

氏名(本籍)	たむらのりこ 田村範子(岩手県)		
学位の種類	博士(生物工学)		
学位記番号	博乙第1699号		
学位授与年月日	平成13年2月28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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies of the Intracellular Proteolytic System in the Archaeon <i>Thermoplasma acidophilum</i> : The Role of Tricorn Protease and Its Aminopeptidase-Interacting Factors (古細菌 <i>Thermoplasma acidophilum</i> における細胞内タンパク質分解機構に関する研究: トリ コーンプロテアーゼとそれに相互作用するアミノペプチダーゼファクターの役割)		
主査	筑波大学教授	理学博士	宗 像 英 輔
副査	筑波大学教授	農学博士	深 水 昭 吉
副査	筑波大学教授	農学博士	小 林 達 彦
副査	筑波大学教授	農学博士	馬 場 忠

### 論文の内容の要旨

細胞内タンパク質分解機構は不要タンパク質の除去のみならず、細胞機能の維持に重要な役割を果たしておりこの機構を理解することの重要性は近年益々高まってきている。細胞内タンパク質は、進化的に保存された高分子量プロテアーゼ複合体、プロテアソームによりエネルギー依存的に初期分解を受けるが、その後の分解経路は不明であった。

本研究は、古細菌 *Thermoplasma acidophilum* 細菌を用いて細胞内タンパク質分解機構の解明を目的として行われた。

古細菌 *T. acidophilum* 細胞の粗抽出液をグリセロール密度勾配遠心法による分画後、高比重画分と低比重画分の混合によりペプチターゼ活性の上昇または新規活性の出現が確認された。これら活性に寄与する高比重タンパク質を精製したところ、分子量120kDaの単一成分6量体からなる複合体でトリプシン、キモトリプシン様の活性を示すペプチダーゼであることが判明し、電子顕微鏡解析よりトリコーンプロテアーゼ (TRI) と名付けられた。一方、低比重タンパク質画分からは2種類の因子が確認され、各々F1, F2と名付けられた。遺伝子クローニングによる TRI 構成成分の1次構造情報から、TRI分子C-末端領域に TSP (tail-specific protease) 領域が保存されていることが明らかになった。しかし TSP の触媒活性アミノ酸は TRI では保存されていないことから、この領域の機能は両酵素で異なっている可能性がある。TRIは濃縮により、TRI分子20個からなる14.6MDaの正20面体構造をもつ超分子集合体を形成することが判明した。この集合体は、TRIと協調的にペプチダーゼ活性を上昇させるファクター群を内包する巨大プロテアーゼ複合体として機能している可能性が考えられる。

TRIと協調的にペプチターゼ活性を上昇または新規活性を出現させる2種のタンパク質のうち、F1の精製と遺伝子クローニングを試みた。その結果、F1は34kDaの単量体タンパク質で、真正細菌由来のプロリルイミノペプチダーゼに高い相同性を示すタンパク質であった。F1の基質特異性を調べたところ、F1は予想されたプロリン以外にも幅広い基質特異性を示すアミノペプチダーゼであった。結晶構造解析が完了している相同タンパク質との比較より推定された触媒活性アミノ酸改変実験から、Ser<sup>105</sup>とHis<sup>271</sup>が触媒活性アミノ酸であることが明らかになった。さらに、改変型酵素は TRI との協調的ペプチダーゼ上昇活性も消失したので、F1自身の活性が TRI との相互

作用に必須であることが判明した。

TRIと協調的にペプチダーゼ活性を上昇させる第2のファクター、F2の精製とクローニング、及び、TRIとファクター群による相互作用の解明を試みた。単離されたF2は89kDaのZn依存性アミノペプチダーゼであった。一方、*T. acidophilum*のゲノム解析進行中、F2に高い相同性(56.3%)を示す遺伝子F3が新たに発見された。両酵素はF1同様、幅広い基質特異性を示したが、特に、F2は塩基性アミノ酸残基にF3は酸性アミノ酸残基に特異性を示した。これらファクター群とTRIの相互作用は、TRIによる分解産物をファクター群が更に分解するという連続反応によるものであること、また、プロテアソーム、TRI、F1-3を用いた*in vitro*での再構成実験より、プロテアソームによるタンパク質分解産物オリゴペプチドはTRIを加えることで選択的に2-4アミノ酸長の短いペプチドへと分解され、これら短いペプチドがF1-3によってアミノ酸まで高率よく分解されることが判明した。これらのことからTRIはプロテアソーム由来の分解産物オリゴペプチドのアミノ酸までの分解効率を促進するペプチダーゼとして機能することが明らかとなった。

TRIの相同タンパク質のコードする遺伝子は、ある古細菌種のみを確認されていたが、最近、いくつかの真正細菌のゲノム上にコードされていることが判明した。その中の一つ、*Streptomyces coelicolor*よりTRI相同遺伝子産物(TRI-ScC77)を組替えタンパク質として大腸菌で発現させ機能解析したところ、TRI-ScC77は*T. acidophilum*由来酵素同様の基質特異性と構造的特徴を持っていた。また、抗Sc77-TRI抗体を用いて、*Streptomyces*細胞内に本酵素が発現していることが確認され、組替えタンパク質同様、117kDaのサブユニット6量体からなる複合体として機能していることを明らかにした。

本研究により、これまで、不明であったプロテアソームの下流におけるオリゴペプチドの分解がTRIとそれに相互作用するアミノペプチダーゼ群とによって高率よく行われていることが明らかになった。また、古細菌のある種のみ確認されていたTRI相同タンパク質が一部の真正細菌にも確認され、本研究で示されたタンパク質分解経路が真正細菌でも保存されていることが示唆された。一方、TRIが保存されていない細胞も多数存在することから、それらの細胞ではTRI様の機能的相同分子が存在し、オリゴペプチドの分解に寄与していることが予想された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞内タンパク質分解機構は細胞内の不要タンパク質の除去のみならず、細胞機能の繊維に重要な役割を果たしている。細胞内タンパク質は進化的に保存された高分子量プロテアーゼ複合体、プロテアソームによりエネルギー依存的に初期分解を受けるが、その後の分解機構は不明であった。そこで本研究は、古細菌 *Thermoplasma acidophilum* 細胞を用いて細胞内タンパク質分解経路の解明を試みた。

古細菌 *T. acidophilum* 細胞の粗抽出液をグリセロール密度勾配遠心法による分画後、高比重画分と低比重画分の混合によりペプチダーゼ活性の上昇または新規活性の出現が確認された。これら活性に寄与する高比重タンパク質は120kDaの単一成分6量体からなるエンドペプチダーゼ複合体で、電子顕微鏡観察よりトリコーンプロテアーゼ(TRI)と名付けられた。本酵素は少なくとも3種類の低分子量タンパク質ファクター(F1-3)と協調的にペプチダーゼ活性を上昇させることのみならず、濃縮によりTRI分子20個からなる正20面体の超分子集合体を形成することも判明した。ファクターであるF1は34kDaのプロリンイミノペプチダーゼであり、F2とF3は相互に高い相同性(56.3%)を示す89kDaのZn依存性アミノペプチダーゼであった。また、F1はプロリン残基に、F2は塩基性アミノ酸残基に、そしてF3は酸性アミノ酸残基に特異性を示すことも明らかになった。諸実験よりこれらのファクター群とTRIの相互作用は、TRIによる分解産物をファクター群が分解するという連続反応によるものであること、プロテアソーム、TRI、F1-3を用いた*in vitro*での再構成実験より、プロテアソームによるタンパク質分解産物オリゴペプチドはTRIによって選択的に2-4アミノ酸長の短いペプチドへと分解され、これら短いペ

チドがF1-3によってアミノ酸まで効率よく分解されることが判明した。これらのことから、TRIはプロテアソーム由来の分解産物オリゴペプチドのアミノ酸までの分解効率を促進するペプチダーゼとして機能することが明らかとなった。

最近、複数の真正細菌のゲノム上にTRIの相同タンパク質をコードする遺伝子が存在することが判明した。その中の一つ、*Streptomyces coelicolor*の遺伝子産物 (TRI-ScC77) を大腸菌で発現させたところ、*T. acidophilum* TRI同様の基質特異性と構造的特徴を示した。また、抗TRI-ScC77抗体を用いて、*S. coelicolor*細胞内にScC77-TRIが実際発現されていることが確認され、本研究で示されたタンパク質分解経路が真正細菌でも保存されていることが示唆された。一方TRIが存在しない細胞ではTRIの機能的相同タンパク質が存在し、オリゴペプチドからアミノ酸への分解に寄与していると予想している。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。