

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14510

研究課題名(和文) 鉄硫黄クラスター生合成における反応中間体捕捉と触媒機構の解明

研究課題名(英文) Identification of reaction intermediates in iron-sulfur cluster biogenesis for understanding its reaction mechanism

研究代表者

藤城 貴史 (FUJISHIRO, Takashi)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：20740450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生命活動に重要な無機補因子である鉄硫黄(Fe-S)クラスターの生合成系(NIF、ISC、SUF、SUF-likeマシナリー)における、硫黄供給酵素群の反応中間体の構造と触媒反応機構を明らかとした。NIFとSUF-likeマシナリーのシステイン脱硫酵素NifSとSufSが、共通の反応中間体PLP-L-システインを形成すること、並びに、触媒ループの構造の違いにより、硫黄運搬過程が異なることを示した。また、SufS-SufU複合体の構造解析により、SufUのZn周りの構造変化をスイッチとして、SufSによってL-システインから生成した無機硫黄がSufSからSufUへと、渡される触媒機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで鉄硫黄クラスター生合成系酵素の生化学的解析、遺伝学的解析、立体構造解析は数多くなされてきた。しかしながら、酵素それぞれの反応中間体の解析に焦点を当て、生合成機構を化学的な観点から詳細に調べた例は多くなく、そのため本研究は挑戦的な試みであった。鉄硫黄クラスターの無機硫黄供給系の化学的な理解により、4種の異なる生合成系の多様性や分子進化について、分子構造の観点から考察が可能となったため、今後、鉄硫黄クラスターが環境に合わせた生物の進化・多様化によりどのような特性を獲得したかについて、生物学的な知見を得ることができるようになると期待される。

研究成果の概要(英文)：Biosynthetic machineries (NIF, ISC, SUF, SUF-like machineries) for the iron-sulfur (Fe-S) clusters, which are biologically essential inorganic cofactors, were investigated by elucidating catalytic intermediates of sulfur-mobilizing enzymes. Two cysteine desulfurases, NifS in NIF machinery and SufS in SUF-like machinery were analyzed by X-ray crystallography. This resulted in elucidation of common intermediate PLP-L-cysteine and different conformational changes of their catalytic loops toward the sulfur-mobilization. Also, X-ray crystallographic analysis of SufS-SufU complex revealed a molecular mechanism in which the Zn-coordination structural change of SufU triggered the sulfur-mobilization from SufS to SufU.

研究分野：生物無機化学

キーワード：鉄硫黄クラスター 生合成 反応中間体 X線結晶構造解析 PLP

1. 研究開始当初の背景

鉄硫黄 (Fe-S) クラスタは、鉄と無機硫黄からなる無機補因子である。Fe-S クラスタは、呼吸や光合成、遺伝子調節などの重要な生命活動を司ることから、古くからその生合成機構に関する研究がなされてきた。現在までに、NIF、ISC、SUF の3種の異なる Fe-S クラスタ生合成マシナリーが同定されている。Fe-S クラスタ生合成の生化学、遺伝学、構造生物学的解析が進み、各マシナリーの主要な構成成分の立体構造が明らかとなったが、依然として詳細な生合成反応機構は明らかとなっていない。

また、最近になって ISC と SUF マシナリーのキメラ型である SUF-like マシナリーが、グラム陽性菌 (例: 枯草菌) で見付き (図1)、鉄硫黄クラスタ生合成系の分子進化、多様性についても注目が集まっている。例えば、NIF、ISC、SUF は、どれも硫黄供給系として、システイン脱硫酵素を有しており、それぞれ NifS、IscS、SufS として知られるが、詳細な分子系統解析から、Type I (NifS と IscS) と Type II (SufS) に分類されることが明らかとされてきた。2つの Type の違いは、特に触媒ループ領域の構造の違い (Type I は触媒ループが長いのに対し、Type II は短い) として見出されているが (図2)、その違いが実際に反応機構にどのような影響を与えるのかについては、明らかとはされていなかった。また、U-type タンパク質と呼ばれる ISC マシナリーの IscU と SUF マシナリーの SufU は、構造相溶性が高いにも関わらず両者で機能は異なることが知られ、IscU は鉄硫黄クラスタ形成足場タンパク質、SufU は硫黄運搬タンパク質である。この違いを構造に基づいて理解するには、SufU または SufU とパートナーとなる SufS の複合体の構造解析が必要不可欠であった。

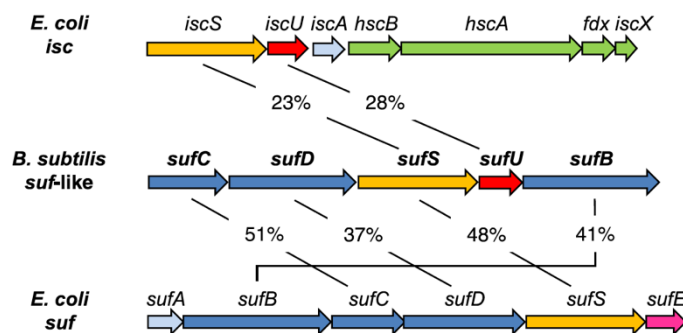


図1. Fe-S クラスタ生合成系 ISC, SUF, SUF-like マシナリーの遺伝子オペロン。パーセンテージは相同性を示す。

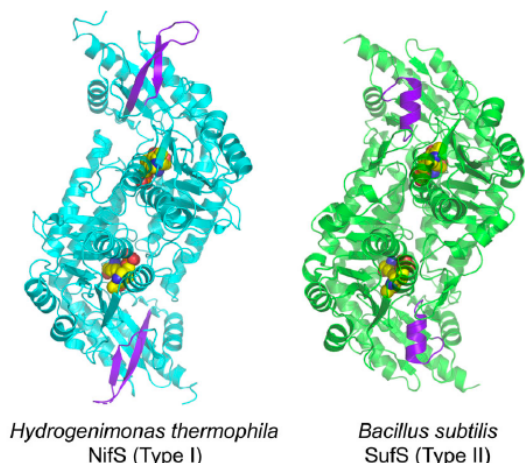


図2. NifS と SufS の全体構造。どちらも PLP (球状モデル) を活性部位として有する。また、触媒ループ (紫色) は、NifS と SufS で異なる。

2. 研究の目的

本研究では、生合成機構の詳細について明らかとするため、酵素反応中間体の構造解析に焦点を当てて研究を進めることとした。主要な反応中間体を結晶構造解析で捕捉することで、反応機構の解明や、構造相同性を示す酵素間の部分構造の違いによる機能の差について調べた。

3. 研究の方法

研究対象として、無機硫黄供給系の NifS、SufS を選択、それらの結晶化と L-システイン基質ソーキングによる反応中間体結晶の作成を行い、X 線結晶構造解析を行った。また、SUF-like マシナリーの SufS-SufU 複合体の X 線結晶構造解析、並びに、反応中間体の構造解析も行った。

4. 研究成果

NifS、SufS の反応中間体の構造解析に成功し、どちらも共通の中間体、PLP-L-システイン付加体を形成することが明らかとなった (図 3)。この中間体は、両者で高度に保存された活性部位周辺のアミノ酸残基により安定化されており、特に PLP の近傍にある His が、PLP-L-システインの硫黄原子と水素結合を形成する共通のメカニズムを初めて明らかとした。一方で、NifS と SufS で異なる構造的特徴である触媒ループを見ると、NifS の場合は、反応中間体形成時に、触媒ループの 2 次構造が緩む現象が見られたのに対し、SufS では触媒ループにそのような構造変化はなく、休止状態と全く同じコンフォメーションであった。このことは、NifS と SufS で、共通の反応中間体形成後の触媒過程が異なることを示唆している。NifS では、おそらく触媒ループがさらに緩んでランダムコイル状態になることで、PLP から 23Å も離れた触媒ループ上の求核基 Cys が、PLP 部位に近接可能となり、結果、PLP-L-システインの硫黄原子と反応し、Cys-persulfide を形成する機構が提案される (図 3)。一方、SufS では、触媒ループ上の求核基 Cys は予め PLP 部位に近く設置されており、触媒ループの構造変化をほとんど起こすことなく、PLP-L-システインの硫黄原子と反応して Cys-persulfide を形成する機構が提案される (図 3)。この違いは、おそらく NifS と SufS の硫黄の使い方の違いに反映されており、NifS ではその硫黄が NifU に渡されることで、Fe-S クラスタ形成反応に使われるのに対し、SufS では硫黄運搬タンパク質 SufE (SUF マシナリー) または SufU (SUF-like マシナリー) に渡されたのち、さらに SufBCD まで運ばれて Fe-S クラスタ形成が行われる。システイン脱硫酵素の触媒機構の共通点と相異点を明確化した本研究により、鉄硫黄クラスター生合成系だけでなく、他の硫黄が関与する代謝系のシステイン脱硫酵素の機能理解も進むことが期待される。

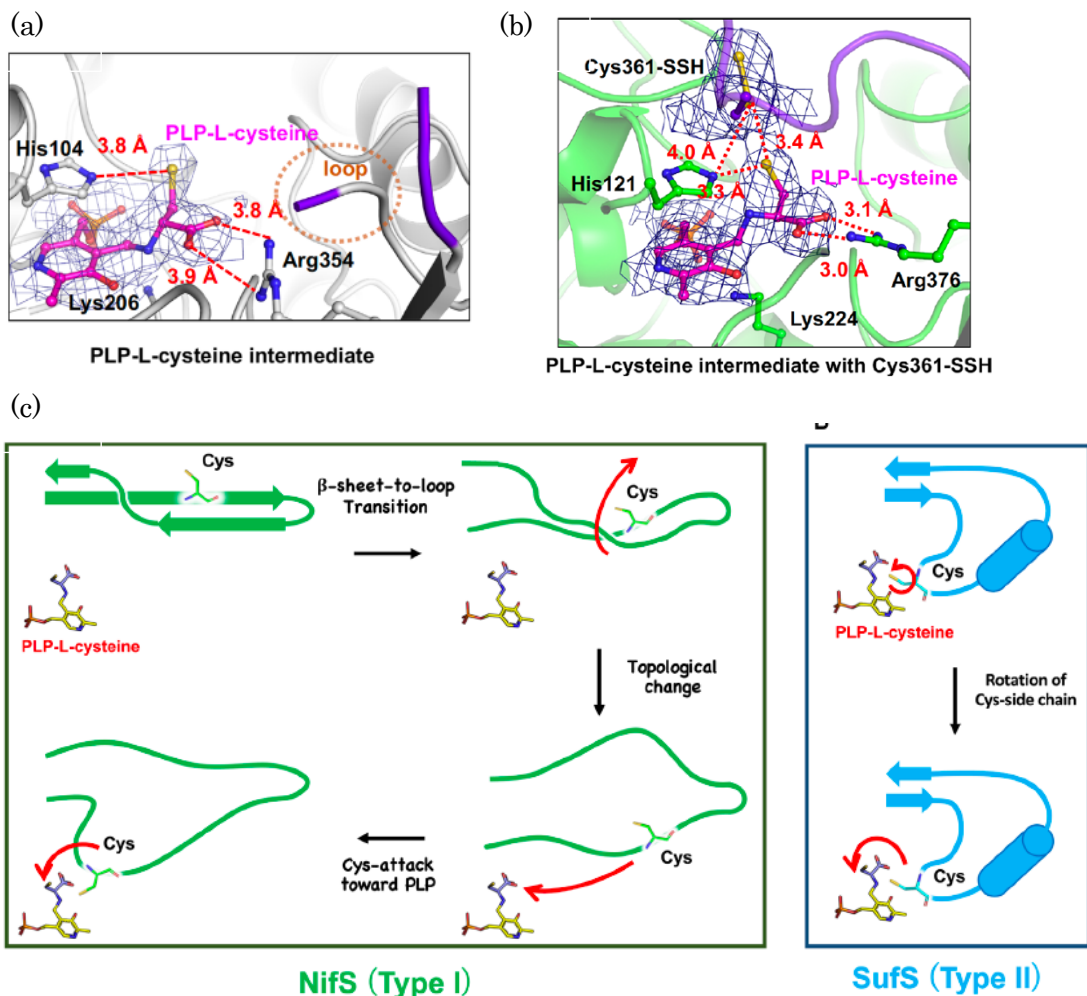


図 3. (a) NifS の PLP-L-cysteine 反応中間体. (b) SufS の PLP-L-cysteine 反応中間体. (c) 反応中間体生成後の触媒ループの推定される構造変化の模式図.

また、SufS-SufU 複合体およびその反応中間体の X 線結晶構造解析にも成功した (図 4)。SufU は、小型の Zn タンパク質として、モノマーで存在しているが、SufS-SufU 複合体形成においては、SufS 二量体に対し、その両端に相当する C 末端側領域に SufU が 1 分子ずつ結合した (SufS)₂-(SufU)₂ 型の dimer of dimer となることを見出された。SufU の Zn 部位は、SufS の活性部位である PLP 部位を向く形となり、さらに Zn の配位子である Cys41, Asp43, Cys66, Cys128 のうち、Cys41 が Zn から外れ、代わりに SufS の表面の His342 が Zn に結合した状態となっている。結果として、SufU の Cys41 は溶媒にむき出しのフリーの状態であり、SufS から硫黄を受け取ることができる。実際に反応中間体の構造解析の結果、基質 L-システインが SufS の PLP に結合した後、触媒ループの Cys によって無機硫黄が引き抜かれることで生成する PLP-L-アラニンとなり、硫黄が、触媒ループの Cys から、SufU の Cys41 まで転移される様子をスナップショットで捉えることに成功した。以上の結果、SufU が硫黄運搬タンパク質であることを、構造上明確にし、Zn の配位構造変化をスイッチとした巧みな分子機構を解明することができた。本研究は、U-type タンパク質の構造/機能の関係性を考える起点となる研究成果であり、またなぜ、硫黄運搬系が SufU から SufE へと移ったのかなど、Fe-S クラスタースynthesis系の多様性を考える上でも役立つと考えられる。

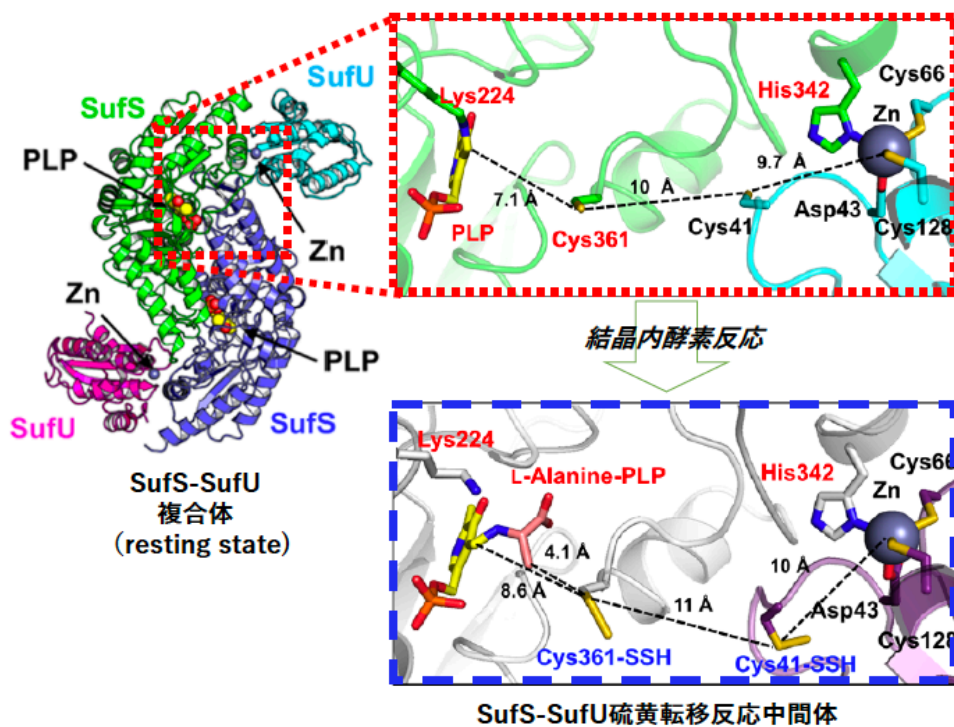


図 4. SufS-SufU の硫黄転移反応中間体の捕捉.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Ryosuke, Hikita Masahide, Ogawa Shoko, Takahashi Yasuhiro, Fujishiro Takashi	4. 巻 287
2. 論文標題 Snapshots of PLP substrate and PLP product external aldimines as intermediates in two types of cysteine desulfurase enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Naoyuki, Yuda Eiki, Fujishiro Takashi, Hirabayashi Kei, Wada Kei, Takahashi Yasuhiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Identification of IscU residues critical for de novo iron-sulfur cluster assembly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 1769 ~ 1783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujishiro Takashi, Shimada Yukino, Nakamura Ryosuke, Ooi Miho	4. 巻 48
2. 論文標題 Structure of sirohydrochlorin ferrocyclase SirB: the last of the structures of the class II chelatase family	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 6083 ~ 6090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8DT04727H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujishiro Takashi, Terahata Takuya, Kunichika Kouhei, Yokoyama Nao, Maruyama Chihiro, Asai Kei, Takahashi Yasuhiro	4. 巻 139
2. 論文標題 Zinc-Ligand Swapping Mediated Complex Formation and Sulfur Transfer between SufS and SufU for Iron/Sulfur Cluster Biogenesis in Bacillus subtilis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 18464 ~ 18467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b11307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Nao, Nonaka Chihiro, Ohashi Yukari, Shioda Masaharu, Terahata Takuya, Chen Wen, Sakamoto Kotomi, Maruyama Chihiro, Saito Takuya, Yuda Eiki, Tanaka Naoyuki, Fujishiro Takashi, Kuzuyama Tomohisa, Asai Kei, Takahashi Yasuhiro	4. 巻 107
2. 論文標題 Distinct roles for U-type proteins in iron-sulfur cluster biosynthesis revealed by genetic analysis of the <i>Bacillus subtilis</i> sufCDSUB operon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 688 ~ 703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.13907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuda Eiki, Tanaka Naoyuki, Fujishiro Takashi, Yokoyama Nao, Hirabayashi Kei, Fukuyama Keiichi, Wada Kei, Takahashi Yasuhiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron-sulfur clusters	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-09846-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 藤城 貴史, 大井 美穂, 高橋 康弘
2. 発表標題 通性嫌気性菌にみられる鉄-硫黄-酸素ハイブリッドクラスタータンパク質の性状解析
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 翔子, 中村 亮裕, 小松 茉里佳, 引田 理英, 藤城 貴史, 高橋 康弘
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生合成系のPLP依存型酵素SufSのシクロセリンによる阻害機構の解明
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤城 貴史, 寺畑 拓也, 島田 侑希乃, 高橋 康弘
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生合成SUF-likeマシナリーにおける亜鉛依存型硫黄運搬タンパク質SufUの構造と機能
3. 学会等名 第92回日本生化学大会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國近 航平、藤城 貴史、山川 誠、和田 啓、高橋 康弘
2. 発表標題 特殊な環境に生育する微生物由来の鉄硫黄クラスター生合成系の試験管再構成の試み
3. 学会等名 第92回日本生化学大会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 亮裕、小松 茉莉佳、小川 翔子、國近 航平、藤城 貴史、高橋 康弘
2. 発表標題 異なる2つのグループに属するシステインデスルフラゼに対する阻害剤の作用機構の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学大会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Fujishiro, Daichi Yamanouchi, Yuuki Kamioka, Yasuhiro Takahashi
2. 発表標題 A biologically unusual [4Fe-4S] cluster coordination found in a cysteine-degradating enzyme
3. 学会等名 錯体化学会第69 回討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 亮裕、藤城 貴史、高橋 康弘
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生合成系における硫黄供給酵素のシステイン脱硫反応機構
3. 学会等名 2019年度 日本生化学会関東支部例会-ノーベル賞と生化学-
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Fujishiro, Y. Shimada, R. Nakamura, M. Ooi
2. 発表標題 Structure-function relationship of sirohydrochlorin ferrochelatase SirB
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Nakamura, T. Fujishiro, Y. Takahashi
2. 発表標題 X-ray crystallographic snapshots of catalytic intermediates of cysteine desulfurases
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Fujishiro
2. 発表標題 X-ray crystallographic snapshots of sulfur mobilization to iron-sulfur cluster biosynthesis
3. 学会等名 The International Symposium on Bioinorganic Chemistry 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Fujishiro
2. 発表標題 [Fe]-Hydrogenase-cofactor biosynthesis
3. 学会等名 The 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Fujishiro, Miho Ooi, Yasuhiro Takahashi
2. 発表標題 Exploring an unusual Cys-rich motif-containing Fe-S enzyme
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Fujishiro, Takuya Terahata, Kunichika Kouhei, Chihiro Maruyama, Kei Asai, Yasuhiro Takahashi
2. 発表標題 Zinc-mediated sulfur acquisition by SufS-SufU complex involved in biosynthesis of iron-sulfur cluster in <i>Bacillus subtilis</i>
3. 学会等名 錯体化学会第68回討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Fujishiro, Takuya Terahata, Kunichika Kouhei, Chihiro Maruyama, Kei Asai, Yasuhiro Takahashi
2. 発表標題 X-ray crystallographic snapshot of SufS-SufU complex in iron-sulfur cluster biosynthetic SUF-like machinery
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤城 貴史・寺畑 拓也・國近 航平・横山 奈央・丸山 ちひろ・朝井 計・高橋 康弘
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國近 航平・藤城 貴史・山川 誠・平林 佳・岩永 朋子・福山 恵一・和田 啓・高橋 康弘
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤城 貴史・朝井 計・高橋 康弘
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Fujishiro, Yasuhiro Takahashi
2. 発表標題 The NIF machinery for iron-sulfur cluster biogenesis
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村亮裕、藤城貴史、高橋康弘
2. 発表標題 Elucidation of catalytic mechanism of cysteine desulfurase NifS of NIF machinery in iron-sulfur cluster biogenesis
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ulf-Peter Apfel, Wolfgang Weigand, Marius Horch, Ingo Zebger, Oliver Lenz, Takashi Fujishiro	4. 発行年 2020年
2. 出版社 De Gruyter	5. 総ページ数 370
3. 書名 Bioorganometallic Chemistry, (Prof. Dr. Wolfgang Weigand and Dr. Ulf-Peter Apfel, Ed.), part I: Reduction and Oxidation Catalysts, 2. Hydrogen development	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>システムから無機硫黄を取り出す酵素反応の瞬間を捉える！ http://www.saitama-u.ac.jp/topics_archives/2017-1215-0953-9.html</p>

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----