

## 論文内容の要旨

申請者氏名 松 井 健 史

汎用有用酵素である西洋ワサビペルオキシダーゼ C (HRPC1a) をコードする遺伝子、*prxC1a* の構造 (Fujiyama ら、1988) と精製酵素のアミノ酸配列 (Welinder、1979) から *prxC1a* には N 末端(NTPP)と C 末端(CTPP)にプロペプチドの存在が明らかになった。本研究では、これらのプロペプチドの HRPC1a の細胞内局在性および酵素成熟への役割を調べた。

第 1 章では、緑色蛍光タンパク質 EGFP に NTPP および/または CTPP を融合した遺伝子を作製し、CaMV35S プロモーター支配下でタバコ培養細胞 BY2 に導入した。形質転換体における蛍光観察の結果、NTPP は小胞体および細胞外へのタンパク質移行のためのシグナルペプチド、CTPP は液胞局在化シグナルであることが明らかになった。同様のことを *prxC1a* について、NTPP と CTPP の有無と C1a の局在を BY2 細胞で調べたところ、NTPP と CTPP 両者がある天然型遺伝子の導入細胞では液胞に活性型 HRP C1a が、NTPP のみでは細胞外へ分泌された。CTPP のみでは活性型酵素の蓄積は認められなかった。タバコの異種タンパク質の N 末シグナルペプチドでも活性型 HRPC1a が分泌された。タバコの *ADH* の 5'非翻訳領域を HRPC1a に連結して BY2 細胞に導入すると、mRNA 量あたりの HRPC1a 蓄積量は、10 倍に上昇した。

第 2 章では、CTPP による液胞輸送機構に関する解析を行った。植物細胞には機能や形態の異なる液胞が少なくとも 2 種類(lytic vacuole; LV および protein storage vacuole; PSV) 存在する。LV への輸送はプロペプチド中の NPIR モチーフを受容体が認識して行われることが知られているが、PSV への輸送は C 末端プロペプチドがシグナルとして機能すること以外、未知の部分が多い。そこで、LV と PSV の区別が明瞭な西洋ワサビにおいて、組織免疫電顕により HRPC1a は PSV に局在することを確認した。さらに、BY2 細胞において CTPP の機能領域解析を行った。植物の PSV 局在性タンパク質は一般に 15 アミノ酸程度の CTPP を有するが、C 末端の数アミノ酸の配列が比較的似ていた。そこで、CTPP の 15 アミノ酸のうち C 末端側の 6 アミノ酸配列だけを HRPC1a の C 末端に融合し BY2 細胞へ導入したところ、液胞輸送能が確認された。既知の PSV 輸送シグナルは C 末端に G 残基を付加することにより、液胞輸送能が損なわれるが、C6 配列の液胞輸送活性は G を 2 残基を付加することで損なわれた。一方、全長 CTPP の C 末端に G を 2 残基付加しても液胞輸送は起こった。全長 CTPP は両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス構造をとる可能性があり、この二次構造も重要であると考えられた。そこで、両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス構造をとることが知られているマウス由来カルボキシペプチダーゼ E の C 末端プロペプチド領域を HRPC1a に融合して BY2 細胞に導入したところ、液胞輸送が見られた。以上の結果から、C6 配列に加えて、C15 配列から構成される二次構造が HRPC1aCTPP による液胞局在化において重要であると結論した。

以上、実用酵素の細胞内局在性とシグナルペプチドの関係を詳細に解明した。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 松 井 健 史

西洋ワサビのペルオキシダーゼ C (HRP C1a) は汎用酵素であると共にフェノール系汚染物質の分解除去にも使える。本酵素は N 末端と C 末端にプロペプチド(それぞれ NTPP、CTPP) を持っており、これが細胞内局在性を支配していることが予想された。本論文は、両プロペプチドの機能を明解に示し、さらに C 末端プロペプチドの構造と機能の詳細を明らかにした。

- 1) 緑色蛍光タンパク質 EGFP をレポーターとしてタバコ培養細胞 BY2 において、NTPP は小胞体および細胞外へ、CTPP は液胞へ局在させるシグナルであることを明らかにした。
- 2) EGFP の代わりに HRP C1a の遺伝子、*prxC1a* でもタバコ細胞で同様の結果を得ている。
- 3) タバコの 2 種類の異種タンパク質の N 末端シグナルペプチドをでも活性型 HRP C1a が分泌されることを確認し、シグナルペプチドにより小胞輸送経路に送られることが酵素成熟に必要であることを示している。
- 4) 翻訳エンハンサーであるタバコ *ADH* 遺伝子の 5' 非翻訳領域を *prxC1a* に連結すると BY2 細胞にて、mRNA 量あたりの HRP C1a 蓄積量が 10 倍に上昇することを示した。
- 5) CTPP による液胞輸送機構に関する解析を詳細に行っている。植物細胞には機能や形態の異なる液胞が少なくとも 2 種類(lytic vacuole; LV および protein storage vacuole; PSV) 存在するが、PSV への輸送は C 末端プロペプチドがシグナルとして機能すること以外、未知の部分が多かった。そこでまず、LV と PSV の区別が明瞭な西洋ワサビにおいて、組織免疫電顕により HRP C1a は PSV に局在することを確認している。
- 6) BY2 細胞において CTPP の機能領域解析を行った。植物の PSV 局在シグナルは C 末端の数アミノ酸の配列が比較的似ていることから、CTPP の 15 アミノ酸のうち C 末端側の 6 アミノ酸配列だけでも、BY2 細胞において HRP C1a が液胞に輸送されることを示し、C 末端に G 残基を 2 個付加することにより液胞輸送が損なわれることを示している。
- 7) 一方、全長 CTPP の C 末端に G を 2 残基付加しても液胞輸送は起こったことから、全長 CTPP の両親媒性  $\alpha$ -ヘリックス構造も液胞輸送に貢献することを予想し、類似の構造をとるマウス由来カルボキシペプチダーゼ E の C 末端プロペプチドでも HRP C1a の液胞輸送が起こることを示している。以上の結果から、C6 配列に加えて、C15 配列から構成される二次構造が HRP C1aCTPP による液胞局在化において重要であると結論している。

以上のように、本論文は実用酵素の西洋ワサビのペルオキシダーゼの生合成と細胞内局在性に関するプロペプチドの機能を明らかにし、学術上の新たな知見を得ると共に、本酵素の生産や環境問題解決への貢献のみならず、植物酵素の生産向上にも寄与するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。