

# 再構成型リニア型 Fe-S 貯蔵タンパク質の Fe-K 端での XAFS 分析 XAFS analysis of Fe-K-edge of the reconstituted linear Fe-S storage protein

藤城 貴史<sup>1,\*</sup>, 相場 怜<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 埼玉大学大学院理工学研究科, 〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

Takashi FUJISHIRO<sup>1,\*</sup>, and Ren AIBA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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)クラスターはほぼ全ての生物に必須の無機補因子であり、鉄イオンと硫化物イオンを材料として、細胞内の鉄硫黄クラスター生合成酵素により生合成される。これまで鉄硫黄クラスターは、その酸素に対する脆弱性から、貯蔵系が考えられてこなかったが、近年、鉄硫黄クラスターまたは鉄硫黄クラスター様の化合物を貯蔵するようなタンパク質複合体 IssA が古細菌 *Pyrococcus furiosus* に存在することが報告された。これまでに、*P. furiosus* から直接精製した IssA の XAFS スペクトル解析など実施され、IssA がリニア型 FeS 化合物を有することが示唆されている。

しかしながら、*P. furiosus* から精製する IssA は、過剰量の強力な界面活性剤である Sodium dodecylsulfate (SDS)を加えた状態を介して得られているため、界面活性剤の影響なしで FeS 種と IssA がどのように結合しているかを議論するには、新たな IssA の調製方法を検討する必要性が生じていた。我々は、この問題を克服するため、大腸菌を宿主とした組換え IssA 生産系を確立し、界面活性剤を用いることなく、比較的高純度かつ高濃度での IssA の取得に成功した。得られた大腸菌組換え型 IssA に含まれる金属化合物が、*P. furiosus* から精製した IssA と同じかどうか確かめるため、大腸菌組換え型 IssA の XAFS 測定を実施した。

## 2 実験

大腸菌細胞内で、大腸菌由来の Fe-S クラスター生合成遺伝子 *isc* オペロンと同時に Strep-tag 融合型の組換え IssA として発現した。Strep-Trap カラム、Superdex S200 increase カラムを用いて高純度に精製し、アミコンを用いて数 mg/mL オーダー程度まで IssA を濃縮した。ビームライン BL-9A で IssA を凍結し、Fe K-edge XAFS の測定を、液体窒素吹き付け装置を用いた低温条件で、蛍光法にて行なった。データ解析は Athena を用いた。また、比較のための参考試料として市販の FeS、Fe<sub>2</sub>S 粉末を KBr 粉末と乳鉢で混合、すりつぶして錠剤としたものも同様に XAFS 測定した。

## 3 結果および考察

大腸菌組換え IssA の Fe K-edge XANES スペクトルは、pre K-edge 領域ピークが 7113 eV、rising edge で 7118, 7122, 7128, 7137 eV のショルダーピークが観測され、これらは既報された native IssA の XANES スペクトルのピークとほぼ一致し、また FeS、Fe<sub>2</sub>S のそれとは明らかに異なっていたことから、今回得られた IssA は、native IssA 同様 linear Fe-S 化合物様構造を持つことが強く示唆された。さらに EXAFS 解析により、EXAFS スペクトルをフーリエ変換し、動径分布関数を得たところ、第一近接原子である S との距離 (Fe-S 距離) は 2.4 Å 程度であり、一般的な Fe-S クラスター関連化合物と同様の Fe-S 距離であった。また Fe-N/O 距離に相当する明確なピークは見られなかったが、Fe-S 距離に相当するピークが通常の 4 つの Cys 配位子を持つ FeS クラスターよりもブロードであり、N/O 配位結合も部分的に存在する可能性も考えられた。ただし、XANES スペクトル比較において、IssA は単核錯体 Fe(SCys)<sub>4</sub> 型構造を持つルブレドキシンとは異なるスペクトルを示していたことから、主として Fe-S 結合の由来は Cys ではなく、S<sup>2-</sup>によるものと考えられた。実際に、複数種の生物由来の IssA のアミノ酸配列を調べると、IssA 保存されている Cys 残基は 1 つしかなく、今後 linear Fe-S を IssA タンパク質に固定化するアミノ酸の有無の調査や、その結合様式をより詳しく調べる予定である。

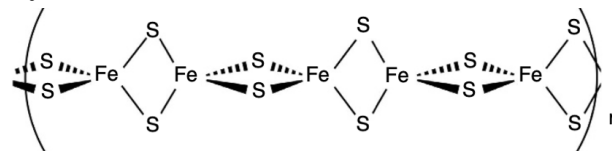


図 1. Linear Fe-S 化合物の構造式

## 謝辞

KEK PF の丹羽尉博 助教には、XAFS 測定で大変にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

[1] Vaccaro, *et al.*, *Nat. Commun.* 8, 16110, (2017).

\* tfujishiro@mail.saitama-u.ac.jp