

氏名	ます だ た ろう 増 田 太 郎
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2545 号
学位授与の日付	平 成 17 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on the structural and functional diversities of soybean ferritin subunits (ダイズフェリチンサブユニットの構造的, 機能的多様性に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 内 海 成 教 授 谷 坂 隆 俊 教 授 廣 瀬 正 明

論 文 内 容 の 要 旨

フェリチンは高等植物, 動物から微生物に至るまでほとんど全ての生物種において見出される鉄貯蔵タンパク質である。既知のフェリチンは24個のサブユニットが会合することで対称性に富んだ球状の多量体を形成しており, この多量体中に多数の鉄原子が無毒な形で貯蔵される。哺乳類のフェリチンには, 機能的に異なったH鎖およびL鎖という二種類のサブユニットが存在し, 両者はヘテロあるいはホモ24量体を形成している。一方, 高等植物由来のフェリチンに関しては, ササゲ, トウモロコシなどにおいて複数の遺伝子が見出されているものの, 各遺伝子がコードする成熟タンパク質の構造と機能に関する知見は得られていない。本研究では, 高等植物におけるフェリチンの遺伝的多様性と遺伝子産物の機能について検討するため, ダイズに関して研究を行った。その主な内容は以下の通りである。

1. ダイズ乾燥種子よりフェリチンを抽出し, 単一に精製したところ, 種子フェリチンは28 kDa および26.5 kDa という2種類のサブユニットがほぼ等量含まれる形で存在していた。各サブユニットの部分アミノ酸配列に対応するフェリチン cDNA (*sfer1*, *sfer2*) を RT-PCR 法により単離し, 塩基配列を決定した。その結果, 26.5 kDa サブユニットは既知のダイズフェリチンの配列 (SFER1) と一致したが, 種子に含まれる24量体中では C-末端部16残基が切断されていた。一方, 28 kDa サブユニットは SFER1 と異なる遺伝子 (*sfer2*) にコードされていた (SFER2)。大腸菌発現系で調製した C-末端部が切断されていない全長の SFER1 からなる24量体と, ダイズから精製した C-末端部が切断された SFER1 と SFER2 のヘテロ24量体に *in vitro* で鉄を取り込ませ, 鉄保持能を検討した結果から, SFER1 の C-末端部16残基の切断に伴い, ①フェリチン内部に蓄えられた鉄原子の放出が起こること, ②24量体構造が不安定化し, SFER1 単独では24量体構造を維持することができず分解に至ること, が明らかとなった。一方, SFER2 は C-末端部の切断を受けず, むしろ SFER1 と共に多量体を構成することで24量体構造を安定化する働きがあることが示唆された。
2. *sfer1*, *sfer2* に加えて, さらに2種類 (*sfer3*, *sfer4*) のダイズフェリチン cDNA を RT-PCR 法により単離し, 塩基配列を決定した。各遺伝子の種子, 葉, 幼根, 上胚軸, 子葉, 頂芽における発現をノーザンプロット法により解析した結果, *sfer1* は登熟期の種子, 幼根, 頂芽, 根で強く発現し, 植物体に過剰の鉄を与えることで葉において発現の誘導がみられた。*sfer2* は種子の登熟段階初期に強く発現しており, 鉄に対する発現誘導のパターンも *sfer1* に類似していた。また, *sfer4* は鉄刺激による発現誘導は見られないものの, 発現時期, 組織特異性が *sfer1*, *sfer2* と極めて類似していた。*sfer3* は他の3種と異なり, 種子ではほとんど発現せず葉での発現が確認され, 過剰の鉄による発現誘導も見られなかった。
3. ダイズフェリチンに関して, 個々のサブユニット単独での24量体形成能と複数サブユニットによるヘテロ24量体形成能およびそれらの鉄貯蔵能を検討するため, 4種類のダイズフェリチン cDNA を鋳型として調製した各々に対応する mRNA を無細胞タンパク質合成系で発現させ, SDS-PAGE および非変性条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析を行った。その結果, SFER1, SFER2, SFER3 は単独での24量体形成が可能で, 鉄貯蔵タンパク質としても機能したが, SFER3 の鉄取り込み活性は SFER1 および SFER2 と比較して微弱であった。また, 2種類のサブユニットを共発現させた場合, SFER1/SFER2 と SFER1/SFER3 は24量体形成が可能で, 強い鉄取り込み活性を示した。SFER2/SFER3 も24量体

形成が可能であったが、鉄取り込み活性をほとんど示さなかった。SFER4に関しては、単独で24量体を形成することができないだけでなく、登熟期種子で共に発現している SFER1, SFER2 のいずれともヘテロ24量体を形成することができず、独立して機能する可能性が示唆された。

4. 哺乳類を含む他の生物由来のフェリチンと比較して特異な一次構造を有する植物フェリチンの活性と立体構造の相関を解析する基盤を確立するため、大腸菌発現系を用いて SFER1 のみからなる24量体を調製し結晶化を試みた。その結果、緩衝液としてトリス塩酸、沈殿剤として酒石酸ナトリウムを用いた条件で、X線結晶構造解析可能な単結晶が得られた。X線を照射し、得られた3.0 Å までの回折データを解析したところ、この結晶は空間群 $I4_122$ の正方晶に属し、非対称単位あたり12個のサブユニットが含まれていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

フェリチンは幅広い生物種に見出されている鉄貯蔵タンパク質であり、その高度な鉄貯蔵能だけでなく、特徴的な立体構造を有する多量体タンパク質としても注目され、これまで多くの研究がなされてきた。しかし、植物に関しては研究が遅れていた。本論文は、ダイズにおけるフェリチン遺伝子ファミリーの存在を明らかにし、これまで知られていなかったダイズフェリチンの構成サブユニット種とそれらの機能について解析したものであり、評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. ダイズ乾燥種子に存在するフェリチンが、異なる遺伝子由来の2種類のサブユニット SFER1 および SFER2 から成っていることを明らかにし、各サブユニットをコードする cDNA, *sfer1* と *sfer2* を単離した。両サブユニットのうち SFER1 は C-末端部16残基が切断されており、この C-末端部が切断を受けることにより、内部に蓄えた鉄原子を放出することを明らかにした。もう一つの構成サブユニットである SFER2 は C-末端部の切断を受けず、フェリチン内部に蓄えた鉄を安定に保持する働きがあることを示した。

2. *sfer1*, *sfer2* に加えて、新規なダイズフェリチン cDNA である *sfer3* と *sfer4* を単離し、ダイズフェリチンが少なくとも4種類の遺伝子群からなるファミリーを形成していることを示した。4種類のフェリチン cDNA について、種子、葉、幼根などでの発現を解析し、各 cDNA が特徴的な発現パターンを示すことを明らかにした。また、*sfer1* と *sfer2* は既知のフェリチンと同様、植物体に過剰の鉄を与えることにより発現が誘導されたが、*sfer3* と *sfer4* については鉄を与えることによる発現誘導が見られず、これらが鉄非誘導性のフェリチンであることを明らかにした。

3. 4種類のフェリチン cDNA を鋳型として各々に対応する mRNA を調製し、無細胞タンパク質合成系において発現させ、各サブユニットの多量体形成能と鉄貯蔵能を解析した。これらにより、単独で多量体形成が可能なサブユニットは SFER1, SFER2 および SFER3 であることを示し、SFER1 と SFER2 を共発現させた場合、種子に存在するものと同様にほぼ等量の SFER1 と SFER2 から成る鉄貯蔵能力の高いヘテロ多量体を形成することを示した。また、SFER4 はホモ多量体もヘテロ多量体も形成することができず、他のサブユニットとは独立して機能している可能性を示した。

4. 大腸菌発現系により調製した SFER1 を単一に精製し、酒石酸ナトリウムを沈殿剤とした条件で結晶化に成功した。得られた結晶に X線を照射し、回折データを解析することにより、この結晶は空間群 $I4_122$ の正方晶に属し、非対称単位あたり12個のサブユニットが含まれていることを明らかにした。

以上のように本論文は、植物の鉄貯蔵タンパク質フェリチンファミリーの構造と機能に関する重要な知見を得たものであり、品質設計開発学、植物生化学、育種学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年11月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。