



Title	シアノバクテリアに由来するフェレドキシン依存性酵素の研究ーイソプレノイド及びフィコビルン生合成系の酵素について
Author(s)	岡田, 健
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46429">https://hdl.handle.net/11094/46429</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">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="#"></a> 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	岡 田 健
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 19734 号
学位授与年月日	平成 17 年 6 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	シアノバクテリアに由来するフェレドキシン依存性酵素の研究—イソプレノイド及びフィコビルン生合成系の酵素について
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 俊治 (副査) 教授 滝澤 温彦 教授 福山 恵一

#### 論文内容の要旨

酸素発生型光合成生物・シアノバクテリアに存在するフェレドキシン (Fd) は、光化学系 I からの光還元力を Fd 依存性酵素へ伝達する電子キャリア蛋白質である。本研究では、好熱性シアノバクテリア・*T. elongatus* BP-1 のゲノム情報をもとに大腸菌発現系により組換え体を調製し、Fd と Fd 依存性酵素である ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR)、heme oxygenase 1 (HO1)、phycocyanobilin : ferredoxin oxidoreductase 及び (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) 間に見出されるタンパク質間相互作用を主なキーワードとして、その電子伝達及び酵素機能の解明をめざして研究を遂行した。

最近、熱帯熱マラリア原虫のゲノム解析が終了し、熱帯熱マラリア原虫のアピコプラストに局在する Fd と FNR に相同性のある遺伝子群の存在が明らかになった。しかし、ゲノム解析が終了しているにもかかわらず Fd からの還元力によって酵素反応を駆動する Fd 依存性酵素がまだ同定されていない。このことから、酸素発生型光合成生物において同定されていない Fd 依存性酵素が存在しているのではないかと考えるに至った。そこで *T. elongatus* BP-1 に存在する遺伝子から bacterial two-hybrid system を用いて、Fd と相互作用する新規タンパク質の探索を行った。その結果、イソプレノイド生合成系のメチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路に関与している GcpE と Fd が強力に相互作用することを突き止めた。GcpE は、最近の研究で MEcPP を HMBPP へ転換する酵素であり、[4Fe-4S] 型鉄・硫黄クラスターが酵素活性に必要であると報告されている。GcpE の MEcPP から HMBPP への転換には 2 電子の供給が必要であり、真正細菌においては、フラボドキシンがその電子供与体であると考えられている。しかし、酸素発生型光合成生物の多くとアピコンプレクサ門に属する原虫類においては、フラボドキシンがゲノム中に存在しておらず GcpE への電子供与体が確認されていなかった。本研究において Fd と GcpE が効率的なレドックス・パートナーであるという証拠をはじめ報告する。MEP 経路は、病原性バクテリア及び、熱帯熱マラリア原虫・アピコプラストなどのプラスチドに存在しているが、人間の生合成経路としては存在しておらず、創薬の分子標的として注目されている生合成経路の 1 つである。

さらに、本研究でフィコビルン生合成系についてもいくつかの重要な知見を報告する。PcyA は、Fd からの還元力に依存して biliverdin IX $\alpha$  (BV IX $\alpha$ ) から phycobilin chromophore となる phycocyanobilin (PCB) を合成する Fd 依存性ビルン還元酵素である。本研究では、PcyA を発現・精製し、HPLC 分析によって反応産物とその中間体を

同定した。さらに、ヘムから BV IX $\alpha$  を合成する HO1 を発現・精製し、PcyA と共存させフィコビルン生合成系を *in vitro* で再構築した。その結果、ヘム (hemin) を PCB へ転換させることに成功した。また、表面プラズモン共鳴を用いて FNR、HO1 及び PcyA の Fd に対するタンパク質間相互作用を精査し、解離定数 ( $K_d$ ) を算出した。HO1-PetF 及び PcyA-PetF 複合体を架橋して、その分子量を推定した。その結果、HO1 及び PcyA が共に PetF と 1 対 2 (PetF) で相互作用することを示していた。Fd は、Fd 依存性酵素へ 1 電子しか伝達できないが、HO1 は 7 電子、PcyA は 4 電子の供給が必要である。本研究において Fd が、多電子の供給系に対して複数で電子供与している可能性を報告する。

#### 論文審査の結果の要旨

学位申請者は、シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 を研究材料にして、電子伝達蛋白質であるフェレドキシン (Fd) と Fd 依存性酵素である Fd : NADP<sup>+</sup> reductase (FNR)、heme oxygenase 1 (HO-1)、phycocyanobilin : Fd oxidoreductase (PcyA)、および (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) との相互作用と反応機構を解明することを目的に、これら酵素・蛋白質の大腸菌組換え体を用いて、生化学的アプローチで研究を行った。

GcpE はイソプレノイド生合成系の非メバロン酸経路の 2-*C*-methyl-D-erythritol cyclodiphosphate を (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate に変換する酵素である。GcpE を大腸菌の two hybrid 系を用いて Fd と相互作用する蛋白質として同定し、本酵素が 1) [4Fe-4S] クラスターをもつ鉄硫黄蛋白質であること、2) Fd と蛋白質・蛋白質相互作用すること、3) NADPH/FNR/Fd の電子供与系により [4Fe-4S] クラスターが還元されることを示し、GcpE が Fd 依存性酵素であることを新たに見出した。HO-1 と PcyA の精製標品を調製し、Fd から供与される還元力を用いて、HO-1 はヘミンをビリベルジン IX $\alpha$  へ、PcyA はビリベルジン IX $\alpha$  からフィコシアノビルンへ、および両酵素が共存するとヘミンからフィコシアノビルンまで一気に効率良く変換することを示した。そして、FNR、HO-1 および PcyA の各々と Fd との分子間相互作用を、表面プラズモン共鳴法、ゲルシフトアッセイ法、および化学架橋実験法で解析し、それらの相互作用様式を詳しく比較・考察した。これら結果は、シアノバクテリアにおけるイソプレノイドおよびフィコビルン生合成系のフェレドキシン依存性酵素の特性について新たな分子レベルの知見を加えるものである。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。