



Title	Formation of Iron-Sulfur Cluster of Ferredoxin in Isolated Chloroplasts.
Author(s)	高橋, 康弘
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37448">https://hdl.handle.net/11094/37448</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	たか 高	はし 橋	やす 康	ひろ 弘
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	9262	号	
学位授与の日付	平成	2年	6月	15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	Formation of Iron-Sulfur Cluster of Ferredoxin in Isolated Chloroplasts. (葉緑体型フェレドキシンの鉄・硫黄クラスター形成機構)			
論文審査委員	(主査) 教授 松原 央 (副査) 教授 福井 俊郎 教授 田川 邦夫			

### 論文内容の要旨

葉緑体型フェレドキシン(Fd)は活性中心として[2Fe-2S]クラスターを有し、光合成電子伝達体として機能する。Fd以外にもFe-S蛋白質は広く生物界に分布しており[4Fe-4S], [3Fe-4S]等のクラスターも知られているが、これらのFe-Sクラスターが生体内で形成されるメカニズムについては現在なお不明である。そこで今回、ホウレンソウFdの生合成の過程で、Fe-Sクラスターがどのように形成されるのかという問題に対し解析を行った。

I. 単離無傷葉緑体におけるFe-Sクラスターの形成: *in vitro*で合成したFd前駆体を無傷葉緑体とインキュベートすると、Fd前駆体は葉緑体内に移行し、切断を受けて成熟型分子量のapo-Fdに変換され、次いでapo-Fdの一部はholo-Fdに変換された。従って、FdのFe-Sクラスターは葉緑体の内部で形成されると考えられる。さらに [<sup>35</sup>S] cysteineを無傷葉緑体とインキュベートすると、cysteineはFe-Sクラスター形成反応におけるS供与体として用いられ、 [<sup>35</sup>S]で標識されたholo-Fdが生成することを見い出した。種々の阻害剤を用いた解析の結果、無傷葉緑体におけるFe-Sクラスターの形成にはATPが必須であることが判明した。

II. 破碎葉緑体を用いたFe-Sクラスター形成機構の解析: 低張処理によって葉緑体の包膜を破碎した葉緑体においても無傷葉緑体同様 [<sup>35</sup>S] cysteineをS供与体としてFe-Sクラスターを形成させることに成功し、この反応系の解析からクラスター形成は光照射とATPの両方に依存していることが判明した。光照射に関しては、光→光化学系→還元力(NADPH)の生成→cysteine分解の促進→S<sup>2-</sup>の遊離という一連の反応の結果、遊離したS<sup>2-</sup>がFe-Sクラスターに組み込まれると考えられる。一方ヌクレオチドの特異性はATP, GTP > CTP, UTPであり、AMP, dATP, AMP-PNPは効果

が無い。S<sup>2-</sup>の生成あるいはFeの利用といった反応にはATPの関与は認められないことから、ATPはクラスター形成反応自体に必要であると考えられる。

III. cysteine分解酵素の単離・精製とFe-Sクラスターの再構成:cysteineからS<sup>2-</sup>を遊離する酵素活性に着目し、ホウレンソウ葉緑体から3種の酵素を精製した。このうち2種はcysteine synthaseのisozymesであり、残り1種はcysteine  $\beta$ -lyaseである。これら3種の精製酵素を用いてFdのFe-Sクラスターの再構成を種々の条件下で試み、化学的な再構成あるいはrhodaneseによる再構成と比較した。いずれの場合もFdのFe-Sクラスターは高収率で再構成されるものの、ATPに対する要求性は認められなかった。従って、葉緑体内ではこれらS<sup>2-</sup>を遊離する酵素だけでなく、ATPの関与する未知のFe-Sクラスター形成酵素の存在が示唆される。以上の知見をもとに、葉緑体内Fe-Sクラスター形成機構について考察した。

### 論文審査の結果の要旨

葉緑体型フェレドキシン(Fd)は活性中心として[2Fe-2S]クラスターを有し、光合成電子伝達体として機能する。このクラスター形成機構を生体内生合成の過程としてとらえたのが高橋君の論文である。

先ず単離無傷葉緑体をFd前駆体とインキュベートするとFdは成熟型ホロFdとしてFe-Sクラスターが形成されることが判ったので、[<sup>35</sup>S]システィンをS供与体として与えると[<sup>35</sup>S]をもったFe-Sクラスターが形成されると予測した。事実その通りであり、かつこのクラスター形成にはATPが必要であることを見出した。次いで膜透過機構の関与を排除するため破碎葉緑体を用いたところ、無傷葉緑体と同様に[<sup>35</sup>S]システィンからFe-Sクラスターの形成を見たが、この際光照射とATPの両方に反応が依存することを見出した。これは光による光化学系の活性化の結果、還元力として生じるNADPHが必要でこれがシスティンの分解を促進しS<sup>2-</sup>の遊離という一連の反応の結果、Fe-Sクラスターの形成が進行すると考えた。又クレオチド各種の特異性をも検討し、S<sup>2-</sup>の生成やFeの利用にはATPの関与はなく、したがってATPはクラスター形成反応自体に必要なものであると結論した。このことは従来化学的あるいは酵素的にクラスター形成がみられるのとは異なり、生体内ではそれらとは別の反応が進行することを示唆している。一方システィンからS<sup>2-</sup>を遊離する酵素を単離することに成功した。ホウレンソウ葉緑体から3種のアイソザイムを精製したが、そのうちの2種はシスティン合成酵素であり、他の1種はシスティン $\beta$ -リアーゼで、このものは合成活性を示さなかった。前2者は構造的によく似ていたが、リニアーゼは全く異なる構造を示した。これらの酵素を用いてFe-Sクラスター形成反応を検討したところ高収率で反応は進行したがATP要求性は示さなかった。このことは葉緑体内にはS<sup>2-</sup>を遊離する酵素のみではなく、ATPの関与する未知のFe-Sクラスター形成酵素が存在することを強く示唆している。

以上の結果を総合してこの論文が理学博士の学位論文として十分価値あるものと認めるものである。