

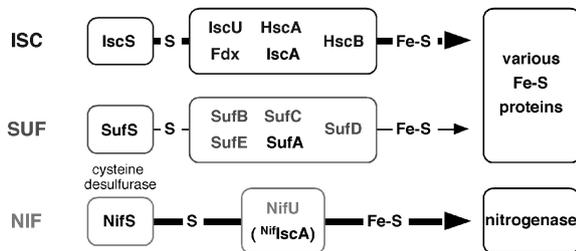
# 多様な鉄硫黄クラスター合成システムの反応特性と微生物の生存戦略

●高橋 康弘 ◆福山 恵一

大阪大学大学院理学研究科

## 〈研究の目的と進め方〉

鉄硫黄 (Fe-S) 蛋白質は、コファクターとして非ヘム鉄と無機硫黄原子から成るFe-Sクラスターを持つ蛋白質の総称で、構造と機能は多種多様、大腸菌では全蛋白質の3%を占める。これらFe-S蛋白質は、エネルギー代謝からDNA修復まで多彩な細胞機能を担っており、その機能発現においてFe-Sクラスターの形成は必須である。われわれは、Fe-S蛋白質の生合成に必須な二種の独立した多成分酵素系 (ISCとSUFマシナリー) を明らかにすることで、新たな研究領域を切り開いてきた。生物界には、これらISCとSUF、さらにニトロゲナーゼの生合成に関与するNIFを加えた、三種類のFe-Sクラスター合成システムが分布しているが、構成成分の多様性や、SUFマシナリーからISCやNIFマシナリーへの大転換は、単純な系統進化で説明できるものではない。では、Fe-Sクラスター合成系はどのように進化してきたのだろうか？ 多様性を生み出した要因は何かという新たな疑問の出現である。そのアプローチとして、本研究ではモデル生物のFe-Sクラスター合成系を系統的に比較、解析し、それぞれの特性と共通する基本原理を分子レベルで明らかにすることを目的とした。さらに微生物の生存戦略との関連を明らかにすることで、ゲノム進化の研究に貢献することも主要な目的である。



## 〈研究開始時の研究計画〉

ゲノム生物学の視点からは、Fe-Sクラスター合成系の多様性がクローズアップされる。SUF類似マシナリー間での構成成分の多様性や、SUFマシナリーからISCやNIFマシナリーへの大転換は、単純な系統進化で説明できるものではない。Fe-Sクラスターは、本来酸素に対して不安定であるため、特に酸素環境に対する適応、生存戦略との関連を予想した。本研究では、枯草菌型 (SUF+ISCキメラ)、ラン藻型 (酸素耐性化? SUF)、窒素固定細菌型 (嫌氣的? NIF)、古細菌型 (原始的? SUF) のFe-Sクラスター合成系を採り上げ、遺伝学、生化学、構造生物学的な解析を有機的に関連させて解析を進めることにより、それぞれの特性と共通する基本原理を分子レベルで明らかにすることを計画した。

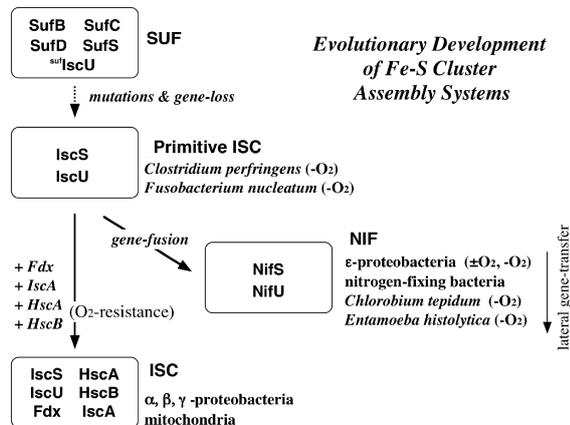
## 〈研究期間の成果〉

われわれは、Fe-Sクラスター合成系のパラダイムとして、大腸菌のISCとSUFマシナリーの解析を詳細に進めてきた。加えて本研究では、ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*)

と赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) のNIFマシナリー、古細菌型 (原始的?) のSUFマシナリーなどを採り上げ、遺伝学、生化学、構造生物学的な解析を進めた。

- (1) 大腸菌のiscとsufの両オペロンを欠損した変異体 (合成致死) に関連遺伝子群を導入し、機能的な相補性を指標にしてFe-Sクラスター合成能をin vivoで評価する実験系を構築した。この変異株は、ピロリ菌や赤痢アメーバのnifS+nifU遺伝子によって相補されることから、従来、ニトロゲナーゼの生合成に特異的と考えられていたNIFマシナリーが、より特異性の広い、generalなクラスター合成系として機能することを明らかにした。NIFマシナリーは、わずか2成分という最もコンパクトなクラスター合成系である。
- (2) 大腸菌変異株を用いた同一のバックグラウンドでisc、suf、nif、3種のオペロンを比較したところ、NIFマシナリーは酸素存在下では機能することができないという特性を持つことが明らかになった。ピロリ菌などのε-プロテオバクテリアと窒素固定細菌に限定的に分布するNIFマシナリーは、嫌氣的 (微好氣的) な環境への適応進化と捉えることができる。真核生物では唯一、赤痢アメーバ (嫌氣性の原生生物) に見られるNIFマシナリーは、水平伝搬によりε-プロテオバクテリアからもたらされた可能性が高い。
- (3) ISCマシナリーについては活性酸素 (過酸化水素) に対する感受性が高いことを見出した。一方、SUFマシナリーは三種類のFe-Sクラスター合成システムの中で、酸素環境の影響を最も受けにくく、この酸素耐性能は、シアノバクテリアや葉緑体など酸素発生の光合成器官にSUFマシナリーが分布することとよく符合している。
- (4) 大腸菌のISCマシナリーについて詳細な遺伝学的解析を進め、新たに、二種類の成分 (HscBとHscA) は好氣条件では必須だが、嫌氣条件では必須でないことを見出した。また、hscBAの欠損をサプレッスする変異株 (14種類) を解析し、IscU内部のさまざまなアミノ置換によって、酸素存在下でもFe-Sクラスター形成が可能になることを明らかにした。これらの知見は、ISCとNIFマシナリーの類似性を浮き彫りにすると共に、酸素が重要な環境要因として、Fe-Sクラスター合成系の進化的変遷をもたらした可能性を強く支持している。
- (5) 上記のHscBとHscAの機能をバイパスする、変異型のIscUタンパク質について生化学的な解析を行い、野生型の構造からは大きく変化していることを明らかにした。IscUはクラスター中間体の形成部位と考えられており、今回の結果は、HscBとHscAが引き起こすIscUの構造変化が、特に酸素存在下でのFe-Sクラスター形成に必須であることを示している。なお、最近報告されたゲノム配列によると、ほとんどのグラム陽性細菌がSUFマシナリーを持つのに対し、一部の絶対嫌氣性グラム陽性細菌 (*Clostridium perfringens*)

と *Fusobacterium nucleatum*) は、IscSとIscUだけからなる原始的なISCシステムを保持している。これらを総合すると、Fe-Sクラスター合成系の進化のなかで、SUFからISCやNIFマシナリーへの変換の過程を次の図のように捉えることができる。



(6)大腸菌のISCとSUF、ピロリ菌のNIF、好熱菌 *Aquifex aeolicus* のISC (原始的?)、好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* のSUFマシナリーの構成成分を各々単独、または複合体として、精製と機能解析、結晶化を進め、大腸菌YfhJ (IscX)、SufA, SufC, SufDについては構造決定に成功した。また、*Sulfolobus*のSufC+SufD複合体についても良質の結晶を得ることができた。SufDについては、構造情報に基づいて種々の変異を導入して機能的に重要な部位を同定し、さらに二次的なサブプレッサー変異の解析も進めている。加えて、好熱菌 *Aquifex*のIscUが意外にもFe-Sクラスター中間体を結合した状態で精製できることを見出し、さらに変異を導入することによって中間体の安定化を達成、構造一機能解析を進めている。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

始源的なbiocatalystであるFe-S蛋白質は、長い進化の歴史の中で構造と機能を多様化させてきた。例えば、大腸菌には100種を越えるFe-S蛋白質が存在し、様々な細胞機能を担っている。これらFe-S蛋白質の機能を支えるのがクラスター合成系である。そのひとつ、SUFマシナリーは、古細菌と真性細菌の共通祖先で基本型 (SufB+SufC) が誕生し、その後、様々な成分を追加することで多様な進化を遂げてきた。真性細菌では、さらに複雑な変革 (遺伝子重複、融合、シャプリング、水平伝搬) を経て、新たにISCマシナリーとNIFマシナリーが生み出されている。本研究では、これらクラスター合成系の革新的な変化が、酸素環境に対する適応や生存戦略に関連しているという可能性を、さまざまな角度から示すことができた。また、進化的、系統的な側面からFe-Sクラスター合成系の多様化の意義を明らかにしただけでなく、その分子的な背景に迫るべく、構造と機能に関する新たな知見を集積している。近年、爆発的な勢いで拡大しつつある、Fe-Sクラスター形成機構の研究分野で、パラダイムの発展、推進力となる成果である。海外招待講演でも好意的な反響が多く、また、最近の総説 (Annu Rev Biochem. 2005; 74: 247-281、Trends Biochem Sci. 2005; 30(3): 133-141) でも大きく取り上げられた。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

大腸菌のiscとsufの二重変異体は、上記ピロリ菌などのnifSUに加えて、枯草菌のsufCBS-iscU-sufBオペロン

(*YurYXWVU*) によっても相補されることを確認しており、現在その性質を解析中。一方、意外なことに、ラン藻 *Synechocystis* 6803 のsufBCDSオペロンは相補能を示さなかった。ラン藻では未知の遺伝子がさらに必要ではないかと考え、現在いくつかの候補遺伝子を検討している。

#### 〈今後の課題〉

- (1) 三種類のFe-Sクラスター合成系の中で、SUFマシナリーは真正細菌から古細菌、植物の色素体と、最も広く分布しており、その構成成分に著しい多様性が見られる。それぞれの成分の具体的な役割を明らかにすると共に、進化的な意義についても洞察を深める必要がある。
- (2) 大腸菌のISCとSUFマシナリーについては、それぞれの構成成分の構造と機能について、多くの知見が集積しつつある。しかし、マシナリーとしての反応機構 (いかにしてFe-Sクラスターがアポタンパク質に作られるか) については、包括的な理解にほど遠い。反応機構の解明の鍵となるのは、ISCマシナリーでは、中間体Fe-Sクラスターを配位したIscUの構造と、その構造変化の実体、SUFマシナリーでは、SufB/SufC/DufD複合体の構造と、サブユニットの入れ替えも含む複雑な構造変化だと考え、それら実体の解明を進めている。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文/プロシーディング (査読付き)
  1. 0402090948  
Yano, T., Sklar, L., Nakamaru-Ogiso, E., Takahashi, Y., Yagi, T., and Ohnishi, T., Characterization of cluster N5 as a fast-relaxing [4Fe-4S] cluster in the Nqo3 subunit of the proton-translocating NADH-ubiquinone oxidoreductase from *Paracoccus denitrificans*, J. Biol. Chem. 278(18), 15514-15522 (2003)
  2. 0402090954  
Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., and Nozaki, T., An Intestinal Parasitic Protist *Entamoeba histolytica* Possesses a Non-redundant NIF-like System for Iron-Sulfur Cluster Assembly under Anaerobic Conditions, J. Biol. Chem. 279(16):16863-16874 (2004)
  3. 0502101431  
Tokumoto U, Kitamura S, Fukuyama K., and Takahashi Y., Interchangeability and Distinct Properties of Bacterial Fe-S Cluster Assembly Systems: Functional Replacement of the isc and suf Operons in *Escherichia coli* with the nifSU-like Operon from *Helicobacter pylori* J. Biochem. 136(2): 100-209 (2004)
- 2) データベース/ソフトウェア なし
- 3) 特許など なし
- 4) その他顕著なもの 海外招待講演  
Yasuhiro Takahashi "Comparative Genetic Analysis of the Three Distinct Systems Involved in the Assembly of Fe-S Clusters." 31st Steenbock Symposium on Fe-S proteins: biogenesis, structure, and function. 2005 May 19-22 University of Wisconsin, Madison, USA