

# ペルオキシソームATPasesの発見とその性質および生理機能

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/30562">http://hdl.handle.net/2297/30562</a>

ペルオキシソーム ATPases の発見と  
その性質および生理機能

清 水 栄

1995年 5月

博 士 論 文

ペルオキシソームATPasesの発見と  
その性質および生理機能

金沢大学大学院自然化学研究科

清水 栄

## 目次

ページ

## 第1章 序論

1-1	ペルオキシソームとは？	2
1-2	ペルオキシソームの形態	2
1-3	ペルオキシソームの起源(真核細胞の進化)	2
1-4	ペルオキシソーム形成(Biogenesis)	3
1-5	ペルオキシソームの誘導・増殖	3
1-6	ペルオキシソーム遺伝病	3
1-7	ペルオキシソームの生理機能	4
1-8	ペルオキシソーム膜における基質輸送(Transport)と タンパク移送(Import)のエネルギー共役機構(Bioenergetics)	6
1-9	最近の展開	7

## 第2章 ラット肝ペルオキシソーム調製とそのATPase

2-1	はじめに	15
2-2	ラット肝ペルオキシソームの調製とATPase活性	15
2-3	クロフィブレート投与ラット肝ペルオキシソームATPaseの性質	
2-3-1	至適pH	17
2-3-2	阻害剤感受性【1】	17
2-3-3	局在性	17
2-3-4	Km値	18
2-3-5	2価カチオン要求性	18
2-3-6	アニオンおよび1価カチオン要求性	18
2-3-7	基質特異性	18
2-3-8	阻害剤感受性【2】	19
2-3-9	可溶化・ゲルろ過クロマトグラフィー	19
2-3-10	ATPaseの部分精製	19
2-4	考察	20

## 第3章 ペルオキシソームATPaseはPMP70ではない。

3-1	はじめに	43
3-2	ペルオキシソームATPaseとPMP70の比較	
3-2-1	ペルオキシソームのproteinase K処理	43
3-2-2	anti-PMP70 IgGによる免疫沈降	43
3-2-3	可溶化ペルオキシソームの未変性ポリアクリルアミド 電気泳動	44
3-2-4	ペルオキシソーム可溶化ATPaseとPMP70の ゲルろ過クロマトグラフィー	44

3-3	考察	44
-----	----	----

## 第4章 ペルオキシソームPPaseの性質

4-1	はじめに	52
4-2	ペルオキシソームPPaseの検出およびクロフィブレート誘導	52
4-3	ペルオキシソームPPaseの性質	53
4-4	考察	54

## 第5章 ペルオキシソームATPasesの生理機能

5-1	はじめに	66
5-2	acyl-CoA oxidase移送	
5-2-1	温度依存性	67
5-2-2	時間およびATP依存性	67
5-2-3	ATPase阻害剤の影響	67
5-3	HSA-SKLの培養CHO細胞ペルオキシソームへの移送	
5-3-1	蛍光抗体法によるCHO細胞ペルオキシソームの検出	68
5-3-2	マイクロインジェクション法によるHSA-SKLの移送	69
5-3-3	ATPase阻害剤の影響	69
5-4	考察	69

## 第6章 まとめ

## 第7章 実験の部

7-1	第2章の実験の部	86
7-2	第3章の実験の部	88
7-3	第4章の実験の部	90
7-4	第5章の実験の部	91

## REFERENCES

## 謝辞

116



略語一覽

4PIs; four protease inhibitors (chymostatin, leupeptin, antipain, and pepstatin A).  
AOx; acyl-CoA oxidase.  
Bicine; *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine.  
BPB; bromophenol blue.  
BSA; bovine serum albumin.  
CBB; coomassie brilliant blue.  
CCCP; carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone.  
C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>; polyoxyethylene 9-lauryl ether.  
CHO; chinese hamster ovary.  
DCCD; *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide.  
DEHP; di(2-ethylhexyl)-phthalate.  
DHAP-AT; acyl-CoA: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase.  
DIDS; 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid.  
DMSO; dimethyl sulfoxide.  
DTT; dithiothreitol.  
FBS; fetal bovine serum.  
H-D; hydratase-dehydrogenase.  
HEPES; *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid).  
HMG-CoA; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA.  
HSA; human serum albumin.  
HSA-SKL; SKL motif-conjugated human serum albumin.  
HSP; heat shock protein.  
MBS; *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester  
MES; 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid.  
MOPS; 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid.  
NAGA;  $\beta$ -*N*-acetyl-D-glucosaminidase.  
NBD-Cl; 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.  
NEM; *N*-ethylmaleimide.  
NSF; NEM-sensitive factor.  
PAF; peroxisome assembly factor.  
PAGE; polyacrylamide gel electrophoresis.  
PAS; peroxisome assembly.  
PBS(-); phosphate-buffered saline without divalent cations.  
PCMPs; *p*-chloromercuriphenyl sulfonic acid.  
PMP70; 70kDa peroxisomal membrane protein.  
PMP; peroxisomal membrane protein.

PMSF; phenylmethanesulfonyl fluoride.  
PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor.  
PPase; inorganic pyrophosphatase.  
PPi; inorganic pyrophosphate.  
PPRE; peroxisome proliferator response element.  
PTS1; peroxisomal targeting signal 1.  
PTS2; peroxisomal targeting signal 2.  
RXR; retinoid X receptor.  
SCP-2; sterol carrier protein-2.  
SDS; sodium dodecylsulfate.  
SMP; submitochondrial particles.  
SEH; 0.25M sucrose, 0.1%(v/v) ethanol, 5mM HEPES-KOH pH7.4.  
SVE; 0.25M sucrose, 1mM EDTA, 0.1%(v/v) ethanol, pH7.4.  
SVEH; 0.25M sucrose, 1mM EDTA, 0.1%(v/v) ethanol, 5mM HEPES-KOH pH7.4.  
STA; silicotungstic acid.  
TBT; tributyltin.  
THCA; 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholestanoic acid.  
TMAH; tetramethylammonium hydroxide.  
TPBS; phosphate-buffered saline containing 0.05%(v/v) Tween 20.

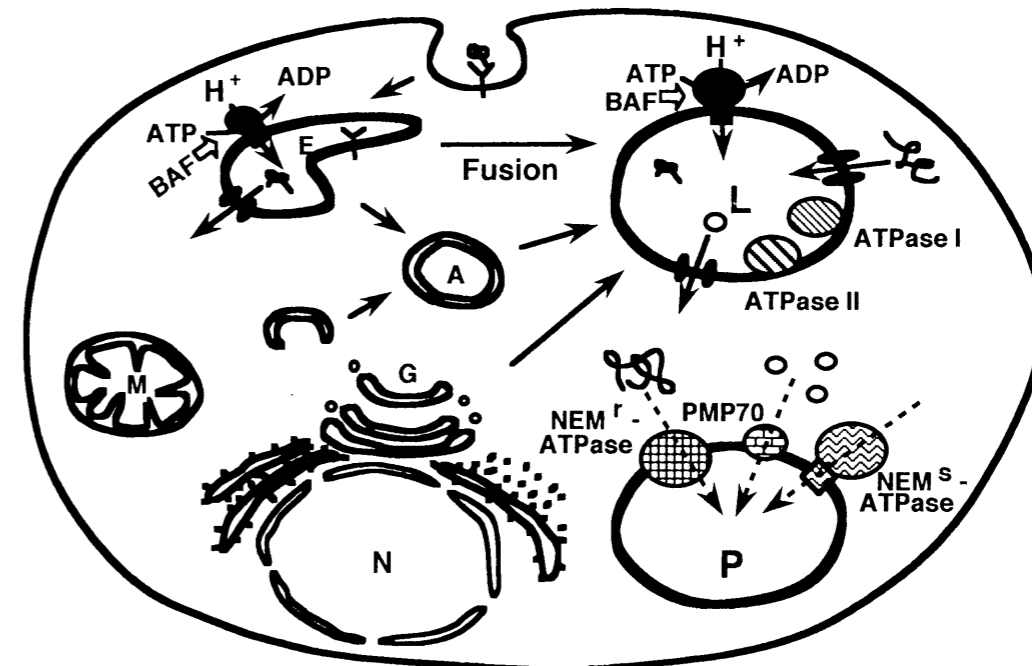
第1章 序 論

生体を構成する細胞はその細胞質内に膜で区画化されたそれぞれ特有の酵素を含むオルガネラを持ち、統制の取れた代謝を行うことにより恒常性維持が保証されている。このオルガネラは酵素など物質レベルと、より高度に組織化された細胞レベルの中間に位置し、生命を物質レベルで解きあかす糸口でもある。我々はこのオルガネラ膜を介する物質・タンパク輸送機構、更にその制御機構、並びにそのダイナミックスの解明を目的として研究している。

この細胞内オルガネラとして、遺伝情報をもつ核、エネルギー生産を行うミトコンドリア、内部に多くの酸性加水分解酵素を含むリソソーム、タンパク合成を行う粗面小胞体、外因性物質の酸化的代謝や脂質合成を行う滑面小胞体、タンパクの翻訳後の修飾を行うゴルジ体、小胞輸送を担うエンドソーム・分泌顆粒、細胞内タンパク分解を担うオートファゴソームなどが存在する。これら以外に、真核細胞に広くペルオキシソームが存在するが、本論文ではこのペルオキシソームについて第1章で概説すると共に、第2章以下に我々が発見した*N*-ethylmaleimide(NEM)感受性、非感受性2種のペルオキシソームATPases(1, 2)とPPase(3)について述べ、その機能について考察する。

真核細胞の模式図をScheme 1-1に示す。

**Scheme 1-1. Possible participation of ATPases in substrate and protein translocation in rat liver peroxisomes**



L, lysosome; P, peroxisome; E, endosome; A, autophagosome;  
 G, Golgi apparatus; N, nucleus; M, mitochondrion;  
 ←BAF, inhibition by bafilomycin A<sub>1</sub>; P, protein; O, substrate.

### 1. 1 ペルオキシソームとは？

1954年、Rhodinはマウス腎尿細管細胞質中に小顆粒を発見し、形態学的にミクロボディーと命名した。1965年、De Duveらはラット肝細胞中に、尿酸オキシダーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼおよびカタラーゼを含む新しいオルガネラを発見し、過酸化水素を生成する酸化酵素と、この有毒な過酸化水素を分解するカタラーゼを含む単層の膜で囲まれたこの顆粒を機能的名称としてペルオキシソームと呼ぶことを提唱した(4, 5)。すべての真核細胞に見られる細胞内小器官(オルガネラ)の1種であり、細胞の種類によりサイズ、数および代謝機能が異なる。発芽ゴマ種子中のミクロボディーはグリオキシル酸サイクルの酵素も含まれることからグリオキシソームと呼ばれる(6, 7)。原虫トリパノソーマのグリコソーム(8, 9)も含めて一般的総称”ミクロボディー”と呼ばれ、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体および空胞系オルガネラ(分泌顆粒、エンドソーム、リソソームなど)と区別されている。

### 1. 2 ペルオキシソームの形態

肝・腎臓細胞のペルオキシソームは0.5-1.0 $\mu$ mであり、ヒト皮膚上皮細胞ではやや小さく0.05-0.2 $\mu$ mである(10)。嚙歯類肝ペルオキシソームには主として尿酸オキシダーゼより成る特徴的結晶性コア構造がみられる(11)。メタノール資化酵母においてはアルコールオキシダーゼをふくむ大きな構造体が認められる(12)。ペルオキシソームは電顕により球状体として検出されるが、連続切片による3次元観察によるとラット再生肝(13, 14)、マウス肝(15)および脂肪腺(16)では管状構造により互いを連結しているペルオキシソーム小胞体と言ふべき構造を取っている。また、カタラーゼやD-アミノ酸オキシダーゼ染色によりヘテロなペルオキシソーム構造が示唆されている(17, 18)。

### 1. 3 ペルオキシソームの起源(真核細胞の進化)

1965年De Duveらは密度勾配遠心法による細胞分画法で新オルガネラとして酸性ホスファターゼを含有するリソソームと同時に、尿酸オキシダーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼおよびカタラーゼを含むペルオキシソームの存在を生化学的に証明した(4, 5)。これだけではミトコンドリア以前の原始的呼吸鎖を残した化石のオルガネラとして冷遇される運命にあったが、その後1976年に脂肪酸の $\beta$ 酸化系がLazarowとDe Duveにより発見され(19)、脂質代謝を主流としてペルオキシソームの機能を追求する研究が広がっていった。かくしてその発見以来約30年を経て、ペルオキシソームは後述のように様々な生理的機能を果たす事が示され、必須の細胞内オルガネラであることは疑いもない。ペルオキシソームの起源は、嫌気的前核細胞に原始的呼吸鎖( $O_2 \rightarrow H_2O_2 \rightarrow H_2O$ )を持ったものが共生したものとDe Duveにより推定されている(20)。この様な

真核細胞の進化は証明すべくもないが、なぜペルオキシソームの酵素の多くが前核細胞に存在しミトコンドリアに存在しないのか、ペルオキシソームが必須のオルガネラとしてミトコンドリアと共に生き残ったのか興味の尽きないところである。

### 1. 4 ペルオキシソーム形成(Biogenesis)

ペルオキシソームは規存のオルガネラが成長・分裂して生成すると言われている(21-23)。ペルオキシソームにはDNAは含まれておらず(24)ペルオキシソームタンパクは核にコードされており、細胞質中のフリーポリゾーム上で合成され(25-27)、小胞体から出芽・分裂して生ずると推定されている規存ペルオキシソームに翻訳後移送される(28)。大部分のペルオキシソームタンパクはマチュアーサイズで合成され移送に伴う分解を受けない。ペルオキシソーム局在性のチオラーゼ(29-31)、アシルCoAオキシダーゼ(31, 32)、非特異的sterol carrier protein-2(SCP-2)(33, 34)は移送後ミトコンドリアにおけるタンパクと同様、タンパク分解を受ける。このうちアシルCoAオキシダーゼは分解産物とのオリゴメリック複合体として機能する。チオラーゼおよびSCP-2は分解によりマチュアー型となる。

### 1. 5 ペルオキシソーム誘導・増殖

高脂血症治療薬、プラスチック可塑剤、高脂肪食により嚙歯類動物においてペルオキシソームが誘導・増殖することが認められている。脂肪酸酸化系酵素などは10数倍にのぼるとされている(35-37)。メタノール、炭化水素、脂肪酸を炭素源として利用できる酵母でもペルオキシソームの顕著な増殖が観察される(38)。プラスチック可塑剤のジエチルヘキシルフタル酸(DEHP)はペルオキシソーム誘導の結果、過酸化水素など酸素ストレスの上昇により8-オキシグアニンを生成することが確認され、直接遺伝物質を攻撃しない発ガン機構が考えられている(39)。

### 1. 6 ペルオキシソーム遺伝病

ヒトにおいてペルオキシソーム欠損あるいはその機能障害を持つ遺伝性疾患が知られており3群に分類されている(40, 41)。A群にはペルオキシソーム欠損症であるZellweger(cerebro-hepato-renal)症が知られており、本症の患者は生後数ヶ月で死亡する。ペルオキシソームはその膜構造体(ペルオキシソームゴースト)として存在し(42, 43)、カタラーゼなどの内在性酵素を含まずカタラーゼは細胞質に存在する(44)か、もしくは分解され(45, 46)、正常なペルオキシソームが形成されない疾患である。さらに最近、ヒトペルオキシソーム欠損症の相補性群解析が日本、アメリカ、オランダにおいてなされ、かつそれら相互のおよびCHO変異細胞との相補性が明らかにされた。B群はペルオキシソームは存在するが複数のペルオキシソーム酵素の欠損症であり、C群

は単一酵素の欠損症であり、極長鎖脂肪酸リガーゼ欠損のX-linked adrenoleukodystrophy症(47)、アシルCoAオキシダーゼ欠損症、チオラーゼ欠損症、アカタラセミア(48)などが知られている。Zellweger症は多くの器官に著しい奇形を随伴しており、そのことはペルオキシソームが器官の発達に重要な役割を演じていることを示唆する。神経細胞移動とガイドワイヤの役割をするradial gliaの関係において、グリアは神経細胞よりペルオキシソームを多く含み、成熟脳より発達中の脳により豊富に存在する。ペルオキシソームの器官形成への関与、神経細胞移動障害の機構、脳成熟過程などの解明が待たれる。

## 1. 7 ペルオキシソームの生理機能

ペルオキシソームは様々な代謝経路を触媒する40種以上のマトリックス酵素を含んでいる。即ち、極長鎖脂肪酸 $\beta$ -酸化系、胆汁酸やプラズマローゲンの生合成などである(Table 1-1)。以下にその例を示す。

### 1.7.1 脂肪酸 $\beta$ -酸化系

LazarowとDe Duveによりラット肝ペルオキシソームにミトコンドリアの系とは異なる脂肪酸 $\beta$ -酸化系が存在することが示された(19, 49)。ヒトペルオキシソーム異常症において極長鎖脂肪酸蓄積がみられる。この事はペルオキシソーム脂肪酸 $\beta$ -酸化系の基質特異性がミトコンドリアに比較して極長鎖脂肪酸に高いこと(50)と一致する。従ってミトコンドリア $\beta$ -酸化系は比較的低級脂肪酸を酸化しエネルギー生成に寄与していると推定される。一方、ペルオキシソームにおいては電子伝達系や酸化的リン酸化系が存在せず、長鎖あるいは極長鎖脂肪酸を低級脂肪酸にまで酸化分解し、ミトコンドリアに送るものと考えられる(51, 52)。その反応様式の特徴は第1段階の脱水素反応がacyl-CoA dehydrogenaseではなくacyl-CoA oxidaseで触媒される点である。本酵素はフラボタンパクであり、還元当量を直接分子状酸素にわたし過酸化水素を生ずる。次の水付加、脱水素反応は78kDaのbifunctional enzyme(二頭酵素; 現在はenoyl-CoA isomerase活性も見出され三頭酵素と呼ばれている)により触媒される。最後にチオラーゼによる分解反応により炭素2個短いacyl-CoAとacetyl-CoAを生じ、1サイクルを終える。

脂肪酸のCoA誘導体への変換はペルオキシソーム膜ペリプラズム表面上の長鎖脂肪酸リガーゼ(53, 54)とペルオキシソーム膜マトリックス側の極長鎖脂肪酸リガーゼ(55, 56)の2種が知られているが、カルニチン依存性はなく、その詳細な輸送機構は明かではない(エネルギー依存性については1. 8に後述)。ペルオキシソーム膜は分子量約800以下の低分子化合物に対し透過性であり(57)、このことによりペルオキシソーム調製時sucroseあるいはNycodenz密度勾配遠心法で高密度画分にペルオキシソームのみが沈降するものと考えられている。

### 1.7.2 胆汁酸代謝

$3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxy- $5\beta$ -cholestanoic acid (THCA)、 $3\alpha, 7\alpha$ -dihydroxy- $5\beta$ -cholestanoic acid (DHCA)は小胞体上のCoA ligaseにより活性化された後(58, 59)、ペルオキシソーム局在性THCA-CoA oxidaseによりコール酸誘導体へ変換( $\beta$ -酸化)される(60-62)。タウリンあるいはグリシン抱合反応もペルオキシソームにおいて行われる(63, 64)。脂肪酸 $\beta$ -酸化系酵素(2頭酵素あるいはチオラーゼ)欠損症においてTHCA蓄積が認められることから同酵素も胆汁酸代謝に関わるものと推定される。

### 1.7.3 その他の代謝物の酸化

不飽和脂肪酸(65)、ジカルボン酸(66)の代謝に関わる酵素もペルオキシソームに見いだされている。フィタン酸分解物のプリスタン酸も存在する(67, 68)。外因性生体異物(xenobiotics)のアシル側鎖の $\beta$ -酸化による分解も知られている(69)。プロスタグランジン $F2\alpha$ 、E2、ロイコトリエンの $\beta$ -酸化もペルオキシソーム内で行われる(70-72)。 $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxy- $5\beta$ -cholestaneをcholestane tetrolに $\omega$ -酸化する活性もペルオキシソームに見出されている(73)。L-リシンの中間代謝物のピペコリン酸の増加がZellweger症の血漿と尿で認められ、ピペコリン酸酸化酵素の細胞内局在は種特異的であり、ラットやウサギではミトコンドリア、ヒトなど霊長類ではペルオキシソームであることが明らかにされている(74, 75)。

### 1.7.4 コレステロール生合成

コレステロール生合成は少なくとも25段階の酵素反応により生合成される。 $3$ -hydroxy- $3$ -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)はacetyl-CoAとacetoacetyl-CoAより細胞質で合成されると考えられているが、ペルオキシソームチオラーゼによってもacetoacetyl-CoAは合成される(76)。メバロン酸を生成するHMG-CoA還元酵素はコレステロール生合成の律速酵素であり、ラット肝細胞の小胞体膜とペルオキシソームマトリックスに存在する(77, 78)。SCP-2はコレステロール合成や脂質の細胞内輸送に機能すると考えられており、ラット肝細胞の細胞質と共にペルオキシソームにも見いだされていること(79, 80)から、ペルオキシソームがコレステロール生合成に重要に関わっている可能性が考えられる。

### 1.7.5 エーテルリン脂質生合成

エーテルリン脂質であるプラズマローゲン(1-0-alk-1'-enyl-2-acylphosphoglycerides)は神経ミエリン鞘の80%以上を構成している。この生合成の初発酵素はacyl-CoA: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)であり、ペルオキシソーム膜タンパクでマトリックス側に触媒部位

を持つ酵素である(81, 82)。alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthaseはアシル基と長鎖アルコール交換反応を触媒し、ペルオキシソーム膜に局在する(83)。alkyl/acyl dihydroxyacetone phosphate oxidoreductaseは小胞体(30%)とペルオキシソーム膜細胞質側(70%)に存在する(84)。以後、プラズマローゲンは小胞体で合成される。このエーテルリン脂質の生理的役割はラジカル・スカベンジャーとして酸素ストレスからの保護(85, 86)や、アラキドン酸の貯蔵(87)や、血小板活性化因子(88)などが考えられ、またZellweger症においてプラズマローゲンの極度の減少が知られていることより神経系の発達に重要に関わっているものと推定される。

## 1. 8 ペルオキシソーム膜における基質輸送(Transport)とタンパク移送(Import)のエネルギー共役機構(Bioenergetics)

我々はペルオキシソーム膜上にNEM感受性および非感受性の少なくとも2種のATPasesが存在することを明らかにした(1, 2)。一方、70kDaペルオキシソーム主要膜タンパク(70 kDa peroxisomal membrane protein; PMP70)のcDNAクローニングの結果よりATP結合ドメインを持つことが明らかにされた(89)が、ATPase活性を持つかどうかは解明されていない。我々はペルオキシソームの2種のATPasesがいずれもこのPMP70に依らないものであることも明らかにした(2)。以下に記すように基質輸送あるいはタンパク移送におけるエネルギー依存性が報告されているが、その機構はまったく解明されておらず、我々の発見したATPasesが関与するのかどうか、その解明が期待される。

### 1.8.1 基質輸送

単離あるいはホモジネート中のペルオキシソームはDe Duveらによるその発見の当初からsucroseなど低分子に対し非特異的に透過性であることが示唆されていた。さらにD-amino acid oxidase、L- $\alpha$ -hydroxyacid oxidase、urate oxidaseについてそのペルオキシソーム構造関連潜在性(structure-linked latency)が低く、ペルオキシソーム内在性の酵素の基質透過性が指摘されている(90, 91)。この事は22kDaペルオキシソーム真在性膜タンパクのリポソーム再構成系あるいは脂質単分子膜系において分子量約800以下の低分子(sucrose、ATP、 $\text{NAD}^+$ 、CoA)が透過性であることと一致する(57, 92)。即ち、核膜やミトコンドリア外膜と同様ポア構造(直径 1.5-3 nm)を形成していると推定される。これに反し、ラット肝ホモジネートあるいは軽ミトコンドリア画分( $\lambda$ フラクション)(93, 94)において、あるいはジギトニン処理によるpermeabilized細胞(95)において、acyl-CoA oxidaseやDHAP-AT活性がATPにより活性化をうけることが報告されている。従って、acyl-CoAの様な比較的高分子量のものの透過性については更に検討が必要であり、また基質輸送における単離ペルオキシソームの無傷性(intactness)や細胞質因子の関わりなど解明さ

れなければならない。

### 1.8.2 タンパク移送

ミトコンドリアあるいは小胞体に於けるタンパク移送機構研究は多いが、ペルオキシソームについては少なく、*in vitro*でのタンパク移送系はacyl-CoA oxidaseについて(96)のみ報告されているだけであり、その詳細な機構は不明である。ペルオキシソームタンパクの移送機構についてシグナルおよびエネルギー依存性が知られており、少なくとも3種の機構の存在が推定できる。第一に、acyl-CoA oxidaseや多くのペルオキシソームタンパクのターゲティングシグナルとしてC-末端トリペプチド(Ser/Ala/Cys-Lys/Arg/His-Leu)配列が同定され、動物細胞の他、植物、昆虫、酵母などにおいて高度に保存されている事が判明した(97-102)。このSKL-motifはperoxisomal targeting signal 1 (PTS1)と呼ばれている。カタラーゼ移送にはアンホールディングが必要であり、細胞質heat shock protein (HSP)の関与が示唆されている(103)。また、四量体へのアッセンブリー後ペルオキシソームへの移送が行われる可能性も示された(104)。第二に、チオラーゼについてN-末端約26残基が分解除去されるシグナルとして働いている(105-108)。このN-末端シグナル配列はPTS2と呼ばれ、sterol carrier protein-2においても見られる。第三に、ペルオキシソーム膜タンパクについてはこのようなシグナルは同定されていないが、アッセンブルとインテグレーションの2段階が推定されている(109)。また、Zellweger症fibroblastにluciferaseあるいはSKL-albuminをマイクロインジェクションするとペルオキシソームに移送されないことより、本症がタンパク移送機構欠損症であろうと推定されている(110) [Table 1-2]。

## 1. 9 最近の展開

最近、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Yarrowia lipolytica*、*Hansenula polymorpha*等のペルオキシソーム欠損酵母を用いた遺伝子工学による研究が盛んに行われている。*S. cerevisiae*ペルオキシソーム欠損株の解析からN-ethylmaleimide-sensitive factor(NSF)などと相同性のあるATP結合サイトを持つ110kDaの可溶性タンパクPAS1(111, 112)、ubiquitin conjugating protein(UBC10)と相同性の高いPAS2(113)、48kDaペルオキシソーム真在性膜タンパクPAS3(114)、PAS1と相同性が高く、ATP結合ドメインを持ちかつその推定アミノ酸配列中に二カ所の膜貫通ドメインを持つと推定されたPAS8(115)、上述のPTS1 receptorと推定されるSKL配列結合性のPAS10(116)およびPTS2 receptorと推定されるPAS7(117)、PEB1(118)がペルオキシソームアッセンブル必須因子として同定された。また、*P. pastoris*変異株の研究からそれぞれ上記因子に対応するPAS1、PAS4、PAS2、PER3、PAS5、PAS8(119-124)が、*Y. lipolytica*からPAY4、PAY2(125, 126)が、*H. polymorpha*からPER1、PER8が得られている(127, 128)。W. H. KunauらはSEC18、NSFなどと相同性の

高い1連の可溶性ATP結合タンパク(PAS1、PAS5、PAY4など)をAAA-protein family(ATPases associated with diverse cellular activities)と呼ぶことを提唱している(129)。

一方、動物細胞においては、chinese hamster ovary(CHO)変異細胞(Z65)の解析により35kDaペルオキシソーム膜タンパクPAF1が同定されている(130, 131)。このPAF1 cDNAをZellweger症fibroblastにトランスフェクトすると正常ペルオキシソームが出現することも確認され、さらにZellweger症においてPAF1遺伝子のコドン119(CGA; Arg)がストップコドン(TGA)へ点突然変異していることが明らかにされた(132)。また、同じくCHO変異細胞(ZP92)からはPAS1と相同性の高いPAF2も発見されている(133)。また、ヒトcDNAからSKL配列リセプターと推定されているPAS8同族体であるPXR1がクローニングされ、HepG2細胞ペルオキシソーム膜上にその存在が証明された(134, 135)。これら因子がタンパク移送機構上、リセプターあるいはマシナリーとして他の膜タンパクと共にいかに働いているのか興味ある問題である。70kDaペルオキシソーム主要膜タンパク(PMP70)もラットおよびヒトのcDNAがクローニングされ互いに高い相同性が示され、多剤耐性因子のP-glycoproteinと相同性の高いATP結合ドメインをもつこと、6ヶ所の膜貫通領域を持ち細胞質側にATP結合部位が存在し、P-glycoproteinの半分に相当する3次元構造をとると推定されている(89, 136)。Zellweger症の一つの相補性群からこのPMP70の遺伝子の変異が見いだされている(137)。さらに、very long chain fatty acyl-CoA ligase欠損症と考えられていたX-linked adrenoleukodystrophy患者でこのPMP70と相同性の高いPMP75(ALD protein)が変異因子と同定され、ligase欠損ではなく基質輸送能異常症あるいはligase移送異常症と推定されるようになった(138)。これらPMP70およびPMP75がホモあるいはヘテロ2量体としてペルオキシソーム膜上で機能すると推定される。さらに、細胞質HSPがタンパク移送に必要であり、ペルオキシソーム膜にも存在し、ペルオキシソーム増殖薬により誘導されることが示された(139)。ラット再生肝より68kDaのペルオキシソーム膜タンパクも発見されており、ヘテロなペルオキシソームの存在が示唆されている(140)。これらの知見からタンパク移送機構のみならず基質輸送機構においてもこのPMP70同族体がいかに関与するのか、エネルギー共役機構の観点からも非常に興味ある問題である。

以上の酵母ペルオキシソーム欠損因子あるいはヒト遺伝病に関する諸知見をTable 1-3とScheme 1-2にまとめて示した。

ペルオキシソームタンパク誘導機構に関しては、分子量約50kDaのZinc finger motifを持つperoxisome proliferator-activated receptor(PPAR)が同定され(141, 142)、retinoid X receptor- $\alpha$ (RXR $\alpha$ )とヘテロ2量体を形成し、peroxisome proliferator response element(PPRE)に結合し、アシルCoAオキシダーゼなどの転写活性を促進すると考えられている(143)。また、クロフィプレートなどのペルオキシソーム増殖薬結合性タンパクとして細胞質の

140kDa(70kDaホモ2量体、HSP同族体)蛋白も同定され(144)、先のPPARと複合体を形成することも示された(145)。また、ペルオキシソーム増殖薬により誘導されるP-450 IVA1により、long chain fatty acidの $\omega$ -酸化により生成するlong chain dicarboxylic acidがPPARの内因性リガンドとして推定された(146)[Scheme 1-3]。

一方、エンドサイトーシス、エキソサイトーシスを担うCentral vacuolar system(小胞体、ゴルジ体、リソソーム、エンドソームなど)の融合・分裂に機能していると推定されている低分子量GTP結合タンパクがペルオキシソーム膜上にも、29, 27, 25kDaの3種が見いだされた(147)。また、PxFと命名された229アミノ酸残基からなり、C末端にCys-Leu-Ile-Met(CAAX)配列を持ち、ファルネシル化(C<sub>15</sub>)を受け、CHO細胞ペルオキシソーム膜上にその存在が示された低分子量GTP結合タンパクも発見された(148)。これらのGタンパクがペルオキシソーム増殖時の分裂に関わる可能性が考えられる。

以上、ペルオキシソームタンパクの転写調節・誘導増殖機構の生理的制御機構ならびにペルオキシソーム形成(Biogenesis)、ペルオキシソームタンパク分子集合(Assembly)の解明は今その緒についたところと言えよう。最後に最近の総説(149-155)を引用しておく。

Table 1-1. ペルオキシソームの生理機能と関連酵素

1. 原始呼吸 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 生成酸化酵素、カタラーゼ
2. 脂肪酸のβ-酸化 アシル-CoAオキシダーゼ、三頭酵素 3-ケトアシル-CoAチオラーゼ
3. プラスマローゲン型エーテルリン脂質の生合成 ジヒドロキシアセトンリン酸 アシルトランスフェラーゼ アルキル-ジヒドロキシアセトンリン酸シンテターゼ
4. アミノ基転移反応および酸化反応 アラニン：グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ (別名セリン：ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ) D-アミノ酸オキシダーゼ
5. プリンの代謝 尿酸オキシダーゼ
6. ポリアミンの代謝
7. 胆汁酸の合成 (コレステロールの代謝)
8. ピペコール酸の代謝
9. フィタン酸の代謝

Table 1-2. Targeting signals of some peroxisomal enzymes.

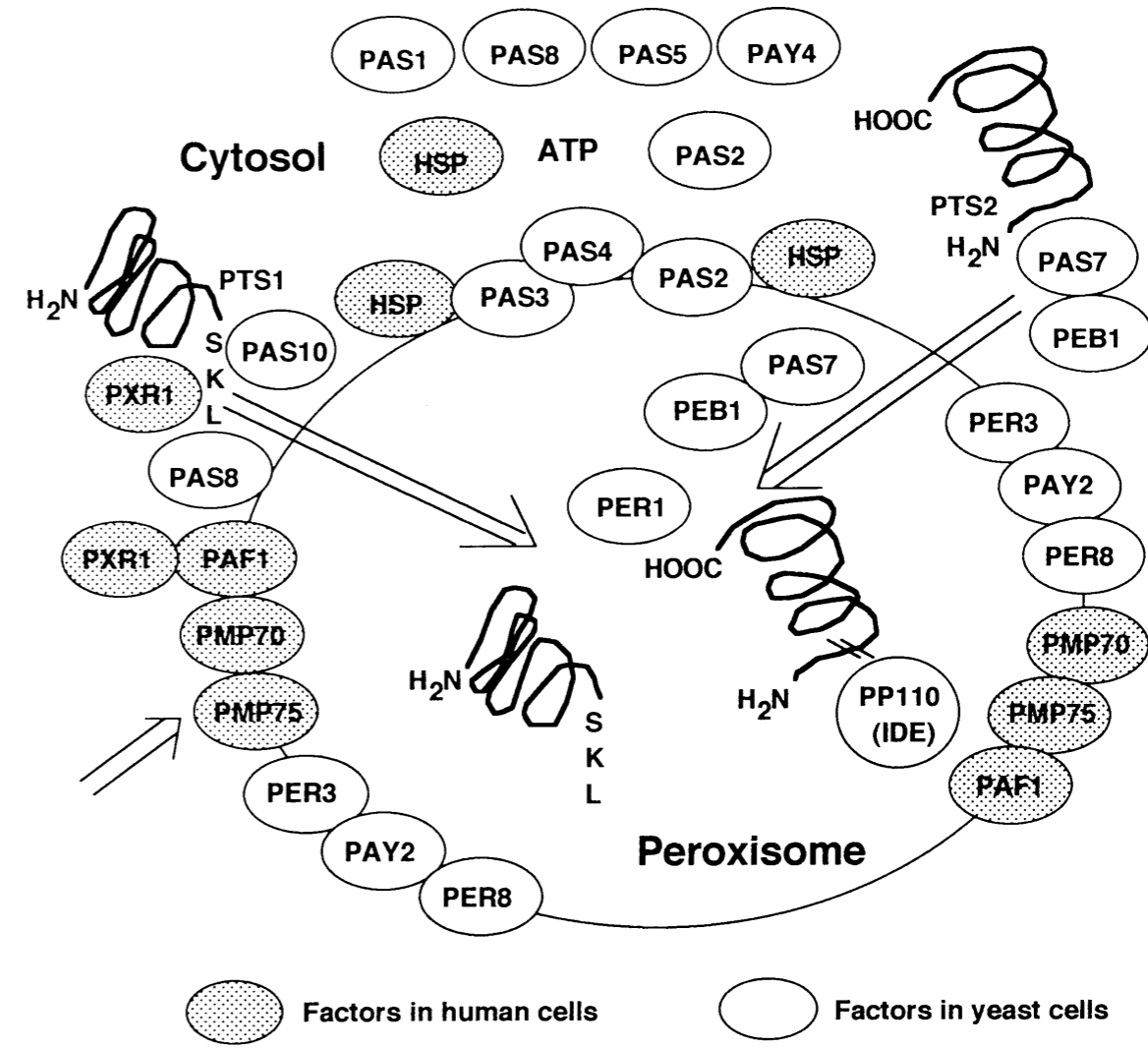
Enzyme	Subunit (kDa)	Amino acids	Targeting signal
Catalase	60	526	PTS1;Ser-His-Leu (518)
Acyl-CoA oxidase	75	661	PTS1;Ser-Lys-Leu (661)
Hydratase-Dehydrogenase	79	722	PTS1;Ser-Lys-Leu (722)
Thiolase	41	398	PTS2;cleavable 26 or 36 a.a.(N-terminal)
D-Amino acid oxidase	39	347	PTS1;Ser-Arg-Leu (347)
Sterol carrier protein-2	13	143	PTS2



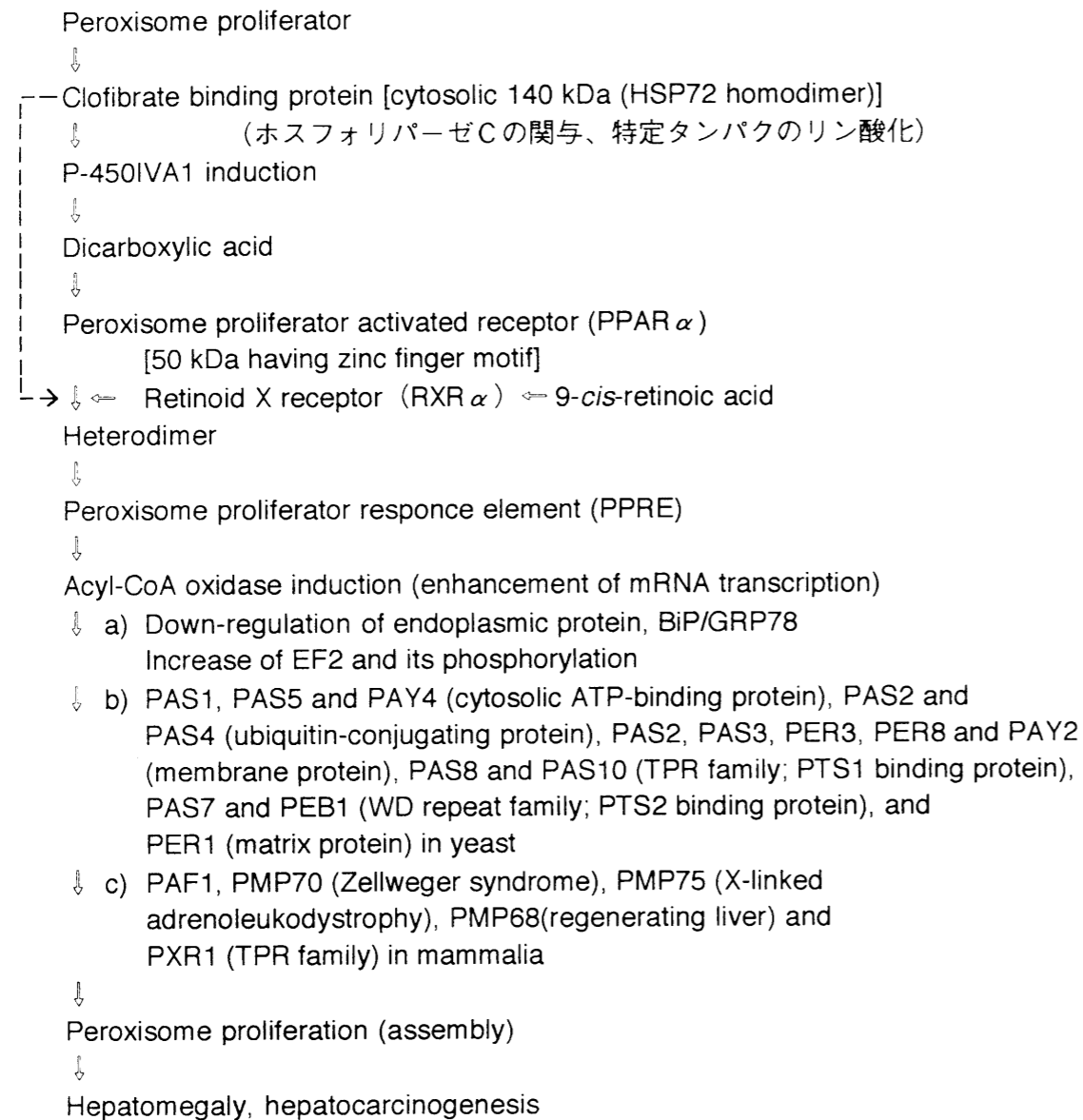
Table 1-3. Peroxisome-deficient factors in human and yeast cells.

Gene	Homolog	Amino acids	Remarks	References
<b>Zellweger syndrome</b>				
Human PAF1	CHO cells PAF1	305	35 kDa PMP	132, 130, 131
Human PMP70	Rat PMP70	659	70 kDa PMP (ATP-binding cassette transporter)	136, 137, 89
<b>Neonatal adrenoleukodystrophy</b>				
Human PXR1	<i>P. pastoris</i> PAS8	602	PTS1 binding protein (tetratricopeptide-repeat family)	134, 135
<b>X-linked adrenoleukodystrophy</b>				
Human PMP75	Human PMP70	745	75 kDa PMP (ALD protein)	138
<b>S. cerevisiae PAS1</b>				
	<i>P. pastoris</i> PAS1	1043	cytosolic ATP-binding protein (AAA-protein family, related to SEC18, NSF and other ATPases)	112, 119
	<i>P. pastoris</i> PAS5			123
	<i>Y. lipolytica</i> PAY4			125
<b>S. cerevisiae PAS8</b>				
		1030	(two membrane-spanning domain)	115
<b>S. cerevisiae PAS2</b>				
	<i>P. pastoris</i> PAS4	183	Ubiquitin-conjugating enzyme	113, 120
<b>S. cerevisiae PAS10</b>				
	<i>P. pastoris</i> PAS8	612	PTS1 binding protein (TPR family)	116, 124
<b>S. cerevisiae PAS7</b>				
	<i>S. cerevisiae</i> PEB1	375	PTS2 binding protein (WD-repeat family)	117, 118
<b>H. polymorpha PER1</b>				
		650	peroxisomal matrix protein (contains both PTS1 and PTS2)	127
<b>S. cerevisiae PAS3</b>				
	<i>P. pastoris</i> PAS2	441	48kDa PMP	114, 121
<b>P. pastoris PER3</b>				
		713	81kDa PMP (42% identical to Per1p)	122
<b>Y. lipolytica PAY2</b>				
		404	42kDa PMP	126
<b>H. polymorpha PER8</b>				
	Human PAF1	295	31kDa PMP (C3HC4 family)	128

Scheme 1-2. Peroxisomal protein import machinery in human and yeast cells



### Scheme 1-3. Biogenesis and induction of peroxisomes



### 第2章 ラット肝ペルオキシソーム調製とそのATPase活性

#### 2-1 はじめに

細胞内はミトコンドリアにおいて電子伝達系と酸化的リン酸化でADPと無機リンからATPを生成する一方、各種ATPaseによって得られるATP加水分解エネルギーを用いて物質の同化、輸送、運動など恒常性維持・生命活動(エネルギー代謝)を行っている。Pedersenらは細胞内ATPaseを以下のように分類・定義している(156)。F-type ATPaseはATP合成酵素としてミトコンドリア内膜上に存在し、膜貫通ドメインのF<sub>0</sub>部分とミトコンドリアマトリックス側の膜表面に存在し、膜貫通ドメインのF<sub>1</sub>部分からなるオリゴメリック複合体を形成している。P-type ATPaseはヘテロダイマー構造であり、その反応サイクルの中でリン酸化中間体を経るATPaseであり、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseなどがある。V-type ATPaseは内部が酸性のオルガネラ(リソソームなど)の膜上に存在し、その構造はF-typeと類似のV<sub>0</sub>、V<sub>1</sub>ドメイン(細胞質側に配向している)からなり、ATP加水分解エネルギーを用いてH<sup>+</sup>を輸送しオルガネラ内部の酸性化に寄与している。C-typeとは筋収縮に機能するmyosinを指す。M-typeは細胞膜上に存在するmultidrug resistant P-glycoproteinを指し、ATP-binding cassette transporter、ABC transporterあるいはtraffic ATPaseとも呼ばれ、単量体膜貫通性蛋白であり、単一ポリペプチド鎖内に十二カ所の膜貫通領域と二カ所のATP結合領域を持ち、薬剤排出などに機能すると考えられている。E-typeとはecto-ATPaseを指し、細胞膜外側に表在する。H-typeは細胞質内に存在するheat shock proteinなどを指し、チャペロン(蛋白安定化因子)としてや、たんぱく分子のホールディングやアンホールディングに機能していると考えられている(Scheme 2-1)。

ペルオキシソーム膜を介する基質輸送とペルオキシソーム内への酵素蛋白の移送の詳細は明らかにされていない。ペルオキシソームにATPaseが存在するという報告は正常およびシプロフィブレート投与ラット肝に関しなされている(157-160)。我々はラット肝より分画遠心とNycodenz密度勾配遠心法により高純度ペルオキシソームを得、その膜上にN-ethylmaleimide (NEM)感受性、非感受性の2種のATPasesを発見した。これらはクロフィブレートにより誘導され、すくなくともNEM感受性ATPaseはproteinase K処理で失活する事から膜表面性触媒中心を持つと推定された。以下にその性質と構造に関し検討して得られた結果について記す。

#### 2-2 ラット肝ペルオキシソームの調製とATPase活性

正常およびクロフィブレート誘導ラット肝より得られる軽ミトコンドリ

ア分画を今中らの方法(96)をスィングローターを用いるなど、一部改変したNycodenz密度勾配遠心法により純度の高いペルオキシソームを調製した。各種マーカー酵素の分布をFig. 2-1に示した。カタラーゼの分布よりペルオキシソームは密度勾配媒体を取り込み他のオルガネラより比重が大きくなり、より密度の高いボトムに近い部分に分布している。一方、ミトコンドリア(cytochrome c oxidase)、ミクロソーム(esterase)、ライソソーム( $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase, NAGA)はペルオキシソームより密度の低いトップに近い部分に存在していることが判る。

正常ラット肝の場合、大部分のATPase活性はペルオキシソーム以外のオルガネラの存在する低密度フラクションに存在し、その50%以上がオリゴマイシン感受性であることより主としてミトコンドリアF-type ATPaseによるものと考えられる。オリゴマイシン非感受性ATPaseはリソソームなどのV-type ATPaseあるいはミクロソームなどのP-type ATPaseの存在を示すものであろうと考えられる。一方、ペルオキシソーム画分のATPase活性は全体の0.14%、その比活性は $1.90 \pm 0.36$  munits/mg protein (Fr. 7)と小さく、またその47%がオリゴマイシン非感受性であるにすぎず、その分布もショルダーを示すのみである。しかし、フラクション3からカタラーゼのピークを示すフラクション7 (arrow head)までのオリゴマイシン非感受性ATPaseの比活性やカタラーゼ活性に対する比は一定であることよりこのオリゴマイシン非感受性ATPaseはペルオキシソームに存在することが示唆される。

これに対し、0.5%クロフィブレート含有粉末飼料を2週間経口投与し、ペルオキシソームを誘導したラット肝の場合、ATPase活性は明確な2ピークを示し、 $5.15 \pm 0.71$  munits/mg protein (Fr. 5)の比活性であり、全ATPase活性の1.6%またoligomycin非感受性ATPase活性の4.2%がペルオキシソームの分画(Fr. 4-6)に存在し、relative concentrationはそれぞれ0.44と0.93であった。また、ペルオキシソーム分画のoligomycin非感受性ATPase活性はクロフィブレート投与により、全活性は約17倍に、比活性は約4.4倍に増加した。一方、カタラーゼ活性は約2倍に増加した。

さらに、ここで得られたペルオキシソーム画分を再度Nycodenz密度勾配遠心法により分画を行うとその大部分が高密度のペルオキシソーム画分に回収することが出来た(第4章)。

以上の結果より、<1>ATPase活性はペルオキシソーム増殖薬で誘導される。<2>誘導ペルオキシソーム画分のATPase活性はピークを示す。<3>F-type ATPase阻害剤のoligomycinに耐性であること、再遠心でペルオキシソーム画分に回収されることより、ミトコンドリアなどの混入によるものではない。従って、ペルオキシソームにATPaseが存在することが強く示唆された。

## 2-3 クロフィブレート投与ラット肝ペルオキシソームATPaseの性質

### 2-3-1 至適pH

ペルオキシソーム画分のoligomycin-resistant ATPaseの至適pHは7.5であり、いかなるpHにおいても $Mg^{2+}$  要求性であった(Fig. 2-2)。

### 2-3-2 阻害剤感受性【1】

上述のようにペルオキシソームATPaseはoligomycin耐性であったが、同じくF-type ATPase阻害剤のsodium azideに対しても耐性であり、さらにV-type ATPase阻害剤のbafilomycin A<sub>1</sub>に対しても耐性であった(Fig. 2-3)。ま

た、p-type ATPase阻害剤のvanadateや、p-type ATPaseの1種である $Na^+, K^+$ -ATPase阻害剤のouabainに対しても耐性であった。この事は前節に記したようにペルオキシソーム画分のATPase活性がミトコンドリアのみならず、リソソームあるいはミクロソームの混入でもないことを示唆するものである。

SH試薬のN-ethylmaleimide(NEM)は10~100  $\mu$ Mの低濃度で66%のATPase活性を阻害した。この阻害効果は4 mMの高濃度を用いても変化無く、一定であった。さらに、同じくSH試薬の7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl)についても25  $\mu$ M~0.2 mMで同様のことが認められ、p-chloro-mercuribenzoic acid(PCMB)やp-chloromercuriphenyl sulfonic acid(PCMPS)についても同様であり、かつNEMとの相加性は認められなかった。この事は、ペルオキシソームATPaseがNEM感受性、非感受性の少なくとも2種存在することと推定される。

より詳細な阻害剤感受性のF-type ATPaseとの比較については後述する。

### 2-3-3 局在性

ペルオキシソームを低張処理後、遠心操作により、34.1%の蛋白が遊離する条件下、ATPase活性はほとんど(2.0%以下)遊離しない。さらに、高濃度(0.5 M)NaCl存在下超音波処理を行っても、14.3%のATPase活性が遊離するのみであった。この時、蛋白は83%、ペルオキシソームマトリックス酵素のカタラーゼ活性は76%が遊離した。従って、ペルオキシソームATPaseは膜蛋白であると推定できる。

ペルオキシソームを0  $^{\circ}$ C、proteinase K処理する(Fig. 2-4)と、最初の10分でATPase活性の50%が消失し、その後徐々にではあるが60分で約60%が失活する。この時残存するATPase活性の大部分(約83%)が1mM NEMに非感受性であった。これらのことから少なくともペルオキシソームATPaseはNEM(proteinase K)感受性、およびNEM(proteinase K)非感受性の2種類が推定され、前者はペルオキシソームの細胞質側の表在性であり、後者はペルオキシソームマトリックス側か、もしくは膜真在性でありproteinase Kの作用を受けないような膜に埋もれた構造を取っている可能性が考えられる。

#### 2-3-4 Km値

NEM感受性、非感受性両ATPaseの基質ATPに対するKm値をDamping Gauss-Newton non-linear least-squares法により求めたところ(Fig. 2-5)、それぞれ780±170および73±7μMと言う値が得られた。また、それぞれ5および0.5 mM ATP存在下、Mg<sup>2+</sup>のKm値は1.8±0.4および0.13±0.04 mMと、ATPに対するKm値のほぼ2倍の値が得られた。また、両ATPaseの至適pHは共に中性付近であり、有意の違いは認められなかった。

#### 2-3-5 2価カチオン要求性

NEM感受性ATPaseの2価カチオン要求性はMg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>(それぞれ5 mM)で、その相対的活性は100:54:65であった。その他の2価カチオン(Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>およびFe<sup>2+</sup>)はいずれも17%以下であり、かつMg<sup>2+</sup>依存性活性を阻害した(Fig. 2-6)。これに対し、NEM非感受性ATPaseはMg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>(100:70:73)のみならず、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>(40-50%)、Cd<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>(約20%)でも活性を示し、Fe<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>はMg<sup>2+</sup>依存性活性を阻害した(Fig. 2-6)。

#### 2-3-6 アニオンおよび1価カチオン要求性

NEM感受性ATPaseのアニオン要求性(いずれも0.1 M)はCl<sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>およびSCN<sup>-</sup>で2~3倍の活性化が見られ、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>でやや活性化され、I<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>では阻害が見られた(Fig. 2-7A)。一方、NEM非感受性ATPaseは上記アニオンのほとんどが影響無く、F<sup>-</sup>、SCN<sup>-</sup>のみが強くその活性を阻害した。特異的1価カチオンの要求性は両ATPase共に認められなかった(Fig. 2-7B)。ただ、NEM感受性ATPaseはNa<sup>+</sup>やK<sup>+</sup>で約2倍に活性化されたが、それらの相加性は見られないことからNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPaseの存在は考えられず、ouabain耐性であることと一致する。

#### 2-3-7 基質特異性

ペルオキシソームNEM感受性ATPaseの基質特異性は、ITP(120%)、ATP(100%)、その他のヌクレオチド(CTP、UTP、GTP)は30-60%であった(Fig. 2-8)。ADPやAMPには作用せず、ADPはATP加水分解をやや阻害した。一方、NEM非感受性ATPaseはすべてのヌクレオチドを同程度に(92-154%)加水分解した。両活性ともに*p*-nitrophenyl phosphateを用いて活性を測定しても、ATPの3%以下の活性を示すのみでphosphatase活性によるものではないと示唆された。

#### 2-3-8 阻害剤感受性【2】

ペルオキシソームATPaseは前述の如く、F-type ATPase阻害剤のoligomycinに耐性である(EtOH濃度1%以下)。しかし、15% EtOH存在下oligomycinと30℃、5分間pre-incubation後、ATPase assay mixtureを4倍容加え、EtOH終濃度3%として活性測定を行うと、部分阻害を受けるようになった(Fig. 2-9)。このことは、Z. A. Malikらの報告(160)と一致している。しかし、同様の条件下でF<sub>1</sub> domain(触媒部位)特異的阻害剤frapeptinやV-type ATPase阻害剤のbafilomycin A<sub>1</sub>ではこの様な現象は認められなかった。

そこでF-typeあるいはV-type ATPase阻害剤として知られている*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide(DCCD)、4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid(DIDS)、7-chloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole(NBD-Cl)、tributyltin(TBT)、quercetin、silicotungstic acid(STA)のペルオキシソームATPaseに対する阻害効果をミトコンドリアATPase(submitochondrial particles; SMP)と比較検討した(Fig. 2-10)。NEM感受性ATPaseはDCCD、STAにより部分阻害を受けるが、DIDS、NBD-Cl、TBTおよびquercetinにより完全阻害を受けた。一方、NEM非感受性ATPaseはSTAにのみ感受性を示した。この事は高濃度EtOH存在下のATPase構造変化など詳細な意義は不明であるが、ペルオキシソームATPaseが少なくとも2種存在し、NEM感受性ATPaseはF-typeとV-typeの中間的性質を持つと示唆される。

#### 2-3-9 可溶化・ゲルろ過クロマトグラフィー

0.5 M NaCl存在下超音波処理により得られるペルオキシソーム膜画分を非イオン性界面活性剤のC<sub>12</sub>E<sub>9</sub>を用いてATPaseを可溶化後、0.5 mlを2本のTSK G4000SWxIカラムを直列に接続し用いるゲルろ過クロマトグラフィーに付し、その溶出パターンにつき検討した(Fig. 2-11)。両ATPaseは共に主要なペルオキシソーム蛋白の溶出位置と分離され、お互いに部分的ではあるが分離され、その分子量はNEM感受性、NEM非感受性それぞれ520および450 kDaを示した。この分子量は即、蛋白の分子量を示すものではなく、界面活性剤のaggregation numberにもとづくミセル構造の分子量を加算したものであると考えられるが、両ATPase共にオリゴメリック複合体を形成していると示唆される。

#### 2-3-10 ATPaseの部分精製

ペルオキシソームATPaseを精製しその分子構造を明らかにする目的で、イオン交換カラムEcono-Pac Q 2本を直列に接続し、NaCl濃度勾配で溶出後、活性画分を前記と同様ゲルろ過クロマトグラフィーに付した。ペルオキシソーム膜画分をC<sub>12</sub>E<sub>9</sub>を用いて可溶化後、その50 ml (120 mg protein, 1.59

munits/mg protein)を、Superloopをもちい注入(流速1 ml/min)した。50分後からFig. 2-12に示した如くNaCl濃度勾配をかけ、1 mlづつ分画した。Flow through画分にはATPase活性はなく、Fr. 45-47に溶出した。この画分におけるATPase比活性は23.2 munits/mg proteinで14.6倍に上昇した。また、NEM感受性は約68%であった。なお、全ATPase活性の回収率は約43%であった。一方、SMPを同様にC<sub>12</sub>E<sub>9</sub>可溶化後、イオン交換クロマトグラフィーに付すと、ペルオキシソームよりやや早くFr. 28-33にピークとして溶出した。その比活性は598 munits/mg proteinで約3.5倍に濃縮され、SMP中のF-type ATPaseの量の多さをうかがわせる。

次いで、ペルオキシソームATPase活性画分(Fr. 45-47)1 mlをゲルろ過クロマトグラフィーにかけたところ(流速; 0.125 ml/min, 0.5 ml/分画)、Fig. 2-13に示したようにたんぱく溶出よりやや早くATPase活性が溶出した。NEM感受性、非感受性ATPaseの分離は少量注入した場合(Fig. 2-11)と同様に部分的であった。NEM感受性ATPaseのピークであるFr. 33の比活性は37.7 munits/mg proteinであり、約23.7倍に上昇した。全ATPase活性のピークFr. 35では28.5 munits/mg proteinであった。この段階の全回収率は約72%であった。ここで得られたATPase活性フラクション(Fr. 31-40)をnative PAGEおよびSDS-PAGEで分析したが、活性と相関する蛋白バンドを特定するまでにはいたらなかった。

## 2-4 考察

この章においてラット肝ペルオキシソームにNEM感受性、非感受性の2種のATPasesが存在し、クロフィブレートで誘導されることを示した。2種のATPasesの存在は以下のような結果から示唆される。<1>低濃度(10 μM)NEMによりATPase活性は部分阻害を受け、高濃度(4 mM)を用いても阻害の程度は変わらず、STAを除きDIDSやNBD-ClのみならずDCCD、TBT、quercetinによる相加的阻害は見られない。<2>ATPについての2つの異なるKm値が得られた。<3>proteinase KはNEM感受性ATPaseのみを失活させる。<4>それぞれ異なる2価カチオン、アニオン要求性とヌクレオチド特異性を示す。<5>ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて部分的に分離できた。

このクロフィブレート誘導ペルオキシソームの2種のATPasesの存在は正常ラット肝ペルオキシソームにおける見かけ上1種(NEM感受性)のATPase活性が存在するという報告(159, 160)と反する。Nycodenz密度勾配中で正常肝ペルオキシソームのATPase活性は明確なピークを示さず、誘導した場合は他のオルガネラを含む低密度の主要ATPase活性と離れたカタラーゼの分布に一致するピークを示すことより、他のオルガネラの混入によるATPase活性ではないと推定できる。さらに、ペルオキシソーム画分の再Nycodenz密度勾配遠心により、定量的にこのATPase活性を回収できること、ならびにNEM感受性に変化のない

ことを確認している(第4章)。このペルオキシソームATPase活性のクロフィブレートによる誘導は約17倍以上であり、このような誘導はペルオキシソーム脂肪酸β-酸化系酵素(27, 29, 161)や膜タンパク(25, 162)の例に見られる。

いわゆるミクロソームマーカー酵素のエステラーゼ活性がクロフィブレート誘導ペルオキシソームに存在することも見いだされた。ミトコンドリアやリソソームマーカー酵素はほとんどペルオキシソーム分画に検出できないことより、非特異的凝集による他のオルガネラ特にミクロソームの混入によるものとは考えにくい。さらにこのエステラーゼ活性はクロフィブレートにより全活性で約10倍以上に、比活性で約1.3倍に誘導され、ATPaseと同様再密度勾配遠心でペルオキシソーム画分に定量的に(109%)回収することが出来た(第4章)ので、エステラーゼはペルオキシソームに真に存在すると考えられる。ペルオキシソームが小胞体と緊密な構造体を形成しているという報告(163, 164)や他のミクロソームマーカー酵素のNADH-cytochrome c(b<sub>5</sub>) reductaseがラット肝ペルオキシソームに存在するという報告(165)と一致するものと考えられる。

誘導ペルオキシソーム上のNEM感受性、非感受性ATPases活性の諸性質について検討した所、両活性はoligomycinに完全に非感受性であり、至適pHは約7.5であった。oligomycinと同様F-type ATPase阻害剤のazide、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase阻害剤のouabain、P-type ATPase阻害剤のvanadate(166, 167)、V-type H<sup>+</sup>-ATPase阻害剤のbafilomycin A<sub>1</sub>(168)など、他のタイプに対する特異的ATPase阻害剤に非感受性であった。これらの結果は正常ラット肝(159, 160)およびciprofibrate-inducedラット肝(158)のペルオキシソームATPaseに関する結果とほぼ一致するものである。

NEM感受性ATPaseのoligomycin感受性については通常の条件下(2 μg/ml, 0.1% EtOH)では非感受性であるのに対し、正常ペルオキシソームATPase活性の報告(160)と同様preincubation時15%、incubation時3% EtOH存在下60%感受性になった。同条件下、F<sub>1</sub>-ATPase特異的阻害剤のefrapeptinやV-type ATPase特異的阻害剤のbafilomycin A<sub>1</sub>にはこのような感受性の変化は見られなかった(Fig. 2-9)。従って、両ATPaseは既知のタイプのATPaseと異なるユニークなものと推定される。

以下に示すような性質からNEM感受性ATPaseはF-typeとV-typeの中間的なものと推定される。NEM、水銀化合物やNBD-ClなどのSH試薬のみならず、アニオンチャンネルブロッカーでV-type H<sup>+</sup>-ATPaseも阻害するDIDS、TBT(169)やquercetin(170)(F-typeおよびV-type ATPase阻害剤)によってNEM感受性ATPaseは阻害された。プロトンチャンネルブロッカーのDCCD(171)で、部分阻害ではあるがNEM感受性ATPaseは阻害された。Fig. 2-10に示したようにF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPaseは高い感受性を示すのに反し、Malikらの報告(160)のように50%EtOH存在下の

preincubationでも部分阻害であった。このDCCD感受性であるということは、 $H^+$ -translocationに関係するか(172)または、少なくともそのATP加水分解活性中心に酸性カルボキシル基の存在が示唆される(173)。牛心臓ミトコンドリアF-type ATPaseを阻害し(174)、アメーバ*Dictyostelium discoideum*のV-type ATPaseをより特異的に阻害すると報告(175)されているSTAでも阻害された。また、F-、V-type ATPaseにアロステリック阻害効果を持つことが知られているADPに阻害効果が観測された(176, 177)。NEM感受性ATPaseのアニオンに対する感受性もまたV-typeとF-type  $H^+$ -ATPaseの中間的なかつユニークな性質を示した。V-typeのリソソーム $H^+$ -ATPaseと同様(178)、 $Cl^-$ および $Br^-$ により活性化を受け、F-、V-type ATPaseと同様、 $I^-$ および $F^-$ で阻害され、V-type ATPaseと異なり $NO_3^-$ で阻害されず、F-、V-typeと異なり $SCN^-$ で阻害されなかった(166, 167)。

今後さらに検討されるべきではあるが、こうした結果より、ペルオキシソームNEM感受性ATPaseはF-あるいはV-ATPaseと似かよった反応機構であることが推定される。メタノール資化酵母*Hansenula polymorpha*のペルオキシソームATPaseがoligomycin感受性との報告(179)とその内部が酸性であるとの報告(180)があるものの、他のメタノール資化酵母*Candida boidinii*のペルオキシソームを分画し、その大部分のATPase活性はすべて他のオルガネラの混入によると判断されている報告(181)もあり、ペルオキシソームATPaseが $H^+$ -ATPaseとして機能するかどうか、更なる検討が必要である。

正常ラット肝ペルオキシソームNEM感受性ATPase(159, 160)はクロフィブレート誘導ラット肝ペルオキシソームNEM感受性ATPaseに相当するものと考えられるが、以下のようないくつかの相違点も見られる。誘導ATPaseと異なり正常ATPaseは<1>TBTに非感受性である；<2>ADPによるアロステリック阻害効果は見られない；<3> $Ca^{2+}$ で活性は発現しない；<4>NEMの最大阻害効果の見られる濃度が1 mMと高濃度を要する；<5>高濃度EtOH存在下、DCCDによって完全に阻害される；<6>ATPに対するKm値が2 mMと高い。これらの違いは、正常ATPaseの比活性がそれぞれ38.8または18.8 munits/mg proteinと報告されているのに対し、誘導ATPaseのそれは5.15 munits/mg proteinと低く、測定条件の違いによるものかもしれない。

ペルオキシソームNEM非感受性ATPaseは広い基質特異性を示しnucleoside triphosphataseと呼んだ方が妥当かもしれない。テストした限りでは、STA以外の如何なるATPase阻害剤にもほとんど影響を受けなかった。こうした性質を持つATPaseとしてはラット肝細胞膜のecto-ATPase(182)、avian myeloblastosis virusのATPase(183)、ラット肝リソソーム膜の $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -ATPase (ATPase II)(184)が知られている。しかしながら以下のような点でNEM

非感受性ATPaseはこれらのATPaseとは異なる。<1>リソソーム膜の $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -ATPaseの如く低濃度 $Ca^{2+}$ による活性化は見られない。<2>これらATPaseと異なり、ペルオキシソームタンパクとして糖タンパクは考えにくい。<3>ゲルろ過法における見かけ上の分子量について、ecto-ATPaseは200 kDa(185)、リソソーム膜の $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -ATPaseは360 kDa(184)と報告されているのに対し、ペルオキシソームのそれはこれらより大きく450 kDaであった。この様な観点より、ペルオキシソームNEM非感受性ATPaseもまた新規のATPaseであろうと考えられる。以上、両ATPasesの性質をTable 2-1にまとめた。

その含量の僅少さなどから困難であろうと予想されたが、2種のペルオキシソームATPasesの分子構造解明を目的として、精製を試みたが、その解明には至らなかった。今後、クロフィブレート誘導ラット肝cDNAライブラリーのクローニングによるATPasesの遺伝子解析などが期待される。

2種のペルオキシソームATPaseのどちらか、あるいは両方がペルオキシソーム膜を介する基質の輸送あるいは酵素タンパクの移送に関わっているのかもしれない。いわゆるペルオキシソームの生理的機能のATP要求性に関しては、acyl-CoA oxidationがATPで活性化されること(93)、digitoninにより細胞膜を透過性にしたfibroblastsにおいて、ペルオキシソームacyl-CoA: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)反応がATP要求性であり、NEMおよびDCCDにより阻害されること(95)が報告されている。これらしたことより、これら反応の基質であるacyl-CoAやdihydroxyacetone phosphateの輸送がNEM感受性ATPaseによっているのかもしれないと示唆される。一方、ペルオキシソーム酵素タンパクの移送に関しては、メタノール資化性酵母*Candida boidinii*のalcohol oxidase移送がプロトノフォアcarbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone(CCCP)で阻害されるが(186)、これに反し、単離ラット肝ペルオキシソームへのacyl-CoA oxidaseの移送がATP依存性であるが、プロトン勾配( $\Delta pH$ )や膜電位差( $\Delta \psi$ )に依存しないこと(96)が報告されている。

この事はNEM感受性ATPase以外のATPaseがタンパク移送に関与する可能性を示す。Fujikiらはこの*in vitro* acyl-CoA oxidase移送が広いヌクレオチド特異性を示すと報告していることより、ペルオキシソームNEM非感受性ATPaseが関与している可能性もあると考えられる。

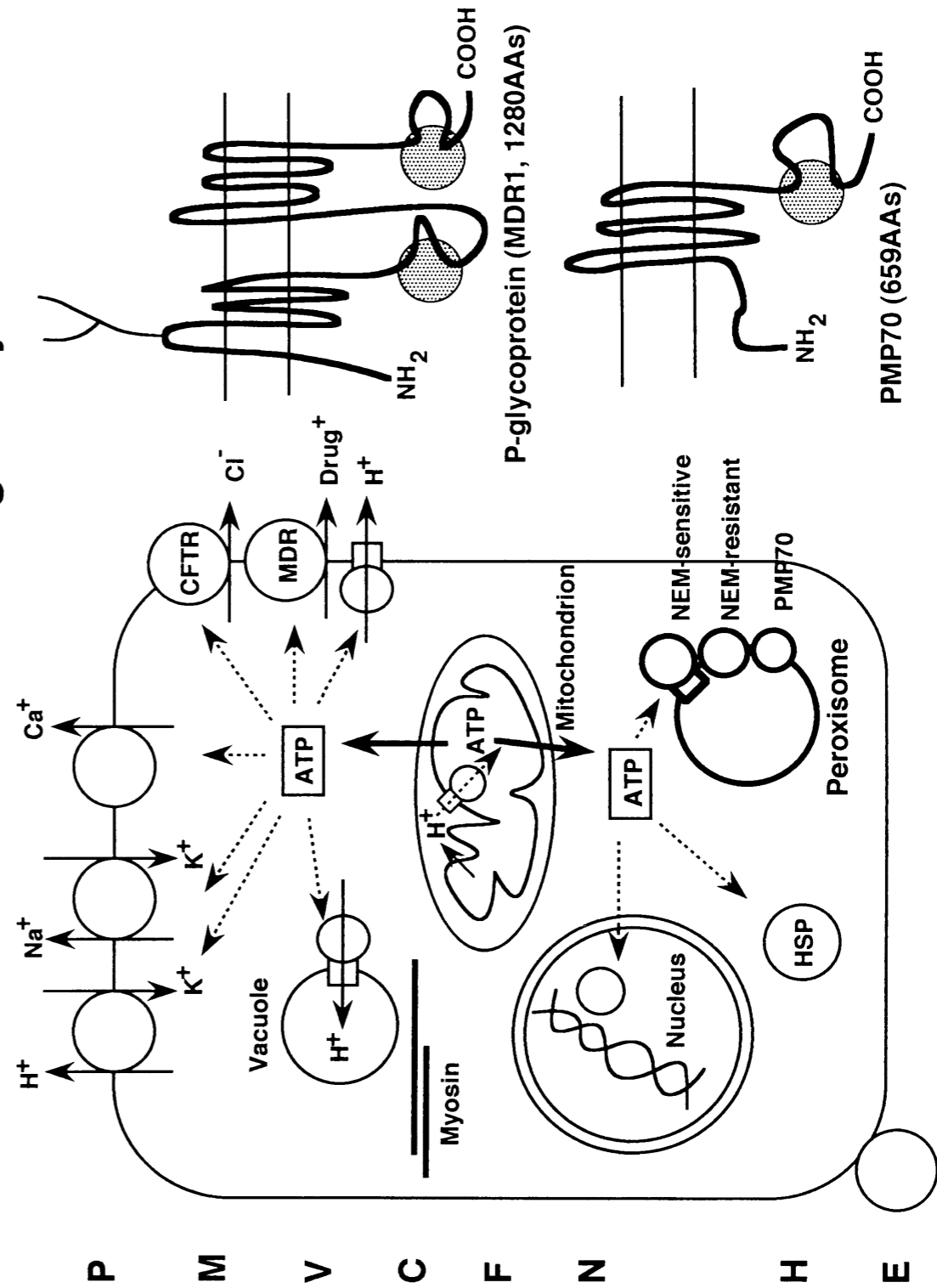
一方、KamijoらはラットPMP70のcDNAクローニングにより、6カ所の膜貫通ドメインと1カ所のATP結合ドメインを持つと推定し、P-glycoproteinを含むtraffic ATPase familyと相同性のあることを明らかにし、このPMP70がタンパク移送あるいは基質輸送に機能すると推定した(89)。しかし、PMP70がtraffic ATPase (ATP-binding cassette transporter)として機能することを排除するものではないが、次章に述べる如くペルオキシソームATPaseはPMP70に寄らないものであるということを明らかにした。

序論に記した如く、ペルオキシソームタンパク輸送machineryを構成す

ると考えられるいくつかの因子が最近明らかにされてきた。それらのうちペルオキシソーム膜タンパクと推定され、かつATPase活性を持つものは報告されていない。ただし、PAS8(115)は2カ所の膜貫通ドメインと1カ所のATP結合ドメインを持つことが示唆され、ペルオキシソームATPaseの一つの候補であるかもしれない。

第5章に記すようにペルオキシソームATPaseの機能について、若干の検討を行った。基質輸送やタンパク移送における生体エネルギー共役機構やATPasesの関与の解明には、これらATPaseの単離、構造解析が重要であると考えられる。加えて、こうした反応のcell-free再構成系の確立など、より詳細な検討が必要となるであろう。

**Scheme 2-1. ATPases in biological systems**





## Legends to Figures.

Fig. 2-1. Distribution profile of ATPase and marker enzymes in Nycodenz gradients. The light mitochondrial fractions from the livers of normal and clofibrate-induced rats were centrifuged through Nycodenz gradient, as described in "Materials and Methods." Gradient fractions were analyzed for ATPase, the indicated marker enzymes, and protein. The arrowheads indicate peaks of peroxisomal distribution. In the ATPase histograms with the inserts (fractions 1-9) with magnified scales, oligomycin-insensitive ATPase are shown as shaded areas.

Fig. 2-2. pH profile of peroxisomal ATPase. ATP hydrolysis was measured at the indicated pHs in the presence (closed symbols) and absence (open symbols) of 2 mM  $MgCl_2$  as described in "Materials and Methods."

Buffers: MES-Tris ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ), MOPS-Tris ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ), Bicine-Tris ( $\bullet$ ,  $\circ$ ).

Fig. 2-3. Effects of inhibitors on peroxisomal ATPase. ATPase activity was measured in the presence of 0.5 mM ATP and 2 mM  $MgCl_2$  as described in "Materials and Methods" in the presence or absence of the indicated inhibitors, and expressed as a percent of the control. The hydrophobic inhibitors dissolved either in ethanol or DMSO were applied so that the final concentration of these solvents do not exceed 4%.

Fig. 2-4. Effect of proteinase K on peroxisomal ATPase activity. Freshly isolated peroxisomes were incubated with proteinase K at 0°C for indicated periods as described in "Materials and Methods." The total ( $\bullet$ ,  $\circ$ ) and NEM-resistant ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) ATPase activities in the presence and absence of proteinase K are shown as closed and open symbols, respectively.

Fig. 2-5.  $K_m$  values for ATP of NEM-sensitive and NEM-resistant ATPases. ATPase activity was measured in the presence of 10 mM  $MgCl_2$  and in the presence or absence of 1 mM NEM. NEM-sensitive ATPase was assessed as the difference between the activities in the absence (total activity) and the presence of NEM (NEM-resistant activity). Inserts show Lineweaver-Burk plots.

Fig. 2-6. Requirements and effects of divalent cations of the two types of peroxisomal ATPase. NEM-sensitive and NEM-resistant ATPase activities were measured as described in "Materials and Methods," except that 5 and 2

mM of the indicated divalent cations were added to the incubation medium, respectively. The effect of the cations on  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase activity were also determined. Divalent cations were added as the sulfate salts. Control ATPase activities were 3.03 and 1.75 munits/mg protein, respectively.

Fig. 2-7. Requirements for anions (A) and monovalent cations (B) of the two types of peroxisomal ATPase. NEM-sensitive and NEM-resistant activities were measured as described in "Materials and Methods," in the presence of 0.1 M of indicated anions (sodium salts) (A) or monovalent cations (chloride salts) (B) using HEPES-TMAH buffer, pH 7.5. Control NEM-sensitive and -resistant activities were 4.92 and 0.65 (NaCl for anion), and 5.06 and 0.73 munits/mg protein (KCl for cation), respectively.

Fig 2-8. Nucleotide specificity of two types peroxisomal nucleoside triphosphatase. NEM-sensitive and NEM-resistant hydrolytic activities were measured as described in "Materials and Methods," using 5 and 0.5 mM nucleotide as the substrate, respectively. Control (ATP) hydrolytic activities were 3.51 and 1.22 munits/mg protein for NEM-sensitive and NEM-resistant activities, respectively.

Fig. 2-9. Effect of inhibitor in the presence of high concentration of ethanol. The ATPase activity was determined as described under "Materials and Methods," after pre-incubation of peroxisomes ( $6 \mu g$ /assay,  $\circ$ ) and submitochondrial particles (SMP;  $0.15 \mu g$  protein/assay,  $\triangle$ ) with the inhibitors in the presence of 15% ethanol for 5 min at 30°C.

Fig. 2-10. Effects of selected inhibitors on peroxisomal NEM-sensitive, NEM-resistant and SMP ATPases. After incubating peroxisomes at 30°C for 5 min with each inhibitor in the presence or absence of 1 mM NEM. The assay was started by adding 5 and 0.5 mM ATP, respectively, for the NEM-sensitive ( $\circ$ ) and resistant ( $\bullet$ ) ATPases as described in "Materials and Methods." The effects of inhibitors on the ATPase activity of submitochondrial particles ( $\triangle$ ) were measured under the same condition as those used for NEM-resistant peroxisomal ATPase. DCCD and TBT were added in 1% ethanol, quercetin in 1% DMSO, and DIDS and NBD-Cl in 4% DMSO, respectively.

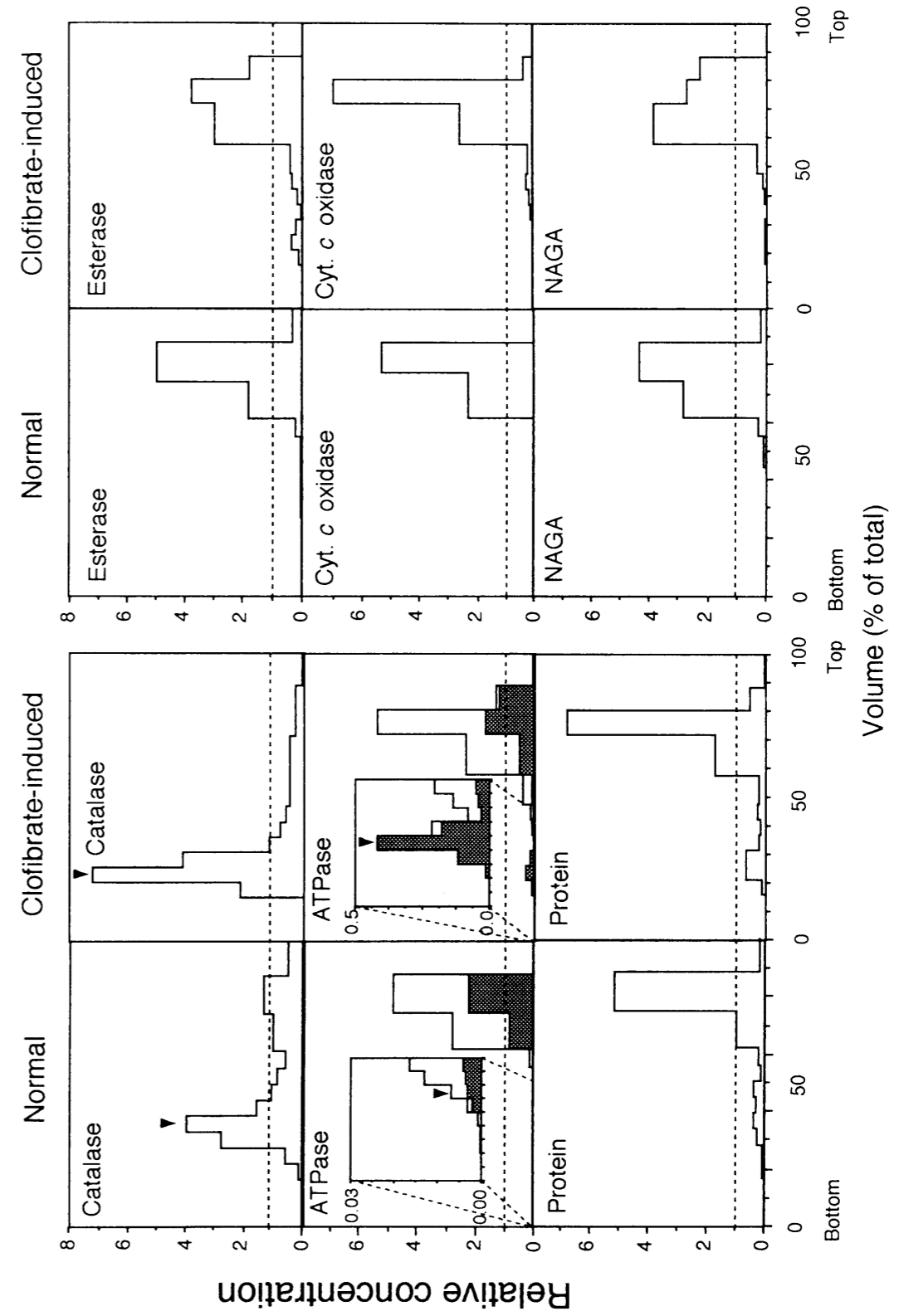
Fig. 2-11. Gel filtration profile of two types of peroxisomal ATPase on TSK G4000SWxl. Solubilized peroxisomal membranes (1.15 mg protein, about 32% of recovery of peroxisomal ATPase) were applied to two successive columns and eluted with 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1 mM DTT, 0.5

mM EGTA, 10% glycerol, 8  $\mu$ g/ml of asolectin liposomes, 0.02%  $C_{12}E_9$ , and 0.2 M NaCl and eluted as 0.5 ml fractions. ATPase and protein were determined as described under "Materials and Methods." The recovery of ATPase activity through the gel filtration was almost quantitative. Total ( $\square$ ), NEM-sensitive ( $\bullet$ ), NEM-resistant ( $\triangle$ ) ATPase activities, and protein ( $\circ$ ) are shown. The arrowheads indicated the molecular weight standards.

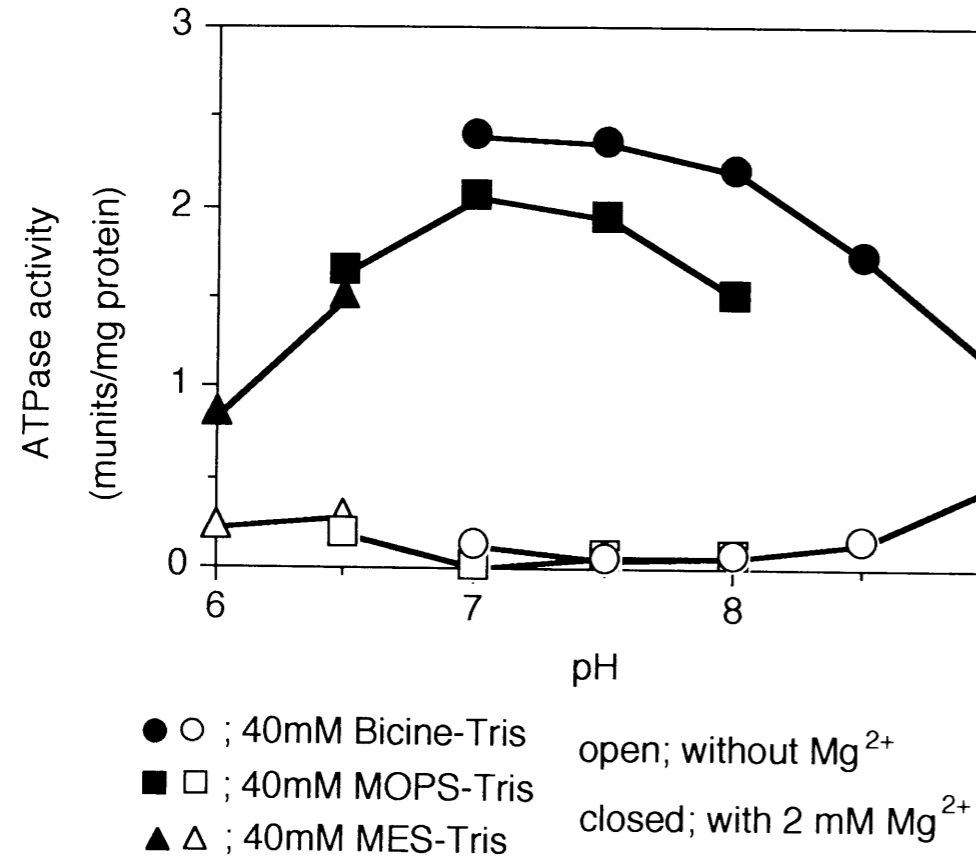
Fig. 2-12. Partial purification of peroxisomal ATPases on Econo-Pac Q ion-exchange FPLC. Clofibrate-induced peroxisomes were solubilized with  $C_{12}E_9$  and purified partially by Econo-Pac Q column, which eluted by NaCl gradient as shown (line). Indicated fractions were used in the next step of gel filtration. Total ( $\circ$ ), NEM-sensitive ( $\square$ ), NEM-resistant ( $\blacksquare$ ) ATPase activities, and protein ( $\triangle$ ) are shown.

Fig. 2-13. Partial purification of peroxisomal ATPases on TSK G4000SWxl gel filtration FPLC. Partial purified ATPase by ion-exchange FPLC, was applied and fractionated on TSK G4000SWxl, as shown in Fig. 2-11. Total ( $\circ$ ), NEM-sensitive ( $\square$ ), NEM-resistant ( $\blacksquare$ ) ATPase activities, and protein ( $\triangle$ ) are shown.

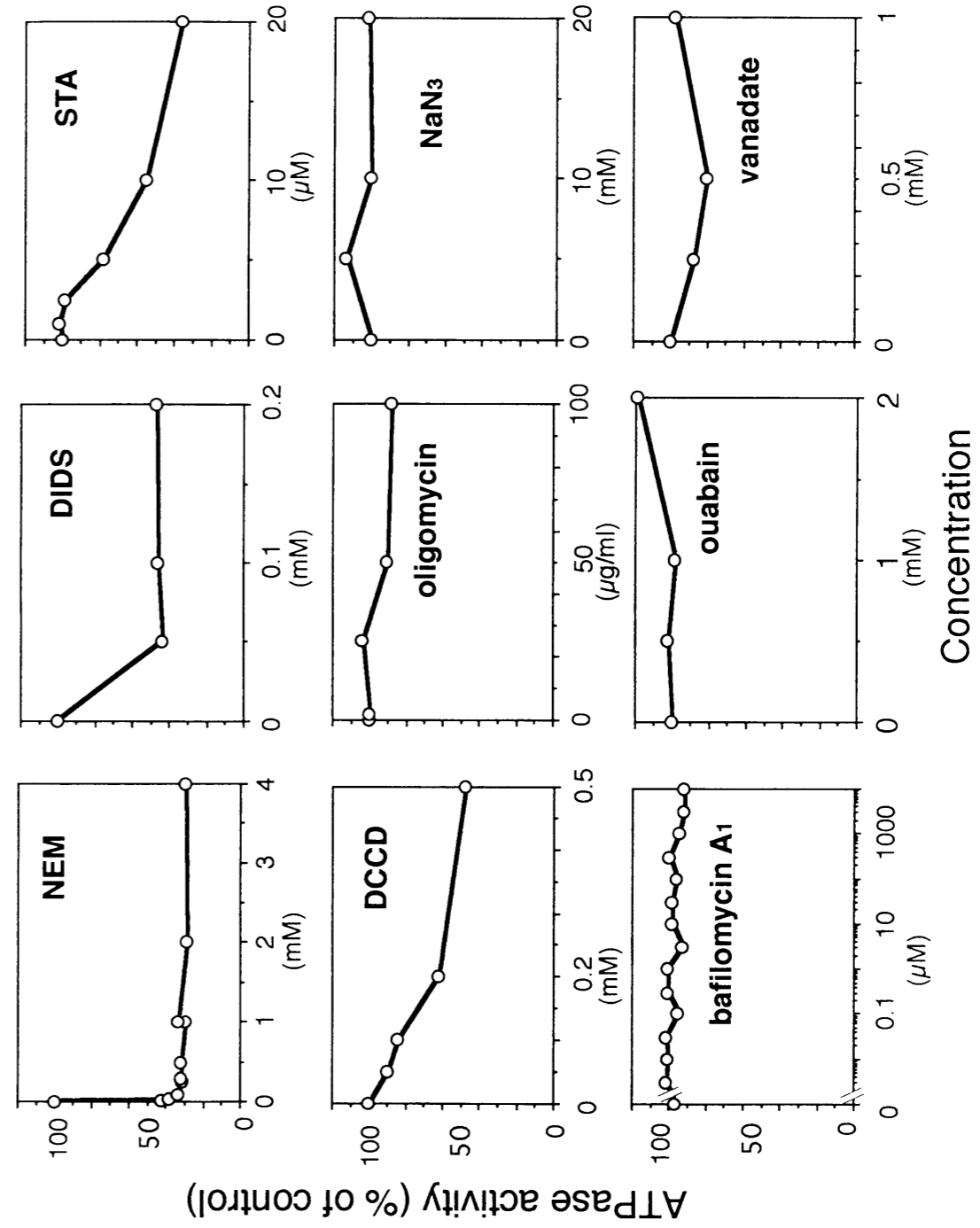
Fig. 2-1. Distribution profile of ATPase and marker enzymes in Nycodenz gradients



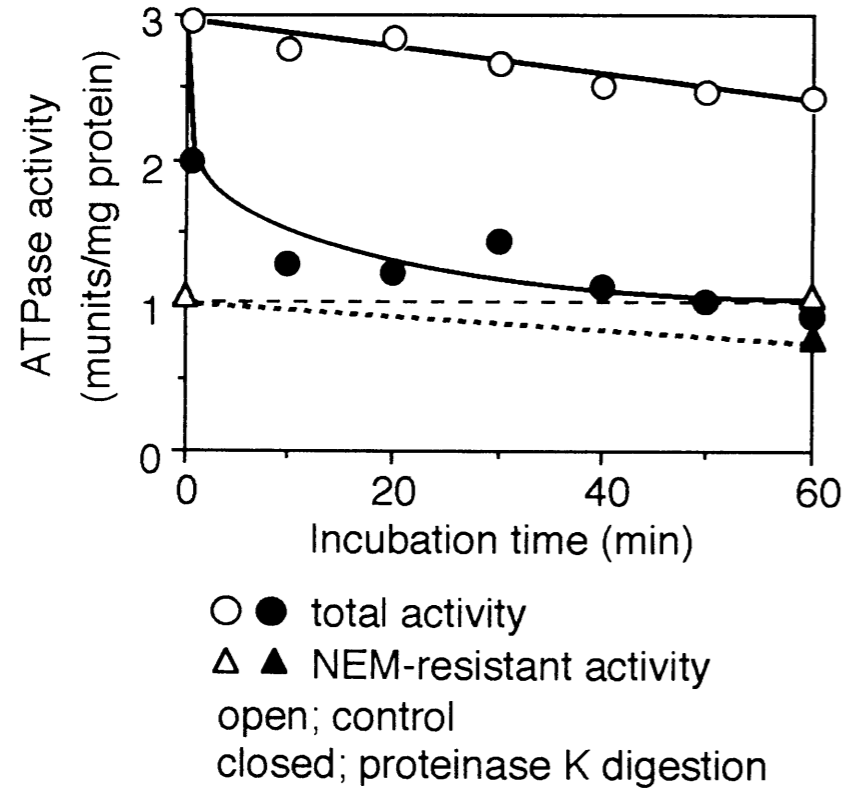
**Fig. 2-2.**  
**pH profile of peroxisomal ATPase**



**Fig. 2-3. Effects of inhibitors on peroxisomal ATPase**



**Fig. 2-4. Effect of proteinase K on peroxisomal ATPase activity**



**Fig. 2-5.  $K_m$  values for ATP of NEM-sensitive and NEM-resistant ATPases**

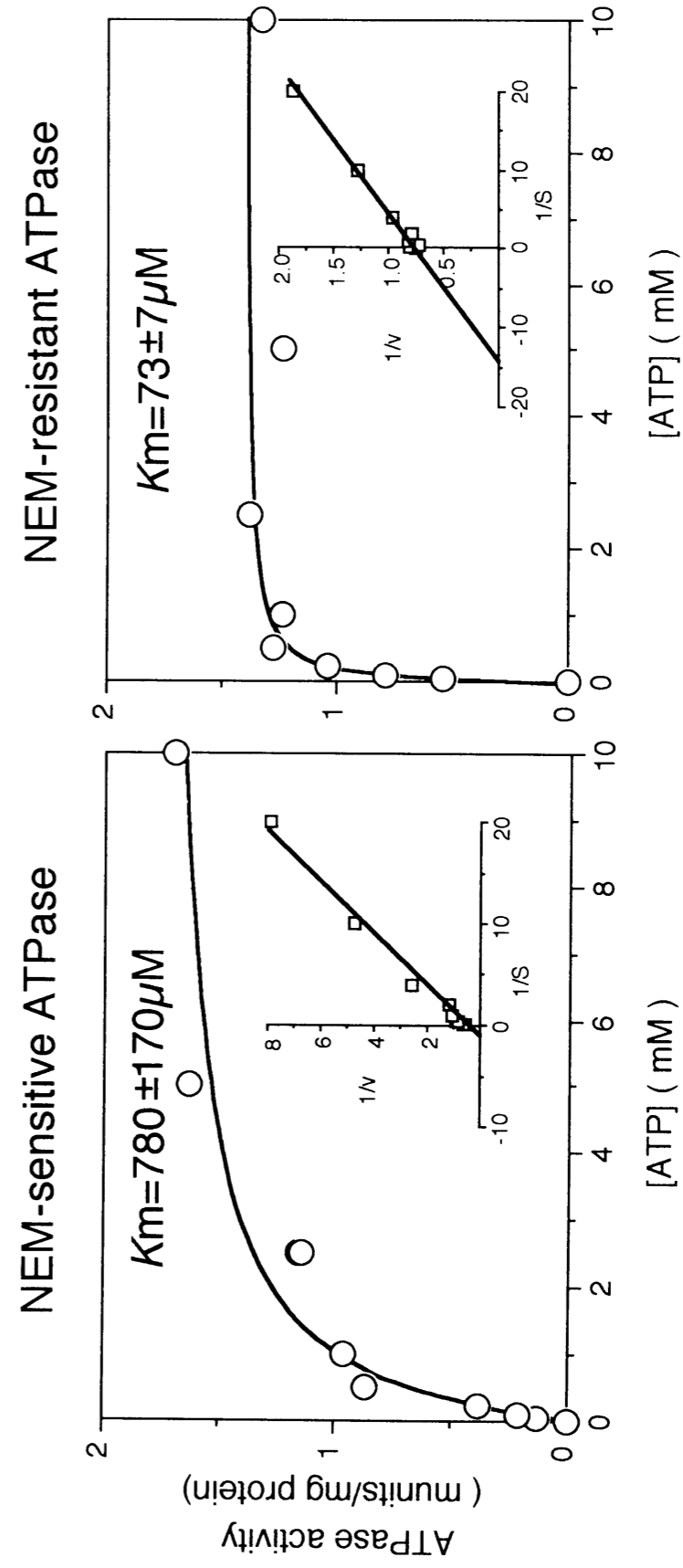


Fig. 2-6.

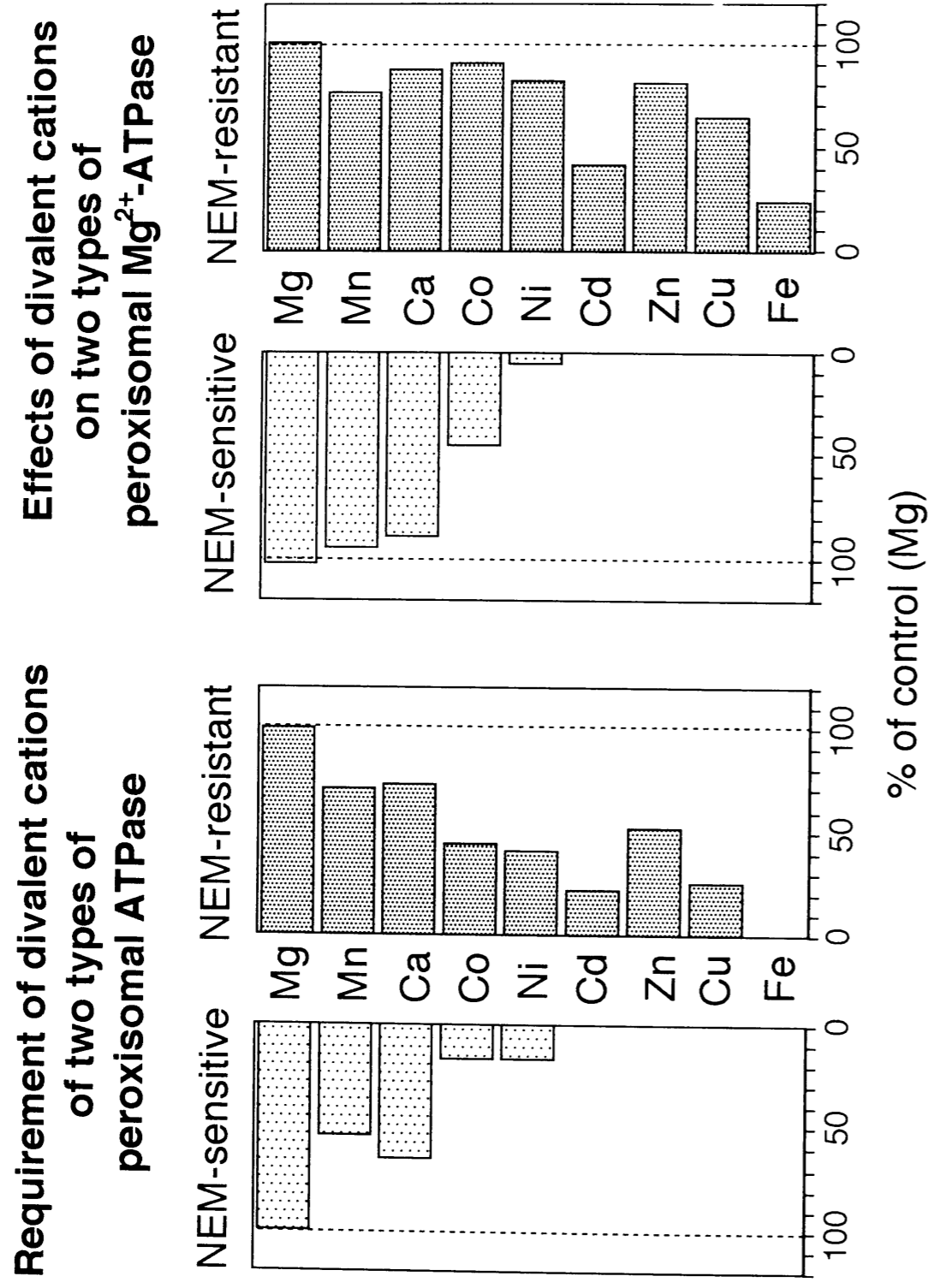
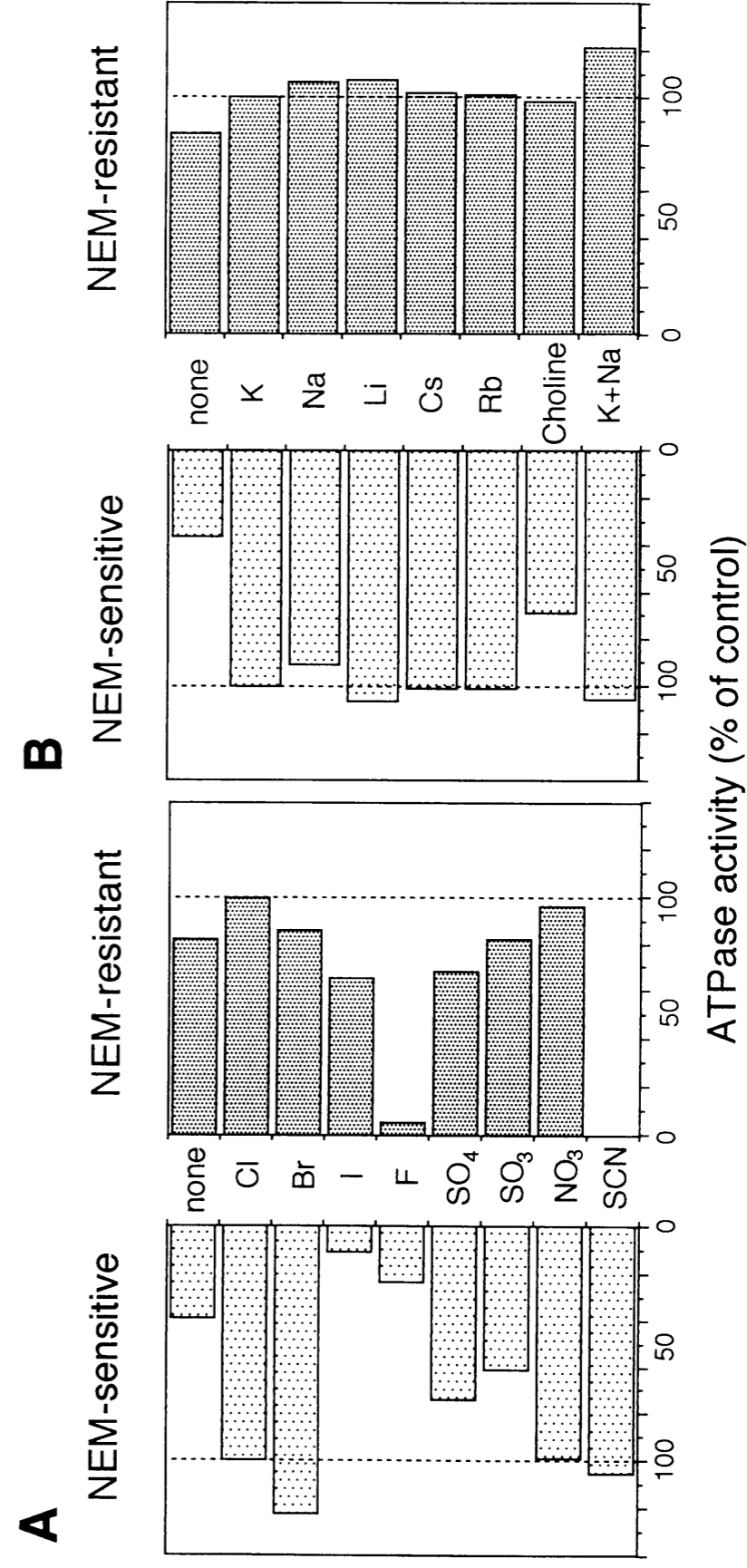
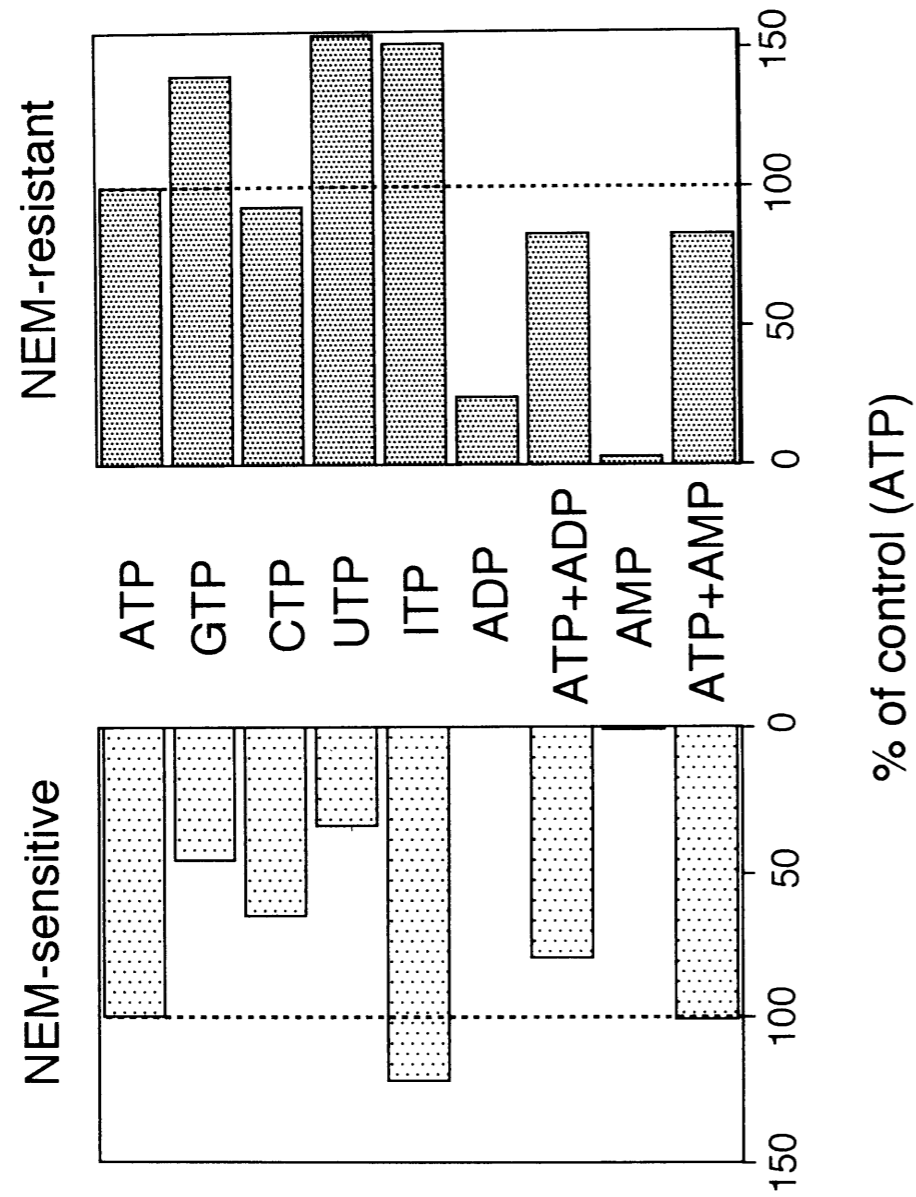


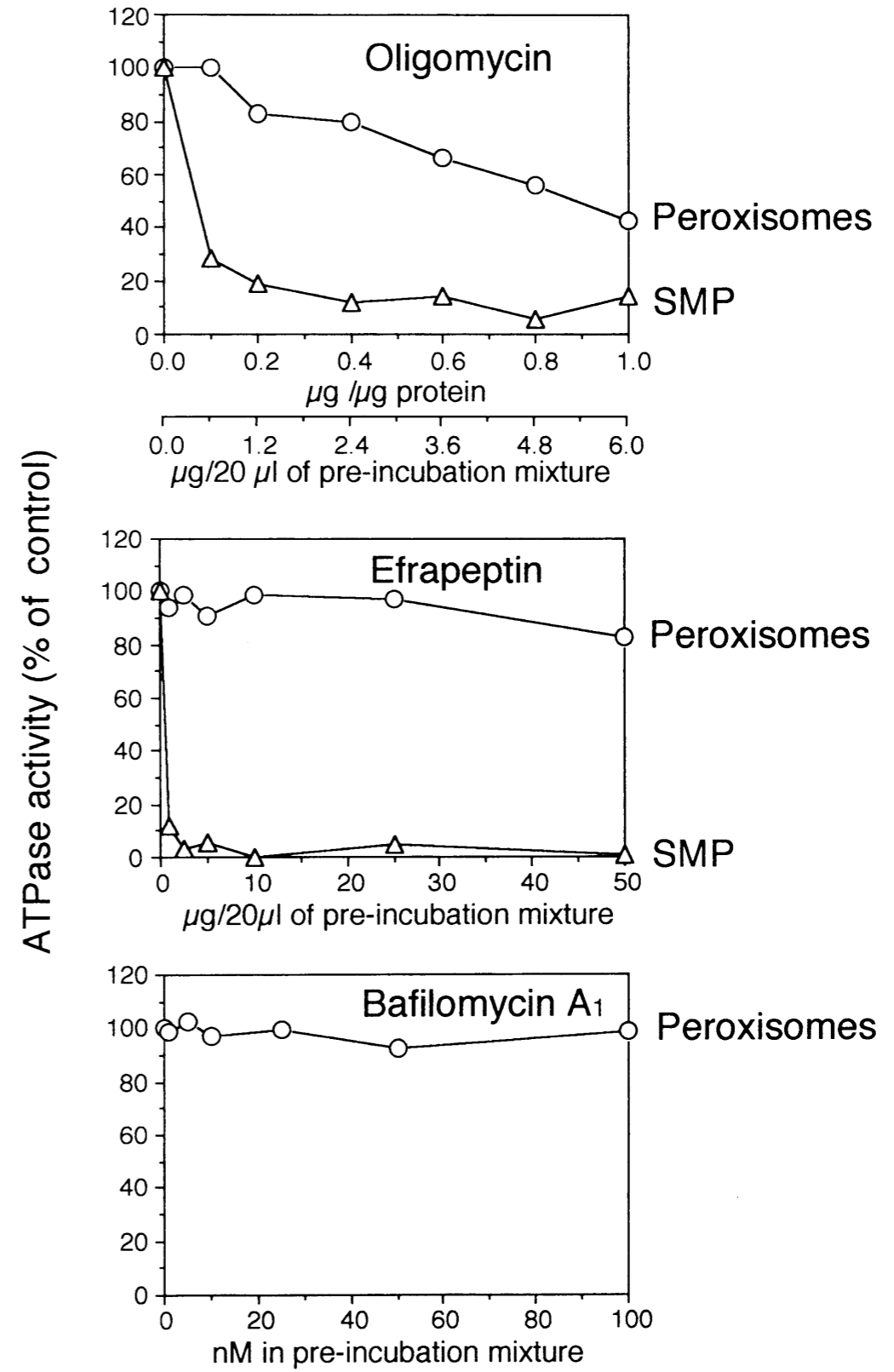
Fig. 2-7 Requirement for anions (A) and monovalent cations (B) of the two types of peroxisomal ATPase



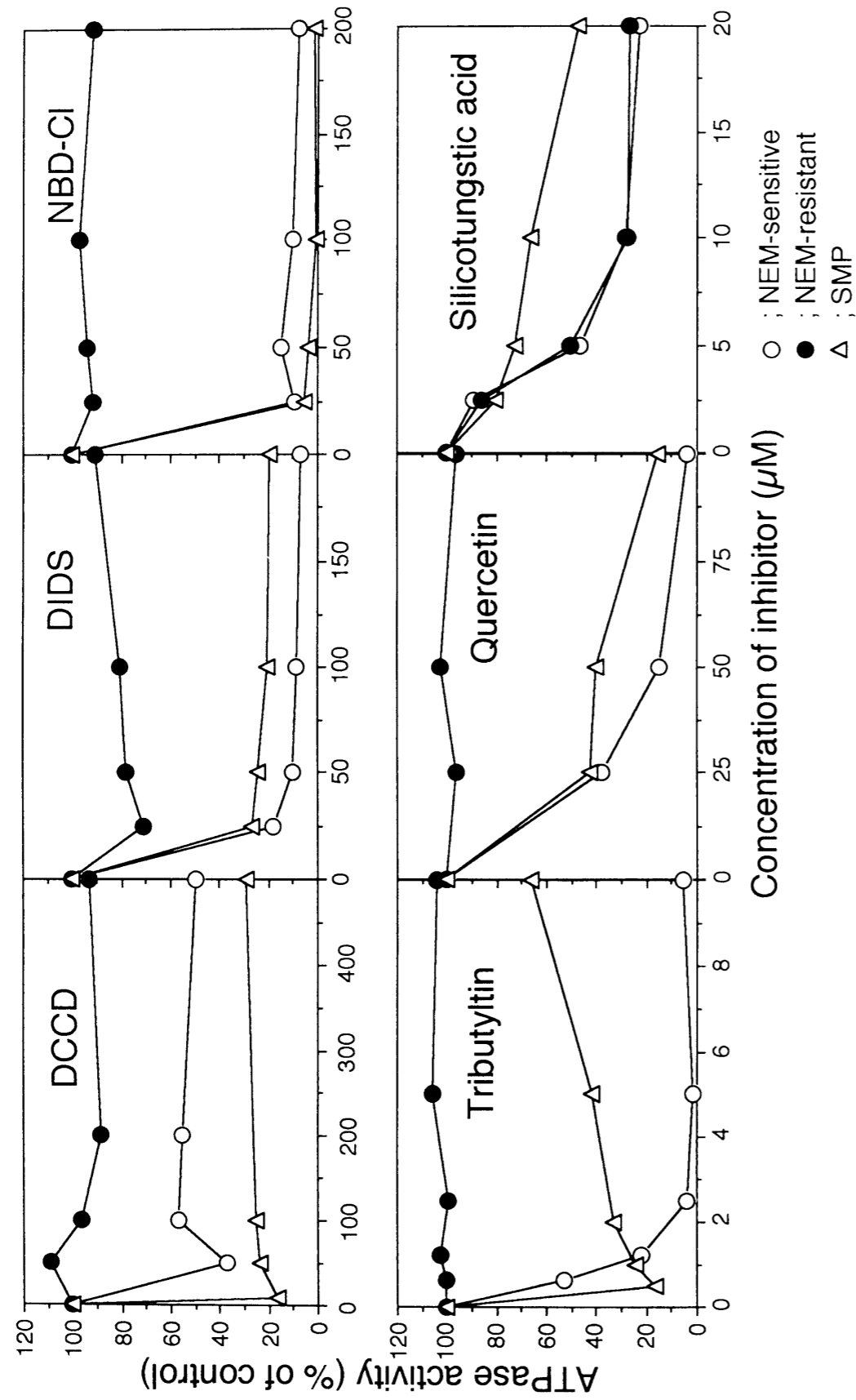
**Fig. 2-8. Nucleotide specificity of two types of peroxisomal nucleoside triphosphatase**



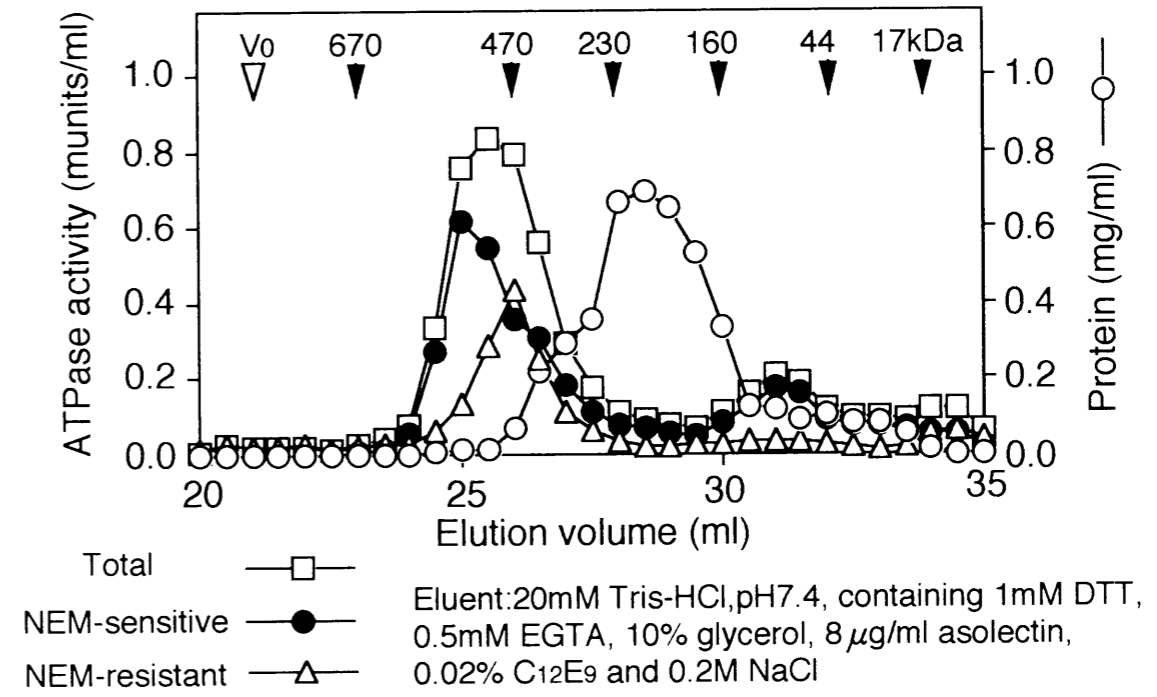
**Fig. 2-9. Effect of inhibitor on ATPase activity in the presence of high concentration of EtOH**



**Fig. 2-10. Effects of selected inhibitors on peroxisomal NEM-sensitive, NEM-resistant and SMP ATPases**



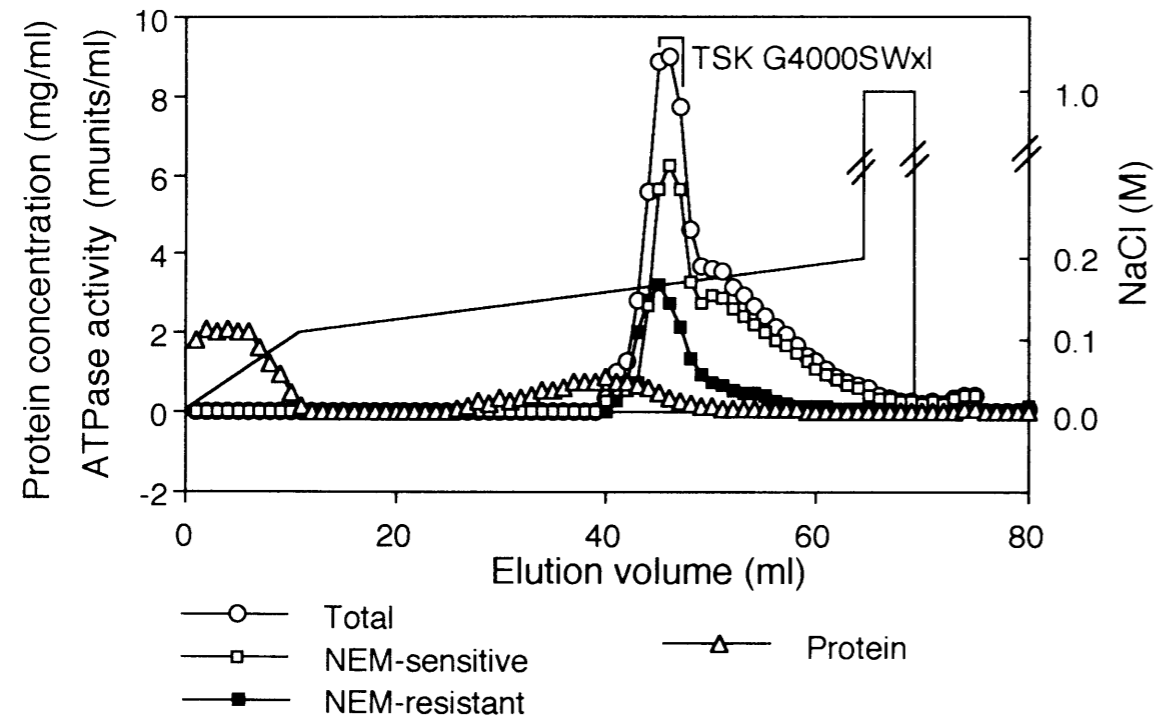
**Fig. 2-11. Gel filtration profile of two types of peroxisomal ATPase on TSK G4000SWxL**





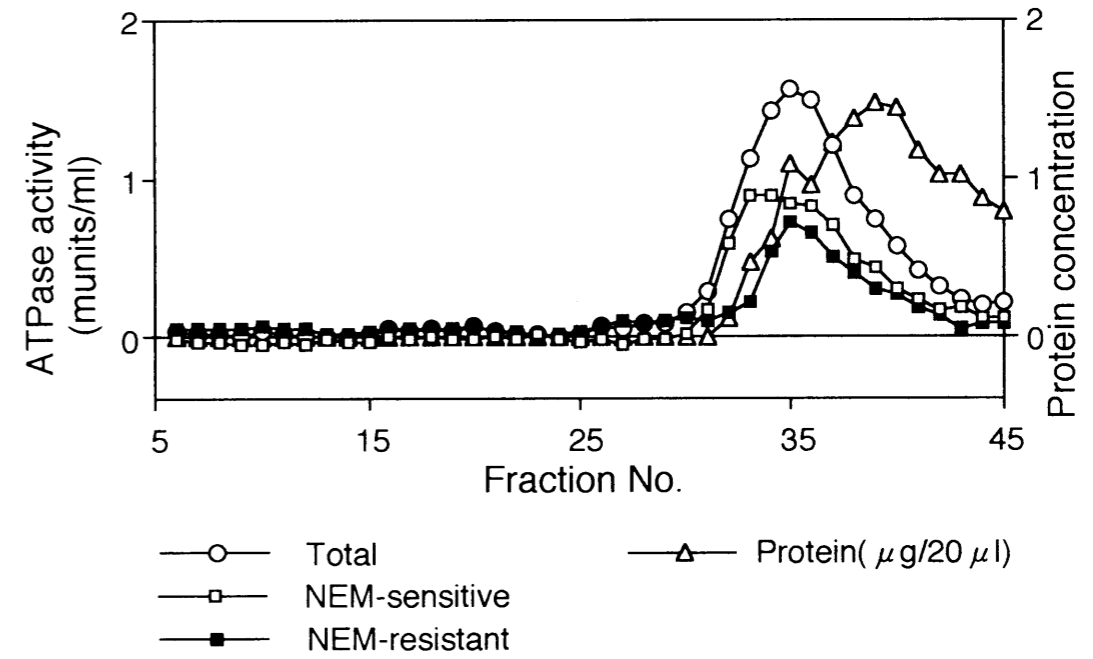
**Fig. 2-12.**

**Partial purification of peroxisomal ATPases  
on Econo-Pac Q ion-exchange FPLC**



**Fig. 2-13.**

**Partial purification of peroxisomal ATPases  
on TSK G4000SWxl gel filtration FPLC**



**Table 2-1. Properties of two types of ATPase on rat liver peroxisomes**

	NEM-sensitive ATPase	NEM-resistant ATPase
Substrate specificity	ATP, ITP > GTP, CTP, UTP	ATP, ITP, GTP, CTP, UTP
Optimum pH	7.5	7.0 - 8.0
Km value for ATP	780 $\mu$ M	73 $\mu$ M
Divalent cation requirement	Mg > Ca, Mn	Mg, Mn, Ca > Ni, Zn, Cu
Sensitivity to chemicals		
Sensitive	NEM, DCCD, DIDS TBT, quercetin, STA	STA
Insensitive	oligomycin, efrapeptin, NaN <sub>3</sub> bafilomycin A <sub>1</sub> , ouabain, vanadate	NEM, DCCD, DIDS, TBT, quercetin oligomycin, efrapeptin, NaN <sub>3</sub> bafilomycin A <sub>1</sub> , ouabain, vanadate
MW	520kDa	450kDa

第3章 ペルオキシソームATPaseはPMP70ではない。

3-1 はじめに

70kDaペルオキシソーム主要膜蛋白(PMP70)のcDNAクローニングによりその推定アミノ酸配列中には、2組の配列からなる1個のATP結合ドメインと6個の膜貫通領域があると推定されている(89)。このPMP70の構造はP-glycoproteinのようなtraffic ATPaseの半分の構造に似ている(Scheme 2-1)。しかし、PMP70がATPase活性を持つかどうか明らかにされていない。序論にも記したようにPMP70がペルオキシソーム遺伝病の原因因子とも考えられ(137, 138)、基質あるいは蛋白移送に関わっている可能性が考えられている。この章ではペルオキシソーム膜上に見出したATPase活性がこのPMP70によるものかどうかにつき検討した。

3-2 ペルオキシソームATPaseとPMP70の比較

3-2-1 ペルオキシソームのproteinase K処理

ATPaseとPMP70のペルオキシソーム膜上におけるtopologyをproteinase K限定消化(蛋白分解)により検討した。第2章にも記したように0℃、10分の処理で約50%のATPaseの失活が見られ、60分では62%まで徐々に失活する。この時、残存ATPaseの大部分(83%)は1mM NEMに耐性であった(Fig. 3-1A)。一方、PMP70はSDS-PAGE後、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色によれば、30秒処理ですでに減少し、10分後には完全に消失した(Fig. 3-1B)。さらに、この事はanti-PMP70 IgGを用いたimmunoblotによっても確認された(Fig. 3-1C)。

3-2-2 anti-PMP70 IgGによる免疫沈降

PMP70はペルオキシソーム $\beta$ -酸化系酵素と同様、ペルオキシソーム増殖薬により誘導されることが知られている(187)。クロフィブレート誘導ラット肝より得られるペルオキシソームを炭酸処理により真在性膜画分とした後、SDS-PAGE、CBB染色後、PMP70のバンドを切り出し、これを細碎し、直接日本白色種ウサギ後肢リンフノードあるいは背部皮下に感作し、抗血清を得た。定法によりIgG分画を調製し用いた。

ペルオキシソーム膜ATPaseは0.5%非イオン性界面活性剤のC<sub>12</sub>E<sub>9</sub>で約50%の収率で可溶化できた。この可溶性画分のATPase活性の約80%はNEM感受性であり、可溶化前後で変化は認められなかった。この可溶化標品とanti-PMP70 IgGと免疫沈降を行うと、protein A-Sepharoseの沈澱中にPMP70は存在し(Fig. 3-2. lane 1 and 3)、上清中には検出できなかったが、preimmune IgGでは多くのPMP70が上清中に残っていた(Fig. 3-2. lane 2 and 4)。一方、可溶化

ATPase活性は結合せず、約90 %が上清に残り、またpreimmuneとの差も認められなかった(Table 3-1)。

### 3-2-3 可溶化ペルオキシソームの未変性ポリアクリルアミド電気泳動

クロフィブレート誘導ペルオキシソーム膜の可溶化標品の4-20 % 濃度勾配ゲルを用いた電気泳動(native PAGE)後、ATPase活性染色を行うと、約270-360 kDaの2本の活性バンドが検出できた(Fig. 3-3Aa, open arrow head)。一方、anti-PMP70 IgGを用いたimmunoblottingでは500 kDa以上の幅広いバンドが検出できた(Fig. 3-3Ab, closed arrow head)。このnative PAGE後のゲルを切り出し、SDS-PAGEを行う2D-PAGEでは銀染色およびimmunoblottingによって高分子量領域にPMP70が検出できた(Fig. 3-3Bc, d, arrow head)。従って、ATPase活性バンドとPMP70の挙動が異なることが明らかとなった。

### 3-2-4 ペルオキシソーム可溶化ATPaseとPMP70のゲルろ過クロマトグラフィー

大部分(86 %以上)のATPase活性がNEM感受性およびNEM非感受性それぞれ520kDaおよび450kDaに相当する位置に溶出した(Fig. 3-4)。anti-PMP70 IgGをもちいるELISAによってPMP70の溶出を検討したところ、PMP70はATPase活性とは明確に分離した位置に溶出し、そのdimerと推定される約160kDaの位置に溶出していた。これらPMP70の溶出しているフラクション中のATPase活性は全体の約2.5 %にすぎなかった。

## 3-3 考 察

クロフィブレート誘導ラット肝ペルオキシソームの2種の主要ATPaseはPMP70と異なり、またPMP70はほんの僅かのATPase活性を持つことをこの章で明らかにした。この結論はペルオキシソームのproteinase K処理(Fig. 3-1)、可溶化ペルオキシソームの免疫沈降(Fig. 3-2、Table 3-1)、未変性PAGE(Fig. 3-3)、ゲルろ過(Fig. 3-4)の結果より得られた。また、ATPase活性とPMP70のTriton X-114を用いる相分離法を行うと、PMP70は疎水性の性質を示すTriton x-114層に移行するが、ATPase活性は水層に残るという結果も得られている(unpublished observation)。

PMP70はヌクレオチド結合部位を持ち、P-glycoproteinやtraffic ATPasesやnucleotide-binding proteinと、その一次構造において相同性があると報告されている(89)。PMP70についてのATPase活性は報告されていないが、Hamadaらは多剤耐性細胞の粗膜画分の0.4 %がP-glycoproteinであり、精製細胞膜P-glycoproteinのATPase活性は1.2 nmol/mg protein/minの比活性であると報告している(188)。次のようなく1 >全ペルオキシソームタンパクの10 %が膜タンパクである(189)；< 2 >di(2-ethylhexyl)-phthalate誘導ペルオキシソームについて見出されているようにペルオキシソーム膜タンパクの70 %が

PMP70である(187)；< 3 >PMP70がP-glycoproteinと同じ比活性のATPase活性を持つ；という仮定にたつと、全ペルオキシソームATPase活性のうちPMP70の寄与は7 %以下と見積もることが出来る。この値は免疫沈降における検出限界以下の活性であると推定される。

上記のような推定はSuperoseゲルろ過において大部分のATPase活性溶出後、PMP70と共に溶出したATPase活性が全可溶化ATPase活性のほんの2.5 %にすぎなかったことと一致する(Fig. 3-4)。PMP70は未変性PAGEでは高分子量オリゴメリック複合体を形成し(Fig. 3-3)、ゲルろ過では2量体と推定される約160 kDaの構造を形成する(Fig. 3-4)傾向にあった。このことはタンパク濃度のような環境因子の影響であろうと推定される。このようなPMP70の2量体構造とオリゴメリック複合体形成の性質はそのペルオキシソーム膜上での生理的機能を果たす時の構造を反映しているのかもしれない。

ペルオキシソームATPase(1, 157-160)およびPMP70(89)はペルオキシソーム酵素やその基質の輸送に関わっているものと考えられる。さらに、アドリアマイシンあるいはビンクリスチン耐性HL60細胞において、細胞膜上に存在すると推定されるV-type ATPaseとP-glycoproteinが共役して薬剤排出を行っていること示唆されている(190)。今後、PMP70のATPase活性とその生理的機能のみならず、ペルオキシソームATPasesの構造および機能、ならびにPMP70とATPasesの共役機構が存在するのかなど、ペルオキシソーム膜輸送システム全体について検討しなければならない。

Legends to Figures.

Fig. 3-1. Effect of proteinase K on peroxisomal ATPase activity and PMP70. Freshly isolated peroxisomes were incubated with proteinase K at 0 °C for the indicated periods as described in "Materials and Method." (A) ATPase activity: Total (□), NEM-sensitive (○), and NEM-resistant (△). (B) 10% SDS-PAGE: After electrophoresis, gels were stained for proteins with Coomassie Brilliant Blue. (C) Immunoblot: Immunoblotting was performed with anti-PMP70 IgG as described in "Materials and Methods."

Fig. 3-2. Behavior of PMP70 on immunoprecipitation with anti-PMP70 IgG. Solubilized peroxisomes were immunoprecipitated as described in Table 3-1. Lanes 1 and 2, normal IgG; lanes 3 and 4, anti-PMP70 IgG; Lanes 1 and 3, immunoprecipitated pellets; lanes 2 and 4, supernatants. The filled and open arrowheads indicate the position of PMP70 and immunoglobulin heavy chain, respectively.

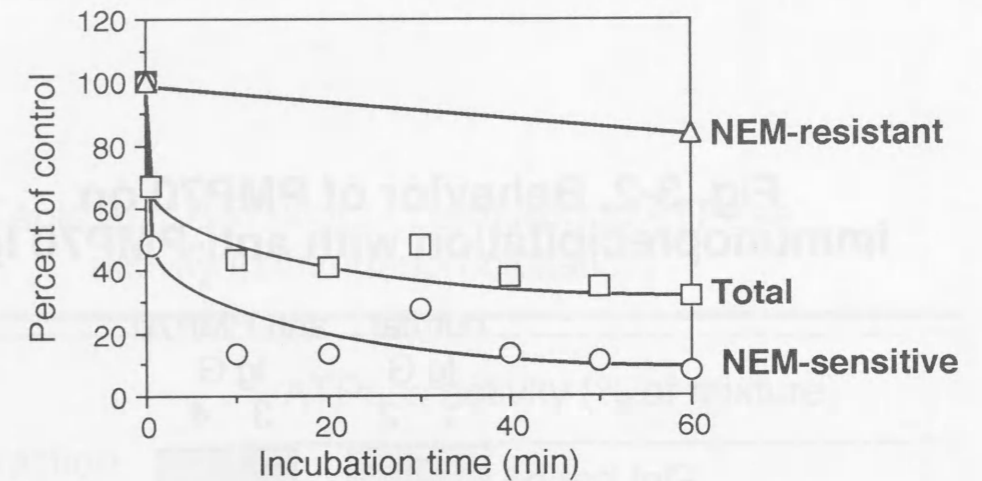
Table 3-1. Behavior of peroxisomal ATPase activity in immunoprecipitation. Solubilized peroxisomes (50 μl, 240 μg protein) were immunoprecipitated with 5 mg of protein A-Sepharose, 400 μg of histone as a carrier protein, and either anti-PMP70 or normal IgG (44 μg protein) at 4°C for 2h. ATPase activities of the supernatants and the pellets were determined as described in "Materials and Methods." The solubilized peroxisomes showed specific ATPase activity of 0.826 munits/mg protein. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Fig. 3-3. ATPase activity and PMP70 on native (A) and two-dimensional PAGE (B) of C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>-solubilized peroxisomes. After native and 2D-PAGE, ATPase activity staining (a), silver staining (c), and immunoblotting with anti-PMP70 antiserum (b, d) were performed as described in "Materials and Methods." The open and closed arrowheads indicate the positions of ATPases and PMP70, respectively.

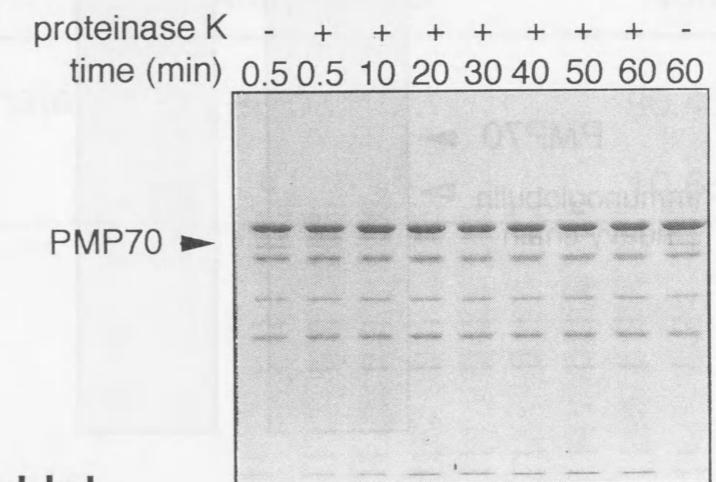
Fig. 3-4. Gel filtration profile of solubilized peroxisomal ATPases on Superose 6 prep HR 16/50. Solubilized peroxisomes (15.1 mg of protein) were applied to the column and eluted with 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1 mM DTT, 0.5 mM EGTA, 10% glycerol, 8 μg/ml of asolectin liposomes, 0.02% C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>, and 0.2 M NaCl. Fractions of 1 ml were collected. Total (□), NEM-sensitive (○), and NEM-resistant (△) ATPases, protein (●), and PMP70 (X) were determined as described under "Materials and Methods." The arrowheads indicate the molecular weight standards.

Fig. 3-1. Effect of proteinase K on peroxisomal ATPase activity and PMP70

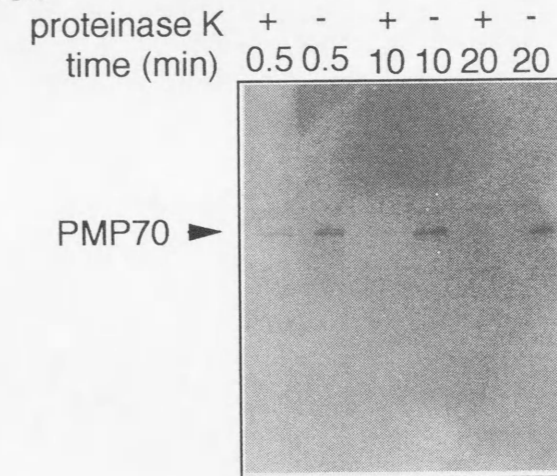
A. ATPase activity



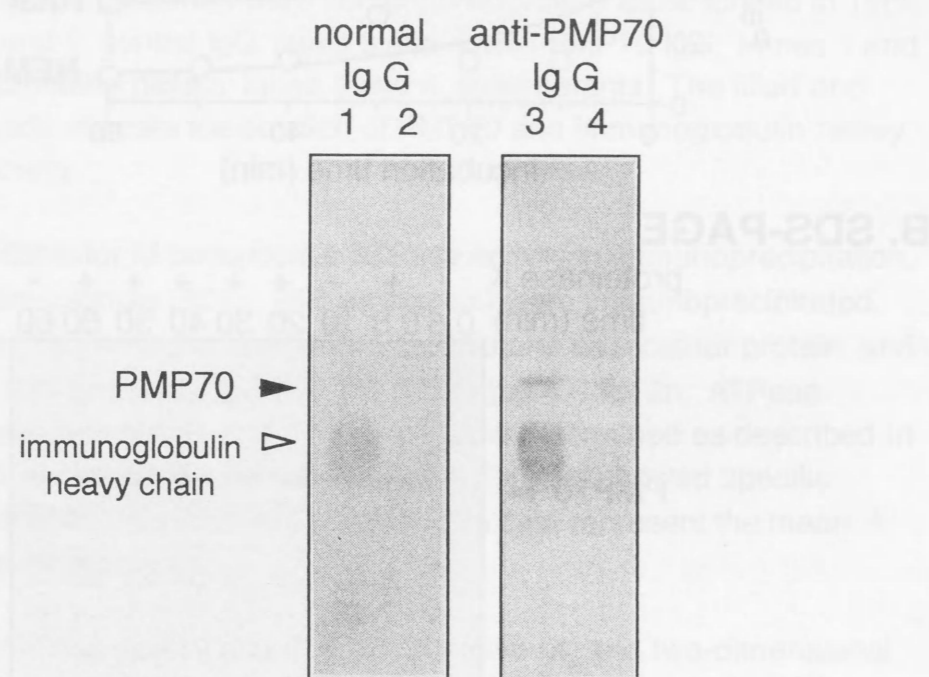
B. SDS-PAGE



C. Immunoblot



**Fig. 3-2. Behavior of PMP70 on immunoprecipitation with anti-PMP70 IgG**

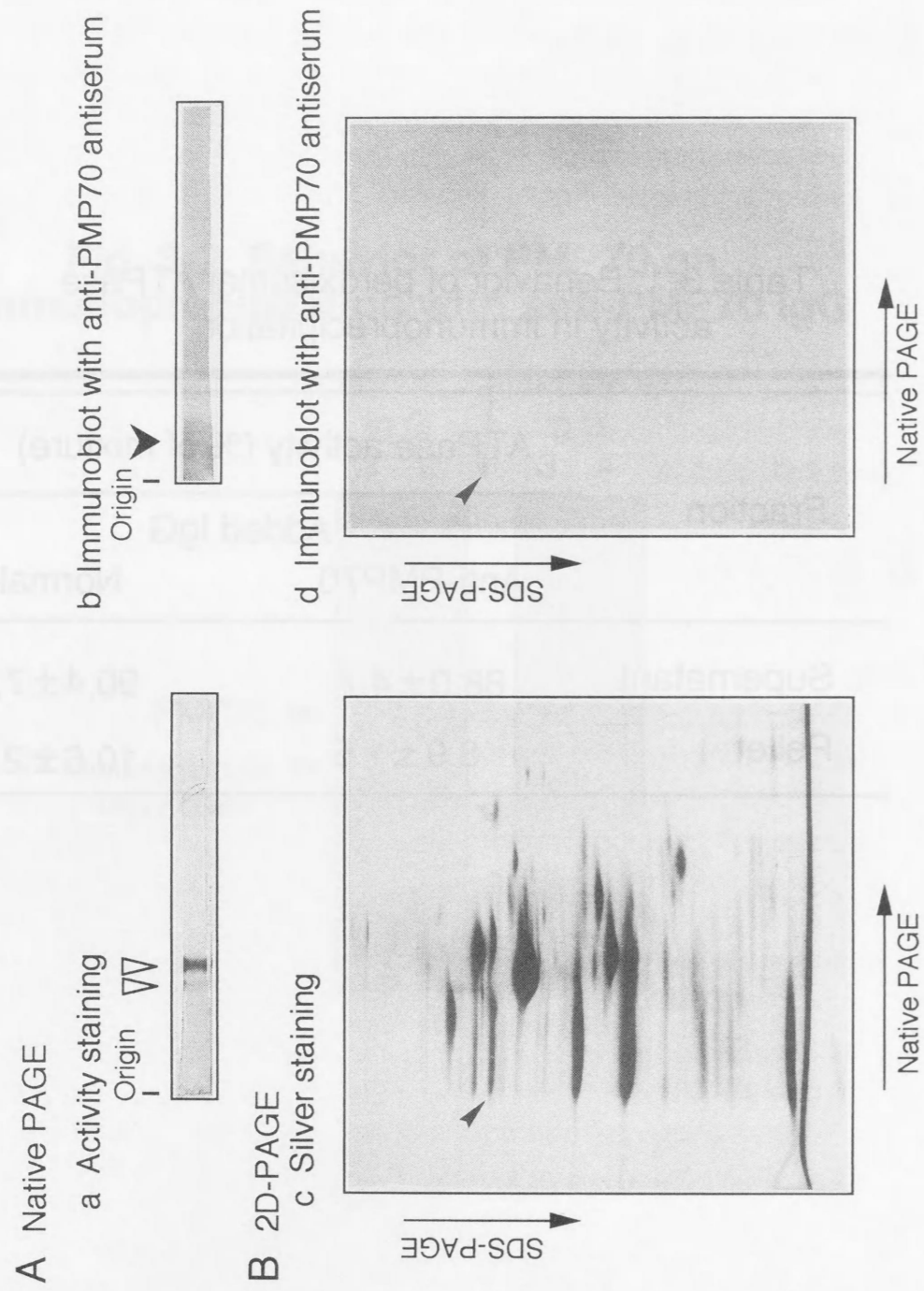


**Table 3-1. Behavior of peroxisomal ATPase activity in immunoprecipitation**

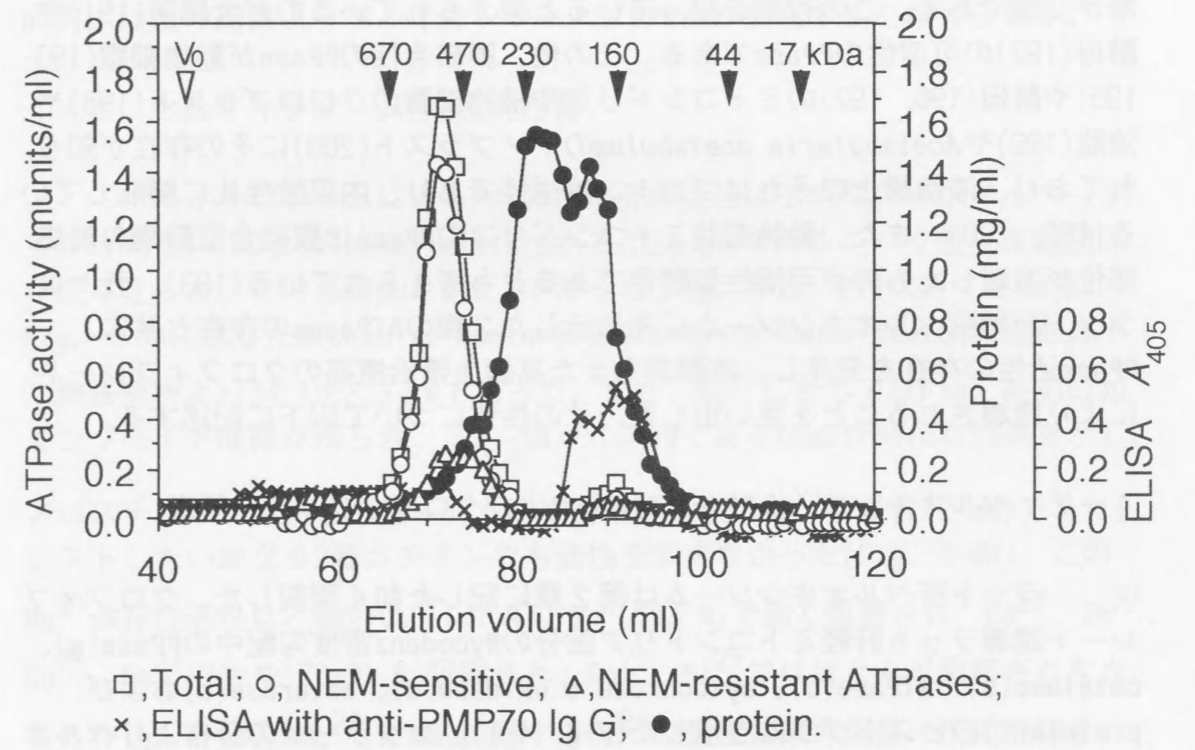
Fraction	ATPase activity (% of mixture)	
	Added IgG	
	Anti-PMP70	Normal
Supernatant	88.0 ± 4.7	90.4 ± 7.1
Pellet	8.9 ± 1.5	10.6 ± 2.3



**Fig. 3-3. ATPase activity and PMP70 on native (A) and two-dimensional PAGE (B) of C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>-solubilized peroxisomes**



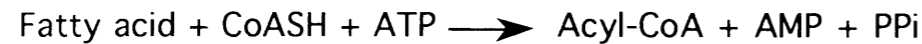
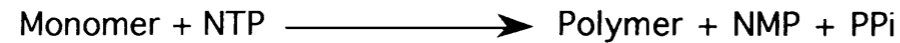
**Fig. 3-4. Gel filtration profile of solubilized peroxisomal ATPases on Superose 6 prep HR 16/50**



## 第4章 ペルオキシソームPPaseの性質

### 4-1 はじめに

無機ピロリン酸(PPi)は生体内で高分子物質、例えばDNA、RNA、タンパク生合成の際に生成する。脂質代謝においてはacyl-CoA ligase反応によっても生成される。



これら生合成反応の持続には無機ピロフォスファターゼ(PPase)によるPPiの分解が必須である。この役割を担っていると考えられているのが大腸菌(191)や酵母(192)の可溶性のPPaseである。この他、膜結合性のPPaseが動物細胞(193-195)や酵母(196, 197)のミトコンドリアや植物細胞のクロロプラスト(198)や液胞(199)や*Acetabularia acetabulum*のトノプラスト(200)にその存在が知られており、液胞膜上のそれはプロトン輸送性であり、内部酸性化に機能している(199, 200)。また、動物細胞ミトコンドリアのPPaseは膜結合型酵素の触媒部位が遊離したものが可溶性型酵素であるとも考えられている(193)。我々はラット肝細胞ペルオキシソームに先に示した2種のATPasesの存在と共に、PPase活性の存在を発見し、本酵素もまた高脂血漿治療薬のクロフィブレートにより誘導されることを見出した。その性質について以下に記述する。

### 4-2 ペルオキシソームPPaseの検出およびクロフィブレート誘導

ラット肝ペルオキシソームは第2章に記した如く調製した。クロフィブレート誘導ラット肝軽ミトコンドリア画分のNycodenz密度勾配中のPPase(a)、catalase(b)、ATPase(c)、cytochrome c oxidase(d)、esterase(e)およびprotein(f)のヒストグラムを示した(Fig. 4-1)。カタラーゼの分布よりペルオキシソームは高密度分画に沈降し、ミトコンドリア、リソソーム、ミクロソームなどと分離していることが判る。(a)のPPaseのヒストグラムのopen areaはクロフィブレート誘導群を、shaded areaは正常群を示している。正常群のPPaseはペルオキシソーム画分で非常に弱く明確なピークとは言えないが、誘導群では弱いながらカタラーゼの分布に一致するピークとして存在する。さらに、PPaseはミトコンドリアに存在することが知られており、そのマーカー酵素のcytochrome c oxidase活性との比を比較すると、ペルオキシソーム画分で0.25であり、ミトコンドリア画分のそれは0.0324であることより、ミトコンドリアの混入によるPPase活性ではないと示唆された(Table 4-1)。この事はペルオキシソーム画分のATPase活性がF-type ATPase特異的阻害剤のoligomycin非感受性であることとも一致する。

さらに、Nycodenz密度勾配遠心法で得られたペルオキシソーム画分を5倍容のSVEHで希釈、遠心後、再密度勾配遠心にかけるとほとんどすべてのPPase活性(64%)がカタラーゼ活性(70%)と同様、高密度画分に回収できた。この時のタンパクの回収率は74%であった。若干回収率が低いのは、上記洗浄操作におけるペルオキシソームタンパクの漏出によるものと考えられる。さらに、一部低密度画分に見られる活性がペルオキシソームから漏れ出した活性と考えられることにもよる。クロフィブレートによる誘導効果は正常群(2匹)のペルオキシソーム画分中には全活性の1.86%に当たる124 munitsのPPase活性が存在するのに対し、クロフィブレート2週間投与誘導群(同じく2匹)では3.42%、1480 munitsが存在し、12倍の誘導増加を示し、比活性は2.4倍に上昇した(正常群、6.56 munits/mg protein: 誘導群、15.9±5.0 milliunits/mg protein、n=8)。以上の結果よりペルオキシソームにPPaseが存在すると考えられる。

### 4-3 ペルオキシソームPPaseの性質

ペルオキシソームによるPPiの加水分解活性は2時間のインキュベーション時間と、100 μlのassay mixture中で7.2 μgまでのタンパク量に直線関係が成り立った。その至適pHは約8.5であった(Fig. 4-2)。PPiに対するKm値はFig. 4-3Aに示したMichaelis-Menten曲線のdamping Gauss-Newton非線形最小二乗法解析より34.1±3.3 μMであった。また、Mg<sup>2+</sup>に対してはFig. 4-3Bの如くシグモイド曲線が得られ、S<sub>0.5</sub>値が100 μMであるhomotropicな効果を示し、

アロステリック酵素と推定された。本酵素は完全にMg<sup>2+</sup>要求性(2 mM)であり、テストしたいかなる2価カチオンでも活性を示さなかった(Fig. 4-4A)。このMg<sup>2+</sup>依存性活性は2 mMのCa<sup>2+</sup>(91%)、Mn<sup>2+</sup>(83%)で強く阻害され、Cd<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>でやや(70-31%)阻害され、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>ではほとんど阻害されなかった(Fig. 4-4B)。Mg<sup>2+</sup>(2 mM)に対するCa<sup>2+</sup>の阻害効果の用量-反応曲線をFig. 4-4Cに示したが、そのIC<sub>50</sub>は0.25 mMであった。

ペルオキシソームを超音波処理後、遠心するとPPase活性の89.9%が上清に回収でき、大部分のPPaseがペルオキシソーム内部マトリックスに存在することが示唆された。

PPi以外のリン酸化合物に対する全ペルオキシソームの加水分解活性をFig. 4-5Aに示した。ATP、GTP、CTP、UTP、ITP、ADP、AMPに対してはいずれもPPiの23-8%の活性を示した。この結果は、ペルオキシソーム膜がATPなど低分子化合物に対し透過性であるとの報告(57)から、ヌクレオチドがペルオキシソーム内部に浸透し、検出された活性と考えられた。従って、超音波処理上清を用いてこれら基質に対する活性を測定したところ(Fig. 4-5B)、完全にPPi特異的であったので、先のヌクレオチドに対する活性は膜結合性の2種のATPase活



性によるものと考えられた。また、全ペルオキシソームは*p*-nitrophenyl phosphateやglucose-6-phosphateをほとんど加水分解しない(PPiの3%以下)他、*trans*-Golgi体のマーカー酵素のthiamine pyrophosphataseの基質であるthiamine pyrophosphateもほとんど加水分解しなかった。

いくつかの阻害剤に対する感受性をFig. 4-6に示した。SH試薬に関しては、*p*-chloromercuriphenyl sulfonic acid (PCMPS)およびHg<sup>2+</sup>はPPase活性を完全に阻害した(A)。一方、NEMは部分阻害(B)、NaFも活性を阻害した(C)。膜結合性PPaseを阻害することが知られているDCCDはペルオキシソームPPase活性を阻害しなかった(D)。この様な阻害剤感受性はラット肝細胞のミトコンドリア(201)や細胞質(202)に存在する可溶性PPaseとほぼ同じ結果であり、差異は認められなかった。

#### 4-4 考察

Nycodenz密度勾配中のPPaseとcytochrome c oxidaseの分布を比較、ペルオキシソームATPaseがoligomycin耐性であること、およびAnti-F<sub>1</sub>-ATPase抗血清によるブロッキングによって、精製ペルオキシソーム中にミトコンドリアF<sub>1</sub>-ATPaseの $\alpha$ ならびに $\beta$ サブユニットが検出できなかったことより(抗体価が低かったのではという問題点が残ってはいるが、unpublished result)、ペルオキシソーム画分に存在するPPaseがミトコンドリアの混入によるものとは考えられない。さらに、2回目のNycodenz密度勾配遠心により大部分のPPase活性がペルオキシソーム画分に回収できたことや、ペルオキシソームPPaseがクロフィブレート投与により誘導を受けることより、このPPaseがペルオキシソーム酵素であると考えられる。

一方、いわゆるミクロソームマーカー酵素のエステラーゼもペルオキシソーム画分に検出され、2回目のNycodenz密度勾配遠心により大部分が回収できたことと、クロフィブレート処理で約10倍に誘導されたことよりエステラーゼもまたペルオキシソーム酵素であると考えられる。この様なペルオキシソーム膜と小胞体膜(endoplasmic reticulum membrane)の両方に存在するものとしてNADH-cytochrome b<sub>5</sub> (c) reductaseが報告されている(165)。我々もこのcytochrome c reductase活性がペルオキシソーム画分に存在することを確認している(unpublished result)。

再遠心によりミトコンドリアマーカー酵素のcytochrome c oxidaseもカタラーゼとともにペルオキシソーム画分に回収できたが、比活性が非常に小さいこと、クロフィブレートで誘導効果が見られなかった。ペルオキシソーム-ミトコンドリア結合がマウス肝において観察されていること(203)などより、cytochrome c oxidaseが本当にペルオキシソームに存在するのかどうか更なる

検討が必要である。ペルオキシソームの起源を推定するとき、ペルオキシソームの不均一性あるいはペルオキシソームのミトコンドリアやミクロソームとの3方向性の関連性も考えられなければならないであろう。

ラット肝臓におけるPPase活性はミトコンドリア(193, 194, 201, 204, 205)、またラットhepatoma 3924A細胞とラット肝細胞の細胞質(202)に存在すると報告されている。ペルオキシソームPPaseの性質は、至適pH(Fig. 4-2)、基質特異性(Fig. 4-5)、2価カチオンの要求性と阻害効果(Fig. 4-4)、Mg<sup>2+</sup>のホモトロピック効果(Fig. 4-3B)、PCMPS、Hg<sup>2+</sup>およびNEMのSH試薬およびNaFの効果(Fig. 4-6)については、すでに報告されている結果(200, 201)とほぼ一致した。DCCDはFig. 4-6Dに示したようにペルオキシソームPPase活性を阻害しなかった。この事は0.1 M KClでも阻害されないこと(data not shown)と併せて、膜結合性H<sup>+</sup>-PPase(191)とは異なるものと推定される。また、ペルオキシソームPPaseはATPやNAD<sup>+</sup>によって阻害されなかった(data not shown)ので、ラット肝核に存在する可溶性PPase(206)とも異なる性質のものであろうと考えられた。

ペルオキシソームPPaseの構造については、native PAGEやゲルろ過クロマトグラフィー(unpublished result)で見える限り60-70 kDaであろうと推定している以外は、まだ明確ではない。ラット肝ミトコンドリアマトリックスおよび内膜結合性PPaseはそれぞれ60kDaのヘテロダイマーおよび120kDaのヘテロテトラマーであると報告されている(193, 194)。このマトリックスヘテロダイマーは内膜結合性のヘテロテトラマーの触媒コンポーネントと推定されている。一方、細胞質PPaseは61kDaのホモダイマーと報告されている(202)。ペルオキシソームPPaseの性質を明らかにし、ミトコンドリアのそれと比較することは今後の課題である。

Mg<sup>2+</sup>のペルオキシソームPPase活性に対するアロステリック効果はペルオキシソーム内における代謝制御の観点からは、適した性質かもしれない。極長鎖脂肪酸は遊離の酸としてペルオキシソーム内へ輸送され、ペルオキシソーム内部で脂肪酸 $\beta$ -酸化されるために、coenzyme A チオエステル体に活性化される(207)。このacyl-CoA ligase反応で生じるPPiは反応の継続のために分解されなければならないであろうし、PPiがacyl-CoA: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase [EC 2.3.1.42]を活性化すること(208)、本酵素がペルオキシソームに局在し(209)、またプラズマローゲン生合成に必須であること(210)が報告され、ペルオキシソームPPaseが脂肪酸代謝やプラズマローゲン生合成の制御に関わっている可能性が考えられる(Scheme 4-1)。

#### Legends to Figures.

Fig. 4-1. Distribution profiles of PPase (a), catalase (b), ATPase (c), cytochrome *c* oxidase (d), esterase (e), and protein (f) in the first (A) and second (B) Nycodenz gradients. The light mitochondrial fractions from the livers of normal and clofibrate-induced rats (2 heads each) were centrifuged through the first Nycodenz gradient, and then the peroxisomal fractions were recentrifuged through the second Nycodenz gradient as described under "Materials and Methods." The ordinate shows the enzyme concentration relative to the concentration corresponding to a uniform distribution throughout the gradient, as reported (219). The distributions PPase from normal and clofibrate-induced rat liver are shown as shaded and open areas, respectively. The oligomycin-sensitive and oligomycin-resistant ATPases are shown as open and shaded areas, respectively.

Table 4-1. Enzymatic activities of peroxisomal and mitochondria-rich fractions of liver from clofibrate-administered rats. Enzymatic activities in Nycodenz gradient fractions (Fig. 4-1) of clofibrate-induced rat liver were determined as described under "Materials and Methods." The activities are expressed as munits/mg protein except for catalase (B. U. /mg protein). The percent distribution values are those relative to the total activity throughout the Nycodenz gradient.

Fig. 4-2. pH profile of rat liver peroxisomal PPase. PPi hydrolysis was measured at the indicated pHs in the presence (closed symbols) and absence (open symbols) of 2 mM MgCl<sub>2</sub>, as described under "Materials and Methods." MES-Tris (●, ○), MOPS-Tris (▲, △), Bicine-Tris (■, □).

Fig. 4-3. Effects of the PPi (A) and MgCl<sub>2</sub> (B) concentrations on peroxisomal PPase activity. PPase activity was measured in the presence of 2 mM MgCl<sub>2</sub> (A) and 0.5 mM PPi (B), respectively. The insets in A and B show a Lineweaver-Burk plot and a Hill plot, respectively.

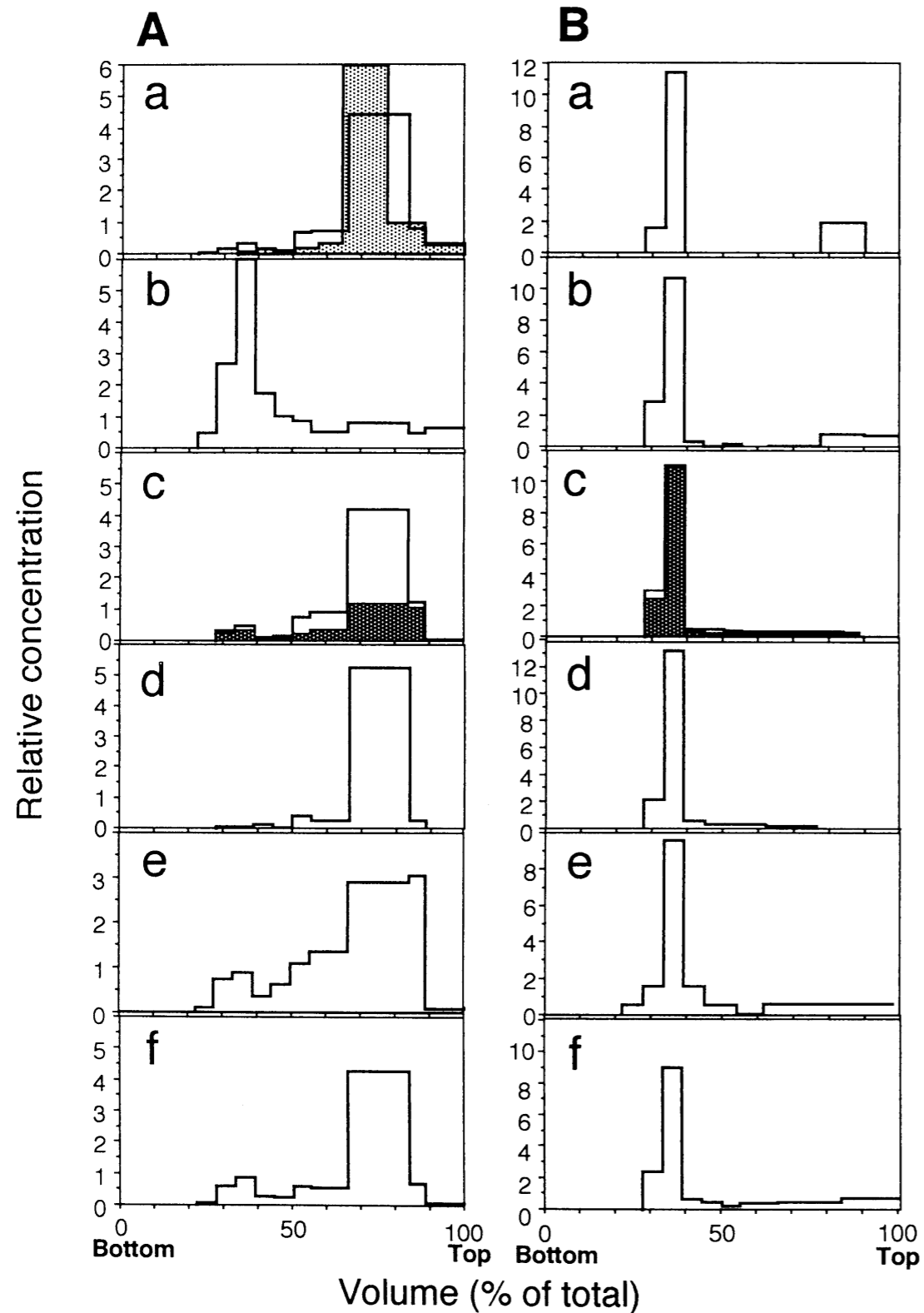
Fig. 4-4. Requirement (A) and effect (B) of divalent cations on the peroxisomal PPase and inhibition by Ca<sup>2+</sup> (C). In A, the PPase reaction was carried out in the absence or presence of various divalent cations at 2 mM. In B and C, the reaction mixture comprised 2 mM MgCl<sub>2</sub> and other divalent cations as indicated (B) or various concentration of CaCl<sub>2</sub> (C). Divalent

cations (2 mM) were added as chloride salts, except for Fe<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, which were added as sulfate salts. The control PPase activity was 12.1 munits/mg protein.

Fig. 4-5. Hydrolytic activity of peroxisomes toward PPi and other phosphorous compounds. The hydrolytic activities of a peroxisomal suspension (A) and a sonicated supernatant of peroxisomes (B) were measured as described under "Materials and Methods," with 0.5 mM of the substrates. The control (PPi) hydrolytic activities were 10.4 and 14.7 munits/mg protein, respectively. The abbreviations used are: pNPP, *p*-nitrophenyl phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; TPP, thiamine pyrophosphate.

Fig. 4-6. Effects of inhibitors on the peroxisomal PPase. The peroxisomal PPase activity was measured as described under "Materials and Methods" in the presence or absence of the indicated inhibitors, and expressed as a percentage of the control (21.6 munits/mg protein). A, PCMPS (open) and HgCl<sub>2</sub> (closed); B, NEM; C, NaF; D, DCCD. The inhibitors other than NaF were pre-incubated with the peroxisomes for 10 min at 30°C. The hydrophobic inhibitors, DCCD and PCMPS, were dissolved in ethanol and DMSO, respectively, and applied so that the final concentration did not exceed 1%.

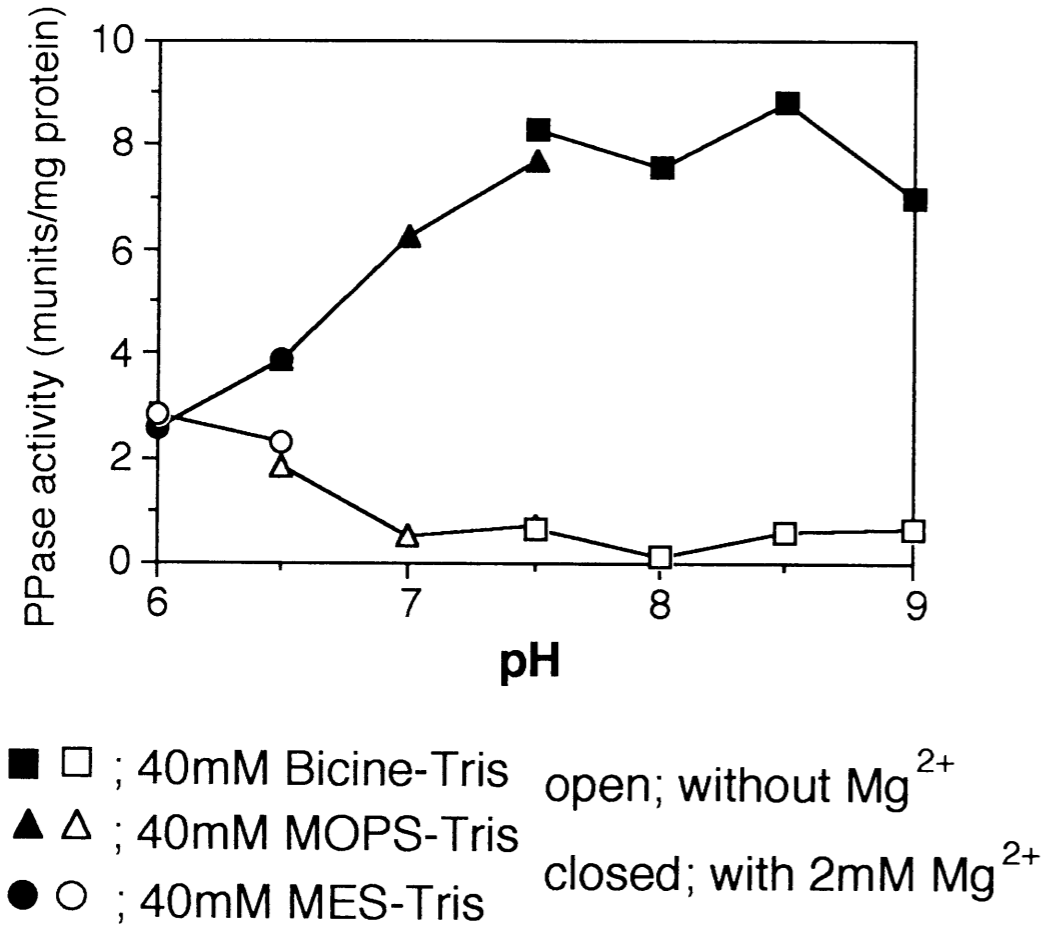
**Fig. 4-1. Distribution profiles of PPase (a), catalase (b), ATPase (c), cytochrome *c* oxidase (d), esterase (e), and protein (f) in the first (A) and second (B) Nycodenz gradients**



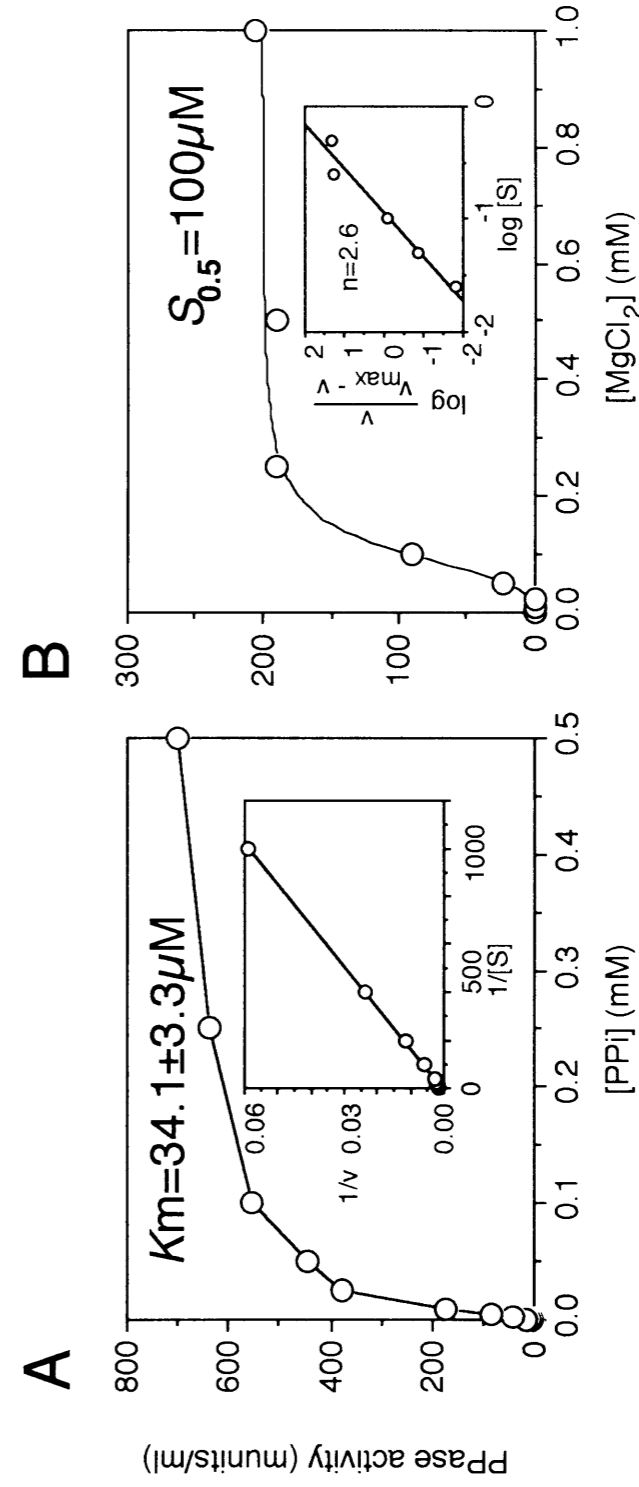
**Table 4-1. Enzymatic activities of peroxisomal and mitochondria-rich fractions of liver from clofibrate-administered rats**

Enzymes	Specific activity (munits/mg protein)		Percent distribution in peroxisomes
	Peroxisomal fraction	Mitochondria-rich fraction	
PPase	16.9	47.3	3.42
Catalase	2.25	0.057	58.8
ATPase			
Oligomycin-resistant	9.07	6.07	10.6
Oligomycin-sensitive	0	15.0	0
Cytochrome <i>c</i> oxidase	67.6	1,460	1.26

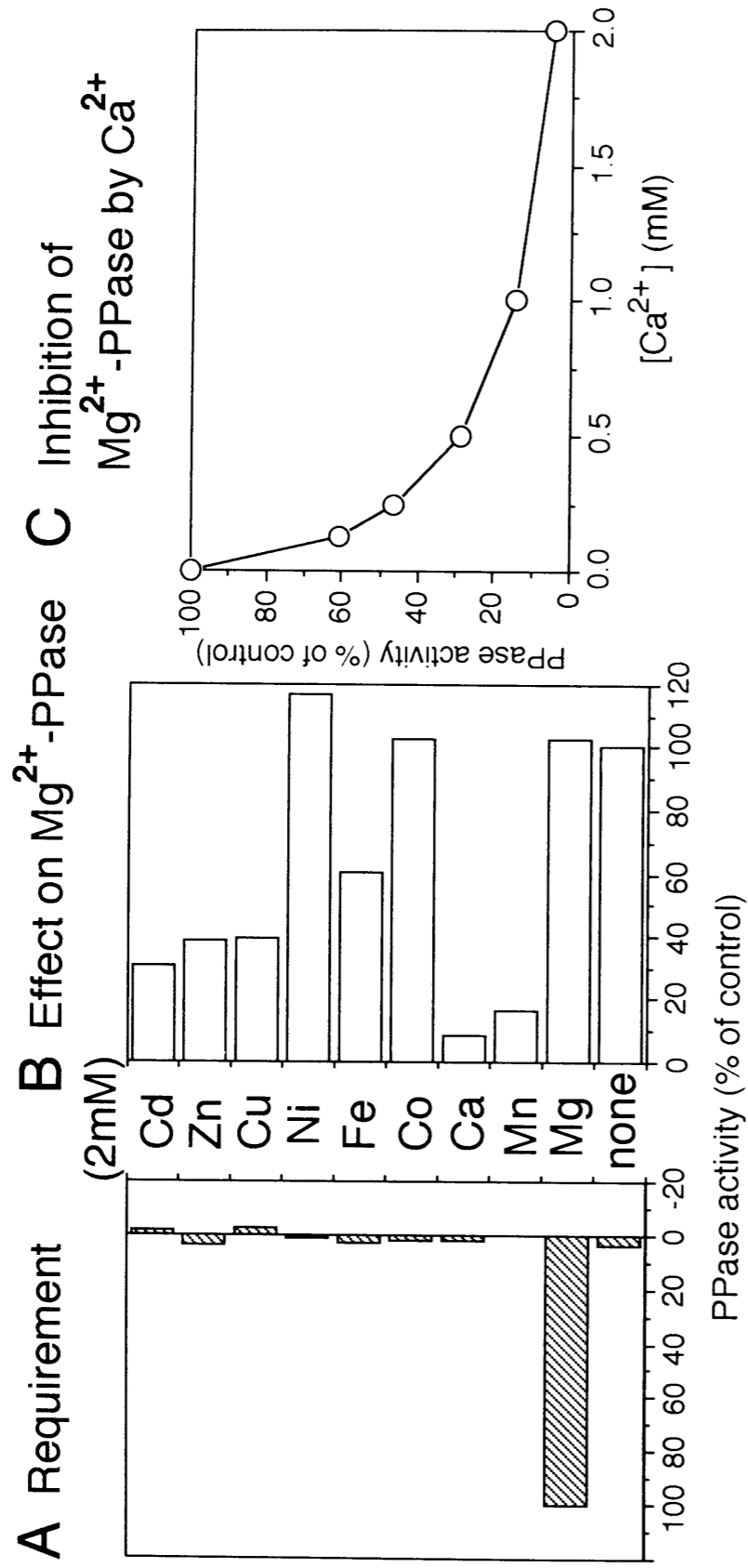
**Fig. 4-2. pH profile of rat liver peroxisomal PPase**



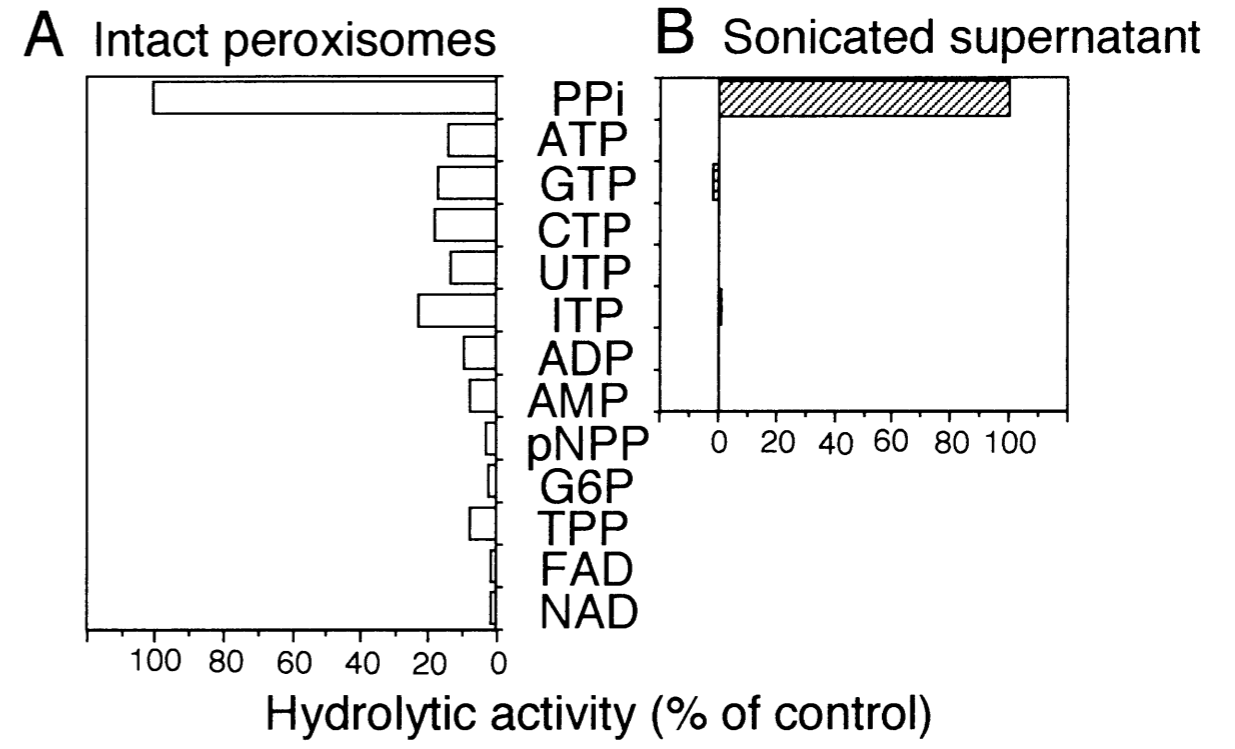
**Fig. 4-3. Effects of PPI (A) and MgCl<sub>2</sub> (B) concentrations on peroxisomal PPase activity**



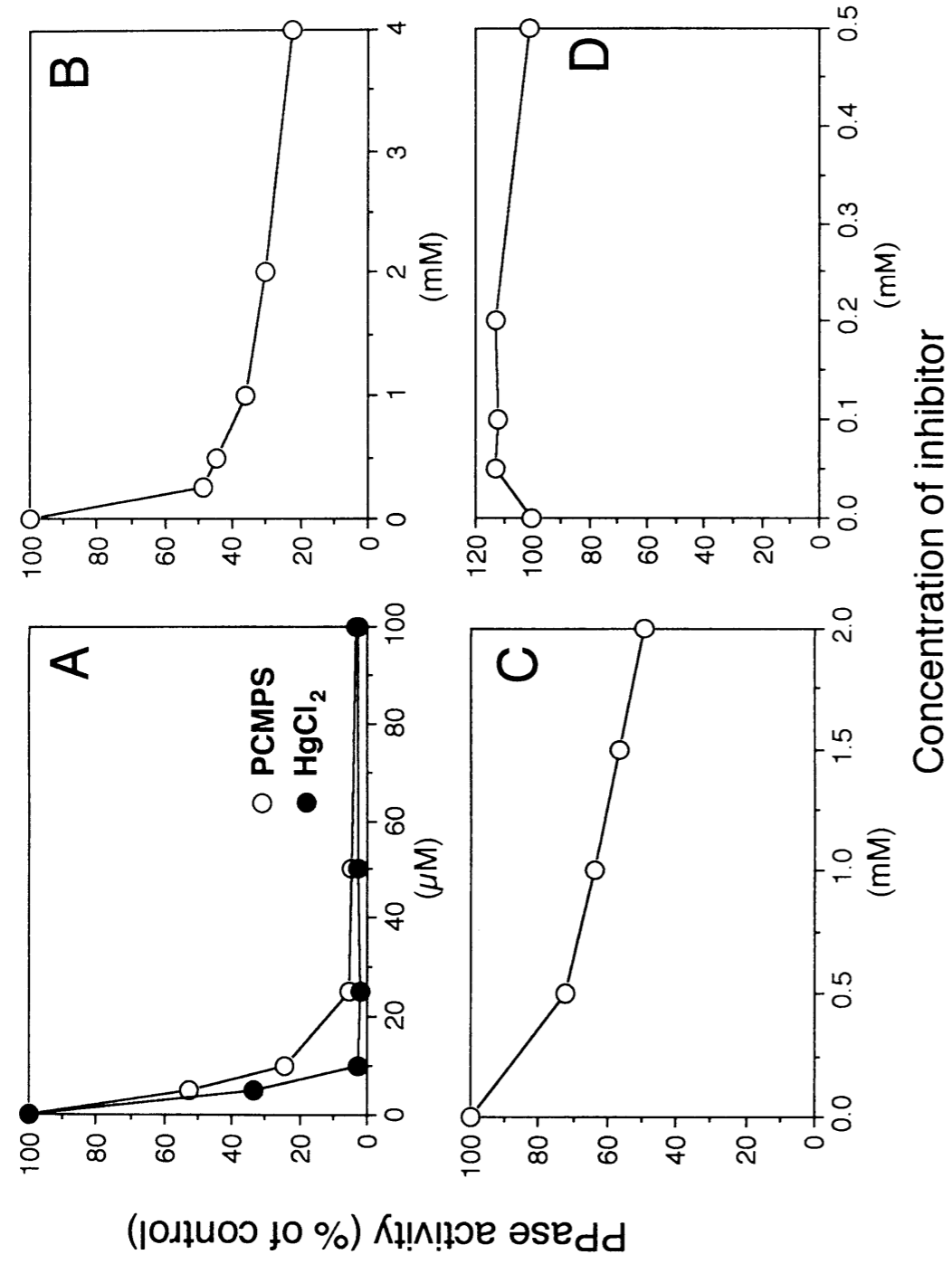
**Fig. 4-4. Effect of divalent cations on peroxisomal PPase**



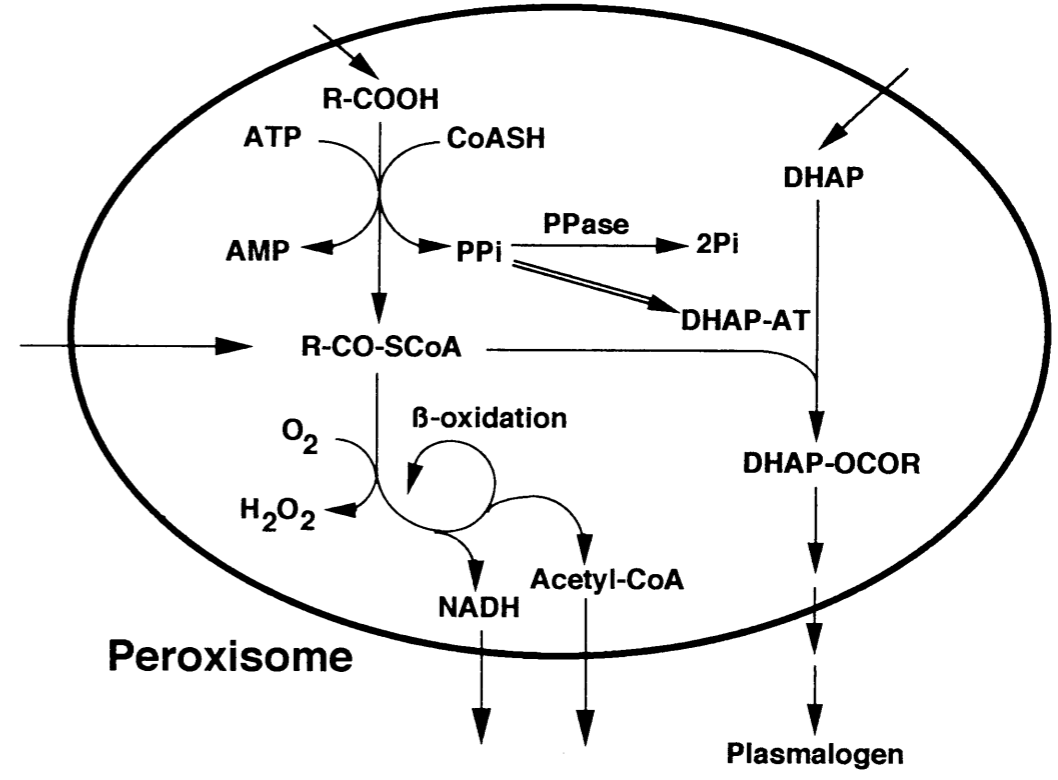
**Fig. 4-5. Hydrolytic activity of peroxisomes toward PPi and other phosphorous compounds**



**Fig. 4-6. Effects of inhibitors on peroxisomal PPase**



**Scheme 4-1. Hypothetic functions of peroxisomal PPase**



## 第5章 ペルオキシソームATPasesの生理機能

### 5-1 はじめに

序論1.8.1に記述したペルオキシソーム局在性酵素であるacyl-CoA oxidaseおよびacyl-CoA: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)反応の基質輸送へのATPaseの関与について種々検討したが(本論文において詳細な記述は省略した)、intactペルオキシソームにおけるATPによる活性化(ATP添加により、消失する潜在性)は認められず、ペルオキシソーム膜の不安定性に起因するものかどうか、更なる測定条件などの検討が必要であると考えられる。

ペルオキシソーム蛋白質の膜透過機構を明らかにする上で、移行過程を*in vitro*の系で再構成することは大変有効である。しかしこの取り込み実験は、ペルオキシソーム膜の不安定性のためか、ミトコンドリア、粗面小胞体など他のオルガネラに比べて成功例は少ない。そのため膜輸送機構についてはほとんどわかっていない。Imanakaらは、クロフィレートで誘導したラットの肝臓から、RNAを調製し、ウサギ網状赤血球可溶性画分、無細胞蛋白質合成系を用い、 $[^{35}\text{S}]$  -メチオニン標識したacyl-CoA oxidaseを用いて移送活性について検討している。即ち、このacyl-CoA oxidaseの移送は、ATP、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 要求性であり、イオノフォーであるnigericin、SF6847、monensin、CCCP、valinomycinをもちいて検討した結果、膜電位の関与はないと報告している。さらにAMPやATPの非加水分解アナログであるAMP-PNPがATPの代替にならないことより、acyl-CoA oxidaseの移送にはATPの加水分解が必要であると結論している(96)。この*in vitro* acyl-CoA oxidase import系を用い、第2章に記したペルオキシソームATPasesの関与があるかどうか検討した。

また、ペルオキシソーム脂肪酸 $\beta$ -酸化系の初発酵素であるacyl-CoA oxidaseは、C-末端に種をこえてよく保存されているトリペプチド配列(Ser-Lys-Leu = PTS1配列)をもっているタンパクであり、このトリペプチドがペルオキシソームへのターゲットシグナルであると考えられている(100-102)。そこで、acyl-CoA oxidaseのC-末端12アミノ酸残基よりなるペプチドをヒト血清アルブミン(HSA)に結合させたHSA-SKLを合成し、マイクロインジェクション法によりCHO細胞においてペルオキシソームに取り込まれるか、またその局在化に第2章に記したペルオキシソームATPasesが関与しているかどうか検討した。

### 5-2 acyl-CoA oxidaseのペルオキシソーム内への移送

*in vitro* acyl-CoA oxidase import系の概略を、Fig. 5-1に示した。ク

ロフィレート投与ラット肝より全RNAを調製し、rabbit reticulocyte lysateと $[^{35}\text{S}]$  protein labeling mixを用いて、無細胞系翻訳を行った。正常ラット肝よりペルオキシソームを調製し、この翻訳産物を精製ペルオキシソームとインキュベーションし、import反応を行わせた。この反応では、シグナル切断など分子量変化を伴わないため、Triton X-100存在下、非存在下にproteinase K処理を行った。Triton X-100存在下に消失し、Triton X-100非存在下に残る75kDaのバンドをペルオキシソーム内に移送されたacyl-CoA oxidaseとして定量した。

#### 5-2-1 温度依存性

26°Cでインキュベーション後、約75 kDaのところにproteinase K耐性のbandが検出できた。つまりacyl-CoA oxidaseがペルオキシソーム内に移送され、proteinase K耐性になったことが確認できた(Fig. 5-2. lane 1-3)。また、acyl-CoA oxidaseの上にある約79 kDaのバンドはTriton X-100存在下でも消失せず、proteinase K耐性のタンパクで、hydratase-dehydrogenase(H-D, bifunctional enzyme)と推定される。さらに0°Cにおいては $[^{35}\text{S}]$  acyl-CoA oxidaseのバンドが、proteinase Kでほとんど消失した(Fig. 5-2. lane 4-5)ことより、ペルオキシソームへのタンパクの輸送は、少なくとも膜結合と輸送という2つのステップが考えられた。即ち、最初の膜に結合する段階は、温度に非依存的であり、次のステップである膜内への輸送は温度依存的であると考えられる。

#### 5-2-2 時間およびATP依存性

またインキュベーション時間との相関性を調べたところ、proteinase K耐性の $[^{35}\text{S}]$  acyl-CoA oxidaseの放射能は時間依存的に増加し、1時間でほぼプラトーに達した(Fig. 5-3. closed circles)。また、トランスレーションプロダクトはタンパクの合成時のATPが存在しているので、ATP枯渇剤であるアピラーゼを反応系に入れたところ(26°C、10分間のプレインキュベーションによりATPが枯渇することをImanakaらは確かめている。)、proteinase K耐性の $[^{35}\text{S}]$  acyl-CoA oxidaseのバンドはほとんど見られなくなった(Fig. 5-2. lane 13-15; Fig. 5-3. open circles)。従って、この輸送活性はATP依存性であると確かめられた。

#### 5-2-3 ATPase阻害剤の影響

このATP依存的なacyl-CoA oxidaseの移送はNEM感受性、非感受性の2種類のATPaseと関係しているのかどうか検討した。ペルオキシソームNEM感受性ATPase活性は第2章に記した如く、NEMやNBD-CIなどのSH試薬や、F-typeおよ

びV-type H<sup>+</sup>-ATPase の阻害剤であるquercetin、TBT、STAや、アニオンのトランスポーターの阻害剤であるDIDSや、F-typeおよびV-type ATPaseのH<sup>+</sup>輸送阻害剤であるDCCDに感受性であった。NEM非感受性のATPase 活性はSTAのみでしか阻害されなかった。阻害の程度はSTA、DCCD以外ほぼ完全阻害、STAでは、NEM感受性、非感受性ATPaseともに80 %程度の阻害、DCCDでは、50 %程度の部分阻害であった。

そこでこれらの阻害剤について検討したところ、DCCDはATPaseの阻害濃度より低濃度の5 μMで(Fig. 5-4. lane 4-6)完全阻害し、STAとquercetinは完全ではないもののATPaseの阻害濃度とほぼ同じ濃度(それぞれ2 μM、25 μM)でacyl-CoA oxidaseの移送を部分阻害した(Fig. 5-5)。またDIDSは反応中に含まれる5 %のdimethyl sulfoxide(DMSO)によりacyl-CoA oxidaseの移送が阻害されたため測定できなかった。

またアッセイ中にDTT 1.05 mMが含まれるので、DTT量に対して過量のNEM(2.2 mM, 3.1 mM)をもちいて、acyl-CoA oxidaseの移送が阻害されるかどうか検討したところ、ほとんど阻害は見られなかった(Fig. 5-6. lane 4-9)。ペルオキシソームに存在するNEM感受性ATPaseを完全に不可逆的に阻害するNEMの濃度は、20 μMであるので、あらかじめ100 μM、及び1 mMのNEMで処理したペルオキシソームをもちいて、acyl-CoA oxidaseのペルオキシソームへの移送活性を検討した(Fig. 5-6. lane 13-18)。その結果、いずれの場合もほとんど阻害されていないか、あるいは阻害活性は非常に低いと考えられた。

### 5-3 HSA-SKLの培養CHO細胞ペルオキシソームへの移送

用いたacyl-CoA oxidaseのC末端配列とマイクロインジェクション法の模式図をFig. 5-7に示した。

#### 5-3-1 蛍光抗体法によるCHO細胞ペルオキシソームの検出

蛍光抗体法によりCHO細胞のペルオキシソームがどの様に染色されるかどうか、ウサギ抗ペルオキシソーム、抗ペルオキシソーム膜タンパク、抗PMP70抗血清を用いて検討したところ、いずれも斑点状の蛍光染色像が抗体価の差によると考えられる強度の差はあったが観察された(Fig. 5-8)。もっとも強い蛍光像が得られた抗ペルオキシソーム抗血清はCHO細胞lysateに対するimmunoblotでも、63 kDaのカタラーゼと推定されるタンパクと強く反応した(data not shown)。このようにCHO細胞のペルオキシソームが斑点状の蛍光像として検出できた。また、抗ヒト血清アルブミン(HSA)抗血清あるいは免疫前正常血清ではこの様な斑点状の蛍光像は観察されず、HSAあるいはHSA-SKLマイクロインジェクション実験に抗HSA抗血清を用いてその細胞内局在性について

検討できることを確認した。

#### 5-3-2 マイクロインジェクション法によるHSA-SKLの移送

HSA-SKLはperoxisomal targeting signal 1 (PTS1)である、C末端に-Ser-Lys-Leuを持つ12アミノ酸残基(acyl-CoA oxidaseのC末端配列)からなるペプチドがそのN末端のCys残基と*m*-succinimidobenzoyl基を介し、HSAのLys残基に結合しており、その結合比は1:8~10と推定できた。

このHSA-SKLおよびHSAをCHO細胞にマイクロインジェクションし、抗HSA抗血清を用いて蛍光抗体法でその細胞内局在性を調べたところ、シグナル配列を持つHSA-SKLは斑点状の蛍光染色像を示し、インジェクション後、24時間の時間依存的ペルオキシソームへの移送が認められた。これに対し、シグナル配列を持たないHSAのみでは細胞質内全体にわたるdiffuseした染色像が得られ、ペルオキシソームへの移行は観察されず、シグナル配列特異的ペルオキシソームへの移行反応であると考えられた(Fig. 5-9)。

#### 5-3-3 ATPase阻害剤の影響

HSA-SKLのペルオキシソームへの移送反応に対するATPase阻害剤の影響を検討したところ、精製ペルオキシソームを用いるNEM感受性ATPase反応を完全阻害する比較的低濃度のNEM、TBT、STAで阻害効果が認められた(Fig. 5-10)。これらATPase阻害剤はNEM、TBT、STAそれぞれ終濃度0.2 mMで用いたが、これら阻害剤の細胞質中での濃度は、細胞体積の5 % (この条件下、インジェクションできる量であり、細胞に対し生理的に影響のない量と言われている(211))をマイクロインジェクションしたとして各10 μMと推定される。また、同時に位相差顕微鏡による観察で、細胞の形態変化などは見られず細胞機能は正常に保たれていると考えられた(data not shown)。一方、ミトコンドリアATPase阻害剤として知られているoligomycinを40 μg/mlの濃度(エタノール終濃度1.7 %、細胞内濃度2 μg/mlと推定)で調べたところ、HSA-SKLの局在化は阻害されず(Fig. 5-10)、こうした上記阻害剤の影響が非特異的ATPase阻害による細胞内エネルギーレベルの低下によるものではないと、示唆された。ペルオキシソームATPaseは高濃度エタノール(15 %)存在下前処理を行うと、oligomycin感受性になるという結果(第2章)も得ているが、上記、細胞レベルの条件下にペルオキシソームATPaseはoligomycinに耐性であると考えられる。

以上の結果より、Hole cellレベルの定量性に欠ける実験結果ではあるが、*in vitro* acyl-CoA oxidase import 実験の結果と考えあわせ、ペルオキシソーム膜に見出されたATPasesがペルオキシソームタンパク移送に関わるものと推定された。

### 5-4 考 察



acyl-CoA oxidase移送系以外の、ペルオキシソームへの*in vitro*タンパク移送系の研究が少ないということはすでに述べたが、細胞膜を透過性にした細胞を用いて、投与したタンパクのペルオキシソームへの移行を観察する方法が報告されている。CHO細胞をstreptolysin-0処理で透過性にし、外因性のluciferaseあるいはHSA-SKLの移送を検討したところ、CHO細胞質因子あるいはrabbit reticulocyte lysate依存性であり、ATP要求性であり、CCCPで阻害を受けず膜電位依存性はないと推定され、用いたrabbit reticulocyte lysateはNEM非感受性で、その膜系(透過性にした細胞)にNEM感受性因子の存在が報告された(212)。また、GTPではその活性は見られず(213)、Zellweger fibroblastsではこの活性は見られていない(212, 213)。

一方、BALV/c 3T3、Zellweger fibroblasts、CHO細胞などにluciferase、HSA-SKL、alcohol oxidaseをマイクロインジェクションする方法(110, 214-216)も試みられ、温度・時間依存性、SKL配列依存性、2-deoxyglucoseとNaN<sub>3</sub>による阻害、anti-HSP70による阻害などが明らかになった。また、ラット肝ペルオキシソーム細胞質側表面にHSP70が結合して存在すること、クロフィブレートで誘導されることより、細胞質HSP70 familyがタンパク移送に関与すると示唆されている(216)。以上のことよりペルオキシソーム蛋白移送系は、細胞質因子および膜系因子からなる複雑な系であると推定される。

*in vitro* acyl-CoA oxidase移送系において、<1>acyl-CoA oxidaseのペルオキシソーム内への移送は、少なくとも2つの段階があり、第1段階の膜に結合する段階は、温度に非依存的であり、第2段階の膜内への移送は温度依存的である。<2>ペルオキシソーム内への移送は、ATP要求性である。<3>その移送はDCCD、STA、quercetinにより阻害される。<4>NEMでは阻害されず、または阻害されていてもその効果は弱いと考えられる。

Hole cellレベルのHSA-SKLマイクロインジェクション法での結果は、そのペルオキシソームへの局在化はNEM、TBT、STAで阻害され、*in vitro* acyl-CoA oxidase import 実験の結果と考えあわせ、<1>cell free acyl-CoA oxidaseの移送反応がNEMにより阻害されないことより、NEM感受性ATPaseは関与しない。<2>STAがcell freeおよびhole cellレベルの両方で阻害効果を示したことより、NEM非感受性ATPaseがタンパク移送反応に関与する。<3>cell free系におけるDCCDの阻害効果はATPaseに対するより高感受性であったので、別のタンパク移送machineryに対する作用であると推定された。

最後に高脂血症について考えてみたい。本症は血清脂質の中でもコレステロールとトリグリセライドが異常に上昇した状態であり、動脈硬化の一因と考えられている。即ち、これらは血清中ではリポ蛋白として存在し、血管内皮において酸化あるいはアセチル化反応などを経て変性LDLとなり、スカベンジャーリセプターを介しマクロファージに取り込まれ、コレステロールエステルの蓄積による泡沫化が起きる。一方、肝細胞において血清リポ蛋白はLDLリセ

プターを介し取り込まれ、リソソームに輸送され加水分解で遊離コレステロールや遊離脂肪酸に代謝される。ペルオキシソームは極長鎖脂肪酸のβ-酸化、コレステロールからの胆汁酸生成に機能している。この事はペルオキシソーム異常症であるZellweger、X-linked adrenoleukodystrophy 症で極長鎖脂肪酸、胆汁酸中間代謝物の蓄積が認められることより推定される。

また、高脂血症治療薬について考えると、コレステロール生合成律速酵素のHMG-CoA還元酵素阻害剤であるプラバスタチン、シンバスタチンおよびコレステロールの胆汁中への異化排泄促進作用のあるプロブコール、さらにクロフィブレート系薬剤などが用いられている。このクロフィブレート系薬剤は齧歯類に対し、脂肪酸β-酸化系酵素などペルオキシソーム酵素の著しい誘導効果とペルオキシソーム増殖作用を示す。本論文でもラット肝ペルオキシソームATPasesおよびPMP70がクロフィブレート投与により誘導されることを示した。一方、ヒトにおいてはこのようなペルオキシソームに対する効果は知られていなかったが、ごく最近ヒト肝細胞(Hep EBNA2)とラット肝細胞(Fa0)に対するクロフィブレートの作用を比較し、ラット細胞ではacyl-CoA oxidase活性が6~11倍に増加すること、ヒト細胞ではラット細胞ほど顕著ではないが、2.4~3倍に、さらに2頭酵素(hydratase-dehydrogenase)のmRNAの発現も増加していることが報告された(217)。従って、齧歯類におけるほど顕著ではないにしても、ヒトにおいてもペルオキシソーム酵素のクロフィブレートによる誘導が示唆される。

しかし、クロフィブレート系薬剤の高脂血症治療機序の詳細は明らかではないが、以下のことが考えられている(218)。(1)リポ蛋白リパーゼ活性を高め、キロミクロン、VLDL中のトリグリセライドの分解を促進する。(2)末梢組織から動員される血中遊離脂肪酸を低下させ、肝臓におけるトリグリセライドの生合成を抑制することにより、VLDL合成を抑制する。(3)LDLリセプター活性を高め、LDL代謝を促進する。(4)胆汁中へのコレステロール排泄を促進する。(5)肝臓でのコレステロール生合成をアセチル-CoAからメバロン酸に至る過程を阻害する。(6)アセチル-CoAカルボキシラーゼを抑制し、脂肪酸の生合成を抑制する。(7)肝性トリグリセリドリパーゼ活性を高め、リポ蛋白の代謝を促進する。これらの機序にペルオキシソームが関わる可能性は十分考えられる。本論文においても、ペルオキシソームATPasesの生理機能として基質輸送、酵素蛋白移送について考察したが、高脂血症病態および治療機序の解明にペルオキシソームに関する知見が寄与することが期待される。

### Legends to Figures.

Fig. 5-2. Temperature and ATP dependence of acyl-CoA oxidase import into rat liver peroxisomes *in vitro*. The import assay was carried out at 26°C or 0°C for 60min. In lanes 1~12, the cell free translation products were imported into peroxisomes with ATP and ATP-regenerating system. In lanes 13~15, translation products were preincubated with apyrase (14U/ml) at 26°C for 10min for the depletion of ATP. 1%EtOH was added in lanes 7~9 and 1% DMSO was added in lanes 10~12. In lanes 3,6,9,12,15, the import mixtures were treated with 1% Triton X-100 prior to proteinase K (2 μg/ml) digestion. In lanes 2, 5, 8, 11, 14, the import mixtures were treated with proteinase K alone. After the incubation the peroxisomes were re-isolated by flash-centrifugation, subjected to 8-12% SDS-PAGE and imaging analyzer, BAS100, as described in "Materials and Methods."

H-D ; peroxisomal bifunctional hydratase-dehydrogenase.  
AOx ; peroxisomal acyl-CoA oxidase.

Fig. 5-3. Time-course of acyl-CoA oxidase import into rat liver peroxisomes *in vitro*. Proteinase K-resistant radioactivities were determined by imaging analyzer, BAS100. The ordinate shows the radioactivity in arbitrary units. closed circles, ATP(+); incubated with ATP and ATP-regenerating system. open circles, ATP(-); preincubated with 14u/ml apyrase at 26°C for 10min and incubated without ATP and ATP-regenerating system.

Fig. 5-4. Effect of DCCD on acyl-CoA oxidase import into peroxisomes. The import assay was carried out as shown in Fig.5-2. In lanes 1~3, 1%EtOH was added alone as vehicle.

Fig. 5-5. Effect of STA and quercetin on acyl-CoA oxidase import into peroxisomes. The import assay was carried out as shown in Fig.5-2. Silicotungstic acid was added as the SEH solution. Quercetin was added by the aid of 1% DMSO. The ordinates show the radioactivity is expressed as percent of control (SEH or 1% DMSO).

Fig. 5-6. Effect of NEM on acyl-CoA oxidase import into peroxisomes. The import assay was carried out as shown in Fig. 5-2. In lanes 4~6 and 7~9, the assay mixtures were added 2.2mM and 3.1mM NEM, respectively. In lanes 13~15 and 16~18, peroxisomes were pre-incubated with 100 μM and

1mM NEM at 30°C for 5min and NEM was quenched with 1mM DTT.

Fig. 5-8. Immunofluorescence microscopy by anti-peroxisome, anti-PMP, and anti-PMP70 antiserum in CHO cells. The CHO cells were fixed with 4% paraformaldehyde, treated with 0.2% Triton X-100, and blocked with 5% skim milk for indirect immunofluorescence analysis. Cells first incubated with rabbit antiserum against rat liver peroxisome, peroxisomal membrane protein (PMP), and 70kDa peroxisomal membrane protein (PMP70), respectively and in the second step with goat anti-rabbit antibodies coupled with FITC. To analyze whether the punctate staining represented peroxisomal location, the coverslips were mounted on microscope slides using mounting fluid containing 0.1% p-phenylenediamine, as described in "Materials and Methods."

Fig. 5-9. Microinjected HSA-SKL import into peroxisomes of CHO cells. HSA-SKL and HSA were microinjected respectively into CHO cells and its localization was analyzed after incubating the cells at 37°C for 4 hours. The indirect immunofluorescence staining was carried out using rabbit anti-HSA antiserum.

Fig. 5-10. Effect of NEM, TBT, STA, and oligomycin on HSA-SKL import into peroxisomes of CHO cells. The inhibitors were microinjected simultaneously with HSA-SKL into CHO cells. NEM, STA, and TBT were used at the concentration of 0.2mM, and oligomycin was used of 40 μg/ml. After the incubation of the cells, the immunofluorescence staining was carried out as shown in Fig. 5-9.

Fig. 5-1. Post-translational import of acyl-CoA oxidase into peroxisomes

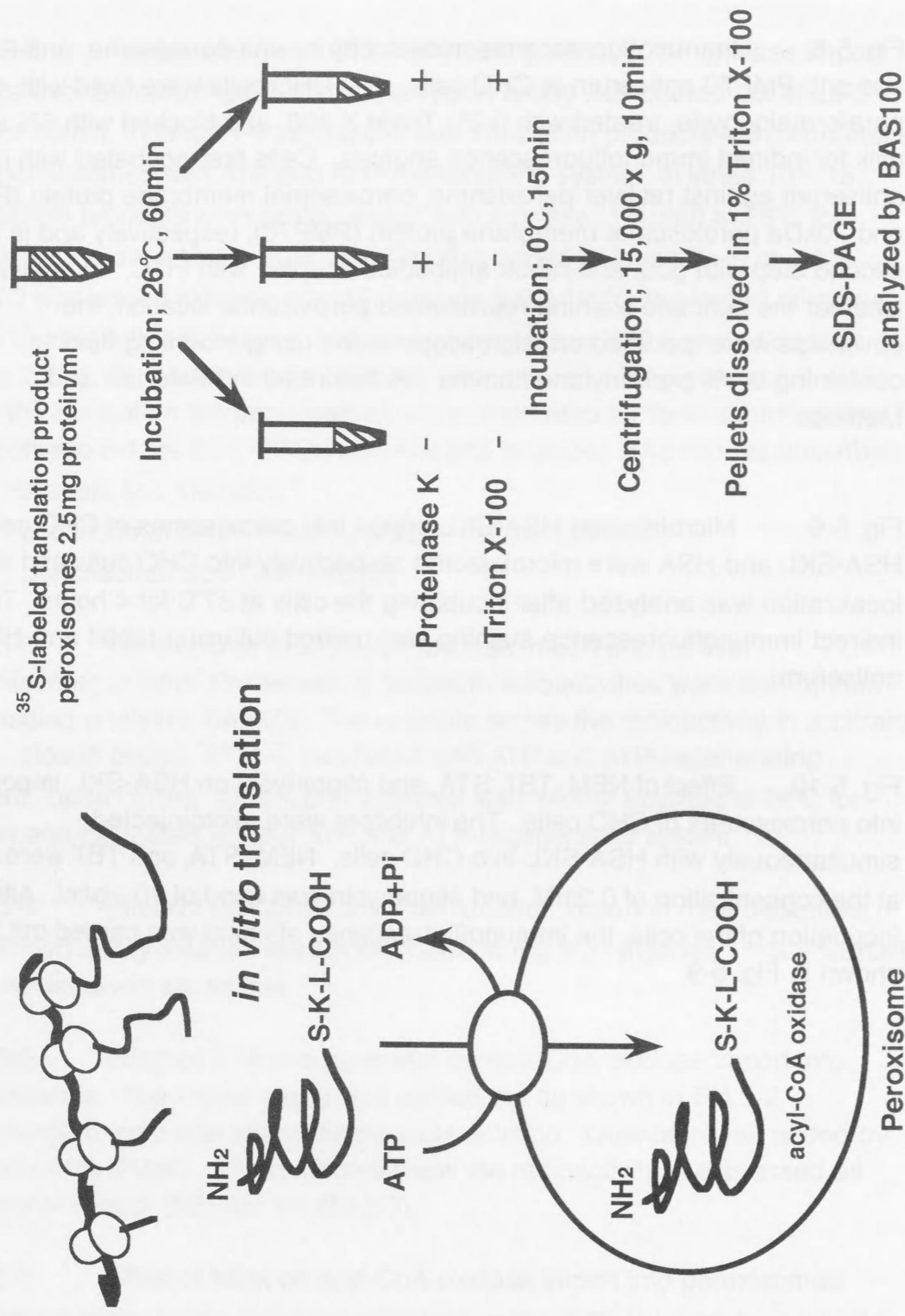
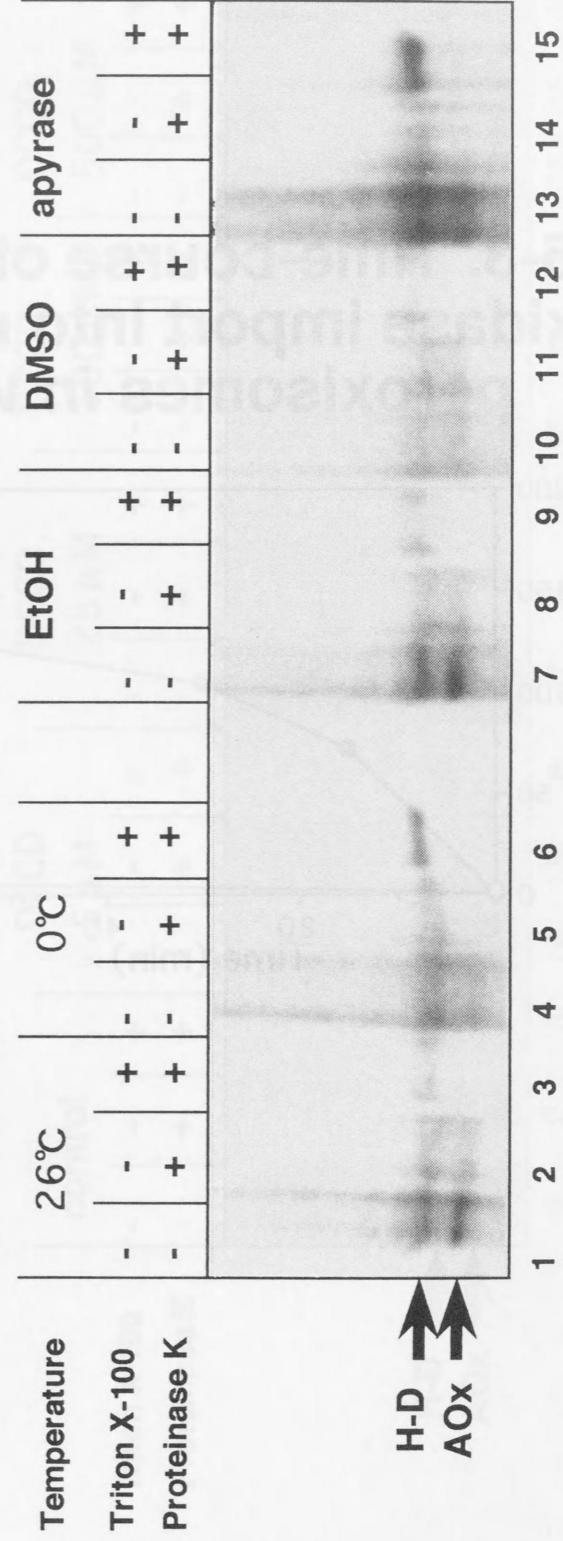
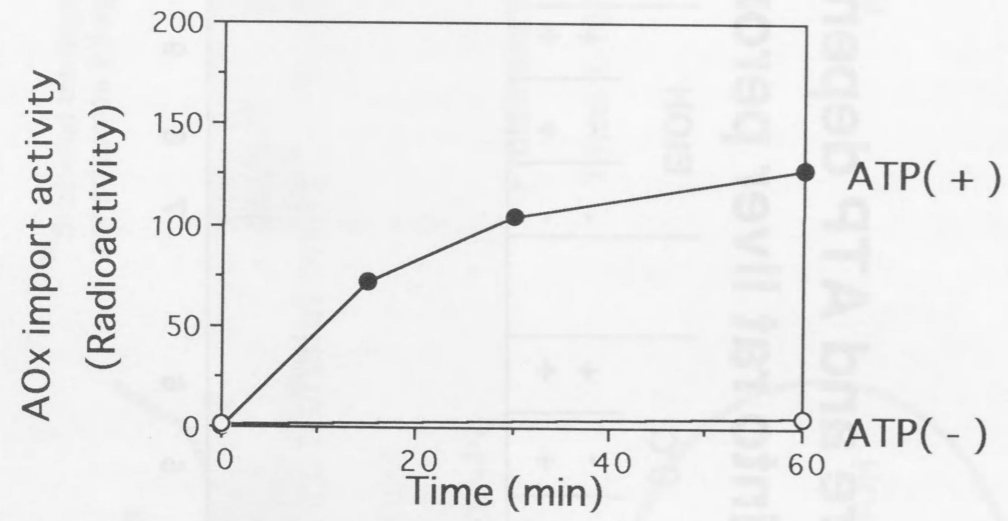


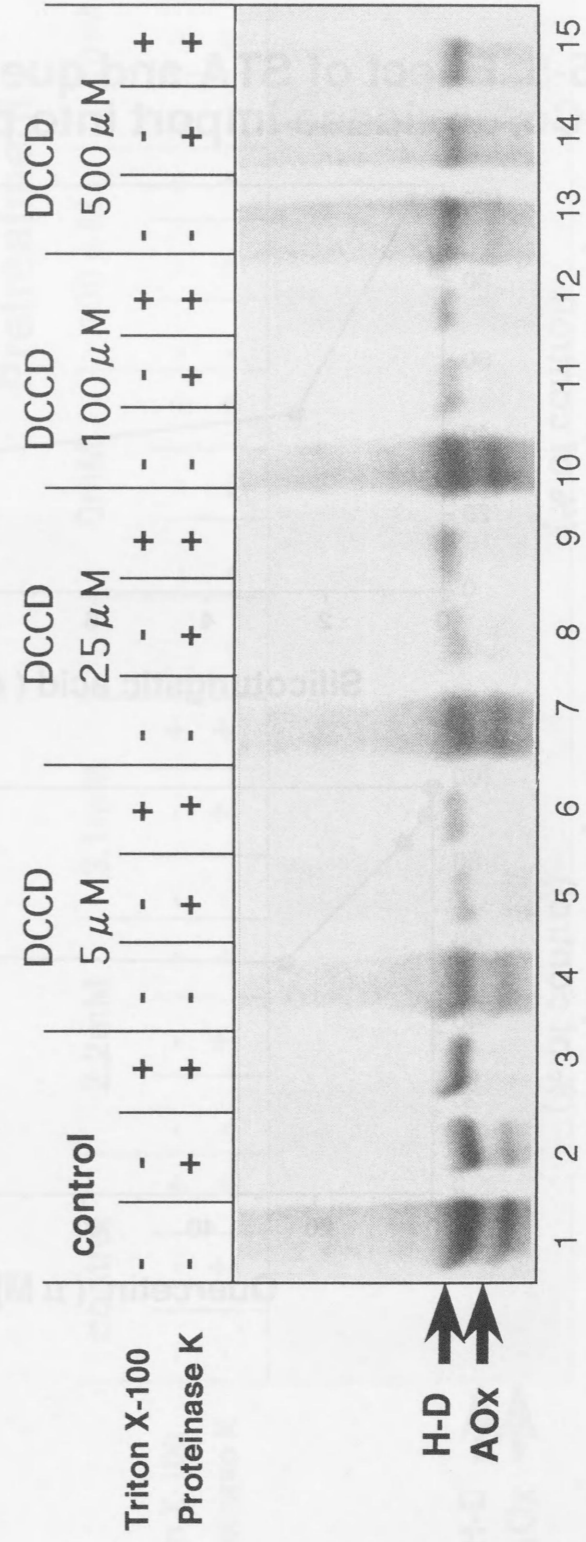
Fig. 5-2. Temperature and ATP dependence of acyl-CoA oxidase import into rat liver peroxisomes *in vitro*



**Fig. 5-3. Time-course of acyl-CoA oxidase import into rat liver peroxisomes *in vitro***

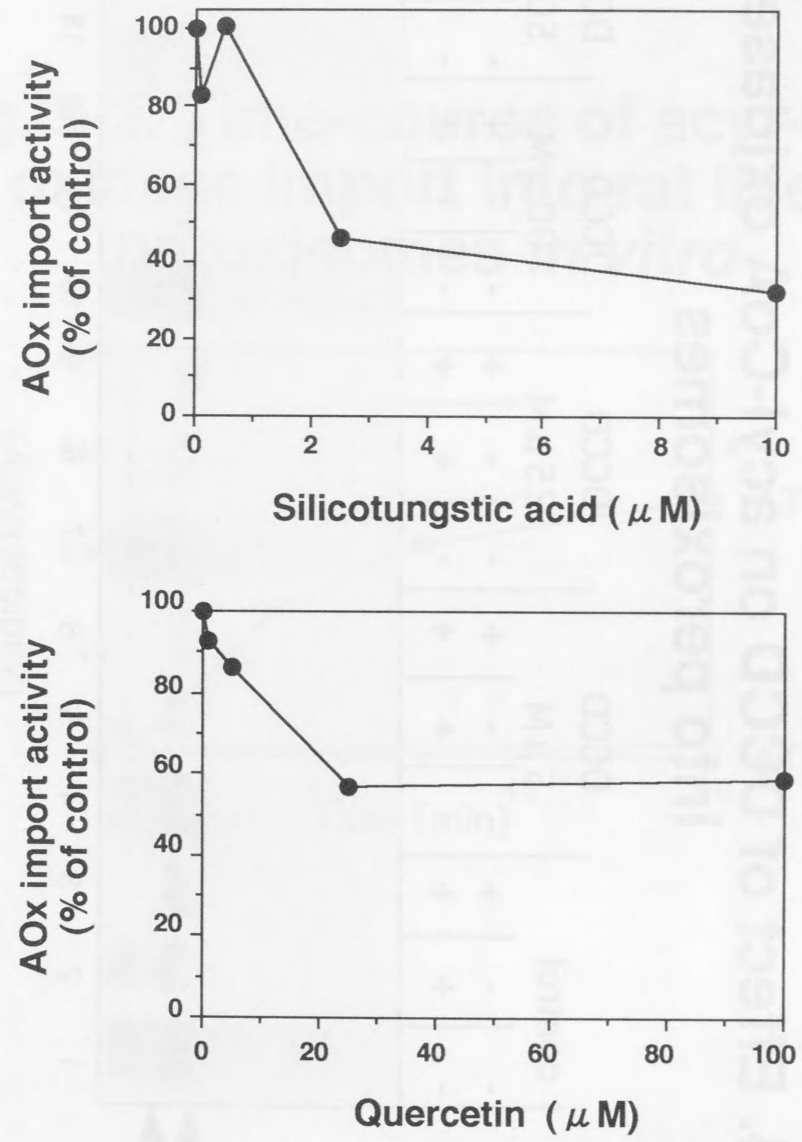


**Fig. 5-4. Effect of DCCD on acyl-CoA oxidase import into peroxisomes**





**Fig. 5-5. Effect of STA and quercetin on acyl-CoA oxidase import into peroxisomes**



**Fig. 5-6. Effect of NEM on acyl-CoA oxidase import into peroxisomes**

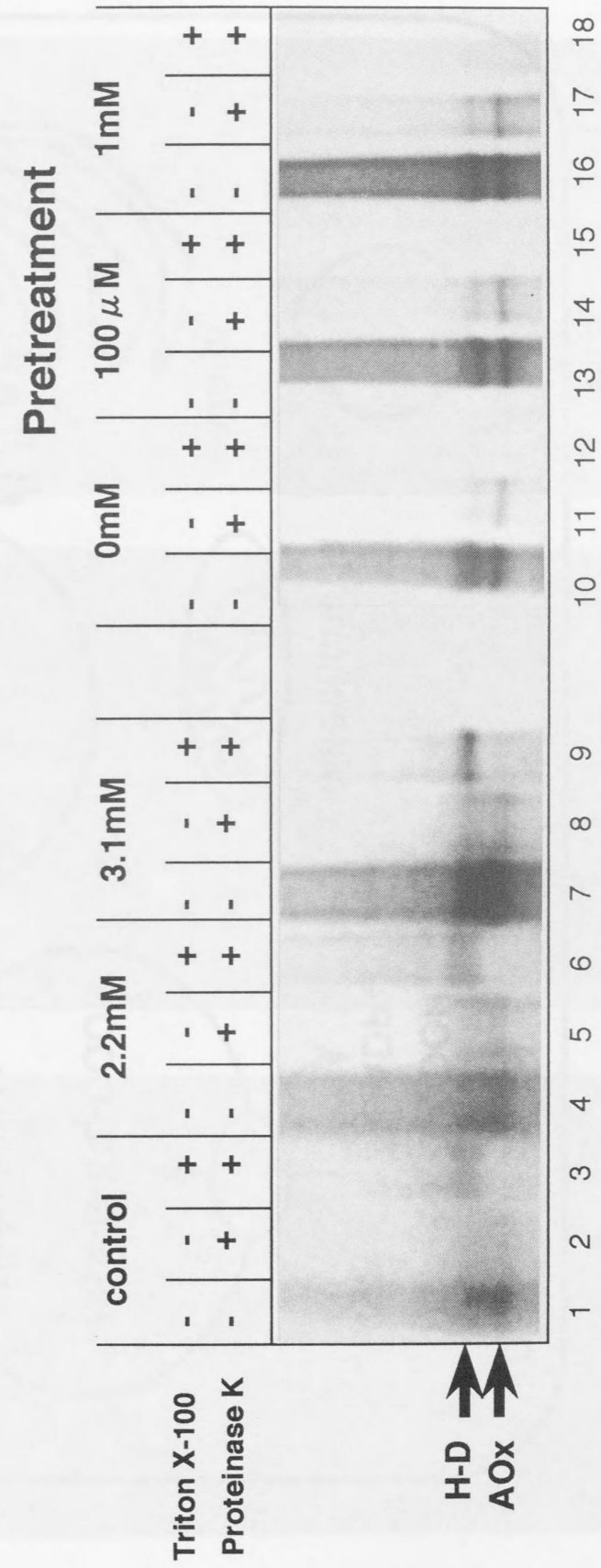


Fig. 5-7. Microinjected HSA-SKL import into peroxisomes of CHO cells  
HSA-Cys-Arg-Tyr-His-Leu-Lys-Pro-Leu-Gln-Ser-Lys-Leu-COOH  
 PTS1

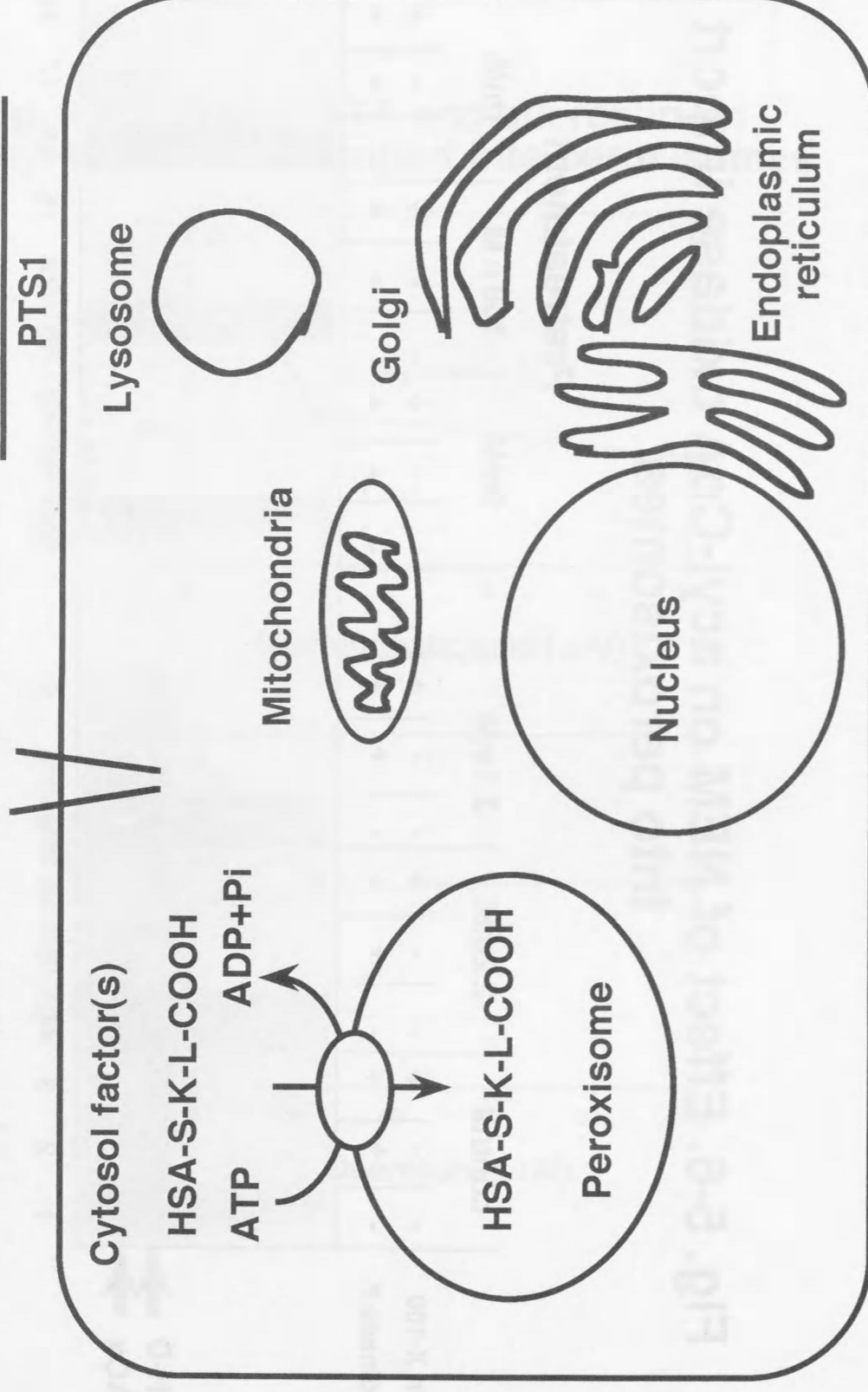
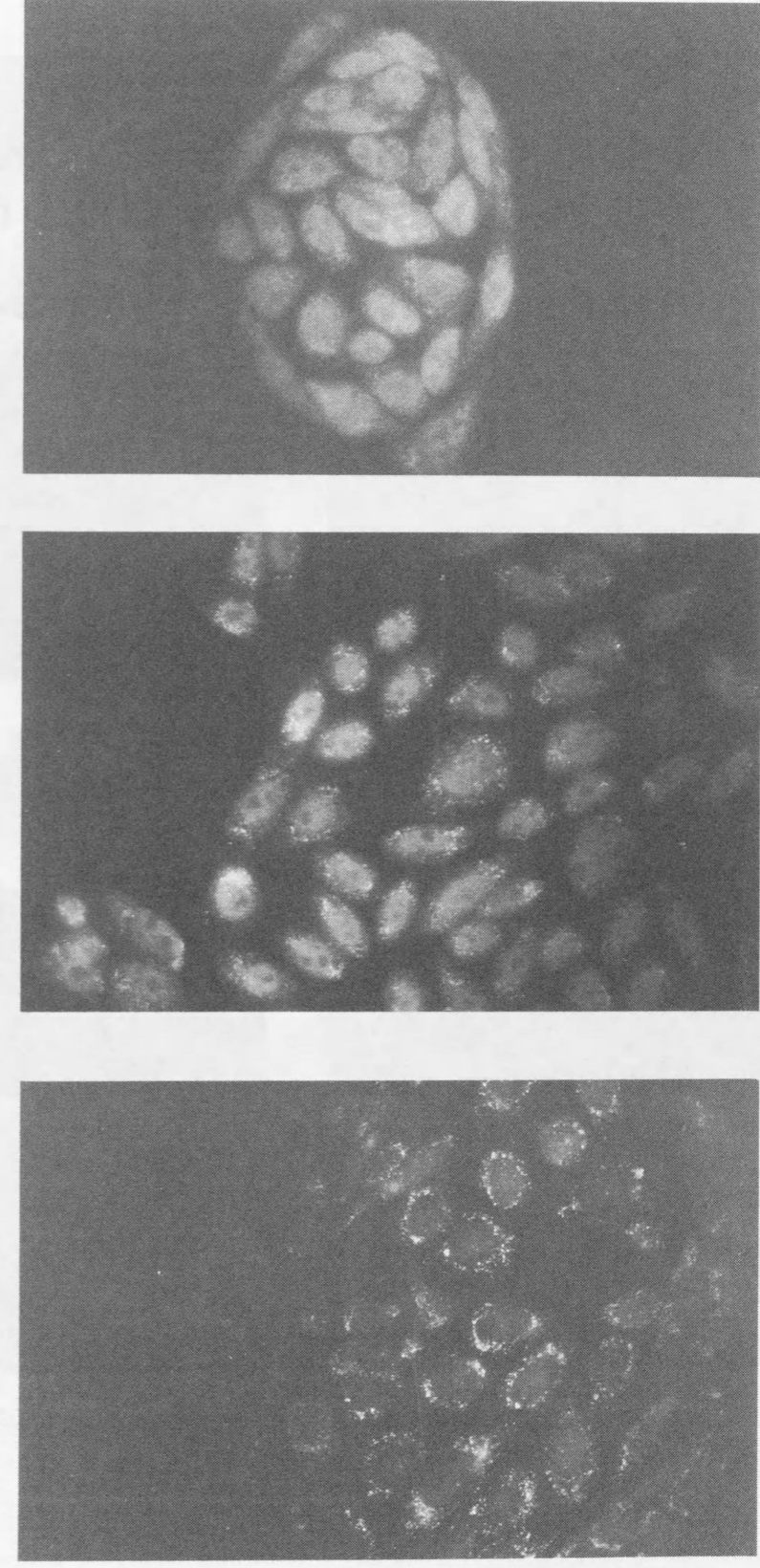
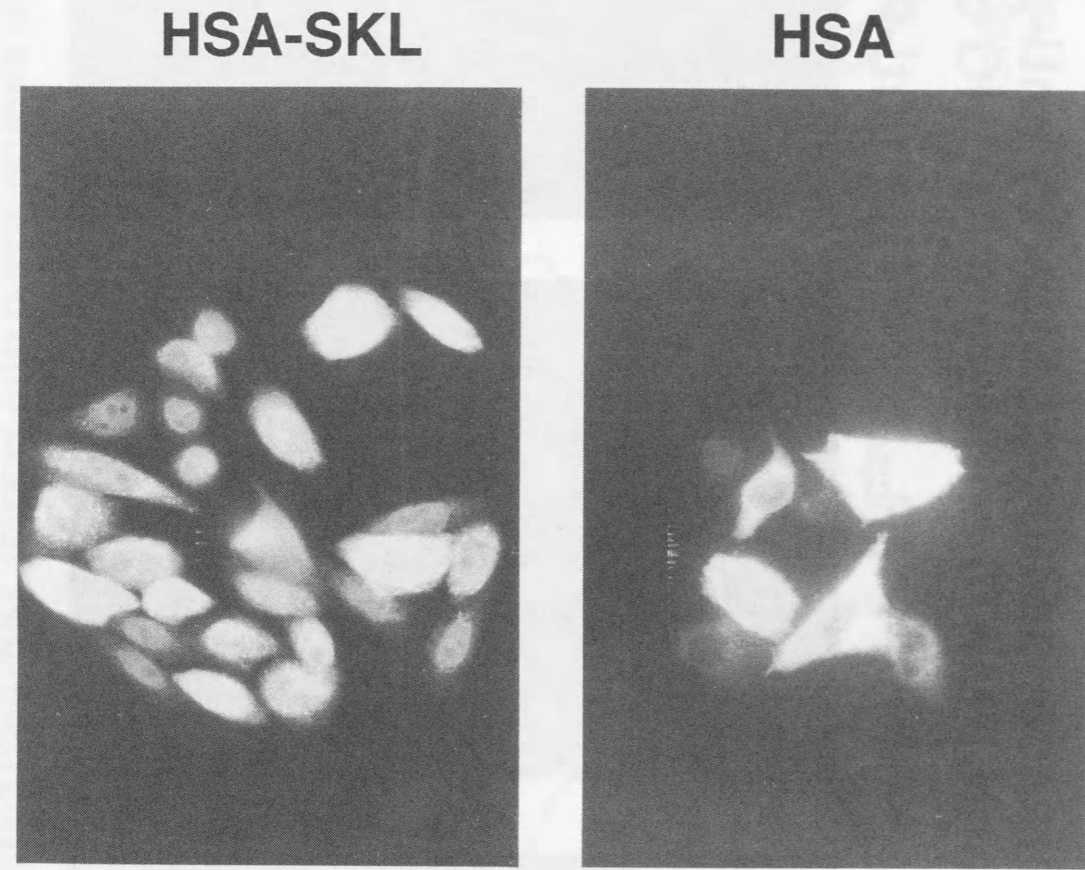


Fig. 5-8. Immunofluorescence microscopy by anti-peroxisome,  
 anti-PMP, and anti-PMP70 antiserum in CHO cells

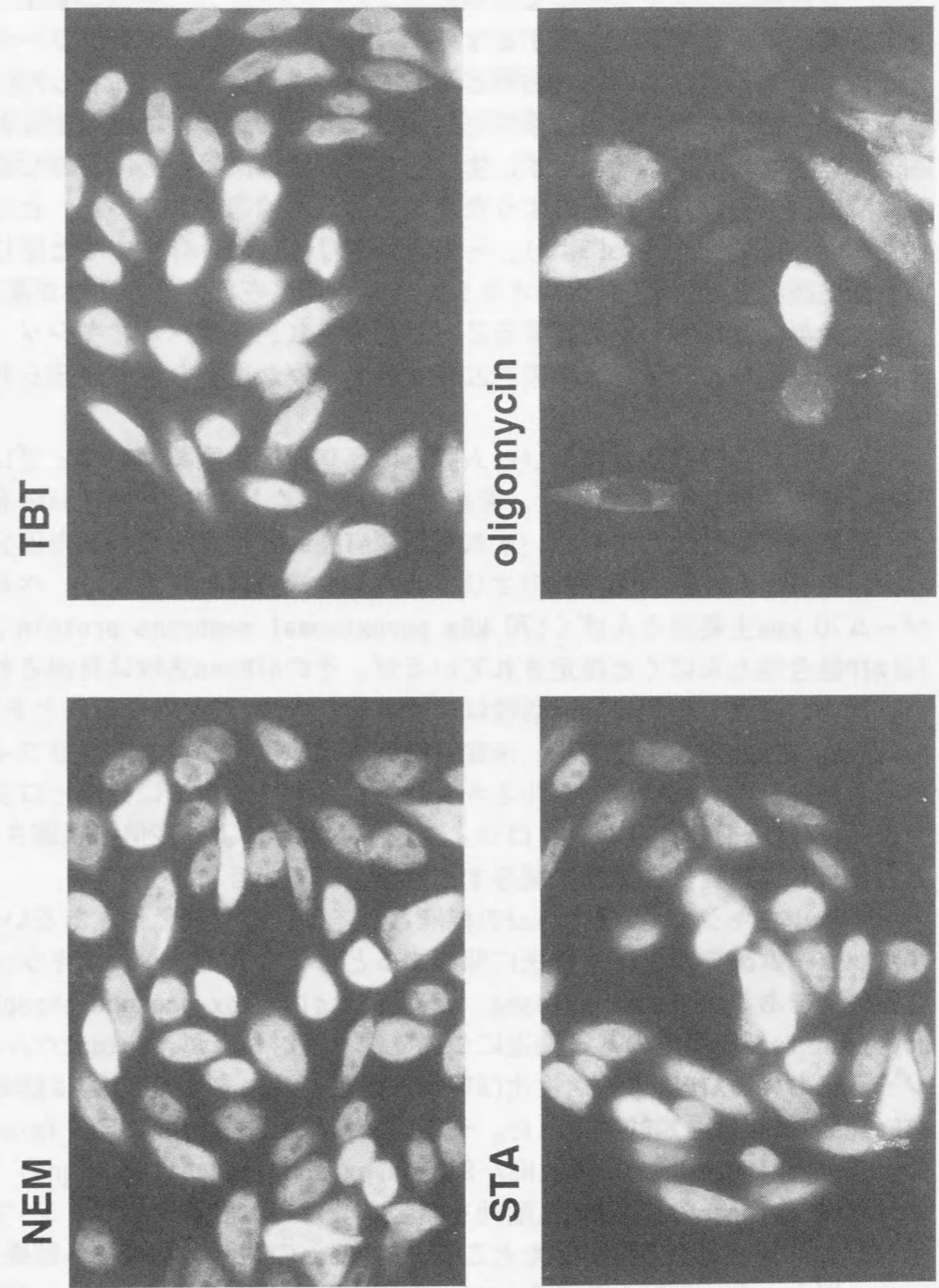




**Fig. 5-9. Microinjected HSA-SKL import into peroxisomes of CHO cells**



**Fig. 5-10. Effect of NEM, TBT, STA, and oligomycin on HSA-SKL import into peroxisomes of CHO cells**



## 第6章 まとめ

真核細胞に広く存在するオルガネラの一つとして、1965年de Duveはラット肝臓に過酸化水素を生成するオキシダーゼ群と分解するカタラーゼを含むオルガネラを見出し、機能的名称としてペルオキシソームと命名した。ラット肝臓では一群の高脂血症治療薬やプラスチック可塑剤などで増殖するという興味深い性質を持つにも関わらず、生理的意義のない原始呼吸に寄与していたような酵素群が残存した化石のようなオルガネラと冷遇されていた。ところが、1976年Lazarowとde Duveにより、ミトコンドリアにのみ存在すると信じられていた脂肪酸の $\beta$ -酸化系がペルオキシソームに発見され、その活性が高脂血症治療薬投与により著しく上昇することが報告され、一躍ペルオキシソームの機能が脚光を浴びるに至り、以来約20年を経て様々な重要な機能が知られるようになった。

我々はこのペルオキシソーム膜上に高脂血症治療薬クロフィブレートで17倍に誘導される、NEM感受性、非感受性の少なくとも2種のATPasesを発見し、その阻害剤感受性などより、いずれも新規ATPaseと推定した。また部分精製の結果、それぞれ520、450 kDaのオリゴメリック複合体と推定した。ペルオキシソーム70 kDa主要膜たんぱく(70 kDa peroxisomal membrane protein; PMP70)はATP結合性たんぱくと推定されているが、そのATPase活性は見出されていない。我々の発見した両ATPase活性はいずれもこのPMP70と異なることをproteinase K処理、免疫沈降、未変性PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィーにより明らかにした。同時に、ペルオキシソームマトリックスに無機ピロフォスファターゼ(PPase)が存在し、クロフィブレート投与により12倍に誘導されることも発見し、脂質代謝調節に関与すると推定している。

ペルオキシソームATPasesの機能としては、基質能動輸送あるいはペルオキシソーム酵素たんぱく移送に関与すると考えられる。ペルオキシソーム局在性酵素であるacyl-CoA oxidase、acyl-CoA: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase反応の基質輸送について種々検討したが、intactペルオキシソームにおけるATPによる活性化(ATP添加により消失する潜在性)は認められず、ATPasesの関与は否定的であった。一方、たんぱく移送について、*in vitro* acyl-CoA oxidase import系とHSA-SKL(peroxisome targeting signal 1であるacyl-CoA oxidaseのC末端SKL配列を結合させたヒト血清アルブミン)マイクロインジェクション法で検討したところ、ATPasesの関与を示唆する結果を得た。

以上、ラット肝ペルオキシソームに少なくとも2種のATPasesが存在すること、それらの性質および生理機能について明らかにすることが出来た。今後、ATPasesの分子構造の解明と蛋白移送機構の解明が期待される。

高脂血症治療薬としてHMG-CoA還元酵素阻害剤(プラバスタチン、シンバスタチン)の他、フィブレート系薬剤(クロフィブレート、ベザフィブレートなど)が用いられているが、このフィブレート系薬剤によるペルオキシソーム増

殖現象は齧歯類に限られており、ヒトでは顕著な誘導は見られず、高脂血症治療機序の詳細は不明である。ペルオキシソームは脂質の分解だけでなく生合成にも深く関与しており、ペルオキシソームATPasesが第4章に記述したPPaseとも相まって、その酵素蛋白移送機構(酵素タンパクのオルガネラへのコンパートメンテーション)を介した、あるいはその誘導機構を介した脂質代謝調節機構やその異常に起因する病態に関わる可能性があり、興味を持たれ、さらなる解析が期待される。



## 第7章 実験の部

### 7-1 第2章の実験の部

動物—ラット(Wistar系、雄、体重250-300 g)はS L C社より購入・使用した。ペルオキシソームを誘導するためには0.5 % (w/w)クロフィブレート含有粉末飼料(MF、オリエンタル酵母)を2週間投与した。

材料—Bafilomycin A<sub>1</sub>はDr. K. Altendorf (Universitat Osnabruck, Germany)より分与を受けた。クロフィブレートおよびNycodenzはそれぞれ和光純薬およびNycomed Diagnostics (Oslo, Norway)より購入した。その他の試薬は特級あるいは入手可能な最高純度のものを用いた。

ペルオキシソームの調製—ペルオキシソーム調製の前日に一晩絶食させた。ラットを2匹エーテル麻酔下、肝臓を採取し、肝湿重量の4倍容の各5 μg/ml, chymostatin, leupeptin, antipain, pepstatin A の4種のprotease阻害剤(4PIs)を含む0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) ethanol, pH 7.4(4PIs-SVE)で洗った後、肝臓をハサミで細かく切り刻み、Potter-Elvehjem homogenizer(50 ml, Top社)でホモジナイズ(Teflon pestle, 1000 rpm, 2 strokes)して、20 %ホモジネートを調製した。これを2,500×g、13分間遠心(日立18PR-5、RPR20-2ローター、4,500 rpm)し、得られた沈澱に肝湿重量の1.5倍容の4PIs-SVEを加えた後、再びPotter-Elvehjem homogenizerでホモジナイズ(1,000 rpm, 1 strokes)して、先と同様に2,500×g、13分間遠心した。1回目の遠心と、2回目の遠心で得られた上清(post mitochondrial supernatant: PMS)を併せて20,000×g、22分間遠心(日立18PR-5、RPR20-2ローター、13,000 rpm)し、フラフイー層をピペティングで取り除き沈澱を得た。この沈澱に肝湿重量同容の4PIs-SVEを加えて、Dounce型ホモジナイザー(40 ml, pestle B, 3 strokes, KONTES社)でホモジナイズした後、再び20,000×g、22分間遠心し、フラフイー層を同様に取り除き沈澱(light mitochondrial fraction)を得た。これに1.5 mlの4PIs-SVEを加えて、Dounce型ホモジナイザー(7 ml, pestle B, 10 strokes)で充分ホモジナイズした後、Nycodenz gradient (2 ml of 1.3 g/ml cushion, 28 ml of 1.15-1.25 g/ml of Nycodenz gradient)に積層し、130,000×g、2.5時間(日立himac CP56G、SRP28SAローター、27,000 rpm)遠心する。ミトコンドリア、リソソームやミクロソームの含まれている上層はバスツールピペットで取り除いた後、下からペリスターポンプ(ATTO, speed 6)で吸い上げ、2 mlずつ分画し、ペルオキシソーム分画を得た。

特に、ペルオキシソームを再度Nycodenz密度勾配遠心にかける場合など必要な場合は、ペルオキシソーム分画を5倍容の0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) ethanol, 5 mM HEPES-KOH, pH 7.4 (SVEH)で希釈、遠心(17,000×g、20分間、RPR20-2ローター、12,000 rpm)後、沈澱をSVEHに懸濁して

Nycodenzを除いて用いた。

マーカー酵素活性測定法—カタラーゼ(ペルオキシソーム)(219)、cytochrome c oxidase(ミトコンドリア)(220)、esterase(ミクロソーム)(221)およびβ-N-acetyl-D-glucosaminidase (NAGA、リソソーム)(222)はそれぞれ既報の方法により測定した。

ATPase活性測定法—ATPase活性およびその他のnucleoside triphosphatase 活性測定はnucleoside triphosphateから遊離する無機リン酸をItaya and Ui(223)によるマラカイトグリーン比色定量法を一部改良して行った。標準的assay mixture (1 ml)は0.2 M sucrose, 0.1 M KCl, 40 mM Bicine-Tris (pH 7.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM ATPおよび各5 μgの4PIs(随時、2.7 μM(2 μg/ml)oligomycin含有)を用いた。反応は約50 μgのペルオキシソーム標品を加えて開始し、30 °C、2時間インキュベーション後、マラカイトグリーン試薬1 ml(0.1624 % (w/v) malachite green, 5.72 % (w/v) ammonium molybdate in 6 N HCl, 2.32 % (w/v) polyvinyl alcoholを当量比で混合し、1時間以上放置後使用する。)を加え、反応を停止すると同時に一分後の630nmの吸光度を測定した。この条件下、2時間までは反応は直線性が保たれていた。また、別法として上記と同様のassay mixtureを用い、Henkelらの方法(224)に準じたマイクロプレート法も用いた。即ち、96 wells plate (MS-3496F、住友ベークライト)上、1ウェル当たり100 μlのassay mixtureと約20 μgのタンパクを用い、30 °C、1時間インキュベーション後、マラカイトグリーン試薬100 μlを加え、5分後の吸光度を655 nmのフィルターをつけたマイクロプレートリーダー(Model 450, Bio-Rad)で測定した。5点検量線をその都度作成したが、遊離するリン酸と吸光度の関係は8 nmoles/wellまで良く相関した。NEM感受性ATPase活性は全活性と1 mM NEM存在下のNEM非感受性ATPase活性との差を用いて表した。また、定量値は2、3回の平均値を用いた。

ペルオキシソームの低張処理—ペルオキシソーム分画0.2 mlを10倍容の各5 μg/mlの4PIsと1 mM DTTを含む20 mM MOPS-TMAH, pH 7.0に滴下し氷上10分間放置後、遠心(200,000×g、30 min、RP-55TAローター、47,000 rpm)し、可溶性画分と顆粒画分に分離した。

ペルオキシソームの高濃度塩洗浄/超音波処理—ペルオキシソーム(1.81g タンパク)を0.5 M NaCl添加した1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 % (v/v) EtOHおよび4PIs含有20 mM MOPS-TMAH, pH 7.0(1 ml)に加え、Branson sonifier (Cell Disrupter 200, setting level, 5; 50 % duty; 15 sec × 3 times)で0 °C処理し、可溶性マトリックス画分と膜画分とに先と同様遠心し(200,000×g、30 min)分離した。

ペルオキシソームのproteinase K消化(限定蛋白分解)—Kamijoらの方法(89)に準じ、ペルオキシソームをproteinase K(Sigma)処理を行った。1 mlのSVEH中、4.31 mgのペルオキシソームと10 μgのproteinase Kを0 °Cインキュ

ベーションし、100  $\mu$ lのサンプルを各時間毎に採取し、反応停止のため1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)を加え、残存するATPase活性をマイクロプレート法で測定した。

ペルオキシソームATPaseの可溶化—高濃度塩洗浄/超音波処理したペルオキシソーム膜画分(5 mg protein)を10 % glycerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 8  $\mu$ g/ml asolectin liposomes, 各5  $\mu$ gの4PIsを含む20 mM MOPS-TMAH, pH 7.0(1 ml)に懸濁し、0.5 % polyoxyethylene 9-lauryl ether ( $C_{12}E_9$ , Sigma)を添加し、vortex後、0  $^{\circ}$ C 10分間氷上に放置後、遠心(200,000 $\times$ g、30 min、RP-55TAローター)し、その上清を可溶化画分とした。ペルオキシソームATPase活性は約32 %の収率で可溶化する事が出来た。

可溶化ペルオキシソームATPaseのゲルろ過クロマトグラフィー—前記のペルオキシソーム膜画分 $C_{12}E_9$ 可溶化画分(0.5 ml)をゲルろ過カラム(TSK G4000SW $\chi$ L, 7.8 x 300 mm, Tosoh) 2本を直列につなぎ、1 mM DTT, 0.5 mM EGTA, 10 % glycerol, 8  $\mu$ g/ml asolectin, 0.02 %  $C_{12}E_9$ および0.2 M NaCl含有20 mM Tris-HCl, pH 7.4を溶出緩衝液として、流速0.1 ml/ml(LKB 2249 LC Gradient Pump, Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden)で溶出し、0.5 mlずつ分画した。各分画のNEM感受性、非感受性ATPase活性とタンパク定量を行ったところ、それぞれ定量的に回収する事が出来た。

ペルオキシソームATPaseの部分精製—精製ペルオキシソーム画分10 ml(170 mg protein)を用い、膜画分を調製後、 $C_{12}E_9$ 可溶化を行った。イオン交換カラムEcono-Pac Q 2本を直列に接続し、50 mlの可溶化抽出物をSuperloop(Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden)を使い注入し、buffer A:1 mM DTT, 0.5 mM EGTA, 10 % glycerol, 8  $\mu$ g/ml asolectin, 0.02 %  $C_{12}E_9$ 含有20 mM Tris-HCl, pH 7.4とbuffer B:buffer Aに1M NaCl添加、を溶出緩衝液としてNaCl gradient溶出した。流速1 ml/mlで、1 mlずつ分画した。得られたATPase活性ピークのFr. 45-47の1 mlを上記と同様、ゲルろ過クロマトグラフィーに注入しATPaseの分離精製を試みた。

その他の方法—タンパク定量は標準タンパクとしてbovine  $\gamma$ -globulinを用い、Bio-Rad protein assay kit(225)で行った。ラット肝のsubmitochondrial particles(SMP)の調製はWehrleらの方法(226)によって調製した。

## 7-2 第3章の実験の部

動物—ラットおよびクロフィブレート投与法は第2章のとうり。

材料—clofibrate, Nycodenz, proteinase K,  $C_{12}E_9$ は第2章のとうり。protein A Sepharose CL4Bおよびalkaline phosphatase-conjugated goat

anti-rabbit IgG antibodyはそれぞれSigma (St. Louis, MO)およびTAGO (Burlingame, CA)から購入した。その他の試薬は特級あるいは入手可能な最高純度のものを用いた。

ペルオキシソームの調製およびタンパク定量—第2章のとうり。

anti-PMP70抗血清の調製—精製ペルオキシソームを0.1 M  $Na_2CO_3$ で20倍希釈し、室温30 min放置後、45,000 rpm、60 min遠心(RP55TAローター)して得られる沈澱をペルオキシソーム膜画分(全ペルオキシソームタンパクの約10 %)として調製した。これを10 % SDS-PAGEで泳動後、CBB染色し、70 kDaペルオキシソーム主要膜タンパクのバンドを切り出し、注射筒と注射針を用いて吸排出を繰り返し細砕し、adjuvantなどは用いずこれだけを抗原として用いた。初回感作はウサギ後肢lymph nodeおよび背部皮下に、2回目以降は背部皮下に2週間ごとに感作した。第7回感作後、全血を採取し抗血清を得た。この抗血清より、定法の硫酸分画、DEAE-Sephadex A 50カラムクロマトグラフィー処理を行い、anti-PMP70 IgGを調製した。

immunoblotting—未変性(native)(227)および10 % SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)(228)ゲルは25 mM Trisおよび0.7 M glycine中4  $^{\circ}$ C、3時間、定電流150 mAで、nitrocellulose sheet (0.1  $\mu$ m pore size, Schleicher and Schuell, Germany)に転写した。この膜は、5 % skim milkを0.05 % Tween 20含有2価カチオンを含まないphosphate-buffered saline (PBS(-)) (TPBS)に加えたものでブロッキングを行った後、anti-PMP70抗血清と反応させた後、2次抗体としてalkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodyを反応させた。検出のための基質系として、5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro-blue tetrazoliumを用いた(229)。

ペルオキシソームのproteinase K消化(限定分解)—第2章のとうり。

ペルオキシソームATPaseの可溶化—第2章のとうり。

可溶化ペルオキシソームの未変性PAGEとATPase活性染色—未変性PAGEはRotheらの方法(227)に準じ、0.02 %  $C_{12}E_9$ を加えた4-20 % gradient polyacrylamide gelを用い、4  $^{\circ}$ Cで泳動を行った。また、ATPase活性染色(230)は以下のように行った。泳動後のゲルを1 mM ATP, 5 mM  $MgCl_2$ と1 mM  $Pb(NO_3)_2$ を含む20 mM Tris-malate, pH 7.5にて30  $^{\circ}$ C、20時間インキュベーション後、水で濯ぎ、ゲル上の $Pb_3(PO_4)_2$ 不溶性白色バンドを、0.5 %  $Na_2S$ で濯ぐことによりPbS褐色バンドとして検出した。

可溶化ペルオキシソームのanti-PMP70 IgGによる免疫沈降—anti-PMP70 IgGおよびpre-immune IgG(各44  $\mu$ g protein)をそれぞれ5 mgのprotein A-Sepharoseと0.5 mlの0.2 M borate buffer, pH 8.2中で室温、30分間攪拌する。

IgG結合protein A-Sepharoseを4,000 $\times$ g、30 sec遠心で沈澱とし、0.5 mlの10 % glycerol, 1 mM DTT, 0.02 %  $C_{12}E_9$ および各5  $\mu$ g/mlのPIsを含む20 mM

MOPS-TMAH, pH 7.0で3回洗浄する。この様にして得られたprotein A-Sepharose-IgGと可溶性ペルオキシソーム(240  $\mu$ g proteinを含む50  $\mu$ l)とを非特異的結合を防ぐためキャリアタンパクとして400  $\mu$ gのヒストン存在下、4  $^{\circ}$ C、2時間攪拌した。遠心操作により上清を採取後、上述の洗浄緩衝液を用い沈澱を3回洗浄後、その上清とprotein A-Sepharose-IgG沈澱のATPase活性測定、SDS-PAGEおよびimmunoblottingを前記の如く行った。

可溶性ペルオキシソームATPaseのゲルろ過クロマトグラフィー—ペルオキシソーム膜画分C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>可溶性画分をゲルろ過カラム(Superose 6 prep HR16/50, Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden)を用い、第2章と同様の1 mM DTT, 0.5 mM EGTA, 10 % glycerol, 8  $\mu$ g/ml asolectin, 0.02 % C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>および0.2 M NaCl含有20 mM Tris-HCl, pH 7.4を溶出緩衝液として、流速0.25 ml/ml(LKB 2249 LC Gradient Pump, Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden)で溶出し、1.0 mlずつ分画した。各分画のNEM感受性、非感受性ATPase活性とタンパク定量を行ったところ、第2章で得られた結果と同様それぞれ定量的に回収する事が出来た。

各分画中のPMP70の検出は以下の如くELISA法により行った。immunoplate (Falcon 3912 Micro Test Flexible Assay Plate, Becton Dickinson, Oxnard, CA)上に各分画の5  $\mu$ lおよび100  $\mu$ lの50 mM炭酸緩衝液、pH 10.0を分注し、4  $^{\circ}$ C、1夜固定する。TPBS洗浄後、1 % bovine serum albumin (BSA) in PBS(-)でブロッキング後、anti-PMP70 IgGと2時間反応させ、alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG goat antibodyとp-nitrophenyl phosphateを基質として用い(231)、プレートリーダー(Model 450, Bio-Rad、405nmフィルター)でPMP70を検出した。

### 7-3 第4章の実験の部

動物—ラットおよびクロフィブレート投与法は第2章のとうり。

材料—clofibrate, Nycodenzは第2章のとうり。その他の試薬は特級あるいは入手可能な最高純度のものを用いた。

ペルオキシソームの調製—クロフィブレート誘導ラット肝ペルオキシソームは第2章のとうり分画遠心法とNycodenz密度勾配遠心法により調製した。ミトコンドリア、リソソームやマイクロソームの含まれている上層はパスツールピペットで取り除いた後、遠心管の下からペリスターポンプ(ATTO、speed 6)で吸い上げ、2 mlずつ分画し、ペルオキシソーム分画を得た。ペルオキシソームを再度Nycodenz密度勾配遠心にかかる場合は、ペルオキシソーム分画を5倍容の0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) ethanol, 5 mM HEPES-KOH, pH 7.4 (SVEH)で希釈、遠心(17,000 $\times$ g、20分間、RPR20-2ローター、12,000 rpm)後、沈澱をSVEHに懸濁してNycodenzを除いて、2回目のNycodenz密度勾配遠心

にかけ、1回目と同様に分画した。

マーカー酵素活性測定法およびタンパク定量—カタラーゼ(ペルオキシソーム)、cytochrome c oxidase(ミトコンドリア)、esterase(マイクロソーム)、 $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase (NAGA、リソソーム)およびATPase活性測定ならびにタンパク定量は第2章に記述した如く行った。

PPase活性測定法—PPase活性はPPiから遊離する無機リン酸をマイクロプレートを用いて、第2章のATPase活性測定法と同様のマラカイトグリーン比色定量法で行った。標準的assay mixture (100  $\mu$ l/well)は0.2 M sucrose, 0.1 M KCl, 40 mM Bicine-Tris (pH 8.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM PPiおよび各0.5  $\mu$ gの4PIsを用いた。反応は約5  $\mu$ gのペルオキシソーム標品を加えて開始し、30  $^{\circ}$ C、1時間インキュベーション後、マラカイトグリーン試薬100  $\mu$ lを加え、5分後の吸光度を655nmのフィルターをつけたマイクロプレートリーダー(Model 450, Bio-Rad)で測定した。この時遊離するリン酸と吸光度の関係は8 nmoles/wellまで良く相関した。

ペルオキシソームの超音波処理—可溶性マトリックス画分と膜画分に分離する目的で、1 mlのペルオキシソーム画分(18 mg タンパク)を、10 mlの1 mM DTTおよび0.5 mM EGTAを含む20 mM Tris-HCl, pH 7.5で希釈後、Branson sonifier (Cell Disrupter 200, setting level, 5; 50 % duty; 15 sec  $\times$  3 times)で0  $^{\circ}$ C処理後、遠心(200,000 $\times$ g、30 min、RP-55TAローター、47,000 rpm)処理により、可溶性マトリックス画分と膜画分とに分離した。

### 7-4 第5章の実験の部

acyl-CoA oxidase移送活性測定用ペルオキシソームの調製—Nycodenz密度勾配遠心によって、得られたペルオキシソーム画分をNycodenzを除く目的で、4倍容のSVEを加えて、0  $^{\circ}$ C、10分間放置した。これを18,000 $\times$ g、20分間遠心(日立18PR-5, RPR20-2ローター、12,000 rpm)し、沈澱に約8~10 mg protein/mlになるように適量のSEH(0.25 M sucrose, 0.1 % (v/v) ethanol, 5 mM HEPES/KOH pH 7.4)を加え、Dounce型ホモジナイザー(7 ml, pestle B, 10 strokes, KONTES社)で充分懸濁したものを、acyl-CoA oxidase移送実験に用いた。

total RNAの調製と翻訳—total RNAは、2週間 0.5 % (w/w) クロフィブレート含有粉末飼料をあたえてペルオキシソームを誘導したラットの肝臓からpost-mitochondrial fractionを調製し、phenol/chloroform法をもちいてtotal RNAの抽出をおこなった(232)。このRNA(10  $\mu$ l)を[<sup>35</sup>S]protein labeling mix(NEN, 11.0 mCi/ml, 15  $\mu$ l)とともにnuclease-treated reticulocyte lysate protein synthesizing system(和光、無細胞タンパク合成キット、90  $\mu$ l)で29  $^{\circ}$ C、90分間インキュベートし、翻訳を行った(233)。リ

ボソームを取り除く為、11,500×g、20分間遠心(TOMY MR-150, MR-150ローター, 11,500 rpm)し、上清を採取し、2 M sucroseを加えて final 0.25 M にし、これをtranslation productとした。

タンパク輸送条件は、import assay mixture [全容、200 μl : 10 μl の translation product、50 μl の ペルオキシソーム (約8-10 mg/ml)、100 μl の import buffer(1 mM ATP, 3 mM Mg(AcO)<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 15 mM

creatine phosphate, 75 μg/ml creatine phosphokinase; いずれもfinal濃度)および40 μlのSEHを混合したもの] を、26 °C、1時間インキュベートした。インキュベーション後、このimport assay mixtureを、SVEH(0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) ethanol, 5 mM HEPES/KOH, pH 7.4)で10倍に希釈し、4等分した。ペルオキシソーム内へ輸送されていないタンパクを取り除くために1 μgのproteinase Kで、0 °C、15分処理をした。このタンパク消化反応は5 mM PMSFおよび各 0.5 mg/ml 4PIsを5 μl加えて停止させた。proteinase K作用の positive controlとして1 % Triton X-100存在下、proteinase K処理をしたものを作成し、このペルオキシソーム内に輸送されたタンパクが、膜を可溶化させることにより実際に消化されることを確認した。各サンプルを15,000×g、10分間遠心(TOMY MR-150, MR-150ローター, 15,000 rpm)後、沈殿を1 % Triton X-100、0.1 mM PMSFの入ったSVEで可溶化し、8-12 % SDS-PAGEにかけた。CBB染色後、ゲルをフィルム化(RAPIDRY、ATTO)し、フルオログラフィーをとるか、またはイメージングプレートに露光した。約75 kDaのproteinase K耐性のタンパクバンドをペルオキシソーム内に移送されたacyl-CoA oxidaseとして定量化した。

gradient SDS-PAGE(228)濃縮用ゲル濃度は、3 % (0.125 M Tris-Cl, pH 6.8, 0.1 % (w/v)SDS)、分離用ゲル濃度は、8-12 % (0.125 M Tris-Cl (pH 8.8), 0.1 % (w/v) SDS)を用いた。濃度勾配はグラジエンター(30 ml、サンプルテック社)で作製した。泳動緩衝液の組成は、0.05 M Tris, 0.38 M glycine, 0.1 % (w/v) SDSで、泳動は室温にて、濃縮ゲル中は50 V、分離ゲル中は150 V(パワーサプライ:M&S INSTRUMENTS INC MODEL 50-SR)の定電圧モードで行った。試料はサンプルバッファー(4 % SDS, 40 mM Tris/HCl, pH 6.8, 20 % sucrose, 0.002 % BPB, 20 mM DTT)を試料と同容量加え、90-100 °Cで5分間加熱処理後アプライした。

ポリクローナル抗体の調製—<1>抗ラットペルオキシソーム抗血清：クロフィプレート投与ラット肝臓よりペルオキシソームを調製し、Nycodenzを除くため、4PIs-SVEで10倍希釈し、12,000 rpm、20 min遠心(RPR20-2ローター)後、沈殿のペルオキシソームを生理食塩水(pss)にDounce型ホモジナイザー(7 ml, type B)で懸濁し、-30 °Cで保存した。初回感作はペルオキシソーム懸濁液 1 mlとFreund's complete adjuvant 1 mlをBranson sonifier (setting 3.5), 30 sec, 3回処理して、乳化状態とし、2匹の雌の日本白色種ウサギ背部

皮下注射により行った。感作タンパク量は0.87 mg protein/headであった。2回目以降の感作はFreund's incomplete adjuvantを用いた他は初回感作と同様に、2週間ごとに行った。第5回感作後、三日目に全血を頸動脈カニューレーションにより採取し、3,000 rpm、15 min遠心し、抗血清を得、-30 °Cで保存した。<2>抗ラットペルオキシソーム膜タンパク抗血清：精製ペルオキシソームを0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で20倍希釈し、室温30 min放置後、45,000 rpm、60 min遠心

(RP55TAローター)して得られる沈殿をペルオキシソーム膜画分(全ペルオキシソームタンパクの約10 %)として調製した(234)。これをPBS(-)に懸濁後、抗原として同量のadjuvantと乳化後、初回感作はウサギ後肢Foot padおよび背部皮下に、2回目以降は背部皮下に2週間ごとに感作した。感作タンパク量は約100 μg protein/headであった。第5回感作後、全血を採取し抗血清を得た。

<3>anti-PMP70抗血清：第3章の実験の部に記載した通り。

<4>抗ヒト血清アルブミン抗血清：ヒト血清アルブミン(HSA、Sigma, A-1653)をpssに溶解し、抗ラットペルオキシソーム抗血清と同様の方法で日本白色種ウサギに感作した。感作タンパク量は1.04 mg protein/headであった。第7回感作後、全血を採取し抗血清を得た。

SKLペプチドの合成—acyl-CoA oxidaseのC-末端ペプチドNH<sub>2</sub>-

CRYHLKPLQSKL-COOHをBioLynx4170全自動ペプチド合成システム(Pharmacia LKB biotechnology)およびFmoc-L-Leu-Novasyn KA樹脂 1gを用いて合成し、樹脂 51.6 mgからトリフルオロ酢酸-アニソール-エタンジチオール(95:2.5:2.5 vol)5 mlで室温、6時間放置後、ろ過により樹脂から切り出し、ろ液を濃縮後、20 mlのエーテルで沈殿とし、10 min遠心(RPRS4ローター、5,000 rpm)で集め、20 mlのエーテルで1回洗浄後、減圧乾燥し、4.4 mgの無色粉末を得た。得られたペプチドの純度はn-BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O (4:1:1および2:1:1)の展開溶媒を用いるTLC/ニンヒドリン発色でone spotであることにより確認した。

HSA-SKLの合成(MBS coupling(235))—10.0 mgのHSA(0.15 μmoles, Sigma, A-1653)を0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8に溶解し、MBS(m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, 和光) 1.4 mg(4 μmoles/50 μl of dimethylformamide)を加え、マグネティックスターラーで室温、30分間攪拌する。この反応混合物を0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8で平衡化したSephadex G-25 column (Pharmacia, NAP-25 column)にのせ、同緩衝液で溶出し、UVモニター(ATTO mini UV monitor II, 280 nm)で溶出液の吸光度を見ながら最初のタンパク溶出部分を集め、未反応のMBSを除いた。上記SKLペプチド(4.4 mg, 3.3 μmoles)を4.0 mlの20 mM EDTAに溶解後、MBS-HSA complexに加え、アルゴンガスを吹き付け、シーロンで封じ、マグネティックスターラーで室温、4時間攪拌する。反応後、pss (1 liter x 2 times)に対し、4 °Cで透析を行い、HSA-SKL (7.2 ml, 2.1 mg protein/ml)を得た。-30 °C凍結保存。ここで得られたHSA-SKLは10 % SDS-PAGEで約70kDaにbroadなbandを示

し、HSAとのUV スペクトルの比較から8~10ペプチド鎖がHSAに共有結合しているものと推定された。

chinese hamster ovary (CHO)細胞培養—CHO-K1細胞は10 % fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, Maryland)添加Ham's F-12 (Gibco, No. 430-1700)(NaHCO<sub>3</sub> 1.18 mg/ml, penicillin 100 units/ml, streptomycin 0.13 mg/mlを添加)を培養液として用い、10 cmシャーレ(10 ml medium/dish)を用いて、5 % CO<sub>2</sub>-incubator中培養した。培養3日毎に、トリプシン処理にて細胞を剥がし、100倍希釈して継代培養を行う。

マイクロインジェクション—上記、CHO-K1細胞をカバーガラス(Matsunami glass ind., 18 x 18 mm)を固定した6 cmシャーレを用い、5 % CO<sub>2</sub>-incubator中にて培養を行う(5 ml medium/dish)。培養3日目にAuto injection system (AIS, Zeiss)とフェムトチップ(Zeiss)を用いて、マイクロインジェクションを行う。条件は種々検討した結果、Z mode(フェムチップは垂直に動き、ステージは同時には動かない。)、Z speed 20、P2(注入圧)= 120 hPa, P3(維持圧)= 30 hPa, 0.2 sec injectionとし、16 flames, 約200~400 cellsに対しインジェクションした。なお、インジェクション効率は40-50 %程度であり、さらにフェムトチップの目ずまりがしばしば起き、何回もの実験を繰り返す必要があった。

マイクロインジェクションするサンプルとして、HSA-SKLおよびHSAを injection buffer (20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.40, 100 mM KCl, 1.2 % sucrose)に対し透析を行ってmedium交換を行った物を使用した。終濃度は1 mg protein/mlである。また、ATPase阻害剤の影響については、NEM, TBT, STA, およびoligomycinをHSA-SKL溶液にそれぞれ終濃度0.2 mM, 0.2 mM, 0.2 mMおよび40 μg/mlを加えて用いた。これら各サンプルは-30 °C保存し、フェムトチップの目ずまりを防止するため、インジェクション前に10,000 rpm、10 min遠心した上清を用いた。

間接蛍光抗体法—マイクロインジェクションしたCHO細胞は、5 % CO<sub>2</sub>-incubator中で4時間インキュベーション後、以下の間接蛍光抗体法の操作を室温にて行う。培養液を吸引除去後、PBS(-) 3 mlで3回洗浄し、4 % paraformaldehyde in PBS(-) 3 mlで10 min固定した。次いで、0.2 % Triton X-100 in PBS(-)でpermeabilizeし、PBS(-) 3 mlでリンス後、5 % Skim milk in PBS(-) 3 mlで一晩、4 °Cブロッキングする。PBS(-) 3 mlでリンス後、100倍希釈一次抗体anti-HSA antiserum in 5 % skim milk in PBS(-) 150 μl、1時間反応する。0.2 % Triton X-100 in PBS(-) 2 mlで、5-10 min、5回洗浄後、200倍希釈二次抗体fluorescein conj. aff. purif. goat anti-rabbit IgG (heavy+light chain specific, CAPPEL) in 5 % skim milk in PBS(-) 150 μlと30 min反応する。0.2 % Triton X-100 in PBS(-) 2 mlで、5-10 min、5回洗

浄後、消光防止マウント液(0.15 % *p*-phenylenediamine, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 90 % glycerol)を用いて、蛍光顕微鏡(Axiovert 135M, Zeiss)で、位相差像(x32対物レンズ使用)および蛍光像(x63対物油浸レンズ、ダイクロイックミラーBlau 450-490 SB使用)をネオパン1600(フジフィルム)を用いて、写真撮影した。

REFERENCES

1. Shimizu, S., Imanaka, T., Takano, T., & Ohkuma, S. (1992) Induction and characterization of two types of ATPase on rat liver peroxisomes. *J. Biochem.*, 112(3), 376-384.
2. Shimizu, S., Imanaka, T., Takano, T., & Ohkuma, S. (1992) Major ATPases on clofibrate-induced rat liver peroxisomes are not associated with 70 kDa peroxisomal membrane protein (PMP70). *J. Biochem.*, 112(6), 733-736.
3. Shimizu, S., & Ohkuma, S. (1993) Inorganic pyrophosphatase of clofibrate-induced rat liver peroxisomes. *J. Biochem.*, 113(4), 462-6.
4. De Duve, C. & Baudhuin, P. (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46(2), 323-357.
5. Baudhuin, P., Beaufay, H., & De Duve, C. (1965) Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. *J. Cell Biol.* 26, 219-243.
6. Beevers, H. (1969) Glyoxisomes of bean endosperm and their relation to glucogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 168, 313-324.
7. Breidenbach, R. W. & Beevers, H. (1967) Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 462-469.
8. Opperdoes, F. R. & Borst, P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organella in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* 80(2), 360-364.
9. Opperdoes, F. R. (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in *Trypanosoma*. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 127-151.
10. Novikoff, P. M., Novikoff, A. B., Quintana, N., & Davis, C. (1973) Studies on microperoxisomes. III. Observations on human and rat liver hepatocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 21(6), 540-558.
11. Angermuller, S., Bruder, G., Volkl, A., Wesch, H., & Fahimi, H. D. (1987) Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes, a cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell Biol.* 45(1), 137-144.
12. Veenhuis, M., Van Dijken, J. P., Pilon, S. A. F., & Harder, W. (1978) Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Arch. Microbiol.* 117(2), 153-163.
13. Yamamoto, K. & Fahimi, H. D. (1987) Biogenesis of peroxisomes in regenerating rat liver: Sequential changes of catalase and urate oxidase detected by ultrastructural cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* 43(3), 293-300.
14. Yamamoto, K. & Fahimi, H. D. (1987) Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: Evidence of interconnections between heterogeneous segments. *J. Cell Biol.* 105(2), 713-722.
15. Gorgas, K. (1985) Serial sectioning analysis of mouse hepatic peroxisomes. *Anat. Embryol.* 172(1), 21-32.
16. Gorgas, K. (1984) Peroxisomes in sebaceous glands. V. Complex peroxisomes in the preputial gland: Serial sectioning and three-dimensional reconstruction studies. *Anat. Embryol.* 169(3), 261-270.
17. Angermuller, S. & Fahimi, H. D. (1988) Heterogeneous staining of D-amino acid oxidase in peroxisomes of rat liver and kidney. *Histochem.* 88(3-6), 277-285.
18. Usuda, N., Yokota, S., Ichikawa, R., Hashimoto, T., & Nagata, T. (1991) Immunoelectron microscopic study of a new D-amino acid oxidase-immunoreactive subcompartment in rat liver peroxisomes. *J. Histochem. Cytochem.* 39(1), 95-102.
19. Lazarow, P. B. & De Duve, C. (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73(6), 2043-2046.
20. De Duve, C. (1969) The nature and function of peroxisomes (microbodies, glyoxysomes). Evolution of the peroxisome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 168(2), 369-381.
21. Lazarow, P. B. & Fujiki, Y. (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 489-530.
22. Borst, P. (1986) How proteins get into microbodies (peroxisomes, glyoxysomes, glycosomes). *Biochim. Biophys. Acta* 866, 179-203.
23. Borst, P. (1989) Peroxisome biogenesis revisited. *Biochim. Biophys. Acta* 1008(4), 1-13
24. Kamiryo, T., Abe, M., Okazaki, K., Kata, S., & Shimamoto, N. (1982) Absence of DNA in peroxisomes of *Candida tropicalis*. *J. Bacteriol.* 152(1), 269-274.
25. Suzuki, Y., Orii, T., Takeguchi, M., Hijikata, M., & Hashimoto, T. (1987) Biosynthesis of membrane polypeptides of rat liver peroxisomes, *J. Biochem.* 101(2), 491-496.
26. Goldman, B. M. & Blobel, G. (1978) Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(10), 5066-

5070.

27. Rachubinski, R. A., Fujiki, Y., Mortensen, R. M., & Lazarow, P. B. (1984) Acyl-CoA oxidase and hydratase-dehydrogenase, two enzymes of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation system, are synthesized on free polysomes of clofibrate-treated rat liver. *J. Cell Biol.* 99(6), 2241-2246.
28. Allen, L.-H., Morand, O. H., & Raetz, C. R. H. (1989) Cytoplasmic requirement for peroxisome biogenesis in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(18), 7012-7016.
29. Furuta, S., Hashimoto, T., Miura, S., Mori, M., & Tatibana, M. (1982) Cell-free synthesis of the enzymes of peroxisomal  $\beta$ -oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105(2), 639-646.
30. Fujiki, Y., Rachubinski, R. A., Mortensen, R. M., & Lazarow, P. B. (1985) Synthesis of 3-ketoacyl-CoA thiolase of rat liver peroxisomes on free polysomes as a larger precursor: induction of thiolase mRNA by clofibrate. *Biochem. J.* 226(3), 697-704.
31. Osumi, T., Hashimoto, T., & Ui, N. (1980) Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. *J. Biochem.* 87(6), 1735-1746.
32. Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., Ohno, K., Miura, S., & Fujiki, Y. (1989) Peroxisome targeting signal of rat liver acyl-CoA oxidase resides at the carboxy terminus. *Mol. Cell. Biol.* 9(1), 83-91.
33. Fujiki, Y., Tsuneoka, M., & Tashiro, Y. (1989) Biosynthesis of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) on free polysomes as a larger precursor in rat liver. *J. Biochem.* 106(6), 1126-1131.
34. Trzeciak, W. H., Simpson, E. R., Scallen, T. J., Vahouny, G. V. & Waterman, M. R. (1987) Studies on the synthesis of sterol carrier protein-2 in rat adrenocortical cells in monolayer culture: regulation by ACTH and dibutyryl cyclic 3',5'-AMP. *J. Biol. Chem.* 262, 3713-3717.
35. Reddy, J. K., Warren, J. R., Reddy, M. K., & Lalwani, N. D. (1982) Hepatic and renal effects of peroxisome proliferators: Biological implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 386, 81-110.
36. Osumundsen, H., Thomassen, M. S., Hiltunen, J. K., & Berge, R. K. (1987) Physiological role of peroxisomal  $\beta$ -oxidation. "Peroxisomes in biology and medicine" (Fahimi, H. D. and Sies, H. eds.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 152-165.
37. Lock, E. A., Mitchell, A. M., & Elcombe, C. R. (1989) Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29,

145-163.

38. Veenhuis, M. & Harder, W. (1987) Metabolic significance and biogenesis of microbodies in yeasts. "Peroxisomes in biology and medicine" (Fahimi, H. D. and Sies, H. eds.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 436-458.
39. Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., & Kurokawa, Y. (1990) Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)adipate. *Jpn. J. Cancer Res.* 81(3), 213-215.
40. Lazarow, P. B. & Moser, H. W. (1989) Disorders of peroxisome biogenesis. "The metabolic basis of inherited disease" (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D. eds.) McGraw Hill, New York, 6th edition, pp. 1479-1509.
41. Van Den Bosch, H., Schutgens, R. B. H., Wander, R. J. A., & Tager, J. M. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 157-197.
42. Santos, M. J., Imanaka, T., Shio, H., & Lazarow, P. B. (1988) Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263(21), 10502-10509.
43. Santos, M. J., Imanaka, T., Shio, H., Small, G. M., & Lazarow, P. B. (1988) Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome: Aberrant organelle assembly. *Science* 239(4847), 1536-1538.
44. Wanders, R. J. A., Kos, M., Roest, B., Meijer, A. J., Schrakamp, G., Heymans, H. S. A., Tegelaars, W. H. H., Van Den Bosch, H., Schutgens, R. B. H., & Tager, J. M. (1984) Activity of peroxisomal enzymes and intracellular distribution of catalase in Zellweger syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123(3), 1054-1061.
45. Schram, A. W., Strijland, A., Hashimoto, T., Wanders, R. J. A., Schutgens, R. B. H., Van Den Bosch, H., & Tager, J. M. (1986) Biosynthesis and maturation of peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes in fibroblasts in relation to the Zellweger syndrome and infantile Refsum disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(16), 6156-6158.
46. Suzuki, Y., Oritani, T., Mori, M., Tatibana, M., & Hashimoto, T. (1986) Deficient activities and proteins of peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes in infants with Zellweger syndrome. *Clin. Chim. Acta* 156(2), 191-196.
47. Moser, H. W. & Moser, A. B. (1989) Adrenoleukodystrophy (X-linked). "The metabolic basis of inherited disease" (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D. eds.) McGraw Hill, New York, 6th edition, pp. 1511-1532.
48. Eaton, J. W. (1989) Acatlasemia. "The metabolic basis of inherited disease" (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D. eds.) McGraw Hill, New York, 6th edition, pp. 1479-1509.



49. Hashimoto, T. (1987) Comparison of enzymes of lipid  $\beta$ -oxidation in peroxisomes and mitochondria. "Peroxisomes in biology and medicine" (Fahimi, H. D. and Sies, H. eds.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 97-104.
50. Osumi, T. & Hashimoto, T. (1978) Acyl-CoA oxidase of rat liver: a new enzyme for fatty acid oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 479-485.
51. Schulz, H. (1991)  $\beta$ -oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1081(2), 109-120.
52. Osmundsen, H., Bremer, J., & Pedersen, J. I. (1991) Metabolic aspects of peroxisomal  $\beta$ -oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1085(2), 141-158.
53. Mannaerts, G. P., Van Veldhoven, P. P., van Broekhoven, A., Vandebroek, G., & Debeer, L. J. (1982) Evidence that peroxisomal acyl-CoA synthetase is located at the cytoplasmic site of the peroxisomal membrane. *Biochem. J.* 204(1), 17-23.
54. Miyazawa, S., Hashimoto, T., & Yokota, S. (1985) Identity of long-chain acyl-CoA synthetase of microsomes, mitochondria and peroxisomes in rat liver. *J. Biochem.* 98(3), 723-733.
55. Lageweg, W., Tager, J. M., & Wanders, R. J. A. (1991) Topology of very long chain fatty acid activating activity in peroxisomes from rat liver. *Biochem. J.*, 276(Pt 1), 53-56.
56. Lazo, O., Contreras, M., Yoshida, Y., Singh, A. K., Stanley, W., Weise, M., & Singh, I. (1990) Cellular oxidation of lignoceric acid is regulated by the subcellular localization of lignoceroyl-CoA ligases. *J. Lipid Res.* 31(4), 583-595.
57. Van Veldhoven, P., Debeer, L. J., & Mannaerts, G. P. (1983) Water and solute-accessible spaces of purified peroxisomes. *Biochem. J.* 210(3), 685-693.
58. Prydz, K., Kase, B. F., Bjorkheim, I., & Pedersen, J. I. (1988) Subcellular localization of 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy- and 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholestanoyl-CoA ligase(s) in rat liver. *J. Lipid Res.* 29, 997-1004.
59. Schepers, L., Casteels, M., Verheyden, K., Parmentier, G., Asselberghs, S., Eyssen, H. J., & Mannaerts, G. P. (1989) Subcellular distribution and characteristics of trihydroxycholestanoyl-CoA synthetase. *Biochem. J.* 257, 221-229.
60. Kase, B. F., Prydz, K., Bjorkheim, I., & Pedersen, J. I. (1986) *In vitro* formation of bile acids from di- and tri-hydroxy-5 $\beta$ -cholestanoic acid in human liver peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* 877(1), 37-42.
61. Casteels, M., Schepers, L., Van Eldere, J., Eyssen, H. J., & Mannaerts, G. P. (1988) Inhibition of 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -tri-hydroxy-5 $\beta$ -cholestanoic acid oxidation and of

bile acid secretion in rat liver by fatty acids. *J. Biol. Chem.* 263(10), 4654-4661.

62. Pedersen, J. I., Hvattum, E., Flatabo, T., & Bjorkheim, I. (1988) Clofibrate does not induce peroxisomal 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholestanoyl-CoA oxidation in rat liver: evidence that this reaction is catalyzed by an enzyme system different from that of peroxisomal acyl-CoA oxidation. *Biochem. Int.* 17(1), 163-169.
63. Kase, B. F., Prydz, K., Bjorkheim, I., & Pedersen, J. I. (1986) Conjugation of cholic acid with taurine and glycine by rat liver peroxisomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138(1), 167-173.
64. Kase, B. F. & Bjorkheim, I. (1989) Peroxisomal bile acid-CoA:amino-acid N-acyltransferase in rat liver. *J. Biol. Chem.* 264(16), 9220-9223.
65. Palosaari, P. M. & Hiltunen, J. K. (1990) Peroxisomal bifunctional protein from rat liver is a trifunctional enzyme possessing 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and s2,s3-enoyl-CoA isomerase activities. *J. Biol. Chem.* 265(5), 2446-2449.
66. Suzuki, H., Yamada, J., Watanabe, T., & Suga, T. (1989) Compartmentation of dicarboxylic acid  $\beta$ -oxidation in rat liver: importance of peroxisomes in metabolism of dicarboxylic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 990(1), 25-30.
67. Vanhove, G., Van Veldhoven, P. P., Vanhoutte F., Parmentier, G., Eyssen, H. J., & Mannaerts, G. P. (1991) Mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation of the branched chain fatty acid 2-methylpalmitate in rat liver. *J. Biol. Chem.* 266(36), 24670-24675.
68. Van Veldhoven, P. P., Vanhove, G., Vanhoutte, F., Dacremont, G., Parmentier, G., Eyssen, H. J., & Mannaerts, G. P. (1991) Identification and purification of a peroxisomal branched chain fatty acyl-CoA oxidase. *J. Biol. Chem.* 266(36), 24676-24683.
69. Yamada, J., Itoh, S., Horie, S., Watanabe, T., & Suga, T. (1986) Chain-shortening of a xenobiotic acyl compound by the peroxisomal  $\beta$ -oxidation system in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 35(24), 4363-4368.
70. Schepers, L., Casteels, M., Vamecq, J., Parmentier, G., Van Veldhoven, P. P., & Mannaerts, G. P. (1988)  $\beta$ -oxidation of the carboxyl side chain of prostaglandin E2 in rat liver peroxisomes and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 263(6), 2724-2731.
71. Diczfalusy, U., Alexson, S. E. H., & Pedersen, J. I. (1987) Chain-shortening of prostaglandin F2 $\alpha$  by rat liver peroxisomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144(3), 1206-1213.
72. Jedlitschky, G., Huber, M., Volkl, A., Muller, M., Leier, I., Muller, J., Lehmann, W. A. D., Fahimi, H. D., & Keppler, D. (1991) Peroxisomal degradation of



leukotrienes by  $\beta$ -oxidation from the  $\omega$ -end. *J. Biol. Chem.* 266(36), 24763-24772.

73. Thompson, S. L. & Krisans, S. K. (1985) Evidence for peroxisomal hydroxylase activity in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130(2), 708-716.
74. Wanders, R. J. A., Romeyn, G. J., Schutgens, R. B. H., & Tager, J. M. (1989) L-pipecolate oxidase: a distinct peroxisomal enzyme in man. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164(1), 550-555.
75. Mihalik, S. J., McGuinness, M., & Watkins, P. A. (1991) Purification and characterization of peroxisomal L-pipecolic acid oxidase from monkey liver. *J. Biol. Chem.* 266(8), 4822-4830.
76. Thompson, S. L. & Krisans, S. K. (1990) Rat liver peroxisomes catalyze the initial step in cholesterol synthesis. The condensation of acetyl-CoA units into acetoacetyl-CoA. *J. Biol. Chem.* 265(10), 5731-5735.
77. Keller, G.-A., Barton, M. C., Shapiro, D. J., & Singer, S. J. (1985) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is present in peroxisomes in normal rat liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 770-774.
78. Keller, G.-A., Pazirandeh, M., & Krisans, S. K. (1986) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase localization in rat liver peroxisomes and microsomes of control and cholestyramine-treated animals: quantitative biochemical and immunoelectron microscopic analyses. *J. Cell Biol.* 103(3), 875-886.
79. Van der Krift, T. P., Leunissen, J., Teerlink, T., van Heusden, G. P. H., Verkleji, A. J., & Wirtz, K. W. A. (1985) Ultrastructural localization of a peroxisomal protein in rat liver using the specific antibody against the non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2). *Biochim. Biophys. Acta* 812(2), 387-392.
80. Tsuneoka, M., Yamamoto, A., Fujiki, Y., & Tashiro, Y. (1988) Nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2) is located in rat liver peroxisomes. *J. Biochem.* 104(4), 560-564.
81. Hardeman, D. & Van Den Bosch, H. (1988) Rat liver dihydroxyacetonephosphate acyltransferase: enzyme characteristics and localization studies. *Biochim. Biophys. Acta* 963(1), 1-9.
82. Hardeman, D. & Van Den Bosch, H. (1989) Topography of ether phospholipid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1006(1), 1-8.
83. Hajra, A. K. & Bishop, J. E. (1982) Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes via the acyl-dihydroxyacetone phosphate pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 386, 170-182.
84. Gohsh, M. K. & Hajra, A. K. (1986) Subcellular distribution and properties of

acyl/alkyl dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in rodent liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 245(2), 523-530.

85. Zoeller, R. A., Morand, O. H., & Raetz, C. R. H. (1988) A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J. Biol. Chem.* 263(23), 11590-11596.
86. Morand, O. H., Zoeller, R. A., & Raetz, C. R. H. (1988) Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *J. Biol. Chem.* 263, 11597-11606.
87. Ford, D. A. & Gross, R. W. (1989) Plasmenylethanolamine is the major storage depot for arachidonic acid in rabbit vascular smooth muscle and is rapidly hydrolyzed after angiotensin II stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3479-3483.
88. Hanahan, D. J., Demopoulos, C. A., Liehr, J., & Pinckard, R. N. (1980) Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J. Biol. Chem.* 255, 5514-5516.
89. Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T., & Hashimoto, T. (1990) The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.* 265(8), 4534-4540.
90. Baudhuin, P. (1969) Liver peroxisomes, cytology and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 168(2), 214-228.
91. Beaufay, H., Jacques, P., Sellinger, O. Z., Berthet, J., & De Duve, C. (1964) Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibrium in various gradients. *Biochem. J.* 92, 184-205.
92. Van Veldhoven, P. P., Just, W. W., & Mannaerts, G. P. (1987) Permeability of the peroxisomal membrane to cofactors of  $\beta$ -oxidation. *J. Biol. Chem.* 262(9), 4310-4318.
93. Thomas, J., Debeer, L. J., De Schepper, P. J., & Mannaerts, G. P. (1980) Factors influencing palmitoyl-CoA oxidation by rat liver peroxisomal fractions. *Biochem. J.* 190(3), 485-494.
94. Osmundsen, H. & Neat, C. E. (1979) Regulation of peroxisomal fatty acid oxidation. *FEBS Lett.* 107(1), 81-85.
95. Wolvetang, E. J., Tager, J. M., & Wanders, R. J. A. (1990) Latency of the peroxisomal enzyme acyl-CoA:dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in digitonin-permeabilized fibroblast: the effect of ATP and ATPase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170(3), 1135-1143.

96. Imanaka, T., Small, G. M., & Lazarow, P. B. (1987) Translocation of acyl-CoA oxidase into peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential. *J. Cell Biol.* 105(6, Pt 2), 2915-2922.
97. Gould, S. J., Keller, G.-A., & Subramani, S. (1987) Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J. Cell Biol.* 105(6, Pt 2), 2923-2931.
98. Gould, S. J., Keller, G.-A., & Subramani, S. (1988) Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J. Cell Biol.* 107(3), 897-905.
99. Gould, S. J., Keller, G.-A., Hosken, N., Wilkinson, J., & Subramani, S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell Biol.* 108(5), 1657-1664.
100. Gould, S. J., Keller, G.-A., Schneider, M., Howell, S. H., Garrard, L. J., Goodman, J. M., Distel, B., Tabak, H. F., & Subramani, S. (1990) Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects, and mammals. *EMBO J.* 9(1), 85-90.
101. Keller, G.-A., Krisans, S., Gould, S. J., Sommer, J. M., Wang, C. C., Schliebs, W., Kunau, W.-H., Brody, S., & Subramani, S. (1991) Evolutionary conservation of a microbody targeting signal that targets proteins to peroxisomes, glyoxysomes, and glycosomes. *J. Cell Biol.* 114(5), 893-904.
102. Miura, S., Kasuya-Arai, I., Mori, H., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., & Fujiki, Y. (1992) Carboxyl terminal consensus Ser-Lys-Leu-related tripeptide of peroxisomal proteins functions *in vitro* as a minimal peroxisome-targeting signal. *J. Biol. Chem.* 267(20), 14405-14411.
103. Middelkoop, E., Strijland, A., & Tager, J. M. (1991) Does aminotriazole inhibit import of catalase into peroxisomes by retarding unfolding? *FEBS Lett.* 279(1), 79-82.
104. Mcnew, J. A., & Goodman, J. M. (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes *in vivo*. *J. Cell Biol.* 127(5), 1245-1257.
105. Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A., & Subramani, S. (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* 10(11), 3255-3262.
106. Osumi, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S., & Hashimoto, T. (1991) Amino-terminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181(3), 947-954.
107. Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S., Hashimoto, T., & Osumi, T. (1994) Characterization of the signal peptide at the amino terminus of the rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase precursor. *J. Biol. Chem.* 269(8), 6001-10.
108. Miura, S., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., & Fujiki, Y. (1994) Post-translational import of 3-ketoacyl-CoA thiolase into rat liver peroxisomes *in vitro*. *J. Biochem.* 115(6), 1064-1068.
109. Diestelkötter, P., & Just, W. W. (1993) *In vitro* insertion of the 22-kD peroxisomal membrane protein into isolated rat liver peroxisomes. *J. Cell Biol.* 123(6, Pt 2), 1717-1725.
110. Walton, P. A., Gould, S. J., Feramisco, J. R., & Subramani, S. (1992) Transport of microinjected proteins into peroxisomes of mammalian cells: inability of Zellweger cell lines to import proteins with the SKL tripeptide peroxisomal targeting signal. *Mol. Cell. Biol.* 12(2), 531-541.
111. Erdmann, R., Veenhuis, M., Mertens, D., & Kunau, W.-H. (1989) Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(14), 5419-5423.
112. Erdmann, R., Wiebel, F. F., Flessau, A., Rytka, J., Beyer, A., Fröhlich, K., & Kunau, W.-H. (1991) PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell* 64(3), 499-510.
113. Wiebel, F. F. & Kunau, W.-H. (1992) The Pas2 protein essential for peroxisome biogenesis is related to ubiquitin-conjugating enzymes. *Nature* 359(6390), 73-76.
114. Hohfeld, J., Veenhuis, M., & Kunau, W.-H. (1991) PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *J. Cell Biol.* 114(6), 1167-1178.
115. Voorn-Brouwer, T., van der Leij, I., Hemrika, W., Distel, B., & Tabak, H. F. (1993) Sequence of the PAS8 gene, the product of which is essential for biogenesis of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1216(2), 325-8.
116. Van der Leij, I., Franse, M. M., Elgersma, Y., Distel, B., & Tabak, H. F. (1993) PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24), 11782-11786.
117. Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M., & Kunau, W. H. (1994) PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *EMBO J.* 13(20), 4908-18.

118. Zhang, J. W. & Lazarow, P. B. (1995). PEB1 (PAS7) in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a hydrophilic, intra-peroxisomal protein that is a member of the WD repeat family and is essential for the import of thiolase into peroxisomes. *J. Cell Biol.* 129(1), 65-80.
119. Heyman, J. A., Monosov, E., & Subramani, S. (1994). Role of the PAS1 gene of *Pichia pastoris* in peroxisome biogenesis. *J. Cell Biol.* 127(5), 1259-1273.
120. Crane, D. I., Kalish, J. E., & Gould, S. J. (1994) The *Pichia pastoris* PAS4 gene encodes a ubiquitin-conjugating enzyme required for peroxisome assembly. *J. Biol. Chem.* 269(34), 21835-21844.
121. Wiemer, E. A. & Subramani, S. (1994). Protein import deficiencies in human peroxisomal disorders. *Mol. Genet. Med.* 4, 119-52.
122. Liu, H., Tan, X. Q., Russell, K. A., Veenhuis, M., & Cregg, J. M. (1995). PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. *J. Biol. Chem.* 270(18), 10940-10951.
123. Spong, A. P., & Subramani, S. (1993) Cloning and characterization of PAS5: a gene required for peroxisome biogenesis in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell Biol.* 123(3), 535-548.
124. McCollum, D., Monosov, E., & Subramani, S. (1993). The pas8 mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells: The PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein family. *J. Cell Biol.* 121(4), 761-774.
125. Nuttley, W. M., Brade, A. M., Eitzen, G. A., Veenhuis, M., Aitchison, J. D., Szilard, R. K., Glover, J. R., & Rachubinski, R. A. (1994) PAY4, a gene required for peroxisome assembly in the yeast *Yarrowia lipolytica*, encodes a novel member of a family of putative ATPases. *J. Biol. Chem.* 269(1), 556-566.
126. Eitzen, G. A., Aitchison, J. D., Szilard, R. K., Veenhuis, M., Nuttley, W. M., & Rachubinski, R. A. (1995). The *Yarrowia lipolytica* gene PAY2 encodes a 42-kDa peroxisomal integral membrane protein essential for matrix protein import and peroxisome enlargement but not for peroxisome proliferation. *J. Biol. Chem.* 270(3), 1429-1436.
127. Waterham, H. R., Titorenko, V. I., Haima, P., Cregg, J. M., Harder, W., & Veenhuis, M. (1994). The *Hansenula polymorpha* PER1 gene is essential for peroxisome biogenesis and encodes a peroxisomal matrix protein with both carboxy- and amino-terminal targeting signals. *J. Cell Biol.* 127(3), 737-49.
128. Tan, X., Waterham, H. R., Veenhuis, M., & Cregg, J. M. (1995). The *Hansenula polymorpha* PER8 gene encodes a novel peroxisomal integral membrane protein involved

in proliferation. *J. Cell Biol.* 128(3), 307-319.

129. Kunau, W. H., Beyer, A., Franken, T., Gotte, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A., & Wiebel, F. F. (1993). Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. *Biochimie* 75(3-4), 209-224.
130. Tsukamoto, T., Yokata, S., & Fujiki, Y. (1990) Isolation and characterization of Chinese hamster ovary cell mutants defective in assembly of peroxisomes. *J. Cell Biol.* 110(3), 651-660.
131. Tsukamoto, T., Yokata, S., & Fujiki, Y. (1991) Restoration by a 35 K membrane protein of peroxisome assembly in peroxisome-deficient mammalian cell mutant. *Nature* 350(6313), 77-81.
132. Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Suzuki, Y., Oritani, T., Shirayoshi, Y., Mori, T., & Fujiki, Y. (1992). A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly. *Science* 225(5048), 1132-1134.
133. Osumi, T. personal communication.
134. Dodt, G., Braverman, N., Wong, C., Moser, A., Moser, H. W., Watkins, P., Valle, D., & Gould, S. J. (1995). Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nature Genetics* 9(2), 115-125.
135. Fransen, M., Brees, C., Baumgart, E., Vanhooren, J. C. T., Baes, M., Mannaerts, G. P., & Van Veldhoven, P. P. (1995) Identification and characterization of the putative human peroxisomal C-terminal targeting signal import receptor. *J. Biol. Chem.* 270(13), 7731-7736.
136. Kamijo, K., Kamijo, T., Ueno, I., Osumi, T., & Hashimoto, T. (1992) Nucleotide sequence of the human 70 kDa peroxisomal membrane protein: a member of ATP-binding cassette transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1129(3), 323-327.
137. Gartner, J., Moser, H., & Valle, D. (1992) Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome. *Nature Genetics* 1(1), 16-23.
138. Mosser, J., Douar, A.-M., Sarde, C.-O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.-M., Mandel, J.-L., & Aubourg, P. (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361(6414), 726-730.
139. Walton, P. A., Wendland, M., Subramani, S., Rachubinski, R. A., & Welch, W. J. (1994). Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *J. Cell Biol.* 125(5), 1037-46.

140. Luers, G., Hashimoto, T., Fahimi, H. D., & Volkl, A. (1993) Biogenesis of peroxisomes: isolation and characterization of two distinct peroxisomal populations from normal and regenerating rat liver. *J. Cell Biol.* 121(6), 1271-1280.
141. Issemann, I. & Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 374(6294), 645-650.
142. Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Grivel, F., Helftenbein, G., & Wahli, W. (1992) Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68(5), 879-887.
143. Kliewer, S., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., & Evans, R. M. (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through hetero-dimer formation of their receptors. *Nature* 358(6389), 771-774.
144. Lalwani, N. D., Alvares, K., Reddy, M. K., Reddy, M. N., Parikh, I., & Reddy, J. K. (1987) Peroxisome proliferator-binding protein: Identification and partial characterization of nafenopin-, clofibrac acid-, and ciprofibrate-binding proteins from rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(15), 5242-5246.
145. Huang, Q., Alvares, K., Chu, R., Bradfield, C. A., & Reddy, J. K. (1994) Association of peroxisome proliferator-activated receptor and HSP72. *J. Biol. Chem.* 269(11), 8493-8497.
146. Kaikaus, R. M., Chan, W. K., Lysenko, N., Ray, R., Ortiz de Montellano, P. R., & Bass, N. M. (1993) Induction of peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation and liver fatty acid-binding protein by peroxisome proliferators. Mediation via the cytochrome P-450IVA1  $\omega$ -hydroxylase pathway. *J. Biol. Chem.* 268(13), 9593-9603.
147. Verheyden, K., Fransen, M., Van Veldhoven, P. P., & Mannaerts, G. P. (1992) Presence of small GTP-binding proteins in the peroxisomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1109(1), 48-54.
148. James, G. L., Goldstein, J. L., Pathak, R. K., Anderson, R. G., & Brown, M. S. (1994). PxF, a prenylated protein of peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 269(19), 14182-14190.
149. ベルオキシソームに関する特集号: *Biology Cell*, 77(1), (1993)
150. Subramani, S. (1993) Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 445-478.
151. 河嶋 洋一 (1993) 動物細胞脂質代謝におけるベルオキシソームの役割. フィブラート系抗高脂血症薬の生体への作用の解析 蛋・核・酵, 38(5), 843-856.
152. Purdue, P. E., & Lazarow, P. B. (1994) Peroxisomal biogenesis: Multiple pathways of protein import. *J. Biol. Chem.* 269(48), 30065-30068.
153. Wiemer, E. A. & Subramani, S. (1994) Protein import deficiencies in human peroxisomal disorders. *Mol. Genet. Med.* 4, 119-152.
154. 橋本 隆 (1994) 脂肪酸酸化におけるミトコンドリアとベルオキシソームの分業. 生化学, 66(10), 1324-1327.
155. 藤木 幸夫 (1995) ベルオキシソームの形成機構とベルオキシソーム病. 生化学, 67(3), 204-223.
156. Pedersen P. L. & Amzel L. M. (1993) ATP synthetases: structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *J. Biol. Chem.* 268(14), 9937-9940.
157. Makita, T., Hakoi, K., & Araki, N. (1990) Cytochemical localization of  $Mg^{2+}$ -ATPase and  $Ca^{2+}$ -ATPase on the limiting membrane of rat liver peroxisomes. *Acta Histochem. Cytochem.* 23(5), 601-611.
158. del Valle, R., Soto, U., Necochea, C., & Leighton, F. (1988) Detection of an ATPase activity in rat liver peroxisomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156(3), 1353-1359.
159. Wolvetang, E. J., Wanders, R. J. A., Schutgens, R. B. H., Berden, J. A., & Tager, J. M. (1990) Properties of the ATPase activity associated with peroxisome-enriched fractions from rat liver: comparison with mitochondrial  $F_1F_0$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1035(1), 6-11.
160. Malik, Z. A., Tappia, P. S., De Netto, L. A., Burdett, K., Sutton, R., & Connock, M. J. (1991) Properties of ATPase activity associated with peroxisomes of rat and bovine liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B(2), 295-300.
161. Reddy, J. K., Goel, S. K., Nemali, M. R., Carrino, J. J., Laffler, T. G., Reddy, M. K., Sperbeck, S. J., Osumi, T., Hashimoto, T., & Lalwani, N. D. (1986) Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(6), 1747-1751.
162. Fujiki, Y., Rachubinski, R. A., & Lazarow, P. B. (1984) Synthesis of a major integral membrane polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(22), 7127-7131.
163. Zaar, K., Volkl, A., & Fahimi, H. D. (1987) Association of isolated bovine kidney cortex peroxisomes with endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 897(1), 135-142.
164. Baumgart, E., Volkl, A., Hashimoto, T., & Fahimi, H. D. (1989) Biogenesis of

peroxisomes: immunocytochemical investigation of peroxisomal membrane proteins in proliferating rat liver peroxisomes and in catalase-negative membrane loops. *J. Cell Biol.* 108(6), 2221-2231.

165. Gutierrez, C., Okita, R., & Krisans, S. (1988) Demonstration of cytochrome reductases in rat liver peroxisomes: Biochemical and immunochemical analyses. *J. Lipid Res.* 29(5), 613-628.

166. Al-Awqati, Q. (1986) Proton-translocating ATPases. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 179-199.

167. Forgac, M. (1989) Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol. Rev.* 69(3), 765-796.

168. Bowman, E. J., Siebers, A., & Altendorf, K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(21), 7972-7976.

169. Moriyama, Y., Takano, T., & Ohkuma, S. (1984) Proton translocating ATPase in lysosomal membrane ghosts. Evidence that alkaline  $Mg^{2+}$ -ATPase acts as a proton pump. *J. Biochem.* 95(4), 995-1007.

170. Ohkuma, S., Moriyama, Y., & Takano, T. (1982) Identification and characterization of a proton pump on lysosomes fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2758-2762.

171. Ohkuma, S., Moriyama, Y., Inuma, K., Morimoto, Y., Watanabe, H., Hayashi, H., Arai, K., & Shimizu, S. (1990) Membranous ATPases and transport functions of lysosomes. *Acta Histochem. Cytochem.* 23(1), 41-51.

172. Arai, H., Berne, M., & Forgac, M. (1987) Inhibition of the coated vesicle proton pump and labeling of a 17,000-dalton polypeptide by *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* 262(23), 11006-11011.

173. Sebald, W., Machleidt, W., & Wachter, E. (1980) *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide binds specifically to a single glutamyl residue of the proteolipid subunit of the mitochondrial adenosinetriphosphatases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(2), 785-789.

174. Racker, E., Horstman, L. L., Kling, D., & Fessenden-Raden, J. M. (1969) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation XXI. Resolution of submitochondrial particles from bovine heart mitochondria with silicotungstate. *J. Biol. Chem.* 244(24), 6668-6674.

175. Padh, H., Lavasa, M., & Steck, T. L. (1989) Characterization of a vacuolar proton ATPase in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta* 982, 271-278.

176. Futai, M., Noumi, T., & Maeda, M. (1989) ATP synthase ( $H^+$ -ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 111-136.

177. Moriyama, Y., & Nelson, N. (1987) Nucleotide binding sites and chemical modification of the chromaffin granule proton ATPase. *J. Biol. Chem.* 262(30), 14723-14729.

178. Arai, K., Shimaya, A., Hiratani, N., & Ohkuma, S. (1993) Purification and characterization of lysosomal  $H^+$ -ATPase: an anion-sensitive V-type ATPase from rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* 268(8), 5649-5660.

179. Douma, A. C., Veenhuis, M., Sulter, G. J., & Harder, W. (1987) A proton-translocating adenosine triphosphatase is associated with the peroxisomal membrane of yeasts. *Arch. Microbiol.* 147(1), 42-47.

180. Waterham, H. R., Keizer-Gunnink, I., Goodman, J. M., Harder, W., & Veenhuis, M. (1990). Immunocytochemical evidence for the acidic nature of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEBS Lett.* 262(1), 17-19.

181. Whitney, A. B., & Belion, E. (1991) ATPase activities in peroxisome-proliferating yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1058(3), 345-355.

182. Lin, S.-H. (1985) The rat liver plasma membrane high affinity ( $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ )-ATPase is not a calcium pump. Comparison with ATP-dependent calcium transporter. *J. Biol. Chem.* 260(20), 10976-10980.

183. Banerjee, R. K., & Racker, E. (1977) Solubilization, purification, and characterization of a nucleoside triphosphatase from avian myeloblastosis virus. *J. Biol. Chem.* 252(19), 6700-6706.

184. Hayashi, H., Arai, K., Sato, O., Shimaya, A., Sai, Y., & Ohkuma, S. (1992) Three types of membranous ATPase on rat liver lysosomes. *Chem. Pharm. Bull.* 40(10), 2783-2786.

185. Lin, S.-H., & Fain, J. N. (1984) Purification of ( $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ )-ATPase from rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259(5), 3016-3020.

186. Bellion, E., & Goodman, J. M. (1987) Proton ionophores prevent assembly of a peroxisomal protein. *Cell* 48(1), 165-173.

187. Hashimoto, T., Kuwabara, T., Usuda, N., & Nagata, T. (1986) Purification of membrane polypeptides of rat liver peroxisomes. *J. Biochem.* 100(2), 301-10.

188. Hamada, H., & Tsuruo, T. (1988) Characterization of the ATPase activity of the Mr 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with

multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res.* 48(7), 4926-4932.

189. Fujiki, Y., Fowler, S., Shio, H., Hubbard, A. L., & Lazarow, P. B. (1982) Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: Comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J. Cell Biol.* 93(1), 103-110.
190. Marquardt, D. & Center, M. S. (1991) Involvement of vacuolar H<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase activity in multidrug resistance in HL60 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 83(15), 1098-1102.
191. Lahti, R., Pitkaranta, T., Valve, E., Ilta, I., Kukko-Kalske, E., & Heinonen, J. (1988) Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170(12), 5901-5907.
192. Cohen, S. A., Sterner, R., Keim, P. S., & Heinrikson, R. L. (1978) Covalent structural analysis of yeast inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* 253(3), 889-897.
193. Volk, S. E., Baykov, A. A., Kostenko, E. B., & Avaeva, S. M. (1983) Isolation, subunit structure and localization of inorganic pyrophosphatase of heart and liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 744(2), 127-134.
194. Volk, S. E., & Baykov, A. A. (1984) Isolation and subunit composition of membrane inorganic pyrophosphatase from rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 791(2), 198-204.
195. Mansurova, S. E. (1989) Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 977(3), 237-247.
196. Lundin, M., Deopujari, S. W., Lichko, L., da-Silva, L. P., & Baltscheffsky, H. (1992) Characterization of a mitochondrial inorganic pyrophosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1098(2), 217-223.
197. Lundin, M., Baltscheffsky, H., & Ronne, H. (1991) Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 266(19), 12168-12172.
198. Gould, J. M., & Winget, G. D. (1973) A membrane-bound alkaline inorganic pyrophosphatase in isolated spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 154(2), 606-613.
199. Maeshima, M., & Yoshida, S. (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *J. Biol. Chem.* 264(33), 20068-20073.
200. Ikeda, M., Satoh, S., Maeshima, M., Mukohata, Y., & Moritani, C. (1991) A

vacuolar ATPase and pyrophosphatase in *Acetabularia acetabulum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1070(1), 77-82.

201. Dubnova, E. B., & Baykov, A. A. (1992) Catalytic properties of the inorganic pyrophosphatase in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 292(1), 16-19.
202. Yoshida, C., Shah, H., & Weinhouse, S. (1982) Purification and properties of inorganic pyrophosphatase of rat liver and hepatoma 3924A. *Cancer Res.* 42(7), 3526-3531.
203. Mann, V. M., Nwosu, V. U., Silcox, A., Jones, C. J. P., Burdett, K., & Connock, M. J. (1992) Subcellular fractionation evidence for a putative peroxisome-mitochondrion attachment in the liver of normal and genetically obese (ob/ob and db/db) mice. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B(3), 551-559.
204. Baykov, A. A., Pavlov, A. R., Kasho, V. N., & Avaeva, S. M. (1989) Allosteric regulation of yeast inorganic pyrophosphatase by substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 273(2), 301-308.
205. Baykov, A. A., Alexandrov, A. P., & Smirnova, I. N. (1992) A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 294(1), 238-243.
206. Kesselring, v. K., & Siebert, G. (1967) Eigenschaften einer löslichen anorganischen Pyrophosphatase aus Rattenleber-Zellkernen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348(5), 585-598.
207. Singh, I., Lazo, O., Dhaunsi, G. S., & Contreras, M. (1992) Transport of fatty acids into human and rat peroxisomes. Differential transport of palmitic and lignoceric acids and its implication to X-adrenoleukodystrophy. *J. Biol. Chem.* 267(19), 13306-13313.
208. Patel, B. N., Mackness, M. I., & Connock, M. J. (1987) Peroxisomal localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase and pyrophosphate-stimulated dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in mouse kidney. *Biochem. J.* 244(2), 443-448.
209. Hajra, A. K., Burke, C. L., & Jones, C. L. (1979) Subcellular localization of acyl coenzyme A: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in rat liver peroxisomes (microbodies). *J. Biol. Chem.* 254(21), 10896-10900.
210. Ballas, L. M., Lazarow, P. B., & Bell, R. M. (1984) Glycerolipid synthetic capacity of rat liver peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 795(2), 297-300.
211. 千田和広 (1992) "細胞工学ハンドブック" マイクロインジェクションー蛋白の培養細胞への直接注入 pp. 234-239.

212. Wendland, M., & Subramani, S. (1993) Cytosol-dependent peroxisomal protein import in a permeabilized cell system. *J. Cell Biol.* 120(3), 675-685.
213. Rapp, S., Soto, U., & Just, W. W. (1993) Import of firefly luciferase into peroxisomes of permeabilized chinese hamster ovary cells: a model system to study peroxisomal protein import *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 205(1), 59-65.
214. Walton, P. A., Gould, S. J., Rachubinski, R. A., & Subramani, S. (1992) Transport of microinjected alcohol oxidase from *Pichia pastoris* in mammalian cells: involvement of the peroxisomal targeting signal. *J. Cell Biol.* 118(3), 499-508.
215. Soto, U., Pepperkok, R., Ansorge, W., & Just, W. W. (1993) Import of firefly luciferase into mammalian peroxisomes *in vivo* requires nucleoside triphosphates. *Exp. Cell Res.* 205(1), 66-75.
216. Walton, P. A., Wendland, M., Subramani, S., Rachubinski, R. A., & Welch, W. J. (1994) Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *J. Cell Biol.* 125(5), 1037-46.
217. Scotto, C., Keller, J. M., Schohn, H., & Dauca, M. (1995) Comparative effects of clofibrate on peroxisomal enzymes of human (Hep EBNA2) and rat (FA0) hepatoma cell lines. *Eur. J. Cell Biol.* 66(4), 375-381.
218. 市村藤雄 監修 (1994) "疾患別 服薬指導マニュアル" 高脂血症と抗高脂血症薬 pp. 133-148.
219. Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J. W., Fowler, S., & de Duve, C. (1968) The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with Triton WR-1339. *J. Cell Biol.* 37(2), 482-513.
220. Cooperstein, S. J., & Lazarow, A. (1951) A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 189, 665-670.
221. Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M., & Berthet, J. (1974) Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver I. Biochemical methods. *J. Cell Biol.* 61, 188-200.
222. Sellinger, O. Z., Beaufay, H., Jacques, P., Doyen, A., & de Duve, C. (1960) Tissue fractionation studies 15. Intracellular distribution and properties of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and  $\beta$ -galactosidase in rat liver. *Biochem. J.* 74, 450-456.
223. Itaya, K., & Ui, M. (1966) A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clin. Chim. Acta* 14, 361-366.
224. Henkel, R. D., VandeBerg, J. L., & Walsh, R. A. (1988) A microassay for ATPase. *Anal. Biochem.* 169, 312-318.
225. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
226. Wehrle, J. P., Cintron, N. M., & Pedersen, P. L. (1978) Phosphate transport in rat liver mitochondria: Energy-dependent accumulation of phosphate by inverted inner membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 253, 8598-8603.
227. Rothe, G. M., & Purkhanbaba, H. (1982) Determination of molecular weights and Stokes' radii of non-denatured proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis 1. An equation relating total polymer concentration, the molecular weight of proteins in the range of  $10^4$ - $10^6$ , and duration of electrophoresis. *Electrophoresis* 3, 33-42.
228. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
229. Harlow, E., & Lane, D. (1988) *Antibodies--A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory pp. 505.
230. Schweikl, H., Klein, U., Schindlbeck, M., & Wieczorek, H. (1989) A vacuolar-type ATPase, partially purified from potassium transporting plasma membranes of Tobacco Hornworm midgut. *J. Biol. Chem.* 264(19), 11136-11142.
231. Mowri, H., Ohkuma, S., & Takano, T. (1988) Monoclonal DLRIa/104G antibody recognizing peroxidized lipoproteins in atherosclerotic lesions. *Biochim. Biophys. Acta* 963, 208-214.
232. Shore, G. C., & Tata, J. R. (1977) Two fractions of rough endoplasmic reticulum from liver II. Cytoplasmic messenger RNA's which code for albumin and mitochondrial proteins are distributed differently between the two fractions. *J. Cell Biol.* 72, 726-743.
233. Pelham, H. R. B., & Jackson, R. J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67, 247-256.
234. Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., & Lazarow, P. B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93(1), 97-102.
235. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., G., S. J., Smith, J. A., & Struhl, K. (1992) "Current Protocols in Molecular Biology." 11.15.1



## 謝・辞

本研究に際し、終始暖かい御指導、御激励を賜りました金沢大学薬学部生化学教室 大熊勝治教授に深く感謝いたします。更に、金沢大学薬学部生化学教室

荒井國三博士はじめ教職員の皆様や諸橋栄介修士はじめ多くの卒研究生の皆様の御支援、御協力に心から感謝いたします。また、共同研究者の帝京大学薬学部 高野達哉教授、今中常雄助教授に深く感謝いたします。終わりに、山本讓、越村三郎 金沢大学両名誉教授の長年にわたる不断の御指導、御鞭撻に心から御礼申し上げます。

