

氏名	山本 由弥子		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	理 学		
学位授与番号	博乙第3578号		
学位授与の日付	平成13年 3月25日		
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)		
学位論文の題目	Carboxyl-Terminal Processing of Precursor D1 Protein of Photosystem II Reaction Center (光化学系 II 反応中心 D1 タンパク質前駆体のカルボキシル 末端プロセッシング)		
論文審査委員	教授 佐藤公行	教授 山本 泰	教授 香川弘昭

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

光合成におけるエネルギー変換反応に直接関わるタンパク質は、一般に、葉緑体ゲノムにコードされており、その機能発現制御や機能調節は核にコードされるタンパク質により行われている。本論文では、葉緑体遺伝子情報発現の翻訳後における制御の一典型として、地球上の生命の生存を基礎づけている“水分解による酸素発生の反応”の機能発現に必須の過程である“光化学系 II 反応中心 D1 タンパク質の核支配プロテアーゼ (CtpA) による C-末端プロセッシング”について、酵素と基質の両面から解析した。

まず、この反応に関与する酵素の局在部位について、チラコイド膜のトリプシン処理による解析と酵素の抽出条件の検討から、この酵素はチラコイド内腔に可溶化状態あるいは膜にゆるく結合した状態で存在することを示し、チラコイド膜のストロマ側で翻訳された前駆体 D1 タンパク質の C-末端は膜を通過してチラコイド内腔に達した後に切断されることを証明した。このことは、その後に行った酵素の純化 (藤田らとの共同研究) および遺伝子の同定 (稲垣らとの共同研究) により明らかにされたホウレンソウ CtpA の N-末端情報からも確認された。

一方、大腸菌 Tsp との相同性と阻害実験から、CtpA は未だその反応機構は明らかにされていない新規のセリンプロテアーゼ (Ser/Lys 二つ組触媒基を活性中心にもつ) であることが示唆された。ついで、本研究では、発現ベクター pET15b(+) を用いて、酵素学的観点からも興味を持たれる CtpA の大腸菌内における大量発現系を確立した。すなわち、菌体の可溶性画分に CtpA が活性を保持した状態で蓄積できる条件 (20°C での IPTG 誘導) を見出し、N-末端の His-tag を利用した Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより CtpA を純化し、これがホウレンソウから抽出されたプロテアーゼと全く同一の酵素学的特性をもつことを示した。ついで、このようにして得られた酵素と、*Scenedesmus* のチラコイド膜中に存在する基質を用いた反応機構の解析から、基質の存在状態により、C-末端近傍の基質認識や切断機構は変化しないが、反応の pH 依存性や酵素の基質に対する親和性に大きな変化 (例えば最適 pH で約 2 の差) を生じることを見出し、反応の場の生理的状況に応じて CtpA の活性が制御されている可能性を示唆した。

論文審査結果の要旨

光合成エネルギー変換反応に直接関わるタンパク質は、一般に葉緑体ゲノムにコードされており、一方、その機能発現制御や機能調節は核にコードされるタンパク質により行われている。本論文では、葉緑体遺伝子情報発現の翻訳後における制御の一典型として、“水分解による酸素発生の反応”の機能発現に必須の過程である“光化学系II反応中心D1タンパク質の核支配プロテアーゼ (CtpA) によるC-末端プロセシング”について、酵素と基質の両面からその機構を解析した。まず、この反応に関与する酵素の局在部位について、チラコイド膜のトリプシン処理による解析と酵素の抽出条件の検討から、この酵素がチラコイド内腔に膜にゆるく結合した状態で存在することを示し、チラコイド膜のストロマ側で翻訳された前駆体D1タンパク質のC-末端は膜を通過してチラコイド内腔に達した後に切断されることを証明した。このことは、その後に行った酵素の純化およびその遺伝子の同定の解析により明らかにされた酵素のN-末端情報からも確証された。一方、大腸菌Tspとの配列の比較と阻害実験から、CtpAは未だその反応機構は明らかにされていない新規のセリンプロテアーゼであることを示唆した。ついで、発現ベクターpET15b(+)を用いて、CtpAの大腸菌内における大量発現系を確立した。すなわち、菌体の可溶性画分に酵素が活性を保持した状態で蓄積できる条件を見出し、これをアフィニティークロマトグラフィーにより純化し、これがハウレンソウから抽出されたプロテアーゼと全く同一の酵素学的特性をもつことを示した。更に、このようにして得られた酵素と、*Scenedesmus*のチラコイド膜中に存在する基質を用いた反応機構の解析から、基質の存在状態により、C-末端近傍の基質認識や切断機構には変化しないが、反応のpH依存性や酵素の基質に対する親和性に大きな変化が生じることを見出し、反応の場の生理的状況に応じてCtpAの活性が制御されている可能性を示唆した。

以上の研究成果は、光合成・光化学系II反応中心の動態の解明のみならず、生体内でのプロテアーゼの機能に関して数多くの新しい知見をもたらすものであり、本論文は本研究科の博士論文としての基準を充たしているものと判定される。