

氏名	まさ やす し 牧 泰 史
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2248 号
学位授与の日付	平成 12 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科植物学専攻
学位論文題目	原核生物型リボソームの蛋白質構成に於ける不均一性

論文調査委員 (主査) 教授 岡田清孝 教授 西村いくこ 教授 長谷あきら

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質の合成を担うリボソームの研究は、生物学の中でも基本的かつ重要である。原核生物型である大腸菌リボソームの構成タンパク質の同定は、過去の分離技術の限界から未完のままであり、また大腸菌リボソームがすべて均一なタンパク質構成を持つとする知見は、対数増殖期の菌体のみを用いた観察から得られたものだった。同じ原核生物型に分類される植物プラスチドリボソームについての研究は殆どが双子葉植物の葉緑体を用いていた。また構成タンパク質の量比まで調べた研究はなされていなかった。本研究はリボソームの単離法やタンパク質の分析法に改良を加え、これまで以上に詳細なりボソームタンパク質構成の研究を目指した。また植物材料や、大腸菌の生育条件などに関して、従来未分析だったものを選び、原核生物型リボソームに関する知見をより深めることを試みた。本研究では植物材料として単子葉植物の一つ、オオムギを用い、暗所下で生育させた黄化葉のプラスチドリボソームのタンパク質構成を調べた。短時間のうちにリボソームの単離が終了するよう工夫を加え、得られたリボソームの活性も確認して、結果に対する信頼性を高めた。現在最もリボソームタンパク質の分離能に優れた RFHR 法を用いて分析し、オオムギプラスチドリボソームのタンパク質構成を決定した。これらは、全般に原核生物型の特徴を有しつつ、酸性タンパク質が多いという葉緑体独自の特徴も示した。特徴的なタンパク質の N 末端アミノ酸配列分析の結果、これまで双子葉植物のみに確認されていた葉緑体特異的リボソームタンパク質 5 種のうち 3 種までを、単子葉プラスチドリボソームに初めて確認した。タンパク質の量比を調べた結果、いくつかのタンパク質が小さいコピー数を示し、プラスチドリボソームがタンパク質構成に関して不均一である可能性を示した。

次に、大腸菌リボソームタンパク質構成に関する研究では、対数増殖期と定常期の菌体由来のものを比較した。定常期の菌体は、植え継ぎ後 1 日程度の培養だけでなく、これまで詳細に調べられることの無かった数日間の培養後のものまでを対象とした。

比較の結果、定常期特異的にリボソームに結合する 2 種の新たなタンパク質を発見した。これらのタンパク質は互いに関連したアミノ酸配列を持ちながら、一方は 70S リボソームに、他方は 100S リボソームという、定常期特異的に見られる二量体化したリボソームに結合していた。またこれらは、翻訳過程にあるリボソームには結合していない事が明らかとなり、大腸菌リボソームが定常期に於いて、これまで知られていた以上に複雑な構造上、構成上の変化を示すことが明確となった。さらに、これら 2 つのタンパク質は、過去にハウレンソウで発見され、本研究でもオオムギに確認された葉緑体特異的とされるリボソームタンパク質との間にアミノ酸配列の相関が見られたほか、多くのバクテリアゲノム中にも相同な遺伝子が見つかったことから、このグループのタンパク質が原核生物型リボソームに普遍的に存在する可能性が高いことが判った。

以上の結果は、葉緑体や大腸菌だけでなく、原核生物全般のリボソームや代謝の研究に新たな知見をもたらした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究の特色のひとつは、リボソームの単離方法とタンパク質の分離分析方法に改良を加え、リボソームのタンパク質構

成に関して詳細かつ信頼性の高い結果を得た点である。従来の研究では、リボソームの単離に長い時間を費やしており、リボソームに対する人為的傷害が発生する可能性が高かった。この操作を極力短時間で済ませることにより、本研究では活性の高いリボソームを得ることに成功した。また従来のタンパク質の分離分析に用いられていたK-W法は分離能や定量性、再現性に関して不十分な点があった。本研究ではこれらの点を改善したRFHR法を用いることにより、定量的な解析をすることに成功した。このように方法から見直して結果の信頼性を上げた点は評価に値する。

本研究のもう一つの特徴は、選んだ実験材料に独自性を持たせた点である。従来、プラスチドリボソームの研究材料は殆どが双子葉植物の葉緑体であったため、得られていた知見は限られた植物材料のものに偏っていた。本研究では単子葉植物であるオオムギの暗所芽生えから単離したエチオプラストを材料に選んだ。これに含まれるリボソームのタンパク質構成を調べた結果、複数の葉緑体特異的リボソームタンパク質を、単子葉植物のリボソーム上に初めて確認し、これらのタンパク質が高等植物に共通して存在する可能性が高いことを見いだした。リボソームの構成タンパク質の量比を調べた実験からは、プラスチドリボソームにコピー数の少ないタンパク質の存在が確認され、タンパク質構成が不均一である可能性を指摘した。大腸菌リボソームの研究は、これまで基本的に対数増殖期のものを用いてなされてきたため、菌体の成育過程の中で時間的に大部分を占める定常期の知見が限られていた。本研究では対数増殖期だけでなく、数日間培養した長期の定常期も調べ、リボソームに結合する2種の新規タンパク質を発見することに成功した。またこの2種は互いに関連したアミノ酸配列を持ったタンパク質でありながら異なる形態のリボソームに結合していたことが判り、大腸菌定常期に於けるリボソームの構成的、構造的変化を明確に表す新たな証拠を提示すると共に、大腸菌リボソームはすべて均一なタンパク質構成からなるとする従来の捉え方を修正するモデルを示した。またこれら2種のタンパク質は、葉緑体特異的リボソームタンパク質としてハウレンソウと本研究のオオムギで確認されたタンパク質とも相同性を持つこと、翻訳反応には関与しないものである可能性も指摘した。多くの原核生物のゲノム中に、これらと強い関連を示すアミノ酸配列のタンパク質をコードする遺伝子がみつかり、本研究の結果は、大腸菌、葉緑体リボソームに限らず、原核生物型リボソーム全般に関して、新たなタンパク質の存在の可能性と、その機能解析への糸口を提示するものとなった。このように、従来の常識に疑問を持ち、実験材料の選択を工夫して新たな知見を得たことは高く評価できる。また本研究は、リボソーム研究だけでなく、原核生物の代謝に対する理解を深める上でも貢献したものと評価できる。

よって審査の結果本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認め、平成12年3月16日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。