

図・本館

高等植物の傷害組織における
チトクロムオキシダーゼの生合成機構

前 島 正 義

名古屋大学図書
和 846930

目 次

第1章——序 論——

ミトコンドリア形成の生化学的研究の経緯

----- 1

高等植物におけるミトコンドリア形成の

生化学的研究

----- 5

研究課題とその意義 (図)

----- 8

第2章——サツマイモ cytochrome c oxidase の
精製とその性質——

はじめに

----- 16

材料および実験方法

----- 20

結果： (図表)

----- 30

Cytochrome c oxidase の可溶化。Cytochrome c oxidase の精製。精製度。Cytochrome c oxidase の物理化学的性質。Cytochrome c oxidase のサブユニット構成。酵素活性に及ぼす potassium phosphate、KCl および Triton X-100 の影響。リン脂質要求性と pH 依存性。

Cytochrome ϵ oxidase 活性と温度との関係。

考察：

----- 65

Cytochrome ϵ oxidase の精製。吸収スペクトル。サブユニット構成。Cytochrome ϵ oxidase サブユニットの立体配置と機能。Cytochrome ϵ oxidase の活性単位。酵素反応の阻害剤と促進剤について。酵素活性の温度依存性について。

第3章——サツマイモ塊根傷害組織における

Cytochrome ϵ oxidase の生合成機構——

はじめに

----- 90

実験方法および材料

----- 96

結果： (図表)

----- 106

傷害組織から精製した Cytochrome ϵ oxidase の性質。 in vivo 実験における酵素タンパク質の合成。Cytochrome ϵ oxidase 関連タンパク質の細胞内局在。Sup II 画分の性質。Sup I 画分の性質。X-タンパク質の phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィー。

X-タンパク質の精製とその分子量。

単離したミトコンドリアによるタンパク質合成。

考察：

----- 135

Cytochrome ϵ oxidase の活性増加を説明する
3つの考え方。健全・傷害両組織の
cytochrome ϵ oxidase の比較と酵素量の増
加について。活性増加に伴う Cytochrome
 ϵ oxidase サブユニットの合成について。
健全組織ミトコンドリアの Sup I 画分お
よび X-タンパク質の性質について。傷
害組織における cytochrome ϵ oxidase の生合
成機構。他の生物における研究成果と
の比較。

結 語

..... 152

引用文献

..... 157

謝 辞

..... 166

ABBREVIATION

(iv)

BSA	: bovine serum albumin
DEAE	: diethylaminoethyl-
DOC	: deoxycholic acid
DPPC	: dipalmitoylphosphatidylcholine
DMPC	: dimyristoylphosphatidylcholine
EDTA	: ethylene diamine tetraacetate
EGTA	: ethylene glycol bis(2-aminoethylether)-tetraacetate
IgG	: immunoglobulin G
PC	: phosphatidylcholine
PE	: phosphatidylethanolamine
SDS	: sodium dodecylsulfate
TEMED	: N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
Tris	: tris (hydroxymethyl) aminomethane

第 1 章

序 論

本研究は、高等植物におけるミトコンドリア形成の機構を考察するために、その内膜に局在する cytochrome c oxidase (EC 1.9.3.1) の生合成の機構を解明することを目的とした。研究結果を述べる前に、まずミトコンドリアの形成に関する一般的研究経緯と高等植物でのミトコンドリア形成の研究の概略について述べる。そして、その次に本研究課題の内容と意義について説明していきたい。

ミトコンドリア形成の生化学的研究の経緯

真核生物の細胞内には機能分化したオルガネラとして、核、小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、液胞、葉緑体等が存在する。現

在では、各オルガネラの機能の大部分が明らかにされ、こうしたオルガネラや細胞内構造を無視して物質代謝やエネルギー代謝を論ずることはできなくなっている。オルガネラは分裂、生長、分化などの細胞の内的要因や、薬剤や病傷害などの外的要因によって、数量、形態、構成々分が適応的に変化する。オルガネラの構成々分であるリン脂質もタンパク質も一定の時間で代謝回転しており、オルガネラはそれぞれの細胞内で、形成・分解の動的平衡状態にあるといえる。

各オルガネラの構造や機能が解明されるにしたがって、しだいにその形成機構に関心が移り、生化学における大きな研究分野を形成するようになった。1970年代に入ると、膜構造に関する一般的な理解が深まり、さらに膜タンパク質が比較的容易に取扱えるようになったこともあり、オルガネラの膜上や内部に局在するタンパク質の生合成及び輸送のメカニズムの解明に力が注がれるようになった。

その中でも、ミトコンドリアの形成機構、具体的にはミトコンドリアタンパク質の生合成と輸送の機構が、特に大きな関心を集めてきた。それは、第一に、植物細胞の葉緑体と並んで、ミトコンドリアが固有の DNA と遺伝情報発現系を備えているためである。これは小胞体やリソゾーム等と著しく異なる点であり、核とミトコンドリアの2種の遺伝情報がいかに関連し合っているのかは、魅力的な課題となっている。第二には、ミトコンドリアは電子伝達系と共役因子、トリカルボン酸回路、脂肪酸の β -酸化系、さらに動物では尿素回路の諸酵素群を含み、物質代謝とエネルギー生産の中心的役割を担っているためである。また、内膜に局在する電子伝達系と共役因子については、酸化的リン酸化の機構の分子レベルでの解明それ自身が生化学の課題であり、チトクロムや ATPase がよく研究されているという背景もある。第三に、ミトコンドリアは構造が明瞭で、特定の条件下で急激に増加

し、ミトコンドリア形成という現象を観察し易いことが挙げられる。例えば酵母では、次のような現象が生化学的な研究対象となった。⁽³⁾

1) 嫌氣的条件下で生育した酵母を好気培養すると、チトクロム等が誘導・合成されミトコンドリアが形成される。 2) *glucose* を含む培地から *glucose* を含まない培地に移すと、ミトコンドリアが形成される。 3) 呼吸欠損変異株や不飽和脂肪酸要求性変異株などミトコンドリア形成に関する変異株がえられている。このほか、ミトコンドリアが比較的単離し易い点、内膜と外膜の二重の膜をもっていることなども研究者の注意を引いた理由と思われる。

ミトコンドリア形成は、研究の経緯や実験のし易さなどのため、主に *Saccharomyces cerevisiae* (コウボキン)、*Neurospora crassa* (アカパンカビ)、動物の肝臓などを材料として研究されている。一方、高等植物のミトコンドリア形成に関しては、生理学的な内容が

中心で、生化学的に解析している研究は少ない。これは、植物生化学者自体が少なく、また植物でのミトコンドリア形成は酵母などに比べるとかなり緩慢で現象が観察しにくいためと思われる。持続的に研究を行っているのは、当研究室とエジンバラ大学（スコットランド）の Leaver らのグループである。前者はサツマイモ塊根と種子を、後者はキクイモ塊茎を材料としている。

高等植物におけるミトコンドリア形成の生化学的研究

ここで、当研究室のこれまでの成果を簡単にふり返える。Asahi らは、サツマイモ塊根組織を用いて、切断等の傷害による呼吸増加現象の生理学的・生化学的機構の解明を研究課題としてきた。その過程でミトコンドリアの数量の変化に気付き、ミトコンドリアを Janus green B で染色し、ミトコンドリア顆粒の数が、組織切断後 2 日間で、細胞分裂を伴わず

に約2倍に増加することを見い出した。⁽⁴⁾ また、サツマイモ塊根の病害組織でもミトコンドリアが新生し、一方、吸水中の種子では内膜が発達し、⁽⁵⁾ 発芽後期の種子ではミトコンドリアの崩壊が生じていることも明らかにした。⁽⁶⁾ これは他の研究者によっても支持された。こうした研究により、高等植物組織での呼吸調節機構の要点が、ミトコンドリア膜の形成・分解にあることを提起した。^(7,8)

その後、傷害組織を用いた実験で、ミトコンドリア膜の形成に注目し次のような成果を得た。

(1) 切断傷害により呼吸活性が増加し、^(9,10) ミトコンドリアの諸酵素活性やRNAが増加する。膜画分のタンパク質とリン脂質も増加し、呼吸活性の増加は、ミトコンドリア膜自体の増加に起因するといえる。

(2) タンパク質合成阻害剤を用いての *in vivo* 実験によれば、ミトコンドリア形成には、細胞質とミトコンドリア自身のタンパク質合成

(9)
系の協同的作動が必要である。

(3) ミトコンドリアの各酵素は同時に誘導されるのではなく、時間的な差がみられ、各々異った調節機構があると考えられる。⁽¹²⁾

(4) 健全および傷害組織の⁽¹¹⁾ミトコンドリア⁽¹³⁾膜画分のタンパク質とリン脂質の組成には大きな差はみられない。

(5) 組織切片にラベルしたアミノ酸を与え、ミトコンドリアタンパク質への取込み速度を比較すると、傷害組織切片では健全組織のものに比ベ十数倍速く、ミトコンドリア形成のためのタンパク質合成は著しく活発化して⁽¹⁴⁾いる。

(6) 切断傷害にともなうて新たに合成されたミトコンドリア膜は、タンパク質当りのリン脂質含量が少ない。そのため傷害組織のミトコンドリアの膜タンパク質は、⁽¹¹⁾界面活性剤で可溶化されにくい。

(7) 傷害後、組織重あたりの呼吸活性が増加するが、特にシアン耐性呼吸の割合が増す。

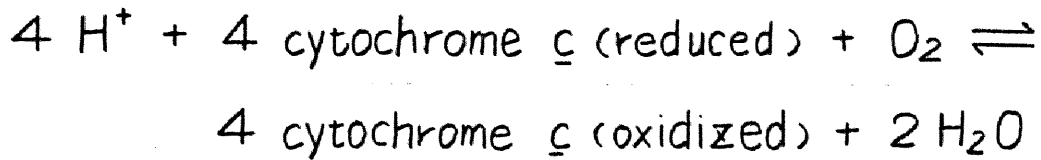
これは、(5)で述べたように傷害組織でのミトコンドリア新生においてリン脂質の供給が不十分なため、膜構造およびタンパク質間の相互作用に変化が生じ、そのためにシアン耐性⁽¹¹⁾呼吸鎖が作動しやすくなるものと予想される。

以上のように、傷害組織を利用してミトコンドリア形成の全体像と特徴が明らかにされてきた。しかし、膜形成機構の詳細を議論するまでには至らず、個々のタンパク質について検討する必要が生じていた。

研究課題とその意義

本研究では、ミトコンドリアに局在するひとつの酵素に着目し、その生合成機構の解明を通じて高等植物でのミトコンドリア形成について考察することを目的とした。その対象として *cytochrome c oxidase* を選んだ。*cytochrome c oxidase* は、ミトコンドリア内膜に局在する電子伝達系末端酵素で、*cytochrome c* から受け取った電子を直接分子状酸素に渡す。反応式

は次のようである。



生物の要求する酸素の90%以上がこの反応で消費される事実は、cytochrome *c* oxidase の重要性を示している。

チトクロムは、1925年、ハエ胸筋の吸収スペクトルを観察していた Keilin によって、⁽¹⁵⁾「呼吸色素チトクロム」として発見された。その後の長い論争の末、これが Warburg の提唱していた呼吸酵素と同一であることが認められ、1940年代に入ってはじめて cytochrome oxidase と呼ばれるようになった。⁽¹⁶⁾ その頃は細胞呼吸の機構が問題となっており、Keilin も Warburg も先駆的役割を演じていた。その後1960年代のはじめには、量的に豊富なウシ心筋を材料として、^(17,18) cytochrome *c* oxidase は単離・精製された。しかし、その時点では反応機構の分光学的実験が中心で、構造についてはアミノ酸組成や沈降係数に関する情報しか得られていた。

かった。やがて、⁽¹⁹⁾ SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動法が開発され、また、膜酵素の取扱い法も進んだ。⁽²⁰⁾ 1973年になると、⁽²¹⁾ Schatz らのグループと Tzagoloff らのグループが、ほぼ同時に、酵母 (Saccharomyces cerevisiae) の cytochrome c oxidase を精製し、サブユニット構成と各サブユニットの生合成部位を報告した。これが、cytochrome c oxidase 研究の新たな発展の切っ掛けとなった。酵母の場合は、分子量の異なる7種のサブユニットから成り、分子量の大きな3種のサブユニットはミトコンドリアで合成され、他の4種は細胞質のタンパク質合成系によりつくられる。これはその後の実験に⁽²²⁾ よっても支持された。研究が進むほど、本酵素の研究課題は増すばかりで、電子伝達のメカニズム、各サブユニットの役割および詳細な合成・輸送機構、酵素形成における補欠分子族の役割等について、現在、多くの生化学者と分子生物学者が研究を進めている。

こうした中で、高等植物の cytochrome c

oxidase については殆んど報告がなかった。が、当研究室では、次のような興味ある現象を見い出していた。^(a) Majima らおよび Seto らの実験によれば、サツマイモ塊根の組織切片の cytochrome c oxidase 活性は、切断後 1 日で約 2 倍に増加する。そして、この活性増加はミトコンドリアのタンパク質合成阻害剤である chloramphenicol により抑制されるが、細胞質でのタンパク質合成を阻害しても無処理のものと同様に増加する (図 1-1)。つまり、切断後の cytochrome c oxidase 活性の増加にはミトコンドリアでのタンパク質合成が必要であるが、細胞質でのタンパク質合成は必ずしも必須ではないことが示された。一方、酵母やカビなどでは、どちらのタンパク質合成を阻害しても cytochrome c oxidase⁽²³⁾ は形成されず、活性も上昇しない。したがって、サツマイモ塊根組織でのこのユニークな現象を解明することにより、生合成機構に関して、他の生物材料では得られない知見を掴むことができるであろうとい

う期待があった。これが cytochrome ϵ oxidase の生合成機構を研究する動機となった。

傷害組織での cytochrome ϵ oxidase の活性増加を説明する考え方はいくつか出ることができる。

(1) cytochrome ϵ oxidase の全サブユニットがミトコンドリアで合成され、細胞質のタンパク質合成系は関与しない。

(2) 組織切断後、ミトコンドリアで合成される活性化因子（タンパク質）が不活性型として存在する cytochrome ϵ oxidase を活性化する。

(3) cytochrome ϵ oxidase の形成には両合成系が関与するが、健全組織の細胞内には、細胞質由来のサブユニットが前駆体またはフォルとして一定量存在する。そして、ミトコンドリア由来のサブユニットは、傷害刺激を受けた後、新たに合成され、細胞質由来の既存のサブユニットと会合して活性をもつ酵素となる。

酵母等に関する研究結果も考慮し、(1)、(2)よりも(3)の考え方に妥当性があると判断し、(3)の考え方を作業仮説として実験計画を立て

た。まず、cytochrome c oxidase のサブユニット構成の解析と抗体を調製する目的で本酵素を精製し、次に、得られた抗体を用いて生合成機構の解析を試みた。

第2章では、本酵素の精製と性質について述べる。cytochrome c oxidase は酵母、カビ、哺乳類、両生類、昆虫、そして細菌から単離・精製されているが、高等植物から精製したのは本研究が初めてである。生合成機構を解析する上で、サブユニット構成を知ることが最も重要なので、その数と分子量を検討した。そのほか吸収スペクトル、リン脂質との関係や温度の影響についても検討したので併せ述べる。次に、cytochrome c oxidase に対する抗体やタンパク質合成阻害剤、またはタンパク質合成能をもつ単離ミトコンドリアを用いて、本来の目的である本酵素の生合成機構の解明を、in vivo または in vitro において試みた。この点を第3章で述べる。

最後に、本研究は膜酵素の性質や生合成機

構といった生化学一般に関する意味だけではなく、植物組織の傷害に対する対応現象を分子レベルで捉えるという意義もあると考えている。植物組織の一部を切断し、傷害を与えてもその個体は生命を保ち続ける。傷害組織にみられる現象は、傷害という異常状態に対する組織の対応ではあるけれども、こうした適応力や防御力が無くては生き延びることができない。傷害反応は植物組織の生命活動が最も顕著に表われる場面であり、その機構を分子レベルで理解することは大きな価値がある。

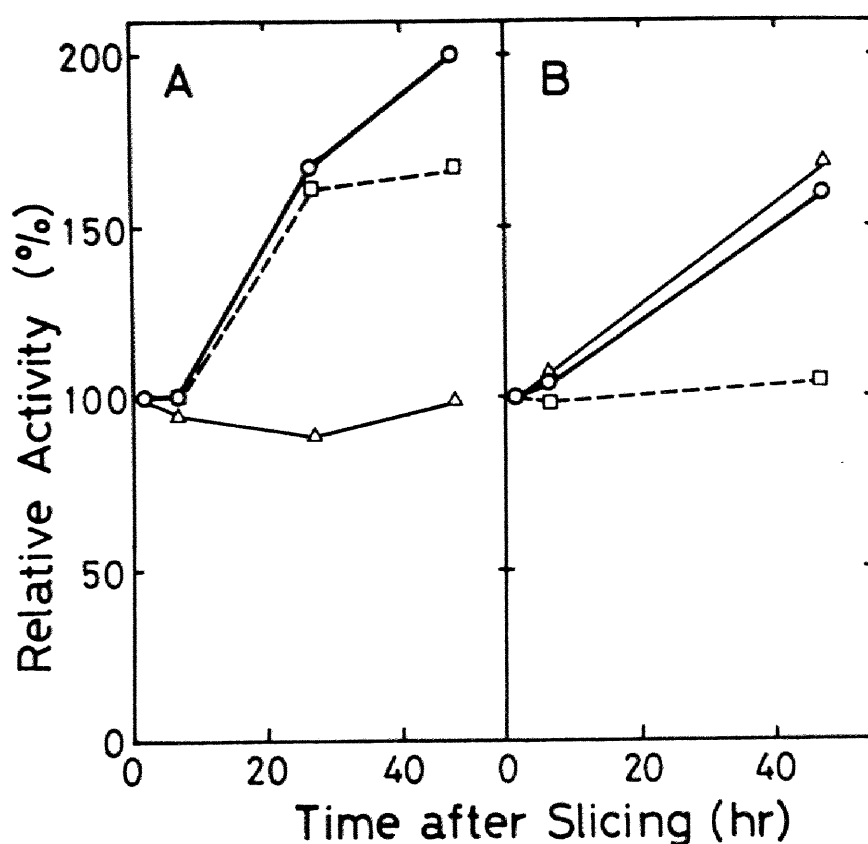


Fig. 1-1. Effects of cycloheximide and chloramphenicol on increases in cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase activities during aging of slices. About 40 slices were incubated for 1 h in 500 ml of 1 mM phosphate buffer, pH 6.5, containing cycloheximide (10^{-5} M) or chloramphenicol (6×10^{-3} M) at room temperature with continuous stirring. Control was run with the buffer containing no antibiotics. Crude mitochondrial fractions were assayed for cytochrome c oxidase (A) and succinate dehydrogenase (B) activities. (O) Control, (□) cycloheximide, (Δ) chloramphenicol.

第 2 章

サツマイモ cytochrome c oxidase の精製とその性質

Cytochrome c oxidase は、現在最も多くの研究者を引き付け、最も活発に研究が進められている酵素である。そして、その発見以来、常に論議を呼び起し続けている酵素でもある。呼吸を行う全ての真核生物のミトコンドリア内膜に存在し、細菌の細胞質膜にも同様の酵素が存在する。cytochrome c oxidase に関心をいだく研究者は生化学者だけでなく、進化学、生物物理学、分子生物学領域の研究者も含まれる。そして研究の目的も多様である。大きくは次の4つに分けることができる。

(1) 電子伝達系のひとつの構成因子としての cytochrome c oxidase と、構造と機能について

明らかにすること。具体的な課題としては、サブユニット構成と各サブユニットの役割、cytochrome c から酸素分子に電子が渡される際の cytochrome c oxidase 内部における電子伝達の機構の解明などである。また最近では、電子伝達と酸化^(38, 39)的リン酸化の詳細な機構が議論の的となっており、cytochrome c oxidase については、これが H^+ -ポンプ⁽⁴⁰⁻⁴³⁾としても作動しているか否かが論争中である。

(2) 複雑な膜酵素やミトコンドリア内膜の形成機構を解明する目的で、cytochrome c oxidase の生合成と形成の機構を解明する。本酵素の各サブユニットが核とミトコンドリア DNA のいずれに支配されているのか、また、その詳細な合成部位とそこからミトコンドリア内膜への移動経路、そして膜上での正確な酵素分子の形成の機序が問題点である。最近では酵母などを用いてミトコンドリア DNA の⁽⁴⁴⁾遺伝子地図の作製も進められている。一方では、ミトコンドリアと核の遺伝情報発現にお

ける相互調節の機構や、各サブユニットの合成の誘導機構に関心を寄せる研究者も多い。^(23, 45)

(3) 膜酵素の典型としての cytochrome c oxidase の物理化学的性質を検討すること。例えば、ヘテロなサブユニットから成る膜酵素の膜中での立体配置、リン脂質が酵素に及ぼす影響などが研究対象となる。ゲル泳動や電気泳動における本酵素の挙動についても検討されている。

(4) 基本的な酵素として広く生物界に存在することから、比較生化学や進化生化学の対象として研究する。いくつかの cytochrome c oxidase の、種々の生物の cytochrome c に対する反応性を検討することにより、進化の道すじを探ることなどはこの例である。^(34, 46)

このように様々な目的のために、多種類の生物から cytochrome c oxidase が単離・精製され多くのことが検討されている。本酵素の各側面について、それぞれ数編の総説が書かれている。最近書かれたものについて述べれば、

精製法や分析方法については(47~49)、電子伝達も含めた構造と機能に関しては(49~57)、また生合成機構や遺伝子関係については(58,60)などが挙げられる。このほかシンポジウムの論文集として(22,44,61~63)などもある。

本研究では、以上の課題全てについて検討することは不可能であるので、(2)に示される内容を研究の中心として、(1)および(3)、(4)に関連する事柄はでき得る範囲内で考察することとした。高等植物の cytochrome ϵ oxidase に関する研究が少ないことを考慮し、その特徴についても注意した。本章においては、サツマイモ cytochrome ϵ oxidase の精製法と、上に述べた(1)、(3)、(4)に関する諸性質について述べる。

材料および実験方法

植物材料および試薬. 使用したサツマイモ (*Ipomoea batatas* cv. Kokei No14) 塊根は名古屋大学附属農場または愛知県刈谷農場で収穫したもので、使用するまで 14 ~ 15 °C の貯蔵室に保存した。サツマイモ塊根から表皮および皮層を取り除いた残りの柔組織と健全組織として用いた。ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L. cv. Rishiri) 塊茎は収穫後 4 °C にて貯蔵し、使用 1 日前に 18 °C でインキュベートしたものをを用いた。

DOC と cholic acid は 50 % ethanol に溶解した後再結晶化し、これを NaOH で中和して用いた。Cytochrome c (ウマ心筋、タイプ III) と catalase は Boehringer Mannheim 社より購入し、BSA (フラクション V) は Reheis Chemical 社より購入した。また、phosphatidylcholine (PC、卵黄、タイプ III; 大豆、タイプ III) は Sigma Chemical 社、L-3-phosphatidylcholine dipalmitoyl と L-3-phospha-

tidylcholine dimyristoyl はフナコシ社のものを使用した。他の試薬は必要に応じて特級または一級のものを用いた。

ミトコンドリア膜画分の調製。ミトコンドリアの精製法は Nakamura & Asahi の方法に従い、組織磨砕液から分画遠心により粗ミトコンドリアを調製し、不連続 (40%, 60% (%)) ショ糖密度勾配遠心により精製した。磨砕液は 0.5 M sucrose、10 mM EDTA、1% isoascorbate、50 mM Tris-HCl、pH 7.2 から成り、洗浄液は 0.5 M sucrose と 50 mM Tris-HCl、pH 7.2 を含む。ジャガイモ塊茎からミトコンドリアを調製する場合も同様の方法で行った。

精製ミトコンドリアを 0.1 M KCl に懸濁し、0℃で30秒間ずつ2回超音波処理をした後、80,000 g で1時間遠心した。遠心後の上清にはミトコンドリアのタンパク質の約30%が含まれていた。沈殿をミトコンドリア膜画分とし、最終タンパク質濃度が 3 mg/ml となるように 0.25 M sucrose を含む pH 7.5 の 50 mM Tris-acetate

buffer (以後断りのない限り pH 7.5、50 mM とする) に懸濁した。

Cytochrome c oxidase の精製法。以下の全ての操作は $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ で行った。

ステップ 1 — DOC による可溶化：ミトコンドリア膜画分の懸濁液に、KCl と 5% DOC を、各々最終濃度 1 M および $0.35 \text{ mg/mg protein}$ となるように加え、 $80,000 \text{ g}$ で 1 時間遠心した。得られた沈殿を Tris-acetate buffer に懸濁し、元のミトコンドリア膜懸濁液の半分の容積にした。この懸濁液に、KCl と DOC を各々最終濃度が 0.1 M および 0.76% となるように加えた。これを 30 分間ゆるやかに攪拌した後、 $80,000 \text{ g}$ で 1 時間遠心し、得られた上清を等量の、0.1% (w/v) Triton X-100 を含む Tris-acetate buffer と混合した。

ステップ 2 — 第 1 回 DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー：ステップ 1 で得られた溶液を、前もって 0.1% Triton X-100 を含む Tris-acetate

buffer で平衡化しておいた DEAE-cellulose (DE-52, Whatman 社) のカラム ($1.5 \times 5 \text{ cm}$) にのせた。このカラムを 0.1% Triton X-100 と 0.1 M KCl を含む Tris-acetate buffer で洗い、その後 0.1% Triton X-100 と 0.3 M KCl を含む緩衝液で cytochrome c oxidase を溶出した。

ステップ 3—第 2 回 DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー：ステップ 2 で得られた黄緑色の分画を、その 4 倍量の 0.1% Triton X-100 を含む Tris-acetate buffer で希釈した後、前もって 0.1% Triton X-100 を含む緩衝液で平衡化しておいた DEAE-cellulose のカラム ($1.5 \times 4 \text{ cm}$) にのせた。まず、0.12 M KCl と 0.1% Triton X-100 を含む緩衝液でカラムを洗い、次に 0.4 M KCl と 0.1% Triton X-100 を含む緩衝液で cytochrome c oxidase を溶出した。

ステップ 4—硫酸分画：ステップ 3 で得られた溶液に飽和硫酸溶液と 20% cholate を、各々最終濃度が、30% 飽和、2% となるように加えた。80,000 g で 10 分間遠心した後、上清に

飽和硫酸溶液と 10 % Triton X-100 を、各々最終濃度が 43 % 飽和、0.1 % となるように加えた。混合液を swing rotor (日立 RPS-50) で 80,000 g で 10 分間遠心し、得られた沈殿と上端の薄い緑色の層を 0.1 % Triton X-100 を含む Tris-acetate buffer に懸濁した。

ステップ 5—ショ糖密度勾配遠心：必要な場合、ステップ 4 で得られた標品を、ショ糖密度勾配遠心によりさらに精製した。ステップ 4 で得られた溶液を 5 ~ 20 % (w/v) ショ糖密度勾配 (総容積 10 ml で、ショ糖溶液は 0.1 M KCl、0.1 % Triton X-100 と Tris-acetate buffer を含む) の上端にのせた。その後、Hitachi RPS-40 T rotor により 30,000 rpm (110,000 g) で 12 時間遠心し、緑色部分を集め、 -20°C または -80°C で保存した。

ゲルクロマトグラフィー。酵素標品 (精製段階のステップ 4) を、0.1 % Triton X-100 と 0.1 M KCl を含む pH 7.5 の 10 mM Tris-acetate buffer で前

もって平衡化しておいた Sepharose 6B (Pharmacia Fine Chemical 社) のカラム (1.56×70 cm) にのせ同一の緩衝液によって溶出した。溶出液を 2 ml づつ分取し cytochrome c oxidase 活性とタンパク質含量を測定した。

ショ糖密度勾配遠心。精製度の検討または沈降係数の測定のために、Martin & Ames の方法⁽⁶⁴⁾によるショ糖密度勾配遠心を行った。5 ~ 20% (w/v) のショ糖密度勾配上に適当量の標品をのせ、50,000 rpm ($180,000 g$) で9時間遠心した。沈降係数の指標として catalase (分子量 24 万、11.3 s) を用いた。ショ糖溶液は 0.1% Triton X-100、0.1 M KCl および 10 mM Tris-acetate (pH 7.5) を含む。

リン脂質ミセル懸濁液の調製。Cytochrome c oxidase 活性の測定に用いるためにリン脂質ミセル懸濁液を調製した。リン脂質を 0.2% DOC と 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-acetate buffer

に懸濁して 10 mg/ml とした。 20 kHz で30秒間の超音波処理を2回行、その後、 $10,000 \text{ g}$ で30分間遠心し、得られた上清画分をリン脂質ミセル懸濁液として使用した。

酵素活性の測定。 Cytochrome c oxidaseの活性は、 25°C において、還元型 cytochrome c の 550 nm での吸光度⁽⁶⁵⁾の経時的減少を測定することにより定量した。適当に希釈した酵素標品を、測定前に、 1 ml 当り約 $260 \mu\text{g}$ のリンを含む卵黄の phosphatidylcholineミセル懸濁液と $1:1$ の割合で混合し、その一定量を測定溶液に入れ最終容積 0.3 ml とした。測定溶液は最終濃度 0.33 mg/ml の還元型 cytochrome c 、 0.05% Triton X-100 と $\text{pH} 7.0$ の 15 mM phosphate buffer から成る。用いた還元型 cytochrome c の濃度は 550 nm での吸光度が約 0.5 になる値である。また Triton X-100 と phosphate buffer の濃度および pH は、精製酵素を用いて阻害条件と至適 pH を測定した結果、上記の値が最適と考えて用いたものである。

酵素活性に及ぼす温度の影響を調べる際には、反応液の温度を電子温度調節器 (Sharp Co.) により調節した。1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の還元型 cytochrome c を酸化する酵素量を cytochrome c oxidase の 1 単位として表示した。

catalase の活性は、 240 nm における H_2O_2 の吸光度の減少を測定することにより定量した。

分析定量法. タンパク質は trichloroacetic acid で沈殿させた後、BSA を標準とし、Lowry らの方法⁽⁶⁶⁾で定量した。試料中に Triton X-100 が含まれている場合には濁りが生ずる。これを防ぐために、Dulley & Grieve の方法に従い反応液中に SDS 溶液を加え最終濃度が 0.5% となるようにした。

リン脂質ミセル懸濁液と精製酵素標品中に含まれるリンは Chen らの方法⁽⁶⁸⁾で定量した。

Cytochrome c oxidase の酸化型および還元型の吸収スペクトルは、日立 356 型自記分光光度計によって測定した。ヘム a 含量はミリモ

(69)

ル吸光係数、 $E_{603-630}$ を 16.5 とし、試料の還元型吸収スペクトルの 601 nm と 603 nm での吸光度差から算出した。

Polyacrylamide ゲル電気泳動。0.1% SDS と 8 M urea の存在下での polyacrylamide ⁽⁷⁰⁾ゲル電気泳動を、Swank & Munkres の方法に従って行った。この方法は、分子量 1 万以下のタンパク質の分子量の測定に有効で、⁽¹⁹⁾膜酵素の場合は、Weber & Osborn の方法よりも分離能が高いことが報告されている。ゲル濃度は acrylamide 全量で 10%、acrylamide と bisacrylamide の重量比は 10:1 または 20:1 となるようにした（いずれの場合も分離パターンに変化はないが、比が 10:1 で架橋度が高い場合はゲルが濁り、一方架橋度が低い場合は透明なゲルでタンパク質の移動度が大きい）。試料を 2% SDS、2% 2-mercaptoethanol と 2 M urea を含む溶液中で、37°C で 1 時間、または 70°C で 2 時間インキュベートした後、2 mA/tube で約 15 時間電気泳

動した。泳動後ゲルを Coomassie brilliant blue で染色し、5% methanol-7% acetic acid で脱色した後 Toyo Densitrol により波長 565 nm での吸収パターンを記録した。分子量の示標として catalase (60,000)、ovalbumin (45,000)、alcohol dehydrogenase (41,000)、myoglobin (17,200)、cytochrome c (12,300) および myoglobin の BrCN 分解産物 (14,900、8,270、6,420、2,550) を用いた。

結 果

[Cytochrome ϵ oxidase の可溶化]

Cytochrome ϵ oxidase は、 $0.4 \text{ mg/mg protein}$ 以下の濃度の DOC では可溶化されず、 1 M KCl と 1 mg/mg protein 以上の DOC によって、ほぼ 100% が内膜から可溶化された (図 2-1)。一方、 $0.4 \text{ mg/mg protein}$ 以下の DOC によって可溶化されるタンパク質の量は、ミトコンドリア膜画分の 70% に当たる。Succinate dehydrogenase や cytochrome b_c1 complex はこの 70% の中に含まれ、これらの酵素に比較して cytochrome ϵ oxidase が膜に強く結合し高い疎水性をもっていることが示された。

DOC による可溶化の際には 1 M 程度の KCl が不可欠であった。また、DOC の代りに Triton X-100 を利用することができるが、cholate を用いた場合はたとえ高濃度であっても 30~40% の cytochrome ϵ oxidase が可溶化されるにすぎなかった。

[cytochrome ϵ oxidase の精製]

ミトコンドリア膜画分のタンパク質は、それぞれ可溶化に必要な界面活性剤の濃度が異なるので、本酵素を選択的に可溶化できる。そこで、分別可溶化を精製の第1段階とした。また、酵母等の cytochrome ϵ oxidase は等電点が pH 6 以下であることが知られていたので、DEAE-cellulose によるイオン交換クロマトグラフィーを第2段階として用いた。精製と濃縮を兼た硫酸塩析を第4段階とした。精製過程の典型的な例を表 2-I に示した。比活性から判断して、本酵素はミトコンドリア膜画分から約 45 倍に精製された。回収率は 46 % であった。ステップラのショ糖密度勾配遠心は、混入タンパク質が存在する時にはそれを除くのに有効であるが、かなりの失活を招いた。結果的には、高等植物の cytochrome ϵ oxidase も、動物や酵母等の酵素の場合とほぼ同様の方法で精製できることが明らかになった。

〔精製度〕

精製標品の精製度を検討する目的で、ステップ4の標品について Sepharose 6B カラムクロマトグラフィーを行った（図2-2）。酵素活性とタンパク質の溶出パターンは対称形ではなかったが、各フラクションの比活性はほぼ一定であった。これは用いた標品がかなり均一であったことを示している。この過程でのタンパク質の回収率はほぼ100%であったが、酵素活性は長時間操作による失活のため10～20%しか回収されなかった。

同じ目的でステップ4の標品をショ糖密度勾配遠心にかけてみると、酵素活性は単一のピークを示した。遠心中に活性は70%失活したが、活性のピークはタンパク質のピークと一致した。しかし、実験によっては図2-3Bのように勾配の上部に混入タンパク質が観察されたので、本酵素のヘム α 含量、リン脂質含量およびサブユニット構成を分析する場合には、ショ糖密度勾配遠心をステップ5として精製

段階に加えた。

一般には精製標品の純度検定にディスク電気泳動法を用いるが、本酵素の場合にはゲルまたは電極緩衝液の条件を変えても、結局分離ゲルに入らなかった。これは酵素と Triton X-100 が大きな複合体を形成しているためと思われる。

以上の結果および次に述べるタンパク質あたりのヘムA含量や吸収スペクトル、比活性の値なども考慮して、ステップ5までの精製法によって得られた酵素標品がほぼ均一であると判断した。以下、精製標品を用いて、物理化学的性質やサブユニット構成、酵素活性促進剤・阻害剤、さらに活性と温度の関係について検討したので順に述べる。

〔Cytochrome c oxidase の物理化学的性質〕

ステップ4の酵素標品を、0.1% Triton X-100 を含むショ糖密度勾配遠心により catalase を指標として沈降係数を求めると、 $S_{20,w}$ 値 6.31 が得

られた (図 2-3A)。ショ糖密度勾配遠心による分子量の推定は、膜酵素 (タンパク質とリン脂質または界面活性剤との複合体) の場合は不適当であるとされている。しかし、仮にこの s 値から分子量を算出すると約 10 万⁽²¹⁾ となる。この値は酵母 cytochrome c oxidase の例と似ている。

次に精製標品の吸収スペクトルを測定した (図 2-4)。酸化型の場合は、601 nm に α -吸収帯を、421 nm に γ -吸収帯を示した。一方、還元型では、 α -吸収帯が 601 nm にあり、 γ -吸収帯は 438 nm にみられた。還元型吸収スペクトルの 517 nm 付近にみられる小さな吸収は、おそらく β -吸収帯と思われる。還元型と酸化型の差スペクトルは、443 nm と 601 nm に極大値を示した (図 2-4B)。これらのスペクトルから判断して、精製標品には cytochrome b , c , c_1 は含まれていない。

ステップ 5 の酵素標品のヘム a 含量は、還元型の吸収スペクトルから 12.4 nmol/mg protein

と計算された。一方、ミトコンドリア膜画分のヘム a 含量は約 $0.18 \sim 0.21 \text{ nmol/mg protein}$ であつたので、ヘム a 含量から計算すると、本酵素は約60倍に精製されたことになる。

ステップ5の酵素標品は、タンパク質 1 mg あたり $1.0 \mu\text{g}$ のリンを含んでいた。このリンが全てリン脂質由来のものであるとすれば、リン脂質含量は約 2.5% (w/w) になる。

さらに、Sephacrose 6Bを用いたゲルろ過法により酵素の分子量を測定しようとしたが、指標タンパク質が不規則な溶出をし、信頼し得る標準曲線が得られなかったため不可能となった。これは、溶出緩衝液中に Triton X-100 が含まれているため、各指標タンパク質の Triton X-100 の結合度に差があつたり、Triton X-100 の大きなミセルのためにゲルの分子ふるい効果が充分発揮できないためと考えられる。

[Cytochrome c oxidase のサブユニット構成]

図 2-5A は、精製酵素 (ステップ5; ヘム a

含量 $12.4 \text{ nmol/mg protein}$) を、 0.1% SDS と 8 M urea を含む 10% polyacrylamide ゲルで電気泳動した結果である。鋭い5つのピークが見られ、それぞれの分子量を図2-5Bの標準曲線から推定すると、 $39,000$ (I)、 $33,500$ (II)、 $26,000$ (III)、 $20,000$ (IV)そして $5,700$ (V)であった。ステップ4の精製標品を用いても同様の結果が得られた。この結果から、サツマイモの cytochrome c oxidase は少なくとも5種のサブユニットで構成されていると判断した。これら5種のサブユニットのモル比については検討していないが、図のバンドVはその分子量が小さいにもかかわらず、他のバンドに比較して Coomassie brilliant blue で濃く染色されていることから、このバンドが複数のサブユニットを含んでいる可能性もある。

さらに、泳動後のゲルを Coomassie brilliant blue で染色した後、各バンドの 440 nm での吸光度を比較すると、バンドIII、Vの値が高いことが解かった(図2-6B)。各バンドの 565 nm

での吸光度に対する 440 nm での吸光度の比を表 2-II に示した。バンド III、V は cytochrome c の値に近いのに対し、バンド I、II はタンパク質のみから成る BSA や ovalbumin の値に近かった。また、染色したゲルを太陽光や電燈光に当てると、cytochrome c のバンドと同様に、バンド III と V が蛍光を発しているように観察された。他のバンドが濃紺色であるのに対して、赤紫色であった。Cytochrome c はヘム c とアポタンパク質がチオエーテル結合による共有結合をしているため、SDS を含む溶液中においても両者の結合した状態が保たれている。Cytochrome c oxidase の場合には、ヘム a とアポタンパク質が共有結合しているという報告はないが、SDS と urea を含む溶液中でも特定のポリペプチド₍₇₂₎とヘム a が同一の挙動を示すという報告がある。こうした点から、今回の結果が必ずしも無意味なものではないと考えた。そして、十分な検討を経ていないけれども、この結果はサブユニット III と V にヘム a が結

合している可能性を示していると考えた。

〔酵素活性に及ぼす potassium phosphate、KCl および Triton X-100 の影響〕

精製酵素の活性は、活性測定溶液中の phosphate buffer の濃度を 30 mM 以上にすると、徐々に低下した(図 2-7A)。これがイオン強度による影響であるのかを、KCl を添加することにより検討した(図 2-7B)。例えば、活性を 20% 低下させるのに必要な phosphate または KCl の濃度は、各々 30 mM、10 mM であった。50 mM phosphate buffer のイオン強度は 0.12、10 mM の KCl を含む 15 mM phosphate buffer のそれは 0.07 と計算される。したがって、イオン強度が高くなる程活性は低下するが、特に KCl の方がその影響が強い。KCl 濃度を 0.5 M とした場合、活性測定溶液中に存在する DOC のために溶液は濁り、酵素活性は全くみられなかった。

Cytochrome c oxidase の可溶化や膜標品の活

性測定の際用いる Triton X-100 も、かなりの阻害作用をもつことが明らかになった (図 2-8)。0.3% (w/v) の Triton X-100 によって活性は 50% 低下した。また、高濃度の Triton X-100 であっても活性を完全に阻害するということではなく、そして、この阻害作用は可逆的であった。

〔酵素のリン脂質要求性と pH 依存性〕

精製した cytochrome c oxidase は、pH 7.0 において、リン脂質ミセルの添加によって 3 倍以上に活性化された (図 2-9)。この活性化は、精製酵素が内膜に存在していた時の状態に回復したことを意味している。リン脂質量と活性上昇の関係をみると、phosphatidylcholine (PC) と phosphatidylethanolamine (PE) の間に大きな差は認められなかった。また、リン脂質は Tween 80 によって置き替え得ることもわかった。図 2-10 に見られるように、0.5% の Tween 80 は 70% まで酵素活性を回復させた。Triton X-100 と Tween 80 はいずれも非イオン性界面活

性剤であるが、前者は阻害作用をもち、後者は活性を回復させる作用をもつことが明らかになった。

図 2-11 は、充分量のリン脂質が存在する条件下での、cytochrome c oxidase 活性の pH 依存性を検討した結果である。PC が存在する場合は、それが卵黄からのものでも、大豆からのものでも、至適 pH は 7.0 ~ 7.5 の範囲にあったが、PE を添加した場合には pH 6.5 で、最大活性は前者の値より 20 % 高かった。一方、膜画分の酵素活性をリン脂質や Trizon X-100 を含まない条件で測定すると、至適 pH は 7.0 ~ 7.5 で、これに卵黄の PC を添加しても変わらなかった（図は省略）。したがって、サツマイモの cytochrome c oxidase は、動物起原のもの（至適 pH は 6.0）と異なり、本来 pH 7.0 ~ 7.5 の範囲に至適 pH をもっていると考えられる。

〔Cytochrome c oxidase 活性と温度の関係〕

多くの膜酵素は、測定温度に対する活性の

変化を観察した時折れ曲り点がみられる。そこで、サツマイモ cytochrome c oxidase についても、Arrhenius プロットをとることによりこの性質を検討した。ミトコンドリアを試料として測定した結果を図 2-12 に示した。5 ~ 40 °C の範囲において、サツマイモ塊根の健全組織と傷害組織そして葉の 3 種のミトコンドリアについて測定した。両塊根組織のミトコンドリアの場合は 24 ~ 25 °C で折れ曲り点を示した。葉ミトコンドリアでも同様であった。ただし、葉の場合は折れ曲り点の上下各々の活性化エネルギーは、塊根のものよりも低いのが特徴であった。これに対してジャガイモ塊茎の場合は直線的で折れ曲り点はみられず、活性化エネルギーも 12.4 kcal/mol と高い値を示した (図 2-13)。40 °C での活性が直線から下がっているのは失活によるものと思われる。事実、ジャガイモ塊茎ミトコンドリアでは、40 °C で測定する場合、還元型 cytochrome c 添加後直ぐに失活し始めた。サツマイモ塊根ミトコ

ミトコンドリアでは、反応初速度を測定するのに必要な30秒間はほぼ安定であった(図省略)。

そして、アラスカエンドウ (Pisum sativum var. Alaska) の茎のミトコンドリアの場合は、 $5 \sim 23^{\circ}\text{C}$ の範囲で直線的で、活性化エネルギーは 12.4 kcal/mol であった。 23°C 以上では、徐々に活性増加率が低下し曲線を描いた(図略)。これも熱失活によるものと考えられる。また、キャッサバ (Manihot esculenta Crantz) 塊根のミトコンドリアでは、 16°C (Ibusuki 2)、または 22°C (Ibusuki 3) に折れ曲り点があり、ジャガイモ塊茎よりサツマイモ塊根のミトコンドリアに近いプロットを得た(図略)。したがって、同一の膜酵素であっても生物種が異なれば折れ曲りの有無が異なることが示された。

一般に、膜酵素の活性の折れ曲りは膜のリン脂質の流動性によると説明されている。すでに述べたように、サツマイモ cytochrome c oxidase もリン脂質の添加により活性が促進される。

そこで、精製酵素標品に数種のリン脂質を添加し、活性-温度の關係に及ぼすリン脂質の影響をみた。図2-14は、卵黃または大豆のPCを添加した場合で、 17.5°C または 15.3°C にそれぞれ折れ曲り点を示し、兩者の差は大きくなかった。しかし、ミトコンドリアを試料とした場合(図2-12)に比べ、約 8°C 転移温度が低下していた。この理由として、精製標品の場合は精製中に性質が変化したり、膜への組込まれ方に違いがあったりするためと思われる。また、リン脂質ミセル中にはDOCが含まれているので、この影響かも知れない。

次に、リン脂質の影響をより正確に調べるために、転移温度が既知である合成リン脂質を用いて同様の実験を行った(図2-15)。

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC ; 転移温度₍₇₃₎、 $T_c = 23.9^{\circ}\text{C}$) と dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC ; ₍₇₃₎ $T_c = 49.5^{\circ}\text{C}$) を用いた。天然リン脂質と同じく活性を1.5~2倍に促進した。両合成リン脂質の間には 26°C の転移温度の差があ

るにも関わらず、いずれの場合も酵素活性の Arrhenius プロットは 15°C 付近に折れ曲り点を示し、リン脂質を添加しないものと変わらなかった。これらの結果から、リン脂質の転移温度は酵素活性の二相性に対し決定的な役割をもつわけではないことが明らかになった。

Table 2-I. Purification of sweet potato cytochrome c oxidase

Fraction	Total protein	Total activity	Recovery	Specific activity	Purification
	mg	units	%	units/mg protein	-fold
Submitochondrial particles ^a	144	466	100	3.24	1
Deoxycholate extract	11.5	292	62.7	25.4	7.8
First DEAE-cellulose eluate	3.70	337	72.3	91.1	28.1
Second DEAE-cellulose eluate	2.14	289	62.0	135	41.7
(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	1.46	214	45.9	147	45.4

^aThe particles were prepared from 3.2 kg of sweet potato root tissue and stored at approximately -80°C until used.

Table 2-II. Absorbance of polyacrylamide gel stained with Coomassie brilliant blue at 565 nm and 440 nm

Protein band	Absorbance at		A_{440}
	565 nm (A_{565})	440 nm (A_{440})	A_{565}
Cytochrome <u>c</u> oxidase			
Subunit I	0.560	0.022	0.04
Subunit II	0.860	0.036	0.04
Subunit III	0.100	0.016	0.16
Subunit IV	0.204	0.015	0.07
Subunit V	0.400	0.060	0.15
Bovine serum albumin	2.92	0.110	0.04
Ovalbumin	2.00	0.080	0.04
Cytochrome <u>c</u>	2.22	0.356	0.16

Table 2-III. Subunits structure of cytochrome c oxidase from different sources

Origin No.	Gel system	Number of subunits	Molecular weights of subunits (x 10 ⁻³)										Reference	
Sweet potato														This
1	SDS-urea	5	39.0	33.5	26.0	20.0					5.7		study	
Pea														
2	SDS-urea	5	39.0	33.0	28.5		16.2			8.0	-	6.0	76	
Beef heart														
3	SDS-urea	7		35.3	25.2	21.0	16.2	12.2			6.7	3.4	77	
4	SDS-urea	7	44.6		23.5	22.7	16.9			9.4	7.6	4.3	78	
5	SDS-urea	8		37.0	26.0	21.0	18.0	15.5	13.5	10.0		4.5	28	
6	SDS	6	47.5			20.4	14.5	14.5	13.0	11.0			29	
Rat liver														
7	SDS-urea	7		34.0	26.8	23.7	17.0		12.5	9.5		3.6	79	
8	SDS	12	43.0		27.0	25.7	16.2	10.7	9.1	8.1	5.4	4.7	80	
<u>Xenopus laevis</u>														
9	SDS	6	44.0	33.0	23.0		17.0		12.0	9.5			32	
Hammerhead shark														
10	SDS	7		34.0	23.0	20.0	17.5	13.0	10.0		6.0		81	
Dog fish														
11	SDS	7		35.1	23.1	21.3	17.9		11.6	8.75		4.6	81	
<u>Locusta migratoria</u>														
12	SDS	7		38.0	24.0		19.0	14.5	12.5	10.0	8.0		33	

Origin No.	Gel system	Number of subunits	Molecular weights of subunits (x 10 ⁻³)								Reference
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>											
13	SDS	7	40.0	27.3	25.0	13.8	13.0	10.2	9.5		21
14	SDS	7	42.4	34.1	24.7	14.6	14.6	12.3	10.6		29
<u>Neurospora crassa</u>											
15	SDS	7	41.0	28.5	21.0	16.0	14.0	11.5	10.0		24
16	SDS	7		36.0	28.0	20.0	14.0	13.0	11.0	8.0	25
<u>Candida utilis</u>											
17	SDS	6	49.0	32.0	28.0	20.0	13.5		8.0		26
<u>Botryodiplodia theobromae</u>											
18	SDS	7	41.0	28.0	19.0	14.8	12.8	11.5	9.3		82

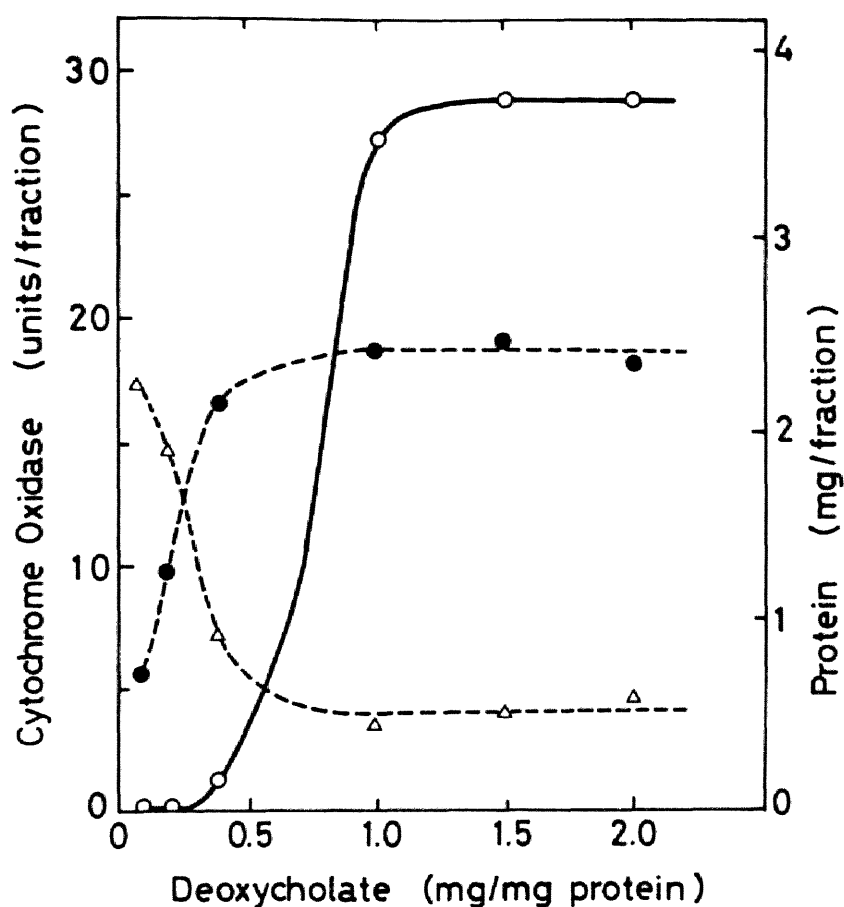


Fig. 2-1. Solubilization of cytochrome c oxidase from submitochondrial particles from sweet potato root tissue with various concentrations of deoxycholate. The submitochondrial particle suspension at a protein concentration of 3 mg/ml was treated with the indicated concentrations of deoxycholate in the presence of 1.0 M KCl. After centrifugation at 80,000g for 1 h, the supernatant and precipitate were assayed for protein content and enzyme activity. (O) Cytochrome c oxidase activity in the supernatant, (●) protein in the supernatant, (Δ) protein in the precipitate.

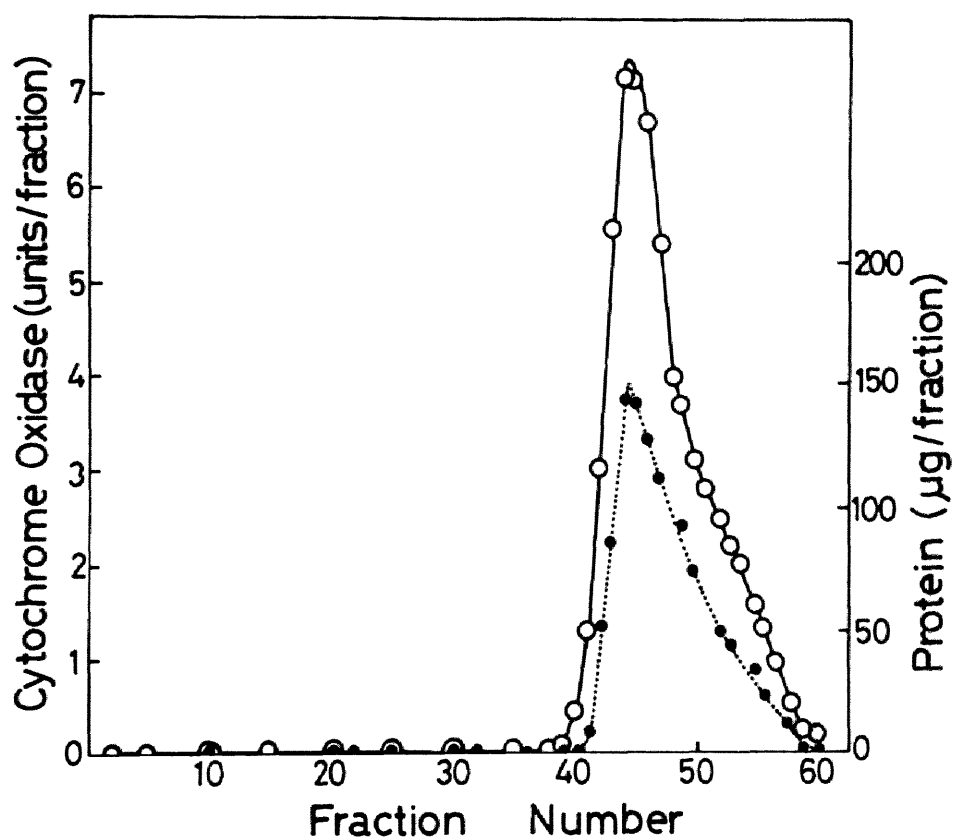


Fig. 2-2. Sepharose 6B column chromatography of a purified enzyme preparation. Enzyme solution (1.5 ml; 0.6 mg of protein/ml) from step 4 was placed on a Sepharose 6B column (1.56 x 70 cm) and then eluted as described under Materials and Methods. Fractions (2 ml) were collected and assayed for cytochrome c oxidase activity (O) and protein content (●).

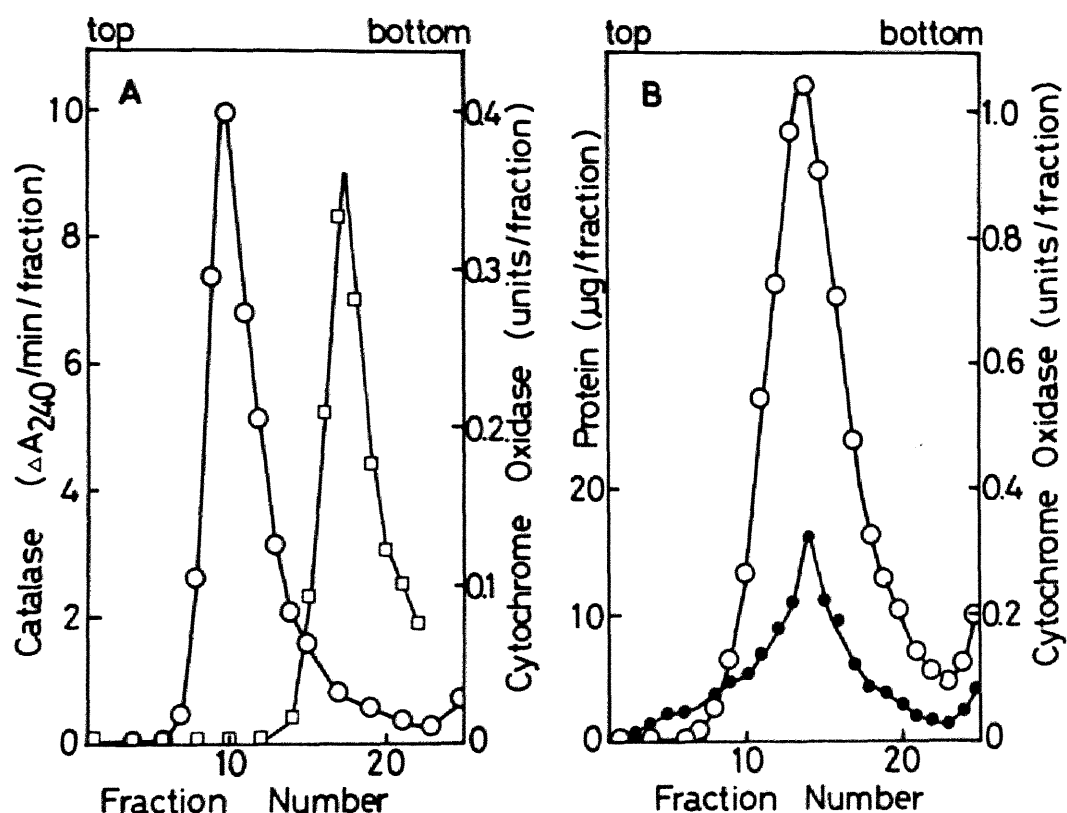


Fig. 2-3. Sucrose density gradient centrifugation of cytochrome c oxidase. (A), A mixture of the enzyme preparation from Step 4 (0.06 mg) and catalase (0.4 mg) in 10 mM Tris-acetate buffer, pH 7.5, containing 0.1% Triton X-100 was applied to a 5-ml linear sucrose density gradient. O: Cytochrome c oxidase activity, \square : catalase activity. (B), The enzyme solution from Step 4 (0.12 mg) was centrifuged as described under Materials and Methods, except that the total volume of the sucrose density gradient was 5 ml. O: Cytochrome c oxidase activity, \bullet : protein content.

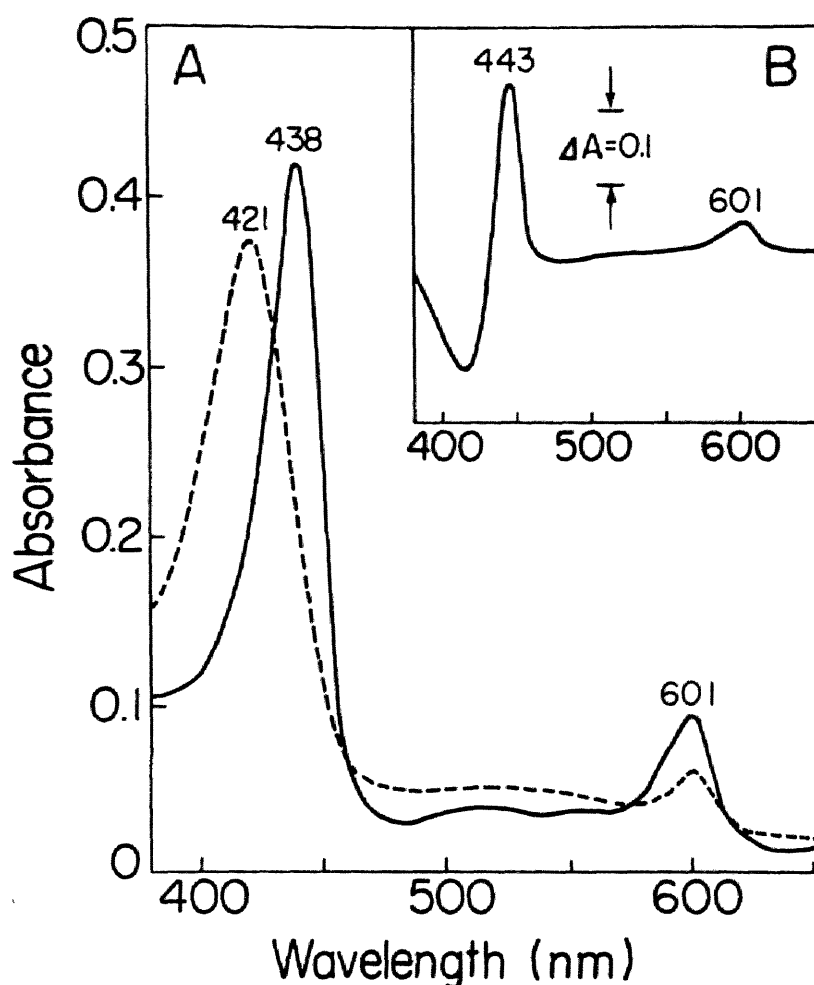


Fig. 2-4. Absorption spectra of sweet potato cytochrome c oxidase. The enzyme solution from Step 5 was diluted to make a concentration of 0.4 mg of protein per ml with 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.5, containing 0.1% Triton X-100 and 0.1 M KCl. (A), Spectra of the air-oxidized (-----) and sodium dithionite-reduced forms (——) of the enzyme. (B), Difference spectrum (dithionite-reduced minus air-oxidized).

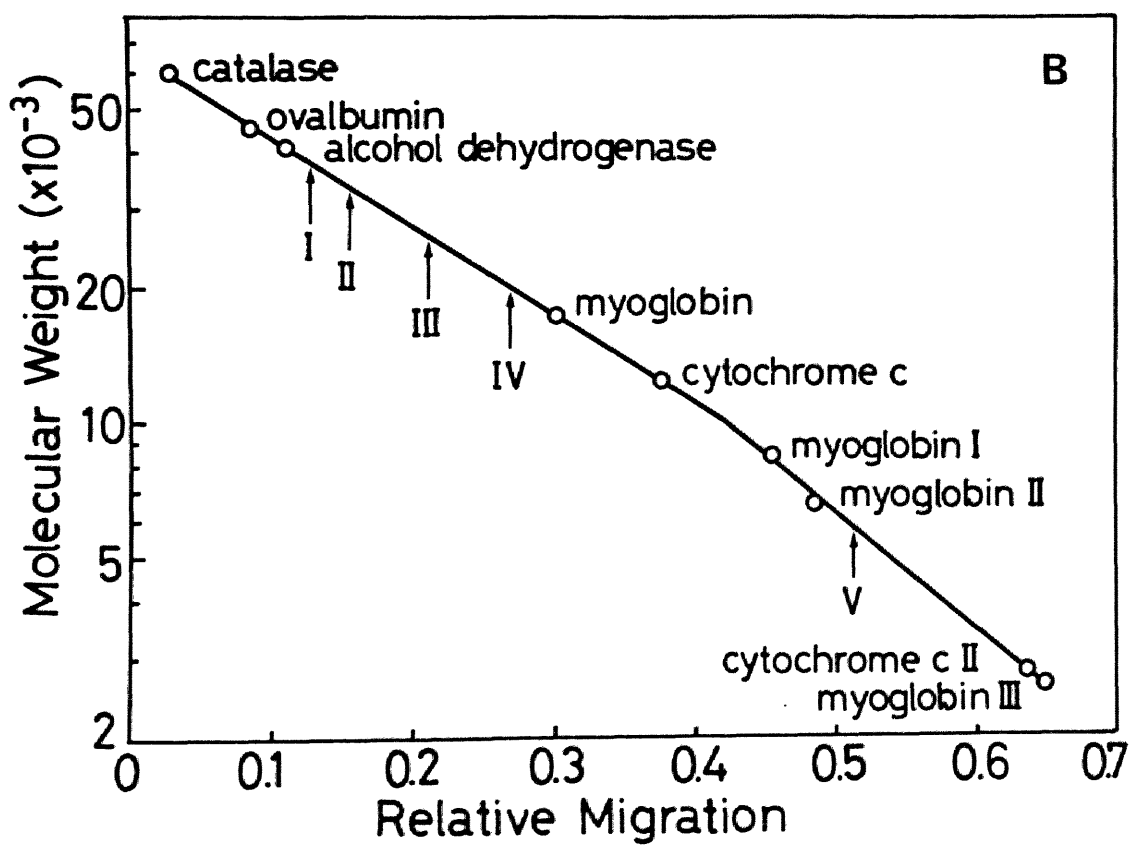
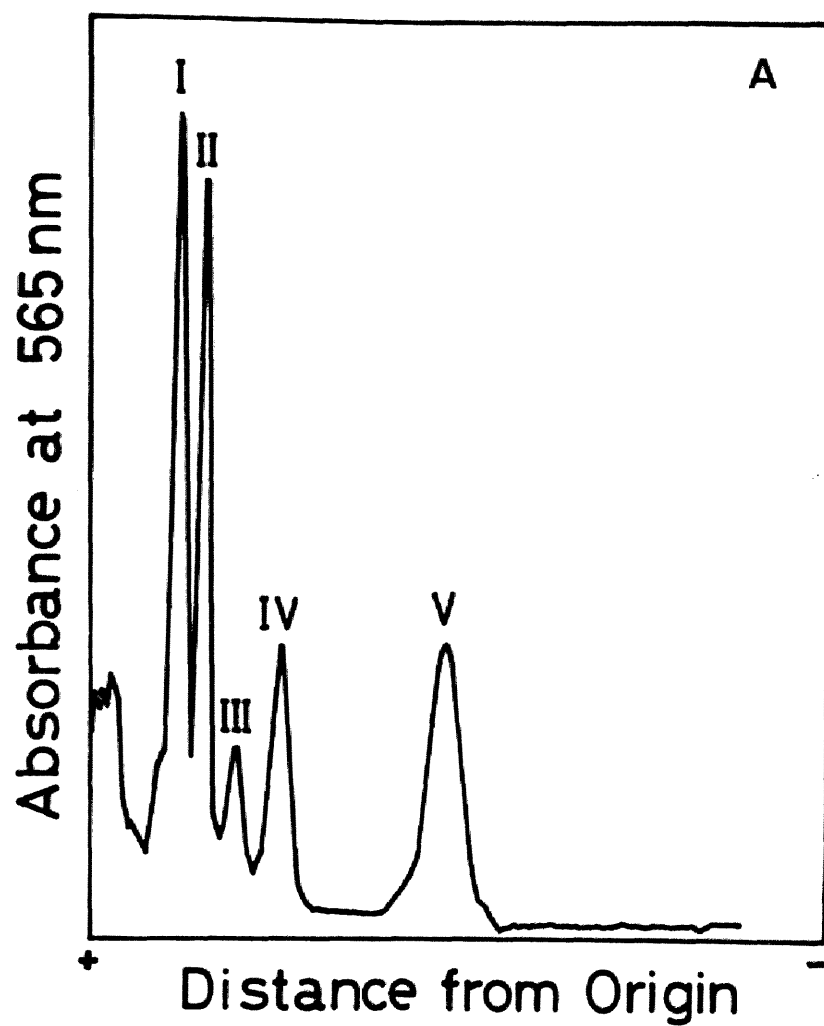


Fig. 2-5. (A) SDS-urea polyacrylamide gel electrophoresis of cytochrome c oxidase subunits. The enzyme solution from Step 5 was treated with the SDS-urea solution as described under Materials and Methods. A 10% acrylamide gel (acrylamide : bisacrylamide = 10 : 1) was used.

(B) Relative electrophoretic mobilities of cytochrome c oxidase subunits and standard proteins. Catalase (60,000), ovalbumin (45,000), alcohol dehydrogenase (41,000), myoglobin (17,200), cytochrome c (12,300), and cyanogen bromide cleavage products of myoglobin (I, 8270; II, 6420; III, 2550) and cytochrome c (II, 2780) were used as molecular weight markers. The apparent molecular weights of the subunits are: I, 39,000; II, 33,500; III, 26,000; IV, 20,000; and V, 5700.

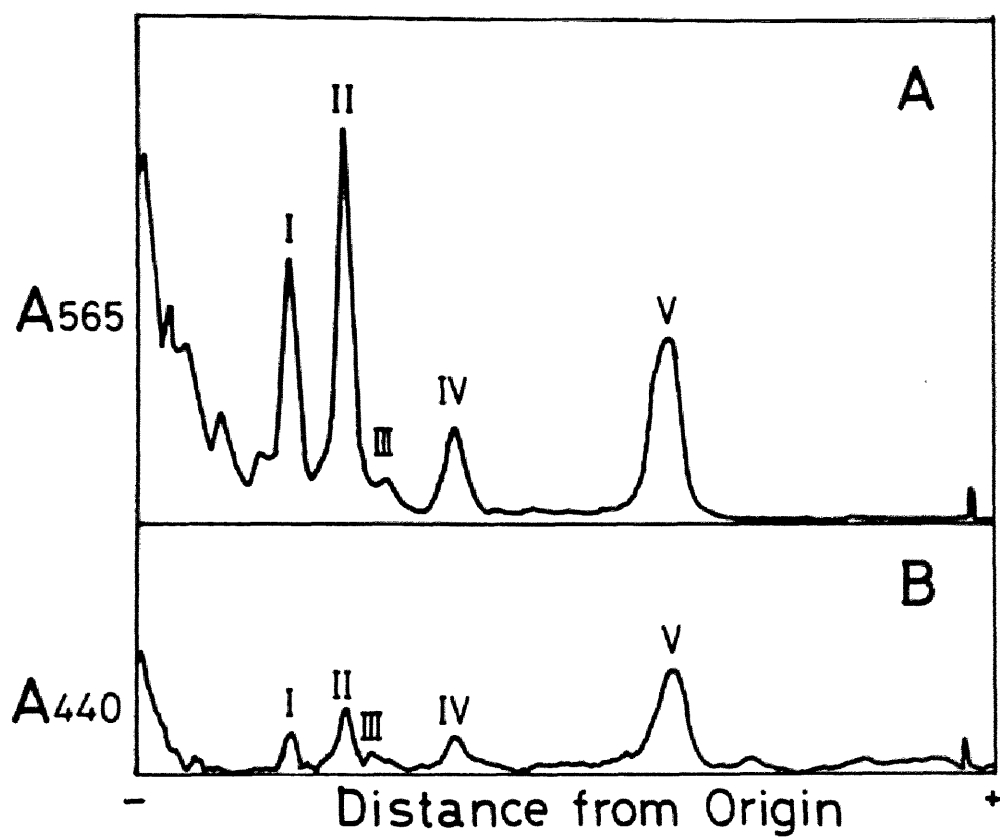


Fig. 2-6. SDS-urea polyacrylamide gel electrophoresis of cytochrome c oxidase subunits. The gel was stained with Coomassie brilliant blue and scanned at 565 nm (A) and 440 nm (B).

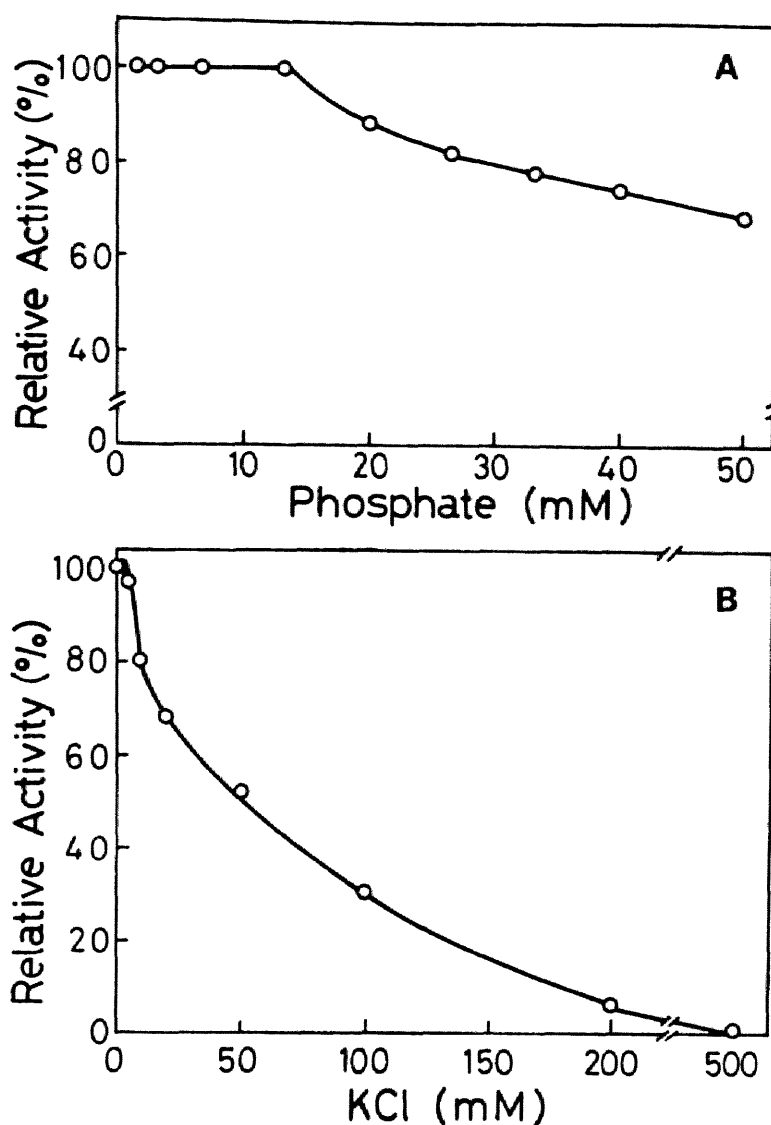


Fig. 2-7. (A) Effect of potassium phosphate on cytochrome c oxidase activity. The enzyme preparation from Step 4 was used. The enzyme activity was assayed at pH 7.5 in the presence of phosphatidylcholine micelles (6.6 μ g P/ assay cuvette) and in the absence of Triton X-100.

(B) Effect of KCl on cytochrome c oxidase activity. The enzyme preparation from Step 4 was used. The enzyme activity was assayed in 15 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing phosphatidylcholine micelles (6.6 μ g P/ assay cuvette) and no Triton X-100.

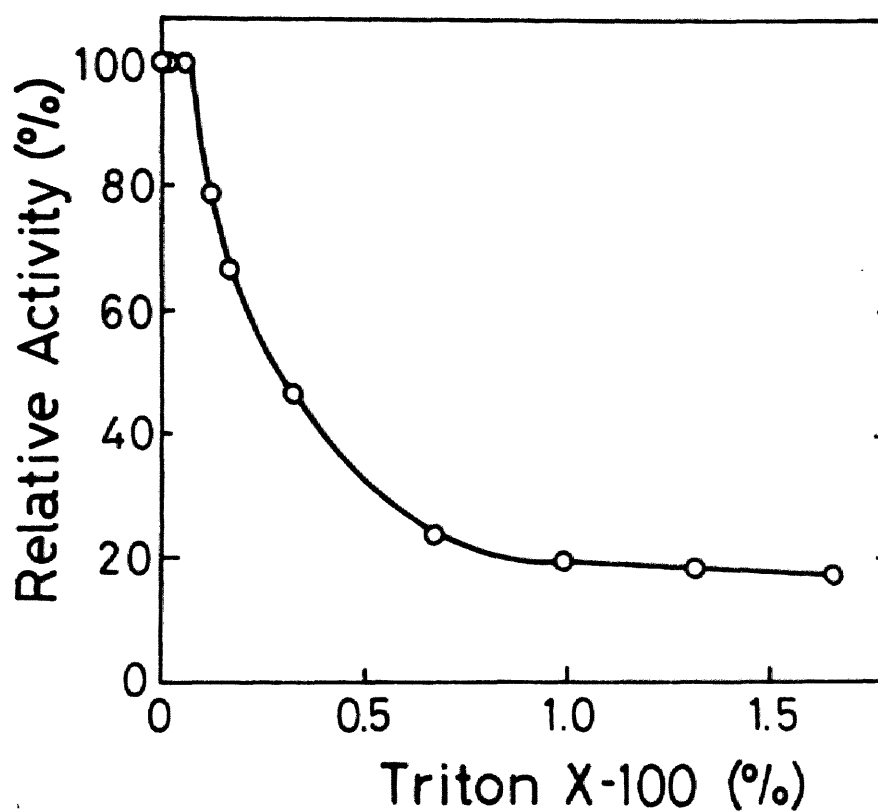


Fig. 2-8. Inhibition of cytochrome c oxidase activity by Triton X-100. The enzyme preparation from Step 4 was used, and the activity was assayed in 15 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing phosphatidylcholine micelles (6.6 μ g P/assay cuvette).

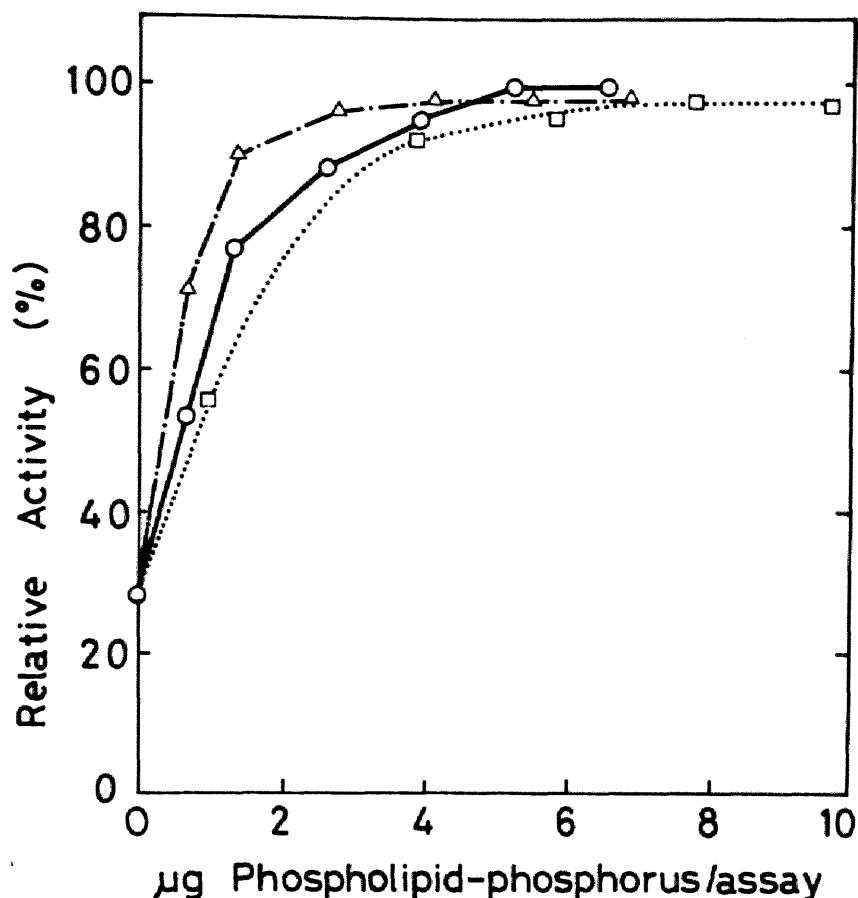


Fig. 2-9. Stimulation of cytochrome c oxidase activity by phospholipids. An aliquot of the enzyme solution from Step 4 was added to the assay medium, pH 7.0, containing the indicated amounts of phospholipid micelles. The activity is expressed as the percentage of the enzyme activity relative to that with egg yolk phosphatidylcholine at a concentration of 6.6 μg P/assay cuvette. O: Egg yolk phosphatidylcholine, □: soybean phosphatidylcholine, Δ: phosphatidylethanolamine.

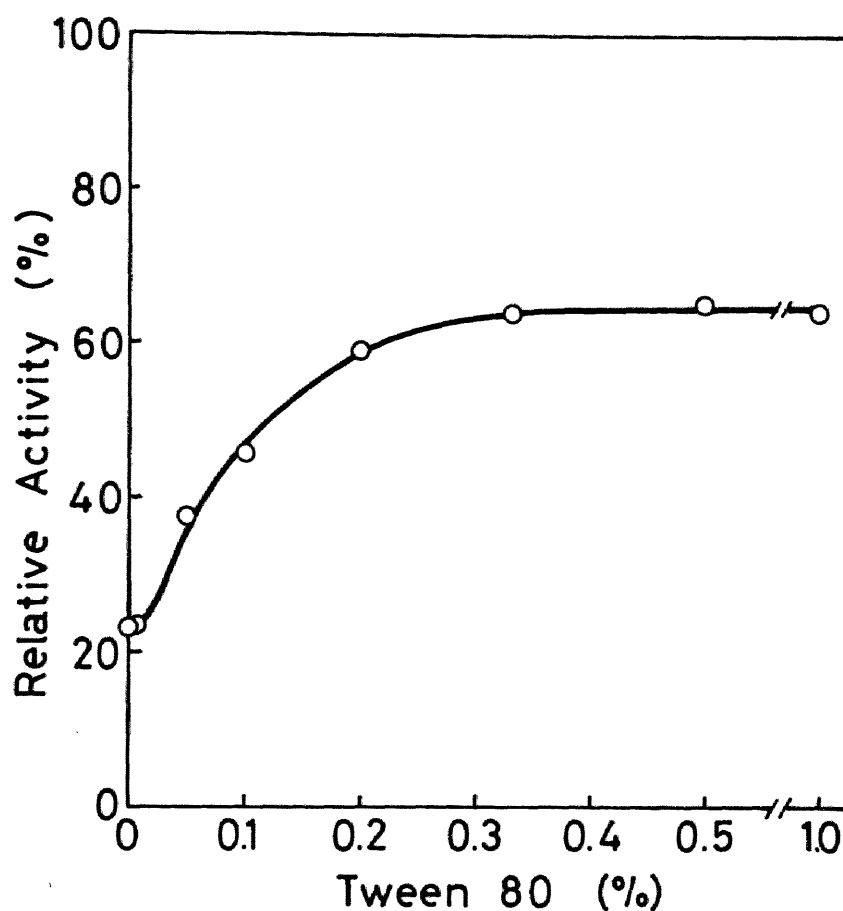


Fig. 2-10. Stimulation of cytochrome c oxidase activity by Tween 80. An aliquot of the enzyme solution from Step 4 was added to the assay medium, pH 7.0, containing 0.05% Triton X-100 and the indicated amounts of Tween 80. The activity is expressed as the percentage of the enzyme activity relative to that with egg yolk phosphatidylcholine.

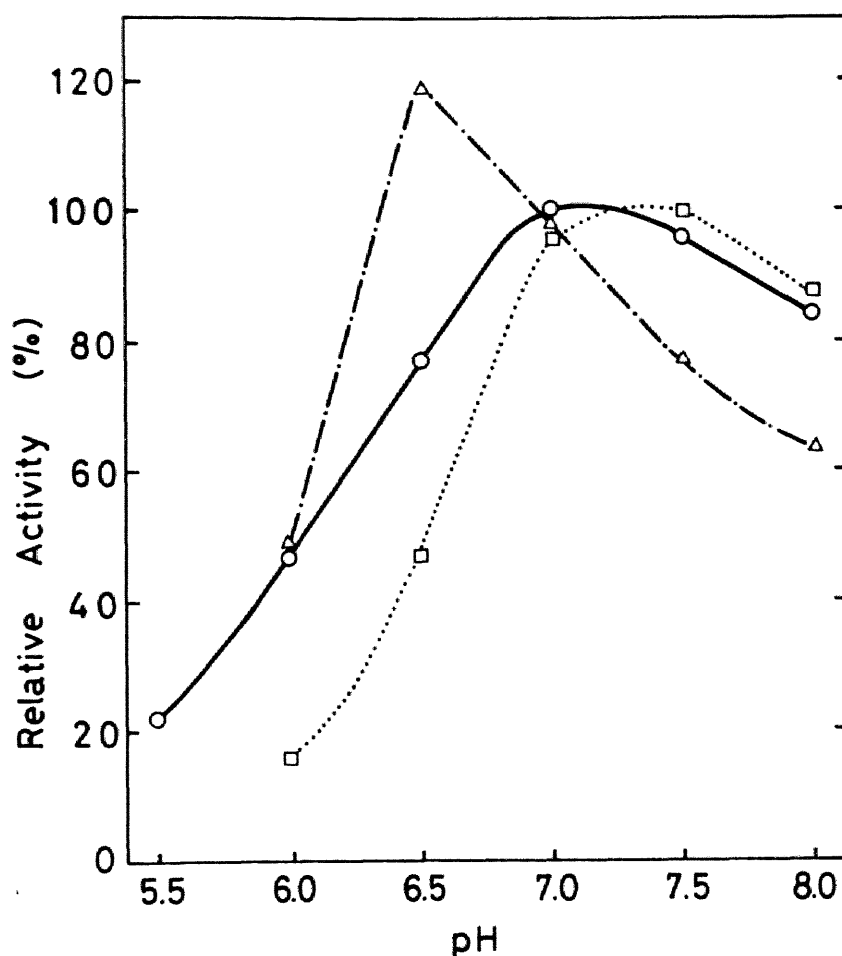


Fig. 2-11. pH dependency of cytochrome c oxidase activity in the presence of different kinds of phospholipids. The enzyme activity was assayed in 15 mM potassium phosphate buffer containing 0.05% Triton X-100 and sufficient amounts of phospholipids. The activity is expressed as the percentage of activity at a given pH relative to that at pH 7.0 with egg yolk phosphatidylcholine. O: Egg yolk phosphatidylcholine (6.6 μ g P/assay cuvette), □: soybean phosphatidylcholine (9.7 μ g P/assay cuvette), Δ: phosphatidylethanolamine (6.9 μ g P/assay cuvette).

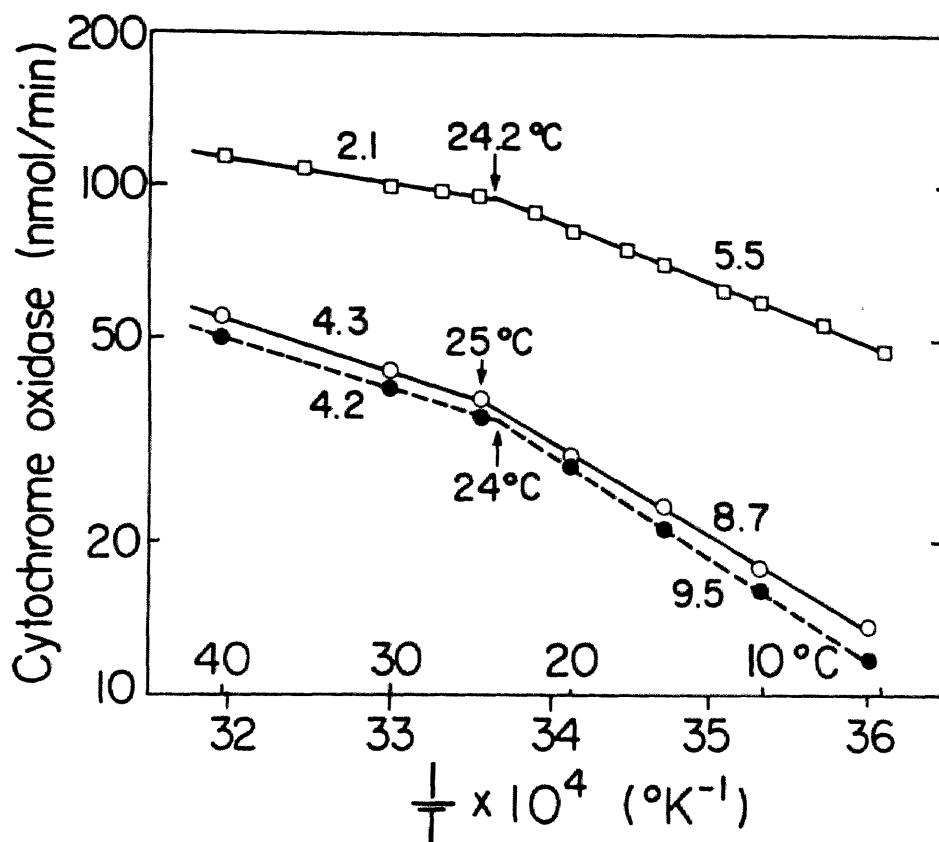


Fig. 2-12. Arrhenius plots of cytochrome c oxidase activity in sweet potato mitochondria. O, the activity in mitochondria from intact root tissue: ●, the activity in mitochondria from root tissue-slices (3 mm in thickness) aged for 2 days at 29°C after slicing (wounded tissue): □, the activity in leaf mitochondria. The arrow indicates the transition temperature and the figure, the activation energy (kcal/mol).

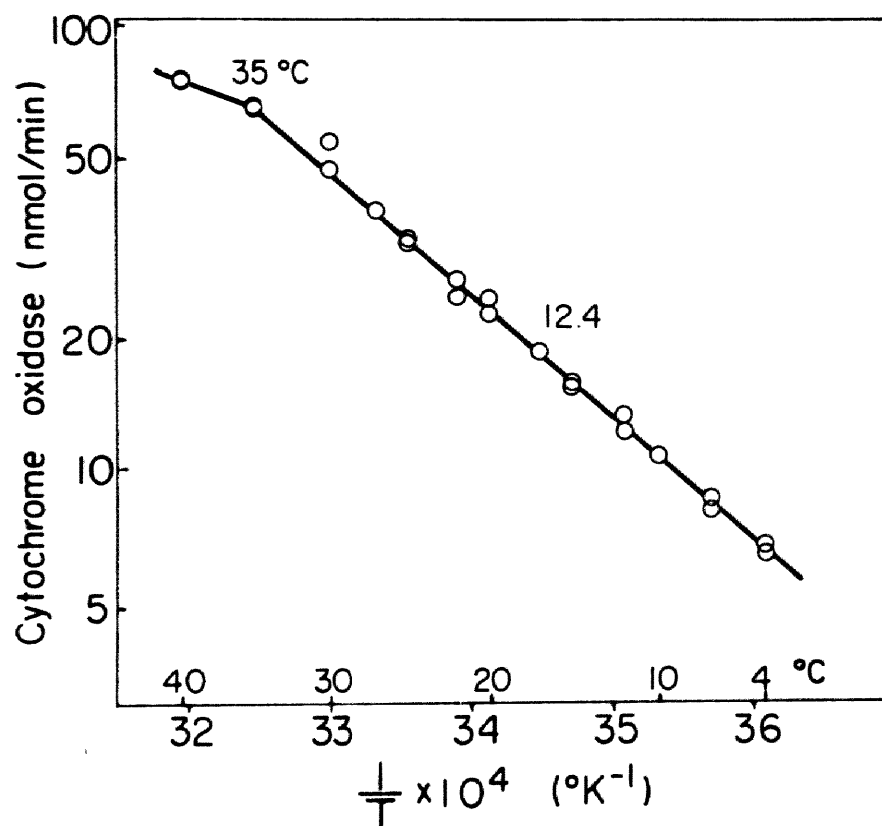


Fig. 2-13. Arrhenius plot of cytochrome c oxidase activity in potato tuber mitochondria.

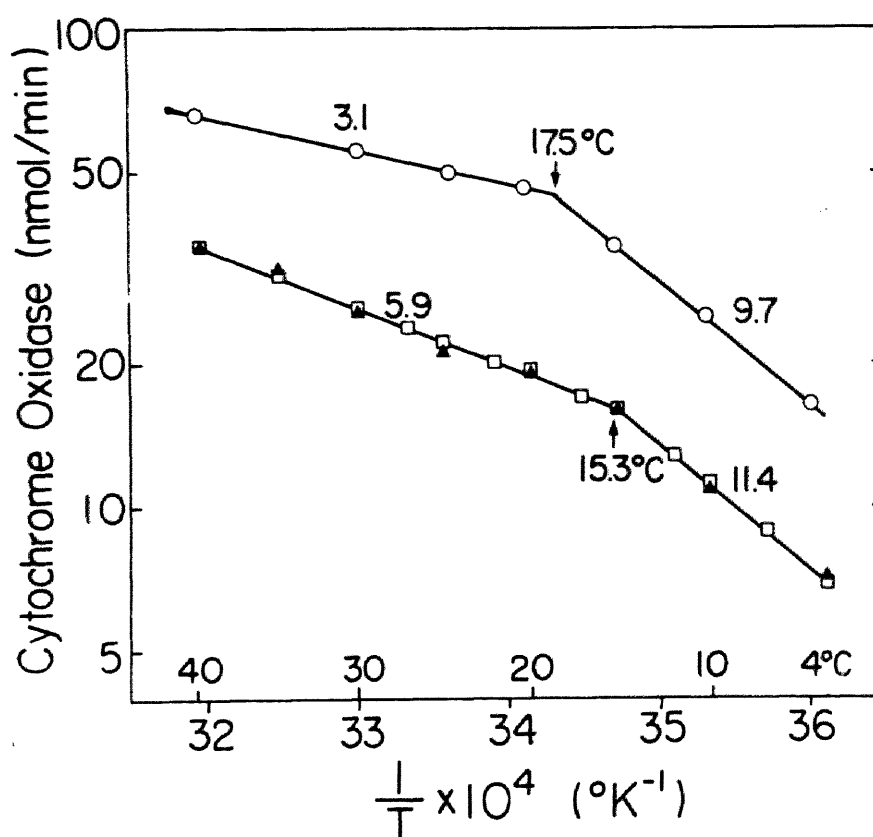


Fig. 2-14. Arrhenius plots of the activity of purified cytochrome c oxidase from sweet potato root tissue. The activity was assayed in the presence of egg yolk phosphatidylcholine (O), soybean phosphatidylcholine (□) or both soybean phosphatidylcholine and bovine serum albumin (▲).

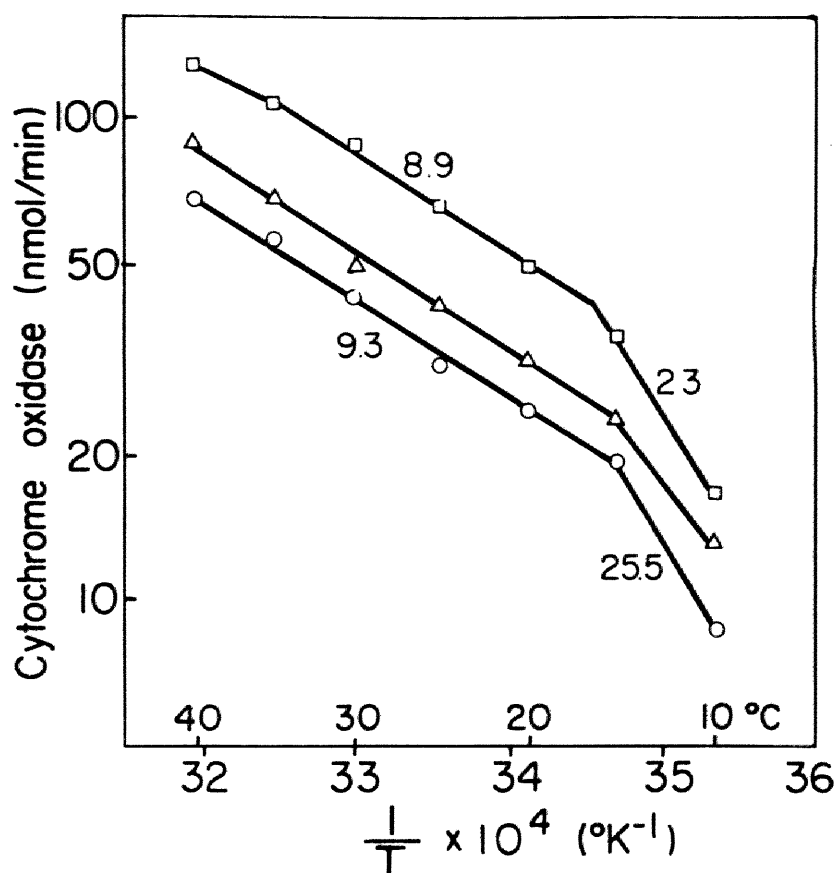


Fig. 2-15. Arrhenius plots of the activity of purified cytochrome c oxidase from sweet potato root tissue. The enzyme activity was assayed in the presence of DPPC (Δ), DMPC (\square) or no exogenous phospholipids (O).

考 察

〔 Cytochrome c oxidase の精製 〕

Cytochrome c oxidase は高等植物にとっても不可欠の酵素である。しかし、ミトコンドリア内膜に強く結合しているため研究しにくい酵素とされていた。これまで高等植物から精製された例はなかった。本研究で初めてサツマイモ塊根組織から本酵素を収率よく均一に精製することができた。精製に用いた方法は動物や酵母の場合に使われた方法であり、特殊な方法は必要としなかった。

硫酸塩析（ステップ4）後の精製標品は、Sephacrose 6B カラムクロマトグラフィーによるタンパク質と活性の分布から判断する限り、ほぼ均一である。しかし、ステップ5のショ糖密度勾配遠心の操作を加えることにより、かなりの失活を伴うけれどもより均一な標品を得ることが出来る。精製標品の吸収スペクトルに他の cytochrome b 、 c_1 、 c などの吸収

帯が見られず、そしてタンパク質当りのヘム a 量 ($12.4 \text{ nmol/mg protein}$) ⁽⁵⁴⁾ が、他の生物種から単一に精製された酵素の値 ($10 \sim 12 \text{ nmol/mg protein}$) と同じであることも得られた標品が単一であることを支持している。

現在、膜酵素、特に本酵素のようにヘテロな複数のポリペプチドから成る酵素の場合、その純度を完璧に示し得る方法は確立されていない。最近、polyacrylamide の濃度勾配をつけたゲルによる電気泳動法が、赤血球膜 ⁽⁷⁴⁾ のタンパク質の分離に有効であるという報告が出されたが、cytochrome c oxidase を試料とした時には、分離ゲルに入るけれどもタンパク質バンドが広がり過ぎ、良好な結果は得られなかった。

[吸収スペクトル]

サツマイモ cytochrome c oxidase の吸収スペクトルは、他の生物のものと似ている。ただし、還元型の r-吸収帯は、他の生物の酵素の

(54)

場合には 443 ~ 445 nm にみられるのに対し、サツマイモ cytochrome ϵ oxidase⁽⁷⁵⁾ では 438 nm にある。Ducet らは、ジャガイモ塊茎から cytochrome ϵ oxidase を部分精製し（ヘム a 含量、サブユニット構成など不明）、吸収スペクトルを測定した。還元型の α -吸収帯は 603 nm で、 r -吸収帯はサツマイモの酵素の値に近く、440 nm⁽⁷⁶⁾ であった。また、Matsuoka & Asahi はアラスカエンドウから精製した cytochrome ϵ oxidase の還元型の r -吸収帯は 439 nm にあることを報告している。したがって、還元型の r -吸収帯が 440 nm 以下であることは、高等植物 cytochrome ϵ oxidase⁽⁷⁵⁾ のひとつの特徴と考えられる。

Ducet らは、さらに還元型の r 、 α -吸収帯の吸光度の比 (r/α) が動物のものが 5.0 ~ 5.1 であるのに対して、ジャガイモの酵素では 4.35 と低い値となっていることを述べている。しかし、サツマイモの精製標品での比の値 (r/α) は 5.06 であり、この値が高等植物の酵素での特徴であるとは言えない。吸収スペクトルは

ヘムa自身の化学構造と、それが補欠分子族としてタンパク質中に取り込まれた時の微細環境によって決まると考えられる。サツマイモ cytochrome c oxidase の場合、ヘムaの化学構造は動物や酵母と同じであり、他方酵素中の微細環境が異なり、ヘムaの2-アルキル鎖（図2-16）の折り畳み方等が若干異なっているために吸収帯が短波長に移行しているものと思われる。

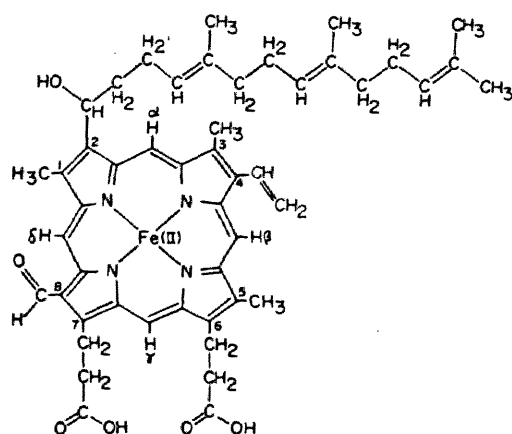


Fig. 2-16. The structure of heme a (54).

[サブユニット構成]

サツマイモの cytochrome c oxidase は、SDS-urea polyacrylamide ゲル電気泳動によって分析すれば、分子量の異なる（39,000～5,700）5種

のサブユニットから構成されている。他の生物種についてみれば、表 2-III (有核細胞の cytochrome c oxidase のみを示した) に見られるように、いずれの酵素も少なくとも 6 種以上⁽⁷⁶⁾のサブユニットを含んでいる。Matsuoka & Asahi が精製したアラスカエンドウの酵素は、サツマイモの酵素と同様に 5 種のサブユニットが確認され、分子量 1 万以上 2 万未満のサブユニットをもたない。この範囲のポリペプチドは、他の生物ではサブユニット III、IV、V または VI として位置づけられているもので、2 個または 3 個含んでいる。

一方、同一生物の同一組織であっても、サブユニットの数や分子量が研究者によって異なることも少なくない。これは酵素の単離法やゲル電気泳動の条件 (ゲルの組成、試料の解離方法) の違いによると考えられる。本酵素のサブユニット構成が混乱している中で、^(71, 77)Capaldi らは、従来行なわれてきた SDS のみを含むゲルではなく、SDS と urea を含むゲルで

分析すると分離能が高くなることを示した。この方法で分析した結果から、サブユニットの中で最も大きなもの (I) と最も小さなもの⁽¹⁹⁾ (VII) の分子量は、Weber & Osborn の方法では大きく見積もられがらになること、そして、II と III、V と VI は両者の方法において泳動順位が逆転することを明らかにした。サツマイモの酵素でも分子量に差がみられた。このことは酵素全体の分子量を算出する上で無視できない。Capaldi らは SDS-urea polyacrylamide ゲル⁽²⁰⁾ 電気泳動法を用いて、それまで 6 種であるとされていたウシ心筋の酵素のサブユニット数が実は 7 種あることを示し、個々のサブユニットの分子量も酵母やカビのものと似ていることを報告した。その結果現在では、少なくともウシ心筋と酵母、カビの cytochrome c oxidase は 7 種のサブユニットで構成されている、という見方が一般的になりつつある。⁽²⁹⁾ しかし、⁽²⁸⁾ ウシ心筋をとっても、強固に 6 種または 8 種のサブユニットから成っていると主

(84)

張する研究者もいる。また、Green らはサブユニットⅢはサブユニットⅠの分解産物の中間体であるとも言っている。

サブユニット数とは、cytochrome c oxidase の機能発現に必要な最小限度のポリペプチドの数である。これまで、還元型 cytochrome c を酸化する能力を cytochrome c oxidase の活性⁽⁴³⁾として測定してきた。しかし、最近 Wikström らが述べているように、本酵素が電子伝達と同時に H^+ -ポンプとしても作動していることが事実ならば、これまでの実験では cytochrome c oxidase の一面しか把⁽²⁹⁾えていなかったことになる。

Phan & Mahler が、酵母の酵素のサブユニットⅠとⅡ、そしてウシ心筋のサブユニットⅠは、cytochrome c の酸化還元には不要であると述べていることもその反映であるかも知れない。ただし、機能が複雑になれば構造も複雑になるとはかりは言えない。例えば、好熱菌 PS3 の cytochrome c oxidase はたった1個のポリペプチドで構成され、しかも電子伝達

(85)

と H^+ 輸送を行なうという報告がある。

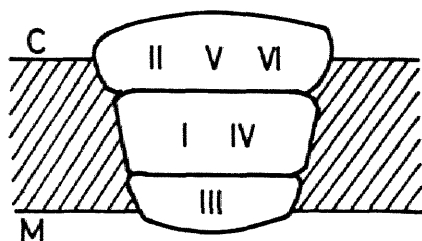
サブユニットのモル比は、等モルずつと考
(86)
えている研究者が多いけれど、必ずしも結論
に達しているとは言えないので、本文ではワ
個またはワつという表現ではなくワ種として
いる。

サブユニット構成については、膜酵素の精
製純度の検定法が確立し、各サブユニットの
配置と役割が明確になった時点でない、解
答が得られない問題である。以下の節で述べ
るように、今その努力が続けられている。現
時点では次のように考えている。各生物種の
cytochrome ϵ oxidase のサブユニットの数は、遺
伝的、進化的制約の中で決められてきたもの
である以上無視することはできない。この意
味で、サツマイモやアラスカエンドウの cyto-
chrome ϵ oxidase が、他の生物と異なり5種の
サブユニットで構成されていることは、これ
が高等植物の cytochrome ϵ oxidase のひとつの
特徴であると言える。

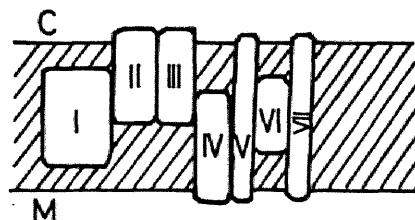
〔 Cytochrome ϵ oxidase サブユニットの立体配置と機能 〕

本酵素の物理化学的性質に興味をもついくつかの研究グループは、各サブユニットの膜中での配置を考察している。図2-17は⁽⁸⁷⁾その模式図である。(a)は1975年 Eytan & Schatz が初めて報告した図である。Schatz らはその後酵母酵素について別のモデルを示し、細胞質側に局在するサブユニット III が cytochrome ϵ の結合部位であると発表した。(b), (c)の図は各サブユニットが細胞質とマトリックスのどちら側に位置しているかを表わしている。⁽⁹¹⁾

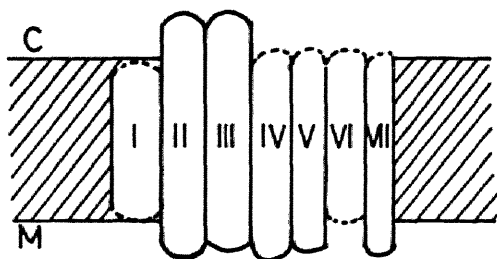
(e)の図を示した Bisson らはサブユニット II が cytochrome ϵ の結合部位であると述べている。(f)は酵素を組み込ませたリポソームをX線により分析した結果を、⁽⁹²⁾酵素分子全体の形状として表わしたものである。これらの共通点の第一は、各サブユニットが細胞質側、マトリックス側または膜の中央に非対称に局在し、分子全体としても複雑な非対称形を成し



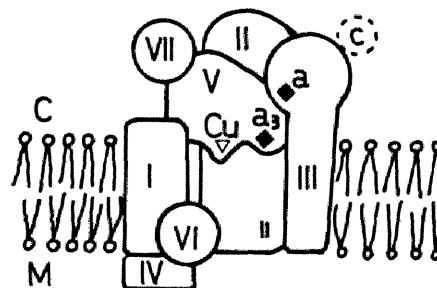
(a) Eytan et al (87)
1975



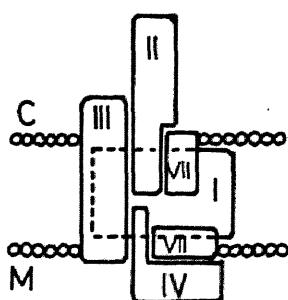
(b) Chan et al (88)
1978



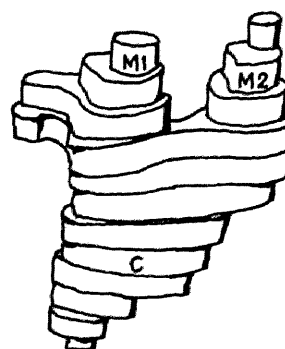
(c) Ludwig et al (89)
1979



(d) Chance et al (90)
1977



(e) Bisson et al (91)
1979



(f) Fuller et al (92)
1979

M1 and M2 are the matrix side domains and C is the cytoplasmic domain.

Fig. 2-17.

Hypothetical models of bovine heart cytochrome c oxidase. C, cytoplasmic side; M, matrix side.

ていることである。細かい点では一致していないが、サブユニットⅡとⅢが細胞質側に面し、サブユニットⅠは内膜の中に埋め込まれているらしい。
(24)

Sebald らは、N. crassa の cytochrome c oxidase のサブユニットⅠ、Ⅱ、Ⅲのアミノ酸組成を分析し、いずれも疎水性が高いことを示した。このことは他の報告によっても支持されている(表 2-Ⅳ)。一般的な可溶性酵素が極性アミノ酸を 50~60% 含んでいるのに対して、cytochrome c oxidase は酵素全体としても疎水性が高いことがわかる。中でもサブユニットⅠ

Table 2-IV. Percent polar amino acids in cytochrome c oxidase and selected subunits.

	Whole complex	Subunit			Reference
		I	II	III	
Bovine heart	39.7	35.5	44.7	39.9	31
<u>S. cerevisiae</u>	39.2	34.7	42.1	—	93
<u>N. crassa</u>	38.5	32.5	40.1	35.8	24

は極性アミノ酸が最も少ない。こうしたことから、分子量の大きなサブユニット I は、II、III と共に本酵素の疎水性を増し、内膜に正確に組込むための錨の役割を果たしていると考えられている（図 2-17 参照）。サツマイモの cytochrome c oxidase も、他の生物の酵素と同様に高濃度の界面活性剤によってのみ可溶化されることから、表 2-IV の酵素と同程度の疎水性をもっていると推察される。

Cytochrome c oxidase のサブユニット立体配置だけでなく、各サブユニットの機能についても論争中で結論に達していない。本酵素は還元型 cytochrome c から受け取った電子を酸素分子へ渡す。Cytochrome c は細胞質側の膜面上にあり、マトリックスにある酸素分子が反応する。その間に 2 つのヘム a (a, a_3) と 2 つの銅原子が介在する。したがって、cytochrome c と反応するサブユニット（部位）、ヘム a や銅を結合しているサブユニット（部位）などの解明が課題となっている。Cytochrome c

と反応、または結合するサブユニットについては、II、III、IVまたはVとVIというように研究者によりまちまちである。銅についてはサブユニットVとVIに含まれているという意見と、サブユニットIIに結合しているという意見がある。そして、ヘム α を結合しているサブユニットについては、V、IVとVIという報告や、Ozawa らや Green らのように、ヘム α の多い集合体 (complex) と少ない集合体に分離できるという報告もある。サツマイモの酵素の場合には、結果の項で述べたように、サブユニットIIIとVがヘム α の結合に何らかの役割を果たしていることが示唆された。操作上での人為的な影響がどの程度こうした結果に表われてくるのか不明ではあるが、もしこれが事実であるならば、分子量の小さなサブユニットのグループがヘム α や銅を結合し電子伝達系を形成するという Green らの考えに近くなる。

[Cytochrome c oxidase の活性単位]

Cytochrome c oxidase の構造に関しては、各サブユニットが1個ずつ会合し1セットとなり、この1セットに2分子のヘムaと2つの銅原子が含まれ基本単位を形成しているという考え方(a)が、現在一般に受け入れられている。図2-17の各モデルもこの考え方を基礎としている。数多く精製された cytochrome c oxidase のサブユニットの分子量を合計すると、それぞれ約13~14万になる。一方、精製標品のヘムa含量が $14 \text{ nmol/mg protein}$ であつたとすると、最小分子量は7万になる。そこで、この2倍の14万の単位(各サブユニットが1個ずつ会合したもの)の中にヘムaと銅原子が各々2つずつ含まれているとする考え方である。そして、膜中ではこの二量体(4ヘム複合体)として存在すると報告されている。しかし、実際のヘムa含量は $11 \sim 12 \text{ nmol/mg protein}$ の場合が多く、最小分子量は9万となり、この2倍の18万が1単位ということにな

る。この場合はサブユニットの合計分子量より大きくなってしま⁽³⁰⁾う。

そこで、Wikström は別の単位を考えている。つまり、ウシ心筋の cytochrome c oxidase は6種のサブユニット(サブユニット III が含まれない)で構成され、それぞれが1個ずつ会合して分子量約10万(サブユニット分子量の合計)の酵素を形成する。一方、この酵素のヘム a 含量は約 10 nmol/mg protein であり、最小分子量はちょうど10万となる。したがって、各サブユニット1個ずつの集合単位にヘム a が1分子ずつ在存する。そして、これだけでは活性を示さず、これが2つ結合して、1つの活性をもった "monomeric cytochrome aa₃" を形成すると考えている(b)。

欧米の研究者は、基本的に cytochrome aa₃ が cytochrome c oxidase であって、機能の異なるヘム a が2種存在してはじめて活性をもつと考⁽⁵⁴⁾えている。つまり、ヘム a 1つから成る単位が酵素活性を示すことはあり得ないと判断し

ている。(a)の考え方も(b)の考え方も、いずれもヘム a 2分子で1つの活性単位を形成するようになっている。しかし、cytochrome a_3 を cytochrome a から分離した例はなく、 a_3 は cytochrome a の特殊な状態である^(56,57,83)と考える研究者もいる。Orr¹¹らは、(a)、(b)の考え方に強く反対し次のように提案している。Cytochrome c oxidaseは、分子量14,000のサブユニット4個が1単位を形成し、これがヘム a 1分子と銅1原子を含み、これだけで充分活性をもつという考え方である(c)。これは必ずしも多くの人に受け入れられているわけではない。

さて、サツマイモ cytochrome c oxidase ではヘム a 含量は最も高い値で12.6 nmol/mg proteinであった。これから得られる最小分子量は、79,000となる。一方、サブユニットが各1個ずつとするとその合計は124,200である。サブユニットⅡが複数含まれているとすると、13万以上になる。現在のところ、分光学的な性質から本酵素には2種のヘム a (a, a_3)と、

存在状態の異なる2種の銅⁽⁵⁴⁾が含まれているとする意見が圧倒的である。サツマイモの場合にはそれを確認しているわけではないが、(c)の考え方を支持するだけの結果も得ていない。現時点では、サツマイモ cytochrome c oxidase は (a) で示したような活性単位を形成し、I から V までのサブユニットが1個ずつ (V については複数かも知れない) 会合しこれが2分子のヘム a と2種の銅原子を含み活性単位を形成していると考えている。活性単位は分子量13万~16万程度と考えられる。ゲルクロマトグラフィー (図2-2) やショ糖密度勾配遠心 (図2-3) の際の活性のピークは、この活性単位またはその2量体によるものと思う。尚、今の時点では、ヘム a 含量から求めた最小分子量を2倍にした値と、各サブユニットの分子量の合計値が一致しない理由を説明できない。

〔酵素反応の阻害剤と促進剤について〕

緩衝液として用いる phosphate も、それが 30 mM 以上になれば cytochrome c oxidase 活性を阻害しはじめる。アラスカエンドウの酵素でもほぼ同じ結果が得られている。⁽⁷⁶⁾ KCl も同様に阻害作用をもつ。Cytochrome c oxidase と、基質としての cytochrome c との反応は静電的な力に依存し、外部からの多量のイオンはこの両者の相互接触を妨げ、反応速度を低下させるものと考えられる。事実、cytochrome c は、サツマイモミトコンドリアでは 0.1 M KCl で、⁽¹⁰⁸⁾ ラット肝ミトコンドリアでは 0.15 M KCl で内膜表面から遊離してしまう。

一方、活性測定溶液にリン脂質ミセルを添加すると、^(109~111) 他の精製標品と同様に、酵素活性が 3 倍以上に促進される。このことは cytochrome c oxidase が内膜中ではリン脂質タンパク質複合体として存在し、酵素活性を発現するためには特定の疎水的外部環境が必須であることを示している。飽和脂肪酸よりも不飽和脂肪酸を含むリン脂質の方が、酵素活性

をより促進するという報告があるが、本研究ではその点については検討していない。

一方、同じ非イオン性界面活性剤であっても、Triton X-100 (polyoxyethylene *p*-*t*-octyl phenol) は活性を阻害し、Tween 80 (polyoxyethylene-glycol sorbitol monooleate) はリン脂質と同様に回復させる作用をもっている(図2-10)。
(113)
これは Robinson & Capaldi の結果とも一致する。彼らは、Tween 80 の疎水部分 (oleic acid, *m.p.* = 13.4 °C) は Triton X-100 の疎水部分よりも流動的で可塑的な疎水環境を形成するためであると推論している。また、図2-18からもわかる

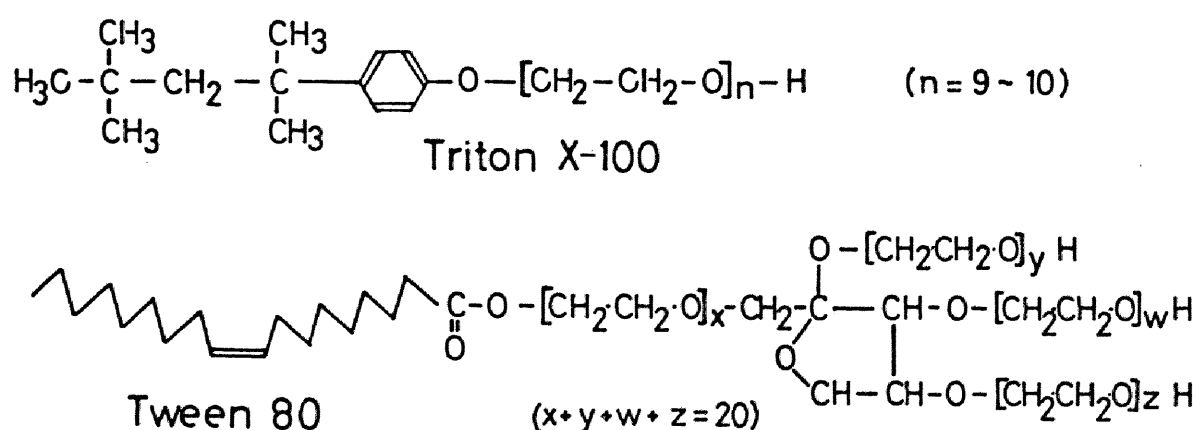


Fig. 2-18. Structural formula of Triton X-100 and Tween 80. (114)

ように、Tween 80 の親水部分は複雑で大きな構造である。そのため Tween 80 がミセルを形成する際、この親水部分が立体障害として作用し、結果的に流動的になることも考えられる。このような理由で、Tween 80 がリン脂質の代用として流動的で可塑性のある疎水環境を与え得るのに対して、Triton X-100 の場合は酵素の周囲にあるリン脂質と置換しリン脂質がつくっていた適当な環境を破壊し活性を阻害するものと考えられる。ただし、Triton X-100 と酵素との結合度は必ずしも強くはなく、臨界ミセル形成濃度以上の時にはじめて酵素に結合するといわれている。Triton X-100 による阻害が可逆的であるのはその理由によると思われる。また、Tween 80 が必ずしも 100% リン脂質の代用となり得ない (70% まで) 理由として、疎水部よりも大きな親水部が cytochrome c と酵素との相互作用に対して立体的な障害となっていることが考えられる。

〔酵素活性の温度依存性について〕

Cytochrome ϵ oxidase 活性の温度依存性に関して2つの知見を得た。第一に、サツマイモ cytochrome ϵ oxidase は、ミトコンドリアにおいても精製標品においても、その Arrhenius フロットが1点で折れ曲がった。熱帯地方に生育するキャッサバ塊根のミトコンドリアの場合も折れ曲り点をもった。これに対し、比較的低温で生育するジャガイモ塊茎のミトコンドリア^(115, 116)の場合は直線的であった。Lyons & Raison は高等植物ミトコンドリアの呼吸活性(コハク酸酸化反応)の温度依存性について検討し、次のように述べている。サツマイモ、トマトおよびキュウリのように低温障害を受けやすい植物のミトコンドリアは折れ曲り点をもった Arrhenius フロットを示し、サトウダイコン、ジャガイモ、カリフラワーのように低温障害を受けにくいものは一直線の Arrhenius フロット^(117, 118)を示す。Yamaki & Uritani も、サツマイモミトコンドリアの呼吸活性の Arrhenius フロ

ットには約9℃と約17℃に2つの折れ曲り点のあることを報告している。高等植物ミトコンドリアのcytochrome c oxidase活性の温度依存性についての研究報告は少ない。今回の結果から、二相性のArrheniusプロットは、熱帯、亜熱帯または温帯に生育する植物がもつcytochrome c oxidaseの特性のひとつと推察される。尚、呼吸活性とcytochrome c oxidase活性が同じArrheniusプロットを示さないのは、cytochrome c oxidaseでの反応が充分速く、コハク酸酸化反応の速度調節部位とはなっていないためと考えられる。

温度依存性に関する第二の知見は、活性測定に用いるリン脂質の種類を変えても、Arrheniusプロットにおける酵素活性の転移温度に大きな差が生じなかったことである。相転移温度が20数度異なるDPPCとDMPCを用いても、殆んど変化はみられなかった。これらの結果および以下に述べる理由で、cytochrome c oxidase活性の温度依存性は、必ずしもリン

脂質によって決定されるものではないと考える。

純粋なリン脂質の二分子層膜においては、結晶状態と液晶状態の明瞭な相転移がみられることはよく知られている。しかし、この明瞭さも膜中にタンパク質が入り込むことによって曖昧になっていく。また、膜酵素の温度依存性がリン脂質の影響を受けるのは、その酵素が機能する際、回転運動とか膜中での移動または大きな構造変化を伴う場合にあってはまることと考えられる。Cytochrome c oxidase の機能発現にそうした大きな変化が伴っている⁽¹¹⁹⁾とは考えにくい。また、最近 Yoshida らは、ウシ心筋の cytochrome c oxidase について、Arrhenius プロットにおける折れ曲りは、リン脂質の相転移ではなく、酵素自身の構造変化に起因すると述べている。彼らは本酵素には“hot 型”と“cool 型”があり、その違いはサブユニットの配列が多少異なるためであると推定している。そして、リン脂質の流動性はこの構造

転換のしやすさに影響するだろうとも述べている。さらに、Kirinoらは、ATPaseのペプチドの水素のゆらぎと温度の関係を van't Hoff プロットし、これが ATPase 活性の Arrhenius プロットと同じ温度で折れ曲り点をもつことを発見している。いずれも酵素の構造が特定の温度で大きく変化し、それが酵素活性に反映することを示した例である。

尚、問題点は酵素分子に強く結合したリン脂質の効果についてである。Robinsonらは、ウシ心筋の cytochrome c oxidase には cardiolipin が強く結合し、界面活性剤で置換することができないと報告している。今回得た精製標品には約2.5% (w/w) のリン脂質が含まれており、外部からリン脂質を添加しなくてもある程度の活性を示すことから、サツマイモの酵素にも強く結合したリン脂質 (annular lipid) が存在していると考えられる。そして、この annular lipid が酵素活性の温度依存性を左右している可能性を否定することはできない。ただその

影響は決定的なものではないだろうと思われる。なぜならば、外部からリン脂質を添加することにより活性は3倍以上に促進され、しかも、そのリン脂質の種類を変えても転移温度に大きな変化がみられないからである。

したがって、現時点では、cytochrome c oxidaseの構造が特定の温度で変化し、annular lipidと呼ばれる酵素表面のリン脂質もこれに多少影響し、結果的に酵素活性の転移点が生ずるものと考えている。おそらく、ジャガイモのように低温域で生育するものの酵素にはこうした特性がないのであろう。結論を得るためには、より詳細な検討が必要である。

第 3 章

サツマイモ 塊根傷害組織における cytochrome c oxidase の生合成機構

ミトコンドリアの形成機構は主に酵母やカビを材料として精力的に研究されてきた。マトリックスに局在する酵素や、内・外膜のリン脂質の合成に関する研究も進められているが、ここでは本研究と関連のある内膜酵素を中心に考えていきたい。

研究の初期には、ミトコンドリア形成におけるミトコンドリア内タンパク質合成系の役割が検討された。研究が進むにつれ、ミトコンドリアはやはり半自律的存在で、細胞質タンパク質合成系に多くの点を依存していることが明らかにされた。ミトコンドリアでのタンパク質合成系は、量的にはミトコンドリア

全タンパク質の10%程度を合成しているに過ぎない。しかし、質的には重要な役割を担っている。ミトコンドリアのタンパク質の中でミトコンドリアリボソーム上で合成されるものは、cytochrome c oxidase の7種のサブユニットのなかの分子量の大きな3種のサブユニット、ミトコンドリア ATPase の "membrane factor" と呼ばれる2個 (*Neurospora*) または4個 (酵母) のタンパク質、および cytochrome b のアポタンパク質である。このほか機能不明なものが数個含まれている。いずれも内膜に強く結合し、重要な機能を担うタンパク質である。しかもそれらは細胞質由来のタンパク質と会合してはじめて機能を発現する。現在、細胞質とミトコンドリアの両合成系の関係や相互調節機構、そして個々のタンパク質の生合成・輸送・酵素複合体の形成に関する具体的なメカニズムに関心が集まっている。

一方では、酵母のミトコンドリア DNA の₍₄₄₎ように詳細な遺伝子地図が作成されつつある例

もある。そして、ミトコンドリアのタンパク質合成系各因子とミトコンドリア DNA または核 DNA との関連についても多くのことが明らかにされている。その概略を図 3-1 に示した。

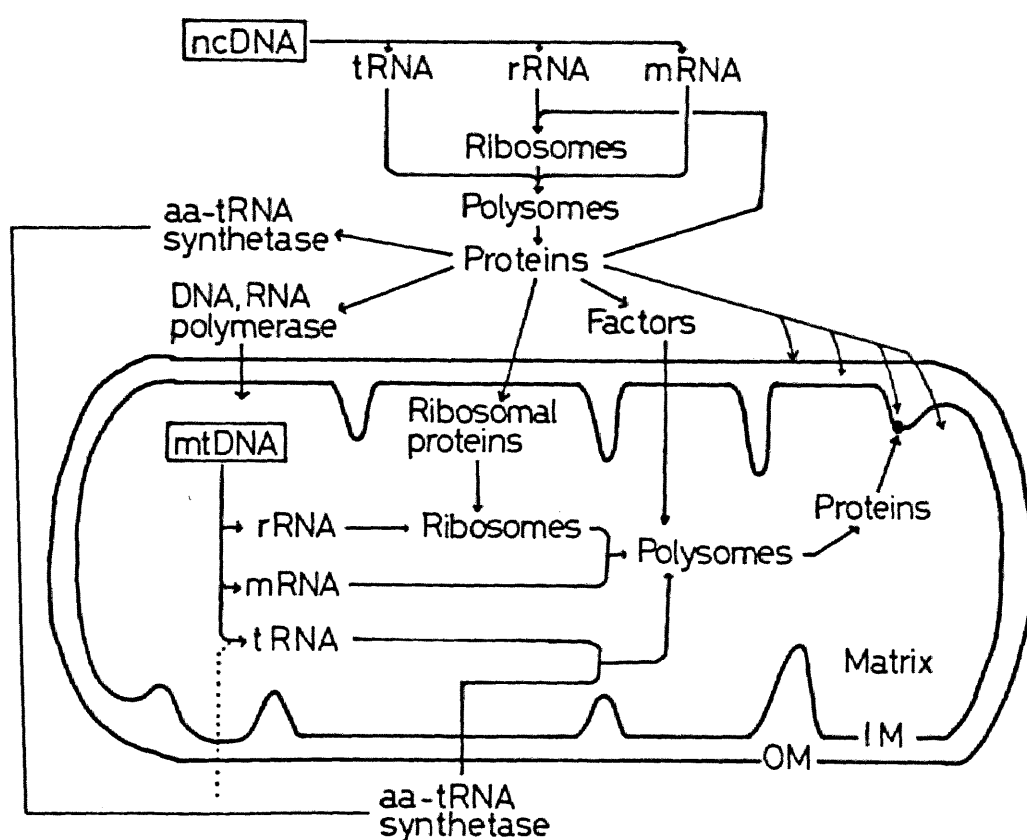


Fig. 3-1. Outline of mitochondrial protein-synthesizing system. aa-, amino acyl; mRNA, messenger RNA; rRNA, ribosomal RNA; tRNA, transfer RNA; mtDNA, mitochondrial DNA; ncDNA, nuclear DNA; IM, inner membrane; OM, outer membrane.

量的にはわずかなタンパク質をつくるに過ぎないミトコンドリアの合成系に、細胞質から多くの因子が送り込まれている。ミトコンドリアの合成系がそれだけ重要な役割をもっているためと考えられる。

研究対象である cytochrome c oxidase は内膜酵素の中でも最も研究が進んでいる。cytochrome c oxidase の生合成部位については、サブユニット数の論議はあるけれども、既に述べたように分子量の大きな3種はミトコンドリア内で合成され、他の4種または3種は細胞質由来であることが定説となっている。そして、ミトコンドリア由来のものは全てミトコンドリア DNA にコードされていることも明らかにされている。現在は、それぞれの部位でつくられたポリペプチドが合成されて内膜に運ばれるまでの過程が研究課題となっている。議論されているのは細胞質由来のサブユニットの生合成および内膜への輸送のメカニズムの点である。酵母での実験結果から対立

する2つの説が出されている。ひとつは Poyton
 らが提出しているもので、細胞質由来の4個
 のサブユニットははじめ1本のポリペプチド
 として合成され、この "polyprotein precursor" が
 内膜に運ばれ、その後個々のサブユニットに
 分離される^(122~126)という説である。これに対して、
^(127, 128) Schatz らをはじめいくつかの研究グループは
 、細胞質由来のサブユニットは最初から個々
 別のサブユニットとして合成される、と反論
 している。

サツマイモ塊根の傷害組織の場合は、酵母
 のように活発な生合成がみられるわけではな
 いが、切断傷害を与えてから2日間で酵素活
 性は約2倍に増加する。この系の特徴は序論
 で述べたように、cytochrome ϵ oxidase 活性の
 増加に細胞質でのタンパク質合成が必ずしも
 必要ではない点にある。本研究ではこの点の
 解明を中心に実験を進めた。その過程で cyto-
 chrome ϵ oxidase の生合成機構について、Poyton
 らの考え方に近い結果も得た。他方、Leaver

(132, 133)

らのグループもキウイモ塊茎の傷害組織を用いて、ミトコンドリア形成について研究している。その結果、高等植物ミトコンドリアの場合も、^(32, 58, 60)他の例と同様に、ミトコンドリアで合成されるタンパク質は8~12種程度であることを明らかにした。しかし、その中に cytochrome c oxidase のサブユニットが含まれるのか否かは不明のままである。本研究は彼らの方法と異なり、傷害刺激にともなうミトコンドリア形成の機構をひとつの酵素の生合成に着目して解明していく点に特徴がある。

生合成機構の検討に先立って、傷害組織ミトコンドリアからも本酵素を精製し、健全組織のものと比較し両者が同じものであることを確認した。その後抗体ヤラベルしたアミノ酸等を用いて、cytochrome c oxidase の活性増加のメカニズムを分析していった。これまでに得られた結果を順次説明していきたい。

実験方法および材料

材料と試薬. サツマイモ塊根を10分間0.1% sodium hypochlorite中に浸し、十分洗浄した後柔組織より厚さ3 mm、直径19 mmの切片(約1 g)を調製した。これを高湿度に保ったプラスチックケースに入れ、一定時間30℃でインキュベートしたものを傷害組織として用いた。ChloramphenicolはBoehringer Mannheim社のもの、cycloheximideはSigma Chemical社から購入した。免疫拡散に用いた寒天は、DIFCO Laboratory社のものを使用した。蒸留水と緩衝液は必要な場合にはオートクレーブ処理をした。他の試薬は第2章と同じである。

組織切片の抗生物質による処理. 組織切片を10倍量の1 mm phosphate buffer (pH 6.5)を含むcycloheximide溶液(10^{-5} M)またはchloramphenicol溶液(6×10^{-3} M)に入れ、室温(約25℃)で1時間攪拌しながら処理した。切片を

蒸留水で洗った後、表面の水分を口紙で吸い取り、30℃でインキュベートした。抗生物質を含まない緩衝液で処理したものをコントロールとして用いた。

アイソトープラベルしたアミノ酸の組織切片への与え方。⁽¹⁴⁾ $[^3\text{H}]$ -leucine をすでに記された方法に従って組織切片に与えた。pH 7.0 の 10 mM phosphate buffer 40 μl に溶かした 80 μCi の $[^3\text{H}]$ -leucine (112 Ci/mmol) を、7 時間インキュベートした各傷害組織切片の表面にのせた。この切片を 40 枚調製し、これをさらに 17 時間 30℃でインキュベートした。

ミトコンドリア膜画分の調製と膜タンパク質の可溶化。ミトコンドリア膜画分は第 2 章の方法に従って調製した。ただし、精製ミトコンドリア画分に、フロテアーゼ阻害剤である phenylmethylsulfonylfluoride を 0.5 mM 添加して超音波処理を行なった点異なる。

健全組織または傷害組織から調製したミトコンドリア膜画分は、最終タンパク質濃度が 3 mg/ml となるように、 0.25 M のショ糖を含む 50 mM Tris-acetate buffer、 $\text{pH } 7.5$ (以下 Tris-acetate buffer とする) に懸濁した。この懸濁液に KCl と 5% DOC を各々の最終濃度が 1 M または $0.4 \text{ mg/mg protein}$ となるように加え、よく攪拌した後 $80,000 \text{ g}$ で 1 時間遠心した。この上清画分を supernatant I (Sup I) とした。沈殿は 0.1 M KCl を含む Tris-acetate buffer に懸濁し、さらに 10% Triton X-100 を最終濃度が 1.5% になるように加えて可溶化処理をした。これを $80,000 \text{ g}$ で 1 時間遠心し、上清画分を supernatant II (Sup II) とした。Cytochrome c oxidase の活性はほぼ 100% Sup II に回収された。

Cytochrome c oxidase の精製。精製は第2章と同じ方法で行なった。ただし、傷害組織の cytochrome c oxidase は高濃度の DOC でも可溶化できないので、 1.5% Triton X-100 で可溶化

して上記の SupII を調製し、これを以後の精製ステップに用いた。

Cytochrome c oxidase に対する抗体の調製.

健全組織から精製した 3 mg の酵素標品 (ステップ 5、 $\Lambda \Delta$ 12.4 nmol/mg protein、2.6 mg/ml) を等量の Freund's complete adjuvant と混合し家兔に注射した。3 週間後、Freund's incomplete adjuvant と混合した 1.5 mg の酵素を注射し、その 1 週間後に同様の酵素 1.3 mg を再び注射した。8 日後採血した。尚、後になって 500 μ g 程度の酵素標品でも抗体が得られることがわかったので、後半の実験ではこの量の酵素を注射して抗体を作らせた。無処理の家兔より得た血清をコントロールとして用いた。

血清は 3 回の硫酸塩析の後 (1 回目 44%、2、3 回目は 33% 硫酸飽和で沈殿する画分) 水に溶かし、予め pH 8.3 の 15 mM Tris-acetate buffer で平衡化しておいた DEAE-cellulose カラム (DE-52、2 \times 15 cm) にのせ、同様の緩衝液を流し

た。素通り画分を immunoglobulin G (IgG) として集め、10 mg/ml に濃縮した後 -80°C に冷凍保存した。

免疫拡散法による抗原抗体反応試験。二次元二重拡散⁽¹³⁴⁾による免疫反応試験は Ouchterlony の方法に従い、シャーレ中に作製した寒天板上で行なった。精製寒天を、0.4% Triton X-100、0.7% NaCl および 0.01 % NaN_3 を含む pH 7.5 の 20 mM Tris-acetate buffer に、最終濃度 0.8% となるように加え加熱して溶かした。各シャーレに 12 ml ずつ分注した。固化した寒天板に穴をあけ、ここに 0.1% 寒天溶液を入れて 30 分後に余分な水分を吸い出し、実験に供した。各々の穴には、抗体、精製酵素または可溶化処理したミトコンドリアなどを 15 μl ずつ入れ、室温 (25°C) に静置し 1 日後に沈降線を観察した。多くの場合、反応後寒天板をよく洗浄し、Coomassie brilliant blue でタンパク質染色を行い、これを写真撮影した。

Polyacrylamide ゲル中のタンパク質と抗体との反応を試験する場合には次のようにした。寒天板に幅1.5mmの溝をつくりここに抗体を入れ、この溝に平行に、2mmの間隔をおいて、ゲルを縦に半分にしたものを静かにのせ室温に静置した。ゲルから浸出したタンパク質と抗体が反応するので、これを上述の方法で観察した。

免疫沈殿の方法。健全組織または傷害組織から調製したSupII画分の各1mlに、IgG 0.15mlと生理食塩水(0.7% NaClを含む20mM Tris-acetate buffer、pH7.5)1mlを加えて攪拌し、4°Cで1日間静置した。抗原抗体複合体を遠心により沈殿させ、これを0.4% Triton X-100を含む生理食塩水で3回洗い、最終的な沈殿を免疫沈殿としてpolyacrylamideゲル電気泳動にかけた。アイソトープラベルしたアミノ酸を取込ませた組織切片から単離したミトコンドリアの場合も、同様の方法で免疫沈殿を調製した。こ

の場合は、沈殿を 20 mM の leucine と 0.4% Triton X-100 を含む生理食塩水にて洗浄した。

Polyacrylamide ゲル電気泳動。 SDS と urea を含む polyacrylamide ゲル電気泳動は第 2 章と同じ方法で行った。 acrylamide と bisacrylamide の比が 20:1 のものを用いた。
(135)

Laemmli の方法を用いる場合もあった。分離ゲルは、15% acrylamide、0.4% bisacrylamide、0.375 M Tris-HCl (pH 8.3)、0.1% SDS、0.025% TEMED を含み、濃縮ゲルは 5% acrylamide、0.13% bisacrylamide、0.125 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.1% SDS、0.025% TEMED を含む。電極緩衝液は 25 mM Tris-0.192 M glycine-0.1% SDS (pH 8.3) を用い、試料タンパク質は、2% SDS と 5% β -mercaptoethanol を含む 63 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) 中で、70 °C 20 分間処理した。分子量の指標として BSA (68,000)、catalase (60,000)、ovalbumin (45,000) および aldolase (40,000) を用いた。

SDS を含まない polyacrylamide⁽¹³⁶⁾ゲル電気泳動⁽¹³⁷⁾は、Davis や Ornstein の方法に従って行った。分離ゲルは 7% acrylamide と 0.375 M Tris-HCl (pH 8.9) を含み、濃縮ゲルは 2.5% acrylamide と 0.063 M Tris-HCl (pH 6.7) を含む。ゲル 1 本あたり 2 mA の電流で泳動した。

Phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィー.

健全組織のミトコンドリアから調製した Sup I に含まれるタンパク質を、その疎水性の違いによって分離するために、phenyl-Sepharose (CL-4B, Pharmacia Fine Chemical 社) を用いてクロマトグラフィーを行った。予め Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.5) で平衡化しておいたカラム (1.2 × 2 cm) に、同様の緩衝液に対して透析した Sup I をのせ、20 ml の Tris-acetate buffer を流した。次に 1% sodium cholate を含む緩衝液を 20 ml、そして 2% Triton X-100 を含む緩衝液を 45 ml 流してタンパク質を溶出させた。これを 2.2 ml ずつ分取し、酵素活性や抗体との反

応の有無について分析した。

単離したミトコンドリアによるタンパク質合成⁽¹³⁸⁾。当研究室の Katō らは、最近サツマイモ塊根から単離したミトコンドリアによるタンパク質合成の方法を確立した。その方法に従って、16時間インキュベートした傷害組織から呼吸調節能の高いミトコンドリアを調製した。Polyclar AT を含む磨砕液で組織をホモジネートした後、300g 7分間の遠心で得られる上清を Sephadex G-25 に通し、素通り画分を分画遠心および不連続ショ糖密度勾配遠心にかけ、ミトコンドリアを単離・精製した。

得られたミトコンドリア $100\mu\text{l}$ ($250 \sim 500\mu\text{g}$) を、 $[^3\text{H}]$ -leucine $10\mu\text{Ci}$ ($182\text{Ci}/\text{mmol}$) を含む反応液に入れ $800\mu\text{l}$ とした。反応液は、 0.25M mannitol、 90mM KCl、 30mM MgCl_2 、 1mM EGTA、 10mM succinate、 $25\mu\text{M}$ amino acid mixture (leucine を除く)、 5mM phosphate buffer (pH 7.2)、 10mM Tricine buffer (pH 7.2)、 2mM ATP と 2mM GTP から成る。この反応液を 25°C

で振盪しながらインキュベートした。60分後反応液に 20mm leucine と 0.5M sucrose を含む Tris-acetate buffer を 2 倍量加え、遠心によりミトコンドリアを沈殿させた。3 回の洗浄後、超音波処理をしてミトコンドリア膜画分を調製した。これを 0.2M KCl と 2% Triton X-100 で可溶化処理をし、80,000g 1 時間の遠心で得られた上清画分 0.2ml に、等量の抗血清とキャリアーとしての精製酵素を約 20 μ g 加え、4°C で 1 日静置した。対照として、抗血清の代りにコントロール血清を添加したものを準備した。免疫沈殿は 3 回洗浄し、そこに含まれる 3 H を測定した。尚、実験器具、緩衝液や反応液は、乾熱滅菌またはオートクレーブ処理をした。

その他の分析方法。酵素活性、吸収スペクトル、ヘム a 含量、タンパク質含量は第 2 章と同じ方法で分析した。ショ糖密度勾配遠心も第 2 章と同様である。

結 果

〔傷害組織から精製した cytochrome ϵ oxidase の性質〕

図1-1に示したように組織重あたりの cytochrome ϵ oxidase の活性は、組織と切断してから2日間で約2倍に増加する（サツマイモ塊根の収穫後の貯蔵期間等の違いにより、1日間で2倍になる場合もある）。その機構を探るにあたって、傷害組織に存在する酵素が健全組織のものと同一であるかどうかを検討した。健全組織の場合とほぼ同様の方法により、2日間インキュベートした傷害組織から本酵素を精製した。図3-2に見られるように、サブユニット組成は同じで、I～Vの5種のサブユニットから成っていた。各サブユニットの染色の度合いもほぼ同じであった。

また、ショ糖密度勾配遠心での沈降速度についても差がみられなかった（図3-3）。さらに、両者各々の酸化型および還元型の吸収

スペクトルを比較したが全く同じであった（図2-4参照）。また、両組織から精製した酵素標品について、Ouchterlonyの方法による免疫拡散試験を行った。いずれも明瞭な1本の沈降線を形成し、互いに融合し免疫学的性質が同じであることを示した（図略）。これらの結果から判断して、傷害組織ミトコンドリアの cytochrome c oxidase は健全組織のものと同一であるといえる。

[*in vivo* 実験における酵素タンパク質の合成]

組織切片に [^3H]-leucine を与えた時、cytochrome c oxidase の各サブユニットにラベルしたアミノ酸が取り込まれるか否かを検討した。 [^3H]-leucine を与えた傷害組織からミトコンドリアを単離し、1% Triton X-100により本酵素を可溶化した。これに抗体を入れ、得られた免疫沈殿を SDS-urea polyacrylamide ゲル電気泳動にかけた結果を図3-4に示した。サブユニット I、II、III には [^3H]-leucine が取り込まれて

いたが、ⅣとⅤには殆んどラベルが入っていないかった。分子量5万以上の画分にも、ラベルされたタンパク質が多量に検出された。これが cytochrome c oxidase と関係あるものかどうかは今のところ不明である。

このほか、chloramphenicol または cycloheximide で処理した組織に [^3H]-leucine を与えたが、いずれもラベルの取り込みがみられなかった。Chloramphenicol の場合は、図 1-1 から考えられるように酵素が合成されていないと思われる。Cycloheximide の場合は、合成されていても、酵素が可溶化されやすい状態になっているのかも知れない。詳細な検討は行っていない。

ともかく、図 1-1 に示された結果（細胞質由来のサブユニットは傷害後合成されなくてもよい）と、サブユニットⅣとⅤは傷害を受けた後活発に合成されることはないというこの実験結果から、ⅣとⅤは細胞質由来のものであろうと判断した。サブユニットⅠ、Ⅱ、Ⅲは、傷害刺激を受けてからミトコンドリア内

で新たに合成され、ⅣとⅤは、健全組織の細胞内のどこかに、前駆体またはフォルとして過剰量存在しているのであろうと推定した。その前駆体を確認するために以下の実験を行った。

〔 Cytochrome ϵ oxidase 関連タンパク質の細胞内局在 〕

健全組織の磨砕液から細胞分画を行い、ミトコンドリア、小胞体、ポスト小胞体画分を調製した。各画分と抗体との反応性を免疫拡散実験で検討したところ、ミトコンドリア画分のみが明瞭な沈降線を形成した（図略）。小胞体やポスト小胞体画分には、少なくとも沈降線を形成する程の cytochrome ϵ oxidase またはこれに関係のあるタンパク質は存在しないことが示唆された。そこで、ミトコンドリアについてさらに検討を進めることにした。

〔 SupⅡ画分の性質 〕

本酵素を精製する過程で、cytochrome c oxidase はミトコンドリア膜に強く結合しており、比較的高濃度の界面活性剤によつてのみ可溶化されることが示された。そこで、実験方法の項で述べたように、ミトコンドリア膜タンパク質を cytochrome c oxidase よりも可溶化しやすい画分 (Sup I) と、本酵素と同程度に強く膜に結合しているタンパク質の画分 (Sup II) に分けた。表 3-I からわかるように、膜画分の全 cytochrome c oxidase 活性が Sup II に回収された。

表 3-II は、Sup II 画分の cytochrome c oxidase 活性とヘム a の含量について、組織切断後の経時的変化を示したものである。酵素活性、ヘム a そしてタンパク質含量は、15時間の誘導期の後40時間目で2倍に増加していた。ヘム a と活性はほぼ並行して増加し、ヘム a あたりの活性は常に一定値 (20 units/nmol of heme a) を示した。このことは、少なくとも、健全組織ミトコンドリアの Sup II にはヘム a を含んだ形

の不活性型 cytochrome c oxidase は存在していないことを意味している。そして、傷害刺激による活性増加は、酵素タンパク質自身の増加によるものであることが示唆された。

この点を次の方法で確認した。Cytochrome c oxidase に対する抗体を健全または傷害組織の SupII 画分に加えて本酵素のみを特異的に沈殿させ、免疫沈殿を SDS-urea polyacrylamide ゲル電気泳動により分析した (図 3-5)。両者の泳動パターンに大きな違いはなく、IgG のサブユニットと本酵素の I から V までの各サブユニットが確認できる。また、Coomassie blue による染色の度合いから判断して、各サブユニットの相対的な量比は、両組織とも同じである。健全組織に cytochrome c oxidase のサブユニット IV と V が特別多量に存在するということはみられなかった。ところで、この実験に用いた SupII は、健全組織では 100 g、傷害組織では 50 g の組織に相当する量である。つまり、傷害組織ミトコンドリアの SupII には、本酵

素の各サブユニットが健全組織の2倍量含まれていることが示された。

〔SupI画分の性質〕

Sup IIには不活性型 cytochrome c oxidase や細胞質由来サブユニットの前駆体と思われるものは含まれていないことが明らかになったので、次に SupI について分析した。

健全組織からの SupI は cytochrome c oxidase 活性を殆んど含んでおらず、本酵素の補欠分子族であるヘム a も検出されなかった（表3-I および図3-6）。しかし、この画分は cytochrome c oxidase に対する抗体と反応し、免疫拡散試験で沈降線を形成した（図3-7B）。そして、この沈降線は、精製酵素に対して形成された沈降線と融合していた。この明瞭で濃い沈降線のほかに、極薄い沈降線が内側にあり、これはミトコンドリア膜画分にも見られた。薄い沈降線は、精製酵素との沈降線と交叉せず、融合しているように観察されることから、

本酵素と何らかの関係をもつタンパク質によるものと思われるが、詳細は不明である。

SupI画分のみを試験した場合はこの薄い沈降線が殆んど見られないこともあり、以後濃い沈降線を形成するタンパク質について性質を調べていった。いずれにせよ、これらの結果は、少なくとも、健全組織の SupI には活性型 cytochrome ϵ oxidase とは異なつた、抗体と反応するタンパク質が存在することを示している。そこで、このタンパク質が cytochrome ϵ oxidase の細胞質由来サブユニットの前駆体である可能性もあると考えた。このタンパク質を便宜上 X-タンパク質と呼ぶことにする。

健全組織の SupI 画分をショ糖密度勾配遠心にかけた結果を図3-8に示した。比較のため精製酵素の活性のパターンも、同じグラフ上に重ねて示した。まず、この SupI に含まれるタンパク質の大部分は、cytochrome ϵ oxidase と同じかまたはそれより小さいことがわかる。そして、X-タンパク質は cytochrome ϵ oxidase と

同じ大きさまたはそれより大きな状態にあることが示された。底の部分のフラクションが沈降線を形成したのは、X-タンパク質が凝集したためと思われる。この結果から、沈降線を形成するタンパク質は cytochrome c oxidase の分解産物ではないと判断される。

また、SupI の X-タンパク質は、組織切断後その量がしだいに減少していくことも示唆された（図 3-9）。図にみられるように、抗体との間に生ずる沈降線は、時間の経過した傷害組織の SupI はと薄くなり、しかも抗原側に近づいた。切断後 66 時間経過した傷害組織の SupI は、はっきりした沈降線を形成せず、X-タンパク質の量が極端に少なくなっていることが示された。

〔X-タンパク質の phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィー〕

SupI に含まれる X-タンパク質の性質を検討する目的で、このタンパク質の単離・精製を

試みた。図 3-10 は、健全組織の SupI 画分の phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィーの結果を示したものである。1% sodium cholate によって溶出されてくるタンパク質のみが抗体に対して沈降線を形成した (図 3-11 A)。

2% Triton X-100 によって溶出されるタンパク質は、B と C の 2 つの画分に分かれた。B 画分の還元型吸収スペクトルを見ると、cytochrome b と c_1 が検出された。SupI に僅かに含まれる cytochrome c oxidase 活性は C 画分に回収された。可溶化した酵素標品で確かめても、2% Triton X-100 によってのみ溶出されるという結果を得た。この結果から、X-タンパク質は、活性型 cytochrome c oxidase や cytochrome bc_1 complex よりも疎水性が弱いと考えられる。

さらに、A 画分に含まれる X-タンパク質が、抗原として精製 cytochrome c oxidase と拮抗することをも、図 3-11 B のようにして確かめた。寒天板上で反応させる前に、抗体と精製酵素と混ぜてしまえば、酵素を含んだ抗体は cyto-

chrome \pm oxidase との間に沈降線を形成しない (well 1 と well 4)。同様にして、A 画分に抗体を加え 0°C で 1 時間反応させた混合液を寒天板上の穴 (well 2) に入れたところ、微かな沈降線は見られたが、明瞭な沈降線は形成されなかった。もし、X-タンパク質が cytochrome \pm oxidase と無関係な抗原であったならば、明瞭な沈降線が形成されたはずである。したがって、この結果からも X-タンパク質は cytochrome \pm oxidase と構造的な共通点をもっていることが示された。

尚、X-タンパク質が非特異的に immunoglobulin を凝集させていることも考えられたので、コントロール血清に対する反応性をみた。X-タンパク質 (A 画分) は、やはり cytochrome \pm oxidase 抗体にのみ沈降線を形成し、コントロール血清との間には何も形成しなかった (図略)。

[X-タンパク質の精製とその分子量]

X-タンパク質を、さらに硫酸塩析または

DEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーにより精製しようとしたが、満足な結果は得られなかった。そこで、phenyl-Sepharoseカラムクロマトグラフィーで得られたA画分をpolyacrylamideディスク電気泳動にかけた。泳動後のゲルを、染色せずに縦に半分に切り寒天板にのせ、抗原抗体反応試験を行った。ゲルから寒天板に浸み出たタンパク質が抗体と反応した。その結果を、染色したゲルと共に図3-11に示した。ゲルの主タンパク質バンドが抗体に対して明瞭な沈降線を形成し、これがX-タンパク質であることが明らかとなった。

このX-タンパク質の前駆体としての可能性を検討する上で、ポリペプチドの数と分子量を知ることが重要である。そのために、ディスク電気泳動により分離されたX-タンパク質のバンドをゲルから切り出し、これをSDS-urea polyacrylamideゲル電気泳動にかけた。その結果を精製酵素のゲルと比較した(図3-12)。X-タンパク質と呼んできたものが、1本の、し

かも分子量のかなり大きなポリペプチドであることが示された。次に X-タンパク質の分子量を測定するために、Laemmliの方法による SDS polyacrylamide ゲル電気泳動を行った。分子量の指標として用いたタンパク質も、X-タンパク質と同様に、ディスク電気泳動にかけた後のタンパク質バンドを試料とした。その結果は図3-14のようであり、X-タンパク質の分子量は 57,000 と算出された。

[単離ミトコンドリアによるタンパク質合成]

傷害組織から単離したミトコンドリアによるタンパク質合成を試みた(表3-III)。in vitro 合成されたミトコンドリア膜タンパク質の2.5%が cytochrome c oxidase の抗体によって沈殿した。これがどのサブユニットであるのかを分析することはできなかったが、ミトコンドリア膜タンパク質ならびに cytochrome c oxidase の生合成に、ミトコンドリアのタンパク質合成系が関与していることを確認できた。

Table 3-I. Fractionation of submitochondrial particles into Sup I and Sup II

Fraction	Protein	Cytochrome <u>c</u> oxidase	Heme <u>a</u>
	mg	units	nmol
Submitochondrial particles*	16.6	82.0	n.d.**
Sup I	8.28	0.94	0
Sup II	2.63	87.5	5.38

* The submitochondrial particles were prepared from 500 g of intact tissue. ** n.d., not determined.

Table 3-II. Changes in cytochrome c oxidase activity and heme a content in Sup II during aging of slices

Time after slicing	Cytochrome <u>c</u> oxidase	Protein	Heme <u>a</u>	Specific activity
h	units	mg	nmol	units/nmol of heme <u>a</u>
0	22.5	0.581	1.13	19.9
15	18.1	0.544	0.81	22.3
24	32.2	0.891	1.61	20.0
40	45.0	1.20	2.15	20.9

Each sample was prepared from 200 g of root tissue.

Table 3-III. In vitro protein synthesis
by isolated sweet potato mitochondria

Fraction	Radioactivity
	incorporated
	dpm
Mitochondrial membrane	281,000
2% Triton X-100 extract	173,000
Immunoprecipitate by antiserum	7,120
Immunoprecipitate by control serum	56

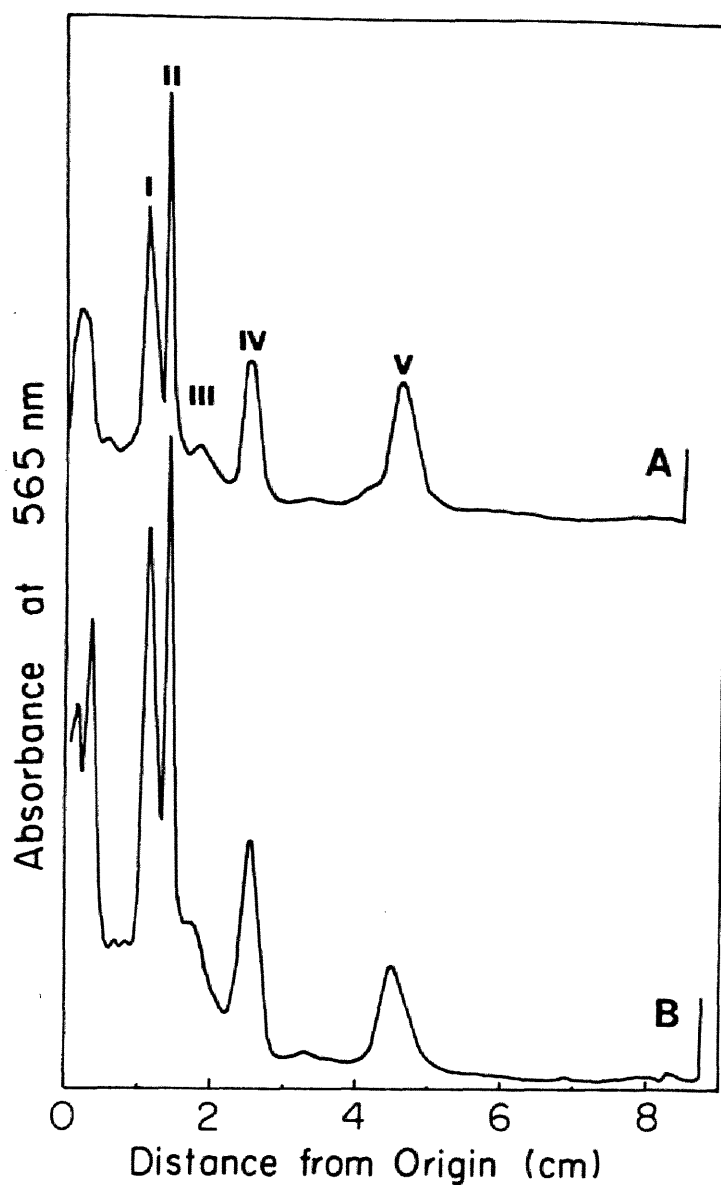


Fig. 3-2. SDS-urea polyacrylamide gel electrophoresis of cytochrome c oxidase from intact (A) or wounded tissue (B). The enzyme preparations used were of purification step 5; namely preparations after sucrose density gradient centrifugation.

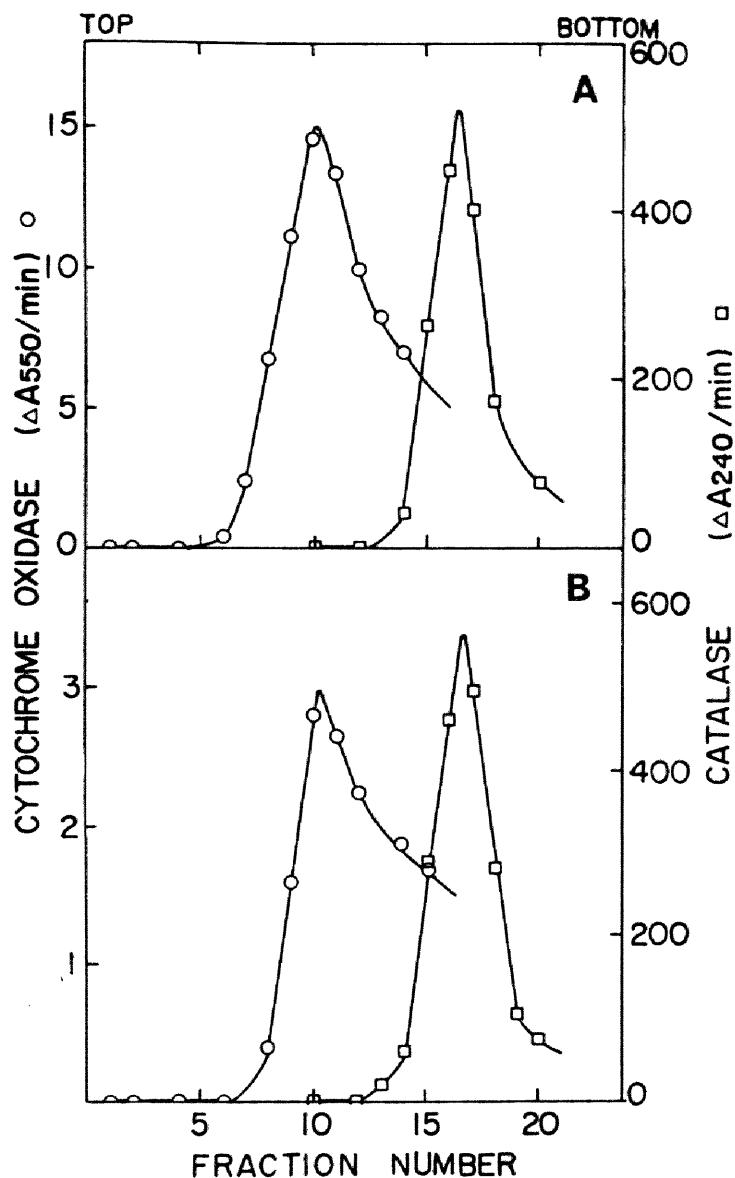


Fig. 3-3. Sucrose density gradient centrifugation of cytochrome c oxidase from wounded (A) or intact tissue (B). O, Cytochrome c oxidase activity expressed as decrease in absorbance at 550 nm per min per ml of fraction. \square , Catalase activity expressed as decrease in absorbance at 240 nm per min per ml of fraction.

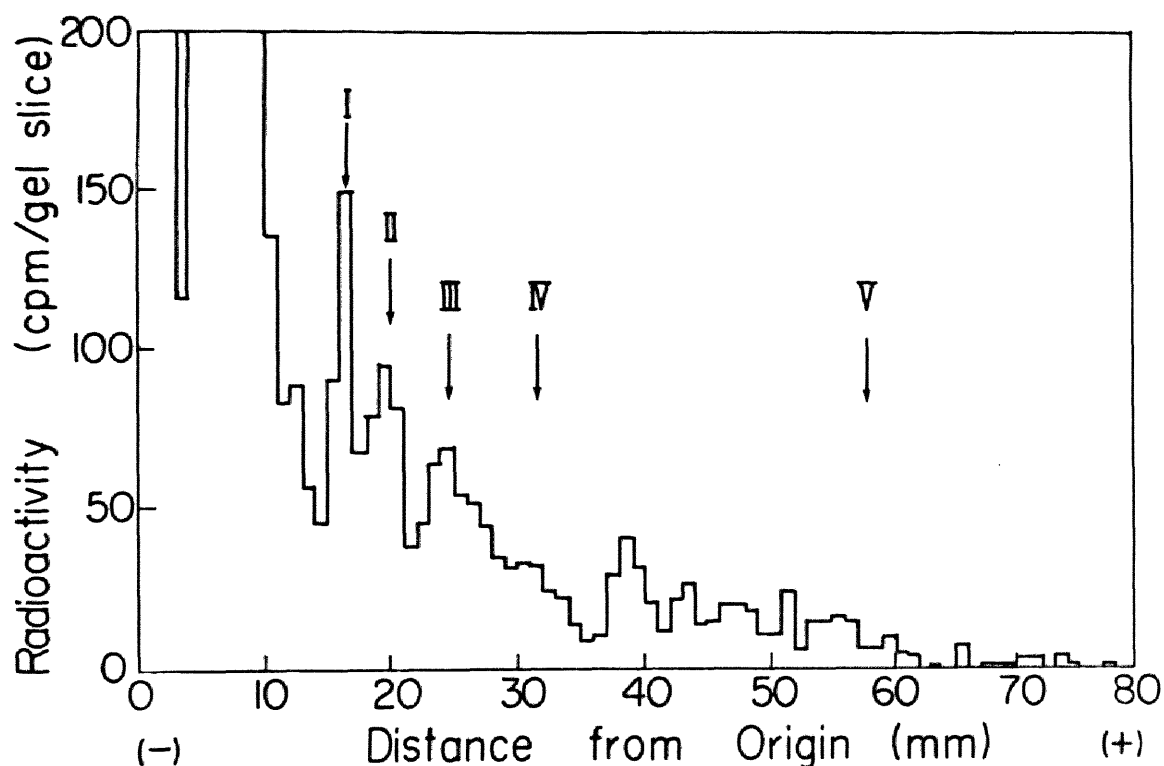


Fig. 3-4. Identification of cytochrome c oxidase polypeptides synthesized during aging of slices. Purified mitochondrial fraction from [^3H]-leucine labeled slices was treated with 0.06% (w/v) deoxycholate containing 1 M KCl and centrifuged at 80,000 g for 1 h. The pellet was extracted with 1% Triton X-100 containing 0.2 M KCl, and the extract was treated with an optimal amount of immunoglobulin. The precipitate was dissolved in a solution containing SDS, urea and mercaptoethanol and subjected to gel electrophoresis as described under Materials and Methods in Chapter 2. The Roman numerals mark position of the subunits of purified enzyme.

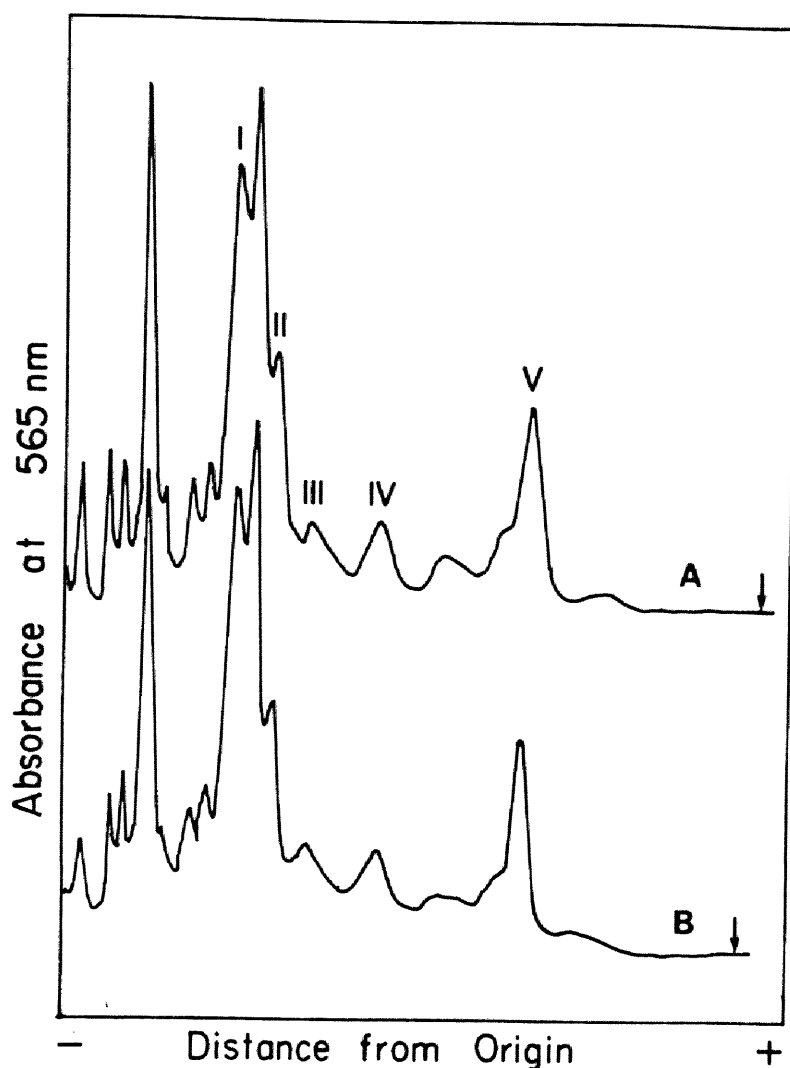


Fig. 3-5. SDS-urea polyacrylamide gel electrophoresis of immunoprecipitates of Sup II fractions from 100 g of intact tissue (A) and 50 g of wounded tissue aged for 24 h (B). To each Sup II fraction (1 ml) was added 0.15 ml of immunoglobulin G fraction (10 mg/ml) and 1 ml of 20 mM Tris-acetate buffer, pH 7.5, containing 0.7% NaCl and 0.01% NaN_3 . After incubation at 4°C for 24 h the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 30 min. The pellet was washed three times with 20 mM Tris-acetate buffer, pH 7.5, containing 0.7% NaCl, 0.01% NaN_3 and 0.1% Triton X-100. The resulting pellet was subjected to SDS-urea polyacrylamide gel electrophoresis.

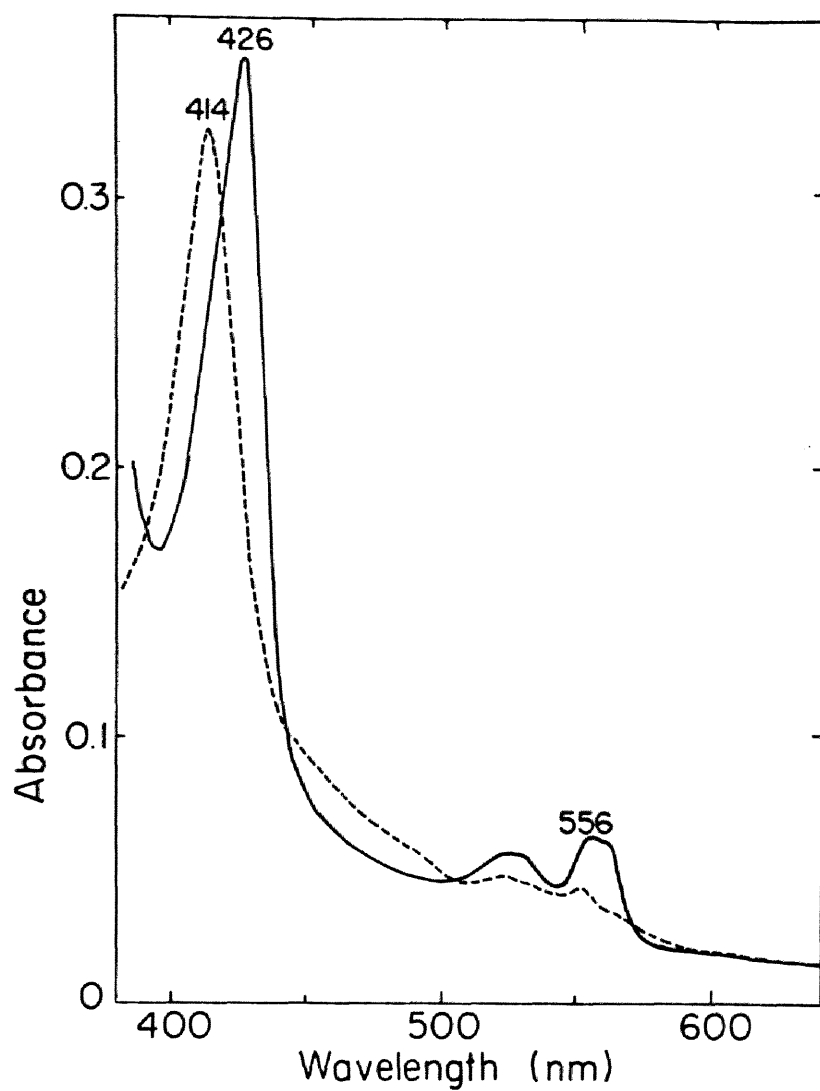


Fig. 3-6. Absorption spectra of the air-oxidized (---) and sodium dithionite-reduced forms (—) of Sup I fraction (0.66 mg/ml) prepared from intact tissue-mitochondria.

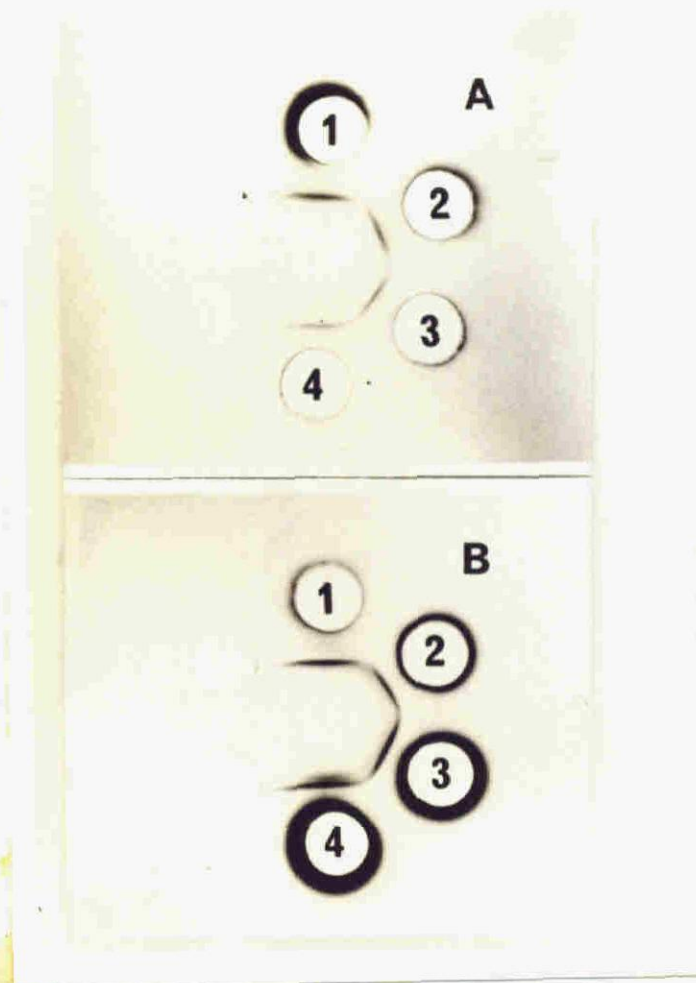


Fig. 3-7. Ouchterlony double immunodiffusion tests of Sup I from intact tissue. The plates were prepared with 0.8% agar in 20 mM Tris-acetate buffer, pH 7.5, containing 0.7% NaCl, 0.4% Triton X-100 and 0.01% NaN_3 . Each well was filled with 15 μl of a sample. After incubation for 40 h the plates were washed and then stained with Coomassie brilliant blue R. (A) Center well; immunoglobulin to cytochrome c oxidase: wells 1, 2, 3 and 4; 12, 6, 1.5 and 0.8 μg of purified cytochrome c oxidase, respectively. (B) Center well; immunoglobulin to cytochrome c oxidase: well 1; purified cytochrome c oxidase (6 μg): wells 2 and 3; the Sup I (22 μg): well 4; submitochondrial particles treated with 2% Triton X-100.

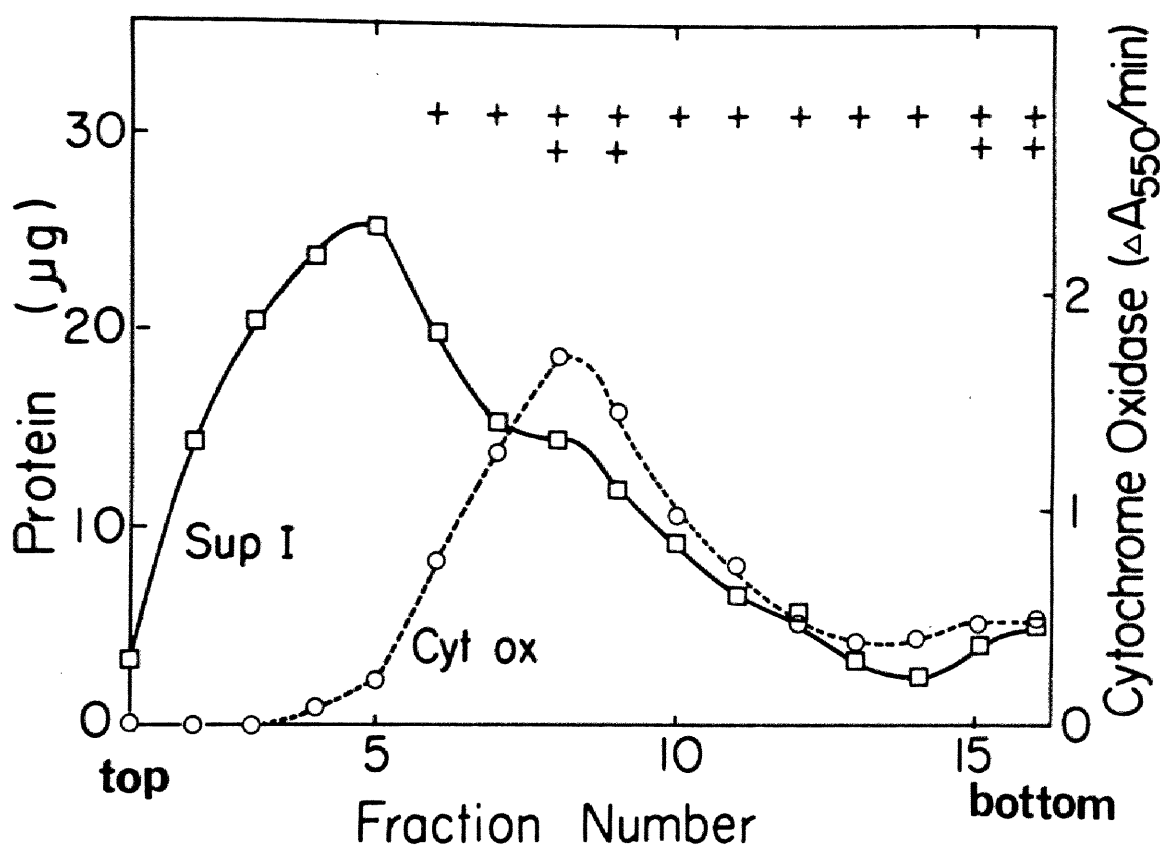


Fig. 3-8. Sucrose density gradient centrifugation of Sup I. Sup I (0.5 ml) and purified cytochrome c oxidase (0.5 ml) from intact tissue were separately loaded on 5-ml linear sucrose density gradients from 5 to 20% containing 0.1% Triton X-100 and 0.1 M KCl. After centrifugation at 40,000 rpm (115,000 g) for 14 h at 4°C, fractions were assayed for protein content (□) in the case of the Sup I and for cytochrome c oxidase activity (O) in the case of purified cytochrome c oxidase. +: Protein forming precipitin lines against anti-cytochrome c oxidase was detected by immunodiffusion tests with fractions from the Sup I.



Fig. 3-9. Ouchterlony double immunodiffusion tests of Sup I prepared from tissue slices aged for various periods. The plate was prepared as given in Fig. 3-7. Center well; immunoglobulin to cytochrome c oxidase: wells 1, 2 and 3; Sup I prepared from tissue slices (1 g) incubated for 0, 40 and 66 h, respectively.

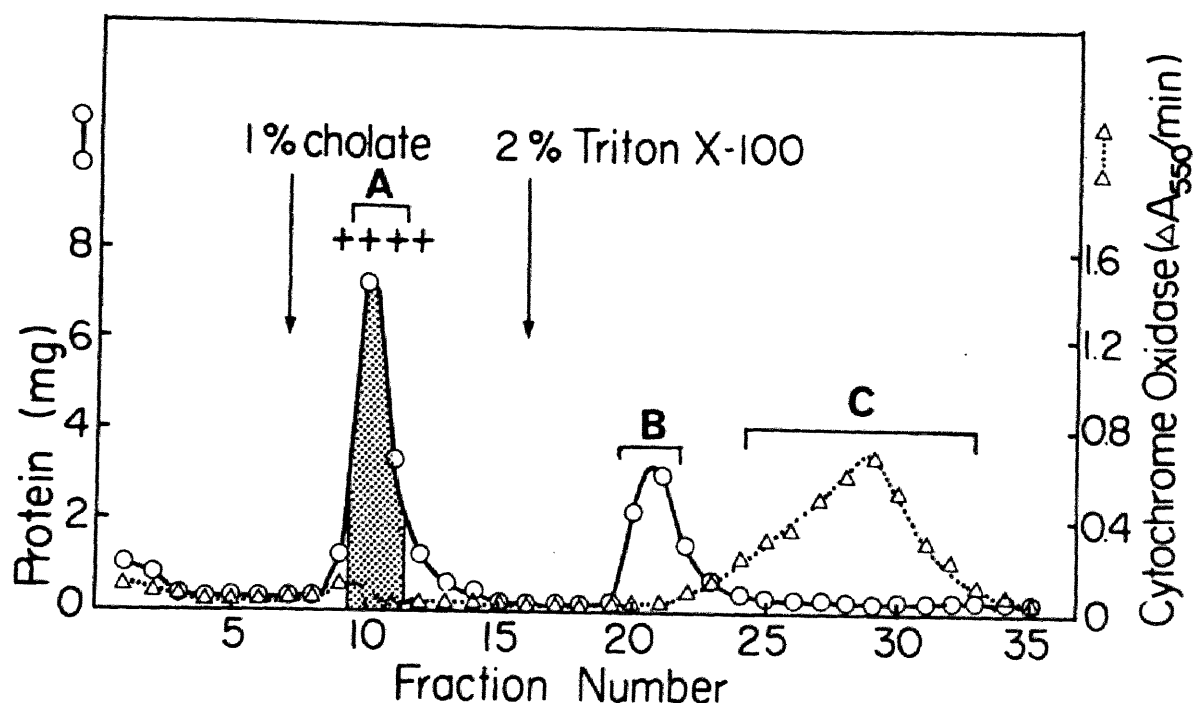


Fig. 3-10. Phenyl-Sepharose column chromatography of Sup I fraction from intact tissue. The Sup I fraction (40 ml) was dialyzed against 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.5, and applied to a phenyl-Sepharose column (1.2 x 2 cm). The column was washed with 20 ml of the same buffer containing 1% sodium cholate, and then with 45 ml of the buffer containing 2% Triton X-100. Each fraction (2.2 ml) was assayed for cytochrome c oxidase activity and protein content, and subjected to immunodiffusion test. +: fractions forming a precipitin line with anti-cytochrome c oxidase immunoglobulin.

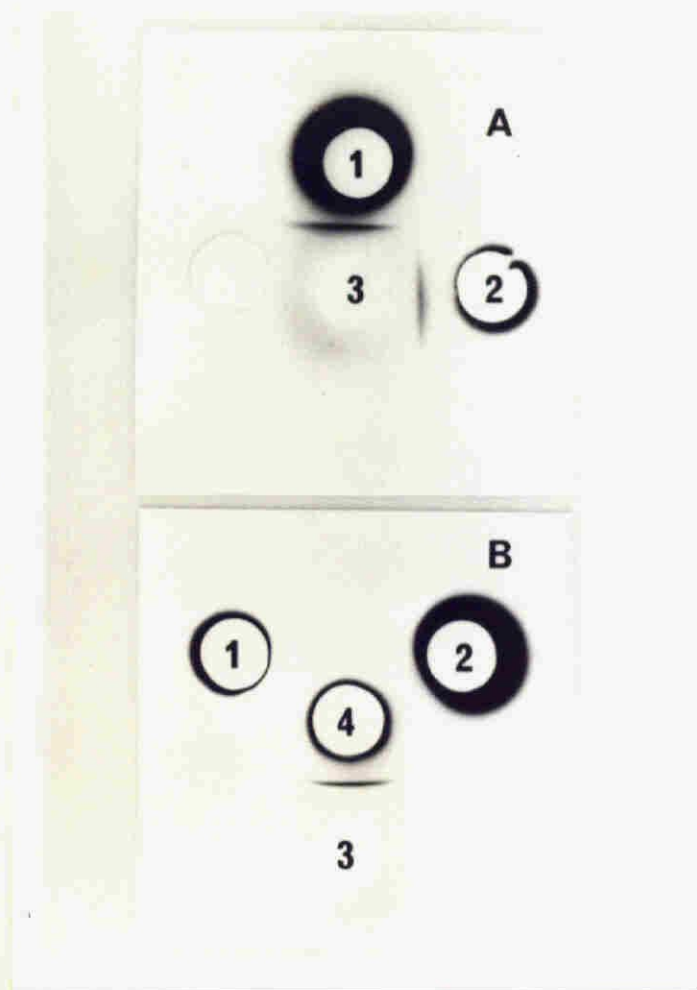


Fig. 3-11. Ouchterlony double immunodiffusion tests of "A" fraction. The plates were prepared as described under Materials and Methods. Each well was filled with 15 μ l of a sample. (A) Well 1, "A" fraction; well 2, purified cytochrome c oxidase; well 3, immunoglobulin to cytochrome c oxidase. (B) Antibody to cytochrome c oxidase was mixed with purified enzyme (5 μ g) or with "A" fraction (30 μ g protein) and then incubated for 1 h at 0°C. The mixture was applied into well 1 (antibody plus purified enzyme) or well 2 (antibody plus "A" fraction). Well 3, antibody with neither purified enzyme nor "A" fraction; well 4, purified enzyme. After incubation for 24 h. These plates were washed and stained with Coomassie brilliant blue.

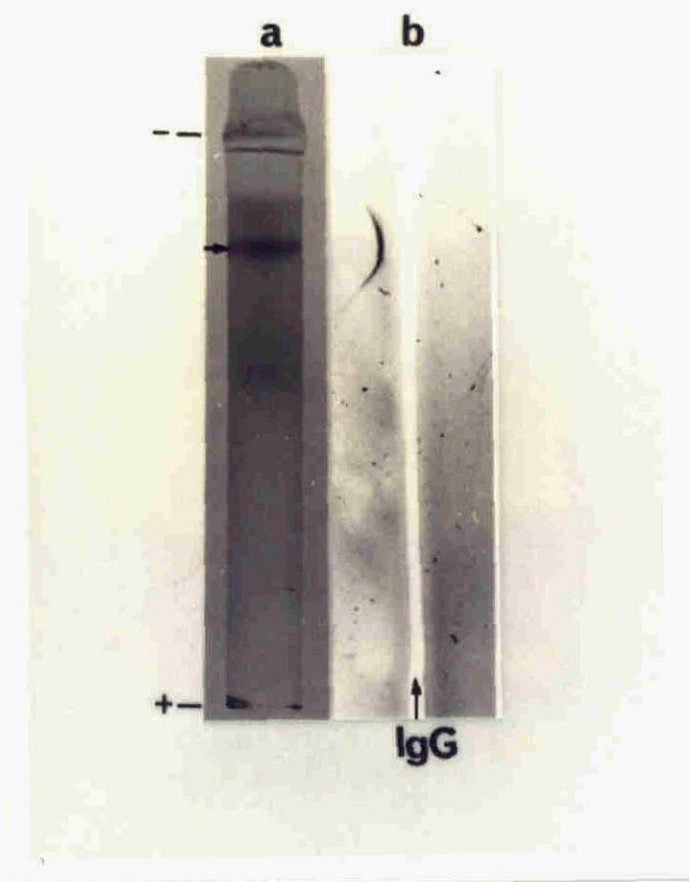


Fig. 3-12. Immunoelectrophoresis of fraction "A".

Fraction "A" was first subjected to electrophoresis on a 7.5% polyacrylamide gel, then the gel was cut lengthwise into two. The half of the gel (a) was placed on 0.8% agar plate along the groove (b) at intervals of 2 mm, which was filled with antibody to cytochrome c oxidase. The agar plate contained 0.7% NaCl, 0.4% Triton X-100, 0.01% NaN₃ and 20 mM Tris-acetate, pH 7.5. The plate was incubated at 25°C for 40 h and then stained with Coomassie brilliant blue after washing.

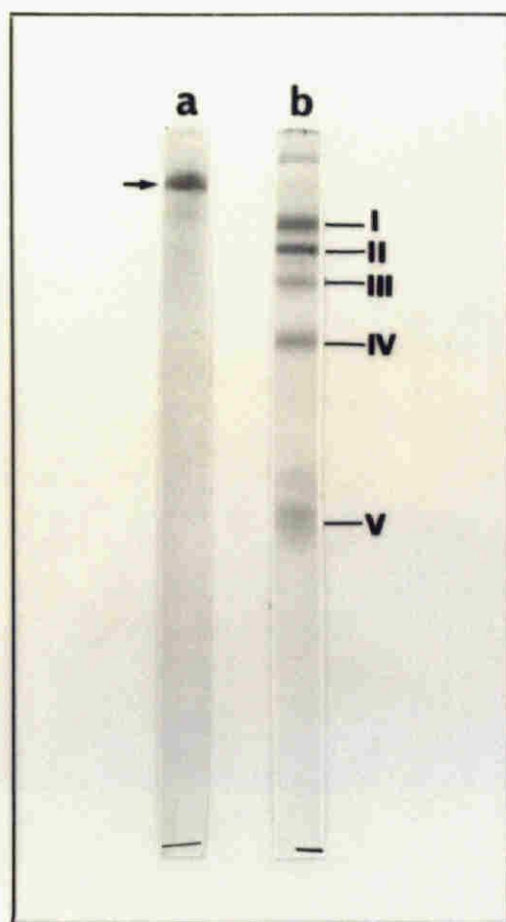


Fig. 3-13. SDS-urea polyacrylamide gel electrophoresis of X-protein and cytochrome c oxidase. Electrophoresis was carried out as described under Materials and Methods.

(a) The main protein band was cut out from polyacrylamide gel after electrophoresis of fraction "A" on the gel and staining with Coomassie brilliant blue, and then subjected to SDS-urea polyacrylamide gel electrophoresis. (b) Purified sweet potato cytochrome c oxidase (30 μ g).

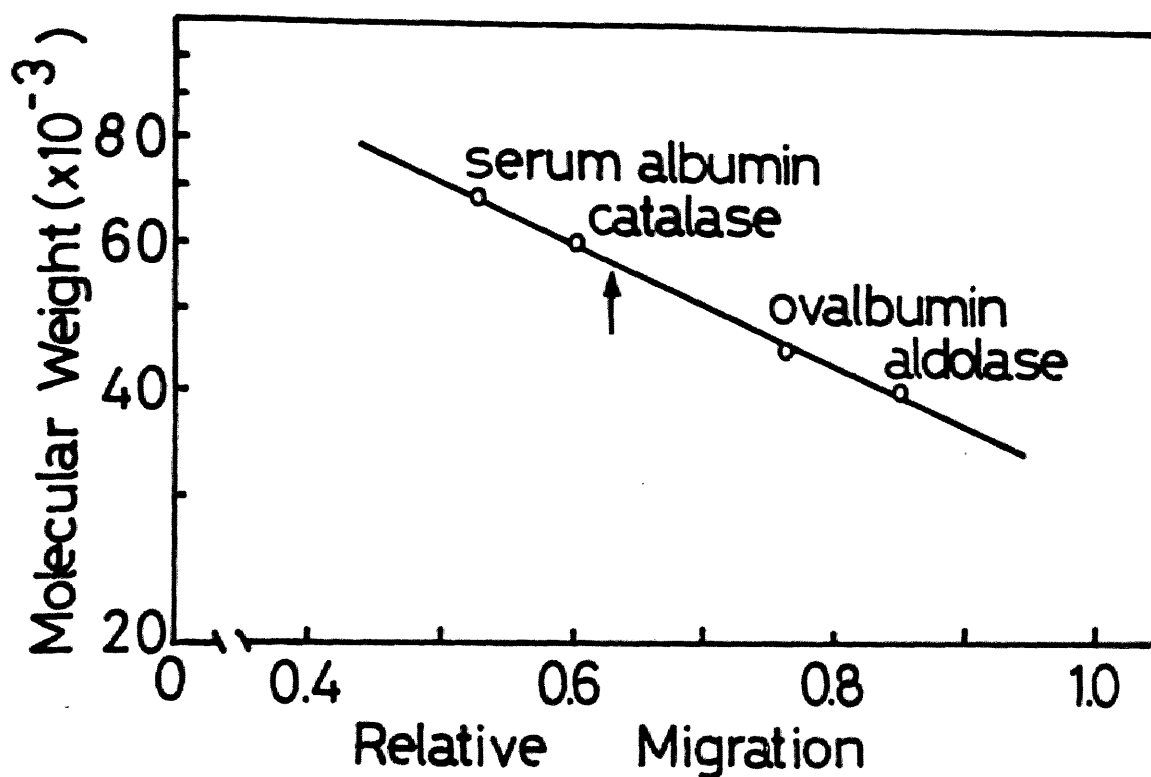


Fig. 3-14. Determination of the molecular weight of X-protein. Electrophoresis was carried out by the Laemmli's method (see Materials and Methods). Bovine serum albumin, catalase, ovalbumin and aldolase were used as molecular weight markers.

考 察

[Cytochrome ϵ oxidase の活性増加を説明する 3 つの考え方]

高等植物の貯蔵組織、例えばサツマイモ塊根やジャガイモ塊茎は、⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾ 傷害刺激に対して代謝変動を伴う様々な対応を示す。傷害に伴う呼吸活性の増加はその一面であり、“wound respiration” と呼ばれる。この wound respiration は主としてミトコンドリアの新生・形成による^(4, 140) ことが既に示唆されている。傷害組織ではミトコンドリアのタンパク質もリン脂質も活発に合成され、ミトコンドリア顆粒の数そのものが増加している。

ところが、この傷害組織でのミトコンドリア形成の場合には、内膜酵素のひとつである cytochrome ϵ oxidase の活性増加は、酵母等の例とは対照的に、細胞質でのタンパク質合成を必要⁽⁹⁾ としていない (図 1-1)。初め Asahi & Majima が発見したこの現象は、今回の実験で

けではなく、エチレンを含む空气中でインキ
ュベートした傷害組織においても確認された。⁽¹⁴²⁾
そこで、サツマイモ塊根の傷害組織においては、
酵母等で述べられているものとは多少異
なつた機構により cytochrome c oxidase の活性が
増加するものと考え、序論で述べたように三
つの可能性を考えた。

すなわち、(1) 本酵素の全てのサブユニッ
トはミトコンドリアで合成される。(2) 不活
性型の本酵素が傷害刺激により活性化される。
ミトコンドリアのタンパク質合成系がこの活
性化に関与する。(3) 健全組織の細胞内には
、細胞質由来のサブユニットまたはその前駆
体が過剰に貯えられている。以上の三つの仮
説である。本研究で(1)、(2)の可能性が否
定され、(3)の考え方が傷害組織における活
性増加を説明する機構であることが示された。

〔健全・傷害両組織の cytochrome c oxidase の比
較と酵素量の増加について〕

傷害組織ミトコンドリアに含まれる活性型の cytochrome c oxidase は、サブユニット組成、沈降係数、そして Ouchterlony の免疫反応テストにおいて健全組織の酵素と同じであった。さらに、ミトコンドリアを試料として両組織の cytochrome c oxidase の温度依存性を Arrhenius プロットしても同じ結果を得た (図 2-12)。

一方、ミトコンドリアの Sup II 画分についての分析結果から、この画分の cytochrome c oxidase に関しては、その各サブユニット量も補欠分子族のヘム a 含量も傷害に伴い 2 倍に増加していることが明らかになった。これは酵素活性の増加に並行している。よって傷害による cytochrome c oxidase 活性の増加は、健全組織のものと全く同じ酵素が量的に増加するためであるということが出来る。しかし、不活性型の cytochrome c oxidase が、健全組織の細胞の Sup II 以外の画分に存在しているかも知れない。もし存在するならば、酵素活性の増加に見合うだけ、つまり活性型酵素と同程度の不活性型

酵素が含まれているはずである。抗体を用いた実験結果は、小胞体、ポスト小胞体画分やミトコンドリアの可溶性画分には、検出し得るほどの不活性型酵素タンパク質は存在しないことを示した。そして、ミトコンドリアの SupI 画分にも、後に議論するように各サブユニットを備えた不活性型酵素は存在していなかった。したがって、不活性型酵素が傷害によって活性化されるという (2) の仮説は否定された。

〔活性増加に伴う cytochrome c oxidase サブユニットの生合成について〕

(1) または (2) の考え方に立てば、cytochrome c oxidase の一部または全てのサブユニットの生合成が傷害組織の中で行なわれていることになる。サツマイモ塊根の組織切片にアイソトープラベルしたアミノ酸を与えると、5種のサブユニットのうち3種 (I、II、III) にラベルが取り込まれ、傷害後これらのサブユ

ニットが新たに合成されていることが示された。ラベルした傷害組織からミトコンドリアを単離し、これを可溶化処理した後免疫拡散実験を行い、cytochrome ϵ oxidase 抗体との反応によって生じた沈降線の部分を切り出してみると、やはりここにもラベルが取り込まれていた。

そして、in vitro 実験によれば、単離したミトコンドリアは cytochrome ϵ oxidase の少なくとも一部のサブユニットを合成し得ることが示唆された。他方、細胞質のタンパク質合成は、傷害後の本酵素の活性増加には関与していないことが既に示されている。これらの結果から、cytochrome ϵ oxidase の5種のサブユニットのうち3種(I, II, III)が組織切断後新たに合成され、しかもそれらはミトコンドリア由来であろうと判断した。

(1) の考え方は、本酵素のサブユニットは全てミトコンドリアリボソーム上で合成されると仮定している。ところが、実際には3種

のサブユニットが合成されるに過ぎない。酵母等においては、ミトコンドリアで合成されるタンパク質としても種または8種(本酵素の3種のサブユニット、cytochrome *b*、ATPaseの2種または4種のサブユニット)^(58,60)が同定されている。高等植物の唯一の例であるキクイモ塊茎でも、ミトコンドリアは8~12種程度^(132,133)のタンパク質を合成しているに過ぎない。

ところで、細胞内には数十から数百個のミトコンドリアが存在し、各々がDNAをもっているため、その中の1個が変異しても次代に伝えられることは稀である。そして、(雌性側)の細胞のミトコンドリアDNAだけが子孫に継承される。こうした理由により、ミトコンドリアの遺伝子は進化の過程で比較的よく保存されてきたと考えられている。サツマイモ塊根においても、キクイモ塊茎と同程度の数のタンパク質がミトコンドリアタンパク質合成系に依存しているに違いない。事実、単離したサツマイモミトコンドリアによる *in vitro* タ

ンパク質合成の予備実験によれば、分子量1万~5万程度のタンパク質が12種合成された。したがって、サツマイモ塊根のミトコンドリアだけが、多数のタンパク質の遺伝情報をもっているとは考えにくい。以上に述べた理由により、cytochrome ϵ oxidaseの5種のサブユニット全てがミトコンドリアで合成されるとする(1)の可能性を否定できると考える。

〔健全組織ミトコンドリアのSupI画分およびX-タンパク質の性質について〕

(1)と(2)の考え方が否定されたので、(3)に示された機構に焦点を絞ることにした。健全組織のミトコンドリア膜タンパク質の中で、cytochrome ϵ oxidaseよりも可溶化しやすいものをSupI画分とし、ここに細胞質由来サブユニットの前駆体が存在するか否かを検討した。SupIにはcytochrome ϵ oxidase活性は殆んど含まれず、ヘム α も検出されなかった。にもかかわらず、SupI画分はcytochrome ϵ oxidase抗体

との間に明瞭な沈降線を形成し、ここに cytochrome ϵ oxidase と関連のあるタンパク質 (X-タンパク質) が含まれることが明らかになった。

健全組織ミトコンドリアの SupI 画分に含まれる X-タンパク質は次の性質をもっていた。

(a) X-タンパク質はヘム α や酵素活性をもたないが、免疫学的性質から判断して cytochrome ϵ oxidase と構造的な共通点をもっている。(図 3-6、3-7、3-11)。

(b) X-タンパク質はある程度の疎水性もち、ミトコンドリアの膜に比較的弱く結合している。その疎水性は、cytochrome ϵ oxidase や cytochrome bc₁ complex 程強くはない。(図 3-10)。

(c) X-タンパク質は cytochrome ϵ oxidase と異なり、SDS 処理をしなくても polyacrylamide ゲルに入り、他のタンパク質から分離することができ。そして、分離された X-タンパク質は分子量 57,000 の 1 本のポリペプチドであった。(図 3-8、3-12、3-13、3-14)。

(d) X-タンパク質は健全組織のミトコンド

リアに多く含まれ、組織切断後の時間経過にしたがってその量が減少し、3日後には殆んど検出されなくなる。(図3-9)。

このような性質をもったX-タンパク質は、cytochrome c oxidaseの細胞質由来サブユニットの前駆体であろうと推定した。

〔傷害組織における cytochrome c oxidase の合成機構〕

もしX-タンパク質が細胞質由来サブユニットの前駆体であるならば、傷害組織における本酵素の活性増加は次のように説明される。

サツマイモ塊根組織の cytochrome c oxidase は5種のサブユニットから成る。このうちサブユニットI、II、IIIはミトコンドリアで合成され、他のIVとVはX-タンパク質として細胞質で合成される。収穫後の貯蔵中の塊根、すなわち健全組織においては、おそらく各サブユニットの合成速度は非常に遅く、少しずつ合成され少しずつ分解されるという平衡状態

にあるものと推定される。なぜならば、急速な代謝回転は貯蔵デンプンや生体エネルギーの浪費となるからである。しかし、ここに傷害刺激が与えられると、ミトコンドリアのタンパク質合成は数時間の誘導期を経て活発化し、サブユニット I、II および III の合成が促進される。一方、健全組織のミトコンドリア膜に一定量貯えられていた X-タンパク質は、傷害刺激によってサブユニット IV と V への分解が促進される。疎水性が弱いと思われるこれらのサブユニットは、新たに供給された疎水性の高いサブユニット I、II、III およびヘム a や銅と会合することにより、活性型酵素として内膜に強く結合した状態になる。以上の考え方を図 3-15 に模式化した。
(142)

最近、Makimoto & Asahi は cytochrome c oxidase の活性変動に関して、次のような結果を得た。サツマイモ塊根の組織切片をエチレン (100 ppm) 存在下でインキュベートすると、本酵素の活性は健全組織に対して 3 倍以上に増加した。

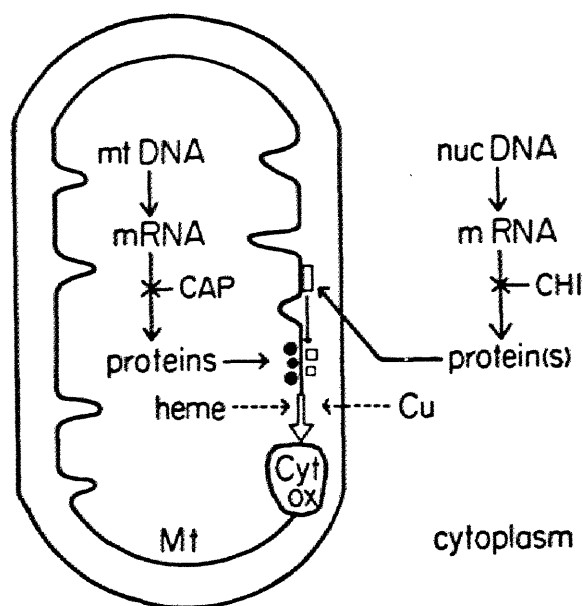


Fig. 3-15. Mechanism of cytochrome c oxidase biogenesis in aged sweet potato root tissue. nucDNA, nuclear DNA; mtDNA, mitochondrial DNA; Cyt ox, cytochrome c oxidase; CAP, chloramphenicol; CHI, cycloheximide.

しかし、cycloheximide で細胞質の合成系を阻害しておくと、エチレン処理をしない傷害組織と同様に2倍までは増加したが、それ以上増加することはないかった。このことは、健全組織にX-タンパク質は少なくとも活性を倍化するのに必要な量だけ貯えられているが、それ以上の量ではないことを示唆している。

一方、本酵素の形成機構に関するこの仮説では、 heme a の役割も大きいと仮定している。この点について、 heme a はチトクロム系タンパク質が内膜に組込まれる際の重要な役割を担っているという報告がいくつかある。例え

ば、ヘムを欠いた酵母は cytochrome b を合成⁽¹⁴³⁾するが、それが内膜に組込まれることはない。また、apocytochrome c がヘム c と結合して holocytochrome c を形成⁽¹⁴⁴⁾する際、膜に結合しやすい構造に変化するらしい。ヘム c_1 は cytochrome c_1 の生合成には影響しないが、cytochrome c_1 が内膜に組込まれる際の不可欠の因子とな⁽¹⁴⁵⁾っている。さらに cytochrome c oxidase の場合には、ヘム a は個々のサブユニットの合成に影響せず、それらがアッセンブリーして酵素を形成するステップで重要な役割を果し、ヘム a がなければ本酵素は内膜に組込まれないと報告^(146, 147)されている。酵素分子の中央に位置すると考えられるヘム a が、サブユニットの配列や酵素分子全体の形状に大きくかかわっていることは間違いないであろう。傷害組織においても、本酵素が正確に会合し内膜に組込まれる際にヘム a は不可欠であると考えられる。

〔他の生物における研究成果との比較〕

酵母 cytochrome c oxidase の細胞質由来のサブユニット (IV ~ VII)
 (122~126) の生合成に関して、Poyton らのグループは、それらがまず1本の "polyprotein precursor" (Pr_{IV-VII}、分子量 55,000) として合成されると述べている。この Pr_{IV-VII} は細胞質 (100,000g 1時間遠心後の上清画分) に存在する。Pr_{IV-VII} はサブユニット IV や VII に対する抗体と反応し、trypsin による分解産物はサブユニット IV、V、VI、VII のそれとよく一致し、またパルスラベル実験によれば経時的に Pr_{IV-VII} が減少し、IV ~ VII のサブユニットにラベルが移行する。この Pr_{IV-VII} と全く同じものがミトコンドリア内膜にも局在している。そして内膜には、分子量 48,000 (i_1) と分子量 37,000 (i_2) の Pr_{IV-VII} の中間体がある。以上の結果から、彼らは、Pr_{IV-VII} (細胞質) \longrightarrow Pr_{IV-VII} (ミトコンドリア内膜) \longrightarrow i_1 (内膜) \longrightarrow i_2 (内膜) を経てサブユニット IV ~ VII が合成され、内膜に局在化すると推定している。さらに、この Pr_{IV-VII} がサブユニット I ~ III の合成を特異的に促進すること

(148)

も見い出している。また、Ries らはラット肝臓を材料として、本酵素の細胞質由来サブユニットの前駆体と思われる分子量 50,000 のタンパク質が、小胞体画分に多量にあることを報告している。

これに対して、他のグループは、細胞質由来サブユニットは個々別々に合成されると反論している。^(127, 128) Lewin らは酵母 cytochrome c oxidase のサブユニット V と VI は、分子量が 3,000 または 7,500 大きな前駆体として別々に合成され、polyprotein precursor は存在しないと述べている。⁽¹²⁹⁾ Mihara & Blobel は酵母の細胞質の poly(A) RNA を用いた in vitro タンパク質合成実験により、サブユニット IV ~ VII は別々に合成されるという結果を得ている。IV、V、VI は分子量が 3,000 から 6,000 大きな前駆体として、VII ははじめから成熟サブユニットと同じ大きさを合成される。⁽¹³⁰⁾ ⁽¹³¹⁾ Schmelzer & Heinrich や Parimoo & Padmanaban も、ラット肝細胞を用いて in vitro タンパク質合成を行い、IV ~ VII のサブユニットが別々に合成され

るという結果を得ている。

同じ酵母でも異なった結果になる理由は不明であり、現在議論されている。もし別々に合成されるならば、ばらばらに合成されたサブユニットが細胞質から内膜へ輸送され、ひとつの酵素分子が形成されるまでの過程が説明されなければならぬ。Poyton らの考え方はその点説明しやすく、しかも P_{IV-M} がミトコンドリア由来サブユニットの合成を調節するという働きをもっている。本研究で見い出されたサツマイモ塊根のミトコンドリア膜に局在する X-タンパク質は、Poyton らの主張する P_{IV-M} と似たものであろうと考えている。

細胞質由来のサブユニットがいずれの機構で合成されるにしても、少なくとも合成されたものは成熟サブユニットよりも少し大きい。したがって、これをプロセッシングする酵素が必要である。ミトコンドリア膜画分にこうした分解酵素があることは、いくつかの研究室から報告されている。例えば、Luzikov らのグ

(149, 150)

(151~153)

(154)

ル-70、Heinrichらのグル-70、またHareが、ミトコンドリア内膜には細胞質のものとは異なつた特有のproteaseが存在することを確認している。もちろん、サブユニットのフォロセシニングに⁽¹⁵⁵⁾関与していることが証明されたわけではない。Aokiは、ラットの骨髓細胞のミトコンドリア膜画分からproteaseを単離・精製している。サツマイモ塊根のミトコンドリアにも同様の酵素が存在し、X-タンパク質の分解またはフォロセシニングに関与しているものと思われる。この点はまだ検討していない。

(156, 157)

さらに、Schatzらは、細胞質で合成された前駆体が成熟サブユニットにフォロセシニングされる際にはエネルギー、具体的にはミトコンドリアマトリックスのATP、が必要であるという興味ある結果を得ている。これは、ミトコンドリアATPaseおよびcytochrome bc₁ complexの細胞質由来のサブユニットについて確認された。

他方、ミトコンドリア由来のサブユニットについては、WernerらがN. crassaを材料とし

(158) (159)

て研究している。サブユニット I、II、および III はいずれも分子量が数千大きな前駆体として合成されると報告されている。それらの前駆体の半減期は数分以内で、合成されると直ちに酵素となって内膜に組込まれるらしい。これらのサブユニットは、その疎水性から考えて、ミトコンドリア内膜に結合したリボソームによって合成され、そのまま内膜に入っていくものと思われる。サツマイモ塊根での *in vivo* 実験 (図 3-4) では、ラベルされたタンパク質ピークは、成熟サブユニット I、II、III と同じ位置であった。しかし、たとえ分子量の大きな前駆体として合成されても、直ちにフロセシングされるためにこうした結果になったのかも知れない。

傷害刺激によって新たに合成されたミトコンドリア由来のサブユニットは、X-タンパク質のフロセシングの引き金になっていることも考えられる。そしてヘム a や銅と共に会合して酵素分子が形成されるものと推察される。

結 語

動植物を問わず生物は生命を維持するために酸素を必要とする。その酸素の大部分は、生体エネルギーを生産するために、cytochrome c oxidase によって消費される。Cytochrome c oxidase は化学的な意味で、生物と外界との接点に立っているといえる。サツマイモ塊根組織を材料として、この重要な酵素の構造と性質を検討した。さらに、傷害組織においてはミトコンドリアの新生・形成とともに本酵素の活性も上昇するので、この系を用いて生合成および形成の機構について考察した。

サツマイモ cytochrome c oxidase は、分子量の異なる5種のサブユニット (I ~ V) から成っている。各サブユニットが1個ずつ会合し、これにヘム a 2分子と銅原子2個が加わり活性型酵素を構成していると考えられる。ヘム a は特定のサブユニット (III, V) に結合

しているらしい。他の生物のものと比較した時のサツマイモ酵素の特徴は、サブユニット数が5種であること（他の多くは7種）、還元型吸収スペクトルの γ -吸収帯が他のものに比べて数nm短波長側に移っていること、そして至適pHがpH7.0～7.5にある点（他の多くはpH6.0付近）である。

本酵素はミトコンドリア内膜を貫通した形で局在し、高濃度の界面活性剤で可溶化される。内膜からはずし、精製することにより酵素活性は低下する。精製標品にリン脂質を加えて、再びリン脂質-酵素複合体を形成させると活性は回復する。非イオン性界面活性剤であるTween 80は、脂肪酸残基をもつためリン脂質の代用となり得、一方、Triton X-100は流動的で可塑的な疎水環境を形成することができず、かえって活性を阻害する。また、一般に膜酵素の活性の温度依存性は膜のリン脂質の流動性の変化の反映であるといわれているが、本酵素の場合は、必ずしもリン脂質の影

響は大きくないと考えられる。

次に生合成の機構について検討した。酵母等の cytochrome c oxidase は、細胞質で合成されるサブユニットとミトコンドリアで合成されるサブユニットから成り、いずれの合成系を阻害しても活性増加はみられなくなる。しかし、サツマイモ塊根の傷害組織における酵素活性の増加には、細胞質での合成系は必ずしも必要ではなく、酵母等とは異なった生合成機構が存在すると推察された。実験の結果次の点が明らかになった。

傷害組織での活性増加は、健全組織の酵素と全く同じものが量的に増すためである。その際すべてのサブユニットが合成されるのではなく、ミトコンドリア由来と思われるサブユニット（I、II、III）のみが合成される。他のIV、Vのサブユニットは前駆体として健全組織の細胞内に貯えられていると考えられる。本研究では、その前駆体と思われる X-タンパク質が、健全組織ミトコンドリアの内膜に弱

く結合していることを見い出した。X-タンパク質は、分子量 57,000 で、cytochrome c oxidase の抗体と反応し、組織切断後の時間経過にもなつてその量が減少する。X-タンパク質がサブユニット IV と V の前駆体であるならば、傷害組織での活性増加は次のように説明される。本酵素のサブユニット I ~ III はミトコンドリアで合成され、そして IV と V は X-タンパク質として細胞質で合成され、ミトコンドリア膜上に一定量貯えられる。健全組織におけるそれらの合成・分解はゆっくりしたものであろう。ここに傷害刺激が与えられると、サブユニット I ~ III の合成は促進され、X-タンパク質は IV と V へプロセッシングされる。各サブユニットはヘム a および銅原子と共に酵素分子を形成して内膜に組込まれ、これが活性増加として観察される。本酵素の重要性から考えて、細胞質由来のサブユニットを X-タンパク質として、ある程度の量を健全組織に貯え、異常状態に備えることは必ずしも不合理

ではない。

X-タンパク質のような前駆体は、酵母の酵素では polyprotein precursor として報告されているが、反論する研究者も多く論争中である。傷害植物組織の系においては、活性変動がゆっくりしているため、前駆体や中間体を捉えやすいと考えている。残された課題として、X-タンパク質がサブユニット IV と V の前駆体であることをより明確に証明し、それが具体的にどのような部位で合成されるのか検討する必要がある。

Cytochrome c oxidase の生合成機構に関する本研究の成果は、今後、高等植物におけるミトコンドリア形成の誘導機構、またミトコンドリア形成における核とミトコンドリア遺伝子の相互作用の機構を解明する上で、寄与できる点が多いと思われる。

REFERENCES

1. Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) Science 175, 720-731
2. Nass, M. K., Nass, S. and Afzelius, B. (1965) Experimental Cell Research 37, 516-539
3. Linnane, A. W. and Crowfoot, P. D. (1975) in Membrane Biogenesis (Tzagoloff, S., ed.) pp.99-124
4. Asahi, T., Honda, Y. and Uritani, I. (1966) Plant Physiol. 41, 1179-1184
5. Greksak, M., Asahi, T. and Uritani, I. (1972) Plant & Cell Physiol. 13, 1117-1184
6. Nawa, Y. and Asahi, T. (1971) Plant Physiol. 48, 671-674
7. Nawa, Y. and Asahi, T. (1973) Plant Physiol. 51, 833-838
8. Nakayama, N. and Asahi, T. (1978) Plant & Cell Physiol. 19, 51-60
9. Asahi, T. and Majima, R. (1969) Plant & Cell Physiol. 10, 317-323
10. Sakano, K., Hirai, M. and Asahi, T. (1971) Agr. Biol. Chem. 35, 953-955
11. Nakamura, K. and Asahi, T. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 174, 393-401
12. Sakano, K. and Asahi, T. (1971) Plant & Cell Physiol. 12, 417-426
13. 大塚公人 (1976) 名古屋大学大学院農学研究科修士論文
14. Sakano, K. and Asahi, T. (1971) Plant & Cell Physiol. 12, 427-436
15. Keilin, D. (1925) Proc. Roy. Soc. London, B98, 312-339
16. Keilin, D. (1966) The History of Cell Respiration and Cytochrome, Cambridge University Press, London
17. Okunuki, K., Sekuzu, I., Yonetani, T. and Takemori, S. (1958) J. Biol. Chem. 45, 847-854
18. Fowler, L. R., Richardson, S. H. and Hatefi, Y. (1962) Biochim. Biophys. Acta 64, 170
19. Weber, K. and Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
20. Mason, T. L., Poyton, R. O., Wharton, D. C. and Schatz, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1346-1354
21. Rubin, M. S. and Tzagoloff, A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4275-4279

22. Bücher, T., Neupert, W., Sebald, W. and Werner, S., editors (1976) The Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria, North-Holland Publishing Co., Amsterdam
23. Brown, G. G. and Beattie, D. S. (1978) Biochim. Biophys. Acta 538, 173-187
24. Sebald, W., Machleidt, W. and Otto, J. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 311-315
25. Werner, S. (1974) Eur. J. Biochem. 43, 39-48
26. Keyhani, J. and Keyhani, E. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 167, 588-595
27. Kuboyama, M., Yong, F. C. and King, T. E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6375-6383
28. Bücher, J. R. and Peniall, R. (1975) FEBS Lett. 60, 180-184
29. Phan, S. H. and Mahler, H. R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 257- 269
30. Penttilä, T., Saraste, M. and Wikström, M. (1979) FEBS Lett. 101, 295-300
31. Briggs, M., Kamp, P. F., Robinson, W. C. and Capaldi, R. A. (1975) Biochemistry 14, 5123-5128
32. Koch, G. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6097-617
33. Weiss, H., Lorenz, B. and Kleinow, W. (1972) FEBS Lett. 25, 49-51
34. Yamanaka, T., Fujii, K. and Kamita, K. (1979) J. Biochem. 86, 821-824
35. Sone, N., Ohyama, T. and Kagawa, Y. (1979) FEBS Lett. 106, 39-42
36. Hon-nami, K. and Oshima, T. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 1023-1029
37. Ludwig, B. and Schatz, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci, U.S. 77, 196-200
38. Boyer, P. D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. and Slater, E. C. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 955-1026
39. Papa, S. (1976) Biochim. Biophys. Acta 456, 39-84
40. Fillingame, R. H. (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 1079-1113
41. Moyle, J. and Mitchell, P. (1978) FEBS Lett. 88, 268-272
42. Moyle, J. and Mitchell, P. (1978) FEBS Lett. 90, 361-363
43. Wikström, M. and Krab, K. (1978) FEBS Lett. 91, 8-14

44. Bandlow, W., Schweyen, R. J., Thomas, D. Y. , Wolf, I. and Kaudwitz, F., editors (1976) *Genetics, Biogenesis, and Bioenergetics of Mitochondria*, Gruyter & Co., Berlin
45. Keyhani, E. Keyhani, J. (1977) in *Mitochondria 1977, Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W., Schweyen, R. J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) pp.523-532, Walter de Gruyter & Co., Berlin
46. Yamanaka, T. and Fukumori, Y. (1977) FEBS Lett. 77. 155-158
47. Fleischer, S. and Packer, L., editors (1978) Methods in Enzymology, Vol. 53
48. Fleischer, S. and Packer, L., editors (1979) Methods in Enzymology, Vol. 56
49. 奥貫-男教授退官記念会編 (1973) チトクロムの研究、東京大学出版会
50. Wilson, D. F. and Erecińska, B. (1979) in *The Porphyrins* (Dolphin, D., ed.) Vol. 7, pp.1-70, Academic Press, New York
51. Malmstrom, B. G. (1979) Biochim. Biophys. Acta 549, 281-303
52. Erecińska, M. and Wilson, D. F. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 188, 1-14
53. DePierre, J. W. and Ernster, L. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 201-262
54. Caughey, W. S., Wallace, W. J., Volpe, J. A. and Yoshikawa, S. (1976) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed.) Vol. 13, pp. 299-344, Academic Press, New York
55. Capaldi, R. A. and Briggs, M. (1976) in *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonosi, A., ed.) Vol.4 , pp.87-102, Plenum Press, New York
56. 折井 豊 (1975) 生化学. 47. 303-322
57. 折井 豊 (1975) 生化学. 47. 887-902
58. Tzagoloff, A. and Macino, G. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 419-441
59. Tzagoloff, A., editor (1975) *Membrane Biogenesis*, Plenum Press, New York
60. Schatz, G. and Mason, T. L. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 51-87
61. Birky, C. W., Jr. Perlman, P. S. and Byers, T. J., editors (1975) *Genetics and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, Ohio State University Press, Columbus.
62. Saccone, C. and Kroon, A. M., editors (1976) *The Genetic Function of Mitochondrial DNA*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam

63. King, T. E., Orii, Y., Chance, B. and Okunuki, K., editors (1979) Cytochrome Oxidase, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
64. Martin, T. G. and Ames, B. N. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1372-1379
65. Smith, L. (1955) in Methods of Biochemical Analysis (Glick, D., ed.) Vol. 2, pp.427-434, Interscience, New York
66. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
67. Dulley, J. R. and Grieve, P. A. (1975) Anal. Biochem. 64, 136-141
68. Chen, P. S., Toribara, T. Y. and Warber, H. (1956) Anal. Chem. 28, 1756-1758.
69. Yonetani, T. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1680-1688
70. Swank, R. T. and Munkres, K. D. (1971) Anal. Biochem. 39, 462-477.
71. Capaldi, R. A., Bell, R. L. and Branchek, T. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 425-433
72. Ozawa, T., Tada, M. and Suzuki, H. (1979) in Cytochrome Oxidase (King, T. E., Orii, Y., Chace, B. and Okunuki, K. eds.) pp.39-52, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
73. Rothman, J. E. and Kennedy, E. P. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 74, 1821
74. Nakashima, H. and Makino, S. (1980) J. Biochem. 88, 933-947
75. Ducet, G., Diano, M. and Denis, M. (1970) C. R. Acad. Sc. Paris, 270, 2288-2291
76. Matsuoka, M. and Asahi, T., submitted to J. Biochem.
77. Downer, N. W., Robinson, N. C. and Capaldi, R. A. (1976) Biochemistry 15, 2930-2936
78. Tracy, R. P. and Chan, S. H. P. (1979) Biochim. Biophys. Acta 576, 109-117
79. Höchli, L. and Hackenbrock, C. R. (1978) Biochemistry 17, 3712-3719
80. Merle, P. and Kadenbach, B. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 499-507

81. Wilson, M. T., Lalla-Maharajh, W. Darley-Usman, V.,
Bonaventura, J., Bonaventura, C. and Brunori, M. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 2722-2728
82. Josephson, M. and Brambl, R. (1980) Biochim. Biophys. Acta
606, 125-137
83. Orii, Y., Manabe, M. and Yoneda, M. (1977) J. Biochem. 81,
505-517
84. Fry, M., Blondin, B. A. and Green, D. E. (1979) Biochim.
Biophys. Acta 91, 192-199
85. 會根勇史, 柳田 豊, Hikle, P. C. (1980) 日本生化学会抄録, pp.571
86. Saraste, M., Penttillä, T., Coggins, J. R. and Wikstrom, M.
(1980) FEBS Lett. 114, 35-38
87. Eytan, G. D., Carroll, R. C., Schatz, G. and Racker, E.
(1975) J. Biol. Chem. 250, 8598-8603
88. Chan, S. H. P., Tracy, R. P. (1978) Eur. J. Biochem. 89,
595-605
89. Ludwig, B., Downer, N. W. and Capaldi, R. A. (1979)
Biochemistry 18, 1401-1407
90. Chance, B., Leigh, J. S. and Warring, A. (1977) in Structure
and Function of Energy-Transducing Membranes (Dam, K. and
Gelder, B. F., eds.) pp.1-10, Elsevier/North-Holland
Biomedical Press, Amsterdam
91. Bisson, R., Montecucco, C., Gutweniger, H. and Azzi, A.
(1979) J. Biol. Chem. 254, 9962
92. Fuller, S. D., Capaldi, R. C. and Henderson, R. (1979)
J. Mol. Biol. 134, 305-327
93. Poyton, R. O. and Schatz, G. (1975) J. Biol. Chem. 250,
752-761
94. Reed, C. A. and Landrum, J. T. (1979) FEBS Lett. 106,
265-267
95. Bisson, R., Jacobs, B. and Capaldi, R. A. (1980) Biochemistry
19, 4173-4178
96. Briggs, M. M. and Capaldi, R. A. (1978) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 80, 553-559
97. Bisson, R., Gutweniger, H., Montecucco, C., Colonna, R.,
Zanotti, A. and Azzi, A. (1977) FEBS Lett. 81, 147-150

98. Bisson, R., Azzi, A., Gutweniger, H., Colonna, R., Montecucco, C. and Zanotti, A. (1978) J. Biol. Chem. 253. 1874-1880
99. Birchmeir, W., Kohler, C. E. and Schatz, G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73, 4334-4338
100. Seiter, C. H. A., Margalit, R. and Perreault, R. A. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 86, 473-477
101. Erecinska, M. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 495-501
102. Gutteridge, S., Winter, D. B., Bruyninckx, W. J. and Mason, H. S. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 945-951
103. Tanaka, M., Haniu, M. and Yasunobu, K. T. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 1014-1019
104. Yu, C. A., Yu, L. and King, T. E. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 670-676
105. Werner, S. (1977) Eur. J. Biochem. 79, 103-110
106. Fry, M., Zande, H. V. and Green, D. E. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 75, 5908-5911
107. Fry, M. and Green, D. E. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 76, 2664-2668
108. Jacobs, E. E. and Sanadi, D. R. (1960) J. Biol. Chem. 235, 531-534
109. Brierley, G. P. and Merola, A. J. (1962) Biochim. Biophys. Acta 64, 205-217
110. Cuyper, M. D. E. and Joniau, M. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 397-405
111. Green, D. E. and Fry, M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 77. 1951-1955
112. Vik, S. B. and Capaldi, R. A. (1977) Biochemistry 16, 5755-5759
113. Robinson, N. C. and Capaldi, R. A. (1977) Biochemistry 16, 375-380.
114. Helenius, A. and Simons, K. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 29-79
115. Lyons, J. M. and Raison, J. K. (1970) Plant Physiol. 45, 386-389
116. Lyons, J. M. (1973) Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 445-466

117. Yamaki, S. and Uritani, I. (1974) Plant & Cell Physiol. 15, 669-680
118. Uritani, I. (1978) in Postharvest Biology and Biotechnology (Hultin, H. O. and Milner, M., eds.) pp.136-160, Food and Nutrition Press Inc., Connecticut.
119. Yoshida, S., Orii, U., Kawamoto, S. and Ikegami, A. (1979) J. Biochem. 86, 1443-1450
120. Kirino, Y., Anzai, K., Shimizu, H., Ohta, S., Nakanishi, M. and Tsuboi, M. (1977) J. Biochem. 82, 1181-1184
121. Robinson, N. C., Strey, F. and Talbert, L. (1980) Biochemistry 19, 3656-3661
122. Poyton, R. O. and McKemmie, E. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6763-6771.
123. Poyton, R. O. and McKemmie, E. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6772-6780
124. Poyton, R. O. and Groot, G. S. P. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 72, 172-176
125. Poyton, R. O. and McKemmie, E. (1976) in Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, T., Neupert, W., Sebald, W. and Werner, S., eds.) pp.207-214 North-Holland, Amsterdam
126. Poyton, R. O. and Kavanagh, J. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73, 3947-3951
127. Lewin, A. S., Gregor, I., Mason, T. L., Nelson, N. and Schatz, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 77, 3998-4002
128. Nelson, N. and Schatz, G. (1979) in Membrane Bioenergetics (Lee, C. P., Schatz, G. and Ernster, L., eds.) pp.133-152, Addison-Wesley, Reading, MA
129. Mihara, K. and Blobel, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 77, 4160-4164
130. Schmelzer, E. and Heinrich, P. C. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7503-7506
131. Parimoo, S. and Padmanaban, G. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 1673-1679
132. Leaver, C. J. and Pope, P. K. (1976) in Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants (Bogorad, L. and Weil, J. H., eds.) pp.213-237, Plenum Publishing Corp., New York

133. Forde, B. G., Oliver, R. J. and Leaver, C. J. (1979) Plant Physiol. 63, 67-73
134. Ouchterlony, O. (1953) Acta Pathol. Microbiol. Scand. 32, 231-241
135. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
136. Davis, B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427
137. Ornstein, L. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321
138. 加藤康之 (1980) 名古屋大学農学部卒業論文
139. Uritani, I. (1976) in Encyclopedia of Plant Physiology (Heitefuss, R. and Williams, P. H., eds.) Vol. 4, pp.509-525, Springer-Verlag, Berlin
140. Asahi, T. (1978) in Biochemistry of Wounded Plant Tissues (Kahl, G., ed.) pp.391-419, Walter de Gruyter & Co., Berlin
141. Uritani, I. and Asahi, T. (1980) in The Biochemistry of Plants (Davies, D. D., ed.) Vol. 2, pp.463-485 Academic Press, New York
142. Makimoto, N. and Asahi, T., submitted to Plant & Cell Physiol.
143. Clejan, L., Beattie, D. S., Gollub, E. G., Liu, K-P. and Sprinson, D. B. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1312-1316
144. Korb, H. and Neupert, W. (1978) Eur. J. Biochem. 91, 609-620
145. Ross, E. and Schatz, G. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1997-2004
146. Saltzgaber-Müller, J. and Schatz, G. (1978) J. Biol. Chem. 253, 305-310
147. Woodrow, G. and Schatz, G. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6088-6093
148. Ries, G., Hundt, E. and Kadenbach, B. (1978) Eur. J. Biochem. 91, 179-191
149. Galkin, A. V., Tsoi, T. V. and Luzikov, V. N. (1979) FEBS Lett. 105, 373-375
150. Kalnov, S. L., Novikova, L. A., Zubatov, A. S. and Luzikov, V. N. (1979) Biochem. J. 182, 195-202
151. Nagasawa, T., Nagasawa-Fujimori, H. and Heinrich, P. C. (1979) Eur. J. Biochem. 94, 31-39
152. Hass, R. and Heinrich, P. C. (1978) Eur. J. Biochem. 91, 171-178

153. Hass, R., Nagasawa, T. and Heinrich, P. C. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 1060-1065
154. Hare, J. F. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 1206-1215
155. Aoki, Y. (1978) J. Biol. Chem. 253, 2026-2032
156. Schatz, G. (1979) FEBS Lett. 103, 203-211
157. Nelson, N. and Schatz, G. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 76, 4365-4369
158. Werner, S. and Bertrand, H. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 463-470
159. Machleidt, W. and Werner, S. (1979) FEBS Lett. 107, 327-330

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、旭正先生には終始親身の御指導をしていただき、また研究発表の機会を与えて頂きました。そうしたことに励まされて研究者への道に歩み寄ることができました。心よりお礼申し上げます。

瓜谷郁三先生をはじめ生物化学研究室の皆様からは、研究の場と研究内容や実験技術等に関する多くの助言をいただきました。そして、赤沢堯先生、吉田昭先生、水島昭二先生には研究討論に参加していただき、貴重な御意見と御助言を頂きました。この場をかりて皆様方に厚く御礼申し上げます。

1981年1月27日

報 文 目 録

1. Masayoshi Maeshima and Tadashi Asahi (1978) Purification and Characterization of Sweet Potato Cytochrome c Oxidase.
Arch. Biochem. Biophys. 187, 423-430
2. Masayoshi Maeshima and Tadashi Asahi (1979) Sweet Potato Cytochrome c Oxidase: Its Properties and Biosynthesis in Wounded Root Tissue. in Cytochrome Oxidase (King, T. E., Orie, U., Chance, B., and Okunuki, K., eds.) pp. 375-382,
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
3. Masayoshi Maeshima, Tadashi Asahi and Ikuzo Uritani (1980) Effect of Temperature on the Activity and Stability of Plant Cytochrome c Oxidase. Agr. Biol. Chem. 44, 2351-2356
4. Masayoshi Maeshima and Tadashi Asahi (1981) Mechanism of Increase in Cytochrome c Oxidase Activity in Sweet Potato Root Tissue during Aging of Slices. submitted to J. Biochem.
5. Masayoshi Maeshima and Tadashi Asahi (1981) Presence of an Inactive Protein Immunologically Analogous to Cytochrome c Oxidase in the Inner Membrane of Sweet Potato Root Mitochondria. submitted to J. Biochem.

参 考 論 文 目 録

1. Masayoshi Maeshima, Ikuzo Uritani and Tadashi Asahi (1980)
Effect of Temperature on the Activities of Cytochrome c Oxidase
and Respiration in Cassava Root Mitochondria.
Agr. Biol. Chem. 44, 2493-2494
2. 前島正義, 旭 正 (1981) 葉緑体とミトコンドリア
の形成機構. 植物生理学 第4巻 代謝Ⅱ(旭正編集),
朝倉書店, 印刷中(4月発行予定)