



| | |
|--------------|---|
| Title | Characterization of iron-sulfur clusters of NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria |
| Author(s) | 増井, 良治 |
| Citation | 大阪大学, 1993, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.11501/3065773 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|---------------|--|
| 氏 名 | 増 井 良 治 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 0 6 0 2 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 5 年 3 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻 |
| 学 位 论 文 名 | Characterization of iron-sulfur clusters of NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria (ウシ心筋ミトコンドリアNADH: ユビキノン酸化還元酵素(複合体I) の鉄硫黄中心の解析) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 松原 央 (副査) 教 授 二井 将光 教 授 崎山 文夫 |

論 文 内 容 の 要 旨

ミトコンドリア呼吸鎖の NADH : ユビキノン酸化還元酵素(複合体I)の 2 つの可溶性蛋白質画分 (FP と IP) から、各種のクロマトグラフィーにより各構成サブユニットを分離した。FP からは 51 kDa, 24 kDa, 9 kDa の 3 個のサブユニットが得られ、9 kDa のサブユニットについて全アミノ酸配列を決定した。IP からは、75 kDa, 49 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 18 kDa, 15 kDa, 13 kDa-A, 13 kDa-B の 8 個のサブユニットが得られた。今回初めて単離された 20 kDa サブユニットの部分配列を決定したところ、葉緑体 DNA にコードされる *psbG* 遺伝子産物と高い類似性を示した。このことから *PsbG* は葉緑体中に存在すると考えられる複合体I 様の酵素複合体の成分である可能性が示唆された。さらに、両者の間で類似性の高い領域が、細菌のヒドロゲナーゼの小サブユニットの配列中にも見つかった。また一次構造の比較から、複合体I が複数のタイプのヒドロゲナーゼと進化的に関連のあることが判明した。次に、複合体I をデオキシコール酸とコール酸で処理し、酢酸アンモニウムによって分画したところ、鉄硫黄中心を含む 3 つの画分 (FP, IP-1, IP-2) を得た。FP は 51, 24 kDa サブユニット、IP-1 は 75 kDa サブユニット、IP-2 は 49, 30, 23, 20, 19 kDa など 10 種類以上のサブユニットを含んでいた。これらの可溶性画分の EPR スペクトルを測定したところ、元の複合体I で観測される全ての鉄イオウ中心が含まれており、さらに複合体の EPR スペクトルには見られない鉄硫黄中心のシグナルも観測された。また IP-2 にはセミキノンラジカルに似たシグナルが見られた。75 kDa, 51 kDa, 23 kDa サブユニットには 4 Fe-4 S 型クラスターを持つ鉄イオウ蛋白質に特徴的なシステイン残基の配列が存在し、24 kDa サブユニットにも種間で保存されている 4 残基のシステインがある。これらのことから、N1b, N2, N3, N4 の各クラスターはそれぞれ 24 kDa, 23 kDa, 51 kDa, 75 kDa サブユニットによって配位されているものと推定された。また 75 kDa サブユニットの N 末端領域や 20 kDa, 19 kDa に存在する保存性の高いシステイン残基は、IP-1 や IP-2 で観測された EPR サイレントなクラスターの配位に関与しているとも考えられた。複合体I の電子伝達活性を阻害することが知られている *N*-bromosuccinimide と *p*-chloromercuriphenylsulfonate で処理すると、NBS では、電子伝達をほとんど阻害しない濃度で N-4 のシグナルだけが顕著に減少していく。PCMPS 処理でも同様に N-4 のシグナルの減少が見られた。このことから N-4 クラスターが電子伝達経路の主流には直接関与していない可能性が示された。また、N3 と N4 の間に相互作用のあることも示唆された。一次構造の類似性や解体実験の結果から、複合体I は大きく 2 つの構造単位から構築されていると考えられた。最終的に、全ての結果を考慮した上で、複合体I の電子伝達経路についてモデルを作成した。

論文審査の結果の要旨

増井君はミトコンドリア呼吸鎖の複合体I（NADH：ユビキノン酸化還元酵素）に存在する鉄イオウ中心の局在サブユニットの同定を目指し、一つは単離サブユニットの一次構造を他の鉄イオウ蛋白質のそれと比較することで、もう一つは各サブユニットを群分画することでそれらのEPRスペクトルを調べることができることで研究に着手した。40種以上のサブユニットを含むこの酵素を単離し群分画を試みたり、一次構造を決めるることは並大抵の努力では達成できないが、その中で数種の構造も決定し、かつEPRスペクトルの同定と構造との比較から鉄イオウ中心の局在部位を推定した。また、他の酵素群との比較からこの酵素の進化してきた過程を推論することに成功した。この研究は博士（理学）の学位論文として十分に価値あるものと認めるものである。