

学 位 論 文 題 名

Studies on the accumulation of a Kunitz - type
proteinase inhibitor present in tubers of
potato (*Solanum tuberosum* L.)

（ジャガイモ塊茎のクニッツ型プロテイナーゼ・インヒビターの
蓄積に関する研究）

学位論文内容の要旨

遺伝子組換えの技術が発達すると共に貯蔵や防御機能を持つタンパク質性のプロテイナーゼ・インヒビター遺伝子に多くの注目が集まっている。その理由は、元来植物内に存在する貯蔵タンパク質を用いて外敵から作物を守る防御機能の開発を可能とするからである。著者は馬鈴薯「品種ダンシャクイモ」の塊茎形成初期過程に発現するクニッツ型プロテイナーゼ・インヒビター（以下PKPIと略す）ファミリーの一つの遺伝子pT1を分離精製し、これを発現ベクターにクローニングした。更に大腸菌で発現したタンパク質に対する抗体を作成しPKPIの発現を解析した。このPKPIは他の分子と異なって、成熟塊茎の可溶性分画には存在しないという結果を得られた。そこで、本研究は馬鈴薯塊茎に発現したPKPIの細胞内蓄積を明らかにすることを主な目的とした。

（１）PKPIの可溶化：成熟塊茎の可溶性タンパク質と作成した抗体の反応は全く検出できなかったが、尿素で可溶化した全タンパク質中にはPKPIが存在し、可溶性のPKPIと同じ20,000の分子量を持っていた。更に、高いpHでPKPIが可溶化されることが明らかである。

（２）アミノ酸配列：塊茎形成初期過程に発現する可溶性PKPIと成熟塊茎中に存在する不溶性PKPIが同一分子種であるか否かを調べるために、全アミノ酸配列を分析した。塊茎形成初期過程の可溶性と成熟塊茎中の不溶性のPKPI（即ち抗体と反応するPKPIタンパク質の6割を示したタンパク質）の全アミノ酸配列を比較したところ、両者の相同性は100%であった。また、これらとpT1遺伝子から予測されたアミノ酸配列とは85%の相同性を示し、ジスルフィド結合に関与するシステインの位置が異なっているので、これらのタンパク質のフォルディング、つまり3次構造が異なる可能性がある。PKPIのアミノ酸配列からこのタンパク質のpIは4.36であると計算され、高いpHでこのタンパク質が可溶化する結果と一致していた。これらの結果から塊茎形成初期過程に発現する可溶

性PKPIと成熟塊茎中のPKPIは同一タンパク質であり、それらの可溶化は細胞内の環境、その他の要因によって異なっていると結論した。

(3) 細胞内局在性：PKPIのアミノ酸配列にはpT1から予測される最初の42個のアミノ酸配列が失われている。これらは小胞体と液胞に導入されるための22個と20個のアミノ酸のシグナル・ペプチドであり、PKPIにはこれらが含まれていないため、このタンパク質は液胞に存在すると予想される。PKPIに反応する抗体とIgG分子に特異的に結合するプロテインA・ゴールドを用いて免疫染色を行ない、金粒子染色が観察されたのは細胞質、液胞内、及び液胞内のプロテイン・アグリゲートであった。塊茎形成初期過程の細胞質の免疫染色密度は成熟塊茎の細胞質の5倍であった。プロテイン・アグリゲート以外の液胞内の免疫染色密度にはそれほど差は見られなかった。プロテイン・アグリゲートの染色密度は最も高く、塊茎形成初期から成熟塊茎へと生育するに従いその値は1.5倍に増加した。この結果から塊茎が成熟するにつれて生成するPKPIの不溶化はアグリゲートの密度の増加と直接関係していると結論した。

(4) アグリゲートの形成：プロテイン・アグリゲートがin vivoでどのようにして形成されるかについて検討した。可溶性PKPIは、低いpHでは沈殿率が高く、逆に高いpHでは沈殿率は低い。高濃度NaClはほとんどPKPIの沈殿を誘導しないが、CaCl₂はPKPIの沈殿率に影響した。特に低いpHと高CaCl₂濃度で、最大約85%のPKPIの沈殿を回収した。

(5) PA40の精製：次に、in vivoの組織で観察される細胞中のプロテイン・アグリゲートを精製した。不溶性分画を遠心により沈殿させ、これをスクローズ密度勾配遠心分離し、タンパク質を3つのピークに分画した。これらの各フラクションのトリプシン阻害活性を量ったところ、真ん中のピークに高い活性が見られ、このピークのタンパク質に抗体との反応があった。また、このピークには20 kDaのPKPI以外に40 kDaのタンパク質がかなりの量を占めていた。このタンパク質のN-末端のアミノ酸を解析し、動物のT-細胞レセプターの一部と高い相同性があった。これは新たなタンパク質で、PA40と名付けた。PA40の発現を調べるため、プロテイン・アグリゲートの全タンパク質に対する抗体を作成し、ウエスタンブロットを行った。その結果、PA40タンパク質は塊茎形成過程の肥大期で初めて強く確認できるもので、PKPIとPA40を混合し、pH 4と30 mM CaCl₂の条件下で最高の85%の沈殿率が得られた。PKPIの沈殿と塊茎に存在するPKPIのアグリゲートを比較すると、PA40存在下で生じたプロテイン・アグリゲートの方がin vivoと著しく類似していた。従って、PA40はin vivoでPKPIアグリゲートの安定性に関与していると思われる。

これらの結果からPKPIの細胞内蓄積と可溶化の現象を一つのモデルにまとめた。PKPIは液胞の低いpHで集積が誘導され、PA40や他のタンパクと結合し、不溶性の状態で安定性が保たれると考えられる。更に、野鼠や幼虫の消化器官のpHは通常高いため、これらの中でPKPが可溶化、活性化が出来るので、塊茎内でPKPIが不溶化していても防御物質としての機能には影響ないと考察される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜久田 嘉 郎

副 査 教 授 生 越 明

副 査 教 授 上 田 一 郎

学 位 論 文 題 名

Studies on the accumulation of a Kunitz - type proteinase inhibitor present in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.)

(ジャガイモ塊茎のクニッツ型プロテイナーゼ・インヒビターの
蓄積に関する研究)

本論文は、図23、表16、引用文献114編、総ページ数126頁からなり、8章をもって構成される。その他5編の参考論文を添えている。

遺伝子組換えの技術が発達すると共に貯蔵や防御機能を持つタンパク質性のプロテイナーゼ・インヒビター遺伝子に多くの注目が集まっている。著者は馬鈴薯「品種ダンシャクイモ」の塊茎形成初期過程に発現するクニッツ型プロテイナーゼ・インヒビター（以下PKPIと略す）の一つの遺伝子pT1を分離精製し、これを発現ベクターにクローニングした。更に大腸菌で発現したPKPIに対する抗体を作成しPKPIの発現を解析した。このPKPIは他の分子と異なり、成熟塊茎の可溶性分画には存在しないという結果を得ている。本研究は馬鈴薯塊茎に発現したPKPIの細胞内蓄積を明らかにすることを主な目的としている。

成熟塊茎の可溶性タンパク質と作成した抗体の反応は全く検出できなかったが、尿素で可溶化した全タンパク質中にはPKPIが存在し、可溶性のPKPIと同じ20,000の分子量を持っていた。更に、高いpHでPKPIが可溶化されることを明らかにした。

塊茎形成初期過程に発現する可溶性PKPIと成熟塊茎中に存在する不溶性PKPIが同一分子種であるか否かを調べるために、全アミノ酸配列を分析した。塊茎形成初期過程の可溶性と成熟塊茎中の不溶性のPKPI（即ち抗体と反応するPKPIタンパク質の6割を示したタンパク質）の全アミノ酸配列を比較したところ、両者の相同性は100%であった。また、これらとpT1遺伝子から予測されたアミノ酸配列とは85%の相同性を示し、ジスルフィド結合に関与するシステインの位置が異なっているため、これらのタンパク質のフォルディング、つまり3次構造が異なる可能性がある。PKPIのアミノ酸配列からこのタンパク質のpIは4.36であると計算され、高いpHでこのタンパク質が可溶化する結果と一致していた。

PKPIのアミノ酸配列にはpT1から予測される最初の42個のアミノ酸配列が失われている。これらは小胞体と液胞に導入されるための22個と20個のアミノ酸のシグナル・ペプチドであり、PKPIにはこれらが含まれていないため、このタンパク質は液胞に存在すると予想される。PKPIに反応する抗体とIgG分子に特異的に結合するプロテインA-ゴールドを用いた免疫染色の結果、金粒子染色が観察されたのは細胞質、液胞内、及び液胞内のプロテイン・アグリゲートであった。塊茎形成初期過程の細胞質の免疫染色密度は成熟塊茎の細胞質の5倍であった。プロテイン・アグリゲートの染色密度は最も高く、塊茎形成初期から成熟塊茎へと生育するに従いその値は1.5倍に増加した。この結果から塊茎が成熟するにつれて生成するPKPIの不溶化はアグリゲートの密度の増加と直接関係していると結論した。

プロテイン・アグリゲートがin vivoでどのようにして形成されるかについて検討した。PKPIは、低いpHでは沈殿率が高く、逆に高いpHでは、可溶性である。高濃度NaClはPKPIの沈殿を誘導しないが、CaCl₂はPKPIの沈殿率に影響した。特に低いpHと高CaCl₂濃度で、最大約85%のPKPIの沈殿を回収した。

次に、in vivoの組織で観察される細胞中のプロテイン・アグリゲートを精製した。不溶性分画をスクロース密度勾配遠心で分離し、タンパク質を3つのピークに分画した。このうち一分画にトリプシン阻害活性、抗体との反応があった。また、この分画には20 kDaのPKPI以外に40 kDaのタンパク質がかなりの量を占めていた。このタンパク質のN-末端のアミノ酸を解析したところ、動物のT-細胞レセプターの一部と高い相同性があった。これは新たなタンパク質で、PA40と名付けた。PA40の発現を調べるため、プロテイン・アグリゲートの全タンパク質に対する抗体を作成し、ウエスタンブロットを行った。その結果、PA40タンパク質は塊茎形成過程の肥大期で初めて強く確認できるもので、PKPIとPA40を混合し、pH 4と30 mM CaCl₂の条件下で最高の85%の沈殿率が得られた。PKPIの沈殿と塊茎に存在するPKPIのアグリゲートを比較すると、PA40存在下で生じたプロテイン・アグリゲートの方がin vivoと著しく類似していた。従って、PA40はin vivoでPKPIアグリゲートの安定性に関与していると思われる。

これらの結果からPKPIの細胞内蓄積と可溶化の現象を一つのモデルにまとめた。PKPIは液胞の低いpHで集積が誘導され、PA40や他のタンパクと結合し、不溶性の状態で安定性が保たれると考えられる。更に、野鼠や幼虫の消化器官のpHは通常高いため、これらの中でPKPIが可溶化、活性化が出来るので、塊茎内でPKPIが不溶化していても防御物質としての機能には影響ないと考察される。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者三森クリスティーナは博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。