The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure Analysis of Chloroplast Type Ferredoxin at 2.8Å Resolution
Author(s)	Fukuyama, Keiichi
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27747
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【21】

氏名・(本籍)	福山恵一（ふくやま けいいち）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 4729 号
学位授与の日付	昭和54年9月29日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**葉緑体型フェレドキシンの構造解析（2.8Å分解能）**
論文審査委員	(主査) 教授 角戸 正夫 (副査) 教授 田所 宏行　教授 松原 央

論文内容の要旨

フェレドキシンは非ヘム鉄とそれと同数の無機イオウからなるクラスターを持ち，酸化還元電位が−400mV以下という極めて低い値を持つタンパク質である。フェレドキシンは光合成系をはじめ，種々の系において電子伝達の役割を果している。フェレドキシンはクラスターの構造，数により，2(4Fe-4S*)型，4Fe-4S*型，及び2Fe-2S*型のものがあり，また分子量も6,000から12,000までと様々である。現在までに，種々のフェレドキシンの一次構造が決定され，分子進化が論じられてきた。フェレドキシンの分子進化及び機能を構造の立場からより深く理解するために，葉緑体型(2Fe-2S*型，分子量約11,000）に属するスピルリナフェレドキシンを2.8Å分解能で解析した。

結晶は，濃度約2％のタンパク溶液を3℃，pH7.5で87％飽和硫安溶液で透析することにより，板状晶として得られた。この結晶の空間群は$C222_1$で，格子定数はa=62.32，b=28.51，c=108.08Åで，単位格子中に8分子含まれている。重原子同型置換結晶は浸漬法で調製した。最終的には$K_3UO_2F_5$溶液中で浸漬したもののみが構造解析に有効であった。

回折強度は，回転対陰極四軸型回折計を用い，Ni箔で単色化したCuKα線を用いて測定した。異常分散を位相決定に利用するため，Bijvoet pairの強度測定を行った。Native結晶に対しては3個の結晶を用い，ウラン誘導体に対しては4個の結晶を用いて，2.8Å分解能の回折強度を測定した。吸収補正及びX線損傷に対する補正を行い，等価な反射は強度を平均して解析に用いた。

重原子の位置は差のパターソン関数で求め，F_{HLE}法で精密化した。Native結晶中の鉄原子の異常分散を利用した差のフーリエ合成から絶対構造及び鉄原子の位置を決定した。位相決定はウラン及び鉄原子の異常分散を考慮した単一同型置換法で行った。最良電子密度をRichards boxを用いて解釈

し，分子モデルを組み立てた。

クラスターは分子の端にあり，その周辺には疎水性残基が多く，一方クラスターの反対側は親水性残基が多く見られる。この分子にはα-ヘリックス構造は見られないが，一部反平行β-構造が見られる。一方の鉄原子にはCys41とCys46が，他方の鉄原子にはCys49とCys79が配位している。クラスター付近に幾つかのNH…S水素結合が見られ，NH(Ala43)-Sγ(Cys41)及びNH(Thr48)-Sγ(Cys46)の部分は3_{10}構造に似たコンホメーションをとっている。細菌型フェレドキシンの構造解析から，クラスターへの電子伝達はチロシンの芳香側鎖を通して行なわれると示唆されていたが，今回の葉緑体型フェレドキシンの解析結果から，芳香側鎖は単にクラスターの近傍を疎水的環境にする役割を果しているように見える。Cys41及びCys46のSγ原子が外界に面しているということから，電子伝達はSγ原子を通して行なわれている可能性が強いと考えられる。種々の葉緑体型フェレドキシンの一次構造より，クラスターに配位しているシステイン残基の近傍の他に，65－70番付近もアミノ酸残基の種による変化量が少いことがわかる。この部分は三次元構造ではクラスターのすぐ隣に位置している。フェレドキシン－NADP-レダクターゼ(FNR)がフェレドキシンとクラスター付近で接して複合体を作るとすると，この部分はFNRと接する部分に相当する。以上のことは，フェレドキシンがFNR存在下ではP-クロロマーキュリベンゾエートと反応しにくいという実験事実と一致している。

論文の審査結果の要旨

福山君の論文は葉緑体型のフェレドキシンのX線結晶解析法により分子構造を決定し，その構造を基礎として電子伝達の機構を推定し，また分子進化の検討にまで及んだ一連の論文を取りまとめたものである。

ラン藻類の一種であるスピルリナから単離されたフェレドキシンは，アミノ残基98個の分子量約11,000で，分子中に活性部として2Fe-2Sクラスターを有するもので，バクテリアフェレドキシンにおける4Fe-4Sクラスターとは異った挙動を示すはずである。結晶定数は，空間群$C222_1$ a＝62.32, b＝28.51, c＝108.08Å，ρ_m＝1.28g・cm^{-3}, Z＝8, V_M＝2.25Å^3/daltonで，同型体として$K_3UO_2F_5$置換体を得た。本結晶の特徴として中性附近において安定な同型体を発見することが困難であり，このため本結晶の場合分子中に存在するFeのCuK$_\alpha$に対する異常分散効果を利用する方法を試みた。従って回折強度測定は極めて精度の高いものを要求されるので，実験は特別の注意が必要であった。以上UO_2イオン及Fe原子の位置が精密に算出され，その位置から回折強度の位相が算出された(＜m＞＝0.5)．最終フーリエにより2.8Å分解の電子密度を得，分子モデルの作成が完成した。

その結果，2Fe-2S型クラスターの構造を初めて明らかにしたこと，バクテリア型分子との間における構造上の進化の過程を論じ，また電子伝達経路を示すなど，同君の論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。