



Title	高等植物プラスチドへの前駆体蛋白質の輸送機構に関する研究
Author(s)	廣橋, 利哉
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40861">https://hdl.handle.net/11094/40861</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	ひろ廣橋利哉
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第13652号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	高等植物プラスチドへの前駆体蛋白質の輸送機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 長谷俊治
	(副査) 教授 吉川和明 教授 田嶋正二 助教授 中井正人

### 論文内容の要旨

#### はじめに

プラスチドは、植物細胞特有のオルガネラであり、炭素、窒素、硫黄の同化、脂質やアミノ酸の生合成など多くの代謝反応を担っている。プラスチド蛋白質の大部分は核にコードされており、細胞質ゾルにおいてN末端に延長ペプチドを持つ前駆体蛋白質として合成される。その後、前駆体はプラスチドに輸送され、ストロマで延長ペプチドのプロセッシングを受け成熟体に変換される。プラスチドへの前駆体の輸送機構に関する研究は、主に、光合成組織に存在するプラスチドすなわち葉緑体を材料としてさかんにおこなわれている。プラスチドへの蛋白質の輸送反応は、ATPに依存していることが知られている。したがって、in vitro の単離葉緑体を用いた前駆体蛋白質の輸送反応系においては、光照射条件で光リン酸化反応によりATPを供給するか、あるいは、暗条件においてはATPを反応液に加える必要がある。多くの前駆体蛋白質では、この光照射下と暗所での輸送過程に本質的な差はないと見なされた。本研究では、トウモロコシ・フェレドキシン(Fd)イソ蛋白質、および、フェレドキシン-NADP還元酵素(FNR)イソ蛋白質を材料として、これらのイソ蛋白質の光照射下と暗所での葉緑体への輸送特性が異なることを示し、その輸送特性の違いと葉緑体における蛋白質輸送機構との関連の解明を目指し、以下の研究をおこなった。

#### 1. 葉緑体へのトウモロコシ・Fdイソ蛋白質の輸送特性の解析

トウモロコシには、4種類のFdイソ蛋白質(Fd I、Fd II、Fd III、Fd IV)が存在する。発現解析から、Fd Iは葉特異的に存在して、光誘導を受ける光合型の、Fd IIIは葉や根にも存在して構成的に発現している非光合型のFdと結論づけられている。Fd I、Fd III各々のcDNAから、in vitro 転写翻訳系を用いて、アイソトープラベルした前駆体を合成した。これらFd I前駆体およびFd III前駆体をトウモロコシの葉より単離した葉緑体に光照射下、あるいは、暗所ATP存在下で輸送させた。Fd Iはいずれの条件下でも効率良く輸送され成熟体に変換された。一方、Fd IIIは暗所ATP存在下では効率良く輸送され成熟体が生じたが、光照射下では、Fd III前駆体の著しい蓄積が認められた。光照射下で蓄積したFd III前駆体はトリプシン処理に対して抵抗性を示すことから、少なくとも葉緑体の外膜は透過していると考えられた。ジキトニンによる可溶化実験および、低張処理による葉緑体破碎実験により、蓄積したFd III前駆体が葉緑体内の可溶性の画分に存在していることがわかった。一旦蓄積したFd III前駆体は、その後暗所条件で反応を継続させても成熟体には変換されなかった。以上の結果は、光照射下で蓄積したFd III前駆体が、ストロ

マではなく、外包膜と内包膜との間である膜間部に存在していることを示唆している。次に、光照射下における葉緑体の酸化還元状態とFdIIIの輸送特性との関連を、酸化還元状態により速やかな活性調節を受けるストロマのリノゴ酸脱水素酵素の活性を指標にして検討した。その結果、電子伝達系を阻害するか、ストロマ内のピリジンヌクレオチドの還元型の割合を低下させるような処理を施すことで、光照射下であっても成熟体に変換される量が増加することが明らかとなり、FdIIIの輸送過程と葉緑体の酸化還元状態との関連が示唆された。

また、FdIIIの輸送実験で観察された光照射下における前駆体の蓄積が、他の前駆体蛋白質でもみられるかどうか調べる目的で、FNR イソ蛋白質(FNR I、FNR II) を用いて葉緑体への輸送実験をおこなったところ、FNR I は光照射下で効率良く輸送されたが、FNR II はFdIII同様、前駆体の蓄積が観察された。そのことから、光照射下での前駆体の蓄積がFdIIIにのみ特異的な現象ではないことが示された。

## 2. 大腸菌発現系より精製した組換え前駆体を用いたプラスチドへの輸送経路の解析

Fd I とFdIIIのアミノ酸配列を比較すると、成熟体領域間では67%の相同性を示すのに対し、延長ペプチド間では25%と相同性は低い。そこで、Fd I、FdIIIの互いの延長ペプチドを交換したキメラFd(Fd I の延長ペプチドにFdIIIの成熟体を連結したFd I -III、FdIIIの延長ペプチドにFd I 成熟体を連結したFdIII - I) を構築し、葉緑体への輸送解析を行った。Fd I -III はFd I と同様に光照射下で葉緑体に効率良く輸送された。一方、FdIII - I はFdIIIと同様にトリプシン抵抗性の前駆体の蓄積が観察された。この結果は光照射下でのFd I、FdIIIの輸送特性の違いが、延長ペプチドに起因することを示している。

次に、Fd I、FdIIIの延長ペプチドに起因する輸送特性の違いが、葉緑体包膜における輸送経路の違いによるものかどうか調べる目的で、輸送反応の競争阻害実験を計画した。まず、これらの延長ペプチドを有する蛋白質を大量に調製することを試みた。トウモロコシ Fd の延長ペプチドとマウスのジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)との融合蛋白質(Fd I -DHFR、FdIII -DHFR)を大腸菌で発現させ精製した。精製した DHFR 融合蛋白質を用いて、FdI 前駆体およびFdIII前駆体の葉緑体への輸送における競争阻害実験をおこなった。その結果、精製した Fd I -DHFR およびFdIII -DHFR は、いずれも、暗所 ATP 存在下におけるFd I、FdIIIの葉緑体への輸送、および光照射下におけるFd I の葉緑体への輸送を阻害するだけでなく、光照射下のFdIII前駆体の蓄積も阻害した。これらの精製 Fd-DHFR 融合蛋白質による競争阻害はFNR イソ蛋白質に対しても同様に観察された。以上の結果は、葉緑体において、Fd およびFNR イソ蛋白質が(少なくとも一部は)共通の経路を用いてストロマへ輸送されていること、さらには、光照射下におけるFdIII およびFNR II の前駆体の蓄積も、その共通の輸送経路を通じて行われていることが示された。

## 3. エンドウ及びトウモロコシのプラスチド包膜に存在する蛋白質輸送装置の解析

トウモロコシ葉緑体で観察されたFdイソ蛋白質の輸送特性の違いが、他の植物(エンドウ、コムギ)由来の葉緑体においても観察されるかどうか解析したところ、コムギ葉緑体では、同様の現象が認められたが、エンドウ葉緑体では、光照射下FdIII前駆体の蓄積が観察されず、葉緑体内に効率良く輸送された。以上の結果は、トウモロコシやコムギ葉緑体において観察されたFdおよびFNR イソ蛋白質の輸送特性の違いが、これらの前駆体蛋白質の延長ペプチド部分だけでなく、前駆体を認識して輸送する葉緑体側の輸送装置の特性に依存しており、エンドウとトウモロコシではその特性が異なる可能性を示唆するものである。現在までに、エンドウ葉緑体包膜においては、蛋白質輸送装置を構成するコンポーネントがいくつか同定されている。すなわち、前駆体蛋白質に対するレセプターとしてToc86、Toc34蛋白質および、膜透過チャンネルを構成すると考えられる Toc75 蛋白質である。また内包膜では Tic110蛋白質が同定されているが、その詳細な機能はまだ不明である。一方、トウモロコシ葉緑体包膜の蛋白質輸送装置に関しては、現在までまったく報告がなかった。そこで、エンドウ葉緑体とトウモロコシ葉緑体の蛋白質輸送装置を比較解析することを目的とし、エンドウ Toc86、Toc75、Toc34、Tic110に対する抗体をそれぞれ調製し、ウェスタンプロット法でエンドウ葉緑体包膜におけるこれらの蛋白質の存在様式をプロテアーゼ処理により解析した。その結果、Toc34はその大部分が細胞質ゾル側に露出していること、Toc86は細胞質ゾル側に突き出た34kDaの部分とプロテアーゼ耐性の52kDaのドメイン構造をとっていること、また Toc75 は細胞質ゾル側、膜間部側いずれにも突き出たドメインがなく分子全体が外包膜に埋もれた構造をしていることが推察された。一方、Tic110はN末端に膜貫通領域と予想さ

れる配列を有し、C末端側約 90kDa は可溶性ドメインを形成すると考えられているが、今回、この可溶性ドメインはストロマ側に配向していることを示す結果が得られた。

次に、トウモロコシ葉緑体に対してエンドウ葉緑体蛋白質輸送装置の各抗体を用いてウエスタン解析を行った。その結果、トウモロコシ葉緑体の包膜画分にエンドウ Toc34 に対する抗体で認識される約37kDa のバンドが見いだされ、トウモロコシにも Toc34 ホモログの存在が予想された。そこで、エンドウ Toc34 の cDNA をプローブとして、トウモロコシ Toc34 ホモログの cDNA をクローニングした。Toc34 におけるエンドウとトウモロコシ間の相同性は 58% で GTP 結合モチーフも保存されていた。Toc86、Toc75、Tic110 についてもトウモロコシからホモログと考えられる cDNA 断片を単離しており、エンドウとトウモロコシでは、葉緑体包膜の蛋白質輸送装置が基本的には相同なコンポーネントから形成されている可能性が示唆された。しかし、トウモロコシ Toc34 がプロテアーゼ処理に抵抗性を示しエンドウ Toc34 とかなり存在様式が異なることが示唆されたことなどから、今後、エンドウとトウモロコシにおける各コンポーネントの存在状態、および特性の違いなど詳細に解析する必要があると考えている。特に、Fd および FNR イソ蛋白質で観察された輸送特性の違いが、エンドウとトウモロコシにおける蛋白質輸送装置のどのコンポーネントの特性の違いに由来するのかについて研究を進めていく考えである。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、高等植物プラスチドへの前駆体蛋白質の輸送機構を、器官特異的発現をする 2 種類のトウモロコシ・フェレドキシンを用いて解析し、これらの輸送過程が、延長ペプチドの構造依存的に、光エネルギーおよび葉緑体内のレドックスにより制御されていることを見い出した。さらに、この輸送を司るプラスチド包膜透過装置の構成蛋白質の一つである Toc34 の遺伝子をクローニングし、その一次構造および包膜上での存在状態を明らかにしたものである。これらの成果は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。