

(様式第9号)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	玉木 峻
審査委員	<p>主査 石川 孝博 (印)</p> <p>副査 真野 純一 (印)</p> <p>副査 澤 嘉弘 (印)</p> <p>副査 渡邊 文雄 (印)</p> <p>副査 藪田 行哲 (印)</p>
題目	<p>Functional analysis of enzymes involved in thiol-based redox metabolism in <i>Euglena gracilis</i> (ユーグレナにおけるチオールレドックス代謝に関する酵素の機能解析)</p>
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>玉木 峻氏から提出された表題の学位論文について、平成27年7月28日に実施した口頭発表も踏まえて、石川孝博を主査とする5名の審査委員で審査を行った。</p> <p>微細藻藻類 <i>Euglena gracilis</i> は、ユーグレノイドに属し光合成能と運動能を有する進化上極めてユニークな生物である。光合成生物にとって活性酸素種 (ROS) の代謝は、ストレス応答やレドックス調節による遺伝子発現制御やタンパク質活性調節など恒常性維持の根幹に関わる重要な問題であるため、厳密に制御される必要がある。したがって、陸上植物では、葉緑体やミトコンドリアを含めた ROS 発生 の場となる細胞内コンパートメントにカタラーゼやペルオキシダーゼなどさまざまな抗酸化酵素を局在させ、ROS 代謝制御系を発達させている。一方、<i>Euglena gracilis</i> はカタラーゼを持たず、また主要な過酸化水素代謝酵素のアスコルビン酸ペルオキシダーゼも細胞質にのみに局在し、葉緑体などのオルガネラにアイソザイムは存在しないことから、<i>Euglena gracilis</i> の ROS 代謝調節機構は大きな問題点であった。玉木氏は、この問題解決のため、<i>Euglena gracilis</i> の遺伝子情報解析により、<i>Euglena gracilis</i> では未解明のチオレドキシシン (Trx)/ペルオキシレドキシシン (Prx) 系の存在を見出し、以下の 1)、2) 項に示すように <i>Euglena gracilis</i> の ROS 代謝における Trx/Prx によるチオールレドックス系の重要性を明らかにしている。また、<i>Euglena gracilis</i> は、Trx 以外にもレドックス性チオール化合物としてグルタチオンとトリパノチオンの両方を含む稀な生物であり、3) 項のごとく玉木氏はそれらの還元酵素にも着目して機能解析を進め、<i>Euglena gracilis</i> のチオールレドックス代謝に関する新たな知見を得ている。</p> <p>1) <i>Euglena gracilis</i> ペルオキシレドキシシンの同定と機能解析: この研究では、<i>Euglena gracilis</i> 発現遺伝子データベースより取得した4つのPrx相同配列 (EgPrx1~EgPrx4) について、それらの酵素学的、生理的役割を明らかにしている。EgPrx1 と EgPrx4 は細胞質、EgPrx2 と EgPrx3 はそれぞれ葉緑体とミトコンドリアへの局在が予測された。各 EgPrx の組換え体酵素を作製し、すべての EgPrx が Trx を電子供与体として H₂O₂ およびアルキルヒドロペルオキシドに対する還元活性を示すこと、反応速度論的解析の結果より EgPrx が各細胞内コンパートメントにおいて、実際に ROS 代謝に寄与することを示唆している。また、各 EgPrx の生理機能解明のため、二本鎖 RNA の導入により各 EgPrx を単独もしくは複合的にノックダウンし、</p>	

Euglena gracilis の ROS 代謝における Trx/Prx によるチオールレドックス系の重要性を明らかにしている。各種 *Euglena gracilis* 細胞を作製した結果、prx1/4 を同時に発現抑制した細胞において、コントロール細胞と比較して生育速度の顕著な低下が観察されたことから、定常状態における細胞質型 Prx の重要性が示された。

2) *Euglena gracilis* NADPH 依存 Trx 還元酵素 (NTR) の同定と機能解析： 本項では、上記の 1) 項とも関連して、Prx のペルオキシダーゼ反応等の結果として生じた酸化型 Trx の再還元に関与している NTR に着目して機能解析を行っている。相同性検索より、3 つの NTR (*EgNTR1*, *EgNTR2*, *EgNTRC*) 遺伝子の完全長 cDNA 配列を決定した。系統樹解析より、*EgNTR1* および *EgNTR2* はそれぞれ NTR ファミリーの Small および Large 型に属することが示され、特に、*EgNTR2* は真核微細藻類に見られるセレン含有 NTR よりも、マラリア原虫に見られる非セレン含有 NTR に進化的に近いことを見出した。*EgNTRC* は、光合成生物に特異的な N 末端側に NTR ドメインを、C 末端側に Trx ドメインを持つ融合酵素であった。*EgNTR1*、*EgNTR2*、*EgNTRC* は、それぞれミトコンドリア、細胞質、葉緑体への局在が予測された。各 *EgNTR* の精製組換え体酵素に対し、代替基質 DTNB の還元活性を指標に評価したところ、いずれの組換え体 *EgNTR* も有意な NTR 活性を示した。反応速度論的解析の結果、*EgNTR2* の NADPH に対する触媒効率 (kcat/Km) は *EgNTR1* や *EgNTRC* と比較して約 40 倍高かったが、これは Small 型 (*EgNTR1*, *EgNTRC*) と Large 型 (*EgNTR2*) とのサブファミリー間での分子構造および触媒機構の差異に起因することを推測している。各 NTR 発現抑制細胞を作製したところ、*EgNTR2* 発現抑制細胞では、生育速度の顕著な低下と細胞体積の増加が認められ、細胞質型 Trx システムは正常な細胞生育および分裂に重要な役割を果たすことを明らかにした。

3) *Euglena gracilis* グルタチオン還元酵素 (GR) とトリパノチオン還元酵素 (TRYR) の機能解析：
Euglena gracilis は、グルタチオンおよびトリパノチオン代謝系を併せ持つ非常に珍しい生物であり、それらの細胞内レドックスにおよぼす影響と生理的役割を解明するため、GR および TRYR に着目して解析を行った。GR および TRYR をコードする *EgGR* と *EgTRYR* を得た。*EgGR* と *EgTRYR* の発現抑制細胞を作製したところ、*EgGR* 発現抑制株および *EgGR/EgTRYR* 同時発現抑制株の総 GR 活性はそれぞれコントロール細胞の 17%、6%に低下した。また、*EgGR* および *EgTRYR* 発現抑制株の生育速度は有意に低下したが、予想外に、両者を同時発現抑制した細胞の生育速度はコントロール細胞と同程度に回復していた。これらの結果から、*Euglena gracilis* 細胞において、GR および TRYR が生理的に重要な役割を果たすにも関わらず、それら酵素に非依存的な生育も可能であることが示唆された。

上記の成果は、学術論文として国際専門誌 *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (1 項) および *Plant Science* (2 項) にそれぞれ受理され掲載されていることから、客観的にも得られた成果が学術的に評価されたと判断できる。また 3 項も追加実験の後、学術論文として投稿予定である点も評価できる。玉木氏は、口頭発表においても得られた成果をその背景から明晰に述べるとともに、審査委員の質問に対してもすべて明確に回答していた。

以上の結果から、審査委員全員一致して玉木 峻氏の提出した論文は、博士の学位を授与するのに相応しいと評価した。