

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670215

研究課題名(和文) グルコース感受性に関わる細菌型mitoNEETシステムの網羅的解析

研究課題名(英文) Structure-function studies of bacterial mitoNEET system

研究代表者

岩崎 俊雄 (Iwasaki, Toshio)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：40277497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：好熱菌 *Thermus thermophilus* の「細菌型mitoNEET (TthNEET)」は、II型糖尿病改善薬ピオグリタゾン標的候補として発見された哺乳類mitoNEET鉄硫黄蛋白質のホモログであり、クラスター近傍残基も保存されている。先の研究でTthNEET遺伝子完全破壊株につき、「グルコース感受性」が増強され増殖阻害されることを見出した。本研究では、変異導入株の構造解析、表現型解析等を行い、このグルコース感受性生育阻害が、mitoNEET型クラスターによるレドックス制御とは直接関連しないことを見出した。またプロテオーム解析等から、TthNEET欠損と相関変動する泳動スポットを検出した。

研究成果の概要(英文)：MitoNEET is a novel outer-mitochondrial membrane iron-sulfur protein, recently identified as a potential mitochondrial target that binds pioglitazone, an insulin sensitizer for the treatment of type II diabetes. Recently we constructed a null-deletion mutant strain of *Thermus thermophilus* lacking TthNEET (the thermophile homolog of mitoNEET), and found a “prokaryotic glucose intolerance” for this delta-TthNEET null strain. In this work, we characterized TthNEET mutant proteins and strains with altered [2Fe-2S] cluster redox potentials by X-ray crystallographic and physiological analyses to better understand the structure-function relationships of this class of proteins, and explored the protein interaction network of TthNEET by monitoring the whole-cell global changes of the *Thermus* protein components, using pulldown assays and two-dimensional gel electrophoresis.

研究分野：生化学

キーワード：mitoNEET 鉄硫黄クラスター 構造生物学 オミックス解析 構造機能 鉄硫黄タンパク質 好熱菌

1. 研究開始当初の背景

MitoNEET は、II 型糖尿病改善薬ピオグリタゾン (アクトス) の新標的候補として同定され、ミトコンドリア外膜の細胞質側に局在する。発見当初はそのアミノ酸配列情報から Zn(Cys)₃(His)₁ タイプ亜鉛フィンガー蛋白質と予想されたが、大腸菌発現酵素を用いた生化学解析・結晶構造解析等から、[2Fe-2S](Cys)₃(His)₁ クラスターをもつ新規鉄硫黄蛋白質ファミリーであることが判明した。MitoNEET ホモログは、細菌からヒトに至るまで保存され、哺乳類 mitoNEET やそのホモログ Miner1/ERIS2 のノックアウトマウスでは、呼吸鎖複合体 I の関わる酸素呼吸活性低下、ミトコンドリア形態形成異常、Ca²⁺ホメオスタシス異常などが報告されており、また最近では mitoNEET と NAF1 因子の相互作用による乳ガン細胞増殖等との関連等も示唆されている。

創薬の新開発への期待から、米国・中国などの複数グループが中心となり、哺乳類・培養細胞等を主材料を主とした生理機能解析が競争的になっているが、当該分野の国際的に焦眉な緊急課題は、mitoNEET ファミリーの基本生理機能が不明なことにある。細胞内小器官・臓器特異性がある高等動物の複雑系では、個々の実験の基本デザインが難しいだけでなく、実験結果の相互解釈も困難な場合も多々あることから、私達は、よりシンプルなモデル生物における基本的なプロセスを理解する戦略が有効ではないかと考えた。

2. 研究の目的

MitoNEET ファミリーはヒトなどの哺乳動物だけでなく、病原性細菌に至るまで高度に保存されている。先の研究で、私達は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の全ゲノム配列情報に着眼し、細菌型 mitoNEET ホモログ (TthNEET) を同定、その結晶構造解析 (1.8Å 分解能) にも世界に先駆け成功した。また、先に作成した好熱菌 TthNEET 遺伝子完全破壊株でも、グルコース感受性が顕著に増強されることで細胞増殖が悪化し、CES-MS メタボローム解析からエネルギー代謝、核酸代謝系の異常等が示唆されていた。

こうした興味深い要素をもつ機能未知酵素の生理究明には「ゲノム情報と逆遺伝学的解析に基づく網羅的分子遺伝学的知見」と「構造生物学的知見」を両輪とすることが望ましい。そこで本研究では、構造生物学とシステム生物学解析により「グルコース感受性増殖阻害に関わる細菌型 mitoNEET の網羅的構造機能生理を解明」することを最終目的とした。

すなわち、全ゲノム情報に基づき遺伝子改変系・トランスクリプトーム解析系・蛋白質発現解析系が完備された高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 と シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を主材料とし、

(1) 細菌型 mitoNEET 遺伝子の欠損株、部位特異的変異導入株を作成して、分子レベル情報に基づく複雑で動的なレドックス代謝・制御系等のオミックス変動分析、(2) 細菌型 mitoNEET システム関連タンパク質の同定・構造機能解析を当面目標とした。これにより、モデル微生物のレドックス・シグナル情報に基づく複雑かつ動的なエネルギー代謝・制御系変動の体系的解析の新規モデルケースを提供できるのではないかと期待もあった。しかるに、以下詳述するように、当初計画で想定していなかった結果を得たため、本研究では適宜計画を変更しつつ遂行した。

3. 研究の方法

(1) **構造生物学的解析**：本研究におけるリコンビナント鉄硫黄蛋白質は既報 [Iwasaki ら (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 9129; Iwasaki ら (2012) *J. Am. Chem. Soc.* 134, 19731 等] に基づき大量精製した。必要により発現ベクターの改変、目的遺伝子の発現領域の改変や部位特異的変異導入を行った。X線結晶構造解析は主に SPring-8 ビームライン BL41XU 等を用いて強度データ収集し、精密化は連携研究者 (JASRI/SPring-8 グループ) が中心となり行った。

(2) **好熱菌 TthNEET の機能生理解析**：高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を宿主とし、耐熱性カナマイシンマーカージェン型遺伝子を利用して相同組換した欠損株、TthNEET 変異体相同組換導入株等を用いた。

野生型 TthNEET 結晶構造および哺乳類 mitoNEET 変異酵素解析 [Zuris ら (2010) *J. Am. Chem. Soc.* 132, 13120] 等に基づき、TthNEET 鉄硫黄クラスター近傍の保存性アミノ酸残基を改変し、クラスター *Em* の異なる部位特異的変異酵素 H52C, K53E を作成した。これら大腸菌で発現させ、① 結晶化・X線結晶構造解析した。さらに、H52C, K53E 変異をそれぞれ好熱菌 *T. thermophilus* ゲノム DNA に相同組換導入して、② 菌体増殖 (OD₆₀₀) 変化、および ③ グルコースオキシダーゼ・センサーを用いた好熱菌 NM 培地中グルコース濃度 (%) 変化を測定した。また、④ 精製 TthNEET を固定化した Ni-NTA カラムを用いたプルダウン・アッセイ、⑤ 二次元電気泳動法による好熱菌野生株と TthNEET 遺伝子完全破壊株の全可溶性タンパク質の比較プロテオーム解析等を行った。

(3) シアノバクテリア *SynechoNEET/PirB* の解析: シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 を材料に目的遺伝子 *pirB* (*synechoNEET*) の各種リガンド変異体を作成・EPR による分光解析等を行った。また、連携研究者(早稲田大学グループ)指導のもとシアノバクテリア *pirB* 欠損株、*pirAB* 欠損株を作成し、生育条件の変動等の予備的表現型解析等を継続して試みた。

4. 研究成果

細菌型 mitoNEET は [2Fe-2S] (His)₁(Cys)₃ クラスタをもつ新規鉄硫黄蛋白質である。高度好熱菌およびシアノバクテリアの全ゲノム配列情報より見出した細菌型 mitoNEET ホモログ (TthNEET および PirB) を中心に、各種構造機能生理解析を連携して実施して下記の主要成果を得、学会等でその一部を発表した。

好熱菌野生型 TthNEET については、先の研究で野生型酵素の X 線構造解析 (1.8Å 分解能) を行い、その立体構造を明らかにした。TthNEET はホモ二量体で、βキャップ領域の構造はミトコンドリア酵素と異なるものの、mitoNEET 型 [2Fe-2S] (Cys)₃(His)₁ クラスタ近傍構造はほぼ完全に保存されている。一般に、生体内電子伝達反応に関与する鉄硫黄蛋白質では、鉄硫黄クラスタの酸化還元電位 (*Em*) が反応性を決定する主要因の一つとなっている。哺乳類 mitoNEET では、鉄硫黄クラスタ近傍の保存性残基 His87, Lys55 をそれぞれ改変 (H87C, K55E など) すると、クラスタ *Em* が高低両方に幅広く変動することが報告されており [Zuris ら (2010) *J. Am. Chem. Soc.* 132, 13120]、TthNEET 構造でも、これらのアミノ酸残基 (それぞれ His52, Lys53) の空間配置は、完全保存されていた。そこで本研究では、TthNEET 鉄硫黄クラスタ *Em* 変動変異酵素 H52C, K53E を作成し、これらを用いて「TthNEET [2Fe-2S] クラスタ *Em* 変化に伴うレドックス変動」と「グルコース感受性の増殖阻害」との相関につき、多角的手法により検討した。以下詳述の通り、当初計画で全く想定していなかった結果を得たため、適宜変更しつつ、慎重に構造生理機能解析をすすめた。

(1) TthNEET H52C 変異酵素

TthNEET に保存されている His52 残基は、mitoNEET 型 [2Fe-2S] (Cys)₃(His)₁ クラスタ配位アミノ酸残基の一つであり、哺乳類 mitoNEET では His87→Cys 変異により、mitoNEET 型クラスタ *Em* が端的に「低下」する。TthNEET H52C 変異酵素を大腸菌で [2Fe-2S] (Cys)₄ 蛋白質として発現、各種分光解析、結晶化、X 線構造解析 (1.8Å 分解能)

した。H52C 変異酵素の全体構造はほぼ野生型酵素と同一であり、His52→Cys 変異に伴う構造変化も非常に局所的であった。すなわち His52→Cys 変異では、弱い His52 Nδ配位子が強い Cys Sγ配位に置換されることで、クラスタ *Em* の端的な低下がみられたと考えられる。

この His52→Cys 変異をもつ TthNEET 遺伝子を相同組換え導入したところ、驚いたことに TthNEET 遺伝子完全破壊株とは異なり、野生型株とほぼ同様の生育曲線を示した。すなわち、TthNEET クラスタ *Em* が端的に「低下」した変異株でも、完全破壊株にみられる「グルコース感受性の増殖阻害」の表現型が相補された。また、グルコースオキシダーゼ・センサーを用いた培地中グルコース濃度 (%) 測定から、生育阻害が認められる TthNEET 遺伝子完全破壊株でも、グルコース取込み反応自体は阻害されていないことが分かった。

(2) TthNEET K53E 変異酵素

TthNEET の His52 残基近傍には、mitoNEET ファミリーで保存されている Lys53 残基があり、哺乳類 mitoNEET では Lys→Glu 変異により、mitoNEET 型クラスタ *Em* が極端に「上昇」する。TthNEET K53E 変異酵素を大腸菌で発現、各種分光解析、結晶化、X 線構造解析 (1.2-1.7Å 分解能) した。K53E 変異酵素の全体構造はほぼ野生型酵素と同一であり、Lys53→Glu 変異に伴う構造変化も極めて局所的であった。すなわち Lys53→Glu 変異では、クラスタ近傍側鎖のチャージ変化により、クラスタ *Em* 上昇がみられたと考えられる。

この Lys53→Glu 変異をもつ TthNEET 遺伝子を相同組換え導入したところ、TthNEET 遺伝子完全破壊株とは異なり、H52C 変異導入株や野生型株とほぼ同様の生育曲線を示した。すなわち、TthNEET クラスタ *Em* が「上昇」した変異株でも、完全破壊株にみられる「グルコース感受性の増殖阻害」の表現型が相補された。

以上の結果を総合すると、研究計画立案時の予想に反し、少なくともこの好熱菌「グルコース感受性阻害」表現型に関しては、TthNEET の [2Fe-2S] クラスタがレドックス制御系の電子伝達メディエーターとして単純寄与するのではなく、むしろ「TthNEET タンパク質本体」がグルコース添加時の細胞増殖調節因子の一部として機能していることが示唆された。

(3) 組換え TthNEET 固定化カラムを用いた TthNEET 結合タンパク質プルダウン・アッセイ解析

変異酵素導入株を用いた表現型解析から「グルコース感受性阻害」が TthNEET 遺伝子の「有無」にのみ相関し、mitoNEET 型 [2Fe-2S] クラスターの酸化還元電位変動とは相関しないことが判明したため、まず Ni-NTA カラムに His-tag を介して固定化した精製リコンビナント TthNEET に結合する *Thermus* 菌体抽出物中のタンパク質の同定を試みた。

野生株および TthNEET 欠損株の細胞破碎抽出物を用い、固定化カラムの洗浄条件を変えて特異的に結合するタンパク質を SDS 電気泳動と質量分析法により試みた。カラム洗浄条件を強くし、TthNEET 結合カラムより溶出されてくるタンパク質として、*Thermus* リボソーム構成サブユニットや分子シャペロン等 (*Thermus* 分子シャペロニン Cpn60、5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase RibD (*ttha1064*) など) を同定したが、いずれも *in vitro* で TthNEET と特異的に複合体形成する直接証拠は得られなかった (例えば、結晶化目的のため、本実験で同定したリボソームサブユニットと TthNEET とを大腸菌共発現させても、安定複合体を形成しなかった)。このことから、プルダウン・アッセイ法による TthNEET 結合タンパク質同定には技術的困難があり、とくに再現性や結合特異性につき根本的問題があることがわかった。

(4) 二次元電気泳動による *Thermus* プロテオーム解析

上記結果を踏まえ、次にグルコース添加時における野生株と欠損株の「タンパク質発現プロファイル」相違を「二次元電気泳動法」により直接同定することを試みた。超音波処理で菌体破碎し、可溶性抽出物中の全タンパク質を二次元電気泳動法で分離、銀染色によりスポットパターンを比較検討した。野生株と TthNEET 欠損株では全体的にはほぼ似たスポットパターンを示し、グローバルなタンパク質変動が認められないことが判明した。現時点での問題として、好熱菌の熱安定タンパク質を材料としているため、とくに高分子領域スポットのパターンがスミアであり、低分子領域の幾つかの薄いスポットについても泳動パターン再現性がやや悪い。タンパク質変性条件が最適化されていないためと考えられるが、市販の二次元電気泳動用ゲルのロット差にも難があり、状況改善には至っていない。

一方、銀染色で強く染まるメインスポット群については十分な再現性があり、野生株サンプルと TthNEET 欠損株サンプル間で顕著な相違が認められるスポットを pH4-7 領域で少なくとも 2 種検出できた。今後は質量分析によるスポットの同定確認と表現型解析等を行い、TthNEET との機能相関の分子基盤解析をさらにすすめる計画である。

(5) その他

・薬剤結合部位同定のため、「線虫 mitoNEET」の発現・精製・結晶化条件を改善し、その X 線構造解析 (1.7 Å 分解能) に成功した。今後は薬剤結合型 mitoNEET の結晶化・X 線強度データ収集等を検討する予定である。

・「シアノバクテリア PirB」は 1 本のポリペプチド鎖に 2 つの mitoNEET 型 [2Fe-2S] クラスター結合モチーフをもち、C 末側疎水性残基領域を介して膜結合するユニークな膜結合型 mitoNEET ホモログである。PirB アミノ酸配列には 2 つのクラスター結合モチーフがあるにも関わらず、2 つの還元型鉄硫黄クラスター間のスピン相互作用に基づく mitoNEET ファミリーに特徴的な EPR シグナル分裂 [Iwasaki ら (2012) *J. Am. Chem. Soc.* 134, 19731] が認められなかった。そこで PirB の 2 つのクラスター結合モチーフ中のそれぞれの His 残基につき、His52→Cys 変異酵素を作成して EPR 解析したところ、両方の結合モチーフに mitoNEET 型クラスターが結合することを示すことができた。一方、組換え PirB の鉄硫黄クラスターは、真核細胞 mitoNEET や TthNEET と比べてはるかに酸素感受性が高く、嫌気条件下で精製タンパク質を扱う必要がある。このため、精製 PirB の結晶化には至っていない。

・シアノバクテリアでも *pirB* 遺伝子欠損株を作成し、好熱菌の場合と同様に、表現型解析を継続して試みたが、助成期間内では十分な結論が得られなかった。このため、当初計画していたマイクロアレイ実験については、非常に高価なことも踏まえ、測定の実行を余儀なくされた。先述した好熱菌 TthNEET の系とは異なり、シアノバクテリアの系では表現型がはっきりしないため、モデル生物としての長所を活かす段階までは進捗していない。

(6) 総括と今後の展望

本研究では遺伝子操作系が高度整備された高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 の構造生物学・生理学的解析から、当該分野研究でのブレークスルーをはかることを目指した。国内外で連携研究グループを組織し、とくに TthNEET [2Fe-2S] クラスターの *Em* 変化に伴うレドックス変動が、(好熱菌 TthNEET 遺伝子完全破壊株でみられる) グルコース感受性増殖阻害にどう影響するか多角的手法により慎重に検討した。すなわち、TthNEET の [2Fe-2S] クラスター近傍残基に部位特異的変異を導入することで、人為的にクラスター *Em* 変化させた変異酵素を作成、これらの X 線構造解析等を行うとともに、これらの変異を個別導入した好熱菌変異株を作成して表現型解析した。当初実験デザインでは、mitoNEET 型 [2Fe-2S] クラスターの人為的 *Em*

変化に伴うグローバルなレドックス変動を想定し、これを系統的かつ網羅的に機能生理解析する計画であった。しかるに、TthNEET 遺伝子に H52C, K53E 変異を個別導入した好熱菌変異株で (TthNEET 完全破壊株が示す) 「グルコース感受性の生育阻害」が完全相補された。すなわち、このグルコース感受性増強による好熱菌生育阻害は TthNEET 完全欠失の場合でのみ認められ、かつ、(計画立案時の予想に反し) mitoNEET 型 [2Fe-2S] (Cys)₃ (His)₁ クラスタによる「レドックス制御」とは必ずしも直接関連しないことが判明した。これらの結果は、好熱菌 TthNEET が単純レドックス系ではなく、むしろ「グルコース利用時における菌体増殖促進因子」の一つとして機能することを示唆している。このような生理機能を示す鉄硫黄タンパク質は前例がなく、全く新規のシステムと考えられる。高度好熱菌という単純モデル生物系においても、TthNEET 遺伝子完全破壊株が示す「グルコース感受性の増殖阻害」という表現型は十分複雑な事象であり、TthNEET 蛋白質と他酵素系との連携相互作用が必要不可欠と考えられる。このため、二次元電気泳動法によるプロテオーム解析を行い、TthNEET 遺伝子の有無と相関変動するメインスポットを検出した。今後は、本研究で得た新知見を基盤に、より詳細なプロテオーム比較解析、DNA マイクロアレイ解析等をすすめて、生理・病態上も重要な mitoNEET 蛋白質ファミリーの関わる代謝制御機構の体系的分子基盤究明を目指していく。

すでに本研究の解析結果の一部については国際学会等でポスター・口頭発表したが、今後これらの点をもっとも重要な成長点とするとともに、着実に未公表データ細部を詰めて成果公表し、日本発の新しい潮流をつくりたいと考えている。

(7) 謝辞

本研究遂行にあたり、多くの皆さんの協力を頂きました。とくに、熊坂 崇 (JASRI/SPRING-8)、長谷川 和也 (JASRI/SPRING-8)、大森 大二郎 (順天堂大)、岩崎 秀雄 (早稲田大)、草野 輝男 (日本医科大)、片山 映 (日本医科大)、萩生田 絵美 (日本医科大)、Alexander Taguchi (日本医科大)、深澤 里沙子 (日本医科大)、大島 泰郎 (共和化工(株))、岩崎 容子 (共和化工(株))、Sergei Dikanov (イリノイ大)、Robert Gennis (イリノイ大)、Werner Goldenhuys (ノースイースト オハイオ医科大) 諸氏の助言と協力を頂きました。また SPRING-8 ビームラインスタッフの協力を頂きました。その他多くの皆さんからも助力を頂きました。ここに記して感謝致します。

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 1 件)

Lin, M. T., Fukazawa, R., Miyajima-Nakano, Y., Matsushita, S., Choi, S.K., Iwasaki, T.,* and Gennis, R.B. (2015) *Escherichia coli* auxotroph host strains for amino acid-selective isotope labeling of recombinant proteins. *Methods Enzymol. (Isotope Labeling of Biomolecules - Labeling Methods)*, 565, 45-66. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Fukazawa, R., Lin, M.T., Miyajima-Nakano, Y., Matsushita, S., Choi, S.K., Baldansuren, A., Dikanov, S.A., Gennis, R.B., and Iwasaki, T. (2014) A set of *Escherichia coli* amino acid auxotrophic expression host strains for selectively labelled metalloenzyme research. (#P191) *12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC 12)*. Zurich, Switzerland. August 2014.

2. Iwasaki, T., Hagiuda, E., Fukazawa, R., Hayashi-Iwasaki, Y., Oshima, T., Hasegawa, K., and Kumasaka, T. (2014) Ligand mutagenesis of TthNEET, a thermophile homolog of mitoNEET. (#P193) *12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC 12)*. Zurich, Switzerland. August 2014.

3. 岩崎 俊雄: X線結晶構造解析と分光学的手法の接点-鉄硫黄蛋白質を例に-. 第 87 回日本生化学会大会「フォーラム: 蛋白質化学に立脚した“超域”生命化学への期待 (セッション 2F05)」, 2014 年 10 月 16 日、京都 (第 5 会場 (C-2)) .

4. Taguchi, A.T., Miyajima-Nakano, Y., Fukazawa, R., Baldansuren, A., Samoilo, R. I., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Dikanov, S.A., and Iwasaki, T. (2015) Mapping the electron spin distribution in [2Fe-2S] proteins by ¹³C(beta) cysteine labeling: implications in electron transport pathways. (OL: A0197) *17th International Conference on Bioinorganic Chemistry*. Beijing, China. July 2015.

5. Taguchi, A.T., Dikanov, S.A., and Iwasaki, T. (2016) Exploring the through-bond outer-sphere interactions in biological [2Fe-2S] proteins by two-dimensional ¹³C(beta)(cysteine) pulsed EPR. *Gordon Conference Metals in Biology 2016*. Ventura, CA., USA. January 2016.

〔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

<http://www.nms.ac.jp/fesworld/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 俊雄 (IWASAKI TOSHIO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：40277497

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

草野 輝男 (KUSANO TERUO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30434129

熊坂 崇 (KUMASAKA TAKASHI)

高輝度光科学研究センター・

タンパク質結晶解析推進室・室長代理

研究者番号：30291066

岩崎 秀雄 (IWASAKI HIDEO)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：00324393