



Title	高等植物葉緑体及びラン藻Synechocystis sp. PCC6803におけるフェレドキシンの鉄・硫黄クラスター形成機構の解析
Author(s)	西尾, 和晃
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41892
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	にし お かず あき 西 尾 和 晃
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 1 9 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	高等植物葉緑体及びラン藻 <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803におけるフェ レドキシンの鉄・硫黄クラスター形成機構の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 長谷 俊治 (副査) 教 授 谷澤 克行 助教授 中井 正人 講 師 高橋 康弘

論 文 内 容 の 要 旨

鉄-硫黄蛋白質は補因子として、非ヘム鉄原子と不安定硫黄原子およびポリペプチド鎖中のシステイン残基の硫黄原子から構成される鉄-硫黄クラスターを持つ蛋白質の総称であり、生物界には多種多様の鉄-硫黄蛋白質が存在している。これらの鉄-硫黄蛋白質の機能に関しては、酸化還元反応、触媒反応および遺伝子発現制御といった様々な生化学的に重要な役割を担っていることが明らかにされている。しかしながら、細胞内でこれらの鉄-硫黄蛋白質のポリペプチド鎖にいかにして鉄-硫黄クラスターが付加されるのかについては、よく解っていない。本研究では、高等植物葉緑体及び葉緑体の進化的起源と考えられるラン藻を材料に、 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ 型クラスターを有するフェレドキシンをモデル蛋白質として、鉄-硫黄クラスターの形成に関与する因子の検索とキャラクターゼーションを行った。

Fd ポリペプチド鎖への鉄-硫黄クラスターの形成は、無細胞蛋白質翻訳系において合成したトリチウムでラベルされたアポ型 Fd を基質として用いて、未変性ゲル電気泳動によりアポ型と新たに生じたホロ型とを分離検出するというアッセイ法により解析した。この手法により、Fd への鉄-硫黄クラスターの形成に葉緑体ストロマに存在する特定の蛋白質因子が関与していること、このような蛋白質因子は分子内に鉄と硫黄の両方を保持していることが示唆された。*nifU* および *nifS* 発現産物はニトロゲナーゼの鉄-硫黄クラスターの形成に関与していると考えられている。最近、*nif* 遺伝子群に含まれる遺伝子と相同な遺伝子が、*isc* (iron-sulfur cluster assembly) 遺伝子群と命名されている。*Synechocystis* sp. PCC6803 には3つの *nifS* (= *iscS*)、1つの *nifU*、および2つの *iscA* 相同遺伝子が存在していた。そこでこれらの遺伝子産物を大腸菌内で大量発現させ精製した。これらの精製蛋白質を用いてトリチウムでラベルされたアポ型 Fd の鉄・硫黄クラスター形成活性を調べたところ、NifU 蛋白質のみが単独で顕著な鉄-硫黄クラスター形成活性を示し、NifU 蛋白質が鉄-硫黄クラスター形成過程において鍵となる役割を担っている可能性が示唆された。精製したラン藻 NifU 蛋白質による鉄-硫黄クラスター形成過程を詳しく調べるため、精製蛋白質より調製したアポ型 Fd を用いた鉄・硫黄クラスター再構成系を構築をした。すなわち、還元的条件下、熱変性および脱塩処理により調製したケミカルアmountのアポ型 Fd と精製した NifU 蛋白質を混ぜ、30℃でインキュベートした。その結果、アポ型 Fd からホロ型 Fd への効率のよい変換が観察された。NifU 蛋白質の鉄-硫黄クラスターが、アポ型 Fd に直接転移することで、Fd に鉄-硫黄クラスターが形成されることを示している。このような鉄-硫黄クラスター転移反応は、NifU 蛋白質の代わりに Fdx 蛋白質等の他の鉄-硫黄蛋白質を用いた場合には、ほとんど観察されなかった。以上の結果は、NifU 蛋白質が、鉄-硫黄クラスターの形成過程におけるクラスターのアセンブリー

の足場となり、そこに形成された鉄-硫黄クラスターを、他のアポ型ポリペプチド鎖へと転移する役割を担っていることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

西尾和晃君は、フェレドキシン (Fd) の酸化還元中心の $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ クラスターが Fd ポリペプチド鎖中に挿入される過程について、植物葉緑体およびラン藻細胞を用いて生化学的研究を行ない、1) 葉緑体ストロマ中に Fd のクラスター形成に関わる蛋白質因子が存在すること、2) *Synechosystis* sp. PCC6803 のゲノムの中の *nifU* 遺伝子がこの過程に関与すること、及び 3) NifU 自身も鉄硫黄クラスターを有する蛋白質であり、この鉄硫黄クラスターが Fd ポリペプチド鎖に転移し、 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ クラスターを備えたホロ型 Fd に変換させる活性があることを見出した。これらの業績は、細胞内での鉄硫黄クラスターの形成機構に新知見を提出したものであり、博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。