

令和元年6月13日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04472

研究課題名(和文) 鉄硫黄クラスターの生合成を担うSufBCD複合体の作動機構の解明と阻害剤の開発

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of the SufBCD complex responsible for biosynthesis of iron-sulfur cluster and development of its inhibitor

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Fe-Sクラスター生合成系のひとつSUFマシナリーの構造と機能について解析を進め、以下の要点を明らかにした。(1) Fe-Sクラスターの新規形成を担うSufBCD複合体の結晶構造を決定し、さらに変異導入解析ならびに生化学的な解析から、この複合体の作動機構を明らかにした。(2) SufUとIscUは機能の異なる相同タンパク質であること、またSufUは亜鉛に依存した硫黄原子のキャリアタンパク質であることを明らかにした。これらの知見は、SUFマシナリーにおけるFe-Sクラスターの生合成機構について、本質的な理解を与えるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、SUFマシナリーにおけるFe-Sクラスターの生合成メカニズムについて、上記のように、鍵となる2つのポイントを世界に先駆けて明らかにすることができた。独自に研究の方向性を見定めて、オリジナルのin vivo実験系とin vitroの生化学的解析ならびに構造解析を有機的に関連付けて発展させた成果である。今後のFe-Sクラスター生合成研究の基盤となる重要な知見であり、学術的な意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have conducted a comprehensive analysis of the SUF machinery to gain insights into molecular mechanisms of the iron-sulfur (Fe-S) cluster biosynthesis. (1) We have determined crystal structure of the SufBCD complex, and also clarified the mechanism of this complex by mutational and biochemical analyses. (2) We found that SufU and IscU are homologous proteins with different functions, and that SufU serves as a zinc-dependent sulfur carrier protein. These findings provide an essential understanding of the Fe-S cluster biosynthesis by the SUF machinery.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：鉄硫黄クラスター 鉄硫黄タンパク質 生合成 SUFマシナリー

1. 研究開始当初の背景

鉄硫黄 (Fe-S) タンパク質は、コファクターとして [2Fe-2S]、[4Fe-4S] などの Fe-S クラスタ-を持つタンパク質の総称である。1000 種類以上が知られており、光合成や呼吸などのエネルギー代謝から、窒素や硫黄の同化反応、アミノ酸やヌクレオチドの生合成、DNA の修復、RNA の修飾、遺伝子発現の制御にいたるまで、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-の生合成系である。研究代表者 (高橋) は 2000 年前後に、世界に先駆けて 2 種類の Fe-S クラスタ-生合成系、ISC と SUF マシナリーを発見した。いずれも多成分から構成される複雑な酵素系であり、作動機構の詳細は不明である。

分子レベルでの理解が進まない要因として、生合成マシナリーで新規に形成される Fe-S クラスタ-が非常に不安定なことが挙げられる。さらに、鉄イオンの非特異的な結合や Fe-S クラスタ-の非酵素的な形成が障害となり、*in vitro* の再構成系で *in vivo* の反応を忠実に再現することは未だに困難である。一方、*in vivo* では関連する遺伝子のほぼすべてが生育に必須なため、これまで遺伝学的なアプローチも限られていた。

2. 研究の目的

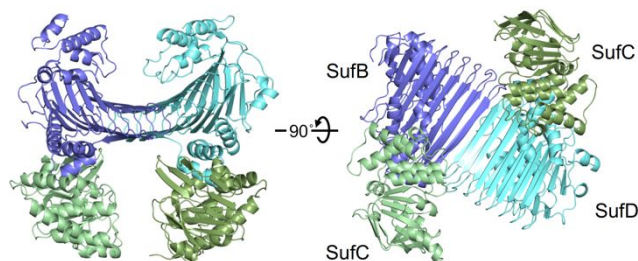
本研究における最大の焦点は、SUF マシナリーにおいて Fe-S クラスタ-の新規形成を担う SufBCD 複合体の作動機構の解明である。研究代表者 (高橋) は近年、大腸菌の代謝経路を改変することによって Fe-S クラスタ-生合成系の必須性を回避させ、関連する遺伝子群を自在に操作することのできる実験系を開発した。本研究では *in vivo* 解析から得られた知見と結晶構造解析を有機的に組み合わせて、Fe-S クラスタ-の生合成反応を超分子マシナリーの作動機構として解き明かすことを目指した。一方、枯草菌などグラム陽性細菌に見られる Fe-S クラスタ-の生合成系は、ISC と SUF のキメラ型である。この SUF 様マシナリーについては、特に SufU (IscU に相同) に着目して *in vivo* 機能解析と結晶構造解析・生化学的解析を進めた。これら生理学から構造生物学にまたがる新たな切り口で、Fe-S クラスタ-の生合成反応を包括的に解き明かすことを目的とした。また、並行して SufBCD 複合体に対する特異的な阻害剤のスクリーニングを進めた。

3. 研究の方法

SufBCD 複合体の X 線結晶解析は、和田と福山が分担した。高橋は全体を総括すると共に、遺伝生化学の観点から以下の方法で研究を進めた。大腸菌や枯草菌のイソプレノイド生合成系 (MEP 経路) を、Fe-S 酵素が関与しないメバロン酸経路に改変すると、Fe-S クラスタ-生合成系が機能しなくても、メバロン酸を含む培地で生育させることができる (発表論文、)。本研究ではこの実験系を利用して、各変異株の表現型や Fe-S クラスタ-形成能を詳細に比較検討した。また、SUF マシナリーの中心となる SufB、SufC、SufD に対して系統的に部位特異変異を導入して機能残基や機能領域を洗い出し、機能不全となったものからはサプレッサー変異を同定した。さらに、大腸菌と枯草菌との間で、関連遺伝子群を双方向で入れ替えるという異種間相補解析を行い、機能的な互換性を検討した。これら *in vivo* の知見に基づいて、野生型と変異型タンパク質の生化学的性質を *in vitro* で詳細に比較するとともに、複合体の構造解析にフィードバックさせることで実験的な検証を掘り下げ、構造機能研究を追求した。

4. 研究成果

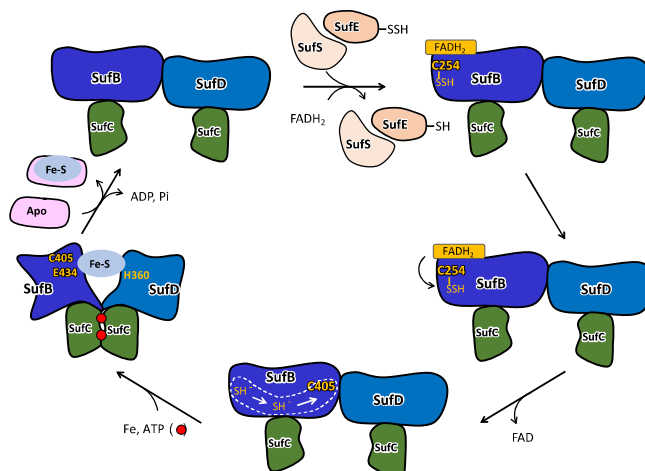
(1) SufBCD 複合体の結晶構造を世界に先駆けて決定した。SufB と SufD の立体構造は相同で、どちらも N 末端ヘリカルドメインと C 末端ヘリカルドメインの間に、20 本のストランドが扁平ならせん状に巻き付いたユニークな α -ヘリカルコアドメインを持つことが明らかになった。SufB



と SufD とはこの α -ヘリカルドメインどうしが会合しており、それぞれの C 末端ヘリカルドメインには SufC が 1 分子ずつ結合している。この構造からは、ATP の存在下で 2 分子の SufC が会合し、SufB と SufD の α -ヘリカルコアドメインに大きな構造変化が生じるという可能性が推

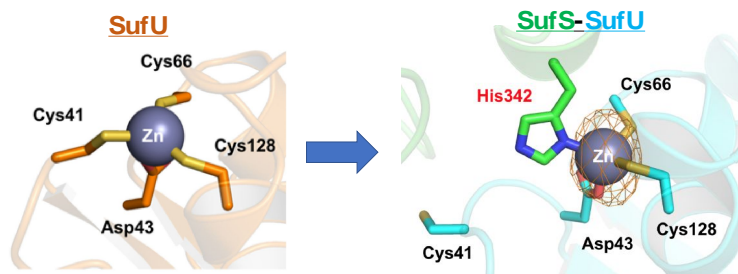
定され、これについて種々の生化学実験によって実証した。(発表論文)

(2) SufB と SufD に系統的な変異を導入し、*in vivo* 機能に重要な 9 残基を同定した。そのうち 6 残基は SufB の α -ヘリカルコアドメインの N 末端側領域に集中しており、そのひとつ Cys254 は SufE から SufB への硫黄転移反応に関与することを生化学的解析によって同定した。一方、SufB と SufD との会合面には *in vivo* 機能に必須な 3 残基 (SufB Cys405, SufB Glu434, SufD His360) が集中しており、この領域で Fe-S クラスタが新規に形成されると推定した。さらに、SufB の α -ヘリカルコアドメインの内部には、N 末端側から C 末端側に通じるトンネルが存在すること、このトンネルを構成するアミノ酸は機能的に重要なものが多いことを明らかにし、このトンネルが硫黄原子の通路やリザーバーとして利用される可能性を示した。これらの知見に基づいて、SufBCD 複合体の作動機構に基づく Fe-S クラスタの生合成機構を提唱した。(発表論文)



(3) SufBCD 複合体の阻害剤のスクリーニングでは、まず、理化学研究所の化合物バンク (NPDepo) のうち、化合物アレイを用いて約 30,000 種の化合物の中から SufBCD 複合体に結合する化合物 1072 種を同定した。次いで、大腸菌の変異株を利用して SUF マシナリーに特異的な阻害剤の *in vivo* スクリーニングを進めたが、大腸菌細胞内には多くの化合物が入りにくいことが分かった。枯草菌の変異株を用いたスクリーニングにスイッチして検討を進めたところ、2 種類の化合物が阻害作用を示すことを見出した。

(4) グラム陽性細菌の Fe-S クラスタ生合成系は、大腸菌の SUF マシナリーと ISC マシナリーのキメラタイプと考えられていたが、異種間の相補解析によって枯草菌と大腸菌の関連成分間の互換性を検討したところ、意外なことに、枯草菌の SufU は大腸菌 IscU のように Fe-S クラスタ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 は、機能の異なる相同タンパク質であることを明らかにした。さらに、枯草菌の SufS-SufU 複合体の結晶構造を決定したところ、複合体の形成に伴って、亜鉛に対する配位子が SufU の Cys41 から SufS の His342 に置き換わることを見出した。この置換は SufS と SufU の結合に寄与するだけでなく、SufU の Cys41 が亜鉛から外れることによって SufS から硫黄原子を受け取ることができるようになる。これら *in vivo* と *in vitro* の解析から、SufU が亜鉛に依存した硫黄原子のキャリアタンパク質であることを、世界に先駆けて明らかにした。(発表論文)



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

N. Yokoyama, C. Nonaka, Y. Ohashi, M. Shioda, T. Terahata, W. Chen, K. Sakamoto, C. Maruyama, T. Saito, E. Yuda, N. Tanaka, T. Fujishiro, T. Kuzuyama, K. Asai, and Y. Takahashi (2018) Distinct roles for U-type proteins in iron-sulfur cluster biosynthesis revealed by genetic analysis of the

Bacillus subtilis sufCDSUB operon. *Mol. Microbiol.* 107(6):688-703. doi: 10.1111/mmi.13907. (査読有)

T. Fujishiro, T. Terahata, K. Kunichika, N. Yokoyama, C. Maruyama, K. Asai, and Y. Takahashi (2017) “Zinc-ligand swapping mediated complex formation and sulfur transfer between SufS and SufU for iron-sulfur cluster biogenesis in *Bacillus subtilis*” *J. Am. Chem. Soc.* 139(51):18464-18467. doi: 10.1021/jacs.7b11307. (査読有)

E. Yuda, N. Tanaka, T. Fujishiro, N. Yokoyama, K. Hirabayashi, K. Fukuyama, K. Wada, and Y. Takahashi (2017) “Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron-sulfur clusters” *Sci. Rep.* 7: 9387 (12 pages). DOI: 10.1038/s41598-017-09846-2 (査読有)

H. Takao, K. Hirabayashi, Y. Nishigaya, H. Kouriki, T. Nakaniwa, Y. Hagiwara, J. Harada, H. Sato, T. Yamazaki, Y. Sakakibara, M. Suiko, Y. Asada, Y. Takahashi, K. Yamamoto, K. Fukuyama, M. Sugishima, and K. Wada (2017) “A substrate-bound structure of cyanobacterial biliverdin reductase identifies stacked substrates as critical for activity” *Nat. Commun.* 8:14397. doi: 10.1038/ncomms14397. (査読有)

N. Tanaka, M. Kanazawa, K. Tonosaki, N. Yokoyama, T. Kuzuyama and Y. Takahashi (2016) “Novel features of the ISC machinery revealed by characterization of *Escherichia coli* mutants that survive without iron-sulfur clusters” *Mol. Microbiol.* 99(50): 835-848. doi: 10.1111/mmi.13271.(査読有)

K. Hirabayashi, E. Yuda, N. Tanaka, S. Katayama, K. Iwasaki, T. Matsumoto, G. Kurisu, F. W. Outten, K. Fukuyama, Y. Takahashi, and K. Wada (2015) “Functional dynamics revealed by the structure of the SufBCD complex, a novel ATP-binding cassette (ABC) protein that serves as a scaffold for iron-sulfur cluster biogenesis” *J. Biol. Chem.* 290(50): 29717–29731. doi: 10.1074/jbc.M115.680934. (査読有)

[学会発表] (計 26 件)

横山奈央、IscU と SufU の機能分化から推定される鉄硫黄クラスター生合成システムの進化的変遷、第 91 回日本生化学会大会、2018 年

佐藤紗希子、鉄硫黄クラスター生合成系の必須成分の機能をバイパスするサブレッサー変異の解析、第 91 回日本生化学会大会、2018 年

村田真耶、メタン生成古細菌の鉄硫黄クラスター生合成系：SUF マシナリーのプロトタイプ、第 91 回日本生化学会大会、2018 年

横山奈央、鉄硫黄クラスターの生合成に關与する IscU と SufU の機能分化、平成 30 年度日本生化学会関東支部例会、2018 年

Kei Wada, Structural and functional analyses of *E. coli* SufBCD complex. 39th Steenbock Symposium on “Iron-Sulfur Proteins—Biogenesis, Regulation and Function” 2018

Yasuhiro Takahashi, Novel insights into bacterial iron-sulfur cluster biosynthesis systems. 39th Steenbock Symposium on “Iron-Sulfur Proteins—Biogenesis, Regulation and Function” 2018(招待講演)

國近航平、超好熱性細菌の鉄硫黄クラスター生合成系：IscS2-IscU 複合体の X 線結晶構造解析、日本化学会第 98 春季年会、2018 年

藤城貴史、枯草菌の鉄硫黄クラスター生合成系の硫黄供給酵素複合体の X 線結晶構造解析、日本化学会第 98 春季年会、2018 年

横山奈央、鉄硫黄クラスター生合成系の多様性：グラム陽性菌にみられるキメラ型生合成系の機能解析、平成 30 年度日本生化学会関東支部例会、2017 年

湯田瑛樹、SufBCD 複合体への変異導入解析から見えてきた鉄硫黄クラスターの生合成機構、ConBio2017 (第 90 回日本生化学会大会第 40 回日本分子生物学会年会合同大会) 2017 年

横山奈央、鉄硫黄クラスター生合成系の多様性：グラム陽性菌にみられるキメラ型生合成系の解析、ConBio2017 (第 90 回日本生化学会大会 第 40 回日本分子生物学会年会 合同大会) 2017 年

藤城貴史、構造情報を利用した枯草菌由来金属キレターゼ様タンパク質の性状解析、ConBio2017(第 90 回日本生化学会大会 第 40 回日本分子生物学会年会 合同大会) 2017 年

横山奈央、鉄硫黄クラスター生合成系の多様性：グラム陽性菌に見られるキメラ型生合成系の逆遺伝学的解析、第 11 回日本ゲノム微生物学会年会、2017 年

金澤美秋、鉄硫黄クラスター生合成系の必須成分の機能をバイパスするサブレッサー変異

- の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
横山奈央、グラム陽性細菌のキメラ型鉄硫黄クラスター生合成系：破壊株の構築と異種間相補解析、日本農芸化学会関東支部 2016 年度大会、2016 年
湯田瑛樹、鉄硫黄クラスター生合成系の中核成分 SufBCD 複合体の遺伝生化学的解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年
横山奈央、グラム陽性細菌に見られるユニークな鉄硫黄クラスター生合成オペロン (sufCDSUB) の遺伝学的解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年
金澤美秋、鉄硫黄クラスター生合成系の必須成分の機能をバイパスするサプレッサー変異の遺伝学的解析、日本遺伝学会第 88 回大会、2016 年
横山奈央、枯草菌のキメラ型鉄硫黄クラスター生合成系の遺伝学的解析、2016 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2016 年
横山奈央、枯草菌の鉄硫黄クラスター生合成系：破壊株の構築と異種間相補解析、平成 28 年度日本生化学会関東支部例会、2016 年
- ②① 湯田瑛樹、鉄硫黄クラスターの生合成を担う SufBCD 複合体の変異導入解析、平成 28 年度日本生化学会関東支部例会、2016 年
 - ②② 高橋康弘、広がりゆく鉄硫黄タンパク質の世界、BMB2015 (第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会) 2015 年、(招待講演)
 - ②③ 飴野佑美子、枯草菌の鉄硫黄クラスター生合成関連遺伝子群の多重破壊株の性質、BMB2015 (第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会) 2015 年
 - ②④ 湯田瑛樹、大腸菌の鉄硫黄クラスター生合成系 (SUF マシナリー) の中核を担う SufB タンパク質の機能解析、第 14 回微生物研究会、2015 年
 - ②⑤ Eiki Yuda, Identification and Analysis of Functional Residues of the SufB Fe-S Cluster Biosynthesis Scaffold Protein. RIKEN Symposium, "Metals in Biology" in Wako, 2015
 - ②⑥ 湯田瑛樹、大腸菌の鉄硫黄クラスター生合成における SufB の機能残基の同定とその役割、第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 埼玉大学 大学院理工学研究科 分子統御研究室
<http://park.saitama-u.ac.jp/%7Eetougyo/Home.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：和田 啓

ローマ字氏名：WADA, kei

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：80379304

研究分担者氏名：福山 恵一

ローマ字氏名：FUKUYAMA, keiichi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院理工学研究科

職名：招へい研究員

研究者番号 (8 桁)：80032283

(2)研究協力者 なし

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。