

## 光によるマイクロボディ機能転換の分子機構

### Molecular Mechanisms on Light Dependent Microbody Transition

研究代表者 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所教授 西村 幹夫  
Prof., Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology  
Mikio Nishimura

共同研究者 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所助手 林 誠  
Res. Assoc., Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology  
Makoto Hayashi

ピサ大学 (イタリア) 生物学科研究員 Luigi De Bellis  
Res. Department of Biology, University of Pisa  
Luigi De Bellis

In germinating pumpkin seedlings, microbodies are functionally transformed to leaf peroxisomes from glyoxysomes during greening, and then converted to glyoxysomes from leaf peroxisomes during senescence. Immunocytochemical studies revealed that these microbody transformations are induced by light and occurs in preexisting cells without cell division. Functional changes at the organelle level, namely organellar differentiation, are the basis for differentiation of higher plant cells. To clarify the flexibility of differentiation of higher plant cells, we studied on molecular mechanisms underlying these microbody transformations. These microbody transformations were shown to be regulated at various levels, such as gene expression, splicing of the mRNA and degradation of microbody proteins.

#### 研究目的

植物は動物と異なり、自らを移動させることによって急激な環境変化を避けることができない。そのため、植物は環境変化に対して、動物より精微な応答系を有している。環境要因の中でも特に光は、植物の生活環の様々な段階で重要な因子として働いている。植物細胞の光による遺伝子発現応答系の制御機構を分子レベルで解析することは、植物細胞の基本的特性を理解する上で極めて重要である。脂肪性種子の子葉組織では、光照射により細胞内のオルガネラ、マイクロボディの変換現象が観察される。光照射により子葉が緑化するに伴い、糖新生に関与するグリオキシゾームから光合成に関与する緑葉パーオキシゾームへと、マイクロボディの機能的変換が生じるのである。このマイクロボディの変換現象は、動・植物を通じ、同一細胞内において、機能的変換が生じる唯一の現象として極めて注目すべきものである。緑葉子葉はその後セネッセンス（老化）してその養分を幼葉に供給して一生を終える。

私達は、この緑化子葉がセネッセンスしていくときに、逆のマイクロボディ機能変換、つまり緑葉パーオキシゾームからグリオキシ

ゾームへの変換がおきていることを明らかにし、マイクロボディの機能変換が可逆であることを証明した。本研究はこうした経緯を踏まえて、子葉の緑化及びセネッセンス時におけるマイクロボディの機能変換の分子機構を解明することにより、その可逆性を分子レベルで明らかにすることを目指すものである。このマイクロボディ機能変換はオルガネラの分化としてとらえることが出来ることから、本研究は植物細胞の分化における柔軟性及び植物細胞の環境応答の分子機構を理解していく上で基礎的知見を提供するものと期待される。

#### 研究経過

本研究は研究代表者が名古屋大学農学部に在職している際に開始したプロジェクトであり、子葉の緑化時に生ずるマイクロボディの機能変換が、グリオキシゾームから緑葉パーオキシゾームへ、直接変換していくことを明らかにした。その後神戸大学、基礎生物学研究所と転任する間の研究により、緑化子葉のセネッセンス時において、緑化時とは逆のマイクロボディ機能変換が生じることが明らかとなり、研究はこのオルガネラ分化における調

PGCS	- -	+++	+	-	- +	50
	MPTDME	LSPSNV	ARHRL	LAFLAAHL	SAASLEPPVMASSLEAHC	VSAQTMVA
WMGMDH	-	+	+	+	+	44
	MQFIPD	VNCRI	ARIS	AHL	HPPK	SQMEESSALRRANCF
CGTHIO	- +	+	++	+	-	41
	MEKAIN	RQSIL	LHLL	RPSS	SAYTN	ESSLSASVCAAGDSASY
RPTHIOA	-	+	++	+	-	44
	MSESVG	RTSAMH	RLOV	VGLHL	AGRP---	ESSALQAAPCSATFPQAS
SCTHIO		+	+++		-	38
	MSQR	LQSI	KDHL	VLSAM	GLGESKR	KNSLLEKRPEDVVI
Consensus			RLxxxxxHL		SxLxxAxCxA	

図1 高分子量前駆体として合成されるマイクロボディ酵素のN末端プレシークエンスの比較  
PGC:カボチャグリオキシゾーム局在クエン酸合成酵素、WGMHDH:スイカグリオキシゾーム局在リンゴ酸脱水素、CTHIO:キュウリ3-オクトアシル-CoAチオラーゼ、RPTHIOA:ラットパーオキシゾーム局在チオラーゼA、ACTHIO:酵母パーオキシゾーム局在チオラーゼ、2つのコンセンサス配列をボックスで記した。□はマイクロボディへの輸送に、■はプレシークエンスのプロセシングを記した。プレシークエンスのプロセシングの部位を縦線で示し、プロセシング部位のシステイン残基は太字で示した。+-は、それぞれ+または-に荷電しているアミノ酸を示した。

節機構の解明に移っている。私達は、既に7種類のマイクロボディ酵素の精製、特異抗体の調製を終了し、そのうち5種の酵素に関しては、そのcDNAクローニングと構造解析を完了している。緑化過程におけるマイクロボディの機能変換は、(a)グリオキシゾーム酵素活性の照射による低下と消失、(b)緑葉パーオキシゾーム酵素活性の照射による出現、(c)両マイクロボディに局在する酵素活性の照射による変動という3つの現象として理解できる。今回は、特に(a)と(b)の現象を中心に解析を加えた。

## 研究成果

### 1. タンパク質輸送レベルの調節

マイクロボディ酵素は遊離ポリゾームで合成され、マイクロボディに輸送されて後、機能を発現する。グリオキシゾームと緑葉パーオキシゾームのタンパク質輸送系が異なれば、両マイクロボディを構成する酵素組成が異なってくる。つまり、両マイクロボディのタンパク質輸送系が異なることにより、マイクロボディの機能変換が生じることも考えられる。そこで私達はマイクロボディへのタンパク質輸送シグナルを解析した。

マイクロボディへのタンパク質輸送におけるシグナルとして、以下に示す2種類がよく知られている。1つは、細胞嚙質で翻訳される際、成熟型タンパク質と同じ分子量で合成されるタンパク質である。このタイプのタンパク質には、C末端に比較的よく保存されたトリペプチド(Ser/Ala)-(Lys/Arg/His)-Leuが存在する。私達は、Ser-Arg-LeuというC末端配列をもつリンゴ酸合成酵素とβ-グルコシダーゼの融合タンパク質をシロイヌナズナで発現させ、黄化子葉、緑葉の各組織における発現産物の局在性を検討した。黄化子葉にはグリオキシゾーム、緑葉には緑葉パーオキシゾームが存在するので、このC末端がグリオキシゾームと緑葉パーオキシゾームという機能の異なる両マイクロボディへの輸送シグナルとして働くか否かを明らかにするためであ

る。免疫電子顕微鏡観察により上に示したどの組織において発現した融合タンパク質はマイクロボディに局在することが判明した。この知見は、リンゴ酸合成酵素のC末端シグナルは、どちらのマイクロボディにたいしても輸送シグナルとして機能することを示しており、C末端シグナルに関してグリオキシゾームと緑葉パーオキシゾームのタンパク質輸送系に違いが見られないことを示している。

マイクロボディのタンパク質輸送機構として知られているもう1つは、タンパク質の翻訳時に高分子量前駆体タンパク質として合成される酵素群である。この輸送シグナルはN末端延長配列付近に存在し、マイクロボディへの輸送される際に、N末端延長配列が切断・除去される。植物のマイクロボディタンパク質のうちこのような機構によって輸送されるものには、リンゴ酸脱水素酵素、β酸化系のチオラーゼ及びクエン酸合成酵素などがある。これらのN末端延長配列には、相同性の高い部分が2カ所存在する(図1)。C末端のシグナルと同様に、クエン酸合成酵素のN末端延長配列とβ-グルコシダーゼの融合タンパク質及び様々なアミノ酸置換した融合タンパク質を発現させることにより、1) N末端延長配列がマイクロボディへの輸送シグナルとして働いていること、2) 相同性の高い2つの部分のうち、N末端に近い部分がマイクロボディへの輸送シグナルとして働いており、N末端から遠い方の相同配列は延長配列のプロセシングに関与していることを明らかにした。C末端シグナルと同様に、このシグナルもグリオキシゾーム及び緑葉パーオキシゾームへの輸送シグナルとして機能することが、免疫電子顕微鏡観察により明らかとなった。現在のところ、いずれのシグナルも両マイクロボディへの輸送シグナルとなることから、これらの輸送シグナルによるタンパク質輸送系の違いによって、マイクロボディの機能転換が生じている可能性は少ないと言えよう。しかし、別のタンパク質の輸送レベルで

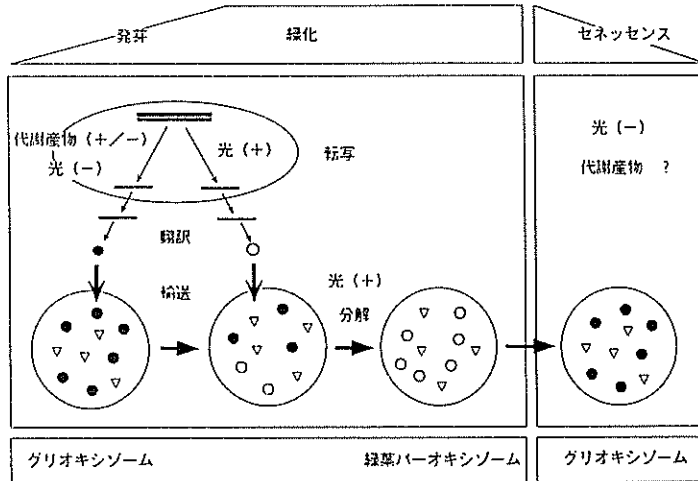


図2 発芽種子にみられるマイクロボディ機能転換の調節機構  
○；グリオキシソーム特異的な酵素、●；緑葉パーオキシソームに特異的な酵素、▽；両マイクロボディに局在する酵素。

の調節系の存在があきらかとなった。

## 2、alternating splicing による調節

ヒドロキシビルビン酸レダクターゼは緑葉パーオキシソーム酵素であり、緑化過程においてマイクロボディ内に誘導されてくる。この酵素の cDNA クローニングを試みたところ 2 種類の cDNA が単離された。塩基配列から推定されるタンパク質の一次構造は、それらの C 末端が異なっており、1 つが Ser-Lys-Leu 配列をもたないのに対し、もう 1 つは Ser-Lys-Leu 配列を有することが判明した。genomic DNA の解析から、これらの mRNA は、1 つの遺伝子が alternative splicing されることにより生じていることが判明した。得られた結果は、alternative splicing より、細内局在性の違う 2 種類のヒドロキシビルビン酸レダクターゼが合成されてくることを示しており、マイクロボディ機能転換に、mRNA のスプライシングという新たな調節機構の存在が浮上してきている。葉緑体ストロマ及びチラコイド結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼも、同様に alternative splicing より局在性の異なるタンパク質として合成されることが明らかとなり、光照射によって、alternative splicing が調節されている可能性が示唆され、高等植物の新たな光調節機構として注目される。

## 3、遺伝子発現及びタンパク質の分解による調節

グリオキシソーム酵素と緑葉パーオキシソーム酵素の cDNA を用いて、それらの mRNA 量の変動を調べると、グリオキシソーム酵素の減少消失は、1 つには光照射によるグリオキシソーム酵素 mRNA 量の減少消失により生じることが明らかである。一方、緑葉パーオキシソーム酵素の mRNA 量は発芽後低いレベルに抑えられているが、光照射後急激に増大した。このようにグリオキシソーム酵素と緑葉パーオキシソーム酵素 mRNA のアンチパラレルな変動は、マイクロボディ機能転換が、遺伝子発現レベルで調節されていることを明確に示している。

一方、光照射によりグリオキシソーム酵素 mRNA 量が減少消失することは、グリオキシソーム酵素の新たな合成を抑制することになるが、既に存在しているグリオキシソーム酵素を分解する必要がある。現在このグリオキシソーム酵素の分解に関しては、*in vitro* のタンパク質輸送系の研究から得られている。リンゴ酸合成酵素を変換時のマイクロボディに導入した場合、同酵素の分解が観察されたが、グリオキシソームや緑葉パーオキシソームに導入した場合は分解されなかった。この知見から、光照射にともない、マイクロボディ内にグリオキシソームに特異的な酵素の分解系が誘導され、グリオキシソーム内でその分解が生じていることが示唆されている。この分解を担うプロテアーゼの実体は明らかになっていないが、最近動物細胞マイクロボディ内にインシュリン分解活性をもつプロテアーゼの存在が報告されており、植物におけるその遺伝子ホモログの解析を進めている。今後の課題と発展

マイクロボディ機能転換に働く調節は遺伝子発現、スプライシング、タンパク質の分解等、多くのステップで行われている。図 2 にその概要を示した。今回は、マイクロボディのマトリックスに局在する酵素群の変動を中心に解析した。最近私達はグリオキシソーム膜から分子量 31 k (MP 31) と 28 k (MP 28) の膜タンパク質を単離精製した。これらの特異抗体を用いて、マイクロボディ機能活性に伴うこれらの膜タンパク質の変動を調べたところ、MP32, 28 も緑化に伴い減少し、特に MP28 は完全に消失してしまうことが明らかとなった。この事実は、マイクロボディ膜も機能転換に伴い大きく変動していることを明確に示している。こうした膜タンパク質の分解はどのように行われているかも、今後に残された興味深い課題である。

マイクロボディの機能転換として、緑化過程におけるグリオキシソームから緑葉パーオキシソームへの転換を中心に解析を加えてい

る。しかしながらこれとまったく逆の機能転換がセネッセンス時に観察される。この場合、緑化過程で観察された調節メカニズムが可逆的にセネッセンス時に働くことにより、逆の機能転換が生じてくるのだろうか。マイクロボディの可逆的な機能転換の分子機構の全容を明らかにすることが、植物細胞分化の柔軟性の解明につながっていくとの観点から、研究を更に発展させていきたい。

#### 発表論文リスト

- 1) De Bellis, L., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I., Alpi, A. and Nishimura, M.: Immunological analysis of aconitase in pumpkin cotyledons: The absence of aconitase in glyoxysomes. *Physiol. Plant.* 90, 757-762 (1994).
- 2) Strzalka, K., Tsugeki, R. and Nishimura, M.: Heat shock induces synthesis of plastid-associated hsp 70 in etiolated and greening pumpkin cotyledons. *Folia Histochem. Cytobiol.* 32, 45-49 (1994)
- 3) De Bellis, L., Hayashi, M., Nishimura, M. and Alpi, A.: Subcellular distribution of aconitase isoforms in pumpkin cotyledons. *Planta*, 195, 464-468 (1995).
- 4) Kato, A., Hayashi, M., Mori, H. and Nishimura, M.: Molecular characterization of a glyoxysomal citrate synthase that is synthesized as a precursor of higher molecular mass in pumpkin. *Plant Mol. Biol.*, 27, 377-390 (1995).
- 5) Yamaguchi, K., Takeuchi, Y., Mori, H. and Nishimura, M.: Development of microbody membrane proteins during the transformation of glyoxysomes to leaf peroxisomes in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol.*, 36, 455-464 (1995).
- 6) Hayashi, M., De Bellis, L., Alpi, A. and Nishimura, M.: Cytosolic aconitase participates in the glyoxylate cycle in etiolated pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol.*, 36, 669-680 (1995).
- 7) Yamaguchi, K., Mori, H. and Nishimura, M.: A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin *Plant Cell Physiol.*, 36, 1157-1162 (1995).
- 8) Hayashi, M., Tsugeki, R., Kondo, M., Mori, H. and Nishimura, M.: Pumpkin hydroxypyruvate reductases with and without a putative C-terminal signal for targeting to microbodies may be produced by alternative splicing. *Plant Mol. Biol.*, 30, 183-189 (1996).
- 9) Yamaguchi, K., Hayashi, M. and Nishimura, M.: cDNA cloning for thylakoid-bound ascorbate peroxidase in pumpkin and its characterization. *Plant Cell Physiol.*, 37, 405-409 (1996).
- 10) Hayashi, M., Aoki, M., Kondo, M., Kato, A. and Nishimura, M.: Transport of chimeric proteins containing carboxy-terminal targeting signal into microbodies of transgenic Arabidopsis. *Plant J.*, 10, 225-234 (1996).
- 11) Kato, A., Hayashi, M., Takeuchi, Y. and Nishimura, M.: cDNA cloning and expression of a gene for 3-ketoacyl-CoA thiolase in pumpkin

- cotyledons. *Plant Mol. Biol.*, 31, 843-852 (1996)
- 12) Kato, A., Hayashi, M., Kondo, M. and Nishimura, M.: Targeting and processing of a chimeric protein with the amino-terminal presequence of the precursor to glyoxysomal citrate synthase. *Plant Cell*, 8, 1601-1611(1996).
- 13) Koumoto, Y., Tsugeki, R., Shimada, T., Kondo, M., Mori, H., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M.: Isolation and characterization of a cDNA encoding mitochondrial chaperonin 10 from Arabidopsis thaliana by functional complementation of an E. coli mutant. *Plant J.*, 10, 1119-1125 (1996).
- 14) Mano, S., Hayashi, M., Kondo, M. and Nishimura, M.: cDNA cloning and expression of a gene for isocitrate lyase in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol.*, 37, 941-948 (1996).
- 15) Nishimura, M., Hayashi, M., Kato, A., Yamaguchi, K. and Mano, S.: Functional transformation of microbodies in higher plant cells. *Cell Struc. Funct.* 21, 387-393 (1996).
- 16) Esaka, M., Yamada, N., Kitabayashi, M., Setoguchi, Y., Tsugeki, R., Kondo, M. and Nishimura, M.: cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin. *Plant Mol. Biol.*, 33, 141-155 (1997).
- 17) Mano, S., Hayashi, M., Kondo, M. and Nishimura, M.: Hydroxypyruvate reductase with a carboxy-terminal targeting signal to microbodies is expressed in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, 38, 449-455 (1997).
- 18) Hayashi, M., Aoki, M., Kondo, M. and Nishimura, M.: Changes in targeting efficiencies of proteins to plant microbodies caused by amino acid substitution in the carboxy-terminal tripeptide. *Plant Cell Physiol.*, 38, 759-768 (1997).
- 19) Mano, S., Yamaguchi, K., Hayashi, M. and Nishimura, M.: Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases are produced by alternative splicing in pumpkin. *FEBS Lett.*, in press (1997).
- 20) Kato, A., Takeda-Yoshikawa, Y., Hayashi, M., Kondo, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M.: Glyoxysomal malate dehydrogenase in pumpkin: cloning of a cDNA and functional analyses of its presequence. *Plant Cell Physiol.*, in press (1997).