The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structural and functional analysis of CnfU : an iron-sulfur cluster biosynthetic scaffold in plant chloroplasts
Author(s)	矢部, 俊樹
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46497
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　矢　部　俊　樹

博士の専攻分野の名称　博　士（理　学）

学　位　記　番　号　第　20037　号

学位授与年月日　平成18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　Structural and functional analysis of CnfU : an iron-sulfur cluster biosynthetic scaffold in plant chloroplasts
（植物葉緑体における鉄硫黄クラスター生合成の足場蛋白質、CnfUの構造と機能の研究）

論　文　審　査　委　員　（主査）
教　授　長谷　俊治

（副査）
教　授　福山　恵一　　教　授　寺島　一郎　　助教授　中井　正人

論　文　内　容　の　要　旨

鉄硫黄クラスターと呼ばれる補因子を持つ鉄硫黄蛋白質群は、電子伝達や遺伝子発現調節など細胞が活動を営む上で極めて重要な代謝経路の中核を担っており、鉄硫黄クラスターがどのようにしてこれらの蛋白質に組み込まれるかについて、近年、Isc (*i*ron-*s*ulfur *c*luster)/Nif (*ni*trogen *f*ixing) 蛋白質群の発見等によりその生合成経路が徐々に明らかにされつつある。本研究では、未だ解明されていない、植物葉緑体における鉄硫黄クラスター形成機構を明らかにするために、分子遺伝学的・分子細胞生物学的解析に適したシロイヌナズナを材料に、原核生物等で見いだされている鉄硫黄クラスター形成に関わる因子のホモログの解析を中心に進めた。

第1章では、葉緑体の進化的起源であるらん藻において鉄硫黄クラスター形成機構の鍵として機能するCnfUのホモログ遺伝子に関する機能解析を行った。葉緑体ストロマ内に3種類のCnfUホモログを見いだし、そのうちAtCnfU-V遺伝子の変異株葉緑体中で、[2Fe-2S] 型の鉄硫黄クラスターをもつフェレドキシンや [4Fe-4S] 型の鉄硫黄クラスターを持つ光化学系Iが顕著に減少し、アポ型基質蛋白質に対する鉄硫黄クラスター挿入活性が顕著に減少していることが明らかとなった。AtCnfU-Vの組換え蛋白質は、reductive labileな [2Fe-2S] 型の鉄硫黄クラスターを2量体で保持し、その鉄硫黄クラスターは *in vitro* においてアポ型基質蛋白質に転移してホロ型蛋白質を形成することが観察されたことから、葉緑体においてCnfUが鉄硫黄クラスター形成の“足場”として機能し、フェレドキシンや光化学系Iの鉄硫黄クラスター結合サブユニット等のアポ型基質蛋白質に供給する運び屋として役割を果たしている事が明らかとなった。

第2章では、AtCnfU-Vの構造解析を行った。ホロ型蛋白質から得られたアポ型単結晶が得られ、その構造は鉄硫黄クラスターのリガンドである保存されたシステイン残基はSS結合を形成することにより、全体として完全な対称形の2量体を形成していた。保存されたCXXC配列周辺領域のアミノ酸残基は、側鎖が短い非極性親水性残基が進化的によく保存されていた。その結果、SS結合を形成している計4つのシステイン残基の硫黄原子が片側の分子表面にのみ露出した構造となっていた。加えて、X線吸収分光法により、ホロ型AtCnfU-V上の鉄硫黄クラスターは、一般的な[2Fe-2S]型のクラスターに近い構造であることが示唆された。以上の結果を用いて構築したホロ型AtCnfU-Vのモデルでは、鉄硫黄クラスターが分子表面に露出した状態になった。従ってホロ型AtCnfU-V上では、側鎖が短い

非極性親水性残基が CXXC 配列の周辺領域に集まることにより、［2Fe-2S］型の鉄硫黄クラスターが２量体の分子間で片側の分子表面に露出した状態で構築されていると考えている。そして、２量体間の相互作用があまり強くないことから、単量体から２量体の形成や２量体から単量体への解離が比較的容易に行えると考えられる。AtCnfU-V 上の鉄硫黄クラスターは２量体間で構築されることから、単量体・２量体間の移行の容易さは鉄硫黄クラスターの構築、解離のしやすさを反映していると考えられ、結果として、鉄硫黄クラスターの授受という足場蛋白質としての機能に都合のよい構造になっていると推察される。

論文審査の結果の要旨

学位申請者は、非ヘム鉄と無機硫黄からなる補欠分子族をもつ蛋白質群の鉄硫黄クラスターの生合成の機構を解明することを目的に、植物細胞の葉緑体に存在する CnfU（C-terminal domain of nifU）に着目して研究を行った。シロイヌナズナのゲノムデータベースをもとに葉緑体には３種類の CnfU ホモログが存在することを見出し、そのうち CnfU-V と名付けた蛋白質をコードする遺伝子を欠損する変異体を選別した。この変異体は光合成機能が低下した表現型を示し、その原因が光化学系 I やフェレドキシンの含量の減少によるものであることを明らかにした。そして、CnfU-V の大腸菌組換え体を調製し、この蛋白質自身が［2Fe-2S］クラスターをもち、他のアポ型の蛋白質にこの鉄硫黄クラスターを挿入する足場蛋白質として機能することを生化学的に証明した。さらに、この蛋白質の X 線結晶構造解析に着手し、アポ型の構造決定に成功した。この構造知見をもとに２量体あたり一つの［2Fe-2S］、クラスターを保持するホロ型の構造を推定し、２量体と単量体の構造変換と連動しながら鉄硫黄クラスターを標的蛋白質に挿入する機能モデルを提唱した。これらの結果は、鉄硫黄クラスターの生合成機構に新たな分子レベルの知見を加えるものである。

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。