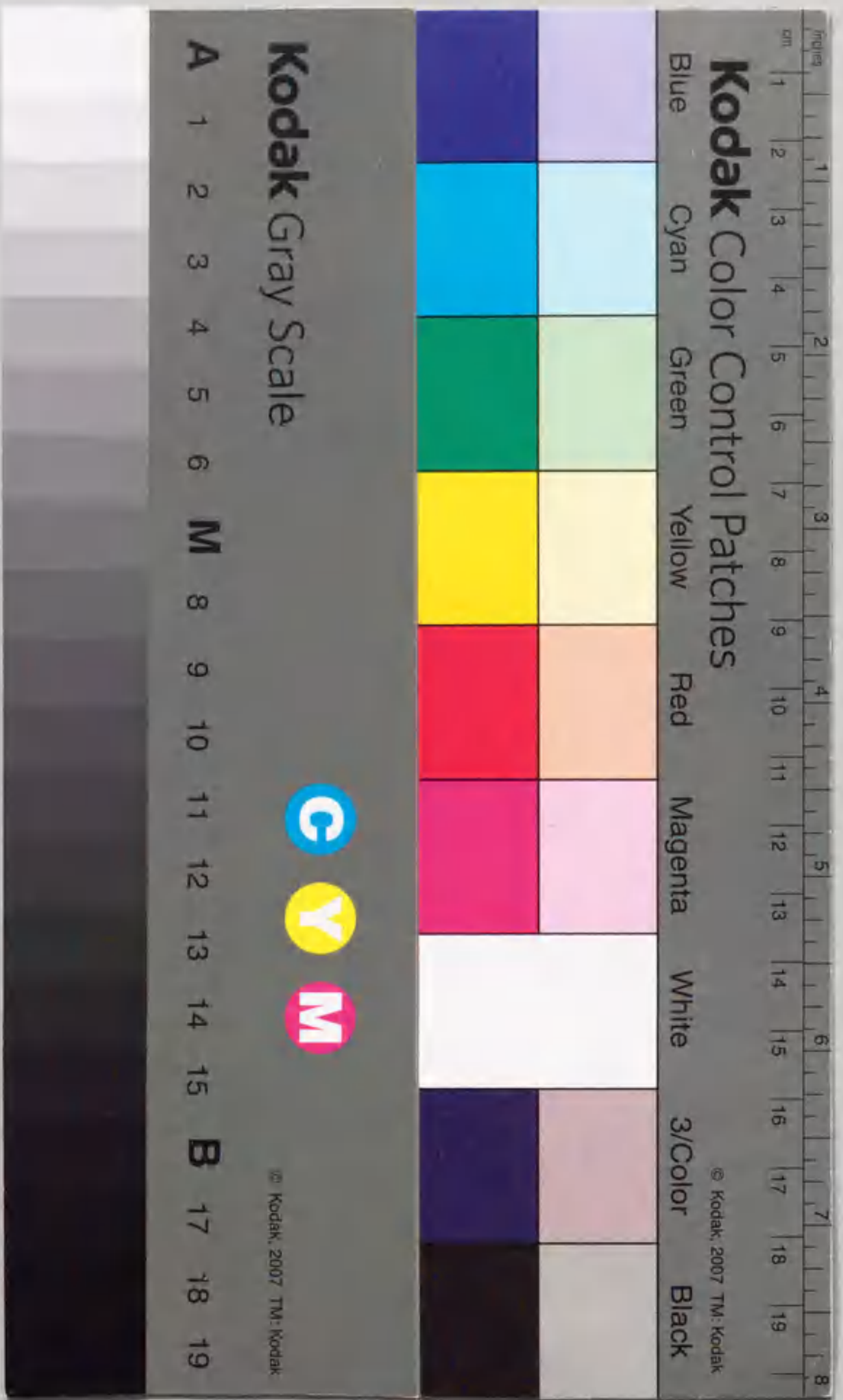


葉緑体のタンパク質輸送機構の解析

小題 第一



報告番 甲第 2801 号

1

# 葉緑体のタンパク質輸送機構の解析

1993年2月

名古屋大学大学院農学研究科  
生化学制御専攻

小西智一

## 図表一覧

### はじめに

- |  |        |
|--|--------|
| 図1 色素体の分化による形態とタンパク質の変化                | 5      |
| 図2 葉緑体の構造のモデル                          | 6      |
| 図3 研究を開始したときに明らかだった、タンパク質輸送に関する知見(モデル) | 7-10   |
| 図4 現時点で発表されている、タンパク質輸送に関するモデル          | 13, 14 |

### I部

#### 1章

- |   |        |
|---|--------|
| 図5 23-kDa と 33-kDa の cDNA の塩基配列         | 23, 24 |
| 図6 33-kDa の cDNA の転写反応のための鋳型の作製         | 25     |
| 図7 33-kDa の合成 mRNA とその翻訳効率              | 26     |
| 図8 カチオンの添加による 33-kDa の前駆体タンパク質の合成の効率の影響 | 27     |
| 図9 葉緑体に輸送された 33-kDa の PS IIからの検出        | 28     |

#### 2章

- |   |    |
|---|----|
| 図10 ATP に依存する、単離葉緑体の内部への 23-kDa 前駆体タンパク質の輸送         | 37 |
| 図11 輸送された 23-kDa の局在部位                              | 38 |
| 図12 23-kDa 前駆体タンパク質の ATP に依存する輸送に対する脱共役剤の影響         | 38 |
| 図13 ATP の pulse と照射の chase による 23-kDa 前駆体タンパク質の輸送実験 | 40 |
| 図14 ATP に依存する、単離葉緑体の内部への 33-kDa 前駆体タンパク質の輸送         | 41 |
| 図15 輸送のタイムコース                                       | 42 |
| 図16 輸送された 33-kDa の局在部位                              | 43 |
| 図17 ストロマから輸送された 33-kDa の成熟形タンパク質が検出された例             | 44 |
| 図18 33-kDa 前駆体タンパク質の ATP に依存する輸送に対する脱共役剤の影響         | 45 |
| 図19 ATP の pulse と照射の chase による 33-kDa 前駆体タンパク質の輸送実験 | 46 |
| 図20 照射による輸送反応における脱共役剤の影響                            | 47 |

表1	包膜とチラコイド膜の輸送装置の性質	48
3章		
図21	ストロマ画分による 23-kDa 前駆体の切断の産物と輸送中間体との分子量の比較	55
図22	ラジオシーケンスによる、切断の産物のN末端の決定	56
図23	23-kDa の輸送ペプチドの一次構造およびヒドロパシープロット	57
図24	高等植物の 23-kDa タンパク質の輸送ペプチドの一次構造	58
II部		
1章		
図25	整列化した、チラコイド内腔のタンパク質の輸送ペプチド	67
図26	Chou & Fasman のプログラムによる、ストロマ切断部位の二次構造の予測	69
図27	いくつかのユニットによる輸送ペプチドの構成のモデル	73
2章		
図28	23-kDa と 33-kDa の輸送ペプチドの保存領域をコードする塩基配列	81
図29	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の輸送ペプチドに見られるエキソン・シャフリングの痕跡 (モデル)	82
図30	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> とエンドウの 23-kDa と 33-kDa の輸送ペプチドの一次構造の比較	83
現在までの研究の成果と今後の展望		
図31	この研究から明らかになった葉緑体へのタンパク質輸送 ① (モデル)	86
図32	この研究から明らかになった葉緑体へのタンパク質輸送 ② (モデル)	87
図33	研究の進む方向についての予測 (モデル)	89

略号

CCCP	carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone
Chl	chlorophyll
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether) N,N'-tetraacetic acid
HEPES	N-2-hydroxypiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PS II	photosystem II
RuBisCO	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SDS	sodium dodecylsulfate
SS	small subunit
Tricine	N-tris(hydroxymethyl)methylglycine
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 概要

本論文は葉緑体へのタンパク質輸送に関して、第I部の試験管内の輸送系を使った実験と、第II部の輸送ペプチドの比較考察から、次のような新たな知見を報告したものである。

- ① 葉緑体は包膜とチラコイド膜に、独立して働くタンパク質の輸送装置を持っている。輸送されるタンパク質がそれぞれの膜を通過すべきか否かの情報はその輸送ペプチドに書かれていて、葉緑体の膜上の輸送装置がそれを認識する。タンパク質が葉緑体のどのコンパートメントに運ばれるかは、この輸送装置による認識で決定される。
- ② 輸送装置のうちチラコイド膜のもの、およびそれに認識される輸送ペプチドのドメインは、現在の原核生物の細胞膜や、ミトコンドリア内膜で知られているような輸送装置と同じ起源を持つと考えられる。
- ③ 包膜にある輸送装置はATPによって駆動される。この装置によって認識される輸送ペプチドのドメインは、おそらく共通のいくつかのmoduleに由来している。この装置についてはまだこれ以上の手がかりを得ていない。他の輸送の系にはない、葉緑体独自の輸送の系がもし存在するとしたら、それはこの輸送系である。
- ④ チラコイド内腔へ輸送されるタンパク質はストロマにおいて輸送ペプチドの一部を切り離されて中間体になる。ストロマにはこの中間体の被輸送活性を保持するための機構が存在する。
- ⑤ ストロマで被輸送活性を失った中間体タンパク質は光を要求する方法で速やかに分解される。被輸送活性の保たれやすさは、輸送されるタンパク質の一次構造によって異なる。
- ⑥ 輸送ペプチドはそのタンパク質の輸送先に応じて共通した構造を持つ。これらの配列は共通した始原的な module から進化したものと思われる。

## 目次

はじめに	1
第 I 部	
1 章 葉緑体タンパク質を単離葉緑体に輸送する実験系の確立	17
実験の材料と方法	17
実験の結果と考察	21
2 章 葉緑体タンパク質を輸送するために必要なエネルギー源の同定	30
実験の材料と方法	31
実験の結果	33
考察	48
3 章 23-kDa 前駆体タンパク質の、ストロマにおける切断部位の決定	52
実験の方法	53
実験の結果	54
考察	59
第 II 部	
1 章 チラコイド内腔のタンパク質のための輸送ペプチドの構造	61
実験の方法	62
実験の結果	64
考察	70
2 章 葉緑体はいかにして葉緑体になったのだろうか?	76
現在までの研究の成果と今後の展望	85
おわりに	91
謝辞	92
報文目録	93



1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70  
 71  
 72  
 73  
 74  
 75  
 76  
 77  
 78  
 79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100

1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70  
 71  
 72  
 73  
 74  
 75  
 76  
 77  
 78  
 79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100

## はじめに

葉緑体の起源は真核生物に共生したラン藻のような単細胞生物であると考えられている。葉緑体が独自のゲノムとその発現系を持っていることは、この考えを裏付ける一つの根拠である。しかし現在の葉緑体のゲノムは葉緑体のタンパク質の全てを踏っていない。むしろ葉緑体のタンパク質をコードする遺伝子の多くは核ゲノムにコードされている。これらのタンパク質は細胞質で前駆体として合成され、葉緑体の内部へと輸送される。

植物細胞はその分化に従って様々なタイプの色素体を持っており、葉緑体はそれら色素体の一つの形態である。色素体の分化は核の遺伝子の変異や、あるいは核遺伝子からの転写を止めることによって阻害される。そこでこの分化は核による支配を受けていると考えられている。この分化は、しばしばたいへん急速に進行する。たとえばエンドウのモヤシに光を照射すると、淡黄色のモヤシの葉は数十分の間に萌葱色をおびてくる。このとき細胞中では、葉緑体の前駆色素体であるエチオプラストからの葉緑体への移行が進行している。これら二つの色素体はその形態および機能が異なり、存在するタンパク質の種類も全く異なる(図1)。完成した葉緑体が持っているタンパク質の多くは、細胞質から運ばれたものである。

葉緑体は3種類の膜系から形成される複雑な構造を持つオルガネラである(図2)。タンパク質はその複雑な構造のなかの決った部位に局在して機能する。そこでタンパク質は本来あるべき部位に輸送される必要がある。葉緑体には、タンパク質を区別して輸送する機構があるはずだ。それはいったいどのような仕組みだろうか？

この論文は私が1987年より生化学制御研究施設の渡辺グループでおこなった研究の結果を、いくつかの独立した章にわけてまとめたものである。ここでは各章に書かれた研究の背景を説明するとともに、その内容について簡単に紹介する。

細胞内の膜を通過するタンパク質の輸送に関しては、動物細胞のER膜を経由する輸送と、大腸菌の内膜を通過する輸送について先駆的な研究がなされていた。当時、これらの研究は以下のような成果をあげていた。

- ① 輸送されるタンパク質の一次構造から、これら輸送されるタンパク質はN末端に輸送の信号となるシグナル配列を持っている。これは共通の配列を持たないが、共通したアミノ酸組成を持つ三つの領域、すなわち正の電荷を持ったN末端の領域・疎水性アミノ酸のクラスター・ターン構造のあとに Ala-X-Ala モチーフを持つC末端の領域から形成されており、ER膜と大腸菌内膜との二つの輸送系のタンパク質の間でたがいに似通っている (von Heijne 1985)。
- ② mRNA を試験管内で翻訳する実験系を用いて、これらの輸送を試験管内で再現する実験系が確立されていた。ER膜は脾臓のマイクロソーム画分を翻訳系に加えることで、また大腸菌は裏返した細胞膜の膜小胞を使うことで、これが可能になった。その結果、輸送に関わる因子として膜および可溶性のタンパク質因子が必須であることや、輸送には ATP などのエネルギーが必須であることがわかった。
- ③ ER の輸送系では、輸送されるタンパク質の翻訳が signal recognition particle (SRP) によって一次中断されること、またその後ドッキングタンパクとの会合で翻訳が再開されることがわかった。この SRP の構成要素は、その後に大腸菌からも発見された。
- ④ 大腸菌では、タンパク質の外膜への分泌ができなくなった温度感受性の変異株がいくつか得られ、その遺伝子がクローニングされた。

これらの知見を総合すると、図3、A、Bのようなモデルが考えられる。

葉緑体へのタンパク質輸送の研究は、これらよりも遅れて始まったが、次のようなことがわかっていった。まずこの研究を始める数年前から dideoxy chain termination 法による DNA の塩基配列の決定方法が普及しだしていた。ちょうどこの研究をはじめたころタバコとゼニゴケから葉緑体ゲノムの塩基配列の決定が完了し (Shinozaki et al. 1986, Ohyama et al. 1986)、また生化学的によく知られていたようなタンパク質の cDNA が次々にクローニングされ、その塩基配列が報告された。その結果として葉緑体のゲノムがどれほどの種類のタンパク質を供給できるかの見当がつきはじめ、核遺伝子に由来するタンパク質の多さがわかるようになった。また前駆体タンパク質のN末端部の構造(輸送ペプチド)も多く知られるようになり、また cDNA から合成された前駆体タンパク質を用いた、単離葉緑体へのタンパク質の輸送実験が行われるようになった。その結果、次のようなことがわかっていった(図3C)。

- ① 葉緑体は、シグナル配列に比べると長くて複雑な輸送ペプチドを持っていた。ストロマに運ばれるタンパク質には親水性の輸送ペプチドが、チラコイド内腔に運ばれるタンパク質にはさらにそのC末端側に疎水性のクラスターが存在していた。この疎水性のクラスターがチラコイド膜を通過するための信号であると推定されていた。
- ② ストロマに輸送されるタンパク質の前駆体は、葉緑体から抽出したストロマの粗画分とインキュベートすると切断されて成熟型の分子量になった。その結果、ストロマには前駆体を切断して成熟形にするためのタンパク質分解酵素が存在すると考えられるようになった。またチラコイド内腔へ輸送されるタンパク質の前駆体は、このストロマの粗画分とインキュベートすると切断されて中間的な大きさのタンパク質になった。
- ③ ストロマのタンパク質の前駆体を単離葉緑体に輸送した実験から、この輸送に ATP が必要であることが明らかになった。この輸送反応は包膜への前駆体の結合と、それに続くストロマへの輸送という二つの段階にわけることができると考えられるようになった。
- ④ RuBisCO のサブユニットの会合に働くと考えられるタンパク質が発見され、その会合に ATP が必要であることがわかった。このタンパク質の研究は、後に分子シャペロンの発見につながっていく。

ここまでの知見をモデルにすると、図3Cのようなものになる（当時の研究の状態の詳細については、それよりやや新しくなるが、巻末に添付した「葉緑体タンパク質—その生合成と遺伝子操作による改変—」を参照されたい）。

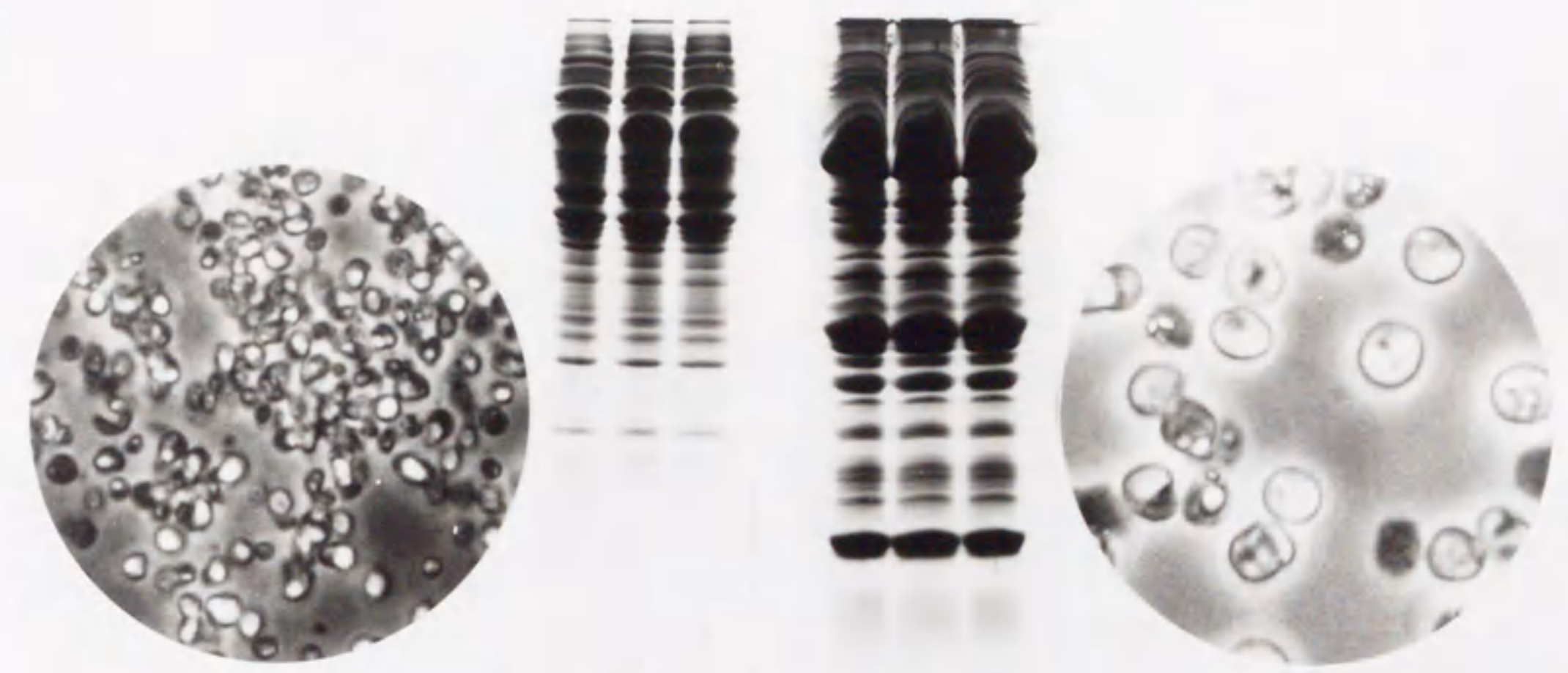
細胞質からミトコンドリアへの輸送は、現在もっともよく研究されているタンパク質の輸送系のひとつである。当時、すでに詳細な輸送に必要なエネルギー源が明らかになっていた（図3D）。

私は葉緑体のチラコイド内腔にタンパク質がどのように輸送されるのか、そのための装置はどのようなものかを調べるために、この輸送を試験管内で再現することにした。当時の渡辺グループはチラコイド内腔に局在する酸素発生系のタンパク質の cDNA をエンドウ緑葉からクローニングし、その塩基配列を決定する作業を行っていた。これらの cDNA を転写して mRNA を得、それを翻訳すればこれらのタンパク質の輸送前駆体を得ることができる。図3Cに明らかなように、当時の葉緑体の

タンパク質輸送の研究は、主にストロマのタンパク質の輸送に関して調べられており、チラコイド内腔のタンパク質についてはそのエネルギー源さえわかっていない状態だった。この輸送を研究するために、mRNA を翻訳して得た前駆体タンパク質をもちいて単離葉緑体への輸送実験を行った、いわば研究の緒にあたる内容を、本文の第 I 部 1 章に記した。またこの単離葉緑体を用いた実験系で、23-kDa タンパク質の輸送に必要なエネルギー源と、ストロマにおける輸送中間体の性質についての知見を得た内容を、第 I 部 2 章に記した。

23-kDa の前駆体タンパク質の輸送に際して、葉緑体のストロマに輸送中間体が観察された (I 部 2 章)。チラコイド内腔のタンパク質の前駆体をストロマ画分とインキュベートすると、前駆体と成熟型の中間的な大きさのタンパク質が得られることは以前から知られていた。ちょうど私が研究を開始したころ、Smeeckens ら (1986) が単離葉緑体を用いた輸送実験においてストロマにおける中間的なタンパク質が生成することを確認した。この研究の後、こうした中間体の生成が、生体内で実際におきている現象を反映していることが信じられるようになった。中間体の構造を調べるために、当時の渡辺グループでは丸田らが 23-kDa 前駆体を単離ストロマで切断し、中間的な大きさのタンパク質の N 末端を決定することを試みていた。ところがその後、粗ストロマ画分から複数のタンパク質分解酵素が発見され、粗ストロマ画分による前駆体タンパク質の切断という方法そのものの妥当性が疑問視されていた。実際、丸田らの中間的な大きさのタンパク質は、I 部 2 章で示した輸送中間体とは異なる分子量を示した。私はあらためてこの輸送中間体の N 末端を決定しなおすことにした。この結果を第 I 部 3 章に記した。

I 部 3 章で決定したストロマにおける前駆体タンパク質上の切断部位は、高等植物の 23-kDa タンパク質の輸送ペプチドの配列において保存されていた。それまで輸送ペプチドの一次構造からは共通する配列が見つかっていなかったもので、チラコイド内腔に輸送される他のタンパク質の前駆体にも同様の配列があるかどうかを調べたところ、これら前駆体の輸送ペプチドが以前に考えられていたよりも共通する構造を持っていたことが明らかになった。この内容を第 II 部 1 章に記した。この作業には核酸やアミノ酸配列のデータベースへの頻繁なアクセスが必要であった。この少し以前から名古屋大学の学内に光ケーブル (LAN) が新設され、ごく最近になって生化学制御研究施設の端末を通じて研究室よりデータベースとメールのやりとりができるようになったことが、この作業を可能にした。さらに輸送ペプチドそのものの起源、すなわち始原的な共生藻が現在の葉緑体になった過程について考察を深めた内容を第 II 部 2 章に記した。



proplastids

chloroplasts

図1 色素体の分化による形態とタンパク質の変化

単離した無傷葉緑体（右側）とプロプラスチド（左側）の位相差顕微鏡像を円内に、またそのタンパク質の SDS-PAGE による分離パターンを中央部に示す。プロプラスチドは未分化な細胞中に存在する色素体であり、これは細胞が光合成器官として分化していく過程で葉緑体へと変化する。SDS-PAGEによる分離パターンは、両者が持つタンパク質の種類がかなり異なっていることを示している。葉緑体はエンドウ緑葉から、またプロプラスチドはタバコ培養細胞 BY-2 のプロトプラストから単離した（単離の方法は巻末に添付した「葉緑体膜透過実験法」を参照されたい）。

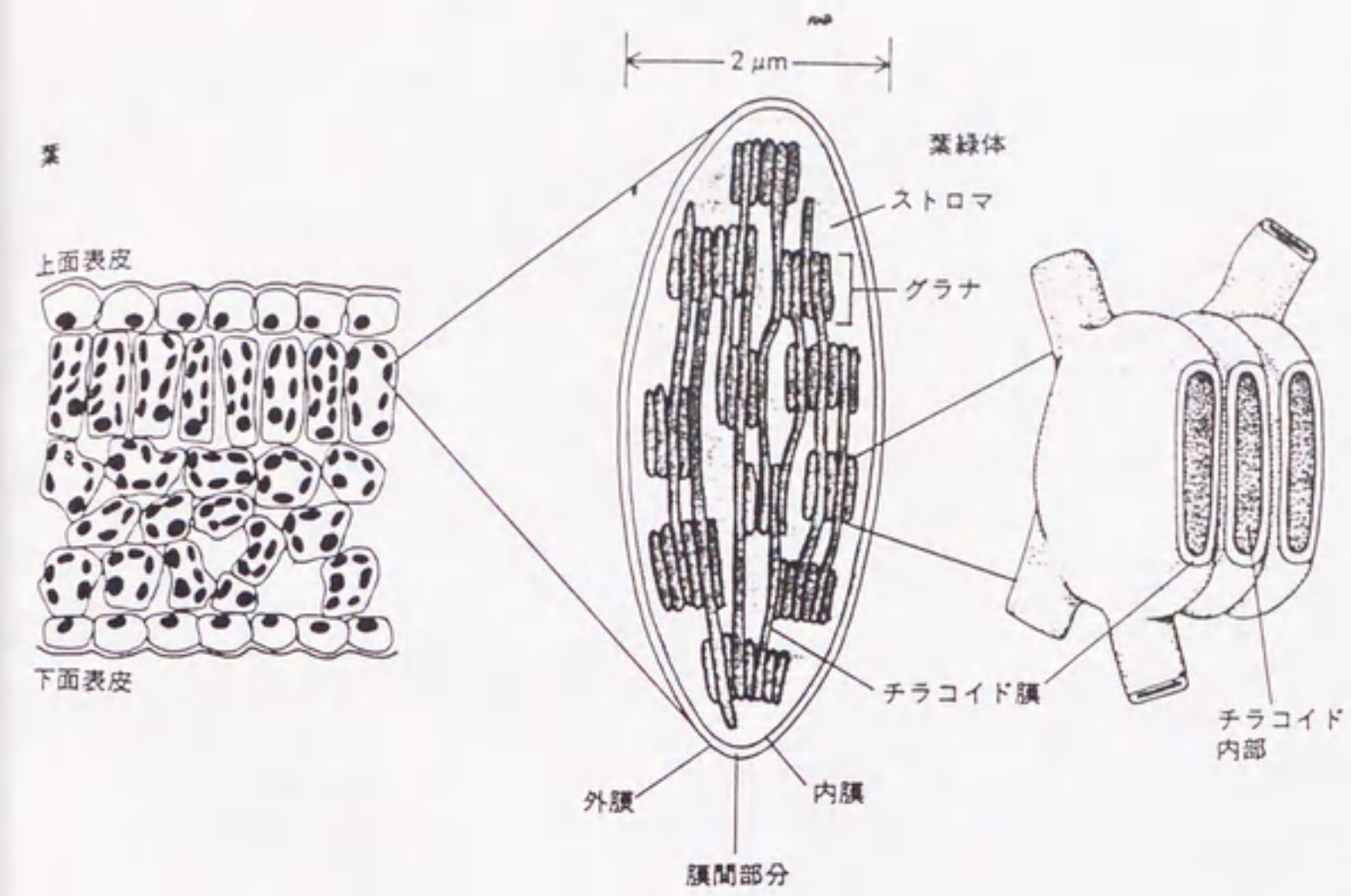


Fig. 7-38 葉緑体には3種類の膜, すなわち外膜, 内膜, チラコイド膜があって, 葉緑体を膜間部分, ストロマ, チラコイドに区分している。チラコイド膜には, 葉緑体のエネルギー生産系がすべて含まれている。電子顕微鏡で観察すると普通, チラコイド膜は偏平な小胞を包みこんだ別々の構造に分断されて見えるが(Fig. 7-39 参照), 葉緑体中ではおそらく単一の複雑に折りたたまれた膜系であると考えられている。図に示すように, チラコイドは相互に連結しており, 集積してグラナとよばれる層板状の構造をなしている。

図2 葉緑体の構造のモデル

細胞の分子生物学、(1989) Alberts, B. ら編、教育社、第2版 pp367 から転載。 葉緑体は外包膜と内包膜によって細胞質と隔てられている。内包膜の内側には、ゲノムの複製・発現や代謝・生合成の場であるストロマと、光合成の明反応による電子伝達系と ATP 合成の場であるチラコイドが発達している。チラコイドはプロプラスチドやエチオプラスチドには見られない構造である。

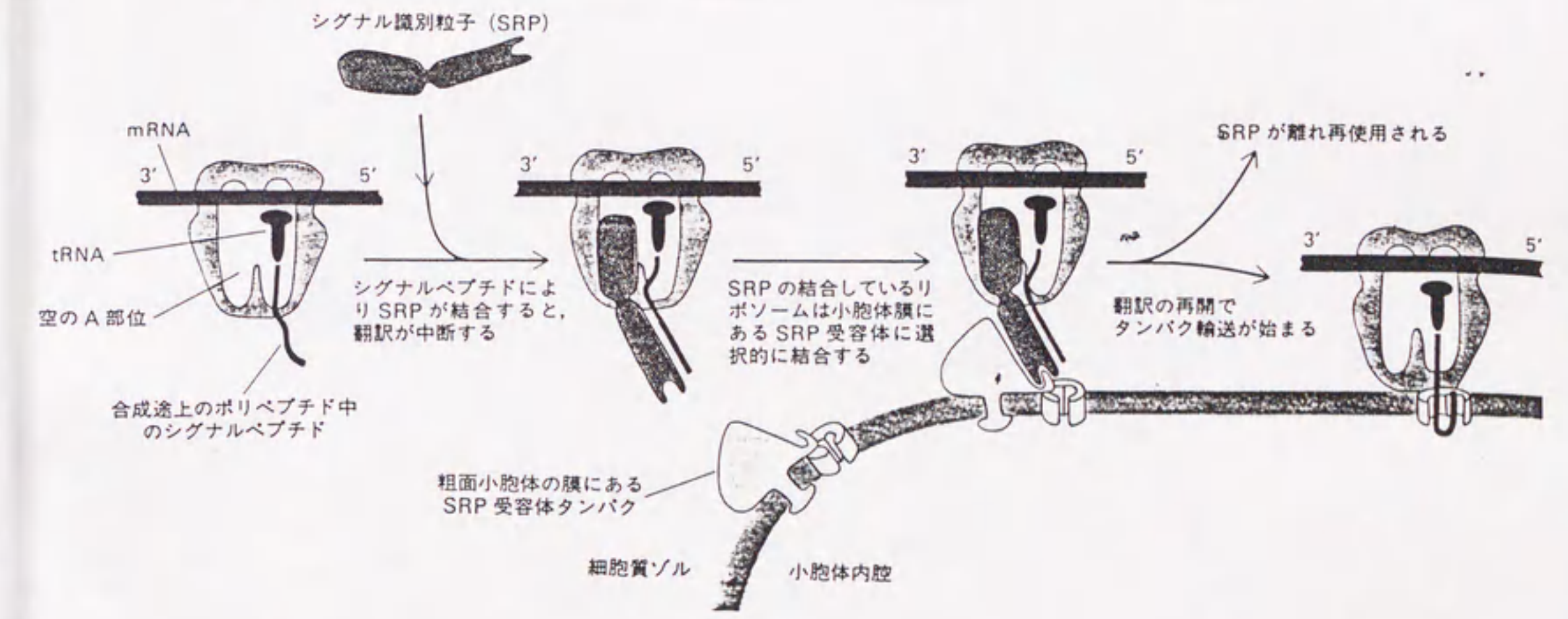
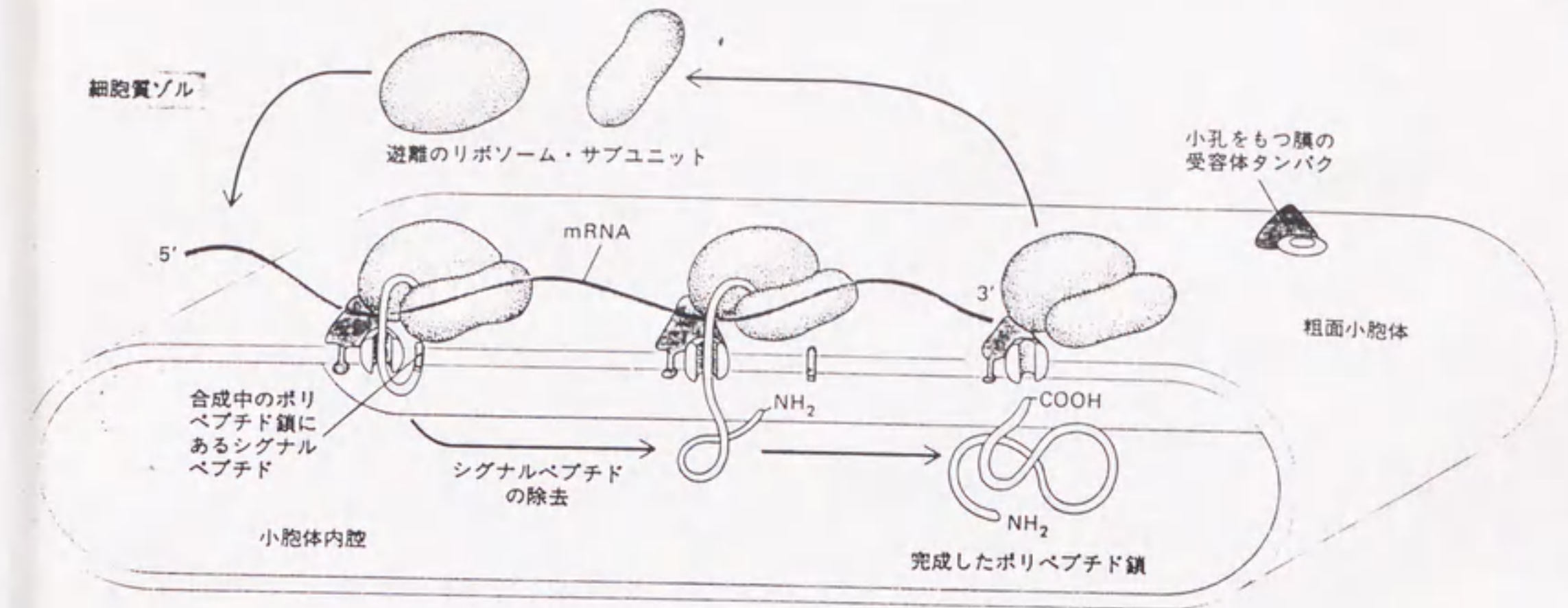


図3 研究を開始したときに明らかだった、タンパク質輸送に関する知見 (モデル)

A. ER 膜の輸送に関するモデル。細胞の分子生物学、(1989) Alberts, B. ら編、教育社、第2版 pp439 と pp440 から転載。



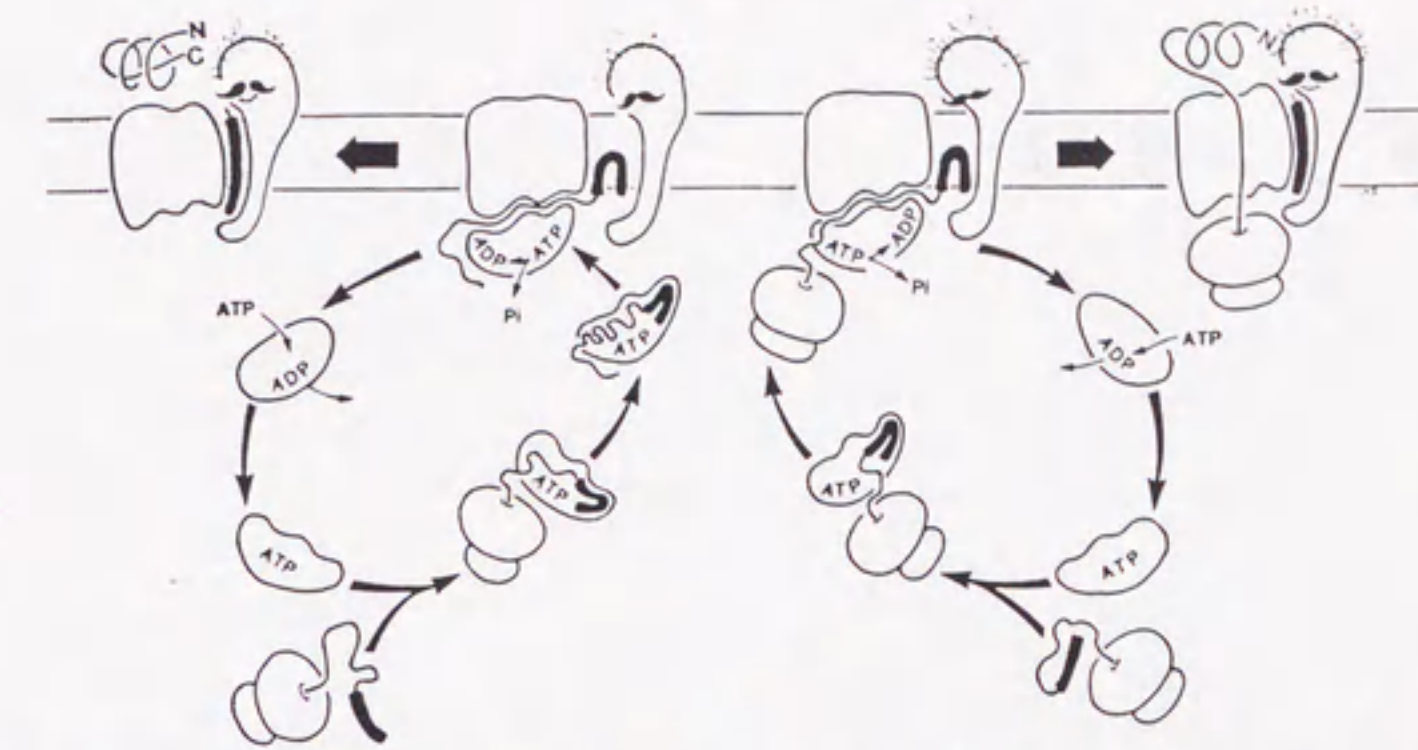


Figure 2 A speculative working model. Cotranslational export is illustrated on the right and posttranslational export on the left. The character in the membrane with the moustache is leader peptidase, and the other character represents the translocator. A cytosolic particle is included in the pathway and is discussed in the text.

図3 研究を開始したときに明らかだった、タンパク質輸送に関する知見（モデル）

B. 大腸菌の細胞質膜の輸送系に関するモデル。

ER 膜の輸送系で考えられている post-translational な輸送（右）との対比で説明されている（左）。Randall et al. (1978) *Ann. Rev. Microbiol.* 41: pp 532 より転載。この当時は、膜内在性の因子としてはシグナル配列を切断する酵素（図中にヒゲ付で描かれている）と SecY タンパク質だけが確認されていた。このころ発見された可溶性の因子（分子シャペロン）も描かれている。

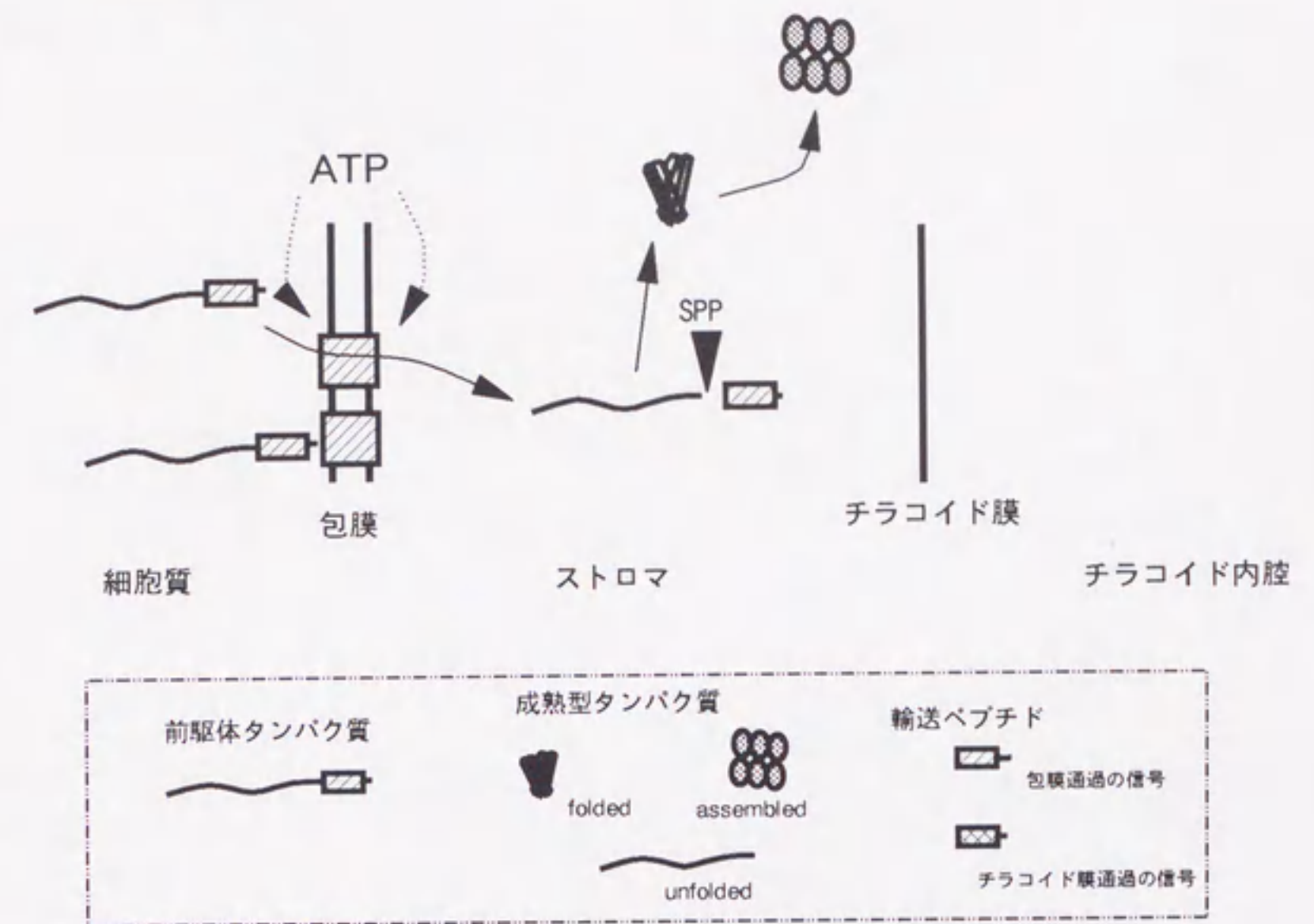


図3 研究を開始したときに明らかだった、タンパク質輸送に関する知見 (モデル)

C. 葉緑体の輸送系に関するモデル。当時は包膜を通過してストロマに至る輸送に関して調べられていた。前駆体タンパク質はATPの存在下で包膜と結合し、温度などの条件が整うとストロマへ輸送される。ストロマで前駆体タンパク質は輸送ペプチドを切り離される。この時点ではチラコイド膜内腔に至る輸送に関しては、その輸送ペプチドの一次構造のみが知られていた。

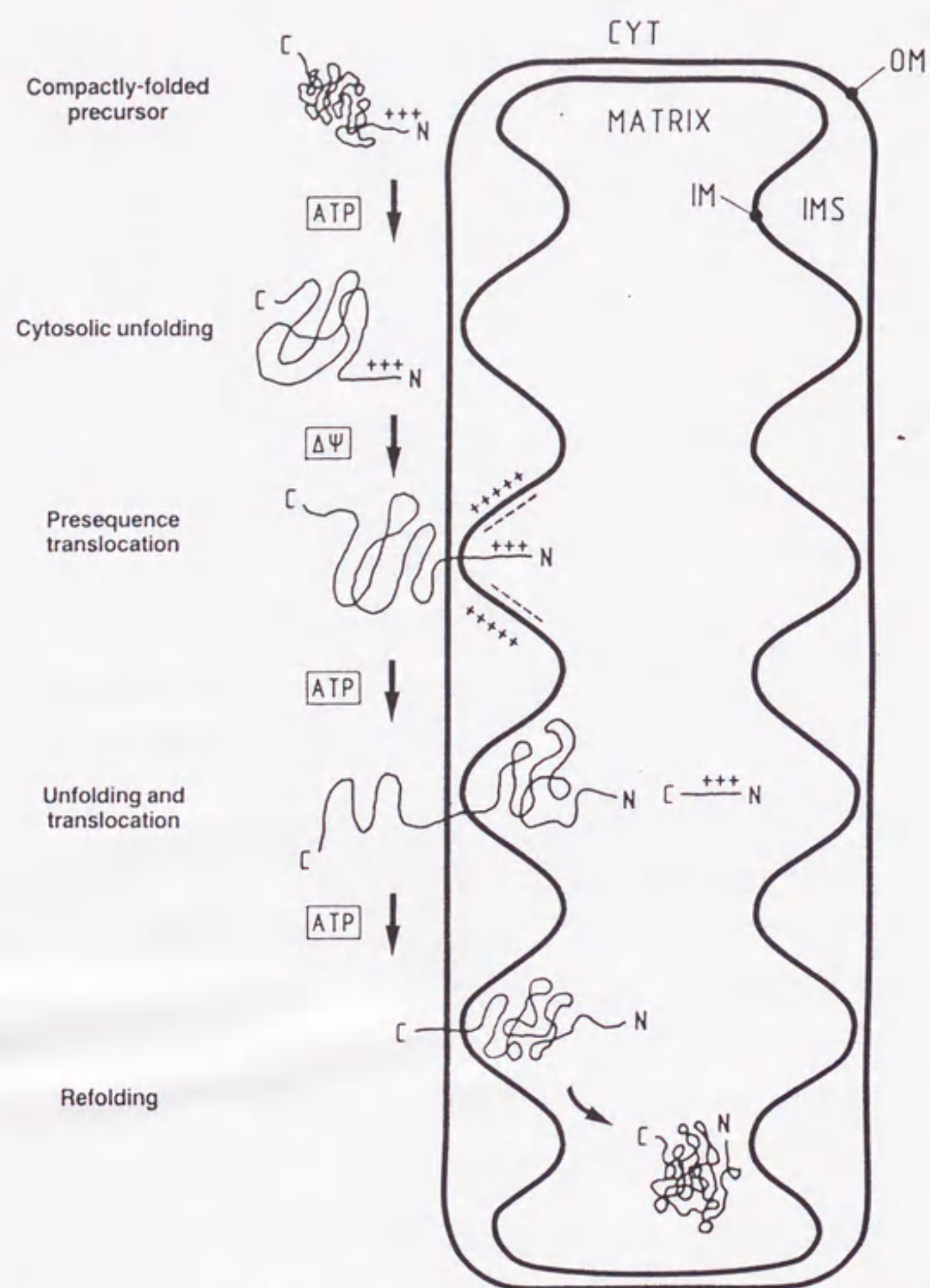


Fig. 1. Model of the key steps of post-translational protein import into mitochondria (modified after Pfanner et al.<sup>11</sup> and Verner and Schatz<sup>12</sup>). The positively-charged presequence (indicated by plus signs) acts and folds independently from the mature protein<sup>1</sup> and initiates membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) dependent protein translocation<sup>8</sup>. Precursor translocation occurs according to Schleyer and Neupert<sup>9</sup> through 'translocation contact sites' (see text) followed by removal of the presequence. Unfolding of the precursor starts within the cytosol and continues on the mitochondrial surface during polypeptide chain translocation. The protein refolds within the mitochondrial matrix. The amino and carboxyl termini of the protein are marked by 'N' and 'C'. The cytosol (CYT), outer membrane (OM), intermembrane space (IMS), inner membrane (IM) and mitochondrial matrix (MATRIX) are indicated.

図3 研究を開始したときに明らかだった、タンパク質輸送に関する知見(モデル)

D. ミトコンドリアの輸送系に関するモデル。内膜の内側であるマトリクスへの輸送に関して、タンパク質の高次構造が解かれることの重要性和、輸送に必要なエネルギーについて説明している。

Hurt, E. C., *Trends Biochem. Sci.* (1987) 12: pp369 より転載。

これらの研究を行っている間にも、膜を通過するタンパク質輸送の機構に関して、以下の様な進展があった。

1) 分子シャペロンの認識: RuBisCO ホロ酵素のアセンブリーに関して研究されていた RuBisCO-binding protein と、バクテリオファージの増殖に必須であることが知られていた大腸菌の GroEL の一次構造に高い相同性が発見され、さらにこれらと相同なタンパク質が広い生物種から見つかったことから、これらは全く新しいカテゴリーのタンパク質として再認識され、シャペロンと名付けられた (Hemmingsen et al. 1988)。この命名は、これが主として新たに合成されたポリペプチドのデビューに付き添う役割をはたすことからなされている。その後、これと同様の機能を持つ別種のタンパク質が発見され、現在までにいくつかのグループが知られている (Georgopoulos 1992)。これらは、あるポリペプチドをほどけた状態に保つ、または変性したポリペプチドをエネルギーを使ってほどくという共通した機能を持ち、分子シャペロンと総称されている (Ellis & Hemmingsen 1989)。この分子の発見以来、特に酵母菌のミトコンドリアへのタンパク質の輸送系で運ばれるタンパク質の高次構造に関する知見が相次いで報告され、またタンパク質輸送にこれら分子シャペロンが深く関与することが示された (Georgopoulos 1992)。

また原核生物の細胞膜と、ミトコンドリアと ER 膜に関する酵母菌を使った研究に関して長足の進歩があった。ごく簡単にまとめると、

2) 大腸菌のタンパク質の輸送系 (Wickner et al. 1991, Bassford et al. 1991) は、遺伝学的手法を用いた方法によって外膜タンパク質の細胞質からの輸送に関する温度感受性の変異株とその復帰変異株が選択され、またそれぞれに対応する遺伝子群である *sec* と *prl* が、また上記の分子シャペロンやそれと協調して働く因子である *groEL*, *groES*, *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *secA*, *secB* などが、クローニングされ、あるいはその働きが再認識された。また生化学的なアプローチからこれらの因子を膜上に再構成することにも成功しており、それぞれの因子の機能の解明が続いている。最近では、ER 膜の輸送系で知られていた SRP に相同な因子が発見され、新たな知見をもたらしつつある (Luirink et al. 1992)。いくつかの研究グループが最新のモデルを提出しているが、そのうちの一つを図 4 A に紹介する。

3) 酵母菌のミトコンドリアについては、生化学的手法で外膜と内膜のコンタクトサイトに受容体分子が発見され、その遺伝子がクローニングされた (Segui-Real et al. 1992, Pfanner et al. 1992)。また輸送前駆体タンパク質のプロセッシング酵素が単離され、遺伝子が同定された。またエネルギーの要求性など、さらに詳細な輸送の様子が明らかになった (図4 B)。

葉緑体に関しても、こうした輸送を調べているいくつかのグループから新たな知見が報告されている。しかしながら、酵母菌や大腸菌に比べると、葉緑体へのタンパク質輸送は明らかに遅れたレベルにある。これらの知見のうち、本研究に関わるものは、順次本文中で紹介していく。

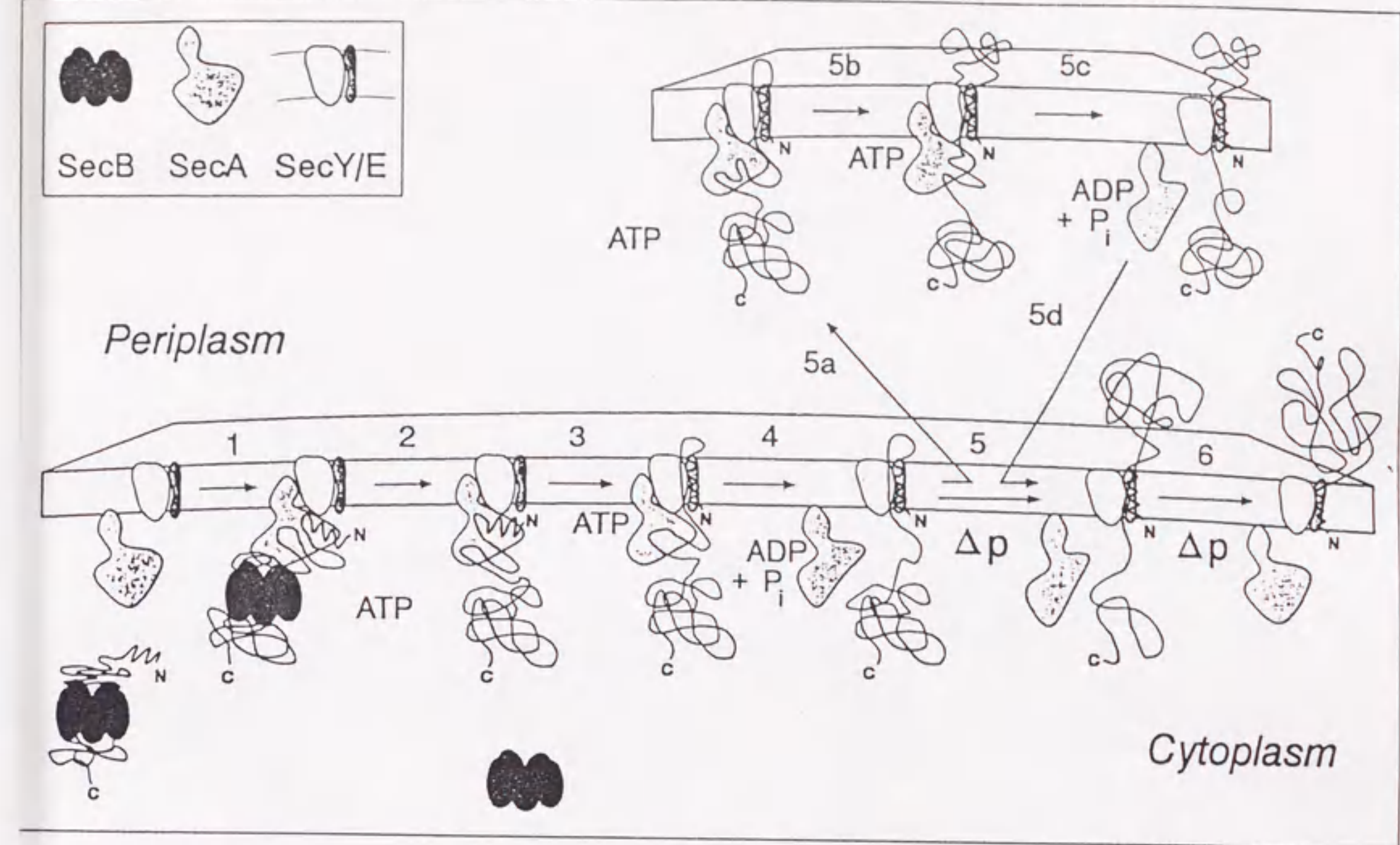


Figure 1  
Schematic representation of the preprotein translocation cascades indicating the functions of ATP and  $\Delta p$  at different stages. The SecD and SecF proteins are not indicated as their catalytic functions are unknown, while signal peptidase is excluded since processing is not required for translocation *per se*. The association of the preprotein with SecY/E has not been demonstrated. See text for details.

図4 現時点で発表されている、タンパク質輸送に関するモデル

A. 大腸菌の細胞膜に関するモデル。ここでは二つの分子シャペロン (SecB と SecA) および膜内在性の輸送装置の一部 (SecY/E 複合体) だけを標記し、特に ATP と電気化学的なポテンシャル ( $\Delta p$ ) がどの段階で必要になるのかを説明している。Driessen, A. J. M., *Trends Biochem. Sci.* (1992) 17: pp 220 より転載。合成されたタンパク質は SecB → SecA と分子シャペロン間で受け渡され、輸送不可能な高次構造をとってしまうことから保護される (1, 2)。SecAはさらにATPを消費して輸送中のタンパク質をほどいていく (3から5)。輸送そのものは電気化学的なポテンシャルによって進行する (5, 6)。このあと、タンパク質はシグナル配列を切り除かれ、本来とるべき高次構造へと折りたたまれる。

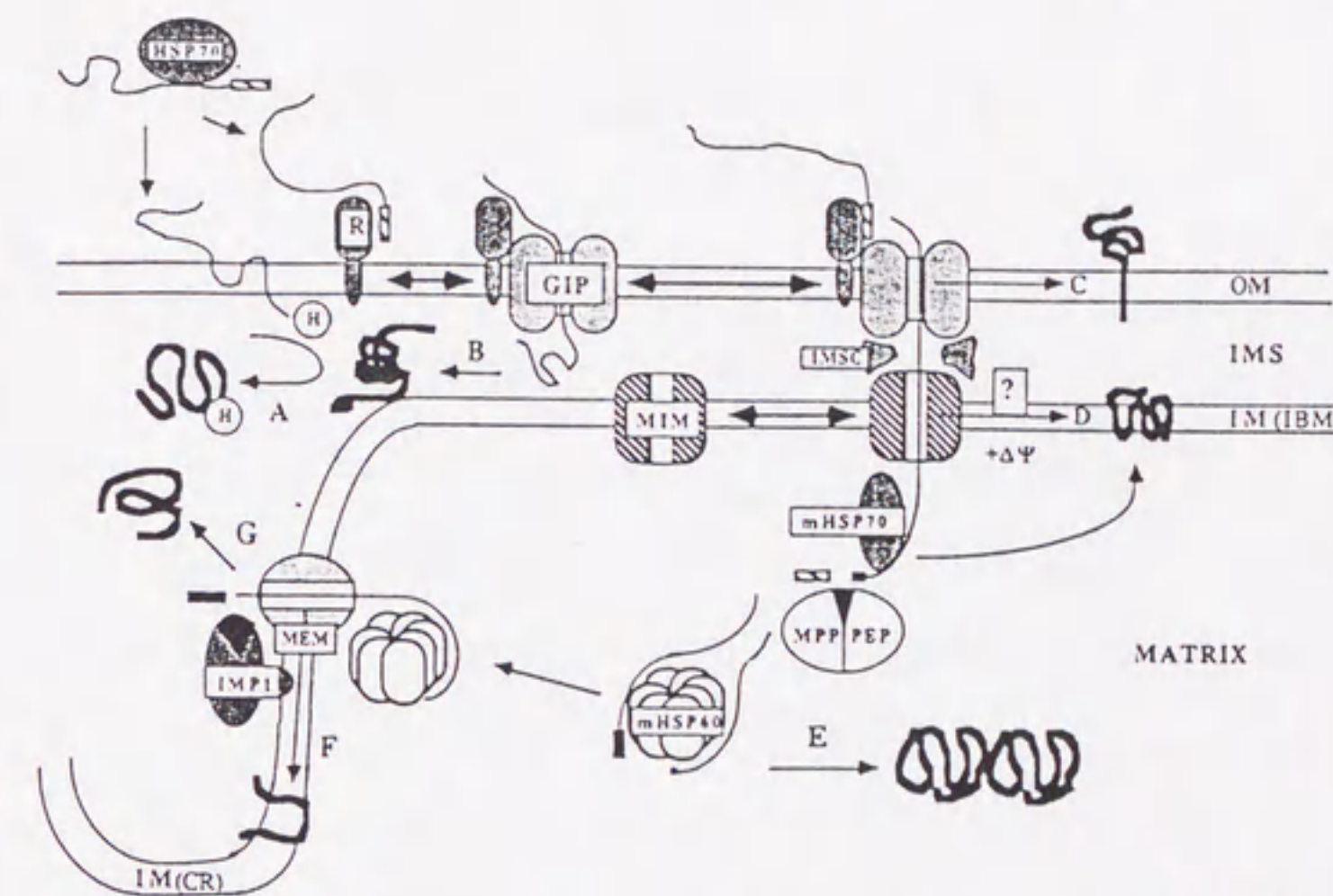


Fig. 1. The different intramitochondrial pathway taken by the various cytosolically synthesized precursor proteins as described in the text are shown here. A-G depict the sorting steps leading to the final location of cytochrome *c*, cytochrome *c* heme lyase (CCHL), MOM72, ADP/ATP carrier (AAC), subunit  $\beta$  of the  $F_1$  ATPase ( $F_1\beta$ ), Rieske Fe/S protein of the ubiquinol cytochrome *c* reductase complex and cytochrome *b*, respectively. Abbreviations used are as follows: R, receptor; GIP, general insertion pore; OM, outer membrane; IMS, intermembrane space; IMSC, intermembrane space component; IM, inner membrane; IBM, inner boundary membrane; CR, cristae; mHsp70, mitochondrial HSP70; MPP, mitochondrial processing peptidase; PEP, protease enhancing protein; MEM, mitochondrial import machinery; MIM, mitochondrial import machinery (inner membrane); IMP1, inner membrane protease 1.

図4 現時点で発表されている、タンパク質輸送に関するモデル

B. ミトコンドリアの膜に関するモデル。いくつかのタンパク質に関して、その輸送される経路を示している。図3のD. と比べると、輸送装置が具体的なタンパク質として登場している点で長足の進歩がある。 B. Segui-Real et al. (1992) *FEBS Lett.* 313: pp 4 より転載。

文献

- Bassford, P., Beckwith, J., Ito, K., Kumamoto, C., Mizushima, S., Oliver, D., Randall, L., Silhavy, T. and Tai P. C. (1991) The primary pathway of protein export in *E. coli*. *Cell* 65: 367-368.
- Ellis, R. J. and Hemmingsen, S. M. (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem. Sci.* 14: 339-342.
- Georgopoulos, C. (1992) The emergence of the chaperone machines. *Trends Biochem. Sci.* 17: 295-299.
- Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W. and Ellis, R. J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 336: 330-334.
- Keegstra, K. and Olsen, L. J. (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 471-501.
- Luirink, J., High, S., Wood, H., Giner, A., Tollervy, D. and Dobberstein, B. (1992) Signal-sequence recognition by an *Escherichia coli* ribonucleoprotein complex. *Nature* 359: 741-746.
- Pfanner, N., Rassow, J., van der Klei, I. J. and Neupert, W. (1992) A dynamic model of the mitochondrial protein import machinery. *Cell* 68: 999-1002.
- Segui-Real, B., Stuart, R. A. and Neupert, W. (1992) Transport of proteins into the various subcompartments of mitochondria. *FEBS Lett.* 313: 2-7.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5: 2043-2049.
- Smeekens, S., Bauerle, C., Hageman, J., Keegstra, K. and Weisbeek, P. (1986) The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartment. *Cell* 46: 365-375.



Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kochi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M. and Cheng, Z. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.

von Heijne, G. (1985) Signal Sequences. *J. Mol. Biol.* 184: 99-105.

Wickner, W., Driessen, A. J. M. and Hartl, F.-U. (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 101-124.

## I 部 1 章

### 葉緑体タンパク質を単離葉緑体に輸送する実験系の確立

前述したような理由で、タンパク質輸送に関する研究をおこなうにあたり、試験管内の実験系を選んだ。この実験を開始した当時、すでにこのような単離葉緑体を用いた試験管内の実験系は一般的なものになりつつあった (Colman & Robinson 1986)。しかし、そうした手法を 23-kDa と 33-kDa にあてはめるためには、ここで述べるようないくつかの解決すべき問題があった。そのころ生理活性物質調節研究室では、私の先輩である村瀬、篠原、丸田らによって、これらのタンパク質の cDNA のクローニングがおこなわれていた。私はそれらの作業を引き継ぐかたちで研究を開始した。この章では、試験管内の実験法の確立について述べる。

### 実験の方法と材料

#### 1. 23-kDa と 33-kDa の cDNA のクローニングと、その塩基配列の決定

これらのタンパク質の cDNA クローンは、発現ベクター pKEN602 (Nakamura et al. 1986) 上に構築したアラスカエンドウ (*Pisum sativum* L. cv Alaska) 緑葉の cDNA ライブラリーを、それぞれのタンパク質の特異抗体によってスクリーニングすることで得た (村瀬 1987、丸田 1988)。23-kDa の cDNA の塩基配列は丸田が、また 33-kDa は村瀬、篠原と私が、dideoxy chain-termination 法に基づいて決定した。

#### 2. 前駆体タンパク質の合成

##### 2.1 鋳型になる mRNA の作製

SP6 RNA Polymerase のプロモーターを持つベクターの下流に 23-kDa および 33-kDa の cDNA をサブクローニングし、試験管内の系で cDNA を転写して mRNA を作製した。

2.1.1 鋳型 DNA の作製：23-kDa の cDNA の翻訳領域をふくむ *Afl* II フラグメントを、ベクター pSP65 の *Sma* I サイトにサブクローニングした。このプラスミドを *Hind* III で切断し、mRNA 転写

\*プロトコール\* RNA の合成

以下の溶液を、室温で混合する。

鋳型 DNA 1 pmole

0.5 M DTT 5  $\mu$ l

NTP 1.5 mM (分子生物学用、ペーリンガーなど)

5x Mix. (600 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 80 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Spermidine) 10  $\mu$ l

BSA 0.1%

Milli-Q water to fill 50  $\mu$ l

SP6 RNA Polymerase 60 U

37°Cで2時間、インキュベーションする。収量を2% アガロースゲル (x1 TBE) による電気泳動によって判断する。20  $\mu$ g ほどの収量が得られる。翻訳反応に用いる場合は、DNase I で鋳型 DNA を分解したのち、フェノール抽出およびエタノール沈殿で RNA を精製する。

の鋳型に用いた。

33-kDa の cDNA は、異なる数種類の制限酵素フラグメントをサブクローニングした。これは、前駆体タンパク質を合成する効率を改善するために、何種類かの mRNA を用意したためである。これら鋳型の作製に使用したクローニングサイトなどは、図6に記した。5'-非翻訳領域の長さを変えたもの3種 (pTK10、pTK11 と pTK35)、およびタバコモザイクウイルスの $\Omega$ 配列 (Gallie et al. 1987) を持つもの2種がある (pTK46、pTK61)。なお $\Omega$ 配列を持つプラスミド pJII101 は、John Innes Institute の T. Michael A. Wilson 博士より供与していただいた。

2.1.3 転写反応: 実験をはじめた当初は、鋳型 DNA を、0.5 mM の ATP、UTP、CTP と 50  $\mu$ M の GTP、5  $\mu$ Ci の [<sup>3</sup>H] UTP (13.5 Ci/mmol)、0.5 mM の Cap analogue (m7GpppG) の存在下で SP6 RNA Polymerase と 37°C 2時間反応させて転写していた。Cap analogue を加えたのは、mRNA の 5' 末端にキャップ構造を持たせるためである。RNA の収量は、[<sup>3</sup>H] UTP の RNA への取り込みを、DEAE ペーパーへの吸着をもとに測定し、算出した。5  $\mu$ g の鋳型 DNA から 10-15  $\mu$ g の RNA が転写された。

その後、以下の理由から、キャップ構造を持たせない Gurevich ら (1991) の方法で mRNA を合成するようになった。

- ① 経験的には、キャップ構造は翻訳効率には劇的な差をもたらさない。
- ② 理由は不明だが、p33-kDa の合成に関しては、キャップのある mRNA の翻訳産物には、完全な前駆体より分子量の小さい副産物がより多く含まれる傾向がある。
- ③ Gurevich らの方法は、より少ない鋳型で多量の RNA を合成でき、安価で簡便である。

## 2.2 試験管内の系による RNA の翻訳

コムギ胚芽抽出液のシステム (Marcu & Dudock, 1974) をもちいておこなった。標識アミノ酸として 33-kDa 前駆体には 1.5 mCi/ml の [<sup>35</sup>S] Met (1,000 Ci/mmol) を、23-kDa 前駆体には 0.5 mCi/ml の [<sup>3</sup>H] Leu (186 Ci/mmol) を加えた。特に断わっていない場合は、反応はアラスカエンドウの poly(A)<sup>+</sup>RNA を効率よく翻訳する条件でおこなった。使用したバッチのコムギ芽抽出液では、KCl が 70 mM、MgCl<sub>2</sub> が 2.5 mM のときにもっとも高い活性を示した。この条件で 100  $\mu$ g/ml の poly(A)<sup>+</sup>RNA を翻訳すると 40-45% の [<sup>35</sup>S] メチオニンが熱

酸不溶性画分に取り込まれた。33-kDa 前駆体の翻訳には、最終濃度が 40 mM になるように KCl を添加した。翻訳の効率は、標識アミノ酸の酸不溶性画分へのとりこみによって判断した。

実験をはじめた当初は、研究室で抽出したコムギ胚芽抽出液をもちいて反応を行っていたが、後半の実験では Promega の製品を使用した。この製品は 2 パッチ試したが、典型的な実験例では 23-kDa 前駆体の合成に関して常に 20% 以上のラベルが取込まれ、また -80 °C での製品の安定性も良い。

### 3. 前駆体タンパク質の葉緑体への輸送

23-kDa と 33-kDa の前駆体をエンドウ (*Pisum sativum* L. cv. Usui) の無傷葉緑体懸濁液に加えて照射下でインキュベートし、葉緑体へと輸送した。33-kDa についてはその葉緑体から酸素発生系タンパク質を単離して、輸送後の PS II への組み込みが正常におこなわれたかどうかを確かめた。

#### 3.1 使用したバッファの組成

Buffer G : 330 mM Sorbitol

1 mM PPI

2 mM EDTA

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM MnCl<sub>2</sub>

50 mM Na-HEPES, pH 6.8

Buffer A : 330 mM Sorbitol

50 mM K-Tricine, pH 8.4

Buffer B : 330 mM Sorbitol

50 mM K-HEPES, pH 8.0

Buffer C : 50 mM NaCl

300 mM Sucrose

500 mM リン酸-NaOH pH 6.8

3.2 エンドウの生育条件：100 ml の種子を 30x40 cm<sup>2</sup> のバットに敷いたパーミキュライトにまき、これを 12 時間ずつ明（ナショナルホルクス蛍光灯、20,000 lux、18°C）・暗（12°C）をきりかえた人工気象機で 2 週間生育させた。葉をつんだときの草丈は約 10-20cm であった。

3.3 無傷葉緑体の調製：葉緑体はエンドウの若い葉 50 g（生重量）から調製した（小西と渡辺、1991）。葉に 250 ml の Buffer G を加え家庭用のミキサー（日立 VA-75G）で 5 秒ごとに断続して 1 分間、破碎してから二重のキムワイプでろ過したものを、日立 RPR-20 ローターで 6,000 rpm で 6 秒間遠心して、葉緑体を含むペレットを得た。このペレットを Buffer A に懸濁し、先と同じ条件で遠心・沈降させて洗った。さらに Buffer A で 2 回、Buffer B で 4 回洗った後、葉緑体のペレットを 1 ml の Buffer B に懸濁した。無傷葉緑体の割合は、位相差顕微鏡で検鏡して調べた。生菜 50 g あたりに 3.5 mg Chl の収量があり、そのうち約 80% が無傷葉緑体だった。

3.4 前駆体タンパク質の調製：前項に述べた方法で 23-kDa ないし 33-kDa の前駆体を合成した。mRNA の翻訳産物に 40 μl に x5 Buffer B を 12 μl、0.2 M メチオニンを 10 μl 加え、輸送反応に使用した。

3.5 輸送反応：3.3 のようにして得た葉緑体 1.2 mg Chl と 33-kDa 前駆体 40 μl を計 450 μl の系で混合し、27°C、5000 lux（タングステンランプ）の光照射下で 1 時間インキュベートした。この反応液を微量遠心機をもちいて 5,000 rpm で 20 秒間遠心して、葉緑体を沈澱させて回収した。

3.6 酸素発生系の単離：回収した葉緑体から Kuwabara & Murata (1979) の方法で PS II 粒子と酸素発生系タンパク質を抽出した。上記の葉緑体を 10 mM NaPPi、400 μl に懸濁して浸透圧で破裂させ、微量遠心機を用いて 15,000 rpm で 1 分間遠心して上清のストロマとチラコイド膜のペレットに分けた。チラコイド膜は 200 μl の Buffer C に懸濁し、Triton X-100 を 8 mg/mg Chl になるように加えて攪拌し、1 分間氷冷した。この混合物を微量遠心機を用いて 5,000 rpm で 1 分間遠心して、沈澱物を捨てた。上清を日立 RP65 ローターを用いて 25,000 rpm で 40 分間遠心して PS II 粒子のペレットを得た。ペレットを Buffer B で 2 回洗ったあと 1 M Tris-HCl pH 9.0 のバッファーに懸濁して酸素発生系のタンパク質を抽出し、RP65 ローターを用いて 48,000 rpm で 25 分間

遠心して上清を集めた。この上清を 1,000 倍量の 10 mM Tris-HCl pH 6.8 に対して 12 時間透析して脱塩し、酸素発生系のサンプルとした。抽出の全過程で適宜サンプリングし、それらを SDS-PAGE で分離した後 フルオログラフを行った。

## 実験の結果と考察

### 1. cDNA の塩基配列

23-kDa および 33-kDa の塩基配列を、図5に示す。それぞれ 259 残基長と 329 残基長のオープンリーディングフレームをもち、予想されるアミノ酸配列は対応するタンパク質精製標品から決定された N 末端部の配列を含んでいた。予想される輸送ペプチドの長さはそれぞれ 73 残基と 81 残基であった。

### 2. 前駆体タンパク質の合成

cDNA から試験管内の転写・翻訳系で合成した 23-kDa および 33-kDa の前駆体タンパク質は、SDS-PAGE 上でそれぞれ 29,000 と 38,000 の分子量を示した。当初、33-kDa の mRNA の翻訳の効率はたいへん低かった（加えたラベルのうち、酸不溶性画分には1-2% しか取り込まれなかった）、mRNA の5'非翻訳領域の長さを変えた3種類の mRNA と、タバコモザイクウイルスの $\Omega$ 配列を持つ2種類の mRNA を新たに合成し、それらを試した。また翻訳の反応系に加える KCl と  $MgCl_2$  の濃度を変えて最適な条件を検討した。このうちもっとも効果が高かったのは、RNA の5'非翻訳領域をなるべく短くすること（図7）、およびKCl の濃度を調節することであった（図8）。この両方を行うことで、翻訳の効率は 10% 程度までに向上した。

### 3. 合成した前駆体タンパク質の単離葉緑体への輸送

いずれの前駆体タンパク質も、光の照射下で単離葉緑体のチラコイド内腔へ取り込まれた（実験の結果は、後の章の内容と重複するため、ここでは示さない）。また 33-kDa については、取り込まれたタンパク質の一部が酸素発生系に組み込まれることを確かめた（図9）。その後これら酸素発生系のタンパク質が、膜と結合しないプールをチラコイド内腔に形成するという知見が発表され

(Ettinger & Theg 1991)、取り込まれたタンパク質は必ずしも PS II に結合する必要はないことがわかった。そこで、23-kDa の前駆体に関しては、PS II への結合を試さなかった。

これらの結果から、合成した前駆体タンパク質と単離葉緑体を用いる実験系が、生体内で実際に起きている現象を再現できると判断し、さらに詳細な知見を得るために以下の章に述べる実験を行うことにした。

10 20 30 40 50 60 70  
 AACACAAAACTCTTGAACACTAGTTTGTGGGAGAACACCAAAATAGTTAACAGGAGCCATGGCAGCC  
 MetAlaAla  
 80 90 100 110 120 130 140  
 TCACTTCAAGCAGCTGCTACTCTCATGCAACCTACAAAAGTTGCGTAGCAACACATTGCAGCTTAAGTCTA  
 SerLeuGlnAlaAlaAlaThrLeuMetGlnProThrLysLeuArgSerAsnThrLeuGlnLeuLysSerAsn  
 150 160 170 180 190 200 210  
 ACCAATCTGTTTCTAAGGCCTTTGGTTTGGAACTATGGAGCTAAGGTTACTTGTCCCTCAGTCTGA  
 GlnSerValSerLysAlaPheGlyLeuGluHisTyrGlyAlaLysValThrCysSerLeuGlnSerAsp  
 220 230 240 250 260 270 280  
 TTTCAAGGAGTTGGCTCACAAGTGTGTGAGGCTTCTAAGATTGCAGGATTTGCTCTTGCCACTTCTGCT  
 PheLysGluLeuAlaHisLysCysValGluAlaSerLysIleAlaGlyPheAlaLeuAlaThrSerAla  
 290 300 310 320 330 340 350  
 CTTGTTGTCTGGAGCAAGTGCAGAAGGTGCTCCAAAGAGGCTAACTTTCGACGAAATCCAAAGCAAAA  
 LeuValValSerGlyAlaSerAlaGluGlyAlaProLysArgLeuThrPheAspGluIleGlnSerLysThr  
 360 370 380 390 400 410 420  
 CATACTTGAAGTCAAAGGAACAGGAACCTGCAACCAATGTCCAACCATTTGATGGAGGAGTAGACTCATT  
 TyrLeuGluValLysGlyThrGlyThrAlaAsnGlnCysProThrIleAspGlyGlyValAspSerPhe  
 430 440 450 460 470 480 490  
 CTCCTTCAAGCCAGGAAAATACAACGCCAAGAACTCTGCCTCGAACCAACTTCATTACAGTAAATCA  
 SerPheLysProGlyLysTyrAsnAlaLysLysLeuCysLeuGluProThrSerPheThrValLysSer  
 500 510 520 530 540 550 560  
 GAAGGCGTAACCAAAAACTCCACTCGCATTCCAAAAACCAAGCTCATGACGCGTTTAACTACACGC  
 GluGlyValThrLysAsnThrProLeuAlaPheGlnAsnThrLysLeuMetThrArgLeuThrTyrThrLeu  
 570 580 590 600 610 620 630  
 TCGACGAGATTGAAGGGCCCTTCGAGGTTTCAGCAGACGGGAGTGTGAAATTCGAGGAGAAAGACGGAAAT  
 AspGluIleGluGlyProPheGluValSerAlaAspGlySerValLysPheGluGluLysAspGlyIle  
 640 650 660 670 680 690 700  
 TGATTACGCTGACAGTACAGTTCAGCTTCTGGAGGCGAGCGTGTCCGTTCTTTTACCATCAAGCAG  
 AspTyrAlaAlaValThrValGlnLeuProGlyGlyGluArgValProPheLeuPheThrIleLysGln  
 710 720 730 740 750 760 770  
 TTGGTAGCATCAGGAAACCTGATAGCTTCAGCGGTGAGTTTTTGGTGCCATCATACAGAGGAAGCTCTT  
 LeuValAlaSerGlyLysProAspSerPheSerGlyGluPheLeuValProSerTyrArgGlySerSerPhe  
 780 790 800 810 820 830 840  
 TCTTGGACCCAAAGGGAAGAGGTGCATCTACCGGTTATGACAACGGGTTGCATTGCCAGCTGGTGAAG  
 LeuAspProLysGlyArgGlyAlaSerThrGlyTyrAspAsnAlaValAlaLeuProAlaGlyGlyArg  
 850 860 870 880 890 900 910  
 AGGTGATGAAGAAGAACTTGGAAAGGAAAACAACAAGAGTGTCTCATCAAAGGGAAAATCACATTG  
 GlyAspGluGluGluLeuGlyLysGluAsnAsnLysSerAlaAlaSerSerLysGlyLysIleThrLeu  
 920 930 940 950 960 970 980  
 AGTGTTACTCAGACTAAGCCTGAACTGGTGAGGTTATTGGTGTGTTGAGAGTATTACGCCATCTGATA  
 SerValThrGlnThrLysProGluThrGlyGluValIleGlyValPheGluSerIleGlnProSerAspThr  
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050  
 CTGATTTGGGAGCAAAAGCTCCAAAGGATGTTAAGATCCAAGGTGTTGGTATGCTCAGCTTGAATCATA  
 AspLeuGlyAlaLysAlaProLysAspValLysIleGlnGlyValTrpTyrAlaGlnLeuGluSer  
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120  
 GATAGCTTCTTTGTTATGGTTTGTGTTGTAACCTCAAGATGTTGATGCATTATCCTTTGACTAAAG  
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190  
 AACTTCAAGAGCTGAGAGGATTATCATGTTTATATATTATATTGATGTTCAATTACAATATGCTTATAA  
 1200 1210 1220  
 TGTTGAGGGTAAATGAATTTCTATGGAGTTT

図5 A 葉緑体 PS II 酸素発生系の 33-kDa タンパク質の cDNA 塩基配列



10 20 30 40 50 60 70  
 GGGGGGGGGGGGACTCTTAGAGTGTCAAATTGACAAGAAAAAATAAACTATAGCATACTCTTAAGAA  
 80 90 100 110 120 130 140  
 AAATGGCATCTACACAATGTTTCTTGCACCACCAATATGCTATTACAACCTCAACTAGAACCTTATCTCA  
 TrpHisLeuHisAsnValSerCysThrThrAsnMetLeuLeuGlnLeuGlnLeuGluProTyrLeuAsn  
 150 160 170 180 190 200 210  
 ACGCCAAGTAGTTACCACCAACCAACCATATTGTTTGAAGGCACAGAAACAAGATGATGTTGTTGAT  
 AlaLys\*\*\*LeuProProAsnGlnThrIleLeuPheAlaArgHisArgAsnLysMetMetLeuLeuMet  
 220 230 240 250 260 270 280  
 GCTGTTGTCTCGTAGGTTAGCACTTCTGTTCTCATTGGTGCTGCTGCTGTTGGCTCCAAGGTTTCCAC  
 LeuLeuCysLeuValGly\*\*\*HisPheLeuPheSerLeuValLeuLeuLeuAlaProArgPheHis  
 290 300 310 320 330 340 350  
 CTGCAGATGCTGCTTATGGAGAAGCTGCTAATGTGTTTGGAAAGGCAAAGACAAACACAGATTACTTGCC  
 LeuGlnMetLeuLeuMetGluLysLeuLeuMetCysLeuGluArgGlnArgGlnThrGlnIleThrCysHis  
 360 370 380 390 400 410 420  
 ATACAATGGAGATGGATTCAAGCTGCTGGTCCAGCAAAAATGGAATCCAAGCAAAGAGAGAGTTCCTT  
 ThrMetGluMetAspSerSerCysTrpCysGlnGlnAsnGlyIleGlnAlaLysArgGluSerSerLeu  
 430 440 450 460 470 480 490  
 GGTCAAGTTCTTAGATATGAGGATAATTTGATGCAACAAGCAATGTTTCGGTTTTAGTCCAAACAACCTG  
 ValArgPheLeuAspMetArgIleIleLeuMetGlnGlnAlaMetPheArgPhe\*\*\*SerLysGlnLeu  
 500 510 520 530 540 550 560  
 ATAAGAAGTCCATCACTGACTATGGTTCACCTGAAGAGTTCCTATCTAAGGTGGACTATTTGCTTGGAAA  
 IleArgSerProSerLeuThrMetValHisLeuLysSerSerTyrLeuArgTrpThrIleCysLeuGluAsn  
 570 580 590 600 610 620 630  
 ACAAGCCTTCTTGGACAACTGATTGAGAGGGAGGTTTCGATACAAATGCTGTAGCTGTTGCAAAACATC  
 LysProSerLeuAspLysLeuIleGlnArgGluValSerIleGlnMetLeu\*\*\*LeuLeuGlnThrSer  
 640 650 660 670 680 690 700  
 TTAGAGAGCTCAGCACCAGTATTGGTGGAAAACAGTATTACAACATTTTCGGTATTGACAAGGACTGCTG  
 \*\*\*ArgAlaGlnHisGln\*\*\*LeuValGluAsnSerIleThrThrPheArgTyr\*\*\*GlnGlyLeuLeu  
 710 720 730 740 750 760 770  
 ATGGAGATGAAGGTGGAAAGCATCAGCTGATTACAGCAACTGTAAGGATGGAAAATTATACATCTGCAA  
 MetGluMetLysValGluSerIleSer\*\*\*LeuGlnGlnLeu\*\*\*ArgMetGluAsnTyrThrSerAlaArg  
 780 790 800 810 820 830 840  
 GGCTCAAGCTGGTACAAGAGGTGGTTTAAAGGAGCAAGAAAGTTTGTGGAGGACTGCAAGTTCTTTC  
 LeuLysLeuValThrArgGlyGlyLeuArgGluGlnGluSerLeuTrpArgThrLeuGlnValLeuSer  
 850 860 870 880 890 900 910  
 AGTGTTCCTAATCAAGAACTTTGGTGAAGGCTGTTATTTTGCATGTAAATCTTATTCTTAAGTAAGCA  
 ValLeu  
 920 930 940 950 960 970 980  
 AGCACTTGGAGTTTAAATTTATAATGGCTTTTTAATCTGCTTTTTAATTAATAAATTTCAAGTTGTTAC  
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050  
 AAGCCGTTTAAAGAAGCACTATAATATGAAAAATCAATTGTTGGAAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA  
 AA

図5B 葉緑体 PS II 酸素発生系の 23-kDa タンパク質の cDNA 塩基配列

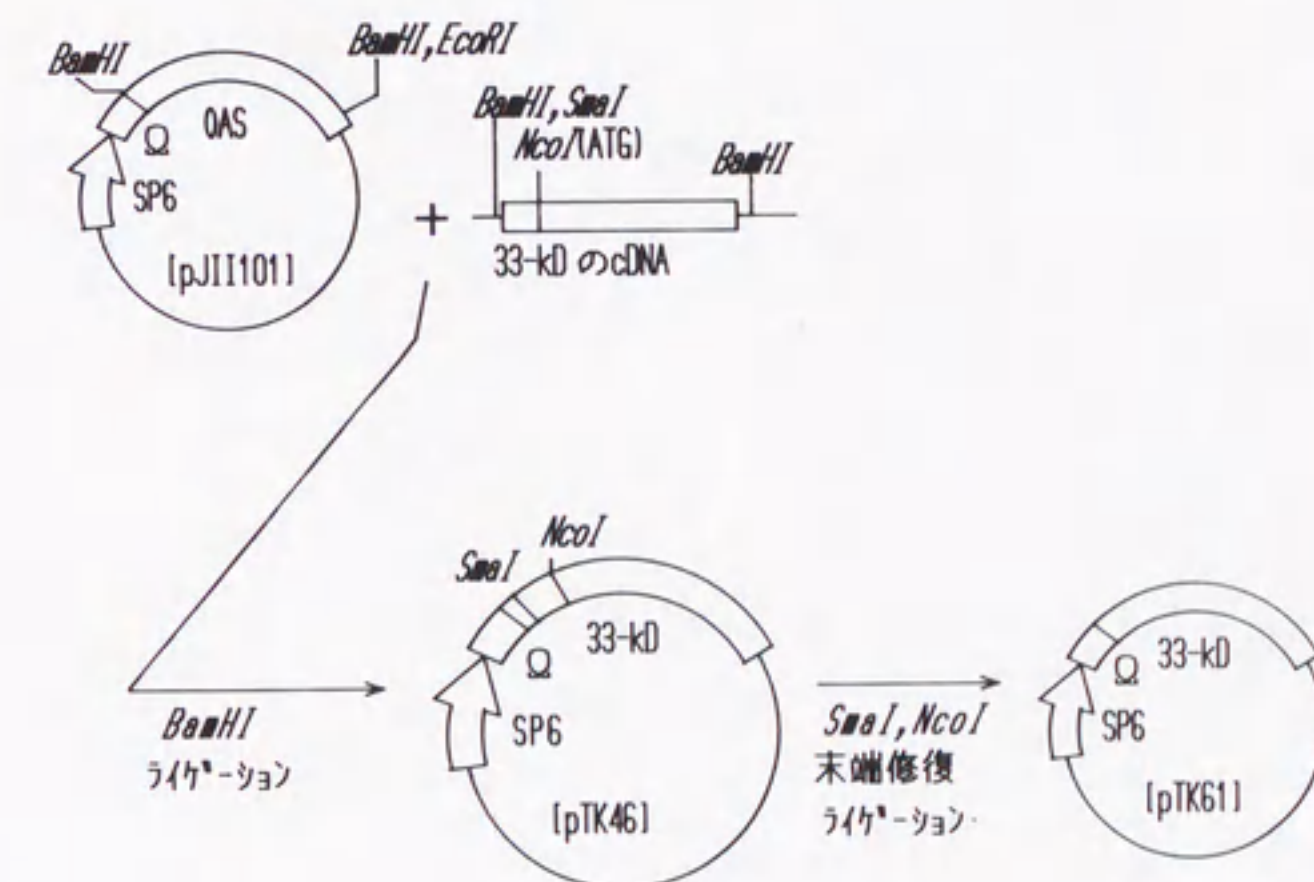
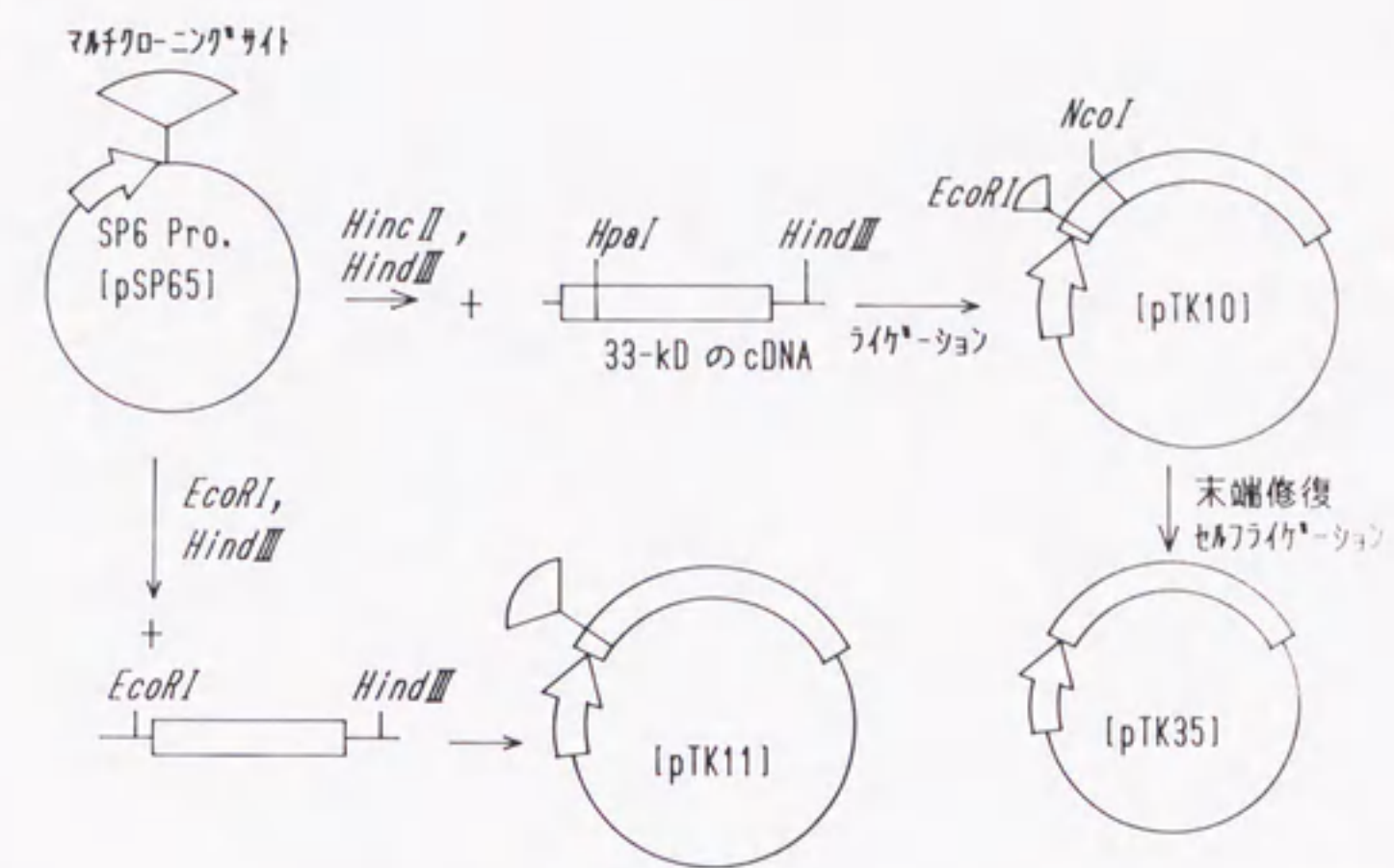


図6 33-kDa の cDNA の転写反応のための鑄型の作製

33-kDa の前駆体タンパク質の合成の効率をあげるために、その mRNA の 5' 非翻訳領域の構造を変えることを試みた。その非翻訳領域の長さを変えたもの三種類の鑄型を上段に、またタバコモザイクウイルスのΩ配列を持たせたもの二種類の鑄型を下段に示す。

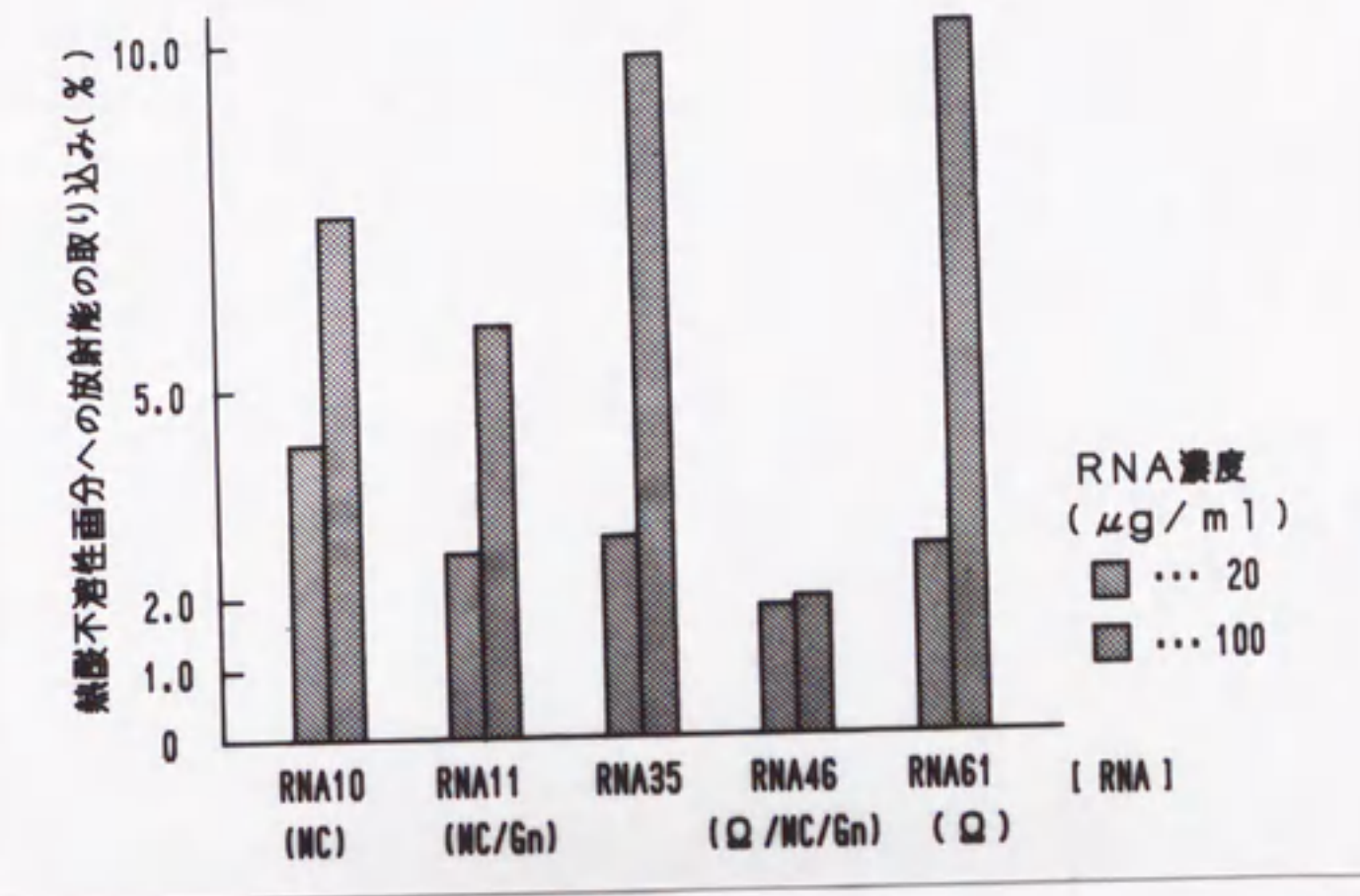


図7 合成した 33-kDa の mRNA の翻訳効率

図6に示した鋳型より転写した mRNA をコムギ胚芽抽出液の系で翻訳した。各 mRNA の翻訳効率を、 $[^{35}\text{S}]$  Met の 5% トリフルオロ酢酸への不溶性画分への取込みによって測定した。RNA の番号は、同じ番号の鋳型から転写されたことを示す (例: pTK10  $\rightarrow$  RNA10)。より短い 5' 非翻訳領域を持つ RNA が、より効率的に翻訳されている。これらのうち  $\Omega$  配列を持つ RNA 61 の翻訳産物は、他の RNA に由来するものよりも小さい分子量を持っており、おそらく 2 番目の AUG コドンから翻訳されたものであると考えられる。

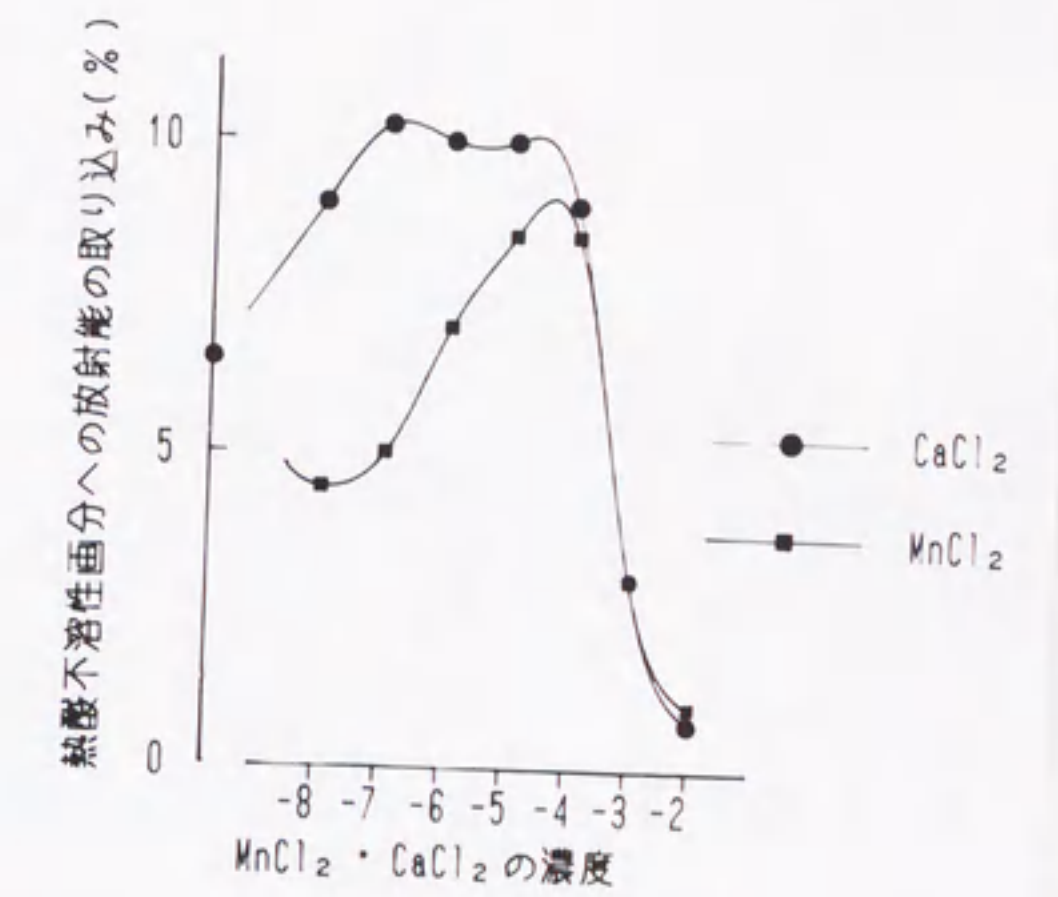
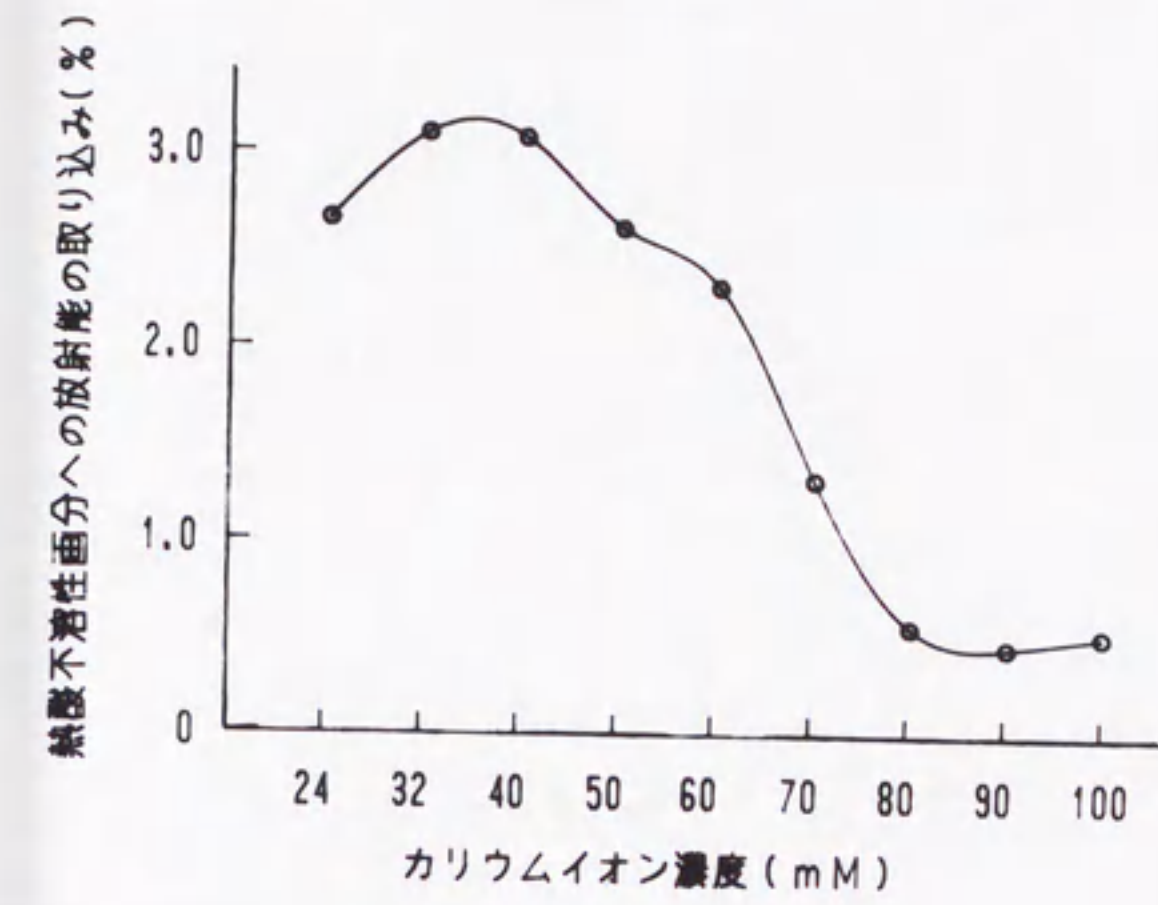


図8 カチオンの添加による 33-kDa の前駆体タンパク質の合成の効率の影響

33-kDa 前駆体タンパク質の合成の効率を改善するために、RNA 35 の翻訳系に加える KCl の量について、その最適条件を調べた (左側)。またこの翻訳系に  $MnCl_2$  や  $CaCl_2$  を加えて翻訳効率への影響を調べた (右側)。これらの条件の最適化によって、約 10% の Met が翻訳産物中にとりこまれるようになった。

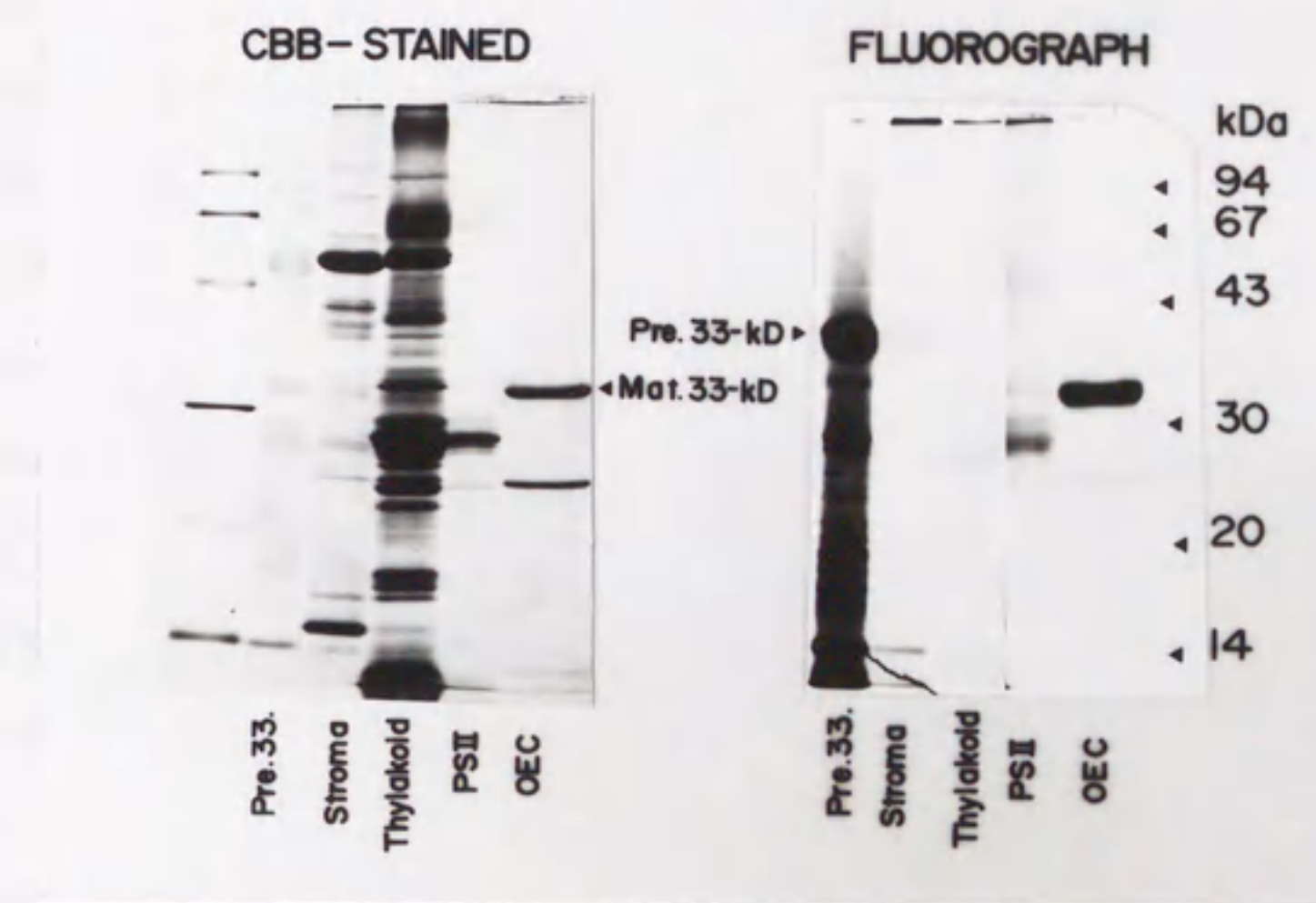


図9 葉緑体に輸送された 33-kDa の PS IIからの検出

33-kDa 前駆体タンパク質を光照射下で葉緑体へ輸送した後、その葉緑体から酸素発生系のタンパク質を単離した(実験の方法と材料の項 3.6 を参照)。左側に SDS-PAGE によるタンパク質の分離パターンのクマシー染色像を、右側にそのゲルのフルオログラフを示す。Pre.33., 33-kDa 前駆体タンパク質; OEC, 酸素発生系標品。PS II は、粗 PS II 画分から酸素発生系を洗い落とした後のサンプルである。輸送された 33-kDa タンパク質は成熟形の分子量になり、酸素発生系に組み込まれていた。フルオログラフのうち、Pre.33. と Stroma と Thylakoid のレーンは一晩の、また PS II と OEC には2週間の露出を行っている。

## 参考文献

- Colman, A. and Robinson, C. (1986) Protein import into organelles: Hierarchical targeting signals. *Cell* 46: 321-322.
- Ettinger, W. F. and Theg, S. M. (1991) Physiologically active chloroplasts contain pools of unassembled extrinsic proteins of the photosynthetic oxygen-evolving enzyme complex in the thylakoid lumen. *J. Cell Biol.* 115: 321-328.
- Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C. and Wilson, T. M. A. (1987) The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucl. Acids Res.* 15: 3257-3273.
- Gurevich, V. V., Pokrovskaya, I. D., Obukhova, T. A. and Zozulya, S. A. (1991) Preparative in vitro mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases. *Anal. Biochem.* 195: 207-213.
- Kuwabara, T. and Murata, N. (1979) Purification and characterization of 33 kilodalton protein of spinach chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* 581: 228-236.
- Marcu, K. and Dudock, B. (1974) Characterization of a highly efficient protein synthesizing system derived from commercial wheat germ. *Nucl. Acids Res.* 1: 1385-1397.
- Nakamura, K., Iwasaki, Y. and Hattori, T. (1986) An improved *Escherichia coli* expression vector for the construction and identification of full-length cDNA clones. *Gene* 44: 347-351.
- 小西智一、渡辺 昭 (1991) 葉緑体膜透過実験法、蛋白質 核酸 酵素 36: 2437-2442.
- 丸田嘉幸 (1988) 修士論文、名古屋大学農学部
- 村瀬 誠 (1987) 修士論文、名古屋大学農学部

## I 部 2 章

### 葉緑体タンパク質を輸送するために必要なエネルギー源の同定

前章で述べたように、合成した 23-kDa および 33-kDa タンパク質前駆体は、光照射下で単離葉緑体のチラコイド内腔へととりこまれた。この反応は他の多くのタンパク質輸送の場合と同じく能動輸送であり、輸送にはエネルギーの消費が必要となる。この場合のエネルギー源は光である。葉緑体は光を様々な形態のエネルギーへと変換し、おそらくそのうちのいくつかがこの輸送反応に利用される。この章で述べる実験を開始した当時は、この輸送のエネルギー源について次のような知見があった。

- ① 葉緑体のストロマに輸送されるタンパク質は、葉緑体内部の ATP のみで輸送される (Theg et al. 1989)。
- ② 包膜を通じてストロマに至る輸送で、ATP は少なくとも二つの効果を持っている。一つは包膜への前駆体の結合であり、もう一つは包膜の通過である。前者は ATP 濃度が低いときにのみ顕在化する (Flügge & Hinz 1986, Olsen et al. 1989)。
- ③ plastocyanin は ATP のみでチラコイド内腔へ輸送され、このときに他のエネルギー源を必要としない (Theg et al. 1989)。

これらを総じて考えると、葉緑体へのタンパク質の輸送はもっぱら ATP をエネルギー源にし、膜を介した電気化学的なポテンシャルを必要とするミトコンドリアや原核細胞の細胞膜とは大きく異なるように見える。さてチラコイド膜は、光合成の明反応に際してチラコイド膜をはさんだプロトンの濃度勾配を形成する。このポテンシャルは ATP 合成のためのエネルギー源として利用される。このポテンシャルが、この膜を通過するタンパク質の輸送に利用されないのは、何かしら不自然な感じがした。私は当時、タンパク質の輸送装置を葉緑体から単離して、より単純な実験系を構築できないかと考えていた。そのためには、その装置が何によって働くのかを知っておくことが不可欠である。そこで、23-kDa および 33-kDa の前駆体が、単離葉緑体のチラコイド内腔へ ATP をエネルギー源として輸送されるか否かを調べることにした。

## 実験の材料と方法

実験は、合成した前駆体と単離葉緑体を適当な条件下でインキュベートすることでおこなった。前駆体の合成方法、および葉緑体の単離方法は、本質的には前章で述べた方法と同じである。

### 1. 実験植物の育成と葉緑体の単離

葉緑体はエンドウ (*Pisum sativum* L. cv Usui) の芽生えから単離した。エンドウはクレハ園芸培土に播き、18 °C・12 時間の昼と、12 °C・12 時間の夜のサイクルで二週間ほど育てたものを使った。このときには成葉はまだ完全には展開していなかった。なお葉緑体内のデンプンの量を減らすため、葉は暗期の最後に摘んだ。20 g の葉から 0.5 mg Chl ほどの葉緑体の収量があった。

### 2. 前駆体の合成

基本的には前章に述べたように転写・翻訳したものを使用した。ただし、輸送に用いる標品に翻訳系からの ATP が残ることを避けるために、Sephadex G-25 のカラムを使ったゲル濾過によって低分子を除いた。ゲル濾過には Boehringer の Quick Spin カラムを輸送用バッファー (330 mM sorbitol, 25 mM K-Tricine, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0) で平衡化したものを、製品に添付された説明書にしたがって使用した。

### 3. 輸送反応

10 µg Chl の葉緑体を 10 µl の前駆体タンパク質とともに、総量 40 µl の系でインキュベートした。反応はエペンドルフチューブの中で、20 °C で 1 時間おこなった。光を照射するときは、白熱電球からチューブ表面を 500 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> の強度で照射した。脱共役剤を加えた反応では、CCCP、バリノマイシン、ナイジェリシンをそれぞれ終濃度 5 µM で加えた。反応は基本的には暗黒下でおこなったが、作業用の安全光として弱い緑の灯 (0.03 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) を使用した。反応後の系から葉緑体を 6,000 xg で 1 分のあいだ遠心して沈殿として回収し、その表面に付着しているタンパク質をサーモライシンで分解したのち洗い落とした。サーモライシンは 1 mM CaCl<sub>2</sub> の存在下で、葉緑体 10 µg Chl あたりに 10 µg を加えて氷上で 20 分間反応させ、その後 1 mM の EGTA を含むバッファーで洗いおとした。ストロマ画分とチラコイド画分に分画した実験では、葉緑体を 100 µl



の 10  $\mu$ M K-Tricine, pH 8.0 に懸濁することで破裂させ、12,000 xg で 3 分間の遠心をしてチラコイド画分を沈殿させた。上清は 50% アセトンによって沈殿させて濃縮し、ストロマ画分として用いた。チラコイド膜は再度のサーモライシン処理の後に SDS-PAGE でタンパク質を分離した。ゲル上の放射能の分布はフルオログラフィーにより検出した。

## 実験の結果

### 1. 単離葉緑体への 23-kDa 前駆体タンパク質の輸送

#### 1.1 ATP による輸送

23-kDa の前駆体を、0 から 32 mM の ATP 存在下で単離葉緑体へと輸送させた。輸送後の葉緑体を実験系から分離し、そのタンパク質を SDS-PAGE で分離して、輸送されたタンパク質をフルオログラフによって検出した (図 10, 11)。3.2 mM または 10 mM の ATP の存在下で、前駆体タンパク質は成熟型タンパク質へと移行しており、チラコイド内腔へ輸送されていた (図 10)。これは、葉緑体が十分な ATP を与えられればこのタンパク質を正常に輸送できることを示している。しかし 0.32 mM ないし 1 mM の ATP 存在下では、前駆体タンパク質は中間的な分子量のタンパク質へと移行し (図 10)、ストロマ画分に見いだされた (図 11)。ATP を加えなかった系では葉緑体への輸送は見られなかった。この条件下で 32 mM の ATP を加えること葉緑体が破裂してしまい、実験系として成立しなかった。

タンパク質が輸送された行き先が加えた ATP の濃度で違ったことは、ATP が 1 mM 以下であったときに輸送反応がストロマで止まったからであると考えられる。すると、その原因は次の二通りに解釈できる。

- ① エネルギー源に質的な欠乏があるから。この場合、輸送反応は ATP と、ATP から派生した別のエネルギー源を消費しておきていると考える。
- ② エネルギー源に量的な欠乏があるから。この場合は、輸送反応が異なる ATP 濃度を要求する二つ (あるいはそれ以上) の段階から成り立っていると考える。

これらの考えの妥当性を確かめるために、この実験系に脱共役剤を加えることで、チラコイド膜を挟んだ電荷を消失させることを試みた。もしこの輸送系がATPの他に、ミトコンドリアや大腸菌と同じように、膜を介した電気化学的なポテンシャルを必要とするなら、脱共役剤の添加は何らかの影響を生むはずである。

## 1.2 脱共役剤の輸送への影響

図10および図11で明らかのように、10 mMのATPの存在下で、23-kDaの前駆体タンパク質はチラコイド内腔へ輸送される。この実験系に、脱共役剤であるバリノマイシン、CCCP、ナイジェリシンを5  $\mu$ Mずつの終濃度で加えた。バリノマイシンは膜電位を、ナイジェリシンはプロトンの濃度勾配を減少させ、CCCPはこれらの両方を減少させる働きを持つ。実験の結果、CCCPおよびナイジェリシンを加えた系では、前駆体は中間的な大きさの分子に移行していた(図12)。CCCPを加えた反応における中間的な大きさの分子は、ストロマに蓄積していることを確認した(図12)。

この結果は、前駆体タンパク質の正常な輸送に、ATPの他に膜を介したプロトンの濃度勾配が必要であることを示している。チラコイド膜は電気化学的なポテンシャルを電位よりもむしろプロトンの勾配で蓄積するので、バリノマイシンの添加に効果がなかったのは妥当な結果である。高濃度のATPの存在下で輸送が正常に行われたのは、チラコイド膜のATP合成酵素が逆反応をおこし、プロトンポンプとして働いたためにプロトンの濃度勾配が形成されたからであると考えられる。

前駆体の正常な輸送のためにはATPとプロトンの勾配が必要であることが明らかになった。では、後者のエネルギーを欠いたときにストロマに現れる中間的な大きさをもつタンパク質は、どのような性質のものであろうか。これも二通りの解釈が可能である。

- ① 必要なエネルギーを欠いたために、輸送が途中で止まっているタンパク質である。この場合、この中間的な大きさをもつタンパク質は、葉緑体に必要なエネルギーを与えることでさらにチラコイド内腔へ輸送されるであろう。
- ② 必要なエネルギーを欠いたために、輸送先を誤った結果である。

以上の解釈の妥当性を確かめるために、中間的な大きさのタンパク質をストロマに蓄積している葉緑

体に光を照射した。光を吸収することでチラコイド膜はプロトンの勾配を形成するはずである。

### 1.3 光照射による、中間的な大きさの分子の輸送

葉緑体を 0.32 mM の ATP 存在下で前駆体タンパク質とインキュベートし、そのストロマに中間的な大きさのタンパク質を蓄積させ、さらにサーモライシンでその表面を処理して未反応の前駆体を分解した(図 13、pulse)。この葉緑体に 20 分間、光を照射した(図 13、chase)。ストロマに存在した中間的な大きさのタンパク質はチラコイド内腔に移行し、成熟型の大きさに切断された。この結果は、ストロマに現れた中間的な大きさのタンパク質が輸送途中にある中間体であることを強く示唆している。以上の実験の結果から、

- ① 23-kDa タンパク質の前駆体は、ATP をエネルギー源として包膜を通過し、ストロマへ輸送される。
- ② ストロマで前駆体はプロセッシングをうけて中間体となる。
- ③ 中間体はプロトンの勾配を必要とする機構によってチラコイド内腔へ輸送される。

ところで、合成した前駆体は平均して 5% 内外の効率で葉緑体内部へと運ばれる(フルオログラフに示した前駆体のサンプルの量が、実験系に加えた前駆体の 5% である)。そこで、たとえば 95% のタンパク質は葉緑体の中に入れて残ることになる。ところがこの中間体は、その大部分がチラコイド内腔へと輸送される。これは特筆すべき高い効率であり、この中間体がチラコイド膜を通過する能力を保持するための何らかの機構が存在することを示唆している。

## 2. 33-kDa 前駆体タンパク質の輸送

33-kDa は、23-kDa の場合とはやや異なる結果が得られた。この結果は解釈が難しく、33-kDa の輸送に必要なエネルギー源についてはまだ確定的な結論を出すに至っていない。

### 2.1 ATP による輸送

23-kDa の場合と異なり 33-kDa では、調べた ATP 濃度の範囲では常に中間的なタンパク質と成熟型タンパク質とが出現した。これらのタンパク種の存在比は ATP 濃度や反応の時間によらずほ

ば一定であった(図14, 15)。中間的な大きさのタンパク質はストロマに、また成熟型タンパク質の大部分はチラコイド内腔に、それぞれ局在した(図16)。なお一部だが無視できない量の成熟型タンパク質がストロマからも検出されることがあった(図17)。このときを含め、SDS-PAGEをクマシー染色したデータから判断する限り、ストロマとチラコイドの画分の分離は良好であった(データは示さない)。これは33-kDa前駆体の一部に、おそらくチラコイド膜の表層で切断を受け、しかも内腔へ移行できずにストロマへ戻るものがあることを示唆している。

## 2.2 脱共役剤の輸送への影響

3.2 mM ATPの存在下で、前駆体を単離葉緑体へ輸送させた。このとき、実験系に5  $\mu$ Mの脱共役剤を加えても影響が認められず(図18)、ほぼ一定の割合で中間的な大きさの分子と成熟型の分子が存在した。これは、ストロマにおける中間的な大きさの分子の成因は、チラコイド膜の電気化学的ポテンシャルが欠けたためではないことを示している。また、このときにチラコイド膜内腔に移行したタンパク質は、かなり低い膜ポテンシャルの下で輸送されたことになる。

## 2.3 光による中間的な大きさのタンパク質の輸送

葉緑体を0.32 mMのATP存在下で前駆体タンパク質とインキュベートし、そのストロマに中間的な大きさのタンパク質を蓄積させ、さらにサーモライシンでその表面を処理して未反応の前駆体を分解した(図19、pulse)。この葉緑体に20分間、光を照射した(図19、chase)。光の照射の前後で、ストロマに存在した中間的な大きさのタンパク質は明らかに減少し、チラコイド内腔の成熟型タンパク質の量は増加したが、およそ半分の量のタンパク質は消滅してしまった。これはストロマの中間的な大きさのタンパク質が、光に関係する機構によって分解されたか、あるいはチラコイド膜の表面に結合し、分画の段階でサーモライシンに分解された、という可能性を示している。光を照射する際に実験系に0.32 mMのATPを加えても、またサーモライシン処理をする際に温度を20  $^{\circ}$ Cに保っても、この結果は変わらなかった(データは省略した)。

## 2.4 光による中間的な大きさのタンパク質の分解

葉緑体を 3.2 mM の ATP 存在下で前駆体タンパク質とインキュベートした (図 20 A)。このとき、同時に光を照射したもの、およびそれらに CCCP を添加したものについて実験を行った。光を照射した実験では、輸送されたタンパク質のほとんどは成熟型になっていた。ほぼ同じ量の中間的なタンパク質が、光を照射しなかった対照から検出された。しかし CCCP を添加した実験では、より少ない量の成熟型タンパク質だけが検出された。この反応系には ATP が添加されているので、光と CCCP の影響でその ATP による効果が阻害されないならば、ある量の中間的な大きさのタンパク質がストロマに蓄積しているはずである。実験結果にそれが現れないのは、前項の 2.4 で考察したように、光に依存する機構でストロマに蓄積した分子が分解されたからではないだろうか。対照としておこなった 23-kDa 前駆体を用いた実験では、光 + CCCP + ATP の系でも、ストロマに蓄積した中間体は分解されなかった (図 20 B)。

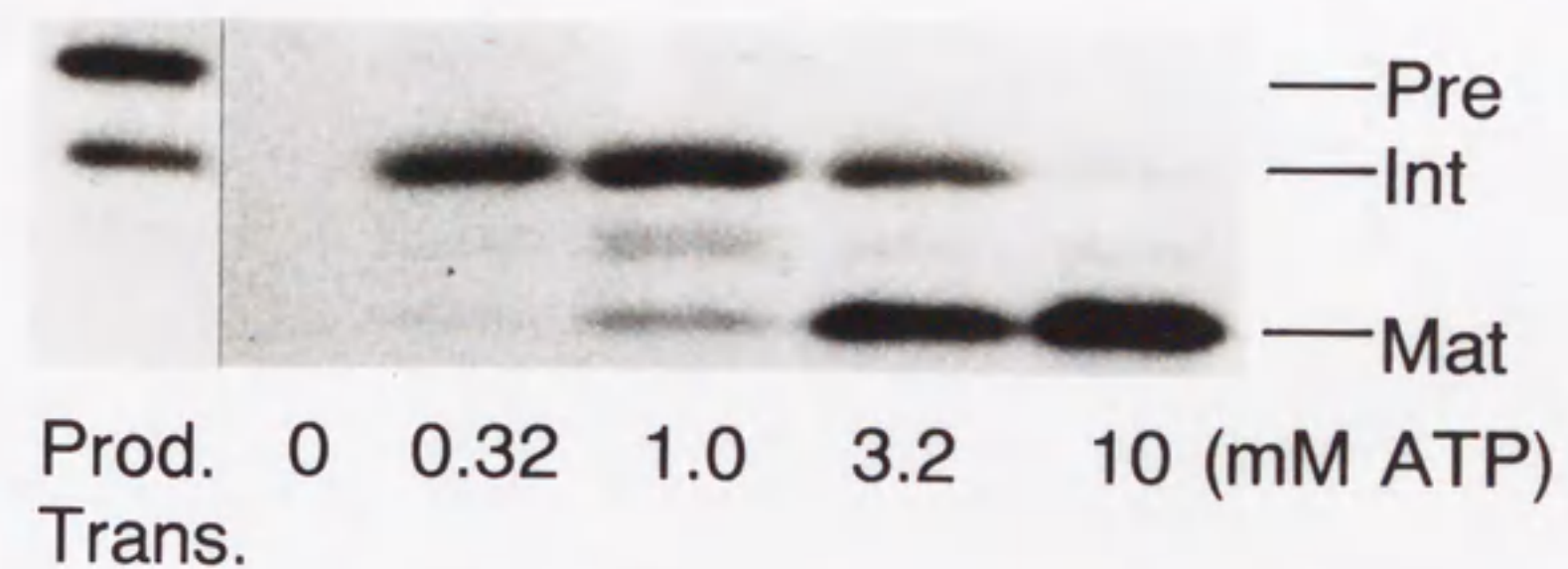


図10 ATP に依存する、単離葉緑体の内部への 23-kDa 前駆体タンパク質の輸送

単離葉緑体と 23-kDa 前駆体を、暗黒下、標記した ATP 濃度のバッファー中でインキュベートした。反応後に葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解し、葉緑体内部へと輸送されたタンパク質だけを SDS-PAGE で分離した。そのフルオログラフを示す。Prod. Trans., 合成した 23-kDa 前駆体タンパク質標品； Pre, 前駆体タンパク質； Int, 中間的な分子量のタンパク質； Mat, 成熟形タンパク質。ATP を加えなかった反応では、タンパク質は輸送されていない。また ATP の濃度に従って、成熟形タンパク質の他に中間的な分子量のタンパク質が出現している。

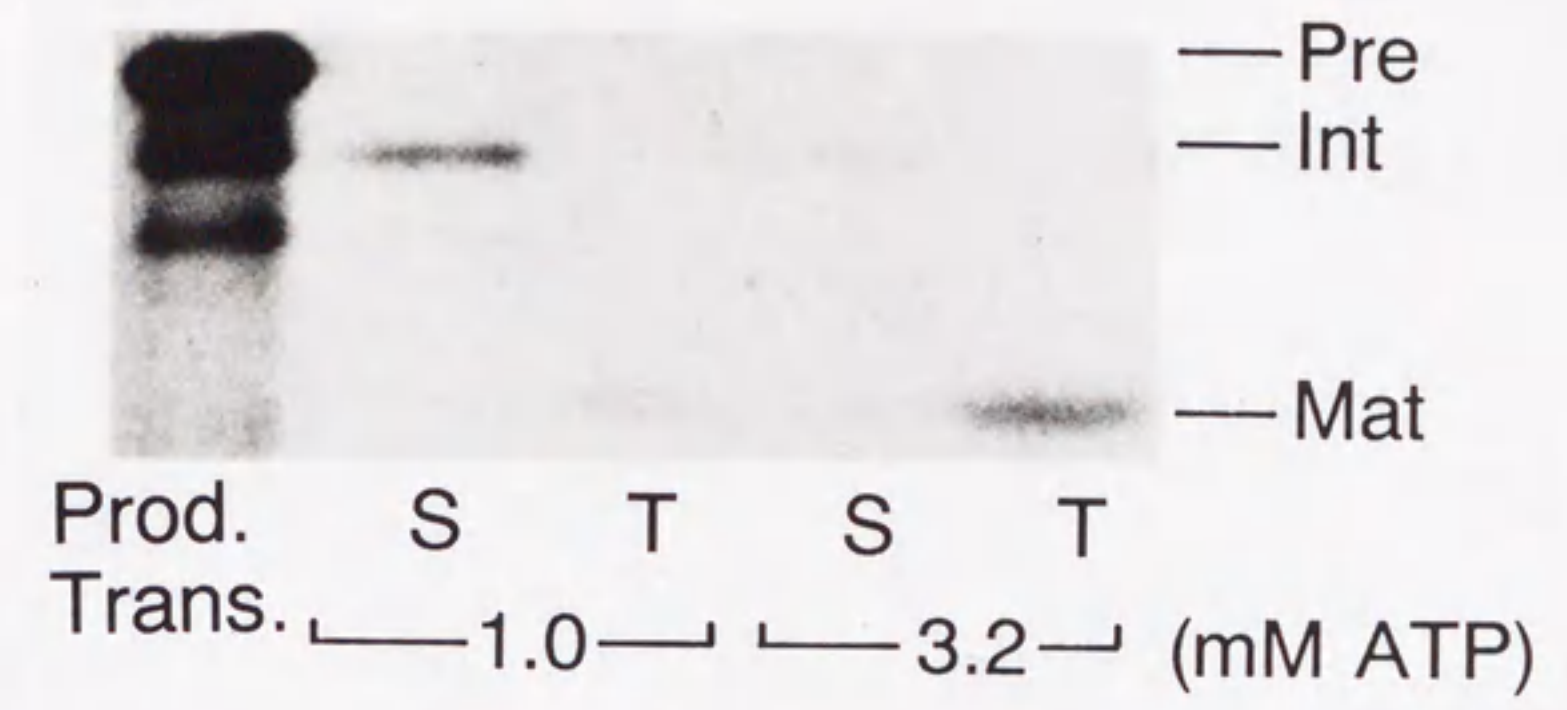


図11 輸送された 23-kDa の局在部位

単離葉緑体と 23-kDa 前駆体を、暗黒下、標記した ATP 濃度のバッファー中でインキュベートした。反応後に葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解した後、葉緑体をストロマ画分とチラコイド画分に分離した。チラコイドの表面を再びサーモライシンで処理したのち、それぞれを SDS-PAGE で分離した。そのフルオログラフを示す。S, ストロマ画分； T, チラコイド画分； Prod. Trans., 合成した 23-kDa 前駆体タンパク質標品； Pre, 前駆体タンパク質； Int, 中間的な分子量のタンパク質； Mat, 成熟形タンパク質。中間的な分子量のタンパク質はストロマに、成熟形タンパク質はチラコイド内腔に、それぞれ局在している。

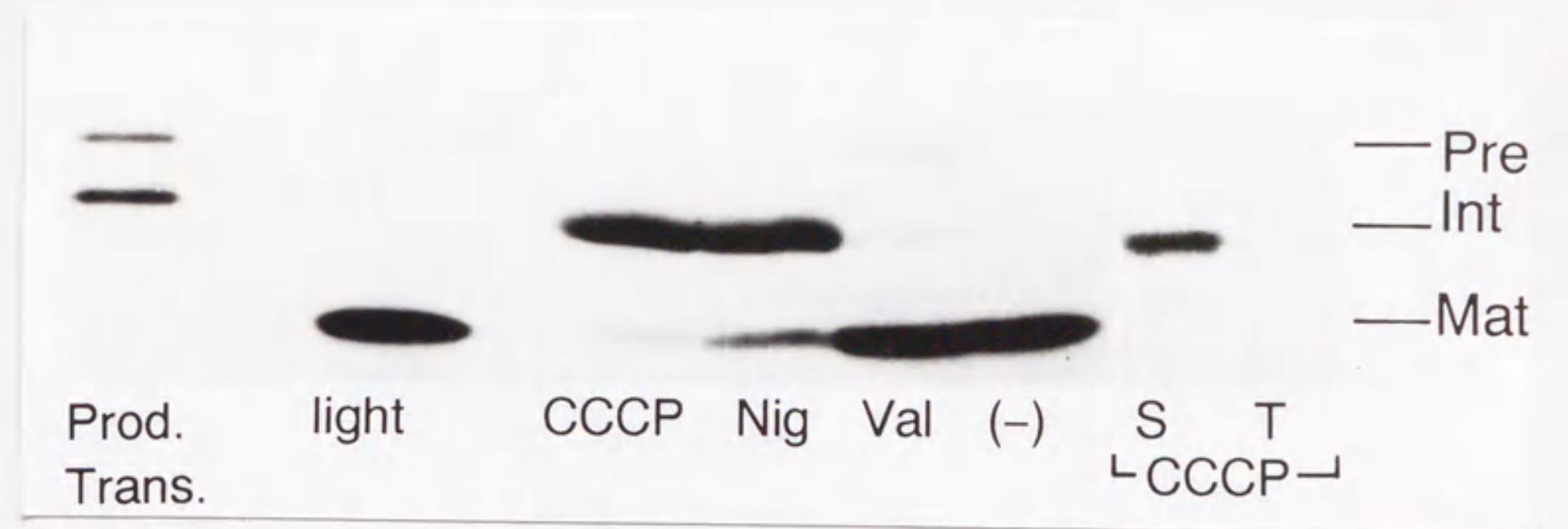


図12 23-kDa 前駆体タンパク質の ATP に依存する輸送に対する脱共役剤の影響

単離葉緑体と 23-kDa 前駆体を、暗黒下、10 mM ATP を含むバッファー中でインキュベートした。反応後に葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解した後、内部に輸送されたタンパク質を SDS-PAGE で分離した。そのフルオログラフを示す。light, 光照射下での輸送実験；(-)、脱共役剤を加えない対照実験； Nig, ナイジェリシン； Val, バリノマイシン； Pre, 前駆体タンパク質； Int, 中間的な分子量のタンパク質； Mat, 成熟形タンパク質。CCCP またはナイジェリシンを加えた反応では、中間的な分子量を持つタンパク質が蓄積している。CCCP を加えた反応については、葉緑体をストロマ画分とチラコイド画分に分画した実験もおこない、中間的な分子量を持つタンパク質がストロマに蓄積することを確認した（右端）。



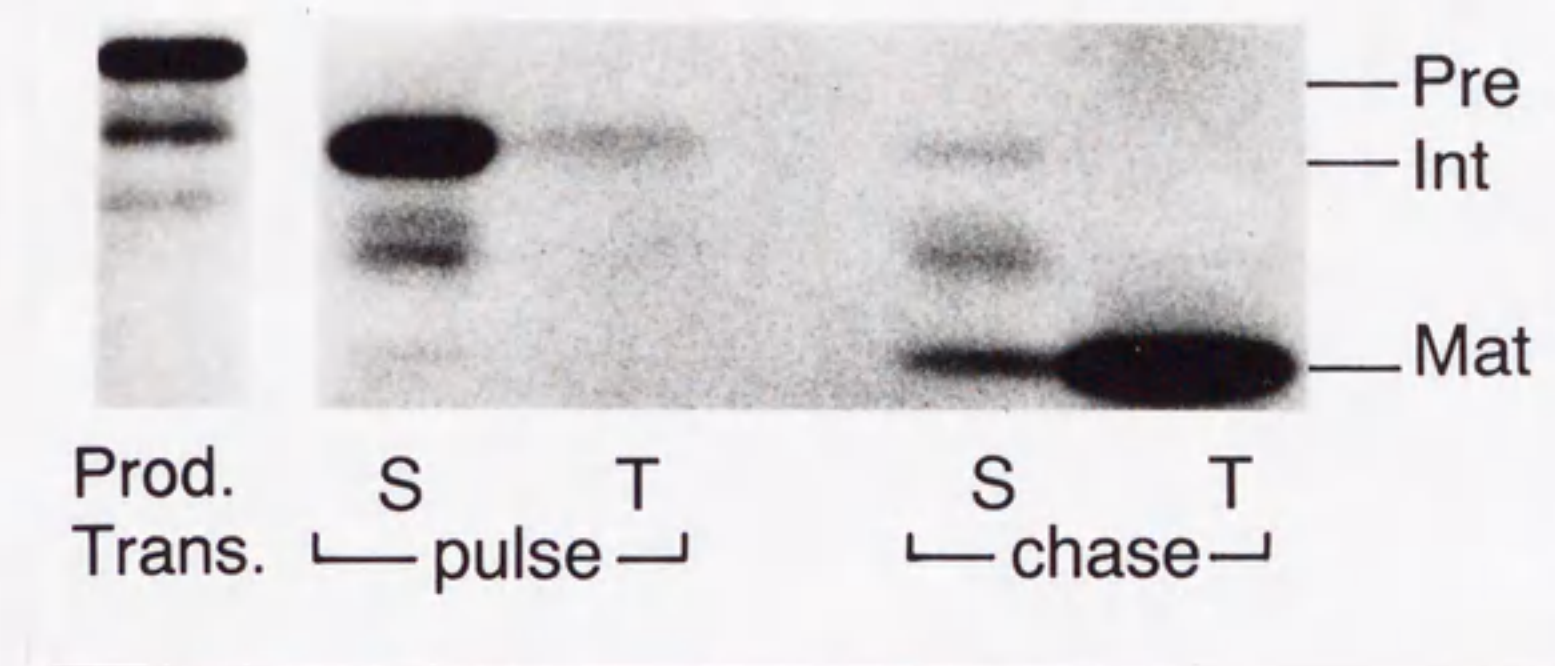


図13 ATP の pulse と光照射の chase による 23-kDa 前駆体タンパク質の輸送実験

単離葉緑体と 23-kDa 前駆体を、暗黒下、10 mM ATP を含むバッファー中でインキュベートした後、葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解した (pulse)。この葉緑体に光を照射した (chase)。Pre, 前駆体タンパク質; Int, 中間的な分子量のタンパク質; Mat, 成熟形タンパク質。ストロマに蓄積した中間的な分子量のタンパク質は、葉緑体が必要なエネルギーを獲得することで速やかに高率にチラコイド内腔へと輸送されている。

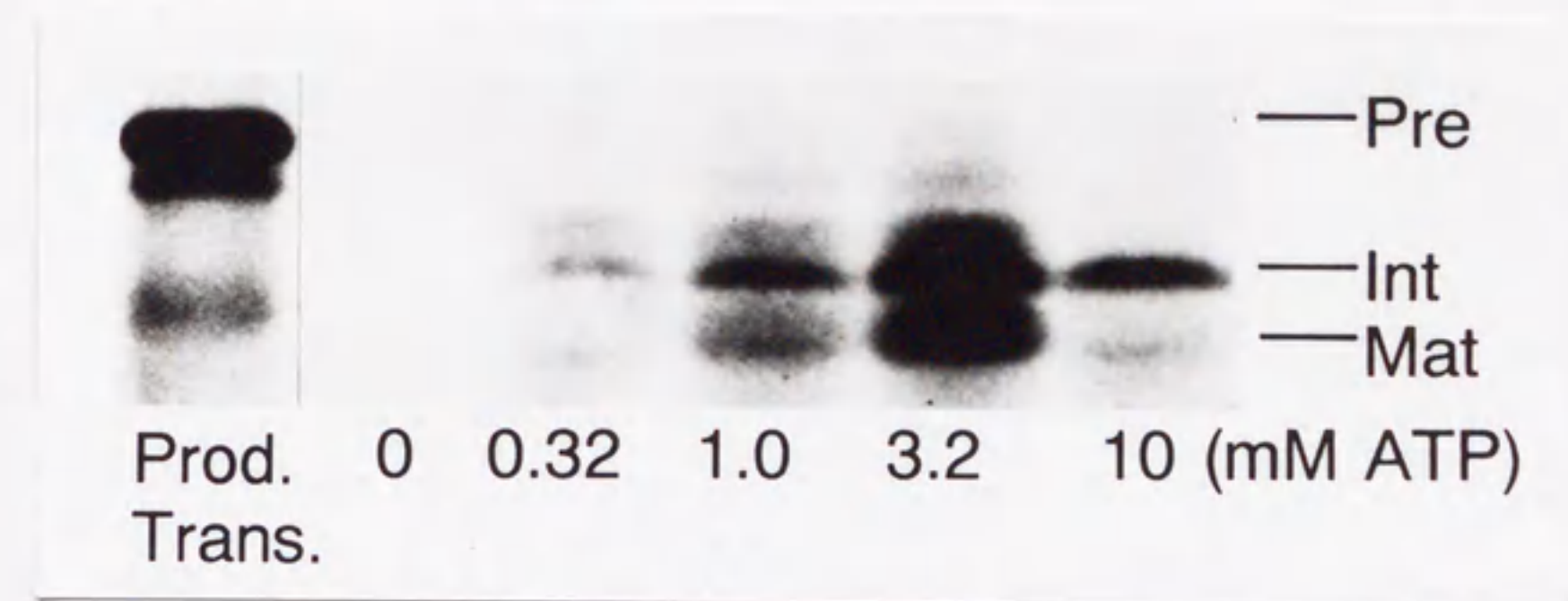


図14 ATP に依存する、単離葉緑体の内部への 33-kDa 前駆体タンパク質の輸送

単離葉緑体と 33-kDa 前駆体を、暗黒下、標記した ATP 濃度のバッファー中でインキュベートした。反応後に葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解し、葉緑体内部へと輸送されたタンパク質だけを SDS-PAGE で分離した。そのフルオログラフを示す。Prod. Trans., 合成した 33-kDa 前駆体タンパク質標品； Pre, 前駆体タンパク質； Int, 中間的な分子量のタンパク質； Mat, 成熟形タンパク質。中間的な分子量のタンパク質は ATP 濃度にかかわらず出現している。

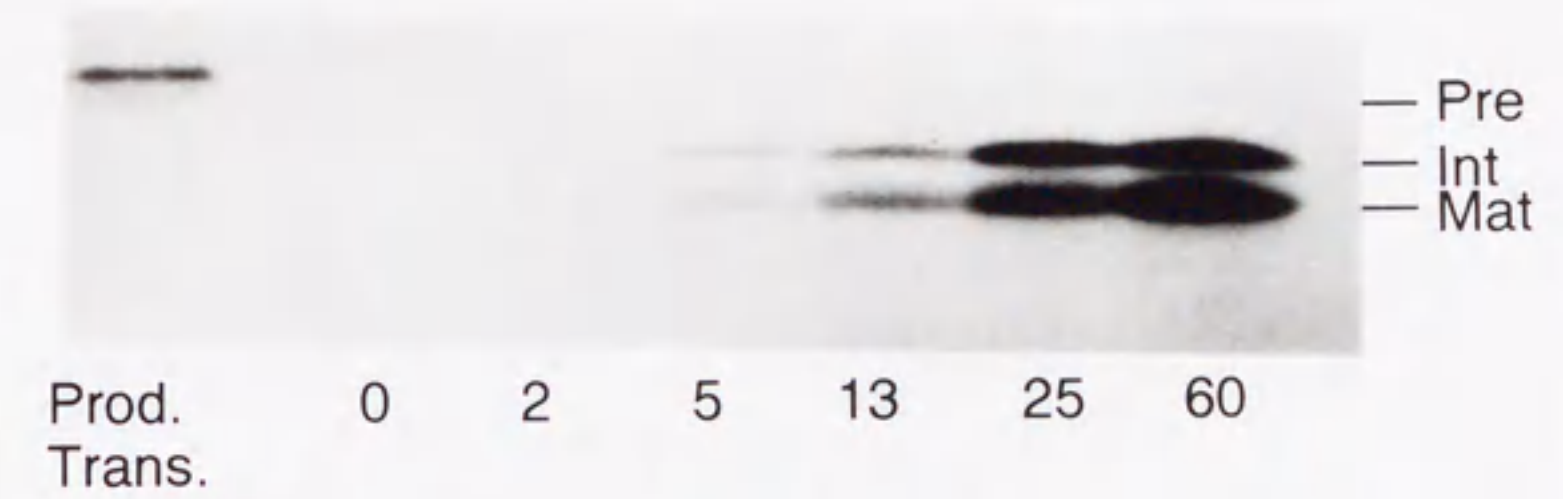


図15 輸送のタイムコース

単離葉緑体と 33-kDa 前駆体を、暗黒下、3.2 mM ATP の存在下でインキュベートした。写真の下側の数字は、インキュベートした時間(分)を示す。反応後に葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解し、葉緑体内部へと輸送されたタンパク質を SDS-PAGE で分離した。そのフルオログラフを示す。Prod. Trans., 合成した 33-kDa 前駆体タンパク質標品; Pre, 前駆体タンパク質; Int, 中間的な分子量のタンパク質; Mat, 成熟形タンパク質。中間的な分子量のタンパク質は輸送の時間にかかわらず出現している。

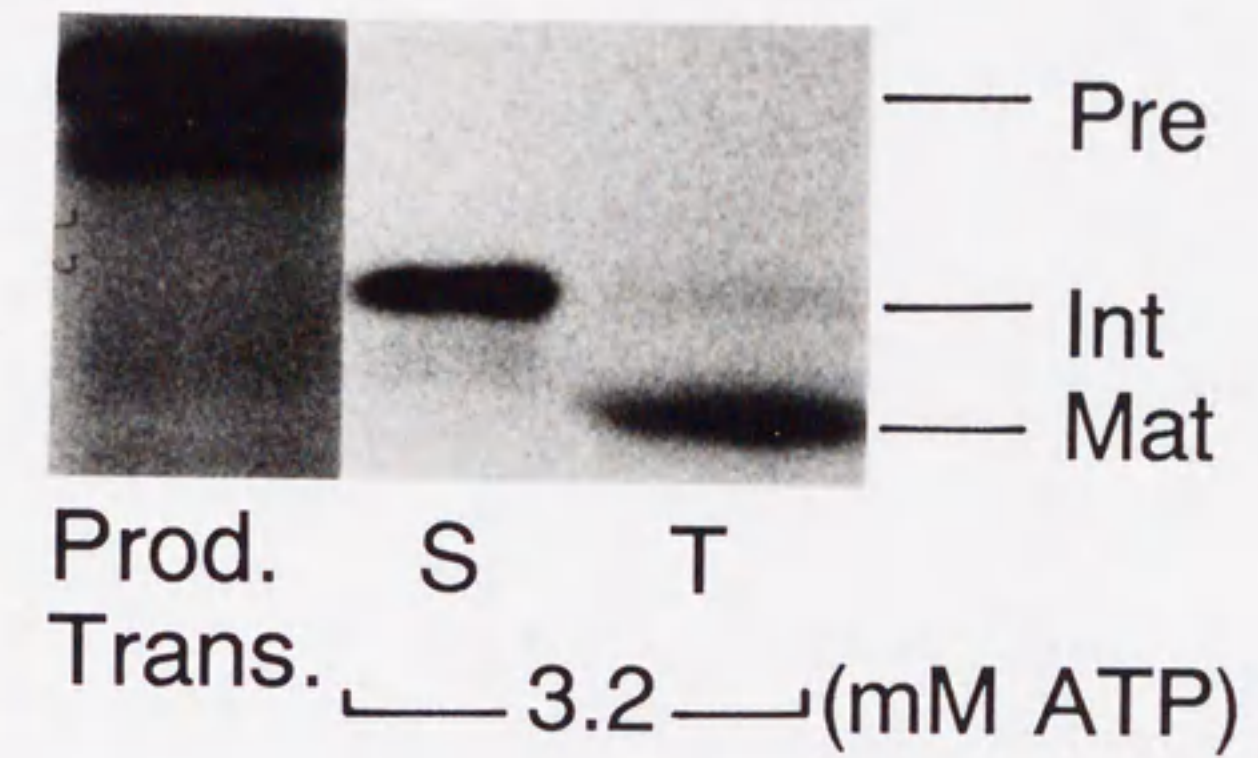


図16 輸送された 33-kDa の局在部位

単離葉緑体と 33-kDa 前駆体を、暗黒下、3.2 mM ATP を含むバッファー中で 60 分間インキュベートした。反応後に葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解した後、葉緑体をストロマ画分とチラコイド画分に分離した。チラコイドの表面を再びサーモライシンで処理したのち、それぞれを SDS-PAGE で分離した。そのフルオログラフを示す。S, ストロマ画分； T, チラコイド画分； Prod. Trans., 合成した 33-kDa 前駆体タンパク質標品； Pre, 前駆体タンパク質； Int, 中間的な分子量のタンパク質； Mat, 成熟形タンパク質。中間的な分子量のタンパク質はストロマに、成熟形タンパク質はチラコイド内腔に、それぞれ局在している。なお成熟形のタンパク質の一部は、ストロマからも検出されている。

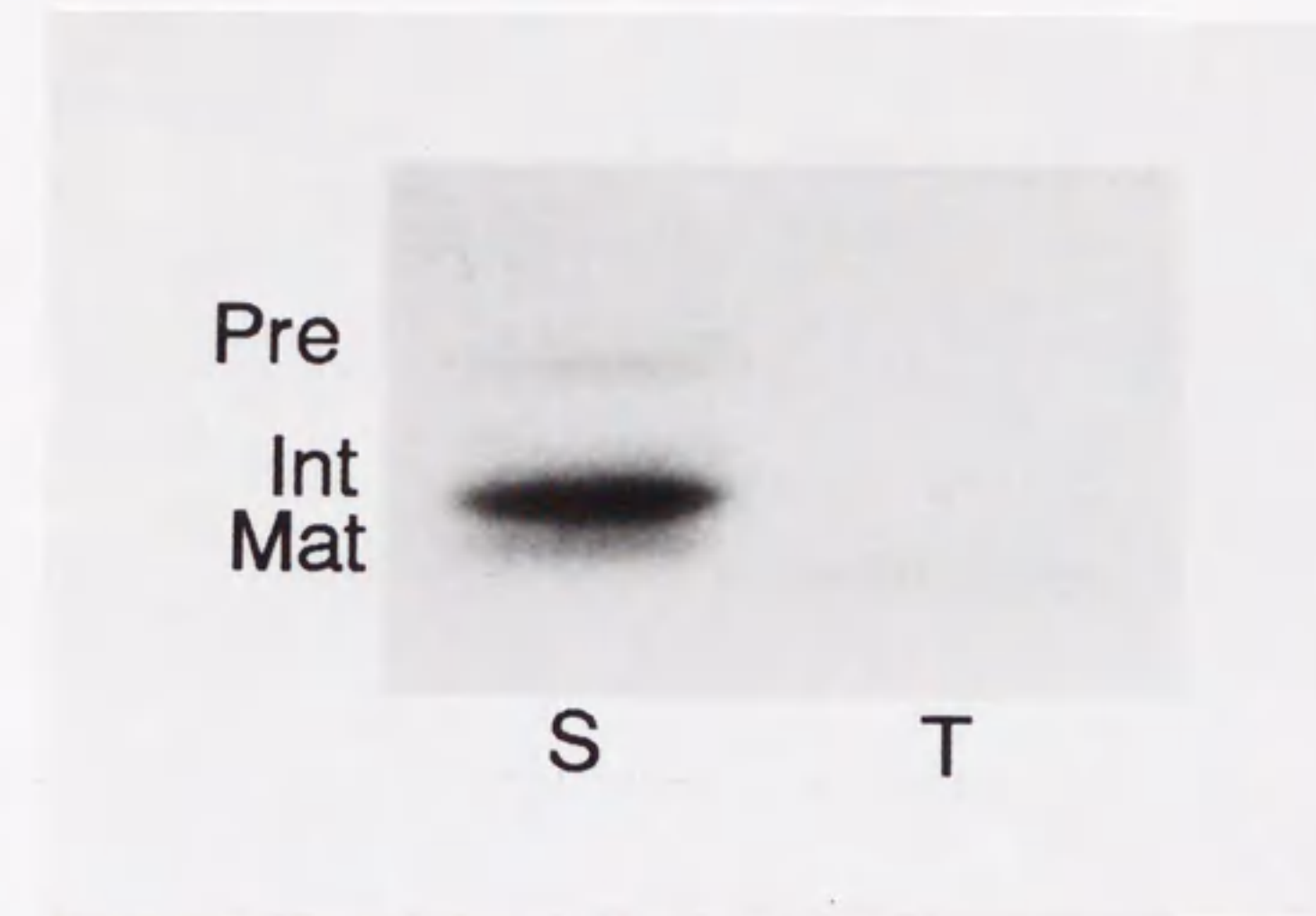


図17 ストロマから輸送された 33-kDa の成熟形タンパク質が検出された例

図16で示した実験と同様に、単離葉緑体と 33-kDa 前駆体を、暗黒下、3.2 mM ATP 濃度のバッファー中で 20 分間インキュベートした。反応後に葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解した後、葉緑体をストロマ画分とチラコイド画分に分離した。チラコイドの表面を再びサーモライシンで処理したのち、それぞれを SDS-PAGE で分離した。そのフルオログラフを示す。S, ストロマ画分； T, チラコイド画分； Pre, 前駆体タンパク質； Int, 中間的な分子量のタンパク質； Mat, 成熟形タンパク質。中間的な分子量のタンパク質はストロマに局在している。成熟形のタンパク質はストロマからも検出されている。

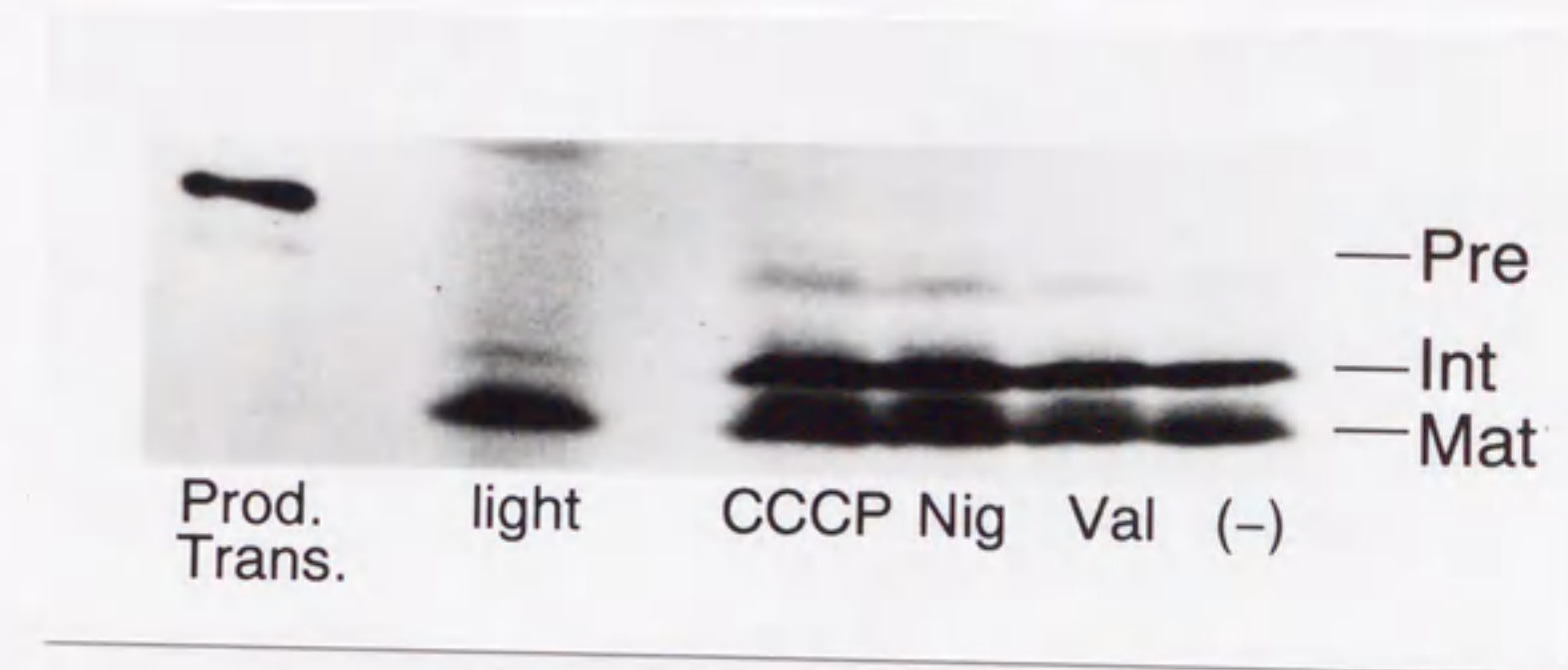


図18 33-kDa 前駆体タンパク質の ATP に依存する輸送に対する脱共役剤の影響

単離葉緑体と 33-kDa 前駆体を、暗黒下、3.2 mM ATP を含むバッファー中でインキュベートした。反応後に葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解した後、内部に輸送されたタンパク質を SDS-PAGE で分離した。そのフルオログラフを示す。Prod. Trans., 合成した 33-kDa 前駆体タンパク質標品； light, 光照射下での輸送実験； (-), 脱共役剤を加えない対照実験； Nig, ナイジェリシン； Val, バリノマイシン； Pre, 前駆体タンパク質； Int, 中間的な分子量のタンパク質； Mat, 成熟形タンパク質。脱共役剤の添加は、成熟形タンパク質の出現を阻害していない。

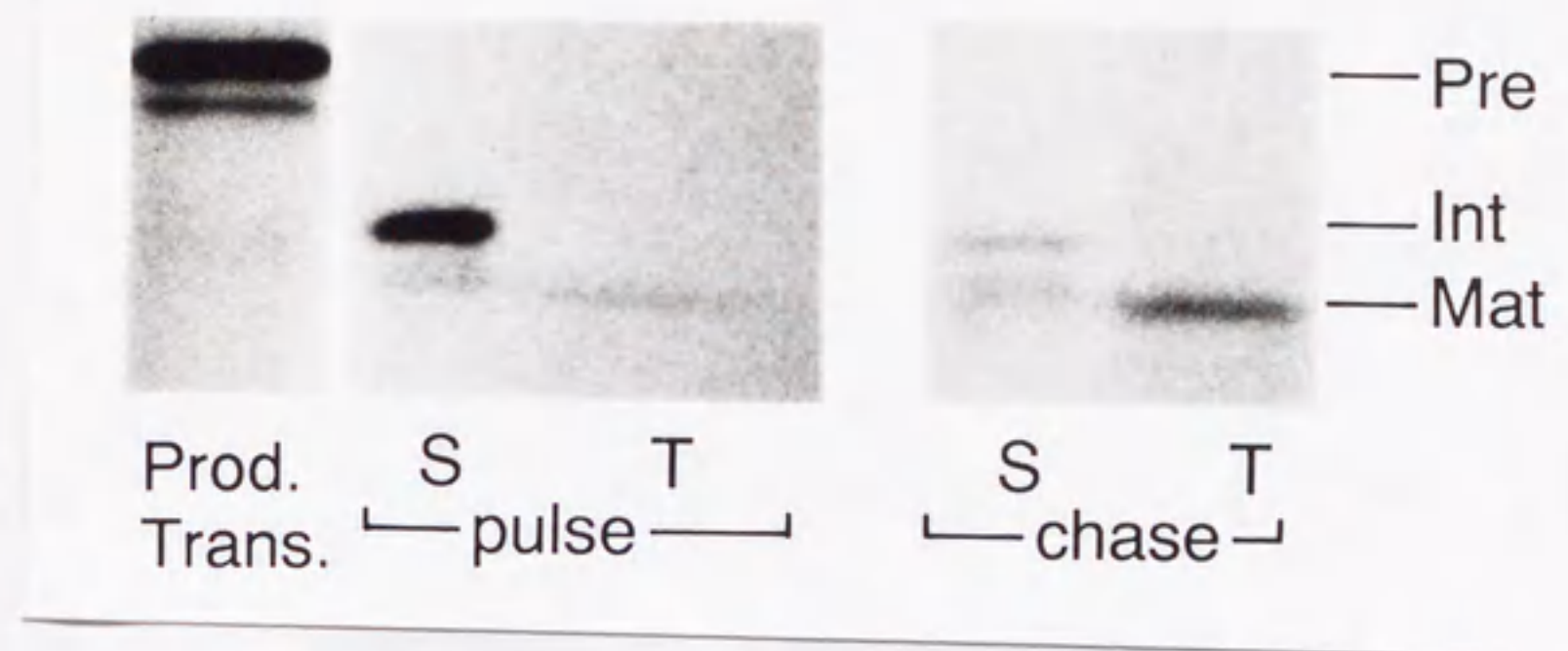


図19 ATP の pulse と光照射の chase による 33-kDa 前駆体タンパク質の輸送実験

単離葉緑体と 33-kDa 前駆体を、暗黒下、3.2 mM ATP を含むバッファー中でインキュベートした後、葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解した (pulse)。この葉緑体に光を照射した (chase)。Prod. Trans., 合成した 33-kDa 前駆体タンパク質標品； Pre, 前駆体タンパク質； Int, 中間的な分子量のタンパク質； Mat, 成熟形タンパク質。ストロマに蓄積した中間的な分子量のタンパク質の一部だけが、葉緑体が必要なエネルギーを獲得することでチラコイド内腔へと輸送されている。しかし中間的な分子量のタンパク質のほとんどは標品から消失している。

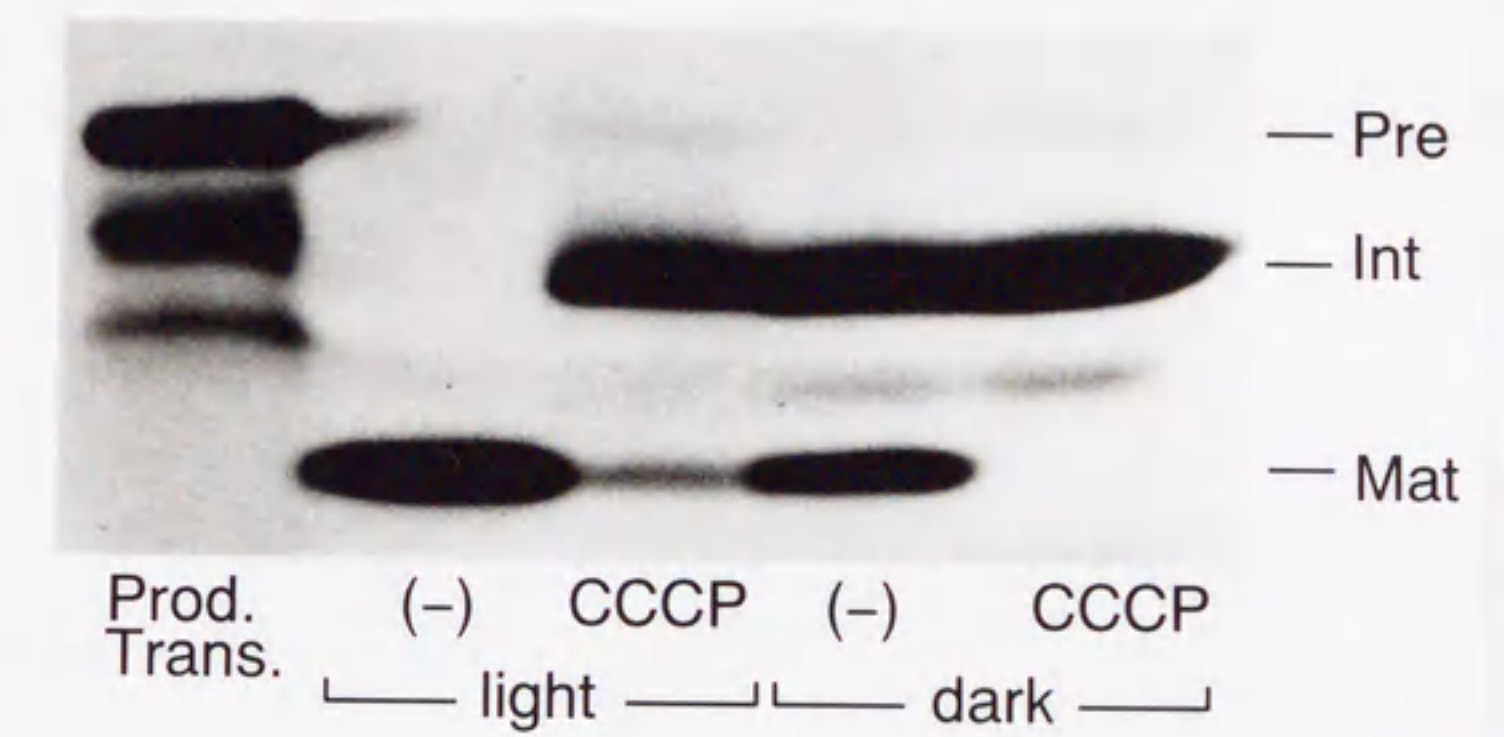
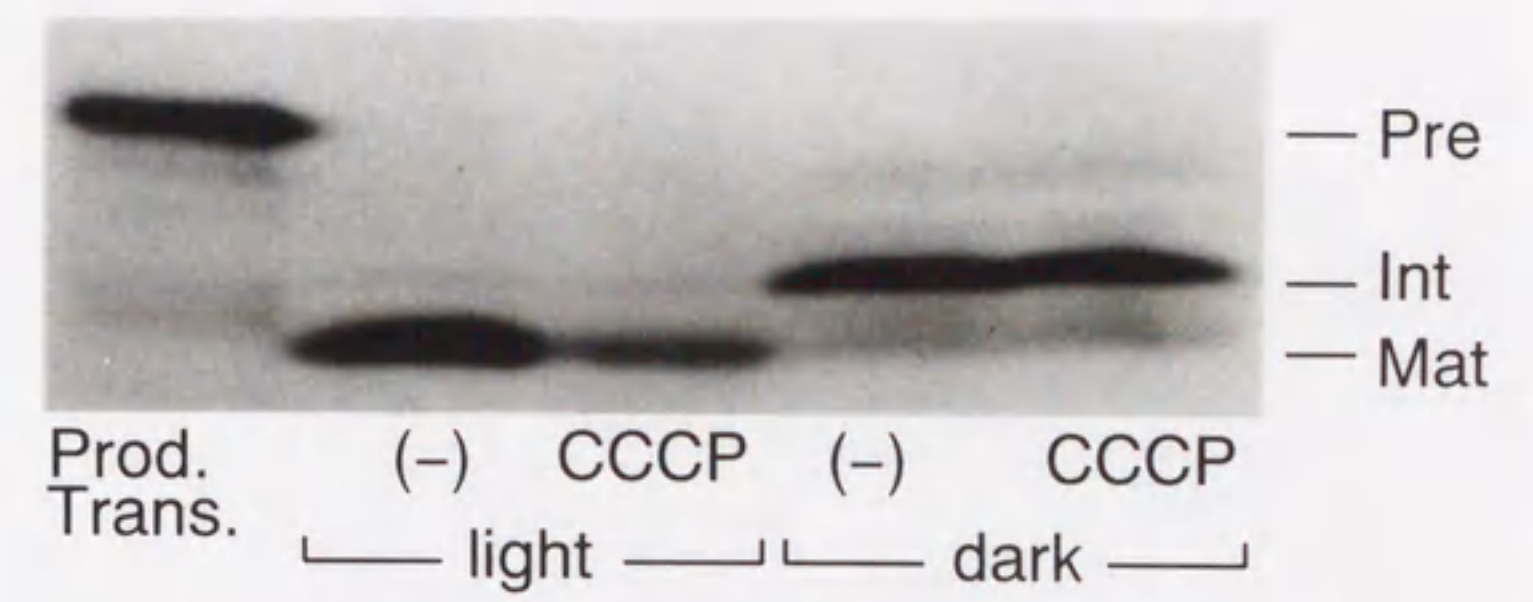


図20 光照射による輸送反応における脱共役剤の影響

単離葉緑体と前駆体タンパク質を、3.2 mM ATP を含むバッファー中でインキュベートした後、葉緑体の表面に残ったタンパク質をサーモライシンで分解した。その際、光照射をしたものと(light) 暗黒下でおこなったもの (dark) を示す。Prod. Trans., 合成した前駆体タンパク質標品；(-), 脱共役剤を含まない対照実験；CCCP, CCCP を含む輸送実験；Pre, 前駆体タンパク質；Int, 中間的な分子量のタンパク質；Mat, 成熟形タンパク質。上のパネルは 33-kDa、下のパネルは 23-kDa の輸送実験である。23-kDa の輸送においては光照射下でも CCCP の添加によって成熟形タンパク質の生成が強く阻害されている。



局在する膜	エネルギー要求性	輸送の基質	予想されるタイプ
包膜	ATP	前駆体タンパク質	未知
チラコイド膜	プロトン勾配 (ATP)	中間体タンパク質	原核生物の細胞膜に由来する?

表1 それぞれの膜に局在する輸送装置の性質

## 考察

### 1. 23-kDa 前駆体タンパク質の輸送について

葉緑体は外部に加えられた ATP を利用して、このタンパク質を取り込むことができた。その輸送反応については以下の事実が明らかになった。

- ① 包膜とチラコイド膜は、性質の異なる輸送装置を持っている (表1)。これらの装置はそれぞれ独立に機能する。
- ② ストロマにおいて 23-kDa 前駆体は切断をうけて中間体へと移行する。この中間体は何らかの機構で、さらにチラコイド膜を通過して輸送されるための能力を保持される。

チラコイド膜の輸送装置は、電気化学的なポテンシャルを必要とすること、またプロトンの駆動方向とタンパク質の輸送方向が逆であることから考えると、原核生物 (Wickner et al. 1991, Bassford et al. 1991) やミトコンドリア (Pfanner & Neupert 1990) で知られている輸送装置と共通の原理で作動することが予想される。またチラコイドそのものが、ラン藻の細胞膜の陥入で形成された膜に由来していると考えられることから (樋口 1980)、これらの輸送装置は共通の祖先型のものから進化しているのではないだろうか。この装置が他の生物種の装置のように複数の前駆体タンパク質を運ぶのか、また 33-kDa の前駆体も輸送するのかについてはまだ明らかではない。

チラコイド内腔へ輸送される前駆体タンパク質がストロマで切断されることはすでに予想されており (Smeekens et al. 1986)、部分的にはあるが切断酵素が精製されている (Musgrove et al. 1989)。図 1-3 に示したデータは、その中間体の存在に関するはじめての直接的な証拠となった。この中間体は、たいへん効率よくチラコイド膜を通過して内腔へと輸送された。まだ予備的な実験であるが、低濃度の ATP による輸送実験の後にストロマを回収し、これを変性させないで電気泳動で分離した結果、この中間体は巨大な分子として存在することが示唆された (データは示さない)。残念ながらこの巨大分子はあまり安定でなく、ストロマをバッファーで希釈すると解離してしまうため、まだその正体が明確ではない。しかしその大きさや性質から考えて、HSP 70 様のタンパク質複合体との会合が予想される。葉緑体のタンパク質輸送の研究からは、RuBisCO ホロ酵素のアセンブリーなどサブユニットの会合に関する知見を除くと、まだ分子シャペロンの関与を示す直接的な証拠は得ら

れていない。しかし、葉緑体や細胞質に複数種の分子シャペロンが存在することは既に明らかになっており (Vierling 1991, Gatenby 1992)、クロロフィル結合タンパク質について、輸送中にストロマにおいて分子シャペロンと会合することを示唆する報告がある (Payan & Cline, 1991)。またミトコンドリアや原核細胞の輸送系からの知見を考慮すると、この輸送中間体がストロマに単独で存在していることは考えにくい。

## 2. 33-kDa 前駆体タンパク質の輸送について

今までに得られているデータからは、このタンパク質が ATP をエネルギー源にして包膜を通過することだけが明らかになっている。このタンパク質がストロマに蓄積したときにあらわれる中間的な大きさの分子が何であるのか、チラコイド膜を通過するときに必要なエネルギー源は何であるのかについては、まだ決定的な証拠となるデータがない。現時点での作業仮説は次の通りである。

1) 33-kDa は前駆体はストロマで切断されて中間体を形成するが、その中間体は速やかに活性を失う。中間的な大きさの分子は、失活した中間体であるか、その分解産物である。これは、中間的な大きさの分子が、光を照射することで分解されるらしいことからの推定である。そして 33-kDa をストロマで足止めした直接の原因は、その立体構造による輸送の障害である。これは、成熟型の 33-kDa の一部が、ストロマに「戻って」しまうことからの着想である。ある割合の分子だけがチラコイド内腔に輸送されることも、ある確率で輸送に必要な構造をとるからであると考えたと説明がつく。

2) 基本的には、葉緑体の外から加えた ATP によって内部の ATP レベルは十分に高くなっている。葉緑体の内部にある ATP の濃度を計測した例によると、その濃度は葉緑体が明所にあるときでも 8 nmol/mg Chl である (Kuroda et al. 1992)。1 mg Chl の単離葉緑体を、輸送用バッファーから遠心沈殿してペレットにすると、100-200  $\mu$ l ほどの体積になる。ストロマの体積がこのうちの 10% しかなかったとしても、ATP の濃度は 0.8 mM にしかならない。ATP や ADP が包膜を通過する機構には定説がないが、ハウレンソウの葉緑体の外に 0.1 mM の ATP を加えたとき、約 80 秒で 70-80% の内部の ATP が置換されるという報告がある (Heldt 1969)。そこで、この実験条件では葉緑体内部の ATP 濃度や [ATP]/[ADP] の値は高く保たれるのではないだろうか。また 23-kDa の輸送で示唆されたように、外部に 3.2 mM の ATP を加えた条件ではストロマの ATP がチ

チラコイド膜の ATP 合成酵素を逆回転させてプロトンの濃度勾配を形成していると考えられる。このことから考えてもストロマの ATP レベルは、光をうけている状態と大差ないのではないだろうか。

3) 上記の推定のように、チラコイド膜内腔へ輸送されなかった原因がプロトンの勾配の不足ではなく、かつ ATP のレベルは十分に高かったと仮定する。このとき、何が輸送途中の 33-kDa を、中間体が失活するだけの時間、ストロマでひきとめたのだろうか。これには二つの可能性を考えている。

- ① 33-kDa の中間体が効率よくチラコイド内腔へ輸送されるためには、光に依存する何らかの修飾を必要とする。これが妨げられたので修飾されなかった分子がストロマに蓄積した。
- ② 33-kDa の中間体の輸送には ATP とプロトン勾配以外のエネルギーが必要である。

いずれにせよ現時点ではまだ直接的な証明につながるデータがない。そこで、たとえば次のような可能性も考えられる。

1' ) 中間的な大きさの分子は、間違っただけによる産物である。これは輸送中間体とは関係がない。33-kDa は中間体を形成しないか、あるいはこの実験系ではそれが検出できない。

これらの可能性の中で直接的な証明ができそうなのは、2) の仮定が誤りであった場合だけである。この場合は、ATP を外から加えるのではなく、より包膜を通過しやすい 3 炭糖リン酸のシャトル系で葉緑体内部の ATP レベルを上げてやれば、正常な輸送がおこなわれるはずである。これ以外の可能性についての証明方法はいまのところいいアイデアがない。こうした実験系はある限られた可能性について肯定または否定することには長けている。しかしいろいろな可能性が考えられる場合、それらをしらみつぶしに調べることは、経験的に言って不可能である。

## 参考文献

- Bassford, P., Beckwith, J., Ito, K., Kumamoto, C., Mizushima, S., Oliver, D., Randall, L., Silhavy and T., Tai P. C. (1991) The primary pathway of protein export in *E. coli*. *Cell* 65: 367-368.
- Flügge, U. I. and Hinz, G. (1986) Energy dependence of protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 160: 563-570.
- Gatenby, A. A. (1992) Protein folding and chaperonins. *Plant Mol. Biol.* 19: 677-687.
- Heldt, H. W. (1969) Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts. *FEBS lett.* 5: 11-14.
- Kuroda, H., Inagaki, N. and Satoh, K. (1992) The level of stromal ATP regulates translation of the D1 protein in isolated chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 33: 33-39.
- Musgrove, J. E., Elderfield, P. D. and Robinson, C. (1989) Endopeptidases in the stroma and thylakoids of pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 90: 1616-1621.
- Olsen, L. J., Theg, S. M., Selman, B. R. and Keegstra, K. (1989) ATP is required for the binding of precursor proteins to chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 264: 6724-6729.
- Payan, L. A. and Cline, K. (1991) A stromal protein factor maintains the solubility and insertion competence of an imported thylakoid membrane protein. *J. Cell Biol.* 112: 603-613.
- Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) The mitochondrial protein import apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 331-353.
- Smeekens, S., Bauerle, C., Hageman, J., Keegstra, K. and Weisbeek, P. (1986) The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartment. *Cell* 46: 365-375.
- Theg, S. M., Bauerle, C., Olsen, L. J., Selman, B. R. and Keegstra, K. (1989) Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J. Biol. Chem.* 264: 6730-6736.
- Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*

*Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.

Wickner, W., Driessen, A. J. M. and Hartl, F.-U. (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 101-124.

樋口昌孝 (1980) 葉緑体の出現と進化、宮地重遠ら編「葉緑体」、理工学社

### I 部 3 章

#### 23-kDa 前駆体タンパク質の、ストロマにおける切断部位の決定

前駆体タンパク質は、葉緑体の内部へと輸送された直後に輸送ペプチドが切り離され、成熟型タンパク質へと移行する。この輸送ペプチドの切り離しの過程を試験管内の実験系で再現した報告は、まずストロマに輸送されるタンパク質を基質にして行われた。単離葉緑体から抽出したストロマ画分は、前駆体タンパク質の輸送ペプチドを切り離し、成熟型と同じ大きさの分子を生成した (Smith & Ellis 1978)。このストロマ画分が、いくつかのチラコイド内腔に輸送されるタンパク質の前駆体も切断し、その結果これらの前駆体は中間的な大きさの分子に移行することが明らかになった (Watanabe et al. 1986)。その後、異種の植物種に由来する前駆体タンパク質と葉緑体の組み合わせにおいて、試験管内の輸送反応のあいだにこうした中間的な大きさの分子が現れることが報告され (Smeekens et al. 1986)、それらが輸送における中間体ではないかと考えられてきた。I 部 2 章で示したように、私は中間体としての活性を持つ分子をはじめて得ることに成功した。この分子はストロマに存在し、チラコイド内腔へ輸送されるための活性を保持していた。この結果は、この分子の N 末端に存在している輸送ペプチドが、チラコイド膜を通過するのに必要な情報を全て持っていることを示している。

この分子の持つ輸送ペプチドの構造を知るために、その N 末端をラジオシーケンスの手法を用いて決定することにした。これは前駆体を合成する際にある特定の種類のアミノ酸だけを標識し、それから得た中間体から Edman 分解によって N 末端のアミノ酸を一つずつはずして集め、その放射能を測定する方法である。これによって標識したアミノ酸が N 末端から何番目の残基として現れるかが明らかになる。この方法はごく少量のポリペプチドから N 末端を同定できる。しかし、輸送反応によって得られる中間体の放射能は極めて微量であり、この方法をそのまま応用することは不可能であった。そこで、より多くの中間体を得るため、前駆体を単離したストロマと反応させることで切断することを試みた。

かつて渡辺グループで、丸田らがこのエンドウ 23-kDa 前駆体をホウレンソウ葉緑体より抽出したストロマを用いて切断し、その産物の N 末端を決定したことがあった。しかしその後、ストロマが認識部位の異なる複数種のタンパク質分解酵素を持つことが報告され (Musgrove et al. 1989)、単離したストロマを精製しないで用いる実験系が正しい部位での切断を再現するかどうか問題になっていた。その後、ホウレンソウのストロマから RuBisCO の SS を切断することを指標に部分精製

された酵素が、コムギの 23-kDa の前駆体タンパク質を切断することが報告され、またその切断の部位が決定された (Bassham et al. 1991)。この部位は丸田らの決定した部位とは明らかに異なっていた。Bassham らの報告した切断の産物は、ホウレンソウの葉緑体にコムギの前駆体を輸送したときに少量現れる中間的なタンパク質と同じ分子量を持っていたが、これが中間体であるという証拠はまだ提出されていない。

驚くべきことに I 部 2 章の方法で得た中間体は、丸田らの決定した「中間体」とは異なる分子量を持っていた。そこで新たにエンドウの単離葉緑体から抽出したストロマ画分を用いて前駆体タンパク質を切断すると、その産物は SDS-PAGE 上で中間体と同一の分子量を示した。この産物の N 末端を決定したところ、輸送ペプチドの親水性領域のなかで切断されていたことが明らかになった。この切断部位の周辺は生物種間でアミノ酸配列が保存されており、Bassham ら (1991) が報告した部位に相当した。

## 実験の方法

### 1. 単離ストロマによる前駆体の切断

ストロマは、エンドウ葉緑体から抽出した。葉緑体を 10 mM K-Tricine, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0 のバッファーに 1mg Chl/ml の濃度で懸濁することで破裂させ、12,000 xg で 3 分間の遠心の上清を集め、-80 °C で保存し、これを単離ストロマとして使用した。mRNA の翻訳反応の際に [<sup>3</sup>H]Val で標識した前駆体とこの単離ストロマとを 20 °C で 8 時間インキュベートした。

### 2. 切断の産物と輸送中間体との大きさの比較

前駆体タンパク質を 1 mM ATP の存在下で単離葉緑体へ輸送することで得た中間体 (I 部 2 章) と、1. で得た中間的な大きさのタンパク質を混合し、約 10 cm の泳動距離を持つ SDS-PAGE による分離を試みた。

### 3. 切断の産物の N 末端の決定

前駆体をストロマとインキュベートし、その産物を SDS-PAGE で分離後、タンパク質を polyvinylidene fluoride (Millipore) メンブランにプロットした。メンブランの一部を切り取り、

EN<sup>3</sup>HNCe (DuPont/NEN) スプレーを用いてフルオログラフを行い、切断による主要な産物の位置を測定した。残りのメンブランから対応するバンドの位置を切出し、気相のアミノ酸シーケンサー (Model 477A, Applied Biosystems) を用いてこのメンブラン上で Edman 分解をおこなった。分解の各サイクル毎に分解物を回収し、そこに含まれる放射能を測定した。

## 実験の結果

### 1. 単離ストロマで前駆体を切断した産物と、輸送中間体の分子量の比較

方法の項で述べたように、単離ストロマによる切断の産物と中間体とを SDS-PAGE で比較した (図 2 1)。これらのうち主要な産物は同じ分子量 (27,000) を示し、また両者の混合物は 1 本のバンドとして出現した (レーン 3)。レーン 3 のバンドが他のものよりもやや遅く泳動しているのは、このレーンのサンプルが他のレーンのものより約 2 倍の RuBisCO の LS を含んでいたためのアーティファクトである。同様の実験を、さらに長く泳動させることや、7 M 尿素を含むゲルによる電気泳動でも試みたが、どちらの方法でもこの二つのポリペプチドは同じ移動度を示した (データを略す)。そこでこれらのポリペプチドは同一か、あるいはほとんど同じ部分で切断されたものであると結論した。ここに示したフルオログラフィの露出を延ばすと、僅かではあるが丸田らが決定したものと同一分子量を持つバンドも出現した (データは略す)。

### 2. 切断の産物の N 末端

単離ストロマによる切断の産物を Edman 分解した結果、7、8、11、12 番目の残基から放射能が検出された (図 2 2)。これに対応できる Val 残基は輸送ペプチドのアミノ酸配列中の 44、45、48、49 番目のみに存在し、切断箇所は 37 Lys ↓ 38 Ala であった。この切断箇所は 23-kDa の輸送ペプチドの親水性領域の中に存在し、切断による産物の N 末端には輸送ペプチドの疎水性クラスタの全域と親水性領域の一部が残されていた (図 2 3)。またこの切断部位の周辺のアミノ酸配列は、生物の種間で保存されており (II 部 1 章に示す)、Bassham ら (1991) で報告があった切断部位に対応するものであった。



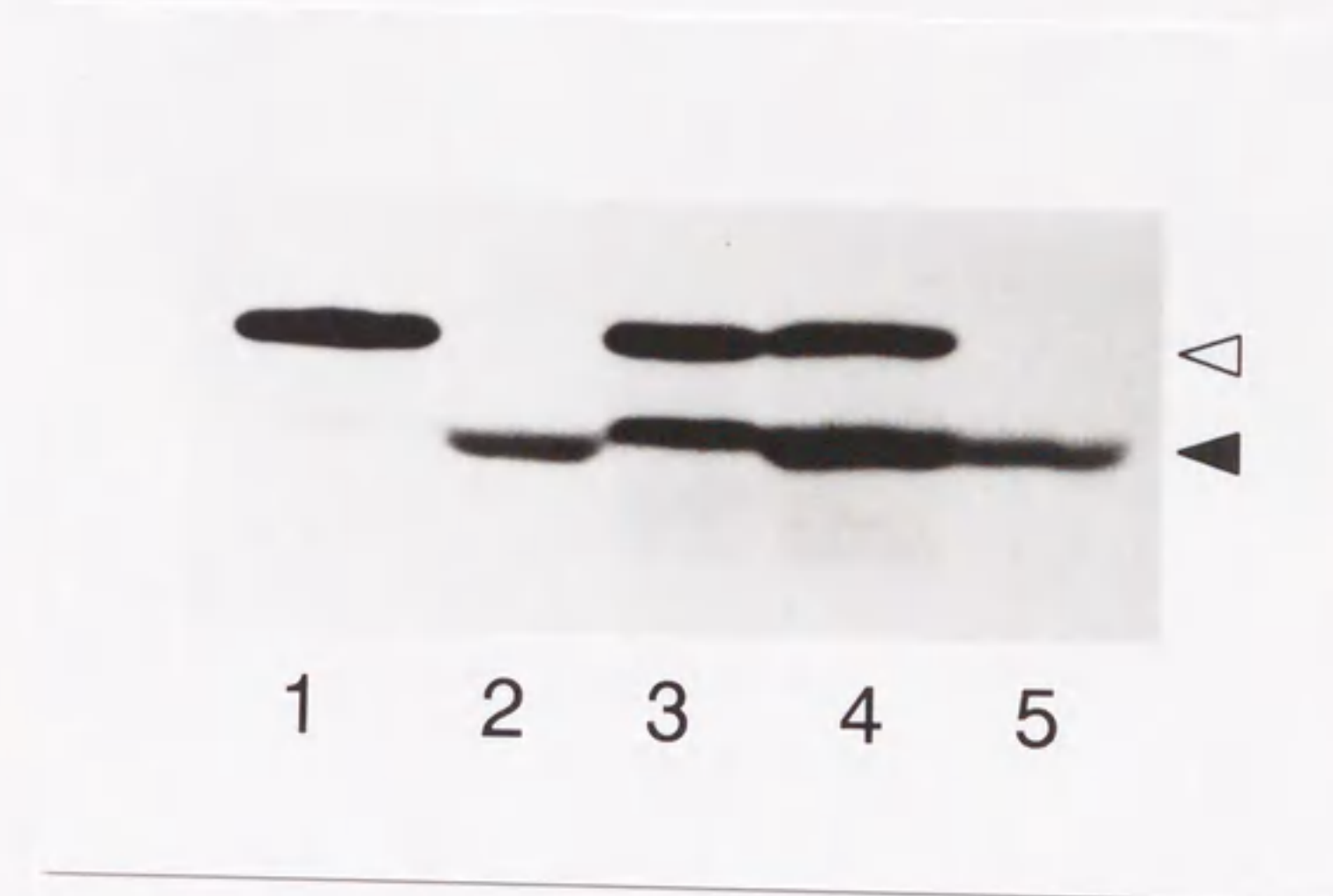


図21 ストロマ画分による 23-kDa 前駆体の切断の産物と輸送中間体との分子量の比較

23-kDa 前駆体タンパク質を葉緑体へ輸送した際にできる輸送中間体と、前駆体タンパク質を粗ストロマ画分で切断した産物の分子量を SDS-PAGE によって比較した。レーン1、合成した 23-kDa 前駆体タンパク質；レーン2、5、輸送中間体；レーン4、粗ストロマ画分で切断した産物。レーン3は、レーン2とレーン4の混合物である。ストロマによる切断の産物は、輸送中間体と同一の移動度を示している（レーン3）。

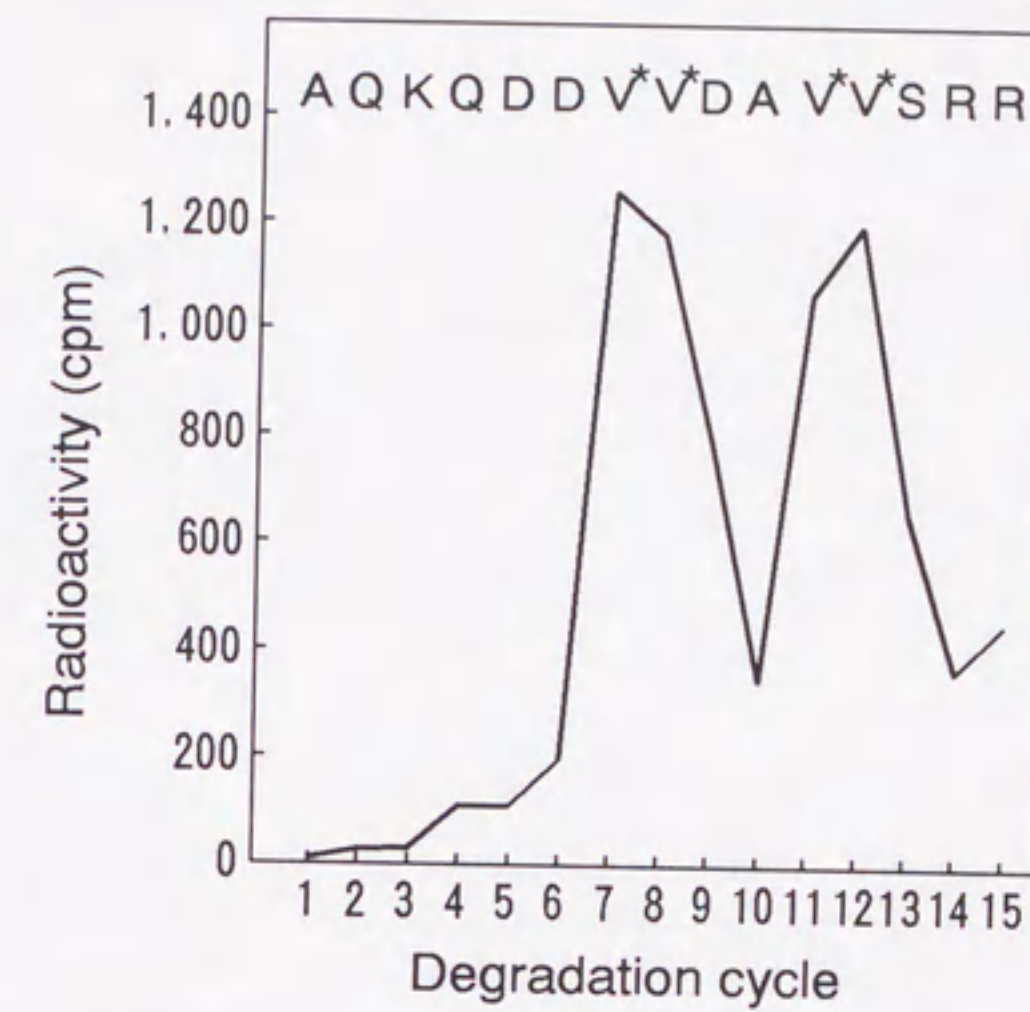


図22 ラジオシーケンスによる、切断の産物のN末端の決定

23-kDa 前駆体を、エンドウ葉緑体から抽出したストロマとインキュベートし、その産物を SDS-PAGE で分離後、タンパク質を polyvinylidene fluoride メンブランにプロットした。分解の産物を アミノ酸シーケンサーを用いて Edman 分解をおこなった。分解の各サイクル毎に分解物を回収し、そこに含まれる放射能を測定した。

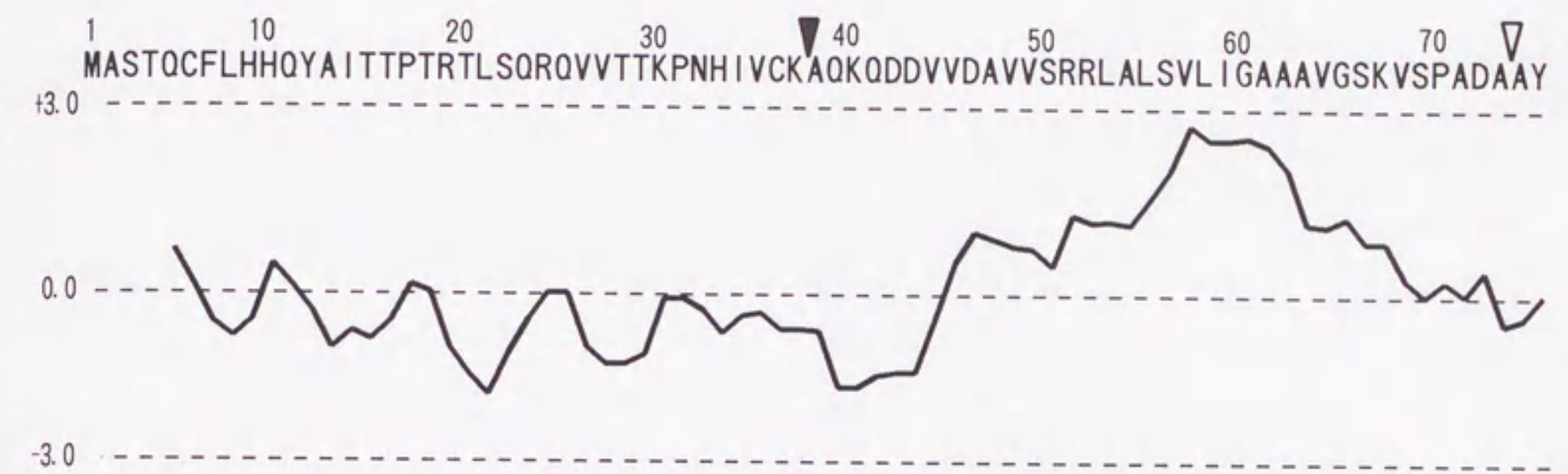


図23 23-kDa の輸送ペプチドの一次構造およびハイドロパシープロット

ハイドロパシープロットは9アミノ酸長の平均である(CHOUFAS, SDC-GENETYX)。ストロマにおける切断部位を黒い矢印で、成熟形タンパク質のN末端を白の矢印で、それぞれ表す。

MUSTARD 1 : MAYSACFLHQ<sup>1</sup>SALASSTARSSPSSSQRYVSI<sup>2</sup>SKLYCKAQ<sup>3</sup>THEEDNSTVSRRLAL<sup>4</sup>TLLYGAAA<sup>5</sup>VGSKVSPADA  
 PEA 1 : MASTQCFL<sup>1</sup>HHQYAITTP<sup>2</sup>RTL<sup>3</sup>SQRQV<sup>4</sup>TKPN<sup>5</sup>HIYCKAQ<sup>6</sup>QDDV<sup>7</sup>DAV<sup>8</sup>VSRRRLALS<sup>9</sup>VLIGAAA<sup>10</sup>VGSKVSPADA  
 SPINACH 1 : MASTACFL<sup>1</sup>HHHAAISS<sup>2</sup>PAAG<sup>3</sup>CSAA<sup>4</sup>QRYQ<sup>5</sup>AVSI<sup>6</sup>KPNQ<sup>7</sup>IYCKAQ<sup>8</sup>KDDNEAN<sup>9</sup>VLSG<sup>10</sup>VSRRLAL<sup>11</sup>TVLIGAAA<sup>12</sup>VGSKVSPADA  
 TOBACCO-F 1 : MASTQCFL<sup>1</sup>HHHALST<sup>2</sup>PARTSL<sup>3</sup>VRGIV<sup>4</sup>PSL<sup>5</sup>KS<sup>6</sup>NQLLYC<sup>7</sup>RAQ<sup>8</sup>VK<sup>9</sup>QSA<sup>10</sup>PQ<sup>11</sup>QDN<sup>12</sup>VNS<sup>13</sup>VSRRRLAL<sup>14</sup>TLLIGAAA<sup>15</sup>VGSKVSPADA  
 TOBACCO-G 1 : MASTQCFL<sup>1</sup>HQHALSSA<sup>2</sup>ARTTSS<sup>3</sup>VSSQ<sup>4</sup>RYVSS<sup>5</sup>LP<sup>6</sup>NQLY<sup>7</sup>CRAQ<sup>8</sup>KQ<sup>9</sup>SSP<sup>10</sup>QEDD<sup>11</sup>CGNS<sup>12</sup>VVSRRRLAL<sup>13</sup>TVLIGAAA<sup>14</sup>IGSKVSPADA  
 TOMATO 1 : MAASTQCFL<sup>1</sup>HQYHAL<sup>2</sup>RSSPARTSS<sup>3</sup>VSSPK<sup>4</sup>PNQLI<sup>5</sup>CRAQ<sup>6</sup>KQDDA<sup>7</sup>NSAA<sup>8</sup>VSRRLAL<sup>9</sup>TLLIGTAA<sup>10</sup>IGSKVSPADA  
 WHEAT 1 : MASTSCFL<sup>1</sup>HQSTARLA<sup>2</sup>ASARPAPAV<sup>3</sup>GR<sup>4</sup>TQLFYCKAQ<sup>5</sup>KNDEAA<sup>6</sup>SDAA<sup>7</sup>VVTSRRRAALS<sup>8</sup>LLAGAAA<sup>9</sup>IAVKVSPAAA

上から、マスタード、エンドウ、ホウレンソウ、タバコ（二種類）、トマト、コムギの配列を示す。下線は、ストロマトにおける切断部位と考えられる共通した配列を表す。

図24 高等植物の 23-kDa タンパク質の輸送ペプチドの一次構造

## 考察

ストロマ画分は、23-kDaの前駆体タンパク質の輸送ペプチドをほぼ中央で切断していた。この切断部位は親水性領域の内部であり、中間体には輸送ペプチドのうち、疎水性のクラスターだけでなく親水性領域の一部が残されていた。チラコイド内腔の輸送に必要な信号は、この残された部分に存在しているはずである。これまでに33-kDaの輸送ペプチドを改変した実験から、チラコイド内腔への輸送のための信号は疎水性のアミノ酸のクラスターにあると予想されていたが(Ko & Cashmore, 1989)、今回の結果はそのクラスターのN末端側に親水性の領域が必要であるという可能性を示唆している。

輸送ペプチドのアミノ酸の一次構造には共通の配列がない。また同じタンパク質の間でも、成熟型タンパク質の部分の配列に比べて輸送ペプチドのアミノ酸配列は相同性が低い。しかし今回あきらかになった23-kDa前駆体のストロマの切断部位は、その周辺の一次構造が生物種間で保存されており(図24)、またこの部分に対応するであろう似た配列が、他の輸送ペプチドにも存在していた(II部1章)。この部分の構造の相同性、ストロマによる切断が50  $\mu$ M EDTAによって阻害されること(データは略す)、および使用した前駆体とストロマの植物種が異なるがBasshamら(1991)の決定した切断部位との一次構造の共通性から、これを切断する酵素は、ストロマに輸送されるタンパク質(RuBisCOのSSなど)と同一のものだと考えられる。

丸田らが決定した切断の産物については、同じ大きさの産物がエンドウの葉緑体を使った輸送実験系でも現れる。丸田が抽出したストロマ粗画分の活性は50  $\mu$ M EDTAで失活しなかったため、ここに含まれている酵素はストロマタンパク質の輸送ペプチドを分解するものとは別種であると考えられる。しかし私が実験した限りでは、ホウレンソウの葉緑体からはエンドウのものと同じ部位で切断し、50  $\mu$ M EDTAで失活する酵素しか見いだせなかった。現時点では、丸田の抽出したストロマに含まれている酵素と、それによって切断された産物である「中間体」の出現については次のような可能性が考えられる。

- ① 葉緑体の表面に付着していた何か別のタンパク質分解酵素によるアーティファクトである。
- ② 市販のホウレンソウの生理条件や品種の差により、この酵素の発現量が増えていた。この酵素は輸送の経路の一部として働くが、通常はごく少量だけ存在する。

③ 市販のホウレンソウの生理条件や品種の差により、抽出の過程でこの酵素を失活させる何かが多量に存在していなかった。しかし丸田の抽出した粗酵素は、 $-20^{\circ}\text{C}$ で5年を経た現在でもまだ安定であり、エンドウやホウレンソウから通常の方法で抽出するときに失活することは考えにくいことも確かである。

少なくとも現時点では、単離葉緑体のストロマに蓄積した中間体のほとんどはこの形をとらなかったことを考慮すると（I部2章）、この酵素が前駆体のストロマにおける切断とチラコイド内腔への輸送に大きな役割を担っているとは考え難い。

#### 参考文献

- Bassham, D. C., Bartling, D., Mould, R. M., Dunbar, B., Weisbeek, P., Herrmann, R. G. and Robinson, C. (1991) Transport of proteins into chloroplasts. Delineation of envelope "transit" and thylakoid "transfer" signals within the presequences of three imported thylakoid lumen proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 23606-23610.
- Ko, K. and Cashmore, A. R. (1989) Targeting of proteins to the thylakoid lumen by the bipartite transit peptide of the 33 kd oxygen-evolving protein. *EMBO J.* 8: 3187-3194.
- Musgrove, J. E., Elderfield, P. D. and Robinson, C. (1989) Endopeptidases in the stroma and thylakoids of pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 90: 1616-1621.
- Smeekens, S., Bauerle, C., Hageman, J., Keegstra, K. and Weisbeek, P. (1986) The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartment. *Cell* 46: 365-375.
- Smith, S. M. and Ellis, R. J. (1979) Processing of small subunit precursor of ribulose biphosphate carboxylase and its assembly into whole enzyme are stromal events. *Nature* 278: 662-664.
- Watanabe, A., Minami, E., Murase, M., Shinohara, K., Kuwabara, T. and Murata, N. (1986) Biogenesis of photosystem II complex in spinach chloroplasts. *Progr. Photosyn. Res.* 4, ed. Biggins, J., pp 629-636, Martinus Nijhoff Publishers.

## II部1章

### チラコイド内腔のタンパク質のための輸送ペプチドの構造

細胞内の生体膜を通過して輸送されるポリペプチドの多くはN末端に余分な配列を持つ前駆体として合成され、この余分な配列は輸送とともに切りはずされる。葉緑体タンパク質の輸送ペプチドも、これらの余分な配列のひとつと考えられる。これらの配列は輸送のための信号であると考えられており、これら様々な余分の配列を様々なタンパク質のN末端に付加したキメラタンパク質が設計され、そのうちのいくつかは目的通りに輸送されている(小西と渡辺 1989, de Boer et al. 1991)。そこでこれらの配列には「そのタンパク質をどこに運ぶべきなのか」という情報が、あるていど詳しく書かれているはずである。しかしこれら余分な配列には一次構造の上で際だった共通配列を持っていない。信号は高次構造の形で書かれていることが予想される。

私が研究を開始した時点では、ストロマのタンパク質の輸送ペプチドの構造について次のような性質が知られていた(Karlin-Neumann & Tobin 1986)。

- ① 全体として、Ser とThr および塩基性アミノ酸の含量が高く、酸性アミノ酸残基をほとんど持たない。
- ② もっともN末端の部分に、10残基ほどの電荷をもたない配列がある。
- ③ 輸送ペプチドの切断部位のN末端側に、 $\beta$ シートをとりうる配列がある。

また、plastocyanin や 33-kDa の輸送ペプチドの構造が明らかになるにつれて、これらチラコイド内腔のタンパク質の輸送ペプチドにも、次のような共通性が報告された(Tyagi et al. 1987)。

- ④ 親水性の性質を持つN末端側の領域と、疎水性の高いC末端側の領域にわけることができる。親水性の領域は上記の①と②の性質をもっている。
- ⑤ 親水性の領域の中に、両親媒性をもった $\beta$ シート構造をとりうる配列がある。

その後、種々のタンパク質の cDNA がクローニングされ、その塩基配列が決定されるにしたがって、明らかになった輸送ペプチドの配列の数が増えてきた。それに伴って、これらの配列から予測される

構造の確からしさが増大した。また、二次構造が明らかになったポリペプチドの数も増大し、この点からも構造予測の確実性が高まった。現時点では、ストロマに輸送されるタンパク質の輸送ペプチドについて、上記の報告に加えて次のような予測がなされている。

- ⑥ 切断部位の一次構造が、各タンパク質の間で弱く保存されている (Gravel & von Heijne 1990)。
- ⑦ 全体として特定の強固な二次構造をとらず、ランダムコイルである (von Heijne & Nishikawa 1991)。

また、チラコイド内腔へ輸送されるタンパク質についても、その輸送ペプチドの一次構造のデータが増えつつある。また I 部 3 章に述べたように、これらの輸送ペプチドをストロマ粗画分で切断した際の切断部位が、いくつかのタンパク種で報告されている。これらの知見をもとにして、輸送ペプチド間で共通する構造を見いだすために、そのアミノ酸配列を整列化した。その結果、これらはそれまでに考えられていた以上に共通した構造を持つことがわかった。また二次構造の予測から、ストロマ粗画分が切断する部位が、ストロマのタンパク質の輸送ペプチドの切断部位と共通の構造を持つことが明らかとなった。

## 実験の方法

### 1. 輸送ペプチドの一次構造の収集

輸送ペプチドの一次構造は、DNA の塩基配列から予想されるオープンリーディングフレームから推定した。このために、平成 4 年 1 2 月 1 日現在、EMBL データベースに登録されている配列のうち、そのコードするタンパク質が葉緑体チラコイド内腔に輸送されることが明らかなもの、つまり PS II の酸素発生系に参与する 33-kDa, 23-kDa, 17-kDa, 10-kDa および plastocyanin の配列を収集した。これらのなかから、高等植物の遺伝子について以後の解析をおこなった。まだデータベースに未登録ないくつかの配列は、その発表された論文にしたがった。同じ生物種から決定されている配列のうち、アミノ酸配列が 100 % の相同性を示すものは、まとめて一種類の配列として扱った。



## 2. 一次構造の整列化

同種のタンパク質の一次構造を、共通のアミノ酸残基が並ぶように、ギャップを考慮しながらハイフンを挿入することで整列化した。この作業には、Lipman & Pearson (1985) のアルゴリズムによるコンピュータプログラム (MALINP, SDC ソフトウェア) を使用した。このアルゴリズムは、まず相同なアミノ酸残基ごとにスコアをつけ、そのあとで高いスコアをもつ配列のまとまりの近傍にハイフンを挿入してギャップをうめるという原理でつくられている。そこでこのアルゴリズムを輸送ペプチドに応用する際には、次のような問題点があった。

- ① 輸送ペプチドの配列は、その長さに多様性がある。そこで相同性をもつ断片的な配列と、その次の相同な配列の間に、比較的長いギャップを持つと考えられる。ところがこのアルゴリズムは、アミノ酸配列の多様性が、その遺伝子の部分的な欠失や挿入よりも残基の置換によっておきるという仮定のもとに作られている。そこで、比較的離れた場所にあるが、高い相同性をもつ配列が無視される傾向にある。
- ② 輸送ペプチドは、平均的なタンパク質とは異なるアミノ酸組成をもっている。そこで、このアルゴリズムが用いている、一致したアミノ酸の組が与えるスコアが妥当でない場合がある。たとえば輸送ペプチドには負の電荷をもつ残基である Asp と Glu が、ごく限られた、しかも共通の位置に存在している。しかしこのアルゴリズムではここに与えられるスコアが、おそらくこの希少さに見合うだけが高くないため、この部分が整列されない場合がある。

以上の問題を避けるために、次のような配慮をした。

- ① 多くの配列を同時に比較するとき、同時に並列して比較する配列の数を4種類までに限ることにした。5種類以上の配列は、整列したいいくつかのグループの結果を手動で繋げた。
- ② 比較するアミノ酸配列の長さがお互いに大きく異なるために整列できないと考えられる場合、完全長の配列をいくつかに分断して、その対応する部分どうしを整列させた。
- ③ 細部を微調整するために、正負の電荷をもち、かつ保存されているアミノ酸残基に着目して、それぞれの位置を手動で整列させた。このときに挿入するハイフンの数は最少になるように注意した。

### 3. 二次構造の予測

各々の輸送ペプチドのアミノ酸配列を、Chou & Fasman の方法 (1978) および Garnier ら (1978) の方法で予測した。ただしデータが膨大で複雑なため、ここではタンパク種ごとに一つずつ、Chou & Fasman の方法で計算した結果だけを示す。これは、既知の $\alpha$ ヘリックス構造、 $\beta$ シート構造および $\beta$ ターン構造をとるポリペプチドのアミノ酸配列を基にした予測プログラムであり、その基本的な考え方は次のような原理に基づいている。

- ① それぞれのアミノ酸残基について、 $\alpha$ ヘリックス構造と $\beta$ シート構造のなかにあらわれる確率を求め、それを基にして、その残基がその構造にどのような影響をもたらすかを予測し、数値化する。
- ② 調べたいアミノ酸配列について、上記の数値を4残基ずつの平均をとりながらスキャンする。こうして得た結果から、 $\alpha$ ヘリックス構造と $\beta$ シート構造をとりうる確率を算出する。いずれの確率も低い部分はコイル構造をとると考える。
- ③  $180^\circ$  の $\beta$ ターン構造をとる4残基長のアミノ酸配列のデータに基づいて、ある残基がその1, 2, 3, 4番目の位置にくる確率を数値化する。
- ④ 調べたいアミノ酸配列について、③の数値(4残基ごとの組み合わせになる)を1残基ずつずらしながら掛け合わせてスキャンする。こうして得た数値から、 $\beta$ ターン構造の始まる位置を予測する。

## 実験の結果

### 1. 輸送ペプチドの整列化

細胞質からチラコイド内腔へ輸送されるタンパク質の輸送ペプチドに関して、5種類のタンパク質について、27の配列を整列させた(図25)。また参考までに、ストロマへ輸送される RuBisCO の小サブユニットの輸送ペプチドと、葉緑体ゲノムにコードされ、N末端の多くの部分がチラコイド内腔に露出する cytochrome *f* の信号の配列を示す (Willey et al. 1984)。この結果、つぎに挙げるようないくつかの共通性が新たに明らかとなった。

- 1) 輸送ペプチドは、三つのよく保存された部位が、三つの可変領域をサンドイッチする構造ででき

ている。この構造が比較的はっきりとわかる 23-kDa の輸送ペプチドを例にとって、N末端部から順に説明しよう。

#### 保存領域 A

この部分には、10残基ほどの電荷のない配列がある（図中に下線で示した）。これは以前から知られているように、葉緑体に輸送されるタンパク質に共通する性質である。この部分の一次構造が、生物種間で保存されている。

#### 可変領域 B

N末端の保存された配列の次には、親水性で、ところどころに正の荷電を有する部分が現れる。この部分には各生物種間で特に保存されている配列がない。また長さがまちまちであるため、ギャップを表すハイフンの数が多くなっている。しかしそのハイフンの位置は、いくつかの生物種で共通であることに注意してほしい。これは、ギャップが生じるような挿入や欠失がごく希にしか起らないために、その位置が進化の過程で「保存」されるのであろう。この現象は、Lipman & Pearson (1985) のアルゴリズムの基となっている、「タンパク質の多様性はギャップよりも置換によっておきる」という経験則を裏付けている。

#### 保存領域 C

親水性の部分のなかに、明らかにハイフンが少なく、また保存された配列の島がある（VCKAQ-K）。この部分は1-3. で明らかにしたように 23-kDa の輸送ペプチドのストロマにおける切断部位であり、また 33-kDa と plastocyanin の切断部位でもある (Bassham et al. 1991)。この配列は、Gravel & von Heijne (1990) が提案しているストロマの輸送ペプチドの切断部位の共通構造ともゆるい共通性がある。また、この部分に対応する配列、すなわち Val/Ile、Lys/Arg および Ala、Ser、Cys などで構成される保存された配列は、全てのタンパク種に存在している（網掛で示す）。また後述するように、この部分を含む配列からは、ある共通した二次構造が予想される。

#### 可変領域 D

再び生物種間で相同性が低い領域となる。この部分には、負の電荷を持つ残基が現れる。輸送ペプ

チドのなかで負の電荷を持つのは、ほとんどこの部分だけである。構成するアミノ酸組成は生物種間で似ているが、長さがまちまちでありギャップを示すハイフンの数が増える。

#### 保存領域 E

正の電荷をもつアミノ酸のあとに、12 ないし 13 残基の疎水性アミノ酸のクラスターがあらわれる。この部分の配列はタンパク質間でほぼ同一である。また最終的な切断部位の N 末端側には、Pro や Gly などターン構造をつくりやすいアミノ酸や、切断の信号と考えられている Ala-X-Ala モチーフがあらわれる (von Heijne et al. 1989)。これは原核細胞の細胞膜や、ER 膜を介する輸送のための信号ペプチドの切断部位 (Landry & Gierasch 1991) と共通する性質である。

2) 酸素発生系のタンパク質のうち、10-kDa の輸送ペプチドは、上記の A、B、および C の構造からできており、D および E の構造を欠いている。これは、この輸送ペプチドがストロマ輸送型の構造を持っていることを意味する。このタンパク質の多くの部分はチラコイド内腔に露出していることは、他の酸素発生系のタンパク質とともに PS II 粗標品から抽出されること (Ljungberg et al. 1986)、また単離葉緑体への輸送実験の結果から (Lautner et al. 1988) 明らかになっている。しかしタンパク質のアミノ酸配列は、その C 末端が膜に埋まっていることを強く示唆しており、この点で他の酸素発生系のタンパク質と大きく異なっている (Lautner et al. 1988)。そこで、タンパク質の輸送される方法が、33-kDa や 23-kDa とは違うことが予想される。

3) 二つの可変領域の配列の変異性は、タンパク質の種類によって大きく異なる。33-kDa の輸送ペプチドは、23-kDa、17-kDa および plastocyanin と比べてずっと強く保存されている。これは比較したアミノ酸配列の由来する生物種の違いによる差とは考えにくい。比較に使用した生物種は基本的に 5 種類の双子葉植物と 1 種類の単子葉植物であり、同じ被子植物門である。そこでこの差はそのタンパク質の種類ごとに特有の性質であると考えられる。

PC  
 ARABIDO MAAITSA-TVTIPTFTGLKLAIVSSSKPKTLTISRSSSATRAPPKLALKSSL-KDFGVIAVATAASIVLAGN-AMA M  
 BARLEY MAALSSA-AVSVPSFAAATPMRSS-----RSS-----RMVVRASLGKKAASAAMAAAGAMLLGGSAMA Q  
 PEA MATVTST-TVAIPSFSGLKTNAATKVSAMA---KIPSTSQSPRLCVRASL-KDFGVALVATAASAVLASN-ALA V  
 SILENE MATVTSSAAVAIPSFAGLKAASSTTRATV---KVA---VATPRMSIKASL-KDVGVVVAATAAAGILLAGN-AMA A  
 SPINACH MATVASSAAVAVPSFTGLKASGSIKPTTA---KIIPTTAVPRLSVKASL-KNVGAAVVATAAAGLLAGN-AMA V  
 TOMATO MATVTSA-AVAIPSFTEGLKAGASSSSRVSTGASAKVAAPVA-RLTVKASL-KDVGAVVVAATAVAMSAMLASN-AMA L  
 Cytochrome f  
 PEA MDRELSNLPNLIVEIFRIKDCMTQTRNAFSWIKKEITRSISVLLMIYIITRAPISNAYPIFAQQGYENPREATGWI  
 VCANCHLANKPVDIEVPAVLPPD  
 Small subunit of Rubisco  
 PEA MASMISSAVTTVSRASRGOSA AVAPFGGLKSMTGFPVKKVNMTDITSITSNNGRVKCMQVWPPIGKKKFETLSYLP  
 PLTRDQLLKEVEYL  
 CFO  
 SPINACH MANMLVASSSKTLPTTTTTITPKPKFPLLKTPLLKLSPPQLPPLKHLNLSVLKSAAITATPPLTSLFLLPYPSLA E

図25 整列化した、チラコイド内腔のタンパク質の輸送ペプチド

33-kDa, OEC  
 ABIDO MAASLQSTATFLOSAKIATAPSRGSSHLRSTQAVGKSFGLTSSARLTCSFQSDFKDFTGKCSDAVKIAGFALATSALVWSGASA E  
 PEA MAASLQAAATLMQPTKL---RSNTLQILKSNQSVSKAFGLE--HYGAKVTCSLQSDFKELAHKVEASKIAGFALATSALVWSGASA E  
 POTATO MAASLQAAATLMQPTKVGVSARRNNLQLRSSQSVSKAFGLE--PSASRLSCSLQTDLKDFAQKCTDAAKIAGFALATSALVWSGANA E  
 SPINACH MAASLQASTFLOPTKVA---SRNTLQLRSTQNVCKAFGVESASSGGRLSLSLQSDLKELANKCVDATKLAGLALATSALIASGANA E  
 TOMATO MAASLQAAATLMQPTKVG---VRNNLQLRSAQSVSKAFGVE--QSGRLTCSLQTEIKELAQKCTDAAKIAGFALATSALVWSGANA E  
 WHEAT MAASLQAAATVM-PAKIG---GRAS-SARPSSHVARAFGVD---AGARITCSLQSDIREVASKCADAAKMGFALATSALLVSGATA E  
 23-kDa, OEC  
 MUSTARD M-AYSACFLHQ-SALASS---TARSSPSSSSQR--YVVISK--LVCKAQ-QT---HEEDNST-----VSRRLALTLVGAAGAAVSGSKVSPADA A  
 PEA M-ASTQCFLHHQYAI--TTP-TRTL---SQROVVTT-KPNH-IVCKAQ-KQ-----DD-----VVDVAVSRRLALSVLIGAAAVSGSKVSPADA A  
 SPINACH M-ASTACFLHHHAI--SSPAARG--SAAQRYQAVS IKPNQ-IVCKAQ-KQ-----DDNEANVLNSGVSRRLALTVLIGAAAVSGSKVSPADA A  
 TOBACCO M-ASTQCFLHH-HAL--STP-AR---TSLVRGIVPSLKSNOQLVGCRAQNKQSAPOQDN---VNSVSVSRRLALTVLIGAAAVSGSKVSPADA A  
 TOBACCO M-ASTQCFLHQ-HALS-SSA-ARTTSSVSSQRY-VSSLKPNQ-LVGCRAQ-KOSSPOEDD---GNSVVSRRALTVLIGAAAVSGSKVSPADA A  
 TOMATO MAASTQCFLHQYHALRSSPA--RT--SSVSSP-----KPNQ-LICRAQ-KQ-----DD---ASNAAVSRRLALTVLIGTAAIGSKVSPADA A  
 WHEAT M-ASTSCFLHQ-----STA--RL---AASARPAVAVGRTQLFVVCKAQ-KN-----DE-AASDAAVVTSRRAALSLLAGAAAIAVKVSPAAA A  
 17-kDa, OEC  
 PEA MAQAMASMTGL---SQGVL-----PSRRADSRT--RTAV---VIVRASAEGDAVAQAARRAVI GLVATGIVGALSQAARA E  
 SPINACH MAQAMASMAGLRGASQA VLEGLSLQISGSNRLSGPTTSRAVAVPKMGLNIRAQOV-SAEAFSTRAMLGFVAAGLASGSFVKAVLA E  
 10-kDa, OEC  
 ARABIDO MAASVMLSSVTLLKPAGFTVE-KTAARGLP SLTRARPSFKIIVA S  
 POTATO MASTVM-SSLSLKP-TFTLE-KTSVKGLP SLARSSSSSFKVVA S  
 SPINACH MATSVM-SSLSLKPSSFVGDTKSAVKGLP SLSRSSSASFVIRA S

## 2. 二次構造の予測

Chou & Fasman の方法 (1978) による予測では、保存領域 C とそのN末端方向に、10-15 残基長ほどの長さのなかで $\beta$ ターン $\rightarrow\beta$ シート $\rightarrow\alpha$ ヘリックスと遷移するような共通した構造が見られた (図26)。これらの構造が予測される場所は互いに少しずつ重なっており、しかもそれぞれがたいへんに短い。これと同じ構造は、ここでは示さない他の生物種由来のタンパク質でも、あるいは Garnier ら (1978) の方法を用いても認められた。またこの構造はストロマタンパク質の輸送ペプチドの切断部位にも認められた (図26、ただし $\alpha$ ヘリックス構造のとり易さはチラコイド内腔のタンパク質のものよりも弱かった)。この結果は、この構造をもつ領域に関して次のことを示唆している。

- ① 保存領域 C はストロマにおける切断部位の機能を持つ。
- ② 輸送ペプチドを切断するストロマの酵素は、基質となるペプチドの立体構造を認識する。おそらく同一か、あるいはごく限られた数の酵素がこれらのペプチドを切断する。
- ③ チラコイド内腔への輸送に関してペプチドがストロマで切断されることが何らかの選択圧になっている。
- ④ タンパク種のなかで弱く保存されてた一次構造は、この領域の $\beta$ 構造から $\alpha$ 構造への移り変わりの部分に相当する。この領域のなかで $\beta$ ターンをつくる一次構造は保存されていなかった。そこで、 $\alpha\rightarrow\beta$ の移り変わりの部分には、より限定された構造にたいして正の選択圧がかかっていると考えられる。

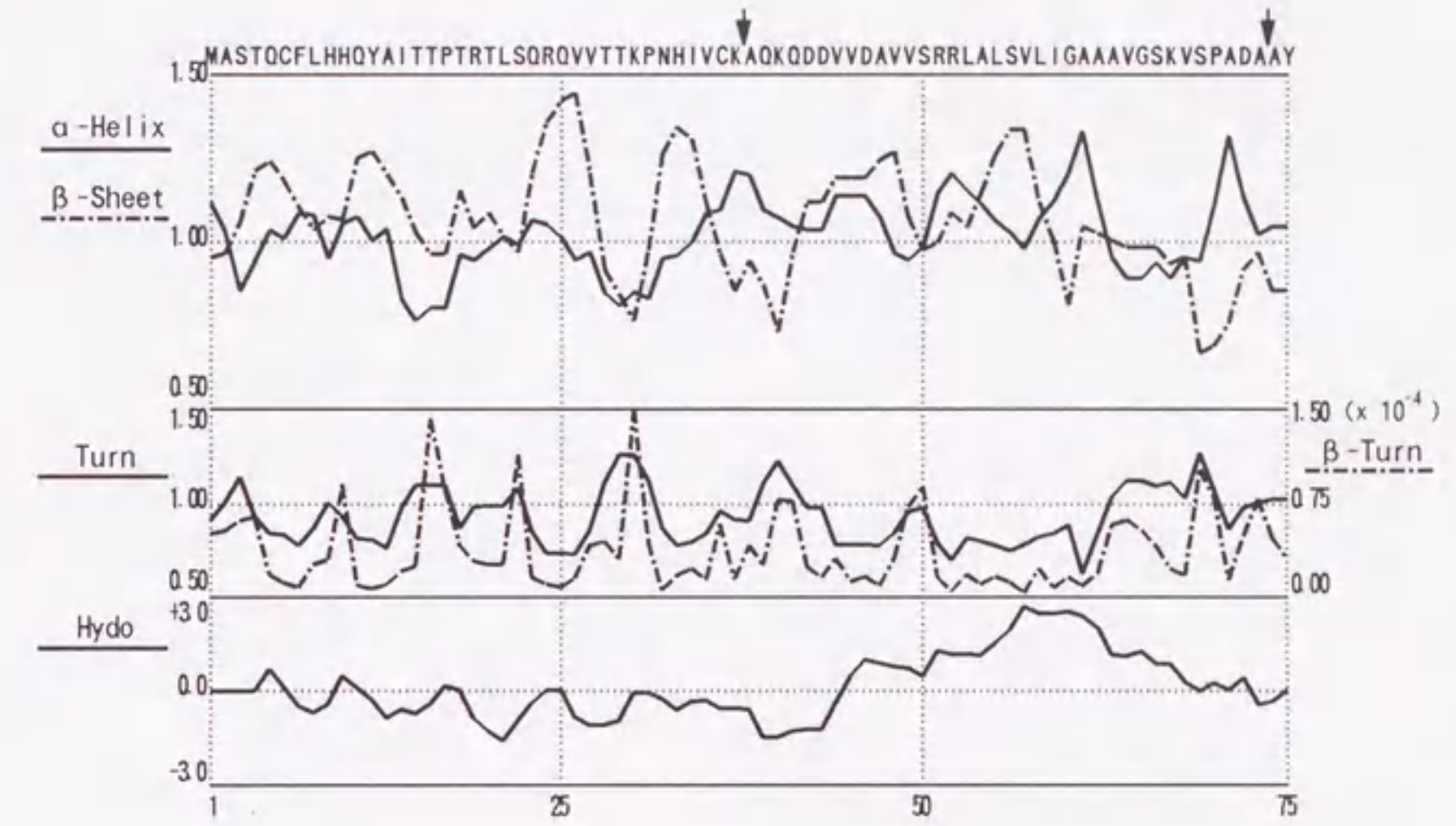
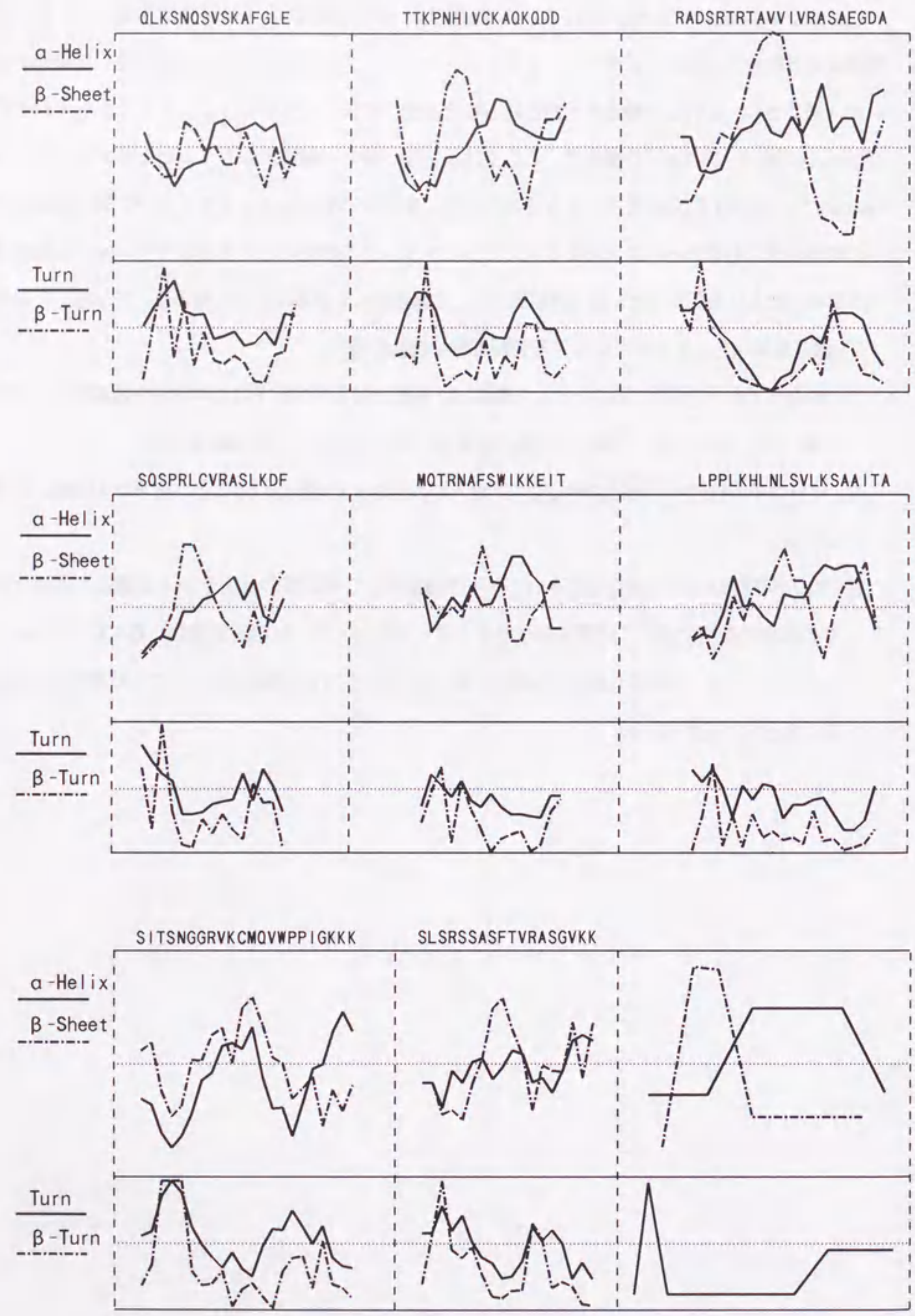


図26 Chou & Fasman のプログラムによる、ストロマ切断部位の二次構造の予測

(左ページ) 輸送ペプチドの二次構造予測の一部を示す。上段左から、エンドウ 33-kDa タンパク質、エンドウ 23-kDa タンパク質、エンドウ 17-kDa タンパク質、中段左からエンドウのプラストシアニン、ホウレンソウ cytochrome *f*、ホウレンソウ C<sub>Fo</sub>、下段左からエンドウ RuBisCO の SS、ホウレンソウ 10-kDa タンパク質、モデル。33-, 23-, 17-, 10-kDa は PS II の酸素発生系のタンパク質である。図中のグラフの目盛の単位は右ページのものと同一である。

(右ページ) エンドウ 23-kDa の輸送ペプチドの二次構造予測(全部)。

## 考察

整列化した輸送ペプチドの配列(図25)から明らかなように、これらの配列は各生物種間で良く保存されている部分と、ある程度の自由度を持つ部分から成り立っていた。またこの性質は各タンパク質間に共通のものであった。この共通性から考えられる輸送ペプチドのモデルを図27に示し、特徴的な構造について以下にその予想される機能を考察する。

### 1) N末端の保存配列 - A

この部分には電荷をもたないアミノ酸が10残基ほど続き、輸送ペプチドのなかで明らかに際だった特徴を持っている。この性質は葉緑体に輸送されるタンパク質に共通である。von Heijne ら(1989)はこの部分の性質に言及しており、Pro や Gly といったヘリックスやシート構造を壊すアミノ酸残基が多いこと、また翻訳開始の Met のあとに Ala になる確率が高いこと、そしてこの部分にはSer残基が特に多くないことを報告している。このうち、翻訳開始部位の Met-Ala- 配列は、輸送ペプチドとしての機能に関する必然性から保存されているのではなく、高等植物の翻訳の開始コドン ATG の後に G がある割合が高い(Joshi 1987) ことからおきる制約であろう。また Pro や Gly 残基は、この保存配列のC末端部か、あるいはさらにC末端側に位置していた。この部分は電荷を持たないこと、そして側鎖が比較的小さい残基がドメインをつくることに選択圧がかかっているのではないか。

この部分の持つ機能の一つの可能性として、葉緑体タンパク質の輸送全般に共通する機能が考えられる。この部分に対応するであろう、やや短い電荷を持たないN末端の配列は、*Chlamydomonas reinhardtii* の葉緑体タンパク質の輸送ペプチドにも見られる(Franzén et al. 1990)。Franzén ら(1990)は *C. reinhardtii* の輸送ペプチドが高等植物とは異なると発表しているが、次の章で述べるように、*C. reinhardtii* の葉緑体、輸送装置および輸送ペプチドは高等植物のものと同じ起源を持つと考えられる。この A の部分の配列は、たとえば葉緑体の輸送装置がつくる包膜を貫通する孔に最初に入るための鍵のような働きをするのではないだろうか。

### 2) 可変領域 - B、D

この部分は保存領域 C も含めて親水性で正の電荷を持っている。この性質のために、この部分はタンパク質の内部へ折り畳まれず、水溶液中ではむしろ外部へと飛び出したかたちになっていると考



えられる。これは信号として働くために重要な性質であろう。またこの部分が正に荷電していることは、受容体との静電的な会合を想像させる。負の荷電が特徴的に少ないことは、輸送ペプチド内の分子内結合による三次構造をとりにくくする機能も持つだろう。輸送ペプチドのこの領域にはいくつかβ構造が予想される部分があるが、この荷電の分布から考えると、あまり安定した構造にはならないと思われる。

### 3) 保存領域 - C

I部3章で述べたように、23-kDaの輸送中間体はこの部分で切断されていた。また Bassham ら (1991) が決定したように、他のタンパク質前駆体もこの部分に切断部位を持っている。また、この部分の二次構造は、ストロマタンパク質の輸送ペプチドの切断部位とも共通の構造を持っていた。この部分は切断後の輸送ペプチドには残らず、しかもその欠如がチラコイド内腔への輸送を妨げない (I部2章)。そこで、この部分はストロマの切断酵素による認識のためにあるのだろう。この配列に別の目的があり、そこをたまたま関係のない酵素が切ることや、この配列が偶然に保存されていることは考えにくい。

一つ問題なのは、これらチラコイド内腔への輸送ペプチドがこの部分で切断されることについて、何が選択圧になって保存されているかということである。23-kDa (Mould et al. 1991) および 17-kDa (Klosgen et al. 1992, Cline et al. 1992) の前駆体タンパク質は、この切断がなくても内腔へ輸送されるという知見がある。現在のところ、切断がおきることがなぜ有利なのかは不明である。

二次構造の予測において、ストロマのタンパク質の輸送ペプチドのαヘリックス構造のスコアが低かった理由は二つ考えられる。

① この部分は成熟型タンパク質のN末端部にあたる。そのためこの部分の構造が機能の面からの制約

をうけ、切断に必要な制約との折衷の結果としてこのような構造になっている。

② この部分は切断には関係しない。むしろこのαヘリックスは、チラコイド内腔への輸送のために必要な部分である。

現在のところ、このいずれかが正しいかを判断できる決定的な知見はない。私は丸田らによって決定された切断部位をもとに 22-kDa 中間体タンパク質を合成し、単離チラコイドへ輸送する実験を行ったことがある。丸田らの決定した切断部位 (I部3章) はこのαヘリックスよりもC末端側に位置し、

そのためこの中間体はこのヘリックスを持たない。ここではデータは示さないが、この中間体は内腔へと輸送された。そこで、おそらく①のほうが正しいと思われる。

#### 4) 保存領域 E

チラコイド膜にある輸送装置は、原核生物の細胞膜にある装置と共通の祖先から進化したものであろう (I部2章)。この部分は、そこで、原核生物のタンパク質輸送のシグナル配列と同じような働きをするものと考えられる。特に疎水性のクラスターは、輸送されるタンパク質の大きさにかかわらず 12 から 14 残基長の長さを持ち、膜を貫通するには少し短いように見えるものの、何らかの膜とのかかわりをもつ機能を想像させる。この機能は、たとえば CF<sub>o</sub> のような膜内在性のタンパク質では、そのタンパク質が膜にどちらの向きで入るかを調節するときに重要になるだろう。

23-kDa の中間体は、可変領域 D と保存領域 E とから構成されていた。また Bassham ら (1991) が決定した、ストロマの酵素によるチラコイド内腔のタンパク質の前駆体における切断部位もここに集中している。実際のタンパク質輸送においてストロマでこうした切断が本当におきているのかにはまだ疑問の余地があるが (I部3章)、これらの中間体はすべて領域 D と E とから構成されるという共通点を持っている。この構造は原核細胞の細胞膜や、真核細胞の ER 膜を介した輸送のための信号のペプチド (Landry and Gierasch 1991) と相同である。実際、これらの中間体を大腸菌内である条件で発現させるとタンパク質はペリプラズムへ輸送されて切断されることから (Seidler & Michel 1990, 周ら 未発表)、この部分の輸送ペプチドが原核細胞の輸送の信号となり得ることが示されている。こうした信号の相同性は、これらの輸送装置が共通の祖先の型から進化しているという考え (I部2章) を支持している。

ここで考察した内容の多くの部分は、改変した輸送ペプチドを持つ前駆体を輸送する実験によって確かめることができるだろう。いままでにもこの種の実験はいくつか行われているが (Ko & Cashmore 1989 など)、まだその知見は限られており、もちろんこれらの領域の機能についても系統立った説明はなされていない。

前駆体タンパク質のN末端

最終的な切断部位

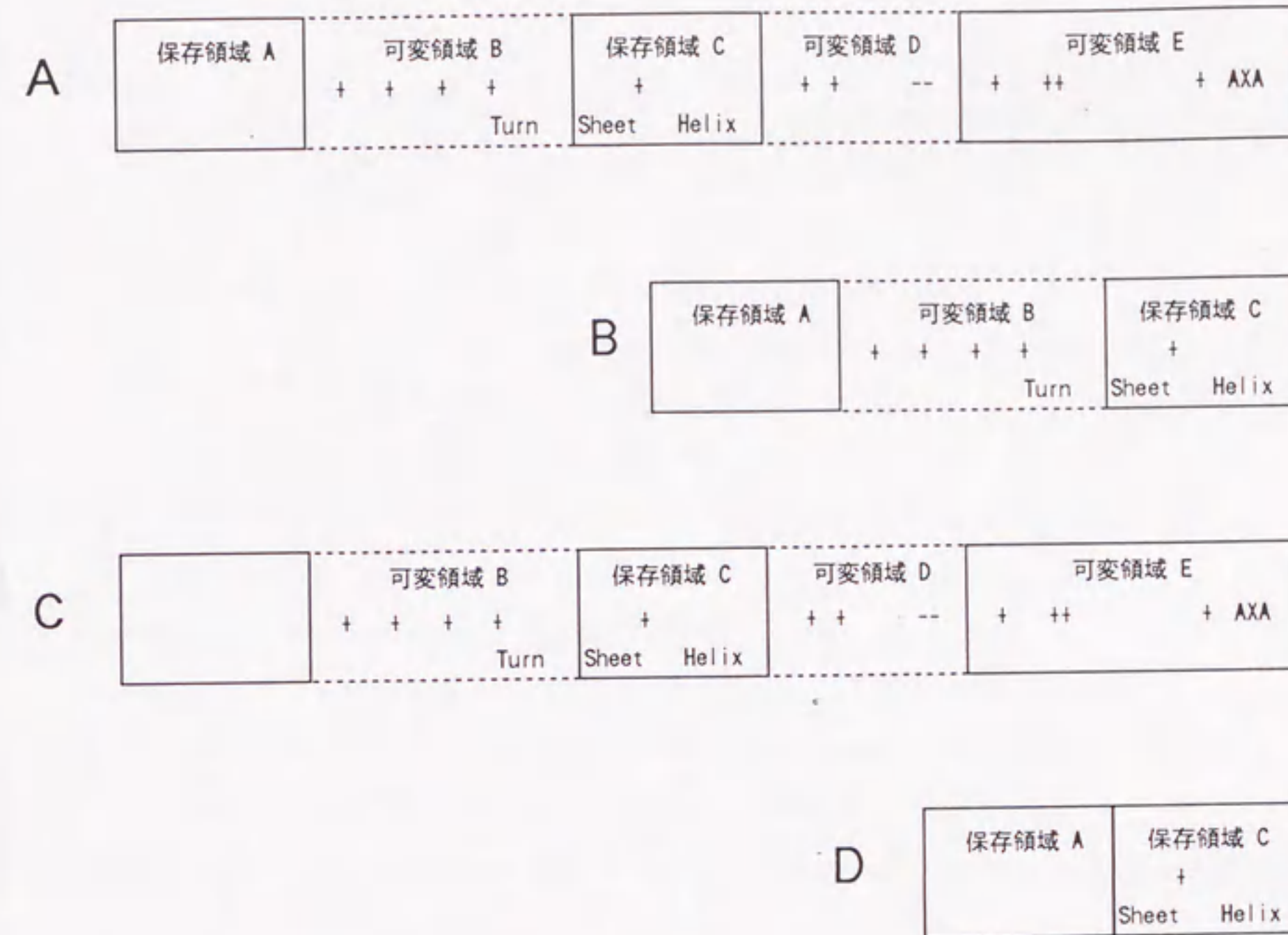


図27 いくつかのユニットによる輸送ペプチドの構成のモデル

A: 細胞質からチラコイド内腔へ輸送されるもの。例) 33- & 23- & 17-kDa, plastocyanin

B: ストロマへ輸送されるもの。例) RuBisCO SS

C: ストロマからチラコイド内腔へ輸送されるもの。例) cytochrome *f*

D: ストロマへ輸送されるもののうち、特に輸送ペプチドが短いもの。例) クロロフィル結合タンパク質, betinaldehyde dehydrogenase

## 参考文献

- Bassham, D. C., Bartling, D., Mould, R. M., Dunbar, B., Weisbeck, P., Herrmann, R. G. and Robinson, C. (1991) Transport of proteins into chloroplasts. Delineation of envelope "transit" and thylakoid "transfer" signals within the presequences of three imported thylakoid lumen proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 23606-23610.
- Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymology.*, 45-148
- Cline, K., Ettinger, W. F. and Theg, S. M. (1992) Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J. Biol. Chem.* 267: 2688-2696.
- de Boer, D., Bakker, H., Lever, A., Bouma, T., Salentijn, E. and Weisbeck, P. (1991) Protein targeting towards the thylakoid lumen of chloroplasts: proper localization of fusion proteins is only observed *in vivo*. *EMBO J.* 10: 2765-2772.
- Franzen, L.-G., Rochaix, J.-D. and von Heijne, G. (1990) Chloroplast transit peptides from green alga *Chlamydomonas reinhardtii* share features with both mitochondrial and higher plant chloroplast presequences. *FEBS Lett.* 260: 165-168.
- Gavel, Y., and von Heijne, G. (1990) A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett.* 261: 455-458.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J. and Robson, B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120: 97-120
- Joshi, C. P. (1987) An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl. Acids Res.* 15: 6643-6653.
- Karlin-Neumann, G. A. and Tobin, E. M. (1986) Transit peptides of nuclear-encoded chloroplast proteins share a common amino acid framework. *EMBO J.* 5: 9-13.
- Klosgen, R. B., Brock, I. W., Herrmann, R. G. and Robinson, C. (1992) Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol. Biol.* 18: 1031-1034.
- Ko, K. and Cashmore, A. R. (1989) Targeting of proteins to the thylakoid lumen by the bipartite transit peptide of the 33 kd oxygen-evolving protein. *EMBO J.* 8: 3187-3194.
- Landry, S. J. and Gierasch, L. M. (1991) Recognition of nascent polypeptide for targeting and folding. *Trends Biochem. Sci.* 16: 159-163.
- Lautner, A., Klein, R., Ljungberg, U., Reilander, H., Bartling, D., Andersson, B., Reinke, H., Beyreuther, K. and Herrmann, R. G. (1988) Nucleotide sequence of cDNA clones

- encoding the complete precursor for the "10-kDa" polypeptide of photosystem II from spinach. *J. Biol. Chem.* 263: 10077-10081.
- Lipman, D. J. and Pearson, W. R. (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227: 1435-1441.
- Ljungberg, U., Åkerlund, H.-E. and Andersson, B. (1986) Isolation and characterization of the 10-kDa and 22-kDa polypeptides of higher plant photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 158: 477-482.
- Mould, R. M., Shackleton, J. B. and Robinson, C. (1991) Transport of proteins into chloroplasts. Requirements for the efficient import of two luminal oxygen-evolving complex proteins into isolated thylakoids. *J. Biol. Chem.* 266: 17286-17289.
- Seidler, A. and Michel, H. (1990) Expression in *Escherichia coli* of the *psbO* gene encoding the 33 kd protein of the oxygen-evolving complex from spinach. *EMBO J.* 9: 1743-1748.
- Tyagi, A., Hermans, J., Steppuhn, J., Jansson, C., Vater, F. and Herrmann, R. G. (1987) Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the complete "33 kDa" precursor protein associated with the photosynthetic oxygen-evolving complex from spinach. *Mol. Gen. Genet.* 207: 288-293.
- von Heijne, G. and Nishikawa, K. (1991) Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? *FEBS Lett.* 278: 1-3.
- von Heijne, G., Steppuhn, J. and Herrmann, R. G. (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180: 535-545.
- Willey, D. L., Auffret, A. D. and Gray, J. C. (1984) Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes. *Cell* 36: 555-562.
- 小西智一, 渡辺 昭 (1990) 葉緑体蛋白質 -その生合成と遺伝子操作による改変-. 蛋白質 核酸 酵素 35: 2503-2511.

## II部2章

### 葉緑体はいかにして葉緑体になったのだろうか？

葉緑体の祖先は、現在のラン藻のような原核生物であったと考えられている。葉緑体とラン藻の間違った違いは、現在の葉緑体はそのタンパク質の多くを宿主の核に依存しているということである。もちろんこれは、たとえば器官分化など、ラン藻の側のゲノムにはないプログラムを可能にしているわけで、これはその後の進化にとって不可欠なファクターである。ここで問題にしたいのは、宿主と共生藻がどうやってこの関係を築いたかである。それは具体的には

- ①前駆葉緑体から宿主核への遺伝情報の複製
- ②宿主核での遺伝子発現
- ③細胞質で合成されたタンパク質の輸送系の確立
- ④葉緑体核からの遺伝情報の消失

といったステップで起きたものと考えられる。ここではこのうち、③のステップで起きたことについて考察する。このステップでは、それまで無駄に細胞質でつくられていたタンパク質が葉緑体に入っていくようになる変化がおきたはずである。これには葉緑体の包膜に輸送装置が、また輸送されるタンパク質のN末端に輸送ペプチドが、それぞれ新しく必要になる。ここで、輸送ペプチドはどのようにつくられたのだろうか？ 同じタンパク質でも、輸送ペプチドのなかの変領域のアミノ酸配列が生物種間で何のつながりも持ちそうにないことから考えると、たとえばエキソン・シャフリングによって生物種ごとにつくられたのだろうか？

1. 高等植物では、各タンパク質をコードする塩基配列は、同じ配列から出発して多様化している。

一般的に、ある前駆体タンパク質のアミノ酸配列のなかで、成熟型タンパク質になる部分は広い生物種で保存されており、たとえば高等植物とラン藻の間でもその相同性は高い (Kuwabara et al. 1987)。これに比して輸送ペプチドの配列は、II部1章の比較から明らかなように、高等植物の間でも大きく異なる部分を持つ。この部分の配列は何故にこのような自由度を持っているのだろうか？ こ

の部分を含めた輸送ペプチドの配列がエキソン・シャフリングのような機構でつくられたのだろうか？

生物種間で比較的保存されていた 33-kDa と、自由度が大きかった 23-kDa を例にして、保存領域に相当する部分をコードする塩基配列を比較してみた(図28)。すると、保存領域であっても、ほとんどのアミノ酸のコードンの3番目はばらばらであった。これは、アミノ酸配列に影響がない限り、これらの塩基配列は保存されないことを示している。またこれらの領域のなかで残基にばらつきがある場所のなかには、コードンの2番目に T がくる場合が多かった。XTX コドンは Leu, Ile, Val, Phe のいずれかをコードするので、この場所は疎水性アミノ酸に対して正の選択圧がかかっていると考えられる。こうした現象から考える限り、もしアミノ酸配列に関して何の選択圧も存在しなければ、これらの塩基配列は生物種間で相同性を持たなくなっているはずである。

以上のように、アミノ酸配列の保存領域をコードする塩基配列は必ずしも保存されてはいなかった。このことから考えると、これらのタンパク質をコードする遺伝子がたとえ共通のものから出発していたとしても、比較的低い選択圧しかかからない部分のアミノ酸配列に多様性が生じるのは当然のことであろう。実際、異種の植物の葉緑体と前駆体タンパク質とを用いた輸送実験が成立することを考えると、葉緑体にある輸送装置そのものは、こうした変異に寛容であるようだ。

## 2. 輸送ペプチドはごく少数の module のシャフリングから形成された。

すでに述べたように、高等植物のタンパク質の輸送ペプチドは、各タンパク質ごとの共通の祖先型から多様化したものらしい。ではそもそもの輸送ペプチドには祖先型はなかったのだろうか？ アミノ酸のデータベースが充実するに従い、タンパク質の一次構造は予想されたほど多様でないこと、従ってこれらは決った数のサブドメインを組み合わせでできていると考えられるようになった (Doolittle, 1989)。現在、脊椎動物の間で module という配列のユニットが提案され、一般的な概念として受け入れられている (Baron et al., 1991)。これはエキソンのシャフリングやエキソンのコピーによってタンパク質の多様化が起きたという考えに基づく、その組み合わせるもとになるタンパク質サブドメインのユニットである。

今回の結果は、チラコイド内腔へ輸送されるタンパク質について、ある共通した構造があることを示した(図27)。この構造はいくつかのユニット(図中にボックスで示した)からできており、そ

のユニットを組み換えることで違うタイプの輸送ペプチドを表現することができる。図27で示したユニットは一次構造の保存性から考えたものであるから、機能を持つドメインごとに分けると少し異なる結果がでるかもしれないが、基本的にはこれらの輸送ペプチドは短いユニットをある決った順番に並べ替えたものと考えることができる。ではこれらの並び換えは、進化のどの段階で起きたのだろうか？

現時点での報告を調べる限り、高等植物の輸送ペプチドをコードする領域にはイントロンは見つけられなかった。しかし RuBisCO の SS (ペチュニア、タバコ、ジャガイモ、トマト)、23-kDa (エンドウ) ではイントロンが輸送ペプチドの直後に存在していた。これは高等植物の間では輸送ペプチドが一つの module として存在しうることを示している。Wolter et al. (1988) はジャガイモの RuBisCO SS の配列から、SS の多形性をエキソン・シャフリングによって説明しているが、この中でも輸送ペプチドは一つの module として扱われている。また最近 Wedel et al. (1992) は、光化学系 II の 22-kDa タンパク質の構造との比較から、チラコイド内腔への輸送ペプチドそのものがこの 22-kDa タンパク質や LHCP の成熟型タンパク質などから構成されるスーパーファミリーに属するという考えを提案した。これらの考えは、チラコイド内腔のタンパク質の輸送ペプチドが進化的に早い段階で出来上がっていたことを示唆している。

これに対し、*Chlamydomonas reinhardtii* の 33-kDa と 17-kDa の遺伝子は、輸送ペプチドをコードする領域にシャフリングの痕跡とおぼしきイントロンをそれぞれ2つずつ持っている (Mayfield et al. 1989)。*C. reinhardtii* は真核・単細胞の緑藻であり、その扱いやすさから生化学や分子生物学の面で広く研究されている実験材料の一つである。module という概念をこの場合に適用するのが可能であること、およびイントロンが進化の過程で消失する傾向にあること、という2つの仮定のもとでこれらの輸送ペプチドの起源を考えると、それぞれいくつかの module のシャフリングによって形成されたものと思われる。*C. reinhardtii* は高等植物と違うミトコンドリアの系統を持つと考えられ、その葉緑体タンパク質の輸送ペプチドは高等植物のものとは少し異なり、高等植物のミトコンドリアへの信号のペプチドと葉緑体への輸送ペプチドの両方の性質を持つとされている (Franzen et al. 1990)。実際、この生物種の 33-kDa と 23-kDa タンパク質の成熟型の部分は高等植物のものと同じ相同性を示すが、輸送ペプチドの一次構造は異なる。

では高等植物の輸送ペプチドと *C. reinhardtii* の輸送ペプチドの起源は違うのか？ 高等植物においては共通の祖先型の遺伝子に、*C. reinhardtii* においてはタンパク質ごとのシャフリングに由来する



のか？ 次のような理由から、これらの生物種の輸送ペプチドは共通の起源を持つと考えられる。

1) *C. reinhardtii* と高等植物は、共通の細胞から進化しており、その細胞は葉緑体と核のゲノムに関して現在と同じような関係を持っていたと考えられる。それは、*C. reinhardtii* と高等植物で、あるタンパク質がどちらのゲノムにコードされているかが、現時点で知られている限りではいくつかの例外を除くとほとんど一致するからである (Rochaix et al. 1992)。あるタンパク質のサブユニットがどちらのゲノムにコードされるべきかという理由は、現在に至ってもまだ理屈づけることができない。おそらく、あるタンパク質がどちらのゲノムにコードされるかには必然性がなく、それは選択圧にならないのだろう。そうだとすると、*C. reinhardtii* と高等植物の葉緑体タンパク質に関してゲノムの割り振りが偶然に一致したとは考えにくい。核に移った遺伝子が機能するためには、その発現のためのプロモーターと、輸送ペプチドの獲得が必須である。ある遺伝子が機能していない間は、その遺伝子の配列を保存する選択圧もかからないので、葉緑体から核に遺伝子のコピーがわたってからその発現が可能になるまでの期間が長ければ、その遺伝子は保存されないで淘汰されるであろう。1. で述べたようにゲノムの割り振りが一致していることを説明するためには、*C. reinhardtii* と高等植物の共通の祖先である細胞ではすでに輸送ペプチドの獲得を終っていただなければならない。

2) *C. reinhardtii* と高等植物の輸送ペプチドには、共通した module から出発していると考えられることをうかがわせる配列が存在している (図29)。 *C. reinhardtii* の 33-, 17-, 23-kDa の輸送ペプチドは高等植物のものと同体的な構造が似ており、また保存領域 C に対応する部分には VCKAQ モチーフを持っている (図30)。このモチーフが *C. reinhardtii* の遺伝子でも保存されていたのだとすると、この部分を含む module は高等植物の保存領域と同じ module から組み立てられた可能性が大きい。これらの輸送ペプチドはその後、両者のミトコンドリアに生じた性質の差が選択圧となって進化して現在のようなかたち、すなわちユニットの構成が似ているが一次構造はほとんど違うものになったのではないか。

始原的な葉緑体が共生した細胞には、すでにシャフリングを終了した輸送ペプチドの原型があったものと思われる。そこに残されていたイントロンの一部が、*C. reinhardtii* の方にだけ残っているのではないだろうか。

ここで考察した内容はまだ完全なものではない。しかしさらに多くのデータを統計処理することで確からしさを向上させることが可能だと思う。また共生ラン藻の細胞膜やゲノムを生化学的に調べることで、ここで挙げたような仮想的な進化のステップの証拠が見つかるかもしれない。葉緑体への移行は、葉緑体の輸送装置の進化をそっくり含む過程である。この分野の研究をおこなうためアイデアを得るという意味でも興味深い。

ここでは触れなかったが、特に包膜の輸送装置の祖先がどのようなものであるかにはおもしろい問題が含まれている。その輸送ペプチドの構造から考えて、この装置は現時点ではたいへんユニークな存在である。しかしこの装置が、共生が始まってから以降にまったく新しく出来上がってきたとは考え難く、その基となった何らかの機構が宿主側か共生体側かに備わっていたはずである。それらはどのような変化を経て現在の状況をつくっているのだろうか？ また種々の *cyanelle* の包膜にもこれらに類似する機構があるだろうか？ など、疑問は尽きない。

23-kDa の輸送ペプチドの保存領域をコードする塩基配列

```

[region A]
M --- A S T Q C F L H
ATG --- GCG tac agc gcg TGT TTC CTA CAT
ATG --- GCA TCT ACA CAA TGT TTC TTG CAC
ATG --- GCT TCC ACT CAA TGC TTC TTG CAC
tobacco-af --- GCT TCA ACA CAA TGT TTC TTG CAC
tobacco-ag ATG GCT GCT TCC ACA CAA TGT TTC TTG CAT
tomato ATG --- GCG TCC ACC TCC TGC TTC CTC CAC
wheat ATG --- GC TC AC CAA TG TTC T CA
consen.

[region C]
C K/R A Q
mustard GTG TGT AAA GCT CAA
pea GTT TGC AAG GCA CAG
tob. af GTG TGC cgt GCC CAA
tob. ag GTT TGC cgt GCC CAA
tomato att TGC cgt GCA CAA
wheat GTC TGC AAG GCG CAG
consen. GT TG AA GC CA

[region E]
V S R R L A L T I L v G A A v G S K V S P A D A
GTC --- TCT CCG CGT CTC GCT CTC ACA ctc CTC gtc GGC GCT GCT ACA gtt GGT TCC AAA GTG TCT CCT GCC GAT GCT
GTC --- TCT CGT AGG TTA GCA CTT tct gtt CTC att GGT GCT GCT GCT GCT GCT TCC AAC GTT TCA CCT GCA GAT GCT
GTC --- TCT CGT AGA TTG GCT CTT ACA ctc CTC att GGT GCT GCT GCT GCT TCC AAC GTT TCC CCT GCA GAT GCT
GTC --- TCG AGA CGA TTG GCT CTT ACT ctc CTC att GGT ACT GCT GCT GCT GCT TCC AAC GTT TCC CCT GCA GAT GCT
wheat GTC ACC AGC CGG CGC GCC GCG CTG tcc ctc CTC gcc GGT GCC GCC atc gcc GTC AAG GTC TCC CCC GCC GCC GCT
consen. GT G G G G C GC GC T GG AA GT TC CC GC G

```

図28 23-kDa と 33-kDa の輸送ペプチドの保存領域をコードする塩基配列

33-kDa の輸送ペプチドの保存領域をコードする塩基配列

```

[region A]
M A A S L Q A A A T I M Q P
pea ATG GCA GCC TCA CTT CAA GCA GCT GCT ACT ctc ATG CAA CCT
wheat ATG GCA GCG TCT CTC CTA CAA GCC GCG ACC gtc ATG --- CCG
potato ATG GCA GCG TCT CTA CAA GCA GCT ACT ctt ATG CAA CCA
spinach ATG GCA GCT TCA TTA CAA GCA tca aca ACC ttt tta CAA CCC
tomato ATG GCT TCT CTA CAA GCA GCT GCT ACT ctt ATG CAA CCG
consen. ATG GC GC TC T CAA GC GC AC T ATG CAA CC

[region C]
V s K A F G
pea GTT tct AAG GCC TTT GGT
wheat GTC gcc cgg GCG TTC GGC
potato GTG agc AAG GCA TTT GGT
spinach GTG tgc AAG GCT TTT GGT
tomato GTG agc AAA GCA TTT GGT
consen. GT AA GC TT GG

[region E]
K i A G F A L A T S A L v V S G A S A
pea AAG att GCA GGA TTT GCT CTT GCC ACT TCT GCT gtt GTC TCT TCT GGA GCA agt GCA
wheat AAG att GCA GGC TTC GCC CTC GCT ACC TCT GCC CTC ctc GTC TCC GCG GCG acg GCG
potato AAG att GCT GGA TTT GCC CTT GCC ACC TCT GCT GCT gtt GTC TCA GGA GCT aat GCT
spinach AAG ctt GCC GGT CTC GCT CTC GCT ACC TCC GCT ctt atc gcc TCG GGG GCA aat GCT
tomato AAG att GCT GGT TTT GCT CTT GCC ACC TCT GCC CTC gtc GTC TCG GGA GCA aat GCG
consen. AAG T GC GG T GC CT GC AC TC GC CT T GTC TC GG GC

```

アミノ酸配列を1文字標記で、また全ての配列に共通する塩基を consen. に示した。小文字は保存の度合いが低い部分を表す。

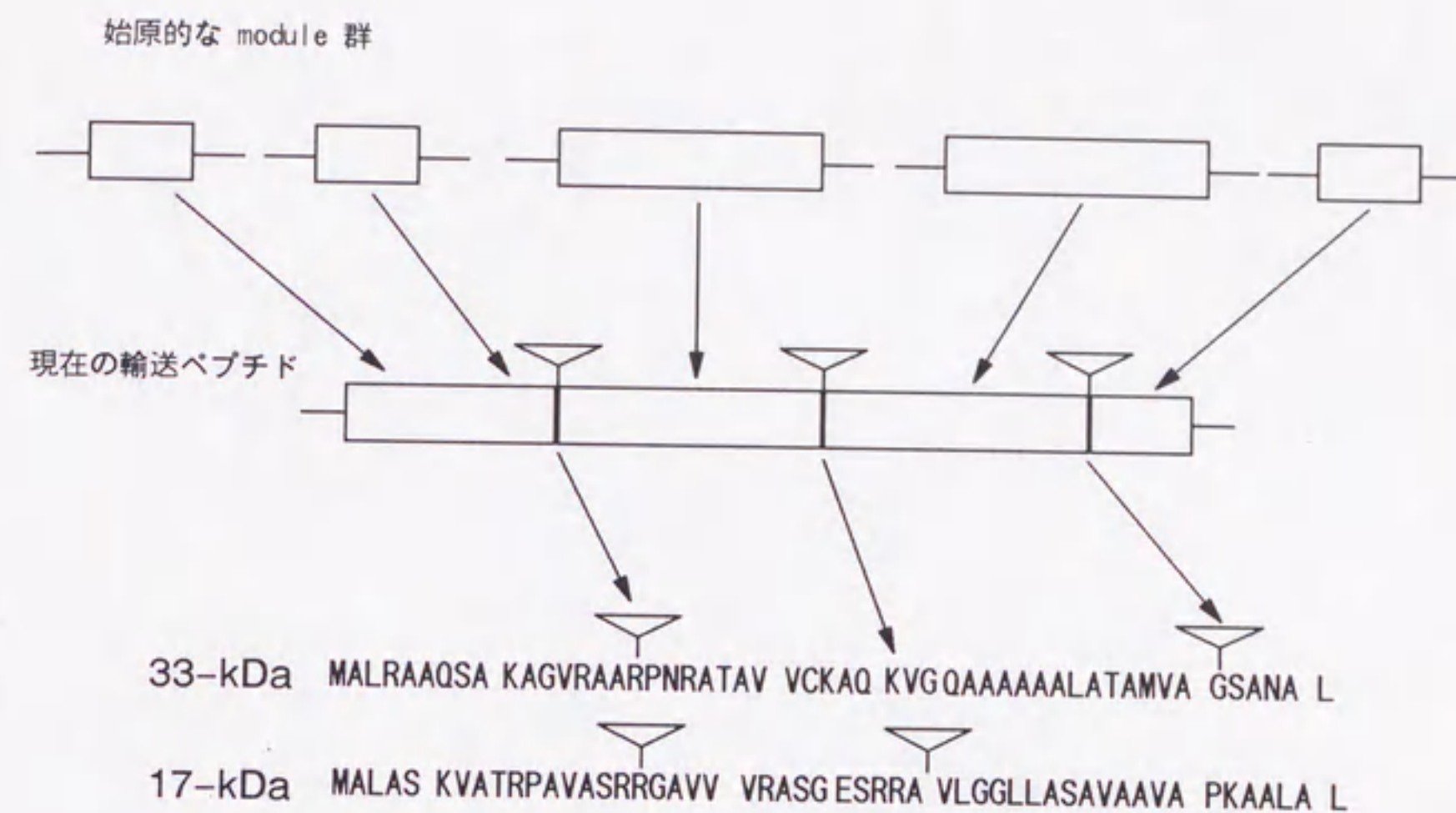


図29 *Chlamydomonas reinhardtii* の輸送ペプチドに見られるエクソン・シャフリングの痕跡 (モデル)

ボックスは一つの module を、逆三角はイントロンを表す。輸送ペプチドの一次構造は、図30にボックスで示す、共通なモチーフごとに分かち書きしてある。二つずつあるイントロンのうち、前側のものは 33-kDa と 17-kDa に共通する位置に存在すること、またもう一方のイントロンが分かち書きの部分に存在することに注目されたい。これは、過去においてもっと多くのイントロンと、現在よりも短いエクソンが存在し、イントロンが進化とともに失われたと考えると説明がつく現象である。

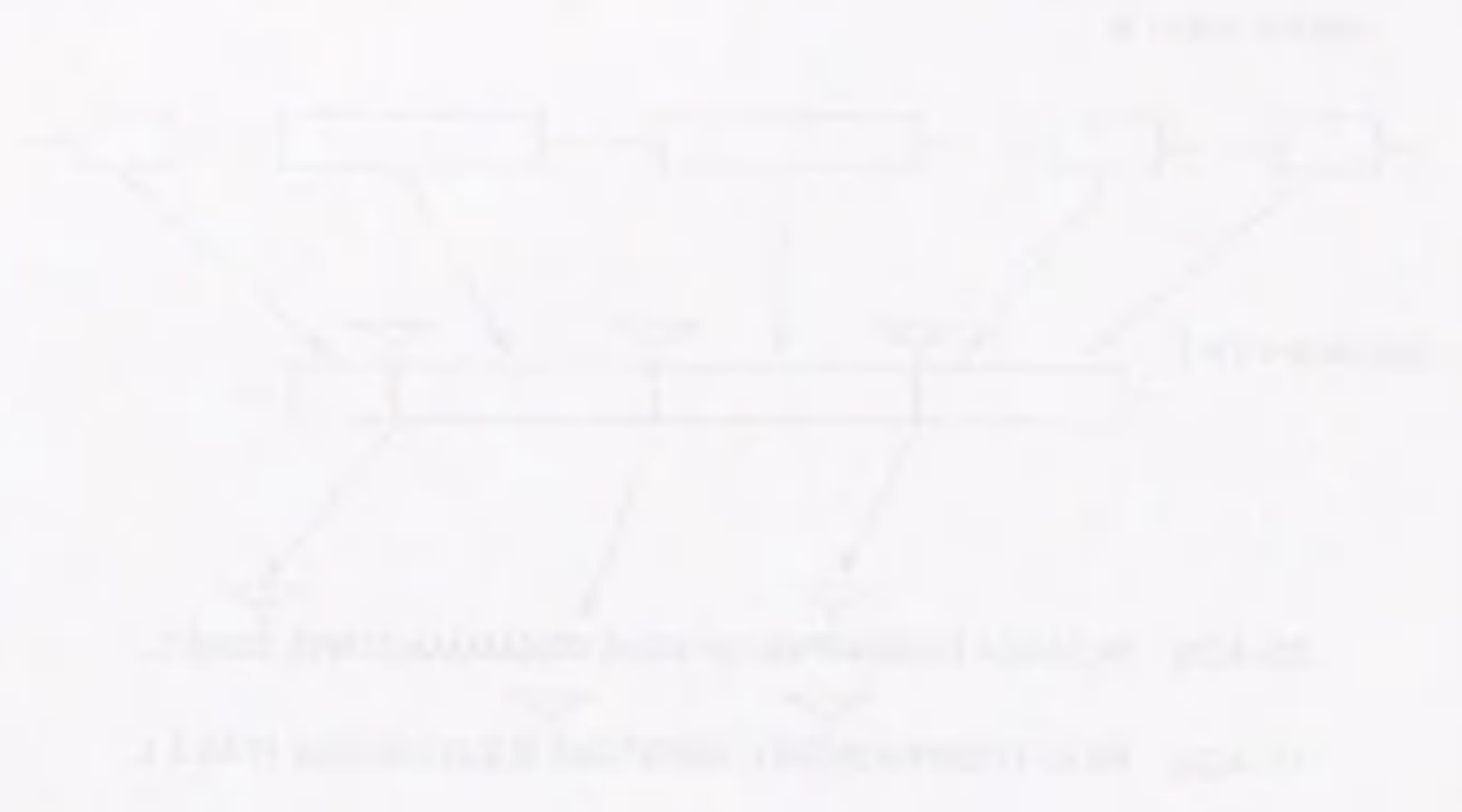
1. The first part of the paper is devoted to a general discussion of the problem. It is shown that the problem is of great importance in the theory of differential equations.

2. In the second part, we consider the case of a linear differential equation. It is shown that the problem is solvable in this case.

3. In the third part, we consider the case of a nonlinear differential equation. It is shown that the problem is not solvable in this case.

4. In the fourth part, we consider the case of a system of differential equations. It is shown that the problem is solvable in this case.

5. In the fifth part, we consider the case of a partial differential equation. It is shown that the problem is solvable in this case.



6. In the sixth part, we consider the case of a system of partial differential equations. It is shown that the problem is solvable in this case.

7. In the seventh part, we consider the case of a system of ordinary differential equations. It is shown that the problem is solvable in this case.

8. In the eighth part, we consider the case of a system of integro-differential equations. It is shown that the problem is solvable in this case.

9. In the ninth part, we consider the case of a system of stochastic differential equations. It is shown that the problem is solvable in this case.

10. In the tenth part, we consider the case of a system of partial integro-differential equations. It is shown that the problem is solvable in this case.

11. In the eleventh part, we consider the case of a system of partial stochastic differential equations. It is shown that the problem is solvable in this case.

12. In the twelfth part, we consider the case of a system of partial integro-stochastic differential equations. It is shown that the problem is solvable in this case.

13. In the thirteenth part, we consider the case of a system of partial integro-stochastic differential equations with delay. It is shown that the problem is solvable in this case.

14. In the fourteenth part, we consider the case of a system of partial integro-stochastic differential equations with delay and control. It is shown that the problem is solvable in this case.

15. In the fifteenth part, we consider the case of a system of partial integro-stochastic differential equations with delay and control and observation. It is shown that the problem is solvable in this case.

	N-terminal uncharged region	positively charged region	stromal processing site	charged region	hydrophobic cluster	thylakoidal processing site
33 kDa <i>C. reinhardtii</i> Pea	MALRAAOSA MAASLQAAATLMQPT	KAGVRAARPPIRATAV KLRSNITLQLKSNQS	VCKAQ VSKAF	KVG GLEHYGAKVTCSLQ- SDFKELAHKVEASK	QAAAAAALATAMVA IAGFALATSALVVS	GSANA L GASA E
23 kDa <i>C. reinhardtii</i> Pea	MATALCN MASTQCFLHHQYAITTPT	KAFAAAPVAPRASRSAYV RTLSQRQVTTKPNHI	VRASG VCKAQ	SDVSR KODDWDVAVSR	AALAGFAGAALVSSS LALSVLIGAAAVGSKVS	PANA A PADA A

図30 *Chlamydomonas reinhardtii* とエンドウの 23-kDa と 33-kDa の輸送ペプチドの一次構造の比較

それぞれのタンパク質の輸送ペプチドの一次構造を、対応すると考えられる部分をボックスで囲んで表した。エンドウ (Pea) の charged region だけ、作図上の都合により二行に書いてある。

参考文献

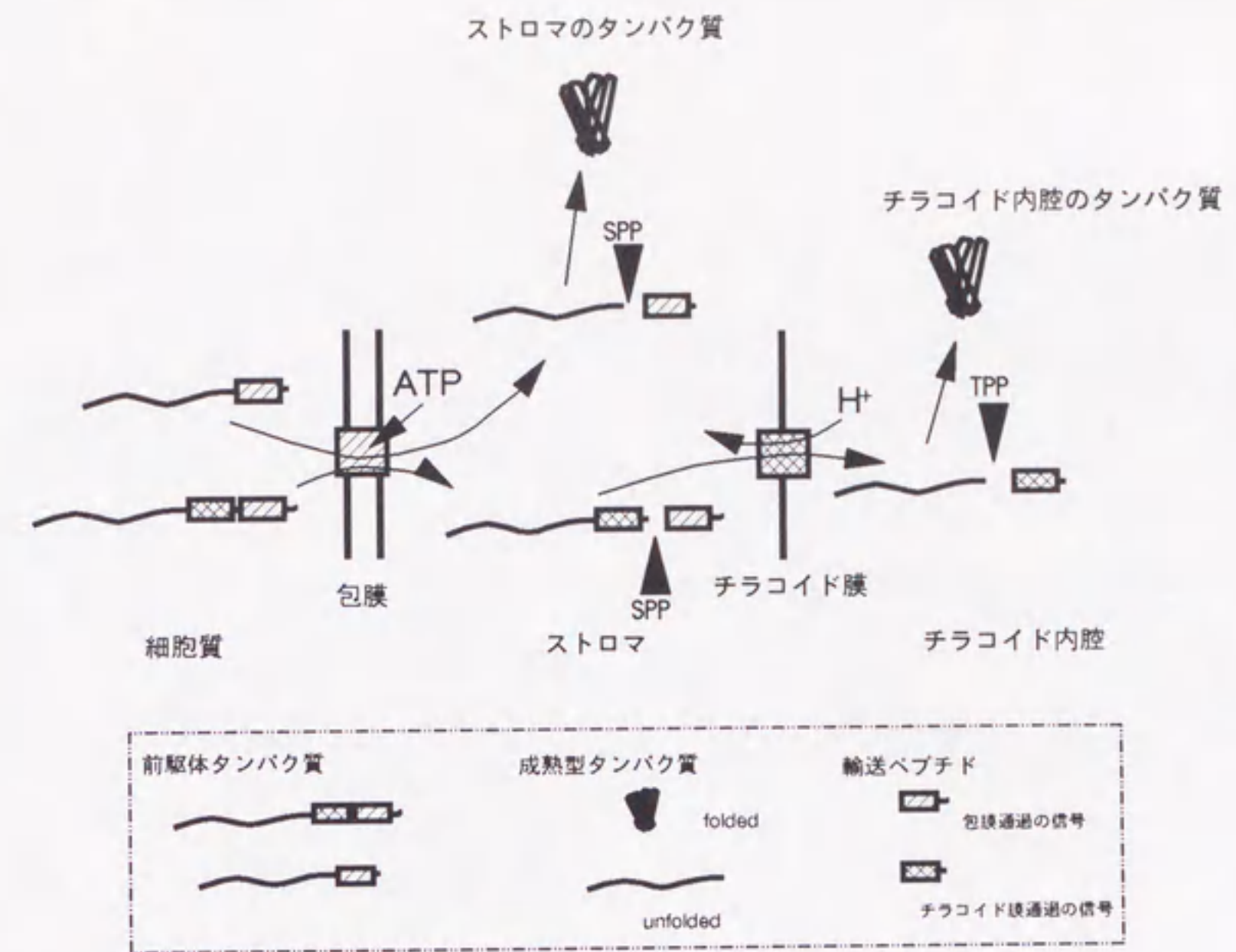
- Baron, M., Norman, D. G. and Campbell, I. D. (1991) Protein modules. *Trends Biochem. Sci.* 16: 13-17.
- Doolittle, R. F. (1989) Similar amino acid sequences revisited. *Trends Biochem. Sci.* 14: 244-245
- Franzen, L.-G., Rochaix, J.-D. and von Heijne, G. (1990) Chloroplast transit peptides from green alga *Chlamydomonas reinhardtii* share features with both mitochondrial and higher plant chloroplast presequences. *FEBS Lett.* 260: 165-168.
- Mayfield, S. P., Schirmer-Rahire, M., Frank, G., Zuber, H. and Rochaix, J.-D. (1989) Analysis of the genes of the OEE1 and OEE3 proteins of the photosystem II complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 12: 683-693.
- Kuwabara, T., Reddy, K. J. and Sherman, L. A. (1987) Nucleotide sequence of the gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 encoding the Mn-stabilizing protein involved in photosystem II water oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8230-8234.
- Rochaix, J. D., Goldschmidt-Chermont, M., Choquet, Y., Takahashi, Y., Kuchka, M., Girard-Bascou, J. and Bennoun, P. (1992) Chloroplast gene expression and reverse genetics in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Regulation of Chloroplast Biogenesis*, ed. Argyroudi-Akoyunoglou, pp 9-16, Plenum Press.
- Wedel, N., Klein, R., Ljungberg, U., Andersson, B. and Herrmann, R. G. (1992) The single-copy gene *psbS* codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II. *FEBS Lett.* 314: 61-66
- Wolter, F. P., Fritz, C. C., Willmitzer, L., Schell, J. and Schreier, P. H. (1988) *rbcS* genes in *Solanum tuberosum*: Conservation of transit peptide and exon shuffling during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 846-850.

## 現在までの研究の成果と今後の展望

現在までに、第Ⅰ部で述べたような試験管内の実験と、第Ⅱ部で述べたような輸送ペプチドの配列の比較から次のようなことが明らかになった。

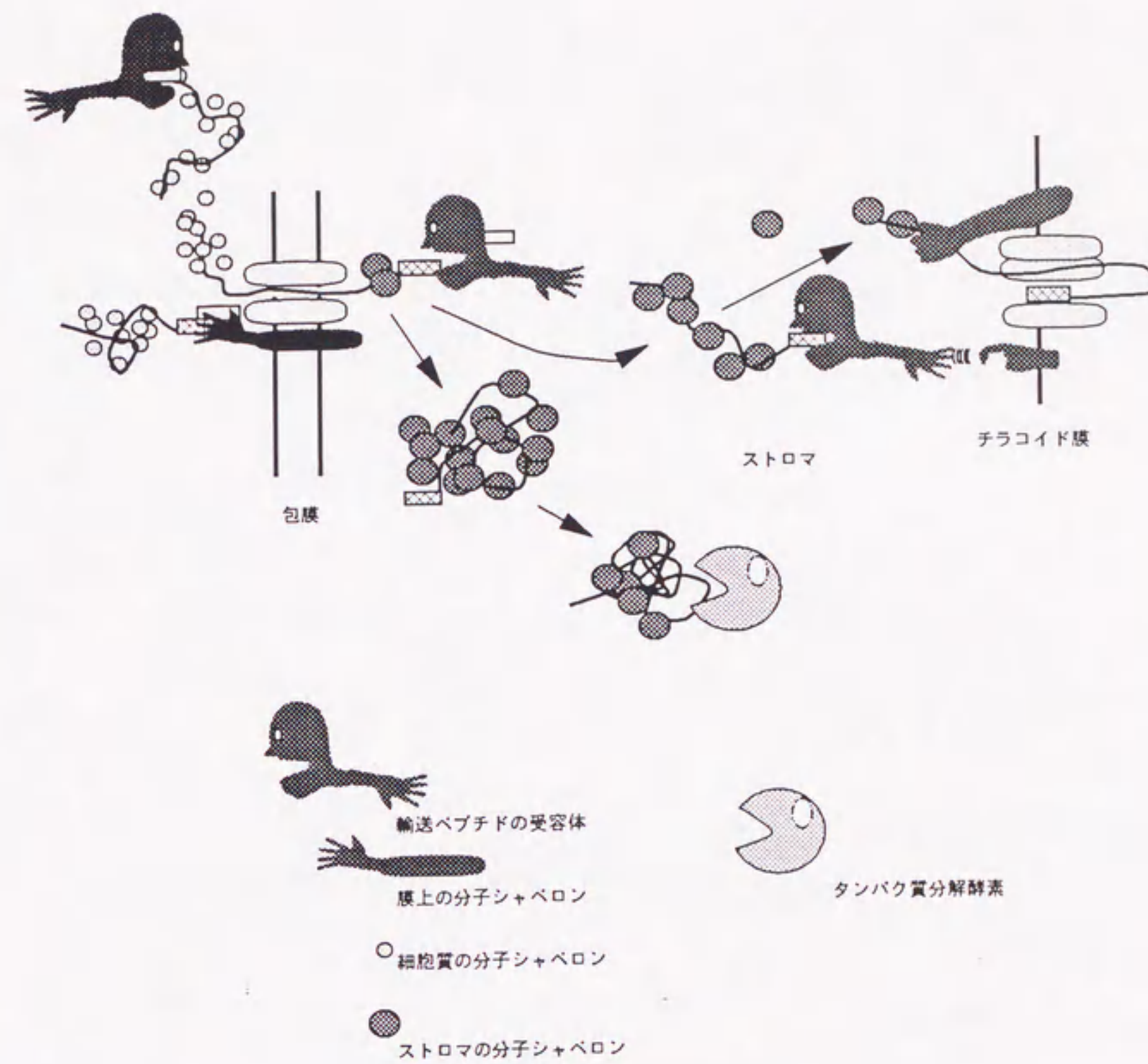
- ① 葉緑体はタンパク質輸送装置を包膜とチラコイド膜に持っている。それぞれの装置は独立して働く。あるタンパク質がそれぞれの膜を通過すべきか否かの情報はその輸送ペプチドに書かれていて、葉緑体の膜上の輸送装置がそれを認識する。タンパク質が葉緑体のどのコンパートメントに運ばれるかは、この輸送装置による認識で決定される(図31)。
- ② おそらくチラコイド膜の輸送装置と、それに認識される輸送ペプチドの部分は、現在の原核生物の細胞膜や、ミトコンドリア内膜で知られているような輸送装置と同じ起源を持つ。
- ③ 包膜にある輸送装置は ATP によって駆動される。この装置についてはまだこれ以上の手がかりを得ていない。他の輸送の系にはない、葉緑体独自の輸送の系がもし存在するとしたら、それはこの輸送系である。
- ④ チラコイド内腔へ輸送されるタンパク質はストロマにおいて輸送ペプチドの一部を切り離されて中間体になる。ストロマにはこの中間体の被輸送活性を保持するための機構が存在する(図32)。
- ⑤ ストロマで被輸送活性を失った中間体タンパク質は光を要求する方法で速やかに分解される(図32)。
- ⑥ 輸送ペプチドはそのタンパク質の輸送先に応じて共通した構造を持つ。これらの配列は共通した始原的な module から進化したものと思われる。





チラコイド内腔へのタンパク質の輸送を、ストロマへの輸送と併せて表す。これらのタンパク質は、同じ装置によって包膜を通過すると考えられる。これらはストロマの酵素 (SPP) に輸送ペプチドを切断される。この切断によって、ストロマのタンパク質からは輸送ペプチドがなくなり、高次構造をとって他のタンパク質と会合する。チラコイド内腔のタンパク質は、さらなる輸送のためのシグナル配列が残った輸送中間体となる。輸送中間体はチラコイド膜をプロトン勾配を消費して通過し、酵素 (TPP) によって成熟形になり、高次構造をとる。

図31 この研究から明らかになった葉緑体へのタンパク質輸送の機構① (モデル)



ストロマにおける中間体の挙動から考えられる、輸送されているタンパク質と分子シャペロンとの相互作用のモデル。合成された前駆体は、分子シャペロン間を受け渡されて包膜を通過してストロマに至る。ストロマで輸送ペプチドを切断され中間体へと移行したタンパク質は、あるものは解かれた状態を保ち、またあるものは変性する。前者はさらにチラコイド膜を通過して輸送され、後者は分解される。図に示されたいくつかの因子のうち、現時点で実際に発見されているのは細胞質とストロマの分子シャペロンだけである。

図32 この研究から明らかになった葉緑体へのタンパク質輸送の機構②(モデル)

これらの成果と、さらに他の研究グループから報告されている内容とをあわせて、葉緑体へのタンパク質輸送の研究の現状を、いくつかのトピックスに分けて考えてみよう。

#### 1) 分子シャペロンの輸送へのかかわり

本文中にも述べたが、意外なことに、葉緑体の輸送系からは輸送後のタンパク質のアセンブリーを除くと分子シャペロンの関与を示すデータがまだ得られていない。もちろん誰もが分子シャペロンの関与について考えているし、それを証明しようとしている研究者も何人かいる。現在、いくつかのグループが葉緑体の HSP60 や HSP70 タンパク質といったシャペロンやその抗体を得ることに成功している。近いうちにこれらのタンパク質と輸送中のタンパク質との相互作用が明らかになるかもしれない。23-kDaの輸送中間体は、輸送中のタンパク質をシャペロンとの相互作用を保ったまま安定に保持することができそうであり、いい実験材料になるだろう。

現在いくつかの研究グループが、大量に合成した前駆体タンパク質や輸送ペプチドを用いての実験を試みている。私がこの論文の I 部で示したような方法は、ごく微量の前駆体タンパク質を使うために、その高次構造を測定することはできない。しかし「もの」としてある程度の量があれば測定が可能になる (Endo et al. 1992)。それは分子シャペロンの作用を論じる上でたいへん重要な知見となる。またこうしたアプローチは、II 部で考察したような、輸送ペプチドがどのような構造を持つのか、それがどんな働きをするのかを実際に具体的に調べることを可能にするだろう。

#### 2) 輸送ペプチドの切断

ごく最近、ストロマにおける前駆体の切断酵素が精製 (Oblong & Lammpa 1992) された。その報告によるとこれは 145 kDa と 143 kDa の分子量のポリペプチドであるが、そのサブユニットの構成などはまだ不明である。これはクロロフィル結合タンパクや RuBisCO の SS などを切断することがわかっているが、II 部で考察したようにチラコイド内腔のタンパク質をも切断するのかはまだ確かめられていない。この酵素がどんな機構で輸送ペプチドのある構造だけを認識するのか、たいへんに興味を持たれる。

チラコイドにあって内腔への輸送ペプチド切断する酵素は、部分精製の報告があるが (Musgrove et al. 1989)、失活が速いとのことで、その後は精製が進んでいないようである (Robinson, 私信)。

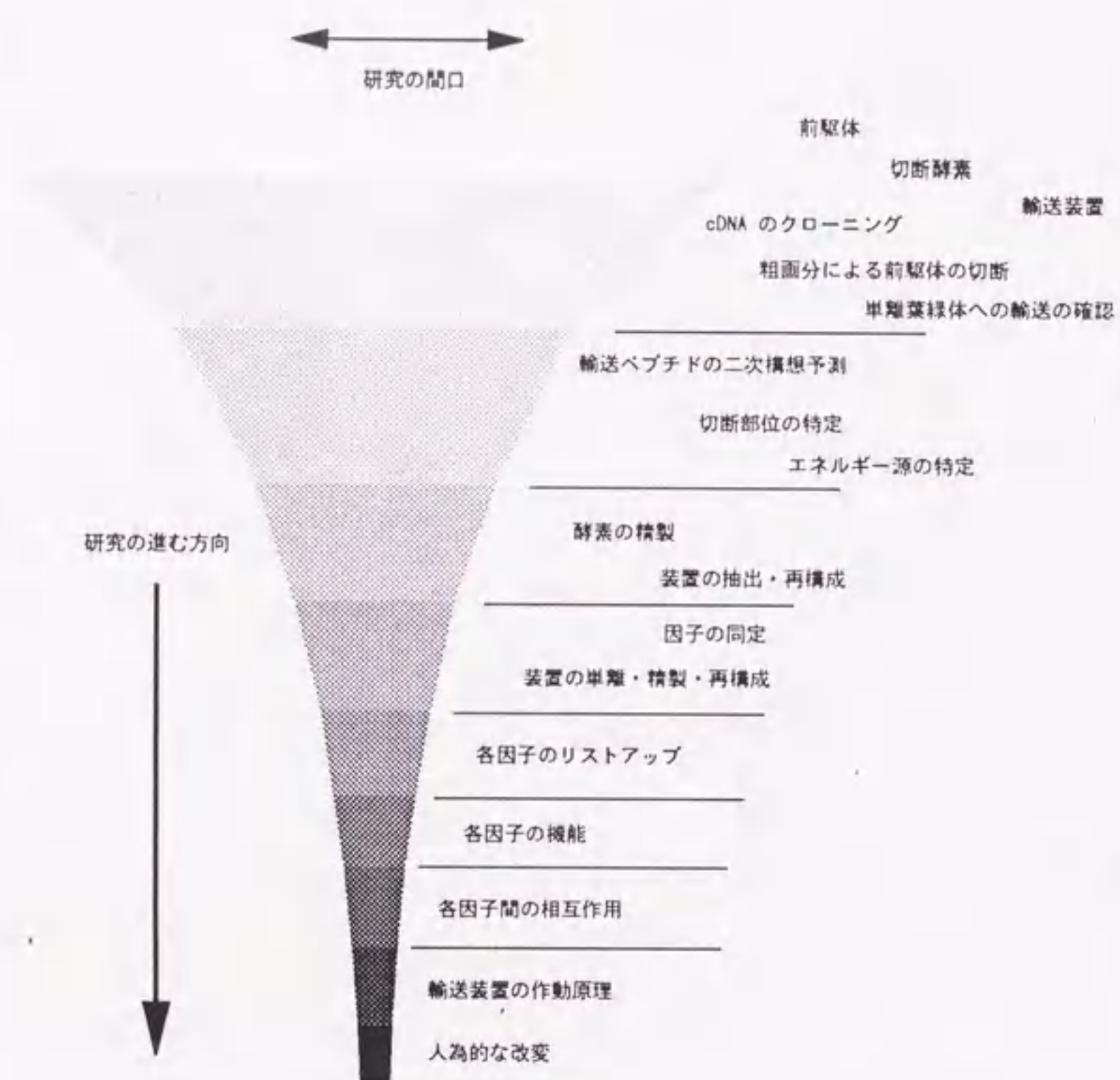


図33 研究の進む方向についての予測（モデル）

上から下へ、これからの研究が進んでいくであろう方向と内容を表している。たとえば光合成の装置であるとか、転写調節の機構のように、その研究の対象がすでに明確な「もの」に絞られている場合は、その研究の進む方向は自ずから決っている。（これと対照的な研究の分野として、たとえば古典的な博物学が考えられる。これはむしろ研究の間口を広げるようなアプローチであろう。）ここで例えば何らかの因子について、その構造や働きなどをより深く知ろうとすると、その実験上の方法の限界にいきあたることになる。研究の限界はここで決まる。その方法が適用できないケースはそれ以上の追及ができないことになるため、新たに画期的な手法が確立されない限り、研究の対象はさらに絞られていく。これを左右の巾で表した。

### 3) 輸送装置の単離・再構成への試み

ごく最近、包膜の輸送装置の再構成 (Soll & Waegemann 1992) がなされた。これは包膜を穏やかに可溶化して、簡単な密度勾配遠心で分画し、それを再構成したものである。実験そのものはシンプルだが、その意義は大変に大きい。この種の研究、つまりその対象がたいへん具体的な「もの」であるような研究、はその個々の研究の内容を明解に階層つけて評価することが可能で、それはたとえば図33に示すようなモデルに表すことができる。この Soll & Waegemann の研究は、現時点での研究の階層を超えるための試みと言える。今後、短期間のうちに次の階層に研究が推移し、そこに達していない研究の多くは駆逐されることが予想される。

具体的にどのような方法があるかを考えると、

- ① 実験系の単純化：葉緑体から活性を保ったまま輸送装置を抽出・再構成し、より単純な実験系を構築する。これはその系に人為的に手を加えやすくして、その結果をより精密に分析するのがその主眼であり、さらにそこから輸送に関わる因子を単離・精製する前段階にもなる。
- ② 変異体をつかった解析：高等植物を使ったアプローチでは現在、Robinson のグループと渡辺のグループが *Arabidopsis thaliana* を用いた変異体の単離を試みている。II部2章で紹介した *Chlamydomonas reinhardtii* などの緑藻も、このアプローチのためのよい材料になると思われる。

輸送装置の同定や精製などに多少トリッキーな方法が使われるかもしれないが、今後は大筋としてはこのようなアプローチで研究が進んでいくものと思う。これらはいわば正攻法であり、よほどのアドバンテージがない限り大きな研究グループのほうが有利である。私個人の研究の方針としては、手元にあるデータを発表しつつ、図33とは違う方向へテーマを展開する予定である。

## 参考論文

- Endo, T., Kawamura, K. and Nakai, M. (1992) The chloroplast-targeting domain of plastocyanin transit peptide can form a helical structure but does not have a high affinity for lipid bilayers. *Eur. J. Biochem.* 207: 671-675.
- Musgrove, J. E., Elderfield, P. D. and Robinson, C. (1989) Endopeptidases in the stroma and thylakoids of pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 90: 1616-1621.
- Soll, J. and Waegemann, K. (1992) A functionally active protein import complex from chloroplasts. *Plant J.* 2: 253-253.
- Oblong, J. E. and Lamppa, G. K. (1992) Identification of two structurally related proteins involved in proteolytic processing of precursors targeted to the chloroplast. *EMBO J.* 11: 4401-4409.
- Roberts, L. M., Meadows, J. W. and Robinson, C. (1991) Targeting of ricin A chain into pea chloroplasts. *FEBS Lett.* 293: 134-136.

おわりに

葉緑体は、その複雑な内部のそれぞれのコンパートメントにタンパク質を輸送するために、その膜ごとに輸送装置を用意していた。現時点ではチラコイド膜の装置についてやや詳しい性質が明らかになっているが、包膜の装置はその起源など不明な点が多く残っている。またおそらく、まだ存在が明らかになっていない装置もあるだろう。たとえばストロマから包膜へ輸送されるタンパク質があるが、このための装置は、現在のところその存在の是非さえわかっていない。これらの輸送装置を構成する部品のリストの作製、装置を駆動するメカニズムの解明、といった問題については、今後の研究に期待したい。

この研究を進めていく過程で、私は非常にきびしい競争にまきこまれることになった。1991年に基礎生物学研究所のセミナーにまねかれた Dr. C. Robinson は、23-kDa および 33-kDa の単離葉緑体への輸送に必要なエネルギー源に関する発表をおこなった。そのとき、それとほぼ同じ内容の実験を行った私のフルオログラフィのデータ(部2章)は、 $-80^{\circ}\text{C}$ で露光中であった。その日、岡崎から帰った私はすぐにそのフィルムを現像し、その翌日の渡辺の発表のためにあわててスライドをつくったりした。今にして思えば、おそらくこの時点で彼らのグループの方が半年くらいのアドバンテージを持っていたものと思われる。Robinson らのそのときのデータは速やかに発表されたが、私は 33-kDa の結果がおもしろくないのに拘泥してその機会を逸し、それを論文にするためのオリジナリティを主張することに苦心することになった。Robinson のグループとはその後も II 部 3 章の内容や、突然変異体を用いたアプローチでも仲よく重なることになった。これは既にかいたが、アプローチの方法が限られており、問題意識がかなり共通するためにおきる現象だと思う。これは個人的にはかなりきびしい状況であったが、いくつかの教訓を残した。その中にはここに書きにくいような内容のものもあるが、全部を忘れてしまったりすると困るので、ここに二つだけ書いておこう。研究者間で連絡をとりあうこと、そして、論文はさっさと書いて投稿してしまうこと、以上である。

## 謝辞

本研究は 1987 年から 1993 年まで生化学制御研究施設の渡辺グループでおこなわれた。渡辺 昭教授には公私にわたってお世話になったが、ここでは特に研究の機会と環境を与えてくれたことを感謝する。この6年間は、おそらく私の研究生生活の中でも最も潤沢に器具・機器・試薬その他が手に入った時期になるような予感がする。この6年で様々なものや方法が進歩したが、(DNA シーケンサー、イメージアナライザ、新しいコンピュータ、ソフトウェア、パソコン通信、エアコンディショナーなどなど)それらは常に身近にあった。渡辺先生はそれらを導入することにも、それらを管理することにも熱心だった。先生のこの進取のお心がなかったら、どうかすると私はまだロットリングで作図していたかもしれない。また先生が集められた文献は、その使いやすい検索システムと共に、この論文を書く上でも重要な資料になった。

第部3章の内容は、農水省森林総研の篠原健司博士との共同研究である。篠原博士には、その他にもいろいろと有益なディスカッションをしていただいている。この場を借りてお礼を申し上げたい。

図1で使用したプロプラスチドのサンプルは、生理活性物質調節の武田 穰博士が提供してくれたタバコの培養細胞から単離した。このほか武田先生が気前よく貸してくれた種々の書籍は、たいへん有益だったり、あるいはきびしい日々の大きな慰めになったりした。

ここ1, 2年の間に、就職のことで多くの人々の手を煩わした。少なくとも私の場合、これはかなり研究の内容に影響していると思われる。そこでこの場で、理化学研究所の井上頼直先生、三井業際植物バイオ研の柴田大輔先生、静岡県立大学の小林裕和先生、環境研の近藤矩郎先生と中嶋信美博士、そして京都大学の佐々木幸子先生に感謝する。

生化学制御研究施設の方々には研究の上だけでなくいろいろとお世話になった。ここで楽しい時間を持てたことを感謝する。馴染んだ「制御」はこの3月に発展的に解散するが、新たに組織される研究センターと、そこで行われる研究の実り多からんことを祈りたい。

報文目録

- 1) Transport of proteins into the thylakoid lumen - Stromal processing and energy requirements for the import of the precursor to the 23-kDa protein of PSII.

Tomokazu Konishi and Akira Watanabe (1993) *Plant Cell Physiol.* 印刷中

- 2) Protein transport to thylakoid lumen.

Tomokazu Konishi and Akira Watanabe (1992) in *Research in Photosynthesis*, ed. N. Murata, Elsevier Science Publ. 印刷中

- 3) Transit peptides of thylakoid lumen proteins: the sites of stromal processing are conserved among higher plants.

Tomokazu Konishi, Yoshiyuki Maruta, Kenji Shinohara and Akira Watanabe (1993) *Plant Cell Physiol.* 投稿中