The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Conformational properties of ferredoxin-NADP+ reductase
Author(s)	前田, 正洋
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44057
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　前田正洋（まえだ まさひろ）

博士の専攻分野の名称　博　士（理　学）

学位記番号　第　17549　号

学位授与年月日　平成15年3月25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　Conformational properties of ferredoxin-NADP$^+$ reductase
（フェレドキシン-NADP$^+$ 還元酵素の立体構造特性）

論文審査委員　（主査）
教　授　後藤　祐児

（副査）
教　授　阿久津秀雄　　教　授　長谷　俊治

論文内容の要旨

蛋白質は、特異的な立体構造に折り畳まれ、固有の機能を発揮する。これまで折り畳み反応や溶液構造の研究対象は、単純な小さい蛋白質や一つの構造ドメインを主として進められてきた。しかしながら天然に広く存在する、より大きな蛋白質も対象とすることが必要である。本研究では、二つの構造ドメインを有するフラビン酵素のフェレドキシン-NADP$^+$ 還元酵素（FNR）を材料として、立体構造の安定性と構造機能相関を、各種分光法を用いて解析した。

トウモロコシ・葉由来の FNR は、光化学系 I からのフェレドキシンを介した NADPH の光還元反応を触媒する。分子中央にフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）を非共有結合的に結合しており、FAD 結合ドメインと NADP$^+$ 結合ドメインからなる分子量 35000 の酸化還元酵素である。

FAD が解離したアポ FNR を作製し、その立体構造の特徴を円二色性、X線小角散乱から得た。二次構造および三次構造はホロ FNR の半分程度崩壊しており、分子の球状性も失って膨潤していたが、完全変性したランダムコイル状態ほど膨張していなかった。アポ FNR の部分的な構造崩壊は、FAD の解離と協同的に起こり、また FAD 非結合型の組換え酵素として発現する Y95A-FNR においても、アポ FNR に類似した構造的特徴が得られたことから、FAD の結合が FNR の立体構造維持に必須であることが示唆された。また NADP$^+$ 結合蛋白質を特異的に結合するアフィニティークロマトグラフィーの結果から、残存構造は NADP$^+$ 結合領域付近に存在することが示唆された。FAD が除去された FNR の立体構造は、従来の蛋白質の折れ畳み反応において提唱されている、二状態転移モデルやモルテングロビュール状態とも異なり、ドメイン単位で偏った立体構造を保持する興味深い構造状態である。

FNR の微視的な構造情報を得るため、核磁気共鳴法（NMR）を適用した。高分子量蛋白質の解析に適した種々の手法を組み合わせて多次元 NMR スペクトルを測定し、主鎖アミドプロトンの帰属を行ったところ、炭素核の化学シフトの値から見積もった二次構造領域は結晶構造と近似していた。次に基質フェレドキシンによる、FNR の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルの変化を解析した。フェレドキシンの結合によって大きな摂動を受けた部位は、結晶構造から決定された結合界面領域と一致した。他方の基質 NADP$^+$ の結合は、NADP$^+$ のアデノシン 2' 位のリン酸基が FNR との結合に重要であり、FNR の C 末端領域に、NADP$^+$ のニコチンアミド基が貫入していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

蛋白質は、特異的な立体構造に折り畳まれ、固有の機能を発揮する。種々の生命体のゲノムが解読される一方、蛋白質の立体構造形成過程や構造機能相関は十分に解明されておらず、これを研究することが必要である。

本論文では、分子量 35000 で二つの構造ドメインを有するフラビン酵素であるフェレドキシン-$NADP^+$ 還元酵素（FNR）を材料として、その立体構造の安定性と構造機能相関を、円二色性、蛍光、X 線溶液散乱、核磁気共鳴などの各種分光法を用いて解析した。その結果、補酵素である FAD が解離したアポ FNR は、FAD 結合ドメインは大きく崩れているが、$NADP^+$ 結合ドメインは立体構造と $NADP^+$ 結合能力を保持しており、FNR の構造形成がドメイン単位でおきることを示した。つぎに、核磁気共鳴を用いて、溶液中における FNR と基質であるフェレドキシンや $NADP^+$ との相互作用の分子機構を原子レベルで示した。

これまで折り畳み反応や溶液構造の研究は小さい蛋白質を中心に進められてきており、FNR のような比較的大きな蛋白質の溶液中での構造機能相関に関する詳細な研究は少ない。本論文は蛋白質の立体構造安定性と構造機能相関の分子機構に新たな知見を与えるものであり、博士（理学）の学位論文として、十分価値のあるものと認める。