

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 閔 震

超好熱性微生物は生命の原始的な形質を有すると考えられており、その代謝は、中央代謝の電子キャリアとしてフェレドキシンを使用するなど、ユニークな特徴を多く持つ。好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* は、特有の亜鉛結合型フェレドキシンを細胞内に多く含む。*S. tokodaii* のフェレドキシンの性質と立体構造はすでに明らかになっているが、その代謝における役割は不明な点が多い。本論文は、*S. tokodaii* に由来する 2-オキソ酸：フェレドキシン酸化還元酵素（OFOR）とフェレドキシン：NADP<sup>+</sup> 酸化還元酵素（FNR）の機能と構造に関する研究であり、3 章より構成される。

序論に続き、第 1 章では *S. tokodaii* 由来 OFOR1（StOFOR1）の反応機構について述べている。StOFOR1 は二つの 70 kDa の a サブユニットと二つの 34 kDa の b サブユニットから構成されている。StOFOR1 は多くの OFOR に見られる分子内フェレドキシンドメインを欠いており、[4Fe-4S] クラスターを一つしか持たないことから、OFOR ファミリーの中で最もシンプルな構造を持つ。従って、StOFOR1 は OFOR の酸化還元反応機構を研究するための優れたモデルであると言える。StOFOR1 は幅広い 2-オキソ酸基質特異性を示し、ピルビン酸と  $\alpha$ -ケトグルタル酸（2-オキソグルタル酸）をどちらも良好な基質とするため、中央代謝の解糖系と TCA サイクルの両方において重要な役割を果たしていると予想される。StOFOR1 は [4Fe-4S] クラスターを b サブユニット中の Cys12、Cys15、Cys46、および Cys197 で配位しており、他のシステイン残基を持っていない。これらのシステイン残基の FeS クラスターの保持における役割を解明するために、C12A、C15A、C46A、C197A、C12/15A の変異体を作成し、それらの性質を調べた。その結果、C197A 以外の変異体はすべて FeS クラスターが完全に失われていたが、C197A には不完全な FeS クラスターが一部残っていることが示唆された。EPR スペクトルを測定したところ、野生型 StOFOR1 にピルビン酸を添加するとヒドロキシエチル-チアミン二リン酸（TPP）ラジカル中間体（HE-TPP）のシグナルが観測され、さらに CoA を加えると HE-TPP のシグナルは消失した。一方、変異体では HE-TPP のシグナルは観測されなかった。酵素活性を測定したところ、変異体においては酸化的脱炭酸反応の活性が大幅に低下したが、副反応である非酸化的脱炭酸反応は変化がなかった。さらに、この非酸化的脱炭酸反応は CoA の添加に影響を受けなかった。従って、StOFOR1 の分子内 FeS クラスターは酸化的脱炭酸活性に必須であるのに対し、非酸化的脱炭酸活性には FeS クラスターと CoA のいずれも不要であることが明らかになった。以上の結果をもとに、StOFOR1 の詳細な反応機構を推定することができた。

第2章では、*S. tokodaii* 由来の2種類の OFOR のX線結晶構造解析について述べている。*S. tokodaii* 由来のゲノム中に存在するパラログである OFOR2 (StOFOR2) は StOFOR1 のように菌体内での発現が認められていなかったが、両者のアミノ酸配列の相同性は高いため、同様の活性を持つと推測した。StOFOR2 の遺伝子をクローニングして大腸菌の組換え酵素の活性を測定したところ、StOFOR1 と同様にピルビン酸と  $\alpha$ -ケトグルタル酸に対して活性を示した。StOFOR2 からは高品質の結晶が得られ、Se-Met 置換体を用いて、リガンドフリー状態およびピルビン酸複合体の立体構造の決定に成功した。さらに、以前にX線回折データが測定されていた StOFOR1 のリガンドフリー状態の結晶構造も、StOFOR2 をサーチモデルとした分子置換法により決定できた。これらの OFOR は、サブユニット間の相互作用から、溶液中では一つのプロトマーが a と b のサブユニットからなる dimer of heterodimer として存在していると考えられた。TPP の結合部位は異なるプロトマーからの a と b のサブユニット間に結合していた。StOFOR2 のピルビン酸は TPP のチアゾリウム環と相互作用しており、Arg344 と Thr257 がピルビン酸のカルボキシル基を認識していた。StOFOR1 の変異体の解析により、Lys49 と Asp468 が  $\alpha$ -ケトグルタル酸の C $\gamma$ -カルボキシル基を認識していることが示唆された。さらに、StOFOR2 と *S. tokodaii* フェレドキシンの複合体のモデリング構造を構築した。フェレドキシンは StOFOR2 の a と b サブユニットの間のポケットにぴったりとはまり、その相互作用が推定できた。以上の結果より、*S. tokodaii* 由来の2種類の OFOR の立体構造を古細菌の OFOR として初めて決定することに成功し、それらの酵素反応に関する構造基盤を明らかにした。

第3章では、*S. tokodaii* 由来の FNR と推定される遺伝子産物 (ST2133) の研究について述べている。大腸菌を用いて組換え体を発現し、精製酵素の機能を調べた。ST2133 はチオレドキシン還元酵素様の FNR ファミリーに属する FAD 含有酵素であり、電子供給体として NADH より NADPH を好むこと、電子受容体として酸素や DCPIP などを利用できることなどが分かった。さらに、NADPH から酸化型フェレドキシンへの電子伝達活性および還元型フェレドキシンから NADP<sup>+</sup>への電子伝達活性を確認した。以上の結果より、ST2133 は FNR としての機能を持つことが分かり、生理的な機能が明らかとなった。

以上、本論文は *S. tokodaii* 由来のフェレドキシン依存性酵素である StOFOR1、StOFOR2、FNR (ST2133) の反応機構と立体構造を解明したものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。