

# [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypB の結晶構造解析

## Crystallographic analysis of [NiFe] hydrogenase maturation factor HypB

佐々木大輔<sup>1</sup>, 渡部聡<sup>1</sup>, 松見理恵<sup>2</sup>, 跡見晴幸<sup>2</sup>, 今中忠行<sup>3</sup>, 三木邦夫<sup>1</sup>

1. 京大・院理・化学, 2. 京大・院工・合成, 3. 立命大・生命・生物工学

金属蛋白質には多様な働きがあり、その機能は活性中心の金属や構造に依存している。[NiFe]ヒドロゲナーゼは、可逆的な水素代謝を触媒する酵素で、大小二つのサブユニットがあり、その大サブユニットの活性中心に NiFe クラスターを有している。Fe 原子には二つの CN 基と CO 分子が配位しており、Ni 原子にはポリペプチド鎖の Cys 残基が四つ配位し、うち二つは Fe 原子にも配位して、架橋構造を形成している。クラスターの生合成には成熟化因子 HypA, B, C, D, E, F が関与している。各因子の働きによって、段階的に Fe と Ni が組み込まれ、成熟化が完了する。このうち HypB は HypA および HypC と共同して Ni 原子を組み込む役割を担う。HypB の GTPase 活性がこの組み込みに必須であることは分かっているが、その詳細な機構はよく分っていない。多くのアーキアには、バクテリアの HypB 遺伝子と相同性の高い遺伝子が存在しない。一方アーキアでは、HypA 遺伝子に隣接して、GTP 結合モチーフを含む遺伝子が保存されていることから、この遺伝子が HypB の機能的ホモログであると考えられる。我々は、Ni 原子組み込み機構を分子レベルで解明するため、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来の HypB ホモログ (Tk-HypB) の X 線結晶構造解析を行った。

大腸菌の発現系で得られた可溶性 Tk-HypB を高純度に精製した。リン酸アンモニウムを沈殿剤とする条件で結晶を得ることができ、分解能 2.3 Å までの回折データを収集した。結晶の空間群は  $I 222$ , 格子定数は  $a = 66.2 \text{ \AA}$ ,  $b = 137.7 \text{ \AA}$ ,  $c = 150.8 \text{ \AA}$  であった。白金誘導体結晶を用いた単波長異常分散法により初期位相を得ることができ、2.3 Å 分解能で構造を決定した ( $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 21.3/26.2 \%$ )。Tk-HypB は結晶の非対称単位中に 2 分子存在しており、これら分子が非結晶学的 2 回軸で関係付けられるホモダイマー構造であった。それぞれの分子の中央には平行  $\beta$  シートが存在し、それらを囲んで  $\alpha$  ヘリックスが存在していた。また、大腸菌由来と思われる ADP が結合しており、このことから、Tk-HypB は ATPase 活性を伴って機能することが示唆された。今後、この ATPase 活性が Ni 組み込みにどのように関与しているかを解明する。