

Title	INSERTION OF CYTOCHROME P-450 INTO MICROSOMAL MEMBRANES
Author(s)	阪口, 雅郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/489
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・（本籍）	さか 阪	ぐち 口	まさ 雅	お 郎
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	7178	号	
学位授与の日付	昭和61年3月25日			
学位授与の要件	理学研究科 生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	新しく合成されたチトクロムP-450の膜への挿入機構			
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤 了 (副査) 教授 福井 俊郎 教授 松原 央			

論文内容の要旨

肝小胞体のチトクロムP-450は典型的な内在性膜蛋白質である。本論文はP-450の膜への結合機構の解明を目的とした。P-450は、分泌蛋白質と同じく膜結合型リボソームで合成される。近年分泌蛋白質のN末に存在するシグナル配列を認識する粒子（シグナル認識粒子：SRP）が見い出されているので、先ずSRPとP-450の膜への結合との関連を調べる実験をおこなった。ウサギ肝臓の全RNAを小麦胚芽系で翻訳し、合成されるP-450を免疫沈降により同定した。合成されたP-450は精製されたものと同一の分子量であった。この翻訳系に犬豚臓の粗面小胞体膜（RM）を共存させると、新たに合成されたP-450は膜に結合した。反面、高濃度の塩によってSRPを抽出除去した膜（KRM）には、結合が見られなかった。しかしKRMに精製したSRPを加えた系では、効率よい結合が見られた。このようなKRMの結合活性の回復は、添加するSRPの量に依存していた。また、膜非存在下では、SRPは分泌蛋白質mRNAの翻訳を特異的に阻害するが、P-450の場合も同様にその合成が阻害された。これらの事実は、小胞体膜蛋白質であるP-450の分子内に、分泌蛋白質のシグナル配列と同様な働きをする配列が存在することを示している。次いで、このシグナル配列の存在位置を明らかにするため次のような方法をとった。単離されたP-450のcDNAと酵母ミトコンドリアのポリンのcDNAより、DNA操作によってキメラcDNAを構築し対応するmRNAを合成した。これらのmRNAは上記の系で翻訳され、目的とするキメラ蛋白質が合成された。キメラ蛋白質のRMへの結合を調べたところ、P-450のN末39及び79残基を含むキメラ蛋白質は膜に結合したが、P-450の99-517残基を含むキメラは結合しなかった。この結果よりP-450のシグナルは、N末39残基以内に存在することが明らかになった。さらにこのN末39残基の性質を明らかにするために、分泌蛋白質であるインターロイキン2（IL-2）の切断をうけ

るシグナル配列の部分をP-450のN末39, 29, 20残基でそれぞれ、おきかえたキメラcDNAを構築した。IL-2は確かにRMを透過することを確かめた上で、これら3種のキメラ蛋白質の膜への結合を上記の系で解析したところ、P-450のN末39, 29残基を含むIL-2は膜に結合したが、透過しなかった。反面N末20残基をもつものは、結合も透過もしないことがわかった。これらの結果より、P-450のN末29残基には、確かにシグナル配列が存在すると同時に、膜透過を停止させる配列も存在すること、及びP-450のシグナル配列の重要な部分が20-29番の残基に存在することが明らかになった。以上の成果により、P-450の膜への結合のためのシグナルが明らかになり、膜上での存在状態形成を考える上で重要な情報が得られた。

論文の審査結果の要旨

肝細胞ミクロソームのチトクロムP-450（以下P-450という）は小胞体膜に結合したポリソームによって合成され、合成と共役して膜に挿入される。阪口君の研究は*in vitro*の転写・翻訳系及び組換えDNA技術を用いてこの挿入の機構を明らかにすることを目的としたもので、次のような重要な結果を得ている。

1. P-450と同じく分泌タンパク質も膜結合型のポリソームで合成され、合成と共役して膜を透過するが、この膜透過はシグナル認識粒子（SRP）に依存しており、また透過とともにN末端のシグナル配列は切断される。阪口君はウサギ肝臓の全RNAを小麦胚芽無細胞系で翻訳させるとともに、その系にイヌ豚臓粗面小胞体膜、高塩濃度によってSRPを除去した膜、および精製したSRPを添加する実験を行い、その結果にもとづいて、P-450の膜への挿入もSRPに依存していること。またP-450にもSRPによって認識されるシグナル配列が存在すること、さらにこのシグナル配列は切断を受けないことを結論した。
2. 上記のP-450のシグナル配列の分子内位置を知るためにP-450のcDNAのさまざまな部分と酵母ミトコンドリア外膜タンパク質であるポリンのcDNAとからキメラcDNAをつくり、それらをサルモネラフェージのSP-6プロモーター及びRNAポリメラーゼを用いて*in vitro*に転写して対応するmRNAを得た。次にこれらのmRNAをイヌ豚臓粗面小胞体膜の存在下で翻訳し、合成されたタンパク質が膜に結合するか否かを調べた。その結果、P-450のシグナル配列はN末端から39残基以内に存在することが明らかとなった。
3. P-450のシグナル配列の存在位置をさらに特定するために、分泌タンパク質であるインターロイキン2の切断を受けるシグナル配列部分をP-450のN末端39, 29, 20残基で置き換えたキメラcDNAを構築し、これらのキメラタンパク質の膜との相互作用を調べた。その結果、P-450のN末端から29残基までに膜への挿入に必要なシグナル配列と膜透過停止配列とが存在すること。またシグナル配列の重要部分がN末端から20-29残基に含まれていることが明らかとなった。

以上の結果は小胞体膜の内在性タンパク質であるP-450の膜への挿入機構について重要な知見を加えたものであり、理学博士の学位論文として十分な価値をもつものと認められる。