講座

遺伝子工学実験講座

Ⅲ. オルガネラの生合成

上領達之

広島大学総合科学部

730 広島市中区東千田町1-1-89

Key Words : organelle, protein translocation, targeting signal

1. オルガネラ研究の視点

1.1 オルガネラの生合成 (biogenesis)

まずオルガネラを「真核性細胞に特有な、分化した膜系」と定義する。一般に真核性細胞は原核性細胞よりも大きい。今、仮に直径で10倍大きいとすれば、体積では1000倍、表面積では100倍大きくなる。言い換えれば単位細胞質(体積)当たりの細胞膜(表面積)の比率が10分の1に低下したことになる。細胞機能の発現には、その表裏、内外に秩序性を構築する膜系の存在が不可欠である。その根源的な表現としてATPの生産を考えればよく分かる。原核性細胞における細胞質と細胞膜の比率が細胞質機能の発現に必要な量的関係にあるとすれば、これよりも直径で10倍大きい(真核性)細胞にとってその細胞膜は必要な膜系の10分の1にしかならないことになる。その不足分を補うために大型(真核性)細胞はその内部に新たな膜系を発達させた。この新たな膜系の起源がその細胞に取り込まれた他の小型(原核性)細胞であるというようなこともあったであろう。いずれにしてもこのような新たな膜系が真核性細胞の進化に伴って機能分化したものが今日のオルガネラであると考えられる。「オルガネラの生合成」を「分化した膜系の形成」と言い換えるならば、それは個々のオルガネラについてその膜を構成する脂質成分と、膜とそれによって囲まれた空間のすべてに存在する蛋白質成分の特性がいかに決定される

かという問題に帰着する。もっと簡単に言えば、オルガネラを構成する脂質成分と蛋白質成分の合成と局在化の問題である。

1.2 リン脂質と蛋白質

特定のオルガネラへの固有蛋白質の局在化にその膜のリン脂質成分が深く関与していることを示唆する報告¹⁾がある。これによるとウシ副腎皮質のミトコンドリア蛋白質、アドレノドキシンの前駆体は、ミトコンドリアのリン脂質から調製したリボソームには結合したが、ミクロソームのリン脂質で作ったリボソームには結合しなかった。さらに、この前駆体はカルジオリピンを含む人工的リボソームには効率よく結合したが、他のリン脂質で調製したリボソームには結合しなかった。この結果は固有蛋白質の局在化の決定因子として脂質の局在化が重要なテーマになることを意味している。しかし今日、脂質の局在化に関して語るべきことはまだきわめてわずかしかなないので、ここでは蛋白質の局在化という問題に焦点を絞ることにする。

1.3 核遺伝子とオルガネラ遺伝子

オルガネラに局在する蛋白質には細胞質で合成されてオルガネラに輸送されるものと、オルガネラ内で合成されるものとの2種類がある。ミトコンドリアやクロロプラストのようにオルガネラ固有の遺伝子とその発現系を備えている例があるからである。哺乳動物のミトコンドリアゲノムとゼニゴケやタバコのクロロプラストゲノムの完全な塩基配列がすでに決定されており、それらの複製や発現の調節機構には興味深いものがある。これらのテーマも「オルガネラの生合成」の一部として扱われるべきであるが、話題があまりに

[†] Introduction to Genetic Engineering. Ⅲ. Biogenesis of organelles. Tatsuyuki KAMIRYO: Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, Higashisenda-machi, Hiroshima 730, Japan.

も散漫になるのでここではその重要性を指摘するに止める。固有ゲノムを持っているオルガネラにおいても大部分の蛋白質は他のオルガネラと同様、細胞質で合成され、何らかの機構で個々のオルガネラに輸送されたものである。そこで本稿では細胞質で合成された蛋白質の局在化を問題にしていきたい。

2. 固有蛋白質の局在化

2.1 蛋白質輸送の形式

蛋白質の局在化、細胞内輸送機構を考えるうえでの出発点は Blobel と Dobberstein によって提唱されたシグナル仮説²⁾である。分泌性蛋白質である免疫グロブリン κ 鎖やプロラクチン(黄体刺激ホルモン)の脾臓ミクロソームへの無細胞輸送実験を基にしたこの仮説によれば、細胞内の膜を通過し、またはその膜に組み込まれる蛋白質は約20残基の疎水性アミノ酸から成るシグナルペプチドをそのN末端に付加した、分子量の大きな前駆体として合成される。前駆体の合成の過程で、翻訳の完了したシグナルペプチド部分がシグナル認識粒子と呼ばれるリボ核蛋白粒子(SRP)に結合すると前駆体の翻訳が一時中断される³⁾(図1, C)。この間に SRP は細胞内膜小胞(ER)上にある SRP 受容体と結合しさらに翻訳途中のリボソームそのものが ER 上に仮想されたリボソーム受容体に結合する(図1, D)。受容体と結合した SRP から遊離されたシグナルペプチドはその疎水性性質によって ER 膜を貫通してこれに続くC末端側の部分の膜通過を可能にする。シグナルペプチド自体は ER 内腔にあるシグナルペプチダーゼによって切断される。その後分泌蛋白質ではC末端までが完全に ER 内腔へ輸送され、膜局在性蛋白質で

はその途中で膜に保持されると考える(図1, 右部分)。この仮説の中の SRP とその受容体の存在は実証され、その構造的解析も進んでいる³⁾。リボソーム受容体はまだ仮定の段階であるが、新たに ER にあって SRP に替ってシグナルペプチドと特異的に結合する蛋白質(シグナル配列受容体)の存在が明らかになった⁴⁾。

この仮説は分泌蛋白質の輸送に関して提唱されたものであったが、大腸菌のペリプラズムやミトコンドリアなどのオルガネラに輸送される蛋白質の多くが輸送の過程で切断される伸長ペプチドを持つ前駆体として合成されていることから、これらの蛋白質に対してもシグナル仮説を拡張して解釈する時期があった。しかし分泌蛋白質の輸送がその翻訳の中断と再開に依存して、すなわち翻訳と共役して行われるのに対し、大腸菌やミトコンドリアなどでの輸送が翻訳の完了後に行われることが示されると、一転して両者における輸送の形式を峻別するようになった。ところが、酵母の分泌蛋白質である α 因子前駆体についての研究⁵⁾などによって、分泌蛋白質の輸送が翻訳との共役を必ずしも必要としていないことが明らかにされてくるにつれ、最近では翻訳と共役した輸送と翻訳完了後の輸送との間に本質的な差異を認めないという考え方が支配的になりつつある⁶⁾。一方、N末端にある伸長ペプチドの切断の有無も輸送の形式を区別する指標にされていた。ミトコンドリアの外膜に局在する蛋白質は末端ペプチドの切断を受けないからである。しかし現在では、この区別も重要なものとは考えられていない⁷⁾。今日最も有力な考え方は、蛋白質(少なくともそのN末端部分)が膜を通過するためにはその分子が一時的な変性

図1 シグナル仮説の模式図

左は分泌蛋白質についてのモデル。右は膜結合型蛋白質についてのモデル(文献³⁾より改変)

状態をとっていることが必要であり、そのような状態を作り出すために ATP が要求されるというものである⁹⁾。翻訳の途中では蛋白質が本来の高次構造をとっていないことは明瞭であり、また末端伸長ペプチドを持つ前駆体蛋白質はその切断によって生じた成熟蛋白質より高次構造をとり難いことを示す結果もある⁹⁾。

2.2 膜通過の不可逆性

一般に蛋白質の膜通過過程は不可逆的であるが、それがどのような機構によるものであるかは必ずしも明らかでない。細菌の外膜蛋白質、ミトコンドリアやクロロプラストの蛋白質の大部分のもの、および ER 膜へ輸送される分泌性蛋白質と膜結合性蛋白質は輸送の過程で N 末端ペプチドの切断を受けるのでこの過程は必然的に不可逆である。しかし核、ミトコンドリアの外膜、およびペルオキシソームへ輸送される蛋白質は輸送の前後で分子量的変化を受けないことが一般的であるから、輸送過程の不可逆性を保障するためには何らかの別の機構が必要である。ペルオキシソームの蛋白質はほとんど例外なく一種類のサブユニットから成る多量体を形成しているので、単量体から多量体への

変化が不可逆性の起源である可能性がある。もちろん輸送過程に必要とされる変性状態を作り出す機構が膜の細胞質側にだけ存在すると考えればこの不可逆性を統一的に理解することができる。事実最近、酵母細胞質に存在するストレス蛋白質の一種である hsp 70 (分子量が約 70 000 のヒートショック蛋白質) が ER 膜系とミトコンドリアのどちらへ輸送される蛋白質に対しても共通の“unfoldase”として機能している可能性が示された^{10), 11)}。

2.3 ミトコンドリア蛋白質の局在化信号

個別膜系蛋白質の局在化信号の一例としてミトコンドリア蛋白質の場合を紹介する。ミトコンドリアには 4 種類の内部区域がある。外膜、内膜、内外両膜間の空間および内膜内部（マトリクス）である。このいずれの区域に輸送される蛋白質も内外両膜が互に接している部分（contact site または adhesion site と呼ばれる）からミトコンドリア内に入るらしい。この両膜の接点付近にミトコンドリアに輸送されるすべての蛋白質に共通な輸送信号（図 2、共通信号）を認識する受容体の存在が仮定されている。外膜蛋白質は外膜保持

輸送蛋白質	局在部位	各蛋白質 N 末端の輸送信号配列
アルコール脱水素酵素 III	マトリクス	<p>共通信号 切断点</p> <p>MLRTSSLFTRRVQPSLFERNILRLQST</p> <p>1 10 20</p>
シトクロム c 酸化酵素 サブユニット IV	内 膜	<p>共通信号 切断点</p> <p>MLSLRQSIRFFKPATRLTLCSSRYLL</p> <p>1 10 20</p>
シトクロム c ₁	内外膜間	<p>共通信号 切断点 内膜保持信号 切断点</p> <p>MFSNLSKRWAQRTLKSFYSTATGAASKSGKLTQKLVTAGVAAAGITASTLLYADSLTAEMTA</p> <p>1 10 20 30 40 50 60</p>
70KDa 外膜蛋白質	外 膜	<p>共通信号 外膜保持信号</p> <p>MKSFITRNKTAIATVAATGTAIGAYYYYNQ LQQQQRGKK</p> <p>1 10 20 30 40</p>

図 2 ミトコンドリア蛋白質の輸送に必要とされるアミノ酸配列（輸送信号）

アミノ酸は標準の一文字表示法に基づいて表現してある。⊕は塩基性アミノ酸を、⊖は酸性アミノ酸を示し、点（・）は水酸基を持つアミノ酸を表している（文献¹²⁾より改変）

信号によって外膜に保持固定され、その輸送の過程でN末端ペプチドの切断を受けない。共通信号のみを持つ蛋白質は両膜の接点部位から直接マトリクスへ輸送され、その過程でN末端ペプチドの切断を受ける。それゆえ共通信号はマトリクスへの輸送信号と考えてもよい。この信号配列は分泌蛋白質の疎水性シグナルペプチドとは異なり、塩基性アミノ酸と水酸基を持つアミノ酸に富んでいて、いわゆる両親媒性の特徴を持っている。共通信号の切断点の後方に疎水性の高い内膜保持信号を持つ蛋白質は内膜に保持固定されてマトリクスへの完全な輸送が阻止される。内膜保持信号を持たない蛋白質やその後方で第二の切断を受けたものは内外膜間へ輸送されたことになる。

3. オルガネラ研究の一例

この節ではオルガネラの生合成 (biogenesis) を研究するさいの問題点を、実際の研究例に即して考察していきたい。例として紹介するのは酵母ペルオキシソームの研究である。ペルオキシソームは細胞にとって有害な過酸化水素の発生を伴う酵素群を収納し、発生した過酸化水素を分解することを共通の役割とするオルガネラである。この実験に用いた材料は脂肪酸資化能力のある無胞子性酵母、*Candida tropicalis* であり、そのペルオキシソームの主要な機能は脂肪酸の β 酸化である。

3.1 遺伝子の単離

蛋白質の局在化機構などオルガネラの生合成という観点からペルオキシソームを研究する場合、それに最もふさわしい蛋白質は代謝の重要性とは無関係に存在するはずである。そこでこのオルガネラ中に多量に存在する蛋白質の遺伝子を無作意的に単離することを考えた。その方法はいわゆるディファレンシャルハイブリダイゼーションであり、目的とする遺伝子の発現が抑制される条件と誘導される条件とを選び、誘導される条件に対応するcDNAとのみ特異的にハイブリダイズする遺伝子を検索する方法である¹³⁾。この方法がうまく適用されるためには二つの条件が要る。

(1) 遺伝子の発現に関して著しく差のある条件を作り得ること

(2) 検出された可能性のある遺伝子の中から目的の遺伝子を選び出す方法を持っていること

(1)については本酵母ペルオキシソーム蛋白質がブドウ糖生育細胞由来の顆粒画分(ミトコンドリアとペルオキシソームを含む画分)中にもほとんど見い出され

ず、一方、オレイン酸生育細胞では粗抽出液中でも主要蛋白質として容易に検出されるほど多量に存在していること、これに対応するmRNAレベルでの差異が両細胞由来mRNAを家兎網状赤血球を用いた無細胞翻訳産物の比較からも確かめられたことによって満足された。

(2)についてはまずこのオルガネラの固有ポリペプチドの確定が必要であった。温和な条件で調製したオレイン酸生育細胞由来の顆粒画分を低イオン強度下(2.5 mM MOPS)の垂直型ロータ(日立, RPV 50 T)を用いるショ糖密度勾配遠心によってほぼ完全に均一なペルオキシソーム標品を調製する方法を開発した¹⁴⁾。この標品を用いて少なくとも18種類の固有ポリペプチド(PXP, 分子量の多い方より順に1から18の番号をつける)を確定した(図3)。オレイン酸生育細胞由来mRNAの翻訳産物の主要なものはほぼこのPXPと一致した。これはペルオキシソーム蛋白質に

図3 *C. tropicalis* のペルオキシソームに局在するポリペプチド

オレイン酸培地で生育させた *C. tropicalis* pK 233 株細胞から精製したペルオキシソーム標品の全蛋白質

特徴的なことであり、シグナルペプチドなどを含み成熟蛋白質よりも大きな前駆体として合成される分泌蛋白質やミトコンドリア蛋白質では期待できないことである。ペルオキシソーム蛋白質の場合にはディフェレンシャルハイブリダイゼーションによって得られた遺伝子と特異的にハイブリット形成する mRNA を回収し¹⁵⁾、得られた mRNA からの翻訳産物と PXP とを電気泳動的に比較することによってその遺伝子が PXP をコードしているか否かを知ることができる。しかし遺伝子の同定法としてはこれでは不十分であるので、^[35S]メチオニンで標識されたその翻訳産物と対応する PXP とを混ぜて両者のプロテアーゼによる部分分解産物を比較する、ペプチドマッピングの方法¹⁶⁾によって最終的な同定を行った(図4参照)。このようにして PXP をコードする多数の遺伝子(POX と命名しその後に対応する PXP の番号を添える)を単離することができた¹⁷⁾。

図4 ペプチドマッピングの例

プラスミド pC 28 にクローニングされた発現領域をメンブランフィルタに固定し、オレイン酸生育細胞由来のポリ(A)⁺RNAのうち、これと特異的に結合した mRNA を溶出して無細胞系で翻訳させた。翻訳産物を SDS-PAGE のゲルから切り出し、この産物と見かけ上分子量の等しい PXP-9 を混ぜて再び SDS-PAGE (分離ゲルの濃度は 15% 程度、濃縮ゲルには EDTA を加えない) にかける。泳動中に SDS に抵抗性のあるブドウ球菌の V8 プロテアーゼ(パパイニンも使用可能)で部分消化する。A、翻訳産物の分解物をフロログラフィで見たもの。B、PXP-9 の分解物をクマジブルー染色で見たもの。各レーン(左から右へ)プロテアーゼの濃度を高めている。A、B のパターン(の一致)に注目

3・2 遺伝子とその発現産物の解析

ペルオキシソーム蛋白質をコードしている遺伝子を含むクローンが見い出されると、その遺伝子の解析が始まる。まず最初に行うことは発現領域の限定である。その遺伝子が発現されている条件(この場合はオレイン酸生育細胞)の mRNA を鋳型にして 1 本鎖 cDNA を合成・標識してサザンハイブリダイゼーション¹⁸⁾のプロープとする。特別な注意を払わずに合成した cDNA は遺伝子の 3' 末端側の配列が相対的に多くなっているため、遺伝子の 5' 末端側を含む DNA 断片は必ずしも強いシグナルを出さないことに注意すべきである。したがってこのようなサザンハイブリダイゼーションで遺伝子の発現領域を推定する場合、遺伝子の転写方向を知っておくことがきわめて重要である。同一の条件下で発現が誘導される多数の遺伝子の転写方向を、M13 ファージベクターなどに再クローニングすることなく直接決定する方法を考案したので紹介する

(図5)。目的の遺伝子の内部には存在せず、その外側近傍にある 2 種類の制限酵素認識部位を利用する。まずそのうちの一方のみで切断して、3' エキソヌクレアーゼで経時的に消化する。その後もう一方の制限酵素で切断した標品を変性条件下で電気泳動して cDNA プロープで検出する。cDNA は mRNA と相同の DNA 鎖とのみハイブリッドを形成するから、無傷の DNA 断片であれ、ヌクレアーゼで短縮された断片であれ、cDNA によって検出された DNA の方向が転写方向となる。この方法によって多数の POX 遺伝子と OLE 遺伝子(オレイン酸で発現が誘導されるが、PXP との対応がっていない遺伝子)の転写方向が一挙に決定された。

2 組のよく似た遺伝子クラスターを形成しており、アミル CoA オキシダーゼの多重遺伝子族を構成していることが判明した POX 2、POX 4、POX 5、カタラーゼの遺伝子である POX 9 および PXP 中最も分子量が小さく機能未知のポリペプチドをコードしている POX 18 の合計 5 種類の遺伝子の完全な塩基配列が決定された^{19)~21)}。いずれの遺伝子にもその転写方向に沿って唯一の長い翻訳可能領域が見い出され、SDS-PAGE の結果から概算される値とほぼ一致する分子量を持ったポリペプチドが推定された。一方、これらの遺伝子の発現産物を精製してからその N 末端

図5 転写方向決定法の模式図

太線で示した遺伝子を両側からはさむ2種類の制限酵素認識部位をA, Bとする。このようなDNAを制限酵素A, 3' エキソヌクレアーゼ (T₄ フェージのDNAポリメラーゼの3' エキソヌクレアーゼを利用することができる), 制限酵素Bの順に消化してその産物を変性させると長さの異なるDNA断片を生ずる。もしもこの実験で無傷の鎖が検出されたとすればcDNAの方向はB→A, したがってmRNAの方向(転写方向)はA→Bとなる

アミノ酸配列を決定したところ、いずれの場合も翻訳開始コドンのメチオニンを除く2番目のアミノ酸からの配列と完全に一致していた。この結果はペルオキシソーム蛋白質がその輸送の過程でN末端ペプチドの切断を受けないことを意味している。

ミトコンドリアの外膜蛋白質も輸送の過程でペプチドの切断を受けないが、そのN末端にはミトコンドリアへの共通輸送信号を保持している。ペルオキシソーム蛋白質の場合はどうであろうか。輸送信号のような重要な構造は共通の遺伝子から派生した多重遺伝子族の中では保存されているはずである。図6はアシルCoAオキシダーゼ多重遺伝子族の発現産物である3種類のPXPの一次構造を比較したものである。一对の疎水指数プロットの間に上下のポリペプチド間の相同性を示している。断点を除いた部分を枠で囲み、両者で同一のアミノ酸を縦線で表した。N末端はいずれも親水性であるがアミノ酸配列としてはまったく保存されていなかった。この結果はペルオキシソーム蛋白質の輸送に必要な信号配列が、ミトコンドリア蛋白質などとは異なり、分子の中央部からC末端側の部分に存在することを暗示している。

3.3 蛋白質輸送の実験法

ここでいったんペルオキシソームの研究を離れて、蛋白質輸送の実験に関する一般的な考察を行うことにする。膜系への蛋白質の輸送を研究する方法には大別して無細胞輸送系と細胞内輸送系の2種類がある。無細胞輸送系とは(部分)精製した膜系に無細胞翻訳系で合成した[³⁵S]メチオニン標識(前駆体)蛋白質を輸送させるものであり、基本的に純化された実験系なので輸送に必要な因子の解析も可能な正統的な方法であって、これまでに多数の成功例がある^{51-53, 12)}。輸送の判定の基準は、シグナルペプチドなどの切断がない場合、(前駆体)蛋白質が外から加えたプロテアーゼに耐性になることであるが、このプロテアーゼ処理の条件が微妙である点に問題がある。もちろん無傷なオルガネラを使用することが不可欠であって、ペルオキシソームのように構造的に脆弱なオルガネラの場合や、由来する細胞に強力な内在性プロテアーゼがある場合には実験系の構築にさいして充分な配慮が必要となる。輸送に用いる前駆体蛋白質の合成には、ふつう家兎網状赤血球の可溶性画分が用いられる。この翻訳系に用いるmRNAの取得方法の一つは目的蛋白質の遺伝子を用いたハイブリッドセレクション¹⁵⁾によって細胞由来のmRNAを分離する方法である。この方法は遺伝子の塩基配列が決定されていなくても適用可能であるが、蛋白質の構造を改変することはできないので使用範囲が限られる。より一般的な方法は目的蛋白質の構造遺伝子部分を転写ベクターに組み込んで試験管内でmRNAを合成することである。市販のT7フェージやSP6フェージのプロモータとそのRNAポリメラーゼを利用する場合ジグアノシン三リン酸(GpppG)を用いるとキャップ様構造を持ったmRNAを効率よく合成することができる。

核蛋白質の輸送²³⁾やペルオキシソーム蛋白質の輸送²⁴⁾⁻²⁶⁾の研究には細胞内輸送系もよく利用される。輸送された蛋白質は蛍光抗体法や金コロイド抗体法などさまざまな細胞学的手段で検出される。とくに多量の蛋白質が輸送される場合にはその蛋白質を直接染色することも不可能ではない。蛋白質の発現も含めたオルガネラの生合成を研究するためには細胞内輸送系の使用が不可欠である。細胞内輸送系を機能させるためには適切な宿主-ベクター系が必要であり、そのためには細胞内にベクターを導入する形質転換の技術がなければならない(本講座Ⅱ参照)。細菌から高等動物細胞までさまざまな細胞に対するさまざまな形質転換法が開発されているが、その中で酵母細胞のそれが最

図6 アシル CoA オキシダーゼ多重遺伝子族に属する3種類のPXPの一次構造の比較

疎水指数の算出法は Kyte と Doolittle²²⁾ に従い、11 残基の平均値を中央残基の値とした。したがって N 末端および C 末端の各 5 残基に対する値は計算されない。横軸は PXP-2 の開始コドンのメチオニン残基を起点とし、ペプチド間の相同性を明示するために挿入した間隙を含んでいる。PXP-4 および PXP-5 の N 末端の位置は PXP-2 の第 23 残基および第 38 残基に相当する。縦軸は基線の上部を疎水性として相対的に表示した。一对の PXP の相同性を示すために中抜きの帯で示した配列部分は、N 末端からのすべての残基を含むものであり、対応する残基が同一である場合にはその位置を縦線で示した

も遅れていた。酵母を対象とした最初の形質転換法はスフェロプラストを用いるものであった²⁷⁾。Ca²⁺ 処理したスフェロプラストに DNA を加えて最終ポリエチレングリコール-4000 濃度を約 2% に保つとスフェロプラストの融合に伴って DNA が取り込まれる。これを 3% の寒天とともに選択プレートにまくとスフェロプラストから細胞が再成される。しかしこの方法ではスフェロプラストの調製に時間がかかる。しかも 3% という高濃度では寒天が固化し易いので、これを用いてスフェロプラストをプレートに重層するという操作は困難なものであり、またその再現性も低かった。その後リチウム塩で処理した生細胞を用いる方法が開発され²⁸⁾、これらの困難性が著しく改善された。この方は対数増殖期の細胞を 50 mM の酢酸リチウムで 1 時間処理した後に DNA を加え、最終濃度 35% のポリエチレングリコール-4000 存在下に 1 時間置いた後 5 分

間の熱処理 (42 °C) をし、細胞を水洗後プレートに直接塗布するという簡単なものである。DNA 当たりの形質転換効率もスフェロプラスト法と同程度であり、またパン酵母以外の酵母にもほとんどそのまま適用できるので最近では多くの研究室で利用されている。

3・4 酵母ペルオキシソーム蛋白質の細胞内輸送

C. tropicalis のペルオキシソーム蛋白質の細胞内輸送系を作るために *C. maltosa* の宿主-ベクター系²⁹⁾を利用した。*C. maltosa* のペルオキシソームは *C. tropicalis* のものと同様、脂肪酸によって誘導され脂肪酸の β 酸化活性を持つ。その蛋白質成分も *C. tropicalis* のものとよく似ているがそれぞれの分子量がわずかに小さいので、発現した *C. tropicalis* の POX 遺伝子産物が宿主細胞のペルオキシソームに輸送された場合それを宿主のペルオキシソーム蛋白質から区別すること

図7 POX4の短縮型遺伝子産物の輸送

(A) POX4遺伝子の部分制限酵素地図。短縮型遺伝子の作製に利用した部位のみを示した。数字は翻訳可能領域の先端から数えた塩基数

(B) 短縮型遺伝子の発現産物の構造とその輸送結果。++, 多量の輸送; +, 少量の輸送; -, 検出不能な輸送, (阻); 宿主ペルオキシソーム蛋白質の輸送の阻害。数字はPXP-4の開始コドンのメチオニンから数えたアミノ酸残基数

ができる。実際 POX2 と POX4 で形質転換した宿主細胞のペルオキシソームには PXP-2 と PXP-4 の存在が明瞭に認められた。しかもこれらの発現産物は外から加えたプロテアーゼに対して抵抗性があったので、確かに宿主ペルオキシソームの中に輸送されているものと判断された。そこで POX4 をさまざまな制限酵素部位で切断し、合成オリゴヌクレオチドを用いて宿主細胞の中で発現可能な短縮型遺伝子を作製した。これら短縮型遺伝子で形質転換した酵母細胞のペルオキシソーム蛋白質を解析した結果(図7), ペルオキシソームへの輸送に必要な主要な信号配列はPXP-4分子の中央からC末端側に存在すること, 主要な信号配列は複数の成分から構成されているらしいこと, N末端側にも微弱な信号配列が存在することなどが明らかになった。さらにペプチド-BH やペプチド-CdH が発現した細胞では宿主ペルオキシソーム蛋白質の輸送が阻害されること, しかもその阻害はPXP-4関連ポリペプチドに限られ, カタラーゼのサブユニットであるPXP-9などはほとんど影響を受けないことが示された。このような事実は細胞内輸送系を用いて初めて明らかにされることであり, ペルオキシソーム表面に存在することが予想される輸送信号の受容体が複数の種類から構成されていることを示唆するものであった。

文 献

- 1) Ou, W.-J., Ito, A., Umeda, M. et al.: *J. Biochem.* (Tokyo), **60**, 589-595 (1988)
- 2) Blobel, G. and Dobberstein, B.: *J. Cell Biol.*, **67**, 835-851 (1975)
- 3) Walter, P., Gilmore, R. and Blobel, G.: *Cell*, **38**, 5-8 (1984)
- 4) Wiedmann, M., Kurzchalia, T.V., Hartmann, E. and Rapoport, T.A.: *Nature*, **328**, 830-833 (1987)
- 5) Hansen, W., Garcia, P.D. and Walter, P.: *Cell*, **45**, 397-406 (1986)
- 6) Zimmermann, R. and Mayer, D.I.: *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 512-515 (1986)
- 7) Wickner, W.T. and Lodish, H.F.: *Science*, **230**, 400-407 (1985)
- 8) Eilers, M. and Schatz, G.: *Cell*, **52**, 481-483 (1988)
- 9) Park, S., Lin, G., Topping, T.B. et al.: *Science*, **239**, 1033-1035 (1988)
- 10) Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburn, M. et al.: *Nature*, **332**, 800-805 (1988)
- 11) Chirico, W.J., Waters, M.G. and Blobel, G.: *ibid.*, **332**, 805-810 (1988)
- 12) Schatz, G.: *Eur. J. Biochem.*, **165**, 1-6 (1987)
- 13) St. John, T.P. and Davis, R.W.: *Cell*, **16**, 443-452 (1979)
- 14) Kamiryo, T., Abe, M., Okazaki, K. et al.: *J. Bacteriol.*, **152**, 269-274 (1982)
- 15) Ricciardi, R.P., Miller, J.S. and Roberts, B.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4927-4931 (1979)
- 16) Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirscher, R. W. and Laemmli, U.K.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1102-1106 (1977)

- 17) Kamiryo, T. and Okazaki, K.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 2136-2141 (1984)
 - 18) Southern, E.M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975)
 - 19) Okazaki, K., Takechi, T., Kambara, N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1232-1236 (1986)
 - 20) Okada, M., Ueda, T., Sugaya, H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **170**, 105-110 (1987)
 - 21) Okazaki, K., Tan, H., Fukui, S. et al.: *Gene*, **58**, 37-44 (1987)
 - 22) Kite, J. and Doolittle, R.F.: *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132 (1982)
 - 23) Dingwall, C. and Laskey, R.A.: *Ann. Rev. Cell Biol.*, **2**, 367-390 (1986)
 - 24) Keller, G.-A., Gould, S., DeLuca, M. and Subramani, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3264-3268 (1987)
 - 25) Bellion, E. and Goodman, J.M.: *Cell*, **48**, 165-173 (1987)
 - 26) Kamiryo, T., Sakasegawa, Y. and Tan, H.: *Agric. Biol., Chem.*, in press.
 - 27) Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1929-1933 (1978)
 - 28) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.: *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168 (1983)
 - 29) Takagi, M., Kawai, S., Chang, M.C. et al.: *ibid.*, **167**, 551-555 (1986)
-