

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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10602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
学位論文名	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た。PCMPs処理でも同様にN4のシグナルの減少が見られた。このことからN4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スペクトルを検べることで研究に着手した。40種以上も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。