

ヤエナリ葉のオルガネラ傷害因子
に関する研究

友 松 篤 信

ヤエナリ葉のオルガネラ傷害因子

に関する研究

名古屋大学図書

和 834927

友 松 篤 信

報告番号 甲 第 1359 号

目 次

貢

序論	3
本論	
5 第1章 オルガネラ傷害因子の存在	12
材料と方法	15
結果	21
考察	38
10 第2章 オルガネラ傷害因子の精製	44
材料と方法	46
結果	51
考察	62
15 第3章 オルガネラ傷害因子の性質と 作用機作	66
材料と方法	69
結果	77
考察	99
文献	103
結語	107
謝辞	113

略号

本論文では、下記の略号を用いる。

DEAE-セルロース diethylaminoethyl-セルロース

EDTA ethylenediaminetetraacetic acid

ODF organelle-damaging factor (オルガネラ傷害因子)

SDS sodium dodecylsulfate

TCA trichloroacetic acid

TLC thin layer chromatography

Tris tris (hydroxymethyl) aminomethane

10

15

序論

植物の生育は、温度、光、栄養条件などの環境条件によって大きく影響される。休眠、⁵発芽、成長、成熟および老化などの現象は、環境条件に対する適応として理解される。このような適応現象は、植物体において形態的あるいは機能的变化を伴う。機能的变化は、植物体を構成する個々の細胞内に存在するオルガネラのレベルでもしばしば見い出されて¹⁰いる。オルガネラの機能的变化のうち、最も顕著な例は、オルガネラの合成と分解現象である。植物でのオルガネラ合成については、近年研究が進展しつつある。そして新しい知見¹⁵(1,2,3)や仮説⁽⁴⁾が提出されている。一方、オルガネラの分解過程やその機構に関する研究は、著しく立ち遅れている。

脂質を貯蔵し、子葉が綠化するようなタイプの種子は、暗所で発芽させると、貯蔵脂質を分解して炭素源として利用するため、グリ

オキシソームが子葉内に形成される。その後、明所に移ると、炭酸固定が行われるためグリオキシソームは不要となり消失し、炭酸固定産物の代謝に関与する緑葉ペルオキシソーム⁵が出現する(5, 6, 7, 8, 9)。種子が吸水して発芽していく時には、貯蔵タンパク質を局在化させているプロテインボディー内で貯蔵タンパク質が加水分解されるらしい⁽¹⁰⁾。一方、植物組織は、一定期間働くと老化し始めることが知られている。発芽後長時間経った子葉では、ミトコンドリアの機能が低下する(11, 12, 13, 14)。これは、ミトコンドリアの何らかの分解によるらしい⁽¹⁵⁾。貯蔵脂質がほとんど利用されてしまった段階のヒマ種子では、グリオキシソームが減少する⁽¹⁶⁾。これらのことからよく、オルガネラの分解現象は植物にとって重要な現象である。

オルガネラの構造の主体は生体膜である。オルガネラ独自の代謝に関与する酵素も、オルガネラを構成する生体膜に存在するが、あ

るいは生体膜によって区切られたオルガネラ内の区画に存在して機能している。生体膜の主要な構成成分は、リン脂質やコレステロールなどの脂質とタンパク質である。生体膜の構造については最近幾つかのモデルが提案されています(17, 18, 19, 20, 21, 22)、SingerとNicolsonによって示された流動モザイクモデル⁽²³⁾は、その基本構造を負っていいる。流動モザイクモデルは、膜タンパク質は脂質二重層の海の中に浮遊しているとみなししている。

流動モザイクモデルで示される生体膜中の膜タンパク質や生体膜で区画化されたタンパク質は、どのように分解されていいるのだろうか。オルガネラの分解機構は、今のところ32つの仮説によって説明されていいる⁽²⁴⁾。その一つは、オルガネラ膜の構成成分は膜内アセンブルしていいる状態とアセンブルしていない状態の2つの状態をとり、アセンブルしていない状態下でのみ分解されると考える説である。他の一つは、オルガネラは autophagic vacuole

によって分解されると考える説である。前者の仮説には幾分疑問がある。まずオルガネラの主要構成成分の1つにリン脂質がある。リン脂質は、特異的なリン脂質交換タンパク質によって、(1) 313なオルガネラ間を交換的に輸送されているらしい(25, 26)。従って、リン脂質においては、膜にアセニブルした状態とアセニブルしていない状態をとりうる。しかし、膜タンパク質については、このようないくつかの存在状態をとりうるという実験的証拠はまだ見い出されておらず、生体膜の様々なモデルでもこのような考えは、取り入れられていない。一方、オルガネラのマトリクス内の可溶性タンパク質については、前述の第一の仮説は全くあてはまらない。このように、前述の第一の仮説にはいくつかの無理がある。従って、今までのオルガネラ及び生体膜の分解に関する研究のうち、動物組織を用いた実験を概括して考察したい。

ラット肝小胞体膜タンパク質の半減期は短

かいもので3時間、長いもので430時間のものが見出されている(27, 28, 29, 30, 31)。ミトコンドリアのタンパク質についても、それぞれのタンパク質に特有な半減期が知られている(32)。従って、膜タンパク質はそれぞれ独自の代謝回転速度を持つらしい。従って、独自になんらかのプロテアーゼによる分解を受けてい るものと見なすことができる。一方、細胞内におけるタンパク質の分解は、タンパク質分子の本質的な不安定性によるものではなく、10タンパク質の分解は生きている細胞内においてのみ認められ、細胞構造が破壊されれば停止することが知られている。細胞内の一定の構造が必要とされるのである。さらに、生き15た細胞内でのタンパク質分解は、好気的な条件下で起り(33)、電子伝達系の脱共役剤やフッ素イオンによって著しく阻害される(34, 35, 36)。

単離したリソームは、ATPを添加すると、タンパク質を取り込み加水分解する(37)。これらの事実は、ATP存在下で、リソームが細

胞内タンパク質を分解していることを示唆するものである。オルガネラ分解とリソソームとの関連性については、リソソーム内に取り込まれたオルガネラがしばしば電子顕微鏡によって観察されている(38)。

オルガネラの主要な構成成分の一つであるリン脂質の分解機構については、ほとんど分かっていない。おそらく各種のホスホリパーゼが最初の分解を行うのであろうと考えられるが、明確な証拠はない。水溶性ホスホリパーゼのいくつかは、高度に精製されて、その酵素化学的性質も次第に明らかになりつつある。しかしながら、代謝経路におけるホスホリパーゼの働きはほとんど明らかになつておらず、その制御に関する研究もこれまでといつてよい。現在のことごろ、オルガネラや生体膜の分解に関する研究とホスホリパーゼとの関係を結びつける系は、ホスホリパーゼの細胞内局在性の問題だけである。各種のホスホリパーゼの細胞内局在性については、いくつ

かの報告がある。ホスホリパーゼA₂は、ヒト
やネズミの赤血球⁽³⁹⁾やネズミの肝臓の細胞膜
(40)に存在する。ホスホリパーゼDは、ネズミ
脳ミクロソーム⁽⁴¹⁾に存在する。しかしながら、
これら5の局在性とオルガネラ分解との間にどう
のような関係があるのかは不明である。

以上述べてきたように、動物組織における
オルガネラの分解には、個々の構成成分、特に
タニパク質の独自な分解と、リソソームによ
る分解が関与するものと推定できる。一方、
植物におけるオルガネラの分解についてはど
うであろうか。残念ながら、分解機構を考察
するに足るほどの知見は得られていない。オ
ルガネラのリシ脂質や全タンパク質をラベル
してその減少を調べた例⁽⁴²⁾や、液胞における
オルガネラの取り込みの形態学的知見⁽⁴³⁾など
が散見されるにすぎない。

オルガネラ分解に関する研究は、オルガネ
ラにおける構成成分の分解現象と各種の加水
分解酵素やリソソームとどのように関連付け

るまで常に困難にひまつたってきた。ここで、今まで試みられてきた研究法を概括しよう。

それらは、「(1) オルガネラの構成成分をラベルし、その減少現象を調べる。(2) 各種の加水分解酵素の性質を調べる。(3) リソソームの分解機能を調べる。(4) オルガネラ内の加水分解酵素を検索する。」などである。これらの研究法には、一長一短がありオルガネラの分解過程に一挙に迫りうる方法とはなりえ
 10 ない。従って、従来試みられてきた研究法に加えて新たな研究法の開発も望まれる。

本研究は、オルガネラ自身を「基質」として、オルガネラのマトリクス酵素の放出をマーク
 15 ーとしてオルガネラの分解因子を検索する従来にない新しい研究法を用いている。第一章では、緑葉ペルオキシソームのマトリクス酵素を放出させる因子（オルガネラ傷害因子）
 がヤエナリの葉に存在すること、さらに、オルガネラ傷害因子の活性測定法の確立について述べる。第二章では、第一章で確立したオ

ルガネラ傷害因子の活性測定法を用いて、ナ
エナリの葉からの精製法およびオルガネラ傷
害因子の化学的性質について述べる。そして、
第三章では、オルガネラ傷害因子の諸性質と
5 その作用機作について述べる。

10

15

第一章 オルガネラ傷害因子の存在

動植物から単細胞藻類に至るまで、生物界には広く、直径が $1\text{ }\mu\text{m}$ 程度でカタラーゼを特異的に含む一重膜を持つオルガネラ（ミクロボディー）が存在する。緑葉に存在するこのオルガネラは、カタラーゼの他にグリコール酸代謝系の酵素を含み、緑葉ペルオキシソームと呼ばれている⁽⁴⁴⁾。多くの高等植物では、その緑葉で光合成が活発に行われる時、同時に活発な呼吸活動も営まれる。この呼吸は、ミトコンドリアでの呼吸とは異り、エネルギーの捕捉を伴わず、光呼吸とよばれている。この光呼吸では、葉緑体での炭酸固定産物の一部が、葉緑体 \rightarrow 緑葉ペルオキシソーム \rightarrow ミトコンドリア \rightarrow 緑葉ペルオキシソーム \rightarrow 葉緑体という順序で移行し、脱炭酸を含む一連の反応を受ける。かくて、現在、緑葉ペルオキシソームは、光呼吸に関与するオルガネラであることが明らかにされている。

暗所で発芽させた植物（黄化植物）に光を照射すると、緑葉ペルオキシソームの諸標識酵素の活性が増加する。したがって光照射によって緑葉ペルオキシソームの形成が活発になるものと考えられる（45, 46）。電子顕微鏡での観察によると、黄化植物に光を照射すると黄化植物に存在していた緑葉ペルオキシソームは、その直径は5倍ほどに大きくなるという（47）。一方、葉のま碎液をシヨ糖密度勾配心にかけて緑葉ペルオキシソームの挙動を調べた実験では、黄化植物に光を照射すると、緑葉ペルオキシソームは、不均一で密度の小さい集団から均一で密度の大きい集団に変化していることが見出されている（48）。これらの実験結果から、黄化植物に光を照射したときの緑葉ペルオキシソームの発達の機構について次の2つの機構を考えられよう。その第一は、黄化植物に存在している不均一で密度の小さい緑葉ペルオキシソームに、光照射後新たに合成されたタンパク質などが多くみこまれ

ていって「成長」し、均一で密度の大きい緑葉ペルオキシソームに発達していくという考えである。もう一つは、緑葉ペルオキシソームは常に代謝回転していて、黄化植物に光を照射すると、この新陳代謝を通じて、より均一でより密度の大きい緑葉ペルオキシソームが、より不均一でより密度の小さい緑葉ペルオキシソームに引きかわっていくという考えである。

もし、後者の考えが正しいとすれば、黄化植物または光照射初期の葉に存在する不均一で密度の小さい緑葉ペルオキシソームは、光が照射されていれば、何らかの作用で急速な分解を受けるはずである。筆者はこのことに着目し、緑葉にこうした分解系が存在するかどうかを調べる実験を行った。

材料と方法

材料

ヤエナリ (*Phaseolus aureus Roxb.*) の種子を、
 5 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 10 分間浸し
 て殺菌した後、滅菌した脱イオニ水で充分洗
 淨した。この殺菌した種子を滅菌水中に 25°C
 1 日間放置して吸水させた。水だけを含むか
 または無機養素 (KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$,
 10 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_2MoO_4 , Fe-EDTA) ⁽⁴⁹⁾ を含む滅菌
 した 0.4% (w/v) 寒天を入れたプラスチックボ
 ックス上に吸水させた種子を播いた後、25°C
 暗所で発芽させた。播種後暗所で 3 日間発芽
 15 させた幼植物の一部は、25°C で 1500 lux の
 光を照射した。実験には、これら幼植物の第
 一葉を用いた。ホウレンソウは、市販のものを
 を用いた。

粗抽出液の調製

ヤエナリの第一葉を、その新鮮重の 5 倍量

の 0.83 M ショ糖を含む 0.02 M グリニルグリシン
シーカー KOH バッファー (pH 7.5) と共に、ブレン
ダーで 2 分間最高速度でま碎した。このま碎液を 4 重のナイロニガーゼで 3 回通した後、3
液を $300 \times g$ で 10 分間遠心した。

オルガネラの分画

ヤエナリあるいはホウレンソウのま碎液の調製とま碎液中のオルガネラのショ糖密度勾配遠心による分画は、Schnarrenberger と Burkhard (50) によって述べられた方法に基づいて行った。

ホウレンソウの葉を、大きな葉脈を除いた後、包丁で細かく刻んだ。そして、新鮮重の 2.5 倍量の氷冷した 30% (w/w) ショ糖と 10 mM ジチオスレイトールを含む 0.1 M グリニルグリシンシーカー KOH バッファー (pH 7.5) と共に、ブレンダーを用いて、弱い回転で 15 秒間、最高回転で 7 秒間ま碎した。ま碎液を二重のミラクロスで 3 回通し、その 3 液 22.5 ml を、遠心管内のショ糖密度勾配上に重層した。ショ糖密度勾配は、0.1 M グリニルグリシンシーカー KOH

バッファー (pH 7.5) を含む 60, 57.5, 55, ... 25 % (w/w) ショ糖液 2.5 ml ずつ 重層させて 調製した。遠心管は、日立 RPS 25 ローターで、3 時間、24,000 回転で遠心された。遠心後、1.5 ml ずつ 分画した。

粗抽出液のゲルろ過による分画

播種後、暗所で 3 日間 発芽させた後、さらに 4 日間 光を照射した ヤエナリ 幼植物の 第一葉を、その新鮮重の 3 倍量の 0.02 M Tris - 塩酸バッファー (pH 7.5) と共に ブレンダーで 2 分間 最高速度で ま碎した。このま碎液を 二重 の ミラクロス で 3 過した後、3 液を $7,700 \times g$ で 30 分間 遠心した。遠心によって 得られた上清液のうち 3 ml を、0.02 M Tris - 塩酸バッファー (pH 7.5) で 平衡化してある セファテックス G-25 カラム ($2.4 \times 50 \text{ cm}$) にかけた。そして、そのボイドボリューム 画分 (7 ml) を 高分子量 画分とした。ボイドボリューム 以後 溶出された 画分 (60 ml) は、凍結乾燥によって 4 ml に濃縮した (低分子量 画分)。凍結乾燥以外

の全操作はすべて 4°C で行った。

オルガネラ傷害因子の活性測定

オルガネラ傷害因子活性測定の原理は、この因子の作用によってホウレンソウの緑葉ペルオキシソームから放出されるヒドロキシピルビン酸還元酵素（緑葉ペルオキシソームの標識酵素の 1/7）の量を測定することにある。

(方法 I) Schnarrenberger と Burkhard の方法(50)に基いて、40 g のホウレンソウの葉からま碎液を調製した（前述「オルガネラの分画」参照）。このま碎液を $7,700 \times g$ で 30 分間遠心し、得られた沈殿を 40 ml の 0.9 M ショ糖を含む 0.1 M グリニルグリシン-KOH バッファー (pH 7.5) (けん濃溶液) にけん濃した。この粗オルガネラけん濃液 1.5 ml とオルガネラ傷害因子標品及びけん濃溶液から成る 2 ml の反応混液を、 10°C で 20 分間インキュベートした。その後氷冷し、直ちに $10,000 \times g$ で 15 分間遠心した。遠心によって得られた上清液中のヒドロキシピルビン酸還元酵素の活性を、測定し

た。オルガネラ傷害因子標品のかわりに、バッファーを用いて同様の操作を行い、これを対照とした。

(方法II) 前述の粗オルガネラけん渦液1.5 ml, 0.02 ml の 0.1M CaCl_2 , オルガネラ傷害因子標品及びけん渦溶液を含む 1.98 ml の反応混液を、10°C で 20 分間インキュベートした。反応を、0.02 ml の 0.5M EDTA (pH 7.5) を加えて停止させ、方法Iで述べたように、遠心してその上清液のヒドロキシピルビン酸還元酵素の活性を測定した。

オルガネラ傷害因子活性の 1 単位は、10°C 1 分間ごと 1 単位のヒドロキシピルビン酸還元酵素 (1 分間に、1 μmole のヒドロキシピルビン酸を還元する活性) を、ホウレンソウ緑葉ペルオキシソームから放出される量として定義した。

酵素活性の測定及びクロロフィル、タンパク質の定量

ヒドロキシピルビン酸還元酵素活性は、Tol-

bert⁵¹ の方法によつて測定した。4 mM
 NADH 0.025 ml, 1% (w/v) Triton X-100 0.015 ml,
 酵素液と脱イオン水 0.21 ml 及び 0.1 M リン
 酸カリウムバッファー (pH 6.2) 0.2 ml を混合し。
 5 分後に 0.01 M ヒドロキシピルビン酸 0.05
 ml を加えて反応を開始させた。そして、25
 °C で NADH の 340 nm の吸収の減少を分光光
 度計を用ひて記録した。

グリコール酸酸化酵素、4トクロムニ酸化
 酵素およびカタラーゼの活性は、それぞれ、
 Tolbert⁵², Nawa と Asahi⁵³ および Tomomatsu
 と Asahi⁵⁴ の方法に基つて測定した。クロロ
 フィルおよびタンパク質の定量は、それぞれ
 Arnon⁵⁵ および Lowry⁵⁶ の方法に基つ
 た。

結果

光照射によるヤエナリ第一葉における酵素活性の変動

無機養素を与えず水だけを与えて発芽させたヤエナリの幼植物に光を照射すると、その第一葉の粗抽出液中の3種類の緑葉ペルオキシソームの標識酵素（カタラーゼ、グリコール酸酸化酵素およびヒドロキシピルビン酸還元酵素）の活性は、暗所で発芽させたものに比べて著しく増加した（図1）。しかしながら、その増加の様相は互いに異り、特にヒドロキシピルビン酸還元酵素の活性は、光照射後4日目には減少する傾向を示した（図1）。

一方、無機栄養を与えて同様の実験を行ったところ、カタラーゼおよびグリコール酸酸化酵素の活性の増加は、無機養素無添加の場合と比べて、より大きかった（図2）。ヒドロキシピルビン酸還元酵素の活性増加は、無機養素無添加の場合と比べ、光照射初期において

ては小さかった。しかし、その活性は光照射後期にふりて減少しなかつた(図2)。従つて、無機養素を与えて光照射を行つた方が、緑葉ペルオキシソームの形成には有利であると判断した。なお、無機養素を与えたヤエナリ幼植物と与えなかつたそれとでは、光照射後5日目まごでは、目で観察したかぎり、その形態などに相違はなかつた。

光照射4日目のヤエナリからの緑葉ペルオ

キシソームの分離

無機養素を与えて生育した光照射4日目のヤエナリの第一葉のま碎液を用ひ、シヨ糖密度勾配遠心を利用して、そのオルガネラを分画した。同時に、対照としてホウレンソウの葉のま碎液中のオルガネラも、同様な操作によつて分画した。ホウレンソウの葉の場合には、シヨ糖密度勾配遠心によつて、ミトコンドリアと葉緑体の間で相互に若干の混入が認められたが、緑葉ペルオキシソーム、ミトコンドリアおよび葉緑体が互いに分離された(

図3,b)。ホウレンソウの葉の緑葉ペルオキシソームは、シヨ糖密度が 1.26 g/cm^3 の領域に沈降し、その標識酵素の活性のはほとんどがこの領域に回収された。一方、ヤエナリ第一葉の場合には、緑葉ペルオキシソームはシヨ糖密度が約 1.28 g/cm^3 から 1.18 g/cm^3 までの領域に不均一に沈降し、しかもその標識酵素の活性のこの領域での回収率は極めて低かった(図3,a)。ホウレンソウの葉のま碎液にヤエナリ第一葉のま碎液の $10,000\times$ 上清画分を加えてシヨ糖密度勾配遠心にかけると、シヨ糖密度 1.26 g/cm^3 の領域に回収されるホウレンソウ緑葉ペルオキシソームの量が減少し、その標識酵素活性の大部分が遠心管上部にとどまった。一方、ホウレンソウミトコンドリアの密度は、 1.23 g/cm^3 から 1.18 g/cm^3 へと減少した(図3,c)。

これらの結果は、緑葉ペルオキシソームに傷害を与える何らかの物質が光照射4日目のヤエナリ第一葉に存在していることを示して

いる。以後、この物質をオルガネラ傷害因子と呼ぶことにする。

オルガネラ傷害因子の活性測定法の確立

ヤエナリ第一葉のま碎液の $7,700 \times 2$ 上清画分を用い、オルガネラ傷害因子の活性を定量的に測定する方法を確立することを試みた。

ホウレンソウの葉の粗オルガネラけん濃液に、種々の量の上述のヤエナリ第一葉粗抽出液を加えて「方法I」に従って反応させ、ホウレンソウ緑葉ペルオキシソームから放出されるヒドロキシピルビニ酸還元酵素の活性を測定した。図4に示したように、加えたヤエナリ第一葉粗抽出液の量と放出されたヒドロキシピルビニ酸還元酵素の活性の間には、直線関係が得られなかつた。すなはち、少量のヤエナリ第一葉粗抽出液では緑葉ペルオキシソームに傷害を与える能力を示さなかつたが、ある程度以上の量の粗抽出液は強く緑葉ペルオキシソームに傷害を与えた。

次に、一定量のヤエナリ第一葉粗抽出液を

反応液に加え、反応時間とホウレンソウ緑葉ペルオキシソームから放出されるヒドロキシピロビン酸還元酵素の活性との間の関係を調べた(図5)。反応時間と放出された酵素の活性の間に直線関係が得られた。ただし、その直線は原点を通りなかつた。以上のことから、オルガネラ傷害因子の活性は、「方法I」によつては定量的に測定できないと判断した。

一方、ヤエナリ第一葉のま碎液の $7,700 \times g$ ⁹上清画分を、セファアデクスG-25ゲル3週によつて高分子量画分と低分子量画分に分画したところ、いずれの画分もほとんどオルガネラ傷害活性を示さなかつた(表1)。しかし、両画分を混ぜると活性が回復した(表1)。低分子量画分のかゆりに、10 mMの塩化カルニウムを加えた高分子量画分は、著しいオルガネラ傷害活性を示した(表1)。塩化カリウムは、こうした高分子量画分のオルガネラ傷害活性の回復効果を示さなかつた。なみ、オルガネラ傷害因子は熱に不安定である(

表1）。以上の結果から、オルガネラ傷害因子は、熱に不安定な高分子量の物質であり、しかもその活性発現のためにカルシウムイオンを必要とすることが判明した。

そこで、オルガネラ傷害因子の活性測定法を、改良し反応液に1mMの塩化カルシウムを加え、反応をEDTAを添加して停止させた（方法II）。1mM 塩化カルシウム存在下では、加えたヤエナリ第一葉粗抽出液の量とホウレンソウ緑葉ペルオキシソームから放出されたヒドロキシピルビン酸還元酵素の活性との間で、ほぼ比例関係が成り立った（図6）。また、放出されたヒドロキシピルビン酸還元酵素の活性は、40分間までの間でほぼ反応時間と比例した（図7）。以上のことから、「方法II」を用いれば、オルガネラ傷害因子の活性を定量的に測定することができると考え、以後この方法を用いて研究することにした。

光照射によるヤエナリ第一葉におけるオルガネラ傷害因子活性の変動

暗所で4日間発芽させたヤエナリの幼植物を1500ルクスの白色光で照射すると、その第一葉中のヒドロキシピルビン酸還元酵素活性およびクロロフィル量と共に、オルガネラ傷害因子の活性も顕著に増加した(図8)。ヒドロキシピルビン酸還元酵素およびオルガネラ傷害因子の両活性は、上記のヤエナリ幼植物を暗所で育てたときにもゆずかに増加した(図8)。さるに、ヤエナリ第一葉中のチトクロムc酸化酵素活性も、暗所で育てたときよりも明所で育てたときの方が、その増加の割合がやや大きかった。しかし、オルガネラ傷害因子活性の増加の光照射による促進の度合は、チトクロムc酸化酵素活性のそれよりも大きかった(図8)。従って、オルガネラ傷害因子活性の増大の光照射による促進は、光による葉の肥大生長によるだけではなく、光による誘導そのものにもよることを示している。

他の植物におけるオルガネラ傷害因子の検

索

植物ミクロボディーは、通常3つの型に分類される。即ち、グリコール酸代謝を行なう緑葉ペルオキシソーム、グリオキシル酸回路を持つグリオキシソームおよび機能の不明なペルオキシソームである。これらの中のミクロボディーを持つ植物組織のうち、コムギ(Triticum vulgare L.)の葉⁽⁴⁸⁾、大豆⁽⁵⁷⁾(Glycine max L. var. Okuhara No.1)の種子およびサツマイモ(Ipomoea batatas L. var. Kokei No.14)の塊根⁽⁵⁸⁾をそれぞれ選び、その粗抽出液中にオルガネラ傷害因子が存在するかどうかを検索した。その結果、黄化または緑化したコムギの葉、吸水させた大豆種子およびサツマイモ塊根のいずれでも、オルガネラ傷害因子活性を認めることができなかった。

Table 1 Fractionation of the crude extract from mung bean leaves by Sephadex G-25 gel filtration

Fraction	Volume (ml)	Addition	ODF activity ^a (units)
Crude extract	0.2	—	434
Boiled crude extract	0.2	—	12
High molecular weight fraction	0.25	—	4
Low molecular weight fraction	0.25	—	1
High molecular weight fraction + low molecular weight fraction	0.25 each	—	51
High molecular weight fraction	0.2	20 mM KCl	0
High molecular weight fraction	0.2	10 mM CaCl ₂	275

^aActivity was assayed by Method I.

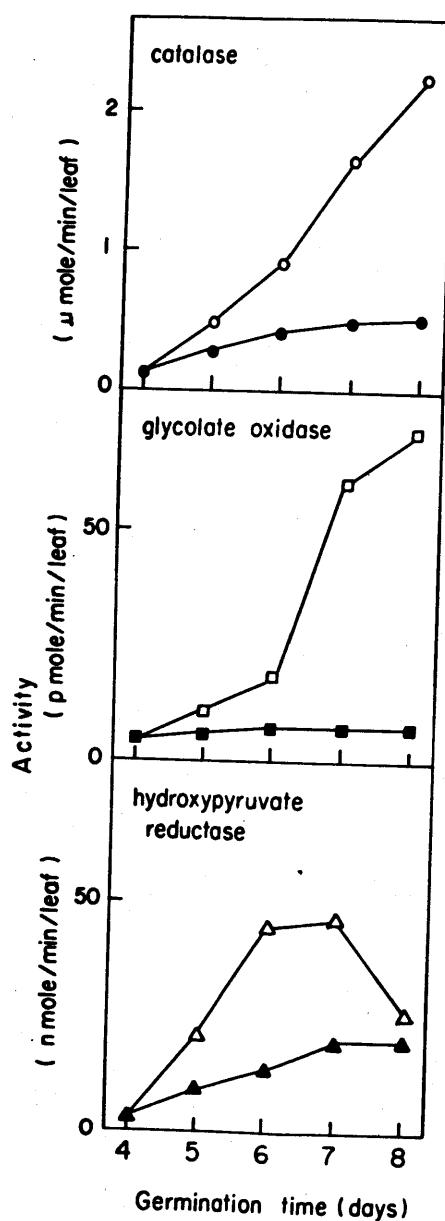


Fig. 1. Increases in activities of peroxisomal enzymes in the primary leaves of mung bean grown on 0.4 % agar in the light. Etiolated 4-day-old seedlings of mung bean were grown in the dark or light for further 4 days. Open symbols: activities in light-grown seedlings. Closed symbols: activities in dark-grown seedlings.

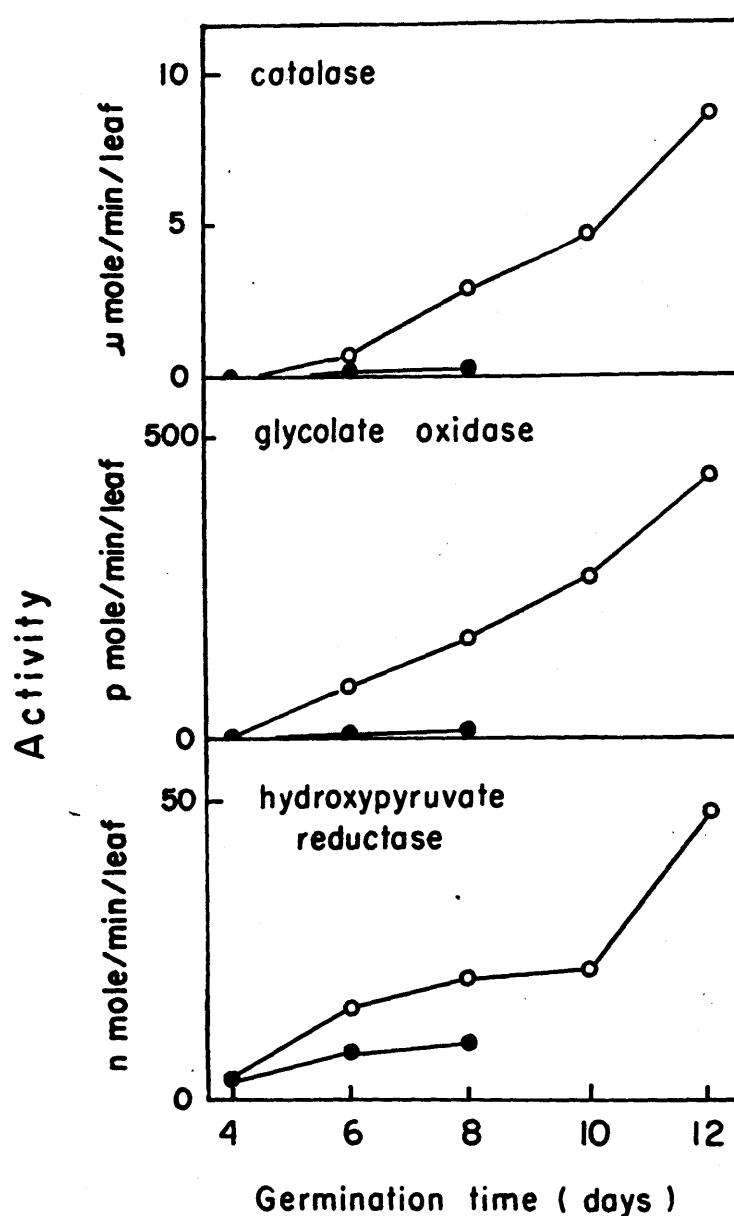


Fig. 2. Increases in activities of peroxisomal enzymes in the primary leaves of mung bean grown on 0.4 % agar containing nutrients (0.2 strength of Johnson's solution) in the light. Etiolated 4-day-old seedlings of mung bean were grown in the dark or light for further 4 or 8 days, respectively. : activities in light-grown seedlings. : activities in dark-grown seedlings.

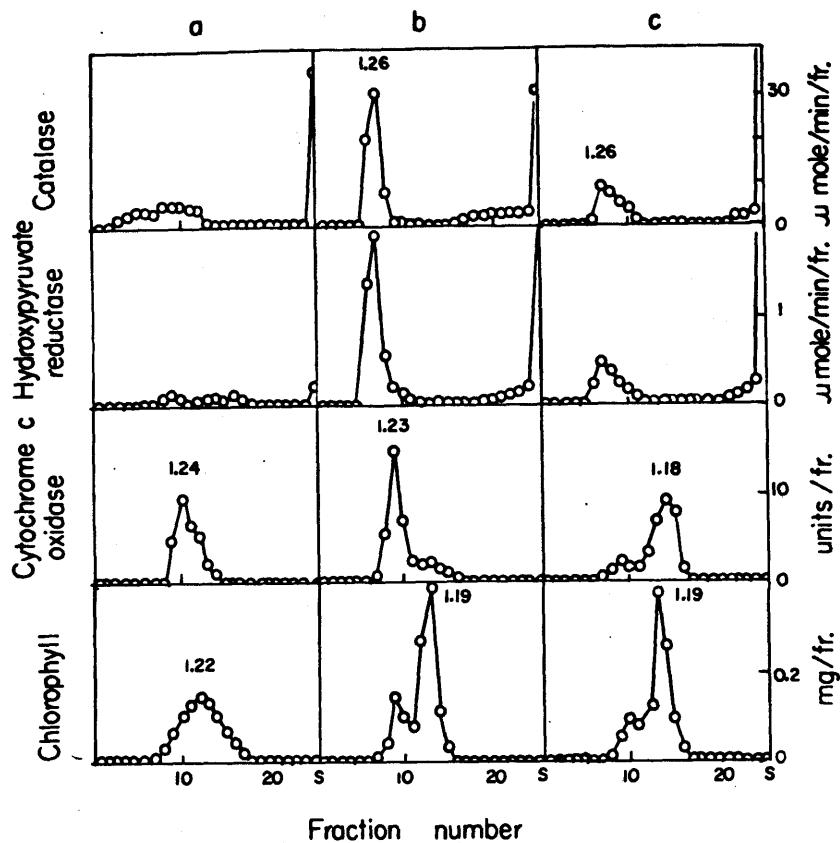


Fig. 3. Separation of cell organelles in homogenates from mung bean and spinach leaves by sucrose density gradient centrifugation. The homogenates (22.5 ml. each) were layered on 37.5 ml-sucrose density gradients (25-60 %, w/w), then centrifuged at 69,000 $\times g$ for 3 hr. "S" on the abscissa represents the fraction corresponding to the layered sample; numerals on the peaks show densities. a; homogenate from 7.5 g of the primary leaves of mung bean, b; homogenate from 4.2 g of spinach leaves, c; mixture of 12.5 ml of spinach leaf homogenate (equivalent to 4.2 g of the leaves) and 7.5 ml of 10,000 $\times g$ supernatant of mung bean leaf homogenate (equivalent to 2.5 g of the primary leaves).

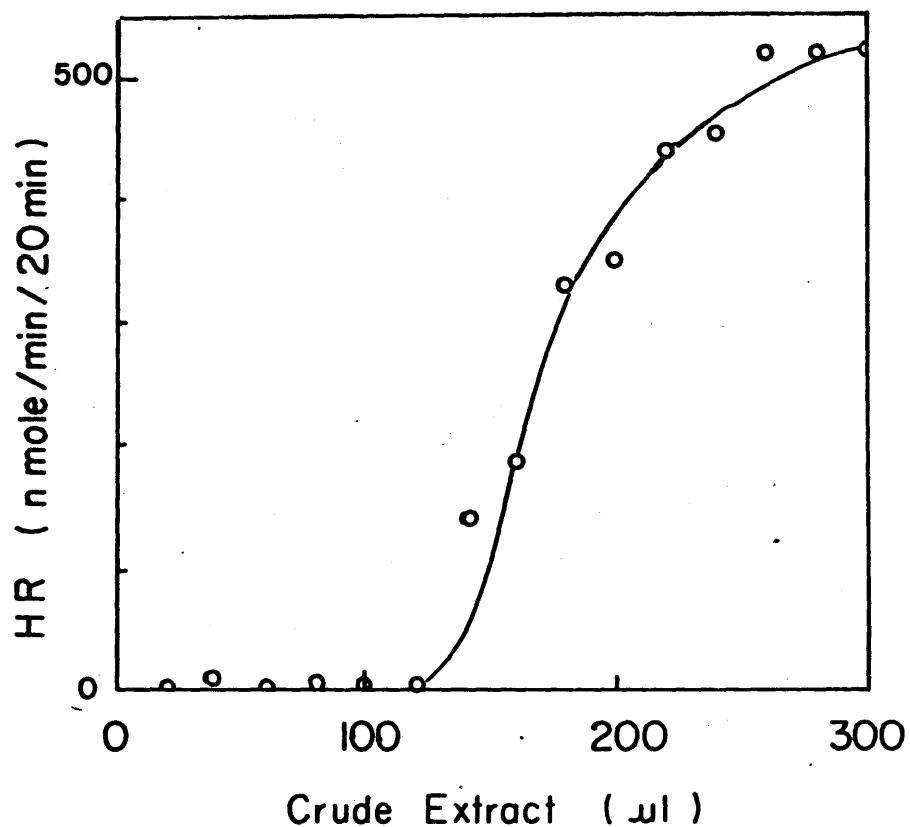


Fig. 4. The activity of hydroxypyruvate reductase (HR) released from leaf peroxisomes as a function of the concentration of organelle-damaging factor. The reaction was carried out according to Method I with 7,700 xg supernatant of homogenate (crude extract) from the primary leaves of mung bean.

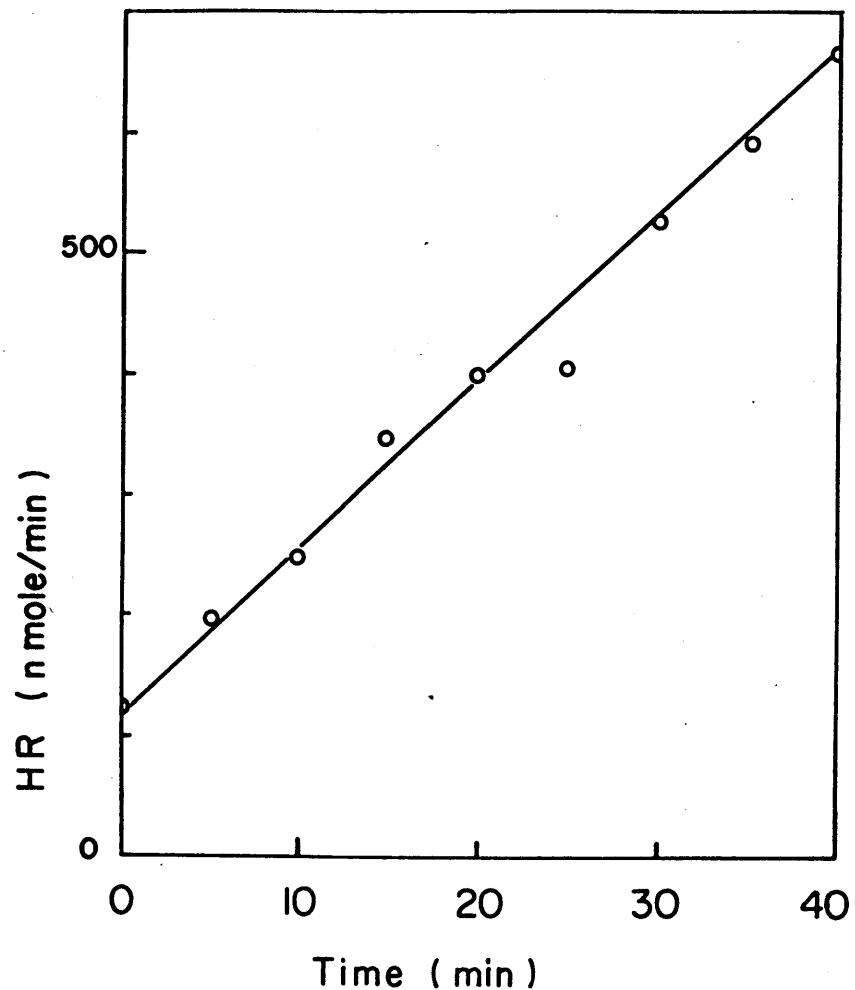


Fig. 5. The time-course of the release of hydroxy-pyruvate reductase (HR) from leaf peroxisomes by the action of organelle-damaging factor. The reaction was carried out according to Method I.

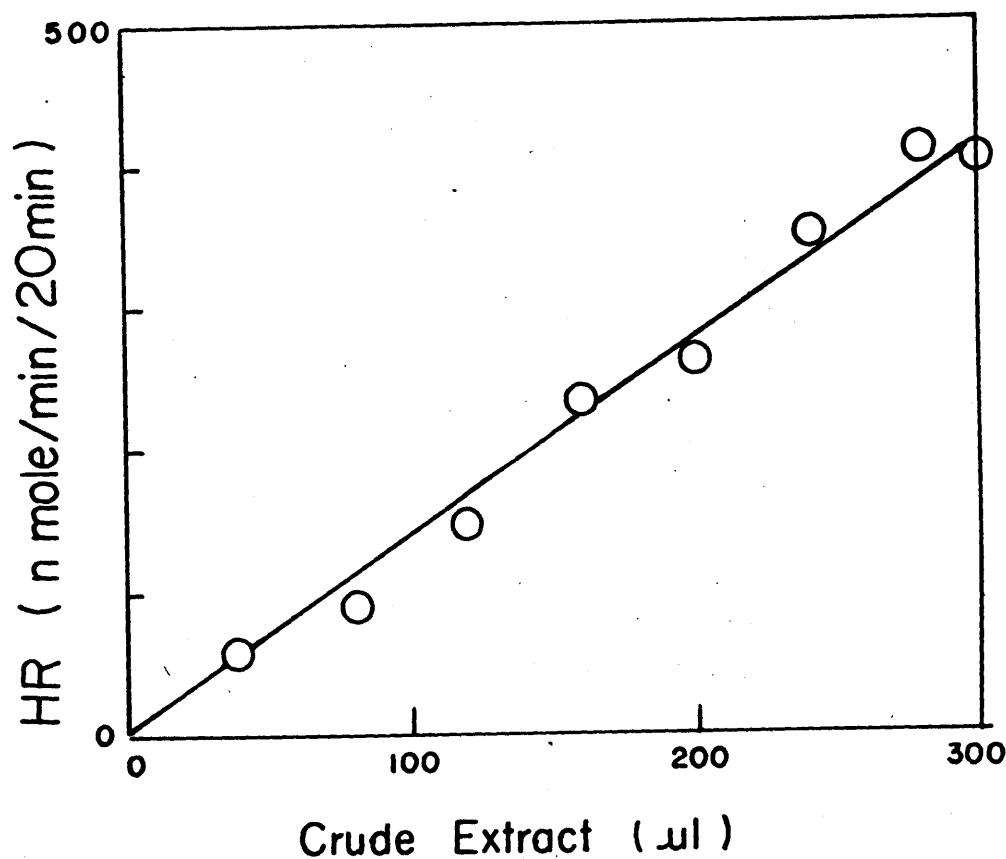


Fig. 6. The activity of hydroxypyruvate reductase released from leaf peroxisomes as a function of the concentration of organelle-damaging factor. The reaction was carried out according to Method II with crude extract from the primary leaves of mung bean.

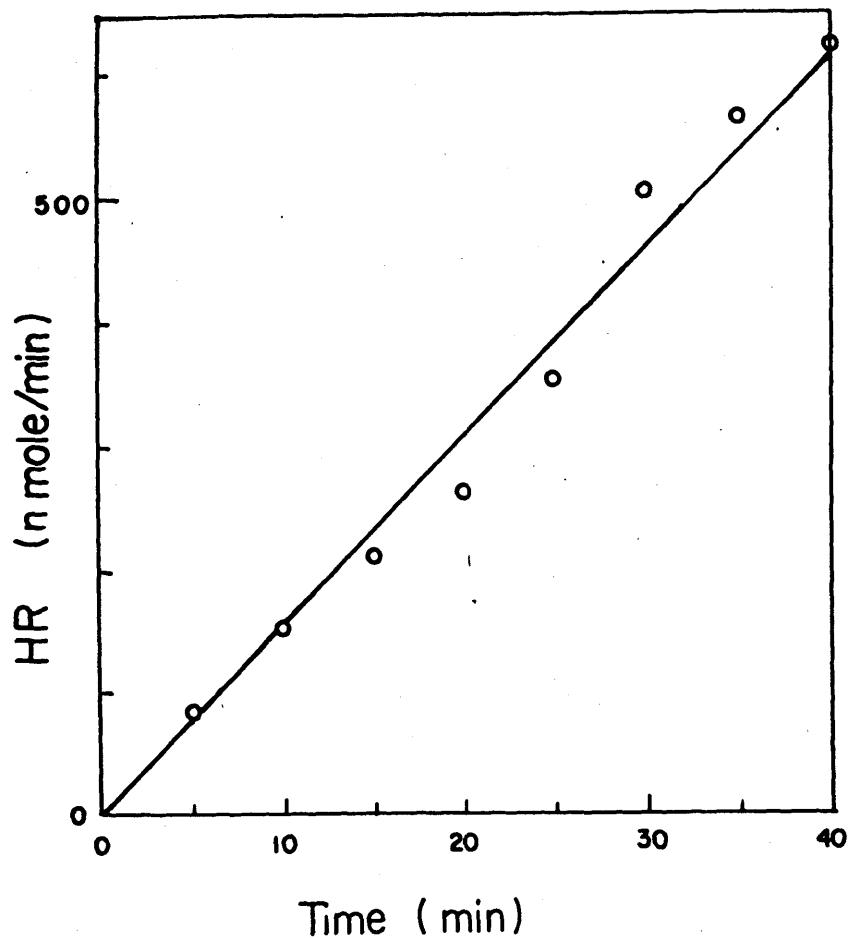


Fig. 7. The time-course of the release of hydroxypyruvate reductase (HR) from leaf peroxisomes by the action of organelle-damaging factor. The reaction was carried out according to Method II.

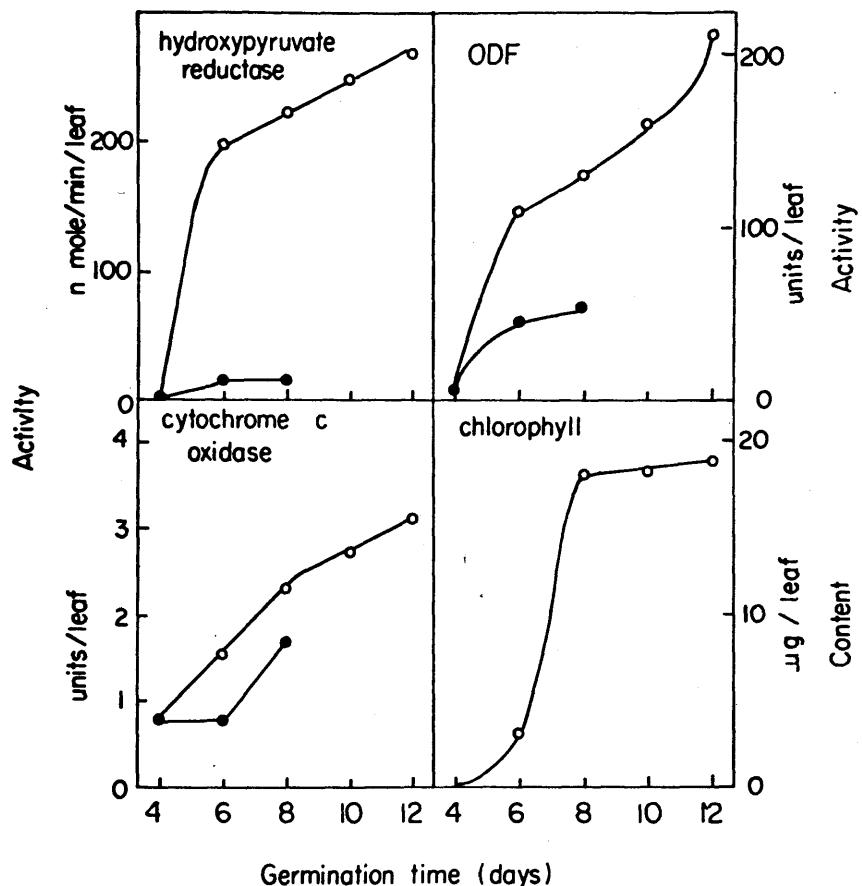


Fig. 8. Increases in enzyme and organelle-damaging factor activities and in the chlorophyll content in the primary leaves of mung bean grown on 0.4 % agar containing nutrients (1.0 strength of Johnson's solution) in the light. Etiolated 4-day-old seedlings of mung bean were grown in the dark or light, and crude extracts of the primary leaves were assayed for the activities and content.

(○) : activity or content in light-grown seedlings. (●) : activity or content in dark-grown seedlings.

考察

オルガネラ傷害因子の活性測定法について
 ヤエナリ第一葉およびホウレンソウの葉の
 5 オルガネラをシヨ糖密度勾配遠心法によつて
 分画した実験で、ヤエナリ第一葉には、ホウ
 レンソウの緑葉ペルオキシソームのマトリク
 ス酵素であるヒドロキシピルビン酸還元酵素
 を遊離させると因子が存在することが示された
 (図3)。

オルガネラ傷害因子の活性を、「方法I」
 によって測定すると、反応液中のヤエナリ第
 一葉粗抽出液の量が少いときは、ヒドロキ
 シピルビン酸還元酵素は緑葉ペルオキシソ
 15 ムから遊離されず、粗抽出液の量が多くなつ
 て始めて遊離される(図4)。カルシウムイ
 オン存在下では、このような現象は見られず
 、粗抽出液の量と遊離されるヒドロキシピル
 ビン酸還元酵素の活性との間に比例関係が成
 り立つ(図6)。従つて、少量のヤエナリ粗

抽出液ではオルガネラ傷害活性を示さないと
 いう図4の結果は、粗抽出液中に含まれるオ
 ルガネラ傷害因子の賦活剤の濃度が低かった
 ためであると思われる。「方法I」で、反応
⁵時間と遊離されるヒドロキシピルビニ酸還元
 酶活性との関係を調べると、その直線は原点
 を通らなかった(図5)。一方、「方法II」
 によって測定すると、そのようなことは認め
 られなかつた(図7)。「方法I」では、反
¹⁰応を止める方法として、反応液を氷冷し、な
 るべく早く遠心分離する試みられてい
 る。おそらく、こうした反応停止のための操
 作中も一定の速度で反応が進行していったため
 に、図5のように直線が原点を通らなかつた
¹⁵のであろう。以上より、「方法II」によると
 オルガネラ傷害因子の活性を定量的に取り扱
 うことが可能であると考えた。以上のよう
 な測定法の検討の過程で、ヤエナリ第一葉中
 のオルガネラ傷害因子は、熱に不安定な高分
 子量の物質で、カルシウムイオンを必要とす

ることも判明した。

光照射初期に見い出されるヤエナリ第一葉の緑葉ペルオキシソームは不均一か

コムギの葉のま碎液をシヨ糖密度勾配遠心にかけ、そのオルガネラを分画した実験では、コムギの葉の光形態形成の過程で不均一で密度の小さい緑葉ペルオキシソームが存在していることが見い出されている。⁽⁴⁸⁾ ヤエナリの場合には、どのように考察できるであろうか。

ホウレンソウ緑葉ペルオキシソームは、ヤエナリ第一葉のオルガネラ傷害因子によって、 1.26 g/cm^3 のシヨ糖密度の領域に沈降するマトリクス酵素が減少し、遠心管上部にとどまつた(図3,C)。従って、オルガネラ傷害因子は、ホウレンソウ緑葉ペルオキシソームを不均一なものにするわけではない。ヤエナリ第一葉のま碎液をシヨ糖密度勾配遠心にかけ、そのオルガネラを分画すると、遠心管内に沈降する緑葉ペルオキシソームのマトリクス酵素は、少量ではあるが不均一に沈降し

ている(図3,a)。従って、少くともヤエナリ第一葉のま碎液中には、不均一な緑葉ペルオキシソームが存在していったものと推定できること。この不均一な緑葉ペルオキシソームが、ま碎などの物理的原因によって生じたのか、それとも、もともと光照射初期の緑葉ペルオキシソームが不均一なものであるのかは判断できない。しかし、少くとも、ま碎時にオルガネラ傷害因子などによって生じたものではなさそうである。

オルガネラ傷害因子の生理的意義

オルガネラ傷害因子の活性は、ヤエナリ第一葉を光照射すると、著しく増加する。この光照射による活性増加の促進度合は、チトクロムC酸化酵素の場合に比べてより大きい(図8)。従って、オルガネラ傷害因子の活性増加は、葉の肥大生長によるだけでなく、光による誘導そのものにもよってなるといえる。

前に述べたように、黄化なしし短期間光を照射した幼植物の葉には、不均一で密度の小

さい緑葉ペルオキシソームが存在する可能性が強い。植物が緑化と光形態形成を終えると、均一で密度の大きい ($1.25 \sim 1.26 \text{ g/cm}^3$) 緑葉ペルオキシソームが見り出される⁽⁴⁸⁾。従つて、不均一で密度の小さい緑葉ペルオキシソームは、タンパク質などの物質を組み込んで11つて次第に均一で密度の大きい緑葉ペルオキシソームへと成長していくか、代謝回転を受けてより均一でより密度の大きい緑葉ペルオキシソームにおきかえられていくのである。少くともヤエナリ第一葉では、不均一で密度の小さい緑葉ペルオキシソームが代謝回転を受けて11る可能性が考えられ、オルガネラ傷害因子がその分解に関与して11る可能性がある。

ヤエナリ第一葉では、オルガネラ傷害因子が細胞内で緑葉ペルオキシソームと自由に出会うと仮定すると、約一分以内に、総このヒドロキシピルビニ酸還元酵素が緑葉ペルオキシソームから遊離されてしまうことになる（

図8の実験データからの計算による）。従って、オルガネラ傷害因子は、in situでは細胞内区画化によって緑葉ペルオキシソームと分離していける可能性が高い。もし、前述のようにオルガネラ傷害因子が緑葉ペルオキシソームの分解に働くとすると、こうした細胞内区画化との関連の上で考察していくことも必要になる。

10

15

第二章 オルガネラ傷害因子の精製

植物組織から種々のオルガネラを単離する際、いろいろな困難に遭遇することが多い。これらの中でも最も多くのケースは、組織をま碎する際に起るオルガネラ膜の物理的損傷と、ま碎後に起る酵素作用による化学的損傷⁽⁵⁹⁾である。

一方、細胞膜に傷害を与える多くの天然物質が存在していることはよく知られている。これらの天然物質は、細菌、植物および動物に見出されており、低分子性物質、ペプチド性物質またはタンパク質であることが知られている⁽⁶⁰⁾。

これらの物質がどのようにして細胞膜に損傷を与えるかについて多くの生化学者が興味をもたれている。おそらく、その作用機作を明らかにすることによって、逆に細胞膜の特性も明らかにすることができるであろうという期待がもたれるためである。

さて、第一章では、ヤエナリ第一葉に緑葉ペルオキシソームに傷害を与える物質が存在することを述べた。この物質が、どのような物質で、どのように緑葉ペルオキシソームの膜に作用するのかを明るかにすることは、1) いろいろな意味で興味深い。前に述べたことに関連して考えてみただけでも、第一にヤエナリの葉からのオルガネラの分離方法の確立に役立つであろうし、第二にはオルガネラ膜の特性の解明にもつながるにちがいない。オルガネラ傷害因子の性質およびその作用機作を解明するためには、その精製が不可欠である。

材料と方法

材料

ヤエナリは、第一章で述べたように発芽させた。まずその種子を滅菌した後1日間暗所で吸水させた。そして、無機養素を含む培地上に播種して3日間暗所で発芽させた、つづいて4日間光を照射しつつ生育させた。実験には、この幼植物の第一葉を用いた。ホウレンソウは、市販のものを用いた。

オルガネラ傷害因子の精製

新鮮重170gのヤエナリ第一葉を、5mMジチオスレイトールを含む0.05M Tris-塩酸バッファー(pH7.5) 510mlと共にブレンダーで2分間最高速度でま碎した。このま碎液を2重のナイロニガーゼで3回した後、3液を $7,700 \times g$ で30分間遠心した。そして、その上清液を粗抽出液とした。

粗抽出液に固体の硫酸アンモニウムを、20%飽和になままでゆっくり加えた。 $10,000 \times g$

で20分間遠心して沈殿を除き、上清液にさうに
固体の硫酸アソモニウムを加え60%飽和にし
た。これを $10,000 \times g$ で20分間遠心して沈殿
を集めた。この沈殿を0.05M Tris-塩酸バッ
ファー-(pH7.5)に溶解し、同じバッファーで
平衡化したセファデックスG-25カラムで脱塩
した(硫酸アソモニウム沈殿画分)。

硫酸アソモニウム沈殿画分を、0.05M Tris-
塩酸バッファー-(pH7.5)で平衡化したDE
10 AE-セルロース(DE-52)カラム(3×9
cm)にかけ、300mlの同じバッファーで洗
淨した。その後、0から0.3M KClの直線的
濃度勾配を持つ同上バッファーを1時間に120
mlの速度で流し、タンパク質を溶出させた。
15 10mlずつ分画し、活性の高い画分を集め
限外3過(Amicon PM10)により1.1mlに濃
縮した(DEAE-セルロースカラム溶出画分)。

DEAE-セルロースカラム溶出画分を、0.1
M KClを含む0.05M Tris-塩酸バッファーで
平衡化したセファデックスG-100カラム(1.5

$\times 84\text{cm}$)にかけ、同上のバッファーを1時間に9mlの速度で流した。2mlずつ分画し、活性の高い画分を回収した(セファデクスG-100カラム溶出画分)。

5 0から50% (w/v)のシヨ糖による直線的濃度勾配と、0.5から1.5% (w/v)のアンフォラインによる直線的濃度勾配を持つ LKB 8100-1 アンフォライン等電点電気泳動カラム (110ml) に、セファデクスG-100溶出画分をかけた。

10 5Wの一定電力 (800-1500V)のもとで、15時間通電した。3mlずつ分画し、活性の高い画分を直ちに0.02Mリン酸カリウムバッファー (pH7) に対し透析した(等電点電気泳動画分)。

15 0.1M KClを含む0.02Mリン酸カリウムバッファー (pH7) で平衡化したコンカナバリンA-セファロースカラム (10ml) に、等電点電気泳動画分をかけ、同上のバッファー 100mlで洗浄した。その後、0.5M α -メチルグルコシド及び0.1M KClを含む0.02M リン酸カ

リウムバッファー (pH 7) 100ml でタンパク質を溶出した。この溶出画分を、0.05M Tris-塩酸バッファー (pH 7.5) に対し透析した後、限外ろ過 (Amicon PM10) で 1ml に濃縮した (コンカナバリン A-セファロースカラム溶出画分)。

ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動
精製したオルガネラ傷害因子の均一性を調べるために、Davis⁽⁶¹⁾ の方法にもとづいて 4% (w/v) のディスクポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。また、オルガネラ傷害因子の分子量決定のために、5から 8% (w/v) のディスクポリアクリルアミドゲルを用い、Hedrick と Smith⁽⁶²⁾ の方法により電気泳動を行った。分子量マーカーとして、アルブミンモノマー (分子量、68,000), シトロートシンターゼ (分子量、100,000), アルドローゼ (分子量、158,000) およびカタラーゼ (分子量、240,000) を用いた。サブユニットの分子量決定のためには、0.1% (w/v) SDS を含む

10% (w/v) のディスクポリアクリルアミドゲルを用い、Weber と Osborn⁽⁶³⁾ の方法に基づいて、電気泳動を行った。サブユニットの分子量を決定するためには、ウシ血清アルブミン（分子量、68,000）、卵アルブミン（分子量、45,000）およびチトクロム C（分子量、12,300）を分子量マーカーとして用いた。電気泳動後、ゲルは、クマシーブリリアントブルー R によって染色した。

オルガネラ傷害因子活性の測定およびタンパク質量の定量

オルガネラ傷害因子活性は、第一章に記した「方法 II」によって測定した。タンパク質は、280 nm の吸光度の測定かまたは、ウシ血清アルブミンによる検量線をもとに、Lowry ら⁽⁵⁶⁾の方法によって定量された。

結果

オルガネラ傷害因子の精製

図9は、DEAE-セルロースカラムからのタニパク質およびオルガネラ傷害因子の典型的な溶出パターンを示したものである。オルガネラ傷害因子の活性は、No.26から32の画分にやや広く分布していった。No.26, 27およびNo.28, 29の画分に見かけ上肩が見られるが、因子活性測定上の誤差範囲内であり、しかも再現性に乏しかった。また、オルガネラ傷害因子の主たる活性ピーク以外の画分にも小さい活性ピークが見い出されるが、これらの小さい活性ピークが出現するパターンには再現性がなかつた。従つて、オルガネラ傷害因子は、DEAE-セルロースカラムから、1つのピークとして溶出されたものと考えた。

セファアデックスG-100カラムクロマトグラフでは、オルガネラ傷害因子は1つのピークとして溶出された（図10）。

セファデクスG-100溶出画分を等電点電気泳動にかけると、オルガネラ傷害因子はpH5の領域にシャープなピークを形成して分離された(図11)。従って、この因子の等電点は5であるとみなされる。

全ての精製過程で得られた標品の比活性および全活性などを表2にまとめた。オルガネラ傷害因子は、セファデクスG-100カラムクロマトグラフィーの段階までに313倍と精製された。等電点電気泳動およびコンカナバリンA-セファロースカラムクロマトグラフィーの段階では、オルガネラ傷害因子の比活性は著しく低下し、最終的に得られた標品の比活性は極めて低くなつた。等電点電気泳動とコンカナバリンA-セファロースカラムクロマトグラフィーで得られた標品では、オルガネラ傷害因子は非常に失活しやすく、0°Cでも数日の中に完全に失活した。今までのところ、この失活を防止しよう試薬をまだ見い出していない。

精製標品のディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動

コンカナバリンAーセフアロースカラムクロマトグラフィで得られた標品をディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけたところ、1本のタンパク質バンドだけが認められた（図12,左）。かくて、最終標品は電気泳動的に完全に均一なものであることがわかつた。

この最終標品を、ディスク SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけたところ、1本のポリペプチドバンドのみが観察された（図12,右）。この泳動度を他の分子量マーカーのそれと比較した結果、ディスク SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で認められたポリペプチドの分子量は45,000であった。一方、最終標品を、SDSを含まない5~8%（w/v）の4段階の濃度のポリアクリルアミドゲルを使用して、ディスク電気泳動にかけ、分子量マーカーを利用して最終標品に含まれるタンパク質の分子量を求めた。その結果、このタンパ

ク質の分子量は、約 90,000 である（図 13）。

オルガネラ傷害因子の最終標品（130 μg タンパク質）を、ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて、糖鎖を確認するため⁵に過ヨウ素酸-Schiff 法（PAS 染色）⁽⁶⁴⁾を行ったが、明確な染色結果は得られなかつた。

オルガネラ傷害因子は、コンカナバリン A-セファロースカラムに吸着し、 α -D-グルコシドで特異的に溶出される。従つて、オルガネラ傷害因子は糖を含んでいる可能性が強い。¹⁰ 緑葉ペルオキシソームからマトリックス酵素を放出させる活性がこの糖鎖部分によるのかどうかを明らかにする目的で、コンカナバリン A 存在下で、セファアデクス G-100 溶出画分¹⁵を用いてオルガネラ傷害因子活性を測定した。その結果、コンカナバリン A はオルガネラ傷害因子の活性を阻害しないことがわかつた（図 14）。

Table 2 Purification of ODF from the primary leaves of mung bean

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Yield (%)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (-fold)
Crude extract	400	501	100	1.25	1
Ammonium sulfate fractionation	300	355	70.9	1.18	0.94
DEAE-cellulose column chromatography	18.5	350	69.9	18.9	15.1
Sephadex G-100 gel filtration	0.87	340	67.9	391	313
Isoelectric focusing	0.61	81	16.1	133	106
Con A-Sepharose column chromatography	0.13	6	1.2	46.2	37.0

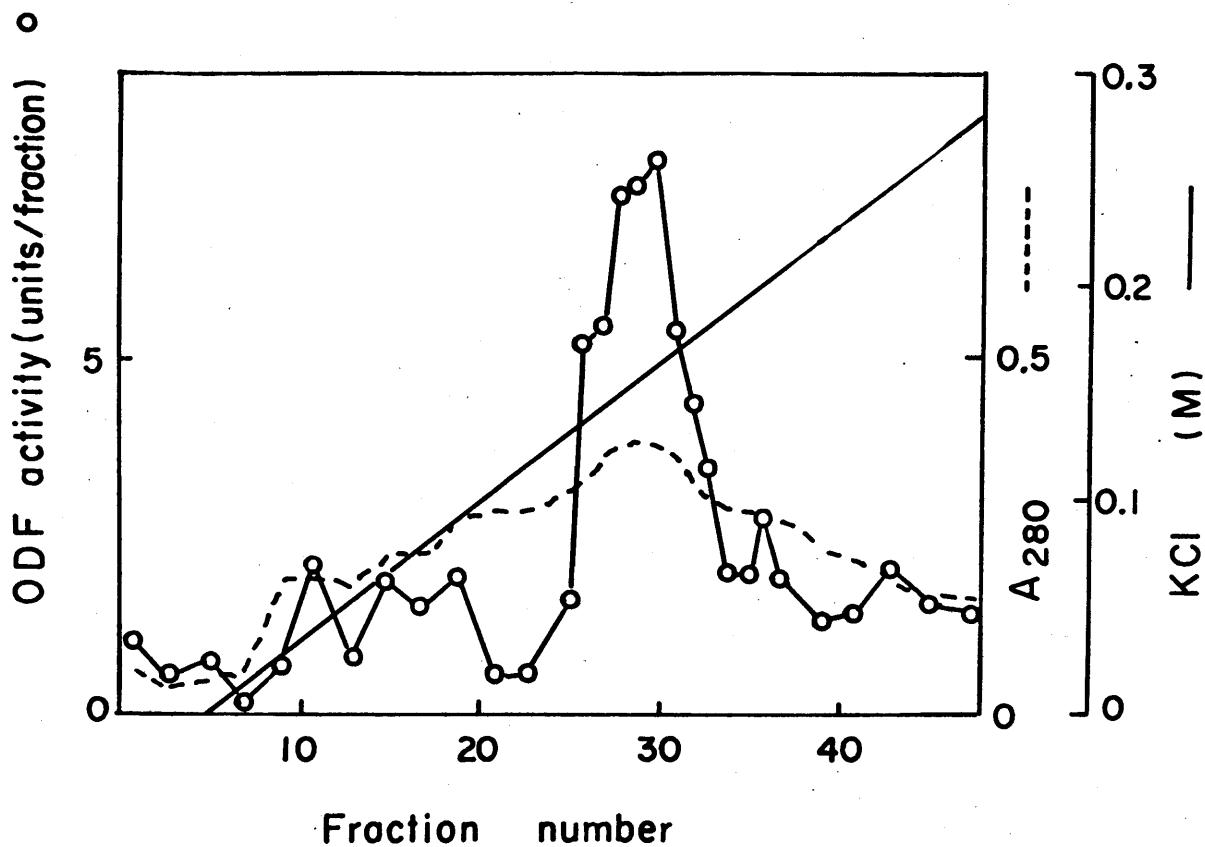


Fig. 9. DEAE-cellulose column chromatography of ammonium sulfate precipitate fraction.

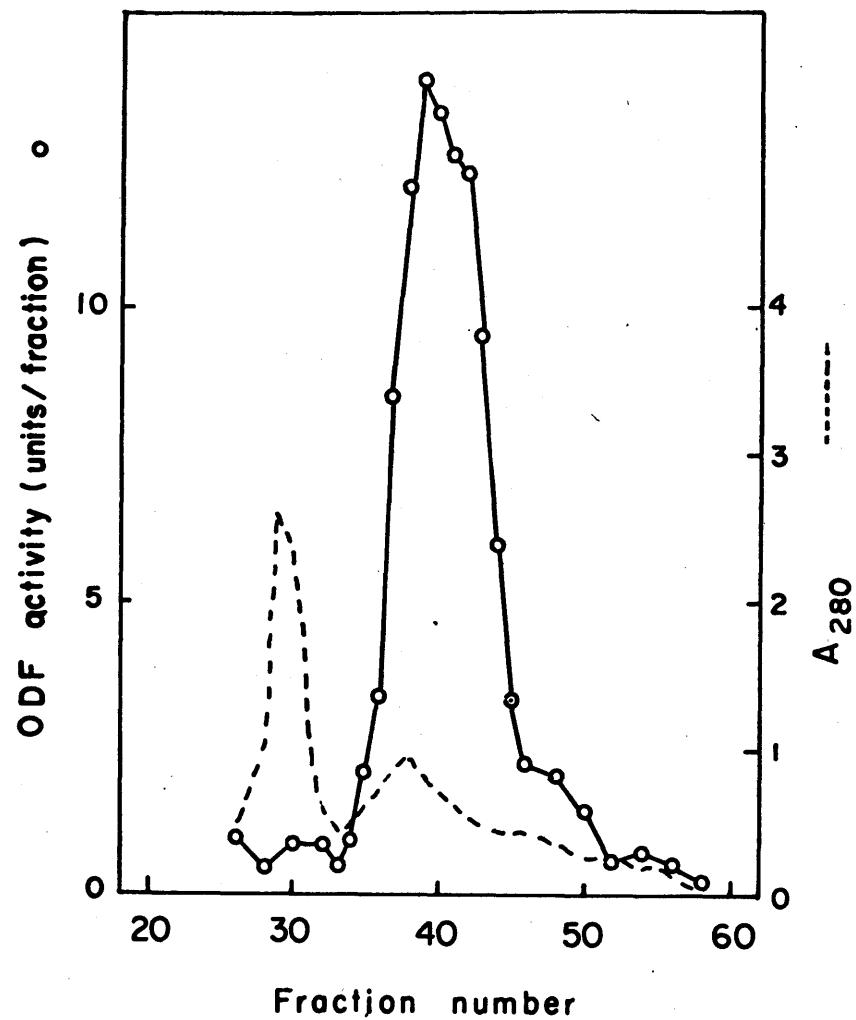


Fig.10. Sephadex G-100 column chromatography of DEAE-cellulose column elute fraction.

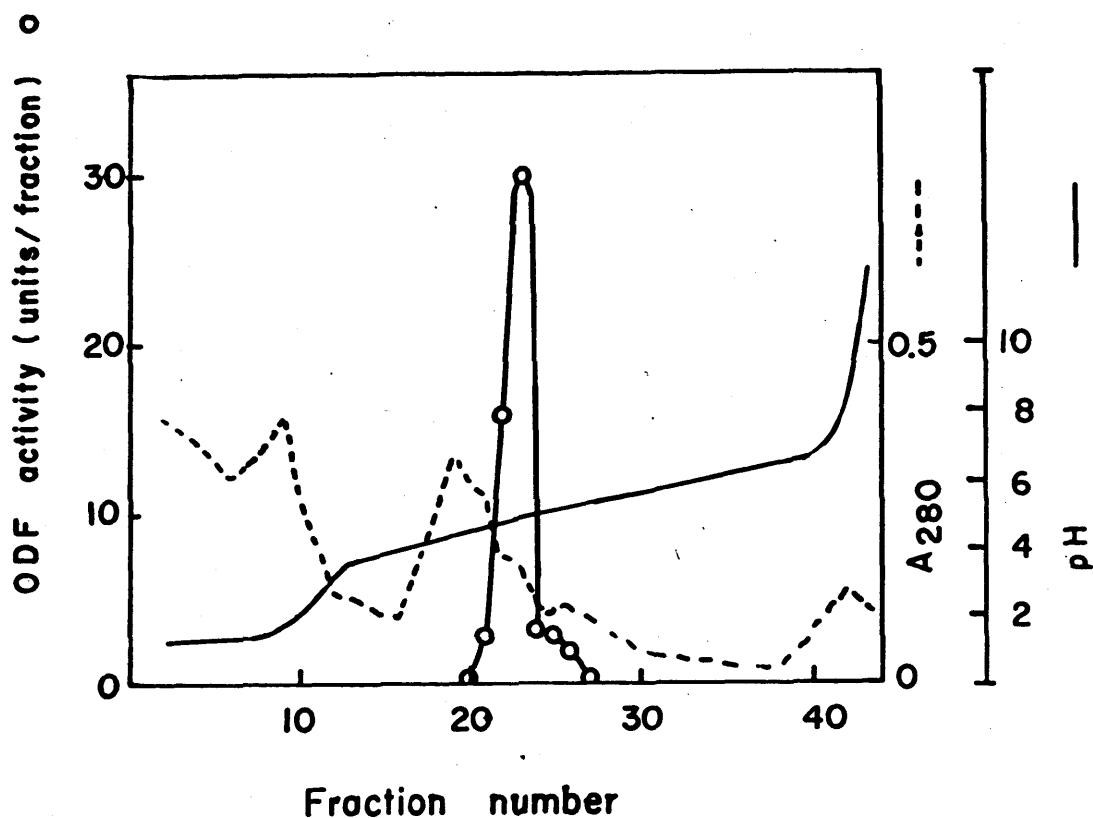


Fig. 11. Isoelectric focusing of Sephadex G-100 column elute fraction.

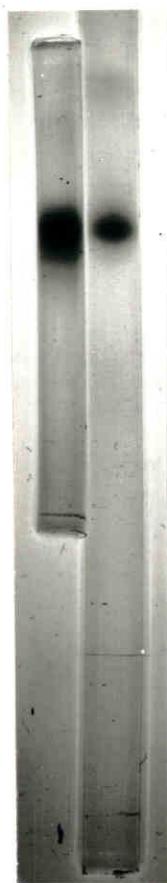


Fig. 12. Disc gel electrophoresis of purified ODF. Left; electrophoresis in a 7% polyacrylamide gel. Right; electrophoresis in a sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel.

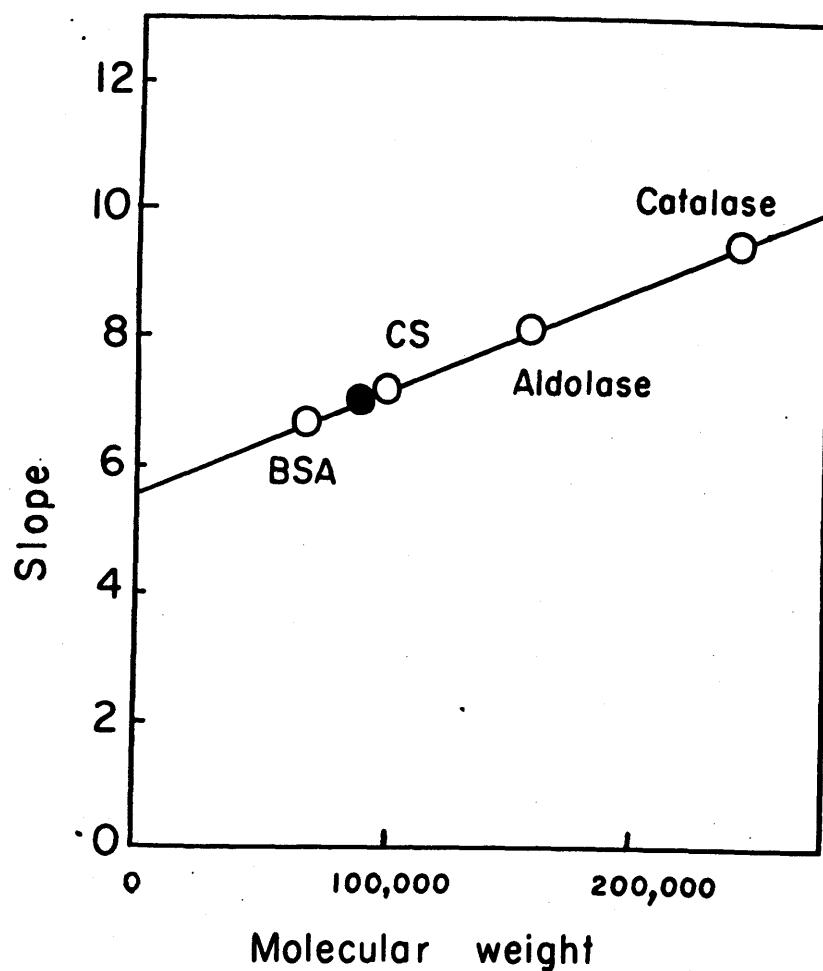


Fig. 13. Estimation of molecular weight of ODF. ● ; ODF,
BSA; bovine serum albumin, CS; citrate synthase.

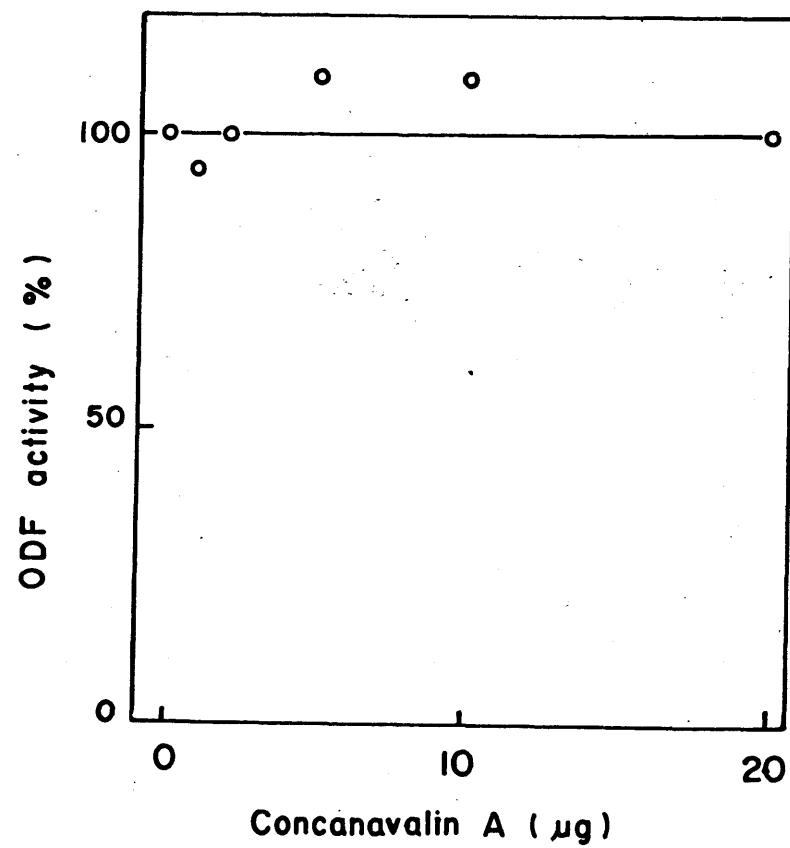


Fig. 14. Effects of concanavalin A on ODF activity.
Sephadex G-100 column elute fraction (7.5 μg protein) was assayed in the presence of varying amount of concanavalin A described as in Method II. The activity of ODF was expressed as percentage of the activity relative to that without concanavalin A.

考察

オルガネラ傷害因子の活性測定上の問題点、

オルガネラ傷害因子は、その量と遊離され
るヒドロキシピルビン酸還元酵素の活性が比
例する範囲内で常に測定されなくてはならな
い。従って、活性を測定するときには、常に
同一のオルガネラ傷害因子の標品について、
その量をいくつか変えて測定することが必要
であった。これを怠ると、例えばカラムから
の溶出パターンがシャープな釣鐘形とならず、
ブロードな台形となってしまった。

測定に用いるホウレンソウは市販のものを
使用したが、季節によって品種が異った。こ
うした品種のちかいや、緑葉やルオキニシー
ムのけん濃操作、このけん濃液の調製から測
定までに要する時間などによって、同一のオ
ルガネラ傷害因子の標品でも、その測定され
る活性の値が異った。従って、同一のホウレ
ンソウから調製した同一の粗オルガネラけん

濁液を用いた同一の測定におけるデータのみ
が、真に比較しうるデータであり、他の測定
条件によって得られた数値との厳密な比較は
あまり意味を持たない。

オルガネラ傷害因子の失活

オルガネラ傷害因子は、セファデクス G-
100 カラムクロマトグラフィによる精製段階
まではほとんど失活せず、凍結しておけば保
存によく耐えだ。しかし、等電点電気泳動お
よびコンカナバリン A-セファロースカラム
クロマトグラフィによる精製後は、測定まで
の時間に比例してその活性が低下し、凍結し
ておいても数日間で完全に失活した。この失
活の原因は不明である。この因子の安定化に
寄与する何らかの物質がこれらの中の精製過程で
失われた可能性を考えられるが、今のところ
不明のまま残されていよい。又、この因子を安
定化させる何らかの化学物質も今までのところ
見り出しができなかつた。オルガネラ
傷害因子は複数あってこれらの協同化でオル

ガネラに対する傷害が引き起され、等電点電気泳動やコンカナバリンA-セファロースカラムクロマトグラフィによってこれらが相互に分離された結果、活性の回収率が著しく低下したという可能性はなさそうである。上に述べたように、セファデックスG-100カラムクロマトグラフィ以後の精製標品では、貯蔵中に急速な失活が起る。おそらく、オルガネラ傷害因子自身の不安定化か、等電点電気泳動やコンカナバリンA-セファロースカラムクロマトグラフィでの活性回収率の低下の原因であろう。

オルガネラ傷害因子の化学的本体

オルガネラ傷害因子は、分子量45,000のサブユニット2つからなる分子量90,000のタンパク質であることが明らかになった。オルガネラ傷害因子は、コンカナバリンA-セファロースに結合して、メチルグルコシドで特異的に溶出されるので何らかの糖鎖を持ったタンパク質である可能性が強い。今のところ、

これに対する直接的証明はなされていない。
この糖鎖部分が活性発現に関与するか、あるいは活性をもたらす物質それ自身である可能性が考えられる。しかしながら、コニカナバ
リニA存在下で活性を測定しても、いささかの活性低下も見られなかつた。従つて、オルガネラに対する傷害活性は、タンパク質部分によつて引き起されたものと想像される。

10

15

第三章 オルガネラ傷害因子の性質と作用

操作

動植物から微生物におよぶ広範囲の生物に、動物細胞に傷害を与える種々の生体物質が存在することが知られている。これらの物質は赤血球を破壊して溶血させたり、動物細胞に損傷を与えてその細胞質を流出させたりする。

こうした傷害は、これらの細胞の細胞膜を損傷させることによって引き起されることが判明している。これらの物質の中には、細胞膜(60)だけに損傷を与えるだけでなく、他の生体膜、例えば、ミクロソーム(65)、ミトコンドリアセリソーム(66, 67, 68)などの膜にも損傷を与える物質があることも報告されている。

これらの物質(cytolysin)は、サポニンなどの低分子量の物質、ポリミキシンなどの微生物によって作られるペプチド様低分子量物質およびタンパク質に区分される。タンパク質は、酵素作用を持つものと酵素作用を持た

ないものに分けられている。前者としては、細菌(69,70) や蛇毒(71,72) に見出されているホスホリパーゼがある。後者に属するものとして、蛇毒中に見出される Direct lytic factor(73,74)、ハチ毒に含まれる Melitin⁽⁷⁵⁾、細菌に見出される各種の毒性タンパク質—すなわち、Aerolysin (*Aeromonas hydrophila*)⁽⁷⁶⁾、 θ, δ -toxin (*Clostridium perfringens*)^(77,78)、haemolysin (*Pseudomonas aeruginosa*)⁽⁷⁹⁾、 α -toxin (*Staphylococcus aureus*)⁽⁸⁰⁾、Streptolysin O, S' (*Streptococcus pyogenes*)^(81,82) および vibriolysin (*Vibrio parahaemolyticus*)⁽⁸³⁾—などがあげられ、これらはすべて人体に対する毒性を持つ物質である。以上のように、人体に対して有害な細菌や各種の毒液中に、酵素作用を伴わないで細胞膜などの生体膜に損傷を与えるタンパク質が見出されているが、こうしたタンパク質が高等動植物の細胞内に見出された例はいまだ報告されていない。

第二章で述べたように、ヤエナリの緑葉に

存在するオルガネラ傷害因子はタンパク質である。従って、前述の細菌や毒液中のタンパク質の作用との比較と二面からみて、このオルガネラ傷害因子が何らかの酵素作用によって緑葉ペルオキシソームに傷害を与えるのか、それとも非酵素的に作用して損傷を与えるのかを明らかにすることは興味深いものがある。一方、ヤエナリ緑葉のオルガネラ傷害因子が、緑葉ペルオキシソーム以外のオルガネラに対しても、同様な傷害活性を示すかどうかも問題となるであろう。

材料と方法

材料

ホウレンソウは、市販のものを用いた。

オルガネラ傷害因子

第二章で述べた方法で精製したセファアテック
スG-100カラム溶出画分は、長期保存に耐え
るので、この画分を用いた。

糖質加水分解活性の測定

基質として、ホウレンソウの葉から調製し
た膜画分を用いた。第一章の方法Iで述べた
ように調製したホウレンソウの葉(120g)の
ま碎液を $7,700 \times g$ で30分間遠心し、得られた
沈殿を60mlの0.1Mグリニルグリシン-K
OHバッファー-(pH7.5)にけん濃した。この
けん濃液を $105,000 \times g$ で2時間遠心し、沈殿
を同じバッファーにけん濃した。この操作を
2回繰り返し、最後に得た沈殿の半分を4ml
の上述のバッファーに(膜画分I)、残りの
半分を50mM酢酸-KOHバッファー-(pH4.5)

にけん濃した(膜画分II)。

膜画分I 0.8ml, オルガネラ傷害因子標品
0.1ml (0.694単位), 0.1M CaCl_2 0.01ml およ
び水 0.09ml の混合液を 10°C でインキュベー
トした。対照は、オルガネラ傷害因子標品の
かわりに、バッファーを用いてインキュベー
トした。

比較のために、ホウレンソウの膜画分を *Tu-
rbo cornutus* のグリコシダーゼとインキュベ
ートした。膜画分II 0.8ml にこのグリコシダ
ーゼ 1mg および水 0.2ml を加え、10°C でイ
ンキュベートした。対照は、膜画分IIのかわ
りに 50mM 酢酸-KOH バッファー (pH 4.5) を
加えるか、もしくはグリコシダーゼを除いて
反応させた。

インキュベーション後、反応混液 0.1ml に
50% (w/v) TCA 0.2ml を加え、10,000 × g
で 10 分間遠心した。そして、その上清中の T
CA 可溶性糖質をフェノール-硫酸法⁽⁸⁴⁾によ
って定量した。糖質の量は、マンノースによ

る検量線を用いて計算した。

タニパク質加水分解活性の測定

ウシヘモグロビン 10 mg、50 mM グリシン
グリシン-KOH バッファー (pH 7.5)、オルガ
ネラ傷害因子標品 0.05 ml (38 μg タニパク
質) および 1 mM CaCl_2 を含む 5 ml の反応
混液を 10°C でインキュベートした。比較のた
めに、ウシヘモグロビン 10 mg、50 mM Tris-
塩酸バッファー (pH 7.5) およびトリプシン 0.1
mg を含む 5 ml の反応混液を 10°C でインキ
ュベートした。又、ウシヘモグロビンのかゆ
りに、熱変性させたウシヘモグロビンについ
ても同様の反応を行った。

反応は、20% (w/v) TCA 0.3 ml を反応混液 0.9
ml に加えることによって停止させた。その
後、10,000 × g で 10 分間遠心し、その上清中
の TCA 可溶性ペプチドおよびアミノ酸を Lowry
法 (56) の方法によって定量した。ペプチドおよ
びアミノ酸の量は、チロシンによる検量線に
基づいて求めた。

脂質加水分解活性の測定

基質として、ホウレンソウの葉から調製した粗オルガネラケン溶液を用いた。第一章の方法 I に基づいて、ホウレンソウの葉 100 g を 5 調製したま碎液を $7,700 \times g$ で 30 分間遠心し、その沈殿を 0.9 M ショ糖を含む 0.1 M グリシン・グリシン-KOH バッファー (pH 7.5) (けん濃溶液) 10 ml にけん濃した。

上述の粗オルガネラケン溶液 5 ml、オルガネラ傷害因子標品 0.1 ml (0.694 単位) および 0.1 M CaCl_2 0.05 ml を含む反応混液を、10 °C で 1 日間インキュベートした。対照として、オルガネラ傷害因子標品のかわりに、0.1 M グリシン・グリシン-KOH バッファー (pH 7.5) を加えた反応混液を用いた。

反応後、反応混液を、氷冷しクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 混液 50 mlと共に、ガラスホモゲナイザーでま碎した。このま碎液をガラスフィルターでろ過した。フィルター上に残った残滓は、上述の混液 50 ml およ

ビクロロホルム-メタノール(1:1, V/V)混液
50mlを用い、2度繰り返してま碎し、前と
同様に3回した。以上のすべての3液を集め、
ロータリーエバポレーターで乾固した。

乾固した粗脂質画分をクロロホルム100ml
に溶解し、これに0.5%(W/V)NaCl 20mlを
加えて分液ロートに入れ、激しく振った後、
下層を分取した。この下層を、同じNaCl溶液
20mlおよび水20mlで2回洗浄した。以上
の過程でのすべての上層はクロロホルム200
mlを加えて振とうし、その下層を分取した。
これら全てのクロロホルム層(下層)を集め、
乾固した。

乾固した脂質画分を、Yamakiら(85)の方法
に基づき、ケイ酸カラムにかけて、中性脂質
画分とリン脂質画分に分画した。両画分を乾
固させた後、クロロホルム-メタノール(2:1
V/V)混液1mlにそれぞれ溶解させ、そのう
ち0.02mlをTLC用プレート(Kiesel Gel
H)上にスポットし、クロロホルム-メタノ

一ル一水 (65:25:4, v/v/v) 混液を用いて展開した。

一方、個々のリン脂質を用いてリン脂質加水分解活性を検索した。0.1M グリシルグリシン-KOH バッファ - (pH 7.5) 0.15 ml, リン脂質 (ホスファチジルイノシトール, ホスファチジルエタノールアミン, ホスファチジルグリセロールまたはホスファチジルコリン) 2.5 mg, 0.1M CaCl_2 0.015 ml, オルガネラ傷害因子標品 0.05 ml およびメタノール 1.5 ml を含む 3 ml の反応混液を 10°C で 1 日間インキュベートした。反応後、メタノール 1.5 ml とクロロホルム 6 ml を加えてよく振った後、クロロホルム層をとり乾固した。この乾固した脂質を 0.2 ml のクロロホルムに溶解し、その 0.1 ml を前述のことく TLC で展開した。対照として、基質として用いた個々のリン脂質そのものを展開して比較した。

オルガネラ傷害因子と葉緑体のインキュベーション

ホウレンソウの葉 33g から、第一章で述べたように、シヨ糖密度勾配遠心法によつて葉緑体画分を調製した。この葉緑体けん渇液 2 ml、オルガネラ傷害因子標品 0.015 ml (0.104 単位) および 1M CaCl_2 0.005 ml を混合し、10°C で、特別に記載しない限りは 30 分間インキュベートした。0.5M EDTA (pH 7.5) 0.02 ml を加えて反応を停止させた後、0.1 M グリシルグリシン-KOH バッファー (pH 7.5) 2 ml を加えた。この混合液を $105,000 \times g$ で 2 時間遠心し、得られた上清液を限外ろ過によつて 1 ml に濃縮した。そして、上清液および沈殿中のオルガネラ傷害因子活性を、第一章の方
法 II によつて測定した。ただし、反応は 2.5 mM CaCl_2 存在下で行ない、反応の停止は 0.5 M EDTA (pH 7.5) 0.02 ml の添加で行った。

光散乱の測定

ホウレンソウの葉からの粗オルガネラけん渇液 (第一章、方法 I 参照) 0.19 ml, 0.9 M シヨ糖を含む 0.1M グリシルグリシン-KOH

バッファー-(pH7.5) (けん濃溶液) 0.2ml, 0.1M
 CaCl_2 0.005ml およびオルガネラ傷害因子標品 0.005ml を加え、25°C で波長 650 nm の吸光度で測定した。

酵素及びオルガネラ傷害因子活性測定

トリオースホスフェートイソメラーゼおよびフマラーゼは、それそれを Burton ⁽⁸⁶⁾ および Racker ⁽⁸⁷⁾ の方法によって活性を測定した。オルガネラ傷害因子活性は、第一章の方法 II によって測定した。

結果

オルガネラ傷害因子の性質

種々の2価金属イオンのオルガネラ傷害因子活性におよぼす影響を図15に示した。銅イオンはオルガネラ傷害因子を活性化しなかつたが、カルシウム、マニガン、マグネシウムおよび亜鉛イオンはオルガネラ傷害因子を活性化した。しかし、各イオンの間で活性化の程度に若干の差がみられ、カルシウムイオンが最も低濃度で、かつ最も強くオルガネラ傷害因子を活性化した。亜鉛イオンの場合には、オルガネラ傷害因子の活性を最大に促進するに必要な濃度が高く、かつその最大活性も他のイオンに比べて低かつた。

カルシウムイオンの存在下で、オルガネラ傷害因子の活性はpH6で最大を示した(図16)。グリシルグリシン-KOHバッファー中では、オルガネラ傷害因子の活性は非常に高く、pH7および7.5における活性は、pH6のTris-

マレイン酸-KOH バッファーにおける活性を上まわった(図16)。従って、通常の活性測定ではグリシルグリシン-KOH バッファーを用いる方が、より便利であろうと判断した。

オルガネラ傷害因子の活性に対する pH の効果は、オルガネラ傷害因子のタンパク質部分の立体構造に対する pH の効果によって引き起されただけではなく、「基質」である緑葉ペルオキシソーム膜のリン脂質の極性基の解離状態や膜タンパク質の立体構造の変化によっても引き起された可能性がある。

オルガネラ傷害因子が緑葉ペルオキシソーム以外のオルガネラに対しても作用するかどうかを検討した。第一章で述べた方法 II に従って反応させ、反応停止後の遠心分離でえられる $10,000 \times g$ 上清液について、ミトコンドリアおよび葉緑体のマトリクス酵素の活性を測定した(図17)。オルガネラ傷害因子は、緑葉ペルオキシソームのみならず、ミトコンドリアおよび葉緑体のマトリクス酵素(それぞれ、

フマラーゼ"とトリオースホスフェートイソメラーゼ")をもほぼ100%遊離させた。葉緑体からのトリオースホスフェートイソメラーゼの遊離は、他のマトリクス酵素の遊離に比較して遅かった。これが、反応混液中の葉緑体の量の多さによるものか、あるいはオルガネラに対する親和性の差異によるのかは不明である。

オルガネラ傷害因子の加水分解酵素活性の測定

図18は、ホウレンソウの葉から調製したオルガネラ膜画分に存在する糖質に対して、オルガネラ傷害因子が加水分解活性を持つかどうかを調べた結果を示している。このオルガネラ膜画分を *I. cornutus* の生産するグリコシダーゼで処理したところ、図18で示したようにTCA可溶性の糖質が多量に生成された。この結果は、このオルガネラ膜画分に、このグリコシダーゼに利用可能な糖質が存在することを示している。一方、オルガネラ傷害因子を

このオルガネラ膜画分に作用させても、TCA 可溶性の糖質は生成されなかった。従って、オルガネラ傷害因子は顯著な糖質加水分解酵素活性はもたないと判断した。

次に、オルガネラ傷害因子がタンパク質を TCA 可溶性のペプチドやアミノ酸に分解する活性をもつかどうかを調べた。ウシヘモグロビンまたは熱変性させたウシヘモグロビンとオルガネラ傷害因子をインキュベートした。

比較のために、オルガネラ傷害因子のかわりに、トリプシンをこれらの中のタンパク質に作用させてみた。トリプシンは活発にタンパク質を分解して TCA 可溶性のペプチドとアミノ酸を生成したが、オルガネラ傷害因子はこうした生成能力は持たなかった（図19）。そこで、オルガネラ傷害因子がタンパク質を分解し、TCA 不溶性のペプチドを作る能力を持つかいなかどうかを確かめた。オルガネラ傷害因子を各種のタンパク質とインキュベートし、この反応混液をディスクポリアクリルアミド

電気泳動にかけ、タンパク質の泳動パターンを調べた（図20）。その結果、すべての場合に、そのタンパク質バンドの泳動パターンは、反応混液に CaCl_2 を加えずに同様に処理した場合のそれと何ら相違が認められなかつた。以上の実験結果から、オルガネラ傷害因子は、顯著なタンパク質加水分解酵素活性はもたないものと判断した。

オルガネラ傷害因子が、各種のオルガネラの膜に損傷を与えることを考えると、この因子が膜構成脂質を活発に加水分解させる作用を持つ可能性は非常に高いといえよう。そこで、オルガネラ傷害因子が脂質加水分解酵素活性を持っているかどうかを調べた。粗オルガネラけん濃液をこの因子とインキュベートした後、まず反応混液中の脂質をケイ酸カラムで中性脂質とリン脂質の両画分に分画した。ついで、両画分を TLC で分析した（図21）。リン脂質画分に、若干中性脂質が混入していだ。() されにせよ、TLC 上での脂質の分離パ

ターンは、オルガネラ傷害因子を加えないと同様の処理をしたときのパターンと何らの相違も見られなかった。次に、オルガネラ傷害因子を、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロールおよびホスファチジルコリンと別々に反応させた。反応混液を TLC で分析したところ、基質として用いたリン脂質のスポット以外に何らのスポットも認められなかつた（図22）。なみ、リン脂質を加えずに同様に 10°C で 1 日間インキュベートした場合、オルガネラ傷害因子はその 50% の活性を保持していった。オルガネラ傷害因子は、以上のことから、脂質加水分解酵素活性を顯著には示さないと結論した。

オルガネラとオルガネラ傷害因子の相互作用

オルガネラ傷害因子を、カルニウムイオン存在下で、シヨ糖密度勾配遠心で精製したブルレンソウ葉緑体と 10°C で 30 分間インキュベ

一トすると、オルガネラ傷害因子活性の少なからぬ量が失われることが見り出された（表3）。カルシウムイオンを加えなかつた場合や加えた場合でも 0°C でインキュベートした場合には、オルガネラ傷害因子の活性の消失はごくわずかであつた（表3）。葉緑体なしに同一の条件下でインキュベートした時には活性消失は全く見られなかつた（データ省略）。一方、トリオースホスフェートイソメラーゼ¹⁰は、相当量のオルガネラ傷害因子活性の消失が起るときのみ、葉緑体から遊離された（表3）。

精製した葉緑体とオルガネラ傷害因子をインキュベートし、オルガネラ傷害因子の活性消失とトリオースホスフェートイソメラーゼ¹⁵の葉緑体からの遊離を経時的に追跡した（図23）。トリオースホスフェートイソメラーゼの葉緑体からの遊離は、10分間のラグの後起り始め、40分後にはほとんどの酵素が葉緑体から遊離した。オルガネラ傷害因子活性の消

失は、トリオースホスフェートイソメラーゼの遊離とほぼ並行して生じた（図23）。カルシウムイオンの有無および温度とは無関係に、少量ではあるが有意な量のオルガネラ傷害因子活性が葉緑体に結合した（表3）。図23から判断して、この結合はオルガネラ傷害因子と葉緑体を混合した直後に生じるようと思われる。以上の結果は、オルガネラ傷害因子がその作用を発揮する時には、まずオルガネラ膜に結合し、作用すると同時に不活性化され、または活性が潜在化することを示唆している。

表4は、オルガネラ傷害因子活性に対する各種の糖質の効果を示したものである。いずれの糖質も、オルガネラ傷害因子の活性を阻害しなかつた。従って、オルガネラ傷害因子は、レクチンの場合の様な機構で膜に結合するのではなさそうである。

図24は、カルシウムイオンの存在下で、粗オルガネラけん渦液とオルガネラ傷害因子を

インキュベートすると、約30秒以内にオルガネラのけん渦液の光散乱が減少することを示している。この光散乱の減少は、カルシウム、マグネシウム、マンガンまたは亜鉛イオンの存在を必要とした。これらのイオンに対する要求性は、オルガネラ傷害因子の作用による緑葉ペルオキシソームからのヒドロキシピルビニ酸還元酵素の遊離における二価金属イオンの要求性と一致していった（図15）。これらの結果は、オルガネラ傷害因子によってオルガネラに何らかの形態的変化が引き起こされていることを示唆しているといえよう。

Table 3 Interaction between ODF and chloroplasts

	-Ca ⁺⁺				+Ca ⁺⁺			
	ODF ^c		TPI ^d		ODF ^c		TPI ^d	
	(%)	(μ mole/min/ incubation mixture)	(%)	(μ mole/min/ incubation mixture)	(%)	(μ mole/min/ incubation mixture)	(%)	(μ mole/min/ incubation mixture)
	0°C	10°C	0°C	10°C	0°C	10°C	0°C	10°C
Sup ^a	87	80	12	19	80	61	90	925
Ppt ^a	6	8	1044	982	9	5	903	23
Lost activity ^b	7	12	—	—	11	34	—	—

^a Spinach chloroplasts were incubated with partially purified ODF in the presence or absence of CaCl₂ at 0 or 10°C as described under Materials and Methods. Then the incubation mixtures were centrifuged at 105,000 xg for 2 hr, and the supernatant (Sup) and precipitate (Ppt) were assayed for ODF and triosephosphate isomerase activities.

^b The activity which was lost during incubation.

^c The activity is expressed as percentage of the activity in each fraction relative to that before the incubation.

^d Triosephosphate isomerase.

Table 4 Effects of sugars on ODF activity

	ODF activity (%)
α -methyl-D-glucoside	111
α -methyl-D-mannoside	97
α -methyl-D-galactosamine	98
D-glucose	108
D-galactose	111
D-fructose	110
L-arabinose	108
L-rhamnose	107
D-xylose	100

The final concentration of each sugar in the reaction mixture was 0.01 M. The activity is expressed as percentage of ODF activity with a given sugar relative to that in the absence of the sugar.

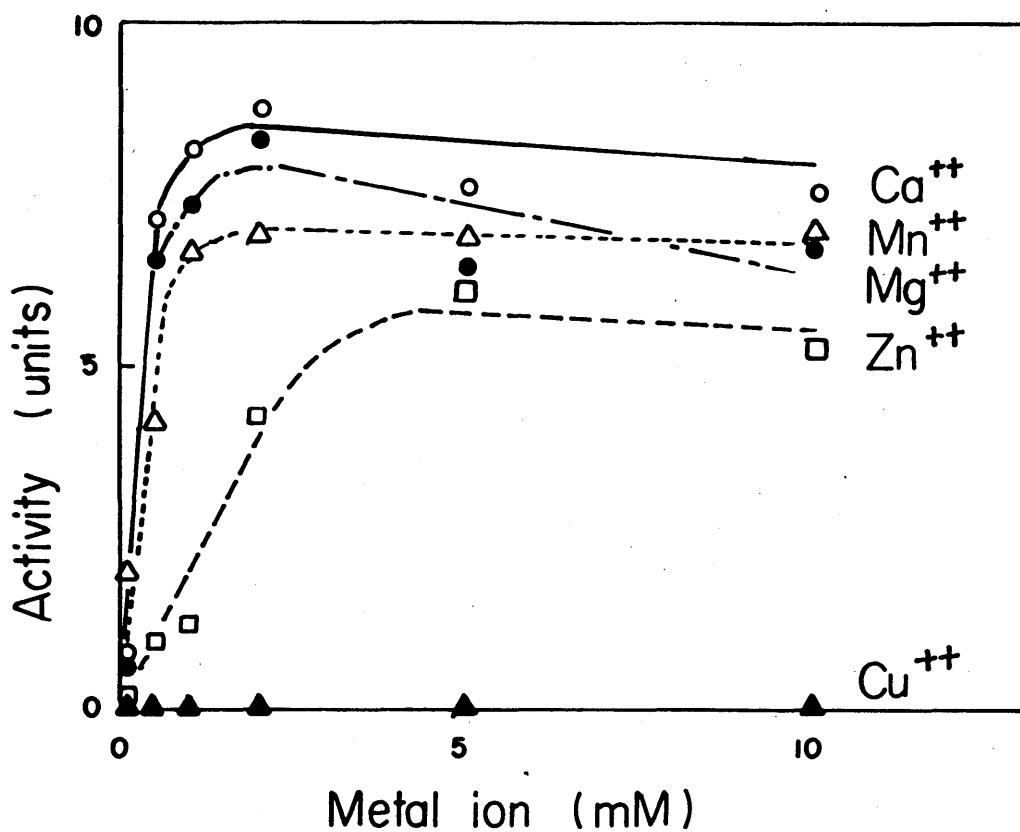


Fig. 15. Effects of divalent metal ions at various concentrations on ODF activity.

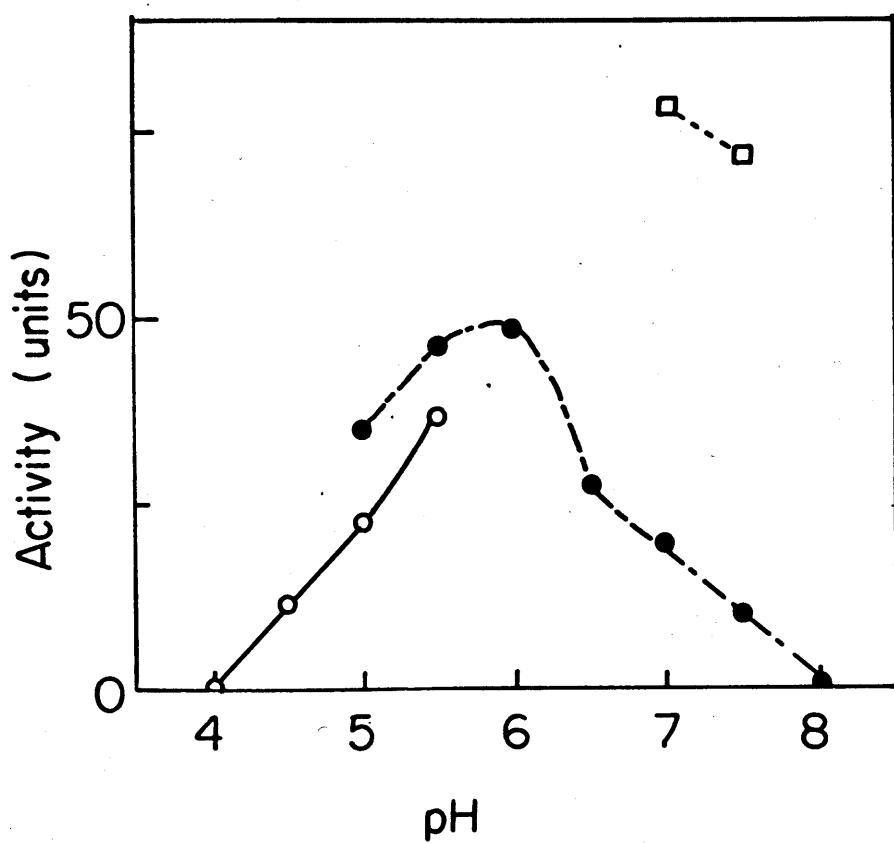


Fig. 16. ODF activity as a function of pH. ○ ; 0.05 M acetic acid-KOH buffer, □ ; 0.05 M glycylglycine-KOH buffer, ● ; 0.05 M Tris-maleic acid-KOH buffer.

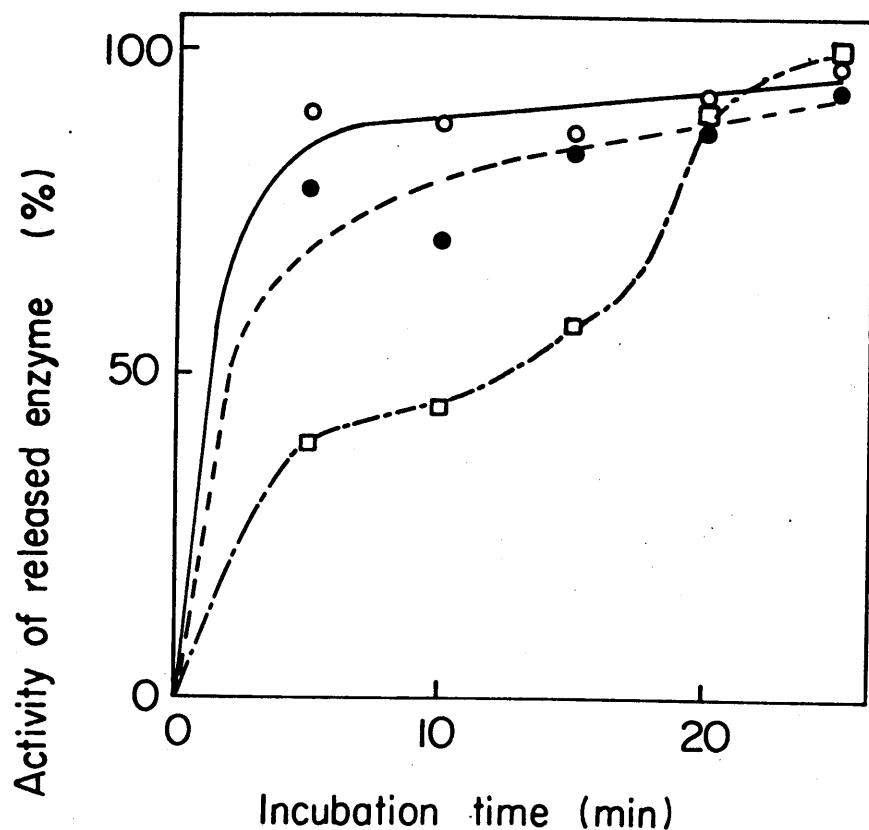


Fig. 17. Release of matrix enzymes from spinach leaf peroxisomes, mitochondria and chloroplasts by ODF. The suspension prepared from spinach leaves (total activity: hydroxypyruvate reductase; 1.46 μ mole/min, fumarase; 47.8 μ mole/min, triosephosphate isomerase; 2.98 μ mole/min) was incubated with partially purified preparation of ODF (0.347 units) under the conditions described for Method II in Chapter I. The incubated mixture then was centrifuged at 10,000 $\times g$ for 15 min. Activities in the supernatant were regarded as those of released enzymes, and are expressed as percentages of total activities. Controls were run without ODF. ○ ; hydroxypyruvate reductase released from the peroxisomes, ● ; fumarase released from the mitochondria, □ ; triosephosphate isomerase released from the chloroplasts.

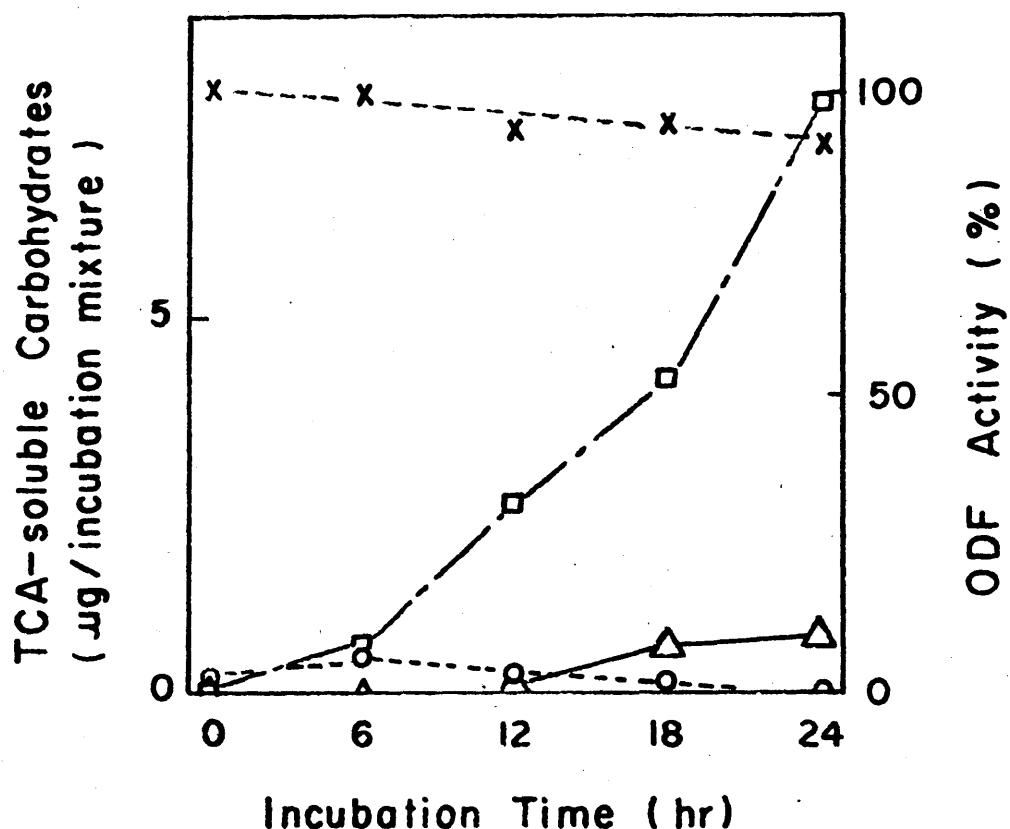


Fig. 18. Action of ODF on membrane carbohydrates. A membrane fraction from spinach leaves was incubated with ODF (○) or glycosidases from *T. cornutus* (□) as described under Materials and Methods. In order to test if ODF inactivates during incubation, the factor was incubated in the absence of the membrane fraction, and an aliquot of the incubation mixture was assayed for ODF activity: the activity (X) is expressed as percentage of ODF activity after incubation for a given period relative to that before incubation. △ : the glycosidases were incubated in the absence of the membrane fraction.

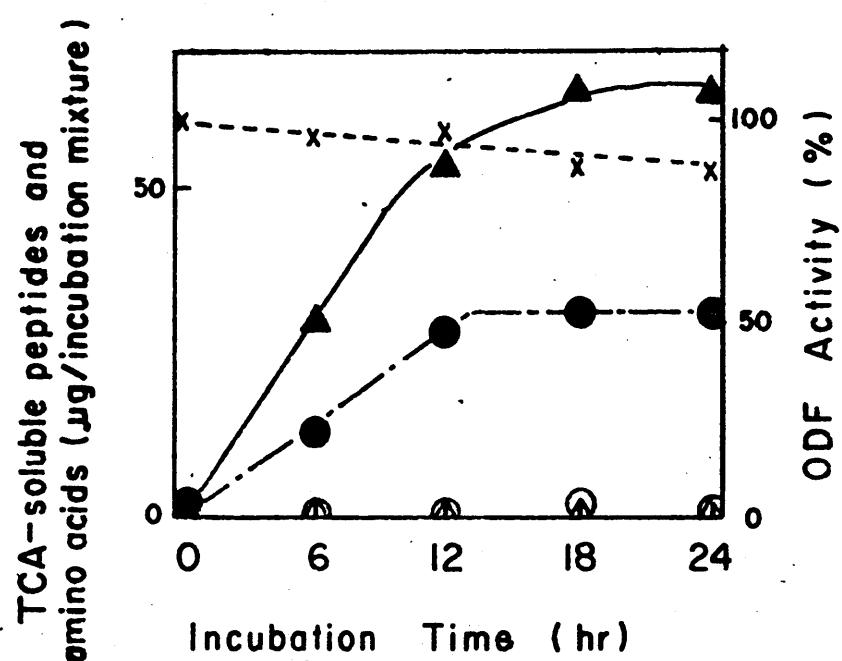


Fig. 19. Action of ODF on native or heat-denatured hemoglobin.
 Native hemoglobin (● and ○) or heat-denatured hemoglobin (▲ and △) was incubated either with ODF (open symbols) or with trypsin (closed symbols) as described under Materials and Methods. X : the same as described for Fig. 18.

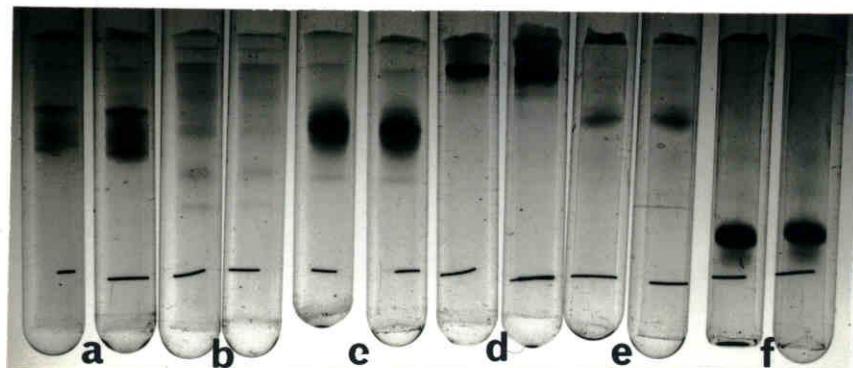


Fig. 20. Polyacrylamide gel electrophoresis of incubation mixture composed of ODF and proteins either in the presence or absence of CaCl_2 . The incubation mixture was composed of 2 mg of protein, 0.05 ml of ODF (38 μg protein), 1 mM CaCl_2 and 0.1 M glycylglycine-KOH buffer, pH 7.5, in a final volume of 1 ml. Control was run without CaCl_2 . After incubation at 10°C for 1 day, 0.01 ml of the incubation mixture was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis as described by Davis (61). Gels were stained for protein with Coomassie brilliant blue R. a; alcohol dehydrogenase, b; alkaline phosphatase, c; hemoglobin, d; γ -globulin, e; glucose oxidase, f; insulin. Each right track; Without 1 mM CaCl_2 , each left track; with 1 mM CaCl_2 .

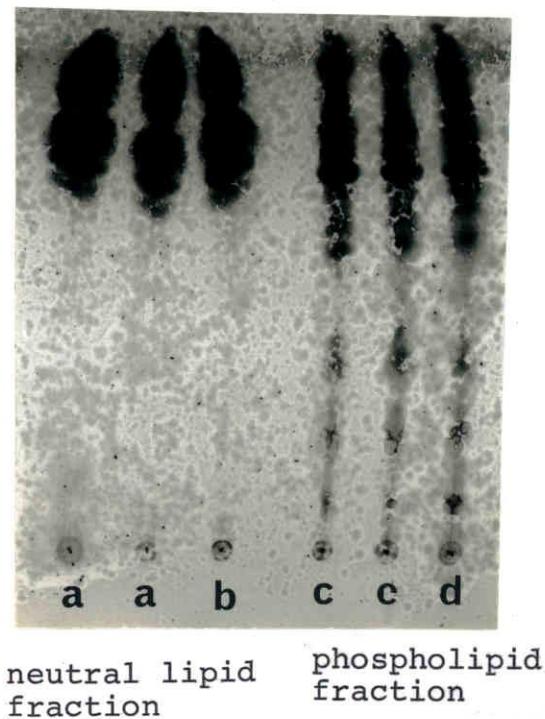


Fig. 21. Action of ODF on organelle-lipids. A membrane fraction from spinach leaves was incubated with ODF, then neutral lipids and phospholipids were extracted from the reaction mixtures and subjected to silica thin layer chromatography as described under Materials and Methods (b and d). Control was run without ODF (a and c). Sulfuric acid (50%, v/v) containing 0.5% (w/v) vanillin was used for detection of spots.

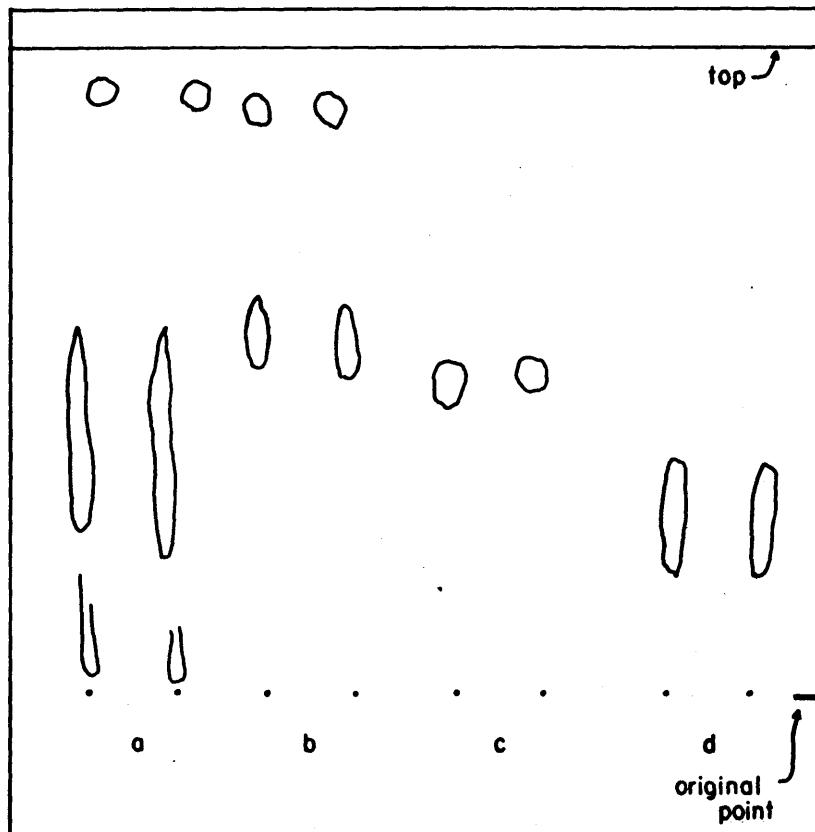


Fig. 22. Action of ODF on phospholipids. Phospholipid [phosphatidyl inositol (a), phosphatidyl glycerol (b), phosphatidyl ethanolamine (c) or phosphatidyl choline (d)] was incubated with ODF, then lipids were extracted from the incubation mixture and subjected to silica thin layer chromatography as described under Materials and Methods (each right track). Each left track: phospholipid itself used as substrate.

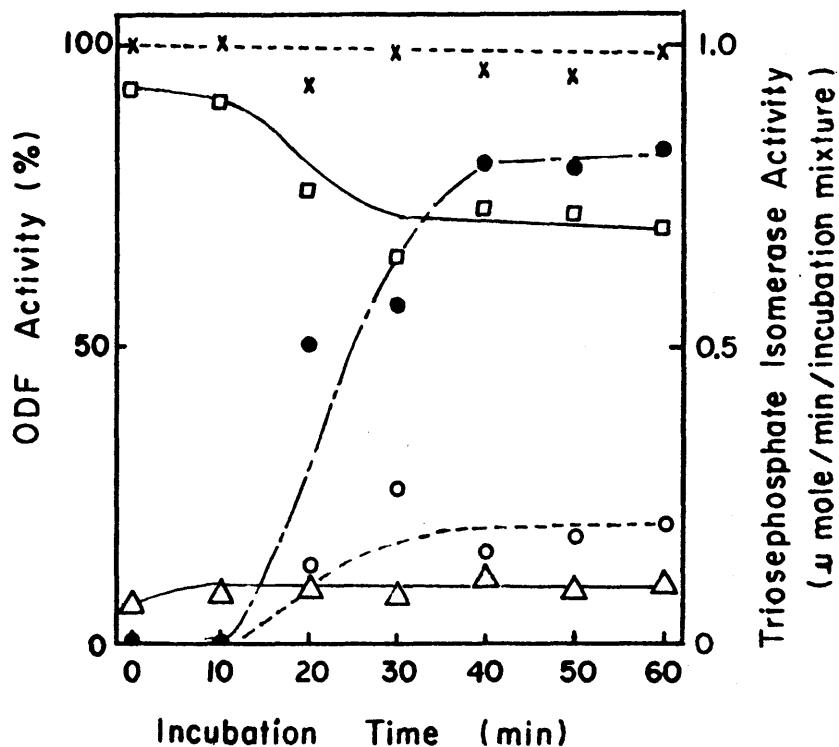


Fig. 23. Interaction between ODF and chloroplasts. Spinach chloroplasts were incubated with ODF in the presence of CaCl_2 for the times indicated as described under Materials and Methods. Then the incubation mixtures were centrifuged at 105,000 $\times g$ for 2 hr, and the supernatant (□) and precipitate (△) were assayed for ODF activity. The activity is expressed as percentage of ODF activity in a given fraction relative to that in the incubation mixture before incubation.

• : ODF activity in the incubation mixture containing no chloroplasts. ○ : loss of ODF activity in the incubation mixture containing chloroplasts. ● : triosephosphate isomerase activity in 105,000 $\times g$ supernatant.

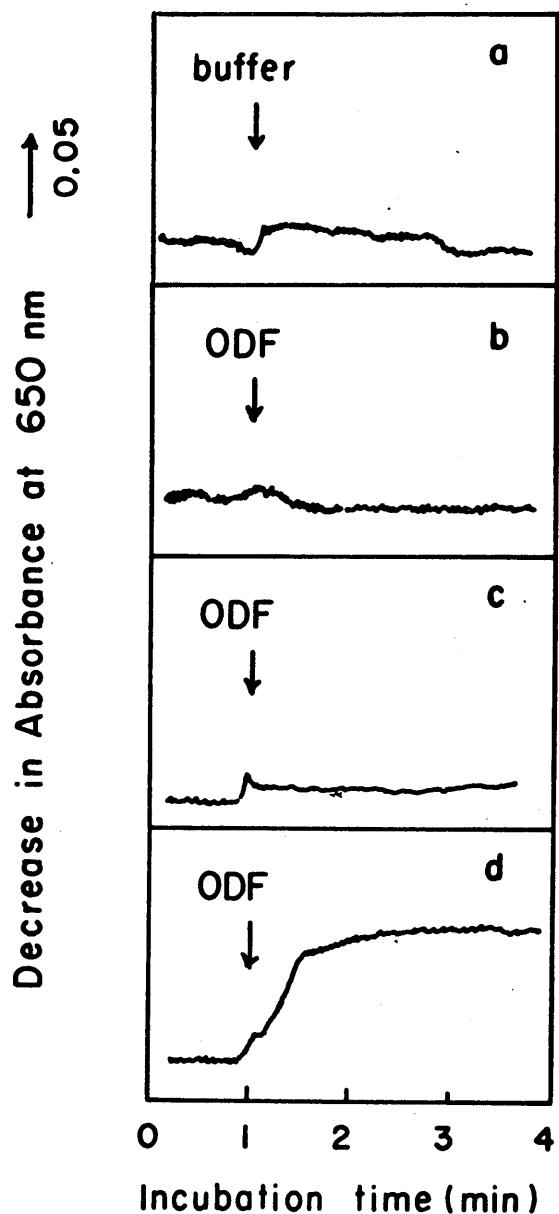


Fig. 24. Decrease in absorbance at 650 nm during incubation of organelle-suspension with ODF in the presence of calcium ions. The composition of the incubation mixtures was initially as follows: a; 0.19 ml of organelle-suspension, 0.2 ml of the suspending medium and 0.005 ml of 0.1 M CaCl_2 , b; the same as for "a" except that water was substituted for 0.01 M CaCl_2 , c; 0.39 ml of the suspending medium and 0.05 ml of 0.1 M CaCl_2 , d; the same as for "a". At the times indicated by arrows, 0.005 ml of partially purified ODF preparation or 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, was added into the incubation mixtures.

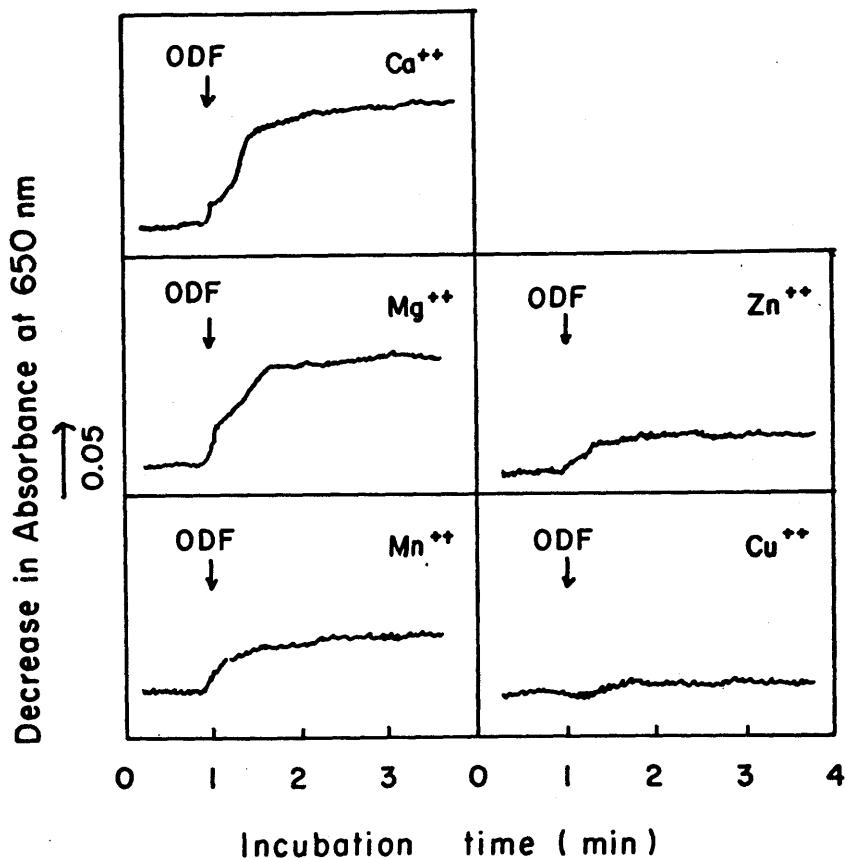


Fig. 25. Effects of divalent metal ions on decrease in absorbance at 650 nm during incubation of organelle-suspension with ODF. Initially, each incubation mixture was composed of 0.19 ml of organelle-suspension, 0.2 ml of the suspending medium and 0.005 ml of 0.1 M metal salt indicated. At the times indicated by arrows, partially purified ODF preparation (0.005 ml) was added into the incubation mixture.

考察

オルガネラ傷害因子の性質

この章の始めに述べたように、細胞膜などに作用してその内部に含まれる可溶性物質を放出させるような働きを持つ酵素は、ホスホリパーゼしか見い出されていない。ヤエナリの葉中に見い出されたオルガネラ傷害因子がある種のホスホリパーゼである可能性は、ほとんどないと考えられる。その根拠として、第一に、脂質、とくにリン脂質にオルガネラ傷害因子を作用させても、脂質分解産物が TLC で検出されない。第二に、通常ホスホリパーゼを膜に作用させた場合、膜に結合せず不活性化も起らなければ、オルガネラ傷害因子は、その作用を発揮するとい活性の消失が起る。さらに、亜鉛イオンは、オルガネラ傷害因子を活性化するが、多くのホスホリパーゼに対しては阻害的に働く(71,72,88,89)。オルガネラ傷害因子は、糖質やタンパク質も加水

分解しない。従って、その作用様式は、非酵素的に作用する毒性タンパク質と極めて良く似ているようと思われる。

オルガネラ傷害因子の作用機作

オルガネラ傷害因子が、カルニウムイオン存在下で、葉緑体に作用すると、オルガネラ傷害因子活性は一部消失する。この活性の消失と並行して葉緑体からのトリオースホスフェートイソメラーゼの遊離が起る。この現象は次のように解釈できよう。まず、オルガネラ傷害因子がカルニウムイオン存在化で葉緑体膜に強く結合する。そして、この結合によって葉緑体膜が損傷をうけ、形態的変化も起し、マトリックス酵素が遊離する。その時、オルガネラ傷害因子は活性を失なう。

オルガネラ傷害因子は、オルガネラに対する特異性を持たないので、緑葉やルオキシソーム、ミトコンドリアおよび葉緑体に共通で、糖質以外の物質と相互作用するのであろう。酵素作用を持たない毒性タンパク質のあるもの

は、ガングリオシド⁽⁹⁰⁾、コレステロール⁽⁸²⁾、またはタンパク質⁽⁹¹⁾と相互作用することが知られている。そして、酵素作用を持たない毒性タンパク質の一種である Staphylococcus aureus からの α -毒素は、活性型は 3S であるが、天然または人工膜とインキュベートすると不活性な 12S 構造をとる^(92, 93, 94)。オルガネラ傷害因子について、以上のような毒性タンパク質で研究されている結合部位や作用機構の詳細については、まだ不明のままに残されているが、その作用機作を想定する上で参考となるようと思われる。

オルガネラ傷害因子の生理的意義

酵素作用によらず生体膜に損傷を与えるオルガネラ傷害因子は、物質的またはその作用機作が毒性タンパク質とよく似ているように思われる。この因子が、細胞内ごとのどのような働きをしているのかについては、想像の域を出ない。しかしながら、今までの知見からある程度の推定もできるようになると思われる。「(1)

オルガネラ傷害因子は、未成熟な緑葉ペルオキシソームが生成される時、ヤエナリ葉において活性が増加する。(2) オルガネラ傷害因子は、細胞内ご緑葉ペルオキシソームと自由に接触すると約1分間で、全てのヒドロキシピルビニ酸還元酵素を遊離させてしまう。(3) オルガネラ傷害因子は、酸性側に至適PHを持つ。」これらの知見から、オルガネラ傷害因子は、液胞内に局在しており、緑葉ペルオキシソームなどのオルガネラの分解に寄与している可能性が考えられる。事実、液胞には、緑葉ペルオキシソーム⁽⁹⁵⁾、色素体⁽⁹⁶⁾およびミトコンドリア⁽⁹⁷⁾などのオルガネラが取り込まれていることが形態学的観察により報告されている。

REFERENCES

1. Chua, N-H. and G. W. Schmidt, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 6110 (1978)
2. Walk, R. A. and B. Hock, Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 636 (1978)
3. Kölle, W. and H. Kindl, FEBS Lett. 88, 83 (1978)
4. Beevers, H., Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 159 (1979)
5. Schnarrenberger, C., A. Oeser and N. E. Tolbert, Plant Physiol. 48, 566 (1971)
6. Kagawa, T., D. I. McGregor and H. Beevers, ibid. 51, 66 (1973)
7. Trelease, R. N., W. M. Becker, P. J. Gruber and E. H. Newcomb, ibid. 48, 461 (1971)
8. Kagawa, T., J. M. Lord and H. Beevers, Arch. Biochem. Biophys. 167, 45 (1975)
9. Schopfer, P., D. Bajracharya, R. Bergfeld and H. Falk, Planta 133, 73 (1976)
10. Nishimura, M. and H. Beevers, Nature 277, 412 (1979)
11. Bain, J. M. and F. V. Mercer, Aust. J. Biol. Sci. 19, 69 (1966)
12. Bain, J. M. and F. V. Mercer, ibid. 19, 85 (1966)
13. Solmos, T., S. S. Malhotra, S. Prasad, S. K. Malhotra and M. Spencer, Can. J. Biochem. 50, 725 (1972)
14. Nawa, Y., Y. Izawa and T. Asahi, Plant & Cell Physiol. 14, 1073 (1973)
15. Nakayama, N., N. Iwatsuki and T. Asahi, ibid. 19, 51 (1978)
16. Gerhardt, b. and H. Beevers, J. Cell Biol. 44, 94 (1970)
17. Finean, J. B., "Form and Function of Phospholipids", ed. by G. B. Ansell, J. N. Hawthorne and R. M. C. Dawson, Elsevier Scientific Publishing Co., p.183 (1973)
18. Nikaido, H., "Bacterial Membranes and Walls", ed. by L. Leive, Marcel Dekker, p.131 (1973)
19. Steck, T. L., J. Cell Biol. 62, 1 (1974)
20. Nicolson, G. L., Biochim. Biophys. Acta 457, 57 (1976)
21. Firean, J. B., R. Coleman, R. H. Michell, [邦訳] 佐藤了. 日野幸伸訳, "生体膜と細胞活動", 培風館, p.146 (1977)
22. Jain, M. K. and H. B. White, Adv. Lipid Res. 15, 1 (1977)
23. Singer, S. J. and G. L. Nicolson, Science 175, 720 (1972)
24. Morré, D. J., Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 441 (1975)
25. Wirtz, K. W. A., Biochim. Biophys. Acta 344, 95 (1974)

26. Zilvelsmit, D. B. and M. E. Hughes, "Methods in Membrane Biology", 7, ed. by E. D. Korn, Plenum Press, p.211 (1976)
27. Omura, T., P. Siekevitz and G. E. Palade, J. Biol. Chem. 244, 2017 (1969)
28. Oshino, N. and R. Sato, Arch. Biochem. Biophys. 149, 369 (1972)
29. Bock, K. W., P. Siekevitz and G. E. Palade, J. Biol. Chem. 246, 188 (1970)
30. Kuriyama, Y., J. Biol. Chem. 247, 2979 (1972)
31. Akao, T. and T. Omura, J. Biochem. 72, 1257 (1972)
32. Schimke, R. T., "Methods in Membrane Biology", 3, ed. by E. D. Korn, Plenum Press, p.201 (1975)
33. Schimke, R. T., E. W. Sweeney and C. M. Berlin, J. Biol. Chem. 240, 4609 (1965)
34. Hershko, A. and G. M. Tomkins, J. Biol. Chem. 246, 710 (1971)
35. Kulka, R. G. and H. Cohen, ibid. 248, 6738 (1973)
36. Aisbitt, R. P. G. and J. M. Barry, Biochim. Biophys. Acta 320, 610 (1973)
37. Hayashi, M., Y. Hiroi and Y. Natori, Nature New Biol. 242, 163 (1973)
38. Holtzman, E., "Lysosomes: A Survey", Springer-Verlag, p.68 (1976)
39. van den Bosh, H., Ann. Rev. Biochem. 43, 243 (1974)
40. Thompson, G. A. Jr., "Form and Function of Phospholipids", ed. by G. B. Ansell, J. N. Hawthorne and R. M. C. Dawson, Elsevier Scientific Publishing Co., p.67 (1973)
41. 育藤政樹, 蛋白質核酸酵素 21, 100 (1976)
42. Morre, D. J., Plant Physiol. 45, 791 (1970)
43. Marty, F., C. R. Acad. Sci. 268, 1388 (1969)
44. Tolbert, N. E., A. Oeser, T. Kisaki, R. H. Hageman and R. K. Yamazaki, J. Biol. Chem. 243, 5179 (1968)
45. Feierabend, J. and H. Beevers, Plant Physiol. 49, 28 (1972)
46. Filner, B. and A. O. Klein, ibid. 43, 1587 (1968)
47. Gruber, P. J., W. M. Becker and E. H. Newcomb, J. Cell Biol. 56, 500 (1973)
48. Feierabend, J. and H. Beevers, Plant Physiol. 49, 33 (1972)
49. Johnson, C. M., P. R. Stout, T. C. Broyer and A. B. Carlton, Plant and Soil 8, 337 (1957)

50. Schnarrenberger, C. and Ch. Burkhard, *Planta* 134, 109 (1977)
51. Tolbert, N. E., R. K. Yamazaki and A. Oeser, *J. Biol. Chem.* 245, 5129 (1970)
52. Tolbert, N. E., A. Oeser and R. K. Yamazaki, *Plant Physiol.* 44, 135 (1969)
53. Nawa, Y. and T. Asahi, *ibid.* 48, 671 (1971)
54. Tomomatsu, A. and T. Asahi, *Plant & Cell Physiol.* 19, 183 (1978)
55. Arnon, D. I., *Plant Physiol.* 24, 1 (1949)
56. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951)
57. Moore, T. S. and H. Beevers, *Plant Physiol.* 53, 261 (1974)
58. Esaka, M. and T. Asahi, *Plant & Cell Physiol.* 20, 1433 (1979)
59. Galliard, J., "Methods in Enzymology", 31, ed. by S. Fleischer and L. Packer, Academic Press Inc., p.520 (1974)
60. Thelestam, M. and R. Möllby, *Biochim. Biophys. Acta* 557, 156 (1979)
61. Davis, B. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964)
62. Hedrick, J. L. and A. J. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155 (1968)
63. Weber, K. and M. Osborn, *J. Biol. Chem.* 244, 4406 (1969)
64. Zacharius, R. M., T. E. Zell, J. H. Morrison and J. J. Woodlock, *Anal. Biochem.* 30, 148 (1969)
65. Finean, J. B. and A. Martonosi, *Biochim. Biophys. Acta* 98, 547 (1965)
66. Bernheimer, A. W. and L. L. Schwartz, *J. Bacteriol.* 87, 1100 (1964)
67. Bernheimer, A. W., *Science* 159, 847 (1968)
68. Macfarlane, M. G. and N. Datta, *Brit. J. Exptl. Pathol.* 35, 191 (1954)
69. Little, C., B. Aurebekk and A. B. Otnaess, *FEBS Lett.* 52, 175 (1975)
70. Möllby, R. and Wadström, T., *Biochim. Biophys. Acta* 321, 569 (1973)
71. Aleksiev, B. and B. Tchorbanov, *Toxicon* 14, 477 (1976)
72. Wu T. W. and D. O. Tinker, *Biochemistry* 8, 1558 (1969)
73. Fryklund, L. and D. Eaker, *ibid.* 12, 661 (1973)

74. Lankisch, P. G. and W. Vogt, *Biochim. Biophys. Acta* 270, 241 (1972)
75. Habermann, E. and K. G. Reiz, *Biochem. Z.* 341, 451 (1965)
76. Wretlind, B., R. Möllby and T. Wadström, *Infect. Immun.* 4, 503 (1971)
77. Smyth, C. J., *J. Gen. Microbiol.* 87, 219 (1975)
78. Tixier, G. and J. E. Alouf, *Ann. Microbiol.* 87, 219 (1975)
79. Berk, R. S., *J. Bacteriol.* 88, 559 (1964)
80. Wadström, T., *Biochim. Biophys. Acta* 168, 228 (1968)
81. Smyth, C. J. and F.J. Fehrenbach, *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 82, 860 (1974)
82. Hewitt, L. F. and E. W. Todd, *J. Pathol. Bacteriol.* 49, 45 (1939)
83. Honda, T., S. Taga, T. Takeda, M. A. Hasibuan, Y. Takeda and T. Miwatani, *Infect. Immun.* 13, 133 (1976)
84. Hodge, J. E. and B. T. Hofreiter, "Methods in Carbohydrate Chemistry", ed. by R. L. Whistler and M. L. Wolfrom, Academic Press Inc., p.388 (1962)
85. Yamaki, S. and I. Uritani, *Plant & Cell Physiol.* 13, 67 (1972)
86. Burton, P. M. and S. G. Waley, *Biochem. J.* 100, 702 (1966)
87. Racker, E., *Biochim. Biophys. Acta* 4, 211 (1950)
88. De Haas, G. H., N. M. Postema, W. Nieuwenhuized and L. L. M. Van Deenen, *ibid.* 159, 103 (1968)
89. Vidal, J. C., P. Cattaneo and A. O. M. Stoppani, *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 168 (1972)
90. Kato, I. and M. Naiki, *Infect. Immun.* 13, 289 (1976)
91. Strobel, G. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1693 (1973)
92. Arbuthnott, J. P., J. H. Freer and A. W. Bernheimer, *J. Bacteriol.* 94, 1170 (1967)
93. Freer, J. H., J. P. Arbuthnott and A. W. Bernheimer, *ibid.* 95, 1153 (1968)
94. Weissmann, G., G. Seassa and A. W. Bernheimer, *Science* 154, 772 (1966)
95. Marty, F., *C. R. Acad. Sci.* 268, 1388 (1969)
96. Gifford, E. M. and K. D. Stewart, Jr., *Amer. J. Bot.* 53, 269 (1968)
97. Poux, N., *C. R. Acad. Sci.* 257, 736 (1963)

結語

第一章 オルガネラ傷害因子の存在

1. ヤエナリ幼植物に光を照射すると、その第一葉中の緑葉ペルオキシソームの諸標識酵素の活性が増加した。無機養素を与えて育て、光を照射すると、この増加はより著しく、緑葉ペルオキシソームの形成が活発になることが示された。

2. 光照射後4日目のヤエナリ幼植物の葉の粗抽出液から緑葉ペルオキシソームを分離したところ、不均一で密度の小さな緑葉ペルオキシソームが極度に低い収率でえられた。この粗抽出液には、ホウレンソウの緑葉ペルオキシソームからそのマトリクス酵素であるヒドロキシピルビン酸還元酵素を遊離させる物質（オルガネラ傷害因子）が含まれていた。

3. オルガネラ傷害因子は、カルニウムイオンを賦活剤として必要とした。カルニウムイオン存在下で、ホウレンソウから調製した

粗オルガネラけん濁液とオルガネラ傷害因子をインキュベートすると、緑葉ペルオキシソームからヒドロキシピルビン酸還元酵素が遊離され、遊離された同酵素の活性と反応混液に加えたオルガネラ傷害因子量は、比例した。従って、オルガネラ傷害因子活性を定量的に測定することが可能となった。

4. ヤエナリ幼植物を無機養素を与えて生育させ、その後、光を照射すると、第一葉中のオルガネラ傷害因子活性は著しく増加し、光照射時に、活発に形成される不均一で密度の小さい未成熟な緑葉ペルオキシソームの分解に関与している可能性が示唆された。

このオルガネラ傷害因子を研究することは、オルガネラの分解の構造を明らかにしようとする研究の新しいアプローチの一つになるであろうと考えた。

第二章 オルガネラ傷害因子の精製

1. オルガネラ傷害因子を、ヤエナリ第一

葉から、硫安分画、DEAE-セルロースカラム
 クロマトグラフィ、セファデックス G-100 カ
 ラムクロマトグラフィ、等電点電気泳動およ
 びコンカナバリン A-セファロースカラムク
 ロマトグラフィによって精製した。

2. 等電点電気泳動以後の精製操作は、オ
 ルガネラ傷害因子の著しい失活をまぬいた。

3. オルガネラ傷害因子は、分子量 45,000
 のサブユニット 2つからなる分子量 90,000 の
 タンパク質であった。オルガネラ傷害因子は、
 コンカナバリン A-セファロースに吸着され、
 メチルグルコシドで特異的に溶出されるので、
 糖鎖を持つタンパク質らしいが、このことを
 直接的に証明することはできなかつた。

4. オルガネラ傷害因子の活性は、コンカ
 ナバリン A によって阻害されなかつた。従つ
 て、オルガネラ傷害因子のタンパク質部分が
 オルガネラ傷害活性を持つものと判断した。

(1) すれにせよ、以上の実験から、オルガネ
 ラ傷害因子はタンパク質であることが証明さ

れた。

第三章 オルガネラ傷害因子の性質と作用 機作

1. オルガネラ傷害因子は、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、マンガンイオンおよび亜鉛イオンによって活性化され、至適PHは6であった。オルガネラ傷害因子は、緑葉ペルオキシソーム以外にもミトコンドリアおよび葉緑体のマトリクス酵素を遊離させる作用を持っていた。

2. オルガネラ傷害因子は、糖質、タンパク質および脂質に対する加水分解活性を示さなかつた。

3. オルガネラ傷害因子が、葉緑体に作用すると、その活性が減少した。この減少と共に、葉緑体からマトリクス酵素であるトリオースホスフェートイソメラーゼが遊離された。オルガネラ傷害因子を粗オルガネラけん濁液に加えると、短期間内に、粗オルガネラけん

濁液の光散乱が減少した。従って、オルガネラ傷害因子は、カルシウムイオン存在下で膜に強く結合し、この結合によってオルガネラの形態変化とマトリクス酵素の遊離が起るものと想定した。

以上の実験結果から、オルガネラ傷害因子の作用機作として図26のような機構を想定してみた。今後この想定が正しいかどうかを検討するためには、オルガネラ膜への結合を直接的に証明すること、および結合後の因子の動向、オルガネラ膜の変化の詳細を明らかにしていく必要がある。なほ、オルガネラ傷害因子の生理的機能と関連して、この因子の細胞内局在性を検討することも極めて重要であると考えている。

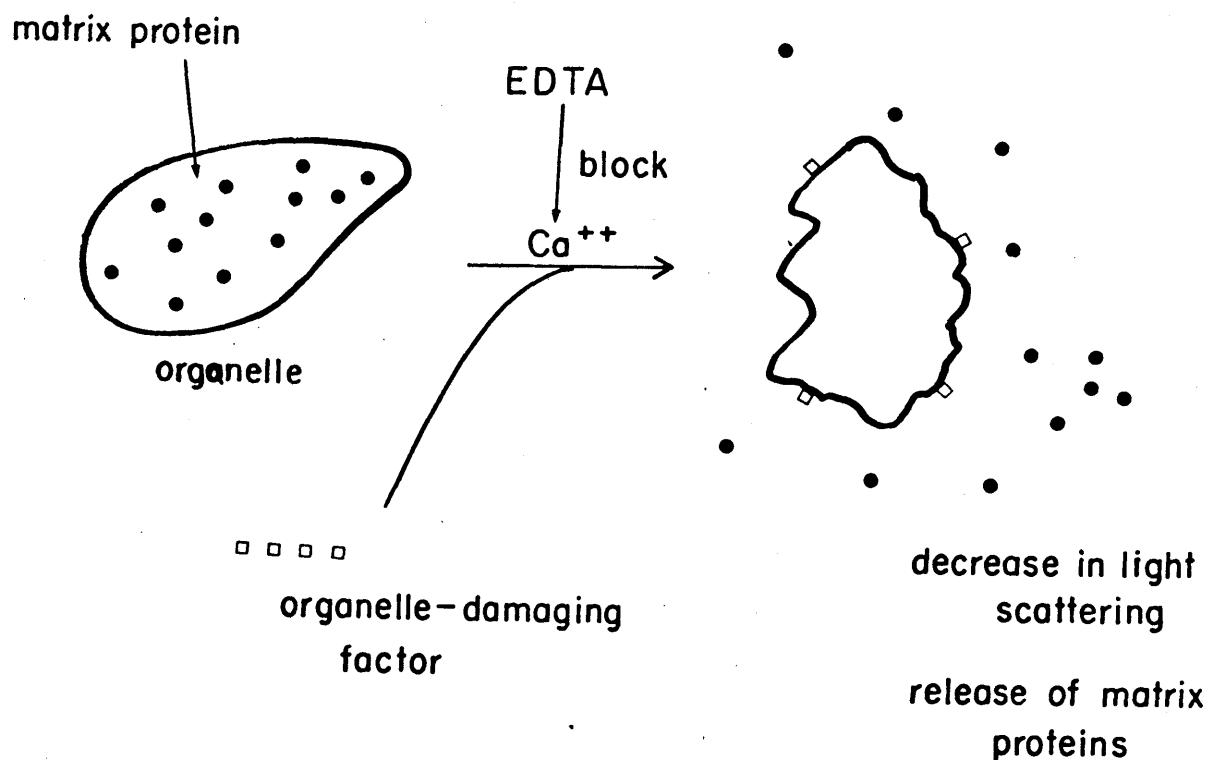


Fig. 26. Hypothetical mode of action of ODF.

謝 辞

本研究をおこなうにあたり、主指導教官として貴重な時間をさき根気強く御指導されま
した生物化学研究室の旭正助教授に深く感謝
致します。オルガネラ傷害因子の精製の研究
について共同研究者として重要な実験をされ
た田中富美子さんに感謝致します。また有益
な助言と励ましを賜りました生物化学研究室
の皆様方に厚くお礼申し上げます。

報文目録

1. A. Tomomatsu and T. Asahi: Non-synchronous increases in activities of peroxisomal enzymes in etiolated mung bean seedling leaves after illumination. *Plant & Cell Physiol.* 19, 183-188 (1978)
2. A. Tomomatsu and T. Asahi: An enzyme in mung bean leaves that damages cell organelles which leads to loss of their matrix enzymes. *ibid.* in press (1980)
3. A. Tomomatsu and T. Asahi: Mechanism of action of organelle-damaging factor from mung bean leaves. *ibid.* submitted
4. A. Tomomatsu and T. Asahi: Purification of organelle-damaging factor from mung bean leaves. *Agric. Biol. Chem. manuscript in preparation*