

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20247009

研究課題名（和文） 金属タンパク質成熟化の構造生物学

研究課題名（英文） Structural Biology on Maturation Process of Metalloproteins

研究代表者

三木 邦夫 (MIKI KUNIO)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：10116105

研究成果の概要（和文）：Hyp タンパク質群（HypA, B, C, D, E, F）は、水素代謝を行う [NiFe] ヒドロゲナーゼにニッケル・鉄クラスターを組み込み、ヒドロゲナーゼを活性体にする成熟化因子である。われわれが初めて結晶構造解析に成功した HypC, HypD, HypE での成果を発展させて、本研究では HypA, HypB, HypF の結晶構造解析、ならびに HypC, HypD, HypE 間の機能的複合体の構造・機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Six Hyp proteins (HypA, B, C, D, E, and F) are primarily involved in the maturation process of [NiFe] hydrogenases which catalyze reversible hydrogen production and consumption. These proteins incorporate a complex Ni/Fe cluster into a protein subunit of [NiFe] hydrogenases. On the basis of our success in the first structure determination of HypC, HypD, and HypE, we have carried out here structure analyses of HypA, HypB, and HypF and of complexes between HypC, HypD, and HypE to obtain mechanistic insights into the [NiFe] hydrogenase maturation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	13,400,000	4,020,000	17,420,000
総計	32,300,000	9,690,000	41,990,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析，タンパク質の構造機能解析，金属取り込み，ヒドロゲナーゼ，hyp タンパク質，複合体構造

1. 研究開始当初の背景

鉄，ニッケル，亜鉛などの金属イオンは、生体内で巧妙にタンパク質に取り込まれ、様々な生体反応を触媒する。金属タンパク質では金属原子がその活性中心を担っている

が、必要な金属クラスターを生物が自ら精巧に合成して、これをタンパク質に取り込ませている（金属タンパク質の成熟化）。これには、この取り込みを触媒する成熟化因子が存在する。[NiFe]ヒドロゲナーゼは、プロトンから水素分子への可逆的な酸化還元反応を

触媒する酵素で、多くの細菌におけるエネルギー代謝に関わっており、細菌からアーキアに至るまで広く保存されている。水素の酸化還元を行う活性中心には、ニッケルと鉄で構成された金属クラスターが存在しており、鉄にはシアノ基と一酸化炭素が配位していることが知られている。[NiFe]クラスターをヒドロゲナーゼに組み込むためには、Hypタンパク質群といわれる成熟化因子が中心的な役割を果たしている。Hypタンパク質群は6つの因子(HypABCDEF)で構成されている。HypAおよびHypBはニッケル原子の組み込みに関わっており、残りの4因子(HypCDEF)は鉄原子のシアノ化とその組み込みに関与する。本研究を開始する時点では、ヒドロゲナーゼの成熟化過程の生化学的解析は、ドイツのA. Böck博士らのグループで大腸菌由来のHypタンパク質群について精力的に行われていたが、Hypタンパク質が関与する成熟化の各段階における分子機構や、それらの立体構造については十分には解明されていなかった。われわれは、超好熱性アーキア*Thermococcus kodakaraensis* KOD1由来のHypタンパク質群の構造生物学的研究を行い、2007年にHypC, HypDおよびHypEの初めての立体構造の決定に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに得られた知見をさらに大きく発展させ、他のHypタンパク質群の構造解析、ならびにHypタンパク質間の機能的複合体の構造機能解析によって、ヒドロゲナーゼのNiFeクラスター生合成ならびに成熟化機構の全体像を原子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、ヒドロゲナーゼ成熟化因子Hypタンパク質の結晶構造解析を通して、成熟化過程の解明を目指すものである。Hypタンパク質群のうち、*T. kodakaraensis*由来のタンパク質を対象に、HypA, HypBホモログおよびHypFの結晶構造解析を行う。また、これらのタンパク質単独の構造決定に並行して、HypC, HypD, HypE間の機能的複合体の構造解析ならびに相互作用解析などの機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) HypA

HypAおよびHypBは、ヒドロゲナーゼへのNi原子の組み込みに関与している。生体内ではHypA-HypB複合体を形成し、HypBのGTPase活性が成熟化に必須であるとされている。しかしながら、HypABによる詳細な組み込み機構については、不明な点が多い。

本研究では成熟化機構を原子レベルで解明するため、*T. kodakaraensis*由来HypAの結晶構造解析を行った。大腸菌発現を用いてTK-HypAを大量発現させ、各種クロマトグラフィーにより精製した。HypAは、溶液中ではHypAモノマーおよびHypAダイマーとして存在しており、両者はそれぞれ安定なオリゴマー状態を保っていた。

HypAの機能単位については、複数のグループにおいて異なる見解が報告されていたため、それぞれについて結晶化を行った。HypAモノマーの結晶は、主に硫酸リチウムを沈澱剤とする条件で得られ、HypAダイマーの結晶は、PEG8000およびイソプロパノールを主な沈澱剤とする条件から得られた。得られた結晶を用いて、放射光での回折実験を行った結果、HypAモノマーについては、2.3 Å分解能の回折強度データを収集し、分子内Zn原子を利用したSAD法によって位相決定した。HypAダイマーについては、3.3 Å分解能の回折強度データを収集し、モノマー構造をモデルとした分子置換法によって構造を決定した。

HypAモノマーの全体構造は、Ni結合ドメインとZn結合ドメインで構成されており、全体構造で類似な構造は見つかっていない(図1)。Zn結合ドメインは、3本のβストランドと、ループ領域で構成されており、ジnkフィンガーモチーフ(CXXCX₃₃CPXC)において、Zn原子を配位している。非対称単位中の独立な分子どうしの比較から、Ni原子結合モチーフ(MHEモチーフ)のコンフォメーション変化によるドメイン間の相対配置変化を通して、ヒドロゲナーゼとの相互作用を制御していることが示唆された(図2)。

一方、興味深いことに、二量体構造ではZn結合ドメインのループ領域が大きく構造変化しており、二量体間でドメイン・スワッピングが形成されていることが分かった(図3)。その結果、C-末側のβストランドは、二分子

間に入れ替わっており、ジンクフィンガーモチーフは、それぞれの分子から形成されていた。このドメイン・スワッピングによるダイマーは、精製過程で単離されているため、おそらく新生タンパク質のフォールディング過程で形成されたと推察される。これらの結果から、HypA の機能上の多様性が示唆された。

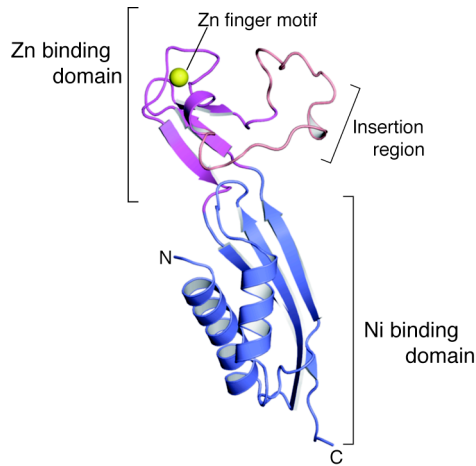


図 1 Tk-HypA モノマーの構造

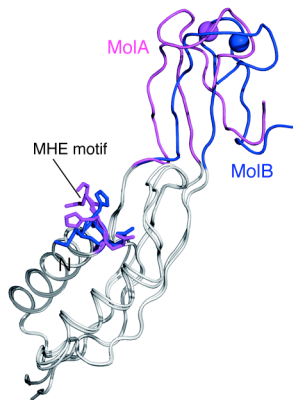


図 2 HypA の構造比較

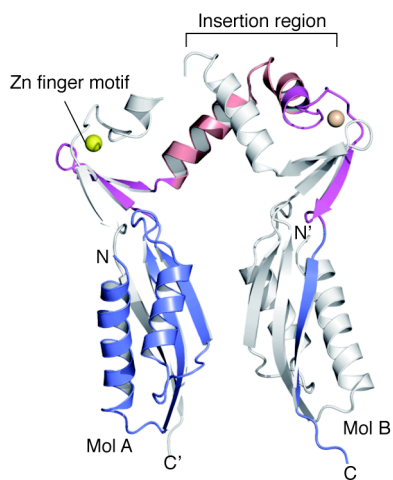


図 3 HypA ダイマーの構造

(2) mmHypB

HypB は、HypA とともに Ni 原子の組み込みに関与しており広く保存されているが、金属イオンの結合能によって、大きく 3 つのサブファミリーに分類される。さらに興味深いことに、*T. kodakarensis* などの一部のアーキアでは、HypB に相同性の高い遺伝子は存在しない。これらの種では、ヌクレオチド結合モチーフを有する Mrp/MinD ファミリーに属する遺伝子(*mmhypB*)が *hypA* 遺伝子に隣接している。本研究では、新規のタンパク質 mmHypB が [NiFe] ヒドロゲナーゼの成熟化に関与していることを明らかにするため、*T. kodakarensis* 由来 mmHypB の遺伝学的解析およびの結晶構造解析を行った。

T. kodakarensis の *mmhyp* 遺伝子欠損株 ($\Delta mmhypB$) は、ヒドロゲナーゼ活性を必要とする培養条件では、菌体増殖速度が著しく低下し、 $\Delta mmhypB$ では、ヒドロゲナーゼの成熟化過程に欠損があることが示唆された。この増殖速度の低下は、培養条件に NiCl を加えることで、野生株と同程度までに回復した。Ni 添加によるヒドロゲナーゼ活性の回復は、大腸菌等の $\Delta hypB$ 株でも観察された現象であり、以上の結果から、*T. kodakarensis* や一部のアーキアでは、mmHypB が HypB の機能的ホモログであることを明らかにした。

Tk-HypB の機能を分子レベルで解明するため、結晶構造を決定した。大腸菌発現系で得られた可溶性 *Tk-mmHypB* を高純度に精製し、リン酸アンモニウムを沈殿剤とする条件で結晶を得ることができた。回折データの解析から、結晶の空間群は *I*222、格子定数は $a = 66.2 \text{ \AA}$, $b = 137.6 \text{ \AA}$, $c = 150.8 \text{ \AA}$ と決定し、白金誘導体結晶を用いた単波長異常分散法により初期位相を得て、 2.1 \AA 分解能の構造を決定した。*Tk-HypB* は、結晶の非対称単位中に 2 分子存在しており、これら分子が非結晶学的 2 回軸で関係付けられるホモダイマー構造であった。それぞれの分子は、中央の β シートとそれを囲む α ヘリックスから構成されており、一次配列からの予想通り、他の Mrp/MinD ファミリーと類似の構造であった。興味深いことに、結晶は高濃度の GTP を含む条件から得られたにも関わらず、それぞれの分子には ADP が結合していた。精製および結晶化においては、ATP や ADP は添加していないため、これらの ADP は、発現ホスト由来のものであると考えられ、*Tk-mmHypB* は、

これまでに知られている GTP 加水分解型の HypB とは異なり、ATPase として機能していることが示唆される。

(3) HypCD 複合体, HypCDE 三者複合体

HypC, HypD および HypE は、成熟化過程において一時的に複合体を形成し、Fe 原子のシアノ化を触媒すると考えられているが、複合体における詳細な相互作用様式については分かっていない。

シアノ化反応機構をさらに原子レベルで解明するため、HypC, HypD, HypE 間の相互作用解析および複合体の X 線結晶構造解析を行った。相互作用解析の結果、HypC は HypD と 1:1 で安定な複合体を形成することが分かった。そこで精製サンプルを等量混合して複合体を調製し、結晶化を行った結果、主にクエン酸アンモニウムを沈澱剤に用いた条件において、柱状の結晶が得られた。放射光による回折実験の結果、2.6 Å 分解能の回折データの収集に成功し、それぞれの単独の構造をモデルに用いた分子置換法によって構造解析に成功した。HypCD 複合体においては、HypC の β バレルドメインが、HypD の二つの α/β ドメインに挟まれるように強く結合しているおり、両者の保存モチーフが近接していることが明らかになった。HypC-HypD の相互作用部位は、主に保存された疎水的性残基間の相互作用で形成されていた。

一方、HypC, HypD および HypE タンパク質間の溶液中での複合体形成についても検討した。HypD-HypE あるいは HypC-HypE 間での複合体形成は確認できなかったが、HypC-HypD 複合体と HypE とは弱い相互作用を確認することができた (図 4)。そこで、HypC, HypD および HypE それぞれの精製サンプルを等量混合し、複合体を調製して結晶化を行った結果、主に PEG400 を沈澱剤に用いた条件と PEG8000 を沈澱剤に用いた条件において、結晶 X 線回折実験に適する三者複合体の結晶が得られた。二種類の結晶は、どちらも空間群は単斜晶系に属するが、格子定数は異なっていた。放射光での回折実験の結果、2.25~2.8 Å 分解能での回折強度データ収集に成功し、分子置換法によって構造解析に成功した。

構造解析の結果、どちらの結晶系においても、HypE ダイマーの側面に HypC-HypD 複合体がそれぞれ相互作用している形で、三者複

合体が形成されていることが分かった。HypC の保存されたループ部分および HypD の α/β ドメインがそれぞれ HypE の C 末ドメインと相互作用しており、HypCD 複合体形成が HypE との相互作用に必要であることが立体構造からも明らかになった。変異体解析の結果、HypE の保存された疎水性残基が三者複合体形成の留め具として重要な役割を果たしていることも明らかになった。シアノ基転位に関わる HypE の C 末端領域は、HypC と HypD で形成される Fe 結合部位の付近に位置しており、Cys 残基間の酸化還元によって Fe 原子のシアノ化が起こる反応機構が、強く示唆されるものであった。

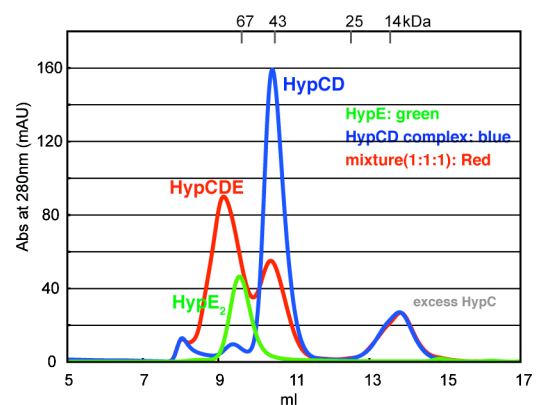


図 4 HypCDE 相互作用解析

(4) HypF

HypF はシアノ基の生合成反応に関与するタンパク質であり、HypE の保存された末端のシステイン残基にカルバモイル基を転位させる反応を触媒する。HypF は分子量約 87kDa であり、Hyp タンパク質の中では、最大のタンパク質である。二つのジンクフィンガーモチーフ、アシルホスファターゼモチーフ、カルバモイルトランスフェラーゼモチーフを有する。

大腸菌発現系を用いて *T. kodakarensis* 由来 HypF を大量発現させ、各種クロマトグラフィーにより精製し、結晶化を行った。結晶化の結果、硫酸アンモニウム、MPD、PEG を主な沈澱剤とする条件で、針状結晶が得られた。また NaCl を主な沈澱剤とする条件で六角板状の結晶を得ることができた。得られた結晶を用いて、放射光において回折実験を行った結果、それぞれ 10 Å, 4 Å 分解能の回折点を確認でき、後者については 4.6 Å 分解能の回折強度データを収集した。結晶の空間群は、

P6₁22 または P6₅22 であり、格子定数は、 $a=b=265\text{\AA}$ 、 $c=694\text{\AA}$ と非常に大きな結晶格子であることが分かった。現在、結晶化条件の最適化が進行中である。

(5) Hyp タンパク質-HyhL 相互作用解析

Hyp タンパク質同士の相互作用については、*in vivo*、*in vitro* の解析により知見が得られていたが、Hyp タンパク質とヒドロゲナーゼとの相互作用については、詳しい解析は報告されていなかった。そこで、Tk-HypA および Tk-HypC と [NiFe] ヒドロゲナーゼ大サブユニット HyhL (*Tk-HyhL*) との相互作用を解析した。これらタンパク質試料の調製には大腸菌発現系を利用し、陰イオン交換およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーなどの手法により精製した。相互作用解析には、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを利用した。*Tk-HyhL* は、溶液中では、モノマーとダイマーの平衡状態にある (図 5)。*Tk-HyhL* と *Tk-HypA* の等量混合サンプルでは、溶出ピークが一つとなっており、*Tk-HyhL* は *Tk-HypA* は 1:1 で安定な複合体を形成することが分かった (図 5)。一方、*Tk-HyhL* と *Tk-HypC* の等量混合サンプルの結果から、*Tk-HyhL* と *Tk-HypC* とは弱く結合することが示唆された。さらに、これら三者間の解析では、それぞれの二者複合体が混在していることが示唆され、したがって、三者複合体の形成は確認できなかった。これら相互作用解析の結果は、バクテリアの成熟化機構とは一致しない点もあり、*T. kodakarensis* 特有の Ni 原子組み込み機構が存在することが考えられた。

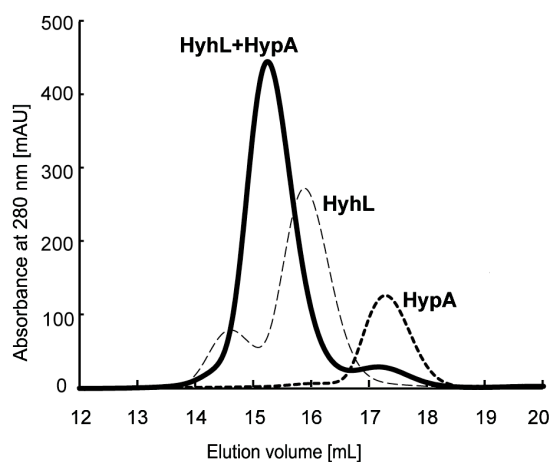


図 5 HyhL-HypA 相互作用解析

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 5 件)

- ① D. Sasaki, S. Watanabe, T. Kanai, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Characterization and *in vitro* interaction study of a [NiFe] hydrogenase large subunit from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 417, 192-196 (2012)
- ② S. Watanabe, T. Arai, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal Structure of HypA, a Nickel Binding Metallochaperone for [NiFe] Hydrogenase Maturation, *J. Mol. Biol.*, 査読有, 394, 448-459 (2009)
- ③ S. Watanabe and K. Miki, Structural Study of [NiFe] Hydrogenase Maturation Proteins, HypC, HypD, and HypE from *Thermococcus kodakarensis* KOD1, *Photon Factory Activity Report 2007*, 査読無, #25 (Part A), pp. 44-45 (2009)
- ④ 渡部 聡, 三木邦夫, [NiFe] ヒドロゲナーゼ成熟化因子群の構造生物学, *化学と生物*, 査読無, 46, 608-613 (2008)
- ⑤ S. Watanabe and K. Miki, Crystal Structures of [NiFe] Hydrogenase Maturation Proteins, HypC, HypD, and HypE, *SPRING-8 Research Frontiers 2007*, S. Kikuta, ed., *JASRI/SPRING-8*, 査読無, pp. 30-31 (2008)

[学会発表] (計 19 件)

- ① K. Miki, Structural basis of [NiFe] hydrogenase maturation process by Hyp proteins, *Alumni Symposium: Protein Crystallography in Martinsried, its Beginnings, Maturation, Dissemination, and no End, 2012.2.18-19*, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Germany
- ② 佐々木大輔, 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe] ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypB の構造機能解析, *日本結晶学会 2011 年度年会*, 2011.11.24-25, 札幌市, 北海道大学学術交流会館
- ③ 富永大河, 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, ヒドロゲナーゼ成熟化に関与する HypF の結晶学的研究, *日本結晶学会 2011 年度年会*, 2011.11.24-25, 札幌市, 北海道大学学術交流会館
- ④ S. Watanabe, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal structures of [NiFe] Hydrogenase Maturase Complexes, *XXII Congress and General Assembly, International Union of Crystallography*, 2011.8.22-30, Madrid, Spain

- ⑤ S. Watanabe, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal Structure of Hyp Protein Complexes for [NiFe] Hydrogenase Maturation, 15th International Conference of Biological Inorganic Chemistry, ICBIC15, 2011.8.7-12, Vancouver, Canada
- ⑥ 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 Hyp タンパク質複合体の結晶構造, 第 28 回 PF シンポジウム, 2011.7.12-13, つくば市, つくば国際会議場エポカル
- ⑦ 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe] ヒドロゲナーゼ成熟化因子 Hyp タンパク質の過渡的相互作用の構造基盤, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011.6.7-9, 吹田市, ホテル阪急エキスポパーク
- ⑧ 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe] ヒドロゲナーゼ成熟化における Hyp タンパク質複合体の結晶構造, 日本結晶学会 2010 年度年会, 2010.12.3-5, 吹田市, 大阪大学コンベンションセンター
- ⑨ K. Miki, Structural Basis of Maturation Process of [NiFe] Hydrogenase by Hyp Proteins, 1st International Symposium on Chemical Biology and Nanotechnology, 2010. 11.12, KAIST, Daejeon, Korea
- ⑩ S. Watanabe, T. Arai, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal structures of the Hyp proteins for [NiFe] hydrogenase maturation, The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association AsCA10, 2010. 10.31-11.3, BEXCO, Busan, Korea
- ⑪ S. Watanabe, T. Arai, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Structural Studies of Hyp Proteins for [NiFe] Hydrogenase Maturation, The 9th International Hydrogenase Conference, 2010.6.27-7.2, Uppsala Concert and Congress Hall, Sweden
- ⑫ 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe] ヒドロゲナーゼ成熟化因子複合体の構造解析, 2010.6.16-18, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌市, 札幌コンベンションセンター
- ⑬ 渡部 聡, 新井崇之, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypA の構造生物学的研究, 2010.3.9-10, 第 27 回 PF シンポジウム, つくば市, つくば国際会議場エポカル
- ⑭ 渡部 聡, 新井崇之, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypA の結晶構造解析, 第 82 回日本生化学会大会合同大会, 2009.10.21-24, 神戸市, 神戸ポートアイランド
- ⑮ 渡部 聡, 新井崇之, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypA の結晶構造, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 2009.5.20-22, 熊本市, 熊本全日空ホテルニュースカイ
- ⑯ S. Watanabe, R. Matsumi, T. Arai, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Structural Basis of [NiFe] Hydrogenase Maturation by Hyp Proteins, The 6th Asian Biophysical Association (ABA) Symposium and the 27th Hong Kong Society of Neuroscience Annual Meeting, 2009.1.11-15, Hong Kong, China
- ⑰ S. Watanabe, R. Matsumi, T. Arai, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal Structures of [NiFe] Hydrogenase Maturation Proteins: HypC, HypD and HypE, XXI Congress and General Assembly, International Union of Crystallography, 2008.8.23-31, Osaka, Japan
- ⑱ 渡部 聡, 松見理恵, 新井崇之, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, ヒドロゲナーゼ活性中心成熟化機構: Hyp タンパク質群の構造と機能, 第 8 回日本蛋白質科学会年会, 2008.6.10-12, 東京都江戸川区, タワーホール船堀

[図書] (計 1 件)

- ① S. Watanabe and K. Miki, [NiFe] Hydrogenase Maturing Proteins, HypC, HypD, and HypE, Handbook of Metalloproteins, Vol. 4, A. Messerschmidt ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, pp. 377-386 (2011); DOI: 10.1002/0470028637.met255 (2009)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
なし
- 取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]

なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
三木 邦夫 (Miki Kunio)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 10116105
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
跡見 晴幸 (Atomi Haruyuki)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 90243047
- (4) 研究協力者
渡部 聡 (Watanabe Satoshi)
京都大学・大学院理学研究科・特定研究員
研究者番号: 50432357