

氏名	加藤 朗
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第145号
学位授与の日付	平成7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	高分子量前駆体として合成されるカボチャマイクロボ ディ酵素の発現調節及び局在化機構
論文審査委員	主査 教授 西村 幹夫 教授 村田 紀夫 教授 藤田 善彦 助教授 岡田 清孝

カボチャやキュウリなどの脂肪性種子では、代謝活動の変化に対応してマイクロボディ内の酵素系が速やかに交換される。発芽過程で光を浴びると子葉の細胞内で、脂肪酸の分解を担っていたグリオキシゾームは光吸収に関与する緑葉パーオキシゾームへと直接的に変換されるのである。この機能変換は可逆的であり、光合成活性の低下するセネッセンス子葉では緑葉パーオキシゾームからグリオキシゾームへと再び変換する。このような劇的なオルガネラ機能の変化には関係する酵素群の転写レベル、或いは転写後レベルでの厳密かつ機能的な調節が必要である。そこで彼はこの機能変換を調節しているメカニズムについて明らかにするために以下の実験を行った。材料として脂肪性種子であるカボチャを使用した。

第1章ではグリオキシル酸回路の酵素であるクエン酸合成酵素 (CS) cDNAのクローニングと解析を行った。本酵素はミトコンドリアTCA回路構成する分子種がよく知られているが、グリオキシゾーム (マイクロボディ) 酵素の遺伝子クローニングは報告されていない。そこでグリオキシゾームCSのcDNAを単離と一次構造の解析、さらに発芽時における発現パターンを調べた。その結果、

- 1) cDNAは1989塩基対から成り516アミノ酸をコードしていた。cDNA及び蛋白質のN末端アミノ酸配列の結果から、グリオキシゾームCSはN末端に43アミノ酸から成る延長配列を持つ高分子量前駆体蛋白質として合成されることが明らかになった。
- 2) cDNAをもとに特異抗体を調製した。カボチャ発芽子葉を細胞分画にかけ、抗体を用いてcDNAがコードした蛋白質の局在を確認した。抗体はマイクロボディ画分のみ反応したことから、この蛋白質が確かにマイクロボディ酵素であることが判った。
- 3) 発芽におけるmRNAと蛋白質量の変動を調べた。mRNA量は暗所下では発芽直後から急増したが2日目を境に低下した。蛋白質量はやや遅れて増加し3日目に最大値に達した。暗所にある限りその後の蓄積量の現象は緩やかであった。しかし一旦明所に移されると急速に蓄積量が低下した。

CSが前駆体蛋白質として合成されるということは予想しなかった知見であった。一般にマイクロボディ酵素は成熟酵素と同じ分子量で生成されるが、中には輸送後に切除される延長配列をN末端に有するものがあり、他にはグリオキシゾーム酵素であるリンゴ酸脱水酵素 (MDH) 等が知られている。第2章ではこのグループに属するもう一つのグリオキシゾーム酵素である3-ケトアシル-CoAチオラーゼ (THIO) のcDNAクローニングを試みた。THIOはグリオキシル酸回路と協同的に働いて脂肪酸の糖への変換に関与する系であり、細胞内輸送の他にもその発現調節機構についてCSとの関連性が注目される。cDNAの解析に加えて発現パターンを調べた。その結果、

- 1) THIO cDNAは1646塩基対で、33アミノ酸の延長配列を含む461アミノ酸をコードしていた。cDNAをもとにしてTHIO蛋白質に対する特異抗体を調製した。
- 2) THIO mRNA量は暗所下では発芽直後に急増し2日目を境に速やかに減少した。蛋白質量はmRNAにやや遅れて増加し5日目に最大を迎えた。その後の暗所下での蛋白質量の減少は緩やかであったが光照射することによって蓄積量は急激に減少した。

3) THIOはセネッセンスの進行に伴ってmRNA、蛋白質ともに増加することが判った。しかしその発現量は同時に発現したグリオキシル酸回路の酵素、リンゴ酸合成酵素と比較するとかなり低かった。

THIOで観察された発芽過程における発現パターンはCSで観察されたパターンとほぼ同じであり、発芽子葉ではグリオキシル酸回路と $\beta$ 酸化系が共通な発現制御を受けている可能性が示された。また光照射時に観察されるCSとTHIOの急速な減少は、グリオキシゾーム酵素を特異的な蛋白質分解系が存在する可能性を示唆している。これは機能変換に際してマイクロボディ内部の代謝系を速やかに交換するために必要な機能であると考えられる。セネッセンス組織でTHIOが発現することが分かった発現量は低くその役割は不明である。が、セネッセンス過程で発芽時に機能するような分解系の酵素が発現することは、その発現調節機構を明らかにする上で注目すべき事実である。

さて機能変換の過程で遺伝子の活性化によって生成された蛋白質は正しくマイクロボディ内に移行しなければならない。N末端に延長配列を持つ前駆体蛋白質として合成されるマイクロボディ酵素は、その延長配列が移行シグナルとされている。シグナルの認識機構など不明な点が多いが、特に延長配列の切断反応(プロセッシング)についてはほとんど解析が行われていない。そこで第3章ではこの切断部位の認識機構の解明を目的として形質転換シロイヌナズナの作出と解析を行った。

切断部位には共通配列が見出されるがその中でも特に興味を引くのは切断される延長配列C末端に存在するCysであった。Cysはポリペプチド内の高次構造形成や酵素の活性発現に直接関与する active なアミノ酸である。そこで延長配列を含むCS N末端45アミノ酸を微生物由来のGUS( $\beta$ -グルクロニダーゼ)につないだ融合遺伝子作製し、Ti-プラスミドを介してアラビドプシスに導入した。共通配列のCys残基を削除したもの(del)、CysをGlyとPheとに置換したものを同時に作製した。融合蛋白質のプロセッシングは抗GUS抗体によるイムノブロットで検討した。さらに融合蛋白質の細胞内局在性を確認し、プロセッシングの反応機構を検討した。その結果、

- 1) CS N末端を付加したGUS融合蛋白質は確かにマイクロボディに移行した。
- 2) アミノ酸置換を導入していない融合遺伝子はプロセッシングされた。
- 3) Glyに置換した株では融合蛋白質の約4割が切断された。
- 4) Phe、delでは切断効率はさらに低かった。
- 5) 免疫組織化学的解析によって、Gly、Phe、delはマイクロボディに移行していることが分かった。

組織化学的解析のよってCSのN末端延長配列が確かにマイクロボディへの移行シグナルとして機能することが明らかになった。当初、Cys残基は延長配列の切断活性に必須であると考えたが、アミノ酸置換に加えてCys残基を削除しても切断を完全に阻害することはできなかつた。しかしアミノ酸の種類によって切断の効率が異なることは、Cysを含んだ共通配列が延長配列の正しい認識、或いは切断のために重要であることを示唆するものである。

## 審査結果の要旨

脂肪性種子の発芽生長過程において、植物のマイクロボディであるグリオキシゾームは緑葉パーオキシゾームへと機能変換する。

申請者は、このマイクロボディ機能変換の分子機構を解明することを目的として、グリオキシゾーム酵素であるクエン酸合成酵素とチオラーゼのcDNAクローニングを行った。塩基配列とN末端アミノ酸配列の解析から、両酵素はN末端に延長配列を持つ高分子量前駆体として合成されることが判明した。発芽過程における両酵素の発現を調べたところ、(1)ともに発芽初期にmRNA量の急激な増減が観察されること、(2)光照射によって転写が抑制され更に蓄積した蛋白質が急速に分解されること、が明らかになった。マイクロボディ酵素に見出されるN末端延長配列はマイクロボディへの移行シグナルとして機能することが予想されている。そこでカボチャN末端延長配列と $\beta$ -glucuronidaseとの融合蛋白質を導入した形質転換シロイヌナズナを数種類作成し、融合蛋白質の細胞内局在性を免疫組織化学的に明らかにした。またウエスタンブロットによって融合蛋白質のプロセッシングを検出した。その結果、(1)N末端延長配列がマイクロボディへの移行に機能していること、(2)延長配列のプロセッシングはマイクロボディへの移行とは関係ない現象であること、(3)延長配列のN末端部位はプロセッシングに関与しており、移行には関係しないことが判明した。形質転換植物を用いたN末端延長配列の機能解析はこれが初めての報告であり、プロセッシング反応におけるアミノ酸配列の特異性を明らかにした結果は特に注目される。本研究で作成した形質転換植物を用いることによって、マイクロボディの蛋白質輸送系の変動を、組織、器官レベルで、或いは生長過程を追って解析することが可能となった。オルガネラの機能分化と蛋白質輸送機構との関係を追求した研究は例を見ない。本研究の成果はオルガネラ機能発現の研究における新しい展開を期待させるものである。

尚、グリオキシゾームクエン酸合成酵素のcDNAクローニングはこれが最初の報告でありその成果の一部は Plant Molecular Biology 誌に掲載が予定されている。本研究は2種類のマイクロボディ酵素N末端延長配列を決定することによりその中の2つのコンセンサス配列の存在を明らかにし、その一つがプロセッシングに関与していることを初めて明らかにしたもので、学位論文として十分な内容を持つものと判定した。

また、専門領域及び関連領域に関する口述試験として、(1)オルガネラ機能変換と蛋白質膜透過の関連、(2)プロセッシング反応の特徴、(3)トランスジェニック植物を用いた研究法の問題点等について質問した。申請者の返答は概して妥当であり、問題点も把握していた。この結果、審査委員一致して加藤朗が学位授与に足る学識と能力を持つと判定した。

英語の能力に関しては、投稿論文から判断して博士として十分であると判定した。