

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291012

研究課題名(和文) ヒドロゲナーゼ成熟化における金属クラスター組み込みの分子機構

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Metal Cluster Incorporation in Hydrogenase Maturation Process

研究代表者

三木 邦夫 (Miki, Kunio)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10116105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

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むことで、ヒドロゲナーゼを活性化させる成熟化因子である。これまでの一連のHypタンパク質およびその複合体の構造解析の成果を発展させて、成熟化過程で過渡的に形成される各種複合体(HypAB複合体、ヒドロゲナーゼ・大サブユニットHyhLとHypAおよびHypCとの複合体)やプロテアーゼHybDの構造・機能解析を行い、さらにはニッケル供給タンパク質の探索にも取り組んで、[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化の分子機構についてのさまざまな知見を得た。

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 Hyp proteins incorporate a Ni/Fe cluster into [NiFe] hydrogenases. On the basis of our previous success in the structure determination of several Hyp proteins and their complexes, we have investigated structure and function of transient complexes such as HypAB complex, hydrogenase large subunit HyhL and Hyp protein complexes, and protease HybD. In addition, we have tried to identify a candidate for the Ni metallochaperone. These experimental results provided us information about the molecular mechanism of the [NiFe] hydrogenase maturation.

研究分野：タンパク質結晶学・構造生物学

キーワード：成熟化タンパク質 X線結晶構造解析 金属取り込み Hypタンパク質 複合体構造

## 1. 研究開始当初の背景

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、微生物による水素生産を触媒する酵素であり、プロトン( $H^+$ )から水素分子( $H_2$ )への可逆的な酸化還元反応を触媒する。多くの細菌におけるエネルギー代謝に関わっており、細菌からアーキアまで幅広く分布している。[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性中心には、金属  $NiFe(CN)_2CO$  クラスタが存在する。[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子である Hyp タンパク質群 (HypA-F) は、ヒドロゲナーゼ前駆体に NiFe クラスタを組み込むことによって、活性型に成熟化させる働きを担っている。また最後に、プロテアーゼによってヒドロゲナーゼ・大サブユニットの C 末端が切断されることで、ヒドロゲナーゼ・小サブユニットが結合して成熟化が完成する。これまで国内外のグループによって、大腸菌をモデルとした生化学的な解析が行われてきた。また、我々のグループでは、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来の 6 つの Hyp タンパク質すべての結晶構造を初めて決定することができ、ヒドロゲナーゼ成熟化機構に関する多くの構造生物学的知見を得た (S. Watanabe, *et al.*, Mol. Cell, 2007; S. Watanabe, *et al.*, J. Mol. Biol., 2009; T. Tominaga, *et al.*, Acta Crystallogr. F, 2012; D. Sasaki, *et al.*, J. Mol. Biol., 2013)。さらに、Fe 原子のシアノ化の際に一時的に形成される HypCD 複合体や HypCDE 三者複合体、HypE 反応中間体の構造も決定し、反応についての重要な構造基盤を明らかにした (S. Watanabe, *et al.*, Structure, 2012; T. Tominaga, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでの知見をさらに発展させて、ヒドロゲナーゼの成熟化過程において過渡的に形成される Hyp タンパク質複合体やヒドロゲナーゼ・大サブユニット HyhL との複合体を中心にそれらの構造解析を行い、成熟化過程の分子機構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 タンパク質群の機能的複合体の結晶構造解析から得られる構造情報を基に、生体内金属活性中心の生合成過程の解明を目指すものである。Ni 原子の組み込みに関わる HypA と HypB について、両者の相互作用解析を行い、得られた過渡的な複合体の構造解析を行う。また、Hyp タンパク質とヒドロゲナ

ーゼ・大サブユニット HyhL との複合体の構造解析にも取り組む。Hyp タンパク質に Ni 原子を供給する新規タンパク質の探索して同定する。さらに、HyhL の C 末端を切断するプロテアーゼ HybD (申請書の HycI より名称変更)の構造および機能解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) HypAB<sub>AT</sub> 複合体の構造解析

HypA および HypB は、Ni 原子の組み込みに関与している。一般的に HypB は GTPase であるが、*T. kodakarensis* など一部のアーキアには存在せず、代わりに ATPase 型の HypB (HypB<sub>AT</sub>) が機能ホモログとして存在する。本研究では、成熟化過程における HypA と HypB の相補的な役割を原子レベルで解明することを目的に、両者間の相互作用解析および複合体の結晶構造解析に取り組んだ。

HypA と HypB<sub>AT</sub> との相互作用をゲル濾過クロマトグラフィーで調べた結果、HypB<sub>AT</sub> が ATP 結合状態の時のみ、HypA と複合体を形成できることが分かった。この結果を踏まえて、ATP アナログである ATP $\gamma$ S または AMPPCP と Ni イオン存在下で、精製した HypA と HypB<sub>AT</sub> を等量に混合することで、複合体を調製して結晶化を行った。その結果、主に PEG 3350 を沈殿剤とする条件で結晶を得ることができた。放射光 X 線を用いて最高で 1.63 Å 分解能の回折データを収集し、それぞれの単独構造をモデル分子とした分子置換法により結晶構造を決定した (図 1)。

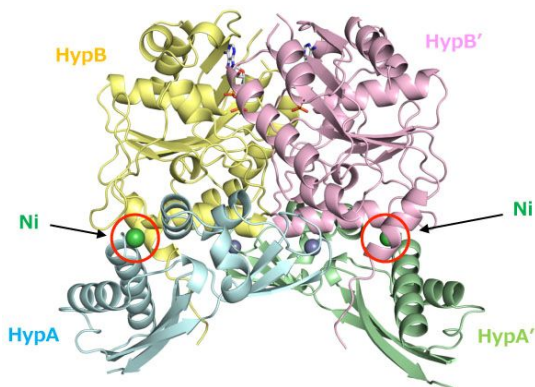


図 1. HypAB<sub>AT</sub> 複合体の全体構造

HypAB<sub>AT</sub> 複合体は、(HypA)<sub>2</sub>(HypB<sub>AT</sub>)<sub>2</sub> の四量体から構成されており、HypA には Ni 原子が結合していた。HypA 単独の構造と比較すると、複合体形成によって HypA が大きく構造変化し、単独の HypA には存在しない Ni 結合部位が形成されることが分かった (図 2, 3)。また、等温滴定カロリーメトリーによる

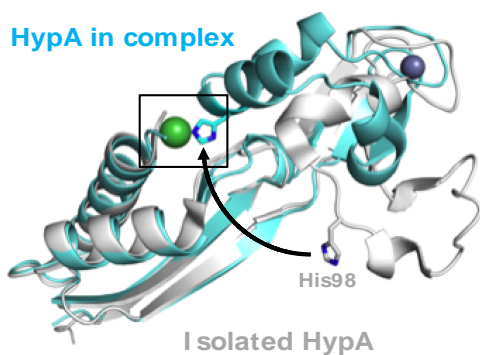


図 2. HypA の構造変化

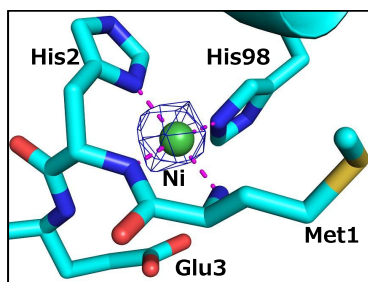


図 3. Ni 結合部位

Ni イオンとの結合実験を行った結果、HypA は HypB<sub>AT</sub> と複合体を形成することで、Ni イオンとの親和性が約 600 倍上昇することも分かった。以上の結果から、ヒドロゲナーゼへの Ni 組み込み機構を考察して、HypA<sub>B<sub>AT</sub></sub> 複合体の形成と解離は、HypB<sub>AT</sub> の ATP 加水分解サイクルにより制御されており、HypB<sub>AT</sub> が HypA の Ni イオン親和性を調節する因子として機能することが分かった。

#### (2) HyhL-HypA 複合体の構造解析

HypA は Ni 原子の組み込みに関わっており、ヒドロゲナーゼ・大サブユニット HyhL と相互作用する。本研究では、両者の複合体の構造解析を行い、相互作用様式や Ni 原子組み込み機構を明らかにすることを目的とした。

HyhL と HypA を別々に発現精製し、1 週間反応させた後にゲル濾過カラム精製を行うことで、複合体試料を調製した。主に PEG 3350 を沈殿剤とする条件で結晶を得ることができたが、20°C および 4°C で得られた結晶の空間群がそれぞれ異なっていた (C222 および P23)。放射光 X 線を用いて回折データを収集し (最高のデータセットで 3.23 Å 分解能)、他種由来のヒドロゲナーゼや HypA 単体をモデル分子とした分子置換法により、空間群の異なる結晶でそれぞれ初期構造を決定することができた (図 4)。現在、それぞれの結晶構造の精密化を進めている。

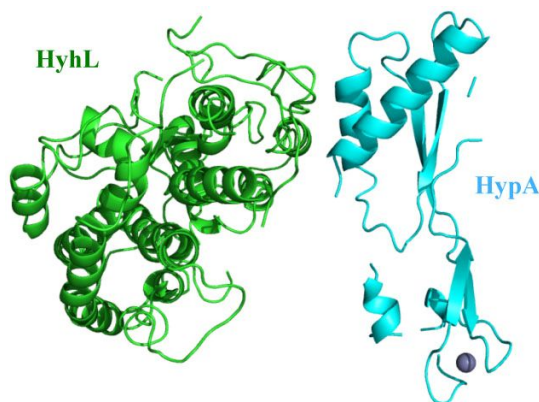


図 4. HyhL-HypA 複合体の初期構造

#### (3) HyhL-HypC 複合体の調製

HypC は Fe 原子の組み込みに関わっており、HyhL と相互作用するが、HypA と比べると結合力は非常に弱い。本研究では、Fe 原子組み込み機構の解明を目指して、両者複合体の調製ならびに構造解析に取り組んだ。

HyhL と HypC を別々に発現精製した後に混合したが、複合体形成はわずかにしか見られなかったため、共発現系の構築を行った。また、HypD との三者共発現系を構築し、培地に Fe も加えたところ、HyhL-HypC 複合体の収量が増大することが分かった。HyhL に Strep タグ、HypC に His タグと異なるアフィニティータグを付加することで、効率的に複合体試料のみを精製できるようになった。現在、得られた試料を用いて結晶化条件の探索を行っている。

#### (4) Ni 供給タンパク質の探索

大腸菌には、Hyp タンパク質に Ni 原子を供給する SlyD タンパク質が存在するが、アーキア由来 SlyD ホモログには Ni 結合能がなく、他のタンパク質が機能を担っていると考えられる。そのため、Ni 原子を供給するタンパク質の候補を探索した。

まず、Strep タグ付き HypB<sub>AT</sub> を作成し、*T. kodakarensis* の菌体抽出液と HypB<sub>AT</sub> および HypA<sub>B<sub>AT</sub></sub> 複合体を反応させた。その後タグ精製を行い、HypB<sub>AT</sub> (HypA<sub>B<sub>AT</sub></sub> 複合体) と結合するタンパク質を探索したが、候補となるものは見つからなかった。また、SlyD ホモログも HypB<sub>AT</sub> (HypA<sub>B<sub>AT</sub></sub> 複合体) と結合しないことが分かった。次に、SlyD タンパク質が持つ Ni 結合モチーフ (HGXXH) に着目して、*T. kodakarensis* 由来タンパク質全体からそのモチーフを BLAST 検索したところ、唯一 TK2203 だけがこの配列を有することが分かった。このタンパク質について構造解析を行

い, Pt を用いた重原子同型置換法により 1.41 Å 分解能で構造を決定した (図 5). しかしながら, TK2203 は Ni 供給タンパク質ではなくジオキシゲナーゼであることが, その構造から明らかになった. 現在までに候補のタンパク質は見つかっておらず, またアーキア由来 HypB<sub>AT</sub> は大腸菌由来のものと全く異なることから, Ni 供給タンパク質が存在しない可能性も考えられる.

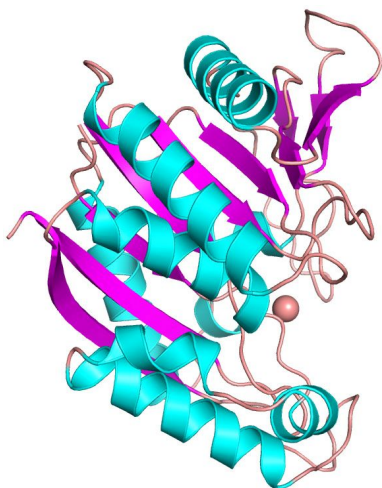


図 5. TK2203 の全体構造

(5) HybD, HyhL-HybD 複合体の構造解析  
 成熟化の最終段階において, HyhL の C 末端はプロテアーゼ HybD により切断修飾を受ける. 本研究では, HybD の切断認識機構を明らかにすることを目的に, HybD および HyhL-HybD 複合体の構造解析に取り組んだ.  
 HybD の発現精製を行い, 得られた試料を用いて結晶化を行ったところ, 主に PEG 6000 を沈殿剤とする条件で結晶を得ることができた. 放射光 X 線を用いて回折データを収集し (最高で 1.82 Å 分解能), 大腸菌由来 HybD をモデル分子とした分子置換法により結晶構造を決定した (図 6). 得られた構造を類似酵素と比較することによって金属結合部位を予想した. また, 表面電荷分布などの計算的手法を用いることで, その部位が妥当であることを追証した (図 7). さらに, HyhL-HybD 複合体の調製にも取り組んだ. 安定した複合体を調製するために, HybD の構造から予想した活性残基を置換した変異体を作成した. また, HyhL の C 末端ペプチドとの複合体も調製した. さらに, HybD 遺伝子を欠損させた *T. kodakarensis* 菌体から, 金属クラスターを含んだ C 末端が切断されていない HyhL を直接精製した. 現在, これらの

試料を用いて複合体を調製し, 結晶化条件を検索している.

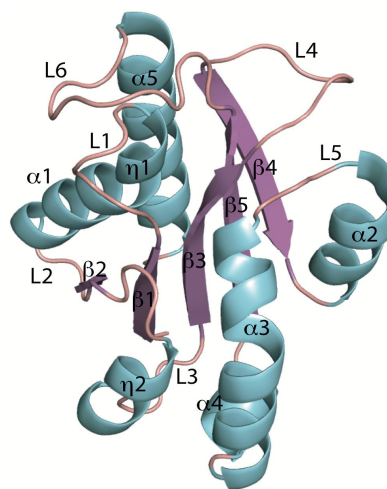


図 6. HybD の全体構造

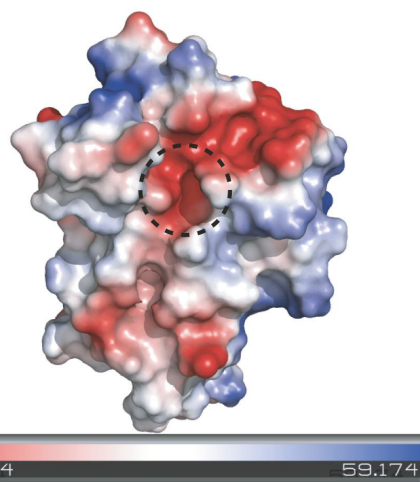


図 7. 金属結合予想部位

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 4 件)

S. Kwon, Y. Nishitani, S. Watanabe, Y. Hirao, T. Imanaka, T. Kanai, H. Atomi, and K. Miki, Crystal Structure of a [NiFe] Hydrogenase Maturation Protease HybD from *Thermococcus kodakarensis* KOD1, *Proteins: Struct., Funct., Bioinfo.*, 査読有, 84, 1321-1327 (2016).  
 doi: 10.1002/prot.25070

Y. Nishitani, J-R. Simons, T. Kanai, H. Atomi, and K. Miki, Crystal Structure of the TK2203 Protein from *Thermococcus kodakarensis*, a Putative Extriol Dioxy-

genase, Acta Crystallogr., 査読有, F72, 427-433 (2016).

doi: 10.1107/S2053230X16006920

S. Watanabe, T. Kawashima, Y. Nishitani, T. Kanai, T. Wada, K. Inaba, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Structural Basis of a Ni Acquisition Cycle for [NiFe]-Hydrogenase by HypA and Its Enhancer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, 112, 7701-7706 (2015).

doi: 10.1073/pnas.1503102112

三木 邦夫, タンパク質が金属を取り込んで成熟化するしくみを構造生物学で解明する, 科研費 NEWS, 査読無, Vol. 2, p.14, 文部科学省 / 日本学術振興会 (2014).

〔学会発表〕(計 11 件)

権 成鶴 (Sunghark Kwon), 西谷 優一, 渡部 聡, 金井 保, 跡見 晴幸, 三木 邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ大サブユニットと成熟化タンパク質との複合体の結晶学的研究, 日本結晶学会 2016 年度年会, 2016.11.17-18, 水戸市, 茨城県立県民文化センター

S. Watanabe, T. Kawashima, Y. Nishitani, T. Kanai, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Structural Study of Hyp Protein Complexes for the Maturation of [NiFe] Hydrogenase from *Thermococcus kodakarensis*, The 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles 2016), 2016.9.12-16, Kyoto, Japan

S. Kwon, Y. Nishitani, S. Watanabe, Y. Hirao, T. Imanaka, T. Kanai, H. Atomi, and K. Miki, Structure Analysis of a Hydrogenase Maturation Protease from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*, The 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles 2016), 2016.9.12-16, Kyoto, Japan

権 成鶴 (Sunghark Kwon), 西谷 優一, 渡部 聡, 金井 保, 跡見 晴幸, 三木 邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に関わるアーキア由来 HybD の X 線結晶構造解析 / Crystal structure of a [NiFe] hydrogenase maturation protease HybD from *Thermococcus kodakarensis* KOD1, 2015 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 第 7 回 MLF シンポジウム 第 33 回 PF シンポジウム, 2016.3.15-16, つくば市, つくば国際会議場エポカル

権 成鶴 (Sunghark Kwon), 西谷 優一, 渡部 聡, 金井 保, 跡見 晴幸, 三木 邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に関わるアーキア由来 HybD の X 線結晶構造解析, 日本結晶学会 2015 年度年会, 2015.10.17-18, 堺市, 大阪府立大学

河島 拓未, 渡部 聡, 西谷 優一, 金井 保, 和田 健彦, 稲葉 謙次, 跡見 晴幸, 今中 忠行, 三木 邦夫, [NiFe] ヒドロゲ

ナーゼへ Ni を組み込む HypAB 複合体の結晶構造解析 (Crystal structure of the HypAB complex for Ni insertion into [NiFe] hydrogenases), 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015.6.24-26, 徳島市, あわぎんホール

河島 拓未, 渡部 聡, 西谷 優一, 金井 保, 跡見 晴幸, 今中 忠行, 三木 邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に関する HypAB 複合体の X 線結晶構造解析, 日本結晶学会 2014 年度年会, 2014.11.1-3, 東京都文京区, 東京大学農学部

T. Kawashima, S. Watanabe, Y. Nishitani, T. Kanai, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Studies on intermediate HypAB complexes for Ni insertion during [NiFe] hydrogenase maturation ([NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化段階において Ni 挿入を担う HypAB 複合体), 第 52 回日本生物物理学会年会, 2014.9.25-27, 札幌市, 札幌コンベンションセンター

S. Watanabe, T. Tominaga, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Structural basis for the biosynthesis of the CN ligand of [NiFe] hydrogenase, XXIII Congress and General Assembly, International Union of Crystallography, 2014.8.5-12, Montréal, Canada

渡部 聡, 富永 大河, 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シアノ基生合成中間体の構造解析 (Crystal structures of intermediates in the biosynthesis of the CN ligand for [NiFe] hydrogenases), 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014.6.25-27, 横浜市, ワークピア横浜 / 横浜産貿ホールマリネリア

三木 邦夫, タンパク質結晶学の歴史 - はじめに, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014.6.25-27, 横浜市, ワークピア横浜 / 横浜産貿ホールマリネリア

〔図書〕(計 1 件)

西谷 優一, 三木 邦夫, 化学同人, CSJ カレントレビュー, 第 17 号「極限環境の生体分子」, 日本化学会編 (分担執筆) 好熱菌タンパク質の構造と機能改良, pp. 50-54 (2014).

〔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

渡部 聡 (WATANABE, Satoshi)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：50432357

(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

西谷 優一 (NISHITANI, Yuichi)

京都大学・大学院理学研究科・特定研究員