

平成22年5月18日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870002

研究課題名（和文）鉄硫黄蛋白質成熟化機構の構造基盤

研究課題名（英文）The structural basis of the Fe-S cluster biosynthesis

研究代表者

矢部 俊樹 (YABE TOSHIKI)

東北大学・多元物質科学研究所・特別教育研究教員

研究者番号：10451634

研究成果の概要（和文）：

本研究では葉緑体内の鉄硫黄クラスター構築機構で足場として機能する CnfU の結晶構造解析を中心にして、足場蛋白質上での鉄硫黄クラスター構築機構、足場蛋白質から基質への鉄硫黄クラスター転移機構を原子レベルで解明することを目的とし、研究を遂行した。鉄硫黄クラスター結合型の構造に関して、2.9Å 分解能での構造決定に成功し、X 線吸収分光測定から、結晶中に結合する鉄硫黄クラスターの構造情報を得る事に成功した。

研究成果の概要（英文）：

The biosynthesis of Fe-S clusters is a highly regulated process involving several proteins. To investigate the molecular basis of the Fe-S cluster biosynthesis pathway, we carried out the structural analysis of the holo form of chloroplast CnfU. Curve-fitting analysis of EXAFS indicated that the coordination environment of the [2Fe-2S] cluster on crystalline CnfU has a different environment from the environment at solution holo-CnfU. The structure of holo-CnfU supports a model in which CnfU has suitable structural feature for Fe-S cluster formation and transfer under an elevated oxygen environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：鉄硫黄蛋白質

1. 研究開始当初の背景

鉄原子と硫黄原子で構成される鉄硫黄クラスターは、鉄硫黄蛋白質と呼ばれる蛋白質群がもつ補因子である。この蛋白質群はあら

ゆる生物種に幅広く存在し、電子伝達や遺伝子発現制御といった重要な機能を持つ。当初、細胞内では鉄と硫黄が存在すれば自発的に鉄硫黄クラスターが構築されると信じられてきたが、Isc/ Nif 蛋白質群による鉄硫黄クラ

スター構築機構の発見により自発的構築の概念が覆された(Johnson et al. (2005) *Annu. Rev. Biochem.* 74, 247-81).

Scaffold protein (足場蛋白質)は、鉄硫黄クラスターを構築する足場となり、種々の蛋白質へ鉄硫黄クラスターを渡す機能を担う。これまで IscU, CnfU, IscA の3種類が同定されており、この3種類の間一次構造上の類似性がないことが、大きな特徴の一つである。また、多くの生物では IscU が必須の足場蛋白質として進化的によく保存されているが、らん藻や葉緑体といった酸素発生の光合成を行う細胞には IscU が存在しない。葉緑体には鉄硫黄クラスター構築活性の存在が長年指摘されていた(Takahashi, et al. (1986) *PNAS* 83, 2434-7)が、この活性の実体は不明であった。研究代表者は、シロイヌナズナ葉緑体に局在する CnfU (AtCnfU-V)が、[2Fe-2S]型と[4Fe-4S]型の双方の鉄硫黄クラスター構築に必須な足場蛋白質であることを明らかにした(Yabe et al. (2004) *Plant Cell* 16, 993-1007)。この結果は、葉緑体における鉄硫黄クラスター構築の足場蛋白質を初めて同定したものであり、当該分野のブレイクスルーとなった。また、CnfU がらん藻や葉緑体間では必須遺伝子としてよく保存されている一方、大腸菌や酵母などでは保存性は低く、必須ではないことから、CnfU は酸素濃度の高い条件下で鉄硫黄クラスターを構築する際に必須であることも示された。

足場蛋白質のうち、IscU と IscA の立体構造解析に関しては、国内外のグループにより近年続々と報告されてきている(Liu et al. (2005) *Proteins* 59, 875-81; Ramelot et al. (2004) *JMB* 344, 567-83; Bilder et al. (2004) *Biochemistry* 43, 133-9; Wada et al. (2005) *FEBS Lett.* 579, 6543-8; Morimoto et al. (2006) *JMB* 360, 117-32)。一方、AtCnfU-V が属する CnfU に関する構造解析の報告は皆無であった。また、足場蛋白質における鉄硫黄クラスターの構築、保持、基質への転移機構に関する構造的知見は乏しく、当該研究分野の重要課題の一つとなっている。

そこで、AtCnfU-V による鉄硫黄クラスター構築機構を原子レベルで明らかにするため、X線結晶構造解析に取り組み、鉄硫黄クラスターを含まないアポ型の結晶構造を1.35Å分解能で得ることに成功した。また、ホロ型蛋白質溶液を用いたX線吸収微細構造解析から、AtCnfU-V に結合する鉄硫黄クラスターの構造情報を得ることに成功した。加えて、鉄硫黄クラスターが結合したホロ型蛋白質の結晶化にも精力的に取り組み、結晶化条件を見いだした。そして、3.0Å分解能での回折強度データ収集と、初期モデルの構築に成功した。得られている初期構造では、2

量体分子が3つ組合わされた6量体構造をとり、中心に鉄硫黄クラスターに由来すると推定される強い電子密度が観測された。溶液中のホロ型 AtCnfU-V は2量体で存在するため、この構造は安定に鉄硫黄クラスターが結合した構造とは異なることが推察された。また、観測された鉄硫黄クラスターに由来する強い電子密度は、6量体構造の中心に位置していたが、電子密度が不明瞭なため、配位様式の詳細については決定できなかった。本結晶構造は、生化学的解析から推察された構造とは全く異なることから、鉄硫黄クラスターの転移中間状態のような、ある種の間状態を反映した構造である可能性が推察された。

2. 研究の目的

これまでに得られていた、鉄硫黄クラスター結合型 AtCnfU-V 結晶構造からは、鉄硫黄クラスターに由来すると推定される強い電子密度が観測された。しかしながら、この強い電子密度を中心とした周囲の電子密度が不明瞭なため、結合している鉄硫黄クラスター自体の構造、鉄硫黄クラスター結合領域のアミノ酸残基に関する詳細な構造情報を得ることが難しい状態であった。そこで高分解能でのホロ型 AtCnfU-V 結晶構造解析を行う事で、鉄硫黄クラスターが結合していると推定される領域の構造を確定することを目指した。また、蛋白質結晶を直接 X線吸収微細構造解析に供することで、鉄硫黄クラスターの構造、配位環境といった構造情報の詳細を得る事を試みた。並行して、2量体のホロ型 AtCnfU-V の構造決定も目指した。得られた結果から、AtCnfU-V による鉄硫黄クラスター構築機構を原子レベルで明らかにする。同時に、他の足場蛋白質との構造比較と生化学的解析から、CnfU が酸素濃度の高い条件下での鉄硫黄クラスター構築に必須である秘密を解き明かす事を目的とした。

3. 研究の方法

X線結晶構造解析--これまでに、決定したホロ型 AtCnfU-V の初期構造から、中心に鉄硫黄クラスターに由来すると推定される強い電子密度が観測された。しかし、現状の分解能では AtCnfU-V に結合する鉄硫黄クラスター自体の構造情報や、鉄硫黄クラスターの結合領域周辺のアミノ酸残基に関する詳細な構造情報を得ることは難しい状態であった。そこで、結晶化条件の更なる精密化と改良を行うことで、分解能を向上させ、鉄硫黄クラスターの構造、配位環境に関する詳細な構造情報を得ることを目指した。良好な結晶を見いだした後、大型放射光施設にて回折強度測定を行い、得られた電子密度図に基づきモデル

構築，構造精密化を行った．精密化には X 線吸収微細構造解析の結果も反映させた（下述）．

並行して，AtCnfU-V が鉄硫黄クラスターを安定に保持している構造の解明を目指した．AtCnfU-V に結合する鉄硫黄クラスターは O₂ 存在下で少しずつ崩壊してしまうため，通常の結晶化中においてアポ型蛋白質の析出を避けることは難しく，その結果，上述の転移中間状態の様な結晶が作出されたと考えられた．そこで，結晶化中にホロ型蛋白質の純度が限りなく 100% に近い状態を保ち，かつ鉄硫黄クラスターの崩壊を押さえることが出来れば，安定に鉄硫黄クラスターを保持した状態の結晶を得ることが期待された．これまでの予備的実験から，ホロ型蛋白質は完全嫌気条件（O₂ 濃度 1 ppm 以下）で，極めて安定であることが確認された．そこで，蛋白質の精製，結晶化を完全嫌気条件で行うことで，鉄硫黄クラスターを安定に保持している構造の結晶化を試みた．また，アミノ酸への変異導入によって，鉄硫黄クラスターが安定に結合する変異体を探索し，その蛋白質の結晶化も試みた．

X 線吸収微細構造解析…これまで得られていた初期構造からは，その中心に鉄硫黄クラスターと推定される高い電子密度が観察され，鉄の異常散乱のピークも一致していた．また，結晶の顕微分光光度計による測定結果から [2Fe-2S] 型クラスターの結合が示唆されていたが，前述の通り，現状の分解能では AtCnfU-V に結合している鉄硫黄クラスターに関する詳細な構造情報を得ることは不可能であった．そこで，蛋白質結晶を試料として用いた XAFS 解析から，結晶中に結合する鉄硫黄クラスターの構造情報を得る事を試みることにした．既に予備的実験から，蛋白質結晶を直接 XAFS 解析に供することが可能であることを確認していた．そこで結晶，溶液双方の XAFS 測定を SPring-8 で行い，鉄イオンの配位数，鉄イオン間の距離，鉄硫黄間の距離情報を求め，溶液試料と結晶試料の配位状態の違いを，XANES 領域のスペクトル比較から検討することとした．得られた構造情報から，AtCnfU-V に結合する鉄硫黄クラスターに関して議論を行うと同時に，結晶構造へ解析結果をフィードバックさせた．

4. 研究成果

鉄硫黄クラスターが結合したホロ型 AtCnfU-V の結晶構造に関して，大型放射光施設での X 線回折データ収集とモデル構築，精密化を行った．複数の蛋白質結晶から得られた回折強度データを統合し，高冗長度なデ

ータを得たことで，2.9Å 分解能での構造決定に成功した (R_{work}/R_{free} , 21.6%/26.0%) ．



AtCnfU-V ホロ型結晶構造

また，ホロ型蛋白質結晶を用いての X 線吸収分光測定を大型放射光施設にて行った．得られたスペクトルデータより，XANES スペクトルの解析，EXAFS 解析等を行った．結果，結晶中に結合する鉄硫黄クラスターの構造，鉄イオンの配位数，鉄イオンの配位子といった構造情報を得る事に成功した．結晶構造中に結合している鉄硫黄クラスターの配位環境は，結晶構造から推定された配位環境と一致し，その環境は特異なものであることを見いだした．そして，X 線吸収分光測定によって得られた構造情報に基づき，ホロ型 AtCnfU-V の結晶構造中の鉄硫黄クラスターの配位環境を構築し，ホロ型 AtCnfU-V 結晶構造の最終構造を決定した．

決定したホロ型 AtCnfU-V の構造は，6 量体を構成している各 2 量体のうち，一つの 2 量体ユニットに鉄硫黄クラスターが結合していた．この 6 量体構造から鉄硫黄クラスターが結合していない 2 量体ユニットを取り除くと，鉄硫黄クラスター結合ユニット上の鉄硫黄クラスターは，溶媒に押し出されるような形で存在した．このことから，この鉄硫黄クラスター結合ユニットの構造は，AtCnfU-V が鉄硫黄クラスターを基質へ渡す中間状態，鉄硫黄クラスターの転移中間状態を反映した構造である可能性が推察された．

得られた構造情報に基づき，鉄硫黄クラスター転移反応における，基質との相互作用面に位置すると推定されたアミノ酸残基に変異を導入し，鉄硫黄クラスター転移活性がどのように変化するかを調べた．変異導入の結果，ホロ型 AtCnfU-V の鉄硫黄クラスター結合安定性が向上し，鉄硫黄クラスター転移活性に若干の影響が見られた変異体を見いだした．また，得られた変異体蛋白質の大量発現系の構築と，精製に成功した．そして，得られた精製蛋白質を用いて結晶化のスクリーニングを行った．

また野生型のホロ型 AtCnfU-V の結晶化を

完全嫌気条件で行ったところ、これまで得られていた結晶の形状とは異なる形状の結晶を得る事が出来たが、構造解析が可能なレベルの回折強度データを得ることは出来なかった。そこで、完全嫌気条件にて新たな結晶化条件を探索するための初期スクリーニングを行った。

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 2 件)

1. Toshiki Yabe, Eiki Yamashita, Akihiro Kikuchi, Kozo Morimoto, Atsushi Nakagawa, Tomitake Tsukihara, and Masato Nakai (2008) Structural Analysis of Arabidopsis CnfU Protein: An Iron-Sulfur Cluster Biosynthetic Scaffold in Chloroplasts, *J. Mol. Biol.* 381, 160-173 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 矢部俊樹, 海野昌喜, 菊池晶裕, 山下栄樹, 松井敏高, 中井正人, 齋藤正男
鉄硫黄クラスター生合成機構の構造基盤
第 42 回酸化反応討論会, 仙台,
2009 年 11 月 14-15 日
2. Toshiki Yabe, Masaki Unno, Akihiro Kikuchi, Eiki Yamashita, Toshitaka Matsui, Masato Nakai, Masao Ikeda-Saito
The structural basis of the iron-sulfur cluster biosynthesis in plant chloroplasts
Gordon Research Conferences on Cell Biology of Metals, Salve Regina University, Newport, RI, USA, 9-14th August 2009
3. Toshiki Yabe, Masaki Unno, Akihiro Kikuchi, Eiki Yamashita, Toshitaka Matsui, Masato Nakai, Masao Ikeda-Saito
The structural basis of the iron-sulfur cluster biosynthesis in plant chloroplasts
ICBIC 14, Nagoya Congress Center, Nagoya, JAPAN, 25th July 2009
4. 矢部俊樹, 海野昌喜, 山下栄樹, 菊池晶裕, 中井正人, 齋藤正男
鉄硫黄蛋白質成熟化機構の構造生物学
日本生物物理学会東北支部例会, 仙台,
2008 年 8 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢部 俊樹 (YABE TOSHIKI)
東北大学・多元物質科学研究所・
特別教育研究教員
研究者番号 : 10451634

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :