

平成 23 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21770112  
 研究課題名(和文) 鉄硫黄クラスター合成を担う多成分コア複合体の作動機構と分子ダイナミズムの構造基盤  
 研究課題名(英文) Structural basis of the complex proteins involved in the iron-sulfur cluster biogenesis  
 研究代表者  
 和田 啓(WADA KEI)  
 大阪大学・大学院理学研究科・助教  
 研究者番号：80379304

## 研究成果の概要(和文)：

本研究では、鉄硫黄クラスター合成に関わる SufC と SufD が安定な二成分の複合体を形成することを初めて見出し、この複合体の立体構造を決定した。複合体の形成により、SufC では大きな構造変化が起き、ATP の結合/加水分解に適した活性型に変化することを明らかにした。さらに、SufC は複合体中で ATP 依存的に二量体化することを変異導入と架橋実験により実証した。これらの成果から、鉄硫黄クラスター合成機構の作動モデルを提唱した。

## 研究成果の概要(英文)：

In this study, the quaternary structure of the SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>2</sub> complex involved in Fe-S cluster biogenesis in which SufC is bound to the C-terminal domain of SufD was determined. Comparison with the monomeric structure of SufC revealed conformational change of the active-site residues: SufC becomes competent for ATP binding and hydrolysis upon association with SufD. These findings, together with biochemical characterization of the SufB-SufC-SufD complex, have led us to propose a model for the Fe-S cluster biosynthesis in the complex.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：鉄硫黄クラスター、X線結晶構造解析、ATP分解酵素、SUFマシナリー、ISCマシナリー

### 1. 研究開始当初の背景

鉄硫黄 (Fe-S) タンパク質は多様にしてかつ生物界に普遍的に分布している。それらのコファクターである Fe-S クラスターは、酸化還元や酵素反応の活性中心、制御のセンサーとして必須の働きをもつ。この Fe-S クラスターの生合成は、多成分タンパク質からなるマシナリーが担っていることが遺伝学的研究から近年明らかにされた。SUF マシナリーはその代表であり、SufABCDSE の六種類のタンパク質から構成されている。これら成分タンパク質がどのように構造を変え、離合集散し、その結果として Fe-S クラスターが形成されるか理解にはほど遠い。本研究では、遺伝学および生化学研究で注目されはじめた SufB、SufC、SufD と呼ばれる成分に焦点をあてる。これらの成分は複合体を形成し、ATP の結合/加水分解に共役したダイナミックな構造変化を起こすことが予想された。さらに、この複合体の構造変化に伴い、供給された鉄や硫黄を Fe-S クラスターへと合成するマシナリーの”心臓部”といえる。本テーマでは、SufB-SufC-SufD 複合体やこれらの成分のサブコンプレックスの構造・機能決定を通じて、この複雑なマシナリーの作動機構の解明を目指している。

### 2. 研究の目的

一連の合成過程の中で、SufB-SufC-SufD 複合体は SufC の ATP 結合/加水分解に伴うダイマー化により構造変化し、複合体内部に埋もれた活性残基 (一部同定済み: SufB および SufD の推定相互作用部位に存在) が露出すると予想している。このような構造変化は、膜輸送体中の ABC-ATPase による動的变化をミミックしている。本研究では、このマシナリーの中核成分 (SufB/SufD/SufC) からなる複合体やそれぞれの成分の構造を決定するこ

とで、この複合体の作動機構のベースを確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究でターゲットとした SufB<sub>1</sub>-SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>1</sub> 複合体の結晶化は現在難航している。そこで、SufC の ATP 分解活性を消失させる変異 (ATP 結合活性は有;K40R, E171Q, H203A) を導入することで一過的なダイマー構造を固定する。さらに、多種類の ATP アナログとリン酸アナログ (バナジン酸、フッ化アルミニウム) の併用により、複合体全体のダイナミックな動きをロックし突破口を開く。これまでに、SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>2</sub> 複合体においては SufC ダイマーの固定に成功しており、そのノウハウを生かす。これらの試みでは同時に、様々な状態で固定された複合体構造を捕捉することを狙っている。回折データ測定は、実験室系の装置と SPring-8 を併用した。

### 4. 研究成果

Fe-S クラスター合成に関わるタンパク質複合体 (SufB-SufC-SufD 複合体) に形成される Fe-S クラスター中間体を無酸素条件下において捕捉に成功し、クラスター合成過程にはオリゴマー状態も変化することを明らかにした。また、SufB<sub>1</sub>-SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>1</sub> 複合体の様々な部位に変異を導入し、その安定性を評価した。

さらに本研究では、SUF マシナリーの成分間における相互作用の組み合わせを洗い出すため、pull-down assay を試み、SufC/SufD が安定な二成分の複合体を形成することを初めて見出した。この SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>2</sub> 複合体については、AMP-PNP 存在下において良好な結晶を得、構造を決定した。この複合体構造から、SufC は SufD と複合体を形成することで活性化し、はじめて ATPase として機能できることを明らかにした。さらに、変異導入と

架橋試薬を駆使して、複合体状態でも SufC はATP 依存的にダイマーになることを実証した。これらの結果から、SufD 分子内に埋もれている機能残基 (Fe-S クラスター配位子と推定) は、SufC のダイマー化をトリガーとして分子表面に露出することがわかった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

(1) 鉄硫黄クラスター生合成マシナリーの構造と作動機構、和田啓、福山恵一、高橋康弘。化学と生物, Vol48, No. 12, 831-838 (2010), 査読無。

(2) 鉄硫黄クラスター生合成マシナリーの構造生物学、和田啓、日本結晶学会誌, 52, 174-183 (2010), 査読有。

(3) 超分子マシナリーが担う鉄硫黄クラスターの生合成。高橋康弘、和田啓、福山恵一。生化学, Vol 82, no. 2, 139-142 (2010), 査読無。

(4) Molecular Dynamism of Fe-S Cluster Biosynthesis Implicated by the Structure of the SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>2</sub> Complex. Wada, K., Sumi, N., Nagai, R., Iwasaki, K., Sato, T., Suzuki, K., Hasegawa, Y., Kitaoka, S., Minami, Y., Outten, W., F., Takahashi, Y. and Fukuyama, K. *J. Mol. Biol.*, 387, 245-258 (2009), 査読有。

[学会発表] (計8件)

(1) 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。平林佳、中嘉孝、高橋康弘、福山恵一、和田啓、第33回日本分子生物学会 第83回日本生化学会合同大会、神戸ポートアイランド (2010年12月10日)

(2) 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。平林佳、岩永朋子、高橋康弘、福山恵一、和田啓、日本結晶学会平成22年度年会、大阪大学コンベンションセンター (2010年12月3日)

(3) 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。平林佳、中嘉孝、高橋康弘、福山恵一、和田啓、第10回蛋白質科学会年会、札幌コンベンションセンター (2010年6月17日)

(4) 鉄硫黄クラスター生合成マシナリーの構造生物学、和田啓、平成21年度日本結晶学会年会 [進歩賞受賞講演]、関西学院大学 (2009年12月6日)。

(5) 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。和田啓、高橋康弘、福山恵一、特定領域研究「生体超分子」第6回公開シンポジウム、千里ライフサイエンスセンター (2009年12月1日)

(6) Structural Studies on the Fe-S Cluster-bound Holo-form of IscU. Takahashi, Y., Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation Conference, Georgia, USA (2009年9月1日)

(7) Crystal Structure of the SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>2</sub> Complex: Implications for Dynamic Rearrangement During Fe-S cluster Biosynthesis. Wada, K., Sumi, N., Nagai, R., Iwasaki, K., Sato, T. Suzuki, K., Nagasaka, Y., Minami., Y., Outten, F.W., Takahashi, Y., Fukuyama., K., Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation Conference, Georgia, USA (2009年9月1日)

(8) 鉄硫黄クラスターの生合成に関与する大腸菌SufCD複合体の構造解析。和田啓、鷺見法香、北岡伸太郎、高橋康弘、福山恵一、第9回日本蛋白質科学会年会、熊本全日空ホテルニュースカイ (2009年5月21日)

[その他]

ホームページ:

<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/%7Ekeiwada/index.htm>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 啓 (WADA KEI)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：80379304

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：