksteder et al. 2000、Kanazawa and Kramer 2002)。pmf は ECS<sub>t</sub> をシングルターンオーバー閃光照射時の ECS シグナル (ECS<sub>st</sub>) で標準化した値 (ECS<sub>t</sub> / ECS<sub>st</sub>) として算出した (Yamamoto et al. 2016)。

### 葉肉細胞および維管束鞘細胞からの葉緑体の単離

葉肉細胞からの葉緑体の単離は Ishikawa et al. (2008b) に記載された方法を一部改変しておこなった。週齢 8 週目の T<sub>2</sub> 世代の植物 (中光栽培) からよく展開した上位葉 (約 5 g) をサンプリングし、メスで数 mm 幅に切断した。葉片は氷冷した chloroplast isolation buffer (0.3 M sorbitol, 50 mM HEPES-KOH (pH7.6) 、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、2 mM EDTA、30 mM KCl、0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 50 mL 中でポリトロン (Brinkmann) を用いて破碎した。破碎液は 2 重ミラクロス (CALBIOCHEM) で濾して 2300 ×g、4°C で 1 分遠心した。得られたペレットを chloroplast isolation buffer 5 mL で懸濁した後、90% (v/v) および 25% (v/v) Percoll を添加した chloroplast isolation buffer を重層したチューブにロードし、2300 ×g、4°C で 10 分遠心した。90% Percoll と 25% Percoll の境界部分の緑のバンドを回収し、体積の約 5 倍の chloroplast isolation buffer で希釈した後、1200 ×g、4°C で 5 分遠心して Percoll を除去した。得られた葉肉細胞葉緑体は遮光して氷上で保存した。

維管束鞘細胞からの葉緑体の単離は Meister et al. (1996) に記載された方法を一部改変しておこなった。週齢 8 週目の T<sub>2</sub> 世代の植物 (中光栽培) はデンプンの蓄積を減らすために約 19 時間の暗処理をおこなった後、よく展開した上位葉 (5~8 g) をサンプリングしてメスで数 mm 幅に切断した。葉片は氷冷した chloroplast isolation buffer 300 mL 中でエースホモジナイザー (Nihonseiki) を用いて最高速度で 5 分磨砕し、更に磨砕操作を 4 回繰り返して葉肉細胞を除去し、維管束鞘を単離した。維管束鞘は chloroplast isolation buffer 40 mL で洗浄した後、digestion buffer (0.35 M sorbitol、10 mM MES-KOH (pH 6.0) 、2 mM EDTA、1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1% (w/v) Macerozyme R-10 (Yakult) 、1% (w/v) Cellulase Onozuka RS (Yakult)) に浸して室温で 10 分インキュベートし、細胞壁を部分的に分解した。維管束鞘は 80 μm ナイロンメッシュに移し、スパテルを使って裏ごしするように維管束鞘細胞を破碎して葉緑体を chloroplast isolation buffer 100 mL 中に回収した。細胞破碎液は 35 μm ナイロンメッシュで濾した後、50 mL チューブに回収し、2300 ×g、4°C で 3 分遠心した。得られたペレットを chloroplast isolation buffer 5 mL で懸濁して 90% (v/v) および 25% (v/v) Percoll を添加した chloroplast isolation buffer を重層したチューブにロードし、2300 ×g、4°C で 10 分遠心した。維管束鞘細胞葉緑体画分の回収は葉肉細胞葉緑体と同様の手順でおこない、得られた維管束鞘細胞葉緑体は遮光して氷上で保存した。

単離した葉肉細胞葉緑体および維管束鞘細胞葉緑体の一部は等量の 2×SDS sample buffer を添加後、65°C、20 分インキュベートして可溶化し、抗 PPKK 抗体および抗 Rubisco 抗体

を用いたイムノブロット解析をおこなって各葉緑体画分への他方の混入比率を確認した。

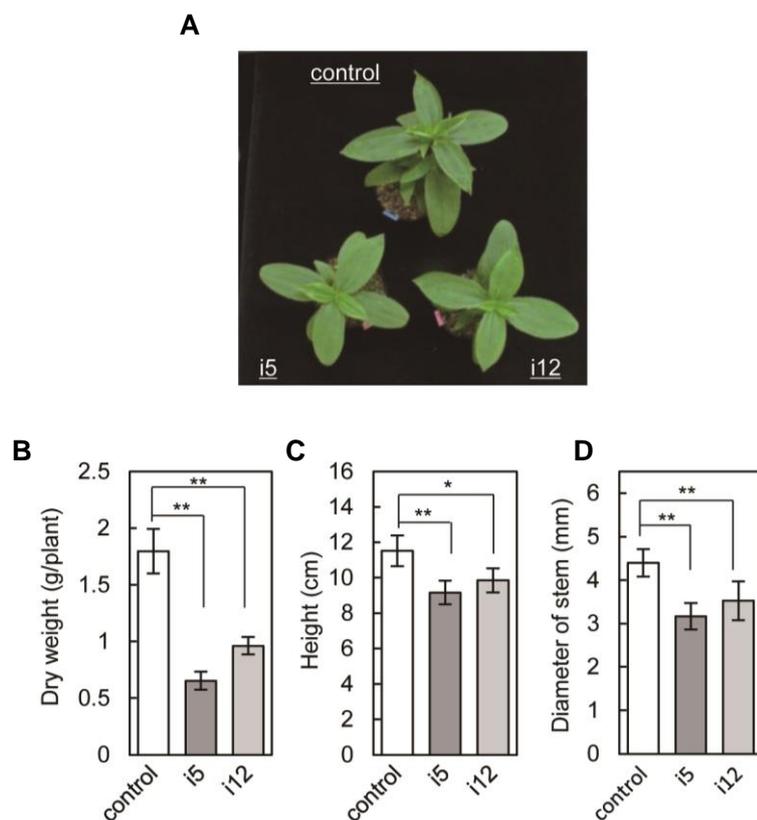
#### 単離チラコイド膜を用いたプラストキノン還元アッセイ

プラストキノン還元能を維持するために高濃度の  $Mg^{2+}$  を加えた低張液 (high-Mg medium: 50 mM HEPES-NaOH (pH7.6) 、15 mM  $MgCl_2$ 、1 mM  $MnCl_2$ 、2 mM EDTA、30 mM KCl、0.25 mM  $KH_2PO_4$ ) 中で葉肉細胞葉緑体および維管束鞘細胞葉緑体をそれぞれ破裂させ 1750 ×g、4°Cで5分遠心してチラコイド膜画分を回収した (Endo et al. 1997) 。チラコイド膜画分は high-Mg medium で洗浄した後、再度 1750 ×g、4°Cで5分遠心した。ペレットはアッセイをおこなうまで氷上に遮光して静置させた。チラコイド膜画分を high-Mg medium 中で 10 μg クロロフィル相当量  $mL^{-1}$  となるように希釈し、室温で5分静置した後、PAM-101 クロロフィル蛍光計 (Walz) を用いて測定光 ( $1.8 \mu mol photons m^{-2} s^{-1}$ ) 照射下でプラストキノンの還元を観察した。その際、光化学反応に由来しない還元力を供与するために 0.25 mM NADPH と 5 μM Fd (ホウレンソウ由来、Sigma-Aldrich) を添加した。

## [結果]

### 異なる光条件における NDH 抑制株の成長解析

*F. bidentis* の NDH 抑制株を  $C_4$  植物の栽培に最適とされる中光条件 ( $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した。その結果、葉の大きさやクロロフィル量、タンパク質量については NDH 抑制株でコントロール株と比べて有意な差は見られなかった (Fig. 2-1A、Table 2-2)。しかし地上部の乾燥重量は NDH 抑制株でコントロール株の約 50% (Fig. 2-1B)、植物高 (Fig. 2-1C) および茎の太さ (Fig. 2-1D) は約 80% に低下した。葉面積当たりの炭素量と  $C_4$  経路による  $\text{CO}_2$  濃縮効率を示す指標となる炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) の値 (Tazoe et al. 2008、Pengelly et al. 2010) にも低下が見られ (Table 2-2)、NDH の抑制により  $C_4$  光合成効率の低下および生育の低下が引き起こされることが示唆された。



**Fig. 2-1 NDH 抑制株 (中光栽培) の表現型。** (A)  $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  で栽培した週齢 8 週目の NDH 抑制株、(B) 地上部の乾燥重量、(C) 植物高、(D) 茎の太さ。グラフは生物学的反復実験 ( $n = 4\sim 6$ ) の平均値と標準偏差 (エラーバー) を表す。\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  でライン間での有意差あり (チューキー検定)。

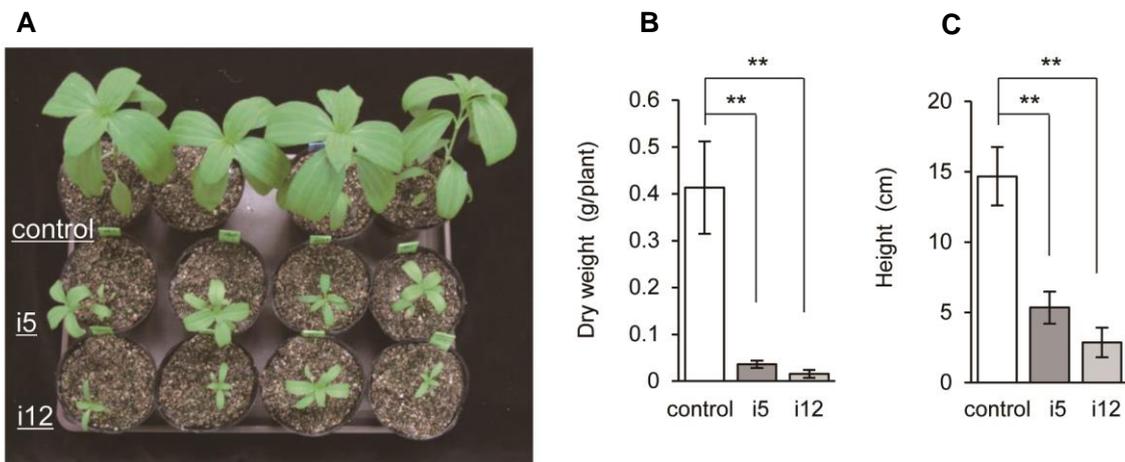
**Table 2-2 NDH 抑制株 (中光栽培) の葉におけるクロロフィル量、タンパク質量、炭素、窒素量および炭素安定同位体比**

	control	i5
Chl (mmol m <sup>-2</sup> )	0.451±0.012	0.434±0.028
Protein (g m <sup>-2</sup> )	9.38±0.43	9.17±0.14
C content (mmol m <sup>-2</sup> )	1470±37	1190±31**
N content (mmol m <sup>-2</sup> )	120±7.2	115±4.3
δ <sup>13</sup> C (‰)	-14.5±0.41	-15.4±0.17*

400 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> で栽培した週齢 8 週目の植物の完全に展開した最上位葉についてクロロフィル量 (Chl)、タンパク質量 (Protein)、炭素量 (C content)、窒素量 (N content)、炭素安定同位体比 (δ<sup>13</sup>C) を測定した。表の値は生物学的反復実験 ( $n = 3$ ) の平均値と標準偏差 (±) を表す。\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  でライン間での有意差あり (ステューデントの t-検定)。

C<sub>4</sub> 光合成ではより多くの ATP を炭酸固定に必要とするため、光合成電子伝達による ATP と NADPH の生成速度が律速条件となる弱光下で不利になる可能性が議論されてきた (Hatch 1970、Ehleringer and Björkman 1977、Sage 2014)。そのため NDH 経路が C<sub>4</sub> 光合成に必要な ATP の供給に機能しているのであれば、その抑制の影響は弱光条件でより大きくなると考えられた。そこで NDH 抑制株を弱光条件 (50 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) で栽培し、NDH の抑制が生育に及ぼす影響について中光条件で栽培した場合との違いを検証した。その結果、弱光条件で栽培した NDH 抑制株では乾燥重量がコントロール株の 10% 以下、植物高は 50% 以下と中光条件で栽培した場合に比べて著しく減少した (Fig. 2-2)。また葉面積当たりの炭素量と δ<sup>13</sup>C のみならず、中光条件で栽培した際には低下が見られなかったクロロフィル量、タンパク質量、窒素量も低下を示した (Table 2-3)。

栽培光強度が RNAi による NDH の抑制効果に影響を及ぼしている可能性について検証するため、中光および弱光で栽培した植物のチラコイド膜における活性型 NDH の蓄積を評価した。その結果、いずれの栽培条件でも NDH 抑制株における NDH の蓄積はコントロール株の 6.5~12.5% 程度で、栽培条件の違いによる NDH 抑制効果の差は認められなかった (Fig. 2-3)。このことから栽培光の強度の違いによる表現型の違いは NDH 経路の寄与が弱光条件でより大きくなるためと考えられた。

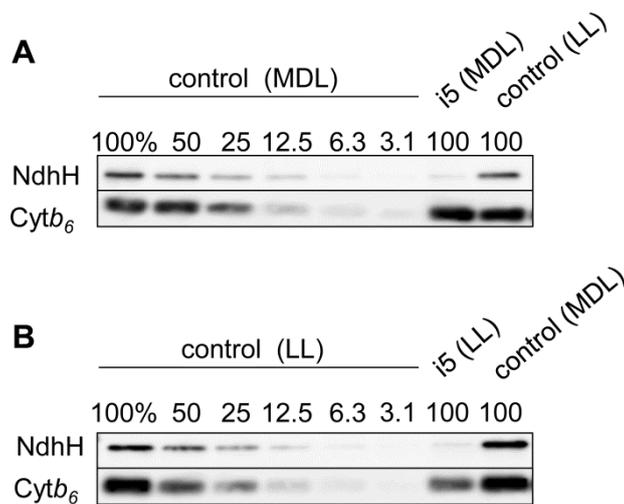


**Fig. 2-2 NDH 抑制株 (弱光栽培) の表現型。** (A)  $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  で栽培した週齢 11 週目の NDH 抑制株、(B) 地上部の乾燥重量、(C) 植物高。グラフは生物学的反復実験 ( $n = 4$ ) の平均値と標準偏差 (エラーバー) を表す。 \*\*:  $P < 0.01$  でライン間での有意差あり (チューキー検定)。

**Table 2-3 NDH 抑制株 (弱光栽培) の葉におけるクロロフィル量、タンパク質量、炭素、窒素量および炭素安定同位体比**

	control	i5
Chl ( $\text{mmol m}^{-2}$ )	$0.350 \pm 0.020$	$0.228 \pm 0.040^{**}$
Protein ( $\text{g m}^{-2}$ )	$4.05 \pm 0.061$	$2.74 \pm 0.11^{**}$
C content ( $\text{mmol m}^{-2}$ )	$353 \pm 6.2$	$287 \pm 5.7^{**}$
N content ( $\text{mmol m}^{-2}$ )	$44.9 \pm 2.9$	$33.2 \pm 1.3^{**}$
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$-19.8 \pm 0.79$	$-23.4 \pm 0.32^{**}$

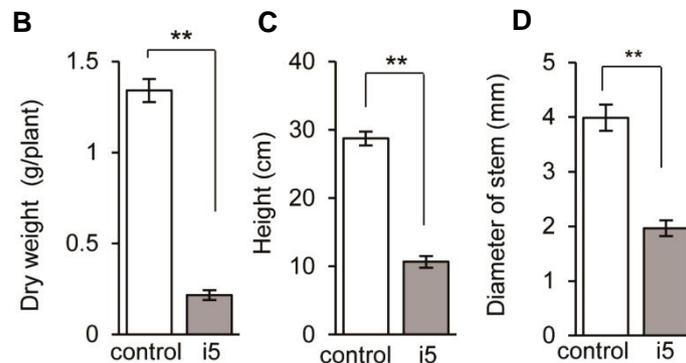
$50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  で栽培した週齢 11 週目の植物の完全に展開した最上位葉についてクロロフィル量 (Chl)、タンパク質量 (Protein)、炭素量 (C content)、窒素量 (N content)、炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) を測定した。表の値は生物学的反復実験 ( $n = 3\sim 7$ ) の平均値と標準偏差 ( $\pm$ ) を表す。 \*\*:  $P < 0.01$  でライン間での有意差あり (スチューデントの t 検定)。



**Fig. 2-3** 異なる光条件で栽培したNDH抑制株におけるNDHの蓄積。(A) 中光条件 (MDL:  $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢8週目の植物 ( $T_2$ 世代)、(B) 弱光条件 (LL:  $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢12週目の植物 ( $T_2$ 世代) のそれぞれについて最上位展開葉から粗チラコイド画分を単離して NdhH に対するイムノブロット解析をおこなった。各レーンには  $7.5 \mu\text{g}$  タンパク質相当量の粗チラコイド画分とその希釈系列をロードした。コントロールとして抗 Cytb<sub>6</sub>抗体を用いた。

弱光下における顕著な生育遅延が、自然光下でのNDH抑制株の生育にどの程度の影響を及ぼすのか検証するため、京都大学北部キャンパス農場内にある形質転換体栽培用特定網室でNDH抑制株を栽培した。その結果、自然光下でもNDH抑制株の乾燥重量はコントロール株の約20%、植物高は約40%、茎の太さは約50%に低下し、自然光下での栽培においてもNDHの抑制が*F. bidentis*の生育遅延を引き起こすことが示された (Fig. 2-4)。

以降の節ではNDHの抑制が光強度に応じて光合成活性に及ぼす影響について更に解析するために、葉のクロロフィル量やタンパク質量の減少がほとんどみられず、これらの二次的影響が少ないと考えられる中光条件で栽培した植物を用いて様々な光強度におけるCO<sub>2</sub>吸収速度や電子伝達活性などについて測定をおこなった。

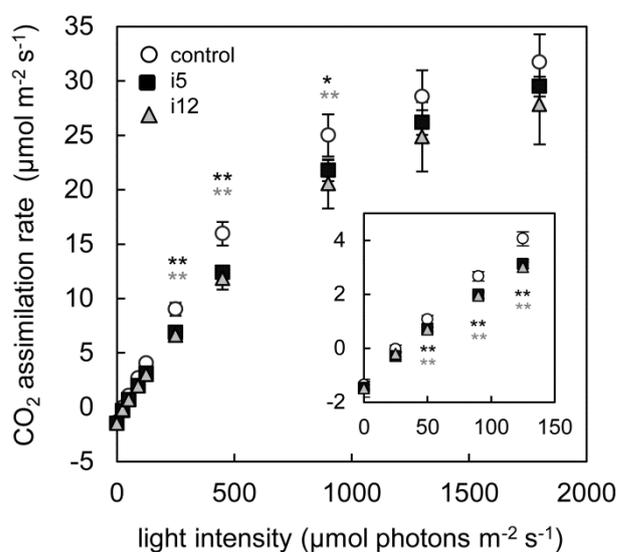
**A**

**Fig. 2-4 NDH 抑制株 (自然光栽培) の表現型。** (A) 自然光下 (京都大学北部キャンパス農場内、形質転換体栽培用特定網室、35°N 135°E) で栽培した週齢 10 週目の NDH 抑制株、(B) 地上部の乾燥重量、(C) 植物高、(D) 茎の太さ。グラフは生物学的反復実験 ( $n = 4$ ) の平均値と標準偏差 (エラーバー) を表す。 \*\*:  $P < 0.01$  でライン間での有意差あり (ステューデントの  $t$ -検定)。栽培は 2014 年 8 月と 9 月の 2 回おこない、いずれも同様の結果を得た。図には 9 月におこなった実験の結果を示した。

### NDH 抑制株における $\text{CO}_2$ 吸収速度の測定

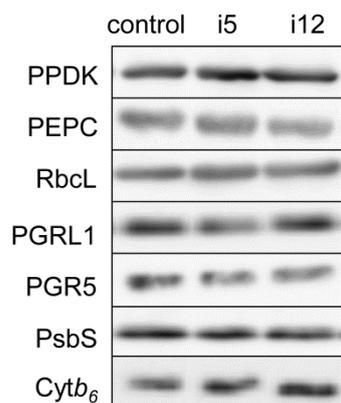
中光条件で栽培した植物を用いて光強度に対する  $\text{CO}_2$  吸収速度の測定をおこなった。その結果、弱光～中光条件 ( $< 1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で NDH 抑制株の  $\text{CO}_2$  吸収速度はコントロール株の約 75%に低下した。しかし  $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  以上の光強度では NDH 抑制株とコントロール株の  $\text{CO}_2$  吸収速度に有意な差は見られなかった (Fig. 2-5)。イムノブロット解析をおこなったところ、PEPC、PPDK、Rubisco といった、 $\text{C}_4$  経路や CBB サイクルで

炭酸固定に寄与するタンパク質の蓄積はNDH抑制株とコントロール株で特に差は認められなかった (Fig. 2-6)。このため弱光～中光下でのCO<sub>2</sub>吸収速度の低下はNDHの抑制によって直接的に引き起こされたものであると考えられた。



**Fig. 2-5 NDH抑制株の光-光合成曲線。**

測定には中光条件 (400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢 8 週目の植物の完全に展開した最上位葉を用いた。弱光領域を拡大したものを差込図として示した。グラフは生物学的反復実験 ( $n = 5$ ) の平均値と標準偏差 (エラーバー) を表す。コントロール株と NDH 抑制株に有意差がある場合はアスタリスク (黒色: i5、灰色: i12) で示した。\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (チューキー検定)。



**Fig. 2-6 NDH抑制株の全葉における光合成関連タンパク質の蓄積。**

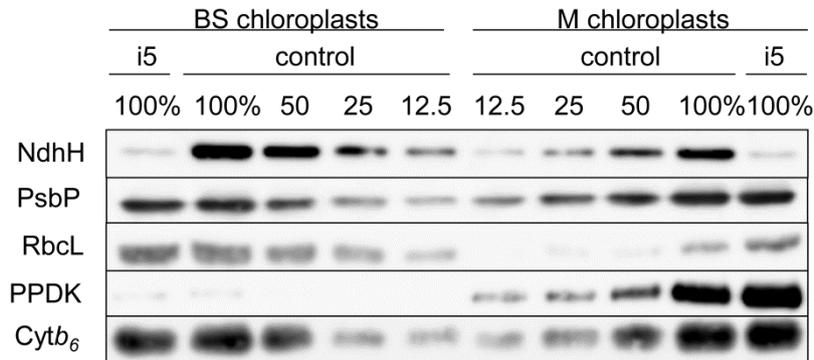
中光条件 ( $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢 8 週目の植物の完全に展開した最上位葉から全葉タンパク質を抽出してイムノブロット解析に用いた。PPDK、PEPC の検出には 10  $\mu\text{g}$ 、RbcL、PGRL1、PGR5 の検出には 15  $\mu\text{g}$ 、PsbS、Cytb<sub>6</sub> の検出には 5  $\mu\text{g}$  の全葉タンパク質を各レーンにロードした。

### NDH抑制株における光合成電子伝達活性の測定

次に中光条件で栽培した植物についてクロロフィル蛍光、P700吸光度およびECS測定をおこなってPS IIおよびPS Iの電子伝達活性について解析した。これらの測定法がC<sub>4</sub>植物における光合成電子伝達活性の評価に有効であることは先行研究によって示されているが

(Genty et al. 1989、Krall et al. 1991、Oberhuber et al. 1993、Kiirats et al. 2010、Savitch et al. 2011)、 $C_4$ 植物の葉には異なる2種類の葉緑体(葉肉細胞葉緑体、維管束鞘細胞葉緑体)が存在し、現行の測定装置では2種類の葉緑体から生じるシグナルを分けて検出することはできない。そのため得られた測定結果を葉肉細胞葉緑体、維管束鞘細胞葉緑体それぞれの光合成電子伝達活性と直接結びつけて解釈することはできない。

PS Iや、ECS測定の対象となるクロロフィル b およびカロテノイドは葉肉細胞葉緑体、維管束鞘細胞葉緑体のどちらにも局在するが、トウモロコシなど単子葉の NADP-ME 型の  $C_4$ 植物では維管束鞘細胞葉緑体にほとんど PS II の蓄積が認められない。このため PS II に由来するクロロフィル蛍光のシグナルに関しては、これらの植物を用いた解析において葉肉細胞葉緑体の電子伝達活性として解釈している文献も見られる (Savitch et al. 2011)。しかし、部分的に NAD-ME 型のような  $C_4$ 経路を持つ *F. bidentis* では (Fig. 1-1)、維管束鞘細胞にも PS II が蓄積することが報告されている (Ketchner and Sayre 1992、Meister et al. 1996)。そこで PS II のサブユニットである PsbP に対する抗体を用いてイムノブロット解析をおこない、維管束鞘細胞葉緑体における PS II の蓄積を確認したところ、NDH 抑制株、コントロール株のいずれでも葉肉細胞葉緑体の 50%程度の蓄積が認められた (Fig. 2-7)。また、葉肉細胞葉緑体および維管束鞘細胞葉緑体における NDH の抑制を確認するために NdhH に対するイムノブロット解析をおこなった結果、NDH の蓄積はコントロール株では維管束鞘細胞葉緑体で葉肉細胞葉緑体の約 3 倍程度多くなるが、NDH 抑制株ではいずれの葉緑体においてもコントロール株の 12.5%未満に減少することが示された (Fig. 2-7)。この結果は NDH が葉肉細胞葉緑体、維管束鞘細胞葉緑体の両方で抑制されていることを示唆し、形質転換に用いたベクターのプロモーターが葉肉細胞、維管束鞘細胞のいずれでも機能することを示した結果 (Fig. 1-4) とよく一致していた。これらの結果から、以下に示すクロロフィル蛍光 (Table 2-4、-5、Figure 2-8)、P700 吸光度 (Fig. 2-9) および ECS 測定の結果 (Table 2-6) は葉肉細胞葉緑体、維管束鞘細胞葉緑体の両方における NDH の抑制を反映したものとして解釈した。



**Fig. 2-7** *F. bidentis* の葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体における NDH および PS II の蓄積。

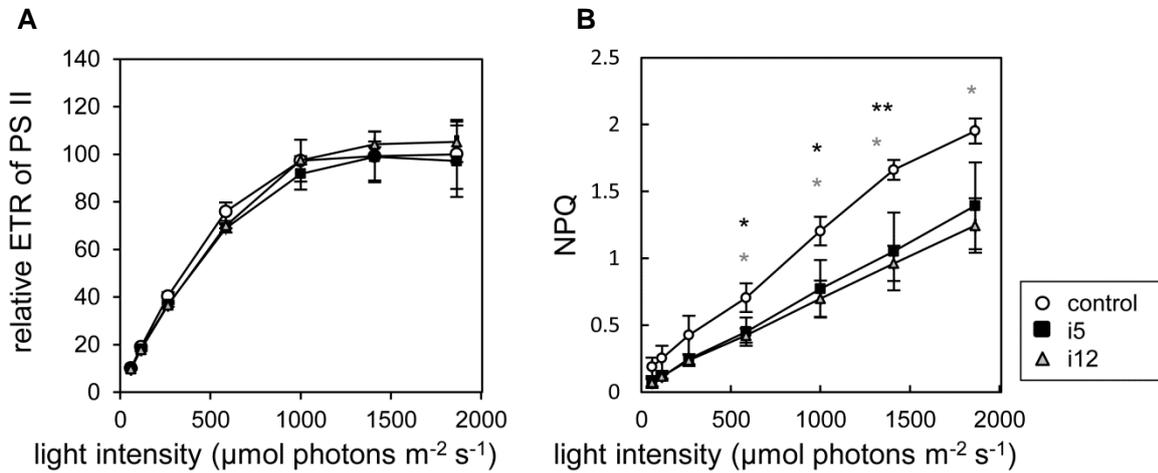
中光条件 ( $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢 8 週目の植物 ( $T_2$  世代) の上位葉から葉肉細胞葉緑体 (M chloroplasts) と維管束鞘細胞葉緑体 (BS chloroplasts) を単離してイムノブロット解析をおこなった。各葉緑体画分への他方の混入を検証するために抗 PPDK 抗体および抗 RbcL 抗体を用いてイムノブロットをおこない、葉肉細胞葉緑体画分への維管束鞘細胞葉緑体の混入は 25% 未満、維管束鞘細胞葉緑体画分への葉肉細胞葉緑体の混入は 12.5% 未満であることを確認した。NdhH を検出するために  $1 \mu\text{g}$ 、それ以外のタンパク質の検出のために  $0.5 \mu\text{g}$  クロロフィル相当量の葉緑体タンパク質とその希釈系列を各レーンにロードした。

PS II の最大量子収率 ( $F_v/F_m$ ) および電子伝達速度に NDH 抑制株とコントロール株で特に差は認められなかったが (Table 2-4, Fig. 2-8A)、NPQ は NDH 抑制株で低下が見られた (Fig. 2-8B)。NDH 抑制株とコントロール株に見られた NPQ の差は短時間の暗処理で解消されたことから (Table 2-5)、PS II アンテナからのフィードバック熱放散 (Quick and Stitt 1989) に由来することが示唆された。フィードバック熱放散はチラコイド膜タンパク質 PsbS を必須因子として光合成電子伝達に伴うルーメンの酸性化によって引き起こされるが (Li et al. 2000, Müller et al 2001)、PsbS の蓄積に NDH 抑制株とコントロール株の間で特に差は認められなかった (Fig. 2-6)。このことから NDH 抑制株ではチラコイド膜間でのプロトン輸送能が低下し、ルーメンの酸性化が抑制されていることが示唆された。

**Table 2-4 NDH 抑制株における PS II の最大量子収率**

	control	i5	i12
$F_v/F_m$	$0.789 \pm 0.014$	$0.790 \pm 0.0072$	$0.778 \pm 0.024$

中光条件 ( $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢 8 週目の植物の完全に展開した最上位葉において PS II の最大量子収率 ( $F_v/F_m$ ) を測定した。表の値は生物学的反復実験 ( $n=3$ ) の平均値と標準偏差 ( $\pm$ ) を表す。 $F_v/F_m$  の値にライン間で有意差は認められなかった (チューキー検定)。



**Fig. 2-8 NDH 抑制株におけるクロロフィル蛍光測定。** 測定には中光条件 ( $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢 8 週目の植物の完全に展開した最上位葉を用いた。(A) PS II の相対電子伝達速度、(B) non-photochemical quenching (NPQ)。グラフの値は生物学的反復実験 ( $n=3$ ) の平均値と標準偏差 (エラーバー) を表す。コントロール株と NDH 抑制株に有意差がある場合はアスタリスク (黒色: i5、灰色: i12) で示した。\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (チューキー検定)。

**Table 2-5 NDH 抑制株における NPQ の誘導と解消**

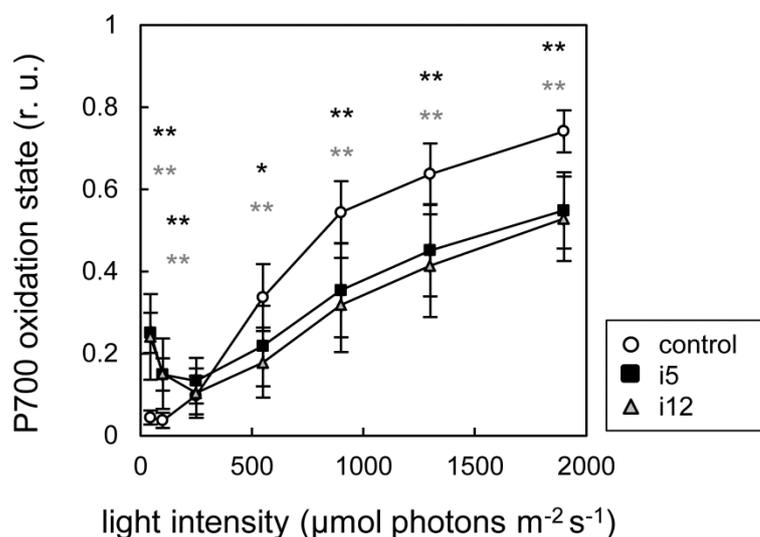
	control	i5
NPQ (AL 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	1.2 $\pm$ 0.21	0.66 $\pm$ 0.042**
After 3min dark	0.037 $\pm$ 0.041	0.045 $\pm$ 0.014
NPQ (AL 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	1.7 $\pm$ 0.090	1.1 $\pm$ 0.18**
After 3min dark	0.064 $\pm$ 0.030	0.050 $\pm$ 0.022
NPQ (AL 1900 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	2.0 $\pm$ 0.11	1.5 $\pm$ 0.17**
After 3min dark	0.11 $\pm$ 0.051	0.074 $\pm$ 0.060

中光条件 ( $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢 8 週目の植物の完全に展開した最上位葉に光合成作用光 (AL: actinic light) を 5 分照射した後、暗所に 3 分静置して NPQ の誘導と解消をモニターした。表の値は生物学的反復実験 ( $n=3$ ) の平均値と標準偏差 ( $\pm$ ) を表す。\*\*:  $P < 0.01$  でライン間での有意差あり (ステューデントの  $t$ -検定)。

次に PS I の反応中心 P700 の酸化レベルを P700 の吸光度変化をモニターすることで見積もった。その結果、 $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  以上の光強度で P700 は NDH 抑制株においてコントロール株に比べて還元的になることが示された (Fig. 2-9)。 $C_3$  植物シロイヌナズナの PGR5-PGRL1 経路欠損株 (*pgr5*, *pgrl1*) では中光以上 ( $> 300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で P700 が著しい過還元状態になることが知られている (Munekage et al. 2002, Dalcorso et al. 2008)。これに対し、シロイヌナズナの NDH 経路欠損株では定常光合成条件では P700 の過還元は見られない (Munekage et al. 2004)。しかし、NDH 経路欠損タバコでは超強光の照射 ( $3500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 10 分) によって P700 の過還元が引き起こされることが報告されている (Endo et al. 1999)。したがって  $C_3$  植物よりも NDH の蓄積が多い  $C_4$  植物の *F. bidentis* では定常光合成での電子伝達における NDH 経路の寄与が増大し、PGR5-PGRL1 経路同様に P700 の過還元を防ぐ役割を果たしていることが示唆された。一方、 $50 \sim 100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の弱光下では、P700 は NDH 抑制株でコントロール株に比べてより酸化的になることが示された (Fig. 2-9)。弱光条件で光合成電子伝達による還元力が過剰に蓄積することは想定されにくいいため、この表現型はコントロール株で P700 の過還元が生じているというよりは、むしろ NDH 抑制株で NDH からシトクロム *b6/f* 複合体を経由した PS I への電子供与が抑制されていることを反映していると考えられた。シトクロム *b6/f* 複合体は光合成電子伝達に伴うストロマからルーメンへのプロトン輸送に機能し (Tikhonov 2014)、NDH も複合体 I との

相同性から同様の機能を持つと考えられている (Friedrich 1995)。そのため NDH 抑制株ではシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体と NDH を介したストロマからルーメンへのプロトン輸送能が低下していると考えられた。

光合成電子伝達に伴ってストロマからルーメンへプロトンが輸送されると、ATP 合成酵素における ATP 生成を駆動する *pmf* が発生する (Sacksteder et al. 2000)。ECS 測定により NDH 抑制株で生じる *pmf* を見積もったところ、コントロール株に対して NDH 抑制株では *pmf* の低下が認められた (Table 2-6)。これにより NDH 抑制株ではストロマからルーメンへのプロトン輸送能が低下し、ATP 生成に支障が生じることが示唆された。



**Fig. 2-9 NDH 抑制株における P700 酸化レベル。**測定には中光条件 (400 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) で栽培した週齢 8 週目の植物の完全に展開した最上位葉を用いた。グラフの値は生物学的反復実験 (n = 8) の平均値と標準偏差 (エラーバー) を表す。コントロール株と NDH 抑制株に有意差がある場合はアスタリスク (黒色: i5、灰色: i12) で示した。\*: P < 0.05、\*\*: P < 0.01 (チューキー検定)。

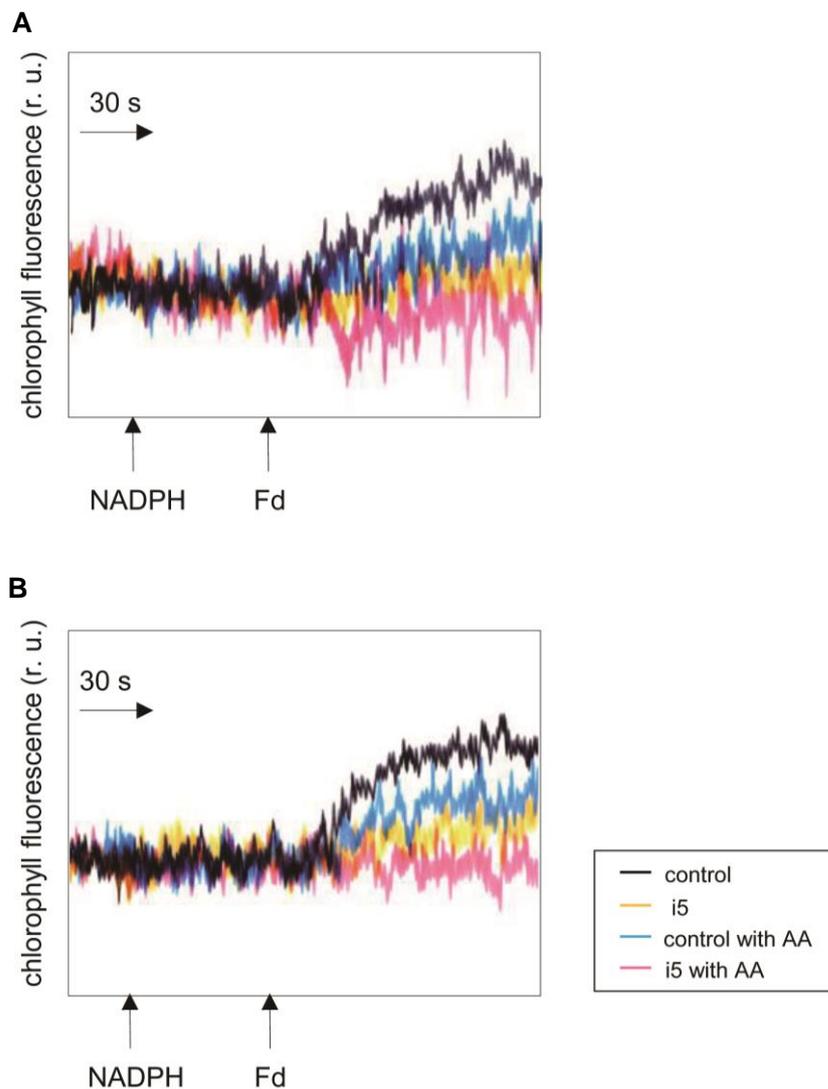
**Table 2-6 NDH 抑制株における *proton motive force* (*pmf*) の測定**

	control	i5
<i>pmf</i> (408 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	0.455 $\pm$ 0.050	0.312 $\pm$ 0.062**
<i>pmf</i> (1050 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	0.579 $\pm$ 0.077	0.415 $\pm$ 0.036**

中光条件 (400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢 8 週目の植物 (T<sub>2</sub> 世代) の完全に展開した最上位葉で electrochromic shift (ECS) 測定をおこなって *pmf* を見積もった。表の値は生物学的反復実験 ( $n = 5\sim 12$ ) の平均値と標準偏差 ( $\pm$ ) を表す。\*\*:  $P < 0.01$  でライン間での有意差あり (ステューデントの  $t$ -検定)。

### NDH 抑制株における PGR5-PGRL1 経路の活性評価

NDH 抑制株において NDH 経路と部分的に重複するもう一つの循環的電子伝達経路、PGR5-PGRL1 経路の活性に影響が出ていないか検証した。まず PGR5-PGRL1 経路の必須タンパク質に対するイムノブロット解析をおこなったところ、PGR5、PGRL1 いずれについても NDH 抑制株とコントロール株で蓄積に差は見られなかった (Fig. 2-6)。次に単離チラコイド膜を用いて *in vitro* での循環的電子伝達活性を評価した (Endo et al. 1997、Munekage et al. 2002)。葉肉細胞、維管束鞘細胞それぞれから単離した葉緑体のチラコイド膜に NADPH と Fd を添加してプラストキノンの非光化学的還元アッセイをおこなった結果、NDH 抑制株では葉肉細胞葉緑体、維管束鞘細胞葉緑体のいずれにおいてもプラストキノン還元能の低下が認められた。更に PGR5-PGRL1 経路の阻害剤である Antimycin A を添加してアッセイをおこなったところ、コントロール株では Antimycin A 非添加時よりも低下したものの、プラストキノンの還元能は維持された。しかし NDH 抑制株では Antimycin A の添加によってプラストキノンの還元はほとんど見られなくなった (Fig. 2-10)。これはコントロール株では NDH 経路、PGR5-PGRL1 経路の 2 つの循環的電子伝達経路によってプラストキノンが還元されるが、NDH 抑制株では PGR5-PGRL1 経路のみが機能しており、Antimycin A の添加によって循環的電子伝達活性がほとんど失われたためと考えられた。以上の結果から NDH 抑制株で PGR5-PGRL1 経路の活性は維持されており、これまでに示した NDH 抑制株における表現型は NDH 経路のみの抑制による影響を反映していると考えられた。



**Fig. 2-10** NDH 抑制株における *in vitro* プラストキノン還元アッセイ。測定には中光条件 ( $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培した週齢 8 週目の植物 ( $T_2$  世代) の上位葉から単離した (A) 葉肉細胞葉緑体、(B) 維管束鞘細胞葉緑体のチラコイド膜画分を用いた。チラコイド膜画分 ( $10 \mu\text{g}$  クロロフィル相当量  $\text{mL}^{-1}$ ) に  $1 \mu\text{M}$  Antimycin A (AA) 存在下/非存在下で  $0.25 \text{ mM}$  NADPH および  $5 \mu\text{M}$  フェレドキシン (Fd) を添加してプラストキノンの非光化学的な還元を誘導した。各葉緑体画分への他方の混入を検証するために抗 PPKK 抗体および抗 RbcL 抗体を用いてイムノプロットをおこない、葉肉細胞葉緑体画分への維管束鞘細胞葉緑体の混入は 25%未満、維管束鞘細胞葉緑体画分への葉肉細胞葉緑体の混入は 12.5%未満であることを確認した。

## [考察]

本章では第1章で作成した *F. bidentis* の NDH 抑制株を用いて植物の生育と光合成活性について測定をおこない、NDH 経路が C<sub>4</sub> 光合成で果たす役割について解析した。光合成電子伝達測定によって NDH 抑制株では PS II アンテナフィードバック熱放散の誘導が抑制されることが示された (Fig. 2-8B、Table 2-5)。フィードバック熱放散は電子伝達に伴うルーメンの酸性化によって誘導されることから NDH 抑制株では NDH 経路を介したチラコイド膜間でのプロトン輸送が抑制されていることが示唆された。フィードバック熱放散の誘導にはルーメンがある程度強く酸性化 (< pH 6) される必要があるため (Niyogi et al. 2004)、弱光条件での NPQ の差は必ずしもチラコイド膜間でのプロトン輸送の状態を反映する訳ではない。しかし NDH 抑制株では弱光条件で P700 がより酸化的事になることから、葉緑体 NDH およびシトクロム *b<sub>6</sub>/f* 複合体を経由した PS I への電子供与が抑制されていることが示唆され、これらの複合体を通じたチラコイド膜間でのプロトンの輸送も減少していると考えられた (Fig. 2-9)。こうしたプロトン輸送によって NDH 経路は ATP 生成を駆動する *pmf* を発生させるが、ECS 測定によって NDH 抑制株では *pmf* が低下することが示された (Table 2-6)。これらの結果から NDH を抑制した C<sub>4</sub> 植物 *F. bidentis* では ATP 生成能が低下していることが示唆された。

しかし強光下 (> 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) では NPQ や *pmf* の低下が認められるにもかかわらず、NDH 抑制株とコントロール株の CO<sub>2</sub> 吸収速度に有意な差は見られず (Fig. 2-5)、強光条件では NDH 経路による ATP 生成は C<sub>4</sub> 光合成における炭酸固定速度の律速要因とならないことが示唆された。また、直線的電子伝達速度を反映していると考えられる PS II の電子伝達速度が 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  付近で飽和するのに対し、CO<sub>2</sub> 吸収速度は更に増大し続けることから (Fig. 2-5、2-8A)、強光条件では光合成電子伝達による ATP や NADPH の生成速度以外の要因が CO<sub>2</sub> 吸収速度を律速していると考えられた。PEPC、PPDK、NADP-ME など C<sub>4</sub> 経路の酵素や Rubisco の蓄積が低下した C<sub>4</sub> 植物を用いた先行研究から、強光条件では特にこれらの酵素の蓄積量が C<sub>4</sub> 光合成における CO<sub>2</sub> 吸収速度を律速することが明らかとなっている (Furbank et al. 1996、1997、Bailey et al. 2000、Pengelly et al. 2012)。NDH 抑制株におけるこれらの酵素の蓄積はコントロール株と比べて差が認められなかったことから (Fig. 2-6) 強光条件での CO<sub>2</sub> 吸収速度にほとんど低下が見られなかったと考えられた。

一方、中光～弱光条件では NDH の抑制により CO<sub>2</sub> 吸収速度に有意な低下が見られた (Fig.

2-5)。 $\delta^{13}\text{C}$  の値からも  $\text{C}_4$  経路を介した  $\text{CO}_2$  濃縮効率は NDH の抑制によって低下することが示唆された (Table 2-2、2-3)。これらの結果から NDH 抑制株では  $\text{C}_4$  光合成が上手く機能しないため植物の成長が抑制されたと考えられた (Fig. 2-1、2-2)。特に弱光条件 ( $< 200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) では  $\text{C}_4$  経路の酵素や Rubisco の蓄積量は  $\text{CO}_2$  吸収速度にほとんど影響せず、もっぱら、ATP と NADPH の生成速度が律速要因となることが先行研究によって示唆されており (Furbank et al. 1996、1997、Bailey et al. 2000、Pengelly et al. 2012)、このような光条件で栽培した植物では中光で栽培した植物と比べても生育遅延が顕著で  $\delta^{13}\text{C}$  の値も大きく低下していた。またこれらの植物では葉の炭素量だけではなく、クロロフィル量、タンパク質量、窒素量にも低下が認められた (Fig. 2-1、2-2、Table 2-2、2-3)。これは弱光下では光合成電子伝達による ATP と NADPH の生成が著しく制限され、NDH の抑制による ATP の不足が炭酸固定以外の同化経路にも影響を及ぼしたためと考えられた。

NDH の抑制による生育遅延は自然光下で生育させた植物でも観察された (Fig. 2-4)。このことから圃場などの屋外で  $\text{C}_4$  植物が健全に生育するためには NDH 経路が不可欠であることが示唆された。また最近の研究によって、トウモロコシ (NADP-ME 型) の NDH 欠損株でも  $\text{C}_4$  経路による  $\text{CO}_2$  濃縮効率が減少することが報告され (Peterson et al. 2016)、双子葉植物、単子葉植物といった進化系統の違いを超えて NDH 経路が  $\text{C}_4$  光合成をおこなうためには重要であることが示された。こうした知見は、 $\text{C}_4$  光合成に関する理解を深めるだけでなく、 $\text{C}_3$  植物であるイネに  $\text{C}_4$  経路を付与し、その光合成効率を改善させるといった分子育種をおこなう際などにも特に重要である。しかしトウモロコシの NDH 欠損株では強光条件下でも  $\text{CO}_2$  吸収速度が低下し、また中光条件で栽培した場合にも  $F_v/F_m$  およびクロロフィル量の低下が見られるなど、*F. bidentis* の NDH 抑制株とは異なる表現型も報告されている (Peterson et al. 2016)。こうした表現型の違いはこれらの植物における  $\text{C}_4$  経路の違いやそれに伴う葉肉細胞および維管束鞘細胞でのエネルギー要求性の違い、維管束鞘細胞葉緑体における PS II の蓄積の違いに基づく NDH 経路への依存度の違いなどを反映していると考えられる。 $\text{C}_4$  経路は維管束鞘細胞での脱炭酸に寄与する酵素によって 3 つのサブタイプに分類されるが、トウモロコシをはじめ、様々な NADP-ME 型および NAD-ME 型の  $\text{C}_4$  植物で PEP-CK 活性が認められるなど (Sommer et al. 2012、Muhaidat and McKown 2013、Koteyeva et al. 2015)、*F. bidentis* 以外にも多くの  $\text{C}_4$  植物で複数のサブタイプを併用した混合型の  $\text{C}_4$  経路が稼働していることが示唆されている。このため近年では  $\text{C}_4$  経路のサブタイプに関する分類法について再検討がなされており (Furbank 2011、Wang et al. 2014)、 $\text{C}_4$  植物における

NDH 経路の研究についても、今後は特に個々の植物における C<sub>4</sub> 経路の代謝反応とエネルギーの要求性に基づいてより詳細に解析していく必要がある。

種子植物では NDH 経路の他に PGR5-PGRL1 経路が循環的電子伝達に機能しており、*F. bidentis* では NDH 経路だけではなく PGR5-PGRL1 経路も C<sub>4</sub> 光合成に必要な ATP 生成に寄与する可能性が指摘されていた (Munekage et al. 2010、Nakamura et al. 2013)。C<sub>3</sub> 植物の変異体の解析から NDH の抑制あるいは欠損は PGR5-PGRL1 経路の活性に影響しないと考えられており (Munekage et al. 2004)、また、本章でおこなった葉肉細胞葉緑体および維管束鞘細胞葉緑体の単離チラコイド膜を用いた解析結果からも C<sub>4</sub> 植物 *F. bidentis* の NDH 抑制株において PGR5-PGRL1 経路は活性を維持していることが示された (Fig. 2-10)。したがって、*F. bidentis* において PGR5-PGRL1 経路だけでは NDH 経路の抑制による C<sub>4</sub> 光合成への影響を完全に補うことはできないことが示唆された。シロイヌナズナの fructose 1,6-bisphosphatase 欠損株を用いた先行研究でも、CBB サイクルの代謝異常によって高まった ATP 需要を満たすために PGR5-PGRL1 経路ではなく NDH 経路が活性化されることが示唆されている (Livingston et al. 2010)。これまでのところ、NDH 経路と PGR5-PGRL1 経路の使い分けを明らかにした研究はほとんど報告されていないが、上記のことから ATP 要求性が高まる状況では PGR5-PGRL1 経路よりも NDH 経路が機能している可能性が考えられた。葉緑体 NDH でメンブレンサブコンプレックスおよびサブコンプレックス A の一部を構成するサブユニットはミトコンドリアの複合体 I でプロトンポンプとして機能するサブユニットと高い相同性を有し (Friedrich et al. 1995、Ifuku et al. 2011、Peltier et al. 2016)、NDH 経路ではシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体と葉緑体 NDH の 2 カ所でプロトンをルーメンに輸送することが可能となる。このためシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体でしかチラコイド膜間のプロトン輸送がおこらない PGR5-PGRL1 経路に比べて、NDH 経路では 1 電子の循環につきより大きな *pmf* を発生させることができると推定されている (Kramer and Evans 2011、Shikanai and Yamamoto 2017)。このような NDH 経路の特性は光合成電子伝達に利用できる光量が制限される弱光条件で特に C<sub>4</sub> 光合成に重要になると考えられる。

弱光栽培によるバイオマスの低下は C<sub>3</sub> 植物であるイネの NDH 抑制株でも報告されている (Yamori et al. 2015)。しかし、イネではチラコイド膜間のプロトン輸送に対する NDH 経路の寄与は非常に小さく、弱光条件下でのバイオマスの低下は ATP 生成能の低下によるものよりも NDH 経路の抑制による光合成電子伝達鎖のレドックスバランスの乱れが影響している可能性が提唱されている (Shikanai 2014、Yamori et al. 2015)。*F. bidentis* の NDH 抑制株

でも弱光下で P700 への電子供与が低下し、電子伝達鎖内のレドックスバランスがコントロール株とは異なっていることが推定された (Fig. 2-9)。現在のところ、こうした NDH 経路の抑制によるレドックスバランスの乱れがどのようなメカニズムで植物の生育に影響を及ぼすのか、その詳細について分子レベルではほとんど解明されていないが、イネによる先行研究に加え、本研究の結果を端緒として NDH 経路の未だ明らかにされていない機能に関する研究が、今後、進展することを期待する。

## まとめ

C<sub>4</sub> 光合成の ATP 要求性と葉緑体 NDH の発現には高い相関性が見られることから、光化学系 I 循環的電子伝達経路の一つである NDH 経路は C<sub>4</sub> 光合成に必要な ATP の供給に寄与しているのではないかと考えられてきた (Takabayashi et al. 2005、Majeran et al. 2008)。本研究では C<sub>4</sub> 植物 *F. bidentis* の NDH 抑制株を作成し、その光合成特性について解析をおこない NDH 経路が C<sub>4</sub> 光合成に重要な役割を果たしていることを生理学的に証明した。1 分子当たりの CO<sub>2</sub> の固定により多くの ATP を必要とする C<sub>4</sub> 光合成は、光合成電子伝達によるエネルギー生成が炭酸固定の律速要因となる弱光条件で C<sub>3</sub> 光合成に比べて不利になるのではないかと、という議論はこれまでも繰り返されてきた (Hatch 1970、Ehleringer and Björkman 1977、Percy and Ehleringer 1984、Sage 2014)。この問いに対する一つの答えとして、Ehleringer らは C<sub>3</sub> 光合成では大気条件で光呼吸によるエネルギーと CO<sub>2</sub> のロスがおこるため、光呼吸活性の高くなる高温条件 (> 30°C) では ATP のコストを費やしたとしても C<sub>4</sub> 光合成の方が効率がよいという結果を示した (Ehleringer and Björkman 1977、Percy and Ehleringer 1984)。これらの報告は、光呼吸が C<sub>3</sub> 光合成の本来の効率を阻害するという事実を明確にした非常に意義深いものであったが、その一方、高いエネルギーコストを補うための仕組みが C<sub>4</sub> 光合成に存在している可能性については明らかにされないままだった。本研究では NDH 経路を抑制した C<sub>4</sub> 植物 *F. bidentis* において特に弱光条件での C<sub>4</sub> 光合成効率が著しく減少することを示し、C<sub>4</sub> 経路を駆動するための ATP コストは光合成電子伝達に利用可能な光エネルギーが制限される弱光条件で C<sub>4</sub> 植物にとって負担となり、NDH 経路を増強させることによってその負担を軽減させている可能性を強く示唆した。これに対し、光呼吸存在下でも ATP/NADPH 要求比が直線的電子伝達経路における ATP/NADPH 生成比とそれほど乖離しない C<sub>3</sub> 植物では NDH 経路を増強しても、ATP の消費キャパシティを超えたプロトン輸送がルーメン側の過度な酸性化を引き起こし、光合成電子伝達の不必要なダウンレギュレーションやチラコイド膜タンパク質へのダメージを引き起こす危険性が考えられた。こうした ATP 要求性の違いから C<sub>4</sub> 植物では NDH の発現が増強される反面、C<sub>3</sub> 植物では NDH の蓄積は低く抑えられているのではないかと推定された。このように光合成電子伝達系は炭酸固定系におけるエネルギーの要求に応じて最適化される必要があり、本研究では、炭酸固定様式の C<sub>4</sub> 化に伴う ATP 要求性の変化に合わせて C<sub>4</sub> 植物では光合成電子伝達も C<sub>4</sub> 化されているということを生理学的に示した。

## 参考文献

- Allahverdiyeva, Y., Suorsa, M., Tikkanen, M. and Aro, E.M. (2015) Photoprotection of photosystems in fluctuating light intensities. *J. Exp. Bot.* 66: 2427-2436.
- Amthor J.S. (2010) From sunlight to phytomass: on the potential efficiency of converting solar radiation to phyto-energy. *New Phytol.* 188:939-959.
- Badger, M.R., von Caemmerer, S., Ruuska, S. and Nakano, H. (2000) Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 1433-1446.
- Bailey, K.J., Battistelli, A., Dever, L.V., Lea, P.J. and Leegood, R.C. (2000) Control of C<sub>4</sub> photosynthesis: effects of reduced activities of phosphoenolpyruvate carboxylase on CO<sub>2</sub> assimilation in *Amaranthus edulis* L. *J. Exp. Bot.* 51: 339–346.
- Bilger, W. and Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173–185.
- Bräutigam, A., Kajala, K., Wullenweber, J., Sommer, M., Gagneul, D., Weber, K.L., et al. (2011) An mRNA blueprint for C<sub>4</sub> photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> species. *Plant Physiol.* 155:142-156.
- Brown, N.J., Parsley, K. and Hibberd, J.M. (2005) The future of C<sub>4</sub> research-maize, *Flaveria* or *Cleome*? *Trends Plant Sci.* 10: 215-221.
- Burnell, J.N. and Hatch, M.D. (1988) Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxylase-type C<sub>4</sub> plants: pathways of C<sub>4</sub> acid decarboxylation in bundle sheath cells of *Urochloa panicoides*. *Arch. Biochem. Biophys.* 260:187-199.
- Burrows, P.A., Sazanov, L.A., Svab, Z., Maliga, P. and Nixon, P.J. (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.* 17: 868–876.
- Carnal, N.W., Agostino, A. and Hatch, M.D. (1993) Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxylase-type C<sub>4</sub> plants: Mechanism and regulation of C<sub>4</sub> acid decarboxylation in bundle sheath cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 306:360-367.

- Chang, C.C., Lin, H.C., Lin, I.P., Chow, T.Y., Chen, H.H., Chen, W.H., et al. (2006) The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* 23:279–91
- Chitty, J.A., Furbank, R.T., Marshall, J.S., Chen, Z. and Taylor, W.C. (1994) Genetic transformation of the C<sub>4</sub> plant, *Flaveria bidentis*. *Plant J.* 6: 949–956.
- Chu, C.C., Qu, N., Bassüner, B. and Bauwe, H. (1997) Genetic transformation of the C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub> intermediate plant, *Flaveria pubescens* (Asteraceae). *Plant Cell Rep.* 16: 715–718.
- Dalcorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schünemann, D., Finazzi, G., et al. (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132: 273–285.
- Driever, S.M. and Baker, N.R. (2011) The water-water cycle in leaves is not a major alternative electron sink for dissipation of excess excitation energy when CO<sub>2</sub> assimilation is restricted. *Plant Cell Environ.* 34: 837–846.
- Edwards, G.E. and Walker, D.A. (1983) Mechanism, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis. p. 299. Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19: 1349.
- Ehleringer, J. and Björkman, O. (1977) Quantum yields for CO<sub>2</sub> uptake in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants : dependence on temperature, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentration. *Plant Physiol.* 59: 86-90.
- Endo, T., Mi, H., Shikanai, T. and Asada, K. (1997) Donation of electrons to plastoquinone by NAD(P)H dehydrogenase and by ferredoxin-quinone reductase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 38: 1272–1277.
- Endo, T., Shikanai, T., Takabayashi, A., Asada, K. and Sato, F. (1999) The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection. *FEBS Lett.* 457: 5–8.
- Fan, X., Zhang, J., Li, W. and Peng, L. (2015) The NdhV subunit is required to stabilize the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* 82:221-231.
- Friedrich, T., Steinmüller, K. and Weiss, H. (1995) The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett.* 367: 107–111.

- Friso, G., Majeran, W., Huang, M., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2010) Reconstruction of metabolic pathways, protein expression, and homeostasis machineries across maize bundle sheath and mesophyll chloroplasts: large-scale quantitative proteomics using the first maize genome assembly. *Plant Physiol.* 152:1219–1250.
- Furbank, R.T. (2011) Evolution of the C<sub>4</sub> photosynthetic mechanism: are there really three C<sub>4</sub> acid decarboxylation types? *J. Exp. Bot.* 62:3103–3108.
- Furbank, R.T., Chitty, J.A., Jenkins, C.L.D., Taylor, W.C., Trevanion, S.J., von Caemmerer, S., et al. (1997) Genetic manipulation of key photosynthetic enzymes in the C<sub>4</sub> plant *Flaveria bidentis*. *Aust. J. Plant. Physiol.* 24: 477–485.
- Furbank, R.T., Chitty, J.A., von Caemmerer, S. and Jenkins, C.L.D. (1996) Antisense RNA inhibition of *RbcS* gene expression reduces Rubisco level and photosynthesis in the C<sub>4</sub> plant *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.* 111: 725–734.
- Genty, B., Briantais, J.M. and Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87–92.
- Gowik, U., Bräutigam, A., Weber, K.L., Weber, A.P.M. and Westhoff, P. (2011) Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*: how many and which genes does it take to make C<sub>4</sub>? *Plant Cell* 23: 2087–2105.
- Grohmann, L., Rasmusson, A.G., Heiser, V., Thieck, O. and Brennicke, A. (1996) The NADH-binding subunit of respiratory chain complex I is nuclear-encoded in plants and identified only in mitochondria. *Plant J.* 10: 793-803.
- Hatch, M.D. (1970) Prediction and Measurement of Photosynthetic Productivity. p. 215. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
- Hatch, M.D. (1987) C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895: 81–106.
- Hatch, M.D., Agostino, A. and Burnell, J.N. (1988) Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C<sub>4</sub> plants: activity and role of mitochondria in bundle sheath cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 261:357-367.

- Hertle, A.P., Blunder, T., Wunder, T., Pesaresi, P., Pribil, M., Armbruster, U., et al. (2013) PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. *Mol. Cell* 49:511-523.
- Horváth, E.M., Peter, S.O., Joët, T., Rumeau, D., Cournac, L., Horváth, G.V., et al. (2000) Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol.* 123: 1337–1349.
- Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T. and Aro, E.M. (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiol.* 52:1560-1568.
- Ifuku, K. and Sato, F. (2001) Importance of the N-terminal sequence of the extrinsic 23 kDa polypeptide in Photosystem II in ion retention in oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 1546: 196–204.
- Ishida, S., Takabayashi, A., Ishikawa, N., Hano, Y., Endo, T. and Sato, F. (2009) A novel nuclear-encoded protein, NDH-dependent cyclic electron flow 5, is essential for the accumulation of chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complexes. *Plant Cell Physiol.* 50: 383-393.
- Ishihara, S., Takabayashi, A., Ido, K., Endo, T., Ifuku, K. and Sato, F. (2007) Distinct functions for the two PsbP-like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast thylakoid lumen of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 145: 668-679.
- Ishikawa, N., Endo, T. and Sato F. (2008a) Electron transport activities of *Arabidopsis thaliana* mutants with impaired chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase. *J. Plant Res.* 121: 521-526.
- Ishikawa, N., Takabayashi, A., Ishida, S., Hano, Y., Endo, T. and Sato, F. (2008b) NDF6; a thylakoid protein specific to terrestrial plants is essential for activity of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 49: 1066–1073.
- Ishikawa, N., Takabayashi, A., Sato, F. and Endo, T. (2016) Accumulation of the components of cyclic electron flow around photosystem I in C<sub>4</sub> plants, with respect to the requirements for ATP. *Photosynth. Res.* 129: 261-277.
- Johnson, G.N. (2011) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochem. Biophys. Acta* 1807: 906–911.
- Kanai, R. and Edwards, G.E. (1999) The biochemistry of C<sub>4</sub> photosynthesis. In: Sage RF, Monson RK (eds) C<sub>4</sub> Plant Biology, Academic Press, San Diego, p. 49-87.

- Kanazawa, A. and Kramer, D.M. (2002) *In vivo* modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12789–12794.
- Kato, Y., Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., et al. (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* 220: 97-104.
- Ketchner, S.L. and Sayre, R.T. (1992) Characterization of the expression of the photosystem II-oxygen evolving complex in C<sub>4</sub> species of *Flaveria*. *Plant Physiol.* 98: 1154–1162.
- Kiirats, O., Kramer, D.M. and Edwards, G.E. (2010) Co-regulation of dark and light reactions in three biochemical subtypes of C<sub>4</sub> species. *Photosynth. Res.* 105: 89–99.
- Klughammer, C. and Schreiber, U. (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700<sup>+</sup>-absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192: 261–268.
- Kono, M., Noguchi, K. and Terashima, I. (2014) Roles of the cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) and O<sub>2</sub>-dependent alternative pathways in regulation of the photosynthetic electron flow in short-term fluctuating light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 55:990-1004.
- Kotera, E., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433: 326–330.
- Koteyeva, N.K., Voznesenskaya, E.V. and Edwards, G.E. (2015) An assessment of the capacity for phosphoenolpyruvate carboxykinase to contribute to C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant Sci.* 235:70–80.
- Krall, J.P., Edwards, G.E. and Ku, M.S.B. (1991) Quantum yield of photosystem II and efficiency of CO<sub>2</sub> fixation in *Flaveria* (Asteracea) species under varying light and CO<sub>2</sub>. *Aust. J. Plant Physiol.* 18: 369–383.
- Kramer, D.M. and Evans, J.R. (2011) The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. *Plant Physiol.* 155: 70–78.
- Ku, M.S., Wu, J., Dai, Z., Scott, R.A., Chu, C. and Edwards, G.E. (1991) Photosynthetic and photorespiratory characteristics of *Flaveria* species. *Plant Physiol.* 96:518-528

- Kubicki, A., Funk, E., Westhoff, P. and Steinmüller, K. (1996) Differential expression of plastome-encoded *ndh* genes in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the C<sub>4</sub> plant *Sorghum bicolor* indicates that the complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase is involved in cyclic electron transport. *Planta* 199:276-281.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Li, P., Ponnala, L., Gandotra, N., Wang, L., Si, Y., Tausta, S.L., et al. (2010) The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nat. Genet.* 42:1060-1067.
- Li, X.G., Duan, W., Meng, Q.W., Zou, Q. and Zhao, S.J. (2004) The function of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco during chilling stress under low irradiance. *Plant Cell Physiol.* 45: 103–108.
- Li, X.P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., et al. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395.
- Livingston, A.K., Cruz, J.A., Kohzuma, K., Dhingra, A. and Kramer, D.M. (2010) An *Arabidopsis* mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (*hcef*) involving the NADPH dehydrogenase complex. *Plant Cell* 22: 221–233.
- Majeran, W., Zybailov, B., Ytterberg, A.J., Dunsmore, J., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2008) Consequences of C<sub>4</sub> differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells. *Mol. Cell Proteomics* 7:1609-1638.
- Meister, M., Agostino, A. and Hatch, M.D. (1996) The roles of malate and aspartate in C<sub>4</sub> photosynthetic metabolism of *Flaveria bidentis* (L.). *Planta* 199: 262–269.
- Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., et al. (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37: 49–59.
- Muhaidat, R. and McKown, A.D. (2013) Significant involvement of PEPCK in carbon assimilation of C<sub>4</sub> eudicots. *Ann. Bot.* 111:577–589.
- Müller, P., Li, X.P. and Niyogi, K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125: 1558–1566.

- Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M., et al. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429: 579–582.
- Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 361–371.
- Munekage, Y.N., Eymery, F., Rumeau, D., Cuiné, S. Oguri, M., Nakamura, N., et al. (2010) Elevated expression of PGR5 and NDH-H in bundle sheath chloroplasts in C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Cell Physiol.* 51: 664–668.
- Nakamura, N., Iwano, M., Havaux, M., Yokota, A. and Munekage Y.N. (2013) Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria*. *New Phytol.* 199: 832–842.
- Niyogi, K.K., Li, X.P., Rosenberg, V. and Jung, H.S. (2004) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 56: 375–382.
- Oberhuber, W., Dai, Z.Y. and Edwards, G.E. (1993) Light dependence of quantum yields of photosystem II to CO<sub>2</sub> fixation in C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> plants. *Photosynth. Res.* 35: 265–274.
- Offermann, S., Friso, G., Doroshenk, K.A., Sun, Q., Sharpe, R.M., Okita, T.W., et al. (2015) Developmental and subcellular organization of single-cell C<sub>4</sub> photosynthesis in *Bienertia sinuspersici* determined by large-scale proteomics and cDNA assembly from 454 DNA sequencing. *J. Proteome Res.* 14:2090-2108.
- Ohta, N., Matsuzaki, M., Misumi, O., Miyagishima, S. Y., Nozaki, H., Tanaka, K., et al. (2003) Complete sequence and analysis of the plastid genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* 30: 67-77.
- Pearcy, R.W. and Ehleringer, J. (1984) Comparative ecophysiology of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Plant Cell Environ.* 7: 1-13.
- Peltier, G., Tolleter, D., Billon, E. and Cournac, L. (2010) Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae. *Photosynth. Res.* 106: 19–31.
- Peltier, G., Aro, E.M. and Shikanai, T. (2016) NDH-1 and NDH-2 plastoquinone reductases in oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 29: 55-80.

- Peng, L., Shimizu, H. and Shikanai, T. (2008) The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283:34873-34879.
- Peng, L., Yamamoto, H. and Shikanai, T. (2011) Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1807:945-953.
- Pengelly, J.J.L., Sirault, X.R., Tazoe, Y., Evans, J.R., Furbank, R.T. and von Caemmerer, S. (2010) Growth of the C<sub>4</sub> dicot *Flaveria bidentis*: photosynthetic acclimation to low light through shifts in leaf anatomy and biochemistry. *J. Exp. Bot.* 61: 4109–4122.
- Pengelly, J.J.L., Tan, J., Furbank, R.T. and von Caemmerer, S. (2012) Antisense reduction of NADP-malic enzyme in *Flaveria bidentis* reduces flow of CO<sub>2</sub> through the C<sub>4</sub> cycle. *Plant Physiol.* 160: 1070–1080.
- Peterson, R.B., Schultes, N.P., McHale, N.A. and Zelitch, I. (2016) Evidence for a role for NAD(P)H dehydrogenase in concentration of CO<sub>2</sub> in the bundle sheath cell of *Zea mays*. *Plant Physiol.* 171: 125-38.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384–394.
- Powell, A.M. (1978) Systematics of *Flaveria* (Flaveriinae: Asteraceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 65:590-636
- Quick, P.W. and Stitt, M. (1989) An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 977: 287–296.
- Roach, T. and Krieger-Liszkay, A. (2014) Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15: 351-62.
- Rochaix, J.D. (2011) Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 878–886.
- Rumeau, D., Bécuwe-Linka, N., Beyly, A., Louwagie, M., Garin, J. and Peltier, G. (2005) New subunits NDH-M, -N, and -O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell* 17: 219–232.

- Sacksteder, C.A., Kanazawa, A., Jacoby, M.E. and Kramer, D.M. (2000) The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: A proton-pumping Q cycle is continuously engaged. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14283–14288.
- Sage, R. (2014) Stopping the leaks: new insights into C<sub>4</sub> photosynthesis at low light. *Plant Cell Environ.* 37: 1037-1041.
- Savitch, L.V., Ivanov, A.G., Gudynaite-Savitch, L., Huner, N.P. and Simmonds, J. (2011) Cold stress effects on PSI photochemistry in *Zea mays*: differential increase of FQR-dependent cyclic electron flow and functional implications. *Plant Cell Physiol.* 52: 1042-54.
- Shikanai, T. (2014) Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26: 25–30.
- Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K. and Yokota, A. (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9705–9709.
- Shikanai, T. and Yamamoto, H. (2017) Contribution of cyclic and pseudo-cyclic electron transport to the formation of proton motive force in chloroplasts. *Mol. Plant* 10: 20-29.
- Shirao, M., Kuroki, S., Kaneko, K., Kinjo, Y., Tsuyama, M., Förster, B., et al. (2013) Gymnosperms have increased capacity for electron leakage to oxygen (Mehler and PTOX reactions) in photosynthesis compared with angiosperms. *Plant Cell Physiol.* 54: 1152-63.
- Sommer, M., Bräutigam, A. and Weber, A.P. (2012) The dicotyledonous NAD malic enzyme C<sub>4</sub> plant *Cleome gynandra* displays age-dependent plasticity of C<sub>4</sub> decarboxylation biochemistry. *Plant Biol.* 14: 621–629.
- Sugiyama, T., Mizuno, M. and Hayashi, M. (1984) Partitioning of nitrogen among ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and pyruvate orthophosphate dikinase as related to biomass productivity in maize seedlings. *Plant Physiol.* 75: 665–669.
- Suorsa, M. (2015) Cyclic electron flow provides acclimatory plasticity for the photosynthetic machinery under various environmental conditions and developmental stages. *Front. Plant Sci.* 6: 800.

- Suorsa, M., Järvi, S., Grieco, M., Nurmi, M., Pietrzykowska, M., Rantala, M., et al. (2012) PROTON GRADIENT REGULATION5 is essential for proper acclimation of *Arabidopsis* photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions. *Plant Cell* 24: 2934-2948.
- Takabayashi, A., Ishikawa, N., Obayashi, T., Ishida, S., Obokata, J., Endo, T., et al. (2009) Three novel subunits of Arabidopsis chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches. *Plant J.* 57: 207-219.
- Takabayashi, A., Kishine, M., Asada, K., Endo, T. and Sato, F. (2005) Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO<sub>2</sub> concentration mechanism in C<sub>4</sub> photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 16898–16903.
- Tazoe, Y., Hanba, Y.T., Furumoto, T., Noguchi, K. and Terashima, I. (2008) Relationships between quantum yield for CO<sub>2</sub> assimilation, activity of key enzymes and CO<sub>2</sub> leakiness in *Amaranthus cruentus*, a C<sub>4</sub> dicot, grown in high or low light. *Plant Cell Physiol.* 49: 19–29.
- Tikhonov, A.N. (2013) pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth. Res.* 116: 511–534.
- Tikhonov, A.N. (2014) The cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways. *Plant Physiol. Biochem.* 81: 163–183.
- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T. and Sugiura, M. (1994) Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9794–98
- Wang, C., Yamamoto, H. and Shikanai, T. (2015) Role of cyclic electron transport around photosystem I in regulating proton motive force. *Biochim. Biophys. Acta* 1847: 931-938.
- Wang, P., Duan, W., Takabayashi, A., Endo, T., Shikanai, T., Ye, J.Y., et al. (2006) Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress. *Plant Physiol.* 141: 465–474.
- Wang, Y., Bräutigam, A., Weber, A.P. and Zhu, X.G. (2014) Three distinct biochemical subtypes of C<sub>4</sub> photosynthesis? A modelling analysis. *J. Exp. Bot.* 65: 3567-3578.
- Wang, Y., Noguchi, K., Ono, N., Inoue, S., Terashima, I. and Kinoshita, T. (2014) Overexpression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 533–538.

- Yabuta, S., Ifuku, K., Takabayashi, A., Ishihara, S., Ido, K., Ishikawa, N., et al. (2010) Three PsbQ-Like proteins are required for the function of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 51: 866–876.
- Yamamoto, H., Peng, L., Fukao, Y. and Shikanai, T. (2011) An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 1480-1493.
- Yamamoto, H., Takahashi, S., Badger, M.R. and Shikanai, T. (2016) Artificial remodelling of alternative electron flow by flavodiiron proteins in Arabidopsis. *Nat. Plants* 2: 16012.
- Yamori, W., Makino, A. and Shikanai, T. (2016) A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. *Sci. Rep.* 6:20147.
- Yamori, W., Sakata, N., Suzuki, Y., Shikanai, T. and Makino, A. (2011) Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice. *Plant J.* 68: 966–976.
- Yamori, W., Shikanai, T. and Makino, A. (2015) Photosystem I cyclic electron flow via chloroplast NADH dehydrogenase-like complex performs a physiological role for photosynthesis at low light. *Sci. Rep.* 5: 13908.
- Yamori, W. and Shikanai, T. (2016) Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* 29: 81-106.
- Yin, X. and Struik, P.C. (2012) Mathematical review of the energy transduction stoichiometries of C<sub>4</sub> leaf photosynthesis under limiting light. *Plant Cell Environ.* 35: 1299-1312.

## 謝辞

本研究をおこなうにあたり多くの方々のお力添えをいただきました。

京都大学大学院生命科学研究科佐藤文彦教授には学術面のみならず、自分の研究の社会の中での意義など、広い視野に基づいたご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

京都大学大学院生命科学研究科遠藤剛准教授には本研究の指導教官として10年の長きに渡り多くのご指導いただきました。心より感謝申し上げます。

京都大学大学院生命科学研究科伊福健太郎助教には研究へのご助言はもちろん、ラボでの研究生活を送る上で多くのお力添えをいただきました。心より感謝申し上げます。

北海道大学低温科学研究所の高林厚史助教、東北大学大学院農学研究科の田副雄士特任助教には当研究室に在籍されていた当時、研究をおこなう上で不可欠な実験手法をご指導いただきました。心から御礼申し上げます。また、事務面では平田陽子氏に大変お世話になりました。この他にも研究室に在籍された多くの方々に様々なお力添えをいただきました。心より感謝申し上げます。

研究室外からも多くの方々にお力添えいただきました。龍谷大学の古本強教授からは *F. bidentis* の種子をご分与いただきました。オーストラリア国立大学の Susanne von Caemmerer 教授からは *F. bidentis* の形質転換法をご指導いただきました。東京薬科大学の野口航教授には NDH 抑制株の炭素、窒素含量および炭素安定同位体比の測定をしていただきました。京都大学の山本宏博士には ECS 測定をご指導いただきました。京都大学の鹿内利治教授、名古屋大学の谷口光隆教授、東京工業大学の久堀徹教授からは抗体を分与していただきました。また関西学院大学の宗景ゆり准教授には有益なディスカッションをしていただきました。上記の方々に心から御礼申し上げます。

最後に、本研究をおこなうにあたり全面的な理解と協力を惜しまず支えてくれた私の家族に心から感謝します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Noriko Ishikawa, Atsushi Takabayashi, Ko Noguchi, Youshi Tazoe, Hiroshi Yamamoto,

Susanne von Caemmerer, Fumihiko Sato and Tsuyoshi Endo

NDH-Mediated Cyclic Electron Flow Around Photosystem I is Crucial for C<sub>4</sub>  
Photosynthesis.

Plant & Cell Physiology 57: 2020-2028. 2016 doi: 10.1093/pcp/pcw127

## 学術雑誌に発表した論文

### 査読あり

- Ishikawa, N., Takabayashi, A., Noguchi, K., Tazoe, Y., Yamamoto, H., von Caemmerer, S., Sato, F. and Endo T. (2016) NDH-Mediated Cyclic Electron Flow Around Photosystem I is Crucial for C<sub>4</sub> Photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 57: 2020-2028.
- Ishikawa, N., Takabayashi, A., Sato, F. and Endo, T. (2016) Accumulation of the components of cyclic electron flow around photosystem I in C<sub>4</sub> plants, with respect to the requirements for ATP. *Photosynth. Res.* 129: 261-277.
- Ishikawa, N., Endo, T. and Sato F. (2008a) Electron transport activities of *Arabidopsis thaliana* mutants with impaired chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase. *J. Plant Res.* 121: 521-526.
- Ishikawa, N., Takabayashi, A., Ishida, S., Hano, Y., Endo, T. and Sato, F. (2008b) NDF6: A Thylakoid Protein Specific to Terrestrial Plants is Essential for Activity of Chloroplastic NAD(P)H Dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 49: 1066–1073.
- Endo, T., Ishida, S., Ishikawa, N. and Sato, F. (2008) Chloroplastic NAD(P)H Dehydrogenase Complex and Cyclic Electron Transport around Photosystem I. *Mol. Cells* 25:158-162.
- Takabayashi, A., Ishikawa, N., Obayashi, T., Ishida, S., Obokata, J., Endo, T. and Sato, F. (2009) Three novel subunits of Arabidopsis chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches. *Plant J.* 57: 207-219.
- Ishida, S., Takabayashi, A., Ishikawa, N., Hano, Y., Endo, T. and Sato, F. (2009) A Novel Nuclear-Encoded Protein, NDH-Dependent Cyclic Electron Flow 5, is Essential for the Accumulation of Chloroplast NAD(P)H Dehydrogenase Complexes. *Plant Cell Physiol.* 50: 383-393.
- Yabuta, S., Ifuku, K., Takabayashi, A., Ishihara, S., Ido, K., Ishikawa, N., Endo, T. and Sato, F. (2010) Three PsbQ-Like Proteins are Required for the Function of the Chloroplast NAD(P)H Dehydrogenase Complex in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 51: 866–876.