

論文の内容の要旨

論文題目 大豆由来プロテインジスルフィドイソメラーゼの機能に関する研究

氏名 貝沼 謙

タンパク質の機能発現において、立体構造の形成過程は遺伝情報翻訳後の最も重要なプロセスの一つである。タンパク質の立体構造を形成する各種化学結合のうち、システインの官能基同士によるジスルフィド結合は、共有結合であるがゆえにタンパク質の機能発現と構造保持に深く関与する。プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、タンパク質のジスルフィド結合の掛け替えによる立体構造形成触媒能を有するタンパク質である。また、PDI は生体内におけるタンパク質の適正な機能発現に関わり、さらに多機能タンパク質としての役割も示唆される。このため、その機能と構造については様々な角度から研究が進められている。しかし PDI 研究の多くは、ほ乳類あるいは微生物由来に関するものであり、植物の PDI に関する知見はあまり得られていない。

植物の PDI は、ほ乳類や酵母と同様に様々な成長過程に必要なタンパク質の高次構造形成を触媒し、その機能発現に関わる。このため植物中の PDI 活性には、その成長を部分的に律速する生理学的な意味合いが含まれている。とくにタンパク質リッチな種子植物においてこの傾向が顕著であると考えられる。ヒト PDI の DNA 配列に基づき作成したプローブを用い、アルファルファ PDI のアミノ酸配列を決定したことが既報で報告されてはいたものの、植物由来の PDI はいまだに未精製であり、その性質についても知られていることは少なかった。

このような背景において研究に着手した著者らは、植物由来 PDI の構造解析および機能の解明を目的として、まず食用として知られる各種植物種子中の PDI 活性を検討した。豆、小麦、大麦、米、トウモロコシなどの植物種子中に見出された PDI 活性は、チオレドキシンや他の低分子チオール化合物とは分子量的に区別された。これら PDI 活性と植物種子抽出液中のタンパク質含量を比較検討した結果、両者の間には高い正の相関 ($R=0.9465$ また

は $R=0.9268$) が認められた。この結果は、種子中の PDI 活性の発現がタンパク質の生成量に比例することを示唆した。

次いで、上記種子中でもとくに貯蔵タンパク質含量が高いことで知られる大豆種子の成長過程における、PDI 活性の変動と部位特異性について検討した。大豆は畑の牛肉と呼ばれるほど栄養価の高い豆類であり、世界各地で生産されている。これは大豆が豊富な貯蔵タンパク質を含むためであるが、これまでにその一次構造と生成過程についての報告はあるものの、高次構造形成過程はほとんど明らかにされていなかった。大豆種子登熟過程、および発芽過程の PDI 活性変動には、大豆種子中の豊富なタンパク質の高次構造形成過程が反映されると考えられる。

測定結果より、登熟過程の PDI 活性の最大値は開花後 15～20 日の間に見られ、その後徐々に減少した。また、発芽中の PDI 活性は浸漬開始 2～3 日目で最大値を示し、その後減少した。登熟過程における PDI 活性の発現時期は、これまでに報告された大豆種子中の貯蔵タンパク質によるプロテインボディー形成時期とほぼ一致していた。

発芽初期に上昇した大豆種子中 PDI 活性の大部分は胚乳由来であった。しかし、胚軸を除去して水中に浸漬した大豆種子の活性上昇は、胚軸を残したまま浸漬したものに比較して低かった。これらの結果は胚軸中に存在する何らかの因子が、胚乳中の活性上昇に関与することを示唆した。また、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド存在下で浸漬した発芽中大豆種子の PDI 活性変動を測定したところ、非存在下とほぼ同様の活性および変動を示した。この結果は、休眠大豆種子中に不活性型 PDI が存在する可能性を示唆した。

次に、これまで活性変動を追うことで検討してきた大豆 PDI の特性をさらに詳細に解析するために精製し、その特異性および一次構造を明らかにした。本精製は発芽中の大豆をホモジナイズした抽出液を初発サンプルとし、その後 6 段階の過程を経た。最終的に得られたタンパク質の精製効率は 12,000 倍であった。

精製された大豆 PDI はこれまでに報告された PDI と同様、分子量 60,000 程度のサブユニットが二つ結合したホモダイマーであった。しかし、その等電点は従来報告されたもの ($pI4.02-4.5$) とは異なりアルカリ側 ($pI7.65$) であった。これは著者らが知る限り、高等植物由来の PDI の精製に成功したはじめての例である。

精製された大豆 PDI をプロテアーゼで分解後、その断片のアミノ酸配列を決定した。その結果得られた 34 のアミノ酸配列のうち、異なる 2 つの配列中にそれぞれ活性部位アミノ酸配列 APWCGHCK が見いだされた。また活性中心近傍のアミノ酸配列は、これまでに DNA

配列から推測された他の植物由来 PDI の活性中心近傍と高い相同性を示した。

精製された大豆 PDI の、ジスルフィド結合掛け替え反応の普遍性を確認するため、各種還元変性タンパク質を用いてリフォールディング実験を行った。リフォールディング実験には、卵白リゾチーム、大豆由来トリプシンインヒビター(Bowman-Birk Trypsin inhibitor)、卵白アルブミンを還元変性したものを基質として供した。卵白リゾチームと大豆由来トリプシンインヒビターはその活性を指標に、卵白アルブミンは CD スペクトルの吸収に見られる二次構造の消長を指標に高次構造の回復を観察した。

大豆由来トリプシンインヒビターは、小胞体とほぼ同様の酸化還元的な環境下で、最も高いトリプシン阻害活性の回復(90%)を示した。しかし、同条件下で本タンパク質が有するキモトリプシン活性阻害能の回復を検討したところ12%しか回復しなかった。この結果は、ジスルフィド結合の掛け替えによる大豆由来トリプシンインヒビターの立体構造形成過程に、二つの律速段階が存在する可能性を示唆した。一方、CD スペクトルの観察結果から還元変性卵白アルブミンが大豆 PDI 存在下で、その二次構造をほぼ完全にリフォールディングすることが示された。これらリフォールディング実験において、酸化還元的な環境の調整は重要な因子であった。

本論文で精製を報告した大豆 PDI と同様に、従来一次構造が明らかにされた PDI には、いずれも共通して APWCGHCK のアミノ酸配列が2ヶ所保存されている。この配列はチオレドキシシン活性部位との相同性から、ジスルフィド結合交換反応の活性中心であると考えられている。著者らはこの配列を有するペプチドを MAP (Multiple Antigen Peptide) ペプチド上に合成し、その PDI 活性を測定した。その結果から、ジスルフィド結合交換反応に CXXC モチーフは必須であることが明らかになった。しかし、本配列のみでは PDI 活性を発現し得ず、この配列が何らかの立体構造をとった場合にはじめて PDI としての活性を持ちうるということが明らかになった。

本論文は以上の骨子から構成されており、植物由来 PDI の構造と機能をタンパク質側から検討した結果、および PDI 活性部位の構造と機能について論じたものである。