

氏名	うえむらこういち 植村康一
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2377号
学位授与の日付	平成13年3月23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	Structure-Function Relationship of Fallover in Ribulose 1,5-bisphosphate Carboxylase / Oxygenase Reaction (リブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ反応にお けるフォールオーバー現象の構造活性相関)
論文調査委員	(主査) 教授 大山莞爾 教授 關谷次郎 教授 佐藤文彦

論文内容の要旨

リブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) は、光合成生物における二酸化炭素固定の初発反応を触媒する酵素である。フォールオーバー (Fallover) は、高等植物の RuBisCO 反応中に活性が徐々に低下する現象である。本論文は、Fallover の構造活性相関に関するものであるが、同時に RuBisCO の機能向上に関する研究も含まれている。その主な内容は以下のとおりである。

- (1) 従来、Fallover は高等植物の RuBisCO のみに観察される現象とされていた。本論文では、種々の生物の RuBisCO について、Fallover 現象の有無と、その程度を測定し、Fallover が高等植物の RuBisCO に特有の現象ではなく、紅藻を含む多くの生物の RuBisCO で起こる現象であること、また、進化の過程で獲得された現象であることを報告している。
- (2) 大腸菌内での発現が可能で Fallover を示さない *Chromatium vinosum* の RuBisCO 大サブユニットの21番目及び305番目のアミノ酸 (ホウレンソウ RuBisCO の番号) を、リジンに換えることにより、Fallover が誘発されることを報告している。同時に、この変異型 RuBisCO が野生型 RuBisCO の2倍、高等植物 RuBisCO の5倍の反応速度を持つことを報告している。また、この変異型 RuBisCO は現時点で報告されている中で、最も速い反応速度を持つ RuBisCO であり、自然界に存在する RuBisCO の機能を上回る RuBisCO が人為的な操作によって作りださうることを報告している。
- (3) Fallover を示すホウレンソウの RuBisCO を用いて、大サブユニットの21番目及び305番目のリジン残基の関与を、X線構造回折を用いて推察した結果について報告している。RuBisCO は大サブユニット8個、小サブユニット8個から構成されるが、Fallover 後の RuBisCO は、各大サブユニットの21番目及び305番目のリジン残基が同じ状態にあるのではないことを報告している。すなわち、21番目のリジン残基が19番目のアスパラギン酸残基と水素結合を持ち、305番目のリジン残基が93番目のグルタミン酸残基とイオン結合を持ったサブユニットと、21番目のリジン残基がどことも関与を持たず、305番目のリジン残基がC末端とイオン結合を持ったサブユニットが、それぞれ4個づつ1分子内に存在することを報告している。反応前の RuBisCO および Fallover を示さない RuBisCO ではこのような分子内の不均一性は認められていないことから、この不均一性が Fallover に大きく影響している可能性を報告している。
- (4) RuBisCO のカルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応の反応速度比を示す比特異性係数の新奇な測定方法として、陰イオンクロマトグラフィーを用いる方法を報告している。本論文では、種々の生物の RuBisCO について、この陰イオンクロマトグラフィーを用いて比特異性係数を測定し、緑色植物については、RuBisCO の進化と Fallover 並びに比特異性係数に相関が認められることを明らかとしている。また、高等植物の RuBisCO とは進化系統の異なる紅藻の RuBisCO が、高等植物の RuBisCO 以上の比特異性係数を示し、特に、好熱性紅藻である *Galdieria partita* と *Cyanidium caldarium* の RuBisCO は高等植物 RuBisCO の2.5倍の比特異性係数を示すことを報告している。一方、Fallover を若干示す接合藻 RuBisCO の比特異性係数が、緑藻 RuBisCO と高等植物 RuBisCO の間にあることを示し、接

合藻の RuBisCO は、陸上植物への RuBisCO へ進化する過程での移行期にあたる性質を持つことを報告している。

論文審査の結果の要旨

フォールオーバー (Fallover) は、高等植物のリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) 反応中に活性が徐々に低下する現象である。本論文は、Fallover の構造活性相関と RuBisCO の機能進化に関するものであり、主な評価すべき点は以下のとおりである。

- (1) Fallover は高等植物の RuBisCO で報告されてきた現象で、その原因にはいくつかの説があるものの十分明らかにされてはいなかった。しかし、種々の生物の RuBisCO を用いて検討した結果、Fallover が高等植物の RuBisCO に特有の現象ではなく、多くの生物の RuBisCO で起こる現象であり、進化の過程で獲得された現象であることを明らかにしている。
- (2) *Chromatium vinosum* の RuBisCO の大サブユニットの21番目及び305番目のアミノ酸をリジンに換えることにより、Fallover を誘発することに成功している。種々の RuBisCO のアミノ酸配列の比較と、この点変異導入の結果から、21番目と305番目のリジン残基は Fallover に関与するアミノ酸であると結論している。同時に、この変異 RuBisCO が野生型 RuBisCO の2倍、高等植物 RuBisCO の5倍の反応速度を持つことを明らかとし、人為的な操作により RuBisCO の機能を向上できることを示している。
- (3) ホウレンソウ RuBisCO の詳細な X 線構造回折データに基づいた詳細な構造予測により、Fallover を起こした RuBisCO では、1分子中に8個存在するサブユニットが同一な状態ではなく、不均一であることを明らかにしている。また、Fallover は大サブユニット中の21番目と305番目のリジン残基の関与を含む RuBisCO の構造変化によって起こる現象であると推論している。
- (4) RuBisCO の比特異性係数の新奇的な測定方法を開発し、Fallover と比特異性係数が相関していることを示している。また、好熱性紅藻の RuBisCO が著しく高い比特異性を示すことを明らかにし、接合藻 RuBisCO は、緑藻型 RuBisCO から陸上植物型 RuBisCO へ進化する過程での移行期にあたる性質を持つことを明らかにしている。

以上のように、本論文は、RuBisCO の Fallover の構造活性相関に加えて、RuBisCO の機能進化に関する解析を行ったものであり、Fallover の機構の一部を明らかにすると共に、著しく比特異性係数に優れた RuBisCO を発見し、また、点変異導入による RuBisCO の機能向上にも成功している。従って、生化学、酵素化学、植物学、分子生物学の発展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13年2月14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。