

近接した2つの[2Fe-2S]クラスターを保持したIscU二量体による  
[4Fe-4S]クラスター生合成の構造基盤  
Structural insight into [4Fe-4S] cluster biosynthesis catalyzed by homodimeric IscU  
harboring two adjacent [2Fe-2S] clusters

藤城貴史, 國近航平, 中村亮裕, 高橋康弘  
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  
Takashi FUJISHIRO\*, Kouhei KUNICHIKA, and Yasuhiro TAKAHASHI\*  
Department of Biochemistry and Molecular Biology,  
Graduate School of Science and Engineering, Saitama University,  
255 Shimo-okubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan

### 1 はじめに

鉄硫黄 (Fe-S) クラスターは、鉄と無機硫黄から構成された金属補因子であり、多くの重要な生命活動 (例: 光合成系や呼吸鎖) において、必須の成分である[1]。Fe-S クラスターは、鉄と硫黄の数や構造により分類され、[2Fe-2S]クラスターや[4Fe-4S]クラスターが生体系で最もみられるタイプとして有名である。多様な構造と機能を示すこれら Fe-S クラスターは、3種類の異なる Fe-S クラスター生合成マシナリー (NIF、ISC、SUF) によって生合成されており[2-5]、その中でも ISC マシナリーは、モデル生物である大腸菌の主要なマシナリーであり、またヒトなどの高等生物からバクテリアに至るまで広く見られることから、精力的な研究がなされている。

ISC マシナリーの各成分の中で最も重要なものとして、Fe-S クラスター足場酵素と呼ばれる IscU が挙げられる。IscU は 17 kDa 程度の小型なタンパク質であるが、ISC マシナリーの他の成分との複合体の形成や、IscU 自身での多量体化を通して、複雑な Fe-S クラスターの組み立てを行っている[6-9]。[2Fe-2S]クラスターの生合成については、IscU が、そのパートナーの1つであるシステイン脱硫酵素 IscS と IscS-IscU 複合体を形成し、その会合面で[2Fe-2S]クラスターを組み立てる機構が提案されている[10]。一方、[4Fe-4S]クラスターの組み立てについては、初期の分光学的な研究による IscU 二量体の関与や[11]、別の IscU のパートナータンパク質 IscA の関与など[12]、様々な機構が提唱されているが、鍵となる Fe-S クラスター結合型の野生型 IscU の構造が未解明であり、詳細な議論ができない状況であった。

この現状を打破するため、本研究では Fe-S クラスターを安定に保持した野生型 IscU の X 線結晶構造解析を、好熱性古細菌 *Methanothrix thermoacetophila* 由来の IscU を用いて、行うこととした。また、構造解析だけでなく、ESR 測定により、IscU による Fe-S クラスター生合成反応の解析も行い、構造に基づく

IscU による Fe-S クラスター生合成反応機構の解明を目指した。

### 2 実験

*Methanothrix thermoacetophila* 由来の野生型 IscU を大腸菌組み換え体として発現し、グローブボックス内で、嫌氣的に精製した。結晶化は、シッティングドロップ蒸気拡散法によりグローブボックス内で嫌氣的に行い、20°C、2週間程度で赤茶色の結晶を得ることに成功した。X線回折データ収集は Photon factory BL-5A、BL-17A、AR-NW12A、AR-NE3A で行った。用いた X 線波長は、native データの 1.000 Å or 0.980 Å に加えて、Fe-anomalous signal を計算するための波長 1.739 Å と、S-anomalous signal を計算するための波長 1.900 Å でも行った。最も分解能が高いデータセットを用いて分子置換法により位相決定、Coot によるモデリング、Refmac5 と Phenix refine による構造精密化を行った。また、活性部位のアミノ酸に変異を導入した IscU H106A 変異型の結晶化も、野生型と同様に行った。

### 3 結果および考察

野生型 IscU と H106A 変異型の X 線結晶構造を、それぞれ、3.5 Å, 1.5 Å の分解能で決定した[13]。どちらの場合も、1分子の IscU が、活性部位に1つの [2Fe-2S] クラスターを保持し、さらにその [2Fe-2S] クラスターを向かい合わせたような IscU 二量体構造となっていた。すなわち、H106A 変異による両者の構造の違いは、106番目のアミノ酸 (His or Ala) を除いて見られなかった。次に [2Fe-2S] クラスター結合部位を見ると、*in vivo* 実験により機能残基として同定されていた活性部位の3つの Cys (Cys38, Cys63, Cys107) と1つの Asp (Asp40) が [2Fe-2S] クラスターの配位子となっていることがわかった。さらに興味深いことに、この Asp40 は、もう1つのプロトマー由来の Lys104 と静電相互作用をしており、IscU 二

量体構造を安定化していることも見出した。また、この Asp-Lys 相互作用以外にも、Phe-Tyr などの  $\pi$ - $\pi$  相互作用も二量体構造の維持に重要な役割を果たすような配置となっていた。

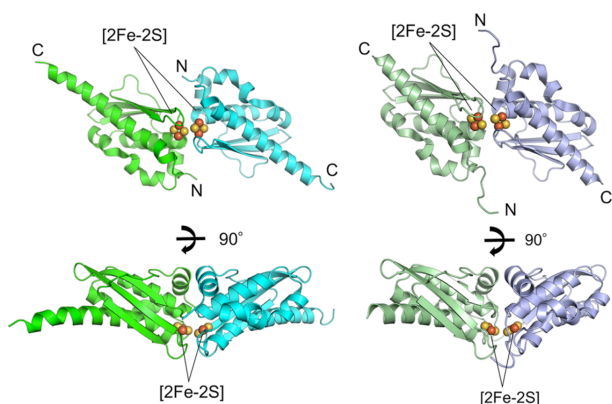


図 1 : [2Fe-2S]クラスター結合型 IscU 二量体. 左が野生型、右が H106A 変異型.

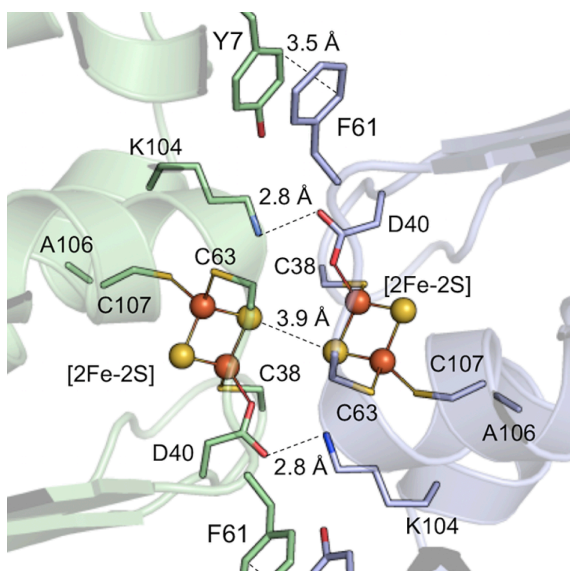


図 2 : [2Fe-2S]クラスター結合型 IscU H106A 二量体の活性部位の構造.

この *M. thermoacetophila* IscU 二量体が、過去の報告例の *Azotobacter vinelandii* IscU 二量体と同様に[11]、2つの[2Fe-2S]クラスターを1つの[4Fe-4S]クラスターへ変換可能かどうか確かめるため ESR スペクトル測定を行った。野生型および変異型 IscU に還元剤を加え酵素反応を行なった結果、野生型 IscU 二量体では、[4Fe-4S]由来の ESR シグナルが新たに観測されたのに対し、変異型では ESR シグナルが見られなかった。以上の結果、今回明らかとした IscU 二量体は、[4Fe-4S]クラスター生合成に重要であり、また、His106 が活性に重要な残基であることを証明できた。

#### 4 まとめ

ISC マシナリーによる Fe-S クラスター生合成の全容解明に向けて、今後は、IscU 二量体における [2Fe-2S]から[4Fe-4S]クラスターへの変換反応の中間体の同定や、IscU が関わる他の種類の Fe-S クラスターの生合成機構など、さらなる構造科学的な研究を進める予定である。

#### 謝辞

本研究は、X 線結晶構造解析は Photon factory のビームラインスタッフの方々、ESR 測定は分子科学研究所スタッフの方々のサポートのもとに行われました。また、科研費 20H03204(to Y.T.), 17K14510(to T.F.)のサポートを受けました。御礼申し上げます。

#### 参考文献

- [1] H. Beinert, R. H. Holm, and E. Münck, *Science* **277**, 653–659, (1997).
- [2] L. Zheng, V. L. Cash, D. H. Flint, D. R. Dean, *J. Biol. Chem.* **273**, 13264–13272, (1998).
- [3] U. Tokumoto, Y. Takahashi, *J. Biochem.* **130**, 63–71, (2001).
- [4] U. Tokumoto, S. Kitamura, K. Fukuyama, Y. Takahashi, *J. Biochem.* **136**, 199–209, (2004).
- [5] Takahashi, Y., U. Tokumoto, *J. Biol. Chem.* **277**, 28380–28383, (2002).
- [6] D. C. Johnson, M. C. Unciuleac, D. R. Dean, *J. Bacteriol.* **188**, 7551–7561, (2006).
- [7] N. Tanaka, M. Kanazawa, K. Tonosaki, N. Yokoyama, T. Kuzuyama, Y. Takahashi, *Mol. Microbiol.* **99**, 835–848, (2015).
- [8] A. D. Smith, J. N. Agar, K. A. Johnson, J. Frazzon, I. J. Amster, D. R. Dean, M. K. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11103–11104, (2001).
- [9] H. D., Urbina, J. J. Silberg, K. G. Hoff, L. E. Vickery, *J. Biol. Chem.* **276**, 44521–44526, (2001).
- [10] E. N. Marinoni, J. S. de Oliveira, Y. Nicolet, E. C. Raulfs, P. Amara, D. R. Dean, J. C. Fontecilla-Camps, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5439–5442, (2012).
- [11] K. Chandramouli, M. C. Unciuleac, S. Naik, D. R. Dean, B. H. Huynh, M. K. Johnson, *Biochemistry*, **46**, 6804–6811, (2007).
- [12] B. D. Weiler, M. C. Brück, I. Kothe, E. Bioll, R. Lill, U. Mühlhoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 20555–20565, (2020).
- [13] K. Kunichika, R. Nakamura, T. Fujishiro, Y. Takahashi, *Biochemistry*, in press.

#### 成果

1. 國近航平、第 9 3 回日本生化学会大会、若手優秀発表賞 受賞

\*tfujishiro@mail.saitama-u.ac.jp(to T.F.)

\*ytaka@mail.saitama-u.ac.jp (to Y.T.)