

옥수수 엽록체 *rbcL* 유전자의 클로닝

李在善·陰眞星*·文惠延**·沈雄燮

(고려대학교 생물학과, *목원대학교 미생물학과, **대구대학교 생물공학과)

Cloning of the *rbcL* Gene from Maize Chloroplast

Lee, Jae Seon, Jin Seong Eum*, Hye Yeon Moon** and Woong Seop Sim

(Department of Biology, Korea University, Seoul,

*Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon

and **Department of Biotechnology, Taegu University, Taegu)

ABSTRACT

In order to study regulation of *rbcL* gene expression, *rbcL* gene of chloroplast DNA (Cp DNA) from maize was cloned. Cp DNA was isolated from intact chloroplast and digested with *Bam*HI. *Bam*HI 9 fragment of Cp DNA containing *rbcL* gene was ligated to pUC19 and transformed into *E. coli* DH5a. This recombinant plasmid was named pRLYS1. pRLYS1 was hybridized with a part of *rbcL* gene from rice and digested with restriction enzyme *Bam*HI, *Hind*III, and *Pst*I. From these results, it was confirmed that pRLYS1 contains intact *rbcL* gene and orientation of *Bam*HI 9 fragment of Cp DNA in pRLYS1 was determined.

서론

엽록체가 독특한 자신의 DNA를 갖는다는 것이 20여년 전에 밝혀진 이후, 엽록체 계놈의 구조와 조성 그리고 구성 유전자들의 특성과 발현 양식들이 활발하게 연구되고 있다 (Palmer, 1985; Herrmann *et al.*, 1975; Kolondner and Tewari, 1975).

거의 모든 엽록체 DNA(Cp DNA)는 83-292 kb 크기의 단일 원형분자로 존재해 그 크기가 진핵생물의 핵 DNA에 비해 월등히 작고 내부에 대개 20-25 kb 크기의 inverted repeat sequence(IR)를 가지고 있다. Cp DNA는 rRNA 유전자, tRNA 유전자외에도 엽록체내에서 합성되는 거의 모든 단백질에 대한 유전자를 가지고 있는데(Murphy and Thompson, 1988; Sugiura, 1989) 일부 단백질이 원핵생물과 상동성을 가지며 기본적인 조절부위의 염기서열은 원핵생물과 유사하나 진핵생물에서 발견되는 인트론을 포함하는 등 원핵생물적 특성과 진핵생물적 특성을 동시에

나타낸다(Marcus, 1989). 이 중 *rbcL* 유전자는 광합성의 캘빈회로에서 ribulose-1,5-bisphosphate의 carboxylation과 동시에 광호흡을 행하는 bifunctional enzyme인 RuBisCo의 두 소단위체 중 큰소단위체인 LSU를 암호화하는 유전자이다. LSU는 엽록체에서 합성되며 활성자리를 포함하는 반면, RuBisCo의 작은 소단위체인 SSU는 핵에서 합성되어 그 전구체가 엽록체로 수송되는 동안 processing된 후 LSU와 조립되는데 그 기능은 아직 밝혀지지 않았다(Guttridge and Gatenby, 1987; Link and Bogorad, 1980; Zurawski *et al.*, 1981; Gringrich and Hallick, 1985).

옥수수에서 LSU를 암호화하는 *rbcL* 유전자는 엽록체 DNA의 *Bam*HI 9 절편내에 2.5 kb 크기로 존재한다는 것이 밝혀졌으며(Coen *et al.*, 1977), *rbcL* 유전자의 3'-말단으로부터 0.33 kb 떨어져 2.5 kb 전사체를 코우딩하는 *atpB* 유전자가 존재하는데 이 두 유전자는 서로 반대 방향으로 전사된다(Link and Bogorad, 1980). *rbcL* 유전자의 프로모터는 엽록체내 대부분 유전자의 프로모터 부위와 같이 원핵생물의 -10 부위와 -35 부위와 상동성을 나타내는데 이는 고등식물의 엽록체 유전자에 있어 필수적인 것은 아니다. *rbcL* 유전자의 5' 지역은 쌍자엽 식물과 단자엽 식

본 연구는 1992년도 교육부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것임.

물에서 80% 이상의 상동성을 갖는다(Marcus, 1989). 단일 사본으로 존재하는 *rbcL* 유전자는 이전에 밝혀진 1.6 kb mRNA와 함께 이보다 238 뉴클레오티드 상류로부터 합성되는 1.8 kb mRNA를 합성하는데 이들간의 비율은 광-유발 발생단계동안 변화된다(Crossland *et al.*, 1984).

엽록체 유전자의 발현조절은 엽록체 유전자 뿐 아니라 핵 유전자에 의해서도 조절되므로 더욱 복잡하며 엽록체 광유전자의 발현조절은 유전자의 종류나 식물종에 따라 매우 다양한 기작에 의해서 이루어진다(Fromm *et al.*, 1985; Berry *et al.*, 1985). 지구상에서 가장 풍부한 단백질 중 하나인 RuBisCo는 엽록체 수용성 단백질의 60% 이상을 차지하는 매우 중요한 효소로서 RuBisCo 효소의 LSU와 SSU는 빛에 의한 발현이 서로 다르게 조절된다(Inamine *et al.*, 1985; Shirley and Meagher, 1990). LSU의 경우, 일부 식물에서는 빛에 의한 mRNA의 양적 변화가 확실한 반면 다른 식물에서는 거의 변화가 없다는 상반된 보고가 있으며(Nelson *et al.*, 1984; Tobin and Silverthorn, 1985; Rodermel and Bogorad, 1985) 여러 식물종의 발생단계에 따른 다양한 조절기작이 보고되어 있다(Fromm *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1984; Tobin and Suttie, 1980; Sasaki *et al.*, 1984; Berry *et al.*, 1986, 1988; Klein *et al.*, 1988). 그러나 많은 연구 결과에도 불구하고 다양한 외부적, 내부적 요인에 의한 각 유전자의 확실한 조절기작의 확립을 위해서는 계속적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

본 실험에서는 식물체내에서 매우 중요한 효소인 RuBisCo의 두 단위체중 엽록체에서 합성되는 LSU 유전자의 발현조절에 관한 특성을 연구하기 위한 실험의 일환으로 옥수수의 *rbcL* 유전자를 클로닝하였다. 국외에서는 이미 Coen 등(1977)이 옥수수의 *rbcL* 유전자를 포함하는 재조합플라스미드, pZmc37을 합성하였으나 이 재조합 플라스미드를 얻을 수 없을 뿐 아니라 국내에서는 아직 엽록체 *rbcL* 유전자의 클로닝에 관한 보고가 없으며 본 실험에 사용된 옥수수 품종은 *Zea mays* L. Golden cross Bantam T-51이므로 *rbcL*에 관해 연구된 기존의 *Zea mays* L. WFG TMS×BS7(Coen *et al.*, 1977)이나 FR9×FR37(Bedbrook *et al.*, 1978; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1985) 품종 등의 연구결과와 비교할 수 있을 것이라 사료되므로 *rbcL* 유전자가 클로닝된 새로운 재조합 플라스미드, pRLYS1을 합성하였다. 앞으로 이를 이용하여 *rbcL* 유전자 프로모터 부위의 특성 및 광을 비롯한 여러 환경요인에 대한 *rbcL* 유전자의 발현조절 기작에 관해 연구하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료. 본 실험에 사용한 옥수수(*Zea mays* L.) 종자는 Sakada 종자회사의 Golden cross Bantam T-51이

었으며 이를 2% sodium hypochlorite solution에서 살균하여 28°C의 암처에서 24시간 동안 침윤시킨 후 vermiculite에 섞어 28°C growth chamber에서 8일간(16 h light; 8 h dark) 성장시켰다.

사용된 균주, 플라스미드 및 배양. 본 실험에서 host cell로 사용된 균주는 *E. coli* DH5a와 JM109(Sambrook *et al.*, 1989)였으며 vector로는 pUC19(Sambrook *et al.*, 1989)을 사용하였다. *E. coli*는 LB 배지에서 접종하여 37°C에서 배양시켰다.

플라스미드의 분리. 플라스미드 DNA의 대량분리는 Marko 등(1982)의 방법을 이용하였고, 소량분리는 Birnboim과 Doly(1979)의 방법을 이용하여 분리하였다.

엽록체 DNA의 분리. 옥수수로부터 엽록체 DNA의 분리는 Kolondner와 Tewari(1975)의 방법을 변형하여 사용하였다. 특별한 언급이 없는 한 실험은 4°C에서 수행하였다. 8일된 옥수수 잎 300 g을 수확하여 1.2 liter의 buffer A(0.3 M mannitol, 0.05 M Tris, 0.3 M EDTA, 0.001 M mercaptoethanol, 0.1% BSA, pH 8.0)에서 Buhler homogenizer로 마쇄한 후 2겹의 cheesecloth와 4겹의 Miracloth에 여과시켜 40×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 다시 1020×g로 원심분리하여 얻은 침전물을 60 ml buffer A에 현탁하고 MgCl₂(0.01 M)와 DNase(50 mg/ml)를 가해 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 180 ml의 buffer B(0.3 M sucrose, 0.05 M Tris, 0.02 M EDTA, pH 8.0)를 가해 1500×g에서 15분 동안 원심분리하였다. 침전물은 180 ml의 buffer B로 두번 세척한 후 1500×g에서 다시 원심분리하여 세척된 엽록체를 얻었다. 이를 옥수수 잎 25 g당 4.8 ml의 buffer C(0.05 M Tris, 0.02 M EDTA, pH 8.0)에 현탁시키고 10% sodium sarcosyl을 포함하는 1.2 ml의 buffer C를 가해 실온에서 30분간 방치시킨 후 4 M CsCl가 함유된 2 ml의 buffer C를 가해 얼음에 1.5 시간동안 방치하였다. 이를 1200×g에서 30분간 원심분리한 후 얻어진 상층액에 CsCl($\rho=1.55$)와 EtBr(final concentration=740 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 가해 Hitachi RP-65 rotor로 38,000 rpm에서 48시간 동안 초원심분리하여 엽록체 DNA 밴드를 얻었다.

재조합 플라스미드 pJJ1의 제조. 명지대 남백희 교수님으로부터 얻은 쌀의 *rbcL* 유전자 내부에 존재하는 0.56 kb 크기의 *Pst*I 절편을 동일한 제한효소 *Pst*I로 절단하고 calf intestinal alkaline phosphatase(CIP)로 5'-인산기를 제거한 pUC19에 ligation한 후 얻어진 재조합 DNA로 *E. coli* JM109를 형질전환시켰다. 위의 실험은 Sambrook 등(1989)의 방법으로 수행하였다.

***rbcL* 유전자의 클로닝.** 옥수수로부터 분리한 Cp DNA를 제한효소 *Bam*HI으로 절단하여 전기영동한 후 *Bam*HI 9 절편을 겔로부터 회수하였다. 동일한 제한효소로 절단한 후 CIP를 처리한 pUC19에 회수된 *Bam*HI 9 절편을 liga-

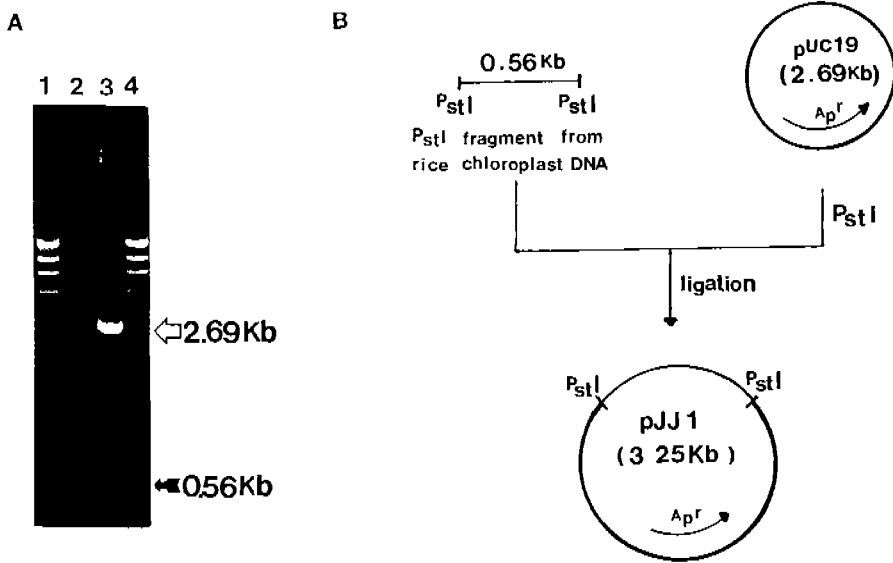


Fig. 1. Gel electrophoretic pattern and cloning scheme of pJJ1. Electrophoresis was carried in 0.7% agarose at 100 V. A. *PstI* digests of pJJ1. Lane 1, 4: λ -*HindIII* (size marker). 2: pJJ1 (uncut). 3: two digests of pJJ1. Filled and empty arrow indicate insert DNA and vector DNA, respectively. B. Cloning scheme of pJJ1.

tion하여 *E. coli* DH5 α 를 형질전환시켰다. 위의 실험은 Sambrook 등(1989)의 방법으로 수행하였다.

형질전환체의 선별. Ampicillin(100 μ g/ml)이 함유된 LB 배지에 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside(X-gal)와 isoprophylthio- β -D-galactoside(IPTG)를 도말하여 전조시키고 형질전환시킨 *E. coli* DH5 α 를 도말하여 성장시킨 후 생성된 흰색 콜로니를 선별하였다.

Southern hybridization. 재조합 플라스미드 pJJ1으로부터 벼의 *rbcl* 유전자 일부인 *PstI* 절편을 회수하기 위해 pJJ1을 *PstI*으로 절단한 후 전기영동하여 0.56 kb 크기의 *PstI* 절편을 electroelution 방법으로 회수하였다. 이를 probe로 하여 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 Cp DNA의 *BamHI* 절편들 및 본 실험에서 새로 만든 재조합 플라스미드와 각각 hybridization을 수행하였다.

결과 및 고찰

재조합 플라스미드 pJJ1의 확인. X-gal과 IPTG가 도말된 ampicillin이 함유된 LB 배지로부터 재조합 플라스미드를 가지고 있다고 생각되는 흰색 콜로니들을 선별한 후 소량분리하여 *PstI*으로 절단하였다. 이를 전기영동하여 vector인 pUC19 DNA와 insert인 0.56 kb의 *PstI* 절편 밴드를 확인하였고(Fig. 1A) 이를 pJJ1이라 명명하였다. pJJ1의 cloning scheme은 Fig. 1B와 같다.

Cp DNA의 제한효소 처리 및 Cp DNA내 *rbcl* 유전자의

위치확인. 옥수수로부터 분리한 Cp DNA를 제한효소 *BamHI*으로 절단하여 전기영동하였다(Fig. 2A). 이를 nitrocellulose filter로 transfer한 후 pJJ1으로부터 회수한 쌀의 *rbcl* 유전자 중 0.56 kb 크기의 *PstI* 절편부위(Fig. 1A)를 probe로 하여 Southern hybridization을 수행한 결과 *BamHI* 9 절편에 *rbcl* 유전자가 존재한다는 Coen 등(1977)의 보고를 확인하였다(Fig. 2B). Negative control로는 λ -*HindIII*를 사용하였다.

rbcl 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드 pRLYS1의 선별. X-gal과 IPTG가 도말된 ampicillin이 함유된 LB 배지로부터 흰색콜로니들을 선별하였다. 선별된 형질전환체는 소량분리하여 *BamHI*으로 절단한 후 전기영동하여 vector인 pUC19(2.69 kb)와 insert인 4.35 kb 크기의 Cp DNA *BamHI* 절편의 밴드를 확인하였다(Fig. 3, lane 3). 옥수수 염록체 DNA 절편중 제한효소 *BamHI*에 의해 생성되는 4.35 kb 크기의 절편은 두 종류이다. 이 두 절편은 동일한 *Sall* 1 절편내에 존재하며 크기는 같으나 염기서열이 다르다. 즉, 완전한 *rbcl* 유전자 부위를 포함하고 있는 *BamHI* 9 절편은 *HindIII*에 대한 인식 부위를 가지고 있지 않은 반면, 다른 유전자 부위인 *BamHI* 9' 절편은 *HindIII*에 대한 두개의 인식부위를 가지고 있다는 Bedbrook 등(1979)의 보고에 따라 본 실험에서 합성된 재조합 플라스미드 중 *rbcl* 유전자 절편을 가지고 있는 재조합 플라스미드만을 선별하기 위하여 재조합 플라스미드들을 제한효소로 절단하고 이를 전기영동하였다. *HindIII*로 절단하였을 경

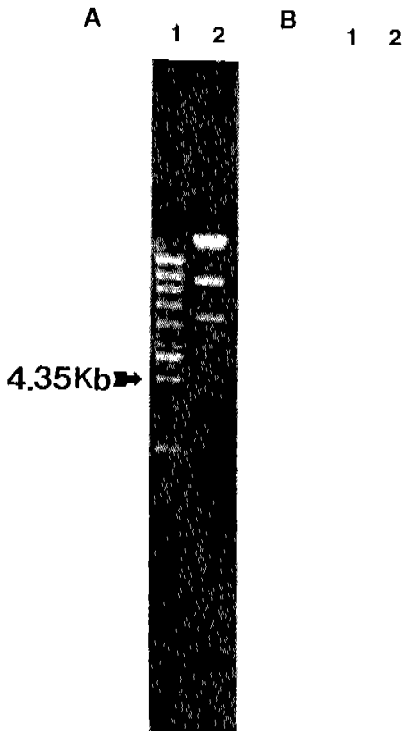


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the restriction fragments of maize chloroplast DNA and blot-transfer hybridization to the rice *rbcL* probe. Maize chloroplast DNA was digested with *Bam*HI and electrophoresed in 0.7% agarose gel at 100 V. The DNA fragments were transferred to a nitrocellulose filter for hybridization. A. Photograph of *Bam*HI digests of chloroplast DNA. Lane 1: *Bam*HI digests of chloroplast DNA. 2: λ -*Hind*III(size marker). The arrow indicates LSU encoding fragment. B. Autoradiograph of filter hybridized to the ³²P-labeled 0.56 kb *Pst*I fragment as the part of the rice *rbcL*. Lane 1: hybridization of rice *Pst*I fragment encoding *rbcL* gene to the 4.35 kb *Bam*HI fragment of chloroplast DNA. 2: λ -*Hind*III (negative control).

우 *Hind*III에 대한 인식부위가 4.35 kb의 *Bam*HI 절편에는 없고 vector로 사용된 pUC19의 multicloning site에만 존재해 7.14 kb(2.69 kb+4.35 kb)의 선형 DNA 분자로 전환되고(Fig. 3, lane 4) *Bam*HI과 *Hind*III로 동시에 절단하였을 때 pUC19 내의 multicloning site 내에 인접해서 *Hind*III와 *Bam*HI에 대한 인식 부위가 모두 존재하며 pUC19 부위 이외에는 부가적인 *Hind*III 인식부위가 없어 insert DNA와 vector의 두 DNA 절편으로만 절단되는(Fig. 3, lane 5) *rbcL* 유전자 부위인 *Bam*HI 9 절편을 갖는 재조합 플라스미드를 선별하였다. 또한 pJ1으로부터 쌀의 *rbcL* 유전자의 일부인 *Pst*I 절편을 회수한 후 probe로 사용하여

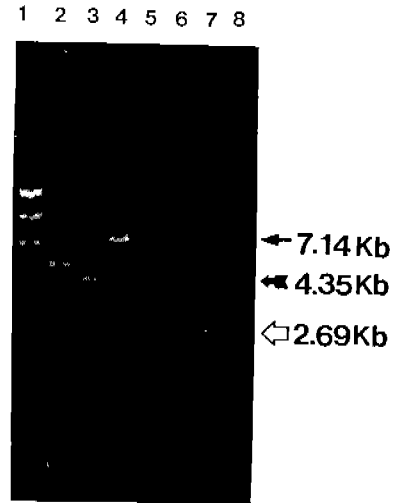


Fig. 3. Restriction fragments of the pRLYS1. Electrophoresis was carried in 0.7% agarose at 100 V. Lane 1, 8: λ -*Hind*III (size marker). 2: pRLYS1 (uncut). 3: *Bam*HI digests of pRLYS1. 4: *Hind*III digests of pRLYS1. 5: double digests of pRLYS1 with *Bam*HI and *Hind*III. 6: pUC 19 (uncut). 7: *Bam*HI digest of pUC19. Filled and empty arrow indicate insert DNA and vector DNA, respectively.

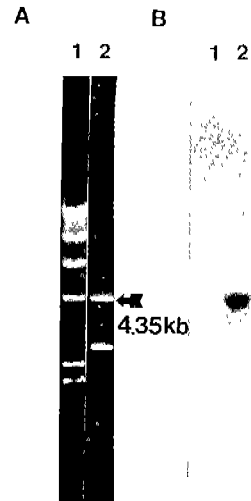
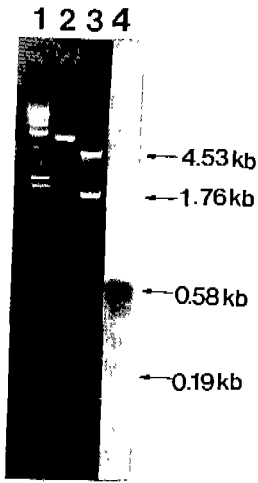


Fig. 4. Hybridization analysis of cloned *rbcL* fragment in pRLYS1. A. Gel electrophoresis of *Bam*HI fragments of pRLYS1 (lane 2) and λ -*Hind*III as size marker (lane 1). Electrophoresis was carried in 0.7% agarose at 100 V. The arrow indicates *Bam*HI fragment of *rbcL* gene from maize. B. Autoradiograph of *Bam*HI digests of pRLYS1 fractionated on gel as shown in A. Lane 1: λ -*Hind*III (negative control). 2: hybridization between probe and 4.35 kb *Bam*HI fragment of pRLYS1.

A.



B.

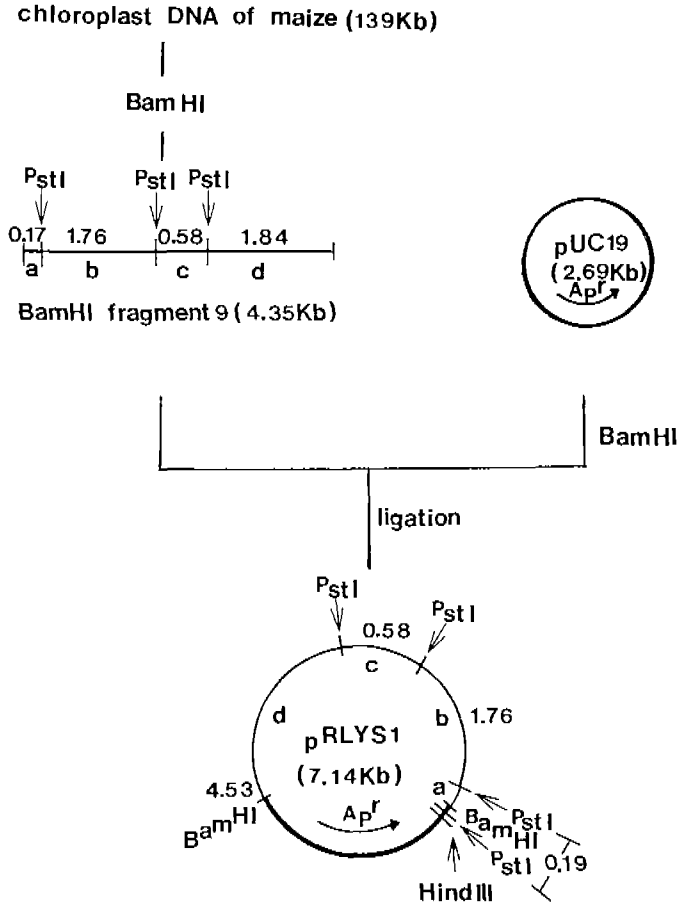


Fig. 5. A. Identification by gel electrophoresis and hybridization analysis of DNA fragment encoding *rbcl* gene inserted in pRLYS1. Electrophoresis was carried in 1.2% agarose at 100 V. Lane 1: λ -HindIII (size marker). 2: pRLYS1 (uncut). 3: *Pst*I digests of pRLYS1. The forth fragment (0.19 kb) is not shown in this photograph. 4: autoradiograph of the hybridization between probe and pRLYS1 digests as shown in lane 3. B. Strategy for construction of recombinant plasmid, pRLYS1, combining *Bam*HI 9 frgmt of Cp DNA from maize and *E. coli* plasmid vector pUC19 and orientation of *rbcl* fragment in pRLYS1. The number indicates the size of DNA fragment.

위에서 선별된 재조합 플라스미드와 Southern hybridization 실험을 수행하였다. 이 실험으로부터 probe는 pRLYS1 중 4.35 kb의 삽입 DNA 밴드와만 정확하게 hybridization 되는 결과를 얻었다(Fig. 4B). Negative control로는 λ -HindIII를 사용하였다. 제한효소를 이용한 분석과 hybridization 실험으로부터 확인된 완전한 *rbcl* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드는 pRLYS1이라 명명하였다.

pRLYS1 내부에 *rbcl* 유전자절편의 삽입방향 결정. pRLYS1 내부의 4.35 kb 크기의 *Bam*HI 9 절편은 *Pst*I에 대한 3개의 인식부위를 가지고 있어 *Bam*HI 9 절편을 제

한효소 *Pst*I으로 절단하였을 경우 생성되는 절편의 크기는 각각 0.17 kb (a), 1.76 kb (b), 0.58 kb (c), 1.84 kb (d)이다 (Fig. 5B). 따라서 pRLYS1을 *Pst*I으로 절단할 경우 *Bam*HI 9 절편의 삽입방향에 따라 4.35 kb, 0.58 kb, 1.76 kb, 0.19 kb의 절편이 생성되거나 1.76 kb, 0.58 kb, 1.86 kb, 2.86 kb의 절편이 생성된다. pRLYS1을 *Pst*I으로 절단하여 전기영동한 결과 4.35 kb, 1.76 kb, 0.58 kb, 0.19 kb의 절편을 확인하였으므로(Fig. 5A, lane 3) 이러한 결과로부터 pRLYS1 내부에 4.35 kb 크기의 *rbcl* 유전자 절편의 삽입방향을 결정하였다. 또한 pRLYS1을 *Pst*I으로 절단한 후 쌀의 *rbcl*

유전자중 *PstI* 절편과 Southern hybridization한 결과 pRLYS1의 4개의 *PstI* 절편중 probe로 사용한 쌀의 *PstI* 절편과 94%의 상동성을 갖는 부위인 0.58 kb 크기의 *PstI* 절편 밴드와만 hybridization 되었으므로(Fig. 5A, lane 4) pRLYS1 내부에 *rbcL* 유전자의 존재를 재차 확인하였다. 그의 삽입방향과 cloning scheme은 Fig. 5B와 같다. 위와 같은 완전한 *rbcL* 유전자를 갖고 있는 재조합플라스미드 pRLYS1을 합성하였으므로 광유전자인 *rbcL* 유전자의 특성과 발현조절기작에 대해 계속적인 연구를 수행하기 위해 이 유전자의 sequencing 및 프로모터 부위의 subcloning 실험이 현재 진행중에 있다.

적 요

rbcL 유전자 발현조절에 관한 연구의 일환으로 Cp DNA로부터 분리한 *rbcL* 유전자를 클로닝하였다. 옥수수의 엽록체로부터 DNA를 분리한 후 제한효소 *BamHI*으로 절단하여 *rbcL* 유전자가 포함된 *BamHI* 9 절편을 pUC19에 클로닝하여 재조합 플라스미드 pRLYS1을 만들었다. 쌀의 *rbcL* 유전자 일부를 probe로 사용하여 pRLYS1과 Southern hybridization한 결과와 제한효소 *BamHI*, *HindIII*, 그리고 *PstI*으로 절단된 pRLYS1 절편의 전기영동 결과로부터 재조합 플라스미드의 내부에 완전한 *rbcL* 유전자의 존재를 확인하였고 삽입방향을 결정하였다.

참 고 문 헌

- Bedbrook, J.R., D.M. Coen, A.R. Beaton, L. Bogorad and A. Rich. 1979. Location of the single gene for the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase on the maize chloroplast chromosome. *J. Biol. Chem.* **254**: 905-910.
- Bedbrook, J.R., G. Link, D.M. Coen, L. Bogorad and A. Rich. 1978. Maize plastid gene expressed during photoregulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 3060-3064.
- Berry, J.O., B.J. Nikolau, J.P. Carr and D.F. Klessig. 1986. Translational regulation of light-induced ribulose 1,5-biphosphate carboxylase gene expression in amaranth. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2347-2353.
- Berry, J.O., Nikolau, J.P. Carr and D.F. Klessig. 1985. Transcriptional and post-transcriptional regulation of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase gene expression in light- and dark-grown amaranth cotyledons. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2238-2246.
- Berry, J.O., J.P. Carr and D.F. Klessig. 1988. mRNAs encoding ribulose-1,5-biphosphate carboxylase remain bound to polysomes but are not translated in amaranth seedlings transferred to darkness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4190-4194.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA plasmid. *Nucl. Acids. Res.* **7**: 1513-1516.
- Coen, D.M., J.R. Bedbrook, L. Bogorad and A. Rich. 1977. Maize chloroplast DNA fragment encoding the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5487-5491.
- Crossland, L.D., S.R. Rodermeil and L. Bogorad. 1984. Sige gene for the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase in maize yields two differentially regulated mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4060-4064.
- Fromm, H., M. Devic, R. Fluhr and M. Edelman. 1985. Control of *psbA* gene expression: On mature *spirodela* chloroplast light regulation of 32-kd protein synthesis is independent of transcript level. *EMBO J.* **4**: 291-295.
- Gringrich, J.C. and R.B. Hallick. 1985. The *Euglena gracilis* chloroplast ribulose-1,5-biphosphate carboxylase gene. *J. Biol. Chem.* **260**: 16162-16168.
- Gutteridge, S. and A.A. Gatenby. 1987. The molecular analysis of the assembly, structure and function of Rubisco. *Oxford Surveys of Plant Mol. Cell Biol.* **4**: 95-135.
- Hanley-Bowdoin, L., E.M. Orozco, J.R. and N-H. Chua. 1985. *In vitro* synthesis and processing of a maize chloroplast transcript encoded by the ribulose 1,5-biphosphate carboxylase large subunit gene. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2733-2745.
- Herrmann, R.G., H-J. Bohnert, K.V. Kowallik and J.M. Schmitt. 1975. Size, conformation and purity of chloroplast DNA of some higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* **378**: 305-317.
- Inamine, G., B. Nash, H. Weissbach and N. Brot. 1985. Light regulation of the synthesis of the large subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase in peas: Evidence for translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5690-5694.
- Klein, R.R., H.S. Mason and J.E. Mullet. 1988. Light-regulated translation of chloroplast proteins. 1. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA*, and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Cell Biol.* **106**: 289-301.
- Kolodner, R. and K.K. Tewari. 1975. The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* **402**: 372-390.
- Link, G. and L. Bogorad. 1980. Size, locations, and directions of transcription of two genes on a cloned maize chloroplast DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1332-1336.
- Marcus, A. 1989. *In*, The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise, Vol. 15. Academic press, San Diego. pp. 150-227.
- Marko, M.A., R. Chipperfield and H.C. Birnboim. 1982. A

- procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal. Biochem.* **121**: 382-387.
- Murphy, T.M. and W.F. Thompson. 1988. Genomes of chloroplasts and mitochondria. *In*, Molecular Plant Development, Prentice Hall. pp. 146-173.
- Nelson, T., M.H. Harpster, S.P. Mayfield and W.C. Taylor. 1984. Light-regulated gene expression during maize leaf development. *J. Cell Biol.* **98**: 558-564.
- Palmer, J.D. 1985. Comparative organization of chloroplast genomes. *Ann. Rev. Genet.* **19**: 325-354.
- Rodermel, S.R. and L. Bogorad. 1985. Maize plastid photogenes: Mapping and photoregulation of transcript levels during light-induced development. *J. Cell Biol.* **100**: 463-476.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sasaki, Y., Y. Tomoda and T. Kamikubo. 1984. Light regulates the gene expression of ribulosebisphosphate carboxylase at the levels of transcription and gene dosage in greening pea leaves. *FEBS Lett.* **173**: 31-35.
- Shirley, B.W. and R.B. Meagher. 1990. A potential role for RNA turnover in the light regulation of plant gene expression: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit in soybean. *Nucl. Acids Res.* **18**: 3377-3385.
- Sugiura, M. 1989. The chloroplast genome. *In*, The Biochemistry of Plants, A. Marcus (ed.). Vol. 15. Academic press, San Diego. pp. 133-150.
- Tobin, E.M. and J.L. Suttie. 1980. Light effects on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in *Lemna gibba* L. G-3. *Plant Physiol.* **65**: 641-647.
- Tobin, E.M., and J. Silverthorne. 1985. Light regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 569-593.
- Zurawski, G., B. Perrot, W. Bottomley and P.R. Whitfeld. 1981. The structure of the gene for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA. *Nucl. Acids Res.* **9**: 3251-3270.

(1992. 5. 4 接受)