



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光合成研究におけるモデル生物のシトクロムb6f複合体変異株
Author(s)	小澤, 真一郎; OZAWA, Shin-Ichiro
Citation	低温科学, 83, 143-155
Issue Date	2025-03-29
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.143
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94810
Type	departmental bulletin paper
File Information	14_p143-155_LT83.pdf



光合成研究におけるモデル生物の シトクロム b_6f 複合体変異株

小澤 真一郎¹⁾

2024 年 12 月 16 日受付, 2025 年 1 月 6 日受理

シトクロム b_6f 複合体の構成サブユニットは核または葉緑体ゲノムにコードされ、複合体の実態が明らかになる前からPSIIとPSIとの電子伝達を行なう成分として変異株が単離され重要な知見を提供している。モデル生物が確立していく過程で、葉緑体遺伝子解析と葉緑体遺伝子改変の技術確立とともに変異株が作出された。同時にエレクトロクロミックシフトによる活性測定技術も確立しスクリーニングと変異株解析に大きく貢献している。近年になって確立した遺伝子編集技術が新しいモデル生物に適用され新たな変異株が単離されており今後の動向が注目される。

Mutants of cytochrome b_6f complex for photosynthesis research in model organisms.

OZAWA Shin-Ichiro¹

Nuclear and chloroplast genes encode the cytochrome b_6f complex subunits. The b_6f mutants have been isolated as mutants, carrying essential components for the electron transfer between PSII and PSI that had been disrupted, even before isolating the b_6f complex. During the establishment of model organisms, the newly developed chloroplast gene manipulation and analysis techniques have been applied to generate b_6f mutants for their characterization. In recent years, gene editing technology has been used to isolate b_6f mutant strains in new model organisms.

キーワード：シトクロム b_6f 複合体, 葉緑体遺伝子, 遺伝子改変技術, モデル生物

Cytochrome b_6f complex, chloroplast genome, gene manipulation technique, model organism

1. はじめに

シトクロム b_6f 複合体 (b_6f 複合体) は電子伝達経路と速度を巧みに制御する事でエネルギー調整役を担う。光化学系Iと光化学系IIは当初から複合体として認識されていたが、(Nelson and Neumann, 1972) らによる報告までは電子伝達に関わるヘムが1つの複合体に組み込まれておらずキノンやプラストシアニンのように個々の粒子として

電子伝達を担う可能性が考えられていた。複合体としての実態が不明な段階から光化学系I反応中心の酸化還元状態に影響する電子伝達成分の変異株として b_6f 複合体の変異株は単離され議論が進められていた。結晶構造解析により原子分解能で b_6f 複合体の構造が解かれ (Kurusu et al., 2003; Stroebel et al., 2003), 以前から指摘されていた呼吸鎖のComplex III (bc_1 複合体) との類似点と b_6f 複合体の特徴が示されると、タンパク質構造から新たな疑問が生じ、

連絡先

小澤 真一郎

岡山大学資源植物科学研究所

〒710-0046 岡山県倉敷市中央 2-20-1

Tel: 086-434-1225

Email: OzwSh1r@okayama-u.ac.jp

1) 岡山大学 資源植物科学研究所

Institute of Plant Science and Resources, Okayama University,
Okayama, Japan

構造生物学の知見に基づく機能解析研究が進められ変異株が作出されている。また、近年になって遺伝子編集技術が確立したことによって20世紀に確立したモデル生物以外で変異株が得られ、さらなる発展が見込まれる。

2. 本稿での遺伝子名記載方法について.

b_6f 複合体は葉緑体ゲノムまたは核ゲノムにコードされるタンパク質が混在する。そして変異株は葉緑体遺伝子改変技術の進歩と密接に関わっているためタンパク質をコードする遺伝子の場所を認識することは大切である。タンパク質をコードする遺伝子の場所を意識しながら読み進める事ができるよう、

<https://www.chlamycollection.org/resources/tools/gene-nomenclature/>

<https://www.chlamycollection.org/content/uploads/2021/11/Nomenclature-Final.pdf>

に記載される緑藻クラミドモナスの遺伝子名記載方法に則った。

どちらも、遺伝子名は斜体、タンパク質名は立体で表記する。

葉緑体遺伝子：小文字から書き始め、サブユニットは大文字。遺伝子産物は大きく書き始める。

核遺伝子：大文字で表記する。変異株はすべて小文字で斜体。

3. b_6f 複合体の機能・構造・サブユニット構成ならびにコファクター

b_6f 複合体は、複合体内の電子伝達と共役したQサイクルによって、ストロマのプロトン (H^+) を消費しルーメンに H^+ を放出することによって、プロトンチャネル機構に因らずルーメンの H^+ 濃度を上昇させる (図1)。Qサイクルは2段階のサイクルとして記述できる。第1サイクルでは、1分子のプラストキノール (PQH_2) が $Q_{o(p)}$ サイトに結合する。このとき PQH_2 の2電子はhigh potential chainとlow potential chainとに1電子ずつ分岐しシトクロム b_6f 複合体内部で独立の電子伝達経路をとる。 PQH_2 は電子を渡すとセミキノン (SQ) となり2つの H^+ がルーメン側に放出されプラストキノン (PQ) となりhigh potential chainでは1電子が $[2Fe-2S]$ クラスター-ヘム f と電子伝達する。low potential chainでは1電子がヘム $b_L(p)$ に伝達しPQがチラコイド膜に放出され、ヘム $b_H(n)$ からストロマ側のヘム $c_i(n)$ に到達し第1サイクルが完了する。第2サイクルは第1サイクルと同じ電子伝達反応

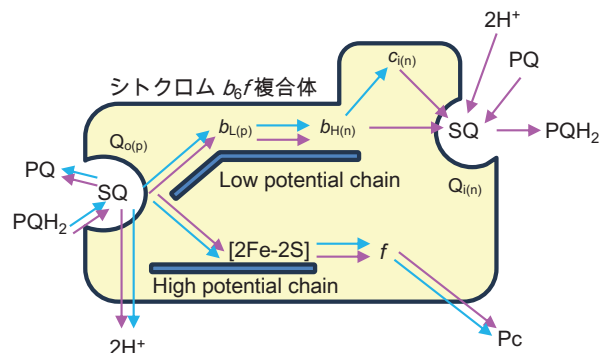


図1：シトクロム b_6f 複合体の電子伝達の概略
電子伝達の概略を模式的に示す。黄色で囲んだ部分をシトクロム b_6f 複合体が担い、Qサイクルの1ステップ目をシアン、2ステップ目をマゼンタで記す。それぞれの略称は本文参照。

が起きるが、ヘム $b_H(n)$ に至った1電子と第1サイクルで到達した $c_i(n)$ の1電子とで $Q_{i(n)}$ サイトに結合する1分子のPQをストロマの H^+ を2つ消費して2電子還元し PQH_2 がチラコイド膜に放出される。ここで、Qサイクルの二つのサイクルはステップごとに進行するため $[2Fe-2S]$ クラスターが再酸化される第1サイクル完了まで第2サイクルは開始されず $Q_{i(n)}$ サイトのPQが一度に2電子還元されることはない。これらの経路は変異株を用いた解析よりも酵素学的な解析で明らかとなった。

b_6f 複合体は8種類のサブユニットが会合した単量体がホモ二量体を形成し合計16サブユニットの約240 kDaの二量体で機能する (表1と図2A)。これら8つのサブユニットは光合成生物で保存されており四つの比較的大きなタンパク質 (HMWタンパク質グループ)、Cyt f (32 kDa 程度)、Cyt b_6 (24 kDa 程度)、リスキ鉄硫黄タンパク質 (20 kDa 程度、以下、PETCタンパク質と表記)、SuIV (20 kDa 程度、以下、PetDタンパク質と表記) が中心部に、その外側に5 kDa以下の四つの小サブユニット (LMWタンパク質グループ) が会合する (PetG, PetL, PETM, PETN)。HMWタンパク質グループは電子伝達に必要な補欠分子族とキノン分子結合と H^+ 放出に重要なモチーフを適切な位置に配置する。Cyt b_6 は二つの b タイプヘムとストロマ側にある一つの c ヘムを、PETCタンパク質は $[2Fe-2S]$ クラスターを、Cyt f はヘム f を、それぞれ結合し、PetDは $Q_{o(p)}$ サイトで H^+ 放出に重要なPEWYモチーフを形成する。LMWタンパク質グループは b_6f 複合体の安定化に寄与するとされている。 c ヘムは2003年に b_6f 複合体の構造解析がなされたときに bc_1 とは異なる特徴として記述されたが (Kurusu et al., 2003;

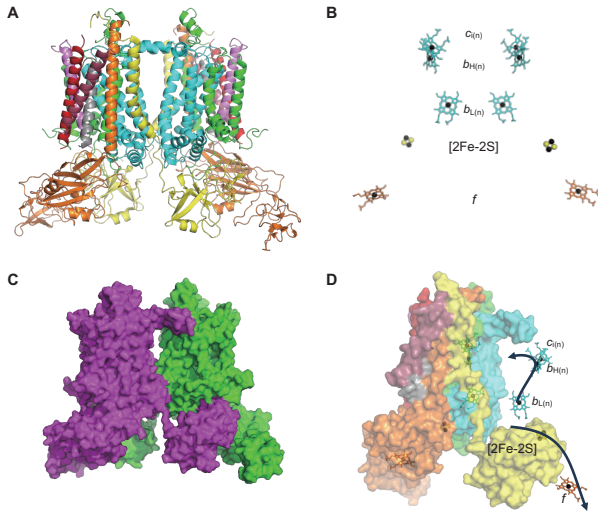


図2：シトクロム b_6f 複合体の構造と電子伝達。タンパク質構造はホウレンソウの構造(Malone et al., 2019) (PDB ID 6RQF) A:全体の構造をコファクターを省略しタンパク質のみで示す。Cyt f : orange, Cyt b_6 : cyan, PETC: yellow, PetD: green, PetG: violet, PetL: raspberry, PETM: red, PETN: gray (60%)。B: コファクターの配置。C: それぞれのモノマーを示す。1つのモノマーをマゼンタまたは緑で示す。D:コファクターの配置と電子伝達経路を示す。2つのうち1つのモノマータンパク質表面を示し透過させる。手前側の [2Fe-2S] は奥側 (タンパク質表面構造を書いている方のモノマー)に属す。

Stroebe et al., 2003), キャリヤー Gとして提案されていた (Lavergne, 1983; Joliot and Joliot, 1988)。コファクターの位置関係のみを見ると単量体でも機能するように見えるが (図2B), PETCタンパク質の典型的なドメインスワッピング構造により, シトクロム b_6f 複合体は必ず二量体で機能する (図2C)。PETCタンパク質の構造を見ると二量体でなければ機能しないことを確認できる。PETCタンパク質は膜貫通部分とルーメン側の親水性のドメインから構成されており, 親水性のドメインに [2Fe-2S] クラスタをもつ。この親水性ドメインはもう一方の単量体へ f 近くまで伸び, もう一方の単量体での電子伝達経路を提供する (図2D)。このPETCタンパク質の親水性ドメインが電子伝達に伴い動くことで f との物理的な距離が変化し [2Fe-2S] と f との電子伝達が行なわれる。

b_6f 複合体の8種類のサブユニットタンパク質のうち, PETCとPETMは核ゲノムにコードされるが, 残り6つは葉緑体ゲノムにコードされる。ただし緑藻クラミドモナスとボルボックスのPETNは核ゲノムにコードされる (表1)。petA遺伝子は葉緑体遺伝子であるが翻訳産物のCyt f のN末端配列が切断されることが報告され (Willey et al., 1984) 末端のTyr残基の α -amino groupが f のリガンドの1つとし

て機能する (Martinez et al., 1994)。さらに植物にはみられないサブユニットも存在する。緑藻クラミドモナスにおいてサブユニットV (SuV, PETO遺伝子にコード) が複合体の構成サブユニットと提案され (Lemaire et al., 1986), その後遺伝子クローニングならびにステート2で可逆的にリン酸化されることが示され b_6f 複合体のサブユニットと同定された (Hamel et al., 2000)。PETO遺伝子はクラミドモナス近縁の緑藻で保存され, artificial micro RNAを用いたPETOノックダウン変異株を用いた解析によってプラストキノンプールの酸化還元状態に依存してANR1やPGRL1やFNRとともにCyclic Electron Flow (CEF) の効率を上げることが示された (Takahashi et al., 2016)。現在まで, SuVを含むシトクロム b_6f 複合体の構造解析は報告されていない。SuVがどのような構造を取りシトクロム b_6f 複合体に会合しているかが明らかになれば, その情報に基づく部位特異的突然変異によるアミノ酸置換で変異株を作出し機能解析を行なう事で, 構造と生理機能との関連を明確に示す事が期待される。PetPはシアノバクテリアと紅藻に保存されシトクロム b_6f 複合体のサイトプラズム側 (植物・藻類のストロマ側に相当) に結合する (Volkmer et al., 2007; Gendrullis et al., 2008)。高熱性シアノバクテリアのPetP遺伝子欠損株の解析により直鎖電子伝達 (Linear Electron Flow) に影響を与えることが示された (Rexroth et al., 2014)。その後, NMRによる構造解析を経て (Veit et al., 2016) クライオ電子顕微鏡による単粒子解析でPetPを結合したシトクロム b_6f 複合体の構造が報告された (Proctor et al., 2022)。今後, 構造情報を元にした変異株作出と機能解析の進展が期待される。

4. b_6f 複合体変異株の歴史と今後

4.1 順遺伝学的に単離された変異株

1980年代頃までは紫外線や薬剤により変異を誘発しサブユニットを欠損した変異株を選抜し変異遺伝子を同定する順遺伝学的手法が採られた文献が多く見られる。しかしシトクロム b_6f を構成する8つのサブユニットのうち6つが葉緑体ゲノムにコードされるためであろうか, 1980年代から1990年代にかけて葉緑体ゲノム解読や葉緑体遺伝子改変技術がモデル生物で確立されるようになると, 葉緑体遺伝子の改変可能なモデル生物を材料とした逆遺伝学的手法で研究展開される。

緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は酢酸を炭素源として与えることで光合成機能が欠損しても生育できる。よって, 任意の変異原を作用させた後に細胞を最少培地で生育させ酢酸要求性を検定すれば光合成変

表1

タンパク質名	サイズ (kDa)	機 能	遺伝子名	遺伝子の場所
Cyt <i>f</i>	32	電子伝達 (ヘム <i>f</i> 結合)	<i>petA</i>	葉緑体
Cyt <i>b₆</i>	24	電子伝達 (ヘム <i>b</i> , ヘム <i>c</i> 結合)	<i>petB</i>	葉緑体
PETC (リスキ鉄硫黄タンパク質)	19	電子伝達 ([2Fe-2S] 結合)	<i>PETC</i>	核
PetD (SuIV)	18	PEWY モチーフ	<i>petD</i>	葉緑体
PetG	4	<i>b₆f</i> 複合体の安定	<i>petG</i>	葉緑体
PetL	3	<i>b₆f</i> 複合体の安定	<i>petL</i>	葉緑体
PETM	4	<i>b₆f</i> 複合体の安定	<i>petM</i>	核
PETN	3	<i>b₆f</i> 複合体の安定	<i>petN</i>	葉緑体 ^a
PETO (SuV)	15	CEF に重要	<i>PETO</i>	核 ^b
PetP	7	LEF と強光応答に必要	<i>PetP</i>	- ^c

*b₆f*複合体の構成サブユニットの一覧

^a: *C. reinhardtii*, *Volvox carteri* などでは核遺伝子にコードされる

^b: *C. reinhardtii*, *V. carteri*などにみられる

^c: シアノバクテリアで見られる。本稿では触れない

異株を選抜できる。加えて核相は単相であり表現型の観察が容易で、生育速度も比較的早く（酢酸存在下の光従属栄養の条件では倍加時間は6-8時間だが変異株によっては10時間程度に及ぶものもある）、単細胞なので細胞の生理状態を揃えることができることから、迅速に変異株を単離できる。そして、二種の接合型を掛け合わせ四分子解析を行なう事で核遺伝子変異株を純化できる。1960年には紫外線照射により変異を与え42の酢酸要求性変異株 (acetate mutants, 頭文字をとり *ac* 変異株系統) が報告された (Levine, 1960)。 *ac* 変異株系統は標準株 (野生株) との戻し交雑で表現型がメンデル遺伝することを確認した核遺伝子変異系統である。この報告の本文で表現型を詳細に記載された変異株は *ac-21* であり、PETCタンパク質の蓄積が大きく損なわれ *b₆f* 複合体を蓄積しない変異株である (表1)。 *ac* 変異株系統は42番より後の系統も単離されており一部が報告されている (Levine and Smillie, 1962)。1960年当時は *ac21* が *b₆f* 複合体の変異株である事は示されなかったが、 *b₆f* 複合体を精製し生化学的に解析することで判明する (Lemaire et al., 1986)。 *ac21* は *b₆f* 欠損株として使われることもあったが、光合成的生育が自然復帰することが知られており PETC 遺伝子相補実験には適さないことが知られていた。1999年に *ac21* は PETC-W163R の1アミノ酸置換株であり、葉緑体プロテアーゼで PETCタンパク質が分解しやすくなっていることが判明する (de Vitry et al., 1999)。 *ac21* が初めて報告された時期、光合成機能欠損株は二酸化炭素固定をできないことに着目し、¹⁴Cで標識した炭酸水素ナトリウムを培地に添加し¹⁴Cのシグナルをオートラ

ジオグラフで検出することで二酸化炭素固定機能を欠損した株を検出する手法を示した報告があり (Levine, 1960)、ここでも *ac21* が使われたが、この手法はこれ以降の文献は見られない。その7年後に光合成機能欠損はクロロフィル蛍光強度が高いことを利用したスクリーニング手法が示され (Bennoun and Levine, 1967)、放射性同位元素を取り込ませる手法より簡便かつ迅速な手法として紹介された。この1967年の報告ではメタンスルホン酸メチルを変異源として処理したのち、酢酸を添加した従属栄養条件で培養することで薬剤処理を生き延びた個体の形成するコロニーから発するクロロフィル蛍光を観察しスクリーニングした。ここで光合成的生育の可否ではなくクロロフィル蛍光強度で変異体の選抜を行ない、大文字のFから始まる変異株が単離されている。このF系統の中では、F16 (Drager et al., 1998) やF18 (Xie et al., 1998) が *b₆f* 複合体変異株として利用されてきたが単離から数十年後に原因遺伝子が特定された。同様の選抜手法は1963年にDuysensとSweerが藻類ではなく植物の葉を測定対象としてクロロフィル蛍光の時間変化で光化学反応測定を報告し (Duysens and Sweers, 1963)、1973年には変異株選抜に使えるほどの簡便さと速度で使える手法として提案されている (Miles and Daniel, 1973)。このように1960-1970年代にはすでにクロロフィル蛍光強度の時間変化に基づく光合成変異株選抜が行なわれている。生物物理学的解析手法開発と並行して遺伝学的手法の発展もみることができる。葉緑体に独自のオルガネラゲノムが存在することが示される前にも、四分子解析で母性遺伝する遺伝因子は認識されており、非メン

デル遺伝の片親遺伝として研究が進められていた。葉緑体遺伝子変異株単離は、Floxuridine (5-Fluorodeoxyuridine) によって特異的に葉緑体遺伝子変異を誘発することが *C. reinhardtii* で報告され (Wurtz et al., 1979), 葉緑体遺伝子変異株の単離がなされた (Shepherd et al., 1979)。変異原薬剤名称にちなんでFUD系統として葉緑体遺伝子変異系統が単離・確立され (Bennoun et al., 1981), クロロフィル蛍光の誘導期現象の時間変化パターンから *b₆f* 複合体変異株としてクラス分けされたFUD2, FUD4, FUD6, FUD8が生化学的解析によってそれぞれCyt *b₆*, Cyt *f*, PetD, *c*ヘム挿入不全の変異株として報告された (Lemaire et al., 1986)。これら葉緑体遺伝子変異系統は *b₆f* 複合体欠損株だけではなく他の光合成機能欠損標準株として使用され後の技術進歩により詳細な変異も示される。

b₆f 複合体サブユニットをコードする遺伝子発現に必要な因子も順遺伝学的手法で単離された。 *C. reinhardtii* を材料とした研究で4.3項で紹介するControl by Epistasy of Synthesis (CES) が *b₆f* 複合体の分子集合機構として提唱されているが、その過程で発見された因子も多い。 *petA* 遺伝子のmRNA安定・プロセシングと翻訳 (Wostrikoff et al., 2001; Boulouis et al., 2011), *petD* 遺伝子のmRNAの安定化 (Rymarquis et al., 2007), *petG* 遺伝子のmRNA安定またはプロセシング (Wang et al., 2015) それぞれに必要なRNA結合タンパク質が発表されている。さらに、mRNA結合タンパク質をコードする遺伝子を効率的に同定する試みも行なわれている。RNA結合タンパク質が結合する場所は比較的分解されづらいことを利用して、RNAseqのデータを野生株と変異株とで比較し解析する変異株を絞り込むことで *petB* のmRNA翻訳に関わる *TCB1* 遺伝子が同定された (Cavaiuolo et al., 2017)。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のゲノムが解読され (*Arabidopsis* Genome, 2000), その後トランスポゾン遺伝子 (T-DNA) を核ゲノムヘランダムに挿入した遺伝子タギングによる網羅的な遺伝子破壊系統が確立され2024年現在も利用される公的に配布される体制がととのえられた (Alonso et al., 2003)。T-DNA挿入破壊株系統は各研究グループが独自に作出し変異株選抜に使われることもある。また、*A. thaliana* ではethyl methanesulfonate (EMS) などの変異原処理を行なったのちに変異株を任意の条件で選抜し原因遺伝子を探る順遺伝学的手法による研究も行なわれる。光合成の変異株は高いクロロフィル蛍光が観察されるので、high chlorophyll fluorescence (HCF) に数字が続く変異株がしばしば記載される (Meurer et al., 1996)。 *A. thaliana* の葉緑体遺伝子で *psbB-psbT-psbH-petB-petD* が共

転写されるが、このポリシストロニックmRNAのプロセシングまたは安定化に必要な因子としてpentatricopeptide repeat をもつRNA結合タンパク質のHCF152が報告された (Meierhoff et al., 2003)。この報告とは独立に *petD* のmRNA安定化に重要とされるCSP41タンパク質が報告された (Bollenbach et al., 2009)。また、*petL* の翻訳に必要なRNA結合タンパク質のPGR3が同定された (Higashi et al., 2021)。トウモロコシ (*Zea mays*) において、トランスポゾンを利用した遺伝子タギング手法で *b₆f* 複合体に関連する葉緑体遺伝子制御因子が単離され、HCF152に類似したCRP1タンパク質 (chloroplast RNA processing 1) は *Z. mays* 葉緑体のポリシストロニックmRNAの *psbB-psbH-petB-petD* の *petD* のRNAプロセシングに必要な因子として単離された (Barkan et al., 1994; Fisk et al., 1999)。サブユニットをコードする遺伝子の翻訳因子に加えて膜への組み込みや分子集合に必要な因子も単離されている。Cyt *b₆* の組み込みを仲介するインセクターゼとしてALB3の可能性が *in vitro* 解析により示された (Kroliczewski et al., 2016)。他には、Conserved in Plant Lineage and Diatoms49 (CPLD49) が *C. reinhardtii* において (Wittkopp et al., 2018), DE-ETIOLATION INDUCED PROTEIN 1 (DEIP1) (Sandoval-Ibanez et al., 2022) と new tiny albino 1 (NTA1) が (Li et al., 2023) *A. thaliana* において、それぞれ単離されている。

植物を材料とした場合、*b₆f* 複合体のHMWサブユニットは電子伝達を担うため欠損すると光合成機能を失い seedling lethal となるが栄養成長させることで光合成変異株は単離される。*A. thaliana* において、PETC欠損株が単離され直鎖電子伝達の完全阻害が確認されている (Maiwald et al., 2003)。光合成機能が失われるとクロロフィル蛍光強度が相対的に高くなるが、単純な強度ではなく、連続光照射中にフラッシュランブを焚くことによる測定で、非光化学的消光 (NPQ) を測定し、NPQに基づいたスクリーニングで光合成機能の一部が失われた変異株を単離し解析することで詳細な光合成電子伝達機能が明らかになっている。PSIとPSIIの量子収率は変わらないもののNPQが低下した変異株が *A. thaliana* で単離され (Shikanai et al., 1999), その後の解析でPETCタンパク質の1アミノ酸置換変異 (PETC-P194L) であり photosynthetic control 機能が損なわれた *pgr1* (proton gradient regulation 1) が示され (Munekage et al., 2001; Jahns et al., 2002; Okegawa et al., 2005), *C. reinhardtii* においては逆遺伝学的手法で作出され解析された (Ozawa et al., 2023)。

4.2 葉緑体遺伝子改変手法の確立

現代では葉緑体遺伝子改変は粒子銃による相同組み換えによる遺伝子導入手法がクラミドモナスとタバコで確立され日常的に行なわれる。黎明期から現在まで俯瞰すると、当初はタバコにおいてアグロバテリウム感染で導入を行なう試みや、粒子銃による導入、などさまざまな手法が試されそれぞれで変異株を得ていた。その後薬剤耐性付加を与える遺伝子カセットを粒子銃で導入し薬剤耐性で変異株を選抜するという手法が確立し研究が進展するようになる。

粒子銃による遺伝子導入は緑藻クラミドモナスの *acu-c-2-29* (*atpB* 遺伝子 2 塩基置換による ATP 合成酵素 β サブユニット欠損株) に *atpB* 遺伝子断片を導入し光合成的生育を相補する手法として報告された (Boynton et al., 1988)。その後、スペクチノマイシン・ストレプトマイシン耐性を付与する大腸菌の Aminoglycoside-3"-adenyltransferase をコードする *aadA* 遺伝子を 35S プロモーターで発現するバイナリベクターをタバコ (*Nicotiana tabacum*) にアグロバテリウム感染で導入し薬剤耐性を付与させる系が示された (Svab et al., 1990)。同年に同じグループから、*N. tabacum* SPC2 系統において、スペクチノマイシンとストレプトマイシン耐性を与える葉緑体遺伝子変異配列を粒子銃で導入することで薬剤耐性を付加したことが報告された (Svab et al., 1990)。翌年に *C. reinhardtii* において、*C. reinhardtii* の *atpA* 遺伝子 (葉緑体 ATP 合成酵素 α サブユニットをコード) のプロモーターと 5'-UTR とルビスコ L サブユニットの 3'-UTR とで *aadA* 遺伝子発現を制御する *aadA* カセットが報告された (Goldschmidt-Clermont, 1991)。その後 *N. tabacum* においても葉緑体リボソーム RNA オペロンを改変したプロモーターと *psbA* 遺伝子の 3'-UTR で制御する *aadA* カセットが報告された (Svab and Maliga, 1993)。*C. reinhardtii* で *aadA* カセットの両末端に相同配列を組み込んだリサイクラブル *aadA* カセットも開発された (Fischer et al., 1996)。このリサイクラブル *aadA* カセットは薬剤選択圧をなくすと *aadA* カセットが脱落するので、*aadA* カセット導入による薬剤耐性で変異株を選抜後同じ薬剤耐性でさらに別の変異を追加導入することができる。選抜に利用できる薬剤の種類は限られているので葉緑体の別の場所に追加で複数の変異を導入するときにリサイクラブル *aadA* カセットは汎用される。しかしながら、現在の *C. reinhardtii* における遺伝子導入でも必ずしもリサイクラブル *aadA* カセットが使われるとは限らない。

4.3 逆遺伝学的手法を駆使した葉緑体遺伝子解析

葉緑体ゲノム解読プロジェクトの成果が 20 世紀末に発表されると、葉緑体遺伝子改変手法は相同組み換えである事を利用し逆遺伝学的手法がひろく取り入れられ多くの成果が発表された。葉緑体ゲノム上で機能未知読み枠の遺伝子を破壊することで機能を同定することが行なわれ、タンパク質の構造情報が手に入るようになると部位特異的突然変異を導入し構造情報とリンクした機能解析を行なえるようになった。葉緑体ゲノム情報が完全にアセンブルされた報告はタバコにおいて初めて行なわれた (Shinozaki et al., 1986)。一方、*C. reinhardtii* では 21 世紀に入ってようやく全体がアセンブルされた (Maul et al., 2002)。ただ、*C. reinhardtii* ではそれまでも断片的な葉緑体ゲノム情報をもとにして重要な光合成遺伝子のクローニングならびに遺伝子発現解析は行なわれていた。

葉緑体ゲノム情報の中には読み枠 (open reading frame, ORF) が多数アサインメントされたが、機能未知の物もあった。そこで、葉緑体遺伝子にコードされ生物種間で保存される機能未知の読み枠 hypothetical chloroplast open reading frames (*ycf*) を規定し通し番号をつけ網羅的に *ycf* 遺伝子破壊を行ない機能解析が行なわれた。

b₆f 複合体の変異株では、クロロフィル蛍光のパターンに加えて、ジョリオらにより確立された、作用光照射により誘起されるエレクトロクロミックシフト (Electrochromic Shift, ECS) の解析技術が大きく貢献する (Joliot and Delosme, 1974; Joliot and Joliot, 1984, 1984)。この ECS は、膜電位変化に伴う 520 nm 近傍の吸収変化を利用した手法で、PSI-PSII の電荷分離、*b₆f* 複合体内の電子伝達、ATP 合成酵素の活性を推定・評価する。ECS 測定ではこれらの現象を直接測定していないので結果の解釈は慎重に行なわれる必要があるが、生化学・遺伝学的手法とを組み合わせることで *b₆f* 複合体の機能を詳細に解析し変異株の単離と機能解析が行なわれた。

1980-1990 年代当時、photosynthetic electron transport に由来し、*pet* にアルファベットが続く遺伝子群の同定と命名が *b₆f* 複合体の構造解析を待たずに並行して行なわれたため、PSI・PSII・ATP 合成酵素のように複合体のサブユニットにまとまった名前がつけられず、*b₆f* 複合体のサブユニットに加えてプラストシアニン (*PETE*)、フェレドキシン (*PETF*)、FNR (*PETH*)、シトクロム *c₆* (*PETJ*) をコードする遺伝子も *PET* から始まる。*b₆f* 複合体のサブユニットのうち、HMW タンパク質グループをコードする遺伝子 (*petA*, *petB*, *PETC*, *petD*) は確定していた。ところが、LMW タンパク質グループ (*petG*, *petL*, *PETM*, *PETN*) は

コファクターは結合せず電子伝達機能への影響はないように数kDaの小さなサブユニットが200 kDa超の b_6f 複合体の重要な構成サブユニットであるという認識は当時は懐疑的であった。そのような状況のなかでも遺伝子破壊と b_6f 複合体の精製ならびに慎重な生物物理学的解析を通して着実にサブユニット同定が進められた。先行していた b_6f 複合体精製で得られたサブユニットのアミノ酸配列情報から遺伝子クローニングは着実に進行しており、*C. reinhardtii*において $petG$ 遺伝子のクローニングが報告されると (Fong and Surzycki, 1992) すみやかに遺伝子破壊とそれにつづく機能解析が報告された (Berthold et al., 1995)。*C. reinhardtii*において $ycf7$ 遺伝子を $aadA$ カセット挿入により破壊し、電子伝達機能は維持されるが対数増殖期を過ぎて定常期にまで細胞を生育すると b_6f 複合体の安定性が損なわれる事を見だし b_6f 複合体の安定性に重要なサブユニットPetLとして同定された (Takahashi et al., 1996)。PetLタンパク質を欠損すると細胞の老化に伴い b_6f 複合体が不安定となる可能性を期待できる。*C. reinhardtii*の研究から10年ほど経過し、*N. tabacum*で $petL$ を破壊した株が解析され b_6f 複合体の光合成機能と安定性への影響は種を越えて保存されることを確認するとともに、葉の老化に伴う b_6f 複合体の影響が示された (Schottler et al., 2007)。これは単細胞モデル生物で得られた細胞生物学的な影響から予測される生物個体への影響が多細胞モデル生物において表現型として観察された好例と言える。*N. tabacum*において、 $ycf6$ 遺伝子を $aadA$ カセット挿入により破壊しPetNサブユニットとして同定した (Hager et al., 1999)。 $PETN$ 遺伝子は*C. reinhardtii*では核遺伝子であり2024年現在でも*C. reinhardtii*では欠損株・変異株の報告はない。 $PETM$ 遺伝子は核遺伝子であり4.4に示すように2020年代になるまで遺伝子破壊株作出は行なわれなかったが、*C. reinhardtii*において精製した b_6f 複合体の構成サブユニットのアミノ酸配列を決定し遺伝子クローニングは行なわれた (de Vitry et al., 1996)。葉緑体遺伝子解析が進むにつれて、過去に単離された b_6f 複合体変異株が詳細に解析され変異が特定された。FUD2は $petB$ のCDSのうち36塩基が繰り返されることによるCyt b_6 サブユニットcdループの延長 (Finazzi et al., 1997) が示された。FUD6は $petD$ の5'-UTR配列攪乱による $petD$ 翻訳不全 (Sturm et al., 1994) が示され $petD$ の翻訳形式の詳細な理解にもつながった (Sakamoto et al., 1994)。現在でもFUD6は*C. reinhardtii*において b_6f 複合体欠損株として用いられることがある。FUD8は b_6f 複合体のヘムの組み込み因子 $ccsA$ 遺伝子破壊株 ($ycf5$ 遺伝子) である事が決定された。

b_6f 複合体のサブユニットをコードする葉緑体遺伝子解

析が行なわれる中で*C. reinhardtii*において、葉緑体遺伝子発現を制御する機構も明らかとなった。 $petD$ 遺伝子欠損株において $petA$ 遺伝子の翻訳が抑制されることから、Cyt f タンパク質のC末端側の領域が $petA$ 遺伝子の5'-UTRに結合し $petA$ 遺伝子発現を抑制するCESが示された (Choquet et al., 1998; Choquet and Vallon, 2000; Choquet et al., 2003)。CESは、PetDに分子集合できないCyt f タンパク質の合成を抑制することで機能しない複合体生合成を抑制する機構として理解される。この成果から始まり、CES機構は分子集合できない葉緑体タンパク質であるCESタンパク質が自身の翻訳を抑制する共通の機構として、*C. reinhardtii*を材料として、PSI (PsaA と PsaC がCES) (Wostrikoff et al., 2004)、PSII (D1 と CP47 がCES) (Minai et al., 2006)、ATP合成酵素CF₁ (AtpB と $\alpha_3\beta_3$ がCES、ただしAtpBは $atpA$ の翻訳を促進する) (Drapier et al., 2007) において、ルビスコにおいて (RbcL がCES、2007年の報告は*N. tabacum*を材料) (Khrebtukova and Spreitzer, 1996; Wostrikoff and Stern, 2007; Wietrzynski et al., 2021)、としてそれぞれ報告される。これら一連の研究では*C. reinhardtii*を材料とした場合、Cyt f をレポーター遺伝子として汎用された。

4.4 構造情報に基づく変異株と最近の遺伝子編集による変異株

b_6f 複合体のQサイクルは bc_1 複合体と共通した機構とされた。 bc_1 複合体の構造生物学と機能解析は b_6f 複合体に先行しており、とりわけキノン結合部位や [2Fe-2S] などは酵母やバクテリアを材料とした bc_1 複合体の結果をもとに作出された変異株を用いて研究が行なわれた文献がみられる。

Cyt f のN末端はプロセシングされTyr末端がcヘムに配位するが、*C. reinhardtii*において末端のTyr残基と続くPro残基を置換した複数の変異株が解析されProをValに置換すると大きく機能が損なわれることが報告されている (Zhou et al., 1996)。*C. reinhardtii*において bc_1 複合体のキノンを酸化するキノン結合サイトのQ_{O(p)}サイトを形成するPEWY配列が、 b_6f に相同なSuVIにもPetD-77PEWY80が見いだされ、PetD-78EのGluをLysまたはLeuに置換すると機能が損なわれることから、このPEWY配列は b_6f 複合体においてもPQを結合するためのQ_{O(p)}として機能することが提案された (Zito et al., 1998)。 b_6f 複合体のキノン結合部位は阻害剤を結合させ構造解析させることや最近ではハウレンソウの b_6f 複合体の構造解析で結合状態のキノンが同定されたが (Malone et al., 2019)、それよりも前に変異株解析を通して結合サイトが同定されていた。PETCのアミノ酸置換

株を作出し機能解析するためには、PETC欠損株にPETCを相補させて作出する手段を執ることがある。ところが*C. reinhardtii*における古典的な*petc*変異株*ac21*はPETC-W163RでありPETCタンパク質蓄積が復帰することもあるため遺伝子相補によるアミノ酸置換株作出には向かない。そこで新たにUVで変異を誘発し選抜した*C. reinhardtii*の788株(*petC-Δ1*)を安定したPETC欠損株として見だし遺伝子相補により部位特異的突然変異株を作出した(de Vitry et al., 1999)。*bc₁*複合体の報告から、PETCタンパク質では[2Fe-2S]をもつ親水性ドメインが電子伝達に伴い動くため、PETCタンパク質の膜貫通部分と親水性ドメインを結ぶ6つのGly残基(6G)が連続した部分がヒンジ部分として機能すると期待される。*petC-Δ1*を親株として使いPETC遺伝子を相補することでヒンジ部分をすべてAlaに置換した場合(de Vitry et al., 1999)とGlyの1残基欠損ならびにGlyの5残基挿入(de Vitry et al., 2004)では変化がなかったが、Glyを3残基欠損させると電子伝達活性が大幅に低下した(de Vitry et al., 2004)ことから、ある程度の柔軟性があるものの、このヒンジは電子伝達に必要であることが示されている。

21世紀初頭に*b₆f*複合体の全体構造がX線結晶構造解析によって、*C. reinhardtii*を材料とした成果がフランスのグループから(Stroebel et al., 2003)、シアノバクテリアの*Mastigocladus laminosus*を材料とした成果が米国のグループから(Kurisu et al., 2003)、それぞれ独立報告された。*C. reinhardtii*では葉緑体遺伝子組み換えによりCyt *f*のC末端に6×Hisを融合した形質転換体を作成し、Niアフィニティークラムクロマトグラフィーで精製している。Cyt *f*のN末端側は成熟段階で切断されN末端がcヘムのリガンドとして機能するため、C末端にタグを融合している。Cyt *f*のC末端はストロマ側に露出するが、*b₆f*複合体はストロマ側は平坦な構造なので、結果として精製に有利なアフィニータグ融合となった。その後、構造情報をもとにした変異株作出が行なわれるが、一部を紹介する。*C. reinhardtii*において、PetDのF40Y置換株が作出され、PetD-F40Yはbヘムの再酸化速度が大きく低下したことから*c_{i(n)}*ヘム鉄の配位状態に影響を与え近傍の*b_{H(n)}*ヘムにも影響し*Q_{i(n)}*でのキノン交換にも波及したと推測された(de Lacroix de Lavalette et al., 2009)。PQプールが還元状態になると、STT7キナーゼを活性化しタンパク質リン酸化を引き起こすが*b₆f*が及ぼす機能ならびに構造的特徴は不明であった。そこでとくにステート遷移の活性が高い*C. reinhardtii*を材料にして、Error-Prone PCR法により*petD*に対してPCR時の複製エラーを利用してランダム変異を導入することで、SuVIのストロマループに相当するAsn122, Tyr124,

Arg125を候補として得て、部位特異的突然変異でPetD-N122L, Y124K, R125Eを導入することで、PetDのストロマループでSTT7が相互作用しキナーゼ活性がオンになると提唱した(Dumas et al., 2017)。

遺伝子編集技術でこれまで順遺伝学的手法では単離されていないサブユニットの変異株も作出・機能解析が行なわれている。PetMを欠損させた例として*A. thaliana*(Lan et al., 2021)とトマトの*Solanum lycopersicum*(Bulut et al., 2023)がある。ほかにも20世紀にウキクサの*Lemna perpusilla*(no. 1073)において*b₆f*欠損株が報告されたが(Lam and Malkin, 1985; Bruce and Malkin, 1991)、今世紀に入っては続報はなかった。しかしゲノム情報整備とCRISPR/Cas 9などの遺伝子編集技術開発が進展しておりこれまでのモデル生物の成果を踏まえた研究が今後展開されるかもしれない(Acosta et al., 2021)。

5. まとめ

*b₆f*複合体の実態が明らかになる前から変異株が単離されており、葉緑体遺伝子改変技術の発展と並行した遺伝子クローニング・葉緑体遺伝子発現様式の知見が報告された。これら20世紀になされた「モデル生物」による成果は生物種間で保存された普遍的な*b₆f*複合体の機能を理解することに貢献してきた。このような歴史を鑑みると、さまざまな生物種で光合成複合体の構造が解かれ、遺伝子編集技術を適用できる生物種が拡大している現状は、多様な光合成生物が*b₆f*複合体をどのように駆使して生き抜くのかを、その新たな「モデル生物」で理解を深める段階にきているのではなかろうか。一方で20世紀に確立された「モデル生物」の*b₆f*複合体変異株解析は構造情報に基づきより詳細に生理的な理解が深まる方向に研究が進展していくのかもしれない。

参考文献

- Acosta K, Appenroth KJ, Borisjuk L, Edelman M, Heinig U, Jansen MAK, Oyama T, Pasaribu B, Schubert I, Sorrels S, Sree KS, Xu S, Michael TP, Lam E (2021) Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the genomics and postgenomics era. *Plant Cell* 33: 3207-3234
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N,

- Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657
- Arabidopsis* Genome I (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Barkan A, Walker M, Nolasco M, Johnson D (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J* 13: 3170-3181
- Bennoun P, Delepelaire P, Delosme M (1981) A uniparental mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* resistant to chloramphenicol. *Curr Genet* 3: 251-253
- Bennoun P, Levine RP (1967) Detecting Mutants That Have Impaired Photosynthesis by Their Increased Level of Fluorescence. *Plant Physiology* 42: 1284-1287
- Berthold DA, Schmidt CL, Malkin R (1995) The deletion of *petG* in *Chlamydomonas reinhardtii* disrupts the cytochrome *bf* complex. *J Biol Chem* 270: 29293-29298
- Bollenbach TJ, Sharwood RE, Gutierrez R, Lerbs-Mache S, Stern DB (2009) The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 69: 541-552
- Boulouis A, Raynaud C, Bujaldon S, Aznar A, Wollman FA, Choquet Y (2011) The Nucleus-Encoded trans-Acting Factor MCA1 Plays a Critical Role in the Regulation of Cytochrome *f* Synthesis in *Chlamydomonas* Chloroplasts. *Plant Cell* 23: 333-349
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, et al. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538
- Bruce BD, Malkin R (1991) Biosynthesis of the chloroplast cytochrome *b₆f* complex: studies in a photosynthetic mutant of *Lemna*. *Plant Cell* 3: 203-212
- Bulut M, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Alseekh S (2023) Characterization of *PetM* cytochrome *b₆f* subunit 7 domain-containing protein in tomato. *Hortic Res* 10: uhad224
- Cavauiolo M, Kuras R, Wollman FA, Choquet Y, Vallon O (2017) Small RNA profiling in *Chlamydomonas*: insights into chloroplast RNA metabolism. *Nucleic Acids Res* 45: 10783-10799
- Choquet Y, Stern DB, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman FA (1998) Translation of cytochrome *f* is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4380-4385
- Choquet Y, Vallon O (2000) Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 82: 615-634
- Choquet Y, Zito F, Wostrikoff K, Wollman FA (2003) Cytochrome *f* translation in *Chlamydomonas* chloroplast is autoregulated by its carboxyl-terminal domain. *Plant Cell* 15: 1443-1454
- de Lacroix de Lavalette A, Barucq L, Alric J, Rappaport F, Zito F (2009) Is the redox state of the *ci* heme of the cytochrome *b₆f* complex dependent on the occupation and structure of the *Q_i* site and vice versa? *J Biol Chem* 284: 20822-20829
- de Vitry C, Breyton C, Pierre Y, Popot JL (1996) The 4-kDa nuclear-encoded *PetM* polypeptide of the chloroplast cytochrome *b₆f* complex. Nucleic acid and protein sequences, targeting signals, transmembrane topology. *J Biol Chem* 271: 10667-10671
- de Vitry C, Finazzi G, Baymann F, Kallas T (1999) Analysis of the nucleus-encoded and chloroplast-targeted *rieske* protein by classic and site-directed mutagenesis of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 11: 2031-2044
- de Vitry C, Ouyang Y, Finazzi G, Wollman FA, Kallas T (2004) The chloroplast *Rieske* iron-sulfur protein. At the crossroad of electron transport and signal transduction. *J Biol Chem* 279: 44621-44627
- Drager RG, Girard-Bascou J, Choquet Y, Kindle KL, Stern DB (1998) In vivo evidence for 5'→3' exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA. *Plant J* 13: 85-96
- Drapier D, Rimbault B, Vallon O, Wollman FA, Choquet Y (2007) Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits. *EMBO J* 26: 3581-3591
- Dumas L, Zito F, Blangy S, Auroy P, Johnson X, Peltier G, Alric J (2017) A stromal region of cytochrome *b₆f* subunit IV is involved in the activation of the *Stt7* kinase in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 12063-12068

- Duysens LN, Sweers H (1963) Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. *Plant and Cell Physiology Special issue: Studies on microalgae and photosynthetic bacteria*: 353-372
- Finazzi G, Buschlen S, de Vitry C, Rappaport F, Joliot P, Wollman FA (1997) Function-directed mutagenesis of the cytochrome b6f complex in *Chlamydomonas reinhardtii*: involvement of the cd loop of cytochrome b6 in quinol binding to the Q(o) site. *Biochemistry* 36: 2867-2874
- Fischer N, Stampacchia O, Redding K, Rochaix JD (1996) Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol Gen Genet* 251: 373-380
- Fisk DG, Walker MB, Barkan A (1999) Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J* 18: 2621-2630
- Fong SE, Surzycki SJ (1992) Organization and structure of plastome *psbF*, *psbL*, *petG* and ORF712 genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* 21: 527-530
- Gendrullis M, Dyczmons N, Gomolla D, Gathmann S, Bernát G, Schneider D, Rögner M (2008) PetP, a New Cytochrome b6f Subunit, and Cytochrome bd Oxidase – Two Potential Regulatory Players of Cyanobacterial Electron Transport. In JF Allen, E Gantt, JH Golbeck, B Osmond, eds, *Photosynthesis. Energy from the Sun*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 585-589
- Goldschmidt-Clermont M (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res* 19: 4083-4089
- Hager M, Biehler K, Illerhaus J, Ruf S, Bock R (1999) Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b(6)f complex. *EMBO J* 18: 5834-5842
- Hamel P, Olive J, Pierre Y, Wollman FA, de Vitry C (2000) A new subunit of cytochrome b6f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. *J Biol Chem* 275: 17072-17079
- Higashi H, Kato Y, Fujita T, Iwasaki S, Nakamura M, Nishimura Y, Takenaka M, Shikanai T (2021) The Pentatricopeptide Repeat Protein PGR3 Is Required for the Translation of *petL* and *ndhG* by Binding Their 5' UTRs. *Plant Cell Physiol* 62: 1146-1155
- Jahns P, Graf M, Munekage Y, Shikanai T (2002) Single point mutation in the Rieske iron-sulfur subunit of cytochrome b6/f leads to an altered pH dependence of plastoquinol oxidation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 519: 99-102
- Joliot P, Delosme R (1974) Flash-induced 519 nm absorption change in green algae. *Biochim Biophys Acta* 357: 267-284
- Joliot P, Joliot A (1984) Electron transfer between the two photosystems. I. Flash excitation under oxidizing conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 765: 210-218
- Joliot P, Joliot A (1984) Electron transfer between the two photosystems. II. Equilibrium constants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 765: 219-226
- Joliot P, Joliot A (1988) The low-potential electron-transfer chain in the cytochrome bf complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 933: 319-333
- Khrebtukova I, Spreitzer RJ (1996) Elimination of the *Chlamydomonas* gene family that encodes the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13689-13693
- Kroliczewski J, Piskozub M, Bartoszewski R, Kroliczewska B (2016) ALB3 Insertase Mediates Cytochrome b6 Co-translational Import into the Thylakoid Membrane. *Sci Rep* 6: 34557
- Kurusu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA (2003) Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* 302: 1009-1014
- Lam E, Malkin R (1985) Characterization of a photosynthetic mutant of *Lemna* lacking the cytochrome b6-f complex. *Biochim Biophys Acta* 810: 106-109
- Lan Y, Chen Q, Kong M, Liu Y, Lyu MA, Perveen S, Mi H (2021) PetM Is Essential for the Stabilization and Function of the Cytochrome b6f Complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 62: 1603-1614
- Lavergne J (1983) Membrane potential-dependent reduction of cytochrome b-6 in an algal mutant lacking Photosystem I centers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 725: 25-33
- Lemaire C, Girard-Bascou J, Wollman F-A, Bennoun P (1986) Studies on the cytochrome b6/f complex. I. Characterization of the complex subunits in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 851: 229-238
- Levine RP (1960) Genetic Control of Photosynthesis in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 46: 972-978

- Levine RP (1960) A screening technique for photosynthetic mutants in unicellular algae. *Nature* 188: 339-340
- Levine RP, Smillie RM (1962) The pathway of triphosphopyridine nucleotide photoreduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 417-421
- Li N, Wong WS, Feng L, Wang C, Wong KS, Zhang N, Yang W, Jiang Y, Jiang L, He JX (2023) The thylakoid membrane protein NTA1 is an assembly factor of the cytochrome *b(6)f* complex essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Commun* 4: 100509
- Maiwald D, Dietzmann A, Jahns P, Pesaresi P, Joliot P, Joliot A, Levin JZ, Salamini F, Leister D (2003) Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-synthase delta-subunit of *Arabidopsis*. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression. *Plant Physiol* 133: 191-202
- Malone LA, Qian P, Mayneord GE, Hitchcock A, Farmer DA, Thompson RF, Swainsbury DJK, Ranson NA, Hunter CN, Johnson MP (2019) Cryo-EM structure of the spinach cytochrome *b₆ f* complex at 3.6 Å resolution. *Nature* 575: 535-539
- Martinez SE, Huang D, Szczepaniak A, Cramer WA, Smith JL (1994) Crystal structure of chloroplast cytochrome *f* reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation. *Structure* 2: 95-105
- Maul JE, Lilly JW, Cui L, dePamphilis CW, Miller W, Harris EH, Stern DB (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* 14: 2659-2679
- Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N, Schuster G (2003) HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. *Plant Cell* 15: 1480-1495
- Meurer J, Meierhoff K, Westhoff P (1996) Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridisation. *Planta* 198: 385-396
- Miles CD, Daniel DJ (1973) A rapid screening technique for photosynthetic mutants of higher plants. *Plant Science Letters* 1: 237-240
- Minai L, Wostrikoff K, Wollman FA, Choquet Y (2006) Chloroplast biogenesis of photosystem II cores involves a series of assembly-controlled steps that regulate translation. *Plant Cell* 18: 159-175
- Munekage Y, Takeda S, Endo T, Jahns P, Hashimoto T, Shikanai T (2001) Cytochrome *b(6)f* mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in *Arabidopsis*. *Plant J* 28: 351-359
- Nelson N, Neumann J (1972) Isolation of a cytochrome *b₆ -f* particle from chloroplasts. *J Biol Chem* 247: 1817-1824
- Okegawa Y, Tsuyama M, Kobayashi Y, Shikanai T (2005) The *pgr1* mutation in the Rieske subunit of the cytochrome *b₆f* complex does not affect PGR5-dependent cyclic electron transport around photosystem I. *J Biol Chem* 280: 28332-28336
- Ozawa SI, Buchert F, Reuys R, Hippler M, Takahashi Y (2023) Algal PETC-Pro171-Leu suppresses electron transfer in cytochrome *b₆f* under acidic lumenal conditions. *Plant Physiol* 191: 1803-1817
- Proctor MS, Malone LA, Farmer DA, Swainsbury DJK, Hawkings FR, Pastorelli F, Emrich-Mills TZ, Siebert CA, Hunter CN, Johnson MP, Hitchcock A (2022) Cryo-EM structures of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 cytochrome *b₆f* complex with and without the regulatory PetP subunit. *Biochem J* 479: 1487-1503
- Rexroth S, Rexroth D, Veit S, Plohnke N, Cormann KU, Nowaczyk MM, Rogner M (2014) Functional characterization of the small regulatory subunit PetP from the cytochrome *b₆f* complex in *Thermosynechococcus elongatus*. *Plant Cell* 26: 3435-3448
- Rymarquis LA, Webster BR, Stern DB (2007) The nucleus-encoded factor MCD4 participates in degradation of nonfunctional 3' UTR sequences generated by cleavage of pre-mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Mol Genet Genomics* 277: 329-340
- Sakamoto W, Sturm NR, Kindle KL, Stern DB (1994) *petD* mRNA maturation in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts: role of 5' endonucleolytic processing. *Mol Cell Biol* 14: 6180-6186
- Sandoval-Ibanez O, Rolo D, Ghandour R, Hertle AP, Armarego-Marriott T, Sampathkumar A, Zoschke R, Bock R (2022) De-etiolation-induced protein 1 (DEIP1) mediates assembly of the cytochrome *b₆f* complex in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 13: 4045
- Schottler MA, Flugel C, Thiele W, Bock R (2007) Knock-out of the plastid-encoded PetL subunit results in reduced stability

- and accelerated leaf age-dependent loss of the cytochrome b6f complex. *J Biol Chem* 282: 976-985
- Shepherd HS, Boynton JE, Gillham NW (1979) Mutations in nine chloroplast loci of *Chlamydomonas* affecting different photosynthetic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1353-1357
- Shikanai T, Munekage Y, Shimizu K, Endo T, Hashimoto T (1999) Identification and characterization of *Arabidopsis* mutants with reduced quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Physiol* 40: 1134-1142
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5: 2043-2049
- Stroebe D, Choquet Y, Popot JL, Picot D (2003) An atypical haem in the cytochrome b6f complex. *Nature* 426: 413-418
- Sturm NR, Kuras R, Büschlen S, Sakamoto W, Kindle KL, Stern DB, Wollman FA (1994) The *petD* gene is transcribed by functionally redundant promoters in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* 14: 6171-6179
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8526-8530
- Svab Z, Harper EC, Jones JD, Maliga P (1990) Aminoglycoside-3'-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* 14: 197-205
- Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 913-917
- Takahashi H, Schmollinger S, Lee JH, Schroda M, Rappaport F, Wollman FA, Vallon O (2016) PETO Interacts with Other Effectors of Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas*. *Mol Plant* 9: 558-568
- Takahashi Y, Rahire M, Breyton C, Popot JL, Joliot P, Rochaix JD (1996) The chloroplast *ycf7* (*petL*) open reading frame of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a small functionally important subunit of the cytochrome b6f complex. *EMBO J* 15: 3498-3506
- Veit S, Nagadoi A, Rogner M, Rexroth S, Stoll R, Ikegami T (2016) The cyanobacterial cytochrome b6f subunit PetP adopts an SH3 fold in solution. *Biochim Biophys Acta* 1857: 705-714
- Volkmer T, Schneider D, Bernát G, Kirchhoff H, Wenk SO, Rögner M (2007) Ssr2998 of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is involved in regulation of cyanobacterial electron transport and associated with the cytochrome b6f complex. *J Biol Chem* 282: 3730-3737
- Wang F, Johnson X, Cavauiuolo M, Bohne AV, Nickelsen J, Vallon O (2015) Two *Chlamydomonas* OPR proteins stabilize chloroplast mRNAs encoding small subunits of photosystem II and cytochrome b6 f. *Plant J* 82: 861-873
- Wietrzynski W, Traverso E, Wollman FA, Wostrikoff K (2021) The state of oligomerization of Rubisco controls the rate of synthesis of the Rubisco large subunit in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 33: 1706-1727
- Wiley DL, Auffret AD, Gray JC (1984) Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes. *Cell* 36: 555-562
- Wittkopp TM, Saroussi S, Yang W, Johnson X, Kim RG, Heinnickel ML, Russell JJ, Phuthong W, Dent RM, Broeckling CD, Peers G, Lohr M, Wollman FA, Niyogi KK, Grossman AR (2018) GreenCut protein CPLD49 of *Chlamydomonas reinhardtii* associates with thylakoid membranes and is required for cytochrome b6 f complex accumulation. *Plant J* 94: 1023-1037
- Wostrikoff K, Choquet Y, Wollman FA, Girard-Bascou J (2001) TCA1, a single nuclear-encoded translational activator specific for *petA* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Genetics* 159: 119-132
- Wostrikoff K, Girard-Bascou J, Wollman FA, Choquet Y (2004) Biogenesis of PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J* 23: 2696-2705
- Wostrikoff K, Stern D (2007) Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6466-6471
- Wurtz EA, Sears BB, Rabert DK, Shepherd HS, Gillham NW, Boynton JE (1979) A specific increase in chloroplast gene mutations following growth of *Chlamydomonas* in 5-fluorodeoxyuridine. *Mol Gen Genet* 170: 235-242
- Xie Z, Culler D, Dreyfuss BW, Kuras R, Wollman FA, Girard-Bascou J, Merchant S (1998) Genetic analysis of chloroplast c-type cytochrome assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*:

One chloroplast locus and at least four nuclear loci are required for heme attachment. *Genetics* 148: 681-692

Zhou J, Fernandez-Velasco JG, Malkin R (1996) N-terminal mutants of chloroplast cytochrome *f*. Effect on redox reactions and growth in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 271: 6225-6232

Zito F, Finazzi G, Joliot P, Wollman FA (1998) Glu78, from the conserved PEWY sequence of subunit IV, has a key function in cytochrome *b₆f* turnover. *Biochemistry* 37: 10395-10403