

3Da-10

マイクロボディ酵素の遺伝情報発現機構の解析

。森 仁志、西村幹夫、赤沢 堯（名大、農、生化学制御）

カボチャ等の脂肪性種子の子葉組織では、その緑化過程に於て、マイクロボディの変換が観察される。即ちマイクロボディは糖新生に関与するグリオキシゾームから光合成（光呼吸）に関与するパーオキシゾームへと機能を変換する。黄化子葉細胞に存在するマイクロボディには、グリオキシゾームに特異的なタンパク質が取り込まれ、緑化子葉細胞ではパーオキシゾームに特異的なタンパク質が取り込まれると考えられる。この様なマイクロボディタンパク質の局在化機構を明らかにすることは、マイクロボディの変換を解明する上で重要な課題である。オルガネラを構成するタンパク質の細胞内局在化機構に関して、ミトコンドリア、葉緑体では精力的に研究が行われ、その機構が明らかにされつつあるが、マイクロボディに関しては未だに十分な知見が得られていない。マイクロボディタンパク質は、細胞質の遊離ポリソーム上で成熟型と同じ分子量のものが合成された後、post-translationalにマイクロボディに輸送されることが明らかにされている。今回、グリオキシゾーム酵素の一つである malate synthase (MS) を *in vitro* 系でグリオキシゾームに取り込ませることに成功したのでその実験結果について報告する。

我々は既に、MS分子の全長をコードするcDNAをクローニングした⁽¹⁾。このcDNAを *in vitro* transcription plasmid Blue-Scribe (STRATAGENE社)の T7 promoter の下流に組み換え、T7 RNA polymeraseを用い cap analogue である m⁷G(5')ppp(5')G 存在下で MS-RNA に転写させた。転写産物をそのまま rabbit reticulocyte lysate の *in vitro* translation系を用いて ³⁵S-Met存在下で翻訳させた。翻訳産物を SDS-PAGE、fluorographyで解析したところ、poly(A)⁺RNAを鋳型にして得られる MS polypeptide と同じ分子量を持つ MS polypeptide のみが検出された。一方、暗所で4日間生育させたカボチャ黄化子葉からグリオキシゾームを調製した。短時間のブレンダー処理によって得られた子葉の磨砕液を分画遠心し、Percollの self gradientで精製した後、等張液で希釈して Percollを除いたものを最終標品とした。この標品は指標酵素の測定により、ミトコンドリア、プラスチッドを殆ど含まない純度の高いグリオキシゾームであることを確認した。 *in vitro* 翻訳産物とグリオキシゾームを 20℃で incubateし、0、15、30分後にその一定量を取り、5 μg/mlの Proteinase Kで水中で15分間処理した。10% Percoll を用いてグリオキシゾームを回収し、SDS-PAGE、fluorography により解析した。また、 *in vitro* 翻訳産物を、Sephadex G-50 のゲルろ過にかけ、ATP等の低分子物質を除いたもの、さらに ATP を添加したもの、Proteinase K 処理時に 1% Triton X-100 を加えた場合についても同様に検討した。

その結果、合成された MS は反応時間の進行と共に取り込まれ、しかもそれが Proteinase K-resistant であることが明らかになった。この様にして、取り込まれた MSは、Triton X-100 処理によって Proteinase K-sensitiveとなった。また取り込みに ATPは必要ではなく、むしろ阻害的に働くと言う結果も得られた。以上の結果は、MSが post-translational にグリオキシゾーム内に取り込まれ、その過程には ATPを必要としないことを示している。このことは、マイクロボディタンパク質の膜透過機構が、葉緑体やミトコンドリアのそれとは異なることを強く示唆している。MSの取り込みに対する膜電位の影響、並びにグリオキシゾーム酵素の一つである MS のパーオキシゾームへの取り込みについても検討した結果を考察する。(1)日本植物生理学会(1986)