
第5章
植物細胞の特征的遺伝子発現

5.1
光 合 成

小林裕和・池内昌彦

シリーズ分子生物学5『植物分子生物学』
(山田康之編, 朝倉書店, 1997年4月刊) 所収

5. 植物細胞の特徴的遺伝子発現

5.1 光 合 成

(1) はじめに

光合成の実験的記述は、1772年のJ. Priestleyにまでさかのぼることができる¹⁾。その後なされた膨大な研究は、光合成の反応およびその機構に関するものが中心であった。1960年代初頭、日本人研究者の貢献により葉緑体DNAの存在が生化学的に証明され^{2,3)}、1970年代には光合成の遺伝子が葉緑体と細胞核の両ゲノムにコードされていることが確立された⁴⁾。1972年に端に発する遺伝子操作技術により、葉緑体DNAにコードされるリブコース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)大サブユニット遺伝子が1977年⁵⁾に、また、細胞核にコードされるRuBisCO小サブユニットmRNAのcDNAが1980年⁶⁾に、それぞれクローンが同定された。これらは、植物からのタンパク質をコードする遺伝子あるいはmRNAのクローニングに先鞭をつけた。1986年には、日本の研究グループにより、葉緑体DNAの全塩基配列が決定された^{7,8)}。1980年代以降、光合成の素反応に介在するほとんどの成分あるいは酵素分子の遺伝子がクローニングされ、それらのDNA塩基配列が決定されてきた。また、並行して植物への外来遺伝子の導入法が改良され、光合成遺伝子およびそのプロモーター領域の改変および置換(reverse genetics)が可能になった。1988年には、細胞核形質転換法を用い antisense RNAによりRuBisCO小サブユニット遺伝子の発現を抑制したタバコが作製され⁹⁾、光合成研究方法論の新しい側面が開拓された。1988年に緑藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)において¹⁰⁾、また1990年にタバコにおいて¹¹⁾、パーティクルガンを用いた葉緑体の形質転換が報告され、葉緑体遺伝子発現制御機構解析の新たな手段となっている。一方、1979年に発表された高CO₂ガス要求性シロイヌナズナ(*Arabidopsis*

thaliana, アラビドプシス)光合成突然変異体の研究¹²⁾は、光合成CO₂固定反応経路の新たな研究の発端になったのみならず、シロイヌナズナを用いた植物分子遺伝学の有用性を認識させる契機となった。

(2) 光合成反応素過程とその遺伝子

光合成生物は、原核生物と真核生物に大別される。さらに、光合成反応の構成成分の違いによって、原核生物は、緑色非硫黄細菌、緑色硫黄細菌、ヘリオ細菌、光合成紅色細菌、およびラン藻に、真核生物は、紅藻、有色藻、および緑色植物(緑藻および高等植物)に大きく分類される¹³⁾。光合成反応は、光エネルギーを受けてNADPH(光合成細菌においてはNADH)およびATPを生産する光化学系と、それらの化学エネルギーを利用して空気中あるいは水中のCO₂を固定するCO₂固定反応系より構成されている。植物の光合成反応は、水から電子を供与され酸素を発生する。原核生物であるラン藻は、水を電子供与体とした植物型の光合成機構を有し、また、実験材料としての利点から、植物型光合成のモデル系として扱われる。したがって、本節においてもラン藻の光合成遺伝子に関する知見を含める。

光合成反応素過程とその遺伝子については、他書^{13,14)}に概説されている。その後、各種生物種から光合成遺伝子が解析され、それらのデータベースも整備され検索が容易になった。したがって、本節では、解析されているすべての光合成遺伝子種の網羅に努めたが、生物種については、それらが解析されている代表的なものに限定して収録した。

a) 光化学系のタンパク質と遺伝子

チラコイド膜の主成分は光化学系I(photosystem I, PS I)、系II(photosystem II, PS II)、チトクロム*b₆/f*、およびATP合成酵素複合体

(ATPase, 共役因子, CF_1 - CF_0) で、穏和な界面活性 しているかによって帰属を決定している。その遺伝 剤処理で単離することができる。したがって、チラ 子は R. B. Hallick らの命名規約¹⁵⁾ により, PS I, コイド膜のタンパク質はどの複合体に特異的に結合 PSII, b_6/f , ATP 合成酵素はそれぞれ *psa* (photo-

表 5.1 代表的なチラコイド膜タンパク質の遺伝子とその産物の機能

遺伝子*	タンパク質	分子量(kD)**	機能, 性質
PS I			
<i>psaA</i> (C)	PSI-A	83	反応中心(P 700, F _x , クロロフィル <i>a</i> , ビタミン K)
<i>psaB</i> (C)	PSI-B	82	反応中心(P 700, F _x , クロロフィル <i>a</i> , ビタミン K)
<i>psaC</i> (C)	PSI-C	9	ストロマ側表在性, 鉄-硫黄センター A/B 結合
<i>psaD</i> (N)	PSI-D	18	ストロマ側表在性, フェレドキシン結合
<i>psaE</i> (N)	PSI-E	10	ストロマ側表在性, 環状電子伝達に関与
...			
<i>lhca1~4</i> (N)	LHC I	25	外部アンテナ色素複合体 LHC I (クロロフィル <i>a/b</i> 結合)
PS II			
<i>psbA</i> (C)	D 1	38	反応中心(P 680, Q _B , フェオフィチン <i>a</i> など)
<i>psbB</i> (C)	CP 47	56	内在性アンテナ(クロロフィル <i>a</i>)
<i>psbC</i> (C)	CP 43	52	内在性アンテナ(クロロフィル <i>a</i>)
<i>psbD</i> (C)	D 2	40	反応中心(P 680, Q _A , フェオフィチン <i>a</i> など)
<i>psbE</i> (C)	チトクロム b_{559} 大	9	膜貫通性
<i>psbF</i> (C)	チトクロム b_{559} 小	4	膜貫通性
...			
<i>psbO</i> (N)	PSII-O	27	ルーメン側表在性, 水分解促進, Mn クラスター安定化
<i>psbP</i> (N)	PSII-P	20	ルーメン側表在性, 水分解促進, Ca ²⁺ および Cl ⁻ 濃縮
<i>psbQ</i> (N)	PSII-Q	17	ルーメン側表在性, Cl ⁻ 濃縮
...			
<i>psbV</i>	チトクロム C_{550}	15	ルーメン側表在性, 水分解促進, 高等植物にはなし
...			
<i>lhcb1~6</i> (N)	LHC II	25	外部アンテナ色素複合体 LHC II (クロロフィル <i>a/b</i> 結合)
その他の電子伝達成分			
<i>petA</i> (C)	チトクロム <i>f</i>	31	チトクロム b_6/f 複合体成分
<i>petB</i> (C)	チトクロム b_6	24	チトクロム b_6/f 複合体成分
<i>petC</i> (N)	Rieske タンパク質	19	Rieske 型鉄-硫黄センター, チトクロム b_6/f 複合体成分
<i>petD</i> (C)	サブユニット IV	15	チトクロム b_6 の一部, チトクロム b_6/f 複合体成分
<i>petE</i> (N)	プラストシアニン	10	ルーメン側表在性, 銅結合, 移動性電子伝達成分
<i>petF</i> (N)	フェレドキシン	10	ストロマ側表在性, 鉄-硫黄センター結合, 移動性電子伝達成分
...			
<i>petH</i> (N)	フェレドキシン NADP- 還元酵素	35	ストロマ側表在性, FAD 結合
<i>petJ</i>	チトクロム C_{553}	9	ルーメン側表在性, 移動性電子伝達成分, 高等植物にはなし
...			
ATP 合成酵素複合体			
<i>atpA</i> (C)	α サブユニット	55	$CF_1(\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1)$ としてストロマ側表在性
<i>atpB</i> (C)	β サブユニット	54	$CF_1(\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1)$ としてストロマ側表在性, 活性中心
<i>atpC</i> (N)	γ サブユニット	36	$CF_1(\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1)$ としてストロマ側表在性, 酸化還元
<i>atpD</i> (N)	δ サブユニット	20	$CF_1(\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1)$ としてストロマ側表在性, CF_0 と結合
<i>atpE</i> (C)	ϵ サブユニット	15	$CF_1(\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1)$ としてストロマ側表在性
<i>atpF</i> (C)	サブユニット I	21	$CF_0(I_1II_1III_{10-12}IV_1)$, 膜貫通性, CF_1 結合部位
<i>atpG</i> (N)	サブユニット II	16	$CF_0(I_1II_1III_{10-12}IV_1)$, 膜貫通性, CF_1 結合部位
<i>atpH</i> (C)	サブユニット III	8	$CF_0(I_1II_1III_{10-12}IV_1)$, 膜貫通性, H ⁺ 通過穴形成
<i>atpI</i> (C)	サブユニット IV	25	$CF_0(I_1II_1III_{10-12}IV_1)$, 膜貫通性

* 高等植物においては, (N):核支配, (C):葉緑体支配。現在, データベースに登録されているのは, *psa* は *N* まで, *psb* は *X* まで, *pet* は *M* までである。なお, *psbG* は *ndhK* に変更, *petI* は未登録, *petK* は *psbV* に変更。

** *psbV*, *petJ* を除き, 代表的なホウレンソウでの値を成熟タンパク質として示した。

system I), *psb* (photosystem II), *pet* (photosynthetic electron transport), および *atp* (ATPase) とされている。また、クロロフィル *a/b* 結合タンパク質は PS I, PS II に結合しているものをそれぞれ *lhca* (light-harvesting chlorophyll *a/b* complex I) および *lhcb* (light-harvesting chlorophyll *a/b* complex II) と呼ぶ(表 5.1)。なお、光化学系の遺伝子群の命名は、植物葉緑体の遺伝子の命名に起因しているため、ラン藻に特異的な遺伝子はこれらの命名規程に従わないことが多い。しかし、昨今のようにラン藻と紅藻などの類縁関係(細胞内共生説)が明らかになり¹⁶⁾、しかもラン藻の光化学系に關与する遺伝子のほとんどが紅藻や高等植物に普遍的に存在する事実を考慮すれば、再考が必要であろう。実際に、機能が明らかにされている光化学系のタンパク質の多くは、主にラン藻を用いて、遺伝子破壊、アミノ酸置換などによる変異株の解析、および *in vitro* 再構成などの実験によるところが大きい。また、1993 年に国際植物分子生物学会植物遺伝子命名委員会により、細胞核にコードされる遺伝子は遺伝子名の 1 文字目を大文字として、葉緑体およびミトコンドリア DNA にコードされる遺伝子は小文字として表記することが推奨されたが¹⁷⁾、本節においては、ラン藻の遺伝子も含むため、必ずしもこの規程に従っていない。

I) 光化学系 I (PS I) のタンパク質と遺伝子
psa 遺伝子は現在、*psaA*~*psaN* まで 14 種類、および PS I に結合しているアンテナクロロフィルタンパク質が 4 種同定されており、ほぼ全容が明らかになっている。なお、ラン藻では植物と共通なものが 10 種クローニングされているが、それら以外のもは存在していない。したがって、アンテナ色素の部分を除き、PS I の複合体の基本は植物とラン藻で同じと考えられる。現在、好熱ラン藻の PS I 複合体が結晶化され、すでに 4.5 Å の解像度で解析されており、さらにくわしい解析が進行中である¹⁸⁾。PS I は、光エネルギーによりプラストシアニンから受け取った電子をフェレドキシンに伝え、NADPH の生成を促す一方で、チトクロム *b₆/f* にも電子を渡す(ATP 合成のための環状電子伝達)。*psaA* および *psaB* の産物である PS I-A と PS I-B はたがいに低い相同性があり、膜を貫通するヘテロダイマーを形成し、電荷分離をする P 700 や初期電子受容体(クロ

ロフィル *a* や鉄-硫黄センター X など)を配置している。PS I-C および PS I-D はフェレドキシンへの電子の伝達に必要で、鉄-硫黄センター A/B も含めて *in vitro* で再構成することができるので、変異タンパク質を用いて機能部位の探索がなされている¹⁶⁾。ラン藻での遺伝子破壊実験から、*psaE* および *psaM* は環状電子伝達に、*psaL* は複合体の三量体形成に必要であることが示されている。

II) 光化学系 II (PS II) のタンパク質と遺伝子
psb 遺伝子は現在までに、*psbA*~*psbX* (ただし、*psbG* は空番)の 23 種、およびアンテナクロロフィルタンパク質が 6 種同定されているが、今後さらにいくつか増えそうである。これらのうち、高等植物で確認されているものは、*psbU* と *psbV* を除く 21 種であり、ラン藻では 18 種ある。PS II は外部アンテナ複合体、内部アンテナ、光化学反応中心複合体、および酸化還元反応を行う領域などに分かれ、非常に多くのサブユニットからなる複雑なタンパク質超複合体を形成しており、強い界面活性剤処理などによってさらに外部アンテナ複合体、コア複合体、および反応中心複合体などのサブ複合体に分離される。このように PS II 複合体は複雑かつ不安定なため、その構造解析は遅れているが、反応中心は、PS I 同様たがいに低い相同性を有する D1 および D2 タンパク質のヘテロダイマーが膜を貫通し、電荷分離をする P 680 や初期電子受容体(フェオフィチン *a* や *Q_A* および *Q_B* キノン)を配置している。この基本構造は、結晶解析が進んでいる紅色光合成細菌の光化学反応中心の L/M サブユニットヘテロダイマーに非常によく似ていると考えられている¹⁹⁾。PS II の反応は、光エネルギーにより水分子から電子を引き抜き(酸化)、プラストキノンへ伝えることである。この水分解反応は光合成細菌にはないユニークな機能で、反応中心に結合している 4 原子マンガンのクラスターの酸化還元が関与している。

ラン藻を使って、反応中心の *psbA* および *psbD* 遺伝子への徹底的な変異導入により、D1 タンパク質上の特定の残基がマンガンクラスターのいくつかの結合部位として推定されている。*psbA* にコードされる D1 タンパク質は C 末端に延長ペプチドをもった前駆体として合成され、そのままでも複合体に取り込まれるが、延長ペプチドのプロセッシングを受けて初めて水分解活性が発現する。この C 末端プ

ロセッシング酵素は、ラン藻を用いた遺伝学的解析においては CtpA として²⁰⁾、またホウレンソウを用いた生化学的解析²¹⁾により同定されている。しかしながら、延長ペプチドを遺伝子操作で取り除いたクラミドモナス (*Chlamydomonas*) やラン藻の生育に変化はなく、その生理的な意義は今後の課題である。高等植物や緑藻で水分解系に働いている表在性の PS II-P、PS II-Q はラン藻や有色藻では見つかっておらず、代わりにチトクロム *c550* などの別の表在性タンパク質がある。系 II は光による特異的な阻害を受けやすく、D1 が他の PS II タンパク質よりも非常に速い代謝回転をしている。葉緑体でのタンパク質合成をパルスラベル法で解析すると、多量に存在する RuBisCO 以上に D1 は合成されている。つまり、*psbA* のプロモーターは葉緑体やラン藻において最も強力なもので、外来遺伝子の発現にもよく利用されている。D1 は多数のサブユニットからなる PS II 複合体の中心にあると考えられるが、損傷を受けた D1 の除去と新規合成されたものの再集合過程はまだよくわかっていない。PS II は主にチラコイド膜のグラナに局在するのに対し、膜結合型ポリソームによる D1 合成はストロマラメラで起こっているため、損傷を受けた複合体または新規合成された D1 の膜内での移動が必要である。D1 の光損傷の主な原因は、過剰な電子伝達の結果、電子の蓄積もしくは電荷分離後の再結合によって引き起こされる活性酸素の発生だと考えられている。ラン藻では、*psbA* は 3~4 個あり、翻訳されるタンパク質として、強い光強度の下で発現するものと弱い光強度で発現するものに分けられる。前者は光耐性に必須であると考えられるが、その機構はよくわかっていない。なお、ラン藻では *psbD* も 2 つあり、*psbA* と同様光強度に依存して発現調節を受けており、他の PS II および PS I を構成する成分の遺伝子が 1 コピーずつしかないことは対照的である。一方、植物ではこれらの遺伝子は 1 コピーずつしかなく、発現の制御機構はラン藻と異なっていると思われる。これまで、部位特異的突然変異により、D1 タンパク質の一次構造と光耐性(または感受性)の関係が研究されてきた。しかしながら、構造と機能に関する知見がない新しい形質をタンパク質に付与するためのアミノ酸置換の予測は不可能に近い。この問題点を克服するために、ラン藻の *psbA* に試験管内でラン

ダムに変異を導入後、ラン藻に戻し、強光下で生育するラン藻形質転換株を選抜することにより、光耐性 D1 タンパク質が作出された²²⁾。

Ⅲ) チトクロム *b₆/f* 複合体 チトクロム *b₆/f* 複合体は、光化学系 II 由来の電子をプラストキノンから受け取り、プラストシアニン経由で PS I に渡し、H⁺ を輸送している。遺伝子は、*petA*~*petD* を含む少なくとも 6 個あり、呼吸系のチトクロム *bc₁* 複合体とよく似た構造をしている。遺伝子の上では、呼吸系のチトクロム *b* に相同なものが、*petB* と *petD* に分割されているのが特徴である。ラン藻ではチトクロム *b₆/f* はチラコイド膜上の呼吸鎖にも必須で、その遺伝子の操作にはいまだ成功していない。したがって、その機能部位の推定はよく研究されている呼吸系のチトクロム *bc₁* の解析によるものが多い。しかし、チトクロム *b₆/f* は環状電子伝達にも働いており、今後は遺伝子操作が可能な高等植物やクラミドモナスを用いた解析が期待される。

移動性の電子伝達成分であるプラストシアニンは高等植物からラン藻まで広く分布しているが、ラン藻や真核藻類では培地中の銅が不足すると、チトクロム *c553* を発現し代替する。銅不足によるプラストシアニンの消失は、転写または翻訳後の安定化の段階で調節されており、一方、チトクロム *c553* の場合は転写の活性化による²³⁾。また、鉄不足によって鉄-硫黄センターをもつフェレドキシンが FMN をもつフラボドキシンに代替されることがラン藻や真核藻類で知られている。

Ⅳ) アンテナクロロフィル *a/b* タンパク質

高等植物の遺伝子は核にコードされ、複雑な遺伝子ファミリーを形成し、その多くはクラスターをなす²⁴⁾。これは、効率的な光捕集と過剰な光エネルギーの解消のために適応進化したためと考えられる。つまり、PS I、PS II に強く結合したアンテナと光条件に応じてリン酸化され光化学系間を移動するものに分化している。系統関係は必ずしもたどれないが、よく似た遺伝子ファミリーは緑藻やユーグレナにもある。一方、クロロフィル *b* をもたない有色藻や紅藻でも、少なくとも PS I には高等植物のクロロフィル *a/b* 型と相同なタンパク質がいくつか検出されており、進化的に興味深い。

Ⅴ) ラン藻と植物の違い 植物においては、光化学系の遺伝子は核 DNA および葉緑体 DNA にコ

ードされており、葉緑体への遺伝子導入は、クラミドモナス¹⁰ およびタバコ¹¹ において成功例はあるものの、細胞核への導入にくらべて困難である。一方、原核生物であるラン藻は、遺伝子破壊あるいはアミノ酸置換などの遺伝子操作において高等植物よりも有利である。しかしながら、特定の遺伝子进行操作した変異株の表現型は、ラン藻とクラミドモナスで非常に異なる場合がある。反応中心の重要なアミノ酸を置換した場合や特定のサブユニットの遺伝子を破壊したとき、ラン藻ではその直接の影響だけが現れるのに対し、クラミドモナスでは光化学系複合体全体が消失することがある。これは、異常タンパク質の検出および除去システムがクラミドモナスでよく発達しているためと考えられ、遺伝子操作の結果の解釈には注意が必要である。

b) 光合成 CO₂ 固定系の酵素と遺伝子

基本的な光合成 CO₂ 固定反応系である Calvin-Benson 回路において、CO₂ を固定する酵素が、RuBisCO であり、この遺伝子とその発現については詳細に研究されている²⁵。この酵素には2つの酵素活性があり、光の存在下で酸素を消費して、CO₂ を放出する光呼吸(グリコール酸経路)へ導く初発段階も触媒する。Calvin-Benson 回路に介在する重要な大半の酵素の遺伝情報が解析されている(表 5.2)。カーボニックアンヒドラーゼ(炭酸脱水酵素)は、高等植物においては、主として葉緑体ストロマに局在し、RuBisCO への CO₂ 供給の役割を果たしているが、ラン藻⁵⁷ やクラミドモナス⁵⁸ においては、periplasmic space(原形質膜と細胞壁の間)においても機能していると考えられている。一方、CO₂ 輸送系を欠損したラン藻(*Synechocystis* 6803)の変異相補により、CO₂ 輸送にかかわる光依存性プロトン放出を支配すると考えられる *cotA* 遺伝子がクローニングされた⁵⁹。この遺伝子は遺伝子産物が葉緑体内膜に存在する葉緑体遺伝子 *cemA* と高い相同性を示したため、葉緑体における CO₂ 能動輸送系の介在を示唆する点において興味深い。トリオースリン酸/リン酸トランスロケーターにより、Calvin-Benson 回路の中間体である 3-ホスホグリセリン酸およびジヒドロキシアセトンリン酸はサイトゾルに輸送され、サイトゾルに局在する Calvin-Benson 回路に介在するいくつかの酵素と共通の活性を有するアイソザイムによりフルクトース-6-リン酸となった後、シ

ョ糖合成酵素⁶⁰ によりショ糖となり、シンク組織に転流される⁶¹。一方、Calvin-Benson 回路の中間体であるフルクトース-6-リン酸からのデンプン合成は、葉緑体を含むプラスチドにおいて行われる^{61,62}。

光照射に依存して O₂ を吸収し CO₂ を排出する光呼吸は、グリコール酸経路^{61,62} に起因する。光呼吸は、光化学系により固定された光エネルギーの無駄使いにあたるが、3種類の阻害剤によるグリコール酸経路の阻害⁶³、また、ホスホグリコール酸ホスファターゼ欠失シロイヌナズナ突然変異体の解析¹² の結果、光呼吸の低下は光合成 CO₂ 固定効率の増大につながらないことが明らかにされている。一方、葉緑体に局在するグルタミン合成酵素活性を増大させることにより、グリシン脱炭素酵素によりミトコンドリアにおいて生産されるアンモニア(NH₃)が円滑に除去され、かつ、グリコール酸からグリシンの変換に必要なグルタミン酸の供給および生成される α -ケトグルタル酸の消費が促進されるため、グリコール酸経路の代謝が活性化され、結果的に光障害が軽減されることが示された⁶⁴。

CO₂ 固定の初期産物が4炭素ジカルボン酸(オキサロ酢酸、リンゴ酸など)である場合は、C₄ 経路と呼ばれる。この際、CO₂(HCO₃⁻として)を固定する酵素がホスホエノールピルビン酸(PEP)カルボキシラーゼである。PEPカルボキシラーゼの HCO₃⁻ に対する親和性が高いため、Calvin-Benson 回路のみによる CO₂ 固定反応(これは CO₂ 固定の初期産物が3炭素カルボン酸であるため、C₃ に対して C₃ と呼ばれる)より CO₂ 固定効率が高い。C₄ 経路には、NADP-リンゴ酸酵素(NADP-ME)型、PEPカルボキシキナーゼ(PCK)型、および NAD-リンゴ酸酵素(NAD-ME)型の3タイプがあり^{61,62,65}、NADP-ME 型のトウモロコシについては、経路に介在する4種類すべての酵素の遺伝情報が解析されている(表 5.2)。また、乾燥地における光合成に有利な crassulacean acid 代謝(CAM)においても、C₄ 経路と同様に、PEPカルボキシラーゼによって CO₂ が固定される。CAM 植物は、夜間に気孔を開平して HCO₃⁻ を固定し、リンゴ酸として液胞に蓄積する。昼間に光化学系から供給されるエネルギーを利用して、リンゴ酸に由来する CO₂ を Calvin-Benson 回路により再固定する^{61,62,65}。サボテンギク(*Mesembryanthemum crystallinum*, ice plant)は、塩ストレ

表 5.2 解析されている高等植物の光合成 CO₂ 固定系の遺伝子*1

遺伝子*2	酵 素	細胞内局在	生物種	遺伝子*3 ファミリー メンバー	アミノ酸残基数		文献
					コード領域	最終産物*4	
Calvin-Benson 回路							
<i>rbcl</i> (C)	リブローズ-1,5-二リン酸 カルボキシラーゼ/ オキシゲナーゼ (RuBisCO) 大サブユニット	葉緑体 ストロマ	タバコ		477	473	26, 27
<i>RbcS</i> (N)	RuBisCO 小サブユニット	葉緑体 ストロマ	シロイヌナズナ	<i>RbcS-1A</i> <i>RbcS-1B</i> <i>RbcS-2B</i> <i>RbcS-3B</i>	180 181 181 181	125 126 126 126	28
<i>Pgk</i> (N)	ホスホグリセリン酸 キナーゼ	葉緑体 ストロマ	ホウレンソウ		433	405	29
<i>Gap</i> (N)	NADP- グリセルアルデヒド リン酸 脱水素酵素	葉緑体 ストロマ	タバコ	<i>GapA</i> <i>GapB</i>	492 439	336 385	30
<i>Tri</i> (N)	トリオースリン酸 イソメラーゼ	葉緑体 ストロマ	ホウレンソウ		322	255	31
<i>Fba</i> (N)	フルクトース二リン酸 アルドラーゼ	葉緑体 ストロマ	ホウレンソウ		394	348	32
<i>Fbp</i> (N)	フルクトース ビスホスファターゼ	葉緑体 ストロマ	シロイヌナズナ		417	359	33
<i>Sbp</i> (N)	セドヘプツワロース ビスホスファターゼ	葉緑体 ストロマ	シロイヌナズナ		393	328~334	34
<i>Prk</i> (N)	ホスホリプロ キナーゼ	葉緑体 ストロマ	シロイヌナズナ		395	349	35
補助代謝							
<i>Ca</i> (N)	カーボニック アンヒドラーゼ (炭酸脱水酵素)	葉緑体 ストロマ	シロイヌナズナ		336	223	36
<i>Rca</i> (N)	RuBisCO 活性化酵素	葉緑体 ストロマ	シロイヌナズナ		474(446)		37
<i>Tpt</i> (N)	トリオースリン酸/ リン酸 トランスロケター	葉緑体 包膜	トウモロコシ		409	324	38
デンプン合成							
<i>Pgm</i> (N)	ホスホグルコムターゼ	葉緑体 ストロマ	ホウレンソウ		584	529	39
<i>AgpS</i> (N)	ADP-グルコース ピロホスホリラーゼ 小サブユニット	葉緑体 ストロマ	ポテト		521		40
グリコール酸経路							
(N)	グリコール酸 酸化酵素	ペロキシソーム	ホウレンソウ		369		41
(N)	グリシン 脱炭酸酵素 H タンパク質	ミトコンドリア	シロイヌナズナ		165	131	42
(N)	ヒドロキシビルビン酸 還元酵素	ペロキシソーム	キュウリ		382		43
C. 経路							
<i>Ppc</i> (N)	PEP カルボキシラーゼ	サイトゾル	トウモロコシ		970		44

(N)	NADP-リンゴ酸 脱水素酵素	葉緑体 ストロマ	トウモロコシ		432	375	45
<i>Me</i> (N)	NADP-リンゴ酸酵素	葉緑体 ストロマ	トウモロコシ	<i>Me1</i>	636		46
<i>Pdk</i> (N)	ピルビン酸, Pi ジキナーゼ	葉緑体 ストロマ	トウモロコシ		947	876	47
<i>AspAT</i> (N)	アスパラギン酸 アミノ基転移酵素	サイトゾル ミトコンドリア	キビ	<i>cAspAT</i> <i>mAspAT</i>	409 428	400	48, 49
<i>AlaAT</i> (N)	アラニン アミノ基転移酵素	サイトゾル	キビ	<i>AlaAT-2</i>	482		50
<i>Me</i> (N)	NAD-リンゴ酸酵素	ミトコンドリア	ヒユ (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)		623	592	51
CAM							
<i>Ppc</i> (N)	PEP カルボキシラーゼ	サイトゾル	サボテンギク (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>)	<i>Ppc1</i>	966		52
(N)	NADP-リンゴ酸 脱水素酵素	葉緑体 ストロマ	<i>M. crystallinum</i>		441		53
<i>Me</i> (N)	NADP-リンゴ酸酵素	葉緑体 ストロマ	<i>M. crystallinum</i>		585		54
<i>Gap</i> (N)	NAD- グリセルアルデヒド リン酸 脱水素酵素	サイトゾル	<i>M. crystallinum</i>		337		55

- * 1 解析されているすべての遺伝子種の網羅に努めたが、生物種については、それらが解析されている代表的な1種に限定して収録した。これらは、その遺伝子あるいはcDNAが報告された最初の生物種とは限らず、くわしく解析されているもの、また、同等にくわしく解析されている場合は、ゲノムDNA塩基配列の解析が進んでいる双子葉植物シロイヌナズナを優先的に収録した。
- * 2 光化学系の遺伝子(表5.1)のように命名規定が提案されていないため、引用文献に記載されている遺伝子名あるいは慣用名を示した。それらが見当たらない場合は、空白となっている。国際植物分子生物学会植物遺伝子命名委員会の規定¹⁸⁾に従い、細胞核にコードされている遺伝子は遺伝子名の1文字目を大文字とし、葉緑体DNAにコードされている遺伝子は小文字として表記した。遺伝子(N):核支配、(C):葉緑体支配。
- * 3 報告されていない場合は、未記入となっている。したがって、未記入は、必ずしもゲノム上の単一遺伝子の存在を意味するとは限らない。
- * 4 翻訳産物のN末端が切断された最終産物のアミノ酸残基数を示す。細胞核遺伝子の最終遺伝子産物が葉緑体などのオルガネラに局在している場合は、そのmRNAは細胞質リボソームで翻訳され、翻訳産物のN末端のシグナルペプチド(transit sequence)により葉緑体あるいはミトコンドリアに輸送される。この際、これらオルガネラ包膜を通過する際にtransit sequenceが切断される。一方、本表に収録されているペルオキシソームに局在する酵素は、C末端の3アミノ酸がそのオルガネラへの輸送に必要な配列であると考えられており、これらは輸送後も切断されない⁶⁶⁾。最終産物がサイトゾルに局在するタンパク質の場合は、輸送先オルガネラを認識する配列は存在しないと考えられる。最終産物が葉緑体あるいはミトコンドリアに局在する核遺伝子であり、かつ最終産物アミノ酸残基数が未記入になっているのは、transit sequenceが報告されていない場合であり、これらは、必ずしもtransit sequenceがないことを意味するのではない。

スによりCAMが誘導されることが知られており、この代謝変化の制御機構に興味を持たれる。したがって、サボテンギクにおけるCAMに介在する酵素の遺伝子解析が進んでいる(表5.2)。

ラン藻の光合成CO₂固定反応系に介在する酵素および機能タンパク質の遺伝情報の多くは、光合成細菌における光化学系の遺伝子¹⁴⁾と同様に、クラスターをなしていることが、近年明らかにされている¹⁶⁾。すなわち、ラン藻(*Synechococcus*)において、

NADH-脱水素酵素、RuBisCOの大および小サブユニット、およびカーボニックアンヒドラーゼを含むCO₂濃縮およびCO₂固定に関与すると考えられる、少なくとも16のコード領域からなるクラスターが発見され解析された¹⁶⁾。一方、高等植物においては、RuBisCO小サブユニット遺伝子(*RbcS*)の遺伝子ファミリーメンバーが隣接して存在することが知られている²⁸⁾。

(3) 光合成遺伝子発現制御機構

表 5.1 および表 5.2 に示したように、光合成遺伝子は細胞核と葉緑体の両ゲノムに分散してコードされている。植物細胞核遺伝子の発現の素過程は、他の真核生物のそれと基本的には共通である。いくつかの細胞核光合成遺伝子の発現は、植物に特有のフィトクロム系の制御下にあり、フィトクロムについては 4.1 節⁶⁶⁾ に詳説されている。一方、葉緑体遺伝子の発現についても、3.1 節⁶⁷⁾ を参照いただきたい。ここでは、それらとの重複をできるだけ避けて、光合成機能構築の制御機構について概説したい。

a) 核遺伝子

真核生物の核遺伝子は、その発生・分化の過程において転写段階での制御が顕著で、核光合成遺伝子発現についても転写制御機構に対する関心が高い。また、細胞質で合成された前駆体タンパク質の葉緑体への輸送、さらにチラコイド膜への挿入の機構は、葉緑体の光合成機能構築に特徴的な過程である。

1) 転写制御

① シグナル伝達 暗下で発芽させた黄化実生を弱光にさらすと、緑化に付随して光合成遺伝子の多くが発現してくることが知られている。また、この際、暗下における実生の伸長は、光により抑制される。この光形態形成が異常になり、暗下でも明下のように伸長が抑制されたシロイヌナズナ突然変異体が選抜された。これらは *det* (de-ethiolated⁶⁸⁾、以下、シロイヌナズナの遺伝子命名規定⁶⁹⁾ に従い、小文字は変異遺伝子発現産物、斜体小文字は変異遺伝子、大文字はその野生型遺伝子産物、斜体大文字は野生型遺伝子とする) および *cop* (constitutively-photomorphogenic)⁷⁰⁾ 突然変異と呼ばれている。これらの突然変異体においては、本来フィトクロムの関与で光により誘導される RuBisCO 小サブユニット遺伝子 *RbcS* およびクロロフィル *a/b* 結合タンパク質遺伝子 *Lhcb* (*Cab* とも呼ばれる) などいくつかの光合成遺伝子の発現も、暗下において明下のように促進された。これらの突然変異体においては、光により解除されるはずの本来の光合成遺伝子発現抑制機構が、突然変異により恒常的に低下あるいは欠失していると考えられる。これら変異遺伝子のいくつかはクローニングされている。それらのうち、COP1 は、G タンパク質 β サブユニットおよび DNA 結合 Zn フィンガーのそれぞれのドメインを

有していた⁷¹⁾。さらに、COP1 と相互作用をする CIP1 (COP1-interactive protein 1) の cDNA が取られている⁷²⁾。CIP1 は、胚軸および子葉の細胞骨格に関係するタンパク質であると考えられ、それらの組織においては COP1 が CIP1 との親和性により細胞質に移行するため、核における光合成遺伝子を含む光形態形成遺伝子発現が進行すると考えられている⁷²⁾。また、DET1⁷³⁾ および COP9⁷⁴⁾ は、細胞核への局在を示唆するドメインを有したが、それ以外に機能に関連すると考えられる構造を示さなかった。また、シロイヌナズナにおいて、暗下においても明下のように葉が発達する *diminuto* (*dim*) 変異が報告されており、*DIM* 遺伝子産物は核移行シグナルをともなっていることが明らかにされた⁷⁵⁾。さらに、形態形成の異常をともなわずに *Cab* 遺伝子が暗下で発現する *doc* (dark-overexpression of *Cab*) が知られている⁷⁶⁾。

このように突然変異を用いた分子遺伝学的解析と並行して、細胞内シグナル伝達ネットワークの阻害剤などを用いた研究が進展している。促進型 G タンパク質 (G_s) を GTP 結合型に留めるコレラ毒素および抑制型 G タンパク質 (G_i) を GDP 結合型に維持する百日咳毒素(したがって、ともにアデニル酸シクラーゼを活性化状態に保つ)、またカルモジュリン拮抗阻害剤 W-7 を用いた実験から、ダイズ独立栄養培養細胞における *Cab* 遺伝子の光依存性発現には、これらシグナル伝達因子の介在が示唆された⁷⁷⁾。フィトクロム (PhyA) 欠失トマト突然変異体 (*aurea*) の胚軸にマイクロインジェクションにより各種シグナル伝達因子を注入し、レポーター遺伝子により *Cab* の発現をモニターする方法により、異種三量体 G タンパク質、カルシウム、カルモジュリン、および cGMP が、野生体におけるフィトクロムによる *Cab* 遺伝子発現シグナル伝達経路に介在していることが示された⁷⁸⁾。トウモロコシ葉肉細胞プロトプラストを用いたレポーター遺伝子のエレクトロポレーション一過性発現実験においてオカダイン酸を用いることにより、 C_4 経路の酵素であるピルビン酸、Pi ジキナーゼの遺伝子 (*Pdk*) の光誘導発現にはタンパク質ホスファターゼが関与していることが示された⁷⁹⁾。

自然界において、光合成系は太陽光に依存し昼間機能する。光化学系の構築もそれに合わせて概日性

を示す。とくに、*Cab* の転写活性の概日性は顕著である。シロイヌナズナを用い、*Cab* 転写の概日性が異常になった突然変異体 *toc* (timing of *Cab* expression) が選抜されている⁸⁰⁾。

Cab など核にコードされる光合成遺伝子は、葉緑体の発達に同調して発現することが知られている。すなわち、葉緑体の発達をカロチノイド合成の阻害剤である norflurazon を用いて抑制すると、*Cab* の発現も低下する。この種の葉緑体からのシグナルによる光合成核遺伝子発現の制御機構が異常になった *gun* (genomes uncoupled) シロイヌナズナ突然変異体が選抜されている⁸¹⁾。高等植物における遺伝子の組織特異的発現の制御機構はきわめて興味深い。*RbcS* および *Cab* のシロイヌナズナ根における低発現は、主として転写段階で制御される⁸²⁾。その制御機構が異常をきたし、*RbcS* が根で野生体の 30~50 倍発現するようになった *res* (root expression of *RbcS*) シロイヌナズナ突然変異体⁸³⁾、あるいは葉での発現量が著しく低下した *des* (depressed expression of *RbcS*) 突然変異体⁸⁴⁾ が選抜されている。

② 転写制御(調節)因子 トマトの *RbcS* 遺伝子コード領域の上流には、L-box, I-box (GA-1), GATA (ASF-2), Gbox (GBF), box II (GT-1), CAAT box, LRE, TATA box (TFIID), および A-T rich 領域 (AT-1 および 3 AT-1) の各シスエレメント(カッコ内はそれに対するタンパク質結合因子)の存在が報告されている⁸⁵⁾。これらのタンパク質因子のうち、ASF-2⁸⁶⁾、GBF^{87,88)}、GT-1⁸⁹⁾、TFIID⁹⁰⁾、および 3 AT-1⁹¹⁾ の cDNA がクローニングされている。GBF (G-box-binding factor) は bZIP タンパク質ファミリーに属しており、シロイヌナズナから 4 種類 (GBF 1, GBF 2, GBF 3, および GBF 4)⁸⁷⁾、またトマトから 3 種類 (GBF 4, GBF 9, および GBF 12)⁸⁸⁾ がクローニングされている。アオウキクサ (*Lemna gibba*) の *RbcS* プロモーターに結合する LRF-1 も報告されている⁹²⁾。また、シロイヌナズナ形質転換体を用いた実験より、タバコ CGF-1 (*Cab* GATA factor 1) は、シロイヌナズナ *Cab* 2 遺伝子発現のフィトクロームによる活性化また概日性制御において重要な役割を演じていることが明らかになった⁹³⁾。

C₄ 植物トウモロコシでは、C₄ 経路に介在するリンゴ酸酵素以外の酵素および PS II は葉肉細胞に、Calvin-Benson 回路の酵素は維管束鞘細胞に局在

する。C₄ 経路の PEP カルボキシラーゼ⁹⁴⁾ およびピルビン酸、Pi ジキナーゼ^{95,96)}、また PS II の *Cab* 産物⁹⁷⁾、各々の葉肉細胞特異的発現に必要なシスエレメントが解明されている。トウモロコシの PEP カルボキシラーゼ⁹⁴⁾ およびピルビン酸、Pi ジキナーゼ⁹⁶⁾ 遺伝子それぞれのプロモーターの制御下に置いたレポーター遺伝子は、C₃ 植物であるイネの形質転換後においても葉肉細胞特異的に発現するため、細胞特異的な転写を制御する因子は単子葉植物において共通に存在する可能性が示唆される。また、トウモロコシ *RbcS* の維管束鞘細胞特異的発現を制御するシスエレメントについても解析されている^{97,98)}。

転写制御因子の同定は、主として DNA とタンパク質の結合実験にもとづいているが、DNA に結合するタンパク質が転写を制御しているとは限らない。この種の方法論的限界を克服するためには、*in vitro* 転写系の開発が不可欠である。タバコ培養細胞 BY-2 から調製された *in vitro* 転写系を用い、*RbcS* の転写に必要な因子が明下生育トマトの実生に由来する核抽出物に存在することが示され、またそのシスエレメントが解析されている⁹⁹⁾。

③ DNA 鋳型活性の変化による制御 *RbcS*, *Cab*, および PS II-O タンパク質遺伝子 (*PsbO*) の転写産物は、シカモアカエダ白色培養細胞においては検出されず、緑色培養細胞において多い¹⁰⁰⁾。 [³H] ウリジンをういた細胞 RNA のパルス-チェイス標識実験より、シカモアカエダ白色培養細胞における低転写産物量は低転写活性に起因することが見出された¹⁰¹⁾。緑色培養細胞核純化 DNA を鋳型として、ヒト培養細胞 (HeLa 細胞) 抽出液を用いた *in vitro* 転写実験が行われたところ、*RbcS*, *Cab*, および *RsbO* はすべて転写された。白色培養細胞核 DNA の場合は、対照としてのアクチン遺伝子以外、3 種類の光合成遺伝子は転写されなかった¹⁰⁰⁾。これらの実験から、転写を制御する因子は DNA に内在すると考えられた。細胞核 DNA のメチル化部位認識制限酵素処理とそれに引き続くサザンハイブリダイゼーション実験により、両培養細胞系において、*RbcS*, *Cab*, および *PsbO* は同一の制限酵素認識部位を有するが、そのいくつかは白色培養細胞においてはメチル化されていることが明らかになった¹⁰⁰⁾。したがって、非光合成植物培養細胞において、光合成核遺伝子は DNA メチル化によりその発現が抑制されてい

ると考えられる。一方、 C_4 植物において、PEPカルボキシラーゼおよびピルビン酸、Piジキナーゼ遺伝子は葉肉細胞特異的に、また *RbcS* は維管束鞘細胞特異的に発現している。トウモロコシの場合、これらは主として転写段階で制御されており、PEPカルボキシラーゼおよびピルビン酸、Piジキナーゼ遺伝子は維管束鞘細胞において、*RbcS* は葉肉細胞においてそれぞれ遺伝子が部分的にメチル化されていることが明らかになった¹⁰²。したがって、 C_4 経路酵素遺伝子の細胞特異的発現の制御にも、DNAメチル化が介在する可能性が考えられる。

II) 転写後の制御 グリコール酸経路に介在するヒドロキシピルビン酸還元酵素は、緑葉ペルオキシソームに局在する。本酵素はサイトゾルで合成された後、C末端のSer-Lys-Leuという認識配列によりペルオキシソームに局在化すると考えられる^{43,56}。alternative splicingによりC末端が異なる少なくとも2種類のmRNAが合成され、その一方の産物のみがペルオキシソームに輸送されることが示唆された¹⁰³。

植物においても、mRNAは主として3'側から分解され、したがって、3' poly(A)がmRNAの安定化に重要であると考えられている¹⁰⁴。ダイズ実生においては、*RbcS* mRNAは暗所において安定であり、一方、成熟葉では明所において安定であることが報告されている¹⁰⁵。また、暗黒下に置いたポテト *RbcS* mRNAの消失速度は、*RbcS* 遺伝子ファミリーメンバーにより異なることが示唆されている¹⁰⁶。

転写産物の分解は、翻訳とカップルしている場合が知られており、ダイズ *RbcS* mRNAの分解産物はポリソームと結合することが報告されている¹⁰⁷。したがって、この場合、mRNAの消失を司る成分はポリソーム中にあると考えられる。また、ヒユ(*Amaranthus hypochondriacus*)の *RbcS* mRNAは明下でポリソームに結合するが、暗下では結合せず、翻訳開始が光により制御されると考えられる¹⁰⁸。

III) 葉緑体への輸送とチラコイド膜への組み込み 1970年代の後半になり、コムギ胚芽抽出液あるいはウサギ網状赤血球溶血液(葉緑体mRNAの翻訳には大腸菌抽出液S-30)を用いた *in vitro* 翻訳系が利用可能となった。この種の方法論により、RuBisCOの小サブユニットが最終産物よりも分子量の大きい前駆体として合成されることが明らかにされた¹⁰⁹。

前駆体はN末端にtransit sequence(transit peptide, 小胞体膜を通過するタンパク質のシグナルペプチドと機能的には類似するが構造を異にする)と呼ばれる葉緑体への輸送に必要な配列を含み、またこのtransit sequenceは葉緑体包膜を通過時に切断されることが1979年に報告された^{110,111}。その後、多くの研究者によってtransit sequenceと相互作用するであろう葉緑体包膜に想定されるレセプターの解析が試みられたが、その全貌の解明は近年まで待たなければならなかった。

試験管内の反応あるいは大腸菌を用いた合成により、RuBisCO小サブユニット前駆体に放射性標識あるいはアフィニティーカラムによる精製に必要なペプチドを付加し、本前駆体を単離葉緑体と短時間混合後、可溶化、分画、さらにアフィニティーカラムにより結合タンパク質複合体が精製された^{112,113}。その結果、小サブユニット前駆体と複合体を形成するタンパク質は、葉緑体外包膜から4種、内包膜から2種が同定された^{112,113}。包膜の通過とtransit sequenceの切断過程は図5.1のように説明される。すなわち、まず、前駆体transit sequenceが86kDのIAP(import intermediate-associated protein)86を認識する。次に、外膜チャンネルタンパク質であるIPA75と結合し、さらに外膜と内膜が接触した小サブユニット通過のための構造がつけられる。これらの過程はATP依存性であると考えられ¹¹⁴。その際、分子シャペロンであるhsp70 IAPが重要な役割を果たしていると考えられる¹¹³。なお、IAP86およびIAP34は、GTP結合タンパク質であり¹¹⁵、GTPの加水分解がこれらの過程に関与している可能性が考えられる。引き続き、内膜のIAP100チャンネルタンパク質を通過する¹¹³。transit sequenceは膜通過の途上、ストロマのプロセッシング酵素により切除される。葉緑体に輸送されるタンパク質のtransit sequenceには共通の構造が見出され^{116,117}。また、フェレドキシン前駆体もRuBisCO小サブユニット前駆体と同一の分子量のIAPタンパク質群と結合するため¹¹³、葉緑体に輸送されるすべてのタンパク質前駆体は同一の膜透過装置により葉緑体内に取り込まれるものと考えられる。また、それら前駆体タンパク質のtransit sequenceは、共通のプロセッシング酵素により切除されると考えられている¹¹⁸。葉緑体チラコイド膜のルーメン(内腔)側に局在す

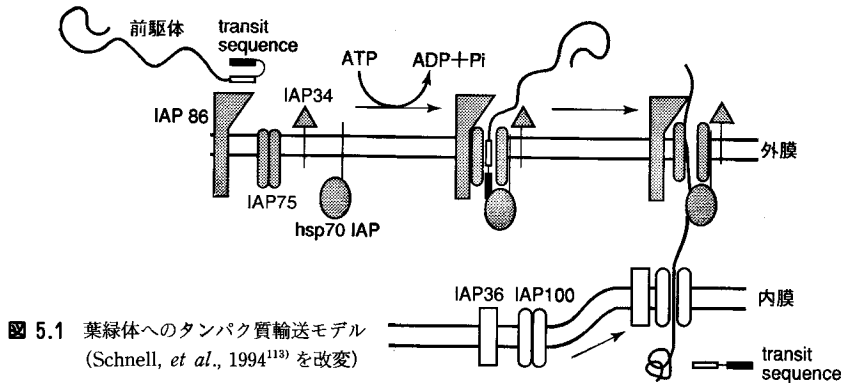


図 5.1 葉緑体へのタンパク質輸送モデル (Schnell, et al., 1994¹¹³⁾ を改変)

るタンパク質の場合は、さらにチラコイド膜を通過しなければならない。葉緑体包膜通過時の削除により形成された新しい N 末端は、チラコイド膜へのターゲットのシグナルとなり、ルーメン側に輸送後それらの配列は削除される¹¹⁹⁾。単離された葉緑体あるいはチラコイド膜を用いた実験により、これらのタンパク質のチラコイド膜通過の機構が解析されている。チラコイド膜通過に必要なエネルギー供給様式の違いから、異なる 3 種類の機構が介在すると考えられている^{120,121)}。第 1 の様式は、ATP およびチラコイド膜の H^+ 勾配に依存性であり、その例として、PS II-O^{122,123)} およびプラストシアニン¹²³⁾ があげられる。大腸菌のタンパク質膜輸送装置のアジ化物感受性構成成分タンパク質である SecA と免疫学的に相同と考えられているタンパク質が、エンドウ葉緑体¹²⁵⁾ およびラン藻 (*Synechococcus*)¹²⁴⁾ からそれぞれ検出および精製されている。SecA に対する抗体を用いた実験から、本 SecA 相同タンパク質は、PS II-O のチラコイド膜通過において重要な役割を果たしていると考えられる¹²⁴⁾。第 2 は、 H^+ 勾配のみに依存して膜通過する場合であり、この例としては、PS II-P^{122,126)} および PS II-Q¹²⁶⁾ が知られている。第 3 は、GTP に依存する場合であり、LHC II がそれに該当する¹²⁷⁾。小胞体膜におけるタンパク質輸送において知られている SRP (signal recognition particle) と同一性が高い 54 kD のタンパク質が、葉緑体において見出され SRP 54 と命名された¹²⁸⁾。これはチラコイド膜に挿入過程の LHC II と複合体を形成する¹²⁹⁾。したがって、第 3 の機構は、小胞体膜の SRP 経路と類似している可能性が高いと考えられる。

b) 葉緑体遺伝子

葉緑体遺伝子とそれらの発現については、3.1

節⁶⁷⁾で解説されているので、本節では葉緑体 DNA にコードされている光合成遺伝子に関し、発現から光合成の機能構築にいたる過程における制御機構について概説したい。

プラスチド (plastid, 色素体) の遺伝子発現には、遺伝子量、転写、転写後、翻訳、および翻訳後と考えるすべての段階の制御が介在している^{130,131)}。また、緑葉葉緑体における光合成遺伝子発現は、非光合成プラスチドとの対比あるいは非光合成プラスチドの変換過程において評価される。非光合成プラスチドとして、未分化組織のプロプラスチド (proplastid, 原色素体)、暗化生育黄化組織のエチオプラスチド (etioplast)、貯蔵組織 (塊茎、塊根、胚乳、子葉) あるいは植物培養細胞などにおける白色体 (leucoplast) およびその一種のアミロプラスチド (amyloplast)、さらに果実あるいは花卉などのクロモプラスチド (chromoplast, 有色体) があげられる¹³¹⁾。この種の非光合成プラスチドの多様性が、それらとの対比において議論される葉緑体光合成遺伝子発現の制御機構の一律な議論を困難にしていると考えられる。

1) DNA コピー数による制御 プラスチド DNA コピー数は高等植物種および組織によって大きく異なり、1 プラスチド当たり 8 コピー¹³²⁾ から 900 コピー¹³³⁾ が報告されている。また、1 細胞当たりのプラスチド数も大きく変化し、1 細胞当たりの葉緑体 DNA コピー数としては、約 6,000¹³⁴⁾ が上限と思われる。スイセンの葉組織葉緑体および花副冠クロモプラスチド¹³²⁾、ホウレンソウ混合栄養懸濁培養細胞の葉緑体およびアミロプラスチド¹³⁴⁾、オオムギ葉組織の葉緑体およびプロプラスチド¹³⁵⁾、エンドウの葉組織葉緑体および根や花卉などの非光合成プラスチド¹³⁶⁾、さらにシロイヌナズナ葉組織葉緑体および根

アミロプラスト¹³⁷⁾の比較において、それぞれの光合成緑色細胞当たりの葉緑体 DNA 量は非光合成細胞当たりのプラスチド DNA 量の 5 倍以上であった。これらの実験結果は、葉緑体 DNA にコードされている光合成遺伝子の発現が遺伝子量によって制御されていることを示唆している。しかしながら、光独立栄養、光混合栄養、および従属栄養条件下で生育させたダイズ培養細胞において、細胞当たりのプラスチド DNA 量は変化しなかった¹³⁸⁾。

葉緑体 DNA の複製開始点^{139,140)} および複製に必要な DNA ポリメラーゼなどの酵素¹⁴¹⁾ に関して研究されており、今後、複製の制御機構が明らかにされると考える。さらに、細胞当たりの葉緑体数を規定する制御機構に関し、シロイヌナズナ葉肉細胞には細胞当たり平均 121 個の葉緑体が存在するが、これが最低で 2 個まで減少した *arc* (accumulation and replication of chloroplasts) 突然変異体が選抜されている¹⁴²⁾。プラスチドは分裂により増殖するが、その際、分裂リングが観察される¹⁴³⁾。原核生物の細胞分裂においてリングを構成する FtsZ タンパク質は、チュープリンの起源であると考えられているが、シロイヌナズナから FtsZ の cDNA がクローニングされた¹⁴⁴⁾。その産物は transit sequence を有し、葉緑体に局在化することが明らかになった¹⁴⁴⁾。

II) 転写制御

① RNA ポリメラーゼ 葉緑体 DNA の転写に関与する RNA ポリメラーゼに関し、1971 年に DNA 依存性 mRNA 合成活性が葉緑体可溶性画分から検出されていた¹⁴⁵⁾。その後、*rpo* (RNA polymerase) 遺伝子群が葉緑体 DNA 上に見出されていたが^{7,8)}、これらの産物が葉緑体において機能しているかが議論的となった。葉緑体 RNA および poly (A)⁺RNA の試験内翻訳¹⁴⁶⁾、*rpo* 遺伝子群あるいは *rpoC2* に欠失があるそれぞれピーチドロップ (*Epifagus virginiana*)¹⁴⁷⁾ あるいはモロコシ¹⁴⁸⁾ の解析、さらに、高温によりあるいは遺伝的にプラスチドリボソームを欠失したオオムギ^{149,150)} あるいはライムギ¹⁵⁰⁾ におけるプラスチド RNA 合成実験により、葉緑体で機能している RNA ポリメラーゼは、細胞核にコードされていると考えられた。

一方、1990 年にトウモロコシ葉緑体から RNA ポリメラーゼが精製・純化され、それを構成するサブユニットの部分的アミノ酸配列が決定された¹⁵¹⁾。そ

の結果、サブユニット構造は、大腸菌 RNA ポリメラーゼ ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) と類似しているが、 β'' を含み $\alpha_2\beta\beta'\beta''\sigma$ であり、 α 、 β 、 β' 、 β'' 、 σ は、それぞれプラスチド遺伝子 *rpoA*、*rpoB*、*rpoC1*、*rpoC2*、および核遺伝子 *RpoD* にコードされていることが明らかになった^{151,152)}。原核生物における転写のプロモーター特異性は、RNA ポリメラーゼコア酵素が結合する異なる σ ファクターに依存する¹⁵³⁾。トウモロコシおよびイネ、クラミドモナス、さらに紅藻 (*Cyanidium caldarium*) の葉緑体 RNA ポリメラーゼから、それぞれ 64 kD、100 kD および 80 kD、さらに 32 kD の σ ファクターの存在が明らかになった¹⁵⁴⁾。これらの実験結果は、葉緑体で機能している RNA ポリメラーゼが核 DNA にコードされているという上記の結論とは相いれない。しかし、核 DNA にコードされると考えられる 110 kD の単一サブユニットの RNA ポリメラーゼがホウレンソウ葉緑体から調製されており¹⁵⁵⁾、複数種の RNA ポリメラーゼが葉緑体遺伝子の転写に関与していることを考慮すれば、矛盾点は説明できるように思われる。

高等植物の緑化過程においてプラスチドはエチオプラストから葉緑体に発達し、この間にプラスチド遺伝子発現が活性化されることが知られている。エチオプラストにおいて発現している遺伝子のプロモーターには典型的な -35 領域の配列が存在しないため、エチオプラストと葉緑体における σ ファクターによる制御の可能性が考えられた。カラシ (*Sinapis alba*) を用い、エチオプラストおよび葉緑体から同様に 3 種類の σ 様ファクターが精製された¹⁵⁶⁾。エチオプラストと葉緑体の σ 様ファクターの違いは、アミノ酸配列ではなく、エチオプラストにおいてリン酸化していることが見出された¹⁵⁷⁾。

② 転写制御(調節)因子 トウモロコシ葉において RuBisCO は維管束鞘細胞に局在しており、核 DNA にコードされる小サブユニット遺伝子 (*RbcS*)^{97,98,102)} と同様に、葉緑体 DNA にコードされる大サブユニット遺伝子 (*rbcL*) の細胞特異的発現の制御機構に興味もたれる。*in vitro* 転写系を用いて、トウモロコシ *rbcL* の転写を促進する S 因子が 1980 年に報告された¹⁵⁸⁾。さらに、エンドウのエチオプラストおよび葉緑体から、またトウモロコシの葉肉細胞および維管束鞘細胞の葉緑体から、*rbcL* のプロモーターに結合する CDF 1 (chloroplast DNA-

binding factor 1)が抽出された¹⁵⁹⁾。しかしながら、これらは、葉緑体特異的なあるいはトウモロコシにおいては維管束鞘細胞葉緑体特異的な *rbcL* の発現制御機構を説明するのに十分なものではない。一方、PS II の D2 および CP 43 をコードするそれぞれ *psbD* および *psbC* は、光により共転写が誘導される¹⁶⁰⁾。この制御に関与すると考えられる転写促進因子が、コムギのプラスチドから抽出されている¹⁶¹⁾。なお、タバコ葉緑体形質転換系を用い、*psbD* プロモーターの制御下でレポーター遺伝子を発現させる方法論により、*psbD* プロモーター上流の 107bp の領域が光依存性発現に介在する転写制御因子と結合する可能性が示唆された¹⁶²⁾。これら以外にも、葉緑体 DNA に結合するタンパク質についての報告例はあるが、葉緑体 RNA ポリメラーゼの σ 様ファクターを含め、それらが RNA ポリメラーゼの構成成分の一部であるのか転写制御因子と呼べるべきものであるか議論の余地が残されている。

③ DNA 鑄型活性の変化による制御 葉緑体 DNA は環状であり⁶⁷⁾、負の超らせん構造をとっている¹⁶³⁾。*in vitro* 転写系において、トウモロコシ共役因子(CF₁)の β および ϵ サブユニット遺伝子 (*atpB/E*) オペロンのプロモーターは、負の超らせん構造度(negative superhelicity)が高いほど高い転写鑄型活性を有することが示された。一方、トウモロコシ *rbcL* プロモーターは負の超らせん構造度が一定以上になると鑄型活性が低下することが明らかにされている¹⁶³⁾。また、この構造変化を触媒する葉緑体 DNA ジャイレースが調製され、*in vitro* 転写系を用いてその機能が解析されている¹⁶⁴⁾。クラミドモナス葉緑体遺伝子の転写活性が、クラミドモナスおよび大腸菌を用いた *in vivo* 実験系において、DNA ジャイレースの阻害剤であるノボジオンにより増大すること、すなわち、負の超らせん構造度の低下により転写鑄型活性が増加することが示された¹⁶⁵⁾。

非光合成細胞において、プラスチド DNA にコードされている光合成遺伝子の発現は低下している。トマト成熟果実中のクロモプラスト¹⁶⁶⁾ およびシカモアカエデ白色培養細胞のアミロプラスト¹⁶⁷⁾ において、*rbcL*、*atpB/E*、および PS I-A タンパク質遺伝子(*psaA*)の転写が DNA メチル化によって抑制されていることが、メチル化部位認識制限酵素処理、

HPLC による修飾塩基の解析、および *in vitro* 転写実験系を用い、明らかにされている^{180,181)}。また、トウモロコシ葉において、*rbcL* 維管束鞘細胞特異的に発現し、葉肉細胞では発現していない。葉肉細胞から調製した葉緑体 DNA の *rbcL* に DNA メチル化が検出された¹⁰²⁾。したがって、細胞特異的な葉緑体遺伝子発現においても DNA メチル化による制御の介在が示唆される。しかし、DNA メチル化は最も簡便な検出法であるメチル化部位認識制限酵素処理とそれに引き続くサザンハイブリダイゼーション実験により議論され、この方法論のみでは、トマト成熟果実クロモプラスト DNA¹⁶⁸⁾、エンドウ非光合成組織アミロプラスト DNA¹⁶⁹⁾、およびシロイヌナズナ根アミロプラスト¹³⁷⁾ において、転写産物の存在と DNA メチル化との間に相関は見出されていない。

Ⅲ) 転写後の制御 葉緑体において RNA エディティングが介在することが、1992 年に報告された¹⁷⁰⁾。光合成遺伝子として、PS II タンパク質の遺伝子である *psbL* は、転写開始コドンが C→U エディティングによりつくられることが知られている¹⁷¹⁾。また、ハウレンソウにおけるチトクロム *b₅₅₉* 小サブユニット遺伝子(*psbF*)および *psbL* の RNA エディティングは、組織特異的かつ生育ステージ特異的に制御されていることが報告されている¹⁷²⁾。*psbF* はハウレンソウにおいてはエディティングされるが、タバコにおいてはハウレンソウにおいて RNA エディティングされたものと同じ配列が DNA にコードされている¹⁷³⁾。ハウレンソウ *psbF* の配列をタバコ葉緑体に導入した結果、タバコにおいてその配列はエディティングされなかった¹⁷³⁾。さらに、エディティングに必要な RNA 上のシス領域を特定するために、*psbL* と薬剤耐性遺伝子が融合され、形質転換によりタバコ葉緑体 DNA に導入された。その結果、効率は低下するものの *psbL* の RNA エディティング部位を含む 98 塩基があればエディティングが起こることが示された¹⁷⁴⁾。

多くのプラスチド遺伝子の 3' 側に存在する stem-loop(hairpin)構造の機能に関し、細菌の rho 非依存性転写終結に類似した機構の介在を想像させるにもかかわらず、ハウレンソウにおいては転写終結はさらに下流であり、stem-loop 構造は、3' 末端からのエキソヌクレアーゼによる分解に対する mRNA の安定化に関与していると報告されてい

る¹⁷⁵⁾。一方、クラミドモナスにおいては、*rbcL* あるいは PSI-B タンパク質遺伝子 (*psaB*) の stem-loop 構造を最大 3 つまで並べてつないだ構造が作製され、クラミドモナス葉緑体に形質転換された¹⁷⁶⁾。その結果、転写産物 3' 末端は、常に 1 つ目 (5' 側) の stem-loop のみを含んでいた。また、*in vivo* パルス-チェイス標識実験により mRNA の半減期が決定され、stem-loop 構造は転写終結に関与しており、mRNA の安定性には関与していないと結論されている¹⁷⁶⁾。ホウレンソウ由来 *in vitro* 実験系を用いた実験結果¹⁷⁵⁾ との矛盾点に関し、可能性の 1 つとして、その *in vitro* 実験系は転写終結因子を欠いていたのではないかと推察される。また、*rbcL* mRNA 5' 非翻訳領域をレポーター遺伝子に融合したキメラ遺伝子が構築され、クラミドモナス葉緑体に形質転換された¹⁷⁷⁾。*in vivo* パルス-チェイス標識実験の結果とあわせて、mRNA 5' 非翻訳領域が明条件下での mRNA 安定化に必要なことが証明されている¹⁷⁷⁾。さらに、同様の方法論を用いることにより、クラミドモナス *rbcL* のコード領域内の 5' 側には、転写促進に必要な配列に引き続き転写産物の安定化に必要な配列が見出されている¹⁷⁸⁾。

iv) 翻訳および翻訳後の制御 クラミドモナスにおいて、PS II の D1 タンパク質をコードする *psbA* の mRNA 5' 非翻訳領域へのタンパク質の結合と光による翻訳促進との相関が示されていた¹⁷⁹⁾。この領域に形成される stem-loop 構造がこの制御に重要なことが明らかにされている¹⁸⁰⁾。活性化タンパク質がこの mRNA 領域に結合することにより翻訳が促進されるが、この結合は光合成により生じる活性化タンパク質の酸化還元 (redox) 電位の変化により制御されていると考えられる¹⁸¹⁾。タバコにおいても、*psbA* の mRNA 5' および 3' 非翻訳領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を構築し、葉緑体形質転換系により葉緑体で発現させられた結果、*psbA* mRNA 非翻訳領域が組織特異的および光依存性翻訳制御に関与していることが示された¹⁸²⁾。

リボソーム上でタンパク質合成が途中で停止した D1 タンパク質の中間体が、エンドウ単離葉緑体を用いた ATP 存在下暗下でのタンパク質合成¹⁸³⁾、およびオオムギ単離葉緑体を用いた明下でのタンパク質合成¹⁸⁴⁾ において、見出されている。パルス-チェイス標識実験の結果、前者は明下で、後者は引き続き、

中間体から全長産物へのタンパク質合成が再開あるいは継続されることが示された。D1 タンパク質は最終的にはクロロフィルとの複合体を形成するため、この停止によりクロロフィルとの結合の効率が增大するのではないかと推察されている¹⁸⁴⁾。

CF₁ α および β サブユニットは葉緑体 DNA にコードされている。これらサブユニットの含量が著しく低下したトウモロコシ高クロロフィル蛍光突然変異体 *hcf*38* において、転写産物量、葉組織 *in vivo* タンパク質合成活性、さらに単離葉緑体タンパク質合成活性が測定された¹⁸⁵⁾。その結果、転写産物量およびタンパク質合成速度において、突然変異体と野生体との間に差異は認められず、サブユニット含量の低下はチラコイド膜に結合後の分解速度の違いに起因すると考えられた¹⁸⁵⁾。この変異体は核遺伝子突然変異体であり、したがって、機能を有するチラコイド膜構造を形成する過程において、チラコイド膜上でのタンパク質の分解の制御機構が重要な役割を果たすと考えられ、今後の解明に興味もたれる。

(4) おわりに

タンパク質複合体の構造と機能の解析の歴史において、光合成反応中心の X 線回折^{18,19)} は特筆すべきものであり、今後、ラン藻および高等植物において光化学系の詳細な構造が解析され、機能との相関が解明されるものと期待される。一方、光合成遺伝子は、細胞核と葉緑体の両 DNA にコードされているが、これらは植物において最もよく研究されている遺伝子群である。近年、光合成遺伝子発現シグナル伝達機構に関する進展が著しく、遺伝学的方法論を取り入れた研究の発展にさらなる期待が寄せられている [本節脱稿後、形質転換型ラン藻 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) のゲノムの全塩基配列が決定された¹⁸⁶⁾。これによって、今後光合成関連遺伝子やその発現調節にかかわる遺伝子群の研究が急速に進展する可能性が出てきた。また、光合成チラコイド膜タンパク質として、NADH 脱水素酵素様複合体の存在が明らかになってきた。ミトコンドリアや細菌の呼吸鎖の NADH 脱水素酵素複合体のサブユニットと相同性を示す遺伝子 (*ndhA*~) が葉緑体 DNA やラン藻のゲノムに存在しており^{7,8,186)}、その転写や産物の存在も確認されている。ラン藻では、呼吸系に必須であるとともに PS I の環状電子伝達に必要で

あることが遺伝的に示されているが¹⁸⁷⁾、活性のあるタンパク質複合体としてはまだ単離されていない。光合成の主産物は NADH ではなく NADPH であること、葉緑体やラン藻の *ndh* 遺伝子は呼吸鎖のものとは系統的に異なることから、NADPH に特異的な脱水素酵素である可能性がある。これは、葉緑体

呼吸や C₄ 植物の葉肉細胞葉緑体における環状電子伝達による ATP 生産にも重要な働きをしていると考えられているが¹⁸⁸⁾、その実体の解明には今後の研究を待たなければならない]。

[小林裕和・池内昌彦]

参 考 文 献

- 1) Priestley, J.: Observations on different kinds of air. *Phil. Trans. Royal Soc. (London)*, **62**, 147 (1772).
- 2) Iwamura, T.: Distribution of nucleic acids among subcellular fractions of *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 161-163 (1960).
- 3) Sager, R. and Ishida, M. R.: Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 725-730 (1963).
- 4) Ellis, R. J. and Hartley, M. R.: Sites of synthesis of chloroplast proteins. *Nature New Biology*, **233**, 193-196 (1971).
- 5) Coen, D. M., Bedbrook, J. R., Bogorad, L. and Rich, A.: Maize chloroplast DNA fragment encoding the large subunit of ribulosebisphosphate carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5487-5491 (1977).
- 6) Bedbrook, J. R., Smith, S. M. and Ellis, R. J.: Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding the precursor to the small subunit of chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Nature*, **287**, 692-697 (1980).
- 7) Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinoza, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M.: The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO J.*, **5**, 2043-2049 (1986).
- 8) Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. and Ozeki, H.: Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature*, **322**, 572-574 (1986).
- 9) Rodermeil, S. R., Abbott, M. S. and Bogorad, L.: Nuclear-organelle interactions: Nuclear antisense gene inhibits ribulose bisphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell*, **55**, 673-681 (1988).
- 10) Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, Robertson, D., Klein, T. M., Shark, K. B. and Sanford, J. C.: Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, **240**, 1534-1538 (1988).
- 11) Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P.: Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8526-8530 (1990).
- 12) Somerville, C. R. and Ogren, W. L.: A phosphoglycolate phosphatase deficient mutant of *Arabidopsis*. *Nature*, **280**, 833-836 (1979).
- 13) 小林裕和：光合成の遺伝子。現代化学 増刊5 植物バイオテクノロジー，山田康之，岡田吉美編，pp. 173-189，東京化学同人，東京(1986)。
- 14) 小林裕和：原核生物の光合成遺伝子。バイオサイエンス戦略マニュアル：新しい素材とマーカー・プローブ，瀬野惺二ほか編，pp. 485-495，共立出版，東京(1990)。
- 15) Hallick, R. B.: Proposals for the naming of chloroplast genes: II. Update to the nomenclature of genes for thylakoid membrane polypeptides. *Plant Mol. Biol. Report*, **7**, 266-275 (1989).
- 16) Bryant, D. A. (ed.): *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, USA, 881 p. (1994).
- 17) C. A. Price: A nomenclature for sequenced plant genes. *Plant Mol. Biol. Report*, **11**, 291-316 (1993).
- 18) Krauss, N., Schubert, W., Klukas, O., Fromme, P., Witt, H. T. and Saenger, W.: Photosystem I at 4.5 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna system. *Nature Structural Biol.*, **3**, 965-973 (1996).
- 19) Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H.: Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, **318**, 618-624 (1985).
- 20) Anbudurai, P. R., Mor, T. S., Ohad, I., Shestakov, S. V. and Pakrasi, H. B.: The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8082-8086 (1994).
- 21) Inagaki, N., Yamamoto, Y., Mori, H. and Satoh, K.: Carboxyl-terminal processing protease for the D1 precursor protein: Cloning and sequencing of the spinach cDNA. *Plant Mol. Biol.*, **30**, 39-50 (1996).
- 22) Narusaka, Y., Murakami, A., Saeki, M., Kobayashi, H. and Satoh, K.: Preliminary characterization of a photo-tolerant mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 obtained by *in vitro* random mutagenesis of *psbA2*. *Plant Sci.*, **115**, 261-266 (1996).
- 23) Hill, K. L. and Merchant, S.: *In vivo* competition between plastocyanin and a copper-dependent regulator of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytochrome *c₆* gene.

- Plant Physiol.*, **100**, 319-326 (1992), correction, **101**, 707 (1993).
- 24) Leutwiler, S., Meyerowitz, E. M. and Tobin, E. M.: Structure and expression of three light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein genes in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4051-4064 (1986).
- 25) 小林裕和: リブローズ-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO). 蛋白質 核酸 酵素 別冊 No. 30 植物の細胞生物学的研究法, 赤澤 堯, 杉浦昌弘, 西村幹夫編, pp. 223-246, 共立出版, 東京(1987).
- 26) Shinozaki, K. and Sugiura, M.: The nucleotide sequence of the tobacco chloroplast gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Gene*, **200**, 91-102 (1982).
- 27) Amiri, I., Salnikow, J. and Vater, J.: Amino-acid sequence of the large subunit of D-ribulosebisphosphatecarboxylase/oxygenase from *Nicotiana tabacum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **784**, 116-123 (1984).
- 28) Krebbers, E., Seurinck, J., Herdies, L., Cashmore, A. R. and Timko, M. P.: Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **11**, 745-759 (1988).
- 29) Bertsch, U., Schlicher, T. B., Schroder, I. and Soll, J.: Sequence of mature phosphoglycerate kinase from spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, **103**, 1449-1450 (1993).
- 30) Shih, M.-C., Lazar, G. and Goodmam, H. M.: Evidence in favor of the symbiotic origin of chloroplasts: primary structure and evolution of tobacco glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Cell*, **47**, 73-80 (1986).
- 31) Henze, K., Schnarrenberger, C., Kellermann, J. and Martin, W.: Chloroplast and cytosolic triosephosphate isomerases from spinach: Purification, microsequencing and cDNA cloning of the chloroplast enzyme. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 1961-1973 (1994).
- 32) Pelzer-Reith, B., Penger, A. and Schnarrenberger, C.: Plant aldolase: cDNA and deduced amino-acid sequences of the chloroplast and cytosol enzyme from spinach. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 331-340 (1993).
- 33) Horsnell, P. R. and Raines, C. A.: Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding chloroplast-fructose-1,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 185-186 (1991).
- 34) Willingham, N. M., Lloyd, J. C. and Raines, C. A.: Molecular cloning of the *Arabidopsis thaliana* sedoheptulose-1,7-bisphosphatase gene and expression studies in wheat and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 1191-1200 (1994).
- 35) Horsnell, P. R. and Raines, C. A.: Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding chloroplast phosphoribulokinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 183-184 (1991).
- 36) Raines, C. A., Horsnell, P. R., Holder, C. and Lloyd, J. C.: *Arabidopsis thaliana* carbonic anhydrase: cDNA sequence and effect of CO₂ on mRNA levels. *Plant Mol. Biol.*, **20**, 1143-1148 (1992).
- 37) Orozco, B. M., McClung, C. R., Werneke, J. M. and Ogren, W. L.: Molecular basis of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase mutation in *Arabidopsis thaliana* is a guanine-to-adenine transition at the 5'-splice junction of intron 3. *Plant Physiol.*, **102**, 227-232 (1993).
- 38) Fischer, K., Arbingner, B., Kammerer, B., Busch, C., Brink, S., Wallmeier, H., Sauer, N., Eckerskorn, C. and Flugge, U. I.: Cloning and *in vivo* expression of functional triose phosphate/phosphate translocators from C₃- and C₄-plants: Evidence for the putative participation of specific amino acid residues in the recognition of phosphoenolpyruvate. *Plant J.*, **5**, 215-226 (1994).
- 39) Penger, A., Pelzerreith, B. and Schnarrenberger, C.: cDNA sequence for the plastidic phosphoglucumutase from *Spinacia oleracea* (L.). *Plant Physiol.*, **105**, 1439-1440 (1994).
- 40) Nakata, P. A., Anderson, J. M. and Okita, T. W.: Structure and expression of the potato ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit. *J. Biol. Chem.*, **269**, 30798-30807 (1994).
- 41) Volokita, M. and Somerville, C. R.: The primary structure of spinach glycolate oxidase deduced from the DNA sequence of a cDNA clone. *J. Biol. Chem.*, **262**, 15825-15828 (1987).
- 42) Srinivasan, R. and Oliver, D. J.: Light-dependent and tissue-specific expression of the H-protein of the glycine decarboxylase complex. *Plant Physiol.*, **109**, 161-168 (1995).
- 43) Schwartz, B. W., Sloan, J. S. and Becker, W. M.: Characterization of genes encoding hydroxypyruvate reductase in cucumber. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 941-947 (1991).
- 44) Yanagisawa, S., Izui, K., Yamaguchi, Y., Shigesada, K. and Katsuki, H.: Further analysis of cDNA clones for maize phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄ photosynthesis. *FEBS Lett.*, **229**, 107-110 (1988).
- 45) Metzler, M., Rothermel, B. A. and Nelson, T.: Maize NADP-malate dehydrogenase: cDNA cloning, sequence, and mRNA characterization. *Plant Mol. Biol.*, **12**, 713-722 (1989).
- 46) Rothermel, B. A. and Nelson, T.: Primary structure of the maize NADP-dependent malic enzyme. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19587-19592 (1989).
- 47) Matsuoka, M., Ozeki, Y., Yamamoto, N., Hirano, H., Kano-Murakami, Y. and Tanaka, Y.: Primary structure of maize pyruvate, orthophosphate dikinase as deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.*, **263**, 11080-11083 (1988).
- 48) Taniguchi, M., Sawaki, H., Sasakawa, H., Hase, T. and Sugiyama, T.: Cloning and sequence analysis of cDNA encoding aspartate aminotransferase isozymes from *Panicum miliaceum* L., a C₄ plant. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 611-620 (1992).
- 49) Taniguchi, M., Mori, J. and Sugiyama, T.: Structure of genes that encode isozymes of aspartate aminotransferase in *Panicum miliaceum* L., a C₄ plant. *Plant Mol.*

- Biol.*, **26**, 723-734 (1994).
- 50) Son, D. and Sugiyama, T.: Molecular cloning of an alanine aminotransferase from NAD-malic enzyme type C₄ plant *Panicum miliaceum*. *Plant Mol. Biol.*, **20**, 705-713 (1992).
 - 51) Long, J. J., Wang, J. L. and Berry, J. O.: Cloning and analysis of the C₄ photosynthetic NAD-dependent malic enzyme of amaranth mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2827-2833 (1994).
 - 52) Cushman, J. C., Meyer, C., Michalowski, C. B., Schmitt, J. M. and Bohnert, H. J.: Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell*, **1**, 715-725 (1989).
 - 53) Cushman, J. C.: Molecular cloning and expression of chloroplast NADP-malate dehydrogenase during crassulacean acid metabolism induction by salt stress. *Photosyn. Res.*, **35**, 15-27 (1993).
 - 54) Cushman, J. C.: Characterization and expression of a NADP-malic enzyme cDNA induced by salt stress from the facultative crassulacean acid metabolism plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Eur. J. Biochem.*, **208**, 259-266 (1992).
 - 55) Ostrem, J. A., Vernon, D. M. and Bohnert H. J.: Increased expression of a gene coding for NAD-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase during the transition from C₃ photosynthesis to crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3497-3502 (1990).
 - 56) Gould, S. J., Keller, G.-A., Hosken, N., Wilkinson, J. and Subramani, S.: A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell Biol.*, **108**, 1657-1664 (1989).
 - 57) Fukuzawa, H., Suzuki, E., Komukai, Y. and Miyachi, S.: A gene homologous to chloroplast carbonic anhydrase (*icfA*) is essential to photosynthetic carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC 7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4437-4441 (1992).
 - 58) Fujiwara, S., Fukuzawa, H., Tachiki, A. and Miyachi, S.: Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9779-9783 (1990).
 - 59) Katoh, A., Lee, K.-S., Fukuzawa, H., Ohyama, K. and Ogawa, T.: A *cemA* homologue essential to CO₂ transport in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4006-4010 (1996).
 - 60) Chopra, S., Del-favero, J., Dolferus, R. and Jacobs, M.: Sucrose synthase of *Arabidopsis*: Genomic cloning and sequence characterization. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 131-134 (1992).
 - 61) Lawlor, D. W.: Photosynthesis: Molecular, Physiological and Environmental Processes, 2nd ed., 318 p., Longman Scientific & Technical, Essex UK, (1993).
 - 62) H. ビーヴァース, 赤沢 堯: 植物の代謝生理, 435 p., 岩波書店, 東京(1986).
 - 63) Servaites, J. C. and Ogren, W. L.: Chemical inhibition of the glycolate pathway in soybean leaf cells. *Plant Physiol.*, **60**, 461-466 (1977).
 - 64) Kozaki, A. and Takeba, G.: Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. *Nature*, **384**, 557-560 (1996).
 - 65) 小林裕和: 光合成 CO₂ 固定反応の環境への適応: Crassulacean Acid代謝(CAM)とC₄経路. 化学と生物, **16**, 228-230 (1978).
 - 66) 古谷雅樹: 本書, pp. 82-91(1997).
 - 67) 杉浦昌弘: 本書, pp. 60-67(1997).
 - 68) Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L., Ausubel, F.: *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell*, **58**, 991-999 (1989).
 - 69) Stewart, A. (ed.): Genetic Nomenclature Guide, *Trends Genet.*, special issue, 43 p., Elsevier, Oxford, UK (1995).
 - 70) Deng, X.-W., Caspar, T. and Quail, P. H.: *cop1*: A regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Devel.*, **5**, 1172-1182 (1991).
 - 71) Deng, X.-W., Mastui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A. M., Feldmann, K. A. and Quail, P. H.: *COPI*, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G_β homologous domain. *Cell*, **71**, 791-801 (1992).
 - 72) Matsui, M., Stoop, C. D., Vonarnim, A. G., Wei, N. and Deng, X.-W.: *Arabidopsis* COPI protein specifically interacts *in vitro* with a cytoskeleton-associated ClPI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4239-4243 (1995).
 - 73) Pepper, A., Delaney, T., Washburn, T., Poole, D. and Chory, J.: *DET1*, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in *Arabidopsis*, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell*, **78**, 109-116 (1994).
 - 74) Wei, N., Chamovitz, D. A. and Deng, X.-W.: *Arabidopsis* COP 9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*, **78**, 117-124 (1994).
 - 75) Takahashi, T., Gasch, A., Nishizawa, N. and Chua, N. H.: The *DIMINUTO* gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. *Genes Devel.*, **9**, 97-107 (1995).
 - 76) Li, H.-M., Altschmied, L. and Chory, J.: *Arabidopsis* mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. *Genes Devel.*, **8**, 339-349 (1994).
 - 77) Romero, L. C. and Lam, E.: Guanine nucleotide binding protein involvement in early steps of phytochrome-regulated gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1465-1469 (1993).
 - 78) Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H. and Chua, N.-H.: Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*, **77**, 73-81 (1994).
 - 79) Sheen, J.: Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize. *EMBO J.*, **12**, 3497-3505 (1993).
 - 80) Millar, A. J., Straume, M., Chory, J., Chua, N.-H. and

- Kay, S. A.: The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science*, **267**, 1163-1166 (1995).
- 81) Susek, R. E., Ausubel, F. M. and Chory, J.: Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear *CAB* and *RBCS* gene expression from chloroplast development. *Cell*, **74**, 787-799 (1993).
- 82) Niwa, Y., Seki, M., Morikawa, H., and Kobayashi, H.: Transcriptional regulation of gene members for small subunit of RuBisCO (*rbcS*) and chlorophyll *a/b*-binding proteins (*cab*) in *Arabidopsis thaliana*. In: (ed. by Murata, N.) Research in Photosynthesis, Vol. 3, pp. 375-376, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992).
- 83) Niwa, Y., Sugawara, Y., Suzuki, A., Tsugane, K., Kobayashi, K. and Kobayashi, H.: *Arabidopsis* mutants, *rec*, *ces*, and *des* expressing the photosynthesis gene *RBCS* in deranged tissue-specificity. *Plant Cell Physiol.*, **37**, s63 (1996).
- 84) Kobayashi, K., Tsugane, K., Niwa, Y. and Kobayashi, H.: Selection and analysis of *Arabidopsis* mutants under-expressing *RBCS*. *Plant Cell Physiol.*, **36**, s128 (1995).
- 85) Manzara, T., Carrasco, P. and Gruijssem, W.: Developmental and organ-specific changes in promoter DNA-protein interactions in the tomato *rbcS* gene family. *Plant Cell*, **3**, 1305-1316 (1991).
- 86) Lam, E. and Chua, N.-H.: ASF-2: A factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35 S promoter and a conserved GATA motif in *Cab* promoters. *Plant Cell*, **1**, 1147-1156 (1989).
- 87) Menkens, A. E. and Cashmore, A. R.: Isolation and characterization of a fourth *Arabidopsis thaliana* G-box-binding factor, which has similarities to Fos oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2522-2526 (1994).
- 88) Meier, I. and Gruijssem, W.: Novel conserved sequence motifs in plant G-box binding proteins and implications for interactive domains. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 470-478 (1994).
- 89) Hiratsuka, K., Wu, X. D., Fukuzawa, H. and Chua, N.-H.: Molecular dissection of GT-1 from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **6**, 1805-1813 (1994).
- 90) Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Roeder, R. G. and Chua, N.-H.: *Arabidopsis thaliana* contains two genes for TFIID. *Nature*, **346**, 390-394 (1990).
- 91) Lam, E., Kano-Murakami, Y., Gilmartin, P., Niner, B. and Chua, N.-H.: A metal-dependent DNA-binding protein interacts with a constitutive element of a light-responsive promoter. *Plant Cell*, **2**, 857-866 (1990).
- 92) Buzby, J. S., Yamada, T. and Tobin, E. M.: A light-regulated DNA-binding activity interacts with a conserved region of a *Lemna gibba* *rbcS* promoter. *Plant Cell*, **2**, 805-814 (1990).
- 93) Anderson, S. L. and Kay, S. A.: Functional dissection of circadian clock-and phytochrome-regulated transcription of the *Arabidopsis CAB2* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1500-1504 (1995).
- 94) Matsuoka, M., Kyojuka, J., Shimamoto, K. and Kanomurakami, Y.: The promoters of two carboxylases in a C₄ plant (maize) direct cell-specific, light-regulated expression in a C₃ plant (rice). *Plant J.*, **6**, 311-319 (1994).
- 95) Sheen, J.: Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes. *Plant Cell*, **3**, 225-245 (1991).
- 96) Matsuoka, M., Tada, Y., Fujimura, T. and Kanomurakami, Y.: Tissue-specific light-regulated expression directed by the promoter of a C₄ gene, maize pyruvate, orthophosphate dikinase, in a C₃ plant, rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9586-9590 (1993).
- 97) Bansal, K. C., Viret, J. F., Haley, J., Khan, M., Schantz, R. and Bogorad, L.: Transient expression from *cab-m1* and *rbcS-m3* promoter sequences is different in mesophyll and bundle sheath cells in maize leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3654-3658 (1992).
- 98) Viret, J. F., Mabrouk, Y. and Bogorad, L.: Transcriptional photoregulation of cell-type-preferred expression of maize *rbcS-m3*: 3' and 5' sequences are involved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8577-8581 (1994).
- 99) Fan, H. and Sugiura, M.: A plant basal *in vitro* system supporting accurate transcription of both RNA polymerase II- and III-dependent genes: Supplement of green leaf component(s) drives accurate transcription of a light-responsive *rbcS* gene. *EMBO J.*, **14**, 1024-1031 (1995).
- 100) Ngerprasisiri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T.: Transcriptional regulation and DNA methylation of nuclear genes for photosynthesis in nongreen plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7919-7923 (1989).
- 101) Ngerprasisiri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T.: Expression of photosynthetic genes is distinctly different between chloroplasts and amyloplasts in liquid-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Cell Struct. Funct.*, **15**, 273-283 (1990).
- 102) Ngerprasisiri, J., Chollet, R., Kobayashi, H., Sugiyama, T. and Akazawa, T.: DNA methylation and the differential expression of C₄-photosynthesis genes in mesophyll and bundle-sheath cells of greening maize leaves. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8241-8248 (1989).
- 103) Hayashi, M., Tsugeki, R., Kondo, M., Mori, H. and Nishimura, M.: Pumpkin hydroxypyruvate reductases with and without a putative C-terminal signal for targeting to microbodies may be produced by alternative splicing. *Plant Mol. Biol.*, **30**, 183-189 (1996).
- 104) Green, P. J.: Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiol.*, **102**, 1065-1070 (1993).
- 105) Thompson, D. M. and Meagher, R. B.: Transcriptional and post-transcriptional processes regulate expression of RNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase differently in petunia and soybean. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 3621-3629 (1990).

- 106) Fritz, C. C., Herget, T., Wolter, F. P., Schell, J. and Schreier, P. H.: Reduced steady-state levels of *rbcS* mRNA in plants kept in the dark are due to differential degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4458-4462 (1991).
- 107) Thompson, D. M., Tanzer, M. M. and Meagher, R. B.: Degradation products of the mRNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in soybean and transgenic petunia. *Plant Cell*, **4**, 47-58 (1992).
- 108) Berry, J. O., Breiding, D. E. and Klessig, D. F.: Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in amaranth cotyledons. *Plant Cell*, **2**, 795-803 (1990).
- 109) Roy, H., Patterson, R. and Jagendorf, A. T.: Identification of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase as a product of wheat leaf cytoplasmic ribosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 64-73 (1976).
- 110) Smith, S. M. and Ellis, R. J.: Processing of small subunit precursor of ribulose bisphosphate carboxylase and its assembly into whole enzyme are stromal events. *Nature*, **278**, 662-664 (1979).
- 111) Schmidt, G. W., Devillers-Thierry, A., Desruisseaux, H., Blobel, G. and Chua, N.-H.: NH₂-terminal amino acid sequences of precursor and mature forms of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.*, **83**, 615-622 (1979).
- 112) Perry, S. E. and Keegstra, K.: Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell*, **6**, 93-105 (1994).
- 113) Schnell, D. J., Kessler, F. and Blobel, G.: Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science*, **266**, 1007-1012 (1994).
- 114) Tranel, P. J., Froehlich, J., Goyal, A. and Keegstra, K.: A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway. *EMBO J.*, **14**, 2436-2446 (1995).
- 115) Kessler, F., Blobel, G., Patel, H. A. and Schnell, D. J.: Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science*, **266**, 1035-1039 (1994).
- 116) Karlin-Neumann, G. A. and Tobin, E. M.: Transit peptides of nuclear-encoded chloroplast proteins share a common amino acid framework. *EMBO J.*, **5**, 9-13 (1986).
- 117) von Heijne, G., Hirai, T., Klosgen, R.-B., Steppuhn, J., Bruce, B., Keegstra, K. and Herrmann, R.: CHLPEP: A database of chloroplast transit peptides. *Plant Mol. Biol. Report*, **9**, 104-126 (1991).
- 118) Lippa, G. K. and Abad, M. S.: Processing of a wheat light-harvesting chlorophyll *a/b* protein precursor by a soluble enzyme from higher plant chloroplasts. *J. Cell Biol.*, **105**, 2641-2648 (1987).
- 119) Hageman, J., Robinson, C., Smeeken, S. and Weisbeek, P. J.: A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin. *Nature*, **324**, 567-569 (1986).
- 120) Theg, S. M. and Scott, S. V.: Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol.*, **3**, 186-190 (1993).
- 121) Robinson, C. and Klosgen, R. B.: Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane: A multitude of mechanisms. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 15-24 (1994).
- 122) Hulford, A., Hazell, L., Mould, R. M. and Robinson, C.: Two distinct mechanisms for the translocation of proteins across the thylakoid membrane, one requiring the presence of a stromal protein factor and nucleotide triphosphates. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3251-3256 (1994).
- 123) Yuan, J. G. and Cline, K.: Plastocyanin and the 33-kDa subunit of the oxygen-evolving complex are transported into thylakoids with similar requirements as predicted from pathway specificity. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18463-18467 (1994).
- 124) Nakai, M., Goto, A., Nohara, T., Sugita, D. and Endo, T.: Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31338-31341 (1994).
- 125) Yuan, J. G., Henry, R., Mccaffery, M. and Cline, K.: SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science*, **266**, 796-798 (1994).
- 126) Mould, R. M., Robinson, C.: A proton gradient is required for the transport of two lumenal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12189-12193 (1991).
- 127) Hoffman, N. E. and Franklin, A. E.: Evidence for a stromal GTP requirement for the integration of a chlorophyll *a/b*-binding polypeptide into thylakoid membranes. *Plant Physiol.*, **105**, 295-304 (1994).
- 128) Franklin, A. E. and Hoffman, N. E.: Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22175-22180 (1993).
- 129) Li, X.-X., Henry, R., Yuan, J. G., Cline, K. and Hoffman, N. E.: A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP 54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3789-3793 (1995).
- 130) 小林裕和: DNA 転写鋳型活性の変化による葉緑体機能発現の制御. *植物細胞工学*, **2**, 198-207(1990).
- 131) Kobayashi, H.: Differentiation of amyloplasts and chromoplasts. *In*: (eds. by Bogorad, L. and Vasil, I. K.) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 7 B: The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation, pp. 395-415, Academic Press, San Diego (1991).
- 132) Liedvogel, B.: DNA content and ploidy of chromoplasts. *Naturwissenschaften*, **63**, 248 (1976).
- 133) Bendich, A. J.: Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome?

- BioEssays*, **6**, 279-282 (1987).
- 134) Aguetaz, P., Seyer, P., Pesey, H. and Lescure, A.-M.: Relations between the plastid gene dosage and the levels of 16 S rRNA and *rbcL* gene transcripts during amyloplast to chloroplast change in mixotrophic spinach cell suspensions. *Plant Mol. Biol.*, **8**, 169-177 (1987).
- 135) Baumgartner, B. J., Rapp, J. C. and Mullet, J. E.: Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development. *Plant Physiol.*, **89**, 1011-1018 (1989).
- 136) Sasaki, Y., Morioka, S. and Matsuno, R.: Correlation of plastid DNA copy number with plastid gene expression in various organs in mature pea plant (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Physiol.*, **31**, 925-931 (1990).
- 137) Isono, K., Niwa, Y., Satoh, K. and Kobayashi, H.: Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiol.*, (印刷中).
- 138) Cannon, G., Heinhorst, S. and Weissbach, A.: Plastid DNA content in a cultured soybean line capable of photoautotrophic growth. *Plant Physiol.*, **80**, 601-603 (1986).
- 139) Takeda, Y., Hirokawa, H. and Nagata, T.: The replication origin of proplastid DNA in cultured cells of tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 191-198 (1992).
- 140) Hedrick, L. A., Heinhorst, S., White, M. A. and Cannon, G. C.: Analysis of soybean chloroplast DNA replication by 2-dimensional gel electrophoresis. *Plant Mol. Biol.*, **23**, 779-792 (1993).
- 141) Bailey, J. C., Heinhorst, S. and Cannon, G. C.: Accuracy of deoxynucleotide incorporation by soybean chloroplast DNA polymerases is independent of the presence of a 3' to 5' exonuclease. *Plant Physiol.*, **107**, 1277-1284 (1995).
- 142) Pyke, K. A., Rutherford, S. M., Robertson, E. J. and Leech, R. M.: arc 6, a fertile *Arabidopsis* mutant with only two mesophyll cell chloroplasts. *Plant Physiol.*, **106**, 1169-1177 (1994).
- 143) Kuroiwa, T., Suzuki, K., Itou, R., Toda, K., Okeefe, T. C. and Kuroiwa, H.: Mitochondria-dividing ring: Ultrastructural basis for the mechanism of mitochondrial division in *Cyanidoschyzon merolae*. *Protoplasma*, **186**, 12-23 (1995).
- 144) Osteryoung, K. W. and Vierling, E.: Conserved cell and organelle division. *Nature*, **376**, 473-474 (1995).
- 145) Bottomley, W., Smith, H. J. and Bogorad, L.: RNA polymerases of maize: Partial purification and properties of the chloroplast enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2412-2416 (1971).
- 146) Lerbs, S., Brautigam, E. and Parthier, B.: Polypeptides of DNA-dependent RNA polymerase of spinach chloroplast: characterization by antibody-linked polymerase assay and determination of sites of synthesis. *EMBO J.*, **4**, 1661-1666 (1985).
- 147) Morden, C. W., Wolfe, K. H., dePamphilis, C. W. and Palmer, J. D.: Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: Intact, missing and pseudo genes. *EMBO J.*, **10**, 3281-3288 (1991).
- 148) Chen, Z. J., Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Schertz, K. F. and Hart, G. E.: A chloroplast DNA deletion located in RNA polymerase gene *rpoC2* in CMS lines of sorghum. *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 251-259 (1993).
- 149) Falk, J., Schmidt, A. and Krupinska, K.: Characterization of plastid DNA transcription in ribosome deficient plastids of heat-bleached barley leaves. *J. Plant Physiol.*, **141**, 176-181 (1993).
- 150) Hess, W. R., Prombona, A., Fieder, B., Subramanian, A. R. and Borner, T.: Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: Evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *EMBO J.*, **12**, 563-571 (1993).
- 151) Hu, J. and Bogorad, L.: Maize chloroplast RNA polymerase: The 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1531-1535 (1990).
- 152) Hu, J., Troxler, R. F. and Bogorad, L.: Maize chloroplast RNA polymerase: The 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid *rpoC1* gene. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 3431-3434 (1991).
- 153) Helmann, J. D. and Chamberlin, M. J.: Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 839-872 (1988).
- 154) Troxler, R. F., Zhang, F., Hu, J. and Bogorad, L.: Evidence that sigma factors are components of chloroplast RNA Polymerase. *Plant Physiol.*, **104**, 753-759 (1994).
- 155) Lerbs-Mache, S.: The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: Single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5509-5513 (1993).
- 156) Tiller, K. and Link, G.: Sigma-like transcription factors from mustard (*Sinapis alba* L.) etioplast are similar in size to, but functionally distinct from, their chloroplast counterparts. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 503-513 (1993).
- 157) Tiller, K. and Link, G.: Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription systems from mustard (*Sinapis alba* L.). *EMBO J.*, **12**, 1745-1753 (1993).
- 158) Jolly, S. O. and Bogorad, L.: Preferential transcription of cloned maize chloroplast RNA sequences by maize chloroplast RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 822-826 (1980).
- 159) Lam, E., Hanley-Bowdoin, L. and Chua, N.-H.: Characterization of a chloroplast sequence-specific DNA binding factor. *J. Biol. Chem.*, **263**, 8288-8293 (1988).
- 160) Sexton, T. B., Christopher, D. A. and Mullet, J. E.: Light-induced switch in barley *psbD-psbC* promoter utilization: A novel mechanism regulating chloroplast

- gene expression. *EMBO J.*, **9**, 4485-4494 (1990).
- 161) Wada, T., Tunoyama, Y., Shiina, T. and Toyoshima, Y.: *In vitro* analysis of light-induced transcription in the wheat *psbD/C* gene cluster using plastid extracts from dark-grown and short-term-illuminated seedlings. *Plant Physiol.*, **104**, 1259-1267 (1994).
- 162) Allison, L. A. and Maliga, P.: Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid *psbD* core promoter. *EMBO J.*, **14**, 3721-3730 (1995).
- 163) Stirdivant, S. M., Crossland, L. D. and Bogorad, L.: DNA supercoiling affects *in vitro* transcription of two maize chloroplast genes differently. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4886-4890 (1985).
- 164) Lam, E. and Chua, N.-H.: Chloroplast DNA gyrase and *in vitro* regulation of transcription by template topology and novobiocin. *Plant Mol. Biol.*, **8**, 415-424 (1987).
- 165) Thompson, R. J. and Mosig, G.: Stimulation of a *Chlamydomonas* chloroplast promoter by novobiocin *in situ* and *E. coli* implies regulation by torsional stress in the chloroplast DNA. *Cell*, **48**, 281-287 (1987).
- 166) Kobayashi, H., Ngerprasisriri, J. and Akazawa, T.: Transcriptional regulation and DNA methylation in plastids during transitional conversion of chloroplasts to chromoplasts. *EMBO J.*, **9**, 307-313 (1990).
- 167) Ngerprasisriri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T.: DNA methylation as a mechanism of transcriptional regulation in nonphotosynthetic plastids in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4750-4754 (1988).
- 168) Marano, M. R. and Carrillo, N.: Chromoplast formation during tomato fruit ripening: No evidence for plastid DNA methylation. *Plant Mol. Biol.*, **16**, 11-19 (1991).
- 169) Ohta, N., Sato, N., Kawano, S. and Kuroiwa, T.: Methylation of DNA in the chloroplasts and amyloplasts of the pea, *Pisum sativum*. *Plant Sci.*, **78**, 33-42 (1991).
- 170) Hoch, B., Maier, R. M., Appel, K., Igloi, G. L. and Kössel, H.: Editing of chloroplast mRNA by creation an initiation codon. *Nature*, **353**, 178-180 (1992).
- 171) Kudla, J., Igloi, G. L., Metzlauff, M., Hagemann, R. and Kössel, H.: RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* messenger RNA by a C-to-U substitution within the initiation codon. *EMBO J.*, **11**, 1099-1103 (1992).
- 172) Bock, R., Hagemann, R., Kössel, H. and Kudla, J.: Tissue-specific and stage-specific modulation of RNA editing of the *psbF* and *psbL* transcript from spinach plastids: A new regulatory mechanism. *Mol. Gen. Genet.*, **240**, 238-244 (1993).
- 173) Bock, R., Kössel, H. and Maliga, P.: Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: The lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *EMBO J.*, **13**, 4623-4628 (1994).
- 174) Chaudhuri, S., Carrer, H. and Maliga, P.: Site-specific factor involved in the editing of the *psbL* mRNA in tobacco plastids. *EMBO J.*, **14**, 2951-2957 (1995).
- 175) Stem, D. B. and Gruissem, W.: Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA-processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription. *Cell*, **51**, 1145-1157 (1987).
- 176) Blowers, A. D., Klein, U., Ellmore, G. S. and Bogorad, L.: Functional *in vivo* analyses of the 3' flanking sequences of the *Chlamydomonas* chloroplast *rbcL* and *psaB* genes. *Mol. Gen. Genet.*, **238**, 339-349 (1993).
- 177) Salvador, M. L., Klein, U. and Bogorad, L.: 5' sequences are important positive and negative determinants of the longevity of *Chlamydomonas* chloroplast gene transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1556-1560 (1993).
- 178) Klein, U., Salvador, M. L. and Bogorad, L.: Activity of the *Chlamydomonas* chloroplast *rbcL* gene promoter is enhanced by a remote sequence element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10819-10823 (1994).
- 179) Danon, A. and Mayfield, S. P.: Light-regulated translational activators: Identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J.*, **10**, 3993-4001 (1991).
- 180) Mayfield, S. P., Cohen, A., Danon, A. and Yohn, C. B.: Translation of the *psbA* mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. *J. Cell Biol.*, **127**, 1537-1545 (1994).
- 181) Danon, A. and Mayfield, S. P.: Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science*, **266**, 1717-1719 (1994).
- 182) Staub, J. M. and Maliga, P.: Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *Plant J.*, **6**, 547-553 (1994).
- 183) Taniguchi, M., Kuroda, H. and Satoh, K.: ATP-dependent protein synthesis in isolated pea chloroplasts: Evidence for accumulation of a translation intermediate of the D1 Protein. *FEBS Lett.*, **317**, 57-61 (1993).
- 184) Kim, J., Klein, P. G. and Mullet, J. E.: Synthesis and turnover of photosystem II reaction center protein D1: Ribosome pausing increases during chloroplast development. *J. Biol. Chem.*, **269**, 17918-17923 (1994).
- 185) Kobayashi, H., Bogorad, L. and Miles, C. D.: Nuclear gene-regulated expression of chloroplast genes for coupling factor one in maize. *Plant Physiol.*, **85**, 757-767 (1987).
- 186) Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S.: Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.*, **3**, 109-136 (1996).

- 187) Ogawa, T.: A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4275-4279 (1991).
- 188) Kubicki, A., Funk, E., Westhoff, P. and Steinmuller, K.: Differential expression of plastome-encoded *ndh* genes in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the C-4 plant *Sorghum bicolor* indicates that the complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase is involved in cyclic electron transport. *Planta*, **199**, 276-281 (1996).