
マイクロボディ変換機構 (グリオキシゾームからパーオキシゾーム) の細胞生物学的研究

Cell biological studies on microbody transition
(from glyoxysomes to peroxisomes)

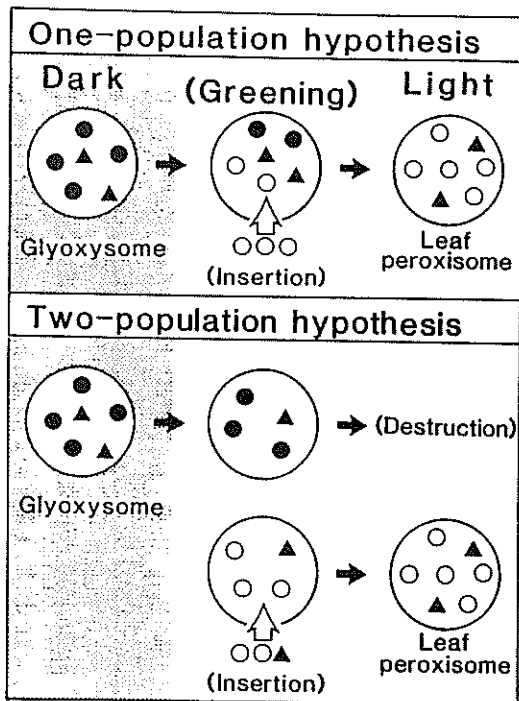
- 代表研究者 名古屋大学農学部助手 西村 幹 夫*
Instructor, School of Agriculture, Res. Inst. for Biochem.
Regulation, Nagoya Univ.
Mikio NISHIMURA
- 協同研究者 名古屋大学農学部大学院生 山口 淳 二
Graduate student, School of Agriculture, Res. Inst. for Biochem.
Regulation, Nagoya Univ.
Junji YAMAGUCHI
- 名古屋大学農学部大学院生 森 仁 志
Graduate student, School of Agriculture, Res. Inst. for Biochem.
Regulation, Nagoya Univ.
Hitoshi MORI

The functional transition of glyoxysomes to peroxisomes occurs during greening of germinating pumpkin (*Cucurbita* sp. Amakuri Nankin) cotyledons. As a step to clarify the mechanism of microbody transition in pumpkin cotyledons, seven microbody enzymes *i.e.*, two glyoxysome-specific enzymes (malate synthase, citrate synthase), two peroxisome-specific enzymes (glycolate oxidase, hydroxypyruvate reductase) and three enzymes present in both microbodies (catalase, malate dehydrogenase, 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase) have been purified and their monospecific antibodies were used for the analysis.

The pertinent question is raised of whether the functional transition of microbodies proceeds in a linear and continuous fashion or whether a discontinuous, two-step sequence operates therein. Two opposing hypotheses *i.e.*, "one-population" and "two-population" models, have been proposed. According to the one-population hypothesis, glyoxysomes are directly transformed to peroxisomes during greening of cotyledons, accompanying the insertion of newly synthesized peroxisome-specific enzymes and concomitant breakdown of glyoxysome-specific enzymes. On the contrary, the two-population hypothesis postulates that glyoxysomes are broken down as a whole and peroxisomes are newly synthesized *de novo*. The immunocytochemical protein-A gold method was employed in the analysis of the transition using antibodies against glyoxysome-specific enzymes and peroxisome-specific enzymes. Double labeling experiment using different sizes of protein-A gold particles shows that both the glyoxysome-specific enzymes and peroxisome-specific enzymes coexist in the microbody of the transitional stage, indicating that glyoxysomes are directly transformed to peroxisomes during greening.

The biosynthesis of microbody enzymes was studied using their monospecific antibodies. In the *in vitro* transition system, both catalase and malate dehydrogenase are synthesized as precursors having larger M_r than the mature enzymes, whereas the other five enzymes are synthesized in a form similar to the mature molecules. Higher M_r precursor of catalase is detectable in both glyoxysomes and peroxisomes, indicating that processing is not obligatorily required for the transport of catalase molecule but is presumably involved in the enzyme

* 62年4月より神戸大学理学部助教授 (Associate Prof., Faculty of Science, Kobe Univ.)



- glyoxysomal enzyme
- leaf peroxisomal enzyme
- ▲ enzyme present in both microbodies

図 2. マイクロボディ変換機構。

脂肪性種子子葉の緑化過程においてグリオキシゾームが直接パーオキシゾームに変換するという説 (one population hypothesis) とグリオキシゾームは全体として崩壊し、新たにパーオキシゾームが出現するという説 (two population hypothesis) が提唱されていた。

変換が生じる唯一の現象として注目すべきものである。

本研究者は両マイクロボディに局在する酵素、膜タンパク質の生合成および局在化機能を分子レベルで解析することにより、マイクロボディの形成、分解、変換機構の解明に取り組んでおり、究極的には、真核細胞の動的な生命現象を維持する調節機構の解明をめざしている。

研究経過

本研究者は、既にグリオキシゾームに特異的な酵素として、malate synthase (MS) と citrate synthase (CS) を、パーオキシゾームに特異的な

酵素として glycolate oxidase (GO)^{1),2)} と hydroxypyruvate (HPR) を、更に両マイクロボディに局在する酵素として catalase (CAT)³⁾, malate dehydrogenase (MDH) および 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (HADH) を単離精製し、それらの特異抗体を調製している (図 1)。特異抗体を用いた研究から、上記 7 種のマイクロボディ酵素のうち、CAT と MDH のみが原酵素より分子量の大きい前駆体として合成されること⁴⁾、またこのうち CAT の前駆体はミトコンドリアや葉緑体タンパク質の場合とは異なり、高分子量前駆体のプロセッシングが膜透過に関与せず、酵素の活性化 (成熟) にかかわっていることを明らかにしている⁵⁾。

研究成果

1) グリオキシゾームが直接パーオキシゾームに変換する

マイクロボディ変換現象を解析する場合、その変換が直接連続的に生じるのか、あるいは不連続的に起こるのかが重要なポイントになる。事実、長年二つの相反する仮説が提唱され、論争されてきていた⁶⁾。一つは one-population hypothesis と呼ばれる仮説であり、子葉の緑化に伴い、グリオキシゾームに特異的な酵素が分解されるとともに、パーオキシゾームに特異的な酵素が新たにマイクロボディに導入されることにより、グリオキシゾームが直接パーオキシゾームに変換していくというものである。今一つは two-population hypothesis と呼ばれるもので、子葉の緑化に伴い、グリオキシゾームは崩壊し、新たにパーオキシゾームが *de novo* に合成されてくるとする仮説である。さまざまな実験方法を用いて、両仮説が検討されてきたが、最終的結論は得られていなかった。本研究者は免疫組織化学的方法を用いて上記仮説に解析を加えた。

図 2 に示すように、one-population hypothesis に従う場合、緑化過程にある子葉組織中のマイクロボディには、グリオキシゾーム、パーオキシゾーム各々に特異的な酵素が共存することになる。一方、two-population hypothesis では、各々のマイクロボディに局在することになり、決

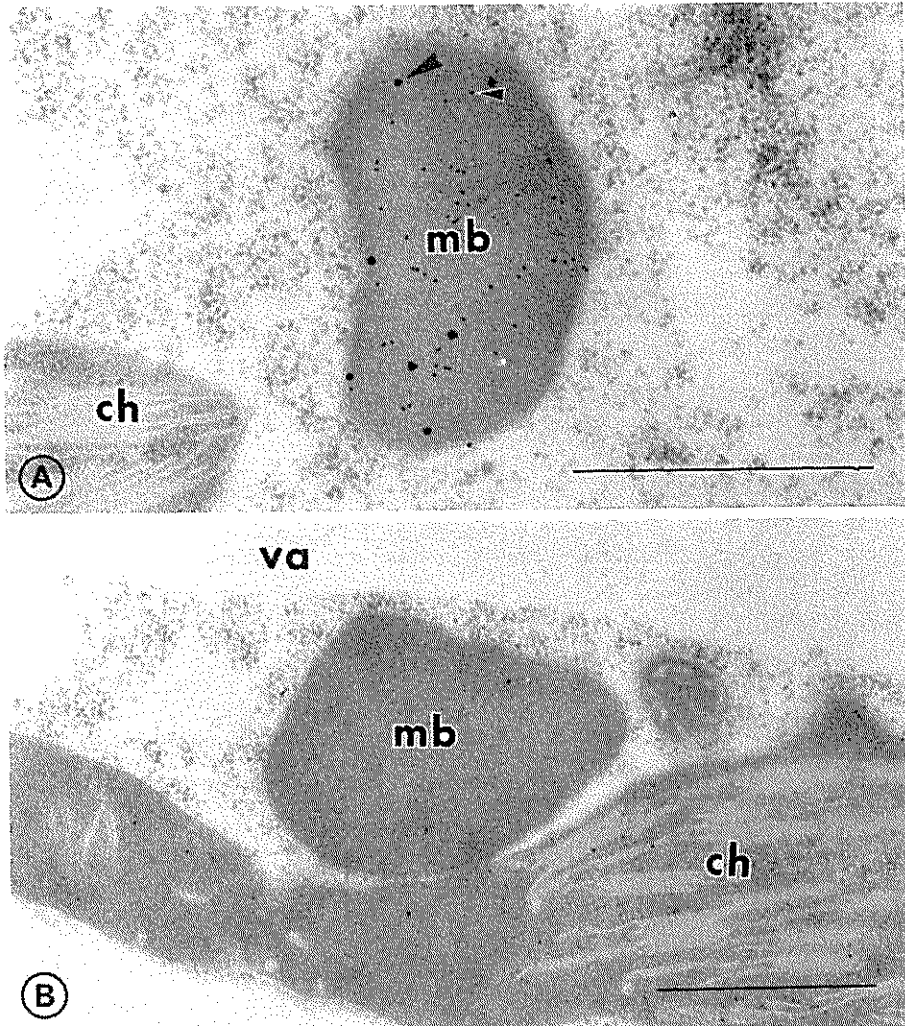


図 3. 免疫電顕法によるマイクロボディ交換系の解析.

- ① 緑化過程におけるマイクロボディにはグリオキシゾームに特異的な酵素 citrate synthase (大きな金粒子) とパーオキシゾームに特異的な酵素 glycolate oxidase (小さな金粒子) が共存している。
 ② non-immune serum を用いた対照実験. バーの大きさは $1\mu\text{m}$. mb: マイクロボディ, ch: クロロプラスト, va: 液胞.

して同一マイクロボディ中に共存することはない。protein A gold 法による免疫組織化学的解析では、金粒子の大きさをかえることによって、同一切片上の複数の抗原の局在性を解析することができる。この利点をいかして、緑化過程にある子葉組織を protein A gold 法により解析した。

グリオキシゾームに特異的な酵素として MS と CS, パーオキシゾームに特異的な酵素として

GO, HPR の各抗体を用いた。これらの抗体を用いた場合、金粒子はマイクロボディのみに検出され、他オルガネラには検出されないこと、グリオキシゾームに特異的な MS と CS の金粒子密度は組織の緑化に伴って減少していくのに対し、パーオキシゾームに特異的な GO, HPR のそれは増大していくことが判明し、それらの酵素活性の緑化に伴う変動とよく一致した。

表 1. カボチャ種子子葉におけるマイクロボディ酵素の生合成
GS: グリオキシゾーム, PS: パーオキシゾーム

Enzyme	Localization	Sub. <i>M_r</i> <i>in vivo</i>		Sub. <i>M_r</i> <i>in vitro</i>		Pulse-chase
		GS	PS	GS	PS	
Malate synthase	GS	60	ND	60	60	60
Citrate synthase	GS	45	ND	45	—	45
Glycolate oxidase	PS	38	38	38	38	38
Hydroxypyruvate reductase	PS	41	41	41	41	41
Catalase	GS, PS	55 > 59	55 > 59	59	59	59 → 55
Malate dehydrogenase	GS, PS	33	33	38	38	38 → 33
3-Hydroxyacyl CoA dehydrogenase	GS, PS	72	72	72	—	72

表 2. 成熟型カタラーゼ (55 kDa catalase) と前駆体カタラーゼ (59 kDa catalase) と性質の比較
*GS: グリオキシゾーム, PS: パーオキシゾーム

	55 kDa catalase	59 kDa catalase
Localization	GS > PS*	GS < PS
Molecular weight	230,000	215,000
Sub. molecular weight	55,000	59,000
Absorption peak (nm)	280, 405, 510, 530, 625	
Heme	Protoheme IX	
Heme content (hematin/catalase)	3.7	4.4
Specific activity (mmol H ₂ O ₂ /mg·min)	200	12
Rate constant (s ⁻¹)	4.4 × 10 ⁶	4.1 × 10 ⁵
K _m (mM)	60	124
pH optimum	Broad (pH 6.5-10)	
Isoelectric point	6.1	6.6
Response against 55 kDa catalase IgG	++	+

図 3 に protein A-gold の粒子の大きさを変えた二重標識実験の結果を示した。小さい粒子 (GO) と大きな粒子 (CS) が緑化過程の子葉組織中のマイクロボディに共存している。同様の結果が他の酵素 MS と HPR を用いた場合にも観察された。この結果は、マイクロボディの変換の際、グリオキシゾーム、パーオキシゾーム両酵素が同一マイクロボディ中に共存していることを示しており、グリオキシゾームがパーオキシゾームに直接連続的に変換するという one-population hypothesis を強く支持するものである。

2) マイクロボディ酵素の生合成

上記 7 種のマイクロボディ酵素の生合成に関して得られた知見を表 1 に要約した。7 種類の酵素のうち CAT と MDH のみが *in vitro* のタンパク質合成系において、原酵素より分子量の大きい前駆体として合成されるが、他の五つの酵素は原酵素と同じ分子量のポリペプチドとして合成された。高分子量前駆体として合成される酵素のうち CAT は、その前駆体が多量にマイクロボディ内に検出されること、また高分子量前駆体のカタラーゼ活性は原酵素の 1/20 と低いことから、CAT

の高分子量前駆体のプロセッシングは、マイクロボ
ディ膜透過に関与するのではなく、酵素の活性化
にかかわっていることが判明した。

今一つの高分子前駆体として合成される MDH
に関しては、その前駆体は pulse-chase 実験に
よってのみ検出されるが、マイクロボディ中には
検出されないことから、速く turnover すると考
えられ、CAT の場合とその性質を異にしている。
大部分のマイクロボディ酵素がプロセッシングを受
けずにマイクロボディに輸送されることから、マ
イクロボディ酵素の膜透過系は、ミトコンドリア
や葉緑体のそれとは異なることが強く示唆され
る。CAT の高分子量前駆体に関しては、その精製
に成功し、前駆体が既にヘムを含んでいるなど
種々の性質を明らかにしている (表 2)。また、子
葉の緑化に伴って、CAT の高分子量前駆体が蓄
積してくることが判明し、マイクロボディ変換に
おけるカタラーゼ活性の変動が、その酵素量によ
るものではなく、活性型への転換を制御してい
ることが示唆された⁹⁾。この結果は、グリオキシ
ゾーム、パーオキシゾーム各々に特異的な酵素の
みならず、両マイクロボディに局在する酵素も、
子葉の緑化に伴うマイクロボディの変換時に、そ
の活性が微妙に制御されていることを端的に示し
ている。

現在、緑化の各段階の子葉からマイクロボディ
を他オルガネラの混在しない状態で調製する方
法を確立したので、その単離したマイクロボディ
(グリオキシゾーム、パーオキシゾーム) を用い
て、膜タンパク質、脂質組成の変動の解析を進
めている。

今後の課題

本研究により、長年論争されていたマイクロボ
ディ変換機構が直接、連続的に起こることを証明
することができた。グリオキシゾームが直接パー
オキシゾームに変換する場合、第 1 に問題にな
ってくるのは、どのようなメカニズムでグリオキシ
ゾームに特異的な酵素が分解されるかという点で
ある。その分解の場 (マイクロボディ内か細胞壁
物質か) を含めて、マイクロボディ酵素の分解調節
機構の解析がマイクロボディ変換の解明に重要な

鍵となる。

第 2 はマイクロボディ変換を誘起する光情報
の問題である。マイクロボディ変換現象は以下の
三つの現象として集約される。

(1) 光照射によるパーオキシゾーム酵素活性
の出現

(2) 光照射によるグリオキシゾーム酵素活性
の低下、消失

(3) 光照射による両マイクロボディに局在す
る酵素の変動

(1) に関しては既にフィトクローム、青色光吸
収色素の関与が報告されているが、(2)、(3) に関
しては、ほとんど解析が進んでいない。本研究か
ら、両マイクロボディに局在する CAT の活性が
光照射により減少すること、その活性の減少は
CAT 分子の低活性型 (前駆体) から活性型への転
換が阻害されていることが明らかにされており、
(3) においても、光による調節機構が作動してい
ることが判明している。また (1) に関しても、従
来酵素活性の増減のみから解析されており、酵素
タンパク質の量やその特異的 m-RNA 量のレベ
ルの解析が必要とされていることを指摘しておき
たい。現在、これらのマイクロボディ酵素遺伝子
発現の光による調節を解析するため、マイクロボ
ディ酵素の cDNA クローニングを行っており、
既にいくつかの特異クローンを得ている。今後、
単離オルガネラ、特異抗体、特異 cDNA クロー
ンを用いて多面からマイクロボディ変換機構を解
析し、その調節機構の解明を目指していきたい。

文 献

- 1) Nishimura, M., Akhmedov, Y. D., Strzalka, K.
and Asazawa, T.: Purification and character-
ization of glycolate oxidase from pumpkin
cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.*, 222, 397-
402 (1983).
- 2) Nishimura, M., Akhmedov, Y. D., and Aka-
zawa, T.: Molecular structure and subcellular
localization of spinach leaf glycolate oxidase.
Photosynthesis Research, 44, 99-109 (1983).
- 3) Yamaguchi, J. and Nishimura, M.: Purification
of glyoxysomal catalase and immunochemical
comparison of glyoxysomal and leaf peroxi-
somal catalase in germinating pumpkin coty-
ledons. *Plant physiol.*, 74, 261-267 (1984).

- 4) Nishimura, M., Yamaguchi, J., Mori, H. and Akazawa, T.: Biosynthesis of glyoxysomal and leaf peroxisomal enzymes in pumpkin cotyledons. In S. Seno and Y. Okada, eds., Proc. International Cell Biology 1984. The Japan Society for Cell Biology, p. 288 (1984).
- 5) Yamaguchi, J., Nishimura, M. and Akazawa, T.: Maturation of catalase precursor proceeds to different extent in glyoxysomes and leaf peroxisomes of greening pumpkin cotyledons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 4809-4813 (1984).
- 6) Beevers, H.: Microbodies in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 159-193 (1979).

研究発表

- 1) Nishimura, M., Douce, R. and Akazawa, T.: A simple method for estimating intactness of spinach leaf protoplasts by glycolate oxidase assay. *Plant Physiol.*, **78**, 343-346 (1985).
- 2) Nishimura, M., Yamaguchi, J., Mori, H., Akazawa, T. and Yokota, S.: Immunocytochemical analysis shows that glyoxysomes are directly transformed to leaf peroxisomes during greening of pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.*, **81**, 313-316 (1986).
- 3) Yamaguchi, J., Nishimura, M. and Akazawa, T.: Purification and characterization of low activity form of catalase from greening pumpkin cotyledons. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 315-322 (1986).
- 4) Yamaguchi, J., Nishimura, M., and Akazawa, T.: Distribution of 59- and 55-kDa catalase in dark- and light-grown pumpkin and various other plant tissues. *Plant Cell Physiol.*, **28**, 219-226 (1987).
- 5) Yamaguchi, J., Mori, H., Nishimura, M.: Biosynthesis and intracellular transport of glyoxysomal malate dehydrogenase in germinating pumpkin cotyledons. *FEBS Letters*, **213**, 329-332 (1987).
- 6) 山口淳二: 脂肪性種子子葉におけるマイクロボディ変換の機構解明の鍵になるか? 不活性型カタラーゼの存在, *化学と生物*, **23**, 491-493 (1985).
- 7) 西村幹夫: マイクロボディの機能的変換機構, 蛋白質, 核酸, 酵素, 別冊“植物の細胞生物学的研究法-植物細胞の構築と形成機構”, 印刷中 (1987).
- 8) Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. and Akazawa, T.: Preparation of protoplasts from plant tissues for organelle isolation. *Methods in Enzymol.*, **148**, 27-34 (1987).
- 9) Nishimura, M.: Microbody transition from glyoxysomes to leaf peroxisomes in greening pumpkin cotyledons. Invited lecture, Univ. of Paul Sabatier, Toulouse, France, June 1985.
- 10) 西村幹夫, 山口淳二, 森 仁志, 横田貞記, 赤沢 堯: 植物マイクロボディの生合成—catalaseの生合成と細胞内輸送を中心として— 日本生化学会大会, シンポジウム“蛋白質の膜透過と局在化の分子機構” 仙台, 昭和60年9月.
- 11) 山口淳二, 森 仁志, 西村幹夫, 赤沢 堯, 横田貞記: マイクロボディ変換機構の解析—組織化学的アプローチ— 日本植物生理学会年会, 仙台, 昭和61年3月.
- 12) 森 仁志, 西村幹夫, 赤沢 堯: マイクロボディ変換機構の解析—リンゴ酸合成酵素遺伝子の単離とクローニング— 日本植物生理学会年会, 仙台, 昭和61年3月.
- 13) 森 仁志, 山口淳二, 西村幹夫, 赤沢 堯: 植物マイクロボディ酵素のcDNAクローニング 日本生化学会大会, 大阪, 昭和61年9月.
- 14) Nishimura, M., Yamaguchi, J., and Mori, H.: Regulatory mechanisms of microbody transition in greening pumpkin cotyledons. The Oji International Seminar “New Aspects of Plant Cell Biology and Molecular Biology,” Kashikojima, Japan, Oct. 1986.
- 15) Mori, H., Yamaguchi, J., and Nishimura, M.: Biosynthesis and transport of microbody enzymes in pumpkin cotyledons. Gordon Research Conference “Agricultural Science”, Santa Barbara, Calif., U. S. A., Jan. 1987.
- 16) Nishimura, M.: Regulation of gene expression during photoinduced microbody transformation in pumpkin cotyledons. International Frontier Research Forum “Photocontrol of Gene Expression”, Wako, Japan, March 1987.
- 17) 森 仁志, 西村幹夫, 赤沢 堯: マイクロボディ酵素の遺伝情報発現機構の解析 日本植物生理学会年会, 浦和, 昭和62年3月.
- 18) Mori, H. and Nishimura, M.: *In vitro* translocation of glyoxysomal malate synthase into glyoxysomes and peroxisomes. The Fourth International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Satellite Symposium “New Aspects of Study on Peroxisome Diseases”, Hakone, Japan, May 1987.