

プラスチドへのタンパク質の集積機構：Cu/Zn型
スーパーオキシドディスムターゼとグルタミン合成酵素の
プラスチド局在型前駆体の構造とソーティングシグナル

坂本 敦・田中 國介

Sorting mechanism of proteins into plastids:

Structure of plastidic precursors for

Cu/Zn-superoxide dismutase and glutamine synthetase,
and the sorting signal for plastids

ATSUSHI SAKAMOTO and KUNISUKE TANAKA

要旨：著者らが最近明らかにしたスーパーオキシドディスムターゼとグルタミン合成酵素の各プラスチド局在型の前駆体構造について、これまでに報告のあるこれらの酵素の配列と比較し、プラスチドソーティングに必須なトランジットペプチド構造の法則性を明らかにしようとした。アミノ酸組成分析に基づいた一次構造の比較から低分子量の疎水性または水酸基性残基（あるいはその両方）および塩基性残基が各配列で保存され、これらがプラスチドへのソーティングシグナルとなっていることが推定された。またプラスチド内のソーティング部位が同じであるイネのグルタミン合成酵素とリブローズ 1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ（小サブユニット）のトランジットペプチド間では上記のアミノ酸残基について保存性が観察されたうえに、さらに二次構造に類似性が見られた。以上の解析より、この2つの要素がトランジットペプチドの機能発現に重要であることが示唆された。

緒 言

真核細胞は、原核細胞とは異なり脂質膜により高度に区画化された複雑な内部構造をとっている。その構成要素として核やミトコンドリアをはじめとする細胞内小器官（オルガネラ）や小胞体などが挙げられるが、それらは独自の役割を持ちつつも互いに協調的に機能し、その結果、生命としての営みが維持されている。個々のオルガネラの機能発現には、物質代謝を担う酵素をはじめとした様々なタンパク質の存在が必要不可欠であるが、これらのほとんどは、ミトコンドリアや

葉緑体といった独自の遺伝情報を持つオルガネラの場合でさえ、自身のゲノムではなく核ゲノムに遺伝子が存在する。このことはこれらのタンパク質は細胞質で翻訳された後、さらに目的とするオルガネラへときわめて正確に輸送（ソーティング）されることを示している。

この一見あたりまえに思える現象には、非常に精巧かつ動的な分子機構が存在するはずであるが、現時点では、その基礎的なモデルが確立されているにすぎない。その1つにシグナル仮説¹⁾がある。この説は、オルガネラにソーティングされるタンパク質は細胞質の

京都府立大学農学部生物化学研究室

Department of Biochemistry, College of Agriculture, Kyoto Prefectural University,
Shimogamo, Kyoto 606, Japan

平成2年8月17日受理

リボソーム上でアミノ末端（あるいはカルボキシル末端）にシグナル配列と呼ばれる余分なペプチド配列を持つ前駆体として合成される事実に基づいている。そしてこのシグナル配列がタンパク質としての機能を発現する後続のポリペプチド（成熟タンパク質）を目的のオルガネラへ導くガイド役を果たすという考えである。酵母や動物細胞でこの分野の研究が精力的に行われてきた結果、現在この説は広く受け入れられている。植物細胞の場合も、これまでに蓄積された知見から基本的にはこれとほぼ同じ機構でタンパク質のソーティングが行われていると考えられる。

物質集積の観点から植物細胞とこれらの真核細胞を比較した場合の大きな相違として、前者に特異的なオルガネラである色素体（プラスチド）の存在が挙げられる。プラスチドには細胞の種類に依存した分化形態により、白色体、有色体、葉緑体が存在する。白色体は、さらにデンプンを貯蔵するアミロプラスト、脂質類を含むオレオプラスト、タンパク質の結晶を持つプロテノプラストなどに分類される。有色体はカロテノイドなどの色素を、また葉緑体は光合成産物の糖質を蓄積することから、これらは蓄積する物質の違いこそあれ基本的に植物細胞の貯蔵オルガネラとして役立っている。プラスチドは外包膜と内包膜の2種類の膜からなっており、さらに葉緑体の場合は内膜系（チラコイド膜）を有する。プラスチドソーティングのシグナル配列はトランジットペプチド（transit peptide）と呼ばれ、この呼び名はミトコンドリアや小胞体のシグナル配列（それぞれプレシークエンス、シグナルペプチドと呼ばれる）と区別するために用いられている。トランジットペプチドの配列は核遺伝子支配の葉緑体タンパク質について多数知られており、その共通配列を見い出そうという試みがなされているが、ミトコンドリアや小胞体のシグナル配列の場合とは異なり、いまだそれは明確にされていない²⁾³⁾。

近年のバイオテクノロジーの発展により、大腸菌などの原核細胞を母体とした有用物質の大量生産が可能となったが、物質の生産、回収、精製をトータルに考慮した場合、膜系を持った真核細胞を用いた場合の方が、物質の部位特異的集積機構を利用できるためはるかに優れているといえる。そして植物細胞の場合、プラスチドという細胞内貯蔵オルガネラが存在するので、理想的な物質生産の母体であると考えられる。我々はこのソーティング機構を用いて植物細胞に人為的に生産させた有用タンパク質をプラスチドに集積・貯蔵させることを目指している。そしてプラスチドのソーティング機構を解明するうえでトランジットペプチドの共通構造を明らかにすることはその第一のステップとなる。高等植物のCu/Zn型スーパーオキシドディ

ムターゼ（SOD）とグルタミン合成酵素（GS）はともにプラスチド局在型のアイソザイムを持ち、葉緑体ではSODは明反応の過程で発生する酸素ラジカルの消去を、またGSは光呼吸の副産物であるアンモニアの同化を行っている。我々はSODについてはハウレンソウ⁴⁾⁵⁾を、GSについてはイネ⁶⁾⁷⁾を材料にそれぞれcDNAクローニングを行い、これらのプラスチド局在型前駆体タンパク質の一次構造を明らかにし、そのN末端にトランジットペプチドが存在することを確認した。本報告では、これらの結果と他に報告されている関連酵素タンパク質のトランジットペプチドの構造を比較することによりその特徴を明らかにし、プラスチドへのソーティング機構に関する法則性を明らかにすることを試みた。

データ及び解析方法

ここで用いたアミノ酸配列のデータはすべてcDNA配列から推定したものである。cDNA配列は報文およびEMBLデータライブラリー（European Molecular Biology Laboratory, Postfach 10.2209, D-6900 Heidelberg, West Germany）からSODとGSについてはプラスチド局在型アイソザイム前駆体の全ての配列を、またリブソーム1, 5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニットについてはイネ（*Oryza sativa* L.）の2種類の配列⁸⁾を引用した。SODについてはハウレンソウ（*Spinacia oleracea* L.）⁴⁾⁵⁾、トマト（*Lycopersicon esculentum*）⁹⁾、ペチュニア（*Petunia hybrida*）¹⁰⁾、エンドウ（*Pisum sativum* L.）¹¹⁾、GSについてはイネ（*Oryza sativa* L.）⁶⁾⁷⁾、オオムギ（*Hordeum vulgare* L.）¹²⁾、インゲンマメ（*Phaseolus vulgaris* L.）¹³⁾、エンドウ（*Pisum sativum* L.）¹⁴⁾の配列がそれぞれ含まれる。

データの解析には京都大学大型計算機センター内の核酸・タンパク質配列データベース解析システムIDEAS（Integrated Database and Extended Analysis System For Nucleic Acids and Proteins）¹⁵⁾と市販のGENETYX遺伝情報処理ソフトウェア（Ver. 6.0, SDCソフトウェア開発株式会社）を併用した。

結 果

1. プラスチド局在型前駆体の一次構造の相同性

同じ機能を有するタンパク質、あるいは同じ遺伝子から分岐・進化したタンパク質はそのアミノ酸配列に相同性を持つ場合が多い。トランジットペプチドはタンパク質輸送に直接関与していると考えられるので、ここでは同じ遺伝子から進化したと考えられる異種植物間のSODあるいはGSのトランジットペプチドの間

で一次構造に相同性が見られるかどうかを調べた。

1) SOD前駆体の一次構造の相同性

ホウレンソウ・プラスチド局在型SOD前駆体のアミノ酸配列をマトリックスとして、これまでに報告のある全ての植物SOD前駆体（ペチュニア、トマト、エンドウ）との相同性を、トランジットペプチド部分と成熟タンパク質部分とに分けて比較した（Table 1）。トランジットペプチドの切断部位は成熟タンパク質の全ペプチド配列の決定されているホウレンソウのものに合わせた¹⁶⁾。この比較から、酵素タンパク質としての機能を発揮する成熟タンパ

ク質部分は4種の植物を通して約90%と非常にアミノ酸配列が保存されていることが示された。対照的にトランジットペプチド部分の相同性はホウレンソウSODのものに対し、いずれも50%以下と成熟部分に比べるとかなり低下していた。またアミノ酸残基数に関しては、成熟部分は154残基と4種のポリペプチドの間で同数であったが、トランジットペプチド部分では最小で3残基（ホウレンソウ・ペチュニア間）、最大で20残基（ホウレンソウ・エンドウ間）の差があり、この領域の相同性の低さを反映していた。

Table 1 Percent identities of the amino acid sequence for the plastidic precursor of the spinach Cu/Zn-superoxide dismutase compared to those of petunia, tomato and pea precursors

Source	Transit peptide		Mature polypeptide	
	Residues	Identity (%)	Residues	Identity (%)
Spinach	68	100.0	154	100.0
Petunia	65	48.6	154	90.3
Tomato	63	38.6	154	89.6
Pea	48	42.3	154	88.3

Table 2 Percent identities of the amino acid sequence for the plastidic precursor of the rice glutamine synthetase compared to those of barley, bean and pea precursors

Source	Transit peptide		Mature polypeptide	
	Residues	Identity (%)	Residues	Identity (%)
Rice	47	100.0	381	100.0
Barley	46	65.2	381	93.4
Bean	49	24.0	380	87.9
Pea	50	26.0	380	86.9

2) GS前駆体の一次構造の相同性

イネGS前駆体のアミノ酸配列をマトリックスとしてオオムギ、インゲンマメ、エンドウについてそれぞれ相同性を求めた。（Table 2）。トランジットペプチドの切断部位は成熟タンパク質のN末端部分の配列が決定されているオオムギの結果¹⁹⁾に基づいて推定した。その結果、SODの場合と同様に成熟タンパク質部分は高い相同性を示した。トランジットペプチド部分はイネとオオムギの間では比較的高い相同性が見られたが（65.2%）、イネとインゲンマメ、あるいはエンドウの間ではアミノ酸残基数の差がほとんどないにもかかわらず（最大でイネとエンドウ間で3残基）、SODの場合よりもさらに相同性は低くなっていた（24~26%）。ただしインゲ

ンマメとエンドウの間では高い相同性が見られた（75.5%、データ未掲載）。

2. トランジットペプチドのアミノ酸組成

トランジットペプチドの化学的性質を知る目的でアミノ酸組成を調べた。

1) SODのトランジットペプチドのアミノ酸組成

まず疎水性アミノ酸、中性アミノ酸、親水性アミノ酸に分けてその値を比較したところ（Table 3）、4種のトランジットペプチドで非常に類似した結果が得られた。すなわちどのペプチドの場合も疎水性アミノ酸と中性アミノ酸がそれぞれ全体の約半数を占め、親水性アミノ酸は10%にも満たなかった。次にこの3つのアミノ酸グループの中でそれぞれの

ような残基が優位を占めているかを調べた (Table 3 の各カラムの括弧内に示す)。その結果、疎水性グループではアラニン, ロイシン, バリンといった比較的分子量の小さいアミノ酸が全体の半量前後含まれていた。特筆すべきことに, 中性グループではそのほとんどをセリン, スレオニンといった水酸基を持つアミノ酸が占めていた。さらに親水性グループでは負電荷を持つ酸性アミノ酸は全く含まれていないのとは対照的に正に荷電した塩基性アミノ酸が存在した。

2) GSのトランジットペプチドのアミノ酸組成

SODと同様にアミノ酸組成を比較した (Table 4)。SODの場合と異なり, GSでは全ての配列を通しての類似性は強くは見られなかった。イネとオオムギではほぼ同じ傾向が見られ, 疎水性アミノ酸が全体の60~70%を占め, 残りを中性と親水性グループが

約半分ずつを占めていた。一方, 一次構造で高い相同性を示すインゲンマメとエンドウの間では, むしろSODの場合に似て疎水性と中性の残基が優位を占めていた。ただし親水性の残基については4種のペプチドともほぼ同じ様な値であった。個々のアミノ酸グループの内容についてもイネ・オオムギの場合とインゲンマメ・エンドウの場合とでは少し異なっていた (Table 4 の各カラムの括弧内に示す)。前者の場合, 低分子量の疎水性アミノ酸がペプチドを構成するアミノ酸の半分からそれ以上を占めているが (47.8~55.3%), 後者の場合は10~16%とかなり低く, そのぶん中性アミノ酸のセリン, スレオニン含量が増加していた。ただし親水性アミノ酸についてはどのペプチドに関しても塩基性アミノ酸がそのほとんどを占めていた。

Table 3 Amino acid composition of transit peptides for plastidic Cu/ Zn-superoxide dismutase

Source	Hydrophobic residues (mol. %)	Neutral residues (mol. %)	Hydrophilic residues (mol. %)
Spinach	47.1 [26.5]	47.1 [41.1]	5.8 [2.9]
Petunia	46.2 [21.5]	44.6 [38.5]	9.2 [6.2]
Tomato	47.6 [23.8]	44.4 [34.9]	8.0 [3.2]
Pea	52.1 [33.3]	39.6 [33.3]	8.3 [6.3]

The values in parentheses indicate as follows:

alanine, leucine and valine contents (mol. %) in the hydrophobic column;

serine and threonine contents (mol. %) in the neutral column;

arginine and lysine contents (mol. %) in the hydrophilic column;

to the total composition.

Table 4 Amino acid composition of transit peptides for plastidic glutamine synthetase

Source	Hydrophobic residues (mol. %)	Neutral residues (mol. %)	Hydrophilic residues (mol. %)
Rice	70.2 [55.3]	14.9 [6.4]	14.9 [14.9]
Barley*	60.9 [47.8]	19.6 [6.5]	17.4 [15.2]
Bean	40.8 [10.2]	40.8 [28.6]	18.4 [16.3]
Pea	48.0 [16.0]	34.0 [24.0]	18.0 [16.0]

See Table 3 for details.

*One unidentified residue is included.

3. トランジットペプチドの共通構造

トランジットペプチドのアミノ酸組成の比較から疎水性が高いというシグナル配列の一般則以外に水酸基性アミノ酸または塩基性アミノ酸、あるいはその両方の含量が比較的高いことが示された。そこでこの点に留意してSOD, GSの各前駆体の一次構造を並列してその共通性を調べた。

1) SODの共通配列

Fig. 1に上位からホウレンソウ (b), ペチュニア (c), トマト (d), エンドウ (e) の順にトランジットペプチド部分 (A) と成熟タンパク質

部分 (B) とに分けて一次構造を並列し、相同アミノ酸をボックスで囲んだ。また成熟タンパク質の最上段にはプラスチド局在型アイソザイムの比較の対象としてホウレンソウ・細胞質型SODの配列⁴⁾を示した(a)。この比較から興味深いことに成熟部分とは対照的にトランジットペプチド部分の相同性が低いにもかかわらず、13の水酸基性アミノ酸 (セリン, スレオニン) のペプチド上の位置が共通していることがわかった (▼)。さらに塩基性アミノ酸であるリジン残基の位置もカルボキシル末端側に2箇所保存されていた (*)。

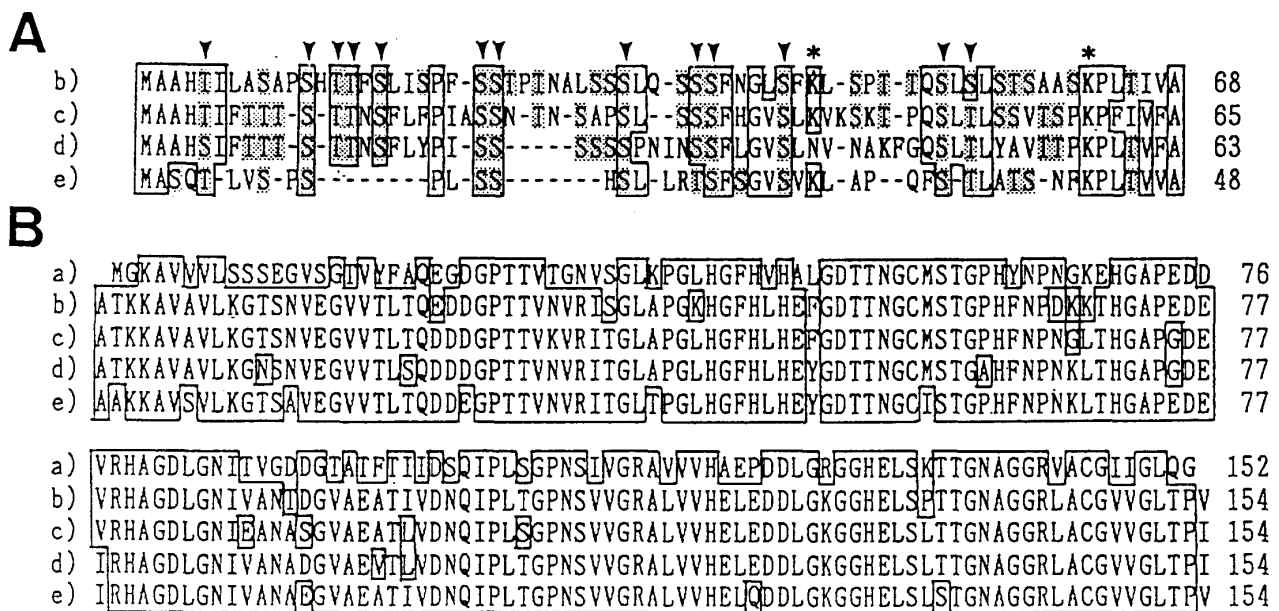


Fig 1. Comparison of the amino acid sequences of cytosolic (a) and plastidic (b-e) superoxide dismutases.

The sequences are derived from spinach (a, b)⁴⁾⁵⁾, petunia (c)¹⁰⁾, tomato (d)⁹⁾ and pea (e)¹¹⁾. Identical residues are boxed. **A** The transit peptide sequences are compared. In the sequences, hydroxylated residues are shaded, and basic residues are bold-typed. Symbols indicate the conserved hydroxylated (▼) or basic (*) residues, respectively. **B** The mature polypeptide regions are aligned.

2) GSの共通配列

Fig. 2にSODの場合と同様に一次構造をイネ (b), オオムギ (c), インゲンマメ (d), エンドウ (e) の順に示し、成熟タンパク質部分 (B) には最上段にイネの葉に特異的に発現する細胞質型GSアイソザイムの配列 (a)⁶⁾⁷⁾を並列させた。SODの場合とは異なり、水酸基性アミノ酸残基に関してはトランジットペプチド切断部位近くに連続して2残基見られるにとどまったが、塩基性アミノ酸 (リジンあるいはアルギニン) については中央部分

に2箇所、カルボキシル末端側に3箇所の計5箇所保存されていた。

4. プラスチド内部のソーティング部位が同一である異種タンパク質のトランジットペプチドの比較

これまでは異種植物間の同一タンパク質前駆体のトランジットペプチドの構造を比較したが、ここでは同一植物内でプラスチド内部のソーティング部位が同じである異種タンパク質間でトランジットペプチドの構造に共通性が見られるかどうかを調べた。プラスチド

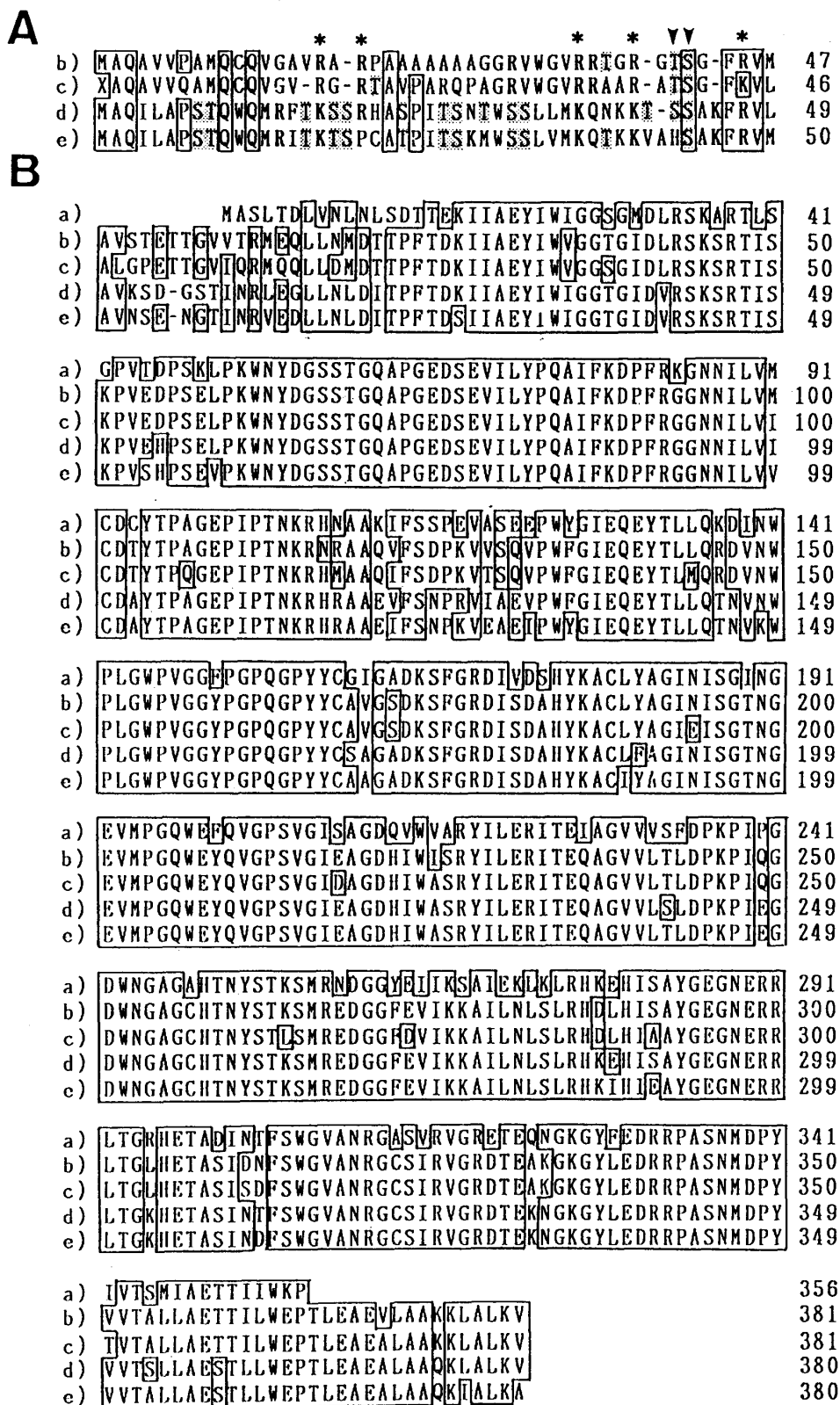


Fig. 2. Comparison of the amino acid sequences of cytosolic (a) and plastidic (b–e) glutamine synthetases.

The sequences are derived from rice (a, b)^{6,7)}, barley (c)¹²⁾, bean (d)¹³⁾ and pea (e)¹⁴⁾.

A The transit peptide region. An unidentified residue in the barley sequence is indicated as X. **B** The mature polypeptide sequences. See the legend of Fig. 1 for details.

局在型GSは葉緑体ではストロマにソーティングされる。同じストロマに局在する核遺伝子支配の葉緑体タンパク質の1つにリブローズ 1, 5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニット (rbcS) がある (この酵素の大サブユニットは葉緑体遺伝子にコードされている)。そこでイネについてGSとrbcS⁸⁾のトランジットペプチドの構造を比較した (Fig. 3)。まず一次構造を比較したところ (A), 2種のrbcS (b, c)の間には高い相同性が見られたが (83.0%), GS (a)とrbcSの間にはあまり相同性は見られなかった (19.1%)。また水酸基性や塩基性アミノ酸について共通性を検索したところ, 前者についてはGSで保存されていたトランジットペプチドの切断部位近くの残基に保存性が見られた。また後者についてはSODおよびGS同士の比較で見られたようにカルボキシル末端側の残

基を含めて3箇所に共通性があった。つぎにChou, Fasmanらの方法¹⁷⁾に従い, トランジットペプチドの二次構造を推定し比較した (B-D)。Bでは α -ヘリックス構造の, またCでは β -シート構造の, そしてDではターン構造の形成に寄与する残基のみをそれぞれ示したところ, 各二次構造を形成する残基のクラスターが, α -ヘリックス, β -シートに関してはペプチドのN末端側に, またターン構造に関してはC末端側と, ペプチド内でそれらの残基がとる位置がGSとrbcSとで非常に一致していることが示された。したがってこれらのトランジットペプチドの二次構造は, N末端側が α -ヘリックスまたは β -シート構造を形成し, C末端側はターン構造をとると推定された。

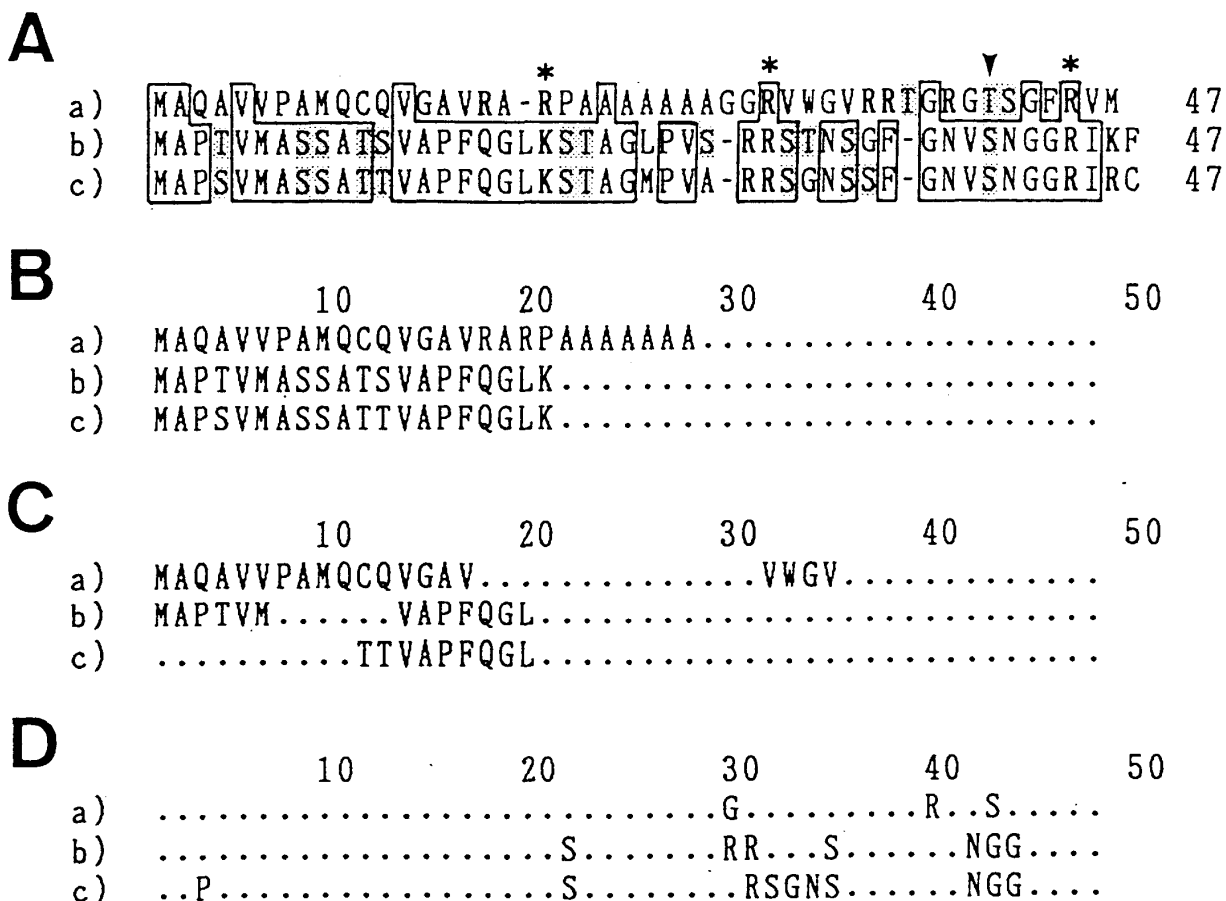


Fig. 3. Comparison of the transit peptides of a glutamine synthetase (a) and two small subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (b, c) from rice.

A Primary structures are aligned. See the legend of Fig. 1 for details. B-C Secondary structures are compared (B, α -helix; C, β -sheet; D, turn), which are deduced by the method of Chou-Fasman¹⁷⁾. Only residues contributing to the structure are shown in each comparison.

考 察

遺伝子のクローニング技術の発展と普及により、ソーティング後にプロセスされその同定が困難であったシグナル配列の一次構造を間接的に決定することが可能となった。その結果、ここ数年の間にトランジットペプチドのアミノ酸配列の情報も飛躍的に蓄積し、現在では100以上の配列が得られている³⁾。しかしまだプラスチドソーティングに必要なトランジットペプチドの共通配列は明らかにされていない。我々はプラスチドへのソーティング機構解明のための研究の1つとしてこの点を明らかにするため、トランジットペプチドの比較の材料として我々が構造解析を進めているSOD⁴⁾⁵⁾とGS⁶⁾⁷⁾を選んだ。これらの酵素タンパク質は生命が原核生物の時代から存在しているので、細胞が真核化しプラスチドが形成された時点ではじめてプラスチド局在型の遺伝子が細胞質型遺伝子から分化したと考えられる。したがってここで挙げた植物種で見られるSODやGSの前駆体タンパク質遺伝子は、それぞれ細胞が真核化した時点で生じたプラスチド局在型遺伝子を共通の祖先としていると考えられる。このことからトランジットペプチドとしての必須の構造が存在するのなら、酵素ごとにそれが保存されているのではないかと考えた。

前駆体タンパク質の一次構造の相同性を各酵素で調べた結果、成熟タンパク質部分は高度に保存され、これらの酵素はそれぞれ同一起源であることが確認できた (Table 1, 2)。しかしトランジットペプチド部分の相同性は低く、このことからトランジットペプチドとしての機能に必要な要素は一次構造そのものではなく、トランジットペプチド中での特定アミノ酸の分布および二次構造の方がより重要である可能性が示唆された。次いでトランジットペプチドの化学的性質を知るために各酵素についてアミノ酸組成を比較したところ (Table 3, 4)、比較的低分子量の疎水性アミノ酸、または水酸性アミノ酸、あるいはその両方の含量が高く、また必ず塩基性アミノ酸が含まれていることが示された (対照的に酸性アミノ酸が含まれることは希である)。疎水性アミノ酸含量が高いのは、膜と相互作用するシグナル配列の一般則である。そこで水酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸に着目して各前駆体の一次構造を並列したところ (Fig. 1, 2), SOD, GSともに疎水性アミノ酸に富むという一般則が保存され、かつ特定部位に必ず塩基性アミノ酸と水酸性アミノ酸が配置されていることが見いだされた。これらの解析から、トランジットペプチド上の特定の位置に存在する特定の残基がプラスチドへのソーティングに関与していることが示唆される。そしてこのこ

とはトランジットペプチド間の一次構造の相同性が低くても機能的に問題がないことの理由の1つとして挙げられよう。すなわち、Kimuraの分子の中立進化説によれば¹⁸⁾、遺伝子 (塩基配列) は一定の速度で突然変異を起こしているが、タンパク質の機能に関わるアミノ酸の変異は速やかに淘汰され、変異遺伝子は消失する。したがってSODやGSの成熟部分の相同性はそれぞれ非常に高い (Table 1, 2)。しかしトランジットペプチドの場合、もしここで述べたように特定の残基だけがソーティングシグナルとしての重要な役割を果たしているのなら、それ以外の大半の残基がアミノ酸の置換や脱離を伴う変異を受けてもそのトランジットペプチドは淘汰されえない。ゆえにトランジットペプチドとしての機能を保持しつつも、全体としての相同性が進化の過程で失われたと解釈できる。またGSの場合、進化的に近いネ科の組合せ (イネとオオムギ) とマメ科の組合せ (インゲンマメとエンドウ) にそれぞれ高い相同性が観察されるのも、このことにより説明できる。

では全く独立に進化してきた異種前駆体のトランジットペプチド間にはこのような限られた共通性が見られるのであろうか。同一植物内のプラスチドの同一部位にソーティングされる異種タンパク質 (イネのGS, *rbcS*) についてそのトランジットペプチドの構造を比較したところ (Fig. 3)、二次構造に関して高い相関が見られた。このことはプラスチドソーティングに重要なペプチド構造は一次構造ではなく二次構造であることを示唆している。同種タンパク質同士の比較の場合と異なり、この場合はトランジットペプチド間で一次構造には共通性があり見られないが、これは両者は真核化以前から全く独立に進化してきた遺伝子で、トランジットペプチド自体の起源が異なるためと考えられる。しかしトランジットペプチドの切断部位の近傍には水酸性および塩基性のアミノ酸がここで行った全ての比較の場合で保存されており、これらの残基はそのプロセッシングに関与する普遍的なシグナルとなっている可能性が考えられる。

以上の結果よりトランジットペプチドとしての機能発現にその一次構造はあまり関与していないと考えられる。ただしその配列中には少数の保存性の高い残基が存在し、これらがプラスチドへのソーティングに関与している可能性が示唆される。また同一植物由来の異種タンパク質のトランジットペプチドの比較からプラスチドタンパク質の輸送にはその二次構造が重要であることが推定される。先の少数の残基と二次構造の重要性がどのように結びつくかは現段階では明確に指摘できないが、一般に膜透過するシグナル配列はその性格上、複雑な二次あるいは高次構造をとりえないと

考えられる。したがってその保存された少数の残基が比較的単純な構造であるが、トランジットペプチドとしての機能発現に必須な二次構造の形成に寄与している可能性が考えられる。

引用文献

- 1) Walter, T., R. Gilmore and G. Blobel (1984): Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell*, 38, 5-8.
- 2) Keegstra, K. (1989): Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell*, 56, 247-253.
- 3) Keegstra, K., L. J. Olsen and S. M. Theg (1989): Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 471-501.
- 4) Sakamoto, A., H. Ohsuga, M. Wakaura, N. Mitsukawa, T. Hibino, T. Masumura, Y. Sasaki and K. Tanaka (1990): Nucleotide sequence of cDNA for the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase from spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Nucleic Acids Res.*, 18, 4923.
- 5) Sakamoto, A., *et al.*, in preparation.
- 6) Sakamoto, A., M. Ogawa, T. Masumura, D. Shibata, G. Takeba, K. Tanaka and S. Fujii (1989): Three cDNA sequences coding for glutamine synthetase polypeptides in *Oryza sativa* L. *Plant Mol. Biol.*, 13, 611-614.
- 7) Sakamoto, A., G. Takeba and K. Tanaka (1990): Structure and expression of glutamine synthetase genes in rice. *Seikagaku*, 62, 197-201.
- 8) Matsuoka, M., Y. Kano-Murakami, Y. Tanaka, Y. Ozeki and N. Yamamoto (1988): Classification and nucleotide sequence of cDNA encoding the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase from rice. *Plant Cell Physiol.*, 29, 1015-1022.
- 9) Perl-Treves, R., B. Nacmias, D. Aviv, E. P. Zeelon and E. Galun (1988): Isolation of two cDNA clones from tomato containing two different superoxide dismutase sequences. *Plant Mol. Biol.*, 11, 609-623.
- 10) Teppermann J., C. Katayama and P. Dunsmuir (1988): Cloning and nucleotide sequence of a petunia gene encoding a chloroplast-localized superoxide dismutase. *Plant Mol. Biol.*, 11, 871-872.
- 11) Scioli, J. R. and B. A. Zilinskas (1988): Cloning and characterization of a cDNA encoding the chloroplastic copper/zinc-superoxide dismutase from pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7661-7665.
- 12) Freeman, J., A. J. Marquez, R. M. Wallsgrove, R. Saarelainen and B. G. Forde (1990): Molecular analysis of barley deficient in chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol. Biol.*, 14, 297-311.
- 13) Lightfoot, D. A., N. K. Green and J. V. Cullimore (1988): The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplast. *Plant Mol. Biol.*, 11, 191-202.
- 14) Tingey, S. V., F. Y. Tsai, J. W. Edwards, E. L. Walker and G. M. Coruzzi (1988): Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 263, 9651-9657.
- 15) Kanehisa, M., P. Klein, P. Greif and C. Delisa (1984): Computer analysis and structure prediction of nucleic acids and proteins. *Nucleic Acids Res.*, 12, 417-428.
- 16) Kitagawa, Y., S. Tsunasawa, N. Tanaka, Y. Katsube, F. Sakiyama and K. Asada (1986): Amino acid sequence of copper, zinc-superoxide dismutase from spinach leaves. *J. Biochem.*, 99, 1289-1298.
- 17) Chou, P. Y. and G. D. Fasman (1978): Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advan. Enzymol.*, 47, 45-148.
- 18) Kimura, M. (1983): "The neutral theory of molecular evolution," Cambridge University Press, Cambridge, England.

Summary

To clarify the essential structure for plastid protein sorting, we compared the transit peptide sequences of spinach Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) or rice glutamine synthetase (GS) recently determined by us with those so far reported in other plant species. Alignment of the primary structures revealed the existen-

ce of several characteristic (*i.e.*, basic, small hydrophobic or hydroxylated) residues conserved at specific positions within both SOD and GS sequences. Besides the characteristic features observed in the primary structures, common secondary structures were inferred to be indispensable for the functioning of the transit peptides as shown in the two chloroplast-stromal proteins, GS and the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase of rice plant.