光合成 CO_2 固定酵素, RuBisCO, の *in vivo*

機能形態と光呼吸の機構†

(1989 年度農芸化学奨励賞受賞)

横 田 明 穂

(大阪府立大学農学部)

"Our Goal is Mathematical Explanation of Photosynthetic Carbon Metabolism."

Joseph A. Berry, Carnegie Institution of Washington, USA, in Sakai, 1989

I. はじめに——生体の生化学的解析の方法論

生命は幾千幾万の諸過程の統合されたものの現実である。その生命の現実を解き明かそうとするわれわれの科学は、この諸過程の解析と解析結果の統合から構成されるはずである。生命科学の方法論としてこの数十年来、生化学はその効力を十分に発揮してきた。そのことは全く否めないし、現在も十分に発揮しつつある。しかし、これまでの生化学的方法論が生命の諸過程の統合に効力を発揮してきたかどうかは、疑わしい。たとえば、ある代謝経路に関与する酵素に関し、生体から純粋に取り出した酵素の *in vitro* での最適条件下での性質についての解析結果に基づいてその酵素の生体内での機能を論じようとしてきたのが、これまでの方法論であった。これは、海水から結晶化した食塩の物理的、化学的性質を調べることと海を語ろうとすることと同じである。海水中の食塩の動態についての知見は、ここからは一向に出てこない。その酵素の生体内での機能の解析は、その酵素が存在する部位の微環境、たとえば pH、基質濃度、その他の代謝中間物の濃度などを加味した条件下で行われるべきである。また、精製した酵素が *in vivo* の状態を保持しているかどうかの検証は不可欠である。これらの前提は各諸過程の統合をめざした研究に必須の条件である。

† *In vivo* Functioning Forms of the Photosynthetic CO_2 -Fixing Enzyme, RuBisCO, and the Mechanism of Photorespiration.

Akiho YOKOTA (Department of Agricultural Chemistry, University of Osaka Prefecture, Sakai 591)

る。

旧来の生化学が明らかにしてきた「事実」のなかに、方法論の未熟さゆえの全くの誤り（それは統合を不可能にする）が多々あるかもしれない。たとえば、1985 年以前、光合成研究においては炭酸の解離定数には純水中で決めた定数 (6.36) がおもに使用されてきた。後で詳述する光合成 CO_2 固定酵素は CO_2 を基質にする。反応系中での CO_2 の濃度は反応系に加えた重炭酸塩の量、炭酸の解離定数および反応系の pH から算出する⁽¹⁾。この酵素は高濃度の Mg^{2+} を必要とし、反応系のイオン強度は 0.15~0.2 M にも達する。イオン強度を加味したこの反応系での炭酸の pK_a は 6.10~6.15 である⁽²⁾。重要なことは、0.2 ポイントの pK_a の減少は反応系中の実際の CO_2 濃度を半減させるということである。この提案によって、これ以前の植物の光合成 CO_2 固定酵素の CO_2 に対する K_m は半分に訂正された⁽³⁾。植物の光合成はこの K_m 値を少し越えたところで行われているので、 K_m 値の半減は非常に重要な意味を持つてくる。

筆者はこれまで 15 年にわたり、光合成反応で重要とされている二つの代謝過程、 CO_2 固定反応と O_2 固定によって生じたグリコール酸の代謝研究、に関与してきた。この機会にこれらの研究を概説し、これまで考えてきた筆者の「生化学的方法論」を述べたい。

II. RuBisCO と光合成炭素代謝——これまでの理解と問題提起

植物が太陽のエネルギーを固定して O_2 を発生し CO_2 を吸収、固定するという事実の初めての記載は 1884 年にさかのぼる。この光合成の全体の過程のうちで CO_2 が固定され糖として蓄積されていく過程を解明したのは、カルビンと彼のグループであった⁽⁴⁾。この解明と並行し

図 1 種々の HCO_3^- 濃度での RuBisCO のカルボキシラーゼ反応の経時変化⁽¹²⁾

て、植物葉抽出液中に全可溶性蛋白質の約半分を占める巨大蛋白質が見出され、Fraction I protein と名付けられた⁽⁵⁾。1956 年には光合成において最初に CO_2 を固定する反応を触媒する酵素、リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ（その後、この酵素がオキシゲナーゼ活性も併せ持つことが発見され、リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ、通称 RuBisCO、と命名された）が精製された⁽⁶⁾。当初、Fraction I protein と RuBisCO が同一蛋白質かどうかについて多くの議論があったようであるが、1970 年には同一のものとして決着がついた⁽⁷⁾。

1974 年以前、古典的手法に基づいて RuBisCO の諸性質について重要な多くの報告がなされたが、それは次のようなものであった⁽⁷⁾。 CO_2 に対する K_m は $\sim 500 \mu\text{M}$ で、 $V_{\max}$ は $2.3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ であった。空気と平衡にある水中の溶存 O_2 濃度は $10 \mu\text{M}$ なので⁽¹¹⁾、空気中では RuBisCO は $V_{\max}$ の約 1% でしか機能できない。RuBisCO が可溶性蛋白質の半分以上を占めるとしても、この活性では実際の緑葉の光合成の数%を説明できない。1973 年の Buchanan の研究においても、精製 RuBisCO と単離葉緑体の CO_2 に対する K_m

には大きな隔たりがあった⁽⁸⁾。

1974 年に Bahr と Jensen は、単離葉緑体を低張下で破碎して葉緑体から放出された直後の RuBisCO は CO_2 に対して $11 \sim 18 \mu\text{M}$ であり、その後徐々に上記の精製酵素型に変わっていくことを見出した⁽⁹⁾。また、精製酵素型のものは、 CO_2 と MgCl_2 であらかじめ処理することによって放出直後のものに近い型に変えられる。この研究は G. H. Lorimer を代表とするオーストラリアのグループの研究によって完結した^(3,10,11)。精製 RuBisCO (E) は活性を測定する前にあらかじめ CO_2 (C) と Mg^{2+} (M) で処理することによって活性型 (ECM) に変換される。ECM 型の RuBisCO に基質である CO_2 とリブローズビスリン酸 (RuBP) を反応させると、RuBisCO は図 1 に示すように、最初の数分間は活発に反応し、その後幾分活性が低下した状態で直線的に反応する^(9,12)。この最初の反応部分を initial burst、直線的な反応部分を linear phase とわれわれはよんでいる。initial burst での基質 CO_2 に対する K_m は $11 \sim 18 \mu\text{M}$ で、linear phase でのそれは $\sim 500 \mu\text{M}$ にもなることから、*in vivo* では RuBisCO は initial burst で機能していると考えられた^(11,12)。それ以来この十数年にわたり、RuBisCO の諸

表 1 Initial burst を使って決定された C₃ 植物 RuBisCO の一般的性質⁽¹⁴⁾

性 質	25°C での測定値
CO ₂ /O ₂ 比特異性 ⁽³⁾	88
$K_m(\text{CO}_2)$	9 μM
$K_m(\text{O}_2)$	535 μM
$K_m(\text{RuBP})$	28 μM
$V_{\max}$	3.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$
k_{cat}	3.3/s/site

表 2 異なる方法で調製した RuBisCO の二相性の強さの比較⁽¹³⁾

Preparation	Activity in the linear phase Activity in the initial burst $\times 100$ (%)
Amm-RuBisCO	33.5 $\pm$ 5.0 ($n=4$)
PEG-RuBisCO	55.1 $\pm$ 7.8 ($n=4$)
RuBisCO released from chloroplasts	
-leupeptin	48.0 $\pm$ 5.0 ($n=3$)
+leupeptin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	57.2 $\pm$ 0.2 ($n=3$)

性質や代謝生理に関する研究は、すべてこの initial burst を使って行われてきた。

表 1 に initial burst を使ってこれまでに確立されてきた緑葉の RuBisCO の一般的な性質をまとめた⁽¹⁴⁾。CO₂ に対する K_m は 9 μM で $V_{\max}$ は 3.2 $\mu\text{mol CO}_2/\text{min}/\text{mg protein}$ である。たとえばホウレンソウ葉の RuBisCO 含量は 6 mg/mg クロロフィル (Chl) なので⁽¹⁵⁾、基質である CO₂ と RuBP が飽和した条件下ではホウレンソウ葉は 1152 $\mu\text{mol}/\text{mg Chl}/\text{hr}$ で光合成を行う能力を持つ。しかし生葉の実際の光合成速度はそれらの基質が飽和した条件下であっても、高々 300~400 $\mu\text{mol CO}_2/\text{mg Chl}/\text{hr}$ であり、RuBisCO の最大稼働率は 26~35% である。表 1 のこれらのパラメーターは、光合成炭素代謝反応のモデル化に一般に使用されている⁽¹⁶⁾。しかし……。

ここで 2 つの大きな疑問が生じる。1 つは、ECM 型でカルボキシラーゼ反応を開始したときに見られる反応開始数分後の活性の大きな低下は何に起因するのか、第二に、*in vivo* では RuBisCO は本当にこの initial burst で機能しているのか、これらの疑問は、われわれが本研究を始めた数年前は RuBisCO 研究の大問題であり、また全く解答を見出せないブラックボックスでもあった⁽³⁾。

III. RuBisCO が機能する細胞部位の微環境

真核生物の場合、RuBisCO は葉緑体のストローマで

機能し、ストローマの全蛋白質の 50% をも占める。その濃度は 0.5 mM にも達する。RuBisCO は 8 個ずつの大小両サブユニットから構成される、分子量約 55 万の巨大蛋白質である⁽¹⁷⁾。各大サブユニットが触媒反応に関与している。よって、ストローマ中の活性部位、言い換えれば基質 RuBP-結合部位の濃度は 4 mM にも達する。RuBP の生体内濃度は緑葉の光合成速度に依存し、たとえば通常の空気中 (340 ppm CO₂) では光合成は CO₂ が律速となり、RuBP 濃度は 8~15 mM にもなる^(18~20)。500~700 ppm CO₂ を含む空気中では、RuBisCO の基質 RuBP-結合部位の濃度である約 4 mM に低下する。さらに CO₂ 濃度を上昇させても、これ以上の RuBP の濃度の低下は起こらないし、光合成速度のそれ以上の上昇も起こらない。RuBisCO が前述のように低い稼働率で光合成が飽和してしまう原因は不明である。逆に RuBisCO の反応生成物である 3-ホスホグリセリン酸は、CO₂ 濃度の上昇に伴って激増する。その他の光合成代謝中間物は CO₂ 濃度の変化に対して、大きな変動は示さない。ストローマの pH は光照射時で 8 付近、暗黒下では 7~7.2 である⁽²¹⁾。遊離の Mg²⁺ の濃度は、2~3 mM と報告されている⁽²²⁾。

IV. RuBisCO の *in vivo* 機能形態

In vitro での解析結果が *in vivo* でのものに限りなく近付くためには、まず第一に生体から精製した RuBisCO が *in vivo* での状態を保持していなくてはならない。これは、精製した酵素と可能な限り *in vivo* に近い酵素、光合成の場合は単離葉緑体から放出されて間のない酵素との比較によって検証できる⁽¹³⁾。図 2 に、硫酸塩析を精製の第一段階で行い、精製酵素の保存も硫酸 50% 飽和状態で -80°C で保存してある RuBisCO (Amm-RuBisCO) と、硫酸の代わりに polyethylene glycol-4000 (PEG) と Mg²⁺ を使って精製、保存したものの (PEG-RuBisCO) のカルボキシラーゼ反応の経時変化を示す。また、表 2 にそれぞれの RuBisCO と葉緑体から放出された直後の RuBisCO の反応の経時変化における linear phase と initial burst の活性比を示してある。Amm-RuBisCO の反応の経時変化は他の RuBisCO に比べ反応開始数分後に大きく折れ曲がる。一方、PEG-RuBisCO の場合は、leupeptin 存在下に内生アルカリプロテアーゼを阻害した条件下での葉緑体の RuBisCO の経時変化に酷似していた。Amm-RuBisCO はその調製

図2 精製法の異なるホウレンソウ RuBisCO と *Euglena* RuBisCO のカルボキシラーゼ反応の経時変化⁽¹³⁾

○, PEG-RuBisCO (ホウレンソウ);
●, Amm-RuBisCO (ホウレンソウ);
□, *Euglena* RuBisCO.

中に、おそらく硫酸によって一部変性を来しているものと思われる。この三種のその他の性質の比較からも、そのことを確認している⁽²³⁾。

以下は、より *in vivo* に近い PEG-RuBisCO を使って研究した。これまでの Amm-RuBisCO を使った研究では、RuBisCO は基質 RuBP に対し 10~50 μ M を示すために、ほとんどの場合 1 mM 以下の RuBP を使って解析されてきた。ところが上述のように、光合成中の葉緑体内の RuBP 濃度は 4~15 mM と大きく変化する。4 mM は RuBisCO の基質結合部位に結合すると仮定すると、遊離 RuBP の濃度は 0~11 mM の間で変化することになる。そこで、より *in vivo* の状態に近い PEG-RuBisCO を使い、RuBP 濃度を 0~10 mM にしたときのカルボキシラーゼ反応の経時変化を追った (図3)⁽²⁴⁾。これまで Amm-RuBisCO を使って数多く報告されてきたように、RuBisCO の反応は一見 0.5 mM RuBP で飽和したように見えるが、*in vivo* で RuBisCO が遭遇するであろうと考えられる 2 mM 以上では、RuBisCO の反応はとくに linear phase において大きな活性上昇を示した。図3の挿入図は initial burst と linear phase での比活性と反応系中の RuBP 濃度との関係を示している。RuBP 濃度が 1 mM から 2 mM に上昇することによ

図3 ホウレンソウ RuBisCO カルボキシラーゼ反応の種々の RuBP 濃度での経時変化⁽²⁴⁾

挿入図では ○ は initial burst の比活性を、● は linear phase での比活性を示す。

って、linear phase の比活性は急激に上昇した。このわずかの RuBP の濃度の上昇で比活性が sigmoidal に上昇する現象は、RuBisCO が initial burst と linear phase で異なった状態で触媒作用を示していると考えたと容易に理解できる。この考え方は、次の結果によってさらに支持される⁽²⁴⁾。4 mM RuBP 存在下に linear phase に到達した RuBisCO を 0.5 mM RuBP に急激に希釈すると、最初の 5 分間は RuBisCO は前反応の 4 mM での比活性を保ち、その後 0.5 mM RuBP での比活性に低下した。もし RuBisCO が 4 mM RuBP 存在下でただ単に高い活性を示したのであれば、RuBP 濃度を 0.5 mM に希釈と同時に活性は低下してよいはずである。また、RuBisCO を 0.25 mM RuBP 存在下に二相性の経時変化を経験させ、自らの触媒作用によって反応系中の RuBP を使い尽くさせた後新しく RuBP を加えると、RuBisCO は再度二相性を示して反応した⁽¹³⁾。このように、initial burst と linear phase での RuBisCO の状態は、RuBP の濃度に依存して完全に相互変換する。そしてどの状態の RuBisCO も基質 CO_2 に対し十分低い K_m 値を有していた。

このような結果から、RuBisCO は図4に示すよう

図 4 ホウレンソウ RuBisCO の *in vitro* 機能形態⁽²⁴⁾

略号は本文参照のこと。PGA, 3-ホスホグリセリン酸。

な種々の機能形態をとって反応していると考えられる⁽²⁴⁾。RuBisCO (E) は活性化 CO_2 (C) および Mg^{2+} (M) とともに RuBisCO の活性型複合体を作る。ECM に基質 RuBP と CO_2 が反応すると、反応開始直後は RuBisCO は ECMRs (Rs は基質結合部位に結合した RuBP) として反応し高い活性を示す。これが initial burst となる。反応系に 0.1~1.0 mM RuBP が存在すると、RuBisCO は徐々に ECMRs から RrECMRs (Rr は調節部位に結合した RuBP) に変化し、反応開始後数分後には完全に RrECMRs 型となる。この後は linear phase として時間に対し直線的に反応するようになる。ここでのたとえば 1 mM RuBP 存在下での比活性は initial burst での比活性の 50~60% である。一方、2~5 mM RuBP 存在下では RuBisCO は linear phase において RrⁿECMRs 型となり、その比活性は 2~5 mM RuBP での initial burst での比活性の約 80% となる。これらの反応形態は反応系の RuBP の濃度に依存し、可逆的である。このような RuBP 濃度に依存した RuBisCO の機能形態変化は、蛍光標識試薬を使った立体構造変化に関する研究によって、最近確認した⁽²⁵⁾。

さらにわれわれは、われわれの説を支持する結果を得ている^(26,27)。非常に興味深いことに、*Euglena gracilis* の RuBisCO はその一次構造、推定二次構造、さらに酵素化学的諸性質、とくに基質 RuBP-結合部位の RuBP 構造類似物への感受性が植物の RuBisCO のものに酷似しているにもかかわらず、二相性の反応は全く示さない(図 2)。

RuBisCO が光合成中にどのような機能形態を有しているのかという疑問は大変興味深い。前述したように、緑葉葉緑体の RuBP 濃度はもう一方の RuBisCO の基質である CO_2 の濃度に依存して、大きく変動する。空気のような低 CO_2 濃度下 (340 ppm) では緑葉光合成は最大速度の 70~80% となるが、このような条件下では葉緑体内の RuBP 濃度は 8~15 mM となる。一方、 CO_2

濃度が 500~700 ppm 以上で光合成が最大速度となった条件下では、RuBP 濃度は約 4 mM となる。RuBisCO の基質 RuBP-結合部位の葉緑体内の濃度は約 4 mM であり、RuBisCO の基質 RuBP に対する K_m は 10~50 μM なので、葉緑体内の RuBP のうち 4 mM に相当する部分は RuBisCO に結合していると考えられる。したがって、通常空気中で光合成している葉緑体中の遊離 RuBP 濃度は 4~11 mM となっているはずである。このような RuBP 濃度では、RuBisCO は RrⁿECMRs として機能していると考えられる(図 5)。一方、 CO_2 が光合成を飽和している条件下では ECMRs として機能しているはずである。これら 2 つの機能形態の遷移段階として RrECMRs が出現すると思われる。この作業仮説の立証に、瞬間凍結法 (freeze-clamper) を用いて緑葉中の RuBisCO の機能形態を調べた⁽²⁸⁾。ある条件下で光合成が定常状態に達した緑葉の一部を 0.5 秒以内に -196°C に冷却する。凍結葉片を液体窒素中で破碎し、液体窒素が気化した直後に葉片粉末の一部を 1 mM RuBP を含む RuBisCO の反応液に加え、その後の反応の経時変化から光合成中の RuBisCO の機能形態を類推

図 5 植物 RuBisCO の *in vivo* 機能形態

葉緑体において Mn²⁺-依存性 NADPH オキシダーゼによって生成した H₂O₂ によって酸化分解され、CO₂ とギ酸となる^(41,42)。 *Euglena* のミトコンドリア GGT は非常に活性が高く、グリオキシル酸への親和性が強く⁽⁴³⁾、ミトコンドリアで生じたグリオキシル酸のすべては直ちにグリシンとなることが予想される。事実、緑藻などのグリコール酸代謝研究において、活性の高い GGT がミトコンドリアに存在するという結果をもとに、ミトコンドリアでのグリコール酸からグリシンへの変換が想定されてきたが⁽⁴⁴⁾、これは全くの誤りである。GGT にはそのような役割はない^(45,46)。 *Euglena* のミトコンドリアに十分量のグルタミン酸存在下に 1-¹⁴C-グリコール酸を代謝させても ¹⁴C-グリシンはほとんど生成せず、大半はグリオキシル酸のままであった⁽⁴¹⁾。グリオキシル酸は TCA 回路に対し非常に強い阻害作用を持つことが知られており⁽⁴⁷⁾、 *Euglena* のエネルギー生産のためには、グリオキシル酸からミトコンドリアのマトリックスを隔離しておく必要がある。ミトコンドリア内膜の外側に結合したグリコール酸デヒドロゲナーゼによって生成したグリオキシル酸の一部は内膜を通過してマトリックスに入る可能性があるが、その部分は直ちに GGT によってグリシンに代謝されると考えられる。このような GGT の役割は、ミトコンドリアのような TCA 回路を持つオルガネラにグリコール酸酸化系を持った生物の宿命であると考えている^(44,45)。また、GGT がすべてのグリオキシル酸をグリシンに代謝しないことは、この生物のグリシン酸化能力が低いことに関係していると思われる⁽³⁸⁾。

一方、グリコール酸の代謝過程で生じたギ酸はグリシンとセリンの合成に供される⁽³⁸⁾。CO₂ は細胞からは放出されず、直ちに光合成によって再固定される⁽⁴⁸⁾。結果として、 *Euglena* は植物型の光呼吸は示さない。セリンはさらにグリセリン酸に代謝された後、3-ホスホグリセリン酸として光合成炭素代謝に組み込まれる。よって後述のアミノオキシ酢酸 (AOA) によってグリコール酸を強制的に細胞外へ排泄させると、 *Euglena* 細胞内の 3-ホスホグリセリン酸のレベルは低下し、ひいては貯蔵多糖の合成速度も大きく低下する⁽⁴⁹⁾。この研究は、グリコール酸代謝の代謝的役割を説明した最初のものである。また、余剰エネルギー消費系としてのグリコール酸代謝の役割についてもすでに報告した⁽⁵⁰⁻⁵²⁾。

光合成中のグリコール酸の生成速度は、グリコール酸代謝経路の阻害剤を使うことによって測定可能である。

アミノトランスフェラーゼの強力な阻害剤である AOA は GGT を強く阻害する⁽⁵³⁾。しかし、AOA の存在下で *Euglena* や緑藻を光合成させても、グリオキシル酸が細胞外に排泄されるわけではない⁽⁵⁴⁾。グリオキシル酸はグリコール酸デヒドロゲナーゼの強い阻害剤であり、その阻害はグリコール酸に対し拮抗的である⁽⁵³⁾。 *K_i* は 10 μM で、この酵素のグリコール酸に対する *K_m* の 1/10 以下である。よって AOA 存在下ではまず GGT が阻害され、細胞内に蓄積したグリオキシル酸が直ちにグリコール酸デヒドロゲナーゼを阻害する。その結果としてグリコール酸が細胞外に排泄されることとなる⁽⁵⁴⁾。このとき、グリオキシル酸の細胞内異常蓄積は起こらない⁽⁵⁵⁾。

AOA を使って測定した、 *Euglena* の通常の空気通気下でのグリコール酸生成速度は 6~8 μmol/mg Chl/hr である⁽⁵⁴⁾。同条件下での光合成 CO₂ 固定速度は 25 μmol/mg Chl/hr なので、 *Euglena* のグリコール酸代謝は光合成炭素代謝全体の大きな部分を占めている。一方、 *Euglena* を 3~5% CO₂ を含む空気中で光合成させたり、また CO₂ 濃縮機構を発現している緑藻においても、4~5 μmol/mg Chl/hr の速度でグリコール酸が合成される⁽⁵⁶⁾。RuBisCO の反応においては CO₂ と O₂ が互いに拮抗しあうので、高 CO₂ 濃度下や CO₂ 濃縮機構が作動中のグリコール酸の生成は一見奇異に見える。しかし、 *Chlamydomonas* の光合成 CO₂ 固定反応、CO₂ 濃縮機構、さらにグリコール酸代謝系の相互の関係についてのモデルを構築しシミュレーションしたところ、それは活発な光合成によって葉緑体内の O₂ 濃度が上昇するためであることが判明した⁽⁵⁶⁾。

おわりに

D.E. Koshland は彼のある代謝学の総説を次のような書出して始めている⁽⁵⁷⁾。

"Nature is not static. Not only the internal chemistry of organism is constantly changing but the external environment poses continual challenges to its adaptability."

われわれの科学の目標は、この生物の "change" と "adaptability" を定量的にとらえ諸過程を統合することである。生物の動態を知るための第一歩は、われわれの *in vitro* の科学がどれだけ *in vivo* に迫れるか、である。科学は、*in vivo* を *in vitro* で再現できなければならない

い。そして、“change”と“adaptability”の予測がその最終目標である。昨今、分子生物学の発展が著しく、高等生物の代謝の人為的改変も研究の射程に入りつつある。“change”と“adaptability”の定量的研究は、将来の分子生物学的研究にとっても最も重要なファクターの一つになってくるような気がする。

終わりにあたって、この15年間終始ご指導、ご鞭撻賜った大阪府立大学名誉教授 北岡正三郎先生に深謝いたします。また、共同研究者として本研究にご参加下さった諸姉諸兄、さらに国内外を問わず活発に議論にご参加くださった方々に心から感謝いたします。

- (1) 浅田浩二：“炭酸ガスと光合成”，北野 康，市川 勝，長 哲郎，井上 平，浅田浩二共著，「炭酸ガスの化学」，共立出版，1976，p.137.
- (2) A. Yokota and S. Kitaoka: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 1075 (1985).
- (3) T. J. Andrews and G. H. Lorimer: “Biochemistry of Plants,” ed. by M. D. Hatch and N. K. Boardman, Academic Press, New York, 1987, p. 131.
- (4) M. Calvin and J. A. Bassham: “The Photosynthesis of Carbon Compound,” Benjamin, New York, 1962.
- (5) S. G. Wildman and J. Bonner: *Arch. Biochem. Biophys.*, **14**, 381 (1947).
- (6) A. Weissbach, B. L. Horecker and J. Hurwitz: *J. Biol. Chem.*, **218**, 795 (1956).
- (7) N. Kawashima and S. G. Wildman: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 325 (1970).
- (8) B. B. Buchanan and P. Schürmann: *J. Biol. Chem.*, **248**, 4956 (1973).
- (9) J. T. Bahr and R. G. Jensen: *Plant Physiol.*, **53**, 39 (1974).
- (10) G. H. Lorimer, M. R. Badger and T. J. Andrews: *Biochemistry*, **15**, 529 (1976).
- (11) G. H. Lorimer, M. R. Badger and T. J. Andrews: *Anal. Biochem.*, **78**, 66 (1977).
- (12) R. G. Jensen and J. T. Bahr: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 379 (1977).
- (13) A. Yokota and S. Kitaoka: *Plant Cell Physiol.*, **30**, 183 (1989).
- (14) I. E. Woodrow and J. A. Berry: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **39**, 533 (1988).
- (15) A. Yokota and D. T. Canvin: *Plant Physiol.*, **77**, 735 (1985).
- (16) G. D. Farquhar and T. D. Sharkey: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 317 (1982).
- (17) T. Akazawa: “Encyclopedia of Plant Physiology,” Vol. 6, ed. by M. Gibbs and E. Latzko, Springer-Verlag, Berlin, 1979, p. 208.
- (18) M. R. Badger, T. D. Sharkey and S. von Caemmerer: *Planta*, **160**, 305 (1984).
- (19) S. von Caemmerer and D. L. Edmonds: *Aust. J. Plant Physiol.*, **13**, 669 (1986).
- (20) J. Kobza and J. R. Seemann: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3815 (1988).
- (21) H. W. Heldt, K. Werdan, M. Milovancev and G. Geller: *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 224 (1973).
- (22) A. R. Portis, Jr.: *Plant Physiol.*, **67**, 985 (1981).
- (23) A. Yokota: unpublished.
- (24) A. Yokota and S. Kitaoka: submitted.
- (25) A. Yokota: unpublished.
- (26) A. Yokota, A. Harada and S. Kitaoka: *J. Biochem.*, **105**, 400 (1989).
- (27) A. Yokota, A. Harada, H. Kobayashi and S. Kitaoka: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2045 (1989).
- (28) A. Yokota, T. Taira, H. Usuda and S. Kitaoka: Proceedings of the 8th International Congress on Photosynthesis, in press.
- (29) C. Paech, J. Pierce, S. D. McCurry and N. E. Tolbert: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1084 (1978).
- (30) S. P. Robinson and A. R. Portis, Jr.: *Plant Physiol.*, **90**, 968 (1989).
- (31) J. Pierce: “Photosynthesis,” ed. by W. R. Briggs, Alan R. Liss, New York, in press.
- (32) T. J. Andrews, G. H. Lorimer and N. E. Tolbert: *Biochemistry*, **12**, 11 (1973).
- (33) G. H. Lorimer, T. J. Andrews and N. E. Tolbert: *Biochemistry*, **12**, 18 (1973).
- (34) G. Bowes and W. L. Ogren: *J. Biol. Chem.*, **247**, 2171 (1972).
- (35) D. W. Husic, H. D. Husic and N. E. Tolbert: *CRC Cr. Rev. Plant Sci.*, **5**, 445 (1987).
- (36) W. L. Ogren: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 415 (1984).
- (37) 横田明穂，北岡正三郎：蛋白質 核酸 酵素，**27**，475 (1982).
- (38) A. Yokota, H. Komura and S. Kitaoka: *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 498 (1985).
- (39) A. Yokota, Y. Nakano and S. Kitaoka: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 115 (1978).
- (40) A. Yokota, Y. Nakano and S. Kitaoka: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 121 (1978).
- (41) A. Yokota, A. Kawabata and S. Kitaoka: *Plant Physiol.*, **71**, 772 (1983).
- (42) A. Yokota, S. Kitaoka, K. Miura and A. Wadano: *Planta*, **165**, 59 (1985).
- (43) A. Yokota, S. Suehiro and S. Kitaoka: *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 507 (1985).

- (44) H. Stabenau: "Compartments in Algal Cells and Their Interaction," ed. by W. Wiessner, D.G. Robinson and R.C. Starr, Springer-Verlag, Berlin, 1984, p.183.
- (45) S. Kitaoka, Y. Nakano, K. Miyatake and A. Yokota: "The Biology of *Euglena*," ed. by D.E. Buetow, Vol. 4, Academic Press, New York, 1989, p.1.
- (46) 横田明穂: "葉緑体と光合成", 北岡正三郎編著「ユーグレナ——生理と生化学」, 学会出版センター, 1989, p.70.
- (47) H. Inui, K. Miyatake, Y. Nakano and S. Kitaoka: *J. Biol. Chem.*, **262**, 9130 (1987).
- (48) A. Yokota, H. Komura and S. Kitaoka: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3309 (1985).
- (49) A. Yokota, K. Asama and S. Kitaoka: in preparation.
- (50) A. Yokota and S. Kitaoka: *Plant Physiol.*, **70**, 760 (1982).
- (51) A. Yokota and S. Kitaoka: *Biochem. J.*, **184**, 189 (1979).
- (52) A. Yokota, S. Haga and S. Kitaoka: *Biochem. J.*, **227**, 211 (1985).
- (53) A. Yokota and S. Kitaoka: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 665 (1987).
- (54) A. Yokota and S. Kitaoka: *Planta*, **170**, 181 (1987).
- (55) A. Yokota and S. Kitaoka: *Plant Sci.*, **46**, 97 (1986).
- (56) A. Yokota, K. Iwaki, K. Miura, A. Wadano and S. Kitaoka: *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1363 (1987).
- (57) D.E. Koshland, Jr.: *TIBS*, **12**, 225 (1987).
-