

## 審査結果の要旨

氏名 野本 直子

フェレドキシンと光合成膜タンパク質の電子伝達機構の構造生物学的解明と題する本論文は、NMR 実験および光化学実験を用いて、光合成型フェレドキシン (Fd) と、光合成膜タンパク質である光化学系 I (PS I) またはシトクロム *b<sub>6</sub>f* (cyt *b<sub>6</sub>f*) の相互作用を解析した研究成果を述べたものである。本論文は5つの章からなり、第1章において序論を述べ、第2章において実験結果をまとめ、第3章において実験結果に対する考察に加えて、光合成明反応機構に関する考察を述べ、第4章において総括している。第5章において実験材料および方法について記述している。

第2章においては、Fd と PS I および cyt *b<sub>6</sub>f* の相互作用に関する解析結果を述べている。まず、ホウレンソウの葉より、PS I および cyt *b<sub>6</sub>f* を単離・精製している。性状解析により、適切なサブユニット構成を有する PS I ミセルおよび cyt *b<sub>6</sub>f* ミセルを NMR 解析に十分な純度で調製できたことを確認している。次に、高等植物由来 Fd とラン藻由来 Fd を異種発現・精製し、Fd の活性中心である鉄を、NMR に適した金属に置換している。調製した Fd の性状解析を行い、NMR 解析に最適な試料としてラン藻由来ガリウム置換 Fd (GaFd) を決定している。Fd 上の PS I および cyt *b<sub>6</sub>f* 結合界面を同定する NMR 実験を行い、GaFd について帰属した主鎖 NMR シグナルに基づき結果を解析している。

Fd の [2Fe-2S] クラスタ近傍のアミノ酸残基に由来する NMR シグナルは、鉄に含まれる不対電子の影響により通常の NMR 測定においては観測されない。この領域を解析対象とするため、鉄を非磁性金属であるガリウムに置換した Fd を調製している。ガリウム置換による Fd の立体構造への影響を考慮し、<sup>1</sup>H、<sup>15</sup>N および <sup>13</sup>C 核に由来する NMR シグナルの化学シフト値に基づき、調製した GaFd の立体構造を評価している。ガリウム置換前後の化学シフトがよく一致したことより、立体構造は保持されていると結論している。さらに、GaFd の主鎖アミドプロトンの縦緩和速度を測定した結果に基づき、以降の NMR 実験に影響しない程度に鉄が除去されたことを確認している。以上のようにして調製した、GaFd と PS I ミセルおよび cyt *b<sub>6</sub>f* ミセルを用いて、以降の相互作用解析を行っている。

まず、NMR 滴定実験による GaFd と PS I の相互作用解析を行った結果、解離定数を 1 μM 程度と算出している。また、native Fd による競合実験より、ガリウム置換が PS I 結合様式に有意な影響を及ぼさないことを確認している。つづいて、転移交差飽和 (TCS) 実験より、金属クラスタ近傍の疎水性領域とその縁に存在する D62 を含む酸性領域を、PS I 結合界面として同定している。

Fd と cyt *b<sub>6</sub>f* の相互作用に関しても、NMR 滴定実験および TCS 実験より、金属クラスタ近傍の疎水性領域とその縁に存在する D68 を含む酸性領域を、cyt *b<sub>6</sub>f* 結

合界面として同定している。さらに、*cyt b<sub>6</sub>f* の基質アナログであるアンチマイシン A (AA) による競合実験を行った結果、*cyt b<sub>6</sub>f* のストロマ界面に存在するヘム近傍を、Fd 結合部位として同定している。また、AA の阻害定数を数  $\mu\text{M}$  と見積もっている。

第3章においては、TCS 実験の結果に基づき、Fd と PSI および *cyt b<sub>6</sub>f* との電子伝達機構を考察している。まず、PSI および *cyt b<sub>6</sub>f* 結合界面において共通する疎水性領域は電子伝達経路として機能し、異なる酸性残基は分子認識に重要な特異的相互作用残基であると結論している。Fd 上の特異的相互作用残基の同定は、変異導入による電子伝達反応の制御を可能とすることが期待される。したがって、光合成電子伝達の研究分野に対し有意義と考えている。次に、Fd と *cyt b<sub>6</sub>f* が互いの酸化還元中心同士を近接させる配向にて複合体を形成することより、Fd と *cyt b<sub>6</sub>f* 間の直接の電子伝達が可能であると結論している。これまでに *in vitro* における Fd と *cyt b<sub>6</sub>f* の相互作用解析の報告例はなく、Fd から未知の分子を介して *cyt b<sub>6</sub>f* へ電子が渡される可能性も考えられてきた。本研究では Fd と *cyt b<sub>6</sub>f* が電子伝達複合体を形成するという結果に基づき、*cyt b<sub>6</sub>f* が Fd から直接電子を受容する機構を提唱している。さらに、AA 競合実験の結果より、AA の阻害機構として、Fd-*cyt b<sub>6</sub>f* 間複合体形成抑制による電子伝達阻害機構を提唱している。

以上、本研究の成果は光合成電子伝達機構の解明に大きく貢献し、かつ膜タンパク質を含む相互作用系に対する構造生物学的研究に有用な知見を与えるものであり、これを行った学位申請者は、博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。