

博士論文

論文題目

大腸菌における鉄硫黄クラスター生合成系の
機能解析

埼玉大学大学院 理工学研究科

理工学専攻 生命科学コース

12BD005 田中 尚志

目次

1. 要旨	p. 4
2. 序論	p. 6
3. 実験材料・実験方法	p. 10
4. 結果	p. 19
5. 考察	p. 27
6. 参考文献	p. 33
7. 図	p. 39
8. 謝辞	p. 61

略語

Fe-S : 鉄硫黄

Ap : アンピシリン

Tc : テトラサイクリン

Cm : クロラムフェニコール

Sp : スペクチノマイシン

Ec : *Escherichia coli*

Aa : *Aquifex aeolicus*

LB : Luria Bertani

TB : Terrific Broth

MVA: mevalonate, メバロン酸

IPP : イソペンテニルニリン酸

1. 要旨

鉄硫黄 (Fe-S) クラスタは無機硫黄原子と非ヘム鉄から成るコファクターで、このクラスタを持つタンパク質は総じてFe-Sタンパク質と呼ばれている。Fe-Sタンパク質の構造と機能は多種多彩で、TCA回路や電子伝達系などのエネルギー代謝から遺伝子の発現制御に至るまで、生命活動の根幹を担っている。これらFe-Sタンパク質の機能を支えているのがFe-Sクラスタの生合成系である。大腸菌は2種類のFe-Sクラスタ生合成系 (*iscSUA-hscBA-fdx-iscX*にコードされるISCマシナリーと、*sufABCDSE*にコードされるSUFマシナリー) を持っており、それぞれのマシナリーが独立してFe-Sクラスタを形成している。そのうちのISCマシナリーは7種類の成分から構成され、これらの成分が協調してクラスタを組み立て、最終的にアポ型タンパク質に渡していると考えられているが、具体的な作動機構はほとんどわかっていない。本研究では、クラスタ形成反応におけるISCマシナリーの作動機構を明らかにすることを目的とし、まず、1) 大腸菌を用いて新たな遺伝学的実験系を構築した。次に、2) *sufABCDSE* と個々の*isc*遺伝子をそれぞれ破壊した変異株を作製・解析し、ISCマシナリーの機能に必須の因子を同定した。さらに、3) マシナリーの中心成分であるIscUについて機能解析を進め、得られた知見に基づいてIscUの分子機構について考察した。

1. Fe-Sクラスタ生合成系の解析を目的とした新たな遺伝学的実験系の構築

Fe-Sクラスタ生合成系は生物の生存に必須であり、大腸菌においてもISCとSUFマシナリーの二重欠損は合成致死となる。しかし、私は大腸菌が持つ124種類のFe-Sタンパク質の働きを洗い直したところ、イソプレノイドの合成経路 (MEP経路) で働く2つのFe-S酵素 (IspGとIspH) のみが生育に必須であることに気が付いた。そこで、Fe-Sタンパク質が関与していない放線菌由来のイソプレノイド合成経路 (MVA経路) の遺伝子群を大腸菌に導入したところ、ISCとSUFの二重欠損株が培地に添加したメバロン酸に依存して生育できることを見出した。これにより、Fe-Sクラスタ生合成系のあらゆる遺伝子群を自在に操作・解析することが初めて可能になった。

2. *suf*オペロン欠損下における個々の*isc*遺伝子破壊による影響

大腸菌のイソプレノイド合成経路をメバロン酸経路に改変した上で、*sufABCDSE*（以下、単に*suf*と記す）と各*isc*遺伝子をそれぞれ個別に破壊した変異株をそれぞれ作製し、変異株の表現型を調べた。その結果、 $\Delta iscX \Delta suf$ 株のみがメバロン酸の有無に関わらず生育可能であることが分かった。一方、嫌気条件下においては、 $\Delta iscX \Delta suf$ 株に加えて $\Delta iscA \Delta suf$ 株と $\Delta fdx \Delta suf$ 株が培地に添加したメバロン酸に依存せずに生育することが分かった。したがって、好気条件下ではIscS, IscU, IscA, HscB, HscA, Fdxの6種類の成分がISCマシナリーの機能に必須だが、嫌気的な条件下では、IscS, IscU, HscB, HscAの4種類のみが必須であることがわかった。さらに $\Delta hscA \Delta suf$ 株と $\Delta hscB \Delta suf$ 株から複数の偽復帰突然変異体を単離し、二次的なサプレッサー変異を調べたところ、それらすべてについてゲノム上の*iscU*遺伝子のコード域内にサプレッサー変異を同定した。*in vitro*において、HscA/ HscB（シャペロン/コシャペロン）は協調してIscU（Fe-Sクラスターの新規形成部位）と結合し、次いでIscUの構造変化を引き起こすことにより、アポ型タンパク質へのクラスター移行反応を促進させることが示されている。今回の結果は*in vivo*におけるIscUとHscA/ HscBの相互作用と、アポ型タンパク質にクラスターを渡す際のIscUの構造変化の重要性を示している。

3. Fe-Sクラスターの新規形成部位、IscUの機能解析

ISCマシナリーの中心成分は、Fe-Sクラスターの新規形成部位として機能するIscUである。すなわちIscUは鉄原子と硫黄原子を受け取り、それらをクラスターの形に組み立て、最終的にアポ型タンパク質へと渡しているが、具体的な反応機構についてはほとんどわかっていない。そこで上記の実験系を用いて、大腸菌IscUに対して系統的に部位特異的な変異を導入し、相補実験により変異型IscUの機能を評価した。その結果、IscUのクラスター配位子（C37, C63, H105, C106）とY3, D39, K103がIscUの機能に必須であることが分かった。また機能不全の変異IscUから復帰突然変異体を単離し、二次的な変異を調べたところ、IscU Y3の変異をサプレッサー変異を、IscS（硫黄原子の供与体）の活性部位近傍に4種類見出した。変異型IscUとサプレッサー変異型IscSを精製し、生化学的解析（Pull down/ Biolayer interferometry法による相互作用解析と、硫黄原子受け渡し活性の測定）を進めたところ、IscU Y3がIscSから硫黄原子を受け取る際の相互作用に重要であることを見出した。これらの結果は、IscU Y3がIscSの構造変化を誘起し、硫黄原子受け渡し反応を促進させる役割があることを示唆している。

2. 序論

Fe-S クラスタは無機硫黄原子と非ヘム鉄から成るコファクターで、一般的に [2Fe-2S]、[4Fe-4S]、[3Fe-4S] の形でタンパク質内部の Cys 残基、稀に His 残基や Asp 残基に配位結合している (Figure 1)。Fe-S クラスタをコファクターとして持つタンパク質は総じて Fe-S タンパク質と呼ばれている。Fe-S タンパク質の構造と機能は多種多彩で、エネルギー代謝から遺伝子発現制御に至るまで、生命活動の根幹を担っている (1, 2)。これら Fe-S タンパク質の機能を支えているのが Fe-S クラスタの生合成系である。現在までに、Fe-S クラスタ生合成系として ISC, SUF, NIF マシナリーの 3 種類が知られている (3 - 8)。NIF マシナリーは *Azotobacter vinelandii* などの窒素固定細菌やピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) などの ϵ -プロテオバクテリア、赤痢アメーバ (嫌気的な原生生物) に存在する Fe-S クラスタ生合成系で、NifS と NifU の 2 種類の成分から構成されている。このマシナリーは、酸素が存在する好気的な環境では十分機能することができないという特徴をもっている (9, 10)。ISC マシナリーと SUF マシナリーは、好気的な生物を含めて生物界に広く分布している (9)。ISC は α , β , γ -プロテオバクテリアと真核生物のミトコンドリアに分布しており、少なくとも 6 種類の成分から構成されている。一方、SUF マシナリーは真正細菌全般から古細菌、植物の色素体と最も広く分布する生合成系である。各マシナリーの成分を比較すると、共通点が限られているため、それぞれのマシナリーは異なるメカニズムで機能すると考えられている。

大腸菌は Fe-S クラスタの生合成系として、ISC と SUF マシナリーを持ち、それぞれのマシナリーは独立して Fe-S クラスタを合成している (4, 10)。ISC マシナリーは、*iscSUA-hscBA-fdx-iscX* にコードされており (Figure 2)、遺伝学的な解析によると、マシナリーの機能に必要な成分は、IscS, IscU, HscB, HscA, Fdx の 5 種類である (11)。その中でも IscU は Fe-S クラスタの新規形成部位 (クラスタ形成の足場) として、マシナリー中心的な役割を担っている (12 - 14)。すなわち IscU では、(1) IscS から硫黄原子を、IscX (または CyaY? IscA?) から鉄原子を受け取り (15 - 18)、(2) それらをクラスタの形に組み立て、場合によってクラスタのタイプを変換し (19)、(3) 不安定なクラスタ中間体を一時的に保持し、(4) 最終的に、HscA と HscB と協調してクラスタをアポ

タンパク質に渡す (20, 21)、といった一連の工程が想定されている (Figure 3)。しかし、IscU の詳細な反応機構や作動機構についてはほとんどわかっていない。近年、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* (*Aa*) のホロ型 *Aa* IscU の結晶構造が決定され (Figure 4 A)、それによるとホロ型 *Aa* IscU は非対称な三量体で、そのうち1つのプロトマーのみが3つの Cys 残基 (Cys36, Cys63, Cys107) と1つの His 残基 (His106) で [2Fe-2S] クラスタを配位結合するというユニークな構造をしている (22, 23)。*Aa* IscU の一次構造は、大腸菌 (*Ec*) IscU のものと比べて約51%の相同性があり、*Ec* IscU のアポ型の構造 (PDB code: 3LVL) と *Aa* IscU のホロ型のプロトマー構造を比較してみると、立体構造も酷似している (Figure 4 B)。*Aa* IscU の結晶構造に基づいて、*Ec* IscU のクラスタの配位子やクラスタ結合領域の近傍に部位特異的変異 (Ala 置換) を導入した実験では、クラスタの配位子あるいは Tyr3, Asp39, Lys103 をそれぞれ Ala に置換した場合に、*in vivo* 機能が失われることが示されている (馬迫卓也 修士論文 2008)。では、これらの機能残基やクラスタ配位子としては非常に稀な His105 は、Fe-S クラスタ合成においてどのような役割を果たしているのだろうか？ 本研究では、これら機能残基の役割を明らかにすることで、IscU の作動機構を解明する突破口が開けることを期待した。

しかし、従来の *in vivo* ならびに *in vitro* の解析方法では、これら機能残基の役割に迫ることは難しい。現在までに、ISC マシナリーの個々の成分の構造や機能について数多くの研究結果が報告されているが、マシナリーとしての詳細な作動機構、反応機構についてはほとんどわかっていない。その要因として、IscU などの足場タンパク質に形成される Fe-S クラスタが非常に不安定であるため、実験操作が非常に困難であることが挙げられる。加えて、*in vitro* 実験系では、鉄イオンの非特異的な結合や、Fe-S クラスタの非酵素的な形成がバックグラウンドとなるため、*in vivo* の反応を忠実に再現することが困難である。一方、*in vivo* の遺伝学的な実験では、関連遺伝子のほとんどが必須遺伝子であることから、制御可能なプロモーターを用いた発現の抑制や、大腸菌変異株における温度感受性プラスミドの入れ替えなどに、解析手段が限られていた。そのため、二次的なサプレッサー変異を同定するなどの踏み込んだ実験は困難であり、これまで詳細な研究は行われてこなかった。*in vivo* において Fe-S クラスタ生合成系の作動機構を理解するためには、より信頼性の高い遺伝学的実験系を構築する必要がある。そこで、Fe-S クラスタを生合成系できなくなると、どうして致

死になるのか考え直してみることにした。

大腸菌は120種類以上の Fe-S タンパク質を持つことが知られており、最近でも新たな Fe-S タンパク質が次々と同定されている。これら Fe-S タンパク質は多彩な生理活性をもっており、大腸菌の生育に重要だが、そのほとんどは生育に必須であるというわけではない (Figure 5)。一方、近年、大腸菌のイソプレノイド生合成経路である非メバロン酸経路 (mevalonate-independent pathway、あるいは 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) 経路) に関与する IspG と IspH が、分光学的な解析により Fe-S クラスターを持つことが示された (24, 25)。さらに、IspG と IspH の結晶構造解析により、IspG は活性中心に [3Fe-4S] または [4Fe-4S] を、IspH は [4Fe-4S] を持つことが明らかにされた (26 - 28)。MEP 経路は、7種類の酵素によりピルビン酸からイソペンテニル二リン酸 (IPP) を合成している (29, 30) (Figure 6)。IspG と IspH は最後の2つの反応を触媒する酵素で、この2種類の Fe-S 酵素は大腸菌の生育に必須である (31, 32)。一方、放線菌や多くの真核生物はイソプレノイド生合成系としてメバロン酸経路 (mevalonate pathway、あるいは MVA 経路) を利用している (33, 34)。このメバロン酸経路では、6種類の酵素群によりアセチル CoA から IPP を合成するが、Fe-S 酵素は全く関与していない。そこで、放線菌由来のメバロン酸経路の mevalonate (MVA) kinase、phosphomevalonate (PMVA) kinase、diphosphomevalonate (DPMVA) decarboxylase の3種類の遺伝子を大腸菌に導入すれば、メバロン酸経路によってイソプレノイドを合成できるようになり、Fe-S クラスター生合成系の必須性を回避できるのではないかと考え、実験系の構築を行なうことにした。

本研究では、ISC マシナリーにおける IscU の作動機構の解明を目指して、以下の研究に取り組んだ。

1. 前述のように、*Ec* IscU では Tyr3, Asp39, Lys103, His105 を Ala に置換すると IscU は機能できなくなる。そこでまず、これらの残基を Ala 以外のアミノ酸残基に置換し、その影響を大腸菌変異株の相補実験 (温度感受性プラスミドの入れ替えを利用) により評価した。その結果、Asp39, Lys103, His105 は他のアミノ酸残基とまったく互換性がないが、Tyr3 は環状構造を持つアミノ酸残基 (Phe, His, Pro, Trp) で代替できることが分かった。

2. 放線菌由来のメバロン酸経路の遺伝子群を Fe-S クラスタースynthesis系の欠損株に導入すると、培地に添加したメバロン酸に依存して生育することを見出した。生育条件や、形質転換の条件を検討し、Fe-S クラスタースynthesis系の遺伝子群を自在に操作できる新たな *in vivo* 実験系を構築した。
3. この実験系を利用して、IscU の機能不全をサプレッサー変異の二次的な変異の同定を試みた。現在までに Tyr3 を置換した変異 IscU からいくつかのサプレッサー変異を同定しており、それらの変異のほとんどが IscS (硫黄原子の供与体) に存在していることを見出した。IscS の結晶構造によると、サプレッサー変異の多くが活性中心ループ (活性残基 Cys328 を含む柔軟なループ) の近傍に位置していた。この活性中心ループは IscU へ硫黄原子を渡す際に、大きく動く必要がある。これらの知見から IscU Tyr3 の役割は、硫黄原子受け渡しの際の IscS の構造変化に関与しているという可能性が浮上した。

3. 実験材料と実験方法

部位特異的変異 *Ec iscU* プラスミドの構築

すべての部位特異的変異 *iscU* は、Inverse PCR 法により作製した。この方法では、プラスミドを鋳型として、逆向きに設定したプライマーを用いて PCR を行い、プラスミドの全周を増幅させる。具体的には、pBBR1MCS-4 ベクター（アンピシリン (Ap) 耐性遺伝子を持つ、低コピー数のプラスミド）に野生型 *Ec iscU* 遺伝子をつないだプラスミド pBBR-*iscU* を鋳型とし、片方のプライマーの 5' 末端に目的の塩基置換が入るように設計したプライマーを用いて、KOD -plus- Ver2 (TOYOBO) で Inverse PCR を行った。続いて、鋳型のプラスミドを消化する目的で、メチル化されている DNA を特異的に分解することができる制限酵素 *Dpn* I を 37°C で 2 時間作用させた。その後、T4 Polynucleotide Kinase (NIPPONGENE) と Ligase (Ligation-Convenience Kit : NIPPONGENE) を同時に作用させて (16°C, 1 時間) Self-Ligation した。Ligation 後、DH5 α に導入し、得られた形質転換体 (Ap で選択) のコロニーを液体 TB 培地で一晚培養 (37°C) した後、SV Miniprep DNA Purification System (Promega) を用いて目的のプラスミドを調製した。最後に、作製したすべてのプラスミドの *iscU* コード領域全体についてシーケンスを確認した。*iscU* に 2 つ以上の変異を導入する場合は、変異 *iscU* を持つ pBBR プラスミドを鋳型にして同様の操作を繰り返して作製した。この方法により、*Ec IscU* の機能残基に対して部位特異的変異を導入し、計 49 種類の変異 *IscU* を作製した。この実験で用いたプライマーの一覧を Table 1 に示した。

大腸菌 *iscU* 欠損株を用いた相補実験系

大腸菌は 2 種類の独立した Fe-S クラスター生合成系、ISC と SUF マシナリーをもっており、これらの二重欠失は合成致死となる。大腸菌 UT109 変異株

($\Delta iscUA-hscBA::Km^r$; $\Delta sufABCDSE::Gm^r$) (9) は、相補プラスミド pKO3-NIF (ピロリ菌の *nifSU* 遺伝子を持つ温度感受性プラスミド) により、許容温度の 30°C 以下で生育が可能である。UT109 に大腸菌の *iscA-hscBA* 遺伝子群をもつプラスミド pRK-*iscA-hscBA* (テトラサイクリン耐性遺伝子をもつ低コピー数プラスミド) を導入し、相補実験用の *Ec iscU* 欠損株とした。ここに野生型 *iscU* をコードした pBBR プラスミドを導入すると、プラスミドが置換し、ISC マシナリーの成分が揃って pKO3-NIF の非許容温度の 43°C で生育することが可能となる。しかし、相補することができない変異 *IscU* が導入された場合、43°C で生育することができず、温度感受性プラスミドの置換は起きない。この実験系を用いて、43°C の生育から変異 *IscU* の相補能を評価した (Figure 7)。

pKO3-NIF から発現する NIF マシナリーは、通常の好気条件で十分機能できないため、この相補株である UT109 pKO3-NIF の生育速度は極めて遅い。そのため通常の形質転換の方法 (CaCl₂ 法など) では、プラスミドを効率よく導入することが困難である。そこで、UT109 pKO3NIF にプラスミドを導入する場合には、効率の良いエレクトロポレーションを用いた。形質転換後、Ap を含む二枚の LB プレートに等量プレーティングし、30°C と 43°C での生育能から変異 *IscU* の相補能を検討した。また 43°C で生育する場合、再度ストリークしてシングルコロニーを複数個取り、クロラムフェニコール (Cm) に対する感受性テストを行った。Cm 感受性である場合は、Cm^r 遺伝子を持つ pKO3-NIF が置換され、変異 *iscU* プラスミドに正しく置き換わっている。つまり、変異 *IscU* が相補可能であることを意味している。

変異 *Ec IscU* タンパク質の発現量の確認

変異 *Ec IscU* タンパク質の発現量は、抗 *IscU* 抗体ウエスタンブロッティングで確認した。変異 *IscU* の中には機能不全であるものが多いため、変異 *iscU* プラスミドを持つすべての大腸菌変異株を pKO3-NIF の許容温度である 30°C で培養した。まず、Ap とテトラサイクリン (Tc) (終濃度がそれぞれ 25 µg/ml、5 µg/ml) を添加した Terrific broth (TB) 液体培地で、一晩かけて前培養した。OD₆₆₀ の濁

度を測定した後、1 ml の菌液を室温で 12000 rpm、2 min で集菌し、各ペレットに BugBuster (NOVAGEN) を (各サンプルの OD₆₆₀) × 20 μl 量入れて溶菌した。4°C、15000 rpm、20 分間遠心後、可溶性画分を SDS-PAGE (15%ゲル) で分離し、PVDF 膜 (GE Healthcare) にブロットした。その後、一次抗体 (抗 IscU 抗体を 1/10000 希釈) と二次抗体 (1/10000 希釈) を用いて反応させ、ECL Plus (GE Healthcare) により検出した。

嫌気条件下における相補実験

嫌気条件下での相補実験は、前述した相補実験と同様の大腸菌変異株を用いて行った。嫌気的な環境を作るために、BBL GasPak Anaerobic System (Becton Dickison) を使用した。このシステムは、密閉された容器内で水素ガスを発生させ、金属触媒で酸素を水に変えることで、酸素濃度が 0.2%以下の環境を作り出すことができる。また、酸素がない環境でも生育できるように、LB 培地に 0.4% グリセロールと 40 mM フマル酸ナトリウム を加えて嫌気呼吸培地で培養した。嫌気呼吸培地に各形質転換体をストリークした後、嫌気 GasPak System の容器内で、嫌気条件下、43°C で 48 時間以上培養した。嫌気条件下での相補実験も、43°C の生育能から相補能を検討した。

生育速度の測定

相補可能な変異 IscU を持つ変異株に対しては生育速度の測定を行い、倍加時間を比較して、さらに相補能を詳しく検討した。それぞれの大腸菌変異株は、LB 培地を用いて、37°C で一晩前培養した。OD₆₆₀=0.01 になるように Ap と Tc (それぞれ終濃度が 25μg/ml、5 μl/ml) を含む 5 ml の LB 培地に希釈し、L 型試験管で 37°C、60 rpm の振とう速度で培養した。培地の濁度は Bio-Photorecorder

TN1506 (ADVANTE) を用いて、15 分毎に 660 nm の濁度を測定した。測定結果から生育曲線を描き、対数増殖期 ($OD_{660} = 0.1 \sim 0.3$) での倍加時間を算出した。なお、生育測定を用いた菌体は、温度感受性 pKO3-NIF プラスミドが変異 *iscU* プラスミドと置き換わって抜け落ちていることを、Cm 感受性テストで確認したものをを用いた。

pUMV22 Sp^r プラスミドの作製

放線菌由来の 3 つのメバロン酸経路の遺伝子 MVA kinase, PMVA kinase, DPMVA decarboxylase を持つプラスミド、pUMV22 (東京大学生物生産工学研究センター、葛山智久先生からいただいたプラスミド) (35) は選択マーカーが pBBR プラスミドと同じ Ap 耐性遺伝子であったため、選択マーカーを変更する必要があった。そこで、pUMV22 の Ap 耐性遺伝子を pAPNC213 (HEF) プラスミドの Sp 耐性遺伝子と挿げ替えることにした。まず、pUMV22 を制限酵素 *Dra* I で 37°C、一晩作用させ Ap 耐性遺伝子のほぼ全長をカットした。次に、pAPNC213 (HEF) プラスミドを鋳型にして、Sp 耐性遺伝子の両端にアニールするプライマーのセット (Spc-Fw と Spc-Rv) で PCR し、Sp 耐性遺伝子断片を増幅させた。この PCR 産物と制限酵素処理した pUMV22 をライゲーションし (Ligation-Convenience Kit : NIPPONGENE を使用)、その後 DH5 α に形質転換した。Sp で選択したコロニーからプラスミドを抽出し、このプラスミドを pUMV22 Sp^r とした。

UT109 pUMV22 Sp^r 株の生育速度の測定

UT109 pUMV22 Sp^r 株は、LB 培地や Terrific broth では生育しないので、より栄養が豊富な Super broth で培養した。0.4% グルコース、40 $\mu\text{g/ml}$ スペクチノマ

イシン (Sp)、100 µg/ml メバロン酸を含む Super broth で 37°C で 48 時間かけて前培養した。各濃度のメバロン酸を含む Super broth (0.4%グルコース, 40 µg/ml Sp) 5 ml に対して、OD₆₆₀=0.01 になるように希釈し、L 型試験管で 37°C、60 rpm の振とう速度で培養した。濁度の測定方法は前述の測定機械を使って行った。

変異 *IscS* (サブレッサー変異) プラスミドの作製

Fe-S クラスター生合成系の欠損株 UT109 に放線菌由来のメバロン酸経路の遺伝子群を導入すると、培地に添加したメバロン酸に依存して生育可能になった。この大腸菌変異株を用いると、機能不全の変異 *IscU* のサブレッサー変異を単離することが可能になる。メバロン酸経路の遺伝子群を導入した大腸菌変異株 UT109 pUMV22 Sp^r に *iscU* 以外のマシナリー成分をのせたプラスミド pRK-*iscA-hscBA* をエレクトロポレーションにより導入した。続いて、前述した変異 *iscU* を持つ pBBR プラスミドを導入し、200 µM メバロン酸を含む LB プレート上、37°C でレプリカ法 (滅菌したろ紙を使用) により長期間培養した。Fe-S クラスター合成できない UT109 pUMV22 Sp^r の生育速度は非常に遅い (非常に小さいコロニーを形成するまでに 3 日以上かかる)。したがって、そこから出現するリバータントの表現型は、生育速度の違いにより容易に判断できると予想した。しばらく継代培養を続けたところ、生育速度が速い表現型のコロニーが出現したので、このコロニーをメバロン酸を添加していない LB 培地に移し、生育可能か確かめた。生育可能であれば、それは Fe-S クラスターを合成できるように変化したリバータント (おそらく変異 *IscU* の機能を二次的にサプレスする変異を持っている) であると判断した。次に、リバータントが持つ二次的な変異の位置を特定するために以下の操作を行った。二次的な変異の位置は ISC マシナリーの残りの成分、つまりプラスミド上の *iscA*, *hscB*, *hscA*、あるいはゲノム上の *iscS*, *fdx*, *iscX* のどこかにあると予想し、プラスミド上の成分とゲノム上の成分についてそれぞれ分けて調べた。プラスミド上のマシナリー成分 *iscA*, *hscB*, *hscA* については、リバータントから抽出したプラスミドを UT109 pUMV22 Sp^r に再導入する、またはプラスミド上のマシナリー成分のシーケンスを確認し

た。一方、ゲノム上のマシナリー成分 *iscS*, *fdx*, *iscX* については、*iscS* - Km^r gene - *fdx* - *iscX* の領域を、*iscS* の上流にアニールするプライマー (*Ec iscS*-120f) と *iscX* の下流にアニールするプライマー (*Ec iscX*+139r) を用いて、コロニーPCR により増幅し (TOYOBO, KOD FX Neo を使用)、増幅した PCR 産物を精製後 (VIOGENE Gel/DNA Isolation System を使用)、*iscS*, *fdx*, *iscX* のシーケンスを確認した。以上の操作をすべてのリバータントで行い、二次的な変異が起こっている位置を特定した。

変異 *IscS* (サブプレッサー変異) プラスミドの作製

変異 *IscU* のサブプレッサー変異が本当に *IscS* の変異によるものか確かめるため、変異 *iscS* をクローニングしたプラスミドを作製した。まず、リバータントのゲノム上の変異 *iscS* の上流 (SD 配列を含む) から変異 *iscS* のストップコドンまでをコロニーPCR により増幅させた (PCR に使用したプライマーの配列を Table 2 に示した)。PCR 酵素には KOD FX Neo を使用した。増幅した断片を電気泳動で流した後、ゲルから断片を抽出した (MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用)。抽出した変異 *iscS* 断片と pRK-*iscA* (*iscA* をもつ pRK プラスミド) を *Xba* I , *Sac* I で処理した後、ライゲーションし (Ligation-Convenience Kit : NIPPONGENE)、DH5 α に形質転換した。Tc で選択した形質転換体のコロニーを液体 TB 培地で一晚培養 (37°C) した後、プラスミドを調製した。野生型 *iscS* のクローニングも同様の方法で行った。

Table 1. 部位特異的変異 IscU 作製に使用したプライマーの一覧

Primer	塩基配列5' – 3' (下線部は変異部位)
IscU-Y3C_F	<u>tgc</u> agcgaaaaagttatcgaccattacg
IscU-Y3D_F	<u>gac</u> agcgaaaaagttatcgaccattacg
IscU-Y3E_F	<u>gaa</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3F_F	<u>ttc</u> agcgaaaaagttatcgaccattacg
IscU-Y3G_F	<u>ggt</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3H_F	<u>cac</u> agcgaaaaagttatcgaccattacg
IscU-Y3I_F	<u>atc</u> agcgaaaaagttatcgaccattacg
IscU-Y3K_F	<u>aaa</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3L_F	<u>ctg</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3M_F	<u>atg</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3N_F	<u>aac</u> agcgaaaaagttatcgaccattacg
IscU-Y3P_F	<u>ccg</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3Q_F	<u>cag</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3R_F	<u>cgt</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3S_F	<u>tcc</u> agcgaaaaagttatcgaccattac
IscU-Y3T_F	<u>acc</u> agcgaaaaagttatcgaccattac
IscU-Y3V_F	<u>gtg</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3W_F	<u>tgg</u> agcgaaaaagttatcgaccattacgag
IscU-Y3_R	agccatatgtatatctctctttaaagttaaac
IscU-D39C_F	<u>tgc</u> gtgatgaagttgcagattaaagtcaac
IscU-D39E_F	<u>gaa</u> gtgatgaagttgcagattaaagtcaacg
IscU-D39H_F	<u>cac</u> gtgatgaagttgcagattaaagtcaac
IscU-D39N_F	<u>aac</u> gtgatgaagttgcagattaaagtcaac
IscU-D39Q_F	<u>cag</u> gtgatgaagttgcagattaaagtcaacg
IscU-D39S_F	<u>tcc</u> gtgatgaagttgcagattaaagtcaa
IscU-D39_R	gccacagccgggtgccccca

Table 1. 部位特異的変異 IscU 作製に使用したプライマーの一覧

Primer	塩基配列5' - 3' (下線部は変異部位)
IscU-K103C_F	<u>tgc</u> attcactgttctattctggcagaagac
IscU-K103D_F	<u>gat</u> attcactgttctattctggcagaagac
IscU-K103E_F	<u>gaa</u> attcactgttctattctggcagaagac
IscU-K103H_F	<u>cat</u> attcactgttctattctggcagaagac
IscU-K103M_F	<u>atg</u> attcactgttctattctggcagaagac
IscU-K103Q_F	<u>caa</u> attcactgttctattctggcagaagac
IscU-K103R_F	<u>cgt</u> attcactgttctattctggcagaagac
IscU-H105C_F	<u>tgc</u> tgttctattctggcagaagacgc
IscU-H105D_F	<u>gat</u> tgttctattctggcagaagacgcga
IscU-H105E_F	<u>gaa</u> tgttctattctggcagaagacgcga
IscU-H105K_F	<u>aaa</u> tgttctattctggcagaagacgcga
IscU-H105M_F	<u>atg</u> tgttctattctggcagaagacgcga
IscU-H105N_F	<u>aa</u> ctgttctattctggcagaagacgc
IscU-H105Q_F	<u>cag</u> tgttctattctggcagaagacgcga
IscU-H105R_F	<u>cgc</u> tgttctattctggcagaagacgc
IscU-H105S_F	<u>tct</u> tgttctattctggcagaagacgc
IscU-H105Y_F	<u>tac</u> tgttctattctggcagaagacgc
IscU-H105_R	aatttcaccggcgagtcag
C36H_Fw	<u>cat</u> ggcgacgtgatgaagttgcag
C36_Rv	ggccggtgccccaccat
C63H_Fw	<u>cac</u> ggtccgctatcgctccag
C63_Rv	gccgtaagtttaaacgcgcgc
H105C+C106H_Fw	<u>tgc</u> cattctattctggcagaagacgcg

特異的変異導入部位は、forward プライマーの5' 末端に設計し、reverse プライマーは鋳型と完全に相補性のある配列とした。Tm 値は “ $T_m = 81.5 + 0.41 \times GC\% - 675 / \text{length} - 100 \times \text{mismatch} / \text{length}$ ” で計算した。

Table 2. 本研究で使用したプライマー

Primer	塩基配列5' – 3' (下線部は制限酵素サイト)
<i>Xba</i> I <i>iscS</i> _Fw	CTG <u>TCTAGAG</u> TACATCCAGCCGGTAGCC
<i>Sac</i> I <i>iscS</i> _Rv 2	GGT <u>GAGCTCT</u> TAATGATGAGCCCATTGATG
<i>Ec iscS</i> -120f	CGCGCTTAATAAAAAAGAATTCAG
<i>Ec iscX</i> +139r	AGCCCCAGGATTTTTCCGCT
Spc-Fw	GGGCAGTGAGCGCAACGC
Spc-Rv	GCCTAATTGAGAGAAGTTTCTA

4. 結果

Ec IscU の機能残基、Tyr3, Asp39, Lys103 に対する変異の導入

Ec IscU の Tyr3, Asp39, Lys103 は、すべての *IscU* の一次構造において厳格に保存されており、*Aa IscU* の結晶構造に対応させると、クラスター配位子 (Cys37, Cys63, His105, Cys106)、すなわち Fe-S クラスターの近傍に位置している。これらの残基を Ala に置換すると、*Ec IscU* の *in vivo* 機能が損なわれることが示されているが、その理由は不明である。そこで、Tyr3, Asp39, Lys103 の具体的な役割に迫るために、これらを Ala 以外のアミノ酸に置換して、その影響を *iscU* 欠損株 (pRK-*iscA-hscBA* と pKO3-NIF プラスミドを持つ UT109 株) を用いた相補実験系で評価した。この実験系では、温度感受性の相補プラスミド (pKO3-NIF) の非許容温度で形質転換体が生育できるかどうか、プラスミドが置換されるかどうかで、相補能を調べることができる。Asp39 と Lys103 に関しては、Fe 原子や S 原子と相互作用可能なアミノ酸や、もとの残基と化学的、構造的に似ているアミノ酸に置換し、Tyr3 については、Ala を除くすべてのアミノ酸 (18 種類) に置換した。

Asp39 を 6 種類のアミノ酸、Lys103 を 9 種類のアミノ酸に置換した場合には、どの変異 *IscU* も相補することができなかった。一方、Tyr3 の場合には、Cys, Asp, Glu, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val に置換した変異 *IscU* は相補することができなかったが、Phe, His, Pro, Trp に置換した場合は、43°C でゆっくりではあるが生育し、相補できることが判明した (Figure 8 A)。相補実験の一覧は Table 3 に記載した。また、30°C (pKO3-NIF の許容温度) で培養し、*IscU* の発現量をウエスタンブロットにより調べたところ、変異の種類によってタンパク量の増減が見られたものの、すべての変異 *IscU* でバンドが認められ、その量は大腸菌の野生株での発現量以上であった (Figure 8 B)。データには載せていないが、大腸菌野生株での *IscU* の発現量は、プラスミドから発現させた *IscU* の量と比べて 1/10 程度である。したがって、これらの変異は *IscU* の安定性や発現量より、むしろ、機能に関係していると考えられる。

大腸菌の Fe-S クラスター生合成系に変異を導入した場合、大腸菌の生育能と

Fe-S クラスター合成能には相関のあることが知られている (10, 11)。そこで、相補可能な変異 IscU (Tyr3Phe, His, Pro, Trp) について、液体 LB 培地、37°C で培養し、生育をモニターした (Figure 8 C)。対数増殖期 ($OD_{660} = 0.1 \sim 0.3$) での倍加時間をそれぞれ算出したところ、野生型 IscU の場合では倍加時間 (25.8 ± 2.2 min)、Tyr3Trp と Tyr3Pro の場合は、それぞれ 47.1 ± 5.5 min と 48.9 ± 7.4 min であった。また、Tyr3His と Tyr3Phe の場合には、それぞれ 58.4 ± 7.2 min と 70.6 ± 8.1 min となった。したがって、Tyr3Phe, His, Pro, Trp による相補は部分的であり、これらの変異を導入した IscU の機能は完全ではないといえる。Tyr と Phe, His, Pro, Trp の共通点は、側鎖に環状構造を持つことであり、Tyr3 の位置には環状構造が必須と考えられる。後で詳しく考察するが、相補能 (Fe-S 合成能) の差はこれら側鎖の構造の違いによるものであろう。以上の結果から、Tyr3 は Phe, His, Pro, Trp と部分的に代替可能であり、Tyr3 の位置には側鎖の環状構造が必須であること、一方 Asp39 と Lys103 は他のアミノ酸では代替できないことが判明した。

Fe-S クラスターの配位子に対する変異の導入

ホロ型 *Aa* IscU の結晶構造によると、三量体のうち 1 つのプロトマーのみが [2Fe-2S] クラスターを持ち、そこでは 3 つの Cys 残基と 1 つの His 残基が [2Fe-2S] クラスターを配位している (Figure 4 A)。これらの配位子に対応する *Ec* IscU の残基 (Cys37, Cys63, His105, Cys106) をそれぞれ Ala あるいは Ser に置換すると *in vivo* 機能を失うことから、4 つの配位子のすべてが必須であることが示されている。そこで本研究では、まずクラスター配位子としては稀な His105 に対して Ala 以外のアミノ酸に置換する変異を導入し、その影響を相補実験系で調べた。その結果、Cys, Asp, Glu, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Tyr に置換した変異 IscU の全てで相補能が認められず、機能不全となることが判明した (Figure 8 A, Table 3)。Cys は一般的な Fe-S クラスターの配位子だが、His105Cys 変異により、4 つの配位子をすべて Cys にした場合も機能できなかった。次に、クラスター配位子の組み合わせを変える、あるいは His の配置を入れ替えるといった変異を IscU の 4 残基 (Cys37, Cys63, His105, Cys106) に導入したが、どの変異 IscU も相補能

を喪失し、機能不全となった (Table 3)。これらの変異 IscU についても、ウエスタンブロットにより、発現量が十分であることを確認している。これらの結果は、ひとつの His を含む 4 配位子の空間的な配置が重要であることを示している。

嫌気条件下における部位特異的変異の影響

IscU に形成される Fe-S クラスタは、酸素に対して非常に不安定であることが知られている。そこで、通常の好氣的条件下では機能できなかった上記の変異 IscU は、嫌氣的な環境であれば機能できるのではないかと期待して、嫌気条件下で同様の相補実験を行った。嫌気 GasPak System によって酸素を除去し、43°C での生育から相補能を検討したところ、Asp39 や 4 残基の配位子に対して変異を導入した場合には、好氣的/嫌氣的に関わらず、全く相補することができなかった。好気条件下で相補可能であった Tyr3Phe, Tyr3His, Tyr3Pro, Tyr3Trp は、嫌気条件下でも相補可能であった。一方、興味深いことに、Tyr3 を Asn, Leu, Ile, Met, Arg に置換した変異 IscU と、Lys103 を His または Arg に置換した変異 IscU は、嫌気条件下でのみ相補可能であった (Figure 9)。この結果は好気/嫌気条件下で *Ec* IscU の機能性が若干異なるということを示している。

放線菌のイソプレノイド生合成系を利用した、新たな *in vivo* 実験系の構築

Fe-S クラスタ生合成系の解析においては、*in vitro* の実験では Fe-S クラスタの非酵素的な形成がバックグラウンドとなるため、*in vivo* の反応を忠実に再現することが困難である。一方、*in vivo* の実験では、クラスタ形成関連遺伝子が生育に必須なので、サプレッサー変異の検出といった踏み込んだ解析は困難だった。本研究では、異種生物のイソプレノイド生合成系 (メバロン酸経路) の遺伝子群を導入することにより、大腸菌の Fe-S クラスタ生合成系の必須性

を回避できるのではないかと考え、新たな *in vivo* 実験系を構築することを計画した。具体的には大腸菌 Fe-S クラスター合成系の欠損株 UT109 ($\Delta iscUA-hscBA::Km^r$; $\Delta sufABCDSE::Gm^r$) に放線菌由来のメバロン酸経路の MVA kinase, PMVA kinase, DPMVA decarboxylase をコードする 3 つの遺伝子を導入し、培地に添加したメバロン酸からイソプレノイドを合成できるような大腸菌変異株を構築することにした。放線菌由来の 3 種類の遺伝子は、コピー数の異なる 2 種類のプラスミドの、いずれも Plac 下流にクローン化したものを用いた。pUMV22 Sp^r (数百コピー) は、pUMV22 (35) の Ap 耐性遺伝子を Sp 耐性遺伝子 (pAPNC213 (HEF) 由来) に挿げ替えたプラスミドで、pUC の複製起点を持つ。pMMV22 (~5 コピー) (36) は、pSC101 の複製起点を持つプラスミドである。

これらのプラスミドを温度感受性の相補プラスミド pKO3-NIF を持つ大腸菌 UT109 株に導入し、メバロン酸 (D-mevalonate) と 0.4% グルコースを添加した LB 寒天培地にプレーティングし、43°C で培養した。Fe-S クラスター合成系を欠損すると、多数の Fe-S タンパク質が関与する TCA 回路や呼吸鎖電子伝達系がほぼ完全に機能できなくなり、細胞内の ATP 供給量が著しく減少することが予想されるため、培地にグルコースを添加し、解糖系で ATP を合成できるようにした。その結果、コピー数の多い pUMV22 Sp^r を導入した場合のみ、メバロン酸を添加した培地で、非常に小さいながらコロニーが出現した (Figure 10 A)。得られた形質転換体を同じ組成の寒天培地にストリークして 37°C で培養したところ、72 時間以上経って非常に小さいコロニーが現れた。いくつかのコロニーを任意に選択し、Cm 感受性を調べたところ、すべて Cm に感受性であり、Cm^r マーカーを持つ相補プラスミド pKO3-NIF は欠落していると判断した。この点は、次のコロニー PCR によっても確認した。pKO3-NIF 上の *nifS* の後半側の配列を増幅させるコロニー PCR (TOYOBO, Blend taq を使用) では、産物が増幅されなかった (Figure 10 B)。これらの結果から、pUMV22 Sp^r を持つ UT109 株は、Fe-S クラスターを全く合成することなく、生育していると考えられる。すなわち、UT109 株では非メバロン酸経路からイソプレノイドを合成することができないが、新たに導入したメバロン酸経路の遺伝子群を利用して、培地に添加したメバロン酸からイソプレノイドを合成できるようになったことにより、致死性を回避できたと考えられる。ただし、その表現型はコロニーが十分目に見える大きさになるまで 3 日以上を要すように、非常に生育が遅い。

得られた形質転換体を液体培地に移して培養しようとする、この変異株は LB 培地や Terrific broth などの富栄養培地を用いても生育できなかった。そこで、より栄養が豊富な Super broth を試したところ、メバロン酸の添加に依存して生育することを見出した。Super broth は、トリプトンの含有量が LB や Terrific broth よりも多いという特徴がある。Fe-S タンパク質の中には、アミノ酸合成に関与するタンパク質がいくつか知られており（たとえば、イソロイシンとバリンの生合成経路には *IlvD*、ロイシンの生合成経路には *LeuC*、システインの生合成経路には *CysI*、グルタミン酸の生合成には *GltD*）、また TCA 回路は一部のアミノ酸（アスパラギン酸やグルタミン酸など）の合成にも関与している。そのため、Fe-S クラスターが合成できない株ではいくつかのアミノ酸が不足するが、Super broth ではこれらのアミノ酸を補うことで、生育が可能になっていると考えられる。グルコースを加えた Super broth に、メバロン酸をさまざまな濃度で添加して生育を調べると、この変異株はメバロン酸の濃度に依存して生育した（Figure 11）。また、200 μ M で生育は頭打ちになり、それ以上の濃度では生育に差は見られなかった。

液体培養が可能になったので、次に、形質転換について検討した。pUMV22 Sp^r を持つ UT109 株に、エレクトロポレーションにより、*isc* オペロン (*iscSUA-hscBA-fdx-iscX*) をクローン化したプラスミド pRK-ISC を導入し、メバロン酸の添加した培地と添加していない培地で培養した。その結果、メバロン酸を添加していない培地では、空ベクターを導入するとコロニーが全く現れないが、pRK-ISC を導入すると形質転換体がコロニーを形成した（Figure 12）。また、そのコロニーは野生株と同程度に生育したことから、Fe-S クラスターの生合成能が大腸菌野生株並みに回復していることが分かった。

以上の結果を整理すると、Fe-S クラスター生合成系の変異株に、放線菌由来のメバロン酸経路の遺伝子群を導入することで、培地に添加したメバロン酸からイソプレノイドを合成することが可能になり、致死性を回避することができた（Figure 13）。大腸菌では、TCA 回路や呼吸鎖電子伝達系、MEP 経路などに、多くの Fe-S 酵素が関与しているが、変異株ではイソプレノイドが合成できなくなるために、致死性を示す。すなわち、大腸菌 Fe-S タンパク質の中で、生育に必須なのは *IspG* と *IspH* だけと考えられる。本研究によって、pUMV22 Sp^r プラスミドを持つ UT109 株のように、Fe-S クラスター生合成系の遺伝子を完全に欠

失させた状態を作り出すことができた（ただし、生育は著しく遅い）。したがって、この株を用いることで、Fe-S クラスター生合成系のあらゆる遺伝子群を自在に操作し、解析することが可能になると考えられる。

変異 IscU をサプレッサーする二次的な変異の解析

前述のように、IscU の Tyr3, Asp39, Lys103 および Fe-S クラスターの配位子 (Cys37, Cys63, His105, Cys106) は、Ala に置換すると機能不全となる。また、これらの残基を別のアミノ酸に置換した場合も、ほとんどの場合で IscU は機能できない。そこで、これら IscU 変異のサプレッサーを単離・同定することで、機能残基の役割に迫ることができないかと考えた。

メバロン酸経路の遺伝子群を導入した UT109 株 ($\Delta iscUA-hscBA::Km^r$; $\Delta sufABCDE::Gm^r$) pUMV22 Sp^r に、*iscU* 以外の ISC マシナリーの成分を含むプラスミド pRK-*iscA-hscBA* をエレクトロポレーションにより導入し、メバロン酸と Tc を含む LB 培地で選択した。この形質転換体に野生型の *iscU* を pBBR ベクターにつないで導入すると、生育はメバロン酸に依存せず、大腸菌野生株並みに回復した。一方、機能不全となった変異 *iscU* を導入した場合には、メバロン酸を含む培地でのみ生育し、その生育は非常に遅かった。そこでこの変異株を、メバロン酸を含む LB 培地にレプリカ法（滅菌したろ紙を使用）で植え継ぎ、長期間培養を続けた。すると、非常に小さいコロニーの中に、大きなコロニーがいくつか出現した (Figure 14)。これらをメバロン酸を含まない培地にストリークしたところ生育が確認できたので、出現した大きいコロニーは Fe-S クラスター合成能を回復させたリバータントであると判断した。この方法で現在までに、Tyr3 を Gly, Leu, Met, Gln, Arg, Val に、Lys103 を Arg に変異させた変異 IscU からそれぞれリバータント得ることができた。

リバータントにおいてサプレッサー変異が生じた部位として、まずは、ISC マシナリーをコードする遺伝子 (*iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA*, *fdx*, *iscX*) にあるのではないかと予想した。そのうち 4 種類の遺伝子はプラスミド上に存在するので、

各リバータントからプラスミドを調製し（この場合 pRK-*iscA-hscBA* と変異を導入した pBBR-*iscU* が混在している）、pUMV22 Sp^r を持つ UT109 株に再導入したところ、形質転換体の生育はすべてメバロン酸に依存していた。また、調製したプラスミド中の pBBR 上の *iscU* 遺伝子のシーケンスを確認したところ、もとの変異はそのままであり、*iscU* のコード域にはそれ以外の変異は見られなかった。したがって、サプレッサー変異は2種類のプラスミドにはないと判断し、次に、ゲノム上の *iscS*, *fdx*, *iscX* の変異を予想した。リバータントゲノム上の *iscS* - Km^r gene- *fdx* - *iscX* の領域を、*iscS* の上流にアニールするプライマーと *iscX* の下流にアニールするプライマーを用いて、コロニーPCRにより増幅し（TOYOBO, KOD FX Neo を使用）、増幅した PCR 産物を精製後（VIOGENE Gel/DNA Isolation System を使用）、*iscS*, *fdx*, *iscX* のシーケンスを確認した。その結果、IscU の Tyr3 Leu, Met, Gln, Arg, Val 変異、あるいは Lys103Arg 変異を持つ株から生じたリバータントについては、*fdx*, *iscX* 内に変異は存在しなかったが、*iscS* のコード域で次のような変異が見つかった。IscU Tyr3Leu あるいは Met のリバータントでは IscS の Ala349 が Val に変異していた。また、IscU Tyr3Arg のリバータントでは IscS の Arg39 が Leu に、IscU Tyr3Gln のリバータントでは IscS の Leu339 が Met に、IscU Tyr3Val のリバータントでは IscS の Asp79 と Asn306 がそれぞれ Glu と Lys に変異していた。また、IscU Lys103Arg のリバータントでは IscS の Leu317 が Met に変異していた。一方、Tyr3Gly からのリバータントでは、*iscS*, *fdx*, *iscX* 内に変異は存在しなかった。

変異 IscU の機能不全は IscS の変異によりサプレスされる

Tyr3 を置換した変異 IscU の機能をサプレスする原因が、本当に IscS の変異（Arg39Leu, Asp79Glu+Asn306Lys, Leu339Met, Ala349Val）なのか、あるいは他に原因があるのか調べる目的で、IscS の変異株を利用して、新たに相補実験系を構築することにした。UT109 株はゲノム上に野生型の *iscS* が残っているため、変異の入った IscS による相補実験には好ましくない。今回は、ゲノム上の *iscSUA* を欠失させた大腸菌変異株 YT2281 株 (Δ *iscSUA*::Km^r; Δ *sufABCDSE*::Gm^r) (9)

を改変し、相補実験に用いることにした。

まず、相補プラスミド pRK-*sufABCDSE* を持つ YT2281 株に pKO3-NIF (ピロリ菌の Fe-S クラスター生合成系 *nifSU* をコードした温度感受性プラスミド) を CaCl₂ 法で導入し、Cm を含む LB 寒天培地で、30°C 培養した。得られた形質転換体を同じ培地にストリークし、30°C で培養した後、Cm 耐性かつ、Tc 感受性の株を選択した。この株が 43°C では生育できないことから、pRK-*sufABCDSE* (Tc 耐性) が欠落し、pKO3-NIF に置換していることを確認した。この大腸菌変異株は、30°C では温度感受性相補プラスミドにより Fe-S クラスターを合成して生育するが、非許容温度の 43°C では、クラスターを合成できず致死性を示す。この大腸菌変異株に pRK-*iscSUA* を導入したところ、不足していた ISC マシナリーの成分が全部揃い、pKO3-NIF の非許容温度 43°C でも野生型並みの生育速度で生育することを確認した。この大腸菌変異株、YT2281 (Δ *iscSUA*::Km^r; Δ *sufABCDSE*::Gm^r) pKO3-NIF を IscS の相補実験系として使用していくことにした (Figure 15)。一方、YT2281 株に前述のメバロン酸経路のプラスミド pUMV22 Sp^r を導入することも検討したが、pKO3-NIF と pUMV22 Sp^r が置換した株が得られなかったため断念した。この理由は不明である。

野生型、あるいは上記の変異型 *iscS* 遺伝子を *iscA* とともに pRK プラスミドにクローン化し、これと野生型、あるいは変異 *iscU* を持つ pBBR プラスミドとともに YT2281 pKO3-NIF 株に導入し、30°C と 43°C の生育から相補能を評価した。野生型の *iscS* と変異 *iscU* (IscU Tyr3Leu, Tyr3Met, Tyr3Gln, Tyr3Arg, Tyr3Val) の組み合わせで導入すると、pKO3-NIF の非許容温度 43°C では生育せず、上述のように IscU は機能不全の状態であった。一方、リバータントで見られた変異 *iscS* と変異 *iscU* の組み合わせで導入すると、43°C で生育できること (Figure 16, 結果は一部しか載せていない)、さらに、Cm 感受性試験から pKO3-NIF が欠落していることを確認した。つまり、IscU Tyr3Leu と IscU Tyr3Met のサプレッサー変異は IscS Ala349Val であり、IscU Tyr3Gln のサプレッサー変異は IscS Leu339Met、IscU Tyr3Arg のサプレッサー変異は IscS Arg39Leu、IscU Tyr3Val のサプレッサー変異は IscS Asp79Glu+Asn306Lys であり、他の原因ではないことを確認することができた。

5. 考察

本研究では、大腸菌のイソプレノイド生合成系を改変することにより、大腸菌の Fe-S クラスター生合成系の必須性を回避できることを見出した。また、この改変大腸菌を利用して Fe-S クラスター生合成系を解析するための新たな *in vivo* 実験系を構築した。この実験系を用いることで、Fe-S クラスター生合成系のあらゆる遺伝子群を自在に操作し、その影響について、信頼性高く調べることが初めて可能になった。真核生物では Fe-S タンパク質がタンパク質の翻訳や DNA の複製にまで関与しているため (37 - 42)、クラスター生合成系の必須性を何らかの方法で回避することは極めて難しい。一方、大腸菌のようにイソプレノイドの生合成系として非メバロン酸経路を持つバクテリアであれば、同様の実験系が構築可能と考えられるが、当研究室の実験によると、非メバロン酸経路を持つ枯草菌に放線菌由来のメバロン酸経路の遺伝子群を導入しても、クラスター合成系の遺伝子を破壊することができなかった (原因は不明)。したがって、本研究で構築した大腸菌変異株は、現在、Fe-S クラスター生合成系の遺伝子を自在に操作できる唯一の生物といえる。

YT2281 株 ($\Delta iscSUA::Km^r$; $\Delta sufABCDSE::Gm^r$) pKO3-NIF では、メバロン酸経路のプラスミド pUMV22 Sp^rを導入しても pKO3-NIF を保持し続け、pUMV22 Sp^rと置換した株が得られなかった。この原因は不明だが、UT109 株 ($\Delta iscUA-hscBA::Km^r$; $\Delta sufABCDSE::Gm^r$) pKO3-NIF ではプラスミドの置換が可能なので、おそらく YT2281 株のゲノム上から *iscS* が欠失していることが原因ではないかと考えられる。IscS は、Fe-S クラスター合成系だけでなく、チアミンやリポ酸の合成、tRNA の塩基修飾においても硫黄原子の供与体として機能し、さらにセレノシステインの代謝にも関与することが知られている (43)。また、*iscS* を破壊すると、他の *isc* 遺伝子を破壊した場合 (例えば $\Delta iscU$) に比べて、より重篤な生育阻害を示すことが観察されている。UT109 pUMV22 Sp^r 株の生育が (ゲノム上に *iscS* を持つ場合でも)、コロニーの形成に 3 日以上かかるほど遅いことを考えると、*iscS* を持たない YT2281 株では、より一層生育が遅くなり、通常の実験室レベルでは生育が見られなくなる可能性がある。

今回の研究では、*Ec* IscU の機能残基である Tyr3, Asp39, Lys103, His105 が、具体的にどのような役割を果たしているのか、その手がかりを得る目的で、IscU の変異をサプレッサー変異の二次的な変異の検出を行った。Tyr3 を置換した変異 IscU からはリバータントが生じ、これらのリバータントでは *iscS* 内に変異が生じていることを見出した。さらに相補実験によって、変異 IscS が変異 IscU (Tyr3) のサプレッサー変異であること (他の原因ではないこと) を実験的に証明した。

IscS は基質 L-システインから硫黄原子を引き抜くシステインデスルフラゼーゼとして機能する。具体的には、IscS 分子内でコファクターであるピリドキサルリン酸 (PLP) と基質 L-システインとが Schiff 塩基を形成した後、活性中心 Cys328 の求核攻撃で基質の S⁰ が引き抜かれ、Cys328 にシステインペルスルフィド (-SSH) が形成する。この硫黄原子はその後、Cys328 から IscU などに、特異的なタンパク質-タンパク質相互作用で渡される (44)。大腸菌 IscS (*Ec* IscS) の結晶構造 (PDB code: 1p3w) (Figure 17 A) によると、*Ec* IscS はホモ二量体であり、PLP は二量体の会合面で分子内部に埋もれている (45)。活性中心の Cys328 は、これを含めて 6 残基ほどディスオーダーしており、結晶構造では見えていない。おそらく柔軟性の高いループと考えられている。さらに、最近では大腸菌 IscS-IscU 複合体の結晶構造が報告されている。この複合体は IscS 二量体に 2 分子のアポ型 IscU が結合したヘテロテトラマーで、IscU は IscS の C 末端側に結合している (Figure 19)。この構造でも IscS の活性中心ループはディスオーダーしているが、IscS Cys328 から硫黄原子を受け取る IscU の Cys63 は、IscS との会合面の近くで、分子表面に露出している。硫黄原子の受け渡しに際しては、IscS の活性残基 Cys328 が、PLP の近傍から、IscU の Cys63 まで大きく (30 Å 以上) 動く必要があり、この残基を含むループ全体が構造変化を起こすと予想されている。今回、IscS 内に同定したサプレッサー変異の多くは、この柔軟な活性中心ループの近傍に同定することができた (Figure 17 B, 18)。またホモログの一次構造を比較すると、いずれの変異個所も保存性は高いが、すべての IscS 配列で保存されているわけではなかった (Figure 20)。

IscU の Tyr3 を別のアミノ酸に置換すると機能不全になるが、IscS 分子内の変異でサプレッサーできるということは、IscU の Tyr3 が IscS との相互作用 (硫黄原子の授受) において重要な役割を果たしていることを示している。では、どのような相互作用で、サプレッサー変異は相互作用にどのように影響しているのだ

ろうか？ 本研究で得られた知見に基づいて、いくつかの可能性を考えてみる。

1. IscU の Tyr3 は、Phe, His, Pro, Trp と部分的にはあるが、代替可能であった。したがって、Tyr3 の位置には側鎖の環状構造が重要と考えられる。一方、IscS-IscU 複合体の結晶構造では、IscU の Tyr3 は Lys103 とともに IscS の Glu311 と水素結合を形成しており、IscS-IscU 間の相互作用に寄与している。この水素結合は Phe, Pro では形成されないので、Tyr3 の役割がこの水素結合だけとは考えにくい (46)。
2. 嫌気的な条件では、Tyr3 を Asn, Leu, Ile, Met, Arg に置換した変異 IscU も機能することができた。その理由については、(1) 酸素に不安定な Fe-S クラスターの新規形成段階あるいはその後の移行段階において、Tyr3 が何らかの形で関与するため、好気/嫌気条件下で IscU の機能性が異なるという可能性がある。一方、(2) 嫌気的な条件では Fe-S クラスターが安定で壊れにくいため、細胞内でのクラスター要求量が少なくなり、IscU としての機能がわずかでも残っていればこと足りるという可能性もある。
3. IscS に生じたサプレッサー変異の内、Leu339Met と Ala349Val は、ディスオーダーした活性中心ループ近くの分子内部で、2本の α -ヘリックスに位置している (Figure 18)。興味深いことに、Leu339 の側鎖と Ala349 の側鎖は疎水結合を形成して、ヘリックスバンドルの安定化に寄与している。Leu339Met と Ala349Val の変異では、それぞれの側鎖の疎水的な性質は保たれているが、大きさが増加しているため、ヘリックスバンドルが不安定になる可能性がある。
4. サプレッサー変異のうち Arg39Leu は、IscS の二量体構造で他方のプロトマーの活性中心ループの近傍に位置しており、Arg39 はこのループの付け根にあたる Ser326 の側鎖の-OH 基と水素結合を形成している (Figure 18)。Arg39 が Leu に変化すると Ser326 と水素結合できなくなり、活性中心ループの構造変化に影響する可能性がある。
5. Asp79 は活性中心ループとは離れて位置しているが、IscS のコファクターである PLP に近接 (3.87 Å) している (Figure 18)。これが Glu に置換すると、基質 (L-システイン) の結合や反応性に影響する可能性がある。ただし、Asp79Glu 変異は Asn306Lys 変異と同時に (すなわち同じ *iscS* 遺伝子内に) 生じた変異であるため、今後、どちらか一方の変異だけでサプレッサーすることができるか検討

する必要がある。

ここに挙げた可能性の全てを統一して反応機構を推定するのは難しいが、注目すべきは、IscS の活性残基 Cys328 を含むループの構造変化である。この構造変化は IscS から IscU への硫黄原子の授受に必要であることと、サプレッサー変異の多く (Leu339Met、Ala349Val、Arg39Leu) がこのループの近傍に位置しており、変異前は IscS の分子内構造安定化に寄与していることを考え合わせると、これらの変異によって活性中心ループの構造が動きやすく変化していると考えられる。仮にそうだとすると、IscU の Tyr3 は、IscS の活性中心ループの大きな構造変化を誘起する分子スイッチとしての役割を担っている可能性がある。複合体の結晶構造では、IscU の Tyr3 と Tyr11 の間に IscS の Met313 が挟まれた形で相互作用をしている (46)。Tyr3 の機能が Phe, His, Pro, Trp で部分的に代替できるということは、疎水的相互作用あるいは π - π スタッキングが引き金になって IscS の活性中心ループの構造変化を引き起こすのかもしれない。

本研究では結晶構造で捉えられない、一過性のデリケートな分子間相互作用に迫ることができたと考えられる。分子機構の詳細については、今後、変異 IscS の生化学的な性質や構造を調べる必要がある。また、IscU の Tyr3 については全てのアミノ酸に置換したプラスミドを作成しているので、今回同定した IscS の 4 種類のサプレッサー変異と組み合わせて相補実験を行えば、より多くの手がかりが得られると期待している。

本研究では、IscU の Lys103 についても、*in vivo* 機能における重要性を示すことができたが、この残基も Tyr3 と同様に、必須というわけではない。Lys103 を His または Arg に置換した変異 IscU は、嫌気条件下では相補可能なので、ある程度は機能することができると考えられる。Lys103 は、HscA (ISC マシナリーの成分で、IscU に特異的に結合する Hsp70 タイプの分子シャペロン) が結合する LPPVK モチーフに存在しており、当初は、IscU-HscA 間の相互作用に関与すると予想していたが、以下の 2 点からその可能性は低いと考えられる。

1. *in vitro* における IscU-HscA 間の相互作用の解析では、LPPVK モチーフのそれぞれの残基を Ala に置換すると、最も親和性が低下するのは Pro101Ala 変異で、Lys103Ala 変異はあまり影響しないことが報告されている (47 - 49)。一方、本研究ならびに当研究室の実験では、*in vivo* 機能に影響があるのは Lys103Ala の変異で、Pro101Ala 変異は全く影響しないという、逆の結果が得られている。IscU

Lys103 の重要性については HscA の結合以外の要因を考える必要がある。

2. 本研究では、IscU の Lys103Arg 変異から生じたリバータントで、IscS の Leu317 が Met に変異していることを見出した。また、プルダウンアッセイによる相互作用解析では、IscU の Lys103Glu 変異タンパク質は、IscS との親和性が低下することが報告されている (46)。これらを総合すると、IscU の Lys103 は (Tyr3 と同様に) IscS との相互作用で重要な役割を担っている可能性が考えられる。ただし、IscS の Leu317Met 変異と IscU の Lys103Arg 変異を組み合わせた相補実験は、時間の関係でまだ行っていないため、まずこの点を確認する必要がある。

IscU の Asp39 ならびに His105 は、本研究で調べた限り、他のアミノ酸に置換することができなかった。ホロ型 *Aa* IscU の結晶構造によると、対応する His106 は [2Fe-2S] クラスターの配位子のひとつである。しかし、*Ec* IscU の His105 は、一般的な配位子である Cys に置換しても機能不全となり、また、Cys と His の位置を入れ替えることもできなかった。これまで、リバータントも得られていない。したがって、IscU の機能においては、この部位に His が位置することが必要不可欠と考えられる。結晶構造では、[2Fe-2S] クラスターに配位した His106 のイミダゾール環の一部が溶媒に露出しており、このプロトネーションがクラスターの安定性/不安定性に関連するのかもしれない。

Ec IscU の Asp39 もすべての IscU で保存されており、興味深いことに、これを Ala に置換するとクラスターの安定性がやや向上することが知られている (50)。*Aa* IscU の結晶構造でも Asp38 が Ala に置換されており、この Ala の側鎖は [2Fe-2S] クラスターに近接 (4.38 Å) している。Asp だと、そのカルボキシ基がクラスターと直接相互作用できる距離である。*Ec* IscU の Asp39 は、Asn や Glu をはじめ、Cys, His, Ser, Gln で置換すると機能不全になり、また、これまで、リバータントも得られていない。おそらく Asp39 も、His105 と同じように、この部位にこの残基が位置することが必要不可欠と考えられる。クラスターの安定性/不安定性を微妙にコントロールすることで、アポタンパク質へのクラスター移行を促進するという役割が考えられる。

本研究では、IscU の一次構造で厳格に保存されている Tyr3, Asp39, Lys103, His105 の役割に着目し、大腸菌変異株を用いた遺伝学的な解析から、いくつかの新しい知見を得ることができた。しかしながら、IscU ならびに ISC マシナリ

一の作動機構を理解するには、さらなる研究が必要である。変異を導入した IscU がどうして機能不全になるのか、Tyr3 の変異が IscS の変異によってサプレスされるのはどうしてなのか、今後は、変異 IscU タンパク質の性質（Fe-S クラスターの保持能力や安定性、オリゴマー状態など）や、変異 IscU と他のタンパク質との相互作用について、*in vitro* で解析することを計画している。

6. 参考文献

1. Beinert H, Holm RH, Münck E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science*. **277** (5326), 653-659.
2. Kiley, P. J. & Beinert, H. (2003). The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 181-185.
3. Jacobson MR, Cash VL, Weiss MC, Laird NF, Newton WE, Dean DR. Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. (1989). *Mol Gen Genet.* **219** (1-2), 49-57.
4. Zheng L, Cash VL, Flint DH, Dean DR. (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem.* **273**(21), 13264-13272.
5. Takahashi Y, Tokumoto U. (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem.* **277** (32), 28380-28383.
6. Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW. (2008). Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **72** (1), 110-125.
7. Py B, Barras F. (2010). Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nat Rev Microbiol.* (6), 436-446.
8. Roland Lill (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature.* **460** (7257), 831-838.
9. Tokumoto U, Kitamura S, Fukuyama K, Takahashi Y. (2004). 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), 199-209.

10. Takahashi Y, Nakamura M. (1999). Functional assignment of the ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem.* 126(5), 917-926.
11. Tokumoto U, Takahashi Y. (2001). Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J. Biochem.* **130** (1), 63-71.
12. Agar JN, Krebs C, Frazzon J, Huynh BH, Dean DR, Johnson MK. (2000). IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry.* **39** (27), 7856-7862.
13. Wu G, Mansy SS, Wu Sp SP, Surerus KK, Foster MW, Cowan JA. (2002). Characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein (ISU1) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry.* **41** (15), 5024-5032.
14. Yoon T, Cowan JA. (2003). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc.* **125** (20), 6078-6084.
15. Shimomura Y, Takahashi Y, Kakuta Y, Fukuyama K. (2005). Crystal structure of *Escherichia coli* YfhJ protein, a member of the ISC machinery involved in assembly of iron-sulfur clusters. *Proteins.* **60**(3), 566-569.
16. Pastore C, Adinolfi S, Huynen MA, Rybin V, Martin S, Mayer M, Bukau B, Pastore A. (2006). YfhJ, a molecular adaptor in iron-sulfur cluster formation or a frataxin-like protein?. *Structure.* 14 (5), 857-867.
17. Ding H, Harrison K, Lu J. (2005). Thioredoxin reductase system mediates iron binding in IscA and iron delivery for the iron-sulfur cluster assembly in IscU. *J Biol Chem.* **280** (34), 30432-30437.
18. Layer G, Ollagnier-de Choudens S, Sanakis Y, Fontecave M. (2006). Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Escherichia coli* CyaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *J Biol Chem.* **281** (24), 16256-16263.

19. Hoff KG, Silberg JJ, Vickery LE. (2000) Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97** (14), 7790-7795.
20. Chandramouli K, Johnson MK. (2006). HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry*. **45** (37), 11087-11095.
21. Unciuleac MC, Chandramouli K, Naik S, Mayer S, Huynh BH, Johnson MK, Dean DR. (2007). *In vitro* activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry*. **46** (23), 6812-6821.
22. Shimomura Y, Wada K, Fukuyama K and Takahashi Y (2008). The Asymmetric Trimeric Architecture of [2Fe-2S] IscU: Implications for Its Scaffolding during Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **383**, 133-143.
23. Shimomura Y, Kamikubo H, Nishi Y, Masako T, Kataoka M, Kobayashi Y, Fukuyama K and Takahashi Y (2007) . Characterization and Crystallization of an IscU-type Scaffold Protein with Bound [2Fe-2S] Cluster from the Hyperthermophile, *Aquifex aeolicus*. *J. Biochem.* **142**, 577-586.
24. Wanke M, Skorupinska-Tudek K, Swiezewska E. (2001). Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. *Acta Biochim Pol.* **48** (3), 663-672.
25. Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.* **295** (Pt 2), 517-524.
26. Wolff M, Seemann M, Tse Sum Bui B, Frapart Y, Tritsch D, Garcia Estrabot A, Rodríguez-Concepción M, Boronat A, Marquet A, Rohmer M. (2003). Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein. *FEBS Lett.* **541** (1-3), 115-120

27. Seemann M, Bui BT, Wolff M, Tritsch D, Campos N, Boronat A, Marquet A, Rohmer M. (2002). Isoprenoid biosynthesis through the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] protein. *Angew Chem Int Ed Engl.* **41** (22), 4337-4339.
28. Rekittke I, Nonaka T, Wiesner J, Demmer U, Warkentin E, Jomaa H, Ermler U. (2011). Structure of the E-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphate synthase (GcpE) from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* **585** (3), 447-51.
29. Lee M, Gräwert T, Quitterer F, Rohdich F, Eppinger J, Eisenreich W, Bacher A, Groll M. (2010). Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of the [4Fe-4S] cluster protein IspG. *J Mol Biol.* **404** (4), 600-610.
30. Rekittke I, Wiesner J, Röhrich R, Demmer U, Warkentin E, Xu W, Troschke K, Hintz M, No JH, Duin EC, Oldfield E, Jomaa H, Ermler U. (2008). Structure of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphate reductase, the terminal enzyme of the non-mevalonate pathway. *J Am Chem Soc.* **130** (51), 17206-17207.
31. Campos N, Rodríguez-Concepción M, Sauret-Güeto S, Gallego F, Lois LM, Boronat A. (2001). *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate: a novel system for the genetic analysis of the 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem J.* **353** (Pt 1), 59-67.
32. Eisenreich W, Schwarz M, Cartayrade A, Arigoni D, Zenk MH, Bacher A. (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem Biol.* **5** (9), 221-233.
33. Harada H, Yu F, Okamoto S, Kuzuyama T, Utsumi R, Misawa N. (2009). Efficient synthesis of functional isoprenoids from acetoacetate through metabolic pathway-engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **81** (5), 915-925.
34. Kuzuyama T. (2002). Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66** (8), 1619-1627.
35. Takagi M, Kuzuyama T, Takahashi S, Seto H. (2000). A gene cluster for the mevalonate pathway from *Streptomyces* sp. Strain CL190. *J Bacteriol.* **182** (15), 4153-4157.

36. Kim YB, Kim SM, Kang MK, Kuzuyama T, Lee JK, Park SC, Shin SC, Kim SU. (2009). Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase genes. *Tree Physiol.* **29** (5), 737-749.
37. Lill R, Dutkiewicz R, Elsässer HP, Hausmann A, Netz DJ, Pierik AJ, Stehling O, Urzica E, Mühlenhoff U. (2006). Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta.* **763**(7), 652-667.
38. Lill R, Mühlenhoff U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* (3), 133-141.
39. Lill R, Mühlenhoff U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem.* **77**, 669-700.
40. Balk J, Pilon M. (2011). Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci.* (4), 218-226.
41. Khoshnevis S, Gross T, Rotte C, Baierlein C, Ficner R, Krebber H. (2010). The iron-sulphur protein RNase L inhibitor functions in translation termination. *EMBO Rep.* (3), 214-219.
42. Netz DJ, Stith CM, Stümpfig M, Köpf G, Vogel D, Genau HM, Stodola JL, Lill R, Burgers PM, Pierik AJ. (2011). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat Chem Biol.* **8** (1), 125-132.
43. Kessler D. (2006). Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **30** (6), 825-840.
44. Cupp-Vickery JR, Urbina H, Vickery LE. (2003). Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **330** (5), 1049-1059.

45. Mihara H, Kurihara T, Yoshimura T, Esaki N. (2000). Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *J Biochem.* **127** (4), 559-567.
46. Shi R, Proteau A, Villarroya M, Moukadiri I, Zhang L, Trempe JF, Matte A, Armengod ME, Cygler M. (2010). Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol.* **8** (4), e1000354.
47. Hoff KG, Ta DT, Tapley TL, Silberg JJ, Vickery LE. (2002). Hsc66 substrate specificity is directed toward a discrete region of the iron-sulfur cluster template protein IscU. *J Biol Chem.* **277** (30), 27353-27359.
48. Hoff KG, Cupp-Vickery JR, Vickery LE. (2003). Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system. *J Biol Chem.* **278** (39), 37582-37589.
49. Cupp-Vickery JR, Peterson JC, Ta DT, Vickery LE. (2004). Crystal structure of the molecular chaperone HscA substrate binding domain complexed with the IscU recognition peptide ELPPVKIHC. *J Mol Biol.* **342** (4), 1265-1278.
50. Raulfs EC, O'Carroll IP, Dos Santos PC, Unciuleac MC, Dean DR. (2008). *In vivo* iron-sulfur cluster formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (25), 8591-8596.

7. 図

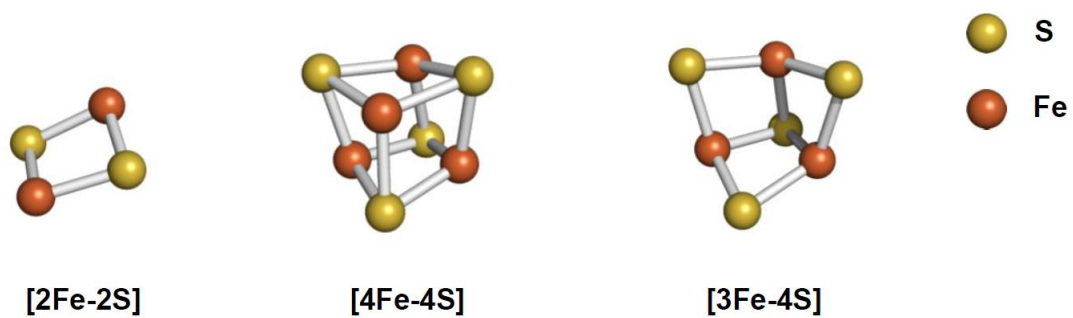


Figure 1. Fe-S クラスターの構造。

左から[2Fe-2S]、[4Fe-4S]、[3Fe-4S]クラスター。これらのクラスターの鉄原子は、ほとんどの場合タンパク質内部の Cys 残基側鎖の硫黄原子に配位結合している。

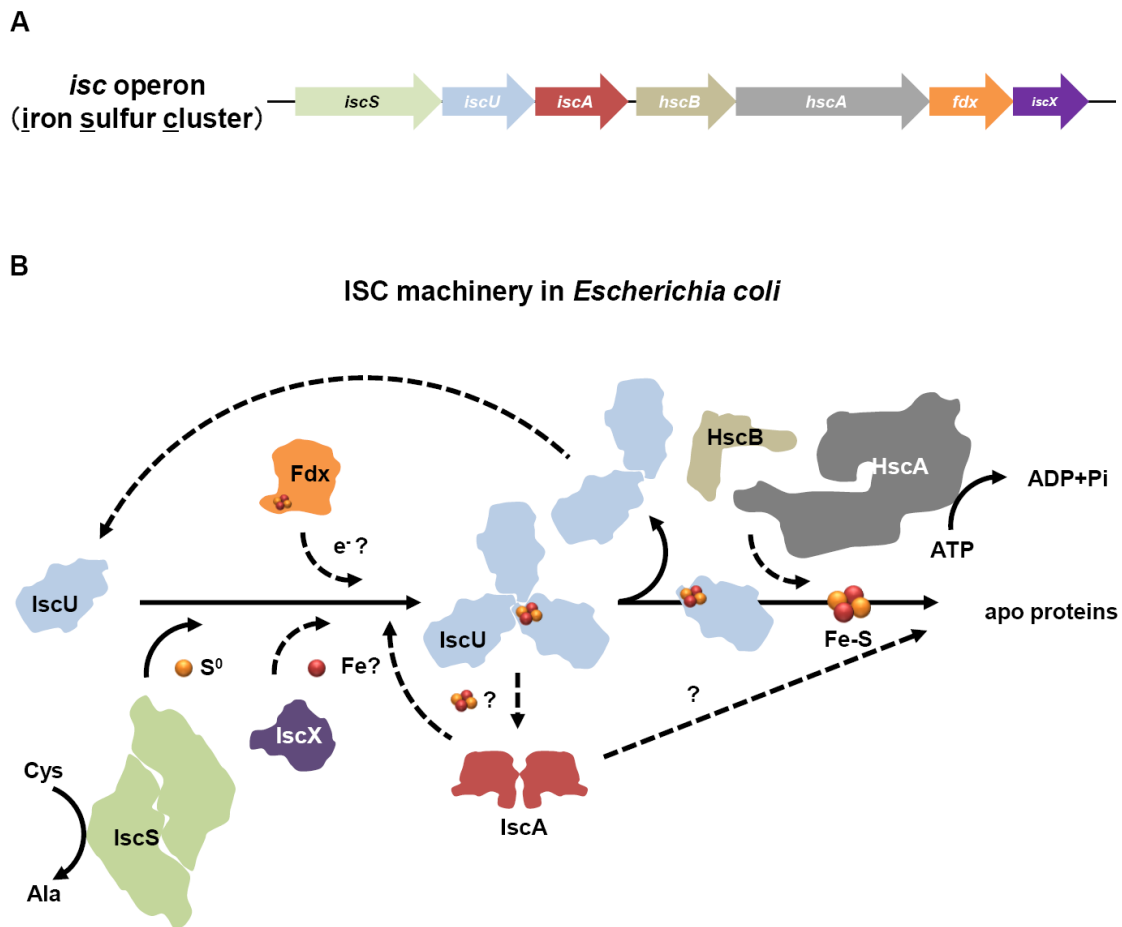


Figure 2. Fe-S クラスター合成系、ISC マシナリーの作動機構のモデル。

(A) 大腸菌の *isc* オペロン。

(B) IscU はクラスターの新規形成部位（足場タンパク質）として機能する。IscS はシステインデスルフラゼで、L-システインから硫黄原子を S^0 の形で引き抜き、それを IscU に引き渡す。Fdx は、安定な [2Fe-2S] クラスターを保持したフェレドキシンで、鉄原子あるいは硫黄原子の還元反応に関与すると考えられている。HscA は DnaK と相同な Hsp70 型の分子シャペロン、HscB は DnaJ と相同な J-ドメインを持つコシャペロンであり、これらは協働して IscU と結合することが報告されている。IscA は鉄シャペロン、あるいは Fe-S クラスターのキャリアとして機能する可能性が示唆されている。未だよく分かっていないプロセスを“?”で示す。

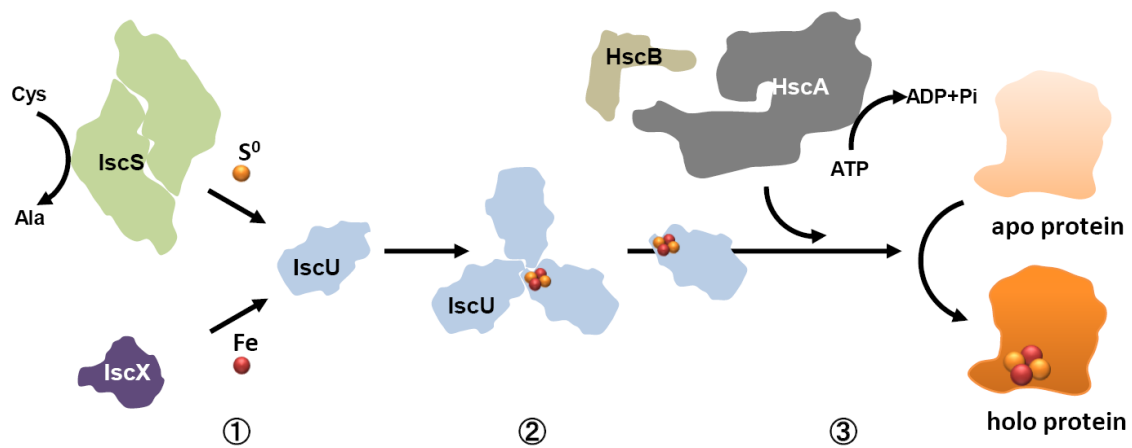


Figure 3. Fe-S クラスターの生合成における IscU の役割。

IscU では、① IscS から硫黄原子を、IscX などから鉄原子を受け取り、② それらをクラスターの形に組み立てて、不安定なクラスター中間体を一時的に保持し、③ 最終的にクラスターをアポタンパク質に渡すと行った一連の工程が想定されている。

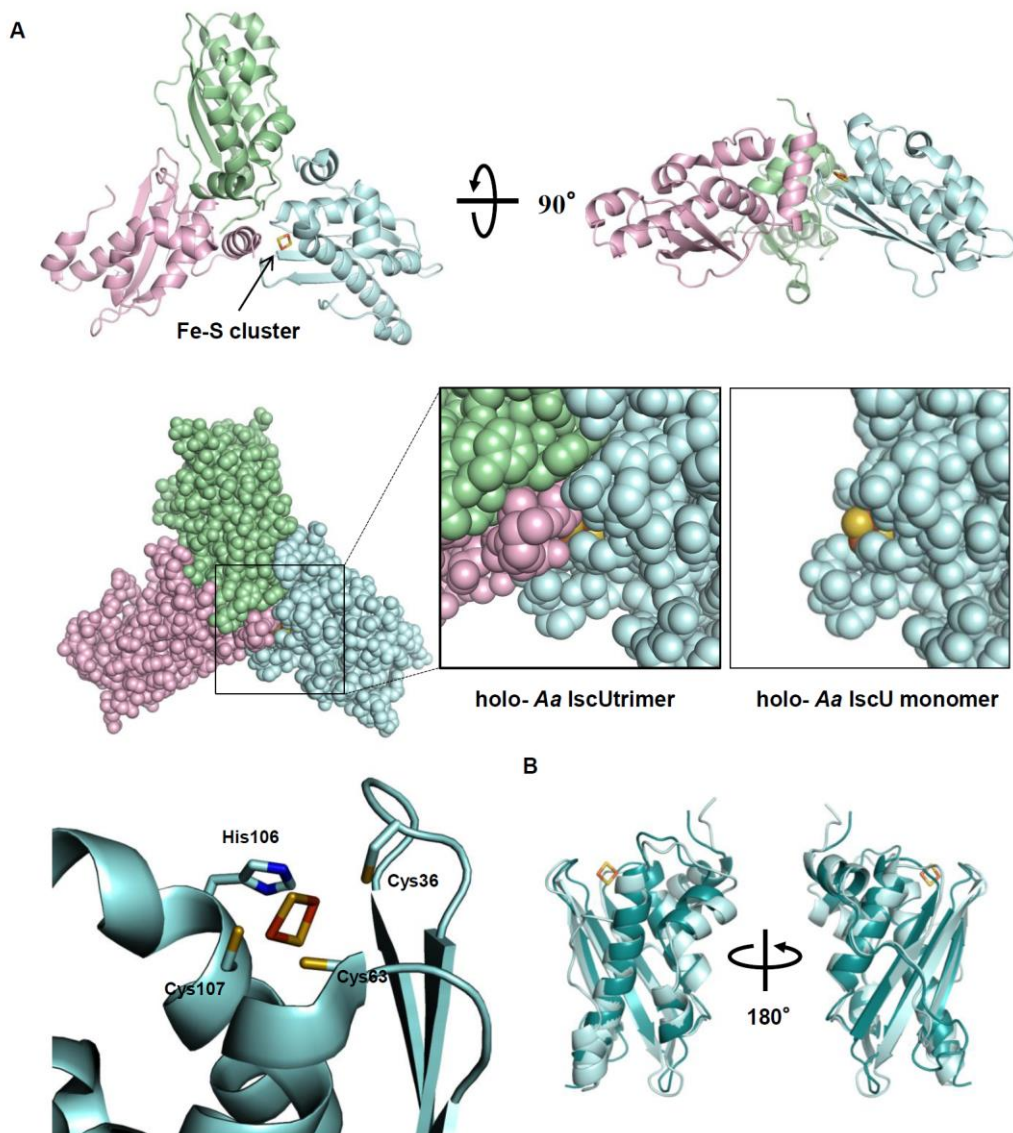


Figure 4. ホロ型 *Aquifex aeolicus* (*Aa*) IscU の結晶構造。

(A) ホロ型 *Aa* IscU は、3つのプロトマーが非対称に会合した三量体構造を形成している。[2Fe-2S]クラスターを持っているのはBプロトマー（水色）のみであり、3つのCys残基（Cys36, Cys63, Cys107）と1つのHis残基（His106）でクラスターを配位している。クラスターは他のプロトマーとの会合面に位置している。Bプロトマーだけを見ると、クラスターの大部分は分子表面に露出している（右図）。

(B) アポ型 *Ec* IscU モノマー（PDB: 3LVL）とホロ型 *Aa* IscU（PDB: 2Z7E）モノマーの重ね合わせ。淡い水色が *Aa* IscU のBプロトマー、濃い水色が *Ec* IscU。2つの構造は非常に良く似ている。

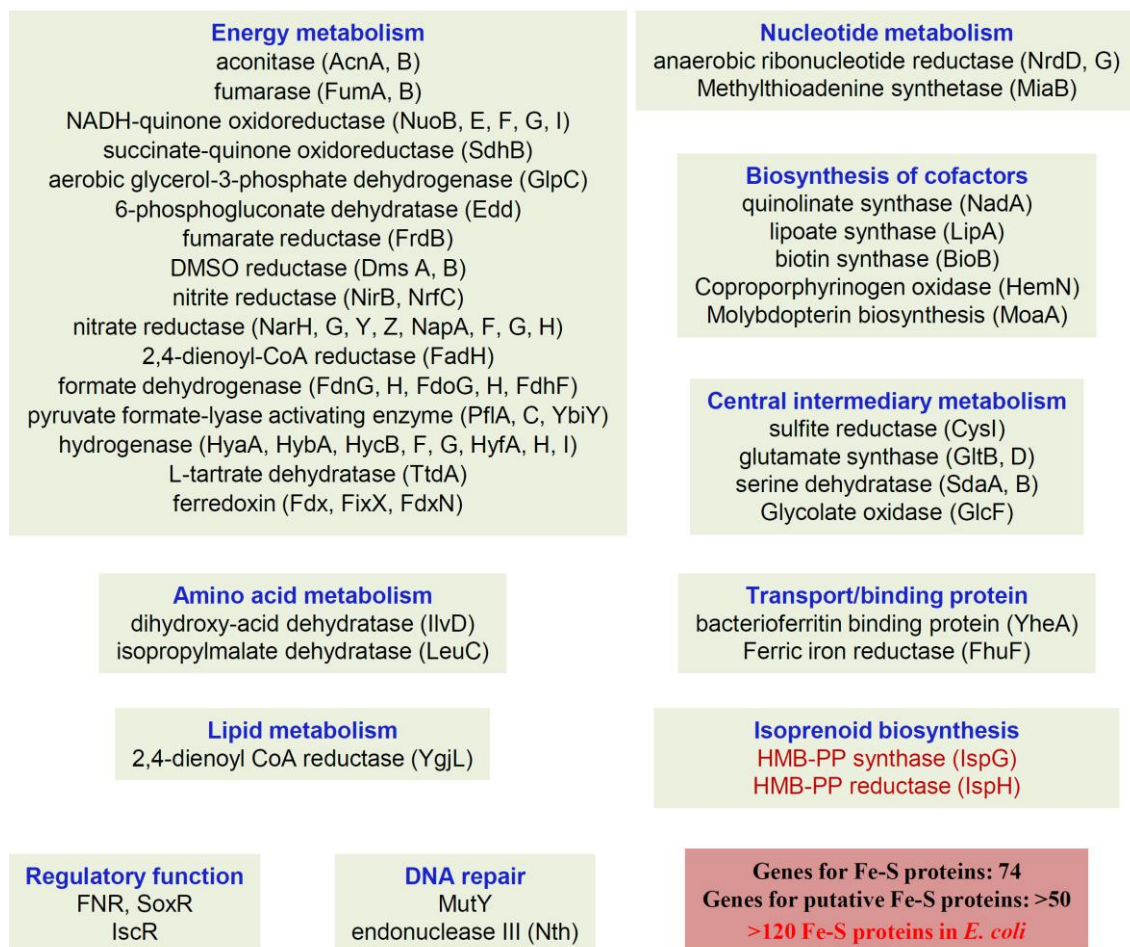


Figure 5. 大腸菌の多彩な Fe-S タンパク質群。

Fe-S タンパク質は、エネルギー代謝やアミノ酸代謝、遺伝子発現の制御を担うものまで、多種多様である。大腸菌では120を超える種類が報告されているが、その中で、生育に必須な Fe-S タンパク質はイソプレノイド生合成系に關与する IspG と IspH のみである（赤字）。

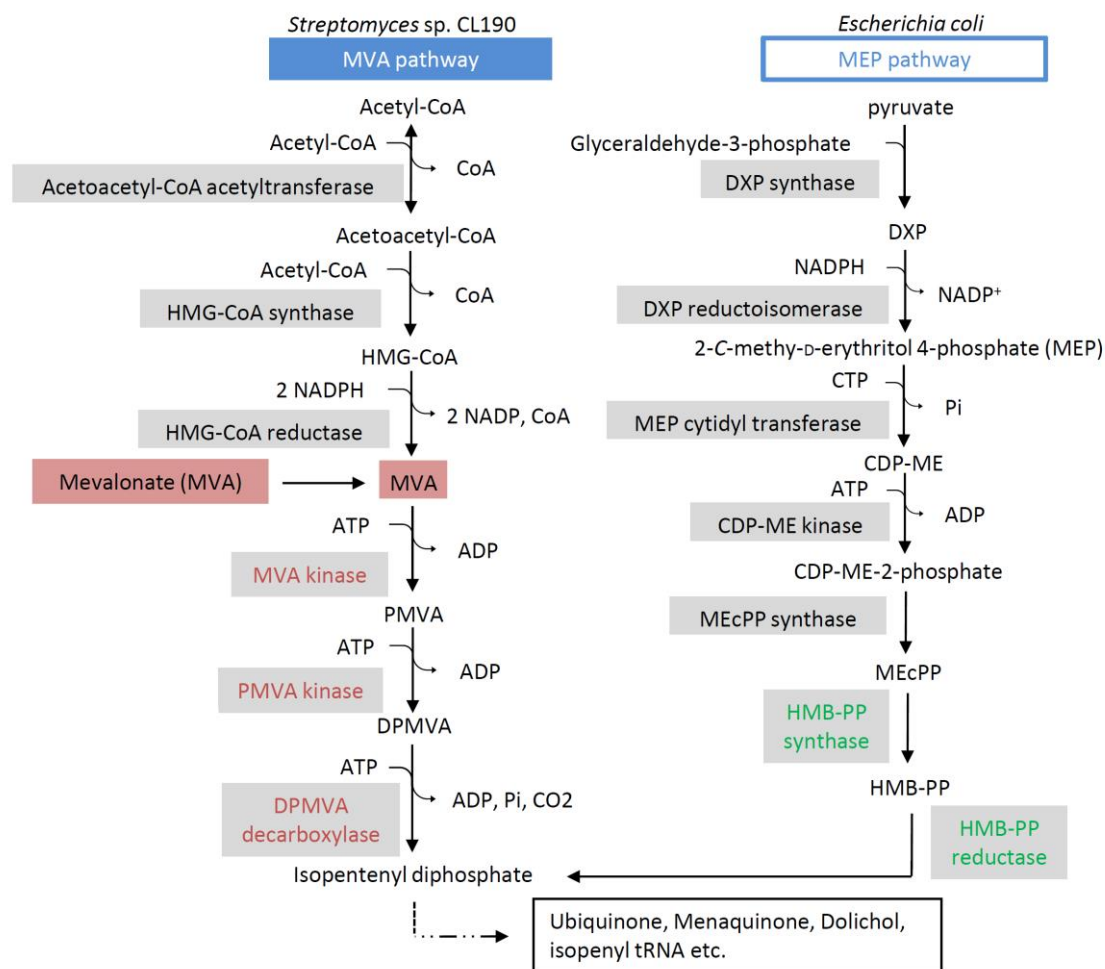


Figure 6. イソプレノイド生合成系、メバロン酸経路（MVA 経路）と非メバロン酸経路（MEP 経路）の比較。

大腸菌が持つ MEP 経路には 2 つの Fe-S 酵素、IspG ((*E*)-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphatase (HMB-PP) syntase) と IspH ((*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphatase (HMB-PP) reductase) が関与している (緑色字)。一方、放線菌などに見られる MVA 経路には Fe-S タンパク質が関与していない。大腸菌の Fe-S クラスター合成系の欠損株では、IspG と IspH が機能できなくなるので、イソプレノイドを合成できない。本研究では、MVA 以降の反応を触媒する 3 種類の酵素、MVA kinase, PMVA kinase, DPMVA decarboxylase をクローン化したプラスミドを Fe-S クラスター合成系の欠損株に導入し、培地に添加した MVA からイソプレノイドを合成できるように計画した。

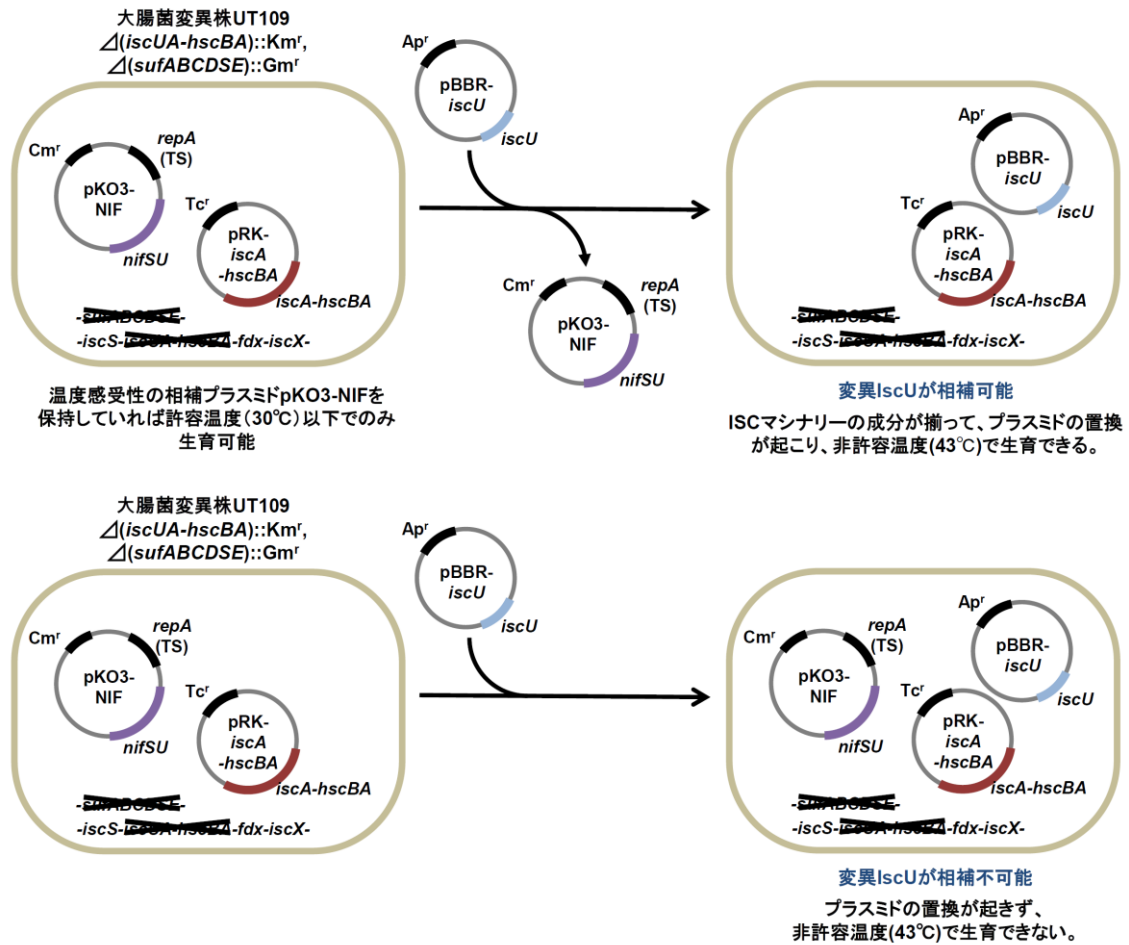


Figure 7. 大腸菌変異株 UT109 株 ($\Delta iscUA-hscBA::Km^r$; $\Delta sufABCDSE::Gm^r$) を用いた相補実験系。

大腸菌の Fe-S クラスター生合成系をコードする *isc*, *suf* オペロンを二重に欠失させると合成致死になる。相補プラスミド pKO3-NIF (*Helicobacter pylori* の *nifSU* をクローン化した温度感受性プラスミド) を導入した UT109 は、許容温度 (30°C以下) でのみ生育することができる。ここに *iscA-hscBA* と *iscU* 遺伝子を2つのプラスミドにクローン化して導入すると、ISC マシナリーの成分が揃って、pKO3-NIF の非許容温度 (43°C) で生育できるようになり、pKO3-NIF は脱落する。相補できない場合は、30°Cでのみ生育し、43°Cではほとんど生育しない。稀に小さいコロニーが現われても、それらは pKO3-NIF プラスミドを保持し続けている。

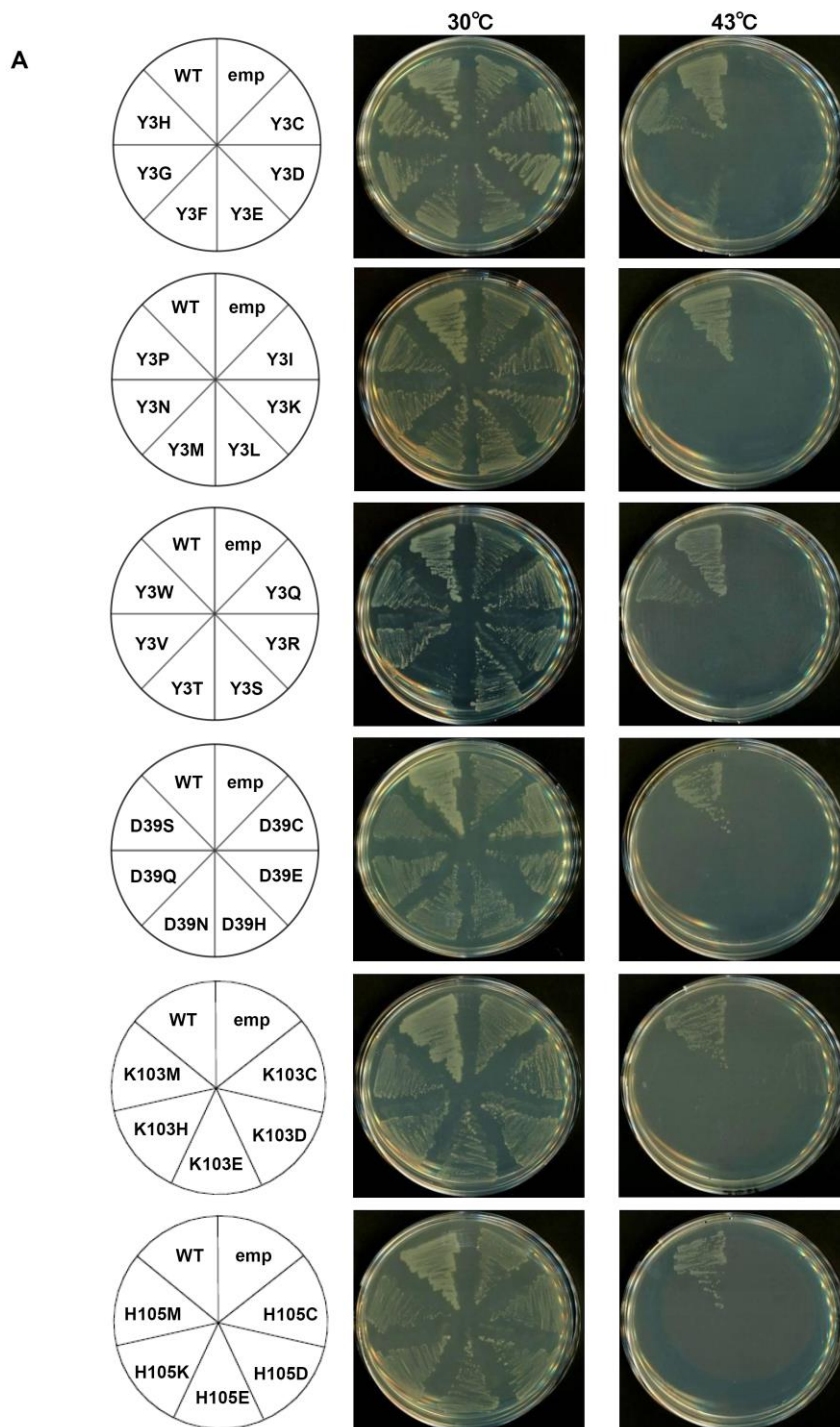


Figure 8. *Ec IscU* に対する変異導入の影響。

(A) pBBR プラスミドにクローン化した *iscU* に部位特異的変異を導入し、*iscU* 欠損株の相補能を 43°C における生育で調べた。

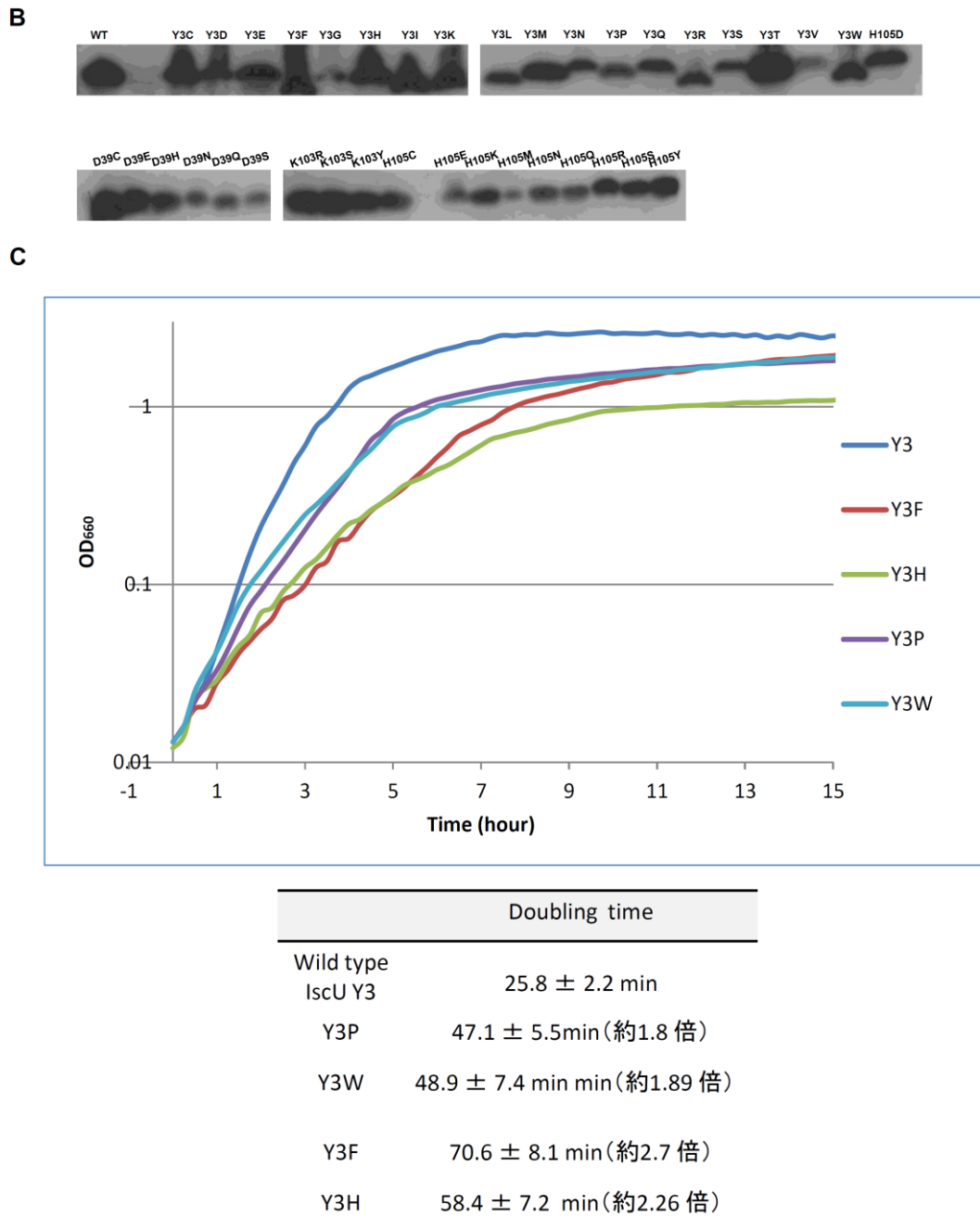


Figure 8. (続き)

(B) 30°C で生育させ、変異 IscU の発現量をウエスタンブロットにより調べた。

(C) Tyr3Phe, Tyr3His, Tyr3Pro, あるいは Tyr3Trp 変異 IscU による相補株の生育曲線と、倍加時間。

Residues in Ec IscU					Ec IscU mutation	Comple- mentation	Ec IscU mutation	Comple- mentation
37	63	105	106	complementation				
C	C	H	C	Yes (WT <i>Ec IscU</i>)	Y3C	No	K103C	No
S	C	H	C	No	Y3D	No	K103D	No
C	S	H	C	No	Y3E	No	K103E	No
C	C	H	S	No	Y3F	Partial	K103H	No
C	C	A	C	No	Y3G	No	K103M	No
C	C	C	C	No	Y3H	Partial	K103Q	No
C	C	E	C	No	Y3I	No	K103R	No
C	C	K	C	No	Y3K	No	K103S	No
C	C	M	C	No	Y3L	No	K103Y	No
C	C	N	C	No	Y3M	No		
C	C	Q	C	No	Y3N	No		
C	C	R	C	No	Y3P	Partial		
C	C	S	C	No	Y3Q	No		
C	C	Y	C	No	Y3R	No		
H	C	C	C	No	Y3T	No	D39C	No
C	H	C	C	No	Y3V	No	D39E	No
C	C	C	H	No	Y3W	Partial	D39H	No
H	C	H	C	No			D39N	No
C	H	H	C	No			D39Q	No
C	H	C	H	No			D39S	No

Table 3. 変異 IscU の相補実験結果一覧。

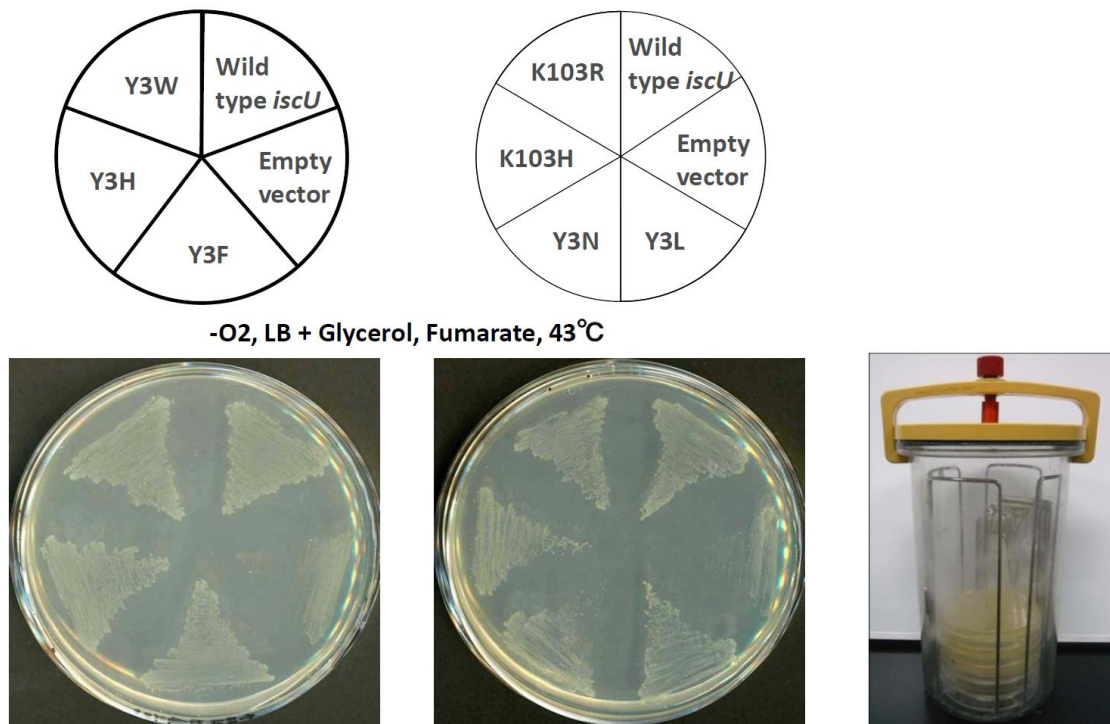


Figure 9. 嫌気条件下での変異 IscU の相補実験。

嫌気 GasPak System (右の写真) により、嫌気的な環境を作り出し、変異 IscU の相補実験を行った。43°C での生育から、好気的な条件で相補可能な変異 IscU に加えて、Tyr3, Lys103 を置換したいくつかの変異 IscU が、嫌気条件で相補できることが判明した。

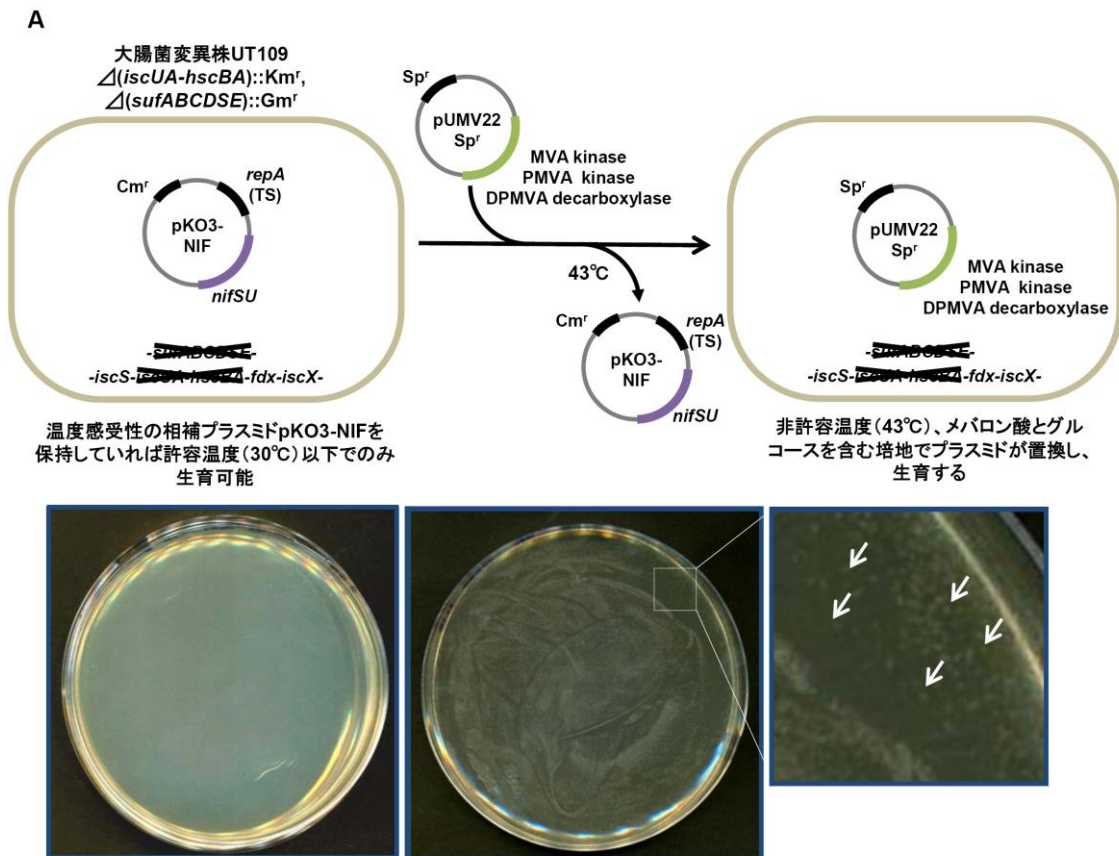


Figure 10. 放線菌由来のメバロン酸経路の遺伝子群による、大腸菌 Fe-S クラスター合成欠損株 UT109 の相補。(A) 温度感受性の相補プラスミド pKO3-NIF を持つ UT109 に、放線菌由来のメバロン酸経路の 3 つの遺伝子群をクローン化したプラスミドを導入し、43°C、メバロン酸 (MVA) を含む LB 培地 (0.4% グルコースを含む) で培養した。培地に添加したメバロン酸に依存して非常に小さいながらコロニーが出現した。

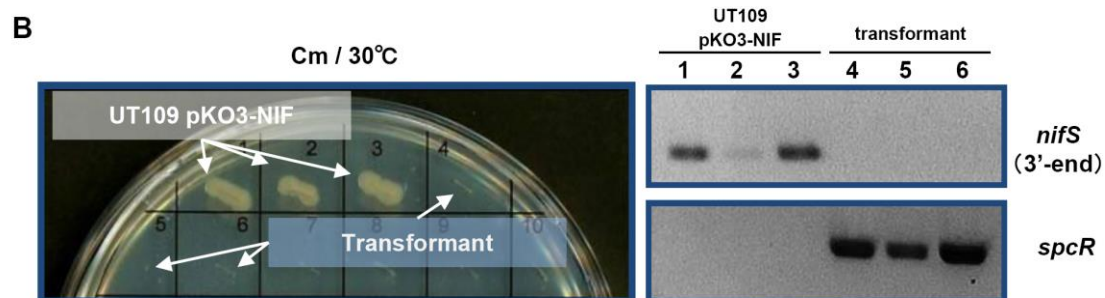


Figure 10 (続き)

(B) 形質転換体におけるプラスミド置換の検討。得られた形質転換体は Cm 感受性であり (プレートの No. 4, 5, 6)、pKO3-NIF が欠落したことを確認した。さらに、pKO3-NIF プラスミド上の *nifS* 後半側の配列をターゲットとしてコロニーPCRを行ったところ、形質転換体では産物が増幅せず (lane 4 - 6)、pKO3-NIF の欠落を確認した。これらの実験では、UT109 pKO3-NIF 株をポジティブコントロールとして用いた。また、pUMV22 Sp^rプラスミド上の Sp 耐性遺伝子 (*spcR*) の 5'末端と 3'末端の配列にアニールするプライマーを使ってコロニーPCRを行い、形質転換体で産物が増幅されることを確認した。

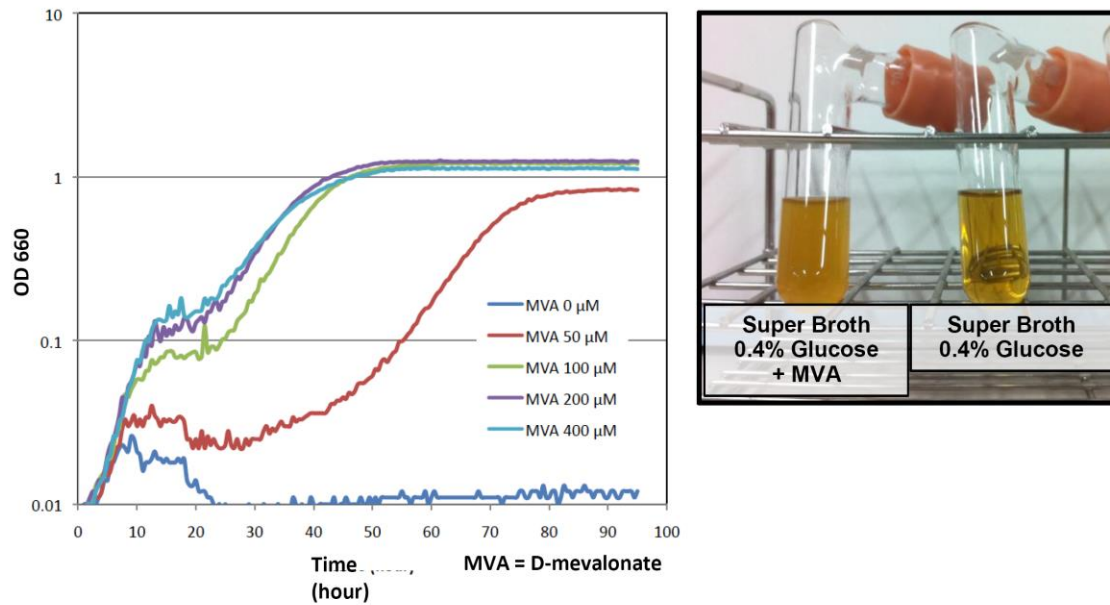


Figure 11. pUMV22 Sp^r プラスミドを持つ Fe-S クラスター合成系欠損株 (UT109) の生育曲線。

液体培地には、0.4%グルコースを含む Super broth を用いた。メバロン酸を添加していない培地では生育しないが、ここにメバロン酸を添加して培養すると、メバロン酸濃度に依存してゆっくりと生育し、200 μM で頭打ちになった。

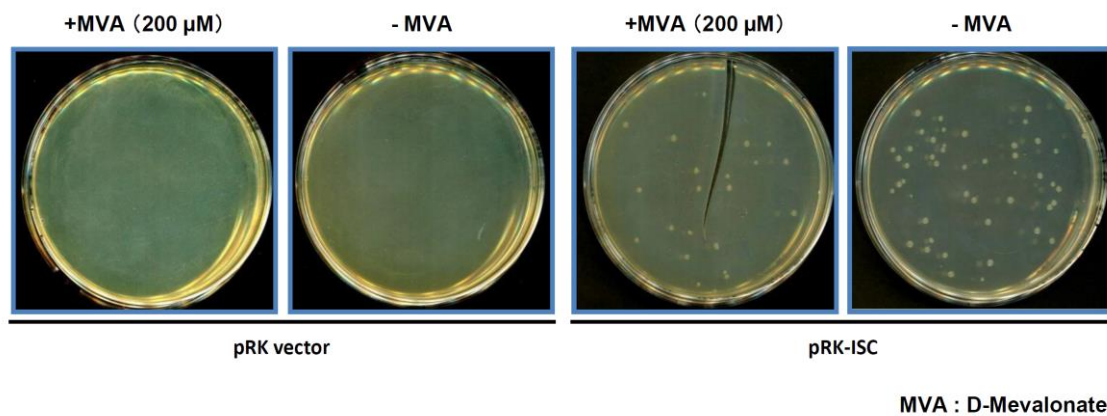


Figure 12. UT109 pUMV22 Sp^r 株を用いた、Fe-S クラスター合成系の相補実験。

UT109 pUMV22 Sp^r (Fe-S クラスター合成系の欠損株) の生育はメバロン酸に依存しているが、ここに大腸菌 *isc* オペロンクローン化したプラスミド (pRK-ISC) を導入すると、メバロン酸の有無に関係なく、また野生株並みの速度で生育した。

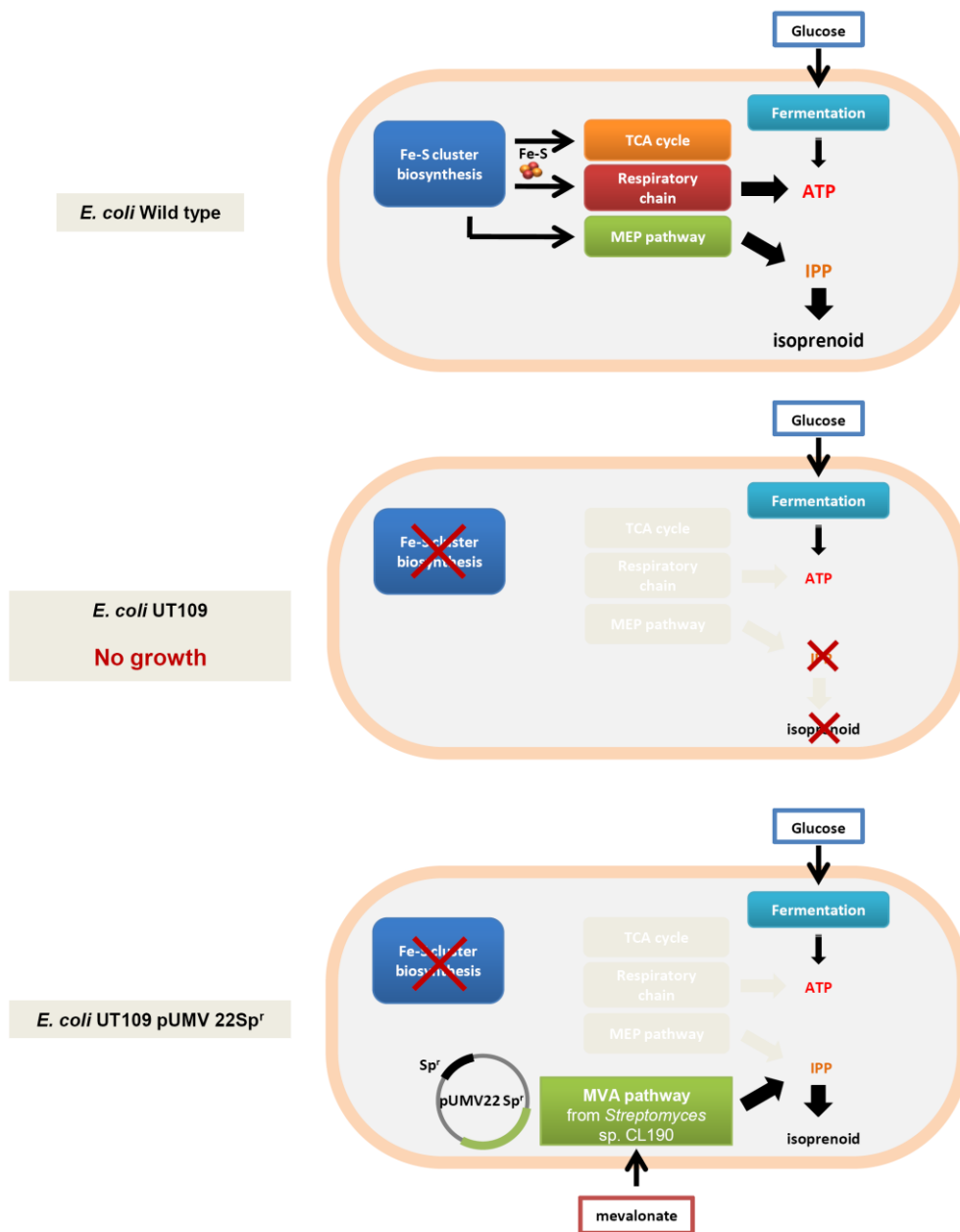


Figure 13. 大腸菌の Fe-S クラスター生合成系の必須性とイソプレノイド生合成系との関連。

大腸菌野生株では、TCA 回路や呼吸鎖電子伝達系、MEP 経路などで、さまざまな Fe-S タンパク質が機能している。Fe-S クラスター生合成系の変異株では、MEP 経路が機能できなくなるので、イソプレノイドが合成できなくなり、致死性を示す。ここに放線菌由来のメバロン酸経路の遺伝子群を導入すると、培地に添加したメバロン酸からイソプレノイドを合成することが合成可能になり、致死性を回避できる。

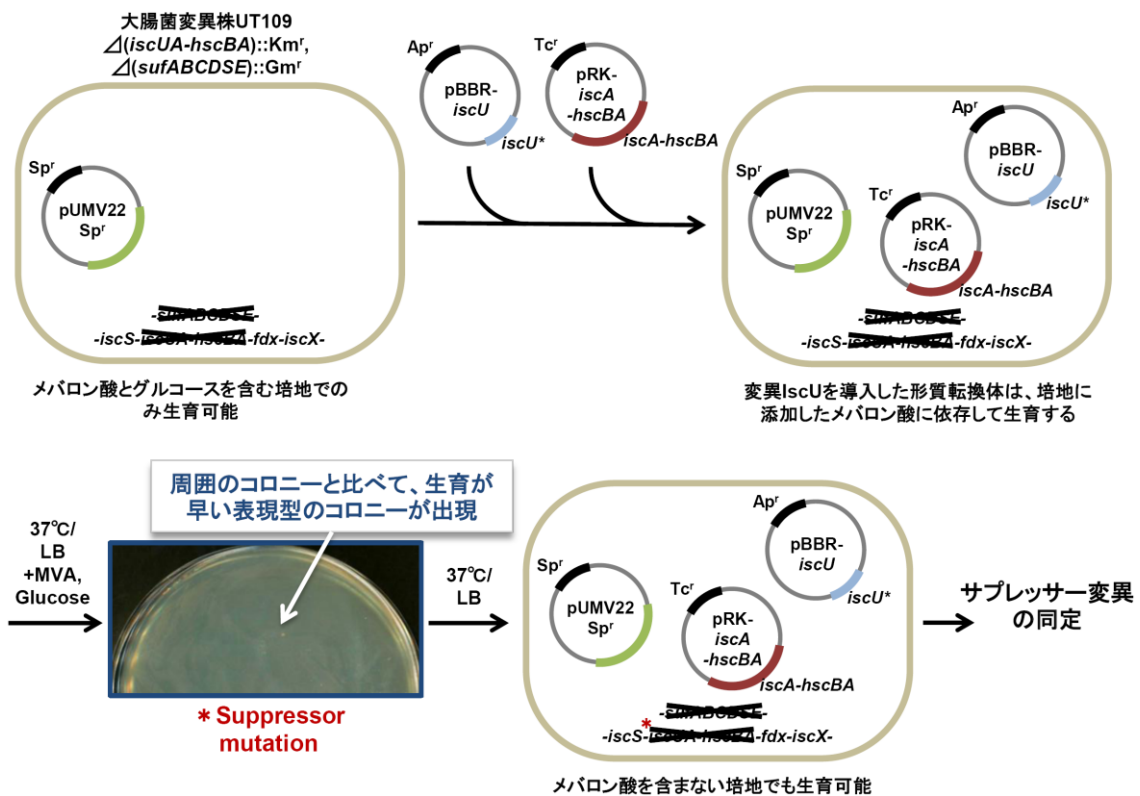


Figure 14. 変異 IscU のサブレッサー変異の検出方法

ISC マシナリーの成分をコードした pBBR プラスミドと pRK プラスミドは、エレクトロポレーションにより UT109 pUMV22 Sp^r株に同時に導入した。機能不全の変異 IscU(図で *iscU**と表記) を導入した場合、形質転換体の生育はメバロン酸に依存した。メバロン酸を含む LB 培地で継代培養を繰り返すと、ごくまれに、大きなコロニーが現れた(矢印で記したコロニー)。これらの大きなコロニーは、メバロン酸を含まない培地でも生育することができたため、リバータントと判断した。

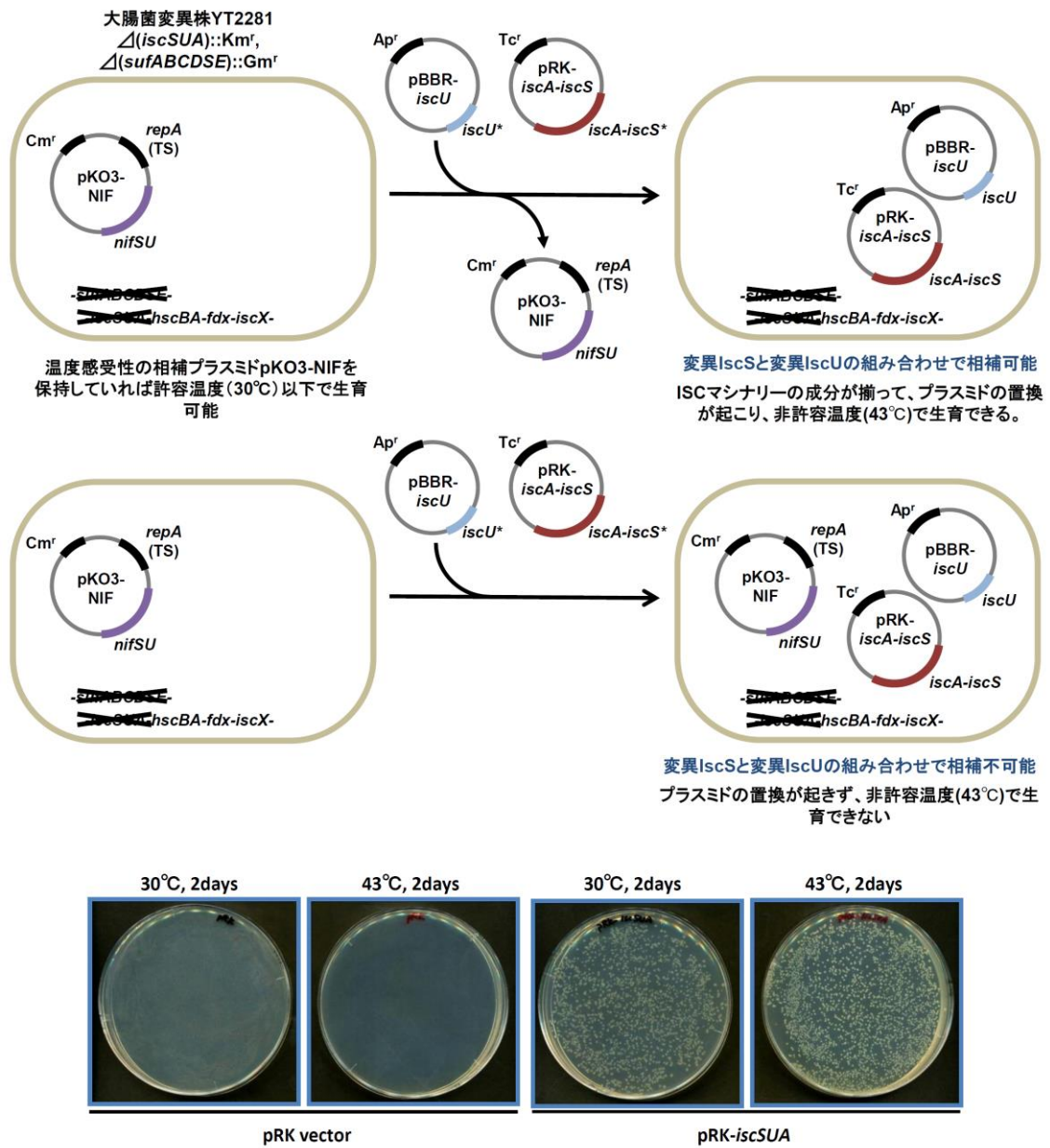


Figure 15. pKO3-NIF プラスミドを保持した大腸菌 YT2281 株変異株 ($\Delta\text{iscSUA}::\text{Km}^r$; $\Delta\text{sufABCDSE}::\text{Gm}^r$) の相補実験の概略。

下のプレートは、pRK-iscSUA プラスミドを導入した相補実験を示す。

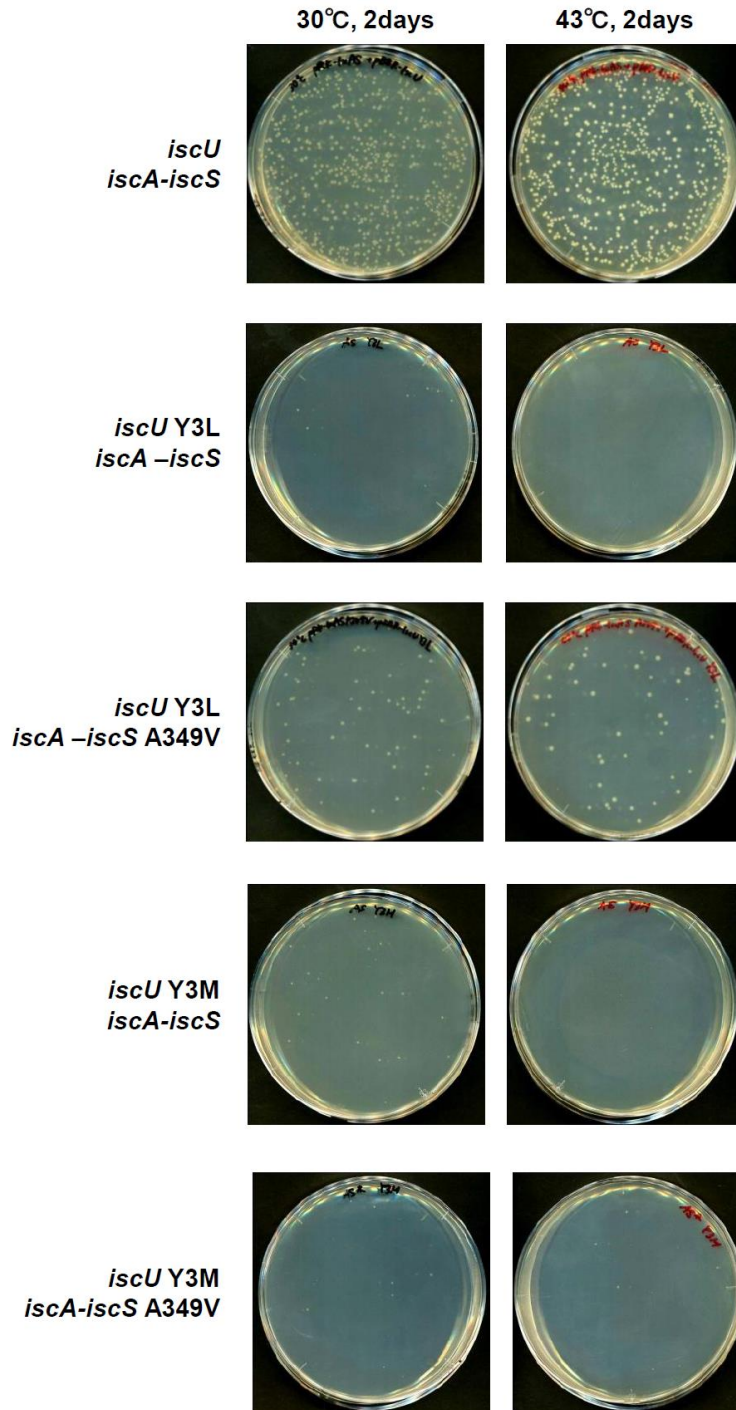


Figure 16. 変異 IscS と変異 IscU との組み合わせによる相補実験。

野生型 IscS と変異 IscU の組み合わせでは 43°C で生育しない。一方、リバータント内に見出した変異 IscS と変異 IscU を組み合わせると、43°C で生育した。結果は一部しか載せていない。

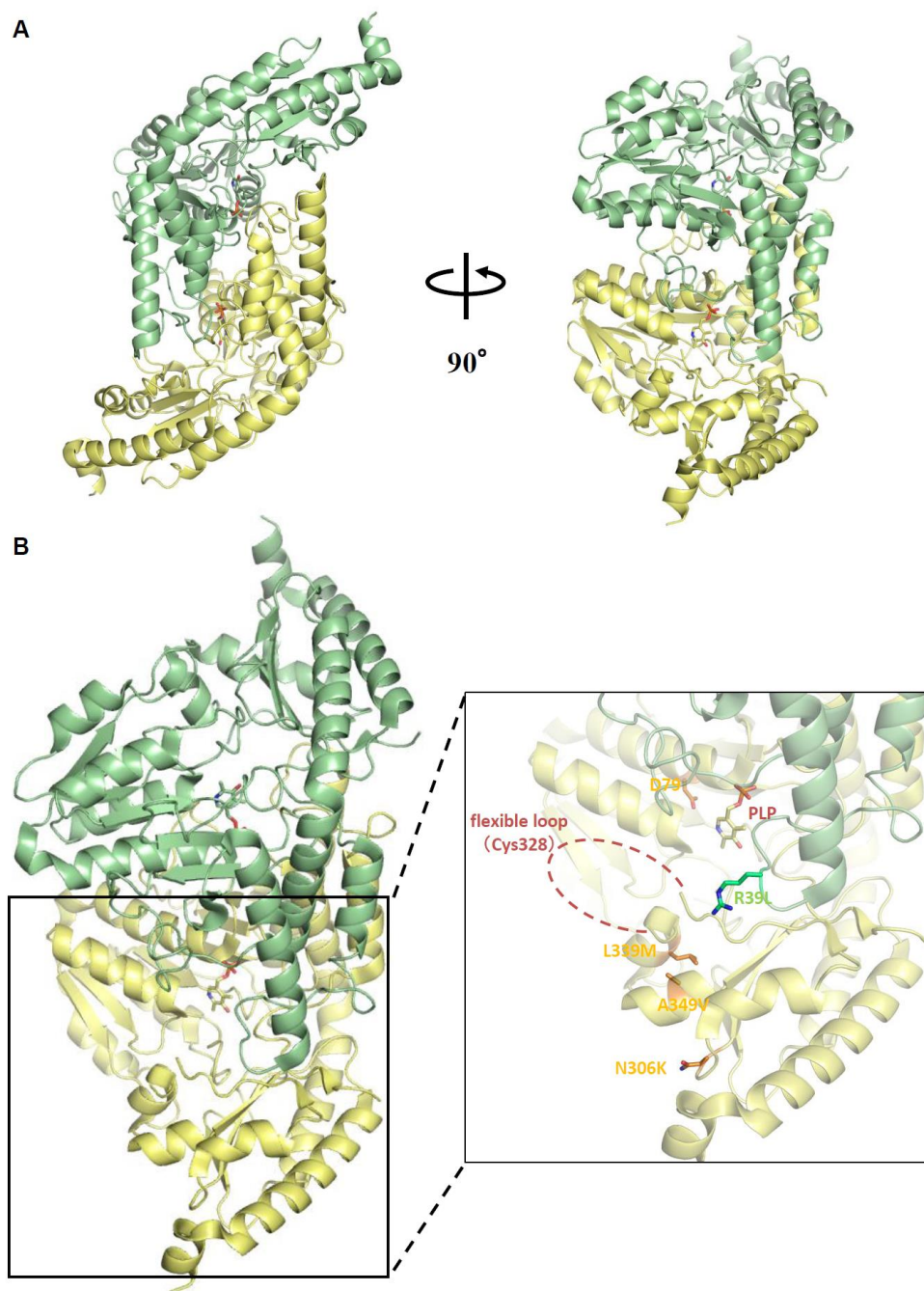


Figure 17. 大腸菌 IscS 二量体の結晶構造。

(A) 大腸菌 IscS 二量体の結晶構造 (PDB: 1p3w)。2 種類のプロトマーを黄色と緑色、PLP を赤色で示す。

(B) 今回同定したサプレッサー変異の位置を棒状モデルで示す。IscS の活性中心である Cys328 を含むループはディスオーダーして、結晶構造では見えていないが、図中の赤い点線のあたりと予想される。

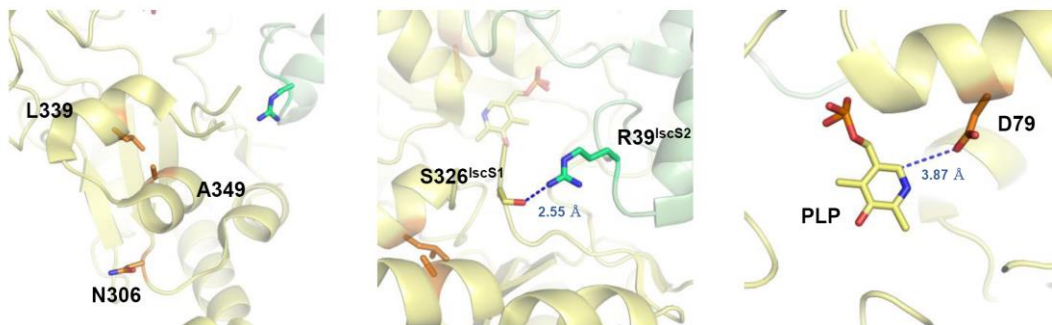


Figure 18. IscU Tyr3 の変異をサプレッサーする IscS の変異（拡大図）。

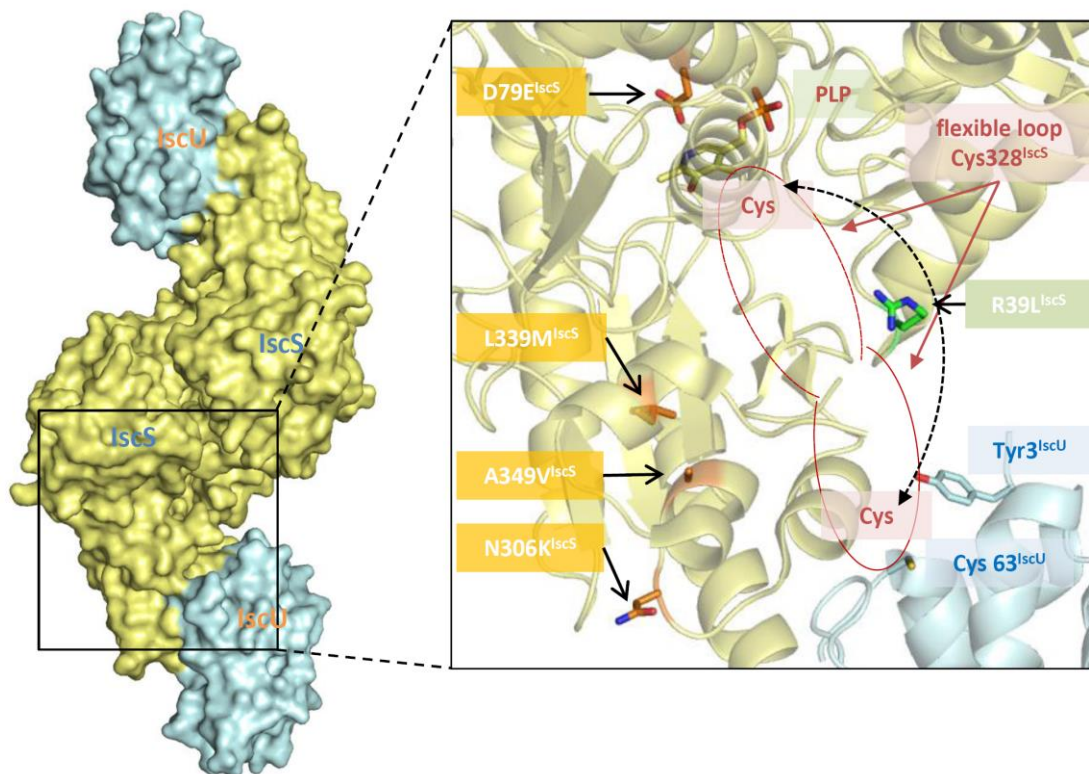


Figure 19. 大腸菌 IscS-IscU 複合体の結晶構造（PDB ID: 3LVL）におけるサプレッサー変異の位置。

IscS の活性中心ループはこの構造でもディスオーダーしているが、図中の赤い点線で示すあたりと予想される。硫黄原子受け渡しに際しては、このループが PLP の近傍から IscU の Cys63 まで大きく動く構造変化が必要となる（約 30 Å の距離を移動）。今回同定した IscU Tyr3 のサプレッサー変異は、活性中心ループの近傍に位置していることから、この構造変化に関与する可能性がある。

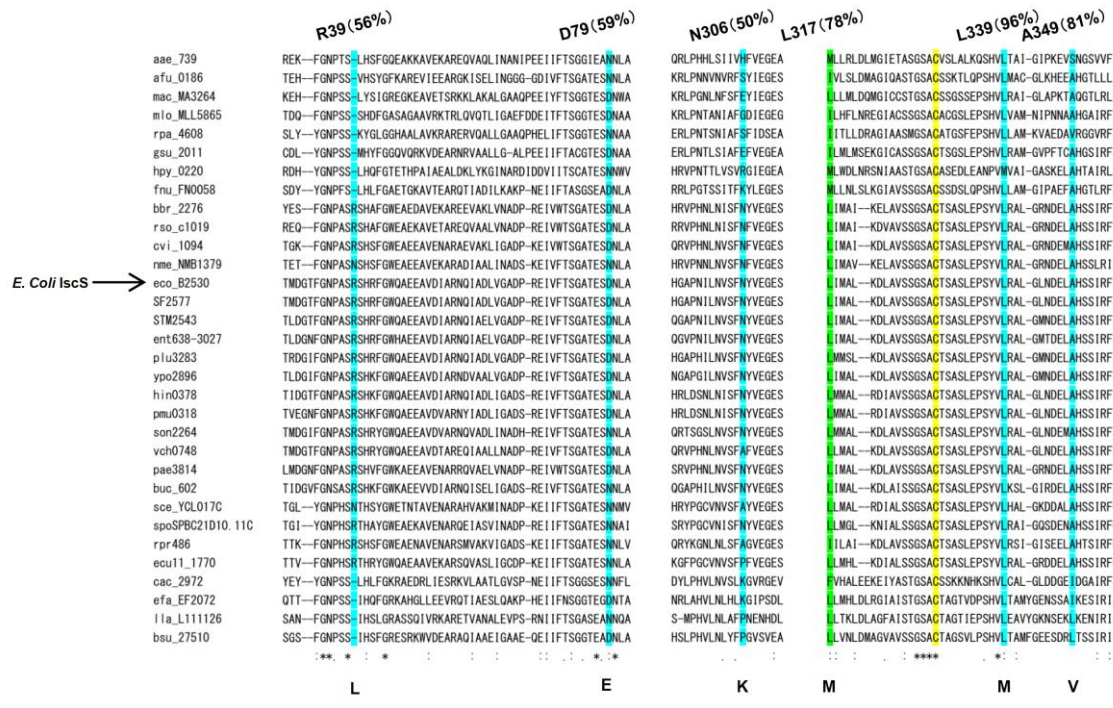


Figure 20. IscS, NifS, SufS の一次構造の比較。

硫黄原子を引き抜く Cys 残基はシステインデスルフラゼで保存されている (黄色) が、今回検出した IscS の変異は、必ずしも保存性されているわけではない。下に変異後のアミノ酸を示した。

8. 謝辞

本研究を行うにあたり、丁寧な御指導、御助言、御協力くださいました高橋康弘教授、朝井計准教授に心から深く感謝いたします。また、本研究で使用したプラスミドpUMV22 を提供してくださった、東京大学生物生産工業研究センターの葛山智久准教授に深くお礼申し上げます。

また、研究生活を共にし、様々な場面で研究を支えてくださった分子統御研究室の全メンバー、ならび実験に関する的確なアドバイスをしてくださった松岡聡博士に深く感謝いたします。