

拟南芥叶绿体分裂突变体 $cpd44$ 中 $ARC6$ 基因的鉴定与分析

张琴, 贾宁, 李慧, 高宏波*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083

摘要: 叶绿体是光合作用的主要场所, 叶绿体的分裂对于维持其正常的功能有着非常重要的作用。本实验从EMS (ethyl methane sulfonate)诱变的拟南芥Columbia生态型(Col)种子中筛选到一个叶绿体分裂突变体 $cpd44$ (*chloroplast division 44*), 其叶绿体的体积显著增大, 每个叶肉细胞中的叶绿体数目减少至1~5个。遗传分析显示该表型是单基因控制的隐性突变。运用图位克隆技术和测序分析发现 $ARC6$ (*accumulation and replication of chloroplasts 6*)基因发生突变, 第1 160个碱基由C突变成T, 发生无义突变。半定量RT-PCR分析结果显示 $cpd44$ 中 $ARC6$ 的mRNA可能被降解。遗传互补实验进一步证明 $cpd44$ 的叶绿体异常表型是由 $ARC6$ 突变造成的。本工作为进一步研究叶绿体分裂机制提供了新材料。

关键词: 拟南芥; 叶绿体分裂; $ARC6$; $cpd44$

Identification and Analysis of $ARC6$ Gene in a Chloroplast Division Mutant $cpd44$ in *Arabidopsis thaliana*

ZHANG Qin, JIA Ning, LI Hui, GAO Hong-Bo*

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Chloroplasts are the major place for photosynthesis. The division of chloroplast is important for the maintaining of its function. *chloroplast division 44* ($cpd44$) is a chloroplast division mutant obtained in a mutant screening of ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenized *Arabidopsis thaliana* in Col ecotype, in which the chloroplast volume was increased obviously and the chloroplast number was decreased to one to five per mesophyll cell. Genetic analysis indicated that the phenotype of $cpd44$ was controlled by a single recessive gene. Map-based cloning and sequencing analysis revealed a mutation in *accumulation and replication of chloroplasts 6* ($ARC6$) gene, which was a change from C to T at the 1 160th base and resulted in a nonsense mutation. Semi-quantitative RT-PCR analysis suggested that the mRNA of $ARC6$ in $cpd44$ might be degraded. Genetic complementation experiment further confirmed that the chloroplast phenotype in $cpd44$ was caused by the mutation of $ARC6$. This work provides a new material for the further study of the division mechanism of chloroplast.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; chloroplast division; $ARC6$; $cpd44$

叶绿体是植物特有的细胞器, 是淀粉、脂肪酸、蛋白质和核酸等重要产物代谢的场所。早在1905年Konstantin Mereschkowsky提出叶绿体起源于内吞的蓝细菌(cyanobacteria) (Martin和Kowallik 1999)。叶绿体普遍存在于绿色植物中, 其光合作用对于维持植物的生长发育具有重要作用。随着细胞的增殖和植物的发育, 叶绿体必须通过分裂以确保其数量和遗传的稳定性。20世纪70年代初, 通过对分裂位点处环状结构的观察证实了叶绿体分裂现象的存在, 并将该过程描述为二分裂(Boffey等1979; Kuroiwa等1998)。

叶绿体分裂时首先在分裂位点形成FtsZ环, FtsZ环由FtsZ1和FtsZ2共同组装形成(Stokes等

2000; Vitha等2001; McAndrew等2001)。FtsZ环定位于叶绿体的基质侧, MinD、MinE、ARC3和MCD1共同作用调节FtsZ环的定位(Colletti等2000; Maple等2002, 2007; Nakanishi等2009; Zhang等2013)。PDV1和PDV2定位在叶绿体外膜, C端位于叶绿体内外膜之间。PDV2通过C端能够与内膜蛋白ARC6相互作用, 同时内膜蛋白PARC6能够指导PDV1定位在正确的叶绿体分裂位点(Glynn等2008, 2009)。PDV1和PDV2的N端位于胞质侧, 能

收稿 2015-01-20 修定 2015-03-20
资助 高等学校学科创新引智计划(B13007)。

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

够招募胞质中的ARC5至叶绿体外膜的分裂位点并与ARC5相互作用(Miyagishima等2006; Holtmark等2013)。ARC5在外膜外侧形成叶绿体分裂的动力环(Gao等2003; Miyagishima等2003)。随后叶绿体分裂环发生构象变化形成缢缩环,最后完成叶绿体的分裂。正常情况下,叶绿体通过二分裂的方式在近中部处向内缢缩,最后分开形成2个大小相近的子叶绿体。

在大肠杆菌细胞中,细胞分裂蛋白FtsA和ZipA与FtsZ的C端相互作用能够锚定FtsZ环并稳定FtsZ环的组装(Ma和Margolin 1999; Errington等2003)。大肠杆菌FtsA和ZipA的双突变体中,细胞分裂和FtsZ环组装都被阻止,其表型类似于*arc6*(Pichoff和Lutkenhaus 2002; Vitha等2003)。植物中没有发现FtsA和ZipA的同源物,因此推测ARC6代替了FtsA和ZipA锚定并稳定FtsZ环的功能。ARC6的N端含有一段类似于J结构域的序列(Vitha等2003)。该结构域有DnaJ(热休克蛋白)分子伴侣的特点,与HSP70结合后能够调节蛋白活性(Walsh等2004; 孔凡英等2014)。在大肠杆菌中,HscA(HSP70家族)与FtsZ通过类似分子伴侣结合的方式参与Z环的组装(Uehara等2001)。因此推测ARC6可能有相似的作用方式。ARC6的C端位于叶绿体的内外膜之间,酵母双杂交实验证明ARC6和PDV2的C端可以相互作用。且*arc6*突变体中YFP-PDV2的信号分散,而在Col中能够看到明显的YFP-PDV2荧光信号和PDV2环状结构。说明在Col中ARC6能够指导PDV2定位在正确的叶绿体分裂位点并行使功能(Glynn等2008)。ARC6的N端位于叶绿体基质侧。酵母双杂交实验和BiFC实验证明FtsZ2和ARC6能够相互作用。FtsZ在*arc6*突变体中形成较短的纤维而在超表达ARC6的植物中形成极长的纤维,且单个叶绿体中有多个FtsZ环。说明ARC6能够促进或稳定FtsZ环的组装(Vitha等2003)。叶绿体的分裂是由位于外膜的叶绿体分裂蛋白和位于内膜的叶绿体分裂蛋白协同作用的结果。因此推测ARC6能够组织和协调内外膜分裂蛋白的协同作用。

本实验从拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh]突变体库中筛选到一个叶绿体分裂异常突变体*cpd44* (*chloroplast division 44*)。其每个叶肉

细胞中的叶绿体数目显著减少,每个叶绿体的体积明显增大。遗传分析证明该突变表型是隐性突变。运用图位克隆技术和测序分析确定ARC6基因中产生了一个终止密码子突变。半定量RT-PCR分析显示突变体的mRNA可能不稳定。

材料与amp;方法

1 材料与仪器

本实验所用野生型拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh]为Col (Columbia)和Ler (Landsberg erecta)两种生态型。叶绿体分裂突变体*cpd44*是本实验室从EMS (ethyl methane sulfonate)诱变的Col种子的M2代中通过叶绿体表型观察筛选得到的。

叶绿体表型观察用奥林巴斯(Olympus Corporation)生产的CX21光学显微镜。叶绿体的表型图用北京睿智公司的MJ300C数码相机采集。PCR扩增用杭州博日科技有限公司的LifePro BYQ6063 PCR基因扩增仪。DNA电泳图的观察用北京百泰克生物技术有限公司的UltraPowerTM可见光凝胶透射仪。DNA电泳图片用日本松下电器产业株式会社的DMC-FZ35数码相机采集。

所用限制性内切酶和T4连接酶均购自纽英伦生物技术(北京)有限公司。植物总RNA的提取用北京艾德莱生物科技有限公司的RN03-RNAPure超纯总RNA快速提取试剂盒。cDNA的合成用康为世纪的HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒。所用草铵膦为永农生物科学有限公司的百速顿草铵膦水剂AS。载体3302Y2和感受态细胞为实验室冻存。

2 方法

2.1 拟南芥生长条件

将拟南芥种子点播在已灭菌的营养土中,在人工培养间培养。培养条件是:温度为20~22 °C,相对湿度为40%~60%,光/暗周期为16 h/8 h,光照强度为120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

2.2 叶片固定及叶绿体表型分析

取生长4周的拟南芥叶片于1 mL 3.5%戊二醛溶液中黑暗处理1 h,然后吸出戊二醛,加入1 mL 0.1 mol·L⁻¹ Na₂EDTA (pH 9.0)于55 °C水浴2 h。用显微镜观察叶绿体的表型并用MJ300C相机采集叶绿体的表型图。叶肉细胞面积和叶绿体面积的采

集用图像分析软件Image Analysis System 11.0。叶绿体个数采用人工计数。数据分析用微软公司的Excel进行统计。

2.3 遗传分析

以突变体 $cpd44$ 为母本, 以野生型Ler为父本进行杂交, 获得 F_1 种子。 F_1 自交得到 F_2 , 在显微镜下观察 F_2 植物的叶绿体表型, 分别统计叶绿体表型正常和表型异常植株的个数。

2.4 $cpd44$ 中突变基因的定位分析

在显微镜下观察 F_2 植物的叶绿体表型, 从中筛选出34棵叶绿体表型异常的植物, 提取基因组DNA构建DNA池并作为PCR模板。用均匀分布在拟南芥5条染色体上且在亲本Col和Ler之间有多态性的23个分子标记作为引物进行PCR扩增。根据粗定位结果确定突变基因与CH5-23.08连锁。然

后在该分子标记附近开发两个新的分子标记CH5-16.5和CH5-21.04, 分别分析这三个分子标记与 $cpd44$ 的连锁情况。

2.5 $cpd44$ 的遗传互补及PCR鉴定

以野生型拟南芥Col基因组DNA为模板, 以ARC6-7和ARC6-6为引物扩增目的基因片段(表1)。PCR产物用BglII和MluI双酶切处理。植物二元表达载体3302Y2用BamHI和MluI双酶切处理。由于BglII和BamHI是同尾酶, 可直接用T4连接酶将酶切后的目的片段和载体进行连接。将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞DH5 α , 挑取单克隆, 提取质粒并测序分析ARC6基因无突变。然后转化农杆菌感受态细胞。浸花法转化突变体 $cpd44$, 收取 T_1 代种子。用60 mg·L⁻¹草铵膦筛选转基因植物。

表1 遗传互补、PCR鉴定及半定量PCR所用引物的序列

Table1 Primers for genetic complementation, PCR analysis and semi-quantitative RT-PCR

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
ARC6-7	CTTAGATCTGCAGTGACTTCTGACCGA	遗传互补
ARC6-6	CTTACGCGTACCAGATGATAACCAGAGCAC	
ARC6-10	CAAGATGGGAAGTGGGACGC	扩增内源ARC6
ARC6-4	GCATAGTCCAGGGAGATCATCATTG	
3302Y2-6	GCTCTCGAGCAAGCTGCTCTAGCCAATAC	扩增外源ARC6
ARC6-4	GCATAGTCCAGGGAGATCATCATTG	
ARC6-3	CCATAAACCTAGACGACCAAACAG	半定量RT-PCR
ARC6-8	CTTGCTCCTTCTCCTGTA AAAAG	
ARC6-5	GACTCTGTGCACTGCTTATAGGC	半定量RT-PCR
ARC6-2	ACAAAGAGAATCTCGCAAGCTCAG	
FtsZ2-1-19	ACAGCTGTCTCTCAGTCTACTC	半定量RT-PCR
FtsZ2-1-16	ACCCGTAGCTATCAGGGTTATG	
ARC5-4	GACGTGGAAGTCTTTCTCTCACC	半定量RT-PCR
ARC5-5	CCTTGCTCACGGTATCCAGC	
HTA9-1	GGTCTCCAGTCCCAGTTGG	半定量RT-PCR
HTA9-2	CTCCTCATCTCCACGAATCGC	

为了验证转基因植物的正确性, 首先分析转基因植物是否为 $cpd44$ 突变体。用引物ARC6-10和ARC6-4扩增内源ARC6基因片段, 测序分析内源ARC6基因是否发生突变(表1)。扩增内源ARC6片段的PCR产物长度是2 369 bp。然后分析转基因植物中是否有外源ARC6片段。分别在载体3302Y2和基因ARC6上设计引物3302Y2-6和ARC6-4用以扩增外源ARC6片段(表1)。扩增外源ARC6片段的PCR产物长度是2 524 bp。

2.6 ARC6基因的mRNA含量分析

用试剂盒分别提取生长4周的Col和 $arc6-6$ 植物的总RNA。然后进行反转录, 合成cDNA。将cDNA连续4倍梯度稀释作为模板进行PCR扩增。HTA9编码组蛋白, 是一个持家基因, 因此将其作为对照。20 μ L PCR反应体系中加入1 μ L cDNA, 0.25 μ mol·L⁻¹引物。PCR扩增条件是: 94 $^{\circ}$ C 预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸1 min 20 s, 30个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

*ARC6*基因突变位点上游片段*ARC6-a*的扩增引物是ARC6-3和ARC6-8 (表1)。*ARC6*基因突变位点下游片段*ARC6-b*的扩增引物是ARC6-5和ARC6-2 (表1)。*FtsZ2-1*的扩增引物是FtsZ2-1-19和FtsZ2-1-16 (表1) (刘晓庆等2014)。*ARC5*的扩增引物是ARC5-4和ARC5-5 (表1) (沈鑫翌等2013)。*HTA9*的扩增引物是HTA9-1和HTA9-2 (表1)。

实验结果

1 *cpd44*的叶绿体表型观察及分析

*cpd44*是本实验室筛选的Col背景的叶绿体分裂突变体。在光学显微镜下观察发现, Col的叶肉细胞中叶绿体多呈椭圆形, 单个细胞中的叶绿体个数较多(图1-A)。而*cpd44*中叶肉细胞的叶绿体形状极不规则, 叶绿体个数较少(图1-B和C)。通过对叶肉细胞平面面积和其中的叶绿体数量的统计发现, 在Col中, 叶肉细胞平面面积大小与其中所含的叶绿体数量有明显的正相关性(图1-D)。即叶肉

细胞平面面积越大, 叶肉细胞中的叶绿体数量越多。在突变体*cpd44*中, 叶肉细胞平面面积大小与其中所含的叶绿体数量没有相关性(图1-E)。*cpd44*叶肉细胞中的叶绿体个数在1~5个之间, 与野生型植物相比显著减少。对叶绿体平面面积大小的统计结果显示, 在Col中, 叶绿体的平面面积大小相近, 都在100 μm^2 以内(图1-F)。而突变体*cpd44*的叶绿体平面面积相差很大, 分布在60.19~2 500 μm^2 之间(图1-G)。

2 遗传分析

为确定*cpd44*中突变基因的显隐性, 将*cpd44*与野生型Ler杂交, 然后观察F₁植物的叶绿体表型。其F₁代植物的叶绿体表型正常, 说明*cpd44*是隐性突变。由F₁自交得到F₂植物。共观察203棵植物, 其中叶绿体表型正常的植物有150棵, 叶绿体表型异常的植物有53棵, 比例接近3:1 ($0.42 < \chi^2_{0.05} = 3.84$)。这说明突变基因的分离符合孟德尔遗传定律, *cpd44*是单基因控制的隐性突变。

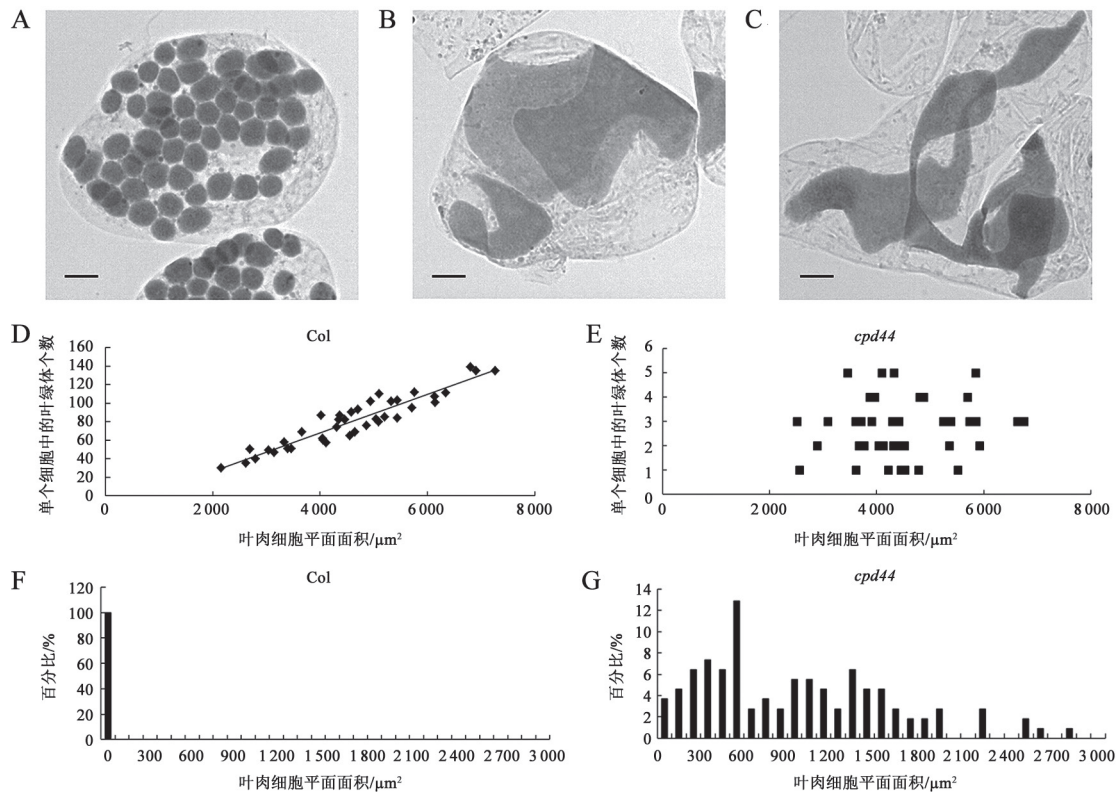


图1 拟南芥Col野生型和*cpd44*的叶绿体表型分析

Fig.1 Chloroplast phenotype analysis of the Col wild type and *cpd44*

A~C: Col (A)和*cpd44* (B~C)叶肉细胞的叶绿体表型, 标尺为10 μm ; D和E: Col和*cpd44*中叶肉细胞平面面积和叶绿体个数之间的关系; F和G: Col和*cpd44*中叶绿体平面面积大小分布情况。

3 *cpd44*中突变基因的粗定位分析

为了确定*cpd44*中突变基因在染色体上的位置, 首先用均匀分布在5条染色体上的23个分子标记进行PCR分析。结果显示, 该基因与5号染色体上的分子标记CH5-23.08连锁。然后用CH5-16.5、CH5-21.04、CH5-23.08三个分子标记对作图群体中的34棵植物进行单株分析(图2-A)。结果显示, 有11棵植物在CH5-16.5分子标记位点是Col纯合, 其重组率是45.59%; 有26棵植物在CH5-21.04分子标记位点是Col纯合, 其重组率是13.24%; 有23棵植物在CH5-23.08分子标记位点是Col纯合, 其重组率是17.65%。说明突变基因与分子标记CH5-21.04连锁紧密(图2-B)。

4 *cpd44*中突变基因*ARC6*的鉴定和测序分析

在分子标记CH5-16.5与CH5-23.08之间, 目前

已知与叶绿体分裂相关的基因有*ARC6*、*CRL*、*PDV1*和*FtsZ1*。由于*cpd44*的表型类似于*arc6*, 我们对候选基因*ARC6*进行测序分析(Pyke等1994)。测序结果显示, *ARC6*基因的第1 160个碱基由胞嘧啶(C)突变成胸腺嘧啶(T), 导致原先编码谷氨酰胺的密码子CAG变成终止密码子UAG(图3-A)。终止密码子的引入会导致*ARC6*翻译提前终止(图3-B)。

5 突变体*cpd44*的遗传互补分析

为了进一步确认*cpd44*的叶绿体异常表型是由*ARC6*基因突变造成的, 克隆了含有*ARC6*基因自身启动子的基因组DNA进行遗传互补实验。用农杆菌浸花法将*ARC6*基因转入*cpd44*, 用草铵膦筛选得到的转基因植物。用引物3302Y2-6和*ARC6*-4进行PCR扩增, 结果显示*cpd44*互补植物中有外源

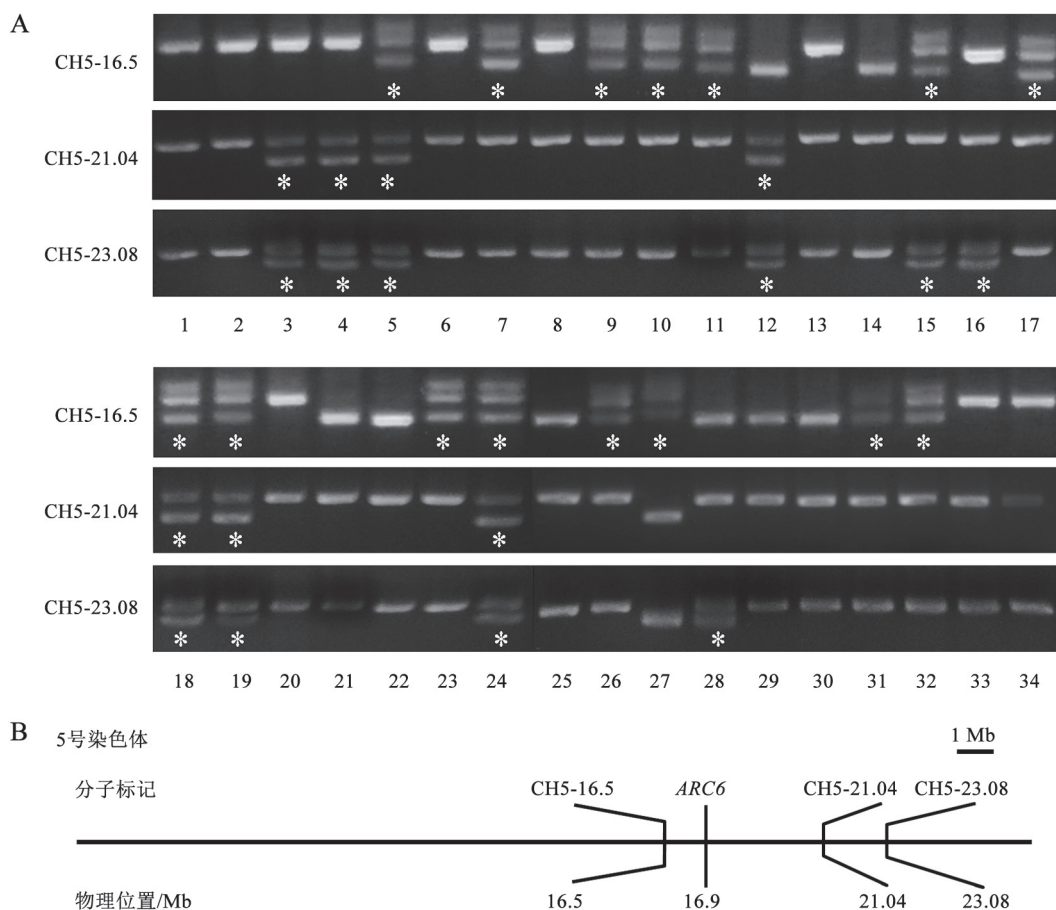


图2 *cpd44*的粗定位分析

Fig.2 Rough mapping of *cpd44*

A: *cpd44*与分子标记CH5-16.5、CH5-21.04、CH5-23.08的连锁情况, 其中上边的条带是Col生态型, 下边的条带是Ler生态型, 星号表示杂合的植物; B: *ARC6*和分子标记在5号染色体上的位置。

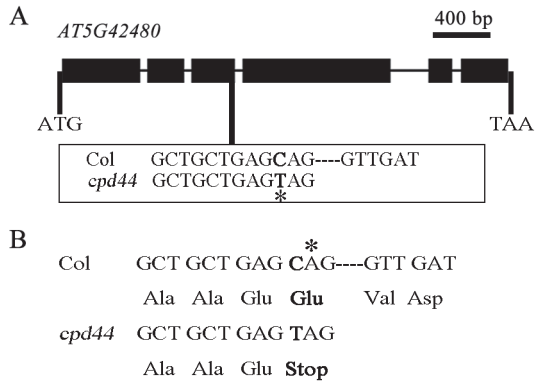


图3 *cpd44*中突变基因*ARC6*的分析

Fig.3 Analysis of the mutant gene *ARC6* in *cpd44*

A: *ARC6*基因结构及*cpd44*中*ARC6*的点突变; B: *cpd44*中*ARC6*突变导致氨基酸发生变化, 星号表示点突变位点。

*ARC6*片段的转入, 而对照Col、*cpd44*均没有外源*ARC6*片段(图4-A)。显微镜观察发现, *cpd44*互补植物的叶绿体表型恢复正常(图4-B)。同时, 统计结果显示, *cpd44*互补植物的叶绿体面积和单个细胞中的叶绿体个数也恢复正常(图4-C)。遗传互补分析进一步证明*cpd44*的叶绿体异常表型是由*ARC6*基因突变造成的。由于之前已有*arc6*突变体的报道, 我们将*cpd44*重新命名为*arc6-6* (Vitha等2003; Ajjawi等2011)。

6 *ARC6*基因的mRNA含量分析

由于*arc6-6*中*ARC6*基因发生突变并提前引入了终止密码子, 因此通过半定量RT-PCR分析*ARC6*基因的mRNA含量。分别提取了相同生长条件下的Col和*arc6-6*植物的总RNA进行半定量分析(图5)。结果显示, 与Col相比, *arc6-6*中*ARC6*基因的mRNA含量明显降低, 且突变位点上游片段*ARC6-a*和下游片段*ARC6-b*的mRNA含量都有明显降低。*HTA9*作为对照, 其含量没有发生变化。*FtsZ2-1*和*ARC5*也是重要的叶绿体分裂基因, 经分析发现其mRNA含量并没有发生变化。

讨论

在研究突变体的叶绿体数量和大小变化的过程中发现了拟南芥*arc*突变体(Pyke和Leech 1991, 1992, 1994)。Pyke指出*arc6*突变体中的叶绿体异常表型是所有*arc*突变体中最严重的, 其叶肉细胞只有1~3个巨大的叶绿体, 叶绿体的平面面积与野

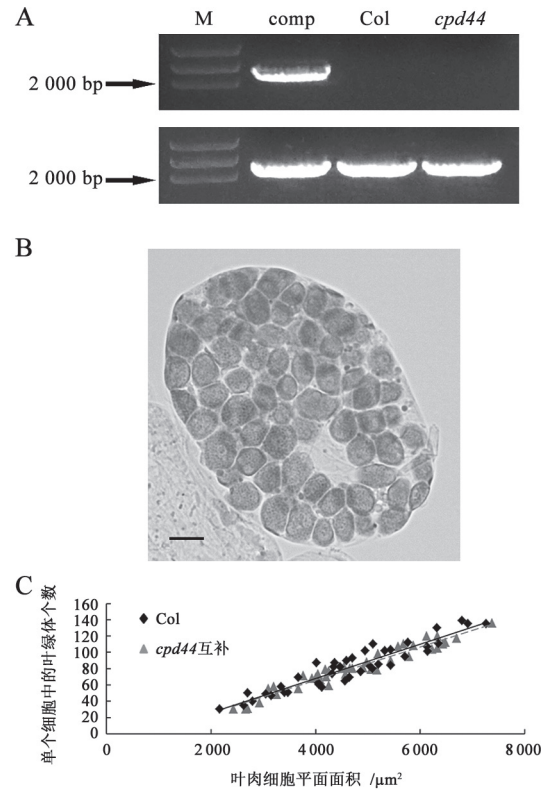


图4 *ARC6*基因可以互补*cpd44*的叶绿体表型

Fig.4 *ARC6* gene can complement the chloroplast phenotype of *cpd44*

A: *cpd44*互补植物的PCR鉴定, 上图为PCR扩增的外源*ARC6*片段, 下图为PCR扩增的内源*ARC6*片段; B: *cpd44*互补植物中叶肉细胞的叶绿体表型, 标尺是10 μm ; C: *cpd44*互补植物中叶肉细胞平面面积与单个细胞中的叶绿体个数之间的关系。

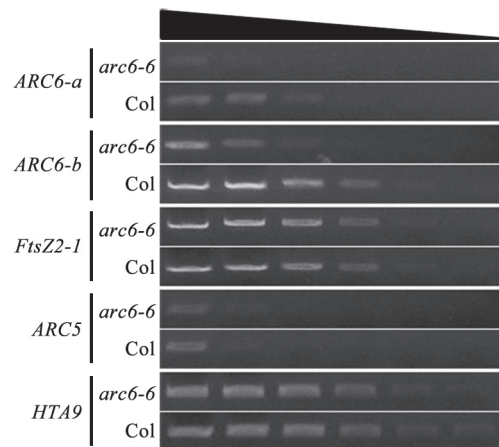


图5 基因的半定量RT-PCR分析

Fig.5 Semi-quantitative RT-PCR analysis

半定量分析Col和*arc6-6*植物中*ARC6*、*FtsZ2-1*、*ARC5*和*HTA9*基因的mRNA含量, 其中*ARC6-a*和*ARC6-b*分别代表突变位点上游和下游的一个片段。

生型比较相差20倍(Pyke等1994)。通过显微镜观察可以看到 $arc6-6$ 叶肉细胞中叶绿体的体积和数目与Col相比有明显的变化, 叶绿体的表型非常严重。以前报道的 $arc6$ 突变体均为Ws背景的T-DNA插入突变体, 而 $arc6-6$ 是Col背景的。 $arc6-6$ 叶肉细胞中叶绿体的个数在1~5个之间, 比 $arc6$ 的叶绿体数目多。因此, $arc6-6$ 在叶绿体分裂的研究中具有特殊的作用。

ARC6是通过与Ftn2进行序列比对时发现的, 而本文是通过图位克隆技术对 $arc6-6$ 的突变基因ARC6进行了鉴定(Vitha等2003)。ARC6基因的物理位置是16.9, 与CH5-16.5最为接近。但是在突变基因的定位分析中发现, 该突变基因与分子标记CH5-21.04连锁最为紧密, 其次是CH5-23.08, 最后是CH5-16.5。推测可能是因为分子标记CH5-16.5和ARC6基因附近有重组热点的存在, 导致该区域表现出较高的重组率(Myers和Stahl 1994)。已有报道用分布在拟南芥4号染色体上的71个SNPs对Col和Ler杂交的 F_2 植物进行基因型分析(Drouaud等2006)。结果显示整条染色体的平均重组率是 $4.6 \text{ cM} \cdot \text{Mb}^{-1}$, 但是4号染色体短臂的重组率从接近着丝粒位置的 $0 \text{ cM} \cdot \text{Mb}^{-1}$ 变化到短臂终端的 $20 \text{ cM} \cdot \text{Mb}^{-1}$ 。对重组率高的单株中交换位点做进一步的精确定位, 在4号染色体短臂上发现了140个交换位点, 其中一些局部区域的重组率达到 $85 \text{ cM} \cdot \text{Mb}^{-1}$ 以上。说明重组率的变化与重组热点的强度和密度紧密相关。本文中出现的这种现象对于今后研究中的遗传作图和重组热点的研究具有一定意义。

我们对 $arc6-6$ 中ARC6基因测序发现, 该基因的第160个碱基由胞嘧啶(C)突变成胸腺嘧啶(T), 导致原先编码谷氨酰胺的密码子CAG突变成终止密码子UAG。因此在突变体 $arc6-6$ 中, ARC6基因突变导致蛋白质翻译提前终止。遗传互补分析进一步证明突变体 $arc6-6$ 的叶绿体异常表型是由ARC6基因突变造成的。对 $arc6-6$ 互补植物中的细胞面积和叶绿体个数的统计分析也表明其叶绿体表型恢复正常。此外半定量分析结果显示, 突变体 $arc6-6$ 中ARC6基因的mRNA含量较Col野生型明显降低。早在1979年发现在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) Ura (aspartate carbamoyl transferase)基

因的开放阅读框中引入无义突变能够极大的加速其mRNA的降解, 即无义突变介导的mRNA降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD) (Exinger和Lacroute 1979)。NMD是真核细胞中重要的RNA转录后监控机制, 能够识别开放阅读框中提前引入的终止密码子并进行降解 (Brojna和Wen 2009; de Lima Morais和Harrison 2010; 李厚华等2015)。因此, $arc6-6$ 中ARC6基因的mRNA含量明显降低很可能是由于无义突变导致其发生降解而造成的

$arc6-6$ 的叶绿体异常表型非常严重, 说明ARC6在叶绿体分裂过程中具有重要作用。已有报道指出ARC6在叶绿体的协同分裂中有重要作用(Glynn等2008)。ARC6在叶绿体内膜一侧能够稳定FtsZ环的组装。作为一个内膜上的跨膜蛋白, 同时还指导外膜上PDV2的定位并联系ARC5的招募。但目前对ARC6的具体作用机制还不是很清楚。因此进一步研究ARC6在叶绿体分裂中的分子作用机制对于阐明叶绿体分裂过程具有重要的理论意义。

参考文献

- 孔凡英, 邓永胜, 尹波, 吕巍, 孟庆伟(2014). 抑制番茄叶绿体 DnaJ 蛋白基因的表达降低转基因番茄的抗高温能力. 植物生理学报, 50 (1): 68~76
- 李厚华, 孔伟胜, 魏圆圆, 张海荣(2015). 植物蛋白质翻译水平的调控. 植物生理学报, 51 (2): 159~165
- 刘晓庆, 潘登, 贾宁, 沈鑫墨, 高宏波(2014). 拟南芥叶绿体分裂突变体 $pd137$ 的基因鉴定与分析. 植物生理学报, 50 (6): 841~848
- 沈鑫墨, 刘含, 刘晓庆, 袁光孝, 高岳芳, 高宏波(2013). 叶绿体分裂突变体 $cpd4$ 中突变基因 ARC5 的鉴定与分析. 植物生理学报, 49 (5): 477~484
- Ajjawi I, Coku A, Froehlich JE, Yang Y, Osteryoung KW, Benning C, Last RL (2011). A J-like protein influences fatty acid composition of chloroplast lipids in *Arabidopsis*. PLoS One, 6 (10): e25368
- 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
- Brojna S, Wen J (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. Nat Struct Mol Biol, 16 (2): 107~113
- Colletti KS, Tattersall EA, Pyke KA, Froelich JE, Stokes KD, Osteryoung KW (2000). A homologue of the bacterial cell division site-determining factor MinD mediates placement of the chloroplast division apparatus. Curr Biol, 10 (9): 507~516
- de Lima Morais DA, Harrison PM (2010). Large-scale evidence for conservation of NMD candidature across mammals. PLoS One,

- 5 (7): e11695
- Drouaud J, Camilleri C, Bourguignon PY, Canaguier A, Berard A, Vezon D, Giancola S, Brunel D, Colot V, Prum B et al (2006). Variation in crossing-over rates across chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* reveals the presence of meiotic recombination "hot spots". *Genome Res*, 16 (1): 106~114
- Errington J, Daniel RA, Scheffers DJ (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol R*, 67 (1): 52~65
- Exinger F, Lacroute F (1979). Genetic evidence for the creation of a reinitiation site by mutation inside the yeast *ura 2* gene. *Mol Gen Genet*, 173 (1): 109~113
- 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, Yang Y, Vitha S, Schmitz AJ, Hemmes M, Miyagishima SY, Osteryoung KW (2009). PARC6, a novel chloroplast division factor, influences FtsZ assembly and is required for recruitment of PDV1 during chloroplast division in *Arabidopsis*. *Plant J*, 59 (5): 700~711
- Holtmark I, Lee S, Lunde KA, Auestad K, Maple-Grodem J, Moller SG (2013). Plastid division control: the PDV proteins regulate DRP5B dynamin activity. *Plant Mol Biol*, 82 (3): 255~266
- 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
- Ma X, Margolin W (1999). Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J Bacteriol*, 181 (24): 7531~7544
- Maple J, Chua NH, Moller SG (2002). The topological specificity factor AtMinE1 is essential for correct plastid division site placement in *Arabidopsis*. *Plant J*, 31 (3): 269~277
- 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
- Martin W, Kowallik KV (1999). Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche'. *Eur J Phycol*, 34 (3): 287~295
- McAndrew RS, Froehlich JE, Vitha S, Stokes KD, Osteryoung KW (2001). Colocalization of plastid division proteins in the chloroplast stromal compartment establishes a new functional relationship between FtsZ1 and FtsZ2 in higher plants. *Plant Physiol*, 127 (4): 1656~1666
- 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, Nishida K, Mori T, Matsuzaki M, Higashiyama T, Kuroiwa H, Kuroiwa T (2003). A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell*, 15 (3): 655~665
- Myers RS, Stahl FW (1994). Chi and the RecBC D enzyme of *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*, 28: 49~70
- Nakanishi H, Suzuki K, Kabeya Y, Miyagishima SY (2009). Plant-specific protein MCD1 determines the site of chloroplast division in concert with bacteria-derived MinD. *Curr Biol*, 19 (2): 151~156
- Pichoff S, Lutkenhaus J (2002). Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *Embo J*, 21 (4): 685~693
- Pyke KA, Leech RM (1991). Rapid image analysis screening procedure for identifying chloroplast number mutants in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol*, 96 (4): 1193~1195
- Pyke KA, Leech RM (1992). Chloroplast division and expansion is radically altered by nuclear mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 99 (3): 1005~1008
- Pyke KA, Leech RM (1994). A genetic analysis of chloroplast division and expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 104 (1): 201~207
- Pyke KA, Rutherford SM, Robertson EJ, Leech RM (1994). *arc6*, A fertile *Arabidopsis* mutant with only two mesophyll cell chloroplasts. *Plant Physiol*, 106 (3): 1169~1177
- Stokes KD, McAndrew RS, Figueroa R, Vitha S, Osteryoung KW (2000). Chloroplast division and morphology are differentially affected by overexpression of FtsZ1 and FtsZ2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124 (4): 1668~1677
- Uehara T, Matsuzawa H, Nishimura A (2001). HscA is involved in the dynamics of FtsZ-ring formation in *Escherichia coli* K12. *Genes Cells*, 6 (9): 803~814
- 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
- Vitha S, McAndrew RS, Osteryoung KW (2001). FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J Cell Biol*, 153 (1): 111~120
- Walsh P, Bursac D, Law YC, Cyr D, Lithgow T (2004). The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep*, 5 (6): 567~571
- Zhang M, Schmitz AJ, Kadirjan-Kalbach DK, Terbush AD, Osteryoung KW (2013). Chloroplast division protein ARC3 regulates chloroplast FtsZ-ring assembly and positioning in *Arabidopsis* through interaction with FtsZ2. *Plant Cell*, 25 (5): 1787~1802