

叶绿素生物合成的分子调控

吴自明¹, 张欣², 万建民^{2,*}

¹江西农业大学, 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室, 农业部双季稻生理生态与栽培重点实验室, 江西省作物生理生态与遗传育种重点实验室, 南昌 330045; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

Molecular Regulation of Chlorophyll Biosynthesis

WU Zi-Ming¹, ZHANG Xin², WAN Jian-Min^{2,*}

¹Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding of Jiangxi Province, Key Laboratory of Physiology, Ecology and Cultivation of Double Cropping Rice, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; ²Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

摘要: 介绍了叶绿素生物合成的分子调控研究进展, 并对今后这一领域的研究作了展望。

关键词: 叶绿素; 生物合成; 分子调控

叶绿素是植物叶绿体内参与光合作用的色素之一。全球每年有大约 10^9 吨的叶绿素季节性合成和降解, 但这些过程大部分是发生在海洋中(Rüdiger 1997)。通过对衣藻、拟南芥和水稻等模式生物的研究, 已经鉴定出参与叶绿素生物合成的所有酶类(Beale 等 2005)。然而因叶绿素的生物合成分子调控的复杂性, 除了受外部环境条件和生长发育影响外, 其内在相关基因调控也很重要。

1 叶绿素生物合成酶的区域化定位

高等植物中叶绿素的生物合成是以谷氨酸与 δ -酮戊二酸作为原料的, 然后合成 δ -氨基酮戊酸(ALA)(图1)。参与叶绿素的生物合成的酶在质体内定位于3个部分, 从5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)到原卟啉IX的合成发生在叶绿体基质中, 后续的合成步骤都是由膜结合或膜相关的一些酶所催化。有人在菠菜叶绿体膜中检测到原卟啉IX氧化酶、原卟啉IX、原叶绿素酸酯氧化还原酶和原叶绿素酸酯等中间代谢产物的存在(Joyard 等 1990; Matringe 等 1992)。Walker 和 Weinstein (1991)证明镁螯合酶复合体对膜有很高的亲和性。这些都充分说明从起始到中间步骤镁卟啉的合成都在叶绿体膜上进行。与初始步骤相反, 叶绿素所有的后期步骤, 如叶绿素酸酯a植醇化及其还原, 以及叶绿素a氧化生成叶绿素b都发生在类囊体膜上(Block 等 1980)。叶绿素生物合成前期和后期的催化步骤区域化定位, 意味着中间代谢产物必须在质体膜到基质、类囊体膜之间运输, 三者

必然存在复杂的代谢调控网络。

2 叶绿素合成途径的分子调控

2.1 ALA的合成 ALA的合成是叶绿素生物合成途径的限速步骤(图1、表1)。从谷氨酸到ALA合成需经三步独立的催化反应(谷氨酰tRNA合成酶; 谷氨酰tRNA还原酶; 谷氨酰-1-半醛转氨酶), 但有初步证据表明催化这三步反应的酶并不是独立起作用。Krishnasamy 和 Wang (1990)发现莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的谷氨酰tRNA还原酶的活性受谷氨酸、ATP和谷氨酰tRNA合成酶激活, 在有谷氨酰tRNA出现时谷氨酰tRNA还原酶才与谷氨酰tRNA合成酶形成复合体(Chen 等 1990; Jahn 1992)。谷氨酰tRNA合成酶和谷氨酰tRNA还原酶形成的复合体便于谷氨酰tRNA更好地向ALA合成的运输, 从而能限制蛋白合成机构对谷氨酰tRNA竞争。因此, 谷氨酰tRNA还原酶是代谢和环境条件调控的关键酶。拟南芥中有3个基因编码谷氨酰tRNA还原酶(HEMA1~3, McCormac 等 2001), 2个基因编码谷氨酰-1-半醛转氨酶(Ilag 等 1994)。HEMA1基因受光诱导在所有组织中表达, 而HEMA2基因不受光诱导, 仅在根中表达(McCormac 等 2001)。

2.2 Mg^{2+} 螯合 叶绿素生物合成和血红素、光敏

收稿 2008-09-19 修定 2008-10-13

资助 江西省教育厅项目(GJJ09477)、江西农业大学博士启动基金和校自然科学基金。

* 通讯作者(E-mail: wanjm@caas.net.cn; Tel: 010-62186628)。

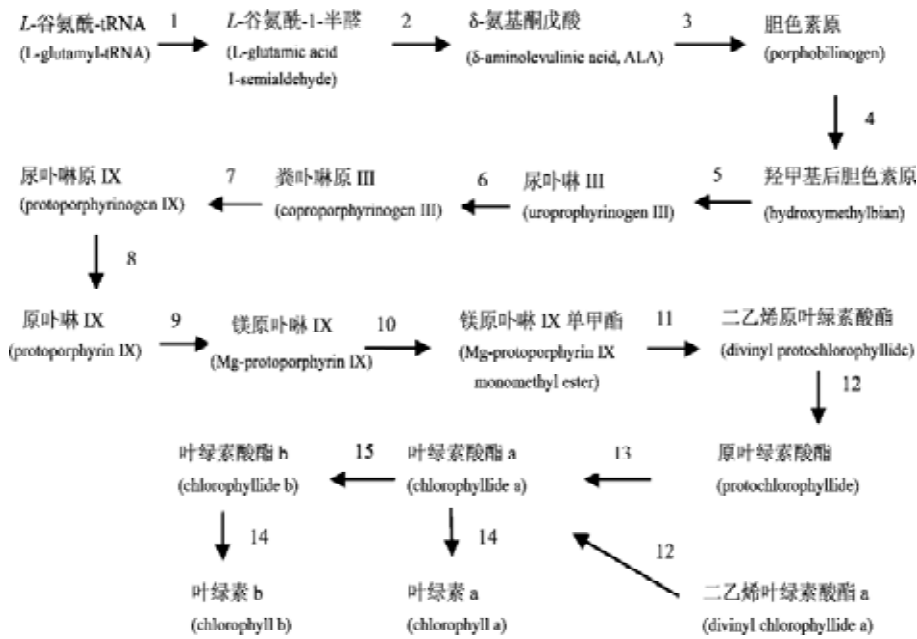


图1 被子植物叶绿素合成途径(Beale 2005)

标有数字的箭头为表1中所列的酶; 根据有效底物发生反应12或13; 反应14可利用2种底物。

表1 被子植物编码叶绿素合成的基因

步骤	酶	基因名称
1	谷氨酰-tRNA 还原酶(glutamyl tRNA reductase)	HEMA1、HEMA2、HEMA3
2	谷氨酸-1-半醛转氨酶(glutamate 1-semialdehyde aminotransferase)	GSA (HEML1)、GSA2 (HEML2)
3	胆色素原合酶(porphobilinogen synthase) [5-氨基酮戊酸脱水酶(5-aminolevulinatase dehydratase)]	HEMB1、HEMB2
4	羟甲基后胆色素原合酶(hydroxymethylbilane synthase) [胆色素原合酶脱氨酶(porphobilinogen deaminase)]	HEMB1、HEMB2
5	尿卟啉原 III 合酶(uroporphyrinogen III synthase) [尿卟啉原 III 共合酶(uroporphyrinogen III co-synthase)]	HEMD
6	尿卟啉原脱羧酶(uroporphyrinogen decarboxylase)	HEME1、HEME2
7	粪卟啉原氧化脱羧酶(coproporphyrinogen oxidative decarboxylase)	HEMF1、HEMF2
8	原卟啉原氧化酶(protoporphyrinogen oxidase)	HEMG1、HEMG2
9	镁螯合酶 D 亚基(Mg chelatase D subunit)	CHLD
	镁螯合酶 H 亚基(Mg chelatase H subunit)	CHLH
	镁螯合酶 I 亚基(Mg chelatase I subunit)	CHLI1、CHLI2
10	镁原卟啉 IX 甲基转移酶(Mg-protoporphyrin IX methyltransferase)	CHLM
11	镁原卟啉 IX 单甲酯环化酶(Mg-protoporphyrinogen IX monomethylester cyclase)	CRD1 (ACSF)
12	二乙烯还原酶(divinyl reductase)	DVR
13	NADPH 原叶绿素酸酯氧化还原酶(NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase)	PORA、PORB、PORC
14	叶绿素合酶(chlorophyll synthase)	CHLG
15	叶绿素酸酯 a 氧化酶(chlorophyllide a oxygenase)	CAO

表中步骤数与图1中数字对应; 基因名称为该基因在拟南芥中的名称, 可变基因名和酶的名称用括号表示, 除POR基因用字母后缀表示, 编码同一基因的不同酶用数字后缀表示。

色素生物合成是四吡咯生物合成途径的2个分支, 原卟啉是形成叶绿素和血红素的分水岭。在质体和核糖体缺乏的大麦突变体, 白叶部分的镁螯合

酶和镁卟啉转甲基酶活性丧失, 铁螯合酶活性增强, 其光合作用的丧失是由于四吡咯代谢偏向血红素的合成, 而不是叶绿素的合成(Yaronskaya等2003)。

在豌豆和拟南芥黄化苗见光后,光诱导ALA合成速率的增加,伴随着叶绿素合成途径代谢中间产物的普遍增加,ALA脱水酶和铁螯合酶的mRNA的水平各自升高大约20倍和5倍。Guo等(1998)研究表明镁螯合酶对原卟啉IX的亲性和高于铁螯合酶,这就意味原卟啉IX偏向叶绿素的合成,大部分原卟啉IX是通向叶绿素合成的Mg²⁺螯合分支。但是在正常光照条件下金鱼草(*Antirrhinum majus*)的镁螯合酶突变体OLIVE(OLI)的mRNA水平下降,黑暗条件下其转录水平恢复正常(Hudson等1993)。Oli基因的翻译产物类似细菌bchH蛋白,结合原卟啉IX(Hudson等1993; Gibson等1995),而Mg²⁺螯合是由镁螯合酶复合物催化。一种推测是光照条件下限制OLI蛋白水平是为了减少黑暗条件下原卟啉IX通向叶绿素合成途径中的Mg²⁺螯合。酶活性的这些变化反映叶绿素和血红素需求的差异,正常生长或没有光合作用条件下,原卟啉IX向叶绿素和血红素合成分配的变化部分是由于各自的核基因表达调控,这些改变源于质体信号介导质体到细胞核生理状态变化。

许多研究表明了镁卟啉(Mg-porphyrin)还参与质体和核质信号转导,镁卟啉和镁卟啉单甲基酯酶能诱导HSP70表达,且镁卟啉能替代光诱导HSP70表达(Kropat等1997, 2000; Strand等2003)。Mg²⁺螯合由镁螯合酶来完成,该酶包含三亚基,CHLH亚基、CHLI亚基和CHLD亚基,其中CHLH亚基在质核信号转导过程中起重要作用。采用除草剂(胡萝卜素合成抑制剂)筛选到的拟南芥基因组解耦联(genomes uncoupled)突变体*gun1-gun5*。其中*gun1*参与了镁卟啉和质体基因表达的反馈信号(Nott等2006; Susek等1993)。Koussevitzky等(2007)研究表明GUN1是可结合DNA的质体定位PPR(pentatricopeptide-repeat)家族蛋白,通过调控质体基因表达,同时作为反馈信号,介导AP2型转录因子ABI4(abscisic acid-insensitive 4)抑制核编码质体基因表达(Koussevitzky等2007)。*gun2*和*gun3*作为编码藻胆色素(phytochromobilin)的合成过程中的酶(*gun2*编码血红素氧化酶,催化血红素转化成胆绿素;*gun3*编码藻胆色素合酶,催化胆绿素向藻胆色素转变),间接的影响镁螯合酶H亚基的信号活性(Mochizuki等2001)。GUN4作为叶绿素合成与细胞内信号的调控子,与镁螯合酶相互作用影响它的

活性(Susek等1993)。有趣的是,这个蛋白既结合底物,又结合镁螯合酶的产物,如原卟啉IX和镁卟啉(Larkin等2003)。这样既保护卟啉和镁卟啉免于酶分解,又便于代谢产物进入下游叶绿素合成。同时,也保护了植物免于光氧化损伤。此外,Wilde等(2004)从蓝细菌(*Synechocystis* sp. PCC 6803)中发现一个类似于*gun4*的突变体,这个蛋白不仅调控镁螯合,而且调控原卟啉IX与铁螯合。*gun5*是被证明编码镁螯合酶CHLH亚基,除了组成镁螯合酶充当催化作用外,还通过结合过多的卟啉或镁卟啉,监测卟啉水平,经由下游调控因子,如*gun1*等(Koussevitzky等2007),向核发送负调控或抑制正向的信号反馈调控核基因的表达(Mochizuki等2001)。除草剂处理的*gun5*突变体叶片中的镁卟啉的含量大幅度降低,与Lhcb1的表达呈负相关关系(Strand等2003),这些结果与镁卟啉超出域值导致限制Lhcb1转录是一致的(Strand等2003)。近来,Shen等(2006)发现一种参与叶绿素生物合成和质体-核信号转导的蛋白质的脱落酸受体ABAR,编码一个已知蛋白质,即定位于质体内的参与催化叶绿素合成和质体-核信号转导的蛋白质镁螯合酶H亚基(CHLH)。

2.3 原叶绿素酸酯(pchl)到叶绿素酸酯(chlide) 原叶绿素酸酯氧化还原酶(POR)在光照条件下催化原叶绿素酸酯形成叶绿素酸酯,其作用机理尚未弄清楚。von Wettstein等(1974)已经鉴定出大量削弱这种机制的大麦突变体,至少有4个基因阻止过多原叶绿素酸酯的积累。从单子叶植物大麦和双子叶植物拟南芥中克隆出了*porA*和*porB*,这2个*por*基因同源性较高(大麦75%,拟南芥88%),但它们具有明显不同的表达模式(Armstrong等1995; Holtorf等1995)。大麦中,PORA(36 kDa)广泛存在于暗光下生长的组织中,见光后很快降解,而小分子PORB蛋白均匀分布在各组织中(Holtorf等1995)。拟南芥中36 kDa形式的PORB与37 kDa形式的PORA相比,光照条件下更丰富、更稳定。*porA*基因在黄化组织中特异性表达,见光后转录水平下降,而*porB*组成型表达在两种类型植物中并不受光照条件影响(Armstrong等1995)。拟南芥在红光条件下发芽产生正常光照下的表型,PORA特异性缺失,而PORB正常,当转移到白光下,PORB光还原原叶绿素酸酯前体。尽管形成光捕获复合体,但

反应中心复合体形成却受阻,说明在拟南芥种子发芽过程中PORA在反应中心形成过程中具有独特功能(Runge等1996)。

关于 *por* 表达的调控机制,单子叶植物中光敏色素介导光诱导负调控 *porA* 的表达(Batschschaer和Apel 1984; Möisinger等1985)。*porA* 和 *porB* 调控模式的差异,是否是由于启动子区域的差异有待进一步研究。结构的差异说明POR转运到细胞器特性的差异。从黄化质体到叶绿体,PORA蛋白除了底物原叶绿素酸酯,还需要ATP结合到蛋白酶敏感因子上,这两种物质都积累在细胞器表面(Reinbothe等1995a)。相反,大麦PORB蛋白无需原叶绿素酸酯,因而在整个变绿的过程中原叶绿素酸酯没有在细胞器表面积累也能起作用。PORA和PORB的水平受光激活蛋白酶的调控,这种蛋白酶由核基因编码,在叶绿体中合成(Reinbothe等1995b)。研究表明PORA辅基蛋白、PORA结合物(单结合或双结合NADPH和原叶绿素酸酯)能够抵抗降解,相反,POR非共价结合叶绿素酸酯易被降解。有人研究提出PORA蛋白的存在是为了建立黄化质体前片层体类晶体结构(Ryberg和Sundqvist 1991; von Wettstein等1995)。似乎PORA并不仅仅作为普通的催化酶,更是充当一种保护催化产物叶绿素酸酯的自杀性酶,见光植株降解PORA蛋白是为了迅速形成类囊体膜(Reinbothe等1995b, c, d)。

2.4 叶绿素(chlorophyll)的形成 叶绿素合成酶作为类囊体定位的酯化酶,能够利用牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)或植醇焦磷酸(phytyl diphosphate, PhyPP)作为底物(Rüdiger等1980; Soll等1983; Oster等1997; Oster和Rüdiger 1997),因而叶绿体拥有一个非常灵活的叶绿素a形成系统。NADPH的含量水平对类囊体膜上的Chl a_{ph} 的增加与减少有显著影响(Soll等1983)。Wu等(2007)研究发现,叶绿素合成酶基因单碱基突变体 *yg11* 的叶绿素合成速率随着叶绿体的发育而增加,表现为叶片缓慢变绿。Soll等(1983)研究提出叶绿体中的叶绿素合成酶比黄化质体中的叶绿素合成酶更加稳定,且对底物的特异性发生改变,叶绿体对底物PhyPP和GGPP亲和性是4:1,而黄化质体是2:1。中间复合物Chl $a_{CG,DHGG,THGG}$ 的增多也会影响类囊体膜的稳定,因此,当黄化质

体转变成叶绿体后,叶绿素合成速率也会加快。

Klein等(1988a, b)认为质体核糖体反应中心新生肽(RCs)对叶绿素a有更高的亲合性,叶绿素b是由叶绿素a氧化而来,所以当RCs不再整合叶绿素a时,富余的叶绿素a才有部分氧化成叶绿素b。部分叶绿素a合成的减少,将会扩大对叶绿素b合成的抑制(Falbel等1996),导致叶绿素a/b值升高。叶绿素b减少也会导致光合单元减少和叶绿体类囊体膜的发育不良。叶绿素酸酯a氧化酶(CAO)是催化叶绿素酸酯b形成的酶,不同的光照强度条件下,拟南芥中叶绿素a和叶绿素b的比值与CAO的mRNA水平相关,表明通过调控CAO的mRNA水平至少可以部分调控叶绿素b的合成。然而,在植物中过多表达CAO,叶绿素a和叶绿素b的比值仅有微小变化(2.85到2.65)(Tanaka等2001);Wu等(2007)研究发现黄绿叶突变体 *yg11* 叶片CAO的mRNA水平轻微下降,而叶绿素a和叶绿素b的比值大大增加(3.63到7.91),说明CAO的活性受转录后水平调控。

3 非叶绿素合成途径的分子调控

3.1 血红素(heme)的反馈调节 血红素反馈抑制已经作为叶绿素合成的关键的调控步骤。减少血红素降解和阻碍胆色素原形成的突变体都降低了原叶绿素酸酯形成,这个效应被认为是血红素限制ALA合成所致(Terry和Kendrick 1999)。最直接的证据是,在番茄 *aurea* 突变体和 *yellow-green-2* 突变体中,血红素氧化酶(heme oxygenase)和光敏色素生色团合酶(P Φ B synthase)突变,造成血红素的过量积累,血红素反馈抑制叶绿素前体ALA的合成,突变体叶色黄化(Terry和Kendrick 1999)。血红素在完整的叶片组织和分离的叶绿体中可被降解(Castelfranco和Jones 1975; Thomas和Weinstein 1990)。当然,血红蛋白的形成需要消耗血红素,血红素的含量水平可被血红素自身的生理浓度变构抑制。当血红素消耗大于合成时,游离的血红素减少就会促进ALA合成,ALA合成速率增加将会促进血红素形成;当血红素的合成大于消耗时,其浓度会再次升高从而抑制ALA的形成。总的结果是原卟啉IX形成速率的自动调节确保满足血红素和镁卟啉IX合成需要,过量产生将会导致光氧化损伤。之所以用血红素而不用原卟啉IX作为反馈调节效应子是因为血红素比原卟啉IX更具有相对较强光化学惰性,

可以避免原卟啉 IX 瞬时增加带来的光氧化损伤。这一结论最早是在具有不同的 ALA 形成过程的光合细菌中提出来的(Lascelles 和 Hatch 1969), 显然也可以应用于叶绿体血红素和叶绿素的合成过程。

血红素作为谷氨酰 tRNA 还原酶的变构抑制剂, 成熟蛋白的 N 端的 31~34 个氨基酸被认为是血红素作用区域(Vothknecht 等 1996)。从古细菌嗜热菌(*Archaeobacterium methanopyrus kandleri*)中分离出的谷氨酰 tRNA 还原酶的晶体结构分析表明, 谷氨酰 tRNA 还原酶是 V 形二聚体酶, 具有保守氨基酸和三体的结合域(NADPH 结合、催化和二聚化位点)(Moser 等 2001)。然而细菌谷氨酰 tRNA 还原酶并没有类似植物谷氨酰 tRNA 还原酶那样的氨基酸末端延伸(Vothknecht 等 1996)。黑暗条件下, 被子植物叶绿素合成在依赖光阶段还原原叶绿素酸酯受阻, 同时 ALA 合成也受限制。在许多黄化苗突变体中鉴定出的拟南芥 *flu* 突变体, 黑暗条件下不依赖血红素调控 ALA 合成, 荧光叶绿素前体积累。研究表明 *FLU* 编码一个负调控因子, 它的一个四聚肽重复区域可与谷氨酰 tRNA 还原酶相互作用(Meskauskiene 等 2001), 但是 *FLU* 如何获取信号, 参与谷氨酰 tRNA 还原酶的翻译后调控还有待进一步研究。

3.2 光敏色素(phytochrome)调控 叶绿素合成受许多来自细胞核和细胞质间信号转导的调节。光敏色素在光作用下进入细胞核与转录因子直接作用调节基因表达, 在光敏色素信号转导中已有报道(Davies 等 1990; Ni 等 1998)。Chory 等(1989)利用酵母双杂交技术, 以光敏色素 B 的 C 端区域为探针, 从拟南芥中分离了一类 helix-loop-helix 转录因子, 光敏色素相互作用因子 3 (phytochrome-interacting factor 3, PIF3)。当光敏色素暴露于红光时, 它便结合 pif3 的蛋白, 该蛋白是调节包括光合作用和植物生物钟有关的许多基因表达的一种转录因子。因此, 抑制光敏色素 B 的活性就可减少植物对远红外光的敏感性, 这将会降低植株的生长趋势。Huq 等(2004)在拟南芥中又发现了一种具有 helix-loop-helix (bHLH) 负调控因子(PIF1), 与光敏色素相互作用负调控叶绿素的生物合成。López-Juez 等(1998)研究拟南芥 *cue* (chlorophyll a/b-binding protein under expressed) 突变体发现, *cue* 突变体响应光敏色素激活, 抑制 *CAB* 基因的表达, 质体信号紧密参与光

敏色素调控编码质体蛋白的核基因表达。另外, 叶绿素降解的中间产物荧光叶绿素代谢物(fluorescent chlorophyll catabolite, FCC)、无荧光叶绿素代谢物(nonfluorescent chlorophyll catabolite, NCCs)等与光敏色素有非常相似的结构, 这是否意味着叶绿素降解产物或降解代谢可能也参与部分植物的信号传递或代谢过程的调控, 这些问题都有待深入研究。

4 结束语

尽管叶绿素的合成及其调控研究取得很大的进展, 但仍有许多问题没有解决。如叶绿素的合成与降解的相互控制机制。根据 Hendry 和 Stobart (1986) 的研究, 叶绿素的半衰期在 16~58 h 之间, 意味着叶绿素积累是个动态的过程, 但是在进行光合作用的成熟叶片中没有发现有 NCCs 存在(Matile 等 1999); 还有叶绿素代谢中间产物, 如卟啉和吡咯, 会导致光氧化损伤, 所以推测叶绿素的合成和降解存在复杂的保护机制。这些机制涉及到的基因功能和作用机理都尚未弄清楚, 都值得我们进一步研究。

参考文献

- Armstrong GA, Runge S, Frick G, Sperling U, Apel K (1995). Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 108: 1505~1517
- Batschschauer A, Apel K (1984). An inverse control by phytochrome of the expression of two nuclear genes in barley. *Eur J Biochem*, 143: 593~597
- Beale SI (2005). Green genes gleaned. *Trends Plant Sci*, 10: 309~312
- Block MA, Joyard J, Douce R (1980). Site of synthesis of geranylgeraniol derivatives in intact spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 631: 210~219
- Castelfranco PA, Jones OTG (1975). Protoheme turnover and chlorophyll synthesis in greening barley tissue. *Plant Physiol*, 55: 485~490
- Chen MW, Jahn D, O'Neill GP, Söll D (1990). Purification of the glutamyl-tRNA reductase from *Chlamydomonas reinhardtii* involved in δ -aminolevulinic acid formation during chlorophyll biosynthesis. *J Biol Chem*, 265: 4058~4063
- Chory J, Peto CA, Ashbaugh M (1989). Different roles for phytochrome in etiolated and green plants deduced from characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell*, 1: 867~880
- Davies TGE, Thomas H, Thomas BJ, Rogers LJ (1990). Leaf senescence in a nonyellowing mutant of *Festuca protensis*: Metabolism of cytochrome *f*. *Plant Physiol*, 93: 588~595
- Falbel TG, Meehl JB, Staehelin LA (1996). Severity of mutant

- phenotype in a series of chlorophyll-deficient wheat mutants depends on light intensity and the severity of the block in chlorophyll synthesis. *Plant Physiol*, 112: 821~832
- Gibson LCD, Willows RD, Kannangara CG, von Wettstein D (1995). Magnesium-protoporphyrin chelatase from *Rhodobacter sphaeroides*: reconstitution of activity by combining the products of the *bchH*, *-I*, and *-D* genes expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1941~1944
- Guo R, Luo M, Weinstein JD (1998). Magnesium-chelatase from developing pea leaves. Characterization of a soluble extract from chloroplasts and resolution into three required protein fractions. *Plant Physiol*, 116: 605~615
- Hendry GAF, Stobart AK (1986). Chlorophyll turnover in greening barley. *Phytochemistry*, 25: 2735~2737
- Holtorf H, Reinbothe S, Reinbothe C, Bereza B, Apel K (1995). Two routes of chlorophyll synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 3254~3258
- Hudson A, Carpenter R, Doyle S, Coen ES (1993). *Olive*: a key gene required for chlorophyll biosynthesis in *Antirrhinum majus*. *EMBO J*, 12: 3711~3719
- Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K, Quail PH (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science*, 305 (24): 1937~1941
- Ilag LL, Kumar AM, Soll D (1994). Light regulation of chlorophyll biosynthesis at the level of 5-aminolevulinic acid formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 6: 265~275
- Jahn D (1992). Complex formation between glutamyl-tRNA synthetase and glutamyl-tRNA reductase during tRNA-dependent synthesis of 5-aminolevulinic acid in *Chlamydomonas*. *FEBS Lett*, 314: 77~80
- Joyard J, Block M, Pineau B, Albrieux C, Douce R (1990). Envelope membranes from mature spinach chloroplasts contain a NADPH: protochlorophyllide reductase on the cytosolic side of the outer membrane. *J Biol Chem*, 265: 21820~21827
- Klein RR, Gamble PE, Mullet JE (1988a). Light-dependent accumulation of radiolabeled plastid-encoded chlorophyll *a* — apoproteins requires chlorophyll *a*. *Plant Physiol*, 88: 1246~1256
- Klein RR, Mason HS, Mullet JE (1988b). Light regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA* and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J Cell Biol*, 106: 289~301
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong FX, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*, 316: 715~719
- Krishnasamy S, Wang WY (1990). Purification of the second enzyme of chlorophyll biosynthesis from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 93: S-62
- Kropat J, Oster U, Rüdiger W, Beck CF (1997). Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 14168~14172
- Kropat J, Oster U, Rüdiger W, Beck CF (2000). Chloroplast signalling in the light induction of nuclear HSP70 genes requires the accumulation of chlorophyll precursors and their accessibility to cytoplasm/nucleus. *Plant J*, 24: 523~531
- Larkin RM, Alonso JM, Ecker JR, Chory J (2003). GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signalling. *Science*, 299: 902~906
- Lascelles J, Hatch TP (1969). Bacteriochlorophyll and heme synthesis in *Rhodospseudomonas sphaeroides*: Possible role of heme in regulation of the branched biosynthetic pathway. *J Bacteriol*, 98: 712~720
- López-Juez E, Paul Jarvis RP, Takeuchi A, Page AM, Chory J (1998). New *Arabidopsis cue* mutants suggest a close connection between plastid- and phytochrome regulation of nuclear gene expression. *Plant Physiol*, 118: 803~815
- Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H (1999). Chlorophyll degradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50: 67~95
- Matringe M, Camadro JM, Block MA, Joyard J, Scalla R, Labbe P, Douce R (1992). Localization within chloroplasts of protoporphyrinogen oxidase, the target enzyme of diphenylether-like herbicides. *J Biol Chem*, 267: 4646~4651
- McCormac AC, Fischer A, Kumar AM, Söll D, Terry MJ (2001). Regulation of HEMA1 expression by phytochrome and a plastid signal during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 25: 549~561
- Meskauskiene R, Nater M, Goslings D, Kessler F, Camp R, Apel K (2001). FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 12826~12831
- Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A, 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 USA*, 98: 2053~2058
- Moser J, Schubert WD, Beier V, Bringemeier I, Jahn D, Heinz DW (2001). V-shaped structure of glutamyl tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J*, 20: 6583~6590
- Mösinger E, Batschauer A, Schäfer E, Apel K (1985). Phytochrome control of *in vitro* transcription of specific genes in isolated nuclei from barley (*Hordeum vulgare*). *Eur J Biochem*, 147: 137~142
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 95: 657~667
- Nott A, Jung HS, Koussevitzky S, Chory J (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 739~759
- Oster U, Bauer CE, Rüdiger W (1997). Characterization of chlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *a* synthases by heterologous expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 272: 9671~9676
- Oster U, Rüdiger W (1997). The *G4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a chlorophyll synthase of etiolated plants. *Bot Acta*, 110: 420~423

- Reinbothe C, Apel K, Reinbothe S (1995d). A light-induced protease from barley plastids degrades NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase complexed with chlorophyllide. *Mol Cell Biol*, 15: 6206~6212
- Reinbothe S, Reinbothe C, Holtorf H, Apel K (1995b). Two NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases in barley: evidence for the selective disappearance of PORA during the light-induced greening of etiolated seedlings. *Plant Cell*, 7: 1933~1940
- Reinbothe S, Reinbothe C, Runge S, Apel K (1995c). Enzymatic product formation impairs both the chloroplast receptor binding function as well as translocation competence of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase, a nuclear encoded plastid precursor protein. *J Cell Biol*, 129: 299~308
- Reinbothe S, Runge S, Reinbothe C, van Cleve B, Apel K (1995a). Substrate-dependent transport of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase into isolated plastids. *Plant Cell*, 7: 161~172
- Rüdiger W (1997). Chlorophyll metabolism: from outer space down to the molecular level. *Phytochemistry*, 46: 1151~1167
- Rüdiger W, Benz J, Guthoff C (1980). Detection and partial characterization of activity of chlorophyll synthetase in etioplast membranes. *Eur J Biochem*, 109: 193~200
- Runge S, Sperling U, Frick G, Apel K, Armstrong GA (1996). Distinct roles for light-dependent NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases (POR) A and B during greening in higher plants. *Plant J*, 9: 513~523
- Ryberg M, Sundqvist C (1991). Structural and functional significance of pigment-protein complexes of chlorophyll precursors. In: Scheer H (ed). *Chlorophylls*. Boca Raton: CRC Press, 587~612
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY et al (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*, 443: 823~826
- Soll J, Schultz G, Rüdiger W, Benz J (1983). Hydrogenation of geranylgeraniol. Two pathways exist in spinach chloroplasts. *Plant Physiol*, 71: 849~854
- Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature*, 421: 79~83
- Susek RE, Ausubel FM, Chory J (1993). Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell*, 74: 787~799
- Tanaka R, Koshino Y, Sawa S, Ishiguro S, Okada K, Tanaka A (2001). Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 26: 365~373
- Terry MJ, Kendrick RE (1999). Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and yellow-green 2 mutants of tomato. *Plant Physiol*, 119: 143~152
- Thomas J, Weinstein JD (1990). Measurement of heme efflux and heme content in isolated developing chloroplasts. *Plant Physiol*, 94: 1414~1423
- von Wettstein D, Gough S, Kannangara CG (1995). Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1039~1057
- von Wettstein D, Kahn A, Nielsen OF, Gough S (1974). Genetic regulation of chlorophyll synthesis analyzed with mutants of barley. *Science*, 184: 800~802
- Vothknecht UC, Kannangara CG, 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 USA*, 93: 9287~9291
- Walker CJ, Weinstein JD (1991). *In vitro* assay of the chlorophyll biosynthetic enzyme Mg-chelatase: resolution of the activity into soluble and membrane-bound fractions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5789~5793
- Wilde A, Mikolajczyk S, Alawady A, Lokstein H, Grimm B (2004). The *gun4* gene is essential for cyanobacterial porphyrin metabolism. *FEBS Lett*, 571: 119~123
- Wu ZM, Zhang X, He B, Diao LP, Sheng SL, Wang JL, Guo XP, Su N, Wang LF, Jiang L et al (2007). A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol*, 145: 29~40
- Yaronskaya E, Ziemann V, Walter G, Averina N, Börner T, Grimm B (2003). Metabolic control of the tetrapyrrole biosynthetic pathway for porphyrin distribution in the barley mutant albostrians. *Plant J*, 35: 512~522