

## 異なる2つのタイプのシステイン脱硫酵素の反応中間体の構造 Structures of reaction intermediates of two distinct types of cysteine desulfurases

藤城貴史<sup>1,\*</sup>, 中村亮裕<sup>1</sup>, 引田理英<sup>2</sup>, 小川翔子<sup>1</sup>, 高橋康弘<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 埼玉大学大学院理工学研究科生命科学部門分子生物学領域,

〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

<sup>2</sup> 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター

〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Takashi FUJISHIRO<sup>1,\*</sup>, Ryosuke NAKAMURA<sup>1</sup>, Masahide HIKITA<sup>2</sup>, Shoko OGAWA<sup>1</sup>,  
and Yasuhiro TAKAHASHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saitama University, Shimo-okubo 255, Sakura-ku, Saitama, 338-8570, Japan

<sup>2</sup>Structural Biology Research Center, Institute of Materials Structure Science,  
High Energy Accelerator Research Organization,

1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

### 1 はじめに

システイン脱硫酵素は、ピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) 依存型酵素であり、基質である L-システインの硫黄原子を、酵素の触媒ループ上の活性残基 Cys のペルスルフィド(Cys-SSH) として取り出す反応を触媒する酵素である[1]。システイン脱硫酵素が関与する代謝系としては、鉄硫黄クラスターやモリブドプテリン、含硫 tRNA などの硫黄を含む生体分子の生合成系が知られてきた。

最も初期から研究されてきた3種の鉄硫黄クラスター生合成系 (NIF、ISC、SUF マシナリー) のシステイン脱硫酵素として、鉄硫黄クラスター生合成 NIF マシナリーの NifS、ISC マシナリーの IscS、SUF マシナリーの SufS が同定されている。これまでの分子系統解析などによって、システイン脱硫酵素は、さらに Type I と Type II に分類され、NifS と IscS は Type I、SufS は Type II とされる。Type I と Type II 両者の違いは、PLP 周辺のアミノ酸配列、すなわち、PLP 周りの活性部位の構造に見られ、特に活性残基 Cys を含む触媒ループの構造が Type I では長く、Type II では短いことが、これまでに明らかとなっていた。しかしながら、このようなシステイン脱硫酵素の局所的な構造の違いが、どのように触媒機構の違いに反映されるのかについては、未解明のままであった。

そこで、本研究では、Type I の NifS、Type II の SufS の結晶構造と反応中間体の構造解析を行い、反応中間体生成過程において、局所構造の違いが、両者の触媒機構にどのように反映されるのかについて調べるとともに、Type I と Type II の共通点、相違点を構造科学的に明らかとすることにした[2]。

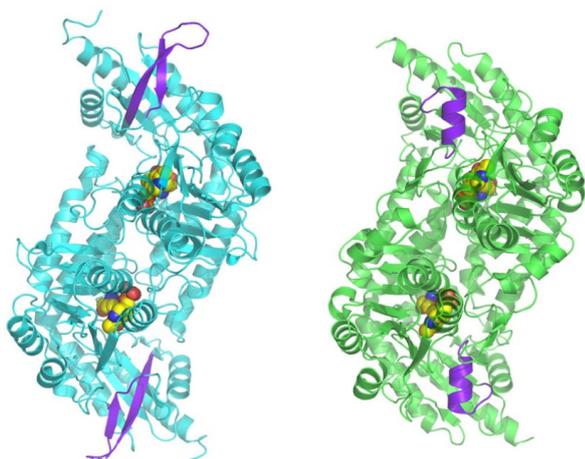
### 2 実験

*Helicobacter pylori* 由来 NifS (*Hp* NifS)、*Hydrogenimonas thermophila* 由来 NifS (*Ht* NifS)、*Bacillus subtilis* 由来 SufS (*Bs* SufS) をそれぞれ大腸菌組換え体として発現、精製し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶を作成した。これらの結晶に対し、基質 L-システイン溶液をソーキングし、一定時間結晶内で酵素反応を行なったのち、すぐに反応した結晶を液体窒素で凍結して、反応中間体型結晶を作成した。Photon factory (PF) の beamline BL-5A, BL-17A, AR-NE3A, AR-NW12A にて X 線回折データを収集した。

### 3 結果および考察

Type I である *Hp* NifS、*Ht* NifS の両方で、基質 L-システインのアミノ基が、休止状態の PLP-Lys 付加体と、Schiff 塩基交換反応を経て、PLP に結合した反応中間体 L-cysteine-PLP の観測に成功した (図 1、図 2)。この L-cysteine-PLP のカルボキシ基は、PLP 近傍の Arg 残基のグアニジウム基と静電的相互作用をし、またチオレート基は、PLP 近傍の His のイミダゾリウム基と相互作用をしていた。

一方、Type II である *Bs* SufS では、最初の turnover が終わったのち、触媒残基 Cys が Cys-SSH になった状態で、2 回目の turnover の基質 L-システインが PLP に結合した状態で、PLP-L-cysteine 反応中間体を捕捉した (図 1、図 3)。この時、NifS で見られた反応中間体と Arg と His との相互作用は、SufS の場合でも共通していた。しかしながら、触媒ループに注目すると、NifS では  $\beta$  シート構造から、ランダムコイル状に変化していたが、SufS では、構造変化はなく、 $\alpha$  ヘリックスのままであった。



*Hydrogenimonas thermophila*  
NifS (Type I)

*Bacillus subtilis*  
SufS (Type II)

図 1 : *Ht* NifS と *Bs* SufS の全体構造. 触媒ループは紫色で示している.

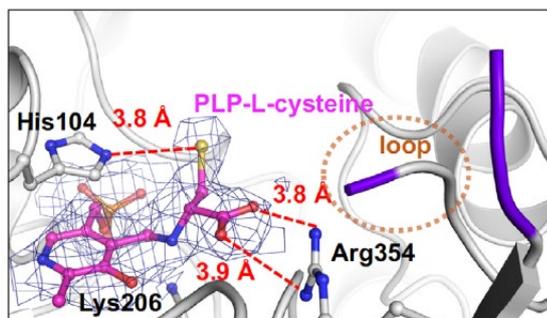


図 2 : *Hp* NifS の反応中間体 L-cysteine-PLP の構造.

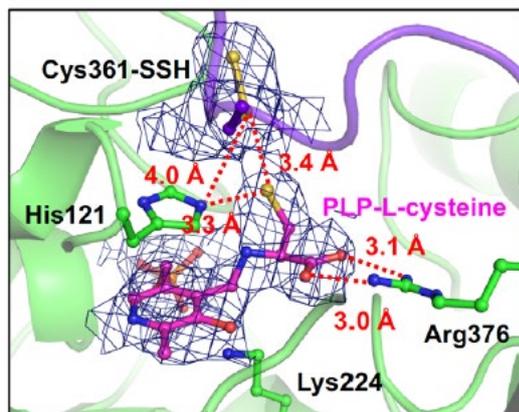


図 3 : *Bs* SufS の反応中間体 L-cysteine-PLP の構造.

また、PF の beamline AR-NW12A 側室の顕微分光装置を用いて、*Hp* NifS、*Bs* SufS 反応中間体結晶の UV-visible スペクトルを測定し、得られたスペクトル

ルが、溶液中での反応中間体を示す UV-visible スペクトルと一致することを確認した。

反応中間体生成時の触媒ループの構造の違いは、生成した Cys-SSH の硫黄が、Type I および Type II のシステイン脱硫酵素が硫黄を渡すパートナータンパク質の違い、すなわち、硫黄の利用経路や使われ方の違いを反映していると考えられる。例えば、鉄硫黄クラスター生合成系では、Type I の NifS の場合、Cys-SSH の硫黄は、鉄硫黄クラスター足場タンパク質 NifU に渡され、そのまま直接 NifU 上で鉄硫黄クラスター生合成反応に用いられる。これに対し、Type II の SufS の場合は、硫黄が SufS から硫黄運搬タンパク質 SufU または SufE に一度渡されたのち、さらに鉄硫黄クラスター足場タンパク質である SufBCD 複合体へ渡されることで、最終的に鉄硫黄クラスター生合成反応が行われることが知られている。本研究での構造解析の結果は、システイン脱硫酵素が、システイン脱硫酵素の触媒ループの構造の違いをうまく利用して、反応時に異なる構造変化をとり、適切なパートナータンパク質へと硫黄供給を行う可能性を構造科学的に示唆するものとなっている。

#### 4 まとめ

本研究では、システイン脱硫酵素 NifS と SufS の反応中間体の構造解析を行い、共通の反応中間体 L-cysteine-PLP が、保存された Arg、His により安定化される機構を明らかにした。これまで *Escherichia coli* の SufS の不活性変異型の結晶内で L-cysteine-PLP を捉えた例はあるが[3]、今回、野生型で、かつ Type I の NifS、Type II の SufS の両方で、L-cysteine-PLP を捉えることに成功したのは初めての例である。また、結晶内でのシステイン脱硫酵素の構造解析と UV-visible スペクトルでの反応中間体捕捉を同時に行ったのも初めてである。また、相違点として、触媒ループの構造変化の違いを明確にした。これらの知見は、システイン脱硫酵素の多様性と、それらのパートナータンパク質、並びにシステイン脱硫酵素が関与する種々の硫黄が関与する生合成系の分子科学的な理解につながると期待される。

#### 謝辞

本研究は、科研費若手研究 (B) 17L14510 のサポートに元に行われました。また、PF の proposal No.2018G505 と BINDS No. 2019RP-03 でのご支援をいただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

#### 参考文献

- [1] Black KA and Dos Santos PC, *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1470–1480, (2015).
- [2] R. Nakamura, et al., *FEBS J.* **287**, 1138–1154 (2020).

[3] M. Blahut, *et al. J. Biol. Chem.* 294, 12444–12458, (2019).

\* [tfujishiro@mail.saitama-u.ac.jp](mailto:tfujishiro@mail.saitama-u.ac.jp)