

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840023

研究課題名(和文) 新たなABC蛋白質ファミリーに属する鉄硫黄クラスター生合成装置の作動ダイナミズム

研究課題名(英文) Structure changes of the novel ABC-type protein complex involved in the iron-sulfur cluster biosynthesis

研究代表者

和田 啓 (Wada, Kei)

宮崎大学・テニュアトラック推進機構・助教

研究者番号：80379304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鉄硫黄クラスター生合成のコア複合体(SufB2-SufC1-SufD2複合体)を安定に発現・精製する系を確立し、その立体構造を決定した。明らかにした複合体構造から、SufBおよびSufDは全く新しい構造モチーフを持つことが分かった。また、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。さらに、コア複合体のATP依存的なダイナミックな構造変化を蛍光ラベル実験により明らかにした。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 SufB2-SufC1-SufD2 complex involved in Fe-S cluster biogenesis in which two SufC molecule are bound to the C-terminal domain of SufB/SufD was determined. The central domain of SufB and SufD possess the novel structural motif. Biochemical and physiological analyses based on the crystal structure provide unprecedented insights into the correlation of cluster assembly with the dynamic conformational change driven by ABC-ATPase activity. We propose a molecular mechanism of Fe-S cluster biogenesis for SufBCD complex.

研究分野：構造生物学

キーワード：鉄硫黄クラスター 結晶構造解析 立体構造 鉄硫黄蛋白質 ABC蛋白質

1. 研究開始当初の背景

Fe-S クラスターを持つタンパク質 (Fe-S タンパク質) は、高等動植物から古細菌まで非常に多様な種類 (大腸菌では全タンパク質の約 3%) が分布する。これら Fe-S クラスターは一見すると単純な構造だが¹⁾、細胞内では多成分で構成される大掛かりな合成マシナリーがこの生合成を担う²⁾。その代表である SUF マシナリーは、オペロンにコードされる六種のタンパク質 (SufABCDSE) から構成され、SufS-SufE 複合体 (硫黄原子の供給)、SufB-SufC-SufD 複合体 (合成の足場, SufC: ATPase) という多成分複合体と、単独の成分 SufA (鉄原子の供給体?) が協調的に機能する (上図)。これまでに研究代表者は、SUF マシナリーの構造生物学研究を展開し、これら複合体の離合集散が分子スイッチとなり段階的に 活性・機能を調節している ことを明らかにした。さらに、

- SufC は SufD との複合体形成により活性化型構造に変化する新奇 ATPase (ABC-ATPase) である。
- SufD および SufB は新規構造モチーフ (長鎖β-ヘリックス構造) をもち、*in vivo assay* で同定したすべて必須残基は分子内に完全に埋もれている。
- SufC₂-SufD₂ 二成分複合体中の SufC は ATP+Mg²⁺ の存在下でダイマー化し、これをトリガーして複合体全体の構造変化が起こることを実証した。

現在、SufB-SufC-SufD 三成分複合体がこのマシナリーの"心臓部"であり、Fe-S クラスターの *de novo* 合成反応の鍵は SufC の ATPase 活性に共役したこの複合体のダイナミックな構造変化にあることを提唱している。興味深いことに ABC トランスポーターにおいても、ATPase ドメインがダイマー化し、膜貫通ドメインの大きな構造変化が引き起こす。膜貫通ドメインと SufB/SufD は立体構造が異なるが、生物は同一の機構を使って膜間輸送と Fe-S クラスター合成の両方を成し遂げている可能性が極めて高い。Fontecave¹⁾(CEA Grenoble)や Outten²⁾(South Carolina 大)は SufB-SufC-SufD 複合体とその構造変化を軽視したモデルを提唱しているが、それは解析の遅れという側面を示しているに過ぎない。本研究では、新規 ABC 蛋白質ファミリーとなる SUF マシナリーの作動機構の実証に向けてコア複合体にターゲットを絞り多面的な研究を展開する。

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

本研究では、Fe-S クラスター合成装置の反応機序を明らかにするために、コア複合体の構造決定を中心に据え、異なる切り口から核心に迫る。その手法の柱とするのは、構造解析 (X 線結晶解析および電顕トモグラフィ)・蛍光分光測定である。さらに、変異導入・ATP アナログを組み合わせ、分光法によりリアルタイムの構造変化を可視化し、複合体の静止 (平均) 構造だけでは理解できない構造変化を実測する。これらに加えて、無酸素条件下 (嫌気チャンバー) での操作により合成途上の中間体 Fe-S クラスターを捕捉する。

4. 研究成果

[1]コア複合体の構造基盤の確立
コア複合体の立体構造の決定・・・Fe-S クラスター合成のコア複合体 (SufB1-SufC2-SufD2 複合体) は、それぞれの遺伝子が大腸菌内で共発現させることで精製することに成功した。構造決定に向けて、精製した複合体蛋白質を用いて好気および嫌気条件での結晶化スクリーニングを進めた結果、幾つかの微結晶を得ることができた。これらの結晶化条件を最適化したところ、糖を沈澱剤とした条件において、結晶のサイズアップに成功した。そこで、大型放射光施設 SPring-8 において、得られた結晶の回折強度測定を行い 2.95Å 分解能のデータを得た。さらに、さまざまな重原子を用いた多波長異常分散法による位相決定を進め、コア複合体の立体構造を決定した。コア複合体は、新規構造モチーフを有し、二分子の SufC が対峙するように配向することが分かった。

[2] 蛍光分光法による ATP 依存的な構造変化の実証

精製したコア複合体 (SufB1-SufC2-SufD2 複合体) を用いて、ATP 依存的な構造変化を蛍光分光器によって検出することを試みた。コア複合体は ATP 存在下において、疎水領域が増加することを実験的に捉えることができ、明らかにコア複合体には構造変化が生じていることを実証した。さらに、ウェスタンブロットリング法によって、SufC と呼ばれる ATPase ドメインが複合体中でダイマー化することを明らかにした。

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) Crystal structure of the catalase-peroxidase KatG W78F mutant from *Synechococcus elongatus* PCC7942 in complex with the antitubercular pro-drug isoniazid. Kamachi, S., Hirabayashi, K., Tamoi, M., Shigeoka, S., Tada, T.*, Wada, K.*

FEBS Lett., 589, 131-137 (2015) [査読有]

(2) The crystal structure of isoniazid-bound KatG catalase-peroxidase from *Synechococcus elongatus* PCC7942. Kamachi, S., Hirabayashi, K., Tamoi, M., Shigeoka, S., Tada, T.*, Wada, K.*

FEBS Journal, 282, 54-64. (2014) [査読有]

(3) The 2.2 Å resolution structure of the catalase-peroxidase KatG from *Synechococcus elongatus*. Kamachi, S., Wada, K.* Hirabayashi, K., Tamoi, M., Shigeoka, S., Tadam T.*.

Acta. Cryst. F. Structural biology communications, 70, 288-293 (2014) [査読有]

(4) Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase. Sugishima, M., Sato, H., Higashimoto, Y., Harada, J., Wada, K., Fukuyama, K., Noguchi. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111, 2524-2529

(2014) [査読有]

(5) Structure of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltranspeptidase in complex with acivicin: diversity of the binding mode of a classical and electrophilic active-site directed glutamate analogue. Ida, T., Suzuki, H., Fukuyama, K., Hiratake, J., Wada, K.* Acta Cryst. D. Biological Crystallography, 70, 607-614 (2014) [査読有]

(6) Cysteine 295 indirectly affects Ni coordination of carbon monoxide dehydrogenase-II C-cluster. Inoue, T. Takao, K. Yoshida, T. Wada, K. Daifuku, T. Yoneda, Y. Fukuyama K., Sako. Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 441, 13-17 (2013) [査読有]

(7) γ -グルタミルトランスペプチダーゼの立体構造と特異的反応 福山恵一, 和田啓, 日本結晶学会誌、55, 340-344 (2013) [査読有]

[学会発表] (計 15 件)

(1) SUF マシナリーによる鉄硫黄クラスター生合成機構の構造・機能解析 和田啓, 大阪大学蛋白研セミナー「嫌気蛋白質を対象とした構造・機能相関の現状」2015年3月5日、大阪大学蛋白質研究所 (大阪府) [招待講演]

(2) 鉄硫黄クラスターの生合成における SufB の機能残基の同定とその役割 湯田瑛樹、佐藤喬之、田中尚志、平林佳、和田啓、福山恵一、高橋康弘、第 87 回 日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、国立京都国際会館 (京都府)

(3) 超好熱細菌 *Aquifex aeolicus* の鉄硫黄クラスター生合成系: 新規な IscS-IscU-[2Fe-2S]複合体の形成 山川誠、岩永朋子、平林佳、和田啓、福山恵一、高橋康弘、第 87 回 日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、国立京都国際会館 (京都府)

(4) 鉄硫黄クラスター生合成系 (ISC マシナリー) における IscU の構造変換の意義 田中尚志、松嶋夢叶、北村整一、和田啓、福山恵一、高橋康弘、第 87 回 日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、国立京都国際会館

館（京都府）

(5) 鉄硫黄クラスター合成を支える新規 ABC タンパク質 SufBCD の ATP 依存的構造変化
平林佳、片山寿美枝、岩崎憲治、福山恵一、高橋康弘、和田啓、第 87 回 日本生化学会大会、2014 年 10 月 15～18 日、国立京都国際会館（京都府）

(6) 鉄硫黄クラスター生合成を担う多成分酵素マシナリーの構造学的研究
和田啓、第 38 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2014 年 9 月 11～13 日、レイクサイドホテル久山（福岡県）[招待講演]

(7) Crystal structures of γ -glutamyltranspeptidase in complex with inhibitors K.
Hirabayashi, T. Ida, S. Ri, H. Suzuki, K. Fukuyama, J. Hiratake, K. Wada, International Union of Crystallography 23rd Congress and general assembly, 2014 年 8 月 5～12 日、International Union of Crystallography 23rd Congress and general assembly（モントリオール、カナダ）

(8) Structural analyses of the two cysteine desulfurases from Aquifex aeolicus K.
Hirabayashi, T. Iwanaga, M. Yamakawa, N. Tanaka, K. Fukuyama, Y. Takahashi, K. Wada, International Union of Crystallography 23rd Congress and general assembly, 2014 年 8 月 5～12 日、International Union of Crystallography 23rd Congress and general assembly（モントリオール、カナダ）

(9) 鉄硫黄クラスター合成を担う新規 ABC 蛋白質 SufBCD 複合体の ATP 依存的構造変化
平林佳、片山寿美枝、岩崎憲治、福山恵一、高橋康弘、和田啓、第 14 回日本蛋白質科学会、2014 年 6 月 25～27 日、ワークピア横浜（神奈川県）

(10) 鉄硫黄クラスター合成に伴う SufBCD 複合体の会合状態変換
平林佳、長坂雄太、佐藤喬之、片山寿美枝、岩崎憲治、福山恵一、高橋康弘、和田啓、平成 25 年度日本結晶学会年会、2013 年 10 月 12～13 日、熊本大学（熊本県）

(11) 新たな ABC 蛋白質ファミリーに属する鉄硫黄クラスター生合成装置の構造・機能解析、平林佳、田中尚志、福山恵一、高橋康弘、和田啓、2013 年 09 月 26～28 日、ゆやど雲仙新湯（長崎県）

(12) 鉄硫黄クラスター合成に伴う SufBCD 複合体の会合状態変換
平林佳、長坂雄太、佐藤喬之、片山寿美枝、

岩崎憲治、福山恵一、高橋康弘、和田啓、平成 25 年度日本結晶学会年会、2013 年 10 月 12 日～13 日、熊本大学（熊本県）

(13) X-ray crystallographic analysis of a non-canonical cysteine desulfurase from the hyperthermophile, Aquifex aeolicus.
K. Hirabayashi, T. Iwanaga, M. Yamakawa, N. Tanaka, K. Fukuyama, Y. Takahashi, K. Wada, International Conference on Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation 2013、2013 年 05 月 20～23 日 Univ. of South Carolina（コロンビア、米国）[招待講演]

(14) Structural basis of protein-protein interaction manners in the plant-type [2Fe-2S] Ferredoxin.
K. Hirabayashi, H. Kameda, Y. Takahashi, K. Fukuyama, K. Wada, 2013 年 05 月 20～23 日 Univ. of South Carolina（コロンビア、米国）

(15) Mutational analysis of IscU revealed novel functional residues. N. Tanaka, T. Masako, K. Wada, K. Fukuyama, Y. Takahashi. 2013 年 05 月 20～23 日 Univ. of South Carolina（コロンビア、米国）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/keiwada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 啓 (WADA KEI)

宮崎大学・テニュアトラック推進機構・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：