

# 高等植物ミクロボディ機能調節機構の分子遺伝学的解析

Molecular genetical analysis for the functional regulation of plant microbodies

研究代表者 林 誠 Makoto Hayashi

基礎生物学研究所・細胞生物学研究系 助手

Research associates, Dept. of Cell Biol., National Institute for Basic Biology

Microbodies in higher plant cells are known to differentiate into at least three different classes, such as glyoxysomes and leaf peroxisomes, depending on the cell types. In germinating fatty seedlings, glyoxysomes that first appear in the etiolated cotyledonary cells are functionally transformed into leaf peroxisomes during greening. Subsequently, the organelles are transformed back into glyoxysomes during senescence of the cotyledons.

In order to analyze the mechanism for the functional regulation of plant microbodies by molecular genetical approach, mutant lines of Arabidopsis seedlings were screened for growth in the presence of toxic levels of 2,4-dichlorophenoxybutyric acid (2,4-DB). I obtained twelve mutants that are resistant to 2,4-DB. Four of these mutants required sucrose for postgerminative growth. Genetic analysis revealed that these mutants are classified as three independent loci, which I designated *ped1*, *ped2*, and *ped3*. *ped1* mutant lacks the thiolase protein, an enzyme involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation during germination and subsequent seedling growth, whereas *ped2* mutant has a defect in the intracellular transport of thiolase from the cytosol to glyoxysomes. Etiolated cotyledons of both *ped1* and *ped2* mutants have glyoxysomes with abnormal morphology.

## 1. 研究目的

高等植物のミクロボディには、グリオキシソームや緑葉ペルオキシソームなど生理機能の異なった状態が存在する。グリオキシソームは、黄化子葉やセネッセンスした組織に見られるミクロボディの一種で、脂肪酸 $\beta$ 酸化系およびグリオキシル酸回路の各酵素の作用により脂肪から糖新生を行う上で重要な役割を果たしている。このオルガネラは、環境シグナルや細胞分化に呼応して、光呼吸を行う緑葉ペルオキシソームへと可逆的かつ連続的に機能を変換する。このようなミクロボディの柔軟な機能変化は、動物細胞や酵母などには見られない高等植物に特徴的な性質である。

本研究は、高等植物細胞におけるミクロボディ機能変換の全体像を解明するために、分子遺伝学的手法によってミクロボディ機能発現の調節機構に関わる遺伝子の検索を目的としている。そのためには、まずなんらかのミクロボディ機能を欠損するシロイヌナズナ突然変異体を作成し、表現型の解析や変異遺伝子の同定を行う必要がある。今回は、ミクロボディ機能のうち特にグリオキシソームの脂肪酸 $\beta$ 酸化系に着目し、この代謝機能を欠損する突然変異体の単離を行うことにした。グリオキシソーム機能欠損突然変異体は、グリオキシソームの機能構築に関与する遺伝子に変異が起きたと考えられ、高等植

物におけるグリオキシソーム機能の調節機構、ひいてはミクロボディ機能変換の制御機構を解析するうえで絶好の材料を提供することが期待される。そこで、得られた突然変異体におけるグリオキシソームの機能や構造を解析するとともに、変異遺伝子の分子遺伝学的解析を行った。これらの結果をもとに、ミクロボディ機能変換の制御機構についても考察を加えたい。

## 2. 研究経過

2-1. 2,4ジクロロフェノキシ酪酸(2,4DB)耐性突然変異体の選抜

エチルメタンスルホン酸により突然変異を誘発したシロイヌナズナの種子を、0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  2,4DBを含む寒天培地上で発芽させ、根が正常に伸長する個体を選抜した。

2-2. スクローズ要求性の解析

2,4DB耐性突然変異体の種子を、スクローズを含まない寒天培地に播種し、連続光下、22°Cで一週間培養し、発芽試験を行った。

2-3. 突然変異体における各種グリオキシソーム酵素のイムノプロット解析

暗所で5日間発芽させた突然変異体から得た粗抽

出液を SDS ゲル電気泳動後、イムノブロット法により解析した。解析を行った酵素は、本研究で新たに抗体を作製したアシル Co A 酸化酵素やリンゴ酸脱水素酵素を含む 8 種類のグリオキシソーム酵素と 2 種類の緑葉ペルオキシソーム酵素である。

#### 2-4. 突然変異体の遺伝学的解析

突然変異体の相補性テストを行い、変異遺伝子座の同定をした。

##### 変異遺伝子座のマッピングと遺伝子の同定

変異遺伝子座の染色体上での位置を決定するために、CAPS 法や SSLP 法を用いて変異遺伝子と各遺伝子マーカーとの距離を測定した。さらに、変異遺伝子座を含む領域をカバーする BAC クローンコンティグを解析し、ゲノムウォーキングによって遺伝子の同定を試みた。

#### 2-5. グリオキシソームの形態学的観察

暗所で 5 日間発芽させた突然変異体のグリオキシソームの形態を調べるため、電子顕微鏡観察およびチオラーゼ抗体およびイソクエン酸リアーゼ抗体を用いた免疫電顕観察を行った。

#### 2-6. ショ糖密度勾配遠心法による細胞分画

暗所で 5 日間発芽させた突然変異体をチョッピング法により破碎し、ショ糖密度勾配遠心により分画した。得られた各画分を SDS ゲル電気泳動後、イムノブロット法により解析した。

### 3. 研究成果

#### 3-1. 脂肪酸 $\beta$ 酸化系欠損突然変異体の同定

野生型シロイヌナズナは、2, 4 ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4 DB) を含む寒天培地で生育させると、根の成長が著しく阻害される。これは、脂肪酸  $\beta$  酸化系の働きにより、2, 4 DB が除草剤 2, 4 ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4 D) へと代謝されるからである。そこで、約 70, 000 のシロイヌナズナ突然変異体から 2, 4 DB 存在下でも根が正常に伸長する突然変異体を 12 個体選抜した (図 1 A 参照)。これらの 2, 4 DB 耐性突然変異体のうち 4 個体は、スクロースを含まない寒天培地では正常に発芽しない (図 1 B)。しかしながら、スクロースを含む培地では正常に発芽し、いったん光合成能を獲得すると、野生型よりやや矮性を示すものの、スクロースを与えなくても独立栄養的に生育する。脂肪酸  $\beta$  酸化系は、発芽初期に種子貯蔵脂肪を成長に必要なスクロースに変換する上で中心的役割を果た

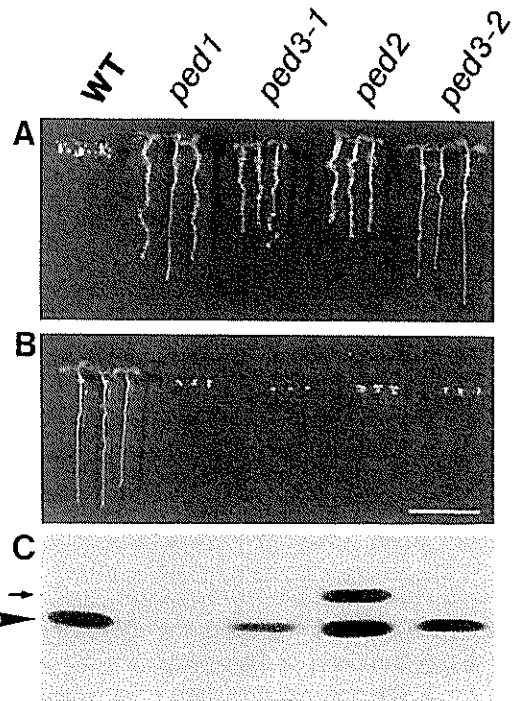


図 1 脂肪酸  $\beta$  酸化系欠損突然変異体の同定

A. 2, 4 DB 存在下における野生型 (WT) および各突然変異体の成長。B. スクロース非存在下における発芽試験。C. チオラーゼ抗体を用いたイムノブロット解析。

す。従って、2, 4 DB に耐性を示し、かつ発芽に際してスクロース要求性を示す突然変異体は、脂肪酸  $\beta$  酸化活性を欠損することが強く示唆される。

スクロース要求性を示す 4 つの突然変異体について各種グリオキシソーム酵素のイムノブロット解析を行ったところ、これら突然変異体のうちには、脂肪酸  $\beta$  酸化系酵素の 1 つであるチオラーゼを欠損する突然変異体や成熟型チオラーゼに加えて、高分子量前駆体型と思われるチオラーゼが蓄積する突然変異体が含まれていることが明らかとなった (図 1 C)。そこで、以降これら 4 つの突然変異体について詳細な検討を行うことにした。

#### 3-2. 遺伝子の解析

遺伝学的な解析の結果、これら 4 つの突然変異体は 3 つの異なる遺伝子座に変異が生じていることが判明し、それぞれの突然変異体を *ped1*、*ped2*、*ped3-1*、*ped3-2* と命名した (図 1 参照)。次に、これら 3 つの遺伝子座のマッピングを行った。その結果、*PED1* 遺伝子座は 2 番染色体の COP1 マーカー近傍、

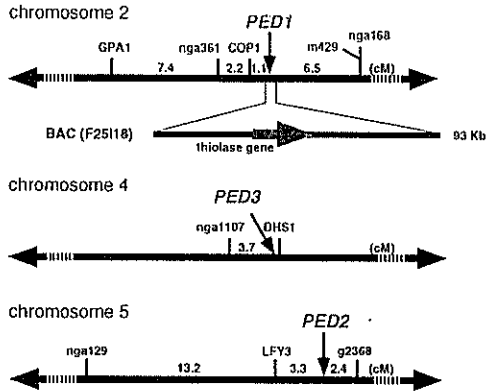


図2 *PED1*、*PED2*、*PED3*の染色体上での位置  
各遺伝子の座乗染色体及び遺伝子マーカーからの距離を示す。*PED1* 遺伝子座をカバーするBACクローンにはチオラーゼ遺伝子が存在する。

*PED2*は5番染色体のg2368マーカー近傍、*PED3*は4番染色体のDHS1マーカー近傍に、それぞれ位置することが明らかになった(図2)。*PED1*遺伝子座については、さらにBACクローンコンテイングの解析を行った。その結果、*PED1*遺伝子座をカバーするBACクローン(F25I18)にチオラーゼ遺伝子が含まれていること、*ped1*突然変異体のチオラーゼ遺伝子は、第4エクソン内にフレームシフト突然変異が存在することが判明した。*PED2*および*PED3*遺伝子座については、現在クロモソームウォーキングを行っている。

### 3-3. 突然変異体におけるグリオキシソーム構造の変化

図3Aは、*ped1*突然変異体を免疫電顕法によって観察した結果を示している。この突然変異体はチオラーゼを欠損するため、チオラーゼ抗体では染色できない。しかしながら、我々が作製した他のグリオキシソーム酵素に対する抗体を用いた場合に染色されるグリオキシソームは、直径約1 $\mu$ mで内部構造の均一な野生型グリオキシソームと比較して、直径が2~4倍大きく内部にチューブ状の構造体を含む。

一方、*ped2*突然変異体のグリオキシソームは、野生型のグリオキシソームよりも小さく潰れている(図3B)。ショ糖密度勾配遠心法によって細胞分画を行った結果、この突然変異体のグリオキシソームが野生型よりも密度が軽いこと、グリオキシソーム内には成熟型チオラーゼのみが局在しており、高分子量前駆体型チオラーゼは細胞基質に存在することが明らかになった。さらに細胞基質には高分子量前

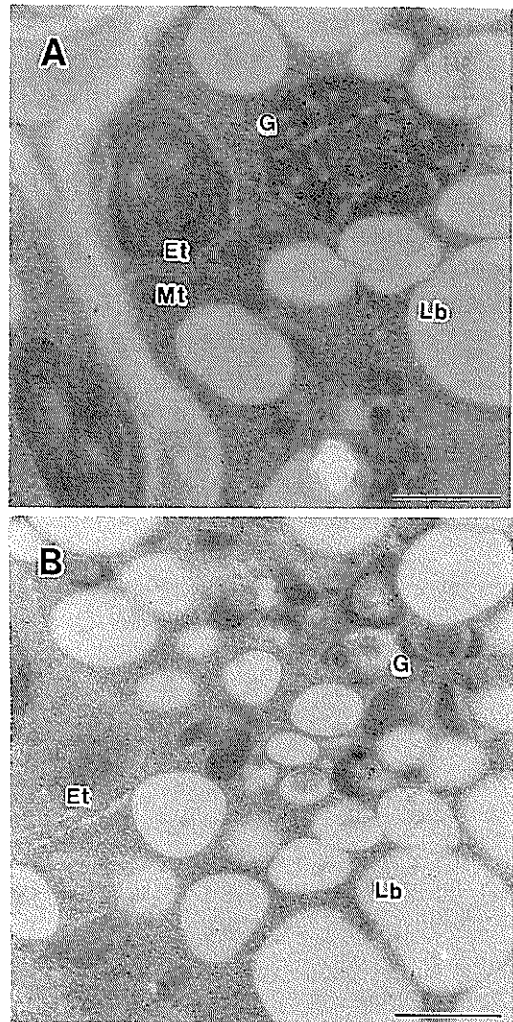


図3 *ped1*、*ped2*突然変異体の免疫電子顕微鏡観察  
A. 暗所で5日間発芽させた*ped1*突然変異体の子葉をイソクエン酸リアーゼ抗体で染色した結果。B. 暗所で5日間発芽させた*ped2*突然変異体の子葉をチオラーゼ抗体で染色した結果。G;グリオキシソーム、Et;エチオプラスト、Mt;ミトコンドリア、Lb;リピッドボディ。バーは1 $\mu$ m。

駆体型リンゴ酸脱水素酵素も蓄積していることも明らかになっている。

### 3-4. 考察

今回の助成による研究の結果、2、4DBによるスクリーニングがグリオキシソームの脂肪酸 $\beta$ 酸化系活性を維持するために必要な遺伝子座の遺伝学的同定に有効であることが示され、実際に脂肪酸 $\beta$ 酸

化系活性を欠損すると考えられる3種の突然変異体が得られた。これらのうち、*ped1*突然変異体は、チオラーゼ遺伝子に生じた変異のためチオラーゼを欠損していた。そのため、脂肪酸 $\beta$ 酸化系活性を失った結果、グリオキシソームの構造変化を引き起こしたと考えられる。一方*ped2*突然変異体は、高分子量前駆体型タンパク質をグリオキシソームへ輸送する機構に変異が生じていることが示唆される。そのため、チオラーゼをはじめ高分子量前駆体で合成される一群のグリオキシソームタンパク質が欠損し、グリオキシソームの形態異常や密度変化をもたらしているのであろう。これら成果は、高等植物ミクロボディの研究において初めて得られた分子遺伝学的知見であり、論文や口頭発表において高い評価を得ている。

#### 4. 今後の課題と発展

本研究の今後の課題としては、(1) 2, 4 DBによるスクリーニングの続行と、(2) 今回得られた突然変異体より詳細な解析の2点があげられる。(1) 今回、約70, 000個の突然変異体をスクリーニングして4つの突然変異体を単離したが、同一遺伝子に突然変異を持つものは一組しかなかった。従って、2, 4 DB耐性を指標にして同定できる遺伝子座を網羅してはいないと思われる。本研究のテーマである高等植物ミクロボディの機能調節機構をよりよく理解するためには、さらにスクリーニングを行い、より多くの遺伝子座を同定する必要がある。(2) *ped1*突然変異体は、変異遺伝子の同定まで完了することができた。しかしながら、この突然変異体におけるグリオキシソームの形態変化の原因や脂肪酸の代謝産物の解析など興味ある点が未解決である。とくに、後者は植物油脂の有効利用の観点からも今後の発展が期待される。一方*ped2*および*ped3*突然変異体については、今後早急に遺伝子の単離を行い、これら遺伝子の機能を明らかにしていく必要がある。また今後、野生型および突然変異体におけるミクロボディ機能変換を比較検討し、高等植物ミクロボディの機能調節機構について考察を行いたい。

#### 5. 発表論文リスト

- (1) Hayashi, M., Aoki, M., Kondo, M. and Nishimura, M. (1997) Changes in targeting efficiencies of proteins to plant microbodies caused by amino acid sub-

stitutions in the carboxy-terminal tripeptide. *Plant Cell Physiol.* 38, 759-768.

- (2) Mano, S., Hayashi, M., Kondo, M. and Nishimura, M. (1997) Hydroxypyruvate reductase with a carboxy-terminal targeting signal to microbodies is expressed in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 38, 449-455.
- (3) Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M. and Nishimura, M. (1998) 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of Arabidopsis have defects in glyoxysomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Plant Cell* 10, 183-195.
- (4) Hayashi, H., De Bellis, L., Yamaguchi, K., Kato, A., Mano, S., Hayashi, M. and Nishimura, M. (1998) Molecular characterization of a glyoxysomal long-chain acyl-CoA oxidase that is synthesized as a precursor of higher molecular mass in pumpkin. *J. Biol. Chem.* 273, 8301-8307.
- (5) Kato, A., Takeda-Yoshikawa, Y., Hayashi, M., Kondo, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (1998) Glyoxysomal malate dehydrogenase in pumpkin: cloning of a cDNA and functional analyses of its presequence. *Plant Cell Physiol.* 39, 186-195.
- (6) Nishimura, M., Hayashi, M., Toriyama, K., Kato, A., Mano, S., Yamaguchi, K., Kondo, M. and Hayashi, H. (1998) Peroxisome Defective Mutants of Arabidopsis. *J. Plant Res.* 111, 329-332.
- (7) Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Kato, A., Mano, S., De Bellis, L., Ishimaru, Y., Yamaguchi, K., Hayashi, H. and Nishimura, M., (1998) Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochem. Biophys.*, submitted.
- (8) Kato, A., Hayashi, M., Kondo, M. and Nishimura, M. (1998) Transport of peroxisomal proteins that are synthesized as large precursors in plants. *Cell Biochem. Biophys.*, submitted.