The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structural and Biochemical Studies on the Components of the ISC Machinery Involved in Iron-Sulfur Cluster Assembly
Author(s)	下村, 喜充
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48805
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

【12】

氏　　名	下　村　喜　充（しも むら よし みつ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２１５４９　号
学位授与年月日	平成 19 年９月 26 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 Biochemical Studies on the Components of the ISC Machinery Involved in Iron-Sulfur Cluster Assembly （鉄硫黄クラスターの生合成を担う ISC マシナリーの成分の構造生物学的、生化学的研究）
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）クラスターは非ヘム鉄と無機硫黄原子からなるコファクターで、Fe-S タンパク質の活性中心として重要かつ多彩な機能を担っている。ISC マシナリーは、主にプロテオバクテリアから真核生物のミトコンドリアに分布する Fe-S クラスターの生合成系で、少なくとも７種類の成分から構成されているが、反応機構についてはほとんど理解が進んでいない。本研究では、生合成メカニズムの核心に迫ることを目的として、ISC マシナリーの二種類の成分 YfhJ と IscU を取り上げ、生化学的および構造生物学的な解析を進めた。

YfhJ は小型で酸性のタンパク質で、プロテオバクテリアでは ISC マシナリーの他の成分とともに良く保存されている。YfhJ の具体的な役割は明らかではないが、硫黄供与体である IscS と特異的に相互作用することが示されており、Fe-S クラスターの生合成に深く関与すると予想されている。本研究では大腸菌由来の YfhJ の立体構造を分解能 1.75Å で決定した。YfhJ の構造は５本のα-ヘリックスから構成され、DNA 結合タンパク質に見られるヘリックスーターンーヘリックス構造に類似している。しかし、YfhJ の分子表面は負電荷を帯びており、DNA に結合するとは考えにくい。YfhJ の分子表面では一方の面に負電荷残基が集中してパッチを形成しており、このような性質はむしろ、フェリチンやフラタキシンといった鉄結合タンパク質に見られる。この表面電荷の特徴から、YfhJ は鉄原子を結合し、Fe-S クラスター生合成反応への鉄供与体として機能するという可能性が示された。

一方、IscU は Fe-S クラスター形成の足場として ISC マシナリーの中心的な役割を担っているが、その Fe-S クラスターが酸素に対して非常に不安定なため、これまで解析が難航していた。本研究では、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* の IscU が比較的安定に Fe-S クラスターを持つことを見出し、さらに Asp38 を Ala に置換することによってクラスターの安定性を大幅に向上させることができた。加えて嫌気的に操作することによって、［2Fe-2S］クラスターを保持したホロ型 IscU の精製と結晶化に成功し、分解能 2.3Å でその立体構造を決定した。驚いたことに、ホロ型 IscU は非対称な三量体構造を形成していた。この三量体では、３種類のプロトマーが会合面でそれぞれの構造を変化させることによって非対称な会合を可能にしている。また、［2Fe-2S］クラスターが結合しているのは三量体の中の１つのプロトマーのみであり、そのクラスターは隣接するプロトマーに覆われるように、三量体会合面の内側に埋もれている。この三量体構造は、新生 Fe-S クラスターを安定に保持するという局面には適しているが、逆に、鉄原子や硫

黄原子、あるいは Fe-S クラスターを受け渡すという段階では適当でない。溶液中の挙動を解析したところ、ホロ型 IscU が三量体なのに対してアポ型は解離し、主に二量体として存在することが判明した。これらの知見から、IscU の非対称な三量体の会合とその解離が、クラスター中間体の形成と標的アポタンパク質へのクラスター移行という ISC マシナリーの分子機構において、その中核を担っていることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

鉄硫黄（Fe-S）クラスターは非ヘム鉄と無機硫黄からなり、Fe-S タンパク質の活性中心として多様な機能を発揮している。Fe-S クラスターの生合成には ISC、SUF、または NIF マシーナリーが関与することが示されているが、各マシーナリーを構成するタンパク質がどのように協調的に働いているかについては理解が遅れていた。本研究では ISC マシーナリーを構成する二種類のタンパク質（YfhJ と IscU）を、とりわけ IscU に重点をおいて、取りあげた。IscU は ISC マシーナリーにおいて要となるタンパク質であるが、これまでは IscU 中に形成する Fe-S クラスターの不安定性が構造と機能の解析を阻んでいた。

下村喜充君は、様々な生物種の IscU を検討し、超好熱細菌 *Aquifex aeolicus* の IscU が比較的安定に Fe-S クラスターを持つことを見つけた。さらに、一アミノ酸を置換することによって Fe-S クラスターの安定性を向上させ、また嫌気的に操作することによって、［2Fe-2S］型のクラスターを保持した IscU を調製することに成功した。引き続きこの IscU を結晶化し、X 線結晶解析により Fe-S クラスターを持った IscU の構造を世界で初めて明らかにした。また、［2Fe-2S］クラスターが IscU に新規な様式で結合していることも明らかにした。

本解析で明らかにした IscU の構造は、これまでの予想とは違って、非対称な三量体をとっており、その一つのプロトマーが［2Fe-2S］クラスターを持っていた。他のプロトマーのアミノ末端領域のヘリックスがクラスターを覆っており、遺伝学・生化学的解析から示唆されていた IscU のこの領域の重要性を、構造から理解することができた。ホロ型 IscU は溶液中でも三量体をとっており、クラスターが IscU から遊離するに伴って、主に二量体に変換することも明らかにした。

本研究結果は、IscU 中に Fe-S クラスターが形成し、さらにこのクラスターが標的のアポ型 Fe-S タンパク質に移行する分子機構について、理解を格段に深めることに貢献した。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。