The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Analysis of Protein Import Complexes on Chloroplast Envelope Membranes
Author(s)	菊地, 真吾
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46512
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	菊　地　真　吾（きく ち しん ご）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２００４５　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Analysis of Protein Import Complexes on Chloroplast Envelope Membranes （葉緑体包膜における蛋白質輸送装置複合体の解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　長谷　俊治 （副査） 教　授　金澤　　浩　　助教授　大岡　宏造　　助教授　中井　正人

論　文　内　容　の　要　旨

第一章　葉緑体外包膜の輸送装置複合体の解析

エンドウより単離した葉緑体を非イオン性界面活性剤で可溶化し、一次元めを Blue Native 電気泳動（BN-PAGE）、二次元めを SDS-PAGE で分離した後、ウエスタン解析を行った。その結果、分子サイズ 800-1000 kDa に泳動される位置に、Toc75、Toc159、Toc34 のいずれをも含むバンドが検出され、これが Toc 複合体であることが示された。ゲルろ過クロマトグラフィーによっても Toc 複合体はほぼ同じサイズに溶出された。次に、これら Toc コンポーネントによる複合体構築様式を明らかにするため、各コンポーネントの存在量の算出を行い、その存在比を見積もったところ、Toc159 : Toc75 : Toc34 の比は 1 : 3 : 3 となった。さらに、葉緑体を外包膜の外側からプロテアーゼ消化することにより Toc 複合体の限定分解をおこない、ジギトニンあるいは Triton X-100 で可溶化し解析したところ、Toc 複合体はサイトゾル側のドメインを段階的に失うことで、サブユニット間の段階的な解離が起こり、それに伴って複合体の分子サイズが段階的に小さくなっていくことがわかった。このとき、Toc159 の断片と Toc75 からなる Toc 複合体のコアと考えられる単位も観察された。本解析は、Toc 複合体が葉緑体外包膜上で 800-1000 kDa という巨大な複合体を形成しており、その構築に、Toc コンポーネントのプロテアーゼ感受性ドメインが大きな寄与をしていることを示唆している。また、エンドウからエチオプラストおよび根プラスチドを単離し、その Toc 複合体を BN-PAGE で解析したところ、これらのプラスチドにも葉緑体同様に Toc75、Toc159、Toc34 のいずれをも含む 800-1000 kDa の Toc 複合体が存在することがわかった。

第二章　葉緑体蛋白質包膜透過過程において新規に見出された輸送中間体複合体の解析

放射性標識した rubisco small subunit 前駆体（pSSU）を単離葉緑体と 500 μM ATP の存在下でインキュベートし、その可溶化サンプルを BN-PAGE で泳動すると、およそ 1 MDa の位置に放射性標識によるシグナルが検出された。2D-BN/SDS-PAGE 解析によって、このシグナルは確かに pSSU に由来するものであることが示された。いったん葉緑体を回収した後、これを ATP の存在下、チェイスすると、1 MDa のシグナルは減少し、かわりに成熟体型 SSU および rubisco 複合体にシグナルが見られるようになった。このことは 1 MDa の輸送装置複合体中でアレストした

前駆体蛋白質が、葉緑体内部に輸送され、プロセシングを受けた後、rubisco 複合体中に組み込まれたことを示しており、1 MDa のシグナルは前駆体蛋白質が包膜を透過する途上で形成された輸送中間体複合体を示していると言うことができる。この輸送中間体が前駆体蛋白質の包膜透過過程のどの段階のものであるのかを調べるため、葉緑体表面のプロテアーゼ処理とショ糖密度勾配遠心を行ったところ、前駆体蛋白質が内包膜にまで到達した段階のものであることがわかった。Antibody-shift BN-PAGE などの手法によって、この輸送中間体複合体の構成因子について検討したところ、抗体が得られている既知の Toc/Tic コンポーネントのいずれをも含まず、新規の複合体であることがわかった。本解析は、前駆体蛋白質が Toc 複合体から Tic110/Tic40/Hsp93 に受け渡される間に、これまでに知られていなかった巨大な複合体が介在していることを示唆しており、その構成因子の同定は今後の大きな課題である。

論文審査の結果の要旨

学位申請者は、植物細胞の葉緑体の包膜に存在する蛋白質輸送装置である Toc 複合体と Tic 複合体を対象にして、その構造の構築様式の解析と蛋白質輸送が行われる際の輸送中間状態にある複合体の同定を行った。エンドウの葉緑体外包膜から Toc 複合体を種々の条件で界面活性剤により可溶化し、Blue Native 電気泳動法を活用した２次元電気泳動法で、複合体を構成する蛋白質群を分離した。そして、含まれる分子種とその存在量について特異抗体を用いて詳細に解析した。その結果、無傷の Toc 複合体は Toc159、Toc75、Toc34 が 1：3：3 の量比からなり、分子サイズが 800-1000 kDa に達する巨大なものであること、及び条件によりサブユニットの部分的な解離やペプチド鎖の切断が起こり、複合体サイズが段階的に減少することを見出した。さらに、葉緑体移行能を持った前駆体蛋白質を放射標識し、条件を工夫して葉緑体とインキュベーションすることにより包膜透過過程の中間状態を捕らえることに成功した。そして、この標識が 800 kDa のサイズの複合体に取り込まれ、この状態には Toc 複合体と Tic 複合体の既知のコンポーネントが含まれていない新規の構造を持つものであることを突き止めた。これらの結果は、葉緑体の蛋白質輸送機構に新たな知見を加えるものである。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。