

機関番号：12401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20570130  
 研究課題名（和文）鉄硫黄クラスター生合成マシナリーの作動機構：IscUの構造変換に基づく反応の機序  
 研究課題名（英文）Molecular analysis of iron-sulfur cluster biosynthesis machinery: Reaction mechanism based on conformational transition of IscU  
 研究代表者  
 高橋 康弘（TAKAHASHI YASUHIRO）  
 埼玉大学・理工学研究科・教授  
 研究者番号：10154874

研究成果の概要（和文）： コファクターとして鉄硫黄（Fe-S）クラスターを持つタンパク質は Fe-S タンパク質と呼ばれ、光合成や呼吸などのエネルギー代謝から遺伝子の発現制御にいたるまで、重要かつ多彩な生理機能を担っている。それら Fe-S タンパク質の機能を支えているのが Fe-S クラスターの生合成系である。本研究では、Fe-S クラスターの生合成マシナリーで中心的な役割を担う IscU タンパク質の性質を解析し、ユニークな構造との相関を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Proteins containing Fe-S clusters are called Fe-S proteins and participate in a wide range of cellular processes from energy metabolism to gene regulation. The assembly of Fe-S clusters is achieved by a multicomponent machinery. In this study, we have characterized the IscU protein that plays a central role in the biosynthesis machinery and revealed its functionality based on the unique structure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：鉄硫黄タンパク質、鉄硫黄クラスター、生合成

#### 1. 研究開始当初の背景

私たちは、以前の遺伝生化学的な研究によって、Fe-S クラスターの生合成系を2種類同定している。大腸菌 *iscSUA-hscBA-fdx-iscX* (*isc* オペロン) にコードされる ISC マシナリーと *sufABCDSE* オペロンにコードされる SUF マシナリーである。これらのマシナリーは生物界に遍く分布しており、真核生物ではミトコンドリアに ISC、葉緑体に SUF が見られる。しかしながら、どちらも複数の成分から構成

される複雑な系であり、どのようにして Fe-S クラスターを組み立てて、アポタンパク質に渡しているのか、作動機構には不明な部分が多い。

ISC マシナリーは7種類の成分から構成されており、その中で IscU は、Fe-S クラスターの *de novo* 形成を担うタンパク質として知られている。すなわち IscU タンパク質では、1) クラスターの材料となる鉄原子と硫黄原子を受け取り、2) それらをクラスターの形に

組み立て、3) 不安定なクラスター中間体を一時的に保護し、4) 最終的にアポタンパク質へ受け渡すという、一連の工程が想定されているが、具体的な作動機構は不明である。近年私たちは、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* IscU の [2Fe-2S] クラスターを保持したホロ型の結晶構造を決定した。驚いたことに、holo-IscU は非対称なホモ三量体であり、3種類のプロトマーが会合面の構造を変化させることによって非対称な会合を可能にしている。また、[2Fe-2S] クラスターが結合しているのは三量体のなかで1つのプロトマーのみであり、そのクラスターはプロトマーの分子表面に大きく露出しているが、三量体中では隣接するプロトマーに覆われるように、会合面の内部に埋もれている。ホロ型 IscU は溶液中でも三量体だがアポ型は解離する傾向にあり、このオリゴマー状態の変換が IscU におけるクラスター中間体の形成と標的タンパク質への移行に重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでのわれわれの研究成果、すなわち ISC マシナリーに対する遺伝生化学的な解析バックグラウンドとホロ型 IscU のユニークな結晶構造に基づいて、これらをさらに発展させることで、Fe-S クラスターの de novo 形成部位としての IscU の構造と機能の相関、ならびにマシナリーの他の成分との相互作用の詳細、すなわちクラスター生合成マシナリーの中核となる作動機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、ホロ型 IscU の結晶構造に基づいて種々の部位特異的変異を導入し、その影響を in vivo と in vitro、ならびに構造解析によって調べた。in vivo の実験系は、大腸菌 IscU (*Ec* IscU) による変異株の相補試験である。大腸菌には ISC マシナリーと SUF マシナリーという2種類の Fe-S クラスター生合成系が存在しており、それらの二重欠失は合成致死となるが、温度感受性の相補プラスミドの入れ替えを利用することで、 $\Delta$ *sufABCDSE*- $\Delta$ *iscU* 株に *iscU* 遺伝子を導入し、その表現型から機能性を評価した。in vitro の生化学的な解析と結晶構造解析には、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* (*Aa*) の IscU を用いた。ホロ型 IscU の結晶構

造の情報に加えて、このタンパク質の [2Fe-2S] クラスターは、他の生物のものに比べて安定性が高いという利点がある。

## 4. 研究成果

本研究では、Fe-S クラスターの de novo 形成部位として、生合成マシナリーのなかで中心的な役割を担っている IscU タンパク質の構造-機能相関、ならびにマシナリーの他の成分との相互作用について研究を進め、以下の成果を得た。

(1) *Aa* IscU の結晶構造では、3残基の Cys と 1残基の His が [2Fe-2S] クラスターを配位しており、この配位子の組み合わせは他にほとんど例がない。*Ec* IscU でこれら4残基に系統的に部位特異的変異を導入し、変異タンパク質の機能を大腸菌変異株の相補試験を用いて検討したところ、4残基のいずれもが IscU の機能に必須であり、他のアミノ酸では機能不全となるばかりか、Cys と His の配置にも互換性が無いことが判明した。*Aa* IscU の結晶構造では、[2Fe-2S] クラスターは三量体の会合面でタンパク質の内部に隔離されているが、His のイミダゾール環の一部は溶媒に露出している。この His のプロトネーションが引き金となって、クラスターの安定性/不安定性を制御するという可能性が浮上してきた。

(2) IscU の Fe-S クラスターの周辺には、IscS と相互作用して複数の S 原子を受け取る部位や、CyaY/IscX と相互作用して複数の Fe 原子を受け取る部位、さらには Fe-S クラスターをアポタンパク質に移行させるために HscA/HscB と相互作用する領域が存在すると想定される。本研究では、Fe-S クラスターの近傍に、系統的な部位特異的変異を導入することにより、in vivo 機能に必須な3残基 (Tyr3, Asp39, Lys103) を特定した。このうち、Asp39 と Lys103 については、他のどのアミノ酸に置換しても IscU の機能が失われたが、Tyr3 については、Trp、Phe、His に置換した場合に、部分的にはあるが相補可能であり、芳香環の重要性が判明した。また、いくつかの変異 IscU では、好気/嫌気条件において機能性が異なるという結果が得られた。これは、元来酸素に対して不安定な Fe-S クラスターに対する、保護機能の低下と考えられる。

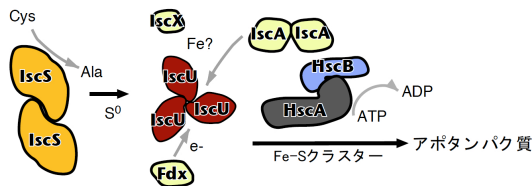


図 ISC マシナリーにおける各成分の役割と相互作用のモデル

(3) 超好熱菌 *Aa* IscU の [2Fe-2S] クラスタは、他の生物のものに比べて安定性が高いため、このタンパク質は生化学的な解析に適している。*Aa* IscU のクラスタの配位子である 3 残基の Cys と 1 残基の His に部位特異的変異を導入したところ、意外なことに、それらのうちの 2 残基を Ala に置換してもなお、三量体に会合して Fe-S クラスタを保持することが判明した。クラスタ配位に対するこの独特な柔軟性は、クラスタの *de novo* 形成の段階に複数の IscU 分子が協調して関与するという可能性を示している。

(4) *Aa* IscU の上記 (3) の変異タンパク質、ならびに、*Aa* IscU と *Aa* IscS1 との複合体の結晶化を行い、後者については良好な結晶が得られた。2.0 Å 分解能までの強度データを収集して構造を決定したところ、*Aa* IscU に相当する領域の多くはディスオーダーしていたが、いくつかの二次構造をアサインし、IscU-IscS 結合モデルを構築することができた。現在、さらに *Aa* Fdx を加えた 3 成分の複合体について結晶化を進めている。

(5) HscA/HscB については、これまで IscU と相互作用することが知られていたが、新たに、ホルムアルデヒドで架橋されるタンパク質を多数検出した。Fe-S クラスタの受け渡しに際して、HscA-HscB が、多数のアポタンパク質を IscU へリクルートするという可能性が浮上してきた。

これらの成果は国内外の学会や論文で発表し、あるいは投稿準備中である。そのなかでも上記 (3) は新たな概念につながる知見を示したもので、国際シンポジウムで大きな反響を得た。今後は、変異を導入した IscU の静的な構造に加えて、Fe-S クラスタ形成の動的な側面を捉えることで研究をさらに発展させる予定である。

## 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 7 件)

① 和田啓、福山恵一、高橋康弘、“鉄硫黄クラスタ生合成マシナリーの構造と作動機構” *化学と生物* 48(12): 831-837 (2010) 査読有

② Yuichi Otsuka, Kumiko Miki, Mitsumori Koga, Natsu Katayama, Wakako Morimoto, Yasuhiro Takahashi, and Tetsuro Yonesaki “IscR regulates RNase LS activity by repressing *rnlA* transcription.” *Genetics*, 185(3): 823-830 (2010) 査読有

③ Yoshinori Hagiwara, Masakazu Sugishima, Htoi Khawn, Hideki Kinoshita, Katsuhiko Inomata, Lixia Shang, J. Clark Lagarias, Yasuhiro Takahashi and Keiichi Fukuyama “Structural Insights into Vinyl Reduction Regiospecificity of Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreductase (PcyA).” *J. Biol. Chem.* 285(2): 1000-1007 (2010) 査読有

④ Hiroshi Nakajima, Nobuyuki Takatani, Kyohei Yoshimitsu, Mitsuko Itoh, Shigetoshi Aono, Yasuhiro Takahashi and Yoshihito Watanabe “The role of the Fe-S cluster in the sensory domain of nitrogenase transcriptional activator VnfA from *Azotobacter vinelandii*.” *FEBS J.* 277(3): 817-832 (2010) 査読有

⑤ 高橋康弘、和田啓、福山恵一、“超分子マシナリーが担う鉄硫黄クラスタの生合成” *生化学* 85(2):139-143 (2010) 査読有

⑥ Kei Wada, Norika Sumi, Rina Nagai, Kenji Iwasaki, Takayuki Sato, Kei Suzuki, Yuko Hasegawa, Shintaro Kitaoka, Yoshiko Minami, F. Wayne Outten, Yasuhiro Takahashi, and Keiichi Fukuyama “Molecular Dynamism of Fe-S Cluster Biosynthesis Implicated by the Structure of SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>2</sub> Complex” *J. Mol. Biol.* 387: 245-258 (2009) 査読有

⑦ Yoshimitsu Shimomura, Kei Wada, Keiichi Fukuyama, and Yasuhiro Takahashi “The asymmetric trimeric architecture of [2Fe-2S] IscU: implications for its scaffolding during iron-sulfur cluster

biosynthesis” *J. Mol. Biol.* 383: 133-143 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 18 件、うち招待講演 5 件)

① 田中尚志、馬迫卓也、和田啓、福山恵一、高橋康弘「鉄硫黄クラスターの *de novo* 形成を担う IscU タンパク質の機能解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会年会合同大会、2010.12.10、神戸

② 平林佳、中嘉孝、高橋康弘、福山恵一、和田啓「鉄硫黄クラスター生合成系における硫黄の供給メカニズム解明に向けた構造生物学的アプローチ」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会年会合同大会、2010.12.10、神戸

③ 平林佳、岩永朋子、高橋康弘、福山恵一、和田啓「鉄硫黄クラスターの *de novo* 合成を担う ISC タンパク質群の複合体解析」日本結晶学会平成 22 年度年会、2010.12.3、大阪

④ 平林佳、中嘉孝、高橋康弘、福山恵一、和田啓「超好熱菌 *Aquifex aeolicus* の鉄硫黄クラスター生合成に関わる中核成分、脱硫黄酵素 IscS と中間体クラスター形成蛋白質 IscU の相互作用」第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010.6.17、札幌

⑤ 高橋康弘「鉄硫黄クラスターの生合成を担う超分子複合酵素系」ラン藻の分子生物学 2009、2009.12.4 (招待講演)、千葉

⑥ 和田啓、高橋康弘、福山恵一「鉄硫黄クラスター生合成に関わる SUF 蛋白質群の構造・機能解析」特定領域研究「生体超分子構造」第 6 回公開シンポジウム、2009.12.1、大阪

⑦ 高橋康弘、和田啓、福山恵一「鉄硫黄クラスターの生合成を担う ISC/SUF タンパク質の複合体構造から予想されるダイナミクス」第 82 回日本生化学会大会、2009.10.23、神戸 (招待講演)

⑧ Yasuhiro Takahashi, Yoshimitsu Shimomura, Kei Wada, and Keiichi Fukuyama “Structural Studies on the Fe-S Cluster-bound Holo-form of IscU” Fifth International Conference on Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation. 2009.8.31, Georgia, USA (招待講演)

⑨ Kei Wada, Norika Sumi, Rina Nagai,

Kenji Iwasaki, Takayuki Sato, Kei Suzuki, Yuta Nagasaka, Yoshiko Minami, F. Wayne Outten, Yasuhiro Takahashi, Keiichi Fukuyama “Crystal Structure of the SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>2</sub> Complex: Implications for Dynamic Rearrangement During Fe-S cluster Biosynthesis” Fifth International Conference on Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation. 2009.8.31, Georgia, USA

⑩ 高橋康弘、和田啓、下村喜充、福山恵一「鉄硫黄クラスターの生合成を担うタンパク質複合体の構造とダイナミクス」第 50 回日本植物生理学会年会、2009.3.21、名古屋 (招待講演)

⑪ 福山恵一、下村喜充、和田啓、馬迫卓也、高橋康弘「鉄硫黄クラスターを持った IscU タンパク質の非対称な三量体構造からいえること」特定領域研究「生体超分子構造」第 5 回公開シンポジウム、2008.12.18、つくば

⑫ 佐藤喬之、和田啓、福山恵一、高橋康弘「鉄硫黄クラスター生合成系 (SUF マシナリー) の中核成分、SufB の機能解析」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会年会合同大会、2008.12.10、神戸

⑬ Yoshinori Hagiwara, Masakazu Sugishima, Htoi Khawn, Hideki Kinoshita, Katsuhiko Inomata, L. Shang, J. C. Lagarias, Yasuhiro Takahashi, Keiichi Fukuyama “Snapshots in the reaction pathway of bilin reductase PcyA” XXI Congress of the International Union of Crystallography, 2008.8.28, Osaka

⑭ Kei Wada, Takayuki Sato, Norika Sumi, Yasuhiro Takahashi, Keiichi Fukuyama “Biosynthesis of Fe-S clusters by the SUF system implicated by the crystal structure of SufCD complex” XXI Congress of the International Union of Crystallography, 2008.8.26, Osaka

⑮ Keiichi Fukuyama, Kei Wada, Yoshimitsu Shimomura, Yasuhiro Takahashi “The asymmetric architecture of 2Fe-2S IscU, a scaffold protein for iron-sulfur cluster biosynthesis” XXI Congress of the International Union of Crystallography, 2008.8.26, Osaka

⑯ 高橋康弘、和田啓、下村喜充、福山恵一「鉄硫黄クラスターの生合成機構:ISC と SUF 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. 12、東京（招待講演）

⑰ 萩原義徳，杉島正一，Htoi khawan，木下秀樹，猪股勝彦，Lixia Shang，J. Clark Lagarias，高橋康弘，福山恵一「ピリン還元酵素 PcyA の反応経路における段階別スナップショット」第 8 回日本蛋白質科学会年会、2008. 6. 11、東京

⑱ 和田啓，佐藤喬之，鷲見法香，北岡伸太郎，高橋康弘，福山恵一「鉄硫黄クラスターの生合成に関する SUF マシナリーの構造・機能解析」第 8 回日本蛋白質科学会年会、2008. 6. 11、東京

〔図書〕（計 1 件）

長谷俊治、高橋康弘、化学同人、タンパク質をつくる-抽出・精製と合成（2008）pp.1-30

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/tougyo/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 康弘 (TAKAHASHI YASUHIRO)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10154874

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

福山 恵一 (FUKUYAMA KEIICHI)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：80032283