The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Biosynthesis of Fe-S Proteins : Genetic Analysis of Multicomponent Systems Involved in Assembly of Fe-S Clusters
Author(s)	徳本, 梅千代
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45100
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

【11】

氏　　名	徳　本　梅千代（とくもと　うめちよ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　１８０９２　号
学位授与年月日	平成15年9月30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	Biosynthesis of Fe-S Proteins : Genetic Analysis of Multicomponent Systems Involved in Assembly of Fe-S Clusters **（鉄硫黄蛋白質の生合成：鉄硫黄クラスターのアセンブリーに必須な多成分酵素系の遺伝学的解析）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　福山　恵一 （副査） 教　授　金澤　浩　　教　授　長谷　俊治　　講　師　高橋　康弘

論　文　内　容　の　要　旨

鉄硫黄（Fe-S）蛋白質は、非ヘム鉄と無機硫黄原子から成る Fe-S クラスターを持つ蛋白質の総称で、ほぼ全ての生物に分布し、多彩な生理機能を担っている。Fe-S クラスターは翻訳後、蛋白質の内部に形成されるコファクターだが、その生合成機構の研究は漸く緒に就いた段階である。近年、大腸菌の *isc* オペロン（*iscRSUA-hscBA-fdx*-ORF3）を過剰に発現させると、細胞内の Fe-S クラスター合成能が増加することが示された。これを検証しさらに発展させるため、1）*isc* オペロンの系統的な破壊実験を行い、関与する遺伝子群を特定した。次いで、2）これら ISC マシナリーの成分間の相互作用を解析し、複雑な機能ネットワークの全体像を明らかにした。さらに、第二の Fe-S クラスター合成系として機能する SUF マシナリー（*sufABCDSE* 産物）を同定するとともに、3）第三の合成系として NIF マシナリー（*nifSU* 産物）の機能と性質を明確にした。

1）<u>*isc* オペロンの系統的破壊</u>　*isc* オペロン内の８種の遺伝子をそれぞれ個別に、または全てを欠失した大腸菌変異体を作成した。これら変異体の性質を詳細に調べ、Fe-S 蛋白質の活性が著しく減少すること、それに伴って生育速度の低下と、ニコチン酸やチアミンなどに対する要求性が生じることを見出した。すなわち、ISC マシナリーは、様々な Fe-S 蛋白質のクラスター形成において、極めて重大な役割を担っていることを実証した。さらに、これら変異体の性質を詳細に比較検討し、IscS、IscU、HscA、HscB、Fdx がマシナリーの中心的な成分であることを明確にした。

2）<u>ISC 蛋白質間の機能ネットワーク</u>　*isc* オペロンにコードされる８種の成分間の相互作用について、pull-down 法と two-hybrid 法を併用して解析を行った。その結果、すでに報告されている IscS-IscU、IscU-HscB、IscU-HscA、HscB-HscA の組み合わせに加えて、IscS-Fdx、IscS-ORF3、IscA-HscA、HscA-Fdx 間で新規な相互作用を検出し、ISC マシナリーにおける複雑な機能ネットワークの実体を明らかにした。ただし、このマシナリーを巨大な蛋白質複合体として検出することはできなかった。おそらく、特異的な結合と解離を含む複雑な反応の中で、Fe-S クラスター中間体が形成され、アポ Fe-S 蛋白質に移されると推定される。

3）<u>大腸菌変異体を用いたピロリ菌 *nifSU* オペロンの機能評価</u>　大腸菌では ISC と SUF の二種のマシナリーが独立して Fe-S クラスター形成を担っている。一方、他の多くの生物種では、類似成分の種類や構成が多様であるた

め統合的な理解が難しい。そこで、大腸菌の *isc* と *suf* 両オペロンの二重変異株に関連遺伝子群を導入し、相補性を指標として Fe-S クラスター形成能を評価する実験系を構築した。二重変異株にピロリ菌の *nifSU* オペロンを導入したところ、わずか２種類の成分で ISC や SUF マシナリー（各々６成分）の機能を相補し、第三の Fe-S クラスター合成系（NIF マシナリー）として機能することが判明した。従来 NIF マシナリーは、窒素固定細菌でニトロゲナーゼの生合成に特異的に関与すると推定されていたが、アポ Fe-S 蛋白質に対する特異性は ISC や SUF マシナリー同様広いものと考えられる。ただし、NIF マシナリーは嫌気的条件下では十分機能するのに対し、酸素存在下での相補能が低い。このような酸素感受性は NIF マシナリーの特性と捉えることができる。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、鉄硫黄（Fe-S）タンパク質のコファクターである、Fe-S クラスターの合成を司る多成分酵素系を遺伝学的な手法で同定し、ISC、SUF、NIF の３種の異なった合成マシナリーを明らかにすると共に、主要なタンパク質の機能や、構成成分の分子間相互作用の解析を系統的に行ったものである。論文は４章から構成されており、第１章は序論。第２章では、ISC マシナリーをコードする大腸菌 *isc* オペロンの８種の遺伝子に対して系統的な破壊実験を行い、このマシナリーが細胞内の様々な Fe-S 蛋白質のクラスター形成において極めて重大な役割を担っていることを実証するとともに、マシナリーで中心的な役割を担う５成分を明確に示している。第３章では、ISC マシナリーを構成する７種の成分について、タンパク質－タンパク質相互作用を解析し、これら７種成分間の機能ネットワークの全体像を明らかにしている。第４章では、大腸菌の ISC、SUF マシナリーと、*Helicobacter pylori*（ピロリ菌）の NIF マシナリーを遺伝学的な手法で比較し、NIF マシナリーがわずか２成分という最もコンパクトな Fe-S クラスターの合成系として機能すること、その代わり酸素存在下では十分に機能できないことを明確に示している。

本研究は、Fe-S クラスターの生合成研究における重要な成果であると共に、メカニズムの解明に大きく貢献するものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。