

氏名 槻木 竜二

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第53号

学位授与の日付 平成5年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 植物細胞のミトコンドリア、葉緑体に局在するシャペロニン60ホモログと70kD熱ショック蛋白質ホモログの解析

論文審査委員 主査教授 西村 幹夫
教授 村田 紀夫
助教授 岡田 清孝
教授 藤田 善彦

論文内容の要旨

分子シャペロン(molecular chaperone)は蛋白質の折れたたみの促進やほどけた状態の維持、蛋白質間の集合や解離を介添えする(chaperone)が、最終的な複合体には組み込まれない蛋白質因子として定義され、蛋白質の翻訳後機能発現過程に必須の因子であることが近年判明してきた。シャペロニン60(Cpn60)や70kD熱ショック蛋白質(Hsp70)ホモログは翻訳の途上や直後の蛋白質、あるいは膜透過の途上や直後の蛋白質と相互作用して高次構造のほどけた状態から適切な折れたたみ状態への移行を補助し、更に蛋白質間の集合、複合体形成過程を介添えする分子シャペロンであることが明かにされつつある。槻木竜二は植物細胞のミトコンドリア、葉緑体に局在するCpn60、Hsp70ホモログをとりあげ、以下の解析を行った。

1. 「カボチャ子葉のミトコンドリアに局在するシャペロニン 60ホモログの精製、cDNAクローニングとその解析」

カボチャ黄化子葉の単離ミトコンドリア可溶性画分からグリセロールの密度勾配遠心によりシャペロニン 60 ホモログ(Cpn60)を精製し、そのN末端アミノ酸配列を決定し、更にそのCDNAクローニングを行い2種類のミトコンドリア Cpn60 cDNAである pMCPN60-1、pMCPN60-2を単離した。この研究で得られた知見は以下の通りである。

- 1) pMCPN60-1とpMCPN60-2がコードするCpn60ホモログはアミノ酸レベルで95.3%同一という高い類似性を示し、これらクローンがコードするCpn60ホモログの蛋白質化学的性質は類似していることを示唆した。
- 2) pMCPN60-1とpMCPN60-2がコードするCpn60ホモログは共にN末端に精製蛋白質には存在しないアミノ酸32残基からなる延長ペプチドを持っていた。この延長ペプチドは塩基性アミノ酸が豊富な一方で酸性アミノ酸を欠いているという性質から、蛋白質のミトコンドリアへの特異的な輸送に関与しているプレ配列に相当するものであることが示唆された。
- 3) カボチャ・ミトコンドリアCpn60ホモログの一次構造は既に報告されている他の生物種のCpn60ホモログ、大腸菌のGroEL、パン酵母、ヒトのミトコンドリアCpn60、ナタネの葉緑体Cpn60のa及びbサブユニットそれぞれと56.1%、59.6%、59.8%、43.7%、46.5%という高い類似性がみられた。
- 4) 原核細胞とパン酵母、ヒトなどの哺乳類のミトコンドリアに局在するCpn60ホモログには観察されているが、高等植物のプラスチドのそれには観察されないC末端のグリシン-グリシン-メチオニンの繰り返し配列がカボチャ・ミトコンドリアのCpn60ホモログに観察された。このことはこの繰り返し配列が原核細胞、及び真核細胞のミトコンドリアに存在するCpn60ホモログに特有のものであることを支持した。
- 5) pMCPN60-1、pMCPN60-2それぞれをプローブとしたGenomic Southern blot解析はカボチャ・ゲノム上に少なくとも2つのミトコンドリアCpn60ホモログ遺伝子が存在することを示唆した。
- 6) pMCPN60-1、pMCPN60-2それぞれをプローブとしたNorthern blot解析はこれら2種類

のミトコンドリアCpn60をコードする遺伝子が環境条件、組織によって異なる発現パターンを示すことを示唆した。

尚、ミトコンドリアに2種類のCpn60が存在すること、それらをコードする遺伝子が生育時期には違った発現パターンを示すことを明かにしたのは動植物を通じて初めての成果といえる。

2. 「葉緑体に局在する70kD熱ショック蛋白質ホモログとシャペロニン60ホモログの解析」

カボチャ緑化子葉の単離葉緑体可溶性画分からATPアガロースアフィニティークロマトグラフィーにより70kD熱ショック蛋白質(Hsp70)ホモログを精製し、その特異抗血清(抗-chl Hsp70)を調製した。単離葉緑体に試験管内で輸送させたフェレドキシン-NADP⁺還元酵素(FNR)とHsp70ホモログ、更にはCpn60ホモログとの相互作用を抗-chlHsp70、及び抗-Cpn60(GroEL)抗血清を用いた免疫沈降法によって解析した。本研究で得られた研究結果は以下の通りである。

- 1) 精製したカボチャ葉緑体Hsp70ホモログは分子量約75kDのストロマ蛋白質であり、そのN末端アミノ酸配列はこれまで明らかにされている他のHsp70ホモログと高い相同性が観察された。中でも、エンドウ葉緑体ストロマ、エンドウ、パン酵母のミトコンドリアのマトリクス、原核細胞で同定されているHsp70ホモログに特に高い相同性が認められた。また抗-chlHsp70抗血清はエンドウ葉緑体粗抽出液中に存在する分子量約75kDの蛋白質と特異的に反応した。
- 2) 単離葉緑体に輸送させたFNRは抗-chl Hsp70、及び抗 - Cpn60(GroEL)抗血清によって、ATPの存在しない条件で免疫沈降された。このことは輸送させたFNRとHsp70、及びCpn60ホモログとの間に物理的な相互作用があることを示唆した。
- 3) 輸送されたFNRは一過的にHsp70ホモログと相互作用すること、その相互作用はCpn60ホモログとのそれに先だっておこることが、輸送反応時間をおって行った免疫沈降実験から明かとなった。
- 4) プラスチドのエチオプラスチドから葉緑体への発達に伴って、プラスチドあたりのHsp70ホモログの蓄積量はわずかに増加するのに対し、Cpn60ホモログの蓄積量はわずかに減少することが明かとなった。

葉緑体ストロマに存在するHsp70、及びCpn60ホモログが葉緑体蛋白質(FNR)と物理的な相互作用を持つこと、Hsp70ホモログの場合その相互作用が一過的なものであること、更にはその相互作用がCpn60ホモログとのそれに先だっておこることを、葉緑体蛋白質(FNR)を実際に単離葉緑体に輸送させ、特異抗血清を用いた免疫沈降法により複合体として単離することによって明らかにしたことはこれが初めてであり、これら蛋白質のプラスチド中での機能を考える上で重要な知見を提供するものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

分子シャペロンは、蛋白質の折れたたみの促進やほどけた状態の維持、蛋白質間の集合や解離を介添えする蛋白質であり、蛋白質翻訳後の機能発現に至る過程で必須の因子であることが明らかにされつつある。

申請者、槻木竜二は高等植物細胞のオルガネラに局在する分子シャペロンの構造と機能を解析し、以下の知見を得た。

葉緑体への蛋白質輸送に働く分子シャペロンの役割を明らかにするため、葉緑体蛋白質としてはフェレドキシン-NADP⁺還元酵素 (FNR) cDNA の *in vitro* 転写翻訳産物を用いて、*in vitro* における葉緑体への蛋白質輸送系を確立した。*in vitro* 蛋白質輸送系において、葉緑体へ輸送させた蛋白質と分子シャペロンである熱ショック蛋白質 (Hsp70) ホモログ及びシャペロニン60 (Cpn60) ホモログとの相互作用を、これら分子シャペロンの特異抗体を用いた免疫沈殿法により解析した。その結果、(1) 葉緑体へ輸送された FNR に Hsp70 及び Cpn60 ホモログが結合すること、(2) Hsp70 ホモログと FNR の相互作用は一過的であり、Cpn60 とそれとの結合よりも先だてて起こることが判明した。葉緑体蛋白質を単離葉緑体に輸送させ、特異抗体による免疫沈殿法により、これらシャペロンの結合を証明したのは本研究が初めてであり、本研究により葉緑体蛋白質の膜透過とそれに続く機能発現過程における分子シャペロンの関与が明らかにされたといえよう。又、ミトコンドリアに存在するシャペロニン60の精製、cDNA クローニングを通してその性質を明らかにすると共に、Northern blot 解析によりこの蛋白質の mRNA が熱ショック等により誘導されるストレス蛋白質であることを明らかにしている。これらの知見は、高等植物細胞における分子シャペロンの機能を解明する上で、重要な知見を提供するものである。この研究の成果の一部は、Eur. J. Biochem. 及び FEBS Letters に掲載が予定されている。

以上の内容により、審査委員会は全員一致で当博士論文に対して合格の判定を下した。