The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structural Basis for the Functional Dynamics of the SufBCD Complex Involved in de Novo Fe-S Cluster Biogenesis
Author(s)	平林, 佳
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56072
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　平林　佳　　）	
論文題名	Structural Basis for the Functional Dynamics of the SufBCD Complex Involved in *de Novo* Fe-S Cluster Biogenesis （ダイナミックな構造変化が駆動する鉄硫黄クラスター生合成機構の構造基盤）

論文内容の要旨

鉄硫黄（Fe-S）タンパク質は、生物界に普遍的に分布しており、呼吸、光合成、クエン酸回路、遺伝子発現制御に至るまで生命活動の根幹に関わる多彩な役割を担っている。この多種多様なFe-Sタンパク質の機能発現には共通して、コファクターである「Fe-Sクラスター」が必要不可欠である。生体内におけるFe-Sクラスターの合成は、SUFマシナリーと呼ばれる多成分酵素系が担っている。SUFマシナリーは6種類のタンパク質（SufA, SufB, SufC, SufD, SufS, SufE）から構成されている。SufA はFe-Sクラスターの材料となるFe原子、SufS/SufEは S原子を供給するドナータンパク質である。そしてSufB/SufC/SufDは、3成分の複合体を形成し（SufBCD複合体）、Fe/S原子を受け取って、新しいFe-Sクラスターを組み立てる合成装置として働いている。合成されたFe-Sクラスターは、様々なFe-Sタンパク質に渡され、各種生体反応系で活躍することになる。

このように合成系で働くSUFタンパク質群の各機能までは明らかとなっているが、詳細な合成分子メカニズムの理解は圧倒的に遅れている。当研究室のこれまでの解析から、マシナリーの中心に位置するSufBCD複合体に関して非常に興味深いことがわかってきた。それは、複合体の成分の一つSufCが、ABCトランスポーターのATPaseドメインに類似しており、特徴的なモチーフも高度に保存されていたことである。このことから私は、SufBCD複合体の機能発現においても、ABCトランスポーターと同様な作動機構を利用しているのではないかと予想した。そこで本研究では、SufBCD複合体の構造変化/機能発現に注目した構造生物学／生化学的アプローチによって、生体内Fe-Sクラスター合成反応メカニズムの解明を目指した。

SufBCD複合体の調製は、組換え大腸菌を用いてSufB/SufC/SufDの遺伝子を同時に発現させることで、安定な３成分の複合体として精製することに成功した。さらに、熱安定性性状解析から最適な溶媒条件を選定し、結晶化スクリーニングを進め、得られた結晶から*E. coli*由来SufBCD複合体の立体構造を2.95 Å分解能で決定した。得られた構造情報から、ABCトランスポーターと共通したSufBCD複合体の立体配座を明らかにした。

ABCトランスポーターは、上部の膜貫通ドメインと下部のATPaseドメインから成っており、ATPaseドメインのATP依存的なダイマー化を駆動力に、膜貫通ドメインに大きな構造変化を引き起こし、膜を越えた基質輸送を可能にしている。すなわちSufBCD複合体においても、SufCのダイマー化によって、上部のSufB-SufD領域に構造変化が起きるのではないかと予想した。そこでSufBCD複合体の構造変化を実証すべく、立体構造情報に基づいた変異導入によって複合体の構造変化中間状態を捕えようと考えた。具体的には、予想されるSufCダイマー会合面にCys残基を導入し、ATP/酸化剤を組み合わせた架橋実験を行った。その結果、S-S結合によってダイマー状態がロックされた中間状態SufBCD複合体をトラップすることに成功した。また、蛍光ラベル剤を用いた構造変化追跡測定においては、SufCのダイマー化に伴う構造変化で、通常SufB-SufD会合面に埋もれている領域が、一時的に大きく露出することも明らかにできた。これらの結果は、ABCトランスポーターと共通した作動機構を支持するものである。さらに、実証した構造変化と機能発現（Fe-Sクラスター合成）の相関についても検証した。変異体を用いたFe-Sクラスター*in vivo*合成能の評価・分光解析の結果、構造変化によって露出する領域の中に、Fe-Sクラスター合成サイトを同定することができた。

私はこれらの結果を総合し、構造変化とリンクしたFe-Sクラスター合成反応メカニズムを提唱したい。すなわち、SufCのATP依存的なダイマー化を駆動力としたダイナミックな構造変化によって、SufB-SufD会合面内部に埋もれたFe-Sクラスターの配位子が露出することで、Fe-Sクラスターの合成が達成されると考えている。本研究で明らかとなったSufBCD複合体の作動機構は、ABCトランスポーターと共通したものであり、同じメカニズムを用いて、全く異なる機能（膜間輸送 / Fe-Sクラスター合成）を成し遂げるという、興味深い洞察を与えている。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（平林　佳　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	栗栖　源嗣
	副 査	教授	中川　敦史
	副 査	教授	長谷　俊治
	副 査	准教授	中井　正人
	副 査	教授	高橋　康弘（埼玉大学大学院理工学研究科）
	副 査	准教授	和田　啓　（宮崎大学テニュアトラック推進機構）

論文審査の結果の要旨

鉄硫黄（Fe-S）タンパク質は、生物界に普遍的に分布し、呼吸、光合成、クエン酸回路、遺伝子発現制御などの基本的生命活動に重要な役割を担うタンパク質群である。各生体反応ではたらく多種多様な Fe-S タンパク質の機能発現には、共通して「Fe-S クラスター」と呼ばれるコファクターが必要であり，生体内における Fe-S クラスターの合成には、SUF マシナリーと呼ばれる多成分酵素系が中心的な役割を担っている。SUF マシナリーで働く SUF タンパク質群については，機能解析は進んでいたものの，その詳細な分子メカニズムの理解が遅れている状況にあった。本論文では、Fe-S クラスターの合成過程ではたらく SufBCD 複合体に焦点をあて、その構造機能相関の解明に取り組んでいる。

学位論文の前半では，これまで未知であった SufBCD のヘテロ 4 量体の結晶構造解析に取り組んだ。SufB/SufC/SufD の遺伝子を、遺伝子組換え大腸菌を用いて同時に発現させることで安定な 3 成分の複合体として精製することに成功している。さらに、熱安定性性状解析から最適な溶媒条件を選定し、結晶化スクリーニングを進めることで、大腸菌由来 SufBCD 複合体の立体構造を 2.95 Å 分解能で決定している。得られた構造情報と ABC 輸送体とのアナロジーから、機能的に重要な構造部位を推定するに至っている。

論文の後半では、構造から推定した機能的に重要な部位として ATPase の 2 量体界面と Fe-S クラスターの予想結合部位に着目し、大腸菌を用いた新しいアッセイ系や蛍光色素測定なども併用して、推定機能部位の重要性を明らかにした。論文の最後に、これら構造解析、機能解析の結果を総合的に考察して、現在考え得る SufBCD 複合体の Fe-S クラスター形成の分子機能モデルを新たに提唱している。

以上、本論文では、生物学的に重要な Fe-S クラスター形成の詳細な分子機構の解明につながる研究成果を挙げ、構造生物学的に重要な貢献を行ったと判断する。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。