

氏 名 深 尾 陽一朗

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第692号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Proteomic Studies on Peroxisomal Transition in *Arabidopsis*  
Cotyledons -Protein Phosphorylation Systems in Peroxisomes-

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 大隅 良典  
教授 飯田 滋  
教授 西村 幹夫  
名誉教授 旭 正（福井県立大学）

## 論文内容の要旨

In higher plants, it has been clarified that glyoxysomes contain enzymes for the fatty acid  $\beta$ -oxidation cycle and the glyoxylate cycle whereas leaf peroxisomes contain enzymes of the photorespiration pathway. Recently, the complete genome sequences of *Arabidopsis* were determined, and 25,498 genes were annotated in the genome. It is deduced from the genome search that 281 genes for proteins with peroxisomal targeting signals (PTS1 and PTS2) or proteins related to the functions of peroxisomes are present in the *Arabidopsis* genome. Also, recent data indicate that peroxisomal membranes are impermeable to small solutes, although it has not been identified the specific transporters for them. These data suggests that peroxisomes have novel proteins and they have novel functions. he performed the following experiments to clarify the novel functions of peroxisomes.

In Chapter 2, to clarify the peroxisomal membrane proteins (PMPs), he characterized one of the major PMPs, PMP38. The deduced amino acid sequence for its cDNA in *Arabidopsis* had high similarity with those of *Homo sapiens* PMP34 and *Candida boidinii* PMP47 known as homologues of mitochondrial ATP/ADP carrier protein. Cell fractionation and immunocytochemical analysis using pumpkin cotyledons revealed that PMP38 is localized on peroxisomal membranes as an integral membrane protein. Peroxisomes has been thought to be transported ATP into peroxisomes for various reactions, because ATP-synthesis pathways have not been found in peroxisomes. Also, the amount of PMP38 in pumpkin cotyledons increased and reached the maximum protein level after 6 d in the dark but decreased thereafter. Illumination of the seedlings caused a significant decrease in the amount of the protein. These results clearly showed that the membrane protein, PMP38 in glyoxysomes changes dramatically during transformation of glyoxysomes to leaf peroxisomes, as do the other glyoxysomal proteins, especially proteins of the fatty acid  $\beta$ -oxidation cycle, that are localized in the matrix of glyoxysomes.

In Chapter 3, to better understand the functions of leaf peroxisomes, he established a method for isolation of leaf peroxisomes from green cotyledons. And then, he performed proteomic analysis combined with 2-D gel electrophoresis and MALDI-TOF MS. He analyzed 53 proteins and identified 29 proteins. Among them, 19 novel proteins were identified except the known leaf peroxisomal proteins, suggesting that leaf peroxisomes contain novel proteins and functions.

In Chapter 4, to clarify the functions of glyoxysomes, he developed the method that he established in Chapter 3 to glyoxysomal proteomic analysis, and identified 19 proteins including 13 novel proteins. Especially, he analyzed serine/threonine protein kinase-like protein identified as one of the novel peroxisomal proteins in detail. He designated this protein peroxisomal protein kinase 1 (PPK1). It has been never proved that protein kinases are localized in peroxisomes. Also, it is a crucial point to confirm the localization of novel identified proteins for proteomic analysis of organelles. The analysis of suborganellar localization and protease sensitivity revealed that PPK1 is a glyoxysomal membrane protein and the putative protein kinase domain is located inside

of in glyoxysomes in Chapter 5. He measured the phosphorylation activity of endogenous PPK1 *in vitro* using glyoxysomes isolated from etiolated pumpkin cotyledons. He revealed that the 40 kDa protein was phosphorylated by PPK1 in glyoxysomes, supporting that peroxisome have sophisticated phosphorylation systems.

## 論文の審査結果の要旨

脂肪性種子植物の子葉に存在するペルオキシソームは、その生育環境によって、大きく機能転換することが知られているオルガネラである。発芽直後の黄化子葉には脂肪酸代謝に関わるグリオキシソームが、緑化子葉には光呼吸に関わる緑葉ペルオキシソームが存在する。しかしながら、近年決定されたシロイヌナズナの全ゲノム配列には、ペルオキシソーム機能に関与することが予想される遺伝子が 281 個存在している。このことは、ペルオキシソームには未同定の新規機能の存在を示唆している。

そこで申請者は、ペルオキシソームに局在するタンパク質を網羅的に解析するために、シロイヌナズナ子葉からの高精製度なペルオキシソーム単離系の確立を目指した。これまで植物ペルオキシソームは、カボチャ子葉など大きな器官を持つ植物より単離され、新規タンパク質や新規機能が同定されてきた。一方シロイヌナズナの場合、ペルオキシソーム単離系が確立されていないものの、解析のための手法が整備されており、新規タンパク質の同定から新規機能の解析を組織的に行うことができる。

本解析では、グリオキシソームと、緑葉ペルオキシソームを解析対象とし、それぞれ高い精製度で単離することに成功した。またこのサンプルを 2 次元電気泳動し、MALDI-TOF MS を用いて網羅的に解析したところ、13 個の新規グリオキシソームタンパク質、20 個の新規緑葉ペルオキシソームタンパク質を同定することに成功した。特に新規グリオキシソームタンパク質として同定された serine/threonine protein kinase は、peroxisomal protein kinase 1 (PPK1) と命名し、特異抗体を作製することでさらに詳細な解析を行った。オルガネラを用いたプロテオーム解析において、新規に同定されたタンパク質が実際そのオルガネラに局在することを確認することは、その実験の精度を証明する上でも非常に重要なポイントとなるためである。

解析の結果、確かに PPK1 はグリオキシソーム内膜に局在する表在性の膜タンパク質であることが明らかにされた。また kinase domain と予想される領域がグリオキシソーム内に存在した。これまでペルオキシソーム内におけるリン酸化機構の存在は全く知られていない。そこで、グリオキシソーム内における PPK1 のリン酸化についてさらに詳細な解析を行ったところ、グリオキシソームタンパク質はリン酸化を受けること、PPK1 が約 40kDa タンパク質のリン酸化を行っていることが示唆された。また、このリン酸化のための ATP の供給源として ATP transporter として働くことが予想される PMP38 がグリオキシソーム膜に局在することを明らかにした。

これらの結果は、ペルオキシソームにおいてタンパク質リン酸化による調節が働いていることを初めて明らかにしたものであり、ペルオキシソームの新規機能を解明する上で重要な発見を含んでいることから、本論文は学位論文として十分に価値があると判断した。なお、本論文に記載された成果の一部は、既に国際誌に 2 報の論文として発表されている。