

報告番号

※ 甲 第 2172 号

主論文の要旨

題名 高等植物チトクロムオキシダーゼ
およびその遺伝子の構造と特性

氏名 中川 強

主論文の要旨

報告番号

※甲第

号

氏名

中川 強

本研究は、高等植物チトクロムオキシダーゼ (EC 1.9.3.1) タンパク質の構造と生合成、およびその遺伝子の構造と発現様式について解析を行ったものである。本酵素はチトクロム_cから分子状酸素に電子を伝達すると共にプロトンをポンプしてATP合成に必要な膜ポテンシャルを形成するものであり、真核生物においてはミトコンドリアDNAにコードされ触媒機能を担う3つのサブユニット (電子伝達に関与するCu_ACu_B、heme_aa₃およびプロトンポンプが含まれる) と核DNAにコードされる数種のサブユニットそれぞれがミトコンドリア内膜中で方向性を持って配置するという構造的特徴を持ち、その形成機構に興味を持たれる。そして現在まで調べられた真核生物で共通して大きい方から3つめまでのサブユニットがミトコンドリアDNAにコードされ生物種間で相同性が高いということ、一方核DNAにコードされているサブユニットは生物種間でその数が異なりまたミトコンドリアDNAにコードされているサブユニットでみられたような高い相同性が認められないことが知られており各生物が進化の度合に応じて核DNA支配サブユニットを生み出し、発達させてきたと考えられ、これらが生み出されてきた原因、過程を解明することは興味深い研究課題といえよう。本酵素はこのような特徴ある構造を持つばかりではなく、高等植物では、貯蔵器官の傷害反応や種子吸水に関する研究により生合成における核DNA支配サブユニット不活性前駆体の存在が知られており、これらが活性型酵素へと構築されていく過程は一般的な膜タンパク質会合のモデルの一つとなると考えられる。ま

た哺乳動物等で本酵素の核DNAにコードされているサブユニットについて、根本的な機能は同じであっても一次構造がわずかに異なる遺伝子のセットが用意されていてこれらが器官特異的に発現することが知られており、このような機構によりホロ酵素に各器官に適した性質を賦与しているということが考えられている。そして高等植物においては葉と根の酵素で耐熱性が異なっていることが報告されており、この相違が上で述べたような核DNAにコードされているサブユニットの器官特異的な出現によるものではないかと推察し、高等植物における本酵素核支配サブユニットの遺伝子の構造およびその発現を調べることも重要であると考えた。そこでサツマイモ塊根やケツルアズキ、エンドウを材料として、チトクロムオキシダーゼ、特にその核DNAにコードされているサブユニットのタンパク質構造、性質、生合成機構、遺伝子構造およびその発現機構を解析することにより以上述べたことについて分子レベルでの解明を試みた。

まずサツマイモ塊根の本酵素が8種のサブユニット I (43kDa)、II (28kDa)、III (32kDa)、IV a (24kDa)、IV b (23kDa)、V a (8.8kDa)、V b (8.0kDa)、V c (7.2kDa)からなること、単離ミトコンドリアタンパク質翻訳と poly(A⁺)RNA の *in vitro* タンパク質翻訳の結果、またタンパク質の疎水性・親水性度、DCCDの結合といった様々な性質を調べた結果、サツマイモのサブユニット I、II、IV a、IV b がミトコンドリアDNA、サブユニット III、V a、V b、V c が核DNAにコードされていると結論した。さらにミトコンドリアDNAにコードされるサブユニットについて、サブユニット II のN末端アミノ酸配列を決定し、多植物のDNA配列から推定されている配列と相同性が高いこと、N末端部分にエキストラペプチドを持つことを見だし、このサブユ

ニットが酵素の機能上重要であることを確認すると共にエキストラペプチドがサブユニットIIの内膜への組み込みやホロ酵素への構築に働いているのであろうと推定した。またサブユニットIV aとIV bについてDCCDラベルおよびペプチドマッピングの結果それぞれ一次構造が僅かに異なるプロトンポンプサブユニットであることを見だし、サツマイモミトコンドリアゲノム中にプロトンポンプサブユニットの遺伝子が2種存在している可能性を示した。核DNAにコードされるサブユニットについてはサブユニットVcが細胞質で成熟型と同じ大きさの前駆体で合成されること、またN末端アミノ酸配列を決定したところ成熟タンパク質のN末端部分にミトコンドリア移行シグナルとなる両親媒性 α -ヘリクスが存在していることを見いだした。一方、ケツルアズキ、エンドウおよびサツマイモの各器官でチトクロムオキシダーゼの熱による失活速度に相違があること、さらにホロ酵素に含まれるサブユニットVcに相当するポリペプチドについてケツルアズキとエンドウの根と下胚軸あるいは上胚軸でその免疫学的性質が、サツマイモの塊根と茎でその量比が異なっていることを見だし、ミトコンドリアDNAにコードされているサブユニットから構成される活性部位に対して核DNAにコードされているサブユニットが様々に働きかけその構造を変えることにより酵素の性質を少しずつ違ったものに仕立てあげ、それぞれの器官に適したものに行っているのであろうと考えた。これ以降このような特性が見いだされたサブユニットVcを中心に研究を進めた。まずサツマイモ塊根のサブユニットVcに対するcDNAクローンを単離した。このcDNAは451bpおよびpolyAからなる配列を含んでおりサブユニットVcのN末端アミノ酸配列と一致するオープンリーディングフレームを持っていた。

これよりサブユニットVcは64個のアミノ酸からなる前駆体として合成されること、先に述べたように、成熟型では開始メチオニンが除去されているのみで大きなプロセッシングを受けないこと、N末端部分のミトコンドリア移行シグナルとなる両親媒性構造に続いて中央部に膜中に埋まると考えられる疎水性 β -シート構造、C末端側に荷電アミノ酸が頻発する α -ヘリクス構造というように約20個づつのアミノ酸からなる3つのドメイン構造を持つことが見いだされた。このことよりサブユニットVcはN末端部分からミトコンドリア内へ移行し、中央部が内膜に達するとC末端側の構造がそれ以上の進入を止め、内膜を一回貫通する形で配置するという生合成経路および構造モデルを考えた。このモデルによれば中央部の疎水性 β -シート構造が他のサブユニットに存在すると考えられるもう1つの β -シート構造とペアを形成することによって互いに関与し合うということが容易に想像でき、このサブユニットの機能としてホロ酵素の構築やその維持に働いていることが考えられ、上で述べたようにこのようなサブユニットが入れ変わったりすることにより酵素の全体的な構造、性質が少しずつ変化することが示された。またこのcDNAから*in vitro*でタンパク質を発現させ単離ミトコンドリアへの移行系を用いて解析を行ったところ内膜通過には多種生物で知られていたように膜ポテンシャルが必要であることが明らかとなった。しかし多種生物においてさらに必須とされるATPおよびこのエネルギーを用いて前駆体タンパク質を膜透過可能な状態にする因子については必要でないことが示唆された。これはサブユニットVcがアミノ酸64個からなる比較的短いポリペプチドであるためもともと膜透過可能な構造を取っているからではないかと考えられ、サブユニットVcの特徴の一

つと言えよう。さらにこれら核DNAにコードされるサブユニットの器官特異的な出現を司っていると考えられる遺伝子の発現調節領域を明らかにするため同サブユニットVcの遺伝子について解析を行った。サツマイモサブユニットVc遺伝子クローンを単離するとともに同ゲノムDNAをサザンプロットにより解析し、サブユニットVc遺伝子がサツマイモゲノム中で単一種として存在していることを明らかにし、この遺伝子からの発現量がサツマイモの各器官で調節されているのであろうと考えた。遺伝子クローンの塩基配列を決定したところ同遺伝子は5'非翻訳領域のみを含むエクソン1と開始コドンの1塩基上流からその後の部分を全て含むエクソン2およびそれを分断するイントロン1から構成されることが明らかとなった。またエクソン1の上流域には3つのTATAボックス様配列および2つのCAAT配列が見いだされた。そこでノーザンプロットおよびプライマーエクステンションにより転写される部分を決定することにより、これらのうちどの配列が遺伝子発現に関わっているかを推定した。その結果転写開始点は3つのTATAボックス様配列のうち2つからは約330および110bp下流、そして残る1つの1bp上流にマップされたためこれら3つの配列はいずれも遺伝子の転写には関与していないと推定され、サブユニットVc遺伝子はTATAボックス以外の配列により発現制御を受けている遺伝子であろうと考えた。