

鉄硫黄クラスター生合成を担う超分子複合体の作動機構

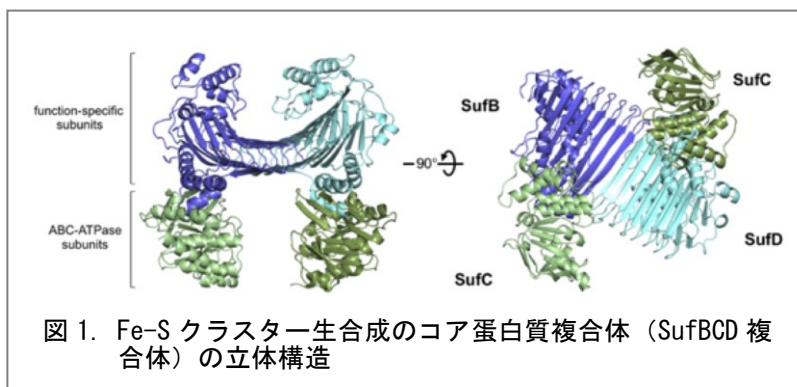
宮崎大学医学部蛋白質機能学分野

和田 啓

鉄硫黄 (Fe-S) タンパク質は、コファクターとして Fe-S クラスターを持つタンパク質の総称で、エネルギー代謝から遺伝子の発現制御に至るまで、重要かつ多彩な生理機能を担っている。それら Fe-S タンパク質の機能を支えているのが Fe-S クラスターの生合成系である。生物界には、SUF, ISC, NIF と呼ばれる三つの Fe-S クラスター合成系が存在し、Fe-S クラスターを生体内で作り上げている。これら三つの Fe-S クラスター生合成は、それぞれの構成蛋白質群が異なり、独立して機能している。例えば、哺乳類や鳥類ではミトコンドリアで ISC が機能しており、植物では葉緑体で SUF、ミトコンドリアで ISC が機能している。微生物の場合は、進化の過程を反映し、それぞれ異なる Fe-S クラスター合成系をもつ。例えば、古細菌では SUF マシナリー、窒素固定細菌は NIF、一部のプロテオバクテリアは ISC と SUF の二つの遺伝子セットをもつ。Fe-S クラスターは、すべての生物の生存に必須な補因子にも関わらず、全く異なる系で同じ Fe-S クラスターが作り上げられている。本研究では、微生物界に広く分布し、進化的にももっとも古い Fe-S クラスター生合成である SUF マシナリーに焦点を合わせている。

SUF マシナリーでは、6 種の成分が協調して Fe-S クラスターを形成し、それをアポタンパク質へ渡すと考えられている。Fe-S クラスター生合成系のひとつ、SUF マシナリーは真正細菌から古細菌、真核生物の色素体に広く分布している。このマシナリーのなかで、SufS と SufE は硫黄原子の供与体として機能することが示されている。SufB・SufC・SufD は三成分の複合体を形成し、Fe-S クラスターを新たに形成すると考えられているが、そのメカニズムは明らかでない。

我々のグループでは最近 SufBCD 複合体の結晶構造を明らかにしている (図 1. *J. Biol. Chem.* 290, 29717-29731 (2015))。この複合体は SufB₁-SufC₂-SufD₁ のストイキオメトリで構成されている。そのうち SufB と SufD はよく似た構造で、N 末端ヘリカルドメイン、C 末端ヘリカルドメイン、



β -ヘリックスコアドメインの 3 ドメインで構成されている。SufB と SufD の C 末端ドメインにひとつずつ結合している SufC は、ABC トランスポーターの ATPase サブユニットと相同なタンパク質である。ABC トランスポーターは ATP の加水分解を利用して物質の輸送を行う膜輸送体であり、2つの ATPase サブユニットが ATP を介して会合することで膜貫通サブユニットの構造変化を引き起こし基質の輸送を行っている。SufC のアミノ酸配列には Walker-A, Walker-B, ABC signature, H モチーフなど、ATPase 活性に重要なモチーフはすべてよく保存されている。したがって、SufBCD 複合体においても、SufC 2 分子が会合して ATP を加水分解するのではないかと考えられる。そこで本研究では、鉄硫黄クラスター生合成を担う超分子複合体である SufBCD 複合体に着目し、どのように Fe-S クラスターをつくりあげるのか? その材料はどのように供給され

るのか?という点を明らかにすることを目的に変異導入による機能解析および構造解析を進めた。

大腸菌はイソプレノイドの合成経路として MEP 経路を利用している。MEP 経路の反応には 2 つの Fe-S 酵素が含まれており、Fe-S クラスター生合成系が機能しなくなると大腸菌はイソプレノイドを作ることができず致死となる。最近、我々のグループでは Fe-S タンパク質が関与していない放線菌由来のイソプレノイド合成経路（メバロン酸経路）の遺伝子群を大腸菌に導入すると、Fe-S クラスター生合成系の欠損変異株がメバロン酸の存在下で生育できることを見出している。これにより、Fe-S クラスター生合成系の遺伝子を自在に操作し、その表現型を正確に評価できるようになった。本研究ではこの実験系を用いて、SufBCD 複合体の遺伝学的な解析を行った。

ATP 依存的な構造変化の必要性を評価するために、ATP 結合部位に変異を導入した。ATP 結合モチーフとして知られている Walker-A モチーフの K40、Walker-B モチーフの E171、ABC signature の S147、H モチーフの H203 に変異を入れて、SufC の ATPase 活性が Fe-S クラスター生合成に必要なのか検討した。前述の代謝改変型の大腸菌を用いて相補能を調べたところ、K40R、E171Q、H203A 変異型の SufC は大腸菌変異株を相補せず、メバロン酸のない培地では生育できなかった。また、これらの変異を導入した SufBCD 複合体を精製し ATPase 活性を調べたところ、その活性はバックグラウンドレベルにまで減少していた。これらの結果から、ATPase 活性を失った SufC は機能不全となることがわかった。すなわち、Fe-S クラスターの合成には SufC の ATPase 活性が必要であることが分かった。

次に、SufB と SufD の機能残基の同定を目的として系統的な変異導入実験を行った。SufB と SufD の中で鉄原子、硫黄原子、あるいは Fe-S クラスターを結合する可能性があり、かつ保存性の高い SufB の 68 残基と SufD の 9 残基に対して、部位特異的にアラニンに置換し相補実験を行ったところ、SufB の R226A、N228A、C254A、Q285A、W287A、K303A、C405A、E434A の 8 種類の変異型と、SufD の H360A 変異型ではメバロン酸を含まない培地で生育せず、機能不全となった。変異によって複合体形成能には影響がないことから、明らかにした必須残基は Fe-S クラスターの合成反応に直接関与することが強く示唆された。SufBCD 複合体の結晶構造において、これらの機能残基は SufB のコアドメイン N 末端側（R226、N228、C254、Q285、W287、K303）と、SufB と SufD の会合面（SufB^{C405}、SufB^{E434}、SufD^{H360}）の 2 領域に分かれていることが判明した。

これら機能残基の役割を明らかにするために、変異型の SufBCD 複合体と SufS、SufE とを組み合わせて *in vitro* での相互作用を解析した。SUF マシナリーでは、SufS が基質のシステインから硫黄原子を引き抜いて、persulfide (-SSH) の形で SufE に渡し、その硫黄原子は更に SufBCD 複合体の SufB に渡されることが示されている。ただし、SufB のどのアミノ酸に渡されるかはわかっていない。そこで、SufB の機能残基に変異を導入した SufBCD 複合体と SufS、SufE を精製して、それらの *in vitro* 相互作用を野生型のものと比較したところ、C254 に変異を導入した SufBCD 複合体でのみ硫黄原子の転移活性が全く見られなくなった。したがって、SufB の C254 は SufE から硫黄原子を受け取る部位であると考えられる。しかし、この C254 の配置から C254 は Fe-S クラスターの配位子として機能するとは考えにくい。一方、SufB と SufD の会合面の機能残基である SufB^{C405}、SufB^{E434}、SufD^{H360} は Fe-S クラスターを配位しうるアミノ酸残基である。したがって、硫黄原子は C254 から C405 へと渡され、その領域で Fe-S クラスターが新規に形成するのではないかと推定される。ただし、C254 と C405 は 20 Å 以上離れており、直接渡すには離れすぎている。おそらく SufC の ATP 加水分解に共役して大きな構造変化がおこって機能残基が再配置され、これを利用して Fe-S クラスターを組み立てるという可能性が考えられた。

以上の成果は、微生物だけがもつ Fe-S クラスター生合成系 SufBCD 複合体の特徴である。さらに、SufB-SufD は生物界で唯一の立体構造（長鎖 β スtrand 構造）を持つことから、この複合体に結合し機能を阻害する化合物は、副作用がない抗生剤開発に直結することが期待される。

本研究はアステラス病態代謝研究会の研究助成により御支援頂き遂行することができました。研究室の立ち上げ時期に助成を頂き、心から感謝致します。