

氏名(本籍)	佐藤忍 (山形県)
学位の種類	理学博士
学位記番号	博甲第269号
学位授与年月日	昭和60年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	生物科学研究科 生物物理化学専攻
学位論文題目	Novel serine proteases in spinach plants (ホウレンソウにおける新しいセリンプロテアーゼの研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 原田 宏
副査	筑波大学教授 理学博士 鈴木 恕
副査	筑波大学教授 理学博士 柳澤 嘉一郎
副査	筑波大学助教授 理学博士 藤伊 正

論 文 の 要 旨

分泌タンパク質や細胞内小器官に局在するタンパク質の多くは、前駆体タンパク質として合成され、合成および移送の過程で限定分解を受けた後、成熟タンパク質として機能することが知られている。この限定分解に関与する proteases の研究は動物・植物を問わずほとんど進展をみていない現状にある。

本研究はホウレンソウを用いて、細胞内に微量に存在する膜結合性の serine proteases を検出し、あわせて酵素としての性質を明らかにしたものであり、4章から成る。

1) 第1章では serine protease の活性中心に高い反応性を持つ Di-isopropyl phosphorofluoridate (DFP) の affinity labeling 法を考案し、ホウレンソウの発育に伴う、DFP 結合タンパク質 (serine enzymes) の消長を調べている。従来植物においては、種子発芽時や葉の老化時のタンパク質の分解に関わる proteases の研究のみが行われて来たが、本報では、子葉や成葉においても多種の serine enzymes が存在することを示し、 $[^3\text{H}]$ -DFP を用いた affinity labeling 法が細胞内の微量な serine enzymes を検出するのに有効な方法であることを示している。

2) 第二章では、成葉細胞内における DFP 結合タンパク質 (serine enzymes) の局在を調べ、同時に protease に対する種々の活性中心修飾試薬を用いて、検出した serine enzymes の特性を明らかにすることを試みている。成葉のクロロプラスト、ミトコンドリアに各1種、ミクロゾームに2種の serine enzymes を検出し、とくにミクロゾームに存在する44Kの serine enzymes が serine protease としての特性を持つことを示している。

3)第三章では、ミクロゾームの研究に適してカルスをホウレンソウの胚軸から誘導し、成葉で抽出したミクロゾームに存在する serine enzymes の詳細な研究を行っている。カルスのミクロゾームには成葉のミクロゾームに存在する serine enzymes と同じ39Kと44Kの serine enzymes が存在し、それらはショ糖密度勾配遠心分画法により、NADH-cyt_c reductase と同一の挙動を示すことから小胞体に存在することを示し、39Kの serine enzymes が弱い界面活性剤(0.05% deoxycholate)で可溶化されるのに対し、44Kの serine enzymes は膜に強固に結合しており、0.5%の cholate に初めて可溶化され、cholate 存在下での分子量は90Kであることを示している。また種々の活性中心修飾試薬を用いた [³H]-DFP との競合実験により、この酵素は-SH 依存性、金属要求性の serine protease であることを推論している。

4)第四章では、カルスのミクロゾームからカゼインを基質として proteinase 活性の抽出を試みている。ミクロゾームには酸性領域と中性領域に至適 pH を持つ2種の DFP 感受性のカゼイン分解活性が検出され、0.5% cholate で可溶化される中性 protease は、分子量90K、Fe²⁺ またはZn²⁺ 要求性、-SH 依存性の serine protease であることを明らかにし、本酵素が第三章で抽出した44Kの serine enzymes と同一のものであることを結論づけている。また、カルスから抽出した mRNA の in vitro 翻訳産物を基質とすると、3.5Kのペプチドのみを特異的に分解することを示し、この protease が高い基質特異性を持つことと、細胞内で機能し得ることを示唆している。

審 査 の 要 旨

膜結合性 proteases の研究が遅れている理由には、これら proteases の(1)の高い基質特異性、(2)活性の不安定性、(3)低含量などをあげることができるが、本研究で開発された [³H]-DFP による affinity labeling 法は、これらの諸問題をある程度解消し、細胞の生理学的研究に大きく寄与するものと考えられる。

また、初めて膜結合性 proteases の存在を明らかにし、その性格づけを行なった事は、従来植物の protease の研究センターをなして来た、発芽時や老化時のタンパク質の分解という観点とは異なった、機能タンパク質の生成に関わる proteases の役割を強く示唆した点で高く評価される。

本研究で得られた酵素の諸性質は、serine proteases の性質と極めて類似しているが、本酵素の細胞内における機能に関しては、細胞内基質を明らかにする事が必須であり、その意味から、3.5Kの翻訳産物が特異的に分解された事は興味深く、今後期待される。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものとみとめる。