

所 属 (主指導教官)	細胞間情報学講座 (磯貝 彰教授)		
氏 名	渡辺 尚英	提 出	平成 12年 1月 6日
題 目	高等植物のポルフィリン生合成系に関する プロトポルフィリノーゲン酸化酵素に関する研究		
要旨 プロトポルフィリノーゲン酸化酵素 (Protox) は、クロロフィルとヘム生合成経路における最後の共通ステップであるプロトポルフィリノーゲンIXからプロトポルフィリンIXへの酸化反応を触媒し、植物や動物を問わずほとんどの生物種に普遍的に存在する重要な酵素である。近年、この酵素が非常に低薬量で殺草活性を示すS23142などのフタルイミド系除草剤のターゲット酵素であることも明らかとなり、この酵素の重要性がより一層増してきている。しかし、高等植物のProtoxの構造や性質、局在部位などの知見は殆ど得られておらず、クロロフィルやヘム生合成の調節機構やS23142などの除草剤の作用機構に関する理解は深まっていないのが現状である。そこで、高等植物の葉緑体やミトコンドリアに存在するProtoxに関する分子レベルの知見を得ることを目的に研究を行った。 当研究室ではS23142に対して約150倍の抵抗性を有するタバコPM培養細胞 (YZI-1S細胞) を選抜しており、YZI-1S細胞の除草剤抵抗性がS23142のターゲット分子であるProtox分子に何らかの変異に起因していることが示唆されていた。そこで、まずこの抵抗性培養細胞の抵抗性機構解析研究から本研究を開始した。研究開始と同時期に明らかになったタバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>) の葉緑体型およびミトコンドリア型Protoxの配列を基に、YZI-1S細胞および野生型細胞から葉緑体型Protoxとミトコンドリア型ProtoxのcDNAをクローニングし、塩基配列を決定したところ、YZI-1S細胞はProtox分子の変異によって抵抗性を獲得しているのでは無いことが明らかになった。そこで、次にそれぞれのProtoxの発現量をノーザン解析によって調べてみたところ、葉緑体型Protox mRNAの発現レベルは野生型細胞とYZI-1S細胞ではほぼ同程度であったが、ミトコンドリア型ProtoxのmRNAはYZI-1S細胞で野生型細胞に比べて約10倍にまで増加していることが明らかとなった。さらに、様々な生化学的活性測定や顕微鏡を用いた細胞観察により、YZI-1S細胞の葉緑体型ProtoxはS23142によって阻害されているが、ミトコンドリア型Protoxが過剰発現することによって除草剤に対する耐性を獲得していることが明らかとなった。このことは、ミトコンドリア型Protoxを過剰発現させることによって除草剤耐性植物の作成が可能であることを示しており、これら除草剤の作用機構を分子レベルで明らかにするためには葉緑体型Protoxだけでなく、ミトコンドリア型Protoxに関する詳細な情報を得ることが必要であることを示している。そこでまず葉緑体型Protoxの構造や葉緑体への移行メカニズム、葉緑体内での存在部位に関する解析を進めることにした。なお、このような研究にはタバコ培養細胞は不向きなため、以降の実験は材料の調達や葉緑体やミトコンドリアの単離が比較的容易なホウレンソウ (<i>Spinacia oleracea</i> L.)を用いて行った。 まず、葉緑体Protoxの構造的知見を得るために、葉緑体Protoxの精製を試みた。ホウレンソウ葉緑体から6段階のカラムクロマトグラフィーによって精製を行ったところ、葉緑体Protoxを電気泳動上で単一のバンドとなるまで初めて精製することに成功した。解析の結果、本酵素は塩基性の膜タンパク質であり、分子量約60kDaの単量体として存在すること、酵素活性には補酵素としてFADを要求し、活性はS-23142により強く阻害されることが明らかとなった。しかし、精製した葉緑体Protoxは非常に微量であり、そのアミノ酸配列の解析は困難であった。そこで、最近明らかにされたアラビドプシスやYZI-1S細胞の葉緑体型Protox遺伝子の配列情報を基に、ホウレンソウからの葉緑体型Protox (Protox-I) のcDNA			

クローニングを行った。配列解析の結果、ハウレンソウのProtox-Iは分子量60kDaのタンパク質であること、N末端領域にFAD結合モチーフや一回貫通型の膜貫通ドメインが存在すること、アラビドプシスやタバコのProtox-Iと70~80%の相同性を示し、N末端に葉緑体移行シグナルと思われる配列が存在することなどが明らかとなった。そこで次に、成熟型Protox-IのN末端を明らかにするため、ハウレンソウProtox-Iの発現タンパクに対するポリクローナル抗体（抗Protox-I抗体）を作成した。この抗体を用いた免疫沈降によって、ハウレンソウ葉緑体からProtox-Iを精製することに成功した。そのN末端アミノ酸配列分析から、ハウレンソウProtox-Iのプロセッシング部位はアラビドプシスやタバコのProtox-Iの中で保存されているシステイン残基（Cys-48）のC末端側であることが明らかとなった。そこで、Met-1~Cys-48の領域が葉緑体へのトランジットペプチドとして機能しているかどうか解析するために、GFP（緑色蛍光タンパク質）との融合遺伝子をハウレンソウ葉で一過的に発現させ、その発現した融合タンパク質のオルガネラへの移行を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、この融合タンパク質が葉緑体にも移行することが明らかとなり、ハウレンソウProtox-IのN末48アミノ酸が葉緑体へのトランジットペプチドとして機能していることが明らかとなった。次に、Protox-Iの葉緑体での局在部位を明らかにするために、まず葉緑体ストロマ、包膜、チラコイド膜の各分画をシュークロース密度勾配遠心法によって精製した。続いて抗Protox-I抗体を用いたウェスタン解析を行ったところ、Protox-Iは包膜とチラコイド膜画分の両方に局在していることが明らかとなった。さらに、ハウレンソウProtox-Iの局在部位をより詳細に解析するために、免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、葉緑体型Protoxの大部分はチラコイド膜のストロマ側に存在しており、一部が内包膜のストロマ側に存在していることが明らかとなった。以上の様に、ハウレンソウの葉緑体型Protoxに関する分子レベルでの知見を得ることができた。

次に、ハウレンソウのミトコンドリアに存在すると考えられるProtox（Protox-II）に関しても分子レベルでの解析を行った。まず、アラビドプシスやタバコYZI-1S細胞のミトコンドリア型Protox（Protox-II）の保存配列を基にプライマーを設計し、PCRにより全長のハウレンソウのProtox-IIのcDNAを単離した。配列解析の結果、本酵素の推定分子量は58,319Daであり、N末端領域にFAD結合ドメインをもつこと、さらにアラビドプシスやタバコのProtox-IIと70~80%程度の高い相同性を示すが、ハウレンソウを始めとするProtox-Iとは30%程度の相同性しか示さないことが明らかとなった。また興味深いことに、ハウレンソウProtox-IIは、他の植物種のProtox-IIに比べて長いN末端配列を有しており、開始メチオニン（Met）の下流26残基にもう一つメチオニン残基が存在していること、さらにこのメチオニン残基以降からC末端までの領域で他のProtox-IIと高い相同性を示すことが明らかとなった。この2番目のMet残基からの翻訳産物の推定分子量は55,615Daであり、他の植物Protox-IIの分子量とほぼ同じである。これは、ハウレンソウのProtox-IIのmRNAにおいて、両方のAUGから翻訳が開始されている可能性や、2番目のAUGからのみ翻訳が開始されている可能性を示唆している。これらの点を確認するため、ハウレンソウのProtox-IIの全長鎖cDNAからmRNAを調製し、小麦胚芽抽出液の*in vitro*翻訳系で翻訳された産物の解析を行ったところ、分子量約59kDaと56kDaの2種類の翻訳産物が合成されていることが明らかとなった。したがって、ハウレンソウProtox-IIのmRNAからは、最初の開始AUGだけでなく、2番目のAUGからも翻訳が開始されていることが明らかとなった。次にこれら二つの翻訳産物の細胞内局在性を調べるため、別途作成したハウレンソウのProtox-IIに対する抗Protox-II抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。その結果、ハウレンソウの葉緑体画分には約57kDaの、ミトコンドリア画分においては約55kDaの特異的なバンドが検出された。以上の結果は、ハウレンソウProtox-IIのmRNAからは推定分子量58.3kDaと55.6kDaの2つの翻訳産物が合成され、それぞれ葉緑体とミトコンドリアに局在していることを示している。以上、ハウレンソウProtox-IIのように一種類のmRNAから二つの翻訳産物が合成され、それぞれが異なったオルガネラに局在しているという例は余り知られておらず、また従来ミトコンドリア型だと考えられてきたProtox-IIがハウレンソウにおいては葉緑体にも存在しているという事実は、高等植物のポリフィリン生合成経路におけるProtox分子群の機能分担を再考させる結果となり、非常に興味深い。

本研究により、高等植物の葉緑体とミトコンドリアに存在するProtox分子の特徴についての多くの知見を得ることができた。本研究で得られた知見は将来の新規Protox阻害型除草剤の開発だけでなく耐性植物の作成にも大きく寄与するものと考えている。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 渡 辺 尚 英

プロトポルフィリノーゲン酸化酵素(Protox)は、ほとんどの生物種に存在し、クロロフィルやヘムの生合成に関わる重要な酵素である。本論文は、高等植物のProtoxについて、その性質、Protox阻害型除草剤への耐性機構、細胞内での局在性、その分配の分子機構等について述べたもので、序章と4章から成る。

申請者はまず序章において、農業生産における除草剤の重要性と、近年低薬量除草剤として注目を浴びてきた光要求型除草剤の作用機作を述べ、それらがProtoxを特異的に阻害することからProtox阻害型除草剤として理解されてきた経過とヘムやクロロフィル生合成の過程におけるProtoxの重要性、および、Protox研究の現状についてふれ、本研究の動機づけと基盤について概説している。

第1章では、Protox阻害型除草剤に耐性のタバコPM培養細胞の耐性機構を解析し、それがProtox分子の変異によるものではなく、ミトコンドリアのProtoxの過剰発現によるものであることを示し、高等植物におけるProtoxの機能の理解のためには、葉緑体型とミトコンドリア型の両方のProtoxについての知見を得ることが必要であることを述べている。

第2章では葉緑体型のProtoxの生化学的な解明を目指して、ホウレンソウを材料としてProtoxの精製を行い、最終的に電気泳動的に単一の蛋白質に精製することに成功し、この酵素が分子量約6万の膜蛋白質であること、補酵素としてFADを必要とすること等を明らかにしている。しかし、得られた蛋白質量が極めて少なかったため、アミノ酸配列に関する情報はここでは得られなかった。

第3章では、この研究の途中で報告されたアラビドプシスやタバコのProtoxの塩基配列の情報を基にホウレンソウの葉緑体型のProtoxのcDNAを単離しその塩基配列を決定した。また、得られた塩基配列を基に発現蛋白質を作り、それに対する抗体を作成した。この抗体を用いてあらためてホウレンソウ葉緑体からProtoxを精製し、そのN末端アミノ酸配列を決定することによって、塩基配列から得た情報とともに、葉緑体型Protoxの成熟蛋白質のアミノ酸配列を明らかにし、葉緑体への移行シグナルを推定した。蛋白質として葉緑体型Protoxのアミノ酸配列が得られたのは本研究が

はじめてで、他の植物のProtoxのプロセッシングサイトもこの結果から推定した。葉緑体への移行シグナル48アミノ酸(M1-C48)の機能はGFPとの融合蛋白質の一過性発現の観察により証明することが出来た。また本酵素の細胞内局在性も免疫電子顕微鏡観察によって詳細に証明している。

第4章では、ハウレンソウのミトコンドリア型ProtoxのcDNAを同様な方法で単離し、その塩基配列を決定した。そのアミノ酸配列を他の植物と比較し、N末端に開始メチオニンの候補が2カ所(M1, M27)認められる特徴を発見した。どちらが開始メチオニンかの同定のため、このmRNAを調製し小麦胚芽抽出液での*in vitro*翻訳系で翻訳したところ、59kDaと56kDaの2種の産物が得られた。発現タンパク質について抗体を作成し、この酵素の細胞内の局在性をウエスタン法で解析したところ、葉緑体では57kDaのバンドが、また、ミトコンドリアでは55kDaのバンドが認められた。すなわち、本酵素のmRNAは2カ所から読み始められ、それぞれ別の細胞内小器官に移行する可能性が示された。そこで、さらにGFPとの融合蛋白質を作成し細胞内小器官への移行を検討した結果、(M1-I27-T97)-GFPは葉緑体へ、(M27-T97)-GFPはミトコンドリアへ移行することを確認した。このように、一つのmRNAから2種の翻訳産物が合成され、それぞれが別々の細胞内小器官に輸送される例はほとんど知られておらず、また、従来ミトコンドリア型であると理解されてきた本酵素が葉緑体にも存在することは新しい発見であり、高等植物のProtoxの機能に新たな問題を投げかけたものである。

以上のように本論文は、高等植物のProtoxについて、新たな且つ重要な多くの知見を示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。