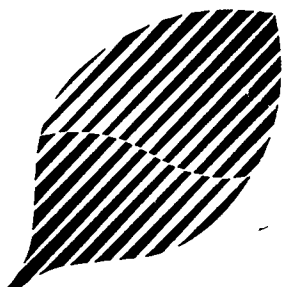


# トランスジェニック植物およびオルガネラの遺伝子 発現

著者	東北大学遺伝生態研究センター
雑誌名	IGEシリーズ
巻	4
ページ	1-58
発行年	1989-03
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/49089">http://hdl.handle.net/10097/49089</a>

IGEシリーズ 4\*\*

トランスジェニック植物  
および  
オルガネラの遺伝子発現



IGE

東北大学遺伝生態研究センター  
Institute of Genetic Ecology

# IGEシリーズの発刊にあたって

地球上の環境は、今、かつてない大きな問題に直面しております。世界各地で進行している生態系の急速な変化のなかには、人間生活に深刻な影響をもたらす可能性のあるものが、多数含まれています。一方、人間の活動が宇宙空間へと広がるにつれ、地球外生態系の構築が、新しい課題として登場しつつあります。生態系の崩壊を防ぎ、より豊かな環境を創造するための科学的努力が、今日ほど強く求められている時はありません。

本研究センターは、DNA分子技術を中心に遺伝子的段階にまで到達した生物研究の諸成果を生かし、生態系における生物の生活を一層深く解明し、新たな人間環境の創造に貢献することを目指しております。いうまでもなく、この課題はきわめて学際的であり、多分野の研究者との相互交流と協力によって、はじめて達成されるものであります。本研究センターでは、ワークショップによる研究者間の討論と意見交換を重視するとともに、その成果をより多くの方々にご利用いただく出版活動にとり組んでおります。ここに発刊しますIGE (Institute of Genetic Ecology の略) シリーズも、こうした努力

の一環であります。

本シリーズの内容は、多岐にわたる可能性をもっておりますが、3つのタイプに大きく類別されるだろうと考えております。すなわち、(i) 特定のテーマ、又はトピックについての解明に関するもの（\*印を付します）、(ii) 特定のテーマ又はトピックに関する最新の文献、実験法の紹介に重点をおくもの（\*\*印）、そして(iii) 新しい可能性を求める学際的交流、対話を試みるもの（\*\*\*印）であります。

このIGEシリーズが、多方面の方々のお役に少しでも立つことを願って、発刊の辞とします。

1989年3月

東北大学遺伝生態研究センター

## ❖ 目 次 ❖

ワークショップのねらい 亀谷 寿昭 .....	1
トランスジェニック植物 の作出法について 内宮 博文 .....	3
ミトコンドリアの構造と機能 (I) 山谷 知行 .....	21
ミトコンドリア構造と機能 (II) 蛋白質の膜透過の分子機構 竹田 真敏 .....	31
イネオルガネラ DNA の構造 平井 篤志 .....	51

# ワークショップのねらい

亀谷 寿昭

近年、著しく発展してきたバイオテクノロジーによって、これまでの自然界にはない、新しい遺伝子組成からなる植物が続々と作出されつつある。これらの植物は実用的利用のみならず遺伝子発現とその安定性、自然界における行動などの遺伝、生態学的観点から、興味ある素材であると考えられる。

本センターにおいても、上記研究課題の一環として形質転換植物の細胞融合における遺伝子発現と安定性について研究している。また、細胞融合によっていくつかの体細胞雑種を育成してきたが、最近、キャベツの核と大根の葉緑体を合せもつ体細胞雑種の育成に成功した。この雑種の両親は正常個体にもかかわらず、この雑種は細胞質雄性不稔であることが判明した。現在、これらのミトコンドリアについて解析を進めている。

本センターのこのような研究状況をふまえて、「トランジェニック植物及びオルガネラの遺伝子発現」のワークショップを開催した。本センターで行なってきた細胞融合の研究の中で「体細胞雑種の選抜」は重要な課題である。これまで、種々の選抜法が試みられてきたが、生化学的突然変異体を用いる方法は、選抜法だけでなく雑種同定のマーカーとして役立つ。トランスジェニック植物は、この分野においても、細胞融合の有用なマーカー植物であると考えられるので、本ワークショップの一課題として、「トランスジェニック植物の作出と遺伝子発現」をとりあげた。

細胞融合は、両親の細胞質が融合時に混合するという点において、性的

交雑とは全く異なる。これまでの葉緑体の動向についての大半の研究は、融合後、葉緑体はランダムに分割し、最終的に雑種細胞内に残存するのは、親細胞のどちらか一方の葉緑体であることを示している。しかしながら、両親由来のもの、あるいは、組換えを起しているという報告もある。ミトコンドリアの体細胞雑種における動向は、主に細胞質雄性不稔との関連で解析されているが、これは細胞質雄性不稔がミトコンドリア DNA にコードされていることが明らかになってきたからである。これまでの研究によって、両親由来のミトコンドリアが共存し、しかも、長期間保持されている場合や、ミトコンドリア DNA の組換えが起っているという状況証拠が累積してきている。オルガネラのこのような行動については、不明の部分が多いが、その構造と機能、遺伝子構造は次第に明らかになってきている。本ワークショップでは「オルガネラの構造と機能、遺伝子構造」をとり上げた。

本センターの研究テーマ「遺伝子組換え植物の遺伝子発現及びその安定性」は、分子—細胞—個体、の各レベルで追究されることが望ましい。細胞融合は各レベルの研究を連結し得る可能性をもっていると考えられるが、手法上の問題が研究遂行の障害となる場合が非常に多い。本ワークショップでは、その点についても話題を提供していただいた。

# トランスジェニック植物の 作出法について

内 宮 博 文

---

トランスジェニック植物を作出する方法として、(1) アグロバクテリウム-Ti プラスミドを利用した方法、(2) 直接、DNA を導入する方法の2つがある。以下、その具体的方法を示す。

## 1. アグロバクテリウム-Ti プラスミドを利用した方法

Ti プラスミドは自然界における遺伝子導入ベクターである。土壌細菌であるアグロバクテリウム (*A. tumefaciens*) は、双子葉植物および一部の単子葉植物に感染するとクラウンガール (crown gall) と呼ばれる腫瘍を形成する。この現象はこれまでの研究によりアグロバクテリウムが保持している Ti プラスミド (Tumour inducing plasmid) の一部分である T-DNA (Transferred DNA) 領域が転移して植物のゲノムに組み込まれ、安定に維持され、さらに T-DNA 上にある遺伝子群が発現した結果であることが明らかにされた。

T-DNA 上にある遺伝子群は腫瘍の形成には必要であるが、T-DNA 自体の転移・組み込みには必要でなく、T-DNA の両端にある 25 塩基対の不完全な繰り返し配列 (境界配列: border sequence) が必須の要素である。従ってこの境界配列の間に外来 DNA を挿入すれば、植物のゲノムへ目的とする DNA を組み込むことができる。また T-DNA 領域の転移には Ti プラスミド上の Vir (virulence) 領域の遺伝子産物が必要である。これらの遺伝子は、トランス (trans) に作用するためバイナリーベクターとして



の使用も可能である。

Ti プラスミドは約 20 万塩基対にも及ぶ巨大な分子である。このようなプラスミドに外来 DNA を組み込む方法としては、あらかじめ T-DNA 領域の一部を組み込んだ中間ベクターに外来 DNA を挿入し、相同組換えにより Ti プラスミドに目的の遺伝子を導入する方法がよく用いられる。また T-DNA 境界配列を別のプラスミドに移して作成したベクター (binary ベクターと呼ばれる) に挿入し、他のプラスミド (Vir 領域をもつもの) と共存させて、binary ベクター上の外来遺伝子を植物ゲノムへ転移する方法もある。いずれの方法も、腫瘍形成に必須な T-DNA 領域内の遺伝子を取り除くことにより、植物個体の再生が可能である。

### 実験 中間ベクターのアグロバクテリウムへの導入

ここではカナマイシン耐性の遺伝子をもつベクター (pNK1 とする) の導入法について触れる。

大腸菌で増殖するベクターを、アグロバクテリウムに移すためには、バクテリアの接合によるプラスミドの転移を利用する。ただし pBR322 のような ColE1 由来のプラスミドは自ら転移することができないので、ヘルパープラスミドと呼ばれるプラスミド (例えば、pGJ28 と R64dra11) によりアグロバクテリウムに移す。

〈準備するもの〉

1. 大腸菌 C600 株 (中間ベクター pNK1: アンピシリン耐性, GJ23 株 (ヘルパープラスミド pGJ28 および R64dra11: テトラサイクリン耐性)
2. アグロバクテリウム C58ClCm<sup>R</sup> (pTiB653) 株: クロラムフェニコール耐性
3. L-Broth プレート
4. 10 mM 硫酸マグネシウム (オートクレーブ滅菌)

〈操作〉

1. アグロバクテリウム, 大腸菌 (GJ23), 大腸菌 (中間ベクター pNK1

を持つもの)をそれぞれ、選択可能な抗生物質を含む液体培地 (L-Broth) 2 ml で一晩振とう培養する。アグロバクテリウムは、28°C、大腸菌は 37°C で培養する。

2. L-Broth (1.5% Bacto agar) プレートに上記 3 種の培養液を 100  $\mu$ l ずつ播き、28°C で一晩培養する。
3. 乾熱滅菌した試験管に 10 mM 硫酸マグネシウムを 1 ml (1 本), 0.9 ml (7 本) 用意する。プレート面に生えたバクテリアの層 (半面分) を白金耳でかき集め 10 mM 硫酸マグネシウム 1 ml に懸濁する (残り半面は、追試の必要な際に用いるために保存する)。
4. 菌体懸濁液 (硫酸マグネシウム溶液) 1 ml ( $10^0$  とする) から 100  $\mu$ l をとり、0.9 ml の試験管に移す。これがバクテリアの  $10^{-1}$  希釈液となる。 $10^{-1}$  からさらに次の 0.9 ml の試験管 1 本に 100  $\mu$ l を移す ( $10^{-2}$  希釈液)、順次 100  $\mu$ l ずつ移すことにより、 $10^0 \sim 10^{-7}$  までのバクテリアの希釈列ができる。
5. 抗生物質の入った L-Broth (1.5% Bacto Agar) プレートを作製しておき、これに上記希釈列を 100  $\mu$ l ずつ播く。バクテリアの希釈液と、プレートの抗生物質の組み合わせは以上の通りである。

プレート	希釈列	培養温度
L-Broth (A, B)	$10^0 \sim 10^{-4}$	28°C
L-Broth (A)	$10^{-6} \sim 10^{-7}$	28°C
L-Broth (B, C)	$10^{-7}$	37°C

アグロバクテリウムの耐性マーカー (クロラムフェニコール) を A、大腸菌 (中間ベクター pNK1: アンピシリン) の耐性マーカーを B、大腸菌 (GT23: テトラサイクリン) の耐性マーカーを C と略す。

6. 通常 2~3 日でコロニーが生ずる。L-Broth (A, B) に生じたコロニーは、組換え体アグロバクテリウムである。同じ抗生物質入りの培地で継代培養する。2 回程度植え継いだところで、-70°C に保存する (50% グリセロール/L-Broth)。L-Broth (A) に生じたコロニーは、アグロバクテリウムの総数を示している。この数をもとに組換え体の生じた頻度を求める。L-Broth (B, C) に生じたコロニーは、2 系統の大腸菌

が接合したものである。これは組換え体アグロバクテリウムが得られなかった場合の考察に役立つ。

#### 〈補足〉

腫瘍形成遺伝子を除去した Ti プラスミド、例えば pGV3850 を持つアグロバクテリウムを使用する際には、T-DNA との相同組換えは不要である。その場合には、pKC7KN のようなベクターを使用する。組換え体の選抜は、pGV3850 のアンピシリン耐性と pKC7KN のカナマイシン耐性、アグロバクテリウムのリファンピシン耐性を利用し本法に従って行う。

### 実験 プロトプラストへの感染

#### 〈準備するもの〉

1. 酵素液(ろ過滅菌) セルラーゼオノズカ R-10 1.4% (W/V), マセロザイム R-10 0.4% (W/V), 0.4 M ショ糖
2. 洗い液 塩化カルシウム 27.5 g/l, MES 0.5% (W/V), pH 5.6
3. 培地 A (K3 培地+0.1 mg/l 2,4D, 1.0 mg/l NAA & 0.2 mg/l 6-BAP)

#### 〈操作〉

##### (1) プロトプラストの単離

1. 播種後 2 ヶ月ほどの無菌培養したタバコの葉を 2 mm 巾に切る。
2. 酵素液 5 ml ( $\phi$  6 cm のシャーレ) に葉片を入れる。このとき葉の裏側が酵素液に触れるようにする。
3. 暗所で 12~16 時間放置する。
4. ミラクロスでろ過後、遠心管 125~10 ml ぐらいずつ分注し洗い液 1 ml を静かに上層し、100 g (800 rpm) で 5 分間遠心する。
5. 酵素液と洗い液との間にプロトプラストの層ができるので、上層の洗い液ごと新しい遠心管に移す。
6. 洗い液で洗浄をもう一度する。
7. プロトプラスト  $1 \times 10^5$ /ml になるように培地 (ショ糖は 0.4 M) を加

え培養する。

(2) 感染および除菌操作・形質転換の選択

1. プロトプラストは2日暗所で静置する。
2. 一晚培養したアグロバクテリウム懸濁液を1 ml エッペンドルフチューブ (1.5 ml) に分注し, 5,000 rpm, 3分間遠心する。
3. 上清を除き, 0.9% 塩化ナトリウムを1 ml 加えボルテックスで攪はんし, 5,000 rpm で3分間遠心する。
4. 上清を除き, 0.9% 塩化ナトリウムを1 ml 加えボルテックスで攪はんする
5. プロトプラスト (2日間培養したもの): アグロバクテリウムが1:100になるように, アグロバクテリウム懸濁液を加え室温で静置する。
6. 16~36時間後, 遠心管に移し洗い液を1 ml 静かに上層し100% (800 rpm) 5分間遠心する。
7. 上清を除き, 洗い液5 ml で3回洗う。
8. 培地 A (ショ糖 0.3 M) を等量加えクラフォラン (Hoechst) を500  $\mu\text{g/ml}$  になるように加え, シャーレに移し明所に放置する。
9. 2週間後, 洗い液で2回洗い上清を除く。細胞を培地 A (0.25 M ショ糖, 0.6% アガロース) にうめ培養する。
10. 1週間後, アガロースごと0.2 M ショ糖液体培地 A (カナマイシン50  $\mu\text{g/ml}$  を含む) に入れて暗所で振とうする (50~60 rpm)。
11. 4週間後, Km 耐性のコロニーを MSB (+Km 50  $\mu\text{g/ml}$ ) で分化させる。

**実験 リーフディスク法 (ペチュニアの葉の切片の場合)**

植物体に再生させる場合には, 腫瘍形成に関与する遺伝子を取り除いた Ti プラスミドを使用する。

〈準備するもの〉

1. *A. tumefaciens* (pGV3850: pKC7KN)
2. *Petunia Hybrida* var. Mitchell

3. タバコ懸濁培養細胞
4. コルクボーラー ( $\phi$  6 cm)
5. LB 液体培地
6. 植物培地 B (ホルモンはベンジルアデニン 1.0 mg/l, 1-ナフタリン酢酸 0.1 mg/l に変える)

〈操作〉

1. 温室で育てたペチュニアの若い葉を滅菌する。
2. コルクボーラーで葉を打ち抜き円盤状の葉の切片 (リーフディスク) をつくる。
3. LB 培地で、28°C 一晩培養したアグロバクテリウム懸濁液にディスクの周辺部を十分に接触させる。感染時間が長過ぎると菌の葉組織への浸潤が過度に起こり葉の成長を阻害するので、通常は数分間処理する。
4. 感染させたディスクは、紙上で余分な菌液を除いた後、フィーダープレート上に置く。フィーダープレートとは、植物培地 A 20 ml に 1 ml のタバコ懸濁培養細胞をまき、その上に紙 (ワットマン No.1 相当品) をのせたものである。
5. 25°C, 8 時間暗黒, 16 時間光条件下で 2 日間培養後、培地 B (カナマイシン 50  $\mu$ g/ml およびクラフォラン 500  $\mu$ g/ml を含む) に移して前述の条件下で培養する。
6. 1~2 週間で、ディスクは膨潤し周辺部からカルスを形成し、2~4 週間で茎葉が分化してくる。
7. 茎葉を切り取り、ホルモンを除いた培地 B に移し根を誘導する。
8. 2~3 週間で発根が見られ、鉢に移植し植物個体を再生する。

## 2. 直接導入法

### 実験 タバコ葉肉プロトプラストへの DNA 導入 (PEG 法)

〈準備するもの〉

酵素液: 1.4% セルラーゼオノズカ R-10

0.4% マセムザイム R-10

(以下を 0.4 M ショ糖を含む K3 培地に溶かす)

K3 培地 (表 1)

F 溶液 (表 2)

PEG 溶液: 40% PEG (ポリエチレングリコール)

6,000 (F 溶液に溶かす)

ウシ胸腺 DNA 溶液 (1 mg/ml 水溶液)

〈操作〉

1. 無菌培養したタバコ (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana SR1) の葉をカミソリで 2~3 mm 程度の切片にする。
2. シャーレ ( $\phi$  6 cm) に、酵素液を 6 ml 入れ葉の切片を浸漬する。
3. 約 16 時間後、軽くシャーレを振り、プロトプラストの分離を促進する。
4. ミラクロスを通して細胞残さを除く。
5. 遠心 (100×g, 5 分)。
6. 酵素液の表面に浮揚した緑色のプロトプラスト層をパスツールピペットで集め、新しい K3 培地 (0.4 M ショ糖) を 5 ml 加える。
7. 遠心 (100×g, 5 分) を繰り返す。
8. プロトプラスト (10<sup>6</sup> 濃度)/ml, DNA 溶液 (カナマイシン耐性の選択マーカーをもつプラスミド 10  $\mu$ l (=10  $\mu$ g DNA), ウシ胸腺 DNA 溶液 50  $\mu$ l (50  $\mu$ g DNA) をプラスチックシャーレ上で混合する。
9. 5 分後、0.5 ml の PEG 溶液をゆっくり加える。
10. 室温で 30 分放置する (時おりゆっくり攪はんする)。
11. F 溶液を 2 ml ずつ、5 分おきに 4 回加える。
12. 遠心 (100×g, 5 分) し、上清をパスツールピペットで除く。
13. 5 ml の K 培地 (0.35 M ショ糖) をゆっくり加える。
14. 細胞数が  $2 \times 10^5$ /ml になるように調整し、暗黒下で培養する。
15. 1 週間後、2.5 ml の K3 培地 (1.25 M ショ糖), ベンジルアデニン (0.5 mg/l) および、硫酸カナマイシンを (75  $\mu$ g/ml) になるように加

え，光条件下（3,000 ルックス）で培養する。

16. 2 週間後，等量の F 溶液を加え，遠心（100×g, 5 分）し，細胞を集める。

表 1. K3 培地の組成表

1) 主要成分	濃度 (mg/l)
KNO <sub>3</sub>	2,500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	250
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	
2) 微量成分	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0
KI	0.75
MgSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10.0
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
3) 鉄分	
Na <sub>2</sub> · EDTA	37.3
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	27.8
4) ビタミン・有機物	
myo-イノシトール	100
ピリドキシン・塩酸	1.0
チアミン・塩酸	10.0
ニコチン酸	1.0
5) ホルモン	
2, 4 D	0.1
ナフタリン酢酸 (NAA)	1.0
ベンジルアデニン	0.2
6) その他	
キシロース	250
CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	66.3

a) 糖濃度は本文に記す。pH を 5.6 に調整する。

表2. F 溶液

成分	濃度 (mg/ml)
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	18.4
NaCl	8.0
KCl	0.37
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.125
グルコースモノハイドレート	1.0

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O は、100 ml として別に作成する。他の成分をすべて溶解してから加える。pH は 7.05 とする。

17. 細胞を 5 ml の K3 培地 (0.25 M ショ糖, ベンジルアデニン 0.5 mg/l, 硫酸カナマイシン 75 μg/ml) に移し, 培養する。このとき, ゆっくり (50 rpm) 振とうするとよい。
18. 1~2 カ月後, カナマイシン耐性のカルスが得られる。

## 実験 タバコ葉肉細胞プロトプラストへの DNA (エレクトロポレーション法)

### 〈計画〉

- 2, 3 カ月前 1. タバコ無菌実生苗の作成
- 1 日目 2. 酵素処理
- 2 日目 3. プロトプラストの単離
4. エレクトロポレーション
5. プロトプラストの培養
- 2~3 日目 6. 発現解析

### 〈器具の準備〉

1. シャーレ (ファルコン社) ガス滅菌したものはプロトプラストの培養には不適。
2. 10 ml メスピペット
3. ピンセット



4. メスまたはカミソリ
5. ミラクロス
6. 遠沈管
7. パスツールピペット
8. エッペンドルフチューブ
9. Ice bath
10. エレクトロポーレーター
11. 血球測定板

〈試薬の準備〉

1.  $K_3$  培地

標準的な調製方法を示す。ホルモン濃度、あるいは糖濃度は、実験の目的に応じて条件検討をすることが望ましい。

1-1. ストック溶液の調製

1-1-1.  $\times 10$  主要成分液 (1,000 ml)

蒸留水 約 900 ml に以下の試薬を溶かす。

$KNO_3$	25 g
$NH_4NO_3$	2.5 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.34 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.5 g
$NaH_2PO_4$	1.5 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	9.0 g

試薬が完全に溶けたら、1,000 ml にする。

1-1-2.  $\times 100$  微量成分液 (1,000 ml)

蒸留水 約 900 ml に以下の試薬を溶かす。

$H_3BO_3$	300 mg
KI	75 mg
$MgSO_4 \cdot 4H_2O$	1000 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	200 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2.5 mg

$\text{Ma}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  25 mg

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2.5 mg

試薬が完全に溶けたら、1,000 ml にする

1-1-3.  $\times 100$  鉄分液 (1,000 ml)

蒸留水 約 900 ml に以下の試薬を溶かす。

EDTA  $\cdot$  Na<sub>2</sub> 37.3 mg

$\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  27.8 mg

EDTA が完全に溶けてから、 $\text{FeCl}_2$  を加える。試薬が完全に溶けてから 1,000 ml にする。

1-1-4.  $\times 100$  ビタミン類液 (100 ml)

蒸留水 約 90 ml に以下の試薬を溶かす。

Pyridoxine-HCl 10 mg

Thiamine HCl 100 mg

Nicotinic acid 10 mg

試薬が完全に溶けたら、100 ml にする。 $-20^\circ\text{C}$  で保存する。

1-2. 培地の調製

1-2-1. 0.4 M Sucrose K<sub>3</sub> 培地の作成

以下のように溶液及び試薬を調製する。

	100 ml	調製
	80 ml	
$\times 10$ 主要成分液	10 ml	
$\times 100$ 微量成分液	1 ml	
$\times 100$ 鉄分液	1 ml	
$\times 100$ ビタミン類液	1 ml	
0.1 mg/ml NAA 溶液	1 ml	
0.1 mg/ml 2, 4-D 溶液	100 $\mu$ l	
0.1 mg/ml 6-BA 溶液	200 $\mu$ l	
Xylose	25 mg	
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg	

Sucrose	14 g
m-Inositol	100 mg

0.1 M HCl あるいは 0.1 M NaOH で pH 5.7 に合わせる。蒸留水を総量 100 ml になるまで加えた後、100 ml 容三角フラスコに 25 ml ずつ分注し、オートクレーブ (120°C, 15 分) する。

### 1-2-2. 0.4 M Mannitol K<sub>3</sub> 培地の作成

以下のように溶液及び試薬を調製する。

	100 ml	調製
蒸留水	80 ml	
×10 主要成分液	10 ml	
×100 微量成分液	1 ml	
×100 鉄分液	1 ml	
×100 ビタミン類液	1 ml	
0.1 mg/ml NAA 溶液	1 ml	
0.1 mg/ml 2, 4-D 溶液	100 μl	
0.1 mg/ml 6-BA 溶液	200 μl	
xylose	25 mg	
CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7 mg	
Mannitol	7 g	
m-Inositol	100 mg	

0.1 M HCl あるいは 0.1 M NaOH で pH 5.7 に合わせる。蒸留水を総量 100 ml になるまで加えた後、100 ml 容三角フラスコに 25 ml ずつ分注し、オートクレーブ (120°C, 15 分) する。

## 2. 酵素液

K <sub>3</sub> medium (0.4 M sucrose)	100 ml
1.4% cellulase R-10	1.4 g

0.4% macerozyme R-10                      0.4 g

室温で十分に攪はんし、酵素を溶かす。8,000 rpm 10 分間遠心分離し、不溶成分をのぞいてから上清をろ過滅菌する。

### 3. MES buffer (to make 200 ml)

蒸留水	180 ml
MES	21.3 mg
KCl	104.4 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	117.6 mg
Mannitol	14.6 g

pH 5.7 に調整する。

蒸留水を加えて 200 ml にする。

#### 〈操作〉

#### 1. タバコ無菌実生苗の作成。

##### 開始

##### 種子の滅菌

タバコ (*Nicotiana tabacum*) の種子をミラクロスでつくった袋に包み、こぼれないようにホチキスで止める。1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 10 分間つけた後、無菌水で種子を洗う。

##### 播種

6 cm シャーレに 0.8% 寒天 (MS 等の培地でもよい) を入れたものに播種する。種子は均等に散らばるようにする。ふたをし、パラフィルムでシールする。人工光下で培養する。約 1 週間で発芽する。

##### 棒ビンへ移植する

MS の無機栄養分を含む、0.8% 寒天培地を入れた棒ビンを多数用意する。子葉が開き、本葉が出始めた頃の実生苗を 1 個体ずつ無菌的に棒ビンに移植する。

##### 実生苗の育成

2-3 カ月、人工光下で培養を続ける。

終了

## 2. タバコ葉肉細胞の酵素処理

開始

酵素を室温に戻す。諸素液  
の分注

冷凍庫で保存してあった酵素液を室温で溶解する。実験に必要な数のシャーレを用意し、酵素液を 6 ml ずつ分注する。

無菌実生苗の葉をきざむ

無菌タバコ実生から色、形のよい健康的な葉を選ぶ。葉の中肋を取り除き、残りの葉身を 1 mm 幅程度に刻み込む。刻みが不十分だと、プロトプラストの収量が低くなる。

きざんだ葉を酵素液に浸す

酵素液の入ったシャーレに葉を入れる。葉の表側を酵素液でぬらすようにしてから、表側が上になるように葉を浸す。

酵素処理

シャーレを空かんにいれ、室温(25°C)で一晩放置する。

終了

## 3. タバコ葉肉プロトプラストの単離

開始

プロトプラストを組織から  
はがす  
ミラクロスでこす

酵素処理したシャーレを 5 分間穏やかに振とうする。プロトプラストが遊離する。滅菌したミラクロスを用意する。0.4 M sucrose を含む  $K_3$  培地でミラクロスをしらす。酵素処理した液をパスツールピペットで取り、ろ過する。

遠心分離

ろ液を遠沈管に移し、100×g (1,000 rpm) で 10 分間遠心する。

プロトプラストの回収

上層のプロトプラストをパスツールピペットで新しい遠沈管に集める。

プロトプラストの洗浄 遠沈管に 0.4 M Mannitol を含む MES buffer を加え、静かに攪はんする。

遠心 100×g (1,000 rpm) で 10 分間遠心する。

プロトプラストの希釈 沈澱したプロトプラストに MES buffer (0.4 M Mannitol) を 0.6× (必要な本数) ml となるように加える。あるいは、buffer を加えてから細胞密度を計算し、適当な濃度になるように希釈する。希釈した後、パストールピペットで静かに攪はんする。

終了

#### 4. エレクトロポレーション

DNA を加える 遠沈管に入ったプロトプラスト液に DNA を加える。

水中で冷やす DNA を加えたら直ちに水中に遠沈管を入れる。

プロトプラスト液の分注 1.5 ml エッペンドルフチューブに 0.6 ml ずつプロトプラスト懸濁液を入れる。水中に 10 分以上置く。

装置の準備 エレクトロポレーターを使用できるように組み立てる。

Fire! プロトプラストと DNA の混合液をセルに移し、目的に応じた条件でスイッチを入れる (タバコ葉肉プロトプラストの場合 250,  $\mu$ F, 50-300 V)。サンプルをもとのチューブに戻す。

サンプルの氷冷 水中に 10 分間放置する。

培地の準備  $K_3$  培地 (1.4 M Mannitol) を 2.5 ml ずつシャーレに分注する。

遠心分離	サンプルの入ったチューブを100×g (1,000 rpm) で10分間遠心する。
培地にプロトプラストを移す	プロトプラスト (沈澱) を、培地で懸濁しシャーレに移す。シャーレをパラフィルムでシールする。
プロトプラストの培養	シャーレを空かんに入れ、室温で間培養する。

終了

(注意する点)

- ◇各段階で、倒立顕微鏡でプロトプラストの状態をチェックすること。収量が低かったり、プロトプラストが壊れてしまったりしたときには、実験の条件を検討し直すこと。
- ◇細胞密度、および生存率を記録しておくことよい。

## 実験 カナマイシンリン酸化酵素の検出

〈器具の準備〉

1. 電気泳動装置
2. ワットマン p 81 ペーパー

〈試薬の準備〉

### 1. 緩衝液 A

グリセロール	10 %
Tris-塩酸 (pH 6.8)	62.5 mM
プロモフェノールブルー	50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
SDS	0.1 %
B-メルカプトエタノール <sup>a</sup>	5 %
a) 使用直前に加える。	

### 2. 緩衝液 B

Tris-リンゴ酸 (pH 7.1)	67 mM
MgCl <sub>2</sub>	42 mM

塩化アンモニウム

400 mM

## 3. ゲル原液

原液	分離ゲル	スタッキングゲル
28.4% アクリルアミド		
1.6% メチレンビスアクリルアミド	8 ml	0.5 ml
蒸留水	4.28 ml	3.82 ml
1 M Tris-塩酸	(pH 8.8) 7.5 ml	(pH 6.8) 0.625 ml
TEMED	0.02 ml	0.005 ml
10% 硫酸アンモニウム	0.2 ml	0.05 ml
計	20 ml	5 ml

## 4. 泳動緩衝液

5 mM Tris-(pH 6.8)

5 mM グリシン

## 5. 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)

## 6. アガロース

## 7. 硫酸カナマイシン

8.  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (3,000  $\mu$  Ci/mmol)

&lt;操 作&gt;

(1日目)

1. 形質転換細胞(10~100 mg)をエッペンドルフチューブに入れ、緩衝液 A を 50~100  $\mu$ l 加え、細胞を破碎する。
2. 遠心(8,000 rpm, 5分)し、上清 10~20  $\mu$ l を電気泳動する。泳動は、12% (pH 8.8) の分離ゲルと 3% のスタッキングゲルを用い(20 mA で 2.5時間)泳動する(ミニゲルの場合)。
3. 泳動後、ゲルを緩衝液 B に 30分浸漬する。
4. ゲル状に溶解した 1% アガロースを 50°C に保ち、硫酸カナマイシン



(1 mg/ml),  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (5  $\mu\text{g}$ -ml) を加え、アクリルアミドゲル上に均等になるように広げる。アガロースは固まるのが早いので、すばやく操作を行う。

5. その上に、p 81 ペーパーをのせる。さらにペーパータオルを 2 cm ほどの高さにし、1 kg 程度の重しをのせる。
6. 2~3 時間後、p 81 ペーパーを蒸留水 (60°C) で 1 時間、リン酸緩衝液 (80°C) で 1 時間洗う。
7. p 81 ペーパーをビニールで包み、X 線フィルムに感光させる。

(2 日目)

1. X 線フィルムを現像する。

# ミトコンドリアの構造と機能 (I)

山 谷 知 行

---

## はじめに

高等植物の緑色組織には、葉緑体とミトコンドリアの二つのエネルギー獲得器官があり、それぞれ独自の遺伝情報と蛋白質合成系を備えている。葉緑体ゲノムに関しては、最近全塩基配列が決定されるなど、研究の進展は著しい。一方、ミトコンドリアゲノムでは、分子構造や遺伝子配列の一部が明らかにされはじめた所であり、葉緑体ゲノムあるいは哺乳動物や酵母のミトコンドリアゲノムの研究に比較して、著しく遅れているのが現状である。植物育種学の方面から、細胞質雄性不稔性とミトコンドリアゲノムの構造変化との関連が示唆されており、制限酵素を用いた解析が進められている<sup>1)</sup>。

植物ミトコンドリアのゲノムサイズは 220~2,400 kb と不均一な分子種から構成されることが多く、かつ哺乳動物や酵母のそれと比較してはるかに大きいことが知られている<sup>1)</sup>。しかし、ミトコンドリア自身の持つ遺伝情報はごく限られたものであり、ミトコンドリアを形成する蛋白質の 95% 以上は核遺伝子支配を受けていることが真核生物では一般的に知られている<sup>2,3)</sup>。従って、核支配で合成された蛋白質がミトコンドリアの二重膜を通過して、それぞれのコンパートメントで機能蛋白質分子に返還される過程が重要であり<sup>3)</sup>、代謝的に完全で他のオルガネラの混入のないミトコンドリアが、これらの解析に要求される。

さて、高等植物のミトコンドリアの単離についての研究は、主としてカリフラワーやジャガイモ塊茎など非緑色組織を材料に用いて進められてきたが、無傷で純度の高い標品の調製の難しさは折りにふれて解説され、また改良法も示されてきた<sup>4)</sup>。本ワークショップでは、構造と機能を研究する上で最も重要な点と考えられる、代謝活性が高く他のオルガネラの混入の少ないミトコンドリアの緑色組織からの単離法について紹介し、単離ミトコンドリアを用いた2~3の研究例を示す。

## I. 緑色組織からのミトコンドリアの単離

### 1) ミトコンドリア単離方法の問題点と媒体

緑葉の細胞内小器官は、核、葉緑体、マイクロボディ、液胞、ER等の多くの膜系など、ミトコンドリア以外にも数多くあり、中でも葉緑体及びその破壊断片であるチラコイド膜がミトコンドリア単離の大きな障害になっていた。各細胞内小器官の分離には、動物組織等を例にショ糖密度勾配遠心法が用いられてきた。しかし、ショ糖中におけるミトコンドリアの密度は $1.18\sim 1.20\text{ g/cm}^3$ で、葉緑体の $1.21\sim 1.24$ やチラコイド膜の $1.16\sim 1.18$ と非常に接近した密度を示し<sup>5)</sup>、これらの混入がさけられなかった。従って、多くの研究には非緑色組織が用いられて来て、緑葉ミトコンドリアの研究は極めておこなわれていた。

1980年を境いに、緑葉から純粋に、短時間で、しかも代謝活性の高いミトコンドリアの単離法が開発された。パーコールを媒体に用いた密度勾配遠心法である。パーコールは、シリカゾルをポリビニールピロリドンで被覆したものでファルマシア社から販売されており、低粘度、低浸透性で無毒である特徴をもっている。以下に、緑葉からのミトコンドリア単離例を具体的に紹介する<sup>6)</sup>。

### 2) 緑葉ミトコンドリアの抽出法

#### A. プロトプラストからの抽出法

プロトプラストは、穏やかに細胞を壊すことができるので、無傷のミトコンドリアを収率良く得ることができる反面、量的に多く単離できにくい点もある。ホーレンソー葉プロトプラストを材料にした Nishimura ら<sup>7)</sup>の

例では、15.6%の収率でミトコンドリアを精製している。彼らの抽出方法を以下に示す。

常法に従って得られた約4 mg クロロフィル相当のプロトプラストを、40 ml の0.3 M マニトール、1 mM EDTA、0.1% BSA (脂肪酸フリー)、0.6% ポリビニルポリピロリドンを含む10 mM Mops-KOH 緩衝液 (pH 7.2) に懸濁する。プロトプラストの破壊法を検討した結果、a) 浸透圧法ではミトコンドリアが液胞膜などに付着すること、b) 注射針法 (2~3度針のついた注射筒を通す方法) ではミトコンドリア自身もかなり損傷をうけることが判明し、c) テフロンホモジナイザーで穏やかに10往復して破壊する方法が最適であった。c) で得られたプロトプラスト破壊抽出液を1,000 g 10分の遠心をし、葉緑体・デンプン粒・未破壊プロトプラストなどを除く。この遠心上清を10,000 g 10分の遠心後、沈殿画分に粗ミトコンドリアを得る。この沈殿画分に、1 ml の0.3 M マニトール、0.1% BSA (脂肪酸フリー) を含む20 mM Hepes-KOH 緩衝液 (pH 7.2) を加え、パストールピペットで極めて穏やかに吸ったり出したりして懸濁後、テフロンホモジナイザーで穏やかに均一にして、粗ミトコンドリア画分とする。なお、沈殿を懸濁する際に絵画用の小さいブラシでなでる方法もあるが、ブラシへの吸着がけっこう認められるので、パストールピペットの方をすすめる。この粗ミトコンドリア画分には、チラコイド膜断片や他の膜、パーオキシゾーム等他の小器官由来の混入がかなり認められる。

#### B. 全葉からの抽出法

プロトプラストを得る操作を行わず、機械的に組織を破壊するため、高収率での単離は望めないが、短時間で抽出できることとプロトプラスト作成過程における細胞やミトコンドリアの変化を考慮しなくても良い利点がある。ホーレンソー葉、トウモロコシ茎葉、エンドウ茎葉、ダイズ葉などが材料として用いられ、報告されてきた。ここでは、方法は類似しているので、トウモロコシ茎葉の例を示す<sup>8)</sup>。

操作はすべて4°Cで行う。発芽5日目のトウモロコシ茎葉約50 gに、5倍量の0.4 M マニトール、1 mM EDTA、0.1% BSA、0.6% ポリビニルポリピロリドンを含む0.1 M Hepes-KOH 緩衝液 (pH 7.5) を加え、シャー

レ中で鋭利なカミソリで約3分間切りきざむ。その後乳鉢に移してさらに磨砕し、抽出液を4層のガーゼで濾過する。濾液をAの場合と同様に1,000 g 10分と10,000 g 10分の遠心を行ない、粗ミトコンドリア画分を得る。乳鉢磨砕の他に、ワーリングブレンダーやポリトロンで数秒間処理して組織を磨砕してもよいが、乳鉢の方が再現性が高いようである。なお、ポリビニルポリピロリドンは、葉緑中のフェノール物質吸着剤として加えている。可溶性のポリビニルピロリドンは、後の操作で除去するのが困難になることから、不溶性の方が良い。

### 3) 粗ミトコンドリア画分からの精製

粗ミトコンドリア画分からは、パーコール不連続密度勾配遠心法を用いて、ミトコンドリアを純化する。パーコールの自己密度形成を利用した精製法も報告されているが、ここではホーレンソー、エンドウ、トウモロコシなどに広く適用されている<sup>6-8)</sup>不連続密度勾配法を紹介する。

パーコールの不連続層は4層から成り、各層は0.25 M ショ糖、20 mM Mops (あるいは HEPES)-KOH 緩衝液 (pH 7.2), 0.2% BSA (脂肪酸フリー) を含む。ベックマンスウィングローターSW 25-3 (SW 27-1) k 遠心チューブ(または、これと同等のもの)に、最下層から A: 4 ml 60% (v/v), B: 4 ml 45% (v/v), C: 4 ml 28% (v/v), D: 4 ml 5% (v/v) パーコール溶液を、順次パスツールピペットで界面が乱れないように、遠心チューブの内壁を伝わらせて重層する。1 ml の粗ミトコンドリアを最上層に重層し、L2-65B (L5-75) 超遠心機で、30,000 g (ボトム) 30 分の超遠心を行なう。遠心終了後、フラクションコレクターで分画し、細胞内小器官のマーカー酵素活性を測定し、精製ミトコンドリアを得る。なお、この分画に際しては、遠心チューブに細いガラス管を界面を乱さないように底まで入れ、ペリスタポンプで最下層から吸引・分画すると便利である。もちろん装置があれば、フラクションネーターで分画してもよい。細胞内小器官のマーカー酵素には、フマラーゼ(ミトコンドリア)、カタラーゼ(パーオキシゾーム)、NADPH-チトクロム C 還元酵素 (ER)、NADH-チトクロム C 還元酵素(液胞膜)、クロロフィル(チラコイド膜)を用いる。ミトコンドリアのマーカーに、チトクロム C 酸化酵素を利用している例を多く見るが、この酵素は

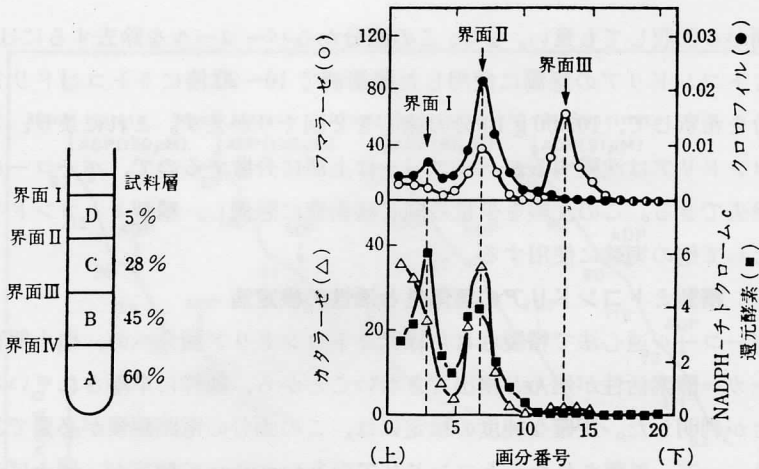


図1 バーコール不連続密度勾配遠心法によるホウレンソウ葉プロトプラストからのミトコンドリアの単離<sup>9)</sup>

図左に、バーコールの不連続密度各層の模式図を示した。図右は、密度勾配遠心後の各オルガネラマーカー酵素の分布を示した。マーカー酵素は、フマラーゼ(ミトコンドリア)、カタラーゼ(ペルオキシゾーム)、クロロフィル(チラコイド膜)、NADPH-チトクロムc還元酵素(ER)を用いた。酵素活性の単位は、 $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{各画分}$ で示し、クロロフィル量は $\text{mg}/\text{各画分}$ で示した。

\* 文献6より抜粋

膜結合酵素であり、*intact* なミトコンドリアのマーカーには、マトリクスに存在しているフマラーゼの方が良い。また余談であるが、同様の見地から、*intact* なパーオキシゾームを精製する際は、カタラーゼよりもヒドロキシピルビン酸還元酵素の方がマーカーとしては優れている。

さて、このバーコール不連続密度勾配遠心法では、図1に示したようにミトコンドリアはBとCの界面に集まる。チラコイド膜とパーオキシゾームはCとDの界面に、またERなどの膜はDと試料層の界面にそれぞれ集まる。図中、試料層に検出されている各マーカーの活性は、操作中に小器官が壊れて可溶性画分に移ったものであり、また図1には示されていないが時々各小器官が凝集したと思われる活性が、AとBの界面に認められる場合もある。この系を用いてミトコンドリアのみを対象とする場合は、ミトコンドリアの集まるBとCの界面付近に他のマーカー酵素活性が検出できないことから、パスツールピペットで注意深くミトコンドリアをこの

界面から回収しても良い。なお、この画分からパーコールを除去するには、粗ミトコンドリアの懸濁に使用した緩衝液で10~20倍にミトコンドリア画分を希釈して、10,000 g 10分の遠心を2回くりかえす。これにより、ミトコンドリアは沈殿するがパーコールは上清に分散するので、パーコールを除去できる。この沈殿を少量の同じ緩衝液に懸濁し、精製ミトコンドリアとして他の実験に使用する。

#### 4) 精製ミトコンドリアの無傷性と活性の検定法

パーコール遠心法で精製された緑葉ミトコンドリア画分への、他小器官マーカー酵素活性が殆んど検出できないことから、純粋に単離されていることが判明した。正確な純度の検定には、この画分の電顕観察が必要であろう。一方、単離されたミトコンドリアの *intactness* の検定が、例えばペプチドや他の物質の輸送などを研究するにあたっては必要とされる。この検定法には、a) ミトコンドリア二重膜構造の完全性と b) ミトコンドリアの呼吸活性が用いられる。

a) には、ミトコンドリア二重膜の外膜の完全性を調べる方法がある。外膜を通過できない基質を要求し、内膜との膜間層に局在する酵素活性を、高張液中でミトコンドリアを破壊しない場合と低張液中で破壊した場合を比較する酵素法である。このマーカー酵素には、膜間層を向いて内膜に結合しているコハク酸：チトクロムC還元酵素を用いて、0.3 M ショ糖添加と無添加処理での活性を比較すると良い。この方法により、ホーレンソー<sup>7)</sup> や トウモロコシ基葉ミトコンドリア<sup>8)</sup> では、90~95% 完全に外膜が保たれていた。

b) の呼吸活性は、クラーク型酸素電極法で簡単に測定できる。ハンザテック社あるいはランクブラザーズ社 (いずれも英国) から安価で販売されている。活性測定の反応溶液組成は、0.3 M マニトール、5 mM  $MgCl_2$ 、10 mM KCl、0.1% BSA (脂肪酸テリール)、を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液を基本とし、ミトコンドリア適量を加えて全量を1ないし2 ml とする。種々の呼吸基質を検討することができる。既知量の ADP を加え、酸化的リン酸化反応を酸素消費量で追跡することができる (図2)。

また、種々の呼吸阻害剤や他の薬剤の影響もこの方法で簡単に検討する

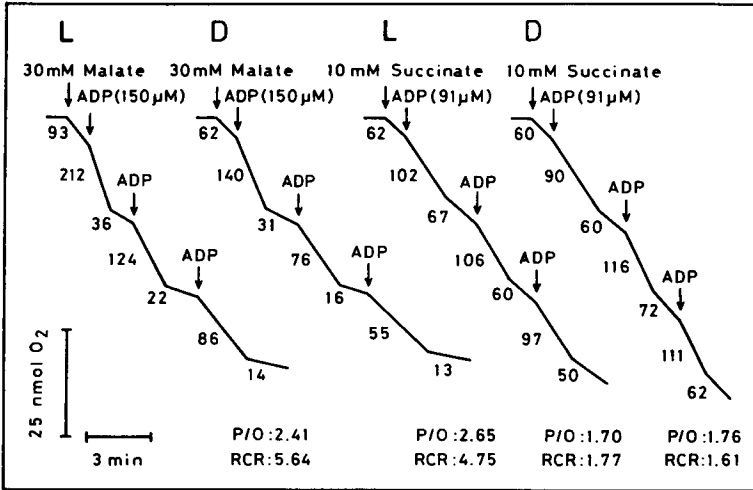


図2 トウモロコシ莖葉から純化されたミトコンドリアによるリンゴ酸とコハク酸の酸化  
 トウモロコシは明所(L), 暗所(D)で生育させ、発芽5日目の莖葉を材料とした。呼吸能はハンザテック社の酸素電極を用い30°Cで測定した。トレース上の数字は、酸素消費速度を  $\text{nmol}/\text{O}_2\text{Kmin}/\mu\text{g}$  ミトコンドリア蛋白質で示したものである。  
 \* 文献8より抜粋

表1. バーコールあるいはショ糖密度勾配遠心法で精製されたミトコンドリアの呼吸活性の比較

材料	媒体	リンゴ酸			コハク酸		
		state 3) <sup>a)</sup>	RCR <sup>b)</sup>	P/O <sup>c)</sup>	state 3) <sup>a)</sup>	RCR <sup>b)</sup>	P/O <sup>c)</sup>
ホウレンソウ <sup>9)</sup>	バーコール	321	2.7~2.9	1.4~2.6	238	2.4~2.6	1.8
トウモロコシ <sup>18)</sup>	バーコール	445	5.1	2.6	617	2.5	1.7
エンドウ <sup>18)</sup>	バーコール	438	8.7	2.3	525	2.5	1.8
エンドウ <sup>24)</sup>	ショ糖	163	8.5	1.9	115	1.4	1.3

- a) ADP 存在下の  $\text{O}_2$  吸収速度。単位は  $\text{nmol O}_2/\text{分}/\text{mg}$  蛋白質。
  - b) 呼吸調節比。
  - c) state 3での酸素消費量 (ng 原子) と加えた ADP (モル) の比。理論値は、リンゴ酸 3.0, コハク酸 2.0。
- \*文献6より抜粋



ことが可能である。パーコール遠心法で精製された緑葉のミトコンドリアは、リンゴ酸、コハク酸、クエン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、NADH、グリシン、グルタミン酸などを酸化できる<sup>7-9)</sup>。また、ミトコンドリア当りの酸素消費速度や呼吸調節比とも、非緑色組織から純化されたミトコンドリアと同等あるいはそれ以上であり、分画遠心で得られた緑葉の粗ミトコンドリアに比較して格段に高い。また、表1に示したように、ショ糖密度勾配遠心法で比較的クロロフィルの混入の少ないミトコンドリアに比較しても、呼吸活性ははるかに高く、ADP/P比も理論値に近い値が得られている。

### 5) 問題点

以上述べて来たように、パーコール不連続密度勾配遠心法は、比較的短時間の間に、他の細胞内小器官の混入が極めて少なく、かつ代謝活性の高い無傷ミトコンドリアを緑葉から単離できるすぐれた方法である。しかし、問題点もいくつか挙げられる。最大の点は、機械的抽出法を用いる場合、材料となる植物の生育時期によって得られるミトコンドリアの代謝活性が大きく変動することである。トウモロコシでは発芽5日目、エンドウでは発芽8日目の莖葉を材料とした場合が最適で、葉齢が進むと単離は困難になってくる。これは、組織の機械的強度の発達や単位組織当りのミトコンドリア数の減少が大きく影響を与えているようである。プロトプラストを出発材料にすると、この問題は解決できるが単離できるミトコンドリア量が限られてくる。最初のステップでの組織の破壊、抽出法を更に検討する必要があるものと思われる。

### 6) 緑葉ミトコンドリアを用いた研究例

トウモロコシ及びエンドウを用いた莖葉から単離されたミトコンドリアを用いて、以下のような研究例を紹介した。詳細については原報を参照。

- a) 単離ミトコンドリアによる  $Ca^{2+}$  の輸送と光の影響<sup>9)</sup>。
- b) ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に及ぼす高濃度  $NH_4^+$  の影響<sup>9)</sup>。
- c) ミトコンドリア内の  $NH_4^+$  濃度<sup>10)</sup>。
- d) NADH-グルタミン酸脱水素酵素のミトコンドリア内での局在と応応平衡<sup>11)</sup>。

e) 光呼吸窒素循環系におけるミトコンドリアの役割<sup>12,13)</sup>。

### 参考文献

- 1) 三上哲夫, 木下俊郎: 蛋白質・核酸・酵素 別冊 No. 30, p. 354-366 (1987).
- 2) 長谷俊治, 松原 央: 蛋白質・核酸・酵素 別冊 No. 30, p. 367-376 (1987).
- 3) 竹田真敏: 本ワークショップ報告 (1989).
- 4) Hanson JB, Day DA: in *The Biochemistry of Plants* (ed. Tolbert NE) **1**, p. 315-358, Academic Press Inc., New York (1980).
- 5) Quail PH: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 425-484 (1979).
- 6) 山谷知行: 蛋白質・核酸・酵素 別冊 No. 30, p. 28-36 (1987).
- 7) Nishimura M, Douce R, Akazawa T: *Plant Physiol.*, **69**, 916-920 (1982).
- 8) Yamaya T, Oaks A, Matsumoto H: *Plant Physiol.*, **75**, 773-777 (1984).
- 9) Yamaya T, Matsumoto H: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **31**, 513-520 (1985).
- 10) Yamaya T, Matsumoto H: *Plant Cell Physiol.*, **26**, 1613-1616 (1985).
- 11) Yamaya T, Oaks A, Matsumoto H: *Plant Physiol.*, **76**, 1009-1013 (1984).
- 12) Yamaya T, Oaks A, Rhodes D, Matsumoto H: *Plant Physiol.*, **81**, 754-757 (1986).
- 13) Yamaya T, Oaks A: *Physiol. Plant.*, **70**, 749-756 (1987).



# ミトコンドリアの構造と機能 (II)

## 蛋白質の膜透過の分子機構

竹 田 真 敏

---

### 1) はじめに

すべての細胞は原核細胞と真核細胞に大別される。細菌や藍藻類は前者に属し、後者には酵母、カビ、原生動物、高等藻類のような単細胞生物をはじめ、ほとんどすべての多細胞生物が含まれる。膜系が発達している真核細胞では、核をはじめ、ミトコンドリア、葉緑体、小胞体等の膜（生体膜）で仕切られた細胞小器官（オルガネラ）が存在し、それらオルガネラは遺伝情報の複製・発現、呼吸・エネルギー生成、蛋白質の合成等、細胞或は生物が生きていくために必要な機能を分担しあっている。--

ミトコンドリアは外膜と内膜の二重膜に包まれたオルガネラ（図1）で、分子状酸素による物質の酸化（呼吸）で得られたエネルギーをATPに変換する（酸化的リン酸化）ことを主要な役割としている。ミトコンドリアは4つのコンパートメント（外膜、膜間腔、内膜、マトリックス）に分れ、それぞれ、物質透過、エネルギーの収支、電子伝達・酸化的リン酸化、物質酸化等、特有の機能を持ち、オルガネラを構成している。言換えれば、各コンパートメントには、それらの機能を発現するために特有の蛋白質（酵素）が存在している。

ミトコンドリアのマトリックスには、固有のDNA、RNAがあり、それ自身、遺伝情報の複製・転写・翻訳の独立した機能を持っている。ミトコンドリアDNAは環状構造をしており、ゲノムの大きさは、14-18 kb（哺乳

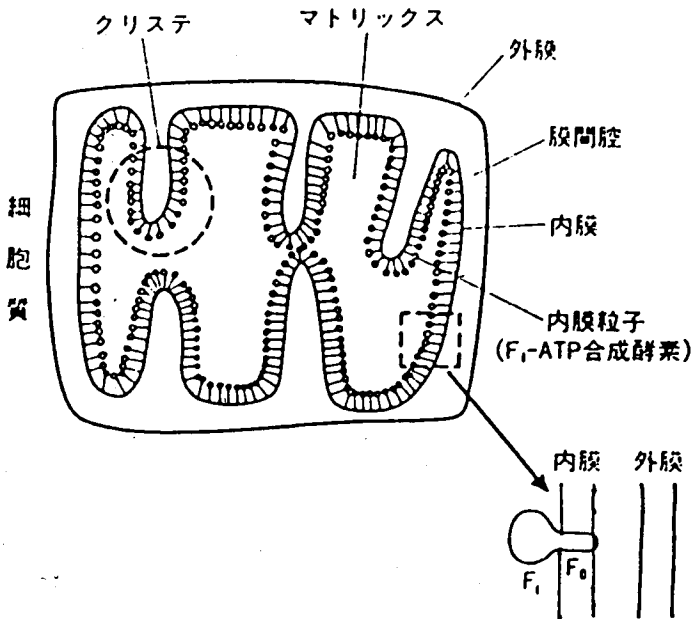


図1 ミトコンドリアの構造  
文献1より一部改変。

動物), 73-82 kb (酵母), 200-2,500 kb (高等植物) と生物種によって大きく異なる。しかし、ミトコンドリア DNA に含まれ遺伝情報は、いずれの生物種でも、高々38-50 種程度の蛋白質を翻訳しているに過ぎない(表1, 2)。したがって、ミトコンドリアを構成している残りの数百種類 (重量にして90% 以上) に及ぶ蛋白質は、核の遺伝情報 (DNA) によって支配されている。

核遺伝子の支配下にある蛋白質は、細胞質のリボソームで合成される。そのため、これらの新しく合成された蛋白質が、ミトコンドリアのしかるべき場所に定着して機能を発現するには、(1) ミトコンドリア膜を識別して内部へ進入する、(2) ミトコンドリアの4つのコンパートメントのいずれかに仕分けされる、(3) 分子集合して機能蛋白質に変換される、という3つの段階を経なければならない。見方をかえれば、新しく合成された蛋白質には、ミトコンドリアの膜を識別し内部へ進入して、各コンパートメン

トへ定着し、機能蛋白質に変換されるための情報が備わっていることになる。

では一体、そのような情報はどのような形（構造）で備わり、どのような仕組み（機構）で発現され、調節されているのだろうか？ これは、ミトコンドリアの構造と機能はもちろん、オルガネラの形成、進化さらには細胞の情報伝達及び形成機構を研究する上で、克服すべき問題であり、現代細胞生物学における最重要テーマの一つとなっている。細菌の分子遺伝

表1. ミトコンドリア遺伝子

遺伝子産物 ゲノムサイズ (kb)	哺乳動物	酵母	高等植物
	14-18	73-82	200-2500
リボソーム RNA			
大サブユニット	16S	21S	26S
小サブユニット	12S	15S	18S
5S	—	+	+
tRNA	22	25	~30
シンクロム c 酸化酵素			
サブユニット I	+	+	+
サブユニット II	+	+	+
サブユニット III	+	+	+
アポシクロム b	+	+	+
F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP 合成酵素			
$\alpha$ サブユニット	—	—	+
サブユニット 6	+	+	+
サブユニット 8	+	+	+
サブユニット 9	—	+	+
リボソーム結合蛋白質			
Var1/S5	—	+	+
S13	—	—	+
NADH 還元酵素			
サブユニット 1-6	6	—	?
RNA プロセッシング			
シクロム b	—	3	?
シクロム酸化酵素 SuI	—	(6)	?
URF	1	3	?

表2. ミトコンドリアのもつ情報と機能

	遺伝子	機能
蛋白質合成系	tRNA, rRNA, Maturase, サブユニット結合蛋白質 etc.	蛋白質合成 遺伝情報の発現
電子伝達系 エネルギー産生系	シンクロム b, シンクロム c 酸化酵素 及び ATP 合成酵素の膜成分	呼吸 呼吸 ATP 合成 物質酸化 (脂肪酸)
その他	不明  turf, pcf, プラスミド (S1, 2)	遺伝情報の保持と 安定化 細胞質遺伝 (母性遺伝) 雄性不稔

学、遺伝子操作技術の進歩は、この難問を次第に克服しつつある。私達は酵母  $F_1$ -ATPase を用いて、蛋白質のミトコンドリア膜の透過機構、さらに機能蛋白質への変換機構を研究している。本稿では、私達の研究を中心に、周辺の研究も含めて、ミトコンドリア蛋白質の生成機構について述べる。また、私達のこれまでの研究経過は、いくつかの総説として出版されている<sup>1-4)</sup>。

## 2) ミトコンドリア $F_1$ -ATPase

ミトコンドリア  $F_1$ -ATPase (以下、 $F_1$  と呼ぶ) は  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  と分子量の異なった5つのサブユニットからなり、いずれも核の遺伝子に支配されている (例外として、高等植物のミトコンドリアでは、 $\alpha$  サブユニットだけがミトコンドリア遺伝子の支配を受けている)。 $F_1$  は内膜のマトリックス側に局在し、生体膜成分である  $F_0$  と複合体 ( $F_1F_0$ ) を形成している (図1の挿入図)。 $F_0$  は、電子伝達系の働きで形成されたプロトン ( $H^+$ ) の輸送路 (チャネル) であり、このプロトンによる電気化学ポテンシャルを利用して、 $F_1$  による ATP 合成 (酸化的リン酸化) が行われる。したがって、 $F_1F_0$  は ATP 合成酵素、或は  $H^+$ -ATPase とも呼ばれ、生体の ATP の大部分はこの酵素によって産生される。このような  $F_1F_0$  は、ミトコンドリア内膜だけでなく、葉緑体チラコイド膜、細菌形質膜など、エネルギー転換生

体膜に普遍的に存在する。

$F_1F_0$ の触媒部位である $F_1$ のうちでも、活性中心は $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニット(以下、 $F_1\alpha$ 及び $F_1\beta$ と略す)である。私達は $F_1$ のミトコンドリアへの膜透過及び分子集合機構を明らかにするため、酵母を用い、先ず $F_1\alpha$ 及び $F_1\beta$ の構造遺伝子(*ATP 1*, *ATP 2*)をクローニングし、その全構造を決定した<sup>5,6)</sup>。その結果、酵母の $F_1\alpha$ 及び $F_1\beta$ 前駆体は、それぞれ544, 511アミノ酸残基から成ることがわかった。遺伝子配列より求められたそれぞれのアミノ酸配列を図2a, bに示す。これまで構造の明らかにされた葉緑体は、大腸菌及びミトコンドリアの $F_1\alpha$ および $F_1\beta$ のアミノ酸配列と比較して、活性発現に関与しているアミノ酸をはじめ、構造が保存されていることがわかる(それぞれ54-63%, 70%以上)。但し、酵母の $F_1\alpha$ 及び $F_1\beta$ には、それらのアミノ末端に余分なペプチド(延長ペプチド)がそれぞれ36及び19残基付いていた。これらの延長ペプチドは、核遺伝子に支配されているミトコンドリア $F_1\alpha$ 及び $F_1\beta$ に見られるが、大腸菌や核以外のオルガネラ(ミトコンドリア及び葉緑体)の遺伝子に支配されている $F_1\alpha$ 及び $F_1\beta$ には見られない(図2a, b)。

これまで、酵母からヒトに至るまで50種以上のミトコンドリア蛋白質の前駆体の構造が報告されている。シトクロム $b_2$ のように、延長ペプチドが80残基のアミノ酸から成るもの、外膜蛋白質やADP/ATPキャリアーのように前駆体と成熟体の分子量が同じものまで千差万別である。しかし、それらのアミノ末端付近の構造は2つのタイプに分けられる。1つは、塩基性アミノ酸(リジン, アルギニン)が多く、酸性アミノ酸(アスパラギン酸, グルタミン酸)は見られない。それに対して他方は、酸性アミノ酸に富んでいる。 $F_1\alpha$ 及び $F_1\beta$ ははじめ、多くのミトコンドリア蛋白質は、前者のグループに属し、ADP/ATPキャリアーやポリリン等は、後者のグループに属する(図3)。



(a)  $F_1\alpha$ 

1. M-VTIRADEISNIIIRERIEQYNREVKIVNTGTVLQVGGGIA  
 2. M--OLNSTEISELIKORIAQFNVSEAHNEGTVSVSDGVI  
 3. MEFSAPRAELTTLLESRMINFYTNLKVDEIGRVVSVGGGIA  
 4. MLARTAAIRSLRRTLINSTKAARPAALASTRRRLASTKAQPTVSSIIERIKGVSD EANLNENETGRVLA VGGGIA

RIHGLDEVAGELVEFEETIGIALNLESNNVGVVLMGDGLL IQEGSSVKATGRIAQIPVSEAYLGRVINALAKPI  
 RIHGLADCMQGE MISP LGNRYAIALNLERDSVGVAVMGPYADLAEGMKVKCTGRILEVVPVGRLLGRVVNTLGAPI  
 RVYGLNEIQAGMEVFASGVKGIALNLENENNGIVVFGSDTAIKEGDLVKRTGSIVDVPAGKAMLRVVDALGVPI  
 RVFGLNNIQAEELVEFSSGVKGMALNLEPGQGVIVLFGSDRLVKEGELVKRTGNIVDVPVPGLLGRVVDALGNPI

DGRGEISASEFRLIESAAPGIISSRRSVYEPLOTGLIAIDSMPIGRGQRELIIGDRQTGKTAVALDTILNQOQN-  
 DGKGLDHDGFSAVEAIAIPGVIERQSDVQPTQGYKAVDSMIPIGRQRELIIGDRQTGKTALAIIDAIIINQDSD--  
 DGKGLSDHERRRVEVKAPGIIERKSVHEPMQTGLKAVDSLVP IGRGQRELIIGDRQTGKTAIADITILNQKQMN  
 DGKGPIDAAASRSRAQVKAPGILPRRSVHEPVOTGLKAVDALVPIGRGQRELIIGDRQTGKTAVALDTILNQKRWNN

-V-----I-CVYVAIGQKASSVAQVVTTLQE-RGAMEYTIIVAETADSPATLQYLAPYTGAAEALEYMYRERHTLI  
 GI---K---CIYVAIGQKASTISNVVRKLEE-HGALANTIVVATASEAALQYLARMPVALMGEYFRDRGEDALI  
 GTNESETLYCVYVAIGQKRSTVAQLVQILSEA-NALEY SMLVAATASDPAPLQFLAPYSGCAMGEYFRDNGMHALI  
 GSDESKLYCVYVAIGQKRSTVAQLVQTL-EQHDAMKYSIIVAATASEAAPLQYLAPFTAASIGEWFRDNGKHALI

IYDDPSKQQAQYRQMSLLLRPPGREAYLGDVFLHSRLLERAAKLSLSS-L-----GE-----GSM TALPIVETQS  
 IYDLSKQAVAYRQISLLLRPPGREAFPGOVFLHSRLLERAAKLSLSS-L-----GE-----GSM TALPIVETQS  
 IYDLSKQAVAYRQMSLLLRPPGREAFPGOVFLHSRLLERAAKRS-D-----QT-----G-AGSLTALPIVETQA  
 VYDDLKASLARYQLSMLRPPGREAYPGOVFLHSRLLERAAKLS-E-----K-E--G-SGSLTALPIVETQG

GDVSAYIPTNVISITDGGIFLNSADLFNSGIRPAINVGISVSRVGSAAQIKAMKQVAGKLLKLELAQFAELEAFQFA  
 GDVSAYIPTNVISITDGGIFLETLNLFNAGIRPAVNPGISVSRVGSAAQIYIMKMLSGGIRTALAQYRELAASFQFA  
 GDVSAYIPTNVISITDGGICLETFLFYRGI RPAINVGLSVSRVGSAAQKAMKQVCGSSKLELAQYREVAFAQFG  
 GDVSAYIPTNVISITDGGIFLEAEFLYKGI RPAINVGLSVSRVGSAAQVKALKQVAGSKLFLAQYREVAFAQFG

SDLDAKATQNLARGORRELLKQSASAPLTVEEQIMTIYTGNGYLDLSEVGVQRKFLVELRVTLYKTNKQPF-QE I  
 SLDLDAATRKLQDHGQVTELLKQKQYAPMSVAQSLVLF AAERGLADVELSKIGSF EAALLAYVDRDHAPLMQEI  
 SLDLDAATQALLNRGARLTVPKQPQYELPIEKQIVVYIAAVNGFCDRMPLDRI SQYEKNILSTINPELLKSFLEK  
 SLDLDASTKQTLVRGRLTQLLKQNYSP LATEEQSMII-AGVNGHSGWYELSRIGFEFSSFLSYLKSNNHELLTEI

ISSTKTFTEAEALLKEAIEQDMRFLIOEQA  
 NG-TGGYNDEIEGKLGK-IL---DSFKATQSW  
 GGLTNERKMEPDASLKESALNL  
 RE-KGELSKELLASLK SATE----S FVATF

図2  $F_1\alpha$  及び  $F_1\beta$  のアミノ酸配列の比較。

文献2より一部改変。

(a)  $F_1\alpha$ 

- 1: タバコ (葉緑体), 2: 大腸菌, 3: トウモロコシ (ミトコンドリア)  
 4: 酵母 (*S. cerevisiae*, ミトコンドリア)。

(b)  $F_1\beta$ 

- 1: タバコ, 2: ホウレンソウ, 3: トウモロコシ (以上, 葉緑体), 4:  
 ウシ (ミトコンドリア, 延長ペプチド部分は未決定), 5: 大腸菌, 6:  
 酵母 (*S. cerevisiae*, ミトコンドリア)。

★: 活性に必要なアミノ酸。

○: 2価カチオン結合部位。

■: DCCD 結合部位。

↓: プロテアーゼによる切断箇所。

—の部分は共通なアミノ酸配列領域を示す。

(b) F<sub>1</sub>β

1. MRINPTTSGSGVSTLEKKNPGRVVQIIGPVLDAVFPPGKMPMIYNALVV--Q  
 2. MRINPTTSDPGVSTLEKKNLGRIAQIIGPVLNVAFFPPGKMPNIYNALIVK---  
 3. MRTNPTTSRPGISTIEEKSVGRIDQIIGPVLDTIFPPGKLPYIYNALIVKS--  
 4. SPSKAGATTGRIVAVIGAVVDVQFDEGLPP-ILNALEV---Q  
 5. MATGKIVQVIGAVVDVEFPQDQAVPRVYDALEV---Q  
 6. MVLRLTYATSRAAFKAAKQSAPLLSTSWKRCMASAAQSTPITGKVTAVIGAIVDVHFEQSELPAILNALEIKTPQ

GRDSVGGQPINVACEVQQLLGNRRVRAIAMSATEGLTRGMEVIDTGAPI SVPVGGATLGRIFNVLGEPVDNLGPVDT  
 GRDTAGQPMNVTCVQQLLGNRRVAVAMSATDGLTRGMEVIDTGAPLSVPVGGPTLGRIFNVLGEPVDNLRPVDI  
 -RDTADKQINVTCVQQLLGNRRVAVAMSATEGLMRGMEVIDTGTPLSVPVGGATLGRIFNVLGEPIDNLGPVDT  
 GRETR-----LVLEVAQHLGESTVRTIAMDGTEGLVRGQKVLDSGAPIRIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPIKT  
 NGNER-----LVLEVQOQLGGGIVRTIAMGSSDGLRRGLDVKDL EHP I E V P G K A T L G R I M N V L G E P V D M K G I G E  
 GK-----LVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEGLVRGEKVLDTGGPISVPVGRETLGRIINVIGEPIDERGPIKS

STTSPIHRSAPAF IQLDTKLSIFE TGI E V V D L L A P Y R R G G I G L F G G A G V G K T V L I M E L I N N I A K A H G G V S V F G G V  
 RTTSPIHRSAPAF TQLDTKLSIFF TGI K V V N L L A P Y R R G G I G L F G G A G V G K T V I I M E L I N N I A K A H G G V S V F G G V  
 SATFPIHRSAPAF IELDTKLSIFF TGI K V V D L L A P Y R R G G I G L F G G A G V G L T V L I M E L I N N I A L A H G G V S V F G G V  
 KQFAAIAEAPEFVEMSVQEQLLVTDKVVOLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVFIMELINNVAKAHGGVSFVAGV  
 EERWA I H R A A P S Y E E L S N S Q E L L E T G I K V I D L M C P F A K G G K V G L F G G A G V G K T V N M M E L I R N I A I E H S G V S V F A G V  
 KL R K P I H A D P P S F A E Q S T S A E I L E T G I K V V D L L A P Y A R G G K I G L F G G A G V G K T V F I Q E L I N N I A K A H G G F S V F T G V

GERTREGNDLYMEMKESGVINEENIAESKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDQVNEQDVLFLIDNIFRF  
 GERTREGNDLYMEMKESGVINEONIAESKVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDQVNEQDVLFLIDNIFRF  
 GERTREGNDLYMEMKESGVVNEKNIEESLVALVYQGMNEPPGARMRVGLTALTMAEYFRDQVNEQDVLFLIDNIFRF  
 GERTREGNDLYHEMIEESGVINLKDAT-SKVALVYQGMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEQDVLFLIDNIFRF  
 GERTREGNDYFHEMTDSNVI---D---KVSLVYQGMNEPPGNRLRVALTGLTMAEKFRD-EGRDVLLFVDNIYRY  
 GERTREGNDLYREMKETGVINL-EG-ESKVALVYQGMNEPPGARARVALTGLTIAEYFRDEEQDVLFLIDNIFRF

VQAGSEVSALLGRMPSAVGYOPLSTEMGSLQERITSTKEGSI T S I Q A V Y V P A D D L T O P A P A T T F A H L D A T T V L S R  
 VOAGSEVSALLGRMPSAVGYOPLSTEMGSLQERITSTKEGSI T S L Q A V Y V P A D D L T O P A P A T T F A H L D A T T V L S R  
 VOAGSEVSALLGRMPSAVGYOPLSTEMGSLQERITSTLGSITSLQAVYVPADDLTNPAPATTF A H L D A T T V L S R  
 TOAGSEVSALLGRIPSAVGYOPLATNMGTMOERITTTKKSITSVQAIYVPADDLTOPAVATF A H L D A T T V L S R  
 TLAGTEVSALLGRMPSAVGYOPLAEEMGVLQERITSTLTGSI T S V Q A V Y V P A D D L T O P S P A T T F A H L D A T T V L S R  
 TOAGSEVSALLGRIPSAVGYOPLATDMGLQERITTTKKSIVTSVQAVYVPADDLTOPSPSTF A H L D A S S V L S R

GLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQPRIVGEEHYETAQR-VKQTLQRYKELQDIIA I L G M D E L S E E D R L T V A R A R K I E R  
 GLAAKGIYPAVDPLDSTSTMLQPRIVGEEHYETAQR-VKETLQRYKELQDIIA I L G M D E L S E E D R L T V A R A R K I E R  
 GLASKGIYPAVDPLDSTSTMLQPRIVGNEHYETAQR-VKETLQRYKELQDIIA I L G M D E L S E E D R L T V A R A R K I E R  
 IAELGIYPAVDPLDSTGRIMNPVIGSEHYDVA-RGVOKILQDYKSLQDIIA I L G M D E L S E E D K L T V S R A R K I Q R  
 QIASLGIYPAVDPLDSTSRQLDPLVVGQEHYDVA-RGVQSI L Q R Y K E L Q D I I A I L G M D E L S E E D K L V V A R A R K I Q R  
 GISELGIYPAVDPLDPSKSRLLDAAVVGGQHYDVA-SK-VQETLQTYKSLQDIIA I L G M D E L S E Q D K L T V E R A R K I Q R

FLSQPFVFAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQILSGELDGLPEQAFYLVGNIDEATAKAMNLMEENLKK  
 FLSQPFVFAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQILSGEYDGLPEQAFYLVGNIDEATAKAMNLMEESKLLK  
 FLSQPFVFAEVFTGSPGKYVGLAETIRGFQILSGEYDGLPEQAFYLVGNIDEASTKA INLEESRLLK  
 FLSQPFQVAEVFTGHLGKLVPLKETIKGFQOILAGEYDHLPEQAFYVMVGP IEEAVAKADKLAEEHS  
 FLSQPFVFAEVFTGSPGKYVSLKDTIRGFKGIMEGEYDHLPEQAFYVMVGSIEEAVEKAKKL  
 FLSQPFVFAEVFTGIPGKLVRLKDTVASFKAVLEGKYDNIPEHAFYVMVGGIEDVVRKAEKLAREAN

## Amino Terminus Sequence of Mitochondrial Protein (Yeast)

	1	+	10	+	20+	Net charge																
F <sub>1</sub> -alpha	Met	Leu	Ala	Arg	Thr	Ala	Ala	Ile	Arg	Ser	Leu	Ser	Arg	Thr	Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Lys	+4	
F <sub>1</sub> -beta	Met	Val	Leu	Pro	Arg	Leu	Tyr	Thr	Ala	Thr	Ser	Arg	Ala	Ala	Phe	Lys	Ala	Ala	Lys	Gln	+4	
Cytochrome c peroxidase EF-Tu	Met	Thr	Thr	Ala	Val	Arg	Leu	Leu	Pro	Ser	Leu	Ser	Gly	Arg	Thr	Ala	His	Lys	Arg	Ser	Leu	+4
Cytochrome c oxidase IV PUT 2	Met	Leu	Ser	Leu	Arg	Gln	Ser	Ile	Arg	Phe	Phe	Lys	Pro	Ala	Thr	Arg	Thr	Leu	Cys	Ser	+4	
Alcohol DH III	Met	Leu	Arg	Thr	Ser	Thr	Leu	Phe	Thr	Arg	Arg	Val	Gln	Pro	Ser	Leu	Phe	Ser	Arg	Asn	+4	
Cytochrome b <sub>2</sub>	Met	Leu	Lys	Tyr	Lys	Pro	Leu	Leu	Lys	Ile	Ser	Lys	Asn	Cys	Glu	Ala	Ala	Ile	Leu	Arg	+4	
Cytochrome b mRNA proc.enz. 70 k OMP	Met	Val	Asn	Trp	Gln	Thr	Leu	Phe	Met	Val	Ser	Leu	Arg	Gln	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	+3	
Cytochrome bc <sub>1</sub> 14 k	Met	Pro	Gln	Ser	Phe	Thr	Ser	Ile	Ala	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Ile	Leu	Lys	Ser	Pro	Val	+1	
Cytochrome bc <sub>1</sub> 17 k ADP/ATP carrier	Met	Asp	Met	Leu	Glu	Val	Gln	Glu	Tyr	His	Glu	Gln	Leu	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Pro	Val	-3	
Porline	Met	Ser	His	Thr	Glu	Thr	Gln	Thr	Gln	Gln	Ser	His	Phe	Gly	Val	Asp	Phe	Leu	Met	Gly	-2	
	Met	Ser	Pro	Pro	Val	Tyr	Ser	Asp	Ile	Ser	Arg	Asn	Ile	Asn	Asp	Leu	Leu	Asn	Lys	Asp	-1	

図3 ミトコンドリア蛋白質のアミノ末端付近の構造(酵母)。  
文献3より一部改変。  
EF-Tu: Elongation factor Tu.  
PUT:  $\Delta$ -Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase.

3) ミトコンドリア F<sub>1</sub>-ATPase の膜透過機構3-1. 遺伝子操作による酵母 F<sub>1</sub> $\beta$  前駆体の膜識別と進入のシグナルの解析

酵母一大腸菌のシャトルベクター-pSEY101を用い、ATP 2と大腸菌 $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)との融合遺伝子を構築した(p $\beta$ Z1, 図4-a)。次にヌクレアーゼ Ba 131により、種々の長さの融合遺伝子を14種類構築した(p $\beta$ Z2~15, 図4-b)。これら融合遺伝子は、大腸菌、酵母いずれの系でも発現される。発現された融合蛋白質は、F<sub>1</sub> $\beta$ 前駆体のアミノ末端よ

図4 F<sub>1</sub> $\beta$ 遺伝子(ATP2)と $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)との融合。

(a) 遺伝子融合に用いたベクターと融合部位の構造。

文献あより一部改変。

(b) 融合遺伝子の構造。

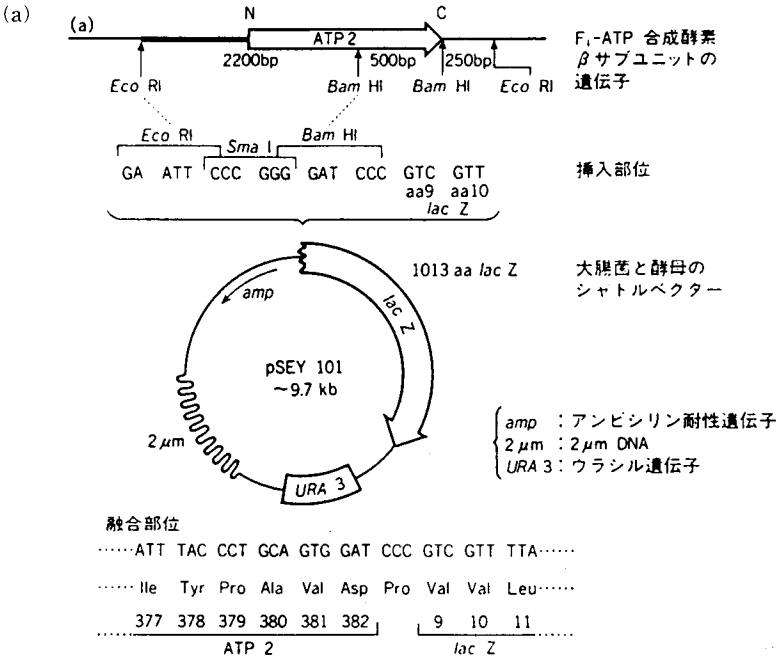
図中の Z5~Z15は *lacZ* の融合部位を示す。

↓ : プロテアーゼによる切断箇所。

~~~~: オリゴマイシンと相互作用する部分。

○ : 2価カチオン結合部位。

■ : DCCD 結合部位。



(b)

```

1      11      21
ATG GTT TTG CCA AGA CTA TAT ACT GCT ACA TCC GGT GCT TTT AAA GCA GCC AAA CAA TCC GCT CGG CTT CTA TCC ACT
met val leu pro arg leu tyr thr ser arg ala ala phe lys ala ala lys Gln Ser Ala Pro Leu Leu Ser Thr

          31      PvuII      41 Z15      51
TCG TCG AAA AGA TGT ATG GCG TCA GGT GCT CAA TCT ACT CCA ATC ACC GGT AAA GTT ACC GCT GTC ATT GGT GCC ATT GTT
ser trp lys arg cys met ala ser ala als gln ser thr pro ile thr gly lys val thr ala val file gly ala ile val

z14      61      71      81
GAC GTT CAT TTT GAA CAA TCA GAG TTG CCC GCT ATT TTG AAC GCT TTA GAA ATT AAA ACA CCT CAA GGT AAG TTG GTT TTG
asp val his phe glu gln ser glu leu pro ala ile leu asn ala leu glu ile lys thr pro gln gly lys leu val leu

          91      z13      KpnI      101      z12
GAA GTT GCT CAA CAT TTG GGT GAA AAC ACT GTC AGA ACC ATT GCT ATG GAT GGT ACC GAA GGT TTG GTC GGT GGT GAA AAG
glu val ala gln his leu gly glu asn thr val arg thr file ala met asp gly thr glu gly leu val arg gly glu lys

111      121      z11      131
GTT CTT GAC ATT GGT GGC CCT ATC TCC GTC CCA GTT GGG AGA GAA ACT TTA GGG AGA ATC ATC ACC CTT ATC GGT GAA CCT
val leu asp thr gly gly pro ile lys ser lys leu pro val gly arg glu thr leu gly arg file ile asn val file gly glu pro

141      z10      151      161
ATT GAT GAA GAA GGT CCA ATT AAG TCC AAA CTA AGA AAG CCA ATT CAC GCA GAC CCT CCT AGI TTT GCA GAA CAA TCT ACT
file asp glu arg gly pro ile his ala asp pro pro ser phe ala glu gln ser thr

171 z9      181
TCG GCT GAA ATT TTG GAA AGA GGT ATC AAA GTC GTC GAT CIA TTA GCT CCT TAT GCC AGA GGT GGT AAG ATT GGT CTT TTC
ser ala glu ile leu glu thr gly file lys val val asp leu leu ala pro tyr ala arg gly gly lys file gly leu phe

191      201      z8      211 NcoI      z7
GGT GGT GCA GGT GCT GGT AAG ACT GTG TTC ATT CAA GAA TTG ATT AAC AAT ATC GCC AAG GCC CAT GGT GGT TTT TCC GTT
gly gly ala gly val gly lys thr val phe file glu glu leu file asn asn file ala lys ala his gly gly phe sgr val

221      231      241 z6
TTC ACC GGT GGT GAT GAA AGG ACC AGA CAC GGT AAT GAC TTG TAC CCT GAA ATC AAG GAA ACT GTC GCT ATT AAC TTG GAA
phe thr gly val gly glu arg thr arg glu gly asn asp leu tyr arg glu met lys glu thr gly val file asn leu glu

251      261      z5
GGT GAA TCC AAG GTC GCC TTA GTT TAC GGT CAA ATC AAG CAA CCT CCA GGA GCC AGA GCC AGA GTC GCT TTA ACT GGT TTG
gly glu ser lys val ala leu val tyr gly gln met asn glu pro pro gly ala arg ala arg val ala leu thr gly leu
    
```

り 41~382 個のアミノ酸残基を含み、酵素活性を保った  $\beta$  ガラクトシダーゼと融合していた。F<sub>1</sub> $\beta$  前駆体の 382 残基を持つ融合蛋白質を  $\beta$  Z1 と命名し、以下、F<sub>1</sub> $\beta$  前駆体の長さの順に  $\beta$  Z2~15 (342~41 残基含む) と命名した<sup>7)</sup>。

次に、これらの融合遺伝子を野生株酵母 SEY2102 ( $\alpha$ , *ura3-52*, *leu2-3*, *112*, *suc2- $\Delta$ 9*, *his4-519*, *gal12*) に導入し、形質転換酵母から、ミトコンドリアを単離し、 $\beta$  ガラクトシダーゼを指標にして、融合蛋白質とミトコンドリアとの相互作用 (ミトコンドリアへの取り込み、局在部位) を調べた。その結果、融合蛋白質は 3 つに大別されることがわかった。クラス I ( $\beta$  Z1~6, 382~241 残基): 95% 以上ミトコンドリアへ転送されるが、酵母はグリセロール培地で生育できない。クラス II ( $\beta$  Z7~9, 214~171 残基): 90% 以上ミトコンドリアへ転送され、酵母はグリセロール培地でも生育できる。クラス III ( $\beta$  Z10~15, 144~41 残基): 60% 程度しかミトコンドリアへ転送されず、高濃度の塩によって容易にミトコンドリアから遊離するが、酵母はグリセロール培地でも生育できる<sup>7)</sup>。

さらに、融合遺伝子 p $\beta$  Z1 を用い、ATP 2 内の特異的な制限酵素切断部位を利用して、F<sub>1</sub> $\beta$  前駆体の構造を一部分欠損させた融合遺伝子を種々構築した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼを指標にして、これら欠損融合遺伝子のミトコンドリアへの取り込みを調べた (図 5)。それらの結果、アミノ末端の 10 残基のアミノ酸があれば、F<sub>1</sub> $\beta$  前駆体はミトコンドリアへ転送される、すなわち、F<sub>1</sub> $\beta$  前駆体がミトコンドリア膜を識別し、ミトコンドリアの内部へ進入できるシグナル (膜識別と進入のシグナル, Targeting and import signal) は、アミノ末端の 10 残基中に存在することがわかった<sup>7,8)</sup>。

ところで、図 3 からわかるように、膜識別と進入のシグナルと思われるミトコンドリア蛋白質のアミノ末端付近の構造には、塩基性アミノ酸に富む以外、これといった特徴 (Consensus sequence) が見出されなかった。しかし、Chou-Fasman 則<sup>9)</sup> にしたがって、F<sub>1</sub> $\alpha$  及び F<sub>1</sub> $\beta$  前駆体の二次構造の予想を行うと、膜識別と進入のシグナル部分を含むアミノ末端付近が、 $\alpha$  ヘリックス構造をとる確率の高いことがわかった。そこで、その部分が  $\alpha$  ヘリックス構造をとると仮定して、 $\alpha$  ヘリックスを二次元に投影した

|              |  | GLY | Mt (%β gal) |
|--------------|--|-----|-------------|
| pβ           |  | +   | -           |
| pβZ1         |  | -   | 95          |
| pβZ8         |  | +   | 90          |
| pβZ15        |  | +   | 10          |
| pβ Δ4-37Z1   |  | +   | <5          |
| pβ Δ10-37Z1  |  | +   | 10          |
| pβ Δ29T37Z1  |  | -   | 65          |
| pβ Δ36-41Z1  |  | -   | 95          |
| pβ Δ35G50Z1  |  | -   | 65          |
| pβ Δ97-211Z1 |  | -   | 85          |

図5 融合及び欠損遺伝子産物のミトコンドリアへの移行。

文献7, 8より一部改変。

GLY: グリセロール培地で生育できる (+), できない (-)。

Mt (%β gal): ミトコンドリアに取り込まれたβガラクトシダーゼ活性。

矢印(↓, ↑)で示した数字は, それぞれプロセッシング, オリゴマイシン感受性, 2価カチオン結合, DCCD結合及び活性中心に関与しているアミノ酸の位置を表わす。

pβ: nativeF<sub>1</sub>β前駆体をコードする遺伝子(ATP2)。

pβ Δ29T37Z1 F<sub>1</sub>β前駆体のアミノ末端から29~37番目のアミノ酸配列を欠損させた融合蛋白質をコードする遺伝子。

T, Gは欠損遺伝子の構築によって, 欠損部位に新しく生じたスレオニン, グリシンを表わす。

□: 欠損領域。

(Helical wheel plot)。その結果, 塩基性アミノ酸等の親水性のアミノ酸はαヘリックス構造の一方の側に集中し, それと反対側に, 疎水性のアミノ酸がクラスターをなす両親媒性構造をとることがわかった<sup>2,5)</sup>。このような両親媒性構造は, 他のミトコンドリア蛋白質のシグナル部分にも見出された(図6)。

### 3-2. ミトコンドリア蛋白質の受容体と膜透過に必要なエネルギー

新しく合成された前駆体は, リボソームを離れた後, ミトコンドリアの外膜に結合する。このことから, 外膜にはミトコンドリア蛋白質前駆体と結合する受容体の存在が予想されるが, 未だ受容体として同定された物質はない。しかし, トリブシン処理したミトコンドリアには前駆体を取り込

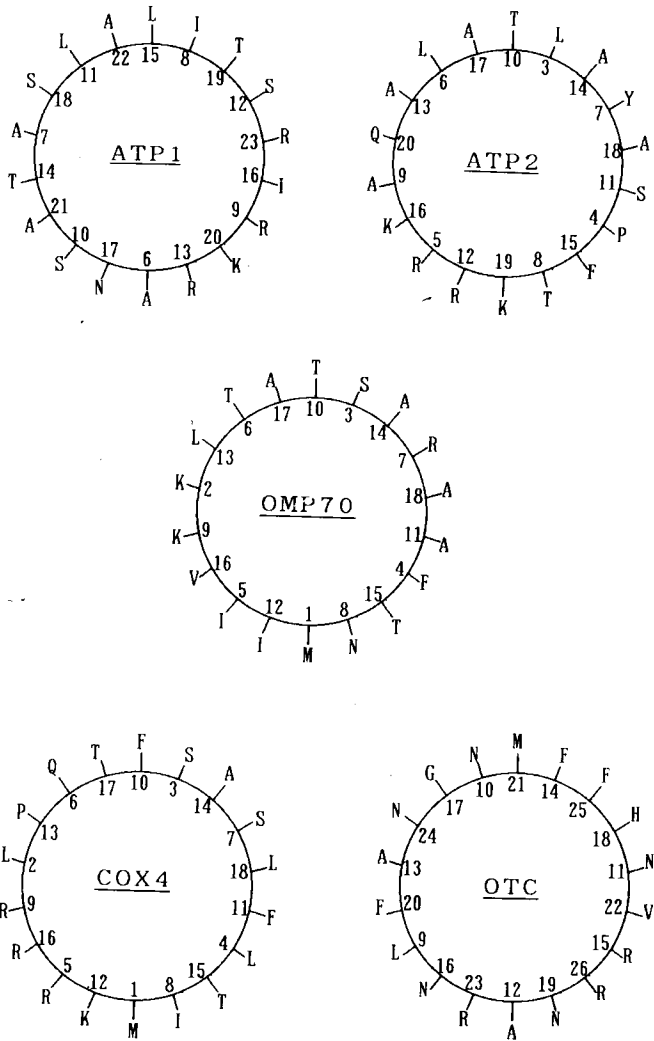


図6 ミトコンドリア蛋白質のシグナル領域に見られる両親媒性構造。

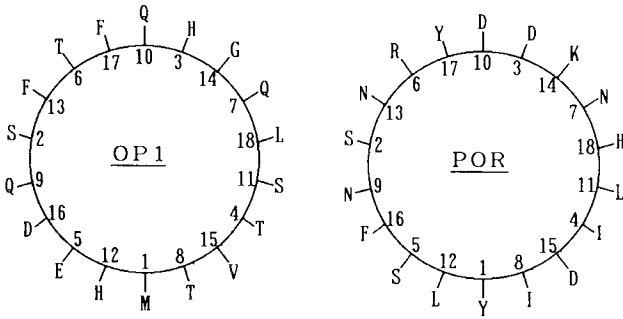
(a)  $F_1\beta$  型

ATP1: 酵母  $F_1\alpha$ , ATP2: 酵母  $F_1\beta$ , OMP: 酵母 70KD 外膜蛋白質,  
COX4: 酵母シトクロム c 酸化酵素サブユニット IV, OTC: Human  
オルニチントランスカルバミラーゼ。

(b) ADP/ATP キャリアー型

OPI: 酵母 ADP/ATP キャリアー, POR: 酵母ポリン。

番号は、それぞれの前駆体のアミノ末端からのアミノ酸の位置を表わす。



まれないことから、前駆体と外膜との結合部位には蛋白質性物質が関与していることは確かなようである。

最近、前駆体のミトコンドリアへの転送に必要な細胞質因子が高度(2万倍)に精製され、その性質が明らかになってきた<sup>10)</sup>。それによると、この細胞質因子は、分子量10~20万であり、前駆体のシグナル部分と親和性をもつことがわかった。したがって、新しく合成された前駆体が、直接外膜に結合するのではなく、細胞質因子と結合した前駆体が外膜の受容体と結合するという考え方が有力になってきた。

新しく合成された前駆体は、リボソームから離れた後、プロテアーゼ等の攻撃を防ぐため、高次構造(多量体等)等、“一定の折たたまれた(folding)構造”を形成し、一時的に安定化されていると考えられる<sup>11)</sup>。しかし、この構造のままではミトコンドリア膜(受容体)と結合できない。そのため、前駆体はその構造の一部をほぐし(unfolding)、ミトコンドリアへ移行できる、言換えれば、前駆体(或は前駆体—細胞質因子複合体)がミトコンドリア外膜の受容体に結合できるコンフォーメーション(Translocation-competent conformation)をとらなければならない。この過程では、ATP或はGTPの加水分解が要求される<sup>12-14)</sup>。このNTPの加水分解には、熱ショック蛋白質(hsp70サブファミリー)が関与していると思われ<sup>15)</sup>、熱ショック蛋白質が前駆体の構造をほぐす酵素の本体(Unfoldase)ではないか、という興味深い考え方が有力になってきた<sup>16)</sup>。

$F_1\beta$  はじめ、前駆体(或は前駆体と細胞質因子複合体)とミトコンドリア



外膜（受容体）との結合する過程では、内膜に膜電位 ( $\Delta\psi$ ) は形成されなくともよい。しかし、前駆体がミトコンドリアの内部へ移行する過程には膜電位を必要とする<sup>11)</sup>。膜電位は、前駆体のシグナル部分が、内膜を透過するのに必要であって、それに続く成熟体部分が内膜を透過するには必要ではない<sup>11)</sup>。言換えれば、内膜に膜電位が形成されると、前駆体のシグナル部分はマトリックスに到達できるが、前駆体のカルボキシル側の大部分はミトコンドリアの外側、つまり、細胞質に残った状態である<sup>11)</sup>。細胞質に残っている前駆体部分がミトコンドリア膜を透過するためには、この部分の構造がほぐれ(unfolding)、膜を透過できる構造をとる必要がある。そのため、この段階で、もう一度 ATP 或は GTP の加水分解によるエネルギーが要求される<sup>12-14)</sup>。この段階では、最初の前駆体と受容体との結合に比べて、より多くの NTP の加水分解エネルギーが使われる<sup>14)</sup>。

前述したように、ミトコンドリアの外膜には受容体が存在すると思われるが、前駆体と受容体との結合様式は一つではない。膜識別と進入のシグナル部分と思われる前駆体のアミノ末端付近の構造を見ても、 $F_1\beta$  のグループと ADP/ATP キャリアーやポリリン等とは違うようである(図3)。前駆体と外膜との結合部位のプロテアーゼに対する感受性の違い<sup>11)</sup>、さらに、この節で述べたように、前駆体と受容体との結合及び膜透過に必要な駆動力(エネルギー)の使われ方、違い等から考えると、前駆体と受容体との結合様式には、 $F_1\beta$  型(大部分のミトコンドリア蛋白質が含まれる)、ADP/ATP キャリアー型、シトクロム *c* 型の3通りあると思われる<sup>3,4)</sup>。

### 3-3. 前駆体の進入ゲートと膜透過中間体の検索

ミトコンドリア外膜の受容体と結合した前駆体は、そのままではミトコンドリアの内部へ進入できないことはすでに述べた。前駆体が内部へ進入するには、ここで膜電位が必要となる。ミトコンドリアを  $Mn^{2+}$  等の2価カチオン或はコハク酸や ADP で処理すると、内膜と外膜が融合した状態が電子顕微鏡で観察される<sup>17,18)</sup>。これは、呼吸系の酵素の働きが活発になり、内膜が活性化され膜電位が形成されたことによると考えられる。 $F_1\beta$  等のミトコンドリア蛋白質前駆体は、この外膜と内膜が融合した部位を通して、ミトコンドリア内部へ進入していることが、生化学、分子遺伝学及び免疫

電顕法によって形態学的にも確かめられた<sup>19-21)</sup>。

3-1で述べたように、*ATP 2-lacZ* 融合遺伝子によって発現した  $F_1\beta$ - $\beta$  ガラクトシダーゼ融合蛋白質は、 $F_1\beta$  前駆体の膜透過と進入のシグナルを持っているため、ミトコンドリアへ移行出来る (図 5)。また、native  $F_1\beta$  と同様、熱ショック蛋白質 (hsp70) によってミトコンドリアへの移行が阻害される<sup>20)</sup>。しかし、融合蛋白質のうち、 $F_1\beta$  の寄与が大きい(382~241 アミノ酸残基)  $\beta$  Z1~ $\beta$  Z6 が発現している酵母は、形質転換前の酵母 (野生株) と違って、グリセロール等の非発酵性の炭素源では生育できなくなる<sup>2,7)</sup> (図 5)。

この原因を明らかにするため、最初に融合蛋白質のうち、それぞれ異なるクラスに属する  $\beta$  Z8,  $\beta$  Z15 を選び、これら融合蛋白質のミトコンドリアでの局在部位を調べた。これら融合蛋白質を発現している酵母よりミトコンドリアを単離し、ショ糖密度勾配遠心法等によるミトコンドリアの細分画及びミトコンドリアを Triton $\times$ 100 やプロテアーゼで処理し融合蛋白質への影響を検討した。その結果、いずれの融合蛋白質もミトコンドリア膜画分に回収されるが<sup>7)</sup>、 $F_1\beta$  部分が長い融合蛋白質ほど、Triton $\times$ 100 やプロテアーゼの影響を受けにくいことが示された<sup>2,7,20)</sup>。また、いずれのミトコンドリアにおいても、呼吸調節率 (Respiratory control rate) は 4~5 と野生株酵母 (対照) と同じであり、シトクロム *c* 酸化酵素 (内膜)、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH, マトリックス), Adenylate kinase (膜間腔), Antimycin insensitive NADH cytochrome *c* reductase (外膜) 等、他のミトコンドリアの酵素活性にも差が見られない<sup>20)</sup> ことから、融合蛋白質の移行によってミトコンドリアの構成成分等は損傷を受けていないこともわかった。

第 2 章でも述べたように、 $F_1\beta$  は本来内膜のマトリックス側で、 $F_1$  の一員として  $F_0$  と複合体  $F_1F_0$  を形成して ATP 合成を行なっている。したがって、native  $F_1\beta$  はマトリックスに到達できる可溶性蛋白質である。しかし、 $F_1\beta$ - $\beta$  ガラクトシダーゼ融合蛋白質は、マトリックスではなく、膜画分に局在していることが上記の実験によって示された。そこで私達は、これら融合蛋白質はミトコンドリアを通過途上で、膜に留まっている膜透過

中間体 (Translocational intermediate) のモデルになると考え、プロテイン A-金を用いた免疫電顕法によって、視覚的にそれら膜透過中間体を捕らえることに成功した<sup>20,21)</sup>。

$\beta$  ガラクトシダーゼ抗体でインキュベートしたミトコンドリアをプロテイン A-金で標識し、固定後、超薄切片を作製して<sup>20)</sup> (走査型電子顕微鏡で見る場合は超薄切片にはしない)<sup>21)</sup>、ミトコンドリアを観察すると、金粒子はミトコンドリア外膜の外側(細胞質側)に、1個のオルガネラ当り、4~5か所見られた。1か所につき、金粒子は数個~数十個集中していた<sup>20,21)</sup>。また、金粒子の局在部位は、内膜と外膜が接近していることも観察された<sup>20)</sup>。面白いことに、 $\beta$  Z1 を取り込んでいるミトコンドリアでは、金粒子はオルガネラの外側だけでなく内側にも観察された<sup>20)</sup>。

以上の諸実験から、次の結論が得られた。 $F_1\beta$ - $\beta$  ガラクトシダーゼ融合蛋白質は、 $F_1\beta$  部分が大きい(長い)ほど、native  $F_1\beta$  と同様、ミトコンドリアの膜透過装置を経由して、ミトコンドリアの内部へ進入が、 $F_1\beta$  部分の占める割合の大きい(382 アミノ酸残基)  $\beta$  Z1 でも、融合蛋白質分子全体は、内膜を通り抜けてはいない。したがって、 $\beta$  Z1 等クラス I に属する融合蛋白質を発現し、ミトコンドリアに取り込んだ酵母では、融合蛋白質が内膜に留まっている(ひっかかっている?) ため、内膜の本来の活発な動きが抑えられ、ミトコンドリアとしての機能が低下することによって、グリセロール等の非発酵性炭素源では生育出来なくなるものと思われる<sup>20)</sup>。

### 3-4. 前駆体のプロセッシングと機能蛋白質への分子集合

ミトコンドリアの内部に到達した前駆体の多は、マトリックスの金属プロテアーゼ<sup>22,23)</sup>によって延長ペプチド(シグナル部分を含む)を切り離し、成熟体となり、膜等然るべき部位にアセンブリーされて、機能を持った蛋白質複合体に変換される<sup>5,6)</sup>。この金属プロテアーゼは、種を越えて広く存在していると思われ、基質特異性が極めて高く、ミトコンドリア蛋白質前駆体以外のポリペプチドは切断されない。切断箇所の認識も特定のアミノ酸配列ではなく、より高度なコンフォーメーションによって支配される<sup>4)</sup>。最近、このプロセッシングプロテアーゼの遺伝子が、アカパンカビ及び酵母より単離され、それらの塩基配列から蛋白質の一次構造が求められ

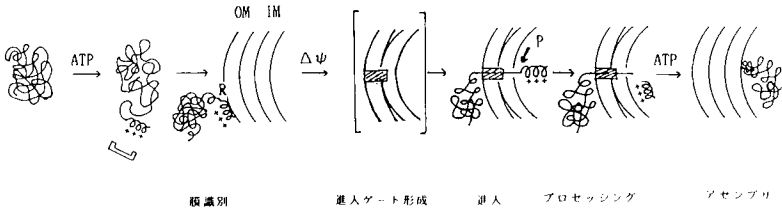


図7 F<sub>1</sub>-ATPase のミトコンドリアへの転送及び分子集合機構。

文献4 より一部改変。

- : F<sub>1</sub>β 前駆体
- : 膜識別と進入のシグナル
- : 細胞質因子
- R : 受容体
- Δψ : 内膜の膜電位
- : 進入ゲート
- P : マトリックスの金属プロテアーゼ
- OM : 外膜
- IM : 内膜

た<sup>24,25)</sup>。マトリックスのプロセッシングプロテアーゼは、膜に埋め込まれていないこと、ミトコンドリア蛋白質以外の前駆体には作用しないこと、金属プロテアーゼであること等から、バクテリアの形質膜や真核生物小胞体膜のシグナルペプチダーゼとは異なったタイプのプロセッシングペプチダーゼと思われる。

F<sub>1</sub>β 遺伝子 (*ATP 2*) を破壊した酵母からミトコンドリアを単離し、F<sub>1</sub>α が正常に取り込まれているかどうか調べたところ、F<sub>1</sub>β がいない細胞でも、F<sub>1</sub>α はミトコンドリアへ移行し、野生株と同様、安定に存在していることがわかった<sup>6)</sup>。すなわち、*in vivo* においては、ミトコンドリアの外側で合成された F<sub>1</sub>α 及び F<sub>1</sub>β 前駆体は、それぞれ独立にミトコンドリアへ移行していることが示された<sup>6)</sup>。

また、F<sub>1</sub>β が発現されない酵母は、F<sub>1</sub>β を持っている野生株酵母に比べて、ミトコンドリアの呼吸調節率には変化が見られないが、オリゴマイシン非感受性になり、F<sub>0</sub> 部分すなわちプロトンチャネルが正常に働いていないことも明らかになった<sup>7)</sup>。

これまでの実験で明らかになった、リボソームで新しく合成された F<sub>1</sub>β 前駆体が、ミトコンドリア膜を透過する分子機構の概略を図7にまとめた。

#### 4) おわりに

分子遺伝学<sup>26)</sup>、遺伝子操作技術の長足の進歩により、細胞質のリボソームで新しく合成された蛋白質が、ミトコンドリアへ移行する分子機構が次第に明らかになり、ミトコンドリアの生合成機構の研究も分子レベルで議論できるようになってきた。しかし、これまでの研究は、主として、細胞質側の情報に基づく成果であり、それに比べて、蛋白質を受入れる主体であるミトコンドリア側の情報、言換えれば、ミトコンドリア DNA で合成される蛋白質の機能、或は核支配蛋白質との相互作用の機構及び他のオルガネラとの物質の伝達機構等に関しては、不明の点が多い。ミトコンドリアの主要な機能である酸化的リン酸化の担い手である  $F_1F_0$  を一つとっても、触媒部位  $F_1$  の  $\alpha$  サブユニットが、酵母はじめ真核生物では、全て核遺伝子の支配を受けているのに、高等植物だけはミトコンドリアの遺伝子に支配されていること(因に、酵母とマメの  $F_1\alpha$  では、延長ペプチドを除くと、70% 以上のホモロジーがある)、 $F_1$  の  $\alpha$ 、 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットの比が、真核、原核生物及びオルガネラの由来を問わず、化学量論的に 3:3:1 であること、生体膜成分である  $F_0$  (ミトコンドリアや葉緑体の  $F_1F_0$  では、このうちの 2~3 種のサブユニットはオルガネラ自身の遺伝子に支配されている) は、種間の類似性が極めて低い、つまり、種特異性が見られること等があげられる。

最近、高等植物に見られる雄性不稔現象が、ミトコンドリア遺伝子によって支配されていることがわかってきた。まだ、トウモロコシ、ツクバネアサガオ等数種の植物でしか報告されていないが、ミトコンドリアの持つ機能、情報、特異性を考えても極めて興味深い問題である。私達も現在、東北大学遺伝子生態研究センターの亀谷寿昭博士のグループと共同で、ニンジン<sup>27)</sup>の雄性不稔株ミトコンドリア DNA より、雄性不稔に関わる遺伝子のクローニングを進めている<sup>27)</sup>。また、高等植物でもミトコンドリア DNA の全構造の解明が進められている(平井氏の論文参照)。これらの研究の進展によって、ミトコンドリアの構造と機能はさらに明らかになり、ミトコンドリアの進化、起源等の問題点も次第に明らかになってくるものと期待さ

れる。

## 謝辞

本研究は、筆者がテキサス大学の Michael G. Douglas 博士の研究室（現、Dallas 校）に留学の機会を得た時から始まった。博士はじめ、Douglas 研究室の方々、カリフォルニア工科大学、Scott D. Emr 博士、電子顕微鏡による膜透過中間体の研究に協力して下さった山形大学医学部、今井 大、湯田文朗両博士、鳥取大学医学部、田中敬一博士に心から感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 竹田真敏：科学，**56**, 468-477 (1986).
- 2) 竹田真敏：蛋白質核酸酵素，**32**, 299-317 (1987).
- 3) 竹田真敏，Emr, S.D., Douglas, M.G.: 酵母のバイオテクノロジー — 基礎と応用 — (平野 正編)，学会出版センター，pp. 71-81 (1988).
- 4) 竹田真敏：バイオ研究データブック，酵母編，(安業泰宏，石川辰夫，田中健治総監修)，医学出版センター，印刷中。
- 5) Takeda, M., Chen, W.-J., Saltzgaber, J., Douglas, M.G.: *J. Biol. Chem.* **261**, 15126-15133 (1986).
- 6) Takeda, M., Vassarotti, A., Douglas, M.G.: *J. Biol. Chem.* **260**, 15458-15465 (1985).
- 7) Emr, S.D., Vassarotti, A., Garrett, J., Geller, B.L., Takeda, M., Douglas, M.G.: *J. Cell Biol.* **102**, 523-533 (1986).
- 8) Vassarotti, A., Chen, W.-J., Smagula, C., Douglas, M.G.: *J. Biol. Chem.* **262**, 411-418 (1987).
- 9) Chou, P.Y., Fasman, G.D.: *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 251-276 (1978).
- 10) Ono, H., Tuboi, S.: *J. Biol. Chem.* **263**, 3188-3193 (1988).
- 11) Chen, W.-J., Douglas, M.G.: *J. Biol. Chem.* **262**, 15598-15604 (1987).
- 12) Chen, W.-J., Douglas, M.G.: *Cell* **49**, 651-658 (1987).
- 13) Eukers, M., Opplinger, W. & Schatz, G.: *EMBO J.* **6**, 1073-1077 (1987).
- 14) Pfanner, N., Tropschug, M., Neupert, W.: *Cell* **49**, 815-823 (1987).
- 15) Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A., Schekman, R.: *Nature* **332**, 800-805 (1988).
- 16) Rothman, J.E., Kornberg, R.D.: *Nature* **322**, 209-210 (1986).
- 17) van Venetie, R., Verkleij, A.J.: *Biochim. Biophys. Acta* **692**, 397-405 (1982).
- 18) Knoll, G., Brdiczka, D.: *Biochim. Biophys. Acta* **733**, 102-110 (1983).
- 19) Schwaiger, M., Herzog, V., Neupert, W.: *J. Cell Biol.* **105**, 235-246

- (1987).
- 20) Takeda, M., Yuda, F., Douglas, M.G., Imai, Y.: submitted.
  - 21) Takeda, M., Tanaka, K.: 投稿準備中.
  - 22) McAda, P.C., Douglas, M.G.: *J. Biol. Chem.* **257**, 3177-3188 (1982).
  - 23) Bohni, P., Daum, G., Schatz, G.: *J. Biol. Chem.* **258**, 4937-4943 (1983).
  - 24) Hawlitschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F-U., Neupert, W.: *Cell* **53**, 795-806 (1988).
  - 25) Witte, C., Jensen, R.E., Yaffe, M.P., Schatz, G.: *EMBO J.* **7**, 1439-1447 (1988).
  - 26) Douglas, M.G., Takeda, M.: *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 192-194 (1985).
  - 27) 神崎洋之, 竹田真敏, 亀谷寿昭: 日本植物学会東北支部会(昭和63年度)講演要旨集.

# イネオルガネラ DNA の構造

平 井 篤 志

---

## 1) はじめに

高等植物には現在細胞核、葉緑体、ミトコンドリアに遺伝情報が存在していることが明らかになっている。そのうちの一つである葉緑体は地球上の全生物が共存するために必須な炭素源を供給している光合成を行う重要な器官である。そこには 120-160 kb の環状 DNA があり、独自の遺伝情報発現と光合成に必要な各種遺伝子が納められている。タバコやゼニゴケではすでに葉緑体 DNA の全塩基配列が決定されており、それによると 4 種のリボソーム RNA, 30 種の転移 RNA, 90 種近くのタンパク質の遺伝子が含まれていることが明らかにされている。このうち遺伝情報発現のためには RNA ポリメラーゼの一部、すべてのリボソーム RNA と 19 種のリボソームタンパク質などが code されている。

また光合成に関しては炭酸ガス固定に直接関与する Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase (Fraction I タンパク質) の大サブユニット、光リン酸化反応に関与し ATP を産生する共役因子 (Coupling factor) の内  $CF_1$  の  $\alpha, \beta$  および  $\epsilon$  サブユニットと  $CF_0$  の I および III サブユニット、光化学系 I の反応中心である  $P_{700}$  のアポタンパク質、光化学系 II に関与するタンパク質の内クロロフィル a と結合する 51KD と 44KD タンパク、キノンと結合すると言われている 32KD タンパクと D2 タンパク、電子伝達系に関与するチトクローム f と  $b_6 \cdot b_{559}$  などの遺伝子が含まれ、核にある遺伝



子と協調して光合成能を遺伝的に支配している。

このように葉緑体ゲノムは重要であるが最近父性遺伝をするといわれている針葉樹などを除き一般的には母性遺伝を行うため交雑によりこれを改良することができないので、遺伝子工学や細胞工学などの新技術による育種に大きな期待がかけられている。

一方すでに全塩基配列が2植物で決定されていることからわかるように、葉緑体 DNA の大きさは適当な 6 塩基認識の制限酵素で 10-30 の断片に切断することができ、プラスミドにクローニングしその微細構造を調べることが他の DNA と比べて比較的容易である。

この葉緑体 DNA の分子構造を調べることは第 1 には光合成関連遺伝子の構造と機能効率の関係を明らかにし、より効率の良い遺伝子を探索そして将来は合成するのに役立つであろう。第 2 には遺伝情報発現の機構を解明し、遺伝子発現の適正な効率化を目指すことを可能にする。特に葉緑体の遺伝情報発現系は原核生物と真核生物の両方の特徴を持っており、この機構を調べることは興味深い。第 3 に葉緑体 DNA の構造解析を進めて行けば、その複製機構が解明されるであろう。それを利用した外来遺伝子導入システムが作られる可能性があり、それにより葉緑体ゲノムの改変が可能になるであろう。このように葉緑体 DNA の構造と機能をクローニング技術を用いて解析することは基礎科学の面でも、またその応用の 1 つである植物育種の面でも重要である。

## 2) 葉緑体 DNA の単離

高等植物の葉緑体 DNA を単離するのに一般的にはまず葉緑体を単離してそれから DNA を抽出する方法が取られている。葉緑体は浸透圧を保つように蔗糖溶液中で穏和な条件で細胞を破壊し、蔗糖密度勾配遠心法で得る場合が多い。しかし四塩化炭素とヘキサンによる非水系で単離・純化されることもあり、小麦で適用されている。またイネのように組織が硬く、葉緑体の単離が困難である場合は液体窒素中で幼苗を磨砕し、その粉末から葉緑体を抽出し、低速の蔗糖密度勾配遠心法で純化し、さらにそれから DNA を抽出するのが良いようである。この方法はイネだけでなく若い葉

を用いればマツなど樹木にも有効であり、ほとんどの植物に利用できるのではないと思われる。しかし何れの場合でも若い生長している植物を材料とすることが非常に大切である。

単離した葉緑体に DNase を処理して、核 DNA などの混在を防ぐ方法があるが、エンドウなどには有効でもタバコなどには利用できないので注意することが必要である。

### 3) 制限酵素による分析

葉緑体 DNA は長さが 100 kbp 以上あるので制限酵素で適当な長さに切断しないと操作が困難である。このとき DNA の純度によっては制限酵素で切れないことがある。これは酵素反応を阻害する重金属、洗剤、炭水化物や塩などが混じっているためで、Ammonium acetate のエタノール沈澱や沈澱を 70% エタノールで洗う操作をやり直すだけでうまく行くこともある。しかしそれでも制限酵素が完全には働かない場合は塩化セシウムによる平衡密度勾配遠心法を行う必要がある。

制限酵素による断片をアガロース電気泳動を行うと他の種の葉緑体 DNA と構造的にどの程度似ているかを知ることができ、断片の大きさを合計することにより、DNA の大きさも知ることができる。

イネ葉緑体 DNA を種々の制限酵素で切断し、アガロース電気泳動して分析したが、Eco RI, Bam HI, Hind III で切断した場合は断片の数が多くなり、同じ 6 塩基認識の制限酵素でも Sal I, Pst I, Pvu II で切断した場合は断片数が少なくなる。これは他の葉緑体 DNA と同じ傾向である。また Sal I, Pst I, Pvu II の断片の長さの合計はいずれも 130 kb でイネ葉緑体 DNA の大きさが 130 kb であることを示している。他の葉緑体 DNA でも同じ方法で大きさが推定されているが単子葉植物のトウモロコシの 139 kb や小麦の 135 kb は、双子葉植物のタバコ、大豆、ホウレンソウなどより 30 kb ほど小さい。

またこれらの実験で種々の制限酵素による断片数と最大の断片のサイズがわかれば、クローニングするときどの制限酵素を用いれば良いかを知ることができる。

#### 4) 物理地図の作成

DNA の構造を知るために必要な制限酵素断片の物理地図は 1976 年にトウモロコシのが発表されて以来、タバコ、ホウレンソウ、大豆、小麦、イネなどほとんどの重要な作物で報告されている。DNA の構造を明らかにするためには、制限酵素による断片が実際の DNA でどのように配列しているかを調べる必要がある。

このためには普通 2-3 種類の制限酵素をそれぞれ単独で働かせた時の断片と同時に働かせた場合の断片を比較して決定するが、葉緑体 DNA は大きすぎてこの方法だけでは決めることが出来ない。そこでいくつかの断片をアガロースから切り出すか、クローニングしてラベルをし、それをプローブにして Southern hybridization を行い決定することが行われている。

イネの場合はタバコの葉緑体 DNA の Bam-2 断片が逆位重複配列 (inverted repeats) に挟まれる short single copy region に位置することに着目し、この Bam-2 断片とハイブリダイズするイネの断片も同じ位置にあると仮定して断片を組み立てた。また同じ大きさの断片が 2 本存在する場合はそれが inverted repeats に相当すると仮定して実験を進めたがこれは常に正しいとは限らなかった。

#### 5) 遺伝子の位置の同定

つぎに葉緑体 DNA に含まれる種々の遺伝子が環状 DNA のどこに位置しているかを調べなければならない。そのためには、他の植物の目的とする遺伝子が手に入ればそれを含む DNA 断片を放射能でラベルし、それとハイブリダイズする制限酵素断片を Southern 法で探すことができる。しかし例えばタバコとイネくらい進化的に離れている植物間ではタンパク質をコードしている部分だけをプローブにしないと間違った結果が得られることがある。これはタンパク質をコードしていない部分の進化が早く、いろいろな部分と相補性を持つためと考えられる。

イネ葉緑体 DNA の場合は RuBisCO の大サブユニット (rbc L) と ATPase の  $\beta$  サブユニット (atp B) の遺伝子を含む DNA 断片は共にイネ

の Pst-14 の断片と相補性を持っていた。またチトクローム f (pet A) の情報を含む断片はイネ葉緑体 DNA の Pst-1, Pvu-2, Bam-1 といずれも大きな断片とハイブリダイズする。また ATP Synthase の  $\alpha$  サブユニット (atp A) の場合も同様にして決定した。この他にもヒトのミトコンドリア遺伝子である ndh 遺伝子がイネ葉緑体 DNA にもあることが明らかにされている。細菌と葉緑体でリボソーム RNA の塩基配列がよく似ていることは知られているが、私たちは  $^{32}\text{P}$  でラベルした大腸菌のリボソーム RNA を用いてイネ葉緑体 DNA 上での  $\gamma$ -DNA の位置を決定した。

## 6) 制限酵素断片のクローニング

ほとんどの植物から葉緑体 DNA を抽出することは可能ではあるが、実験に必要な量を十分得ることは容易ではない。特に硬い組織から抽出する場合は核や葉緑体を傷つけずに単離する必要があるため、液体窒素などを使用して破碎効率を下げなければならない。これは葉緑体 DNA の抽出効率を非常に低下させる。DNA のより詳細な構造解析のためには、純化した DNA が多量に必要なになるので、バクテリアの系に葉緑体 DNA の全断片をクローニングし、培養したバクテリアから均一な葉緑体 DNA 断片を単離できるようにすることが望まれる。

DNA の制限酵素断片をバクテリアのプラスミド系にクローニングすることは現在では標準的な手法になっている。しかしある DNA の完全なクローンを得るためには 2 種類以上の制限酵素断片をクローニングする必要がある。なぜなら 6 塩基認識の制限酵素でも 200-300 塩基の断片を切り出すことがあるが、それらは電気泳動でも検出しにくく存在さえ気が付かない場合があり、その部分のクローンを欠くことになる。これを防ぐためには断片数があまり多くなく、最大の断片でも 20 kb を超えない 2 種類以上の制限酵素による全断片をクローニングすることが必要である。

さらにクローニングした断片の中から挿入された断片の大きさがもとの葉緑体 DNA の断片と同じであり、しかもラベルした葉緑体 DNA とハイブリダイズするクローンを選抜し、葉緑体 DNA の組換え体としなければならない。クローニングは DNA 断片を挿入された 1 分子のプラスミドか

ら多数のコピーを作る技術である。従って非常に少ない混在した DNA 断片を間違えてクローニングする可能性は常に有り得る。私たちがクローニングの過程で、葉緑体 DNA 断片と同じサイズでありながら葉緑体 DNA とハイブリダイズしないクローンなどを多数得ている。クローンを得たらすぐ挿入された DNA 断片が目的とするものであるかチェックすることが大切である。

クローニング用のベクターとして、プラスミドの他にファージやコスミドを用いる方法がある。 $\lambda$  ファージは 9-22 kbp, コスミドは 20-40 kbp の大きな断片をクローニングできるので、全葉緑体 DNA をクローニングする時などは便利であろう。とくに  $\lambda$  ファージでは最近いくつかの断片をオーバーラップしてクローニングしていくために、挿入断片の末端に相補的な RNA を合成するためのプロモーターを持っているのもあり便利になっている。しかしプラスミドと異なり DNA を取るのに慣れが必要であったり、コスミドのように不安定な面もありプラスミドより絶対的に良いわけではない。

## 7) 遺伝子の塩基配列の決定

前述のように葉緑体 DNA には光合成に重要な働きをする遺伝子が多数含まれている。それらの遺伝子の合成の制御機構や、構造と機能の関係を調べることは興味有ることである。遺伝子の塩基配列が明らかになればアミノ酸配列を知ることができ、それからタンパク質の構造を推定することが出来る。いくつかの種の植物からある酵素を取りその酵素活性と構造を比べれば両者の関係が明らかになるであろう。

また葉緑体は原核生物の遺伝情報発現系に良く似たシステムを持っているが、promoter や terminator の構造から発現の制御機構がやがて解明されるであろう。そうすればある種のタンパク質を多量に発現させることもいずれ可能になるであろう。このようなことから遺伝子の塩基配列の決定は非常に重要な仕事である。

そこで葉緑体 DNA に含まれる遺伝子のうち光合成に重要な働きをする遺伝子の塩基配列を決定することを試みた。RuBisCO の大サブユニット

(LS) 遺伝子と、プロトン輸送性 ATP 合成酵素複合体 (ATP Synthase) の  $\beta$  および  $\epsilon$  サブユニット遺伝子のうち、 $\beta$  遺伝子は  $C_3$  植物でも  $C_4$  植物でも発現されるが、LS 遺伝子は、 $C_4$  植物の葉肉細胞では発現されない。また、LS 遺伝子と  $\beta$  遺伝子のプロモーターは隣あって存在するが、その発現量は全く異なる。そこで、イネ葉緑体遺伝子の発現機構の解明のため LS 遺伝子と、 $\beta$  および  $\epsilon$  サブユニット遺伝子の構造と発現を解析した。

まず LS、 $\beta$ ・ $\epsilon$  遺伝子の存在するクローン、B-1/pBR322/HB101 及び P-14/pUC8/JM83 から、500 bp 前後の断片を M13 RF DNA にサブクローニングを行い、ジデオキシ法により DNA の塩基配列を決定した。また幼苗より、RNA を調製し、S1 マッピング法により mRNA の転写開始領域を同定した。

その結果、LS 遺伝子と  $\beta$  遺伝子は、互いに異なる DNA 鎖上に 784 bp 離れて存在しているが、その間はタンパク質をコードしていない領域にも関わらずイネとトウモロコシで非常に高いホモロジーを示した。また LS 遺伝子は 477 個、 $\beta$  遺伝子は 498 個のアミノ酸残基をコードしていることが明らかになった。 $\beta$  遺伝子の翻訳終止部と  $\epsilon$  遺伝子の翻訳開始部は、他の高等植物と同様、4 b 重なっていた。各遺伝子の翻訳開始コドンの 5~15 b 上流には、16S rRNA の 3' 末端付近と相補的である、SD 配列が存在していた。また、トウモロコシの LS との相同性は、アミノ酸レベルで 92%、 $\beta$  サブユニットでは、トウモロコシと 97%、小麦と 96%、大麦と 97% であり、LS よりも  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列の方が、植物間で保存されていることがわかった。

LS 遺伝子、 $\beta$  遺伝子、共にそのプロモーター配列は、トウモロコシや小麦、大麦とほとんど同じであったが、LS 遺伝子の 5' flanking region を比較すると、トウモロコシにのみ、他の 3 植物と異なる配列が見つかり、 $C_3$  植物と  $C_4$  植物の LS 遺伝子発現機構の差異を考える上で興味深い結果が得られた。

また LS 遺伝子の転写集結点付近には Stem & loop 構造が取られるようである。この構造は RNA に転写されたときに非常に安定であることがわかっている。

## 8) ミトコンドリア DNA の構造

一般に高等植物のミトコンドリア DNA は均一な分子ではなく、マスターコピーから組替えにより種々の環状分子が現れると考えられている。したがって、制限酵素などで切断すると多数の断片が現れゲノムサイズが非常に大きいとされている。このミトコンドリア DNA にはエネルギー産生や雄性不稔に関係がある遺伝子が納められているといわれている。そこで私たちはイネの緑葉からミトコンドリア DNA を単離し、この断片を  $\lambda$ -DNA にクローニングした。現在ミトコンドリアのクローンを重ねて、環状 DNA の物理地図を作製中である。

IGE シリーズ 4

トランスジェニック植物および  
オルガネラの遺伝子発現

---

発行 1989年3月  
発行者 東北大学遺伝生態研究センター  
〒980 仙台市片平2-1-1  
☎022-227-6200(代)  
印刷所 笹氣出版印刷株式会社