

ブラシノステロイドおよび光の  
シグナル伝達による  
葉緑体発達制御機構の研究

立花 諒

# 目次

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 要旨 .....                                                                       | 3  |
| 略語一覧 .....                                                                     | 5  |
| 序論 .....                                                                       | 9  |
| 葉緑体の発達制御機構 .....                                                               | 9  |
| GLK 転写因子 .....                                                                 | 11 |
| 植物ホルモン・ブラシノステロイド (BR) .....                                                    | 13 |
| BR シグナル伝達機構 .....                                                              | 14 |
| BR シグナル伝達による葉緑体発達制御機構 .....                                                    | 17 |
| BR 生合成阻害剤 Brz を用いた変異体スクリーニング .....                                             | 18 |
| 本研究の目的 .....                                                                   | 20 |
| 第一章 BR シグナルと光シグナルの下流で機能する新規葉緑体制御因子 BPG4 による葉緑体恒常性維持機構の解明 .....                 | 21 |
| 背景と目的 .....                                                                    | 21 |
| 結果 .....                                                                       | 22 |
| <i>BPG4-FOX</i> の原因遺伝子候補 <i>BPG4</i> の高発現植物体は、 <i>BPG4-FOX</i> の表現型を再現した ..... | 22 |
| <i>BPG4</i> はストレプト藻類および陸上植物に進化的に広く保存されている .....                                | 24 |
| <i>BPG4</i> は植物体の内生クロロフィル含量を減少させ、葉緑体グラナの発達を抑制する .....                          | 28 |
| <i>BPG4</i> は核に局在し、光合成関連核遺伝子 (PhANGs) の発現を抑制する .....                           | 32 |
| <i>BPG4</i> は葉緑体発達のマスター転写因子 GLKs と核内で相互作用する .....                              | 35 |
| <i>BPG4</i> は GLK1 の DNA 結合能の低下を介して、その転写活性化能を抑制する .....                        | 38 |
| <i>BPG4</i> mRNA 発現は、BR シグナル伝達のマスター転写因子 BES1 を介して BR シグナルによって抑制される .....       | 41 |
| <i>BPG4</i> mRNA は、明所において光合成組織特異的に発現し、概日リズムによって発現が制御される .....                  | 48 |
| <i>BPG4</i> は、強光条件における活性酸素分子種 (ROS) の発生の抑制と ROS 発生に伴う光阻害の回避において重要な役割を果たす ..... | 51 |
| 考察 .....                                                                       | 55 |
| 材料と方法 .....                                                                    | 63 |

|                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 第二章 BPG4 相同性因子 BGH2 による脱黄化時の子葉の緑化制御機構の解明 .....                                                  | 79  |
| 背景と目的 .....                                                                                     | 79  |
| 結果 .....                                                                                        | 82  |
| BGHs は明所における内生クロロフィル含量制御において BPG4 と冗長的に機能しない .....                                              | 82  |
| BGH2 の mRNA 発現は、明所誘導型の BPG4 とは対照的に暗所で生育した黄化芽生えの子葉において活性化する .....                                | 88  |
| 暗所誘導型 BPG4 相同性因子は、他の植物種間において保存されている .....                                                       | 91  |
| BGH2 は、黄化芽生えにおける過剰な Pchl <sub>ide</sub> 蓄積を抑制することにより、脱黄化時の ROS 発生による枯死を回避させ、子葉の正常な緑化を促進する ..... | 92  |
| BGH2 は暗所における GLK の過剰な活性化を抑制することにより、脱黄化時の正常な子葉の緑化を促進する .....                                     | 98  |
| PIF 転写因子は BGH2 プロモーター領域の G-box 配列に結合し、BGH2 発現を暗所で活性化することにより脱黄化時の子葉の正常な緑化を促進する .....             | 103 |
| HY5 転写因子は、明所で BPG4 発現を活性化する .....                                                               | 108 |
| GLK 転写因子は、BPG4 プロモーター領域に直接結合し、明所で BPG4 発現を活性化する .....                                           | 109 |
| 考察 .....                                                                                        | 115 |
| 材料と方法 .....                                                                                     | 122 |
| 総合考察 .....                                                                                      | 134 |
| 引用文献 .....                                                                                      | 143 |
| 謝辞 .....                                                                                        | 156 |

## 要旨

光合成反応は、地球生命を支えてきた重要な生命現象であり、植物特有の細胞小器官である葉緑体で実行されている。葉緑体は、常に周囲の環境変動に曝されており、植物は最適な光合成効率を維持するために、環境に応じて葉緑体の発達を精密に調節している。植物ホルモンの一種であるブラシノステロイド (BR) は、葉緑体の発達制御に関して非常に強い生理活性を持つことが知られている。BR 生合成阻害剤 Brz 処理により BR 内生量が低下すると、内生クロロフィル含量が増加し葉緑体発達が促進された濃緑色形態を示すこと明らかとなっている。しかし、BR シグナルによる葉緑体制御の分子機構には未解明な点が多く残されている。そこで本研究は、シロイヌナズナを用いて BR シグナル下流で機能する新規な葉緑体制御因子を解析することにより、その解明を試みた。

当研究室の先行研究により、Brz 処理による内生クロロフィル含量の増加に低感受性の淡緑色形態を示す *BRZ-INSENSITIVE-PALE GREEN 4 (BPG4)-FOX* 形質転換植物体が単離され、その表現型の原因遺伝子候補 *BPG4* が同定されていた。これまでに、葉緑体発達のマスター転写因子 *GOLDEN2-LIKE (GLK)* が *BPG4* と相互作用することなどが明らかとされていた。しかし、*BPG4* の分子機能や発現制御機構には多くの未解明領域が残されており、本研究の第一章ではそれらの解明を試みた。*BPG4* はストレプト藻類と陸上植物に進化的に保存されていた一方、既知の機能ドメインを持たない機能未知遺伝子であった。*BPG4* 欠損株は内生クロロフィル含量が増加し葉緑体チラコイド膜の発達が促進した濃緑色形態を示した一方、*BPG4* 高発現株は逆に内生クロロフィル含量が低下した淡緑色形態を示した。次に RT-qPCR 解析により、光合成関連核遺伝子 (PhANGs) の発現が *BPG4* 欠損株で増加し *BPG4* 高発現株で低下していることが明らかとなった。さらに、EMSA およびルシフェラーゼを用いたレポーター解析の結果から、*BPG4* は DNA 結合能の阻害を介して *GLK1* の転写活性化能を抑制していると考えられた。また、*BPG4* の mRNA 発現は、Brz 処理により増加しブラシノライド処理によって低下したことから、BR シグナルは *BPG4* 発現を抑制していると考えられた。さらに、RT-qPCR や EMSA などにより、BR シグナル伝達のマスター転写因子 *BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1)* が *BPG4* プロモーター領域に直接結合することで *BPG4* 発現を抑制していると考えられた。また、GUS 染色および RT-qPCR により、*BPG4* は明所における光合成器官で強く発現していることが明らかとなった。

以上の結果より、*BPG4* は明所や BR 欠損のような葉緑体発達が促進される条件下で発現が活性化するにも関わらず、逆に葉緑体発達を抑制する機能を持つと考えられた。そこで、この一見すると矛盾しているように考えられる結果から *BPG4* の生理学的意義を明らかにするために、*BPG4* が活性酸素分子種 (ROS) の発生および光合成活性に及ぼす影響を解析した。その結果、*BPG4* 欠損は、強光条件における ROS 発生量の増加および光合成活性の低下を引き起こすことが明らかとなった。これらの結果より、*BPG4* は BR および光のシグナル伝達の下流で *GLK* を抑制することにより、PhANGs の適切な発現制御、最適な内生クロロフィル含量の維持、葉緑体の過剰発達の抑止、ROS 発生および光合成活性低下の回避

に寄与する葉緑体恒常性維持因子 (ホメオスタシスファクター) として機能すると考察された。

第二章では、BPG4 の相同性因子 BPG4 HOMOLOGOUS GENE 2 (BGH2) の機能解析を行った。RT-qPCR 解析により、*BPG4* は明所の光合成器官で強く発現するのに対し、*BGH2* は暗所で発芽した黄化芽生えの子葉で強く発現していることが明らかとなった。また、*BGH2* 欠損株は暗所で過剰量のクロロフィル前駆体を蓄積し、脱黄化時に ROS 発生により子葉が緑化できず枯死することが明らかとなった。さらに、*BGH2* は GLK の転写活性化能の制御を介して暗所でのクロロフィル生合成を抑制すること、*BGH2* と *BPG4* の光環境に応じた発現制御には PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR および GLK が関与することが考察された。これらの結果より、*BGH2* は暗所で色素体の恒常性を維持することにより脱黄化時の ROS 発生を回避させ、子葉の正常な緑化を促進する役目を担っていると考察された。

本研究は、BR と光のシグナル下流で機能する葉緑体制御因子 *BPG4* とその相同性因子 *BGH2* が葉緑体/色素体の分化/発達を制御する分子機構を明らかにした。本研究の成果は、有用作物の光合成活性向上を通じた大気中の CO<sub>2</sub> 削減や農作物・バイオマスの生産性向上などの応用研究に繋がることが期待される。

## 略語一覽

|             |                                          |
|-------------|------------------------------------------|
| ABRC        | Arabidopsis Biological Resource Center   |
| ACT2        | ACTIN 2                                  |
| <i>AmTr</i> | <i>Amborella trichopoda</i>              |
| APRR2       | ARABIDOPSIS PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 2  |
| ARF6        | AUXIN RESPONSE FACTOR 6                  |
| <i>At</i>   | <i>Arabidopsis thaliana</i>              |
| BAK1        | BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1         |
| BBX         | B-BOX DOMAIN PROTEIN                     |
| <i>Bd</i>   | <i>Brachypodium distachyon</i>           |
| BES1        | BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1                    |
| BGH         | BPG4 HOMOLOGOUS GENE                     |
| bHLH        | basic helix-loop-helix                   |
| BiFC        | Bimolecular fluorescence complementation |
| BIL         | Brz-insensitive-long hypocotyl           |
| BIN2        | BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2            |
| BK11        | BRI1 KINASE INHIBITOR 1                  |
| BL          | Brassinolide                             |
| BLAST       | Basic Local Alignment Search Tool        |
| BPG         | Brz-insensitive-pale green               |
| BR          | Brassinosteroid                          |
| BRI1        | BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1            |
| BRRE        | BR response element                      |
| BSK         | BRASSINOSTEROID SIGNALING KINASE         |
| BSS1        | BRZ-SENSITIVE-SHORT HYPOCOTYL 1          |
| BSU1        | BRI1 SUPPRESSOR 1                        |
| BZR1        | BRASSINAZOLE-RESISTANT 1                 |
| <i>Ca</i>   | <i>Chlorokybus atmophyticus</i>          |
| CAB         | CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN          |
| CaMV        | Cauliflower mosaic virus                 |
| CAO         | Chlorophyll <i>a</i> oxygenase           |
| <i>Cb</i>   | <i>Chara braunii</i>                     |
| CCD         | Charge-coupled device                    |
| cDNA        | Complementary DNA                        |
| CDS         | Coding sequence                          |
| CGA1        | CYTOKININ-RESPONSIVE GATA1               |
| ChIP        | Chromatin immunoprecipitation            |
| CHLG        | Chlorophyll synthase                     |

|           |                                                        |
|-----------|--------------------------------------------------------|
| CHLH      | MAGNESIUM CHELATASE H SUBUNIT                          |
| CO        | CONSTANS                                               |
| CoIP      | Co-immunoprecipitation                                 |
| Col-0     | Columbia-0                                             |
| COP       | CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1                        |
| <i>Cr</i> | <i>Ceratopteris richardii</i>                          |
| DAB       | 3,3-diaminobenzidine                                   |
| DAPI      | 4',6-diamidino-2-phenylindole                          |
| DBD       | DNA-binding domain                                     |
| <i>Dc</i> | <i>Diphasiastrum complanatum</i>                       |
| DET1      | DE-ETIOLATED 1                                         |
| DET2      | DE-ETIOLATED 2                                         |
| DGP1      | DEEP GREEN PANICLE 1                                   |
| DMSO      | Dimethyl sulfoxide                                     |
| DNA       | deoxyribonucleic acid                                  |
| DTT       | dithiothreitol                                         |
| DV        | Divinyl                                                |
| DVR       | Divinyl protochlorophyllide <i>a</i> 8-vinyl reductase |
| DWF4      | DWARF4                                                 |
| EDTA      | Ethylenediaminetetraacetic acid                        |
| eIF4a     | EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4a1           |
| EMSA      | Electrophoretic Mobility Shift Assay                   |
| FLU       | FLUORESCENCE                                           |
| FOX       | Arabidopsis Full length cDNA Over eXpressing line      |
| FT        | FLOWERING LOCUS T                                      |
| <i>G2</i> | <i>Golden 2</i>                                        |
| GA        | Glutaraldehyde                                         |
| GAPDH     | GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE               |
| GCT-box   | GLK/C-terminal-box                                     |
| GFP       | GREEN FLUORESCENT PROTEIN                              |
| GLK       | GOLDEN2-LIKE                                           |
| <i>Gm</i> | <i>Glycine max</i>                                     |
| GNC       | GATA NITRATE-INDUCIBLE CARBON-METABOLISM-INVOLVED      |
| GNL       | GNC-LIKE                                               |
| GST       | Glutathione S-transferase                              |
| GUN4      | GENOMES UNCOUPLED4                                     |
| GUS       | β-glucuronidase                                        |
| HPLC      | High-performance liquid chromatography                 |

|                     |                                              |
|---------------------|----------------------------------------------|
| HY5                 | ELONGATED HYPOCOTYL5                         |
| IPTG                | Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside |
| IQR                 | Interquartile range                          |
| <i>Kn</i>           | <i>Klebsormidium nitens</i>                  |
| LED                 | Light-emitting diode                         |
| LHC                 | Light-harvesting complex                     |
| LIN                 | Lincomycin                                   |
| LSD1                | LESION-SIMULATING DISEASE 1                  |
| LUC                 | Firefly luciferase                           |
| MBP                 | Maltose-binding protein                      |
| <i>Mp</i>           | <i>Marchantia polymorpha</i>                 |
| mRNA                | Messenger RNA                                |
| MS                  | Murashige and Skoog                          |
| Mu                  | Mutated                                      |
| MV                  | Monovinyl                                    |
| NADPH               | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  |
| NBT                 | Nitro blue tetrazolium                       |
| NC                  | Negative control                             |
| NF                  | Norflurazon                                  |
| NOS                 | Nopaline synthase                            |
| <i>Nt</i>           | <i>Nicotiana tabacum</i>                     |
| <i>Os</i>           | <i>Oryza sativa</i>                          |
| OsO4                | Osmium tetroxide                             |
| P.I.                | Protease Inhibitor                           |
| PAO                 | pheophorbide <i>a</i> oxygenase              |
| PC                  | Positive control                             |
| Pchl <sub>ide</sub> | Protochlorophyllide                          |
| PCR                 | Polymerase chain reaction                    |
| PEL                 | PSEUDO-ETIOLATION IN LIGHT                   |
| PFA                 | Paraformaldehyde                             |
| PhANGs              | Photosynthesis-associated nuclear genes      |
| PhAPGs              | Photosynthesis-associated plastid genes      |
| PIF                 | PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR               |
| PO                  | Propylene oxide                              |
| POR                 | Protochlorophyllide reductase                |
| PP2A                | PROTEIN PHOSPHATASE 2A                       |
| PRD                 | Proline-rich domain                          |
| PSI/II              | Photosystem I/II                             |

|              |                                                               |
|--------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>Pt</i>    | <i>Populus trichocarpa</i>                                    |
| <i>rbcL</i>  | ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit |
| <i>rbcS</i>  | ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit |
| REN          | Renilla luciferase                                            |
| RNA          | Ribonucleic acid                                              |
| ROS          | Reactive oxygen species                                       |
| RPGE         | REPRESSOR OF PHOTOSYNTHETIC GENES                             |
| RT-PCR       | Reverse transcription-PCR                                     |
| RT-qPCR      | Real-time-quantitative PCR                                    |
| SD           | standard deviation                                            |
| SDS          | Sodium dodecyl sulfate                                        |
| SIB          | SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1                                |
| <i>Sl</i>    | <i>Solanum lycopersicum</i>                                   |
| <i>Sm</i>    | <i>Selaginella moellendorffii</i>                             |
| SOSG         | Singlet Oxygen Sensor Green                                   |
| <i>Sp</i>    | <i>Specific</i>                                               |
| <i>SpMu</i>  | <i>Spirogloea muscicola</i>                                   |
| T-DNA        | Transfer-DNA                                                  |
| TAIR         | The Arabidopsis Information Resource                          |
| TB           | Trypan Blue                                                   |
| TEM          | Transmission electron microscopy                              |
| Tp           | Thuja plicata                                                 |
| <i>U</i>     | <i>Uniform ripening</i>                                       |
| UTR          | Untranslated region                                           |
| Ws           | Wassilewskija                                                 |
| WT           | Wild-type                                                     |
| Y2H          | Yeast two-hybrid                                              |
| YFP          | YELLOW FLUORESCENT PROTEIN                                    |
| <i>Zc</i>    | <i>Zygnema cf. cylindricum</i>                                |
| <i>Zm</i>    | <i>Zea maize</i>                                              |
| UBI          | UBIQUITIN                                                     |
| $\lambda$ PP | $\lambda$ Protein Phosphatase                                 |

## 序論

### 葉緑体の発達制御機構

植物は、大気中の二酸化炭素を炭水化物へと変換する光合成反応によって地球生命を支えてきた。光合成反応は、植物に特異的な細胞小器官（オルガネラ）である葉緑体で実行されており、光合成反応と葉緑体の発達は密接に結びついている。植物細胞内の葉緑体は、常に周囲の環境変動に曝されており、植物は最適な光合成効率を維持するために、環境に応じて葉緑体の発達を精密に調節している。葉緑体発達を司るタンパク質は、光合成関連プラスチド遺伝子（*Photosynthesis-associated plastid genes*, PhAPGs）と光合成関連核遺伝子（*Photosynthesis-associated nuclear genes*, PhANGs）によってコードされる（Cackett et al., 2022）。光化学系 II (PSII) における D1 タンパク質をコードする *psbA* 遺伝子やリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（ルビスコ）大サブユニットをコードする *rbcL* 遺伝子など、光合成に必須な因子の一部は葉緑体ゲノムに PhAPGs として存在し、葉緑体内で原核生物型 RNA ポリメラーゼやシグマ因子などによって発現が制御されている（Börner et al., 2015; Chi et al., 2015）。一方、クロロフィル合成関連酵素や光捕集複合体（Light-harvesting complex, LHC）および光化学系 I/II (PSI/II) のサブユニットなど、光合成装置の主要な構成要素の大部分は、核ゲノムに PhANGs としてコードされている（Cackett et al., 2022）。

核においては、複数の転写因子が光シグナルや植物ホルモンシグナルの下流で PhANGs の発現を制御している（Cackett et al., 2022; Frangedakis et al., 2024）。赤色光受容体フィトクロムと相互作用する basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子として同定された PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs) は、暗所における PhANGs 発現抑制において主要な役割を果たすことが知られている（図 0-1）（Monte et al., 2004; Moon et al., 2008; Stephenson et al., 2009）。*PIF* 欠損変異体 (*pif*) は、暗所においてクロロフィル前駆体を過剰蓄積し、暗所から明所に移った際に光酸化ストレスにより枯死することが知られている（Monte et al., 2004; Stephenson et al., 2009; Wang et al., 2020）。明所においては、ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5)、GOLDEN2-LIKE (GLK)、GATA NITRATE-INDUCIBLE CARBON-METABOLISM-INVOLVED (GNC)、CYTOKININ-RESPONSIVE GATA1 (CGA1)/GNC-LIKE (GNL)、および MYB 関連転写因子 (MYBS) が協調的に PhANGs 発現、クロロフィル合成、および葉緑体の発達を促進することが知られている（図 0-1）（Lee et al., 2007; Waters et al., 2009; Bastakis et al., 2018; Cackett et al., 2022; Frangedakis et al., 2024）。以下に、現在までに明らかとなっている (I) 暗所および (II) 明所における PhANGs 発現制御を介した葉緑体発達制御機構の概要を記す。

**(I) 暗所における PhANGs 発現制御機構:** 暗所においては、PhANGs 発現の活性化因子である GLK、GNC/CGA1、MYBS1/2 の mRNA 発現が抑制されている。E3 リガーゼの一種である CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) や DETIOLATED 1 (DET1) は、ユビキチン-プロテアソーム系を介して暗所における PhANGs 発現の活性化因子である HY5 や GLK のタンパク質分解を促進していることが報告されてい

る (図 0-1) (Cackett et al., 2022; Zhang et al., 2024)。また、PIFs タンパク質の蓄積量が増加し、PhANGs 発現が抑制されるため、色素体は葉緑体へと分化せずエチオプラストとして存在する (Cackett et al., 2022)。(II) 明所における PhANGs 発現制御機構: 明所においては、PIFs が速やかに分解されるため PIFs による PhANG 抑制が解除される。また、COP1/DET1 による HY5 および GLKs の分解が解除されるため、GLKs や HY5 のタンパク質蓄積量が増加する。また、GLKs、GNC/CGA1、MYBSs の mRNA 発現が活性化する。その結果、HY5、GLKs、GNC/CGA1、MYBSs などの転写因子が協調的に機能し、PhANGs 発現および葉緑体の発達が促進される (図 0-1) (Martín et al., 2016; Bastakis et al., 2018; Zhang et al., 2021; Cackett et al., 2022; Frangedakis et al., 2024; Zhang et al., 2024)。これらの先行研究により、植物が周囲の環境変化、特に光環境の変化を受容して PhANGs 発現を活性化し、葉緑体の分化および発達を制御する分子メカニズムが明らかとなってきた。

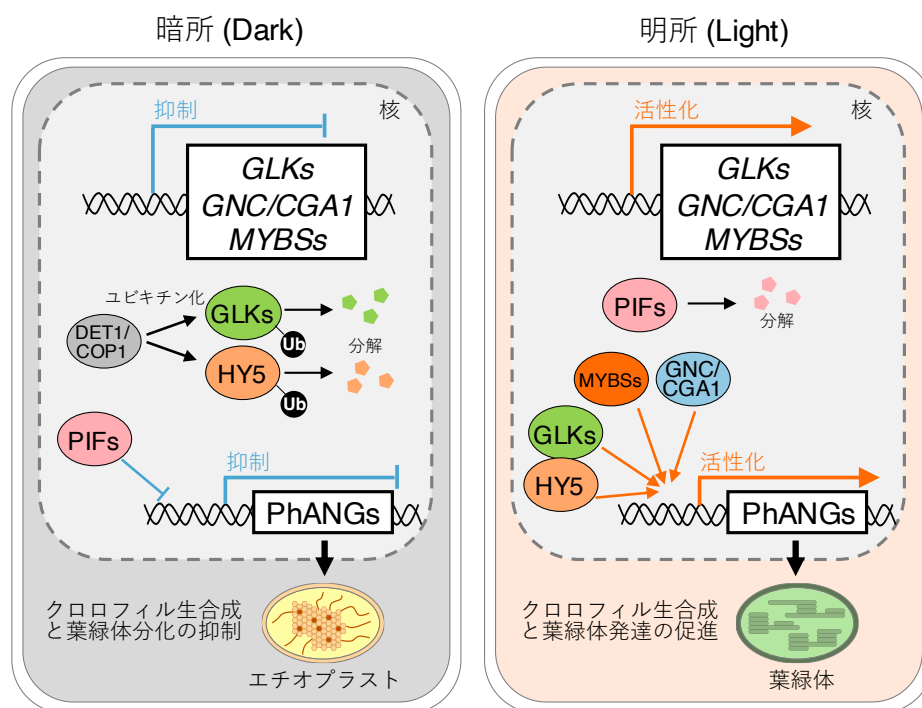


図 0-1. PhANGs 発現制御を介した葉緑体発達制御機構の概要図

暗所においては、GLKs、GNC/CGA1、MYBSs の発現が抑制されることに加えて、DET1 や COP1 の働きにより GLKs や HY5 はユビキチン化され、26S プロテアソームによって分解される。また、PIFs が PhANGs のプロモーター領域に結合することにより、PhANGs 発現は抑制され、エチオプラストから葉緑体への分化は抑制される。明所においては、光受容体であるフィトクロムが光を受容し、PIFs は分解される。また、GLKs、GNC/CGA1、MYBSs の発現は光によって活性化され、DET1 や COP1 によるタンパク質分解も解除される。HY5、GLKs、GNC/CGA1、MYBSs 転写因子は、PhANGs のプロモーター領域に結合することにより、協調的に PhANGs 発現を活性化し、葉緑体の発達を促進する。

## GLK 転写因子

GLK 転写因子は、Golden2、ARR-B、PSR1 から構成される GARP ファミリーに属する転写因子である。GLK 転写因子の研究は、1926 年にトウモロコシにおいて黄金色の葉を示す変異体として単離された *Golden 2 (G2)* に端を発しており (Jenkins, 1926)、その後シロイヌナズナ、トマト、イネ、オオムギ、タケ、ヒメツリガネゴケ、ゼニゴケなど様々な植物種で研究が進められてきた (Rossini et al., 2001; Fitter et al., 2002; Yasumura et al., 2005; Bravo-Garcia et al., 2009; Waters et al., 2009; Powell et al., 2012; Wang et al., 2013; Taketa et al., 2021; Wu et al., 2022; Hernández-Muñoz et al., 2024)。シロイヌナズナにおいては、GLK1 と GLK2 が冗長的に機能しており、GLK1 および GLK2 の単一遺伝子欠損植物体 (*glk1* および *glk2*) は野生型植物 (WT) と明確な表現型の違いが認められない一方、*glk1glk2* 二重変異体は葉緑体の発達が顕著に抑制された淡緑色形態を示す (Waters et al., 2008; Waters et al., 2009)。また、GLK1/2 は、クロロフィル生合成酵素や LHC サブユニットをコードする遺伝子などの PhANGs のプロモーター領域に直接結合し、それらの遺伝子の発現を網羅的に増加させる機能を持つことが報告されている (Waters et al., 2009)。これらの先行研究より、GLK 転写因子は PhANGs 発現、クロロフィル生合成、光合成装置の構築、葉緑体の発達を促進するために必要不可欠な働きをしていると考えられており、「葉緑体発達のマスター転写因子」として広く認められている (Fitter et al., 2002; Waters et al., 2009; Wang et al., 2013; Hernández-Muñoz et al., 2024)。

GLK は、その mRNA 発現、タンパク質の安定性、転写活性化能が光シグナルや葉緑体から核への逆行性 (レトログレード) シグナル、植物ホルモンシグナルなどによって制御されることが報告されている (Yu et al., 2011; Kobayashi et al., 2012; Martín et al., 2016; Kobayashi et al., 2017; Tokumaru et al., 2017; Zhang et al., 2021; Veciana et al., 2022)。光シグナル伝達の抑制的マスター転写因子 PIFs は *GLK1* 発現を抑制するのに対し、光シグナル伝達の促進的マスター転写因子 HY5 は *GLK1* 発現を活性化することが知られている (Martín et al., 2016; Zhang et al., 2024)。HY5 はタンパク質レベルにおいても GLK を制御しており、HY5 は GLK と相互作用することで協調的に PhANGs 発現を活性化する (Zhang et al., 2024)。葉緑体にカロテノイド生合成阻害剤ノルフルラゾン (Norflurazon, NF) や葉緑体内のタンパク質生合成阻害剤リンコマイシン (Lincomycin, LIN) を添加した際に、葉緑体が受けた傷害を逆行性シグナルとして核に伝えることにより PhANGs 発現が抑制されることが知られている (Susek et al., 1993; Mochizuki et al., 2001)。GLK の発現およびタンパク質の安定性は、この逆行性シグナルの制御下にあり、GLK の mRNA 発現量およびタンパク質蓄積量は、NF 処理および LIN 処理によって低下する (Waters et al., 2009; Martín et al., 2016; Tokumaru et al., 2017)。また、オーキシンやサイトカイニン、ブラシノステロイドなどの植物ホルモンによっても GLK が制御されることが知られている。*GLK2* 発現は、オーキシンにより抑制されサイトカイニンによって活性化されることが報告されており、通常は根においては抑制された状態にある (Kobayashi et al., 2012)。一方、強制的に GLK を異所発現させた植物体においては根においても葉緑体が発達することから、オーキシンとサイトカイニンによる *GLK* 発現制御は組織

特異的な色素体分化において重要な役割を果たしていると考えられる (Kobayashi et al., 2012; Kobayashi et al., 2017)。また、GLK の mRNA 発現、タンパク質の安定性、および転写活性化能は BR シグナルによっても制御されることが報告されている (Yu et al., 2011; Zhang et al., 2021)。BR シグナル伝達のマスター転写因子である BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) によって *GLK1/2* 発現が抑制される (Yu et al., 2011)。一方、BR シグナル伝達において主要な役割を担うリン酸化キナーゼ BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 (BIN2) は、*GLK1/2* と直接相互作用することにより *GLK1/2* をリン酸化し *GLK1/2* のタンパク質安定性および転写活性化能を増加させる (Zhang et al., 2021)。これらの先行研究に基づき、GLK 転写因子は様々なシグナルを統合するハブとして機能することにより、葉緑体発達の司令塔として機能していると考えられている。

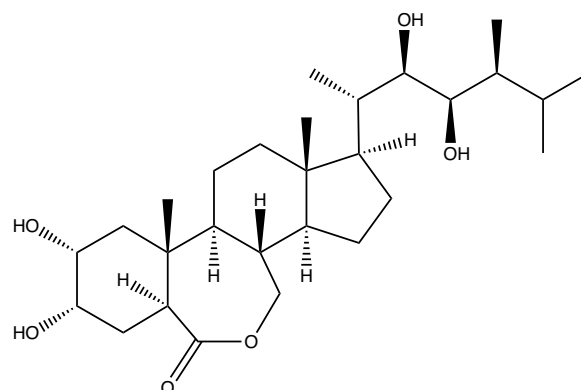
近年、GLK 転写因子は農業上有用な形質を生み出す因子として脚光を浴びている。イネにおいて、トウモロコシ (*Zea mays*, *Zm*) の *ZmG2* 遺伝子および *ZmGLK1* を *ZmUBIQUITIN* (*ZmUBI*) プロモーターの制御下で高発現させた植物体は、WT よりも光合成活性および種子収量が増加することが報告されている (Li et al., 2020)。また、*ZmUBI* プロモーターではなく、*ZmG2* プロモーターおよび *ZmGLK1* プロモーターを用いて作出した植物体においても同様の形質が報告されており (Yeh et al., 2021)、*ZmG2/ZmGLK1* をイネにおいて高発現させることで作物収量を増加できると考えられている。また、トマト (*Solanum lycopersicum*, *Sl*) において農業管理上有利な形質として選抜されてきた *Uniform ripening* (*U*) の原因遺伝子が *SIGLK2* であることが 2012 年に報告された (Powell et al., 2012)。通常、未成熟なトマト果実は上部が濃い緑色の Green shoulder と呼ばれる葉緑体が発達した組織を持つ一方、果実下部は葉緑体が発達していない薄緑色の組織となる。しかし、このように上部と下部で内生クロロフィル含量に差がある果実は、成熟時期の管理がしづらくなるという農業上の欠点があるため、Green shoulder がなく果実全体が薄緑色で葉緑体が発達しておらず均一に果実が熟す系統である *Uniform ripening* (*U*) が品種改良の過程で選抜されてきた (Powell et al., 2012)。一方、*SIGLK2* を欠損した *Uniform ripening* (*U*) 表現型を示す品種は、*SIGLK2* が機能し Green shoulder を持つ品種よりも糖含有量やカロテノイドなどの栄養素含有量が低下することが明らかとなってきた (Powell et al., 2012)。そこで逆に、*SIGLK1* および *SIGLK2* をカリフラワーモザイクウイルス (*CaMV*) 由来の 35S プロモーターの制御下で高発現させたトマトを作出したところ、糖およびカロテノイドなどの栄養素の含有量が WT と比較して増加することが報告されている (Grove et al., 1979; Powell et al., 2012; Nguyen et al., 2014)。これらの先行研究より、GLK を有用作物において高発現させることにより種子収量の増加や糖・栄養素含量の増加などの有用形質が達成できることが示唆されており、GLK の制御機構の解明は応用的な観点からも注目度が高い。

## 植物ホルモン・ブラシノステロイド (BR)

植物は自らの力で自由に移動することができないため、植物生体内に存在する多様な分子機構により周囲の環境変動に適応している。その分子機構の一端を担っているのが植物ホルモンと呼ばれる低分子化合物である。植物ホルモンは、一般に「多くの植物が共通して持つ生理活性の強い低分子化合物」として定義される。植物ホルモンの歴史は、植物が光のある方向に屈性を示すことから発見に至ったオーキシンを皮切りに、現在までにジベレリン、サイトカイニン、エチレン、アブシシン酸、ブラシノステロイド、ストリゴラクトン、ジャスモン酸などが見出されている。それぞれの植物ホルモンは、植物生体内で生合成され、受容された後、各植物ホルモンに特異的なシグナル伝達機構により植物に生理作用を発揮することが知られている。

ブラシノステロイド (BR) は、ステロイド骨格を持つ植物独自の成長ホルモンであり、多くの陸上植物に普遍的に存在する (Zebosi et al., 2024)。BR は、セイヨウアブラナの花粉中から同定されたインゲンマメ幼植物の成長を促進する未知物質として 1970 年に発見された (Mitchell et al., 1970)。その後 1979 年に、生理活性物質の本体としてステロイド骨格を有する化合物が同定され、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) の属名にちなんでブラシノライド (BL) と名付けられた (図 0-2) (Grove et al., 1979)。これまでに活性を持つ天然型の BR として、BL の他に BL 前駆体であるカステステロンが報告されている (Yokota et al., 1982)。

1990 年代に顕著な矮性形態を示す突然変異体 *de-etiolated 2 (det2)* 変異体が発見された。*det2* は、暗所で生育した際にも胚軸が短化し子葉が展開した表現型を示すことから、光形態形成において重要な役割を果たすと考えられた (Chory et al., 1991)。また、暗所条件下において生育させた *det2* 変異体においては、ルビスコ小サブユニットをコードする *rbcS*、LHC サブユニットをコードする *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)*、および *psbA* などの暗所では通常発現しない光合成関連遺伝子が高発現していることが報告された (Chory et al., 1991)。後に、この *det2* の表現型の原因遺伝子が BR 生合成酵素の一つである DWARF6 (DWF6) の欠損であると同定され、その矮性形態を指標とした分子遺伝学的研究によって、BR 生合成経路の解明が進められていった (Fujioka and Yokota, 2003)。その後の研究によって、BR は植物の成長促進、葉緑体の分化・発達制御、環境ストレス耐性の亢進、および病害抵抗性の向上など様々な生理作用を持つことが明らかとされている。現在、BR は植物ホルモンの一種として認められ、多くの研究者によってその生理活性およびシグナル伝達機構の解明が進められている。



**図 0-2. ブラシノステロイド (BR) の構造式**

天然の活性型 BR の一つであるブラシノライド (BL) の構造式。

## BR シグナル伝達機構

*det2* の単離以降、BR 処理への感受性を指標とした分子遺伝学的スクリーニングが行われ、*det2* と類似した表現型を示すにもかかわらず BR 処理によって表現型が回復しない変異体である *brassinosteroid-insensitive 1 (bri1)* が単離された (Clouse et al., 1996)。BRI1 はロイシンリッチリピート (LRR) 配列と膜貫通ドメインを有する受容体型セリン/スレオニンキナーゼであり、BR 受容体として機能することが明らかとなっている (図 0-3) (Li and Chory, 1997)。BRI1 周辺の BR シグナル伝達因子としては、BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1)、BRI1 KINASE INHIBITOR 1 (BKI1) および BRASSINOSTEROID SIGNALING KINASE (BSK) が同定されている (Li et al., 2002; Nam and Li, 2002; Wang and Chory, 2006; Kim and Wang, 2010)。BAK1 は、BRI1 とともに細胞膜上で機能する因子として、*bril-5* を相補する変異体 *bril-associated receptor kinase1-1 Dominant (bak1-1D)* から単離された。BAK1 は LRR 配列とセリン/スレオニン型キナーゼドメインを持つタンパク質であり、BR 存在下で BRI1 とヘテロダイマーを形成することにより共受容体として機能する (Nam and Li, 2002)。BRI1 と BAK1 は互いにリン酸化し合い、リン酸化された BRI1 は細胞外ドメインを欠く受容体様細胞質キナーゼである BSK をリン酸化することにより BR シグナル伝達を促進する (図 0-3) (Nam and Li, 2002; Kim and Wang, 2010; Nolan et al., 2020)。BSK は、BR 非存在条件下においては BRI1 と相互作用しているが、BRI1 によってリン酸化されると BRI1 から分離し BR シグナルに促進的に機能する (図 0-3) (Kim and Wang, 2010; Nolan et al., 2020)。BR 非存在条件下においては、BRI1 と BAK1 の相互作用は BKI1 によって阻害されており、この阻害によって BR シグナル伝達が抑制される (図 0-3) (Wang and Chory, 2006)。

BR 存在条件下において BRI1 によってリン酸化された BSK は、Kelch-repeat ドメインを有するセリン/スレオニン型ホスファターゼである BRI1 SUPPRESSOR 1 (BSU1) をリン酸化

することにより BSU1 のホスファターゼ活性を増加させる (Nolan et al., 2020)。リン酸化により活性化した BSU1 は、BR シグナル伝達において主要な役割を果たすリン酸化キナーゼ BIN2 の自己リン酸化を抑制することで、BR シグナル伝達に促進的に機能する (図 0-3) (Kim et al., 2011)。BIN2 は、*bri1* と同様の表現型を示す変異体である *bin2-1* から単離された GSK3 (glycogen synthase kinase 3) 様キナーゼであり、BR 非存在条件下で BR シグナル伝達のマスター転写因子である BRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYL 1 (BIL1)/BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) や BES1 をリン酸化することで BR シグナル伝達に抑制的に機能する (図 0-3) (Li et al., 2001)。

BIL1/BZR1 と BES1 は、88% のアミノ酸同一性を有している相同的な bHLH 型転写因子であり、BR シグナル下流で約 3,000 もの遺伝子を制御する BR シグナル伝達のマスター転写因子として機能する (Wang et al., 2002; Yin et al., 2002; Nolan et al., 2020)。BIL1/BZR1 と BES1 のタンパク質の安定性および細胞内局在はリン酸化修飾によって制御される (Wang et al., 2002; Yin et al., 2002; Nolan et al., 2020)。BR 非存在条件下においては、BIN2 によってリン酸化された BIL1/BZR1 と BES1 は、14-3-3 によって核外に排出され 26S プロテアソーム系によって分解される (図 0-3) (Gampala et al., 2007)。また、BR 非存在条件下において、BIL1/BZR1 は BRZ-SENSITIVE-SHORT HYPOCOTYL 1 (BSS1) の凝集によって核移行が阻害されることが報告されている (図 0-3) (Shimada et al., 2015)。PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A) は、BIN2 によってリン酸化された BIL1/BZR1 と BES1 を脱リン酸化し、活性化状態へと促す BR シグナル伝達の促進因子である (図 0-3) (Tang et al., 2011)。脱リン酸化によって核移行が促進された BIL1/BZR1 と BES1 は、結合 *cis* 配列である G-box 配列 (CACGTG) や BR response element (BRRE) 配列 [CGTG(C/T)G] に結合し、下流の遺伝子発現を抑制/活性化する (Wang et al., 2002; Asami et al., 2003; He et al., 2005; Nosaki et al., 2018)。この際、PIF4 や AUXIN RESPONSE FACTOR 6 (ARF6) などの他の転写因子と相互作用することにより協調的に遺伝子発現を制御することが知られている (Oh et al., 2012; Oh et al., 2014)。なお、BIL1/BZR1 と BSS1 は、BR 生合成阻害剤 Brz を用いた変異体スクリーニング系により、当研究室の先行研究の中で同定された因子である (Brz および当該スクリーニング系に関する詳細は、18–19 頁にて後述する)。以上のように、当研究室を含む先行研究の寄与により、BR 受容体から BR シグナルのマスター転写因子 BIL1/BZR1 および BES1 までのシグナル伝達機構の解明が進みつつあり、現在までに図 0-3 に示すような分子メカニズムが考察されている。

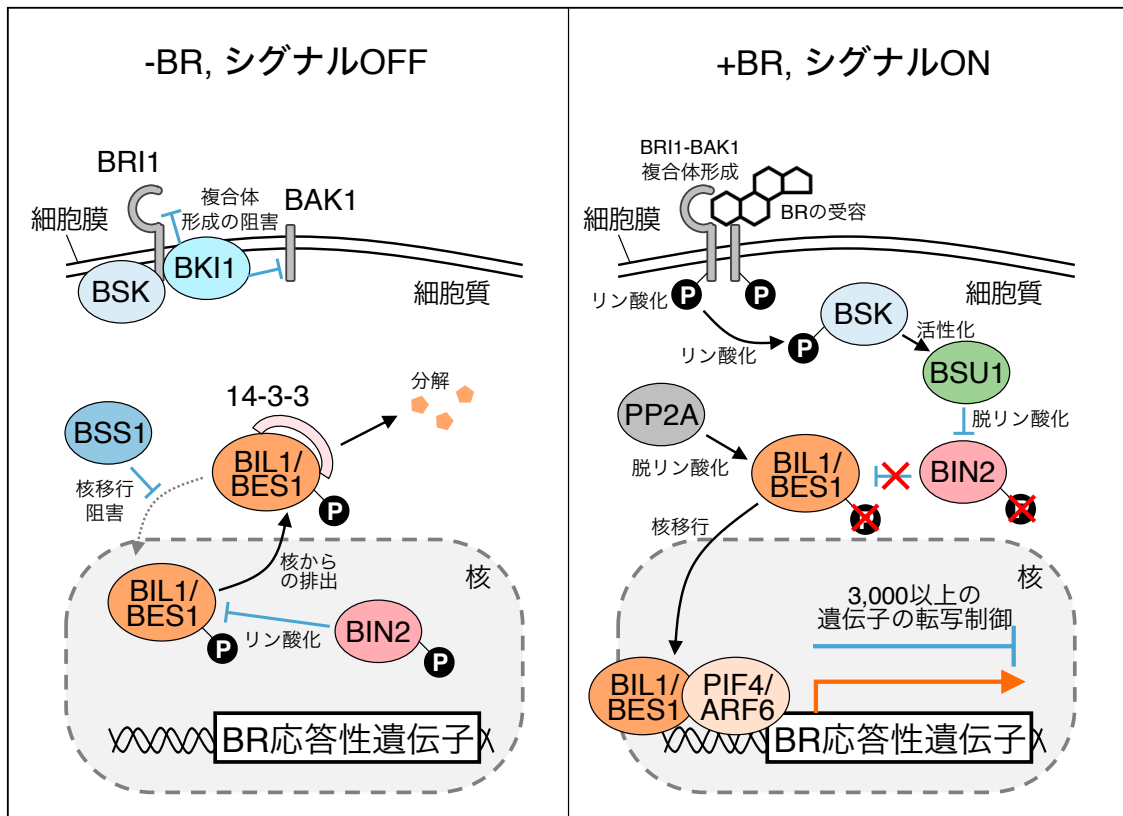


図 0-3. BR シグナル伝達機構の概要図

(左) BR 非存在条件下においては、BRI1 と BAK1 の複合体形成を BKI1 が阻害している。細胞膜上では、BSK が不活性化状態で BRI1 に結合している。核において、BIN2 が BIL1/BZR1 および BES1 をリン酸化し、リン酸化された BIL1/BZR1 および BES1 は 14-3-3 によって核から排出されて 26S プロテアソームによって分解される。また、BSS1 によって BIL1/BZR1 の核移行が阻害される。これらのメカニズムにより、BIL1/BZR1 および BES1 の核からの排出およびタンパク質分解が起こるため、BR 応答性遺伝子の発現制御は実行されない。

(右) BR 存在条件下においては、BRI1 と BAK1 がヘテロダイマーを形成し、互いをリン酸化し合う。リン酸化された BRI1 によって BSK がリン酸化され、BRI1 から脱離する。脱離した BSK は、BSU1 をリン酸化することにより、BSU1 を活性化する。活性化した BSU1 は、BIN2 の自己リン酸化を阻害することにより、BIN2 による BIL1/BZR1 および BES1 のリン酸化を抑制する。また、PP2A によって BIL1/BZR1 および BES1 の脱リン酸化が促進される。脱リン酸化により核に移行した BIL1/BZR1 および BES1 は、ホモ二量体として BR 応答性遺伝子の発現を制御することに加えて、PIF4 や ARF6 などの転写因子と複合体を形成して遺伝子発現を制御する。

## BR シグナル伝達による葉緑体発達制御機構

先に述べた通り、*det2* は当初、暗所においても明所下のように胚軸が短化し子葉が展開するといった「暗所光形態形成」を示す変異体として単離され、後にその原因が BR 生合成酵素 DWF6 の欠損によるものと証明された (Chory et al., 1991; Fujioka et al., 1997; Fujioka and Yokota, 2003)。明所条件下において生育させた *det2* は、内生クロロフィル含量が増加した濃緑色形態を示す (Chory et al., 1991)。一方、暗所条件下において生育させた *det2* においては、*rbcS*、*LHC/CAB*、*psbA* などの暗所では通常発現しない光合成関連遺伝子の発現が増加することが認められている (Chory et al., 1991)。また、BR 受容体 BRI1 の欠損変異体 *bri1* においても同様の形態が認められている (Clouse et al., 1996)。さらに、同様の表現型は、BR 生合成阻害剤 Brz 処理による BR 欠損状態によっても再現されることが確認されている (Asami et al., 2000)。暗所において、Brz を投与された植物体においては、*LHC* や *psbA* のような光化学系/光捕集アンテナに関係する遺伝子だけではなく、クロロフィル生合成遺伝子の発現も網羅的に増加する (Tachibana et al., 2022)。このような BR 欠損が引き起こす明所における濃緑色形態や暗所光形態形成は、シロイヌナズナ以外の植物種においても、エンドウ、クレス、トマト、タバコ、キュウリなどの幅広い植物種においても報告されている (Asami and Yoshida, 1999)。

一方で、BR シグナル伝達のマスター転写因子 BES1 の機能獲得型変異体 *bes1-D* は内生クロロフィル含量が低下した低緑化形態を示すことが明らかとなっている。*bes1-D* 変異体においては、葉緑体発達の異常、クロロフィル内生量の低下が報告されている (Yu et al., 2011)。さらに、BL 処理によっても内生クロロフィル含量が低下することが報告されている (Zhang et al., 2021)。以上のように、BR シグナルが欠乏した植物は濃緑色形態を示し、逆に BR シグナルが活性化した植物は淡緑色形態を示すことが明らかとなっている。これらの知見より、BR シグナルは葉緑体発達を抑制する生理作用を持つと考察されている。

また、11-12 頁で前述したように、BR シグナルによる葉緑体制御機構において GLK 転写因子が重要な役割を果たすことが報告されている (Yu et al., 2011; Zhang et al., 2021)。淡緑色形態を示す *bes1-D* において、*GLK1/2* の mRNA 発現が低下することが報告されている (Yu et al., 2011)。また、BR シグナル伝達において主要な役割を果たすリン酸化キナーゼである BIN2 が、GLK1 をリン酸化することでタンパク質を安定化し転写活性化能を向上させていることが示されている (Zhang et al., 2021)。しかし、BR シグナルがどの組織、どの環境で GLK 転写因子とその下流の遺伝子発現を制御しているかは明らかになっておらず、その制御の生理学的意義も解明の余地がある。また、BR シグナルによって発現が制御される光合成関連遺伝子は、GLK 転写因子の標的遺伝子以外にも多く存在しており、それらの遺伝子発現が制御される分子機構など BR シグナルによる葉緑体発達制御機構には未だ多くの謎が残されている。

## BR 生合成阻害剤 Brz を用いた変異体スクリーニング

1990 年代後半に BR 受容体 BRI1 が単離されたことから、BRI1 の下流で機能する BR シグナル伝達因子の解明が期待された。しかし BRI1 と BIN2 の単離以降、BR 欠損に特徴的な矮性表現型に対する BR 感受性を利用したスクリーニングによって BR シグナル伝達因子が単離されることはなく、研究の停滞期が訪れた。この停滞期を打破したのが、1998 年に東京大学の浅見忠男博士らによって開発された BR 生合成の特異的阻害剤 Brz を用いたケミカルバイオロジー (化学生物学) 的手法によるスクリーニング系である (図 0-4) (Asami and Yoshida, 1999)。Brz は、トリアゾール環がシトクロム P450 モノオキシゲナーゼのヘム位に親和性を持ち、BR 生合成経路上のシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ DWF4 を特異的に阻害する (Asami et al., 2000; Asami et al., 2001)。Brz 処理により、内生 BR 含量が減少し、*det2* や *bri1* と同様の矮性表現型が生じる (Asami et al., 2000)。暗所で発芽した WT 株は、子葉が閉じ胚軸が徒長したもやし様の形態を示す。一方、暗所で Brz を投与した WT 株は、BR 欠乏により胚軸が短化し子葉が開化した表現型を示す。そこで、暗所 Brz 添加条件にも関わらず、胚軸が短化せず逆に徒長するような表現型を示す変異体が単離できれば、その変異体の原因遺伝子は BR シグナル伝達因子をコードしていると考え、当研究室でスクリーニングが行われてきた (図 0-4)。このような表現型を示す変異体は、*Brz-insensitive-long hypocotyl (bil)* 変異体と名付けられ、未報告のものも含めると現在までに 9 つの変異体が単離されている (Wang et al., 2002; Bekh-Ochir et al., 2013; Yamagami et al., 2017; Chagan et al., 2024; Miyaji et al., 2024; Surina et al., 2024)。*bil1-D* 変異体より同定された BIL1/BZR1 は、前項で述べたように BR シグナル伝達のマスター転写因子として機能することが明らかとなっている (図 0-3) (Wang et al., 2002; Asami et al., 2003; Nosaki et al., 2018)。*bil* 変異体とは反対に Brz 処理で通常よりも胚軸が短くなる Brz 高感受性変異体として *Brz-sensitive-short hypocotyl 1-ID (bss1-ID)* が単離されている (図 0-4) (Shimada et al., 2015)。BSS1 は、Brz 処理による BR 欠損状態でタンパク質が凝集し、BIL1/BZR1 を捕捉することにより、BIL1/BZR1 の細胞質から核への移行を阻害する (図 0-3) (Shimada et al., 2015)。

BR は、植物の成長制御だけではなく、葉緑体発達の制御に対しても非常に強い生理活性を有する。先行研究により、*det2* や *bri1* は矮性かつ内生クロロフィル含量が増加した濃緑色形態を示すことが知られている (Chory et al., 1991; Clouse et al., 1996)。Brz を添加した培地で生育させた WT は、明所において、*det2* や *bri1* と同様の矮性かつ濃緑色形態を示し、葉緑体チラコイド膜のグラナの発達も WT より促進されることが報告されている (Nagata et al., 2000)。そこで、明所 Brz 添加条件で生育させた際に、葉が濃緑色にならず逆に淡緑色のまま維持されるような変異体が単離できれば、その変異体の原因遺伝子は葉緑体の発達制御に関する BR シグナル伝達因子をコードしていると考え、当研究室でスクリーニングが行われてきた (図 0-4)。このような表現型を示す変異体は、*Brz-insensitive-pale green (bpg)* 変異体と名付けられ、現在までに 3 つの変異体が報告されている (Komatsu et al., 2010; Yoshizawa et al., 2014; Tachibana et al., 2022)。*BPG1* は、クロロフィル生合成関連酵素の一つ

である 3, 8-divinyl protochlorophyllide *a* 8-vinyl reductase (DVR) をコードしていた (Nagata et al., 2005; Tachibana et al., 2022)。DVR を含むクロロフィル生合成関連遺伝子群の発現は、暗所において Brz 処理により活性化することが明らかとなっている (Tachibana et al., 2022)。BPG2 は、光合成生物および細菌に進化的に保存されている葉緑体 GTPase であり、葉緑体リボソーム RNA (rRNA) の正常な成熟に必須の役割を果たす (Komatsu et al., 2010)。BPG3 は、高等植物、藻類、光合成細菌に保存されている葉緑体タンパク質であり、PSII の光合成活性に影響を与える (Yoshizawa et al., 2014)。BPG1、BPG2、および BPG3 の発現は、Brz 処理による BR 欠乏に応答して増加することから、BR シグナルによってこれら遺伝子の mRNA 発現が抑制されていると考えられ、BPG1、BPG2 および BPG3 は、BR シグナルによる葉緑体発達制御機構において重要な役割を果たしていると考えられている。

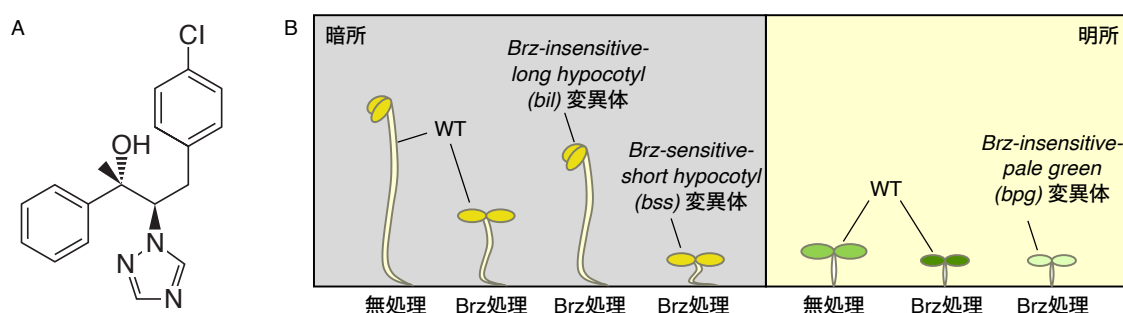


図 0-4. BR 生合成阻害剤 Brz を用いた *bil1* 変異体、*bss* 変異体および *bpg* 変異体のスクリーニング方法の概要図

(A) BR 生合成阻害剤 Brz の構造式。

(B) *bil* 変異体、*bss* 変異体、*bpg* 変異体のスクリーニング法の概要図。暗所で Brz を処理された植物体は、通常は胚軸が短化した表現型を示す。一方、*bil* 変異体は暗所 Brz 条件下においても胚軸が短化せず逆に徒長した表現型を示す。*bss* 変異体は、暗所 Brz 条件において Brz に WT よりも高い感受性を示し、WT よりも胚軸が短くなる。明所で Brz を処理された植物体は、矮性かつ葉の内生クロロフィル含量が増加した濃緑色形態を示す。*bpg* 変異体は、明所 Brz 条件においても葉の内生クロロフィル含量が増加せず、淡緑色形態のまま維持される。

## 本研究の目的

シロイヌナズナにおける光シグナル伝達機構の解明の過程で、光環境による葉緑体発達制御の分子機構の解明が進み、その制御において中心的な役割を果たす転写因子が同定されてきた。一方、葉緑体の発達は光などの外部環境要因だけではなく、植物ホルモンなどの内在性シグナル伝達によっても制御されることが明らかになりつつある。しかし、植物ホルモンを対象とした研究は、植物の成長制御、ストレス耐性制御などに焦点を当てる傾向が強く、植物ホルモンによる葉緑体制御機構には依然として多くの未解明領域が残されている。特に、BR は葉緑体発達や光形態形成に対して非常に強い生理活性を有するにも関わらず、BR シグナルによる葉緑体発達制御の分子機構には謎が多く残されている。

これまでの当研究室の先行研究において、BR シグナルによる葉緑体発達制御の分子機構の解明を目的に、*bpg* 変異体のスクリーニングが行われ、BR シグナル伝達の下流で葉緑体発達を制御する因子として BPG1、BPG2、BPG3 が同定されてきた (Komatsu et al., 2010; Yoshizawa et al., 2014; Tachibana et al., 2022)。BPG1、BPG2、BPG3 は、いずれも BR シグナルによって mRNA 発現が制御されており、葉緑体局在因子として葉緑体の発達制御に関与することが明らかとなっている (Komatsu et al., 2010; Yoshizawa et al., 2014; Tachibana et al., 2022)。一方、BR は細胞膜で受容されたのち核にシグナルが伝達されることから、BR シグナルによって制御される核局在の葉緑体制御因子の解明が求められていたが、そのような因子に関する知見は乏しいのが現状であった。

当研究室の先行研究により 4 番目の *bpg* 変異体として同定されていた *BPG4-FOX* 形質転換体から新規因子として BPG4 が単離されていた。第一章で後述するように、これまでの当研究室の先行研究によって *BPG4* が高発現した *BPG4-FOX* が淡緑色形態を示すこと、BPG4 が核と細胞質に局在すること、*BPG4* は光合成組織で主に発現すること、BPG4 と GLK 転写因子が相互作用することなどが明らかにされている (阿部, 2014; 丸上, 2017)。一方、BPG4 は既知の機能ドメインを持たない新規因子であり、BPG4 による葉緑体発達制御機構の詳細については多くが未解明な状況であった。本研究は、この BPG4 に関する研究を行い、光環境における BR シグナル伝達による葉緑体発達制御の分子機構に関する理解を深めることを目的とする。また、暗所誘導型の BPG4 相同性因子として同定した BPG4 HOMOLOGOUS GENE 2 (BGH2) の機能に関する研究を行うことにより、暗環境および脱黄化時における葉緑体/色素体発達制御の分子機構に関する理解を深めることも本研究の目的とする。

# 第一章 BRシグナルと光シグナルの下流で機能する新規葉緑体制御因子 BPG4 による葉緑体恒常性維持機構の解明

## 背景と目的

Brz は BR 生合成の特異的阻害剤であり、植物の内生 BR 含量を減少させる。Brz を添加した培地で生育させた植物は、暗所においても胚軸が短化し子葉が開化した光形態形成を示す。この際、クロロフィル生合成関連遺伝子、*LHC*、*rbcS*、*psbA* などの光合成関連遺伝子の発現が増加することが知られている。また、Brz を添加した植物を明所で生育させると、葉の内生クロロフィル含量が増加し葉緑体発達が促進した濃緑色形態を示すことが知られている (Komatsu et al., 2010; Tachibana et al., 2022)。このように葉緑体の発達に対する BR の生理作用は明確であるにもかかわらず、BR シグナルがどのように葉緑体の発達を制御しているのか、その分子機構は未だ解明されていない。

この未解明な分子機構を明らかにするために、Brz と約 10,000 株のシロイヌナズナ遺伝子強制発現系統 [Arabidopsis Full length cDNA Over expressing line (FOX ライン)] (Ichikawa et al., 2006) を用いたスクリーニングを行い、当研究室の先行研究において *BPG4-FOX* 植物体が単離されていた (阿部, 2014)。Brz 添加条件で生育した WT の子葉は、Mock 条件下で生育した WT よりも、内生クロロフィル含量が増加した濃緑色形態を示した。一方、*BPG4-FOX* の子葉は、Brz 添加条件および非添加条件の双方において淡緑色形態を示した (図 1-1 A-B)。 *BPG4-FOX* の内生クロロフィル含量は WT の約 60%程度に減少しており、Brz 添加によって有意に増加しなかった (図 1-1 B)。これらの結果から、*BPG4-FOX* の原因遺伝子である *BPG4* は、BR シグナルによる葉緑体制御に重要な機能を持つと考えられている。

FOX ラインは、カリフラワーモザイクウイルス (*CaMV*) 由来の 35S プロモーターとノパリン合成酵素をコードする遺伝子 (*NOS*) のターミネーターの制御下でシロイヌナズナ全長 complementary DNA (cDNA) を無作為に発現させた形質転換体である (Ichikawa et al., 2006)。そこで、当研究室の先行研究において、35S プロモーターと *NOS* ターミネーターに特異的なプライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) が行われ、*BPG4-FOX* に挿入された cDNA が決定された (阿部, 2014)。その結果、これまでに *AT3G55240* の cDNA が *BPG4-FOX* に挿入されていることが明らかとなっている。Real-time-quantitative PCR (RT-qPCR) によって、*BPG4-FOX* における *AT3G55240* の mRNA 発現を解析したところ、*BPG4-FOX* において *AT3G55240* の発現が WT と比較して 20 倍以上に増加していることが認められた (図 1-1 C)。これらの結果より、*BPG4-FOX* の原因遺伝子が *AT3G55240* であると推測されており、*AT3G55240* が *BPG4* と命名されている。

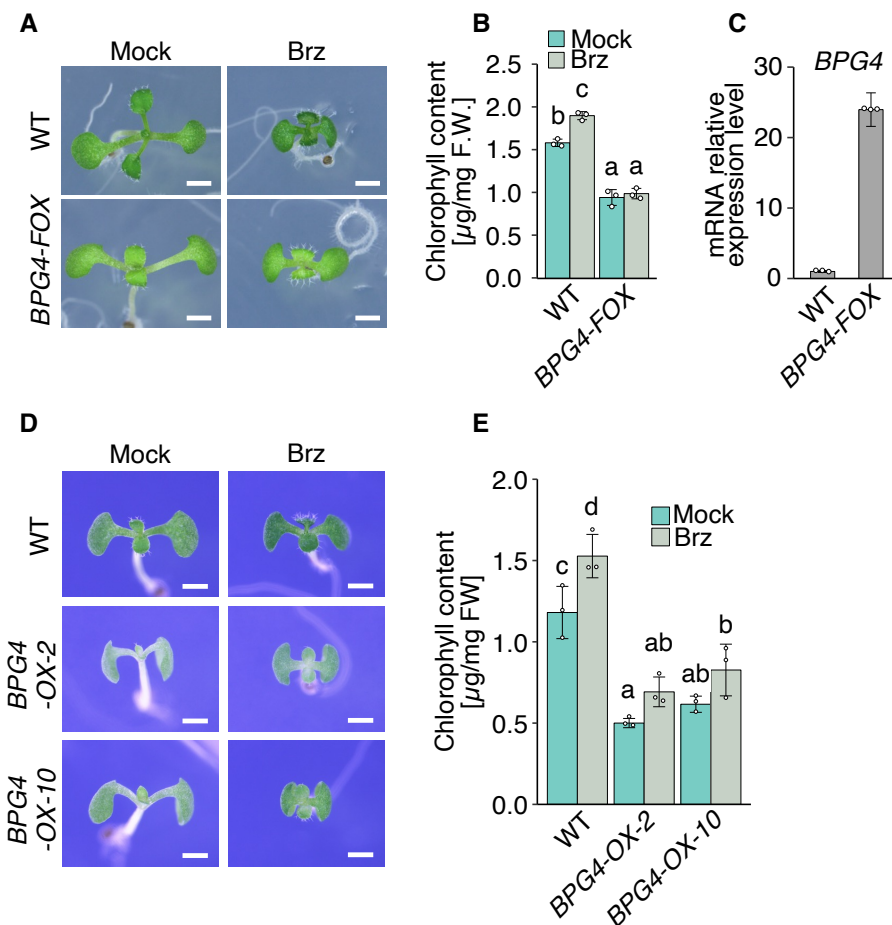
BR シグナルによる葉緑体制御において重要な機能を持つと考察された *BPG4* は、当研究室の先行研究によって、その分子機能および発現制御機構の解明が進められてきた (阿部, 2014; 丸上, 2017)。これまでに、*BPG4* は核において GLK 転写因子と相互作用するこ

と、光および BR シグナルにより mRNA 発現が制御されること、並びに BPG4 の細胞内局在や器官別発現が明らかとされてきた (阿部, 2014; 丸上, 2017)。これらの先行研究により明らかとされている BPG4 の分子機能および発現制御機構に関しては、本章の結果の中で記述することとする。しかし、葉緑体発達制御における BPG4 の生理学的機能をはじめとして、BPG4 の分子機能・発現制御機構・生理学的意義には依然として多くの未解明領域が残されているのが現状であった。そこで、本章では BPG4 の分子機能、mRNA 発現制御機構、および生理学的意義の解明を目指した。本研究により、植物が葉緑体発達の恒常性を維持し、活性酸素分子種 (ROS) の発生を回避しながら効率的に光合成を行う分子機構に関して新たな知見が得られた。

## 結果

### ***BPG4-FOX* の原因遺伝子候補 *BPG4* の高発現植物体は、*BPG4-FOX* の表現型を再現した**

前述のように、当研究室の先行研究によって *BPG4-FOX* の原因遺伝子候補は、*AT3G55240* であると推測されていた (阿部, 2014)。そこで、*AT3G55240* の高発現が *BPG4-FOX* の淡緑色形態の原因であることを確認するために、35S プロモーター下で *AT3G55240* の完全長 Coding sequence (CDS) を高発現した植物体 (*BPG4-OX-2*, *BPG4-OX-10*) を作出し、表現型を観察した。*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* は、Brz 添加条件および非添加条件の双方で *BPG4-FOX* と同様の淡緑色形態を示した (図 1-1 D-E)。*AT3G55240* の高発現植物体によって *BPG4-FOX* の表現型が再現されたことから、*BPG4-FOX* の原因遺伝子が *AT3G55240* であると確認された。



**図 1-1. Brz 処理条件における *BPG4-FOX* および *BPG4* 高発現植物体の表現型観察**

**(A–B)** WT および *BPG4-FOX* の表現型 **(A)**、および新鮮重当たりの総クロロフィル内生量 **(B)**。1  $\mu\text{M}$  Brz または Brz と同等の量の Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Mock) を含む 1/2MS 培地において、弱光条件 (20  $\mu\text{E}$ ) で 9 日間 **(A)**、もしくは 14 日間 **(B)** 生育した。Scale bars = 1 mm。 **(B)** において、平均および標準誤差 (Standard deviation, SD) は、100mg の植物を一つの試料として生物学的 3 反復より算出した。

**(C)** WT および *BPG4-FOX* における *BPG4* mRNA 発現の RT-qPCR 解析の結果。内部標準には *ACTIN 2* (*ACT2*) を用いた。平均および SD は、実験的 3–4 反復より得た。

**(D–E)** WT、*BPG4-OX-2*、および *BPG4-OX-10* の表現型 **(D)**、および新鮮重当たりの総クロロフィル内生量 **(E)**。1  $\mu\text{M}$  Brz または Brz と同等の量の DMSO (Mock) を含む 1/2MS 培地において、弱光条件 (20  $\mu\text{E}$ ) で 8 日間生育した。Scale bars = 1 mm。 **(E)** において、平均および SD は、14–16 個体の植物を一つの試料として生物学的 3 反復より算出した。

**(B)** および **(E)** において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

**(B) (C)** の実験は、阿部晋氏によって行われた。

## BPG4 はストレプト藻類および陸上植物に進化的に広く保存されている

BPG4 は、先行研究により PSEUDO-ETIOLATION IN LIGHT (PEL) および REPRESSOR OF PHOTOSYNTHETIC GENES 2 (RPGE2) として報告されていた (Ichikawa et al., 2006; Kim et al., 2016) が、その詳細な分子機能は明らかになっていなかった。The Arabidopsis Information Resource [TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)] から取得した BPG4 のアミノ酸配列に基づいて、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索を行った。その結果、シロイヌナズナにおいて3つのパラログ (AT3G28990、AT5G02580、AT1G10657) が存在することが明らかとなり、これらの因子を BPG4 HOMOLOGOUS GENE 1、BPG4 HOMOLOGOUS GENE 2、および BPG4 HOMOLOGOUS GENE 3 (BGH1、BGH2、および BGH3) と命名した。BGH2 は RPGE1 として PIFs の下流で機能することが報告されていた (Soy et al., 2016; Zhang et al., 2020b; Yan et al., 2021) が、BGH2/RPGE1 の詳細な分子機能は明らかになっていなかった。BPG4 オルソログは、動物、非光合成細菌、藍藻、紅藻、灰色藻、ブラシノデルマ藻類、緑藻においては存在を確認できなかった。ストレプト藻類においては、メソスティグマ藻綱である *Mesostigma viride* では、BPG4 オルソログの存在を認められなかった。一方、クロロキブス藻綱である *Chlorokybus atmophyticus*、クレブソルミディウム藻綱である *Klebsormidium nitens*、車軸藻綱である *Chara braunii*、接合藻綱である *Spirogloea muscicola*、*Zygnema cf. cylindricum* においては BPG4 オルソログの存在が認められた。さらに、陸上植物において BPG4 オルソログの探索を行ったところ、コケ植物 (*Marchantia polymorpha*)、小葉植物・シダ植物 (*Diplazium complanatum*、*Ceratopteris richardii*、*Selaginella moellendorffii*)、裸子植物 (*Thuja plicata*)、被子植物アンボレラ目 (*Amborella trichopoda*)、真正双子葉植物 (*Nicotiana tabacum*、*Solanum lycopersicum*、*Glycine max*、*Populus trichocarpa*) および単子葉植物 (*Oryza sativa*、*Brachypodium distachyon*、*Zea mays*) において BPG4 オルソログの存在が認められた。なお、コケ植物においては、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) においては BPG4 オルソログを確認できなかった。以下 (25–27 頁) に記した分子系統樹とアミノ酸配列比較の結果および BPG4 ファミリーの光環境に応じた発現解析の結果 (第二章) に基づき、同定された BPG4 オルソログに命名した (補足表 1-1, 73–74 頁)。

得られた BPG4 オルソログのアミノ酸配列を用いて BPG4 ファミリーの分子系統樹を作成した (図 1-2)。BPG4 ファミリーは藻類から裸子植物においてはサブグループを持たない一方、双子葉植物においては三つのサブグループ (BPG4、BGH2、BGH3)、単子葉植物においては二つのサブグループ (BPG4、BGH2) を持つことが予測された。シロイヌナズナ BPG4 (AtBPG4) とシロイヌナズナ BPG4 パラログ (AtBGH1/AtBGH2/AtBGH3) におけるアミノ酸配列比較を行った結果、AtBPG4 と AtBGHs のアミノ酸配列は全長にわたって保存されていることが明らかとなった (図 1-3 A)。特に、機能未知ドメイン A<sub>thal</sub>\_3526 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF09713/>) が AtBPG4 と AtBGHs 間で高度に保存されていた。さらに、AtBPG4 と各植物種における BPG4 オルソログのアミノ酸配列比較を行った結果、A<sub>thal</sub>\_3526 ドメインは他の植物種においても進化的に広く保存されていること

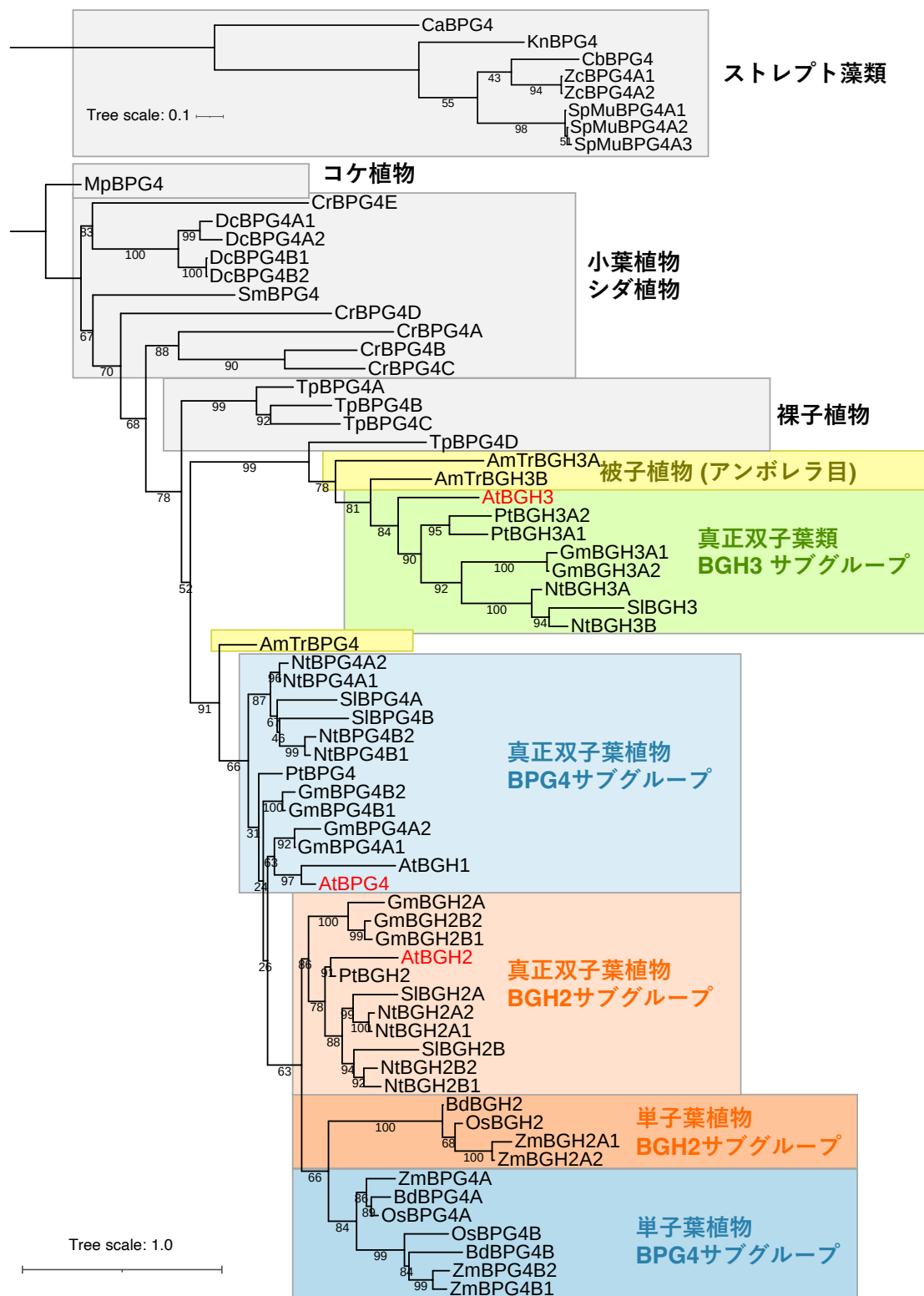
が明らかとなった (図 1-3 B)。また、いずれの植物種においても A<sub>thal</sub>\_3526 ドメイン以外に機能ドメインは認められなかった。これらの結果より、BPG4 はストレプト藻類以降の光合成生物に進化的に広く保存されていることが示唆された。

(図は次頁に掲載)

---

#### 図 1-2. BPG4 ファミリーの分子系統樹

一部のストレプト藻類および陸上植物における BPG4 オルソログの分子系統樹。ストレプト藻類と陸上植物においては、アミノ酸の置換モデルが異なると予測されたため、分離して分子系統樹を作成した。略称は *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Gm*, *Glycine max*; *Pt*, *Populus trichocarpa*; *Sl*, *Solanum lycopersicum*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Os*, *Oryza sativa*; *Bd*, *Brachypodium distachyon*; *Zm*, *Zea mays*; *AmTr*, *Amborella trichopoda*; *Tp*, *Thuja plicata*; *Cr*, *Ceratopteris richardii*; *Dc*, *Diphasiastrum complanatum*; *Sm*, *Selaginella moellendorffii*; *Mp*, *Marchantia polymorpha*; *SpMu*, *Spirogloea muscicola*; *Zc*, *Zygnema cf. cylindricum*; *Cb*, *Chara braunii*; *Kn*, *Klebsormidium nitens*; *Ca*, *Chlorokybus atmophyticus* をそれぞれ示す。各枝の値は Bootstrap value を示す。分子系統樹の作成に使用したアミノ酸配列の Accession number については補足表 1-1 に示した (73–74 頁)。



(図の説明は前頁に記載)

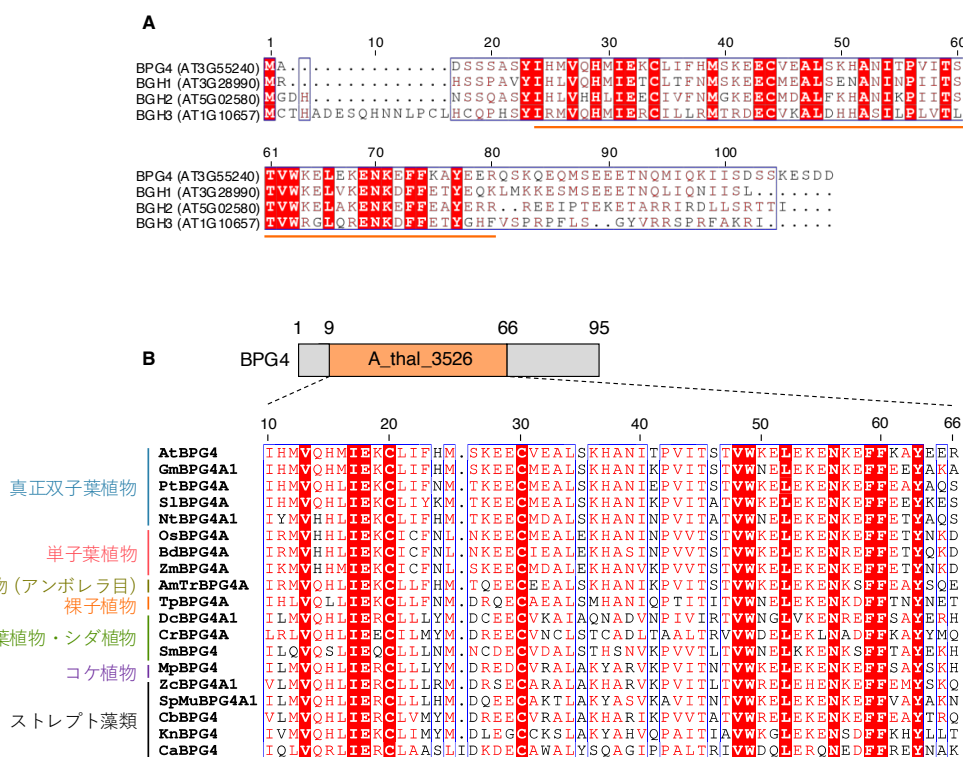


図 1-3. BPG4 ファミリーのアミノ酸配列比較

(A) シロイヌナズナにおける BPG4 パラログ BGH1/2/3 と BPG4 のアミノ酸配列比較。オレンジ色の線は、A\_thal\_3526 ドメインを示す。

(B) シロイヌナズナにおける BPG4 のアミノ酸配列における A\_thal\_3526 ドメインの位置、および各生物種の BPG4 オルソログにおける A\_thal\_3526 ドメインのアミノ酸配列比較。略称は図 1-2 と同様に示す。使用したアミノ酸配列の Accession number については補足表 1-1 に示す。

赤塗りと赤字のアミノ酸残基は、比較された植物種間で完全に保存されたアミノ酸残基と高度に保存された性質の類似したアミノ酸残基をそれぞれ示す。青枠は、赤塗りと赤字のアミノ酸残基から構成される高度に保存された配列を示す。

## BPG4 は植物体の内生クロロフィル含量を減少させ、葉緑体グラナの発達を抑制する

BPG4 の生理学的機能を解明するために、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) の Transfer-DNA (T-DNA) 挿入変異体種子ライブラリーから *BPG4* 欠損変異体 *bpg4-1* (CS927130) および *bpg4-2* (CS391583) の種子を入手し、ホモ変異系統を単離した (図 1-4 A)。また、*BPG4* 高発現植物体として前述した *BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* を用いることとした。*BPG4* 高発現植物 (*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10*) および *BPG4* 欠損植物 (*bpg4-1* および *bpg4-2*) における *BPG4* の mRNA 発現量および BPG4 タンパク質蓄積量を解析するために、RT-qPCR および anti-BPG4 抗体を用いた免疫ブロット解析 (Western blotting) を行った (図 1-4 B-C)。*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* では、WT と比較して *BPG4* mRNA 発現量および BPG4 タンパク質蓄積量が顕著に増加しており、逆に *bpg4-1* および *bpg4-2* では減少していた (図 1-4 B-C)。WT、*BPG4-OX-2*、*BPG4-OX-10* においては、BPG4 のアミノ酸配列から予測される分子量と一致するシグナルに加えて、高分子量側にシフトしたシグナルが確認された。最新のシロイヌナズナゲノム情報 (Araport11) において、*BPG4* はスプライシングバリエントを有しないと予測されており、*BPG4* 欠損植物体においては二つのシグナルの両方が消失することから、高分子量側にシフトしたシグナルは BPG4 タンパク質由来のシグナルである可能性が示唆された。

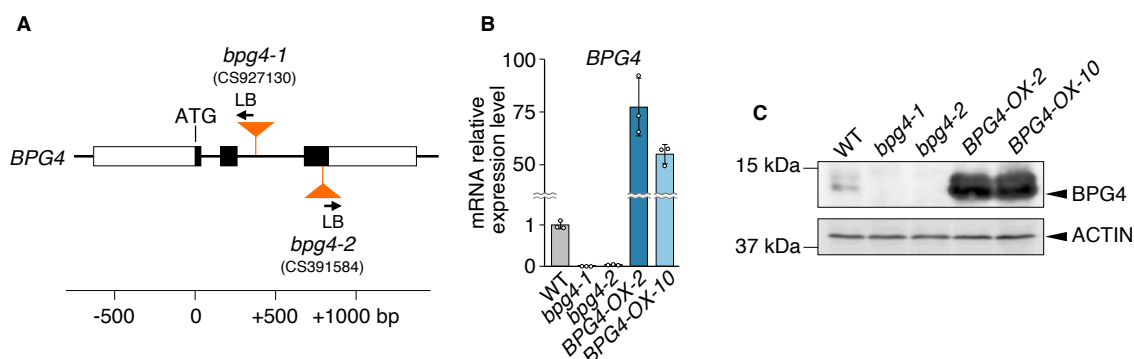


図 1-4. *BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体の作出

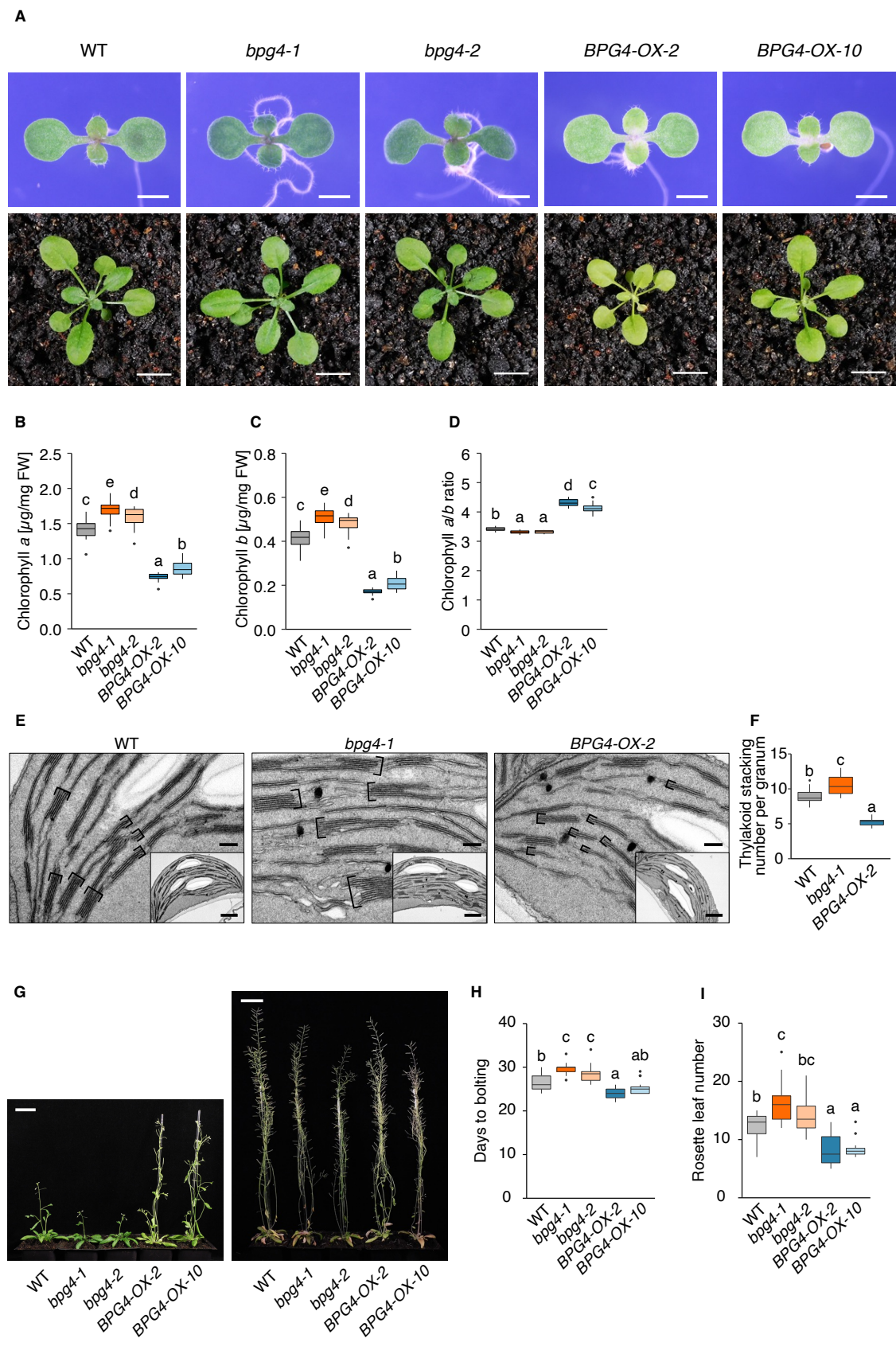
(A) *BPG4* 遺伝子の模式図、および *bpg4-1* 変異体と *bpg4-2* 変異体における T-DNA 挿入位置。黒い四角形がエキソン、白い四角形が非翻訳領域 (Untranslated region, UTR)、他の領域がイントロンを示す。オレンジ色の三角形がそれぞれの変異体の T-DNA 挿入位置を示す。

(B-C) WT、*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、および *BPG4-OX-10* における *BPG4* mRNA 発現の RT-qPCR 解析の結果 (B)、および anti-BPG4 抗体を用いた Western blotting による BPG4 タンパク質の検出結果 (C)。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間 (B) または 7 日間 (C) 生育した。(B) において、内部標準には *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH*) を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より算出した。(C) において、Loading control には ACTIN を用いた。

次に、幼植物および栄養成長期における *BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体の表現型を観察した。明所で 8 日間生育した幼植物において、*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* の子葉は、WT と比較して淡緑色形態を示したが、*bpg4-1* および *bpg4-2* の子葉は濃緑色形態を示した (図 1-5 A)。明所で 23 日間生育した植物体においても、*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* は、WT と比較して淡緑色のロゼット葉を有していたのに対し、*bpg4-1* および *bpg4-2* は濃緑色のロゼット葉は有していた (図 1-5 A)。幼植物における新鮮重あたりの内生クロロフィル含量を定量した結果、*bpg4-1* および *bpg4-2* においてクロロフィル *a* とクロロフィル *b* の内生量が WT と比較して約 10–20%増加していたのに対し、*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* においては約 40%低下していた (図 1-5 B–C)。これらの結果より、*BPG4* は内生クロロフィル含量を低下させる機能を持つことと考察された。

さらに、葉緑体発達制御における *BPG4* の機能を明らかにするために各植物のクロロフィル *a/b* 比を計算した。クロロフィル *a* が LHC と PSI/II の両方に存在するのに対して、クロロフィル *b* は LHC にしか存在しないことから、クロロフィル *a/b* 比は LHC のサイズの指標とされている (Leong and Anderson, 1984; Jia et al., 2016)。クロロフィル *a/b* 比は、*bpg4-1* および *bpg4-2* において WT より低下し、*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* において増加していた (図 1-5 D)。この結果より、*bpg4-1* および *bpg4-2* においては WT より LHC アンテナサイズが増大している一方、*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* においては低下している可能性が示唆された。そこで、WT、*bpg4-1*、*BPG4-OX-2* における葉緑体の内部構造を透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy, TEM) により観察した (図 1-5 E–F)。その結果、*bpg4-1* において、葉緑体チラコイド膜のグラナ当たりのスタッキング層数が WT と比較して増加していることが明らかとなった (図 1-5 E–F)。また、*BPG4-OX-2* においては、グラナ当たりのスタッキング層数の低下に加えてチラコイド膜の断片化が観察された (図 1-5 E–F)。これらの結果より、*BPG4* は内生クロロフィル含量を低下させるだけでなく、グラナ構造や LHC アンテナサイズなど葉緑体の発達を抑制する機能を果たすことが考察された。

最後に、生殖成長期における *BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体の表現型を観察した (図 1-5 G–I)。長日条件 (明期 16 時間/暗期 8 時間) において、抽苔までにかかった日数は、*bpg4-1* と *bpg4-2* は WT よりも増加したのに対し、*BPG4-OX-2* と *BPG4-OX-10* では減少した (図 1-5 G–H)。*bpg4-1* と *bpg4-2* は花成時点のロゼット葉の枚数が WT より増加した花成遅延形態を示したのに対し、*BPG4-OX-2* と *BPG4-OX-10* は花成時点のロゼット葉の枚数が減少した花成促進形態を示した (図 1-5 I)。最終的な花茎長については、WT、*BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体間で明確な差を認められなかった (図 1-5 G)。これらの結果より、*BPG4* は葉緑体の発達だけでなく、花成を制御する機能も持つ可能性が考察された。



### 図 1-5. *BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体の表現型観察

(A) WT、*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、および *BPG4-OX-10* の表現型。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間 (上段)、もしくは 1/2MS 培地において 7 日間生育した後、土に植え替えて 16 日間 (下段) 生育した。Scale bars = 1 mm (上段)、もしくは 1 cm (下段)。

(B–D) WT、*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、および *BPG4-OX-10* における新鮮重当たりのクロロフィル *a* (B)、クロロフィル *b* (C) の内生量、およびクロロフィル *a/b* 比 (D)。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した。n = 20。

(E) WT、*bpg4-1*、および *BPG4-OX-2* における TEM による葉緑体観察画像。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した後、土に植え替えて 11 日間 (合計 19 日間) 生育した。Scale bars = 0.2  $\mu$ m および 1  $\mu$ m (挿入図)。

(F) (E) に示した植物体の葉肉細胞におけるグラナスタッキング数の定量的解析結果。チラコイド膜は、1つの内腔を囲む1対の膜として1層として定義した。各葉緑体におけるチラコイド膜のスタッキング層数は、葉緑体中の第1、第2、第3に大きなグラナにおけるスタッキング層数をそれぞれ数え、それらの平均値を各葉緑体におけるグラナのスタッキング層数として解析に用いた。n = 15。

(G) WT、*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、および *BPG4-OX-10* の成熟個体の表現型。左図の植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した後、土に植え替えて 24 日間生育した。右図の植物体は、1/2MS 培地において 7 日間生育した後、土に植え替えて 46 日間生育した。Scale bars = 5 cm。

(H–I) WT、*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、および *BPG4-OX-10* における抽だいまでにかかった日数 (H)、および抽だい時点におけるロゼット葉の枚数 (I)。植物体は、1/2MS 培地において 7 日間生育した後、土に植え替えて 17–27 日間 (合計 24–34 日間) 100  $\mu$ E で生育した。n  $\geq$  13。

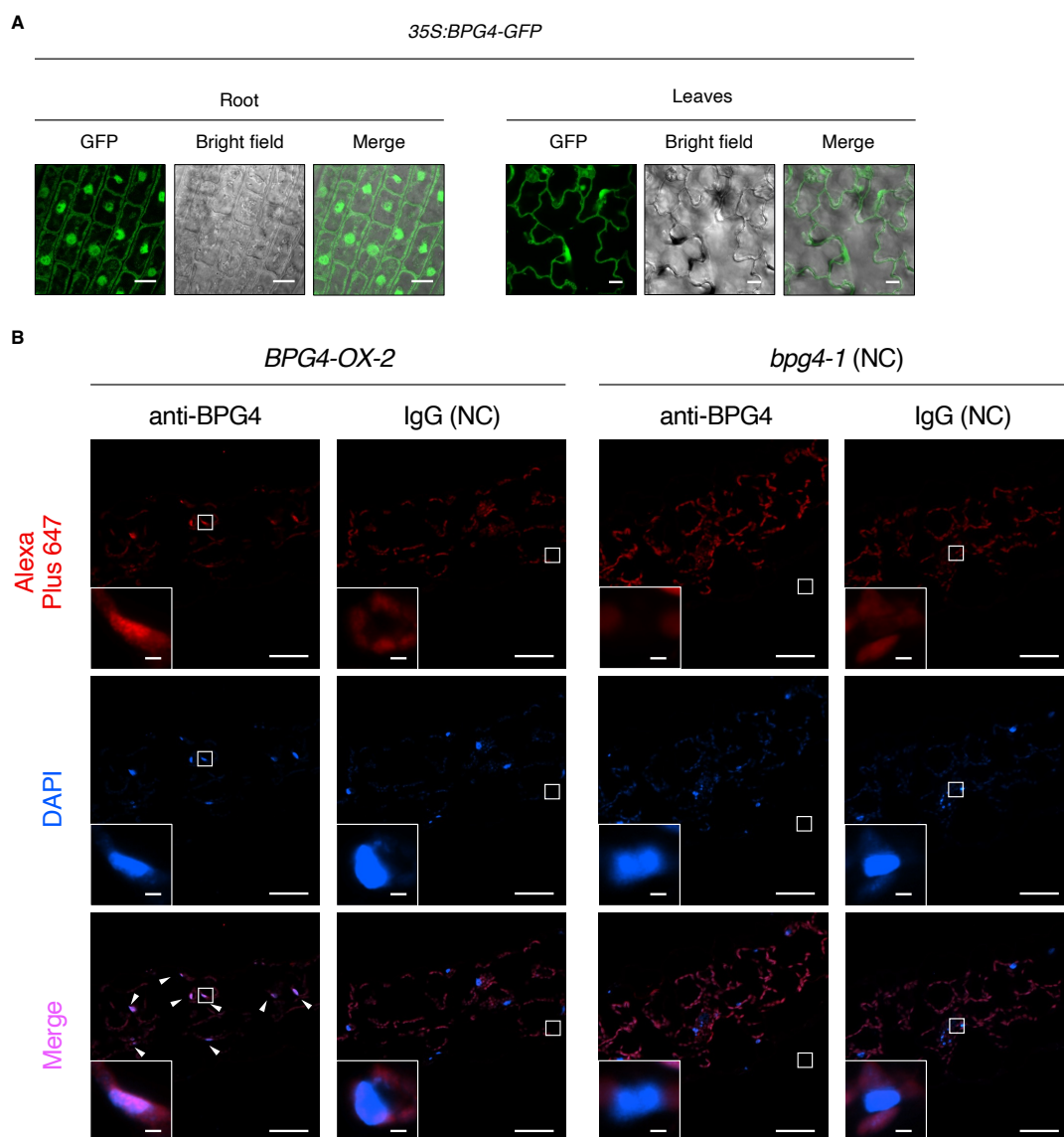
(B–D) (F) (H–I) において、箱を 2 等分する水平線、箱の下辺、箱の上辺は、それぞれ中央値、下位四分位数、上位四分位数を示す。ひげの長さは下四分位数と上四分位数から四分位範囲 [Interquartile range (IQR)] の 1.5 倍以内にあるデータ点を表す。この範囲外のデータポイントを外れ値とみなし、ひげの外に個別にプロットした。

(B–D) (F) (H–I) において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

## BPG4 は核に局在し、光合成関連核遺伝子 (PhANGs) の発現を抑制する

当研究室の先行研究により、BPG4 が葉緑体発達および内生クロロフィル含量を抑制する分子機構を明らかにするために、BPG4 タンパク質の細胞内局在の解析が行われていた (阿部, 2014)。35S プロモーターの下流で BPG4 の C 末端に GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) を融合したタンパク質を発現した形質転換体を作成し、根の根幹細胞および葉の表皮細胞を観察した結果、BPG4-GFP の蛍光シグナルは主に細胞質と核において観察された (阿部, 2014) (図 1-6 A)。さらに、*BPG4-OX-2* と anti-BPG4 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った (図 1-6 B)。anti-BPG4 抗体による蛍光シグナルは、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による蛍光が示す核シグナルと重なって検出された。これらの結果から、BPG4 タンパク質は核と細胞質に局在していると考察された。

葉緑体の発達には、クロロフィル生合成関連酵素、LHC サブユニット、PSI/II の構成要素、ルビスコなどの多くの光合成関連タンパク質が必要である。これらのタンパク質は葉緑体に局在している一方、クロロフィル生合成関連酵素や LHC などの重要な葉緑体タンパク質の多くは、光合成関連核遺伝子 (PhANGs) として核ゲノムにコードされている。BPG4 が核に局在すると考察されたことから、BPG4 は核における PhANGs 発現制御に寄与しているのではないかと考えた。WT、*BPG4* 欠損植物、および *BPG4* 高発現植物において 14 の光合成関連遺伝子 (13 の PhANGs と 1 つの PhAPG) の RT-qPCR 解析を行った (図 1-7 A-B)。その結果、クロロフィル生合成関連酵素をコードする 5 つの遺伝子 [glutamyl-tRNA reductase (*HEMA1*)、magnesium chelatase cofactor (*GUN4*)、magnesium chelatase H subunit (*CHLH*)、protochlorophyllide oxidoreductase (*PORB*)、chlorophyllide *a* oxygenase (*CAO*)] と LHC サブユニットをコードする 3 つの遺伝子 [light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein 1.2 (*LHCB1.2*)、light-harvesting complex photosystem II subunit 6 (*LHCB6*)、Photosystem I light-harvesting complex 1 (*LHCA1*)] の mRNA 発現が、*bpg4-1* と *bpg4-2* においては WT に比べて増加したが、*BPG4-OX-2* と *BPG4-OX-10* においては減少していることが明らかとなった (図 1-7 A-B)。一方、クロロフィル生合成関連酵素をコードする 3 つの遺伝子 [protoporphyrinogen oxidase (*HEMGI*)、3,8-divinyl protochlorophyllide *a* 8-vinyl reductase (*DVR/BPG1*)、chlorophyll synthase (*CHLG*)] については増減を認められなかったほか、クロロフィル分解酵素 pheophorbide *a* oxygenase をコードする *PAO* や *rbcS*、*psbA* についても明確な発現変動は認められなかった。これらの結果より、BPG4 が核において PhANGs の発現を包括的に抑制していることが示唆された。



**図 1-6. BPG4 タンパク質の細胞内局在観察**

**(A)** *35Spro::BPG4-GFP* における葉および根の共焦点顕微鏡観察像。Scale bars = 10  $\mu$ m。植物体は、1/2MS 培地において 3 日間生育した。

**(B)** *BPG4-OX-2* における anti-BPG4 抗体を用いた免疫蛍光染色の観察像。植物体は、1/2MS 培地において 9 日間生育した個体の子葉を用いた。切片を anti-BPG4 抗体または正常ウサギ IgG で染色した後、Alexa Fluor Plus 647 (赤) を結合させたロバ抗ウサギ IgG 二次抗体で染色することにより、BPG4 タンパク質を染色した。葉緑体由来の非特異的シグナルを示すために、植物体のネガティブコントロール (NC) として *bpg4-1* を、抗体の NC として IgG を用いた。核は DAPI (青) で染色した。挿入図は代表的な核の拡大図であり、各図において拡大した核を白い四角で囲んで示した。白矢印は、DAPI シグナルと重なる anti-BPG4 抗体による蛍光シグナルを示す。Scale bars = 50  $\mu$ m および 2.5  $\mu$ m (挿入図)。

**(A)**の実験は、阿部晋氏によって行われた。

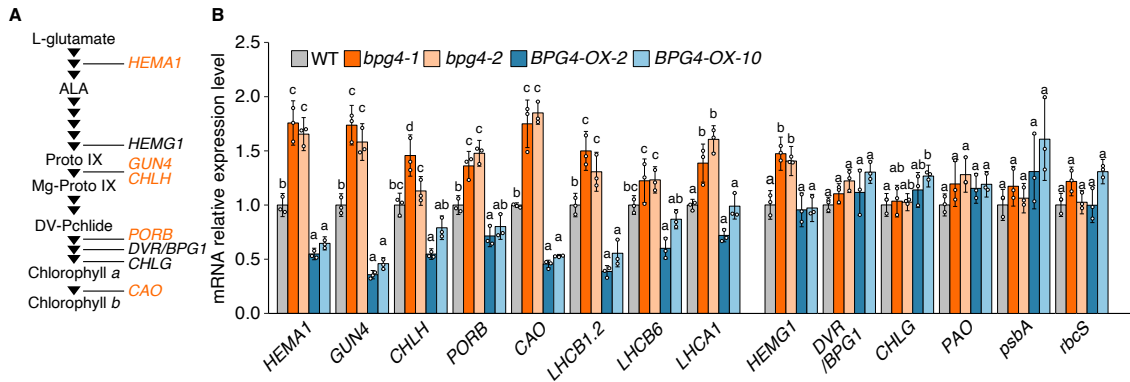


図 1-7. *BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体における光合成関連遺伝子の発現解析

(A) シロイヌナズナにおけるクロロフィル生合成経路の概要図。図中に示した各遺伝子によって、以下の酵素がコードされる。glutamyl-tRNA reductase (*HEMA1*); protoporphyrinogen oxidase (*HEMG1*); magnesium chelatase cofactor (*GUN4*); magnesium chelatase H subunit (*CHLH*); protochlorophyllide oxidoreductase (*PORB*); 3,8-divinyl protochlorophyllide *a* 8-vinyl reductase (*DVR/BPG1*); chlorophyll synthase (*CHLG*); and chlorophyllide *a* oxygenase (*CAO*)。

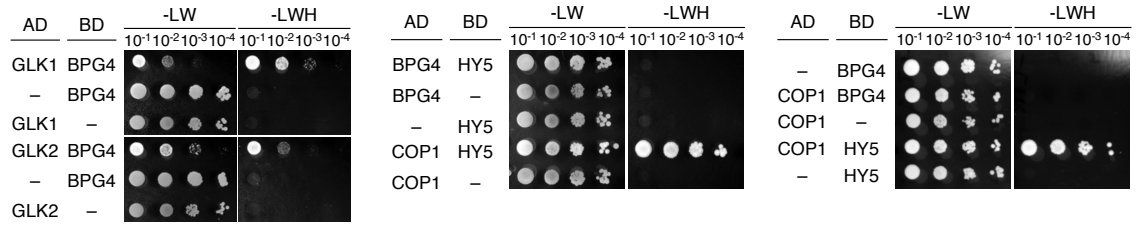
(B) WT、*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、および *BPG4-OX-10* における光合成関連遺伝子の mRNA 発現の RT-qPCR 解析の結果。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した。グラフ中に示した各遺伝子によって、以下のタンパク質がコードされる。Light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein 1.2 (*LHCB1.2*); light-harvesting complex photosystem II subunit 6 (*LHCB6*); Photosystem I light-harvesting complex 1 (*LHCA1*); Pheide *a* oxygenase (*PAO*); PSII D1 protein (*psbA*); and Rubisco small subunit (*rbcs*)。内部標準には *GAPDH* を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より算出した。グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

## BPG4 は葉緑体発達のマスター転写因子 GLKs と核内で相互作用する

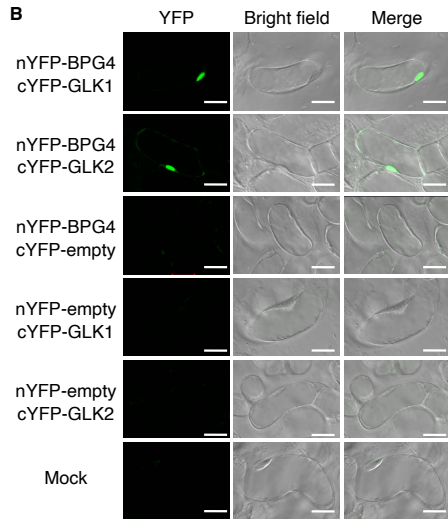
当研究室の先行研究により、核内で機能する 3 つの主要な光合成関連因子ファミリー (HY5、COP1、GLKs) と BPG4 の相互作用が Yeast two-hybrid (Y2H) 法により解析されていた (阿部, 2014) (図 1-8 A)。その結果、BPG4 と GLK1 および GLK2 との相互作用が検出されたが、HY5 および COP1 に関しては BPG4 との相互作用は検出されなかった (図 1-8 A)。GLKs は、クロロフィル合成関連酵素や LHC のサブユニットをコードする遺伝子など PhANGs の発現を統括的に促進する機能を持ち、光合成装置の形成に主要な役割を果たすことが知られている (Fitter et al., 2002; Waters et al., 2009)。そこで、植物細胞内における BPG4 と GLK の相互作用を解析するために、シロイヌナズナ培養細胞を用いて、BPG4 を YELLOW FLUORESCENT PROTEIN (YFP) の N 末端に融合したもの (nYFP-BPG4) と、GLK1/2 を YFP の C 末端に融合したもの (cYFP-GLK1/2) を用いた Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析が、当研究室の先行研究により行われていた (阿部, 2014) (図 1-8 B)。nYFP-BPG4 と cYFP-GLK1/2 の両方を共発現している細胞では核内の YFP 蛍光シグナルが観察されたが、BPG4 または GLK1/2 のみを発現している細胞ではシグナルは観察されなかった (図 1-8 B)。さらに、当研究室の先行研究により、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) において GFP 融合 BPG4 タンパク質 (BPG4-GFP) と Myc 融合 GLK1/2 タンパク質 (Myc-GLK1/2) を一過的に発現させ、共免疫沈降 (CoIP) 解析が行われた結果、BPG4-GFP と Myc-GLK1/2 の相互作用が確認されていた (丸上, 2017) (図 1-8 C)。そこで、シロイヌナズナにおける内在性 BPG4 タンパク質と GLK 転写因子の相互作用を確認するために、35S:GLK1-GFP/glklglk2 と 35S:GLK2-GFP 植物体と anti-BPG4 抗体を用いた CoIP 解析を行った。その結果、シロイヌナズナ幼植物において内在性 BPG4 タンパク質が GLK1/2-GFP と相互作用することが明らかとなった (図 1-8 D)。これらの結果より、BPG4 は GLK1/2 と核で相互作用していると考察された。

GLK は、4 つの機能ドメイン [天然変性領域と核移行シグナルから構成される N 末端ドメイン (N-terminal)、Myb-DNA 結合ドメイン (DBD)、プロリンリッチドメイン (PRD)、GLK C terminal-box (GCT-box) ドメイン] を持つことが知られている (Rossini et al., 2001; Fitter et al., 2002; Li et al., 2021; Zhang et al., 2021)。また、BPG4 は進化的に保存されたドメイン A<sub>thal</sub>\_3526 を有する (図 1-3 B)。GLK1 と BPG4 の相互作用に必要なドメインを特定するため、各ドメインに分割した断片を用いて Y2H 解析を行ったところ、BPG4 の A<sub>thal</sub>\_3526 が GLK1 の GCT-box と相互作用することが明らかになった (図 1-8 E-F)。これらの結果より、BPG4 は核において A<sub>thal</sub>\_3526 を介して GLKs の GCT-box と相互作用していると考察された。

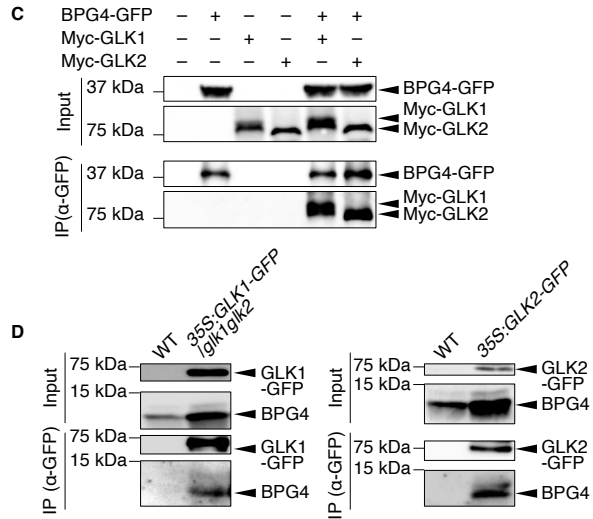
**A**



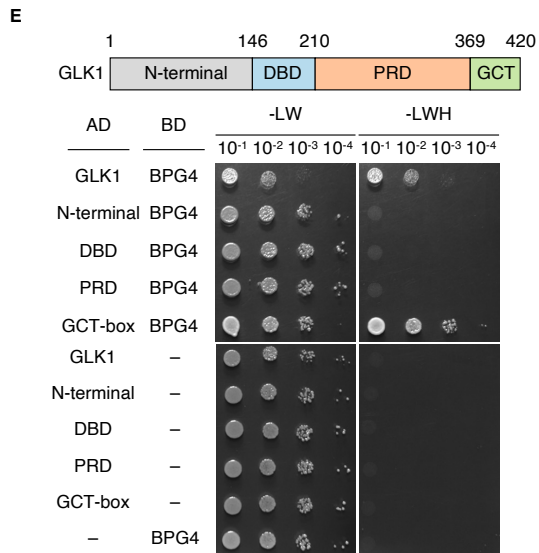
**B**



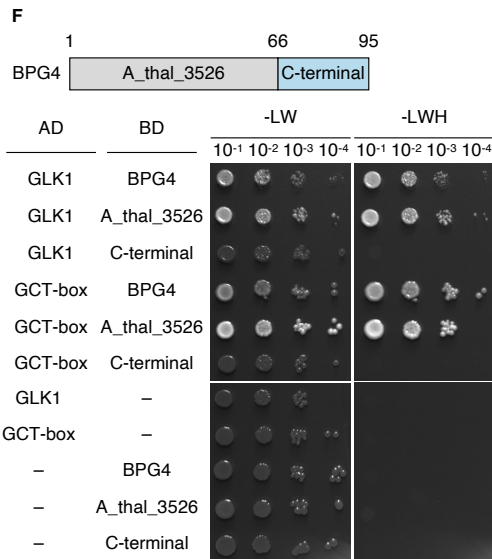
**C**



**E**



**F**



### 図 1-8. BPG4 と GLK 転写因子の相互作用解析

(A) BPG4 と GLK1、GLK2、HY5、COP1 の相互作用を解析した Y2H の結果。COP1 と HY5 の相互作用は実験のポジティブコントロールとして確認した。

(B) シロイヌナズナ培養細胞における YFP の N 末端断片融合 BPG4 (nYFP-BPG4) と YFP の C 末端断片融合 GLK1、GLK2 (cYFP-GLK1、cYFP-GLK2) の BiFC の結果。Scale bar = 10  $\mu$ m。

(C) BPG4 と GLK1、GLK2 の相互作用を解析した CoIP の結果。BPG4-GFP と 10x Myc-GLK1 または 10x Myc-GLK2 をベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*)で一過的に発現させた。BPG4-GFP は GFP-Trap A を用いて免疫沈降させ、anti-GFP 抗体と anti-Myc 抗体を用いてタンパク質を検出した。

(D) シロイヌナズナにおいて内在性 BPG4 と GLK1、GLK2 の相互作用を解析した CoIP の結果。WT と 35S:GLK1/*glk1glk2* または 35S:GLK2 を 1/2MS 培地で 14 日間生育させた。GLK1-GFP、GLK2-GFP を GFP-Trap A を用いて免疫沈降させ、anti-GFP 抗体および anti-BPG4 抗体を用いてタンパク質を検出した。

(E-F) BPG4 と相互作用する GLK1 のドメイン (E) と GLK1 と相互作用する BPG4 のドメイン (F) を解析した Y2H の結果。GLK1, 完全長 GLK1; N-terminal, 1-146 残基; DNA 結合ドメイン (DBD), 147-210 残基; プロリンリッチドメイン (PRD), 210-369 残基; GLK C-terminal ドメイン (GCT-box), 369-420 残基; BPG4, 完全長 BPG4; A<sub>th</sub>1\_3526, aa 1-66 残基; C-terminal, aa 67-95。

(A-B) の実験は、阿部晋氏によって行われた。(C) の実験は、丸上萌々氏によって行われた。

(E-F) の実験は、大橋隆生氏によって行われた。

## BPG4 は GLK1 の DNA 結合能の低下を介して、その転写活性化能を抑制する

BPG4 と GLK1 の遺伝学的相互作用を調べるために、*bpg4-1* と *glk1glk2* を交配して *bpg4glk1glk2* 三重変異体を作製した。WT と比較して、*bpg4-1* は新鮮重当たりの内生クロロフィル含量が増加した濃緑色形態を示したのに対し、*glk1glk2* および *bpg4glk1glk2* は内生クロロフィル含量が低下した淡緑色形態を示した (図 1-9 A-B)。 *bpg4glk1glk2* と *glk1glk2* における内生クロロフィル含量に有意な差は認められなかった (図 1-9 A-B)。さらに、*BPG4-OX-2* と *GLK1-OX* を交配して、BPG4 と GLK1 を共に高発現する二重形質転換体 (*BPG4-OX GLK1-OX*) を作製した。*BPG4-OX-2* は WT と比較して内生クロロフィル含量が低下した淡緑色形態を示したのに対し、*GLK1-OX* は内生クロロフィル含量が増加した濃緑色形態を示した (図 1-9 C-D)。*BPG4-OX GLK1-OX* においては、*BPG4-OX-2* の淡緑色形態が *GLK1* の高発現により部分的に回復した (図 1-9 C-D)。これらの結果から、*glk1glk2* は *bpg4-1* に対して遺伝学的に上位に作用しており、GLK1 はクロロフィル合成の制御において BPG4 の下流で働くことが示唆された。

さらに、*BPG4* 欠損時に *GLK1* を高発現することにより、内生クロロフィル含量がさらに増加した植物体を作成できると予測された。そこで、*bpg4-1* と *GLK1-OX* を交配して *bpg4-1 GLK1-OX* を作製し、内生クロロフィル含量と PhANGs 発現を解析したところ、予測と異なり、*bpg4-1 GLK1-OX* は *bpg4-1* と同程度のクロロフィル含量と PhANGs 発現を示すことが明らかとなった (図 1-9 E-G)。この結果の原因を調べるために、各植物体における *GLK1* 発現を RT-qPCR で解析した。*GLK1-OX* における *GLK1* 発現量は WT の 21.9 倍であったのに対し、*bpg4-1 GLK1-OX* においては約 2.4 倍にとどまっていることが明らかとなった (図 1-9 H)。この結果から、*bpg4-1* の T-DNA 中の 35S プロモーター制御下で発現した選択マーカー遺伝子が *GLK1-OX* の T-DNA 中の 35S プロモーター制御下で発現した *GLK1* 遺伝子に干渉した結果として *GLK1* 発現が低下した可能性が示唆され、更なる解析が必要と考えられた。

GLK1 に対する BPG4 の分子機能を解明するために、BPG4、GLK1 のリコンビナントタンパク質と GLK1 標的遺伝子 *CAO* のプロモーター配列を用いた Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) を行った (図 1-10 A-C)。GLK1-DNA 複合体のシグナルは、BPG4 存在下では BPG4 非存在下に比べて減少した (図 1-10 A)。また、BPG4 による GLK1-DNA 複合体シグナルは、BPG4 の添加量依存的に減少した (図 1-10 B)。さらに、GLK1 の転写活性化能に対する BPG4 の影響を解析するために、GLK1 標的遺伝子 *HEMA*、*GUN4*、*CAO* のプロモーター下流でホタルルシフェラーゼ (LUC) を発現させたベクターを用いたプロトプラスト一過性レポーターアッセイを行った (図 1-10 D-E)。各レポーターにおける LUC の相対シグナル強度は、35S:*GLK1* エフェクターを導入した場合、コントロールと比較して増加した一方、35S:*GLK1* エフェクターに加えて 35S:*BPG4* エフェクターを共に導入した場合は、35S:*GLK1* のみを導入した場合と比較して低下した (図 1-10 E)。これらの結果から、BPG4 は GLK1 転写因子と核内で直接相互作用し、DNA 結合能を阻害することにより転写活性化能を抑制していると考えられた。

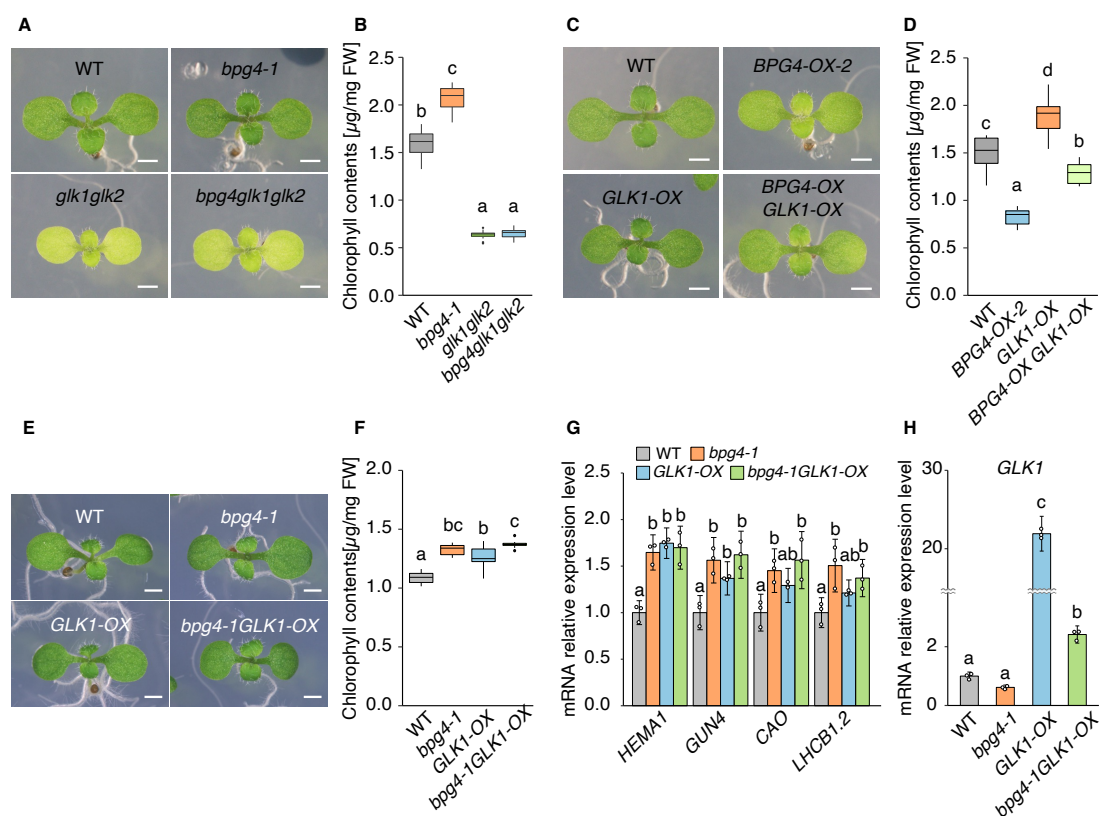


図 1-9. BPG4 と GLK 転写因子の遺伝学的相互作用の解析

(A–B) WT、*bpg4-1*、*glk1glk2*、および *bpg4glk1glk2* の表現型 (A)、および新鮮重当たりの総クロロフィル内生量 (B)。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した。Scale bars = 1 mm。n = 18。

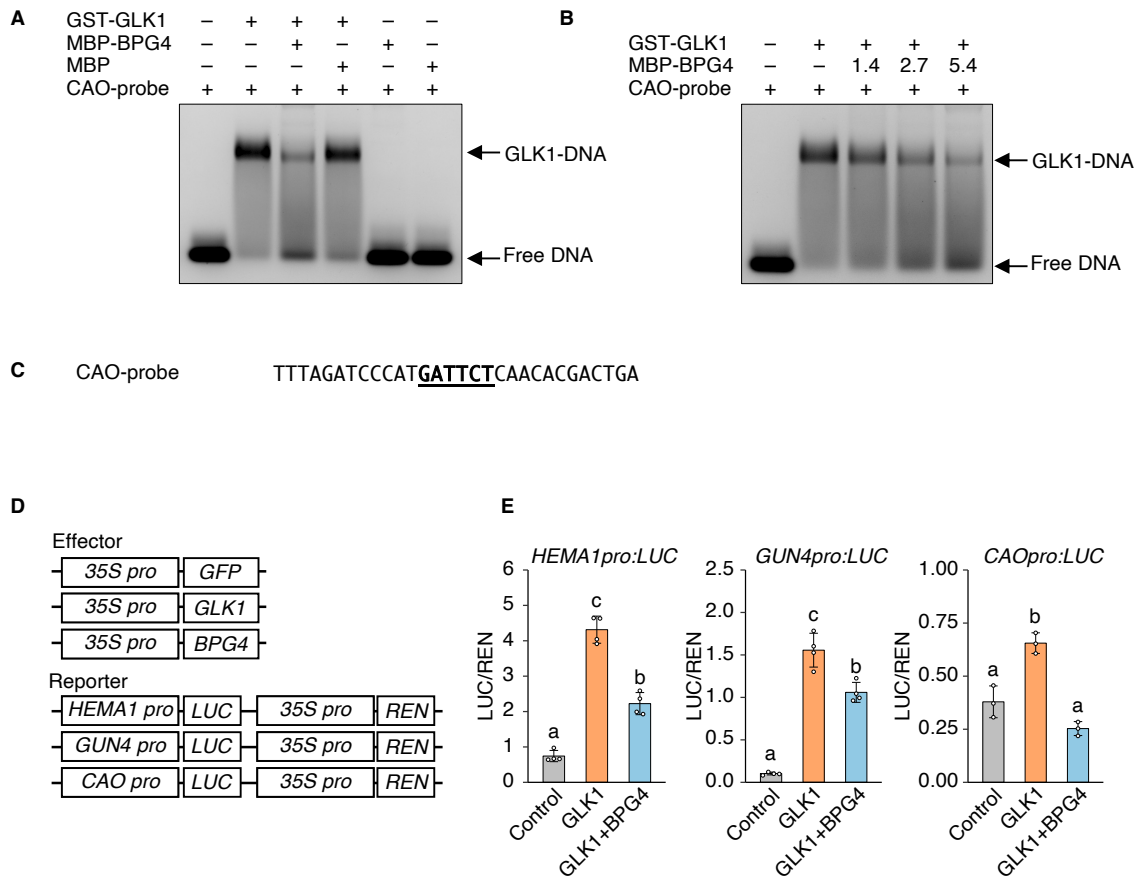
(C–D) WT、*BPG4-OX-2*、*GLK1-OX*、および *BPG4-OX GLK1-OX* の表現型 (C)、および新鮮重当たりの総クロロフィル内生量 (D)。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した。Scale bars = 1 mm。n = 18。

(E–F) WT、*bpg4-1*、*GLK1-OX*、および *bpg4-1 GLK1-OX* の表現型 (E)、および新鮮重当たりの総クロロフィル内生量 (F)。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した。Scale bars = 1 mm。30 mg の植物を一つの試料として生物学的 9 反復により統計処理を行った。

(G–H) WT、*bpg4-1*、*GLK1-OX*、および *bpg4-1 GLK1-OX* における光合成関連遺伝子 (E)、および *GLK1* (F) の mRNA 発現の RT-qPCR 解析結果。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した。内部標準には *GAPDH* を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より算出した。

(B)(D)(F) において、箱を 2 等分する水平線、箱の下辺、箱の上辺は、それぞれ中央値、下位四分位数、上位四分位数を示す。ひげの長さは下四分位数と上四分位数から IQR の 1.5 倍以内にあるデータ点を表す。この範囲外のデータポイントを外れ値とみなし、ひげの外に個別にプロットした。

(B)(D)(F)(G)(H) において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。



**図 1-10. BPG4 による GLK1 転写活性化能の制御機構の解析**

(A–C) BPG4 が GLK1 の DNA 結合能に与える影響を解析した EMSA 実験の結果。プローブとして、CAO プロモーター領域の GLK1 結合部位を含む FAM 標識二本鎖 DNA を用いた。タンパク質は、大腸菌で発現させた GST-GLK1、MBP (コントロール)、MBP-BPG4 を用いた。(B) の図中の数字 (1.4、2.7、5.4) は MBP-BPG4 と GST-GLK1 のモル比を示す。使用したプローブ配列を (C) に示す。

(D–E) BPG4 が GLK1 転写活性化能に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。野生型植物の葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた。(D) に使用したベクターの模式図を示す。レポーターとして、HEMA1、GUN4、CAO プロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ (LUC) を発現させたベクターを用いた。レポーターの導入効率の補正には、レポーターベクター上に組み込んだ 35S プロモーターの下流で発現させたウミシイタケルシフェラーゼ (REN) を用い、相対 LUC 活性 (LUC/REN) を、HEMA1、GUN4、CAO プロモーター活性として解析した。エフェクター [コントロール (GFP)、GLK1 (GLK1+GFP)、または GLK1 + BPG4] を各レポーターと共に導入した。平均および SD は、生物学的 4 反復 (HEMA1、GUN4) または生物学的 3 反復 (CAO) より算出した。(E) において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

## **BPG4 mRNA 発現は、BR シグナル伝達のマスター転写因子 BES1 を介して BR シグナルによって抑制される**

*BPG4-FOX* は、BR 生合成阻害剤 Brz 存在下でも子葉が淡緑色形態を示す植物体として単離されたことから、BPG4 は BR シグナル伝達による葉緑体発達制御において重要な役割を果たしていると考えられた。そこで、BPG4 と BR シグナルの関係を明らかにするため、Brz 処理が *BPG4* 発現に与える影響を解析した。Brz 処理により *BPG4* 発現は無処理 (Mock) と比較して約 1.8 倍に増加した (図 1-11 A)。逆に、活性型 BR であるブラシノライド (BL) を 3 時間処理した際は、Mock と比較して *BPG4* 発現は約 50%減少した (図 1-11 B)。これらの結果により、BR シグナルは *BPG4* mRNA 発現を抑制していると考察された。

次に、BR シグナル伝達によって *BPG4* 発現が抑制される分子機構を明らかにするために、BR 生合成変異体および BR シグナル伝達変異体における *BPG4* 発現を解析した。BR 生合成欠損変異体 *det2*、BR 受容体欠損変異体 *bri1-5*、および BR シグナル伝達に抑制的に機能するリン酸化キナーゼ BIN2 の機能獲得変異体 *bin2-1* における *BPG4* 発現を解析した結果、*BPG4* 発現はいずれの変異体においても WT よりも増加していることが明らかとなった (図 1-11 C)。一方、BR シグナル伝達マスター転写因子 BES1 の機能獲得型変異体 *bess1-D* における *BPG4* 発現は、WT 植物と比較して約 70%減少していた (図 1-11 D)。解析した 4 種の BR 関連変異体の中では、BES1 が BR シグナル伝達の最も下流で機能していることから、BR シグナルによる *BPG4* の発現抑制に BES1 が関与している可能性が考察された。

BES1 が *BPG4* 発現を直接制御している可能性を検証するために、*BPG4* プロモーター領域を解析したところ、開始コドン (ATG) の 288 bp 上流 (G-box 1) と 180 bp 上流 (G-box 2) に、典型的な BES1 結合モチーフ (Yu et al., 2011) である 2 つの G-box (CACGTG) 配列が検出された (図 1-12 A-B)。当研究室の先行研究において、*BES1pro:BES1-GFP* と anti-GFP 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析が行われ、2 つの G-box 部位を含む *BPG4* プロモーター領域に BES1-GFP が結合して可能性が示唆されていた (丸上, 未発表) (図 1-12 A, C)。そこで、*BPG4* プロモーターの下流で LUC を発現させるベクターを使ったプロトプラスト一過性レポーターアッセイを行った (図 1-12 D-E)。35S:*BES1* エフェクターをレポーターと共に導入した際は、LUC の相対シグナル強度がコントロールと比較して有意に減少した。一方、植物細胞において強力な転写活性化ドメインとして機能することが知られる VP16 配列の 4 回繰り返し配列 (VP64) (Beerli et al., 1998) と BES1 の融合タンパク質 (BES1-VP64) をエフェクターとして用いた際には、LUC の相対シグナル強度はコントロールと比較して有意に増加した。これらの結果より、BES1 は *BPG4* プロモーター領域に直接結合することにより *BPG4* 発現を抑制していると考察された。

さらに、BES1 による *BPG4* 発現制御機構をさらに詳細に明らかにするために、BES1 DNA 結合ドメイン (DBD) のリコンビナントタンパク質と、G-box 周辺の 24 bp 配列を含む G-box 1 または G-box 2 の DNA プローブを用いて EMSA を行った (図 1-12 B, F-G)。BES1 DBD と DNA プローブの複合体は G-box 1 と G-box 2 の両方において観察されたが、G-box 2 プロ

ープのシグナルは G-box 1 のシグナルよりも著しく強かった (図 1-12 F)。G-box 配列 (CACGTG) を AAAAAA に変異させると、BES1 DBD-DNA 複合体は G-box 1 と G-box 2 の双方において検出されなくなった (図 1-12 G)。最後に、*BPG4* プロモーター領域中の G-box 配列を AAAAAA に変異したベクターを用いたプロトプラスト一過性レポーターアッセイを行った (図 1-12 H)。*35S::BES1-VP64* エフェクターの導入によって、変異無しレポーター (WT) および G-box 1 のみ変異させたレポーター (Mu-1) をレポーターとした際の LUC の相対シグナル強度はコントロールと比較して上昇した。一方、G-box 2 を変異させたレポーター (Mu-2) および G-box 1 と G-box 2 の双方を変異させたレポーター (Mu1&2) においては、*35S::BES1-VP64* エフェクターの導入による LUC の相対シグナル強度の増加は認められなかった。これらの結果から、BES1 が *BPG4* プロモーター領域の G-box 2 に直接結合し、BR シグナル伝達に関連して *BPG4* 発現を抑制していると考察された。

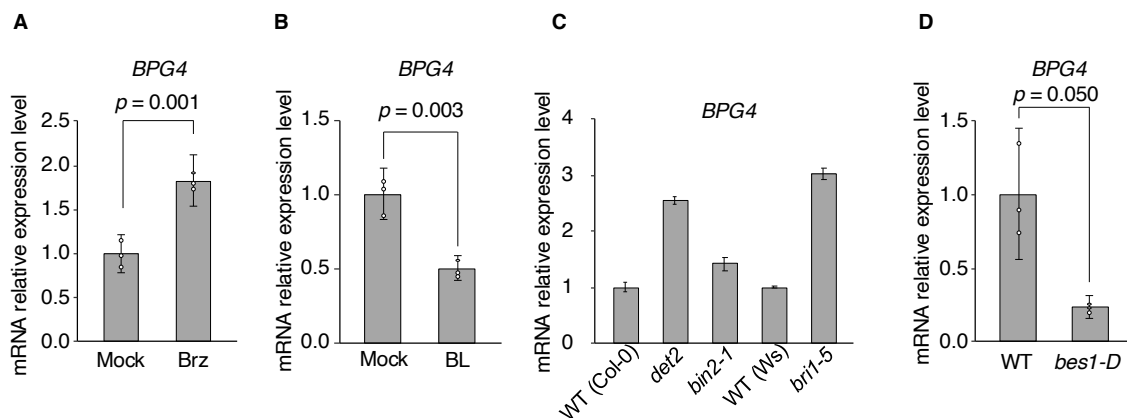
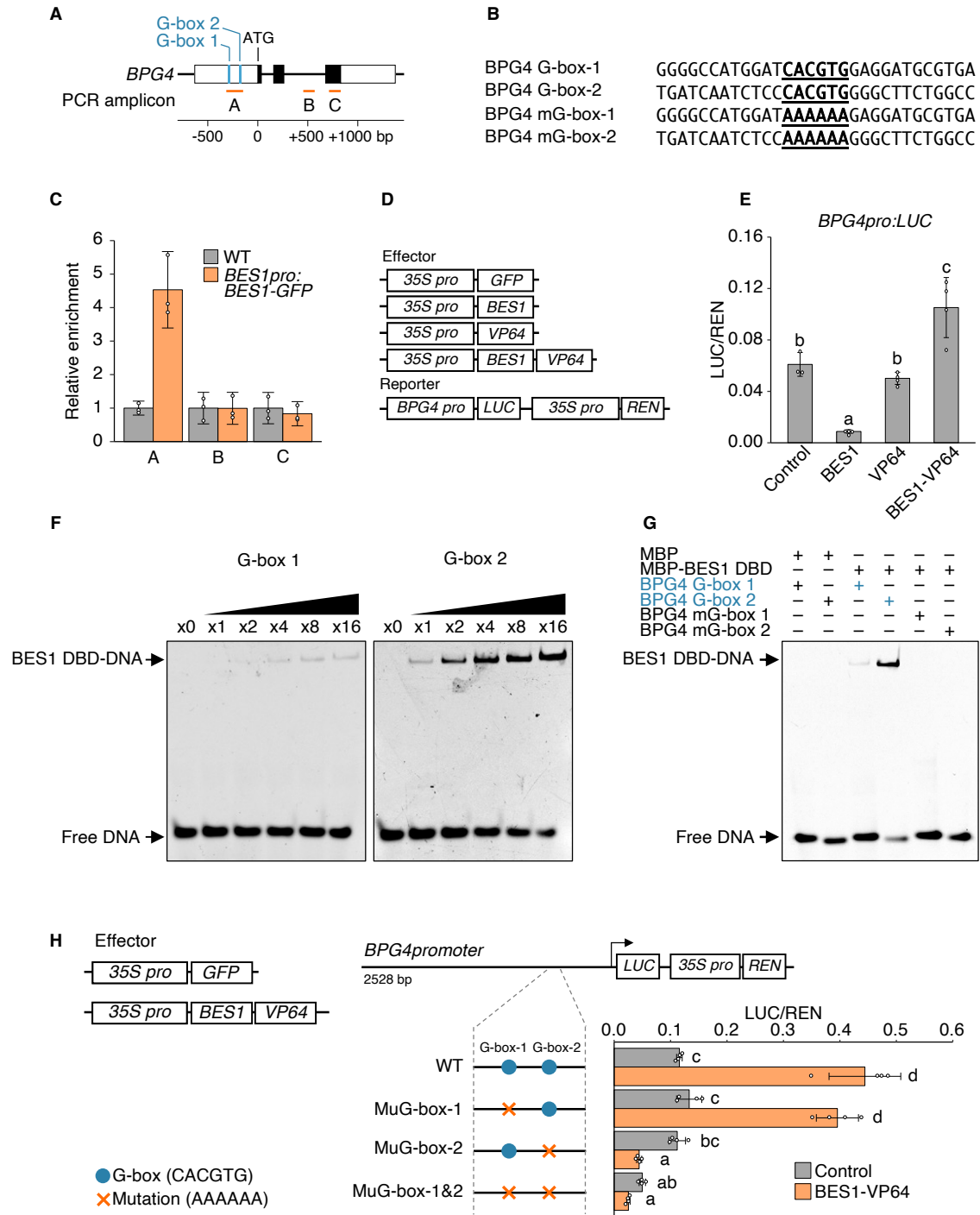


図 1-11. BR シグナルが *BPG4* mRNA 発現に与える影響の解析

(A–D) *BPG4* の mRNA 発現の RT-qPCR 解析結果。(A) においては、野生型植物体 (WT) を 3  $\mu$ M Brz または Brz と同等の量の DMSO (Mock) を含む 1/2MS 培地において 7 日間生育した。(B) においては、1/2MS 培地において 12 日間生育した野生型植物体に、500 nM BL または BL と同等の量の DMSO (Mock) を 3 時間処理した。(C) においては、WT (Col-0, Ws)、*det2*、*bin2-1*、および *bri1-5* を 1/2MS 培地において 8 日間生育した。(D) においては、WT および *bes1-D* を 1/2MS 培地において 8 日間生育した。内部標準には *GAPDH* を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復 (A–B) (D) もしくは実験的 3–4 反復 (C) より得た。

(A) (B) においては、スチューデントの両側 *t* 検定により統計処理を行った。(D) においては、ウェルチの両側 *t* 検定により統計処理を行った。

(B) の実験は、西田快世氏と協力して行った。



**図 1-12. BR シグナルのマスター転写因子 BES1 による BPG4 発現の転写制御機構の解析**

**(A)** *BPG4* 遺伝子の模式図。黒い四角形がエキソン、白い四角形が UTR、他の領域がイントロンを示す。*BPG4* プロモーターの G-box と **(C)** で増幅した DNA 断片をそれぞれ青またはオレンジの線で示す。ATG は開始コドンを示す。

**(B)** *BPG4* プロモーターにおける G-box とその周辺配列、および **(F-G)** で用いた変異 G-box のプローブ配列。

**(C)** BES1 の *BPG4* プロモーターへの結合を解析した ChIP-qPCR 実験の結果。平均および SD は、実験的 3 反復より得た。

**(D-E)** BES1 が *BPG4* のプロモーター活性に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。野生型植物の葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた。**(D)** に使用したベクターの模式図を示す。レポーターとして、*BPG4* プロモーターの下流に LUC を発現させたベクターを用いた。レポーターの導入効率の補正には、レポーターベクター上に組み込んだ 35S プロモーターの下流で発現させた REN を用い、相対 LUC 活性 (LUC/REN) を、*BPG4* プロモーター活性として解析した。エフェクター [コントロール (GFP)、BES1、VP64 または BES1-VP64] を各レポーターと共に導入した。平均および SD は、生物学的 3-4 反復より算出した。

**(F-G)** BES1 と *BPG4* プロモーター領域中の G-box もしくは変異 G-box (mG-box) の結合を解析した EMSA 実験の結果。プローブとして、*BPG4* プロモーター領域の G-box 配列を含む FAM 標識二本鎖 DNA を用いた。使用したプローブ配列を **(B)** に示す。タンパク質は、大腸菌で発現させた MBP (コントロール)、MBP- BES1 DNA 結合ドメイン (DBD) を用いた。

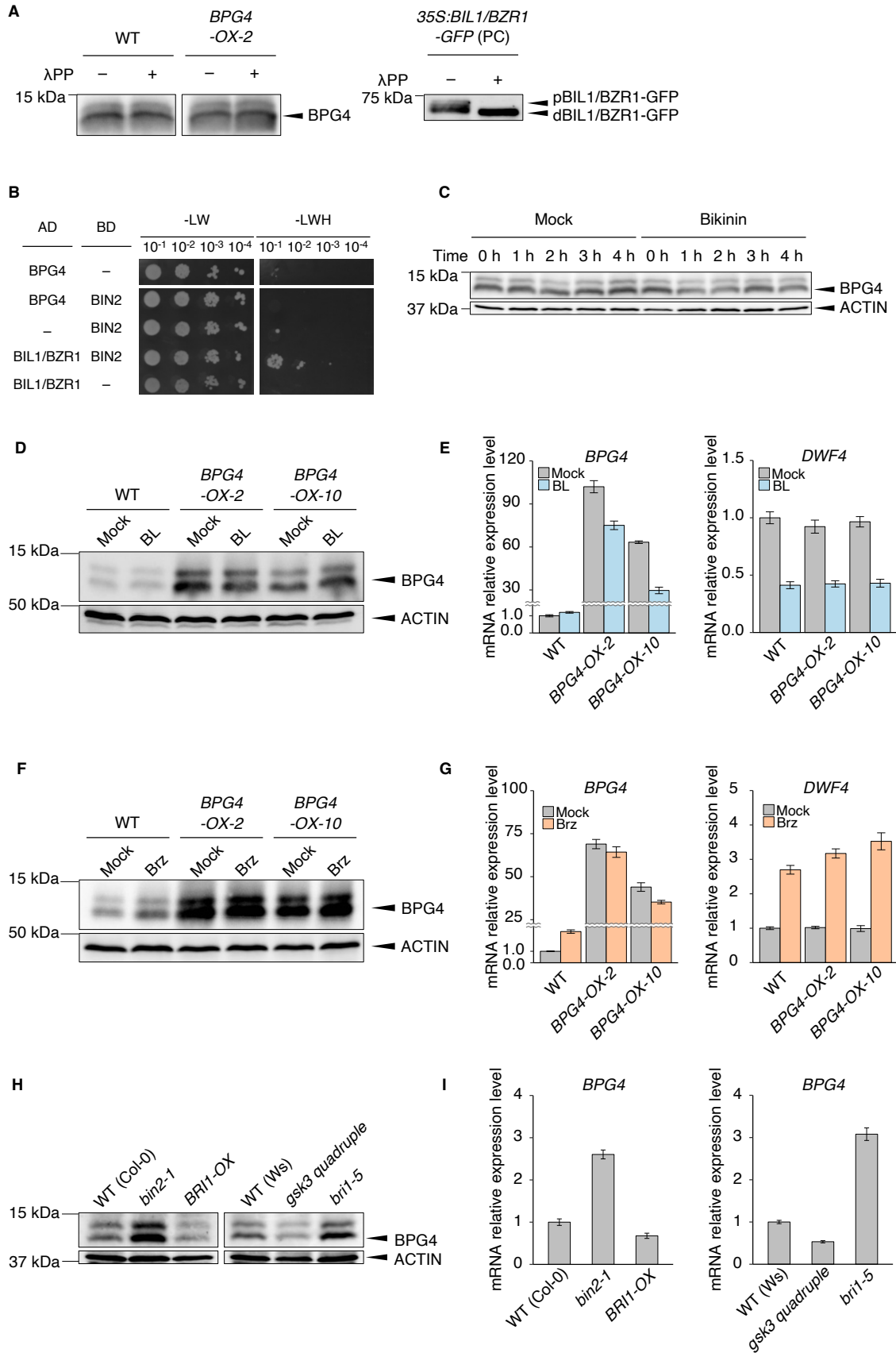
**(H)** *BPG4* のプロモーター領域における G-box 配列が BES1 による *BPG4* 発現の転写制御に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。野生型植物の葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた。レポーターとして、G-box (CACGTG) に変異 (AAAAAA) を導入した *BPG4* プロモーターの下流に LUC を発現させたベクターを用いた。*BPG4* プロモーター活性は **(D-E)** と同様に算出した。エフェクター [コントロール (GFP)、BES1-VP64] を各レポーターと共に導入した。平均および SD は、生物学的 4 反復より算出した。

**(E) (H)** において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

**(C)** の実験は、丸上萌々氏と Jong-Myong Kim 博士によって行われた。

anti-BPG4 抗体を用いた免疫ブロット解析において、内在性 BPG4 タンパク質は、主要なバンドと高分子量側にシフトしたバンドの 2 つの状態を検出された (図 1-4 C)。最新のシロイヌナズナゲノムのデータベース (Araport11) において、BPG4 のスプライシングバリエーションは同定されていないため、これらの 2 つのシグナルは BPG4 の翻訳後修飾に由来するシグナルである可能性が予測された。リン酸化は、タンパク質に負の電荷を与え、電気泳動中の移動度を変化させることが広く知られている。そこで、内在性 BPG4 タンパク質がリン酸化修飾されている可能性を解析するため、WT と *BPG4-OX-2* のタンパク質抽出液に λ プロテインホスファターゼ (λPP) を処理し、anti-BPG4 抗体を用いて免疫ブロット解析 (Western blotting) を行った (図 1-13 A)。BPG4 を示す二つのバンドシグナルについて、双方ともに λPP 処理によって明確な変化を認められなかった。さらに、BR シグナル伝達における主要な細胞質型キナーゼである BIN2 と BPG4 の相互作用を、Y2H 法によって解析したが、相互作用は認められなかった (図 1-13 B)。加えて、BIN2 阻害剤である *Bikinin* 処理によって、BPG4 を示す二つのバンドシグナルに明らかな変化は認められなかった (図 1-13 C)。これらの結果から、内在性 BPG4 タンパク質の 2 つのバンドシグナルはリン酸化による制御を受けていないと考察された。

次に、BPG4 タンパク質の状態と安定性が BR シグナルによって制御されているかを明らかにするために、anti-BPG4 抗体を用いた免疫ブロット解析 (Western blotting) を行った (図 1-13 D-I)。WT に長期間の Brz 処理をした際は、BPG4 タンパク質蓄積量は Mock と比較して増加した (図 1-13 D)。一方、*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* においては、Brz 処理は明確な影響を及ぼさなかった。WT における BPG4 タンパク質蓄積量の増加は、*BPG4* 発現量の増加に起因すると考察された (図 1-13 E)。BL を長期間処理した際は、WT、*BPG4-OX-2*、*BPG4-OX-10* のいずれの植物体においても、BPG4 タンパク質蓄積量に明確な影響は認められなかった (図 1-13 F)。内在性 BPG4 タンパク質蓄積量は *bin2-1* と *bri1-5* において WT と比較して増加し、BRI1 高発現植物体 *BRI1-OX* と BIN2 ファミリーの多重変異体 *gsk3 quadruple (bin2 bil1 bil2 ATSK13RNAi)* において減少した (図 1-13 H)。一方、これらの内在性 BPG4 タンパク質蓄積量の変化は、BES1 による *BPG4* mRNA 発現抑制に起因する可能性が高いと考察される (図 1-13 I)。これらの結果を総合すると、BPG4 はタンパク質レベルではなく、mRNA レベルで BR シグナルによって制御されていると考察された。



**図 1-13. BR 生合成および BR シグナル伝達因子が BPG4 タンパク質の蓄積量および電気泳動時の移動度を与える影響の解析**

**(A)** WT および *BPG4-OX-2* のタンパク質抽出液に  $\lambda$  プロテインホスファターゼ ( $\lambda$ PP) 処理した後、anti-BPG4 抗体を用いた Western blotting により BPG4 タンパク質を検出した結果。植物体は、1/2MS 培地で 8 日間生育させた。35S:*BIL1/BZR1-GFP* を  $\lambda$ PP 処理のポジティブコントロール (PC) として用いた。pBIL1/BZR1-GFP, リン酸化 BIL1/BZR1-GFP; dBIL1/BZR1-GFP, 脱リン酸化 BIL1/BZR1-GFP を示す。

**(B)** BPG4 と BIN2 との相互作用を解析した Y2H の結果。BIN2-BIL1/BZR1 間の相互作用をポジティブコントロールとして用いた。

**(C)** BIN2 阻害剤 bikinin を処理した *BPG4-OX-2* において、anti-BPG4 抗体を用いた Western blotting により BPG4 タンパク質を検出した結果。植物体は、1/2MS 培地で 11 日間生育させた後、50  $\mu$ M のビキニンまたは同量の DMSO (Mock) を 0、1、2、3、または 4 時間処理した。

**(D–E)** BL 添加条件における BPG4 タンパク質の蓄積量 **(D)** および *BPG4* mRNA 発現量**(E)** の解析結果。WT、*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* を、100 nM BL または同量の DMSO (Mock) を添加した 1/2MS 培地で 8 日間生育させた。**(D)** においては、anti-BPG4 抗体を用いた Western blotting により BPG4 タンパク質を検出した。**(E)** において、内部標準には *GAPDH* を用い、平均および SD は、実験的 3–4 反復より得た。**(E)** における *DWF4* は BL 処理のポジティブコントロールとして用いた。

**(F–G)** Brz 添加条件における BPG4 タンパク質の蓄積量 **(F)** および *BPG4* mRNA 発現量**(G)** の解析結果。WT、*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* を、3  $\mu$ M Brz または同量の DMSO (Mock) を添加した 1/2MS 培地で 9 日間生育させた。**(F)** においては、anti-BPG4 抗体を用いた Western blotting により BPG4 タンパク質を検出した。**(G)** において、内部標準には *GAPDH* を用い、平均および SD は、実験的 3–4 反復より得た。**(G)** における *DWRF4* (*DWF4*) は BL 処理のポジティブコントロールとして用いた。

**(F–G)** WT (Col-0)、*bin2-1*、*BRI1-OX*、WT (Ws)、*gsk3 quadruple* (*bin2 bil1 bil2 ATSK13RNAi*)、*bri1-5* における BPG4 タンパク質の蓄積量 **(F)** および *BPG4* mRNA 発現量 **(G)** の解析結果。植物体は、1/2MS 培地で 7 日間生育させた。**(F)** においては、anti-BPG4 抗体を用いた Western blotting により BPG4 タンパク質を検出した。**(G)** において、内部標準には *GAPDH* を用い、平均および SD は、実験的 3–4 反復より得た。**(G)** における *DWF4* は BL 処理のポジティブコントロールとして用いた。

**(C) (D) (F) (I)** において、Loading control には ACTIN を用いた。

## **BPG4 mRNA は、明所において光合成組織特異的に発現し、概日リズムによって発現が制御される**

BR 欠損変異体 *det2* や BR シグナル伝達が抑制された変異体 *bri1-5* および *bin2-1* は、WT よりも内生クロロフィル含量が増加し葉緑体の発達が促進した濃緑色形態を示すことが報告されている (Zhang et al., 2021)。また、Brz 処理によって内生 BR 含量が低下した植物体もこれらの変異体と同様の表現型を示す (Nagata et al., 2000)。一方、植物体に BL を添加すると、濃度依存的に内生クロロフィル含量が低下することが知られており (Zhang et al., 2021)、さらに BR シグナル伝達が活性化した変異体である *bes1-D* は内生クロロフィル含量が減少した淡緑色形態を示すことが報告されている (Yu et al., 2011)。これらの知見から、BR シグナルは一般に、植物体の内生クロロフィル含量を低下させ、葉緑体の発達を抑制する生理作用を持つと考えられている。しかし、本研究の BPG4 はクロロフィルの生合成と葉緑体の発達を抑制する機能を持つ (図 1-5) にも関わらず、BPG4 発現は BR シグナル伝達によって抑制される (図 1-11) ことが明らかとなった。BR シグナルが欠損した際に、内生クロロフィル含量は増加するが、その際に同時にクロロフィル生合成の抑制因子である BPG4 の mRNA 発現も増加していると考えられた。したがって、BR シグナルを介した葉緑体発達の制御という観点からは、BPG4 の発現制御は BPG4 のタンパク質機能とは一見すると矛盾しているように考察された。この矛盾を考察し、BR シグナルを介した葉緑体発達制御における BPG4 の実質的な役割と、植物成長における BPG4 の生理的意義を明らかにするために、光環境が BPG4 発現に及ぼす影響と組織特異的な BPG4 発現制御の解析を試みた。

まず、BPG4 発現の組織特異性を解析するために、BPG4 の 5'側上流と第一エキソンを含む 2.1 kb の領域の下流に  $\beta$ -glucuronidase (GUS) を発現させた形質転換体が当研究室の先行研究により作出され、GUS 染色が行われていた (阿部, 2014; 丸上, 2017) (図 1-14 A)。明所で生育した幼植物の子葉および胚軸で明確な GUS 染色が観察された一方、暗所で生育した幼植物における GUS 染色は明所よりも著しく弱かった。成熟した植物体においては、ロゼット葉などの光合成組織で強い GUS 染色が観察された。

次に、明所または暗所で生育した WT における BPG4 発現量および BPG4 タンパク質蓄積量について、RT-qPCR および anti-BPG4 抗体を用いた免疫ブロット分析 (Western blotting) によって解析した (図 1-14 B-C)。その結果、明所において BPG4 発現は暗所の 75 倍以上に増加していることが明らかになった (図 1-14 B)。また、明所においては明確な BPG4 タンパク質蓄積が認められたのに対し、暗所において BPG4 のタンパク質蓄積は検出されなかった (図 1-14 C)。さらに、光による BPG4 発現制御をより詳細に解析するために、暗所で 4 日間生育した植物に 0-72 時間の光照射を行い、BPG4、GLK1/2、PhANGs 発現の経時的变化を解析した (図 1-14 D)。GLK1/2 と、GLK1/2 によって直接発現が活性化される LHC サブユニットおよびクロロフィル生合成酵素をコードする遺伝子などの PhANGs の発現は、光に応答して 2 時間以内に迅速に誘導され、12 時間以内に最大値に達した。一方、光による BPG4 発現の活性化は光照射 6 時間後に開始し、光照射後 72 時間まで発現が増加し続けた (図 1-

14 D)。

最後に、*BPG4* 発現が概日リズムによって制御されているかを明らかにするために、WT を明所 12 時間/暗所 12 時間 (LD サイクル) 条件下で 24 日間生育させた後、48 時間連続光 (LL) 条件に移し、その後 4 時間ごとに経時的な発現変化を解析した (図 1-14 E)。その結果、*BPG4* 発現は昼に誘導されており、LL 条件に移して 56 時間後および 76–80 時間後に最も高かった。逆に、*BPG4* 発現は夜間に抑制され、LL 条件に移して 68 時間後および 92 時間後に最も低かった。*GLK2* と PhANGs の発現は LL 条件に移して 48–56 時間後と 72–76 時間後に最も高く、LL 条件に移して 60–64 時間後と 88–92 時間後に最も低かった。したがって、*BPG4* 発現は概日リズムによって厳密に制御されており、*GLK2* と PhANGs の発現に対して数時間遅れたリズムで発現している可能性が考えられた。これらの結果から、*BPG4* 発現は、光照射によって活性化し、概日リズムによって制御されており、光合成組織で特異的に活性化していることが考察された。

(図は次頁に掲載)

#### 図 1-14. 光環境および概日リズムによる *BPG4* mRNA 発現制御機構の解析

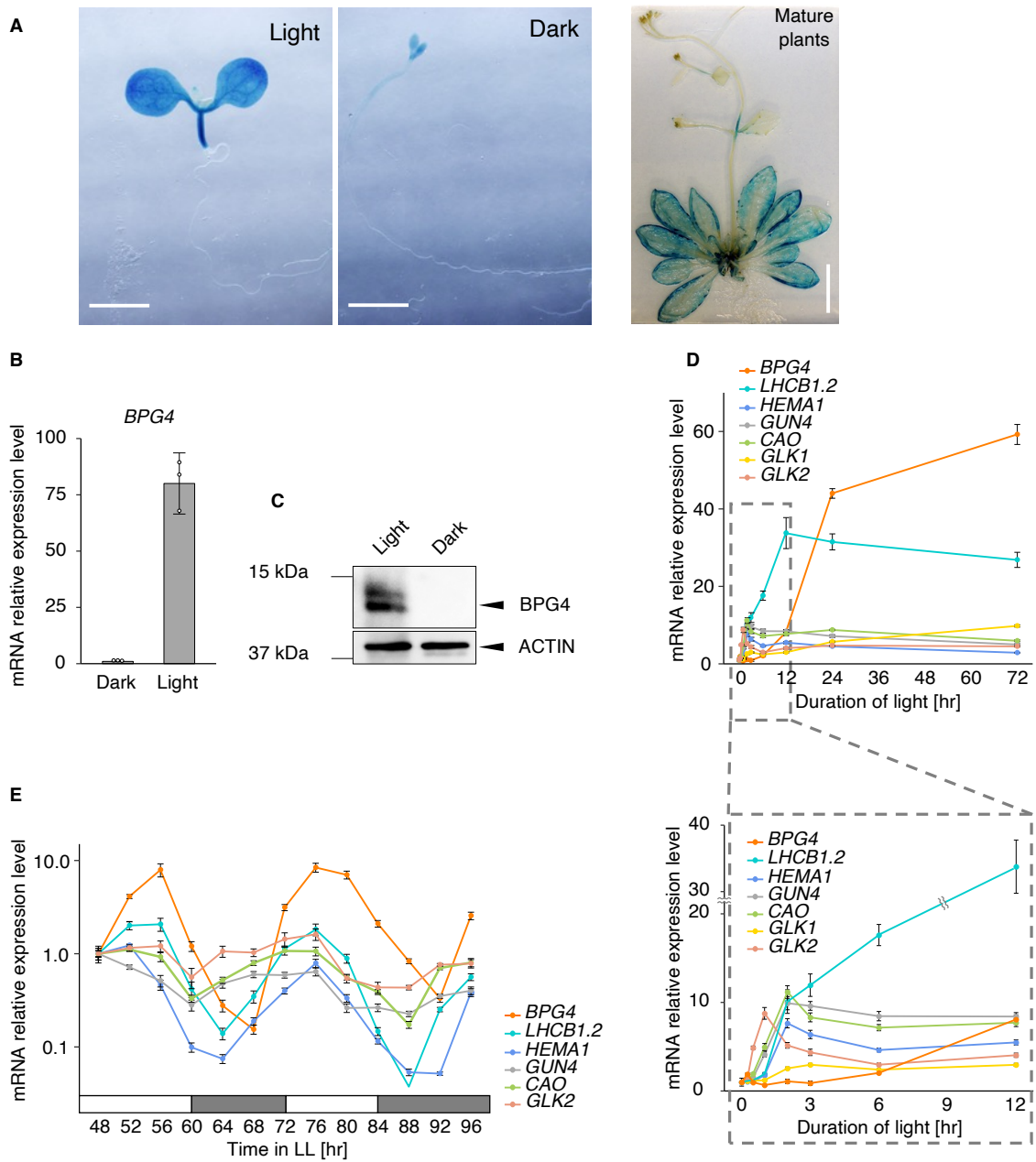
(A) *BPG4pro::GUS* における GUS 染色の結果。左図において、植物体は 1/2MS 培地で 7 日間明所 (Light) もしくは暗所 (Dark) で生育した。右図において、植物体は土壌において 30 日間生育させた。Scale bar = 2 mm (左)または 2 cm (右)。

(B–C) 明所 (Light) もしくは暗所 (Dark) における *BPG4* mRNA 発現量 (B) および *BPG4* タンパク質の蓄積量 (C) の解析結果。WT を連続光条件下または暗条件下で 7 日間生育させた。(B) において、内部標準には *EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4a1* (*eIF4a*)を用い、平均および SD は、実験的 3–4 反復より得た。(C) においては、anti-*BPG4* 抗体を用いた Western blotting により *BPG4* タンパク質を検出し、Loading control には ACTIN を用いた。

(D–E) *BPG4*、*GLKs*、光合成関連核遺伝子 (PhANGs) の mRNA 発現の RT-qPCR 解析結果。

(D) においては、WT を 4 日間暗所で生育させた後、0.25、0.5、1、2、3、6、12、24、または 72 時間連続光下で生育させた (上段)。0–12 時間までのグラフの拡大図を下段に示す。(E) においては、明所 12 時間/暗所 12 時間 (LD サイクル) 条件下で 24 日間土壌で生育させた WT 植物を 48 時間連続光 (LL) 条件に移し、その後 4 時間ごとに 48 時間サンプリングした。X 軸における白の四角と灰色の四角は、LL 条件前に明所だった時間帯、暗所だった時間帯をそれぞれ示す。内部標準には *eIF4a* を用い、平均および SD は、実験的 3–4 反復より得た。相対発現量は、(D) (E)ともに 0 時間の発現量を基準に正規化した。(E) の Y 軸は対数スケールで表した。

(A) の実験は、丸上萌々氏によって行われた。



(図の説明は前頁に記載)

## BPG4 は、強光条件における活性酸素分子種 (ROS) の発生の抑制と ROS 発生に伴う光障害の回避において重要な役割を果たす

ここまでの結果により、*BPG4* の mRNA 発現は BR 欠乏条件および光照射によって誘導されることが明らかとなった。先行研究により、BR 欠乏と光は共にクロロフィルの生合成と葉緑体の発達を促進することが明らかとなっている。したがって、BR シグナルと光による *BPG4* 発現の制御は、クロロフィル生合成と葉緑体の発達を抑制する *BPG4* タンパク質の機能とは正反対であり、矛盾しているように考えられた。しかし、葉緑体内の恒常性維持という観点から考えることにより、この矛盾を考察し、植物成長における *BPG4* の実際の役割と生理的意義に関する仮説を立てることができると考えた。

PSI/II と LHC に存在するクロロフィルは光エネルギーを吸収して励起し、光合成反応を駆動する。したがって、クロロフィルによる光エネルギーの吸収は、植物が光独立栄養生物として成長するために必要不可欠である。一方、強光や低温のような環境ストレス条件下では、過剰な光エネルギー吸収は植物にとって有害な活性酸素分子種 (ROS) の発生を引き起こし、光障害と呼ばれる光合成活性の低下を引き起こすことが知られている (Melis, 1999; Tripathy and Oelmüller, 2012)。また、タンパク質と結合していない遊離のクロロフィルやクロロフィル前駆体の過剰な蓄積も、ROS の発生を引き起こすことが報告されている (Tanaka et al., 2003; Wagner et al., 2004)。発生した ROS は、膜脂質の酸化、タンパク質の分解、細胞死を引き起こすため、植物にとって非常に有害である。したがって、ROS の発生を回避し効率的かつ健全な光合成を実行するためには、内生クロロフィル含量と LHC アンテナサイズを厳密かつ最適に制御し、吸収する光エネルギーが過剰になりすぎないように適切に制御する必要がある。

近年、その具体的な分子機構の一端が解明されつつある。葉緑体発達のマスター転写因子 GLK が過剰に活性化すると、クロロフィル前駆体や LHC タンパク質が過剰に蓄積し、ROS の発生が促進され、光障害を引き起こし、細胞死に至ることが近年報告された (Lv et al., 2019; Li et al., 2021)。したがって、ROS の発生を抑制し、健全な光合成を維持するためには、GLK 活性を精密に制御することが不可欠であると考えられる。また、先行研究において、GLK の発現と転写活性化能は、光と BR 欠乏によって増加することが示唆されている (Yu et al., 2011; Zhang et al., 2021)。そこで、光および BR 欠乏により GLK の mRNA 発現や転写活性化能が増加すると並列的に *BPG4* の mRNA 発現が増加することにより、*BPG4* はブレーキとして GLK の過剰な活性化を抑止し、内生クロロフィル含量を適量に維持し葉緑体の恒常性を維持することで、光エネルギー過剰時の ROS 発生と光障害の回避に貢献しているのではないかと考えた。

*BPG4* が過剰な光エネルギー吸収によって誘導される ROS 発生の抑制に寄与しているかを解析することにより、この *BPG4* の生理的意義に関する仮説の検証を試みた。まず、3,3-diaminobenzidine (DAB) と nitro blue tetrazolium (NBT) を用いた組織化学染色を行うことで植物における代表的な ROS である過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) とスーパーオキシド ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) の量を解

析し、強光照射による ROS 発生を WT、*BPG4* 欠損植物、*BPG4* 高発現植物において比較した (図 1-15 A-B)。その結果、強光照射による過剰な光エネルギーはいずれの植物体においても  $\text{H}_2\text{O}_2$  および  $\text{O}_2^{\cdot-}$  の発生を誘導していることが観察された。*bpg4-1* および *bpg4-2* においては、発生した  $\text{H}_2\text{O}_2$  および  $\text{O}_2^{\cdot-}$  の量が WT よりも増加しており、*BPG4-OX-2* および *BPG4-OX-10* においては減少していることが明らかとなった (図 1-15 A-B)。植物体内の  $\text{O}_2^{\cdot-}$  蓄積量について定量的な解析を行った結果、強光条件下での  $\text{O}_2^{\cdot-}$  蓄積量は *BPG4-OX-2* においては WT より少なく、*bpg4-1* においては WT よりも多かった (図 1-15 C-D)。これらの結果より、*BPG4* は GLK を介して葉緑体の発達を抑制することにより、強光条件下での過剰な光エネルギー吸収によって誘導される ROS 発生の回避に寄与していると考えられた。

最後に、光合成活性に対する *BPG4* の影響を解析するために、植物の光合成能の指標の一つである PSII の最大量子収率 ( $\text{Fv}/\text{Fm}$ ) を、WT、*bpg4-1*、*BPG4-OX-2* 間で比較した (図 1-16)。植物体を 成育光条件 ( $90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で 11 日間育てた後、強光条件 ( $900 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に 0-24 時間移した後、 $\text{Fv}/\text{Fm}$  を測定した。各植物の  $\text{Fv}/\text{Fm}$  は、強光処理時間に依存的に減少したことから、いずれの植物においても光障害が発生したと考えられた。*bpg4-1* において、 $\text{Fv}/\text{Fm}$  は WT よりも大きく減少した一方、*BPG4-OX-2* においては強光照射後も  $\text{Fv}/\text{Fm}$  は WT よりも高い値のまま維持された (図 1-16)。これらの結果を総合すると、*BPG4* は過剰な光エネルギー吸収によって光合成活性が低下する光障害と呼ばれる現象を回避し、強光のようなストレス環境下においても光合成活性を高いまま維持することに寄与していると考えられた。したがって、*BPG4* は植物の光合成能を効果的かつ健全に維持するために重要な働きを持つ葉緑体恒常性維持因子 (葉緑体ホメオスタシスファクター) として機能していると考えられた。

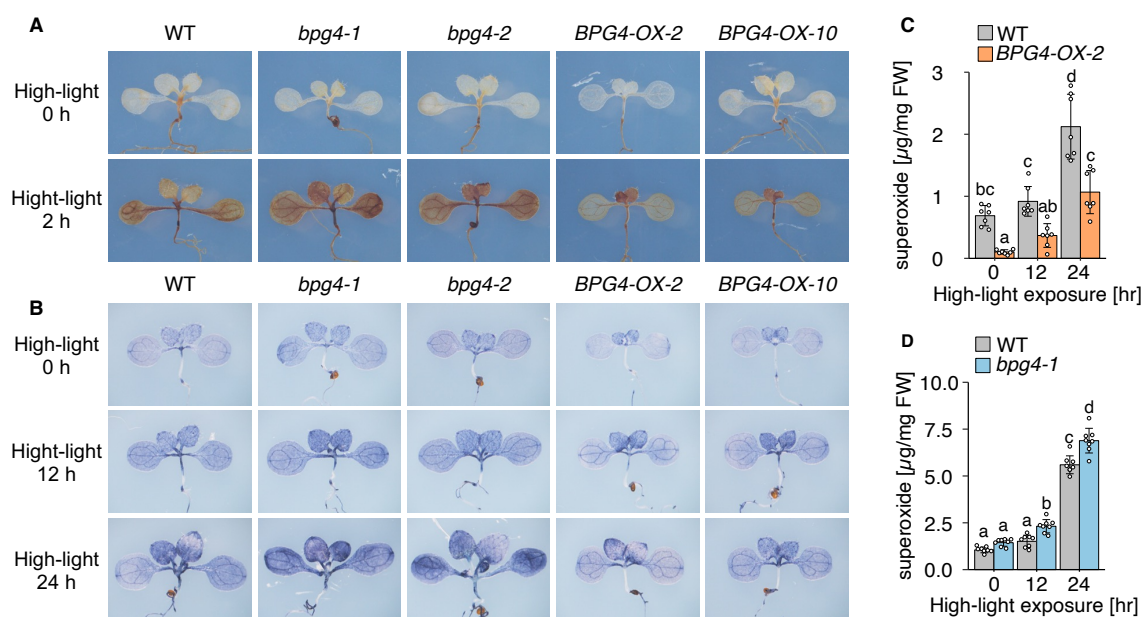


図 1-15. *BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体における強光条件時の活性酸素分子種 (ROS) 蓄積量の解析

(A–B) DAB 染色 (A) および NBT 染色 (B) による  $\text{H}_2\text{O}_2$  および  $\text{O}_2^{\bullet-}$  の検出結果。(A) においては、WT、*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、および *BPG4-OX-10* を、成育光 ( $90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、長日条件) 条件において 1/2MS 培地で 7 日間生育させた後、DAB 試薬を浸潤させ、強光条件 ( $1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に 2 時間移した。(B) においては、植物体を、成育光 ( $90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、長日条件) 条件において、1/2MS 培地で 7 日間生育させた後、強光条件 ( $800 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に 12 時間または 24 時間移した後、NBT 試薬を浸潤させた。(C–D) WT と *BPG4-OX-2* (C)、WT と *bpg4-1* (D) における内在性  $\text{O}_2^{\bullet-}$  含量の定量結果。植物体を成育光 ( $90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、長日条件) において、1/2MS 培地で 8 日間生育させた後、強光条件 ( $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に 12 時間または 24 時間移した。(C) において、平均および SD は、15–18 個体の植物を一つの試料として生物学的 7 反復より算出した。(D) において、平均および SD は、50 mg の植物を一つの試料として生物学的 8 反復より算出した。(C)(D) において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

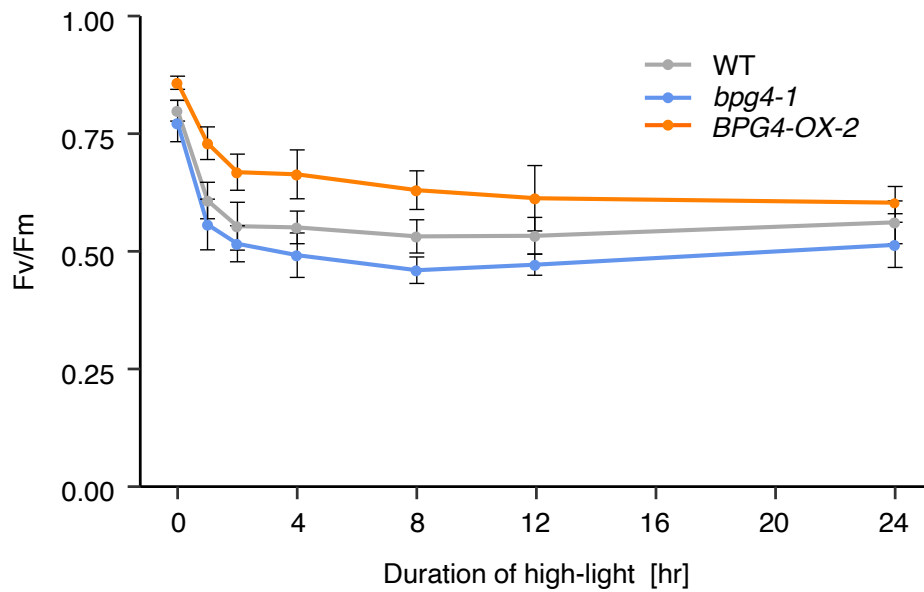


図 1-16. *BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体における強光条件時の光化学系 II 最大量子収率の解析

WT、*bpg4-1*、および *BPG4-OX-2* における PSII の最大量子収率 ( $F_v/F_m$ ) の強光照射による経時的变化。植物体を成育光 ( $90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、長日条件) において、1/2MS 培地で 11 日間生育させた後、強光条件 ( $900 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に 0、1、2、4、8、12、または 24 時間移した。平均および SD は、生物学的 10–11 反復より算出した。

## 考察

本研究は、BR 生合成阻害により植物体の内生クロロフィル含量の増加を誘導する化合物である Brz に不感受性を示し、Brz 存在条件下においても淡緑色形態を示す *BPG4-FOX* 植物体から同定されていた新規因子 BPG4 の機能解明を行なったものである。*BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体の表現型より、BPG4 はクロロフィル生合成と葉緑体発達の負の制御因子として機能すると考察された (図 1-5 A-F)。BPG4 は、葉緑体の発達制御において非常に重要な役割を果たす転写因子 GLK1/2 と核内で相互作用することが当研究室の先行研究により明らかとされていた (図 1-8 A-F)。本研究は、さらに BPG4 と GLK の遺伝学的相互作用の解析 (図 1-9) および BPG4 が GLK1 の転写活性化能に与える影響の解析 (図 1-10) を行うことにより、BPG4 は、GLK1 の DNA 結合能の阻害を介して GLK1 の転写活性化能を抑制することを明らかにした。さらに、この BPG4 による GLK の転写活性化能の抑制は、核におけるクロロフィル生合成関連遺伝子や *LHC* 遺伝子を含む (PhANGs) の発現を低下させ (図 1-7 B)、葉緑体におけるクロロフィル生合成の抑制と光捕集アンテナサイズの減少を引き起こすと考えられた (図 1-5 A-F)。一般に、PSII と LHCII は葉緑体のチラコイド膜の多層構造であるグラナ上に局在すると考えられている。LHCII は植物チラコイドの全タンパク質の約 3 分の 1 を占め、クロロフィル *a* とクロロフィル *b* の双方に結合し、グラナ形成において中心的な役割を果たす (Wan et al., 2014)。したがって、*bpg4-1* および *bpg4-2* においては、*BPG4* の欠損が GLK の活性化を介してクロロフィル *a* およびクロロフィル *b* の生合成を活性化し、LHCII の蓄積を誘導し、最終的にグラナあたりのチラコイド膜のスタッキング層数の増加を引き起こしたと考えられる。

BPG4 は、GLK1 の DBD ではなく GCT-box との直接的な相互作用を介して、GLK1 の DNA 結合能を阻害したと考えられた (図 1-8 E-F)。GCT-box は GLK ファミリー特異的なドメインとして同定され、トウモロコシやイネでは GLK のホモ/ヘテロ二量体化に関連することが報告されている (Rossini et al., 2001)。また、先行研究において、Turnip Yellow Mosaic Virus P69 が GLK1 の GCT-box を含む領域と相互作用し、GLK1 の転写活性化能を抑制することが報告されており、GCT-box は GLK1 の転写活性化能に重要な役割を果たしていると考えられている (Ni et al., 2017)。GCT-box が GLK の転写活性化能において担う役割や、BPG4 が GCT-box を介して GLK1 の DNA 結合能を制御する分子機構を明らかにするために、さらなる研究が必要であると考えられる。

近年の先行研究において、BR を含む植物ホルモンシグナル伝達が、GLK の転写活性化能を調整することが報告されている (Lv et al., 2019; Li et al., 2021; Zhang et al., 2021)。サリチル酸 (SA) シグナルの下流では、SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 (SIB1) と LESION-SIMULATING DISEASE 1 (LSD1) が GLK 転写活性化能を拮抗的に制御することにより PhANGs 発現が精密に調節されていることが報告されており、この PhANGs 発現の微調節が ROS 発生の抑制に寄与していると考えられている (Lv et al., 2019; Li et al., 2021)。BR シグナル伝達における主要なリン酸化キナーゼ BIN2 は、GLK1 の DBD および GCT-box に直

接相互作用し、DBD と PRD に存在する 4 つの Thr 残基をリン酸化することが報告されている (Zhang et al., 2021)。BIN2 による GLK のリン酸化は、GLK1 タンパク質の安定性を高めるだけでなく、GLK1 の DNA 結合能および転写活性化能を促進することが明らかとなっている。BIN2 と BPG4 は共に BR シグナル伝達因子として機能するが、GLK1 に対しては正反対の分子機能を有しており、BPG4 と BIN2 は SIB1 と LSD1 と同様に、GLK の転写活性化能を拮抗的に制御している可能性が考察される。今後、BPG4 と BIN2 が競合的に機能する可能性について解析することにより、GLK による葉緑体発達のより詳細な制御メカニズムを解明できることが期待される。

*BPG4* 高発現植物体は花成促進形態を示したのに対し、*BPG4* 欠損植物体は逆に花成遅延形態を示した (図 1-5 G-I)。先行研究において、*glk1glk2* および *GLK1/2-OX* はそれぞれ、*BPG4* 高発現植物体および *BPG4* 欠損植物体と同様の花成促進形態および花成遅延形態を示すことが報告されている (Waters et al., 2008; Zubo et al., 2018)。また、GLK が *B-BOX DOMAIN PROTEIN 14/15/16 (BBX14/15/16)* の発現を直接活性化することにより、*FLOWERING LOCUST (FT)* の発現制御因子である CONSTANS (CO) の転写活性化能を抑制し、花成を抑制することが報告された (Susila et al., 2023)。これらの結果より、*BPG4* による GLK 抑制は、葉緑体の発達だけでなく、*FT* の発現調節を介した花成制御にも影響を与える可能性が示唆された。

BR は葉緑体発達を抑制すると考えられており、先行研究において GLK が BR シグナル伝達による葉緑体発達の中心因子として機能することが示唆されている (Yu et al., 2011; Zhang et al., 2021)。*det2*、*bri1-5*、*bin2-1* 変異体は BR シグナル伝達の欠損による内生クロロフィル含量が増加した濃緑色形態を示すが、これらの変異体に *glk1glk2* 変異体を掛け合わせた三重変異体は濃緑色形態を示さず、淡緑色形態を示す (Zhang et al., 2021)。また、*GLK* 発現量は *bri1* 変異体においては増加し、BL 処理および BR シグナル伝達のマスター転写因子 BIL1/BZR1 および BES1 の機能獲得型変異体においては低下する (Sun et al., 2010; Yu et al., 2011)。一方、本研究においては、*BPG4* 発現は BR シグナル伝達の下流において BES1 が *BPG4* プロモーター領域の G-box に直接結合することで抑制されることが示唆された (図 1-11 D, 2-12 A-H)。当研究室の先行研究により、BIL1/BZR1 転写因子ファミリーは、結合 *cis* 配列である G-box または BRRE-core 配列に隣接する 2 つの周辺塩基に対して高度な選択性を示すことが示唆されており (Nosaki et al., 2022)、G-box 2 とその周辺塩基配列 (CC|CACGTG|GG) は BIL1/BZR1 による DNA 結合に最適な配列ペアの一つである一方、G-box 1 とその周辺塩基配列 (AT|CACGTG|GA) に対する BIL1/BZR1 結合親和性は相対的に低いと報告されている。したがって、G-box 1 と G-box 2 に対する BES1 結合親和性の違いは、G-box の周辺配列の変化に起因していると考えられた。

*BPG4* 発現は、BR シグナルだけでなく、光と概日リズムによっても制御されていた (図 1-14 A-E)。*BPG4* の発現は光合成組織で特異的に観察され、光によって誘導され、概日リズムとともに明確に増減した (図 1-14 A-E)。先行研究における網羅的解析の結果より、HY5

転写因子と PIF 転写因子が *BPG4* 発現を制御している可能性が示唆された (Lee et al., 2007; Kim et al., 2016)。HY5 と PIF はともに光シグナル伝達において主要な役割を担う転写因子であることから、光による *BPG4* 発現の活性化は、HY5 と PIF による直接的な制御に起因する可能性が示唆された。なお、光環境に応じた HY5 と PIF による *BPG4* 発現制御機構については、本研究の第二章において詳細な解析を行った。また、HY5 と PIF は概日リズムとの関連も報告されていることに加えて (Soy et al., 2016; Hajdu et al., 2018)、*BPG4* 発現を直接の制御因子として同定された BES1 も概日リズムによる遺伝子発現制御に関連していることが示唆されている (Lee et al., 2020; Torii et al., 2022)。これらの知見より、HY5、PIFs、BES1 といった複数の転写因子による協調的な制御によって、概日リズムに伴う厳密な *BPG4* 発現が実行されていると考察された。

植物における ROS は、植物にとって光エネルギーが過剰になると、主に葉緑体で発生する。過剰な光エネルギー吸収は PSI/II 内での ROS 発生を誘発し、最終的に光阻害と呼ばれる植物への深刻なダメージを引き起こす (Pospíšil, 2016; Takagi et al., 2016)。先行研究において、GLK 転写因子の過剰な活性化が ROS 発生を促進し、光阻害と細胞死を引き起こすことが報告されている (Lv et al., 2019; Li et al., 2021)。そこで本研究では、*BPG4* 欠損植物体および *BPG4* 高発現植物体について、過剰な光エネルギー (強光) 条件における ROS 発生量および光合成活性を測定した。その結果、*BPG4* 欠損は強光条件における ROS 発生量を増加させ、光合成活性 (Fv/Fm) を低下させた一方で、*BPG4* の高発現化は ROS 発生と光阻害の回避を誘導する可能性が示された (図 1-15 A-D, 2-16)。*BPG4* 欠損は、GLK の過剰な活性化を抑制できず、LHC などの光合成装置の余剰形成を促進し、光エネルギーの過剰吸収を引き起こし、最終的に ROS 発生と光阻害を誘発したと考察された。これらの結果から、*BPG4* は GLK を介して葉緑体の発達を負に制御することで、葉緑体中の ROS 発生を回避し、強光などのストレス条件下における光合成活性の維持に寄与していることが示唆された。

BR 生合成変異体および BR シグナル変異体に関する多くの先行研究から、BR シグナル欠乏が葉緑体発達とクロロフィル生合成を促進することは自明であると考えられる (Chory et al., 1991; Yu et al., 2011; Zhang et al., 2021)。また、暗所で生育したクロロフィルと葉緑体を持たないもやし様の植物体からわかるように、光照射が葉緑体発達とクロロフィル生合成を促進することもまた自明であると考えられる。これまでに、GLK、GNC/CGA1、HY5、PIF、BIN2、BES1 など多くの因子が、光と BR シグナルの下流で葉緑体の発達を制御する主要因子として同定されている (Waters et al., 2009; Yu et al., 2011; Bastakis et al., 2018; Zhang et al., 2021; Cackett et al., 2022)。PIF や BES1 などの葉緑体発達の抑制因子は、暗所や BR シグナル活性化時に mRNA 発現やタンパク質蓄積量が増加するのに対し、GLK や BIN2 などの葉緑体発達の促進因子は、明所や BR シグナル欠乏時に mRNA 発現やタンパク質蓄積量が増加することが知られている (Cackett et al., 2022)。光と BR シグナルによるこれらの因子の mRNA 発現とタンパク質蓄積量の制御は、葉緑体制御におけるこれらの因子の分子機能と対応しており、光と BR シグナルによる葉緑体制御において矛盾しない。一方、これらの因

子とは対照的に、本研究で新規に同定した葉緑体制御因子である BPG4 は、光と BR シグナル欠乏により mRNA 発現が活性化するにも関わらず葉緑体の発達を抑制する機能を持った因子であった。光と BR シグナル欠乏は双方とも GLK の発現の活性化を介して葉緑体発達を促進することが報告されている (Yu et al., 2011; Martín et al., 2016)。本研究により、GLK の活性化と同時に GLK の抑制因子である BPG4 の mRNA 発現も活性化することが明らかとなった。すなわち、BPG4 は葉緑体発達が促進される際に活性化するにも関わらず、葉緑体発達を抑制する機能を持つと考察された。このように、光と BR シグナルによる葉緑体発達制御において、BPG4 の mRNA 発現調節は BPG4 の分子機能とは正反対であり、一見すると矛盾しているように考えられた。この矛盾しているように考えられる BPG4 の mRNA 発現制御とタンパク質の分子機能から、葉緑体恒常性維持因子としての BPG4 の生理的意義を考察した。

GLK による PhANGs の過剰な転写活性化は ROS 発生量の増加につながり、植物にとって有害となる可能性があるため (Lv et al., 2019; Li et al., 2021)、GLK の過剰な活性化を抑制するメカニズムが存在すると考えられる。BPG4 の存在下では (WT においては)、光や BR シグナル欠乏が GLK を活性化すると、同時に BPG4 の mRNA 発現も GLK のブレーキとして誘導される。また、光照射による BPG4 発現の活性化は、GLK および GLK 下流の PhANGs の発現活性化より数時間遅れていることが観察されている (図 1-14 D)、この BPG4 発現の遅延誘導は、一度 GLK とその下流の PhANG が光照射によって活性化した後、不必要な GLK の活性化にブレーキをかける BPG4 の役割を示唆していると考察している。光による GLK の活性化に伴い、PhANGs 発現が光照射後 1-3 時間で急速に活性化された後、BPG4 発現の開始と同時に PhANGs 発現の増加が抑制されたように見受けられた (図 1-14 D)。したがって、この BPG4 による GLK 転写活性化能の抑制は、PhANGs 発現の微調整に寄与し、それによって葉緑体の恒常性を維持していると考察された (図 1-17)。

BPG4 非存在下では (BPG4 欠損植物体においては)、光および BR シグナル欠乏により GLK の mRNA 発現および転写活性化能が過剰に活性化され、PhANGs 発現の増加および光合成装置の余剰形成が誘発される。そのため、強光などの環境ストレス条件下では、WT よりも過剰な光エネルギー吸収による ROS 発生や光障害が起こりやすくなると考えられる (図 1-17)。BPG4 高発現植物においては、多量の BPG4 タンパク質蓄積により、GLK 転写活性化能が強く阻害され、PhANGs 発現が低下し、葉緑体発達が抑制される。その結果、過剰な強光条件においては逆に光エネルギーが適度に吸収され、ROS 発生が抑えられ、光障害の回避が可能になったのではないかと考察された (図 1-17)。このように、BPG4 は既知の因子に基づく葉緑体発達制御メカニズムという観点からは、mRNA 発現制御とタンパク質の分子機能が一見すると矛盾するように思われた。しかし、BPG4 は典型的な葉緑体制御因子とは逆の挙動を示すことによって、PhANGs 発現の微調整、内生クロロフィル含量と光捕集アンテナサイズの最適化、ROS 発生の回避、葉緑体の恒常性維持という重要な生理学的意義を担っていると考察された。

BPG4 ファミリーは、ストレプト藻類 (クロロキブス藻綱、クレブソルミディウム藻綱、車軸藻綱、接合藻綱) と陸上植物に進化的に広く保存されていた (図 1-2)。興味深いことに BPG4 の相互作用因子である GLK ファミリーもまたストレプト藻類と陸上植物に進化的に保存されており (図 1-18)、先行研究において光合成生物の陸上化の過程で出現したと予測されている (Dadras et al., 2023; Hernández-Muñoz et al., 2024)。BPG4 ファミリーと GLK ファミリーは、ほとんどの植物種で進化的に共存しており (図 1-19)、BPG4 ファミリーと GLK ファミリーは、進化的に密接に関連している可能性が示唆された。

BPG4 ファミリーは、被子植物以降は 3 つのサブグループ (BPG4、BGH2、BGH3) に分かれていると予測された (図 1-2)。これまでに、シロイヌナズナにおける *BPG4*、*BGH2*、*BGH3* の高発現体は全て淡緑色形態を示すことが明らかとなっている (詳細は第二章に記す)。また、イネにおいて、*OsBPG4B* は DEEP GREEN PANICLE 1 (DGP1) として同定されており、光環境下で GLK 転写因子を抑制する機能を持つことが報告されている (Zhang et al., 2020a)。さらに、ロシアタンポポ (*Taraxacum koksaghyz*, *Tk*) における BPG4 オルソログ (*TkBPG4*) の過剰発現により、シロイヌナズナの *BPG4-OX* と同様の淡緑色形態が誘導されることが近年報告された (Wolters et al., 2023)。加えて、BPG4 ファミリー間で BPG4 と GLK の相互作用において主要な役割を果たすと考えられる *A\_thal\_3526* ドメインは種間で高度に保存されていることから (図 1-3 B)、BPG4 ファミリーのタンパク質としての機能は非常に高度に保存されている可能性が高いと考察された。近年発表された論文において、BPG4 ファミリーは、RPGE ファミリーおよび PEL ファミリーとして同定され、機能解明が進みつつある (Han et al., 2023; Kim et al., 2023)。本研究およびこれらの二つ報告において、BPG4/RPGE/PEL ファミリーが GLK 転写因子を介して葉緑体の発達を抑制することが明らかとなっているが、BPG4 ファミリーの色素体発達調節における機能冗長性および機能の差異は未解明であり、環境に応じた BPG4 ファミリーの機能分担を明らかにするためには、さらなる研究が必要であると考えられる。

近年、光捕集アンテナサイズや葉の内生クロロフィル含量を最適化することで、光合成効率およびバイオマス収量を向上し得ることが報告されている (Friedland et al., 2019; Cutolo et al., 2023; Vani et al., 2023)。さらに、イネにおいてトウモロコシの GLK オルソログ (*ZmGLK*) を高発現させた植物体においては、光合成活性、バイオマス、穀物収量が増加することが明らかとなっている (Li et al., 2020; Yeh et al., 2021)。加えて、トマトにおいて *SIGLK* を高発現させることにより、果実の糖度およびカロテノイド、リコピンなどの栄養素が増加することが知られている (Powell et al., 2012; Lupi et al., 2019)。BPG4 の分子機能をさらに詳細に解明することにより、将来的にはイネやトマトなどの有用作物において収量や栄養素が増加した新品種を作出できることが期待される。

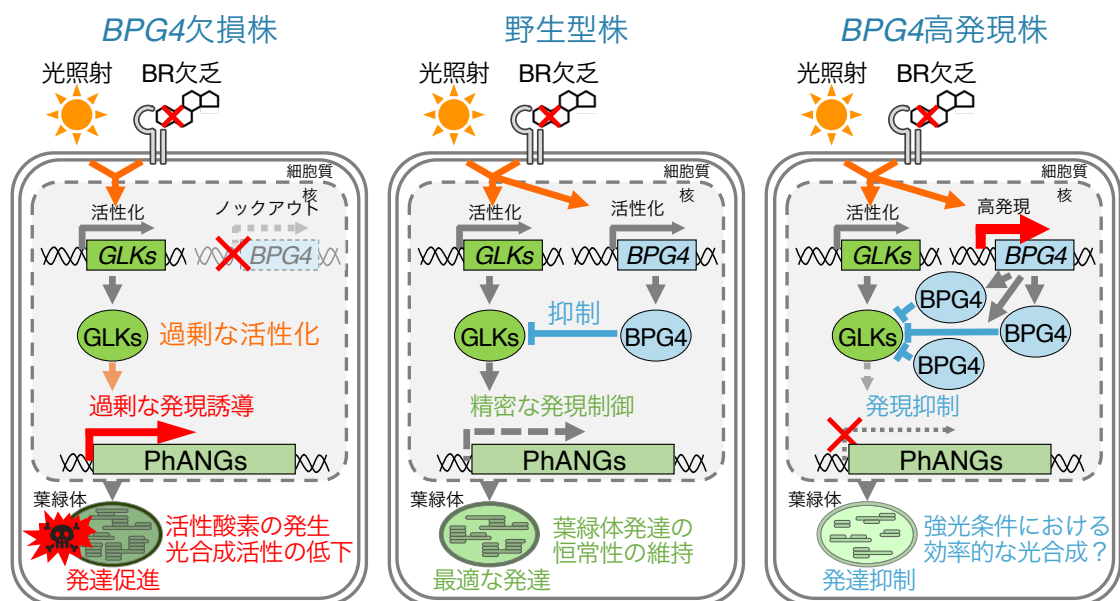


図 1-17. BPG4 の機能の作業仮説

光照射および BR シグナル欠乏は *GLKs* 発現を活性化し、*GLKs* はクロロフィル合成関連酵素や LHC サブユニットをコードする遺伝子を含む光合成関連核遺伝子 (*PhANGs*) の発現を誘導することにより葉緑体の発達を促進する。この際、光照射および BR シグナル欠乏は *BPG4* 発現も活性化し、活性化された *BPG4* は *GLK* 転写活性化能を低下させることで葉緑体の発達を抑制する。WT においては、このように *GLKs* の活性化と *BPG4* による *GLKs* の抑制が同時に起こることにより、*PhANGs* 発現が精密に調節された結果内生クロロフィル含量と光捕集アンテナサイズが最適化され、葉緑体の恒常性が維持される (中パネル)。*BPG4* 欠損植物体においては、*BPG4* 欠損により *GLK* 転写活性化能が不必要に促進された結果、*PhANGs* 発現の過剰活性化、および光合成装置の余剰形成が誘発され、光エネルギーの過剰吸収による ROS 発生と光阻害が引き起こされる (左パネル)。*BPG4* 高発現植物体においては、多量の *BPG4* タンパク質が *GLK* 転写活性化能を強く阻害し、*PhANGs* 発現低下とそれに伴う葉緑体の発達抑制が発生する。*BPG4* によるこの葉緑体発達抑制は、強光条件下で ROS 発生を抑え、光阻害を回避することにより、効果的で健全な光合成の維持に寄与すると考えられる (右パネル)。

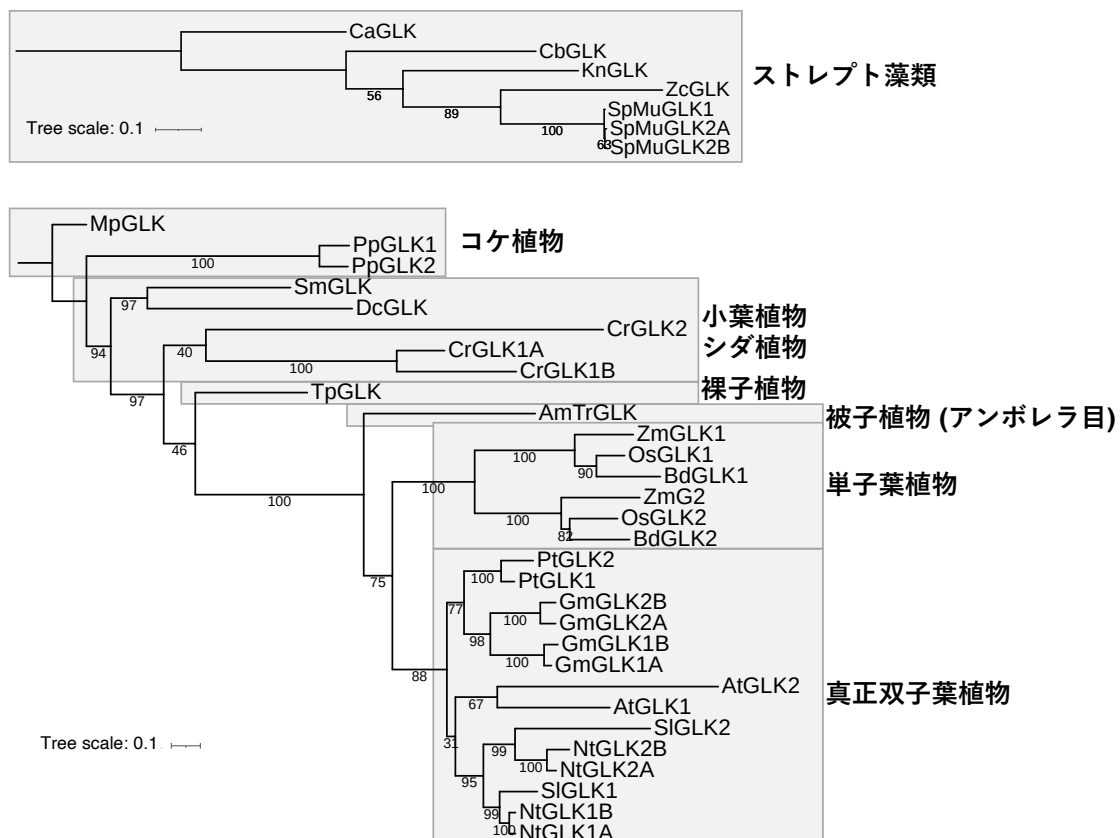


図 1-18. GLK ファミリーの分子系統樹

一部のストレプト藻類および陸上植物における GLK オルソログの分子系統樹。ストレプト藻類と陸上植物においては、アミノ酸の置換モデルが異なると予測されたため、分離して分子系統樹を作成した。略称は図 1-2 と同様に示す。各枝の値は Bootstrap value を示す。分子系統樹の作成に使用したアミノ酸配列の Accession number については補足表 1-1 に示した。

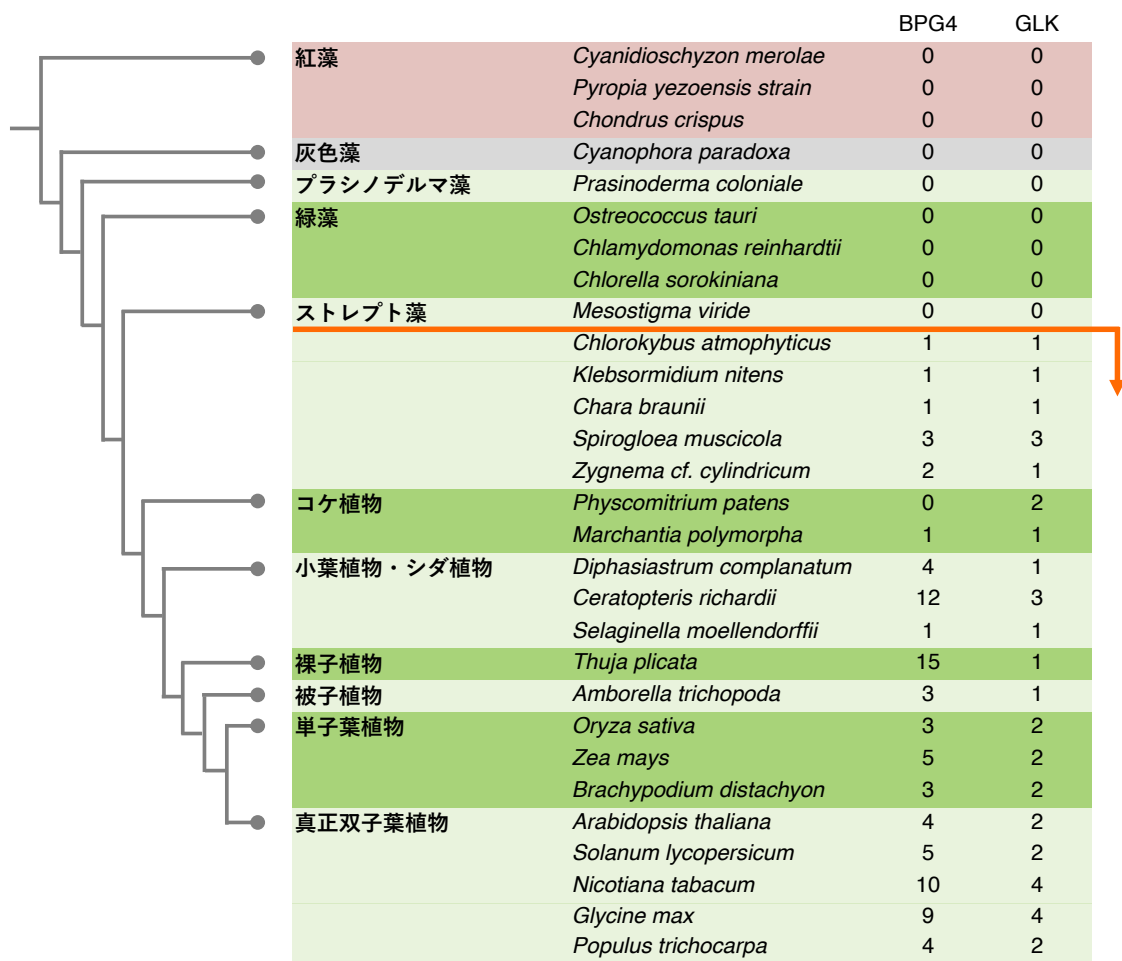


図 1-19. BPG4 ファミリーと GLK ファミリーの進化的保存性の比較

主な光合成生物の系統樹と各生物種における BPG4 ファミリーおよび GLK ファミリーの遺伝子数。

## 材料と方法

### 植物体と栽培条件

シロイヌナズナの Columbia-0 (Col-0) と Wassilewskija (Ws) を野生型植物 (WT) として用いた (特に記載がない場合は、Col-0 を野生型植物として用いた)。 *bpg4-1* (CS927130)、 *bpg4-2* (CS391584)、 *35S:GLK1-GFP/glk1glk2* (CS2107720)、 *35S:GLK2-GFP* (CS71752) は ABRC から購入した。 *det2*、 *bri1-5*、 *bin2-1*、 *bes1-D*、 *gsk3 quadruple*、 *BRI1-OX* および *glk1glk2* は先行研究において報告されている株を使用した (Li et al., 1996; Noguchi et al., 1999; Friedrichsen et al., 2000; Li et al., 2001; Fitter et al., 2002; Yin et al., 2002; Kondo et al., 2014)。 *BES1pro:BES1-GFP* は、Dr. Ana I Caño-Delgado より分譲していただいた (Vilarrasa-Blasi et al., 2014)。 *GLK1-OX* は稲葉丈人博士より分譲していただいた (Tokumaru et al., 2017)。

種子を、Seed solution [ 70% (v/v) EtOH, 0.5% Triton X-100 ] により 20–30 分滅菌したのち、100% エタノールで 1 分滅菌した。1/2 希釈のムラシゲ&スークグ (MS) (Duchefa, Haarlem, The Netherlands)、0.8% phytoagar (Duchefa) および 1.5% スクロースから構成される培地で発芽させた。実験に応じて、1/2MS 培地から土壌に移植した。植物は、白色光条件下 [長日条件 (16 時間明期/8 時間暗期)] もしくは、暗黒条件下で、22°Cにおいて生育させた。

### \*BPG4-FOX 植物体のスクリーニング

約 10,000 株のシロイヌナズナ FOX ライン (Ichikawa et al., 2006) を、1μM Brz を添加した 1/2MS 培地で生育させた。明所条件下で 9 日間生育させた後、子葉の緑色が WT よりも薄い植物を同定した。スクリーニングされた植物のクロロフィル含量を測定し、*CaMV 35S* プロモーターと NOS ターミネーターの特異的プライマーを用いた PCR により、変異体に挿入されている全長 cDNA を同定した。使用したプライマー配列を補足表 1-2 に示す。

\*本学位論文の根拠論文においては *bpg4-1D* として命名されているが、遺伝学上の適切な命名法に基づき本学位論文においては当該植物体を *BPG4-FOX* と呼称することとした。

### シロイヌナズナ形質転換植物体の作出

#### ・ *BPG4-OX (35Spro:BPG4)*

*BPG4* の全長 CDS をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) により *CaMV 35S* プロモーターを含むバイナリーベクター pGWB2 (Nakagawa et al., 2007) (<http://shimane-u.org/nakagawa/gbv.htm>) にクローニングした。得られたベクターをアグロバクテリウムに形質転換し、floral-dip 法 (Clough and Bent, 1998) によりシロイヌナズナ Col-0 に形質転換した。得られた植物体は、25 mg/L カナマイシンを含む 1/2MS 培地によって選抜した。この植物体の作出は、阿部晋氏によって行われた。

・ 35Spro:BPG4-GFP

*BPG4* のストップコドンで欠損した全長 CDS をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) により *CaMV35S* プロモーターおよび GFP を含むバイナリーベクター pGWB5 (Nakagawa et al., 2007) にクローニングした。作成したベクターを用いて、*BPG4-OX* と同様に形質転換体を作成した。この植物体の作出は、阿部晋氏によって行われた。

・ BPG4pro:GUS

*BPG4* のプロモーター領域と第一エクソンを含む 2.1 kb の領域をシロイヌナズナ Col-0 のゲノムから増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) により GUS を含むバイナリーベクター pGWB3 (Nakagawa et al., 2007) にクローニングした。作成したベクターを用いて、*BPG4-OX* と同様に形質転換体を作成した。この植物体の作出は、丸上萌々氏によって行われた。

・ *bpg4glk1glk2*, *BPG4-OX GLK1-OX*, *bpg4-1 GLK1-OX*

*bpg4-1* と *glk1glk2* を交配させることにより、*bpg4glk1glk2* を作出した。*BPG4-OX-2* と *GLK1-OX* を交配させることにより、*BPG4-OX GLK1-OX* を作出した。*bpg4-1* と *GLK1-OX* を交配させることにより、*bpg4-1 GLK1-OX* を作出した。

形質転換体の作出に使用したプライマー配列を補足表 1-3 に示す。

### 新鮮重あたりの内生クロロフィル含量の定量

植物体の地上部を、BEADS CRUSHER  $\mu$ T-01 (TAITEC, Japan) を用いて液体窒素中でホモジナイズし、80% (v/v) アセトン 0.5–1 mL に加え、暗所で氷上 15 分間インキュベートした後、4°C、12000 rpm で 15 分間遠心した。遠心した上清の 646.6 nm、663.6 nm、750 nm における吸光度を吸光度計 (SHIMADZU, Japan) で測定した。上清におけるクロロフィル *a* とクロロフィル *b* 濃度は、先行研究に基づき、以下の式に則り計算した (Porra et al., 1989)。

$$\text{クロロフィル } a \text{ } [\mu\text{g Chl} / \text{ml}] = 12.25 * (A_{663.6} - A_{750}) - 2.55 * (A_{646.6} - A_{750})$$

$$\text{クロロフィル } b \text{ } [\mu\text{g Chl} / \text{ml}] = 20.31 * (A_{646.6} - A_{750}) - 4.91 * (A_{663.6} - A_{750})$$

$$\text{クロロフィル } a + b \text{ } [\mu\text{g Chl} / \text{ml}] = 17.76 * (A_{646.6} - A_{750}) + 7.34 * (A_{663.6} - A_{750})$$

### 花成時期の測定

花成時期は、先行研究 (Ohto et al., 2001; Endo et al., 2013) と同様にして、主花茎の長さが 1 cm 以上に伸びるまでにかかった日数と最初の花が開花した時点における長さ 1 cm 以上のロゼット葉の枚数を数えることにより測定した。

### Real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いて植物体から total RNA を抽出し、抽出した RNA を鋳型に PrimeScript RT reagent kit (Takara, Japan) を用いて cDNA を合成した。RT-qPCR は、TB Green Premix Extaq II (Takara, Japan) を用いて、Thermal Cycler Dice (Takara, Japan) を用いて行った。各遺伝子の特異的プライマー配列を補足表 1-4 に示す。

### 透過型電子顕微鏡 (TEM) による葉緑体の観察

サンプルは 0.05 M カコジル酸緩衝液 (pH7.4) 中 2%パラホルムアルデヒド (PFA) と 2%グルタルアルデヒド (GA) を用いて 4°Cで一晩固定した。この固定後、サンプルを 0.05 M カコジル酸緩衝液で 30 分ずつ 3 回洗浄し、0.05 M カコジル酸緩衝液中 2%四酸化オスミウム (OsO<sub>4</sub>) で 4°C、3 時間固定した。50%および 70%溶液での脱水は 4°Cで各 30 分間、90%溶液での脱水は室温で 30 分間、無水エタノールでの脱水は室温で各 30 分間、それぞれ 3 回行った。これらの脱水工程の後、試料を無水エタノール中で一晩、室温で脱水した。試料をプロピレンオキシド (PO) に 2 回、それぞれ 30 分間浸漬した後、PO と Quetol-651 樹脂 (Nisshin EM, Tokyo, Japan) の 50 対 50 混合物に 3 時間浸し、さらに 100%樹脂に 3 時間移した。その後、サンプルを 60°Cで 48 時間重合させた。重合した樹脂の超薄切片 (80 nm) を、ダイヤモンドナイフを装備したウルトラミクロトーム (Ultracut UCT; Leica, Vienna, Austria) を用いて作成し、切片を銅グリッドにマウントした。その後、切片を 2%酢酸ウラニルにより 15 分間室温で染色し、蒸留水で洗浄した後、鉛染色液 (Sigma Aldrich, Tokyo, Japan) により 3 分間室温で 2 回目の染色を行った。観察および画像化に関しては、透過型電子顕微鏡 (JEM-1400Plus; JEOL, Tokyo, Japan) を用い、加速電圧 100 kV でグリッドを観察した。電荷結合素子 (CCD) カメラ (EM-14830RUBY2; JEOL, Tokyo, Japan) を用いてデジタル画像 (3296 x 2472 pixels) を収集した。この実験は株式会社東海電子顕微鏡解析に業務委託することにより行った。

### リコンビナントタンパク質の作成

#### ・ MBP-BES1 DBD

BES1 の DBD を pMAL-c2x にクローニングしたベクターは、先行研究 (Nosaki et al., 2018) により作成されていたものを宮川拓哉博士および野崎翔平博士より分譲していただいた。分譲していただいたベクターを Rosetta(DE3) に形質転換した。0.1 mM イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) で 18°Cで一晩振盪培養し、タンパク質の発現を誘導した。培養した菌体を遠心により回収し、Amylose binding buffer (20 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 5%Glycerol, 1 mM DTT, P.I. cocktails) に懸濁し、ソニケーションにより菌体を破碎した。Amylose resin (NEB, Ipswich, MA, USA) と Amylose Elution buffer (20 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT, 30 mM maltose, P.I. cocktails) を用いて、MBP-BES1 DBD を精製した。

#### ・ MBP-BPG4

*BPG4* の全長 CDS をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、In-Fusion HD クローニングシステム (Takara) により pMAL-c4x ベクター (NEB) にクローニングした。作成したベクターを BL21(DE3)pLysS に形質転換した。0.4 mM IPTG で 37°C、4 時間振盪培養し、タンパク質の発現を誘導した。培養した菌体を遠心により回収し、Amylose binding buffer に懸濁し、ソニケーションにより菌体を破碎した。Amylose resin (NEB) と Amylose Elution buffer を用いて、MBP-BPG4 を精製した。

#### ・ GST-GLK1

GST-GLK1 は先行研究に基づき発現・精製した (Ahmad et al., 2019)。GLK1 の全長 CDS をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、In-Fusion HD クローニングシステム (Takara) により pGEX-6P-3 ベクターにクローニングした。作成したベクターを Rosetta(DE3) に形質転換した。0.5 mM IPTG を加えて 16°Cで一晩振盪培養し、タンパク質の発現を誘導した。培養した菌体を遠心により回収し、GST binding buffer (1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 1% Triton X-100, 1xPBS, P.I. cocktails) に懸濁し、ソニケーションにより菌体を破碎した。Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) と GST Elution buffer [50 mM Tris-HCl (pH9.6), 150 mM NaCl, 25 mM GSH, pH 8.5] を用いて、GST-GLK1 を精製した。

GST-GLK1 と MBP-BPG4 は、Vivaspin 20 Centrifugal Concentrator (Sartorius, Göttingen, Germany) を用いて濃縮・脱塩した。使用したプライマー配列を補足表 1-5 に示す。

#### 免疫ブロット解析 (Western blotting)

植物体サンプルを液体窒素中で粉碎し、Laemmli 緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM dithiothreitol (DTT), 2% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% (w/v) bromophenol blue, and 10% (w/v) glycerol] を加え、95°Cで 5 分静置し、遠心して上清を得た。得られたタンパク質抽出液を SDS-PAGE (7.5–15%アクリルアミドゲル) で分離した。電気泳動後、タンパク質を Hybond ECL ニトロセルロースメンブレン (Amersham, UK) に転写した。転写したメンブレンを 1% Ponceau S に 5 分間振盪し、転写を確認した。5% 脱脂乳 (Morinaga, Japan)を含む TBS (20 mM Tris, 0.137 M NaCl, pH 7.4) を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、メンブレンを抗体と共に Western Blot Immuno Booster Solution 1 (Takara) を用いて 4°Cで一晩インキュベートした。室温で 1% 脱脂乳 (Morinaga,) を含む TBS で洗浄後、メンブレンを抗体と共に Western Blot Immuno Booster Solution 2(Takara) を用いて室温で 1 時間インキュベートした。ECL Immobilon Western HRP substrate (Millipore, USA) と LAS-4000 mini デジタルイメージングシステム (Fuji Film, Japan) を用いて化学発光によりシグナルを検出した。

BPG4 に対するウサギポリクローナル抗体は、MBP-BPG4 融合タンパク質を抗原として用いることにより作製した。作製した anti-BPG4 抗体の性能は WT、*bpg4-1*、*BPG4-OX-2* を

用いて確認した。anti-BPG4 抗体は 1:30,000 希釈して、1:90,000 希釈した anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Promega, Madison, WI, USA) とともに使用した。anti-ACTIN 抗体 (0869100-CF, MP Biomedical, Santa Ana, USA)は 1:20,000 希釈して、1:60,000 希釈した anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Promega) とともに使用した。

### 脱リン酸化処理

BPG4 および BIL1/BZR1-GFP のリン酸化状態を分析するために、植物体サンプル (250 mg) を液体窒素中で粉碎し、0.5 mL の氷冷  $\lambda$ PP 抽出バッファー[1x NEB Buffer for Protein Metallo Phosphatases (PMP), 2.5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1% (w/w) NP-40 and protease inhibitor cocktail (Roche)]を加えて乳鉢と乳棒で粉碎して、タンパク質を抽出した。抽出液を二重層のミラクロスに通した後、フロースルーを一部に (50 $\mu$ l) を 400 ユニットの  $\lambda$ PP (NEB, P0753) を加えた。コントロールには何も加えなかった。30°C、30 分間インキュベートし、5x Laemmli バッファーで 95°C、5 分間煮沸した。免疫ブロット解析は上述と同様にして行った。

### Chromatin Immunoprecipitation-qPCR (ChIP-qPCR)

DNA の免疫沈降は、先行研究と同様に行った(Kim et al., 2017)。明所で 15 日間生育した *BES1pro:BES1-GFP* および WT を用いて、anti-GFP 抗体 (Molecular Probes) を用いた ChIP 実験を行った。免疫沈降した DNA は RT-qPCR と同様の手順で qPCR を行った。ChIP サンプルの反応閾値周期を自身の INPUT の希釈値と比較することで、INPUT から回収された DNA の絶対分率 (%input DNA) を推定し、WT の値を 1 とした。使用したプライマー配列を補足表 1-6 に示す。本実験は、丸上萌々氏と Jong-Myong Kim 博士によって行われた。

### プロトプラストにおける一過性ルシフェラーゼアッセイ

*HEMA1* (1.7kb)、*GUN4* (1.5kb)、*CAO* (1.2kb)、*BPG4* (2.5kb) のプロモーター領域の DNA 断片を増幅し、In-Fusion HD クローニングシステム (Takara) を用いて光田信孝博士より入手した pGLHNew\_RLH ベクターにクローニングした。*BPG4* プロモーター領域の G-box (CACGTG) 配列は、PrimeSTAR Max (Takara) を用いた Inverse PCR により AAAAAA に変異させた。*BES1*、*VP64*、*BPG4*、および *GLK1* の全長 CDS を pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、Gateway 法により光田信孝博士から入手したバイナリーゲートウェイ発現ベクター pDEST-35SHSP にクローニングした。35S:*BES1-VP64* エフェクターは、*VP64* の DNA 断片を増幅し、In-Fusion HD クローニングシステム (Takara) を用いて 35S:*BES1* エフェクターにクローニングした。35S:*GFP* エフェクターは光田信孝博士から入手した。使用したプライマー配列を補足表 1-7 に示す。

3-4週間土で生育させた WT のロゼット葉の表皮をメンディングテープで剥がし、Enzyme Solution [400 mM Mannitol, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 mM KCl, 20 mM MES, 1 % (w/v) Cellulase R10

(Yakult, Japan), 0.25 % (w/v) Macerozyme R10 (Yakult), 5 mM  $\beta$ -ME) に浸し、暗所で 2 時間振盪した。ミラクロスで夾雑物を除去し、スクロース密度勾配法によって無傷プロトプラストを単離した。プロトプラストを MMg Solution (400 mM Mannitol, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM MES) に懸濁し、PEG- $\text{Ca}^{2+}$  Solution (40 % wt/vol PEG4000, 200 mM Mannitol, 100 mM  $\text{CaCl}_2$ ) と混合することにより、ベクターをプロトプラストに導入した。暗所 22°Cにおいて一晩静置し、Pickagene<sup>®</sup> Dual Sea Pansy Luminescence Kit (Toyo Bnet, Tokyo, Japan) と SpectraMax i3x または SpectraMax iD5 (MOLECULAR DEVICES, USA)を用いて LUC および REN を検出した。

### Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)

BES1 DBD の *BPG4* プロモーター領域への結合を解析するための実験は、先行研究 (Nosaki et al., 2018) と同様に実施した。*BPG4* プロモーター領域における G-box (CACGTG) とその前後配列 12 塩基を用いた。FAM 標識した 30mer 二本鎖 DNA (5pmol) と poly (dI-dC) (20  $\mu\text{g}$ ) を MBP-BES1 DBD と EMSA reaction buffer [20mM Tris-HCl (pH7.5), 125mM KCl, 0.5mM EDTA, 2.5%グリセロール, 10mM EDTA] に混合し、25°Cで 20 分間インキュベートした。反応液を 10% PAGE ゲルにロードし、ChemiDoc Touch<sup>™</sup> Imaging System (Bio-Rad, USA) を用いて蛍光を検出した。

GLK1 の *CAO* プロモーター領域への結合を解析するための実験においては、先行研究 (Zhang et al., 2021) で報告されていた *CAO* プロモーター領域中における GLK 結合配列を用いた。GST-GLK1 を 19  $\mu\text{L}$  の結合バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 10 mM EDTA, 2.5% glycerol, 1 mM DTT, 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  poly(dI-dC)] 中で、氷上で 5 分間インキュベートした後、25°Cで 25 分間 MBP-BPG4 または MBP-tag とインキュベートした。さらに、1  $\mu\text{L}$  の FAM 標識 30mer 二本鎖 DNA (5 pmol) を加えて、氷上で 30 分間インキュベートした。反応液を 1x TAE バッファーで 1%アガロースゲルを用いて電気泳動により分離した。使用した DNA 配列を補足表 1-8 に示す。

### 蛍光顕微鏡観察

35*Spro:BPG4-GFP* における GFP 蛍光を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 [LSM700 (Zeiss, Jena, Germany)] で観察した。本実験は阿部晋氏によって行われた。

### 免疫蛍光染色

サンプルを FAA solution [3.7%ホルムアルデヒド (メタノールフリー), 5% 氷酢酸, 50%エタノール, pH7.4] で固定した。組織切片はキシレンで脱パラフィンし、エタノールと PBS で再水和した。G-Block (Genostaff, Tokyo, Japan) を用いて 10 分間室温でブロッキングし、TBS を用いて 5 分間室温で 3 回リンスした。次に、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-BPG4 ウサギポリクローナル抗体または normal rabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark, #X0936)を用いて 4°Cで一晩標識し、TBS-T (TBS with 0.1% Tween20) を用いて室温で 5 分間 2 回リンスし、さらに TBS でリンスした。

Donkey anti-rabbit IgG secondary antibody, Alexa Fluor™ Plus 647 (Invitrogen #A32795, 1:200 希釈) を添加し、室温で 60 分間標識し、核を DAPI (Dojindo, Kumamoto, Japan) で染色した。組織切片を TBS を用いて 5 分間室温で 3 回リンスし、ProLong Gold (Invitrogen #P36934) で接着した。サンプルは ECLIPSE Ni microscope (Nikon, Tokyo, Japan) 顕微鏡で観察した。本実験はジェノスタッフ株式会社への業務委託により行った。

### Yeast two-hybrid (Y2H) 解析

*BPG4* の全長 CDS および *BPG4* のドメイン断片配列をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) に基づきバイナリーベクター pDEST32 (Invitrogen) にクローニングした。*BIN2*、*GLK1*、*GLK2*、*HY5*、および *COP1* の全長 CDS、ならびに *GLK1* のドメイン断片配列をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) に基づきバイナリーベクター pDEST22 (Invitrogen) にクローニングした。作成したベクターを用いて、先行研究 (Shimada et al., 2015) と同様にして実験を行った。ベクターを yeast strain Y187 (Clontech, USA) に形質転換し、-LW もしくは -LWH 培地で生育させた。使用した DNA 配列を補足表 1-9 に示す。ベクターの作成および実験は、阿部晋氏と大橋隆生氏によって行われた。

### Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析

*BPG4*、*GLK1*、*GLK2* の全長 CDS をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) に基づきバイナリーベクター pB4nYGW と pB4cYGW にクローニングした。得られたベクターを、先行研究 (Ueda et al., 2004) と同様に前述のようにアグロバクテリウムを用いてシロイヌナズナ培養細胞に感染させた。GFP 蛍光は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 [LSM700 (Zeiss, Jena, Germany)] で観察した。使用したプライマー配列を補足表 1-9 に示す。本実験は、阿部晋氏によって行われた。

### Coimmunoprecipitation (CoIP) 解析

*GLK1*、*GLK2* の全長 CDS をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) に基づきバイナリーベクター pGWB421 にクローニングした。作成したベクターおよび前述の *35S::BPG4-GFP* ベクターをアグロバクテリウムに形質転換した。ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) における一過的発現は先行研究 (Kondo et al., 2014) と同様に行った。

タバコの葉にアグロバクテリウムを感染させてから 46 時間後に葉を回収し、0.5 g の植物体を液体窒素で凍結した。植物体サンプルを乳鉢と乳棒で粉碎し、1 mL の氷冷 Extraction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% (w/w) NP-40 and protease

inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)] と共にホモジナイズした。このホモジナイズ液を 11,000rpm、4°C で 5 分間遠心し、得られた上清をさらに 11,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清の一部をインプットとして回収し、残りの上清を GFP-Trap A (Chromo Tek, Planegg, Germany) とともに 4°C で 2 時間インキュベートした。インキュベートしたサンプルを Extraction buffer で 3 回洗浄した後、洗浄したビーズに Laemmli buffer [100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM DTT, 4% (w/v) SDS, 0.2% (w/v) bromophenol blue, and 10% (w/v) glycerol] を加えて 95°C で 5 分間静置し、タンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液は、anti-Myc 抗体 (Sigma-Aldrich) と anti-GFP 抗体 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) を用いて、上述と同様にしてイムノブロット解析した。本実験は、丸上萌々氏によって行われた。

シロイヌナズナの CoIP も上記と同様に行い、抽出したタンパク質は anti-BPG4 抗体と anti-GFP 抗体 (Molecular Probes) を用いたイムノブロット解析で検出した。使用したプライマー配列を補足表 1-9 に示す。

### **β-glucuronidase (GUS) 染色**

GUS 発現の組織化学的検出には *BPG4pro::GUS* を用いた。植物体を 80% アセトンで固定した後、先行研究 (Ito and Fukuda, 2002) と同様に、GUS 染色 solution {0.5 mg/mL X-Gluc, 0.5 mM  $K_4[(CN)_6]$ , 0.5 mM  $K_3[(CN)_6]$ , 1 mM EDTA, 50 mM リン酸緩衝液 [pH 7.0]} に浸し、37°C で一晩染色した後、脱色液 (抱水クロラール 8g, グリセロール 1 mL, milliQ 2 mL) で脱色した。本実験は、丸上萌々氏によって行われた。

### **活性酸素分子種 (ROS) の組織化学染色**

DAB 染色は、先行研究 (Fryer et al., 2003; Yang et al., 2022) と同様の手法で行った。植物体を通常光 ( $90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、長日条件) 条件において 1/2MS 培地で 7 日間生育させた後、DAB solution [5 mg/ml DAB, pH 3.8] に暗所で 12 時間浸した。植物体を 1/2MS 培地に戻した後、強光条件 ( $1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に 2 時間移した。染色した植物体を脱色液 [60% (v/v) ethanol, 20% (v/v) acetic acid, 20% (v/v) glycerol] に浸し、100°C、5 分間静置した。漂白した植物体を保存液 [80% (v/v) ethanol, 20% (v/v) glycerol] に移し、実体顕微鏡で観察した。

DAB 染色は、先行研究 (Ramel et al., 2009) と同様の手法で行った。植物体を通常光 ( $90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、長日条件) 条件において 1/2MS 培地で 8 日間生育させた後、強光条件 ( $800 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に 12 時間または 24 時間移した。強光処理した植物体を NBT solution [ $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  NBT, 10 mM potassium phosphate buffer, 10 mM  $\text{NaN}_3$ ] に浸し、脱気により NBT solution を植物体を浸潤させ、暗所で 2 時間静置した。染色した植物体を DAB 染色と同様に脱色し、観察した。

### 内在性 O<sub>2</sub><sup>-</sup>蓄積量の定量的解析

内在性 O<sub>2</sub><sup>-</sup>蓄積量の定量は、先行研究 (Zhang et al., 2010) と同様の手法で行った。植物体サンプル (15~18 株もしくは 50~60mg) を、液体窒素中で粉砕し、氷冷 Extraction buffer [195 μM phosphate buffer (pH 7.8), 10 μM hydroxylammonium chloride, 100 μM EDTA-Na<sub>2</sub>]を 200 μL 加えてホモジナイズした。ホモジナイズ液を 5,000 g、4°C で 5 分遠心した後、上清 100 μL を新しい 1.5 mL チューブに移し、氷冷 17 mM sulfanilamide / 30% 酢酸 100 μl と氷冷 7 mM naphthalene diamine dihydrochloride 100 μl を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、300 μL のジエチルエーテルを加え、反応液をよく混合した後、5,000 g、常温で 5 分遠心した。下層に存在する水相の A<sub>540</sub> を分光光度計で測定した。0~5 μM の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の検量線 ( $r^2 = 0.9998$ ) を作成し、反応式 ( $2 \text{O}_2^- + \text{H}^+ \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NO}_2^-$ ) に基づいて、検量線から式  $[\text{O}_2^-] = 2[\text{NO}_2^-] (\mu\text{M})$  に従って O<sub>2</sub><sup>-</sup> 濃度を計算した。

### 光合成活性の測定

生育光条件 (90 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、16 時間明期/8 時間暗期サイクル) で 11 日間生育した植物を、高照度条件 (900 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、連続光) に 1、2、4、8、12、24 時間移した。20 時間の暗馴化の後、FluorCam システム (FluorCam 800MF; Photon Systems Instruments) を用いて Fv/Fm を測定した。

### 分子系統樹の作成

TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) から得た AtBPG4 (AT3G55240) のアミノ酸配列に基づいて、以下のゲノム情報を用いて BPG4 オルドログ候補を BLASTP により検索した。

- NCBI reference protein (refseq protein)

*Nicotiana tabacum*、*Selaginella moellendorffii*

- Phytozome 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)

*Marchantia polymorpha* v3.1、*Physcomitrium patens* v3.3、*Ceratopteris richardii* v2.1、*Diplazium complanatum* v3.1、*Thuja plicata* v3.1、*Amborella trichopoda* var. *SantaCruz\_75* HAP1 v2.1、*Solanum lycopersicum* ITAG4.0、*Glycine max* Wm82.a4.v1、*Populus trichocarpa* v4.1、*Arabidopsis thaliana* Araport11、*Oryza sativa* v7.0、*Brachypodium distachyon* v3.2、*Zea mays* RefGen\_V4

- PhycoCosm (<https://phycocosm.jgi.doe.gov/phycocosm/home>)

*Cyanidioschyzon merolae* Soos、*Neopyropia yezoensis* strain:U-51、*Chondrus crispus* Stackhouse、*Cyanophora paradoxa* CCMP329、*Prasinoderma coloniale* CCMP1413、*Ostreococcus tauri* RCC4221 v3.0、*Chlamydomonas reinhardtii* CC-4532 v6.1、*Chlorella sorokiniana* DOE1412、*Mesostigma viride* CCAC 1140、*Chlorokybus atmophyticus* CCAC 0220、*Klebsormidium nitens* NIES-2285、*Chara braunii* S276、*Spirogloea muscicola* CCAC 0214、*Zygnema cf. cylindricum* SAG 698-1a

e-value、アミノ酸の長さ、類似性 (Similarity)、同一性 (Identity)、予測ドメイン構造に基づいて、BPG4 相同性因子を決定した。*Thuja plicata* と *Ceratopteris richardii* においては重複遺伝子の数が多かったため、CD-HIT により BPG4 相同性因子をクラスター化した (Identity は 0.7 とした) (Fu et al., 2012)。BPG4 相同性因子のアミノ酸配列は、G-INS-1 を用いた MAFFT (Kato et al., 2019) によってアラインメントした (Unalignlevel を 0.8 に設定)。MAFFT によって生成されたアラインメントデータは ClipKIT (Steenwyk et al., 2020) によってトリミングし、系統樹は IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016) によって生成した。IQ-TREE によって得られたツリーファイルを iTOL (Letunic and Bork, 2021) を用いて修正した。陸上植物と藻類においては、アミノ酸置換モデルが異なると予測されたため、陸上植物と藻類に分けて分子系統樹を作成した。分子系統樹の作成に使用したアミノ酸配列の Accession number については補足表 1-1 に示した。

### アミノ酸配列の比較

各生物種において、作成した分子系統樹で AtBPG4 に最も進化的に近い因子を選び、アミノ酸配列を MAFFT (Kato et al., 2019) によってアラインメントした (Unalignlevel を 0.8 に設定)。AtBPG4 における A\_thal\_3526 に該当する領域 (10–66 残基) のみを抜き出し、多重配列比較の結果を ESPript 3.0 (<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) (Gouet et al., 1999) を用いて出力した。

### 統計処理

全ての図の作成と統計解析は R 環境で実行した。3 つ以上のサンプルにおける多重比較においては、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行ったのちに Tukey-Kramer の検定を用いた。2 群間比較においては、F 検定を行った後に両側 Welch の *t* 検定または両側 Student の *t* 検定を行った。サンプルサイズの計算は行わず、予備データと先行研究に基づいて設定した。分析から除外したデータはない。植物材料は、植物プールから無作為に選択した。

### Accession number

この章で研究したシロイヌナズナ遺伝子の配列データは、The Arabidopsis Information Resource ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) に以下のアクセッション番号で示されている：  
*BPG4/RPGE2/PEL1* (AT3G55240)、*BGH1/RPGE3* (AT3G28990)、*BGH2/RPGE1* (AT5G02580)、*BGH3/RPGE4* (AT1G10657)、*ACT2* (AT3G18780)、*GAPDH* (AT1G13440)、*eIF4A* (AT3G13920)、*HEMA1* (AT1G58290)、*GUN4* (AT3G59440)、*CHLH* (AT5G13630)、*PORB* (AT4G27440)、*CAO* (AT1G44446)、*CHLG* (AT3G51820)、*HEMG1* (AT4G01690)、*DVR/BPG1* (AT5G18660)、*LHCB1.2* (AT1G29910)、*LHCB6* (AT1G15820)、*LHCA1* (AT3G54890)、*PAO* (AT3G44880)、*rbcs* (AT1G67090)、*psbA* (ATCG00020)、*HY5* (AT5G11260)、*COPI* (AT2G32950)、*GLK1* (AT2G20570)、*GLK2* (AT5G44190)、*DET2* (AT2G38050)、*DWF4* (AT3G50660)、*BRI1* (AT4G39400)、*BIN2*

(AT4G18710)、*BIL1* (AT2G30980)、*BIL2* (AT2G30980)、*ATSK13* (AT5G14640)、*BIL1/BZR1* (AT1G75080)、および *BES1* (AT1G19350)。

補足表 1-1. 分子系統樹作成に用いた **BPG4** オルソログおよび **GLK** オルソログの  
**Accession number**  
**BPG4** オルソログ

| Species                        | Gene name         | NCBI (refseq_protein)                                                | JGI (Phytozome 13) | Identity (%)<br>vs AtBPG4 | Remarks                                                      |
|--------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>Arabidopsis thaliana</i>    | BPG4 (RPGE2/PEL1) | NP_191084.1                                                          | At3g55240.1        | 100.00                    |                                                              |
|                                | BGH1 (RPGE3/PEL3) | NP_189541.1                                                          | At3g28990.1        | 64.58                     |                                                              |
|                                | BGH2 (RPGE1/PEL2) | NP_568103.3                                                          | At5g02580.1        | 49.52                     |                                                              |
|                                | BGH3 (RPGE4/PEL4) | NP_001077507.1                                                       | At1g10657.2        | 26.15                     |                                                              |
| <i>Solanum lycopersicum</i>    | SIBPG4A           |                                                                      | Solyc04g010285.1.1 | 59.62                     |                                                              |
|                                | SIBPG4B           | XP_010321371.1<br>XP_010321370.1                                     | Solyc05g054750.3.1 | 47.22                     |                                                              |
|                                | SIBGH2A           | XP_004246743.1                                                       | Solyc09g005730.4.1 | 36.84                     |                                                              |
|                                | SIBGH2B           | XP_004249525.1                                                       | Solyc10g084600.2.1 | 35.51                     |                                                              |
|                                | SIBGH3            | XP_004238655.1                                                       | Solyc05g005230.3.1 | 25.00                     |                                                              |
| <i>Nicotiana tabacum</i>       | NtBPG4A1          | XP_016434036.1<br>XP_016434037.1                                     |                    | 60.71                     |                                                              |
|                                | NtBPG4A2          | XP_016433381.1                                                       |                    | 58.93                     |                                                              |
|                                | NtBPG4B1          | XP_016501479.1                                                       |                    | 58.25                     |                                                              |
|                                | NtBPG4B2          | XP_016452742.1<br>XP_016452743.1                                     |                    | 55.66                     |                                                              |
|                                | NtBGH2A1          | XP_016475081.1                                                       |                    | 41.27                     |                                                              |
|                                | NtBGH2A2          | XP_016497002.1                                                       |                    | 32.89                     |                                                              |
|                                | NtBGH2B1          | XP_016512117.1                                                       |                    | 37.88                     |                                                              |
|                                | NtBGH2B2          | XP_016504634.1                                                       |                    | 35.61                     |                                                              |
|                                | NtBGH3A           | XP_016476191.1                                                       |                    | 26.15                     |                                                              |
|                                | NtBGH3B           | XP_016511951.1<br>XP_016511952.1                                     |                    | 25.40                     |                                                              |
|                                | GmBPG4A1          | XP_025980937.1                                                       | Glyma.02G095700.2  | 78.57                     |                                                              |
|                                | GmBPG4A2          | XP_003551816.1                                                       | Glyma.18G285700.1  | 72.73                     |                                                              |
| <i>Glycine max</i>             | GmBPG4B1          | XP_003555622.1                                                       | Glyma.20G240100.1  | 70.59                     |                                                              |
|                                | GmBPG4B2          | XP_006589753.1                                                       | Glyma.10G291000.1  | 51.22                     |                                                              |
|                                | GmBGH2A           | XP_003542470.1                                                       | Glyma.13G133300.1  | 52.34                     |                                                              |
|                                | GmBGH2B1          | XP_003521351.1                                                       | Glyma.03G173700.1  | 52.83                     |                                                              |
|                                | GmBGH2B2          | XP_003554334.1                                                       | Glyma.19G174600.1  | 52.83                     |                                                              |
|                                | GmBGH3A1          | XP_003552028.1<br>XP_014625827.1                                     | Glyma.18G140500.1  | 29.77                     |                                                              |
|                                | GmBGH3A2          | NP_001238177.1                                                       | Glyma.08G285100.1  | 29.01                     | The residue at 67 position is different between NCBI and JGI |
|                                | PtBPG4            | XP_024465663.1<br>XP_006378740.1                                     | Potri.010G211500.1 | 67.96                     |                                                              |
|                                | PtBGH2            | XP_002308479.1                                                       | Potri.006G213500.1 | 48.65                     |                                                              |
|                                | PtBGH3A1          | XP_002312687.2                                                       | Potri.008G189100.2 | 30.77                     |                                                              |
| <i>Populus trichocarpa</i>     | PtBGH3A2          | XP_024466074.1                                                       | Potri.010G042300.6 | 28.35                     |                                                              |
|                                | OsBPG4A (DGP1B)   | XP_015638792.1                                                       | LOC_Os05g38680.1   | 53.21                     |                                                              |
|                                | OsBPG4B (DGP1)    | XP_015629123.1<br>XP_015629128.1                                     | LOC_Os01g62060.1   | 41.32                     |                                                              |
| <i>Oryza sativa</i>            | OsBGH2 (DGP1C)    | XP_015629400.1                                                       | LOC_Os03g17200.1   | 45.19                     |                                                              |
|                                | ZmBPG4A           | XP_008649715.1                                                       | Zm00001d038387     | 50.93                     |                                                              |
|                                | ZmBPG4B1          | XP_008657080.1<br>XP_008657081.1<br>XP_035817831.1<br>XP_035817830.1 | Zm00001d012431     | 36.59                     |                                                              |
| <i>Zea mays</i>                | ZmBPG4B2          | NP_001143287.1                                                       | Zm00001d042940     | 21.70                     |                                                              |
|                                | ZmBGH2A1          | NP_001150934.2                                                       | Zm00001d028675     | 43.40                     |                                                              |
|                                | ZmBGH2A2          | NP_001148858.1                                                       | Zm00001d047779     | 42.06                     |                                                              |
|                                | Bradi2g23060      | XP_003568285.1                                                       | Bradi2g23060       | 49.07                     |                                                              |
| <i>Brachypodium distachyon</i> | Bradi2g54400      | XP_003564568.1<br>XP_010232537.1                                     | Bradi2g54400       | 37.82                     |                                                              |
|                                | Bradi1g66280      | XP_003558209.1<br>XP_024316363.1                                     | Bradi1g66280       | 41.07                     |                                                              |
|                                | AmTrBPG4A         | XP_006844259.1                                                       | AmTrH1.08G064200   | 44.07                     | The residue at 27 position is different between NCBI and JGI |
| <i>Amborella trichopoda</i>    | AmTrBGH3A         | XP_011622263.1                                                       | AmTrH1.02G140600   | 30.47                     |                                                              |
|                                | AmTrBGH3B         | XP_006840678.1<br>XP_011622004.1                                     | AmTrH1.03G073000   | 30.43                     |                                                              |

(次頁に続く)

## (補足表 1-1 続き)

| Species                           | Gene name  | NCBI (refseq_protein) | JGI (Phytozome 13)    | Identity (%)<br>vs AtBPG4 | Remarks               |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| <i>Thuja plicata</i>              | TpBPG4A    |                       | Thupl.29380866s0007.1 | 34.68                     |                       |
|                                   |            |                       | Thupl.29380866s0001.1 |                           | clusterd to TpBPG4A   |
|                                   |            |                       | Thupl.29380866s0005.1 |                           | clusterd to TpBPG4A   |
|                                   |            |                       | Thupl.29380866s0002.1 |                           | clusterd to TpBPG4A   |
|                                   | TpBPG4B    |                       | Thupl.29380866s0004.1 |                           | clusterd to TpBPG4A   |
|                                   |            |                       | Thupl.29380866s0003.1 | 31.93                     |                       |
|                                   |            |                       | Thupl.29381588s0019.1 | 35.48                     |                       |
|                                   |            |                       | Thupl.29381163s0002.1 |                           | clusterd to TpBPG4C   |
|                                   | TpBPG4C    |                       | Thupl.29381163s0001.1 |                           | clusterd to TpBPG4C   |
|                                   |            |                       | Thupl.29379701s0004.1 | 25.00                     |                       |
|                                   |            |                       | Thupl.29379701s0002.1 |                           | clusterd to TpBPG4D   |
|                                   |            |                       | Thupl.29339150s0001.1 |                           | clusterd to TpBPG4D   |
| <i>Diphasiastrum complanatum</i>  | DcBPG4A1   |                       | Thupl.29379701s0001.1 |                           | clusterd to TpBPG4D   |
|                                   |            |                       | Thupl.29379701s0003.1 |                           | clusterd to TpBPG4D   |
|                                   |            |                       | Thupl.29380630s0001.1 |                           | clusterd to TpBPG4D   |
|                                   |            |                       | Thupl.29380630s0001.1 |                           | clusterd to TpBPG4D   |
| <i>Ceratopteris richardii</i>     | DcBPG4A2   |                       | Dicom.03G027100.1     | 25.90                     |                       |
|                                   |            |                       | Dicom.03G027000.1     | 25.18                     |                       |
|                                   |            |                       | Dicom.05G012100.1     | 25.36                     |                       |
|                                   |            |                       | Dicom.05G012800.1     | 25.36                     |                       |
|                                   | DcBPG4B1   |                       | Ceric.06G074400.1     | 23.94                     |                       |
|                                   |            |                       | Ceric.38G016300.1     | 27.08                     |                       |
|                                   |            |                       | Ceric.35G021800.1     | 24.68                     |                       |
|                                   |            |                       | Ceric.26G032800.1     | 24.34                     |                       |
|                                   | DcBPG4B2   |                       | Ceric.06G035800.1     | 24.05                     |                       |
|                                   |            |                       | Ceric.06G035700.1     |                           | clusterd to CrBPG4E   |
|                                   |            |                       | Ceric.06G035300.1     |                           | clusterd to CrBPG4E   |
|                                   |            |                       | Ceric.06G035500.1     |                           | clusterd to CrBPG4E   |
| <i>Selaginella moellendorffii</i> | CrBPG4A    |                       | Ceric.06G035900.1     |                           | clusterd to CrBPG4E   |
|                                   |            |                       | Ceric.06G035600.1     |                           | clusterd to CrBPG4E   |
|                                   |            |                       | Ceric.06G036100.1     |                           | clusterd to CrBPG4E   |
|                                   |            |                       | Ceric.06G036000.1     |                           | clusterd to CrBPG4E   |
|                                   | CrBPG4B    |                       | XP_024524108.1        | 27.97                     |                       |
|                                   |            |                       | Mapoly0002s0278.1     | 27.27                     | Mp1g25980 (MapolBase) |
|                                   |            |                       | UTEX1559_04743.1.v1   | 20.88                     | 20705 (Protein ID)    |
|                                   |            |                       | UTEX1559_12328.1      | 20.88                     | 3843 (Protein ID)     |
|                                   | CrBPG4C    |                       | SM000270S10359        | 29.05                     | 13114 (Protein ID)    |
|                                   |            |                       | SM000186S04122        | 29.23                     | 8130 (Protein ID)     |
|                                   |            |                       | SM000342S12964        | 29.05                     | 16030 (Protein ID)    |
|                                   |            |                       | rna-CBR_g70694        | 25.15                     | 352805 (Protein ID)   |
| <i>Marchantia polymorpha</i>      | CrBPG4D    |                       | kfi00312_0040_v1.1    | 25.00                     | 7984 (Protein ID)     |
|                                   |            |                       | Chrsp10S01472         | 20.44                     | 350 (Protein ID)      |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | CrBPG4E    |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | CrBPG4E    |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
| <i>Spirogloea muscicola</i>       | SmBPG4     | XP_024524108.1        |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | MpBPG4     |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | ZcBPG4A1   |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
| <i>Chara braunii</i>              | ZcBPG4A2   |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | SpMuBPG4A1 |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | SpMuBPG4A2 |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
| <i>Klebsormidium nitens</i>       | SpMuBPG4A3 |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | CbBPG4     |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | KnBPG4     |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
| <i>Chlorokybus atmophyticus</i>   | CaBPG4     |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | CaBPG4     |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   | CaBPG4     |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |
|                                   |            |                       |                       |                           |                       |

## GLK オルソログ

| Species                           | Gene name  | NCBI (refseq_protein) | JGI (Phytozome 13)  | Identity (%) vs AtGLK1 | Remarks                                   |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|---------------------|------------------------|-------------------------------------------|
| <i>Arabidopsis thaliana</i>       | GLK1/GPRI1 | NP_565476.1           | AT2G20570           | 100.00                 |                                           |
|                                   | GLK2/GPRI2 | NP_199232.1           | AT5G44190           | 39.75                  |                                           |
| <i>Solanum lycopersicum</i>       | SIGLK1     | NP_001266193.1        | Solyc07g053630.4.1  | 45.17                  |                                           |
|                                   | SIGLK2     | NP_001266252.1        | Solyc10g008160.3.1  | 37.13                  |                                           |
| <i>Nicotiana tabacum</i>          | NtGLK1A    | XP_016499361.1        |                     | 46.29                  |                                           |
|                                   | NtGLK1B    | XP_016487823.1        |                     | 45.91                  |                                           |
|                                   | NtGLK2A    | XP_016477567.1        |                     | 43.10                  |                                           |
|                                   | NtGLK2B    | XP_016480018.1        |                     | 33.61                  |                                           |
| <i>Glycine max</i>                | GmGLK1A    | XP_003543323.1        | Glyma.13G294300.1   | 45.42                  |                                           |
|                                   | GmGLK1B    | XP_003540379.1        | Glyma.12G206600.1   | 43.83                  |                                           |
|                                   | GmGLK2A    | NP_001241943.2        | Glyma.06G289300.1   | 45.45                  |                                           |
|                                   | GmGLK2B    | XP_003539944.1        | Glyma.12G117700.1   | 44.21                  |                                           |
| <i>Populus trichocarpa</i>        | PtGLK1     | XP_002310413.4        | Potri.007G136901.1  | 46.07                  |                                           |
|                                   | PtGLK2     | XP_006372753.3        | Potri.017G015800.2  | 44.51                  |                                           |
| <i>Oryza sativa</i>               | OsGLK1     | NP_001389733.1        | LOC_Os06g24070.1    | 35.84                  |                                           |
|                                   | OsGLK2     | NP_001384874.1        | LOC_Os01g13740.1    | 31.86                  |                                           |
| <i>Zea mays</i>                   | ZmG2       | NP_001105513.1        | Zm00001d039260_P001 | 30.53                  |                                           |
|                                   | ZmGLK1     | NP_001105018.1        | Zm00001d044785_P001 | 32.34                  |                                           |
| <i>Brachypodium distachyon</i>    | BdGLK1     | XP_024313157.1        | Bradi1g43710.1      | 26.81                  |                                           |
|                                   | BdGLK2     | XP_003565554.1        | Bradi2g08287.1      | 32.06                  |                                           |
| <i>Amborella trichopoda</i>       | AmTrGLK    | XP_011623599.1        | AmTrH1.01G151300.1  | 35.08                  |                                           |
| <i>Thuja plicata</i>              | TpGLK      |                       | Thupl.29380931s0010 | 21.25                  |                                           |
| <i>Diphasiastrum complanatum</i>  | DcGLK      |                       | Dicom.05G108700     | 17.93                  |                                           |
| <i>Ceratopteris richardii</i>     | CrGLK1A    |                       | Ceric.21G073900     | 17.42                  |                                           |
|                                   | CrGLK1B    |                       | Ceric.16G061900     | 16.15                  |                                           |
|                                   | CrGLK2     |                       | Ceric.01G106700     | 12.94                  |                                           |
| <i>Selaginella moellendorffii</i> | SmGLK      | XP_002990416.1        | 428906              | 20.26                  |                                           |
| <i>Physcomitrium patens</i>       | PpGLK1     | XP_024379514.1        | Pp3c7_5800          | 23.08                  |                                           |
|                                   | PpGLK2     | XP_024388769.1        | Pp3c11_21140        | 23.38                  |                                           |
| <i>Marchantia polymorpha</i>      | MpGLK      |                       | Mapoly0156s0007     | 19.95                  | Mp7g09740 (MapolBase)                     |
| <i>Zygnema cf. cylindricum</i>    | ZcGLK      |                       | Zci1a_30915.1       | 18.02                  | 26410 (Protein ID)                        |
| <i>Spirogloea muscicola</i>       | SpMuGLK1   |                       | SM000015S01186      | 24.08                  | 5404 (Protein ID)                         |
|                                   | SpMuGLK2A  |                       | SM000086S23019      | 23.08                  | 25525 (Protein ID)                        |
|                                   | SpMuGLK2B  |                       | SM000002S05546      | 22.98                  | 9082 (Protein ID)                         |
| <i>Chara braunii</i>              | CbGLK      |                       | rna-CBR_g57032      | 8.90                   | 350821 (Protein ID)<br>GCT-box is lacked. |
| <i>Klebsormidium nitens</i>       | KnGLK      |                       | kfi00316_0100_v1.1  | 16.00                  | 8048 (Protein ID)                         |
| <i>Chlorokybus atmophyticus</i>   | CaGLK      |                       | Chrsp127S01876      | 23.84                  | 1618 (Protein ID)                         |

補足表 1-2. BPG4-FOX 植物体のスクリーニングに用いたプライマー配列

| Primer name | Sequence (5' - 3')            |
|-------------|-------------------------------|
| FOX-F3      | GTACGTATTTTACAACAATTACCAACAAC |
| FOX-R3      | CAAATGTTTGAACGATCGGGGAAAT     |

補足表 1-3. 形質転換体の作出に使用したプライマー配列

| Primer name          | Sequence (5' - 3')        |
|----------------------|---------------------------|
| BPG4-CDS-F1          | CACCATGGCAGATTCTTCTTCTGCT |
| BPG4-CDS-R1          | TCAGTCGTCGGATTCTTTAGA     |
| BPG4-cDNA-no-stop-R1 | GTCGTCGGATTCTTTAGATGA     |
| BPG4-promoter-F1     | CACCGAGGTCCACATGATGAGGAA  |
| BPG4-first-exon-R1   | CATGTGAATGTAAGAAGCAGAA    |

補足表 1-4. RT-qPCR に用いたプライマー配列

| Gene            | Primer name    | Sequence(5' - 3')               |
|-----------------|----------------|---------------------------------|
| <i>GAPDH</i>    | qRT-GAPDH-F1   | CTGCCCCAAGCAAAGATGCG            |
|                 | qRT-GAPDH-R1   | TTGGCAAGAGGAGCAAGGCA            |
| <i>ACT2</i>     | qRT-ACT2-F1    | CGCCATCCAAGCTGTTCTC             |
|                 | qRT-ACT2-R1    | TCACGTCCAGCAAGGTCAAG            |
| <i>eIF4a</i>    | qRT-eIF4a-F1   | TGACCACACAGTCTCTGCAA            |
|                 | qRT-eIF4a-R1   | ACCAGGGAGACTTGTTGGAC            |
| <i>BPG4</i>     | qRT-BPG4-F1    | GGAATTCTTCAAGGCGTATGA           |
|                 | qRT-BPG4-R1    | CAGTCGTCGGATTCTTTAGATG          |
| <i>HEMA1</i>    | qRT-HEMA1-F1   | GTGAGCTCTCTGCTTCTTCTGATTCTG     |
|                 | qRT-HEMA1-R1   | CTGCTTCTTTTCCTTTGTATATCGATCAGCT |
| <i>GUN4</i>     | qRT-GUN4-F1    | GAAACCGCGACCATATTCGAC           |
|                 | qRT-GUN4-R1    | CGGCTTCTCCGGATATCTGAA           |
| <i>CHLH</i>     | qRT-CHLH-F1    | TGGTAGAGAGACAGAAGCTCGAAA        |
|                 | qRT-CHLH-R1    | CCAAAGAACCTGCCCAAGAG            |
| <i>PORB</i>     | qRT-PORB-F1    | TGATTACCCTTCAAAGCGTCTCA         |
|                 | qRT-PORB-R1    | CAATGTATTTCGTGTTCCCGGT          |
| <i>CAO</i>      | qRT-CAO-F1     | CCGGTGGAACACGGTTTACTTCTAGATA    |
|                 | qRT-CAO-R1     | AGTATCCTTGGAGACCCGAGGTAGGTGT    |
| <i>LHCB1.2</i>  | qRT-LHCB1.2-F1 | ATCCGACCGAGTCAAGTACT            |
|                 | qRT-LHCB1.2-R1 | GGTTCCTTGCGAATGTCT              |
| <i>LHCB6</i>    | qRT-LHCB6-F1   | GGACTTTGAGAAGCTGGAGAGG          |
|                 | qRT-LHCB6-R1   | ACAAACCAAGAGCACCGAGAG           |
| <i>LHCA1</i>    | qRT-LHCA1-F1   | AAGTACCCGGGAGGCGCATT            |
|                 | qRT-LHCA1-R1   | CGCAAGCCGCCCGTTCT               |
| <i>HEMG1</i>    | qRT-HEMG1-F1   | TGCCTCCAACACGATCCTT             |
|                 | qRT-HEMG1-R1   | CGGCGGAGGTATTAGTCGTC            |
| <i>DVR/BGH1</i> | qRT-DVR-F1     | CGCTTGTAACCGATCAGCG             |
|                 | qRT-DVR-R1     | AATGGCGTTAATGCCTTGCC            |
| <i>CHLG</i>     | qRT-CHLG-F1    | TATTATGCGTTGGCGTTGGT            |
|                 | qRT-CHLG-R1    | GCGCTTGCCTGGTACTTGA             |
| <i>PAO</i>      | qRT-PAO-F1     | GCTCAGACGGCATGGTAAG             |
|                 | qRT-PAO-R1     | GCATCTGACGCTTGGTTAAG            |
| <i>psbA</i>     | qRT-psbA-F1    | CTATACAACGGCGGTCTC              |
|                 | qRT-psbA-R1    | GCATACCCAGACGGAACTA             |
| <i>rbcS</i>     | qRT-rbcS-F1    | GCACCGACTCCGCTCA                |
|                 | qRT-rbcS-R1    | TGGACTTGACGGGTGTTGTC            |
| <i>GLK1</i>     | qRT-GLK1-F1    | TTGGGTCTCCGATTCTCCCTAT          |
|                 | qRT-GLK1-R1    | GCAACTGGCGGTGCTCTAAAT           |

補足表 1-5. リコンビナントタンパク質の作成に用いたプライマー配列

| Primer name                | Sequence (5' - 3')                   |
|----------------------------|--------------------------------------|
| In-Fusion-pMAL-c4X-F       | GACTGGGAAAACCCTGGCGTTA               |
| In-Fusion-pMAL-c4X-R       | CAAGCTTGCTGCAGGTCGAC                 |
| BPG4-In-Fusion-pMAL-c4X-F  | CTGCAGGCAAGCTTGATGGCAGATTCTTCTTCTGCT |
| BPG4-In-Fusion-pMAL-c4X-R  | AGGGTTTTTCCAGTCTCAGTCGTCGGATTCTTTAGA |
| In-Fusion-pGEX-6P-3-F      | GACTGACGATCTGCCTCGC                  |
| In-Fusion-pGEX-6P-3-R      | GGGCCCCTGGAACAGAAC                   |
| GLK1-In-Fusion-pGEX-6P-3-F | CTGTTCCAGGGGGCCCATGTTAGCTCTGTCTCCGGC |
| GLK1-In-Fusion-pGEX-6P-3-R | GGCAGATCGTCAGTCTCAGGCACAAGACGCGGTCTG |

補足表 1-6. ChIP-qPCR に用いたプライマー配列

| Primer name           | Sequence (5' - 3')       |
|-----------------------|--------------------------|
| ChIP-BPG4-promoter-F1 | ATGTATAGAGAGAGAGGGGCC    |
| ChIP-BPG4-promoter-R1 | ATATGCATGCATGGGGCCAGA    |
| ChIP-BPG4-exon-F1     | GGAATTCTTCAAGGCGTATGA    |
| ChIP-BPG4-exon-R1     | CAGTCGTCGGATTCTTTAGATG   |
| ChIP-BPG4-intron-F1   | CTACAGATAGGATCTAGCGTGATG |
| ChIP-BPG4-intron-R1   | TCTAGTCGCCAGGTAGTCAAGT   |

補足表 1-7. プロトプラストにおける一過性ルシフェラーゼアッセイに用いたプライマー配列

| Primer name                    | Sequence (5' - 3')                                  |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------|
| pGLHNew_RLH-In-Fusion-F1       | GAGCTCGGCGCGCCTTAATTAA                              |
| pGLHNew_RLH-In-Fusion-R1       | GGGAATTCGTACCGGCCAGTTA                              |
| HEMA1-In-fusion-pGLHNew_RLH-F1 | CCGGTACGAATTCCCggtcaattggttagcatcca                 |
| HEMA1-In-fusion-pGLHNew_RLH-R1 | AGGCGCGCCGAGCTCtgaaccccaaatctcaaatctc               |
| GUN4-In-fusion-pGLHNew_RLH-F1  | CCGGTACGAATTCCCcagacgcatttacatgcacaa                |
| GUN4-In-fusion-pGLHNew_RLH-R1  | AGGCGCGCCGAGCTCtggatggagaggaagagagag                |
| CAO-In-fusion-pGLHNew_RLH-F1   | CCGGTACGAATTCCCaaacgaaataacttttagatttagt            |
| CAO-In-fusion-pGLHNew_RLH-R1   | AGGCGCGCCGAGCTCggcgtcaccggaaagaga                   |
| BPG4-In-fusion-pGLHNew_RLH-F1  | CCGGTACGAATTCCCccggtatactatacgatatgattatcttaagccaaa |
| BPG4-In-fusion-pGLHNew_RLH-R1  | AGGCGCGCCGAGCTCtgtaatggaaccctagaattaacacccaa        |
| BPG4pro-G-box-1-mutation-F1    | tggatAAAAAagaggatgcgtgagatggaaatga                  |
| BPG4pro-G-box-1-mutation-R1    | tctctTTTTTatccatggcccctctctctctat                   |
| BPG4pro-G-box-2-mutation-F1    | tctccAAAAAagggtcttgccccatcatgca                     |
| BPG4pro-G-box-2-mutation-R1    | agcccTTTTTggagattgatcataattggctga                   |

### 補足表 1-8. EMSA に用いた DNA 配列

| Primer name             | Sequence (5' - 3')             |
|-------------------------|--------------------------------|
| BPG4-promoter-G-box-1-F | GGGGCCATGGATCACGTGGAGGATGCGTGA |
| BPG4-promoter-G-box-1-R | TCACGCATCCTCCACGTGATCCATGGCCCC |
| BPG4-promoter-G-box-2-F | TGATCAATCTCCCACGTGGGGCTTCTGGCC |
| BPG4-promoter-G-box-2-R | GGCCAGAAGCCCCACGTGGGAGATTGATCA |
| BPG4-G-box-1-mutation-F | GGGGCCATGGATAAAAAAGAGGATGCGTGA |
| BPG4-G-box-1-mutation-R | TCACGCATCCTCTTTTTTATCCATGGCCCC |
| BPG4-G-box-2-mutation-F | TGATCAATCTCCAAAAAGGGCTTCTGGCC  |
| BPG4-G-box-2-mutation-R | GGCCAGAAGCCCTTTTTTGGAGATTGATCA |
| CAO-probe-F             | TTAGATCCCATGATTCTCAACACGACTGA  |
| CAO-probe-R             | TCAGTCGTGTGAGAATCATGGGATCTAAA  |

### 補足表 1-9. Y2H 解析・BiFC 解析・CoIP 解析に用いたプライマー配列

| Primer name         | Sequence (5' - 3')         |
|---------------------|----------------------------|
| BPG4-CDS-F1         | CACCATGGCAGATTCTTCTTCTGCT  |
| BPG4-CDS-R1         | TCAGTCGTCCGATTCTTTAGA      |
| GLK1-CDS-F1         | CACCATGTTAGCTCTGTCTCCGGC   |
| GLK1-CDS-R1         | TCAGGCACAAGACGCGGTC        |
| GLK2-CDS-F1         | CACCATGTAACTGTTTCTCCGGCT   |
| GLK2-CDS-R1         | TCAAGGAAGAGGAGGAACATT      |
| HY5-CDS-F1          | CACCATGCAGGAACAAGCGACTAG   |
| HY5-CDS-R1          | TCAAAGGCTTGCATCAGCATT      |
| COP1-CDS-F1         | CACCATGGAAGAGATTTCGACGGAT  |
| COP1-CDS-R1         | TCACGCAGCGAGTACCAGA        |
| BIN2-CDS-F1         | CACCATGGCTGATGATAAGGAGAT   |
| BIN2-CDS-R1         | TTAAGTTCCAGATTGATTCA       |
| GLK1-N-terminal-F1  | caccATGTTAGCTCTGTCTCCGGC   |
| GLK1-N-terminal-R1  | tcaACTGATCCGATTGTTCTTGGA   |
| GLK1-DBD-F1         | caccAACAACGAAGGGAAGAGAAAG  |
| GLK1-DBD-R1         | tcaATGTTTCCGATGAGACCTATAT  |
| GLK1-PRD-F1         | caccTTGCTAGCTCGTGAGGCCG    |
| GLK1-PRD-R1         | tcaCGGATGTAAGTCTACCGGAG    |
| GLK1-GCT-box-F1     | caccTCAAAAGAGAGCGTGGATGC   |
| GLK1-GCT-box-R1     | TCAGGCACAAGACGCGGTC        |
| BPG4-A_thal_3526-F1 | caccATGGCAGATTCTTCTTCTGCT  |
| BPG4-A_thal_3526-R1 | tcaCCTCTCCTCATAACGCTTG     |
| BPG4-C-terminal-F1  | caccCAAAGCAAACAAGAGCAAATGT |
| BPG4-C-terminal-R1  | TCAGTCGTCCGATTCTTTAGA      |

## 第二章 BPG4 相同性因子 BGH2 による脱黄化時の子葉の緑化制御機構の解明

### 背景と目的

光は植物の成長において必要不可欠な役割を果たしており、光合成反応を駆動するために必要なエネルギーを提供している。一方、光が持つ強大なエネルギーは時に ROS を生み出し、植物にとって有害に働く場合もある (Li et al., 2009)。種子が土壌の深部で発芽すると、植物は徒長した胚軸とフックが閉じた子葉を形成し、この形態は暗所形態形成 (skotomorphogenesis) または黄化芽生え (etiolated seedling) と呼ばれる (図 2-1 A)。胚軸の先端にある子葉が土壌表面に到達し、フィトクロムやクリプトクロムなどの光受容体が光を感知すると、光形態形成 (photomorphogenesis) または脱黄化 (de-etiolation) と呼ばれる現象が開始する。光形態形成が始まると、胚軸の伸長が抑制され、子葉が開き、葉緑体バイオジェネシス (Chloroplast biogenesis) が起こる (図 2-1 A) (Cackett et al., 2022)。このような自然界における土壌中で発生する植物の形態変化は、実験上においては暗所で発芽した黄化芽生えに白色光を照射することで再現することができると考えられている (図 2-1 B)。

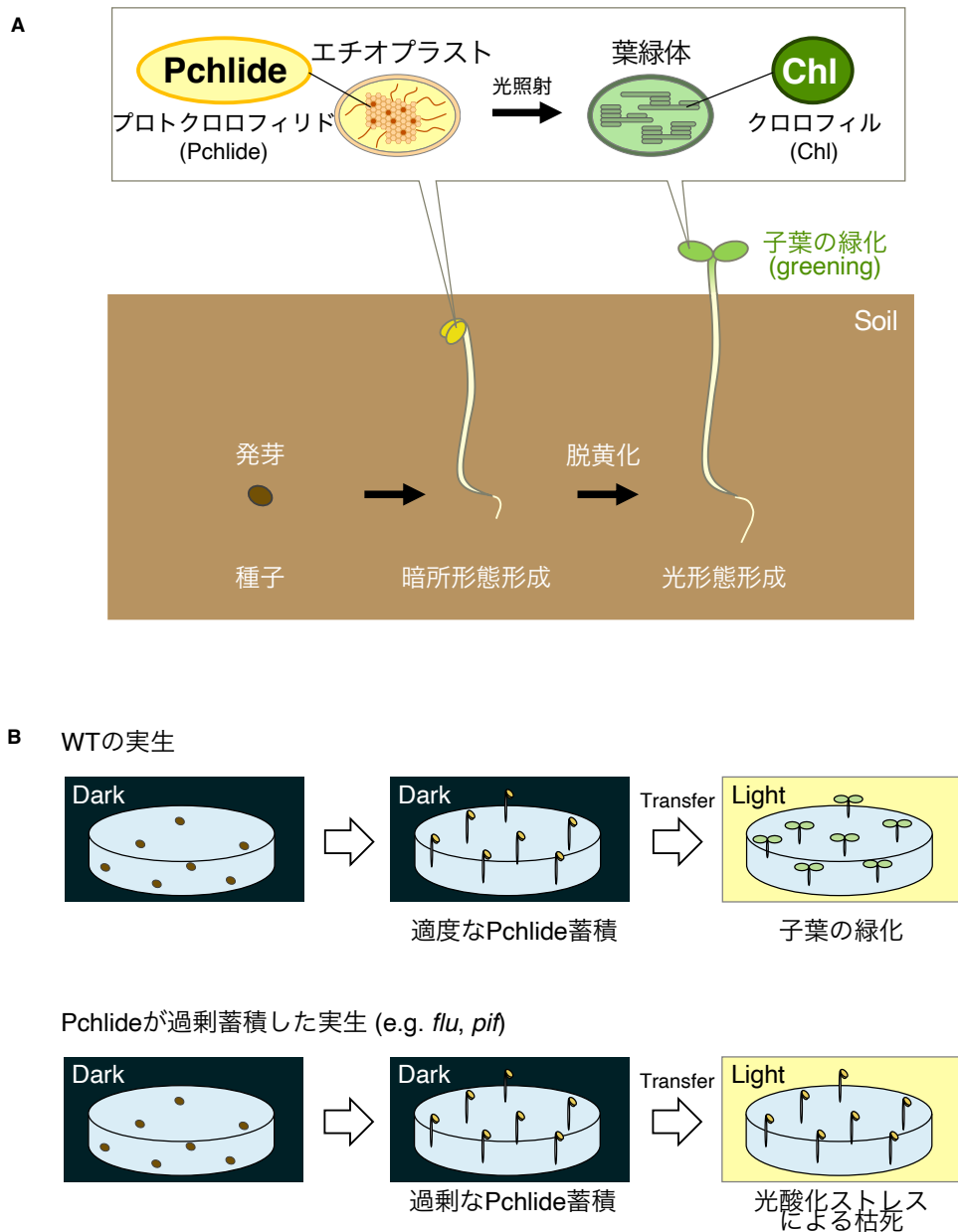
暗所で生育した黄化芽生えにおいて、色素体は葉緑体に分化しておらず、エチオプラスト (etioplasts) として存在し、光照射に応答して葉緑体へと分化する。エチオプラストではクロロフィル (Chl) が合成されず、その前駆体であるプロトクロロフィリド (Pchl<sub>ide</sub>) が大量に蓄積する。これは、Pchl<sub>ide</sub> をクロロフィリド *a* に還元する酵素であるプロトクロロフィリド還元酵素 (NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase, POR) がその酵素反応に光を必要とするためである (Vedalankar and Tripathy, 2019)。暗所で発芽した黄化芽生えに光を照射すると、Pchl<sub>ide</sub> からクロロフィルへの変換が進み、チラコイド膜などの葉緑体の内部構造の発達と共に子葉の緑化 (greening) が進行する (図 2-1 A) (Zhong et al., 2009)。光照射後に速やかに緑化するために、暗所で生育した黄化芽生えのエチオプラスト内には適度に Pchl<sub>ide</sub> が蓄積している必要があると考えられている。一方、エチオプラスト内に過剰に Pchl<sub>ide</sub> が蓄積すると、脱黄化時に深刻な光酸化ストレスが引き起こされ、植物体が枯死してしまうことが知られている (図 2-1 B) (Mochizuki et al., 2010)。例えば、暗所で過剰な Pchl<sub>ide</sub> を蓄積する *fluorescence (flu)* 変異体を暗所から明所へ移すと、植物体は緑色にならず逆に白化し細胞死が起こり、枯死する (図 2-1 B) (Meskauskiene et al., 2001)。これらの知見より、ROS 発生による枯死を回避しながら光に応答した迅速な緑化を行うために、暗所におけるクロロフィル生合成の精密な調節が、不可欠であると考えられている。

クロロフィル生合成関連酵素をコードする遺伝子はすべて核ゲノムに PhANGs として存在する (Cackett et al., 2022)。諸言において述べたように、複数のシグナルの下流で、PIFs、HY5、GLKs、GNC/CGA、MYBSs などの転写因子が複合的に PhANGs 発現を調節していることが知られている (Cackett et al. 2022; Frangedakis et al. 2024)。特に、PIF 転写因子は、暗

所でのクロロフィル合成抑制に重要な役割を果たしており、*PIF* 欠損変異体 (*pif*) は、暗所で過剰に Pchl<sub>ide</sub> を蓄積し、暗所から明所に移った際に光酸化ストレスにより枯死する (図 2-1 B) (Monte et al., 2004; Stephenson et al., 2009; Wang et al., 2020)。明所においては、HY5、GLK、GNC/CGA1、MYBSs 転写因子が PhANGs 発現を協調的に促進しており、中でも特に GLK 転写因子が主要な役割を果たすことが知られている (Lee et al., 2007; Waters et al., 2009; Bastakis et al., 2018; Cackett et al., 2022; Frangedakis et al., 2024)。しかし、近年の報告では、GLK の過剰活性化がクロロフィル前駆体の過剰蓄積とそれに伴う ROS の発生を誘発し、細胞死を引き起こすことが示唆されている (Lv et al., 2019; Li et al., 2021)。そのため、GLK 活性の精密な微調整が、適切なクロロフィル代謝を維持し、光酸化ストレスを防ぎ、葉緑体の恒常性を保つために重要であると考えられる。しかし、GLK 活性がどのように光環境に適応して精密に制御されるのか、その分子メカニズムは未解明である。

第一章において、BR シグナルおよび光シグナルの下流で機能する葉緑体発達の負の調節因子である BPG4 を同定し、その機能と生理学的意義を明らかにした。*BPG4* 欠損植物体は、光条件下で内生クロロフィル含量が増加した濃緑色形態を示すことを明らかにした。*BPG4* は核内で GLKs と直接相互作用し、その転写活性化能を抑制し、PhANGs 発現を低下させ、葉緑体発達を抑制する。*BPG4* による葉緑体発達の抑制は、強光条件下における ROS 発生を低減し、光障害の回避に寄与していると考えられた。現在、*BPG4* が光条件下で葉緑体発達を最適化し、ROS 生成を防ぐことで葉緑体恒常性維持因子 (葉緑体ホメオスタシスファクター) として機能していると考えている。シロイヌナズナにおいて、*BPG4* (AT3G55240) は、*BPG4* HOMOLOGOUS GENE 1/2/3 (*BGH1/BGH2/BGH3*, AT3G28990, AT5G02580, AT1G10657) という 3 つのパラログを持つ (図 1-3 A)。近年の先行研究により、*BPG4* ファミリーは REPRESSOR OF PHOTOSYNTHETIC GENES (RPGE) ファミリーおよび PSEUDO-ETIOLATION IN LIGHT (PEL) ファミリーとしても同定されている (Han et al., 2023; Kim et al., 2023)。しかし、本研究の第一章およびこれらの報告においては、*BPG4*/RPGE/PEL ファミリー間の機能的冗長性や機能的な役割分担については未解明な点が多く残されている。

本研究では、*BPG4* のパラログの一つである *BGH2* に着目し、*BPG4* 発現と *BGH2* 発現が光によって正反対に制御されることを明らかにし、暗所誘導性 *BPG4* パラログである *BGH2* の機能および生理学的意義の解明を試みた。また、明所誘導型因子である *BPG4* と暗所誘導型因子である *BGH2* の発現制御機構の差異の解明も合わせて行った。本研究により、*BPG4* ファミリーが明所および暗所の双方において GLK 転写因子の調節を介してクロロフィル合成および葉緑体/色素体発達を制御する分子機構に関する新たな知見が得られた。



**図 2-1. 自然界における植物の暗所形態形成と光形態形成と実験室条件による環境再現の模式図**

**(A)** 土壌中で発芽した胚軸は、胚軸が徒長し子葉が閉じた黄化芽生えとなる。黄化芽生えに光が照射されると、光形態形成が開始し、黄化芽生えのエチオプラストは葉緑体へと分化し、子葉が緑化する。

**(B)** 暗所で発芽した幼植物は上記の自然界における土壌中の表現型を模倣する。暗所で成長した野生型の幼植物は適度な量の Pchlride を蓄積し、光照射時に速やかに子葉が緑化する。一方で、暗所で過剰な Pchlride を蓄積する変異体 (例: *flu* および *pif*) は明所に移った際に光酸化ストレスにより白化し枯死する。

## 結果

### BGHs は明所における内生クロロフィル含量制御において BPG4 と冗長的に機能しない

BPG4 ファミリーはストレプト藻類および陸上植物に広く保存されており、被子植物以降では双子葉植物で3つのサブグループ、単子葉植物で2つのサブグループに分岐する (図 1-2)。BGH1 は BPG4 と同じサブグループに属するが、BGH2 と BGH3 は BPG4 と異なるサブグループに属する (図 1-2)。BPG4 と BGH1/2/3 間では、GLK 転写因子との相互作用に必要な A\_thal\_3526 ドメイン (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF09713/>) が高度に保存されており、BGHs は BPG4 と類似したタンパク質機能を持つことが考察された (図 1-3 A)。そこで、まず BGHs が BPG4 と類似した生理学的機能を持つか明らかにするために BGHs 欠損植物体および BGHs 高発現植物体を作成した。ゲノム編集により CDS 中に 1 塩基のフレームシフトを引き起こし、BGH1/2/3 を欠損した植物体 *bgh1-1*、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*bgh3-1*、*bgh3-2* を作成した (図 2-2 A-C)。また、35S プロモーターの下流で BGH2 および BGH3 を高発現させた植物体である BGH2-OX および BGH3-OX を作成した (図 2-2 D)。BGH1 高発現体については、シロイヌナズナ幼植物から抽出した cDNA から BGH1 の全長 CDS を PCR によって増幅できなかったため、作出を断念した。

明所で生育した BGHs 欠損植物体および BGHs 高発現植物体の幼植物の表現型観察を行った。WT と比較して、*bgh1-1*、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*bgh3-1*、*bgh3-2* では明確な表現型の差異は観察されなかった (図 2-3 A, B, D)。BGH2 高発現植物体 (BGH2-OX-2 および BGH2-OX-11) および BGH3 高発現植物体 (BGH 3-OX-1 および BGH 3-OX-20) は BPG4 高発現植物と類似した淡緑色表現型を示した (図 2-3 B-E)。WT と BPG4-OX-2、BGH2-OX-2、BGH3-OX-1 における内生クロロフィル含量を比較した結果、BGH2-OX-2 は BPG4-OX-2 と同程度にまで内生クロロフィル含量が低下していた。一方、BGH3-OX-1 においては、WT よりは低下しているものの BPG4-OX-2 と BGH2-OX-2 より高い内生クロロフィル含量を示した (図 2-3 F-G)。さらに、BPG4 と BGHs の機能的冗長性を明らかにするために、*bpg4-1*、*bgh2-1*、*bgh3-1* を交配して多重変異体を作成し、それらの幼植物の表現型を観察した (図 2-4 A-F)。*bgh2bgh3* 二重変異体は、*bgh2-1* と *bgh3-1* と同様に WT と同程度の内生クロロフィル含量を示した (図 2-4 C, E)。*bpg4bgh2* 二重変異体、*bpg4bgh3* 二重変異体、*bpg4bgh2bgh3* 三重変異体は、いずれも *bpg4-1* と同程度の内生クロロフィル含量を示した (図 2-4 A-B, D-F)。これらの結果より、BGH2 と BGH3 は異所的な強制発現によって BPG4 高発現植物と同様の表現型を示すことから、BPG4 と BGH2/3 は類似したタンパク質機能を持つと考察された。一方で、BGHs 単一欠損植物体および BPG4 と BGHs の多重欠損植物体の解析結果より、少なくとも明所で生育した幼植物においては BPG4 と BGHs は冗長的には機能しないことが示唆された。

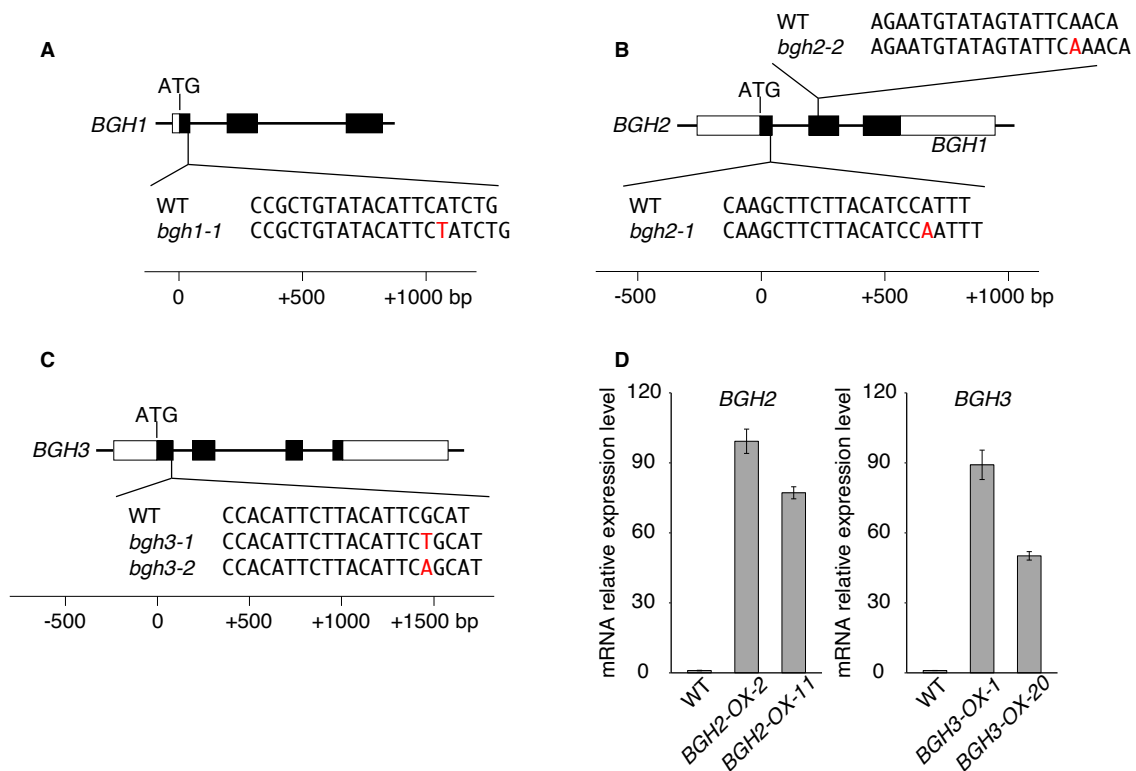
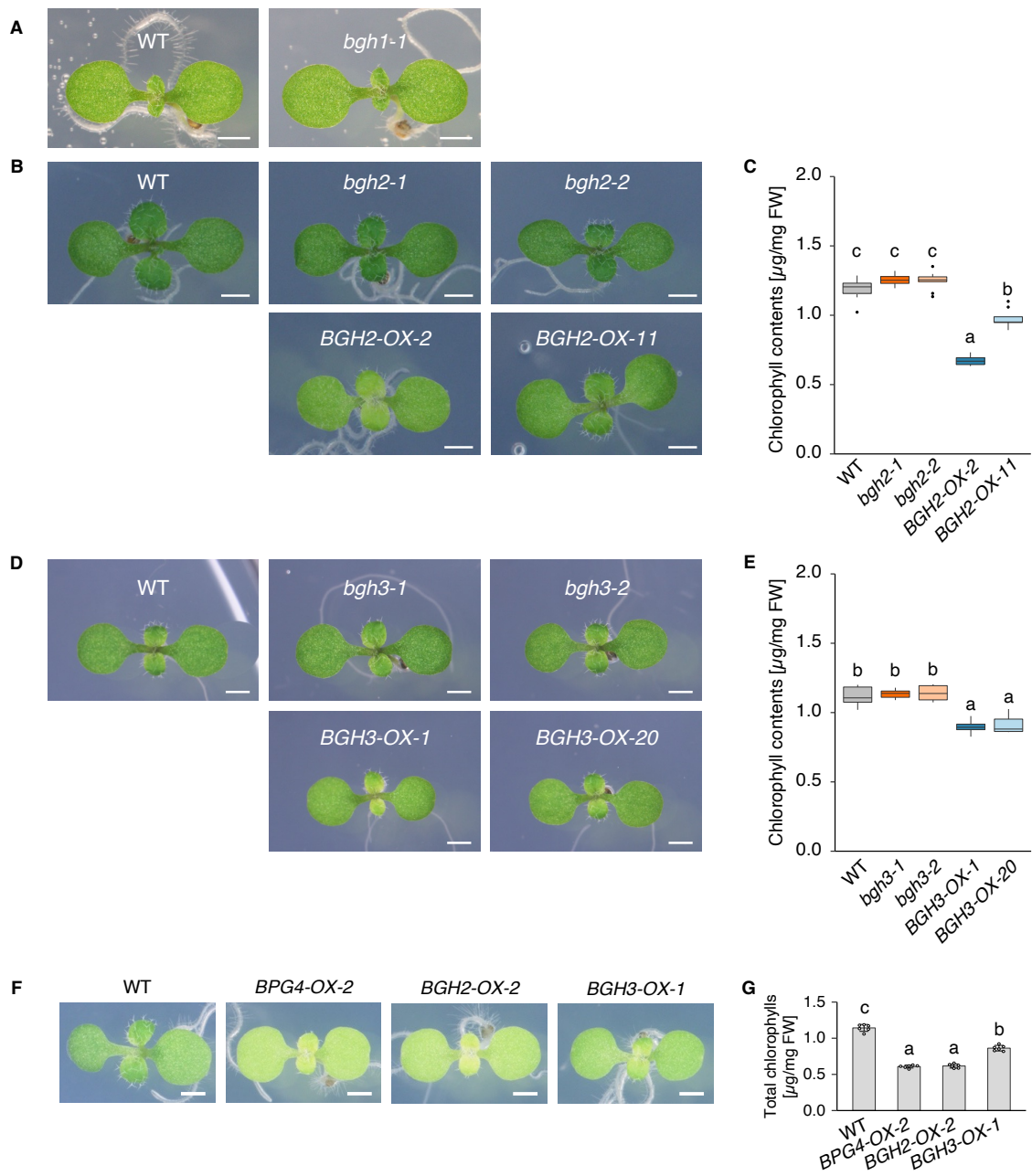


図 2-2. *BGHs* 欠損植物体および *BGHs* 高発現植物体の作出

(A–C) *BGH1* 遺伝子 (A)、*BGH2* 遺伝子 (B)、*BGH3* 遺伝子 (C) の模式図、および *bgh1-1*、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*bgh3-1*、*bgh3-2* の変異位置。黒い四角形がエキソン、白い四角形が UTR、他の領域がイントロン非翻訳領域を示す。

(D) WT、*BGH2-OX-2*、および *BGH2-OX-11* における *BGH2* mRNA 発現の RT-qPCR 解析の結果、および WT、*BGH3-OX-1*、および *BGH3-OX-20* における *BGH3* mRNA 発現の RT-qPCR 解析結果。植物体は、1/2MS 培地において 7 日間明所で生育した。内部標準には *GAPDH* を用い、平均および SD は、実験的 3–4 反復より算出した。

(D) の実験は、明間莉乃氏によって行われた。



### 図 2-3. BGHs 欠損植物体および BGHs 高発現植物体の表現型観察

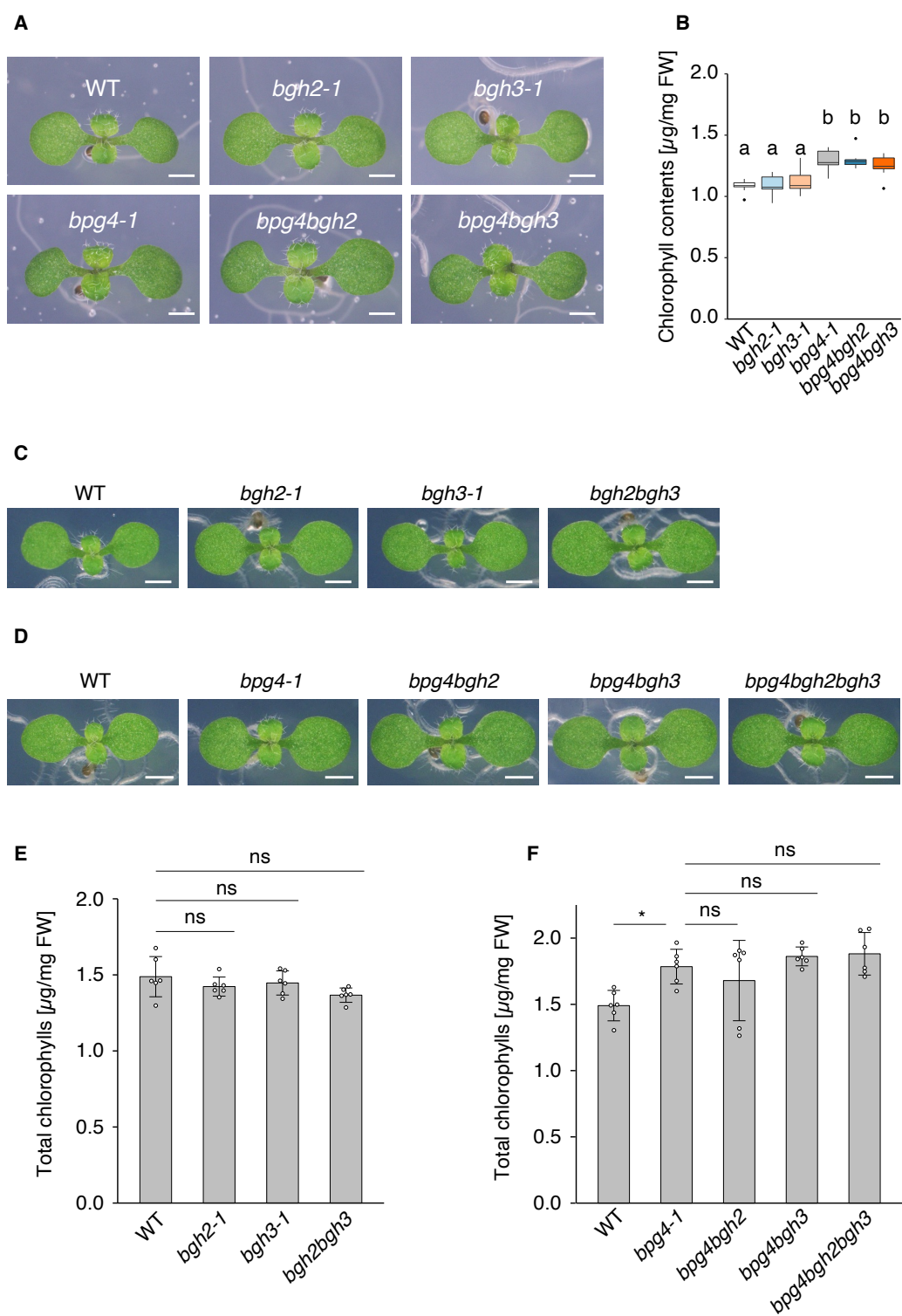
(A) WT および *bgh1-1* の表現型。植物体は、1/2MS 培地において 7 日間 (上段)、生育した。

Scale bars = 1 mm。

(B–G) WT、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*BGH2-OX-2*、*BGH2-OX-11* (B–C)、WT、*bgh3-1*、*bgh3-2*、*BGH3-OX-1*、*BGH3-OX-20* (D–E)、または WT、*BPG4-OX-2*、*BGH2-OX-1*、*BGH3-OX-1* (F–G) の表現型 (B, D, F) および新鮮重当たりの内生クロロフィル含量 (C, E, G)。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した。30 mg の植物を一つの試料として生物学的 9 反復 (C, E) または生物学的 6 反復 (G) により統計処理を行った。Scale bars = 1 mm。

(C) (E) において、箱を 2 等分する水平線、箱の下辺、箱の上辺は、それぞれ中央値、下位四分位数、上位四分位数を示す。ひげの長さは下四分位数と上四分位数から IQR の 1.5 倍以内にあるデータ点を表す。この範囲外のデータポイントを外れ値とみなし、ひげの外に個別にプロットした。(C)(E)(G) において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

(A–E) の実験は、明間莉乃氏によって行われた。



#### 図 2-4. BPG4 および BGHs 多重欠損植物体の表現型観察

(A–F) WT、*bgh2-1*、*bgh3-1*、*bpg4-1*、*bpg4bgh2*、*bpg4bgh3* (A–B)、WT、*bgh2-1*、*bgh3-1*、*bgh2bgh3* (C, E)、または WT、*bpg4-1*、*bpg4bgh2*、*bpg4bgh3*、*bpg4bgh2bgh3* (D, F) の表現型 (A, C, D) および新鮮重当たりの内生クロロフィル含量 (B, E, F)。植物体は、1/2MS 培地において 8 日間生育した。30 mg の植物を一つの試料として生物学的 9 反復 (B) または生物学的 6 反復 (E–F) により統計処理を行った。Scale bars = 1 mm。

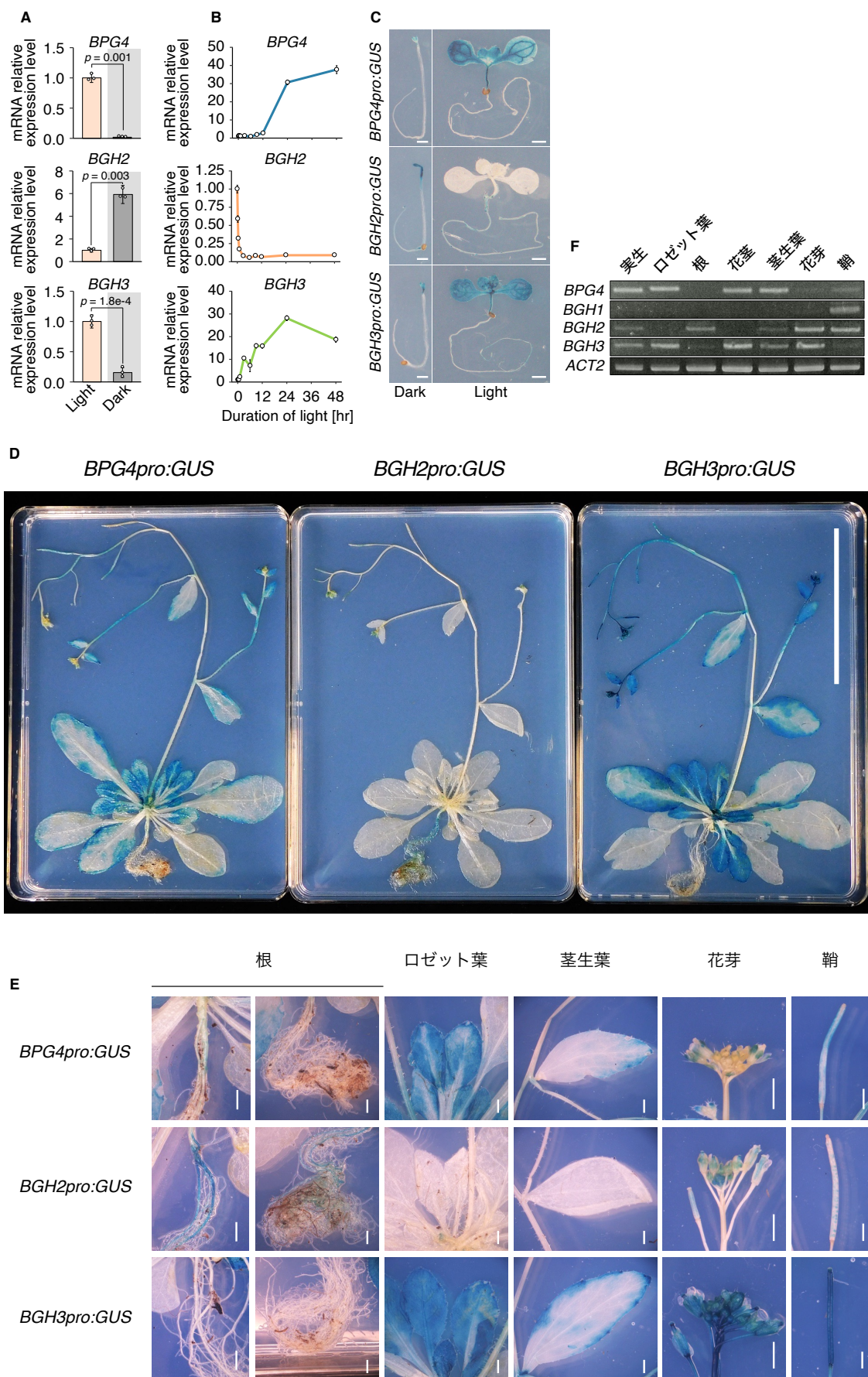
(B) において、箱を 2 等分する水平線、箱の下辺、箱の上辺は、それぞれ中央値、下位四分位数、上位四分位数を示す。ひげの長さは下四分位数と上四分位数から IQR の 1.5 倍以内にあるデータ点を表す。この範囲外のデータポイントを外れ値とみなし、ひげの外に個別にプロットした。(B) において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。(E–F) においては、Dunnett のテストにより、統計処理を行った (ns, not significant; \*,  $p < 0.05$ )。

全ての実験は、明間莉乃氏によって行われた。

## **BGH2 の mRNA 発現は、明所誘導型の BPG4 とは対照的に暗所で生育した黄化芽生えの子葉において活性化する**

BGHs 高発現体の表現型から、BGHs は BPG4 と類似したタンパク質機能を持つと予測された (図 2-3)。一方、BGHs 欠損変異体は BPG4 欠損植物体とは異なり、明所において明確な表現型を示さない (図 2-3、図 2-4)。これらの結果から、BPG4 は明所で生育した光合成組織で機能する一方で、BGHs は BPG4 とは異なる組織や異なる環境において機能しているのではないかという仮説を立てた。そこで、光環境が BPG4 および BGH2/3 の mRNA 発現に与える影響を解析するために、明所および暗所条件で生育した WT の幼植物における BPG4/BGH2/BGH3 発現量を RT-qPCR で解析した (図 2-5 A)。BPG4 および BGH3 の発現は暗所と比較して明所で活性化していた一方、BGH2 発現は逆に暗所で生育した幼植物において活性化していた (図 2-5 A)。次に、BPG4/BGH2/BGH3 の mRNA の光応答性を詳細に解析するため、暗所で 4 日間育てた WT の幼植物に白色光を照射した際の発現変動を経時的に解析した (図 2-5 B)。その結果、BPG4 発現は光照射 9 時間後に活性化され始め、48 時間後には光照射前の約 40 倍にまで増加した一方で、BGH2 発現は光照射によって即座に低下し、光照射 3 時間後には光照射前の 10%以下にまで減少した (図 2-5 B)。BGH3 発現は、BPG4 発現と同様に光照射によって増加した。これらの結果より、BPG4 および BGH3 は明所で特異的に活性化するのに対し、BGH2 は暗所において特異的に活性化することが示唆された。

明所および暗所における BPG4/BGH2/BGH3 の詳細な器官特異的発現を解析するために、BPG4/BGH2/BGH3 プロモーターの下流で GUS を発現させた植物体 (BPG4/BGH2/BGH3 $pro$ :GUS) を作出し、GUS 染色を行った (図 2-5 C-E)。BPG4 発現は、明所で生育した植物の子葉、胚軸、ロゼット葉で強く検出され、暗発芽した幼植物や明所で生育した植物の根などでは比較的弱かった (図 2-5 C-E)。一方で、BGH2 発現は暗所で生育した植物の子葉で強く観察されたが、明所で生育した植物の子葉においては検出できなかった (図 2-5 C)。明所条件下においては、BGH2 発現は根、花芽、鞘などの非光合成組織でのみ確認された (図 2-5 D-E)。BGH3 発現は、BPG4 発現と類似した様式を示したが、BGH2 のように非光合成組織においても発現が認められた。また、BPG4/BGH1/BGH2/BGH3 発現の器官特異性を半定量的に解析するために、WT の器官別発現を Reverse transcription-PCR (RT-PCR) によって解析した (図 2-5 F)。BGH1 発現は鞘でのみ検出され、この結果は先行研究による結果と同様であった (Han et al., 2023; Kim et al., 2023)。BGH2 は根や花芽などの非緑色組織で高発現しており、BGH3 および BPG4 はロゼット葉などの光合成組織で高発現していた (図 2-5 F)。また、これらの結果は Arabidopsis eFP Browser で公開されている結果 ([http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Klepikova\\_Atlas](http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Klepikova_Atlas)) (Klepikova et al., 2016) と概ね一致していた。これらの結果から、明所における光合成組織で特異的に高発現する BPG4 とは対照的に、BGH2 発現は暗所で生育した幼植物や明所で生育した際の非光合成器官で高発現することが示唆された。



## 図 2-5. *BPG4* および *BGHs* の光環境に応じた発現解析および器官特異的な発現解析

(A) 明所 (Light) もしくは暗所 (Dark) における *BPG4/BGH2/BGH3* mRNA 発現量の RT-qPCR 解析の結果。WT を 1/2MS 培地において明所下または暗所で 7 日間生育させた。内部標準には *eIF4a* を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。ウェルチの両側 *t* 検定により統計処理を行った。

(B) *BPG4/BGH2/BGH3* の mRNA 発現の RT-qPCR 解析の結果。WT を 1/2MS 培地において 4 日間暗所で生育させた後、0.25、0.5、1、3、6、9、12、24、または 48 時間連続光下で生育させた。内部標準には *eIF4a* を用い、平均および SD は、実験的 3-4 反復より得た。相対発現量は、0 時間の発現量を基準に正規化した。

(C-E) *BPG4pro::GUS*、*BGH2pro::GUS*、*BGH3pro::GUS* における GUS 染色の結果。(C) においては、植物体を明所下で 8 日間もしくは暗所で 4 日間生育させた。(D-E) においては、植物体を明所下で土壌において 39 日間生育させた。(D) に植物体の全体像を示し、(E) に各器官の拡大図を示す。Scale bar = 1 mm (C)、5 cm (D)、2 mm (E)。

(F) RT-PCR による *BPG4/BGH1/BGH2/BGH3* の器官別発現解析の結果。幼植物は、1/2MS 培地において明所で 8 日間生育した植物体から植物体全体を試料として用いた。ロゼット葉および根は、土壌において明所で 24 日間生育した植物体から採取した試料を解析に用いた。花茎、茎生葉、花芽および鞘は、土壌において明所で 42 日間生育した植物体から採取した試料を解析に用いた。*ACT2* は内部標準コントロールとして用いた。

(A-B) (F)の実験は、明間莉乃氏によって行われた。

## 暗所誘導型 BPG4 相同性因子は、他の植物種間において保存されている

光条件による *BPG4* と *BGH2* の対照的な発現制御が、シロイヌナズナだけではなく他の植物種間においても保存されているかどうかを解析するために、真正双子葉植物であるトマト (*Solanum lycopersicum*, *Sl*) および単子葉植物であるイネ (*Oryza sativa*, *Os*) における *BPG4* オルソログの mRNA 発現量について RT-qPCR 解析を行った (図 2-6 A–C)。明所および暗所で生育したトマト幼植物における *BPG4* オルソログの mRNA 発現量を解析したところ、*SIBPG4A* (Solyc04g010285)、*SIBPG4B* (Solyc05g054750)、および *SIBGH3* (Solyc05g005230) は明所で活性化されていた一方で、*SIBGH2A* (Solyc09g005730) および *SIBGH2B* (Solyc10g084600) は暗所で活性化されていることが明らかとなった (図 2-6 B)。イネにおいても同様の解析を行ったところ、*OsBPG4A* (LOC\_Os05g38680) および *OsBPG4B* (LOC\_Os01g62060) は明所において活性化しており、*OsBGH2* (LOC\_Os03g17200) は暗所で活性化していることが明らかとなった (図 2-6 C)。これらの結果より、*BPG4* ファミリーにおいて明所誘導性の *BPG4* および *BGH3* サブグループと暗所誘導性の *BGH2* サブグループが両方とも双子葉植物および単子葉植物で保存されていることが示唆された。また、暗所誘導性である *BGH2* が他の種においても保存されていたことから、*BPG4* ファミリーが光環境だけでなく暗環境においてもクロロフィル代謝制御に重要な役割を果たすと考察された。

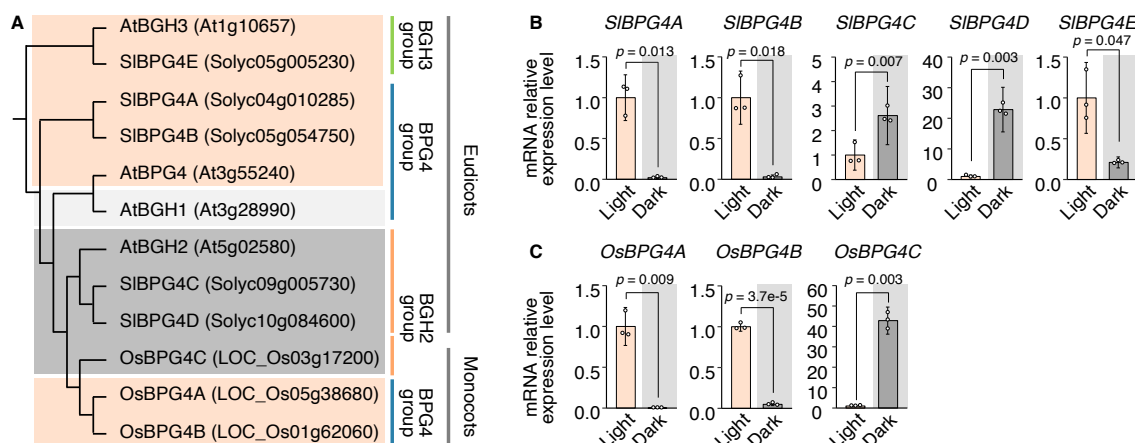


図 2-6. *BPG4* および *BGHs* の光環境に応じた発現解析および器官特異的な発現解析

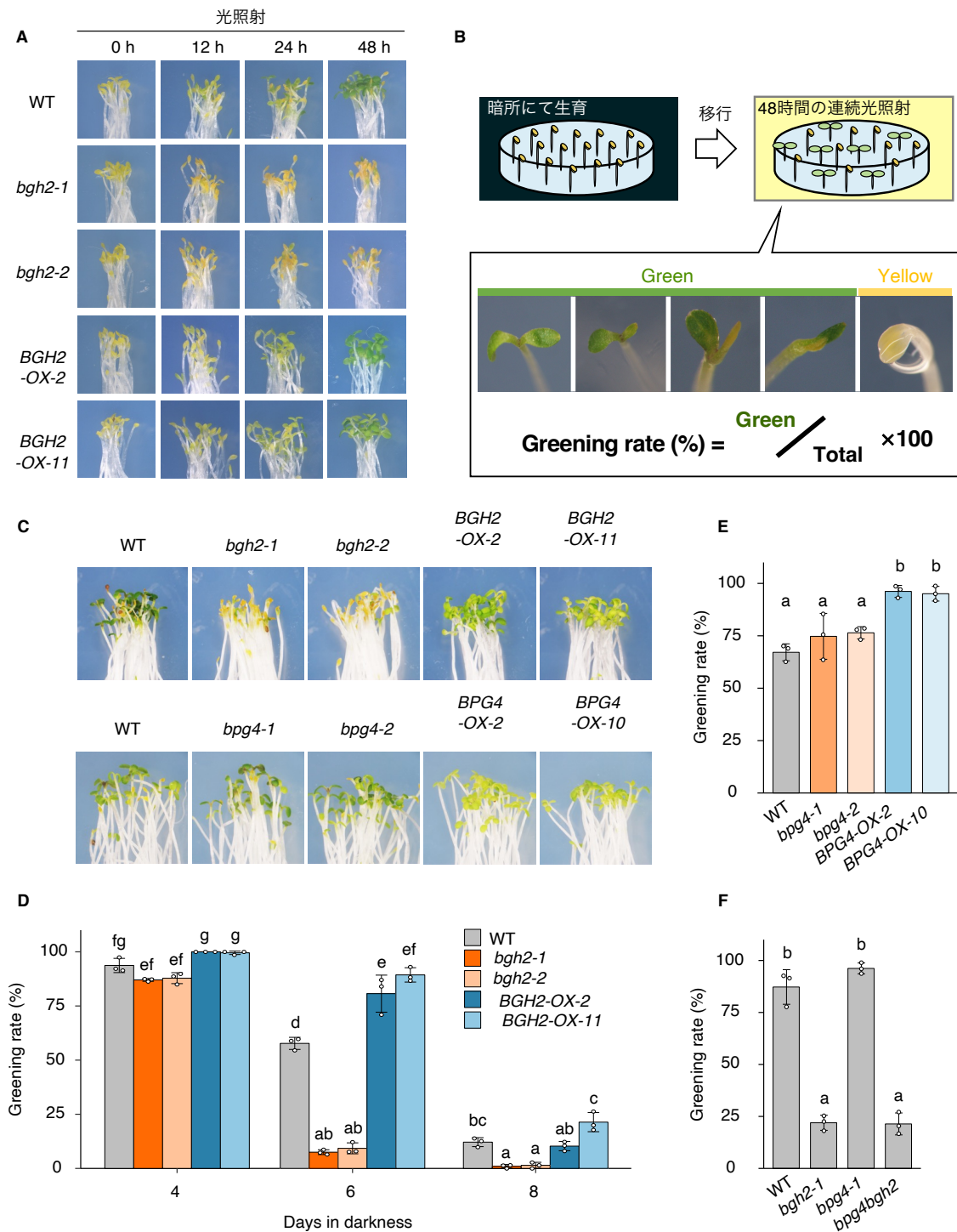
(A) シロイヌナズナ (*At*)、トマト (*Sl*) およびイネ (*Os*) における *BPG4* オルソログの分子系統樹。図 1-2 に基づき作成した。オレンジ色または濃灰色の四角で囲まれた遺伝子は、それぞれ明所または暗所下で活性化される遺伝子を示す。薄灰色の四角で囲まれた遺伝子はどちらにも分類できない遺伝子を示す。

(B–C) 明所 (Light) もしくは暗所 (Dark) で生育したトマト (*Sl*) (B) およびイネ (*Os*) (C) における *BPG4* オルソログの mRNA 発現量の解析結果。1/2MS 培地 (B) もしくは MS 培地 (C) において、WT (*Sl*; MicroTom, *Os*; Nipponbare) を明所もしくは暗所で 7 日間生育させた。内部標準には *SlExpressed* (B) もしくは *18S rRNA* (C) を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。ウェルチの両側 *t* 検定により統計処理を行った。

## **BGH2 は、黄化芽生えにおける過剰な Pchl<sub>a</sub> 蓄積を抑制することにより、脱黄化時の ROS 発生による枯死を回避させ、子葉の正常な緑化を促進する**

*BGH3* 発現は *BPG4* 発現と類似した器官特異性と光応答性を示したが *BGH3* 高発現植物体の表現型が *BPG4* 高発現植物体よりも弱かったこと、*BGH1* 発現はごく一部の器官でしか認められなかったことから、以降は暗所誘導性の *BPG4* パラログである *BGH2* に着目して解析を進めていくこととした。

*BGH2* は黄化芽生えの子葉において高発現していたことから、*BGH2* が暗所で生育した黄化芽生えにおける色素体制御およびクロロフィル代謝制御に関与すると考えた。暗所におけるクロロフィル代謝異常は、脱黄化時の子葉の緑化不全、白化枯死を引き起こすことが知られており、これは Pchl<sub>a</sub> などのクロロフィル前駆体が過剰に蓄積すると、光照射時に有害な ROS が発生するためだと考えられている (Meskauskienė et al., 2001; Stephenson et al., 2009)。そこで、脱黄化時の子葉の緑化に *BGH2* が与える影響を明らかにするために、WT、*BGH2* 欠損植物体および *BGH2* 高発現植物体を暗所で 7 日間生育させた後、12、24、48 時間の連続光照射を行い経時的に表現型を観察した (図 2-7 A)。その結果、WT、*BGH2-OX-2*、および *BGH2-OX-11* の子葉は黄色から徐々に緑色に変化した一方、*bgh2-1* および *bgh2-2* の子葉は緑化せず黄色のままであった (図 2-7 A)。脱黄化時の子葉の緑化を定量的に解析するための方法として、暗所で生育した植物体に 48 時間の連続光を照射し緑化できた子葉の割合を算出する Greening rate 法が知られており、Greening rate は脱黄化時の光酸化ストレスの程度を表す指標として使用可能であると考えられている (図 2-7 B) (Chen et al., 2013; Wang et al., 2020; Li et al., 2023)。そこで、暗所で 4、6、8 日間生育した WT、*BGH2* 欠損植物体および *BGH2* 高発現植物体における Greening rate を解析した結果、暗所で 6 日間生育した条件下において、WT と比較して、*bgh2-1* および *bgh2-2* では Greening rate が著しく低下し、*BGH2-OX-2* および *BGH2-OX-11* では Greening rate が増加することが明らかとなった (図 2-7 C-D)。一方、*bpg4-1* および *bpg4-2* においては Greening rate は低下しなかった (図 2-7 C, E)。また、*bgh2-1* および *bpg4bgh2* 二重変異体の Greening rate において有意差な差は認められなかった (図 2-7 F)。これらの結果より、*BGH2* が脱黄化時の子葉の正常な緑化において必須の役割を担っていること、および脱黄化時の子葉の緑化制御において *BGH2* と *BPG4* は冗長的に機能していないことが考察された。



## 図 2-7. BGH2 が脱黄化時の子葉の緑化制御機構の解析

(A) WT、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*BGH2-OX-2*、および *BGH2-OX-11* における脱黄化時の子葉の経時の変化の観察。植物体を 1/2MS 培地において 7 日間暗所で生育させた後、12、24、48 時間の連続光処理を行い子葉の表現型を観察した。

(B) Greening rate 法による脱黄化時の子葉の緑化の定量的解析の概要図。暗所で生育させた黄化芽生えに白色連続光を 48 時間照射し、緑化した芽生えの個体数と黄色のままの芽生えの個体数を数え、全体の中で緑化した個体の割合 (Greening rate) を算出する。子葉の一部でも緑化している個体を Green として数え、子葉全体が黄色のままの個体を Yellow として数えた。

(C) WT、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*BGH2-OX-2*、*BGH2-OX-11* または WT、*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、*BPG4-OX-10* の緑化表現型。植物体を 1/2MS 培地において 6 日間暗所で生育させた後、48 時間の連続光処理を行い子葉の表現型を観察した。

(D) WT、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*BGH2-OX-2*、および *BGH2-OX-11* の Greening rate の解析結果。植物体を 1/2MS 培地において 4、6、8 日間暗所で生育させた後、48 時間の連続光処理を行い Greening rate を算出した。平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。

(E) WT、*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、および *BPG4-OX-10* の Greening rate の解析結果。植物体を 1/2MS 培地において 6 日間暗所で生育させた後、48 時間の連続光処理を行い Greening rate を算出した。平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。

(F) WT、*bpg4-1*、*bgh2-1*、および *bpg4bgh2* の Greening rate の解析結果。植物体を 1/2MS 培地において 7 日間暗所で生育させた後、48 時間の連続光処理を行い Greening rate を算出した。平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。

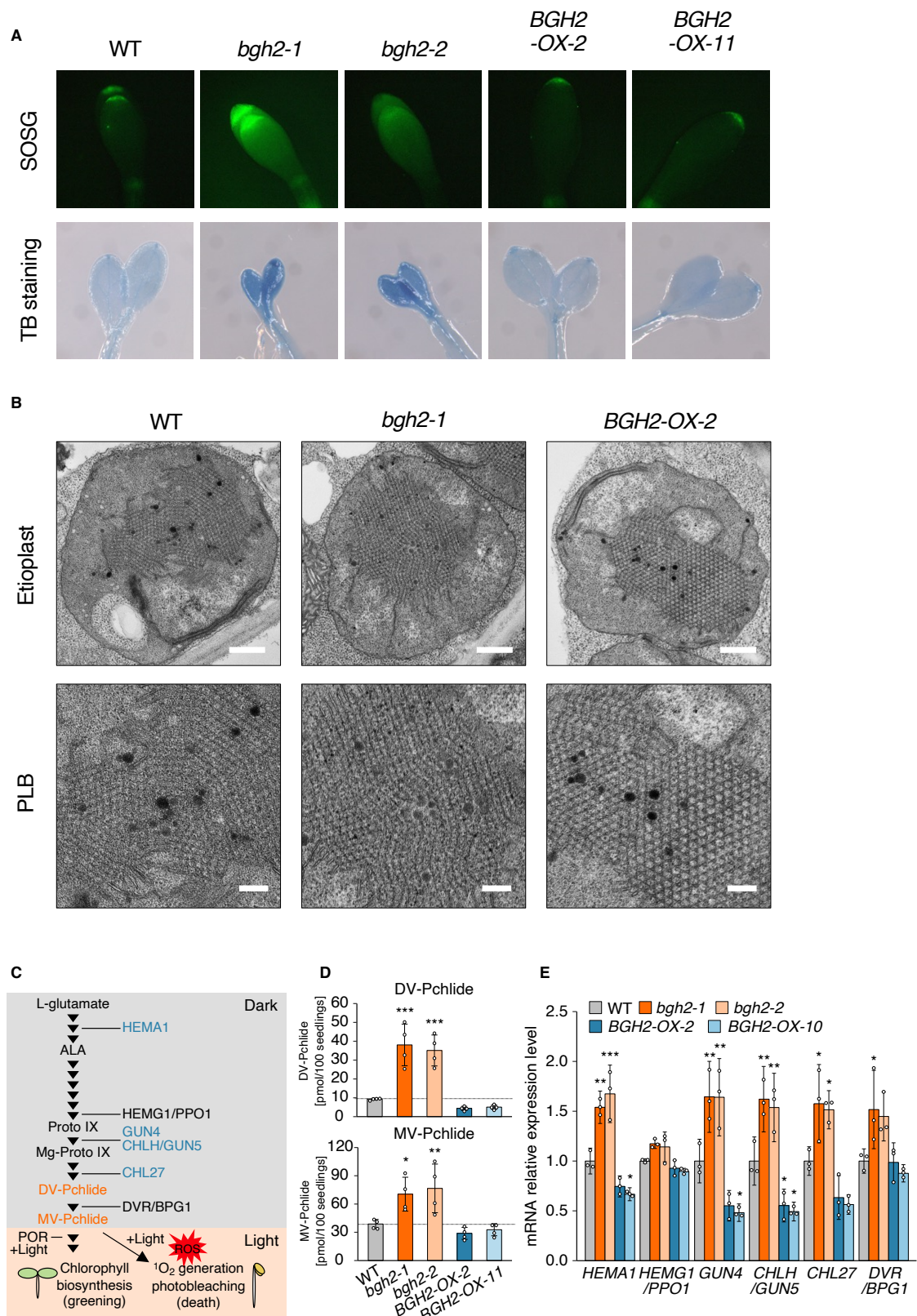
(D–F) において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

全ての実験は、明間莉乃氏によって行われた。

脱黄化時の子葉の白化・細胞死は、遊離のクロロフィル前駆体が光と反応して生成する一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) という ROS によって引き起こされると考えられている (op den Camp et al., 2003)。BGH2 が脱黄化時の正常な子葉の緑化を促進する分子機構を明らかにするために、まず  $^1\text{O}_2$  特異的に反応する蛍光試薬 Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) を用いた蛍光染色を行った。その結果、*bgh2-1* および *bgh2-2* において脱黄化時に強い緑色蛍光が観察された (図 2-8 A)。また、死細胞を特異的に染色する Trypan Blue (TB) 染色を行ったところ、緑化できなかった *bgh2-1* および *bgh2-2* の子葉において、明確な青色染色が認められた。これらの結果より、BGH2 欠損植物体においては脱黄化時に多量の  $^1\text{O}_2$  が発生し、細胞死が引き起こされたため子葉の緑化に異常をきたしたと考えられた。

次に、BGH2 が葉緑体の前駆体であるエチオプラストの発達に及ぼす影響を明らかにするため、TEM を用いてエチオプラストの内部構造を観察した (図 2-8 B)。エチオプラストは、内部に POR、Pchl $id$ e、NADPH および脂質から構成されるプロラメラボディ (PLB) という特徴的な構造を持ち、PLB は独特な周期性を有する連続膜構造として知られている (Bykowski et al., 2020)。エチオプラストおよび PLB の大きさについて、WT、*bgh2-1*、BGH2-OX-2 間で明確な差異は認められなかった。一方、BGH2-OX-2 においては WT よりも PLB の周期性が低下しており、*bgh2-1* では PLB の周期性が増加している傾向が観察された。PLB の周期性の増加は、Pchl $id$ e が過剰に蓄積した植物体に特徴的な形質であり (Bykowski et al., 2020)、*bgh2-1* において Pchl $id$ e が過剰に蓄積している可能性が示唆された。

そこで、BGH2 が暗所で生育した黄化芽生えの Pchl $id$ e 蓄積量に与える影響を明らかにするために、暗所で 7 日間生育させた黄化芽生えにおける内生 Pchl $id$ e 蓄積量を高速液体クロマトグラフィー (High-performance liquid chromatography, HPLC) で定量的に解析した。暗所で生育したシロイヌナズナ黄化芽生えでは、Pchl $id$ e は Divinyl (DV)-Pchl $id$ e と Monovinyl (MV)-Pchl $id$ e の 2 つの状態が存在する (図 2-8 C)。WT と比較して、*bgh2-1* および *bgh2-2* では、DV-Pchl $id$ e が約 3 倍、MV-Pchl $id$ e が約 2 倍蓄積していることが明らかとなった (図 2-8 D)。BGH2 による Pchl $id$ e 制御機構を明らかにするために、暗所で生育した WT と BGH2 欠損/高発現植物体における Pchl $id$ e 生合成関連遺伝子の発現を解析した。その結果、複数の Pchl $id$ e 生合成関連遺伝子の mRNA 発現が、*bgh2-1* および *bgh2-2* において WT と比較して増加し、BGH2-OX-2 および BGH2-OX-11 で低下していることが明らかとなった (図 2-8 E)。これらの結果より、BGH2 は Pchl $id$ e 生合成関連遺伝子の発現を網羅的に低下させることにより黄化芽生えにおける過剰な Pchl $id$ e 蓄積を抑制し、脱黄化時の光酸化ストレスを抑え、最終的に子葉の正常な緑化を促進する働きをしていると考察された。



**図 2-8. BGH2 欠損植物体および BGH2 高発現植物体における ROS 発生量、エチオプラストの内部構造、および Pchlride 代謝の解析**

**(A)** WT、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*BGH2-OX-2*、および *BGH2-OX-11* における SOSG 染色および TB 染色の結果。SOSG 染色は、暗所で 7 日間生育した植物体に 1 時間白色光を照射したのち、SOSG 試薬に暗所で 2 時間浸し、1 時間白色光を照射した植物体の緑色蛍光を観察した。TB 染色は、暗所で 7 日間生育した後 48 時間の白色光を照射した植物体について染色を行った。

**(B)** WT、*bgh2-1*、および *BGH2-OX-2* におけるエチオプラストの TEM 観察像。1/2MS 培地において暗所で 7 日間生育した黄化芽生えの子葉を観察した。Scale bars = 500 nm (上段) and 200 nm (下段)。

**(C)** シロイヌナズナのクロロフィル生合成経路およびクロロフィル生合成関連酵素の概要図。POR が酵素反応に光を必要とするため、暗所で生育した黄化芽生えでは Pchlride は蓄積する。光照射された際に、POR は Pchlride を還元することによりクロロフィルへと変換する。一方、POR と結合していない遊離の POR は光照射時に ROS の一種である  $^1\text{O}_2$  を発生させ、細胞死を引き起こす。矢印は、各反応ステップを示す。各遺伝子は、以下の酵素を表す。glutamyl-tRNA reductase (*HEMA1*); protoporphyrinogen oxidase (*HEMGI*); magnesium chelatase cofactor (*GUN4*); magnesium chelatase H subunit (*CHLH*); protochlorophyllide oxidoreductase (*POR*); 3,8-divinyl protochlorophyllide *a* 8-vinyl reductase (*DVR/BPG1*)。

**(D)** WT、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*BGH2-OX-2*、および *BGH2-OX-11* における内生 MV-Pchlride および DV-Pchlride の蓄積量。植物体は、1/2MS 培地において暗所で 7 日間生育させた。平均および SD は、生物学的 4 反復より得た。

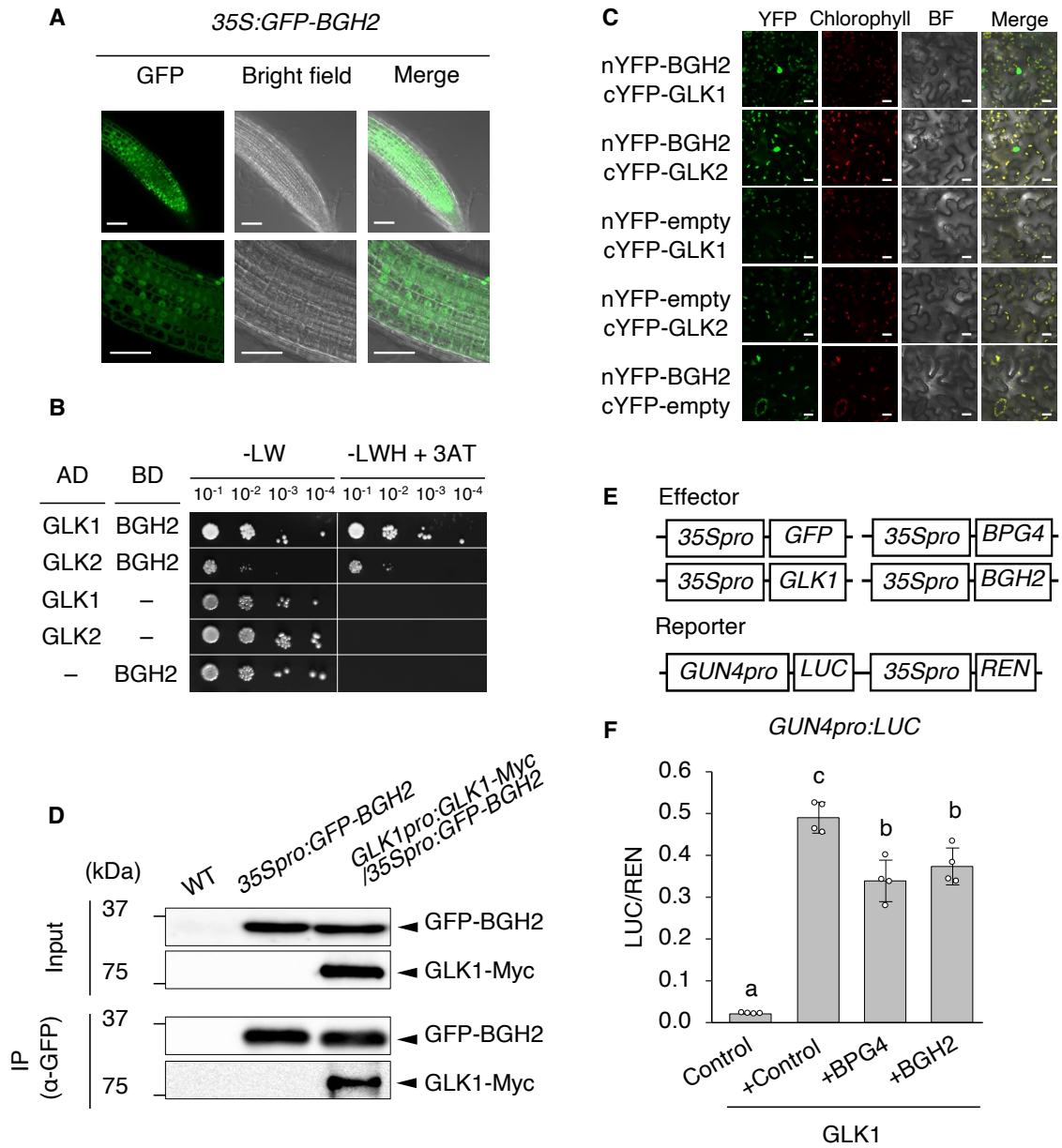
**(E)** WT、*bgh2-1*、*bgh2-2*、*BGH2-OX-2*、および *BGH2-OX-11* における Pchlride 生合成遺伝子の mRNA 発現量の RT-qPCR 解析の結果。植物体は、1/2MS 培地において暗所で 7 日間生育させた。内部標準には *eIF4a* を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。

**(D-E)** では、Dunnett のテストにより統計処理を行った (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。

**(A) (E)** の実験は、明間莉乃氏によって行われた。**(B)** の実験は、明間莉乃氏と京都大学電子顕微鏡室と協力して行った。**(D)** の実験は、明間莉乃氏、岸本純子氏 (北大)、田中亮一博士 (北大) と協力して行った。

## BGH2 は暗所における GLK の過剰な活性化を抑制することにより、脱黄化時の正常な子葉の緑化を促進する

第一章において、BPG4 がクロロフィル生合成および葉緑体発達のマスター転写因子である GLKs と相互作用し、GLK1 の転写活性化能を阻害することにより、明所でクロロフィル生合成関連遺伝子を含む PhANGs 発現を抑制することを明らかにした。BPG4 は核に局在して GLKs を抑制することが明らかになっているため、BGH2 が BPG4 と同様に核に局在するかどうか解析するために 35S プロモーターの下流で GFP-BGH2 を発現させた植物体 (35S:GFP-BGH2) を作出し、根において GFP 蛍光を観察した (図 2-9 A)。その結果、GFP-BGH2 の蛍光を核と細胞質において観察したことから、BGH2 は BPG4 と同様に細胞質と核に局在していると考えられた (図 2-9 A)。BGH2 は、GLK との相互作用において重要な役割を果たす A<sub>th</sub> 3526 ドメインを BPG4 と同様に有しているため (図 1-3 A)、BGH2 は GLKs と相互作用し、暗所で Pchl<sub>ide</sub> 生合成関連遺伝子の発現を抑制するのではないかと考えた。そこで、Y2H 法および BiFC 法を実施したところ、BGH2 が核内で GLK1 および GLK2 と相互作用することが明らかとなった (図 2-9 B-C)。また、暗所で生育したシロイヌナズナ黄化芽生えにおいて共免疫沈降解析 (CoIP) を行ったところ、GFP-BGH2 が *GLK1* プロモーター下で発現させた GLK1-Myc タンパク質と相互作用することが明らかとなった (図 2-9 D)。さらに、GLK 転写活性化能に対する BGH2 の影響を解析するために、GLK 標的遺伝子 *GUN4* プロモーターの制御下で LUC を発現させたレポーターを使ったプロトプラスト一過性レポーターアッセイを行った (図 2-9 E-F)。*GUN4pro:LUC* の相対シグナル強度は、35S:*GLK1* エフェクターを導入した場合、コントロールと比較して増加した一方、35S:*GLK1* エフェクターに加えて 35S:*BPG4* エフェクターまたは 35S:*BGH2* エフェクターを導入した場合は、35S:*GLK1* のみを導入した場合と比較して低下した (図 2-9 F)。これらの結果から、BGH2 は、BPG4 と同様には GLK 転写因子と核内で直接相互作用し、暗所で GLK の転写活性化能を抑制していると考えられた。



**図 2-9. BGH2 の細胞内局在解析および BGH2 による GLK1 転写活性化能の制御機構の解析**

**(A)** 35S:*GFP-BGH2* における GFP 蛍光の共焦点顕微鏡による観察結果。1/2MS 培地において明所で4日間生育した植物体の根を観察した。Scale bars = 50  $\mu$ m。

**(B)** BGH2 と GLK1、GLK2 の相互作用を解析した Y2H の結果。

**(C)** ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) における YFP の N 末端断片融合 BGH2 (nYFP-BGH2) と YFP の C 末端断片融合 GLK1、GLK2 (cYFP-GLK1、cYFP-GLK2) の BiFC の結果。Scale bar = 10  $\mu$ m。

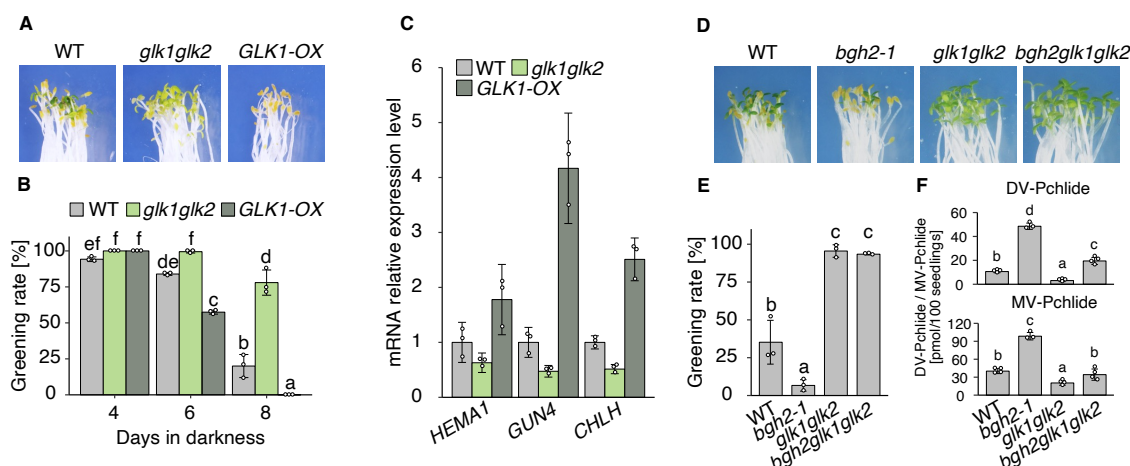
**(D)** シロイヌナズナにおいて GFP-BGH2 と GLK1-Myc の相互作用を解析した CoIP の結果。WT と 35S:*GFP-BGH2* または *GLK1pro:GLK1-Myc/35S:GFP-BGH2* を 1/2MS 培地において暗所で4日間生育させた。BGH2-GFP を GFP-Trap A を用いて免疫沈降させ、anti-GFP 抗体および anti-Myc 抗体を用いてタンパク質を検出した。

**(E-F)** BGH2 が GLK1 転写活性化能に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。野生型植物の葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた。**(E)** に使用したベクターの模式図を示す。レポーターとして、*GUN4* プロモーターの下流に LUC を発現させたベクターを用いた。レポーターの導入効率の補正には、レポーターベクター上に組み込んだ 35S プロモーターの下流で発現させた REN を用い、相対 LUC 活性 (LUC/REN) を、*GUN4* プロモーター活性として解析した。エフェクター [コントロール (GFP)、GLK1 (GLK1 + GFP)、GLK1 + BPG4、または GLK1 + BGH2] を *GUN4pro:LUC* レポーターと共に導入した。平均および SD は、生物学的4反復より算出した。グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

**(A-C)** の実験は、明間莉乃氏によって行われた。

GLK 転写因子は、光環境下で mRNA 発現量およびタンパク質蓄積量が増加し (Martín et al., 2016; Zhang et al., 2021)、明所においてクロロフィル合成および葉緑体発達のマスター転写因子として機能することが知られている (Waters et al., 2008; Waters et al., 2009)。一方、暗所で生育した黄化芽生えにおける GLK の知見は限定的であり、GLK が脱黄化時の子葉の緑化に与える影響は未解明な点が多く残されている。そこで、GLK が脱黄化時の子葉の緑化に与える影響を与えるかどうかを明らかにするために、*glk1glk2* 二重変異体および *GLK1* 高発現体 (*GLK1-OX*) において Greening rate の解析を行った。その結果、暗所で 6 日間および 8 日間生育した後に連続光照射した植物体において、*glk1glk2* 二重変異体では WT よりも Greening rate が増加し、*GLK1-OX* では Greening rate が低下した (図 2-10 A–B)。また、暗所で生育した黄化芽生えにおいて、Pchlide 生合成関連遺伝子の発現は *glk1glk2* で WT と比較して減少し、逆に *GLK1-OX* では増加していることが明らかとなった (図 2-10 C)。これらの結果から、GLK 転写因子は明所条件下だけではなく、暗所でも機能しており、脱黄化時の子葉の緑化に影響を与えることが示唆された。

最後に、BGH2 が GLKs を介して脱黄化時の子葉の緑化に影響を与えているかどうかを解明するため、WT、*bgh2-1*、*glk1glk2*、および *bgh2glk1glk2* の Greening rate を解析した (図 2-10 D–E)。その結果、*BGH2* 欠損によって引き起こされた脱黄化時に正常な緑化が損なわれる表現型は、*bgh2glk1glk2* 三重変異体においては完全に回復することが明らかとなった (図 2-10 D–E)。また、*bgh2-1* において増加していた内生 Pchlide 蓄積量は、*bgh2glk1glk2* においては WT と同程度にまで低下することが明らかとなった (図 2-10 F)。これらの結果より、BGH2 は GLKs と黄化芽生えにおいて直接相互作用し、その転写活性化能を阻害することで暗所での過剰な Pchlide 蓄積を抑制し、最終的に脱黄化時の子葉の正常な緑化を促進することが考察された。



**図 2-10. BGH2 による GLK 転写因子を介した脱黄化時の緑化制御の遺伝学的解析**

**(A–B)** WT、*glk1glk2*、*GLK1-OX* の緑化表現型 **(A)** および Greening rate の解析結果 **(B)**。植物体を 1/2MS 培地において 8 日間暗所で生育させた後、48 時間の連続光処理を行い子葉の表現型を観察した **(A)**。植物体を 1/2MS 培地において 4、6、8 日間暗所で生育させた後、48 時間の連続光処理を行い Greening rate を算出した **(B)**。平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。

**(C)** WT、*glk1glk2*、*GLK1-OX* における Pchl 生合成遺伝子の mRNA 発現量の RT-qPCR 解析の結果。植物体は、1/2MS 培地において暗所で 6 日間生育させた。内部標準には *eIF4a* を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。

**(D–E)** WT、*bgh2-1*、*glk1glk2* および *bgh2glk1glk2* の緑化表現型 **(D)** および Greening rate の解析結果 **(E)**。植物体を 1/2MS 培地において 7 日間暗所で生育させた後、48 時間の連続光処理を行い子葉の表現型を観察 **(D)**、Greening rate の算出を行った **(E)**。平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。

**(F)** WT、*bgh2-1*、*glk1glk2* および *bgh2glk1glk2* における内生 MV-Pchl および DV-Pchl の蓄積量。植物体は、1/2MS 培地において暗所で 7 日間生育させた。平均および SD は、生物学的 4 反復より得た。

**(B)(E)(F)** において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

**(A–B)(D–E)** の実験は、明間莉乃氏によって行われた。**(F)** の実験は、明間莉乃氏、岸本純子氏 (北大)、田中亮一博士 (北大) と協力して行った。

## PIF 転写因子は *BGH2* プロモーター領域の G-box 配列に結合し、*BGH2* 発現を暗所で活性化することにより脱黄化時の子葉の正常な緑化を促進する

BPG4 と BGH2 は GLK の転写活性化能を抑制するという同一のタンパク質機能を有する一方で、光環境に応じた発現様式が正反対である。その結果として植物に与える生理作用が異なっており、BPG4 は明所で誘導され葉緑体の発達を制御しており、BGH2 は暗所で誘導されエチオプラストの発達を制御している。すなわち、光環境に応じた *BPG4* と *BGH2* の mRNA 発現制御機構が、BPG4 と BGH2 の生理学的役割の違いを生み出していると考えられる。そこで、*BPG4* と *BGH2* の光環境依存的な発現調節機構を解明するため、BPG4 と BGH2 の発現を制御する光シグナル伝達関連の転写因子を探索した。

PIFs は光シグナル伝達において主要な役割を担う転写因子として広く知られており、*BGH2* (*AT5G02580*) は PIF 応答性マーカー遺伝子として複数の先行研究で使用されている (Zhang et al., 2013; Soy et al., 2016; Zhang et al., 2020b; Yan et al., 2021)。そこで、PIFs が *BPG4* と *BGH2* の mRNA 発現を制御する可能性を検証するために、明所および暗所で生育した WT および PIF1/3/4/5 四重変異体 (*pifQ*) における *BPG4*/*BGH2*/*BGH3* 発現を RT-qPCR により解析した (図 2-11 A)。明所で生育した条件において *pifQ* における *BPG4* 発現は WT の約 50% に減少したが、暗所においては WT および *pifQ* の双方において *BPG4* 発現は非常に低く、有意な差は認められなかった (図 2-11 A)。一方、*BGH2* 発現は、明所では WT および *pifQ* のいずれにおいても非常に低かったが、暗所で WT において高い発現が検出された。また、暗所で生育した *pifQ* では、*BGH2* 発現が WT の約 15% にまで減少した (図 2-11 A)。 *BGH3* 発現は、明所および暗所の双方において WT と *pifQ* 間で有意な差が検出されなかった (図 2-11 A)。これらの結果より、PIFs は明所においては部分的に *BPG4* 発現を活性化していること、および PIFs は暗所における *BGH2* 発現の活性化において主要な働きをしていることが示唆された。

次に、PIFs が *BPG4* および *BGH2* の mRNA 発現を直接活性化している可能性を検証するために、プロトプラスト一過的発現系において *BPG4* および *BGH2* プロモーターを用いた LUC レポーターアッセイを行った (図 2-11 B-C)。その結果、*35S:PIF4* エフェクターの導入により *BPG4pro:LUC* のシグナル強度が約 2.8 倍、*BGH2pro:LUC* のシグナル強度が約 5.1 倍に増加することが明らかとなった (図 2-11 C)。 *BGH3pro:LUC* のシグナル強度は、*35S:PIF4* エフェクターによって変化しなかった (図 2-11 C)。これらの結果から、PIFs は *BPG4* および *BGH2* の発現を直接活性化することが示唆された。

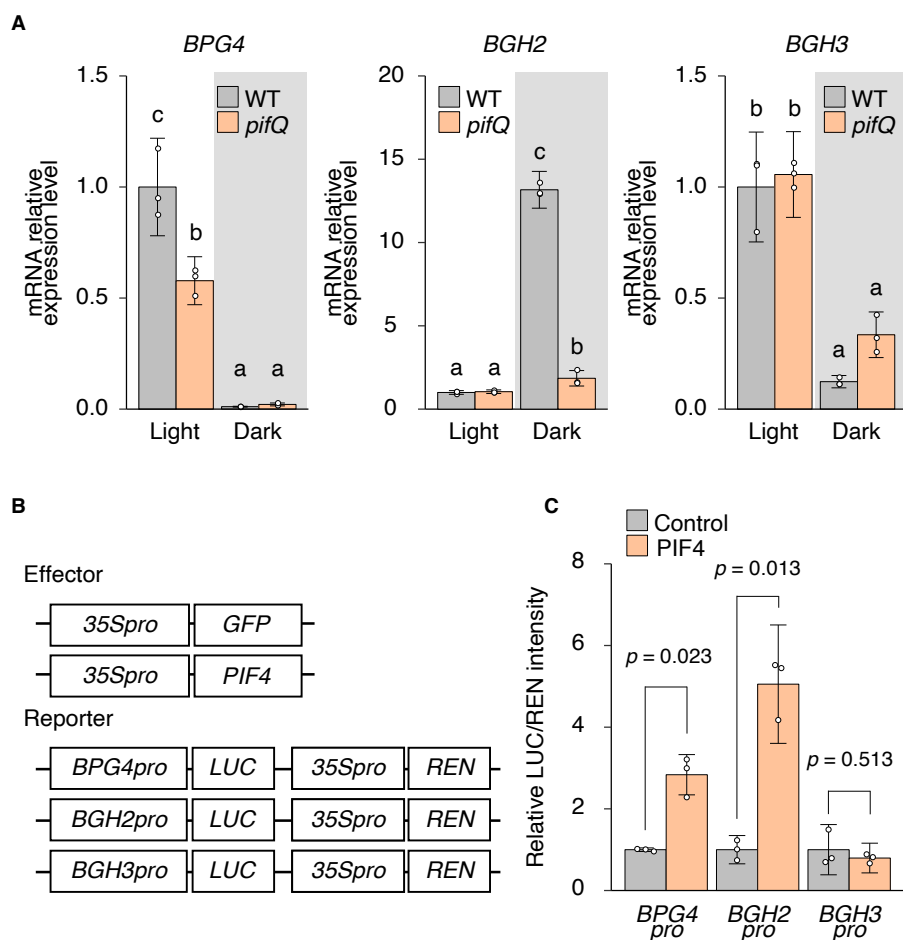


図 2-11. PIF 転写因子による *BPG4/BGH2/BGH3* 発現制御機構の解析

(A) WT、*pifQ* における *BPG4/BGH2/BGH3* の mRNA 発現量の RT-qPCR 解析の結果。植物体は、1/2MS 培地において明所または暗所で 7 日間生育させた。内部標準には *eIF4a* を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。

(B–C) PIF4 が *BPG4/BGH2/BGH3* のプロモーター活性に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。野生型植物の葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた。(B) に使用したベクターの模式図を示す。レポーターとして、*BPG4/BGH2/BGH3* プロモーターの下流に LUC を発現させたベクターを用いた。レポーターの導入効率の補正には、レポーターベクター上に組み込んだ 35S プロモーターの下流で発現させた REN を用い、相対 LUC 活性 (LUC/REN) を、*BPG4/BGH2/BGH3* プロモーター活性として解析した。エフェクター [コントロール (GFP)、または PIF4] を各レポーターと共に導入した。平均および SD は、生物学的 3 反復より算出した。

(A) において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。(C) においては、ウェルチの両側  $t$  検定により統計処理を行った。

(A) の実験は、明間莉乃氏によって行われた。

PIFs による *BPG 4* および *BGH2* の mRNA 発現活性化に関する詳細な分子機構を明らかにするために、*BGH2* のプロモーター領域を解析した。その結果、*BGH2* プロモーターにおいて TSS の上流 492 bp (G-box 1) および上流 390 bp (G-box 2) に G-box 配列 (CACGTG) が検出された (図 2-12 A-B)。そこで、PIF4 の DNA 結合ドメイン (DBD) のリコンビナントタンパク質と G-box 配列を含んだ DNA プローブを用いた EMSA を行ったところ、G-box 1 および G-box 2 を含む DNA プローブと PIF4 DBD の複合体シグナルが観察された (図 2-12 C)。また、この PIF4 DBD-DNA 複合体のシグナルは、G-box 配列 (CACGTG) を AAAAAA に変異すると完全に消失した (図 2-12 C)。さらに、*BGH2* プロモーター領域中の G-box 配列を AAAAAA に変異させたベクターを用いて LUC レポーターアッセイを行った。*35S:PIF4* エフェクターの導入により、全てのレポーターにおいて LUC シグナル強度は増加したものの、G-box 2 に変異を導入したレポーターにおいてはシグナル強度の増加割合が低下した (図 2-12 D)。*BGH2* と同様に、*BPG4* プロモーターにおいても二つの G-box 配列が検出され (図 2-12 A-B)、EMSA および PIFs が *BPG4* プロモーター領域の G-box にも結合したことから、同様の EMSAs および LUC レポーターアッセイを行ったところ、*BPG4* においても *BGH2* と同様の結果が得られた (図 2-12 C-D)。これらの結果より、PIFs がプロモーター領域内の G-box に直接結合することで、暗所では *BGH2* 発現を、明所では *BPG4* 発現を活性化すると考察された。

(図は次頁に掲載)

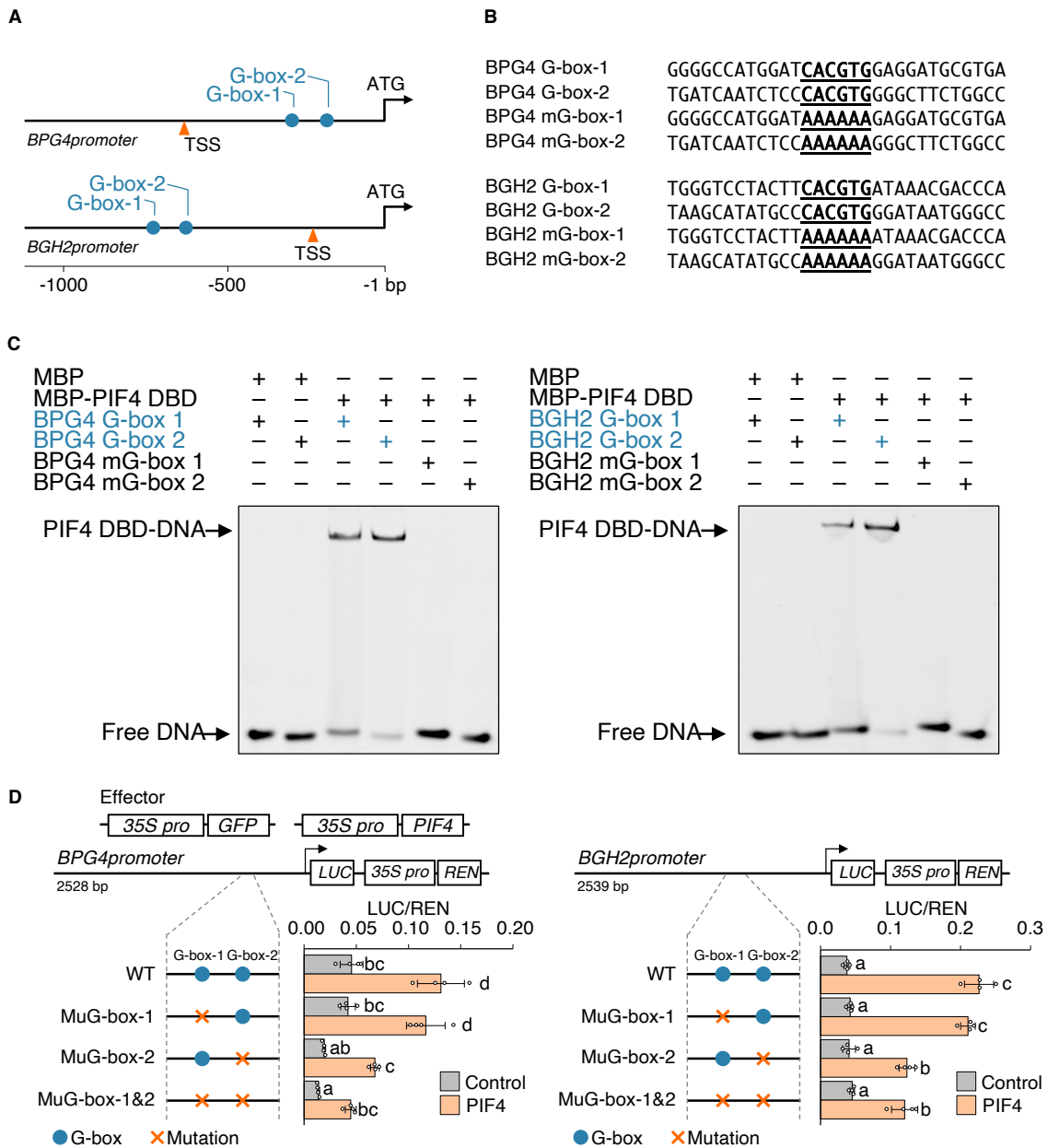
## 図 2-12. PIF 転写因子による *BPG4/BGH2* プロモーター領域への結合を介した *BPG4/BGH2* 発現活性化機構の解析

**(A-B)** *BPG4* および *BGH2* のプロモーター領域の模式図 **(A)** および *BPG4/BGH2* プロモーターにおける G-box とその周辺配列 **(B)**。

**(C)** PIF4 と *BPG4/BGH2* プロモーター領域中の G-box もしくは変異 G-box (mG-box) の結合を解析した EMSA 実験の結果。プローブとして、*BPG4/BGH2* プロモーター領域の G-box 配列を含む FAM 標識二本鎖 DNA を用いた。使用したプローブ配列を **(B)** に示す。タンパク質は、MBP (コントロール)、MBP-BES1 DNA 結合ドメイン (DBD) を用いた。

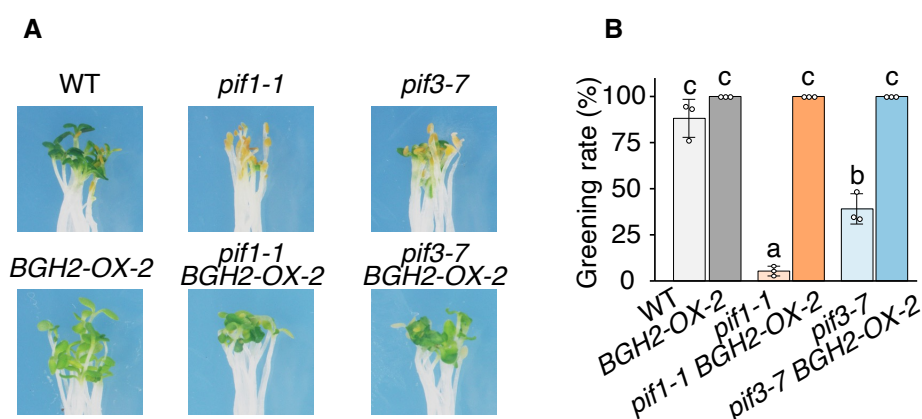
**(D)** *BPG4* および *BGH2* のプロモーター領域における G-box 配列が PIF4 による *BPG4/BGH2* 発現の転写制御に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。野生型植物の葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた。レポーターとして、G-box (CACGTG) に変異 (AAAAAA) を導入した *BPG4/BGH2* プロモーターの下流に LUC を発現させたベクターを用いた。*BPG4/BGH2* プロモーター活性は図 2-11 (C) と同様に求めた。エフェクター [コントロール (GFP)、PIF4] を各レポーターと共に導入した。平均および SD は、生物学的 4 反復より算出した。グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

**(C)** の実験は、明間莉乃氏と協力して行った。



(図の説明は前頁に記載)

PIFs は、暗条件下での Pchl<sub>ide</sub> 生合成を抑制し、脱黄化時の正常な子葉の緑化を促進することが報告されている (Monte et al., 2004; Moon et al., 2008; Stephenson et al., 2009)。暗所で生育させた *pif* の黄化芽生えは、過剰量の Pchl<sub>ide</sub> が蓄積し、脱黄化時に光酸化ストレスにより白化枯死することが知られている (Monte et al., 2004; Stephenson et al., 2009; Chen et al., 2013)。PIFs および BGH2 のいずれも脱黄化時の正常な子葉の緑化を促進すること、および PIFs が暗条件下で BGH2 発現を活性化することから、PIFs が BGH2 を介して脱黄化時の正常な子葉の緑化を促進すると考えた。特に PIF1 および PIF3 は、PIFs による Pchl<sub>ide</sub> 生合成制御において主要な働きを担うことが知られていることから (Chen et al., 2013)、BGH2-OX-2 と *pif1-1* 変異体または *pif3-7* 変異体を交配し、PIFs と BGH2 の遺伝的相互作用を解析した (図 2-13 A-B)。その結果、*pif1-1* および *pif3-7* においては、WT と比較して著しく Greening rate が低下したが、BGH2-OX-2 との交配により *pif1-1* および *pif3-7* の白化枯死表現型は完全に回復した (図 2-13 A-B)。これらの結果より、BGH2 は PIFs の下流において、Pchl<sub>ide</sub> 蓄積を抑制を介して脱黄化時の正常な子葉の緑化を促進していると考察された。



**図 2-13. PIF 転写因子と BGH2 の遺伝学的相互作用の解析**

(A-B) WT、*pif1-1*、*pif3-7*、BGH2-OX-2、*pif1-1* BGH2-OX-2、および *pif3-7* BGH2-OX-2 の緑化表現型 (A) および Greening rate の解析結果 (B)。植物体を 1/2MS 培地において 7 日間暗所で生育させた後、48 時間の連続光処理を行い子葉の表現型の観察 (A)、および Greening rate の算出 (B) を行った。平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

## HY5 転写因子は、明所で *BPG4* 発現を活性化する

明所において *BPG4* 発現は *pifQ* で減少した一方、*pifQ* においても WT の約 50% の発現が維持されていた (図 2-11 A)。この結果は、PIFs 以外の転写因子が明所で *BPG4* 発現を活性化している可能性を示唆している。そこで、*BPG4* 発現を活性化する他の転写因子を同定するために、光シグナル伝達のもう一つの主要な転写因子である HY5 に着目した。ChIP-on-chip 法により HY5 の標的遺伝子を網羅的に探索した先行研究により、HY5 が *BPG4* 発現を活性化する可能性が示唆されていた (Lee et al., 2007)。そこで、明所および暗所で生育した WT および *hy5* における *BPG4/BGH2/BGH3* 発現を RT-qPCR により解析した (図 2-14 A-B)。*BGH2* および *BGH3* 発現はいずれの条件においても有意な変化が認められなかった一方、*hy5* における *BPG4* 発現は明所で生育した際に WT に比べて約 50% にまで低下した (図 2-14 A-B)。そこで、*BPG4* プロモーターを用いた一過的 LUC レポーターアッセイを実行したところ、35S:*HY5* エフェクターの導入によって *BPG4pro:LUC* のシグナル強度は増加しないことが明らかとなった (図 2-14 C-D)。これらの結果は、HY5 が明所で *BPG4* 発現を活性化していることを示唆しているが、その詳細な活性化機構の解明にはさらなる解析が必要であると考えられた。

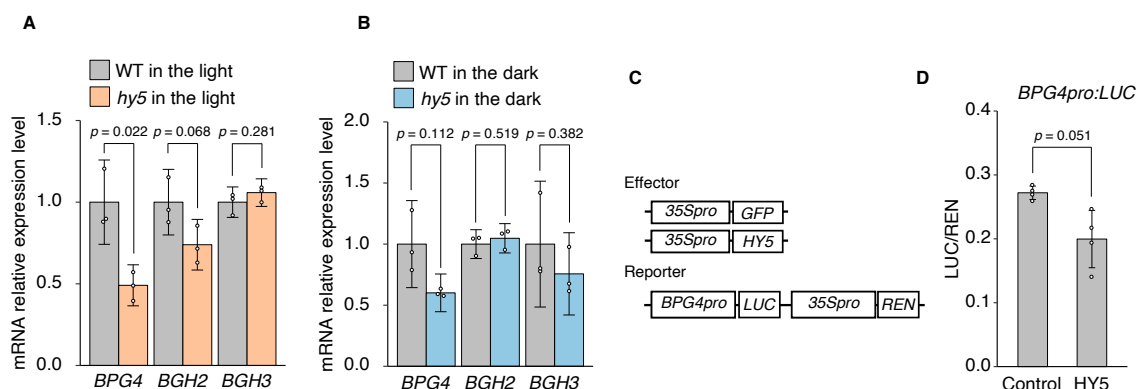


図 2-14. HY5 転写因子による *BPG4/BGH2/BGH3* 発現制御機構の解析

(A-B) WT、*hy5* における *BPG4/BGH2/BGH3* の mRNA 発現量の RT-qPCR 解析の結果。植物体は、1/2MS 培地において明所で 8 日間 (A) または暗所で 6 日間 (B) 生育させた。内部標準には *eIF4a* を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。ウェルチの両側 *t* 検定により統計処理を行った。

(C-D) HY5 が *BPG4* のプロモーター活性に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。野生型植物の葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた。(C) に使用したベクターの模式図を示す。レポーターとして、*BPG4* プロモーターの下流に LUC を発現させたベクターを用いた。相対 LUC 活性 (LUC/REN) を、*BPG4* プロモーター活性として解析した。エフェクター [コントロール (GFP)、または HY5] をレポーターと共に導入した。平均および SD は、生物学的 4 反復より算出した。ウェルチの両側 *t* 検定により統計処理を行った。(B) の実験は、明間莉乃氏によって行われた。

## GLK 転写因子は、*BPG4* プロモーター領域に直接結合し、明所で *BPG4* 発現を活性化する

近年、明所において HY5 が *GLK* 発現を直接活性化することが報告された (Zhang et al., 2024)。GLK はクロロフィル生合成および葉緑体の発達制御において重要な働きを果たす転写因子であり、その転写活性化能は *BPG4* および *BGH2* によって抑制される (図 2-9 F)。重要な機能を持つ因子の機能は、フィードバック機構などにより精密に調節される例が多いことから、GLK 転写因子が光シグナル伝達下で *BPG4* 発現を活性化する因子の候補ではないかと考えた。

この仮説を検証するために、まず *glk1glk2*、*GLK1-OX*、WT における *BPG4/BGH2/BGH3* 発現を解析した (図 2-15 A)。明所において、*BPG4* 発現は *GLK1-OX* では WT の約 3 倍に増加した一方、*glk1glk2* では暗所で生育した植物体と同程度にまで減少した (図 2-15 A)。*BGH2* 発現は明所ではいずれの植物においても低かったが、暗所では *GLK1-OX* において WT と比較して増加した。*BPG4* プロモーターを用いた LUC レポーターアッセイを行った結果、*35S:GLK1* エフェクターの導入により *BPG4pro:LUC* のシグナル強度が約 9.8 倍に増加した (図 2-15 B-C)。*BGH2pro:LUC* のシグナル強度も *35S:GLK1* エフェクターの導入によりわずかに増加したが、*BGH2* 発現は明所および暗所において WT と *glk1glk2* 間で有意な差が認められなかったため、実際の植物体においては GLK 転写因子による *BGH2* 発現の活性化の寄与度は小さいと考察された。*BGH3* 発現は、*BPG4* と同様に GLKs によって活性化されたと考えられた (図 2-15 A-C)。さらに、先行研究で報告された GLK1/2 の ChIP-seq データを解析したところ、*BPG4*、*BGH2*、および *BGH3* のプロモーター領域に GLK1/2 が結合していることが示唆された (図 2-16) (Tu et al., 2022)。これらの結果から、GLKs は明所において *BPG4* および *BGH3* の mRNA 発現を直接活性化していると考察された。また、第一章で明らかにしたように、*BPG4* が GLK の転写活性化能を抑制し GLK の過剰な活性化を防ぐ分子機能を有するという観点からは、GLKs による *BPG4* 発現の活性化は GLK 転写活性化能のフィードバック機構として機能していると考えられた。すなわち、GLK が自らの抑制因子である *BPG4* の発現を活性化することにより、自身の過剰な転写活性化能を抑制し、葉緑体発達の恒常性を維持していると考えられた。

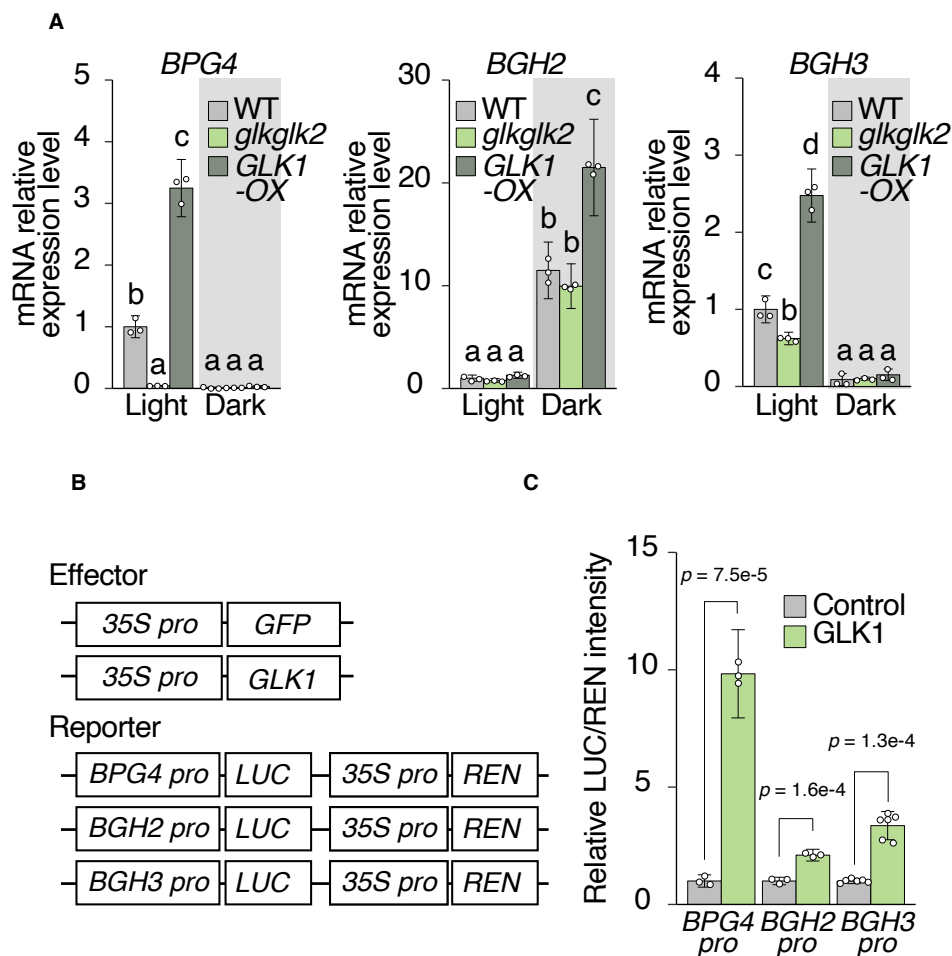
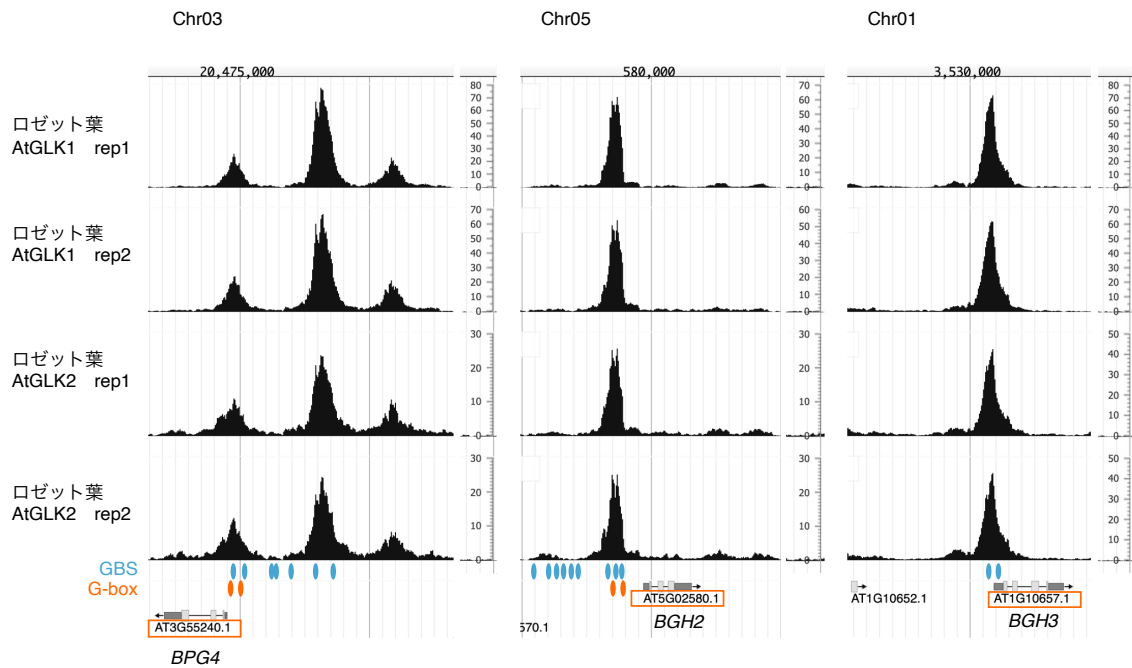


図 2-15. GLK 転写因子による *BPG4/BGH2/BGH3* 発現制御機構の解析

(A) WT、*glk1glk2*、*GLK1-OX* における *BPG4/BGH2/BGH3* の mRNA 発現量の RT-qPCR 解析の結果。植物体は、1/2MS 培地において明所または暗所で 6 日間生育させた。内部標準には *eIF4a* を用い、平均および SD は、生物学的 3 反復より得た。グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

(B–C) GLK1 が *BPG4/BGH2/BGH3* のプロモーター活性に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。野生型植物の葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた。(B) に使用したベクターの模式図を示す。レポーターとして、*BPG4/BGH2/BGH3* プロモーターの下流に LUC を発現させたベクターを用いた。レポーターの導入効率の補正には、レポーターベクター上に組み込んだ 35S プロモーターの下流で発現させた REN を用い、相対 LUC 活性 (LUC/REN) を、*BPG4/BGH2/BGH3* プロモーター活性として解析した。エフェクター [コントロール (GFP)、または GLK1] を各レポーターと共に導入した。平均および SD は、生物学的 3–6 反復より算出した。ウェルチの両側 *t* 検定により統計処理を行った。

(A) の実験は、明間莉乃氏によって行われた。



**図 2-16. GLK 転写因子のゲノム上の結合箇所を解析した先行研究の ChIP-seq の結果**  
 先行研究 (Tu et al., 2022) から抽出した GLK1/2 の *BPG4/BGH2/BGH3* ゲノムへの結合データ。青い円は GBS を、オレンジの円は G-box を示す。

先行研究により、GLK 結合モチーフはいくつかのコンセンサス配列が予測されている (図 2-17 A) (Waters et al., 2009; Franco-Zorrilla et al., 2014; Zubo et al., 2018; Ahmad et al., 2019; Zhang et al., 2021; Tu et al., 2022)。GLK による詳細な *BPG4* 活性化機構を明らかにするために、*BPG4* プロモーターにおける GLK 結合配列の同定を試みた。先行研究により報告されていた GLK 結合部位 (GLK-binding-site, GBS) およびその相補配列を比較したところ、RAATCY モチーフ (相補配列: RGATTY) が多くの GBS において保存されていることが明らかとなった。この配列は Tu et al. (2022) によって報告された GLK コア結合モチーフ (RGATYY) と概ね合致していた (図 2-17 B)。*BPG4* プロモーター領域には 7 つの RAATCY 配列 (RAATCY が 3 つ、相補配列である RGATTY が 4 つ) が含まれており、そのうち 2 つ (GBS-1 および GBS-2) は *BPG4* プロモーター領域の TSS と ATG の間に位置していた (図 2-18 A-B)。様々な長さの *BPG4* プロモーター領域 (2528 bp、1200 bp、627 bp) を用いた一過的 LUC レポーターアッセイにより、*BPG4* プロモーター領域における TSS と ATG の間の領域は、GLK が *BPG4* 発現を活性化するのに十分であることが示された (図 2-18 C)。そこで、GLK 転写因子が GBS-1 および GBS-2 に直接結合することにより *BPG4* 発現を活性化していると考えた。

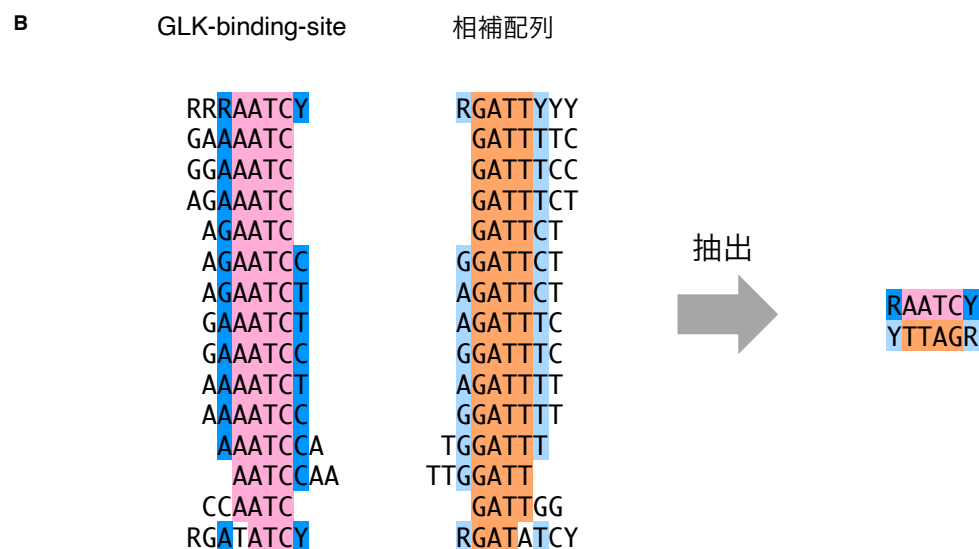
この仮説を検証するために、まず GLK1 リコンビナントタンパク質と GBS-1 または GBS-2 を含む DNA プローブを用いた EMSA を行った (図 2-18 D)。GBS-1 および GBS-2 の両方で GLK1-DNA 複合体が観察されたが、GBS-2 における複合体のシグナル強度は GBS-1 由来のシグナル強度よりも強かった (図 2-18 D)。Competitor (競合用 DNA 配列) として FAM 標識していない DNA プローブを加えた際、GBS-1 のシフトは特異的 (Sp) Competitor および変異 (Mu) Competitor の両方によって消失したが、GBS-2 のシフトは Sp Competitor の添加によってのみ弱まり、Mu Competitor の添加によっては維持された (図 2-18 D)。最後に、*BPG4* プロモーター領域の GBS に変異を導入したベクターを用いた一過的 LUC レポーターアッセイを行った (図 2-18 E)。35S:*GLK1* エフェクターの導入により、GBS-1 変異レポーターの LUC シグナル強度は増加した一方、GBS-2 変異レポーターで LUC シグナル強度の増加は全く発生しなかった (図 2-18 E)。これらの結果より、GLK 転写因子は *BPG4* プロモーター領域における GBS-2 への直接結合を介して *BPG4* 発現を活性化していると考えられた。

ここまでの結果を統合すると、*BPG4* 発現は明所で PIFs と GLKs によって活性化され、*BGH2* 発現は暗所で PIFs によって活性化されと考えられた。この *BPG4* および *BGH2* 発現の光環境に応じた正反対の制御によって、明所において葉緑体制御を担う *BPG4* と暗所においてエチオプラスト制御を担う *BGH2* が色素体制御における役割を分担していると考えられた。*BPG4* ファミリーは、明所および暗所において色素体の恒常性を維持することにより、光エネルギー由来の ROS ストレスの発生を抑止し、植物の健全な成長を維持する重要な役割を担っていると考えられる。

**A**

| GLKs | 報告された<br>GLK-binding-site | 相補配列     | 参考文献                                   |
|------|---------------------------|----------|----------------------------------------|
| GLK1 | AAAATCC                   | GGATTTT  | Tu et al., 2022, Nature Communications |
|      | GAAAATC                   | GATTTTC  |                                        |
|      | AAATCCA                   | TGGATT   |                                        |
|      | AGATTTC                   | GAAATCT  |                                        |
|      | GAAATCC                   | GGATTTC  |                                        |
|      | AGAATCC                   | GGATTCT  |                                        |
|      | AATCCAA                   | TTGGATT  |                                        |
|      | AAAATCT                   | AGATTTT  |                                        |
|      | GATTTC                    | GGAAATC  |                                        |
|      | AGAAATC                   | GATTCT   |                                        |
| GLK1 | CCAATC                    | GATTGG   | Water et al., 2009, The Plant Cell     |
| GLK1 | CCAATC                    | GATTGG   | Ahmad et al., 2019, Plant Physiology   |
| GLK1 | GATTCT                    | GAATC    | Zhang et al., 2021, Developmental Cell |
| GLK1 | RGATATCY                  | RGATATCY | Franco-Zorrilla et al., 2014, PNAS     |
|      | AGATTCT                   | GAATCT   |                                        |
| GLK2 | RGATATCY                  | RGATATCY | Zubo et al., 2018, Plant Physiology    |
|      | RGATYYY                   | RRRAATCY |                                        |

R = A/G    Y = C/T



**図 2-17. GLK 転写因子の結合 *cis* 配列の解析**

**(A)** 先行研究により報告された GBS およびその相補的配列をまとめた表。

**(B)** (A) で報告された配列の比較と、抽出されたモチーフ配列。

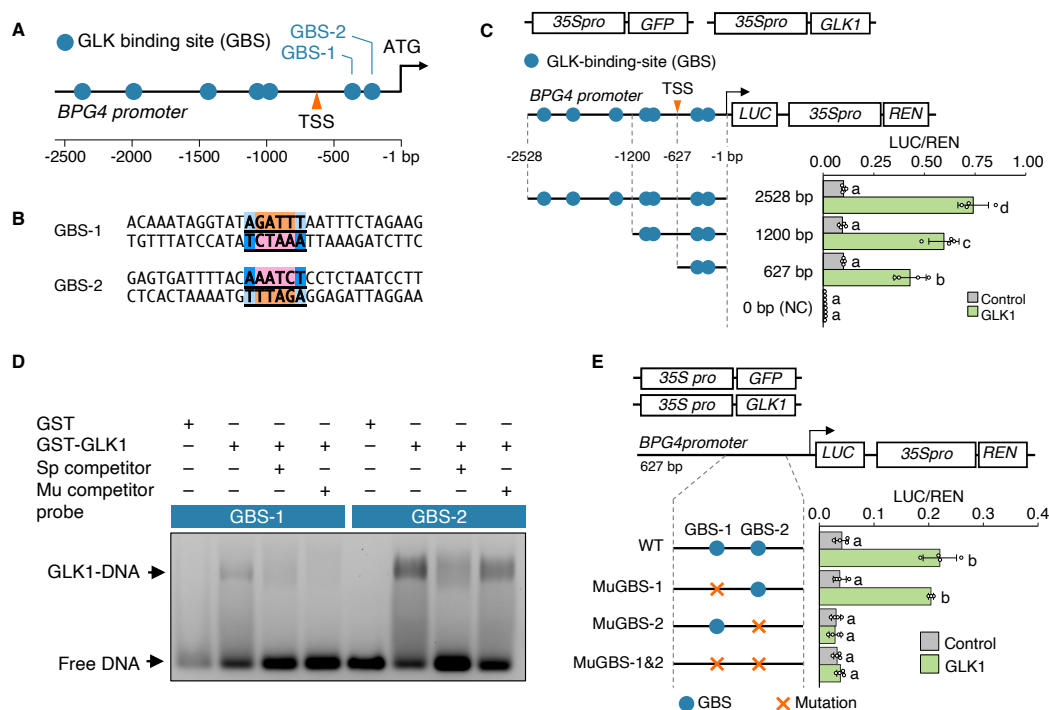


図 2-18. GLK 転写因子による *BPG4* プロモーター領域への結合を介した *BPG4* 発現活性化機構の解析

(A–B) *BPG4* プロモーター領域の模式図 (A) および *BPG4* プロモーターにおける GBS とその周辺配列 (B)。

(C) *BPG4* プロモーター領域の長さが GLK1 による *BPG4* 発現の転写制御に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。野生型植物の葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた。レポーターとして *BPG4* プロモーターの下流に LUC を発現させたベクターを用いた。エフェクター [コントロール (GFP)、GLK1] を各レポーターと共に導入した。平均および SD は、生物学的 4 反復より算出した。

(D) GLK1 と *BPG4* プロモーター領域中の GBS の結合を解析した EMSA 実験の結果。プローブとして、*BPG4* プロモーター領域の GBS 配列を含む FAM 標識二本鎖 DNA を用いた。特異的 (Sp) Competitor プローブとして FAM 標識していない二本鎖 DNA を用いた。変異 (Mu) Competitor プローブとして FAM 標識していない GBS とその周辺配列を変異させた二本鎖 DNA を用いた。タンパク質は、大腸菌で発現させた GST (コントロール)、GST-GLK1 を用いた。

(E) *BPG4* プロモーター領域における GBS 配列が GLK1 による *BPG4* 発現の転写制御に与える影響を解析した一過性ルシフェラーゼアッセイの結果。レポーターとして、GBS-1 または GBS-2 とその周辺配列に変異 (AAAAA) を導入した *BPG4* プロモーターの下流に LUC を発現させたベクターを用いた。平均および SD は、生物学的 4 反復より算出した。

(C) (E) において、グラフ上のアルファベットは、Tukey-Kramer 法において  $p < 0.05$  でサンプル間に統計的な有意差があるグループを示す。

## 考察

第一章では、BPG4 は明所における光合成器官で特異的に誘導され、GLK 転写因子を抑制することで PhANGs の適切な発現制御、最適な内生クロロフィル含量の維持、ROS 発生の抑制に寄与する葉緑体恒常性維持因子（ホメオスタシスファクター）として機能することを明らかにした（図 1-17）。本章では、BPG4 の相同性遺伝子 BGH2 が暗所で特異的に高発現し（図 2-5 A-C）、エチオプラスト内のクロロフィル生合成を適切に調節する上で重要な役割を果たしていること明らかにした（図 2-7）。暗所で生育した際や自然環境下で深い土壌中で発芽した際に、黄化芽生えのエチオプラスト内では迅速な緑化のためにクロロフィル前駆体（主に Pchl<sub>ide</sub>）が一定量は生合成されて蓄積していると考えられている（図 2-1）。一方で、過剰な Pchl<sub>ide</sub> の蓄積は光酸化ストレスやそれに伴う細胞死を引き起こすことが知られており（Meskauskiene et al., 2001）、土壌中や暗所条件から明所条件に移行した際に適切に光環境の変化に順応するために黄化芽生えにおけるクロロフィル代謝は厳密に制御される必要があると考えられている。本章で中心的に解析した BGH2 は GLK 転写因子を介して Pchl<sub>ide</sub> 生合成関連遺伝子の発現を抑制する機能をもつ（図 2-8-図 2-9、図 2-19）。BGH2 欠損すると、GLK 転写活性化能が過剰に活性化し、Pchl<sub>ide</sub> がエチオプラスト内に過剰に蓄積し、脱黄化時に遊離の Pchl<sub>ide</sub> から有害な <sup>1</sup>O<sub>2</sub> が生成され、細胞死が引き起こされる（図 2-19）。すなわち、暗所で誘導される BGH2 は、適切な Pchl<sub>ide</sub> 蓄積を維持し、光酸化ストレスや細胞死を回避するためのエチオプラスト恒常性維持因子（ホメオスタシスファクター）として機能すると考察された。

これまでの先行研究により、GLKs が PhANGs 発現を直接活性化することにより葉緑体発達を促進する「葉緑体発達のマスター転写因子」として機能することは多くの研究者の共通認識となっている（Waters et al., 2009; Cackett et al., 2022; Frangedakis et al., 2024）。一方、明所における GLK の機能の解明は精力的に進められてきたが、暗所における GLK の役割に関する知見は乏しい。本章では、暗所における GLK の機能の重要性に焦点を当てて解析を行った。暗所において、GLKs は Pchl<sub>ide</sub> 生合成関連遺伝子の発現とエチオプラスト内での Pchl<sub>ide</sub> 蓄積を促進する（図 2-10 C, F）。植物体を長期間（6-8 日間）暗所で生育させた場合、GLK1-OX は WT よりも著しく低い Greening rate を示した一方、glk1glk2 では Greening rate は大幅増加した（図 2-10 A-B）。これらの結果は、黄化芽生えを長期間暗所で生育した際に GLK が過剰に活性化すると、Pchl<sub>ide</sub> が過剰に蓄積し、植物にとって有害になることを示唆している。一方で、近年の先行研究では、GLK の活性化が子葉の緑化に正の影響を与えることが示唆されている（Zhang et al., 2021; Zhang et al., 2024）。植物体を暗所で短期間（4 日間）生育させた後に光照射した場合、GLK1 高発現植物体は WT よりも早く緑化することが報告されている（Zhang et al., 2021）。また、同様の実験において glk1glk2 は WT よりも子葉の緑化速度が遅く、内生クロロフィル含量も低下することが示されている（Zhang et al., 2024）。これらの結果は、黄化芽生えを短期間暗所で生育させた際には、GLK の活性化が脱黄化時の子葉の緑化を促進することを示唆している。これらを総合すると、GLK の活性化

は植物成長において正と負の両方の影響を持つと考えられ、適切な発生段階で GLK を適度に活性化することが、正常な葉緑体分化および光独立栄養成長の開始にとって重要であると考えられる。

先行研究 (Lv et al., 2019; Li et al., 2021) および本研究の第一章において、GLK の過剰な活性化は光酸化ストレスや、光合成活性の低下、細胞死を引き起こすことが示唆されている。したがって、GLK の活性は環境に応じて適切なレベルに維持されるよう厳密に調節されていると考えられる。本章では、GLK が自身の抑制因子である BPG4 の mRNA 発現を直接活性化することを明らかにした。この GLK による BPG4 発現の活性化は、明所で余剰な GLK の活性化を防ぐためのフィードバック機構として機能していると考えられる (図 2-20)。BPG4 と BGH2 の mRNA 発現は異なる光条件で活性化することを考えると、BPG4 と BGH2 は生育段階や環境条件に応じた GLK 転写活性化能の微調整に寄与している可能性が考察される。BPG4 および BGH2 のさらなる解析は、各発達段階における適切な GLK 調節の詳細な制御メカニズムの解明に寄与すると考えられる。

BPG4 と BGH2 は、GLK の転写活性化能を抑制するという共通したタンパク質機能を有する一方で、光環境に応じて異なる発現様式を示すことにより、役割を分担して色素体を制御していると考えられた。光環境に応じた BPG4 と BGH2 発現制御機構には、PIFs と GLKs が関与することが明らかとなった (図 2-11–図 2-18)。暗所における BGH2 発現の活性化は、PIF が BGH2 プロモーター領域中の G-box 配列に直接結合することにより行われると考察された (図 2-11–図 2-12、図 2-19)。また、明所における BPG4 発現の活性化には、PIFs と GLKs の双方が関与すると考察された (図 2-11–図 2-18)。これらの明所および暗所における BPG4 ファミリーの発現制御機構に関しては、第一章の BR シグナル伝達の内容も交えながら総合考察にて議論する。

前述のように、クロロフィルやその前駆体は生物にとって猛毒である ROS を生じる性質があり、植物はクロロフィル代謝系を厳密に制御することによって、光酸化ストレスによる枯死を回避している。特に、暗所における Pchl<sub>ide</sub> の過剰蓄積を防ぐために、植物は複数の段階でクロロフィル生合成を制御していることが知られている。代表的なものとしては、(A) FLU を介した翻訳後段階の制御と (B) PIF を介した転写段階の制御が知られている (Li et al., 2009)。暗所における Pchl<sub>ide</sub> 制御機構において最も寄与度が高いと考えられている経路が、**(A) FLU/POR/CHL27 複合体によるグルタミル tRNA 還元酵素 (GluTR) のフィードバック抑制**である。クロロフィル生合成はグルタミン酸から始まり、GluTR によるグルタミル tRNA<sup>Glu</sup> の還元によりクロロフィルを含むテトラピロール独自の代謝経路に入る (小林, 2012)。したがって、クロロフィル生合成の制御において GluTR の活性制御は最も重要な律速段階の一つと考えられている。この GluTR の酵素活性レベルでの制御において最も重要な役割を果たすと考えられている因子が FLU である (Meskauskienė et al., 2001) (図 2-21)。FLU は Pchl<sub>ide</sub> や他のクロロフィル前駆体の蓄積に応じて、GluTR と直接結合して酵素反応を阻害する。さらに、FLU は CHL27 や POR と複合体形成することにより、GluTR の代謝

産物である 5-アミノレブリン酸 (ALA) 生合成を制御している (図 2-21)。ALA の量は Pchl<sub>ide</sub> 蓄積量と強い相関を持つことが知られており、*FLU* 欠損変異体 (*flu*) では、暗所で Pchl<sub>ide</sub> を過剰に蓄積し、その後の光照射により枯死することから、*FLU* は暗所における Pchl<sub>ide</sub> 蓄積の制御において主要な役割を持つと考えられている (小林, 2012) (図 2-21)。

一方、クロロフィル生合成酵素の転写制御に関しては、PIF 転写因子の寄与が大きいことが知られている (Moon et al., 2008; Stephenson et al., 2009; Cackett et al., 2022) (図 2-21)。この制御機構に関して、第一に **(B-1) PIF によるクロロフィル生合成遺伝子の直接的な発現抑制**が知られている (図 2-21)。PIF はクロロフィル生合成遺伝子のプロモーター領域に直接結合することにより、そちらの遺伝子発現を網羅的に抑制する機能を持つ (Moon et al., 2008)。第二の経路として **(B-2) PIF による GLK 転写因子の発現抑制を介したクロロフィル生合成遺伝子の発現抑制**が考えられる (図 2-21)。GLK はクロロフィル生合成のマスター転写因子であり (Waters et al., 2009)、PIF は *GLK* の mRNA 発現を直接抑制することが知られている (Martín et al., 2016)。したがって、暗所で PIF が *GLK* 発現を抑制することにより、*HEMA1*、*GUN4*、*CHLH/GUN5*、*CHL27* などのクロロフィル生合成遺伝子の発現が低下していると考えられる (図 2-21)。本研究は、**(B-3) PIF 下流における BGH2-GLK モジュールを介したクロロフィル生合成遺伝子の発現抑制**を明らかにしたものであり、PIF によるクロロフィル生合成遺伝子の転写制御の第三の経路に位置づけられると考える (図 2-21)。PIF は暗所で *BGH2* 発現を活性化し、*GLK* のタンパク質レベルでの過剰な活性化を抑止することにより最適なクロロフィル生合成の維持に寄与していると考えられる (図 2-21)。このように、植物はより厳密かつ精密にクロロフィル代謝を調節するために多層的な制御機構を発達させてきたと考察された。*BGH2* は黄化芽生えにおける多層的クロロフィル生合成制御によるエチオプラスト恒常性維持に貢献していると考えられた。

第一章において、BPG4 ファミリーは、ストレプト藻類 (クロロキブス藻綱、クレブソルミディウム藻綱、車軸藻綱、接合藻綱) と陸上植物に進化的に広く保存されており、被子植物以降は 3 つのサブグループ (BPG4、BGH2、BGH3) に分かれていると予測された (図 1-2)。先行研究により、BPG4 ファミリーのタンパク質機能は植物種間で高度に保存されていることが示唆されている (Zhang et al., 2020a; Wolters et al., 2023)。本章により、シロイヌナズナだけでなく、トマトやイネにおいても、明所誘導型の BPG4 サブグループ、BGH3 サブグループと暗所誘導型の BGH2 サブグループが保存されていることが明らかとなった (図 2-6)。トマトやイネの *BPG4* オルソログのプロモーター領域には、*AtBPG4* および *AtBGH2* と同様に、典型的な PIF および GLK 結合モチーフ (G-box および GBS) が含まれており、さらに先行研究の ChIP-seq の結果は *OsGLK1/2* および *SlGLK1/2* が *BPG4* ファミリーのプロモーターに直接結合することが示唆されている (Tu et al., 2022)。これらの結果を総合すると、*GLK* を抑制する BPG4 ファミリーのタンパク質機能は、植物種間で広く保存されていることに加えて、BPG4 サブグループおよび BGH2 サブグループの光環境に対する発現制御機構も植物種間で保存されている可能性が考察された。

近年発表された論文において、BPG4/RPGE/PEL ファミリーは葉緑体だけでなく、他の色素体の分化・発達においても重要な機能を持つ因子として認識され始めている (Ichikawa et al., 2006; Iorizzo et al., 2016; Kim et al., 2016; Zhang et al., 2020a; Han et al., 2023; Kim et al., 2023; Wolters et al., 2023; Tachibana et al., 2024; Wang et al., 2024)。BPG4 および BGH3 はロゼット葉などの光合成器官で強く発現しているのに対し、BGH2 は葉緑体以外の色素体を持つ根や花などで強く発現していることが明らかとなった (図 2-5)。先行研究において、BGH2/RPGE1 は、アミロプラストの発達と胚軸の重力屈性を制御することが報告されている (Kim et al., 2016)。さらに、BGH2/PEL2 欠損により、花卉において異所的に葉緑体発達が促進されることから、BGH2/PEL2 が花卉における白色体 (Leucoplast) の発達に関連している可能性も示唆されている (Han et al., 2023)。また、ニンジン (*Daucus carota*, Dc)において、根のオレンジ色を司る Y 遺伝子座の原因遺伝子 *DCAR\_032551* は、DcRPGE1/BGH2 をコードしていることが近年報告された (Iorizzo et al., 2016; Wang et al., 2024)。DcRPGE1/BGH2 は、GLK と同じ GARP ファミリーに属する ARABIDOPSIS PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 2 (APRR2) と相互作用し、その転写活性化能を低下させることにより根におけるカロテノイド生合成を抑制し、有色体 (Chromoplast) の発達を制御すると考えられている (Wang et al., 2024)。BPG4 ファミリーの多様な役割のさらなる解析により、クロロフィルだけではなく他の色素の生合成や葉緑体も含めた多様な色素体の制御に関する理解が深まり、将来的には糖含量や栄養素含量が増加した作物や野菜の分子育種に繋がることが期待される。

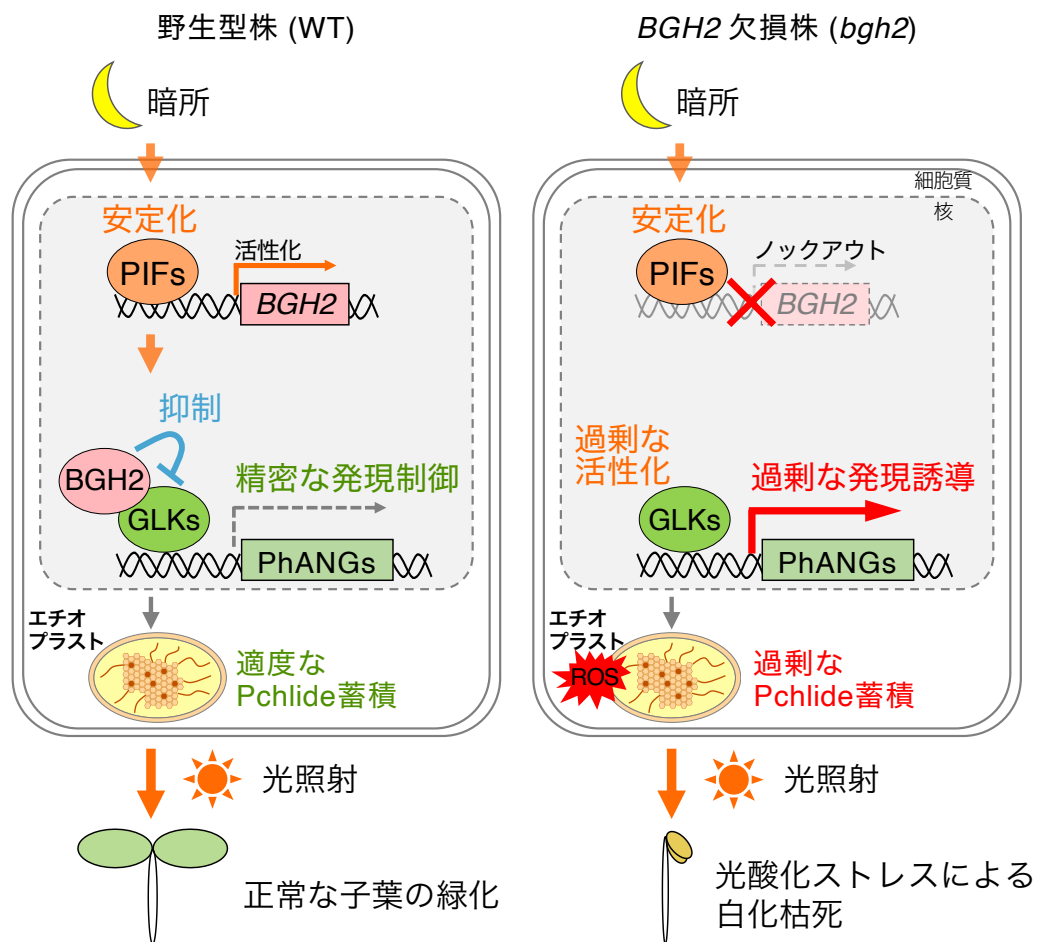
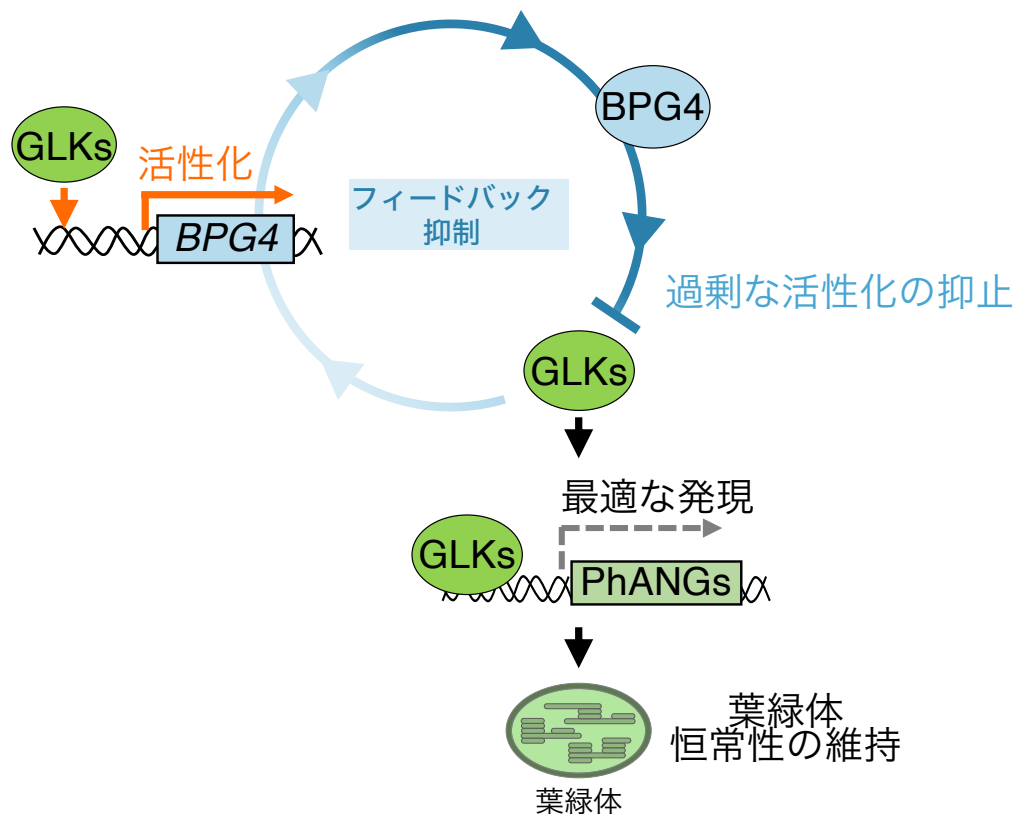


図 2-19. 暗所における *BGH2* によるエチオプラスト制御機構の作業仮説

WT の黄化芽生えにおいては、暗所で安定化した PIF 転写因子が *BGH2* 発現を直接活性化する。*BGH2* は、暗所での GLK 転写活性化能を抑制することにより、Pchl<sub>ide</sub> 生合成遺伝子などの光合成関連核遺伝子 (PhANGs) 発現を適正な状態に維持し、エチオプラストにおける Pchl<sub>ide</sub> 蓄積量が最適化する。これにより、脱黄化時の ROS 発生が回避され、子葉が正常に緑化できる。*BGH2* 欠損植物体 (*bgh2*) においては、GLK の転写活性化能が過剰に活性化し、PhANGs 発現が過剰に誘導されし、Pchl<sub>ide</sub> の生合成が過剰に促進される。暗所での Pchl<sub>ide</sub> の過剰蓄積は、脱黄化時に深刻な光酸化ストレスとそれに伴う細胞死を引き起こす。



**図 2-20. BPG4 を介した GLK 転写活性化能のフィードバック制御機構の作業仮説**

BPG4 は GLK の転写活性化能を抑制する機能を持つ。GLK は、*BPG4* のプロモーター領域に存在する GBS 配列に直接結合することにより、*BPG4* の mRNA 発現を直接活性化する。したがって、GLK が自らの抑制因子である BPG4 の mRNA 発現を活性化することにより、GLK は自らの転写活性化能をフィードバック的に抑制していると考えられた。このフィードバック制御機構により、明所において GLK の余剰な活性化が抑止され、PhANGs 発現が最適化され、葉緑体発達の恒常性が維持されることが考えられた。

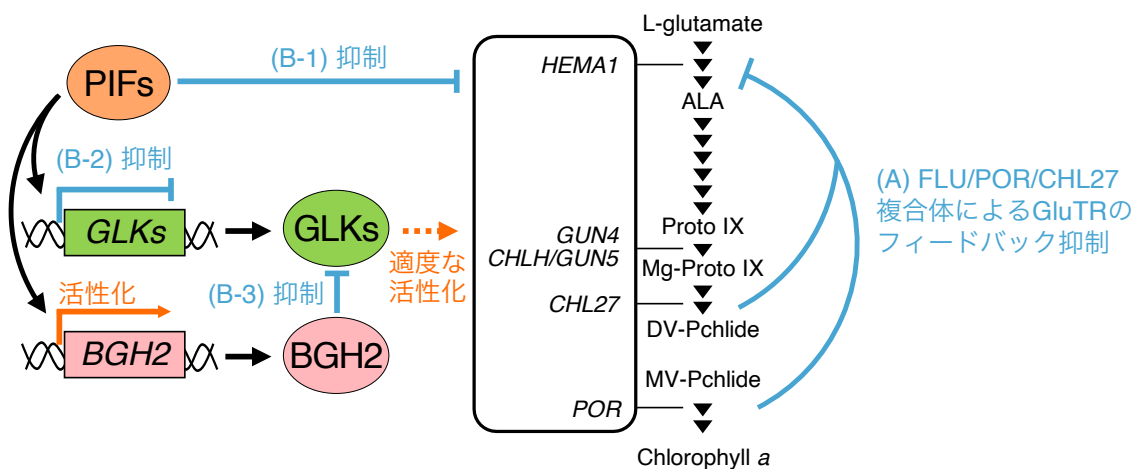


図 2-21. 暗所における多層的なクロロフィル生合成制御機構の作業仮説

暗所において、クロロフィル生合成経路は、(A) 翻訳後の酵素レベルでの制御と (B) PIF 転写因子による転写レベルでの制御を多層的に受けることにより、最適な代謝を維持していると考えられる。(A) においては、FLU が POR と CHL27 と複合体形成することにより、HEMA1 遺伝子がコードする GluTR の活性を抑制し、ALA の量をフィードバック的に制御している。(B) においては、(B-1) PIF による直接的なクロロフィル生合成遺伝子の発現抑制、(B-2) PIF による GLK 発現制御を介したクロロフィル生合成遺伝子の発現抑制、および (B-3) PIF 下流における BGH2-GLK モジュールを介したクロロフィル生合成遺伝子の発現抑制の三つの経路が存在すると考察された。本研究で明らかにした (B-3) 経路においては、PIF が直接 BGH2 発現を暗所で活性化することにより、GLK の過剰な活性化を抑止し、クロロフィル生合成遺伝子の最適な発現活性化に寄与していると考えられた。

## 材料と方法

### 植物体と栽培条件

#### ・シロイヌナズナの植物体および栽培条件

シロイヌナズナの Columbia (Col-0) を野生型植物 (WT) として用いた。*hy5* (SALK\_096651C)、*pif1-1* (CS66041)、*pif3-7* (CS66042)、*pifQ* (CS66049) は ABRC から購入した。*glk1glk2* および *GLK1-OX* は先行研究において報告されている株を使用した (Waters et al., 2008; Tokumaru et al., 2017)。*bpg4-1*、*bpg4-2*、*BPG4-OX-2*、*BPG4-OX-10* は第一章で作出したものを使用した。

種子を、Seed solution [70% (v/v) EtOH, 0.5% Triton X-100] により 20–30 分滅菌したのち、100% エタノールで 1 分滅菌した。1/2 希釈のムラシゲ&スクーグ (MS) (Duchefa)、0.8% phytoagar (Duchefa) および 1.5% スクロースから構成される培地で発芽させた。実験に応じて、1/2MS 培地から土壌に移植した。植物は、白色光条件下 [長日条件 (16 時間明期/8 時間暗期)] もしくは、暗黒条件下で、22°Cにおいて生育させた。

#### ・トマトの植物体および栽培条件

トマトの Micro-Tom を野生型植物 (WT) として用いた。シロイヌナズナと同様の条件で栽培した。

#### ・イネの植物体および栽培条件

イネの Nipponbare を野生型植物 (WT) として用いた。生育は、ムラシゲ&スクーグ (MS) (Duchefa)、0.8% phytoagar (Duchefa) および 1.5% スクロースから構成される培地で発芽させた。植物は、白色光条件下 [長日条件 (16 時間明期/8 時間暗期)] もしくは、暗黒条件下で、28°Cにおいて生育させた。

### シロイヌナズナ形質転換植物体の作出

#### ・*BPG2/3-OX (35Spro:BPG2/3)*

*BGH2* および *BGH3* の全長 CDS をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) により *CaMV 35S* プロモーターを含むバイナリーベクター pGWB2 (Nakagawa et al., 2007) (<http://shimane-u.org/nakagawa/gbv.htm>) にクローニングした。得られたベクターをアグロバクテリウムに形質転換し、floral-dip 法 (Clough and Bent, 1998)によりシロイヌナズナ Col-0 に形質転換した。得られた植物体は、25 mg/L ハイグロマイシンを含む 1/2MS 培地によって選抜した。この植物体の作出は、明間莉乃氏と協力して行った。

・ 35Spro:GFP-BGH2

BGH2 および BGH3 の全長 CDS をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) により CaMV 35S プロモーターと GFP の CDS を含むバイナリーベクター pGWB6 (Nakagawa et al., 2007) (<http://shimane-u.org/nakagawa/gbv.htm>) にクローニングした。作成したベクターを用いて、BGH2/3-OX と同様に形質転換体を作出した。この植物体の作出は、明間莉乃氏と協力して行った。

・ BPG4/BGH2/BGH3pro:GUS

BPG4/BGH2/BGH2 のプロモーター領域と第一エクソンを含む 2.5 kb/2.0 kb/2.0 kb の領域をシロイヌナズナ Col-0 のゲノムから増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) により GUS を含むバイナリーベクター pGWB3 (Nakagawa et al., 2007) にクローニングした。作成したベクターを用いて、BGH2/3-OX と同様に形質転換体を作出した。これらの植物体の作出は、明間莉乃氏と協力して行った。

・ GLK1pro:GLK1-Myc/35Spro:GFP-BGH2

GLK1 のプロモーター領域 (2.5 kb) とゲノム全体 (ストップコドンなし) をシロイヌナズナ Col-0 のゲノムから増幅し、p10xMyc-HSP-entry にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) により pBCKB にクローニングした。p10xMyc-HSP-entry は、光田展隆博士より分譲していただいた pGFP-HSP-entry を基に作成した。pBCKB は光田展隆博士より分譲していただいた。作成したベクターを用いて、35Spro:GFP-BGH2 を背景に BGH2/3-OX と同様の手法で形質転換した。得られた植物体は、10 mg/L バスタを含む 1/2MS 培地によって選抜した。実験にはホモ化していない植物体を用いた。

・ bgh1-1、bgh2-1、bgh2-2、bgh3-1、bgh3-2

bgh1-1、bgh2-1、bgh2-2、bgh3-1、bgh3-2 変異体は CRISPR-Cas9 システムを用いて作製した。CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp/>)を用いて、各遺伝子に対して 2 つのガイド RNA を設計した。gRNA の有効性および BPG4、BGH1、BGH2、BGH3 におけるオフターゲット効果を Guide-it sgRNA In Vitro Transcription and Screening System (Takara)により確認した。作成した gRNA を pKIR1.1 (Tsutsui and Higashiyama, 2016) の AarI 部位にクローニングし、得られたベクターを BGH2/3-OX と同様の方法で Col-0 植物に形質転換した。変異株をサンガーシーケンシングにより選抜し、CRISPR-Cas9 導入遺伝子のヌル分離体を各変異体として用いた。これらの植物体の作出は、明間莉乃氏と協力して行った。

・ *bpg4bgh2*、*bpg4bgh3*、*bgh2bgh3*、*bpg4bgh2bgh3*、*bgh2glk1glk2*、*pif1-1 BGH2-OX-2*、*pif3-7 BGH2-OX-2*

*bpg4-1* と *bgh2-1* または *bgh3-1* を交配させることにより、*bpg4bgh2* または *bpg4bgh3* を作出した。*bgh2-1* と *bgh3-1* を交配させることにより、*bgh2bgh3* を作出した。*bpg4bgh2* と *bpg4bgh3* を交配させることにより、*bpg4bgh2bgh3* を作出した。*bgh2-1* と *glk1glk2* を交配させることにより、*bgh2glk1glk2* を作出した。*pif1-1* と *BGH2-OX-2* を交配させることにより、*pif1-1 BGH2-OX-2* を作出した。*pif3-7* と *BGH2-OX-2* を交配させることにより、*pif3-7 BGH2-OX-2* を作出した。これらの植物体の作出は、明間莉乃氏と協力して行った。

形質転換体の作出に使用したプライマー配列を補足表 2-1 に示す。ゲノム編集による欠損植物体の作出に使用したプライマー配列を補足表 2-2 に示す。変異体の遺伝型決定に使用したプライマー配列を補足表 2-3 に示す。

### 新鮮重あたりの内生クロロフィル含量の定量

植物体の地上部を、BEADS CRUSHER  $\mu$ T-01 (TAITEC, Japan) を用いて液体窒素中でホモジナイズし、80% (v/v) アセトン 0.5–1 mL に加え、暗所で氷上 15 分間インキュベートした後、4°C、12000 rpm で 15 分間遠心した。遠心した上清の 646.6 nm、663.6 nm、750 nm における吸光度を吸光度計 (SHIMAZDU, Japan) で測定した。上清におけるクロロフィル *a* とクロロフィル *b* 濃度は、先行研究に基づき、以下の式に則り計算した (Porra et al., 1989)。

$$\text{クロロフィル } a \text{ } [\mu\text{g Chl} / \text{ml}] = 12.25 * (A_{663.6} - A_{750}) - 2.55 * (A_{646.6} - A_{750})$$

$$\text{クロロフィル } b \text{ } [\mu\text{g Chl} / \text{ml}] = 20.31 * (A_{646.6} - A_{750}) - 4.91 * (A_{663.6} - A_{750})$$

$$\text{クロロフィル } a + b \text{ } [\mu\text{g Chl} / \text{ml}] = 17.76 * (A_{646.6} - A_{750}) + 7.34 * (A_{663.6} - A_{750})$$

### Greening rate の解析

1.5% (w/v) スクロースを添加した 1/2MS 培地で、22°C 暗所で一定期間生育させた幼植物を白色光 (蛍光灯; 100–120  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  または擬似太陽光 LED; 140–170  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を 48 時間照射した。Greening rate は、各植物体において少なくとも 35 個体の幼植物から、緑色または黄色の子葉の割合を数えることによって決定した。緑色および黄色の子葉の判定基準は図 2-7 B に示した。

### SOSG 染色

SOSG 染色は、先行研究と同様に行った (Li et al., 2023)。7 日間暗所で生育した幼植物に連続白色光 (130  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を 1 時間照射した後、SOSG solution [10  $\mu\text{M}$  SOSG (Invitrogen, S36002)、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.7)] に暗所で 2 時間浸した。50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.7) で濯いだ後、連続白色光 (130  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を 1 時間照射し、実体顕微鏡 (Olympus SZX16; 励起波長 460–480 nm、発光波長 495–540 nm) で観察した。

## TB 染色

TB 染色は先行研究と同様に行った (Wang et al., 2020)。7 日間暗所で生育した幼植物に連続白色光 ( $130 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を 48 時間照射した後、染色液 {TE 飽和フェノール [フェノール含量 69% (w/v)]: 乳酸: グリセロール: 1 mg/mL trypan blue = 9: 10: 10: 10} に浸し、95°C で 5 分間インキュベートした。室温で 6 時間静置した後、染色液を捨てて脱色液 (抱水クロラル 125g, milliQ 50 mL, pH 1.2) で濯ぎ、脱色液中で一晩静置し、実体顕微鏡で観察した。

## TEM によるエチオプラストの観察

植物体試料として、暗所で 7 日間生育させた幼植物の子葉を用いた。試料を固定液 [2% グルタルアルデヒド, 4% パラホルムアルデヒド, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4)] に浸し、4°C で一晩インキュベートした。0.1 M PBS で洗浄後、1% 四酸化オスミウムに浸して、さらに一晩固定した。エタノール溶液希釈系列を用いて脱水した後、Luveak-812 エポキシ樹脂 (ナカライテスク) で包埋した。重合後、サンプルをウルトラミクロトーム (ARTOS 3D, Leica) で超薄切片 (厚さ 70 nm) に切り出し、1% 酢酸ウラニルとクエン酸アルカリ鉛で染色した。超薄切片を透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 Flash, JEOL) で観察した。植物体の固定、切片の作成、染色は、京都大学 電子顕微鏡室によって行われた。

## 蛍光顕微鏡観察

35S::GFP-BGH2 における GFP 蛍光を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 [LSM700 (Zeiss, Jena, Germany)] で観察した。本実験は明間莉乃氏によって行われた。

## $\beta$ -glucuronidase (GUS) 染色

GUS 発現の組織化学的検出には *BPG4pro::GUS*、*BGH2pro::GUS*、*BGH3pro::GUS* を用いた。染色は、第一章と同様に行った。

## Yeast two-hybrid (Y2H) 解析

*BGH2* の全長 CDS および *BPG4* のドメイン断片配列をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) に基づきバイナリーベクター pDEST32 (Invitrogen) にクローニングした。*GLK1*、*GLK2* を pDEST22 (Invitrogen) にクローニングしたベクターは第一章で作成したものを用いた。作成したベクターを用いて、先行研究 (Shimada et al., 2015) と同様にして実験を行った。ベクターを yeast strain Y187 (Clontech, USA) に形質転換し、-LW もしくは -LWH 培地で生育させた。使用した DNA 配列を補足表 2-4 に示す。ベクターの作成および実験は、明間莉乃氏によって行われた。

## Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析

*BGH2* の全長 CDS をシロイヌナズナ Col-0 の cDNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、続いて Gateway 法 (Invitrogen) に基づきバイナリーベクター pB4nYGW と pB4cYGW にクローニングした。*GLK1* と *GLK2* のベクターは第一章で作成したものを用いた。得られたベクターを、先行研究 (Ueda et al., 2004) と同様に前述のようにシロイヌナズナ培養細胞に感染させた。GFP 蛍光は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 [LSM700 (Zeiss, Jena, Germany)] で観察した。使用したプライマー配列を補足表 2-4 に示す。ベクターの作成および実験は、明間莉乃氏によって行われた。

## Coimmunoprecipitation (CoIP) 解析

暗所で 4 日間生育させた合計 300–500 個体の幼植物を回収し、液体窒素で凍結した。植物体サンプルを乳鉢と乳棒で粉砕し、1 mL の氷冷 Extraction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% (w/w) NP-40 and protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)] と共にホモジナイズした。このホモジナイズ液を 11,000rpm、4°C で 5 分間遠心し、得られた上清をさらに 11,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清の一部をインプットとして回収し、残りの上清を GFP-Trap A (Chromo Tek, Planegg, Germany) とともに 4°C で 2 時間インキュベートした。インキュベートしたサンプルを Extraction buffer で 3 回洗浄した後、洗浄したビーズに Laemmli buffer [100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM DTT, 4% (w/v) SDS, 0.2% (w/v) bromophenol blue, and 10% (w/v) glycerol] を加えて 95°C で 5 分間静置し、タンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液は、anti-Myc 抗体 (Sigma-Aldrich) と anti-GFP 抗体 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) を用いて、上述と同様にしてイムノブロット解析した。

## リコンビナントタンパク質の作成

### ・ MBP-PIF4 DBD

PIF4 の DBD を pMAL-c2x にクローニングしたベクターは、先行研究 (Nosaki et al., 2018) により作成されていたものを宮川拓哉博士および野崎翔平博士より分譲していただいた。分譲していただいたベクターを Rosetta(DE3) に形質転換した。0.1 mM イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) で 18°C で一晩振盪培養し、タンパク質の発現を誘導した。培養した菌体を遠心により回収し、Amylose binding buffer (20 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 5% Glycerol, 1 mM DTT, P.I. cocktails) に懸濁し、ソニケーションにより菌体を破砕した。Amylose resin (NEB, Ipswich, MA, USA) と Amylose Elution buffer (20 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT, 30 mM maltose, P.I. cocktails) を用いて、MBP-PIF4 DBD を精製した。

### ・ GST-GLK1

GST-GLK1 は先行研究に基づき発現・精製した (Ahmad et al., 2019)。GST-GLK1 を発現する

ベクターについては、第一章で作成したものを用いた。ベクターを Rosetta(DE3) に形質転換した。0.5 mM IPTG を加えて 16°C で一晩振盪培養し、タンパク質の発現を誘導した。培養した菌体を遠心により回収し、GST binding buffer (1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 1% Triton X-100, 1xPBS, P.I. cocktails) に懸濁し、ソニケーションにより菌体を破碎した。Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare) と GST Elution buffer [50 mM Tris-HCl (pH9.6), 150 mM NaCl, 25 mM GSH, pH 8.5] を用いて、GST-GLK1 を精製した。GST-GLK1 と MBP-BPG4 は、Vivaspin 20 Centrifugal Concentrator (Sartorius) を用いて濃縮・脱塩した。

### Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)

PIF4 DBD の *BPG4/BGH2* プロモーター領域への結合を解析するための実験は、先行研究 (Nosaki et al., 2018) と同様に実施した。DNA プローブとして *BPG4/BGH2* プロモーター領域における G-box (CACGTG) とその前後配列 12 塩基を用いた。FAM 標識した 30mer 二本鎖 DNA (5pmol) と poly (dI-dC) (20 µg) を MBP-PIF4 DBD と EMSA reaction buffer [20mM Tris-HCl (pH7.5), 125mM KCl, 0.5mM EDTA, 2.5%グリセロール, 10mM EDTA] に混合し、25°C で 20 分間インキュベートした。反応液を 10% PAGE ゲルにロードし、ChemiDoc Touch™ Imaging System (Bio-Rad) を用いて蛍光を検出した。

GLK1 の *BPG4* プロモーター領域への結合を解析するための実験においては、第一章と同様に行った。GST-GLK1 を 19 µL の結合バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 10 mM EDTA, 2.5% glycerol, 1 mM DTT, 0.05 µg/µl poly(dI-dC)] 中で、氷上で 5 分間インキュベートした。さらに、1 µL の FAM 標識 30mer 二本鎖 DNA (5pmol) を加えて、氷上で 30 分間インキュベートした。反応液を 1x TAE バッファーで 1% アガロースゲルを用いて電気泳動により分離した。

使用した DNA 配列を**補足表 2-5** に示す。

### Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR)

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いて total RNA を抽出し、抽出した RNA を鋳型に SuperScript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher) を用いて cDNA 合成を行った。合成した cDNA を鋳型に Home Taq を用いて PCR を行い 2% アガロースゲルに PCR 産物を電気泳動した。各遺伝子の特異的プライマー配列を**補足表 2-6** に示す。

### RT-qPCR

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、抽出した RNA を鋳型に PrimeScript RT reagent kit (Takara) を用いて cDNA を合成した。RT-qPCR は、TB Green Premix Extaq II (Takara) を用いて、Thermal Cycler Dice (Takara) を用いて行った。各遺伝子の特異的プライマー配列を**補足表 2-7** に示す。

## プロトプラストにおける一過性ルシフェラーゼアッセイ

*BGH2* (2.5 kb)、*BGH3* (0.9 kb) のプロモーター領域の DNA 断片を増幅し、In-Fusion HD クローニングシステム (Takara) を用いて光田信孝博士より入手した pGLHNew\_RLH ベクターにクローニングした。*GUN4* のプロモーター領域をクローニングしたベクターは第一章で作成したものを用いた。*BPG4* プロモーター領域の G-box (CACGTG) 配列を変異させたベクターは、第一章で作成したものを用いた。*BGH2* プロモーター領域の G-box (CACGTG) 配列を変異させたベクター、*BPG4* プロモーター領域の GBS 配列を変異させたベクター、*BPG4* プロモーター領域の長さを変化させた植物体は、第一章と同様に PrimeSTAR Max (Takara) を用いた Inverse PCR により作成した。*HY5*、*PIF4* および *BGH2* の全長 CDS を pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、Gateway 法により光田信孝博士から入手したバイナリーゲートウェイ発現ベクター pDEST-35SHSP にクローニングした。*35S:GLK1* エフェクターは、第一章で作成したものを用いた。使用したプライマー配列を補足表 2-8 に示す。

プロトプラストの精製、ベクターのプロトプラストへの導入、LUC 及び REN の検出は、第一章と同様に実施した。

## 統計処理

全ての図の作成と統計解析は R 環境で実行した。3 つ以上のサンプルにおける多重比較においては、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行ったのちに Tukey-Kramer の検定を用いた。2 群間比較においては、F 検定を行った後に両側 Welch の *t* 検定または両側 Student の *t* 検定を行った。サンプルサイズの計算は行わず、予備データと先行研究に基づいて設定した。分析から除外したデータはない。植物材料は、植物プールから無作為に選択した。

## Accession number

この章で研究したシロイヌナズナ遺伝子の配列データは、The Arabidopsis Information Resource ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) に以下のアクセッション番号で示されている：*BPG4/RPGE2/PEL1* (AT3G55240)、*BGH1/RPGE3/PEL3* (AT3G28990)、*BGH2/RPGE1/PEL2* (AT5G02580)、*BGH3/RPGE4/PEL4* (AT1G10657)、*eIF4a* (AT3G13920)、*HEMA1* (AT1G58290)、*GUN4* (AT3G59440)、*CHLH* (AT5G13630)、*HEMG1* (AT4G01690)、*DVR/BPG1* (AT5G18660)、*HY5* (AT5G11260)、*GLK1* (AT2G20570)、*GLK2* (AT5G44190)、*PIF1* (AT2G20180)、*PIF3* (AT1G09530) および *PIF4* (AT2G43010)。この章で研究したトマト遺伝子及びイネ遺伝子の配列データは、Phytozome 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) に以下のアクセッション番号で示されている：*SIBPG4A* (Soly04g010285.1.1)、*SIBPG4B* (Soly05g054750.3.1)、*SIBPG4C* (Soly09g005730.4.1)、*SIBPG4D* (Soly10g084600.2.1)、*SIBPG4E* (Soly05g005230.3.1)、*SlExpressed* (Soly07g025390)、*OsBPG4A* (LOC\_Os05g38680)、*OsBPG4B* (LOC\_Os01g62060)、*OsBPG4C* (LOC\_Os03g17200) および *Os18SrRNA* (LOC\_Os09g00999)。

補足表 2-1. 形質転換体の作出に使用したプライマー配列

| Primer name                  | Sequence (5' - 3')                            |
|------------------------------|-----------------------------------------------|
| BGH2-CDS-GW-F1               | CACCATGGGTGATCATAATAGCTCG                     |
| BGH2-CDS-GW-R1               | TTAGATTGTAGTTCGTGAAAGC                        |
| BGH3-CDS-GW-F1               | CACCATGTGTACTCATGCTGATGAAT                    |
| BGH3-CDS-GW-R1               | TTATATCCTTTTCGCAAACCTC                        |
| BPG4-promoter-F1             | CACCCCGGTATACTATACGTATATGATTATCTCTAAGCCAAA    |
| BPG4-first-exon-R1           | CATGTGAATGTAAGAAGCAGAAGAAGAATCTGC             |
| BGH2-promoter-F1             | CACCGGTGGTCCCTAAAAATGTTTCGAGAA                |
| BGH2-first-exon-R1           | AGCTTGCGAGCTATTATGATCACCCATA                  |
| BGH3-promoter-F1             | CACCGTGTCCGTCAATTAAATCTGAGAGA                 |
| BGH3-first-exon-R1           | AGAATGTGGTTGGCAATGGAGACAA                     |
| pGFP-HSP-entry-inverse-R1    | AGAGCGGCCCGCCACCGCGGTGGAGCTC                  |
| pGFP-HSP-entry-inverse-F2    | GTCGACGAGCTCATATGAAGATGAAGATGAAATATTTGG       |
| 10xMyc-pHSP-IF-F1            | GGTGCGGCCGCTCAGCGGGTTAATTAACGGTGAA            |
| 10xMyc-pHSP-IF-R1            | TATGAGCTCGTCGACTCAAACAGCGCTACCGTTCAAGT        |
| p10xMyc-HSP-entry-inverse-F1 | CGGCCGCTCAGCGGGTTAATTAACGGTGAA                |
| GLK1pro-IF-pMyc-HSP-F1       | GGTGCGGCCGCTCCTTTTACGAAAGTTGCACTTCATTTTTAAT   |
| GLK1genome-IF-pMyc-HSP-R1    | CCCCTGAGCGGCCGGGCACAAGACGCGGTTCGGAGGAA        |
| GLK2pro-IF-pMyc-HSP-F1       | GGTGCGGCCGCTCCTTTGAAGTGCCTAGAACAAGTCTTCTTCTTT |
| GLK2genome-IF-pMyc-HSP-R1    | CCCCTGAGCGGCCGAGGAAGAGGAGGAACATTAGAACTCC      |

補足表 2-2. ゲノム編集による遺伝子欠損植物体の作出に使用したプライマー配列

| Primer name      | Sequence (5' - 3')     |
|------------------|------------------------|
| BGH1-gRNA1-F     | TCCCGCTGTATACATTCATC   |
| BGH1-gRNA2-F     | TTCTCTTTGCTCATGTAA     |
| BGH2-gRNA1-F     | GCAAGCTTCTTACATCCATT   |
| BGH2-gRNA2-F     | AGAATGTATAGTATTCAACA   |
| BGH3-gRNA1-F     | TGTAAGAATGTGGTTGGCAA   |
| BGH3-gRNA2-F     | ACCACATTCTTACATTCGCA   |
| BGH1-gRNAcheck-F | GACCATTCGTCAACATACATAA |
| BGH1-gRNAcheck-R | AGGACCTATGGATGAAAAATGA |
| BGH2-gRNAcheck-F | GGGTCTTGTAGCGTTTTATATA |
| BGH2-gRNAcheck-R | CGTCGGATCATACATATACAC  |
| BGH3-gRNAcheck-F | CTGCGTATGTATATGCATGTG  |
| BGH3-gRNAcheck-R | GCACACTTGCAAAGCCTAATA  |
| BPG4-gRNAcheck-F | ACGATCGAACATCGCGATC    |
| BPG4-gRNAcheck-R | TCAGCCAATTATGATCAATCTC |

**補足表 2-3. 変異体の遺伝型決定に使用したプライマー配列**

| Primer name                 | Sequence (5' - 3')                  |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| BPG4-genotyping-F1          | CCATCACGCTAGATCCTATC                |
| BPG4-genotyping-R1          | GTGCAGCACATGATAGAGAAA               |
| BGH2-genotyping-F1          | GACCATTTCGTCAACATACATAA             |
| BGH2-genotyping-R1          | AGGACCTATGGATGAAAAATGA              |
| BGH3-genotyping-F1          | CTGCGTATGTATATGCATGTG               |
| BGH3-genotyping-R1          | GCACACTTGCAAAGCCTAATA               |
| pROK2-LB1.3                 | ATTTTGCCGATTTCGGAAC                 |
| GLK1-2bgs2                  | AACTGCAGGTTACTGATCCGATTGTTCTT       |
| GLK1-Spm5                   | CGGGATCCGACACTCTTTAATTAAGTACACTC    |
| GLK1-Promoter-genotyping-F1 | CTCAATAGGCGGGCCTTATCTAG             |
| GLK1-genotyping-R1          | GATAAGATCTCAGGGTCGATCTCC            |
| GLK2-Spm1                   | CCTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG      |
| GLK2-genotyping-F1          | CGACGGAAGACTTGCCGGACTT              |
| GLK2-genotyping-R1          | GTGTAAGTCCGGCGTCCAATCC              |
| pif1-1-WT-F1                | GGCGGCGCGTATAATCGGAA                |
| pif1-1-WT-R1                | CCGTTTCTGTTACCAAATCCGCGA            |
| pCSA110-LB3                 | TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC |
| pif3-7-WT-F1                | AGAAGCAATTTGGTCACCATGCTC            |
| pif3-7-WT-R1                | TGCATACAAATAGTCGATCGTATG            |
| pif3-7-del-F1               | GGTGTGTATGTGAGAAGGTACATCCATCG       |
| pif3-7-del-R1               | AAGCTTAGCTTTGGTGAGCCTGAAAAGCTC      |

**補足表 2-4. Y2H 解析・BiFC 解析に用いたプライマー配列**

| Primer name    | Sequence (5' - 3')        |
|----------------|---------------------------|
| BGH2-CDS-GW-F1 | CACCATGGGTGATCATAATAGCTCG |
| BGH2-CDS-GW-R1 | TTAGATTGTAGTTCGTGAAAGC    |

補足表 2-5. EMSA に用いた DNA 配列

| Primer name              | Sequence (5' - 3')             |
|--------------------------|--------------------------------|
| BPG4-promoter-G-box_1_-F | GGGGCCATGGATCACGTGGAGGATGCGTGA |
| BPG4-promoter-G-box_1_-R | TCACGCATCCTCCACGTGATCCATGGCCCC |
| BPG4-promoter-G-box_2_-F | TGATCAATCTCCCACGTGGGGCTTCTGGCC |
| BPG4-promoter-G-box_2_-R | GGCCAGAAGCCCCACGTGGGAGATTGATCA |
| BPG4-G-box_1_mutation_-F | GGGGCCATGGATAAAAAAGAGGATGCGTGA |
| BPG4-G-box_1_mutation_-R | TCACGCATCCTCTTTTTTATCCATGGCCCC |
| BPG4-G-box_2_mutation_-F | TGATCAATCTCCAAAAAGGGCTTCTGGCC  |
| BPG4-G-box_2_mutation_-R | GGCCAGAAGCCCTTTTTTGGAGATTGATCA |
| BGH2-promoter-G-box_1_-F | TGGGTCCTACTTCACGTGATAAACGACCCA |
| BGH2-promoter-G-box_1_-R | TGGGTCGTTTATCACGTGAAGTAGGACCCA |
| BGH2-promoter-G-box_2_-F | TAAGCATATGCCACGTGGGATAATGGGCC  |
| BGH2-promoter-G-box_2_-R | GGCCATTATCCCACGTGGGCATATGCTTA  |
| BGH2-G-box_1_mutation_-F | TGGGTCCTACTTAAAAAATAAACGACCCA  |
| BGH2-G-box_1_mutation_-R | TGGGTCGTTTATTTTTTTAAGTAGGACCCA |
| BGH2-G-box_2_mutation_-F | TAAGCATATGCCAAAAAGGATAATGGGCC  |
| BGH2-G-box_2_mutation_-R | GGCCATTATCCTTTTTTGGCATATGCTTA  |
| BPG4pro-GBS-1-F1         | ACAAATAGGTATAGATTTAATTTCTAGAAG |
| BPG4pro-GBS-1-R1         | CTTCTAGAAATTAAATCTATACCTATTTGT |
| BPG4pro-GBS-2-F1         | GAGTGATTTTACAAATCTCCTCTAATCCTT |
| BPG4pro-GBS-2-R1         | AAGGATTAGAGGAGATTGTAAATCACTC   |
| BPG4pro-GBS-1-SpComp-F1  | ACAAATAGGTATAGATTTAATTTCTAGAAG |
| BPG4pro-GBS-1-SpComp-R1  | CTTCTAGAAATTAAATCTATACCTATTTGT |
| BPG4pro-GBS-1-MuComp-F1  | ACAAATAGGTAGGGGGGGGATTCTAGAAG  |
| BPG4pro-GBS-1-MuComp-R1  | CTTCTAGAAATCCCCCCCCTACCTATTTGT |
| BPG4pro-GBS-2-SpComp-F1  | GAGTGATTTTACAAATCTCCTCTAATCCTT |
| BPG4pro-GBS-2-SpComp-R1  | AAGGATTAGAGGAGATTGTAAATCACTC   |
| BPG4pro-GBS-2-MuComp-F1  | GAGTGATTTTAGGGGGGGGCTCTAATCCTT |
| BPG4pro-GBS-2-MuComp-R1  | AAGGATTAGAGCCCCCCCCTAAATCACTC  |

補足表 2-6. RT-PCR に用いたプライマー配列

| Primer name | Sequence (5' - 3')       |
|-------------|--------------------------|
| RT-ACT2-F1  | GTGAAGGCTGGATTTGCAGGA    |
| RT-ACT2-R1  | AACCACCGATCCAGACACTGT    |
| RT-BGH1-F1  | GGTTGTAGCAAAATATATAATAGA |
| RT-BGH1-R1  | CCTTTTTCATAAGCTTCTGCT    |
| RT-BGH2-F1  | CCATCATCATATCTCTCTCTA    |
| RT-BGH2-R1  | CCCCAAAGGTGAATTATTCATT   |
| RT-BGH3-F1  | GAGCGAAGATCAAAGGATAAG    |
| RT-BGH3-R1  | GGGAACCTTATGACATCAAAAG   |
| RT-BPG4-F1  | ATGGCAGATTCTTCTTCTGCT    |
| RT-BPG4-R1  | GTCGTCGGATTCTTTAGATGA    |

補足表 2-7. RT-qPCR に用いたプライマー配列

| Gene               | Primer name        | Sequenece(5' - 3')             |
|--------------------|--------------------|--------------------------------|
| <i>eIF4a</i>       | qRT-eIF4a-F1       | TGACCACACAGTCTCTGCAA           |
|                    | qRT-eIF4a-R1       | ACCAGGGAGACTTGTGGAC            |
| <i>BPG4</i>        | qRT-BPG4-F1        | GGAATTCTTCAAGGCGTATGA          |
|                    | qRT-BPG4-R1        | CAGTCGTCGGATTCTTTAGATG         |
| <i>BGH2</i>        | qRT-BGH2-F1        | GGAAAGAGCTAGCGAAAGAG           |
|                    | qRT-BGH2-R1        | GAAAGCAAATCACGGATTCT           |
| <i>BGH3</i>        | qRT-BGH3-F1        | ACATTCTTACATTTCGCATGC          |
|                    | qRT-BGH3-R1        | GGTGGTCTAACGCCTTGAC            |
| <i>HEMA1</i>       | qRT-HEMA1-F1       | GTGAGCTCTCTGCTTCTTCTGATTCTG    |
|                    | qRT-HEMA1-R1       | CTGCTTCTTTTCTTTGTATATCGATCAGCT |
| <i>GUN4</i>        | qRT-GUN4-F1        | GAAACCGCGACCATATTCGAC          |
|                    | qRT-GUN4-R1        | CGGCTTCTCCGGATATCTGAA          |
| <i>CHLH</i>        | qRT-CHLH-F1        | TGGTAGAGAGACAGAAGCTCGAAA       |
|                    | qRT-CHLH-R1        | CCAAAGAACCTGCCCAAGAG           |
| <i>HEMG1</i>       | qRT-HEMG1-F1       | TGCCTCCAACACGATCCTT            |
|                    | qRT-HEMG1-R1       | CGGCGGAGGTATTAGTCGTC           |
| <i>DVR</i>         | qRT-DVR-F1         | CGCTTGTAACCGATCAGCG            |
|                    | qRT-DVR-R1         | AATGGCGTTAATGCCTTGCC           |
| <i>SlBPG4A</i>     | qRT-SlBPG4A-F1     | AGGCACTATCCAAGCATGCAA          |
|                    | qRT-SlBPG4A-R1     | AGCACTTGTCTCTTCCTCTGTCA        |
| <i>SlBPG4B</i>     | qRT-SlBPG4B-F1     | GGGGGATTGCCCTGCTTCTT           |
|                    | qRT-SlBPG4B-R1     | TGCATGCTTAGAAAGTGCCTCT         |
| <i>SlBGH2A</i>     | qRT-SlGH2A-F1      | TCCAAGGAAAAACAATAGCGGCA        |
|                    | qRT-SlGH2A-R1      | TCACCCGTGAAACCTGAATTTGA        |
| <i>SlBGH2B</i>     | qRT-SlBGH2B-F1     | ACATCCACTTGGTGCATCGCT          |
|                    | qRT-SlBGH2B-r1     | GGAAAGTGCTTCCATGCATTCTT        |
| <i>SlBGH3</i>      | qRT-SlBGH3-F1      | CGAGAGGTGCTTAGTGTTGGG          |
|                    | qRT-SlBGH3-R1      | TACGAGTGGGCGGATTCTGG           |
| <i>SlExpressed</i> | qRT-SlExpressed-F1 | AACGTGCTGCAACTCCCACA           |
|                    | qRT-SlExpressed-R1 | CCGGCGCCAACCTTTCAACTG          |
| <i>OsBPG4A</i>     | qRT-OsBPG4A-F1     | GGCGCCATGGGAGACTCATC           |
|                    | qRT-OsBPG4A-R1     | CTCCAGCTCCTTCCATACTGTGG        |
| <i>OsBPG4B</i>     | qRT-OsBPG4B-F1     | CCACCGTGTGGAAGGAGCTT           |
|                    | qRT-OsBPG4B-R1     | ACTGCTCTTGCTCTCCGCTG           |
| <i>OsBGH2</i>      | qRT-OsBGH2-F1      | TGACGTTTCGGGATGAGCATGG         |
|                    | qRT-OsBGH2-R1      | CCTTCCATACTGTGGAGGTGACG        |
| <i>Os18SrRNA</i>   | qRT-Os18SrRNA-F1   | CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA         |
|                    | qRT-Os18SrRNA-R1   | ACACTTCACCGGACCATTCAA          |

補足表 2-8. プロトプラストにおける一過性ルシフェラーゼアッセイに用いたプライマー配列

| Primer name                   | Sequence (5' - 3')                                 |
|-------------------------------|----------------------------------------------------|
| pGLHNew_RLH-In-Fusion-F1      | GAGCTCGGCGCGCCTTAATTAA                             |
| pGLHNew_RLH-In-Fusion-R1      | GGGAATTCGTACCGGCCAGTTA                             |
| BGH2-In-fusion-pGLHNew_RLH_F1 | CCGGTACGAATTCCCggagtggtttcttcggaatttaattgatt       |
| BGH2-In-fusion-pGLHNew_RLH_R1 | AGGCGCGCCGAGCTCaaatactattaaagagtagttgtgttata<br>cg |
| BGH3-In-fusion-pGLHNew_RLH_F1 | CCGGTACGAATTCCCgatattcatcggttggtgactc              |
| BGH3-In-fusion-pGLHNew_RLH_R1 | AGGCGCGCCGAGCTCtttctctcttctccttatacctttgatct       |
| BGH2pro-G-box-1-mutation-F1   | tacttAAAAAataaacgacccaaccgccacgta                  |
| BGH2pro-G-box-1-mutation-R1   | ttatTTTTTTaagtaggacccacactacgtagtta                |
| BGH2pro-G-box-2-mutation-F1   | atgccAAAAAaggataatgggccctatcacgag                  |
| BGH2pro-G-box-2-mutation-R1   | atccTTTTTTggcatatgcttatgattggctgag                 |
| BPG4pro_1200bp-TA-F1          | AATTCCCAgagggttactaatgtatatggattatctca             |
| BPG4pro_1200bp-TA-R1          | aaacctctGGGAATTCGTACCGGCCAGTTAGGC                  |
| BPG4pro_TSS-TA-F1             | AATTCCCccttaacataagtgttaagacttatgattata            |
| BPG4pro_TSS-TA-R1             | tgtaaggGGGAATTCGTACCGGCCAGTTAGG                    |
| BPG4pro-GBS-New-1-Mu-F1       | ggtaGGGGGGGGatttctagaagattatggaaattaaacacg         |
| BPG4pro-GBS-New-1-Mu-R1       | aatCCCCCCCCtacctattgttaatgttttaacttatataagaaa      |
| BPG4pro-GBS-New-2-Mu-F1       | tttaGGGGGGGGctctaactcttctcagccaattatgatca          |
| BPG4pro-GBS-New-2-Mu-R1       | agagCCCCCCCCtaaaatcactcttctctcttctccctt            |
| BGH2-CDS-GW-F1                | CACCATGGGTGATCATAATAGCTCG                          |
| BGH2-CDS-GW-R1                | TTAGATTGTAGTTCGTGAAAGC                             |
| BGH3-CDS-GW-F1                | CACCATGTGTACTCATGCTGATGAAT                         |
| BGH3-CDS-GW-R1                | TTATATCCTTTTCGCAAACCTC                             |
| HY5-CDS-GW-F1                 | CACCATGCAGGAACAAGCGACTAG                           |
| HY5-CDS-GW-R1                 | TCAAAGGCTTGCATCAGCATT                              |
| PIF4-CDS-GW-F1                | CACCATGGAACACCAAGGTTGGAG                           |
| PIF4-CDS-GW-R1                | CTAGTGGTCCAAACGAGAAC                               |

## 総合考察

本研究は、当研究室の先行研究により、Brzを用いた *bpg* 変異体スクリーニングにより単離した *BPG4-FOX* から同定されていた新規葉緑体制御因子 BPG4 とその相同性因子 BGH2 の機能解析を行った。第一章では、BPG4 による葉緑体発達制御機構、BR シグナルによる *BPG4* 発現制御機構、および植物成長における BPG4 の生理学的意義の解明を試みた。BPG4 は、光環境で生育した光合成組織で特異的に機能し、BR シグナル伝達によって発現が制御されていた。BPG4 は、葉緑体発達のマスター転写因子 GLKs の転写活性化能を低下させることにより内生クロロフィル含量を低下させ、葉緑体発達を抑制する機能を持つことが明らかとなった。さらに、BPG4 による GLKs を介した葉緑体発達抑制が、強光条件下における ROS 発生および光障害の抑止に寄与していることを明らかにした。BPG4 は、近年 RPGE2 及び PEL1 としても同定され、GLKs を介した葉緑体発達制御が報告されているが (Han et al., 2023; Kim et al., 2023)、BPG4 による GLK 抑制の生理学的意義については報告されていない。本研究により、植物が BR と光のシグナル伝達の下流で、BPG4 を介して葉緑体の恒常性を維持し、ROS の発生を回避しながら効率的に光合成を行う分子機構に関して新たな知見が得られた (図 3-1)。

本研究の第二章では、第一章で同定した BPG4 の相同性因子 BGH1/2/3 の解析を行い、BPG4 ファミリーの機能冗長性、機能的差異について解析した。特に、明所誘導型の BPG4 とは対照的に暗所で特異的に機能することが明らかとなった BGH2 について詳細な分子機能及び生理学的意義の解析を行った。BGH2 は、GLK を介して暗所でのクロロフィル前駆体の過剰蓄積を抑制することにより、脱黄化時の  $^1\text{O}_2$  発生及び細胞死を抑制し、健全な子葉の緑化を促進する機能を持つことが明らかとなった。また、*BGH2* の mRNA 発現は暗所で PIF 転写因子によって活性化されること、*BPG4* の mRNA 発現は明所で GLK 転写因子によってフィードバック的に活性化されることが明らかとなった。BGH2 は暗所における PIF によるクロロフィル生合成遺伝子の転写制御に寄与することにより、クロロフィル代謝およびエチオプラストの恒常性の維持に寄与し、脱黄化時に光酸化ストレスを回避して健全な子葉の緑化を促進する働きをすると考察された。BGH2 は、近年 RPGE1 及び PEL2 としても同定され、避陰応答時の PhANGs 発現抑制において重要な役割を果たすことが報告されているが (Han et al., 2023; Kim et al., 2023)、暗所および脱黄化時の BGH2 による GLK 抑制の生理学的意義については報告されていなかった。本研究により、BPG4 ファミリーが明所と暗所の双方において、GLK の過剰な活性化を抑制することにより、クロロフィル生合成および葉緑体/色素体発達の恒常性維持を行う分子機構に関して新たな知見が得られた (図 3-1)。

本研究の第一章および第二章により、BPG4 ファミリーは GLK 転写因子の転写活性化能を抑制するという共通したタンパク質機能を有することが明らかとなった。BPG4 は GLK1 の GCT-box と相互作用することより GLK1 の DNA 結合能を低減し、GLK1 の転写活性化能を抑制した。一方、タンパク質機能の保存性とは対照的に、BPG4 と BGH2 で光環境におけ

る発現様式が正反対であり、この対称性が *BPG4* と *BGH2* の色素体制御における生理学的役割の差異を生んでいると考察された。そこで、第一章で明らかとなった BR シグナルによる *BPG4* 発現制御機構と当研究室の未発表データである BR シグナルによる *BGH2* 発現制御機構に関する知見を交えながら、*BPG4* ファミリーの発現制御機構および機能発現機構の作業仮説を議論する (図 3-1)。

第二章では、光シグナル伝達のマスター転写因子である PIFs が *BPG4* および *BGH2* のプロモーター領域の G-box に結合し、その発現を活性化することを RT-qPCR、EMSA、プロトプラストを用いた一過性 LUC レポーターアッセイで明らかにした (図 2-11-図 2-12)。さらに、GLK1 が *BPG4* プロモーターの GBS に結合し、その発現を活性化することを解明した (図 2-15-図 2-18)。しかし、明所および暗所における *BPG4* および *BGH2* 発現の制御機構は完全には解明できていないため、第一章および第二章における結果と先行研究における報告を統合することにより、以下の 4 つの条件 (I-IV) で明所および暗所における *BPG4/BGH2* 発現制御機構の作業仮説について考察する (図 3-1)。

**(I) 暗所における PIFs による制御:** 暗所で安定化した PIFs は *BGH2* 発現を直接活性化する (図 2-11-12)。PIFs は暗所で生育した黄化芽生えにおける Pchl<sub>a</sub> 蓄積を抑制し、脱黄化時の正常な子葉の緑化を促進することが知られており (Chen et al., 2013)、*BGH2* は PIFs の下流で脱黄化時の正常な子葉の緑化を促進していると考えられた (図 3-1 A, C)。先行研究における ChIP-seq の結果では、PIFs は暗所で生育した黄化芽生えにおいて、*BGH2* だけでなく *BPG4* のプロモーター領域にも結合することが示唆されている (Kim et al., 2016)。しかし、図 2-11 A に示される通り、*BPG4* 発現は明所でのみ PIFs によって発現が制御されると考えられる。

**(II) 明所における PIFs による制御:** PIFs は通常、暗所で機能すると考えられており (Leivar and Monte, 2014)、明所では *pifQ* における *BGH2* 発現の低下は認められなかった (図 2-11 A)。一方、先行研究により、PIFs は明所においても補因子と共に遺伝子発現を活性化する機能を持つことが報告されている (Leivar and Monte, 2014)。したがって、明所において PIFs が未知の他の因子と協調的に *BPG4* 発現を活性化している可能性が考察される (図 3-1 E)。

**(III) 暗所における GLKs による制御:** 暗所において *BPG4* 発現は *GLK1-OX* で増加しなかった一方 (図 2-14 A)、他の GLK 標的遺伝子 (*HEMA1*、*GUN4*、*CHLH*) の発現は、暗所においても *GLK1-OX* で増加した (図 2-10 C)。*BGH2* 発現は *GLK1-OX* で増加したが、*glk1glk2* では低下しなかった (図 2-15 A)。この結果より、異所的に *GLK* を強制発現すると暗所で *BGH2* 発現を活性化する可能性が考察された一方、内在性 *GLK* は *BGH2* 発現に顕著な影響を及ぼさないことが示唆された (図 3-1 A)。

**(IV) 明所における GLKs による制御:** GLKs の発現、タンパク質安定性、および転写活性化能は明所で増加する (Martín et al., 2016; Zhang et al., 2021)。GLKs は明所で *BPG4* 発現を直接活性化し、このメカニズムは第二章で考察したように *GLK* の転写活性化能の恒常性を維持するフィードバック機構として機能すると考えられる (図 3-1 E-F)。先行研究に ChIP-seq により、*GLK1/2* は明所においても *BGH2* プロモーター領域に結合することが示唆されてい

るが (図 2-16)、明所では *BGH2* 発現が *GLK1-OX* で増加しないことから、*BGH2* 発現は明所では *GLK* によって制御されていないと考察された (図 2-15 A、図 3-1 D)。

以上を総括すると、PIFs は暗所で *BGH2* 発現を活性化し (図 3-1 A)、PIFs および *GLKs* は明所で *BPG4* 発現を活性化すると考えられる (図 3-1 E)。しかし、PIFs または *GLKs* がプロモーター領域に結合している場合も遺伝子発現の活性化が生じない場合があることから、PIFs および *GLKs* による *BPG4/BGH2* 発現の活性化を抑制する上位の制御機構が存在する可能性が考察される (図 3-1 B, D)。例えば、近年の先行研究において、*BGH2* (*AT5G02580*) の H3K9 アセチル化が、光シグナル伝達経路の下流で PIFs によって制御されることが示されている (González-Grandío et al., 2022)。したがって、ゲノムのクロマチン修飾状態の制御が、*BPG4* および *BGH2* の光依存的な転写制御を調節する分子機構の候補として考えられる。今後の解析により、明所および暗所で *BPG4* および *BGH2* 発現が制御される分子機構のさらなる解明が期待される。

上記の光シグナルによる発現制御に加えて、*BPG4* ファミリーは BR シグナルによっても発現が制御される。以下の (V–VI) において明所および暗所における BR シグナルによる *BPG4/BGH2* 発現制御機構の作業仮説について考察する (図 3-1)。

**(V) 明所における BR シグナルによる制御:** 本研究の第一章において、*BPG4* 発現は明所条件下で BR シグナルによって抑制されることが明らかとなった (図 3-1 G)。BR シグナル伝達のマスター転写因子 BES1 が *BPG4* プロモーター領域中の G-box 配列に直接結合することにより *BPG4* 発現が抑制される (図 3-1 G)。この BES1 は PIF4 とヘテロ複合体を形成することにより、協調的または拮抗的に下流の遺伝子発現を制御することが報告されていること (Martínez et al., 2018)、BES1 が結合する G-box 配列は PIF が結合する G-box 配列と同じものであることから (図 1-12、図 2-12)、*BPG4* プロモーター上で BES1 と PIF4 が拮抗的に機能することにより *BPG4* 発現が BR と光のシグナルの下流で統合的に制御される可能性が考察された。

**(VI) 暗所における BR シグナルによる制御:** 当研究室の明間氏の研究により、*BGH2* 発現は暗所条件下で BR シグナルによって促進されることが明らかとなっている (図 3-1 H) (明間, 2024)。BR シグナル伝達のマスター転写因子 BIL1/BZR1 が *BGH2* プロモーター領域中の G-box 配列に直接結合することにより *BGH2* 発現が抑制される (図 3-1 H)。この BIL1/BZR1 は PIF4 とヘテロ複合体を形成することにより、協調的または拮抗的に下流の遺伝子発現を制御することが報告されている (Sun et al., 2010; Oh et al., 2012)。また、BIL1/BZR1 が結合する G-box 配列は PIF が結合する G-box 配列と同じものであることから (図 2-12)、*BGH2* プロモーター上で BIL1/BZR1 と PIF4 が協調的に機能することにより *BGH2* 発現が BR と光のシグナルの下流で統合的に制御される可能性が考察された。

上記の考察により、*BPG4* と *BGH2* 発現は光シグナルだけではなく、BR シグナルによっても正反対に制御されている可能性が考察された。また、興味深いことに、*BPG4* と *BGH2* は 2 つの G-box 配列を有するという類似したプロモーター領域を持つに関わらず、*BPG4* は

BES1 と PIF によって拮抗的に制御され、*BGH2* は BIL1/BZR1 と PIF によって協調的に制御される可能性が考察された。しかしながら、現段階では、*BPG4* と *BGH2* の正反対な発現制御機構の根底に潜む謎を解き明かすことは難しい状況である。今後、double DAP-seq や double ChIP-seq などの転写因子複合体による遺伝子発現制御やヒストンの修飾状態などのエピジェネティックな制御に関する解析により、BR シグナルと光シグナルによる *BPG4* ファミリーの発現制御機構、および *BPG4* ファミリーを介した葉緑体/色素体制御機構がさらに詳細に解明されることが期待される。

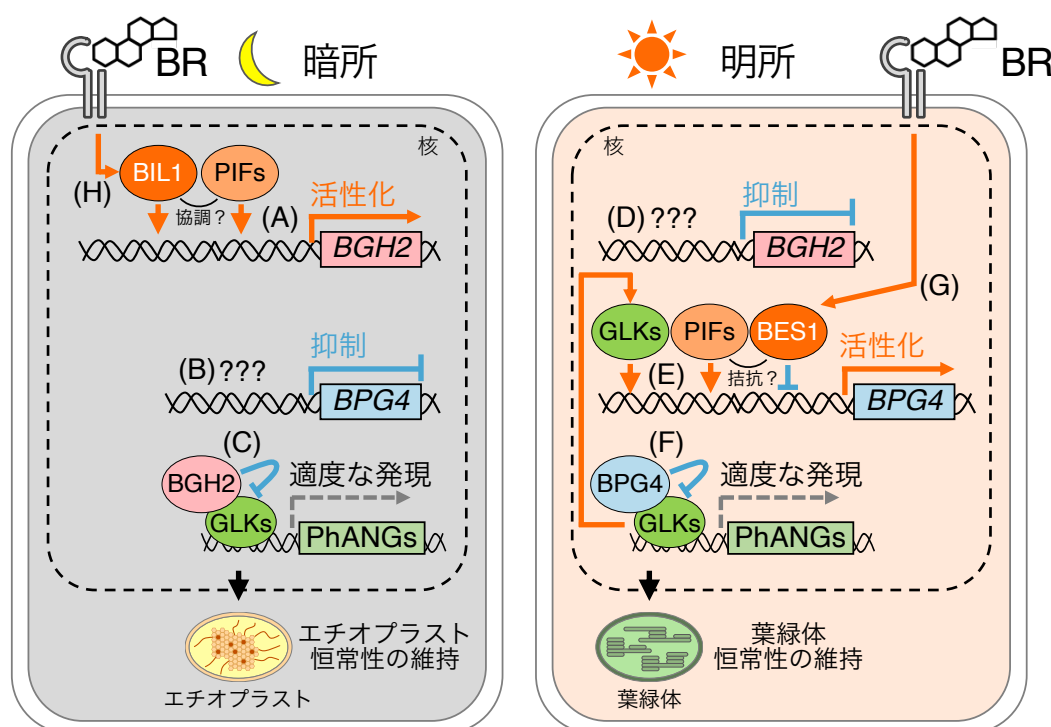


図 3-1. *BPG4* ファミリーを介した BR と光のシグナル伝達による葉緑体/色素体制御機構の作業仮説

暗所で生育した黄化芽生えでは、安定化した PIF が *BGH2* 発現を活性化する (A)。この際、*BGH2* 発現の活性化には BR シグナルの下流で BIL1/BZR1 が協調的に機能する可能性が考えられる (H)。BGH2 は GLK 活性を阻害し、光合成関連核遺伝子 (PhANGs) が適度に発現し、適切な Pchl<sub>a</sub> 含量が保たれるため、エチオプラストの恒常性が維持される (C)。明所においては、*BPG4* 発現は PIF によって活性化される (E)。この際、BR シグナルの下流で BES1 が PIF による *BPG4* 発現の活性化と拮抗的に機能する可能性が考えられる (G)。また、GLK 転写因子は自らの抑制因子である *BPG4* の mRNA 発現を活性化することにより (E)、フィードバック制御として自らの過剰な活性化を防いでいる (F)。BPG4 は適切なクロロフィル量を維持し、葉緑体の恒常性を維持している (F)。暗所での *BPG4* 発現抑制機構 (B) や明所での *BGH2* 発現抑制機構 (D) の解明、BR と光による複合的な *BPG4*/*BGH2* 発現制御 (G-H) にはさらなる解析が必要である。

最後に、植物が明所誘導型の BPG4 サブグループと暗所誘導型の BGH2 サブグループの両方を持つ意義が何か？という疑問について議論したい。すなわち、明所と暗所の双方で恒常的に機能する単一の遺伝子として存在するのではなく、明所誘導型と暗所誘導型に分かれて存在する意義は何だろうか？この意義について、以下の3つの仮説を考察した。

**(I) 光環境依存的な精密な PhANGs 発現制御:** 明所誘導型と暗所誘導型の二つのサブグループが存在する意義を解き明かす手がかりとして、暗所で生育した黄化芽生えに光照射した際の BPG4 活性化と BGH2 抑制のタイムラグに着目した。暗所では、BGH2 発現が活性化されており、クロロフィル前駆体の過剰蓄積を抑制している。光照射されると数時間以内に BGH2 発現は急速に減少する一方、BPG4 発現の活性化はこの時点では起こっておらず BPG4 発現は低いままである。したがって、BPG4 と BGH2 の発現は両方とも低い状態となっており、PhANGs 発現のブレーキが完全に解除されるため、クロロフィル生合成が非常に活性化され、急速な子葉の緑化が起こる (図 3-2)。脱黄化の後期 (光照射から 12-24 時間後) では、PhANGs の活性化に遅れて BPG4 発現が活性化され、BPG4 が PhANGs 発現の抑制を開始するため、クロロフィル生合成の活性化速度が低下し葉緑体の発達しすぎが抑制されるため葉緑体恒常性が維持されると考えられる (図 3-2)。したがって、PhANGs 発現のブレーキである BPG4 と BGH2 の総量は、エチオプラストの恒常性を維持するために暗所で高度に蓄積し、クロロフィルの生合成と葉緑体発達を急激に促進するために光照射直後に一旦減少し、葉緑体の恒常性を維持するために脱黄化後期に再び増加するのではないかと考察した (図 3-2)。第一章においても、PhANGs の発現が光照射後に速やかに上昇し、BPG4 発現の活性化の開始とともに発現活性化がピークアウトすることを考察している。明所と暗所の両方で恒常的に発現が活性化するような単一の遺伝子では、このような複雑な発現制御を実行するのが困難な可能性があり、植物が明所誘導型 (BPG4) と暗所誘導型 (BGH2) の2つのサブグループを持つ意義の一つが光環境依存的な精密な PhANGs 発現制御を実行するためではないかと考察された。

**(II) 陸上植物の進化に伴うクロロフィル生合成制御の変化:** 明所誘導型と暗所誘導型の二つのサブグループが存在する意義を解く鍵が、陸上植物におけるクロロフィル生合成系の進化に関係しているのではないかと考察した。クロロフィルの中間代謝物の多くは有害な ROS を生み出す光増感剤であるため、ROS による障害を回避するためにクロロフィルの生合成は厳密に制御されている (田中 et al., 2004)。クロロフィル生合成経路は緑藻から陸上植物に至るまで進化的によく保存されている (Sousa et al., 2013)。一方、Pchlide のクロロフィリドへの還元を触媒する POR 酵素は、光非依存性プロトクロロフィリド還元酵素 (DPOR) と光依存性プロトクロロフィリド酸化還元酵素 (LPOR) の2種類が存在しており、進化的な保存性が種ごとに異なることが知られている (Vedalankar and Tripathy, 2019)。DPOR は緑藻、コケ植物、小葉植物、裸子植物に存在する一方、被子植物には存在が認められないことが報告されている (Sousa et al., 2013; Vedalankar and Tripathy, 2019)。DPOR 遺伝子の完全な消失は被子植物の進化の初期に起こったと考えられており、DPOR を持たない被子植物

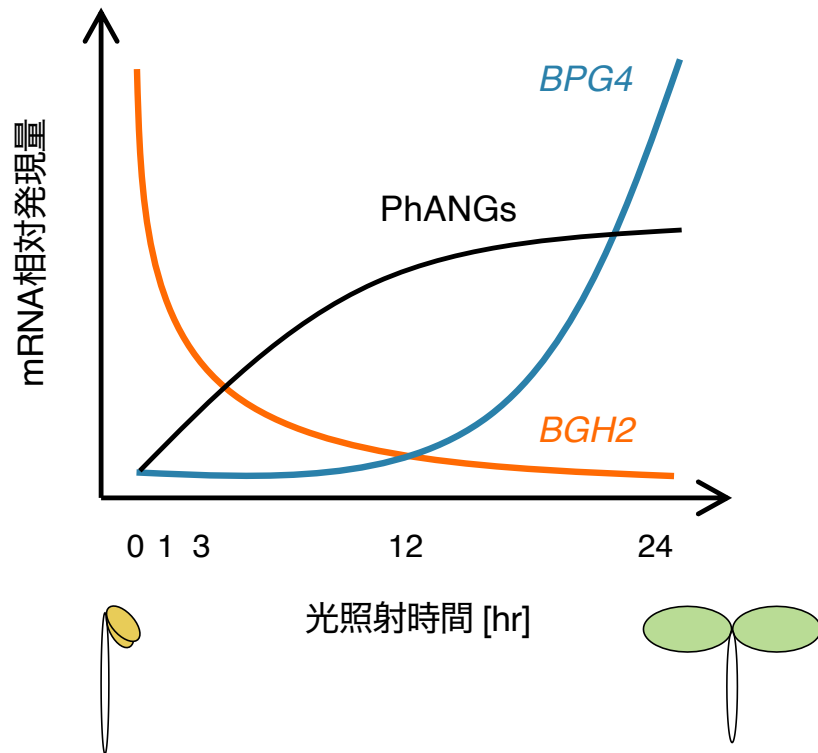
は暗所で Pchl<sub>ide</sub> を還元してクロロフィルを生合成する能力を持たない (Vedalkar and Tripathy, 2019)。したがって、DPOR を持たず暗所でクロロフィルを生合成できない被子植物のみが暗所で ROS の発生源となる Pchl<sub>ide</sub> の過剰蓄積を回避するような機構を有する可能性が考えられる。BPG4 ファミリーは、ストレプト藻類から裸子植物まではサブグループを持たず、基部被子植物であるアンボレラでは BPG4 サブグループと BGH3 サブグループのみを有し、それ以降の被子植物においては BPG4、BGH2、BGH3 の 3 つのサブグループを有する (図 3-3)。ゼニゴケにおける GLK オルソログ (MpGLK) の先行研究では、*MpBPG4* は *AtBPG4* と同様に GLK によって活性化される可能性が示唆されており (Frangedakis et al., 2024)、祖先型である *MpBPG4* は明所誘導型である可能性が考察される。すなわち、BPG4 ファミリーは元々明所誘導型として GLK 転写因子と共に誕生し、暗所誘導型 BGH2 サブグループは被子植物から誕生した可能性が考えられる (図 3-3)。すなわち、DPOR の消失により暗所における過剰な Pchl<sub>ide</sub> 蓄積を抑制する必要性が生じた被子植物にのみ BGH2 が存在していると推測された。したがって、BPG4 ファミリーが明所誘導型と暗所誘導型の二つのサブグループ分岐した理由の仮説の一つとして、陸上植物のクロロフィル生合成系の進化に伴う暗所の Pchl<sub>ide</sub> 制御の必要性が高まり、自然選択の結果として暗所誘導型サブグループが誕生したのではないかと考察された (図 3-3)。

**(III) BPG4 と BGH2 のタンパク質機能の差異:** BPG4 ファミリーのアミノ酸配列は A<sub>thal</sub>\_3526 ドメインにおいては非常に高度に保存されており、BPG4 ファミリーと GLK 転写因子の相互作用は種間で保存されていると考えられる。実際に、先行研究においてシャジクモ (*Chara braunii*) 及びゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) における BPG4 オルソログ (CbBPG4、MpBPG4) は CbGLK 及び MpGLK と相互作用することが報告されている (Kim et al., 2023)。一方、BPG4 の C 末端には真正双子葉植物の BPG4 サブグループのみにしか保存されていない領域が存在する (図 3-4)。この領域は先行研究によりアントシアニン生合成制御に関連した機能を持つ可能性や GLK 以外の転写因子と相互作用する可能性が指摘されている (Han et al., 2023)。すなわち、BPG4 サブグループと BGH2 サブグループは、GLK 転写因子の制御に関しては機能的に類似している一方、その他の生理機能に関しては共通していない可能性が考えられる。したがって、BPG4 ファミリーが明所誘導型と暗所誘導型の二つのサブグループを有する意義の仮説の一つとして、GLK 制御以外の機能について、BPG4 は明所でのみ BGH2 は暗所でのみ機能することにより、それぞれの因子が光環境特異的な機能を発揮することが考えられる。

上述したように、BPG4 ファミリーが恒常的に機能する一分子種ではなく、明所誘導型と暗所誘導型のサブグループに分かれて機能する意義として、(I) 光環境依存的な精密な PhANGs 発現制御、(II) 陸上植物の進化に伴うクロロフィル生合成制御の変化、(III) BPG4 と BGH2 のタンパク質レベルの機能的差異、が考察された。しかしながら、上記の仮説を支持する科学的根拠は不足しており、BPG4 ファミリーの機能冗長性、機能的差異の解明にはプロモーターを入れ替えた相補株の作成などさらなる解析が必要になると考えられる。今後

の解析により、BPG4 ファミリーのサブグループ間の役割分担とその意義についてさらなる解明が期待される。

葉緑体の発達制御機構は、光シグナル伝達の解明を起点に COP1 や DET1 などの E3 リガーゼや GLK、PIF、MYBS などの転写因子が関与することが明らかとなってきた (Cackett et al., 2022; Frangedakis et al., 2024)。一方、COP1、DET1、PIF など暗所で機能する葉緑体発達の抑制因子は報告例が多くあるが、明所で機能する抑制因子は報告例が乏しい (Cackett et al., 2022)。本研究は明所で機能する新規葉緑体制御因子 BPG4 の機能を明らかにしたものであり、今後イネなどの有用作物における BPG4 オルソログのゲノム編集により、明所における GLK の転写活性化能、葉緑体の発達、光合成活性を改変した新植物を作出し、植物の収量や栄養素を向上させられる可能性が期待される。また、暗所誘導型 BPG4 相同性因子として同定された BGH2 は根や鞘などの非光合成器官で高発現することが明らかとなった。BPG4 ファミリーは、クロロフィルだけではなくカロテノイドやアントシアニンなどのクロロフィル以外の色素の生合成に関与することが明らかとなっている (Han et al., 2023; Wang et al., 2024)。DcBGH2/RPGE1 がニンジン栽培化 (カロテノイド高蓄積化) の原因遺伝子 *Y* であることから (Wang et al., 2024)、今後果実などの有用作物における BGH2 オルソログのゲノム編集により、果実などにおける栄養素を向上した品種を作出できる可能性が期待される。今後、BPG4 ファミリーのさらなる解析により、様々な色素の生合成を操り葉緑体を含む色素体の分化・発達を自在に制御できるようになることが期待される。BPG4 ファミリーによる葉緑体/色素体制御により、収量や栄養価が向上した新植物を作出できるようになり、地球温暖化や食料不足などの地球的問題の解決につながることを期待したい。



**図 3-2. BPG4 と BGH2 による光環境依存的な精密な PhANGs 発現制御の作業仮説**

*BGH2* 発現は、暗所で生育した黄化芽生えにおいて *PhANGs* 発現を抑制するために活性化している。光照射に応じた迅速な *BGH2* 発現抑制により *PhANGs* 発現が光照射と共に急激に活性化すると考えられる。*BPG4* 発現は *PhANGs* 発現の活性化より遅れて光照射から 9–12 時間経過したのちに活性化する。*PhANGs* 発現の活性化に *BPG4* 発現の開始とともに抑制 (ブレーキ) がかかり、活性化が穏やかになり発現がピークアウトすると考えられる。mRNA レベルで *BPG4* と *BGH2* の総和を考慮すると、光照射前に高度に発現し、脱黄化初期は双方ともに低発現状態となり、脱黄化後期に再び高度に発現しているように考えられる。*PhANGs* 発現の活性化は概ね *BPG4* と *BGH2* の総和と相関しているように考えられ、*BPG4* と *BGH2* の二分子種が脱黄化時の精密な *PhANGs* 発現制御に寄与している可能性が示唆される。

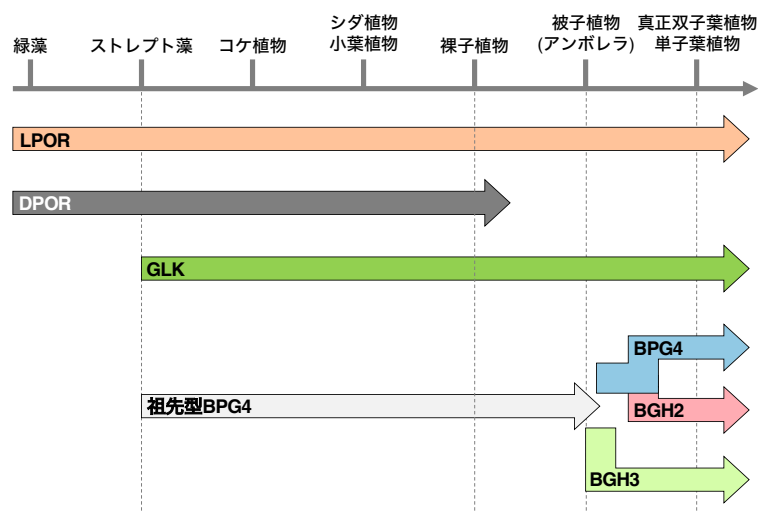


図 3-3. LPOR、DPOR、GLK、BPG4 の進化

クロロフィル生合成経路は緑藻から陸上植物に至るまで高度に保存されている。一方、POR については、LPOR は被子植物でも保存されているのに対して、DPOR は緑藻からラン植物までにしか保存されていない。BPG4 ファミリーと GLK ファミリーはストレプト藻類においてほぼ同時に誕生したと考えられる。DPOR を失い暗所でクロロフィルを生合成できなくなった被子植物において BPG4 ファミリーは BPG4 サブグループと BGH2 サブグループに分岐した可能性が考えられる。

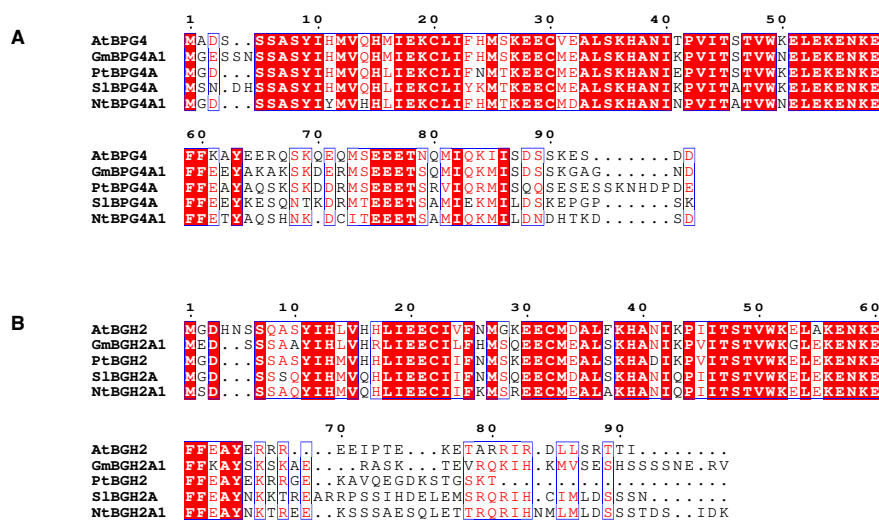


図 3-4. 真正双子葉植物における BPG4 サブグループ及び BGH2 サブグループのアミノ酸配列比較

(A) 真正双子葉植物における BPG4 サブグループ (A) 及び BGH2 サブグループ (B) のアミノ酸配列比較。略称は図 1-2 と同様に示す。使用したアミノ酸配列の Accession number については補足表 1-1 に示す。赤塗りと赤字のアミノ酸残基は、比較された植物種間で完全に保存されたアミノ酸残基と高度に保存された性質の類似したアミノ酸残基をそれぞれ示す。青枠は、赤塗りと赤字のアミノ酸残基から構成される高度に保存された配列を示す。

## 引用文献

- Ahmad R, Liu Y, Wang T-J, Meng Q, Yin H, Wang X, Wu Y, Nan N, Liu B, Xu Z-Y (2019) GOLDEN2-LIKE Transcription Factors Regulate WRKY40 Expression in Response to Abscissic Acid. *Plant Physiol* **179**: 1844–1860
- Asami T, Min YK, Nagata N, Yamagishi K, Takatsuto S, Fujioka S, Murofushi N, Yamaguchi I, Yoshida S (2000) Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol* **123**: 93–100
- Asami T, Mizutani M, Fujioka S, Goda H, Min YK, Shimada Y, Nakano T, Takatsuto S, Matsuyama T, Nagata N, et al (2001) Selective interaction of triazole derivatives with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase of the brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in planta. *J Biol Chem* **276**: 25687–25691
- Asami T, Nakano T, Nakashita H, Sekimata K, Shimada Y, Yoshida S (2003) The Influence of Chemical Genetics on Plant Science: Shedding Light on Functions and Mechanism of Action of Brassinosteroids Using Biosynthesis Inhibitors. *J Plant Growth Regul* **22**: 336–349
- Asami T, Yoshida S (1999) Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends Plant Sci* **4**: 348–353
- Bastakis E, Hedtke B, Klermund C, Grimm B, Schwechheimer C (2018) LLM-Domain B-GATA Transcription Factors Play Multifaceted Roles in Controlling Greening in Arabidopsis. *Plant Cell* **30**: 582–599
- Beerli RR, Segal DJ, Dreier B, Barbas CF (1998) Toward controlling gene expression at will: Specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14628–14633
- Bekh-Ochir D, Shimada S, Yamagami A, Kanda S, Ogawa K, Nakazawa M, Matsui M, Sakuta M, Osada H, Asami T, et al (2013) A novel mitochondrial DnaJ/Hsp40 family protein BIL2 promotes plant growth and resistance against environmental stress in brassinosteroid signaling. *Planta* **237**: 1509–1525
- Börner T, Aleynikova AY, Zubo YO, Kusnetsov VV (2015) Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1847**: 761–769
- Bravo-Garcia A, Yasumura Y, Langdale JA (2009) Specialization of the Golden2-like regulatory pathway during land plant evolution. *New Phytol* **183**: 133–141
- Bykowski M, Mazur R, Buszewicz D, Szach J, Mostowska A, Kowalewska Ł (2020) Spatial Nano-Morphology of the Prolamellar Body in Etiolated Arabidopsis thaliana Plants With Disturbed Pigment and Polyprenol Composition. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**:
- Cackett L, Luginbuehl LH, Schreier TB, Lopez-Juez E, Hibberd JM (2022) Chloroplast development in green plant tissues: the interplay between light, hormone, and transcriptional regulation. *New Phytol* **233**: 2000–2016

- op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg É, Göbel C, Feussner I, et al** (2003) Rapid Induction of Distinct Stress Responses after the Release of Singlet Oxygen in Arabidopsis[W]. *Plant Cell* **15**: 2320–2332
- Chagan Z, Nakata G, Suzuki S, Yamagami A, Tachibana R, Surina S, Fujioka S, Matsui M, Kushiro T, Miyakawa T, et al** (2024) BRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYL8 inhibits kinase-mediated phosphorylation to regulate brassinosteroid signaling. *Plant Physiol* **191**
- Chen D, Xu G, Tang W, Jing Y, Ji Q, Fei Z, Lin R** (2013) Antagonistic Basic Helix-Loop-Helix/bZIP Transcription Factors Form Transcriptional Modules That Integrate Light and Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1657–1673
- Chi W, He B, Mao J, Jiang J, Zhang L** (2015) Plastid sigma factors: Their individual functions and regulation in transcription. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1847**: 770–778
- Chory J, Nagpal P, Peto CA** (1991) Phenotypic and Genetic Analysis of *det2*, a New Mutant That Affects Light-Regulated Seedling Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **3**: 445–459
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* -mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743
- Clouse SD, Langford M, McMorris TC** (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* **111**: 671–678
- Cutolo EA, Guardini Z, Dall’Osto L, Bassi R** (2023) A paler shade of green: engineering cellular chlorophyll content to enhance photosynthesis in crowded environments. *New Phytol* **239**: 1567–1583
- Dadras A, Fürst-Jansen JMR, Darienko T, Krone D, Scholz P, Sun S, Herrfurth C, Rieseberg TP, Irisarri I, Steinkamp R, et al** (2023) Environmental gradients reveal stress hubs pre-dating plant terrestrialization. *Nat Plants* **9**: 1419–1438
- Endo M, Tanigawa Y, Murakami T, Araki T, Nagatani A** (2013) PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE-FLOWERING accelerates flowering through physical interactions with phytochrome B and CONSTANS. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 18017–18022
- Fitter DW, Martin DJ, Copley MJ, Scotland RW, Langdale JA** (2002) GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant J Cell Mol Biol* **31**: 713–727
- Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R** (2014) DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 2367–2372
- Frangedakis E, Yelina NE, Billakurthi K, Hua L, Schreier T, Dickinson PJ, Tomaselli M, Haseloff J, Hibberd JM** (2024) MYB-related transcription factors control chloroplast biogenesis. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2024.06.039
- Friedland N, Negi S, Vinogradova-Shah T, Wu G, Ma L, Flynn S, Kumssa T, Lee C-H, Sayre RT** (2019) Fine-tuning the photosynthetic light harvesting apparatus for improved

- photosynthetic efficiency and biomass yield. *Sci Rep* **9**: 13028
- Friedrichsen DM, Joazeiro CA, Li J, Hunter T, Chory J** (2000) Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol* **123**: 1247–1256
- Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM, Baker NR** (2003) Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves. *Plant J* **33**: 691–705
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W** (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl* **28**: 3150–3152
- Fujioka S, Li J, Choi YH, Seto H, Takatsuto S, Noguchi T, Watanabe T, Kuriyama H, Yokota T, Chory J, et al** (1997) The Arabidopsis deetiolated2 mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **9**: 1951–1962
- Fujioka S, Yokota T** (2003) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 137–164
- Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, Bai MY, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron JM, et al** (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Dev Cell* **13**: 177–189
- González-Grandío E, Álamos S, Zhang Y, Dalton-Roesler J, Niyogi KK, García HG, Quail PH** (2022) Chromatin Changes in Phytochrome Interacting Factor-Regulated Genes Parallel Their Rapid Transcriptional Response to Light. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2022.803441
- Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metoz F** (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305–308
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC** (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen. *Nature* **281**: 216–217
- Hajdu A, Dobos O, Domijan M, Bálint B, Nagy I, Nagy F, Kozma-Bognár L** (2018) ELONGATED HYPOCOTYL 5 mediates blue light signalling to the Arabidopsis circadian clock. *Plant J Cell Mol Biol* **96**: 1242–1254
- Han Y, Li F, Wu Y, Wang D, Luo G, Wang X, Wang X, Kuang H, Larkin RM** (2023) PSEUDO-ETIOLATION IN LIGHT proteins reduce greening by binding GLK transcription factors. *Plant Physiol* kiad641
- He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY** (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* **307**: 1634–1638
- Hernández-Muñoz A, Agreda-Laguna KA, Ramírez-Bernabé IE, Oltehua-López O, Arteaga-**

- Vázquez MA, Leon P** (2024) *Marchantia polymorpha* GOLDEN2-LIKE transcriptional factor; a central regulator of chloroplast and plant vegetative development. *New Phytol* **243**: 1406–1423
- Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Kuroda H, Kondou Y, Tsuchihara Y, Suzuki K, Ishikawa A, Seki M, et al** (2006) The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J Cell Mol Biol* **48**: 974–985
- Iorizzo M, Ellison S, Senalik D, Zeng P, Satapoomin P, Huang J, Bowman M, Iovene M, Sanseverino W, Cavagnaro P, et al** (2016) A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nat Genet* **48**: 657–666
- Ito J, Fukuda H** (2002) ZEN1 Is a Key Enzyme in the Degradation of Nuclear DNA during Programmed Cell Death of Tracheary Elements. *Plant Cell* **14**: 3201–3211
- Jenkins MT** (1926) A Second Gene Producing Golden Plant Color in Maize. *Am Nat* **60**: 484–488
- Jia T, Ito H, Tanaka A** (2016) Simultaneous regulation of antenna size and photosystem I/II stoichiometry in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **244**: 1041–1053
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD** (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform* **20**: 1160–1166
- Kim J-M, To TK, Matsui A, Tanoi K, Kobayashi NI, Matsuda F, Habu Y, Ogawa D, Sakamoto T, Matsunaga S, et al** (2017) Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nat Plants* **3**: 1–7
- Kim K, Jeong J, Kim J, Lee N, Kim ME, Lee S, Chang Kim S, Choi G** (2016) PIF1 Regulates Plastid Development by Repressing Photosynthetic Genes in the Endodermis. *Mol Plant* **9**: 1415–1427
- Kim N, Jeong J, Kim J, Oh J, Choi G** (2023) Shade represses photosynthetic genes by disrupting the DNA binding of GOLDEN2-LIKE1. *Plant Physiol* **191**: 2334–2352
- Kim TW, Guan S, Burlingame AL, Wang ZY** (2011) The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Mol Cell* **43**: 561–571
- Kim TW, Wang ZY** (2010) Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 681–704
- Klepikova AV, Kasianov AS, Gerasimov ES, Logacheva MD, Penin AA** (2016) A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J* **88**: 1058–1070
- Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, Sato M, Toyooka K, Keränen M, Aro E-M, Fukaki H, Ohta H, Sugimoto K, et al** (2012) Regulation of Root Greening by Light and Auxin/Cytokinin Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 1081–1095

- Kobayashi K, Ohnishi A, Sasaki D, Fujii S, Iwase A, Sugimoto K, Masuda T, Wada H** (2017) Shoot Removal Induces Chloroplast Development in Roots via Cytokinin Signaling. *Plant Physiol* **173**: 2340–2355
- Komatsu T, Kawaide H, Saito C, Yamagami A, Shimada S, Nakazawa M, Matsui M, Nakano A, Tsujimoto M, Natsume M, et al** (2010) The chloroplast protein BPG2 functions in brassinosteroid-mediated post-transcriptional accumulation of chloroplast rRNA. *Plant J Cell Mol Biol* **61**: 409–422
- Kondo Y, Ito T, Nakagami H, Hirakawa Y, Saito M, Tamaki T, Shirasu K, Fukuda H** (2014) Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF–TDR signalling. *Nat Commun* **5**: 3504
- Lee HG, Won JH, Choi Y-R, Lee K, Seo PJ** (2020) Brassinosteroids Regulate Circadian Oscillation via the BES1/TPL-CCA1/LHY Module in *Arabidopsis thaliana*. *iScience* **23**: 101528
- Lee J, He K, Stolz V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, Tongprasit W, Zhao H, Lee I, Deng XW** (2007) Analysis of Transcription Factor HY5 Genomic Binding Sites Revealed Its Hierarchical Role in Light Regulation of Development. *Plant Cell* **19**: 731–749
- Leivar P, Monte E** (2014) PIFs: Systems Integrators in Plant Development. *Plant Cell* **26**: 56–78
- Leong TY, Anderson JM** (1984) Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynth Res* **5**: 105–115
- Letunic I, Bork P** (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* **49**: W293–W296
- Li J, Chory J** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**: 929–938
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J** (1996) A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* **272**: 398–401
- Li J, Nam KH, Vafeados D, Chory J** (2001) BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 14–22
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC** (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 213–222
- Li M, Lee KP, Liu T, Dogra V, Duan J, Li M, Xing W, Kim C** (2021) Antagonistic modules regulate photosynthesis-associated nuclear genes via GOLDEN2-LIKE transcription factors. *Plant Physiol* kiab600
- Li X, Wang P, Li J, Wei S, Yan Y, Yang J, Zhao M, Langdale JA, Zhou W** (2020) Maize GOLDEN2-LIKE genes enhance biomass and grain yields in rice by improving photosynthesis and reducing photoinhibition. *Commun Biol* **3**: 1–12

- Li Y, Liu H, Ma T, Li J, Yuan J, Xu Y-C, Sun R, Zhang X, Jing Y, Guo Y-L, et al** (2023) Arabidopsis EXECUTER1 interacts with WRKY transcription factors to mediate plastid-to-nucleus singlet oxygen signaling. *Plant Cell* **35**: 827–851
- Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK** (2009) Sensing and Responding to Excess Light. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 239–260
- Lupi ACD, Lira BS, Gramegna G, Trench B, Alves FRR, Demarco D, Peres LEP, Purgatto E, Freschi L, Rossi M** (2019) *Solanum lycopersicum* GOLDEN 2-LIKE 2 transcription factor affects fruit quality in a light- and auxin-dependent manner. *PLOS ONE* **14**: e0212224
- Lv R, Li Z, Li M, Dogra V, Lv S, Liu R, Lee KP, Kim C** (2019) Uncoupled Expression of Nuclear and Plastid Photosynthesis-Associated Genes Contributes to Cell Death in a Lesion Mimic Mutant. *Plant Cell* **31**: 210–230
- Martín G, Leivar P, Ludevid D, Tepperman JM, Quail PH, Monte E** (2016) Phytochrome and retrograde signalling pathways converge to antagonistically regulate a light-induced transcriptional network. *Nat Commun* **7**: 11431
- Martínez C, Espinosa-Ruíz A, de Lucas M, Bernardo-García S, Franco-Zorrilla JM, Prat S** (2018) PIF4-induced BR synthesis is critical to diurnal and thermomorphogenic growth. *EMBO J* **37**: e99552
- Melis A** (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci* **4**: 130–135
- Meskauskiene R, Nater M, Goslings D, Kessler F, op den Camp R, Apel K** (2001) FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 12826–12831
- Mitchell JW, Mandava N, Worley JF, Plimmer JR, Smith MV** (1970) Brassins--a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* **225**: 1065–1066
- Miyaji T, Yamagami A, Nakamura Y, Nishida K, Tachibana R, Surina S, Fujioka S, Garcia-Hourquet M, Mora-García S, Nosaki S, et al** (2024) BIL7 enhances plant growth by regulating the transcription factor BIL1/BZR1 during brassinosteroid signaling. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.17212
- Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A, Chory J** (2001) Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 2053–2058
- Mochizuki N, Tanaka R, Grimm B, Masuda T, Moulin M, Smith AG, Tanaka A, Terry MJ** (2010) The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends Plant Sci* **15**: 488–498
- Monte E, Tepperman JM, Al-Sady B, Kaczorowski KA, Alonso JM, Ecker JR, Li X, Zhang Y, Quail PH** (2004) The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early,

- selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 16091–16098
- Moon J, Zhu L, Shen H, Huq E** (2008) PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 9433–9438
- Nagata N, Min YK, Nakano T, Asami T, Yoshida S** (2000) Treatment of dark-grown *Arabidopsis thaliana* with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants. *Planta* **211**: 781–790
- Nagata N, Tanaka R, Satoh S, Tanaka A** (2005) Identification of a Vinyl Reductase Gene for Chlorophyll Synthesis in *Arabidopsis thaliana* and Implications for the Evolution of *Prochlorococcus* Species. *Plant Cell* **17**: 233–240
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**: 34–41
- Nam KH, Li J** (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 203–212
- Nguyen CV, Vrebalov JT, Gapper NE, Zheng Y, Zhong S, Fei Z, Giovannoni JJ** (2014) Tomato GOLDEN2-LIKE Transcription Factors Reveal Molecular Gradients That Function during Fruit Development and Ripening. *Plant Cell* **26**: 585–601
- Ni F, Wu L, Wang Q, Hong J, Qi Y, Zhou X** (2017) Turnip Yellow Mosaic Virus P69 Interacts with and Suppresses GLK Transcription Factors to Cause Pale-Green Symptoms in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **10**: 764–766
- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, Yuan H, Feldmann KA, Tax FE** (1999) Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol* **121**: 743–752
- Nolan TM, Vukašinović N, Liu D, Russinova E, Yin Y** (2020) Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses[OPEN]. *Plant Cell* **32**: 295–318
- Nosaki S, Mitsuda N, Sakamoto S, Kusubayashi K, Yamagami A, Xu Y, Bui TBC, Terada T, Miura K, Nakano T, et al** (2022) Brassinosteroid-induced gene repression requires specific and tight promoter binding of BIL1/BZR1 via DNA shape readout. *Nat Plants* 1–13
- Nosaki S, Miyakawa T, Xu Y, Nakamura A, Hirabayashi K, Asami T, Nakano T, Tanokura M** (2018) Structural basis for brassinosteroid response by BIL1/BZR1. *Nat Plants* **4**: 771–776
- Oh E, Zhu J-Y, Bai M-Y, Arenhart RA, Sun Y, Wang Z-Y** (2014) Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl.

eLife. doi: 10.7554/eLife.03031

- Oh E, Zhu J-Y, Wang Z-Y** (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol* **14**: 802–809
- Ohto M, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K** (2001) Effects of Sugar on Vegetative Development and Floral Transition in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**: 252–261
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (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 BBA - Bioenerg* **975**: 384–394
- Pospíšil P** (2016) Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II as a Response to Light and Temperature Stress. *Front. Plant Sci.* **7**:
- Powell ALT, Nguyen CV, Hill T, Cheng KL, Figueroa-Balderas R, Aktas H, Ashrafi H, Pons C, Fernández-Muñoz R, Vicente A, et al** (2012) Uniform ripening Encodes a Golden 2-like Transcription Factor Regulating Tomato Fruit Chloroplast Development. *Science* **336**: 1711–1715
- Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G** (2009) Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in Arabidopsis thaliana plantlets. *BMC Plant Biol* **9**: 28
- Rossini L, Cribb L, Martin DJ, Langdale JA** (2001) The Maize Golden2 Gene Defines a Novel Class of Transcriptional Regulators in Plants. *Plant Cell* **13**: 1231–1244
- Shimada S, Komatsu T, Yamagami A, Nakazawa M, Matsui M, Kawaide H, Natsume M, Osada H, Asami T, Nakano T** (2015) Formation and dissociation of the BSS1 protein complex regulates plant development via brassinosteroid signaling. *Plant Cell* **27**: 375–390
- Sousa FL, Shavit-Grievink L, Allen JF, Martin WF** (2013) Chlorophyll Biosynthesis Gene Evolution Indicates Photosystem Gene Duplication, Not Photosystem Merger, at the Origin of Oxygenic Photosynthesis. *Genome Biol Evol* **5**: 200–216
- Soy J, Leivar P, González-Schain N, Martín G, Diaz C, Sentandreu M, Al-Sady B, Quail PH, Monte E** (2016) Molecular convergence of clock and photosensory pathways through PIF3–TOC1 interaction and co-occupancy of target promoters. *Proc Natl Acad Sci* **113**: 4870–4875
- Steenwyk JL, Iii TJB, Li Y, Shen X-X, Rokas A** (2020) ClipKIT: A multiple sequence alignment trimming software for accurate phylogenomic inference. *PLOS Biol* **18**: e3001007
- Stephenson PG, Fankhauser C, Terry MJ** (2009) PIF3 is a repressor of chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 7654–7659
- Sun Y, Fan X-Y, Cao D-M, Tang W, He K, Zhu J-Y, He J-X, Bai M-Y, Zhu S, Oh E, et al** (2010) Integration of Brassinosteroid Signal Transduction with the Transcription Network for Plant Growth Regulation in Arabidopsis. *Dev Cell* **19**: 765–777

- Surina S, Yamagami A, Miyaji T, Chagan Z, Chung KM, Mitsuda N, Nishida K, Tachibana R, Zhu Z, Miyakawa T, et al** (2024) BIL9 Promotes Both Plant Growth via BR Signaling and Drought Stress Resistance by Binding with the Transcription Factor HDG11. *Plant Cell Physiol* pcae009
- Susek RE, Ausubel FM, Chory J** (1993) Signal transduction mutants of arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* **74**: 787–799
- Susila H, Nasim Z, Gawarecka K, Jung J-Y, Jin S, Youn G, Ahn JH** (2023) Chloroplasts prevent precocious flowering through a GOLDEN2-LIKE–B-BOX DOMAIN PROTEIN module. *Plant Commun* 100515
- Tachibana R, Abe S, Marugami M, Yamagami A, Akema R, Ohashi T, Nishida K, Nosaki S, Miyakawa T, Tanokura M, et al** (2024) BPG4 regulates chloroplast development and homeostasis by suppressing GLK transcription factors and involving light and brassinosteroid signaling. *Nat Commun* **15**: 370
- Tachibana R, Yamagami A, Miyagi S, Nakazawa M, Matsui M, Sakuta M, Tanaka R, Asami T, Nakano T** (2022) BRZ-INSENSITIVE-PALE GREEN 1 is encoded by chlorophyll biosynthesis enzyme gene that functions in the downstream of brassinosteroid signaling. *Biosci Biotechnol Biochem* zbac071
- Takagi D, Takumi S, Hashiguchi M, Sejima T, Miyake C** (2016) Superoxide and Singlet Oxygen Produced within the Thylakoid Membranes Both Cause Photosystem I Photoinhibition. *Plant Physiol* **171**: 1626–1634
- Taketa S, Hattori M, Takami T, Himi E, Sakamoto W** (2021) Mutations in a Golden2-Like Gene Cause Reduced Seed Weight in Barley albino lemma 1 Mutants. *Plant Cell Physiol* **62**: 447–457
- Tanaka R, Hirashima M, Satoh S, Tanaka A** (2003) The Arabidopsis-accelerated cell death Gene ACD1 is Involved in Oxygenation of Pheophorbide a: Inhibition of the Pheophorbide a Oxygenase Activity does not Lead to the “Stay-Green” Phenotype in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **44**: 1266–1274
- Tang W, Yuan M, Wang R, Yang Y, Wang C, Oses-Prieto JA, Kim T-W, Zhou H-W, Deng Z, Gampala SS** (2011) PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* **13**: 124–131
- Tokumaru M, Adachi F, Toda M, Ito-Inaba Y, Yazu F, Hirosawa Y, Sakakibara Y, Suiko M, Kakizaki T, Inaba T** (2017) Ubiquitin-Proteasome Dependent Regulation of the GOLDEN2-LIKE 1 Transcription Factor in Response to Plastid Signals. *Plant Physiol* **173**: 524–535
- Torii K, Inoue K, Bekki K, Haraguchi K, Kubo M, Kondo Y, Suzuki T, Kubota A, Uemoto K, Shimizu H, et al** (2022) A guiding role of the *Arabidopsis* circadian clock in cell

- differentiation revealed by time-series single-cell RNA sequencing. *Cell Rep* **40**: 111059
- Trifinopoulos J, Nguyen L-T, von Haeseler A, Minh BQ** (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res* **44**: W232–W235
- Tripathy BC, Oelmüller R** (2012) Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal Behav* **7**: 1621–1633
- Tsutsui H, Higashiyama T** (2016) pKAMA-ITACHI Vectors for Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **57**: 191
- Tu X, Ren S, Shen W, Li J, Li Y, Li C, Li Y, Zong Z, Xie W, Grierson D, et al** (2022) Limited conservation in cross-species comparison of GLK transcription factor binding suggested wide-spread cisome divergence. *Nat Commun* **13**: 7632
- Ueda T, Uemura T, Sato MH, Nakano A** (2004) Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells. *Plant J Cell Mol Biol* **40**: 783–789
- Vani MV, Basha PO, Chandrasekhar T, Riazunnisa K** (2023) Development and characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* low chlorophyll mutants to improve photosynthetic efficiency and biomass. *Braz J Bot* **46**: 307–318
- Veciana N, Martín G, Leivar P, Monte E** (2022) BBX16 mediates the repression of seedling photomorphogenesis downstream of the GUN1/GLK1 module during retrograde signalling. *New Phytol* **234**: 93–106
- Vedalankar P, Tripathy BC** (2019) Evolution of light-independent protochlorophyllide oxidoreductase. *Protoplasma* **256**: 293–312
- Vilarrasa-Blasi J, González-García M-P, Frigola D, Fàbregas N, Alexiou KG, López-Bigas N, Rivas S, Jauneau A, Lohmann JU, Benfey PN, et al** (2014) Regulation of Plant Stem Cell Quiescence by a Brassinosteroid Signaling Module. *Dev Cell* **30**: 36–47
- Wagner D, Przybyla D, op den Camp R, Kim C, Landgraf F, Lee KP, Würsch M, Laloi C, Nater M, Hideg E, et al** (2004) The Genetic Basis of Singlet Oxygen-Induced Stress Responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **306**: 1183–1185
- Wan T, Li M, Zhao X, Zhang J, Liu Z, Chang W** (2014) Crystal Structure of a Multilayer Packed Major Light-Harvesting Complex: Implications for Grana Stacking in Higher Plants. *Mol Plant* **7**: 916–919
- Wang L, Tian Y, Shi W, Yu P, Hu Y, Lv J, Fu C, Fan M, Bai M-Y** (2020) The miR396-GRFs Module Mediates the Prevention of Photo-oxidative Damage by Brassinosteroids during Seedling De-Etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **32**: 2525–2542
- Wang P, Fouracre J, Kelly S, Karki S, Gowik U, Aubry S, Shaw MK, Westhoff P, Slamet-Loedin IH, Quick WP, et al** (2013) Evolution of GOLDEN2-LIKE gene function in C3 and C4 plants. *Planta* **237**: 481–495
- Wang X, Chory J** (2006) Brassinosteroids Regulate Dissociation of BKI1, a Negative Regulator of

- BRI1 Signaling, from the Plasma Membrane. *Science* **313**: 1118–1122
- Wang Y-G, Zhang Y-M, Wang Y-H, Zhang K, Ma J, Hang J-X, Su Y-T, Tan S-S, Liu H, Xiong A-S, et al** (2024) The Y locus encodes a REPRESSOR OF PHOTOSYNTHETIC GENES protein that represses carotenoid biosynthesis via interaction with APRR2 in carrot. *Plant Cell* koae111
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, et al** (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* **2**: 505–513
- Waters MT, Moylan EC, Langdale JA** (2008) GLK transcription factors regulate chloroplast development in a cell-autonomous manner. *Plant J* **56**: 432–444
- Waters MT, Wang P, Korkaric M, Capper RG, Saunders NJ, Langdale JA** (2009) GLK Transcription Factors Coordinate Expression of the Photosynthetic Apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 1109–1128
- Wolters SM, Benninghaus VA, Roelfs K-U, van Deenen N, Twyman RM, Prüfer D, Schulze Gronover C** (2023) Overexpression of a pseudo-etiolated-in-light-like protein in *Taraxacum koksaghyz* leads to a pale green phenotype and enables transcriptome-based network analysis of photomorphogenesis and isoprenoid biosynthesis. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2023.1228961
- Wu R, Guo L, Wang R, Zhang Q, Yao H** (2022) Genome-Wide Identification and Characterization of G2-Like Transcription Factor Genes in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Mol Basel Switz* **27**: 5491
- Yamagami A, Saito C, Nakazawa M, Fujioka S, Uemura T, Matsui M, Sakuta M, Shinozaki K, Osada H, Nakano A, et al** (2017) Evolutionarily conserved BIL4 suppresses the degradation of brassinosteroid receptor BRI1 and regulates cell elongation. *Sci Rep* **7**: 5739
- Yan J, Li S, Kim YJ, Zeng Q, Radziejwoski A, Wang L, Nomura Y, Nakagami H, Somers DE** (2021) TOC1 clock protein phosphorylation controls complex formation with NF-YB/C to repress hypocotyl growth. *EMBO J* **40**: e108684
- Yang YN, Le TTL, Hwang J-H, Zulfugarov IS, Kim E-H, Kim HU, Jeon J-S, Lee D-H, Lee C-H** (2022) High Light Acclimation Mechanisms Deficient in a PsbS-Knockout *Arabidopsis* Mutant. *Int J Mol Sci* **23**: 2695
- Yasumura Y, Moylan EC, Langdale JA** (2005) A Conserved Transcription Factor Mediates Nuclear Control of Organelle Biogenesis in Anciently Diverged Land Plants. *Plant Cell* **17**: 1894–1907
- Yeh S-Y, Lin H-H, Chang Y-M, Chang Y-L, Chang C-K, Huang Y-C, Ho Y-W, Lin C-Y, Zheng J-Z, Jane W-N, et al** (2021) Maize Golden2-like transcription factors boost rice chloroplast development, photosynthesis, and grain yield. *Plant Physiol* **188**: 442–459

- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J** (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**: 181–191
- Yokota T, Arima M, Takahashi N** (1982) Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Lett* **23**: 1275–1278
- Yoshizawa E, Kaizuka M, Yamagami A, Higuchi-Takeuchi M, Matsui M, Kakei Y, Shimada Y, Sakuta M, Osada H, Asami T, et al** (2014) BPG3 is a novel chloroplast protein that involves the greening of leaves and related to brassinosteroid signaling. *Biosci Biotechnol Biochem* **78**: 420–429
- Yu X, Li L, Zola J, Aluru M, Ye H, Foudree A, Guo H, Anderson S, Aluru S, Liu P, et al** (2011) A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BESI target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J Cell Mol Biol* **65**: 634–646
- Zebosi B, Vollbrecht E, Best NB** (2024) Brassinosteroid biosynthesis and signaling: Conserved and diversified functions of core genes across multiple plant species. *Plant Commun* **5**: 100982
- Zhang C, Zhang J, Tang Y, Liu K, Liu Y, Tang J, Zhang T, Yu H** (2020a) DEEP GREEN PANICLE1 suppresses GOLDEN2-LIKE activity to reduce chlorophyll synthesis in rice glumes. *Plant Physiol*. doi: 10.1093/plphys/kiaa038
- Zhang D, Tan W, Yang F, Han Q, Deng X, Guo H, Liu B, Yin Y, Lin H** (2021) A BIN2-GLK1 Signaling Module Integrates Brassinosteroid and Light Signaling to Repress Chloroplast Development in the Dark. *Dev Cell* **56**: 310-324.e7
- Zhang T, Zhang R, Zeng X-Y, Lee S, Ye L-H, Tian S-L, Zhang Y-J, Busch W, Zhou W-B, Zhu X-G, et al** (2024) GLK transcription factors accompany ELONGATED HYPOCOTYL5 to orchestrate light-induced seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* kiae002
- Zhang Y, Mayba O, Pfeiffer A, Shi H, Tepperman JM, Speed TP, Quail PH** (2013) A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **9**: e1003244
- Zhang Y, Pfeiffer A, Tepperman JM, Dalton-Roesler J, Leivar P, Gonzalez Grandio E, Quail PH** (2020b) Central clock components modulate plant shade avoidance by directly repressing transcriptional activation activity of PIF proteins. *Proc Natl Acad Sci* **117**: 3261–3269
- Zhang Y-J, Zhang X, Chen C-J, Zhou M-G, Wang H-C** (2010) Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. *Pestic Biochem Physiol* **98**: 151–157
- Zhong S, Zhao M, Shi T, Shi H, An F, Zhao Q, Guo H** (2009) EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 21431–21436

**Zubo YO, Blakley IC, Franco-Zorrilla JM, Yamburenko MV, Solano R, Kieber JJ, Loraine AE, Schaller GE** (2018) Coordination of Chloroplast Development through the Action of the GNC and GLK Transcription Factor Families. *Plant Physiol* **178**: 130–147

丸上萌々 (2017) 修士論文. 明治大学

小林康一 (2012) 高等植物のクロロフィル合成系の制御. *光合成研究* **22**: 125–138

明間莉乃 (2024) 修士論文. 京都大学

田中歩, 平島真澄, 田中亮一 (2004) クロロフィル代謝と植物の発育. *化学と生物* **42**: 93–98

阿部晋 (2014) 修士論文. 明治大学

## 謝辞

本研究は、京大生命科学研究科全能性統御機構学分野にて中野雄司教授のご指導のもとに進められました。中野雄司教授には、数々の熱心なご指導と貴重なご助言をいただきましたことを心から感謝申し上げます。また、山上あゆみ助教（京大生命科学研究科）には、実験指導や論文執筆に関する多大なるご助言を賜り、深く感謝しております。宮川拓也准教授（京大生命科学研究科）には精製タンパク質や転写因子の *cis* 配列に関する実験指導とご助言を賜り、感謝の意を表します。伊福健太郎教授（京大農学研究科）には、光合成活性測定装置に関する実験指導に加え、光合成に関する基本的な知識のご指導を賜り、誠に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くの方々からご協力をいただきました。阿部晋氏（明治大学農学研究科卒業生）には、*BPG4-FOX* 株の単離、*BPG4* の同定、各種形質転換植物の作成や Y2H、BiFC など様々な実験を行っていただきました。丸上萌々氏（明治大学農学研究科卒業生）には、CoIP、ChIP-qPCR 及び GUS 染色の実験を行っていただきました。明間莉乃氏（京大生命科学研究科卒業生）には、BGHs に関する各種形質転換体/ゲノム編集植物体の作成、Greening rate の測定、BGHs の発現解析、EMSA など様々な実験を行っていただきました。大橋隆生氏（京大生命科学研究科卒業生）には、*BPG4* と *GLK1* の相互作用ドメインの同定に関する Y2H を行っていただきました。西田快世氏（京大生命科学研究科）には、BL 処理が *BPG4* 発現に与える影響を解析した RT-qPCR 実験にご協力していただきました。Jong-Myong Kim 博士（アクプラント株式会社）には、ChIP-qPCR 実験にご協力していただきました。野崎翔平助教（筑波大学生命環境系）には、MBP-BES1、MBP-BIL1、MBP-PIF4 の発現用ベクターの分与を賜りました。稲葉丈人准教授（宮崎大学農学部）には *GLK1-OX* 及び *glklglk2* の分与を賜りました。田中亮一教授および岸本純子氏（共に北海道大学低温科学研究所）には、HPLC による内生 Pchlide 含量の測定にご協力していただきました。TEM による葉緑体観察に際しては、株式会社東海電子顕微鏡解析にご協力していただきました。TEM によるエチオプラスト観察に際しては、京都大学電子顕微鏡室にご協力していただきました。免疫蛍光染色に際しては、ジェノスタッフ株式会社にご協力していただきました。また、関原明博士（理化学研究所 CSRS）、松井南博士（理化学研究所 CSRS）、久城哲夫教授（明治大学農学研究科）、田之倉優教授および浅見忠男教授（共に東京大学農学生命科学研究科）には貴重なご助言を賜りました。深く感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、全能性統御機構学分野の皆様からは多大なるご支援とご協力をいただきましたことを、感謝申し上げます。

私の選んだ道を応援し、長期に渡る学生生活をあらゆる面で支えてくれた、父・立花茂則、母・立花まゆみ、兄・立花慧に感謝申し上げます。

最後に、研究の道に進むことを理解し、研究を応援してくれた妻・立花瑠奈に心より感謝申し上げます。

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。

Ryo Tachibana, Susumu Abe, Momo Marugami, Ayumi Yamagami, Rino Akema, Takao Ohashi, Kaisei Nishida, Shohei Nosaki, Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura, Jong-Myong Kim, Motoaki Seki, Takehito Inaba, Minami Matsui, Kentaro Ifuku, Tetsuo Kushiro, Tadao Asami, and Takeshi Nakano, BPG4 regulates chloroplast development and homeostasis by suppressing GLK transcription factors and involving light and brassinosteroid signaling. *Nature Communications*, 2024;**15**(1):370.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-44492-5>