

氏名	横山 奈央
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 1082 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	枯草菌における鉄硫黄クラスター生合成系の研究
論文審査委員	委員長 教授 高橋 康弘 委員 教授 小竹 敬久 委員 教授 日原由香子 委員 教授 戸澤 譲

論文の内容の要旨

鉄硫黄 (Fe-S) タンパク質は、Fe-S クラスターをコファクターとして持つタンパク質の総称で、エネルギー代謝から遺伝子の発現制御に至るまで、重要かつ多彩な生理機能を担っている。これら Fe-S タンパク質の機能を支えているのは、Fe-S クラスターの生合成系であり、これまでに 3 種類 (ISC、SUF、NIF マシナリー) が知られている。これらのマシナリーはどれも、Fe-S クラスターを新規に組み立てて、それをアポタンパク質まで受け渡すと考えられている。ただし、成分の構成が大きく異なっており、その作動機構には多様性が見られる。

大腸菌は、*iscSUA-hscBA-fdx* オペロンと *sufABCDSE* オペロンにコードされる 2 種類の生合成系、ISC マシナリーと SUF マシナリーを保持している。通常の生育条件では、ISC マシナリーが主に Fe-S クラスター合成を担っているが、鉄飢餓や酸化ストレス条件下では、SUF マシナリーが発現することが知られている。これらのマシナリーで、共通しているのはシステイン脱硫黄酵素 (IscS / SufS) であり、硫黄原子のドナーとして、クラスターの材料となる硫黄原子をそれぞれ、IscU / SufE に渡している。その後、ISC マシナリーでは、IscU において Fe-S クラスターが新規に形成されるのに対し、SUF マシナリーでは、SufE が硫黄原子のキャリアとして SufBCD 複合体に硫黄原子を渡し、この複合体で Fe-S クラスターが新規に形成されることが知られている。

一方、枯草菌などグラム陽性菌のゲノムには、*sufCDSUB* オペロンがコードされており、興味深いことに、この生合成系は、ISC マシナリーの成分である IscU と、SUF マシナリーの 4 成分 SufS、B、C、D とのキメラ構成と推定される (SUF 様マシナリーと呼ぶ)。枯草菌 SufS は、大腸菌の IscS / SufS と相同なシステイン脱硫黄酵素で、硫黄原子のドナーとして機能することが示されている。一方、枯草菌の SufU (IscU ホモログ) や SufBCD については、大腸菌のホモログと同様に機能すると考えると、SUF 様マシナリーには Fe-S クラスターの新規形成部位が 2 か所存在することになる。ただし、SufBCD 複合体の精製が極めて困難なため、生化学的な解析は進んでいなかった。そこで、本研究では、遺伝学的なアプローチで、枯草菌 SUF 様マシナリーの各成分の役割やマシナリーとしての作動機構を解析することにした。

枯草菌の *suf* 様オペロンの遺伝子はどれも生存に必須なため、*in vivo* における解析もほとんど進んでいなかった。枯草菌は 60 種類以上の Fe-S タンパク質を保持しているが、それらの機能を洗い直したところ、生

存に必須なものはイソプレノイド生合成系（MEP 経路）の2つの Fe-S 酵素、IspG / IspH と推測できた。放線菌など一部のバクテリアや真核生物では、Fe-S 酵素が関与しないメバロン酸（MVA）経路でイソプレノイドを合成している。そこで、枯草菌の MEP 経路を MVA 経路へ改変したところ、*suf* 様オペロンの必須性を回避して、破壊株を構築することに初めて成功した。*sufCDSUB* の5種類の遺伝子それぞれの破壊株とオペロン全体の欠失株はどれも MVA に完全に依存して生育した。また、これら破壊株における Fe-S 酵素（アコニターゼ、コハク酸脱水素酵素、グルタミン酸合成酵素）の活性を測定したところ、どれも検出限界以下となった。さらに、*suf* 様オペロン破壊株では、バリン、イソロイシン、ロイシンなどのアミノ酸や、プリン・ピリミジンに要求性が見られ、これらの表現型から、それぞれの生合成経路に含まれる Fe-S 酵素が機能していないことを確認した。したがって、枯草菌の Fe-S クラスター生合成には、*suf* 様オペロンにコードされる5成分全てが必要であることが判明した。また、変異株の表現型から、枯草菌の Fe-S タンパク質群が全て機能できなくても、それを補う代謝経路を用いることで生育できるようになることがわかった。

構築した枯草菌変異株に、大腸菌 *isc* / *suf* オペロンの関連遺伝子群を、また逆に、大腸菌変異株に、枯草菌の *suf* 様オペロンの関連遺伝子群を導入して、異種生物の成分間での互換性を検討した。その結果、SufBCD のうち、SufC、SufD では、大腸菌 / 枯草菌どちらにおいても機能的な互換性が認められたが、SufB では異種間での相補性は認められなかった。ただし、サプレッサー変異の解析から、SufB 内の1アミノ酸置換で異種の SufB を代替できるようになることがわかった。したがって、枯草菌の SufBCD は、大腸菌 SufBCD と同様に複合体を形成し、Fe-S クラスターの新規形成部位として機能すると考えられる。

SufSU について異種間での相補解析を行ったところ、意外なことに、枯草菌の SufSU は、構造の相同な大腸菌 IscSU ではなく、大腸菌 SufSE と相互に代替できることが判明した。したがって、枯草菌の SufU は、大腸菌 IscU のように Fe-S クラスターの新規形成部位として機能するのではなく、大腸菌 SufE と同様に、硫黄原子のキャリアとして機能することがわかった。すなわち、SufU と IscU が機能の異なる相同タンパク質であることを明確に示した。これらの知見を統合すると、枯草菌 Suf 様マシナリーでは、SufS から SufU、SufBCD 複合体の順に硫黄原子が受け渡され、SufBCD 複合体において Fe-S クラスターが新規に形成されると考えられる。

SufU / IscU に相同な 794 種類のアミノ酸配列について分子系統関係を調べたところ、これらの配列は、SufU グループと IscU グループの2つの大きなサブファミリーに分離することが分かった。したがって、SufU と IscU は、共通祖先から分岐した後、異なる機能（それぞれ、硫黄原子のキャリア / Fe-S クラスター形成の足場）を持つように進化したと考えられる。さらに、SufU / IscU の系統関係に加えて、種々の生合成マシナリーに特徴的な成分の分布を考え合わせることで、多様な Fe-S クラスター生合成系がどのように進化してきたのか、その道筋を示すことができた。

論文の審査結果の要旨

本学位論文の発表会を平成 30 年 2 月 21 日に理学部 3 号館において公開で開催し、詳細な質疑とともに論文内容を審査した。以下に、学位論文の審査結果を要約する。

本論文は、枯草菌における鉄硫黄 (Fe-S) クラスターの生合成系 (SUF 様マシナリー) の遺伝学的な解析結果をまとめたものである。Fe-S クラスターは無機硫黄原子と非ヘム鉄から成るコファクターで、このクラスターを持つタンパク質は総じて Fe-S タンパク質と呼ばれている。Fe-S タンパク質の構造と機能は多種多様で、呼吸系や光合成系の電子伝達系などのエネルギー代謝から遺伝子の発現制御に至るまで、生命活動の根幹を担っている。これら Fe-S タンパク質の機能を支えているのが Fe-S クラスター生合成系である。これまでに 3 種類のクラスター生合成系 (NIF、ISC、SUF マシナリー) が同定・解析されているが、生物種によってはさまざまなバリエーションが見られる。そのひとつ、枯草菌などのグラム陽性細菌に分布する SUF 様マシナリーは、興味深いことに大腸菌の ISC と SUF マシナリーのキメラ構成になっている。本論文では、枯草菌 SUF 様マシナリーを構成する 5 種類の成分 (SufB、SufC、SufD、SufS、SufU) のなかで、特に IscU (ISC マシナリーの構成成分) のホモログである SufU に焦点を当てて、*in vivo* における詳細な遺伝学的解析からその機能を明らかにした研究成果が述べられている。

序章では、本論文の背景が詳細に記述されている。これまでに明らかにされている Fe-S クラスター生合成系マシナリーの構成や分布、含まれる成分の特徴や構造、成分間の相互作用について解説した上で、現状ではなぜ SUF 様マシナリーの解析が進んでいないのか、問題点を提起している。また、問題点を解決する方向として、本研究の着想に到った背景を説明している。

第一章では、枯草菌の *suf* 様オペロン (*sufCDSUB*) を破壊した変異株の構築とその解析結果が述べられている。枯草菌において、*suf* 様オペロンの 5 遺伝子はいずれも生存に必須であるため、横山はまず、枯草菌が持つ 60 種類もの Fe-S タンパク質の機能を洗い直すことにより、イソプレノイドの合成経路 (MEP 経路) で働く 2 つの Fe-S 酵素 (IspG と IspH) のみが必須と推定した。これらの必須性を回避するために、Fe-S タンパク質が関与しない別のイソプレノイド合成経路 (MVA 経路) へと代謝改変したところ、*suf* 様オペロンの破壊株が、培地に添加したメバロン酸 (MVA) に依存して生育できることを見出した。すなわち、MVA 経路でイソプレノイドを合成させると、MEP 経路の IspG と IspH、ひいては SUF 様マシナリーの機能がバイパスされることを示した。*suf* 様オペロンの 5 遺伝子を個別に破壊した変異株を構築して比較したところ、共通して、MVA 要求性、グルコースとピルビン酸に対する依存性、生育の遅延が認められた。また、コハク酸脱水素酵素、グルタミン酸合成酵素、アコニターゼといった Fe-S 酵素の活性は全く検出されなかった。さらに、これらの破壊株は種々のアミノ酸やプリン、ピリミジンに要求性を示したが、これらの要求性も枯草菌の代謝経路に含まれる Fe-S 酵素の機能不全から予想される表現型に一致した。これらの結果から、*suf* 様オペロンにコードされる 5 種類の成分はいずれも、数多くの Fe-S タンパク質のクラスターの生合成に不可欠であることを明確にした。

suf 様オペロンの破壊株は形質転換ができなくなっていたが、横山は、コンピテンスの主要制御因子である ComK を人為的に発現誘導して形質転換できるように改変し、Fe-S クラスター生合成系の遺伝子群を自在に操作することのできる実験系を開発した。この系を用いて、ピロリ菌の *nifSU* を破壊株に導入すると表

現型が相補されたことから、NIF マシナリーが枯草菌の Suf 様マシナリーの機能を代行できること、すなわち、Suf 様マシナリーは NIF マシナリーと同様に、アポタンパク質に対する特異性の広い Fe-S クラスターの生合成系として機能することを示した。

第二章では、第一章で構築した破壊株に大腸菌 *isc / suf* オペロンの関連遺伝子群を導入し、異種の成分間で機能的な相補性があるかどうか、詳細に解析を進めた結果が述べられている。また逆に、大腸菌の変異株に枯草菌の関連遺伝子を導入することで、相互の互換性についても検討している。

Suf 様マシナリーの成分のなかで、SufC と SufD については大腸菌／枯草菌どちらにおいても機能的な互換性が認められたが、SufB では異種間での相補性は認められなかった。ただし、サプレッサー変異の解析から、SufB 内の 1 アミノ酸置換で異種の SufB を代替できるようになることを見出した。したがって、枯草菌の SufBCD は、大腸菌 SufBCD と同様に複合体を形成し、Fe-S クラスターの新規形成部位として機能するという可能性を示した。

SufSU についての異種間相補解析では、意外なことに、枯草菌の SufSU は構造の相同な大腸菌 IscSU ではなく、大腸菌 SufSE と相互に代替できることを見出した。したがって、枯草菌の SufU は、大腸菌 IscU のように Fe-S クラスターの新規形成部位として機能するのではなく、大腸菌 SufE と同様に、硫黄原子のキャリアとして機能することがわかった。すなわち、SufU と IscU が機能の異なる相同タンパク質であることを明確にした。これらの知見を統合して、枯草菌 Suf 様マシナリーでは、SufS から SufU、SufBCD 複合体の順に硫黄原子が受け渡され、SufBCD 複合体において Fe-S クラスターが新規に形成されると結論している。

さらに、SufU / IscU に相同な 794 種類のアミノ酸配列について分子系統関係を調べ、これらの配列は、SufU グループと IscU グループの 2 つの大きなサブファミリーに分割されることを見出した。したがって、SufU と IscU は共通祖先から分岐した後、異なる機能（それぞれ、硫黄原子のキャリア／Fe-S クラスターの足場）を持つように進化したと考えられる。また、SufU / IscU の系統関係に加えて、種々の生合成マシナリーに特徴的な成分の分布を考え合わせることで、多様な Fe-S クラスター生合成系がどのように進化してきたのか、そのアウトラインを明らかにしている。

以上、本学位論文では、枯草菌の Suf 様マシナリーの必須性を回避して破壊株を構築し、これを用いた異種間の相補解析によって、5 種類の構成成分の個々の特徴や相互作用、サプレッサー変異など、これまでにない新たな知見を多数見出している。なかでも特筆すべきは、構造の相同な SufU と IscU の機能が異なっていることを明らかにした点であり、この発見は、Fe-S クラスター生合成系の成り立ちや進化変遷を理解する上で大きく貢献した。今後の研究に対して、方向性と分子的な基盤を与えるものである。これらの成果から、本審査委員会は本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値すると判断し、合格と判定した。