

# 葉緑体プロテアーゼによるオルガネラ恒常性と細胞内情報伝達の制御

西村 健司

関西学院大学理工学部生命科学科

〒669-1337 兵庫県三田市学園 2-1

## Chloroplast proteolysis - between organellar homeostasis and cellular signaling

Kenji Nishimura

Department of Bioscience, School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University,

2-1 Gakuen, Sanda, Hyogo 669-1337, Japan

Keywords: chloroplast, homeostasis, peptide, protease, signaling

DOI: 10.24480/bsj-review.12a7.00200

### 1. はじめに

葉緑体は光合成だけでなく、色素合成やアミノ酸合成、脂肪酸合成など様々な代謝反応が行われるオルガネラである。こうした反応を触媒・制御するのは、延べ 3000 種類にも上る葉緑体タンパク質であるが、これらが種々の環境変化によって不要になった場合や高次構造の形成・維持に異常が現れた場合は、速やかに分解・除去される必要がある。この機能を担うのが、これまでに 20 種類以上存在することが知られている葉緑体プロテアーゼである。特に AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) ファミリーに属する Clp, FtsH, Lon は、細菌から真核生物のオルガネラまで進化的に高度に保存され、ATP 依存的な基質の構造変化と共役したタンパク質分解活性を備えたプロセッシブプロテアーゼとして、葉緑体タンパク質の量的制御と品質管理において中心的な役割を果たすと考えられている。本稿では、これら葉緑体プロセッシブプロテアーゼの基本的な構成や特性について概説するとともに、オルガネラ恒常性における役割、そして近年注目されつつあるこれらプロテアーゼの細胞内シグナル伝達への関わりについて紹介したい。

### 2. 葉緑体プロセッシブプロテアーゼ概論

プロセッシブプロテアーゼの基本構造は、AAA+型シャペロンドメインとプロテアーゼドメインからなる(Gottesman, 1996; Gottesman and Maurizi, 1992) (図 1A)。シャペロンドメインにおいて認識された基質は、ATP 依存的に高次構造が解かれながら、プロテアーゼドメイン上部の小孔から内腔へと取り込まれる。プロテアーゼ内腔には、複数の触媒部位が存在しており、その空間位置に依存して基質配列内の複数箇所においてエンド型の切断反応が多発的に起こる(プロセッシブ分解)。その結果、多数のペプチド鎖へと断片化して分解される。生成されたペプチド断片は最終的にプロテアーゼチャンバーから外部に放出されるが、切断途中の基質タンパク質の放出は起きない。このようにプロセッシブプロテアーゼでは、触媒部位がプロテアーゼ内部に隔離されることで分解反応が区画化し、不必要なタンパク質分解が抑えられる。それと同時にシャペロンドメインで基質選別を行うことで選択的なタンパク質分解が

可能となっている。またプロセッシブ分解とは、プロテアーゼの内部に到達した基質配列から順次断片化が進行し、切断可能な箇所が全て切断されたのちペプチド断片の放出が行われることを指すことから (Thompson et al., 1994), シャペロン機能は必ずしもこれに結びついていないわけではない。実際、非常に短いペプチドの分解にはシャペロン機能は必要ない。また、ある程度のサイズのタンパク質の分解については ATP の加水分解エネルギーが必須となるが、比較的短いポリペプチド鎖に関しては、ATP の結合のみで分解できる。

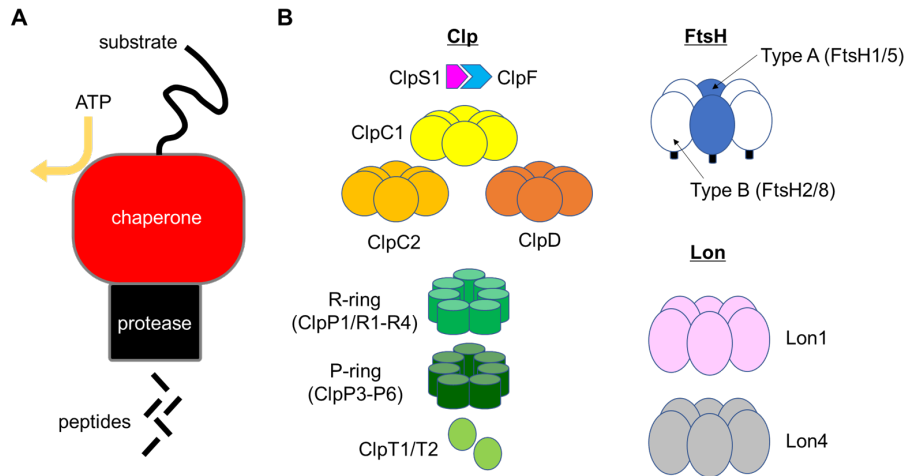


図 1. 葉緑体プロセッシブプロテアーゼ  
A. プロセッシブプロテアーゼの作用機構  
B. 代表的な3つの葉緑体プロセッシブプロテアーゼ複合体の構成

プロセッシブプロテアーゼの代表的なものとして、細菌と真核細胞のオルガネラに存在する Clp, FtsH, Lon, 及び古細菌や真核生物の細胞質などに存在するプロテアソームが挙げられる。葉緑体には細菌を起源とする3つのタイプのプロセッシブプロテアーゼ、すなわち Clp, FtsH, Lon が存在するが、その構成や特性は細菌がもつプロトタイプのプロセッシブプロテアーゼと比較して複雑・多様化している。

## 2-1. Clp

Clp は ATP 依存的なセリンプロテアーゼ活性を示す多量体構造として機能しており、シャペロンドメインとプロテアーゼコアドメインが独立の複合体として存在する点において FtsH や Lon とは異なる (図 1 B)。またバクテリア Clp のシャペロンとプロテアーゼコアが各々単一サブユニットからなるホモ複合体であるのに対し、シアノバクテリアや葉緑体ではいずれもヘテロ複合体を形成している (Nishimura and van Wijk, 2015)。さらに葉緑体の場合は、コア構造の形成・維持あるいは基質認識制御を担う固有のサブユニットを獲得している。

葉緑体 Clp シャペロンは、ClpC1/ClpC2/ClpD の3つのサブユニットで構成されており、それぞれがホモ 6 量体として存在することが示唆されている (Nishimura and van Wijk, 2015)。これら3つのシャペロンサブユニットのうち ClpC1 のみ機能欠損によって生育遅延を引き起こすことから、同サブユニットが主要な構成成分と考えられる。Clp シャペロンはそれ自身で基質の認識が可能である。しかしその制御には進化的に保存されている ClpS1 及びこれと相互作用する葉緑体特異的な ClpF の2つのアダプタータンパク質からなるバイナリーモジュールが関与しており、ClpS1/F 複合体が基質を直接認識し、相互依存的に基質タンパク質を Clp

シャペロンに供給することが示唆されている (Nishimura et al., 2013, 2015)。細菌の ClpS は単独で基質認識制御を行っているが、特にタンパク質の N 末端アミノ酸残基とそのタンパク質の安定性を関連付ける N-end rule 経路に関与することが知られている (Varshavsky, 2011)。N-end rule 経路において、タンパク質の不安定化を引き起こす N 末端アミノ酸残基を N-degron と呼ぶが、細菌の ClpS はこれを直接認識することができる。葉緑体においても類似した N-end rule 経路の存在が示唆されており (Bouchnak and van Wijk, 2019), 実際細菌 ClpS が認識する N-degron のいくつかは葉緑体 ClpS1 も認識することができる (Colombo et al., 2018; Montandon et al., 2019)。ClpS/F の欠損変異体はいずれも野生型と同等の生育であることから、両者およびこれらの関与が示唆される葉緑体 N-end rule 経路は植物の通常生育には必須ではないと考えられる (Nishimura et al., 2015)。

Clp プロテアーゼコアは、ClpP3/ClpP4/ClpP5/ClpP6 の 4 つのサブユニットが 1:2:3:1 の化学量論比で配位した P リングと、ClpP1/ClpR1/ClpR2/ClpR3/ClpR4 が 3:1:1:1:1 の比率で構成される R リングからなるヘテロ 14 量体を形成する (Olinares et al., 2011)。このうち ClpP1 は Clp で唯一葉緑体ゲノムにコードされるサブユニットである (Shikanai et al., 2001)。各 ClpP/R サブユニットの欠損変異体の表現型は、生育の遅延や停止、胚性致死など異なるが、サブユニットの存在比と相関する (Nishimura and van Wijk, 2015)。ここで、ClpP サブユニットの配列上には、セリン-ヒスチジン-アスパラギン酸の 3 アミノ酸残基からなる活性部位があるのに対し、ClpR サブユニットはこの部位が欠失しているため触媒能がない。したがって、葉緑体 Clp のプロテアーゼコア内には都合 10 箇所の活性部位が存在している。2 つの非対称な P/R リングの会合及び安定化には、植物特異的な 2 つのアクセサリタンパク質である ClpT1/T2 が関わる (Clarke, 2012; Kim et al., 2015; Sjögren and Clarke, 2011)。すなわち、単量体 ClpT1 が P リングに結合して複合体を形成し、これが単量体 ClpT2 と結合することで R リングと結合でき、安定化すると考えられている。一方 Clp シャペロンは P リングではなく R リングに結合すると考えられる。シャペロンとプロテアーゼコアがどのように連結しているかは明らかではないが、ClpT サブユニットはシャペロンサブユニットとも結合できることが知られている (Colombo et al., 2014)。

## 2-2. FtsH

FtsH は ATP 依存性の亜鉛 (Zn) 配位型メタロプロテアーゼ複合体として機能し、N 末端側に膜貫通ドメインがあるのが特徴である。また細菌の FtsH が単一サブユニットで構成されているのに対して、植物では遺伝子重複により 12 種類のホモログが存在し、このうち FtsH1/2/5/6/7/8/9/11/12 の 9 種類が葉緑体、残り 3 種類がミトコンドリアにそれぞれ局在する (Sakamoto et al., 2003)。葉緑体 FtsH のうち、FtsH1/2/5/8 はチラコイド膜、FtsH7/9/11/12 は包膜に存在することが確認されているが、FtsH6 については不明である (Nishimura et al., 2017)。

チラコイド FtsH を構成する 4 つの FtsH サブユニットはその機能的互換性からタイプ A (FtsH1/5) とタイプ B (FtsH2/8) に分類され (Yu et al., 2004, 2005; Zaltsman et al., 2005), それぞれ 2:4 の化学量論比でヘテロ 6 量体を形成する (Moldavski et al., 2012) (図 1 B)。これら FtsH サブユニットの N 末端側にはチラコイド膜にアンカーするための一回膜貫通ドメインが存在し、6 量体形成時にはタンデムに並んだシャペロンドメインとプロテアーゼドメインはスト

ロマ側に配向している (Nishimura et al., 2017)。FtsH5 と FtsH2 の機能欠損変異体は、いずれも斑入り表現型を示すことからそれぞれ *yellow variegated1/2 (var1/var2)* と呼ばれる (Kato and Sakamoto, 2018)。一方 FtsH1 と FtsH8 の場合は野生株と同等の表現型を示すが、これはサブユニットの存在量を反映しているとされる。遺伝学的解析から、*var1* または *var2* 変異体の斑入り表現型を抑圧する変異体が多数単離された (Putarjuna et al., 2013)。その多くは葉緑体 Clp サブユニットあるいは葉緑体コードの ClpP1 の発現に影響を与えうる変異体であったことから、Clp-FtsH の機能的関連性が示唆される。FtsH の安定性は、細菌から真核生物まで高度に保存される GTPase ファミリータンパク質の 1 つである EngA が制御している (Kato et al., 2018)。EngA は FtsH5/2 のシャペロンドメインを介して直接相互作用する。また EngA の遺伝子欠損株は胚性致死であるのに対して、過剰発現体は FtsH 欠損変異体と同様に斑入り表現型を示し、かつ FtsH サブユニットの過剰蓄積と高分子量 FtsH 複合体の安定化が引き起こされる。EngA を介した機能不全 FtsH 複合体の分解制御モデルが提唱されている。また FtsH5/2 サブユニットは複数のサイトでリン酸化制御を受けることが知られており、FtsH 複合体の形成や安定化に関わることが示唆されている (Kato and Sakamoto, 2019)。

包膜 FtsH11 は他の包膜 FtsH とは複合体を形成しないことからホモ複合体として存在することが示唆されている (Adam et al., 2019)。またストロマの CPN20 シャペロンと相互作用することから、内包膜上でストロマ側に配向すると考えられる。FtsH7 と FtsH9 は高い相同性を示すことから、同一のヘテロ複合体を形成すると予測されているが (Wagner et al., 2012)、詳細は不明である。興味深いことに、FtsH12 は内包膜において、典型的な FtsH の活性部位が欠失した FtsHi1/2/4/5 タンパク質及びこれらと共通の進化的起源をもつ Ycf2 タンパク質、そして NAD 型リンゴ酸脱水素酵素からなる 2-MD のヘテロ複合体を形成し、内包膜の 1-MD 輸送装置である TIC 複合体と相互作用することで ATP 依存的な膜輸送モーターとして機能することが明らかとなった (Kikuchi et al., 2018)。FtsH12 の Zn 配位モチーフに点変異を導入することでメタロプロテアーゼ活性を消失させても膜輸送効率には影響しないことから、当該サブユニットが輸送基質の牽引に寄与していることが示唆される。他方もう一つの FtsHi ファミリータンパク質である FtsHi3 は、Ycf2/FtsHi 複合体や TIC 複合体とは独立して、内包膜上で 1-MD の高分子複合体を形成して輸送基質と相互作用することから、膜輸送モーターとして機能すると考えられている。

### 2-3. Lon

Lon は ATP 依存性のセリンプロテアーゼ複合体である (Pinti et al., 2016)。細菌から真核生物オルガネラいずれにおいてもホモ多量体として存在し、6 量体構造をとる (図 1 B)。一般に Lon タンパク質は 2 つのタイプに分類され、細菌及び真核生物のミトコンドリアと葉緑体をもつ LonA はシャペロンドメイン上流の N 末端に基質結合領域があるのに対し、古細菌の LonB はシャペロンドメイン内部に膜貫通領域があるのが特徴である (Rotanova et al., 2004)。

葉緑体には 2 種類の Lon (Lon1/4) が存在する (Rigas et al., 2014)。シアノバクテリアには全長 Lon プロテアーゼに相当する遺伝子はなく、代わりに LonA の N 末端ドメイン配列だけからなるタンパク質がコードされている。この Lon の N 末端ドメインのみからなるタンパク質はシロイヌナズナゲノム上にも 4 種類存在し、そのうち少なくとも 3 種類は葉緑体局在であ

る (van Wijk, 2015)。Lon1/4 については、いずれもミトコンドリアに共局在することから、太古の  $\alpha$  プロテオバクテリアの Lon に由来すると考えられる。Lon1/4 の葉緑体内での正確な存在箇所は明らかではない。また葉緑体の Lon1 の機能欠損が生育遅延を引き起こすことは知られているが、Lon4 欠損の生理的影響については分かっていない (Daras et al., 2014)。

### 3. オルガネラの恒常性における役割

これまでの遺伝学的・生化学的解析などから、葉緑体プロテアーゼによるタンパク質の生合成、あるいは量的制御や品質管理に関する様々な分子メカニズムが報告されている (図 2)。これらは複数のプロテアーゼにより段階的または協調的に行われるものや、環境因子や補助因子などを介したものなど多岐にわたり、オルガネラの機能維持に不可欠である。本項ではその事例をいくつか紹介する。

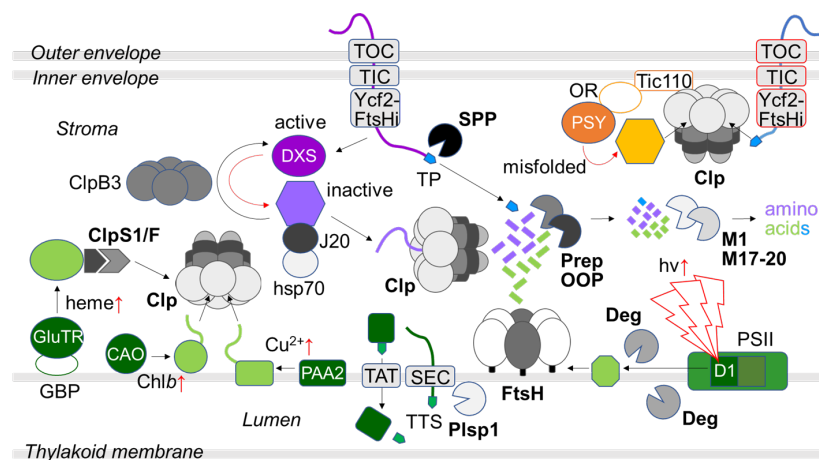


図 2. 葉緑体プロテアーゼによるオルガネラ恒常性の制御メカニズム  
プロセッシングプロテアーゼである SPP/Plsp1 は前駆体タンパク質の成熟化を担う。一方、プロセッシングプロテアーゼの Clp/FtsH は代謝環境や栄養状態の変動によるタンパク質の量的制御やストレスなどによる異常タンパク質の品質管理を行う。これらプロテアーゼの分解反応の結果生じるペプチドは、オリゴペプチダーゼ OOP/PreP とアミノペプチダーゼ M1/M17-20 の協調的な働きにより、アミノ酸にまで分解する。

葉緑体内に存在する数千種類のタンパク質の大部分は核ゲノムにコードされ、細胞質で N 末端側に葉緑体移行シグナル (TP) をもつ前駆体として合成された後、葉緑体外包膜の TOC 複合体により認識され、内包膜の TIC-Ycf2/FtsHi を介してストロマに輸送される (Thomson et al., 2020)。ストロマの Zn 結合エンド型ペプチダーゼである SPP は、こうした前駆体タンパク質を認識して TP を切断 (プロセッシング) する (Teixeira and Glaser, 2013)。TP を切り離されたタンパク質はここで解離するが、TP はその後も SPP 内に留まって C 末端側をトリミングされた後ストロマに放出される (Richter and Lamppa, 1999, 2002)。SPP 発現抑制株は生育遅延と発達異常を引き起こし、欠損変異体は胚性致死を示す (Trösch and Jarvis, 2011; Zhong et al., 2003)。SPP 過剰発現体は野生株と同等の生育であるが、興味深いことに核コードの光化学系 II (PSII) アンテナ複合体 (LHCII) サブユニットの遺伝子発現が 10 倍以上上昇し、逆に発現抑制株では低下する (Yue et al., 2010)。一方チラコイド膜内腔 (ルーメン) 局在タンパク質では、TP の下流に輸送シグナル (TTS) が存在し、TAT 依存経路によって高次構造を保持した状態、または SEC 依存経路によって折りたたみが解かれた状態でルーメン内に移行する

(Jarvis and Lopez-Juez, 2013)。この TTS はチラコイド膜局在のセリンプロテアーゼである Plsp1 によってプロセッシングされる (Midorikawa et al., 2014; Shipman and Inoue, 2009)。Plsp1 は酸化還元制御を受けており、ルーメン側の 2 つのシステイン残基間のジスルフィド結合により活性化する (Midorikawa et al., 2014)。Plsp1 欠損株では SEC 依存的に輸送される光化学系複合体サブユニットのプラストシアニンや PsbO がプロセッシング途中の状態ではチラコイド膜内に留まって蓄積してしまう (Frielingsdorf and Klösgen, 2007; Midorikawa and Inoue, 2013; Shackleton and Robinson, 1991)。一方 TAT 基質である PsbP の場合は、TTS 切断サイトを消失させると、恐らく TAT 透過装置内に留まった状態で、チラコイド膜で検出されるが、Plsp1 を欠損するとプロセッシング中間体がモノマー状態でストロマに蓄積する (Frielingsdorf and Klösgen, 2007; Midorikawa and Inoue, 2013; Shipman-Roston et al., 2010)。

代謝産物や無機栄養の合成や恒常性に関わる酵素は、葉緑体内の代謝・栄養環境の変化によってタンパク質分解を介した量的制御を受ける。クロロフィル b (Chlb) を合成するクロロフィリド a オキシゲナーゼ (CAO) は、生成物である Chlb 量の上昇に応答して Clp によって分解制御される (Nakagawara et al., 2007; Yamasato et al., 2005)。CAO の N 末端領域には短鎖長の分解シグナルが存在しており、恐らくこれが Chlb のない状態では CAO 構造の内部に位置しているが、Chlb の蓄積に伴って CAO が構造変化することで外部に露出するため ClpC シャペロンにより認識されて分解されると考えられている (Sakuraba et al., 2007, 2009)。また同じテトラピロール合成経路のグルタミル tRNA 還元酵素 (GluTR) は、ヘム蓄積量が上昇すると ClpS1/F 依存的に分解される (Richter et al., 2019)。通常 GluTR は N 末端領域と GluTR 結合タンパク質 (GBP) との相互作用を介してチラコイド膜上に係留している (Czarnecki et al., 2011)。しかし GBP はヘム結合タンパク質でもあり、ヘム存在下では GBP-GluTR 複合体の形成が阻害される (Richter et al., 2019)。したがってヘム蓄積量の上昇により、N 末端領域から GBP が解離し、同領域がストロマに露出する。この領域は ClpS1 によっても認識されることから、GBP から遊離した GluTR は Clp により分解される。さらに、チラコイド膜局在の銅トランスポーター PAA2 は、ルーメンのプラストシアニンに銅イオンを供給するが、葉緑体内の銅イオン濃度が過剰になると Clp によって分解制御される (Tapken et al., 2015)。この銅濃度依存的な PAA2 の分解に ClpS1 は必要ないことから、ClpC シャペロンが直接認識すると考えられる。詳細な基質認識機構は不明であるが、PAA2 の N 末端側には金属結合モチーフがあるため、これが銅濃度の上昇により構造変化を引き起こし、CAO の場合と同様に Clp による認識を促すと考えられている。

光合成など葉緑体の代謝系を正常に維持するためには、葉緑体タンパク質の大部分を占める核コードタンパク質の輸送や各種代謝酵素群自体の品質管理が重要となる。Clp の大部分はストロマに存在するが、一部は Tic110 と呼ばれる足場タンパク質を介して内包膜に局在している (Flores-Pérez et al., 2016; Sjögren et al., 2014)。前駆体タンパク質が膜輸送中に輸送チャネル内で凝集や停滞した際、あるいは TIC 複合体から解離後のプロセッシングや高次構造形成に不具合が生じた際に分解排除することで、膜輸送の円滑化と品質管理に寄与することが示唆されている (Flores-Pérez et al., 2016)。カロテノイド生合成経路のフィトエン合成酵素 (PHY) は、Tic110 を介して葉緑体内包膜に係留する DnaJ 様シャペロンの ORANGE (OR) タ

ンパク質と結合することで、その高次構造と酵素活性が維持されているが (Welsch et al., 2018; Yuan et al., 2020), 高次構造の形成異常を引き起こした PHY は ClpS1/F や ClpC/D を介して分解制御を受ける (Welsch et al., 2018)。イソプレノイド合成系のメチルエリスリトール 4-リン酸 (MEP) 経路の主要な律速酵素であるデオキシキシロース 5-リン酸合成酵素 (DXS) の品質管理は, J20 アダプタータンパク質と Hsp70 シャペロンを介して ClpB3 依存のリフォールディング活性または Clp 依存の分解活性により制御されている (Pulido et al., 2016)。高次構造の形成異常あるいは凝集により不活性化した DXS は, Hsp40/DnaJ タンパク質である J20 により認識されて Hsp70 シャペロンに引き渡される。これにより不活性化 DXS は, Hsp70 及び ClpB3 による協調的なリフォールディング反応を通じた再活性化, あるいは Hsp70 から ClpC1 への基質輸送を伴う分解制御を受ける。この不活性化 DXS の運命決定は, ClpB3 と ClpC1 の相対的な量により決まると考えられている。Hsp70 から ClpC1 への基質輸送は直接または他の制御因子の介在が推察されている。Hsp70 と Clp はいずれも酸化ストレス障害を受けたタンパク質の品質管理に関与することも示唆されている (Pulido et al., 2017)。過剰な光照射により活性酸素種が発生すると光合成装置が光障害を被るが, その主要なターゲットは PSII の反応中心 D1 タンパク質である (Kato and Sakamoto, 2018)。光障害を受けた PSII 複合体はグラナからストロマチラコイドに移動し, ここで部分的に解離することで D1 タンパク質が外部に露出する。その際に D1 はチラコイドルーメンとストロマにそれぞれ複数存在するセリンタイプのエンドペプチダーゼである DEG によって部分切断されて断片化し, その後 FtsH によりペプチドへとさらに分解されて除去される。その後葉緑体内で新規合成された D1 が PSII に挿入され, 再会合してグラナに移動する。この光障害を受けた PSII の修復には可逆的なリン酸化修飾が関与しており, リン酸化の標的として PSII コアタンパク質の D1/D2 や CP43, PsbH が, またリン酸化酵素と脱リン酸化酵素として STN8 と PBCP がそれぞれ知られている (Kato and Sakamoto, 2014; Puthiyaveetil and Kirchhoff, 2013; Samol et al., 2012)。STN8 は DEG 依存的な D1 断片化を抑制し, PBCP は D1 分解を促進するが, 詳細なメカニズムは不明である。

上述した SPP により輸送前駆体から切断された TP や Clp/FtsH により分解されたタンパク質由来ペプチドは, ストロマ局在の Zn 結合型エンドペプチダーゼファミリーに属する 3 つのオリゴペプチダーゼ PreP1/2 と OOP がさらに断片化する (Kmiec et al., 2014)。TP のサイズは概ね 26~146 aa であり (Zybailov et al., 2008), 一般的な Clp と FtsH の分解産物はそれぞれ 5~12 aa と 10~20 aa の短鎖ペプチドである (Choi and Licht, 2005; Ito and Akiyama, 2005) のに対して, PreP1/2 と OOP はそれぞれ 10~65 aa 及び 8~23 aa のペプチド断片を分解するため (Kmiec et al., 2014; Moberg et al., 2003; Ståhl et al., 2005), これらペプチドを分解できる。一方 PreP/OOP 依存的に分解されたペプチドは, 3~4 aa 程度となるもののアミノ酸への分解には至らない。PreP/OOP の下流では, 2 つの金属結合性アミノペプチダーゼである M1 と M17-20 が TP などに由来する数アミノ酸程度のペプチドをさらに分解して遊離アミノ酸を生成すると考えられている (Teixeira et al., 2017)。

#### 4. 細胞内シグナル伝達との関係

葉緑体タンパク質分解と共役した細胞内情報伝達経路の例が最近いくつか報告されている。

これらはシグナル伝達関連因子の分解制御や分解装置自体の損傷により誘導されるストレス応答機構、そして分解産物の蓄積が誘導する新たな細胞応答機構など幅広い。

葉緑体から核へのシグナル (レトログレードシグナル) の伝達機構において中心的役割を果たすストロマ局在シグナル統合因子として知られる GENOME UNCOUPLED1 (GUN1) は Clp による分解制御を受ける (Wu et al., 2018)。GUN1 はストロマに局在するペンタトリコペプチドリピート (PPR) タンパク質の一種である。GUN1 は通常生育環境下では Clp 依存的な分解により極めて低い蓄積量に抑えられているが、レトログレードシグナルが駆動されるストレス環境下では分解速度が低下し、ストレス応答が引き起こされる。特にレトログレードシグナルを駆動する薬剤であるリンコマイシン (LIN) などにより葉緑体の翻訳を阻害した場合は GUN1 の顕著な蓄積量の上昇が見られるが、このとき葉緑体コードの ClpP1 サブユニットの発現量の低下も観察されている。Clp がどのように GUN1 を認識しているかは明らかではないが、GUN1 の安定性には PPR モチーフが関与することが示唆されている。また GUN1 はヘム結合タンパク質であることも示されている (Shimizu et al., 2019)。一方、活性酸素種 (ROS) の一種である一重項酸素 ( $O_2$ ) が引き起こすレトログレードシグナル伝達経路では、チラコイド膜局在の FtsH とグラナ周縁部に局在する  $O_2$  センサーである EXECUTER1 (EX1) が協調して機能する (Dogra et al., 2017; Wang et al., 2016)。すなわちグラナ周縁部の  $O_2$  が増大すると EX1 の特徴的なトリプトファン残基が酸化修飾されることで FtsH による EX1 分解が引き起こされ、結果として核コードのストレス応答遺伝子の発現が誘導される (Dogra et al., 2017, 2019a)。

真核生物オルガネラ内のタンパク質恒常性に異常があると、オルガネラ局在のシャペロンやプロテアーゼ等をコードする核遺伝子の発現が誘導される。この現象は小胞体ストレス応答 (unfolded protein response) と呼ばれ、酵母や動物の小胞体 (UPR) やミトコンドリア (UPRmt) で見られる (Haynes et al., 2013; Walter and Ron, 2011)。緑藻や植物の葉緑体においても、RNAi や LIN を利用した Clp の発現低下により核コードの ClpB3 をはじめとするシャペロン群等の発現上昇及び葉緑体タンパク質の恒常性の回復などが観察され、葉緑体の UPR の存在が示唆されている (cpUPR) (Llamas et al., 2017; Ramundo et al., 2014)。この cpUPR の誘導は GUN1 非依存的なシグナル伝達経路であり、転写因子である HsfA2 が関与すると考えられている (Llamas et al., 2017)。一方、チラコイド FtsH の欠失により PSII などの葉緑体タンパク質の恒常性に異常が生じた場合は、シャペロンやプロテアーゼ、ROS 消去系酵素などのタンパク質品質管理関連因子の蓄積が上昇することが観察されている (Dogra et al., 2019b)。これら因子の蓄積上昇は転写レベルで制御されており、この現象は上述の UPR と類似していることから UPR 様応答、あるいは酸化修飾を受けた損傷タンパク質が蓄積していることから損傷タンパク質応答 (damaged protein response, DPR) と呼ばれる。また欠失とは異なるチラコイド FtsH の機能損傷、すなわちシャペロンドメインの変異によって基質のアフォールド活性のみを損なった異常な FtsH が存在する場合は、完全欠失したときにも見られた PSII タンパク質の恒常性障害だけでなく、サリチル酸 (SA) 応答性遺伝子の発現上昇を伴う特徴的なストレス応答を示す (Duan et al., 2019)。このストレス応答には、葉緑体で合成される SA による核遺伝子の発現制御、すなわちレトログレードシグナルとしての役割が示唆されている。他



方 SA 合成を担うイソコリスミ酸経路酵素群と FtsH 機能との関係についても興味もたれる (Dogra and Kim, 2019)。

オリゴペプチダーゼ PreP/OOP を欠損した 3 重変異体では TP 由来ペプチド及びその下流の機能性領域に由来する分解産物の蓄積が確認されている (Kmiec et al., 2018)。分解産物の蓄積が検出されたタンパク質は, Rubisco の大サブユニットや Rubisco アクチベース, LHCII, D1, CP47, プラストシアニンなど存在量が比較的多いものであった。興味深いことに, この 3 重変異体は病原菌に感染していないにも関わらず, 病害ストレス応答関連遺伝子の発現上昇が観察されている。このことから, 蓄積したペプチドが病原性エフェクターとして細胞内の防御応答シグナル伝達経路を活性化していることが示唆されるが, 葉緑体タンパク質由来ペプチドがどこで蓄積し, どのように感知・伝達されているかは明らかではない。一方ヒメツリガネゴケにおいて生体内ペプチドの網羅的解析が行われており, 葉緑体タンパク質由来ペプチドが細胞内だけでなく細胞外においても多数検出されている (Fesenko et al., 2015; Mamaeva et al., 2020)。

## 5. おわりに

葉緑体プロセッシングプロテアーゼは, 細菌由来の分子装置から派生しているものの, 共生進化の過程で多様化・高度化することで独自の分解システムを構築し, 葉緑体タンパク質分解において中心的な役割を果たすようになった。実際, 植物の代謝環境や栄養状態等の変化に応じたオルガネラの恒常性維持機構やストレス下における細胞内情報伝達系での機能は多岐にわたり, かつ複数の介助因子等を巻き込んだ複雑な分解制御系を形成している。そのためプロテアーゼ機能の障害は代謝環境やシグナル伝達系に甚大な影響を引き起こす。そのようなことから, 葉緑体プロテアーゼはオルガネラ恒常性と細胞内シグナル伝達のあいだ, あるいはその境界において両者を統合制御する存在と言えるのではないだろうか。一方, オリゴペプチダーゼ変異体の解析等により分解産物ペプチドが新たな役割を果たす可能性も出てきた。これはプロテアーゼが, 単に役目を終えたタンパク質を除去しているのではなく, 不要タンパク質を短鎖ペプチドという新たな機能分子種に再生していることを意味しているのかもしれない。ヒト小胞体膜上には TAP (transporter associated with antigen processing) と呼ばれるペプチドトランスポーターが存在し, ウィルス感染等に由来する病原体タンパク質の分解産物ペプチドを細胞質から小胞体内に取り込む (Parcej and Tampé, 2010)。これにより小胞体ルーメン内の MHC (major histocompatibility complex) クラス I 分子がペプチドと結合し, ゴルジ体を経て感染細胞表層に移行すると, 当該ペプチドを異物として抗原提示して免疫応答が引き起こされる。また線虫ミトコンドリアの UPR<sub>mt</sub> では, Clp 依存的に分解されたマトリックスタンパク質の断片が HAF-1 と呼ばれる包膜局在のペプチドエクスポーターによって放出される (Haynes and Ron, 2010)。興味深いことに, シロイヌナズナゲノム上にはヒト TAP や線虫 HAF-1 のホモログをコードする遺伝子が 2 つ存在し, その 1 つはプロテオーム解析により葉緑体包膜において検出されている (Huang et al., 2013)。この TAP ホモログの解析を通じて, 葉緑体タンパク質分解に由来するペプチド断片がその後辿る運命や果たす役割, あるいはオルガネラ恒常性と細胞内シグナル伝達との関係についての理解に繋がるかもしれない。

## 謝辞

本研究は JSPS 科研費 (課題番号 19K23734) の助成を受けて行われた。

## 引用文献

- Adam, Z., Aviv-Sharon, E., Keren-Paz, A., Naveh, L., Rozenberg, M., Savidor, A., and Chen, J. (2019). The Chloroplast Envelope Protease FTSH11 – Interaction With CPN60 and Identification of Potential Substrates. *Front. Plant Sci.* *10*, 428.
- Bouchnak, I., and van Wijk, K.J. (2019). N-Degron Pathways in Plastids. *Trends Plant Sci.* *24*, 917–926.
- Choi, K.H., and Licht, S. (2005). Control of peptide product sizes by the energy-dependent protease ClpAP. *Biochemistry* *44*, 13921–13931.
- Clarke, A.K. (2012). The chloroplast ATP-dependent Clp protease in vascular plants - new dimensions and future challenges. *Physiol. Plant.* *145*, 235–244.
- Colombo, C. V., Ceccarelli, E.A., and Rosano, G.L. (2014). Characterization of the accessory protein ClpT1 from *Arabidopsis thaliana*: oligomerization status and interaction with Hsp100 chaperones. *BMC Plant Biol.* *14*, 228.
- Colombo, C. V., Rosano, G.L., Mogk, A., and Ceccarelli, E.A. (2018). A Gatekeeper Residue of ClpS1 from *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts Determines its Affinity Towards Substrates of the Bacterial N-End Rule. *Plant Cell Physiol.* *59*, 624–636.
- Czarnecki, O., Hedtke, B., Melzer, M., Rothbart, M., Richter, A., Schröter, Y., Pfannschmidt, T., and Grimm, B. (2011). An *Arabidopsis* GluTR Binding Protein Mediates Spatial Separation of 5-Aminolevulinic Acid Synthesis in Chloroplasts. *Plant Cell* *23*, 4476–4491.
- Daras, G., Rigas, S., Tsitsekian, D., Zur, H., Tuller, T., and Hatzopoulos, P. (2014). Alternative Transcription Initiation and the AUG Context Configuration Control Dual-Organellar Targeting and Functional Competence of *Arabidopsis* Lon1 Protease. *Mol. Plant* *7*, 989–1005.
- Dogra, V., and Kim, C. (2019). Chloroplast protein homeostasis is coupled with retrograde signaling. *Plant Signal. Behav.* *14*, 1656037.
- Dogra, V., Duan, J., Lee, K.P., Lv, S., Liu, R., and Kim, C. (2017). FtsH2-Dependent Proteolysis of EXECUTER1 Is Essential in Mediating Singlet Oxygen-Triggered Retrograde Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* *8*, 1145.
- Dogra, V., Li, M., Singh, S., Li, M., and Kim, C. (2019a). Oxidative post-translational modification of EXECUTER1 is required for singlet oxygen sensing in plastids. *Nat. Commun.* *10*, 2834.
- Dogra, V., Duan, J., Lee, K.P., and Kim, C. (2019b). Impaired PSII proteostasis triggers a UPR-like response in the var2 mutant of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *70*, 3075–3088.
- Duan, J., Lee, K.P., Dogra, V., Zhang, S., Liu, K., Caceres-Moreno, C., Lv, S., Xing, W., Kato, Y., Sakamoto, W., et al. (2019). Impaired PSII Proteostasis Promotes Retrograde Signaling via Salicylic Acid. *Plant Physiol.* *180*, 2182–2197.
- Fesenko, I.A., Arapidi, G.P., Skripnikov, A., Alexeev, D.G., Kostyukova, E.S., Manolov, A.I., Altukhov, I.A., Khazigaleeva, R.A., Seredina, A. V., Kovalchuk, S.I., et al. (2015). Specific pools

- of endogenous peptides are present in gametophore, protonema, and protoplast cells of the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* *15*, 87.
- Flores-Pérez, Ú., Bédard, J., Tanabe, N., Lympieropoulos, P., Clarke, A.K., and Jarvis, P. (2016). Functional Analysis of the Hsp93/ClpC Chaperone at the Chloroplast Envelope. *Plant Physiol.* *170*, 147–162.
- Frielingsdorf, S., and Klösgen, R.B. (2007). Prerequisites for Terminal Processing of Thylakoidal Tat Substrates. *J. Biol. Chem.* *282*, 24455–24462.
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* *30*, 465–506.
- Gottesman, S., and Maurizi, M.R. (1992). Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* *56*, 592–621.
- Haynes, C.M., and Ron, D. (2010). The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J. Cell Sci.* *123*, 3849–3855.
- Haynes, C.M., Fiorese, C.J., and Lin, Y.-F. (2013). Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond. *Trends Cell Biol.* *23*, 311–318.
- Huang, M., Friso, G., Nishimura, K., Qu, X., Olinares, P.D.B., Majeran, W., Sun, Q., and Van Wijk, K.J. (2013). Construction of plastid reference proteomes for maize and arabidopsis and evaluation of their orthologous relationships; The concept of orthoproteomics. *J. Proteome Res.* *12*, 491–504.
- Ito, K., and Akiyama, Y. (2005). Cellular Functions, Mechanism of Action, and Regulation of FtsH Protease. *Annu. Rev. Microbiol.* *59*, 211–231.
- Jarvis, P., and López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 787–802.
- Kato, Y., and Sakamoto, W. (2014). Phosphorylation of photosystem II core proteins prevents undesirable cleavage of D1 and contributes to the fine-tuned repair of photosystem II. *Plant J.* *79*, 312–321.
- Kato, Y., and Sakamoto, W. (2018). FtsH Protease in the Thylakoid Membrane: Physiological Functions and the Regulation of Protease Activity. *Front. Plant Sci.* *9*, 855.
- Kato, Y., and Sakamoto, W. (2019). Phosphorylation of the Chloroplastic Metalloprotease FtsH in Arabidopsis Characterized by Phos-Tag SDS-PAGE. *Front. Plant Sci.* *10*, 1080.
- Kato, Y., Hyodo, K., and Sakamoto, W. (2018). The Photosystem II Repair Cycle Requires FtsH Turnover through the EngA GTPase. *Plant Physiol.* *178*, 596–611.
- Kikuchi, S., Asakura, Y., Imai, M., Nakahira, Y., Kotani, Y., Hashiguchi, Y., Nakai, Y., Takafuji, K., Bédard, J., Hirabayashi-Ishioka, Y., et al. (2018). A Ycf2-FtsHi Heteromeric AAA-ATPase Complex Is Required for Chloroplast Protein Import. *Plant Cell* *30*, 2677–2703.
- Kim, J., Kimber, M.S., Nishimura, K., Friso, G., Schultz, L., Ponnala, L., and van Wijk, K.J. (2015). Structures, Functions, and Interactions of ClpT1 and ClpT2 in the Clp Protease System of Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Cell* *27*, 1477–1496.
- Kmiec, B., Teixeira, P.F., and Glaser, E. (2014). Shredding the signal: Targeting peptide degradation in mitochondria and chloroplasts. *Trends Plant Sci.* *19*, 771–778.

- Kmiec, B., Branca, R.M.M., Berkowitz, O., Li, L., Wang, Y., Murcha, M.W., Whelan, J., Lehtio, J., Glaser, E., and Teixeira, P.F. (2018). Accumulation of endogenous peptides triggers a pathogen stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *96*, 705–715.
- Llamas, E., Pulido, P., and Rodriguez-Concepcion, M. (2017). Interference with plastome gene expression and Clp protease activity in *Arabidopsis* triggers a chloroplast unfolded protein response to restore protein homeostasis. *PLoS Genet.* *13*.
- Mamaeva, A., Taliansky, M., Filippova, A., Love, A.J., Golub, N., and Fesenko, I. (2020). The role of chloroplast protein remodeling in stress responses and shaping of the plant peptidome. *New Phytol.* *227*, 1326–1334.
- Midorikawa, T., and Inoue, K. (2013). Multiple fates of non-mature luminal proteins in thylakoids. *Plant J.* *76*, 73–86.
- Midorikawa, T., Endow, J.K., Dufour, J., Zhu, J., and Inoue, K. (2014). Plastidic type I signal peptidase 1 is a redox-dependent thylakoidal processing peptidase. *Plant J.* *80*, 592–603.
- Moberg, P., Ståh, A., Bhushan, S., Wright, S.J., Eriksson, A.C., Bruce, B.D., and Glaser, E. (2003). Characterization of a novel zinc metalloprotease involved in degrading targeting peptides in mitochondria and chloroplasts. *Plant J.*
- Moldavski, O., Levin-Kravets, O., Ziv, T., Adam, Z., and Prag, G. (2012). The hetero-hexameric nature of a chloroplast AAA+ FtsH protease contributes to its thermodynamic stability. *PLoS One* *7*, e36008.
- Montandon, C., Dougan, D.A., and van Wijk, K.J. (2019). N-degron specificity of chloroplast ClpS1 in plants. *FEBS Lett.* *593*, 962–970.
- Nakagawara, E., Sakuraba, Y., Yamasato, A., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2007). Clp protease controls chlorophyll b synthesis by regulating the level of chlorophyllide a oxygenase. *Plant J.* *49*, 800–809.
- Nishimura, K., and van Wijk, K.J. (2015). Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plastids. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1847*, 915–930.
- Nishimura, K., Asakura, Y., Friso, G., Kim, J., Oh, S.-h., Rutschow, H., Ponnala, L., and van Wijk, K.J. (2013). ClpS1 Is a Conserved Substrate Selector for the Chloroplast Clp Protease System in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *25*, 2276–2301.
- Nishimura, K., Apitz, J., Friso, G., Kim, J., Ponnala, L., Grimm, B., and van Wijk, K.J. (2015). Discovery of a Unique Clp Component, ClpF, in Chloroplasts: A Proposed Binary ClpF-ClpS1 Adaptor Complex Functions in Substrate Recognition and Delivery. *Plant Cell* *27*, 2677–2691.
- Nishimura, K., Kato, Y., and Sakamoto, W. (2017). Essentials of Proteolytic Machineries in Chloroplasts. *Mol. Plant* *10*, 4–19.
- Olinares, P.D.B., Kim, J., Davis, J.I., and van Wijk, K.J. (2011). Subunit Stoichiometry, Evolution, and Functional Implications of an Asymmetric Plant Plastid ClpP/R Protease Complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *23*, 2348–2361.
- Parcej, D., and Tampé, R. (2010). ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 572–580.

- Pinti, M., Gibellini, L., Nasi, M., De Biasi, S., Bortolotti, C.A., Iannone, A., and Cossarizza, A. (2016). Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1857*, 1300–1306.
- Pulido, P., Llamas, E., Llorente, B., Ventura, S., Wright, L.P., and Rodríguez-Concepción, M. (2016). Specific Hsp100 Chaperones Determine the Fate of the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway for Either Refolding or Degradation by the Stromal Clp Protease in Arabidopsis. *PLOS Genet.* *12*, e1005824.
- Pulido, P., Llamas, E., and Rodriguez-Concepcion, M. (2017). Both Hsp70 chaperone and Clp protease plastidial systems are required for protection against oxidative stress. *Plant Signal. Behav.* *12*, e1290039.
- Putarjunan, A., Liu, X., Nolan, T., Yu, F., and Rodermel, S. (2013). Understanding chloroplast biogenesis using second-site suppressors of *imm1* and *var2*. *Photosynth. Res.* *116*, 437–453.
- Puthiyaveetil, S., and Kirchhoff, H. (2013). A phosphorylation map of the photosystem II supercomplex C2S2M2. *Front. Plant Sci.* *4*, 459.
- Ramundo, S., Casero, D., Mühlhaus, T., Hemme, D., Sommer, F., Crèvecoeur, M., Rahire, M., Schroda, M., Rusch, J., Goodenough, U., et al. (2014). Conditional depletion of the chlamydomonas chloroplast ClpP protease activates nuclear genes involved in autophagy and plastid protein quality control. *Plant Cell* *26*, 2201–2222.
- Richter, S., and Lamppa, G.K. (1999). Stromal Processing Peptidase Binds Transit Peptides and Initiates Their Atp-Dependent Turnover in Chloroplasts. *J. Cell Biol.* *147*, 33–44.
- Richter, S., and Lamppa, G.K. (2002). Determinants for Removal and Degradation of Transit Peptides of Chloroplast Precursor Proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 43888–43894.
- Richter, A.S., Banse, C., and Grimm, B. (2019). The GluTR-binding protein is the heme-binding factor for feedback control of glutamyl-tRNA reductase. *Elife* *8*, e46300.
- Rigas, S., Daras, G., Tsitsekian, D., Alatzas, A., and Hatzopoulos, P. (2014). Evolution and significance of the Lon gene family in Arabidopsis organelle biogenesis and energy metabolism. *Front. Plant Sci.* *5*, 145.
- Rotanova, T. V., Melnikov, E.E., Khalatova, A.G., Makhovskaya, O. V., Botos, I., Wlodawer, A., and Gustchina, A. (2004). Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur. J. Biochem.* *271*, 4865–4871.
- Sakamoto, W., Zaltsman, A., Adam, Z., and Takahashi, Y. (2003). Coordinated Regulation and Complex Formation of Yellow Variegated1 and Yellow Variegated2, Chloroplastic FtsH Metalloproteases Involved in the Repair Cycle of Photosystem II in Arabidopsis Thylakoid Membranes. *Plant Cell* *15*, 2843–2855.
- Sakuraba, Y., Yamasato, A., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2007). Functional analysis of N-terminal domains of Arabidopsis chlorophyllide a oxygenase. *Plant Physiol. Biochem.* *45*, 740–749.
- Sakuraba, Y., Tanaka, R., Yamasato, A., and Tanaka, A. (2009). Determination of a Chloroplast Degron in the Regulatory Domain of Chlorophyllide a Oxygenase. *J. Biol. Chem.* *284*, 36689–36699.

- Samol, I., Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Fucile, G., Crèvecoeur, M., Vener, A. V., Rochaix, J.-D., and Goldschmidt-Clermont, M. (2012). Identification of a Photosystem II Phosphatase Involved in Light Acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 2596–2609.
- Shackleton, J.B., and Robinson, C. (1991). Transport of proteins into chloroplasts. The thylakoidal processing peptidase is a signal-type peptidase with stringent substrate requirements at the -3 and -1 positions. *J. Biol. Chem.* 266, 12152–12156.
- Shikanai, T., Shimizu, K., Ueda, K., Nishimura, Y., Kuroiwa, T., and Hashimoto, T. (2001). The chloroplast clpP gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 42, 264–273.
- Shimizu, T., Kacprzak, S.M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Watanabe, S., Shimada, T., Tanaka, K., Hayashi, Y., Arai, M., Leister, D., et al. (2019). The retrograde signaling protein GUN1 regulates tetrapyrrole biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 24900–24906.
- Shipman-Roston, R.L., Ruppel, N.J., Damoc, C., Phinney, B.S., and Inoue, K. (2010). The Significance of Protein Maturation by Plastidic Type I Signal Peptidase 1 for Thylakoid Development in *Arabidopsis* Chloroplasts. *Plant Physiol.* 152, 1297–1308.
- Shipman, R.L., and Inoue, K. (2009). Suborganellar localization of plastidic type I signal peptidase 1 depends on chloroplast development. *FEBS Lett.* 583, 938–942.
- Sjögren, L.L.E., and Clarke, A.K. (2011). Assembly of the Chloroplast ATP-Dependent Clp Protease in *Arabidopsis* Is Regulated by the ClpT Accessory Proteins. *Plant Cell* 23, 322–332.
- Sjögren, L.L.E., Tanabe, N., Lymperopoulos, P., Khan, N.Z., Rodermel, S.R., Aronsson, H., and Clarke, A.K. (2014). Quantitative Analysis of the Chloroplast Molecular Chaperone ClpC/Hsp93 in *Arabidopsis* Reveals New Insights into Its Localization, Interaction with the Clp Proteolytic Core, and Functional Importance. *J. Biol. Chem.* 289, 11318–11330.
- Ståhl, A., Nilsson, S., Lundberg, P., Bhushan, S., Biverstahl, H., Moberg, P., Morisset, M., Vener, A., Måler, L., Langel, U., et al. (2005). Two Novel Targeting Peptide Degrading Proteases, PrePs, in Mitochondria and Chloroplasts, so Similar and Still Different. *J. Mol. Biol.* 349, 847–860.
- Tapken, W., Kim, J., Nishimura, K., van Wijk, K.J., and Pilon, M. (2015). The Clp protease system is required for copper ion-dependent turnover of the PAA2/HMA8 copper transporter in chloroplasts. *New Phytol.* 205, 511–517.
- Teixeira, P.F., and Glaser, E. (2013). Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 360–370.
- Teixeira, P.F., Kmiec, B., Branca, R.M.M., Murcha, M.W., Byzia, A., Ivanova, A., Whelan, J., Drag, M., Lehtiö, J., and Glaser, E. (2017). A multi-step peptidolytic cascade for amino acid recovery in chloroplasts. *Nat. Chem. Biol.* 13, 15–17.
- Thompson, M.W., Singh, S.K., and Maurizi, M.R. (1994). Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 269, 18209–18215.
- Thomson, S.M., Pulido, P., and Jarvis, R.P. (2020). Protein import into chloroplasts and its regulation by the ubiquitin-proteasome system. *Biochem. Soc. Trans.* 48, 71–82.

- Trösch, R., and Jarvis, P. (2011). The Stromal Processing Peptidase of Chloroplasts is Essential in Arabidopsis, with Knockout Mutations Causing Embryo Arrest after the 16-Cell Stage. *PLoS One* 6, e23039.
- Varshavsky, A. (2011). The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci.* 20, 1298–1345.
- Wagner, R., Aigner, H., and Funk, C. (2012). FtsH proteases located in the plant chloroplast. *Physiol. Plant.* 145, 203–214.
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081–1086.
- Wang, L., Kim, C., Xu, X., Piskurewicz, U., Dogra, V., Singh, S., Mahler, H., and Apel, K. (2016). Singlet oxygen- and EXECUTER1-mediated signaling is initiated in grana margins and depends on the protease FtsH2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E3792–E3800.
- Welsch, R., Zhou, X., Yuan, H., Álvarez, D., Sun, T., Schlossarek, D., Yang, Y., Shen, G., Zhang, H., Rodriguez-Concepcion, M., et al. (2018). Clp Protease and OR Directly Control the Proteostasis of Phytoene Synthase, the Crucial Enzyme for Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis. *Mol. Plant* 11, 149–162.
- van Wijk, K.J. (2015). Protein Maturation and Proteolysis in Plant Plastids, Mitochondria, and Peroxisomes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 75–111.
- Wu, G.-Z., Chalvin, C., Hoelscher, M., Meyer, E.H., Wu, X.N., and Bock, R. (2018). Control of Retrograde Signaling by Rapid Turnover of GENOMES UNCOUPLED1. *Plant Physiol.* 176, 2472–2495.
- Yamasato, A., Nagata, N., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2005). The N-Terminal Domain of Chlorophyllide a Oxygenase Confers Protein Instability in Response to Chlorophyll b Accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 1585–1597.
- Yu, F., Park, S., and Rodermel, S.R. (2004). The Arabidopsis FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J.* 37, 864–876.
- Yu, F., Park, S., and Rodermel, S.R. (2005). Functional Redundancy of AtFtsH Metalloproteases in Thylakoid Membrane Complexes. *Plant Physiol.* 138, 1957–1966.
- Yuan, H., Pawlowski, E.G., Yang, Y., Sun, T., Thannhauser, T.W., Mazourek, M., Schnell, D., and Li, L. (2020). Arabidopsis ORANGE protein regulates plastid preprotein import through interacting with Tic proteins. *J. Exp. Bot.* (*in press*), <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa528>.
- Yue, R., Wang, X., Chen, J., Ma, X., Zhang, H., Mao, C., and Wu, P. (2010). A Rice Stromal Processing Peptidase Regulates Chloroplast and Root Development. *Plant Cell Physiol.* 51, 475–485.
- Zaltsman, A., Ori, N., and Adam, Z. (2005). Two Types of FtsH Protease Subunits Are Required for Chloroplast Biogenesis and Photosystem II Repair in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 2782–2790.
- Zhong, R., Wan, J., Jin, R., and Lamppa, G. (2003). A pea antisense gene for the chloroplast stromal processing peptidase yields seedling lethals in Arabidopsis : survivors show defective GFP import in vivo. *Plant J.* 34, 802–812.

Zybaïlov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., and van Wijk, K.J. (2008). Sorting Signals, N-Terminal Modifications and Abundance of the Chloroplast Proteome. PLoS One 3, e1994.