

高等植物のクロロフィル合成系の制御[‡]

東京大学 大学院 総合文化研究科

小林 康一*

1. はじめに

植物の先祖となる細胞が太古の昔にシアノバクテリアと共生して以来、植物は細胞内共生体である色素体が行う光合成に依存することで大いなる発展を遂げてきた。単細胞藻類では、色素体は光合成を行う葉緑体として専ら機能し、宿主細胞の生命活動の根拠を担っている。一方、高等植物では、色素体は葉緑体だけでなく、様々な機能を持つ形態へと分化することで、多様な細胞の機能を支えている。実際、葉肉細胞では葉緑体が活発に発達する一方、根や花卉では葉緑体形成は抑制され、色素体はアミロプラストやクロモプラストなどの非光合成色素体に分化する。このように植物は高度な多細胞系へと進化する過程で、細胞や組織の役割に応じて葉緑体の分化を誘導または抑制する機構を獲得してきたと考えられる。特に、葉緑体の発達に伴い活発に合成されるクロロフィルやその前駆体は、光増感酸化作用により活性酸素を発生させ、植物に深刻な光酸化ダメージを与えることから、その合成は光合成系の構築と連動して厳密に制御されている。最近の研究から、発達段階や光環境、ストレス条件に応じて、様々な調節因子や制御機構がクロロフィルの合成をコントロールしていることが明らかとなってきた。そこで、本稿では被子植物、とくにモデル植物のシロイヌナズナで明らかになってきたクロロフィル合成の制御機構について紹介したい。

2. 植物におけるクロロフィル合成経路

最初に、植物のクロロフィル合成経路について、鍵となる酵素や制御段階に沿って概説したい。各ステップの詳細や酵素の特性、進化、多様性などについては、本特集の他の記事や最近の総説を参照されたい¹⁻⁴⁾。

植物では、クロロフィル合成は色素体内で行われ

る。クロロフィルを含むテトラピロールの合成はグルタミン酸から始まり、グルタミルtRNA^{Glu}の還元によりテトラピロール代謝に独自の合成経路へと入る(図1)。この反応はHEMA遺伝子にコードされるグルタミルtRNA還元酵素(GluTR)によって触媒され、テトラピロール合成全体を調節する律速段階となっている。シロイヌナズナの場合、GluTRの3つのアイソフォームが存在することが知られており、そのうち、HEMAI遺伝子がコードするGluTR1がクロロフィル合成に主要な役割を果たす。さらにアミノ基の転移を経て、5-アミノレブリン酸(ALA)が合成される。その後、2分子のALAが縮合しピロール環を形成した後、さらにそれが4分子縮合し閉環することで、最初のテトラピロールであるウロポルフィリノーゲンIIIが合成される。シロヘムはウロポルフィリノーゲンIIIから分岐する経路により合成される。ウロポルフィリノーゲンIIIは脱水酵素(ALAD)による反応の後、脱炭酸を含む2段階の酸化反応を受け、プロトポルフィリンIX(Proto IX)へと変換される。Proto IXはクロロフィルとヘム合成の共通の基質であり、Fe²⁺が配位するとヘム(ヘムb)が作られる一方、Mg²⁺が配位するとMg-Proto IXが合成され、その後クロロフィル合成経路へと進む。Fe²⁺の配位はシングルペプチドのフェロキラーゼ(FeCh)により触媒されるのに対し、Mg²⁺の配位は3つのサブユニット(CHLD、CHLH、CHLI)から構成されるMg-キラーゼ(MgCh)によって触媒される。また、葉緑体タンパク質であるGUN4が、このMgChの酵素活性に必要なことが分かっている。Mg-Proto IXはメチル化を受けた後、Mg-Proto IX monomethylester cyclase(MgCY)に触媒される反応によって5番目の環状構造が形成され、プロトクロロフィリドへと変換される。CHL27は、MgCYの膜結合型サブユニットをコードする。そ

[‡] 解説特集「光合成を支えるテトラピロール代謝の多様性」

* 連絡先 E-mail: kkobayashi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

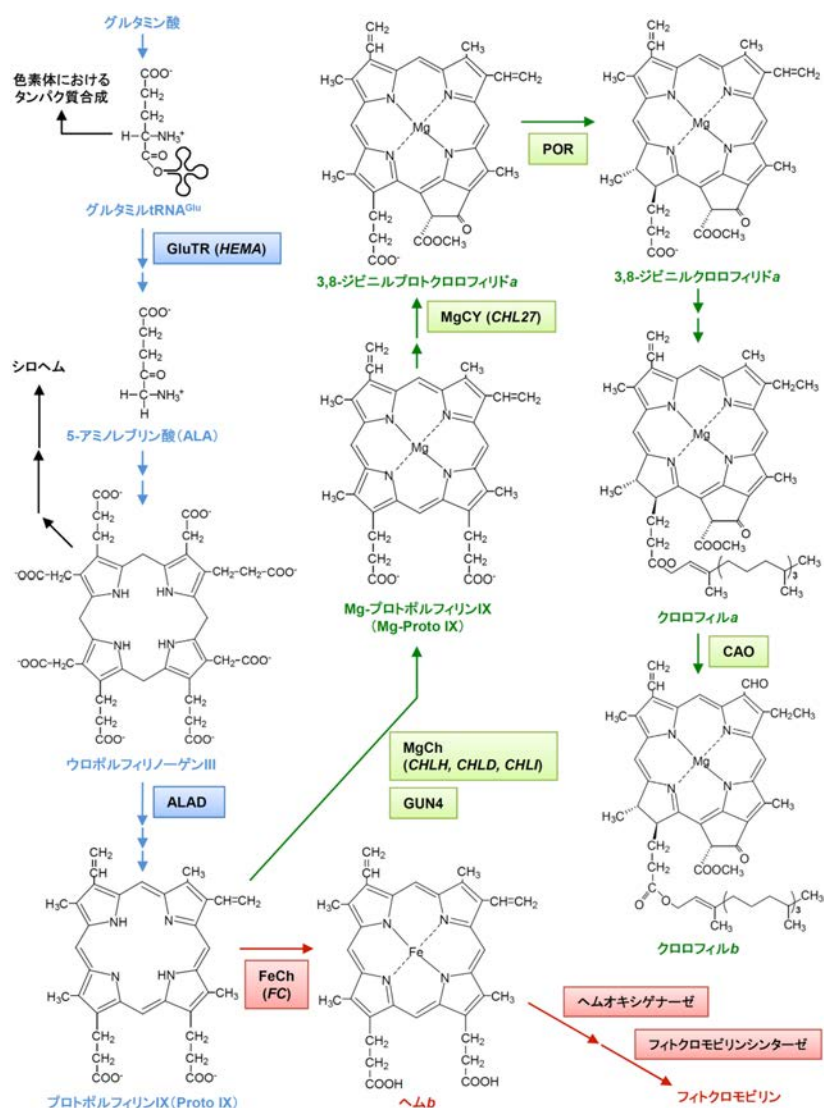


図1 高等植物におけるクロロフィル合成経路

青字と青矢印は、テトラピロール合成に共通する経路、赤字と赤矢印はヘム合成・分解経路、緑字と緑矢印はクロロフィル合成経路を示す。制御上重要なステップには、反応を触媒する酵素名（括弧内は酵素名と異なる場合の遺伝子名）を記した。

の後、プロトクロロフィリドはプロトクロロフィリド還元酵素 (POR) によってクロロフィリドaとなる。PORには、酵素反応に光を必要とするLPORと、必要としないDPORの二種の異なった酵素が知られている。シアノバクテリアを含め、藻類から裸子植物まではLPORとDPORを両方保持しており、その多くが暗所でクロロフィルを合成できるのに対し、被子植物はDPORを進化の過程で失ったため、暗所ではプロトクロロフィリドから先の合成は起らない。クロロフィリドaの合成後は、フィトール鎖が付加されることでクロロフィルaとなる。フィトール鎖の合成は、別経路において、CHLPの触媒するゲラニルゲラニルピロリン酸の還元によって行われる。クロロフィルa (ク

ロロフィリドa)の一部はオキシゲナーゼ (CAO) によってクロロフィルb (クロロフィリドb) に変換される。

3. 被子植物の生活環における、クロロフィル合成制御の変化

制御機構の詳細な解説に入る前に、被子植物の生活史に沿って、クロロフィル合成制御の変化を以降の章の構成とともに簡単に紹介したい。

休眠中の種子では、色素体は原色素体の形に退化しており、クロロフィル合成は起らない。休眠を打破し、地中 (暗所) で発芽した芽生えは、暗所特有の形態変化を行う (暗形態形成)。すなわち、黄化した子葉を閉じ、先端はフックを形成し、胚軸は著しく伸長する。この時、黄化子葉では、色素体は光合成能を持たないエチオプラストとして分化する。エチオプラスト内には、プロトクロロフィリドとPORの複合体がプロラメラボディの形で蓄積し、光を受けたら直ちにクロロフィルを合成できるように準備をしている。過剰なプロトクロロフィリドの蓄積

は光酸化の危険性も伴うため、この複合体形成は厳密な制御の下に行われる。第4章では、暗形態形成時における転写レベルでの制御を、第5章では酵素活性レベルでの制御を解説する。

黄化芽生えが地上 (明所) に出て光を受けると、胚軸の伸長は抑制され、フックは伸び子葉が展開する (光形態形成)。子葉の細胞内では、エチオプラストが速やかに葉緑体へと変換する。この時、葉緑体の発達に伴い多量のクロロフィルが光合成タンパク質と共に合成される。まず、エチオプラスト内に蓄積されたプロトクロロフィリドは共に蓄積したPORによってクロロフィリドへと変換され、プロラメラボディが崩壊するとともにチラコイド膜の形成が起こる。

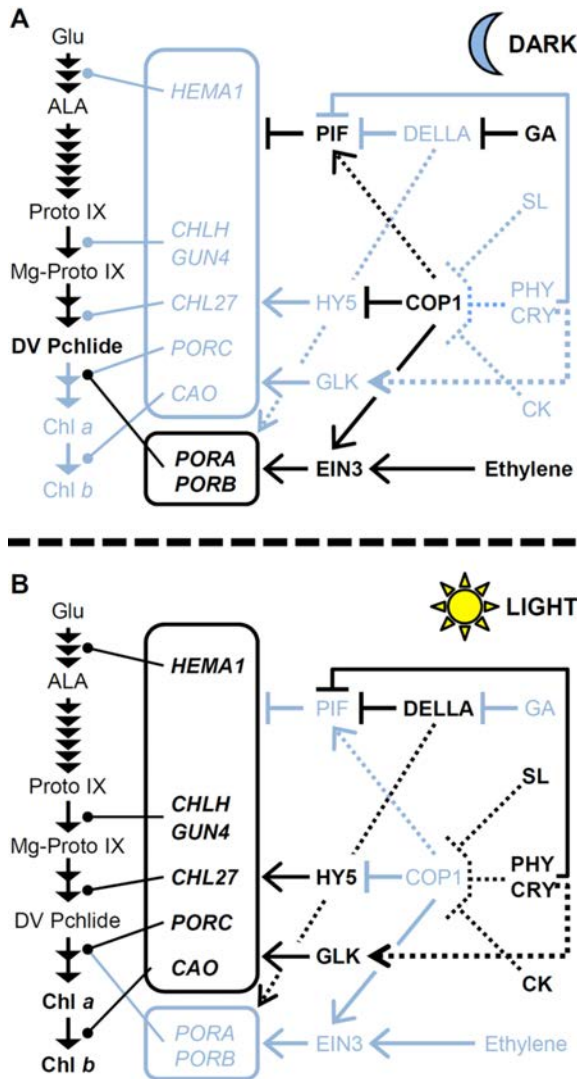


図2 暗形態形成 (A) および光形態形成時 (B) におけるクロロフィル合成遺伝子の転写制御モデル

暗所 (A) では、COP1がHY5の分解を引き起こすとともに、PIFの蓄積を誘導する。さらにジベレリン (GA) が、DELLAの分解を通してPIFを活性化する。正の制御因子であるHY5の分解と、負の制御因子であるPIFの活性化により、光誘導性のクロロフィル合成遺伝子 (*HEMA1*、*CHLH*、*GUN4*、*CHL27*、*PORC*、*CAO*) の発現は抑制される。一方、COP1の作用により蓄積したEIN3は、*PORA*と*PORB*のプロモーターに結合し、その発現を誘導する。明所 (B) では、フィトクローム (PHY) とクリプトクローム (CRY) がCOP1の機能を阻害することで、HY5の蓄積が起こる。サイトカイニン (CK) とストリゴラクトン (SL) もCOP1の抑制を介して、HY5の蓄積に寄与する。それに対し、PIFはDELLAによる阻害を受けるとともに、フィトクローム依存的な分解を受ける。*GLK*の遺伝子発現もPHYを介した光情報伝達によって誘導される。その結果、HY5、*GLK*の活性化とPIFの不活性化により、光誘導性のクロロフィル合成遺伝子の発現が上昇する。一方、EIN3はCOP1の不活性化とエチレンシグナルの減少により分解を受け、*PORA*と*PORB*の発現は減少する。DELLAも*PORA/B*の発現に対して促進的に働くことが示唆されているが⁸⁾、その意義は不明である。矢印とT字はそれぞれ正の制御と負の制御を表す。また、点線は間接的な制御を意味する。黒色と淡青色はそれぞれ、活性化された状態と不活性化された状態を示す。

フィル合成制御機構についての著者らの最近の研究を紹介し (第10章)、今後の課題について考えたい (第11章)。

4. 暗形態形成におけるクロロフィル合成の転写制御

暗所におけるクロロフィル合成の転写制御には、転写抑制因子であるphytochrome-interacting basic helix-loop-helix transcription factors (PIF) が大きな役割を担っている。PIFは暗所で核内に蓄積し、クロロフィル合成に関わる遺伝子の発現を抑制する。6種のPIFタンパク質のうち、少なくとも4種 (PIF1, 3, 4, 5) が暗所におけるクロロフィル合成抑制に関わっており^{6,7)}、特にPIF1とPIF3は*HEMA1*、*CHLH*、*GUN4*などの鍵となる段階を担う遺伝子の発現抑制に重要であることが示されている⁸⁾ (図2)。興味深いことに、*HEMA1*、*CHLH*、*GUN4*の転写産物は暗所で周期的な増減を繰り返すが、PIF1やPIF3はこれらの遺伝子の周期的発現に関わる⁸⁾。以上のようなPIFによる暗所抑制の重要性は、PIFを欠いた変異体が光照射後の酸化ストレスにより枯死 (photobleaching) することから明らかである。また、このPIFによる転写抑制には、植物ホルモンであるジベレリンが、負の制御因子で

それと同時に、*de novo*のクロロフィル合成が活性化し、光合成タンパク質とともに光合成装置を作り上げる。この光によるクロロフィル合成の誘導も、転写レベル (第6章) と酵素レベル (第9章) での活性化を両輪として行われる。その後、クロロフィル合成系は日周期に同調した形で制御される。クロロフィル合成の鍵遺伝子が概日時計にしたがってリズムを刻む一方 (第7章)、ヘム合成とクロロフィル合成の分岐点では明暗サイクルに応じてフローの切り替えが起こると考えられている (第9章)。さらに、強烈な光などのストレスによって葉緑体や光合成の機能が損なわれた時には、クロロフィル合成は遮断され、光酸化による傷害を防ぐ。これは主にクロロフィル合成系の転写抑制によって起こると考えられる (第8章)。その後、葉の老化に伴い、クロロフィルは合成から分解のステージへと移るが、分解については他の総説を参照されたい^{4,5)}。本稿の最後に、器官分化に応じたクロロ

あるDELLAを介して関与することが明らかとなった^{9,10)}。DELLAはPIFに直接結合することで、その転写抑制活性を阻害する機能を持つ。しかし暗所芽生えでは、DELLAはジベレリンの作用によりユビキチン化を受け分解されるため、PIFは阻害されることなく、クロロフィル合成遺伝子の発現を抑制する。つまり、ジベレリンはPIFの活性化を通して、暗所でクロロフィル合成遺伝子の発現を抑制する。

暗所では、PIFの働きにより光誘導性のクロロフィル合成遺伝子の発現が抑制される一方、*POR*のアイソフォーム (*PORA*および*PORB*) は活発に発現し、プロトクロロフィリドとともにプロラメラボディを形成する¹¹⁾。暗所における*POR*の発現には、ユビキチンE3リガーゼであるCOP1が強く関与する (図2)。COP1は光情報伝達系の抑制因子であり、暗所で光形態形成を抑制する¹²⁾。COP1を欠損した変異体では、暗所でも光形態形成が進行するとともに、*PORA*と*PORB*の発現が大幅に減少し、色素体のプロラメラボディが消失する¹³⁾。このCOP1を介した*POR*の発現誘導機構の詳細はまだ良く分かっていないが、少なくともその一つとしてエチレンシグナリングが関与することが示されている。エチレンシグナルの正の制御因子であるEIN3/EIL1は、エチレンとCOP1の作用により暗所で蓄積し、*PORA*と*PORB*のプロモーター領域に直接結合することで発現を誘導する¹⁴⁾。また、新規の植物ホルモンとして注目されているストリゴラクトンも、COP1の核への局在を阻害することで、暗所での*POR*の発現を減少させることが示されている¹⁵⁾。

さらに最近、フィトクロームAの下流で働く転写因子であるFAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 (FHY3) およびFAR-RED-IMPAIRED RESPONSE1 (FAR1) が、ALA脱水酵素 (ポルフォビリノーゲン合成酵素) をコードする*ALADI* (*HEMB1*) の発現に関与することが示された¹⁶⁾。これらの因子を共に欠く二重変異体では、黄化子葉における*ALADI*の発現が減少し、暗所でのポルフォビリノーゲン合成活性が低下すると共に、プロトクロロフィリドの蓄積も減少した。これらの因子は*ALADI*のプロモーターに直接結合し発現を誘導するが、その活性はPIF1によって抑制される。その一方で、その他のテトラピロール合成遺伝子、特に鍵遺伝子に対する影響は小さく、これらの因子が、暗形態形成時のテトラピロール合成全体にどれほど関わって

いるのかは、今のところ不明である。

5. 暗所におけるクロロフィル合成のフィードバック制御

クロロフィル合成経路にはいくつかの重要な制御ポイントが知られているが、その中でも、GluTRの触媒する反応は、グルタミルtRNA^{Glu}からテトラピロール独自の合成経路に入るステップであり (図1)、テトラピロール合成全体を制御する律速段階となっている。実際、暗所芽生えにALAを与えこの律速段階をバイパスさせると、プロトクロロフィリドやクロロフィル合成の中間体が顕著に蓄積することから¹⁷⁾、GluTRを介したALA合成制御の重要性が明らかである。

このステップでは、主要なGluTRをコードする*HEMAI*の発現制御に加え、酵素活性レベルでも負の制御を受ける。特に、プロトクロロフィリドの蓄積とALA合成には強い負の相関が見られることから、プロトクロロフィリドを介したGluTRのフィードバック阻害が考えられている¹⁸⁻²⁰⁾。この負の制御で最も重要な役割を果たす因子が、FLUである。FLUはプロトクロロフィリドやその他のクロロフィル前駆体の蓄積に応じて、*HEMAI*のコードするGluTR1と直接結合することで、この反応を阻害すると考えられている²¹⁻²³⁾。さらに最近、FLUはCHL27やPOR、CHLPと複合体を形成することが分かり、この複合体がプロトクロロフィリド依存的にGluTR1と結合することで、ALA合成を制御するモデルが示されている²⁴⁾ (図3)。FLUを欠いた変異体では、暗所でプロトクロロフィリドを過剰に蓄積し、その後の光照射により枯死することから、この因子は、黄化子葉が光照射後に過剰な光酸化傷害を受けないように、暗所でのプロトクロロフィリド蓄積を適切に保っていると考えられる。

テトラピロール合成経路の最終産物の一つであるヘムも、GluTRのフィードバック阻害を引き起こすことが示されている。*in vitro*での解析から、ヘムはGluTRの触媒中心やFLU結合部位とは異なった部分に結合し、この酵素の活性を阻害することが明らかとなった^{21,25-27)}。さらに、ヘムオキシゲナーゼの欠損などのヘム分解が阻害された変異体では、GluTRの活性が抑制されることから、実際に*in vivo*でもヘムによるGluTRのフィードバック阻害が働くことが示唆された¹⁷⁾。また、ヘムオキシゲナーゼの欠損が*flu*変異によるプロトクロロフィリドの過剰蓄積を抑制したことか

能性が考えられる。

緑化を正に制御するもう一つの転写因子が、GLK (GLK1およびGLK2) であり、クロロフィル合成系や集光性アンテナタンパク質の遺伝子発現を特異的に誘導する。GLKアイソフォームを共に欠いた変異体 (*glk1 glk2*) では、クロロフィルやアンテナタンパク質が減少し、pale greenの表現型を示す³³⁾。この二重変異体に誘導型GLK遺伝子を導入した植物体では、*HEMA1*、*CHLH*、*GUN4*、*CHLM*、*CHL27*、*PORA*、*PORB*、*PORC*、*CAO*の発現がGLK1やGLK2の誘導後に直ちに上昇したことから、これらの転写因子の直接のターゲットとして見出された³⁴⁾ (図2)。さらに、GLK1については、クロマチン免疫沈降解析から、実際にこれらの遺伝子のプロモーター領域に結合することが確認された。黄化芽生えへの照射によりGLK2の遺伝子発現が急激に増加することから³⁵⁾、光により誘導されたGLK2がそれに続くターゲット遺伝子の発現を上昇させると考えられる。このGLK2の光誘導はフィトクロームを介して起こることが分かっており³⁵⁾、HY5タンパク質の安定化と共に、フィトクロームが光形態形成時のクロロフィル合成に重要な役割を果たしている。実際、フィトクロームの変異体では*HEMA1*や*CHLH*、*GUN4*の光応答性が大幅に減少し^{28,29,36)}、クロロフィル合成が強く抑制されることが明らかとなっている³⁷⁾。

7. 恒常的なクロロフィル合成に関わる転写制御

光形態形成後は、クロロフィル合成の鍵遺伝子は概日リズムに応じてその発現が制御され、クロロフィル合成の恒常性を維持する。クロロフィル合成遺伝子のミニアレイ解析から、*HEMA1*、*CHLH*、*CHL27*、*CAO*の発現は、昼間高く夜間低いという概日リズムで振動することが分かった³⁸⁾。これらの遺伝子の発現は、集光性アンテナ遺伝子とよく同調していたことから、アンテナの形成とクロロフィル合成を協調させる制御ポイントとなっていると考えられる。さらに、大規模データを用いた遺伝子の共発現ネットワーク解析から、*GUN4*や*CHLP*、*CLA1* (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthaseをコードし、フィトール鎖の合成に関与する) が、核コードの光合成遺伝子と共に上記の鍵遺伝子と強く共発現することが明らかとなった^{2,39)}。また、*PORA*と*PORB*も、上記の遺伝子とは若干異なる周期の概日リズムで振動することから³⁸⁾、クロ

ロフィル合成のリズム制御に関与していると思われる。

明暗による光周サイクルにおいては、フィトクロームとクリプトクロームが概日時計への光シグナルの入力を行う。フィトクロームの制御下にあるGLK2の発現も概日時計に従ったリズムを刻むことから³³⁾、光シグナルはGLK2の日周変化を介して、クロロフィル合成や集光アンテナに関わる遺伝子の概日リズムに関与すると考えられる。さらに、PIF1やPIF3の機能欠損により、*HEMA1*や*CHLH*、*GUN4*の暗所における概日リズムが乱れることから⁸⁾、これらの転写因子もフィトクロームを介したクロロフィル合成系の光周期的な遺伝子発現に関与する可能性が考えられる。これらの因子は概日時計の中心振動体には影響を及ぼさないことから、時計シグナルの出力に関わっていると予想されている。さらに興味深いことに、概日リズムの中心振動体の一つであるTIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1) が、*CHLH*のプロモーターに直接結合することで、その概日リズムを制御することが明らかとなった⁴⁰⁾。TOC1の発現を抑制した変異体では、*CHLH*の発現が本来周期的に減少するタイミングで逆に上昇し、過剰発現体では、*CHLH*の発現が高くなる時間帯でも常に抑制された表現型を示した。この結果は、最近報告されたTOC1の転写抑制因子としての性質とよく一致する⁴¹⁾。

また最近、GATA結合型の転写因子、GNC (GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON METABOLISM-INVOLVED) とそのパラログであるCGA1 (CYTOKININ-RESPONSIVE GATA TRANSCRIPTION FACTOR1) がクロロフィル合成に関わることが報告された^{42,43)}。GNCとCGA1を共に欠損すると*HEMA1*、*GUN4*、*PORB*や*PORC*の発現が減少する一方、これらの転写因子の過剰発現により上記遺伝子の発現が上昇することが示された。しかし、GNCとCGA1は共に上記遺伝子のプロモーター領域には直接結合しないことから、クロロフィル合成遺伝子の発現に対しては、間接的に関わっていると考えられる⁴³⁾。GNCとCGA1の遺伝子発現は光や窒素、サイトカニンにより上昇する一方、ジベレリンやその下流のPIF3により抑制されることが知られている⁴²⁻⁴⁴⁾。また、これらの因子は、クロロフィル量だけでなく、発芽率や葉の大きさ、葉緑体の分裂、開花時期や老化など、植物の生長に多様な影響を与えること

が分かっており⁴²⁻⁴⁵⁾、これらにおける変化が、二次的にクロロフィル合成遺伝子の発現に影響しているのかもしれない。

8. プラスチドシグナルによるクロロフィル合成の転写制御

環境の日周変動に加え、自然界では植物は様々な環境変化に対応しなければならない。光合成において光は毒にもなるため、葉緑体の機能を損なうような環境下では、植物は核内で光合成関連遺伝子の発現を抑制する仕組みを発達させている。この際、核は葉緑体からのシグナル（プラスチドシグナル）により葉緑体の機能状態をモニターし、光合成関連遺伝子の発現をその機能状態に合わせて調節すると推測されている⁴⁶⁾。実際、ノルフルラゾンなどの除草剤処理によって葉緑体の機能を欠損させても、核の光合成関連遺伝子の発現抑制が起こらなくなった変異体が単離されたことから、色素体から核への逆行性制御（レトログレードシグナリング）の存在が強く支持された⁴⁷⁾。これらの変異体は*genomes-uncoupled* (*gun*) と名付けられ、*gun1*から*gun5*までが単離された。*gun1*以外の4つはテトラピロール代謝に関与し、特にMgChの機能に関わる*gun4*とCHLHに変異を持つ*gun5*が発見されたことから、MgChとプラスチドシグナルの関わりが示唆された⁴⁸⁻⁵¹⁾。未だにその詳細は明らかでない一方³⁾、最近、FeChのアイソフォームであるFC1やHEMA2にコードされるGluTRの過剰発現株が*gun*表現型を示すことが報告され⁵²⁾、ヘムがレトログレードシグナリングに関与する可能性が示された。実際、*gun1*と*gun2*はそれぞれヘムオキゲナーゼとフィトクロモビルシンターゼに変異を持ち、これらはともにヘム代謝に関わる酵素であることから、レトログレードシグナリングにおけるヘムの役割が注目されている。レトログレードシグナリングに関しては、詳しくは最近の総説などを参照されたい^{3,46,53,54)}。

核にコードされた光合成関連遺伝子と同様に、大部分のクロロフィル合成遺伝子は、ノルフルラゾンによる葉緑体の機能欠損によって、その発現が強く抑制される⁵⁰⁾。このことは、クロロフィル合成経路が葉緑体の機能状態に応じて、遺伝子発現のレベルで統合的に制御されていることを示している。しかし、これらの抑制は、*gun1 gun5* 二重変異体では軽減される。特に、HEMA1やCHLHなどの鍵段階の遺伝子で顕著に

軽減されることから⁵⁰⁾、プラスチドシグナルは主にこれらの遺伝子の抑制を介して、クロロフィル合成経路を制御していると考えられる。これらのクロロフィル合成遺伝子と同様に、GLK1とGLK2の発現も葉緑体の発達阻害剤で減少するが、*gun*変異体ではその抑制が解除された³⁴⁾。さらに、GUN1はGLK1の遺伝子発現を抑制することで、クロロフィル合成や光合成関連遺伝子の発現を抑制することが示された⁵⁵⁾。これらの結果から、GLKはレトログレードシグナリングの下流で、葉緑体の機能状態に応じてクロロフィル合成を転写レベルで制御していると考えられる。

また、LHCB遺伝子の発現解析から、HY5もレトログレードシグナリングにおける抑制因子として働くことが示唆されている⁵⁶⁾。HY5は光シグナルの正の制御因子と考えられているが、このモデルによれば、葉緑体の機能が阻害された時には、HY5は正の制御因子から負の制御因子へと変わることで、ターゲット遺伝子の発現を抑制する。実際、クリプトクロームの変異体や*hy5*変異体ではこの発現抑制が働かないため、強光ストレスに弱くなることが示されている。このモデルでは、光シグナルはGUN1とは独立な経路で働き、葉緑体の機能阻害時にこの二つの制御系が働くことが、核における光合成関連遺伝子の抑制に重要なことが示されている。プラスチドシグナルがどのようにHY5の機能を転換するのかは現時点では不明であり、今後の解明が期待される。

9. 明所における酵素活性レベルでのクロロフィル合成制御

暗所におけるGluTR1の活性は、それをコードするHEMA1遺伝子の発現抑制に加え、活性阻害因子であるFLUやヘムによって低く抑えられている。FLUは暗所で蓄積するが、光照射後もそのタンパク質量は大きく変わらない。実際、*flu*変異体では光照射下でもALA合成活性が野生株より高いことから^{19,21)}、明所でもある程度ALA合成制御に寄与していることが分かる。それに対し、GluTR1のタンパク質量はHEMA1の誘導に伴い光照射で大幅に上昇する²¹⁾。その結果、大量に合成されたGluTR1がFLUによる抑制を上回り、光形態形成時のテトラピロール合成を活性化させると考えられている。さらに、最近の研究によると、光照射によるプロトクロロフィリドの減少も、FLUによるGluTRの活性抑制の解除に寄与する可能性が示され

ている。すなわち、暗所などのプロトクロロフィリドが蓄積した条件では、PORやCHL27と複合体を形成したFLUがGluTRと結合しその活性を抑制するが、光によりプロトクロロフィリドが代謝されると、GluTRのみが複合体から解離し、ALA合成を活性化するというモデルが提案されている²⁴⁾(図3)。この考えは、GluTRが暗所でのみFLUと結合することや²⁴⁾、ALA合成の抑制が、FLU依存的にPORと結合したプロトクロロフィリドによって引き起こされること¹⁹⁾などに基づいている。プロトクロロフィリド量とALA合成活性は、明暗に従って逆相関した形で増減することから¹⁹⁾、この制御機構は、昼夜の日周リズムに対しても働いていると考えられる。

これらの仕組みに加え、光照射後には、クロロフィル合成へのフローが一気に増加すると考えられる。それによりヘム経路へのフローが相対的に減少することで、ヘムによるGluTRのフィードバック阻害が解除されることも、光形態形成時のクロロフィル合成の活性化に寄与するかもしれない。実際、FeChの過剰発現がクロロフィル含量を低下させることが報告されており⁵²⁾、過剰発現したFeChにより合成されたヘムが、GluTRのフィードバック阻害を引き起こしている可能性も議論されている。光照射によりクロロフィル合成フローが増加する一つの要因としては、*CHLH*や*GUN4*などのクロロフィル経路の鍵遺伝子の発現が*HEMAI*と共に急激に上昇することが挙げられる³⁸⁾。さらに以下に述べるように、酵素活性のレベルでクロロフィル合成フローを活性化する仕組みが働くと考えられる。

Proto IXにFe²⁺が配位するとヘムが、Mg²⁺が配位するとMg-Proto IXが合成されクロロフィル合成経路へと進む。クロロフィルとヘムの合成はそれぞれ、発達段階や環境、組織によって異なる制御を受けること、また一方、基質であるProto IXは非常に強い光増感酸化能を持ち、細胞内にプールしておけないことから、Proto IXのヘムおよびクロロフィル合成系への振り分けは、FeChとMgChによって厳密な制御を受けると考えられる。MgChの活性は光照射により上昇し、日周期や概日リズムにより変動する。すなわち、明期後すぐに最大となり、その後暗期に向けて減少する。この変化は、*CHLH*の発現パターンとよく一致することから、*CHLH*の発現がその活性変化に大きく影響すると考えられる⁵⁷⁾。それに加え、活性化のレベルでも

日周期による制御を受けている可能性も示唆されており、その一つとして、葉緑体ストロマにおけるATPとMg²⁺量の変動が関与すると考えられている。ATPやMg²⁺は共にMgChの活性に必要であるが^{58,59)}、その葉緑体内での濃度はどちらも、暗期に低く、明期に高くなる^{60,61)}。そのため、日周期においては、これらの補因子の増減を介してMgChの酵素活性を調節すると考えられる(図3)。特に、Mg²⁺は*CHLH*の葉緑体内での局在に影響することも分かっており、Mg²⁺濃度の増加により*CHLH*は可溶性画分から膜画分へ移行する^{62,63)}。この局在の変化もMgChの活性調節に寄与しているのかもしれない。さらに、*CHLH*はポルフィリンの濃度依存的に膜へ局在することも示されている。*GUN4*も*CHLH*と同様の挙動を示し、これらはお互いの局在に影響しあうことから^{64,65)}、*GUN4*はMgChの酵素活性調節だけでなく、膜における複合体形成にも関与する可能性が考えられる。シアノバクテリアの*Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*)では、Mg²⁺による*CHLH*の活性化に*GUN4*が関与することも示されており⁶⁶⁾、MgChの活性調節機構におけるこれらの因子の動態の詳細な解明が待たれる。

一方で、FeCh活性はMgCh活性とは正反対の日周変化を示し、明期の後半から暗期の始まりにかけて高くなり、その後減少することが報告されている⁵⁷⁾。興味深いことに、FeChの活性はATPによって阻害されることが示されており⁶⁷⁾、ストロマにおけるATP濃度の変化が、MgChとFeChの切り替えに関与している可能性も考えられる。

ATPやMg²⁺による活性化に加え、酸化還元状態がMgChの活性に影響を与えることも明らかとなっている。*Synechocystis*の組み換えタンパク質を用いた*in vitro*での実験から、還元剤であるdithiothreitolがMgChの活性を大幅に上昇させることが示された⁶⁸⁾。さらに、*CHLI*や*CHLH*のチオール基における修飾がMgChの活性に必須であった。特に、*CHLI*はATPase活性を持ち、Mg²⁺の配位に必要な加水分解エネルギーを供給すると考えられているが、システイン残基がその活性に寄与していることが示された。また、同様に組み換えタンパク質を用いた研究により、高等植物の*CHLI*は葉緑体型のチオレドキシンのターゲットであり⁶⁹⁾、チオレドキシンを介したシステイン残基の還元により、シロイヌナズナの二つのIサブユニット(*CHLI1*および*CHLI2*)のATPase活性が顕著に上昇

することが分かった^{70,71}). さらに*in vivo*でも、CHLIは葉緑体型チオレドキシシンと相互作用し還元を受けることが、エンドウを用いた解析により示された⁷²). ATPase活性だけでなく、MgCh複合体の活性もIサブユニットの還元により大幅に上昇したことから、CHLIの還元がMgChの活性化に重要であることが明らかとなった(図3)。一方で、チオレドキシシンドメインを持つNADPH依存型チオレドキシシン還元酵素(NTRC)は葉緑体ストロマに局在し、CHLIのATPaseを活性化するが、MgChの全体としての活性には寄与しないことが未発表データの形で報告されている⁷³). しかし、Luoら⁷²)の報告によると、NTRCはCHLIと相互作用せず、またMgChの活性化もしないことから、CHLIはNTRCの直接のターゲットではない可能性も示されている。光合成電子伝達を介して還元を受けるチオレドキシシンは、酵素タンパク質に光シグナルを伝達する因子として働くことが知られている。実際、数多くの葉緑体酵素タンパク質がチオレドキシシンの還元によりそのスイッチが調節されている⁷⁴). CHLIに見られるようなチオール基を介したMgChの活性調節も、光照射に応答したクロロフィル合成経路の活性化に寄与していると考えられる。

10. 器官分化に応じた色素体分化とクロロフィル合成制御

発芽前の植物の種子では、色素体は原色素体と呼ばれる未分化な形態に退化している。その後、植物の器官分化に伴い、葉では葉緑体へと分化する一方、根などの非光合成組織では光合成能力を持たない白色体などの色素体へと分化する。これらの色素体の分化は一方通行ではなく、発達過程や生育環境に応じて相互変換できることが知られているが、その分子制御メカニズムはまだよく分かっていない。特に、光増感酸化作用をもつクロロフィルおよびその前駆体の合成は、色素体の分化と協調して厳密な制御を受ける必要がある。これまで、クロロフィル合成制御は専ら光合成器官において、特に光形態形成の過程において盛んに研究されてきたが、非光合成器官における制御機構に関しては、ほとんど謎のままだった。そこで著者らは、非光合成組織ではどのように葉緑体分化が抑制されているのか、という視点から根におけるクロロフィル合成制御機構の解明を試み、最近その成果を報告したので^{39,75})、最後にこの場を借りて簡単に紹介し

たい。

シロイヌナズナの根は、光が当たる環境においても、葉緑体の分化はほとんど起こらず、クロロフィルの合成は低く抑えられている。しかし、地上部を切り離した根では、クロロフィル合成が活性化し、緑化が引き起こされることが分かった⁷⁵)。この切除根の緑化は、オーキシンの添加により抑制された。さらにオーキシンの極性輸送における変異やオーキシンシグナルの変異も根の緑化を引き起こしたことから、通常は、根では地上部から輸送されるオーキシンの作用によって、クロロフィルの合成が抑制されていると考えられた。一方、根でのクロロフィル合成がサイトカイニン添加により上昇したのに対し、サイトカイニンレセプターの変異体では減少したことから、オーキシンとは反対に、サイトカイニンはクロロフィル合成に促進的に働くことが分かった。また、これらの緑化した根では、*HEMA1*や*CHLH*、*CHL27*、*CHLP*などのクロロフィル合成における鍵遺伝子の発現が強く誘導され、さらに発現レベルの変化が、根におけるクロロフィル量の変化とよく一致したことから、根の緑化はクロロフィル合成遺伝子の発現上昇によって引き起こされていることが示された。

そこで次に、これらの植物ホルモンが根でのクロロフィル合成を調節する仕組みについて詳しく調べた。その結果、根でのクロロフィル合成遺伝子の発現にはHY5が必須であり、植物ホルモンはHY5を介して緑化制御に関与することが分かった。オーキシンシグナル欠損により緑化した根では、HY5タンパク質の蓄積が見られたことから、これらのホルモンは、HY5の蓄積を介して根の緑化を調節している可能性が考えられる。*cop1*⁷⁶)や*det1*⁷⁷)といった、HY5の分解が阻害された変異体で根の緑化が顕著に起こることも、この結果とよく一致する。一方で、ホルモンシグナリングの改変により緑化した根では、*GLK2*の発現が上昇していることも明らかとなった。さらに、*GLK1*や*GLK2*を過剰発現した植物体では、根でのクロロフィル蓄積が強く誘導されたことから、これらの因子の発現上昇により直接クロロフィル合成が活性化されることが分かった。シロイヌナズナの野生株の根では*GLK1*はほとんど発現しないことから³³)、根でのクロロフィル合成にはHY5と*GLK2*の働きが重要であり、植物ホルモンは少なくともこれらの二つの転写因子を介して、遺伝子の発現制御を行っていることが

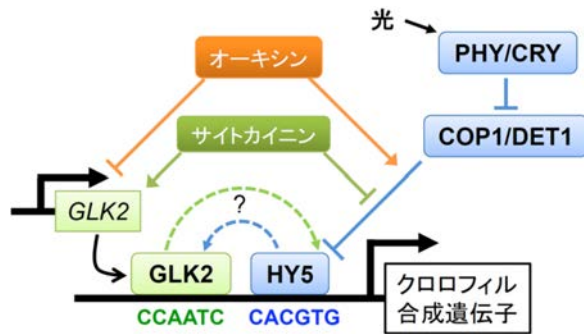


図4 根における転写レベルでのクロロフィル合成制御モデル (79より改変)

光はフィトクローム (PHY) やクリプトクローム (CRY) に受容され、COP1によるHY5の分解を抑制する。サイトカイニンもHY5の安定化を誘導するのに対し、オーキシシンは反対に働く。蓄積したHY5はプロモーター上のG-box (CACGTG) に結合し、クロロフィル合成遺伝子の発現を誘導する。サイトカイニンはGLK2の遺伝子発現も誘導し、オーキシシンはそれを抑制する。GLK2は推定認識配列 (CCAATC) を介し、クロロフィル合成遺伝子の発現を上昇させる。G-boxとCCAATC配列は、クロロフィル合成を含む光合成共発現遺伝子のプロモーター上に有意に高頻度で共存することから⁴⁰⁾、これらの配列を介したHY5とGLKの相互作用が想定される。

明らかとなった (図4)。これらの結果は、通常は光合成を行わない根の細胞も、環境に応じて葉緑体を分化させる能力を持っており、それが植物ホルモンを介した器官分化と協調した形で制御されていることを示している。

さらに、HY5とGLKの遺伝学的な相互作用を調べるため、*hy5*変異体でGLK1およびGLK2を過剰発現させたところ、それらの個体は*hy5*とGLK過剰発現株との中間的な表現型を示した。この結果は、HY5はGLKの機能に必須ではないが、重要であることを意味している。GLKの過剰発現により根でのHY5のタンパク質量が増加していたことから、直接的な相互作用をしている可能性も考えられる⁷⁵⁾。HY5はプロモーター上のG-boxと名付けられたシス配列に結合する一方、GLKはCCAATCという新規のシス配列と相互作用すると推測されている。プロモーターのシス配列解析から、クロロフィル合成の鍵遺伝子である*CHLH*、*CHL27*、*CHLP*と、これらと強く共発現する光合成関連遺伝子のプロモーター上には、上記のG-boxとCCAATC配列が有意に共存していることが明らかとなった³⁹⁾ (図4)。この結果は、これらのシス配列が、クロロフィル合成および光合成関連遺伝子の共発

現制御に重要な役割を果たす可能性を示唆している。さらに、*CHLH*のプロモーター解析から、G-boxは特に根で*CHLH*の転写活性に強い影響を与えることが明らかとなった³⁹⁾。HY5の機能欠損は、根でのクロロフィル合成を完全に阻害する一方^{75,78)}、葉では大きな影響を与えない⁷⁹⁾。それに対し、GLKの機能欠損は、根では大きな影響を与えない一方⁷⁵⁾、葉ではクロロフィル合成を強く阻害する³³⁾。これらの結果は、HY5、GLKと、それらが結合するシス配列における作用機構が、葉と根では大きく異なることを示している。特に、地上部では関わる因子やそれによる制御機構がより複雑になっていると思われる、クロロフィル合成に関わる遺伝子発現の制御機構の解明に向け、さらなる解析が必要である。

11. おわりに

約35億年前にシアノバクテリアで酸素発生型光合成が誕生して以来、光化学系システムそのものはほとんど変化せずに、今日の植物まで受け継がれてきたと言われている。同様に、クロロフィル*a*および*b*も、葉緑体獲得の際に植物に持ち込まれて以来、その構造は一切変わることなく光合成に使われてきた。その一方で、クロロフィルの代謝制御レベルでは、生物の生活史や生育環境に適応する形で、生物種ごとに大きな変化を遂げてきたのだろう。その中でも、ここでは、被子植物、それも主にモデル植物であるシロイヌナズナで分かってきたことを紹介した。近年の解析技術の進歩やデータの蓄積により、多くのことが明らかとなったが、依然として未解明な部分も数多く残されている。クロロフィル合成に直接関与することが明らかとなった転写因子はまだ片手で数えるほどであり、協調的な遺伝子発現がどのように維持されているかは謎である。タンパク質レベルでは、プロトクロロフィリドなどの合成中間体によるフィードバック制御について、ようやくその仕組みに迫り始めたところである。Proto IX以降のクロロフィル合成中間体は、どれも強い光増感酸化作用を持っており、合成量の微調整や基質の正確な受け渡しが常に必要となるが、その制御についてもほとんど明らかでない。また、光合成組織と非光合成組織でのクロロフィル合成制御の違いについても、今後の大きな研究課題として残っている。

ここまで紹介してきたことは特定の植物種におい

て実験室で明らかとなったことであり、実際の自然環境ではその制御もまた大きく異なるかもしれない。自然界では、多様な植物種が様々な環境下で固有の生活を営んでおり、クロロフィル合成制御機構の多様性もまた、様々に存在していると想像される。クロロフィル合成制御の研究は、まだ始まったばかりである。

Received June 30, 2012, accepted July 30, 2012, Published August 31, 2012

参考文献

- Masuda, T. (2008) Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls, *Photosynth. Res.* 96, 121-143.
- Masuda, T. and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131-1149.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, A. G., Tanaka, A. and Terry, M. J. (2010) The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle, *Trends Plant Sci.* 15, 488-498.
- Tanaka, R., Kobayashi, K. and Masuda, T. (2011) Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis Book* 9, e0145.
- Hörtensteiner, S. (2012) Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown, *Plant Mol. Biol.* in press.
- Leivar, P., Tepperman, J. M., Monte, E., Calderon, R. H., Liu, T. L. and Quail, P. H. (2009) Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young *Arabidopsis* seedlings, *Plant Cell* 21, 3535-3553.
- Shin, J., Kim, K., Kang, H., Zulfugarov, I. S., Bae, G., Lee, C. H., Lee, D. and Choi, G. (2009) Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7660-7665.
- Stephenson, P. G., Fankhauser, C. and Terry, M. J. (2009) PIF3 is a repressor of chloroplast development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7654-7659.
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J. P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M. J., Genschik, P. and Achard, P. (2011) DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 23, 1849-1860.
- Lau, O. S. and Deng, X. W. (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones, *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 571-577.
- Armstrong, G. A., Apel, K. and Rüdiger, W. (2000) Does a light-harvesting protochlorophyllide *a/b*-binding protein complex exist?, *Trends Plant Sci.* 5, 40-44.
- Bae, G. and Choi, G. (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 281-311.
- Sperling, U., Franck, F., van Cleve, B., Frick, G., Apel, K. and Armstrong, G. A. (1998) Etioplast differentiation in *Arabidopsis*: both PORA and PORB restore the prolamellar body and photoactive protochlorophyllide-F655 to the *cop1* photomorphogenic mutant, *Plant Cell* 10, 283-296.
- Zhong, S., Zhao, M., Shi, T., Shi, H., An, F., Zhao, Q. and Guo, H. (2009) EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of *Arabidopsis* seedlings, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21431-21436.
- Tsuchiya, Y., Vidaurre, D., Toh, S., Hanada, A., Nambara, E., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and McCourt, P. (2010) A small-molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolactone, *Nat Chem Biol* 6, 741-749.
- Tang, W., Wang, W., Chen, D., Ji, Q., Jing, Y., Wang, H. and Lin, R. (2012) Transposase-derived proteins FHY3/FAR1 interact with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 to regulate chlorophyll biosynthesis by modulating HEMB1 during deetiolation in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 24, 1984-2000.
- Terry, M. J. and Kendrick, R. E. (1999) Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient *aurea* and *yellow-green-2* mutants of tomato, *Plant Physiol.* 119, 143-152.
- Huang, L. and Castelfranco, P. A. (1989) Regulation of 5-aminolevulinic acid synthesis in developing chloroplasts : I. Effect of light/dark treatments in vivo and in organello, *Plant Physiol.* 90, 996-1002.
- Richter, A., Peter, E., Pörs, Y., Lorenzen, S., Grimm, B. and Czarniecki, O. (2010) Rapid dark repression of 5-aminolevulinic acid synthesis in green barley leaves, *Plant Cell Physiol.* 51, 670-681.
- Stobart, A. K. and Ameen-Bukhari, I. (1986) Photoreduction of protochlorophyllide and its relationship to delta-aminolaevulinic acid synthesis in the leaves of dark-grown barley (*Hordeum vulgare*) seedlings, *Biochem. J.* 236, 741-748.
- Goslings, D., Meskauskiene, R., Kim, C., Lee, K. P., Nater, M. and Apel, K. (2004) Concurrent interactions of heme and FLU with Glu tRNA reductase (HEMA1), the target of metabolic feedback inhibition of tetrapyrrole biosynthesis, in dark- and light-grown *Arabidopsis* plants, *Plant J.* 40, 957-967.
- Meskauskiene, R. and Apel, K. (2002) Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU, *FEBS Lett.* 532, 27-30.
- Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F.,

- op den Camp, R. and Apel, K. (2001) FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12826-12831.
24. Kauss, D., Bischof, S., Steiner, S., Apel, K. and Meskauskiene, R. (2012) FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the Mg(++)-branch of this pathway, *FEBS Lett.* 586, 211-216.
25. Pontoppidan, B. and Kannangara, C. G. (1994) Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA(Glu) reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis, *Eur. J. Biochem.* 225, 529-537.
26. Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. and von Wettstein, D. (1996) Expression of catalytically active barley glutamyl tRNA^{Glu} reductase in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9287-9291.
27. Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. and von Wettstein, D. (1998) Barley glutamyl tRNA^{Glu} reductase: mutations affecting haem inhibition and enzyme activity, *Phytochemistry* 47, 513-519.
28. McCormac, A. C. and Terry, M. J. (2002) Light-signalling pathways leading to the co-ordinated expression of HEMA1 and Lhcb during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 32, 549-559.
29. Stephenson, P. G. and Terry, M. J. (2008) Light signalling pathways regulating the Mg-chelatase branchpoint of chlorophyll synthesis during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1243-1252.
30. Lee, J., He, K., Stolz, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I. and Deng, X. W. (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development, *Plant Cell* 19, 731-749.
31. Vandenbussche, F., Habricot, Y., Condiff, A. S., Maldiney, R., Van der Straeten, D. and Ahmad, M. (2007) HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 49, 428-441.
32. Hedtke, B., Alawady, A., Albacete, A., Kobayashi, K., Melzer, M., Roitsch, T., Masuda, T. and Grimm, B. (2012) Deficiency in riboflavin biosynthesis affects tetrapyrrole biosynthesis in etiolated *Arabidopsis* tissue, *Plant Mol. Biol.* 78, 77-93.
33. Fitter, D. W., Martin, D. J., Copley, M. J., Scotland, R. W. and Langdale, J. A. (2002) GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species, *Plant J.* 31, 713-727.
34. Waters, M. T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R. G., Saunders, N. J. and Langdale, J. A. (2009) GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 21, 1109-1128.
35. Tepperman, J. M., Hwang, Y. S. and Quail, P. H. (2006) phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of *Arabidopsis* seedling de-etiolation, *Plant J.* 48, 728-742.
36. McCormac, A. C., Fischer, A., Kumar, A. M., Söll, D. and Terry, M. J. (2001) Regulation of HEMA1 expression by phytochrome and a plastid signal during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 25, 549-561.
37. Strasser, B., Sánchez-Lamas, M., Yanovsky, M. J., Casal, J. J. and Cerdán, P. D. (2010) *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4776-4781.
38. Matsumoto, F., Obayashi, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Ohta, H., Takamiya, K. and Masuda, T. (2004) Gene expression profiling of the tetrapyrrole metabolic pathway in *Arabidopsis* with a mini-array system, *Plant Physiol.* 135, 2379-2391.
39. Kobayashi, K., Obayashi, T. and Masuda, T. (2012) Role of the G-box element in regulation of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis* roots, *Plant Signal Behav.* in press.
40. Legnaioli, T., Cuevas, J. and Mas, P. (2009) TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought, *EMBO J.* 28, 3745-3757.
41. Gendron, J. M., Pruneda-Paz, J. L., Doherty, C. J., Gross, A. M., Kang, S. E. and Kay, S. A. (2012) *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3167-3172.
42. Richter, R., Behringer, C., Müller, I. K. and Schwechheimer, C. (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS, *Genes Dev.* 24, 2093-2104.
43. Hudson, D., Guevara, D., Yaish, M. W., Hannam, C., Long, N., Clarke, J. D., Bi, Y. M. and Rothstein, S. J. (2011) GNC and CGA1 modulate chlorophyll biosynthesis and glutamate synthase (GLU1/Fd-GOGAT) expression in *Arabidopsis*, *PLoS One* 6, e26765.
44. Naito, T., Kiba, T., Koizumi, N., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2007) Characterization of a unique GATA family gene that responds to both light and cytokinin in *Arabidopsis thaliana*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1557-1560.
45. Chiang, Y. H., Zubo, Y., Tapken, W., Kim, H. J., Lavanway, A., Howard, L., Pilon, M., Kieber, J. and Schaller, G. E. (2012) Functional Characterization of the GATA Transcription Factors GNC and CGA1 Reveals Their Key Role in Chloroplast Development, Growth, and Division in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* in press.
46. Larkin, R. M. and Ruckle, M. E. (2008) Integration of

- light and plastid signals, *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 593-599.
47. Susek, R. E., Ausubel, F. M. and Chory, J. (1993) Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development, *Cell* 74, 787-799.
 48. Mochizuki, N., Brusslan, J. A., Larkin, R., Nagatani, A. and Chory, J. (2001) Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2053-2058.
 49. Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T. and Nagatani, A. (2008) The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15184-15189.
 50. Moulin, M., McCormac, A. C., Terry, M. J. and Smith, A. G. (2008) Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15178-15183.
 51. Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R. and Chory, J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX, *Nature* 421, 79-83.
 52. Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M. and Chory, J. (2011) Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants, *Curr. Biol.* 21, 897-903.
 53. Inaba, T., Yazu, F., Ito-Inaba, Y., Kakizaki, T. and Nakayama, K. (2011) Retrograde signaling pathway from plastid to nucleus, *Int Rev Cell Mol Biol* 290, 167-204.
 54. Nott, A., Jung, H. S., Koussevitzky, S. and Chory, J. (2006) Plastid-to-nucleus retrograde signaling, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 739-759.
 55. Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F. S., Terauchi, R. and Inaba, T. (2009) Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling, *Plant Physiol.* 151, 1339-1353.
 56. Ruckle, M. E., DeMarco, S. M. and Larkin, R. M. (2007) Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in Arabidopsis, *Plant Cell* 19, 3944-3960.
 57. Papenbrock, J. and Grimm, B. (2001) Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis--studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids, *Planta* 213, 667-681.
 58. Gibson, L. C., Willows, R. D., Kannangara, C. G., von Wettstein, D. and Hunter, C. N. (1995) Magnesium-protoporphyrin chelatase of Rhodospirillum rubrum: reconstitution of activity by combining the products of the bchH, -I, and -D genes expressed in Escherichia coli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1941-1944.
 59. Reid, J. D. and Hunter, C. N. (2004) Magnesium-dependent ATPase activity and cooperativity of magnesium chelatase from Synechocystis sp. PCC6803, *J. Biol. Chem.* 279, 26893-26899.
 60. Ishijima, S., Uchibori, A., Takagi, H., Maki, R. and Ohnishi, M. (2003) Light-induced increase in free Mg²⁺ concentration in spinach chloroplasts: measurement of free Mg²⁺ by using a fluorescent probe and necessity of stromal alkalization, *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 126-132.
 61. Usuda, H. (1988) Adenine Nucleotide Levels, the Redox State of the NADP System, and Assimilatory Force in Nonaqueously Purified Mesophyll Chloroplasts from Maize Leaves under Different Light Intensities, *Plant Physiol.* 88, 1461-1468.
 62. Gibson, L. C., Marrison, J. L., Leech, R. M., Jensen, P. E., Bassham, D. C., Gibson, M. and Hunter, C. N. (1996) A putative Mg chelatase subunit from Arabidopsis thaliana cv C24. Sequence and transcript analysis of the gene, import of the protein into chloroplasts, and in situ localization of the transcript and protein, *Plant Physiol.* 111, 61-71.
 63. Nakayama, M., Masuda, T., Bando, T., Yamagata, H., Ohta, H. and Takamiya, K. (1998) Cloning and expression of the soybean chlH gene encoding a subunit of Mg-chelatase and localization of the Mg²⁺ concentration-dependent ChlH protein within the chloroplast, *Plant Cell Physiol.* 39, 275-284.
 64. Adhikari, N. D., Froehlich, J. E., Strand, D. D., Buck, S. M., Kramer, D. M. and Larkin, R. M. (2011) GUN4-porphyrin complexes bind the ChlH/GUN5 subunit of Mg-Chelatase and promote chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis, *Plant Cell* 23, 1449-1467.
 65. Adhikari, N. D., Orlor, R., Chory, J., Froehlich, J. E. and Larkin, R. M. (2009) Porphyrins promote the association of GENOMES UNCOUPLED 4 and a Mg-chelatase subunit with chloroplast membranes, *J. Biol. Chem.* 284, 24783-24796.
 66. Davison, P. A., Schubert, H. L., Reid, J. D., Iorg, C. D., Heroux, A., Hill, C. P. and Hunter, C. N. (2005) Structural and biochemical characterization of Gun4 suggests a mechanism for its role in chlorophyll biosynthesis, *Biochemistry* 44, 7603-7612.
 67. Cornah, J. E., Roper, J. M., Pal Singh, D. and Smith, A. G. (2002) Measurement of ferrochelatase activity using a novel assay suggests that plastids are the major site of haem biosynthesis in both photosynthetic and non-photosynthetic cells of pea (Pisum sativum L.), *Biochem. J.* 362, 423-432.
 68. Jensen, P. E., Reid, J. D. and Hunter, C. N. (2000) Modification of cysteine residues in the ChII and ChIH subunits of magnesium chelatase results in enzyme inactivation, *Biochem. J.* 352 Pt 2, 435-441.
 69. Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P. and Buchanan, B. B. (2003) Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast

- thioredoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 370-375.
70. Ikegami, A., Yoshimura, N., Motohashi, K., Takahashi, S., Romano, P. G., Hisabori, T., Takamiya, K. and Masuda, T. (2007) The CHLI1 subunit of *Arabidopsis thaliana* magnesium chelatase is a target protein of the chloroplast thioredoxin, *J. Biol. Chem.* 282, 19282-19291.
71. Kobayashi, K., Mochizuki, N., Yoshimura, N., Motohashi, K., Hisabori, T. and Masuda, T. (2008) Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* isoforms of the Mg-chelatase CHLI subunit, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1188-1195.
72. Luo, T., Fan, T., Liu, Y., Rothbart, M., Yu, J., Zhou, S., Grimm, B. and Luo, M. (2012) Thioredoxin redox regulates ATPase activity of magnesium chelatase CHLI subunit and modulates redox-mediated signaling in tetrapyrrole biosynthesis and homeostasis of reactive oxygen species in pea plants, *Plant Physiol.* 159, 118-130.
73. Stenbaek, A. and Jensen, P. E. (2010) Redox regulation of chlorophyll biosynthesis, *Phytochemistry* 71, 853-859.
74. Buchanan, B. B. and Balmer, Y. (2005) Redox regulation: a broadening horizon, *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 187-220.
75. Kobayashi, K., Baba, S., Obayashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Keränen, M., Aro, E. M., Fukaki, H., Ohta, H., Sugimoto, K. and Masuda, T. (2012) Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 24, 1081-1095.
76. Deng, X. W. and Quail, P. H. (1992) Genetic and phenotypic characterization of *cop1* mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 2, 83-95.
77. Chory, J. and Peto, C. A. (1990) Mutations in the DET1 gene affect cell-type-specific expression of light-regulated genes and chloroplast development in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8776-8780.
78. Usami, T., Mochizuki, N., Kondo, M., Nishimura, M. and Nagatani, A. (2004) Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light, *Plant Cell Physiol.* 45, 1798-1808.
79. Oyama, T., Shimura, Y. and Okada, K. (1997) The *Arabidopsis HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl, *Genes Dev.* 11, 2983-2995.

Regulation of Chlorophyll Biosynthesis in Higher Plants

Koichi Kobayashi*

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo