OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure-function relationships of the menaquinol:cytochrome c oxidoreductase in the green sulfur bacterium Chlorobaculum tepidum
Author(s)	岸本, 拓
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92176
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　（　岸本　拓　　）	
論文題名	Structure-function relationships of the menaquinol:cytochrome *c* oxidoreductase in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* (緑色硫黄細菌*Chlorobaculum tepidum*におけるメナキノール:シトクロム*c*酸化還元酵素の構造機能相関)

論文内容の要旨

キノール:シトクロム（cyt）*c*酸化還元酵素（cyt*bc* 複合体)は、ミトコンドリア、葉緑体といったオルガネラや細菌に存在するエネルギー変換装置であり、呼吸や光合成の電子伝達鎖で機能する重要な膜タンパク質複合体である。この複合体は、電子伝達反応と膜を介したプロトン輸送とを共役させた特徴的な反応を行い、その結果、ATP合成に不可欠であるプロトン駆動力（*pmf*）を生成している。これらのタンパク質は、少なくとも3つの膜貫通タンパク質、cyt *b*、Rieskeタンパク質、cyt c_1(シアノバクテリアや葉緑体ではcyt *f*)から構成されおり、cyt *b*には2つのヘム*b*、cyt c_1または*f*には1つのヘム*c*、Rieskeタンパク質には1つの鉄硫黄クラスターが含まれている。紫色光合成細菌では、cyt bc_1複合体の3つの膜貫通タンパク質をコードする遺伝子が、ゲノム上に単一のオペロンとして配置されている。しかし、緑色硫黄細菌ではオペロンの転写ユニットにcyt c_1または*f*をコードする遺伝子が存在していない。そのため、緑色硫黄細菌がもつcyt *bc*複合体は、Rieskeタンパク質とcyt *b*の2つのサブユニットのみからなるより始原的な構造や機能を持つ、Rieske/cyt*b*複合体であり、cyt c_1や*f*は進化の過程において後で獲得されたものであると長い間考えられてきた。この複合体は反応中心へと直接電子を伝達していると考えられたが、その実態は明らかにされていなかった。一方で、緑色硫黄細菌*Chlorobaculum tepidum*の膜を用いて得られた分光学的なデータから、556nmに吸収スペクトルのαピークを持つ膜結合型の*c*型シトクロム（cyt *c*-556）が、Rieskeタンパク質から反応中心のcyt c_zへの電子伝達反応に関わっていることを我々は明らかにしていた。cyt *c*-556は共有結合した脂肪酸鎖で膜にアンカーしていると考えられており、Sox系からcyt c_zに電子を伝達する水溶性cyt *c*-554をコードしている*CT0075*遺伝子の上流に位置している*CT0073*遺伝子が、cyt *c*-556をコードする遺伝子の候補であると考えられた。水溶性のcyt *c*-554はRieskeタンパク質から電子を受け取らないことが明らかとなっており、これらのシトクロムはcyt c_zへ独立して電子を伝達しているという点で機能的に関連している。

本研究では緑色硫黄細菌の反応中心に電子を伝達するRieske/cyt*b*複合体の実態を解明することを目的として、まずこの複合体の単離精製を試みたが、嫌気性細菌で機能することタンパク質複合体は酸素存在下では不安定であり、単離精製が困難であった。一方で、複合体においてRieskeタンパク質の可溶性ドメインは様々な生物種においてその構造決定が行われていることから、*C. tepidum*についてもRieskeタンパク質およびCT0073タンパク質の可溶性ドメイン(Rieske$_{sol}$, CT0073$_{sol}$)に着目した。まず1章において*CT0073*遺伝子が*c*型シトクロムとして発現していることを質量分析により確認し、CT0073タンパク質がcyt c_zへ電子を伝達するcyt *c*-556であることをin vitroでの再構成実験により示した。これらのことから、*CT0073*遺伝子はcyt *c*-556をコードすることを明らかにした。2章および3章ではcyt *c*-556$_{sol}$およびRieske$_{sol}$の構造決定を行った。cyt *c*-556$_{sol}$はクラス1型の構造を保持しており、Rieske$_{sol}$は光合成電子伝達鎖で機能しているRieskeタンパク質と同様に双葉型であった。4章ではNMR法を用いて、これらのタンパク質間の相互作用を検証した。酸化型のRieske$_{sol}$に酸化型のcyt *c*-556を加えたところ化学シフト変化は観測されなかったが、部分的に還元されたcyt *c*-556$_{sol}$を加えたところ変化を観測した。このことから、Rieskeタンパク質とcyt *c*-556が電子伝達反応のために過渡的な複合体を形成することが分かった。シグナル帰属により、Rieske$_{sol}$のcyt *c*-556に対する相互作用部位を決定したが、この部位はクラスター近傍の非極性のアミノ酸残基領域であった。次に、特定した相互作用部位を指定することでZDOCK serverおいてドッキングモデルを作製した。このモデルを用いて相互作用を検証した結果、水溶性タンパク質の電子伝達で見られるような静電的な長距離相互作用は必要ではなく、非極性相互作用により近接するタンパク質間で電子伝達に適した配向が実現することが明らかとなった。これらの結果から、緑色硫黄細菌のメナキノール:シトクロム*c*酸化還元酵素は、Rieskeタンパク質とcyt *c*-556が相互作用するcyt *bc*複合体として機能しており、水溶性シトクロムのcyt *c*-554ではなく、膜アンカー型のcyt *c*-556を介して反応中心へ電子を伝達していることを明らかにした。また、cyt *c*-556がcyt *f*へと変化することで、光合成電子伝達鎖で機能するcyt b_6f複合体へ進化したというモデルを提案した。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　岸本　拓　）	
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	栗栖　源嗣
	副 査　教授	昆　隆英
	副 査　教授	大岡　宏造
	副 査　准教授	田中　秀明
	副 査　准教授	宮ノ入　洋平

論文審査の結果の要旨

学位申請者は、緑色イオウ光合成細菌 *Chlorobaculum tepidu*m がもつメナキノール:シトクロム *c* 酸化還元酵素の構造機能相関を解明することを目的とし、「STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF THE MENAQUINOL:CYTOCHROME *C* OXIDOREDUCTASE IN THE GREEN SULFUR BACTERIUM *CHLOROBACULUM TEPIDUM*(緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidu*mにおけるメナキノール:シトクロム *c* 酸化還元酵素の構造機能相関)」と題する研究を行った。

キノール:シトクロム *c* 酸化還元酵素（シトクロム(cyt) *bc* 複合体）は呼吸や光合成の電子伝達鎖において不可欠な膜タンパク質複合体であり、ミトコンドリア、葉緑体などのオルガネラをはじめ、広く細菌に存在するエネルギー変換装置である。複合体を構成するサブユニットは少なくとも 3 種類存在し、それらは cyt *b*（シアノバクテリアや葉緑体では cyt b_6 とサブユニット IV に分裂)、cyt c_1（シアノバクテリアや葉緑体では cyt *f*)、Rieske タンパクである。紅色光合成細菌の cyt bc_1 複合体では、これらサブユニットをコードする遺伝子は同一オペロン上に存在する。一方、緑色イオウ光合成細菌には cyt c_1 をコードする遺伝子が見つからず、Rieske/cyt*b* 複合体が始原型のコアユニットとして機能すると提唱されてきた。しかし標品調製の困難さから断片的な報告が多く、光合成電子伝達鎖における知見は非常に希薄であった。本論文では、申請者は緑色イオウ光合成細菌の反応中心に電子を供与するメナキノール:シトクロム *c* 酸化還元酵素の生化学的実体を解明した。

これまでの研究において、緑色イオウ光合成細菌の膜標品には分光学的に見いだされた膜結合型 cyt *c*-556 が存在し、Rieske タンパクから反応中心複合体のサブユニット cyt c_z への電子伝達反応に関与していることが示唆されていた。そこで本論文ではまず 1) CT0073 遺伝子が膜結合型 cyt *c*-556 をコードすることを明らかにした。具体的には CT0073 遺伝子が *c* 型ヘムタンパクとして発現していることを質量分析により確認し、CT0073 タンパクが cyt c_z への電子伝達反応を担う cyt *c*-556 であることを in vitro による再構成実験から示した。次に構造的側面から議論するために 2) cyt *c*-556、および 3)Rieske タンパクの可溶性ドメインの X 線結晶構造解析を行った。cyt *c*-556 は典型的なクラス 1 型の構造を保持し、Rieske タンパクは光合成電子伝達鎖で働く Rieske タンパクに特徴的な双葉構造であった。最後に 4) Rieske タンパクと cyt *c*-556 の相互作用を NMR 法により調べた。酸化型どうしを混合すると化学シフト変化は観測されなかったが、還元型の cyt *c*-556 を調製して混合したところ相互作用に由来する化学シフト変化が観測された。このことは Rieske タンパクと cyt *c*-556 の間では電子伝達反応に起因する過渡的な複合体形成が生じることを意味する。また Rieske タンパク上の相互作用部位は、[2Fe-2S]クラスター周辺に存在する非極性のアミノ酸残基領域であった。水溶性電子伝達タンパク間で見られるような電荷的な長距離相互作用の過程は必要なく、非極性残基が関わる疎水的相互作用により近接タンパク間で電子伝達に適した配向が実現することを明らかにした。

申請者は、緑色イオウ光合成細菌のメナキノール:シトクロム *c* 酸化還元酵素は Rieske タンパクと膜結合型 cyt *c*-556 が相互作用する cyt *bc* 複合体として機能することを明確にした。また cyt *bc* 複合体は進化のなかで様々なヘムタンパクを付加させながら多様化してきたことも示した。本論文の研究内容は、ATP 合成に不可欠な H^+駆動力を形成する cyt *bc* 複合体の反応機構と進化的成立過程を理解する上で，大変意義のある成果である。

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。