

Title	Analyses of Interaction of Plant Ferredoxin : NADP+ Oxidoreductase with Ferredoxin : Molecular Recognition of Photosynthetic and Nonphotosynthetic Isoenzymes and Biosynthetic Process for Acquiring the Interaction Ability
Author(s)	恩田, 弥生
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41933">https://hdl.handle.net/11094/41933</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"＞</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜/a＞</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	おん だ や よい 恩 田 弥 生
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 5 1 7 6 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Analyses of Interaction of Plant Ferredoxin : NADP <sup>+</sup> Oxidoreductase with Ferredoxin : Molecular Recognition of Pho- tosynthetic and Nonphotosynthetic Isoenzymes and Biosynthetic Process for Acquiring the Interaction Ability (植物フェレドキシン : NADP <sup>+</sup> 酸化還元酵素のフェレドキシンとの 相互作用の解析 : 光合成および非光合成型イソ酵素の分子認識と相互 作用能力獲得の生合成過程)
論文審査委員	(主査) 教 授 長谷 俊治  (副査) 教 授 後藤 祐児    教 授 福山 恵一    助教授 楠木 正巳

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (i) 序論

高等植物のフェレドキシン (Fd) -NADP<sup>+</sup> 酸化還元酵素 (FNR) は FAD を非共有結合的に有するフラボ蛋白質である。FNR は Fd と静電的相互作用により 1 : 1 の複合体を形成し、葉緑体においては光化学系で生じた電子を Fd を介して受け取って NADP<sup>+</sup> を還元し、物質同化に必要な還元力である NADPH を生成する。FNR の生合成過程については、サイトゾルで前駆体として合成された後、葉緑体に輸送されることが明らかにされている。しかし、一連の生合成過程のどの段階で FNR が Fd との相互作用能をもつ分子種に変換されるのかについては不明である。

葉緑体は光合成器官にのみ存在するプラスチドであるが、非光合成器官である根には他のプラスチドが存在する。いずれのプラスチドも無機物同化反応に関与する酵素群を有し、直接の還元力供給源として Fd を用いる。光還元力を利用できない根プラスチドではペントースリン酸回路で生じた NADPH を用いて Fd を還元し、Fd 依存性蛋白質に電子を供給すると考えられている。この電子伝達カスケードには FNR が関与することが示唆されており、この際は光合成系と逆の反応を触媒する。これまでに、FNR、Fd とともにイソ蛋白質の存在が報告されている。それぞれ光合成型、非光合成型のサブグループに分かれることが判明しており、プラスチドに特異的な両分子種の組合せが生理的な反応を駆動するのに重要ではないかと推定される。

本研究ではトウモロコシを材料に FNR と Fd との相互作用に着目し、(I) 光合成、非光合成器官特異的組合せの観点からの両 FNR イソ酵素の機能特性、および、(II) 葉緑体における機能分子種への変換過程を明らかにすることを目的とした。

#### (ii) トウモロコシ芽生えにおける FNR イソ酵素の器官特異的分布

Leaf- (L-) FNR および Root- (R-) FNR について、組み換え蛋白質を大量発現可能な系を構築し、精製標品を得た。L-FNR および R-FNR を特異的に認識する抗体を作製し、両 FNR 蛋白質について植物体での器官分布を解析したところ、L-FNR および R-FNR はそれぞれ葉および根特異的に発現していた。プラスチド内の分布は、L-FNR は葉緑体内でチラコイド膜画分に局在するのに対し、R-FNR は根プラスチド内でストロマ画分に局在することが示された。さらに、エチオプラストでは両 FNR が確認された。

#### (iii) 酵素反応学的特性および蛋白質間相互作用における L-FNR および R-FNR の比較解析

精製蛋白質を用いて NADPH に対する親和性をジアフッラーゼ活性により測定したところ、R-FNR は L-FNR と比較して10倍小さい *K<sub>m</sub>* を示した。還元力として NADPH を、電子受容体として光合成型 (Fd I) および非光合

成型 (FdⅢ) Fd イソ蛋白質を用いてシトクロム *c* 還元活性を測定したところ、両者の  $K_m$  は R-FNR で顕著な相違を示し、FdⅢに対して  $K_m 3 \mu M$ 、Fd I に対しては  $K_m 29 \mu M$  であった。FNR : Fd の静電的相互作用による複合体の解離定数においても、R-FNR : FdⅢは R-FNR : Fd I よりも10倍小さい  $K_d (3 \mu M)$  を示し、この相違は Fd をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによっても確認された。一方、L-FNR は、両 Fd アイソザイムに対し同様の  $K_m$  および  $K_d$  を示した。シトクロム *c* 還元活性での触媒活性 ( $K_{cat}/K_m$ ) は、R-FNR の方が L-FNR と比較して3倍高かった。L-FNR は Fd I および FdⅢに対して同様の触媒活性を示す一方 (Fd I :  $37 \mu M^{-1}s^{-1}$ 、FdⅢ :  $39 \mu M^{-1}s^{-1}$ )、R-FNR は FdⅢ ( $130 \mu M^{-1}s^{-1}$ ) に対してのほうが Fd I ( $13 \mu M^{-1}s^{-1}$ ) と比較して10倍高い触媒活性を示した。

Fd と相互作用する部位として L-FNR の Lys89 および Lys91 が示唆されている。興味深いことに、R-FNR ではそれぞれ Ala および Asn に置換されており、他の生物種由来の L-FNR および R-FNR においても同様である。R-FNR の生化学的特性における、Ala86 および Asn89 の役割を明らかにすることを目的として、部位特異的変異導入法により A86K/N89K R-FNR 変異体を作製し、Fd I および FdⅢとの電子伝達反応および相互作用を解析した。その結果、野生型 R-FNR とは対照的に、A86K/N89K R-FNR は Fd I に対する  $K_m$  が  $3.4 \mu M$  まで減少した。

以上の結果より、R-FNR は Fd アイソザイムを識別する性質を持ち、Fd I に対する弱い相互作用は Ala86 および Asn89 によることが示され、一方、R-FNR が FdⅢ特異的に示す強い相互作用は、非光合成器官のプラスチドにおいて NADPH 依存的に Fd を還元し Fd 依存性の無機物同化酵素へ還元力を供給する上で重要であることが示唆された。

(iv) 葉緑体内における、Fd との相互作用能力を持つ FNR 分子種への変換過程の解析 : FAD アセンブリーおよびチラコイド膜結合

L-FNR の Fd との相互作用能をもつ分子種への変換過程について、単離葉緑体への蛋白質輸送実験系を用いて解析した。FNR 蛋白質を熱変性後、FAD 存在下、非存在下において再構成することにより、FAD を保持するホロ型 FNR および保持しないアポ型 FNR を作製した。Fd をリガンドして結合させた Sepharose 樹脂を用い、ホロ型およびアポ型 FNR 分子について Fd への結合を比較解析した結果、ホロ型分子のみが Fd-resin と有意に結合し、Fd との結合能はホロ型分子種の同定に役立つことを確認した。

in vitro で合成した前駆体 FNR 分子について単離葉緑体への輸送実験を行い、葉緑体内でのホロ型分子への変換過程を解析したところ、前駆体分子は葉緑体内で成熟体サイズにプロセッシングされた後、Fd との結合能を有するホロ型分子へと変換された。このホロ型分子は葉緑体内でチラコイド膜へと結合し、この過程は時間および温度依存的であった。さらに、FAD アセンブリーに重要であることが示唆される Tyr95 を Ala に改変した変異体 FNR 分子についてチラコイド膜への結合過程を比較解析したところ、野生型分子に比べ顕著に遅延した。以上の結果より、FNR は葉緑体内において成熟体サイズ分子にプロセッシングされた後ホロ型分子へと変換されること、そしてこのホロ型分子への変換過程は FNR がチラコイド膜へと結合するのに必要であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

恩田弥生君は、高等植物の葉緑体や根プラスチドに存在するフェレドキシン (Fd) : NADP<sup>+</sup> 還元酵素 (FNR) に着目し、葉緑体と根プラスチドに特異的に分布する葉型 (L-FNR) と根型 (R-FNR) アイソザイムの存在を同定し、それぞれ膜結合と可溶性酵素であり、また黄化葉エチオプラストには両者が共存していることを見出した。そして、これらアイソザイムの生理活性を、Fd との分子間相互作用の観点から詳細に解析し、R-FNR は光合成型 Fd と非光合成型 Fd に顕著な親和性の差異を示すこと及びその構造要因を明らかにし、プラスチドの酸化還元代謝反応の駆動力となる NADPH/FNR/Fd の電子伝達カスケードの成り立ちの分子基盤を確立した。また、葉緑体内で FNR ポリペプチド鎖に補欠分子族 FAD が挿入し、Fd との親和性の獲得とチラコイド膜への結合の解析を行い、これまで未知であった FNR の生合成過程の一部を明らかにした。これらの業績は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。