

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570040

研究課題名（和文）葉緑体鉄硫黄クラスター供給システムの分子機構とその制御に関する解析

研究課題名（英文） Analysis on molecular mechanism and regulation of iron-sulfur cluster delivery system in chloroplasts

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（和文）：

本研究では、酸素発生型の光合成を営む植物葉緑体において、酸素に不安定な鉄硫黄クラスターの供給システムに焦点を当て、その分子機構と制御メカニズムの詳細を明らかにすることを目的として研究を進めた。その結果、これらの過程において鍵となる役割を担う葉緑体 cpSufE と2種類のモノチオール型グルタレドキシンおよび cpHcf101 蛋白質に関して、機能に必須なアミノ酸残基の特定、鉄硫黄クラスター様分子の付加などを確認することができた。

研究成果の概要（英文）：

The main objective of this study was to elucidate molecular mechanism and regulation of oxygen-labile iron-sulfur cluster biogenesis in higher plant chloroplasts which perform oxygen-evolving photosynthesis. We identified and characterized key components involved in these processes which include cpSufE protein, two monothiol-type glutaredoxins, and cpHcf101 protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ、レドックス制御、光化学系、生合成、葉緑体、補欠分子族、鉄硫黄蛋白質、電子伝達

1. 研究開始当初の背景

生物界に広く分布する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電子伝達のキーコンポーネントとして細胞内で

様々な代謝活動に関与している。鉄硫黄蛋白質、そしてその活性中心である鉄硫黄クラスターが細胞のエネルギー生産系の中核コンポーネントを占めるのは、地球上に生命が誕生した初期の細胞活動が鉄や硫黄が豊富に存在する環境で営まれたことと、これらの無機分子が非常に反応性に富み、さまざまな化

学反応を触媒するのに好都合であったことに由来すると思われる。反応性が高いということは細胞にとって一面好都合でもあったが、反面、非常に危険な分子となりうることを含み持つ。細胞は長い歴史の中で、自然界に存在する鉄と硫黄を安全に利用するため、剥き出しの鉄硫黄クラスター分子を蛋白質のポリペプチド鎖へと導入しコントロールして用いるすべを獲得してきたと考えられる。

細胞内の鉄硫黄クラスター形成の分子メカニズムは、始原バクテリアで確立されたメカニズムが様々な細胞に受け継がれ、その様々な生育環境に適したメカニズムをそれぞれの細胞内で獲得しフィットさせてきたと考えられる。このような柔軟性は、細胞の適応戦略として大変興味があるものであるし、このような柔軟性が要求されるというのは、逆に言えば鉄硫黄クラスターがそれだけ様々な環境に敏感に影響を受けやすいからであるとも理解できる。鉄や硫黄が酸素に対して不安定であることを考えれば、酸素発生型の光合成を営むらん藻、高等植物葉緑体では、酸素を発生する細胞内環境ならではの鉄硫黄クラスター生合成の分子メカニズムが進化してきたと考えられる。

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、それを基質蛋白質であるアポ型の ferredoxin 分子へと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。さらに CnfU の発現量が減少した葉緑体では ferredoxin 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示した。また IscA 蛋白質も、やはり鉄硫黄クラスターを一過的にアセンブリすることができることが分かってきている。われわれは、これらの蛋白質の作用機構を原子レベルで解明するため立体構造解析に着手し、最近、植物葉緑体の CnfU 蛋白質については、そのアポ型の立体構造およびチャージされた [2Fe-2S] 型鉄硫黄クラスターの微細配位構造を、らん藻 IscA 蛋白質については、鉄硫黄クラスターがチャージされた状態のホロ型の立体構造を、いずれも世界に先駆けて決定することに成功している。植物葉緑体で鉄硫黄クラスター形成に関与する他の因子としては、システインからの硫黄原子の引き抜きに関与する SufSE の他、鉄の供給に関与するのではと考えられている SufBCD が見つかってきており、これらは CnfU 等の足場蛋白質上に一過的な鉄硫黄クラスターを構築するのに必要であると考え

られている。

一方 CnfU から下流への鉄硫黄クラスターの流れはよく分かっていなかった。CnfU 自身は [2Fe-2S] 型のクラスターを保持しうるが、そこで組み立てられたクラスターは、[2Fe-2S] 型だけでなく、最終的には [4Fe-4S] 型クラスターとしても供給されると考えられる。この過程に関与すると予想される蛋白質のひとつは、Hcf101 と呼ばれる ATP 結合ドメインを有する蛋白質である。シロイヌナズナの Hcf101 欠損株では光化学系 I の他、[4Fe-4S] 型クラスターを持つ蛋白質の生合成が影響を受けるが [2Fe-2S] 型のクラスターを持つものは影響を受けない。興味深いことに、この蛋白質のアミノ末端側のドメインも、CnfU に近い立体構造を形成する可能性が高く、CnfU との機能的関連に注目が集まっている。

われわれの最近 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。

一方、葉緑体の鉄硫黄クラスター生合成の制御という観点からは研究が進んでいない。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はほかならない。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。では葉緑体内ではどうであろうか。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であろう。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ンの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。

2. 研究の目的

このような研究の背景に基づき、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) 葉緑体 SufE と 2 種類のグルタレドキシンの相互作用の *in vivo* 解析; ii) 2 種類のグルタレドキシンのそれぞれ、および両方を欠失させた変異植物体の形質の詳細の解析と各種酸化ストレスに対する感受性の解析; iii) 大腸菌で発現精製したリコンビナントの SufE とグルタレドキシンの相互作用の *in vitro* 解析; iv) 結晶構造解析・NMR 解析等、物理学的手法による SufE とグルタレドキシンの相互作用の構造的基盤に関する解析 といった観点から研究を進める。

In vivo 解析は、シロイヌナズナを材料として用い、T-DNA ノックアウト株や RNAi による発現抑制株、および種々の変異を導入した改変遺伝子による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。また *in vitro* 解析では、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、結晶構造解析や NMR 解析、さらには、EPR や EXAFS 測定等、各種の生物物理学的手法により、SufE とグルタレドキシンの相互作用の構造的基盤や、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詳細な構造情報を得ることを目指す。本研究で得られる成果は、植物葉緑体が、光化学系 I という多量の鉄硫黄クラスターを必要としながら、一方で酸素発生という鉄硫黄クラスター生合成にとっては不利な副産物を生成するような光合成を効率的に営む上で、獲得してきた環境適応戦略の仕組みを明らかにする良いモデルとなると期待できる。

鉄硫黄クラスター生合成と制御メカニズムの研究は、大腸菌やミトコンドリアや窒素固定細菌など、酸素発生を伴わない細胞内環境を持つ生物で主に進められてきた。したがって、本研究で提案するような、酸素発生型の細胞内環境での鉄硫黄クラスター生合成

の分子メカニズムと密接に関連した制御機構をターゲットとするような研究は殆どなされていない。一方、葉緑体を持たない真核細胞では酸素を消費するオルガネラであるミトコンドリアで鉄硫黄クラスターの生合成が行われており、そこに関与する因子も葉緑体のそれとは異なっている。そして、その制御のメカニズムも酸素消費型細胞内環境に適したものとなっているはずである。本研究より明らかになる葉緑体での鉄硫黄クラスター生合成とその制御の分子機構について、海外の複数グループにより解析が進行中のミトコンドリア内のものと比較解析を行なうことで、異なる細胞内環境での生物の適応戦略がより明確になると期待される。

3. 研究の方法

(1) 葉緑体 SufE と 2 種類のグルタレドキシンの相互作用の *in vivo* 解析

我々はこれまで葉緑体 SufE および 2 種類のグルタレドキシに対する特異抗体の調製に成功しているが、これら特異抗体を用いた免疫沈降実験から、シロイヌナズナの葉緑体ストロマにおいて、これらの分子が実際に相互作用している事を明らかにしている。そこで、この実験系を用いて、相互作用が葉緑体のどのような生理条件の時にどのような影響を受けるか、例えば植物の生育の様々なステージ（暗期と明期や、子葉・本葉・老化葉など）で調製した葉緑体ストロマ、さらには植物体を様々なストレス（強光、酸化ストレス、熱ストレス、鉄や硫黄の飢餓および過剰状態など）にさらし、そこから調製した葉緑体ストロマにおいて解析することで、SufE とグルタレドキシンの相互作用に関する生理的意義に関する知見を得る。また、この際、SufE との相互作用に関して 2 種類のグルタレドキシで差異が認められるか、詳しく検討する。

(2) 2 種類のグルタレドキシンのそれぞれ、および両方を欠失させた変異植物体の形質の詳細の解析と各種酸化ストレスに対する感受性の解析

我々はこれまで 葉緑体 SufE と相互作用する 2 種類のグルタレドキシについて T-DNA 挿入変異株および RNAi による発現抑制株の確立に成功している。そこでまず、それぞれのグルタレドキシについての欠失や発現量の低下が、植物体にどのような影響を与えているか表現形質について詳細に調べる。そして、葉緑体内の鉄硫黄蛋白質や光化学系の存在量や活性化状態を調べる。次に、観察された影響が、変異体の葉緑体ストロマ中での鉄硫黄クラスター生合成活性とどのように関連しているか調べる。その際、片方のグルタレドキシンの欠失や発現量の低下

が、残っているもう片方のグルタレドキシンの SufE との相互作用様式にどのように影響を与えているか解析する。これらの解析は、

(1) で挙げたような様々なストレスにさらした植物体についても行い、これらグルタレドキシンの *in vivo* において担っている役割についての知見を得る。さらに、確立された2種類のグルタレドキシンの単独の変異株ラインを掛け合わせるにより、2重変異株ラインを作製する。この際、2重変異は胚性致死もしくは芽生え初期に致死になる可能性も充分考えられる。その場合は、より生化学的解析に適した RNAi 発現抑制株との掛け合わせによりデフェクトが部分的に生じているようなラインの確立をおこなう。また、誘導型 RNAi の発現コンストラクトを用いて、ある程度生育させておいてからグルタレドキシンの発現を完全に抑えるようなラインの確立を目指す。

(3) 大腸菌で発現精製したリコンビナントの SufE とグルタレドキシンの相互作用の *in vitro* 解析

我々はこれまで、SufE とグルタレドキシンの大腸菌内での発現系の構築に成功している。また、これら大腸菌内において共発現させた時に複合体を形成することを確認しており、さらにこの複合体形成には、何らかの鉄硫黄分子種の介在が必要である事を見いだしている。その複合体形成様式は葉緑体内で実際に観察される SufE とグルタレドキシンの相互作用様式と同一であることが期待できるが、この事をさらに詳細に検討する。手法としては、大量調製した野生型葉緑体ストロマから、SufE-グルタレドキシンの複合体の精製を試み、大腸菌より精製したリコンビナントの複合体と生化学的性質（吸収スペクトル、酸化剤・還元剤に対する反応性・感受性）を比較する 1), 2)。この際、システインから硫黄を引き抜き SufE へと渡す SufS（葉緑体 cpNifS）も精製済みであり、これを用いて、リコンビナントの SufE-グルタレドキシンの複合体とストロマから精製した SufE-グルタレドキシンの複合体について、SufS からの硫黄受け取り能力を比較する。また、鉄およびアポ型足場蛋白質 CnfU 共存下での鉄硫黄クラスター再構成反応系 1), 2) に加えることで、SufE-グルタレドキシンの複合体からの硫黄遊離活性、および鉄硫黄クラスター形成活性を比較する。この際、SufE 単独の場合とも比較し、グルタレドキシンの結合が SufE の機能にどのようなインパクトを持っているのか明らかにする。

(4) 様々な変異を導入した SufE とグルタレドキシンの相互作用の *in vitro* 解析

初年度の解析で得られた SufE と2種類のグルタレドキシンの相互作用様式に関するデータをもとに、それらのアミノ酸配列上、

相互作用や機能に必要なと思われるアミノ酸残基を多数予想し、それらに変異を導入した改変遺伝子を多数作製する。これをさまざまな組み合わせで大腸菌内で発現させ、導入した変異が、SufE とグルタレドキシンの物理的相互作用にどのような影響を与えるのか、介在する鉄硫黄分子種の保持にどのような影響を与えるのか、SufS からの硫黄の受け取りや足場蛋白質への硫黄の受け渡しにもどのような影響を与えるのか、*in vitro* の再構成実験等により解析し、これらのアミノ酸残基が果たす役割を明らかにする。

(5) cpHcf101 蛋白質を欠失させた変異植物体を用いた相補実験

in vivo においても意義のあることなのかどうか検証する事は重要である。そこで、解析に用いた変異の中で典型的な影響を与える変異体を選別し、これを誘導発現型プロモーター下に組み込み、2種類のグルタレドキシンのそれぞれ、および両方を欠失させた変異植物体に形質転換する。得られた形質転換個体を誘導発現条件下におき、導入した変異が、SufE とグルタレドキシンの相互作用に与える影響、葉緑体内鉄硫黄クラスター生合成に与える影響、各種ストレスに対する感受性に与える影響を調べる。

4. 研究成果

初年度は これまでの研究をさらに発展させ、i) 葉緑体 SufE と2種類のグルタレドキシンの相互作用の *in vivo* 解析; ii) 2種類のグルタレドキシンのそれぞれ、および両方を欠失させた変異植物体の形質の詳細の解析と各種酸化ストレスに対する感受性の解析; iii) 大腸菌で発現精製した SufE とグルタレドキシンの相互作用の *in vitro* 解析といった観点から研究を進めた。In vivo 解析は、シロイヌナズナを材料として用い、T-DNA ノックアウト株や RNAi による発現抑制株、および種々の変異を導入した改変遺伝子による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った。また *in vitro* 解析では、大腸菌で発現させた組み換え蛋白質による生化学的解析を進めた。その結果、葉緑体 SufE と2種類のグルタレドキシンの間には相互作用が観察され、さらに相互作用に必要なドメインや、アミノ酸残基の特定、鉄硫黄クラスター様分子の付加などを確認することができた。

この解析はさらに次年度、最終年度へと継続し、葉緑体に存在する2種類のグルタレドキシンのについて、両方を欠失させた変異植物体を単離することができた。Genomic PCR による genotyping および 両蛋白質を区別して認識する事ができる特異抗体を用いた Western 解析により、変異植物個体の葉緑体中では確かに両グルタレドキシンの欠損し

ている事が確認できた。変異個体の各種ストレスに対する生育能を、強光ストレス、酸化ストレス、低温ストレスといった観点から、野生型植物およびシングルノックアウトの植物体との比較解析を進めた。

これら、cpSufE とグルタレドキシンの解析に加えて葉緑体鉄硫黄クラスター形成において特に重要な役割を果たす cpHcf101 蛋白質に関しても以下の研究を進めた。葉緑体光合成電子伝達系において、4Fe-4S 型の鉄硫黄クラスターはフェレドキシソキシソ群や光化学系などに含まれる重要なコアファクターである。この 4Fe-4S 型鉄硫黄クラスターのアセンブリーと組み込みは葉緑体内で起こるが、その分子メカニズムには不明の点が多く残されていた。Hcf101 (high chlorophyll fluorescence 101) 蛋白質は、葉緑体のストロマ側に局在している可溶性蛋白質で、同じくストロマ側に局在する 2Fe-2S クラスターの足場蛋白質 CnfU から、光化学系 1 複合体へ 4Fe-4S クラスターを供給する経路の中間で働くのではないかと考えられている。Hcf101 蛋白質は、鉄硫黄クラスターのリガンドとなる可能性のある保存された Cys を含む N 末端、C 末端ドメインと、中央の p-loop NTPase ドメインを持っている。野生型 Hcf101 蛋白質を発現した大腸菌細胞は鉄硫黄クラスターに特徴的な茶褐色を示すことが知られている。本研究では Hcf101 の鉄硫黄クラスターの保持様式と生理機能との関連を明らかにするために、大腸菌内の組み換え発現システム、またシロイヌナズナ hcf101 ノックアウト株に変異型 Hcf101 を発現させたトランスジェニック植物を用いた部位特異的変異導入解析を進めた。得られた結果は、いくつかの保存された Cys 残基は大腸菌内で発現させた場合、鉄硫黄クラスター保持に関わっている事が分かったが、植物体 in vivo での機能においては、必ずしも必須でない事を示している。この事は、これら単一の変異体においては、おそらく複数ある他のリガンドでその機能が代替されうる可能性を示している。また Cys 残基以外でも in vivo での機能にとっては必要不可欠な残基が確認された。Hcf101 の鉄硫黄クラスター形成とどう関わっているのか、興味を持たれた。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①古谷嘉宏、菊地真吾、中井正人、葉緑体内で鉄硫黄クラスター形成に関与する Hcf101 蛋白質の構造と機能の解析、第 33 回日本分子生物学会、2010. 12. 8、神戸国際展示場

②山の中貴裕、菊地真吾、中井正人、Analysis of the interactions between cpSufE and chloroplastic monothiol glutaredoxins、第 82 回日本生化学会大会、2009. 10. 22、神戸国際会議場

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