

### 第3章

## 高等植物 $F_1F_0$ ATPase に関する研究

### 1. 高等植物の $F_1F_0$ ATPase の サブユニット構成について

#### 1-1 はじめに

生体において代表的なプロトン輸送性ATPaseである $F_1F_0$ ATPase (ATP合成酵素複合体)はエネルギー生産系の最終ステップにおいて働く重要な酵素で、好氣的生物に広く存在している。 $F_1F_0$ ATPaseはATPase活性を持つ $F_1$ 部分と膜内でプロトンチャンネルを形成する $F_0$ 部分から成り立っている。その構造と機能は様々な生物において研究され、その高次構造についてもいくつかモデルが示されている(図3-1)。また、近年、高度に発展した遺伝子工学的技術を用い、人工的に変異した酵素を細菌につくらせ、酵素の機能と構造について詳細な研究がされている<sup>(2)</sup>。

植物細胞には、エネルギー供給の役割を果たすオルガネラとして、葉緑体とミトコンドリアの2種のオルガネラが存在する。周知のように、葉緑体では光合成、ミトコンドリアでは呼吸によって、ATPを生産する。どちらのオルガネラも複雑な電子伝達系を有し、その電子移動に伴う酸化還元電位を効率よく利用して、細胞にエネルギーをATPの形で供給するといった共通の機能を持っている。これらは酸化的リン酸化(ミトコンドリア)あるいは光リン酸化(葉緑体)と呼ばれているが、その過程に関与する酵素も非常によく知っている。葉緑体とミトコンドリアにはそれぞれ独自の $F_1F_0$ ATPaseが存在し、葉緑体

では光合成における光リン酸化反応で、ミトコンドリアでは酸化的リン酸化反応の最終段階において、電子伝達系でつくられたプロトンの濃度勾配を利用してATPを合成している。

以上のように、 $F_1F_0$ ATPaseは生物界に広く存在しているが、これらの酵素は構造的にもきわめて類似している。動物、細菌、菌類の $F_1$ や葉緑体 $CF_1$ （以後 $CF_1$ と略す）全てが5つのサブユニットより構成されており、それらは分子量の順に $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ と名づけられている。その構成比は3:3:1:1:1とされている。このうち $\alpha$ と $\beta$ については詳細に研究され、ATP結合サイトなどATPase触媒部位が存在し、ATPaseの活性中心を形成していることが示されている<sup>(8)</sup>。またこの2つのサブユニットに関しては、いろいろな生物種からのタンパク質の間で高い相同性があると共に、他のATPase分子種との間でも相同性が存在する<sup>(2)</sup>（第1章および第2章参照）。これに対し、他の3つのマイナーサブユニット、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ は $\alpha$ 、 $\beta$ に較べて生物種間で相同性が低い<sup>(104)</sup>。また、これらのサブユニットの働きに関しても不明な点が多い。細菌においては、 $\gamma$ は $F_1$ の高次構造形成と活性発現に必要であることが示されている<sup>(105, 106)</sup>。いくつかの生物種より得られた $\gamma$ について、そのアミノ酸配列が部分的に高い相同性をもっていることが見つかっている<sup>(104, 107)</sup>。 $\delta$ と $\epsilon$ は $\alpha\beta\gamma$ 複合体と $F_0$ 部分を結合させる構造的な役割をしているものと思われる<sup>(108, 109)</sup>。また、 $\epsilon$ は大腸菌や $CF_1$ では、ATPase活性に阻害的な役割をしていることが報告されている<sup>(105, 110)</sup>。しかしながら、アミノ酸配列からの考察においては、動物や菌類の $\delta$ 、 $\epsilon$ は細菌や $CF_1$ の $\delta$ 、 $\epsilon$ とはそれぞれ対応関係がなく、動物や菌類の $\delta$ と細菌や $CF_1$ の $\epsilon$ が相同性を示す。そして細菌と $CF_1$ の $\delta$ は動物のOSCP (Oligomycin Sensitivity Conferring Protein) と相同性を示す。OSCPは $F_1$ の構成サブユニットではないが、 $\alpha\beta$ と結合し、 $F_1$ と $F_0$ 部分をつなぐ役割をしていると考えられている<sup>(111)</sup>。また動物の $\epsilon$ は

他のどの $F_1$ のサブユニットや関連タンパク質とも相同性は見つかっていなかったが、最近になり酵母 $F_1$ の $\epsilon$ に相同性のあることが示された<sup>(112)</sup>。

近年、いくつかの植物よりミトコンドリア $F_1$ が精製された。これらのうち、単子葉類（トウモロコシ<sup>(113, 114)</sup>、オートムギ<sup>(115)</sup>、エンレイソウ<sup>(116)</sup>）から精製された $F_1$ は5つのサブユニットから構成され、それぞれのサブユニットは互いによく似た分子量をもっている（ $\gamma = 35,000$ 、 $\delta = 22,000$ 、 $\epsilon = 11,000 \sim 14,000$ ）。一方、双子葉類であるサツマイモ塊根より精製された $F_1$ は6つのサブユニットからなることが観察された<sup>(117)</sup>（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\delta'$ 、 $\epsilon$ ）。このうち $\delta$ と $\delta'$ は分子量的によく似た（ $\delta = 27,000$ 、 $\delta' = 23,000$ ）。また同じく双子葉類のアラスカエンドウから精製された $F_1$ もサツマイモのサブユニット構成とよく似たサブユニット構成を有していた<sup>(118, 119)</sup>。ソラマメより精製された $F_1$ は5つのサブユニットより構成されていると報告されているが<sup>(120)</sup>、その $\epsilon$ は分子量22,900でサツマイモの $\delta'$ と分子量的によく似ており、ソラマメ $F_1$ の“ $\epsilon$ ”は電気泳動上で観察されなかった可能性がある。このようにサブユニット構成が単子葉類と双子葉類で異なるのは酵素の性質によるものなのか、精製法の違いなどが要因なのかは明らかになっていない。

これまで“ $F_1$  ATPaseは5つのサブユニットより構成されている”ということが生物種を越えた共通の概念として認められていた。しかし前述のように、近年の研究の発展はそれぞれのサブユニットの対応関係は生物種間で必ずしも一致していないことを示した<sup>(104)</sup>（表3-2）。従って、 $F_1$ のマイナーサブユニットに関し、生物種間での対応関係を明らかにし、その相同性を探ることは、 $F_1$ の構造と機能を解明する点においても、さらには分子進化を考える上でも意義深いことである。特に植物細胞においては、二つのオルガネラに別々の $F_1$ -ATPaseが存在しており、これらを比較することは植物細胞の進化を考える上

でも重要であると思われる。現在までに、植物  $F_1$  のマイナーサブユニットについては、他生物種の  $F_1$  のサブユニットとの対応関係が明らかにされていなかった。本章では、サツマイモ  $F_1$  のマイナーサブユニット  $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\delta'$ 、 $\varepsilon$  の N 末端アミノ酸配列を決定した結果を示し、植物では初めて、他生物の  $F_1$  とサブユニット間の対応関係を検討した。

## 1 - 2 実験方法及び材料

### (1) サツマイモ塊根ミトコンドリアF<sub>1</sub>ATPaseの精製

F<sub>1</sub>はサツマイモ (*Ipomoea batatas* Lam. var Kokei No.14)塊根の柔組織より岩崎と旭の方法<sup>(17)</sup>に従い精製した。方法の概略を図3-2に示した。

### (2) サブユニットの精製

精製F<sub>1</sub>約1mgをSDS-PAGE (12.5%ポリアクリルアミド) にかけて後、ゲルを3M酢酸ナトリウムに浸してタンパク質バンドを検出した。このバンドを切り出した後、電氣的にタンパク質を回収した (Max-Yield GP, ATTO Co.,)。泳動液は、0.1M Tris-Tricine緩衝液、pH8.8に0.1% SDSを加えたものを用いて、20V、18時間溶出した。ポリペプチドを溶出後、0.001% SDS溶液中で4℃、2日間、高速液体クロマトグラフィー用蒸留水で透析した後、凍結乾燥して濃縮した。

### (3) N末端アミノ酸配列の決定

PTH-アミノ酸誘導体の解析は気相式シーケンサー (Applied Biosystems, model 470A) を用いて行った。サンプル量はそれぞれ $\gamma=125\sim 255\text{pmol}$ 、 $\delta=110\sim 255\text{pmol}$ 、 $\delta'=90\sim 195\text{pmol}$ 、 $\epsilon=70\sim 150\text{pmol}$ を用いた。

### (4) その他の実験方法

タンパク質定量はBio-rad protein assay kitを用いてBSA (bovine serum albumin) を標準にして行った。SDS-PAGEはLaemmliの方法<sup>(23)</sup>で行い、タンパク質染色は、クマシーブリリアントブルーRまたは銀染色 (和光

純葉銀染色キット)を用いた。免疫ブロッティングは Towbin らの方法<sup>(12)</sup>で行い、検出は<sup>125</sup>I-Protein A (Amersham International社)を用いて行った。

試薬は市販の一級または特級を用いた。

### 1 - 3 結果

#### (1) トウモロコシF<sub>1</sub>δに対する抗体を用いた免疫プロットィング

5種のサブユニットからなっているトウモロコシF<sub>1</sub>のδは、分子量的にはサツマイモF<sub>1</sub>のδ'と似ている(表3-1)。6サブユニットタイプと5サブユニットタイプとのマイナーサブユニットの対応関係をあきらかにするため、トウモロコシF<sub>1</sub>のδに対して調製された抗体を用いて精製サツマイモF<sub>1</sub>の免疫プロットィングを行った。図3-3に示すように、トウモロコシF<sub>1</sub>δは免疫学的にサツマイモF<sub>1</sub>のδと相関関係があることが示された。また、δ'とは反応しなかったことから、δとδ'は免疫学的にも異なることが示された。

#### (2) サツマイモF<sub>1</sub>のマイナーサブユニットの精製

以前小林ら<sup>(122)</sup>はサツマイモF<sub>1</sub>のαとβを高速液体クロマトグラフィーで分離した。しかし、マイナーサブユニットについては回収率と精製度に問題があり、完全な分離はできなかった。そこで今回は、SDS-PAGEでサブユニットを分離した後、切り出したゲルからサブユニットを電氣的に溶出した。この方法で単離したサブユニットは、SDS-PAGE後銀染色において単一のバンドを示した(図3-2)。従って十分な精製度のサブユニットが単離できたと判断した。

#### (3) N末端アミノ酸配列の決定

##### サブユニットの異形性

4つのマイナーサブユニットについて30~36残基のN末端アミノ酸配列

を決定することができた(図3-4~6)。これらのうちいくつかの残基については、決定することができなかつたり、はっきりと決定できないアミノ酸残基もあった。これらはそれぞれ $\alpha$ とアルファベットの小文字で示してある。 $\gamma$ については、20番目のアミノ酸残基としてイソロイシンとグリシンが、21番目のアミノ酸残基としてセリンとリジンが同時に現れた。このことから、わずかにアミノ酸配列の異なる2種類のポリペプチドが存在しているものと推定された(図3-4)。 $\beta$ についても、小林らにより等電点電気泳動で二本のバンドが観察されている<sup>(122)</sup>。また、*Nicotiana plumbaginifolia*において、ミトコンドリアF<sub>1</sub>の $\beta$ の遺伝子は二つ存在しており、そのどちらも発現していることがBoutryとChuaにより報告されている<sup>(123)</sup>。一方、 $\delta$ 、 $\delta'$ および $\epsilon$ については、複数のポリペプチドが存在するような結果はえられなかった。しかし後で述べるように、 $\delta$ のcDNAクローンの解析から、少なくとも2つの異なるmRNAが存在することが分かってきた(図3-10)ので、今回分析できたN末端部以外の部分に前述のような異形性が存在する可能性が高い。

#### $\gamma$ サブユニットのN末端アミノ酸配列

様々な生物種のF<sub>1</sub>のマイナーサブユニットの中で、 $\gamma$ はおたがいによく似た分子量を持っている<sup>(104, 107)</sup>(表3-1)。さらに動物、細菌およびCF<sub>1</sub>すべての $\gamma$ がアミノ酸配列で相同性を示すことが報告されている。サツマイモF<sub>1</sub> $\gamma$ もそのN末端アミノ酸35残基は他の生物種の $\gamma$ と高い相同性を示した(図3-4)。このことは、 $\gamma$ が構造的および機能的に生物種を越えて広く相同性を有していることを示している。

#### $\delta$ および $\delta'$ サブユニットのN末端アミノ酸配列

$\delta$ のN末端アミノ酸33残基の分析を行ったが、1、21、26、31番目



のアミノ酸は決定することができなかった(図3-5)。しかし決定できたN末端アミノ酸配列から、サツマイモF<sub>1</sub>δは細菌やCF<sub>1</sub>のδ、動物や酵母のOSCPと相同性があることが認められた。

一方、δ'のN末端アミノ酸35残基も決定したが、δとは相同性は全く見からず、またデータベースで検索したが(EMBL)その他のタンパク質とも相同性を見つけることはできなかった。

#### εサブユニットのN末端アミノ酸配列

εのN末端アミノ酸36残基を決定した。その結果、サツマイモのF<sub>1</sub>εはウシのF<sub>1</sub>εと45%、酵母のF<sub>1</sub>εとは29%の相同性がみられた(図3-6)。細菌やCF<sub>1</sub>のεはウシのF<sub>1</sub>δに対応している(表3-2)。従ってミトコンドリアF<sub>1</sub>のεはこれらに特異的であるといえる。サツマイモのCF<sub>1</sub>εはその他の植物のCF<sub>1</sub>εと高い相同性があることが示されており<sup>(124)</sup>、植物ミトコンドリアF<sub>1</sub>に特異的なεが存在することはその進化を考える上で興味深い。

#### 1 - 4 考 察

高等植物のミトコンドリア $F_1$ の研究においては、岩崎と旭<sup>(117)</sup>によりサツマイモ $F_1$ が6種のサブユニットから構成されていることが報告されて以来、6番目のサブユニット $\delta'$ の存在が議論の対照となってきた。現在までに精製された植物 $F_1$ はそのサブユニット構成から2つのグループに分かれる(表3-1)。ひとつはトウモロコシ<sup>(113, 114)</sup>、オートムギ<sup>(115)</sup>、エンレイソウ<sup>(116)</sup>など単子葉植物から精製された $F_1$ で、5種のサブユニットより構成されていた。もうひとつはサツマイモ<sup>(117)</sup>、アラスカエンドウ<sup>(118, 119)</sup>、ソラマメ<sup>(120)</sup>などの双子葉植物からで、6種のサブユニットより構成されていた。これらの事実から、双子葉植物のミトコンドリア $F_1$ は6サブユニット構成で、単子葉植物の $F_1$ は5サブユニット構成であろうと推論されている。しかし、このような植物種の分類と $F_1$ のサブユニット構成との関係の考えが正しいかどうかは、今のところはっきりとは言えない。たとえば、オートムギより精製された $F_1$ には6番目のサブユニット( $\delta'$ )が現れることもあるということが報告されており<sup>(115)</sup>、単子葉植物にもこのサブユニットが存在することも十分考えられる。

$F_1$ のマイナーサブユニットの機能については $\gamma$ が最もよく研究されている。 $\gamma$ は、細菌を用いた変異実験より、 $\alpha$ と $\beta$ が活性のある高次構造を形成するのに必要な種の役割をはたしていることが示唆されている<sup>(8)</sup>。このように、 $\gamma$ がATPase活性にとり重要であることは、生物種間で比較的高い相同性を示すことから推定されることである。また、細菌や動物の $\gamma$ や $CF_1\gamma$ の全一次構造の比較から、N末端側とC末端側に相同性の高い部分が存在し、N末端側の相同部位が $F_1$ の活性に重要な役割をしている可能性が報告されている<sup>(125, 126)</sup>。サツマイモミトコンドリア $F_1$ の $\gamma$ もN末端アミノ酸配列が他の

F<sub>1</sub>と相同性が高く、従来の結果を支持するものであった(図3-4)。

本研究でのN末端アミノ酸配列決定により、サツマイモミトコンドリアF<sub>1</sub>δが細菌やCF<sub>1</sub>のδおよび動物のOSCPと対応関係にあることが示された(図3-5)。また、トウモロコシのF<sub>1</sub>δとサツマイモF<sub>1</sub>δが免疫学的に相同性のあることが示された(図3-3)。HorackとPacker<sup>(119)</sup>は、アラスカエンドウのF<sub>1</sub>で、硫酸やDOCによる抽出のされやすさからδ(分子量26,500)がOSCPと近い性質を有していることを示唆した。このことは、5サブユニットタイプのF<sub>1</sub>にあるδは6サブユニットタイプのδに対応し、これらは細菌やCF<sub>1</sub>のδ、動物や酵母のOSCPに対応することを示唆している。しかしδ'については、N末端アミノ酸配列からは相同性のあるF<sub>1</sub>サブユニットや関連タンパク質を見つけることができなかった。

サツマイモミトコンドリアF<sub>1</sub>εはウシ心筋や酵母のεと高い相同性があった(図3-6)。ウシ<sup>(104)</sup>と酵母<sup>(112)</sup>のεの一次構造の比較から、N末端アミノ酸配列に相同性の高い部分が存在することが報告されており、サツマイモでも今回決定したN末端アミノ酸配列が高い相同性を示すのはこのこととも一致する。植物ミトコンドリアF<sub>1</sub>では、5サブユニットタイプのεはその分子量から考えると6サブユニットタイプのεに対応するのではないかとと思われる。一方、細菌やCF<sub>1</sub>のεは動物のδに対応しているが、植物F<sub>1</sub>にこれに対応するサブユニットがあるかどうかは未解決のまま残った。おそらく、植物では6サブユニットタイプのδ'がこれに対応するのではないかとと思われる。そして5サブユニットタイプでは、このδ'が精製中に喪失するのではないかと推察される。

本研究で、高等植物ミトコンドリアのF<sub>1</sub>マイナーサブユニットに関し、δ'を除き、他生物F<sub>1</sub>やCF<sub>1</sub>との対応が明らかとなった。これらの対応関係より、真核細胞のミトコンドリアF<sub>1</sub>には“ε”が特異的に存在することが確認された。これに対応するサブユニットは細菌F<sub>1</sub>やCF<sub>1</sub>では見つからない。大腸菌

のF<sub>1</sub>とF<sub>0</sub>のサブユニット遺伝子はひとつのオペロン上に存在しており、真核細胞ミトコンドリアF<sub>1</sub>の“ε”に対応する遺伝子のみが別に存在する可能性は少なく、真核細胞の“ε”に対応するサブユニットは細菌F<sub>1</sub>にはないと結論できよう。このように“ε”が真核細胞ミトコンドリアF<sub>1</sub>に特異的に存在することは、F<sub>1</sub>の機能や分子進化を考える上で興味深い。εの存在に関しては更に詳細な研究が必要と思われる。CF<sub>1</sub>には“ε”に対応するサブユニットが存在しないと考えられているので、CF<sub>1</sub>は進化的にミトコンドリア型よりも細菌型に近いといえよう。今回決定したN末端アミノ酸配列で対応のついたγサブユニットは、他生物のF<sub>1</sub>やCF<sub>1</sub>とN末端部分の長さがほぼ同じであったが(図3-4)、δとεに関してはいずれも他の対応サブユニットより長かった(図3-5,6)。一方、CF<sub>1</sub>に関してはδおよびεは細菌のδおよびεとそれぞれ同じくらいの長さである。このことも、“ε”の特異的存在とかねあわせて興味深い事実である。F<sub>1</sub>の高次構造や分子進化に関してさらに詳細に解析していくために、cDNAクローニングによって植物ミトコンドリアF<sub>1</sub>サブユニットの一次構造を明らかにすることはきわめて有意義であると思われる。

## 2. サツマイモ $F_1ATPase\delta$ サブユニットの cDNA 単離と 一次構造について

### 2-1 はじめに

植物細胞には核以外に独自の遺伝情報を持つ2つのオルガネラ、ミトコンドリアと葉緑体が存在している。呼吸活動を担うミトコンドリアは主にTCA回路や $\beta$ 酸化系を構築するタンパク質を、一方、光合成を担う葉緑体は主にクロロフィル結合タンパク質やカルビン回路を構成するタンパク質をふくんでいる。さらに、それぞれの電子伝達系で最終的にATPを合成する $F_1F_0ATPase$ を持っている。両オルガネラは独自の遺伝情報を持っているが、そこにコードされているタンパク質は個々のオルガネラの全タンパク質の数%を占めているのみで、あとは核の遺伝子に支配されている。核遺伝子に支配されているタンパク質はそのほとんどが細胞質で分子量の大きな前駆体として合成された後、前駆体の持つ付加配列によりそれぞれのオルガネラへと仕分けされ輸送される。植物ではミトコンドリア $F_1$ と葉緑体 $CF_1$ の各サブユニットについてその遺伝子支配が明らかにされている(図3-7)。両酵素とも、複雑なサブユニット構造をしていることに加え、そのサブユニット支配についても核とオルガネラ両遺伝子に分かれて支配されており、研究の興味はつきない。 $CF_1$ については $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ が葉緑体遺伝子に、 $\gamma$ と $\delta$ が核遺伝子に支配されている<sup>(12)</sup>。一方、 $F_1$ は $\alpha$ がミトコンドリア遺伝子に、それ以外は核遺伝子に支配されていることが既に明らかになっている。また動物や糸状菌では、全ての $F_1$ サブユニットが核遺伝子に支配されており<sup>(9)</sup>、植物とは遺伝子支配が異なっている。このように、

同じ起源の酵素のサブユニットが異なった遺伝子支配を受けることは、その分子進化を考える上でも興味深い。植物  $F_1$  の各サブユニットと他生物種や  $CF_1$  の各サブユニットとの対応については既に述べた。N末端アミノ酸配列からは、 $\delta'$ サブユニットは他のものと対応がつけられなかった。一方、 $\delta$ サブユニットは細菌や  $CF_1$  の  $\delta$  および動物の OSCP に相当することが示された。また、6サブユニットタイプ  $F_1$  のサツマイモ  $\delta$  が5サブユニットタイプであるトウモロコシの  $\delta$  と免疫学的にも相当していることが示された。しかし、N末端アミノ酸配列は  $\gamma$  や  $\varepsilon$  にくらべると相同性が低かった。細菌や  $CF_1$  の  $\delta$  サブユニットおよび動物の OSCP の役割については今のところ  $F_1$  部分と  $F_0$  部分とを結合させているということが推定されているが<sup>(108, 109)</sup>、それ以外は不明のままになっている。そこでここでは、 $\delta$  サブユニットの対応関係をより明確にし、その機能を推定するため、cDNA クローンを単離し、このサブユニットの一次構造を解析した。またこの前駆体の一次構造から、ミトコンドリアへの輸送シグナル(プレ配列)が判明したので、他のミトコンドリア輸送シグナルと比較した。

## 2-2. 実験材料及び方法

### (1) サツマイモ $F_1\delta$ の cDNA の単離

#### cDNAライブラリーの作製

サツマイモ塊根より poly(A)<sup>+</sup>RNA を抽出し、シヨ糖密度勾配遠心にかけて分画した後、目的のタンパク質をコードする poly(A)<sup>+</sup>RNA が最も多く存在すると考えられる画分を選んで cDNA ライブラリーの作製に用いた。cDNA は、吉田ら<sup>(127)</sup>により報告されているように、pNUT-4 ベクターよりベクタープライマー及びテイルドリンカーを中村らの方法<sup>(128)</sup>にしたがって調製し、岡山と Berg の方法<sup>(129)</sup>にしたがって作製した。方法は図3-8にその概略を示した。この cDNA を大腸菌 JM83 に Hanahan の方法<sup>(130)</sup>に従って導入した。

#### プローブの合成およびラベル

プローブとして、 $\delta$  サブユニット N 末端アミノ酸配列より推定した mRNA の塩基配列に相補的な DNA (20mer、126通り) を合成した (Applied Biosystems model 381A)。この混合 DNA プローブの 5' 末端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて  $\gamma$  [<sup>32</sup>P]-ATP でラベルした。このときの反応液 (25  $\mu$ l) は 10 pmol DNA、20 pmol [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (5,000 Ci/mmol, Amersham International)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM DTT、0.1 mM スベルミジン、0.1 mM EDTA、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) であった。37°C で 30 分間反応後、0.5 M EDTA で反応を停止させ、フェノール抽出、エタノール沈澱によってプローブを得た。プローブの配列は図3-9に示した通りである。この標識プローブに取り込まれた <sup>32</sup>P は、一部を DE81 フィルターペーパー (ワットマン社) にスポットして、0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> で 5 回、

水、エタノール、エーテルでそれぞれ2回洗浄した後乾燥させて、液体シンチレーションカウンターで測定した。

#### コロニーハイブリダイゼーション

cDNAで形質転換した大腸菌を、50mg/mlのアンピシリンを含むLBプレート（以下、LAと略す）上で、1プレート（栄研器材角シャーレ、14cm x 10cm）当たり2,000~5,000コロニーとなるように塗抹し、37°Cで1晩培養した。合計約 $10^4$ 個のコロニーをバイオダイナAメンブレンフィルター（ポール社）に転移した。そのフィルターを新しいLAプレート上に37°Cで12時間おき、さらに170mg/mlのクロラムフェニコールを加えたLAプレート上で37°C一晩培養した。そして0.5M NaOH、1.5M NaClを含む溶液で変性し、3M 酢酸ナトリウム（pH5.5）溶液で中和し、80°Cで2時間焼き付けた。次に6xSSC（0.15M NaCl、15mM クエン酸ナトリウム）、10xDenhardt溶液、0.1mg/ml サケ精子DNA（超音波処理により断片化したもの）を含む溶液中で、65°C、2時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、同じ組成の溶液に $10^6$  cpm/mlとなるように標識プローブを加え、36°Cで2晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを6xSSC、0.1% SDSで36°Cで20分、2回洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。その後、温度を5°Cずつ上げてフィルターを同様にして洗浄し、陽性クローンの同定を行った。得られた陽性コロニーから1次スクリーニングと同じ方法で2次スクリーニングを行って単一コロニーを分離した。方法の概略を図3-9に示した。

#### (2) *In vitro* RNA転写

SP6プロモーターを配したF<sub>1</sub>δ cDNAクローン（pF1DB）を、そのインサートの3'側をKpnIで切断したものを鋳型DNAとし、SP6 RNAポリメラーゼによって転写RNAを得た。反応は6mM MgCl<sub>2</sub>、2mM スペルミジン、10mM DTT、0.1mg/



ml BSA、0.5mM (G, A, T, C) TP、4 unit/ $\mu$ l RNase inhibitor、50  $\mu$ g/ml 鋳型 DNA、0.6~1.5 unit/ $\mu$ l SP6 RNA ポリメラーゼを含む40mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) 中で、40°Cで1時間行った。また、転写産物を [ $^3$ H]-UTPで標識し、転写反応をモニターした。放射活性の取り込み量は、前述のプロープの合成およびラベルのところで用いた方法と同様にして測定した。

### (3) *In vitro* タンパク質翻訳

SP6 RNA ポリメラーゼによって合成されたRNAをエタノール沈澱により回収し、小麦胚芽無細胞翻訳系により *In vitro* でタンパク質を合成した。反応は酢酸カリウム濃度を20mMにした他は、渡辺らの方法<sup>(131)</sup>に従って行った。また $^{35}$ S-メチオニンにより翻訳産物を標識し、取り込み量は翻訳産物の一部をガラスウールフィルター(ワットマン社)にスポットして、5%TCA(トリクロロ酢酸)で10分、80°Cで5分、冷却した5%TCAで10分2回、エタノールで2回、エーテルで1回洗浄し、乾燥してから液体シンチレーションカウンターで測定した。

### (4) 翻訳産物の免疫沈降とSDS-PAGEによる解析

*In vitro* 翻訳反応系にSDS(最終濃度1%)を加え、95°C、3分間熱処理をした後、抗サツマイモF $\delta$ 抗血清と、0.2M NaCl、1mM EDTA、0.1% Triton X-100を含む、20mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)中で30°C、1時間イキュベートした。生成した翻訳産物とIgGとの複合体をProtein A-Sepharoseに結合させ、遠心して回収した。これを2% $\beta$ メルカプトエタノール、2%SDSの存在下で95°C、3分間加熱処理した後、17.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにかけた。ENHANCE(New England Nuclear社)処理を含むフルオログラフィーによって検出した。

(5) ノーザンプロットハイブリダイゼーション

RNAの電気泳動はホルムアルデヒド法により行った。サツマイモF<sub>1</sub>δ-cDNA (pF1DA) クローンよりXbaIでインサートを切り出したDNA約1ngと、中川らにより調製されたサツマイモ塊根poly(A)<sup>+</sup>RNA10μgそれぞれを、6.4%ホルムアルデヒド、50%ホルムアミド、5mM 酢酸ナトリウム、0.5mM EDTA、20mM MOPS-KOH緩衝液 (pH7.0) の溶液中で65°C、10分間加熱処理をした。この試料それぞれに、1/10溶のグリセリン色素液 (50%グリセロール、1mM EDTA、0.4%プロモフェノールブルー、0.4%キシレンシアノール) を加え電気泳動試料とした。ゲルは1.5%アガロース、10mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA、2.2M ホルムアルデヒド、40mM MOPS-KOH緩衝液 (pH7.0) からなり、泳動液は10mM 酢酸カリウム、1mM EDTA、40mM MOPS-KOH緩衝液 (pH7.0) であった。分子量マーカはサツマイモのリボソームRNAを用いた。

泳動後、Zeta-Probeナイロンメンブレン (Bio-Rad社) に、そのマニュアルに従いアルカリプロットングを行った。pF1DA のインサート部分のXbaI DNA断片を、オリゴラベリングキット (Pharmacia社) を用いて<sup>32</sup>Pで標識した。これをプローブとして用い、ハイブリダイゼーションを行った。すなわちまず、50%ホルムアミド、5xSSC、5xDenhardt溶液、1%SDS、1mM EDTA、0.5mg/mlサケ精子DNA、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) 中で42°C、1時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に5x10<sup>6</sup> cpm/mlの濃度の標識プローブを含む上記溶液中で43°C、1晩ハイブリダイゼーションを行った。最後に0.1xSSC、0.1%SDSを含む溶液で43°C、20分間、2回洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

(6) ゲノミックサザンプロットハイブリダイゼーション

サツマイモ高系14号の葉組織より神山らが抽出したゲノムDNA、をそれぞれ6

$\mu\text{g}$ を用いて図3-17に示された各種制限酵素で1晩処理し、完全分解した。またハプロイドゲノム当りの遺伝子コピー数を求めるさいには、 $11\mu\text{g}$ のゲノムDNA (サツマイモのハプロイドゲノム当りのDNA量に相当) をHindIIIで上記同様に完全分解した。コピー数を求めるためのマーカーとして、pF1DAをKpnIで切断し、 $75\text{pg}$  (1コピー相当量) と $150\text{pg}$  (2コピー相当量) を用いた。これらを1%アガロースゲル電気泳動により分離した。泳動後、ゲルを $0.25\text{N}$  HCl中で脱プリン化を行った後、Zeta-Probeナイロンメンブレンにマニュアルに従い転移した。その後は(5)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行った。ただし、プローブとしてpF1DAのPstI-BamHIフラグメント $0.4\text{kb}$ を用いた。

#### (7) pF1DBの塩基配列決定

##### 3'側欠失株の作成

pF1DBよりBluescript M13(-) (Stratagene社) ベクターに正方向にサブクローンされたcDNAのインサートの3'側をKpnI及びHindIIIで切断後、エキソヌクレアーゼIIIとエキソヌクレアーゼVIIを用いるYanisch-Perronらの方法<sup>(132)</sup>により、段階欠失させた。Klenow酵素による末端修復後、SalI-linker, DNA Ligation kit (宝酒造) を用いてlinker ligationを行い、大腸菌MV1184を形質転換させ、種々の長さのcDNAの3'側欠失株を作製した。形質転換体よりプラスミドを調製し、インサートの両側をPstI、SalIで切断し、アガロースゲル電気泳動によってそのサイズを調べた。一部のクローンにはSalI-linkerが複数タンデムに挿入されていたため、SalI切断後、ligation、形質転換を行い、過剰のSalI-linkerサイトを除いた。

##### 塩基配列の決定

一連の3'側欠失株から、M13 K07ヘルパーファージを用いて一本鎖DNAを調製

し、T3プライマーをアニーリングさせた後、dideoxy法によりシーケンス反応を行った。 $[^{32}\text{P}]$ -dCTPによりラベルした各DNA断片は、熱変性後、7M尿素を含む5または8%アクリルアミドゲルによって電気泳動した。ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーを行い塩基配列を決定した。塩基配列の解析は、GENE-TYXソフトウェア（ソフトウェア開発（株））のプログラムを用いて行った。

またタンパク質のハイドロパシープロフィールはKyteとDooliteの方法<sup>(133)</sup>にもとずいて行った。

#### (8) その他の方法及び試薬

制限酵素を含め試薬類は市販のものを用いた。またその他の方法は基本的にManiatisらの方法<sup>(134)</sup>に従って行った。

## 2-3. 結果と考察

### (1) サツマイモF<sub>1</sub>δの全鎖長cDNAの単離

大腸菌発現ベクターpNUT4を用い、サイズ分画したpoly(A)<sup>+</sup>RNAより岡山-Berg法でcDNAライブラリーを作製した(図3-8)。pNUT4ベクターはtac-SP6プロモーターを持っており、このプロモーター下にベクタープライマー法で合成したcDNAにコードされるタンパク質をIPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)存在下、大腸菌内で発現させることができる。抗トウモロコシF<sub>1</sub>δ抗体を用いてこのライブラリーを免疫スクリーニングしたが、偽陽性クローンしか得られなかった。

そこで、サツマイモF<sub>1</sub>δのN末端アミノ酸配列の7番目から13番目の配列より推定されるmRNA塩基配列に対して相補的な合成DNAプローブ(20mer 128通り、図3-9)を用いてcDNAライブラリーをスクリーニングした。約10<sup>4</sup>個のコロニーをスクリーニングし、最も高い温度(T<sub>d.min</sub>)でフィルターを洗浄したとき、全部で7個の陽性クローンを得た。ライブラリーは一度増幅してあるので、これら7個のうちいくつかは同じものである可能性が高かった。これら陽性クローンよりプラスミドDNAを単離したところ、1.0~1.2kbのインサートを含んでいた。これらは少なくとも2つのグループに分けられた。すなわち、4つのクローンは3'側にPstIサイトを持っていたが、他の3つは持っていなかった。そこで、これら2つのグループをそれぞれpF1DAとpF1DBと名づけた。これら2つのcDNAインサートは、3'側にPstIサイトの有無と3'側と5'側の長さが少し異なること以外は、同じ位置にEcoRI、BamHI、PstIサイトを持っており類似しているものと考えられた(図3-10)。

pNUT4ベクターはcDNAインサート上流にSP6プロモーターを持っている。そこで、SP6 RNAポリメラーゼでpF1DBより *in vitro* でRNAを合成させ、小麦胚芽無細胞翻訳系を用いて *in vitro* でcDNAに対する翻訳タンパク質を作らせた。そしてこの翻訳産物を抗サツマイモF<sub>1</sub>δ抗体で免疫沈降させた。その結果、全翻訳産物及び免疫沈降物はいずれも分子量27,000のところバンドが観察された(図3-11)。pF1DAプラスミドでも同じ結果が得られたことから(データは示していない)、このcDNAはサツマイモF<sub>1</sub>δをコードしているものと推定した。

得られたクローンが全鎖長のcDNAであるかどうかを調べるため、pF1DAをプローブとし、塊根からのpoly(A)<sup>+</sup>RNAとえられたcDNAについてハイブリダイゼーション実験を行った。図3-12に示すように、poly(A)<sup>+</sup>RNAの場合にはプローブは約1150塩基のところハイブリダイズした。これはXbaIで切断されたcDNA(1200bp)より少し短かった。このことはこのcDNAインサートがほぼ完全鎖長であることを示唆している。

## (2) δサブユニットcDNAの塩基配列決定と一次構造

上記cDNAのうちpF1DBについて全塩基配列を決定し、δサブユニットの前駆体のアミノ酸配列を推定した(図3-13)。cDNAはpoly(A)<sup>+</sup>鎖を除いて1035bpの長さを持ち、114bpの5'非翻訳領域、244残基のアミノ酸をコードする735bpの翻訳領域および186bpの3'非翻訳領域を持っていた。3'非翻訳領域の850bpから855bpにpoly(A)<sup>+</sup>付加シグナルAATAAAが存在していた。また、翻訳領域の最初のATGの22bp上流には終始コドンTAGが存在していた。翻訳領域には3つのATGコドンが存在するが(1、3および10番目のMet、図3-13参照)、真核細胞の翻訳開始領域のリボソームスキニングモデ

ル<sup>(135)</sup>と高等植物におけるmRNAの翻訳開始領域における共通配列<sup>(136)</sup>を考えると、1番目のATGから翻訳されているものと推定される。従って、cDNA塩基配列より推定される前駆体の分子量は27,200で、cDNAを鋳型にしてin vitroで合成したタンパク質の大きさで見合っている。一方、46番目から78番目のアミノ酸配列がN末端アミノ酸配列と一致していた(但しN末端アミノ酸配列の分析では1番目のアミノ酸は同定できていない)。このことから、成熟体 $\delta$ は46番目のリジンより始まるものと結論した。推定される成熟体 $\delta$ は199残基のアミノ酸より構成されており、その分子量は22,249でSDS-PAGE上で計算される分子量27,000より小さかった。この理由については不明であるが、おそらくアミノ酸組成や高次構造によりSDS-PAGE上では移動度が遅くなっているのではないかとと思われる。

N末端アミノ酸配列から、サツマイモ $F_1\delta$ は細菌 $F_1$ や $CF_1$ の $\delta$ 、動物や酵母のOSCPに対応していることが既に示されていたが(図3-5)、cDNAより推定される成熟体 $\delta$ の一次構造と上述の他の対応サブユニットの一次構造とを比較した(図3-14)。ギャップを考慮して最も相同性の高い並べ方をしたときでさえ、相同性は18~44%まで差があった。サツマイモ $F_1\delta$ は、OSCPタンパク質とは比較的相同性が高く32~37%であったが、細菌 $F_1$ とは18~25%、 $CF_1\delta$ とは26%と低い値を示した。高等植物の $F_1$ のサブユニットが、細菌や $CF_1$ の $\delta$ より本来 $F_1$ のサブユニットではないOSCPと相同性が高いという事実は興味深いものがある。

一次構造より推定される成熟体タンパク質のヒドロパシープロフィールを図3-15に示した。サツマイモ $\delta$ および他の対応サブユニットの全てがよく似たプロフィールを示した。サツマイモ $\delta$ は、特にウシのOSCPとよく似たプロフィールを示した。一次構造全体では相同性が低くても、その高次構造は互いによく似ているものと推定できる。また全てのサブユニットで共通に現れるア

ミノ酸があり、これらは構造上重要な働きをしている可能性がある。それ以外のアミノ酸ではある変異を別の変異が補うような形で進化したのではないかと推察される。

今回決定したサツマイモ F<sub>1</sub>δ 前駆体の mRNA のコドン使用頻度を他のサツマイモタンパク質のそれと比較したのが表 3-3 である。塊根貯蔵タンパク質 スポラミン<sup>(137)</sup>、βアミラーゼ<sup>(138)</sup>、カタラーゼ<sup>(139)</sup>については、リジン、グルタミン酸、アルギニンのような例外もあるが、多くのアミノ酸で 3 番目の塩基が G か C であるコドンの使用頻度が高くなっていた。しかし、サツマイモ F<sub>1</sub>δ の場合には、3 番目の塩基が A または T であるコドンの使用の方がやや多い傾向がみられた。

### (3) サツマイモ F<sub>1</sub>δ mRNA の異型性とゲノム遺伝子

cDNA の構造より、サツマイモ塊根には、F<sub>1</sub>δ をコードする mRNA が少なくとも 2 種類存在することは前述した。このうち、一方の cDNA (pF1DB) の塩基配列については図 3-12 に示したが、pF1DA について 5' 側 383 bp の塩基配列を決定したところ、4ヶ所に塩基の置換がみられた (C<sup>-114</sup>→T; G<sup>-89</sup>→C; C<sup>-86</sup>→A; A<sup>+10</sup>→G)。このうちの A<sup>+10</sup>→G の置換によりアミノ酸配列が Thr<sup>-42</sup> から Ala へ変化していることが分かった。サツマイモ塊根には等電点電気泳動の結果より β サブユニットの異型性が<sup>(122)</sup>、N 末端アミノ酸配列からは F<sub>1</sub>γ の異型性が示されており、その他のサブユニットについても異型性のあることが考えられる。サザンブロッティングによる結果より δ の遺伝子はハプロイドゲノム当り (5.4 × 10<sup>5</sup> kb / ハプロイドゲノム) 1~2 個存在することが示された (図 3-18)。また様々な制限酵素で分解したゲノム DNA を用いてサザンブロッティングを行ったところ、複数のバンドが観察された (図 3-17)。このこ



とは $\delta$ の遺伝子が複数存在することを示唆している。サツマイモゲノムは六倍体構造をしているため、この異形性が allelic polymorphism によるものであるか、それとも同一ゲノム上での複製による結果であるのか不明である。

#### (4) $\delta$ サブユニット前駆体のプレ配列の構造

高等植物では、ミトコンドリア $F_1$ の $\delta$ サブユニット<sup>(10, 11)</sup>も、葉緑体 $C F_1$ の $\delta$ サブユニット<sup>(12)</sup>も核遺伝子にコードされ、分子量の大きな前駆体として細胞質で合成された後、N末端の付加配列によって正確にそれぞれのオルガネラへ分配される。pF1DBに含まれるN末端プレ配列は45アミノ酸である。このプレ配列は、ホウレンソウ $C F_1$ の $\delta$ のトランジット配列<sup>(140)</sup>あるいはウシ<sup>(141)</sup>や酵母<sup>(142)</sup>のOSCPのプレ配列とは、一次構造的に相同性がなかった(図3-15)。しかし、塩基性アミノ酸、特にアルギニンが多いこと、セリンとスレオニンが多いこと、疎水性アミノ酸が多いことなどの特徴は共通していた。ミトコンドリアへの前駆体輸送には、ポリペプチドのN末端側が両親媒性の $\alpha$ ヘリックス構造をとることが必要であるとされている<sup>(143, 144)</sup>。Eisenbergらの方法<sup>(145)</sup>に従ってこのプレ配列から両親媒性のモーメントを計算するとMet<sup>-43</sup>からSer<sup>-26</sup>までの値(図3-15)が最高でミトコンドリアへの前駆体輸送シグナルとしての両親媒性の条件を満たしていた。他のミトコンドリア行きシグナルとサツマイモ $F_1$ の $\delta$ のプレ配列がとる両親媒性の $\alpha$ ヘリックス構造を図3-17に示した。

サツマイモ $F_1$ の $\delta$ のプレ配列は両親媒性の $\alpha$ ヘリックス構造の後に27個のアミノ酸が余分についており、動物と酵母のプレ配列に較べて長かった(図3-17B)。これと同じようなことがタバコ $F_1$ の $\beta$ のプレ配列についても言える<sup>(122)</sup>。こうした事実は、植物には $F_1$ をもつ2つのオルガネラが存在しているためにこ

れらを区別するための余分のシグナルが必要なのではないかと推定される。このことは、F<sub>1</sub>の生合成のみならず、ミトコンドリアや葉緑体の進化にも関する重要な仮説である。従って、さらに多くのプレ配列を比較し、かつまたプレ配列を持った融合タンパク質を用いてオルガネラへの輸送に関する実験を行って調べる必要があるであろう。

### 3. 形質転換植物を用いた サブユニット前駆体の ミトコンドリア輸送シグナルの解析

#### 3-1. はじめに

植物細胞には独自の遺伝情報を持ったふたつのオルガネラ、葉緑体とミトコンドリアが存在するが、その構成タンパク質のほとんどが核遺伝子に支配されていることは既に述べた<sup>あ</sup>通りである。それらのタンパク質は一般に分子量の大きな前駆体として細胞質で合成され、そのN末端に付加したペプチドによりそれぞれのオルガネラに振り分けられていると考えられている。

一般に、ミトコンドリアの構築の分子機構に関してはミトコンドリアへの核支配タンパク質の輸送の機構が最もよく研究されている<sup>(146)</sup>。この研究の始まりは、酵母において多くの核支配タンパク質が成熟体タンパク質のN末端側に数十個の余分なペプチド(プレ配列)がついており、ミトコンドリア内へ輸送されると切断されるという実験結果より、このペプチドがミトコンドリア行きシグナルとして働くのではないかという推察がなされたからであった<sup>(147)</sup>。このプレ配列は塩基性に富み、塩基性アミノ酸が数個の非極性アミノ酸をはさんで繰り返し現れるという特徴を有していた。また延長ペプチドを持たない前駆体の場合でも、そのN末端に延長ペプチドと同じ特徴を持ったアミノ酸配列が存在し、ミトコンドリア局在化シグナルの役割を果たしているものと思われた<sup>(150)</sup>。このプレ配列の役割とミトコンドリア膜透過の機構を解明するために、Schatzらは酵母を材料として、アイソトープ標識した前駆体タンパク質を単離ミトコンドリアへ移行させる実験系を開発して多くの先駆的な研究を行った。

彼らは、チトクロームcオキシダーゼサブユニットIV<sup>(148, 149)</sup>やF<sub>1</sub>-ATPaseβサブユニットのプレ配列<sup>(150)</sup>、そして成熟型と同じ大きさの前駆体として合成される70kd外膜タンパク質<sup>(151)</sup>やADP/ATP translocator中などに存在するミトコンドリア移行シグナル<sup>(152)</sup>となるアミノ酸配列に注目した。そしていろいろな領域の欠失変異や外来タンパク質と融合させた組換えDNAを作製し、これから翻訳されるタンパク質がin vitroあるいはin vivoにおいてミトコンドリアへ輸送されるかどうかを調べた。彼ら以外のグループも哺乳動物<sup>(153, 154)</sup>やカビ<sup>(155)</sup>で同様の解析を行っている。しかし、このようにして明らかにされたミトコンドリアへの輸送シグナルについては、一次構造上の共通配列が見いだされなかった。一方、Roiseら<sup>(143)</sup>およびvon Heijneら<sup>(144)</sup>は、これらの輸送シグナルと思われるペプチド部分は両親媒性のαヘリックスを形成しやすいことを見いだした。そして、この性質がミトコンドリアへの移行に必要な十分であることを提唱した。その後、Schatzら<sup>(144, 156, 157)</sup>は様々な両親媒性アミノ酸配列を持ったペプチドをDHFR (dihydrofolate reductase)と融合させ、その物理化学的性質とミトコンドリアへの移行能力を系統的に調べ、両親媒性がミトコンドリア移行シグナルの本質であることを明らかにした。

このようなミトコンドリア移行シグナルの同定と並行して、ミトコンドリア膜のタンパク質透過において働く機構についても検索が行われた。現在までに分かっている機構をまとめると、図3-20のようになる<sup>(146)</sup>。細胞質で合成を完了した前駆体はATPの化学エネルギーによって高次構造が解かれる。そして解かれたことによって、表面に露出したシグナル部分に存在する正電荷両親媒構造部位でミトコンドリア外膜を認識し、プロトンによって内膜で構成されている膜ポテンシャルを利用してミトコンドリア内へと移行する。このときマトリクスに存在するプロテアーゼによってプレ配列が除かれ、成熟型タンパク質になる。従って、ミトコンドリア内部への前駆体の輸送とプレ配列の除去は共

役していないとされている。更にミトコンドリア内部のどの分画へ最終的に局在するかということについては、さきに述べた両親媒性 $\alpha$ ヘリックスと膜透過を停止させるような部分との相対的な位置関係にもとづくという機構が考えられている<sup>(158)</sup> (図3-21A)。外膜タンパク質の場合、移行シグナルと外膜停止シグナルが隣接しており、この部分が膜に到達した時点で移行が停止し、外膜にアンカーした形となる。マトリクスタンパク質の場合は移行シグナルのみを持ちそのままマトリクスまで入ってしまう。内膜タンパク質、膜間層タンパク質の場合には移行シグナルと膜通過停止シグナルとが離れて存在しており、前駆体タンパク質のN末端部分はとにかくマトリクスまで到達して切断され、その後、そのまま内膜にアンカーするものと、2度目のプロセッシングがなされて膜間層に遊離するもの、あるいは一旦マトリクスへ完全に入った後、再び内膜へ組み込まれるいくものがあると考えられている。最近になりこれらの行程を効率よく進めるための様々な因子の同定がなされている。細胞質では前駆体の高次構造を解くときに働く熱ショックタンパク質の一つHSP70というタンパク質<sup>(160, 161)</sup>が、また前駆体をミトコンドリア膜表面に導くためのターゲット因子の存在などが報告されている<sup>(162-164)</sup>。またミトコンドリア表面でも前駆体を認識し、内部へ輸送するときに働く因子がSchatzらやBlobelらによって酵母で<sup>(165)</sup>、Neupertらによりアカパンカビで<sup>(166-168)</sup>、坪井らによりラット肝細胞で<sup>(169)</sup>同定され、それぞれの因子のうちのいくつかは生物種間での対応もつけられている。このように前駆体タンパク質がどのようにミトコンドリア膜を通過し、一定の画分に局在するかについてかなりの知見が集積されつつある。

これに対し植物細胞ではもう一つの独自遺伝系を持つ葉緑体に関して势力的な研究がなされ、多くの報告がなされている<sup>(170)</sup>。これらの報告をまとめると次のような過程が推定されている (図3-21B)。1. 細胞質の遊離リボソーム上

で通過ペプチド（トランジットペプチド）と呼ばれる数十から100アミノ酸残基からなる余分なペプチドを持った前駆体が合成される。2. この前駆体は葉緑体表面に存在すると考えられている受容体により認識され葉緑体内部へ取り込まれる。この過程で葉緑体内のATPが必要であるとされている。3. 取り込まれた後、トランジットペプチドやタンパク質自身の持つ性質によりストロマ、チラコイド膜、チラコイド内膜へと輸送される。しかし、個々のステップにおける詳細な機構やそこに働く因子については、まだ解明されるには至っていない面が多い。特に前駆体がいかにして葉緑体を認識するかという点に関しては、そのトランジットペプチドは既に100種以上が知られているにもかかわらず<sup>(170)</sup>、共通的结构についての提唱がなされていない。また、前駆体が葉緑体内に輸送されるにはミトコンドリアへの輸送と同様その構造が解かれた状態が必要であるという報告もある<sup>(171)</sup>。葉緑体への前駆体の輸送はトランジットペプチドがかぎを握っていることは確かなようであるが、その共通構造やメカニズムについては不明な点が多い。

一方、植物におけるミトコンドリアへの輸送に関しては、*in vitro*における輸送実験がラベルした前駆体タンパク質を用いて行われているし<sup>(172-175)</sup>、*in vivo*においても BoutryとChua<sup>(176)</sup>が*N. plumbaginifolia*のプレ配列を含む89アミノ酸がCAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）をミトコンドリアへ特異的に移行させることを示している。また、SchmitzとLonsdale<sup>(177)</sup>は酵母ミトコンドリアのtryptophanyl tRNA synthaseのプレ配列を含むN末端ペプチド部分が大腸菌GUS（βグルクロニダーゼ）を植物細胞内でミトコンドリアへ移行させることを示した。さらに、Bowlerら<sup>(178)</sup>はトウモロコシのミトコンドリアスーパーオキシドジスムターゼが酵母内でミトコンドリアへ輸送され、正確にプロセスされることを示した。これらの報告より判断すると、基本的には植物においてもミトコンドリアへの移行シグナルは他生物と

同じではないかと推察される。しかし一方で、特殊ではあるが、酵母のミトコンドリアプレ配列をつけた外来タンパク質が、植物細胞ではミトコンドリア、葉緑体双方に輸送されうるという報告もある<sup>(179-181)</sup>。現在までに分かっている植物ミトコンドリアタンパク質の前駆体については、プレ配列は他生物のものに較べて長かった。このことの解釈として、葉緑体とミトコンドリアを区別するためにこの余分な部分が必要なのではないかとの推論がある。しかし、酵母のミトコンドリアタンパク質のプレ配列が外来タンパク質を植物ミトコンドリアへ輸送しうるという報告があり<sup>(177)</sup>、このことは上記推論では説明できないことになる。これらのことを考えると、植物細胞におけるミトコンドリアへの前駆体輸送のシグナルと機構を調べることは、他生物における研究とは別に興味深い点が多い。

既に前節で、サツマイモミトコンドリアF<sub>1</sub>ATPaseの $\delta$ サブユニットの前駆体の一次構造を解析し、そのN末端についている45アミノ酸より構成されるプレ配列の一部が両親媒性の $\alpha$ ヘリックス構造をとりうることを示した。しかし、この両親媒性 $\alpha$ ヘリックスをとる配列の後に、プレ配列としてさらに20数残基のアミノ酸配列が存在している。一方、このサツマイモF<sub>1</sub> $\delta$ に対応するホウレンソウの葉緑体CF<sub>1</sub> $\delta$ の前駆体構造も分かっている<sup>(140)</sup>。これら二つの $\delta$ サブユニットの付加配列には一次構造上共通性は見いだされない。相同性のある二つの酵素の、しかも相同性のあるサブユニットに関して、その輸送シグナルを比較解析することはミトコンドリアと葉緑体への前駆体の特異的輸送を解析する上で重要な知見がえられるものと期待される。そこで、サツマイモF<sub>1</sub> $\delta$ のプレ配列を含むN末端側アミノ酸配列をいろいろ長さだけ欠失させた、長さの異なるこれらのペプチドに外来タンパク質である大腸菌のGUSをつないだ融合タンパク質を調製し、これらが植物細胞内でどこに輸送されるかを調べ、ミトコンドリア輸送に必要なシグナルの同定を行った。

### 3-2. 実験材料および方法

#### (1) プラスミドの構築

融合タンパク質をコードする遺伝子はそれぞれ次のようにして作製した。

DG73: pF1DBをBluescript(-)にサブクローニングして、塩基配列決定のために3'側欠失変異をさせたクローンの中からN末端より73アミノ酸残基に相当するものを選び、NaeIとSalIで切断し、 $\delta$ N末端断片を得た。

DG25: pF1DBをBglIIで切断後、<sup>K</sup>klenow修復、linker ligationによって新たにsalIサイトを導入してからNaeIとSalIで切断した。

DG46: pF1DBを鋳型にしてN末端アミノ酸残基46個に相当するヌクレオチド配列を含み、3'側にSalIサイトを持つようにデザインしたプローブとユニバーサルなプライマーを5'に用いてPCR法により遺伝子断片を合成した。

上記の遺伝子断片と、開始ATG部位にSalIサイトが導入してあるpIG221<sup>(182)</sup>からSalIとEcoRIで切り出したGUS遺伝子を、pSP64のSmaIとEcoRIで切断した部位に3 fragment ligationで導入した。このプラスミドからXbaIとSnaBIで $\delta$ N末端とGUSの一部を持つ遺伝子断片を切り出し、pBI-H1<sup>(183)</sup>のGUS遺伝子のN末端側へCaMV35Sプロモーターと共に導入して図3-22示すような植物形質転換用プラスミドを得た。また酵母への導入はYEp51ベクターへ上記の融合遺伝子を加工して導入した。遺伝子工学的な手法はManiatisらの方法<sup>(134)</sup>にしたがって行った。

#### (2) 酵母の形質転換

酵母の形質転換はItoらの方法<sup>(184)</sup>にしたがって、アルカリ金属法で行った。宿主はBJ1824 (Ura3<sup>-</sup>, Trp1<sup>-</sup>, Leu2<sup>-</sup>)を用い、形質転換体は最小培地(0.67



% Yeast nitrogen base w/o amino acids DIFCO, 2% glucose, 2% Agar, 20 mg/l uracil, 40mg/l tryptophan) でLeu<sup>r</sup>になったクローンを選択した。GUS 遺伝子の発現にはYPGa/Sa培地 (2% Bacto Peptone, 1% Bacto yeast extract, 2% galactose, 0.5% sucrose) を用いた。

### (3) タバコの形質転換

図3-22Aのようにして作製した融合遺伝子を持つベクターを、三菌種間接合により *Agrobacterium tumefaciense* EHA101株に導入した。この時選抜は50mg/lのカナマイシン、50 mg/lのリファンピシン、50 mg/lのハイグロマイシンを含むYEB培地上で行った。形質転換はリーフディスク法で行った。形質転換体の選抜は150 mg/lカナマイシン、50 mg/lハイグロマイシン、500mg/lカルベニシリンで行った。得られた形質転換タバコを植木鉢に移して植物体にした後、抽出に用いた。

### (4) タバコ培養細胞の形質転換

長田らの方法<sup>(185)</sup>に従い、BY-2用培地 (MS無機塩ただしKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>は370mg/l, 100mg/l ミオイノシトール、1 mg/l チアミン塩酸塩、3% ショ糖、0.2mg/ml 2, 4-D、pH5.5) で継代培養したタバコ培養細胞を An の方法<sup>(186)</sup>に従って形質転換した。形質転換体選抜の条件は200mg/l カナマイシン、50mg/l ハイグロマイシン、500mg/l カルベニシリンで行った。

### (5) 培養細胞からのミトコンドリアの単離

プロトプラスト化は長田らの方法<sup>(185)</sup>で行った。8 mlのプロトプラストに抽出溶液 (0.4M マンニトール、2mM EDTA、2mM DTT、0.1% BSA、50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0) を加え、18Gの注射針にナイロンガーゼを取り付けた注射器で吸

ったり出したりして細胞を壊して磨砕物を得た。この磨砕物を1,000xgで5分間遠心した後（これを細胞抽出画分とした）、上清を10,000xgで15分間遠心した。この沈澱を粗ミトコンドリア画分、上清をポストミトコンドリア画分とした。ミトコンドリアをさらに精製したときは、粗ミトコンドリア画分を21%/45% (V/V)のパーコール密度勾配遠心につけ、21%と45%の界面を回収した。これを抽出溶液で希釈した後、10,000xgで15分間遠心し、沈澱を精製ミトコンドリア画分とした。精製ミトコンドリア画分をプロテアーゼ処理の実験に用いた。プロテアーゼ処理は2 mg/mlのタンパク質濃度に対して10mg/mlとなるようにプロテイナーゼKを加えて反応させた後、PMSFを加えて反応を止めた。

#### (6) タバコ植物体からのミトコンドリア単離

タバコ植物体から葉を採集し、脱イオン水で洗浄した後、抽出に用いた。この葉を抽出溶液（0.33M ショ糖、0.2% アスコルビン酸ナトリウム、0.2% BSA、1mM  $\beta$ メルカプトエタノール、50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0）の中でカミソリで細かく刻んだ後、海砂を加えて乳鉢と乳棒ですりつぶした。磨砕物は4重のミラクロスで濾過した後、1,000xgで5分間遠心した。この上清（これを細胞抽出画分とした）を10,000xgで15分間遠心して沈澱を粗ミトコンドリア画分とした。また上清をポストミトコンドリア画分とした。沈澱は懸濁溶液（0.33M ショ糖、0.1% BSA、10mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.2）に懸濁した。

#### (7) タバコ植物体からの葉緑体の単離

葉をミトコンドリア抽出に用いた時と同じ抽出溶液中でカミソリを用いて、非常に細くなるまで細断した。この抽出物をミラクロスで濾過した後、5,000xgで5分間遠心した。沈澱を懸濁溶液に穏やかに攪はんした後、パーコールの密度勾配遠心（80%のクッションの上に40%~60%(V/V)の連続密度勾配をの

せたもの) にのせて日立RPS-40Tローターで5,000回転、15分間遠心をした。遠心後、注射針を用いて遠心管の底から順番に分画を行った。

#### (8) 酵母のミトコンドリア単離

YPGa/Sa培地で一晚培養した形質転換体を常法に従いプロトプラスト化した。このプロトプラストに約2倍容の抽出溶液(0.4M マンニトール、5mM EDTA、0.1% BSA、0.2mM PMSF、20mM HEPES-KOH緩衝液、pH7.5)を加えて懸濁した後、テフロンホモゲナイザーを用いて細胞を壊して抽出物を得た。この抽出物を3,000xgで10分間遠心した後、上清(これを細胞抽出物とした)を10,000xgで15分間遠心して沈澱をミトコンドリア画分とした。

#### (9) BY-2の *in vivo*ラベル

タバコ培養細胞はTran<sup>35</sup>Sを用いて松岡らの方法<sup>(187)</sup>により行った。植え継ぎ後3日後の培養細胞、0.5mlをファルコンチューブにとり2.8 MBqのTran<sup>35</sup>Sを用いて30分間25°Cで振盪した。その後、氷上で反応を止め、直ちに遠心して上清を除いた。さらにLYS溶液(1mM PMSF、1mM EDTA、0.05% SDS、0.05% Triton X-100、100 $\mu$ M leupeptin、100 $\mu$ M pepstatin、100 $\mu$ M antipainを含むTris buffered saline溶液(0.15M NaCl、50mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5))で2回洗浄した後で、同じ溶液に懸濁して超音波で細胞を破碎した。この破碎液から抗GUS抗体を用いて免疫沈降でGUS融合タンパク質を回収し、SDS-PAGEにかけ、フルオログラフィーでタンパク質バンドを検出した。

#### (10) 酵母の *in vivo*ラベル

5x10<sup>7</sup>の形質転換酵母を2%ガラクトースを含む最小培地で懸濁し、2.8MBqのTran<sup>35</sup>Sを加えて、15分間、30°Cで振盪した後、氷上で冷やして反応を止め、遠

心して菌体を回収した後、2回、LYS溶液で洗浄した。この菌体を0.5mlのLYS溶液でけんたくし、ガラスビーズを加えて激しく攪はんし菌体を破碎した。この溶液から免疫沈降でGUS融合タンパク質を回収した。以後の操作はBY-2のところ  
で述べた方法と同様にして行った。

#### (11) 酵素の活性測定

##### フマラーゼ

フマラーゼの活性はHillとBradshawの方法<sup>(186)</sup>に従い、Lリンゴ酸を基質として240nmの吸光度の増加を測定することで活性を計った。

##### チトクロームcオキシダーゼ

チトクロームcオキシダーゼの活性は前島と旭の方法<sup>(81)</sup>に従い、25°Cにおいて還元型チトクロームcの550nmでの吸光度の経時的減少を測定した。

##### GUS

Jeffersonらの方法<sup>(182)</sup>に従い、4-メチルウンベルフェリルグルクロニドを基質として用い、反応によって生じる蛍光を4-メチルウンベリフェロンナトリウムを標準にして測定した。

タンパク質定量はLowryら方法<sup>(82)</sup>に従い行った。ただし、タンパク質を、一度TCAで沈澱させてから測定に用いた。

### 3-3 結果

#### (1) プラスミドの構築と融合遺伝子の作製

図3-22Aに、ミトコンドリア移行の実験に用いた3種の融合遺伝子を示した。これらの融合遺伝子は、大腸菌のGUS遺伝子のN末端から3番目のアミノ酸残基に相当するヌクレオチド配列の5'側に、サツマイモF<sub>1</sub>のプレ $\delta$ のN末端アミノ酸配列部に相当するヌクレオチドの配列をリンカーを介してつないだものである(図3-22B)。これらの融合遺伝子の産物、すなわち融合タンパク質のうち、DG25は両親媒性の $\alpha$ ヘリックス構造を含むプレ配列の一部を持っていた。DG46は完全なプレ配列と成熟体部分の最初のアミノ酸残基アラニンを含んでいた。DG73はプレ配列に加えて成熟体のN末端側28アミノ酸残基を持っていた。但し、図3-22Aに示すようなリンカー付加に伴う4アミノ酸が結合部分に付加する結果となった。また、コントロールとしてGUS遺伝子のみのもを用いた。このような融合遺伝子を導入した形質転換植物は下記のようにして作出した。これらの融合遺伝子をハイグロマイシン耐性とカナマイシン耐性の二重耐性マーカーをもつベクターpBI-H1<sup>(183)</sup>のカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーターの下流につなげ、タバコ(SR1)とタバコの培養細胞(BY-2)に導入した。ただし、コントロールとなるGUS遺伝子のみの場合には、カナマイシン耐性のみを持つベクターpBI-121<sup>(182)</sup>を用いた。また、酵母への導入には、マルチコピーベクター YEp51 を用い、GAL10プロモーターのもとで発現させた。

#### (2) 形質転換と融合遺伝子の発現

導入された遺伝子の発現はGUS活性を測ることによりモニターした。形質転換効率は、植物では植物体および培養細胞とも、いずれの融合遺伝子を用いても

大きな変化はなかった。このことはGUS融合遺伝子の発現が細胞にとり有害ではないことを示唆している。まず、植物体及び培養細胞に関して得られたいくつかのクローンについて、X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide) を用いて染色することでGUS遺伝子が発現しているかどうかを調べた。その場合、ほとんどが形質転換体であることがわかった。これは二重耐性マーカーを用いたことで、疑似陽性形質転換体の出現を抑えることができるという太田ら<sup>(199)</sup>の報告と一致した。これら形質転換植物体では、同じ融合遺伝子で形質転換したものでも、GUSの比活性が異なるいくつかの植物体を得られた。そこで、それらのうちの活性の異なるものを数検体用い、ミトコンドリアの単離実験を行った。このような発現量の違いはTiプラスミドベクターを用いて形質転換を行った場合起こりうることであり、いくつかの検体を調べることで発現量の差による実験誤差をなくすことが必要であった。培養細胞に関しては、プレート上で得られた形質転換体をまとめて液体培養にもっていったので、個々のクローンについては活性を測らなかった。しかし、X-glucによる染色では、ほとんど全てのクローンが形質転換体であったこと、液体培養で何回も植え継ぎを繰り返してもGUSの比活性が変化しないことがわかった。そこで、全体として液体培養に含まれるクローンの組成に変化はないものと考えた。培養細胞では、細胞磨砕物中のGUSの比活性はDG25, DG46, DG73の順に弱くなっていった(表3-4)。また同じことが酵母の形質転換体でも観察された。これはSchmitzとLonsdaleらの報告<sup>(177)</sup>と一致しており、その原因として、N末端に余分な配列がつくことにより、融合タンパク質が細胞質で分解され易くなっていることもそのひとつであると考えた。GUSタンパク質の量を調べるため、細胞粗抽出画分をSDS-PAGEにかけたのち市販の抗GUS抗体を用いて免疫ブロッティングをおこなって調べたが、非特異的吸着が多く、GUSタンパク質だけを検出することはできなかった。

### (3) 形質転換培養細胞におけるGUS活性の細胞内局在

培養細胞をプロトプラスト化した後、細胞を壊して粗抽出画分を得て、そこから分画遠心で粗ミトコンドリア画分を得た。この画分とポストミトコンドリア画分とに含まれるGUS活性を測定して、ミトコンドリアマトリクス酵素のひとつであるフマラーゼの測定結果と比較し、ミトコンドリアへのGUSの輸送量を考察した。図3-23Aに示すように、フマラーゼ活性の粗ミトコンドリア画分への回収率は約30~60%であった。一方、融合タンパク質の場合では、DG73のみが粗ミトコンドリア画分に約40%回収されており、フマラーゼ活性の回収結果から判断して、効率的にほぼ100%ミトコンドリアへ輸送されているのではないかと考えた。DG46の場合には、その回収率はかなり低かったが、DG25やGUSに較べるとGUS活性の回収率は明らかに高かった。このことから、一部はミトコンドリアへ輸送されているのではないかと推察した。一方、DG25の場合は、ほとんどコントロールのGUS遺伝子のみの場合と変わりがなく、ミトコンドリアへは輸送されていないものと思われた。ただしコントロールの場合には、二重耐性ベクターを用いていないため、その発現量が融合タンパクと較べかなり低く、厳密な意味でのコントロールとはなっていないおそれがある。しかし、DG25の場合の方がコントロールよりもGUS活性が強いにもかかわらず、粗ミトコンドリア画分への回収率がコントロールと変わらなかった。このことから、少なくともDG25およびコントロールの場合には、粗ミトコンドリア画分で測定されたGUS活性は、非特異的吸着による結果であるのかも知れないと考えられた。この考えは、粗ミトコンドリア画分をパーコール不連続密度勾配遠心にかけてインタクトなミトコンドリアのみを単離したときのGUS活性とフマラーゼ活性の挙動から裏づけられた(表3-4)。すなわち、コントロール、DG25およびDG46の場合には、フマラーゼの濃縮度(fold)にたいするGUSの濃縮度は1/100以下

であったが、DG73の場合には、フマラーゼの濃縮度よりもむしろ高い値を示した。このことから、DG73のみがミトコンドリアへ効率的に輸送されていると判断した。

培養細胞は発現量の異なる形質転換細胞の集合を液体培養しているため、融合タンパク質の輸送効率はそれらの平均値を見ていることになる。そこでDG73については、その発現量が輸送効率に与える影響を調べるため、発現量の異なるいくつかのクローンについてミトコンドリアへのGUSタンパク質の輸送効率を調べた(表3-5)。その結果、どの発現量のクローンにおいても、その輸送効率には大きな差がないことがわかった。また、DG73がミトコンドリア内部へ輸送されているかどうかを次のようにして調べた。まず、粗ミトコンドリア画分をパーコールの密度勾配遠心にかけてインタクトなミトコンドリアを単離した。ついで、このミトコンドリア画分をプロテアーゼで処理し、単にミトコンドリア表面に結合している融合タンパク質を分解し、ミトコンドリア内部に輸送されたGUSの活性のみを測った。図3-25に示すように、ほぼ100%の活性がプロテアーゼ処理によっても残っていた。しかも、界面活性剤Triton X-100を加えてミトコンドリア膜を破壊した場合には、ほとんど活性を検出することができなかった。また、この実験においてGUS活性とフマラーゼ活性は同じ挙動を示した。このことから、DG73の場合には、ミトコンドリア画分で活性の見られたGUS融合タンパク質は、ほぼ全部がミトコンドリア内部に輸送されたものを表していると考えられる。ただし、ミトコンドリア内部のどこに局在しているかは、密度勾配遠心で回収されたミトコンドリアが少なかったため調べることはできなかった。

#### (4) 形質転換植物における融合タンパク質の細胞内局在

形質転換植物においては、個体によってGUS活性に差があったので、いくつか



の形質転換体について、粗ミトコンドリア画分へのGUS活性の回収率を測定した。図3-25に示すように、各融合タンパク質の挙動は基本的には培養細胞における結果と同じであった。ただしDG73においては、フマラーゼの回収率に対するGUS活性の回収率は培養細胞のときと比べて低かった。このことから、植物体と培養細胞の間では、融合タンパク質のミトコンドリアへの輸送効率に差があるのではないかと考えられた。

ミトコンドリアへ効率的に輸送されるDG73について、ミトコンドリアへ特異的に輸送されているかどうかを調べるために、粗オルガネラ画分（葉緑体を主にミトコンドリアも含む分画遠心の画分）をパーコールの連続密度勾配遠心にかけて、密度勾配中におけるミトコンドリアの指標酵素であるチトクロームcオキシダーゼの活性とGUS活性、葉緑体の指標酵素であるRubisco (Ribulose-1, 5 bisphosphate carboxylase) の大サブユニットの分布を調べた。ミトコンドリアマトリクスのマーカー酵素であるフマラーゼの活性も測定したが、この粗オルガネラ画分では活性が弱いため測定できなかった。その結果、図3-26に示すようにチトクロームcオキシダーゼとGUS活性は大部分が密度勾配遠心の上端に残った。一方、Rubiscoは密度勾配の上端と密度勾配中部（画分8～10）にピークが現れた。このうち中部の画分は緑色のバンドが存在した画分でもあった。パーコールの密度分布を考えると、上部に現れたRubiscoは壊れた葉緑体由来しており、インタクトな葉緑体は中部の画分に現れているものと考えた。また、ミトコンドリアはこの密度勾配の条件では上部に残るものと考えられ、これらのことよりGUS活性はクロロプラストとは挙動を共にしていないものと結論した。

#### (5) 酵母における融合タンパク質の細胞内局在

植物のミトコンドリア移行シグナルが酵母でも機能するかどうか、あるいは

同じ長さのシグナルが必要かどうかを調べるために、融合タンパク質をコードする遺伝子を酵母で発現させ、その細胞内における挙動を調べた。図3-23Bに示すように、基本的にはタバコ培養細胞と同じで、DG73のみが効率的にミトコンドリア画分へ輸送されていた。しかし、フマラーゼの回収率に対して、GUS活性の回収率がやや低く、融合タンパク質が植物と同じ効率で輸送されていない可能性があった。

#### (6) 融合タンパク質のプロセッシング

松岡ら<sup>(197)</sup>は、培養細胞に標識アミノ酸を取り込ませることにより発現しているタンパク質をラベルして、その後、細胞を超音波で破碎して、その画分から免疫沈降によって目的のタンパク質を回収して電気泳動で検出する実験系を開発した。この方法で植物液胞タンパク質のプロセッシングを解析している。まず、形質転換細胞の粗抽出物や粗ミトコンドリア画分をSDS-PAGEにかけた後、免疫ブロッティングによって融合タンパク質を検出しようとしたが、非特異的吸着が多くて検出できなかった。そこで、松岡らの方法を培養細胞と酵母の双方に応用し、融合タンパク質の細胞内でのプロセッシングを観察した。その結果、図3-27に示すように培養細胞及び酵母で同じような結果が得られた。すなわち、酵母と培養細胞のいずれの場合でも、DG25とDG46はそれぞれの分子量に相当しているところにバンドが観察され、非標識アミノ酸でチェイスした後も分子量に変化はみられなかった。このことは、これらの融合タンパク質がプロセスされないこと、および細胞質内で急激な分解を受けていないことを示している。一方、DG73はチェイス後は分子量の小さなバンドの比率が増えている。このプロセスされたタンパク質はDG25よりもほんの少し大きな分子量を有していた。つまり、DG73はプロセッシングによって約50アミノ酸残基が除かれたことになる。もしもプロセッシングによってDG73からサツマイモF<sub>1</sub>δのプレ配

列が正確に切断されたとすると、45アミノ酸残基が除かれている。従って、これらの結果から推察すると、ほぼ正確にプレ配列が除去されているのではないと思われる。しかし、細胞質内やあるいは細胞を磨碎するとき前駆体が分解を受けている可能性を完全に否定することはできない。

### 3-4 考 察

本研究で、サツマイモミトコンドリアF<sub>1</sub>δのプレ配列を含む融合タンパク質のうち、成熟体サブユニットのN末端側の28アミノ酸を含んだDG73だけが、植物においても、酵母においても、効率的にミトコンドリアへ輸送されることが示された。しかし、その輸送効率は、GUS活性とフマラーゼ活性の粗ミトコンドリア画分への回収率から判断すると、タバコ培養細胞、タバコ植物体及び酵母の間で、異なっていた。最も回収率が高かったのは培養細胞で、ほぼ100%ミトコンドリアへ輸送されているものと推察された。BY-2細胞はミトコンドリア含量が多いことがそのユビキノンの含量の多さから報告されており<sup>(189)</sup>、従って、ミトコンドリア形成の機構も発達しているものと考えられる。このため、融合タンパク質が高い効率でミトコンドリアへ輸送されているのではないかと考えられる。また、GUSの発現量の異なる培養細胞におけるDG73の輸送効率の比較検討結果(表3-5)からみて、かなり発現量が多くてもミトコンドリアへの輸送機構の許容量を越えていないのではないかと考えられた。一方、植物体では、各組織によってミトコンドリア含量も異なるうえに、プロモーターの発現も組織や細胞によって違うため、どの組織を調べたかによってミトコンドリアへの輸送効率が違うのではないかと推察される。Boutryら<sup>(176)</sup>は、*N. plumbaginifolia*ミトコンドリアF<sub>1</sub>βの輸送シグナルを用いて、融合タンパク質(CAT:細菌クロラムフェニコールトランスフェラーゼ)の輸送実験を行っている。本研究で用いた融合タンパク質とは異なっているので直接比較はできないが、彼らの融合タンパク質は形質転換植物でほぼ100%ミトコンドリアへ輸送されていたと報告している。本研究で、融合遺伝子を発現させるのに彼らと同じプロモーターを用いている。しかし、本研究では、2重耐性マーカーを

もつベクター (pBI-H1) を用いているためにかなり融合遺伝子の発現量が多いものと推定される。ひょっとするとこの結果、輸送効率に差が生じたのかも知れない。本研究ではじめて、植物ミトコンドリアへの移行シグナルの解析に培養細胞を用いた。植物体を用いるのに較べて単一な細胞の集団を扱うことができ、ミトコンドリア含量も多いことからこの実験系は、非常に有効な実験系であるといえる。

酵母においても、培養細胞よりも輸送効率は低く、植物体とほぼ同じかやや低めであった。SchmitzとLonsdale<sup>(177)</sup>は、酵母のミトコンドリア移行シグナルによるGUS融合タンパク質の輸送効率は、酵母に較べると、植物細胞では低いと報告している。本研究の結果をあわせて考えると、ある生物のミトコンドリア輸送シグナルは他の生物の細胞では効率が悪いのではないかと推論できるかも知れない。ミトコンドリアへの輸送シグナルを認識する因子が存在するとすれば、この因子と輸送シグナルの間の親和力が他生物の間で低くなるために、輸送効率に差が生じるのではないかと推察される。

しかし、培養細胞、植物体と酵母の間での融合タンパク質のミトコンドリアへの輸送効率を、フマラーゼ活性とGUS活性のミトコンドリアへの回収率の比較からのみ決定することは危険かも知れない。というのは、第一に抽出過程で壊れたミトコンドリアから放出されたフマラーゼがはたして活性のある形で安定に存在し続けているかという疑問がある。さらにまた、ミトコンドリアへ輸送されなかったGUS融合タンパク質DG73は、かなり長い付加ペプチドをN末端側に持っているので、ミトコンドリア内でプロセスされ、短くなった融合タンパク質と同じ比活性を持っているのかといった問題も考えらる。実際、DG25タンパク質を発現している酵母とDG46を発現している酵母ではGUSの比活性が異なっており、N末端に余分なアミノ酸がつくことによる活性への影響は大きいのではないかと考えられる。この点に関してはさらに検討が必要と思われる。

Schatzら<sup>(144, 156, 157)</sup>は、酵母を用いた研究で、プレ配列内にミトコンドリアへの前駆体タンパク質の移行に必要な十分な情報が含まれていることを報告している。一般に酵母のプレ配列は、植物のプレ配列に較べて短く、両親媒性の $\alpha$ ヘリックス構造を含んだ20数アミノ酸であることが多い。これに対して、植物ではタバコF; $\beta$ のプレ配列が55アミノ酸(ただし前駆体のcDNA配列とサツマイモF1 $\beta$ のアミノ酸配列からの推定<sup>(122)</sup>)、サツマイモF; $\delta$ のプレ配列が45アミノ酸と長い。このうちミトコンドリアへの移行シグナルに必要な両親媒性の $\alpha$ ヘリックス構造の構築に関与しているのはN末端側の20数アミノ酸残基の部分に入っており、残りの20アミノ酸残基以上の部分の役割は不明である。Boutryら<sup>(176)</sup>は、*N. plumbaginifolia*のF; $\beta$ のプレ配列を含むN末端89アミノ酸残基の部分細菌のCATにつないだ融合タンパク質の形質転換タバコ植物体での細胞内局在性を調べ、この融合タンパク質がミトコンドリア内に輸送されて、プロセスされていることを報告した。また、SchmitzとLonsdale<sup>(177)</sup>は、逆に酵母のミトコンドリアtryptophanyl-tRNA synthaseのプレ配列(35アミノ酸)を含むN末端部にGUSタンパク質をつないだ融合タンパク質の、酵母とタバコ植物体における細胞内局在性を調べ、プレ配列に加えて成熟体部分の配列を含んでいるときのみ(全部で101アミノ酸)融合体タンパク質がミトコンドリアへ効率的に移行され、かつプロセッシングされることを報告している。これらの結果は、酵母と植物におけるミトコンドリア移行のメカニズムの共通性を示すと共に、植物のミトコンドリアタンパク質前駆体のプレ配列の長さについて新たな問題をなげかけている。これらの報告で用いられたプレ配列は、いずれも正確なプロセスサイトが決定されていない。従って正確な意味でどれだけのプレ配列を用いたか未定である。今回の実験で、はっきりとわかっているプロセスサイトのアミノ酸残基をもつプレ配列のみでは、異種タンパク質を酵母においても植物においても効率的にミトコンドリアへ移

行させることができないことが明らかになった。そして一方で、プレ配列を含んだ十分な長さの配列が存在すれば、酵母でも植物でも異種タンパク質を効率的にミトコンドリアへ移行させることができることを示した。また培養細胞を用いた *in vivo* のパルスラベラーチェイス実験 によって、融合タンパク質がほぼ正確にプロセスされることも示すことができた。同時にまた、チェイス後の前駆体とプロセスされたタンパク質の存在比を調べることによって、輸送効率をある程度推定することもできた。30分ラベルしてから、酵母で1時間、培養細胞で2時間チェイスしてもかなりプロセスされずに残っている融合タンパク質が検出された。この結果は、他の前駆体の *in vitro* における輸送実験に較べると、かなり効率が悪いように思われる<sup>(190)</sup>。前駆体のミトコンドリアへの輸送にはその高次構造がほどかれ (unfold) なくてはならない。従って、このunfoldされる速度やunfoldされ易さがミトコンドリア移行の律速となる場合があるにちがいない。GUSタンパク質はその高次構造がunfoldしにくいタンパク質なのかも知れない。もしそうであるならば、このような異種タンパク質の輸送実験では、同じプレ配列を用いてもどういうレポータータンパク質を用いるかによって必要な移行シグナルの長さも違ってくるのかもしれない。このように考えると、植物のミトコンドリアタンパク質前駆体のプレ配列が長いのは、その成熟体部分との関係で前駆体をunfoldするのに必要な長さになっているのかも知れない。現在のところ、前駆体をミトコンドリア内へと輸送させる因子に認識される共通構造が完全に決定されていないと言ってよい。この解明には、ミトコンドリア移行の機構の解明とプレ配列に関する系統的な研究が必要と思われる。

#### 4. まとめ

細胞内でエネルギーを生産する $F_1F_0$ ATPaseは、ほとんどの生物に存在し、生体にとってきわめて重要な役割をはたしている。このうちの可溶性の $F_1$ 部分は、ATPase活性を持っており、生化学的によく研究されている<sup>(9)</sup>。一般に $F_1$ ATPaseは、5種類のサブユニットより構成され、 $\alpha$ と $\beta$ が活性の中心となっていることが示されてきた。両サブユニットはすべての $F_1$ でよく保存されており、その活性部位についても細菌 $F_1$ を中心に研究されてきた。一方でマイナーサブユニットについては、各 $F_1$ についてそのアミノ酸配列から対応関係が明らかにされてきたが、その相同性は $\alpha$ 、 $\beta$ に較べて低いものであった<sup>(104, 107, 112, 140)</sup>。このことは、これらマイナーサブユニットがATPaseの活性発現よりもむしろ酵素の活性の調節や高次構造を維持するために必要な因子として働いているのではないかということ推定させる。植物ミトコンドリア $F_1$ のマイナーサブユニットに関して、構造を比較したり生物種間での対応を比較することは、 $F_1$ の酵素化学的な解析に必要であるばかりでなく、ATPaseの分子進化の点から考えても興味深いものがある。しかし、このような試みは現在までなされていなかった。また植物細胞には、FタイプのATPaseとしてミトコンドリア $F_1$ と葉緑体 $C F_1$ が存在することから、両ATPaseのサブユニットについて、それぞれの対応や生合成を考えることは、ATPaseの分子進化のみならず、ミトコンドリアと葉緑体の由来を考える上でも重要な知見が得られるものと期待された。高等植物のミトコンドリア $F_1$ に関しては、岩崎と旭<sup>(117)</sup>がサツマイモより精製をして、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\delta'$ 、 $\epsilon$ という6種類のサブユニットより構成されていることを示した。一方、単子葉植物のミトコンドリアからは5種類のサブユニットを持つ $F_1$ が精製されてい



た。従って、両者のマイナーサブユニットの対応関係を明らかにすることは、ATPaseの構造と機能の関係を考慮する上できわめて有効であると思われる。本研究により、サツマイモ $F_1$ の $\gamma$ 、 $\delta$ および $\varepsilon$ については、他の $F_1$ のサブユニットとの対応が明らかになり、基本的には植物のミトコンドリア $F_1$ も他の $F_1$ と同じであることが明らかになった(図3-4~6)。特に $\delta$ については、動物や酵母のOSCPと相同性があることがわかり、さらに $\varepsilon$ についても、動物や酵母の $\varepsilon$ と相同性があることがわかったことは興味深い。また、免疫学的にサツマイモ $F_1$ の $\delta$ はトウモロコシ $F_1$ の $\delta$ と相同性があることが示された(図3-3)。一方で $\delta'$ については、そのN末端アミノ酸配列からは、 $F_1$ に関連するタンパク質の中からは相同性のあるものを見つけることはできなかった。しかしながら、他の報告を考慮に入れると単子葉植物では $\delta'$ が精製中に喪失するのではないかと思われた。

N末端アミノ酸配列より対応関係の分かった3つのサブユニットのうち、 $\delta$ についてはcDNAをクローニングし、塩基配列から一次構造を推定し、他の $F_1$ の対応するサブユニットと比較した。その結果、サブユニット全体では、相同性が低く18~37%であったが、全てのサブユニットで保存されているアミノ酸については、サツマイモ $F_1$ の $\delta$ でもよく保存されていた(図3-14)。またハイドロパシープロフィールも類似していた(図3-15)。サツマイモ $F_1$ の $\delta$ と対応するこれらのサブユニットの間で、特に酵母と動物のOSCPが、細菌 $F_1$ や葉緑体 $CF_1$ の $\delta$ よりも、アミノ酸配列の上からもさらにハイドロパシープロフィールの上からもサツマイモ $F_1$ の $\delta$ とよく似ていた。一方で、葉緑体 $CF_1$ の $\delta$ はサツマイモ $F_1$ の $\delta$ よりもむしろ光合成細菌の $F_1$ の $\delta$ とよく似ていた。サツマイモ $F_1$ の $\varepsilon$ は動物や酵母の $F_1$ の $\varepsilon$ と対応しており、 $CF_1$ には対応するサブユニットが見つからなかった。このこともあわせると、ミトコンドリアと葉緑体に存在するATPaseは、基本的には類似しているが、進化的にはむしろ遠いのではな

いかと推察される。サツマイモ  $F_1\delta$  の前駆体にあるプレ配列を含んだポリペプチドが異種タンパク質をミトコンドリアへ特異的に移行させることは、ミトコンドリアと葉緑体が独自に進化していたことを示唆しており、上記の考えの基本となっているといえよう。これらのことは植物細胞における両オルガネラの共生進化を考える上でも興味深い。



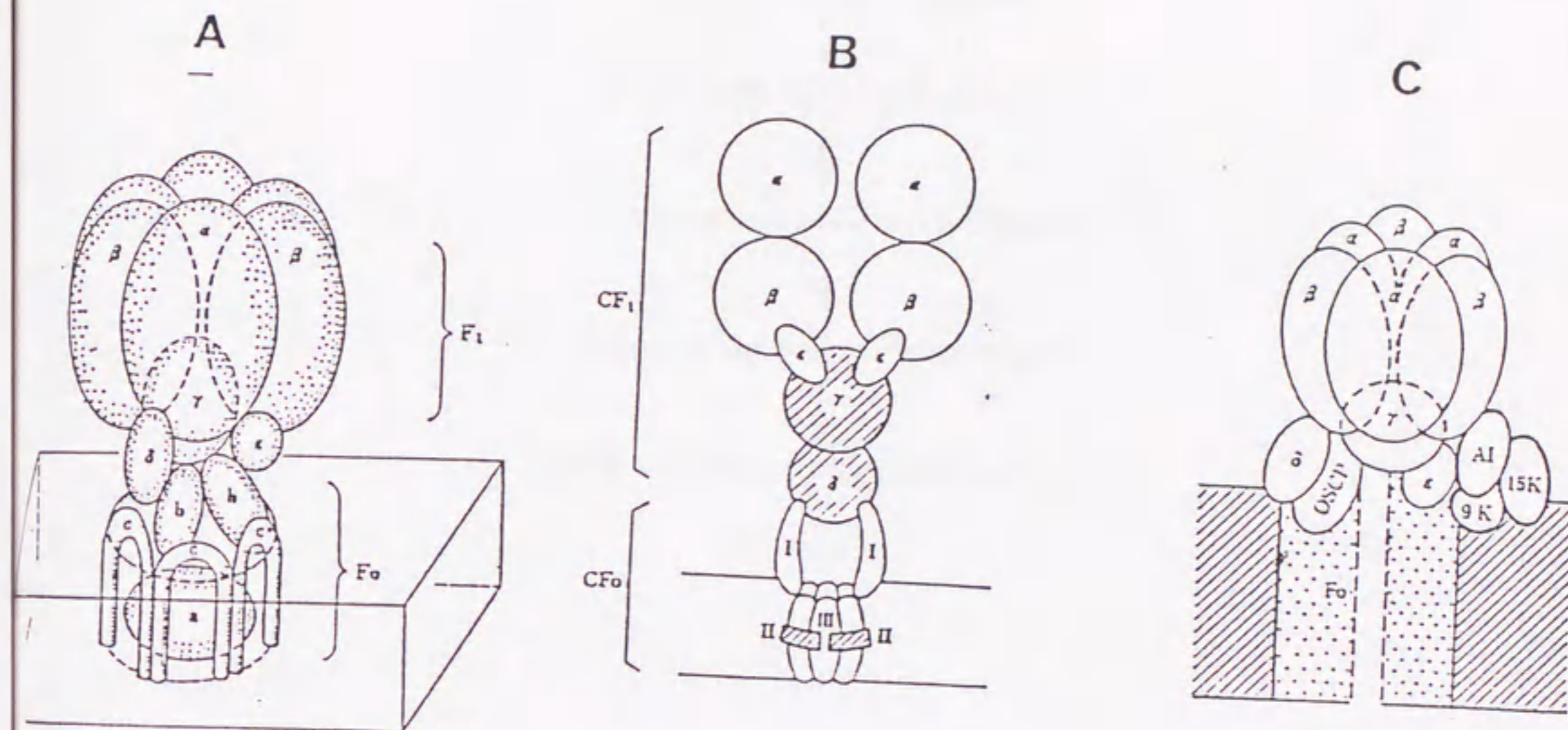


Fig. 3-1 Models for the structures of  $F_1F_0$ ATPases from *E. coli* (A), spinach chloroplast (B), and yeast mitochondria (C).  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , a, b, c, I, II, III, the names of subunits; OSCP, oligomycin sensitivity conferring protein; AI, ATPase inhibitor protein; 9K and 15K, the stabilizing factors with molecular weights of 9,000 and 15,000, respectively.

Preparation of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase

Parenchymatous tissue of sweet potato roots

↓  
Mitochondria

↓  
Submitochondrial particles

↓  
Solubilization by sonic oscillation

↓  
Ammonium sulfate fractionation

↓  
Sephrose 6B colum chromatography

↓  
DEAE - cellulose colum chromatography

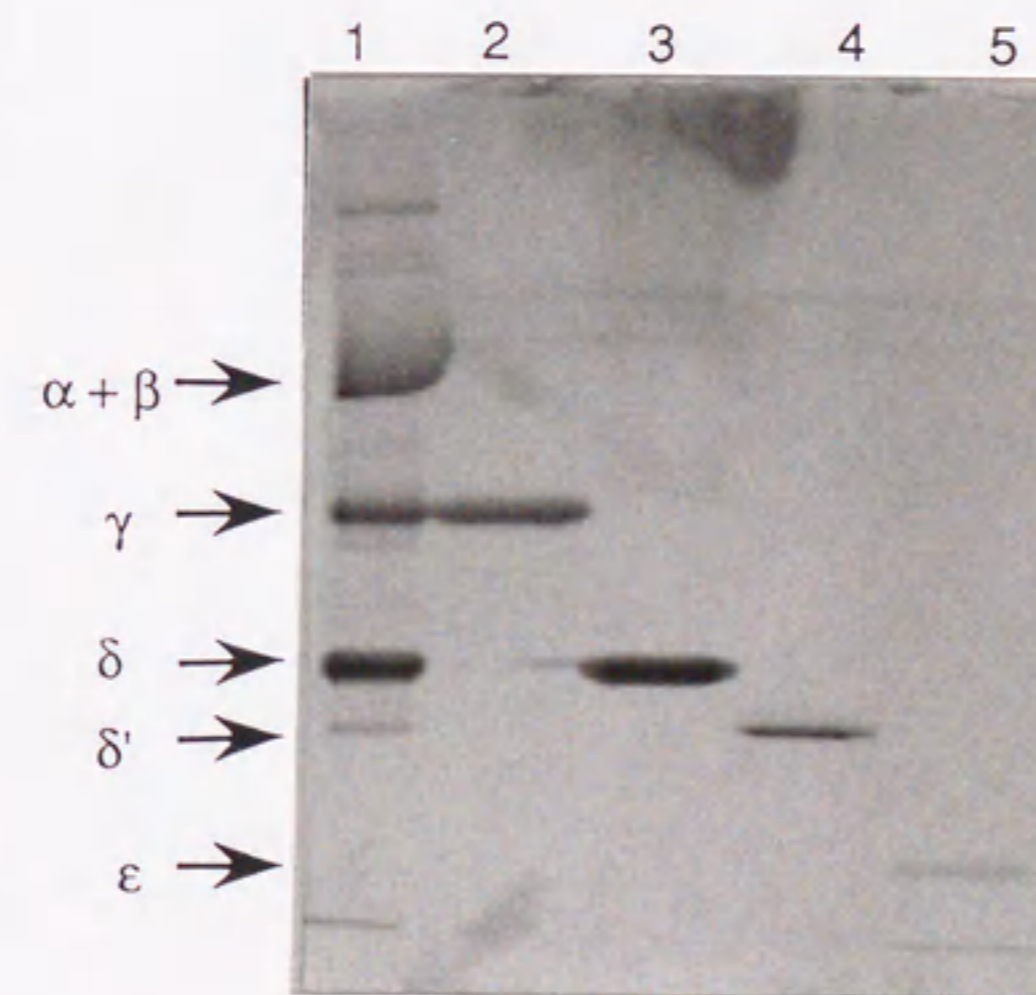


Fig. 3-2 Purification of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase and separation of the minor subunits by SDS-PAGE. Mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase was purified from the parenchymatous tissue of the sweet potato tuberous roots as described by Iwasaki and Asahi<sup>(117)</sup>. The purified mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase was subjected to SDS-PAGE (12.5% polyacrylamide gel) and its minor subunits were isolated as described in Materials and Methods. The isolated subunits (40-200 ng) were subjected to SDS-PAGE and after which protein was visualized by silver staining.

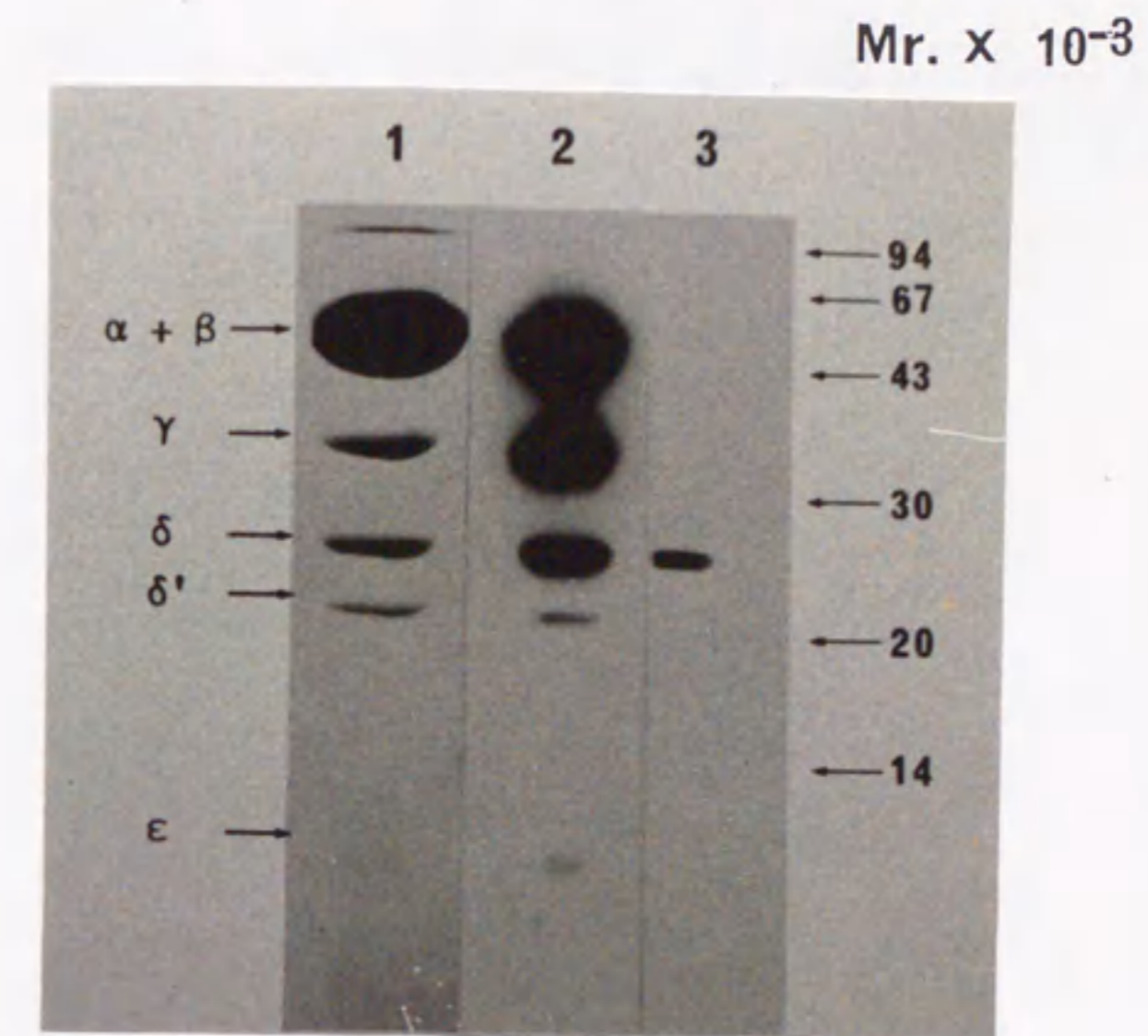


Fig. 3-3 Immunological cross-reactivity of F<sub>1</sub>ATPase subunits of sweet potato root mitochondria with antibody against the  $\delta$ -subunit of maize mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. Purified sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub> (30 $\mu$ g) was subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R (lane 1) or analyzed by immunoblotting with antibody against sweet potato F<sub>1</sub> (lane 2) or against the  $\delta$ -subunit of maize F<sub>1</sub> (lane 3).

E.coli  
 Rps.blastica  
 Rps.rubrum  
 Spinach CF1  
 Bovine  
 Sweet potato

1 M A G A K E I R S K I A S V Q N T Q K I T T K A M E M V A A S K M R K S Q - -  
 M P S L K D L K N R I G S V K N T R K I T T K A M Q M V A A A K L R R A Q - -  
 M A S L K D L R S R I T S V K S T Q K I T T S A M K M V A A S R L R R A Q - -  
 A N L R E L R D R I G S V K N T Q K I T T E A M K L V A A A K V R A Q E - -  
 A T L K D I T R R L K S I K N I Q K I T T K S M K M V A A A K Y A R A E - -  
 I S T Q V V R N R M K S S V K N I Q K I I S A M K M V A A A K L X X I n - -

30

20

10

\*(GK)

Fig. 3-4 Homology of the N-terminal amino acid sequence of the  $\gamma$ -subunit of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase to the  $\gamma$ -subunits from other sources. In the N-terminal amino acid sequence of the  $\gamma$ -subunit from sweet potato, the residues at positions 32 and 33 (indicated by x) could not be determined, and two amino acid residues were detected at positions 20 and 21 (see text). The N-terminal part of the amino acid sequences of the  $\gamma$ -subunits from *E.coli*(191), *Rhodopseudomonas blastica*(192), *Rhodospirillum rubrum*(193), spinach chloroplast(107), and bovine heart(104) mitochondria are taken from the literature. Amino acid residues identical with those of the sweet potato subunit are boxed.



**A**

Synechococcus

E. coli

Rsp. blastica

Rsp. rubrum

Spinach CF1-δ

Yeast OSCP

Bovine OSCP

Sweet potato F1-δ

M T S T S . Q L F D P P Y A A E A L M A I A R - -  
 M S E F I T V A R P P Y A K A A F D F A V - -  
 M A E A A S I S Q G I A E R Y A T A L F F E L S K - -  
 M S S H K A G V T G V A E R Y A T A L Y E K A E - -  
 V D S T . . A S R Y A S A L A D V A D - -  
 ? . P P V R L F G V E G T Y A T A L Y Q A A A - -  
 F A K L V R P P V Q I Y G I Q G R Y A T A L Y S A A S - -  
 A T A S A S K E Q K I K V P L T M Y G V S G N Y A S A L Y L x x V - -

1

10

20

30

**B**

Sweet potato F1-δ'

x T D L P A E T A A D S T F V E A x K k L I P N V D P P k x P x A x M  
 \* \* \* \* \*  
 1 10 20 30

Fig. 3-5 Homology of the N-terminal amino acid sequence of the  $\delta$ -subunit of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase to F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPase subunits from other sources and the N-terminal amino acid sequence of the  $\delta'$ -subunit of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase.

**A** In the N-terminal protein sequencing analysis of the  $\delta$ -subunit of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>, the residues at positions 1, 21, 31, and 32 (indicated by x) could not be determined. N-Terminal part of the amino acid sequences of  $\delta$ -subunits from *E. coli*(191), *Synechococcus*6301(194), *Rhodospseudomonas blastica*(192), *Rhodospirillum rubrum*(193), spinach CF<sub>1</sub>(140), yeast OSCP(142), and bovine OSCP(195) are taken from the literature. Amino acid residues identical with those of the sweet potato  $\delta$ -subunit are boxed.

**B** In the N-terminal amino acid sequence of the  $\delta'$ -subunit of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase, the residues at positions 1, 18, 30, 32, and 34 (indicated by x) could not be determined, and lysine residues at positions 20 and 29 were assigned with some uncertainties.

Yeast	A	S	W	R	K	A	G	I	S	Y	A	A	Y	L	N	V	A	A	Q	A	I	R	S	S	L	K	T	E	L	Q	-	-		
Bovine	V	A	Y	W	R	Q	A	G	L	S	Y	I	Y	S	Q	I	C	A	K	A	V	R	D	A	L	K	T	E	F	K	-	-		
Sweet potato	V	A	P	F	S	R	A	A	G	M	T	Y	Y	S	N	L	x	A	N	M	V	R	D	x	L	K	E	P	x	Y	-	-		
	A	S	N	A	A	V																												

30

20

10

Fig. 3-6 Homology of the N-terminal amino acid sequence of the  $\epsilon$ -subunit of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase with that of the  $\epsilon$ -subunit of bovine heart mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase. The residues at positions 23, 30, 35, and 36 (indicated by x) of the N-terminal amino acid sequence of the sweet potato  $\epsilon$ -subunit could not be determined. The N-terminal amino acid sequences of the  $\epsilon$ -subunits of bovine and yeast mitochondrial F<sub>1</sub>ATPases are taken from Walker et al. (104) and from Arselin et al. (112) respectively. Amino acid residues identical with those for the sweet potato subunit are boxed.



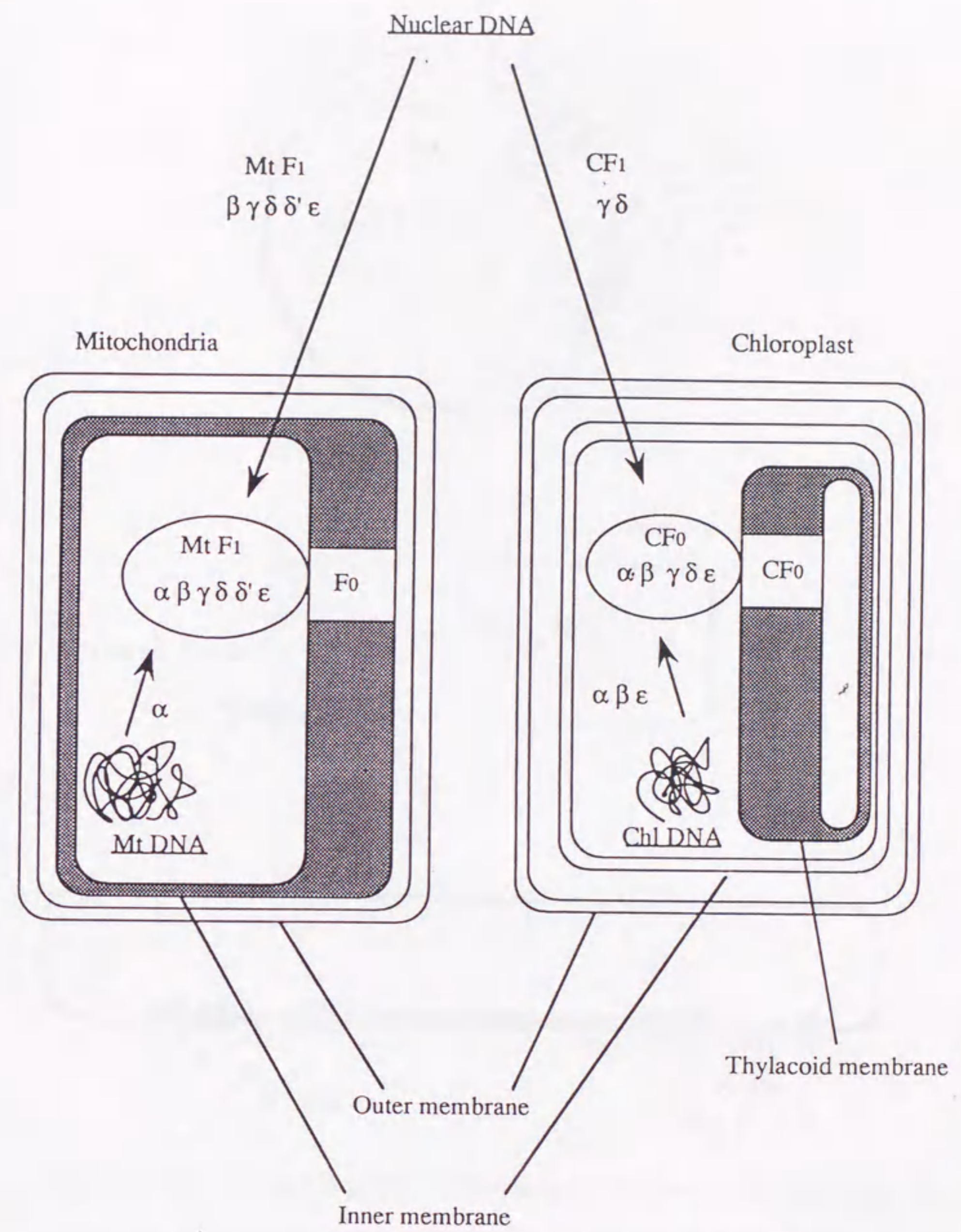


Fig. 3-7 A scheme for the intracellular sites of the synthesis of plant mitochondrial F<sub>1</sub> and chloroplast CF<sub>1</sub> subunits.

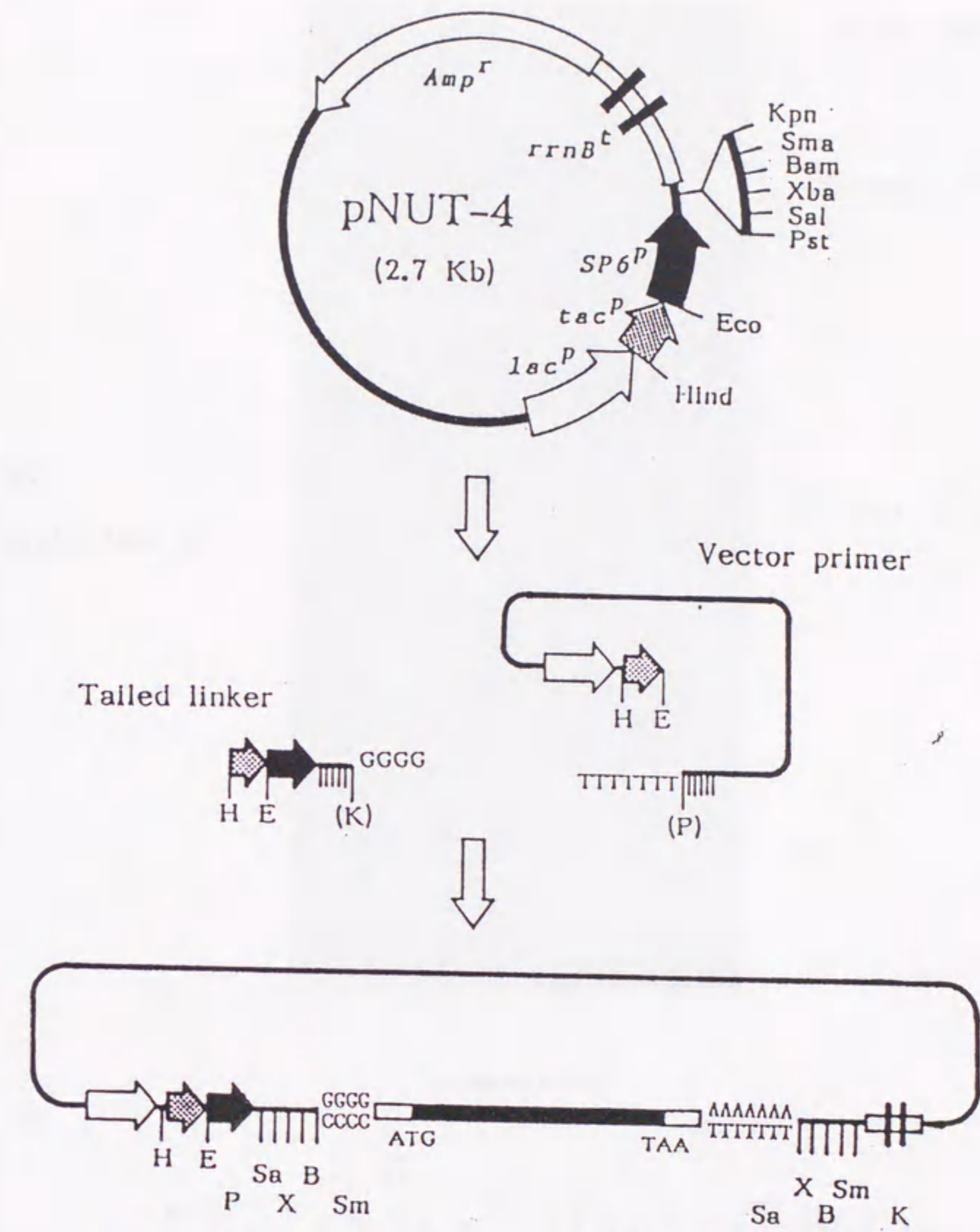


Fig. 3-8 Synthesis of double-stranded cDNA with pNUT-4 vector. The following abbreviations are used for the restriction enzymes. H, HindIII; E, EcoRI; K, KpnI; P, PstI; Sa, SalI; X, XbaI; B, BamHI; Sm, SmaI. Parentheses indicate restriction enzyme sites eliminated by homopolymer tailing. Filled-in (■) and open boxes (□) in the cDNA indicate the coding and noncoding regions of mRNA, respectively.

Colony Hybridization

Wash Temp.

Td min. - 10°C



Td min - 5°C

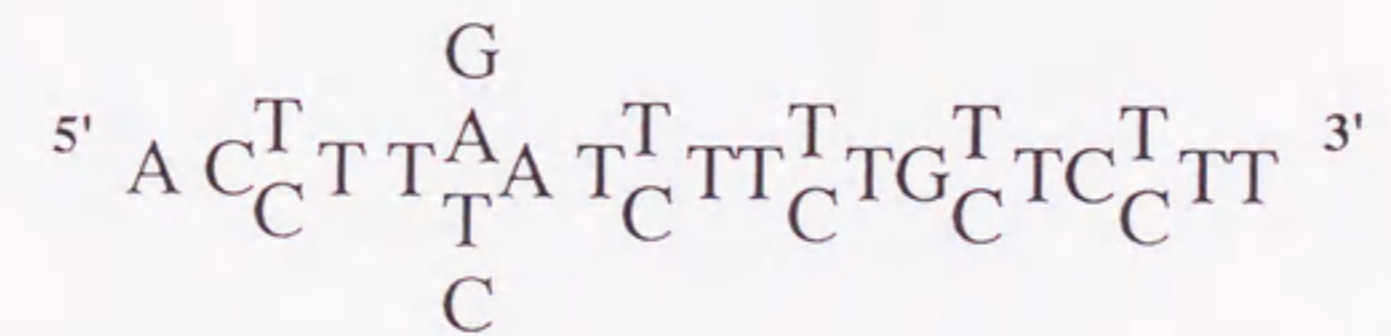


Td min



6 x SSC  
Hybridization 36°C

Synthetic Probe



20 mer 128 pieces      Td min. 46°C

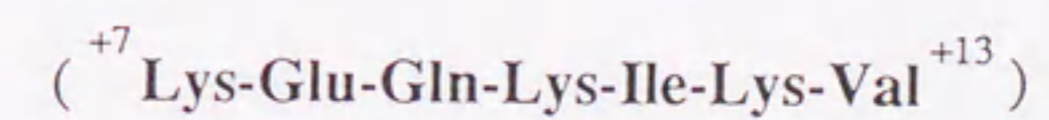




Fig. 3-9 Detection of cDNA clone with the colony hybridization method using the synthetic oligonucleotide probe. The cDNA library constructed with the size fractionated poly(A)<sup>+</sup>RNA from sweet potato tuberous root tissue was screened as described in Materials and Methods. The arrow indicates a positive clone. A mixture of 128 different 20mer oligonucleotide probes was synthesized and labeled with <sup>32</sup>P by T4 polynucleotide kinase and used for colony hybridization.



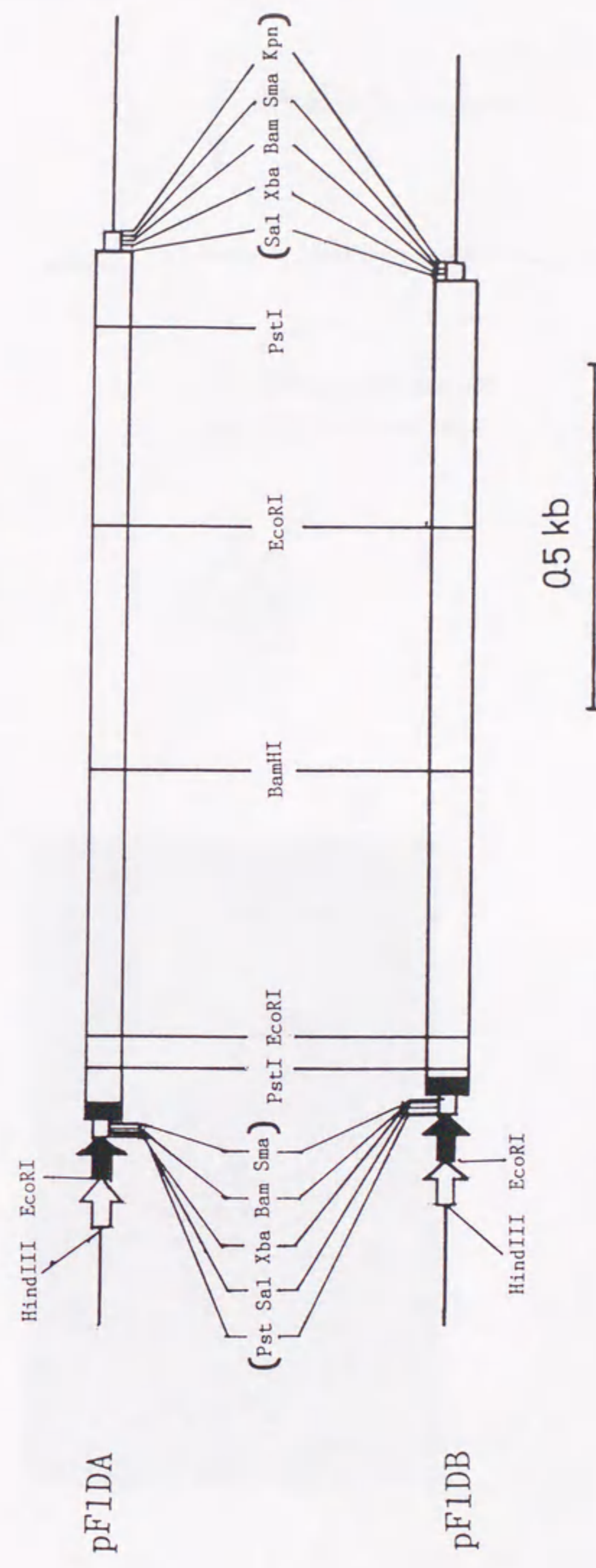


Fig. 3-10 The structure of cDNA inserts of pF1DA and pF1DB. The open and filled-in boxes indicate cDNA and a homopolymer (dG/dC)-tail attached during cDNA synthesis, respectively. The white arrow (⇨) and black arrow (➡) indicate tac promoter and SP6 promoter, respectively.



SP6 RNA Polymerase

mRNA

Wheat germ extract  
In vitro translation

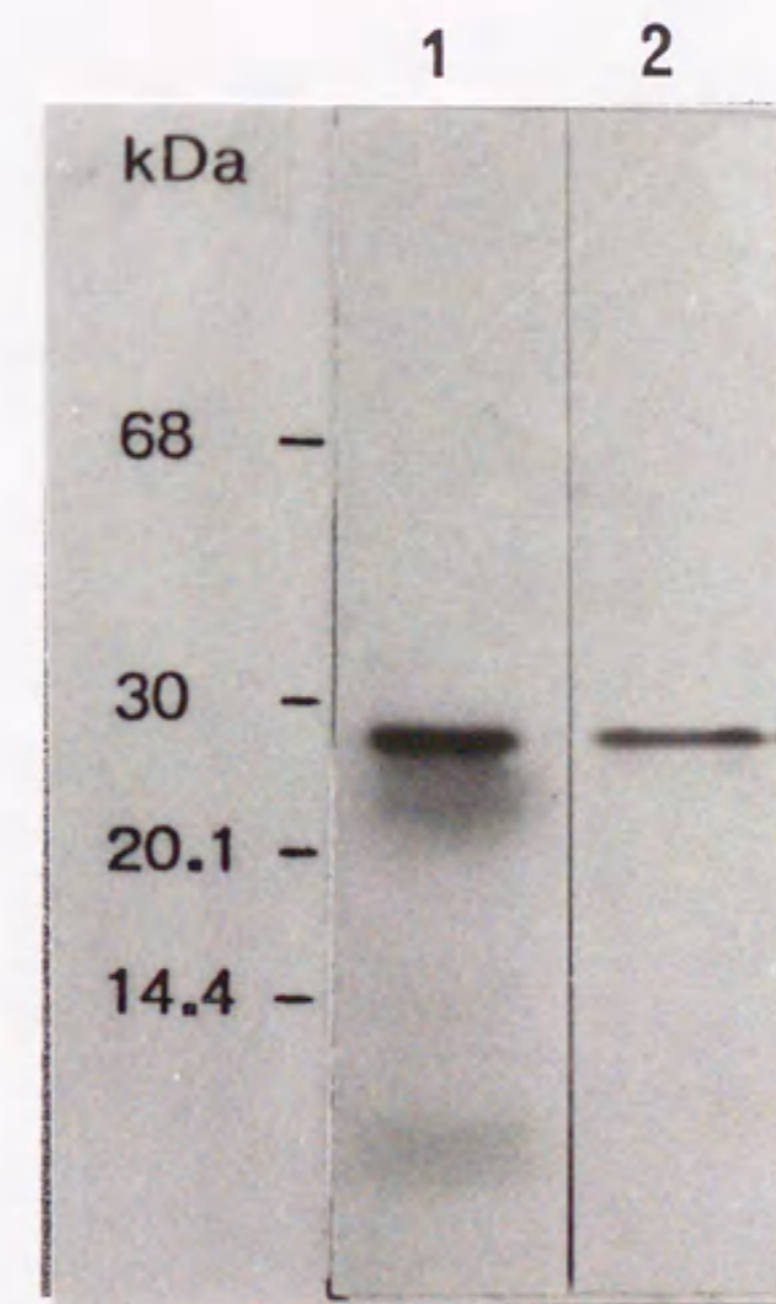


Fig. 3-11 *In vitro* translation of cDNA-encoded polypeptide. SP6 transcripts from KpnI-linearized pF1DB were translated in a wheat germ lysate in the presence of [<sup>35</sup>S]methione, and total translation products (lane 1) and immunoprecipitates with anti-( $\delta$ -subunit) antiserum (lane 2) were analyzed by 17.5% SDS-PAGE.

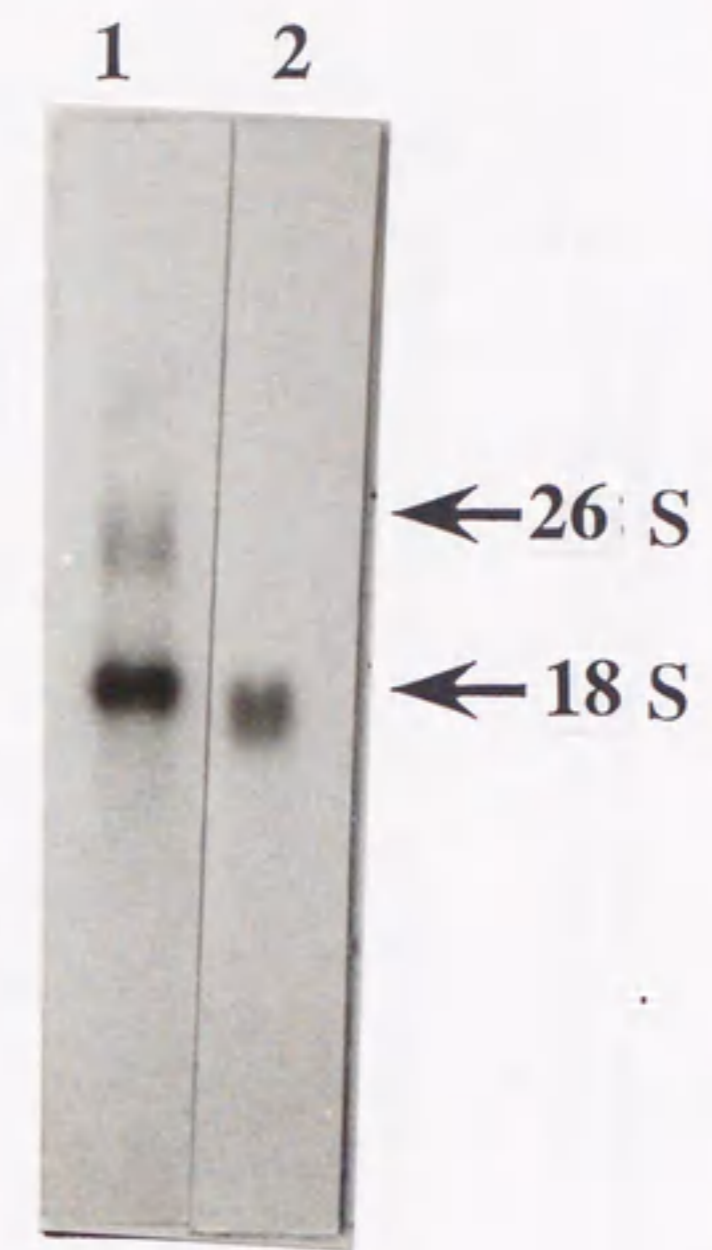


Fig. 3-12 Northern blot hybridization of sweet potato tuberous root poly(A)<sup>+</sup>RNA with the cDNA probe. The cDNA insert of pF1DA excised by XbaI (lane1) and the sweet potato tuberous root poly(A)<sup>+</sup>RNA (6µg; lane2) were denatured with formaldehyde, transferred to Zeta-Probe membrane (Bio-Rad), and hybridized with the <sup>32</sup>P-labeled cDNA insert of pF1DA excised by XbaI (see Fig.3-10).

-114 \* \* \* \* \* CATAGGCTAAACTCCAGCGTTCTTTGGGCTTGGTTCTCAACCCTTCCCTTGTGTCCGAACTCTCTCGGGGGGCGCAAGCATTCAGCTTAGCAAAAGAGAGAGCTCTCTGAT \* \* \* \* \* -1

+1 \* \* \* \* \* (T)GCATACAGGACGGTCTAGATCG(T)GGCTTCTCTATTCTCCAGAGGGCCCTCTCTTCAGCCAGAGATCTAACGGCTCATCGATCCATTCTCTGGCCCTACCCCTCTCAAAGCTCTGAG \* \* \* \* \* 120  
 MetAlaIstThrGlyArgAlaArgSerMetGlyPheSerIleLeuGlnLysAlaLeuSerSerAlaGlnArgSerAsnAlaHisArgSerIleLeuCysProThrLeuSerAsnSerGlu

\* \* \* \* \* CTGCTGAGGAATATGCCAACTGCCCTCTGCTTCAAAAGAACAAAATTAAGGTGGCTCTCACAAATCTATGGGGTTTCTGGAACTATGCAATCTGCTTTGTACCTTCCAGCAGCTAAAGTCT \* \* \* \* \* 240  
 LeuLeuArgAsnTyrAlaThrAlaSerAlaSerLysGluGlnLysIleLysValProLeuThrMetTyrGlyValSerGlyAsnTyrAlaSerAlaLeuTyrLeuAlaAlaValLysSer

\* \* \* \* \* AACACATTAGAGACGTTGACTCAGAGCTCTATGACCTTGTGAGGCTTCAAGAAGAGTCTTACATTTTCTCAGTTTCATGAGGGATCCCATCTCTACTGTTGATCTAGAGTGAATGCC \* \* \* \* \* 360  
 AsnThrLeuGluLysValGluSerGluLeuTyrAspLeuValGluAlaSerLysLysSerProThrPheSerGlnPheMetArgAspProSerValProValAspThrArgVarAsnAla

\* \* \* \* \* ATAAAGGAAATTTGTCTCAAGCTAAATTTGGGATACGACCCAGAACCTTCTTGGCTGAAAATGGGAGCTGAAACACACATTGATCGCATTTGCAAGCCATTCAAAGAGAGCTG \* \* \* \* \* 480  
 IleLysGluIleCysAlaGlnAlaLysPheGlyAspThrThrGlnAsnPheLeuLeuIleLeuAlaGluLysGlyArgLeuLysIleAspArgIleValLysArgPheLysGluLeu

\* \* \* \* \* ACCATGCCACACAGGGGAGAGTCAAACCCACTGTGACACAGTAATTCGCCCTTCCCGCTGATGAGGAGAAAGAAATTCAGCCACATTCGAGGAAATGGTGGACAGGAAAGACTGTT \* \* \* \* \* 600  
 ThrMetAlaHisArgGlyGluValLysAlaThrValThrValIleProLeuProAlaAspGluGluLysGluLeuLysAlaThrLeuGlnGluMetValGlyGlnGlyLysSerVal

\* \* \* \* \* CAAATTCACAGACAGATTGATCCAACCAATTTGGTGGCCCTTGTGGAAATTCGGCCAGAAAGCTTTTGACATGCTATTAAGGACACGGGGCAGCCAGATGGAGAGATTCTTCCGTCAA \* \* \* \* \* 720  
 GlnIleGluGlnLysIleAspProThrIleLeuGlyGlyLeuValValGluPheGlyGlnLysValPheAspMetSerIleArgThrArgAlaArgGlnMetGluArgPheLeuArgGlu

\* \* \* \* \* CCACTCAACTTTTCAATGCCCTCCAATCCCGTTAGAGGGCTTTTTCATCTTGAGAAAGCAGATTTCCGTTCTGGGCTCCCTGAGCTGCTGTTTCCGATAAACATTGTTCTGCTC \* \* \* \* \* 840  
 ProLeuAsnPhe\*\*\*

\* \* \* \* \* TTTTTTCCAAATAAGAAAACCTTCTTTTGTAAAGATTTGATGGAAAAAAGAAACCTAATGTTTCTTACTTCTGCTC \* \* \* \* \* +921

Fig. 3-13 Nucleotide sequence of the pF1DB cDNA insert and deduced amino acid sequence of a precursor for the sweet potato mitochondrial F1-ATPase  $\delta$ -subunit. The A residue of the first ATG codon in the open reading frame is numbered as +1, and the 3'-terminal poly(A) residues are omitted in the figure. The TAG termination codon preceding the ATG codon of the open reading frame is marked by a box, and three ATG codons in the same reading frame in the presequence region are marked by circles. The sequence identical to the N-terminal 33-amino acid sequence of the purified  $\delta$ -subunit is underlined. The double underlined sequence AATAAA in the 3'-noncoding region indicates the putative polyadenylation signal.

1 Synechococcus

- 2 E. coli
- 3 Rps. blasticca
- 4 Rsp. rubrum
- 5 Spinach
- 6 Yeast
- 7 Bovine
- 8 Sweet potato

CF1-δ  
OSCP  
OSCP  
F1-δ

MTSTSQ·L  
MSEFI·TV  
M AEAAISQGI  
M SSHKAGVTGV  
V D S T ·  
P P P V R L F F G V  
V R P P V Q I Y G I  
I K V P L T M Y G V

F D P P Y A E A L M A  
A R P Y A K A A F D  
A E R Y A T A L F F E  
A E R Y A T A L Y E  
A S R Y A S A L A D  
E G T Y A T A L Y Q  
E G R Y A T A L Y S  
S G N Y A S A L Y L

I A R E Q G L E D R  
F A V E R Q S V E R  
L S K E T G A L K T  
L A E D R G A L D D Q  
V A A D V T G T L E A  
A A A K N S S I D A  
A A S K Q N K L E Q  
A A V K S N T L E K

1 F G E D A A L F R S T L A A S A D L R H  
2 W Q · D M L A F A A E V T K N E Q M · A  
3 L E T D I D A L K D V L A G S P D L G A  
4 V S A D L R S L K A M L D E S G D L R R  
5 T N S D V E K L I R I F S E E P · V Y Y  
6 A F Q S L Q K V E S T V K K N P K L G H  
7 V E K E L L R V G Q I L · K E P K M A A  
8 V E S E L Y D L V E A S K K S P T F S Q

50

1 N R I A F L D G I A D R Y Q A L L · · R  
2 G R L N A L P D V L E Q F I H L R A V ·  
3 R R L F A L P Q V L S A L A G L I A E E  
4 H R S F A V P G M I G A F L E R L A A R  
5 E R I N L V K E I L N E F F E D V F N K I  
6 N R L G C F E K I A S D F F G V L N D A H  
7 G R L T N T P A V I S A F S T M M S V H  
8 G R L K H I D R I V K R F K E L T M A H

L L E N P T L F S S  
E L L S G A L A P E  
M I A S P V I S R G  
V I A S P V I G R D  
F F A N P V I S I D  
S L L N P A L S L K  
L L L N P Y V K R S  
F M R D P S V P V D

Q K K A V L N Q V F  
T L A E S F I A V C  
D Q A K A V A A I A  
D Q R K A L T A L A  
N K R S V L D E I I  
D R N S V I D A I V  
V K V K S L S D M T  
T R V N A I K E I C

G · S S V H P L V L  
G · E Q L D E N G Q  
G K M G L S P L M T  
E K A G F H E I V R  
T T S G L Q P H T A  
E T H K N L D G Y V  
A K E K F S P L T S  
A Q A K F G D T T Q

· N F L N L L V D R  
· N L I R V M A E N  
· N T L A L M S E K  
· N F L G V V A A K  
· N F I N I L I D S  
V N L L K V L S E N  
· N L I N L L A E N  
· N F L L I L A E N

1 I E S Q V D A D L L G G V I I K V G ·  
2 L N C K I D K S V M A G V I I R A G ·  
3 L N T T V D E S L I G G L L V K L G ·  
4 I D A S V D P A L L G G M V V R V G ·  
5 I K T V I D P S L V A G F T I R Y G N  
6 L L E N V V K P E I K G G L I V E L G ·  
7 L L E V K I D P S I M G G M I V R I G ·  
8 I E Q K I D P T I L G G L V V E F G ·

· · S Q V L D A S L  
· · D M V I D G S V  
· · S T M I D T S V  
· · S R M V D S S L  
E G S K L V D D M S V I  
· · D K T V D L S I  
· · E K Y V D M S A  
· · Q K V F D M S I

V S S A V P P L T E A  
V I S A A A L S E Q  
· · A A T K L S A A  
· · S A T A L T S A  
· · S V V K L E N D  
· · S A E P L D D K  
· · T A S A L D E T  
· · T V I P L P P A D

Q V Q V I T E K V K  
Q L A K I S A A M E  
Q A K K L A E T L K  
Q K S A L T T A L N  
H L A Q I A K G V Q  
S F K R I E K A L S  
T L T E L K T V L K  
E E K E L K A T L Q

Q · L T G A A G V E  
K R L S · K · V K  
A K V · · G K T V V T  
· K A T · G N T V T  
· K I T G A K N V R  
A S K L V G Q Q K S  
S F L S K G Q V L K  
E M V G G Q G K S V Q

[18%]  
[21%]  
[23%]  
[25%]  
[26%]  
[32%]  
[37%]  
[ - ]

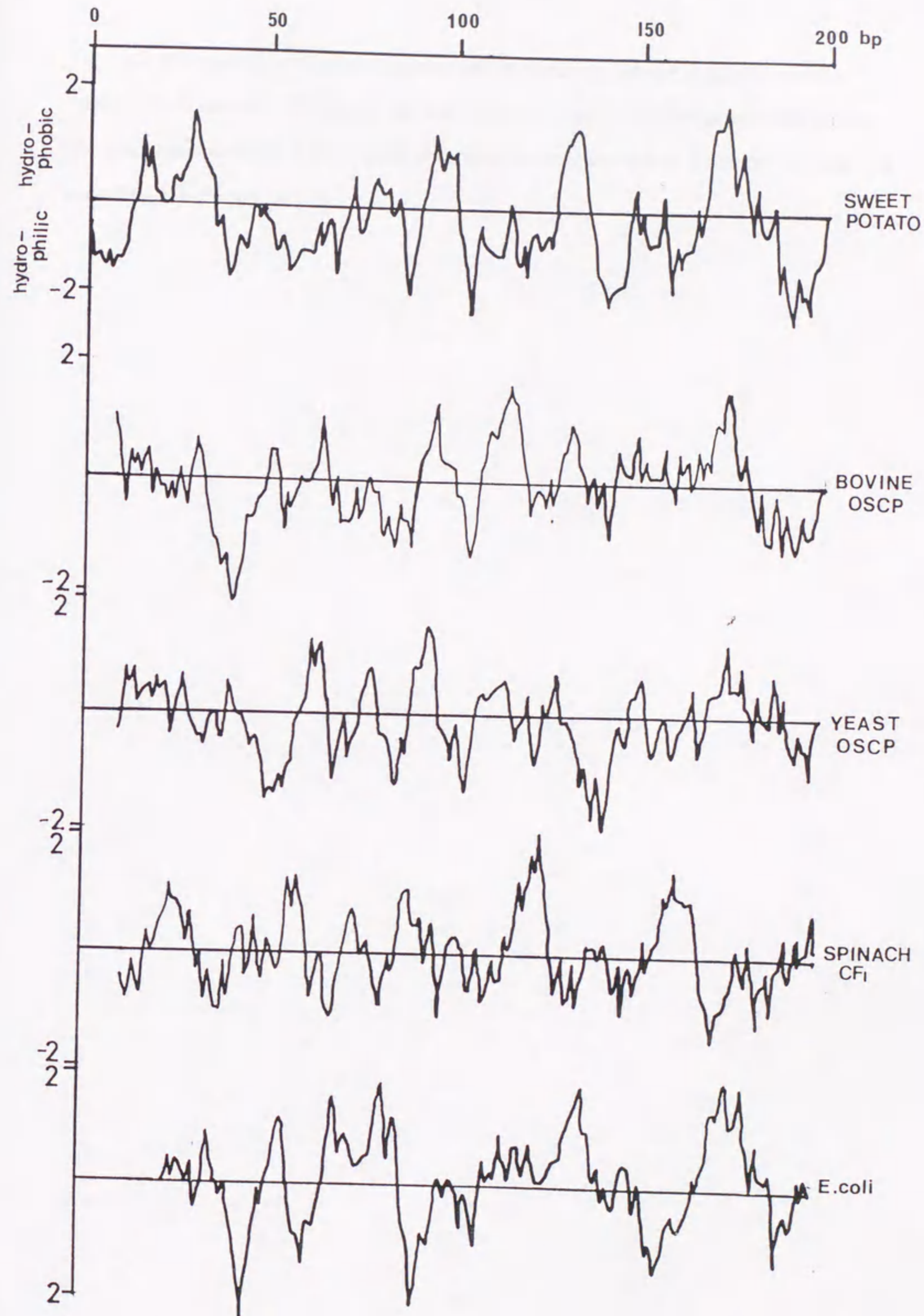
1 L A A  
2 L Q S  
3 N A M K E V G  
4 L A M K G V G  
5 L E M D D V T L A V  
6 K V L E D S I  
7 R A M R E I L  
8 R F L R E P L N F

200

Similarity

Fig. 3-14 Comparison of the amino acid sequence of the mature- $\delta$ -subunit of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase with that of the corresponding subunit from various organisms. The amino acid sequence of the mature  $\delta$ -subunit of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase deduced from the nucleotide sequence of pF1DB (Fig. 3-13) is compared with the amino acid sequences of the F<sub>1</sub>ATPase  $\delta$ -subunit of *Synechococcus* 6301, *E. coli*, *Rhodospseudomonas blastica*, and *Rhodospirillum rubrum*, of the CF<sub>1</sub>ATPase  $\delta$ -subunit of spinach chloroplast and of the OSCP's of yeast and bovine mitochondria. The sequence of yeast OSCP is that of pre-OSCP deduced from the nucleotide sequence of ATP5 gene, the N terminus of the mature form is not known. Gaps introduced to maximize sequence homology are indicated by dots, and amino acid residues conserved in more than five sequences are boxed. Calculated homology of each sequence compared with the sweet potato  $\delta$  subunit is indicated at the end of sequence in brackets.





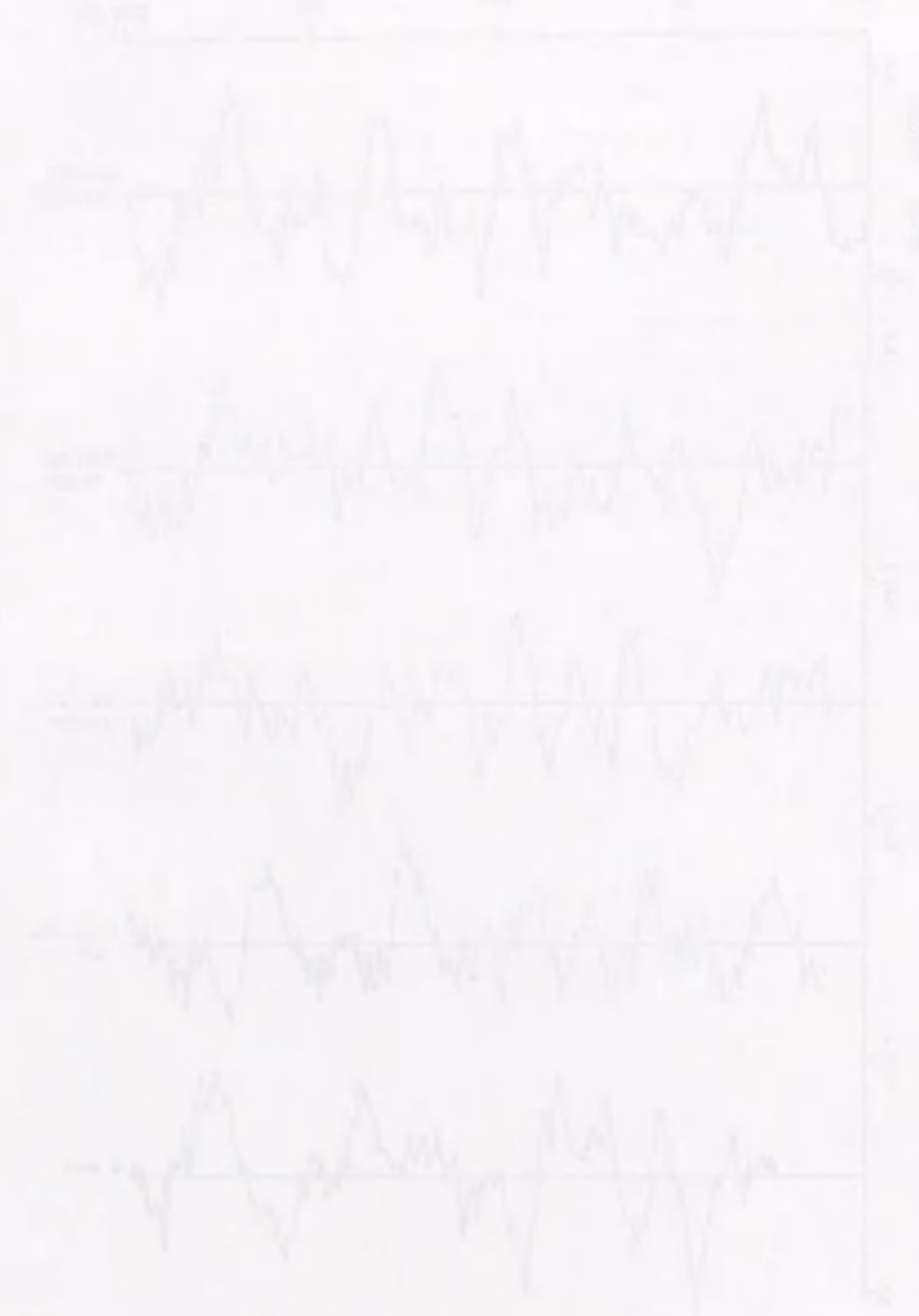


Fig. 3-15 Hydropathy profiles of the amino acid sequences of mature  $\delta$ -subunit of sweet potato mitochondrial  $F_1$ ATPase, E. coli and spinach  $CF_1$  and of OSCP's of yeast and bovine. The amino acid sequence of the mature proteins related to sweet potato  $\delta$  subunit was analyzed according to Kyte and Doolite.

Sweet potato Pre-F1-δ

+  
MAMTGRARSMGESSILQKALSSAQRSNÄHRSILCPTIUSNSELIRNY ATAS1

Bovine Pre-OSCP

+  
MAALAVSGESQQVRCETSUVVRP FAKLI

Yeast Pre-OSCP

+  
MÄNRVFRSFASSLRRAASKAAAPPVVR ?

Spinach Pre-CF1-δ

+  
MAALQNPVALQSRRTTAVAAU<sup>\*</sup>STSSTTSPPKPF<sup>\*</sup>ESL<sup>\*</sup>SSST<sup>\*</sup>AT<sup>\*</sup>ENP<sup>\*</sup>RIK<sup>\*</sup>IL<sup>\*</sup>TK<sup>\*</sup>KL<sup>\*</sup>TAKPRGGALGTRM<sup>\*</sup>VDST<sup>\*</sup>

-60

-40

-20

-1 1

Fig. 3-16 The N-terminal presequence of the pre- $\delta$ -subunit of sweet potato mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase and its comparison with the N-terminal presequences of the pre-OSCPs of bovine and yeast mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase and the N-terminal transit peptide of pre- $\delta$ -subunit of spinach chloroplast CF<sub>1</sub>. The sequences of pre-OSCPs from bovine and yeast and pre- $\delta$ -subunit of spinach chloroplast CF<sub>1</sub> are taken from the literature (see legend for Fig. 3-14). The N-terminal amino acid residue of the mature subunit is numbered as +1 except for the pre-OSCP of yeast in which the amino acid sequence of the mature subunit is not known. Basic and acidic residues are indicated by + and -, respectively, and Ser and Thr residues are underlined. Shaded residues are hydrophobic amino acids.

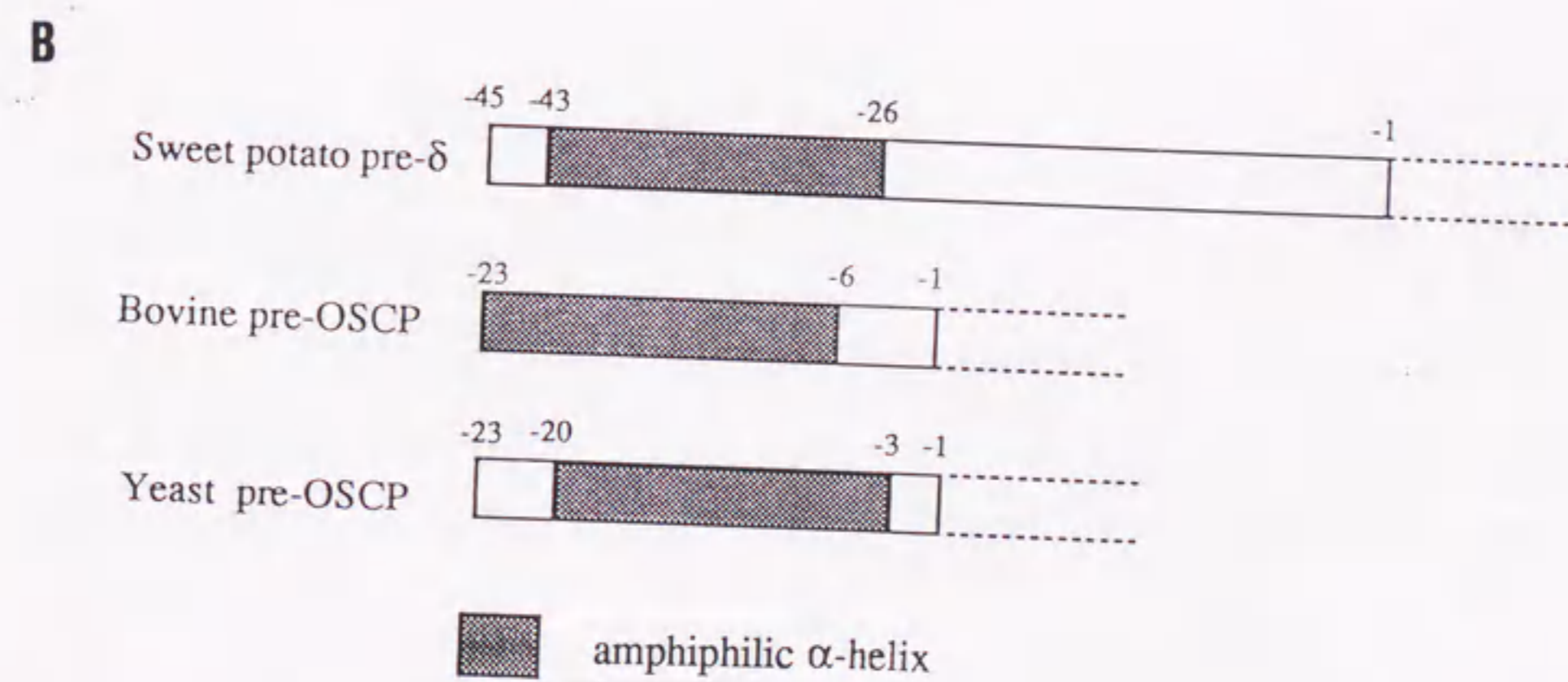
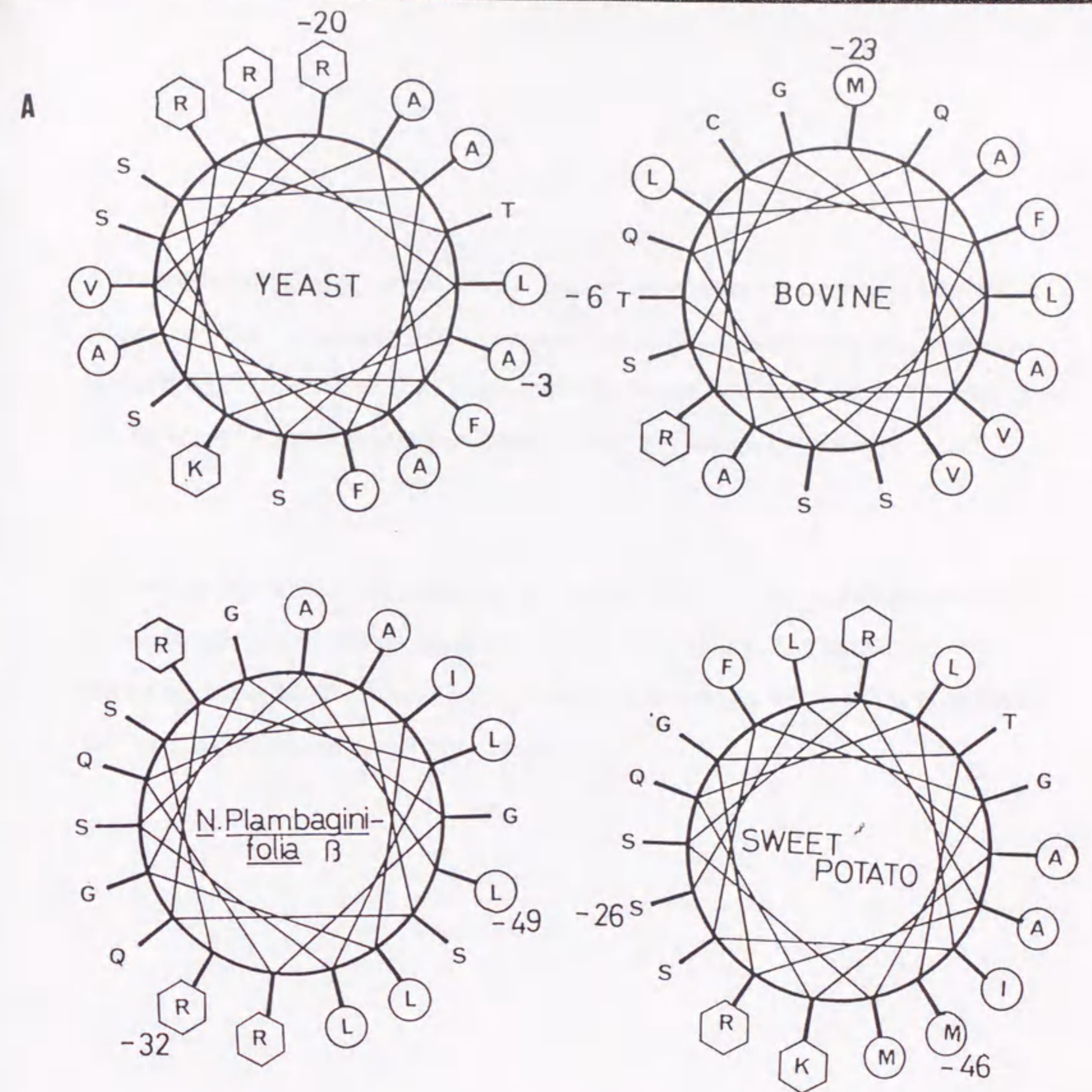




Fig. 3-17

**A** The amphiphilical  $\alpha$ -helix structures of N-terminal presequences of the pre- $\delta$ -subunits of sweet potato and *N. plumbaginifolia* mitochondrial F<sub>1</sub>ATPases and pre-OSCPs of yeast and bovine F<sub>1</sub>ATPases. The C-terminal amino acid of the presequence is numbered as -1 (see Fig. 3-16). Basic and hydrophobic amino acids are indicated by  $\square$  and  $\circ$ , respectively.

**B** Schematic illustration of the presequences of the pre-OSCPs of yeast and bovine and pre- $\delta$ -subunit of sweet potato. The presequences are indicated by box ( $\square$ ). Amphiphilical- $\alpha$ -helix regions are shaded ( $\blacksquare$ ). The number on the presequence indicate the amino acid position from the C-terminal amino acid of each presequence.

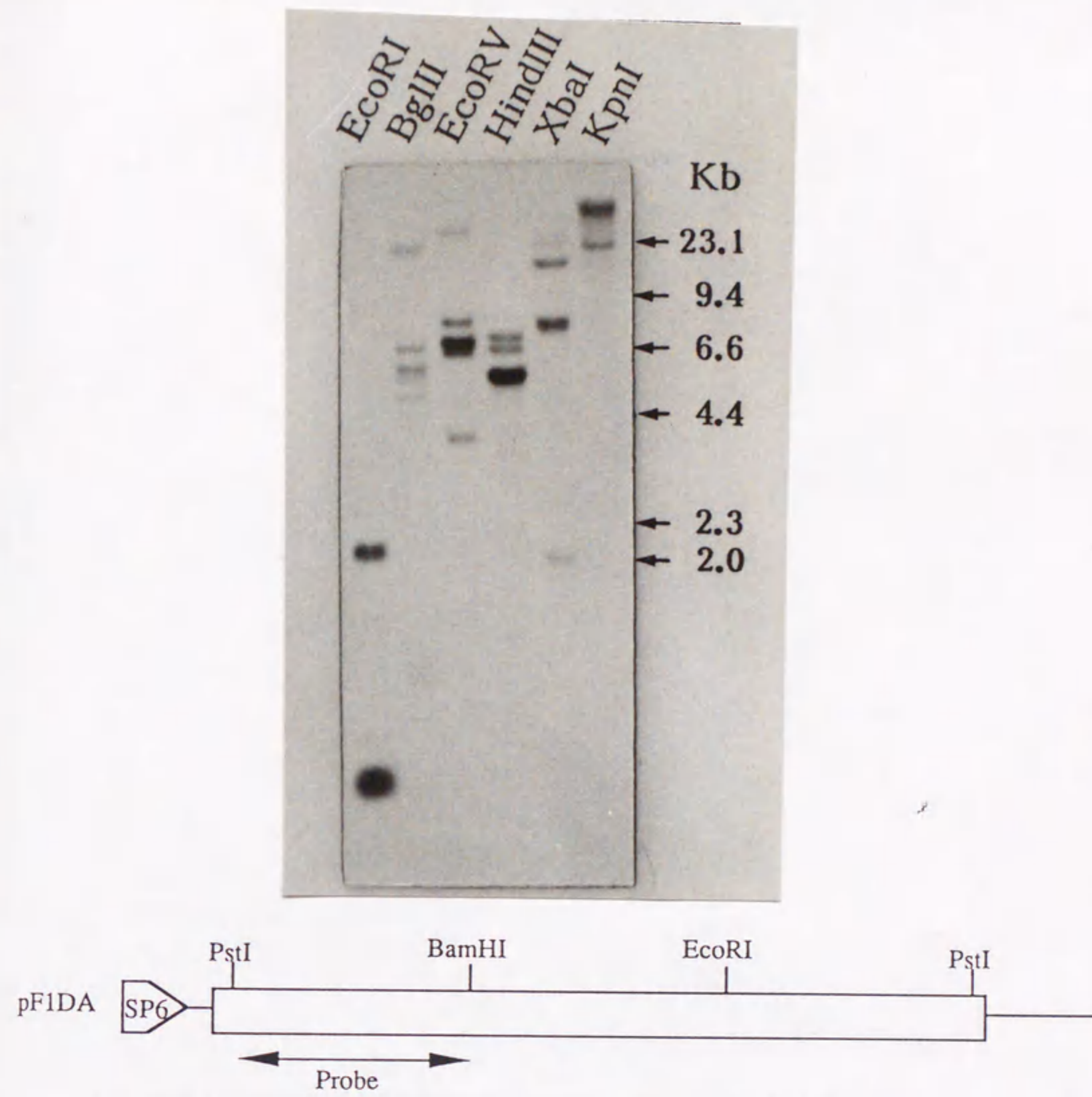


Fig. 3-18 Hybridization of restriction enzyme digests of sweet potato DNA with the  $\delta$ -subunit cDNA probe. Sweet potato DNA digested with restriction enzymes indicated in the figure was hybridized with a  $^{32}\text{P}$ -labeled 0.4kb PstI-BamHI fragment covering the 5' one-third of the pF1DA cDNA. The HindIII-digested fragments of  $\lambda$ phage DNA served as size standards.

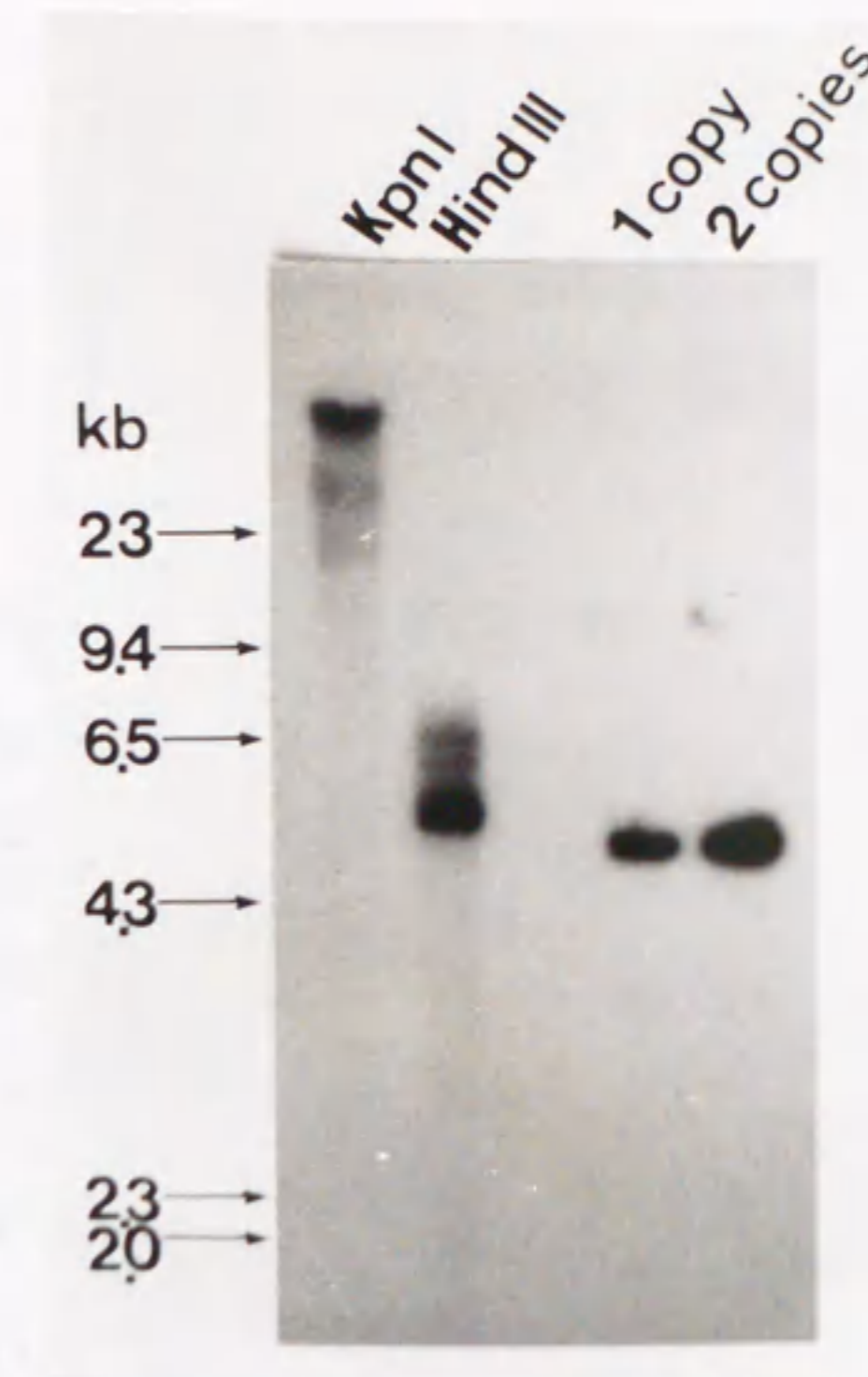


Fig. 3-19 Estimation of the  $\delta$ -subunit gene copy number from the hybridization intensity of bands on genome size of the sweet potato. Sweet potato DNA (11 $\mu$ g; DNA for haploid genome) digested with the restriction enzymes indicated in the figure was hybridized with a  $^{32}$ P-labeled probe (see Fig. 3-17). The cDNA (pF1DA) digested with HindIII was served as intensity standards.



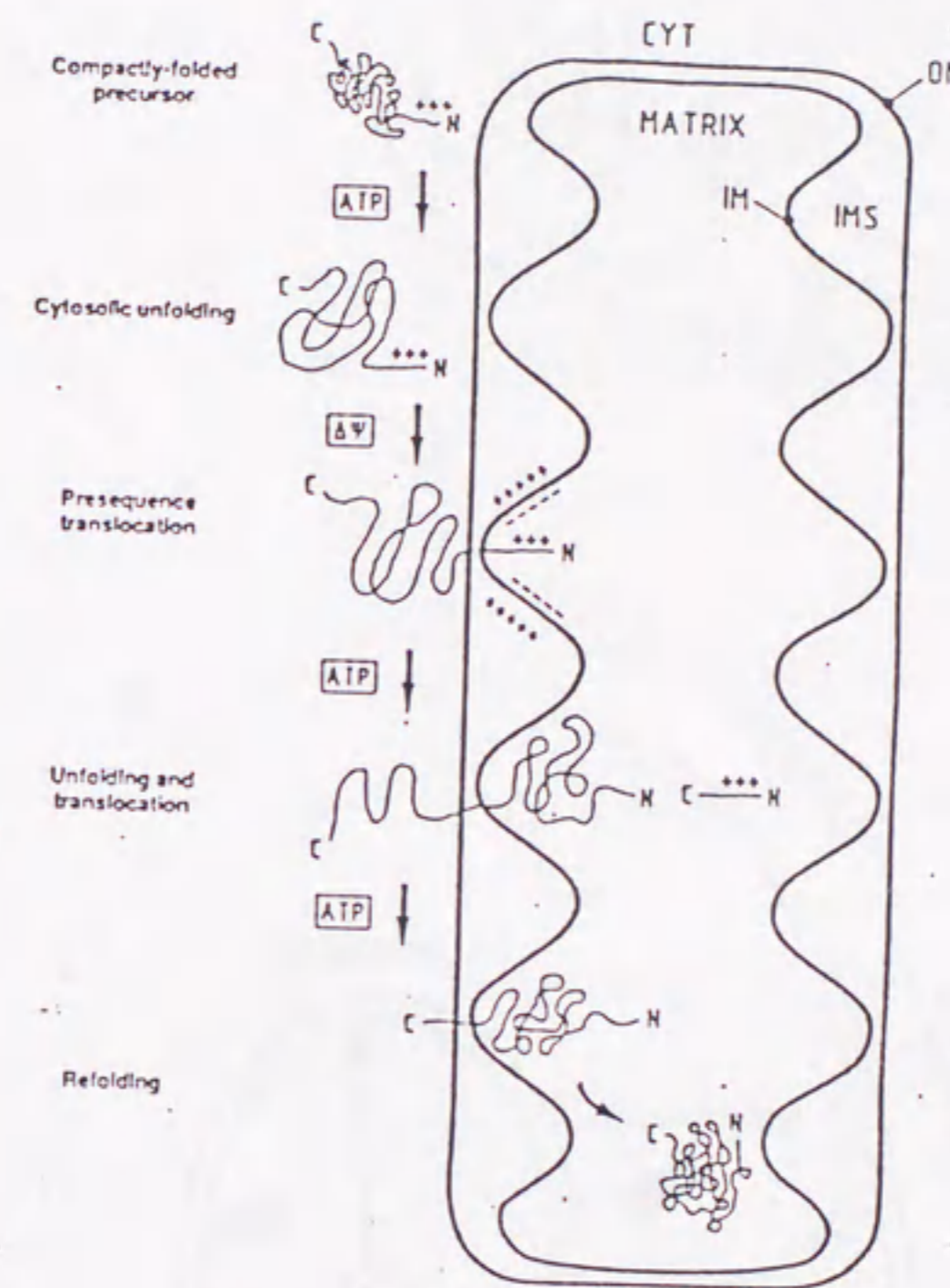


Fig. 3-20 Proposed model for the molecular mechanisms of post-translational protein import into mitochondria (from ref. 146). See text for details.

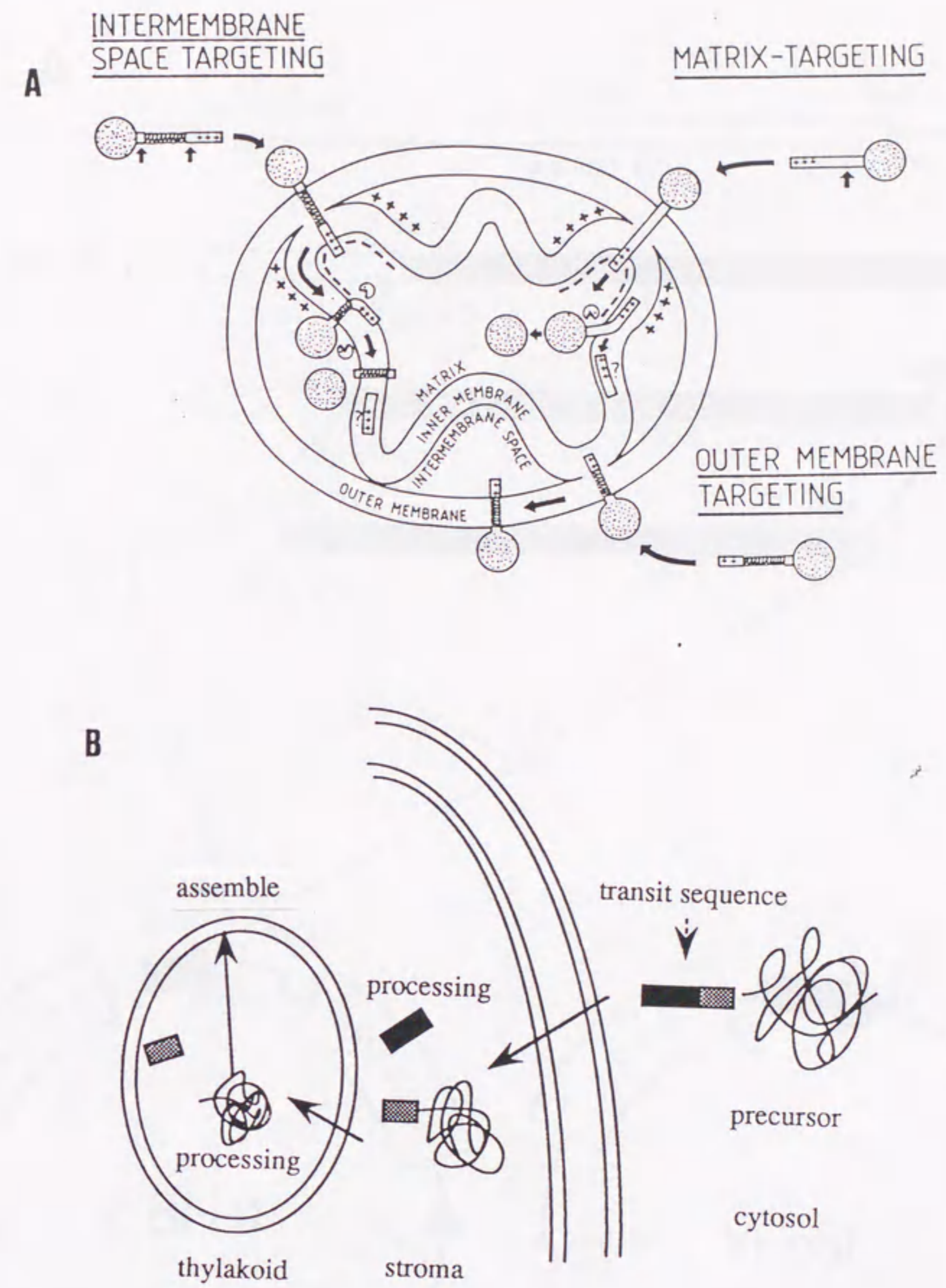
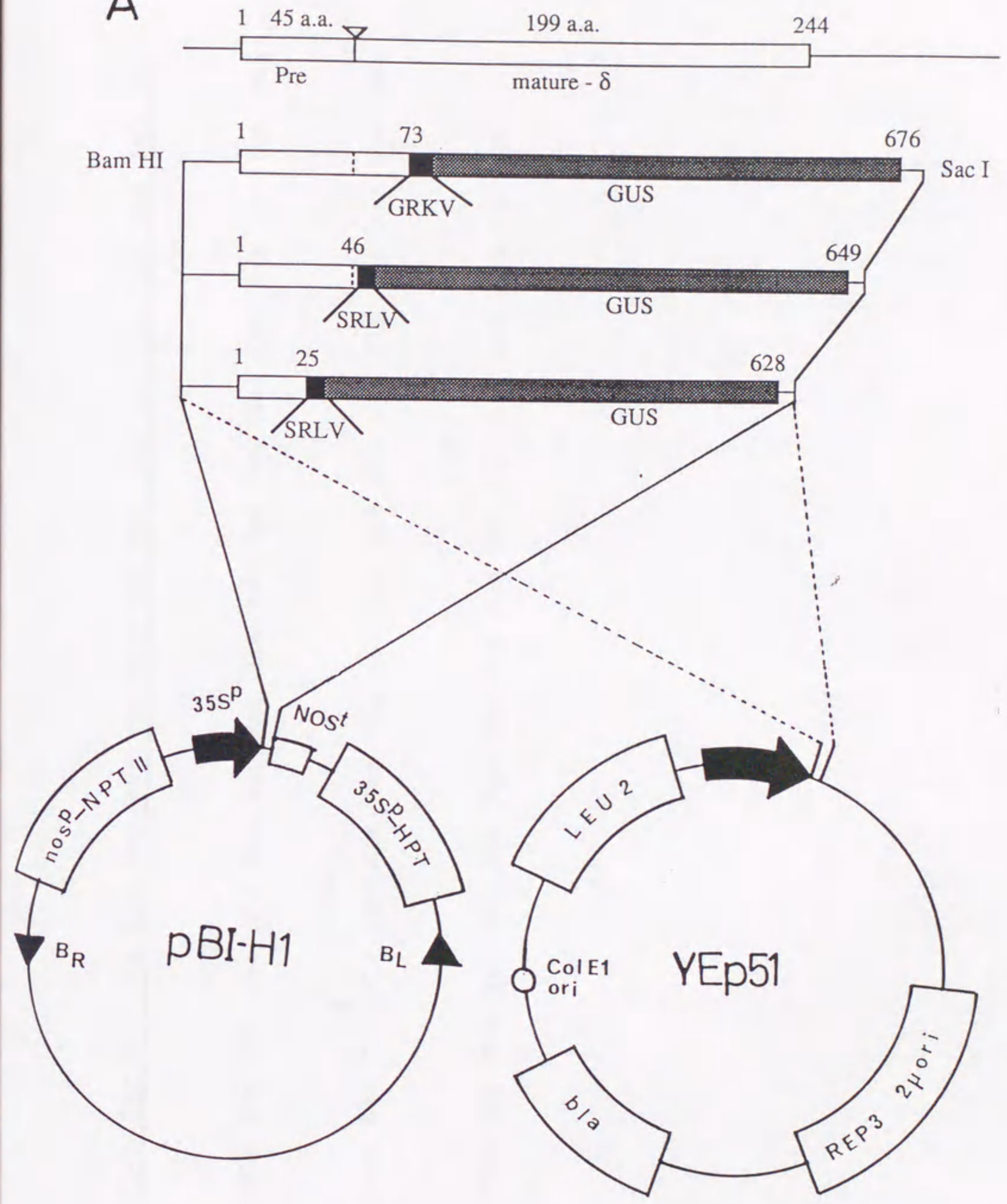


Fig. 3-21 Schematic illustration of intracellular protein targeting to mitochondria and chloroplasts (from ref. 158). See text for details. A: A model for mitochondrial protein sorting. B: A model for chloroplast protein sorting.

A





B

-43

Met Ala Met Thr Gly Arg Ala Arg Ser Met Gly Phe Ser Ile Leu Gln Lys Ala Leu Ser

-26

↓ DG25

Ser Ala Gln Arg Ser Asn Ala His Arg Ser Ile Leu Cys Pro Thr Leu Ser Asn Ser Glu

.1 ▲ +1 ↓ DG46

Leu Leu Arg Asn Tyr Ala Thr Ala Ser Ala Ser Lys Glu Gln Lys Ile Lys Val Pro Leu

↓ DG73

Thr Met Tyr Gly Val Ser Gly Asn Tyr Ala Ser Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Val Lys ---

Fig. 3-22 Fused proteins of GUS with N-terminal parts of the pre- $\delta$  subunit of sweet potato F<sub>1</sub>ATPase.

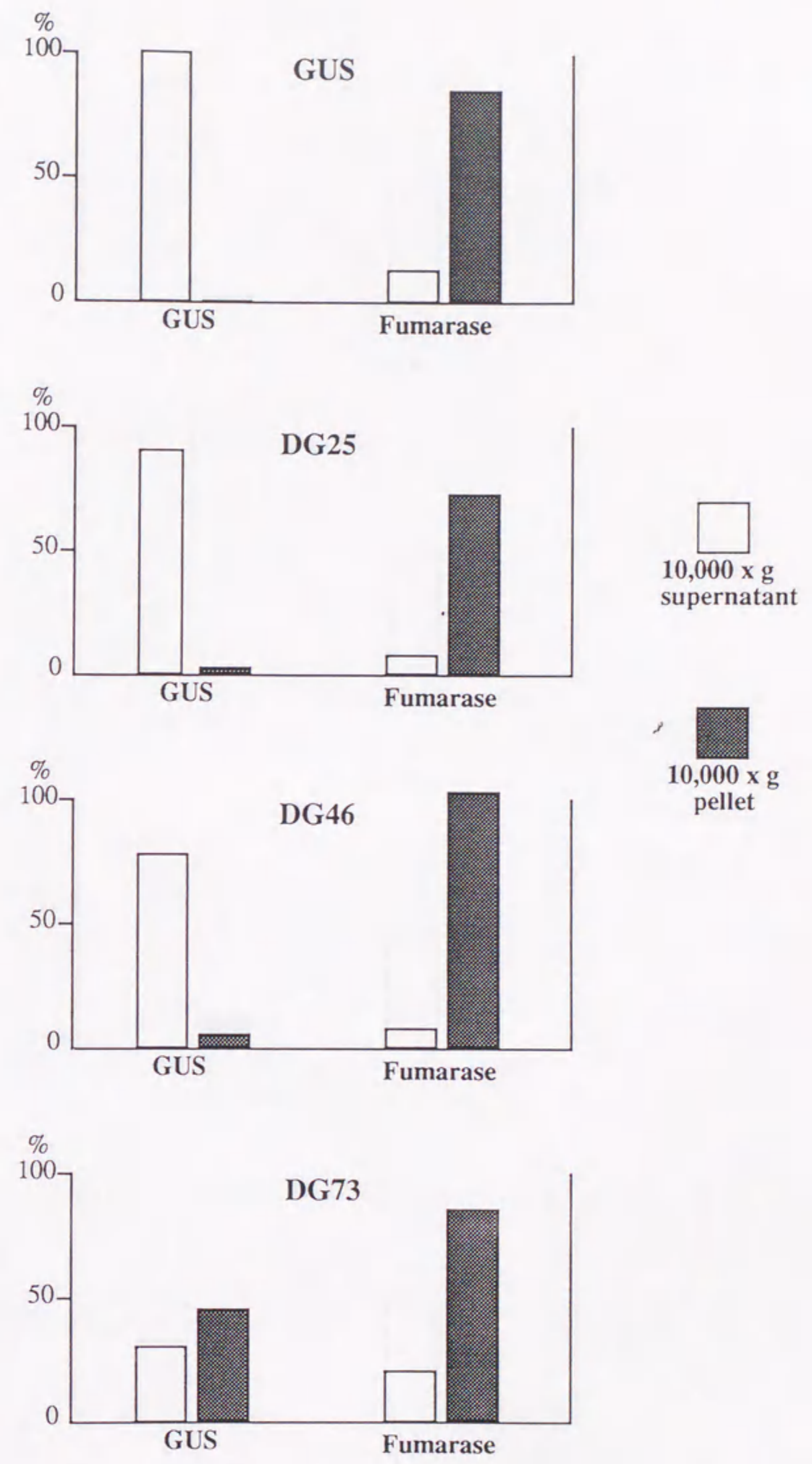
A: Structures of fused genes of the GUS gene with cDNA parts coding N-terminal parts of the pre- $\delta$  subunit. The coding part of the cDNA for the subunit is schematically shown on the top. The next three schemes show the structures of the fused genes for DG73, DG46 and DG25 in the vectors, pBI-H1 for tobacco and YEp51 for yeast. See text for details.

B: Amino acid sequence of N-terminal part of the pre- $\delta$  subunit. The triangle ( $\blacktriangledown$ ) indicates the processed site recognized by the mitochondrial signal peptidase. The sites of the N-terminal part fused with GUS in DG73, DG46 and DG25 are indicated by arrows ( $\downarrow$ ).

The underlined amino acid sequence is the putative amphiphilic  $\alpha$ -helix.

A  
(BY-2)

Percentage of Total Activity in Cell Extract



**B**  
**(Yeast)**

Percentage of Total Activity in Cell Extract

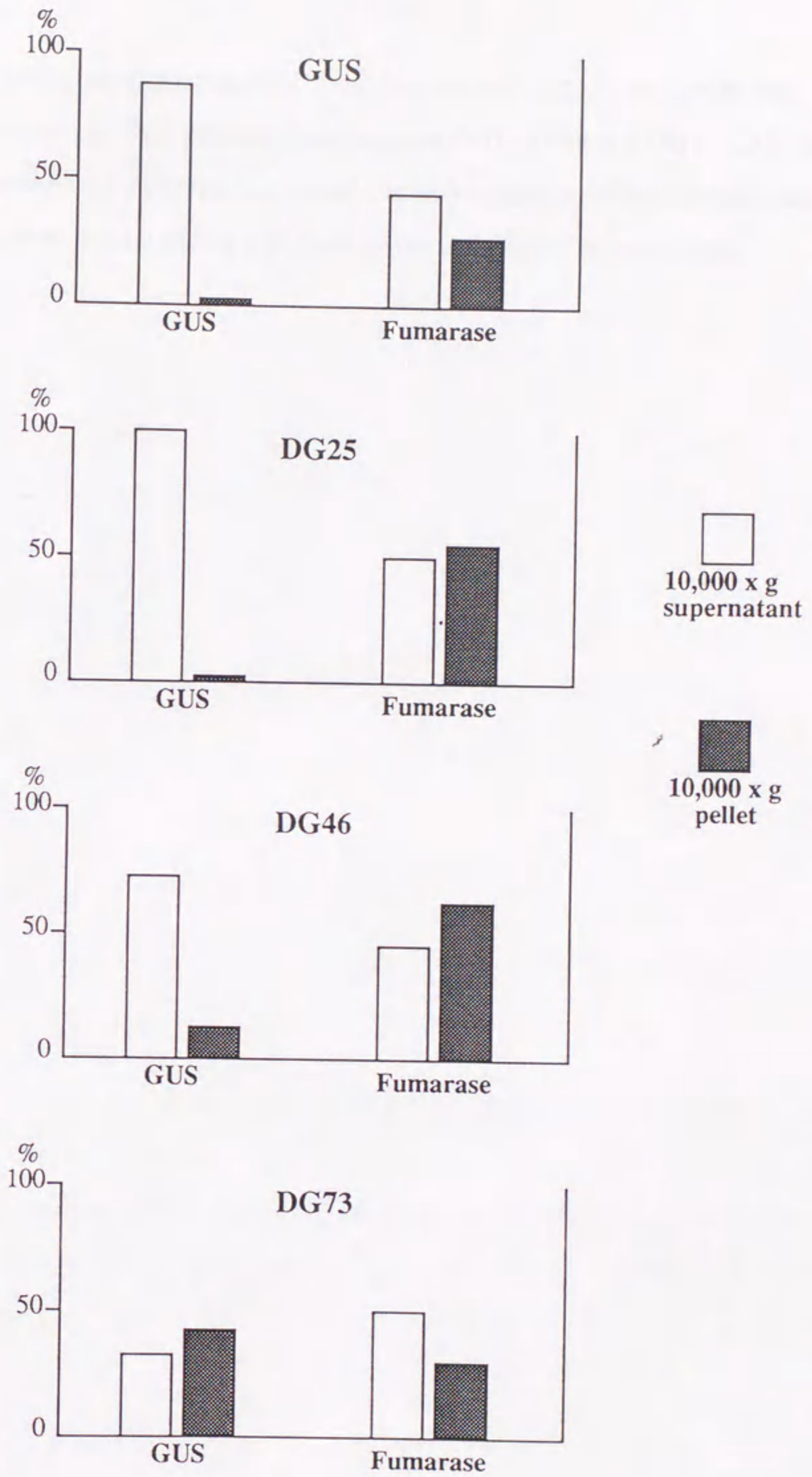


Fig. 3-23 Subcellular localization of GUS and fumarase in BY-2(A) and yeast(B) cells transformed with the GUS gene and fused genes for DG25, DG46 and DG73. GUS or fumarase activity in a 10,000xg supernatant (open bar) or pellet (solid bar) is expressed in percentage of the activity relative to the total activity in the original crude extract.



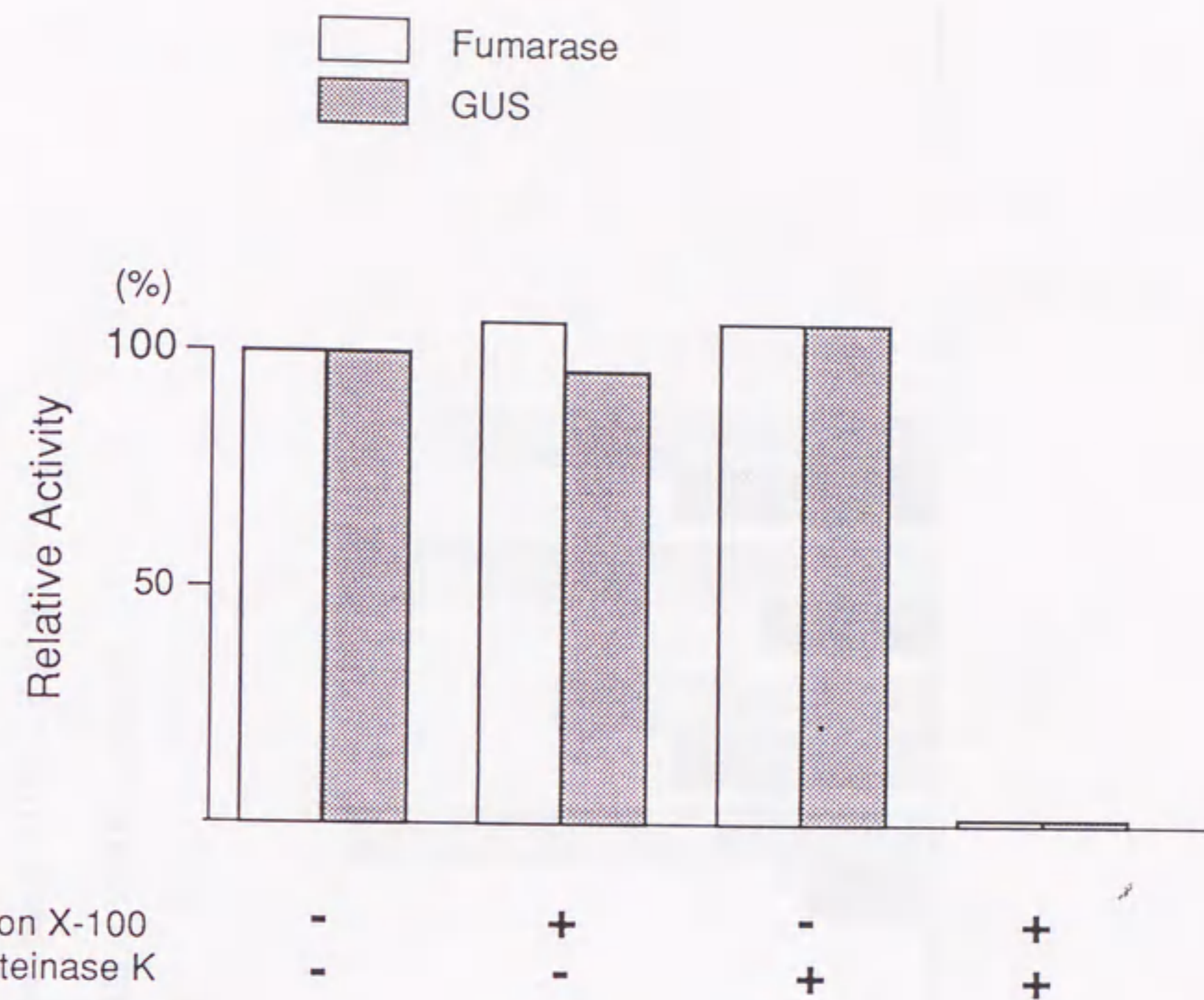


Fig. 3-24 Resistance to proteinase K treatment of GUS in purified mitochondria from transformed BY-2 which expresses DG73 protein. The mitochondria were incubated with proteinase K as described in Materials and Methods. The GUS (solid bar) or fumarase (open bar) activity is expressed in percentage of the activity after the treatment relative to that in the original sample.

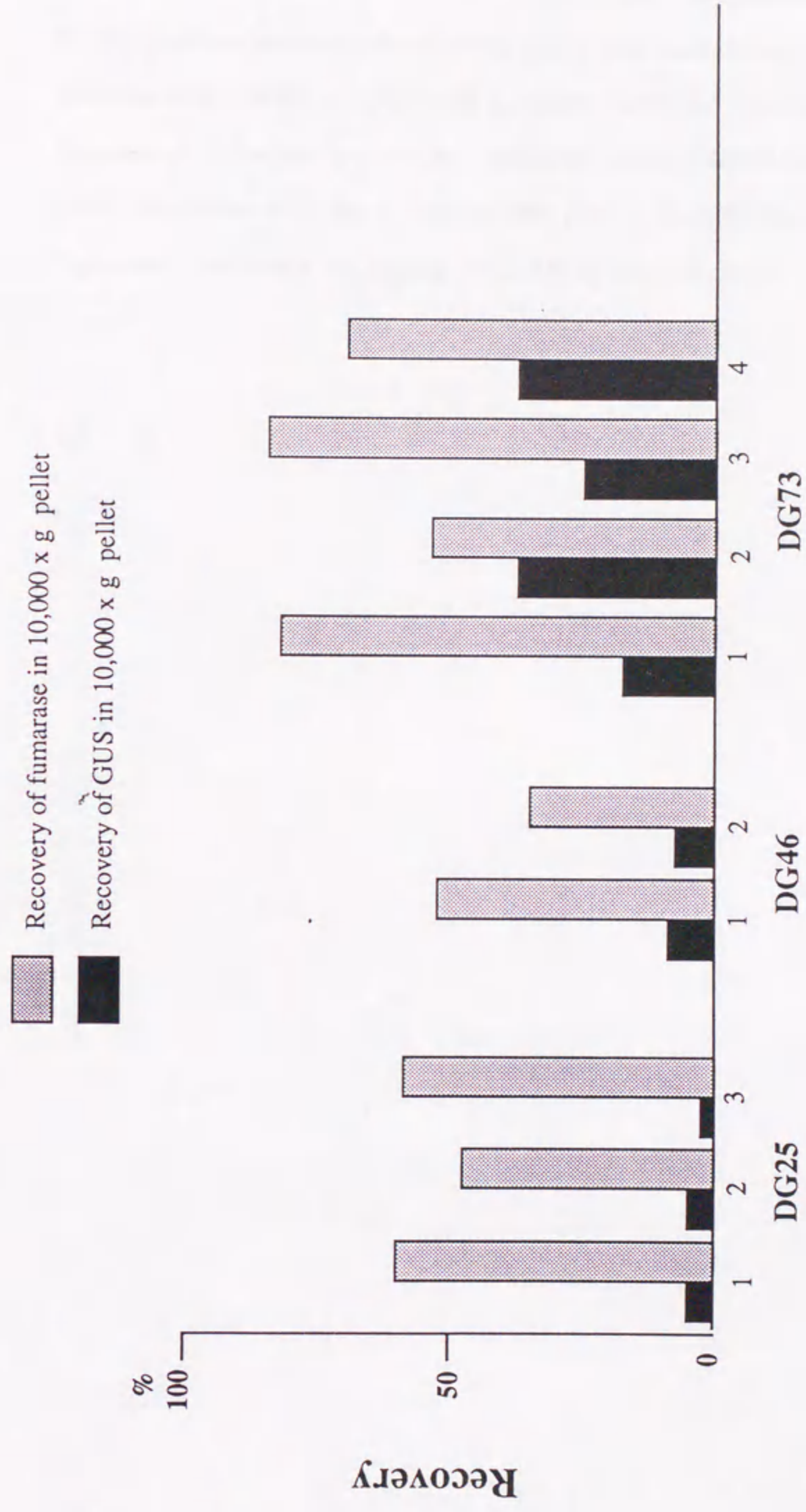
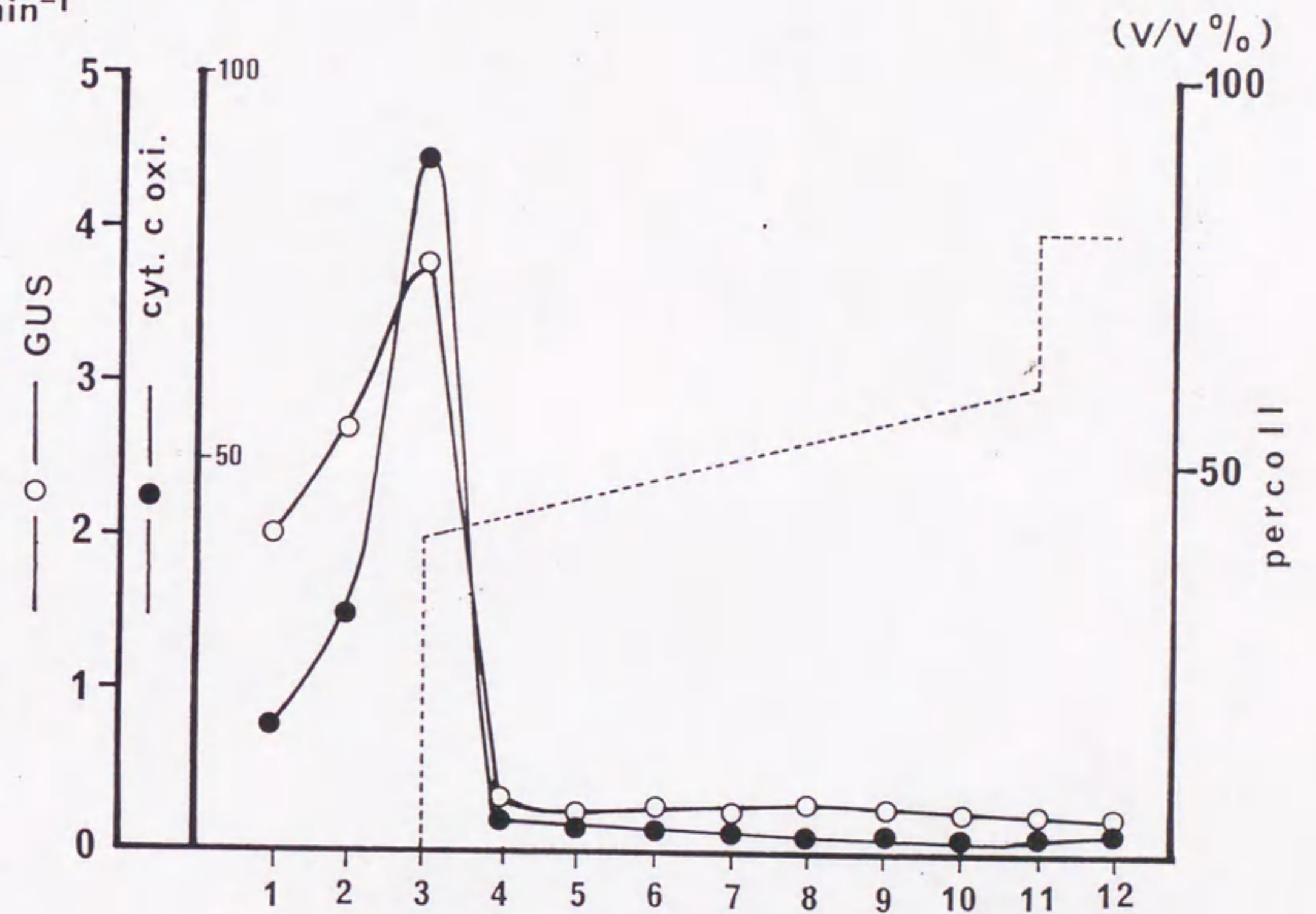


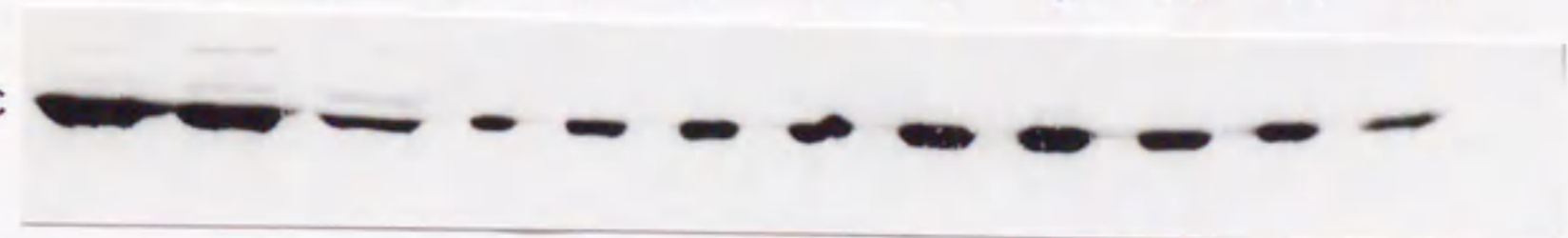
Fig. 3-25 Subcellular localization of GUS and fumarase in transgenic tobacco plants. The 10,000xg supernatants and pellets were prepared from transgenic tobacco plants carrying the genes for DG25, DG46 and DG73 and assayed for GUS and fumarase activities as described in Materials and Methods. The data with individual plants (4 for DG25, 2 for DG46 and 4 for DG73) are shown, GUS (■) or fumarase (▣) activity in a 10,000xg supernatant or pellet is expressed in percentage the activity relative to the original extract.



$\times 10^{-5}$   $\Delta 550\text{nm} \cdot$   
 $\mu\text{mol MU} \cdot$   
 $\text{min}^{-1}$   $\text{min}^{-1}$



Anti - rbc



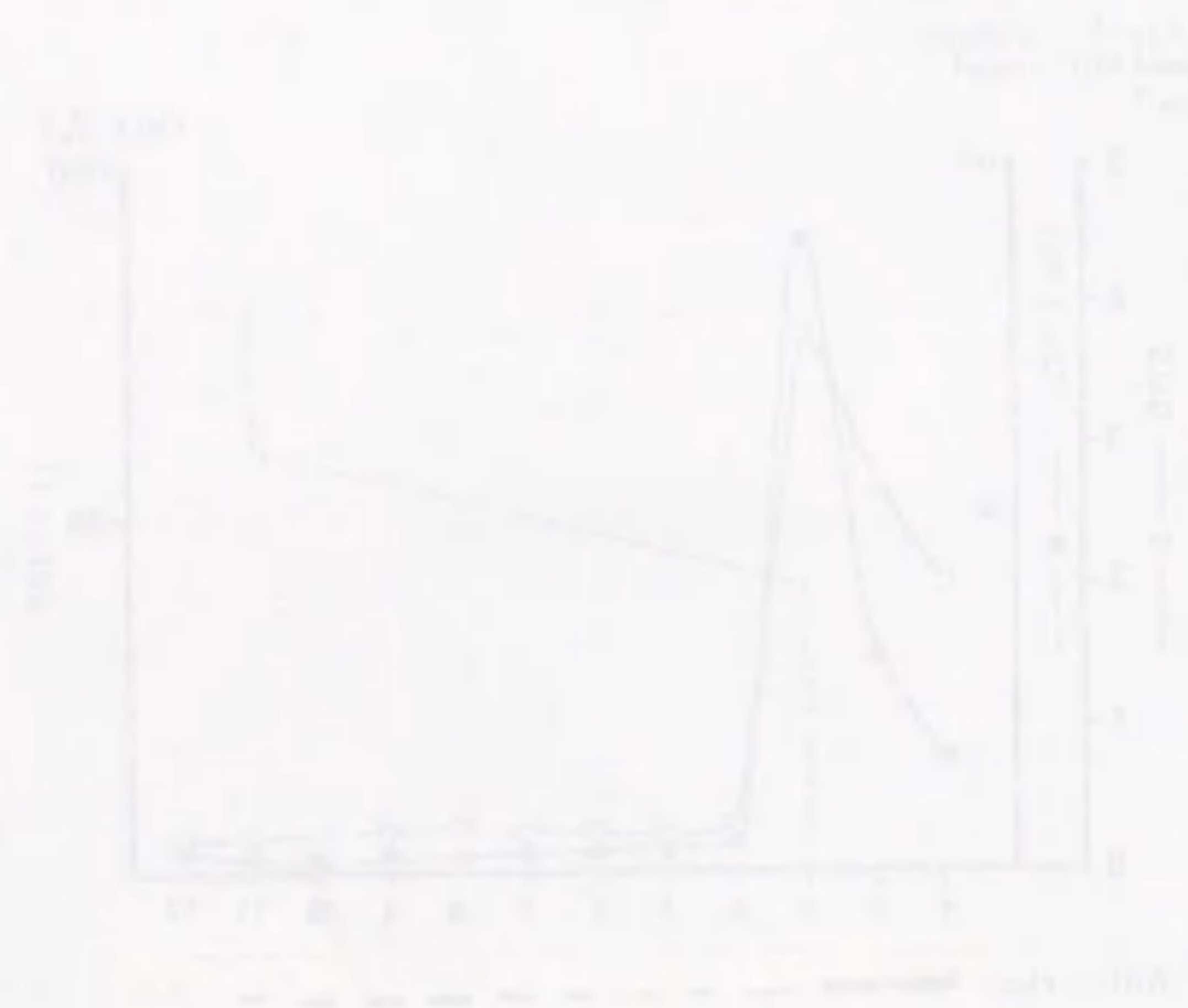
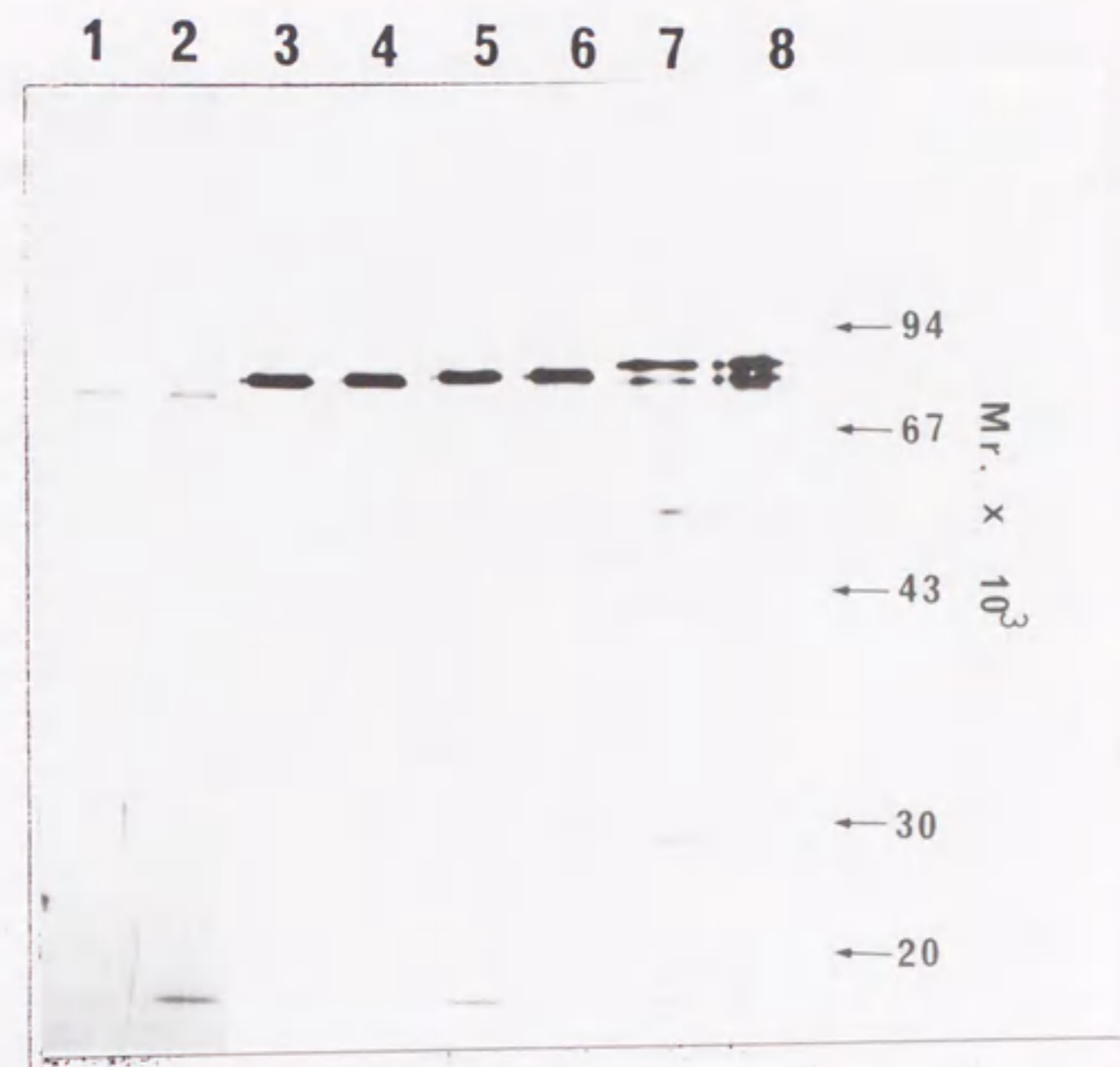
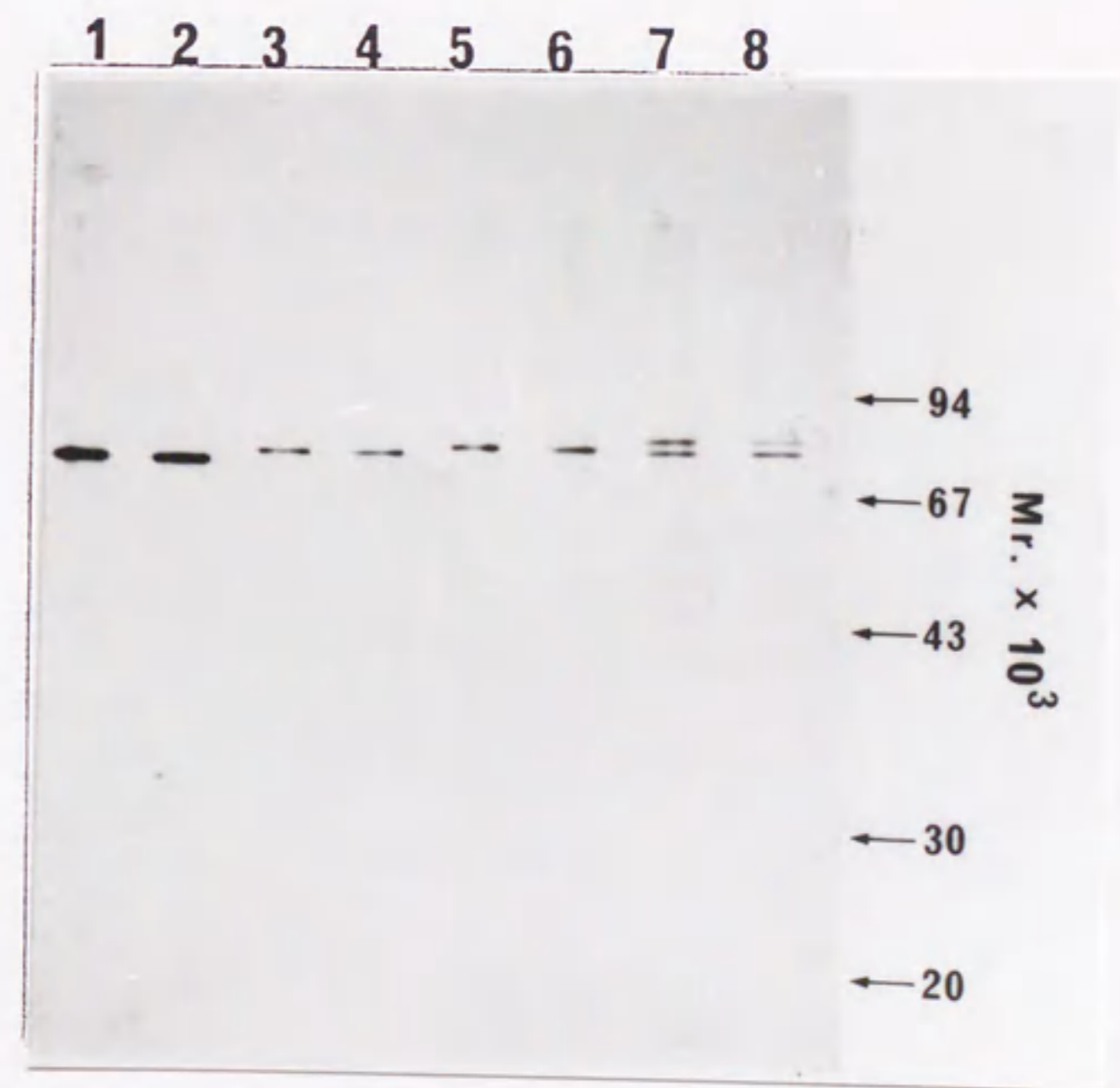


Fig.3-26 Distributions of GUS (●) and cytochrome c oxidase (○) activities and Rubisco large subunit after linear percoll density gradient centrifugation of the 10,000xg pellet from the leaves of transgenic tobacco plants carrying the fused gene for DG73. Rubisco large subunit was assayed by immunoblot analysis with antibody against subunit. The dotted line shows the concentration of percoll.

A



B



GUS DG25 DG46 DG73

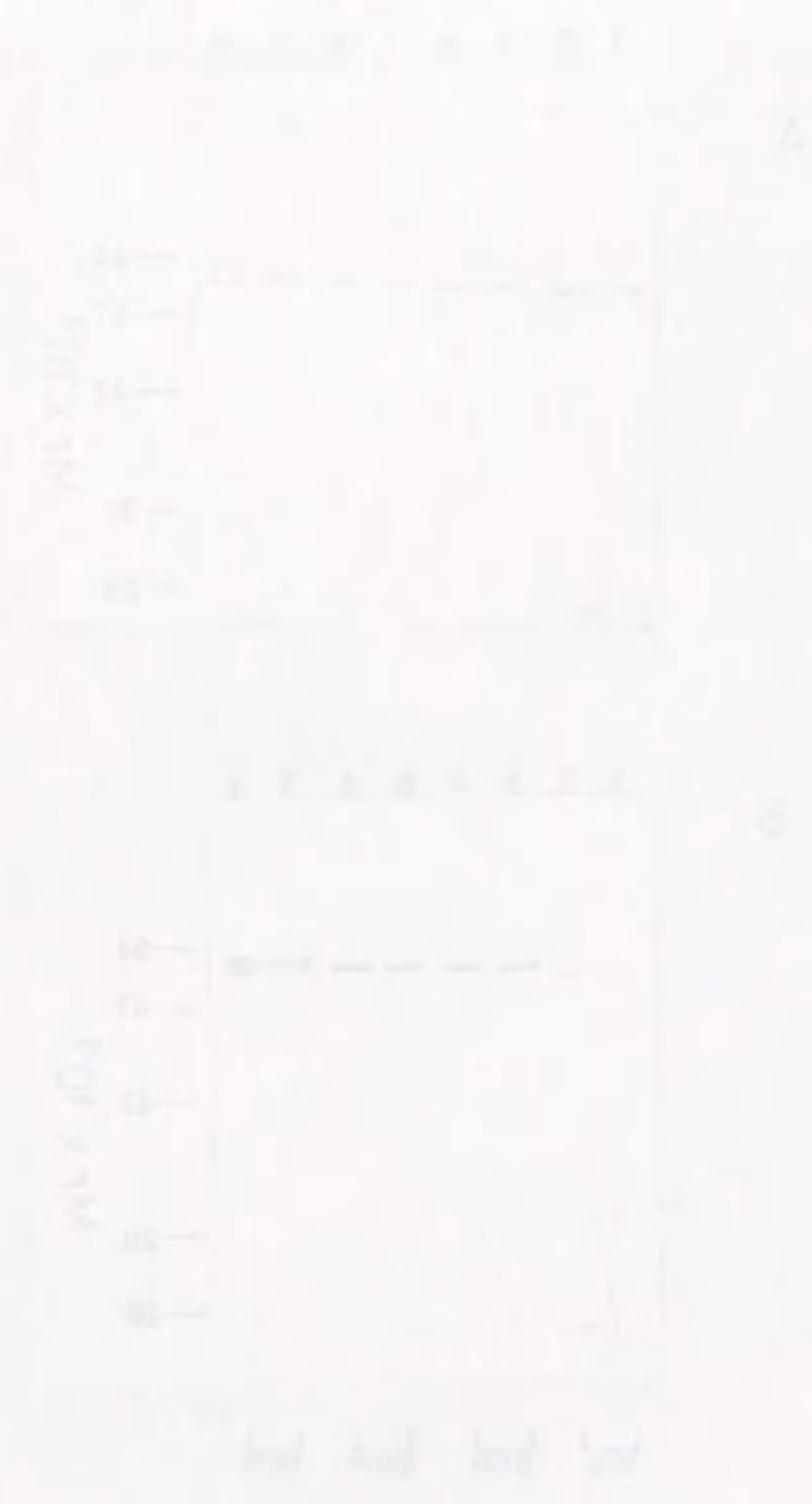


Fig. 3-27 Processing of fusion proteins in vivo. BY-2 (A) and Yeast (B) cells carrying the GUS gene (lanes 1 and 2) and the fusion genes for DG25 (lanes 3 and 4), DG46 (lanes 5 and 6) and DG73 (lanes 7 and 8) were labeled with  $\text{Tran}^{35}\text{S}$ -label and disrupted by sonication as described in Materials and Methods. Labeled protein was immunoprecipitated with anti-GUS antibody as described in Materials and Methods. Lanes 1, 3, 5 and 7, pulse labeled; lanes 2, 4, 6 and 8, chased with cold methionine and cysteine after pulse labeling.

Table 3-1  
Subunit molecular masses of higher plant mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase compared  
to F<sub>1</sub>ATPase subunits from several other sources

| Source                              | $\alpha$ | $\beta$ | $\gamma$ | $\delta$ | $\delta'$ | $\epsilon$ | Reference |
|-------------------------------------|----------|---------|----------|----------|-----------|------------|-----------|
| Plant mitochondrial F <sub>1</sub>  |          |         |          |          |           |            |           |
| Sweet potato                        | 52.2     | 51.5    | 35.5     | 27       | 23        | 12         | 117       |
| Pea                                 | 57       | 55      | 36.5     | 26.5     | 22.5      | 8          | 118       |
| Faba bean                           | 52       | 51      | 34       | 23.8     |           | 22.9       | 120       |
| Maize                               | 58       | 55      | 35       | 22       |           | 12         | 114       |
| Oat                                 | 58       | 55      | 35       | 22       |           | 14         | 115       |
| Animal mitochondrial F <sub>1</sub> |          |         |          |          |           |            |           |
| Bovine                              | 53       | 50      | 33       | 17       |           | 7.5        | 104       |
| Bacterial F <sub>1</sub>            |          |         |          |          |           |            |           |
| <i>E. coli</i>                      | 57.2     | 52.5    | 31.5     | 20.5     |           | 14.5       | 114       |
| Chloroplast CF <sub>1</sub>         |          |         |          |          |           |            |           |
| Maize                               | 60       | 56      | 40       | 22.5     |           | 15.5       | 114       |



Table 3-2

Proposed correspondence of minor subunits of plant mitochondrial  
F<sub>1</sub>-ATPase to F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPase subunits from other sources

| Bacteria | Plant           |                              | Animal<br>Mitochondrial F <sub>1</sub> | Yeast<br>Mitochondrial F <sub>1</sub> |
|----------|-----------------|------------------------------|--|---------------------------------------|
|          | CF <sub>1</sub> | Mitochondrial F <sub>1</sub> |  |                                       |
| γ        | γ               | γ                            | γ                                      | (γ?)                                  |
| δ        | δ               | δ                            | OSCP                                   | OSCP                                  |
| ε        | ε               |                              | δ                                      | (δ?)                                  |
|          |                 | ε                            | ε                                      | ε                                     |
|          |                 | (δ?)                         |  |                                       |

Table 3-3  
Codon usages of various sweet potato mRNA

|     | Spo | β-Amy | Cat | F1-δ | CO-Vc |
|-----|-----|-------|-----|------|-------|
| Leu | 6   | 3     | 2   | 1    | 0     |
| TTA | 22  | 8     | 7   | 6    | 1     |
| TTC | 13  | 4     | 4   | 6    | 2     |
| CTT | 59  | 16    | 8   | 6    | 2     |
| CTC | 4   | 0     | 1   | 0    | 0     |
| CTA | 13  | 9     | 8   | 5    | 0     |
| CTG | 5   | 6     | 3   | 11   | 0     |
| TCT | 60  | 4     | 8   | 1    | 0     |
| TCC | 0   | 2     | 2   | 5    | 0     |
| TCA | 12  | 3     | 1   | 1    | 0     |
| TGG | 9   | 2     | 3   | 2    | 2     |
| AGT | 17  | 3     | 6   | 0    | 2     |
| AGC | 6   | 2     | 10  | 2    | 0     |
| CGT | 13  | 3     | 5   | 2    | 0     |
| CGC | 3   | 1     | 4   | 2    | 0     |
| CGA | 8   | 3     | 2   | 1    | 0     |
| CGG | 15  | 4     | 8   | 4    | 1     |
| AGA | 9   | 8     | 7   | 5    | 1     |
| AGG | 8   | 9     | 4   | 7    | 5     |
| GTT | 41  | 9     | 13  | 2    | 0     |
| GTC | 16  | 4     | 2   | 3    | 1     |
| GTA | 36  | 16    | 11  | 5    | 2     |
| GTG | 7   | 5     | 4   | 4    | 0     |
| CGT | 34  | 7     | 11  | 2    | 0     |
| CCC | 8   | 8     | 6   | 3    | 1     |
| CCA | 24  | 9     | 14  | 0    | 0     |
| CCG | 17  | 4     | 10  | 3    | 0     |
| ACT | 35  | 7     | 12  | 5    | 0     |
| ACC | 7   | 3     | 4   | 8    | 1     |
| ACA | 28  | 3     | 4   | 0    | 0     |
| ACG | 17  | 11    | 7   | 9    | 1     |
| GCT | 59  | 15    | 14  | 6    | 1     |
| GCC | 6   | 8     | 2   | 7    | 1     |
| GCA | 17  | 6     | 5   | 0    | 1     |
| GCG | 0   | 6     | 5   | 1    | 6     |
| GGT | 48  | 12    | 11  | 2    | 1     |
| GGC | 14  | 10    | 8   | 5    | 1     |
| GGA | 18  | 13    | 3   | 4    | 0     |
| GGG |     |       |     |      |       |

|     | Spo | β-Amy | Cat | F1-δ | CO-Vc |
|-----|-----|-------|-----|------|-------|
| Ile | 13  | 7     | 10  | 11   | 1     |
| ATT | 46  | 15    | 16  | 0    | 1     |
| ATC | 7   | 1     | 2   | 2    | 0     |
| ATA | 10  | 6     | 9   | 4    | 1     |
| TTT | 66  | 16    | 21  | 6    | 2     |
| TTC | 16  | 10    | 5   | 4    | 1     |
| TAT | 37  | 12    | 13  | 1    | 1     |
| TAC | 7   | 4     | 7   | 1    | 1     |
| CAT | 16  | 4     | 14  | 2    | 1     |
| CAC | 3   | 12    | 5   | 3    | 0     |
| CAA | 23  | 11    | 8   | 9    | 2     |
| CAG | 24  | 9     | 9   | 2    | 0     |
| AAT | 82  | 19    | 21  | 7    | 1     |
| AAC | 26  | 12    | 5   | 8    | 2     |
| AAA | 13  | 17    | 17  | 11   | 3     |
| AAG | 13  | 18    | 21  | 6    | 1     |
| GAT | 67  | 18    | 12  | 2    | 1     |
| GAC | 29  | 12    | 10  | 9    | 3     |
| GAA | 19  | 16    | 19  | 9    | 2     |
| GAG | 6   | 2     | 2   | 1    | 0     |
| TGT | 19  | 4     | 5   | 1    | 0     |
| TCC | 26  | 17    | 12  | 9    | 3     |
| ATG | 11  | 11    | 10  | 0    | 2     |
| TGG |     |       |     |      |       |

Table3-4  
Enrichment of GUS activity in purified mitochondria

|      | GUS (pmol MU / min / mg protein) |              |      | Fumarase (units / mg protein ) |              |      |
|------|----------------------------------|--------------|------|--------------------------------|--------------|------|
|      | 1000 x g<br>super                | Mitochondria | fold | 1000 x g<br>super              | Mitochondria | fold |
| GUS  | 1932                             | 206          | 0.11 | 2.1                            | 5.0          | 2.4  |
| DG25 | 21849                            | 3778         | 0.17 | 2.2                            | 30           | 14   |
| DG46 | 15118                            | 7236         | 0.48 | 2.1                            | 15           | 12   |
| DG73 | 11590                            | 126177       | 10.9 | 1.9                            | 22           | 7.1  |

A: 1,000xg supernatant    B: purified mitochondria     $\frac{B}{A}$  : fold

*[Faint, illegible text and table structure visible through the paper from the reverse side.]*

Table 3-5

Recovery of GUS and fumarase in 10,000xg pellet from different BY-2 transformant expressing DG73

| BY-2 No | GUS<br>pmolMU/min/mg protein | GUS<br>% of recovery in<br>10,000xg pellet | Fumarase<br>% of recovery in<br>10,000xg pellet |
|---------|------------------------------|--|---|
| 1       | 200                          | 79   | 61  |
| 2       | 1040                         | 76   | 100   |
| 3       | 1987                         | 69   | 93  |
| 4       | 15971                        | 63   | 100   |
| 5       | 32151                        | 56   | 90  |