

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：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247014

研究課題名(和文)ヒドロゲナーゼ成熟化の分子機構

研究課題名(英文)Molecular Mechanism of Protein Maturation of Hydrogenase

研究代表者

三木 邦夫(Miki, Kunio)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10116105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：Hypタンパク質群(HypA, B, C, D, E, F)は、水素代謝を行う[NiFe]ヒドロゲナーゼにニッケル・鉄クラスターを組み込み、ヒドロゲナーゼとしての機能を発現させる成熟化因子である。われわれがこれまでにやってきたHypタンパク質の構造解析の成果を発展させて、成熟化過程で過渡的に形成される各種複合体(HypAB複合体, HypCDならびにHypCDE複合体, ヒドロゲナーゼ・ラージサブユニットHyhLとHypタンパク質との複合体)や反応中間体(カルバモイル化HypE, シアノ化HypE)の構造・機能解析を行い、[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化の分子機構について知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Six Hyp proteins (HypA, B, C, D, E, and F) are primarily involved in the maturation process of [NiFe] hydrogenases which catalyze reversible hydrogen production and consumption. These Hyp proteins incorporate a complex Ni/Fe cluster into a protein subunit of [NiFe] hydrogenases. On the basis of our previous success in the structure determination of several Hyp proteins, we have investigated structure and function of transient complexes (HypAB, HypCD, and HypCDE complexes, and hydrogenase-large subunit (HyhL) and Hyp protein complexes) and reaction intermediates (carbamoylated and cyanated HypEs) to obtain insights into molecular mechanism of the [NiFe] hydrogenase maturation.

研究分野：タンパク質結晶学・構造生物学

キーワード：成熟化タンパク質 X線結晶構造解析 金属取り込み Hypタンパク質 複合体構造

1. 研究開始当初の背景

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、微生物による水素生産を触媒する酵素である。複雑なNiFe(CN)₂CO 活性中心において、プロトン(H⁺)から水素分子への可逆的な酸化還元反応を触媒する。[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子であるHypタンパク質群(HypABCDEF)は、ヒドロゲナーゼにNiFe活性中心を組み込み、活性型へと成熟化させる働きを担っている。これまで国内外のグループによって、大腸菌をモデルとした生化学的な解析が行われ、成熟化機構の全体像が明らかになった。また、我々のグループが中心となってHypタンパク質の結晶構造解析を行い、各Hypタンパク質の構造機能相関について多くの知見を得てきた。これまでに、超好熱アーキア*Thermococcus kodakarensis* KOD1由来のHypタンパク質群のうち、シアノ基の合成とFe原子への配位に関与するHypC, HypDおよびHypEの立体構造を初めて決定し、各タンパク質の保存モチーフやそれぞれの機能について知見を得た [S. Watanabe, R. Matsumi, T. Arai, H. Atomi, T. Imanaka and K. Miki, Mol. Cell, 27, 29-40 (2007)]. またNi組み込みに関与するHypAの構造を初めて決定し、Ni結合モチーフのコンフォメーションが全体構造の変化と連動していること、およびドメイン・スワッピングによる二量体形成を明らかにした [S. Watanabe, T. Arai, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka and K. Miki, J. Mol. Biol., 394, 448-459 (2009)].

2. 研究の目的

本研究は、これまでに得られた知見をさらに大きく発展させ、ヒドロゲナーゼの成熟化過程において過渡的に形成されるHypタンパク質複合体や中間状態について構造解析を行い、成熟化過程の分子機構を原子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、ヒドロゲナーゼ成熟化因子Hypタンパク質群の機能的複合体の結晶構造解析を通して、生体内金属活性中心の生合成過程の解明を目指すものである。Hypタンパク質群のうち、唯一構造が報告されていないHypFの結晶構造解析を行う。また、Fe原子のシアノ化に関与するHypC, HypDおよびHypEについて、過渡的な複合体の構造機能解析や金属イオンとの相互作用解析を行う。また、シアノ基の生合成に関与するHypEの反応中間体や、HypAとHypBとの二者複合

体、ヒドロゲナーゼ・ラージサブユニットとHypタンパク質間の複合体について構造機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) HypCD複合体, HypCDE複合体

HypC, HypDおよびHypEは、成熟化過程において一時的に複合体を形成し、Fe原子のシアノ化を触媒すると考えられているが、複合体における詳細な相互作用様式については分かっていない。

HypC-HypD複合体については、等温滴定カロリメトリー (ITC) による結合解析の結果、両者間のK_d値が0.14 μMであり、比較的安定な複合体を形成することが分かった。主にクエン酸アンモニウムを沈澱剤に用いた条件において柱状の結晶が得られ、2.6 Å分解能での結晶構造解析に成功した。

HypC-HypD-HypE複合体については、HypEとHypCD複合体間の相互作用のK_d値は1.9 μMであり、三者複合体は比較的弱い一時的な相互作用であることが分かった。主にPEG400またはPEG8000を沈澱剤に用いた条件において、X線回折実験に適した結晶が得られ、2.25-2.75 Å分解能での結晶構造解析に成功した(図1)。HypCDE三者複合体は、HypE二量体に対して、HypCD複合体が両側から相互作用していることが明らかになった。複合体形成において、HypCのN末端の保存されたCys残基(Cys2)がHypDの保存されたCys残基(Cys38)と近接していることが明らかになった(図2)。ITCによるFe(II)イオンとの相互作用実験の結果、Cys38のアラニン変異体では、HypCD複合体とFe原子との結合が確認できなかったため、この2つのCys残基がFe結合部位であることが示唆された。一方、HypEのC末端Cys残基は、HypDのCys66に近接しており、Cys66を中心とした連続的な酸化還元反応によるFe原子のシアノ化機構が推定された。

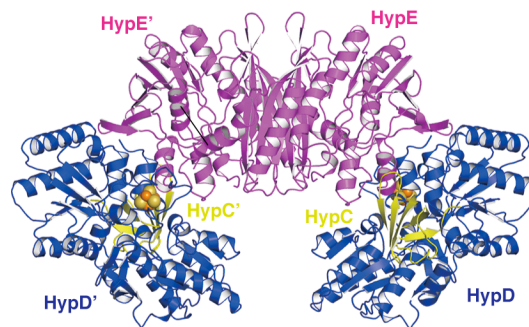


図1 HypCDE複合体の全体構造

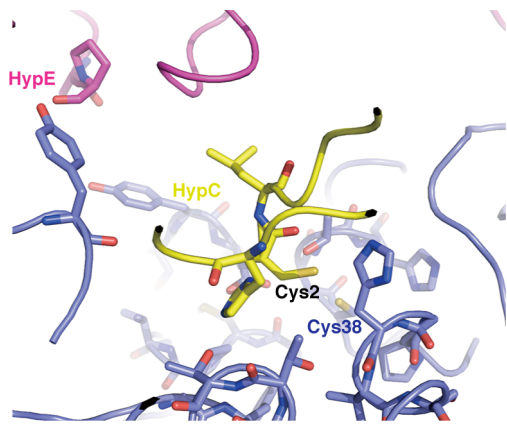


図2 HypCDE 複合体の活性中心

(2) HypF

HypF は、カルバモイルリン酸を基質として、HypE の保存された Cys 残基にカルバモイル基を転移させる反応を触媒する。HypF の反応メカニズムを明らかにするため、HypF の結晶構造解析を行った。

T. kodakarensis 由来の HypF について、セレノメチオン標識タンパク質を調製し、ネイティブ結晶と同程度の結晶が得られた。別グループから報告された N 末ドメインを欠いた HypF の構造を利用した分子置換法と、セレノメチオン標識タンパク質を利用した単波長異常分散法を組み合わせることで、HypF の全長構造を 4.5 Å 分解能で決定した。全体構造は、ACP ドメイン、Zn フィンガードメイン、ミドルドメイン、C 末ドメインで構成されており、ACP ドメインの相対配置の柔軟性や正電荷に帯電した保存ポケットが明らかになった。

(3) HypE によるシアノ基生成の反応中間体

HypE は、ATP 依存的な脱水反応によってカルバモイル基からシアノ基への変換反応を触媒する。HypE の立体構造はすでに決定していたが、どのように HypE がカルバモイル基を認識し脱水反応を触媒するかについては、構造的には明らかではなかった。本研究では、HypE が触媒する変換反応の詳細を解明するために、HypE のカルバモイル化状態およびシアノ化状態での構造解析を行った。シアノ酸カリウムを用いて、HypE の Cys 残基を特異的にカルバモイル化させ、AMPPNP または ATP と共結晶化を行い、反応前のカルバモイル化状態、および ATP による脱水反応後のシアノ化状態について、それぞれ 1.53 Å、1.64 Å 分解能で構造を決定した (図 3)。構造解析の結果、脱水反応開始の触媒残基と予想されていた Glu272 は、カルバ

モイル基の窒素原子に近接しているが、脱プロトンにはあまり適さない角度に位置していることが分かった (図 4)。一方、カルバモイル基の酸素原子は、水分子を介して Lys134 と相互作用していた。興味深いことに、Lys134 の pKa は Arg222 との近接により著しく低下しており、Lys134 がプロトンアクセプターとして機能していることが示唆された。以上の結果から、Lys134 および Glu234 による二段階の脱プロトンを経由したカルバモイル基の脱水反応機構を提唱した。

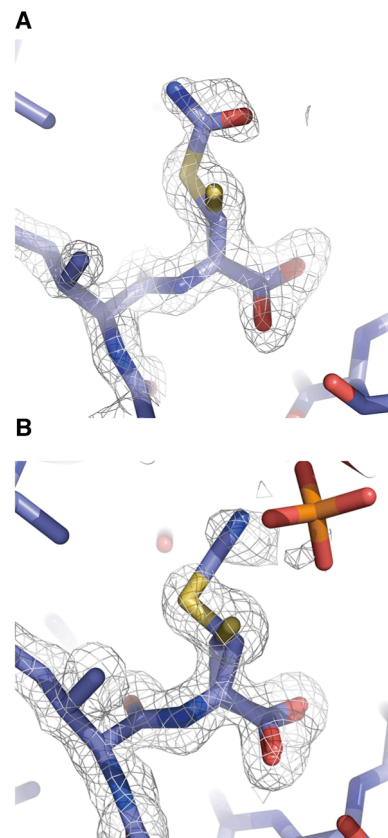


図3 HypE のカルバモイル化システイン (A) およびシアノ化システイン (B)

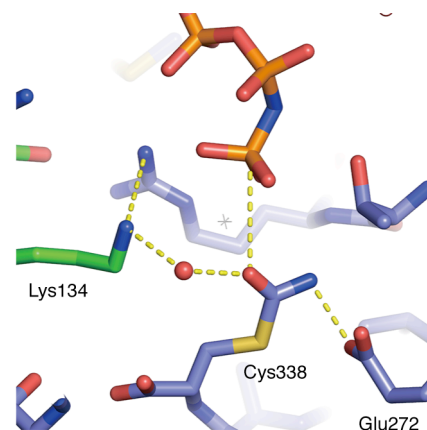


図4 カルバモイル化システイン周辺の相互作用

(4) HypA-HypB_{AT} 複合体

HypA および HypB は、Ni 原子の組み込みに関与している。GTPase である HypB は、金属イオンの結合能によって大きく 3 つのサブファミリーに分類され、また *T. kodakarensis* などの一部のアーキアでは、ATPase 型の HypB (HypB_{AT}) が機能ホモログとして機能している。本研究では、成熟化過程における HypA と HypB の相補的な役割を原子レベルで解明するため、二者間の相互作用解析および複合体の結晶構造解析に取り組んだ。

HypB_{AT} の ATP 結合状態、ADP 結合状態、ヌクレオチドフリー状態について、それぞれ HypA との相互作用をゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって調べた結果、ATP 結合状態の時のみ HypA と複合体を形成できることが分かった。また、HypB_{AT} の ATPase 活性が HypA 存在下で約 3 倍に増進された。そこで、ATP の類似体である ATP γ S または AMPPCP と、Ni イオン存在下で、精製した HypA と HypB_{AT} を等量に混合して複合体を調製し、結晶化を行った。その結果、主に PEG3350 を沈殿剤に用いた条件において複合体の結晶が得られた。放射光での回折実験において、最高で 1.63 Å 分解能での回折強度データを収集し、それぞれ単独の構造をモデルに用いた分子置換法によって構造解析に成功した (図 5)。HypAB_{AT} 複合体は、主に 3 つの部位で複合体を形成していることが分かった。単独の構造と比較した結果、複合体形成によって、HypA の Zn 結合ドメインは大きく構造変化し、単独の HypA には存在しない Ni 結合部位が形成されることが分かった (図 6, 7)。ITC による Ni イオンとの結合解析を行った結果、HypA 単独では Ni イオンに対する K_d 値が 4 μ M であるのに対し、HypAB_{AT} 複合体では 7 nM であり、複合体形

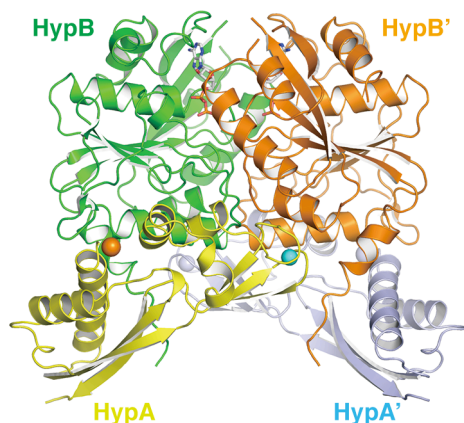


図 5 HypAB 複合体の全体構造

成によって大幅に親和性が上昇することが明らかになった。以上の結果から、ヒドロゲナーゼに Ni イオンを組み込む過程では、ATP 加水分解依存的な Ni 獲得のサイクルが存在し、HypB_{AT} が HypA の Ni イオン親和性を調節する因子として機能していることが明らかになった。

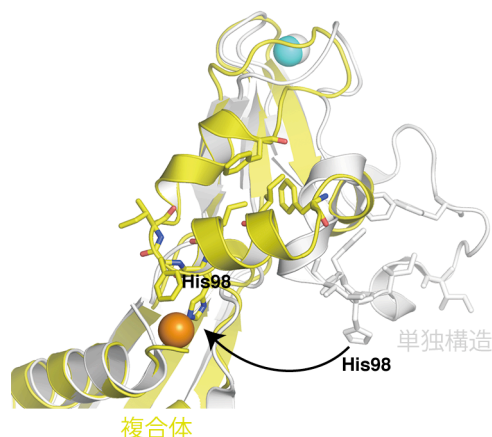


図 6 複合体形成に伴う HypA の構造変化

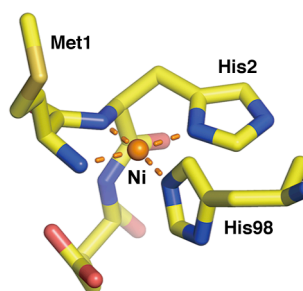


図 7 HypAB 複合体における Ni 結合サイト

(5) HyhL-HypA, HyhL-HypC 複合体

我々がこれまでに相互作用を確認したヒドロゲナーゼ・ラーゼサブユニット HyhL と HypA または HypC との複合体について、相互作用様式を明らかにするため、結晶化を行った。それぞれについて、複合体の調製方法の検討と結晶化条件のスクリーニングを進めた。HyhL-HypA については、主に PEG3350 を沈殿剤に用いた条件において複合体の結晶が得られ、放射光による回折実験の結果、約 4 Å 分解能の回折データを収集した。現在、結晶化条件およびクライオ条件の最適化を進めている。

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 S. Watanabe, T. Kawashima, Y. Nishitani, T. Kanai, T. Wada, K. Inaba, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Structural Basis of a Ni Acquisition Cycle for [NiFe]-Hydrogenase by HypA and Its Enhancer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, published online (2015): doi: 10.1073/pnas.1503102112
- ② T. Tominaga, S. Watanabe, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal Structures of the Carbamoylated and Cyanated Forms of HypE for [NiFe] Hydrogenase Maturation, 査読有, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110, 20485-20490 (2013). doi: 10.1073/pnas.1313620110
- ③ D. Sasaki, S. Watanabe, R. Matsumi, T. Shoji, A. Yasukochi, K. Tagashira, W. Fukuda, T. Kanai, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Identification and Structure of a Novel Archaeal HypB for [NiFe] Hydrogenase Maturation, J. Mol. Biol., 査読有, 425, 1627-1640 (2013). doi: 10.1016/j.jmb.2013.02.004
- ④ S. Watanabe, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal Structures of the HypCD Complex and the HypCDE Ternary Complex: Transient Intermediate Complexes during [NiFe] Hydrogenase Maturation, Structure, 査読有, 20, 2124-2137 (2012). doi: 10.1016/j.str.2012.09.018
- ⑤ T. Tominaga, S. Watanabe, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Structure of the [NiFe] Hydrogenase Maturation Protein HypF from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, Acta Crystallogr., 査読有, F68, 1153-1157 (2012). doi: 10.1107/S1744309112036421
- ⑥ S. Watanabe, D. Sasaki, T. Tominaga, and K. Miki, Structural Basis of [NiFe] Hydrogenase Maturation by Hyp Proteins, Biol. Chem., 査読有, 393, 1089-1100 (2012). doi: 10.1515/hsz-2012-0197
- ⑦ D. Sasaki, S. Watanabe, T. Kanai, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Characterization and *in vitro* interaction study of a [NiFe] hydrogenase large subunit from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1, Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, 417, 192-196 (2012). doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.083

[学会発表] (計 16 件)

- ① 河島拓未, 渡部 聡, 西谷優一, 金井 保,

跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe] ヒドロゲナーゼ成熟化に關与する HypAB 複合体の X 線結晶構造解析, 2014.11.1-3, 日本結晶学会 2014 年度年会, 東京都文京区, 東京大学農学部

- ② T. Kawashima, S. Watanabe, Y. Nishitani, T. Kanai, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Studies on intermediate HypAB complexes for Ni insertion during [NiFe] hydrogenase maturation ([NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化段階において Ni 挿入を担う HypAB 複合体), 2014.9.25-27, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌市, 札幌コンベンションセンター
- ③ S. Watanabe, T. Tominaga, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Structural basis for the biosynthesis of the CN ligand of [NiFe] hydrogenase, XXIII Congress and General Assembly, International Union of Crystallography, 2014.8.5-12, Montréal, Canada
- ④ 渡部 聡, 富永大河, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化におけるシアノ基生合成中間体の構造解析 (Crystal structures of intermediates in the biosynthesis of the CN ligand for [NiFe] hydrogenases), 2014.6.25-27, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 横浜市, ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア
- ⑤ D. Sasaki, S. Watanabe, R. Matsumi, T. Shoji, A. Yasukochi, K. Tagashira, W. Fukuda, T. Kanai, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Identification and Structure of a Novel Archaeal HypB for [NiFe] Hydrogenase Maturation, 27th European Crystallographic Meeting, 2012.8.6-11, Bergen, Norway
- ⑥ S. Watanabe, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal Structures of the HypCD and HypCDE Transient Complexes for [NiFe] Hydrogenase Maturation, Annual Meeting of American Crystallographic Association, 2012. 7.28-8.1, Boston, USA
- ⑦ 佐々木大輔, 渡部 聡, 松見理恵, 東海林寿久, 安河内綾子, 田頭健太, 福田青郎, 金井 保, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化を担う新規な HypB の同定と構造, 2012.6.20-22, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋市, 名古屋国際会議場
- ⑧ 富永大河, 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質 HypF の結晶構造, 2012.6.20-22, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋市, 名古屋国際会議場
- ⑨ 佐々木大輔, 渡部 聡, 松見理恵, 東海林寿久, 安河内綾子, 田頭健太, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木

- 邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に関する新規 HypB の同定と構造解析, 2012.3.15-16, 第 29 回 PF シンポジウム, つくば市, つくば国際会議場エポカル
- ⑩ K. Miki, Structural basis of [NiFe] hydrogenase maturation process by Hyp proteins, Alumni Symposium: Protein Crystallography in Martinsried, its Beginnings, Maturation, Dissemination, and no End, 2012.2.18-19, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Germany
- ⑪ 佐々木大輔, 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypB の構造機能解析, 日本結晶学会 2011 年度年会, 2011. 11. 24-25, 札幌市, 北海道大学学術交流会館
- ⑫ 富永大河, 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, ヒドロゲナーゼ成熟化に関する HypF の結晶学的研究, 日本結晶学会 2011 年度年会, 2011.11. 24-25, 札幌市, 北海道大学学術交流会館
- ⑬ S. Watanabe, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal structures of [NiFe] Hydrogenase Maturase Complexes, XXII Congress and General Assembly, International Union of Crystallography, 2011.8.22-30, Madrid, Spain
- ⑭ S. Watanabe, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, and K. Miki, Crystal Structure of Hyp Protein Complexes for [NiFe] Hydrogenase Maturation, 15th International Conference of Biological Inorganic Chemistry, ICBIC15, 2011.8.7-12, Vancouver, Canada
- ⑮ 佐々木大輔, 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypB タンパク質複合体の結晶構造, 第 28 回 PF シンポジウム, 2011.7.12-13, つくば市, つくば国際会議場エポカル
- ⑯ 渡部 聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe] ヒドロゲナーゼ成熟化因子 Hyp タンパク質の過渡的相互作用の構造基盤, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011.6.7-9, 吹田市, ホテル阪急エキスポパーク

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
なし

○取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 邦夫 (Miki Kunio)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 10116105

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

跡見 晴幸 (Atomi Haruyuki)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 90243047

(4) 研究協力者

渡部 聡 (Watanabe Satoshi)
京都大学・大学院理学研究科・特定研究員
(現職: 東北大学・多元物質科学研究所・助教)
研究者番号: 50432357