Osaka University Knowledge Archive

Title	フェレドキシンと亜硝酸還元酵素を中心とした酸化還元酵素との分子間相互作用に関する生化学的、構造生物学的研究
Author(s)	榊原, 由紀子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59443
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【52】

氏　　名	榊（さかき）　原（ばら）　由紀子（ゆきこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理学）
学　位　記　番　号	第　２５２１４　号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 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	**フェレドキシンと亜硝酸還元酵素を中心とした酸化還元酵素との分子間相互作用に関する生化学的、構造生物学的研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　長谷　俊治 （副査） 教　授　栗栖　源嗣　　准教授　池上　貴久

論　文　内　容　の　要　旨

１．研究の背景と目的

フェレドキシン（Fd）は補欠分子族として[2Fe-2S]クラスターを保持した分子量約 12 kDa の蛋白質で、非常に低い酸化還元電位をもつ（-480 ~ -330 mV）。還元された Fd は、ストロマ中を拡散移動しながら Fd-$NADP^+$還元酵素(FNR)を介して $NADP^+$を光還元し、NADPH を生産する。NADPH は無機物同化の為の還元力として利用される。Fd は FNR 以外の様々な酸化還元酵素の電子供与体としても働いており、これらの酵素と相互作用し、複合体を形成することで反応中心である鉄硫黄クラスターより電子を供与する。このようにして、Fd が一連の Fd 依存酵素との複合体の会合・解離の両方の過程を効率よく行うことで速やかに電子の授受がおこり、窒素同化や硫黄同化などを行うことができる。Fd は以上のように電子伝達反応において光合成を制御する極めて重要な蛋白質であり、細胞構築の基本原理である物質同化の特徴を理解する上で、Fd と Fd 依存酵素群との複合体構造を原子レベルで観ることが必須であると考えられる。

これまで様々な光合成生物に存在する単体 Fd の立体構造が決定されているが、今日まで Fd と Fd 依存酵素との相互作用が原子レベルで解明されたものは Fd-FNR、Fd-亜硫酸還元酵素（SiR）、Fd-チオレドキシン還元酵素のみであり、他の酵素との相互作用様式は未だ解明するには至っていない。従って、窒素同化に関与する亜硝酸還元酵素（NiR）と Fd の電子伝達とそれに伴う複合体形成の特性を把握することを本研究の目的とした。

２．研究の結果と考察

一般的に Fd と Fd 依存酵素群との相互作用は静電的な力が安定な複合体形成を支えていると考えられている。本研究では、この概念が Fd と NiR においても適応されるのかを明らかにするために Fd の NMR 解析と変異体解析を行った。予想通り、Fd-NiR 複合体形成においても静電的相互作用が重要な役割を果たし、Fd の反応中心側の分子表面に保存された特定の酸性アミノ酸残基を用いて塩橋を形成していることが示唆された。Fd-NiR 間の特異的な相互作用を分子進化の観点からもより詳細に理解するために、シアノバクテリア Fd (LbFd)と、

それと表面電荷の分布や立体構造において相同性の高いトウモロコシ Fd (FdI)を用いて、シアノバクテリア NiR との複合体形成・反応特性・親和性について比較・検討した。その結果、両 Fd は同じ酸性領域を用いて NiR と相互作用するにも関わらず、LbFd は FdI より高い速度論的親和性と物理的親和性を示した。この反応特性の差異は今回の NMR 解析での分解能を超えた微妙な構造の違いに起因するものと考えられる。Fd と NiR の接触面が非常に厳密化された構造を要していると予想し、両 Fd の鉄硫黄クラスター近傍の表面に局在する異なった非極性アミノ酸残基を入れ替えた変異体を作製し、それぞれの NiR に対する相互作用を調べた。NiR と各変異体 Fd の親和性は相互置換したアミノ酸残基に強く影響を受け、LbFd 変異体は FdI に、FdI 変異体は LbFd に近い傾向を示した。従って、Fd と NiR との複合体形成の基盤は静電的な親和力だけでなく、疎水的相互作用なども重要であると考えられた。そこで、この非極性領域の、NiR との反応特性に対する影響を調べるために、側鎖の大きなトリプトファンを導入した Fd (Trp-Fds ; S40W、A45W、S47W、T48W) を作製した。S40W と A45W は変異体の中でも突出して NiR 活性が減少し、さらに野生型で見られたような塩濃依存的な特徴は失われた。しかしながら、NiR との物理的親和性は野生型より強い傾向を示した。NiR-Fd の複合体構造は決定されていないので、NiR と類似した特性を持つ SiR の Fd との複合体構造情報を利用して変異体がもたらす電子伝達や複合体形成への影響を確認した。その結果、SiR においても NiR 同様の現象が認められ、Trp-Fds が SiR 側の活性中心の疎水領域に影響し、電子伝達の経路を阻害している事が考えられた。

以上の事を総括して、Fd の Fd 依存酵素との分子認識・相互作用には塩橋だけでなく表面構造や疎水的環境の寄与も十分に考慮する必要があるとことを強調したい。また、分子進化の途上でその生物にあった蛋白質の立体構造の最適化が起こり円滑な電子伝達が行われている一つの証拠を提示した。

3．研究業績

発表論文

Sakakibara Y., Kimura H., Iwamura A., Saito T., Ikegami T., Kurisu G.,and Hase T. (2012) A new structural insight into differential interaction of cyanobacterial and plant ferredoxins with nitrate reductase as revealed by NMR and x-ray crystallographic studies. J. Biochem. *in press*

関連論文

Bowsher C.G., Eyres L.M., Gummadova J.O., Hothi P., McLean K. J., Munro A.W., Scrutton N. S., Hanke G. T., Sakakibara Y., and Hase T. (2011) Identification of N-terminal regions of wheat leaf ferredoxin NADP+ oxidoreductase important for interactions with ferredoxin. Biochemistry, 50, 1778-1787

Kimata-Ariga Y,. Sakakibara Y., Ikegami T., and Hase T. (2010) Electron transfer of site-specifically cross-linked complexes between ferredoxin and ferredoxin-$NADP^+$ reductase. Biochemstry, 49, 10013-10023

Sekine K., Sakakibara Y., Hase T., and Sato N. (2009) A novel variant of ferredoxin-dependent sulfite reductase having preferred substrate specificity for nitrite in *Cyanidioschyzon merolae*. Biochem J. 423, 91-98

論文審査の結果の要旨

榊原由紀子は、植物やシアノバクテリアの光合成の電子キャリアー蛋白質であるフェレドキシンとそれから電子を受け取り機能する亜硝酸還元酵素との蛋白質の分子間相互作用を NMR 分光法により詳細に解析し、相互作用領域の同定に成功した。その情報に基づき、部位特異的変異法により作製した改変フェレドキシン分子群と亜硝酸還元酵素を中心とした酸化還元酵素との反応性や結合力を生化学的に解析し、分子間相互作用が静電力と疎水力の両方で安定化されている証拠を提出した。この知見は、光合成系におけるレドックス代謝の分子基盤を明らかにしたものであり、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。