

生体由来金属クラスター合成の生物無機化学

Bioinorganic chemistry on biosynthesis of metal clusters in metalloproteins

理工学研究科生命科学部門分子生物学領域 藤城貴史

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Science and Engineering

Takashi Fujishiro

Abstract

Metals are essential for all kinds of living organisms and utilized by metalloproteins as their metal cofactors. Because of their unique properties, metalloproteins and their metal cofactors have been extensively studied by using multidisciplinary approaches in "bioinorganic chemistry". This review briefly highlights how biosynthesis of biological metal clusters in metalloproteins can be investigated by taking an example of our recent results in studying biosynthesis of the iron-sulfur cluster.

1. はじめに

生命がその機能を維持するために必須とする元素は、生体を構成するアミノ酸や脂質、核酸、糖の材料である水素、炭素、窒素、酸素、リンなどの典型元素である。しかしながら、遷移金属元素もまた、生命維持に必須となる多くの代謝反応を中心に、微量元素として生命に必須である。例えば、光合成系における水から酸素を発生させる光化学系 II ではマンガン、ミトコンドリアの呼吸鎖では鉄が使われている。この時、金属がタンパク質に結合した複合体を「金属タンパク質」と呼び、金属はその機能をつかさどる補因子(コファクター)として働く。金属が持つユニークな特性、例えば多価酸化還元状態や、金属への配位結合による構造多様性(正八面体や三方両錐型の幾何構造など)、配位子置換反応などに見られる構造可換性などは、典型元素のみではなし得ない機能を金属タンパク質にもたらしている。

金属タンパク質の分子レベルでの研究は、「生物無機化学」と呼ばれる学問分野で展開されている。そこでは、金属イオンや金属を含む補欠分子族(例:ヘム鉄)に結合したタンパク質のアミノ酸は、金属錯体の第一配位圏で結合する「配位子」であり、またタンパク質分子全体は巨大なキレート配位子と見なすことができる(図1)。さらに金属タンパク質に特徴的なのは、小分子型の金属錯体では比較的困難とされる第2配位圏の利用である。多くの金属タンパク質は、その金属結合部位をタンパク質内部のポケットに有し、そのポケットを構成するアミノ酸が金属中心の周囲(第2配位圏)に適切に配

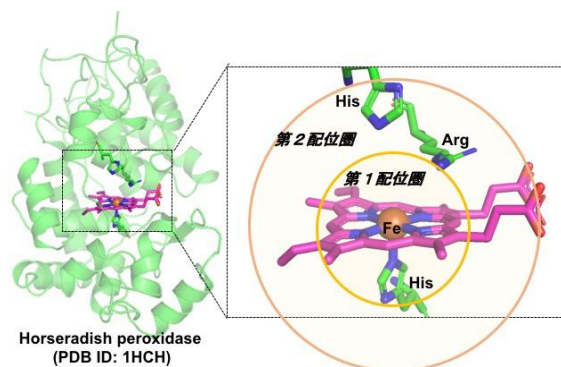


図1 ヘム鉄を有する酵素 Horseradish peroxidase の全体構造と活性中心となるヘム鉄の配位圏。

置され、金属中心と協調して機能する。例えば、ヘム酵素 Horseradish peroxidase では、ヘム鉄の軸配位子の His だけでなく、遠位側の His や Arg がその酵素機能に重要である。金属タンパク質を分子レベルで理解し、さらにそれらの機能を模倣したモデル錯体、超分子錯体の研究も精力的に展開されている。さらに金属の性質を利用した細胞内イメージングや、バイオミネラリゼーションなどの材料科学など、生物無機化学は、融合領域として新たな局面を見せている。筆者も、化学のバックグラウンドを持ちつつ、現在分子生物学領域に所属し、化学と分子生物学の融合研究を目指している。本稿では、生物無機化学の観点から、埼玉大学の科学分析センターの機器を利用した筆者たちの最新の研究結果を紹介する。

2. 嫌気的微生物の生命活動を支える金属クラスター化合物とその生合成

近年、金属タンパク質が利用する金属化合物で注目を集めているのが、2つ以上の金属からなる、生体由来の多核金属クラスター化合物である。代表的なものとして、鉄と無機硫黄から構成される鉄硫黄クラスター、水素を活性化し、そのヘテロ開裂反応を触媒する [FeFe]-ヒドロゲナーゼ酵素の活性中心 Fe, Fe-クラスター (H-クラスター)、CO を CO₂ へ変換する CO デヒドロゲナーゼ酵素の Ni, Fe-クラスター (C-クラスター) などがある(図2)。これらの金属クラスターは生物の中でも、特に地球化学的要素循環の重要な一端を担う「嫌気性微生物」の主要なエネルギー代謝で利用される金属コファクターとして知られ、これらの金属クラスターを利用する酵素に関する多くの研究がなされてきた。

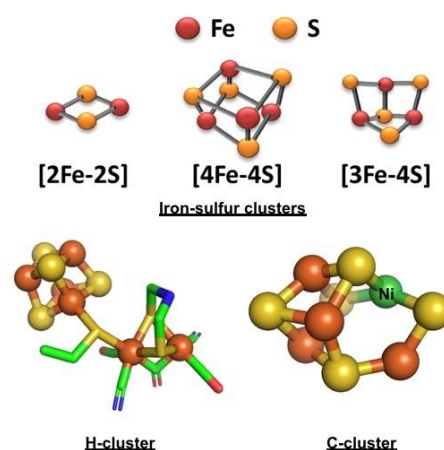


図2 生体由来金属クラスター化合物の例。

一方で、これらの多核金属クラスター化合物が、実際に細胞内でどのように生合成されるかについての研究は、それほど進んでいない。金属クラスター生合成を行う系(生合成マシナリー)は、非常に多くの酵素群が関与した複雑なシステムであることや、金属クラスター化合物自身やその生合成中間体が比較的不安定である(とくに酸素に対する脆弱性)という事実が、金属クラスター生合成研究の障壁となっている。筆者は、ポストク時代に、嫌気性古細菌が持つ水素活性化酵素 [Fe]-ヒドロゲナーゼの活性中心である単核鉄錯体の生合成¹に関する研究に従事し、X線結晶構造解析とバイオインフォマティクスによる機能予測を柱として、多成分からなる複雑な生合成系を研究する手法を確立した。現在は、その手法を、より複雑な多核金属クラスター生合成系の研究へと発展的に展開している状況である。

3. 鉄硫黄クラスター生合成系の分子機構: 動的 X 線結晶構造解析による反応中間体の同定

筆者が現在、主な研究対象としているのは、生体由来金属クラスター化合物の中でも最も広く利用される「鉄硫黄クラスター」(図2)の生合成系の分子機構である。鉄硫黄クラスターの生合成を担う遺伝子群は、現在までに3種類同定され、それぞれ ISC マシナリー、SUF マシナリー、NIF マシナリーと呼ばれている。多くの遺伝学的、生化学的、構造生物学的研究がなされてきたが、化学の視点から、分子・原子レベルでその生合成メカニズムを理解したとはいえないのが現状である。そこで筆者は、生物無機化学で用いられる錯体の分光分析や X 線結晶構造解析の手法を駆使し、分子・原子レベルで鉄硫黄クラスター生合成のメカニズム解明を目指している。特に力を入れているのが、「動的」X 線結晶構造解析と呼ばれる方法である(図3)。これは、X 線結晶構造解析において、作成したタンパ

ク質結晶を、基質となる分子を含む結晶化母液を一定時間浸す(ソーキング)することで、タンパク質結晶内で酵素反応を行ったのち、急速凍結を行うことで、反応中間体を含む状態を結晶内に捉えるものであり、この方法で様々な反応中間体の構造を同定し、鉄硫黄クラスター生合成の分子機構の解明を行っている。

最近、鉄硫黄クラスターの生合成マシナリーのうち、SUF マシナリーと ISC マシナリーのキメラ型とみなせる"SUF-like マシナリー"が、グラム陽性細菌(例:枯草菌)で見つかった。この SUF-like マシナリーは、通常の SUF マシナリーの構成成分である SufBCD と SufS に加え、ISC マシナリーの IscU に似た SufU と呼ばれるタンパク質を持つ点が、特徴的である。SufU は単核 Zn 中心を有する小型のタンパク質であり、SufS 酵素によって触媒される L-システインの脱硫反応で生じた無機硫黄を SufS から受け取り、鉄硫黄クラスター集積酵素 SufBCD へと運搬する役割を担う(図4)²。SufU の Zn の役割はこれまで明らかではなく、そのメカニズムが大いに注目されてきた。

まず筆者らは、SUF-like マシナリーを持つ枯草菌由来の SufU を、大腸菌組換え体として発現・精製を行った。埼玉大学科学分析センターの ICP-OES OPTIMA 5300DV により、得られた SufU の Zn 含量を調べたところ、確かに SufU 1分子あたり 1 当量の Zn が含まれることがわかった。一方、同様に精製した IscU には、SufU のように安定して Zn が結合する現象は現在のところ見られていない。今回の ICP-OES による測定結果は、過去の SufU に関する生化学的解析の報告と一致するものであった³。

さらに SufU の Zn の役割を調べるため、SufU に硫黄を渡す SufS と、SufU との複合体の X 線結晶構造解析と、SufS-SufU 複合体による硫黄転移反応の中間体の捕捉を行った。その結果、

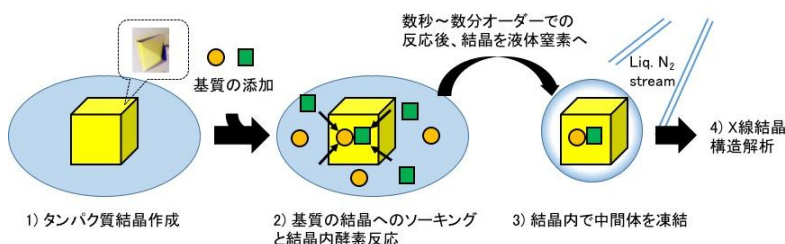


図3 動的 X 線結晶構造解析に向けた反応中間体を捕捉するための結晶作成の模式図

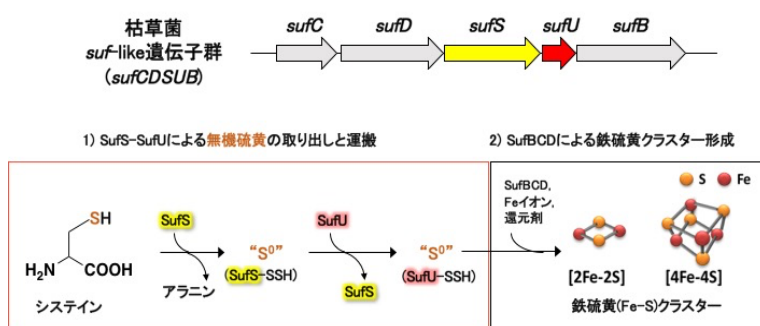


図4 SUF-like マシナリーによる鉄硫黄クラスター生合成

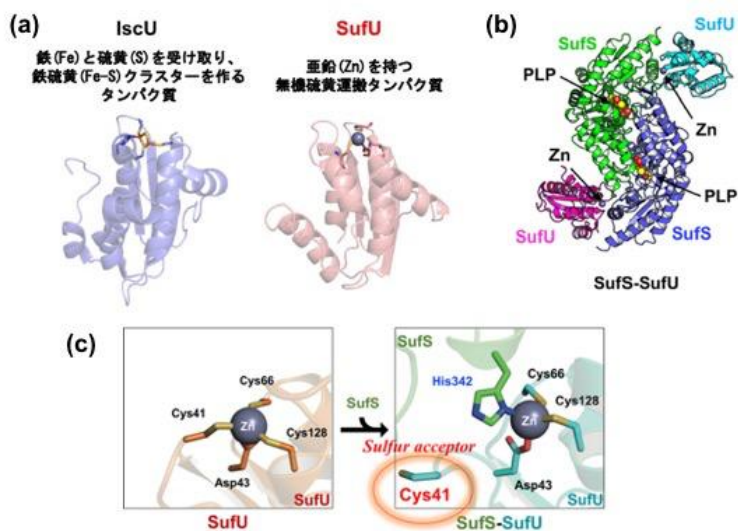


図5 (a) IscU と SufU の全体構造. (b) SufS-SufU 複合体の全体構造. (c) SufS-SufU 複合体化に伴う Zn の配位子 (SufU の Cys41 と SufS の His342) の置換反応。

SufS-SufU 複合体は、SufS 二量体を中心とし、その両端に SufU がそれぞれ1分子結合した、(SufU)-(SufS)₂-(SufU)型であることが明らかとなった(図5)。SufU の Zn 部位は SufS の活性部位に向けた状態であり、さらに Zn の配位子である SufU の 41 番目の Cys(Cys41)が外れ、代わりに SufS の 342 番目の His(His342)が Zn に結合することで、安定な SufS-SufU 複合体構造を維持していた。この時、Cys41 は SufS 活性部位近傍にあり、SufS から硫黄を受け取ることができるようになっている。実際に、反応中間体を捕捉した結果、SufS-SufU は複合体構造を維持しつつ、その Cys41 周りの構造変化を伴いながら、無機硫黄が SufS から SufU へと転移していく過程をスナップショット写真のように捉えることに成功した(図6)。よって、SufU は、必須補因子として Zn を利用し、SufS との配位子置換反応をトリガーとして硫黄を転移するユニークな反応機構を示すことが明らかとなった⁴。

4. おわりに

今回紹介した SufS-SufU の系で硫黄転移反応をスナップショットした手法は、他の鉄硫黄クラスター生合成系タンパク質の分子機構の解析、例えば鉄と硫黄の集積による鉄硫黄クラスター合成反応にも展開できると期待される。そのためには、鉄硫黄クラスターの酸素脆弱性を克服するような実験設備が必要であり、現在その整備に取り組んでいる。また、「なぜ SufU と IscU は非常によく似た全体構造を持つタンパク質であるにもかかわらず、両者の金属の利用法やタンパク質機能が異なるのか？」という観点からも、本系は興味を持たれる。SufU や IscU などの U-type タンパク質ファミリーが示す金属選択性と配位環境、さらにその機能の関連性の研究には、今回のような金属分析が重要であり、今後、科学分析センターの ICP-OES 装置を利用した研究を推し進めていく予定である。

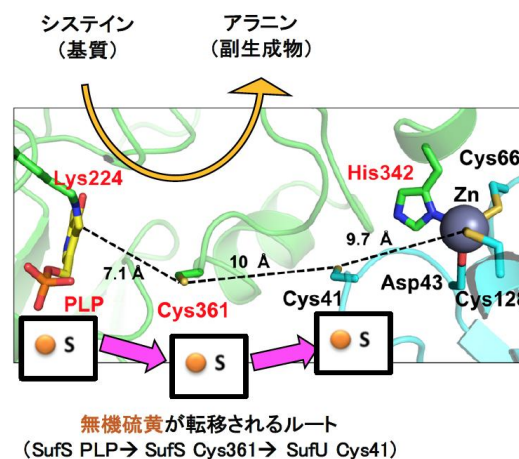


図6 SufS-SufU 複合体の中間体スナップショット解析で明らかとなった SufS 活性部位から SufU Cys41 への無機硫黄の転移ルート。

5. 謝辞

本研究紹介で詳細について紹介した内容は、主に埼玉大学理工学研究科生命科学部門分子生物学領域の高橋康弘教授の研究室で研究を行ったものになります。高橋康弘先生、そして本研究に従事した学生諸氏には、この場をお借りして深く感謝申し上げます。また、ICP-OES 測定は埼玉大学科学分析センターの OPTIMA 5300DV 装置を利用させていただきました、改めて感謝申し上げます。

6. 参考文献

1. (a) T. Fujishiro, *et al.*, *Angew. Chem Int. Ed.*, **2013**, 52, 12555–12558.; (b) T. Fujishiro, *et al.*, *FEBS Lett.*, **2014**, 588, 2789–2793.; (c) T. Fujishiro, *et al.*, *Nat. Commun.*, **2015**, 6, article number:6895.; (d) T. Fujishiro, *et al.*, *FEBS J.*, **2015**, 282, 3412–3423.; (e) T. Fujishiro, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 9648–9651.
2. N. Yokoyama, *et al.*, *Mol. Microbiol.* **2018**, 107, 688–703.
3. (a) B. P. Selbach, *et al.*, *Biochemistry* **2014**, 53, 152–160. (b) A. G. Albrecht, *et al.*, *FEBS Lett.*, **2011**, 585, 465–470.
4. T. Fujishiro, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 18464–18467.