



Title	Analysis of the intermolecular electron transfer reaction between plant ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes
Author(s)	明石, 哲行
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41593
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	あか 明 石 哲 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 8 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 6 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科 生物化学専攻
学 位 論 文 名	Analysis of the intermolecular electron transfer reaction between plant ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes. (植物フェレドキシンとフェレドキシン依存性酵素の分子間電子伝 達反応の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 長谷 俊治 (副査) 教 授 福山 恵一 教 授 倉光 成紀

論 文 内 容 の 要 旨

高等植物は、葉緑体で吸収される光エネルギーを還元力に変換し、 CO_2 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 等の無機物を同化する。葉緑体内の電子運搬体であるフェレドキシン (Fd) は、酸化還元中心として $[\text{2Fe-2S}]$ クラスターを保有する小さな酸性蛋白質である。Fd は、光化学系 I から由来する電子を、無機物同化代謝系に関与する Fd-NADP⁺還元酵素 (FNR)、亜硫酸還元酵素 (SiR)、亜硝酸還元酵素、グルタミン酸合成酵素などといった複数の蛋白質へ電子を分配するという重要な役割を担っている。Fd とこれらの酵素とは効率の良い電子伝達が可能となるような蛋白質-蛋白質複合体を形成され、その後、両蛋白質の補欠分子族間の電位差によって生じる駆動力で電子の授受が行われると考えられている。

Fd と Fd 依存性酵素との分子認識機構を解明するために、保存性の高い 8 領域の酸性アミノ酸残基 (D27, E30, D58, D61, D66/D67, E71/E72, D85, E93) のカルボキシル基をそれぞれ部位特異的変異法によりアミド基置換した改変体を作製した。これらの分子の分光学的性質は、野性型と変わらず、置換による主鎖の構造変化は観察されなかった。また、酸化還元電位を測定したところ、E93Q を除く全ての分子種は野性型の -321 mV と大差なかった。これらの分子種を電子供与体としたときの 2 つの Fd 依存性酵素 (FNR と SiR) の活性を測定したところ、特に D66N/D67N と E93Q による反応は顕著に変化していた。さらに興味深いことに、FNR に対しては D66N/D67N の方が E93Q よりも大きく活性が減少していたが、一方、SiR に対してはこの関係は逆転していた。ゲル濾過や Fd-または SiR-アフィニティーのクロマトグラフィー法によりこれらの改変体と 2 つの酵素との複合体形成能を評価した結果、D66/D67 の酸性領域 FNR との結合に不可欠であり、一方、E93 の酸性残基は SiR と結合する上で重要であることが明らかになった。このことは、Fd における両酵素との結合領域が少なくとも一部異なることが示唆された。

上述の実験での E93Q の電位は野性型に比べ 67 mV ほど高くなっており、これが酵素活性の低下の一つの要因と考えられた。そこで次に、E93 と同様に Fd の鉄硫黄クラスター近傍の保存性の高い 46 番目の Ser に着目し、部位特異的変異の導入により Asn, His, Ala, Gly に置換した分子 (S46N, S46H, S46A, S46G) を作製した。これらの分子の分光学的性質は、野性型と変わらなかったにもかかわらず、各々の電位を測定したところ、S46H, S46A, S46G の電位は、野生型に比べて高くなっていた。特に、S46G の電位は約 180 mV も上昇していた。SiR の酵素活性を測定した

結果、これらの分子種はいずれも、電位の上昇に伴い活性が低下しており、S46G に至っては、殆ど活性は見られなかった。パルスラジオリシス法により単発の電子移動速度を測定したところ、同様に [2Fe-2S] クラスターの電位の上昇に伴い、移動速度の低下が観察された。また、これらの反応速度定数は、6 電子酸化還元を行う SiR 酵素反応の比活性と相関関係がみられた。このことは、Fd を電子供与体とする SiR の酵素反応において、Fd から SiR への電子の伝達過程が律速反応となっていることを示唆していた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、光合成電子キャリアー蛋白質であるフェレドキシン (Fd) の部位特異的改変体を系統的に作製し、Fd と Fd-NADP⁺ 還元酵素や亜硫酸還元酵素との相互作用領域や Fd の [2Fe-2S] クラスターの酸化還元電位を規定している構造要因を明らかにしたものである。これは Fd と Fd 依存性酵素との分子間電子伝達の反応機構に新知見を与えたものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認められる。