

叶绿体分裂突变体 $cpd4$ 中突变基因 $ARC5$ 的鉴定与分析

沈鑫墨¹, 刘含¹, 刘晓庆¹, 袁光孝¹, 高岳芳^{1,*}, 高宏波^{1,2,*}

北京林业大学生物科学与技术学院,²林木育种国家工程实验室, 北京100083

摘要: $cpd4$ 是一个以Col为背景的拟南芥叶绿体分裂突变体, 其突变表型与以Ler为背景的突变体 $arc5-1$ 表型相似, 即叶绿体数量明显减少, 体积明显增大且形状常呈哑铃型。该突变未能对叶绿素含量造成明显影响。遗传分析显示其突变表型受隐性单基因控制。通过图位克隆的方法确定其突变性状是由 $ARC5$ 基因突变引起的。该突变影响了 $ARC5$ 基因mRNA的正常剪切, 对mRNA的稳定性也造成严重影响。该工作为进一步研究 $ARC5$ 在叶绿体分裂中的作用提供了有用的材料和信息。

关键词: 拟南芥; 叶绿体分裂; $ARC5$

Identification and Analysis of the Mutant Gene $ARC5$ in a Chloroplast Division Mutant $cpd4$

SHEN Xin-Zhao¹, LIU Han¹, LIU Xiao-Qing¹, YUAN Guang-Xiao¹, GAO Yue-Fang^{1,*}, GAO Hong-Bo^{1,2,*}

¹College of Biological Sciences and Biotechnology, ²National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: $cpd4$ (*chloroplast division 4*) is a chloroplast division mutant isolated from Columbia background. It has a phenotype similar to that of $arc5-1$, a mutant from Landsberg erecta background, i.e., fewer and larger dumbbell shaped chloroplasts. The chlorophyll content was not obviously affected by the mutation in $cpd4$. Genetic analysis indicated that the mutant phenotype was controlled by a single recessive gene. The gene responsible for the mutant phenotype was identified to be $ARC5$ through a map-based cloning strategy. The mutation seriously affected the correct splicing and the stability of $ARC5$ mRNA. This work provides some useful materials and information for further studying the function of $ARC5$.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; chloroplast division; $ARC5$

叶绿体是质体的一种, 普遍存在于绿色植物中。依据内共生理论, 叶绿体起源于蓝细菌(cyanobacterium)。叶绿体和蓝细菌有着相似的分裂模式, 即中部缢缩的双元分裂(Boffey等1979)。早期的电镜观察显示, 叶绿体是通过内膜及外膜的同时缢缩而分裂的, 在分裂位点处会形成一个电子致密的环状结构, 称为PD (plastid-dividing)环(Kuroiwa等1998)。近些年的研究已经鉴定了多个与叶绿体分裂相关的蛋白, 它们在分裂位点处聚集形成一个围绕内膜及外膜的大的复合物(Yang等2008; Maple和Moller 2010; Miyagishima和Kabeya 2010)。这些蛋白既有原核细胞起源的如FtsZ家族和 $ARC6$ (Osteryoung等1998; Vitha等2003); 也有真核细胞起源的如PDV1、PDV2和 $ARC5$ (Gao等2003; Miyagishima等2006)。FtsZ是普遍存在于真细菌和古细菌中的一种细胞骨架蛋白, 具有GT-Pase活性, 在整个原核生物界中高度保守(Osteryoung等1998; Strepp等1998)。叶绿体分裂时, 首先

在基质侧的分裂位点形成一个FtsZ环(Maple和Moller 2007), FtsZ环的正确定位由MinD、MinE和 $ARC3$ (Vitha等2003; Shimada等2004; Maple等2007; Yang等2008)共同调控。 $ARC6$ 定位在叶绿体膜内侧分裂环处, 具有维持FtsZ环稳定的功能(Vitha等2003)。FtsZ环形成后, $ARC6$ 和PDV2相互作用(Glynn等2008; Yang等2008), 使PDV2和PDV1聚集到分裂位点。在PDV1和PDV2的作用下, 发动蛋白 $ARC5$ 被招募到叶绿体外膜的分裂位点, 形成动力环(Miyagishima等2006), 促使叶绿体最终分裂为两个新的叶绿体。但是目前对叶绿体分裂的详细分子机制和动力机制还不是很清楚。

收稿 2013-03-21 修定 2013-04-08

资助 国家自然科学基金(30971439和J1103516)和北京市自然科学基金(5102022)。

* 共同通讯作者(E-mail: gaobjfu@yahoo.com; yuefanggao@126.com; Tel: 010-62336496)。

*ARC5*是第一个通过图位克隆技术发现的叶绿体分裂基因,起源于内共生事件后(Gao等2003)。研究显示*ARC5*属于真核生物发动蛋白家族的GTP酶,通过水解GTP产生的机械作用力促使膜重新整合。该家族蛋白的功能还涉及到线粒体、过氧化物酶体的分裂以及囊泡的产生等(Glynn等2007; Hoppins等2007; Ungewickell和Hinrichsen 2007; Zhang和Hu 2009)。研究显示,红藻(red algae)中的*ARC5*同源蛋白CmDnm2也具有缢缩叶绿体的功能(Yoshida等2006)。缢缩过程开始后,与*ARC5*类似, CmDnm2也被定位在叶绿体外膜的外侧。

本实验的主要研究对象是一个*ARC5*基因的等位突变体*cpd4*,不同于之前已被报道的突变体*arc5-1*(Robertson等1996; Gao等2003),该突变体是以拟南芥Col生态型为背景的叶绿体分裂突变体。遗传分析显示该突变为隐性单基因突变。通过显微观察、图位克隆、半定量RT-PCR等实验方法对该突变体做了详细分析,并对*ARC5*突变导致拟南芥叶绿体分裂异常的原因进行了探讨。

材料与amp;方法

1 实验材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)有Landsberg erecta (Ler)和Columbia (Col)两种生态型。*cpd4*是本实验室筛选的以Col为背景的拟南芥叶绿体分裂突变体。*arc5-1*是以Ler为背景的*ARC5*基因突变体(Gao等2003)。

2 实验方法

2.1 拟南芥生长条件

将拟南芥在植物培养间培养,培养条件为:温度20~22 °C,光/暗周期为16 h/8 h,光照强度为90~120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,相对湿度约60%。

2.2 叶片固定及表型分析

固定叶片时所选材料主要为生长4周左右的拟南芥植物叶片。固定时首先将叶片浸泡于3.5%戊二醛,黑暗处理1 h后,将戊二醛吸出,并加入0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA·Na₂ (pH 9),置于55 °C水浴锅中处理2 h即可在光学显微镜下进行观察。光学显微镜的型号是OLYMPUS-CX21,采集叶绿体图片所用的数码相机是北京睿智公司生产的MJ300C。使用图像分析软件Image Analysis System 10.0收集叶绿体

面积及叶肉细胞面积等数据。

2.3 叶绿素含量测定

植物材料为生长4周左右的拟南芥叶片。Col和*cpd4*各做3组平行实验以减小误差。每组称取0.2 g植物材料,加石英砂、碳酸钙及2~3 mL 95%乙醇研磨。研成匀浆后过滤到容器中,用95%乙醇定容至25 mL,摇匀后分别测量在663 nm及645 nm波长下的光吸收值。使用的分光光度计是Biochrom公司生产的WPA Biowave II。叶绿素浓度计算公式: Chl a ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)=12.7*A*₆₆₃-2.69*A*₆₄₅; Chl b ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)=22.9*A*₆₄₅-4.68*A*₆₆₃ (Arnon 1949)。叶绿素含量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)=[叶绿素浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)×提取液体积(L)×稀释倍数]/样品鲜重(g)。

2.4 基因的粗定位

从F₂代植物中随机挑选23株叶绿体分裂突变体植株,提取每个单株的基因组DNA,然后取等量混匀作为PCR扩增模板。选取在两亲本Ler和Col之间有明显多态性的23个分子标记进行连锁分析和粗定位,并设计分子标记CH3-5.9和CH3-7.1进一步确定突变基因在染色体上的位置。

2.5 *cpd4*与*arc5-1*的等位测验

以Col遗传背景的突变体植株*cpd4*为母本, Ler遗传背景的突变体植株*arc5-1*为父本杂交得到F₁,为实验组。以Col遗传背景的突变体植株*cpd4*为母本、Ler为父本的杂交实验为对照组。分别提取*cpd4*、*arc5-1*及杂交F₁代单个植株的全基因组DNA,以此为模板,使用CH3-5.9、CH3-7.1和CH3-8.1三个分子标记做PCR,以鉴定所观察的F₁代植物是否为*cpd4*与*arc5-1*杂交的F₁代植物。通过对F₁代植物的表型分析来测试*cpd4*与*arc5-1*中的突变基因是否为等位基因。

2.6 *ARC5*基因的mRNA分析

RNA的提取:植物材料为生长1个月左右的Col和突变体*cpd4*的幼嫩叶片组织,方法参照BioTeke公司提供的植物总RNA提取试剂盒。以上述RNA为模板,参照Fermentas公司的RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒方法进行反转录,将反转录产生的cDNA连续4倍梯度稀释,以此为模板进行扩增。

*ARC5*基因上游片段的引物序列为ARC5-4: 5'-GACGTGGAAGTCTTTCTCTCACC-3'; ARC5-

5'-CCTTGCTCACGGTATCCAGC-3'。 $ARC5$ 基因下游片段的引物序列为 $ARC5-12$: 5'-GATGA-AAGGACACAAGGAGGAGC-3'; $ARC5-14$: 5'-GC-CTTCGCAACTGCTATAACAC-3'。 $HTA9$ 基因的引物序列为 $HTA9F$: 5'-GGTCTCCAGTTCCCAGT-TGG-3'; $HTA9R$: 5'-CTCCTCATCTCCAC-GAATCGC-3'。 $PDV2$ 基因的引物序列为 $PDV2F$: 5'-GCTTGCTTCTTTACAGAATCTAAGGC-3'; $PDV2R$: 5'-CCCATTTCGCATCCGATTTCTTC-3'。

2.7 RNA二级结构预测

使用GeneBee-Molecular Biology Server网站上的在线预测工具对RNA二级结构进行预测分析 (<http://www.genebee.msu.su/genebee.html>)。

实验结果

1 突变体 $cpd4$ 的分离及表型分析

$cpd4$ 是本实验室筛选到的一个以Col生态型为背景的拟南芥叶绿体分裂突变体, 其营养生长和生殖生长正常。显微观察显示, 在野生型植物的叶肉细胞中, 叶绿体呈椭球形(图1-A); 在突变体植物的叶肉细胞中, 叶绿体数量少体积大, 形状多呈哑铃型(图1-B、C)。在野生型植物中, 叶肉细胞大小与叶绿体数量之间呈正相关(图1-D), 叶肉细胞平面面积越大, 叶绿体数量越多, 反之则越少; 在 $cpd4$ 突变体植物中, 每个叶肉细胞含3~7个叶绿体, 叶绿体数量与叶肉细胞的大小没有明显的相关

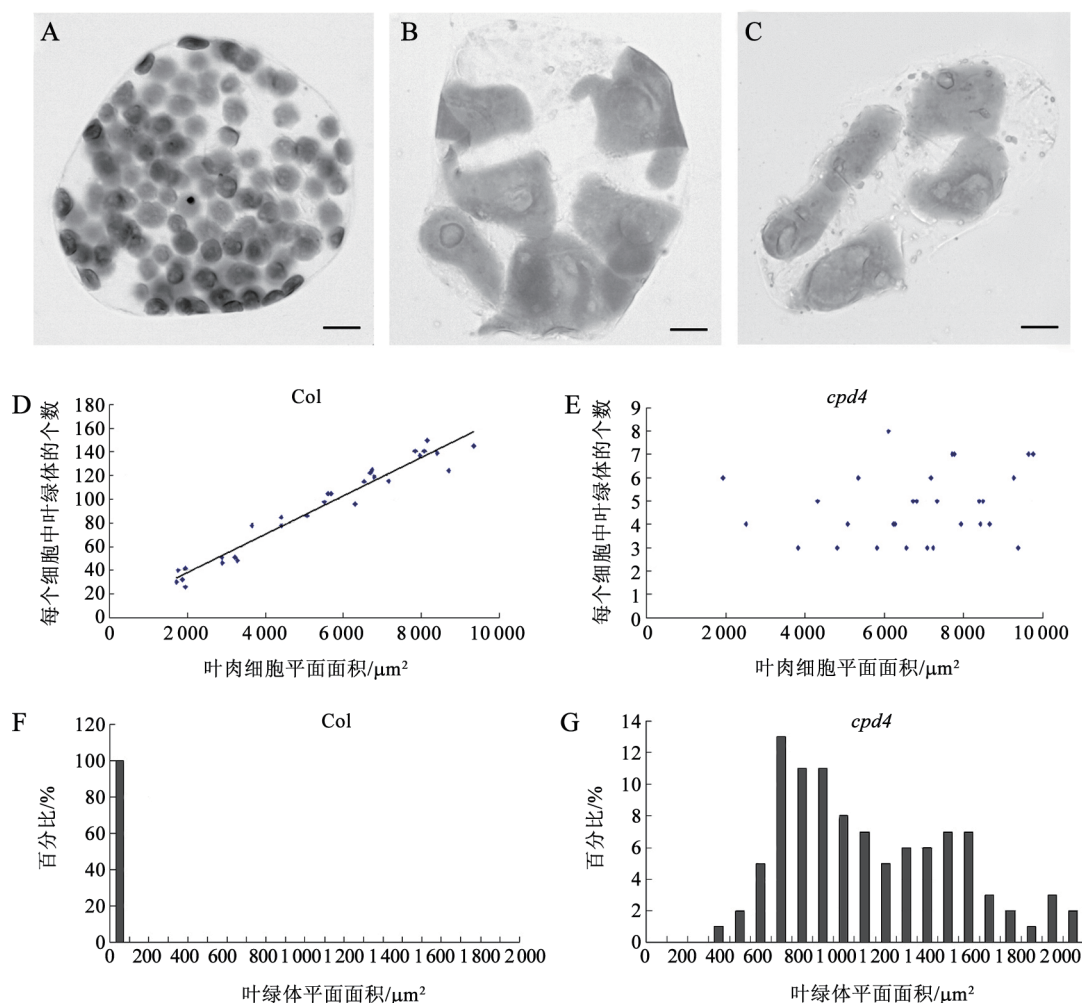


图1 野生型Col和突变体 $cpd4$ 中叶绿体的表型分析

Fig.1 Phenotype analysis of the wild type (Col ecotype) and $cpd4$ mutant

A: 野生型Col; B、C: 突变体 $cpd4$; D、E: 生长4周左右拟南芥叶肉细胞的平面面积与叶绿体数量之间的关系; F、G: 生长4周左右拟南芥叶肉细胞中单个叶绿体平面面积大小分布规律。A~C中的标尺均为10 μm 。

性(图1-E)。Col野生型植物中,叶绿体的平面面积大小接近,均在 $100 \mu\text{m}^2$ 以内(图1-F);在*cpd4*突变体植物中,叶绿体的平面面积与野生型相比普遍明显较大,主要集中在 $600\sim 1600 \mu\text{m}^2$ 之间(图1-G)。

2 叶绿素含量分析

由于突变体*cpd4*中叶绿体分裂异常,而叶绿素合成的主要场所是叶绿体,因此我们对*cpd4*叶肉细胞中的叶绿素含量进行了测定分析。结果显示,突变体*cpd4*中叶绿素a和叶绿素b的含量均与Col接近,差异不显著(表1)。说明该基因的突变虽然影响了叶绿体的正常分裂,却未能对叶肉细胞中叶绿素的含量造成明显影响。

表1 野生型Col和突变体*cpd4*叶绿素含量分析

Table 1 Analysis of chlorophyll contents in wide type and *cpd4* mutant

	Chl a含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	Chl b含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	Chl a+b含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)
Col	0.8401 \pm 0.0012	0.3791 \pm 0.0009	1.2191 \pm 0.0213
<i>cpd4</i>	0.8266 \pm 0.0006	0.3669 \pm 0.0310	1.1935 \pm 0.0074

$P_{(\text{chl a})}=0.861679>0.05$, $P_{(\text{chl b})}=0.829269>0.05$, $P_{(\text{chl a+b})}=0.572726>0.05$ 。

3 遗传分析

为了确定*cpd4*中突变表型的显隐性,我们将*cpd4*与野生型Ler杂交得到 F_1 代。 F_1 代植物叶绿体表型正常,说明该突变为隐性突变(图4-B)。 F_1 代自交得到的 F_2 代出现性状分离,在观察的124株 F_2 植物中叶绿体分裂正常的植物有94株,叶绿体分裂异常的植物有30株(表2),比例接近3:1($\chi^2=0.043<\chi^2_{(P=0.05)}=3.84$),符合孟德尔遗传定律,表明*cpd4*是单基因控制的隐性突变。

表2 突变体*cpd4*的遗传分析

Table 2 A genetic analysis of *cpd4* mutant

F_2	突变表型植株/株	野生型植株/株	总植株/株	χ^2
<i>cpd4</i> ×Ler	30	94	124	0.043

4 *cpd4*中突变基因的粗定位及序列分析

为了确定*cpd4*中突变基因在染色体上的位置,我们对该突变基因进行了粗定位。首先用在拟南芥5条染色体上均匀分布的23个分子标记进行初

步连锁分析,通过PCR技术以及凝胶电泳分析发现,该突变基因与所使用的23个分子标记中的CH3-0.7和CH3-8.1连锁紧密,这2个分子标记均位于第3条染色体上。单独分析作图群体中的23株突变体植物,有21株植物在CH3-0.7分子标记位点纯合,有18株植物在CH3-8.1分子标记位点纯合,说明突变基因与分子标记CH3-0.7及CH3-8.1连锁紧密。随后我们在分子标记CH3-0.7和CH3-8.1之间设计两个新的分子标记CH3-5.9和CH3-7.1,发现23株植物在CH3-5.9和CH3-7.1这两个分子标记位点全部纯合,说明突变基因与这两个分子标记连锁更为紧密。最终将突变基因定位在CH3-5.9和CH3-7.1这两个分子标记附近(图2-A、B)。

对CH3-5.9和CH3-7.1这两个分子标记附近的基因进行分析,发现与叶绿体分裂相关的基因有*ARC5* (*AT3G19720*)和*ARC6H* (*AT3G19180*)。对该突变体的*ARC6H*基因测序,结果显示该基因没有突变,加之突变体*cpd4*的表型与*ARC5*基因突变后的叶绿体表型相似,推测*cpd4*的突变基因可能是*ARC5*。对*ARC5*基因的测序分析结果显示,*ARC5*基因中第4700个碱基的鸟嘌呤突变为腺嘌呤,该突变位点位于第9个内含子与第10个外显子拼接位点处,即acagAATG突变为acaaAATG(图3-A、B)。由于该突变位点刚好位于内含子与外显子的衔接处,推测其可能会影响到mRNA的正常剪切。通过对*ARC5*基因的cDNA测序,发现*ARC5*基因第10个外显子中丢失了7个碱基,即AATGCAGGGAT...突变为GGAT... (图3-C)。这可能是由于碱基的突变导致了原始的AG剪切位点消失,mRNA在剪切过程中又识别了新的AG剪切位点,致使外显子中的部分碱基被错误剪切。mRNA中7个碱基的丢失导致该基因发生移码突变,从第434个氨基酸的密码子开始发生改变,到第462个氨基酸的密码子变为终止密码子,使得蛋白翻译过程提前终止(图3-D)。

5 *cpd4*与*arc5-1*的等位测验

为了进一步验证突变体*cpd4*中突变基因是*ARC5*,我们采用遗传学方法,以Col遗传背景的突变体植物*cpd4*为母本,Ler遗传背景的突变体植物*arc5-1*为父本进行杂交得到 F_1 代,将以*cpd4*为母本、Ler为父本的杂交实验设为对照组。由于*cpd4*和*arc5-1*中的突变基因均为隐性单基因突变,若它们的突变基因不是等位基因,则杂交后 F_1 代植株的

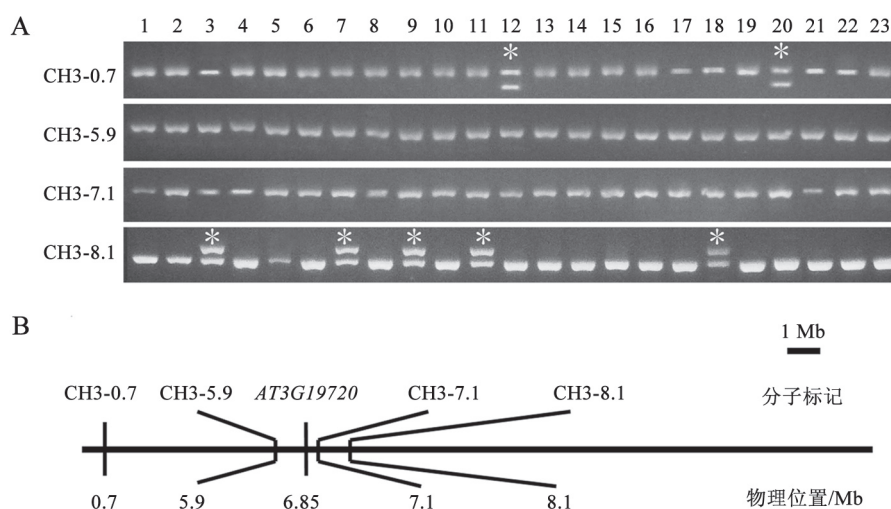


图2 *cpd4*的粗定位

Fig.2 Rough mapping of *cpd4*

A: 突变基因与分子标记CH3-0.7、CH3-5.9、CH3-7.1、CH3-8.1的连锁情况分析。图中显示了23株F₂突变体的PCR分析结果。星号表示在相应的分子标记位点杂合的植株。B: *ARC5* (*AT3G19720*)和4个分子标记在染色体上的位置。

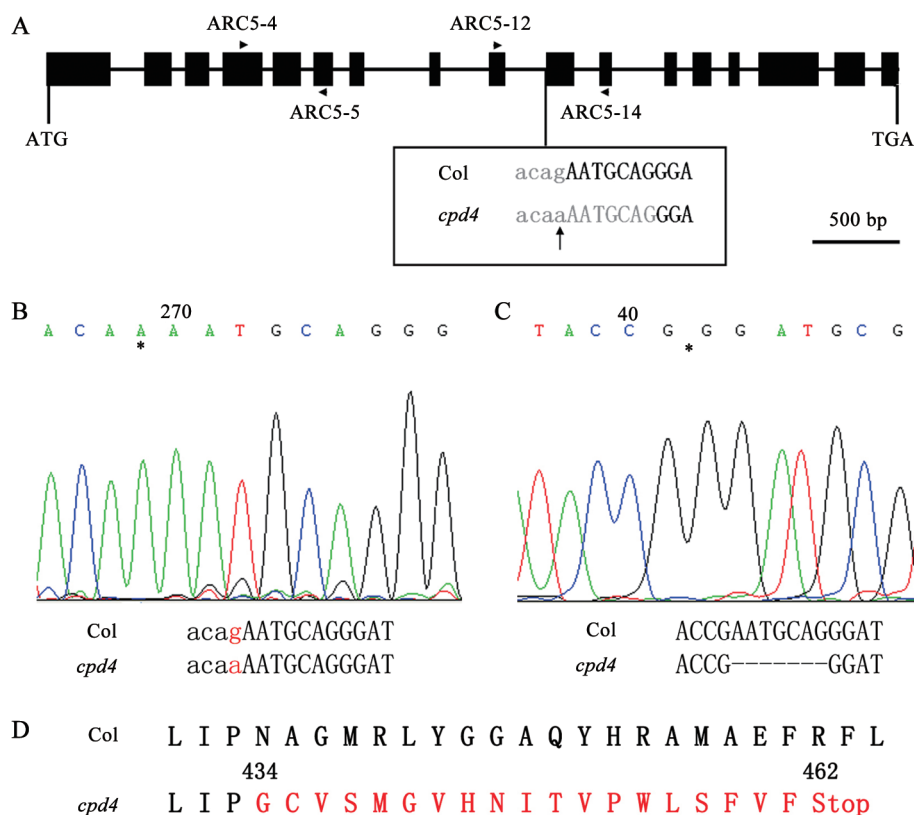


图3 *cpd4*中突变基因*ARC5*的分析

Fig.3 Analysis of the mutant gene *ARC5* in *cpd4* mutant

A: *ARC5* (*AT3G19720*)基因的结构及在突变体*cpd4*中的碱基变化。黑色框代表基因的外显子, 直线代表基因的内含子。方框中的箭头指示突变位点, 灰色小写字母表示内含子, 灰色大写字母表示*cpd4*中被错误剪切的外显子部分。ARC5-4、ARC5-5、ARC5-12、ARC5-14是指RT-PCR中所用的引物, 三角箭头指示引物方向。B: 突变体*cpd4*中*ARC5*基因的基因组DNA测序结果。星号表示突变位点。C: 突变体*cpd4*中*ARC5*基因的cDNA测序结果。星号表示缺失的7个碱基的位置。D: 突变体*cpd4*中*ARC5*发生移码突变的氨基酸序列。

叶绿体表型应为野生型,若它们的突变基因是等位基因, F_1 代表型应与亲本基本一致。首先通过分子标记鉴定,确定所观察的 F_1 代植物为 *cpd4*和 *arc5-1*杂交的 F_1 代植物。如图4-A所示,选取PCR分子标记CH3-5.9、CH3-7.1和CH3-8.1对 F_1 代植物进

行鉴定,结果显示 F_1 代植物均为杂合体,说明该植物是 *cpd4*与 *arc5-1*杂交的 F_1 代植物。然后对所鉴定的 F_1 代植物的叶肉细胞进行显微观察,结果显示其表型与突变体 *cpd4*的叶绿体表型一致,与 *arc5-1*的表型也一致(图4-B)。上述结果进一步说明突变体

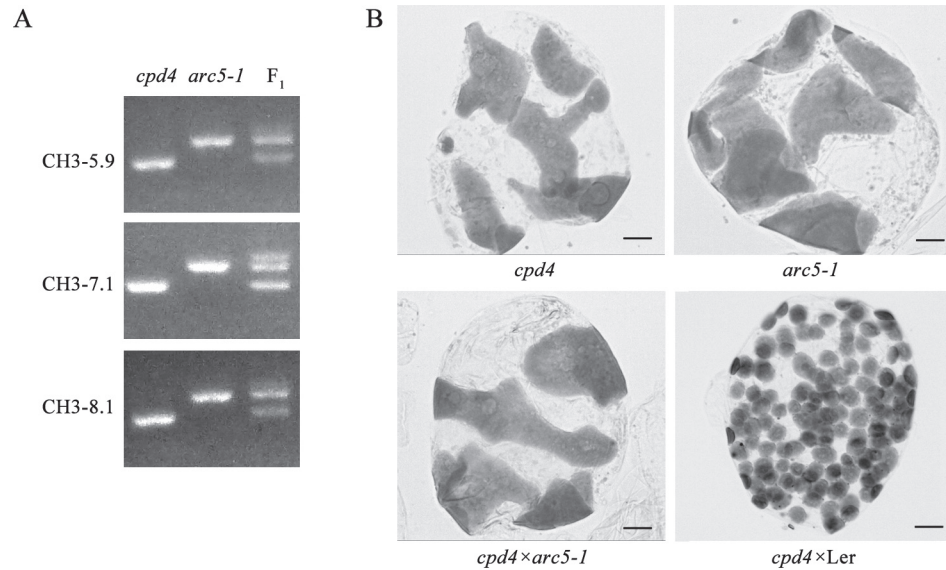


图4 *cpd4*与 *arc5-1*的等位测验

Fig.4 Allele test between *cpd4* and *arc5-1*

A: 使用分子标记鉴定 F_1 代植物是否为杂合植物。 F_1 表示鉴定的 *cpd4*与 *arc5-1*杂交的 F_1 代植物。 B: 亲本及杂交 F_1 代的叶肉细胞照片。标尺均为10 μm 。

*cpd4*中的突变基因是 *ARC5*。

6 *ARC5*基因的mRNA分析

研究显示,在动物体内,基因的无义突变会介导mRNA的降解,使突变基因mRNA的水平下降(Ross 1995)。为了探究突变体 *cpd4*中 *ARC5*基因的突变对其mRNA水平的影响,分别提取同时期种植的突变体 *cpd4*和 *Col*野生型植物的总RNA,通过半定量RT-PCR对 *ARC5*的mRNA含量进行检测,结果如图5所示。在突变体 *cpd4*中,内参基因的mRNA含量与野生型 *Col*无明显差异, *ARC5*基因的上游片段(*ARC5-a*,由引物 *ARC5-4*和 *ARC5-5*扩增;图3-A)及 *ARC5*基因的下游片段(*ARC5-b*,由引物 *ARC5-12*和 *ARC5-14*扩增;图3-A)的mRNA含量均明显低于野生型 *Col*,这可能是由于基因的无义突变造成了mRNA的降解。

为了检测mRNA中碱基的缺失是否影响到mRNA的二级结构,我们使用GeneBee-Molecular Biology Server网站上提供的RNA二级结构预测软

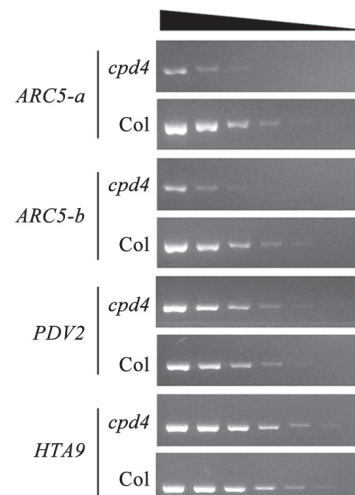


图5 *cpd4*与 *Col*中 *ARC5*基因的半定量RT-PCR分析

Fig.5 Semi-quantitative RT-PCR analyses of *ARC5* in *cpd4* and *Col*

*ARC5-a*表示突变体 *cpd4*中 *ARC5*基因的上游片段, *ARC5-b*表示突变体 *cpd4*中 *ARC5*基因的下游片段。 *PDV2*和 *HTA9*为内参基因(Pan等2013)。图上端的黑色三角指示连续4倍梯度稀释的方向。

件, 对Col和 $cpd4$ 中 $ARC5$ 基因mRNA的二级结构进行了预测分析(图6)。结果显示, 与野生型相比, $cpd4$ 中 $ARC5$ 基因mRNA的自由能略低, 但二级结构发

生了明显变化(图6中箭头指示), 突变体中7个碱基的缺失导致了野生型中的颈环结构变成了螺旋结构, 这可能进一步影响到mRNA结构的稳定性。

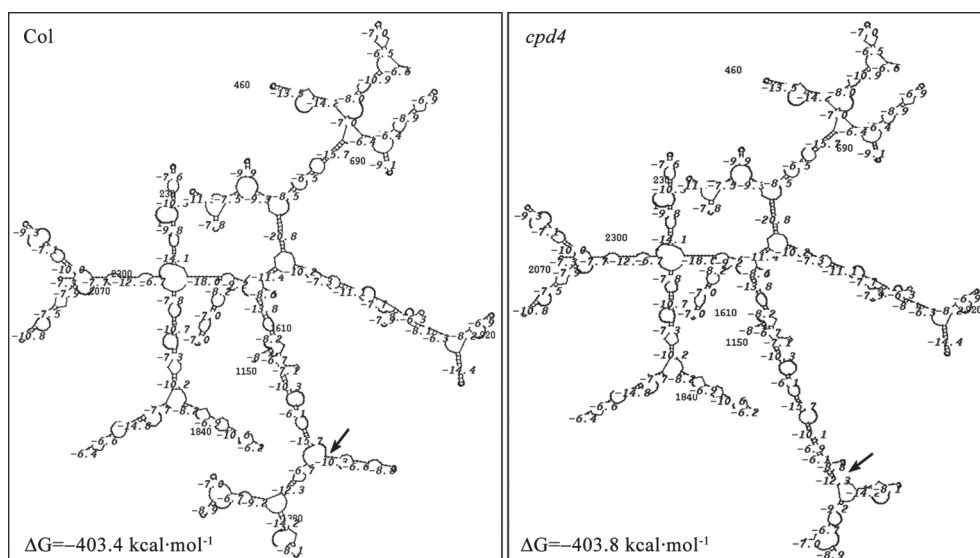


图6 $ARC5$ 基因的mRNA二级结构预测

Fig.6 Prediction of the secondary structure of $ARC5$ mRNA

图中箭头指示突变体 $cpd4$ 和Col在二级结构上有差异的位置。

讨 论

$cpd4$ 是一个以Col为背景的叶绿体分裂突变体, 遗传分析显示该突变为隐性单基因突变。显微观察显示, 其突变性状主要表现为叶绿体数量减少体积增大, 且形状多呈哑铃型, 与以Ler为背景的突变体 $arc5-1$ 表型相似(Gao等2003), 但也存在一定的差异。在以Ler为背景的突变体 $arc5-1$ 中, 平均每个叶肉细胞中大约有13个叶绿体(Pyke和Leech 1994; Robertson等1996), 也有统计显示每个叶肉细胞中有3~15个叶绿体(Gao等2003)。在以Col为背景的 $ARC5$ 突变体 $cpd4$ 中, 每个叶肉细胞中有3~7个叶绿体(图1-E), 比 $arc5-1$ 的叶肉细胞中叶绿体数量少。 $arc5-1$ 属于无义突变, 即碱基的突变(G突变成A)导致编码色氨酸(Trp)的密码子突变为终止密码子(Gao等2003), 而 $cpd4$ 属于内含子剪切异常导致的无义突变。上述两种突变均导致了 $ARC5$ 基因功能的丧失, 致使突变体叶肉细胞内的叶绿体数量减少, 体积明显增大。 $cpd4$ 叶肉细胞内的叶绿体数量较 $arc5-1$ 叶肉细胞内的叶绿体数量少, 这一突变表型上的差异可能是由两个突变体

的遗传背景不同导致的。

真核生物编码蛋白的基因是以单个基因为转录单位, 通常含有需要被切除的内含子。内含子左端通常为GT, 右端为AG。剪切过程主要是首先在内含子左端切开, 产生的5'末端与3'末端上游形成磷酸二酯键, 构成套索结构。随后内含子右端切开, 2个外显子连接起来。通过不同的拼接方式, 可形成不同的mRNA。 $cpd4$ 突变体中 $ARC5$ 基因发生突变的碱基(鸟嘌呤)位于第9个内含子与第10个外显子拼接位点处, 该突变致使原本的AG剪切位点消失, 并在第10个外显子中识别了一个新的AG剪切位点, 导致该外显子中的前7个碱基被错误剪切。由于mRNA的错误剪切, 导致以这段mRNA为模板进行蛋白翻译的过程提前终止。半定量RT-PCR分析显示, 突变体 $cpd4$ 中 $ARC5$ 基因的mRNA含量与Col中 $ARC5$ 基因的mRNA含量相比大幅度下降, 说明 $ARC5$ 基因的突变产生了无义突变介导的mRNA降解。通过生物信息学方法, 对 $cpd4$ 和Col中 $ARC5$ 基因mRNA的二级结构进行预测, 发现和野生型相比, 突变体的二级结构有明显的变化,

可能进一步影响到mRNA结构的稳定性。

ARC5是定位在叶绿体外膜上的具有GTP酶活性的发动蛋白,也叫做DYNAMIN-RELATED PROTEIN5B (DRP5B) (Hong等2003),在藻类和陆生植物中都很保守(Gao等2003)。研究显示,拟南芥叶绿体分裂突变体*pdv1*和*pdv2*与*arc5-1*具有相似的表型,说明PDV1和PDV2在叶绿体分裂过程中的功能可能是与ARC5密切相关的(Miyagishima等2006)。PDV1和PDV2仅存在于高等陆生植物中(Miyagishima等2006)。酵母双杂交的结果显示,PDV1和PDV2与ARC5没有直接的相互作用(Miyagishima等2006),这表明ARC5可能需要通过一个中间蛋白来介导自身与PDV1和PDV2的结合,详细的作用机制还需要进行更多的研究。本项工作中,我们鉴定了一个以Col生态型为背景的拟南芥叶绿体分裂突变体*cpd4*,其突变性状是由ARC5基因突变引起的。该项研究为进一步探讨ARC5在叶绿体分裂中的作用提供了新的材料。

参考文献

- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24 (1): 1~15
- Boffey SA, Ellis JR, Sellden G, Leech RM (1979). Chloroplast division and DNA synthesis in light-grown wheat leaves. *Plant Physiol*, 64 (3): 502~505
- Gao H, Kadirjan-Kalbach D, Froehlich JE, Osteryoung KW (2003). ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (7): 4328~4333
- Glynn JM, Froehlich JE, Osteryoung KW (2008). *Arabidopsis* ARC6 coordinates the division machineries of the inner and outer chloroplast membranes through interaction with PDV2 in the intermembrane space. *Plant Cell*, 20 (9): 2460~2470
- Glynn JM, Miyagishima SY, Yoder DW, Osteryoung KW, Vitha S (2007). Chloroplast division. *Traffic*, 8 (5): 451~461
- Hong Z, Geisler-Lee CJ, Zhang Z, Verma DPS (2003). Phragmoplastin dynamics: multiple forms, microtubule association and their roles in cell plate formation in plants. *Plant Mol Biol*, 53 (3): 297~312
- Hoppins S, Lackner L, Nunnari J (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76: 751~780
- Kuroiwa T, Kuroiwa H, Sakai A, Takahashi H, Toda K, Itoh R (1998). The division apparatus of plastids and mitochondria. *Int Rev Cytol*, 181: 1~41
- Maple J, Moller SG (2007). Plastid division: evolution, mechanism and complexity. *Ann Bot*, 99 (4): 565~579
- Maple J, Moller SG (2010). The complexity and evolution of the plastid-division machinery. *Biochem Soc Trans*, 38 (3): 783~788
- Maple J, Vojta L, Soll J, Moller SG (2007). ARC3 is a stromal Z-ring accessory protein essential for plastid division. *EMBO Rep*, 8 (3): 293~299
- Miyagishima SY, Froehlich JE, Osteryoung KW (2006). PDV1 and PDV2 mediate recruitment of the dynamin-related protein ARC5 to the plastid division site. *Plant Cell*, 18 (10): 2517~2530
- Miyagishima SY, Kabeya Y (2010). Chloroplast division: squeezing the photosynthetic captive. *Curr Opin Microbiol*, 13 (6): 738~746
- Osteryoung KW, Stokes KD, Rutherford SM, Percival AL, Lee WY (1998). Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial *ftsZ*. *Plant Cell*, 10 (12): 1991~2004
- Pan D, Shi Y, Liu X, Gao Y, Liu Z, Gao H (2013). Genetic mapping and isolation of two *arc3* alleles in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 32 (1): 173~182
- Pyke KA, Leech RM (1994). A genetic analysis of chloroplast division and expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 104 (1): 201~207
- Robertson EJ, Rutherford SM, Leech RM (1996). Characterization of chloroplast division using the *Arabidopsis* mutant *arc5*. *Plant Physiol*, 112 (1): 149~159
- Ross J (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev*, 59 (3): 423~450
- Shimada H, Koizumi M, Kuroki K, Mochizuki M, Fujimoto H, Ohta H, Masuda T, Takamiya K (2004). ARC3, a chloroplast division factor, is a chimera of prokaryotic FtsZ and part of eukaryotic phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Plant Cell Physiol*, 45 (8): 960~967
- Strepp R, Scholz S, Kruse S, Speth V, Reski R (1998). Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (8): 4368~4373
- Ungewickell EJ, Hinrichsen L (2007). Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol*, 19 (4): 417~425
- Vitha S, Froehlich JE, Koksharova O, Pyke KA, van Erp H, Osteryoung KW (2003). ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell*, 15 (8): 1918~1933
- Yang Y, Glynn JM, Olson BJ, Schmitz AJ, Osteryoung KW (2008). Plastid division: across time and space. *Curr Opin Plant Biol*, 11 (6): 577~584
- Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, Nishida K, Yagisawa F, Fujiwara T, Nanamiya H, Kawamura F, Kuroiwa T (2006). Isolated chloroplast division machinery can actively constrict after stretching. *Science*, 313 (5792): 1435~1438
- Zhang X, Hu J (2009). Two small protein families, DYNAMIN-RELATED PROTEIN3 and FISSION1, are required for peroxisome fission in *Arabidopsis*. *Plant J*, 57 (1): 146~159