

大腸菌由来の Hybrid cluster protein(HCP)の X線結晶構造解析 X-ray crystal structure analysis of hybrid cluster protein (HCP) from *Escherichia coli*

藤城貴史*

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

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

Hybrid cluster protein (HCP)は、活性中心に珍しい鉄-硫黄-酸素型の金属クラスターを保有する金属酵素であり、NO の N₂O への還元反応や、NH₂OH の NH₃ への還元反応を触媒する。HCP は嫌気性微生物に主に見られ、細胞内の酸化ストレス応答や除去、NO を用いたシグナル伝達において機能していると考えられている。HCP のアミノ酸配列アライメントにより、これまでに3種の異なるタイプのHCPが分類されてきた。Type I HCP は、最も古くから知られており、硫酸還元菌 *Desulfovibrio* 属のものが盛んに研究されている。Type II HCP は、通性嫌気性微生物、例えば大腸菌やサルモネラ菌に分布し、還元力をHCPに供給するパートナータンパク質 HCP reductase (HCR)と協調して、還元触媒反応を行う。Type III HCP は二量体型HCPであり、好熱性微生物のものが研究されている。

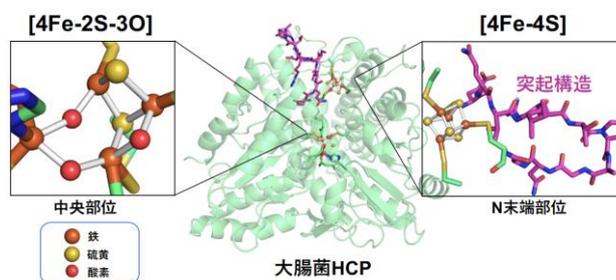
これらのうち、Type II HCPのみ、ユニークなパートナータンパク質HCRを利用可能である。しかしながら、なぜHCRが利用できるかなど、構造科学的な知見は一切明らかとされていない。その理由として、Type II HCPの立体構造が不明であること、生理学的／遺伝学的解析に比べて生化学的解析が不十分であることがあげられる。

そこで、我々は大腸菌由来の Type II HCP の研究を開始し、その X線結晶構造を決定することを目的として実験を進めた。

2 実験

大腸菌由来のHCPは、His-tag融合タンパク質として嫌氣的に精製し、結晶化を行った。得られた結晶は、嫌氣的な雰囲気下で、液体窒素中で凍結し、Photon factory BL5Aにて回折データ収集を行った。データ処理はXDSを用い、*Desulfovibrio* 属の Type I HCPを用いた分子置換法により位相決定を行った。得られた初期モデルを、Coot、Refmac5を用いて構造精密化を行った。構造評価はMolProbityを用いて行った。

3 結果および考察



最終的に分解能 3.6 Å で構造を決定することができた。構造解析を進めるうちに、N-末端部位の Fe-S クラスターは、EPR 解析で報告されていた [2Fe-2S] クラスターではなく、[4Fe-4S] クラスターであることが明らかとなった。一方、hybrid cluster は、これまでの報告例と同じ構造であった。

さらに詳細に構造を調べると、大腸菌の HCP の N 末端の [4Fe-4S] クラスター周辺の構造は、以前に報告された Type I HCP とはかなり異なり、タンパク質内側から溶媒側に突き出したようなループ構造を取っていた。Type I, II の両者のループ周辺構造の違いは、表面電荷の違いとしても反映され、Type II HCP のループ周辺は、他の周辺に比べ、かなり疎水的な表面となっていた。パートナータンパク質である HCR は、このループ周辺に結合すると考えられるため、Type II HCP の N 末端周辺の特徴的なループ構造は、その HCR の利用において、重要な役割を果たしていることが提示された。

謝辞

PF のスタッフの皆様には、X線回折データ測定で大変お世話になりました。この場をお借りして御礼申し上げます。

成果

1. Fujishiro, T., Ooi, M., Takaoka, K., *FEBS J.* 288, 6752-6868, 2021.

* t.fujishiro@mail.saitama-u.ac.jp