

Title	ヒトチトクロームcの酵母での機能発現
Author(s)	田中, 良和
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36651
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	た	なか	よし	かず
	田	中	良	和
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	8403	号	
学位授与の日付	昭和63年12月14日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	ヒトチトクロームCの酵母での機能発現			
論文審査委員	(主査)			
	教授	松原	央	
	(副査)			
	教授	濱口	浩三	教授 二井 将光 教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

ヒトチトクロームCのアミノ酸配列に基づく合成ヌクレオチドを用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒトチトクロームC遺伝子の一部を含むcDNAを得た。次に、このcDNAをプローブとして、ヒト染色体DNAライブラリーをスクリーニングしたところ3種のチトクロームC偽遺伝子が得られた。偽遺伝子のうちの1つはヒトチトクロームCと5箇所の異なるタンパク質をコードできた。この5箇所のアミノ酸をコードするコドン部位特異的に突然変異を起こさせ、ヒトチトクロームC遺伝子を構築した。この遺伝子を含む酵母の発現ベクターで、酵母のイソ-1-チトクロームC遺伝子であるCYCIを人為的に欠損させた株(この株は呼吸能がなく乳酸を資化できない)を形質転換したところ、ヒトチトクロームC遺伝子がCYCI欠損を相補し、形質転換株は乳酸を資化して生育した。これは、CYCIを欠損した酵母中でヒトチトクロームC遺伝子が発現し、ヒトチトクロームCが酵母のイソ-1-チトクロームCの代わりにミトコンドリア電子伝達系の一成分として機能したことを示す。

酵母が生産したヒトチトクロームCを精製し、そのアミノ酸組成及びアミノ末端アミノ酸配列を決定した。組換えチトクロームCのアミノ酸配列はヒトチトクロームCと同じであるが、アミノ末端がアセチル化されていないこと、リジン残基の一部がトリメチル化されていることの2点で異なっていた。組換えチトクロームCがウシチトクロームCオキシダーゼと良好に反応したので、アミノ末端のアセチル基はチトクロームCオキシダーゼとの反応には必須ではないことが分かる。チトクロームCオキシダーゼCの組換えチトクロームCに対する V_{max} , K_m は、真のチトクロームCに対する V_{max} , K_m より小さかった。

ヒトチトクロームCの7箇所のアミノ酸残基を置換し、置換の起こった変異チトクロームCがどの程

度CYC I欠損を相補するかを調べ、各残基の重要性について考察した。チトクロームcの分子進化の過程で変異の起こっていない、あるいは起こりにくいとされている Cys-14, Cys-17, Arg-38, Gly-84を他の残基に置換したチトクロームcは、CYC I欠損を全くもしくは部分的にしか相補しなかった。他方、変異できるとされている Thr-28, Gly-37をそれぞれイソロイシン、アルギニンで置換しても相補性は全く損なわれなかった。Gly-56も変異できる残基であるがシステインに変異すると相補性は低下した。以上の結果から、進化的に保存されているアミノ酸残基はチトクロームcが機能する上で重要な役割を担っていると思われる。

論文の審査結果の要旨

チトクロームc及びその同族体は動植物をはじめ、微生物界に広く分布する小分子の電子伝達ヘム蛋白質である。このものは呼吸鎖電子伝達系において、チトクロームc₁より電子を受けとり、チトクロームc酸化酵素に電子を渡す役割を演じている。従来より多くの研究者がこの蛋白質の構造、機能や進化について研究してきた。最近ではこの蛋白質の遺伝子を取り出されるようになり、その遺伝子の部位特異的変異によって生じる変異チトクロームcの性質が調べられるようになり、構造と機能との関連研究に新しい方向から迫ることができるようになった。

田中君は今までに行われなかったヒトチトクロームcの遺伝子进行操作し、構造と機能との相関を追究する目的で、酵母チトクロームc遺伝子欠損変異株を利用して、ヒトチトクロームc変異遺伝子が酵母細胞内で発現生産する変異チトクロームcの酵母の生育に及ぼす影響についてくわしく検討した。

その結果、田中君は先ず、3種のヒトチトクロームc偽遺伝子をえ、その中の1つは本来のヒトチトクロームcと5箇所のアミノ酸が置換されたもので、酵母細胞では発現しないことを見出した。しかし、これら5つを置換して本来のヒトチトクロームcをコードするように構築したものは酵母の細胞内で発現し、自分のチトクロームcの代わりにこのヒトのチトクロームcを利用して酵母は生育した。即ち、ヒトのチトクロームcは酵母のチトクロームcの代わりに酵母のミトコンドリア電子伝達系で十分作用することを示している。

酵母が生産したヒトチトクロームcを単離精製し、そのアミノ酸組成及びアミノ末端アミノ酸配列を決定したところ、組換えチトクロームcの組成と配列は本来のヒトチトクロームcと同じであるが、末端がアセチル化されていないこと、リジン残基が一部トリメチル化されていることの2点で異っていることを見出した。このものは動物の酸化酵素と良好に反応したので、末端アセチル基は酸化酵素との反応には必須でないと結論した。

さらにヒトチトクロームcの7箇所のアミノ酸置換を行い、その酵母内での相補性を検討し、各残基の機能的な重要性を考察し、チトクロームcの進化的に保存されているアミノ酸残基はこの分子が機能する上で重要な役割を担っていると指摘した。以上を総合し、この論文が理学博士の学位論文として十分価値あるものと認めるものである。