

(様式第 1 3 号)

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: 玉木 峻

題目: Functional analysis of enzymes involved in thiol-based redox metabolism  
in *Euglena gracilis*  
(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)

本研究は、緑藻ユーグレナ (*Euglena gracilis*) における活性酸素種 (ROS) 代謝およびレドックス制御機構の解明を目的として、チオールレドックス代謝関連酵素の酵素学的性質および生理機能を解析した。

ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ 、スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカルなど) は、呼吸や光合成といった好氣的代謝の副産物として多量に生成される。過剰なROSの蓄積は、DNA、タンパク質、脂質の酸化を引き起こすため、細胞毒となるが、一方で、ROSは生育やストレス応答などを制御するシグナル伝達分子としても機能することが知られている。そのため、細胞内ROSレベルは厳密に制御されなければならない。

ユーグレナはカタラーゼを持たず、細胞質にのみ局在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) が $\text{H}_2\text{O}_2$ 代謝に機能する。しかし、主要なROS発生源である葉緑体やミトコンドリアといった細胞内コンパートメントにおけるROS代謝は不明であった。ほぼすべての生物種において、チオールペルオキシダーゼの一種、ペルオキシレドキシシン (Prx) がROS代謝に重要な役割を果たすことが明らかにされたが、ユーグレナにおいてPrx遺伝子は未同定である。また、チオレドキシシン (Trx) およびNADPH依存性Trx還元酵素 (NTR) から成るTrxシステムは Prxの再生系として機能するだけでなく、DNA合成、光合成、タンパク質フォールディングなど多様な細胞内プロセスを制御する重要なレドックスシステムであるが、ユーグレナではTrxシステム構成酵素遺伝子も未同定である。そこで本研究では、PrxおよびTrxシステムを介したROS代謝およびレドックス制御機構の解明を目的として、ユーグレナPrxおよびNTRの同定および機能解析を行った。

ユーグレナRNA-Seqデータの相同性検索により、4つのPrx cDNA配列 (*EgPrx1~4*) および3つのNTR cDNA配列 (*EgNTR1, -2, -C*) を取得した。TargetPおよびTMHMMを用いた解析から、*EgPrx1, -4, -NTR2*は細胞質、*EgPrx2, -NTRC*は葉緑体、*EgPrx3, -NTR1*はミトコンドリアへの局在が予測された。*EgPrx*および*EgNTR*の酵素学的性質を調べるために、各*EgPrx*および*-NTR*の組換え体酵素を作製した。活性測定の結果、すべての組換え体*EgPrx*が $\text{H}_2\text{O}_2$ 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した。組換え体*EgPrx*のカイネティクスパラメーターは植物Prxと同程度であり、*EgPrx*が各細胞内コンパートメントにおいて、ROS代謝に寄与することが示唆された。また、すべての組換え体*EgNTR*がジスルフィ

ド還元活性を示した。組換え体EgNTR2の触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は組換え体EgNTR1およびEgNTRCの約30~46倍であり、この結果は、Large型NTRに属するEgNTR2の分子構造および触媒機構の差異に起因すると考えられた。

ユーグレナ細胞におけるPrxおよびNTRの生理機能を明らかにするために、ユーグレナ細胞への二本鎖RNA導入により、各PrxおよびNTRのノックダウン (KD) 細胞を作製した。KD-*prx1/4*および*-ntr2*細胞の生育速度は、コントロール細胞と比較して顕著に低下したことから、細胞質型PrxおよびNTRの生理的重要性が明らかになった。さらに、KD-*ntr2*細胞の細胞サイズは有意に増加した。KD-*prx1/4*および*-apx*細胞においてこの表現型が現れなかったことから、ROS代謝系とは独立して、細胞質型Trxシステムが正常な細胞分裂に寄与することが明らかになった。

ユーグレナと同じユーグレノゾア門に属するトリパノソーマ類はレドックス性チオール化合物としてグルタチオンの代わりに、トリパノチオン ( $N^1, N^8$ -bis(glutathionyl)spermidine) を利用する。グルタチオンおよびトリパノチオンはROS代謝を含む様々な生理機能を担い、それらのレドックス比を維持するために、それぞれグルタチオン還元酵素 (GR) およびトリパノチオン還元酵素 (TRYR) が機能するが、トリパノソーマ類はGRを持たない。しかしながら、ユーグレナがGRおよびTRYRの両方を持つことが報告され、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ることが示唆された。そこで本研究では、ユーグレナにおけるグルタチオンおよびトリパノチオン代謝系の生理的役割の解明を目的として、ユーグレナGRおよびTRYRの同定および機能解析を行った。

ユーグレナRNA-Seqデータに基づき、GRおよびTRYRをコードするcDNA配列を取得し、それぞれEgGR、EgTRYRとした。EgTRYRアミノ酸配列は報告されたユーグレナTRYRの部分ペプチド配列を含んでいた。既にユーグレナGRは細胞質局在であることが報告されたが、EgTRYRも細胞質への局在が予測された。前述の方法と同様に、GRおよびTRYRのKD細胞を作製した。KD-*gr*および*-gr/tryr*細胞の総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、KD-*gr*および*-tryr*細胞の生育速度は有意に低下したが、予想外に、KD-*gr/tryr*細胞の生育速度はコントロール細胞と同程度であった。これらの結果から、ユーグレナ細胞において、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が可能であることが示唆された。