

学位論文審査の結果の要旨

氏名	POHARE MANOJ BALIRAM
審査委員	主査 秋田 充 副査 阿野 嘉孝 副査 田中 直孝 副査 関藤 孝之 副査 大西 浩平

論文名

Application of precursor proteins with steric hindrance for blocking the process of protein import into chloroplasts *in vitro*

(立体障害を有する前駆体蛋白質が葉緑体への蛋白質輸送に及ぼす影響)

審査結果の要旨

POHARE MANOJ BALIRAM 氏の学位論文を以下に要約する。

葉緑体は、植物の代謝の中心である。光合成はもとより、葉緑体内で起こる様々な代謝反応の結果生じる代謝産物は、植物自身のみならず、私たちの生命を支えている。代謝反応の進行には、蛋白質である酵素が必須である。しかし、葉緑体は自身でゲノムを有しているが、代謝酵素を始めとする葉緑体蛋白質の大部分は、核内ゲノムにコードされている。これらの蛋白質の多くは、細胞質ゾルでアミノ末端部に葉緑体移行シグナルであるトランジット配列を有した前駆体として翻訳された後、葉緑体を囲む二重の包膜に存在する蛋白質輸送装置(トランスロコン)である Toc 及び Tic 複合体を利用して、葉緑体内に輸送される。その際、トランジット配列は切断され、成熟体となる。しかし、蛋白質がどのように葉緑体に輸送されるのか、特に、前駆体蛋白質が葉緑体表面で認識されたのち、蛋白質輸送が完了するまでの分子機構について解明は進んでいない。そこで、本研究では、トランスロコンを通過中の前駆体蛋白質の動きを止めることで、膜を透過中の前駆体蛋白質とそれを取り巻く周辺の因子との間の分子間相互作用を解析するために、立体障害を導入した前駆体蛋白質を作製し、作製した前駆体蛋白質が葉緑体への蛋白質輸送に及ぼす影響を検証した。

得られた実験結果を以下に解説する。

I. カルボキシ末端に DHFR (デヒドロ葉酸レダクターゼ)を連結した前駆体蛋白質を用いた葉緑体蛋白質輸送実験

葉酸のアナログであるメトトレキサート(MTX)は、DHFR の 3 次構造を安定化し、ほぐれにくくする。そこで、カルボキシ末端に DHFR を連結した前駆体蛋白質を設計し、遺伝子組換えにより、当該蛋白質の遺伝子をクローニングした発現プラスミドを作製した。大腸菌で過剰発現すると当該蛋白質は可溶性を保持していた。当該蛋白質を精製後、単離葉緑体とともに、*in vitro* 葉緑体

蛋白質輸送実験を行った。当該蛋白質は、トランジット配列が切断され、葉緑体内に輸送された。このことは、大腸菌で過剰発現した可溶性前駆体蛋白質が、*in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験に適用できることを初めて示すものであった。さらに、蛋白質輸送時における MTX の影響を検討した。MTX 存在下では、輸送効率の低下が観察されたが、輸送が完全にブロックされることはなかった。このことは、葉緑体表層に強力な蛋白質の構造をほぐす(アンフォールディング)活性の存在、あるいは、前駆体蛋白質を強力に葉緑体内部に引き込む力がはたらいている可能性を示唆した。

II. 一価性ストレプトアビジンを結合させたビオチン化前駆体蛋白質を用いた *in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験

前項 I では、同一分子上に安定な 3 次構造を有する前駆体蛋白質を用いることで、輸送途上の蛋白質の動きを止めることを試みた。ここでは、前駆体蛋白質を獲得後、安定な構造体を修飾することで、立体障害を導入することとした。そのため、大腸菌で過剰発現する際に、前駆体蛋白質が *in vivo* ビオチン化されるように、前駆体蛋白質にビオチン受容ペプチド(BAP)を連結した。遺伝子組換えにより、当該蛋白質の遺伝子をクローニングした発現プラスミドを作製した。一方、当該前駆体蛋白質を修飾するために、一価性ストレプトアビジンを調製した。通常ストレプトアビジンは、ビオチンに強固に結合するビオチン結合サイトを 4 か所もつ安定な 4 量体であるが、ビオチンとの結合力を損なわず、そのうちの 3 か所のビオチン結合サイトをつぶしたものが一価性ストレプトアビジンである。一価性ストレプトアビジンを結合した前駆体蛋白質を用いて *in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験を行った。前項の DHFR 連結前駆体蛋白質の場合と同様、ストレプトアビジン結合前駆体蛋白質においても葉緑体への輸送効率の低下が観察されたが、輸送は完全にブロックされることはなかった。ビオチンとストレプトアビジンとの間との相互作用は、変性条件下でも維持されることから、葉緑体表層のアンフォールディング活性により、ストレプトアビジンがほぐれた結果、ストレプトアビジンが前駆体蛋白質から外れたのではなく、前駆体蛋白質が葉緑体内部に強い力で引き込まれた結果ストレプトアビジンの脱離が起きたと考えられた。

III. 相同組換えに基づく新規クローニング法の開発

前項 I 及び II で、前駆体蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ発現プラスミド作製の際に、一本の PCR 産物の末端部の塩基配列が、もう一本の PCR 産物の末端部の塩基配列と相補するように調製した 2 本の PCR 産物を同時に大腸菌に導入すると、大腸菌内で、相同組換えが起きることで、作製を意図したプラスミドを獲得できた。そこで、クローニング効率の良い実験条件を検討した。

以上の研究成果からは、当初の目標であった、立体障害により輸送が途上で停止した前駆体蛋白質の獲得に至らなかった。しかし、葉緑体への蛋白質輸送においては、非常に強い力で、前駆体蛋白質を葉緑体内に引き込むモーター蛋白質の存在を強く示唆することができた。このことは、葉緑体蛋白質輸送の独自性を示すものであり、今後の葉緑体蛋白質輸送研究の発展に対する貢献が非常に大きい。また、新規クローニング法に関しては、特別な試薬や修飾酵素を必要としないことから、今後、広く活用されることが期待される。

本論文に関する公開審査会を平成29年2月4日に愛媛大学農学部において開催し、論文発表と質疑応答を行った。引き続き開催された学位論文委員会において、本論文の内容について審査した結果、審査員全員一致して本論文は博士(学術)の学位を授与するに値すると判定した。