

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06517

研究課題名(和文) NiFe型ヒドロゲナーゼの成熟化における一酸化炭素の輸送機構の解明

研究課題名(英文) Structural study of carbon monoxide transport during NiFe-hydrogenase maturation

研究代表者

村木 則文 (Muraki, Norifumi)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：20723828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：NiFe型ヒドロゲナーゼの活性中心に必須の一酸化炭素を生成する酵素HypXと、一酸化炭素を配位子とする鉄錯体を合成する足場タンパク質複合体HypC-HypDに着目して構造生物学的研究を行った。好気性細菌由来のHypCとHypDの結晶構造をそれぞれ決定した。HypDでは、結晶に依存した構造多形を見出した。さらに、HypC、HypD、HypXが1分子ずつからなる複合体が形成されることを確認するとともに、X線小角散乱やクロスリンク質量分析の結果を基にHypCDX複合体の構造予測を行った。しかし、複合体における一酸化炭素の輸送経路を推定可能な分解能の構造情報を得ることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一酸化炭素は高い生体毒性をもつことで知られており、バクテリアにおいても金属酵素の反応阻害が報告されている。そのため、ヒドロゲナーゼの活性中心の生合成過程では、合成した一酸化炭素を漏らさずに効率的に輸送する仕組みが存在するはずである。本研究はその仕組みに着目している。2019年に我々が世界に先駆けて結晶構造を報告した一酸化炭素生成酵素HypXに加えて、本研究期間においてHypC、HypDの単体の構造と複合体の予測モデルが得られた。クライオ電子顕微鏡によるHypCDX複合体の単粒子構造解析も進めており、ヒドロゲナーゼ成熟化機構の解明に向けて、今後の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：HypX synthesizes carbon monoxide in the metal cluster of NiFe-hydrogenase in certain aerobic bacteria. The carbon monoxide generated by HypX is transported by the scaffold protein complex HypC-HypD. I determined the crystal structures of HypC and HypD from aerobic bacteria, respectively. During the crystal structure analysis of HypD, the multiple structure polymorphs were observed within the similar crystal data. Furthermore, I confirmed the formation of a complex consisting of HypC, HypD, and HypX in a 1:1:1 ratio. Based on the results of X-ray small-angle scattering and cross-linking mass analysis, I predicted the structure of the HypC-HypD-HypX complex. However, my estimated model is insufficient accuracy to estimate the carbon monoxide transport pathway within the HypC-HypD-HypX complex.

研究分野：構造生物化学

キーワード：複合体構造解析 ヒドロゲナーゼ 構造多形 金属酵素の成熟化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NiFe 型水素ゲナーゼは活性中心にある金属クラスターを用いて水素の酸化反応・プロトンの還元反応を可逆的に触媒する酵素である。本酵素がもつ金属クラスターは生体内で自発的に形成されるわけではなく、複数の成熟化因子によって段階的に組み立てられ、水素ゲナーゼ本体に組み込まれる。最近、申請者らは金属クラスターの配位子となる一酸化炭素を生合成する酵素 HypX の立体構造を世界に先駆けて報告した (Muraki *et al.*, *Commun. Biol.*, 2019)。HypX による一酸化炭素生合成機構を提唱することができたが、HypX が生成した一酸化炭素を金属クラスター合成の足場となる HypC-HypD 複合体へ輸送するための仕組みは明らかになっていない状況だった。

2. 研究の目的

NiFe 型水素ゲナーゼの成熟化因子は互いに過渡的な複合体形成によって物質輸送を行っている。例えば、金属酵素の配位子の一つであるシアン化物イオンは HypE-HypF 複合体によって生合成された後、HypE が HypC-HypD と 3 者複合体を形成することでシアン化物イオンを受渡している。同様に、HypX は HypC、HypD と複合体形成することで一酸化炭素を輸送していると考えた。本研究では、NiFe 型水素ゲナーゼの活性中心構築 (成熟化) 過程の解明に向けて、金属クラスターの前駆体形成に関わる HypC、HypD、HypX に着目して、これらの過渡的な複合体構造の決定と構造的特徴づけを目的とした。

3. 研究の方法

好気性細菌 *Aquifex aeolicus* 由来の HypC、HypD、HypX について、複合体形成実験を行うとともに、MALS によって正確な複合体形成比を算出した。*A. aeolicus* 由来の HypC、HypD の結晶構造をそれぞれ決定した。興味深いことに、HypD の結晶構造には構造多形が見られたため、構造多形解析を行なった。

次に、HypC-HypD-HypX 3 者複合体 (以下、HypCDX 複合体) について、結晶化を試みた。しかしながら、結晶は得られなかったため、異なる 3 つの方法による構造決定に取り組んだ。一つ目は、X 線小角散乱による構造解析である。HypC、HypD、HypX の単体および HypD-HypX 複合体、HypCDX 複合体をそれぞれサイズ排除クロマトグラフィに流し、得られたピークについて放射光を使った X 線小角散乱データを収集して、溶液構造を決定した。二つ目は、クロスリンク質量分析である。HypCDX 複合体を形成する分子間を架橋して、質量分析によって架橋部位を特定した。架橋部位の情報を距離制限として、ドッキングシミュレーションによる構造予測を行った。三つ目は、クライオ電子顕微鏡単粒子解析である。

4. 研究成果

サイズ排除クロマトグラフィと MALS によって、HypC、HypD、HypX がそれぞれ 1 分子からなる三者複合体を形成することを確認した。また、大腸菌由来の HypD を用いて同様に実験を試みたが、HypX との複合体形成は見られなかった。このことから、*A. aeolicus* 由来の HypD (AaHypD) には HypX 認識に関わる特徴を有していると考えた。

最初に得られた AaHypD の結晶構造では、一部の温度因子が高く、信頼性の高い構造モデルの作成が困難だった ($R_{\text{free}} > 0.27$)。そこで、改めて試料調製と X 線回折測定を行なった結果、同型の結晶であるにも関わらず、disorder 領域もなく構造決定することができた (精密化終了後の R_{free} 値: 0.20)。両者のデータを比較すると、N 末端領域や一部のループの構造に違いがあり、C 末端ドメインの温度因子にも大きな差が見られた (図 1)。

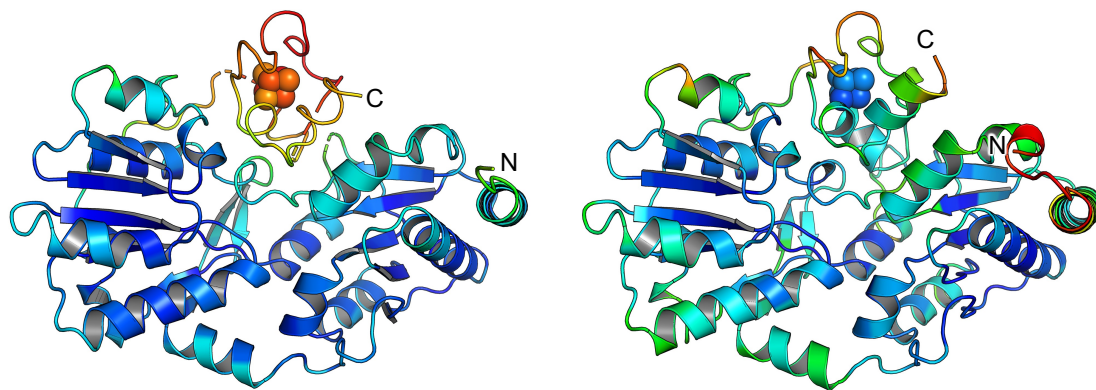


図 1. AaHypD の同型結晶から得られた 2 つの構造を示す。二次構造は DSSP の基準に従い、色分けは温度因子の高低を示す。

そこで、SPring-8 BL45XUの自動測定によって、複数の結晶からデータ収集して比較したところ、両者の構造が混在していた。このような構造の違いは、精製ロット、結晶化条件、結晶の形状、空間群、格子定数などから見分けることはできなかった。すなわち、同型の結晶であるにもかかわらず結晶毎に異なる2つの構造多形が見られた。このような構造多形は、回折強度の相関関数によって判断できることがわかった。本件については、BioRxivに発表すると共に、現在論文投稿中である (Matsuura *et al.*, *BioRxiv*, 2022)。また、*A. aeolicus*由来のHypC単量体の結晶構造解析にも成功している。

X線小角散乱はKEKの清水伸隆教授らの協力を得た。サイズ排除クロマトグラフィを組み合わせたSEC-SAXSを用いて、HypC、HypD、HypXの単体およびHypD-HypX複合体とHypCDX複合体の測定を行なった。HypCDX三者複合体の強度データから $p(r)$ 関数やGuinier plotを計算して、ビーズモデルを得た(図2)。 $p(r)$ 関数やGuinier plotから得られた分子サイズは、サイズ排除クロマトグラフィやMALSから得られた分子量とよく一致した。HypD-HypX複合体に比べると単分散性が良いデータだったが、HypC/D/Xの分子の配向を決定するだけの構造情報は得られなかった。

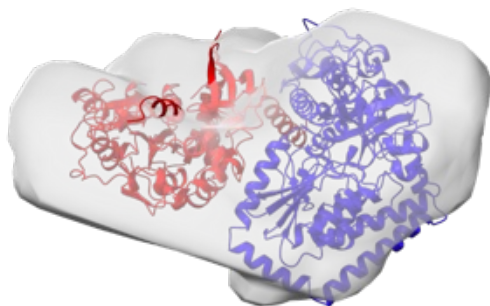


図2. SEC-SAXSで得られたHypCDXのビーズモデル

そこで、分子の配向を決めるための構造情報を得るために、大阪大学の内山進教授の協力を得て、HypCDX複合体のクロスリンク質量分析を行った。HypDとHypXはいずれもLys残基を分子表面に有することから、Lys架橋剤であるDSSO (disuccinimidyl sulfoxide)を用いた。その結果、分子内架橋が多く見られた一方でHypD-HypX間に3つの架橋形成を検出することができた。これら3つの架橋を拘束条件として、HADDOCKによるHypD-HypX複合体予測を行った。距離の束縛条件を25Å以下(DSSO架橋条件では一般的な距離)にすると、ほぼ一つの複合体構造に収束した(図3)。SAXSのビーズモデルとは一致しなかった。

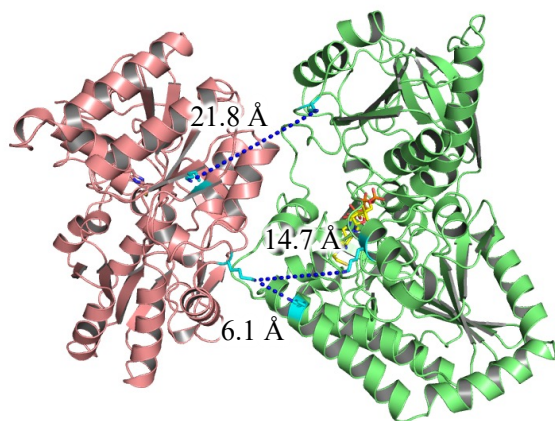


図3. クロスリンク質量分析の結果を基にHADDOCKで作成したHypD-HypX複合体モデル

本研究の開始段階から、HypCDX三者複合体の結晶化スクリーニングを続けてきたが、結晶は得られなかった。HypC、D、X単体は結晶化していることから、精製純度に問題はないと考えられた。そこで、HypCDX複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析を試みた。結晶化用サンプルと同様にサイズ排除クロマトグラフィによって単離したHypCDX複合体を使ってクライオグリッドを作成して、クライオ電子顕微鏡画像を取得した。現在、構造計算を行っている。これまでに、HypCDX複合体と思われる分子サイズの粒子が得られており、原子分解能の構造情報を得るべく、構造解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsui Daisuke, Muraki Norifumi, Chen Ke, Mori Tomoya, Ingram Aaron A., Oike Keiko, Groeger Harald, Aono Shigetoshi, Asano Yasuhisa	4. 巻 230
2. 論文標題 Crystal structural analysis of aldoxime dehydratase from Bacillus sp. OxB-1: Importance of surface residues in optimization for crystallization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2022.111770	査読の有無 無
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 Nishinaga Megumi, Sugimoto Hiroshi, Nishitani Yudai, Nagai Seina, Nagatoishi Satoru, Muraki Norifumi, Toshi Takehiko, Tsumoto Kouhei, Aono Shigetoshi, Shiro Yoshitsugu, Sawai Hitomi	4. 巻 4
2. 論文標題 Heme controls the structural rearrangement of its sensor protein mediating the hemolytic bacterial survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01987-5	査読の有無 無
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 Muraki Norifumi, Takeda Kouta, Nam Dayeon, Muraki Megumi, Aono Shigetoshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Structural Characterization of Y29F Mutant of Thermoglobin from a Hyperthermophilic Bacterium Aquifex aeolicus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 603 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200879	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 -

1. 著者名 Ohnishi Yusuke, Muraki Norifumi, Kiyota Daiki, Okumura Hideo, Baba Seiki, Kawano Yoshiaki, Kumasaka Takashi, Tanaka Hideaki, Kurisu Genji	4. 巻 167
2. 論文標題 X-ray dose-dependent structural changes of the [2Fe-2S] ferredoxin from Chlamydomonas reinhardtii	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 549 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa045	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 -

1. 著者名 MURAKI Norifumi	4. 巻 62
2. 論文標題 Molecular Mechanism of Heme Transport and Uptake Reaction in Corynebacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nihon Kessho Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 78～79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5940/jcrsj.62.78	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12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 村木則文
2. 発表標題 過渡的な複合体形成を伴うヒドロゲナーゼの金属クラスター生合成
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norifumi Muraki
2. 発表標題 Structure and function of heme uptake system in Corynebacteria
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Metallomics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村木則文
2. 発表標題 コリネバクテリアが細胞外のヘムを獲得する仕組み
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norifumi Muraki
2. 発表標題 Structural insight into the biosynthesis and transport of carbon monoxide for [NiFe] hydrogenase maturation
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry (AsBIC10) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norifumi Muraki, Shigetoshi Aono
2. 発表標題 Structure and Function of HtaA/HtaB from <i>Corynebacterium glutamicum</i>
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Norifumi Muraki, Shigetoshi Aono
2. 発表標題 Structural basis for the heme transfer reaction in the novel bacterial heme uptake system
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村木則文
2. 発表標題 金属酵素成熟化において一酸化炭素が合成されて輸送される分子機構の解明
3. 学会等名 第69回SPring-8 先端利用技術ワークショップ / 大阪大学蛋白質研究所セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村木則文、青野重利
2. 発表標題 NiFe型ヒドロゲナーゼ活性中心の構築反応におけるCOの生成とその輸送
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村木則文、松井大亮、浅野泰久、青野重利
2. 発表標題 Bacillus sp. 0xB-1由来アルドキシム脱水酵素の結晶構造解析
3. 学会等名 令和3年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村木 則文
2. 発表標題 水素代謝酵素の活性中心に必須な一酸化炭素を生成する分子機構
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第188回例会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村木 則文
2. 発表標題 ヒドロゲナーゼの活性中心に必要な一酸化炭素が生成されて輸送される仕組み
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村木 則文
2. 発表標題 好気性細菌におけるヒドロゲナーゼの金属中心構築の分子機構
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 472
3. 書名 ヘムタンパク質の科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------