

主論文

シロイヌナズナ *crumpled leaf* 変異体

サプレッサー遺伝子の同定と解析

吉村 亮

2024年3月

目次

概要	3
序論	5
色素体外包膜 β バレルタンパク質の機能と膜挿入機構	5
シロイヌナズナ <i>CRUMPLED LEAF</i> 遺伝子	6
本研究の目的と成果	9
結果	10
S2-6 は <i>crl-2</i> の多面的な形質をほぼ野生型に回復させる	10
半顕性もしくは顕性遺伝する 1 遺伝子が S2-6 のサプレッサー原因遺伝子である	10
<i>OEP80</i> ^{G516E} が S2-6 のサプレッサー原因遺伝子である	11
<i>OEP80</i> ^{G516E} 単独変異体の表現型解析	12
<i>OEP80</i> ^{G516E} は CRL 機能喪失変異体を抑圧した	13
G516E、A424V アミノ酸置換は <i>OEP80</i> の β バレルの構造を変化させると予測される	14
CRL は <i>OEP80</i> を含む複合体の形成に関与する	15
CRL タンパク質は <i>OEP80</i> タンパク質と相互作用する	16
考察	18
材料と方法	23
参考文献	30
図および表	37
謝辞	62

概要

シロイヌナズナ *crumpled leaf (crl)* は陸上植物に保存された核ゲノムコードの *CRL* 遺伝子の潜性変異体であり、矮性、色素体分裂阻害、芽生え葉身における異常な細胞死等の重篤かつ多面的な表現型を示す。点変異誘導剤エチルメタンスルホン酸(EMS) 処理を施した *CRL* の 1 アミノ酸置換変異体 *crl-2* を用いたサプレッサースクリーニングによって得られた複数のサプレッサー変異体候補から、本研究は S2-6 と名付けられた系統に着目し、S2-6 系統の表現型解析とサプレッサー原因遺伝子の同定を行った。その結果、S2-6 は *crl-2* の地上部形態、葉緑体分裂阻害等、確認した全ての表現型をほぼ完全に野生型に回復させる事が明らかとなった。次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析などによって、サプレッサー候補遺伝子候補を色素体外包膜に局在する *OUTER ENVELOPE PROTEIN of 80 KDA (OEP80)* に 1 アミノ酸置換変異 *OEP80^{G516E}* に絞り込んだ。さらに、*OEP80^{G516E}* ゲノム断片を導入した *crl-2* 安定形質転換体を作成し、*OEP80^{G516E}* が S2-6 のサプレッサー原因遺伝子であることを証明した。色素体外包膜には複数の β バレルタンパク質が局在し、イオン、アミノ酸、脂質、核コードタンパク質等の物質輸送に関わっているが、*OEP80* は色素体外包膜 β バレルタンパク質の膜挿入に関わる必須遺伝子である。

さらに本研究は *OEP80^{G516E}* が *crl* 機能喪失変異体 *crl-1* を抑圧することを示した。また、本研究は抗 GFP 抗体を用いた共免疫沈降実験によって、CRL-GFP 融合タンパク質が *OEP80* と相互作用することを示した。さらに、単離葉緑体膜タンパク質画分を用いた Blue-Native/SDS-PAGE 二次元電気泳動解析によって、分子量約 200,000 の *OEP80* タンパク質複合体が *crl-2* では不安定化し、S2-6 では安定化していることを明らかにした。また、大部分の CRL タンパク質が分子量約 66,000 に検出され、ごく一部の CRL タンパク質のみが分子量約 200,000 に存在することを明らかにした。以上の結果から、CRL は *OEP80* と安定な複合体を形成しているのではなく、一過的に *OEP80* と相互作用し、*OEP80* 複合体の形成を促進する因子であることが示唆された。本研究の成果は、CRL が *OEP80* タンパク質の複合体形成もしくは安定化を通じて外包膜 β バレルタンパク質の膜挿入に関与することを示唆し、*crl* 変異体が示す多面的な形質が葉緑体外包膜に存在する β バ

レルタンパク質の機能不全、もしくは低下に起因することを示唆する。また、CRL は葉緑体タンパク質外包膜輸送装置(TOC: Translocon at outer envelope membrane of chloroplasts)と相互作用し、色素体へのタンパク質輸送に関与することが報告されていることから、*crl* の多面的な異常は色素体本研究により示唆された β バレルタンパク質の外包膜挿入機構、および色素体タンパク質輸送機構の相加的もしくは相乗的な効果に起因する可能性が考えられる。

序論

色素体外包膜 β バレルタンパク質の機能と膜挿入機構

色素体は葉緑体として光合成を行う植物固有の細胞小器官である。色素体は内包膜と外包膜の2重の包膜に囲まれており、内包膜、外包膜を介して細胞質基質や他の細胞小器官と物質の交換を行なっている。例えば、色素体に局在するタンパク質の大部分は核ゲノムにコードされているため、N末端にトランジットペプチドと呼ばれる色素体移行シグナル配列を持つ前駆体として細胞質で翻訳され(Leister, 2003)、外包膜タンパク質輸送複合体(TOC; translocon on the outer chloroplast membrane)と内包膜タンパク質輸送複合体(TIC; translocon on the inner chloroplast membrane)を介して、色素体内部へ輸送される(Bölter and Soll, 2016)。また、外包膜に局在する β バレルタンパク質が色素体内外の物質交換に関与している。例えば、エンドウ (*Pisum sativum*) の outer envelope protein 21、24、37、40 (OEP21, 24, 37, 40) はチャンネル活性を持つ β バレルタンパク質であり、イオンやアミノ酸等代謝産物の輸送に関わる(Pohlmeier et al., 1998; Bölter et al., 1999; Goetze et al., 2006; Harsman et al., 2016)。シロイヌナズナの TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL4 (TGD4) は ER 膜から葉緑体への脂質の輸送に関与する β バレルタンパク質である(Wang et al., 2012)。色素体へのタンパク質輸送に関与する TOC のチャンネルを構成している TOC75 も外包膜に局在する β バレルタンパク質の1つである(Hinnah et al., 2002; Sveshnikova et al., 2005)。最近、単細胞緑藻クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)において、TOC-TIC の立体構造が明らかにされ(Jin et al., 2022; Liu et al., 2023)、クラミドモナスの TOC75 の β バレルドメインが、別の TOC 構成因子である TOC120 の β バレルドメインもしくは TOC90 の β バレルドメインと融合して1つの β バレルを形成していることが報告された(Jin et al., 2022; Liu et al., 2023)。

外包膜に局在する β バレルタンパク質は、細胞質で翻訳された後、TOC を通って膜間領域に輸送されて外包膜に挿入される(Day et al., 2019; Gross et al., 2021)。シロイヌナズナでは外包膜 β バレルタンパク質の外包膜挿入に関与するタンパク質が、それ

自身も外包膜 β バレルタンパク質である OEP80 である (Gross et al., 2021)。OEP80 はシロイヌナズナの TOC75 である TOC75-III のパラログであり、両者は β バレルドメインに加えて、タンパク質相互作用に関与する膜間領域に露出した polypeptide transport associated (POTRA) ドメインをもつ (Day et al., 2014)。OEP80 と TOC75-III は細菌、ミトコンドリア、色素体に広く保存された Omp85 タンパク質ファミリーに属しており (Day et al., 2014)、Omp85 ファミリータンパク質は、細菌、ミトコンドリア、色素体において外膜、外包膜への β バレルタンパク質の膜挿入という保存された機能を有している。例えば、細菌の Omp85 ファミリータンパク質、BamA、TamA は外膜 β バレルタンパク質の膜挿入を制御しており (Hagan et al., 2011; Selkrig et al., 2012)、ミトコンドリア外膜に局在する Omp85 ファミリータンパク質である Sam50 はミトコンドリア外膜への β バレルタンパク質挿入を制御している (Neupert and Herrmann, 2007)。細菌、および、ミトコンドリアにおける外膜への β バレルタンパク質の膜挿入機構、および、それに関与するタンパク質に関しては解明が進んでいるが、色素体外包膜への β バレルタンパク質の膜挿入に関しては、シロイヌナズナ OEP80 (Gross et al., 2021) とトウモロコシ (*Zea mays*) の DEFECTIVE KERNEL5 (DEK5) (Zhang et al., 2019) の関与が報告されているのみであり、その詳細は不明である。DEK5 は色素体内包膜局在タンパク質であり、細菌において TamA と相互作用して外膜への β バレルタンパク質の膜挿入を行うことが知られている内膜タンパク質 TamB のホモログであるが (Zhang et al., 2019)、シロイヌナズナの TamB ホモログである TRANSLOCON AT THE INNER-ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS236 (TIC236) は DEK5 とは異なり、外包膜への β バレルタンパク質の膜挿入への関与は示されておらず、色素体へのタンパク質輸送に関与することが報告されている (Chen et al., 2018)。

シロイヌナズナ *CRUMPLED LEAF* 遺伝子

シロイヌナズナの *CRUMPLED LEAF* (*CRL*) 遺伝子は核ゲノムにコードされる遺伝子であり、コケ植物から被子植物まで様々な陸上植物に保存されている (Asano et al.,

2004 ; Sugita et al., 2012)。CRL タンパク質は N 末端に膜貫通ドメインと推測される疎水性に富んだ領域を持つ、色素体外包膜に局在する膜内在性タンパク質である (Asano et al., 2004)。CRL タンパク質が色素体外包膜に局在しているも関わらず、*crl* 変異体は色素体分裂阻害や成長阻害、クロロフィル含量の低下といった、色素体の増殖や光合成に関連した形質のみならず、細胞分裂、細胞分化、植物体の形態形成、ストレス関連遺伝子の発現上昇、自発的細胞死の誘導など、一見、色素体機能とは関連がないような様々な形質を示す (Asano et al., 2004; Šimková et al., 2012; Hudik et al., 2014)。*crl* が示すこのような形質は色素体が細胞分裂、細胞分化、植物体の形態形成、ストレス関連遺伝子の発現上昇、自発的細胞死の誘導などに関与していることを示しているが、色素体がどのようにこれらの現象に関与しているのかについてわかっていないことは少ない。

基部陸上植物の1つであるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) は2つの CRL 相同遺伝子、*PpCRL1* と *PpCRL2* をもち、それらの2重欠損変異体 ($\Delta 1/2$) は原糸体 (protonema)、茎葉体 (gametophore) 両方において生育阻害と葉緑体分裂阻害を示す (Sugita et al., 2012)。また、シロイヌナズナ CRL は $\Delta 1/2$ を相補する (Sugita et al., 2012)。これらのことから、CRL の機能は陸上植物で保存されているとことが示唆されている (Sugita et al., 2012)。一方、CRL タンパク質はシアノバクテリア (*Synechococcus elongatus* PCC 6301) の発色団 Phycocyanobilin を色素タンパク質 Phycocyanin の β サブユニットに結合させるピリンリアーゼ (CpcT) とアミノ酸配列で25%程度の類似性を示すが、*PpCRL1* タンパク質の葉緑体局在に必要な配列を N 末端に付加した CpcT は $\Delta 1/2$ を相補しない (Sugita et al., 2012)。また、CpcT の酵素活性に重要なアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基をシロイヌナズナの CRL で置換しても、CRL としての機能が保持される (Wang et al., 2020)。以上から、CRL は CpcT から進化した、植物の陸上進出の過程で、CpcT と異なる新規機能を獲得したのではないかと考えられている (Sugita et al., 2012; Wang et al., 2020)。

近年、*crl* のサプレッサースクリーニングによって複数のサプレッサー遺伝子が報告されている (Li et al., 2020; Fang et al., 2022)。サプレッサーの一つはパルミチン酸(16:0)からパルミトイル酸(16:1)への変換を触媒する酵素の1つ FATTY ACID

DESATURASE 5 (FAD5) の 1 アミノ酸置換変異である (Li et al., 2020)。FAD5 の 1 アミノ酸置換変異は *cr1* の自発的細胞死と植物の成長阻害を抑圧するが、色素体分裂阻害を抑圧しない (Li et al., 2020)。サプレッサーに生じた 1 アミノ酸置換により FAD5 の機能が低下してパルミトイル酸(16:1)量が減少すると、パルミトイル酸(16:1)に由来する多価不飽和脂肪酸量が減少し、それによって多価不飽和脂肪酸の酸化が起きにくくなることが自発的細胞死を抑圧する原因であると提唱されている (Li et al., 2020)。Li らはさらに葉緑体分裂が阻害されると、葉緑体における活性酸素種生成の恒常性と脂質の恒常性が何らかの原因で破綻して脂質の過酸化が起き、それが自発的細胞死のシグナルとして働くという説を提唱している (Li et al., 2020)。また、色素体へのタンパク質輸送に関与する TIC236 に生じた 1 アミノ酸置換が *cr1* のサプレッサーであることも報告されている (Fang et al., 2022)。TIC236 は DUF490 と呼ばれる C 末端側のドメインを介して TOC 構成因子の一つである TOC75 の POTRA ドメインと相互作用し、TOC-TIC 超複合体の形成に関わると考えられている (Chen et al., 2018)。TIC236 の C 末端側に生じた 1 アミノ酸置換によって *cr1* が示す生育阻害、葉緑体分裂阻害、細胞死といった多面的な表現型がほぼ完全に野生型様に回復する (Fang et al., 2022)。Fang らは CRL が TOC 複合体と *in vivo* で結合することなどから、色素体へのタンパク質輸送能の低下が *cr1* が示す多面的な表現型の原因であり、TIC236 の C 末端側に生じた 1 アミノ酸置換によって、色素体へのタンパク質輸送能が亢進することによって *cr1* の多面的な表現型が抑圧されると提唱している (Fang et al., 2022)。TIC236 の発現量が低下した変異体 *tic236-2* が *cr1* と類似した多面的な形質を示すことも (Chen et al., 2018; Fang et al., 2022)、*cr1* が示す多面的な形質の原因が色素体へのタンパク質輸送能の低下であるという Fang らの考え方と一致している。しかし、CRL が TOC を構成するタンパク質であり、タンパク質輸送に関与するのであれば、葉緑体へのタンパク質輸送に関係する CRL 以外の遺伝子の変異体は *cr1* と類似した形質を示すことが期待されるが、葉緑体へのタンパク質輸送に関係する遺伝子の変異体で *cr1* と類似した形質を示すものは *tic236-2* 以外に知られていない。また、恒常的プロモーターで転写される色素体 YFP タンパク質が *cr1* において野生型同様に色素体にすべて局在するので (Chen et al., 2009)、*cr1* におけるタンパク質輸送能の低下はあったとしてもそれほど重篤ではないことが予

想される。したがって、Fang らが提唱するように、タンパク質輸送能の低下だけによって、*crl*の多面的な形質を引き起こされるのかに関しては議論の余地がある。

本研究の目的と成果

本研究は CRL タンパク質の機能を明らかにすることを目的として、*crl* 変異体が見出す多面的な形質を抑圧する新奇サプレッサー遺伝子の解析を行い、サプレッサーの原因遺伝子が β バレルドメインに 1 アミノ酸置換をもつ OEP80 タンパク質の遺伝子であることが明らかとなった。さらに、CRL が *in vivo* において OEP80 と相互作用すること、および、CRL が OEP80 の複合体形成を補助する働きを持つことが明らかとなった。これらの結果は *crl* 変異体が見出す多面的な形質が葉緑体外包膜に存在する β バレルタンパク質の機能不全、もしくは低下に起因することを示唆している。OEP80 の機能喪失変異体 *oep80-2* が胚性致死であるのに対して、CRL の機能喪失変異体である *crl-1* は致死ではないことから、CRL は OEP80 複合体の形成に必須の因子ではなく補助的な働きをしている因子であると考えられる。また、RNAi による OEP80 の発現抑制システムが *crl* 類似の形質を示さないことから (Huang et al., 2011)、*crl* 変異体が見出す多面的な形質は OEP80 の機能低下と葉緑体へのタンパク質輸送能の低下の相加的、もしくは相乗的效果による可能性が考えられる。本研究の成果は葉緑体外包膜に存在する β バレルタンパク質が、核ゲノム遺伝子の発現制御、植物の形態形成や成長、自発的細胞、葉緑体分裂に重要な働きをしている可能性を新たに示し、これらの現象に関与する葉緑体機能を理解する手がかりを提供するものである。

結果

S2-6 は *crl-2* の多面的な形質をほぼ野生型に回復させる

crl-2 は矮性で葉および茎は黄緑色をしており、葉身は皺が寄り左右の対称性が弱くなる(図 1 A; *crl-2*)。S2-6 ではこれらの形質がほぼ野生型同様に回復しており、外見は野生型と区別がつかなかった(図 1 A; Col-0, S2-6)。S2-6 地上部の芽生え生重量は野生型と同じであり、*crl-2* よりも有意に増加した(図 1 B)。*crl-2* で減少している地上部生重量あたりのクロロフィル含量も S2-6 では野生型と同じに回復した(図 1 C)。*crl-2* の葉肉細胞葉緑体は葉緑体分裂が阻害された結果、巨大になり細胞当たりの数が減少する(図 2 A; *crl-2*)。S2-6 では葉緑体の大きさと形が野生型に近づき、葉肉細胞の単位面積あたりの葉緑体数が野生型と同じに回復した(図 2 B)。*crl-2* は 1 週齢芽生えの子葉ではスポット状に局所的細胞死が生じており、子葉面積全体の 8%前後の領域で細胞死が観察されたが、S2-6 では野生型同様そのような細胞死の誘導が抑圧されていた(図 3 A, B)。

また、S2-6 におけるゲノム遺伝子の発現を調べるために、フランス Université Paris-Saclay の Raynaud 博士、Benhamed 博士との共同研究によって RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、ストレス応答遺伝子を含む *crl-2* で発現が上昇していた遺伝子の発現量は野生型と同程度に減少し、*crl-2* で低下していた遺伝子の発現量は S2-6 において野生型と同程度に上昇していることが明らかとなった(図 4)。すなわち S2-6 では *crl-2* における遺伝子発現レベルの変化も野生型同様に回復することが示された。

以上の結果から、S2-6 は *crl-2* が示す多面的な形質を全てほぼ完全に野生型に回復させるサプレッサー系統であることが示された。

半顕性もしくは顕性遺伝する 1 遺伝子が S2-6 のサプレッサー原因遺伝子である

次に S2-6 がもつサプレッサー原因遺伝子の遺伝様式を解析した。*crl-2* と S2-6 を

交配して得られた F₁ 植物を自家受粉した F₂ 世代の子葉葉肉細胞において、葉緑体の大きさと形状が均一であり野生型様である個体、大部分の葉緑体の大きさと形状は野生型と同じであるが、一部に巨大な葉緑体が混じっている個体、および、すべての葉緑体が *crl-2* 様に巨大である個体が出現し、その比率は 1:2:1 であった。また、地上部の形態的特徴(背丈、色、葉の形)に関しては、上記 F₂ 世代において、野生型様の個体と *crl-2* 様の個体が 3:1 の割合で出現し、中間の表現型を示す個体は現れなかった。以上の結果から、S2-6 のサプレッサー原因遺伝子は核ゲノムの 1 遺伝子座に存在し、形質によって半顕性遺伝もしくは顕性遺伝することが明らかとなった。

OEP80^{G516E} が S2-6 のサプレッサー原因遺伝子である

S2-6 における *crl-2* 抑圧原因遺伝子の同定するため、S2-6 を *crl-2* と交配し、自家受粉して得られた F₂ 世代において、20 個体のサプレッサー原因遺伝子のホモ接合体から全ゲノム DNA 抽出して、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行なった。その結果、サプレッサー原因遺伝子は V 番染色体の上腕に存在すると予測された。その染色体領域中には葉緑体外包膜に局在する OEP80 タンパク質遺伝子(AT5G19620)が含まれており、S2-6 の *OEP80* は 516 番目のグリシン(Gly)がグルタミン酸(Glu)に置換する塩基置換を持っていた。以後この *OEP80* 遺伝子を *OEP80^{G516E}* と表記する。S2-6 とは独立に単離された *crl-2* のサプレッサー系統 S1-9 においても、OEP80 の 424 番目のアラニンがバリンに置換した 1 アミノ酸置換(A424V)が生じていたことから(南河, 2019) *OEP80^{G516V}* が S2-6 のサプレッサー原因遺伝子であると予想した。

OEP80^{G516E} がサプレッサー原因遺伝子であることを確認するために、*OEP80^{G516E}* と野生型の *OEP80* ゲノム断片それぞれをクローニングして *crl-2* に導入し、安定形質転換体を作成した。導入したゲノム断片は *OEP80* 遺伝子の翻訳開始コドンの 1kb 上流から 3'UTR までの領域を含むようにした。その結果、野生型の *OEP80* ゲノム断片は *crl-2* の生育阻害も葉緑体分裂阻害も回復させなかったが(図 5; *genomicOEP80^{WT}*)、*OEP80^{G516E}* ゲノム断片は *crl-2* の生育阻害と葉緑体分裂阻害を部

分的に抑圧した(図 5 A, B; *genomicOEP80^{G516E}*)。 *OEP80^{G516E}* ゲノム断片を導入した *crl-2* には内在の野生型 OEP80 存在しているため、交配によって OEP80 の機能喪失変異 *oep80-2* を作成した形質転換体に導入した。 *oep80-2* のホモ接合体は胚性致死であるため、交配には *oep80-2* のヘテロ接合体を用いた。 *genomicOEP80^{G516E}* を導入した *crl-2 oep80-2* 二重変異体では地上部の生育と葉緑体分裂が野生型と同様に回復した(図 6 A, B; *genomicOEP80^{G516E} crl-2; oep80-2*)。一方、 *genomicOEP80^{WT}* を導入した *crl-2 oep80-2* 二重変異体では *crl-2* が示す生育阻害、葉緑体分裂阻害いずれもまったく回復しなかった(図 6 A, B; *genomicOEP80^{WT} crl-2; oep80-2*)。

以上の結果より、 *OEP80^{G516E}* が S2-6 のサプレッサー原因遺伝子であることが示された。 OEP80 は N 末端に色素体移行配列をもち、 N 末側に 3 個の POTRA と呼ばれるタンパク質相互作用に関わるドメイン、 C 末側に 16 個の β ストランドから構成される β バレルドメインを持つ(Day et al, 2014; Day et al., 2019, Gross et al., 2020)。 OEP80 の POTRA ドメインは色素体外包膜と内包膜の間の膜間腔に露出し、 β バレルドメインは色素体外包膜を貫通していると考えられている(Day et al., 2014; Gross et al., 2020)。 *OEP80^{G516E}* の 516 番目のグリシンからグルタミン酸への置換は β バレルドメインの 7 番目の β ストランドに位置し、 S1-9 が持つ OEP80 の 424 番目のアラニンからバリンへの置換は β バレルドメインの 2 番目の β ストランドに位置している(図 7; 南河, 2019)。

OEP80^{G516E} 単独変異体の表現型解析

S2-6 を野生型と交配し、野生型 *CRL* 持つ *OEP80^{G516E}* 単独変異体を作成し、表現型を解析した。その結果、 *OEP80^{G516E}* 単独変異体の見た目は野生型と区別がつかず、地上部の生重量、クロロフィル含量、葉肉細胞葉緑体の大きさは野生型と同じであった(図 8A-D)。 *OEP80* の RNAi 系統が生育阻害と葉の緑色が黄緑色になるという形質を示すことから(Huang et al., 2011)、この結果は *OEP80^{G516E}* が *OEP80* の機能を保持していることを示す。

次に、2 週齢芽生え地上部全体における内在 OEP80 タンパク質量を *OEP80^{G516E}* 単

独立変異体と野生型で比較した。その結果、*OEP80^{G516E}* 単独変異体では OEP80 の内在タンパク質量が野生型よりも減少していることが示された(図 9)。外包膜タンパク質 TOC75-III 内在量が *OEP80^{G516E}* 単独変異体で減少していないことから、この内在 OEP80 タンパク質量の減少は外包膜タンパク質全体が減少しているのではなく、*OEP80^{G516E}* 特異的なものである可能性が考えられる。*crl-2* では OEP80 が過剰に蓄積しており、*OEP80^{G516E}* が内在 OEP80 タンパク質量を減少させることによって *crl-2* のサプレッサーとして機能する可能性が考えられたため、*oep80-2* のヘテロ接合体を用いてこの可能性を検証した。まず、*OEP80^{G516E}* 単独変異体と *oep80-2* ヘテロ接合体において、TOC75、TOC33、OEP80 タンパク質内在量を評価した(図 10 A, B)。*OEP80^{G516E}* 単独変異体と *oep80-2* ヘテロ接合体の TOC75、TOC33 タンパク質内在量は野生型と同じであったが、OEP80 タンパク質内在量は *OEP80^{G516E}* 単独変異体では野生型の 70%程度、*oep80-2* のヘテロ接合体では野生型の 50%程度である事を確認した(図 10 B)。交配によって作成した *oep80-2* をヘテロ接合体に持つ *crl-2* では *crl-2* が示す生育阻害及び、葉緑体分裂阻害はまったく回復しなかった(図 11)。この結果から、*OEP80^{G516E}* における OEP80 内在タンパク質量の低下はサプレッサー機能には関係ないと考えられる。*crl-2* において内在 OEP80 タンパク質量は野生型と同程度であったことも、この結論と一致している(図 12)。

OEP80^{G516E} は *CRL* 機能喪失変異体を抑圧した

crl-2 の CRL タンパク質(CRL^{G31D})は膜貫通ドメインと考えられている領域の 31 番目のグリシンがアスパラギン酸に置換した 1 アミノ酸置換を持っており、見かけの質量が減少し、CRL タンパク質内在量が野生型に比べ大幅に低下している(図 13)。そこで、*OEP80^{G516E}* が CRL タンパク質内在量を増加させることで *crl-2* のサプレッサーとして機能している可能性を検討した。その結果、*OEP80^{G516E}* が CRL^{G31D} タンパク質内在量をわずかに増加させていた(図 13)。この CRL タンパク質内在量の増加が *crl-2* の多面的形質の抑圧に関与している可能性が考えられたため、次に *OEP80^{G516E}* が *CRL* の機能喪失変異体 *crl-1* を抑圧するか検討した。交配によって

OEP80^{G516E} と *CRL* の機能喪失変異体 *crl-1* との二重変異体を作成し、その形質を観察した。その結果、*OEP80^{G516E} crl-1* 二重変異体は *crl-1* が示す多面的な表現型（生育阻害、葉の形態異常、葉緑体分裂阻害、クロロフィル含量の低下、子葉における細胞死）をすべて抑圧した(図 14、図 15)。ただし、*OEP80^{G516E}* は *crl-1* の葉緑体分裂阻害以外の形質はすべて野生型同様に回復させたが、葉緑体分裂阻害については、部分的にしか回復させなかった(図 14 B, E)。以上の結果から、*OEP80^{G516E}* による *CRL* タンパク質内在量増加は *crl* の多面的形質の抑圧に本質的ではないことが明らかとなった。

G516E、A424V アミノ酸置換は *OEP80* の β バレルの構造を変化させると予測される

近年、AlphaFold 2 を用いて、タンパク質のアミノ酸配列から精度の高いタンパク質の立体構造予測が可能となっている(Jumper et al., 2021)。そこで、AlphaFold Protein Structure Database から *A. thaliana* *OEP80* の構造情報(AlphaFold identifier AF-Q9C5J8-F1)を入手し、構造可視化ツール UCSF chimeraX を用いて、*OEP80* の予測立体構造を調べ、516 番目のグリシンからグルタミン酸への置換、424 番目のアラニンからバリンへの置換が *OEP80* の立体構造にどのような影響を及ぼし得るかを検討した。AlphaFold 2 による解析の結果、*OEP80* の 3 個の連続した POTRA ドメインと β バレルドメインは信頼性スコア(pLDDT)が非常に高く、精度よく予測されていた(図 16)。一方、POTRA ドメインよりも N 末端側の領域は、信頼性スコアが低く、無秩序な構造と予測された(図 16)。AlphaFold 2 による予測精度が高いと、側鎖の立体配座も正確に予測される場合が多い(Jumper et al., 2021)。従って、*OEP80* の β バレルドメインにおけるアミノ酸側鎖の立体配座も精度良く予測されていると期待される。そこで、野生型 *OEP80* の予測立体構造を用いて、*in silico* で 516 番目のグリシンをグルタミン酸に置換し、その影響を評価した。その結果、予測立体配座の全てにおいて、G516E の置換により生じたグルタミン酸と隣接するアミノ酸残基の原子間で重なり合い(衝突)が確認された。ある立体配座では β -バレルドメインの

内部でグルタミン酸と周辺のアミノ酸残基との間で 7 つの衝突を示した(図 17; OEP80^{G516E})。したがって、OEP80 における G516E のアミノ酸置換は自身の β バレルドメインの構造に影響を及ぼしていると考えられる。A424V の置換に関しても *in silico* で周囲のアミノ酸残基への影響を検討した結果、予測された全ての立体配座において、A424V の置換部位周辺でバリリンと隣接するアミノ酸残基との間で原子の衝突が確認された。ある立体配座では β バレルドメインの内部でバリリンと周辺のアミノ酸残基との間で 2 箇所の衝突が予測された(図 18)。したがって、OEP80 における A424V のアミノ酸置換も自身の β バレルドメインの構造に影響を及ぼしていると考えられる。

CRL は OEP80 を含む複合体の形成に関与する

in silico 解析により、G516E 変異と A424V 変異は OEP80 の立体構造を変化させることが示唆された。そこで、OEP80 の立体構造変化が OEP80 の機能にどのように影響を及ぼしうるのかを検討するため、*crl-2* および S2-6 における OEP80 複合体の解析を行った。単離葉緑体から調製した膜タンパク質画分を Blue-Native PAGE と SDS-PAGE を用いた二次元ゲル電気泳動 (2D-BN/SDS-PAGE) に供試し、OEP80 複合体を野生型(WT)、*crl-2*、S2-6 で比較した(図 19)。野生型では、OEP80 のシグナルは約 200 kDa に見られた(図 19; Col-0)。この結果は Gross らの報告と一致する (Gross et al., 2021)。対照的に、*crl-2* では約 200 kDa の OEP80 シグナルが著しく弱くなっていた(図 19; *crl-2*)。また、S2-6 では約 200 kDa の OEP80 シグナルの強さが野生型に近くまで回復していた(図 19; S2-6)。これらの結果は、CRL が約 200 kDa の OEP80 複合体の形成関与すること、および、OEP80^{G516E} が CRL がない状態でも約 200 kDa の複合体を形成する能力を獲得したことを示唆する。

共同研究者による OEP80 複合体検出条件の改良、および、*crl-1* を用いた OEP80 複合体解析によって、CRL は約 200 kDa の OEP80 複合体の安定化に働くこと、および、OEP80^{G516E} では野生型 OEP80 よりも約 200 kDa の OEP80 複合体が安定化していることが示唆されている(補助図 1 A, B)。すなわち、*crl-1* では約 200 kDa の

OEP80 シグナルが弱くなり、約 160 kDa の位置に主要な OEP80 シグナルが検出された(補助図 1 A; *crl-1*)。この結果から、*crl-1*では約 200 kDa の OEP80 複合体が解離しやすくなっていることが示唆される。また、OEP80 が解離しやすくなるようなある BN-PAGE 泳動条件では、野生型において約 200 kDa の OEP80 シグナルが不明瞭になり、146 kDa の位置の OEP80 シグナルが強くなった(補助図 1 B; Col-0)。それに対して *crl-2*では 146 kDa の位置の OEP80 シグナルが強くなり、約 200 kDa の OEP80 シグナルが野生型と比べてより不明瞭になった(補助図 1 B; *crl-2*)。この結果から、*crl-2*では特定条件下において約 200 kDa の OEP80 複合体が野生型よりも解離しやすくなっていることが示唆される。そして、S2-6 では、約 200 kDa の OEP80 シグナルがわずかに広がって検出され、146 kDa の OEP80 シグナルはほとんど検出されなかった(補助図 1 B; S2-6)。この結果から、OEP80^{G516E}では野生型 OEP80 よりも約 200 kDa の OEP80 複合体が安定化していることが示唆される。

CRL タンパク質は OEP80 タンパク質と相互作用する

CRL タンパク質と OEP80 タンパク質との相互作用を *in vivo* で検討した。そのために、*crl-1* を相補できる機能的な CRL-GFP を発現している植物から葉緑体を単離し、抗 GFP 抗体を用いた共免疫沈降実験を行った。対照実験として色素体ストロマ局在 GFP (pt-GFP) を発現する植物の単離葉緑体を用いた。可溶化した葉緑体タンパク質に対して抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降を行うと、CRL-GFP と共に OEP80 タンパク質が沈殿したが(図 20; Eluate *CRL-GFP*, *crl-1*)、OEP80 は pt-GFP とは共沈殿しなかった(図 20; *pt-GFP*, Col-0)。また、CRL-GFP と pt-GFP は 葉緑体内膜タンパク質 TIC40 とは共沈殿しなかった(図 20; Eluate α TIC40)。以上の結果から *in vivo* において CRL と GFP が相互作用すること明らかとなった。

さらに、共同研究者は単離した野生型葉緑体のジキトニン抽出可溶性画分と抗 OEP80 抗体を用いた免疫沈降実験によって CRL と OEP80 とが *in vivo* で相互作用することを確かめている(補助図 2 A; Eluate α OEP80)。用いた電気泳動条件下では、CRL タンパク質は大きさの異なる 2 本のバンドとして検出されるが(補助図 2B; Col-

0) 、小さい方のバンドのみが OEP80 と共沈殿した(補助図 2 A; Elute α ORP80)。

次に、野生型の葉緑体を用いて、CRL を含む複合体のサイズを 2D-BN/SDS-PAGE を用いて解析した。CRL シグナルは 1.2 MDa から 66 kDa 以下の領域で検出された(図 21; IB: α CRL)。そして、CRL 一部のみが約 200 kDa の位置に検出された(図 21; IB: α CRL, solid line)。この結果から、CRL は OEP80 複合体と安定に結合している構成因子ではなく、OEP80 複合体と一過的に相互作用し、約 200 kDa の OEP80 複合体の形成を促進する OEP80 相互作用因子であることが示唆された。

考察

本研究は *crl-2* サプレッサー系統 S2-6 が *crl* の多面的かつ重篤な表現型をほぼ全て抑圧し、野生型様に回復させることを示した(図 1-4)。そして、S2-6 のサプレッサー原因遺伝子が *OEP80^{G516E}* であることを明らかにした(図 5-7)。そして、OEP80 の立体構造予想を用いて、OEP80^{G516E}、および、*crl-2* のサプレッサーであることが示されている OEP80^{A424V} の β バレルドメイン構造が変化している可能性を示し(図 16-18)、*OEP80^{G516E}CRL* が OEP80 複合体の形成に関与する働きを持つこと、および、*OEP80^{G516E}* では OEP80 を含むタンパク質複合体が安定化していることを明らかとした(図 19)。更に、本研究は CRL が OEP80 と相互作用すること(図 20)、そして、その相互作用が一過的である可能性を示した(図 21)。これらの結果から、CRL は OEP80 と一過的に相互作用し、その複合体を安定化する因子であり、*OEP80^{G516E}* は CRL の補助なしで安定な複合体を形成する機能を持つと結論した。

OEP80^{G516E} 単独変異体は成長、クロロフィル含量、葉緑体分裂において野生型と同じであったが(図 8)、OEP80 タンパク質量が野生型に比べて減少していた(図 9)。しかし、この OEP80 タンパク質量の減少は *OEP80^{G516E}* のサプレッサー機能とは関係なかった(図 10-12)。また、*OEP80^{G516E}* には *crl-2* において減少している CRL タンパク質内在量を増加させたが、*OEP80^{G516E}* が *crl* の機能喪失変異体 *crl-1* を抑圧したことから、この CRL タンパク質内在量の変化も *OEP80^{G516E}* のサプレッサー機能とは関係ないことが示された(図 13-15)。

以上から、本研究は *crl* が示す多面的な形質の原因は、OEP80 複合体の不安定化であり、OEP80^{G516E} は OEP80 複合体を安定化することで、*crl* の多面的形質をすべて抑圧すると結論した。OEP80 は色素体 β バレルタンパク質の膜挿入に関与するため(Gross et al., 2021)、CRL は OEP80 を介して、色素体外包膜 β バレルタンパク質の膜挿入に関与すると考えられる。色素体外包膜には複数の β バレルタンパク質が局在しており、これらはタンパク質、アミノ酸、脂質、イオン等各種物質の輸送、交換に関与する(Pohlmeier et al., 1998; Bölter et al., 1999; Goetze et al., 2006; Wang et

al., 2012; Harsman et al., 2016; Bölter and Soll 2016)。したがって、*crl*が示す生育阻害、形態形成異常、葉緑体分裂阻害および恒常的な細胞死等の多面的な形質は色外包膜 β バレルタンパク質の膜挿入の機能低下による可能性が考えられる。既知の外包膜 β バレルタンパク質の変異の中に、*crl*様の形質を示すものは知られていないので、*crl*が示す多面的形質は複数の β バレルタンパク質の機能低下の相加的な効果による可能性がある。あるいは、CRL が色素体へのタンパク質輸送に参与することが報告されているので(Fang et al., 2022)、*crl*が示す多面的形質は外包膜 β バレルタンパク質の機能低下と色素体へのタンパク質輸送能の低下の相加的、あるいは、相乗的效果によるのかもしれない。

S2-6 とは独立に単離された *crl-2*のサプレッサー系統 S1-9 も OEP80 に生じた 1 アミノ酸置換 A424V が *crl* 抑圧の原因であることが示されている(南河, 2019)。OEP80^{G516E} および OEP80^{A424V} は OEP80 の β バレルドメインを形成する β ストランド上に 1 つのアミノ酸置換を持つ。そして、OEP80^{G516E} では OEP80 複合体の安定性が増していることが示唆されたことから(図 19)、OEP80 に生じた A424V および G516E の置換は OEP80 の β バレルドメインの構造変化を介して、自身の複合体を安定化させる機能獲得型変異であると考えられる。この考えは OEP80^{G516E} および OEP80^{A424V} が半顕性、もしくは顕性の遺伝様式を示すことと一致している。

OEP80 の機能喪失変異体、*oep80-2* は胚発生の球状胚期で発生を停止させる(Patel et al., 2008)が、CRL の機能喪失変異体、*crl-1* は発芽し、花を咲かせる(Asano et al., 2004)。そのため、*crl-1* において OEP80 の機能が完全に失われてはいないと考えられる。実際に *crl-1* の 2D-BN/SDS-PAGE 解析において 200 kDa 前後に少量の OEP80 シグナルが検出されているので(図 21; IB α CRL solid line)、*crl-1* においても機能的な OEP80 複合体が少量形成されていると考えられる。そして、このことは CRL が OEP80 の複合体形成に必須の因子ではないことを示している。おそらく、CRL は OEP80 複合体を安定化を促進する補助的因子として機能するのであろう。

OEP80 が *crl* の多面的形質を野生型に回復されるサプレッサーの原因遺伝子であったことから、OEP80 の機能低下型変異体は *crl* のような形質を示すと考えられる。しかし、OEP80 の RNAi 系統は生育阻害と葉の緑色が黄緑色になるという形質を示す

(Huang et al., 2011)。また、色素体へのタンパク質輸送能が低下した変異体で *crl* のような形質を示すものは稀である。これらのことは、*crl* の多面的形質は OEP80 の機能低下と色素体へのタンパク質輸送能の低下の両方が同時に起こった場合にのみ顕れる可能性を示唆しているのかもしれない。

CRL は色素体外包膜に局在する TOC 複合体構成因子(TOC75、TOC33 および TOC159)と *in vivo* で相互作用する(Fang et al., 2022)。TOC75 および OEP80 は同一の Omp85 ファミリーに属することから(Hsu and Inoue, 2009)、CRL は OEP80 のみならず TOC 複合体の安定化にも関わっている可能性があるだろう。TOC 複合体の大きさは 720-1048 kDa であることが報告されている(Chen and Li, 2017)。したがって、720-1048 kDa 付近で検出される CRL 複合体(図 21; IB: α CRL)は TOC 複合体と相互作用して、TOC 複合体の安定化に働いている CRL タンパク質であるのかもしれない。CRL は陸上植物以外では相同遺伝子がみつからないため(Asano et al., 2004; Sugita et al., 2012)、CRL は陸上植物が誕生した前後において、色素体へのタンパク質輸送や β バレルタンパク質の外包膜挿入に関与するようになった補助的因子と考えられる。

OEP80 のグラム陰性菌ホモログである BamA は 4 つの補助リポタンパク質(BamB, C, D, E)と相互作用し、 β バレルタンパク質外膜統合装置(BAM)を形成する(Hagan et al., 2011)。BAM は β バレルタンパク質の基質認識、バレル構造の形成、最終的な膜への乖離を含む複数の動的ステップを経て、 β バレルタンパク質の膜統合を実行する(Doyle et al., 2022)。Bam 構成因子のうち、*BamA* と *BamD* は必須遺伝子であり、BamD は自身が β バレルタンパク質である BamA や外膜 β バレルタンパク質 OmpA の未フォールディング型と結合することが示されている(Hagan et al., 2013)。BamD の必須性を回避する *BamD* 抑圧変異体 *BamA_{E470K}* がスクリーニングにより同定されており、BamA の E470K 変異は β バレル領域の β ストランド上に位置し、変異部位が BamA 活性に重要であると示唆されている(Hart and Silhavy, 2020)。本研究が同定した *crl* 抑圧変異 OEP80^{G516E} のアミノ酸置換も β バレル領域の β ストランド上に位置していた。また、S1-9 に生じている OEP80 A424V のアミノ酸置換も β バレル領域の β ストランド上に位置していた。したがって、CRL と OEP80 の関係

は BamD と BamA の関係に類似していると捉えることが可能である。すなわち、CRL は OEP80 に対して、BAM 補助タンパク質と類似の機能を持ち、 β バレルタンパク質膜統合の活性制御に関わる作用を示すと解釈することも可能である。

また、酵母ミトコンドリア外包膜に局在する OEP80 ホモログ Sam50 は複数の補助タンパク質と相互作用し、 β バレルタンパク質の外包膜統合装置(SAM)を形成、 β バレルタンパク質の外包膜挿入に関わることが知られている (Neupert and Herrmann, 2007)。しかし、植物における色素体 β バレルタンパク質の外包膜挿入機構の詳細および関連因子はほとんどわかっておらず、最近になって、色素体に保存された Omp85 ファミリータンパク質 OEP80 が β バレルタンパク質と中間複合体を形成し、膜挿入機構に関与することが示された (Gross et al., 2021)。Gross らは OEP80 の他に未知の因子が色素体外包膜挿入の機構に関与する可能性を指摘しているが (Gross et al., 2021)。CRL は OEP80 の複合体形成に関与することが実験的に示された初めての因子であり、本研究の成果は色素体 β バレルタンパク質の膜挿入機構の解明に貢献すると考えられる。

シロイヌナズナ *TIC236* の機能低下型変異体 (*tic236-2*) は生育阻害、葉緑体分裂阻害、葉の細胞における異常な細胞死など、*crl* とよく似た特徴を示し、また、サプレッサースクリーニングより *TIC236* における複数の一アミノ酸置換が *crl* の多面的な表現型を抑圧することが示された (Fang et al., 2022)。トウモロコシの *TIC236* 相同遺伝子 *dek5* も生育阻害を示し、チラコイド膜は正常であるが葉緑体は数が減少し巨大化する (Zhang et al., 2019)。Fang らは CRL が TOC 複合体の構成因子であり、タンパク質輸送能の回復が *TIC236* サプレッサー系統における *crl* 抑圧の原因であると示唆している (Fang et al., 2022)。しかし、*crl* は葉緑体タンパク質輸送能が低下しているが、TOC75 の過剰発現は *crl* を部分的にしか回復させない (宮崎, 2020)。また、TOC 構成因子である *TOC33* 変異体の葉緑体は野生型よりも小さく、*crl* のようにはならない (Jarvis et al., 1998)。さらに、ストロマ局在 YFP は *crl* で正常に葉緑体内部へと輸送される (Chen et al., 2009)。これらの知見から、色素体タンパク質輸送能の低下だけで *crl* の多面的形質を説明することは適切ではなく、*crl* の多面的形質は本研究で示唆した色素体 β バレルタンパク質の外包膜挿入機能と色素体へのタンパク質

輸送能の両方の低下による相加的もしくは相乗的な原因に起因すると考えるほうがより適切であると考ええる。

材料と方法

植物の生育条件および系統

種子の滅菌方法、土壌および Murashige and Skoog (MS) 培地上での生育条件は Chen らの方法に従った(Chen et al., 2009)。シロイヌナズナ(*A. thaliana*)は Columbia-0 (Col-0)を用いた。*Crl-2*は Šimkováらによって単離された(Šimková et al., 2012)。S2-6 は EMS 処理した *crl-2* のサブレッサー候補(瀬田, 2016)から MS 培地上での地上部の形質(生育状態、色、葉の形態)と子葉葉肉細胞の葉緑体サイズを指標に単離した。本研究では *crl-1*, *35S::CRL-GFP*, *crl-1*(Asano et al., 2004)、*35S::pt-sGFP(S65T)*; *Col-0* (Niwa et al., 1999)を使用した。*oep80-2*(GK_429H12)(Patel et al., 2008)は Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)から入手した。*OEP80^{G516E} crl-1* は、S2-6 と *crl-1* へテロ接合体を交配することで作出した。*OEP80^{G516E}* 単独変異体は S2-6 と Col-0 を交配することで作出した。*crl-2 oep80-2* は *crl-2* と *oep80-2* へテロ接合体を交配することで作出した。遺伝子型の判定に用いたプライマーを表 1 に示した。

ゲノム断片(*genomic OEP80^{G516E}* および *genomic OEP80^{WT}*)を導入した安定形質転換植物はアグロバクテリウムを用いる方法により作出した(Clough and Bent, 1998)。S2-6 および Col-0 よりゲノム DNA を抽出し、翻訳開始点 1 kb 上流から 3'UTR までの領域を含む OEP80 ゲノム断片を PCR により増幅した。増幅に用いたプライマーを表 1 に示した。増幅した PCR 産物は TA cloning kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて pCR8 にクローニングした。ゲノム断片は LR 反応により pGWB501 バイナリーベクター (Nakagawa et al., 2007) に挿入した。得られたバイナリーベクターをエレクトロポレーションにより *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)に形質転換した。フローラルディップ法 (Clough and Bent, 1998)により、OEP80 ゲノム断片を *crl-2* のゲノムに導入した。組み換え植物体は 15 µg/ml のハイグロマイシン B を添加した MS 培地上で選抜した。独立に取得した第 1 世代のうち、代表的な系統の第 3 世代を解析に用いた。

葉緑体の自家蛍光像の取得と葉緑体数の測定

クロロフィルの自家蛍光像は蛍光顕微鏡 (AxioImager M1, ZEISS) で観察し、Filter set 43 (励起光バンドパス BP545/25、蛍光バンドパス BP605/70)を用いて AxioCam MRm (ZEISS)で撮影した。葉緑体数の定量は以下の様に行った。2 週齢芽生え子葉をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl) に溶かした 4% (w/v) パラホルムアルデヒドで浸潤し、一晚、4°C、暗所で固定した。固定した子葉を 0.1 M EDTA pH 9.0 の溶液に 2 日間以上浸し、プレパラート上で子葉を軽く圧迫して細胞を解離させた。共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i, Olympus) を用いて、葉肉細胞の Z スタック蛍光像および明視野像を撮影した。スタック像を画像解析ソフト Fiji で再構成し、単位面積(5000 μm²)あたりの葉肉細胞における葉緑体数を求めた。励起レーザーの波長は 635 nm とし、660-760 nm の蛍光を取り込んだ。レーザー強度、ゲインはデフォルトの設定を用いた。

トリパンブルー染色

トリパンブルーによる細胞死の検出は、Weigel と Glazebrook の方法に変更を加えて以下の様に行った (Weigel and Glazebrook, 2002) 。子葉を染色液 (0.1 g トリパンブルー、10 ml 乳酸、10 ml グリセロール、10 ml フェノール、10 ml 水、80 ml エタノール) に浸し、90°C で 3 分間加熱、試料を室温で 6 時間静置させることで染色液を浸透させた。抱水クロラール溶液 (2.5 g/ml 抱水クロラール) に浸し、室温で 18 時間振盪し、脱色した。子葉を 70%グリセロール溶液に一晚浸し、実体顕微鏡で観察と撮影を行なった。子葉の局所死細胞領域の定量化は画像解析ソフト Fiji を用いて次の様に行った。撮影した画像を 8bit のグレースケールに変換し、各画像に対して、明度の閾値を局所的に生じている死細胞と維管束の間で設定し、子葉面積に対する局所的に発生している細胞死領域の割合を算出した。

クロロフィル量定量

クロロフィル定量は Porra らの方法に従い以下の様に行った (Porra et al., 1989) 。2 週齢芽生え地上部を 1 ml の N,N-dimethylformamide に浸し、4°C で一晚、暗所下で静置し、クロロフィルを抽出した。吸光度計を用いて、換算式(Chl_{a+b} (nmol/ml) =

19.43 x A_{646.8} + 8.05 x A_{663.8})に当てはめ、生重量あたりのクロロフィル量を算出した。

統計処理

統計処理には R パッケージの multcomp を用いた。統計処理したデータの作図には R パッケージの ggplot2 を用いた。

トランスクリプトーム解析

12 日齢の植物体から RNA Plus Kit (Macherey-Nagel) を用いて、キットのマニュアルに従い、Total RNA を抽出した。2 µg の RNA から NEBNext[®] Ultra[™] II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina を用いて、キットのマニュアルに従い、ライブラリーを調製した。ライブラリーは Illumina NextSeq[®] 500 を用いて配列の決定をした。RNA-seq サンプルのシングルエンドシーケンスは、Trimomatic-0.38 (Bolger et al., 2014)を使用し、下記のパラメータ (Minimum length of 30 bp; Mean Phred quality score greater than 30; Leading and trailing bases removal with base quality <5) でトリミングした。Bowtie2 aligner (Langmead and Salzberg, 2012) を用いて TAIR10 ゲノムアセンブリにマッピングした。その後、Araport11 の遺伝子アノテーションに基づき、featureCounts (Liao et al., 2014) を用いて、生のリードカウントを抽出した。最後に、DESeq2 (Love et al., 2014) を用いて、差次的に発現した遺伝子を同定した。リードカウント ≥ 20 の遺伝子を差次的な解析の対象とした。クラスタリングとヒートマップの生成は、Pheatmap v1.0.12 (KOLDE, R. pheatmap v1. 0.12. 2019) を用いて、下記のパラメーター (cutree_rows = 8 and scale = "row") で行なった。

ゲノムシーケンス

S2-6 のゲノムシーケンスは *crl-2* と一度戻し交配した F2 ホモ個体の DNA を用いた。DNeasy Plant mini Kits (QIAGEN) を用いて抽出した DNA は超音波処理 (Covaris 社の S220 <http://covarisinc.com/>) により断片化し、TruSeq DNA Sample Prep Kits (Illumina, <http://www.illumina.com/>) を用いて、メーカーのプロトコルに従い、ライブラリー化した。ライブラリーは NextSeq500 (Illumina) により塩基配列を決定し

た。生成された bcl ファイルは bcl2fastq (Illumina) により fastq ファイルに変換した。fastq ファイルは Mitsucal(Suzuki et al., 2018)を用いて解析した。

OEP80 の構造予測と *in silico* アミノ酸置換

OEP80 の 3 次元予測構造(AlphaFold identifier AF-Q9C5J8-F1)は、AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk>)から取得した。OEP80 予測構造の可視化は UCSF ChimeraX(Goddard et al., 2018; Pettersen et al., 2021)を用いた。*in silico* の変異誘導は UCSF ChimeraX のツールから Dunbrack rotamer library (Shapovalov and Dunbrack, 2011)を利用し、アミノ酸置換後の立体配座を決定した。原子間の衝突はファンデルワールスオーバーラップ $\geq 0.6 \text{ \AA}$ で定義した。

総タンパク質の抽出とウエスタンブロット解析

液体窒素中で破碎した 2 週齢芽生え地上部をタンパク質抽出バッファー(2% SDS, 10% Sucrose, 56 mM Na₂CO₃, 2 mM EDTA pH 8.0) に懸濁し、95°Cで 5 分間加熱した。2 度の遠心分離 (14,000 x g, 10 min) を行い、上清を回収した。BCA アッセイキット (TaKaRa Bio inc.) を用いて、タンパク質濃度を測定した。20-30 μg のタンパク質を 2-メルカプトエタノールおよび Bromophenol blue と混ぜ、95°Cで 5 分間煮沸し、ウエスタンブロットの試料とした。試料中のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、セミドライ法により PVDF メンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング溶液 (1% Skimmed milk powder, 0.1% Tween 20 / PBS) に浸し、1 時間室温で静置させた。一次抗体反応は 4°Cで一晩反応させた。二次抗体反応は室温で 90 分間反応させた。メンブレンを PBS で洗浄し、ECL prime もしくは ECL select (Cytiva, Marlborough, MA, USA)をメンブレンに添加した。化学発光は CCD イメージャー(LAS4000 mini, Cytiva) で撮影した。抗 OEP80 抗体は PHY0814A もしくは PHY2423A (PhytoAB Inc., San Jose, CA, USA))を使用した。抗 CRL 抗体はポリクローナル抗体(Asano et al., 2004)を用いた。抗 TOC75-III 抗体は稲葉丈人博士から分与されたものを用いた。抗 TOC33 抗体は中井正人博士から分与されたものを用いた。二次抗体は Donkey anti-rabbit IgG-HRP (NA934, GE Healthcare, Chicago, IL, USA)を使用した。TIC40 抗体は

(AS10709, Agrisera, Vännäs, Västerbotten, Sweden)を使用した。抗 GFP 抗体は Anti-GFP pAb (598) (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) を使用した。抗 CRL 抗体を除き、全ての抗体はブロッキングバッファーで希釈した。抗 CRL 抗体は Can Get Signal® Solution 1 (TOYOBO Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて希釈した。

無傷葉緑体の単離

MS 培地で生育させた 3 週齢の植物体地上部を切り取り、酵素液 (1% Cellulase "Onozuka" R-10, 0.25% Macerozyme "Onozuka" R-10, 400 mM Mannitol, 20 mM MES-KOH pH5.7, 20 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 0.1% BSA) に浸した。これを脱気し、植物組織に酵素液を浸透させた。2 時間静置することでプロトプラスト化させ、ミラクロスで濾過し、組織片を除去した。濾液を遠心分離 (100 x g, 4°C, 5 min) し、プロトプラストのペレットを緩衝液 (300 mM Sorbitol, 20 mM Tricine-KOH, pH8.4, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM NaHCO₃, 0.1% BSA) に懸濁した。懸濁液を 20 μm のナイロンメッシュで濾過し、細胞を破碎した。この溶液をパーコールグラジエント (下段: 85% パーコール、上段: 40%パーコール) に重層した。遠心分離(2,500 x g, 4°C, 10 min)し、2 つの 40%パーコールと 80%パーコールの境界に形成される無傷葉緑体を含む層を回収した。2 倍容量の洗浄バッファー (330 mM Sorbitol, 50 mM HEPES-KOH pH 8.0) で洗浄後、遠心分離 (700 x g, 4°C, 5 min) し、沈殿を洗浄バッファーに再懸濁して無傷葉緑体画分とした。クロロフィル量は換算式($\text{Chl (mg/ml)} = 2.899A_{652}$)を用いて算出した。

単離葉緑体を用いた免疫沈降実験

説明書に従い Dynabeads M280-tosylactivated (Thermo Fisher Scientific K.K.) に GFP ポリクローナル抗体 (Anti-GFP pAb (598), MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) を固定化した。無傷葉緑体 (クロロフィル量: 500-700 μg) を 1 ml の可溶化バッファー (50 mM HEPES-KOH pH 7.3, 1% n-dodecyl-β-D-maltoside) で懸濁し、氷上に 5 分間静置し可溶化させた。遠心分離(14,000 x g, 4°C, 5

min)し、少量の上清をインプットとして回収した。残りの上清を抗 GFP 抗体で固定したビーズに懸濁し、1 時間室温で回転させ、免疫沈降を行った。1ml の可溶化バッファでビーズを 4 回洗浄した。16 μ l の 0.1 M glycine-HCl pH 2.8 で溶出した。4 μ l の 1.0 M Tris-HCl pH 8.0 で溶出液を中和し、これを溶出分画とした。溶出画分及び、インプットに 4 x sample buffer (250 mM Tris-HCl pH6.8, 8% SDS, 20% sucrose)を加え、95°C で 5 分間、加熱変性させたものをウエスタンブロットの試料とした。抗 OEP80 抗体を用いた免疫沈降実験は以下のように行った。葉緑体を可溶化バッファ (50 mM Bis-Tris, 10%グリセロール, 50 mM NaCl, 1% digitonin) 中で 30 分間氷上で可溶化した。遠心分離 (100,000 x g, 4°C, 30 min) 後、150 μ g のクロロフィルに相当する上清を 50 μ g の purified normal rabbit IgG (FujiFilm Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan)と混合した。その後、上清に 6 mg の Dynabeads Protein A (Thermo Fisher Scientific K.K.) を加え、氷上で 30 分間インキュベートした。Dynabeads の未結合画分の半分を 8 μ g の抗 OEP80 抗体と混合した。残りの未結合画分を 8 μ g の purified normal rabbit IgG と混合した。氷上で 2 時間インキュベートした後、6 mg の Dynabeads Protein A (Thermo Fisher Scientific K.K.) を上清に加え、氷上で 30 分間インキュベートした。ビーズを 1% Triton X-100 を含む 1 mL の PBS バッファで 3 回洗浄した後、 β -メルカプトエタノールを含まない 40 μ L の SDS サンプルバッファで免疫沈降物を溶出した。 β -メルカプトエタノール (最終濃度 5%) の添加後、溶出液を 95°C で 5 分間煮沸し、SDS-PAGE に供試し、イムノブロッティングで分析した。OEP80 の検出には、一次抗体で一晩、二次抗体で 60 分間、4°C でインキュベートした。OEP80 の検出には OEP80 に対する抗体 (PHY2423A, PhytoAB Inc.) を、CRL の検出には抗 CRL 抗体 (Asano et al., 2004) を用いた。

2 次元電気泳動

30 μ l の無傷葉緑体 (クロロフィル量: 1 mg/ml) を 30 μ l の 2 x 可溶化バッファ (100 mM Bis-Tris, 20% Glycerol, 100 mM NaCl, 2% Digitonin) に懸濁し、4°C で 30 分間静置した。超遠心分離 (100,000 x g, 4°C, 30 min)し、30 μ l の上清を 4 x native sample buffer (200 mM Bis-Tris, 40% Glycerol, 200 mM NaCl, 0.5% CBB-G250, 50 mM Aminocaproic

acid) と混ぜ、これを Blue-Native PAGE の試料とした。試料中のタンパク質複合体は自作の 3-12%リニアグラジエントアクリルアミドゲルと BN-PAGE 陰極バッファ (50 mM Tricine-KOH pH7.0, 15 mM BisTris-HCl pH7.0, 0.02% CBB G-250 solution) と陽極バッファ (50mM BisTris-HCl pH7.0) を用いて分離した。陰極バッファは泳動の途中で 0.002% CBB 含有の陰極バッファに置換した。泳動後、レーンを切り、変性バッファ (3.3% SDS, 4% 2-mercaptoethanol, 65 mM Tris-HCl pH 6.8) 中で、37°C で 30 分間インキュベートした。各ゲル断片を SDS-PAGE で分離し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した。一次抗体で一晩、二次抗体で 60 分間、4°C でインキュベートした。その後、メンブレンを PBS で洗浄し、ECL-select solution (Cytiva, Marlborough, MA, USA) を加えた。化学発光の記録には CCD イメージャー (LAS4000 Mini, Cytiva) を用いた。

改良による OEP80 複合体の検出と CRL 複合体の検出は以下のように行った。単離した葉緑体を可溶化バッファ (50 mM Bis-Tris, 10% グリセロール, 50 mM NaCl, 1% digitonin) に懸濁し、4°C で 30 分間静置した。超遠心 (10,000 g, 4°C, 30 分) 後、上清に 1/10 容量の EzApply Native (ATTO Corp., Tokyo, Japan) または 1/20 容量の 5% CBB-G250 溶液 (50mM Bis-Tris, 500mM aminocaproic acid, 5% CBB-G250) を加えた。サンプルは、EzRun BlueNative バッファ (ATTO Corp.) を用い、3%-14% リニアグラジエントアクリルアミドゲル (u-PAGEL H, ATTO Corp.) で分離した。レーンを切り、変性バッファ (3.3% SDS, 4%, 2-mercaptoethanol, 65 mM Tris-HCl pH 6.8) 中で室温で 30 分間インキュベートした。各ゲル断片を SDS-PAGE で分離し、ゲル上のタンパク質を EzFastBlot HMW (ATTO Corp.) を用いてポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した。OEP80 複合体を検出するため、一次抗体で一晩、二次抗体で 60 分間、4°C でインキュベートした。その後、メンブレンを PBS で洗浄し、ECL-select solution (Cytiva, Marlborough, MA, USA) を加えた。化学発光の記録には CCD イメージャー (LAS4000 Mini, Cytiva) を用いた。

参考文献

Asano, T., Yoshioka, Y., Kurei, S., Sakamoto, W., Sodmergen and Machida, Y. (2004) A mutation of the CRUMPLED LEAF gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 38: 448–459.

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30: 2114–20

Bölter, B., Soll, J., Hill, K., Hemmler, R. and Wagner, R. (1999) A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *EMBO J*. 18: 5505–5516.

Bölter, B. and Soll, J. (2016) Once upon a Time – Chloroplast Protein Import Research from Infancy to Future Challenges. *Molecular Plant*. 9: 798–812.

Chen, Y., Asano, T., Fujiwara, M.T., Yoshida, S., Machida, Y. and Yoshioka, Y. (2009) Plant Cells Without Detectable Plastids are Generated in the crumpled leaf Mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*. 50: 956–969.

Chen, Y.-L., Chen, L.-J., Chu, C.-C., Huang, P.-K., Wen, J.-R. and Li, H. (2018) TIC236 links the outer and inner membrane translocons of the chloroplast. *Nature*. 564: 125–129.

Chen, L. and Li, H. (2017) Stable megadalton TOC-TIC supercomplexes as major mediators of protein import into chloroplasts. *The Plant Journal*. 92: 178-188.

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16: 735–743.

Day, P.M., Potter, D. and Inoue, K. (2014) Evolution and targeting of Omp85 homologs in the chloroplast outer envelope membrane. *Front Plant Sci*. 5: 535.

Day, P.M., Inoue, K. and Theg, S.M. (2019) Chloroplast Outer Membrane β -Barrel Proteins Use Components of the General Import Apparatus. *The Plant Cell*. 31: 1845–1855.

Doyle, M.T., Jimah, J.R., Dowdy, T., Ohlemacher, S.I., Larion, M., Hinshaw, J.E., et al. (2022) Cryo-EM structures reveal multiple stages of bacterial outer membrane protein folding. *Cell*. 185: 1143-1156.e13.

Fang, J., Li, B., Chen, L.-J., Dogra, V., Luo, S., Wu, W., et al. (2022) TIC236 gain-of-function mutations unveil the link between plastid division and plastid protein import. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 119: e2123353119.

Goddard, T.D., Huang, C.C., Meng, E.C., Pettersen, E.F., Couch, G.S., Morris, J.H., et al. (2018) UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci*. 27: 14–25.

Goetze, T.A., Philippar, K., Ilkavets, I., Soll, J. and Wagner, R. (2006) OEP37 Is a New Member of the Chloroplast Outer Membrane Ion Channels*. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 17989–17998.

Gross, L.E., Spies, N., Simm, S. and Schleiff, E. (2020) Toc75-V/OEP80 is processed during translocation into chloroplasts, and the membrane-embedded form exposes its

POTRA domain to the intermembrane space. *FEBS Open Bio.* 10: 444–454.

Gross, L.E., Klinger, A., Spies, N., Ernst, T., Flinner, N., Simm, S., et al. (2021) Insertion of plastidic β -barrel proteins into the outer envelopes of plastids involves an intermembrane space intermediate formed with Toc75-V/OEP80. *The Plant Cell.* 33: 1657–1681.

Hagan, C.L., Silhavy, T.J. and Kahne, D. (2011) β -Barrel Membrane Protein Assembly by the Bam Complex. *Annu Rev Biochem.* 80: 189–210.

Hagan, C.L., Westwood, D.B., and Kahne, D. (2013) Bam Lipoproteins Assemble BamA in Vitro. *Biochemistry.* 52: 6108–6113.

Harsman, A., Schock, A., Hemmis, B., Wahl, V., Jeshen, I., Bartsch, P., et al. (2016) OEP40, a Regulated Glucose-permeable β -Barrel Solute Channel in the Chloroplast Outer Envelope Membrane *. *Journal of Biological Chemistry.* 291: 17848–17860.

Hart, E.M., and Silhavy, T.J. (2020) Functions of the BamBCDE Lipoproteins Revealed by Bypass Mutations in BamA. *Journal of Bacteriology.* 202: e00401-20.

Hinnah, S.C., Hill, K., Wagner, R., Schlicher, T., and Soll, J. (1997) Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J.* 16: 7351–7360.

Hsu, S.-C., and Inoue, K. (2009) Two evolutionarily conserved essential beta-barrel proteins in the chloroplast outer envelope membrane. *Biosci Trends.* 3: 168–178.

Huang, W., Ling, Q., Bédard, J., Lilley, K. and Jarvis, P. (2011) In Vivo Analyses of the Roles of Essential Omp85-Related Proteins in the Chloroplast Outer Envelope

Membrane. *Plant Physiology*. 157: 147–159.

Hudik, E., Yoshioka, Y., Domenichini, S., Bourge, M., Soubigout-Taconnat, L., Mazubert, C., et al. (2014) Chloroplast dysfunction causes multiple defects in cell cycle progression in the Arabidopsis crumpled leaf mutant. *Plant Physiol*. 166: 152–167.

Jarvis, P., Chen, L.-J., Li, H., Peto, C.A., Fankhauser, C., and Chory, J. (1998) An Arabidopsis Mutant Defective in the Plastid General Protein Import Apparatus. *Science*. 282: 100–103.

Jin Z, Wan L, Zhang Y, Li X, Cao Y, Liu H, Fan S, Cao D, Wang Z, Li X, et al (2022) Structure of a TOC-TIC supercomplex spanning two chloroplast envelope membranes. *Cell* 185: 4788-4800.e13

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 596: 583–589.

Langmead, B., Salzberg, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 9: 357–9

Leister D (2003) Chloroplast research in the genome age. *Trend Genet* 19: 47-56

Li, B., Fang, J., Singh, R.M., Zi, H., Shanshan Lv, Liu, R., et al. (2020) FATTY ACID DESATURASE5 Is Required to Induce Autoimmune Responses in Gigantic Chloroplast Mutants of Arabidopsis. *The Plant Cell*. 32: 3240–3255.

Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose

program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 30: 923–30

Liu H, Li A, Rochaix J-D, Liu Z (2023) Architecture of chloroplast TOC–TIC translocon supercomplex. *Nature* 615: 349–357

Love, M.I., Huber, W., Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15: 550

Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., et al. (2007) Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71: 2095–2100.

Niwa, Y., Hirano, T., Yoshimoto, K., Shimizu, M. and Kobayashi, H. (1999) Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *The Plant Journal*. 18: 455–463.

Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 76: 723–749.

Patel, R., Hsu, S.-C., Bédard, J., Inoue, K. and Jarvis, P. (2008) The Omp85-Related Chloroplast Outer Envelope Protein OEP80 Is Essential for Viability in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 148: 235–245.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Meng, E.C., Couch, G.S., Croll, T.I., et al. (2021) UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* 30: 70–82.

Pohlmeyer, K., Soll, J., Grimm, R., Hill, K. and Wagner, R. (1998) A high-conductance

solute channel in the chloroplastic outer envelope from Pea. *Plant Cell*. 10: 1207–1216.

Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 975: 384–394.

Selkrig, J., Mosbahi, K., Webb, C.T., Belousoff, M.J., Perry, A.J., Wells, T.J., et al. (2012) Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nat Struct Mol Biol*. 19: 506–510.

Shapovalov, M.V. and Dunbrack, R.L. (2011) A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure*. 19: 844–858.

Šimková, K., Kim, C., Gacek, K., Baruah, A., Laloi, C. and Apel, K. (2012) The chloroplast division mutant *caa33* of *Arabidopsis thaliana* reveals the crucial impact of chloroplast homeostasis on stress acclimation and retrograde plastid-to-nucleus signaling. *The Plant Journal*. 69: 701–712.

Sugita, C., Kato, Y., Yoshioka, Y., Tsurumi, N., Iida, Y., Machida, Y., et al. (2012) CRUMPLED LEAF (CRL) Homologs of *Physcomitrella patens* are Involved in the Complete Separation of Dividing Plastids. *Plant and Cell Physiology*. 53: 1124–1133.

Suzuki, T., Kawai, T., Takemura, S., Nishiwaki, M., Suzuki, T., Nakamura, K., et al. (2018) Development of the Mitsucal computer system to identify causal mutation with a high-throughput sequencer. *Plant Reprod*. 31: 117–128.

Sveshnikova, N., Grimm, R., Soll, J., and Schleiff, E. (2000) Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75. *Biol Chem.* 381: 687–693.

Wang, F., Fang, J., Guan, K., Luo, S., Dogra, V., Li, B., et al. (2020) The Arabidopsis CRUMPLED LEAF protein, a homolog of the cyanobacterial bilin lyase, retains the bilin-binding pocket for a yet unknown function. *Plant J.* 104: 964–978.

Wang, Z., Xu, C. and Benning, C. (2012) TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *The Plant Journal.* 70: 614–623.

Weigel, D. and Glazebrook, J. (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 86-87.

Zhang, J., Wu, S., Boehlein, S.K., McCarty, D.R., Song, G., Walley, J.W., et al. (2019) Maize defective kernel5 is a bacterial TamB homologue required for chloroplast envelope biogenesis. *J Cell Biol.* 218: 2638–2658.

瀬田遼平 (2016) シロイヌナズナ *crl* 変異体のサプレッサー・エンハンサー変異スクリーニング 名古屋大学理学部生命理学科 卒業論文

南河駿 (2019) シロイヌナズナ *crl* 変異体におけるサプレッサー原因遺伝子の同定と解析 名古屋大学大学院生命理学専攻 修士論文

宮崎紗英 (2020) シロイヌナズナ *crl* 変異体における葉緑体タンパク質輸送能の解析 名古屋大学大学院生命理学専攻 修士論文

図表

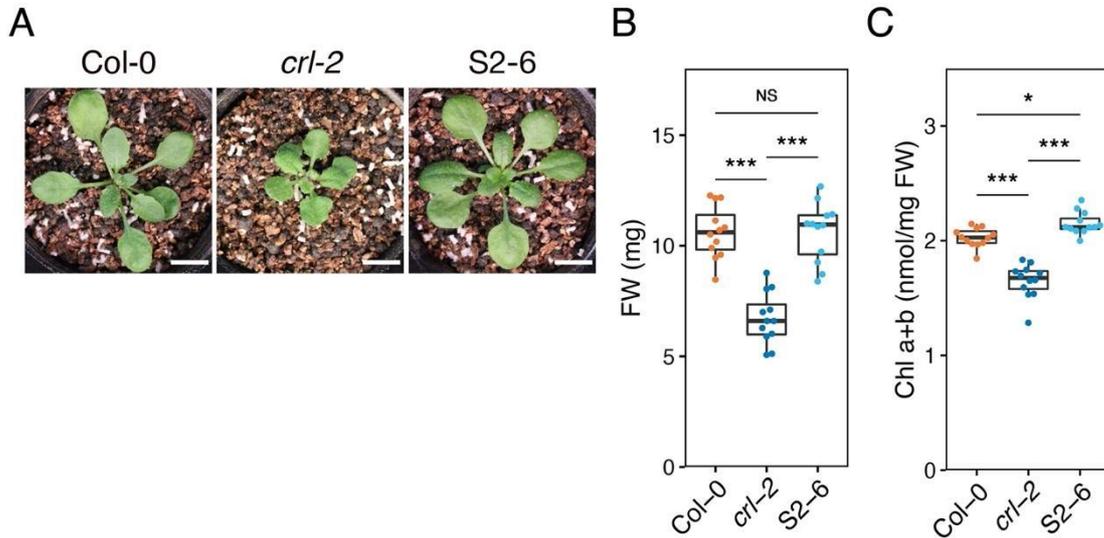


図1 S2-6 は *crl-2* の地上部形質を野生型に回復させる

(A) 土壌で生育させた3週齢植物体。Bar = 1 cm。(B) MS培地で生育させた2週齢植物体の生重量(FW, $n = 12$)。(C) MS培地で生育させた2週齢植物体のクロロフィル含量(Chl a+b, $n = 12$)。統計解析はTukey検定による($***P < 0.001$, $*P < 0.05$, NS; $P > 0.05$)。箱ひげ図は四分位範囲(IQR)を示し、中央値は線で示す。ひげはIQRの1.5倍に相当する。点は個々の値を示す。

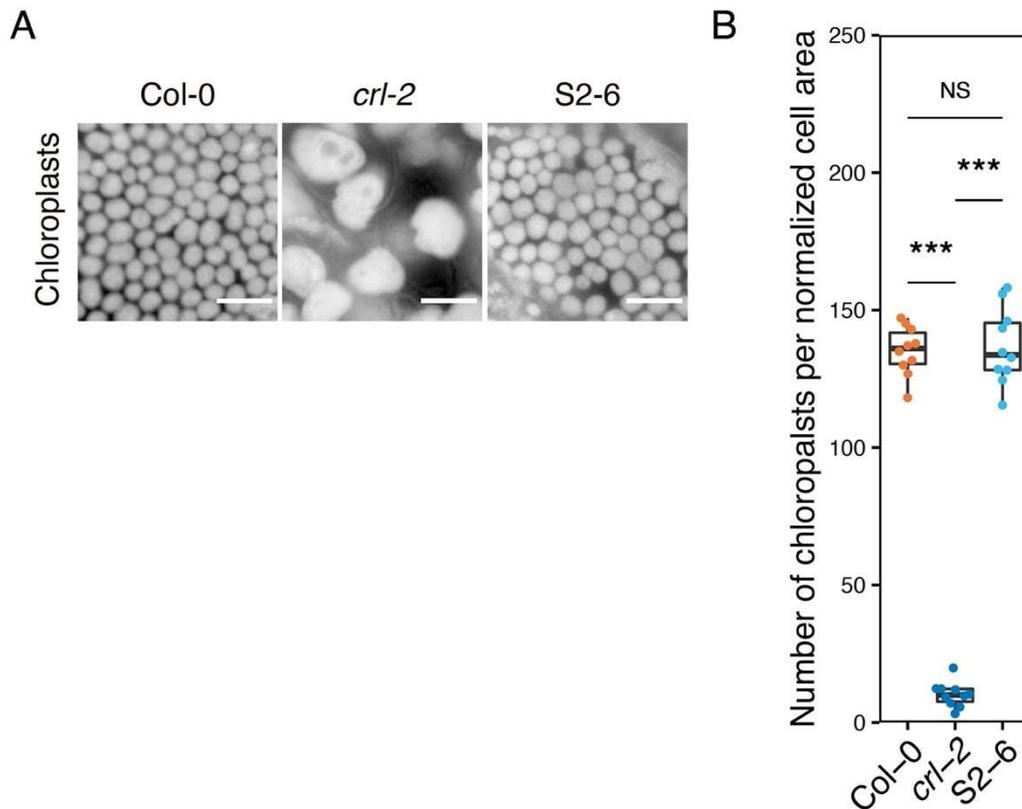


図 2 S2-6 は *crl-2* の葉緑体分裂阻害を抑制する

(A) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体子葉葉緑体の自家蛍光像。Bar = 20 μm 。(B) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体子葉における葉肉細胞 $5000 \mu\text{m}^2$ あたりの葉緑体数 ($n = 10$)。統計解析は Tukey 検定による (***) $P < 0.001$, NS; $P > 0.05$)。箱ひげ図は四分位範囲 (IQR) を示し、中央値は線で示す。ひげは IQR の 1.5 倍に相当する。点は個々の値を示す。

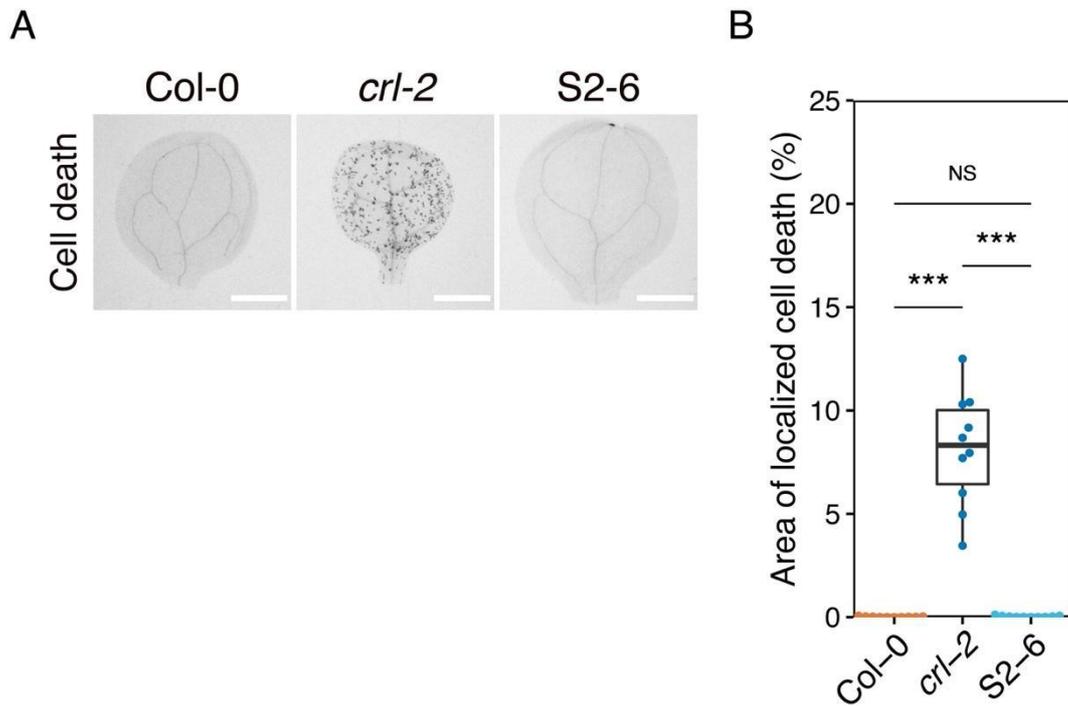


図3 S2-6は *crl-2*の局所的細胞死を抑圧する

(A) MS培地で生育させた1週齢芽生え子葉のトリパンブルー染色像。Bar = 1 mm。
 (B) MS培地で生育させた1週齢芽生え子葉の局所的な細胞死領域の子葉全体面積に対する割合 ($n = 10$)。統計解析はTukey検定による (***) $P < 0.001$, NS; $P > 0.05$)。箱ひげ図は四分位範囲 (IQR) を示し、中央値は線で示す。ひげは IQR の 1.5 倍に相当する。点は個々の値を示す。

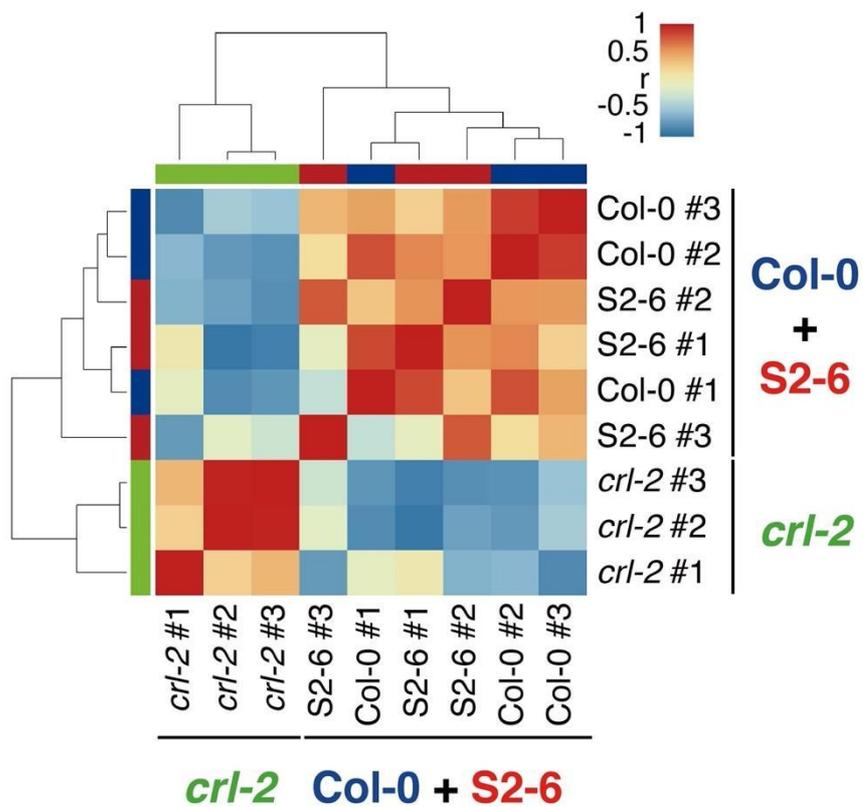


図 4 S2-6 は *crl-2* のトランスクリプトームを野生型様に回復させる

RNA-seq によるトランスクリプトームデータの類似性解析。生物学的 3 反復 (#1 - #3) を用い、ユークリッド距離に基づく相関係数の類似性のクラスタリング結果。メタ遺伝子の発現値間の相関係数 (r) を青色から赤色で示した。

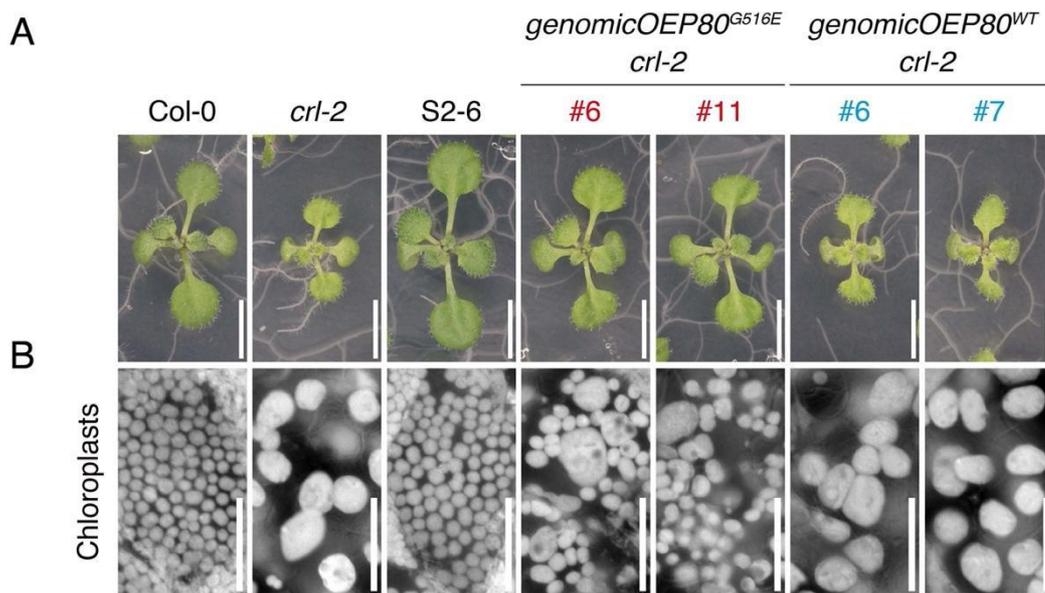


図 5 *OE80^{G516E}* は *crl-2* を抑圧する

(A) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体地上部。Bar = 5 mm。(B) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体子葉葉緑体の自家蛍光像。 *OE80^{G516E}* ゲノム断片を導入した形質転換 *crl-2*(*genomicOE80^{G516E} crl-2* #6, #11)と野生型 *OE80* ゲノム断片を導入した形質転換 *crl-2*(*genomicOE80^{WT} crl-2* #6, #7)。それぞれ独立した形質転換体を示す。Bar = 50 μm。

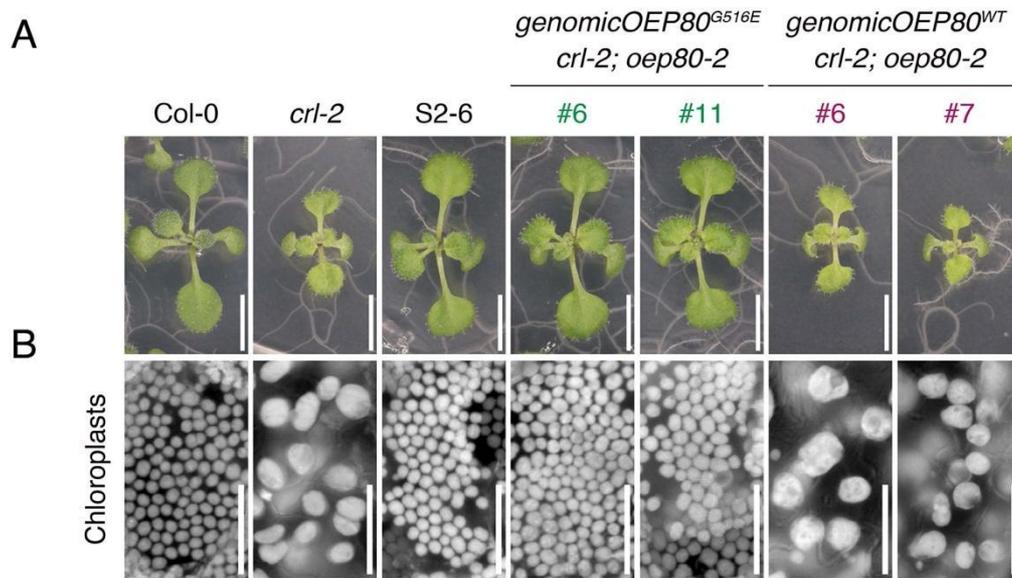


図 6 *OEP80^{G516E}* は *crl-2 oep80-2* を抑圧する

(A) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体地上部。Bar = 5 mm。(B) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体子葉葉緑体の自家蛍光像。*OEP80^{G516E}* ゲノム断片を導入した形質転換 *crl-2 oep80-2*(*genomicOEP80^{G516E} crl-2; oep80-2* #6, #11)と野生型 *OEP80* ゲノム断片を導入した形質転換 *crl-2 oep80-2*(*genomicOEP80^{WT} crl-2; oep80-2* #6, #7)。それぞれ独立した形質転換体を示す。Bar = 50 μ m。



図 7 OEP80 タンパク質の構造模式図

N 末端側に POTRA (polypeptide transport associated) ドメイン、C 末端側に β バレルドメイン (β -barrel domain) を持つ。 β バレルドメイン内の黒四角は β -ストランドを示す。S2-6 における 516 番目のグリシン(G)からグルタミン酸 (E) への置換部位、S1-9 における 424 番目のアラニン (A) からバリン (V) への置換部位を示す。

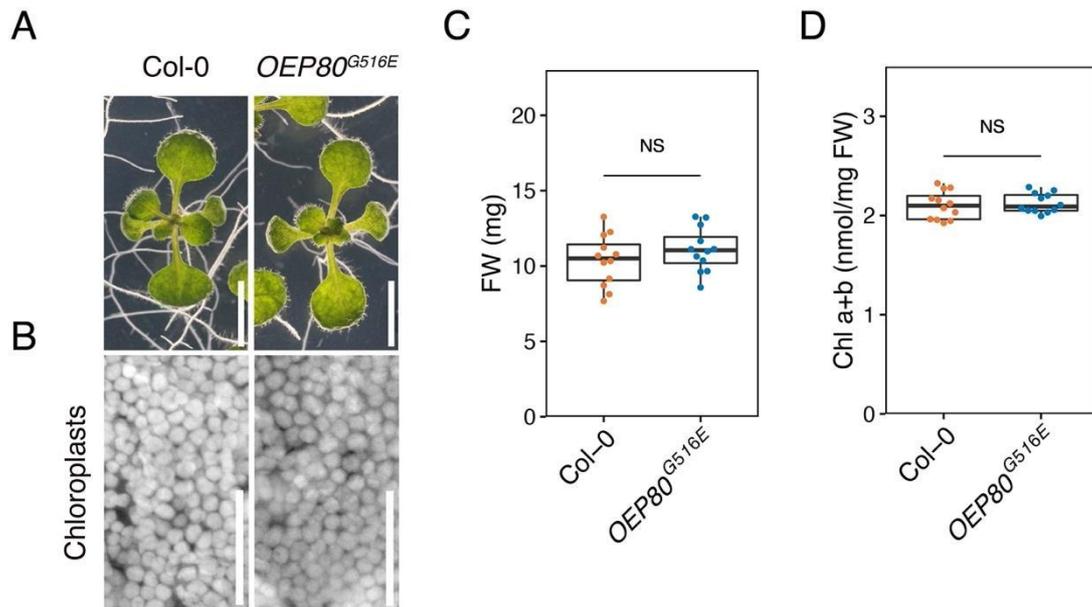


図8 *OEP80^{G516E}* 単独変異体の表現型

(A) MS 培地で生育させた 2 週齢の野生型 (Col-0) と *OEP80^{G516E}* 単独変異体 (*OEP80^{G516E}*)。Bar = 5 mm。(B) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体子葉葉緑体の自家蛍光像。Bar = 50 μ m。(C) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体地上部の生重量 (FW, $n = 12$)。 (D) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体地上部のクロロフィル含量 (Chl a+b, $n = 12$)。統計解析は t 検定による (NS; $P > 0.05$)。箱ひげ図は四分位範囲 (IQR) を示し、中央値は線で示す。ひげは IQR の 1.5 倍に相当する。点は個々の値を示す。

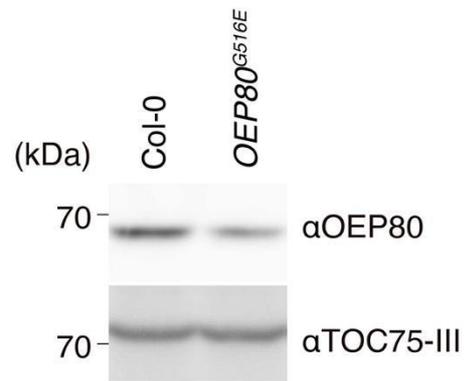


図9 $OEP80^{G516E}$ 単独変異体において内在 OEP80 タンパク質量は減少している

MS 培地で生育させた 2 週齢植物体地上部から総タンパク質を抽出し、抗 OEP80 抗体と抗 TOC75-III 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供試した。代表的なデータを示した($n \geq 3$)。

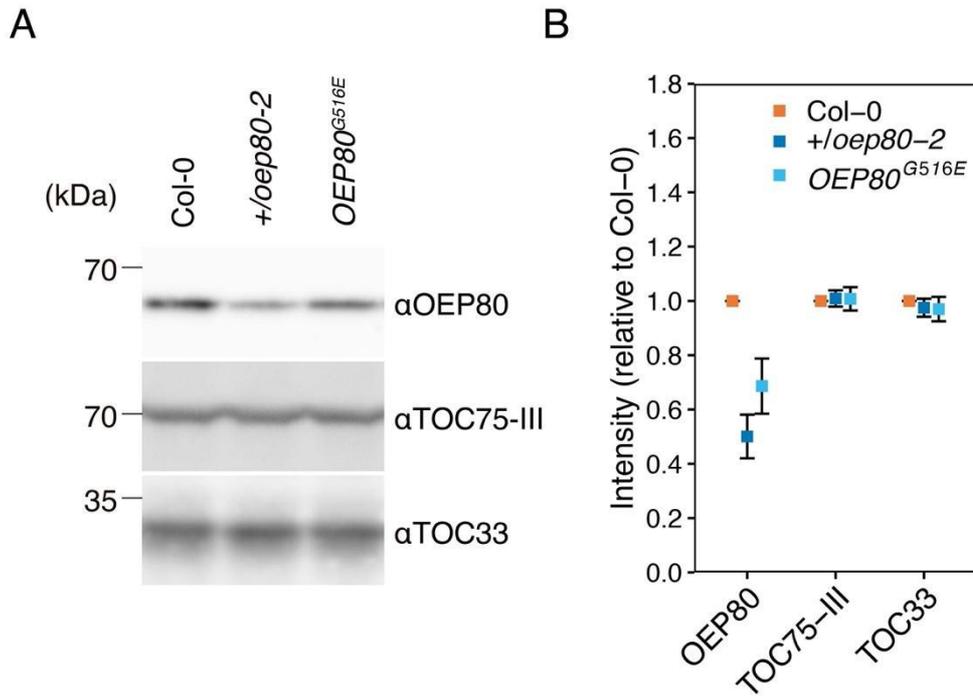


図 10 *oep80-2*ヘテロ接合変異体では OEP80 タンパク質内在量が約 1/2 に減少している

(A) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体から総タンパク質を抽出し、抗 OEP80 抗体、抗 TOC75-III 抗体と抗 TOC33 抗体を用いたウェスタンブロット解析に供試した。(B)ImageJ を用いて各種タンパク質のバンドのシグナル強度を定量化して比較した。各変異体における強度は野生型を 1 として標準化されている。値は平均値±SD を示す ($n=3$)。*oep80-2*は *OEP80*ヌル変異対立遺伝子。*+/oep80-2*は *oep80-2*のヘテロ接合変異体、*OEP80^{G516E}*は *OEP80^{G516E}*単独変異体をそれぞれ示す。

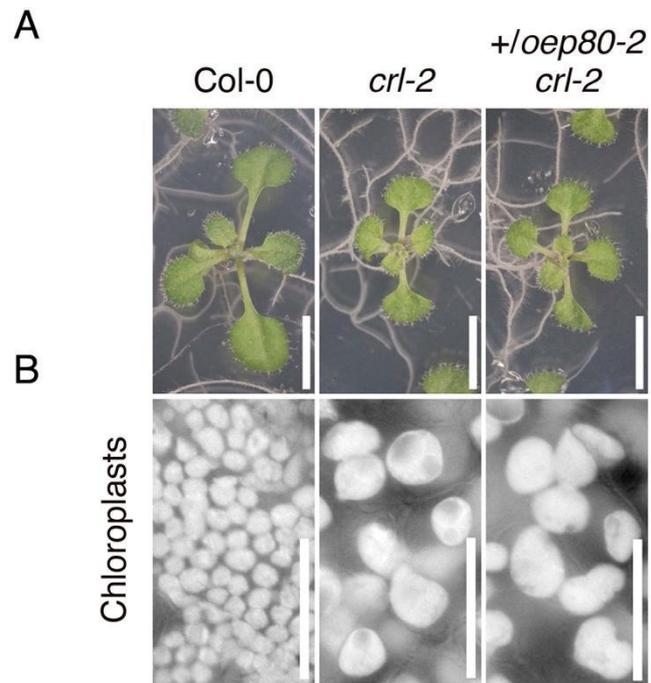


図 11 OEP80 タンパク質内在量の減少は *crl-2* を抑圧しない

(A) MS 培地で生育させた 2 週齢芽生え地上部。Bar = 5 mm。(B) MS 培地で生育させた 2 週齢芽生え子葉葉緑体の自家蛍光画像。Bar = 50 μm。 *oep80-2* は *OEP80* ノル変異対立遺伝子。 *+/oep80-2* は *oep80-2* のヘテロ接合変異体を示す。

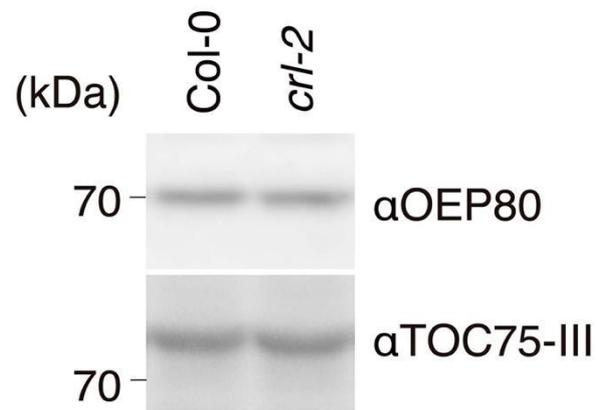


図 12 *crl-2*における OEP80 タンパク質内在量は野生型と変化していない

MS 培地で生育させた 2 週齢植物体から総タンパク質を抽出し、抗 OEP80 抗体と抗 TOC75-III 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供試した。

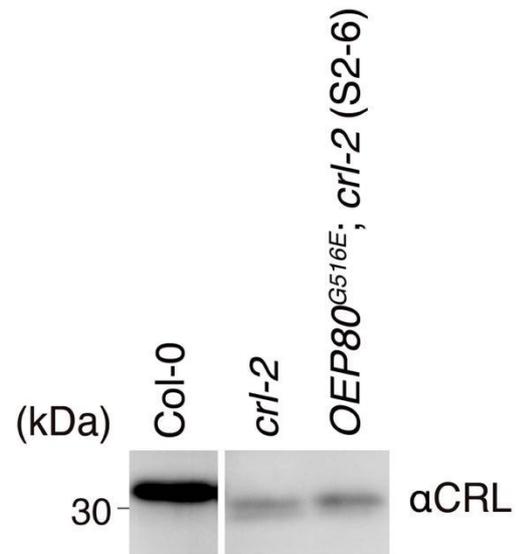


図 13 S2-6 において CRL^{G31D} のタンパク質量は増加している

MS 培地で生育させた 2 週齢植物体から総タンパク質を抽出し、抗 CRL 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供試した。

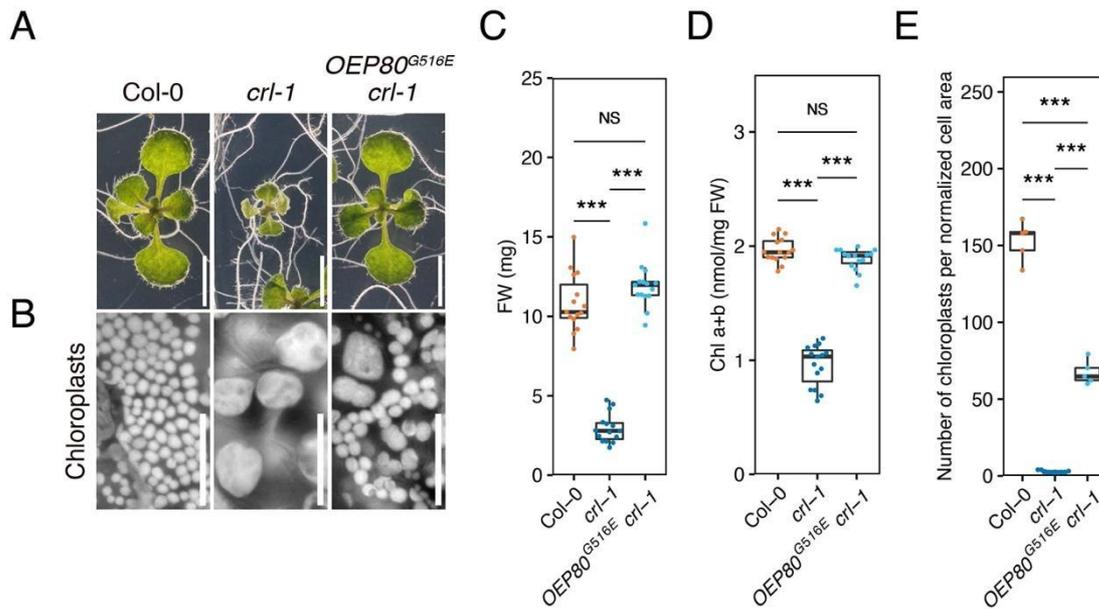


図 14 *OEPE80^{G516E}* は *crl-1* の地上部形質を回復させる

(A) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体地上部。Bar = 5 mm。(B) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体子葉葉緑体の自家蛍光像。Bar = 50 μ m。(C) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体地上部の生重量(FW, $n = 15$)。 (D) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体のクロロフィル含量(Chl a+b, $n = 15$)。 (E) MS 培地で生育させた 2 週齢植物体子葉における葉肉細胞 5000 μ m² あたりの葉緑体数($n \geq 5$)。統計解析は Tukey 検定による (***) $P < 0.001$, NS; $P > 0.05$)。箱ひげ図は四分位範囲 (IQR) を示し、中央値は線で示す。ひげは IQR の 1.5 倍に相当する。点は個々の値を示す。

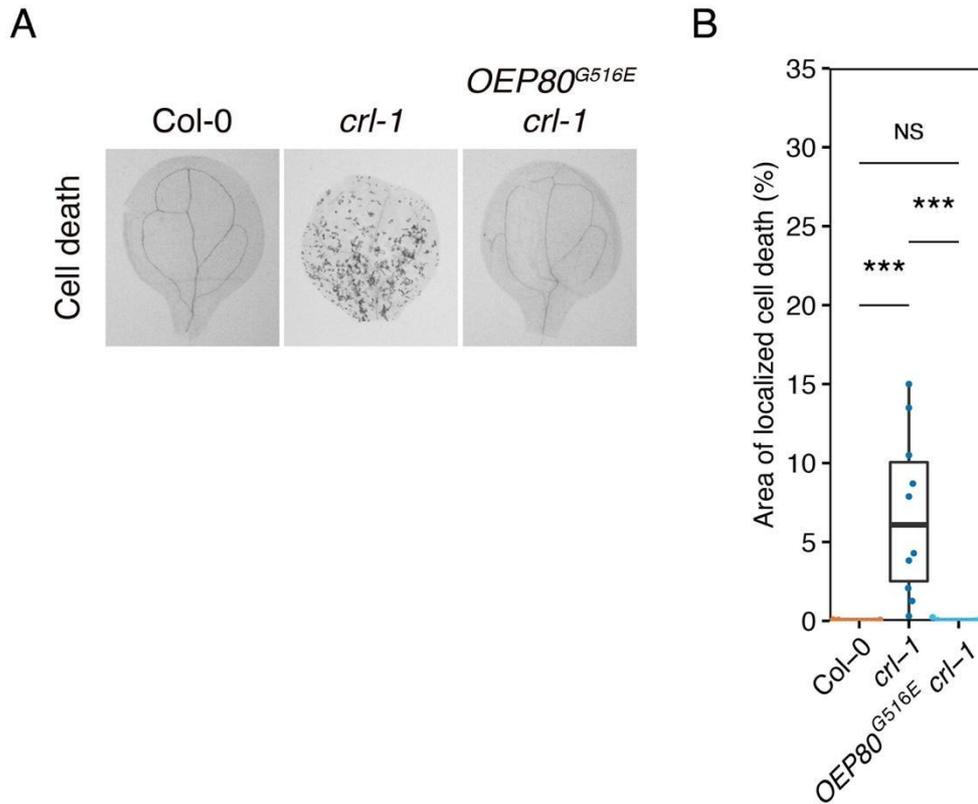


図 15 *OEP80^{G516E}* は *crl-1* の局所的細胞死を抑圧する

(A) MS 培地で生育させた 1 週齢芽生え子葉のトリパンブルー染色像。Bar = 1 mm。
 (B) MS 培地で生育させた 1 週齢芽生え子葉の局所的な細胞死領域の子葉全体面積に対する割合 ($n = 10$)。統計解析は Tukey 検定による (***) $P < 0.001$, NS; $P > 0.05$)。箱ひげ図は四分位範囲 (IQR) を示し、中央値は線で示す。ひげは IQR の 1.5 倍に相当する。点は個々の値を示す。

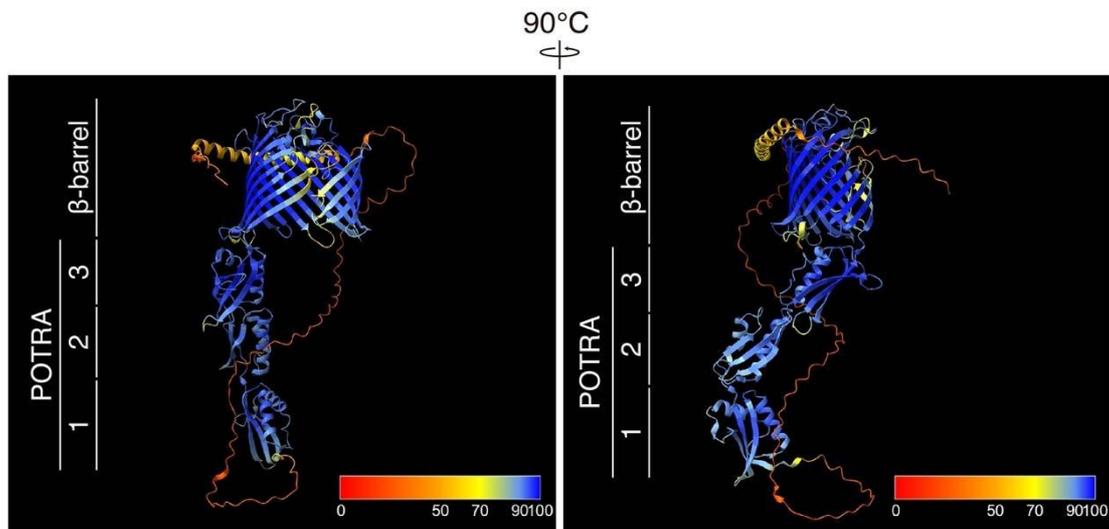


図 16 AlphaFold2 による OEP80 の予測立体構造

シロイヌナズナ OEP80 の AlphaFold2 予測構造(AlphaFold identifier: AF-Q9C5J8-F1)。可視には UCSF chimeraX を用いた。主鎖構造は信頼度スコア (pLDDT) に基づいて色付けされている。pLDDT は 0 から 100 の値をとる。青は pLDDT が 100 を示す。水色は pLDDT が 90 を示す。黄色は pLDDT が 70 を示す。橙色は pLDDT が 50 を示す。赤は pLDDT が 0 を示す。

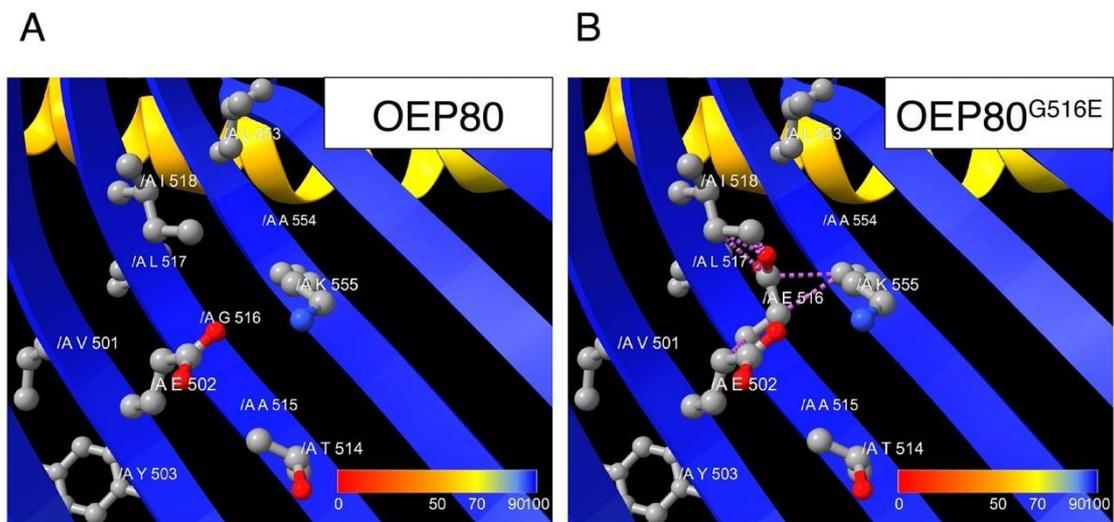


図 17 AlphaFold2 OEP80 予測構造への *in silico* G516E 変異誘導

(A)野生型 OEP80 の 516 番目のグリシン周囲 10\AA 範囲内のアミノ酸残基と内側から見た β バレルドメイン内部構造を拡大表示した。主鎖の色は図 16 の pLDDT に基づく。灰色の球は炭素原子、赤色は酸素原子、青色は窒素原子をそれぞれ示している。(B)OEP80 516 番目のグリシン(G516)をグルタミン酸(E516)に置換した。紫色の破線は予測される原子間衝突を示す。

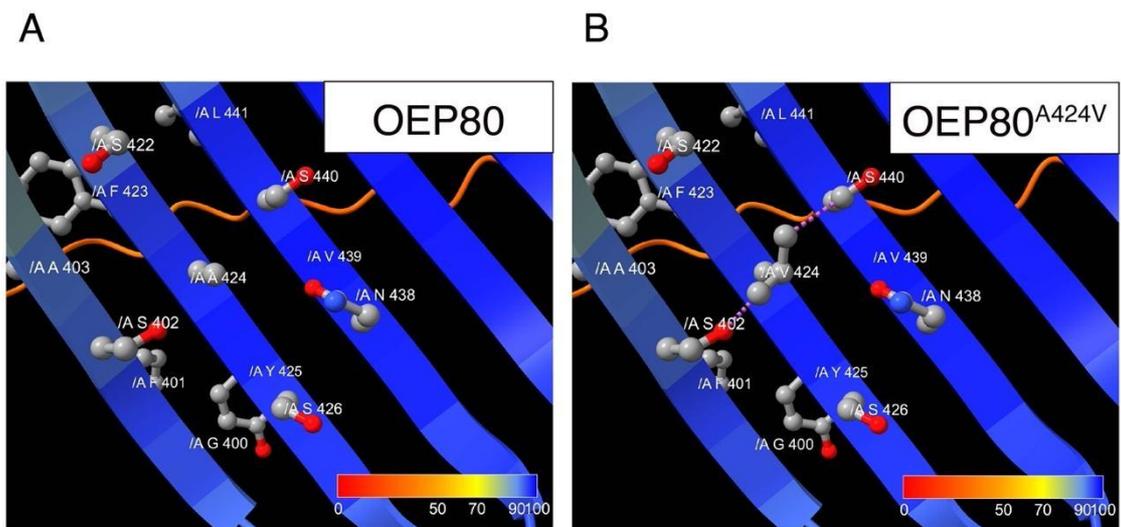


図 18 AlphaFold2 OEP80 予測構造への *in silico* A424V 変異誘導

(A)野生型 OEP80 の 424 番目のアラニン周囲 10 Å 範囲内のアミノ酸残基と内側から見た β バレルドメイン内部構造を拡大表示した。主鎖の色は図 16 の pLDDT に基づく。灰色の球は炭素原子、赤色は酸素原子、青色は窒素原子をそれぞれ示している。
 (B)OEP80 424 番目のアラニン(A424)をバリン(V424)に置換した。紫色の破線は予測される原子間衝突を示す。

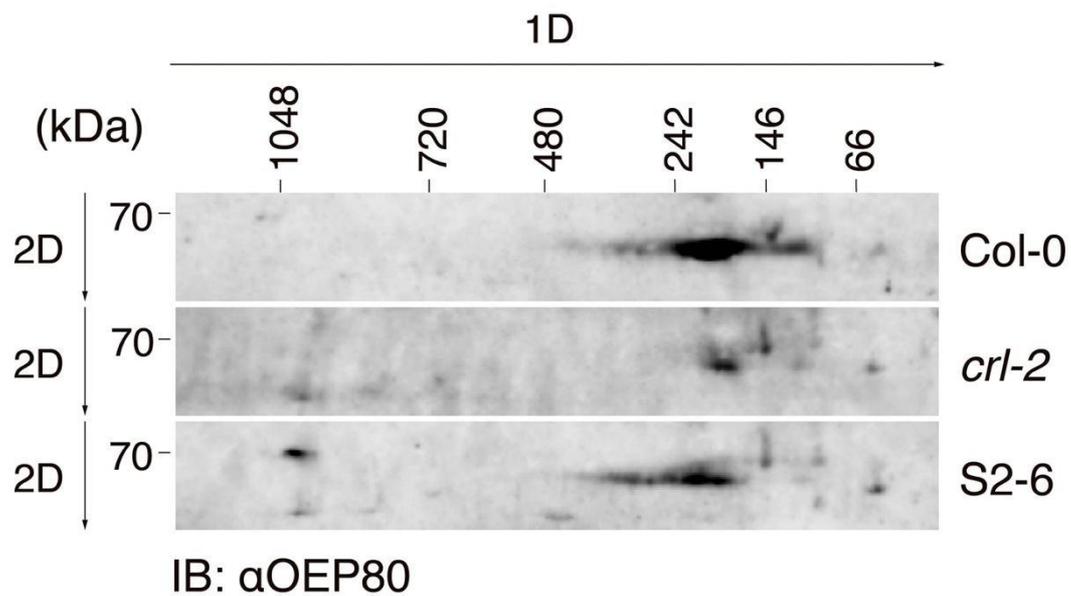


図 19 CRL は OEP80 複合体形成に関与する

MS プレートで育てた 3 週齢植物体の単離葉緑体を 1%ジキトニンで可溶化し、可溶性画分を Blue-Native PAGE(1D)と SDS-PAGE(2D)による 2 次元電気泳動で分離した。OEP80 は抗 OEP80 抗体 PHY2423A で検出した。IB, 免疫ブロッティング。

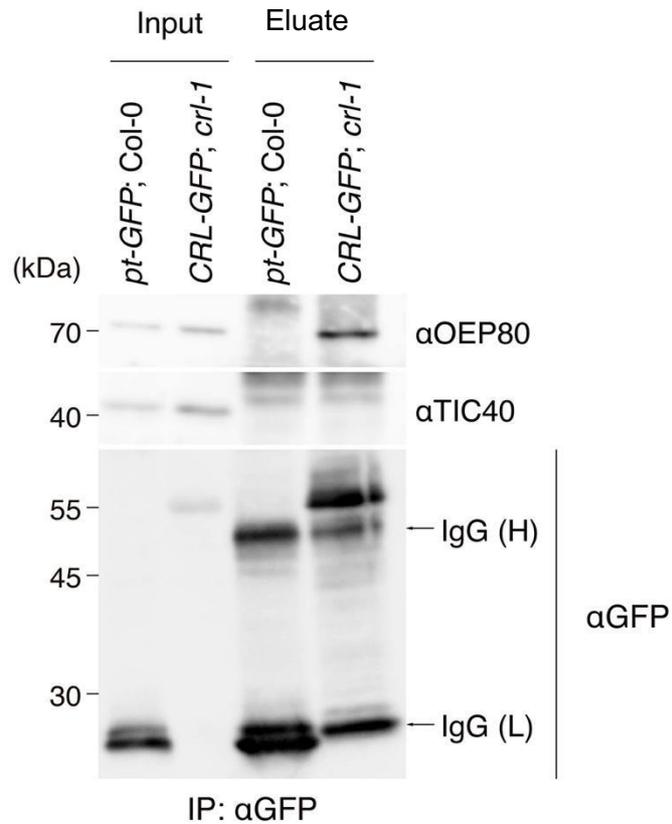


図 20 CRL は *in vivo* で OEP80 と相互作用する

抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降物のウエスタンブロット。MS プレートで生育させた 3 週齢植物体から調製した単離葉緑体を 1% n-ドデシル-β-D-マルトシドで可溶化して免疫沈降に供試した。免疫沈降物は SDS-PAGE で分離し、それぞれ抗 OEP80 抗体、抗 TIC40 抗体、抗 GFP 抗体で検出した。 *pt-GFP*, 35S::*pt-sGFP(S65T)*; *CRL-GFP*, 35S::*CRL-sGFP(S65T)*; IgG(H), IgG 重鎖; IgG(L), IgG 軽鎖; IP, 免疫沈降。

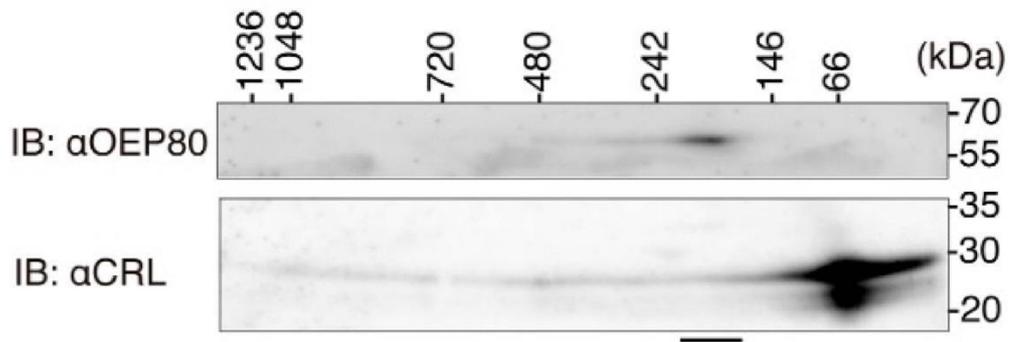
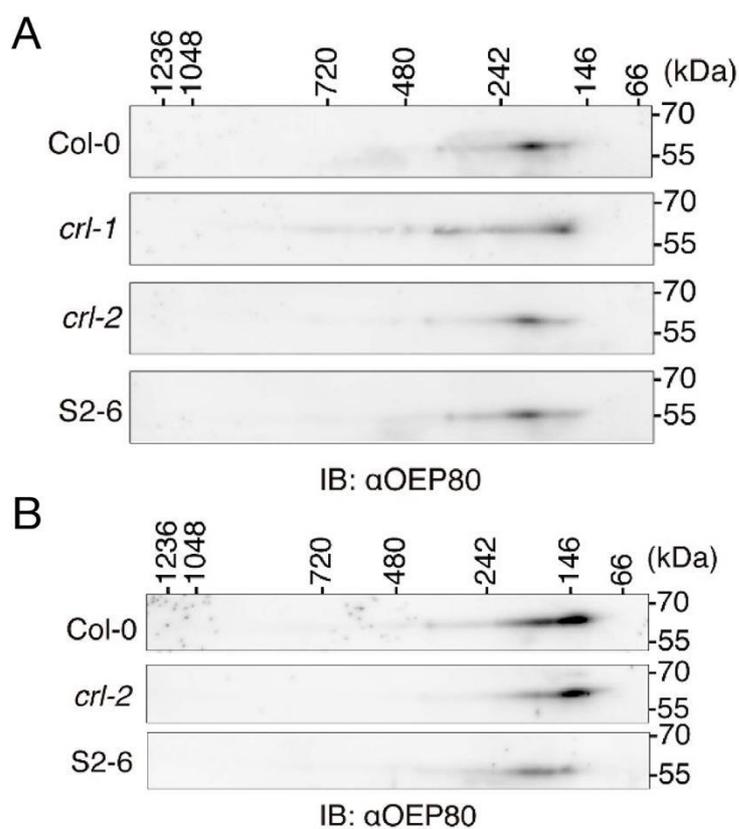


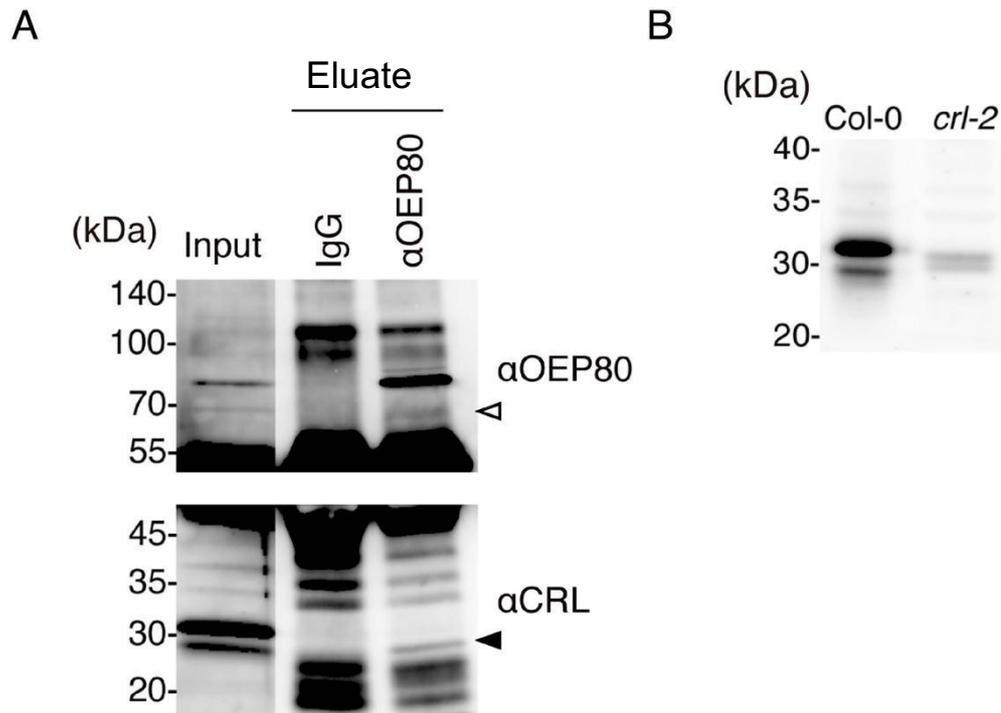
図 21 一部の CRL が OEP80 複合体と同じ大きさに検出される

単離葉緑体 1%ジギトニン可溶化画分を用いた OEP80 複合体と CRL 複合体の免疫ブロッティング検出。1/10 容量の EzApply Native (ATTO Corp.) を加えた後、約 25 μg のタンパク質に相当する上清を 2D-BN/SDS-PAGE で分離した。ブロッティング後、メンブレンを上下に分割し、それぞれ OEP80 と CRL 複合体の検出に用いた。約 200 kDa のサイズを実線で示す。MS プレート上で生育させた 3 週齢植物体を材料に用いた。IB, 免疫ブロッティング。



補助図 1 *crl*では OEP80 複合体が不安定化している

単離葉緑体 1%ジギトニン可溶化画分を用いた OEP80 複合体のイムノブロッティング検出。(A) 1/10 容量の EzApply Nativ (ATTO Corp.)を添加した後、約 50 μg のタンパク質を含む上清を 2D-BN/SDS-PAGE で分離した。(B) 1/20 容量の 5% CBB-G250 溶液を添加した後、約 25 μg のタンパク質を含む上清を 2D-BN/SDS-PAGE で分離した。MS プレート上で生育させた 3 週齢植物体を材料に用いた。OEP80 は抗 OEP80 抗体 PHY2423A で検出した。IB, 免疫ブロッティング。



補助図 2 OEP80 は *in vivo* でと相互作用する

(A) 抗 OEP80 抗体を用いた免疫沈降物のウエスタンブロット。MS プレートで生育させた 3 週齢野生型植物体から調製した単離葉緑体を 1%ジギトニンで可溶化して免疫沈降に供試した。免疫沈降物を SDS-PAGE で分離し、それぞれ抗 OEP80 抗体 PHY2423A および抗 CRL 抗体で検出した。OEP80 と CRL はそれぞれ白矢印と黒矢印で示す。IgG, 精製正常ウサギ IgG による免疫沈降物。IP, 免疫沈降。(B) ジギトニン可溶化葉緑体タンパク質中の CRL タンパク質の検出。MS プレートで生育させた Col-0 および *crl-2* の 3 週齢植物体から調製した単離葉緑体を 1%ジギトニンで可溶化しウエスタンブロットに供試した。クロロフィル含量 5 μ g に相当する可溶化タンパク質を SDS-PAGE で分離し、免疫沈降物のイムノブロット(A)と同じ条件で抗 CRL 抗体を用いて検出した。

表1 プライマーリスト

Primer	Sequence (5' to 3')	Purpose
OEP80_Hph1_F	AAAGTGGAATGGTACTGGTG	<i>OEP80</i> ^{G516E} genotyping. PCR amplified fragments from <i>OEP80</i> ^{G516E} have a <i>Hph</i> I site
OEP80_Hph1_R	GGCATCTATCAAATTCATATG	
OEP80_T- DNA_F	AGTAAGAACGAAAGATGGTGAGGA	<i>oep80-2</i> genotyping
OEP80_T- DNA_R	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	
OEP80_WT_F	CGCTTTGCTCTTACGGCGATACG	<i>OEP80</i> genotyping
OEP80_WT_R	TTTACACACCTCCTGCAGGTTGAGG	
crl-2u	GAGGCGAAAACGTCGATCGTCACAACCT TAC	<i>crl-2</i> genotyping. PCR amplified fragments from <i>CRL</i> have <i>Hae</i> II site
crl-2d	TTTAGTGAGACGCTTGATGAGAAGAGC AGCG	
BAR_d1	AGAAACCCACGTCATGCCAGT	<i>crl-1</i> genotyping
lprimer_U1	TACACGCCGAAATAAACGACC	

CRL1_F	ATGGGTACCGAGTCG	<i>CRL</i> genotyping
CRL1_R	CTAGTCTTGCAAGATGAGGGACC	
gOEP80_F	GGTGTTGCCTTGCCTTGGTTTGATCCT	Amplification of <i>OEP80</i> containing the regions from 1 kb upstream of the translation initiation site to 3'UTR
gOEP80_R	GTTGAGTTATTATCACTCTATCGGAC	

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導してくださった名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻発生成長制御学グループの吉岡泰准教授に感謝申し上げます。吉岡泰准教授には技術的なことをはじめ、実験の進め方、発表の仕方、論文の書き方など、ありとあらゆる研究の進め方についてご指導を賜りました。先生の心優しいお人柄にも感服いたします。吉岡泰准教授に重ねて、感謝申し上げます。共同研究者の皆様にも深く感謝申し上げます。中部大学の鈴木孝征博士にはサプレッサー原因遺伝子同定に必要なゲノム解析をしていただきました。フランス Université Paris-Saclay の Raynaud 博士、Benhamed 博士にはサプレッサー変異体の RNA-seq 解析をしていただきました。名古屋大学の木下俊則教授、現東京大学の東山哲也教授には研究に関する多大なご助言をいただきました。発生成長制御学グループの方々には研究を支援していただきました。特に南河駿様にはサプレッサーの同定、解析にご協力をいただきました。サプレッサー系統の単離を進めてくださった瀬田遼平様にも感謝いたします。この場を借りて、御礼申し上げます。最後に、いつも支えてくれる家族と友人に深く感謝申し上げます。