

鉄硫黄クラスター生合成系 **SUF** マシナリーにおける  
中核成分 **SufBCD** 複合体の機能解析

2017年9月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

理工学専攻 生命科学コース（主指導教員 高橋 康弘）

14DB003 湯田 瑛樹

## 目次

略号	p. 2
要旨	p. 3
第 1 章 序論	p. 6
第 2 章 SufBCD 複合体の <i>in vivo</i> 機能解析	
2.1 序	p. 17
2.2 材料と方法	p. 21
2.3 結果	p. 26
2.4 考察	p. 35
第 3 章 <i>in vitro</i> における SufBCD 複合体と SufSE との相互作用の解析	
3.1 序	p. 42
3.2 材料と方法	p. 45
3.3 結果	p. 50
3.4 考察	p. 54
参考文献	p. 61
図と表	p. 70
謝辞	p. 113

## 略号

Fe-S : 鉄硫黄

Ap : Ampicillin

Tc : Tetracycline

Km : Kanamycin

Gm : Gentamicin

DTT : Dithiothreitol

MVA : メバロン酸、mevalonate

MEP : 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate

LB : Luria-Bertani

TB : Terrific broth

SB : Super broth

PLP : Pyridoxal-5'-phosphate

ABC-ATPase : ABC トランスポーターの ATPase サブユニット

## 要旨

鉄硫黄 (Fe-S) タンパク質は、コファクターとして Fe-S クラスタを持つタンパク質の総称で、エネルギー代謝から遺伝子の発現制御に至るまで、重要かつ多彩な生理機能を担っている。それら 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。Fe-S クラスタ生合成系のひとつ SUF マシナリーは、大腸菌では *sufABCDSE* オペロンにコードされており、これら 6 種の成分が協調して Fe-S クラスタを形成し、アポ Fe-S タンパク質へ渡すと考えられている。このマシナリーのなかで、SufS と SufE は硫黄原子の供与体として機能している。SufB、SufC、SufD は、SufB<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub> の複合体 (SufBCD 複合体) を形成し、この複合体で Fe-S クラスタが新規に形成されると考えられている。我々のグループでは最近、SufBCD 複合体の結晶構造を決定したが、その構造からは Fe-S クラスタの形成部位や反応機構を推定することは困難であった。そこで本研究では、まず SufB、SufC、SufD に対して系統的な変異を導入し、*in vivo* における遺伝学的な解析から機能残基・機能領域を特定することにした。さらに、*in vitro* の生化学的な解析を組み合わせることによって、Fe-S クラスタ形成における SufBCD 複合体の具体的な作動機構を明らかにすることを目指した。

SufC は ABC トランスポーターの ATPase サブユニット (ABC-ATPase) と相同なタンパク質で、SufB と SufD の C 末端ドメインにそれぞれ 1 分子ずつ結合している。SufC のアミノ酸配列には ABC-ATPase にみられる重要なモチーフがよく保存されていることから、類似の作動機構、すなわち ATP の結合と加水分解に共役して SufC 二分子の会合と解離が起こるのではないかと予想した。そこで、SufC の Walker A モチーフ (SufC<sup>K40</sup>)、Walker B モチーフ (SufC<sup>E171</sup>)、H-モチーフ (SufC<sup>H203</sup>) に変異を導入したところ、いずれの場合も *in vivo* 機能が消失し、またこれらの変異を導

入した SufBCD 複合体は、*in vitro* で ATPase 活性を示さなくなった。すなわち、Fe-S クラスターの新規形成には SufC の ATPase 活性が必要であることを明確にした。また、共同研究者によって、SufBCD 複合体における SufC 二分子が、ATP の存在下で実際に会合することが示されている。ABC トランスポーターとの類似性を考え合わせると、SufC は ATPase 活性を利用して二分子が会合し、それによって SufB、SufD に大きな構造変化をもたらすという可能性が示唆された。

次に、SufB と SufD の機能残基・機能領域の同定を目的として系統的な変異導入実験を行った。鉄原子、硫黄原子、あるいは Fe-S クラスターを結合する可能性があり、かつ保存性の高い SufB の 68 残基と SufD の 9 残基のそれぞれを、部位特異的にアラニンに置換したところ、9 種類の変異型で機能不全になった。SufBCD 複合体の結晶構造において、これらの機能残基は 2 つの領域に分かれて分布しており、一方は SufB の  $\beta$ -ヘリックスコアドメイン N 末端側 (SufB<sup>R226</sup>、SufB<sup>N228</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>Q285</sup>、SufB<sup>W287</sup>、SufB<sup>K303</sup>) に、他方は SufB と SufD の会合面 (SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup>) に集中していた。SufB と SufD の会合面には Fe-S クラスターを結合する 3 残基の必須アミノ酸が集中していることから、この領域で Fe-S クラスターが新規に形成されると考えられる。ただし、結晶構造におけるこれら 3 残基の配置は Fe-S クラスターの結合には適していないため、構造変換が必要と考えられる。

SufS は基質のシステインから硫黄原子を引き抜いて persulfide (-SSH) の形で SufE に渡し、SufE からさらに SufBCD 複合体の SufB に渡されることが示されているが、SufB のどのアミノ酸が受け取るのかは特定されていない。そこで、機能不全となる変異を導入した 8 種類の変異型 SufBCD 複合体を精製し、SufS と SufE の精製標品とを組み合わせ、*in vitro* での相互作用を解析したところ、SufB<sup>C254</sup> に変異を導入した場合でのみ硫黄原子の転移活性が全く見られなくなった。したがって、SufE から硫黄原子を受け取るのは

SufB<sup>C254</sup>であるということが明らかになった。

SufB<sup>C254</sup>は、 $\beta$ -ヘリックスコアドメインN末端側の機能領域に位置しており、Fe-Sクラスターの新規形成部位と予想されるSufBとSufDの会合面までは 25 Å 以上離れている。そこで、SufBCD複合体の結晶構造を精査したところ、SufBの $\beta$ -ヘリックスコアドメインの内部に、SufB<sup>C254</sup>からSufB<sup>C405</sup>までつながるトンネルを見出した。このトンネルを構成するアミノ酸残基は保存性の高いものが多く、なかでもSufB<sup>Q285</sup>とSufB<sup>K303</sup>は本研究で明らかにした機能残基である（上述）ことから、このトンネルの重要性が裏付けられた。

以上の知見を考え合わせて、SufBCD複合体の作動機構を次のように推定した。1) 硫黄原子はSufEからSufB<sup>C254</sup>に渡される。2) この硫黄原子はおそらく還元されることによってSufB<sup>C254</sup>から遊離し、コアドメイン内部のトンネルを通過してSufB<sup>C405</sup>へと移動する。3) ATPの結合に共役してSufC二分子が会合し、SufBとSufDの会合面の構造が大きく変化する。4) その構造変化によって、会合面に位置するSufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup>が露出し、Fe-Sクラスターが新規に形成される。本研究ではこのように、SUFマシナリーにおけるFe-Sクラスターの生合成について、重要な反応機構を提唱した。

## 第 1 章 序論

鉄硫黄 (Fe-S) タンパク質は、Fe-S クラスターをコファクターとして持つタンパク質の総称である。Fe-S クラスターは一般に、[2Fe-2S]、[4Fe-4S]または[3Fe-4S]の形でポリペプチド内の主にシステイン残基に配位結合している<sup>1</sup> (Fig. 1)。まれにはあるが、ヒスチジンやアスパラギン酸、アルギニン、セリン、スレオニンが配位する場合も知られている<sup>1,2</sup>。これまでに 500 種類を超える多様な Fe-S タンパク質が報告されており、それらは呼吸、光合成、窒素固定、TCA 回路や遺伝子の発現制御などで、重要かつ多彩な役割を担っている<sup>3-6</sup>。Fe-S クラスターは、*in vitro* で鉄イオンと硫化物イオンを嫌気条件下で混合するだけの簡単な反応で合成されるが、ほぼ全ての生き物は Fe-S クラスターの生合成システムを保持している。高濃度の鉄イオンや硫化物イオンは細胞にとって毒性が強いため、それらの毒性を回避するよう効率的にハンドリングするシステムが進化的に保存されてきたと考えられる。Fe-S クラスターの生合成系として、バクテリアでは NIF、ISC 及び SUF マシナリーが同定されている (Fig. 2)<sup>7-9</sup>。NIF マシナリーは窒素固定細菌やピロリ菌など一部の嫌氣的/微好氣的生物に見られる。ISC マシナリーは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -プロテオバクテリアやミトコンドリアに分布している。SUF マシナリーはより広く、真正細菌全般から古細菌、植物の色素体に分布している<sup>9-12</sup>。

NIF マシナリーは 1989 年、Dean らによって最初に報告され、彼らは窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* の *nifU* と *nifS* 遺伝子がニトロゲナーゼに特有な FeMo コファクター [Mo-C-7Fe-9S-homocitrate] や P クラスター [8Fe-7S] などの金属コファクターの形成に必要であることを見出した<sup>7</sup>。このマシナリーは NifS と NifU の 2 つのタンパク質で構成されており、ニトロゲナーゼのコファクター生合成に必要な Fe-S クラスターを新規に組立てて、[4Fe-4S]クラスターの形で NifB に渡すと考えられている<sup>13</sup>。ニトロゲナーゼのコファクター生合成には、他にも多数の酵素が関与しており、最終的に P クラスターと FeMo コファクターが形成されてニトロゲナーゼアポタンパク質 (NifD-NifK) に渡される。ニトロゲナーゼにおいて電子は P クラスターから FeMo コファクターへと



渡され、FeMo コファクター上で N<sub>2</sub>が還元される<sup>13</sup>。

NIF マシナリーは、*A. vinelandii* のような窒素固定細菌ではニトロゲナーゼの成熟化に特化しているが、窒素固定を行わない *Entamoeba histolytica* や *Helicobacter pylori* ではニトロゲナーゼ以外の Fe-S タンパク質の成熟化を担っている<sup>14</sup>。NIF マシナリーの成分のひとつ NifS は、pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 依存的に L-cysteine から硫黄原子 (S<sup>0</sup>) を引き抜き、L-alanine へと変換するシステインデサルフラゼであり、引き抜いた S<sup>0</sup> を NifU に供与する。NifU は 3 種類のドメインから構成されるタンパク質で、中央ドメインに安定な[2Fe-2S]クラスターを結合している。このクラスターは電子を N 末端ドメインに供給し、N 末端ドメインで Fe-S クラスターが新規に組立てられると考えられている。NifU の C 末端ドメインは、N 末端ドメインで組み立てられた Fe-S クラスターをアポ型タンパク質に運搬する役割があるのではないかと考えられている<sup>15,16</sup>。NIF マシナリーでは、このように 2 種類の成分で Fe-S クラスターを形成するのに対して、ISC と SUF マシナリーはいずれも 6 種類以上の成分から構成される複雑な多成分酵素系である。

大腸菌は ISC と SUF マシナリーの 2 種類の Fe-S クラスター生合成系を保持しており、それらは独立して機能している。これらの二重欠失は合成致死となるが、どちらか一方でも存在していれば生育することが可能である<sup>9</sup>。ただし、結核菌や枯草菌などは SUF マシナリーを唯一の Fe-S クラスター生合成系としている一方、緑膿菌やコレラ菌などは ISC マシナリーを唯一の生合成系としている<sup>17-20</sup>。大腸菌の *iscSUA-hscBA-fdx-iscX* オペロンにコードされる ISC マシナリーは、通常の生育条件で高発現しており、そのオペロンの破壊は Fe-S クラスター形成能の低下と生育の遅延を引き起こす<sup>21</sup>。一方、*sufABCDSE* オペロンにコードされる SUF マシナリーは、通常の条件では発現が抑えられており、過酸化水素センサー OxyR や鉄依存レギュレーター Fur によって、過酸化水

素ストレス、鉄飢餓条件下で発現が誘導される<sup>10</sup>。また、これらのオペロンは不安定な [2Fe-2S] クラスターをセンサーとする転写制御タンパク質の IscR によっても制御されている<sup>22,23</sup>。ホロ型の IscR は *isc* オペロンを負に制御し、逆にアポ型の場合には *suf* オペロンを正に制御する。したがって、細胞内で Fe-S クラスターが不足しているときには IscR がアポ型となり、*isc* と *suf* オペロンの発現が誘導されて Fe-S クラスターの供給が促進される。*isc* オペロンの欠失が深刻な生育の遅延を示すのに対して、*suf* オペロンの欠失は、通常の生育条件でほとんど影響が見られない<sup>9</sup>。大腸菌で SUF マシナリーは、鉄飢餓や酸化ストレス環境でのバックアップシステムとして用いられている。また、*in vitro* の実験においても SUF マシナリーの成分は酸化ストレスに耐性があることが示されている<sup>24-27</sup>。

大腸菌の ISC マシナリーは7種類の成分から構成されており、そのうち IscS は NifS に相同なシステインデサルフラゼとして、L-cysteine から S<sup>0</sup> を引き抜いて IscU に渡す。IscS は IscU の他にもチアミン合成や tRNA の硫黄修飾に関わる ThiI や TusA などのタンパク質に S<sup>0</sup> を渡すことができる<sup>28,29</sup>。IscU は NifU の N 末端ドメインと相同なタンパク質で、IscS から S<sup>0</sup> を受け取り、Fe-S クラスターを新規に形成する足場タンパク質として機能する。IscA は Fe イオンとの親和性が高いことから Fe シャペロンとして機能する可能性も提唱されているが、最近の研究では、[4Fe-4S]クラスターを特異的にアポ型のタンパク質に運搬する A-タイプキャリアタンパク質と考えられている<sup>30-32</sup>。HscA は Hsp70 型のシャペロンで、HscB はそのコシャペロンとして働く。これらは協調して IscU に結合して ATP 依存的に IscU の構造を変化させ、IscU から Fe-S クラスターをアポ型タンパク質へ受け渡す反応を促進すると考えられている<sup>33-35</sup>。Fdx は [2Fe-2S] クラスターを持つタンパク質で、IscU が Fe-S クラスターを形成するのに必要な電子を供給すると考えられている。

2002年、高橋・徳本は遺伝学的な研究によって *sufABCDSE* オペロンが Fe-S クラスター形成に関与することを初めて明らかにした。すなわち、*isc* オペロンを欠失させた大腸菌変異株で *suf* オペロンを過剰に発現させると、Fe-S クラスター形成能が回復すること、また  $\Delta isc$  のバックグラウンドでは *suf* オペロンの6種類の成分すべてが必須であることが示された<sup>9</sup>。以来、SUF マシナリーを構成するこれらの成分の機能 (Fig. 3) については、盛んに研究が進められてきたが、未だに不明な点が多い。成分のひとつ SufA は、IscA と相同で、これらの間には機能的な互換性があることが知られており、A-タイプキャリアタンパク質と考えられている<sup>36-38</sup>。SufA については、アポ型二量体の結晶構造が報告されており、二量体の会合面で Fe-S クラスターを結合するのではないかと予想されている<sup>36</sup>。

SufS は IscS のパラログだが、SufS 単独ではシステインデサルフラゼ活性は低い。その活性はセレノシステインを基質とした場合の 290 分の 1 程度であり、当初はセレノシステインリアーゼであると考えられていた<sup>39</sup>。しかし、SufS は SufE と相互作用することで確かにシステインデサルフラゼとして機能し、Fe-S クラスターの硫黄の供給源となることが示されている<sup>40</sup>。SufS は PLP をコファクターとして有しており、休止状態では SufS<sup>K226</sup> の側鎖の  $\epsilon$ -アミノ基が PLP のアルデヒド基とシッフ塩基を形成している。基質 L-cysteine が結合すると、L-cysteine の  $\alpha$ -アミノ基が SufS<sup>K226</sup> の  $\epsilon$ -アミノ基と置換して、L-cysteine-PLP のシッフ塩基を形成する。この状態の L-cysteine に対して、SufS の活性残基である SufS<sup>C364</sup> が求核攻撃することによって S<sup>0</sup> を引き抜き、SufS<sup>C364</sup> に S<sup>0</sup> が結合した状態の persulfide (-SSH) を形成する<sup>41</sup>。この persulfide の S<sup>0</sup> は、硫黄原子のシヤトルタンパク質である SufE へと、特異的なタンパク質-タンパク質相互作用によって受け渡される<sup>40,42</sup>。SufE は SufS と結合すると、SufE<sup>C51</sup> を含むループが構造変化を起こして、SufE<sup>C51</sup> が SufS<sup>C364</sup> の -SSH に求核攻撃すると考えられている<sup>43-45</sup>。大腸菌では SufS から SufE に硫黄原子が渡されるが、Firmicutes の SUF マシナリーには SufE が存在せ

ず、代わりに SufU が存在している。この SufU は、ISC マシナリーにおける Fe-S クラスタ形成の足場タンパク質である IscU のホモログである<sup>46</sup>。SufU には IscU で Fe-S クラスタのリガンドとなるシステイン残基が保存されているが、NMR 構造によるとこの部位には  $Zn^{2+}$  が配位している。*In vitro* の解析から、SufU は IscU とは異なり、Fe-S クラスタの足場ではなく硫黄原子のキャリアとして機能する可能性が示唆されている<sup>47</sup>。また最近、当研究室では遺伝学的な研究によって、枯草菌 SufU は大腸菌 SufE と機能的な互換性があること、すなわち SufU は硫黄原子のキャリアとして機能することが明確に示されている（横山修士論文、2015）。

システインデサルフラゼは活性中心のシステインを含むモチーフの配列から、group I と II に分類されている。SufS は group II に属しており、このグループでは RXGHHCA 配列が保存されている<sup>48</sup>。大腸菌には group II システインデサルフラゼとしてもうひとつ CsdA が存在しており<sup>48</sup>、CsdA は SufS-SufE の関係と同様に CsdE と特異的に相互作用することが知られている<sup>49</sup>。CsdA-CsdE は Fe-S クラスタの形成ではなく、TcdA の機能をサポートして tRNA 修飾（環状  $N^6$ -threonylcarbamoyladenosine の形成）に関与している<sup>50</sup>。一方、IscS や NifS は group I に属するシステインデサルフラゼで、活性中心のシステインを含むモチーフとして SSGSACTS 配列が保存されている<sup>48</sup>。Group I 酵素の活性中心のシステインを含むループは group II のものより長く、フレキシビリティが高いと考えられている<sup>51,52</sup>。Group II 酵素は group I 酵素と異なり、単独での活性が低く抑えられているが、パートナーのタンパク質が存在することでその活性が著しく促進する。すなわち、SufS は SufE に、CsdA は CsdE に  $S^0$  を受け渡すことでシステインデサルフラゼ活性は大きく上昇する<sup>40,49</sup>。また、SufS+SufE のシステインデサルフラゼ活性は、さらに SufBCD 複合体を加えることにより数倍増加することが報告されている<sup>24,40,53</sup>。加えて、質量分析によって、実際に SufB に  $S^0$  が付加されることが示されている<sup>53</sup>。これらの知見は、SufS が L-cysteine から引き抜いた  $S^0$  が、SufE を

經由して SufBCD 複合体の SufB へ渡されることを示している。しかし、SufB のどのアミノ酸が  $S^0$  を受け取るかは明らかにされていない (Fig. 4)。

SufB、SufC、SufD は 3 成分の複合体を構成し、SUF マシナリーの中核、すなわち Fe-S クラスターの新規形成を担うと考えられている。これらのタンパク質については、大腸菌の SufC 単体、SufD 二量体やメタン生成古細菌 *Methanosarcina mazei* Go1 の SufB 二量体のそれぞれの結晶構造が明らかにされている (Fig. 5A-C) <sup>54,55</sup>。また、これらのタンパク質のヘテロ複合体として、SufCD 複合体、SufBCD 複合体の結晶構造も明らかにされている (Fig. 5D, E) <sup>56,57</sup>。これらの複合体はいずれも 2 分子の SufC を含んでおり、それぞれ SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>2</sub> と SufB<sub>1</sub>-SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>1</sub> のストイキオメトリで構成されている。SufB と SufD は低いながらも相同性があり (Fig. 6)、よく似た立体構造をとっている。これらは N 末端ヘリカルドメイン、C 末端ヘリカルドメインと中央の  $\beta$ -ヘリックスコアドメインの 3 種のドメインで構成されている。中央のコアドメインでは、20 本の  $\beta$ -ストランドがらせん状に巻き付いて、二つの平行  $\beta$ -シートを形成している。また、SufB と SufD のダイマー会合面では、 $\beta$ -ヘリックスコアドメインの C 末端側で逆平行  $\beta$ -シートを形成することで結合している。SufCD 複合体と SufBCD 複合体に二分子含まれる SufC は、SufB と SufD の C 末端ヘリカルドメインにそれぞれひとつずつ結合している。SufC は膜内の輸送タンパク質である ABC トランスポーターの ATPase サブユニット (ABC-ATPase) と類似性を示す。また、SufC の ATPase 活性は SufB または SufD と結合することで促進されることが示されている <sup>58-60</sup>。ABC-ATPase の場合、二分子の間に二分子の ATP を挟み込んで会合し、ATP を加水分解して解離することで、膜貫通サブユニットの構造変化を引き起こすと考えられている <sup>61</sup>。SufBCD 複合体の SufC 二分子は、結晶構造では 40 Å 以上離れているが、会合面のアミノ酸を部位特異的にシステインに置換 (Y86C) させた場合に、ATP の存在下で会合して S-S 結合を形成することが示されている。ATP に依存した SufC の会合と解離は、複合体全体の構造を大きく変化

させる可能性がある<sup>56,57,60</sup>。

Euryarchaeota の中には SufB と SufC のみで構成される SUF マシナリーが、また *Blastocystis* では SufC と SufB が融合した SufCB タンパク質が見つかっており、これらの生物では SufBC 複合体が Fe-S クラスターの生合成を担っていると考えられる<sup>46,62</sup>。分子系統解析から、進化の初期段階では SufB と SufC のみで Fe-S クラスター形成を行っていたのではないかと推測され、*sufD* 遺伝子は *sufB* 配列の遺伝子重複によって生じたと考えられている<sup>11</sup>。大腸菌においても、SufB と SufC は SufB<sub>2</sub>-SufC<sub>2</sub> という複合体を形成し得る。この SufBC 複合体や、SufCD 複合体の生理的意義はわかっていないが、大腸菌では SufB、SufC、SufD の3成分のすべてが *in vivo* での Fe-S クラスター形成に必須であることから<sup>9</sup>、SufBC や SufCD ではなく SufBCD 複合体が主要な複合体として機能すると考えられる。

SufB については、上記のように SufE と相互作用して硫黄原子を受け取るという性質に加えて、*in vitro* では化学的な Fe-S クラスターの再構成によって（非常に不安定ではあるが）[4Fe-4S]クラスターを持つようになることが報告されている<sup>53</sup>。一方、大腸菌から嫌氣的に精製した SufBCD 複合体は、[4Fe-4S]クラスターとは異なるクラスターを保持することが示されており、予備的な段階だが、リニア型の[3Fe-4S]クラスターではないかと考えられている<sup>63</sup>。SufB には CxxCxxxC という Fe-S クラスター結合モチーフが存在し、この部位で Fe-S クラスターを結合する可能性が指摘されている<sup>53</sup>。また、SufB のアミノ酸配列には *p*-cresol methylhydroxylase ファミリーの FAD 結合モチーフも含まれており、嫌気条件下では SufBCD 複合体あたりひとつの FADH<sub>2</sub> を結合した状態で精製されることが報告されている<sup>63-65</sup>。これらの知見から、SufBCD 複合体では SufB に硫黄原子と鉄原子が集積され、FADH<sub>2</sub> から還元力の提供を受けて、Fe-S クラスターが新規に組立てられると考えられているが、そのメカニズムは不明である。

大腸菌の Fe-S タンパク質は 130 種類以上が知られており、重要な反応を担っているが、それらのほとんどは必須というわけではない (Fig. 7)。それらの中で生育に必須であると報告されているのはイソプレノイド生合成の 2 種類の 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) 経路に含まれる [4Fe-4S] タンパク質 IspG と IspH のみである<sup>66-68</sup>。一方、多くの真核生物や放線菌など一部のバクテリアは、イソプレノイド生合成系のメバロン酸 (MVA) 経路を利用しており、この経路には Fe-S タンパク質が一切含まれていない (Fig. 8)。最近、当研究室の田中らにより、放線菌由来の MVA 経路の遺伝子群を大腸菌に導入してイソプレノイド合成経路を改変することで、Fe-S クラスター生合成系の必須性を回避し、*isc* と *suf* の両オペロンを破壊した変異株が構築された<sup>32</sup>。この大腸菌変異株を用いることで Fe-S クラスター生合成系の遺伝子を自在に操作することができるようになった。そこで、本研究ではこの変異株を用いて SufB・SufC・SufD の遺伝学的解析を行い、機能残基・機能領域を明らかにすることとした。さらに、*in vitro* の生化学的な解析を組み合わせることによって、具体的な作動機構を明らかにすることを目指した。

先に述べたように、SufC は ABC-ATPase と相同で、主要なモチーフも保存されている (Fig. 9)。そのうち、Walker A モチーフ (GxxxxGKT/S) は ATP の  $\alpha$ -および  $\beta$ -リン酸基との結合部位である。Walker B モチーフ ( $\phi\phi\phi\phi$ DE、 $\phi$  は疎水性アミノ酸残基) は  $Mg^{2+}$  に配位する。ABC signature (LSGGQ) は二量体を形成するもう片方のサブユニットに結合した ATP の  $\gamma$ -リン酸基と結合する。H-モチーフ (または H-loop, switch region) には ATP の結合と加水分解に関わるヒスチジン残基が保存されている<sup>61,69-71</sup>。第 2 章ではまず、SufC の ATPase 活性が Fe-S クラスター生合成に必要なのかを調べるために、これらのモチーフに対して部位特異的な変異を導入し、大腸菌変異株の相補実験系を用いて機能解析を行った。その結果、Walker A モチーフの SufC<sup>K40</sup>、Walker B モチーフの SufC<sup>E171</sup>、H-モチーフの SufC<sup>H203</sup> が *in vivo* 機能に必須なことがわかった。さらに、これ

らの変異型の SufBCD 複合体を精製し、*in vitro* で ATPase 活性を調べたところ、活性はバックグラウンドレベルにまで減少していた。したがって、SufC の ATPase 活性が Fe-S クラスタース合成に必須であることがわかった。

つぎに、SufB と SufD の中で鉄原子、硫黄原子、あるいは Fe-S クラスタースを結合する可能性があり、かつ保存性の高い SufB の 68 残基と SufD の 9 残基に対して、部位特異的にアラニンへの置換を行った。その結果、SufB の 8 種類のアミノ酸残基 (SufB<sup>R226</sup>、SufB<sup>N228</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>Q285</sup>、SufB<sup>W287</sup>、SufB<sup>K303</sup>、SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>) と SufD の 1 つのアミノ酸残基 (SufD<sup>H360</sup>) は *in vivo* 機能に必須であることがわかった。これらのアミノ酸残基は SufB の  $\beta$ -ヘリックスコアドメインの N 末端側 (Region A) と、SufB-SufD 会合面 (Region B) の 2 つの領域に存在し、Region B に Fe-S クラスタースを結合しうる 3 残基の必須アミノ酸が集中していることから、この領域で Fe-S クラスタースが新規に形成されると考えられる。これらの結果に基づいて、第 3 章では部位特異的変異を導入して機能不全となった SufBCD 複合体を精製し、SufS-SufE との *in vitro* 相互作用を解析した。その結果、Region A に位置する SufB<sup>C254</sup> が硫黄原子の受容部位であることが明らかになった。さらに、Region A と Region B をつなぐトンネルを SufB の  $\beta$ -ヘリックスコアドメインの内部に見出した。硫黄原子はこのトンネルを通過して Region A から Region B まで移動する可能性が考えられる。これらの知見に基づいて、SufBCD 複合体による Fe-S クラスタース形成のメカニズムを考察する。



## 第 2 章 SufBCD 複合体の *in vivo* 機能解析

## 序

大腸菌の Fe-S タンパク質は 130 種類以上が知られており、それらの機能を支えているのが Fe-S クラスタースynthesis系である。大腸菌には *iscSUA-hscBA-fdx-iscX* オペロンにコードされる ISC マシナリーと、*sufABCDSE* オペロンにコードされる SUF マシナリーが存在し、これらのマシナリーによって Fe-S クラスタースynthesis系が組立てられ、アポタンパク質へと供給されている<sup>72,73</sup>。*isc* オペロンは通常の条件で高発現しており、*suf* オペロンは鉄飢餓、酸化ストレス条件下で発現が誘導される<sup>10</sup>。また、*isc* オペロンの破壊は著しい生育の遅延を引き起こすが、*suf* オペロンの破壊では生育に影響がみられない<sup>9</sup>。ただし、*suf* オペロン破壊株は過酸化水素への感受性が強くなることが報告されている<sup>26</sup>。これらのマシナリーは Fe-S クラスタースynthesis系を独立して行っており、*isc* と *suf* オペロンの二重欠失は Fe-S クラスタースynthesis系を形成できなくなり合成致死となる<sup>9</sup>。そのため、これまでは詳細な遺伝学的解析が困難だった。しかし最近、当研究室では Fe-S クラスタースynthesis系の必須性を回避した大腸菌変異株が構築されている<sup>32</sup>。

大腸菌の Fe-S タンパク質は重要な機能を担っているが、それらのほとんどは必須というわけではない。それらの中で生育に必須と報告されているのはイソプレノイド合成に関わる 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) 経路に含まれる[4Fe-4S]タンパク質の IspG と IspH のみである<sup>66-68</sup>。一方、多くの真核生物や放線菌など一部のバクテリアに分布するイソプレノイド合成系メバロン酸 (MVA) 経路には、Fe-S タンパク質が一切含まれていない。最近、当研究室の田中らにより、放線菌由来の MVA 経路の遺伝子群を大腸菌に導入してイソプレノイド合成経路を改変することで、Fe-S クラスタースynthesis系の必須性を回避させ、*isc* と *suf* の二重破壊株が構築されている<sup>32</sup>。この大腸菌変異株を用いることで Fe-S クラスタースynthesis系の遺伝子を自在に操作することがで

きるようになった。そこで、本研究ではこの変異株を用いて SufB・SufC・SufD の遺伝学的解析を行うことにした。

SufBCD 複合体は SUF マシナリーにおける中核成分で、Fe-S クラスターの新規形成を担う足場タンパク質と考えられている<sup>64</sup>。最近、我々のグループでは SufBCD 複合体の結晶構造を明らかにした<sup>57</sup> (Fig. 5E)。この複合体は SufB<sub>1</sub>-SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>1</sub> のストイキオメトリで構成されている。複合体に 2 分子含まれる SufC は ABC トランスポーターの ATPase サブユニット (ABC-ATPase) と相同で、主要なモチーフは全て保存されている (Fig. 9)。Walker A モチーフ (GxxxxGKT/S) は ATP の  $\alpha$ -および  $\beta$ -リン酸基との結合部位である。Walker B モチーフ ( $\phi\phi\phi\phi$ DE、 $\phi$  は疎水性アミノ酸残基) は Mg<sup>2+</sup> に配位する。ABC signature (LSGGQ) は二量体を形成するもう片方のサブユニットに結合した ATP の  $\gamma$ -リン酸基と結合する。H-モチーフ (または H-loop, switch region) には ATP の結合と加水分解に関わるヒスチジン残基が保存されている<sup>61,69-71</sup>。ABC-ATPase は、二分子の間に ATP を二分子挟み込んで会合し、ATP を加水分解して解離することで、膜貫通サブユニットの構造変化を引き起こすと考えられている<sup>61</sup>。同様に SufBCD 複合体の SufC 二分子も、ATP の存在下で会合することが示されており、これが SufB と SufD の構造を大きく変化させる可能性が予想されている<sup>56,57,60</sup>。本研究ではまず、SufC の ATPase 活性が Fe-S クラスター生合成に必要なのか確かめるために、これらのモチーフに対して部位特異的な変異を導入し、大腸菌変異株の相補実験系を用いて機能解析を行った。その結果、Walker A モチーフの SufC<sup>K40</sup>、Walker B モチーフの SufC<sup>E171</sup>、H-モチーフの SufC<sup>H203</sup> が SufC の *in vivo* 機能に必須なことがわかった。さらに、これらの変異型の SufBCD 複合体を精製し、*in vitro* で ATPase 活性を調べたところ、活性はバックグラウンドレベルにまで減少していた。したがって、SufC の ATPase 活性は確かに Fe-S クラスター生合成に必須であることがわかった。

SufB については、*in vitro* で化学的に[4Fe-4S]クラスターが再構成されることや、SufE から Fe-S クラスターの材料となる硫黄原子 (S<sup>0</sup>) を受け取ることが明らかとなっている<sup>53</sup>。SufD の役割についてはよくわかっていないが、鉄の獲得に必要なのではないかという説がある<sup>63</sup>。SufB と SufD の間には相同性が認められ、その立体構造はとてもよく似た N 末端ヘリカルドメイン、β-ヘリックスコアドメイン、C 末端ヘリカルドメインの 3 つのドメインで構成されている。β-ヘリックスコアドメイン C 末端側の SufB と SufD の会合面では、ふたつのアミノ酸残基 SufB<sup>C405</sup> と SufD<sup>H360</sup> が *in vivo* 機能に重要であることが示されている<sup>57</sup>。これらの残基の側鎖は β-ヘリックスの内部に埋もれているが、ATP の存在下では (おそらく SufC 2 分子が会合することにより) 構造変化をおこして、溶媒へと露出されることが示されている<sup>57</sup>。SufB<sup>C405</sup> と SufD<sup>H360</sup> はこの構造変化を利用して Fe-S クラスターの形成に関与することが予想されている。ただし、Fe-S クラスターを結合するには 4 つの配位子が必要であり、この 2 つのアミノ酸残基だけでは不足している。また、SufB においては SufD との会合面から離れた領域に CxxCxxxC という Fe-S クラスター結合モチーフも見られ、こちらが Fe-S クラスター形成部位として機能するという可能性も提唱されている<sup>53</sup>。

このように、SufB と SufD については Fe-S クラスターの新規形成部位として中心的な役割を果たすと考えられるが、その機能部位や反応機構などは明らかになっていない。そこで、本研究では SufB と SufD の機能に重要なアミノ酸残基や領域を同定する目的で、鉄原子、硫黄原子、あるいは Fe-S クラスターを結合する可能性があり、かつ保存性の高い SufB の 68 残基と SufD の 9 残基に対して、部位特異的にアラニンへの置換を行った。その結果、SufB の 8 種類のアミノ酸残基 (SufB<sup>R226</sup>、SufB<sup>N228</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>Q285</sup>、SufB<sup>W287</sup>、SufB<sup>K303</sup>、SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>) と SufD の 1 つのアミノ酸残基 (SufD<sup>H360</sup>) が *in vivo* 機能に重要であることがわかった。結晶構造に当てはめると、これらの重要残基のうち、6 種類 (SufB<sup>R226</sup>、SufB<sup>N228</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>Q285</sup>、SufB<sup>W287</sup>、SufB<sup>K303</sup>) は SufB の β

ーヘリックスコアドメインの N 末端側 (Region A と呼ぶ) に集中しており、残りの 3 残基 (SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup>) は SufB-SufD 会合面 (Region B と呼ぶ) に集中していることが判明した。Region B の 3 残基はいずれも、Fe-S クラスターの配位子として機能し得るアミノ酸である。この 3 残基の近傍に着目して多重変異を導入したところ、SufB<sup>E432</sup>、SufB<sup>H433</sup>、SufD<sup>C358</sup> の 3 重置換が重篤な影響を示すことが判明した。これらの結果から、Region B では SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup> を配位子として Fe-S クラスターが新規に形成されるという可能性が示唆された。また、4 番目の配位子については、重複した役割をもつ SufB<sup>E432</sup>、SufB<sup>H433</sup>、SufD<sup>C358</sup> のうちのどれかひとつが用いられるのではないかと考えられる。

## 材料と方法

### プラスミドの構築

本研究で使用した大腸菌株とプラスミドは Table 1 に、プライマーは Table 2 に示す。*sufB*、*sufD* に対する部位特異的変異は inverse PCR 法、または QuikChange 法を利用して導入した。具体的には、pBBR-*sufAB*、pBBR-*sufD*、または pRK-*sufCDSE* プラスミドを鋳型として、inverse PCR 法の場合には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 PCR を行った。続いて DpnI によって鋳型のプラスミドを消化し、T4 Polynucleotide Kinase (NIPPONGENE) と Ligation Convenience Kit (NIPPONGENE) を同時に 16°C、1 時間反応させた。反応物を大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入し、得られた形質転換体からプラスミドを調製した。QuikChange 法の場合には Agilent Technologies 社のマニュアルを参考にした。プライマーの中央部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 PCR を行い、DpnI によって鋳型のプラスミドを消化した後、DH5 $\alpha$  に導入し、得られた形質転換体からプラスミドを調製した。変異を導入した *suf* 遺伝子群については、全コード域の塩基配列を確認した。

### 変異型の SufB、SufC、SufD の *in vivo* 機能評価

MVA 経路の遺伝子群をコードするプラスミド pUMV22 Sp<sup>r</sup> を導入した大腸菌変異株 UT109 (*DiscUA-hscBA::Km<sup>r</sup>;  $\Delta$ sufABCDSE::Gm<sup>r</sup>*) は、MVA とグルコースの存在下で生育することができる<sup>32</sup>。この UT109 pUMV22 Sp<sup>r</sup> 株に、まず、*sufCDSE* をクローン化したプラスミド pRK-*sufCDSE* をエレクトロポレーションにより導入し、得られた形質転換体を培養して、エレクトロポレーション用のコンピテントセルを作製した。これに、*sufAB* をクローン化したプラスミド pBBR-*sufAB* を導入すると、SUF マシナリーの構成成分が

揃い、MVA に依存することなく生育することができるようになる。同様に、変異を導入した *sufB* を含む pBBR-*sufAB* プラスミドは、同様に UT109 (pUMV22 Sp<sup>r</sup>, pRK-*sufCDSE* プラスミドを含む) 株にエレクトロポレーションで導入し、MVA を含む Luria-Bertani (LB) プレート (Ap 50 µg/ml、Tc 10 µg/ml、0.4% D-glucose、200 µM MVA を含む) と、MVA を含まない LB プレート (Ap 50 µg/ml、Tc 10 µg/ml を含む) に等量スプレッドして生育を比較した。嫌気条件での培養には GAS GENERATING KIT ANAEROBIC SYSTEM (Oxoid) を用いた。変異型 SufC による相補実験は、変異を導入した pBBR-*sufC* と pRK-Δ*sufCp* プラスミド<sup>57</sup> を用いて同様に行った。変異型 SufD による相補実験には、変異を導入した pBBR-*sufD* と pRK-*sufABC-SE* プラスミド<sup>56</sup> を用いた。

### サプレッサー変異の単離

アラニンへの置換変異を導入することで、*in vivo* で機能不全となった 9 種類の変異型 SufB<sup>R226A</sup>、SufB<sup>N228A</sup>、SufB<sup>C254A</sup>、SufB<sup>Q285A</sup>、SufB<sup>W287A</sup>、SufB<sup>K303A</sup>、SufB<sup>C405A</sup>、SufB<sup>E434A</sup>、SufD<sup>H360A</sup> について、長期間培養することでサプレッサー変異が生じるか検討した。LB プレート (Ap 50 µg/ml、Tc 10 µg/ml、0.4% D-glucose、200 µM MVA を含む) 上のコロニーを、Super broth (SB) 液体培地 (Ap 50 µg/ml、Tc 10 µg/ml、0.4% D-glucose、200 µM MVA を含む) で 37°C、3 日間培養した。菌液を 5,000 rpm、4°C、5 分間遠心し、ペレットを 1 ml LB で洗浄した。ペレットに 200 µl LB を加えて懸濁し、MVA を含まない LB プレート (Ap 50 µg/ml、Tc 10 µg/ml を含む) にスプレッドした。出現したリバータントは Teriffic broth (TB) 液体培地で培養し、プラスミド DNA (pBBR-*sufAB* と pRK-*sufCDSE* の混合物) を調製した。このプラスミド DNA を DH5α に導入し、Ap 耐性、Tc 感受性で、pBBR-*sufAB* のみを含むコロニーを選択した。TB 液体培地 (Ap 50 µg/ml を含む) で 37°C 一晩培養し、Mini Plus<sup>TM</sup> Plasmid DNA Extraction System (Viogene) を用いてプラスミドを調製し、相補実験用の上記の宿主株 (UT109、pUMV22 Sp<sup>r</sup>, pRK-*sufCDSE*)

に再導入した。全てのリバータントから調製した pBBR-*sufAB* で相補能 (MVA を含まない培地での生育) が観察できたことから、二次的な変異がこのプラスミド上にあることを確認した。次いで、pBBR-*sufAB* 内の *sufAB* コード域の DNA 配列を調べて、二次的なサプレッサー変異の部位を特定した。

### SufB の機能残基に対するランダム変異の導入

Inverse PCR 法によって、SufB の機能残基 8 種類に部位特異的なランダム変異を導入した。アラニンへの置換変異を持つ pBBR-*sufAB* を鋳型として、アラニン置換部位 (SufB<sup>R226A</sup>、SufB<sup>N228A</sup>、SufB<sup>C254A</sup>、SufB<sup>Q285A</sup>、SufB<sup>W287A</sup>、SufB<sup>K303A</sup>、SufB<sup>C405A</sup>、SufB<sup>E434A</sup>) のコドンに NNK (N は A、T、G、C の 4 塩基、K は G、T の 2 塩基のミックスで、20 種類のアミノ酸残基にランダムに置換する) に置換するプライマー (Table 1) を用いて inverse PCR を行った。続いて、メチル化サイトを切断する制限酵素 DpnI を加えて、鋳型プラスミドを消化した。PCR 産物に、T4 Polynucleotide Kinase (Nippongene) と Ligation-Convenience Kit (Nippongene) を加えて、Kinase/Ligase 同時反応を行った。この Ligation 産物を、ランダムな点変異を持つプラスミドライブラリーとした。

このプラスミドライブラリーを、相補実験用の上記の宿主株 (UT109、pUMV22 Sp<sup>r</sup>、pRK-*sufCDSE*) にエレクトロポレーションで導入し、37°C で MVA を含まない LB プレート (Ap 50 µg/ml を含む) で培養した。出現したコロニーは、TB 液体培地 (Ap 50 µg/ml を含む) で定常期になるまで培養し、プラスミドを調製した。このプラスミドを DH5α に再導入し、Ap 耐性、Tc 感受性で、pBBR-*sufAB* のみを含むコロニーを選択した。TB 液体培地 (Ap 50 µg/ml を含む) で 37°C 一晚培養し、Mini Plus<sup>TM</sup> Plasmid DNA Extraction System (Viogene) を用いてプラスミドを調製した。調製したプラスミドの DNA 配列を調べ、どのようなコドンに変わっているか同定した。



## 大腸菌変異株の生育速度の測定

サプレッサー変異型の SufB、ならびに SufB-SufD 会合面への多重変異を導入した大腸菌変異株については、液体培地での生育をモニターした。LB 培地 (Ap 50 µg/ml、Tc 10 µg/ml を含む) で前培養したのち、660 nm の濁度が 0.01 となるように、4 ml の同じ培地に植菌した。L 字管で Bio-Photorecorder TN1506 (Advantec) を用いて、37°C、60 rpm で震盪し、30 分毎に 660 nm の濁度を測定した。

## ウエスタンブロット解析

大腸菌細胞内で、Fdx に [2Fe-2S] クラスターが形成されるか調べるため、native PAGE で holo-Fdx と apo-Fdx を分離し<sup>74</sup>、western blotting を行った。具体的には、まず 2 ml SB 培地 (Ap 50 µg/ml、Tc 10 µg/ml、0.4% D-glucose、200 µM MVA を含む) で 37°C、3 日間培養し、濁度 (OD<sub>600</sub>) を測定した。集菌し、OD<sub>600</sub> の値 × 100 µl の 50 mM Tris-HCl pH7.8、200 µg/ml lysozyme、プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク) を含む溶液を加えて懸濁し、37°C、5 分間インキュベートした。細胞を超音波で破碎し、18,800 xg、4°C、20 分間遠心後、上清を回収した。サンプルを native PAGE (15%ゲル) で分離し、抗 Fdx 抗体を用いて western blotting を行った。また、SufB、SufC および SufD タンパク質の発現量は、上記のサンプルを SDS-PAGE (12.5%ゲル) で分離し、対応する抗体を用いて western blotting で確認した。検出には ECL prime kit (GE Helthcare) を用いた。

## SufBCD 複合体の過剰発現と精製

*suf* オペロン全長をコードするプラスミド pGSO164<sup>40</sup> は大腸菌 TOP10 株に導入し、SUF マシナリーの全成分を発現させた。SufC に部位特異的変異を導入した pGSO164

は、YT2512 株 (*ΔsufABCDSE*)<sup>9</sup> に導入して発現させた。過剰発現には TB (Ap 50 μg/ml を含む) 培地を用いた。前培養液を 1/200 に植菌し、37°C で 2 時間培養した後、L-arabinose (終濃度 0.2%) を添加して発現を誘導し、OD<sub>600</sub> = 0.4-0.6 まで培養し集菌した。菌体は 50 mM Tris-HCl pH 7.8、100 mM NaCl、1 mM DTT 溶液に懸濁して超音波破碎した。22,000 xg、4°C、30 分間遠心分離し、可溶性画分を回収した。(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 20% 飽和になるよう、氷上で 30 分かけて徐々に加えた後に 30 分間攪拌を続けて塩析を行い、22,000 xg、4°C、30 分間遠心分離して上清を回収した。サンプルを 50 mM Tris-HCl pH 7.8、100 mM NaCl、20% 飽和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1 mM DTT 溶液で平衡化した HiPrep 16/60 Phenyl FF low sub カラム (GE Healthcare) にロードし、20-0% 飽和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の濃度勾配で溶出した。各画分を SDS-PAGE でチェックし、SufBCD 複合体を回収し、50 mM Tris-HCl pH 7.8、1 mM DTT 溶液で透析を行った。サンプルを同じ溶液で平衡化した Mono Q HR 5/50 GL カラム (GE Healthcare) にロードし、0-1 M NaCl の濃度勾配で溶出した。SufBCD 複合体を含むフラクションを濃縮し、50 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl 溶液で平衡化した HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR カラム (GE Healthcare) にロードした。精製したタンパク質は VIVASPIN 20 (Sartorius) を用いて濃縮し、-80°C で保存した。

### ATP 加水分解活性の測定

ATP の加水分解速度は、生じた ADP を NADH の酸化に共役させることで測定した。反応は、250 μl 中で、50 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM KCl、1 mM DTT、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.16 mM NADH、1 mM ホスホエノールピルビン酸、50 U ピルビン酸キナーゼ、50 U 乳酸デヒドロゲナーゼ、2 mM ATP の組成で、20°C で行った。生成した ADP は、NADH の減少を 340 nm の吸光度を測定することにより定量した。

## 結果

### SufC における機能残基の同定

SufBCD 複合体は、SufB<sub>1</sub>-SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>1</sub> のストイキオメトリで構成されており、Fe-S クラスターの新規形成を担う足場タンパク質として働くと考えられている。この複合体に 2 分子含まれる SufC は ABC トランスポーターの ATPase サブユニットと相同で、2 分子の SufC が 2 分子の ATP を挟み込んで head-to-tail の形で会合することで SufB と SufD の構造変化を引き起こし、その構造変化を利用して Fe-S クラスターを組立てるのではないかと推定されている<sup>57</sup>。そこで、本研究ではまず SufC の ATPase 活性が本当に Fe-S クラスター生合成に必要なのか調べることにした。

本研究では SufC に部位特異的変異を導入し、その機能性を大腸菌変異株 UT109 の相補実験を利用して検討した。具体的には、pUMV22 Sp<sup>r</sup> プラスミドを持つ UT109 株にまず、*sufAB-DSE* を挿入したプラスミド pRK- $\Delta$ *sufCp* をエレクトロポレーションにより導入し、次いで、*sufC* を持つプラスミド pBBR-*sufC* を導入した。こうして SUF マシナリーのメンバーが揃うと、MVA に依存しないで生育するようになることを確認した。次に、SufC に部位特異的変異を導入してその影響を調べた。変異によって SufC の機能が損なわれれば、大腸菌変異株は MVA を含まない培地で生育できない。

部位特異的変異を導入する部位は、ABC-ATPase と SufC との間で保存されている Walker A モチーフ (SufC<sup>K40R</sup>)、Walker B モチーフ (SufC<sup>E171Q</sup>)、ABC signature (SufC<sup>S147A</sup>)、H-モチーフ (SufC<sup>H203A</sup>) とした (Fig. 9)。また、ABC-ATPase では保存されていないが、SufC において Walker B モチーフの SufC<sup>E171</sup> と塩橋を形成する SufC<sup>K152</sup> もアラニンに置換した。これらのうち、SufC<sup>S147A</sup> と SufC<sup>K152A</sup> を導入した大腸菌変異株は、野生型 SufC を導入した場合と比較して非常にゆっくりではあるが生育し、部分的に相補することが

わかった (Fig. 10A)。残りの SufC<sup>K40R</sup>、SufC<sup>E171Q</sup>、SufC<sup>H203A</sup> の 3 種類の変異型は、MVA を含まない培地では全く生育しなかった (Fig. 11A)。これらの変異型 SufC のタンパク質レベルを調べたところ、すべての変異型について野生型と同程度の発現量を確認することができた (Fig. 10B)。したがって、これらの変異によって相補ができなくなるのは、SufC のタンパク質の量の問題ではないと考えられる。

SufC には分子表面にヒスチジン残基やグルタミン酸残基が集中している部位があり、この部位に鉄イオンが結合する可能性を考えて SufC<sup>H25</sup>、SufC<sup>E28</sup>、SufC<sup>H30</sup>、SufC<sup>H217</sup> をアラニンに置換した。また、SufC<sup>C167</sup> もアラニンに置換してみた。しかし、これらの変異型 SufC はすべて大腸菌変異株を相補することがわかった (Fig. 10A)。したがって、これらのアミノ酸残基は Fe-S クラスター生合成には重要ではないと考えられる。

次に、*in vivo* で機能不全となった変異型 SufC (SufC<sup>K40R</sup>、SufC<sup>E171Q</sup> または SufC<sup>H203A</sup>) を含む SufBCD 複合体と、野生型の複合体を精製した。どの複合体もゲル濾過クロマトグラフィーで野生型とほぼ同じ位置に溶出されたこと、SDS-PAGE で SufB、SufC、SufD のバンドの量比が変化しないことから、SufB<sub>1</sub>-SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>1</sub> の複合体は正常に形成されていると考えられる (Fig. 11A-D)。次に、これらの精製標品を用いて ATPase 活性を測定したところ、SufC<sup>K40R</sup>、SufC<sup>E171Q</sup>、SufC<sup>H203A</sup> 変異型を含む SufBCD 複合体の ATPase 活性はどれもバックグラウンドレベルであった (Fig. 11E)。したがって、SufC は ATPase 活性を失うことで *in vivo* で機能できなくなったものと考えられる。すなわち、SufBCD 複合体による Fe-S クラスターの生合成には SufC の ATPase 活性が必要であることがわかった。

### SufB における機能残基の同定

SufB についてはこれまで、*in vitro* で化学的に Fe-S クラスターが再構成されることや

<sup>53</sup>、SufE と相互作用して Fe-S クラスター形成に必要な硫黄原子を受け取ること<sup>53</sup>が報告されており、SufBCD 複合体における Fe-S クラスターの新規形成を担うのではないかと考えられている。我々のグループでは最近 SufBCD 複合体の結晶構造を明らかにしたものの、それでも Fe-S クラスターが複合体のどこで、どのようにして形成されるかといった知見はほとんど得られなかった<sup>57</sup>。そこで、本研究では SufB と SufD に系統的な部位特異的変異を導入することで、機能残基・機能領域の同定を行うことにした。

SufB については、鉄原子や硫黄原子、あるいは Fe-S クラスターと相互作用可能で、かつ保存性の高い 68 種類のアミノ酸残基に着目して部位特異的変異を導入し、その機能性を相補実験によって評価した。まず、Fe-S クラスターのリガンドとして一般的なシステイン残基とヒスチジン残基に着目した。SufB のオルソログ 237 種間で 35%以上保存されているシステイン 9 種類 (SufB<sup>C167</sup>、SufB<sup>C217</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>C307</sup>、SufB<sup>C332</sup>、SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>C414</sup>、SufB<sup>C448</sup>、SufB<sup>C467</sup>) と、ヒスチジン 5 種類 (SufB<sup>H176</sup>、SufB<sup>H265</sup>、SufB<sup>H363</sup>、SufB<sup>H417</sup>、SufB<sup>H433</sup>)、加えて保存性は低いながら CxxCxxxC という Fe-S クラスター結合モチーフのシステイン 3 種類 (SufB<sup>C96</sup>、SufB<sup>C99</sup>、SufB<sup>C103</sup>) をそれぞれアラニンに置換し、上記の相補実験を行った。その結果、SufB<sup>C254A</sup> と SufB<sup>C405A</sup> の 2 種類の変異型 SufB の場合は MVA を含まない培地では全く生育せず、相補能が消失することが判明した (Fig. 12A)。また、SufB<sup>H265A</sup> 変異型 SufB を導入した大腸菌の生育は遅くなり、相補能は部分的であった。一方、それ以外の変異型はアラニン置換による影響が全く見られなかった (Table 3)。CxxCxxxC の 8 残基すべてを欠失させた場合 (SufB<sup>Δ96-103</sup>) についても検討したが、相補能への影響は見られなかった (Table 3)。したがって、CxxCxxxC モチーフは予想に反して SufB の *in vivo* 機能に必要ではないと考えられる。

次に、側鎖に N、S または O 原子を持ち、かつ SufB オルソログで 75%以上保存されているアミノ酸残基に部位特異的変異を導入した。その結果、SufB<sup>R226A</sup>、SufB<sup>N228A</sup>、SufB<sup>Q285A</sup>、SufB<sup>W287A</sup>、SufB<sup>K303A</sup>、SufB<sup>E434A</sup> の 6 種類の変異型 SufB を導入した大腸菌変

異株は、MVA を含まない培地では全く生育せず、*in vivo* 機能を相補しなかった (Fig. 12A)。これらの変異型について嫌氣的条件での相補性も検討したところ、SufB<sup>K303A</sup> 変異型の SufB を導入した場合に嫌気条件でのみゆっくりと生育したが、それ以外は嫌気条件でも全く生育しなかった (Fig. 12A)。一方、残りの 45 種類の変異型 SufB は大腸菌変異株を相補することがわかった。45 種類のうち、SufB<sup>M56A</sup>、SufB<sup>E230A</sup>、SufB<sup>T238A</sup>、SufB<sup>E244A</sup>、SufB<sup>Y250A</sup>、SufB<sup>T302A</sup>、SufB<sup>R304A</sup>、SufB<sup>S323A</sup>、SufB<sup>Y329A</sup>、SufB<sup>S345A</sup>、SufB<sup>K360A</sup>、SufB<sup>M361A</sup>、SufB<sup>T368A</sup>、SufB<sup>S370A</sup>、SufB<sup>K375A</sup>、SufB<sup>Y386A</sup>、SufB<sup>D406A</sup>、SufB<sup>T418A</sup>、SufB<sup>Y421A</sup>、SufB<sup>N426A</sup>、SufB<sup>E432A</sup>、SufB<sup>S438A</sup>、SufB<sup>Y447A</sup>、SufB<sup>R451A</sup>、SufB<sup>E477A</sup> の 25 種類では変異による影響がほとんど見られなかったが、SufB<sup>E52A</sup>、SufB<sup>R60A</sup>、SufB<sup>D192A</sup>、SufB<sup>Y224A</sup>、SufB<sup>Q234A</sup>、SufB<sup>E236A</sup>、SufB<sup>R237A</sup>、SufB<sup>D243A</sup>、SufB<sup>E252A</sup>、SufB<sup>E270A</sup>、SufB<sup>Y281A</sup>、SufB<sup>T283A</sup>、SufB<sup>N286A</sup>、SufB<sup>N299A</sup>、SufB<sup>W316A</sup>、SufB<sup>T326A</sup>、SufB<sup>K328A</sup>、SufB<sup>Q353A</sup>、SufB<sup>D356A</sup>、SufB<sup>R387A</sup> の 20 種類の変異型 SufB を導入した場合は野生型と比較して明らかに生育が遅延しており、相補は部分的であった (Table 3)。これらの中で、SufB<sup>Y224A</sup>、SufB<sup>Q234A</sup>、SufB<sup>E236A</sup>、SufB<sup>E252A</sup> の 4 種類の変異型の場合、43°C では生育できないという温度感受性を示した (Fig. 12B)。これら温度感受性となる置換部位は、SufB の立体構造の形成・維持、または構造変化に関係する可能性が考えられる。

機能不全となる 8 種の変異を導入した場合には、大腸菌のイソプレノイド生合成系 (MEP 経路) の IspG と IspH の Fe-S クラスターを形成できないため、MVA 依存性から抜け出せないと考えられる。IspG と IspH はいずれも [4Fe-4S] クラスターを活性中心とすることが知られている。他の Fe-S タンパク質の場合、クラスターが形成されるのか、あるいは [2Fe-2S] クラスターの場合にはどのような影響を受けるのかを調べる目的で、以下の実験を行った。

Ferredoxin は電子伝達体として働く Fe-S タンパク質であり、大腸菌では *isc* オペロン

にコードされる Fdx が知られている。Fdx は [2Fe-2S] クラスターを持つ Fe-S タンパク質で、holo-Fdx と Fe-S クラスターを持たない apo-Fdx とは、native PAGE で移動度が異なる<sup>74</sup>。これを利用して、SufB に対する変異導入の影響を検討した。その結果、野生型 SufB の場合には holo-Fdx のバンドを明確に確認できたが、相補能を消失した 8 種類の変異型 (SufB<sup>R226A</sup>、SufB<sup>N228A</sup>、SufB<sup>C254A</sup>、SufB<sup>Q285A</sup>、SufB<sup>W287A</sup>、SufB<sup>K303A</sup>、SufB<sup>C405A</sup>、SufB<sup>E434A</sup>) の場合には、その全てにおいて holo-Fdx が全く検出されず、Fdx の [2Fe-2S] クラスターが形成されていないことがわかった (Fig. 12C)。一方、これらの 8 種類の変異型のタンパク質レベルをウェスタン解析によって調べたところ、すべての変異型 SufB、SufC、SufD の発現量は野生型と同等であることを確認することができた (Fig. 12D)。したがって、これらのアミノ酸置換は SufB の安定性に影響するのではなく、機能不全を引き起こしたものと考えられる。これらの結果を総合すると、SufB には機能的に重要な 8 種類のアミノ酸残基があり、これらをアラニンに置換すると [4Fe-4S] だけでなく [2Fe-2S] クラスターの形成もできなくなると考えられる。これら 8 種類の残基 (SufB<sup>R226</sup>、SufB<sup>N228</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>Q285</sup>、SufB<sup>W287</sup>、SufB<sup>K303</sup>、SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>) を機能残基と呼ぶことにする。また、アラニンに置換することによって温度感受性を示すようになる 4 種類の残基 (SufB<sup>Y224</sup>、SufB<sup>Q234</sup>、SufB<sup>E236</sup>、SufB<sup>E252</sup>) は温度感受性残基と表す。

### SufB の機能不全をサプレスする二次的な変異の解析

SufB の 8 種類の機能残基のうち、4 種の置換型 (SufB<sup>N228A</sup>、SufB<sup>Q285A</sup>、SufB<sup>K303A</sup>、SufB<sup>E434A</sup>) を導入した大腸菌からは、MVA に依存しないで生育するよう変化したリバータントが出現した。一方、残りの 4 種類 (SufB<sup>R226A</sup>、SufB<sup>C254A</sup>、SufB<sup>W287A</sup>、SufB<sup>C405A</sup>) については長期間培養してもリバータントが出現することはなかった。

得られたリバータントの中では、二次的なサプレッサー変異が生じた可能性があるので、その部位を特定する目的で、まずリバータントからプラスミド pBBR-*sufAB* を調製した。これを pUMV22 Sp<sup>r</sup>、pRK-*sufCDSE* プラスミドを持つ UT109 株に再導入したところ、全ての形質転換体が MVA に依存せずに生育したため、変異型 SufB の機能不全をサプレスする二次的な変異は pBBR-*sufAB* プラスミドにあることが判明した。続いて pBBR-*sufAB* 上の *sufAB* コード領域の DNA sequencing を行ったところ、全てのサプレッサー変異は *sufB* のコード域に位置することが分かった。SufB<sup>N228A</sup> のサプレッサー変異は SufB<sup>T223S</sup>、SufB<sup>R226L</sup>、SufB<sup>P257T</sup> の 3 種類、SufB<sup>Q285A</sup> のサプレッサー変異は SufB<sup>A256S</sup>、SufB<sup>K303A</sup> のサプレッサー変異は SufB<sup>A256S</sup>、SufB<sup>E434A</sup> のサプレッサー変異は SufB<sup>V423F</sup> であった (Table 4)。興味深いことに、SufB<sup>Q285A</sup> と SufB<sup>K303A</sup> の 2 種類の機能不全変異型からは、SufB<sup>A256S</sup> という同じサプレッサー変異が得られた。

これらの変異を持つリバータントについて LB 液体培地における生育を比較したところ、野生型の SufB (倍化時間は 36.4 ± 3.86 min) に比べてどれもゆっくりと生育し、リバータントの倍加時間は早いもの (SufB<sup>Q285A</sup>、SufB<sup>A256S</sup>) で 72.3 min、遅いもの (SufB<sup>K303A</sup>、SufB<sup>A256S</sup>) では 281 min であった (Table 4)。したがって、はじめに導入した機能不全変異は二次的な変異によって部分的にサプレスされてはいるが、その程度は限定的と考えられる。

### SufB 機能残基に対する部位特異的なランダム変異の導入

SufB の 8 種類の機能残基 (SufB<sup>R226</sup>、SufB<sup>N228</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>Q285</sup>、SufB<sup>W287</sup>、SufB<sup>K303</sup>、SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>) をアラニンに置換すると機能不全になるが、機能を保持したままで他のアミノ酸に置換できるかどうか検討することにした。機能残基のそれぞれを 20 種類のアミノ酸に置換させるため、アラニンに置換したプラスミド pBBR-*sufAB* を鋳型と



して、そのアラニンに対応するコドンに NNK (N は A、G、C、または T; K は G または T) に置換するよう部位特異的な変異を導入した。次いで、そのプラスミドを pUMV22 Sp<sup>r</sup> と pRK-sufCDSE プラスミドを持つ UT109 株に導入し、MVA が存在しなくても生育可能なコロニーを単離し、ランダム変異を導入した領域の DNA sequencing を行った。その結果、SufB<sup>R226</sup> は I、L、V に、SufB<sup>N228</sup> は H、C、Q に、SufB<sup>Q285</sup> は G、N、R に、SufB<sup>W287</sup> は F、Y、M に、SufB<sup>K303</sup> は R、E に、SufB<sup>E434</sup> は D に置換したものが得られた (Table 5)。これらの中で、SufB<sup>N228</sup> ならびに SufB<sup>K303</sup> に置換可能なのは、全て極性を持つアミノ酸であった。一方、SufB<sup>W287</sup> は疎水性の側鎖を持つアミノ酸で置換可能であった。

これらの変異型 SufB を持つ大腸菌について、LB 液体培地における生育を観察したところ、どれも野生型 SufB の場合と比べて生育速度が遅くなっていた。4 種類 (SufB<sup>Q285G</sup>, SufB<sup>W287F</sup>, SufB<sup>K303R</sup>, SufB<sup>E434D</sup>) の変異型 SufB の場合、倍加時間は野生型の場合と比べて 2 倍以内だが、それ以外の 11 種類の倍化時間は野生型 SufB の場合と比べて 2 倍以上となり、なかでも SufB<sup>Q285R</sup> では 6 倍と非常に遅くなっていた。

他方、SufB<sup>C254</sup> と SufB<sup>C405</sup> については、SufB の機能を保持したままで他のアミノ酸に置換したものは得られなかった。アラニン置換した SufB<sup>C254</sup> または SufB<sup>C405</sup> のコドンに対して、さらにランダム変異 (NNK) を導入して得られた復帰変異体をそれぞれ 30 種類と 27 種類単離して調べたところ、全て元のシステインのコドンに戻っていた。したがって、これらの残基は他のアミノ酸では代替できない必須残基と考えられる。

### SufD ならびに SufB-SufD 会合面における機能残基の同定

SufD についてはこれまでに、SufD<sup>H360</sup> が *in vivo* 必須残基であることが明らかにされている<sup>56</sup>。しかし、その実験では温度感受性の相補プラスミドを非許容温度 (43°C) で

入れ替えるという手法が用いられていたため、変異型 SufD が温度感受性となっている可能性も残されていた。そこで、本研究では pUMV22 Sp<sup>r</sup> プラスミドを持つ UT109 株に、変異を入れた pBBR-*sufD* と pRK-*sufABC-SE* を導入することで、SufD<sup>H360</sup> 残基に対する部位特異的変異の影響を再検討した。その結果、SufD<sup>H360A</sup> 変異型を導入した場合は 37°C でも MVA 依存性の生育を示し (Fig. 13A)、[2Fe-2S] Fdx のクラスター形成もできないことがわかった (Fig. 13B)。また、SufD<sup>H360A</sup> のタンパク質レベルは野生型と同程度であることから (Fig. 13C)、SufD<sup>H360A</sup> の置換によってその機能が損なわれたものと考えられる。SufD<sup>H360A</sup> 変異型について、MVA 非依存性となるサプレッサー変異が得られないか試みたが、長期間培養を行っても得ることはできなかった。

次に、SufD<sup>H360</sup> 以外の機能残基についても探索することにした。側鎖に N、S または O 原子を持ち、かつ SufD のオルソログで 60% 以上保存されている 8 種類の残基をそれぞれアラニンに置換した (SufD<sup>D283A</sup>、SufD<sup>H290A</sup>、SufD<sup>K302A</sup>、SufD<sup>D344A</sup>、SufD<sup>E350A</sup>、SufD<sup>D354A</sup>、SufD<sup>D355A</sup>、SufD<sup>C358A</sup>) が、どれも大腸菌の生育にほとんど影響がなく、SufD に新たな機能残基を見つけることはできなかった (Fig. 13A)。

次に、SufB と SufD の会合面で 3 種類の機能残基 (SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup>) が近接していることに着目した (Fig. 14A)。これらシステイン、グルタミン酸、ヒスチジンはどれも Fe-S クラスターのリガンドになりうるアミノ酸残基である。そこで、これらに近接するアミノ酸に着目して、pBBR-*sufAB* と pRK-*sufCDSE* プラスミドに多重変異を入れ、pUMV22 Sp<sup>r</sup> を持つ UT109 株に導入することで、重複機能を持つアミノ酸残基を同定することにした。上記のように SufB<sup>D406A</sup>、SufB<sup>E432A</sup>、SufB<sup>H433A</sup> または SufD<sup>C358S</sup> の単独変異は相補株の生育に影響を与えなかったが (Table 3)、これらの変異を組み合わせると相補能が損なわれるようになった (Fig. 15A, B)。そのうち、SufB<sup>D406A</sup>、SufB<sup>E432A</sup>、SufB<sup>H433A</sup> の 3 重変異で生育が遅くなり、SufB<sup>E432A</sup>、SufB<sup>H433A</sup>、SufD<sup>C358S</sup> の 3 重変異だと

さらに生育が遅延した。ただし、これら4つのアミノ酸をすべて置換(SufB<sup>D406A</sup>、SufB<sup>E432A</sup>、SufB<sup>H433A</sup>、SufD<sup>C358S</sup>)しても、SufB<sup>E432A</sup>、SufB<sup>H433A</sup>、SufD<sup>C358S</sup>の3重変異の場合とほとんど変わらず、相加的な効果は見られなかった (Fig. 15A, B)。また、これらの多重変異導入株では Fdx の [2Fe-2S] クラスタ形成量も著しく低下していた (Fig. 15C)。変異型の SufB と SufD のタンパク質レベルは野生型のものとほぼ同程度であった (Fig. 15D) ことから、これらの残基は機能的に重要であると考えられる。以上の結果から、SufB<sup>E432</sup>、SufB<sup>H433</sup>、SufD<sup>C358</sup>の3残基は Fe-S クラスタ生合成に必須というわけではないが重要な役割を持っており、それらの機能は重複していることが示唆された。

## 考察

本研究では、網羅的・系統的に部位特異的変異を導入することで、SufBCD 複合体の機能に重要な3つの領域を明らかにすることができた。ひとつは SufC の中で ATP を結合し、加水分解を触媒すると予想された領域である。具体的には、Walker A モチーフの SufC<sup>K40</sup>、Walker B モチーフの SufC<sup>E171</sup>、H-モチーフの SufC<sup>H203</sup> で、これらはいずれも SufC の *in vivo* 機能に必須であった (Fig. 10)。またこれらの変異型では実際に *in vitro* における ATPase 活性が見られなかった (Fig. 11) ことから、SufBCD 複合体による Fe-S クラスターの生合成には SufC の ATP 加水分解が必要であることが明らかとなった。SufC は ABC トランスポーターの ATPase サブユニット (ABC-ATPase) と相同なタンパク質である (Fig. 9)。ABC トランスポーターでは、2 分子の ABC-ATPase が 2 分子の ATP を挟み込んで会合し、ATP を加水分解して解離することで、膜貫通サブユニットの構造変化を引き起こすと考えられている<sup>61</sup>。SufBCD 複合体の SufC 2 分子についても、ATP の存在下で会合すること、またそれに伴って SufB-SufD 会合面の構造を変化させることが示されている<sup>57</sup>。この会合が、SufB と SufD にどのように影響するか予想するために、SufBCD 複合体の構造を人為的に SufBC と SufCD に解離させ、2 分子の SufC を ABC-ATPase のひとつ HlyB のダイマー型の構造に重ね合わせて、SufC 会合型 SufBCD 複合体のモデルを構築した (Fig. 16)。このモデルによると、SufB と SufD の  $\beta$ -ヘリックスコアドメインの大部分が重なり、クラッシュしている。実際には、SufB-SufD 会合面を含む  $\beta$ -ヘリックス構造が大きく変化すると予想される。おそらく SufC の二量体化による SufB と SufD のダイナミックな構造変化が、Fe-S クラスターの生合成に重要だと考えられる。

2 つ目の機能領域は、SufB の  $\beta$ -ヘリックスコアドメインの N 末端側で、この領域に

は 6 種類の機能残基 (SufB<sup>R226</sup>、SufB<sup>N228</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>Q285</sup>、SufB<sup>W287</sup>、SufB<sup>K303</sup>) が存在している (Fig. 14A)。この領域を Region A と呼ぶことにする。3 つ目は SufB と SufD の会合面で、3 種類の機能残基 (SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup>) が存在しており (Fig. 14A)、この領域は Region B と呼ぶことにする。これらのアミノ酸残基はすべて  $\beta$ -ヘリックスコアドメインに存在しており、この独特な構造をしたドメインの重要性を初めて明らかにすることができた。

今回の実験では SufB と SufD のコアドメイン以外には機能残基を見いだすことができなかったが、SufB の N 末端ヘリカルドメインには、アラニンに置換すると部分的に *in vivo* での機能性が低下する 3 つの残基 (SufB<sup>E52</sup>、SufB<sup>R60</sup>、SufB<sup>D192</sup>) を同定することができた。これらのアミノ酸残基は、何らかの役割を持つ可能性があるが、本研究ではこれ以上の解析を行っていない。一方、SufD の N 末端ヘリカルドメインについては、N 末端から 4 つのヘリックスを欠失 (SufD<sup>A2-81</sup>) させても *in vivo* 機能に影響がないことが報告されており、Fe-S クラスタ形成には重要ではないと考えられる<sup>56</sup>。ただし、SufD の N 末端から 5 番目のヘリックスに含まれるヒスチジン残基を置換 (SufD<sup>H128A</sup>) すると SufA の [2Fe-2S] クラスタ形成が促進されるという現象が報告されており<sup>75</sup>、N 末端のヘリックスすべてが不要というわけではないのかもしれない。本研究では、SufB の C 末端ヘリカルドメインにもいくつかの変異を導入してみたが、機能残基を見出すことはできなかった。これらのうち、SufB<sup>Y447</sup> と SufB<sup>R451</sup> は SufC との結合に関与する残基であるが、これらのアミノ酸残基を置換しても影響がなかった。これについては、SufB と SufC との結合には複数の極性残基と非極性残基が関与しているためと考えられる。

Region A には 6 種類の機能残基 (SufB<sup>R226</sup>、SufB<sup>N228</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>Q285</sup>、SufB<sup>W287</sup>、SufB<sup>K303</sup>) に加えて 4 種類の温度感受性残基 (SufB<sup>Y224A</sup>、SufB<sup>Q234A</sup>、SufB<sup>E236A</sup>、SufB<sup>E252A</sup>) も集中している (Fig. 14A)。これらのアミノ酸残基を SufBCD 複合体の結晶構造で詳し

く調べてみると、いくつかは水素結合や塩橋の形成に関与していることがわかった。温度感受性残基である SufB<sup>Y224</sup> と機能残基である SufB<sup>R226</sup> は C 末端ヘリカルドメインの SufB<sup>E481</sup> とそれぞれ水素結合と塩橋を形成している。機能残基である SufB<sup>K303</sup> は温度感受性残基である SufB<sup>E252</sup> と SufB<sup>T283</sup> の両方に静電的に結合している。SufB<sup>T283</sup> はアラニンに置換すると *in vivo* の機能性が低下する残基である。これらの重要なアミノ酸同士が結合していることには何らかの意義があると思えるので、今後の解析に期待したい。

Region A の具体的な役割について可能性をいくつか考察する。まず、Fe-S クラスタ一の新規形成部位として働くことができるか考える必要がある。Fe-S クラスタ一は一般的に、システイン残基に配位結合しているが、ヒスチジン、アスパラギン酸、アルギニン、スレオニンやセリンが配位子となる場合もある。Region A に存在する機能残基のうち、SufB<sup>C254</sup> と SufB<sup>R226</sup> は Fe-S クラスタ一のリガンドになりうる残基だが、SufB<sup>R226</sup> は疎水性残基のバリン、イソロイシン、ロイシンに機能的に置換することができた (Table 5)。したがって、Region A が Fe-S クラスタ一を形成するための配位子を提供できるとは考えにくい。

もうひとつの可能性として、FADH<sub>2</sub> と相互作用できるかということについて考えてみる。SufBCD 複合体は、嫌氣的に精製すると複合体あたり 1 分子の FADH<sub>2</sub> が結合していることが報告されている<sup>64</sup>。FADH<sub>2</sub> の具体的な役割についてはよくわかっていないが、Fe<sup>3+</sup>を Fe<sup>2+</sup>に、あるいは S<sup>0</sup>を S<sup>2-</sup>に還元するのではないかと予想されている<sup>64</sup>。SufB のアミノ酸配列上には *p*-cresol methylhydroxylase ファミリーで見られる FAD 結合モチーフが指摘されており、Region A には R(x)<sub>6</sub>ExxY(x)<sub>5</sub>G(x)<sub>8</sub>Y 配列がオーバーラップしている (Fig. 17)。しかしながら、SufB の立体構造におけるモチーフの配置は *p*-cresol methylhydroxylase ファミリーのものとは全く異なっており (Fig. 19)、また、最初のアルギニンと 2 番目のグルタミン酸 (SufB<sup>R237</sup>、SufB<sup>E244</sup>) をアラニンに置換しても *in vivo*

機能に影響が見られなかった。同様に *p*-cresol methylhydroxylase family で保存性の高い C 末端のアルギニンも SufB 配列上で指摘されているが (SufB<sup>R451</sup>)、これをアラニンに置換しても *in vivo* 機能に影響が見られなかった。したがって、Region A が FADH<sub>2</sub> に結合するとは考えにくく、FADH<sub>2</sub> の正確な結合部位についてはさらなる検討が必要である。Region A の SufB<sup>C254</sup> が SufE と相互作用して S<sup>0</sup> を受け取るという可能性については、第 3 章で詳しく検討した。

Region B は逆平行 β-シートで結合する SufB-SufD 会合面に位置しており、この領域には 3 種類の機能残基 (SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup>) が存在している。これらのアミノ酸残基のうち、SufB<sup>C405</sup> と SufD<sup>H360</sup> は他の 19 種類のアミノ酸残基に置換すると機能することができず、SufB<sup>E434</sup> はアスパラギン酸にのみ置換可能だった (Table 5)。これらの機能残基はいずれも Fe-S クラスタを配位し得る残基である。SufBCD 複合体の結晶構造解析では、位相決定に用いる重原子の Hg<sup>2+</sup> イオンがこの領域に 2 つ結合しており、そのうちひとつは SufB<sup>C405</sup> に結合し、もうひとつは SufD<sup>H360</sup> の近くの SufD<sup>C358</sup> に結合していた<sup>57</sup>。この領域には金属イオンが結合できることを示しており、Hg<sup>2+</sup> の代わりに Fe イオンまたは Fe-S クラスタが配位する可能性も考えられる。本研究では、SufD<sup>C358</sup> の単独置換では全く影響がみられなかったが、この残基を含む 3 重変異 (SufB<sup>E432A</sup>、SufB<sup>H433A</sup>、SufD<sup>C358S</sup>) によって機能が大きく低下することを示した (Fig. 15)。これらの結果から、SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup> の 3 残基はいずれも Fe-S クラスタのリガンドとして必須だが、SufB<sup>E432</sup>、SufB<sup>H433</sup>、SufD<sup>C358</sup> の 3 残基の役割は重複しており、そのうちのどれかが 4 番目のリガンドとして機能するという可能性が考えられる。

上記のように Region B の数残基が Fe-S クラスタのリガンドとして機能するという可能性については、相容れない点がふたつある。ひとつは、SufB<sup>E434A</sup> の置換が SufB<sup>V423F</sup> の置換によってサプレスされた (Table 4) という点である。フェニルアラニンは鉄や Fe-

S クラスターと結合することはできないため、これが直接リガンドになるとは考えにくい。この点については、V→F の置換によって側鎖が大きくなり、それが周辺の構造を変化させることで、他のアミノ酸が SufB<sup>E434</sup> を代替するような配置になるという可能性を考えている。実際に SufB<sup>V423</sup> の側鎖は SufB<sup>C425</sup> と β-ヘリックスの内部で隣接しており、また反対側の β-シートの SufB<sup>H433</sup> と向き合っているため、SufB<sup>V423F</sup> の置換は、これらの構造に影響する可能性がある。もうひとつ相容れない点として、Region B の機能残基の側鎖の向きが β-ヘリックスの内側と外側で分かれており (SufB<sup>C405</sup> と SufB<sup>H433</sup>、SufD<sup>C358</sup>、SufD<sup>H360</sup> は内向き、SufB<sup>E432</sup> と SufB<sup>E434</sup> は外向き)、結晶構造のままでは Fe-S クラスターを配位することはできないということが挙げられる。この点については、上述した SufC の ATPase 活性を利用した構造変化によっておそらく機能残基が再配置され、Fe-S クラスターを配位できるようになるという可能性を考えている。

このように Region B では Fe-S クラスターが新規に形成される可能性が高いと考えられるが、SufB にはこれとは離れた位置に Fe-S クラスターの結合モチーフ (CxxCxxxC) が存在している (Fig. 17)。そこで、本研究ではこのモチーフを欠失させてみたが、*in vivo* 機能には全く影響が現れなかった (Table 3)。この CxxCxxxC モチーフは大腸菌とその近縁種では保存されているが、SufB オルソログ内での保存性が低い (Fig. 17) ことから、Fe-S クラスター形成部位としては考えにくい。また、本研究では SufD や SufC に対しても、システインやヒスチジン残基を主な対象として系統的な変異導入解析を進めたが、SufD では Region B の SufD<sup>H360</sup> 以外に機能残基は見当たらず、また、SufC では ATP 加水分解に関与する H-モチーフの SufC<sup>H203</sup> のみが機能に必須であった。したがって、SufBCD 複合体において Fe-S クラスターの新規形成部位の候補として考えられるのは、Region B のみであろう。実際に、Region B で Fe-S クラスターが形成されるかどうかを調べるためには、不安定なクラスター中間体を捕える必要がある。*in vitro* 再構成系を用いて、野生型と変異型の SufBCD 複合体におけるクラスター形成の比較を試みた



結果を第 3 章に示す。

本研究では、大腸菌の SufBCD 複合体に焦点を当てて *in vivo* における機能解析を進めたが、Euryarchaeota の中には SufD、SufS、SufE を持たず、SufB と SufC の 2 成分だけで Fe-S クラスタを生合成すると考えられているものもある<sup>11</sup>。また、*Blastocystis* では SufCB 融合型の成分が同定されている<sup>62</sup>。分子系統解析によると、*sufD* は、進化の初期段階で *sufB* 遺伝子の重複によって生じたことが示されている<sup>11</sup>。したがって Euryarchaeota の一部や *Blastocystis* では、遺伝子重複以前の状態が保持されており、SufD を含まない SufBC 複合体で Fe-S クラスタを生合成していると考えられる。一方、大腸菌の SUF マシナリーでは、SufD は Fe-S クラスタの生合成に必須であるが、その意義についてはよくわかっていない。SufB と SufD はパラログスな関係で、それらの立体構造はとてもよく似ている。本研究で SufD<sup>H360</sup> は SufD で唯一の必須残基であることを示したが、このヒスチジン残基は SufB でも保存されている (Fig. 6)。それにも関わらず、大腸菌の SufB は SufD の機能を代替することができない。このパラドックスを解く手がかりを得るために、当研究室では SufB と SufD のアミノ酸配列を部分的に入れ替えてキメラタンパク質を構築し、SufD の機能に必須な領域を明らかにすることを進めている。

本研究では、大腸菌のイソプレノイド生合成経路の代謝改変株を用いることで、SufBCD 複合体の *in vivo* 解析を行い、機能的に重要なアミノ酸残基や機能領域を明らかにすることができた。機能領域のひとつ SufB-SufD 会合面では Fe-S クラスタが新規に組立てられる可能性が高い。第 3 章では、第 2 章で明らかにした知見に基づいて、SufBCD 複合体と SufSE との *in vitro* 相互作用について解析した結果を述べる。

### 第3章

*in vitro* における SufBCD 複合体と SufSE との相互作用の解析

## 序

大腸菌の Fe-S クラスター生合成系 SUF マシナリーでは、*sufABCDSE* オペロンにコードされる 6 種類の成分が協調して Fe-S クラスターを組立てている。6 種類の成分のうち、SufS と SufE は硫黄原子の供与体である<sup>40</sup>。SufB、SufC、SufD は 3 成分の複合体を形成し、Fe-S クラスターを新規に形成する足場タンパク質として、中心的な役割を担うと考えられている<sup>57,64</sup>。この複合体は Fe-S クラスターを結合した状態で精製できることが報告されている<sup>63</sup>。また、SufB には化学的に[4Fe-4S]クラスターを再構成させることができ、そのクラスターは SufA に不可逆的に渡されることが示されている<sup>53,76</sup>。SufA からは *in vitro* で Fdx や AcnA に Fe-S クラスターを渡すことができることから、SufA は Fe-S クラスターをアポタンパク質へと受け渡すキャリアではないかと考えられている<sup>75</sup>。また、嫌氣的に調製した SufBCD 複合体にはひとつの FADH<sub>2</sub> が結合していることが報告されており、Fe<sup>3+</sup>から Fe<sup>2+</sup>、または S<sup>0</sup>から S<sup>2-</sup>への還元に関与する可能性が想定されている<sup>64</sup>。これらの知見をまとめると、SufBCD 複合体には SufS、SufE から SufBCD 複合体に硫黄原子が渡され、複合体で Fe-S クラスターが新規に組立てられ、そのクラスターは SufA を経由してアポタンパク質に渡されるという多段階の複雑な工程が想定されている。しかしながら、その反応機構の詳細については不明である。

SufS は PLP 依存的に L-cysteine から硫黄原子 (S<sup>0</sup>) を引き抜くシステインデサルフラゼである。L-cysteine から引き抜かれた S<sup>0</sup> は persulfide (-SSH) の形で活性中心の SufS<sup>C364</sup> に結合する<sup>39</sup>。SufS のシステインデサルフラゼ活性は、SufS 単独の場合は低く抑えられており、これは活性中心となるシステイン残基 (SufS<sup>C364</sup>) が溶媒から隔離されて persulfide の状態が保護されるためと考えられる。SufS の活性は SufE 共存下で促進し、さらに SufBCD 複合体を加えることで促進されることが報告されている<sup>40</sup>。これは SufS から SufE、SufE から SufBCD 複合体へと S<sup>0</sup>が転移することで SufS のターンオ

ーバーが可能になるためと考えられている。

SufE は  $S^0$  を SufS から SufBCD 複合体へと輸送するシャトルタンパク質であり、モノマーの結晶構造が報告されている<sup>77</sup>。SufS-SufE 複合体の結晶構造はこれまで報告されていないが、水素-重水素交換質量分析 (HDX-MS) によって、SufE は SufS の活性部位付近に結合することが示唆されている<sup>44</sup>。SufE の必須システイン残基である SufE<sup>C51</sup> は分子内部に埋もれているが、SufE が SufS と相互作用することで SufE<sup>C51</sup> を含むループの構造が変化し、SufS<sup>C364</sup> 上の persulfide に求核攻撃ができるようになると考えられている<sup>43-45</sup>。

SufBCD 複合体は、SufS、SufE からの  $S^0$  の最終的な受容体で、ここに鉄と硫黄が集められて Fe-S クラスタが組立てられると考えられている。Pull-down 解析によって、SufE は SufBCD 複合体の SufB と相互作用することが示されている<sup>53</sup>。また、L-cysteine と SufS、SufE、SufBCD 複合体を反応させた後、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) によって polysulfide が付加した SufB が検出されている<sup>53</sup>。このように、SufS<sup>C364</sup>→SufE<sup>C51</sup>→SufB の順に persulfide を形成することで  $S^0$  が運搬されるが、SufB に存在する 13 種類のシステイン残基のうち、どれが  $S^0$  を受け取るのかは明らかにされていない (Fig. 4)。

第 2 章では、網羅的かつ系統的な変異導入解析によって、SufBCD 複合体の *in vivo* 機能に重要な残基を同定した。それらの重要残基は Region A、Region B と呼ぶ 2 つの領域に集中しており、そのうち Region B では Fe-S クラスタが新規に形成される可能性が高いことを示した。また、Region A と Region B には、*in vivo* 機能に必要なシステイン残基がそれぞれひとつずつ含まれている (SufB<sup>C254</sup> と SufB<sup>C405</sup>)。第 3 章ではこれら機能残基の情報に基づいて、変異型の SufBCD 複合体を精製し、*in vitro* での SufS-SufE との相互作用解析を行った。その結果、SufB<sup>C254A</sup> 変異型を含む SufBCD 複合体では SufE か

らの硫黄の転移が見られず、 $S^0$ が全く結合しなくなったことから、 $SufB^{C254}$ は  $SufE$  から  $S^0$ を受け取る残基であることが判明した。また、 $\beta$ -ヘリックスコアドメインの内側にトンネルがあることを見出し、この中を通して  $SufB^{C254}$  から  $SufB^{C405}$  まで硫黄が移動するという可能性が示唆された。これらの知見を総合して、 $SufBCD$  複合体における  $Fe-S$  クラスタ形成のメカニズムを考察する。

## 方法

### プラスミドの構築

*suf* オペロン全長がコードされているプラスミド pGSO164<sup>40</sup> への部位特異的変異の導入は、inverse PCR 法を用いて行った。用いたプライマーは Table 2 に示す。*sufE* の発現プラスミドについては、まず EcSufE-F と EcSufE-R のプライマーセットを用いた PCR により *sufE* コード域を増幅し、TA クローニング法により pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) にクローン化した。次に、NdeI-BamHI 断片を pET21(a) vector (Novagen) に挿入し、pET21a-*sufE* を構築した。SufE の C 末端に対する His タグの付加は、pRK-*sufCDSE* プラスミドを鋳型として pRK-His6-F と SufE-Cter-R のプライマーセットを用いて inverse PCR を行い、pRK-*sufCDSE*-His を構築した。

### Suf タンパク質の過剰発現と精製

#### ・ SufBCD 複合体と SufS の過剰発現と精製

pGSO164<sup>40</sup> の SufB または SufD のコード域に変異を入れたプラスミドを YT2512 株<sup>9</sup> に導入して発現させた。培養には TB (Ap 50 µg/ml を含む) 培地を用いた。前培養液を 1/200 に植菌し、37°C で 2 時間培養した後、L-arabinose (終濃度 0.2%) を添加して発現を誘導し、3 時間培養し集菌した。50 mM Tris-HCl pH 7.8、100 mM NaCl、1 mM DTT 溶液に菌体を懸濁して超音波破碎した。22,000 xg、4°C、30 分間遠心分離し、可溶性画分を回収した。(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 20% 飽和になるよう、氷上で 30 分かけて徐々に加えた後に 30 分間攪拌を続けて塩析を行い、22,000 xg、4°C、30 分間遠心分離して上清を回収した。サンプルを 50 mM Tris-HCl pH 7.8、100 mM NaCl、20% 飽和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1 mM DTT 溶液で平衡化した HiPrep 16/60 Phenyl FF low sub カラム (GE Healthcare) に

ロードし、20–0% 飽和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  の濃度勾配で溶出した。各画分を SDS-PAGE でチェックし、SufBCD 複合体と SufS の両方を含むフラクションを回収し、50 mM Tris-HCl pH 7.8、1 mM DTT 溶液で透析を行った。サンプルを 50 mM Tris-HCl pH 7.8、1 mM DTT 溶液で平衡化した HiPrep 16/60 Q XL カラム (GE Healthcare) にロードし、0–1 M NaCl の濃度勾配で溶出したところ SufBCD と SufS は分離して溶出された。それぞれのフラクションを VIVASPIN 20 (Sartorius) を用いて濃縮し、50 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl 溶液で平衡化した HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 カラム (GE Healthcare) にロードした。精製したタンパク質は VIVASPIN 20 (Sartorius) を用いて濃縮し、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として、プロテインアッセイ CBB 溶液 (ナカライテスク) を用いて Bradford 法により決定した。ゲルろ過における分子サイズの推定には、 $\gamma$ -グロブリン (158 kDa)、アルブミン (44 kDa)、ミオグロビン (17 kDa) を分子サイズマーカーとして用いた。

#### • SufE の過剰発現と精製

His タグを付加していない SufE の発現プラスミド pET21a-*sufE* を大腸菌 HMS174(DE3) 株に導入して過剰発現させた。培養には TB (Ap 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む) 培地を用いた。前培養液を 1/200 に植菌し、 $28^\circ\text{C}$  で 2.5 時間培養した後、isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (終濃度 0.5 mM) を添加して発現を誘導し、約 18 時間培養し集菌した。50 mM Tris-HCl pH 7.8、100 mM NaCl、1 mM DTT 溶液に菌体を懸濁して超音波で破碎した。22,000  $\times\text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、30 分間遠心分離し、可溶性画分を回収した。氷上で  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を 30% 飽和になるよう、30 分かけて徐々に加え、さらに 30 分間攪拌を続け塩析を行い、22,000  $\times\text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、30 分間遠心分離し、上清を回収した。サンプルを 50 mM Tris-HCl pH 7.8、100 mM NaCl、30% 飽和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 mM DTT 溶液で平衡化した HiPrep 16/60 Phenyl FF low sub カラム (GE Healthcare) にロードし、30–0% 飽和

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の濃度勾配で溶出した。SufE を含むフラクションを回収し、50 mM Tris-HCl pH 7.8、1 mM DTT 溶液で透析を行った。サンプルを 50 mM Tris-HCl pH 7.8、1 mM DTT 溶液で平衡化した HiPrep 16/60 Q XL カラム (GE Healthcare) にロードし、0–1 M NaCl の濃度勾配で溶出した。精製したタンパク質は−80°C で保存した。タンパク質濃度は、上記の Bradford 法により決定した。

### SufS から SufE、SufBCD 複合体への硫黄原子の受け渡し活性の測定

SufS は L-cysteine から硫黄原子を引き抜き、その硫黄原子は SufE を経由して SufBCD 複合体に渡される。そのため SufE、SufBCD 複合体の存在下では SufS のターンオーバーが起こり、見かけのシステインデサルフラゼ活性が上昇する。本実験ではこのシステインデサルフラゼ活性によって生じる S<sup>0</sup> を DTT で S<sup>2-</sup> に還元した後、メチレンブルーに変換して測定した。酵素反応は 25 mM Tris-HCl pH7.8、150 mM NaCl、2 mM DTT、2 mM L-cysteine、0.5 μM SufS、2.0 μM SufE、0-5 μM SufBCD 複合体の組成で、総量 500 μl とし、30°C で 10 分間反応させた。反応後、50 μl の *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine in 7.2 M HCl と、50 μl の 30 mM FeCl<sub>3</sub> in 1.2 M HCl を加え、室温、20 分間、暗所でインキュベートして、メチレンブルーを形成させた。18,800 xg、1 分間遠心して沈殿物を取り除いたのち、670 nm の吸光度からメチレンブルー濃度を測定した。標準曲線は Na<sub>2</sub>S を用いて作成した。

### Pull-down 法による変異型 SufB と SufE との相互作用解析

*sufB* に変異を含む pBBR-*sufAB* と pRK-*sufCDSE*-His を大腸菌変異株 YT2512 株 (*ΔsufABCDSE::Gm<sup>r</sup>*) に導入して発現させた。培養には LB (Ap 50 μg/ml、Tc 10 mg/ml を含む) 培地を用いた。37°C で OD<sub>600</sub> = 0.2-0.3 まで培養し集菌した。50 mM Tris-HCl pH



7.8、300 mM NaCl、10 mM DTT、20 mM imidazole、100 µg/ml lysozyme、1× プロテアーゼ阻害カクテル（ナカライテスク）溶液に菌体を懸濁し、37°C、10 分間インキュベートした後、細胞を超音波で破碎した。18,800 xg、4°C、30 分間遠心分離し、可溶性画分を回収し COSMOGEL His-Accept（ナカライテスク）を加えた。4°C、1 時間インキュベートした後、50 mM Tris-HCl pH 7.8、300 mM NaCl、10 mM DTT、20 mM imidazole で洗浄した。樹脂に結合しているタンパク質を 50 mM Tris-HCl pH 7.8、300 mM NaCl、500 mM imidazole で溶出した。溶出タンパク質を SDS-PAGE で分離して、抗 SufB 抗体と抗 SufE 抗体を用いて western blotting を行った。検出には ECL prime kit (GE Healthcare) を用いた。サンプルは菌体の濃度 (OD<sub>600</sub>) の値でノーマライズした。

#### **SufBCD 複合体に結合した S の定量**

SufE のバッファーに含まれている DTT を取り除くために、Centri-Spin 10（ナカライテスク）を用いて 50 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl 溶液に置換した。SufBCD 複合体に persulfide (-SSH) を形成させる反応は、50 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl、2 mM L-cysteine、0.5 µM SufS、0.5 µM SufE、10 µM SufBCD 複合体の組成で計 125 µl とし、30°C で 3 時間行った。反応後の SufBCD 複合体は、100 kDa cut off の Amicon Ultra (Millipore) を用いた限外濾過により、50 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl 溶液で洗浄して分離した。サンプルを 125 µl に希釈して、280 nm の吸光度から SufBCD 複合体の濃度を測定した ( $\epsilon = 130 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )。DTT（終濃度 2 mM）を加えて還元し、12.5 µl の 20 mM *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine in 7.2 M HCl と 12.5 µl の 30 mM FeCl<sub>3</sub> in 1.2 M HCl を加え、室温、20 分間暗所でメチレンブルーを形成させた。18,800 xg、1 分間遠心して沈殿物を取り除いたのち、670 nm の吸光度からメチレンブルー濃度を測定した。

## SufBCD 複合体における Fe-S クラスターの再構成

嫌気操作はすべて COY 社の嫌気チャンバーを用いて行った。用いるバッファーは予め脱気し、嫌気チャンバー内で 2 日間、スターラーを用いて激しく攪拌し、酸素を取り除いた。実験で用いるタンパク質は、直列に 4 本繋いで嫌気バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl、5 mM DTT) で平衡化した HiTrap Desalting カラム (GE Healthcare) に通してバッファー置換を行った。溶出したタンパク質は Amicon Ultra (Millipore) で濃縮し、タンパク質濃度は上記の Bradford 法で定量した。Fe-S クラスター再構成反応は、50 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl、5 mM DTT、750  $\mu$ M L-cysteine、250  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>、0.5  $\mu$ M SufS、0.5  $\mu$ M SufE、50  $\mu$ M SufBCD 複合体の組成で、室温、嫌気条件で 4 時間インキュベートすることで行った。再構成反応後、UV-vis スペクトルを、gas-tight なキュベットに移し、V-630BIO 分光光度計 (JASCO) を用いて測定した。

## 結果

### SufSE と変異型 SufBCD 複合体との相互作用（硫黄原子の受け渡し）

Fe-S クラスターの材料となる硫黄原子は、システインデサルフラゼ SufS が基質 L-cysteine から硫黄原子を引き抜いて SufE へと渡し、その硫黄原子はさらに SufE から SufBCD 複合体の SufB へと渡される (Fig. 4)。この硫黄原子の受け渡しによって、SufS の見かけのシステインデサルフラゼ活性は SufE を共存させると数十倍に促進され、さらに SufBCD を加えることで数倍上昇することが知られている<sup>24,40,78</sup>。硫黄原子は  $S^0$  の形でシステイン残基に persulfide 結合 (-SSH) しており、それが別のタンパク質のシステイン残基にタンパク質間の相互作用を利用して渡されるという仕組みである。SufS では C364<sup>48</sup>、SufE では C51 が関与することが知られているが<sup>40</sup>、SufB のどのシステイン残基が  $S^0$  を受け取るのかはこれまで明らかではない。そこで本研究では、第 2 章で明らかにした SufB の機能残基のどれかが  $S^0$  の受け渡しに関与するのではないかと考え、機能不全となるアミノ酸置換を導入した SufBCD 複合体と SufS、SufE との *in vitro* 相互作用を調べることにした。

まず、SufB の 8 種類の機能残基 (SufB<sup>R226</sup>、SufB<sup>N228</sup>、SufB<sup>C254</sup>、SufB<sup>Q285</sup>、SufB<sup>W287</sup>、SufB<sup>K303</sup>、SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>) をそれぞれアラニンに置換した SufBCD 複合体を精製した。これらの複合体は、精製の最終段階におけるゲル濾過クロマトグラフィーでいずれも 160 kDa 前後の位置に溶出された (Fig. 20A)。また、精製標品の SDS-PAGE では SufB、SufC、SufD のバンド (Fig. 20B) の量比から、野生型の複合体と同様に SufB<sub>1</sub>-SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>1</sub> (158 kDa) の構成比と推定された。すなわち、SufB の機能残基に変異を導入しても、SufBCD 複合体の構築には影響がないことを確認した。

SufS と SufE についても、SDS-PAGE でほぼ単一バンドになるよう精製し、これらの

精製標品を組み合わせて、見かけのシステインデサルフラゼ活性の測定を行った。SufS 単独の場合と比較して、SufS に SufE を加えると見かけのシステインデサルフラゼ活性は 11 倍に促進され、野生型の SufBCD 複合体を加えるとさらに 4.3 倍増加した (Fig. 21)。これは Outten らの報告とほぼ同じ結果であり<sup>24,40,78</sup>、S<sup>0</sup> は SufS → SufE → SufBCD と渡されていると考えられる。続いて SufB の機能残基に変異を含む SufBCD 複合体について同様の実験を行ったところ、SufB<sup>R226A</sup>、SufB<sup>N228A</sup>、SufB<sup>K303A</sup>、SufB<sup>C405A</sup>、SufB<sup>E434A</sup> 変異型は野生型の複合体と同様の活性促進作用を示した (Fig. 22)。一方、SufB<sup>Q285A</sup> と SufB<sup>W287A</sup> 変異型では野生型と比較して促進効果が減少していた。注目すべきことに、SufB<sup>C254A</sup> 変異型では活性の上昇が全く見られなかった (Fig. 22)。

#### 変異型 SufB と SufE との相互作用 (Pull-down 解析)

上記のように、いくつかの変異型の複合体で SufS の活性促進効果が消失または減少した原因としては、SufE からの硫黄原子の受容に支障が生じた可能性に加えて、SufE との物理的な会合に障害があるという可能性も考えられる。そこで、SufE との物理的な会合への影響を調べるために、pull-down 法を用いて相互作用を解析した。この実験では、変異を導入した pBBR-*sufAB* と SufE の C 末端に His タグを付加した pRK-*sufCDSE-His* を YT2512 株 ( $\Delta$ *sufABCDSE::Gm<sup>r</sup>*) に導入してマシナリー成分を発現させた。YT2512 株には *isc* オペロンがゲノム上に残っているため、通常の条件で培養することができる。その結果、SufB<sup>C254A</sup>、SufB<sup>Q285A</sup>、SufB<sup>W287A</sup> の変異型 SufB は SufE-(His)<sub>6</sub> と共精製された (Fig. 23)。したがって、これらのアミノ酸置換は SufB と SufE との物理的な会合にはほとんど影響を及ぼさないことがわかった。また、他の機能不全変異型 SufB の機能残基についても pull-down 解析を行ったが、野生型の SufB と同様に SufE-(His)<sub>6</sub> と共精製された (Fig. 23) ことから、これらの会合にはほとんど影響がないことがわかった。

## 変異型 SufBCD 複合体に移行する S 原子の総量

次に、SufBCD 複合体に形成される persulfide (-SSH) の定量を行った。この実験では、精製した SufS、SufE、SufBCD 複合体と基質の L-cysteine をインキュベートして、SufBCD 複合体に persulfide を形成させ、反応後、限外濾過によって SufS、SufE と基質 L-cysteine を取り除いた。SufBCD 複合体に結合した  $S^0$  は DTT で  $S^2$  に還元し、メチレンブルーを形成させて比色定量を行った。その結果、野生型の SufBCD 複合体では複合体あたり  $4.8 \pm 0.9$  の  $S^0$  原子が検出された (Fig. 24)。Fe-S クラスタを形成するのに十分な硫黄原子が蓄積していると考えられる。二種類の変異型 SufB (SufB<sup>C254A</sup>、SufB<sup>C405A</sup>) と一種類の変異型 SufD (SufD<sup>C358A</sup>) を含む複合体で同様に実験を行ったところ、SufD<sup>C358A</sup> 変異型の場合には複合体あたり  $4.6 \pm 1.0$  と、野生型に匹敵する  $S^0$  が検出されたが、SufB<sup>C405A</sup> 変異型の複合体では複合体あたり  $1.0 \pm 0.1$  の  $S^0$  と、顕著に減少していた。一方、興味深いことに SufB<sup>C254A</sup> 変異型の SufBCD 複合体では  $S^0$  が全く検出されなかった。これらの結果は、SufB<sup>C254A</sup> 変異型ではシステインデサルフラゼ活性の促進がみられないという上記の実験結果と対応しており、SufB<sup>C254</sup> では SufE から  $S^0$  を直接受け取るという可能性を支持している。

## 変異型 SufBCD 複合体における Fe-S クラスタの再構成

SufBCD 複合体については、Fe イオンの存在下で L-cysteine、SufS、SufE と反応させることで [4Fe-4S] クラスタが再構成することが報告されている<sup>64</sup>。本研究でも、同様の方法で嫌気条件下に反応させたところ、[4Fe-4S] クラスタに特徴的な 400 nm 付近のブロードなピークがみられた (Fig. 25)。この 400 nm 付近のブロードなピークは、反応液から SufBCD 複合体を除くとほとんど見られなくなったことから、SufBCD 複合体

に再構成された[4Fe-4S]クラスターに由来すると考えられる。ただし、SufB<sup>C405A</sup> 変異型を含む複合体を用いた場合には、野生型の場合とほとんど変わらないという結果になった。また、SufB<sup>C254A</sup> 変異型を含む複合体を用いた場合には、全体的に吸光度が低下するという違いはあったが、やはり 400 nm 付近にブロードなピークが出現していた。これら、SufB<sup>C254A</sup> と SufB<sup>C405A</sup> は、どちらも *in vivo* 機能を消失するアミノ酸置換である。前者は SufE からの硫黄原子の受け取り、後者は Fe-S クラスターの新規形成に支障があると考えられることから、この *in vitro* 再構成の結果とは明らかに相容れない面がある。この点については後ほど考察する。

## 考察

第3章では、第2章の *in vivo* における機能解析の結果に基づいて、*in vitro* で SufBCD 複合体と SufSE との相互作用の解析を行った。Outten らの研究によって、Fe-S クラスターの材料となる  $S^0$  は SufS から SufE、SufE から SufBCD 複合体へと特異的なタンパク質間相互作用を利用して渡されることが示されている。それによると、SufS の活性中心のシステイン (SufS<sup>C364</sup>) は分子内部に埋もれており、酵素反応で生じた-SSH は DTT などの還元剤から保護されているため、SufS 単独ではターンオーバーが起こらず、ほとんど活性を示さない。しかし、SufE と SufBCD 複合体が共存すると、 $S^0$  はリレー形式で渡され、SufS<sup>C364</sup> の-SSH は-SH に再生してターンオーバーできるようになる。この実験系を利用して、SufB の 8 種類の機能残基をそれぞれアラニンに置換した変異型の SufBCD 複合体を精製し、SufS+SufE のシステインデサルフラゼ活性を促進するか検討したところ、SufB<sup>C254A</sup> 変異型を含む SufBCD 複合体は、システインデサルフラゼ活性を全く促進しないということがわかった (Fig. 22)。

本研究ではさらに、DTT の非存在下で SufS、SufE から  $S^0$  を SufBCD 複合体に転移させて、複合体に結合する  $S^0$  の総量を調べたところ、約 5 個の  $S^0$  が野生型の複合体に集積されていることがわかった (Fig. 24)。ここに Fe イオンや還元力 (おそらく ATP も) が提供されれば、Fe-S クラスターの形成が進むと考えられる。一方、SufB<sup>C254A</sup> 変異型の SufBCD 複合体では  $S^0$  の蓄積が全く見られなかった (Fig. 24)。この SufB<sup>C254A</sup> の置換は、SufB、SufC および SufD のタンパク質レベルや、SufBCD 複合体の形成、また SufB と SufE 間の物理的な会合にはほとんど影響しなかったことから、SufB<sup>C254A</sup> の置換によって SufE から SufB への硫黄原子の運搬が直接阻害された可能性が高い。SufBCD 複合体の結晶構造によると SufB<sup>C254</sup> の側鎖は  $\beta$ -ヘリックスコアドメインの内側に位置しているが、ドメインの N 末端側で溶媒に接しており、SufE との相互作用は可能と考えられ

る (Fig. 14B)。その SufB<sup>C254</sup> には機能残基である SufB<sup>Q285</sup> と SufB<sup>W287</sup> が非常に近接しており (Fig. 14A)、それらをアラニンに置換した変異型の SufBCD 複合体では、システインデサルフラゼ活性の促進効果が有意に減少していた (Fig. 22)。この結果からも SufB<sup>C254</sup> とその周辺の数残基が SufE との特異的なタンパク質間相互作用に関与しており、S<sup>0</sup> は特異的に SufB<sup>C254</sup> に渡されるという可能性が支持される。

本研究では、精製標品を用いて *in vitro* における Fe-S クラスターの再構成も試みたが、予想とは異なる結果になった。すなわち、SufB<sup>C254A</sup> 変異型、SufB<sup>C405A</sup> 変異型を含む SufBCD 複合体では、どちらにも野生型の複合体と同様に [4Fe-4S] クラスターが再構成された。この明らかな矛盾については、*in vitro* 再構成の方に問題があると考えている。その理由として、第 1 に、大腸菌から嫌氣的に調製した SufBCD 複合体は、*in vitro* で SufBCD に再構成したクラスターとは明確に異なる吸収スペクトルを示すことが報告されている<sup>63,64</sup>。この複合体の Fe-S クラスターは非常に不安定なため詳しく解析されていないが、直鎖状の [3Fe-4S] クラスターではないかと考えられている<sup>63</sup>。第 2 に、*in vitro* で再構成した [4Fe-4S] クラスターの配位子は Mössbauer を用いた解析によってすべてシステインと示されている<sup>64</sup>が、SufBCD 複合体でそのような配置をとり得るシステインは SufB の CxxCxxxC モチーフのみである。ところが、第 2 章で述べたようにこの 3 残基のシステインは *in vivo* の機能に全く必要ではない。第 3 に、この *in vitro* 再構成反応には ATP が含まれていないため、生理的な反応とは考えにくい。ATP は Fe<sup>2+</sup> を含む 2 価金属イオンのキレーターであるため、今後、*in vitro* の再構成実験では添加量を微調整しながら検討する必要がある。これらの点を踏まえると、今回の *in vitro* 再構成反応においては、SufE または SufB に形成された persulfide が DTT で還元されて S<sup>2-</sup> の形で遊離し、その S<sup>2-</sup> と Fe イオンによって、化学的 (非酵素的)・非特異的に SufB の CxxCxxxC モチーフに [4Fe-4S] クラスターが再構成された可能性が高い。*in vitro* の化学的な反応では、本来とは異なる Fe-S クラスターが形成されることがたびたび報告さ



れており、一例として、血清アルブミンでも Fe-S クラスターを持つようになる<sup>79</sup>。実際に、SufBCD 複合体で Fe-S クラスターが組み立てられることを実験的に証明するためには、たいへん不安定なクラスターを保持した状態で大腸菌から複合体を調製する必要があると考えており、当研究室では、それに向けて嫌気的な精製システムのセットアップを進めている。

*In vitro* の再構成実験からは SufBCD 複合体における Fe-S クラスター形成部位を同定することはできなかったが、第 2 章で行った系統的・網羅的な変異導入解析から、Fe-S クラスターは Region B の機能残基を利用して組立てられる可能性が高いと考えられる。すなわち、SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup> の 3 残基はどれも Fe-S クラスターのリガンドとして必須であり、加えて SufB<sup>E432</sup>、SufB<sup>H433</sup>、SufD<sup>C358</sup> の 3 残基のうちどれかひとつが 4 番目のリガンドとして機能するという可能性である。しかしながら、S<sup>0</sup> の受容部位である Region A の SufB<sup>C254</sup> から Region B までは最も近くの SufB<sup>C405</sup> でも 25 Å 以上離れており、直接渡すには離れすぎている。Region A と Region B の間には SufB<sup>C307</sup> と SufB<sup>C332</sup> のふたつのシステイン残基が存在しているが、これらを同時にアラニンに置換してもほとんど *in vivo* 機能に影響はみられなかった (Table 3)。したがって、これらのシステイン残基が SufB<sup>C254</sup> から SufB<sup>C405</sup> への S<sup>0</sup> の移動を中継する可能性は低い。

それでは、硫黄は SufB<sup>C254</sup> から Region B までどのようにして運搬されるのだろうか。ひとつの可能性として、SufB<sup>C254</sup> に付加された S<sup>0</sup> が S<sup>2-</sup>へと還元され、SufB の内部を通過して SufB<sup>C405</sup> まで移動するというを考えて、Caver ソフトウェア<sup>80-82</sup>を用いて SufB 内部の空間を調べてみたところ、β-ヘリックスの内部に SufB<sup>C254</sup> から SufB<sup>C405</sup> まで続くトンネルがあることがわかった (Fig. 26A)。このトンネルはほとんどが親水的なアミノ酸残基で構成されており (Fig. 26B、Table 6)、HS-のような硫黄が通るのに適しているのかもしれない。注目すべきことに、このトンネルを構成するアミノ酸残基には保存

性の高いものが多く、なかでも SufB<sup>Q285</sup> と SufB<sup>K303</sup> はアラニンへの置換によって機能不全になる残基である (Fig. 12)。加えて、SufB<sup>E236</sup>、SufB<sup>E252</sup>、SufB<sup>H265</sup>、SufB<sup>T283</sup>、SufB<sup>T326</sup>、SufB<sup>K328</sup> はアラニンへの置換によって明らかに機能が低下した (Table 3) ことから、このトンネルの重要性が裏付けられる。これらのアミノ酸残基の中で、SufB<sup>K328</sup> は通路を制限するような位置にあり、トンネルのボトルネックになっている (Fig. 26A)。そのボトルネック部の半径は 1.04 Å で、S<sup>2-</sup>のイオン半径の 1.84 Å<sup>83</sup> より狭く、この部分を硫黄が通過するためには SufB<sup>K328</sup> の側鎖の向きが変化する必要がある。ただし、SufB<sup>K328A</sup> 置換の場合、側鎖が小さくなくても *in vivo* での機能が低下した (Table 3) ことから、ボトルネックによる調節には重要な意味があるのかもしれない。

SufD の立体構造は SufB とよく似ている (Fig. 5) が、SufD の内部にはトンネルは存在しなかった。一方、興味深いことに、*Methanosarcina mazei* Go1 の SufB の構造でトンネルを探してみると、β-ヘリックス内部に SufB<sup>C177</sup> (大腸菌 SufB<sup>C254</sup> に対応) から SufB<sup>C319</sup> (大腸菌 SufB<sup>C405</sup> に対応) まで続くトンネルを見出すことができた (Fig. 26A)。*M. mazei* は SufD を持たず、おそらく SufB と SufC が SufB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> の複合体を形成すると予想されているが、結晶構造は SufB のホモ二量体について Protein Data Bank に登録されている。*M. mazei* SufB と大腸菌 SufB のアミノ酸配列の相同性は 17% と低く、トンネルの周囲のアミノ酸残基のほとんども保存されていない (Fig. 17)。にもかかわらず、大腸菌 SufB の機能に必要な 2 残基のシステインが保存されており、加えてそれら 2 残基のシステインの間にトンネルが存在するという点は注目に値する。加えて大腸菌 SufB の E434、SufD の H360 に対応する残基も *M. mazei* の SufB で保存されている (それぞれ E348 と H347 に対応) ため、これらは Fe-S クラスター形成の基本的なメカニズムに関係していると考えられる。

以上の知見を総合して、SUF マシナリーによる Fe-S クラスターの生合成機構を考

察する (Fig. 27)。システインデスルフラナーゼ SufS によって基質の L-cysteine から引き抜かれた硫黄原子は、 $S^0$  の形でまず SufE<sup>C51</sup> に、次いで SufBCD 複合体の SufB<sup>C254</sup> へと渡される。SufB<sup>C254</sup> に結合した  $S^0$  は、おそらく FADH<sub>2</sub> によって還元されることで SufB<sup>C254</sup> から遊離し、H<sub>2</sub>S または HS<sup>-</sup> の形で SufB の  $\beta$ -ヘリックス内部のトンネルを SufB<sup>C405</sup> まで移動する。このトンネルの内部には、複数の硫黄が蓄積される可能性もある。2 分子の SufC は 2 分子の ATP をサンドイッチにして会合し、それによって SufB-SufD の会合面には大きな構造変化が生じる。その構造変化を利用して、Region B で SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup> の再編成が起こり、これらを中心的な配位子として Fe-S クラスタが新規に形成される。この領域では、重複機能を持つ SufB<sup>E432</sup>、SufB<sup>H433</sup>、SufD<sup>C358</sup> の 3 残基のうちの一つが、4 番目の配位子として機能する可能性がある。SufC によって ATP が加水分解されると、2 分子の SufC は再び解離し、それに伴う構造変化を利用して、Fe-S クラスタは SufA を含む他のタンパク質へと移行する。本研究ではこのような反応機構に加えて、 $\beta$ -ヘリックスという独特な構造についてはじめて重要な意義を見出すことができた。SufB 内部のトンネルが進化的に保存されていることから、 $S^2$  を溶媒から隔離してクラスタ形成に備えることの重要性が示唆される。

最後に、分子機構のさらなる解明を進めるために、今後の研究に向けた課題を述べる。

1. SufB の  $\beta$ -ヘリックス内部のトンネルを、実際に硫黄が通ることができるのか、また通るとするとどのような分子種 (H<sub>2</sub>S または HS<sup>-</sup>) なのか確かめる必要がある。この点については、宮崎大学工学部の湯井先生にお願いして、分子動力学計算によるシミュレーションを進めている。
2. Fe-S クラスタの材料となる Fe イオンが、どのようにして SufBCD 複合体まで運ばれてくるのか明らかにする必要がある。遊離の Fe イオンは毒性が強いため、Fe シャペロンといったタンパク質が関与するのではないかと考えられている。世界中

でその探索が進められており、候補となるタンパク質は多いが、これまで決め手がない。

3. SufBCD 複合体が Fe-S クラスタ中間体を結合した状態を捕らえる必要がある。これについては上述のように、*in vitro* 再構成ではなく、不安定なクラスタを保持させた状態で大腸菌から SufBCD 複合体を調製する必要があると考えている。
4. SufBCD 複合体がどのように構造を変化させるのか、その実体を捉える必要がある。この点については、大阪大学タンパク質研究所の岩崎先生らと共同で電子顕微鏡による単粒子解析、宮崎大学の和田先生らと共同で X 線小角散乱による解析を進めてきたが、ATP 存在下での構造変化を捕らえることには成功していない。和田先生らは一過性の構造変化を永続的にロックすることを目指して、SufC 2 分子の会合面のアミノ酸をシステインに置換 (Y86C) し、変異型の SufC 2 分子が ATP の存在下でジスルフィド結合により二量体化することを示した<sup>57</sup>が、この状態の SufBCD 複合体は溶解度が低下して、徐々に沈殿するという難点がある。
5. SufBCD 複合体で形成された不安定な Fe-S クラスタ中間体が、どのようにしてターゲットとなるアポタンパク質まで運ばれるのか、アポタンパク質はどのようにして認識されるのか明らかにする必要がある。当研究室では、SufA などクラスタの運搬を担うと予想されるいくつかのタンパク質群と、アポタンパク群との相互作用について、解析が進められつつある。
6. 第 2 章の考察でも述べたが、進化的には、SufB と SufD との機能分化がどうして生じたのか、またなぜ必要なのか、興味深いところである。

このように、SUF マシナリーの作動機構については重要な難課題が山積しているが、これは別タイプの Fe-S クラスタ生合成系である ISC マシナリーや NIF マシナリーに

ついても似たような状況である。ただし、SUF とその類似マシンリーは、真正細菌全般から古細菌、植物の葉緑体やマラリア原虫のアピコプラストと幅広く分布しているが、動物には見られないため、特異的な阻害剤の探索といった応用面での研究も期待できる。今後も、*in vivo* の研究を土台にして、*in vitro* の生化学的研究や構造生物学的研究が進展し、理解が一層深まることを期待している。

## 参考文献

1. Bak, D. W. & Elliott, S. J. Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 50–58 (2014).
2. McLaughlin, M. I., Lanz, N. D., Goldman, P. J., Lee, K.-H., Booker, S. J. & Drennan, C. L. Crystallographic snapshots of sulfur insertion by lipoyl synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 9446–9450 (2016).
3. Beinert, H. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653–659 (1997).
4. Fontecave, M., Choudens, S. O. De, Py, B. & Barras, F. Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 713–721 (2005).
5. Lill, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838 (2009).
6. Mettert, E. L. & Kiley, P. J. Fe-S proteins that regulate gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1284–1293 (2015).
7. Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E. & Dean, D. R. Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 49–57 (1989).
8. Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. & Dean, D. R. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **273**, 13264–13272 (1998).
9. Takahashi, Y. & Tokumoto, U. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in Archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* **277**, 28380–28383 (2002).
10. Outten, F. W., Djaman, O. & Storz, G. A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **52**, 861–872 (2004).
11. Boyd, E. S., Thomas, K. M., Dai, Y., Boyd, J. M. & Outten, F. W. Interplay between oxygen and Fe-S cluster biogenesis: insights from the Suf pathway. *Biochemistry* **53**, 5834–5847 (2014).
12. Balk, J. & Schaedler, T. A. Iron cofactor assembly in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**, 125–153 (2014).

13. Hu, Y. & Ribbe, M. W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J. Biol. Chem.* **288**, 13173–13177 (2013).
14. Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K. & 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**, 199–209 (2004).
15. Smith, A. D., Jameson, G. N. L., Dos Santos, P. C., Agar, J. N., Naik, S., Krebs, C., Frazzon, J., Dean, D. R., Huynh, B. H. & Johnson, M. K. NifS-mediated assembly of [4Fe-4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein. *Biochemistry* **44**, 12955–12969 (2005).
16. Py, B. & Barras, F. Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 436–446 (2010).
17. Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S. J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C. R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M. F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauel, C., Meima, R., Mellado, R. P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H. M., Rapoport, G., Rawlins, J. P., Rivas, L. a, Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H. H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J. F. M. L., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H. B., Vagner, V., van Dijl, J. M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U. & Ogasawara, N. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4678–4683 (2003).
18. Huet, G., Daffé, M. & Saves, I. Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of [Fe-S] cluster assembly: Evidence for its implication in the pathogen's survival. *J. Bacteriol.* **187**, 6137–6146 (2005).
19. Romsang, A., Duang-Nkern, J., Leesukon, P., Saninjuk, K., Vattanaviboon, P. &

- Mongkolsuk, S. The iron-sulphur cluster biosynthesis regulator IscR contributes to iron homeostasis and resistance to oxidants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **9**, e86763 (2014).
20. Lim, J. G. & Choi, S. H. IscR is a global regulator essential for pathogenesis of *Vibrio vulnificus* and induced by host cells. *Infect. Immun.* **82**, 569–578 (2014).
  21. Tokumoto, U. & Takahashi, Y. Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J. Biochem.* **130**, 63–71 (2001).
  22. Schwartz, C. J., Giel, J. L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F. J., Beinert, H. & Kiley, P. J. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14895–14900 (2001).
  23. Yeo, W. S., Lee, J. H., Lee, K. C. & Roe, J. H. IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol. Microbiol.* **61**, 206–218 (2006).
  24. Dai, Y. & Outten, F. W. The *E. coli* SufS-SufE sulfur transfer system is more resistant to oxidative stress than IscS-IscU. *FEBS Lett.* **586**, 4016–4022 (2012).
  25. Selbach, B. P., Pradhan, P. K. & Dos Santos, P. C. Protected sulfur transfer reactions by the *Escherichia coli* Suf system. *Biochemistry* **52**, 4089–4096 (2013).
  26. Jang, S. & Imlay, J. A. Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Mol. Microbiol.* **78**, 1448–1467 (2010).
  27. Blanc, B., Clemancey, M., Latour, J.-M., Fontecave, M. & Choudens, S. O. de. Molecular investigation of iron-sulfur cluster assembly scaffolds under stress. *Biochemistry* **4**, 7867–7869 (2014).
  28. Kambampati, R. & Lauhon, C. T. Evidence for the transfer of sulfane sulfur from IscS to ThiI during the *in vitro* biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *J. Biol. Chem.* **275**, 10727–10730 (2000).
  29. Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.-F., Matte, A., Armengod, M. E. & Cygler, M. Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol.* **8**, e1000354 (2010).



30. Ding, H., Clark, R. J. & Ding, B. IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions. *J. Biol. Chem.* **279**, 37499–37504 (2004).
31. Tan, G., Lu, J., Bitoun, J. P., Huang, H. & Ding, H. IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in *Escherichia coli* under aerobic growth conditions. *Biochem. J.* **420**, 463–472 (2009).
32. Tanaka, N., Kanazawa, M., Tonosaki, K., Yokoyama, N., Kuzuyama, T. & Takahashi, Y. Novel features of the ISC machinery revealed by characterization of *Escherichia coli* mutants that survive without iron-sulfur clusters. *Mol. Microbiol.* **99**, 835–848 (2015).
33. Hoff, K. G., Silberg, J. J. & Vickery, L. E. 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**, 7790–7795 (2000).
34. Tokumoto, U., Nomura, S., Minami, Y., Mihara, H., Kato, S.-I., Kurihara, T., Esaki, N., Kanazawa, H., Matsubara, H. & Takahashi, Y. Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **131**, 713–719 (2002).
35. Chandramouli, K. & Johnson, M. K. HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry* **45**, 11087–11095 (2006).
36. Wada, K., Hasegawa, Y., Gong, Z., Minami, Y., Fukuyama, K. & Takahashi, Y. Crystal structure of *Escherichia coli* SufA involved in biosynthesis of iron-sulfur clusters: Implications for a functional dimer. *FEBS Lett.* **579**, 6543–6548 (2005).
37. Lu, J., Yang, J., Tan, G. & Ding, H. Complementary roles of SufA and IscA in the biogenesis of iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **409**, 535–543 (2008).
38. Chahal, H. K. & Outten, F. W. Separate Fe-S scaffold and carrier functions for SufB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and SufA during *in vitro* maturation of [2Fe-2S] Fdx. *J. Inorg. Biochem.* **116**, 126–134 (2012).
39. Mihara, H., Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T., Hata, Y. & Esaki, N. A *nifS*-like gene, *csdB*, encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *J. Biol. Chem.* **274**, 14768–14772 (1999).
40. Outten, F. W., Wood, M. J., Muñoz, F. M. & Storz, G. The SufE protein and the

- SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 45713–45719 (2003).
41. Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T. & Esaki, N. 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**, 559–567 (2000).
  42. Loiseau, L., Ollagnier de Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M. & Barras, F. Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system. SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J. Biol. Chem.* **278**, 38352–38359 (2003).
  43. Kim, S. & Park, S. Y. Structural changes during cysteine desulfurase CsdA and sulfur acceptor CsdE interactions provide insight into the trans-persulfuration. *J. Biol. Chem.* **288**, 27172–27180 (2013).
  44. Singh, H., Dai, Y., Outten, F. W. & Busenlehner, L. S. *Escherichia coli* SufE sulfur transfer protein modulates the SufS cysteine desulfurase through allosteric conformational dynamics. *J. Biol. Chem.* **288**, 36189–36200 (2013).
  45. Dai, Y., Kim, D., Dong, G., Busenlehner, L. S., Frantom, P. A. & Outten, F. W. SufE D74R substitution alters active site loop dynamics to further enhance SufE interaction with the SufS cysteine desulfurase. *Biochemistry* **54**, 4824–4833 (2015).
  46. Wayne Outten, F. Recent advances in the Suf Fe-S cluster biogenesis pathway: Beyond the Proteobacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 1464–1469 (2015).
  47. Selbach, B. P., Chung, A. H., Scott, A. D., George, S. J., Cramer, S. P. & Dos Santos, P. C. Fe-S cluster biogenesis in gram-positive bacteria: SufU is a zinc-dependent sulfur transfer protein. *Biochemistry* **53**, 152–160 (2014).
  48. Mihara, H. & Esaki, N. Bacterial cysteine desulfurases: Their function and mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 12–23 (2003).
  49. Loiseau, L., Ollagnier de Choudens, S., Lascoux, D., Forest, E., Fontecave, M. & Barras, F. Analysis of the heteromeric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 26760–26769 (2005).
  50. Miyauchi, K., Kimura, S. & Suzuki, T. A cyclic form of *N*<sup>6</sup>-threonylcarbamoyladenosine as a widely distributed tRNA hypermodification. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 105–111 (2013).
  51. Kaiser, J. T., Clausen, T., Bourenkow, G. P., Bartunik, H. D., Steinbacher, S. & Huber,

- R. Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* **297**, 451–464 (2000).
52. Cupp-Vickery, J. R., Urbina, H. & Vickery, L. E. Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **330**, 1049–1059 (2003).
53. Layer, G., Gaddam, S. A., Ayala-Castro, C., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Fontecave, M. & Outten, F. W. SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* **282**, 13342–13350 (2007).
54. Badger, J., Sauder, J. M., Adams, J. M., Antonysamy, S., Bain, K., Bergseid, M. G., Buchanan, S. G., Buchanan, M. D., Batiyenko, Y., Christopher, J. A., Emtage, S., Eroshkina, A., Feil, I., Furlong, E. B., Gajiwala, K. S., Gao, X., He, D., Hendle, J., Huber, A., Hoda, K., Kearins, P., Kissinger, C., Laubert, B., Lewis, H. A., Lin, J., Loomis, K., Lorimer, D., Louie, G., Maletic, M., Marsh, C. D., Miller, I., Molinari, J., Muller-Dieckmann, H. J., Newman, J. M., Noland, B. W., Pagarigan, B., Park, F., Peat, T. S., Post, K. W., Radojicic, S., Ramos, A., Romero, R., Rutter, M. E., Sanderson, W. E., Schwinn, K. D., Tresser, J., Winhoven, J., Wright, T. A., Wu, L., Xu, J. & Harris, T. J. R. Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **60**, 787–796 (2005).
55. Kitaoka, S., Wada, K., Hasegawa, Y., Minami, Y., Fukuyama, K. & Takahashi, Y. Crystal structure of *Escherichia coli* SufC, an ABC-type ATPase component of the SUF iron-sulfur cluster assembly machinery. *FEBS Lett.* **580**, 137–143 (2006).
56. Wada, K., Sumi, N., Nagai, R., Iwasaki, K., Sato, T., Suzuki, K., Hasegawa, Y., Kitaoka, S., Minami, Y., Outten, F. W., Takahashi, Y. & Fukuyama, K. Molecular dynamism of Fe-S cluster biosynthesis implicated by the structure of the SufC<sub>2</sub>-SufD<sub>2</sub> complex. *J. Mol. Biol.* **387**, 245–258 (2009).
57. Hirabayashi, K., Yuda, E., Tanaka, N., Katayama, S., Iwasaki, K., Matsumoto, T., Kurisu, G., Outten, F. W., Fukuyama, K., Takahashi, Y. & Wada, K. Functional dynamics revealed by the structure of the SufBCD complex, a novel ATP-binding cassette (ABC) protein that serves as a scaffold for iron-sulfur cluster biogenesis. *J. Biol. Chem.* **290**, 29717–29731 (2015).
58. Rangachari, K., Davis, C. T., Eccleston, J. F., Hirst, E. M. A., Saldanha, J. W., Strath, M. & Wilson, R. J. M. SufC hydrolyzes ATP and interacts with SufB from *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett.* **514**, 225–228 (2002).

59. Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D. & Barras, F. SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J.* **22**, 427–437 (2003).
60. Petrovic, A., Davis, C. T., Rangachari, K., Clough, B., Wilson, R. J. M. I. & Eccleston, J. F. Hydrodynamic characterization of the SufBC and SufCD complexes and their interaction with fluorescent adenosine nucleotides. *Protein Sci.* **17**, 1264–1274 (2008).
61. Locher, K. P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 487–493 (2016).
62. Tsaousis, A. D., Ollagnier de Choudens, S., Gentekaki, E., Long, S., Gaston, D., Stechmann, A., Vinella, D., Py, B., Fontecave, M., Barras, F., Lukes, J. & Roger, A. J. Evolution of Fe/S cluster biogenesis in the anaerobic parasite *Blastocystis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 10426–10431 (2012).
63. Saini, A., Mapolelo, D. T., Chahal, H. K., Johnson, M. K. & Outten, F. W. SufD and SufC ATPase activity are required for iron acquisition during *in vivo* Fe-S cluster formation on SufB. *Biochemistry* **49**, 9402–9412 (2010).
64. Wollers, S., Layer, G., Garcia-Serres, R., Signor, L., Clemancey, M., Latour, J. M., Fontecave, M. & De Choudens, S. O. Iron-sulfur (Fe-S) cluster assembly: The SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor. *J. Biol. Chem.* **285**, 23331–23341 (2010).
65. Dym, O. & Eisenberg, D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* **10**, 1712–1728 (2001).
66. Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Sauret-Güeto, S., Gallego, F., Lois, L. M. & Boronat, A. *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**, 59–67 (2001).
67. Seemann, M., Bui, B. T. S., Wolff, M., Tritsch, D., Campos, N., Boronat, A., Marquet, A. & Rohmer, M. Isoprenoid biosynthesis through the methylerythritol phosphate pathway: The (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] protein. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **41**, 4337–4339 (2002).
68. Wolff, M., Seemann, M., Tse Sum Bui, B., Frapart, Y., Tritsch, D., Garcia Estrabot, A., Rodríguez-Concepción, M., Boronat, A., Marquet, A. & Rohmer, M. 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**, 115–120 (2003).
69. Smith, P. C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J. E., Rosen, J., Thomas, P. J. & Hunt, J. F. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell* **10**, 139–149 (2002).
  70. Buchaklian, A. H. & Klug, C. S. Characterization of the LSGGQ and H motifs from the *Escherichia coli* lipid A transporter MsbA. *Biochemistry* **45**, 12539–12546 (2006).
  71. ter Beek, J., Guskov, A. & Slotboom, D. J. Structural diversity of ABC transporters. *J. Gen. Physiol.* **143**, 419–435 (2014).
  72. Ayala-Castro, C., Saini, A. & Outten, F. W. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 110–125 (2008).
  73. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. & Johnson, M. K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 247–281 (2005).
  74. Nakamura, M., Saeki, K. & Takahashi, Y. Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster. *J. Biochem.* **126**, 10–18 (1999).
  75. Gupta, V., Sendra, M., Naik, S. G., Chahal, H. K., Huynh, B. H., Outten, F. W., Fontecave, M. & De Choudens, S. O. Native *Escherichia coli* SufA coexpressed with SufBCDSE purifies as a [2Fe-2S] protein and acts as an Fe-S transporter to Fe-S target enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 6149–6153 (2009).
  76. Chahal, H. K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C. & Outten, F. W. The SufBCD Fe-S scaffold complex interacts with SufA for Fe-S cluster transfer. *Biochemistry* **48**, 10644–10653 (2009).
  77. Goldsmith-Fischman, S., Kuzin, A., Edstrom, W. C., Benach, J., Shastry, R., Xiao, R., Acton, T. B., Honig, B., Montelione, G. T. & Hunt, J. F. The SufE sulfur-acceptor protein contains a conserved core structure that mediates interdomain interactions in a variety of redox protein complexes. *J. Mol. Biol.* **344**, 549–565 (2004).
  78. Ollagnier de Choudens, S., Lascoux, D., Loiseau, L., Barras, F., Forest, E. & Fontecave, M. Mechanistic studies of the SufS-SufE cysteine desulfurase: evidence for sulfur transfer from SufS to SufE. *FEBS Lett.* **555**, 263–267 (2003).

79. Yang, J., Bitoun, J. P. & Ding, H. Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters. *J. Biol. Chem.* **281**, 27956–27963 (2006).
80. Schrodinger LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.7.2.1. (2015).
81. Chovancova, E., Pavelka, A., Benes, P., Strnad, O., Brezovsky, J., Kozlikova, B., Gora, A., Sustr, V., Klvana, M., Medek, P., Biedermannova, L., Sochor, J. & Damborsky, J. CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002708 (2012).
82. Pavelka, A., Sebestova, E., Kozlikova, B., Brezovsky, J., Sochor, J. & Damborsky, J. CAVER: algorithms for analyzing dynamics of tunnels in macromolecules. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinforma.* **13**, 505–517 (2016).
83. Shannon, R. D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr. Sect. A* **32**, 751–767 (1976).
84. Kovach, M. E., Elzer, P. H., Steven Hill, D., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. & Peterson, K. M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176 (1995).
85. McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P. & Lopez, R. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **41**, W597–W600 (2013).
86. Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J. & Lopez, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **38**, W695–W699 (2010).
87. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D. & Higgins, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539 (2014).
88. Robert, X. & Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**, W320–W324 (2014).
89. Krissinel, E. & Henrick, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2256–2268 (2004).

## 図と表

**Table 1.** 本研究で使用した大腸菌株とプラスミド

Strain/plasmid	Description	Reference/source
<b>Strains</b>		
MG1655	Wild type	Laboratory strain
UT109	MG1655 $\Delta(\text{iscUA-hscBA})::\text{Km}^r \Delta(\text{sufABCDSE})::\text{Gm}^r$	14
YT2512	MG1655 $\Delta(\text{sufABCDSE})::\text{Gm}^r$	9
HMS174(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>hsdR</i> ( $\text{rk12}^- \text{mk12}^+$ ) (Rif <sup>R</sup> ) (DE3)	Novagen
<b>Plasmids</b>		
pUMV22 Sp <sup>f</sup>	Sp <sup>f</sup> ; pUC19 derivative carrying three gene for MVA kinase, PMVA kinase and DPMVA decarboxylase.	32
pRKNMC	Tc <sup>r</sup> ; IncP-1 replicon, low-copy-number vector	74
pRK- $\Delta\text{sufCp}$	pRKNMC derivative carrying <i>E. coli</i> <i>sufAB-DSE</i> added an artificial promoter to the upstream region of SufD	57
pRK- <i>sufCDSE</i>	pRKNMC derivative carrying <i>E. coli</i> <i>sufCDSE</i>	佐藤修論、2009
pRK- <i>sufCDSE</i> -His	pRK- <i>sufCDSE</i> carrying <i>sufE</i> fused with (His) <sub>6</sub> -tag sequence	This study
pRK- <i>sufABC-SE</i>	pRKNMC derivative carrying <i>E. coli</i> <i>sufABC-SE</i>	56
pBBR1MCS-4	Ap <sup>r</sup> ; pBBR replicon, low-copy-number vector	84
pBBR- <i>sufC</i>	pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli</i> <i>sufC</i>	57
pBBR- <i>sufAB</i>	pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli</i> <i>sufAB</i>	佐藤修論、2009
pBBR- <i>sufD</i>	pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli</i> <i>sufD</i>	56
pGSO164	Ap <sup>r</sup> ; pBAD/ <i>Myc</i> -His C derivative carrying <i>E. coli</i> <i>sufABCDSE</i>	40
pET21a- <i>sufE</i>	Ap <sup>r</sup> ; pET21a derivative carrying <i>E. coli</i> <i>sufE</i>	This study

Table 2. 本研究で使用したプライマー

Primer	Sequence
M13Rev	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
SufB-RSc3	5'-CTCCAGAGCTCCACTTAACATGTTTATTTCCTTATCCGAC-3'
SufC-FSc2	5'-GCTCTAGAGCTCTGAACACAGCGTCGGATAAG-3'
SufER-Nh	5'-CCGGGCTAGCCAACCGGATGAAAGCTGT-3'
pRK-His6-F	5'-CATCATCATCATCATTAGCTAGCTAATCACTGGCCGTC-3'
SufE-Cter-R	5'-GCTAAGTGCAGCGGCTTTGG-3'
EcSufE-F	5'-CATATGGCTTTATTGCCGGATAAAG-3'
EcSufE-R	5'-GGATCCTCGAGCTCAGCTAAGTGCAGCGGCTTTG-3'
SufB_E52A_F	5'-GGCGAAGCGTAATGCGCCGAGTGGATG-3'
SufB_E52A_R	5'-CATCCACTCCGGCGCATTACGCTTCGCC-3'
SufB_M56A_F	5'-GCGCTGGAGTTTCGTCTAAACGCC-3'
SufB_M56-R	5'-CCACTCCGGCTCATTACGC-3'
SufB_R60A_F	5'-GAGTGGATGCTGGAGTTTGCCTCTAAACGCCTATCGCGC-3'
SufB_R60A_R	5'-GCGCGATAGGCGTTTAGAGCAAACCTCCAGCATCCACTC-3'
SufB_C96A_F	5'-GCCGGTAATTGTGACGACACTTGCGCGTC-3'
SufB_C96_R	5'-CGATGGTGCTGAGTAGTAGCTGTAATC-3'
SufB_C99A_F	5'-CACCATCGTGCGGTAATGCTGACGACACTTGCGCG-3'
SufB_C99A_R	5'-CGCGCAAGTGTCTGTCAGCATTACCGCACGATGGTG-3'
SufB_C103A_F	5'-GCCCGTCTGAACTGGCGCGGTGC-3'
SufB_C103_R	5'-AGTGTCTGCACAATTACCGCACGATG-3'
SufB_C167A_F	5'-CGGAGCAGGGAATTATTTTCGCTTCCTTTGGTGAGGCGA-3'
SufB_C167A_R	5'-TCGCTCACCAAAGGAAGCGAAAATAATTCCTGCTCCG-3'
SufB_H176A_F	5'-GAGGCGATCCACGATGCCCGGAACTGGTGC-3'
SufB_H176A_R	5'-GCACCAGTTCGGGGCATCGTGGATCGCCTC-3'
SufB_D192A_F	5'-GCCAACTTCTTTGCCGCGCTTAATGCG-3'
SufB_D192_R	5'-ATTCCCGGCACCACGGTGCCGAGATATTTAC-3'
SufB_C217A_F	5'-CCTAAAGGCGTGCGCGCCCGATGGAACCTTCC-3'
SufB_C217A_R	5'-GGAAAGTTCATCGGGCGCGCACGCTTTAGG-3'
SufB_Y224A_F	5'-GCTTTTCGATTAACGCAGAAAAAACCGGCAGTTTG-3'
SufB_Y224_R	5'-GGTGGAAAGTTCATCGGGCAGCGC-3'
SufB_R226A_F	5'-GCCATTAACGCAGAAAAAACCGGCAGTTTGAGC-3'
SufB-R226X_F	5'-NNKATTAACGCAGAAAAAACCGGCAG-3'
SufB_R226_R	5'-AAAATAGGTGGAAAGTTCATCGGGC-3'
SufB_N228A_F	5'-GCCGCAGAAAAAACCGGCAGTTTGAGCG-3'



Table 2. 続き

Primer	Sequence
SufB_N228X_F	5'- <u>NNK</u> GCAGAAAAAACCGGGCAGTTTGA-3'
SufB_N228_R	5'-AATGCGAAAAATAGGTGAAAGTTCCATCG-3'
SufB_E230A_F	5'- <u>G</u> CAAAAACCGGGCAGTTTGTAGCGCAC-3'
SufB_E230_R	5'-TGCGTTAATGCGAAAAATAGGTGAAAGTTC-3'
SufB_Q234A_F	5'-CGCAGAAAAAACCGGG <u>G</u> CGTTTGTAGCGCACCACTTCTG-3'
SufB_Q234A_R*	5'-CAGAATGGTGCCTCAAAC <u>G</u> CCCCGGTTTTTTTCTGCG-3'
SufB_E236A_F	5'-CCGGGCAGTTT <u>G</u> CGCGCACCACTTCTGG-3'
SufB_E236A_R	5'-CCAGAATGGTGC <u>G</u> CGCAAACGCCCCG-3'
SufB_R237A_F	5'- <u>G</u> CCACCACTTCTGGTGGCCGACGAAGACAG-3'
SufB_R237_R	5'-CTCAAACGCCCCGGTTTTTTTCTGCG-3'
SufB_T238A_F	5'- <u>G</u> CCATTCTGGTGGCCGACGAAGACAG-3'
SufB_T238_R	5'-GCGCTCAAACGCCCCGGTTTTTTTCTG-3'
SufB_D243A_F	5'- <u>G</u> CCGAAGACAGCTACGTCAGCTACATTG-3'
SufB_D243_R	5'-GGCCACCAGAATGGTGCCTCAAAC-3'
SufB_E244A_F	5'- <u>G</u> CAGACAGCTACGTCAGCTACATTGAAGG-3'
SufB_E244_R	5'-GTCGGCCACCAGAATGGTGCCTCAAAC-3'
SufB_Y250A_F	5'- <u>G</u> CCATTGAAGGCTGTTCCGCTCCGGTGC-3'
SufB_Y250_R	5'-GCTGACGTAGCTGTCTTCGTCGGCC-3'
SufB_E252A_F	5'- <u>G</u> CAGGCTGTTCCGCTCCGGTGCCTG-3'
SufB_E252_R	5'-AATGTAGCTGACGTAGCTGTCTTCGTC-3'
SufB_C254A_F	5'-GTCAGCTACATTGAAGGC <u>G</u> CTTCCGCTCCGGTGC-3'
SufB_C254A_R	5'-GCACCGGAGCGGAAG <u>G</u> CGCCTTCAATGTAGCTGAC-3'
SufB_C254X_F	5'- <u>NNK</u> TCCGCTCCGGTGCCTGA-3'
SufB_C254_R	5'-GCCTTCAATGTAGCTGACGTAG-3'
SufB_H265A_F	5'-GCGTGACAGCTATCAGTTA <u>G</u> CCGCGGCAGTGGTG-3'
SufB_H265A_R	5'-CACCAGTCCCGG <u>G</u> CTAACTGATAGCTGTCACGC-3'
SufB_E270A_F	5'- <u>G</u> CAGTCATCATCCATAAAAACGCCGAGGTG-3'
SufB_E270_R	5'-CACCAGTCCCGGTGTAACGATAG-3'
SufB_Y281A_F	5'- <u>G</u> CTTCCACGGTACAAAACGGTTTCCTGGCG-3'
SufB_Y281_R	5'-TTTCACCTCGGCGTTTTTATGGATGATGAC-3'
SufB_T283A_F	5'- <u>G</u> CGGTACAAAACGGTTTCCTGGCGATAAC-3'
SufB_T283_R	5'-GGAATATTTACCTCGGCGTTTTTATGGATG-3'
SufB_Q285A_F	5'- <u>G</u> CAAACGGTTTCCTGGCGATAACAACCCGG-3'
SufB_Q285X_F	5'- <u>NNK</u> AACTGGTTTCCTGGCGATAACAAC-3'

Table 2. 続き

Primer	Sequence
SufB_Q285_R	5'-TACCGTGGAATATTTACCTCGGCG-3'
SufB_N286A_F	5'-GAAATATTCACGGTACAAGCCTGGTTTCCTGGCGATAACAAC-3'
SufB_N286A_R	5'-GTTGTTATCGCCAGGAAACCAGGCTTGTACCGTGGAATATTTAC-3'
SufB_W287A_F	5'-GCGTTTCCTGGCGATAACAACACCGGCGG-3'
SufB_W287X_F	5'-NNKTTTCCTGGCGATAACAACACCG-3'
SufB_W287_R	5'-GTTTTGTACCGTGGAATATTTACCTCGG-3'
SufB_N299A_F	5'-GCCTTCGTCACCAAGCGTGCTTTGTGCGAA-3'
SufB_N299_R	5'-GAGAATACCGCCGGTGTGTTATCG-3'
SufB_T302A_F	5'-GCCAAGCGTGCTTTGTGCGAAGGCG-3'
SufB_T302_R	5'-GACGAAGTTGAGAATACCGCCGGTG-3'
SufB_K303A_F	5'-GCGCGTGCTTTGTGCGAAGGCGAAAACAG-3'
SufB_K303X_F	5'-NNKCGTGCTTTGTGCGAAGGCGA-3'
SufB_K303_R	5'-GGTGACGAAGTTGAGAATACCGCCG-3'
SufB_R304A_F	5'-CTCAACTTCGTCACCAAGGCTGCTTTGTGCGAAGGCG-3'
SufB_R304A_R	5'-CGCCTTCGCACAAAGCAGCCTTGGTGACGAAGTTGAG-3'
SufB_C307A_F	5'-GTCACCAAGCGTGCTTTGGCGAAGGCGAAAACAGC-3'
SufB_C307A_R	5'-GCTGTTTTCGCCTTCGCGCAAAGCACGCTTGGTGAC-3'
SufB_W316A_F	5'-GCGAAAACAGCAAAATGTCAGCGACGCAATCAGAAAACCGGG-3'
SufB_W316A_R	5'-CCCGGTTTCTGATTGCGTCGCTGACATTTTGCTGTTTTTCGC-3'
SufB_S323A_F	5'-GCAGCGATTACGTGGAAATATCCAGCTG-3'
SufB_S323_R	5'-CCCGGTTTCTGATTGCGTCCATGAC-3'
SufB_T326A_F	5'-GCGTGGAATATCCAGCTGCATTTTGCG-3'
SufB_T326_R	5'-AATCGCTGACCCGGTTTCTGATTGC-3'
SufB_K328A_F	5'-GCATATCCAGCTGCATTTTGCGCGGCGATAAC-3'
SufB_K328_R	5'-CCACGTAATCGCTGACCCGGTTTCTG-3'
SufB_Y329A_F	5'-GCGATTACGTGGAAAAGCTCCAGCTGCATTTTGCGCG-3'
SufB_Y329A_R	5'-CGCGCAAAATGCAGCTGGGAGCTTTCCACGTAATCGC-3'
SufB_C332A_F	5'-CGTGGAATATCCAGCGCCATTTTGCGCGGCGATAAC-3'
SufB_C332A_R	5'-GTTATCGCCGCGCAAAATGGCGCTGGGATATTTCCACG-3'
SufB_S345A_F	5'-GCAGTGGCGCTGACCAGCGGTCATC-3'
SufB_S345_R	5'-GTAAAACACCAATGGAGTTATCGCCG-3'
SufB_Q353A_F	5'-GCGCAAGCGGATACCGCACCAAGATGATC-3'
SufB_Q353_R	5'-ATGACCGCTGGTCAGCGCCACTGAG-3'
SufB_D356A_F	5'-GTCATCAGCAAGCGCTACCGGCACCAAG-3'

Table 2. 続き

Primer	Sequence
SufB_D356A_R	5'-CTTGGTGCCGGTAGCCGCTTGCTGATGAC-3'
SufB_K360A_F	5'-GCGATGATCCACATCGGTAAAAACACCAAATCGACC-3'
SufB_K360_R	5'-GGTGCCGGTATCCGCTTGCTGATGAC-3'
SufB_M361A_F	5'-GCGATCCACATCGGTAAAAACACCAAAT-3'
SufB_M361_R	5'-CTTGGTGCCGGTATCCGCTT-3'
SufB_H363A_F	5'-CCGGCACCAAGATGATCGCCATCGGTAAAAACACCAAATC-3'
SufB_H363A_R	5'-GATTTGGTGTGTTTTACCGATGGCGATCATCTTGGTGCCGG-3'
SufB_T368A_F	5'-GCCAAATCGACCATTATCTCGAAAGGGATCTC-3'
SufB_T368_R	5'-GTTTTTACCGATGTGGATCATCTTGGTGC-3'
SufB_S370A_F	5'-GCGACCATTATCTCGAAAGGGATCTCTGC-3'
SufB_S370_R	5'-TTTGGTGTGTTTTACCGATGTGGATCATCTTG-3'
SufB_K375A_F	5'-GCAGGGATCTCTGCCGGACATAGTCAGAAC-3'
SufB_K375_R	5'-CGAGATAATGGTCGATTTGGTGTGTTTTACC-3'
SufB_Y386A_F	5'-GCTCGCGGCTTAGTGAAAATCATGCCGACG-3'
SufB_Y386_R	5'-ACTGTTCTGACTATGTCCGGCAGAG-3'
SufB_R387A_F	5'-GCCGGCTTAGTGAAAATCATGCCGACGGC-3'
SufB_R387_R	5'-ATAACTGTTCTGACTATGTCCGGCAG-3'
SufB_C405A_F	5'-GCGCGCAATTTCACTCAGGCCGACTCAATGCTGATTGG-3'
SufB_C405A_R	5'-CCAATCAGCATTGAGTCGGCCTGAGTGAAATTGCGCGC-3'
SufB_C405X_F	5'-NNKGACTCAATGCTGATTGGCGCTAAT-3'
SufB_C405_R	5'-CTGAGTGAAATTGCGCGCATTG-3'
SufB_D406A_F	5'-GCCTCAATGCTGATTGGCGCTAATTGTGG-3'
SufB_D406_R	5'-GCACTGAGTGAAATTGCGCGCATTG-3'
SufB_C414A_F	5'-CAATGCTGATTGGCGCTAATGCTGGGGCGCATACTTC-3'
SufB_C414A_R	5'-GAAGGTATGCGCCCCAGCATTAGCGCCAATCAGCATTG-3'
SufB_H417A_F	5'-CGCTAATTGTGGGGCGCTACCTTCCCGTATGTTGAG-3'
SufB_H417A_R	5'-CTCAACATACGGGAAGGTAGCCGCCCCACAATTAGCG-3'
SufB_T418A_F	5'-GCCTTCCCGTATGTTGAGTGTCGTAACAATAG-3'
SufB_T418_R	5'-ATGCGCCCCACAATTAGCGCCAATC-3'
SufB_Y421A_F	5'-GCTGTTGAGTGTCGTAACAATAGTGCGCAACTGG-3'
SufB_Y421_R	5'-CGGGAAGGTATGCGCCCCACAATTAG-3'
SufB_N426A_F	5'-GCCAATAGTGCGCAACTGGAACACGAGGC-3'
SufB_N426_R	5'-ACGACACTCAACATACGGGAAGGTATG-3'
SufB_E432A_F	5'-GCACACGAGGCAACGACATCACGTATTG-3'

Table 2. 続き

Primer	Sequence
SufB_E432A/H433A_F	5'-GCAGCCGAGGCAACGACATCAC-3'
SufB_E432_R	5'-CAGTTGCGCACTATTGTTACGACTC-3'
SufB_H433A_F	5'-CAATAGTGCGCAACTGGAAGCCGAGGCAACGACATCAC-3'
SufB_H433A_R	5'-GTGATGTCGTTGCCTCGGCTTCCAGTTGCGCACTATTG-3'
SufB_E434A_F	5'-GCGGCAACGACATCACGTATTGGTGAAG-3'
SufB_E434X_F	5'-NNKGCAACGACATCACGTATTGGTGAAG-3'
SufB_E434_R	5'-GTGTTCCAGTTGCGCACTATTGTTAC-3'
SufB_S438A_F	5'-GCACGTATTGGTGAAGATCAACTGTTTTACTGCC-3'
SufB_S438_R	5'-TGTCGTTGCCTCGTGTCCAGTTGC-3'
SufB_Y447A_F	5'-GCCTGCCTGCAACGCGGGATCAGCGAAG-3'
SufB_Y447_R	5'-AAACAGTTGATCTTCACCAATACGTGATGTC-3'
SufB_C448A_F	5'-GGTGAAGATCAACTGTTTTACGCCCTGCAACGCGGGATC-3'
SufB_C448A_R	5'-GATCCCGCGTTGCAGGGCGTAAAAACAGTTGATCTTCACC-3'
SufB_R451A_F	5'-GCCGGGATCAGCGAAGAAGACGCCATCTC-3'
SufB_R451_R	5'-TTGCAGGCAGTAAAAACAGTTGATCTTCAC-3'
SufB_C467A_F	5'-CGATGATTGTTAACGGTTTCGCCAAAGACGTGTTCTCGGAG-3'
SufB_C467A_R	5'-CTCCGAGAACACGTCTTTGGCGAAACCGTTAACAATCATCG-3'
SufB_E477A_F	5'-CGGAGCTGCCGTTGGCATTGCCGTTGAAG-3'
SufB_E477A_R	5'-CTTCAACGGCAAATGCCAACGGCAGCTCCG-3'
SufD_D283A_F	5'-GCTACCCGTACCTGGCTGG-3'
SufD_D283_R	5'-ACACACCTCGTTTTTCACCGGC-3'
SufD_H290A_F	5'-GCCAATAAAGGTTTTTGTAACAGCCGAC-3'
SufD_H290_R	5'-TTCCAGCCAGGTACGGGTATC-3'
SufD_K302A_F	5'-GCAACTATCGTCAGCGACAAAGGC-3'
SufD_K302_R	5'-GTGCAACTGTCGGCTGTTACAAAAAC-3'
SufD_D344A_F	5'-GCTACGAAACCGCAGCTGGAAATC-3'
SufD_D344_R	5'-CACTCCGCCAGTTTGGCC-3'
SufD_E350A_F	5'-GCAATCTATGCAGATGATGTGAAATGC-3'
SufD_E350_R	5'-CAGCTGCGGTTTCGTATCCAC-3'
SufD_D354A_F	5'-GCTGATGTGAAATGCAGCCACG-3'
SufD_D354_R	5'-TGCATAGATTTCCAGCTGCGG-3'
SufD_D355A_F	5'-GCTGTGAAATGCAGCCACGGC-3'
SufD_D355_R	5'-ATCTGCATAGATTTCCAGCTGCG-3'
SufD_C358A_F	5'-GCCAGCCACGGCGGACG-3'

**Table 2. 続き**

Primer	Sequence
SufD_C358_R	5'-TTTCACATCATCTGCATAGATTTCAG-3'
SufD_C358S_F	5'-CAGATGATGTGAAATCGAGCCACGGCGCGACGG-3'
SufD_C358S_R	5'-CCGTCGCGCCGTGGCT <u>CG</u> ATTTCACATCATCTG-3'

部位特異的変異の導入箇所を下線で示す。制限酵素認識サイトを二重下線で示す。

**Table 3. SufB・SufC・SufD に対する部位特異的変異の影響**

<b>Substitution</b>	<b>Complementation</b>	<b>Substitution</b>	<b>Complementation</b>
SufB <sup>E52A</sup>	Partial	SufB <sup>R304A</sup>	Yes
SufB <sup>M56A</sup>	Yes	SufB <sup>C307A</sup>	Yes
SufB <sup>R60A</sup>	Partial	SufB <sup>W316A</sup>	Partial
SufB <sup>C96A</sup>	Yes	SufB <sup>S323A</sup>	Yes
SufB <sup>C99A</sup>	Yes	SufB <sup>T326A</sup>	Partial
SufB <sup>C103A</sup>	Yes	SufB <sup>K328A</sup>	Partial
SufB <sup>C167A</sup>	Yes	SufB <sup>Y329A</sup>	Yes
SufB <sup>H176A</sup>	Yes	SufB <sup>C332A</sup>	Yes
SufB <sup>D192A</sup>	Partial	SufB <sup>S345A</sup>	Yes
SufB <sup>C217A</sup>	Yes	SufB <sup>Q353A</sup>	Partial
SufB <sup>Y224A</sup>	Partial (TS)	SufB <sup>D356A</sup>	Partial
SufB <sup>R226A</sup>	No	SufB <sup>K360A</sup>	Yes
SufB <sup>N228A</sup>	No	SufB <sup>M361A</sup>	Yes
SufB <sup>E230A</sup>	Yes	SufB <sup>H363A</sup>	Yes
SufB <sup>Q234A</sup>	Partial (TS)	SufB <sup>T368A</sup>	Yes
SufB <sup>E236A</sup>	Partial (TS)	SufB <sup>S370A</sup>	Yes
SufB <sup>R237A</sup>	Partial	SufB <sup>K375A</sup>	Yes
SufB <sup>T238A</sup>	Yes	SufB <sup>Y386A</sup>	Yes
SufB <sup>D243A</sup>	Partial	SufB <sup>R387A</sup>	Partial
SufB <sup>E244A</sup>	Yes	SufB <sup>C405A</sup>	No
SufB <sup>Y250A</sup>	Yes	SufB <sup>D406A</sup>	Yes
SufB <sup>E252A</sup>	Partial (TS)	SufB <sup>C414A</sup>	Yes
SufB <sup>C254A</sup>	No	SufB <sup>H417A</sup>	Yes
SufB <sup>H265A</sup>	Partial	SufB <sup>T418A</sup>	Yes
SufB <sup>E270A</sup>	Partial	SufB <sup>Y421A</sup>	Yes
SufB <sup>Y281A</sup>	Partial	SufB <sup>N426A</sup>	Yes
SufB <sup>T283A</sup>	Partial	SufB <sup>E432A</sup>	Yes
SufB <sup>Q285A</sup>	No	SufB <sup>H433A</sup>	Yes
SufB <sup>N286A</sup>	Partial	SufB <sup>E434A</sup>	No
SufB <sup>W287A</sup>	No	SufB <sup>S438A</sup>	Yes
SufB <sup>N299A</sup>	Partial	SufB <sup>Y447A</sup>	Yes
SufB <sup>T302A</sup>	Yes	SufB <sup>C448A</sup>	Yes
SufB <sup>K303A</sup>	No	SufB <sup>R451A</sup>	Yes

**Table 3. 続き**

<b>Substitution</b>	<b>Complementation</b>
SufB <sup>C467A</sup>	Yes
SufB <sup>E477A</sup>	Yes
SufB <sup>A96-103</sup>	Yes
SufC <sup>H25A</sup>	Yes
SufC <sup>E28A</sup>	Yes
SufC <sup>H30A</sup>	Yes
SufC <sup>K40R</sup>	No
SufC <sup>S147A</sup>	Partial
SufC <sup>K152A</sup>	Partial
SufC <sup>C167A</sup>	Yes
SufC <sup>E171Q</sup>	No
SufC <sup>H203A</sup>	No
SufC <sup>H217A</sup>	Yes
SufD <sup>D283A</sup>	Yes
SufD <sup>H290A</sup>	Yes
SufD <sup>K302A</sup>	Yes
SufD <sup>D344A</sup>	Yes
SufD <sup>E350A</sup>	Yes
SufD <sup>D354A</sup>	Yes
SufD <sup>D355A</sup>	Yes
SufD <sup>C358A</sup>	Yes
SufD <sup>H360A</sup>	No
SufD <sup>H360S</sup>	No
SufD <sup>H360C</sup>	No
SufB <sup>C307A</sup> /SufB <sup>C332A</sup>	Yes
SufB <sup>D406A</sup> /SufB <sup>E432A</sup>	Yes

<b>Substitution</b>	<b>Complementation</b>
SufB <sup>D406A</sup> /SufB <sup>H433A</sup>	Yes
SufB <sup>E432A</sup> /SufB <sup>H433A</sup>	Partial
SufB <sup>D406A</sup> /SufD <sup>C358A</sup>	Yes
SufB <sup>D406A</sup> /SufD <sup>C358S</sup>	Yes
SufB <sup>E432A</sup> /SufD <sup>C358A</sup>	Yes
SufB <sup>E432A</sup> /SufD <sup>C358S</sup>	Yes
SufB <sup>H433A</sup> /SufD <sup>C358A</sup>	Yes
SufB <sup>H433A</sup> /SufD <sup>C358S</sup>	Yes
SufB <sup>D406A</sup> /SufB <sup>E432A</sup> /SufB <sup>H433A</sup>	Partial
SufB <sup>D406A</sup> /SufB <sup>E432A</sup> /SufD <sup>C358A</sup>	Yes
SufB <sup>D406A</sup> /SufB <sup>E432A</sup> /SufD <sup>C358S</sup>	Yes
SufB <sup>D406A</sup> /SufB <sup>H433A</sup> /SufD <sup>C358A</sup>	Yes
SufB <sup>D406A</sup> /SufB <sup>H433A</sup> /SufD <sup>C358S</sup>	Yes
SufB <sup>E432A</sup> /SufB <sup>H433A</sup> /SufD <sup>C358A</sup>	Partial
SufB <sup>E432A</sup> /SufB <sup>H433A</sup> /SufD <sup>C358S</sup>	Partial
SufB <sup>D406A</sup> /SufB <sup>E432A</sup> /SufB <sup>H433A</sup> /SufD <sup>C358A</sup>	Partial
SufB <sup>D406A</sup> /SufB <sup>E432A</sup> /SufB <sup>H433A</sup> /SufD <sup>C358S</sup>	Partial

**Table 4. 機能不全となる変異型 SufB に対する二次的な置換の影響**

<b>Primary substitution</b>	<b>Secondary substitution</b>	<b>Doubling time (min)</b>
SufB <sup>N228A</sup>	SufB <sup>T223S</sup>	142 ± 26.5
SufB <sup>N228A</sup>	SufB <sup>R226L</sup>	85.6 ± 2.88
SufB <sup>N228A</sup>	SufB <sup>P257T</sup>	138 ± 14.8
SufB <sup>Q285A</sup>	SufB <sup>A256S</sup>	72.3 ± 7.59
SufB <sup>K303A</sup>	SufB <sup>A256S</sup>	281 ± 87.7
SufB <sup>E434A</sup>	SufB <sup>V423F</sup>	103 ± 30.9



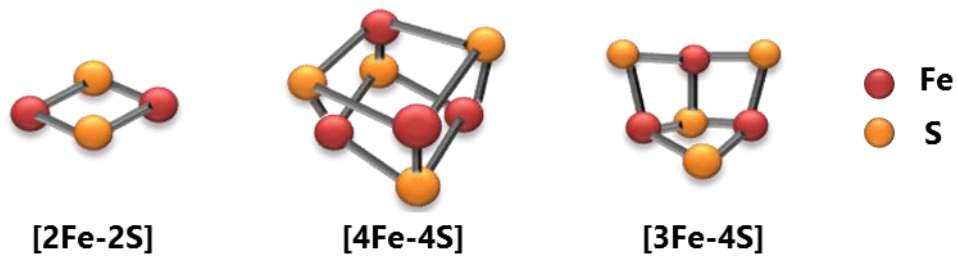
**Table 5. SufB の機能残基に対する部位特異的な変異の影響**

<b>Substitution</b>	<b>Doubling time (min)</b>
R226V	119 ± 4.47
R226I	81.9 ± 3.53
R226L	96.3 ± 4.74
N228C	115 ± 3.38
N228H	84.0 ± 22.1
N228Q	105 ± 6.48
Q285G	53.5 ± 4.05
Q285N	74.0 ± 14.0
Q285R	239 ± 6.67
W287Y	140 ± 22.4
W287M	81.9 ± 9.46
W287F	43.3 ± 6.95
K303E	101 ± 2.53
K303R	49.8 ± 6.95
E434D	53.8 ± 3.09
Wild type SufB	34.0 ± 3.08

**Table 6. SufB のコアドメイン内部のトンネルを構成するアミノ酸残基**

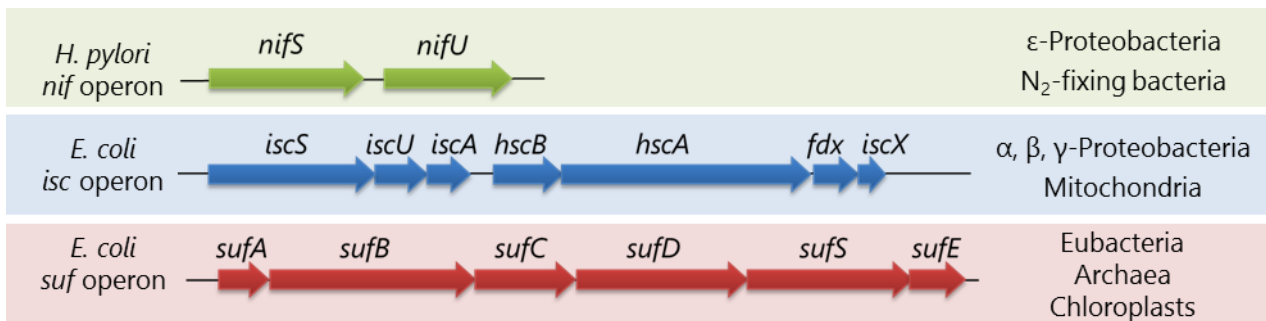
SufB residue	Main/side chain	Conservation (%)	Complementation <sup>a</sup>
E236	Side	99.2	Partial
E252	Side	99.6	Partial
C254	Side	100	No
H265	Side	100	Partial
A267	Side	82.7	Not done
T283	Side	98.3	Partial
Q285	Side	97.5	No
K303	Side	95.4	No
Q318	Side	54.9	Not done
S319	Main	12.2	Not done
E320	Side	55.3	Not done
T326	Side	95.8	Partial
K328	Side	91.6	Partial
S345	Side	91.6	Yes
A347	Side	93.3	Not done
A355	Side	46.0	Not done
T357	Side	67.9	Not done
S374	Side	71.7	Not done
G376	Main/side	53.6	Not done
N384	Side	54.9	Not done
S385	Main	27.0	Not done
Y386	Side	94.5	Yes
C405	Side	100	No
D406	Main	96.6	Yes
S407	Side	58.7	Not done
T418	Side	98.3	Yes

<sup>a</sup>アラニン変異を導入することによる生育への影響を示す



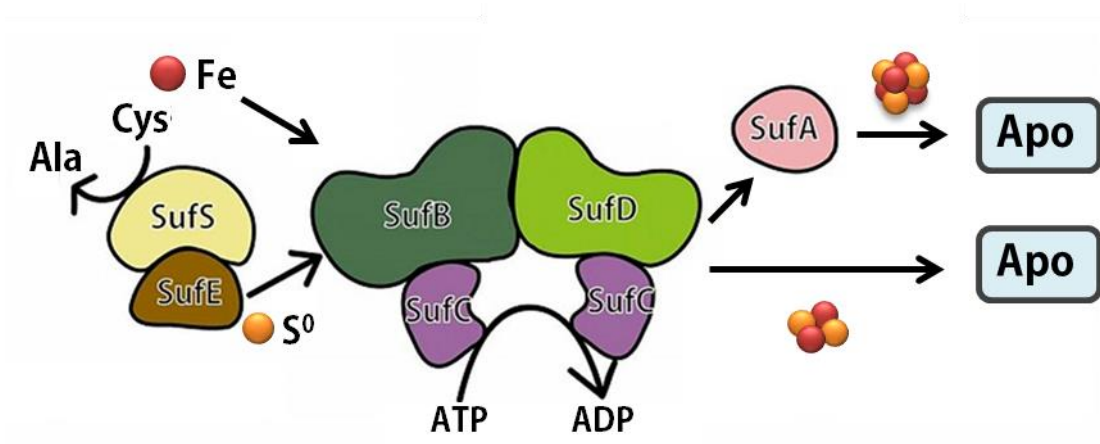
**Figure 1. Fe-S クラスターの構造**

左から[2Fe-2S]、[4Fe-4S]、[3Fe-4S]クラスターの構造を示す。Fe 原子は赤、S 原子は黄色の球棒モデルで示す。Fe-S クラスターは一般的にタンパク質のシステイン残基に配位結合しているが、まれにヒスチジン残基やアスパラギン酸残基などに結合する例もある。



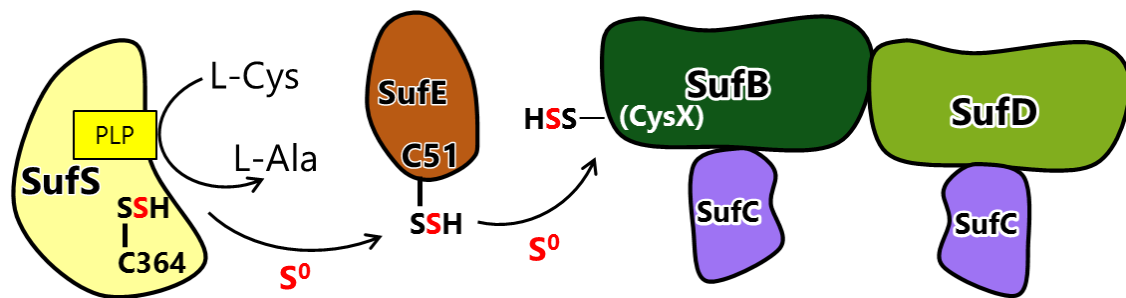
**Figure 2. Fe-S クラスター生合成オペロンの比較**

*Helicobacter pylori* の *nif* オペロン、大腸菌の *isc* オペロンと *suf* オペロンの構造を示す。NIF マシナリーが 2 種類のタンパク質で構成されるのに対し、ISC マシナリーとSUF マシナリーは 6 種類以上のタンパク質で構成される複雑な多成分酵素系となっている。NIF マシナリーは ε-プロテオバクテリアや窒素固定細菌に、ISC マシナリーは α、β、γ-プロテオバクテリアやミトコンドリアに、SUF マシナリーは真性細菌全般から古細菌、真核生物の色素体に分布している。



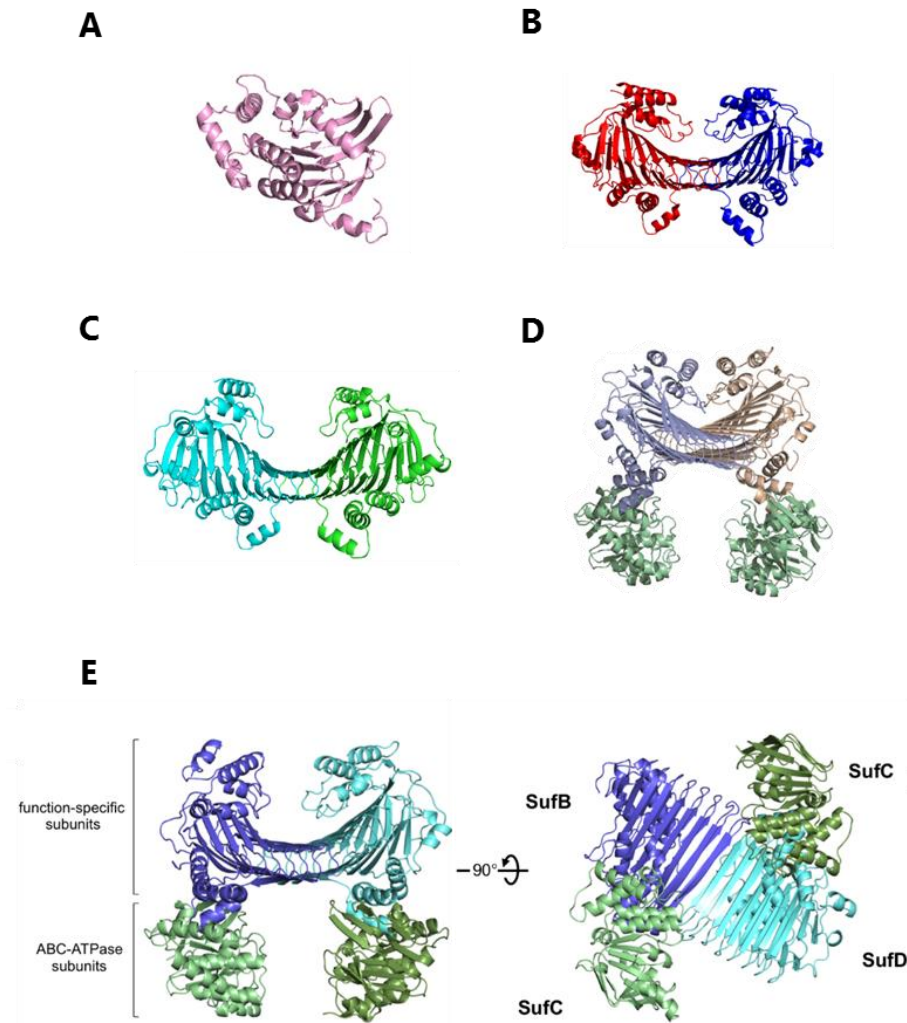
**Figure 3. Suf マシナリーの作動モデル**

Fe-S クラスターの生合成系 Suf マシナリーでは、*sufABCDSE* オペロンにコードされる 6 種類の成分が協調してクラスターを形成している。SufS は基質のシステインから硫黄原子を供給するシステインデサルフラゼ、SufE は硫黄原子のシャトルタンパク質である。SufA は鉄原子または Fe-S クラスターのキャリアではないかと考えられている。SufB、SufC、SufD は三成分の複合体を構成し、その中で SufB は SufE から硫黄原子を受け取り、Fe-S クラスターを新規に形成すると考えられている。SufC は ATPase 活性を持ち、複合体の構造変化を誘起すると予想されているが、その詳細は不明である。



**Figure 4. 硫黄原子の受け渡しのモデル**

システインデサルフラナーゼ SufS では、活性残基である C364 が PLP 依存的に基質 L-cysteine から硫黄原子を引き抜き、それを C364 に結合させて persulfide (–SSH) を形成する。SufS は、C364 が persulfide の状態ではターンオーバーすることができない。この硫黄原子はシャトルタンパク質である SufE の C51 へ、次いで SufBCD 複合体の SufB へと渡される。硫黄転移反応によって C364 が thiol の状態に戻ると SufS はターンオーバーできるようになる。そのため、*in vitro* における見かけのシステインデサルフラナーゼ活性は SufE の共存下で促進し、さらに SufBCD 複合体を加えると促進する。SufB のどの残基が硫黄原子を受け取るのかはわかっていない。



**Figure 5. SufB、SufC、SufD の結晶構造**

(A) 大腸菌 SufC モノマー (PDB code: 2D3W)、(B) 大腸菌 SufD ホモダイマー (PDB code: 1VH4)、(C) *M. mazei* SufB ホモダイマー (PDB code: 4DN7)、(D) 大腸菌 SufC<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 複合体 (PDB code: 2ZU0)、(E) 大腸菌 SufBCD 複合体 (PDB code: 5AWF)。SufB と SufD は N 末端ヘリカルドメイン、C 末端ヘリカルドメインとβ-ヘリックスコアドメインの3種のドメインで構成されている。SufD 二量体、SufB 二量体、SufBCD 複合体の SufB-SufD 会合面ではβ-ヘリックスコアドメインの C 末端側で逆平行β-シートを形成して会合している。SufC<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 複合体と SufBCD 複合体では、SufB と SufD の C 末端ヘリカルドメインのそれぞれに SufC が 1 分子ずつ結合している。この SufC 二分子は ATP の存在下で会合し、複合体全体の構造を大きく変化させるのではないかと予想されている。

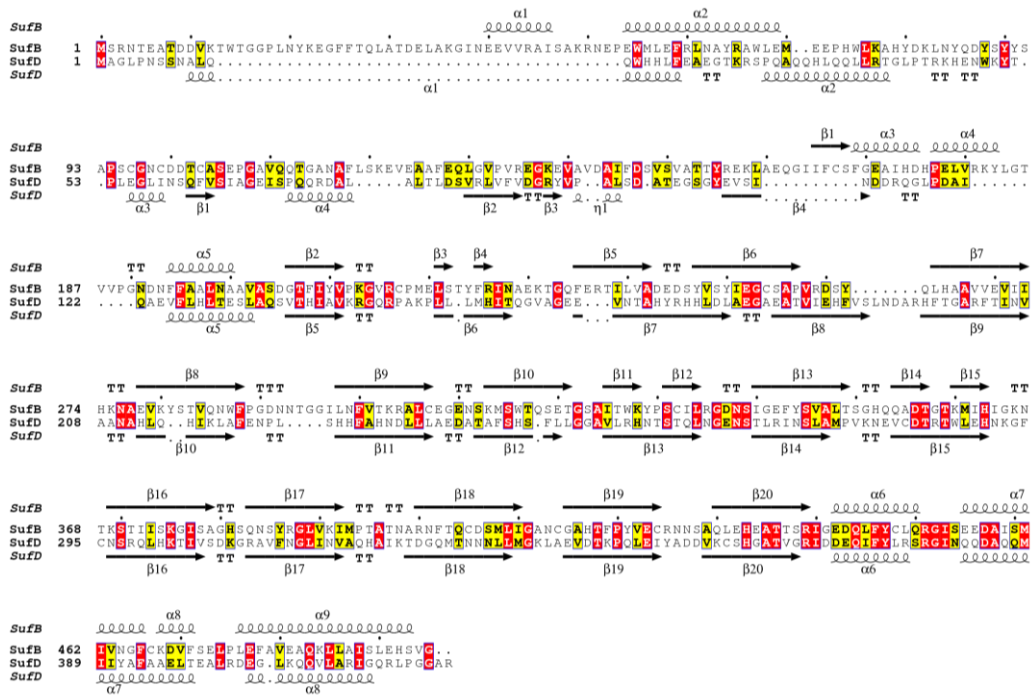
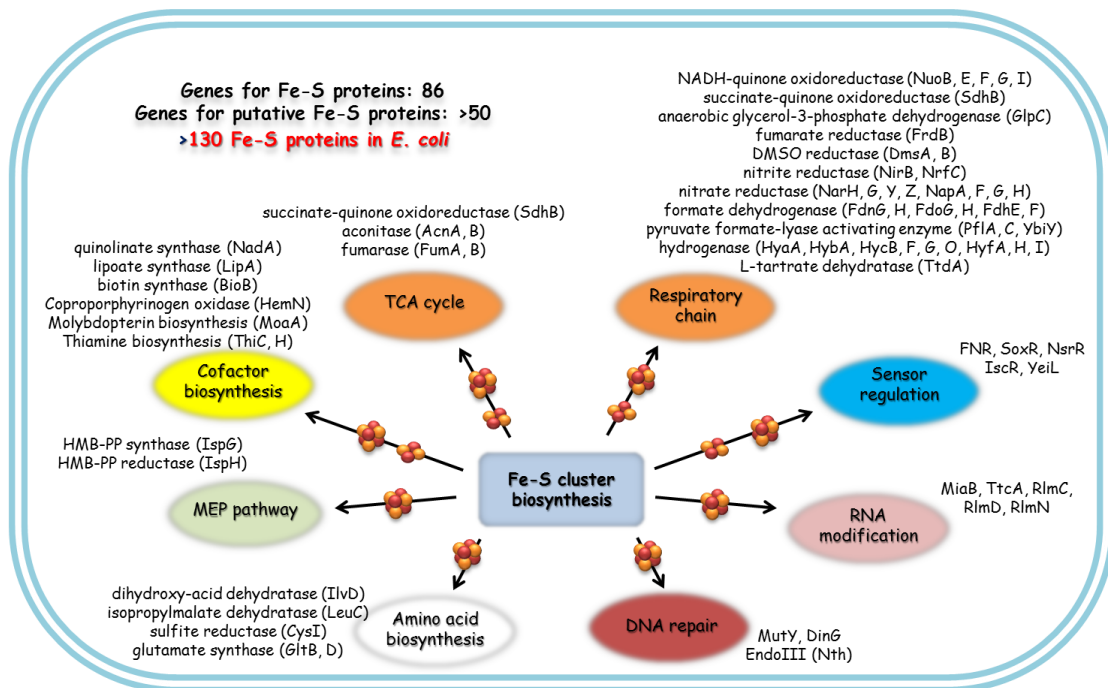


Figure 6. 大腸菌の SufB と SufD 配列の比較

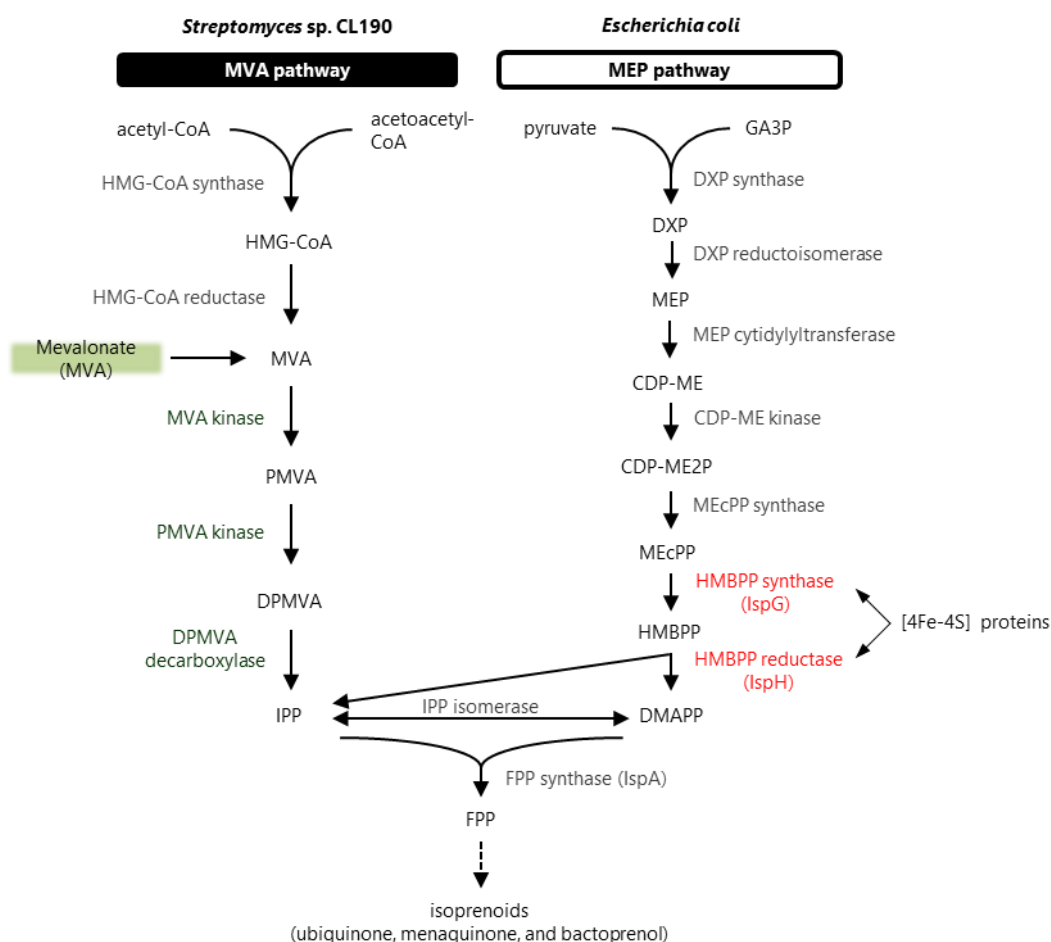
SufB と SufD のアミノ酸配列の比較。Clustal Omega を用いてアミノ酸配列のアライメントを行い、ESPrint を用いて図を作製した<sup>85-88</sup>。保存された残基を赤、類似の残基を黄色で示す。SufB と SufD の二次構造を、それぞれ配列の上と下にらせん ( $\alpha$ -ヘリックス) と矢印 ( $\beta$ -ストランド) で示す。SufB と SufD の一次構造の類似性は低い (17% identity、37% similarity) が、立体構造はよく似ている。





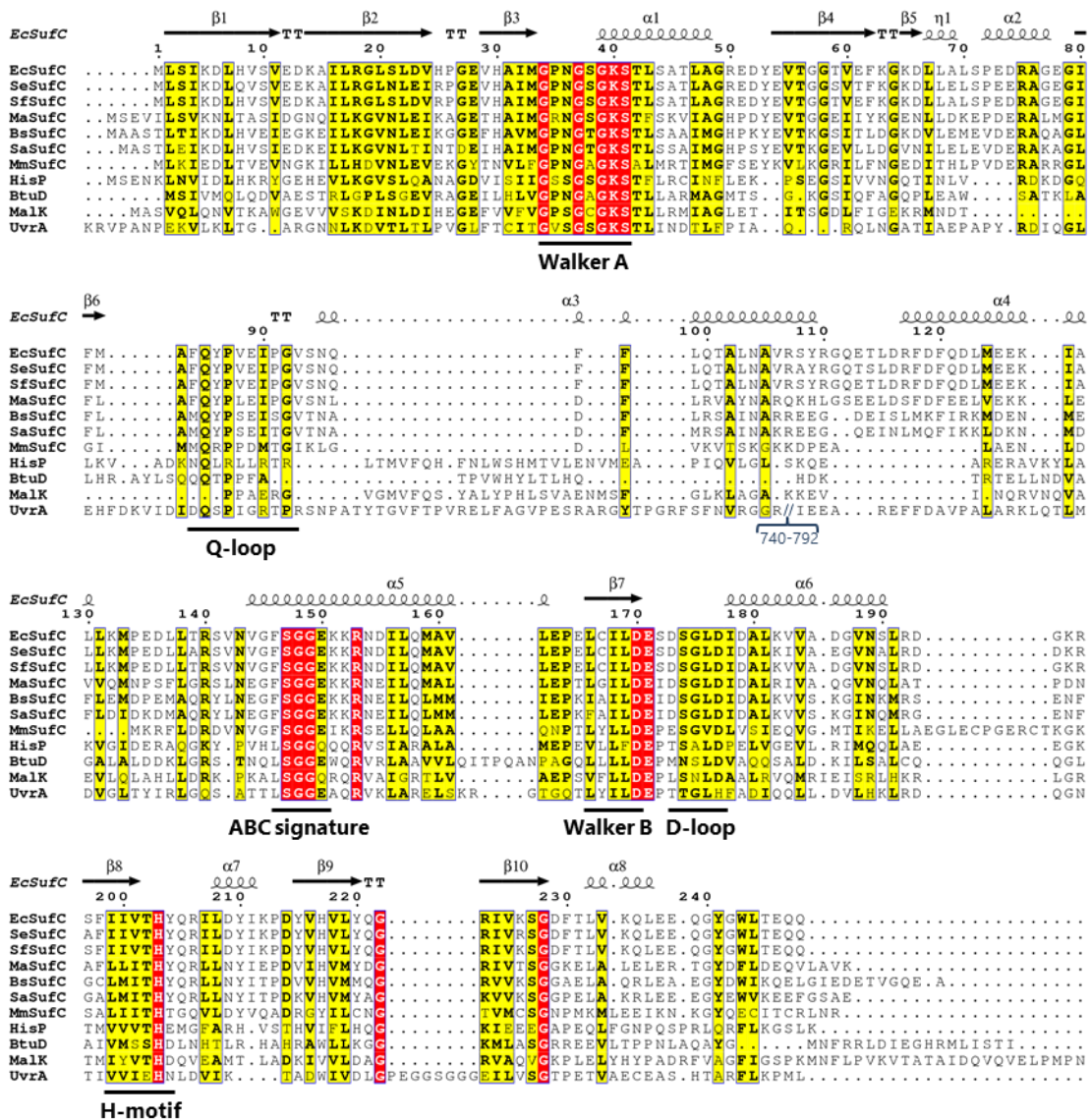
**Figure 7. 大腸菌における Fe-S タンパク質群**

大腸菌では Fe-S タンパク質が 130 種類以上知られており、それらはエネルギー代謝やアミノ酸代謝、遺伝子の発現制御など、多彩な機能を担っている。その中で、大腸菌の生育に必須なのはイソプレノイド生合成を担う MEP 経路の Fe-S タンパク質 (IspG と IspH) のみである。



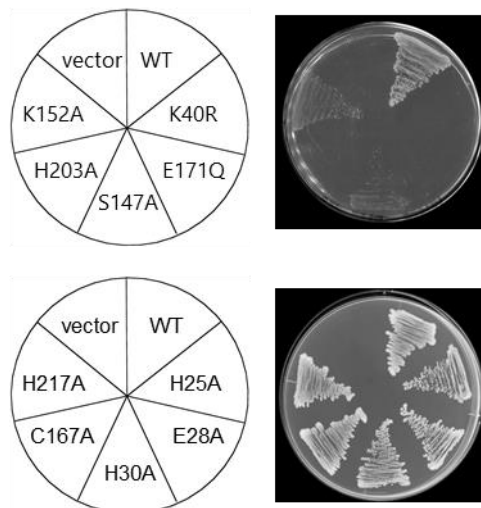
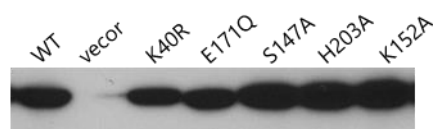
**Figure 8.** イソプレノイド生合成経路の比較

大腸菌の MEP 経路には 2 つの Fe-S 酵素、IspG ((*E*)-1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphatase (HMB-PP) synthase) と IspH (HMB-PP reductase) が関与している (赤字)。一方、多くの真核生物や一部のバクテリアに分布する MVA 経路には Fe-S タンパク質が関与していない。大腸菌の 2 種類の Fe-S クラスター生合成系は欠損すると、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ず致死となる。しかし、MVA 経路の 3 種類の酵素、MVA kinase, PMVA kinase, DPMVA decarboxylase (緑字) を発現させるように改変すると、培地に添加した MVA からイソプレノイドを合成し、Fe-S クラスターを合成できなくても生育できるようになる<sup>32</sup>。(HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; GA3P, glyceraldehyde-3-phosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; CDP-ME, 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol; CDP-ME2P, 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol; MEcPP, 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate; FPP, farnesyl diphosphate)



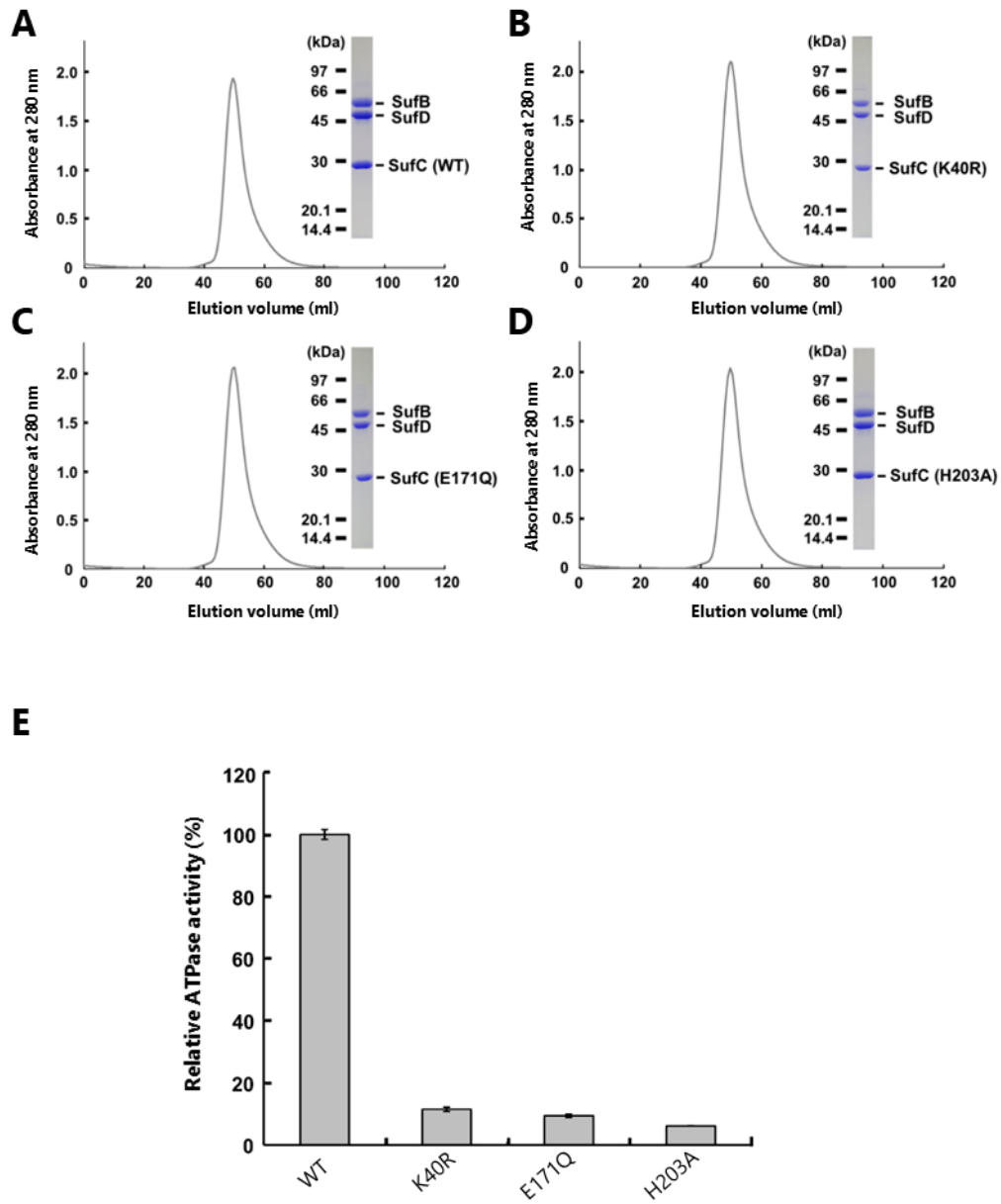
**Figure 9. SufC のアミノ酸配列の比較**

様々な生物種の SufC と、大腸菌の 3 種類の ABC-ATPase (HisP、BtuD、MalK) ならびに SMC タンパク質である UvrA との比較。Clustal Omega を用いてアミノ酸配列のアライメントを行い、ESPrnt を用いて図を作製した<sup>85-88</sup>。保存された残基を赤、類似の残基を黄色で示す。SufC の二次構造を、配列の上にならせん ( $\alpha$ -ヘリックス)、矢印 ( $\beta$ -ストランド) で示す。保存されたモチーフを配列の下に示す。(Ec, *Escherichia coli*; Se, *Salmonella enterica*; Sf, *Shigella flexneri*; Ma, *Microcystis aeruginosa*; Bs, *Bacillus subtilis*; Sa, *Staphylococcus aureus*; Mm, *Methanosarcina mazei*)

**A****B**

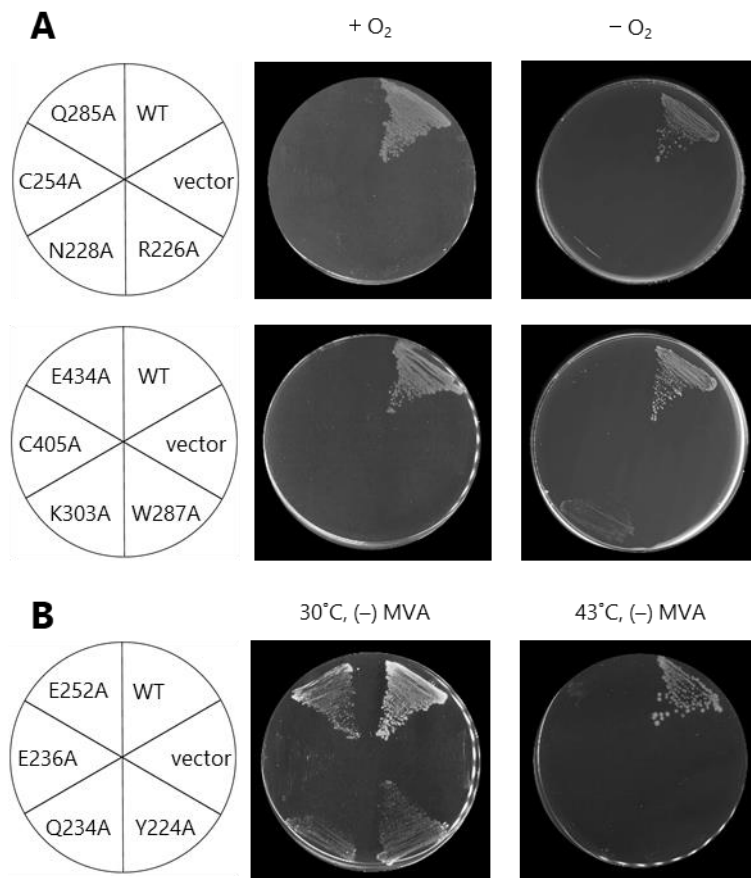
**Figure 10. SufC の *in vivo* 機能に対するアミノ酸置換の影響**

変異 *sufC* を持つプラスミド pBBR-*sufC* を pRK- $\Delta$ *sufCp* と pUMV22 Sp<sup>r</sup> を含む UT109 株に導入し、*in vivo* 機能への影響を調べた。WT は野生型の *sufC*、vector は *sufC* を持たない pBBR 空ベクターを導入している。(A) MVA を含まない LB 寒天培地で 37°C、好気条件で培養した。K40R、E171Q、H203A 変異型 SufC を導入した変異株は MVA が存在しなければ全く生育できなかつたが、S147A、K152A 変異型の場合は非常にゆっくりと生育した。(B) 変異型 SufC を導入した株において、SufC の発現量を調べた。これらは、MVA を含む SB 培地で培養し、その破砕液上清を SDS-PAGE で分離した後、抗 SufC 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。



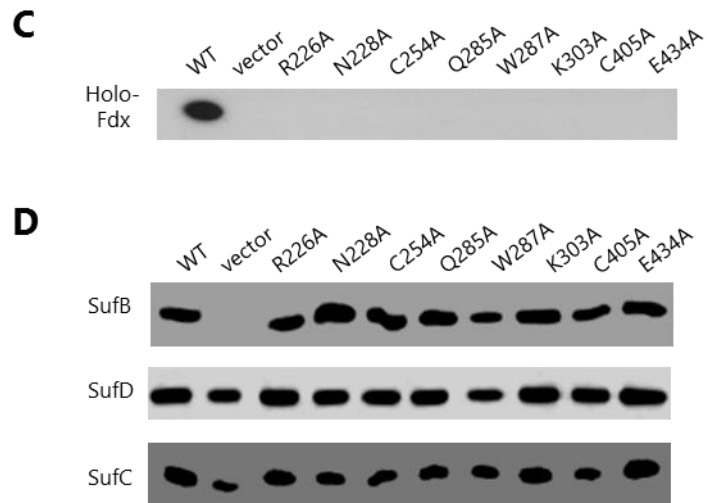
**Figure 11. 変異型 SufBCD 複合体の精製と ATPase 活性の測定**

精製した野生型 (A)、SufC<sup>K40R</sup> (B)、SufC<sup>E171Q</sup> (C)、SufC<sup>H203A</sup> (D) 変異型 SufC を含む SufBCD 複合体について、ゲル濾過のクロマトグラムと、SDS-PAGE を示す。(E) A-D のサンプルを用いて、SufBCD 複合体の *in vitro* ATPase 活性を測定した。



**Figure 12. SufB の *in vivo* 機能に対するアミノ酸置換の影響**

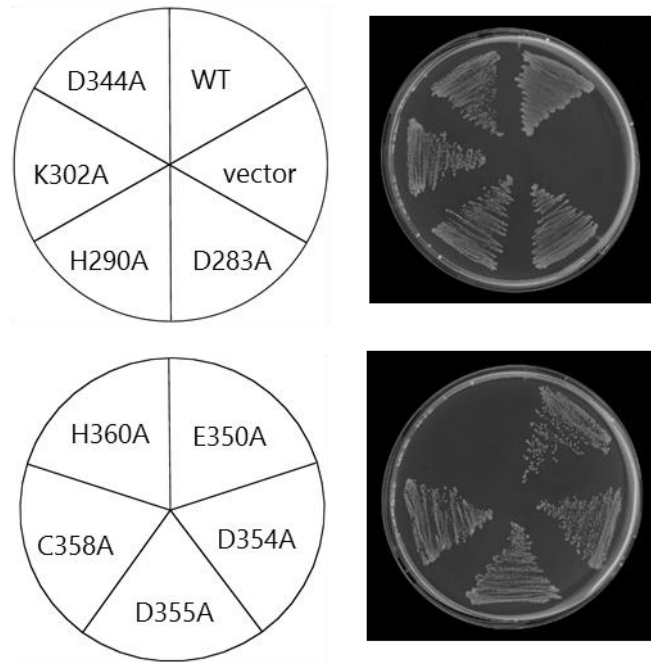
変異 *sufB* を持つプラスミド pBBR-*sufAB* を pRK-*sufCDSE* と pUMV22 Sp<sup>r</sup> を含む UT109 株に導入し、*in vivo* 機能への影響を調べた。WT は野生型の *sufB*、vector は *sufB* を持たない pBBR 空ベクターを導入している。(A) MVA を含まない LB 寒天培地で 37°C、24 h、好気または嫌気条件で培養した。SufB<sup>R226A</sup>、SufB<sup>N228A</sup>、SufB<sup>C254A</sup>、SufB<sup>Q285A</sup>、SufB<sup>W287A</sup>、SufB<sup>K303A</sup>、SufB<sup>C405A</sup>、SufB<sup>E434A</sup> を導入した場合には、MVA が存在しなければ全く生育できなかった。嫌気条件では SufB<sup>K303A</sup> 変異を導入した株は MVA がなくてもわずかに生育した。(B) MVA を含まない LB 寒天培地で 30°C または 43°C、48 h、好気条件で培養した。ここに示す変異型 SufB<sup>Y224A</sup>、SufB<sup>Q234A</sup>、SufB<sup>E236A</sup>、SufB<sup>E252A</sup> を導入した株はいずれも温度感受性の生育を示した。



**Figure 12. (続き)**

8種の変異型 SufB を導入した株において、ホロ型 Fdx ならびに SufB、SufC および SufD の発現量を調べた。これらの変異型遺伝子を導入した細胞は、MVA を含む SB 培地で培養し、(C) その破砕液上清を native PAGE で分離した後、抗 Fdx 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。(D) 破砕液上清を SDS-PAGE で分離した後、抗 SufB、抗 SufC、抗 SufD 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

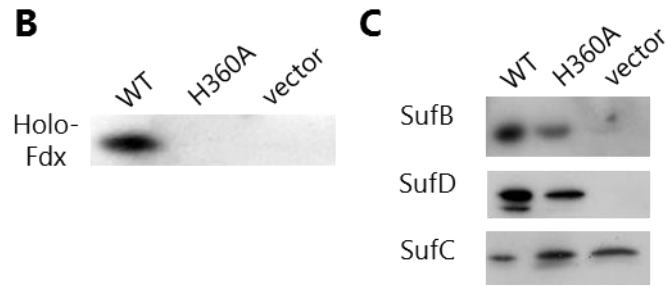
**A**



**Figure 13. SufD の *in vivo* 機能に対するアミノ酸置換の影響**

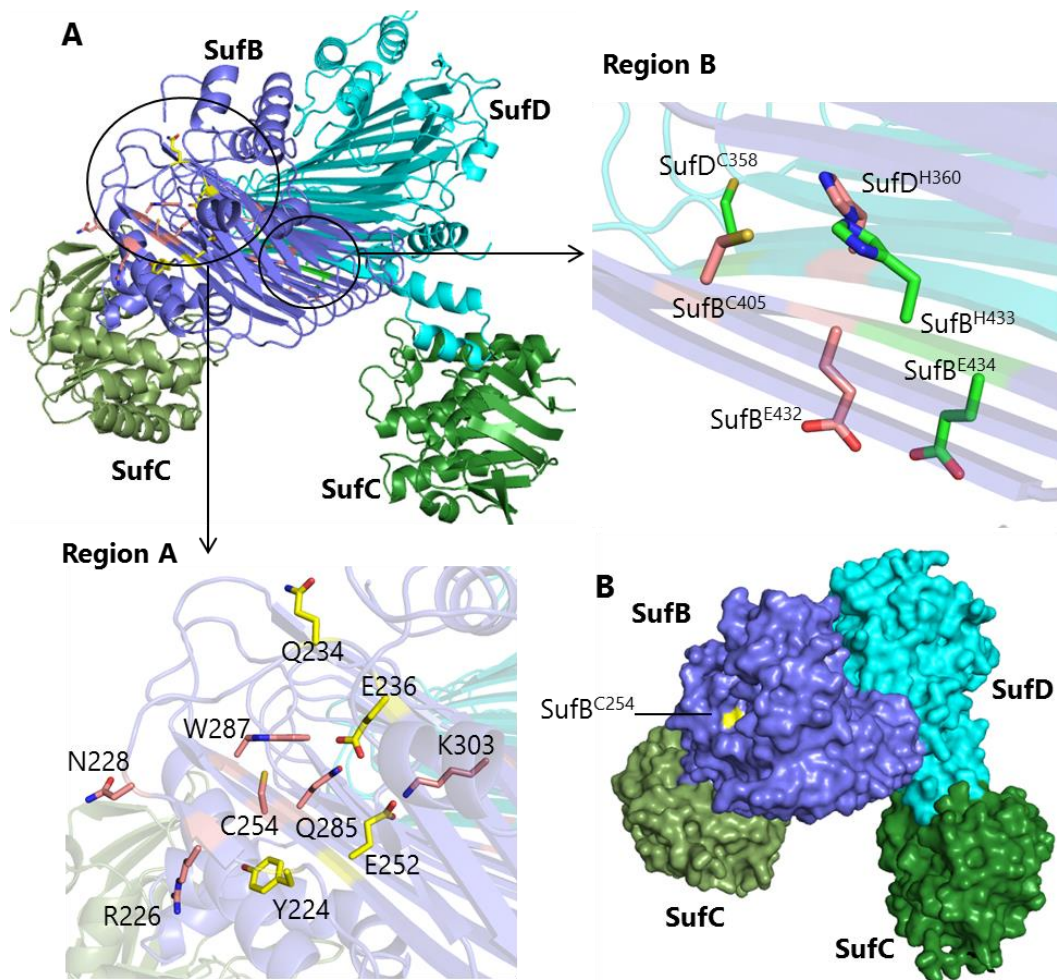
変異 *sufD* を持つプラスミド pBBR-*sufD* を pRK-*sufABC-SE* と pUMV22 Sp<sup>r</sup> を含む UT109 株に導入し、*in vivo* 機能への影響を調べた。WT は野生型の *sufD*、vector は *sufD* を持たない pBBR 空ベクターを導入している。(A) MVA を含まない LB 寒天培地で 37°C で培養した。変異型 SufD<sup>H360A</sup> を導入した変異株は MVA のない培地では生育できなかった。





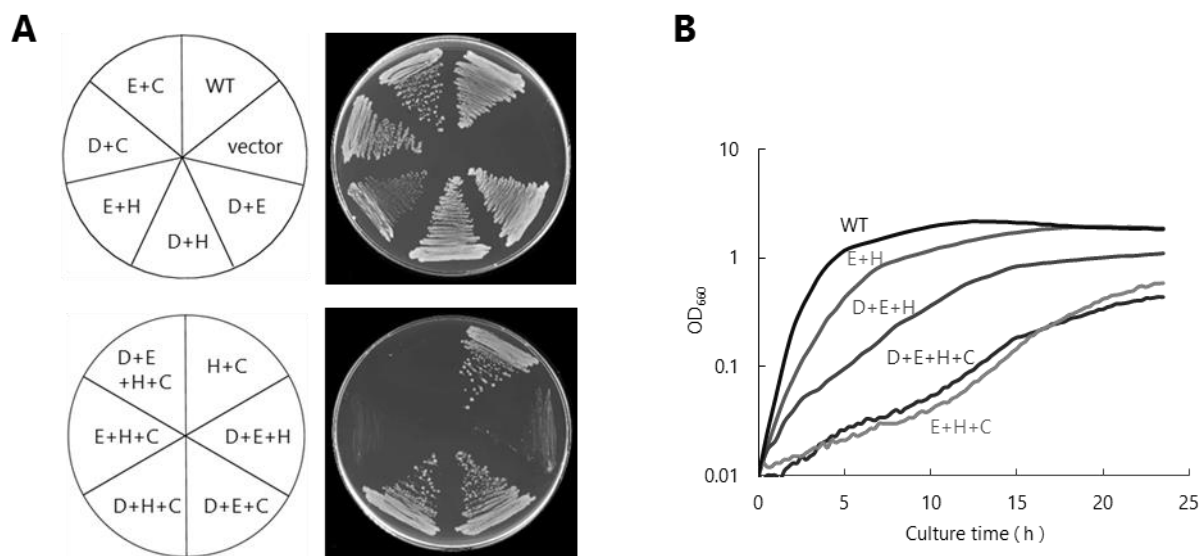
**Figure 13. (続き)**

変異型 SufD<sup>H360A</sup>を導入した株において、ホロ型 Fdx ならびに SufB、SufC および SufD の発現量を調べた。MVA を含む SB 培地で培養し、(B) その破砕液上清を native PAGE で分離した後、抗 Fdx 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。(C) 破砕液上清を SDS-PAGE で分離した後、抗 SufB、抗 SufC、抗 SufD 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。



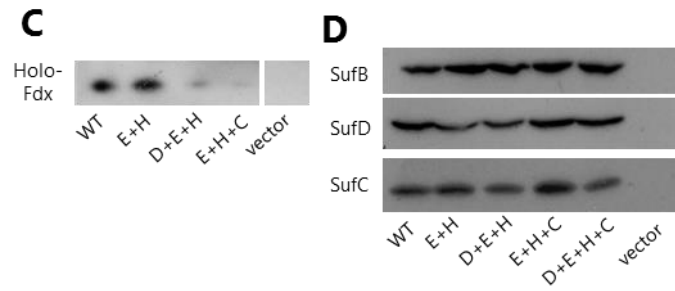
**Figure 14. SufBCD 複合体の結晶構造における機能残基の配置**

(A) SufB と SufD の機能残基は 2 つの領域に分けられる。本研究で明らかにした機能残基をピンク、温度感受性残基を黄、多重変異で機能に影響のある残基を緑のスティックモデルで SufBCD 複合体の結晶構造 (PDB code: 5AWF) に示す。それらの残基は SufB の  $\beta$ -ヘリックスコアドメインの N 末端側と SufB-SufD 会合面に集中しており、それぞれ Region A と Region B と表す。(B) SufBCD 複合体の表面構造。SufB<sup>C254</sup> の側鎖を黄色で示す。



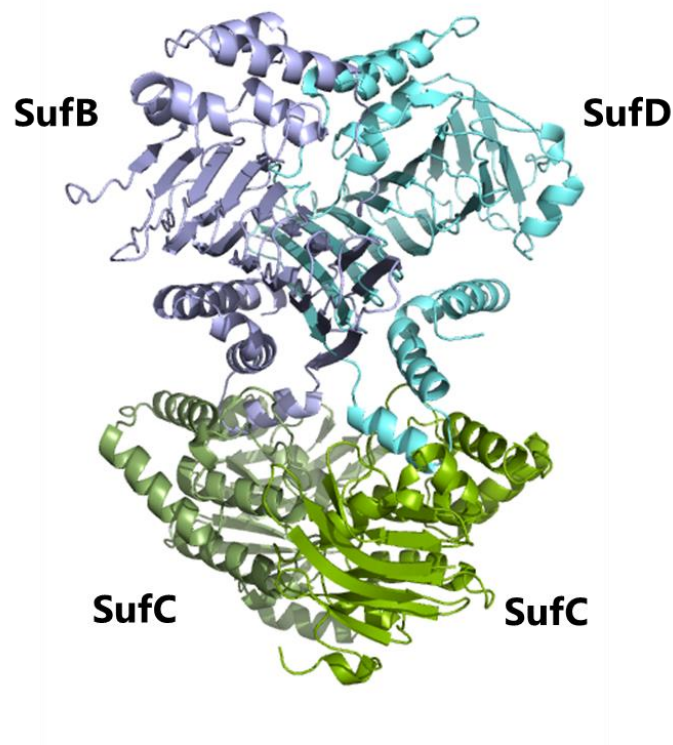
**Figure 15. SufB-SufD 会合面におけるアミノ酸の多重置換の影響**

変異 *sufAB* を持つプラスミド pBBR-*sufAB* と変異 *sufD* を持つ pRK-*sufCDSE* を pUMV22 Sp<sup>r</sup> を含む UT109 株に導入し、*in vivo* 機能への影響を調べた。WT は野生型の *sufB* と *sufD*、vector は pBBR 空ベクターと pRK 空ベクターを導入している。D、E、H、C はそれぞれ SufB<sup>D406A</sup>、SufB<sup>E432A</sup>、SufB<sup>H433A</sup>、SufD<sup>C358S</sup> を表す。(A) LB 寒天培地での生育。変異を導入した株を、MVA を含まない LB 寒天培地で 37°C で 24 h 培養した。(B) 液体培地での生育。MVA を含まない LB 液体培地で 37°C で培養した。



**Figure 15. (続き)**

SufB と SufD に多重変異を導入した株において、ホロ型 Fdx ならびに SufB、SufC および SufD の発現量を調べた。TB 培地で培養し、(B) その破砕液上清を native PAGE で分離した後、抗 Fdx 抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った。(C) 破砕液上清を SDS-PAGE で分離した後、抗 SufB、抗 SufC、抗 SufD 抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った。



**Figure 16.** SufC の 2 分子を人為的に会合させたモデル

SufBCD 複合体の構造 (PDB code: 5AWF) を人為的に SufBC と SufCD に解離させ、PDBeFold<sup>89</sup> を用いて、2 分子の SufC を ABC-ATPase のひとつ HlyB のダイマー型の構造 (PDB code: 1XEF) に重ね合わせて、モデルを構築した。SufB と SufD に構造変化が起きなければ、双方の $\beta$ -ヘリックスコアドメインの大部分が重なって、クラッシュすることを示している。

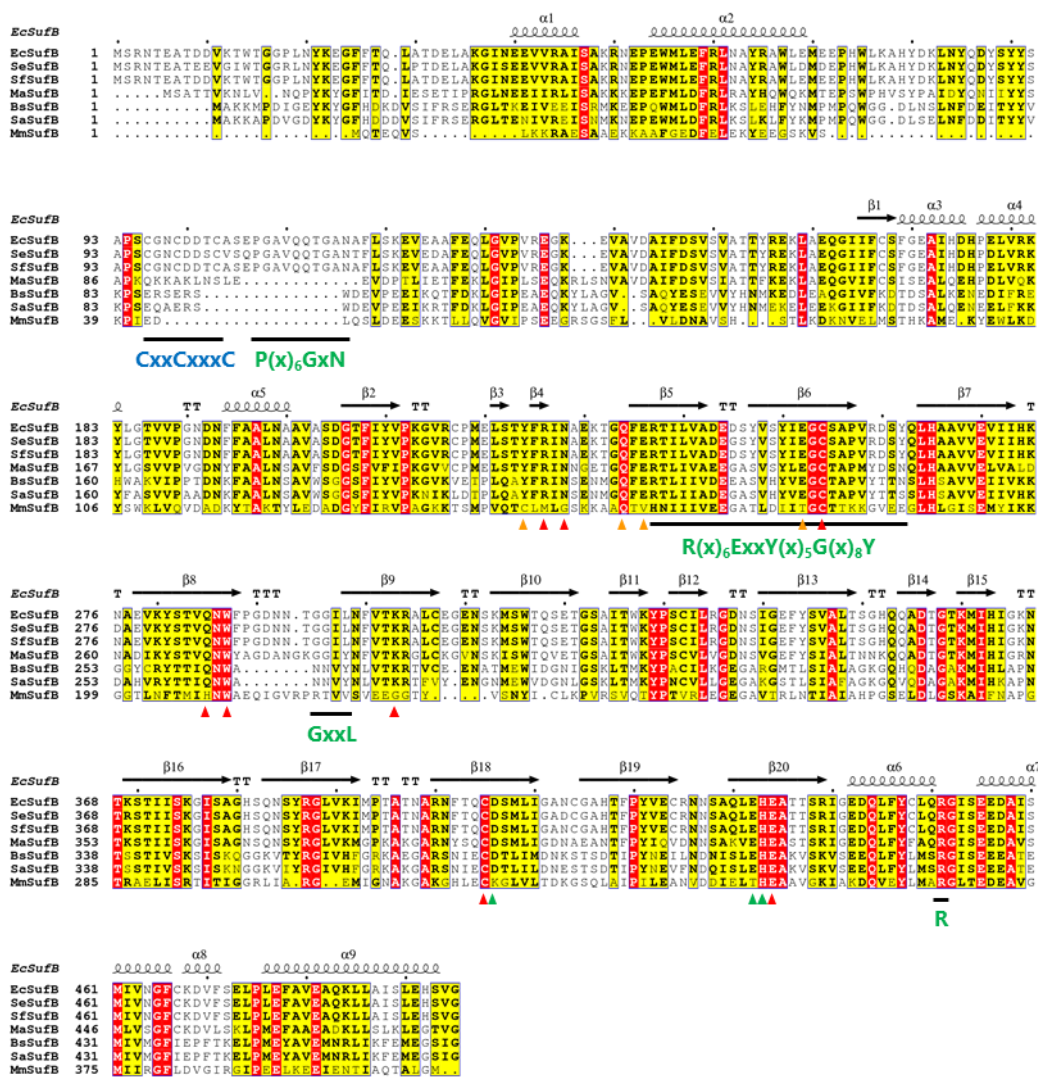


Figure 17. SufB の一次構造の比較

Clustal Omega を用いてアミノ酸配列のアライメントを行い、ESPrpt を用いて図を作製した<sup>85-88</sup>。保存された残基を赤、類似の残基を黄色で示す。SufB と SufD の二次構造は、配列の上にならせん ( $\alpha$ -ヘリックス)、矢印 ( $\beta$ -ストランド) で示す。Fe-S クラスター結合モチーフを青で、FAD 結合モチーフを緑で配列の下に示す。機能残基を赤、温度感受性残基を橙、多重変異で機能に影響のある残基を緑の三角で示す。

(Ec, *Escherichia coli*; Se, *Salmonella enterica*; Sf, *Shigella flexneri*; Ma, *Microcystis aeruginosa*; Bs, *Bacillus subtilis*; Sa, *Staphylococcus aureus*; Mm, *Methanosarcina mazei*.)

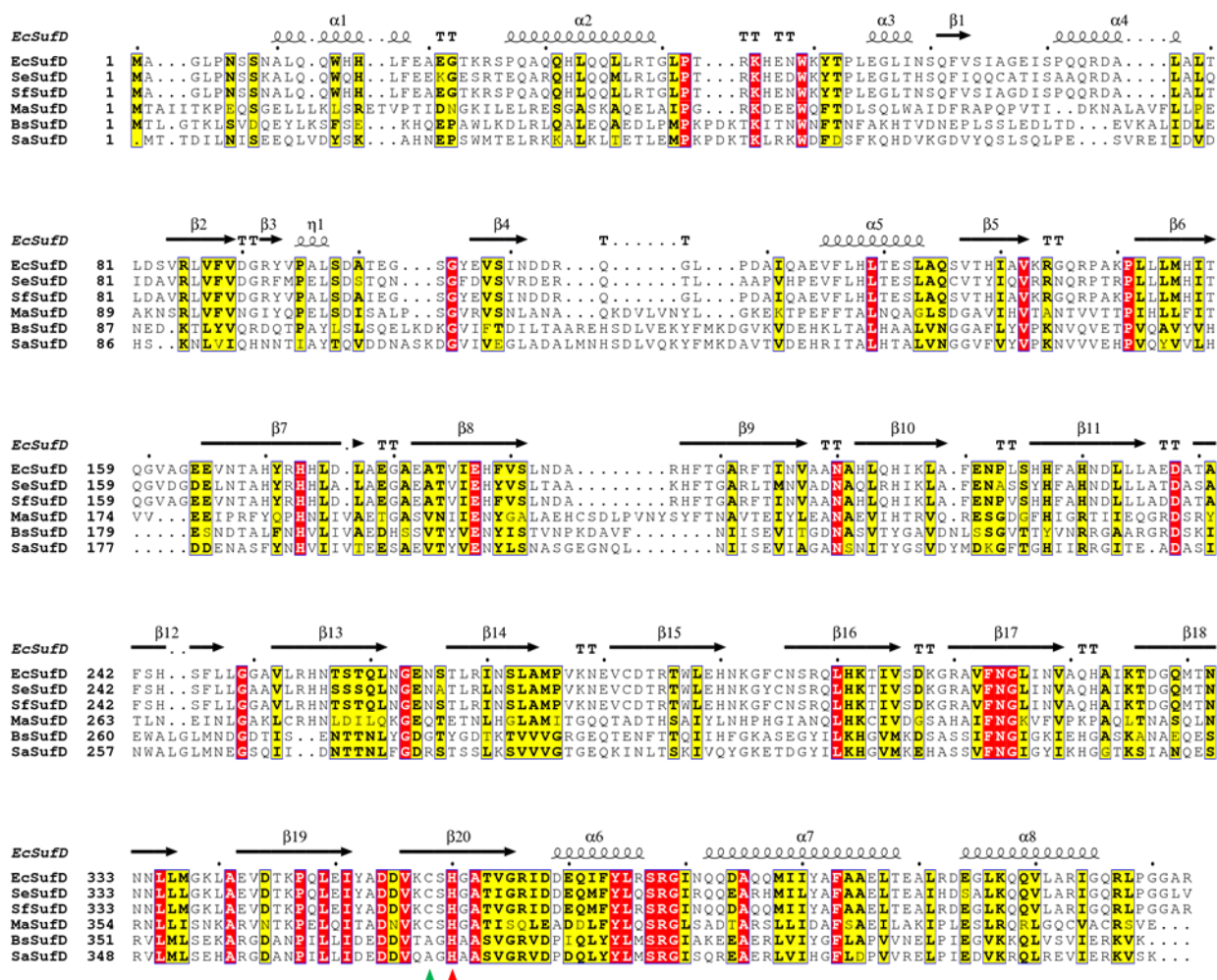
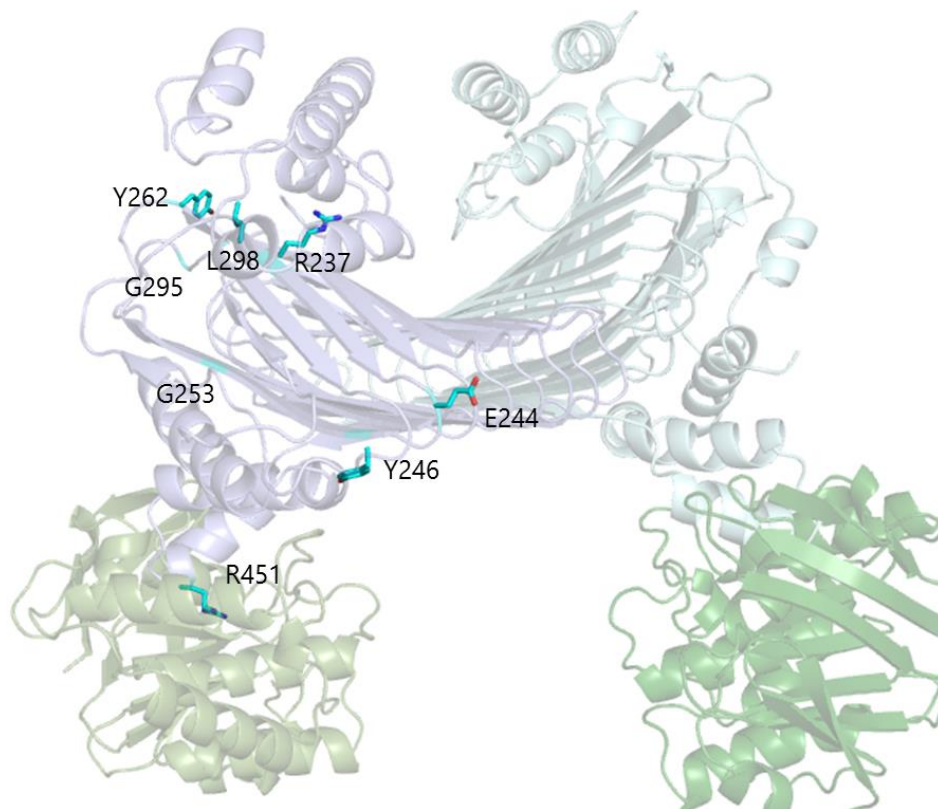


Figure 18. SufD の一次構造の比較

Clustal Omega を用いてアミノ酸配列のアライメントを行い、ESPrint を用いて図を作製した<sup>85-88</sup>。保存された残基を赤、類似の残基を黄色で示す。SufD の二次構造は、配列の上にならせん ( $\alpha$ -ヘリックス)、矢印 ( $\beta$ -ストランド) で示す。機能残基を赤、多重変異で機能に影響のある残基を緑の三角で示す。

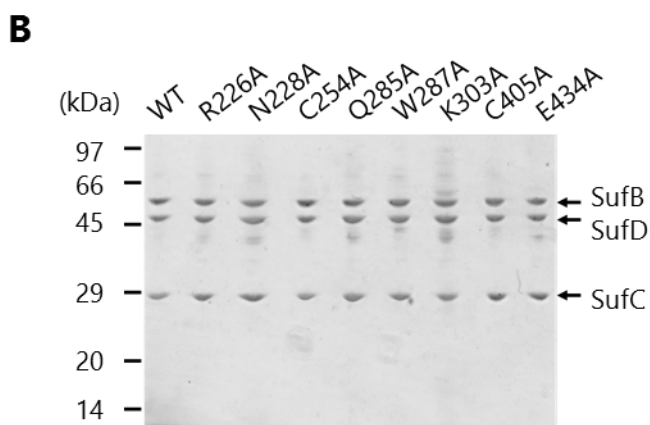
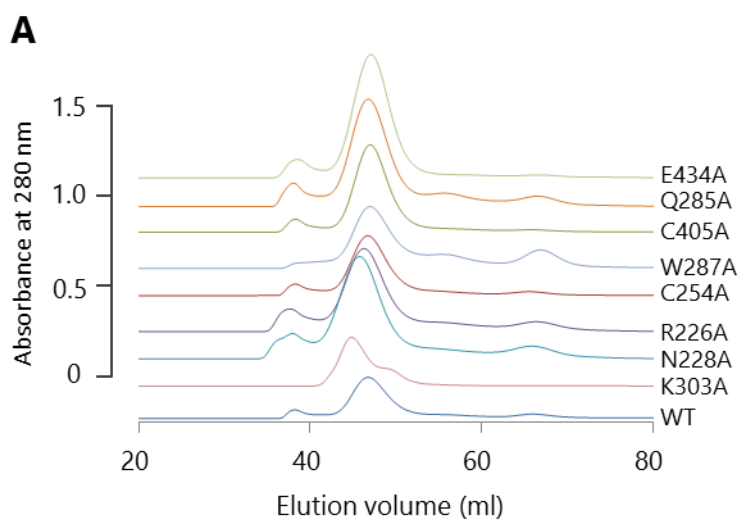
(Ec, *Escherichia coli*; Se, *Salmonella enterica*; Sf, *Shigella flexneri*; Ma, *Microcystis aeruginosa*; Bs, *Bacillus subtilis*; Sa, *Staphylococcus aureus*)



**Figure 19. SufBCD 複合体の結晶構造における FAD 結合モチーフの配置**

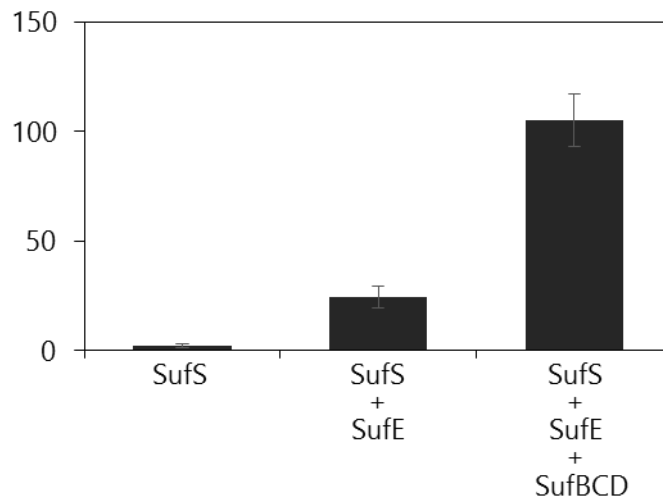
SufB の一次構造上では *p*-cresol methylhydroxylase family で保存されている FAD 結合モチーフが指摘されている。GxxL モチーフの G295 と L298、R(x)<sub>6</sub>ExxY(x)<sub>5</sub>G(x)<sub>8</sub>Y モチーフの R237、E244、Y246、G253 と Y262 および C 末端の R451 の配置を水色のスティックで示す。いくつかの残基は立体構造上大きく離れており、これらが協調して FAD を結合するとは考えにくい。





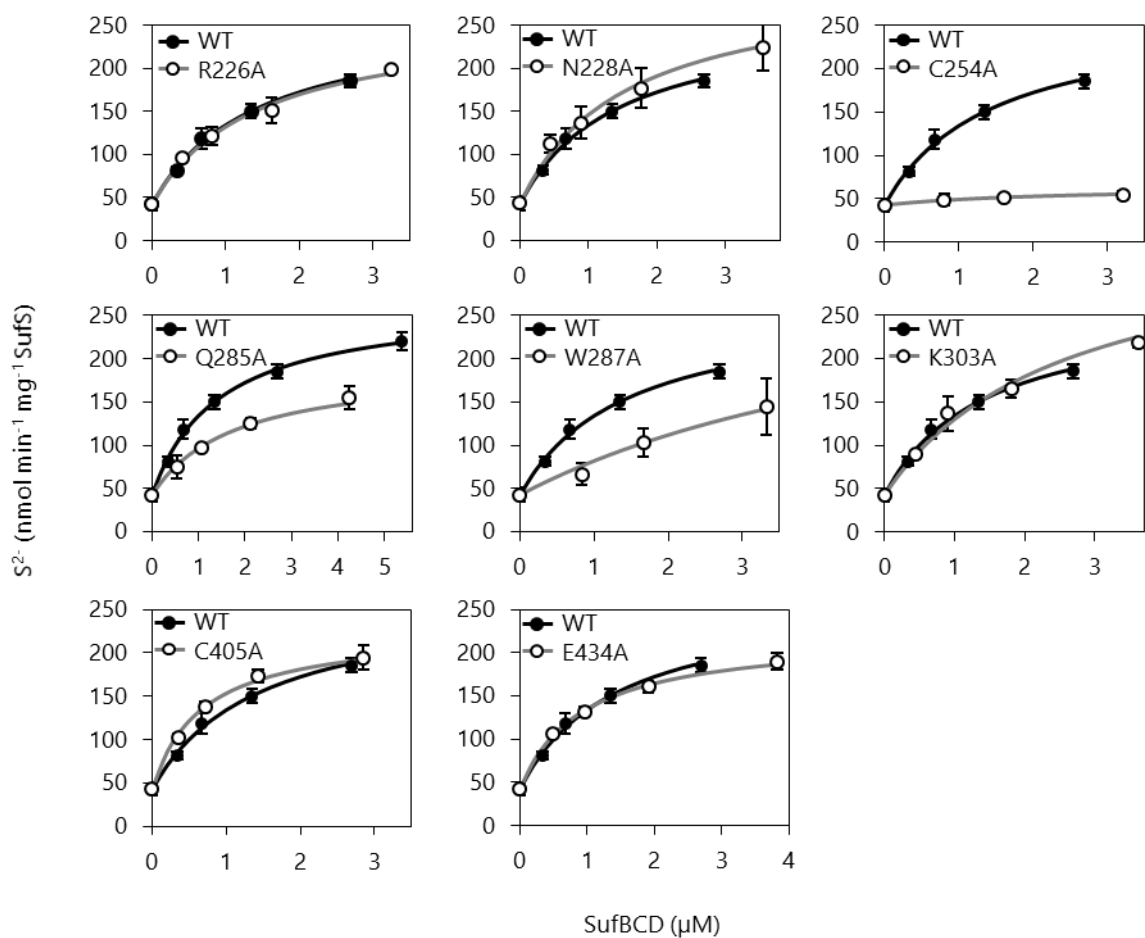
**Figure 20. 変異型 SufB を含む SufBCD 複合体の精製**

(A) 変異型 SufBCD 複合体のゲル濾過クロマトグラムの比較。(B) 精製標品 (それぞれ 3  $\mu$ g) の SDS-PAGE (12.5%ゲル)。



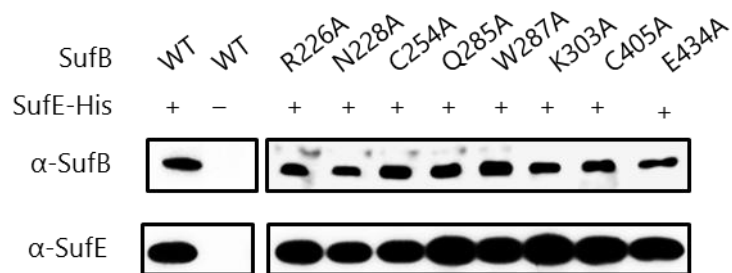
**Figure 21. SufS の見かけのシステインデサルフラゼ活性に対する SufE と SufBCD 複合体の影響**

反応は 0.5  $\mu$ M SufS、2.0  $\mu$ M SufE、2.0  $\mu$ M SufBCD、2 mM L-cysteine、2 mM DTT、25 mM Tris-HCl、150 mM NaCl の組成で、30°C、10 分間行った。SufS のシステインデサルフラゼ活性は、SufE を加えることで 11 倍に、さらに SufBCD 複合体を加えることで 4.3 倍に促進した。値は少なくとも 3 回の反応の平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。



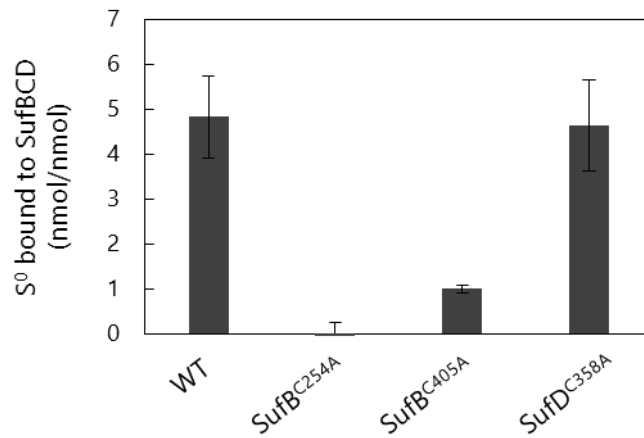
**Figure 22.** SufSE の見かけのシステインデサルフラゼ活性に対する変異型 SufBCD 複合体の影響

反応は Fig. 21 と同じ条件で、SufBCD 複合体の濃度を変えて行った。各 SufBCD 複合体の濃度において、少なくとも 3 回の測定を行い、その平均値と標準偏差を示す。



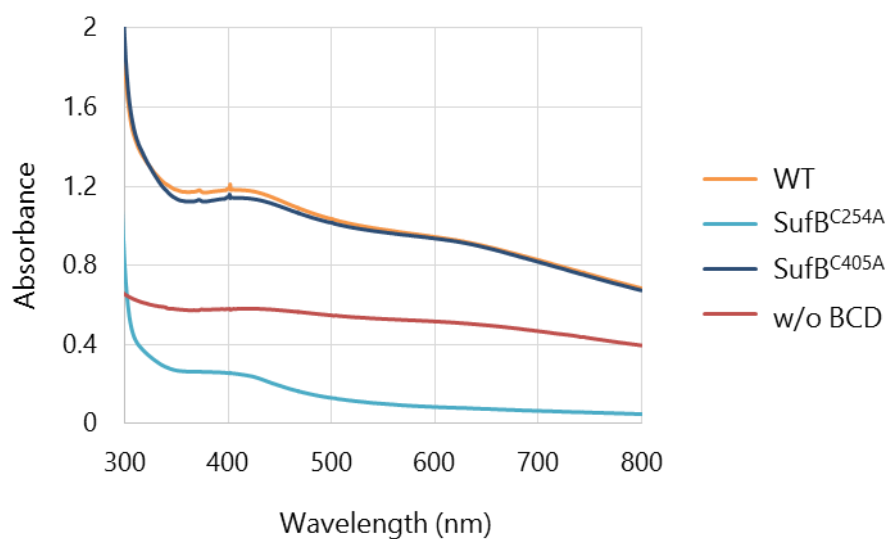
**Figure 23. Pull-down** 法による SufB-SufE 間の相互作用解析

大腸菌の YT2512 変異株 ( $\Delta$ *sufABCDSE*) に、*sufB* に部位特異的変異を入れた pBBR-*sufAB* プラスミドと SufE に His タグを付加した pRK-*sufCDSE*-His プラスミドを導入した。LB 液体培地で培養し、その細胞破砕液を Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。精製標品を SDS-PAGE で分離して、抗 SufB 抗体または抗 SufE 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。タンパク質量は菌体量 (OD<sub>600</sub> の値) でノーマライズした。



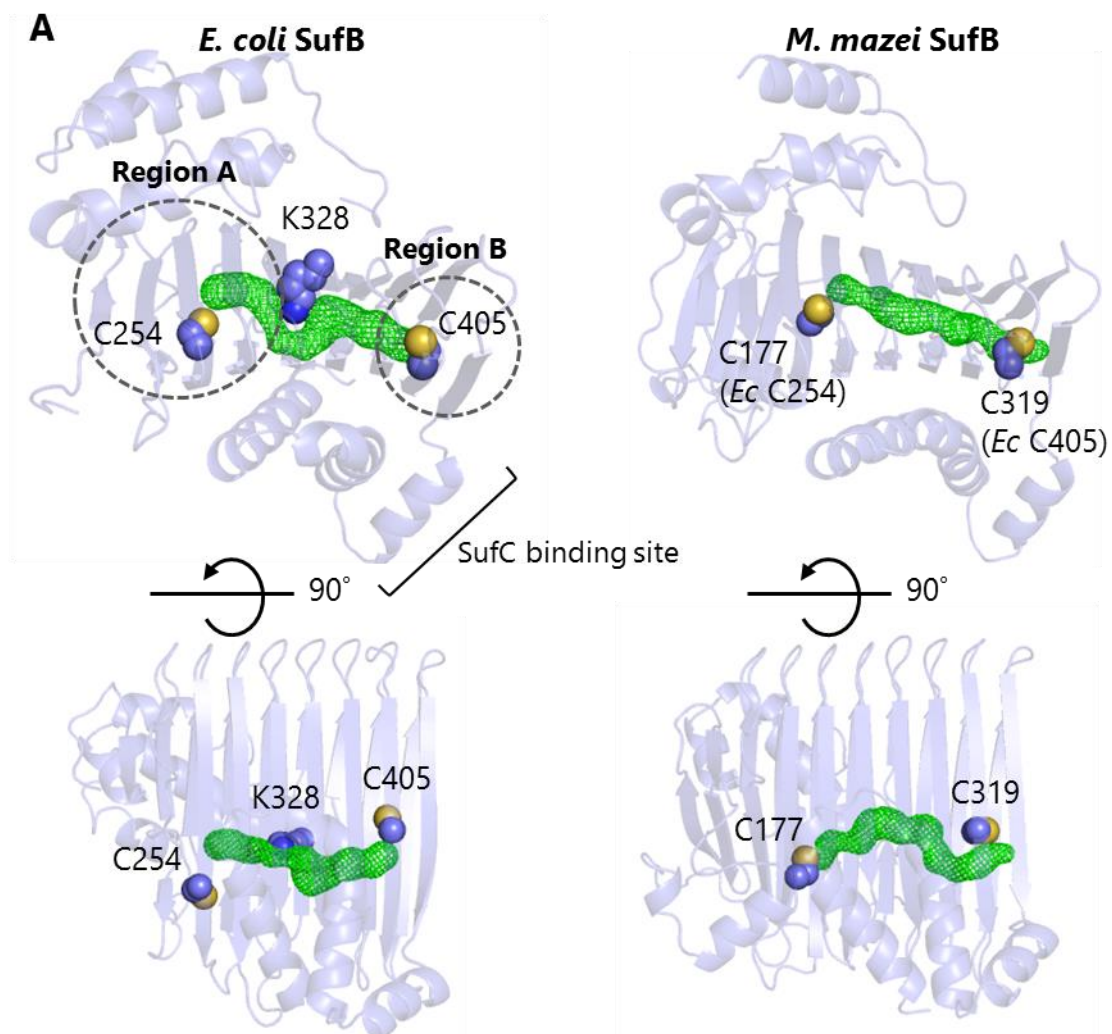
**Figure 24. 変異型 SufBCD 複合体に結合した S の総量**

SufBCD 複合体に persulfide (-SSH) を形成させるよう、DTT の非存在下で、50 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl、2 mM L-cysteine、0.5  $\mu$ M SufS、0.5  $\mu$ M SufE、10  $\mu$ M SufBCD 複合体の組成で 30°C で 3 時間インキュベートした。反応後 SufBCD 複合体を、100 kDa cut off のフィルターを用いた限外濾過によって分離した。2 mM DTT で還元し、*N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine と FeCl<sub>3</sub> を加えてメチレンブルーを形成させた。遠心して沈殿物を取り除いたのち、670 nm の吸光度からメチレンブルー濃度を測定した。実験は少なくとも 3 回行い、平均値と標準偏差を示す。



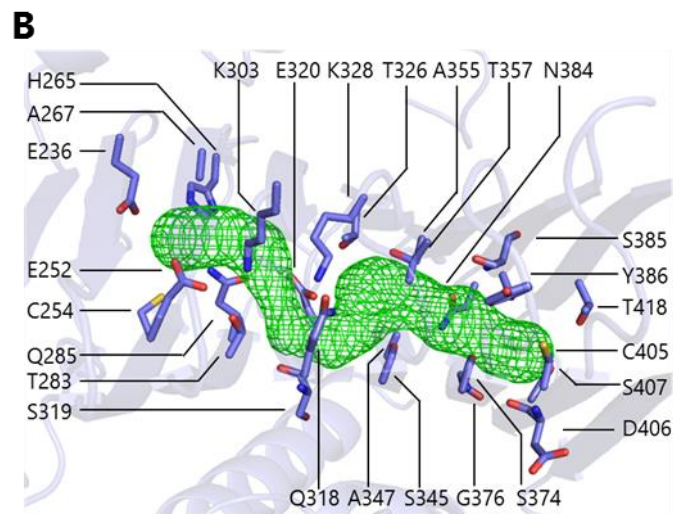
**Figure 25. *in vitro* における Fe-S クラスターの再構成**

50 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl、5 mM DTT、250  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>、750  $\mu$ M L-cysteine、0.6  $\mu$ M SufS、0.6  $\mu$ M SufE、50  $\mu$ M SufBCD 複合体の組成で、室温、嫌気条件で 4 時間反応させ、Fe-S クラスターを再構成させた。反応液は gas-tight なキュベットに移し、吸収スペクトルを測定した。w/o BCD (赤線) は SufBCD 複合体を含まない反応液のスペクトルを示す。



**Figure 26. SufB の  $\beta$ -ヘリックス内部を通るトンネル**

(A) 大腸菌 (左) と *Methanosarcina mazei* (右) の SufB におけるトンネルの比較。トンネルの計算には PyMOL プラグインの Caver ver3.01 を用いた<sup>80-82</sup>。パラメータは Minimal probe radius = 1.04 Å, Shell depth = 5 Å, Shell radius = 3 Å とした。重要なアミノ酸残基の側鎖を球状モデルで、トンネルを緑のメッシュで示す。



**Figure 26. (続き)**

(B) 大腸菌 SufB のトンネルのクローズアップ。(A) の左上の図と同じ角度で示す。トンネルを囲むアミノ酸残基をスティックモデルで示す。



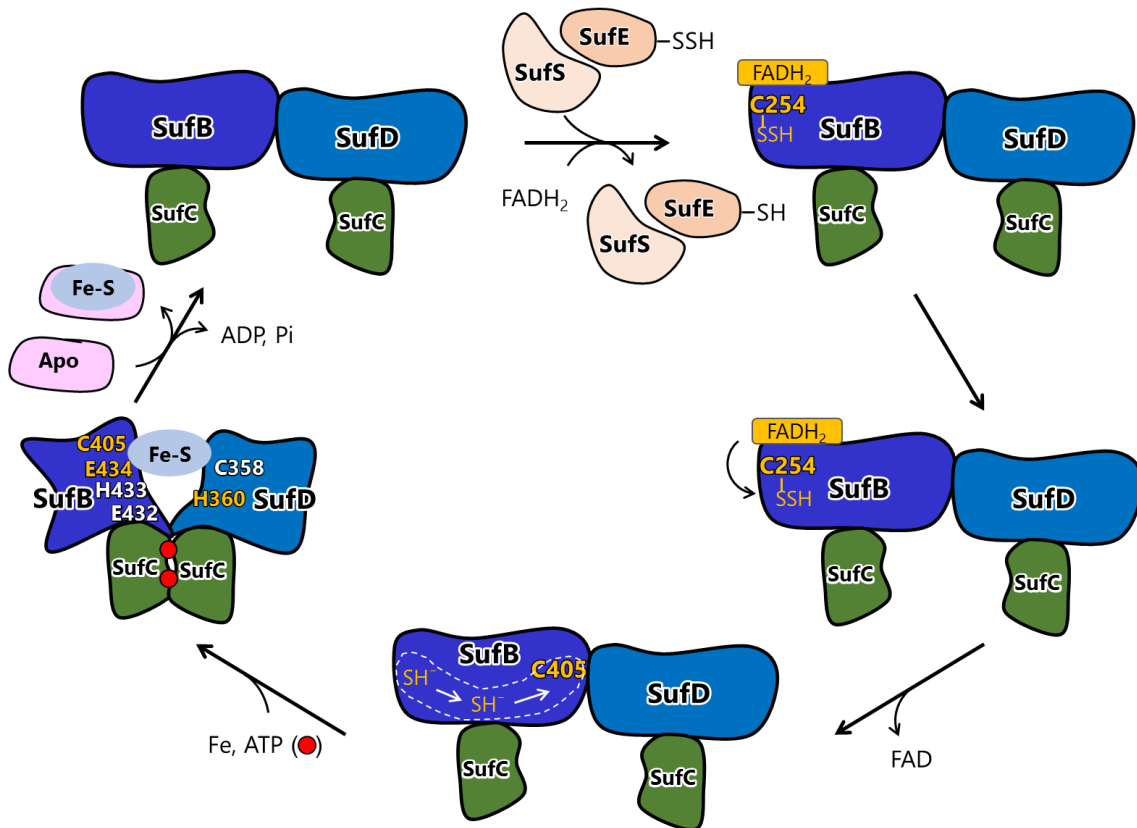


Figure 27. Fe-S クラスター形成における SufBCD 複合体の作動モデル

SufS は基質 L-cysteine から硫黄原子 ( $S^0$ ) を引き抜き、この  $S^0$  は persulfide (-SSH) の形で SufS から SufE、SufE から SufB<sup>C254</sup> へと渡される。 $S^0$  はおそらく FADH<sub>2</sub> の還元力によって  $S^2$  に還元され、HS<sup>-</sup> または H<sub>2</sub>S の形で形成して親水的なトンネルを SufB<sup>C254</sup> から SufB<sup>C405</sup> まで移動する。複数の硫黄がトンネルの内部に蓄積される可能性もある。ATP を用いた SufC の二量体化によって SufB-SufD 会合面の構造変化が引き起こされ、そこで SufB<sup>C405</sup>、SufB<sup>E434</sup>、SufD<sup>H360</sup> の 3 残基を配位子として Fe-S クラスターが新規に形成される。SufB<sup>E432</sup>、SufB<sup>H433</sup>、SufD<sup>C358</sup> の役割は重複しており、これら 3 残基のうちの一つが 4 番目の配位子として機能する可能性がある。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始丁寧なご指導をして頂きました高橋康弘教授、藤城貴史助教、東京農業大学の朝井計教授、宮崎大学の和田啓准教授に心より深く感謝致します。また、研究を支えて下さった分子統御研究室の皆様に、深く感謝致します。