

氏 名	か とう しんいちろう 加 藤 伸 一 郎
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1301 号
学位授与の日付	平 成 14 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Enzymological Studies of Cysteine Desulfurases Involved in Iron-Sulfur Cluster Assembly (鉄-硫黄クラスター形成に関与するシステインデスルフラゼの酵素学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 江 崎 信 芳 教 授 關 谷 次 郎 教 授 坂 田 完 三

論 文 内 容 の 要 旨

鉄-硫黄クラスターは、電子伝達に関与するタンパク質をはじめ、酵素やセンサータンパク質など、多種多様な機能性タンパク質の活性中心を構成し、呼吸、光合成、窒素固定、代謝など、多彩な生体反応に関与している。鉄-硫黄クラスターは一般に化学的に不安定で、活性酸素やフリーラジカルなどと反応すると、そのクラスター構造は容易に破壊される。したがって、生体は鉄-硫黄クラスターの高効率な生成系あるいは修復系をもつ必要があると考えられる。窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* では、L-システインをL-アラニンと元素状硫黄に分解するシステインデスルフラゼ(CDS)というピリドキサル酵素が、ニトロゲナーゼに含まれる鉄-硫黄クラスターの形成に関与することが明らかにされている。ところが、窒素固定能をもたない他の多くの生物種も CDS 類縁遺伝子をもつことが明らかになり、CDS は、ニトロゲナーゼのみならず多種多様な鉄-硫黄タンパク質の鉄-硫黄クラスター形成に関与すると推論されている。なお、ほとんどの生物種が複数の CDS 類縁遺伝子をもつことから、CDS 類縁酵素はおのおの固有の機能を担っていると考えられるが、詳細は不明である。

本研究では、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 および大腸菌 *Escherichia coli* を対象とし、CDS 類縁酵素の鉄-硫黄クラスター形成における役割を明らかにするとともに、その過程で CDS は鉄-硫黄クラスターのみならず tRNA の含硫修飾塩基の生成にも関与することを見いだした。研究の具体的成果の概要は次のとおりである。

1) *Synechocystis* sp. PCC6803 に 3 種の CDS 類縁遺伝子を見いだした。これらの遺伝子産物の性質を明らかにするため、おのおのの発現系を構築するとともに、それぞれ均一状態に精製してその酵素学的な機能を調べた。いずれも L-システインを基質として L-アラニンと元素状硫黄を生成する反応を触媒することから、機能的に CDS であることを確認した。ラン藻由来のアポ型フェレドキシン、L-システインならびに二価鉄イオンを含む反応系において、いずれの CDS を触媒として用いた場合も、構造的ならびに機能的に同一のホロ型フェレドキシンが効率よく生成したことから、これらの酵素はいずれも鉄-硫黄クラスター形成能をもつことが証明された。

2) *E. coli* にも 3 種の CDS 類縁遺伝子が存在することから、それぞれの機能を調べた。そのうち *iscS* 遺伝子については、その破壊株においてアコニターゼなどの鉄-硫黄酵素の活性が著しく低下し、それとともに顕著な生育遅延がみられた。一方、他の CDS 類縁遺伝子については、同一の反応を触媒するにもかかわらずこのような現象は認められないことから、*E. coli* においては主に *IscS* が鉄-硫黄クラスター形成に関与していると推論した。*IscS* は細胞内では、*IscU* という鉄-硫黄タンパク質とジスルフィド結合を介して複合体を形成しており、*IscS* 単独の場合に比べ数倍活性化された状態で存在することを見いだした。*IscS* の活性中心システイン残基は、基質 L-システインの分解により生成した硫黄原子をシステインペルスルフィドとして受け取り、この硫黄原子を *IscU* の Cys63 残基に転移した後、*IscU* の二量体において鉄-硫黄クラスターの原形構造が形成されると推論した。

3) *E. coli* の *iscS* 破壊株についてさらに検討した結果、*IscS* は鉄-硫黄クラスター形成のみならず、チアミンや 4-チオ

ウリジンの生合成にも関与することが明らかになった。また、tRNA のアンチコドンループに位置し、翻訳時のコドン認識に重要な役割を果たしている 5-メチルアミノメチル-2-チオウリジンも同様に、*iscS* 破壊株においては生成しなくなることから、IscS はこれらの含硫修飾塩基の生合成に必須の硫黄転移反応を触媒すると推論した。

論文審査の結果の要旨

鉄-硫黄クラスターは、電子伝達に関与するタンパク質やセンサータンパク質などの活性中心に存在し、生理的に極めて重要な役割を果たしている。鉄-硫黄タンパク質に関しては、これまで主に鉄-硫黄クラスターの構造や特性の解明に主眼がおかれており、鉄-硫黄クラスターの動的変換やその生理的意義についてはほとんど研究されていない。本論文は、細菌の CDS 類縁酵素について、鉄-硫黄クラスター形成における役割を解明するとともに、tRNA の含硫修飾塩基の生成にも CDS が関与することをはじめて明らかにしたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. *Synechocystis* sp. PCC6803 の 3 種の CDS 類縁酵素について、おのおのの精製と機能解析を行うとともに、3 種の CDS 類縁酵素はいずれも、ラン藻のアポ型フェレドキシンに作用して鉄-硫黄クラスターを形成し、ホロ型に変換する反応を触媒することを実証した。3 種の酵素の生理的役割の詳細は未解明ながら、本論文は、ラン藻の CDS が鉄-硫黄クラスター形成に直接関与することをはじめて実証したものであり、評価できる。

2. *E. coli* の CDS 類縁酵素について、遺伝子破壊株を用いてその機能を解析し、そのうち主として IscS が鉄-硫黄クラスター形成に関与することを証明した。また、IscS は細胞内では IscU とジスルフィド結合を介して複合体を形成しており、さらに複合体を形成することで活性化された状態を保持していることを実証した。IscS の活性中心システイン残基は、基質 L-システインの分解により生成した硫黄原子を、ペルスルフィドを形成することで受け取り、その後 IscU の Cys63 残基に受け渡し、それが鉄-硫黄クラスターの原形構造に変換されるという新しい機構を提案した。これは、鉄-硫黄クラスター形成の初期過程の解明につながる研究として高く評価できる。

3. *E. coli* の *iscS* 破壊株についてさらに検討を加え、IscS は鉄-硫黄クラスター形成のみならず、4-チオウリジンや 5-メチルアミノメチル-2-チオウリジンの生成にも関与することを証明した。これは、tRNA の含硫修飾塩基の生合成という未解明の分野を切り開く研究として評価できる。

このように本論文は、細菌の CDS 類縁酵素について、鉄-硫黄クラスター形成ならびに tRNA の含硫修飾塩基の生合成への関与をはじめて明らかにしたものであり、生化学、酵素化学の発展に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年10月11日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。