

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570039
 研究課題名 (和文) 酸素発生型光合成生物における光化学系 I 活性中心の生合成の分子メカニズムの解明
 研究課題名 (英文) Molecular analysis on biogenesis of iron-sulfur centers of photosystem I in oxygen-evolving organisms
 研究代表者
 中井 正人 (NAKAI MASATO)
 大阪大学・蛋白質研究所・准教授
 研究者番号：90222158

研究成果の概要：

鉄硫黄蛋白質はポリペプチド鎖に無機の鉄と硫黄が鉄硫黄クラスターと呼ばれる特徴的な配位構造を形成して組み込まれている生物界に広く分布する蛋白質の総称で、呼吸鎖や光化学系の電子伝達鎖におけるキーコンポーネントとして細胞内で様々な代謝活動に参与している。本研究では、酸素発生型の光合成を営む植物葉緑体やらん藻を材料に、鉄硫黄クラスター生合成の分子メカニズムに焦点を当て研究を進めた。その結果、光化学系 I の鉄硫黄クラスター活性中心の生合成に参与する因子のキャラクタリゼーションに成功した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2008 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：植物分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理 分子

キーワード：鉄硫黄クラスター・膜蛋白質複合体・生合成・葉緑体・光化学系・オルガネラ

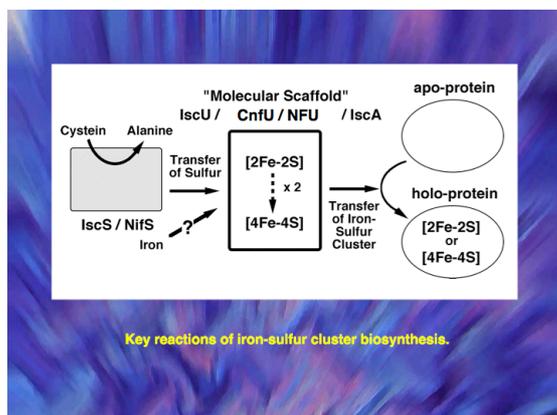
1. 研究開始当初の背景

(1) われわれはこれまでに、らん藻および植物葉緑体に存在する CnfU 蛋白質が [2Fe-2S] 型の鉄硫黄クラスターを保持し、そのクラスターを基質蛋白質であるアポ型の ferredoxin 分子へと *in vitro* において効率よく転移することができ

る、すなわち鉄硫黄クラスター生合成過程において、Scaffold protein (足場蛋白質) として中心的な役割を果たすことを示してきた。

(2) さらに CnfU の発現量が減少した葉緑体ではフェレドキシンだけでなく光化学系 I の生合成も影響を受けることを見

いだし、CnfU蛋白質が酸素発生型光合成を営む細胞内環境において重要な役割を演じていることを明らかにしている。またIscAと名付けられた蛋白質も、やはりScaffold proteinとして鉄硫黄クラスターを一過的にアセンブリーすることができる事が分かってきている。



2. 研究の目的

本研究では、われわれのこれまでの研究をさらに発展させ、i) [2Fe-2S]型鉄硫黄クラスターの足場タンパクCnfUの構造学的基盤はどのようなものか？ ii) Sufコンポーネントからどのように CnfUへ鉄硫黄クラスターが供給されているか？ iii) CnfUから光化学系Iの [4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターの供給に関与すると予想されているHcf101がどのような役目を担っているか？ 等を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

解析は、らん藻としては *Synechocystis* PCC6803 や *Anabaena* PCC7120、および *Thermosynechococcus elongatus*を、植物としては シロイヌナズナを材料として用い、比較解析しながら進める。手法としては大腸菌で発現させた組み換え精製蛋白質による生化学的解析に加え、ノックアウト株や相補株を用いた分子遺伝学および分子細胞生物学的解析を行なう。さらには、EPRやEXAFS測定および結晶構造解析等、生物物理学的手法により、関与する因

子の立体構造やそこに結合する鉄硫黄クラスターの微細構造や電荷状態についての構造情報を得ることを目指す。

葉緑体における鉄硫黄クラスター生合成のうち、少なくとも硫黄の供給はSufS (cpNifS) およびcpSufEを含むSufマシナリーを介して行われることが分かっている。これまで 葉緑体内で足場として働くCnfUおよびHcf101と Suf マシナリーの機能的関連は調べられていない。一方、葉緑体のcpSufEは Bo1Aと呼ばれるエクストラドメインを有し、このドメインが Grx (グルタレドキシン) と相互作用していることが推測されている。実際これまでの予備的な解析から、cpSufE は葉緑体内で Grx と複合体を形成していること、大腸菌で共発現させたcpSufEとGrx も複合体を形成するが、この複合体は鉄硫黄クラスターと考えられるコファクターを結合しうること、このコファクターを不安定化させると複合体も不安定化すること、が分かっている。以上の結果は、Sufマシナリーから供給される鉄硫黄クラスターが Grx の関与のもと CnfUやHcf101 といった光化学系Iへの鉄硫黄クラスターの運び屋蛋白質に供給されている可能性を示唆している。

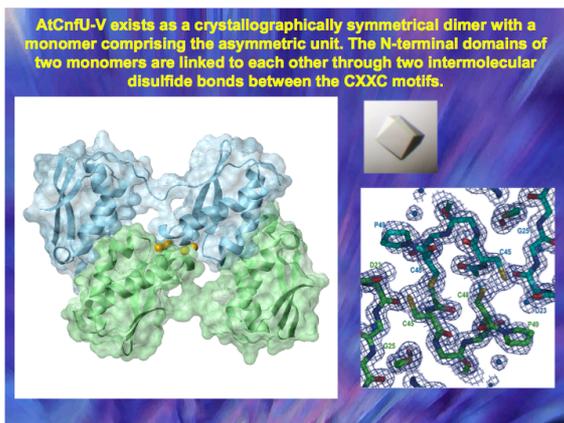
そこで、cpSufE-Grx複合体と CnfUおよびHcf101 の生化学的性質や分子間相互作用に関して、葉緑体ストロマを使った解析、並びに、大腸菌で発現させた精製蛋白質を用いた in vitro の解析を並行して進める。また、cpSufE-Grx複合体から これらの蛋白質への鉄硫黄クラスターの転移が起こるかどうか、そこに還元力が必要なかどうか、等、詳細に解析を行う。また、これらの因子の機能的関連を in vivo においても解析するために、これらのコンポーネントのいずれかを欠損した変異体を親株として、掛け合わせによりダブルミュータントを作製した。その表現形質をシングルミュータントと比較したり、そこから調製した葉緑体における鉄硫黄クラスター形成能や、PSIをはじめ内在性の鉄硫黄蛋白質の生合成状態を解析する。

4. 研究成果

まず、葉緑体内[4Fe-4S]クラスター形成

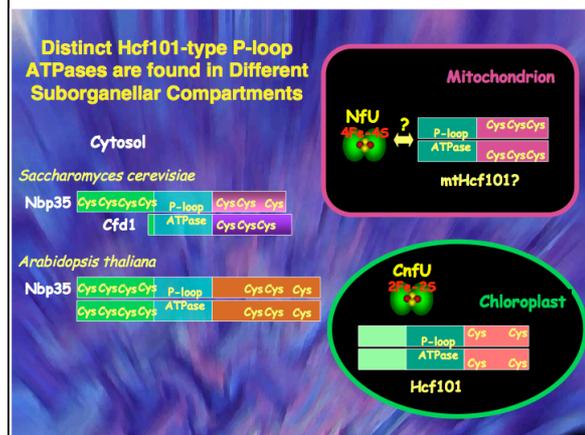
の鍵となるHcf101蛋白質について、精製を行い低温EPRスペクトルおよびNTPase活性の有無を測定した。また、シロイヌナズナに存在するHcf101 ホモログであるNbp35 についても、野生型および変異体の精製を行い、低温EPRスペクトル、NTPase活性測定等を行い、Hcf101 との相違点および共通点を明らかにした。また 葉緑体内で [2Fe-2S]型クラスターの足場であるCnfU や [4Fe-4S] 型クラスターの足場であると考えられるHcf101 に 鉄硫黄クラスターを組み込むメカニズムについて特に近年その関与が推測されている glutaredoxin についても その生化学的性質と植物における必須性について 解析を進めた。

われわれのこの2年間の研究で、葉緑体Hcf101が実際に鉄硫黄クラスターを結合する足場蛋白質として機能すること、そのアミノ末端側ドメインとカルボキシル末端側ドメインに結合している鉄硫黄の分子種が異なっている事を示す結果を得ている(論文準備中)。このことは、このHcf101蛋白質が、CnfUから下流で光化学系に鉄硫黄クラスターを供給する鍵となる蛋白質であることを示唆しており、現在その構造と機能に関して詳細な解析を進めている。また細胞質にもHcf101ホモログであるNbp35が存在しているが、この蛋白質

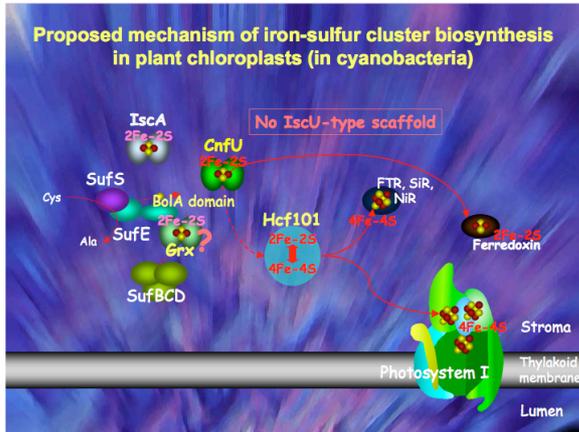


においてもATP結合ドメインを挟んだアミノ末端側ドメインとカルボキシル末端側ドメインに異なるタイプの鉄硫黄クラスターを保持する事が我々の最近の研究で分かっており、このファミリーに属する蛋白質上で異なるタイプの鉄硫黄クラスターが構築される可能性が高くなってきて

いる。



葉緑体を持たない酵母や動物の細胞では鉄硫黄クラスターの生合成はミトコンドリアで行われるが、鉄硫黄クラスターの生合成に異常をきたした細胞では、鉄の蓄積や硫黄代謝などに大きな変化が生じ細胞活動に重篤な影響が出る。これは遊離の鉄や硫黄が極めて反応性が高く細胞にとって危険な分子であるからにほかならない。言い換えれば、ミトコンドリア内での鉄硫黄クラスターの生合成は通常そのような影響がでないように厳密にコントロールされている。葉緑体内は光合成による酸素発生が行われる場であり、もし遊離した鉄や硫黄が蓄積すれば、容易く反応し細胞毒性を持った各種酸素ラジカルの発生につながる。このような観点から、葉緑体内でも鉄硫黄クラスターの生合成は厳密にコントロールされている必要がある。われわれの最近の研究から、この制御のキーとなっているのがSufEと呼ばれる蛋白質である事が分かってきた。葉緑体SufEには硫黄原子を運搬するドメインの他に、他の生物のSufEには見られないBo1Aドメインが存在している。われわれは、このドメインには葉緑体局在の二種類のグルタレドキシシンが結合することを見いだした。しかもその結合には何らかの鉄硫黄の分子種の介在を必要とする。グルタレドキシシン自身は様々な生物に存在しレドックス制御の要と働く蛋白質であるが、葉緑体鉄硫黄クラスター生合成においても、この蛋白質が制御の中心となって働いている可能性が高くなってきた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Kohbushi Hirokazu, Nakai Yumi, Kikuchi Shingo, Yabe Toshiki, Hori Hiroshi, Nakai Masato. Arabidopsis cytosolic Nbp35 homodimer can assemble both [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in two distinct domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 378(4):810-815. 査読有り

② Asakura Yukari, Kikuchi Sshingo, Nakai Masato. Non-identical contributions of two membrane-bound cpSRP components, cpFtsY and Alb3, to thylakoid biogenesis. *The Plant Journal*. 2008; 56:1007-1017. 査読有り

③ Oikawa Kazusato, Yamasato Akihiro, Kong Sam Geun, Kasahara Masahiro, Nakai Masato, Takahashi Fumio, Ogura Yasunobu, Kagawa Takatoshi, Wada Masamitsu. Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. *Plant Physiology*. 2008; 148(2):829-842. 査読有り

④ Nakai Yumi, Nakai Masato, Hayashi Hideyuki. Thio modification of yeast cytosolic tRNA requires a ubiquitin-related system that

resembles bacterial sulfur transfer systems.

Journal Biological Chemistry. 2008; 283(41):27469-27476. 査読有り

⑤ Yabe Toshiki, Yamashita Eiki, Kikuchi Akihiro, Morimoto Kozo, Nakagawa Atsushi, Tsukihara Tomitake, Nakai Masato. Structural analysis of Arabidopsis CnfU protein: an iron-sulfur cluster biosynthetic scaffold in chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*. 2008; 381(1):160-173. 査読有り

⑥ Nakai Yumi, Nakai Masato, Lill Roland, Suzuki Tsutomu, Hayashi Hideyuki. Thio modification of yeast cytosolic tRNA is an iron-sulfur protein-dependent pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 2007; 27(8):2841-2847. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

① 中井由実, 中井正人, 林秀行 2008年12月11日 横浜 日本生化学会・日本分子生物学会合同大会 ユビキチン様タンパク質 Urm1 と硫黄運搬タンパク質 Uba4 は酵母サイトゾル tRNA の硫黄修飾に必要である。

② 桂真一郎, 矢部俊樹, 中井正人 2007年12月13日 横浜 日本生化学会・日本分子生物学会合同大会 葉緑体における cpSufE と AtGrx3 の相互作用と Fe-S クラスター生合成との関連について

③ 矢部俊樹, 堀洋, 中井正人 2007年12月13日 横浜 日本生化学会・日本分子生物学会合同大会 [4Fe-4S] 型鉄硫黄クラスター形成に関与する蛋白質 HCF101 の機能解析

④ 中井由実, 中井正人, 林秀行 2007年12月13日 横浜 日本生化学会・日本分子生物学会合同大会 酵母 tRNA の 2チオ修飾と鉄硫黄クラスター形成経路の関係

⑤ Nakai Masato 2007年7月10日 フランス
 ヴィラドゥランス
 CnfU, Nfu, & NifU : Similar but Distinct
 Fe-S Cluster Biosynthetic Scaffolds
 Required under Different Intracellular
 Conditions.

Biogenesis of Iron Sulfur proteins:
 Cluster Assembly and regulation

⑥ 矢部俊樹, 山下栄樹, 菊池晶裕, 齋藤正男,
 中井正人 2007年6月23日 仙台 東北大学
 第34回 生体分子科学討論会 葉緑体
 における鉄硫黄クラスター生合成機構の構
 造生物学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 正人 (NAKAI MASATO)
 大阪大学・蛋白質研究所・准教授
 研究者番号 : 90222158

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者