様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：１２１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４４００３４

研究課題名（和文）真核生物細胞質における鉄硫黄クラスター合成マシーナリーの構造生物学

研究課題名（英文）Structural studies on the cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system

研究代表者
庄村　康人（Shomura, Yasuhito）

茨城大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：５０４２３９００

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究は，真核生物の核・細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質の合成に関与するタンパク質群について，単体および複合体での結晶構造解析を行い，合成経路およびその主要段階の反応機構を解明することを目的とした．分裂酵母および線虫の構成タンパク質の発現系を構築し，遺伝子配列，発現ベクター，および宿主の最適化により，すべての主要なタンパク質を生成することに成功した．鉄硫黄クラスター前駆体をもつタンパク質は好気条件下では不安定であったため，精製および結晶化は嫌気条件下で行った．線虫由来のCia1については良質な結晶が得られ，1.5Å分解能のX線構造を決定し，他の種由来のものとの立体構造の違いを見出した．

研究成果の概要（英文）：Iron-sulfur proteins assume a variety of roles in living cells and require systems for the assembly of iron-sulfur clusters. The iron-sulfur assembly (CIA) system has recently been identified as unique system for iron-sulfur cluster proteins in the eukaryotic cytosol and nucleus. We have started the structural studies on the components and complex of the CIA system in order to elucidate the exact pathway and reaction mechanisms. All the major components were successfully produced with E. coli expression systems after optimization of sequences, expression vectors, and hosts. The precursor of iron-sulfur clusters are unstable under aerobic condition, and therefore, they are purified and crystallized under anaerobic glove box. The Cia1 protein from C. elegans has been crystallized and the X-ray structure was determined to 1.5 angstrom resolution. The structure comparison revealed the local conformational divergence among species suggesting different protein interaction for each species.

研究分野：構造生物学

キーワード：鉄硫黄クラスター　金属タンパク質　分子シャペロン

１．研究開始当初の背景

鉄硫黄クラスターを含むタンパク質は生体内で様々な役割を担っており，バクテリアからヒトまであらゆる生物に存在する．そのクラスター自身の機能は，タンパク質の構造安定化，電子伝達，反応触媒など多岐にわたる．鉄硫黄クラスターの合成およびタンパク質への組み込みには生物種やオルガネラによって異なる幾つかの経路が存在し，ミトコンドリアには ISC（iron-sulfur cluster）系，葉緑体には SUF（sulfur mobilization）系，バクテリアには ISC，SUF，NIF（nitrogen fixation）系の何れか（或いは複数）が存在することが知られている．一方，真核生物細胞質において鉄硫黄クラスタータンパク質はオルガネラで合成されたのちに輸送されてくるというモデルが考えられていたが，近年，上記 3 つのものとは異なる第 4 の鉄硫黄クラスター合成経路，CIA（cytosolic iron-sulfur cluster assembly）系の存在が明らかになった．この CIA 系の一部のタンパク質については，真核生物細胞質だけではなく，共通の祖先をもつとされる古細菌や真正細菌にもホモログが見られることが報告されていた．また，これら 4 つの系には直接属さない因子も続々と同定されてきており，鉄硫黄クラスター合成マシーナリーはより多岐にわたり複雑なものであると考えられてきていた．研究開始当初は，ドイツのグループが出芽酵母の系で先行して研究を進めており，CIA の主要な構成因子が多く同定されており，他の鉄硫黄クラスター合成経路と同様，以下のサブマシーナリーから成ると考えられていた．

・鉄硫黄クラスター前駆体を合成・転移する足場タンパク質複合体
・鉄硫黄クラスターを取り込む前のアポタンパク質の凝集を抑制しながら，これを足場タンパク質へ運搬する分子シャペロン
・クラスター形成と転移に必要な電子を供給する電子伝達タンパク質

２．研究の目的

まだ不明な点が多い CIA 系の原子レベルでの反応機構の解明を目的とした．具体的には出芽酵母以外の生物種における各構成要素の多様性を調べ，それぞれの相互作用の確認と，結晶構造解析による分子認識機構の解明および鉄硫黄クラスター前駆体の合成・輸送機構の解明を目指した．

３．研究の方法

(1) CIA 系構成要素の真核生物における多様性の確認

様々なモデル生物（分裂酵母，線虫，ショウジョウバエ，ゼブラフィッシュ，ヒト，シロイヌナズナ等）の cDNA 塩基配列データベースから，出芽酵母の Nar1，Cia1，Nbp35，Cfd1 に相同なタンパク質をコードする遺伝子を探索した．

(2) 各タンパク質発現系の構築

全てのタンパク質は大腸菌発現系によって産生した．分裂酵母および線虫の cDNA ライブラリーは「理研バイオリソースプロジェクト(NBRP)」より入手し，PCR 法によって目的遺伝子を増幅し，各種発現ベクターに挿入した．また，産生量が芳しくないものについては，生物種の違いによるレアコドンの頻度に原因がある可能性を考慮して，人工遺伝子合成によりレアコドンを無くした遺伝子についても発現系を構築した．

(3) 培養・タンパク質の発現の確認

作製した発現ベクターで大腸菌を形質転換し，振とう培養・発現誘導後の細胞破砕液を SDS-PAGE で解析した．標的タンパク質の ORF にはレアコドンが多数存在するものがあるため，産生量が少ない場合には宿主となる大腸菌がレアコドン tRNA を産生するような系を用いた．また，必要に応じて大腸菌の培養は嫌気条件下で行った

(4) タンパク質の精製

数リットルのスケールで培養した菌体を用いて各タンパク質の精製を行った．Cia1 には His タグを，Nar1 および Nbp35 には Strep タグを挿入し，それぞれ Ni キレート担体および Strep-tactin 担体によって精製した．また，必要に応じて陰イオン交換カラムとゲル濾過カラムも精製に用い，嫌気条件下での精製はグローブボックスの中で行った．

(5) 結晶化・X 線回折実験

高純度の精製タンパク質については，市販のスクリーニングキットを用いて結晶化条件の探索を行った．長径 0.1 ㎜以上の大きさの単結晶が得られたら，X

線回折実験を行い，十分の回折能をもつものについては回折データを取得した．最終的なデータ測定は放射光施設（SPring-8）で行った．

４．研究成果

(1)　分裂酵母の系

分裂酵母においては，出芽酵母でのCia1とCfd1が一つの融合タンパク質として存在するため，複合体としての結晶化に有利であると考えた．

しかし，大腸菌で当該ORFを発現させても，まったく目的タンパク質の生産は確認できず，不溶性成分についても同様であった．そこで，ORFをCia1ドメインとCfd1ドメインに分けてそれぞれ単独で発現させたところ，Cfd1のみでタンパク質の産生が確認された．Cia1においては，コドンの最適化およびmRNAの高次構造形成をとりにくいような設計を施した人工遺伝子を用いたが，不溶性成分としてもタンパク質の産生は確認されなかった．このような問題が生じた場合，N末端側に全く別の安定なタンパク質を付加した融合タンパク質として発現させると合成の阻害が改善されることが知られており，今回はその目的に比較的実績のあるGSTをN末端側に付加する発現系を選択した．実際に大腸菌で発現させてみると，SDS-PAGEで確認できるほどの目的タンパク質の産生が見られ，大部分は不溶性成分であったにもかかわらず，一部は可溶化していると考えられ，Niキレートカラムでの精製により高純度な試料が得られた．

一方，Nar1およびNbp35については，大腸菌で可溶性タンパク質として，比較的高収率で産生させることが可能であることが分かったが，長時間酸素雰囲気化にさらすと，鉄硫黄クラスターが壊れてタンパク質が不安定化するという問題が明らかになった．そこで，精製から結晶化までをグローブボックスの中の嫌気雰囲気化で行う系を立ち上げ，酸化によるタンパク質の変性を回避することを試みた．その結果，Nar1，Nbp35ともに安定に長期間保管することができ，精製の純度も飛躍的に高くなったが，それぞれの単結晶を得ることはできなかった．

(2)　線虫の系

線虫のcDNA配列の探索の結果，Cia1には４つの遺伝子が，Nar1およびNbp35には１つの遺伝子がそれぞれ存在することが分かったが，Cfd1に該当する遺伝子を確認することができなかった．他の研究グループからは，線虫以外に，植物においてもそのような種が存在することが報告されている．われわれは，線虫は他の真核生物と比較して，よりシンプルなCIA系をもつと推定し，その複合体結晶の調製に着手した．

分裂酵母同様，Nar1，Nbp35はStrepタグ融合タンパク質として，Cia1はHisタグ融合タンパク質として発現させた．３者ともに大腸菌内で高い産生が見られ，可溶性成分として精製することができた．Nar1およびNbp35においては分裂酵母と同様に，好気雰囲気化では鉄硫黄クラスターの崩壊が顕著に見られたため，精製および結晶化はグローブボックス内の嫌気的雰囲気化で行った．純度および収量は十分に高かったが，単体での結晶を得ることはできなかった．

結晶化を妨げている要因として，Nar1，Nbp35ともにもつN末端側の鉄硫黄クラスター前駆体結合部位に構造の揺らぎが生じていると考え，それぞれのN末端欠損体のコンストラクト作製を試みた．N末端側の不安定な領域は，酸素雰囲気化における限定分解および分解産物のN末端配列解析により決定し，それぞれ安定C末端領域の発現ベクターを作製した．このコンストラクトから得られたタンパク質は酸素雰囲気化でも安定で，結晶化条件の初期スクリーニングで幾つかの微結晶を析出する条件が得られている．

一方，Cia1は好気雰囲気下でも安定で，結晶化条件の探索の結果，複数の条件で単結晶を得ることができた．これらの結晶を用いてSPring-8にてX線回折データを取得し，分子置換法によって位相を決定し，1.5 Å分解能で構造精密化を行った．非対称単位には3つのCia1分子が含まれており，それぞれ決まった構造をとらないループ領域が異なっていた．結晶中の分子のパッキングの影響であると考えられる．これまでに，出芽酵母由来およびヒト由来のCia1の結晶構造が報告されているが，それぞれのCα原子に対するRmsd値は，1.4，1.1Åであり，立体構造はよく似ていることが分かった．分裂酵母ではCfd1とは融合タンパク質として結合しており，線虫ではCfd1を介さずにNbp35と相互作用すると考えられるが，微妙な構造の違いがこれらの相互作用の違いを与えていること

が示唆された.

(3)　精製タンパク質間の物理的相互作用
分裂酵母の系，線虫の系ともに足場タンパク質である Cia1 には His タグが，これと相互作用すると考えられる Nar1 および Nbp35 には Strep タグを付加していたため，それぞれを異なるアフィにてイーカラム担体に結合させて，プルダウンアッセイを行った．その結果，どの組み合わせにおいても相互作用を確認することができなかった．これまでに，機能的な相互作用を裏付ける結果は幾つかのグループから報告されているが，物理的相互作用については信頼できるデータは確認できていない．今回我々の系で複合体の形成が確認できなかった理由としては，
① 結合はするが，親和性が低くアフィニティーカラムの洗浄で解離してしまった.
② 結合はするが，pH やイオン強度等の条件が不適切であった.
③ Nar1 やアポ Fe-S タンパク質が結合した Cia1 でないと結合しない.
④ そもそも線虫由来の Cia1 と Nbp35 は結合しない
等考えられ，今後は複合体での結晶化を目指し，これらの可能性を検討していく必要がある.

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）
〔雑誌論文〕（計　0 件）

〔学会発表〕（計　2 件）
① 松本卓樹、『Fe-S タンパク質成熟化因子 Cia1 の結晶構造解析』，第 88 回　日本生化学会大会，2015.12.1，神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）
② 庄村康人、『ヒドロゲナーゼがもつ鉄硫黄クラスターの構造的多様性』，第 88 回日本生化学会大会，2015.12.1，神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）
〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0 件）
〔その他〕
ホームページ等
http://www.…

６．研究組織
(1)研究代表者
庄村　康人（SHOMURA YASUHITO）
茨城大学・理工学研究科・准教授
研究者番号：50423900

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者
無し

(4)研究協力者
無し