



Title	Studies on a redox protein and an oxidereductase involved in fermentative metabolism of the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus</i> sp. strain KOD1
Author(s)	Masood, Ahmed Siddiqui
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40643
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	マスード アハメド シディキ Masood Ahmed Siddiqui
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 13876 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Studies on a redox protein and an oxidereductase involved in fermentative metabolism of the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus</i> sp. strain KOD 1 (超好熱菌 <i>Pyrococcus</i> sp. KOD 1 株の嫌気的醸酵に関するレドックス蛋白質フェレドキシン及び酸化還元酵素に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 室岡 義勝
	(副査) 教授 山田 靖宙 教授 小林 昭雄 教授 塩谷 捨明 教授 関 達治 教授 金谷 茂則 教授 ト部 格 教授 原島 俊 教授 菅 健一 教授 吉田 敏臣 教授 二井 将光

論文内容の要旨

超好熱菌 (Hyperthermophilic archaea) は、その生育環境の特殊性や系統解析から、原始生命体に最も近い生物の一つと考えられている。本研究は最も原始的なレドックス蛋白質の特徴を明確にするため、フェレドキシン (FRD) とインドールピルビン酸酸化還元酵素 (IOR) に注目し、その遺伝子構造、蛋白質の性質について検討している。本論文は5章からなり、その内容は以下のとおりである。

第1章ではこれまでの研究で蓄積された超好熱菌 *Pyrococcus* sp. KOD 1 株の特殊な遺伝子構造、酵素の興味深い反応特性の概略を述べ、本研究を行なうに至った経緯を説明している。

第2章では超好熱菌のフェレドキシンを用いた系統解析を試みている。KOD 1 株からフェレドキシン遺伝子をクローニングし、その遺伝子構造を明らかにしている。得られた配列を用いて系統樹を作成したところ、細菌、始原菌を問わず、超好熱菌のフェレドキシンが系統上、顕著な近縁性があることが示されている。この分岐パターンは 16S rRNA に基づき構築されたユニバーサルな系統樹とは異なることが明らかにされている。

第3章ではインドールピルビン酸酸化還元酵素 (IOR) に注目し、遺伝子の取得を行ない塩基配列を決定している。IOR の α , β サブユニットをコードする遺伝子 (*iorA*, *iorB*) はクラスターを形成し、特に α サブユニットは様々な種類の酸化還元酵素の部分配列がモザイク状に混在していることから、生物進化の過程で遺伝子シャッフリングを経ていることが予想されている。*iorA*, *iorB* を大腸菌内で発現させると、70°Cを最適温度とする活性型 IOR が確認され、各サブユニット蛋白質が活性型構造 ($\alpha_2\beta_2$) にアセンブリーしていることが示されている。

第4章では高温環境下で耐熱性レドックス蛋白質の構造成熟について研究している。円偏光二色性 (CD) 解析法により組換えフェレドキシンの構造を天然型フェレドキシンと比較したところ、両者で構造上の違いが認められたが、熱処理により、組換え型構造は天然型構造に近似変換されることが示されている。次に IOR の 2 種類のサブユニットを大腸菌で発現し、それぞれを組換え蛋白質として取得している。両者は単独では酵素活性を示さないが、共存状態で熱処理を行うことで活性型構造 ($\alpha_2\beta_2$) へアセンブリーすることが示されている。一方、各サブユニットを熱処理後、混合して再び熱処理しても活性型構造への変換は見られない。以上の結果から耐熱性蛋白質の構造成熟における高温環境の重要性が示されている。

第5章では得られた知見を要約するとともにレドックス蛋白質の熱処理による構造の成熟機構について考察している。

論文審査の結果の要旨

超好熱菌は最も原始的な生物のひとつと考えられているが、その代謝経路は不明な点が多い。本研究では他生物の代謝経路で多数確認されているレドックス蛋白質の中から、フェレドキシン (FRD) とインドールピルビン酸酸化還元酵素 (IOR) に注目し、その遺伝子構造、蛋白質の性質について検討したものである。また、高温環境がこれら蛋白質の構造熟成にどのように関与しているのか明らかにしている。主な成果は以下のとおりである。

- (1) フェレドキシンを用いた系統解析を試みたところ、超好熱菌のフェレドキシンは細菌、始原菌を問わず、顕著な近縁性が示され、その分岐パターンは16S rRNA に基づき構築されたユニバーサルな系統樹とは異なっていることを明らかにしている。
- (2) IOR の遺伝子構造を解析し、既知の配列と比較することで超好熱菌の2-オキソ酸の酸化還元酵素は他の酸化還元酵素の部分配列がモザイク状に混在していることを示している。
- (3) 高温環境下で組換えフェレドキシンの構造が天然型フェレドキシンの構造に近似変換されることを示し、フェレドキシンが熱により構造成熟することを明らかにしている。また、次に IOR の2種類のサブユニット、 α 、 β が熱処理により活性型構造 ($\alpha_2\beta_2$) へ、アセンブリーすることを *in vitro* の実験により証明している。以上の結果から、耐熱性蛋白質が適切な高次構造を形成する上で高温環境が重要な役割を果たしていることを明らかにしている。

以上のように、本論文において超好熱菌のレドックス蛋白質の遺伝子構造の特徴及び蛋白質が高温環境において構造成熟することが明らかにされた。本研究は超好熱菌の進化系統における位置付けを明確にするとともに、耐熱性蛋白質の性質を知る興味深い知見を提供するものとして高く評価される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。