

氏 名 河 本 恭 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大乙第88号

学位授与の日付 平成13年3月23日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 シロイヌナズナにおけるコ-シャペロニンの解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 飯田 滋
教授 大隅 良典
教授 西村 幹夫
助教授 橘 秀樹 (神戸大学)

論文内容の要旨

生物の持つ遺伝情報は DNA→mRNA→タンパク質というセントラルドグマに従い伝達され、機能を発揮する。DNA、RNA という核酸は主としてその 1 次構造が重要であるのに対して、タンパク質は正しい高次構造をとる必要がある。高次構造形成(巻き戻り)は遺伝情報発現における重要な過程の 1 つであると考えられる。巻き戻りは自発的に起こると考えられてきたが、近年いわゆる分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質が重要な機能を果たすことが明らかになってきた。分子シャペロンの中でもシャペロニンシステムはタンパク質の巻き戻り過程に直接関与する重要な因子である。そこで、本研究ではシャペロニンシステムに注目し、高等植物においてその全体像の解明を目的とした。

シャペロニンシステムは原核細胞から真核細胞まで全ての生物が共通に持っている。シャペロニンシステムはシャペロニン(Cpn)とコ-シャペロニンから成る。最も研究の進んでいるのは大腸菌のシャペロニン(GroEL)である。GroEL は 57kDa のタンパク質で、その 14 量体が形成する筒状の構造はタンパク質の巻き戻りのための‘場’となる。GroEL は GroES と呼ばれる 10 kDa の調節因子を必要とし、このような調節因子はコ-シャペロニンと総称されている。本研究においてはまず、コ-シャペロニンについて解析を行った。

シロイヌナズナのコ-シャペロニンホモログを同定するため、大腸菌の GroES 温度感受性突然変異体を相補する cDNA クローンを単離した。得られたクローンは 10 kDa のコ-シャペロニン(Cpn10)ホモログをコードしていた。動物のミトコンドリアの Cpn10 に 50%程度の高い同一性を示したことからミトコンドリア Cpn10 のホモログ(AT1)であると予想された。Cpn10(AT1)はシロイヌナズナのロゼット葉を用いた細胞分画や、過剰発現する形質転換タバコを用いた免疫電顕により、ミトコンドリアに局在すること確かめられた。

葉緑体のコ-シャペロニンホモログである Cpn20 は Cpn10(GroES)様のドメインが 2 つタンデムにつながった構造をもつ。シロイヌナズナの Cpn20 の cDNA クローンを単離した結果、予想される成熟タンパク質部分はホウレンソウのものと 61%の同一性を示した。過剰発現する形質転換タバコを用いた免疫電顕により、葉緑体に局在することが確かめられた。GroES は 7 量体で機能することが知られているが、Cpn20(AT2)の多量体構造を調べた結果から 4 量体を形成することがわかった。Cpn20(AT2)の 4 量体には GroES 様ドメインが 8 個含まれることになる。Cpn20(AT2)は GroES と同様に、GroEL と相互作用しコ-シャペロニンとして機能できる。GroEL と Cpn20(AT2)の複合体に含まれるそれぞれの量比は 14:3.6 であったので、GroEL の 14 量体と Cpn20(AT2)の 4 量体が結合していることが強く示唆された。GroES はモバイルループと呼ばれる突出した部位で GroEL と結合する。GroES と GroEL の複合体では、1 つのモバイルループが 1 つの GroEL と結合していると考えられる。一方、Cpn20(AT2)の多量体は 8 カ所のモバイルループを持つため、GroEL との結合は 1 対 1 ではなく不規則で柔軟な相互作用をしていると考えられる。

さらに、EST データバンクを検索することにより、アミノ末端に延長配列を持つ Cpn10 ホモログ(AT3)が見つかった。既知のコ-シャペロニンホモログの系統樹を作成したところ、Cpn10(AT3)はどのホモログとも相同性が低いことがわかった。結晶構造が解析されている GroES との比較から、Cpn10(AT3)はループ構造に当たる領域が大きく変化したコ-シャペロニンであると推測された。T4 ファージのコ-シャペロニンホモログである Gp31 は、より大きな基質に対応するためにループ構造を欠失する形に進化したと考えられている。Cpn10(AT3)もループ構造に変異が変化していることから、

特異的な基質が存在する可能性がある。Cpn10(AT3)はチラコイド内腔に存在する可能性があり、葉緑体の発達と関連した発現パターンを示すことからチラコイド膜に多く含まれる光合成に関わるタンパク質が基質である可能性が考えられた。

本研究では、シロイヌナズナにおいて3種類のコ-シャペロニンホモログを同定した。その結果、ミトコンドリアのシャペロニンシステムは大腸菌のGroEL-GroES型とよく似ていることがわかった。一方葉緑体には複数のシャペロニンシステムが存在し、GroEL-GroES型とは異なる特徴を持っていた。おそらく基質となるタンパク質の特異性に合わせて変化してきたのだろうと考えている。

論文の審査結果の要旨

生物の持つ遺伝情報はDNA→mRNA→タンパク質というセントラルドグマに従い伝達され機能を発揮する。DNA、RNAという核酸は主としてその1次構造が重要であるのに対し、タンパク質は高次構造形成(フォールディング)を行う必要がある。フォールディングにはシャペロニンシステムが重要な働きを示すことが知られている。申請者はフォールディングを遺伝情報発現の最終過程であると考へ、その過程に関わるシャペロニンシステムに注目した。シャペロニンシステムは全ての生物が共通に持つタンパク質であり、1次配列上から2つのグループに分類される。グループ1のシャペロニンシステムは大腸菌などの真正細菌と真核細胞のミトコンドリアや葉緑体に存在している。グループ1のシャペロニンシステムはコ-シャペロニンと総称される制御因子を持つことが特徴である。シロイヌナズナにおいてはミトコンドリアと葉緑体のシャペロニンは既に同定されていたので、本研究において申請者は制御因子であるコ-シャペロニンの解析を行った。

まず、シロイヌナズナのコ-シャペロニンを同定するため、大腸菌のコ-シャペロニン(GroES)の温度感受性突然変異体の表現型を回復するcDNAクローンを単離した。得られたクローンは10 kDaのコ-シャペロニン(Cpn10)をコードしており、動物のミトコンドリアCpn10と50%程度の高い同一性を示した。シロイヌナズナを用いた細胞分画や過剰発現する形質転換タバコを用いた免疫電顕により、ミトコンドリアに局在することが確かめられた。葉緑体のコ-シャペロニンについては、既にGroES様ドメインを2つタンデムに持つCpn20がホウレンソウにおいて同定されていた。本研究ではシロイヌナズナのcDNAクローンを単離したところ、予想通り葉緑体への移行シグナルとなるトランジットペプチドの後ろにGroES様ドメインを2つ持っていた。この2つのGroES様ドメインと上述のミトコンドリアCpn10のアミノ酸配列を用いて、シロイヌナズナのESTデータベースを検索したところ、どちらも低い相同性を示すcDNAクローンを同定した。このクローンはトランジットペプチドを持つCpn10ホモログであった。このCpn10は立体構造が解析されているGroESとの比較から、ループ構造に相当する部分が大きく変化したコ-シャペロニンであることが示唆された。以上のように、申請者は葉緑体にCpn20に加えCpn10が存在することを明らかにした。このことは葉緑体に2つのシャペロニンシステムが存在することを示唆するものであり、重要な発見であるといえる。さらに、シロイヌナズナにおいて同定された3つのコ-シャペロニンホモログについて、発現パターンの解析やin vitroにおけるコ-シャペロニン活性の測定を行った。これらの結果は、シロイヌナズナにおける各コ-シャペロニンの機能分担を示す基礎的知見を含んでいた。

コ-シャペロニンの解析として、次に申請者はCpn20の多量体構造について解析を加えた。Cpn20はゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行ったところ、多量体と単量体に相当するピークが観察され、それぞれの測定分子量から4量体か5量体を形成していると考えられた。さらに、架橋した多量体を解析することによりCpn20の多量体は4量体であることがわかった。大腸菌のGroESは7量体で機能することが明らかにされているが、Cpn20の4量体はGroES様ドメインを8個持つことになる。そこで、Cpn20の4量体がシャペロニンとともに機能し得るのかを調べるため、Cpn20と大腸菌のシャペロニンとの複合体を調製し、複合体に含まれるそれぞれの量比を分析した。その結果、複合体を形成しているCpn20は4量体であることが確かめられ、Cpn20は4量体で機能することが示された。Cpn20の多量体構造は本研究により初めて明らかにされた重要な知見である。

本論文はシロイヌナズナのコ-シャペロニンについて網羅的に解析することにより植物細胞の葉緑体に存在するシャペロニンシステムが、大腸菌やミトコンドリアのホモログと異なる特徴をもつものであ

ることを示したものである。葉緑体という植物独自のオルガネラにおける複数のシャペロニンシステムの発見を含んでおり、学位論文として十分本論文は価値があると判断した。なお、これらの成果の一部は PlantJournal に発表されている。

博士論文に関わる専門分野並びにその関連分野に関する学識、及び独立の研究者として必要なその他の能力について口述試験を行った。河本さんの応答は満足すべきもので、この分野全般にわたって十分な知識と理解をもつことが明らかとなり、審査委員会全員一致して、河本さんが学位授与に足る学識と能力を持つとの結論に達した。英語の実力に関しては、すでに発表されている英文論文から判断して、十分であると判定した。