

氏名(本籍)	なかむらよしこ (長野県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博乙第1,173号		
学位授与年月日	平成8年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Studies on Nitrate Reductase from the Red Alga <i>Porphyra yezoensis</i> (紅藻 <i>Porphyra yezoensis</i> の硝酸還元酵素に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	猪川倫好
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学教授	理学博士	堀輝三
副査	筑波大学教授	理学博士	山根國男

論文の要旨

真核生物型硝酸還元酵素(NR)は、植物において硝酸同化の主要な鍵酵素として機能し、様々な環境要因により多様な活性調節を受け、植物の生育に重要な影響を及ぼしているが、その活性調節の機構はまだ殆ど明らかにされていない。これを明らかにするためには、酵素を精製し、構造と機能を明らかにすることが必要である。しかしながら、NRの精製は、一般に分子量が大きく、極めて不安定であることなどからごく一部の植物についてのみ行われ、緑色植物以外の植物、特に多細胞海産藻類については、緑色植物で用いられてきた抽出・精製法が適用できないため、これまで多くの研究者により試みられてきたが完全精製は行われていなかった。本論文は、紅色植物門原始紅藻類綱の *Porphyra yezoensis* (スサビノリ) のNRを完全精製し、酵素化学的諸性質を明らかにするとともに、その構造についてcDNAの塩基配列から全アミノ酸配列を決定し、機能的構造についても明らかにしたものである。

第1章では、酵素の抽出・部分精製法に関し新たに開発した方法について述べている。多細胞海産藻類は一般に多量の細胞間粘質多糖、酵素阻害物質、可溶性色素タンパク質等を含有するため、不安定な酵素タンパク質の抽出・精製に様々な障害をもたらすためにこれまで多細胞海産藻類の酵素に関する研究は極めて少なかった。著者は、抽出・精製法について種々検討し、ポリエチレングリコール-硫酸アンモニウム系の水性二層分配法を用い適切な条件設定により粘性多糖等混在物質と酵素との選択的分配が可能であることを見つけ、本法がNR初め他の酵素の抽出・部分精製法として極めて有効であることを明らかにしている。

第2章では、前章で開発した方法により調製した粗酵素を種々のクロマトグラフィーを用いて単一タンパク質として精製し、スサビノリのNRは分子量が220,000で100,000のサブユニットの2量体からなることを明らかにした。また、本酵素はNADHに特異的で、分子内にチトクロム b₅₅₇を含む、diaphorase活性と硝酸還元活性に大別される部分活性を有すること、前者はさらにNADH-ferricyanide reductase活性とNADH-cytochrome c reductase活性に、後者はFMNH₂-NR活性とMVH-NR活性に分けることができ、それぞれの部分活性に関する解析結果からスサビノリのNRは、diaphoraseドメインの高次構造において、他の植物起源のNRと異なる特殊性をもつことなどを明らかにした。

第3章では、スサビノリと他の真核生物型NRの高次構造との免疫学的比較を行うためモノクローナル抗体を作成し、22クローンを得た。ホロ酵素タンパク質および2種のプロテアーゼによる限定分解産物とモノクローナ

ル抗体との交叉性を解析し、抗体は3タイプに分けられ、タイプ1はヘムドメイン、タイプ2はMoCoドメイン、タイプ3はFADドメインに特異的な抗体であることを明らかにした。

これらの抗体を用い、5植物門36種の植物起源のNRとの交叉性を調べ、MoCoドメインに特異的な抗体のいくつかはすべての植物起源のNRに対して交叉性を示すことから、これらのNRの高次構造には高い相同性が認められること、しかし、FAD、ヘムドメインはスサビノリと同目に属する紅藻と一部の紅藻との間にのみ相同性が認められ、他の植物起源のものとは明らかに異なることなどを明らかにした。さらに、多細胞紅藻と単細胞紅藻との間にも抗体の交叉性に顕著な違いが見られ、紅藻の系統進化に新たな知見を与えている。

第4章では、スサビノリNRの構造について、NRのサブユニットのcDNAを単離し、2.87 kbのcDNAを得た。ORFは2.68kbで892アミノ酸残基からなる推定分子量98,299、推定pIは5.3であることを明らかにした。全アミノ酸配列の比較から真核生物型NRとの相同性は36から51%であることを示した。他の酸化還元酵素との相同性等を解析した結果、スサビノリのNRは他の真核生物型NRと同様の順にN末端側から、他の植物起源のNRとの相同性がなくスサビノリに特異的なN末端領域、sulfite oxidaseとの相同性の高いMoCoドメイン、他のNRと相同性がないhinge 1領域、L-lactate dehydrogenase、チトクロムb₅のヘムと相同性のあるヘムドメイン、他のNRと相同性がないhinge 2領域、cytochrome b₅ reductaseとの相同性のあるFADドメインの6つのドメインから構成されていることを明らかにした。

審 査 の 要 旨

本論文は、植物の無機態窒素の同化の鍵酵素として重要な機能をもつ硝酸還元酵素について初めて多細胞海産藻類から単一タンパク質として完全に精製し、酵素化学的諸性質、全アミノ酸配列、および機能的な高次構造を明らかにし、さらに、他の系統分類学的に異なる多くの植物起源の同酵素との相違点についても明らかにしたもので、硝酸還元酵素について新たな知見をもたらしたものとして高く評価できる。さらに、海産の多細胞藻類からの酵素の抽出・精製について汎用可能な方法を開発したことは、従来適切な方法がないために大きく遅れていた種々の多細胞海産藻類の代謝生理化学的研究の進展に大きく貢献するものとして高く評価される。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。