

# 枯草菌における鉄硫黄クラスター生合成系の研究

2018年3月

埼玉大学理工学研究科 博士後期課程理工学専攻 生命科学コース

指導教員 高橋 康弘

15DB004 横山 奈央

## 略号

|                  |   |
|------------------|---|
| Fe-S             | iron-sulfur、鉄硫黄   |
| ISC              | iron sulfur cluster   |
| SUF              | sulfur mobilization   |
| NIF              | nitrogen fixation   |
| MVA              | mevalonate、メバロン酸  |
| MEP              | 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate、2-C-メチル-D-エリトリトール-4-リン酸                 |
| PLP              | pyridoxal-5'-phosphate、ピリドキサール-5'-リン酸                                       |
| LB               | Luria Bertani   |
| Em               | erythromycin、エリスロマイシン   |
| Sp               | spectinomycin、スペクチノマイシン   |
| Nm               | neomycin、ネオマイシン   |
| Cm               | chloramphenicol、クロラムフェニコール  |
| IPTG             | isopropyl $\alpha$ -D-1-thiogalactopyranoside、イソプロピル- $\alpha$ -チオガラクトピラノシド |
| PMVA             | phosphomevalonate、ホスホメバロン酸  |
| DPMVA            | Diphosphomevalonate、ジホスホメバロン酸   |
| IPP              | isopentenyl diphosphate、イソペンテニルニリン酸   |
| HMBPP            | (E)-1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphatase                            |
| DMAPP            | diphosphomevalonate   |
| BGSC             | Bacillus Gene Stock Center  |
| Cyt              | cytchrome、シトクロム   |
| MQ               | menaquinone、メナキノン   |
| MQH <sub>2</sub> | menaquinol、メナキノール   |
| Ap               | ampicillin、アンピシリン   |
| Gm               | gentamicin、ゲンタマイシン  |
| Km               | kanamycin、カナマイシン  |
| Tc               | tetracycline、テトラサイクリン   |
| MBGD             | Microbial Genome Database for Comparative Analysis                          |
| PDB              | Protein Data Bank   |

# 目次

|  |    |
|--|----|
| 概要                                     | 1  |
| 序章                                     | 4  |
| 鉄硫黄 (Fe-S) クラスターと Fe-S タンパク質           | 5  |
| Fe-S クラスターの生合成系                        | 6  |
| — NIF マシナリー                            | 7  |
| — ISC マシナリー                            | 8  |
| — SUF マシナリー                            | 11 |
| — ISC/SUF のキメラ型生合成系 : SUF 様マシナリー       | 16 |
| 本研究の目的とアプローチ                           | 18 |
| 第 1 章 枯草菌 <i>suf</i> 様オペロン破壊株の構築とその性質  | 21 |
| 1.1 序                                  | 22 |
| 1.2 材料および実験方法                          | 23 |
| 1.2.1 枯草菌の <i>suf</i> 様オペロン破壊株の構築と培養条件 | 23 |
| <i>suf</i> 様オペロン破壊株の栄養要求性の検討           | 24 |
| <i>suf</i> 様オペロン破壊株の形質転換               | 24 |
| 1.2.2 プラスミドの構築                         | 25 |
| MVA 経路の遺伝子発現用プラスミド pBMV4 の構築           | 25 |
| 相補実験用プラスミド (pHCMC05 シリーズ) の構築          | 26 |
| 1.2.3 酵素活性の測定                          | 28 |
| アコニターゼ活性の測定                            | 28 |
| コハク酸脱水素酵素の活性                           | 29 |
| グルタミン酸合成酵素の活性                          | 30 |
| リンゴ酸脱水素酵素の活性                           | 31 |

|  |  |    |
|--|--|----|
| 1.3                                      | 結果   | 32 |
| 1.3.1                                    | <i>suf</i> 様オペロン破壊株の構築                     | 32 |
| 1.3.2                                    | <i>suf</i> 様オペロン破壊株の表現型（富栄養培地における生育）       | 35 |
| 1.3.3                                    | <i>suf</i> 様オペロン破壊株における Fe-S 酵素の機能不全       | 36 |
| 1.3.4                                    | <i>suf</i> 様オペロン破壊株の栄養要求性                  | 37 |
| 1.3.5                                    | <i>suf</i> 様オペロン破壊株の形質転換                   | 39 |
| 1.4                                      | 考察   | 42 |
| 1.4.1                                    | SUF 様マシナリーは枯草菌で唯一の Fe-S クラスター生合成として機能する    | 42 |
| 1.4.2                                    | <i>suf</i> 様オペロン破壊株の栄養要求性と Fe-S タンパク質の機能不全 | 43 |
| 1.4.3                                    | <i>suf</i> 様オペロン破壊株におけるエネルギー代謝             | 45 |
| 1.4.4                                    | Fe-S クラスター生合成系を持たない枯草菌                     | 47 |
| <b>第 2 章 Fe-S クラスター生合成系の遺伝学的解析と進化的考察</b> |  | 49 |
| 2.1                                      | 序  | 50 |
| 2.2                                      | 材料および実験方法                                  | 51 |
| 2.2.1                                    | 菌株と培養条件                                    | 51 |
| 2.2.2                                    | プラスミドの構築                                   | 51 |
|  | 枯草菌相補実験用プラスミド（pHCMC05 シリーズ）の構築             | 51 |
|  | 大腸菌相補実験用プラスミド（pBBR・pRK シリーズ）の構築            | 53 |
|  | Error prone PCR によるランダム変異の導入               | 55 |
| 2.2.3                                    | IscU/SufU の系統解析                            | 55 |
| 2.3                                      | 結果   | 57 |
| 2.3.1                                    | 枯草菌の <i>suf</i> 様オペロン破壊株を用いた異種間相補解析        | 57 |
| 2.3.2                                    | 大腸菌変異株を用いた異種間相補解析                          | 60 |
| 2.3.3                                    | SufB の種特異性を变化させるサプレッサー変異                   | 62 |
| 2.3.4                                    | 枯草菌 SufU で保存されたアミノ酸の機能性                    | 63 |
| 2.3.5                                    | IscU/SufU の分子系統解析                          | 64 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.4 考察 .....  | 69  |
| 2.4.1 枯草菌 <i>SUF</i> 様シナリーにおける <i>SufBCD</i> 複合体の機能 .....         | 69  |
| 2.4.2 枯草菌 <i>SUF</i> 様シナリーにおける <i>SufU</i> の機能 .....              | 71  |
| 2.4.3 <i>IscU</i> / <i>SufU</i> の機能分化と Fe-S クラスター生合成系の進化的変遷 ..... | 74  |
| 2.5 今後の展望 .....   | 78  |
| <b>参考文献</b> .....   | 82  |
| <b>表</b>  |     |
| Table 1 本研究で使用した菌株 .....  | 97  |
| Table 2 本研究で使用したプラスミド .....                                       | 98  |
| Table 3 本研究で使用したプライマー .....                                       | 100 |
| <b>図</b>  |     |
| Fig. 1 Fe-S クラスターの構造 .....  | 103 |
| Fig. 2 3種類の Fe-S クラスター生合成マシナリーの作動モデル .....                        | 104 |
| Fig. 3 Fe-S クラスター生合成の成分の分布 .....                                  | 105 |
| Fig. 4 <i>IscU</i> / <i>NifU</i> / <i>SufU</i> のアミノ酸配列の比較 .....   | 106 |
| Fig. 5 大腸菌の <i>SufBCD</i> 複合体 .....                               | 107 |
| Fig. 6 大腸菌と枯草菌の Fe-S クラスター生合成オペロンの比較 .....                        | 108 |
| Fig. 7 枯草菌 <i>suf</i> 様オペロン破壊のストラテジー (1) .....                    | 109 |
| Fig. 8 枯草菌 <i>suf</i> 様オペロン破壊のストラテジー (2) .....                    | 110 |
| Fig. 9 枯草菌 168 株の Fe-S タンパク質群 .....                               | 111 |
| Fig. 10 2種類のイソプレノイド生合成経路 .....                                    | 112 |
| Fig. 11 構築した枯草菌 <i>suf</i> 様オペロンの破壊株 .....                        | 113 |
| Fig. 12 コロニーPCRによる <i>suf</i> 様オペロン破壊株の遺伝子型の確認 .....              | 114 |
| Fig. 13 <i>suf</i> 様オペロン破壊株の富栄養寒天培地における生育 .....                   | 115 |
| Fig. 14 <i>suf</i> 様オペロン破壊株の液体培地における生育 .....                      | 116 |
| Fig. 15 <i>suf</i> 様オペロン破壊株における Fe-S 酵素の活性 .....                  | 117 |
| Fig. 16 <i>suf</i> 様オペロン破壊株の栄養要求性 .....                           | 118 |
| Fig. 17 <i>suf</i> 様オペロン破壊株の形質転換 .....                            | 119 |
| Fig. 18 枯草菌 $\Delta$ <i>sufCDSUB</i> 株の相補実験 .....                 | 120 |
| Fig. 19 枯草菌におけるヌクレオチドの生合成経路と関与する Fe-S 酵素 .....                    | 121 |
| Fig. 20 枯草菌におけるイソロイシン、バリン、ロイシンの生合成経路と関与する Fe-S 酵素 ...             | 122 |
| Fig. 21 枯草菌における硫黄同化ならびに窒素同化経路と関与する Fe-S 酵素 .....                  | 123 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Fig. 22   | 枯草菌におけるエネルギー代謝と関与する Fe-S 酵素 .....                                   | 124 |
| Fig. 23   | 枯草菌 <i>suf</i> 様オペロン破壊株の相補実験 .....                                  | 125 |
| Fig. 24   | 大腸菌 <i>suf</i> 欠失株の相補実験 .....                                       | 126 |
| Fig. 25   | 大腸菌 $\Delta$ <i>iscS</i> 株と $\Delta$ <i>iscU</i> 株を用いた異種間相補実験 ..... | 127 |
| Fig. 26   | 枯草菌 <i>sufB</i> 内のサプレッサー変異による大腸菌 $\Delta$ <i>sufB</i> 株の相補 .....    | 128 |
| Fig. 27   | 枯草菌 SufU 内の部位特異的変異の影響 .....   | 129 |
| Fig. 28   | IscU / NifU / SufU とそれらの類似タンパク質の一次構造に基づいた系統樹 .....                  | 131 |
| Fig. 29   | IscU / NifU / SufU とそれらの類似タンパク質の一次構造の比較 .....                       | 133 |
| Fig. 30   | SufB の一次構造の比較 .....   | 134 |
| Fig. 31   | SufC の一次構造の比較 .....   | 135 |
| Fig. 32   | SufD の一次構造の比較 .....   | 136 |
| Fig. 33   | 種の壁を越える SufB 内のサプレッサー変異 .....                                       | 138 |
| Fig. 34   | IscU / SufU / SufE の立体構造の比較 .....                                   | 139 |
| Fig. 35   | SufB において SufE または SufU との相互作用が予想される領域の構造比較 .....                   | 140 |
| Fig. 36   | 枯草菌の SufU と SufS における Zn 配位子の置換を介した相互作用 .....                       | 141 |
| Fig. 37   | 枯草菌の SUF 様マシナリーの作動モデル .....   | 142 |
| Fig. 38   | IscU / SufU タンパク質の分子進化と Fe-S クラスター生合成系の変遷 .....                     | 143 |
| <b>謝辞</b> | .....   | 144 |

## 概要

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、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。これら Fe-S タンパク質の機能を支えているのは、Fe-S クラスターの生合成系であり、これまでに 3 種類 (ISC、SUF、NIF マシナリー) が知られている。これらのマシナリーはどれも、Fe-S クラスターを新規に組み立てて、それをアポタンパク質まで受け渡すと考えられている。ただし、成分の構成が大きく異なっており、その作動機構には多様性が見られる。

大腸菌は、*iscSUA-hscBA-fdx* オペロンと *sufABCDSE* オペロンにコードされる 2 種類の生合成系、ISC マシナリーと SUF マシナリーを保持している。通常の生育条件では、ISC マシナリーが主に Fe-S クラスター合成を担っているが、鉄飢餓や酸化ストレス条件下では、SUF マシナリーが発現することが知られている。これらのマシナリーで、共通しているのはシステイン脱硫黄酵素 (IscS/SufS) であり、硫黄原子のドナーとして、クラスターの材料となる硫黄原子をそれぞれ、IscU/SufE に渡している。その後、ISC マシナリーでは、IscU において Fe-S クラスターが新規に形成されるのに対し、SUF マシナリーでは、SufE が硫黄原子のキャリアとして SufBCD 複合体に硫黄原子を渡し、この複合体で Fe-S クラスターが新規に形成されることが知られている。

一方、枯草菌などグラム陽性菌のゲノムには、*sufCDSUB* オペロンがコードされており、興味深いことに、この生合成系は、ISC マシナリーの成分である IscU と、SUF マシナリーの 4 成分 SufS、B、C、D とのキメラ構成と推定される (SUF 様マシナリーと呼ぶ)。枯草菌 SufS は、大腸菌の IscS/SufS と相同なシステイン脱硫黄酵素で、硫黄原子のドナーとして機能することが示されている。一方、枯草菌の SufU (IscU ホモログ)

や SufBCD については、大腸菌のホモログと同様に機能すると考えると、SUF 様マシナリーには Fe-S クラスターの新規形成部位が 2 か所存在することになる。ただし、SufBCD 複合体の精製が極めて困難なため、生化学的な解析は進んでいなかった。そこで、本研究では、遺伝学的なアプローチで、枯草菌 SUF 様マシナリーの各成分の役割やマシナリーとしての作動機構を解析することにした。

枯草菌の *suf* 様オペロンの遺伝子はどれも生存に必須なため、*in vivo* における解析もほとんど進んでいなかった。枯草菌は 60 種類以上の Fe-S タンパク質を保持しているが、それらの機能を洗い直したところ、生存に必須なものはイソプレノイド生合成系 (MEP 経路) の 2 つの Fe-S 酵素、IspG/IspH と推測できた。放線菌など一部のバクテリアや真核生物では、Fe-S 酵素が関与しないメバロン酸 (MVA) 経路でイソプレノイドを合成している。そこで、枯草菌の MEP 経路を MVA 経路へ改変したところ、*suf* 様オペロンの必須性を回避して、破壊株を構築することに初めて成功した。*sufCDSUB* の 5 種類の遺伝子それぞれの破壊株とオペロン全体の欠失株はどれも MVA に完全に依存して生育した。また、これら破壊株における Fe-S 酵素 (アコニターゼ、コハク酸脱水素酵素、グルタミン酸合成酵素) の活性を測定したところ、どれも検出限界以下となった。さらに、*suf* 様オペロン破壊株では、バリン、イソロイシン、ロイシンなどのアミノ酸や、プリン・ピリミジンに要求性が見られ、これらの表現型から、それぞれの生合成経路に含まれる Fe-S 酵素が機能していないことを確認した。したがって、枯草菌の Fe-S クラスター生合成には、*suf* 様オペロンにコードされる 5 成分全てが必要であることが判明した。また、変異株の表現型から、枯草菌の Fe-S タンパク質群が全て機能できなくても、それを補う代謝経路を用いることで生育できるようになることがわかった。

構築した枯草菌変異株に、大腸菌 *isc* / *suf* オペロンの関連遺伝子群を、また逆に、大腸菌変異株に、枯草菌の *suf* 様オペロンの関連遺伝子群を導入して、異種生物の成分間



での互換性を検討した。その結果、SufBCDのうち、SufC、SufDでは、大腸菌／枯草菌どちらにおいても機能的な互換性が認められたが、SufBでは異種間での相補性は認められなかった。ただし、サプレッサー変異の解析から、SufB内の1アミノ酸置換で異種のSufBを代替できるようになることがわかった。したがって、枯草菌のSufBCDは、大腸菌SufBCDと同様に複合体を形成し、Fe-Sクラスターの新規形成部位として機能すると考えられる。

SufSUについて異種間での相補解析を行ったところ、意外なことに、枯草菌のSufSUは、構造の相同な大腸菌IscSUではなく、大腸菌SufSEと相互に代替できることが判明した。したがって、枯草菌のSufUは、大腸菌IscUのようにFe-Sクラスターの新規形成部位として機能するのではなく、大腸菌SufEと同様に、硫黄原子のキャリアとして機能することがわかった。すなわち、SufUとIscUが機能の異なる相同タンパク質であることを明確に示した。これらの知見を統合すると、枯草菌SUF様マシンリーでは、SufSからSufU、SufBCD複合体の順に硫黄原子が受け渡され、SufBCD複合体においてFe-Sクラスターが新規に形成されると考えられる。

SufU / IscUに相同な794種類のアミノ酸配列について分子系統関係を調べたところ、これらの配列は、SufUグループとIscUグループの2つの大きなサブファミリーに分離した。したがって、SufUとIscUは、共通祖先から分岐した後、異なる機能（それぞれ、硫黄原子のキャリア／Fe-Sクラスターの足場）を持つように進化したと考えられる。さらに、SufU/IscUの系統関係に加えて、種々の生合成マシンリーに特徴的な成分の分布を考え合わせることで、多様なFe-Sクラスター生合成系がどのように進化してきたのか、その道筋を示すことができた。

## 序章

## 鉄硫黄 (Fe-S) クラスタと Fe-S タンパク質

鉄硫黄 (Fe-S) タンパク質は、コファクターとして無機硫黄原子と非ヘム鉄からなる Fe-S クラスタを持つタンパク質の総称で、ほぼすべての生物に存在している。Fe-S タンパク質の生理機能は多彩で、呼吸や光合成、窒素固定などのエネルギー代謝から、DNA 修復、遺伝子の発現制御に至るまで生命活動の根幹を担っている (Beinert, 1997; Rees, 2003; Lill, 2009; Mettert and Kiley, 2015; Pain and Dancis, 2016)。Fe-S クラスタは一般に、[2Fe-2S]、[4Fe-4S]、または、[3Fe-4S]の形で Fe-S タンパク質の内部に結合している (Fig. 1) が、特殊な Fe-S クラスタとして、ニトロゲナーゼが持つ Fe-Mo コファクター [Mo-7Fe-9S-C-homocitrate] や P クラスタ [8Fe-7S] のような構造も知られている (Johnson *et al.*, 2005)。これらのクラスタのほとんどは、Fe-S タンパク質内部の Cys 残基のチオラート S 原子に配位結合している。ただし稀ではあるが、His や Arg 残基の N 原子、Asp や Ser 残基の O 原子が用いられる例も知られている (Bak and Elliott, 2014; McLaughlin *et al.*, 2016)。クラスタを構成する硫黄原子と鉄原子の高い化学的反応性に加えて、クラスタの種類や Fe-S タンパク質の構造、クラスタを取り巻く配位環境が、Fe-S タンパク質の多彩な機能を生み出す要因となっている。例えば、電子伝達を行う Fe-S タンパク質群の酸化還元電位は、-700 mV から+500 mV まで実に幅広い値が報告されており、それぞれの酸化還元反応で最適な電位になるように調整されている (Bak and Elliott, 2014)。また、アコニターゼなどの酵素ではルイス酸として触媒活性に、IRP や FNR などの制御タンパク質では鉄濃度や酸素濃度などのセンサーとしてクラスタを利用している (Mettert and Kiley, 2015)。また、ラジカル SAM スーパーファミリーの酵素群は、[4Fe-4S]クラスタと S-アデノシルメチオニン (SAM) から 5'-deoxyadenosyl ラジカルを生成して酵素反応に利用している (Duschene *et al.*, 2009; Booker and Grove, 2010; Lanz and Booker, 2015)。さらに近年、真核生物では DNA ポリメ

ラーゼや DNA プライマーゼに、古細菌では RNA ポリメラーゼにも Fe-S クラスターが存在することが示されている (Klinge *et al.*, 2007; Hirata *et al.*, 2010; Netz *et al.*, 2012)。これら DNA に結合する酵素の Fe-S クラスターは、DNA を通して電子をやり取りし、酵素と DNA との結合/解離を調節する (charge transfer communication) という可能性が示唆されている (O'Brien *et al.*, 2017)。

Fe-S クラスターは、それ自体不安定な錯体化合物である。そのため、Fe-S タンパク質が変性すると、クラスターが容易に崩壊して、アポ型 (クラスターを保持していない状態) となる。1960 年代には、還元剤、鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ )、硫化物イオン ( $\text{S}^{2-}$ ) をアポ型 Fe-S タンパク質に加えてインキュベートすると、Fe-S クラスターが再構成されることが示され、以来、生体内の Fe-S クラスター合成も非酵素的 (自発的) に起こると考えられてきた (Malkin and Rabinowitz, 1966)。しかしながら、化学的にクラスターを再構成するためには、細胞内よりもはるかに高い濃度の  $\text{Fe}^{2+}$  と  $\text{S}^{2-}$  が必要となる。細胞内では一般に、 $\text{Fe}^{2+}$  や  $\text{S}^{2-}$  は毒性が高いため、極めて低濃度に制御されている。そのため、自発的なクラスター形成には疑問の声もあり、実際に、葉緑体におけるフェレドキシンの Fe-S クラスター形成反応は ATP を必要とすることから、未知の酵素系が関与するという可能性も指摘されていた (Takahashi *et al.*, 1986)。2000 年前後の分子遺伝学的研究によって、ようやく Fe-S クラスターの生合成に関与する複雑な多成分酵素系 (マシナリー) の実体が明らかにされ始めた。

## Fe-S クラスターの生合成系

これまでに、Fe-S クラスターの生合成系として 3 種類のマシナリー、NIF (nitrogen

fixation)、ISC (iron sulfur cluster)、SUF (sulfur mobilization)、が同定されている (Fig. 2)。これらの生合成系では、L-システインから硫黄原子を引き抜き、それを鉄イオンと結合させて Fe-S クラスターの形に組み立て、その不安定なクラスターを壊さないようにアポタンパク質まで渡す、と考えられている。ただし、3種類の生合成系マシナリーを構成する成分は大きく異なっているため、反応のメカニズムもまた大きく異なると考えられている。なお、真核生物ではミトコンドリアの ISC マシナリー、葉緑体の SUF マシナリーに加えて、細胞質に真核生物独自の CIA (cytosolic iron-sulfur assembly) マシナリーが存在しているが、このマシナリーはミトコンドリアの ISC マシナリーで形成された Fe-S クラスターを利用してそれを改変すると考えられており (Lill *et al.*, 2015; Paul and Lill, 2015)、本稿では取り上げないことにする。

## — NIF マシナリー

NIF マシナリーは、NifS、NifU という 2 種類の成分からなる生合成系で、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* を用いた Dean らの研究によって見出された。彼らは、*nifSU* 遺伝子産物 (NifS と NifU) が、ニトロゲナーゼに含まれる 3 種類の Fe-S クラスター ([4Fe-4S] クラスター、P クラスター、FeMo コファクター) のすべての合成に関与することを示したのである (Jacobson *et al.*, 1989)。NifS はピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) 依存的に L-システインを分解して、L-アラニンと硫黄 (S<sup>0</sup>) を生成するシステイン脱硫黄酵素で、生成した硫黄原子を persulfide (-SSH) の形で、NifU に提供する (Zheng *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1994)。NifU は 3 種類のドメインから構成されており、そのうちの N 末端ドメインは ISC マシナリーの IscU (後述) と相同である。これらは、Fe-S クラスターの新規形成部位 (Scaffold : 足場) として機能し、不安定な Fe-S クラスターを結合する

ことができる。この部位で形成されたクラスターがアポ型タンパク質に渡されることも示されている (Yuvaniyama *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2004)。NifU の中央ドメインには安定な [2Fe-2S] クラスターが結合している。このクラスターは、電子を N 末端ドメインに供給することで、 $S^0$  から  $S^{2-}$  への還元、または [2Fe-2S] から [4Fe-4S] への変換に用いられると考えられている。また、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 (Smith *et al.*, 2005; Py and Barras, 2010)。

当初、NIF マシナリーは窒素固定細菌におけるニトロゲナーゼの Fe-S クラスター形成のみに特化していると考えられていたが、窒素固定を行わない生物 (例えば *Helicobacter pylori*) にも *nifSU* 遺伝子が存在しており (Fig. 3)、実験的にも、ニトロゲナーゼ以外の Fe-S タンパク質の成熟化に関与することが示された (Tokumoto *et al.*, 2004)。ただし、NIF マシナリーの分布は窒素固定細菌と嫌気性または微好気性の生物に限られている。窒素固定細菌では、ニトロゲナーゼの Fe-S クラスターが酸素に不安定なため、窒素固定は低酸素分圧下で行われている。実際、NIF マシナリーは好気条件下では十分に機能することができないことも示されており、低酸素環境に特化した Fe-S クラスターの生合成系と考えられている (Ali *et al.*, 2004; Tokumoto *et al.*, 2004)。

## — ISC マシナリー

大腸菌の ISC マシナリーは、*iscSUA-hscBA-fdx-iscX* オペロンにコードされる 7 種類の成分から構成されており、これらの成分が協調して Fe-S クラスターを合成している (Nakamura *et al.*, 1999; Tokumoto and Takahashi, 2001)。IscS は NifS、IscU は NifU の N 末

端ドメインとそれぞれ一次構造上高い相同性を有しており、それぞれ硫黄原子の供与体と Fe-S クラスターの新規形成部位として機能している (Agar *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001; Urbina *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2002; Shimomura *et al.*, 2008)。IscU や NifU の N 末端ドメインには、3 つの Cys 残基、Asp 残基、His 残基が厳密に保存されている (Fig. 4)。IscU の結晶構造によると、これらのうち、3 つの Cys 残基と 1 つの His 残基が、[2Fe-2S] クラスターの配位子として機能している。また、保存性の高い Asp 残基 (大腸菌では IscU Asp39) が Ala へ置換されることによって、IscU の Fe-S クラスターが安定化されることが知られている (Shimomura *et al.*, 2008)。この置換型 IscU はクラスターを離すことができず、機能できなくなる (Johnson *et al.*, 2006)。

IscA は、IscU と同様に Fe-S クラスターと結合することができる。ただし、Fe-S クラスター新規形成部位としてではなく、IscU の下流で、Fe-S クラスターのキャリアとして機能すると考えられている (Vinella *et al.*, 2009)。また、IscA は [4Fe-4S] クラスターの形成には必要だが、[2Fe-2S] クラスターの形成には関与しないことも示されており、IscU で形成された [2Fe-2S] クラスターを [4Fe-4S] に変換する段階に、あるいは [4Fe-4S] に特異的なキャリアとして機能する可能性がある (Tan *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2016)。一方、IscA は高い親和性で鉄イオンを結合できることから、鉄シャペロンとして機能する可能性も示唆されている (Tan *et al.*, 2009)。HscA は、HSP70 型の分子シャペロン、HscB は J-タイプドメインを有するコシャペロンで、これらは協調して IscU と結合することによりその構造を変化させて、IscU に結合した Fe-S クラスターをアポ型タンパク質へ移す反応を促進させると考えられている (Hoff *et al.*, 2000; Tokumoto *et al.*, 2002; Chandramouli and Johnson, 2006)。Fdx は安定な [2Fe-2S] クラスターを活性中心に持つフェレドキシンで、硫黄原子  $S^0$  を  $S^2$  に還元する役割があると考えられている (Kakuta *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2013)。IscX は分子量の小さい酸性タンパク質で、鉄シャ

ペロンと推定されているが不明な点が多い (Shimomura *et al.*, 2005; Pastore *et al.*, 2006)。

これらの知見をまとめると、ISC マシナリーでは、以下の 4 つのステップを経て Fe-S クラスタを新規に形成すると考えられている。

- 1) IscS から硫黄原子が persulfide (-SSH) の形で IscU に渡される。
- 2) Fdx によって  $S^0$  が  $S^2$  に還元される。
- 3) IscU において、 $S^2$  と Fe (供与体は不明) が結合して、[2Fe-2S] クラスタが新規に形成される。
- 4) HscA と HscB が協調して IscU のコンフォメーションを変化させることでクラスタがリリースされてアポタンパク質に渡される。
- 5) [4Fe-4S] クラスタの形成には IscA も関与する。

ただし、Fe-S クラスタの中間体が非常に不安定なため反応の実体を捉えにくいことと、*in vitro* の実験では *in vivo* の反応を忠実に再現することができない (副反応が多い) という難点があり、メカニズムには不明な点が多く残されている。

最近、*in vivo* の研究によって、大腸菌 ISC マシナリーの 7 種類の成分のうち、IscS と IscU の 2 種類はマシナリー機能に常に必須だが、その他の成分は必ずしも必須でないことが示された。HscA と HscB の機能は、IscU 内部にサプレッサー変異 (1 アミノ酸置換) が生じるとバイパスされるようになり、また、嫌気条件下においては Fdx と IscA の機能がバイパスされる (Tanaka *et al.*, 2016)。なお、IscX については、遺伝子を破壊してもほとんど影響が見られない (Roche *et al.*, 2015)。したがって、ISC マシナリーのコアになるのは IscS と IscU の 2 成分と考えられる。

ISC マシナリーの成分の多くは、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -プロテオバクテリアから真核生物のミト



コンドリアに分布している (Fig. 3)。ミトコンドリアでは、大腸菌の IscX を除く 6 種類の成分が機能しており、そのメカニズムは基本的に大腸菌の ISC マシナリーに類似している。ただし、ミトコンドリアに特有な成分 (Arh1、Isd11、Yfh1、Mge1、Grx5、Iba57) も同定されており、より複雑化したマシナリーになっている (Braymer and Lill, 2017)。一方、いくつかのバクテリアでは逆に単純化したマシナリーが見られ、例えば高度好熱菌 *Aquifex aeolicus* のゲノムには IscS と IscU、Fdx、IscA の 4 成分が、偏性嫌気性細菌 *Clostridium perfringens* のゲノムには IscS と IscU のみがコードされている。

## — SUF マシナリー

SUF マシナリーは、大腸菌の *isc* オペロンの欠失 ( $\Delta isc$ ) 株から生じたサプレッサー変異の解析により見出された (Takahashi and Tokumoto, 2002)。すなわち、*sufABCDSE* オペロンの発現量が増加すると、 $\Delta isc$  株における Fe-S クラスターの供給不足が回復することが示された。また、*suf* オペロンの遺伝子は単独で破壊してもほとんど影響が見られないが、*isc* オペロンの遺伝子破壊と組み合わせると合成致死になることも示された。したがって、大腸菌は 2 種類の Fe-S クラスター生合成系を持つこと、また通常の培養条件では ISC マシナリーが主要な経路として機能することが分かった。その後の研究で、大腸菌の *suf* オペロンの発現は、鉄センサーである Fur (ferric uptake regulator) によって負の制御、 $H_2O_2$  センサーである OxyR によって正の制御を受けることが示された (Outten *et al.*, 2004)。すなわち、大腸菌の SUF マシナリーは、鉄飢餓や酸化ストレス環境におけるバックアップシステムとして用いられている。*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 (Jang and Imlay, 2010; Dai and Outten, 2012; Selbach *et al.*, 2013; Blanc *et al.*, 2014)。逆に、*isc* オペロ

ンの発現は、ノンコーディング RNA の一種 RyhB によって、鉄飢餓条件では抑制される (Desnoyers *et al.*, 2009)。また、これら 2 種類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。ホロ型の IscR は *isc* オペロンを負に、逆にアポ型の場合には *suf* オペロンを正に制御する (Schwartz *et al.*, 2001; Yeo *et al.*, 2006)。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、Fe-S クラスターの供給が促進される。

大腸菌の SUF マシナリーは、*sufABCDSE* にコードされる 6 種類の成分から構成されている (Fig. 2)。そのひとつ SufA は ISC マシナリーの IscA と一次構造レベルで 47% 同一で、これらの間には機能的な互換性がある (Lu *et al.*, 2008; Vinella *et al.*, 2009)。したがって、SufA は IscA と同様、[4Fe-4S] クラスターの形成に特異的に関与するという可能性が高い。これらは、Fe-S クラスターを新規に形成する IscU などの U タイプタンパク質と区別して、A タイプのキャリアタンパク質と呼ばれている。U タイプと A タイプどちらにも、3 残基の Cys が保存されている。大腸菌のアポ型 SufA の結晶構造解析によると、SufA は二量体を形成し、C 末端側の Cys114、Cys116 が二量体の会合面で近接していることから、これらの 4 つの Cys 残基が、Fe-S クラスターを配位するという可能性が指摘されている (Wada *et al.*, 2005)。

SufS は IscS のパラログ (25% 相同) で、IscS と同様に基質 L-システインから PLP 依存的に硫黄原子を引き抜くシステイン脱硫黄酵素として機能している (Mihara *et al.*, 1999)。これらの酵素は、休止状態では Lys 残基 (SufS では Lys226) の側鎖の  $\epsilon$ -アミノ基が PLP のアルデヒド基と Schiff 塩基を形成して結合している。基質 L-システインが結合すると、基質の  $\alpha$ -アミノ基が Lys の  $\epsilon$ -アミノ基と置換して、L-システイン-PLP の Schiff 塩基を形成する。この状態の L-システインに対して、活性残基の Cys (SufS では Cys364) が求核攻撃することによって  $S^0$  を引き抜き、Cys に  $S^0$  が結合した状態の

persulfide (-SSH) を生成する (Mihara *et al.*, 2000)。この persulfide の  $S^0$  は、SUF マシナリーでは 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 (Loiseau *et al.*, 2003; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003)。SufS と SufE が結合すると、SufE の Cys51 を含むループが構造変化を起こして、SufS Cys364 の-SSH に求核攻撃すると考えられている (Kim and Park, 2013; Singh *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2015)。次いで、この硫黄原子は SufE から SufBCD 複合体の SufB へと渡される (Outten *et al.*, 2003; Layer *et al.*, 2007)。すなわち、SufE は SufS と相互作用して、その硫黄原子を SufE の活性残基である Cys51 に persulfide (-SSH) の形で受け取り、次いで SufB と相互作用して硫黄原子を渡すという、硫黄キャリアタンパク質として機能している。なお、大腸菌には第3のシステイン脱硫黄酵素として CsdA が存在しており (Mihara *et al.*, 1997; Mihara and Esaki, 2003)、SufS-SufE の関係と同様、CsdA は CsdE と特異的に相互作用することが知られている (Loiseau *et al.*, 2005)。CsdA-CsdE は Fe-S クラスターの形成ではなく、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 (Miyachi *et al.*, 2013)。SufS と CsdA は、IscS とは異なり、単独での活性が低く抑えられているが、パートナータンパク質が存在することでその活性が著しく促進される。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脱硫黄酵素活性が大きく上昇する (Outten *et al.*, 2003; Loiseau *et al.*, 2005)。

SufBCD は SufB<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub> の量比で複合体を形成し、SUF マシナリーにおいて Fe-S クラスターの新規形成を担っている (Wollers *et al.*, 2010; Hirabayashi *et al.*, 2015)。SufB と SufD の一次構造は低いながらも相同性があり、結晶構造によると、それらの立体構造も類似している (Fig. 5A) (Hirabayashi *et al.*, 2015)。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おり、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、2つ

の平行  $\beta$ -シートを形成している。また、SufB と SufD との会合面では、 $\beta$ -ヘリックスコアドメインの C 末端側で逆平行  $\beta$ -シートを形成して結合している。SufBCD 複合体に 2 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 1 分子ずつ結合している。SufC の構造は膜輸送を担う ABC (ATP-binding cassette)-transporter におけるヌクレオチド結合サブユニット (ABC-ATPase) と相同である。ABC-transporter では、2 分子の ABC-ATPase が、2 分子の ATP を分子間に挟み込んで会合し、ATP を加水分解して解離することによって、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 (Locher, 2016)。SufBCD 複合体の 2 分子の SufC 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 (Tyr86Cys) 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た。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と考えられている (Petrovic *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2009; Hirabayashi *et al.*, 2015)。

SufB については、*in vitro* の化学的な 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 (Layer *et al.*, 2007)。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、このクラスターはリニア型の [3Fe-4S] クラスターではないかと考えられている (Saini *et al.*, 2010)。また嫌気条件下では、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ている (Saini *et al.*, 2010; Wollers *et al.*, 2010)。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。最近、我々の研究グループでは、大腸菌の SufB と SufD に対して網羅的な変異導入解析が行われ、*in vivo* 機能に必須な 2 つの領域が同定された (Yuda *et al.*, 2017)。そのひとつは SufB の  $\beta$ -ヘリックスコアドメインの N 末端側に位置

しており、その領域では Cys254 が SufE から硫黄原子を受け取る必須残基である。もうひとつの機能領域は SufB と SufD の会合面に位置しており、Fe-S クラスタを結合しうる 3 残基の必須アミノ酸 (SufB の Cys405 と Glu434、SufD の His360) が集中していることから、この領域で Fe-S クラスタが新規に形成されると考えられている。また、SufB のβ-ヘリックスコアドメインの内部には、SufB の Cys254 から Cys405 までつながるトンネルが見出された。これらの知見を考え合わせて、SufBCD 複合体の作動機構は次のように推定されている (Fig. 5B)。

- 1) 硫黄原子は SufE の Cys51 から SufB の Cys254 に渡される。
- 2) この硫黄原子は、おそらく FADH<sub>2</sub> によって還元され、Cys254 から遊離して、コアドメイン内部のトンネルを通して SufB の Cys405 へと移動する
- 3) ATP の結合に共役して 2 分子の SufC 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 の Cys405 と Glu434、SufD の His360 が露出し、Fe-S クラスタが新規に形成される。

ただし、SufBCD 複合体の構造変化の実体や、Fe-S クラスタを保持した状態は未解明であり、それらを捉えることは大きな課題といえる。また、Fe がどのようにして供給されるのかという問題についても、NIF マシナリーや ISC マシナリーの場合と同様、未解明である。

SUF マシナリーの成分は、真性細菌全般から古細菌、真核生物の色素体と、生物界にたいへん広く分布しているが、その組成には多くのバリエーションが見られる (Fig. 3)。Euryarchaeota の中には (例えば *Methanococcus jannaschii* では) 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、これらの生物ではおそらく SufB<sub>2</sub>C<sub>2</sub> 複合体の形で Fe-S クラス

ターの生合成を担っていると考えられる (Tsaousis *et al.*, 2012; Outten, 2015)。これらは、分子系統解析から SUF マシナリーのプロトタイプと推測されており、*sufB* の遺伝子重複によって *sufD* が加わったと考えられている (Boyd *et al.*, 2014)。進化の過程では、その後、システイン脱硫黄酵素 SufS がメンバーに加わり、さらに遅れて硫黄キャリアタンパク質 SufE が加わったと推定されている。ただし、多くのグラム陽性細菌のゲノムには SufE がコードされておらず、代わりに ISC マシナリーの中核成分である IscU のホモログが *suf* 様オペロンの中にコードされている (Fig. 3)。

## — ISC/SUF のキメラ型生合成系：SUF 様マシナリー

上述のように、グラム陽性細菌の一種である枯草菌のゲノムには、*suf* 様オペロン (*sufCDSUB*) がコードされている (Fig. 6)。興味深いことに、このオペロンから予想される SUF 様マシナリーは、大腸菌 SUF マシナリーの中の SufA と SufE を除く 4 成分 (SufS、SufB、SufC、SufD) と、ISC マシナリーの IscU (枯草菌のホモログは SufU と呼ぶ) のキメラ構成となっている (Fig. 6)。このようなキメラ型のオペロンは、グラム陽性細菌の Bacilli や Actinobacteria に加え、Spirochaetes、Thermotogae、Proteobacteria の一部でも見られ、真性細菌に広く分布している (Tokumoto *et al.*, 2004; Huet *et al.*, 2005; Boyd *et al.*, 2014; Outten, 2015)。なお、枯草菌では、*suf* 様オペロンから離れた座位に *sufA* がコードされているが、*sufCDSUB* の 5 遺伝子がいずれも生存に必須 (Kobayashi *et al.*, 2003) なのに対して、*sufA* は破壊しても全く影響が見られない (Albrecht *et al.*, 2010)。

枯草菌の SufB、SufC、SufD には、大腸菌 SUF マシナリーの中核成分である SufBCD

と高い相同性（それぞれ 41、51、37%）を示すことから (Fig. 6)、大腸菌の SufBCD と同様に、複合体を形成し、Fe-S クラスターの新規形成部位として機能すると推定されている (Boyd *et al.*, 2014; Outten, 2015)。ただし、SufBCD の精製が困難であるため、これまで実験的な解析は全く行われていない (Dos Santos, 2017)。

枯草菌の SufS は大腸菌 SufS と相同 (48%) なシステイン脱硫黄酵素である (Fig. 6)。枯草菌 SufU と大腸菌 IscU のアミノ酸配列の相同性は比較的低い (28%) が、IscU で Fe-S クラスターの配位子となる 3 残基の Cys など機能性アミノ酸の多くは、SufU でも保存されている (Fig. 4)。ただし、IscU で配位子のひとつとなる His 残基は、SufU では Lys に置換されており、IscU における HscA 結合モチーフ (LPPVK 配列) も SufU では保存されていない。2 番目と 3 番目の Cys 残基の間に約 20 アミノ酸の挿入があるというのも SufU サブファミリーの特徴である。立体構造も IscU と SufU でよく似てはいるが、IscU の 2 本の短いヘリックス ( $\alpha 3$  と  $\alpha 4$ ) は SufU では 1 本につながっており、また SufU に特有な約 20 アミノ酸の挿入配列は  $\alpha$ ヘリックスを形成している (Shimomura *et al.*, 2008)。

近年、Marahiel のグループは、枯草菌 *sufU* 遺伝子のプロモーターを人為的にコントロール可能な  $P_{xyIA}$  にすげ替えた変異株を構築し、その発現を抑制すると枯草菌の生育が遅延すること、また、アコニターゼやコハク酸脱水素酵素といった Fe-S 酵素の活性が低下することを示した (Albrecht *et al.*, 2010)。また、*in vitro* で Fe-S クラスターを化学的に再構成すると、SufU は [4Fe-4S] クラスターを保持するようになること、またこのホロ型 SufU は isopropylmalate isomerase のアポ型をホロ型に変換できることを示した。さらに、枯草菌の SufS にアポ型の SufU を共存させると、システイン脱硫黄酵素活性が 40 倍増加することから、これらのタンパク質の間の硫黄転移反応が示された。また、SufU の 3 残基の Cys (Cys41、Cys66、Cys128) を Ala に置換したところ、いずれの置換

によっても活性増加が消失した (Albrecht *et al.*, 2010; Albrecht *et al.*, 2011)。これらの実験が意味するところは、枯草菌のアポ型 SufU は SufS から硫黄原子を受け取り、新規にクラスターを形成してホロ型 SufU に変換するということと、SufS との相互作用には SufU の 3 残基の Cys が必要ということである。これに基づいて彼らは、枯草菌の SufU は (IscU と同様に) Fe-S クラスターの新規形成部位として機能すると提案した。

Dos Santos らのグループは、この提案に真っ向から反論している。彼女たちは、Marahiel らの実験のうち、SufU によって SufS の活性が大幅に上昇するという点は再現できたが、SufU のホロ型は確認できず、アーティファクトではないかと考えた (Selbach *et al.*, 2010; Selbach *et al.*, 2014)。実際、*in vitro* の実験では、Fe-S クラスターの生成におけるこの種のアーティファクトは珍しくない。彼女らはさらに、枯草菌 SufU では 3 残基の Cys (Cys41、Cys66、Cys128) と Asp43 を配位子として亜鉛イオンがたいへん強固に結合している ( $K_a = 10^{17} \text{ M}^{-1}$ ) こと、この亜鉛を人為的に取り除くと SufU の二次構造が大きく変化して、SufS と相互作用できなくなることを示した。この 3 残基の Cys は、Marahiel らの想定する Fe-S クラスターの結合部位に相当している。したがって、Dos Santos らは、SufU が Fe-S クラスターを結合する可能性は極めて低いと考え、SufU は Fe-S クラスターの新規形成部位として機能するのではなく、大腸菌 SufE のように硫黄キャリアタンパク質として機能するのではないかと提案した。しかし、SufU がこの硫黄をどのタンパク質に運ぶのか、SufBCD 複合体を含めて実験的には何も示されていない。

## 本研究の目的とアプローチ

上述のように、キメラ型の SUF 様マシナリーについては、不明な点が多い。最も注



目されるのは、IscU のホモログである SufU の役割である。仮に、(IscU と同様に) Fe-S クラスターの新規形成部位として機能するのであれば、このマシナリーでは SufU と SufBCD 複合体の 2 か所でクラスターを形成することになり、それらが機能的にどのように分業しているのか、大変興味深い問題になる。あるいは、枯草菌の SufBCD に、大腸菌とは異なるなんらかの仕組みが隠されているのかもしれない。一方、SufU が、(SufE と同様に) 硫黄キャリアタンパク質として機能するのであれば、IscU と SufU は機能の異なる相同タンパク質ということになる。とすると、それらの機能分化がどのようにして生じたのか分子進化の観点からも興味深い。

本研究では、枯草菌 SUF 様マシナリーのユニークな特性に着目し、その性質やメカニズムを明らかにすることを目的として研究を進めることにした。ただし、枯草菌 SufBCD の精製が著しく困難なため、生化学的なアプローチではなく、遺伝学的なアプローチで枯草菌 *sufCDSUB* オペロンがコードする 5 成分の役割に迫ることにした。上述の通り、これらの 5 遺伝子はどれも枯草菌の生存に必須 (Kobayashi *et al.*, 2003) であるため、これまでは、*sufU* のプロモーターを制御可能なものにすげ替えて発現を抑制するという研究しか行われていない (Albrecht *et al.*, 2010)。一方、我々の研究室では最近、大腸菌のイソプレノイド合成経路を代謝改変することで 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 (Tanaka *et al.*, 2016)。この大腸菌の例に倣って、本研究ではまず、枯草菌のイソプレノイド合成経路を MVA 経路へと代謝改変し、*sufCDSUB* オペロンを破壊することができるかどうかという試行錯誤からスタートした。

第 1 章では、この *sufCDSUB* オペロン破壊株の構築と破壊株の性質について述べる。5 種類の遺伝子をそれぞれ個別に破壊したところ、すべての破壊株で Fe-S タンパク質の活性が見られなくなったことから、これら 5 種類の遺伝子はどれも Fe-S クラスター

の生合成に必須であることが判明した。また、これらの破壊株で ComK を人為的に発現誘導して形質転換できるように改変し、Fe-S クラスタ生合成系の遺伝子群を自在に操作することのできる実験系を開発した。この系を用いて、ピロリ菌の NIF マシナリーが、枯草菌の SUF 様マシナリーの機能を代行できることを示した。

第 2 章では、第 1 章で構築した枯草菌の破壊株に大腸菌の関連遺伝子を導入する、あるいは逆に、大腸菌の破壊株に枯草菌の関連遺伝子を導入するという、異種間での相補解析を行った結果について述べる。枯草菌の SUF 様マシナリーと大腸菌の SUF マシナリーの成分との間では、いくつかの機能的な互換性を見出すことができ、特に、注目していた枯草菌の SufU は、IscU のように Fe-S クラスタの新規形成部位として機能するのではなく、硫黄原子のキャリアとして機能することがわかった。また、SufU と IscU との系統的な関係（分子進化）を解析し、これに基づいて Fe-S クラスタ生合成系の進化のアウトラインを明らかにした。

## 第 1 章 枯草菌 *suf* 様オペロン破壊株の構築とその性質

## 1.1 序

枯草菌などグラム陽性菌のゲノムにコードされる *suf* 様オペロンは、大腸菌などの SUF マシナリーの成分 SufB、C、D、S のホモログと、ISC マシナリーの IscU のホモログをコードしている。これらの遺伝子産物はグラム陽性菌でも Fe-S クラスター生合成系 (SUF 様マシナリー) として機能すると考えられているが、キメラ型のマシナリーの中でそれぞれの成分が具体的にどのような役割を果たしているのか、配列の相同性から予想することは困難である。ただし、SufBCD の精製は困難なため、*in vitro* の解析はこれまで SufS と SufU に限られている (Dos Santos, 2017)。また、*suf* 様オペロンの 5 つの遺伝子はどれも生存に必須であるため、*in vivo* での解析もほとんど進んでいなかった (Kobayashi *et al.*, 2003; Huet *et al.*, 2006; Albrecht *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2017)。一方、大腸菌ではイソプレノイド生合成経路 (MEP 経路) を MVA 経路へと改変することにより、クラスター生合成系を欠損した変異株 ( $\Delta isc \Delta suf$ ) が構築され、Fe-S クラスターを全く作れなくても生育できることが示された (Tanaka *et al.*, 2016)。そこで本章では、大腸菌の場合と同様に、枯草菌でもイソプレノイド生合成経路を改変することによって、*sufCDSUB* オペロンの破壊株を構築できるか検討した。次いで、*suf* 様オペロンの個々の遺伝子を破壊した変異株の性質を比較することによって、5 種類の成分のすべてが Fe-S クラスターの生合成に必須であることを明らかにした。また、Fe-S クラスターを持たない枯草菌がどのような代謝経路を利用して生育しているのか考察した。

## 1.2 材料および実験方法

### 1.2.1 枯草菌の *suf* 様オペロン破壊株の構築と培養条件

本章で用いた菌株を Table 1 に示した。

枯草菌の 168 株と 1A976 株の培養には、LB 培地を用いた。1A976 株の培養では、0.5  $\mu\text{g/ml}$  Em を添加した。

枯草菌の *suf* 様オペロン破壊株は、MVA 経路の 4 遺伝子を発現させるプラスミド (pBMV4 Nm<sup>r</sup>) の存在下で、それぞれのコード域をスペクチノマイシン耐性遺伝子 (Sp<sup>r</sup>) と置換させて欠失させて構築した。詳細を Fig. 7 と Fig. 8 に示す。破壊株の培養には、2×YT 培地に 1% グルコース、1% ピルビン酸ナトリウム、20 mM KPi バッファー (pH 7.0) を加え (Ye *et al.*, 2000)、さらに 0.2 mM IPTG、0.5 mM MVA を添加した培地を用いた (2 x YT complete 培地と称す)。破壊株構築の際の選択培地には、Sp を終濃度 200  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加した。必要に応じて、5  $\mu\text{g/ml}$  Nm、5  $\mu\text{g/ml}$  Cm、100  $\mu\text{g/ml}$  Sp、0.5  $\mu\text{g/ml}$  Em を添加した。

嫌気条件下の培養には、BBL GasPak Anaerobic System (Becton Dickinson)を用いた。2 x YT complete 寒天培地を使用し、GasPac ジャーに入れて密閉し、37°C、48 時間毎に生育を観察した。

液体培地での生育観察では、まず、2 x YT complete 液体培地で、37°C、18 時間前培養した後、L 字管に入れた 4 ml の 2 x YT complete 培地に植菌して、BioPhotorecorder

TN1506 (ADVANTEC) を用いて、37°C、60 rpm で培養し、30 分毎に 660 nm における濁度を測定した。

### ***suf* 様オペロン破壊株の栄養要求性の検討**

合成培地は、Spizizen 最少培地に、10 µg/ml、1% グルコース、1% ピルビン酸ナトリウム、0.5 mM IPTG、0.5 mM MVA、2 µg/ml チアミン、2 µM ニコチン酸、0.2 µM ビオチン、2 ng/ml リボ酸、19 種類のアミノ酸、プリン類、ピリミジン類を加えたものを用いた。アミノ酸、プリン、ピリミジンの濃度は Cutting と Vander Horn の記述を参考にした (Cutting and Vander Horn, 1990)。2 x YT complete 液体培地で、37°C、18 時間前培養した後、3 ml の合成培地を入れたプラスチック製の培養管 (17×100 mm、Labcon) に、前培養液を 1/1000 容植菌し、37°C、180 rpm で振盪培養した。mini photo 518R (TAITEC) を使用して 600 nm における濁度を経時的に測定した。

### ***suf* 様オペロン破壊株の形質転換**

枯草菌 *suf* 様オペロンの破壊株は、グリセロールストックから 2 x YT complete 寒天培地に起こし、2 日以内のコロニーを用いた。爪楊枝で 2xYT complete 液体培地に植菌して、37°C で約 18 時間培養し、前培養液とした。L 字管に入れた 2xYT complete 培地 4-5 ml に 1/10 容の前培養液を加えて 37°C で振盪培養した。0.5-1 時間ごとに mini photo 518R (TAITEC) を使用して 600 nm における濁度を測定し、増殖が止まらないことを確認しつつ、OD<sub>600</sub> の値が 0.5-0.7 程度になった時点で、終濃度 1% となるようにキシロー

スを添加し、さらに 37°C で 1 時間振盪培養した。次いで、培養液（形質転換当たり、300  $\mu$ l）をカルチャーチューブに移し、そこに DNA（約 0.5-1  $\mu$ g）を添加して、37°C で 1.5 時間振盪した。選択培地に全量をスプレッドし、37°C で培養して形質転換体を得た。

## 1.2.2 プラスミドの構築

本章で使用したプラスミドとプライマーを、それぞれ Table 2、Table 3 に示す。

### MVA 経路の遺伝子発現用プラスミド pBMV4 の構築

放線菌 *Streptomyces* sp. CL190. 由来の MVA 経路の 4 つの酵素（MVA kinase、phosphomevalonate (PMVA) kinase、diphosphomevalonate (DPMVA) decarboxylase、isopentenyl diphosphate (IPP) isomerase）用の発現プラスミド、pBMV4 は、東京大学 生物産工研究センター、葛山智久先生から供与いただいた。構築方法を簡単に記す。まず、枯草菌用発現ベクター pHB201 (Bron *et al.*, 1998) を NcoI と BclI で処理して ori1060/rep1060 を含む 2.8 kb の断片を切り出し、この断片を、pDH88 (Henner, 1990) から NcoI と BclI で切り出した断片（P<sub>spac</sub> と polylinker、lacI を含む）とつないで、pAA101 ベクターとした。上記の放線菌 *Streptomyces* sp. CL190. 由来の MVA 経路の 4 つの遺伝子（*pmvk*、*mvd*、*mvk*、*idi*）は、それぞれ枯草菌用の SD 配列 (GGAGGTTGTTTT) を付加して PCR で増幅し、P<sub>spac</sub> プロモーターの下流にクローン化された。このプラスミドは選択マーカーが Cm 耐性であったため、本研究では、枯草菌内で pCm::Nm プラスミド

(Steinmetz and Richter, 1994) との相同組換えを利用して、Nm 耐性に置換して (pBMV4 Nm<sup>r</sup>) 用いた。

## 相補実験用プラスミド (pHCMC05 シリーズ) の構築

### — 発現用ベクター-pHCMC05-NMC

大腸菌-枯草菌シャトルベクターpHCMC05 は Cm 耐性マーカを持ち、枯草菌細胞内で  $\theta$  型の自立複製をするプラスミドである (Nguyen *et al.*, 2005)。また、IPTG 存在下で強力に転写をドライブする  $P_{spac}$  プロモーターの下流にマルチクローニングサイトが配置されている。本研究では、さらに多くの制限酵素認識部位を導入するため、以下の改変を行った。

マルチクローニングサイトから離れた位置に存在する XhoI-PstI-SphI 認識部位を削除するため、XhoI と SphI で切断し、T4 DNA polymerase で平滑化してセルフライゲーションした。同様に、マルチクローニングサイトから離れた位置に存在する NheI-SacI 認識部位を削除するため、NheI と SacI で切断し、mung bean nuclease で平滑化してセルフライゲーションした。次いで、マルチクローニングサイト内の XbaI と SmaI で切断し、その間にリンカーDNA (Table 3、pHCMC linkerF と pHCMC linkerR を 85°C で 10 分処理し、アニールしたもの) を挿入して、pHCMC05-NMC を構築した。新たなマルチクローニングサイトは、BamHI-XbaI-SphI-XhoI-SacI-SacII-NheI-NruI-BmgBI である。

### — pHCMC05-Bs *sufC*、-Bs *sufD*、-Bs *sufS*、-Bs *sufU*、-Bs *sufB*

枯草菌 *sufC*、*sufD*、*sufS*、*sufU*、*sufB* をそれぞれ、*La Taq* DNA Polymerase (TaKaRa) を



用いて PCR で増幅した。プライマーはそれぞれ、Bs SufF-Xb と Bs sufC-R-Sc、Bs sufD-F-Xb と Bs sufΔSU-R、Bs sufS-FXh と Bs sufS-R-Sc、Bs sufU-F-Xb と Bs sufU-RNh、Bs sufΔSU-F と Bs SufR-Sc という組み合わせで使用した (Table 3)。まず、これら PCR 産物を、pMD20-T vector (TaKaRa) へ TA クローニングした。クローン化した *sufC*、*sufD*、*sufU*、*sufB* は XbaI と SacI、*sufS* は XhoI と SacI で制限酵素処理を行い、切り出した。この断片と、対応する制限酵素で処理した pHCMC05-NMC をライゲーションして、pHCMC05-*Bs sufC*、-*Bs sufD*、-*Bs sufS*、-*Bs sufU*、-*Bs sufB* を構築した。

#### — pHCMC05-*Bs sufSU*

枯草菌 *sufSU* を *Ex Taq* polymerase (TaKaRa) と Bs sufS-FXh、Bs sufU-RNh プライマー (Table 3) を用いて PCR で増幅し、pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) へ TA クローニングした。このプラスミドをまず SpeI 処理で切断し、T4 polymerase で平滑化した。次いで XbaI で処理して断片を切り出し、XbaI と SmaI で処理した pHCMC05 にサブクローニングした。このプラスミドを pHCMC05-*Bs sufSU* とした。

#### — pHCMC05-*Bs sufCDSUB*、-*Hp nifSU*

枯草菌 *sufCDSUB* (5.2 kb) 断片は、pRK-*BsSUF-sufAnfu* (大橋 2012 年修士論文) プラスミドから XbaI と SacI で処理して切り出した。同様に、ピロリ菌 *nifSU* (2.2 kb) は pRKHpSU プラスミド (Tokumoto *et al.*, 2004) より切り出した。これらをそれぞれ、pHCMC05-NMC の XbaI/SacI 部位にクローン化し、pHCMC05-*Bs sufCDSUB*、-*Hp nifSU* とした。

### 1.2.3 酵素活性の測定

枯草菌の野生株と変異株を 2 x YT complete 培地で定常期の初期まで培養した。各培養液の 600 nm における濁度に基づいて、氷冷した 50 mM Pi バッファー (pH 7.5) を加えて菌体濃度を  $OD_{600}=2$  になるように揃えた。ここに、0.1 mm 径のガラスビーズ ( $OD_{600}=1.0$  当たり 0.4 g) を加えて、超音波 (30 pulse → 氷冷 40 秒を 5 回) で破碎した。4°C、15,000 rpm、30 分間遠心分離した後、上清を回収した。この上清を用いて、アコニターゼ、コハク酸脱水素酵素、グルタミン酸合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素の活性測定を行った。

#### アコニターゼ活性の測定

アコニターゼは、TCA サイクルの酵素の 1 つで、*cis*-アコニット酸を中間体として、クエン酸とイソクエン酸の可逆的な異性化反応を触媒する。この酵素には 1 つの [4Fe-4S] クラスタが結合しており、この Fe-S クラスタは、基質を配位するルイス酸として機能している。アコニターゼの活性測定は、イソクエン酸からの *cis*-アコニット酸の生成を、240 nm における吸光変化をモニターすることで調べた (Kennedy *et al.*, 1983)。まず、ブラックセルにイソクエン酸を除く次頁の表の試薬を加えて混合し、240 nm における吸光度を 7 分間測定してこれをバックグラウンドとした。そこへ、イソクエン酸を添加して素早く混合し、240 nm での吸光度を 5 分間測定した。*cis*-アコニット酸のモル吸光係数は、 $3.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  として活性を算出した。

### アコニターゼ活性測定用の反応液組成

|                  | Stock | Volume                        | Final concentration |
|------------------|-------|-------------------------------|---------------------|
| Tris-HCl pH 7.8  | 1 M   | 90 $\mu$ l                    | 90 mM               |
| H <sub>2</sub> O |       | 870 $\mu$ l – Enzyme solution |                     |
| Enzyme solution  |       | 20-200 $\mu$ l                |                     |
| Isocitrate       | 0.5 M | 40 $\mu$ l                    | 20 mM               |
|                  |       | Total 1 ml                    |                     |

### コハク酸脱水素酵素の活性

コハク酸脱水素酵素はコハク酸を酸化してフマル酸を生成し、その電子をキノンへ渡す酵素（別名：呼吸鎖電子伝達系複合体II）である。電子は、まず、フラビンサブユニット (FP) のFADに渡り、続いてFe-Sサブユニット (IP) の [2Fe-2S]、[3Fe-4S]、[4Fe-4S] クラスタを介して膜貫通サブユニットのヘムにわたり、最終的にキノンへと渡される。PMS (Phenazinemethosulfate) とMTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2, 4-tetrazolium bromide) は、人工の電子受容体であり、PMSはコハク酸脱水素酵素のFe-Sクラスターから電子を受け取り、次いでMTTへと渡す。MTTは還元されると570 nm付近に吸収極大を示すことから、この570 nmの吸収変化を指標にして、コハク酸脱水素酵素の活性を調べた (Tokumoto and Takahashi, 2001)。まず、コハク酸ナトリウム以外の次頁の表の試薬を混合し、570 nmにおける吸光度を7分間測定して、これをバックグラウンドとした。そこへコハク酸ナトリウムを加えて素早く混合し、570 nmにおける吸光度を10分間測定した。MTTのモル吸光係数は、 $17 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として活性を算出した。

### コハク酸脱水素酵素活性測定用の反応液組成

|                  | Stock   | Volume                        | Final concentration |
|------------------|---------|-------------------------------|---------------------|
| KPi pH 7.5       | 1 M     | 25 $\mu$ l                    | 25 mM               |
| PMS              | 4 mg/ml | 30 $\mu$ l                    | 120 $\mu$ g/ml      |
| MTT              | 2 mg/ml | 30 $\mu$ l                    | 60 $\mu$ g/ml       |
| KCN              | 1 M     | 2 $\mu$ l                     | 2 mM                |
| H <sub>2</sub> O |         | 868 $\mu$ l – Enzyme solution |                     |
| Enzyme solution  |         | 10-75 $\mu$ l                 |                     |
| Sodium succinate | 0.5 M   | 20 $\mu$ l                    | 10 mM               |
|                  |         | Total                         | 1 ml                |

### グルタミン酸合成酵素の活性

グルタミン酸合成酵素は、L-グルタミンと $\alpha$ -ケトグルタル酸から 2 分子の L-グルタミン酸を生成する反応を触媒する酵素である。この反応では、NADPH が酸化され、NADP<sup>+</sup>が生じるので、NADPH の 340 nm の吸光度の減少をモニターすることで、グルタミン酸合成酵素の活性を調べた (Tokumoto and Takahashi, 2001)。グルタミンを除く下表の試薬を UV 透過型のアクリル製プラスチックキュベット内で混合し、340 nm における吸光度を 10 分間測定してこれをバックグラウンドとした。次いで、グルタミン溶液を加えて素早く混合し、340 nm における吸光度を 5 分間測定した。NADPH のモル吸光係数は  $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  として活性を算出した。

### グルタミン酸合成酵素活性測定用の反応液組成

|                         | Stock  | Volume                        | Final concentration |
|-------------------------|--------|-------------------------------|---------------------|
| Tris-HCl pH 7.8         | 1 M    | 100 $\mu$ l                   | 100 mM              |
| NADPH                   | 8 mM   | 20 $\mu$ l                    | 0.16 mM             |
| H <sub>2</sub> O        |        | 780 $\mu$ l – Enzyme solution |                     |
| Enzyme solution         |        | 20-100 $\mu$ l                |                     |
| $\alpha$ -ketoglutarate | 100 mM | 50 $\mu$ l                    | 5 mM                |
| Glutamine               | 200 mM | 50 $\mu$ l                    | 10 mM               |
|                         |        | Total                         | 1 ml                |

## リンゴ酸脱水素酵素の活性

リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) は、リンゴ酸とオキサロ酢酸の間の可逆的な酸化還元反応を触媒する酵素である。オキサロ酢酸からリンゴ酸への反応では、NADH が酸化され、NAD<sup>+</sup>が生じる。そこで、NADH の 340 nm の吸光度の減少をモニターして、リンゴ酸脱水素酵素の活性を調べた (Tokumoto and Takahashi, 2001)。まず、オキサロ酢酸以外の下表の試薬を混合して、340 nm における吸光度を 2 分間測定し、これをバックグラウンドとした。そこへ、オキサロ酢酸溶液を加えて素早く混合し、340 nm での吸光度変化を 2 分間測定した。NADH のモル吸光係数は  $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  として活性を算出した。

### リンゴ酸脱水素酵素活性測定用の反応液組成

|                  | Stock   | Volume                                | Final concentration |
|------------------|---------|---------------------------------------|---------------------|
| KPi pH 7.5       | 1 M     | 100 $\mu\text{l}$                     | 100 mM              |
| NADH             | 14.3 mM | 10 $\mu\text{l}$                      | 0.143 mM            |
| H <sub>2</sub> O |         | 873.3 $\mu\text{l}$ – Enzyme solution |                     |
| Enzyme solution  |         | 5-10 $\mu\text{l}$                    |                     |
| Oxaloacetic acid | 20 mM   | 16.7 $\mu\text{l}$                    | 0.33 mM             |
|                  |         | Total 1 ml                            |                     |

本研究では、以上の 4 種類の酵素活性について、いずれの場合も 1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の生成物が生じたときの活性を 1 unit とした。また、タンパク質の濃度は、Bradford 法 (Nacalai Tesque) によって決定し、それぞれの酵素の比活性を求めた。

## 1.3 結果

### 1.3.1 *suf* 様オペロン破壊株の構築

枯草菌の *suCDSUB* オペロンの 5 つの遺伝子はどれも、枯草菌の生存に必須である (Kobayashi *et al.*, 2003)。Fe-S クラスターの生合成系が生存に必須ということは、枯草菌には必須機能を持つ Fe-S タンパク質が存在することを示唆している。過去の文献とデータベース UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) を用いて検索してみると、枯草菌には 60 種類以上の Fe-S タンパク質が存在することが分かった (Fig. 9)。これら Fe-S タンパク質の中で、枯草菌の生育に必須なものをデータベース BSORF (<http://bacillus.genome.jp>) を用いて検索したところ、イソプレノイド合成系 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) 経路に含まれる 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphate (HMBPP) synthase (IspG) と HMBPP reductase (IspH) の 2 つの Fe-S タンパク質が必須と示唆された (Fig. 9, Fig. 10)。イソプレノイドは、イソプレンを単位とするテルペン化合物(テルペノイド)の総称で、メナキノンやバクトプレノールなどを含む必須成分である。そのため、Fe-S クラスター合成系を破壊すると、IPP と diphosphomevalonate (DMAPP) が合成できなくなり、致死となることが予想された。枯草菌や大腸菌など多くのバクテリアでは、イソプレノイドは Fe-S タンパク質 (IspG と IspH) が関与する MEP 経路により合成されるが、一方、真核生物や放線菌などの一部のバクテリアは、全く異なるメ MVA 経路によって、合成されている (Kuzuyama, 2017)。この MVA 経路に Fe-S タンパク質は関与していない。また最近では、大腸菌において、放線菌由来の MVA 経路の遺伝子群を導入しておく、Fe-S クラスターの生合成系を完全に欠損させても生育できること、その生育は培地に添加した MVA に完全に依存することが報告されている (Tanaka *et al.*, 2016)。そこで本研究では、枯草菌においても同様の方法で、Fe-S クラスター生合成系の必須性を回避し

て、*suf* 様オペロンを破壊できるかどうか検討することにした。

放線菌の MVA 経路の遺伝子群は、東京大学の葛山智久准教授から提供していただいたプラスミド (pBMV4) を用いて、枯草菌に導入した。このプラスミドには、放線菌の MVA 経路の 4 つの酵素 (MVA kinase、PMVA kinase、DPMVA decarboxylase、IPP isomerase) の遺伝子それぞれが、枯草菌内で適切に翻訳されるように人工的な SD 配列 (GGAGGTTGTTTT) を付加して PCR で増幅され、IPTG 誘導性の P<sub>spac</sub> プロモーターの下流にクローニングされている。

本研究では、標的とする枯草菌 *sufCDSUB* それぞれの遺伝子のコード域 (またはオペロン全体) をスペクチノマイシン耐性遺伝子 (Sp<sup>r</sup>) と置換することにより欠失させることにした。まず、標的遺伝子上流域 (約 800 bp またはそれ以上) と Sp<sup>r</sup>、標的遺伝子下流域 (約 800 bp またはそれ以上) の 3 種類を PCR で増幅し、これらの DNA 断片を 2 段階目の PCR によって融合した (Fig. 7)。枯草菌 168 株に、まず MVA 経路の 4 種類の遺伝子を持つ pBMV4 プラスミドを導入してイソプレノイド生合成経路を改変し、ついで、PCR で作成した破壊用の Sp<sup>r</sup> カセットを導入した (Fig. 8)。

LB 培地では (MVA とグルコースを添加しても) 形質転換体が得られなかったため、種々の培地を検討したところ、MVA とグルコース、ピルビン酸を含む富栄養培地 (2×YT complete 培地) において、2~3 日で小さなコロニーが出現した。このとき、スペクチノマイシン (Sp) を比較的高濃度 (200 µg/ml) 添加すると、偽陽性コロニーの出現を抑えることができた。コロニー PCR によって調べたところ、相同組み換えから予想される長さのバンドが検出され、目的の遺伝子が Sp<sup>r</sup> と置換していることを確認することができた。こうして、枯草菌  $\Delta$ *sufCD* 株 (NY018)、 $\Delta$ *sufB* 株 (NY012)、 $\Delta$ *sufSU* 株 (NY004)、

$\Delta$ *sufCDSUB* 株 (NY027)、の 4 種類の破壊株を構築することができた (Fig. 11)。

しかし、これらの破壊株はいずれも、従来の二段階培養法 (Anagnostopoulos and Spizizen, 1961) やエレクトロポレーション法 (Cao *et al.*, 2011) では形質転換することができなかった。関連遺伝子群を操作するためには遺伝子導入が不可欠であるため、新たな形質転換法を検討することにした。近年、枯草菌のコンピテンスの主要制御因子である ComK を人為的に発現させることによって、形質転換能を発現させる方法が報告されている (Zhang and Zhang, 2011)。この枯草菌 1A976 株 (BGSC ID、原著論文では SCK6 株) では、ゲノム上の *lacA* 遺伝子内に、キシロース誘導性プロモーター ( $P_{xyIA}$ ) で制御できる *comK* と Em 耐性遺伝子が導入されており、富栄養培地においてもキシロースを添加するだけでコンピテンスを発現することができる。そこで本研究では、この改変株からゲノム DNA を抽出し、枯草菌 168 株に導入して Em 耐性株を選択することで、 $P_{xyIA}$  *comK* 領域を移行させた。この株 (NY105) をホストとして、上記のようにまず放線菌由来の MVA 経路の遺伝子群をクローン化したプラスミド (pBMV4  $Nm^r$ ) を導入し、次いで *suf* 様オペロンを破壊するための  $Sp^r$  カセットを導入して形質転換することで、新たに *suf* 様オペロン破壊株を構築し直した。これらの形質転換体で標的の遺伝子が  $Sp^r$  と置換しているかどうか、コロニーPCRによって調べた (Fig. 12)。図に示すプライマーセットを用いて PCR を行ったところ、 $Sp^r$  耐性コロニーのほぼ全てにおいて、相同組換えから予想される長さのバンドが検出され、目的の遺伝子が  $Sp^r$  と置換していることを確認することができた。こうして、枯草菌  $\Delta$ *sufC* 株、 $\Delta$ *sufD* 株、 $\Delta$ *sufS* 株、 $\Delta$ *sufU* 株、 $\Delta$ *sufB* 株、 $\Delta$ *sufSU* 株、 $\Delta$ *sufCDSUB* 株の 7 種類の破壊株を構築することができた (Fig. 11)。なお、以下に述べる破壊株の性質は、 $P_{xyIA}$  *comK* 領域を付加しても全く変化がないことを確認している。



### 1.3.2 *suf* 様オペロン破壊株の表現型（富栄養培地における生育）

構築した破壊株のうち、5種類の個別破壊株とオペロン全体の欠失株を用いて、2×YT complete 培地での生育を観察した。寒天培地における生育を比較したところ、*suf* 様オペロンの破壊株はどれも野生株に比べてゆっくりと生育し、1~2日で小さなコロニーを形成した (Fig. 13)。これらのコロニーは10日程度で溶菌し、植え継げなくなった。また、胞子を形成することもできなくなった。液体培養における対数増殖期での倍加時間を比較すると、野生株の約26分に対して、破壊株では約87分から約105分と3~4倍遅くなっていた (Fig. 14)。なお、*suf* 様オペロンの6種類の破壊株の間では、コロニーの生育速度や液体培養における倍加時間・到達濁度のいずれにおいても有意な違いは見られなかった。

MEP 経路の 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase をコードする *dxr* 遺伝子を、pMUTIN を用いて破壊した枯草菌変異株 (*dxr::Em<sup>r</sup>*) (東京大学の葛山智久准教授から供与) と生育を比較してみたところ、2×YT complete 培地における生育速度は、野生株 > *dxr* 破壊株 > *suf* 様オペロン破壊株の順であった (データは示していない)。一方、培地から MVA を除いた (添加しなかった) 場合には、*suf* 様オペロンの破壊株はどれも全く生育することができず (Fig. 13)、この MVA 要求性は *dxr* 破壊株と一致した。この結果は、*suf* 様オペロンの破壊株では *dxr* 破壊株と同様に、MVA からイソプレノイドを合成しなければ生育できないこと、すなわち、枯草菌に本来備わっている MEP 経路が全く機能していないことを示している。MEP 経路の2つの Fe-S 酵素、IspG と IspH に [4Fe-4S] クラスターが形成されず、機能不全となっていることが原因と考えられる。MVA を含む培地で、*suf* 様オペロン破壊株の生育が *dxr* 破壊株に比べて遅いのは、MEP 経路だけでなく、他の Fe-S タンパク質にも影響が及んでいるためと推定された (後述)。

*suf* 様オペロン破壊株の生育は、2×YT complete 培地からグルコースまたはピルビン酸のどちらか一方を除くと、より遅くなった。グルコースとピルビン酸を同時に除くとさらに遅くなったが、小さなコロニーが観察でき、全く生育できないというわけではなかった (Fig. 13)。枯草菌の野生株は、嫌気条件下においても、グルコースとピルビン酸を含む 2×YT complete 培地で、発酵によってゆっくりと生育することができる。*suf* 様オペロンの 6 種類の破壊株について、嫌気条件で生育できるか検討したところ、どれも小さなコロニーがかろうじて観察できる程度で、ほとんど生育が認められなかった (Fig. 13)。すなわち、同じ培地であっても、好気条件下の方がはるかによく生育することが判明した。好気呼吸 (TCA 回路や電子伝達系) には種々の Fe-S タンパク質が関与しているが、この点については後で考察する。なお、嫌気条件下の生育においても 6 種類の *suf* 破壊株の間でほとんど違いは認められなかった。

### 1.3.3 *suf* 様オペロン破壊株における Fe-S 酵素の機能不全

5 種類の個別破壊株とオペロン全体の欠失株の MVA 要求性は、MEP 経路の 2 つの Fe-S 酵素 (IspG と IspH) にクラスターが形成されず、MEP 経路が機能不全になっていることに起因すると考えられる。次に、IspG / IspH 以外の Fe-S タンパク質の活性についても調べることにした。この実験では、保持するクラスターの種類や数が異なる 3 種類の Fe-S タンパク質、アコニターゼ (CitB)、コハク酸脱水素酵素 (SdhABC)、グルタミン酸合成酵素 (GltAB) の活性を測定した。アコニターゼは、TCA 回路でクエン酸をイソクエン酸に異性化する酵素で、活性中心として [4Fe-4S] クラスターを 1 つ持つ。コ

コハク酸脱水素酵素は、コハク酸をフマル酸に酸化して、メナキノン還元する酵素で [2Fe-2S] クラスタ、[3Fe-4S] クラスタ、[4Fe-4S] クラスタを 1 つずつ持っている。グルタミン酸合成酵素は、グルタミンと 2-オキシグルタル酸から 2 分子のグルタミン酸を合成する酵素で、[3Fe-4S] クラスタと [4Fe-4S] クラスタを 1 つずつ持つ。枯草菌は、炭素源や窒素源の有無に応じて、これらの酵素の発現を厳密に制御している (Fujita, 2009) ため、これらの酵素活性の測定には、通常、最少培地で培養した細胞の破砕液が用いられている。ただし本研究では、2×YT complete 培地で培養した枯草菌野生株において、低いながらも十分に有意な活性を検出することができた (アコニターゼ活性はグルコースとピルビン酸を含まない 2×YT complete 培地で培養したものに比べて約 1/40、グルタミン酸合成酵素の活性はグルタミン酸を含まない合成培地で培養したものに比べて約 1/25)。一方、*suf* 様オペロンの個別破壊株 ( $\Delta$ *sufC* 株、 $\Delta$ *sufD* 株、 $\Delta$ *sufS* 株、 $\Delta$ *sufU* 株、 $\Delta$ *sufB* 株) とオペロン全体の欠失株 ( $\Delta$ *sufCDSUB* 株) では、どの Fe-S 酵素の活性も検出限界以下であった (Fig. 15)。他方、コントロールとして、Fe-S クラスタを持たないリンゴ酸脱水素酵素の活性を測定したところ、どの破壊株でも野生株とほぼ同程度の活性がみられた。これらの結果から、枯草菌 *suCDSUB* それぞれの遺伝子産物はどれも Fe-S クラスタの形成に必須で、どれか 1 つでも成分が欠けるとアコニターゼやコハク酸脱水素酵素、グルタミン酸合成酵素の Fe-S クラスタが形成されず、機能できなくなると考えられる。

#### 1.3.4 *suf* 様オペロン破壊株の栄養要求性

大腸菌の場合、Fe-S クラスタ合成系を破壊した変異株 ( $\Delta$ *isc*  $\Delta$ *suf* 二重欠損株) は、

著しく栄養豊富な Superbroth にグルコースと MVA を添加した場合のみ、極めてゆっくりと生育することができる (Tanaka *et al.*, 2016)。これと比較すると、今回構築した枯草菌 *suf* 様オペロン破壊株の方が、はるかに生育速度が早い。そこで、枯草菌の破壊株は合成培地でも生育できるのではないかと考え、条件を検討した。

*suf* 様オペロン破壊株は、グルコースを含む最少培地では、MVA を添加しても全く生育出来なかった。そこで、枯草菌の 60 種の Fe-S タンパクの機能を見直したところ、いくつかのアミノ酸や、ヌクレオチド、ビタミン類 (チアミン、リポ酸、ビオチン、ニコチン酸) の生合成経路に Fe-S タンパクが関与すると推測できた (Fig. 9)。*suf* 様オペロン破壊株においては、これらの Fe-S 酵素が機能不全となり、上記のような分子の生合成経路が停止している可能性がある。そこで、グルコース、ピルビン酸、IPTG、MVA を添加した最少培地へ、さらに 20 種類のアミノ酸、4 種のプリン・ピリミジン、4 種のビタミン類を加えて培養したところ、*suf* 様オペロンの破壊株が生育できることが分かった。次いで、添加した物質の中で生育に必要な成分を特定する目的で、合成培地から一つずつ (あるいはいくつかをまとめて) 除去してみることにした。

まず、プリン・ピリミジンに対する要求性の検討を行った。アデニン、グアニン、ウラシル、チミジンを一つずつ、またはプリン (アデニンとグアニン) をまとめて合成培地から除去し、野生株と  $\Delta$ *sufCDSUB* 株の生育を測定した (Fig. 16A)。野生株の生育は、プリンやピリミジンの添加の有無でほとんど変化がなかった。一方、 $\Delta$ *sufCDSUB* 株は、プリン塩基の場合アデニン・グアニンのどちらか一方が培地に存在する場合は生育したが、アデニンとグアニンの両方を培地から除去した場合には生育しなくなった。ピリミジン塩基の場合、破壊株はチミジンを除去しても生育したが、ウラシルを除去すると (チミジンが存在してもしなくても) 生育しなかった。

アミノ酸についても同様に要求性の検討を行った。この実験では、各アミノ酸を一つずつ、またはメチオニンとシステイン、グルタミンとグルタミン酸を共に、合成培地から除去して培養を行った。トリプトファンは、枯草菌 168 株では必須のアミノ酸であるため、全ての培地に含めている。野生株は、合成培地からどのアミノ酸を除去した場合でも生育した (Fig. 16B)。一方、*suf* 様オペロンの破壊株は、イソロイシン、ロイシン、バリンをそれぞれひとつずつ除去した場合に、ほとんど生育しなくなった。システインとメチオニンについては、それぞれひとつずつ除去した場合、全てのアミノ酸を含む場合に比べて濁度やや減少する程度であった。しかし、システインとメチオニンを共に培地から除去した場合には、生育が認められなくなった。グルタミンとグルタミン酸についても同様に、どちらか一方を除去した場合には生育できるが、両方同時に除去すると生育しなくなった (Fig. 16B)。これらの栄養要求性と Fe-S 酵素の関係については後で考察する。本研究では、チアミン、リポ酸、ビオチン、ニコチン酸についても要求性を検討してみたが、生育に対する影響を再現性よく観察することはできなかった。これらのビタミン類はごくわずかな量しか用いられないため、前培養から持ち込まれた量で、ある程度まかなえるのではないかと考えている。

### 1.3.5 *suf* 様オペロン破壊株の形質転換

*suf* 様オペロン破壊株で人為的に ComK を発現させることによって、形質転換させることが可能かどうか、 $\Delta$ *sufSU* 株を用いて以下のように検討した。形質転換には、シャトルベクター (pHCMC05) に枯草菌の *sufSU* をクローン化したプラスミド (pHCMC05-*Bs sufSU*) を用いた。*suf* 様オペロン破壊株の生育は、MVA の添加に完全に依存している

が、このプラスミドが導入されて *sufSU* の欠失が相補されると、MVA を添加しない培地でも生育できるように回復すると予想される。そこで、MVA を含まない培地でのコロニー数を形質転換の指標とすることにした。 $\Delta$ *sufSU* 株を 2×YT complete 培地で培養し、1%キシロースを添加することによって ComK を過剰発現させ、これに pHCMC05-*Bs sufSU* を加えてインキュベートし、MVA を含まない培地に撒いたところ、翌日にはコロニーが出現した。このコロニーは、MVA がなくても野生株並みの早さで生育したことから *sufSU* 欠失の表現型が相補されたと考えられる (Fig. 17A)。また、pHCMC05 ベクター上のプライマーを用いたコロニーPCR によって、確かに pHCMC05-*Bs sufSU* プラスミドが導入された形質転換体であることを確認した (データは示していない)。

この形質転換法では、キシロース添加後の誘導時間 (DNA 添加までの時間) が形質転換効率に大きく影響することがわかった。すなわち、誘導時間は 1 時間をピークにして、2 時間、3 時間と長くなるにつれて得られる形質転換体数は減少し、5 時間以上誘導すると全く形質転換体を得られなくなった (Fig. 17B)。ここでは $\Delta$ *sufSU* 株のデータのみを示しているが、ほかのどの *suf* 様オペロン破壊株においても同様に、ComK を人為的に過剰発現させることによって形質転換が可能になった。ただし、理由は不明だが形質転換効率は著しく低く、約 1  $\mu$ g 程度のプラスミドを用いても得られた形質転換体は 10 個以下であった。

*sufCDSUB* オペロン全体、またはそれぞれの *suf* 遺伝子を個別に pHCMC05 ベクターにクローン化し、対応する破壊株に導入したところ、どの形質転換体も (MVA を含まない培地でも) 枯草菌野生株と同様に生育した (Fig. 18, Fig. 23)。このように表現型が完全に相補されたことから、*Sp<sup>r</sup>* カセットを挿入した破壊株において、下流遺伝子の発現が影響を受けるといった極性効果はほとんどないものと考えられる。

以前の研究で、大腸菌において、 $\Delta isc \Delta suf$  二重欠損株がピロリ菌由来の *nifSU* によって相補できることが示されている (Tokumoto *et al.*, 2004)。そこで、pHCMC05 にピロリ菌の *nif* オペロン (*nifSU*) をクローン化し、枯草菌  $\Delta sufCDSUB$  株に導入したところ、形質転換体は MVA に依存せずに生育できるようになった。この結果は、枯草菌の *sufCDSUB* オペロンが欠失していても、ピロリ菌の NIF マシナリーによって Fe-S クラスタ形成が代行できることを示している。

## 1.4 考察

### 1.4.1 SUF 様マシンナリーは枯草菌で唯一の Fe-S クラスター生合成として機能する

本章では、枯草菌の *suf* 様オペロンの破壊株を初めて構築し、その性質について解析した結果を示した。枯草菌の生存に必須な Fe-S タンパク質、IspG/IspH をバイパスするために、放線菌由来の MVA 経路の 4 遺伝子を導入してイソプレノイド生合成系を改変することで、枯草菌の *sufCDSUB* オペロンの必須性もまた回避することができた。構築した *suf* 破壊株はどれもゆっくりと生育し、MVA に対して厳格に要求性を示した。また、破壊株においては、アコニターゼ、コハク酸脱水素酵、グルタミン酸合成酵素といった Fe-S 酵素の活性がどれも検出限界以下となった。これらの表現型は、*suf* 様オペロンの個別破壊株 ( $\Delta$ *sufC* 株、 $\Delta$ *sufD* 株、 $\Delta$ *sufS* 株、 $\Delta$ *sufU* 株、 $\Delta$ *sufB* 株) とオペロン全体の欠失株 ( $\Delta$ *sufCDSUB* 株) で共通して観察されたことから、*sufCDSUB* オペロンの 5 種類の遺伝子産物はどれも同等に Fe-S クラスターの生合成に必須と考えられる。また、ピロリ菌由来の NIF マシンナリーは、これまで遺伝学的・生化学的な解析が進んでいる Fe-S クラスターの生合成系のひとつだが、ピロリ菌の *nifSU* によって枯草菌  $\Delta$ *sufCDSUB* 株の表現型が相補されたという結果は、枯草菌の SUF 様マシンナリーが実際に、アポ型タンパク質に対して広い特異性を持つ生合成系として機能することを示している。加えて当研究室では、大腸菌の  $\Delta$ *isc*  $\Delta$ *suf* 二重欠損株の表現型が枯草菌 *sufCDSUB* オペロンによって (部分的にはあるが) 相補されることが観察されており (大橋、2012 年修士論文)、このことから、枯草菌 SUF 様マシンナリーの機能は、基本的にピロリ菌の NIF マシンナリー、ならびに、大腸菌の ISC や SUF マシンナリーと同等と捉えることができる。



#### 1.4.2 *suf* 様オペロン破壊株の栄養要求性と Fe-S タンパク質の機能不全

*suf* 様オペロンの破壊株は、プリンやピリミジン塩基といくつかのアミノ酸に対して栄養要求性を示した (Fig. 16)。これらの結果を、生合成経路に含まれる Fe-S タンパク質の役割に基づいて考察する。プリンの生合成経路 (Fig. 19A) では、5-ホスホリボシル 1 $\alpha$ -ニリン酸 (PRPP) から 5-ホスホ- $\beta$ -リボシルアミンを合成する、アミドホスホリボシルトランスフェラーゼが [4Fe-4S] クラスターを持つ Fe-S タンパク質である (Smith *et al.*, 1994)。そのため、破壊株でこの酵素が機能しなくなると、アデニンとグアニンの共通の前駆体であるイノシンーリン酸 (IMP) を合成できなくなると考えられる。アデニンヌクレオチドとグアニンヌクレオチドは相互に変換可能なため、アデニンとグアニンのどちらか一方が培地に存在すれば、他方は不用になる。しかし、共に培地から除去してしまうとどちらも合成することができないため、生育できなくなると推測され、実験結果 (Fig. 16) と符合する。すなわち、破壊株ではアミドホスホリボシルトランスフェラーゼの [4Fe-4S] クラスターが形成されず、機能していないと考えられる。

ピリミジンの生合成経路 (Fig. 19B) では、ジヒドロオロト酸をオロト酸に変換する、ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼが、[2Fe-2S] クラスターを持つ Fe-S タンパク質である (Kahler *et al.*, 1999)。この酵素が機能しないと、ウリジンーリン酸 (UMP) が合成されず、ピリミジンヌクレオチド全体の合成が停止する。UMP から下流の合成経路には Fe-S タンパク質が存在しないため、ウラシルが存在すれば UMP に変換し、そこからシトシンやチミンを含むヌクレオチドの合成が可能である。一方チミジンからは、シトシンヌクレオチドやウラシルヌクレオチドへの変換経路がないため、培地にチミジンのみを添加した場合には、生育できなくなると推測される。実験結果 (Fig. 16A) は、代謝経路から推測される表現型とよく合致した。すなわち、*suf* 様オペロンの破壊株ではジヒド

ロオロト酸デヒドロゲナーゼの [2Fe-2S] クラスターが形成されず、機能していないと考えられる。

イソロイシン、バリンの合成経路 (Fig. 20) には、[4Fe-4S] クラスターを持つ、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼが関与している。この酵素は、イソロイシン合成では、2,3-ジヒドロキシ-3-メチル吉草酸から 2-オキシ-3-メチル吉草酸への変換、バリン合成経路では、2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸から 2-オキシイソ吉草酸への変換という、ふたつの反応を触媒することが知られている。また、ロイシンの合成経路には [4Fe-4S] クラスターを持つ、3-イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼが関与し、2-イソプロピルリンゴ酸から 3-イソプロピルリンゴ酸に変換する過程を触媒している。すなわち、今回 *suf* 様オペロン破壊株で観察された、イソロイシンとバリンに対する要求性はジヒドロキシ酸デヒドラターゼの機能不全、ロイシンに対する要求性は 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼの機能不全と捉えることができ、これらの酵素に [4Fe-4S] クラスターが形成されていないと考えられる。

システインとメチオニンの合成経路 (Fig. 21A) の上流には Fe-S タンパクである亜硫酸還元酵素が関与している。システインは、硫化物イオン ( $S^{2-}$ ) と O-アセチルセリンから、システイン合成酵素によって合成されるが、その硫化物イオンを亜硫酸還元酵素が供給している。そのため、亜硫酸還元酵素の [4Fe-4S] クラスターが形成されないと、システインのみならずメチオニンも合成できなくなる。システインとメチオニンは相互に変換可能であるため、どちらか一方が培地中に存在すると、他方に変換される。すなわち、システインとメチオニンを同時に除去した場合に破壊株が生育できなくなるという結果は、亜硫酸還元酵素の [4Fe-4S] クラスターが形成されず、機能不全になっていると考えて矛盾がない。

グルタミンと 2-オキシグルタル酸から 2 分子のグルタミン酸を合成するのは、[3Fe-4S] と [4Fe-4S] クラスタ、さらに FAD と FMN を含むグルタミン酸合成酵素である。この酵素は、グルタミン酸にアミノ基を結合させてグルタミンに変換するグルタミン合成酵素とともに窒素同化の鍵になっており、グルタミン酸合成酵素が機能しなければ、グルタミン酸が作れないだけでなく、グルタミン酸とグルタミンの総量を増加させることができなくなる (Fig. 21B)。グルタミン酸、グルタミンのどちらか一方を培地に添加した場合に、*suf* 様オペロン破壊株が生育できたのは、これらふたつが互いに変換可能なためである。どちらも培地に存在しない場合に生育できなくなるのは、グルタミン酸合成酵素の [3Fe-4S] と [4Fe-4S] クラスタが形成されない状態では、まずグルタミン酸が枯渇し、次いでグルタミンが枯渇するためと考えられる。

このように、枯草菌 *suf* 様オペロンの破壊株では、ピリミジン生合成経路におけるジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ、プリン生合成経路におけるアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ、バリンとイソロイシン生合成経路におけるジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、ロイシン生合成経路における 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ、含硫アミノ酸生合成における亜硫酸還元酵素、さらに窒素同化に関与するグルタミン酸合成酵素が機能不全になっていると考えられる。ただし、富栄養な 2×YT complete 培地では、必要なアミノ酸類とヌクレオチド類は 2×YT 培地の Tryptone と Yeast Extract から供給されるため、生育の律速にはならないと推定される。

#### 1.4.3 *suf* 様オペロン破壊株におけるエネルギー代謝

Fe-S クラスタが合成できなくなると、TCA サイクルや電子伝達系の Fe-S タンパク

質も機能できなくなるが、解糖系の酵素やピルビン酸脱水素酵素には Fe-S クラスターは含まれていない。2×YT 培地にはアミノ酸が多量に含まれているが、*suf* 様オペロンの破壊株では、アミノ酸の異化によって効率的に ATP を生成することができず、そのため、グルコースやピルビン酸に対する依存度が高くなったものと考えられる。枯草菌の呼吸鎖電子伝達系にはコハク酸脱水素酵素（電子伝達複合体 II）とシトクロム *bc* (Cyt *bc*) という 2 つの Fe-S タンパク質が関与している (Winstedt and von Wachenfeldt, 2000; Gyan *et al.*, 2006)。そのため、Fe-S クラスター生合成系が欠損すると、これらの電子伝達複合体が機能不全になり、電子の最終受容体として酸素を利用する酸素呼吸ができなくなるのではないかと予想していた。しかし実際は、嫌気条件よりも好気条件の方が良く生育した (Fig. 13) ことから、*suf* 様オペロンの破壊株は、培地中のグルコースとピルビン酸を利用して、酸素呼吸によって生育していると考えられる。酸素まで電子を伝達する経路は、以下のように推定できる (Fig. 22)。

枯草菌は、NADH を NAD<sup>+</sup> に酸化する NADH デヒドロゲナーゼ Type II (NDH Type II) を持っているが、これはミトコンドリアの複合体 I とは異なり、Fe-S クラスターの代わりに FAD を利用している (Bergsma *et al.*, 1982)。この酵素は NADH の電子をメナキノン (MQ) に渡してメナキノール (MQH<sub>2</sub>) へと還元する (Bergsma *et al.*, 1981)。枯草菌には、メナキノールの電子を直接酸素に渡して酸素を還元し、それに共役してプロトン輸送を行うシトクロム *aa*<sub>3</sub> (Cyt *aa*<sub>3</sub>) がある。また、Cyt *aa*<sub>3</sub> と同様の酸化還元反応を行うがプロトン輸送は行わないシトクロム *bd* (Cyt *bd*) も有している (Winstedt and von Wachenfeldt, 2000)。すなわち枯草菌では、Fe-S タンパク質である電子伝達複合体 III (Cyt *bc*) を介さなくても、NADH から O<sub>2</sub> まで電子を伝達する経路が存在しており、*suf* 様オペロンの破壊株ではこの経路が働いていると推定される。この経路によってプロトンの濃度勾配が形成されるだけでなく、解糖系によって生じた NADH を酸素依存的に再酸

化することができるため、好気条件において良く生育できるのだろう。TCA サイクルにおける 2 つの Fe-S 酵素（アコニターゼとコハク酸脱水素酵素）は機能しないため、好気条件では還元力の供給が不足する可能性があるが、この点は、培地に添加したピルビン酸からピルビン酸脱水素酵素の働きで NADH が供給され、埋め合わされると考えられる (Fig. 22)。

#### 1.4.4 Fe-S クラスター生合成系を持たない枯草菌

本研究では、枯草菌 *suf* 様オペロンの破壊株では、イソプレノイド生合成系の IspG と IspH の 2 種類の Fe-S 酵素に加えて、多くの Fe-S タンパク質が機能していないことを明らかにした。このことは、枯草菌 SUF 様マシンリーが多種多様なアポタンパク質に、[2Fe-2S]、[3Fe-4S]、[4Fe-4S] クラスターを供給していることを示している。すなわち、SUF 様マシンリーは、他の生物の ISC、SUF、NIF マシンリーと同様に、アポタンパク質に対する特異性の広い Fe-S クラスターの生合成系であると結論することができる。代謝系以外にも、Fe-S タンパク質の中には、遺伝子の発現制御や DNA 修復、RNA の修飾に関与するものも多い (Fig. 9) ため、*suf* 様オペロンの破壊株では、代謝調節の攪乱、変異率の増加、翻訳の効率や正確性の低下、といった様々な面で悪影響が生じている可能性がある。これらの影響が重なることによって、破壊株の生育速度の低下を招いていると考えられる。ただし、枯草菌に存在する 60 種類もの Fe-S の中で、生存に必須なのはイソプレノイド生合成系の IspG と IspH の 2 種類のみであり、この点は大腸菌と類似している。大腸菌は 140 種類以上の Fe-S タンパク質を有しており、その数は枯草菌の倍以上である。一般的に、大腸菌などの通性嫌気細菌や偏性嫌気細菌には Fe-S タン

パク質が多いという傾向が見られ、この傾向は、Fe-S クラスタ自体の酸素に対する不安定性と関連すると考えられている (Andreini *et al.*, 2017)

*suf* 様オペロン破壊株では ComK を人為的に過剰発現させることによって、形質転換がはじめて可能になった (ただし効率は著しく低い)。本章では、この形質転換系を利用することによって、欠失させた遺伝子をトランスに再導入すると表現型が相補できること、また、ピロリ菌由来の NIF マシナリーで SUF 様マシナリーの機能が代行できることを示した (Fig. 18)。第 2 章では、この実験系を用いて大腸菌の関連遺伝子を導入し、異種の成分の間で機能的な互換性があるかどうか、詳細に解析した結果を述べる。

## 第 2 章 Fe-S クラスタースト合成系の遺伝学的解析と進化的考察

## 2.1 序

第 1 章では、枯草菌のイソプレノイド生合成系を MEP 経路から MVA 経路へと代謝改変することで Fe-S クラスター生合成系の必須性を回避し、*sufCDSUB* オペロンを破壊した株を構築して、それらの性質について解析した。その結果、枯草菌では *sufCDSUB* にコードされる SUF 様マシンナリーが唯一の Fe-S クラスター生合成系として機能すること、さらに、このオペロンにコードされる 5 種類の成分はいずれもマシンナリーの機能に必須であることが明らかになった。また、*suf* 様オペロンの破壊株においては、キシロース誘導性プロモーターから *comK* を人為的に過剰発現させるという方法で、形質転換させることもできるようになった。本章では、これら枯草菌の破壊株を用いて異種間の相補実験を行い、枯草菌の SUF 様マシンナリーと大腸菌の ISC または SUF マシンナリーの成分との間の、機能的な関連性について検討した。また逆に、大腸菌の変異株に対して枯草菌の関連遺伝子を導入することで、相互の互換性を調べた。特に注目したのは、枯草菌 SUF 様マシンナリーに特徴的な成分、SufU の役割である。その結果、枯草菌の SufU の構造は大腸菌 IscU と相同だが、IscU のように Fe-S クラスターの新規形成部位として機能するのではなく、硫黄原子のキャリアとして機能することがわかった。本章の後半では、SufU と IscU との系統的な関係（分子進化）について解析した結果を述べる。



## 2.2 材料および実験方法

### 2.2.1 菌株と培養条件

使用した菌株を Table 1 に示す。

枯草菌変異株の培養は、第 1 章の『1.2 材料および実験方法』に記した方法で行った。

大腸菌変異株の培養には、LB 寒天培地、あるいは液体 Super broth (3.2% bacto tryptone、2% yeast extract、0.5% NaCl) を使用した。pUMV22 Sp<sup>r</sup> を保持する UT109、NT1401、NT2001 株の培養では、0.2 mM MVA (Sigma-Aldrich) と 0.4% グルコースを培地に添加した。必要に応じて、40 µg/ml Sp、50 µg/ml Km、50 µg/ml Ap、5 µg/ml Tc を添加した。

### 2.2.2 プラスミドの構築

本研究で使用したプラスミドとプライマーはそれぞれ、Table 2 と Table 3 に示す。

#### 枯草菌相補実験用プラスミド (pHCMC05 シリーズ) の構築

##### — pHCMC05-*Ec sufA*、-*Ec sufB*、-*Ec sufC*、-*Ec sufD*、-*Ec sufS*、-*Ec sufE*

大腸菌の *sufA*、*sufB*、*sufC*、*sufD*、*sufS*、*sufE* 断片は、それぞれがクローン化された pBBR プラスミド (後述) から XbaI と SacI 処理によって切り出し、pHCMC05-NMC の XbaI-SacI 部位にサブクローニングした。これらのプラスミドを、pHCMC05-*Ec sufA*、-

*Ec sufB*、*-Ec sufC*、*-Ec sufD*、*-Ec sufS*、*-Ec sufE* とした。

#### — pHCMC05-*Ec iscSU*、*-Ec sufSE*、*-Ec csdAE*

大腸菌 *iscSU* は pTOPO-*Ec iscSU* (後述) から XbaI と SmaI で処理して切り出し、pHCMC05 の XbaI-SmaI 部位にサブクローニングして、pHCMC05-*Ec iscSU* とした。大腸菌の *sufSE* または *csdAE* を含む断片は、それぞれ pTOPO-*Ec sufSE* または *-Ec csdAE* プラスミド (後述) から、SpeI 処理、T4 polymerase による平滑化、XbaI 処理によって切り出した。これらの断片を、pHCMC05 の XbaI-SmaI 部位にクローン化して、pHCMC05-*Ec sufSE* と *-Ec csdAE* を構築した。

#### — pHCMC05-*Ec sufSE* (*SufE*<sup>C51A</sup>)

*Ec sufE* への部位特異的変異 (C51A) 導入では、まず、pBBR-*Ec sufSE* プラスミド (後述) を鋳型として、Table 3 に示したプライマー (*Ec-sufE-C51A\_F* と *Ec-sufE-C51A\_R*) を用いて inverse PCR を行い、塩基置換を導入した (pBBR-*Ec sufSE\_C51A*)。変異を含む *Ec sufSE* 断片は、SacII と XbaI で処理して切り出した。pHCMC05 ベクターは、まず、KpnI で処理して T4 polymerase で平滑化し、ここに XbaI linker (Table 3) を挿入して、新たに XbaI サイトを付加した。これを SacII と XbaI で処理し、上述の変異 *Ec sufSE* を含む SacII-XbaI 断片をライゲーションして、pHCMC05-*Ec sufSE\_C51A* とした。

#### — pHCMC05-*Bs sufU* への部位特異的変異の導入 (*SufU*<sup>C41D</sup>、*SufU*<sup>C66D</sup>、*SufU*<sup>C128D</sup>、*SufU*<sup>D43C</sup>、*SufU*<sup>D43E</sup>)

第 1 章で構築した pHCMC05-*Bs sufU* を鋳型として、inverse PCR 法で部位特異的変異を導入した。使用したプライマー (*Bs-sufU-C41D\_F*、*Bs-sufU-C41A\_R*、*Bs-sufU-C66D\_F*、*Bs-sufU-C66A\_R*、*Bs-sufU-C128D\_F*、*Bs-sufU-C128A\_R*、*Bs-sufU-D43C\_F*、*Bs-SufU-*

D43E\_F、Bs-sufU-D43A\_R) は、Table 3 に示した。

## 大腸菌相補実験用プラスミド (pBBR・pRK シリーズ) の構築

### — pBBR-*Ec sufA*、-*Ec sufB*、-*Ec sufC*、-*Ec sufD*、-*Ec sufS*、-*Ec sufE*

大腸菌のゲノムを鋳型として、*sufA*、*sufB*、*sufS*、*sufE* を Table 3 に示したプライマーセット (EcSufA-F / EcSufA-R、EcSufB-F / EcSufB-R、EcSufS-F / EcSufS-R、EcSufE-F / EcSufE-R) を用いて、PCR で増幅し、まず、pCR2.1-TOPO ベクターへクローン化した。次いで NdeI と BamHI で処理して *suf* 遺伝子を含む断片を切り出し、それを pET21a (+) プラスミド (Novagen) にサブクローニングした。このプラスミドから XbaI と SacI で処理して切り出した断片を、同様の制限酵素で処理した pBBRMCS-4 (Kovach *et al.*, 1995) とライゲーションして、pBBR-*Ec sufA*、*Ec sufB*、-*Ec sufS*、-*Ec sufE* を構築した。pBBR-*Ec sufC* と -*Ec sufD* は、同様の方法で構築され、既に報告されているものを使用した (Wada *et al.*, 2009; Hirabayashi *et al.*, 2015)。

### — pBBR-*Ec sufSE*、-*Ec csdAE*、-*Ec iscSU*

大腸菌のゲノムを鋳型として、*sufSE* と *csdAE* を PCR で増幅した。プライマーはそれぞれ、*sufSF* と *sufER*、*csdAF* と *ygdKR* という組み合わせで使用した (Table 3)。PCR 産物を pCR2.1-TOPO ベクターへ TA クローニングし、それぞれを pTOPO-*Ec sufSE* と pTOPO-*Ec csdAE* とした。これらのプラスミドを、XhoI と NheI で制限酵素処理し、切り出した断片を XhoI と XbaI で処理した pBBRMCS-4 ベクターにサブクローニングして、pBBR-*Ec sufSE* と pBBR-*Ec csdAE* とした。大腸菌 *iscSU* は、プライマー *iscSF* と *iscUR-Sm* (Table 3) を用いて PCR で増幅した後、まず pCR2.1-TOPO ベクターへクローン化し

た (pTOPO-*Ec iscSU*)。これを XbaI と SacI で制限酵素処理し、切り出した *iscSU* 断片を、同様の処理をした pBBRMCS-4 とライゲーションして、pBBR-*Ec iscSU* を構築した。

#### — pBBR-*Bs sufSU*

pTOPO-*Bs sufSU* (第1章に記述) から、XhoI と NheI で処理して枯草菌 *sufSU* 断片を切り出し、それを XhoI と NheI で処理した pBBRMCS-4 にサブクローン化した。

#### — pBBR-*Bs sufC*、-*Bs sufD*、-*Bs sufS*、-*Bs sufU*、-*Bs sufB*

第1章で構築した pHCMC05-*Bs sufC*、-*Bs sufD*、-*Bs sufU*、-*Bs sufB* から XbaI と SacI で、枯草菌 *sufC*、*sufD*、*sufU*、*sufB* を切り出した。これらの断片を、同様の制限酵素で処理した pBBRMCS-4 とライゲーションして、pBBR- *Bs sufC*、-*Bs sufD*、-*Bs sufU*、-*Bs sufB* を構築した。枯草菌 *sufS* は、pHCMC05-*Bs sufS* から XhoI と SacI で切り出して、同様の制限酵素で処理した pBBRMCS-4 とライゲーションして、pBBR- *Bs sufS* を構築した。

#### — pRK-*sufA\_CDSE* ( $\Delta$ *sufB*)、-*sufAB\_DSE* ( $\Delta$ *sufC*)、-*sufABC\_SE* ( $\Delta$ *sufD*)、-*sufABCD\_E* ( $\Delta$ *sufS*)、-*sufABCDS* ( $\Delta$ *sufE*)、-*sufABCD* ( $\Delta$ *sufSE*)

pRKSUF017 プラスミドでは、大腸菌 *sufABCDSE* オペロンが pRKNSE (Nakamura *et al.*, 1999) にクローン化されている (Takahashi and Tokumoto, 2002)。また、pRKSUF017 の *sufB* または *sufS* のコード域に、終止コドンを含む PacI リンカーを挿入することによって、*sufB* または *sufS* を個別に破壊したプラスミド (それぞれ pRKSUF058, pRKSUF088) が構築されている (Takahashi and Tokumoto, 2002)。この pRKSUF058 を鋳型として、プライマー *sufA-RSc* と C-FSc2 を用いて inverse PCR で増幅し、SacI 処理とセルフライゲーションによって、*sufB* のみをインフレームで欠失させた。これを pRK-*sufA\_CDSE* (以

下、本文中では pRKSUF $\Delta$ sufB と表記する) とした。また、同様の方法で、pRKSUF088 を鋳型として inverse PCR (プライマー : D-RSc2 と E-FSc2) を行い、pRK-sufABCD\_E (pRKSUF $\Delta$ sufS) を構築した。pRKSUF $\Delta$ sufS を XbaI と SacI で処理して、pBBRMCS-4 へサブクローン化し、それをさらに KpnI と SacI 処理で切り出して pRKNMC に移したものを、pRK-sufABCD (pRKSUF $\Delta$ sufSE) とした。pRK-sufABCDS (pRKSUF $\Delta$ sufE)、pRK-sufABC\_SE (pRKSUF $\Delta$ sufD)、pRK-sufAB\_DSE (pRKSUF $\Delta$ sufC) は、既報のものを用いた (Takahashi and Tokumoto, 2002; Wada *et al.*, 2009; Hirabayashi *et al.*, 2015)。

### Error prone PCR によるランダム変異の導入

pBBR-Bs sufB を鋳型とし、BST3 と BST7 プライマー (Table 3) を用いてエラープロードン PCR を行い、ランダムな変異を導入した。PCR 断片を XbaI と SacI で処理し、同様の制限酵素処理をした pBBRMCS-4 とライゲーションした。このライゲーション産物を濃縮して形質転換に用いた。

### 2.2.3 IscU/SufU の系統解析

データベース MBGD (Microbial Genome Database for Comparative Analysis; <http://mbgd.genome.ad.jp/>) では、登録されている微生物のゲノムデータ (4742 ゲノム、最終更新日 2016 年 5 月 19 日) の中から代表的な生物系統/生物種のゲノムが予め選択されており (あるいは、任意に選択することができ)、その中でホモロジー検索をする

ことができる。また、生物のゲノムデータから代表的なオルソログがグループ化されている (Ortholog Cluster) ので、それらをそのまま系統解析に利用することもできる (Uchiyama *et al.*, 2013)。このデータベース上で、868 種類のゲノム配列 (デフォルト) に対して、大腸菌 IscU と枯草菌 SufU の 2 種類のアミノ酸配列を入力して BLAST 検索を行ったところ、720 種の遺伝子産物が有意な相同性を示した。ただし、MBGD がグループ化した IscU の Ortholog Cluster では、IscU のオルソログとして 673 種類のゲノム配列の中に 844 種の遺伝子産物がリストされていた (Cluster ID : O735)。BLAST 検索の結果よりも多くの相同配列が含まれていたため、Cluster O735 の配列を利用して系統解析を行うことにした。

Cluster O735 に含まれているアミノ酸配列の中で、大腸菌 IscU や枯草菌 SufU の配列とはかけ離れているもの (大幅に短縮された配列や、保存性の高い 3 残基の Cys のうち 2 つ以上を持たないもの) 50 種類を手動で除外して、653 種類のゲノム配列内の 794 種類のオルソログ配列を系統解析に用いることにした。また、これらの配列の中で、NifU の配列に対しては中央ドメインと C 末端ドメインの配列を手動で削除し、IscU/SufU に相同な N 末端ドメインの配列のみを用いることにした。これらの配列を、MEGA7 内の Clustal W (Gap penalty = 4) でアラインメントし、近隣結合法 (Neighbor-joining method) で系統樹を作成した。また、これら 653 種類のゲノム配列において、SUF マシナリーに特徴的な成分 (SufB, SufE) または ISC マシナリーに特徴的な成分 (HscB) がコードされているのかを調べ、その有無を系統樹の横に記した。さらに、IscU/SufU に相同な遺伝子の近傍にどのような遺伝子がコードされているか、MGDB を利用して Cluster O735 の Genome Region Map を作成し、1 つずつ検討した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 枯草菌の *suf* 様オペロン破壊株を用いた異種間相補解析

枯草菌の *sufCDSUB* オペロンと大腸菌の *sufABCDSE* オペロンを比較すると、多くの成分で高い相同性が認められる。SufS の場合はアミノ酸レベルで 48% 同一であり、SufB では 41%、SufC では 51%、SufD では 37%、それぞれ同一である (Fig. 6)。一方、枯草菌の SufU は大腸菌 ISC マシナリーの IscU と相同 (28%) だが、大腸菌 SUF マシナリーの残りの成分である SufA や SufE とは一次構造の類似性が見られない。ただし、枯草菌 SufU は不安定な Fe-S クラスターを持つことができるという点で大腸菌 SufA と共通点があり (Wada *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2009; Albrecht *et al.*, 2010)、また、大腸菌 SufE とは立体構造が類似している (Goldsmith-Fischman *et al.*, 2004)。そこで、枯草菌と大腸菌の関連する成分の間に機能的な互換性があるのか検討することにした。

大腸菌 *sufABCDSE* オペロンの 6 種類の遺伝子それぞれに人工的な SD 配列 (AAGGAGATATACAT) を付加させて、個別に pHCMC05-NMC シャトルベクターにサブクローニングした。大腸菌に比べて、枯草菌では SD 配列と 16S rRNA 内の anti-SD 配列との間で厳密に塩基対が形成されないと、翻訳が開始されないためである (Abolbaghaei *et al.*, 2017)。これらのプラスミドを、対応する枯草菌の *suf* 遺伝子の個別破壊株に導入して、表現型が相補できるかどうか検討することにした。

形質転換後、MVA を含む 2×YT complete 培地 (Cm 耐性で選択) と MVA を含まない培地に等量ずつプレーティングしてコロニーの現れる様子を比較したところ、枯草菌  $\Delta$ *sufD* 株に大腸菌 *sufD* を導入した場合、ならびに枯草菌  $\Delta$ *sufC* 株に大腸菌 *sufC* を導入

した場合に、形質転換体は MVA を含まない培地でも生育できるようになった。また、その生育速度は、枯草菌 $\Delta$ sufD 株や $\Delta$ sufC 株に枯草菌の *sufD*、*sufC* をそれぞれ再導入した場合とほとんど変わらず、野生株並みに回復していた (Fig. 23)。これらの結果は、枯草菌 SufD の機能が大腸菌 SufD によって、また枯草菌 SufC の機能が大腸菌 SufC によって代替できることを示している。一方、枯草菌 $\Delta$ sufS 株に大腸菌 *sufS* を導入した場合と、 $\Delta$ sufB 株に大腸菌 *sufB* を導入した場合には、形質転換体は MVA を含む培地でのみゆっくりと生育し、MVA が無ければ全く生育しなかった (Fig. 23)。すなわち、これらのタンパク質は枯草菌と大腸菌で保存性が高いにもかかわらず、異種間での相補性は認められなかった。また、枯草菌 $\Delta$ sufU 株に大腸菌の *iscU*、*sufA* または *sufE* を導入した場合も相補は観察できなかった (Fig. 23、ただし、*sufA*、*iscU* についてのデータは示していない)。

枯草菌の $\Delta$ sufS 株や $\Delta$ sufU 株が、大腸菌の関連遺伝子で相補されなかった原因の 1 つとして、システイン脱硫黄酵素とそのパートナータンパク質との特異的相互作用に着目した。大腸菌は *IscS*、*SufS*、*CsdA* という 3 種類のシステイン脱硫黄酵素を保持しており、それぞれのパートナータンパク質である *IscU*、*SufE*、*CsdE* へ特異的に硫黄原子を受け渡すことが知られている (*IscS* については、*IscU* の他にも、*ThiI*、*TusA*、*MoaD* へ硫黄原子を渡すことができる)。これらシステイン脱硫黄酵素とパートナータンパク質との間の相互作用にクロストークはみられない (Outten *et al.*, 2003; Tokumoto *et al.*, 2004; Loiseau *et al.*, 2005)。なお、*CsdA* と *CsdE* はそれぞれ *SufS* と *SufE* によく似たタンパク質だが、Fe-S クラスターの生合成ではなく、tRNA の修飾 (cyclic N<sup>6</sup>-threonylcarbamoyladenosine の形成) に関与している (Miyauchi *et al.*, 2013)。枯草菌は *SufS* に加えて 3 種類のシステイン脱硫黄酵素を保持しているが、それぞれの酵素とパートナータンパク質との相互作用は、大腸菌と同様、特異的と考えられている。例えば、シス



テイン脱硫黄酵素のひとつ NifZ は ThiI タンパク質に特異的に硫黄を渡すことで tRNA の硫黄修飾 (s<sup>4</sup>U tRNA 合成) に関与している。同様に、s<sup>2</sup>U tRNA 合成に関与するシステイン脱硫黄酵素 YrvO とそのパートナーである MnmA の関係も特異的である (Rajakovich *et al.*, 2012; Black and Dos Santos, 2015a; Black and Dos Santos, 2015b)。

そこで、大腸菌の *sufS* と *sufE*、*csdA* と *csdE* または *iscS* と *iscU* をそれぞれ、2 遺伝子ずつのペアにしてシャトルベクター pHCMC05 につなぎ、枯草菌  $\Delta$ *sufS* 株または  $\Delta$ *sufU* 株に導入して、相補能を検討した。枯草菌  $\Delta$ *sufS* 株に pHCMC05-*Ec csdAE*、または -*Ec iscSU* をそれぞれ導入した場合は、空ベクターの場合と同様、全く相補能が見られなかった (データは示していない) が、pHCMC05-*Ec sufSE* を導入した場合には、MVA を含まない培地でも生育できるようになり、相補能が観察できた (Fig. 23)。同様に、枯草菌  $\Delta$ *sufU* 株の場合も、pHCMC05-*Ec csdAE*、または -*Ec iscSU* では相補できなかったが、-*Ec sufSE* を導入した場合には相補能が認められた (Fig. 23)。これらの結果は、枯草菌の SufS と SufU という 2 成分の機能は、大腸菌の SufS と SufE とのペアによって代替することができるが、大腸菌の IscS と IscU (SufU ホモログ) のペア、または CsdA と CsdE のペアでは代替できないことを示している。この点をさらに確認するため、枯草菌  $\Delta$ *sufSU* 株を用いて同様の相補実験を行った。枯草菌  $\Delta$ *sufSU* 株においても枯草菌の *sufSU* を pHCMC05-*Bs sufSU* プラスミドの形で再導入すると、表現型が野生株に回復した。この変異株に、大腸菌の *sufSE* または *iscSU*、*csdAE* を導入して相補能を検討したところ、*sufSE* のみが相補能を示した (Fig. 23)。また、大腸菌 *sufSE* を導入した相補株の生育は、枯草菌 *sufSU* を戻した場合とくらべてほとんど遜色がなかった。

大腸菌の SufE は、硫黄原子を persulfide (-SSH) の形で Cys51 の側鎖に結合して、SufS から SufBCD 複合体まで運搬することが知られている (Outten *et al.*, 2004; Singh *et al.*,

2013)。そこで、大腸菌 *sufSE* の中の SufE\_Cys51 を部位特異的に Ala に置換して枯草菌  $\Delta$ *sufSU* 株に導入したところ、形質転換体は MVA を含まない培地では生育することができず、相補能が消失した。大腸菌 SufE の Cys51 は、枯草菌細胞内で機能する際にも必須であることを示している。したがって、大腸菌の *sufSE* を導入した相補株では、大腸菌の SufS から大腸菌 SufE の Cys51 に硫黄原子が渡され、さらに枯草菌の SufBCD 複合体に渡されて、Fe-S クラスタが新規に形成すると考えられる。枯草菌の  $\Delta$ *sufS* 株に大腸菌の *sufS* を導入しても相補されなかったのは、大腸菌 SufS と枯草菌 SufU との間で相互作用できないことが原因だろう。同様に、枯草菌  $\Delta$ *sufU* 株が大腸菌 *sufE* で相補されなかったのは、枯草菌 SufS と大腸菌 SufE との間の相互作用に支障があるためと考えられる。一方、相補の見られなかった他の組み合わせでは、大腸菌の IscU または CsdE と枯草菌の SufBCD 複合体との間の相互作用に支障がある可能性が高い。

### 2.3.2 大腸菌変異株用いた異種間相補解析

大腸菌 UT109 変異株 (Tokumoto *et al.*, 2004) は、ゲノム上の *suf* オペロンと *isc* オペロンを二重に欠失している ( $\Delta$ *sufABCDSE*  $\Delta$ *iscUA-hscBA*)。この変異株に、MVA 経路の遺伝子群がクローン化された pUMV22 Sp<sup>r</sup> プラスミドを導入しておく、MVA 存在下でのみ生育させることができる (Tanaka *et al.*, 2016)。大腸菌 *suf* オペロンの発現は、通常の生育条件では抑えられている (Outten *et al.*, 2004; Jang and Imlay, 2010) が、*Plac* プロモーター下に *sufABCDSE* を組み込んだプラスミド (pRKSUF017) を UT109 株に導入すると、野生株と同等に生育させることができる。そこで本研究では、この pRKSUF017 プラスミドから *suf* 遺伝子のコード域をひとつずつ (または *sufSE* の 2 遺伝子をまとめ

て) 欠失させた 6 種類のプラスミド (pRKSUF $\Delta$ sufB、 $\Delta$ sufC、 $\Delta$ sufD、 $\Delta$ sufS、 $\Delta$ sufE、 $\Delta$ sufSE) を構築し、利用することにした。これらのプラスミドを導入した UT109 細胞をそれぞれ、 $\Delta$ sufB、 $\Delta$ sufC、 $\Delta$ sufD、 $\Delta$ sufS、 $\Delta$ sufE、 $\Delta$ sufSE と表すことにする。これらの変異株に、suf オペロンのメンバーが揃うように別のプラスミド (pBBR) で遺伝子を導入すると (例えば、 $\Delta$ sufB 株の場合は pBBR-sufB を導入)、MVA を含まない培地でも野生株と同様に生育することができるようになった (Fig. 24)。

これら大腸菌の  $\Delta$ suf 株に対して枯草菌の対応する遺伝子を導入して、異種間での相補が可能か検討した。大腸菌の  $\Delta$ sufC 株と  $\Delta$ sufD 株に、それぞれ枯草菌の *sufC* と *sufD* を導入すると MVA が無い培地でも生育できるように回復した。ただし、枯草菌 *sufC* を導入した相補株の生育は遅く、相補は部分的であった (Fig. 24)。一方、大腸菌の  $\Delta$ sufB、 $\Delta$ sufS、 $\Delta$ sufE にそれぞれ、枯草菌 *sufB*、*sufS*、*sufU* を導入した場合には、相補性は見られなかった。ただし、 $\Delta$ sufS、 $\Delta$ sufE、 $\Delta$ sufSE 株のそれぞれに、枯草菌の *sufSU* をペアにして導入すると生育は回復し、相補性が認められた (Fig. 24)。これらの結果は、2.3.1 で述べた枯草菌変異株における異種間相補実験での結果とよく一致した。

以前 Marahiel のグループは、*in vitro* の実験で、枯草菌 SufU に Fe-S クラスタが再構成できることから、SufU は大腸菌 IscU と同様に Fe-S クラスタ新規形成の足場として機能するという可能性を提唱している (Albrecht *et al.*, 2010; Albrecht *et al.*, 2011)。しかし、『2.3.1 枯草菌の *suf* 様オペロン破壊株を用いた異種間相補解析』では、大腸菌 *iscSU* は、枯草菌  $\Delta$ sufSU 株を相補することができなかった。そこで次に、大腸菌 IscU の機能を、枯草菌 SufU が代替できるのかについて検討することにした。具体的には、pUMV22 Sp<sup>r</sup> を持つ大腸菌変異株 NT1401 ( $\Delta$ iscS  $\Delta$ sufABCDSE) あるいは NT2001 ( $\Delta$ iscU  $\Delta$ sufABCDSE) に、枯草菌 *sufSU* をプラスミドの形で導入した。枯草菌 SufSU が大腸菌

IscSU の機能を代替できれば、MVA を含まない培地でも生育できるようになると考えたが、好気条件・嫌気条件どちらにおいても相補性はみられなかった (Fig. 25)。これらの結果をまとめると、枯草菌 SufSU については、大腸菌 SufSE との間には機能的な互換性があるが、大腸菌 IscSU との間には互換性は見られないということになる。

### 2.3.3 SufB の種特異性を変化させるサプレッサー変異

上記のように、枯草菌と大腸菌を用いて双方向から異種間相補解析を行ったところ、SufC と SufD はそれぞれ枯草菌と大腸菌の間で入れ替えることができたので、機能的な互換性があると考えられる。しかし、SufB では、枯草菌と大腸菌の間で 41% という高い相同性あるにもかかわらず (Fig. 6)、互換性が認められなかった (Fig. 23, Fig. 24)。そこで、枯草菌 *sufB* にエラープローン PCR によってランダムな変異を導入し、大腸菌  $\Delta$ *sufB* を相補するサプレッサー変異が得られるか検討した。数千の形質転換体について調べてみると、MVA を含まない培地でも (ゆっくりとはあるが) 生育できるように変化したものが 29 種類現れた。それらからプラスミドを回収して塩基配列を解析したところ 5 種類の変異が見つかり、それぞれ SufB の中に 1 アミノ酸置換が生じていた。Met312Lys または Val354Ala、Asp376Ala、Asp387Gly、Ile464Thr のいずれかの置換である。変異の入ったプラスミドを大腸菌  $\Delta$ *sufB* 株に再導入してみると、初めに得られたコロニーと同様に、MVA を含まない培地でもゆっくりと生育し、部分的な相補性を示した (Fig. 26)。これらの実験から、上記のアミノ酸置換がサプレッサー変異の要因であると特定することができた。また逆に、当研究室の陳によって、枯草菌  $\Delta$ *sufB* を相補できるように変化させる大腸菌 SufB 内のサプレッサー変異 (Lys484Arg) も同定された。(陳、

2018年修士論文)。したがって、枯草菌と大腸菌の SufB は、いずれも 1 つのアミノ酸が置換すれば、種の壁を越えて互いに代替できるようになることが分かった。

#### 2.3.4 枯草菌 SufU で保存されたアミノ酸の機能性

IscU と SufU の間では、3 残基の Cys と 1 残基の Asp が保存されている (Fig. 4)。これらの残基は、IscU において Fe-S クラスターの新規形成部位として機能するために必須であり、他の 19 種類に置換すると機能できなくなる (Johnson *et al.*, 2006; 田中 2016 年博士論文)。本研究では、修士 2 年の寺畑と共同して、大腸菌 IscU の必須残基に対応する枯草菌 SufU のアミノ酸残基 (Cys41、Cys66、Cys128、Asp43) を他のアミノ酸に置換し、枯草菌  $\Delta$ sufU 株へ再導入して、それらの機能性を相補実験で評価した。

第 1 章でも述べたように、枯草菌  $\Delta$ sufU 株に、野生型 sufU をプラスミドの形で再導入すると、培地に添加した MVA の有無にかかわらず生育できるようになり、その表現型は完全に相補される (Fig. 23)。SufU の Cys41 と Cys66 (大腸菌 IscU の Cys37 と Cys63 に対応) をそれぞれ、Ser、Asp、His へ置換した場合、形質転換体は MVA を含む培地でのみ生育し、相補性は見られなくなった (Fig. 27, 寺畑、2018 年修士論文)。一方、Cys128 (大腸菌 IscU の Cys106 に対応) を Asp に置換したところ、MVA の無い培地でもゆっくりと生育し、枯草菌の sufU 欠失を部分的にはあるが相補することができた。また、Asp43 (大腸菌 IscU の Asp39 に対応) を、Glu あるいは Cys に置換した場合には、野生株並みに生育でき、表現型が完全に相補された (Fig. 27)。したがって、枯草菌の SufU では、Cys128 と Asp43 をそれぞれ他のアミノ酸に置換しても、(程度は異なるが) その

機能が維持されることがわかった。大腸菌 IscU で必須な 4 残基のうち、枯草菌 SufU では、少なくともこれら 2 残基は必須ではないことを示している。したがって、大腸菌 IscU と枯草菌 SufU では、これらのアミノ酸残基（大腸菌 IscU の Cys106 と Asp39、枯草菌 SufU の Cys128 と Asp43）の機能的な重要性は異なると考えられる。

### 2.3.5 IscU/SufU の分子系統解析

データベース MGD (<http://mbgd.genome.ad.jp/>) を利用して、653 種類のゲノム配列（真正細菌 559 種、古細菌 55 種、真核生物 39 種を含む）から、IscU/SufU に相同な 794 種類の配列を取得した。これらの配列について近隣結合法 (Neighbor-joining method) で系統樹を作成したところ、根元で大きく 2 つに分岐しており (Group 1 と 2)、その 2 つのグループはそれぞれ 3 つ (a、b、c) のサブグループに分けることができた (Fig. 28)。

Group 1a (IscU サブファミリー) には、214 個の遺伝子産物（全体の 27%）が分類された。このグループでは、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -プロテオバクテリアが大多数を占めており、その他のバクテリアとしては、 $\delta$ -proteobacteria の一部、Acidobacteria の一部、Bacteroidetes の一部、Chlorobi の一部、Nitrospirae が含まれていた。これらバクテリアのほとんどでは *iscU* 遺伝子の周辺に、ISC マシナリーの他の成分をコードする遺伝子群 (*iscS*、*iscA*、*hscB*、*hscA*、*fdx*) がコードされている。したがって、このサブファミリーに属する IscU は、典型的な ISC マシナリーにおける中心成分として Fe-S クラスター新規形成の機能を担うと考えられる。ただし、興味深いことに、 $\beta$ -プロテオバクテリアのごく一部 (*Zinderia insecticola*、*Tremblaya princeps*、*Nasuia deltocephalinicola*、*Castellaniella*

*defragrans*, *Pusillimonas* sp.) では、*hscB* 遺伝子がゲノムから欠落していた。*HscB* は J ドメインを持つコシャペロンで、*Hsp70* ファミリーに属する分子シャペロン *HscA* と協調して、*IscU* と特異的に結合する成分である (Kim *et al.*, 2012)。*HscA* は *IscU* 内の LPPVK 配列に結合することが知られているが、*Z. insecticola*, *N. deltocephalinicola*, *C. defragrans* の *IscU* ではそれぞれ、LSPIK、LAADK、LPIIK に変化していた (*T. princeps*, *Pusillimonas* sp. の *IscU* では LPPVK 配列は保存されている)。*HscA-HscB* は大腸菌 ISC マシナリーの必須成分だが、最近の研究では、*IscU* 内の点変異によってそれらの機能がバイパスされることが示されている (Tanaka *et al.*, 2016)。したがって、*HscB* を持たない生物であっても、*IscU* ホモログが Fe-S クラスターの新規形成部位として機能することは十分に考え得る。一方、真核生物の *IscU* ホモログ (*Isu/ISCU*) は全て、このサブファミリーに分類され、これらホモログのいくつかはミトコンドリアやマイトソームにおいて ISC マシナリーの成分として機能することが実験的に示されている (Mühlenhoff *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 2003; Tong and Rouault, 2006)。ただし、真核生物においても、*HscB* のホモログがゲノムに見当たらない場合があった (*Dictyostelium discoideum*, *Babesia bovis*, *Neospora caninum*, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*)。真核生物の *HscB* は保存性が低いいため、BLAST 検索で同定できなかったのかもしれない。

NIF マシナリーの主要成分である *NifU* は、*IscU* に相同な N 末端ドメインと *Fer2\_BFD* ドメインと呼ばれる中央ドメイン、C 末端の *Nfu* ドメインから構成されている。本研究では、中央ドメインと C 末端ドメインの配列を削った後に系統解析を行ったが、それらの配列は全て Group 1b の単系統に分類された。この *NifU* サブファミリーには、81 の配列 (全体の 10.2%) が含まれている。

Group 1c (*IscU*-like サブファミリー) には、147 種類の配列 (全体の 18.5%) が含まれ

ているが、この Group 1c は複数の系統から構成されており、配列にも多様性がみられる。ただし、Group 1a の IscU において重要なアミノ酸残基(大腸菌 IscU における Cys37、Asp39、Cys63、His105、Cys106) は、Group 1b NifU サブファミリーに含まれるすべての配列と、Group 1c IscU-like サブファミリーの大多数 (130/147、88.4%) で保存されている (Fig. 29)。したがって、この Group 1c サブファミリーのメンバーの多くは (全てではないかもしれないが)、IscU や NifU のように Fe-S クラスターの新規形成部位として機能すると推定される。このサブファミリーの配列をコードしている生物のゲノムでは、IscS のホモログはコードされているものの、それ以外の ISC マシナリーの補助的成分 (HscB、IscA、Fdx) はほとんど見られない。また興味深いことに、Group 1c に含まれる配列のうち、Chlorobi やいくつかの Spirochaetes の配列では、IscU-like 配列の C 末端側に NifU の中央ドメインの配列が付加しているものが見られる (ただし NifU の C 末端ドメインは無い)。また、この Group 1c の配列をコードしている生物のほとんどは偏性嫌気性の細菌または古細菌である。これらの知見を総合すると、IscU-like サブファミリーのタンパク質は IscS ホモログと共同して、嫌気的な環境下において (酸素に対して不安定な) Fe-S クラスターを組み立てることができる生合成系として機能するのではないかと考えられる。

Group 2 は、進化の初期段階で上記の Group 1 から分岐している (Fig. 28)。枯草菌 SufU が含まれる Group 2b (SufU サブファミリー) は、214 種類の配列 (全体の 27%) から構成されている。IscU と比べると IscU の機能に重要な 2 番目と 3 番目の Cys 残基の間に約 20 アミノ酸の挿入がみられ (214/214、100%)、また、そのほとんどで、IscU の His (大腸菌 IscU では His105) が Lys へと置換している (203/214、94.9%) (残りの約 5% は His、Lys 以外のアミノ酸へ置換) (Fig. 29)。この SufU サブファミリーをコードする遺伝子のほとんどは、SUF マシナリーの他の成分 (SufS、SufB、SufC、SufD) の遺伝子



群と近接している (183/214, 85.5%) ため、この Group 2b SufU サブファミリーのタンパク質は、枯草菌と同様に SUF 様マシナリーの成分として機能すると考えられる。

Group 2c は、69 個の配列 (全体の 8.7%) を含んでおり、そのほとんどは  $\alpha$ -プロテオバクテリアに見られる。このサブファミリーの配列には、SufU (Group 2b) と同様に、IscU の 2 番目と 3 番目の Cys 残基の間に約 20 アミノ酸の挿入が見られるが、3 番目の Cys が Ser に置換している点が特徴的である (Fig. 29)。 $\alpha$ -プロテオバクテリアに属する根粒菌の一種、*Sinorhizobium meliloti* では、SUF 関連因子として *sufBCDSTA* 遺伝子クラスター (Sasaki *et al.*, 2016) と、そこから離れたところに、この Group 2c に属する SufU 様タンパク質 (SMC01006) と SufE (SMC00118) が個別にコードされている。当研究室では、大腸菌変異株を用いた相補実験によって、*S. meliloti* の SufBCDS が、Group 2c の SufU とではなく、SufE と協調して Fe-S クラスターの生合成を遂行できることが示されている (齋藤、2015 年卒業論文)。この Group 2c SufU の機能については、現在のところ不明である。

Group 2b や 2c の系統とは早い段階で分岐した、いくつかの系統の SufU 様配列を、まとめて Group 2a とした。これらの中で、Group 2b と 2c との間で分岐した多数派 (55/69, 80%) では、興味深いことに、2 番目と 3 番目の Cys 残基の間の長さは IscU とほぼ同様で、20 アミノ酸程度の挿入は見られないが、少数派の配列の中にはこの挿入配列を持つものもある。いずれにせよ、Group 2a の SufU 様タンパク質をコードする遺伝子のほとんどは *sufS* と近接しており (55/69, 80%)、このペアで硫黄の供与体として機能すると推定される。ただし、SufB、SufC、SufD をコードする遺伝子群が近接しているものは半数に満たない (28/69, 40.6%)。また、Group 2a の少数派の中には、Mollicutes の配列も含まれている。そのひとつ、*Mycoplasma genitalium* は、ゲノムの中に Fe-S タ

ンパク質や Fe-S クラスター生合成系の遺伝子群が見られないという、数少ない生物の一つである (Tokumoto *et al.*, 2004)。したがって、この Group 2a の SufU 様タンパク質の中には、Fe-S クラスター生合成に関与するものだけでなく、別の経路で硫黄の供与体として機能するものも含まれており、系統的な面に加えて機能的にも多様なグループとして捉える必要がある。

## 2.4 考察

本章では、枯草菌の *suf* 遺伝子破壊株に大腸菌の関連遺伝子を導入する、あるいは逆に、大腸菌の変異株に枯草菌の遺伝子を導入するといった方法で、双方向の異種間相補解析を進めた。さらに、種の壁を越えるサプレッサー変異や、部位特異的変異の影響、SufU/IscU の分子系統などを解析した結果、枯草菌 *sufCDSUB* にコードされる SUF 様マシナリーの実体、SufU と IscU の機能分化、ならびに Fe-S クラスタースynthesisの進化的な変遷が浮かび上がってきた。

### 2.4.1 枯草菌 SUF 様マシナリーにおける SufBCD 複合体の機能

グラム陽性菌の SufBCD はアミノ酸配列の相同性から、大腸菌 SufBCD と同様に複合体を形成し、Fe-S クラスタースynthesisの新規形成機能を担うと推定されていた。しかし、SufB の発現・精製が困難な(封入体になる)ため、生化学的な解析は全く進んでいなかった (Dos Santos, 2017)。本研究では、大腸菌/枯草菌の変異株を宿主とした双方向の異種間相補解析により、SufC と SufD は、どちらも大腸菌と枯草菌の間で機能的に互換性があることを明らかにした。一方、SufB は、そのままでは大腸菌と枯草菌の間で入れ替えることはできなかったが、SufB に 1 アミノ酸の置換が入れば、種の壁を越えて機能できるようになることがわかった。これらの知見から、枯草菌の SufBCD が大腸菌 SufBCD と機能的に類似していることを、初めて実験的に示すことができた。したがって、枯草菌の SufBCD は、大腸菌と同様に 1:2:1 の複合体を形成し、その複合体で Fe-S クラスタースynthesisを新規に組み立てると考えられる。最近、大腸菌の SufB<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub> 複合体の結晶構造が明らか

かにされ (Fig. 5A)、加えて、*in vivo* における系統的な変異導入解析や、*in vitro* における生化学的な解析から、複合体の作動機序についてのアウトラインが明らかにされている (Hirabayashi *et al.*, 2015; Yuda *et al.*, 2017)。それらの報告によると、1) 大腸菌 Suf マシナリーでは、硫黄原子が SufS から SufE へ、次いで SufBCD 複合体内の SufB の Cys254 へと渡される。2) 硫黄原子は、おそらく還元されることで Cys254 から遊離し、SufB の  $\beta$ -ヘリックスコアドメイン内部を貫くトンネルを通過して、Cys405 へと移動する。3) SufBCD 複合体内に含まれる 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 と SufD の会合面に大きな構造変化を引き起す。4) その構造変化によって、SufB と SufD の会合面に位置している SufB の Cys405 と Glu434、SufD の His360 が溶媒に露出し、これらを配位子として Fe-S クラスタが新規に形成される、と考えられる (Fig. 5B)。重要なことに、これら一連の反応に不可欠な大腸菌 SufBCD のアミノ酸残基 (SufB の Arg226、Asn228、Cys254、Gln285、Trp287、Lys303、Cys405、Glu434 ; SufC の Lys40、Glu171、His203 ; SufD の His360) は全て、枯草菌 SufBCD でも保存されている (Fig. 30, Fig. 31, Fig. 32)。

本研究では、修士 2 年の陳と共同で、SufB の種特異性を変化させるサプレッサー変異 (枯草菌 SufB では Met312Lys, Val354Ala, Asp376Gly, Asp387Gly, Ile464Thr、大腸菌 SufB では Lys484Arg) を明らかにした。これらのうち、異種 SufB と同じアミノ酸に置換したのは、大腸菌 SufB K484R のみだった。枯草菌の SufB で見られた Met312Lys、Val354Ala、Asp376Gly、Asp387Gly、Ile464Thr はすべて、大腸菌 SufB とは異なるアミノ酸への置換である。これらのうち Asp376Gly では、意外なことに、大腸菌 SufB でも Asp 残基 (Asp406 に相当) が保存されているにもかかわらず (Fig. 30)、別のアミノ酸 (Gly) へ置換していた。したがって、これらのサプレッサー変異の多くは、異種間で同一のアミノ酸になるよう置換したというわけではない。大腸菌の SufBCD 複合体の結晶

構造に基づいて、枯草菌 SufB のホモロジーモデリングを行い、このモデル構造に 5 種類のアミノ酸置換を当てはめてみた (Fig. 33) ところ、枯草菌 SufB Met312Lys、Val354Ala、Asp376Gly、Asp387Gly は、 $\beta$ -ヘリックスコアドメイン内に位置している。これらのうち Asp376Gly は、上述の必須な Cys 残基 (大腸菌 SufB の Cys405 に相当) に隣接しているが (Fig. 30)、他の 3 種類の置換は、離れたところに散在していた。また、枯草菌 SufB の Ile464Thr と、大腸菌 SufB の Lys484Arg は C 末端  $\alpha$ -ヘリックスドメイン内に位置していた。この構造を見る限り、これらのサブレッサー変異はどれも、SufC、あるいは、SufD との相互作用に直接関与するとは考えにくい。これら種特異性を変化させるサブレッサー変異の役割については、今後、様々なアプローチで検討していく必要がある。

#### 2.4.2 枯草菌 SUF 様マシナリーにおける SufU の機能

グラム陽性細菌の SUF 様マシナリーで最も特徴的なのは、大腸菌 SUF マシナリーで用いられる SufE の代わりに、U タイプの足場タンパク質のホモログである SufU が含まれている点である。これまでの *in vitro* の研究によって、枯草菌のシステイン脱硫黄酵素 SufS から SufU へと硫黄原子が受け渡されることが明確に示されているが、その硫黄原子を受け取った SufU が、Fe-S クラスタ新規形成の足場として機能するのか、あるいは、硫黄原子のキャリアとして機能するのか、議論が続いていた (Albrecht *et al.*, 2010; Selbach *et al.*, 2010; Albrecht *et al.*, 2011; Selbach *et al.*, 2014)。この課題に対して、本研究では、双方向の異種間相補解析を進め、枯草菌 SufSU と大腸菌 SufSE が *in vivo* で代替可能であることを初めて示した。上述のように、大腸菌 SUF マシナリーでは、ま

ず、システイン脱硫黄酵素 SufS が L-システインから硫黄原子を引き抜き、それを SufE の Cys51 に受け渡す。その後、SufE がキャリアとして硫黄原子を SufBCD 複合体へ渡し、そこで Fe-S クラスタが新規に形成される (Loiseau *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003; Layer *et al.*, 2007)。したがって、枯草菌 SufSU と大腸菌 SufSE に機能的な互換性があるということは、*in vivo* において、大腸菌 SufSE が枯草菌の SufBCD 複合体へと硫黄原子を渡し、また逆に、枯草菌 SufSU が大腸菌の SufBCD 複合体へと硫黄原子を渡すことを示している。大腸菌 SufE の Cys51 を Ala に置換すると異種間での相補性が見られなくなる (Fig. 23) ことから、硫黄原子は大腸菌 SufE の Cys51 を経由して、枯草菌の SufBCD 複合体へ渡されるという経路が支持される。枯草菌 SufU と大腸菌 SufE の間では、アミノ酸配列には相同性が見られないが、立体構造には類似性があり、大腸菌 SufE で硫黄原子を結合する Cys51 と同じような位置に、枯草菌 SufU では Cys41 が存在している (Fig. 34)。大腸菌では、SufE の Cys51 から SufB の Cys254 へと硫黄原子が受け渡される (Yuda *et al.*, 2017) が、この SufB Cys254 は、 $\beta$ -ヘリックスコアドメインの N 末端側に位置しており、枯草菌 SufB でも保存されている (Cys231)。また、これらの Cys 残基の周囲のアミノ酸残基もまた、大腸菌と枯草菌の間でよく保存されている (Fig. 35)。それらの保存残基の中で、Arg226 と Asn228 は、大腸菌 SufB の *in vivo* 機能に重要であることも示されている (Yuda *et al.*, 2017)。これらのアミノ酸残基が、大腸菌 SufE と枯草菌 SufB との相互作用、また逆に、枯草菌 SufU と大腸菌 SufB との相互作用に関与すると推定できる。

大腸菌の ISC マシナリーは 7 種類の成分から構成されているが、近年、SUF マシナリーを欠失させたバックグラウンドにおいて *isc* オペロン (*iscSUA-hscBA-fdx-iscX*) の個別遺伝子を破壊した変異株が構築され、それらの解析から、ISC マシナリーで常に必要となる成分はシステイン脱硫黄酵素 IscS と Fe-S クラスタ形成の足場となる IscU の 2

種類のみであることが示されている (Tanaka *et al.*, 2016)。IscA と Fdx は、好気条件下では必須だが嫌気条件下では必須ではない。電子供与体としての Fdx の機能は、嫌気条件下では還元力が過剰になってバイパスされ、IscA については、酸素に対して不安定な Fe-S クラスタを保護しつつ運搬するために必要ではないかと推定されている。また、HscA と HscB のシャペロン-コシャペロン機能は好気・嫌気両条件で必須だが、IscU 分子内の 1 アミノ酸置換によってバイパスされることも示された。したがって、ISC マシナリーの 7 種類の成分は、必須成分である IscS と IscU、補助的な成分である IscA、Fdx、HscA と HscB、不必要な（必要性が不明な）成分 IscX に分類することができる。この大腸菌 IscU と枯草菌 SufU とは、一次構造から立体構造までよく似ている (Fig. 4, Fig. 29, Fig. 34)。しかし本研究では、異種間の相補実験において、大腸菌 IscSU は、枯草菌の  $\Delta$ sufS 株、 $\Delta$ sufU 株や  $\Delta$ sufSU 株を相補することはできなかった (Fig. 23)。また逆に、枯草菌 SufSU では、好気/嫌気条件のどちらにおいても、大腸菌  $\Delta$ iscS 株や  $\Delta$ iscU 株を相補することができなかった (Fig. 25)。また、IscU と SufU では、保存されている 3 残基の Cys と 1 残基の Asp の機能性にも違いが見られた。大腸菌 IscU において Cys37、Cys63、Cys106 と Asp39 は Fe-S クラスタ形成の足場として機能するために必須で、どれも他の 19 種類のアミノ酸に置換すると機能不全になる (田中、2016 年博士論文) が、SufU ではこのうち 2 つの残基を別のアミノ酸に置換することができた (Fig. 27)。

SufU において、これら 3 残基の Cys と 1 残基の Asp は、分子表面で亜鉛イオンを配位している (Selbach *et al.*, 2014)。これらのうち、SufU の Asp43 は、亜鉛を配位することの可能な Glu または Cys では機能的な置換が可能であったが、亜鉛を配位することのできない Asn や Gln では置換することができなかった (Fig. 27, 寺畑、2018 年修士論文)。Dos Santos のグループは、枯草菌 SufU から亜鉛を人為的に除去すると二次構造が変化すること、また、枯草菌 SufS からの硫黄転移活性が失われることを報告している

(Selbach *et al.*, 2014)。さらに重要なことに、当研究室では最近、枯草菌 SufSU 複合体の結晶構造が決定され、複合体形成に伴って、亜鉛に対する配位子の掛け替えが起こることが明らかにされた (Fig. 36)。すなわち、SufU の Cys41 に代わって SufS の His342 が亜鉛の配位子となり、SufS と SufU との会合に寄与することがわかった。このとき、SufU の Cys41 は亜鉛から外れることでフリーな -SH 状態となり、SufS の活性中心である Cys361 から硫黄原子を受け取ることができるようになる (Fujishiro *et al.*, 2017)。この SufSU 複合体の構造から、枯草菌 SufU が亜鉛を保持することは、構造の安定性だけでなく機能的にも重要だということが明確に示された。したがって、本研究で得られた知見を総合すると、枯草菌 SufU は亜鉛に依存した硫黄原子のキャリアタンパク質であり、SufS から SufBCD に硫黄原子を運搬する機能を担うと結論することができる (Fig. 37)。ただし、この硫黄原子のキャリアという機能に加えて、SufU が Fe-S クラスターの新規形成部位としても働くことができるかどうかについては、可能性は非常に低いと思われるが、現段階では完全に排除することはできない。この可能性については、別のアプローチ (*in vitro* における生化学的、分光学的研究) で検証または否定されるべきである。

#### 2.4.3 IscU/SufU の機能分化と Fe-S クラスター生合成系の進化的変遷

一部の寄生性細菌 (*Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma genitalium* など) を除いて、全ての生き物は複数の (多種多様な) Fe-S タンパク質を有しているが、それらに Fe-S クラスターを供給する生合成系にもいくつかのバリエーションが見られる。Fe-S クラスター生合成系の成分の中で、最も広範に分布しているのは SufB と SufC である。メタン生成古細菌 *Methanococcus maripaludis* などではゲノム上に *sufCB* のみがコードされて



おり、それらの産物は SufB<sub>2</sub>SufC<sub>2</sub>複合体として機能すると予想されている (Boyd *et al.*, 2014)。Fe-S クラスターの硫黄源としては、システインではなく、これらメタン菌の棲息環境に豊富に存在する S<sup>2-</sup>が直接用いられることが示されている (Liu *et al.*, 2010)。別の古細菌、*Thermoplasma acidophilum* などでは、ゲノム上に *sufCBD* がコードされている。SufD は SufB と相同なタンパク質で、SufB の遺伝子重複によって生じたものである。これによって SufB<sub>2</sub>SufC<sub>2</sub>複合体の SufB 1 分子が SufD に置き換わり、SufB<sub>1</sub>SufC<sub>2</sub>SufD<sub>1</sub>複合体として機能するようになったと考えられている。SufD の役割は不明だが、嫌気環境から好気環境への適応に関連しているのではないかと推定されている (Boyd *et al.*, 2014)。

S<sup>2-</sup>が豊富に存在するのは一部の嫌氣的な環境に限られている。そのため多くの生き物は、システインから脱硫黄酵素 (SufS、IscS、NifS) が硫黄原子を引き抜いて、Fe-S クラスターの硫黄源としている。システイン脱硫黄酵素は分子系統的に Group I と Group II に分けられ (Mihara *et al.*, 1997)、そのうち、Group I に属する IscS と NifS は、Fe-S クラスターの新規形成の足場タンパク質である IscU と NifU にそれぞれ直接硫黄原子を供給している。加えて、Group I システイン脱硫黄酵素のメンバーの中には、tRNA の硫黄修飾などに特化したものも含まれている (Rajakovich *et al.*, 2012; Black and Dos Santos, 2015a)。一方、Group II に属する SufS はキャリアタンパク質である SufE/SufU を介して SufBCD 複合体に硫黄原子を供給しているが、大腸菌 CsdA のように CsdE を介して、tRNA の修飾に関与するものもある。

本研究では、IscU と SufU の分子系統解析によって、これらは共通祖先の遺伝子重複によって生じ、その後に機能分化を果たして、一方は Fe-S クラスター形成の足場として、他方は硫黄原子のキャリアとして進化してきたと推定した (Fig. 28, Fig. 38)。SufE

は、SufU とはアミノ酸配列の相同性が見られないことから、収斂進化によって生じたと考えられる。SufU と SufE の分布を比較してみると、SufE を有する生物は、 $\alpha$ -、 $\gamma$ -プロテオバクテリアと一部のシアノバクテリア (葉緑体を含む) などに限られている。一方、SufU は、Actinobacteria 全般、Firmicutes 中の Bacilli、Thermotogae、Spirochaetes、Cyanobacteria の一部とより広範に分布している。したがって、SUF マシナリーの進化においては、まず Group II の SufS が Group 2b の SufU と共同して SufBCD 複合体に硫黄原子を供給するようになり、次いで、硫黄原子のキャリアとしての SufU の機能が、SufE に置換したと推定される。SufE と相同性の高い CsdE の結晶構造によると、このタンパク質単体では硫黄原子を受け取る Cys61 残基が分子内部に格納されているが、システイン脱硫黄酵素 CsdA と会合すると、局所的なコンフォメーション変化によって Cys61 が分子表面に突き出すことが示されている (Kim and Park, 2013)。このような構造変化は、酸素に対する防御機構 (-SH 基や -SSH を酸化されないように保護する) として、好気的な条件下ではより適合している可能性が考えられる。

IscU と SufU の分子系統解析によって分類した 6 グループの内、Group 2c のメンバーの役割は全く不明であり、Group 2a の中にも役割の不明なものが含まれている。一方、Group 1 の方では、これまでよく調べられている ISC マシナリーの IscU (Group 1a)、NIF マシナリーの NifU (Group 1b) 以外にも、IscU-like なタンパク質が多数含まれていることが分かった (Group 1c)。Group 2 の配列とは異なり、Group 1c の配列では、IscU や NifU において Fe-S クラスターの新規形成機能に必要な残基 (大腸菌 IscU では Tyr3、Cys37、Asp39、Cys63、Lys103、His105、Cys106) の全てが保存されている (Fig. 29)。Group 1c の *iscU*-like 遺伝子のほとんどは、Group I システイン脱硫黄酵素 (IscS、NifS) の遺伝子に隣接してコードされているが、*iscU* (Group 1a) の場合とは異なり、ISC マシナリーの他の補助的メンバーはほとんど見あたらない。さらに興味深いことに、このグループに

は SUF マシナリー (SufB) を持たない生物が多く含まれている。したがって、これらの生物では、Group 1c の IscU-like タンパク質が Group I システイン脱硫黄酵素と共同して、唯一の Fe-S クラスター生合成系として機能しているという可能性が考えられる。これらを保持しているのは偏性嫌気性の細菌と古細菌であり、大腸菌 ISC マシナリーの性質 (IscU と IscS のみが常に必須) とも合致する。これらの知見を総合すると、Group 1c の IscU-like タンパク質とシステイン脱硫黄酵素は、嫌気的な環境下で機能することのできる、ISC マシナリーのプロトタイプとして捉えることができる。Group 1c の中では例外的だが、*Chlorobaculum tepidum* の IscU-like タンパク質は C 末端側に NifU の中央ドメインが融合している (ただし、NifU の C 末端ドメインは融合していない)。実際に、このタンパク質を *C. tepidum* の IscS と大腸菌で共発現させると、嫌気的な条件でのみ、大腸菌  $\Delta isc \Delta suf$  変異株を相補することができる (関、2017 年 卒業論文)。ただし、NifU の中央ドメインを持たない、Group 1c の IscU-like タンパク質の機能については、今後の実験で検証する必要がある。

## 2.5 今後の展望

これまで述べてきたように、本研究では、枯草菌 Suf 様マシナリーの特性や作動機構、IscU/SufU タンパク質の機能分化、ならびに Fe-S クラスタースynthesis系の進化のアウトラインについて明らかにすることができた。最後に、この分野の研究で残されている課題や、本研究によって新たに浮かび上がってきた問題点を整理する。

1. SufBCD 複合体の作動機構：この複合体には鉄イオンと硫黄原子が集められ、大きな構造変化を利用して、Fe-S クラスタースが新規に形成されると考えられている。その具体的なメカニズムを理解するためには、今後、構造変化の実体や、不安定なクラスタースを保持した状態の構造を捉える必要がある。分子動力学シミュレーションも、アプローチのひとつとして有効かもしれない。
2. SufBCD 複合体からアポ型タンパク質への Fe-S クラスタースの輸送：大腸菌や酵母では、いくつかの補助的タンパク質 (IscA/SufA、NfuA、GrxD、BolA、YgfZ、ApbC、Cia2 など) の働きによって、Fe-S クラスタースがアポ型タンパク質に輸送されるのではないかと考えられているが、不明な点が多い。それら補助的タンパク質群は、生物種によってもバリエーションが大きく、枯草菌のゲノムにコードされているのは、3 種類 (SufA、Nfu、SufT) のみである。当研究室では、これらの遺伝子の単独破壊株が構築されたが、その生育は、野生株とほとんど変わらなかった。枯草菌でこれら 3 成分の機能が関連、あるいは重複している可能性が考えられ、これらの多重破壊株を用いた研究が進められている (飴野、2016 年修士論文)。補助的タンパク質群がどのように協調して、あるいは、役割分担して、不安定な Fe-S クラスタースを壊さないように輸送しているのか、また、多種多様なアポ型タンパク質を

どのようにして認識・識別しているのか、今後の Fe-S クラスター生合成研究における最大の課題かもしれない。

3. **SufB** における種特異性 : **SufB** については枯草菌と大腸菌との間で互換性が見られなかったが、この種間の壁は、いくつかの 1 アミノ酸置換によって超えられることを示した。今後はまず、これらのアミノ酸置換が、本来の機能に対してどのように影響するのか (あるいは影響しないのか) について確認する必要がある (陳、2018 年修士論文)。また、**SufB** 内の 1 アミノ酸置換によって、**SufB** の性質がどのように変化し、異種の **SufCD** と共同できるようになるのか、まずは **SufC**、**SufD** との結合 (**SufBCD** 複合体の形成能) が影響を受けるのかどうかを明らかにする必要がある。生化学的アプローチでは、Pull-down アッセイや native-PAGE、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた解析が有効だと思われる。仮に、**SufB** 内のアミノ酸置換が複合体形成能に影響しないということになれば、**SufBCD** 複合体のコンフォメーション変化に影響する可能性が考えられる。その場合は、置換部位を別の (性質の異なる) アミノ酸に置換してみるというアプローチが有効になるかもしれない。上述のように、**SufBCD** 複合体の作動機構には未だ不明な点が残されており、その手掛かりになることを期待している。
4. システイン脱硫黄酵素とパートナータンパク質との特異性 : 本研究では、システイン脱硫黄酵素 (**SufS**) の単独では異種間で互換性が見られないことを示したが、サプレッサー変異の解析から、大腸菌 **SufE** に 4 アミノ酸の欠失 (111-114) が生じると、枯草菌 **SufS** と相互作用できるようになることを見出している (データは示していない)。今後、この 4 アミノ酸欠失型の **SufE** の性質を調べるとともに、単体、あるいは **SufS** との複合体の結晶化を試みる予定である (櫻井、2018 年卒業論文)。また、大腸菌 **CsdAE** や枯草菌 **SufSU** 複合体の X 線結晶構造解析から、システイン

脱硫黄酵素とそのパートナータンパク質間の相互作用に関与するアミノ酸残基が明らかにされている (Kim and Park, 2013; Fujishiro *et al.*, 2017)。現在、これら相互作用に関与するアミノ酸残基を種々のアミノ酸へ置換して、パートナーとの特異性が変化するか検討している (李、2018 年卒業論文)。これらを足掛かりとして、今後、システイン脱硫黄酵素とパートナータンパク質との特異性を左右する要因が明らかにされることを期待している。

5. **SufD の役割** : SufD は SufB の遺伝子重複によって生じたもので、両者は立体構造も良く似ている。ただし、大腸菌や枯草菌では SufD の必須残基 (His360) が SufB でも保存されているにもかかわらず、SufB<sub>2</sub>SufC<sub>2</sub> 複合体としては機能することができない。その理由を明らかにするために、当研究室では SufD と SufB のキメラタンパク質を構築して、SufD の機能に必須な領域をしぼりこむという実験が進められている (林、2018 年卒業論文)。
6. **SufU/SufE 間の優劣** : 本研究で、SufU と SufE は共に硫黄原子のキャリアとして機能すること、進化的には SufU の方が古い、いくつかの細菌の系統で SufE に置換した可能性が高いことを示した。SufU に比べて SufE を用いる方が、なんらかのメリットがあると考えられる。酸素に対する防御機構に優れているという可能性が考えられるが、この点は、生化学的に検証する必要がある。
7. **Fe-S クラスタースynthesisマシナリーのプロトタイプ** : メタン菌に見られる SufBC (SUF マシナリーのプロトタイプ) については、本当に Fe-S クラスタースynthesis系として機能できるのか、実験的に確かめる必要がある。現在、当研究室ではメタン生成古細菌の一種、*Methanocaldococcus jannaschii* の *sufCB* を大腸菌変異株で発現させることによって、相補できるか検討されている (村田、2018 年卒業論文)。また本研究では、嫌氣的ないくつかの生物では IscU-like タンパク質 (Group 1c) とシ

ステイン脱硫黄酵素の2成分で、Fe-S クラスターの生合成系として機能する (ISC マシナリーのプロトタイプ) という可能性を示したが、この可能性についても実験的に検証する必要がある。当研究室では、そのひとつ *Heliobacterium modesticaldum* の *iscSU-like* を用いて異種間の相補実験が行われているが、現在まで、嫌気条件においても大腸菌の  $\Delta isc \Delta suf$  変異株を相補することには成功していない (関、2017年卒業論文)。一方、このような ISC マシナリーのプロトタイプは真正細菌の祖先で生じた可能性が考えられるが、SUF マシナリーのプロトタイプ (SufBC) と比べてどちらがより古いのか、また、どのように使い分けられてきたのか、という進化の道筋も興味深い。

Fe-S クラスター生合成系については未だ多くの謎が残されている。今後、詳細な作動機構が明らかにされることによって、不安定な Fe-S クラスターを自在に扱う道も見えてくるかもしれない。また、なぜ Fe-S クラスター生合成系がここまで多様化してきたのか？その道筋や意義に対して理解が深まることを期待している。本研究が、そのさきがけになれば望外の喜びである。

## 参考文献

- Abolbaghaei, A., Silke, J.R., and Xia, X. (2017) How changes in anti-SD sequences would affect SD sequences in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *G3* **7**: 1607–1615.
- Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: Sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **39**: 7856–7862.
- Albrecht, A.G., Netz, D.J. a, Miethke, M., Pierik, A.J., Burghaus, O., Peuckert, F., *et al.* (2010) SufU is an essential iron-sulfur cluster scaffold protein in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**: 1643–1651.
- Albrecht, A.G., Peuckert, F., Landmann, H., Miethke, M., Seubert, A., and Marahiel, M.A. (2011) Mechanistic characterization of sulfur transfer from cysteine desulfurase SufS to the iron–sulfur scaffold SufU in *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett* **585**: 465–470.
- Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., and Nozaki, T. (2004) An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J Biol Chem* **279**: 16863–16874.
- Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**: 741–746.
- Andreini, C., Rosato, A., and Banci, L. (2017) The relationship between environmental dioxygen and iron-sulfur proteins explored at the genome level. *PLoS One* **12**: 1–15.
- Bak, D.W., and Elliott, S.J. (2014) Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **19**: 50–58.
- Beinert, H. (1997) Iron-sulfur clusters: Nature’s modular, multipurpose structures. *Science* **277**:



653–659.

- Bergsma, J., Strijker, R., Alkema, J.Y.E., Seijen, H.G., and Konings, W.N. (1981) NADH dehydrogenase and NADH oxidation in membrane vesicles from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **606**: 599–606.
- Bergsma, J., Van-Dongen, M., and Konings, W.N. (1982) Purification and characterization of NADH dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **128**: 151–157.
- Black, K.A., and Dos Santos, P.C. (2015a) Abbreviated pathway for biosynthesis of 2-thiouridine in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **197**: 1952–1962.
- Black, K.A., and Dos Santos, P.C. (2015b) Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors: Mechanism and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors. *Biochim Biophys Acta* **1853**: 1470–1480.
- Blanc, B., Clémancey, M., Latour, J.-M., Fontecave, M., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2014) Molecular investigation of iron–sulfur cluster assembly scaffolds under stress. *Biochemistry* **4**: 7867–7869.
- Booker, S.J., and Grove, T.L. (2010) Mechanistic and functional versatility of radical SAM enzymes. *F1000 Biol Rep* **2**: 52.
- Boyd, E.S., Thomas, K.M., Dai, Y., Boyd, J.M., and Outten, F.W. (2014) Interplay between oxygen and Fe-S cluster biogenesis: insights from the Suf pathway. *Biochemistry* **53**: 5834–5847.
- Braymer, J.J., and Lill, R. (2017) Iron–sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem* **292**: 12754–12763.
- Bron, S., Bolhuis, A., Tjalsma, H., Holsappel, S., Venema, G., and van-Dijl, J.M. (1998) Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in Bacilli. *J Biotechnol* **64**: 3–13.

- Cao, G., Zhang, X., Zhong, L., and Lu, Z. (2011) A modified electro-transformation method for *Bacillus subtilis* and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. *Biotechnol Lett* **33**: 1047–1051.
- Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2006) HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry* **45**: 11087–11095.
- Cutting, S.M., and Vander Horn, P.B. (1990) Genetic analysis. In *Molecular Biology Methods for Bacillus*. Harwood, C.R., and Cutting, S.M. (eds). John Wiley & Sons Ltd., pp. 27–74.
- Dai, Y., Kim, D., Dong, G., Busenlehner, L.S., Frantom, P.A., and Outten, F.W. (2015) SufE D74R substitution alters active site loop dynamics to further enhance SufE interaction with the SufS cysteine desulfurase. *Biochemistry* **54**: 4824–4833.
- Dai, Y., and Outten, F.W. (2012) The *E. coli* SufS-SufE sulfur transfer system is more resistant to oxidative stress than IscS-IscU. *FEBS Lett* **586**: 4016–4022.
- Desnoyers, G., Morissette, A., Prévost, K., and Massé, E. (2009) Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *EMBO J* **28**: 1551–1561.
- Dos Santos, P.C. (2017) *B. subtilis* as a model for studying the assembly of Fe–S clusters in Gram-positive bacteria. *Methods Enzymol* **595**: 185–212.
- Dos Santos, P.C., Smith, A.D., Frazzon, J., Cash, V.L., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2004) Iron-sulfur cluster assembly: NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. *J Biol Chem* **279**: 19705–19711.
- Duschene, K.S., Veneziano, S.E., Silver, S.C., and Broderick, J.B. (2009) Control of radical chemistry in the AdoMet radical enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **13**: 74–83.
- Fujishiro, T., Terahata, T., Kunichika, K., Yokoyama, N., Maruyama, C., Asai, K., and Takahashi, Y. (2017) Zinc-ligand swapping mediated complex formation and sulfur

- transfer between SufS and SufU for iron–sulfur cluster biogenesis in *Bacillus subtilis*. *J Am Chem Soc* **139**: 18464–18467.
- Fujita, Y. (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 245–259.
- Goldsmith-Fischman, S., Kuzin, A., Edstrom, W.C., Benach, J., Shastry, R., Xiao, R., *et al.* (2004) 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.
- Gupta, V., Sendra, M., Naik, S.G., Chahal, H.K., Huynh, B.H., Outten, F.W., *et al.* (2009) 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.
- Gyan, S., Shiohira, Y., Sato, I., Takeuchi, M., and Sato, T. (2006) Regulatory loop between redox sensing of the NADH / NAD<sup>+</sup> ratio by Rex ( YdiH ) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**: 7062–7071.
- Henner, D.J. (1990) Inducible expression of regulatory genes in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* **185**: 223–228.
- Hirabayashi, K., Yuda, E., Tanaka, N., Katayama, S., Iwasaki, K., Matsumoto, T., *et al.* (2015) 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.
- Hirata, A., Klein, B.J., and Murakami, K.S. (2010) The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Archaea* **451**: 851–854.
- Hoff, K.G., Silberg, J.J., and Vickery, L.E. (2000) Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7790–7795.

- Huet, G., Castaing, J.P., Fournier, D., Daffé, M., and Saves, I. (2006) Protein splicing of SufB is crucial for the functionality of the *Mycobacterium tuberculosis* SUF machinery. *J Bacteriol* **188**: 3412–3414.
- Huet, G., Daffé, M., and Saves, I. (2005) 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.
- Jacobson, M.R., Cash, V.L., Weiss, M.C., Laird, N.F., Newton, W.E., and Dean, D.R. (1989) Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet* **219**: 49–57.
- Jang, S., and Imlay, J.A. (2010) Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Mol Microbiol* **78**: 1448–1467.
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* **74**: 247–281.
- Johnson, D.C., Unciuleac, M.C., and Dean, D.R. (2006) Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **188**: 7551–7561.
- Kahler, A.E., Nielsen, F.S., and Switzer, R.L. (1999) Biochemical characterization of the heteromeric *Bacillus subtilis* dihydroorotate dehydrogenase and its isolated subunits. *Arch Biochem Biophys* **371**: 191–201.
- Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y., and Fukuyama, K. (2001) Crystal structure of *Escherichia coli* Fdx, an adrenodoxin-type ferredoxin involved in the assembly of iron-sulfur clusters. *Biochemistry* **40**: 11007–11012.
- Kato, S., Mihara, H., Kurihara, T., Takahashi, Y., Tokumoto, U., Yoshimura, T., and Esaki, N.

- (2002) Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS-IscU complex: Implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5948–5952.
- Kennedy, M.C., Emptage, M.H., Dreyer, J.L., and Beinert, H. (1983) The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J Biol Chem* **258**: 11098–11105.
- Kim, J.H., Frederick, R.O., Reinen, N.M., Troupis, A.T., and Markley, J.L. (2013) [2Fe-2S]-ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin. *J Am Chem Soc* **135**: 8117–8120.
- Kim, J.H., Tonelli, M., Frederick, R.O., Chow, D.C.F., and Markley, J.L. (2012) Specialized Hsp70 chaperone (HscA) binds preferentially to the disordered form, whereas J-protein (HscB) binds preferentially to the structured form of the iron-sulfur cluster scaffold protein (IscU). *J Biol Chem* **287**: 31406–31413.
- Kim, S., and Park, S. (2013) Structural changes during cysteine desulfurase CsdA and sulfur acceptor CsdE interactions provide insight into the trans-persulfuration. *J Biol Chem* **288**: 27172–27180.
- Klinge, S., Hirst, J., Maman, J.D., Krude, T., and Pellegrini, L. (2007) An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 875–877.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., *et al.* (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4678–4683.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad host range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic resistance cassettes. *Gene* **166**: 175–176.

- Kuzuyama, T. (2017) Biosynthetic studies on terpenoids produced by *Streptomyces*. *J Antibiot* **70**: 811–818.
- Lanz, N.D., and Booker, S.J. (2015) Auxiliary iron-sulfur cofactors in radical SAM enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1853**: 1316–1334.
- Layer, G., Aparna Gaddam, S., Ayala-Castro, C.N., Choudens, S.O. De, Lascoux, D., Fontecave, M., and Outten, F.W. (2007) SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* **282**: 13342–13350.
- Lill, R. (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831–838.
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Freibert, S.A., Heidenreich, T., Mascarenhas, J., Netz, D.J., *et al.* (2015) The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Eur J Cell Biol* **94**: 280–291.
- Liu, Y., Sieprawska-Lupa, M., Whitman, W.B., and White, R.H. (2010) Cysteine is not the sulfur source for iron-sulfur cluster and methionine biosynthesis in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J Biol Chem* **285**: 31923–31929.
- Locher, K.P. (2016) Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol* **23**: 487–493.
- Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Lascoux, D., Forest, E., Fontecave, M., and Barras, F. (2005) Analysis of the heteromeric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 26760–26769.
- Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M., and Barras, F. (2003) 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.
- Lu, J., Yang, J., Tan, G., and Ding, H. (2008) Complementary roles of SufA and IscA in the biogenesis of iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *Biochem J* **409**: 535–543.

- Malkin, R., and Rabinowitz, J.C. (1966) The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **23**: 822–827.
- McLaughlin, M.I., Lanz, N.D., Goldman, P.J., Lee, K.-H., Booker, S.J., and Drennan, C.L. (2016) Crystallographic snapshots of sulfur insertion by lipoyl synthase. *Proc Natl Acad Sci* **113**: 9446–9450.
- Mettert, E.L., and Kiley, P.J. (2015) Fe–S proteins that regulate gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1853**: 1284–1293.
- Mihara, H., and Esaki, N. (2003) Bacterial cysteine desulfurases: Their function and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 12–23.
- Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., and Esaki, N. (2000) Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *J Biochem* **127**: 559–567.
- Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K., and Esaki, N. (1997) Cysteine sulfinate desulfinate, a NIFS-like protein of *Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. Gene cloning, purification, and characterization of a novel pyridoxal enzyme. *J Biol Chem* **272**: 22417–22424.
- Mihara, H., Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T., Hata, Y., and Esaki, N. (1999) A *nifS*-like gene, *csdB*, encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. Gene cloning, purification, characterization and preliminary X-ray crystallographic studies. *J Biol Chem* **274**: 14768–14772.
- Miyauchi, K., Kimura, S., and Suzuki, T. (2013) A cyclic form of  $N^6$ -threonylcarbamoyladenine as a widely distributed tRNA hypermodification. *Nat Chem Biol* **9**: 105–111.
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003) Components involved in assembly

- and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J* **22**: 4815–4825.
- Nakamura, M., Saeki, K., and Takahashi, Y. (1999) 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.
- Netz, D.J.A., Stith, C.M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Heide, M., *et al.* (2012) Eukaryotic DNA polymerase require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat Chem Biol* **8**: 125–132.
- Nguyen, H.D., Nguyen, Q.A., Ferreira, R.C., Ferreira, L.C.S., Tran, L.T., and Schumann, W. (2005) Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid* **54**: 241–248.
- O’Brien, E., Holt, M.E., Thompson, M.K., Salay, L.E., Ehlinger, A.C., Chazin, W.J., and Barton, J.K. (2017) The [4Fe4S] cluster of human DNA primase functions as a redox switch using DNA charge transport. *Science* **355**: eaag1789.
- Ollagnier-de-Choudens, S., Lascoux, D., Loiseau, L., Barras, F., Forest, E., and Fontecave, M. (2003) Mechanistic studies of the SufS-SufE cysteine desulfurase: Evidence for sulfur transfer from SufS to SufE. *FEBS Lett* **555**: 263–267.
- Outten, F.W. (2015) Recent advances in the Suf Fe-S cluster biogenesis pathway: Beyond the Proteobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1853**: 1464–1469.
- Outten, F.W., Djaman, O., and Storz, G. (2004) A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **52**: 861–872.
- Outten, F.W., Wood, M.J., Muñoz, F.M., and Storz, G. (2003) 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.



- Pain, D., and Dancis, A. (2016) Roles of Fe-S proteins: From cofactor synthesis to iron homeostasis to protein synthesis. *Curr Opin Genet Dev* **38**: 45–51.
- Pastore, C., Adinolfi, S., Huynen, M.A., Rybin, V., Martin, S., Mayer, M., *et al.* (2006) YfhJ, a molecular adaptor in iron-sulfur cluster formation or a frataxin-like protein? *Structure* **14**: 857–867.
- Paul, V.D., and Lill, R. (2015) Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim Biophys Acta* **1853**: 1528–1539.
- Petrovic, A., Davis, C.T., Rangachari, K., Clough, B., Wilson, R.J.M.I., and Eccleston, J.F. (2008) Hydrodynamic characterization of the SufBC and SufCD complexes and their interaction with fluorescent adenosine nucleotides. *Protein Sci* **17**: 1264–1274.
- Py, B., and Barras, F. (2010) Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nat Rev Microbiol* **8**: 436–446.
- Rajakovich, L.J., Tomlinson, J., and Dos Santos, P.C. (2012) Functional analysis of *Bacillus subtilis* genes involved in the biosynthesis of 4-thiouridine in tRNA. *J Bacteriol* **194**: 4933–4940.
- Rees, D.C. (2003) The interface between the biological and inorganic worlds: Iron-sulfur metalloclusters. *Science* **300**: 929–931.
- Roberts, C.A., Al-Tameemi, H.M., Mashruwala, A.A., Rosario-Cruz, Z., Chauhan, U., Sause, W.E., *et al.* (2017) The Suf iron-sulfur cluster biosynthetic system is essential in *Staphylococcus aureus* and decreased Suf function results in global metabolic defects and reduced survival in human neutrophils. *Infect Immun* **85**: e00100-17.
- Roche, B., Huguenot, A., Barras, F., and Py, B. (2015) The iron-binding CyaY and IscX proteins assist the ISC-catalyzed Fe-S biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **95**: 605–623.

- Saini, A., Mapolelo, D.T., Chahal, H.K., Johnson, M.K., and Outten, F.W. (2010) SufD and SufC ATPase activity are required for iron acquisition during *in vivo* Fe-S cluster formation on SufB. *Biochemistry* **49**: 9402–9412.
- Sasaki, S., Minamisawa, K., and Mitsui, H. (2016) A *Sinorhizobium meliloti* RpoH-regulated gene is involved in iron-sulfur protein metabolism and effective plant symbiosis under intrinsic iron limitation. *J Bacteriol* **198**: 2297–2306.
- Schwartz, C.J., Giel, J.L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F.J., Beinert, H., and Kiley, P.J. (2001) 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.
- Selbach, B., Earles, E., and Dos Santos, P.C. (2010) Kinetic analysis of the bisubstrate cysteine desulfurase SufS from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **49**: 8794–8802.
- Selbach, B.P., Chung, A.H., Scott, A.D., George, S.J., Cramer, S.P., and Dos Santos, P.C. (2014) Fe-S cluster biogenesis in Gram-positive bacteria: SufU is a zinc-dependent sulfur transfer protein. *Biochemistry* **53**: 152–160.
- Selbach, B.P., Pradhan, P.K., and Dos Santos, P.C. (2013) Protected sulfur transfer reactions by the *Escherichia coli* Suf system. *Biochemistry* **52**: 4089–4096.
- Shimomura, Y., Takahashi, Y., Kakuta, Y., and Fukuyama, K. (2005) Crystal structure of *Escherichia coli* YfhJ protein, a member of the ISC machinery involved in assembly of iron-sulfur clusters. *Proteins* **60**: 566–569.
- Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2008) The asymmetric trimeric architecture of [2Fe-2S] IscU: Implications for its scaffolding during iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Mol Biol* **383**: 133–143.
- Singh, H., Dai, Y., Outten, F.W., and Busenlehner, L.S. (2013) *Escherichia coli* SufE sulfur

- transfer protein modulates the SufS cysteine desulfurase through allosteric conformational dynamics. *J Biol Chem* **288**: 36189–36200.
- Smith, A.D., Agar, J.N., Johnson, K.A., Frazzon, J., Amster, I.J., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2001) Sulfur transfer from IscS to IscU: The first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Am Chem Soc* **123**: 11103–11104.
- Smith, A.D., Jameson, G.N.L., Dos Santos, P.C., Agar, J.N., Naik, S., Krebs, C., *et al.* (2005) NifS-mediated assembly of [4Fe-4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein. *Biochemistry* **44**: 12955–12969.
- Smith, J.L., Zaluzec, E.J., Wery, J.P., Niu, L., Switzer, R.L., Zalkin, H., and Satow, Y. (1994) Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science* **264**: 1427–1433.
- Steinmetz, M., and Richter, R. (1994) Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through *in vivo* recombination. *Gene* **142**: 79–83.
- Takahashi, Y., Mitsui, A., Hase, T., and Matsubara, H. (1986) Formation of the iron-sulfur cluster of ferredoxin in isolated chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 2434–2437.
- Takahashi, Y., and Tokumoto, U. (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in Archaea and plastids. *J Biol Chem* **32**: 28380–28383.
- Tan, G., Lu, J., Bitoun, J.P., Huang, H., and Ding, H. (2009) 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.
- Tanaka, N., Kanazawa, M., Tonosaki, K., Yokoyama, N., Kuzuyama, T., and Takahashi, Y. (2016) Novel features of the ISC machinery revealed by characterization of *Escherichia coli* mutants that survive without iron-sulfur clusters. *Mol Microbiol* **99**: 835–848.

- Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2004) Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*. *J Biochem* **136**: 199–209.
- Tokumoto, U., Nomura, S., Minami, Y., Mihara, H., Kato, S., Kurihara, T., *et al.* (2002) Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. *J Biochem* **131**: 713–719.
- Tokumoto, U., and Takahashi, Y. (2001) Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J Biochem* **130**: 63–71.
- Tong, W.H., and Rouault, T.A. (2006) Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab* **3**: 199–210.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., Giezen, M. van der, *et al.* (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**: 172–176.
- Trotter, V., Vinella, D., Loiseau, L., Choudens, S.O. De, Fontecave, M., and Barras, F. (2009) The CsdA cysteine desulphurase promotes Fe/S biogenesis by recruiting Suf components and participates to a new sulphur transfer pathway by recruiting CsdL (ex-YgdL), a ubiquitin-modifying-like protein. *Mol Microbiol* **74**: 1527–1542.
- Tsaousis, A.D., Ollagnier de Choudens, S., Gentekaki, E., Long, S., Gaston, D., Stechmann, A., *et al.* (2012) Evolution of Fe/S cluster biogenesis in the anaerobic parasite *Blastocystis*. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 10426–10431.
- Uchiyama, I., Mihara, M., Nishide, H., and Chiba, H. (2013) MGD update 2013: The microbial genome database for exploring the diversity of microbial world. *Nucleic Acids Res* **41**: 631–635.

- Urbina, H.D., Silberg, J.J., Hoff, K.G., and Vickery, L.E. (2001) Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J Biol Chem* **276**: 44521–44526.
- Vinella, D., Brochier-Armanet, C., Loiseau, L., Talla, E., and Barras, F. (2009) Iron-sulfur (Fe/S) protein biogenesis: Phylogenomic and genetic studies of A-type carriers. *PLoS Genet* **5**: e000497.
- Wada, K., Hasegawa, Y., Gong, Z., Minami, Y., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2005) Crystal structure of *Escherichia coli* SufA involved in biosynthesis of iron-sulfur clusters: Implications for a functional dimer. *FEBS Lett* **579**: 6543–6548.
- Wada, K., Sumi, N., Nagai, R., Iwasaki, K., Sato, T., Suzuki, K., *et al.* (2009) 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.
- Winstedt, L., and von Wachenfeldt, C. (2000) Terminal oxidases of *Bacillus subtilis* strain 168: One quinol oxidase, cytochrome *aa*<sub>3</sub> or cytochrome *bd*, is required for aerobic growth. *J Bacteriol* **182**: 6557–6564.
- Wollers, S., Layer, G., Garcia-Serres, R., Signor, L., Clemancey, M., Latour, J.M., *et al.* (2010) 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.
- Ye, R., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M., and Li, L. (2000) Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J Bacteriol* **182**: 4458–4465.
- Yeo, W.S., Lee, J.H., Lee, K.C., and Roe, J.H. (2006) IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol Microbiol* **61**: 206–218.
- Yuda, E., Tanaka, N., Fujishiro, T., Yokoyama, N., Hirabayashi, K., Fukuyama, K., *et al.* (2017) Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron-sulfur

clusters. *Sci Rep* **7**: 9387.

Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 599–604.

Zhang, X.Z., and Zhang, Y.H.P. (2011) Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*. *Microb Biotechnol* **4**: 98–105.

Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., and Dean, D.R. (1994) Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. *Biochemistry* **33**: 4714–4720.

Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., and Dean, D.R. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2754–2758.

田中尚志 (2016) 大腸菌における鉄硫黄クラスター生合成系の機能解析..

**Table 1** 本研究で使用した菌株

| Strain | Genotype  | Reference or Source           |
|--------|---|-------------------------------|
| 168    | <i>Bacillus subtilis trpC2 sfp</i> <sup>0</sup>   | Laboratory strain             |
| SCK6   | <i>Bacillus subtilis his nprR2 mprE18 ΔaprA3 ΔeglS102 ΔbglT bglSRV lacA::P<sub>xyIA</sub>-comK Em<sup>r</sup></i> | Zhang and Zhang, 2011         |
| NY018  | <i>Bacillus subtilis ΔsufCD::Sp<sup>r</sup></i>   | This study                    |
| NY004  | <i>Bacillus subtilis ΔsufSU::Sp<sup>r</sup></i>   | This study                    |
| NY027  | <i>Bacillus subtilis ΔsufCDSUB::Sp<sup>r</sup></i>  | This study                    |
| NY012  | <i>Bacillus subtilis ΔsufB::Sp<sup>r</sup></i>  | This study                    |
| NY105  | <i>Bacillus subtilis lacA::P<sub>xyIA</sub>-comK Em<sup>r</sup></i>   | This study                    |
| NY144  | <i>Bacillus subtilis lacA::P<sub>xyIA</sub>-comK Em<sup>r</sup>, ΔsufC::Sp<sup>r</sup></i>                        | This study                    |
| NY145  | <i>Bacillus subtilis lacA::P<sub>xyIA</sub>-comK Em<sup>r</sup>, ΔsufD::Sp<sup>r</sup></i>                        | This study                    |
| NY151  | <i>Bacillus subtilis lacA::P<sub>xyIA</sub>-comK Em<sup>r</sup>, ΔsufS::Sp<sup>r</sup></i>                        | This study                    |
| NY153  | <i>Bacillus subtilis lacA::P<sub>xyIA</sub>-comK Em<sup>r</sup>, ΔsufU::Sp<sup>r</sup></i>                        | This study                    |
| NY116  | <i>Bacillus subtilis lacA::P<sub>xyIA</sub>-comK Em<sup>r</sup>, ΔsufB::Sp<sup>r</sup></i>                        | This study                    |
| NY120  | <i>Bacillus subtilis lacA::P<sub>xyIA</sub>-comK Em<sup>r</sup>, ΔsufCDSUB::Sp<sup>r</sup></i>                    | This study                    |
| NY081  | <i>Bacillus subtilis lacA::P<sub>xyIA</sub>-comK Em<sup>r</sup>, ΔsufSU::Sp<sup>r</sup></i>                       | This study                    |
| UT109  | <i>Escherichia coli</i> MG1655 $\Delta(\text{iscUA-hscBA})::\text{Km}^r \Delta(\text{sufABCDSE})::\text{Gm}^r$    | Tokumoto <i>et al.</i> , 2004 |
| NT1401 | <i>Escherichia coli</i> MG1655 $\Delta\text{iscS}::\text{Km}^r \Delta(\text{sufABCDSE})::\text{Gm}^r$             | Tanaka <i>et al.</i> , 2016   |
| NT2001 | <i>Escherichia coli</i> MG1655 $\Delta\text{iscU}::\text{Km}^r \Delta(\text{sufABCDSE})::\text{Gm}^r$             | Tanaka <i>et al.</i> , 2016   |

**Table 2** 本研究で使用したプラスミド

| Plasmid   | Description   | Reference or source         |
|---|---|-----------------------------|
| pAA101  | Cm <sup>r</sup> ; shuttle vector, replicative in <i>B. subtilis</i> (ori1060), P <sub>spac</sub> promoter | This study                  |
| pBMV4   | pAA101 derivative carrying <i>pmvk-mvd-mvk-idi</i> from <i>Streptomyces</i> sp.                           | This study                  |
| pBMV4 Nm <sup>r</sup>                               | pBMV4 with Cm <sup>r</sup> ::Nm <sup>r</sup>  | This study                  |
| pCm::Nm   | pIC177 with Cm <sup>r</sup> ::Nm <sup>r</sup>   | Steinmetz and Richter, 1994 |
| pHCMC05   | Cm <sup>r</sup> ; shuttle vector; replicative in <i>B. subtilis</i> , P <sub>spac</sub> promoter          | Nguyen <i>et al.</i> , 2005 |
| pHCMC05NMC  | pHCMC05 derivative with modified multi-cloning sites  | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufC</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>B. subtilis sufC</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufD</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>B. subtilis sufD</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufS</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>B. subtilis sufS</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufU</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>B. subtilis sufU</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufU</i><br>(SufU <sup>C41D</sup> )  | pHCMC05- <i>BssufU</i> carrying SufU <sup>C41D</sup> point mutation                                       | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufU</i><br>(SufU <sup>C66D</sup> )  | pHCMC05- <i>BssufU</i> carrying SufU <sup>C66D</sup> point mutation                                       | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufU</i><br>(SufU <sup>C128D</sup> ) | pHCMC05- <i>BssufU</i> carrying SufU <sup>C128D</sup> point mutation                                      | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufU</i><br>(SufU <sup>D43C</sup> )  | pHCMC05- <i>BssufU</i> carrying SufU <sup>D43C</sup> point mutation                                       | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufU</i><br>(SufU <sup>D43E</sup> )  | pHCMC05- <i>BssufU</i> carrying SufU <sup>D43E</sup> point mutation                                       | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufB</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>B. subtilis sufB</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufSU</i>                            | pHCMC05 derivative carrying <i>B. subtilis sufSU</i>  | This study                  |
| pHCMC05- <i>Bs sufCDSUB</i>                         | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>B. subtilis sufCDSUB</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Hp nifSU</i>                            | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>H. pylori nifSU</i>  | This study                  |
| pHCMC05- <i>Ec sufA</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>E. coli sufA</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Ec sufB</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>E. coli sufB</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Ec sufC</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>E. coli sufC</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Ec sufD</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>E. coli sufD</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Ec sufS</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>E. coli sufS</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Ec sufE</i>                             | pHCMC05-NMC derivative carrying <i>E. coli sufE</i>   | This study                  |
| pHCMC05- <i>Ec sufSE</i>                            | pHCMC05 derivative carrying <i>E. coli sufSE</i>  | This study                  |
| pHCMC05- <i>Ec sufSE</i>                            | pHCMC05- <i>EcsufSE</i> carrying SufE <sup>C51A</sup> point mutation                                      | This study                  |



(SufE<sup>C51A</sup>)

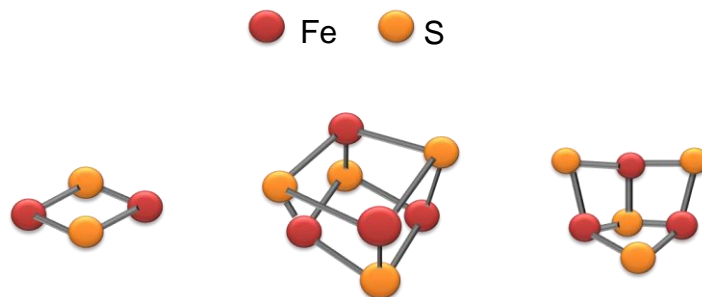
|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
| pHCMC05- <i>Ec iscSU</i>                      | pHCMC05 derivative carrying <i>E. coli iscSU</i>  | This study                       |
| pHCMC05- <i>Ec csdAE</i>                      | pHCMC05 derivative carrying <i>E. coli csdAE</i>  | This study                       |
| pUMV22 Sp <sup>r</sup>                        | Sp <sup>r</sup> ; pUC118 derivative carrying <i>mvk-pmvk-mvd</i> from <i>Streptomyces</i> sp. | Tanaka <i>et al.</i> , 2016      |
| pRKNMC  | Tc <sup>r</sup> ; IncP-1 replicon, low-copy-number vector, P <sub>lac</sub> promoter          | Nakamura <i>et al.</i> , 1999    |
| pRKSUF017                                     | pRKNMC derivative carrying <i>E. coli sufABCDSE-ynhG</i>                                      | Takahashi and Tokumoto, 2002     |
| pRK- <i>sufA_CDSE</i>                         | pRKSUF017 derivative carrying <i>E. coli sufACDSE</i> ( $\Delta$ <i>sufB</i> )                | This study                       |
| pRK- <i>sufAB_DSE</i>                         | pRKSUF017 derivative carrying <i>E. coli sufABDSE</i> ( $\Delta$ <i>sufC</i> )                | Hirabayashi <i>et al.</i> , 2015 |
| pRK- <i>sufABC_SE</i>                         | pRKSUF017 derivative carrying <i>E. coli sufABCSE</i> ( $\Delta$ <i>sufD</i> )                | Wada <i>et al.</i> , 2009        |
| pRK- <i>sufABCD_E</i>                         | pRKSUF017 derivative carrying <i>E. coli sufABCDE</i> ( $\Delta$ <i>sufS</i> )                | This study                       |
| pRK- <i>sufABCDS</i>                          | pRKSUF017 derivative carrying <i>E. coli sufABCDS</i> ( $\Delta$ <i>sufE</i> )                | Takahashi and Tokumoto, 2002     |
| pRK- <i>sufABCD</i>                           | pRKSUF017 derivative carrying <i>E. coli sufABCD</i> ( $\Delta$ <i>sufSE</i> )                | This study                       |
| pBBR1MCS-4                                    | Ap <sup>r</sup> ; pBBR replicon, low-copy-number vector, P <sub>lac</sub> promoter            | Kovach <i>et al.</i> , 1995      |
| pBBR- <i>Bs sufC</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>B. subtilis sufC</i>  | This study                       |
| pBBR- <i>Bs sufD</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>B. subtilis sufD</i>  | This study                       |
| pBBR- <i>Bs sufS</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>B. subtilis sufS</i>  | This study                       |
| pBBR- <i>Bs sufU</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>B. subtilis sufU</i>  | This study                       |
| pBBR- <i>Bs sufB</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>B. subtilis sufB</i>  | This study                       |
| pBBR- <i>Bs sufSU</i>                         | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>B. subtilis sufSU</i>                                       | This study                       |
| pBBR- <i>Ec sufA</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli sufA</i>  | This study                       |
| pBBR- <i>Ec sufB</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli sufB</i>  | This study                       |
| pBBR- <i>Ec sufC</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli sufC</i>  | Hirabayashi <i>et al.</i> , 2015 |
| pBBR- <i>Ec sufD</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli sufD</i>  | Wada <i>et al.</i> , 2009        |
| pBBR- <i>Ec sufS</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli sufS</i>  | This study                       |
| pBBR- <i>Ec sufE</i>                          | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli sufE</i>  | This study                       |
| pBBR- <i>Ec sufSE</i>                         | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli sufSE</i>   | This study                       |
| pBBR- <i>Ec sufSE</i> (SufE <sup>C51A</sup> ) | pBBR4- <i>Ec sufSE</i> carrying SufE <sup>C51A</sup> point mutation                           | This study                       |
| pBBR- <i>Ec iscSU</i>                         | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli iscSU</i>   | This study                       |
| pBBR- <i>Ec csdAE</i>                         | pBBR1MCS-4 derivative carrying <i>E. coli csdAE</i>   | This study                       |

**Table 3** 本研究で使用したプライマー

| Oligonucleotide      | Sequence (5'-3')                             |
|----------------------|--|
| mvk-F                | GGAGATCTGGAGGTTGTTTTATGACGACAGGTCAGCGCAC     |
| mvk-R                | GGATCGATTTAGATCCCTTCCAGGGCAG                 |
| pmvk-F               | GGAAGCTTGGAGGTTGTTTTATGCAGAAAAGACAAAGGGA     |
| pmvk-R               | GGTCTAGATCACTGCGCATGGTTGTCTGA                |
| mvd-F                | GGTCTAGAGGAGGTTGTTTTATGCGCAGTGAACACCCGAC     |
| mvd-R                | GGAGATCTTCATGCGCCCTCGCTCAGCA                 |
| idi-F                | GGATCGATGGAGGTTGTTTTATGACCAGCGCCCAACGCAA     |
| idi-R                | GGGCATGCTCATCGTGTGCTTCCCGTCG                 |
| Spc-Fw               | GGGCAGTGAGCGCAACGC                           |
| Spc-Rv               | GCCTAATTGAGAGAAGTTTCTA                       |
| sufC-up-F            | CTGCGTGAGGTGGATAAAGG                         |
| Spc-sufC-up-R        | GCGTTGCGCTCACTGCCAGCCATATCTATACCTCCAAAAA     |
| Spc- $\Delta$ sufC-F | TAGAACTTCTCTCAATTAGGCGCGTTAGGGGATTAATATGA    |
| Bs sufS-R2           | GCTGATGAAGGATCGGGAAC                         |
| Bs sufC-up-F2        | GAGGAATGTGCAAGGCACG                          |
| Spc- $\Delta$ sufD-R | GCGTTGCGCTCACTGCCCTTACGCTTCTTGGCCAACAG       |
| Spc-sufS-F           | TAGAACTTCTCTCAATTAGGCCGAAAGGAAAGTGAAGTAATGAA |
| Bs sufUR-xh          | CTCGAGATTGCCGCTTCTTCTTTTCG                   |
| Bs suf-seq2          | CGCTGATCGACATTGAAAACG                        |
| sufD-Spc-R           | GCGTTGCGCTCACTGCCCTTACTTCACTTTCCTTTTCGATAA   |
| Spc- $\Delta$ sufS-F | TAGAACTTCTCTCAATTAGGCCAAAAGACAAAGGAGTATTTTAC |
| sufB-R               | TGTAAACGTTGTTGCCCCAG                         |
| Bs suf-seq4          | GCGTGCTGTCATTGAAACAC                         |
| Spc- $\Delta$ sufU-R | GCGTTGCGCTCACTGCCCATTAAGACATTTGTAAAATACTC    |
| Spc-sufB-F           | TAGAACTTCTCTCAATTAGGCGGATTGGAGTGAAAATGGATG   |
| Bs sufS-FXh          | CCGGCTCGAGCGAAAGGAAAGTGAAGTAATG              |
| Spc-sufU-R           | GCGTTGCGCTCACTGCCCATCCATTTTCACTCCAATCC       |
| Spc-sufB-down-F      | TAGAACTTCTCTCAATTAGGCCCTTTGTTTATCAAGGGGTTTAG |
| sufB-down-R          | CCGCGCTCCCCCTTAG                             |
| pHCMC linkerF        | CTAGAGCATGCTCGAGATGAGCTCCGCGGCTAGCTCGCGA     |
| pHCMC linkerR        | TCGCGAGCTAGCCGCGGAGCTCATCTCGAGCATGCT         |
| Bs SufF-Xb           | CTAGTCTAGAGGAGGTATAGATATGGCTGC               |
| Bs sufC-R-Sc         | GAGCTCATATTAATCCCCCTAACGCT                   |

|                 |                                     |
|-----------------|-------------------------------------|
| Bs sufD-F-Xb    | TCTAGAGCGTTAGGGGGATTAATATG          |
| Bs sufΔSU-R     | CATTACTTCACTTTTCCTTTTCGATAACAG      |
| Bs sufS-R-Sc    | GAGCTCTGTACAATGTATCTAAGTTTGCA       |
| Bs sufU-F-Xb    | TCTAGACAAAGGAGTATTTTACAAATG         |
| Bs SufU-RNh     | CCGGGCTAGCTTTTAATTGCCGCCTT          |
| Bs sufΔSU-F     | GGATTGGAGTGAAAATGGATGGC             |
| Bs SufR-Sc      | GCCGGAGCTCATCATTAACCGATAGAACC       |
| Bs-sufU-C41D_F  | GACGACCGCATCAGACTG                  |
| Bs-sufU-C41A_R  | TGTCGGATTGTTCATATCCACGAC            |
| Bs-sufU-C66D_F  | GATTCCATTTCAATGGCATCCGCTTC          |
| Bs-sufU-C66A_R  | GCCTTCCCCTTCAAACCTTCGC              |
| Bs-sufU-C128D_F | GATGCAACCCTGTCATGGAAAGCAC           |
| Bs-sufU-C128A_R | TTTGATACGGGCAGGGAATTTTGAAAC         |
| Bs-sufU-D43C_F  | TGCATCAGACTGACAATGAAGCT             |
| Bs-SufU-D43E_F  | GAGCGCATCAGACTGACAATGAAGCTT         |
| Bs-sufU-D43A_R  | GCCGCATGTCGGATTGTTCATATC            |
| Bs suf-seq1     | CTTAACGAAGGCTTCTCAGG                |
| Bs suf-seq3     | CAAACCTTTACGGTGACGGC                |
| Bs suf-seq5     | AGCCCTGCTGGAAAACATGG                |
| Bs sufB-R2      | CAATCCGCGCTCTGAACGG                 |
| Bs sufB-down-R2 | CAAATTCGGCACGCCGGC                  |
| EcSufA-F        | CATATGGACATGCATTCAGGAAC             |
| EcSufA-R        | GGATCCTCGAGCTCATACCCCAAAGCTTTCGC    |
| EcSufB-F        | CATATGTGGCTGTGGCGAAAGC              |
| EcSufB-R        | GGATCCTCGAGCTCATCCGACGCTGTGTTCAAG   |
| EcSufS-F        | CATATGATTTTTTCCGTCGAC               |
| EcSufS-R        | GGATCCTCGAGCTCATCCCAGCAAACGGTGAATAC |
| EcSufE-F        | CATATGGCTTTATTGCCGGATAAAG           |
| EcSufE-R        | GGATCCTCGAGCTCAGCTAAGTGCAGCGGCTTTG  |
| Ec-sufE-C51A_F  | GCTCAGAGTCAGGTGTGGATTGTCAT          |
| Ec-sufE-C51A_R  | GCCCTGAATGCTATTTTGTGGACT            |
| sufSF           | CCGGCTCGAGTCTAGACGGCTGCCAGGAGGTGC   |
| sufER           | CCGGGCTAGCGAATTCCCTGTTATCCCAGCAAAC  |
| csdAF           | CCGGCTCGAGGAGTACCATGAACGTTTT        |
| ygdKR           | CCGGGCTAGCGAACGTCTTATCCGACCC        |
| iscSF-Xb        | TCTAGAGCATTGAGTGATGTACGGAG          |

|                |                                    |
|----------------|------------------------------------|
| iscUR-Sm       | CCCGGGCAAACCTCAACTCTTATTTTGC       |
| SufA-RSc       | GGGCTCGAGCTCATACCCCAAAGCTTTCGCCAC  |
| C-FSc2         | GCTCTAGAGCTCTGAACACAGCGTCGGATAAG   |
| D-RSc2         | GCTCTAGAGCTCAAAAATCATCTTGCACCTCCTG |
| E-FSc2         | GCTCTAGAGCTCCACCGTTTGCTGGGATAACA   |
| BST3           | ACTAAAGGGAACAAAAGCTGG              |
| BST7           | CTCACTATAGGGCGAATTGG               |
| Bs sufΔSU-F    | GGATTGGAGTGAAAATGGATGGC            |
| Bs SufR-Sc     | GCCGGAGCTCATCATTAACCGATAGAACC      |
| XbaI linker    | GGGTCTAGACCC                       |
| SacII linker   | GGCCGCGGCC                         |
| Ec-sufE-C51A_F | GCTCAGAGTCAGGTGTGGATTGTCAT         |
| Ec-sufE-C51A_R | GCCCTGAATGCTATTTTGTGGACT           |
| BST3           | ACTAAAGGGAACAAAAGCTGG              |
| BST7           | CTCACTATAGGGCGAATTGG               |



**Fig. 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。鉄原子を赤色、硫黄原子を黄色の球棒モデルで示す。Fe-S クラスターは一般的に、タンパク質内部の Cys 残基に配位結合しているが、まれに His 残基のイミダゾール窒素原子や、Asp 残基のカルボキシル酸素原子に配位する例もある。

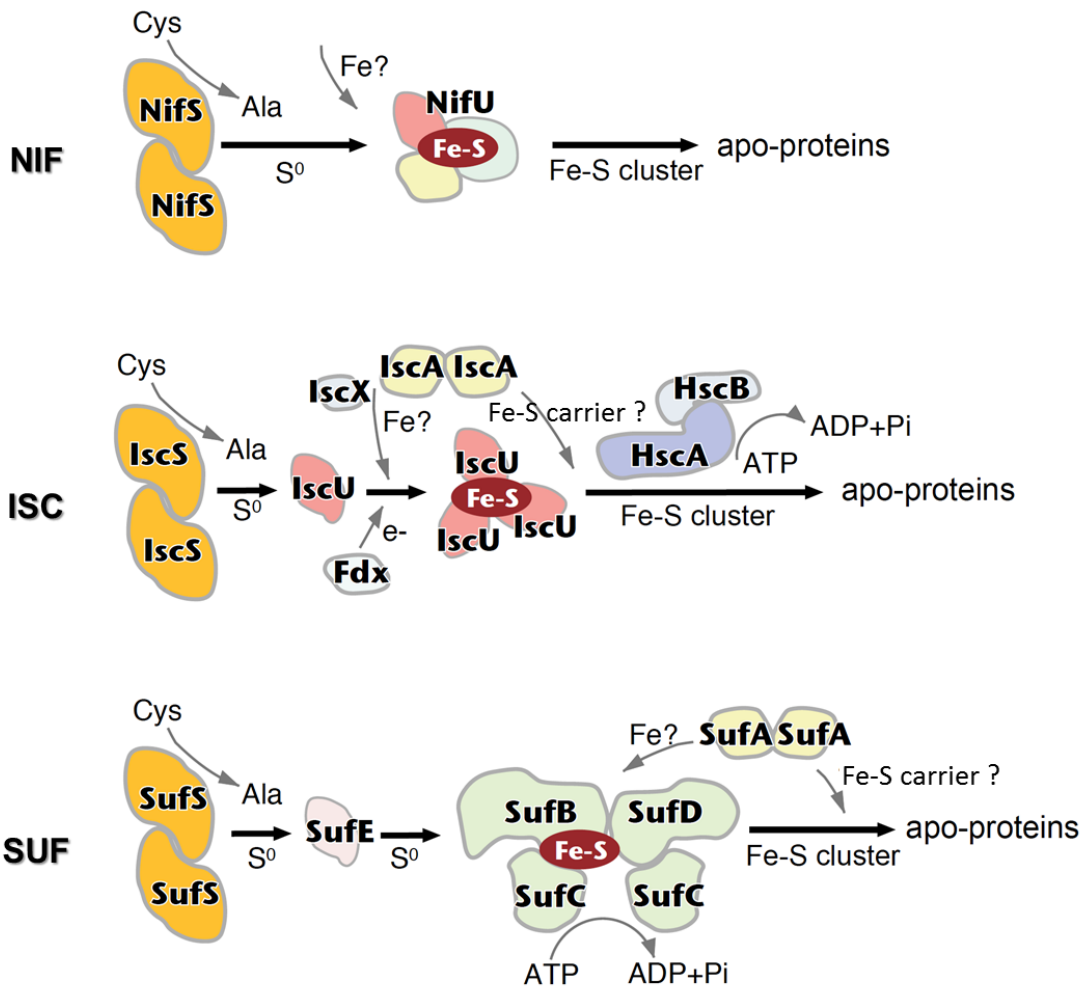


Fig. 2 3種類のFe-Sクラスター生合成マシナリーの作動モデル

Fe-S クラスター形成は、硫黄源である L-システインからシステイン脱硫黄酵素 (NifS / IscS / SufS) が硫黄原子を引き抜く過程から始まる。その後、NIF マシナリーでは硫黄原子が NifU に、ISC マシナリーでは IscU に渡され、NifU / IscU で新規に Fe-S クラスターが形成される。SUF マシナリーでは SufS から SufE に硫黄原子が渡され、次いで SufBCD 複合体に運ばれて Fe-S クラスターが形成される。

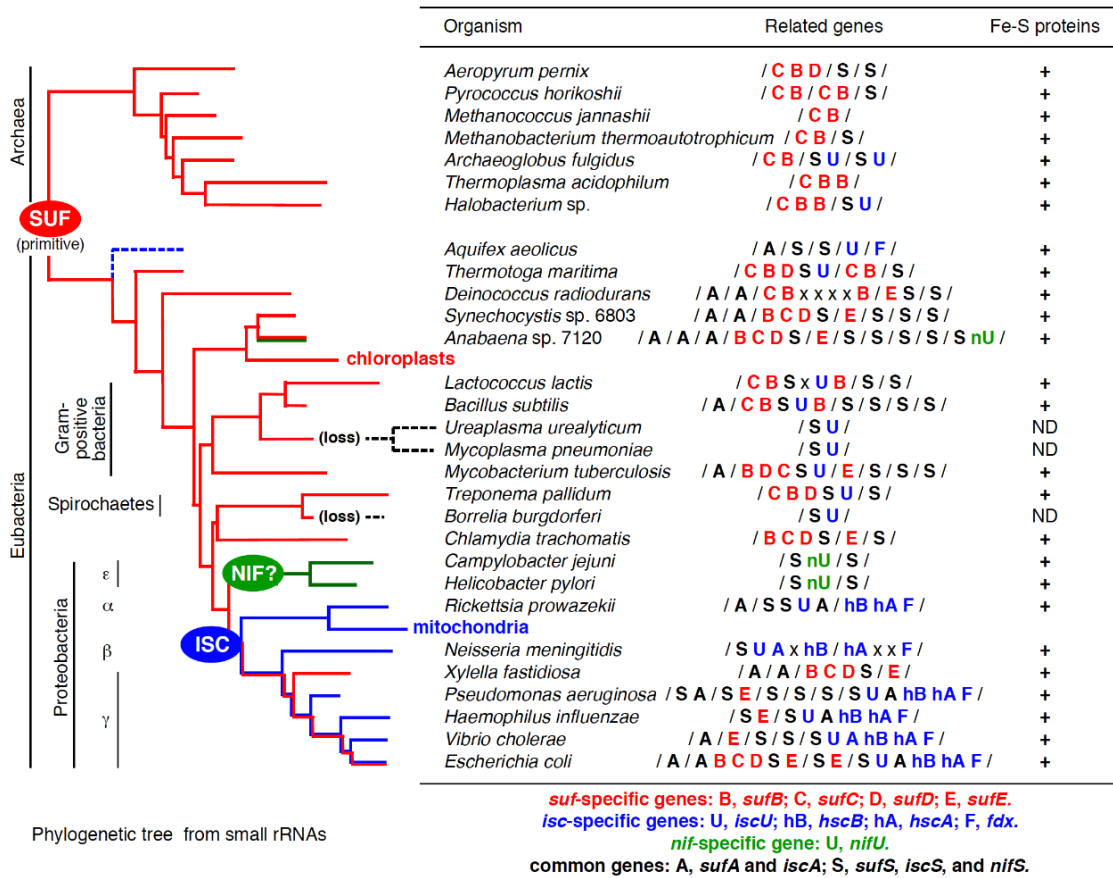


Fig. 3 Fe-S クラスタースynthesisの成分の分布

大腸菌の SUF マシナリーに特徴的な遺伝子 (B, *sufB*; C, *sufC*; D, *sufD*; E, *sufE*) を赤字で、ISC で特徴的な遺伝子 (U, *iscU*; hB, *hscB*; hA, *hscA*; F, *Fdx*) を青字で、NIF マシナリーに特徴的な遺伝子 (nU, *nifU*) を緑字で表す。これらのマシナリーで共通する成分 (S, *sufS* / *iscS* / *nifS*; A, *sufA* / *iscA*) は黒字で示している。左の系統樹は 5S RNA の配列に基づいている。論文 (Tokumoto *et al.*, 2004) より改変。

```

● IscU_E.coli          ----- --MAYSEKVI DHYENPRNVG SFDNNNDN-- ---VGSQMVG APACGDVMKL QIKVND-EGI IEDARFKTYG CQSAIASS
IscU_H.influenzae    ----- --MAYSEKVI DHYENPRNVG SLDKKDSN-- ---VSTQMVG APACGDVMQL QIKVND-NGI IEDAKFKTYG CQSAIASS
IscU_A.vinelandii    ----- --MAYSDKVI DHYENPRNVG KLDQDPD-- ---VSTQMVG APACGDVMRL QIKVNE-QGI IEDAKFKTYG CQSAIASS
IscU_S.cerevisiae    AMGVLRASSI TKRLYHPKVI EHYTHPRNVG SLDKKLPN-- ---VSTGLVG APACGDVMRL QIKVNDSTGV IEDVKFKTFG CQSAIASS
IscU_M.musculus      PRLPARELSA PARLYHKKVIV DHYENPRNVG SLDKTSKN-- ---VSTGLVG APACGDVMKL QIKVNE-KGK IVDARFKTFG CQSAIASS
IscU_A.aeolicus      ----- MSPEYNEKVL DBFLNPRNVG VLEDAN----- ---GVQCG NPA CGDAWLF TIKVNPENDV IEDVRFKTFG CQSAIASS
Nifu_A.vinelandii    ----- MWD-YSEKVK EHFYMPKNAG AVEGAN----- ---AIGDVG SLS CGDALRL TLKVPETDV ILDAGFQTFG CQSAIASS
● Nifu_H.pylori      MAKHDLVGSV LWDAYSEKIQ RRMDNPTHLG VITEEQAKAK NAKLIVADYG AECGDAVRL YWLVESTDR TVDAKFKSPG CQTAIASS
Sufu_T.maritima      ----- MV FKMMEYEAAL DYANSKKFRG KLDDATVIE----- ---EGK NIS CGDEITL YLKVED--GV VKDAKFEFGM CVISQA-A
Sufu_S.pyogenes      ----- MALSK LNHLVMAVVA DSKRPHHHG QLDGVEA-- ---VQLN NPTCGDVISL TVKFD--DK IEDIAFAGNG CTISTAAS
● Sufu_B.subtilis    ----- MSFNAN LDTLYRQVIM DHYKNPRNKG VLNDSIVV-- ---DMN- NPTCGDRIRL TMKLG--DI VEDAKFEFGC CSISMA-A

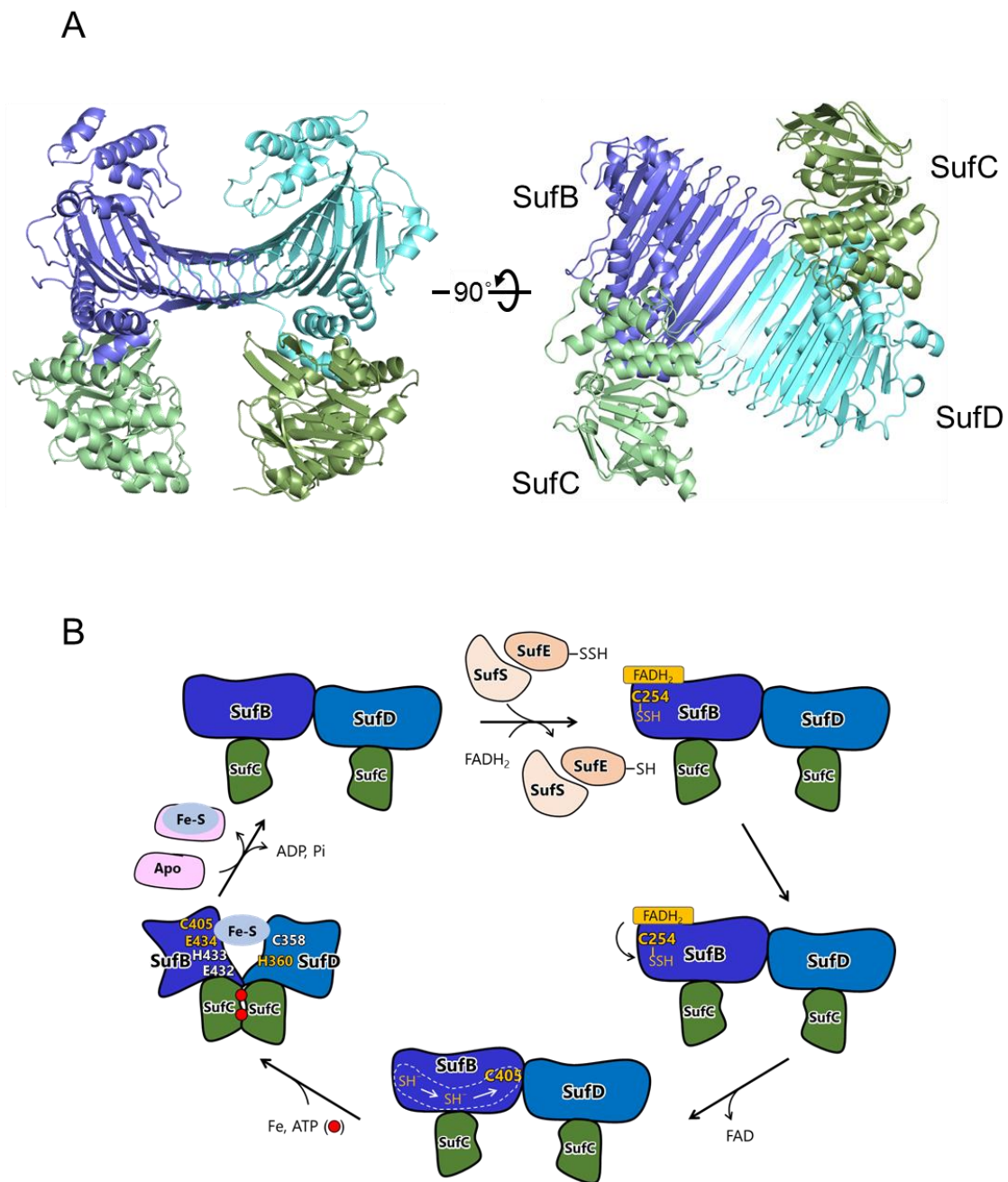
● IscU_E.coli          SL VTEWVKGKSL DEAQAIKNTD IAEELE----- ---LPPVK IHC ILAEDA IKAAIADYKS KREAK----- ----
IscU_H.influenzae    SL ITEWVKGKSL EEAGAIKNSQ IAEELE----- ---LPPVK VHC ILAEDA IKAAIADYKA KQG----- ----
IscU_A.vinelandii    SL ATEWVKGRTL EEAEIKNTQ IAEELE----- ---LPPVK IHC VLAEDA IKAAVRYKH KKGLV----- ----
IscU_S.cerevisiae    SY MTELVQMTL DDAKKNTE IAKELS----- ---LPPVK LHC MLEDA IKAAIKDYKS KRNTPTMLS-----
IscU_M.musculus      SL ATEWVKGTV EEALTKNTD IAKELC----- ---LPPVK LHC MLEDA IKAALADYKL QBSKKEEPE KQ---
IscU_A.aeolicus      SM LTEMVKGPPI QYALNLTYPD IFELGG----- ---LPEK IHC TNLGLET LHVAIKDYLM KQGRVEEASK IPDCY
Nifu_A.vinelandii    SA LTEMVKGLTL DEALKISQD IADYLDG----- ---LPEK MHC VMGRE A LQAVAN/RG ETIEDDHEEG ALICK
● Nifu_H.pylori      DM MVELCLN RV QDAVKITNLD VERGLRDDP----- -DTPAVFGQK MHC VM YDV IKAAGM/LG KNAEDFEEI IVCE-
Sufu_T.maritima      SL MLERIIQERV EEIFSLIEEA EKMSRGENFD EGKLN-VTL MSDIKNYFAR VKCFILAWKT LKALKKISR P-----
Sufu_S.pyogenes      SM MTDVAIGYSK EEALALADIF SEMVQGENP AQKELGEAEL LAGVAKFQR IKCTLAWNA LKALKRSAN AQHLTDQNVK EGKNV
● Sufu_B.subtilis    SM MTAQAIKGD IETALSMKIF SDMMQKEYD DSIDLGDIEA LQGVSKFAR IKCATLSWKA LEKGVAK--- -----E EGGN-

```

Fig. 4 IscU / NifU / SufU のアミノ酸配列の比較

NifU については IscU と相同な N 末端ドメインの配列のみを示している。本研究で取り上げたものを青丸で示した。





**Fig. 5 大腸菌の SufBCD 複合体**

A. 大腸菌 SufBCD 複合体の結晶構造 (PDB ID: 5AWF)

B. 大腸菌 SufBCD 複合体における Fe-S クラスター形成機構のモデル。論文 (Yuda *et al.*, 2017) より改変。

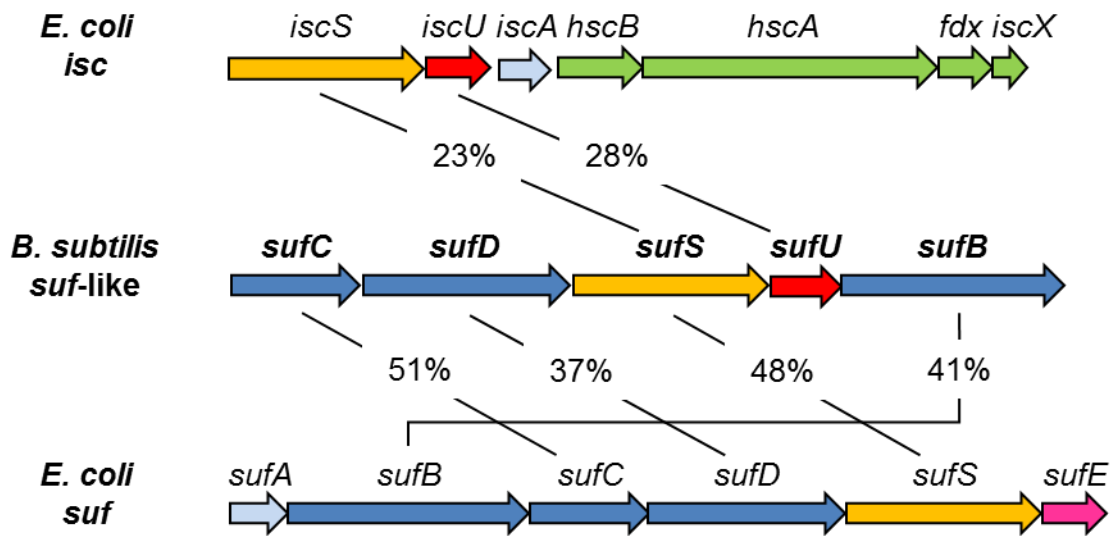
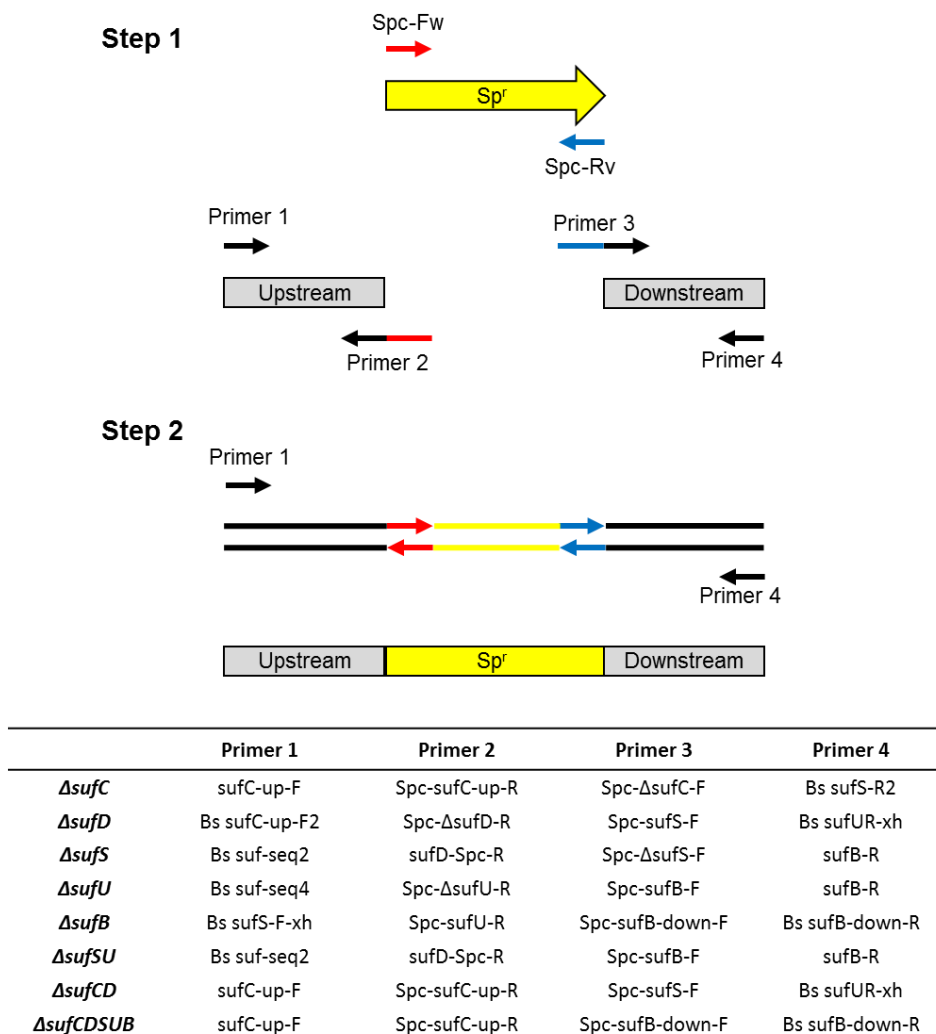


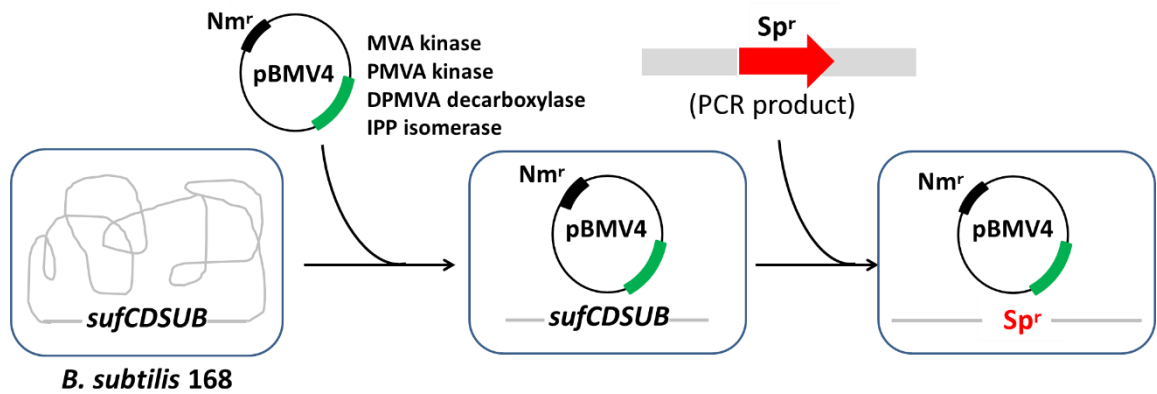
Fig. 6 大腸菌と枯草菌の Fe-S クラスタースynthesis オペロンの比較

大腸菌は *iscSUA-hscBA-fdx-iscX* オペロンにコードされる ISC マシナリーと、*sufABCDE* オペロンにコードされる SUF マシナリーの 2 種類の Fe-S クラスタースynthesis 系を有している。一方、枯草菌などのグラム陽性菌では、*sufCDSUB* オペロンにコードされる SUF 様マシナリーが、Fe-S クラスタースynthesis を担うと考えられており、このオペロンの遺伝子はすべて枯草菌の生育に必須である。この SUF 様マシナリーは、大腸菌 SUF マシナリーの SufA、SufE を除く SufB、SufC、SufD、SufS と、ISC マシナリーの IscU (枯草菌では SufU と改称) という成分から構成されている。アミノ酸レベルでの同一性を%で示す。



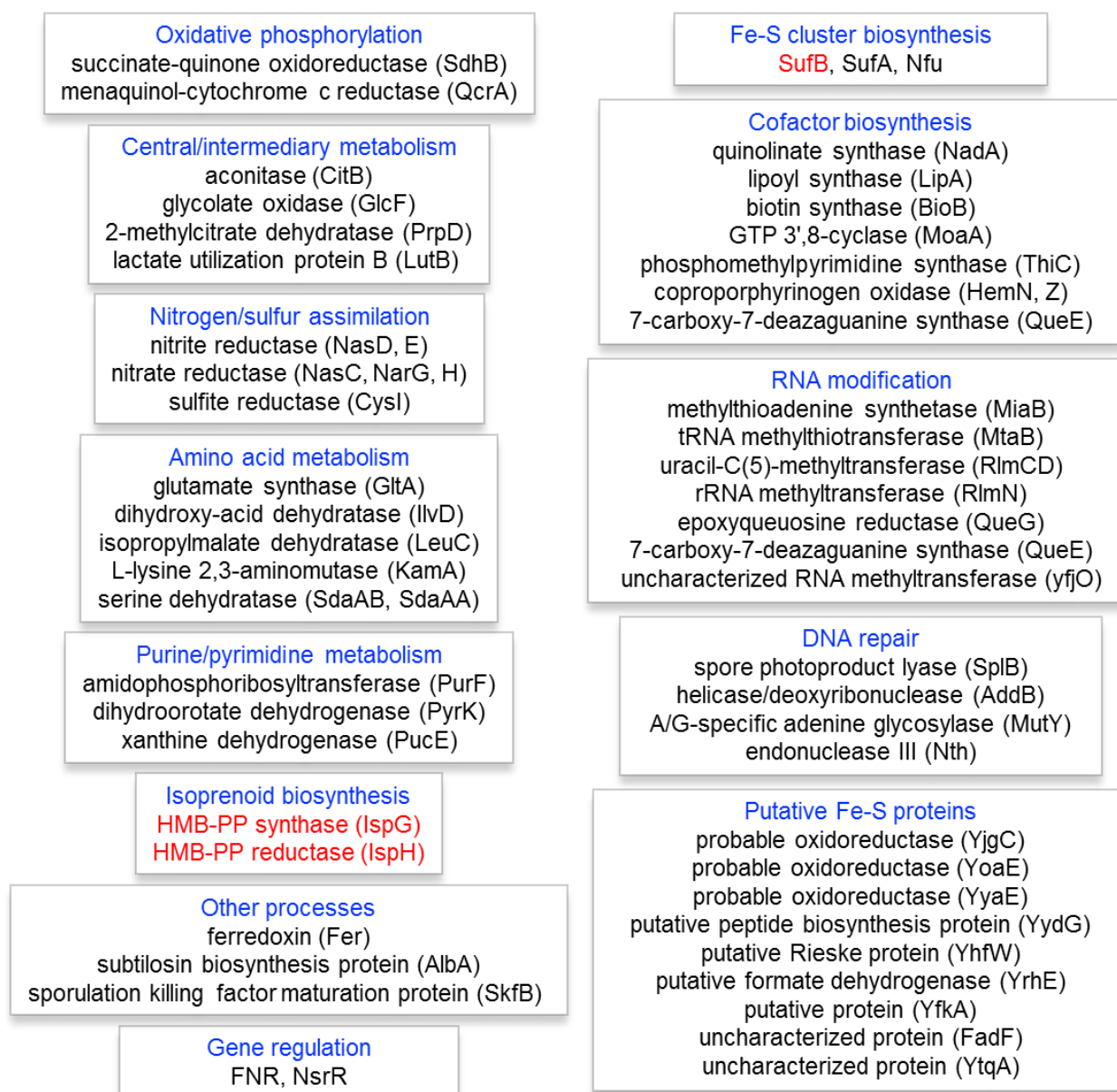
**Fig. 7 枯草菌 *suf* 様オペロン破壊のストラテジー (1)**

スペクチノマイシン耐性遺伝子 ( $Sp^r$ ) は、pAPNC213 (HEF) プラスミドを鋳型とし、Spc-Fw と Spc-Rv の 2 種類のプライマーを用いて PCR で増幅した。標的とする遺伝子のコード域の上流域と下流域 (それぞれ 800-1500 bp) は、プライマーセットにそれぞれ、Primer 1 と 2、Primer 3 と 4 を用いて、KOD-Plus- Neo DNA polymerase で増幅した。なお、Primer 2 と 3 の 5'側には、 $Sp^r$  の配列 (約 20 nt) を付加している。Step 2 の PCR では、3 種類の PCR 産物を混合し、これらを PCR で連結させた。



**Fig. 8 枯草菌 *suf* 様オペロン破壊のストラテジー (2)**

まず、枯草菌 168 株に、放線菌由来の MVA 経路の 4 遺伝子をクローン化したプラスミド *pBMV4* を導入した。次いで、PCR で作成した遺伝子破壊用の *Sp<sup>r</sup>* カセットを導入した。形質転換体の選択には、MVA とグルコース、ピルビン酸を含む富栄養培地 (2×YT complete 培地) に 200 μg/ml *Sp* を添加した寒天培地を用いた。



**Fig. 9 枯草菌 168 株の Fe-S タンパク質群**

枯草菌 168 株に見られる 60 種類の Fe-S タンパク質を、機能によって分類した。生育に必要な Fe-S タンパク質を赤字で示す。

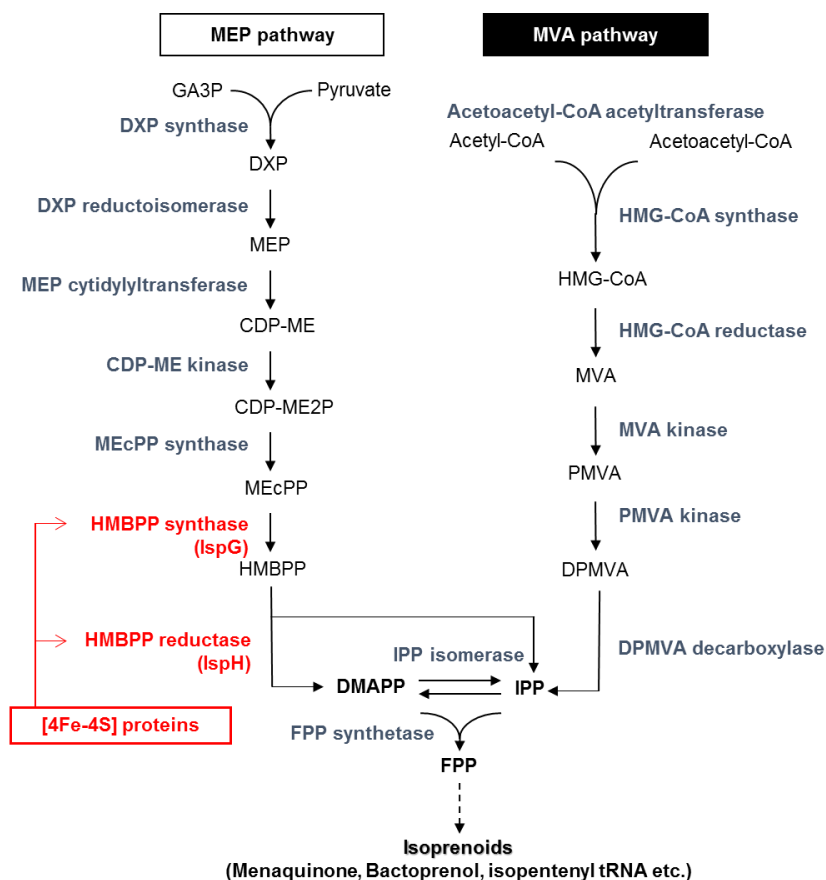
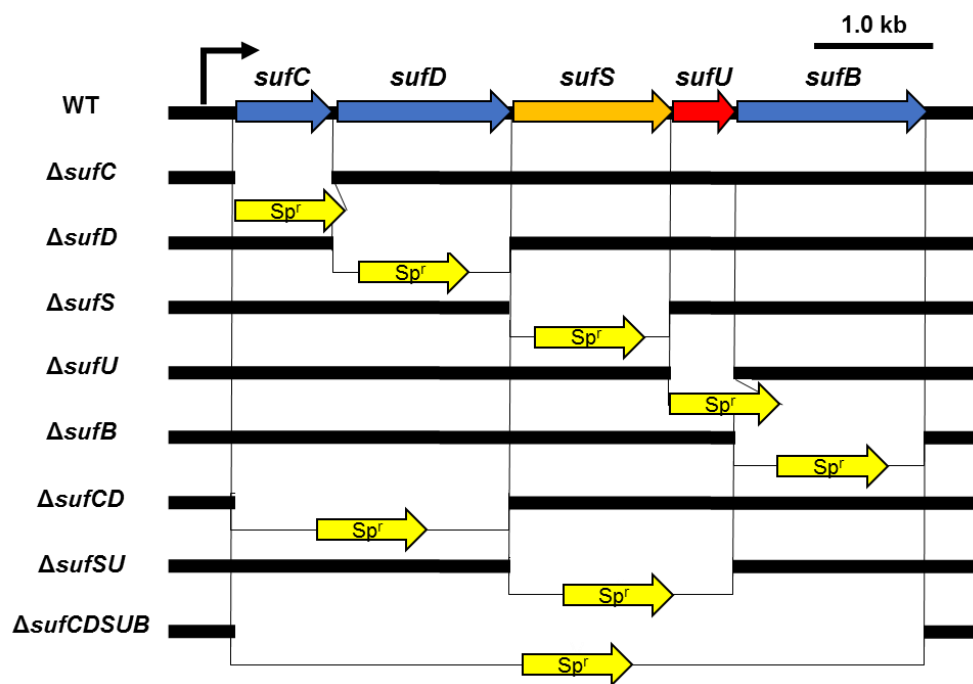


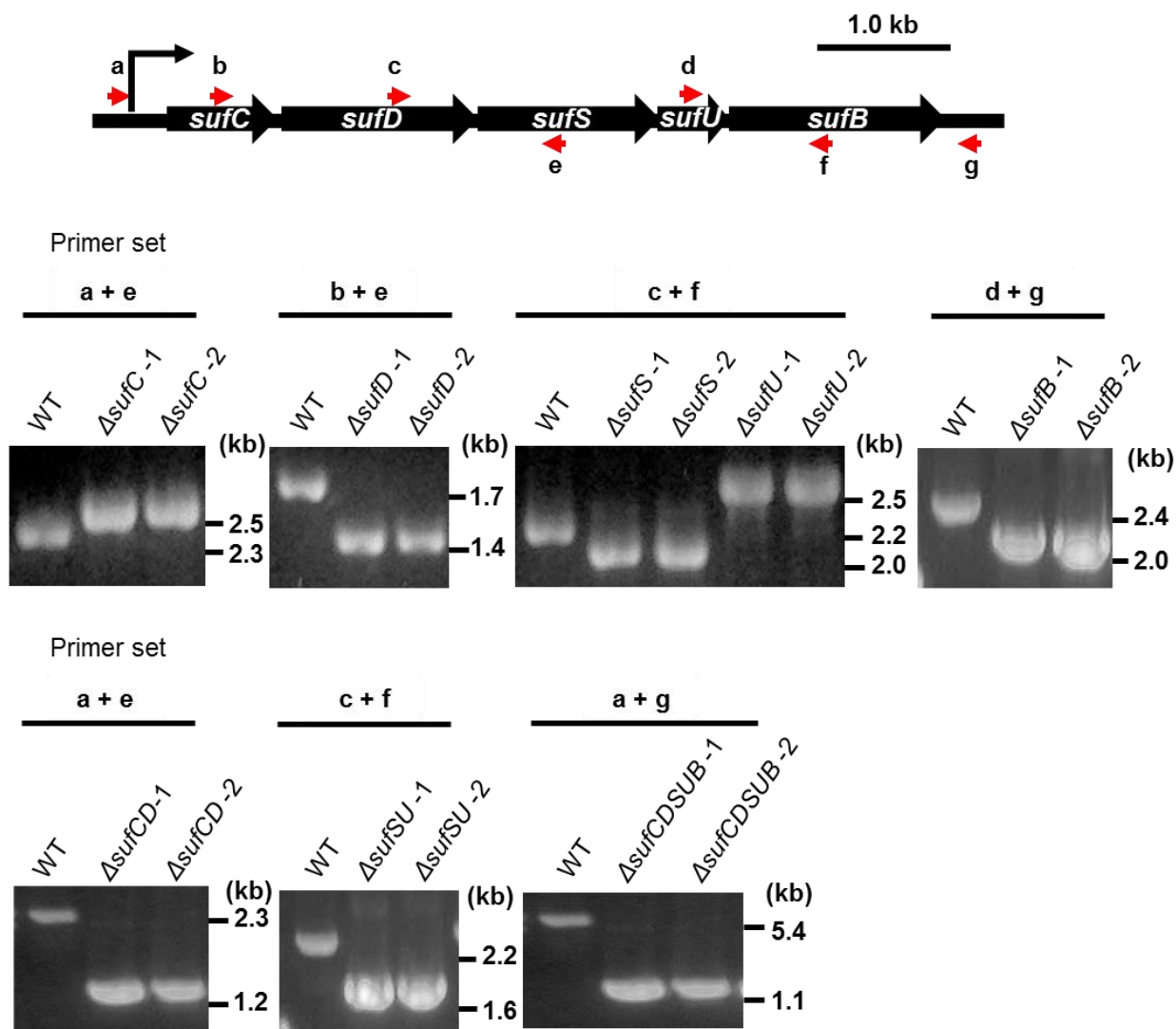
Fig. 10 2種類のイソプレノイド生合成経路

イソプレノイドの生合成経路には、MVA経路と非MVA経路（MEP経路）の2種類が存在する。大腸菌や枯草菌はMEP経路でイソプレノイドを合成している。一方、放線菌などの一部のバクテリアや真核生物はMVA経路を持つことが知られている。MEP経路には2種類のFe-S酵素、IspG (*(E)*-1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphatase (HMB-PP) synthase) と IspH (HMB-PP reductase) が関与しているが、MVA経路にはFe-S酵素が存在しない。略号：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; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA.



**Fig. 11 構築した枯草菌 *suf* 様オペロンの破壊株**

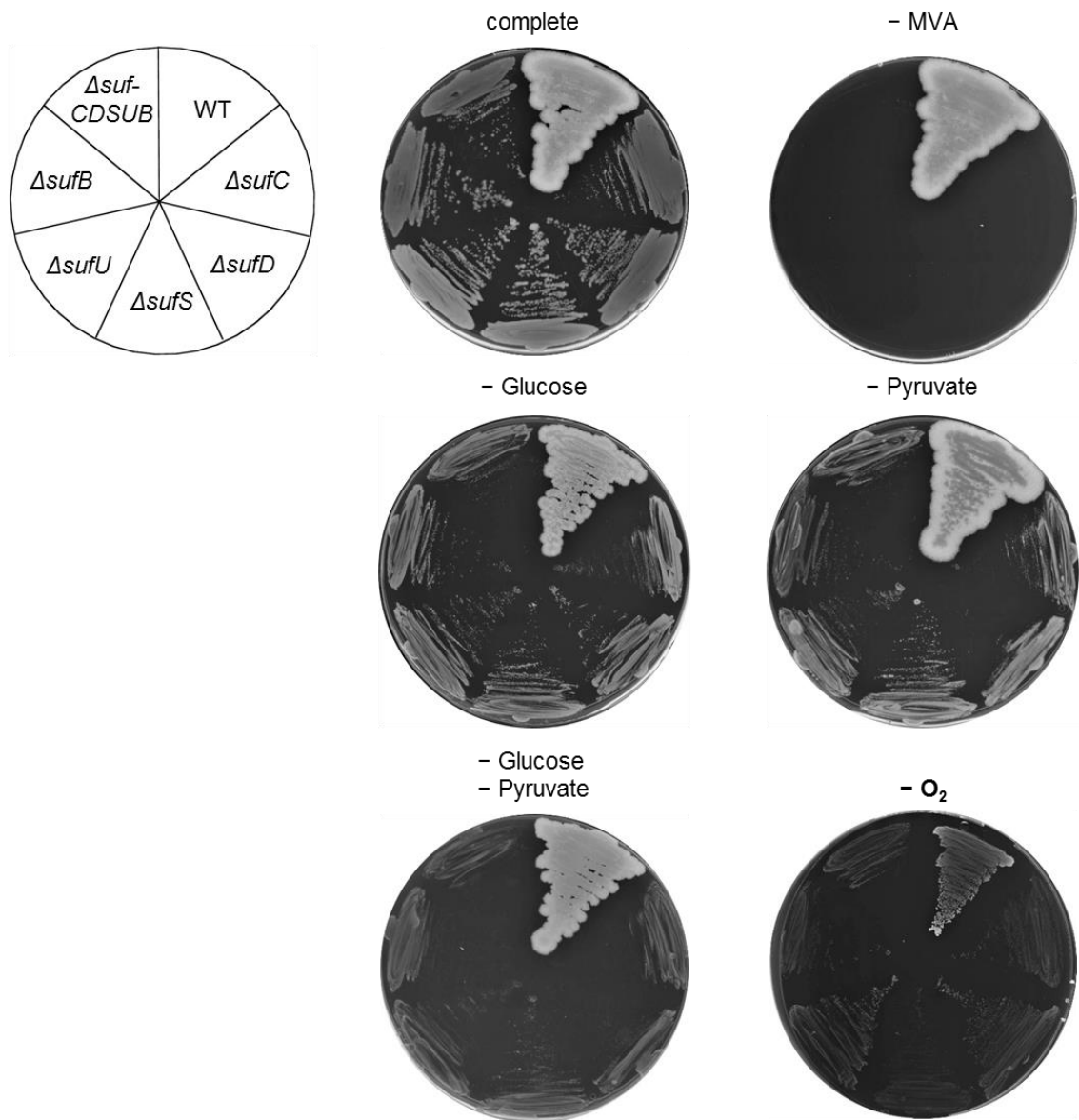
相同組換えによって、ゲノム上の *suf* 様オペロンの遺伝子を個別に、あるいはいくつかを組み合わせて破壊した。



**Fig. 12** コロニーPCRによる *suf* 様オペロン破壊株の遺伝子型の確認

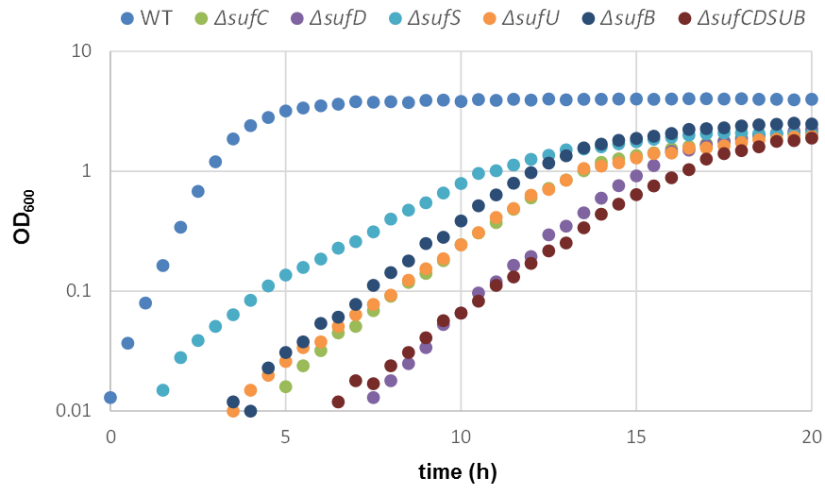
目的の遺伝子が破壊されていることをコロニーPCR によって確認した。プライマーは以下の組み合わせで使用し (Primer a, *sufC*-up-F2; b, Bs *suf*-seq1; c, Bs *suf*-seq3; d, Bs *suf*-seq5; e, Bs *sufS*-R2; f, Bs *sufB*-R2; g, Bs *sufB*-down-R2)、それらの配列は、Table 3 に示す。





**Fig. 13** *sul* 様オペロン破壊株の富栄養寒天培地における生育

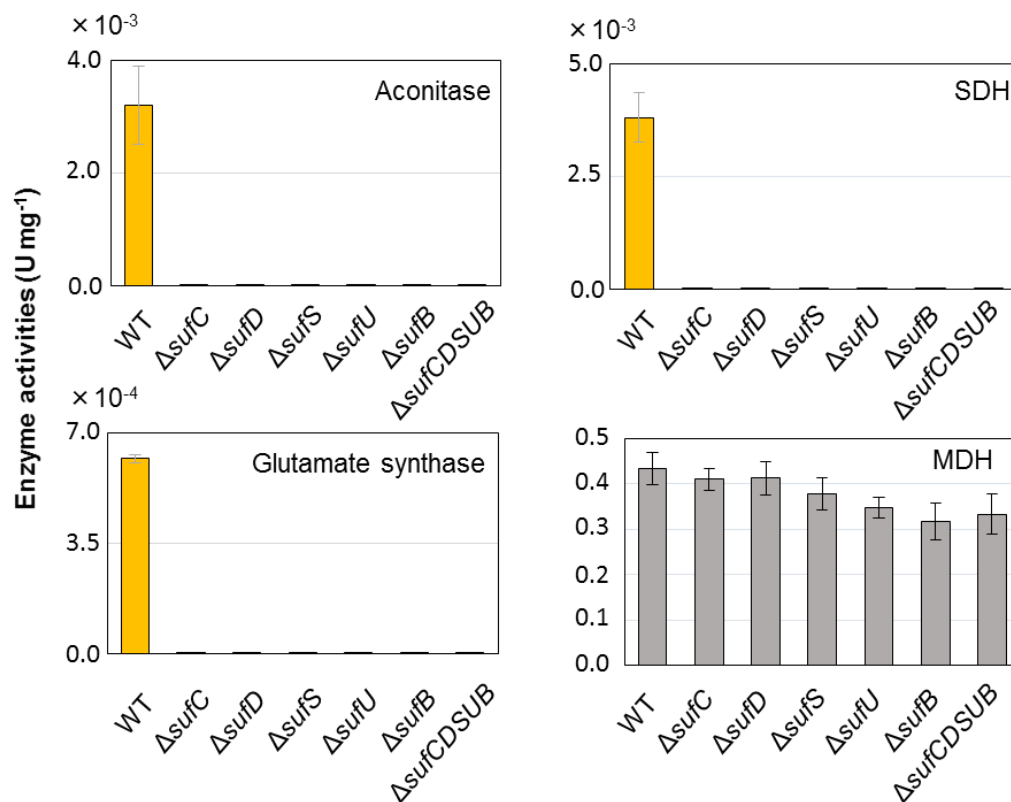
枯草菌野生株と 6 種類の *sul* 様オペロン破壊株を、好気、あるいは嫌気条件下で、37°C、48 時間培養した。寒天培地には、2×YT complete 培地を用いた。また、好気培養では、2×YT complete 培地から MVA、またはグルコースとピルビン酸を除いた培地も用いた。



|                   | 倍加時間<br>(min) |
|-------------------|---------------|
| WT                | 26±4.0        |
| $\Delta$ sufC     | 87±5.2        |
| $\Delta$ sufD     | 97±9.9        |
| $\Delta$ sufS     | 98±11         |
| $\Delta$ sufU     | 96±9.2        |
| $\Delta$ sufB     | 93±7.9        |
| $\Delta$ sufCDSUB | 105±11        |

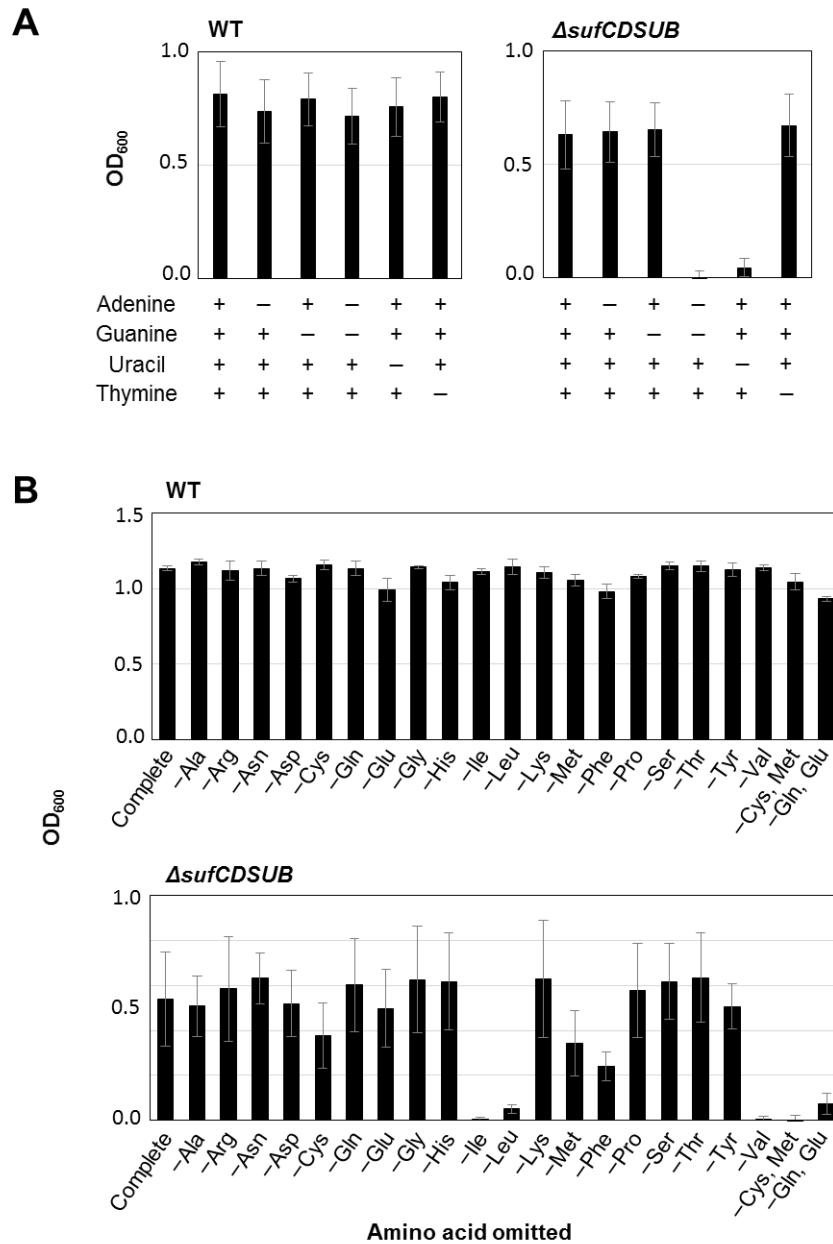
**Fig. 14** *suf* 様オペロン破壊株の液体培地における生育

枯草菌野生株と 6 種類の *suf* 様オペロン破壊株について、好気条件下、Em を含む 2×YT complete 培地で生育を比較した。L 字管を用いて 37°C、自動振盪培養機で培養し、30 分ごとに OD<sub>600</sub> を測定した。培養に用いた菌株は  $\Delta$ sufC (NY144)、 $\Delta$ sufD (NY145)、 $\Delta$ sufS (NY151)、 $\Delta$ sufU (NY153)、 $\Delta$ sufB (NY116)、 $\Delta$ sufCDSUB (NY120)、WT (NY105) である。実験はそれぞれ 3 回行い、倍加時間の平均値と標準偏差を下表に示した。



**Fig. 15** *suf* 様オペロン破壊株における Fe-S 酵素の活性

枯草菌野生株と 6 種類の *suf* 様オペロン破壊株を、好気条件下、2×YT complete 培地で定常期の初期まで生育させた。菌体を破砕し、その上清を用いてアコニターゼ、コハク酸脱水素酵素 (SDH)、グルタミン酸合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) の活性測定を行った。

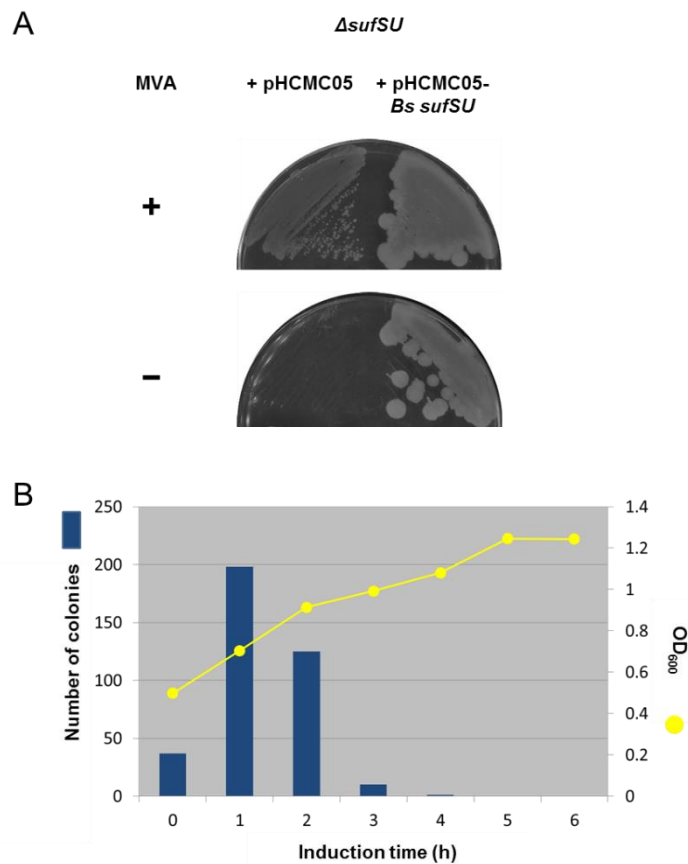


**Fig. 16** *suf* 様オペロン破壊株の栄養要求性

枯草菌野生株と $\Delta$ *sufCDSUB* 株を、合成培地で 37°C、48 時間培養した。合成培地からは、ヌクレオチドやアミノ酸を除き、生育に対する影響を濁度 (OD<sub>600</sub>) で示した。

A. プリン/ピリミジン要求性

B. アミノ酸要求性

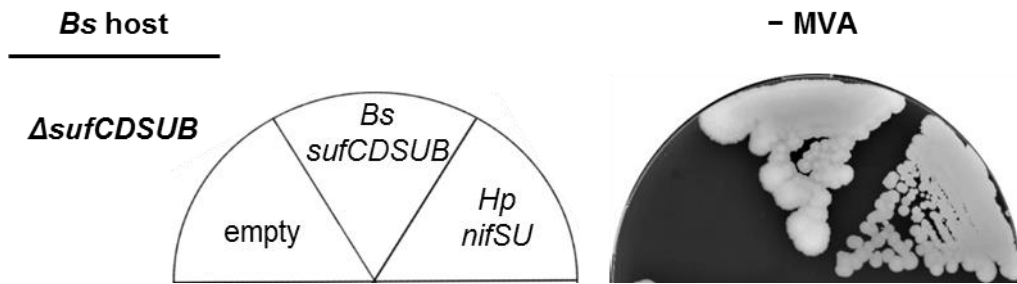


**Fig. 17 *suf* 様オペロン破壊株の形質転換**

枯草菌 $\Delta$ *sufSU* 株を、2×YT complete 液体培地で 37°C、約 18 時間前培養し、同じ培地に 1/10 容を植菌して 37°C で振盪培養した。OD<sub>600</sub> の値が 0.5–0.7 程度になった時点で、終濃度 1% となるようにキシロースを添加し、37°C で振盪培養した。次いで、培養液の一部に DNA (pHCMC05-*Bs sufSU* または pHCMC05 の空ベクター) を添加して、37°C で 1.5 時間振盪した。Cm を含む選択培地にスプレッドし、37°C で培養して形質転換体を得た。

A. 形質転換体の生育 : MVA を含む、あるいは含まない 2×YT complete 培地で 37°C、48 時間培養した。

B. 形質転換効率に対するキシロース添加後の培養時間の影響



**Fig. 18 枯草菌  $\Delta$ sufCDSUB 株の相補実験**

$\Delta$ sufCDSUB 株に対して、pHCMC05 (empty) または pHCMC05-*Bs sufCDSUB*、pHCMC05-*Hp nifSU* プラスミドを導入し、Cm を含む選択培地で形質転換体を得た。これらを、MVA を含まない 2×YT complete 寒天培地に植菌し、37°C で 48 時間培養した。

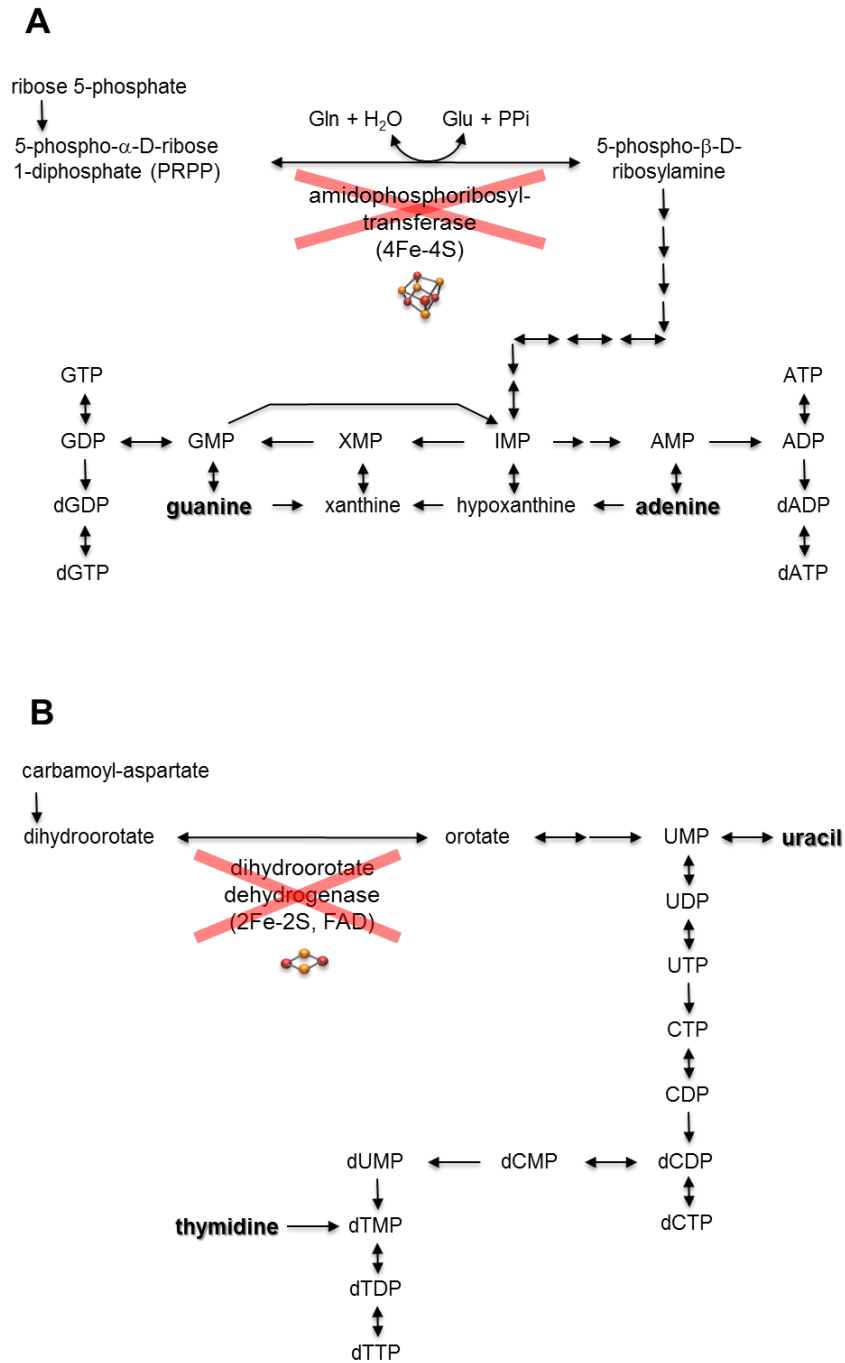


Fig. 19 枯草菌におけるヌクレオチドの生合成経路と関与する Fe-S 酵素

A. プリンの生合成 略号 : XMP, xanthosine monophosphate; IMP, inosine monophosphate

B. ピリミジンの生合成

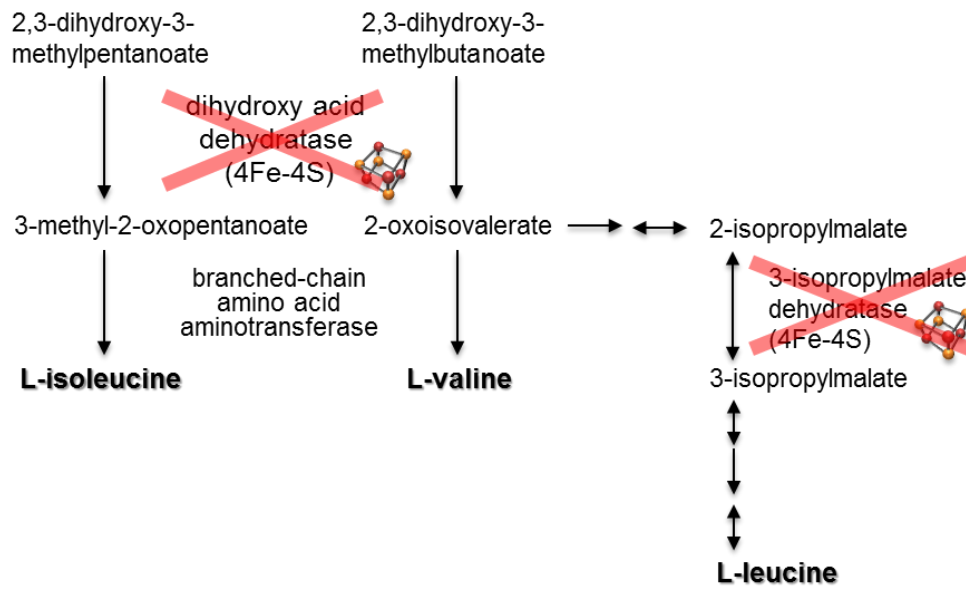


Fig. 20 枯草菌におけるイソロイシン、バリン、ロイシンの生合成経路と関与する Fe-S 酵素



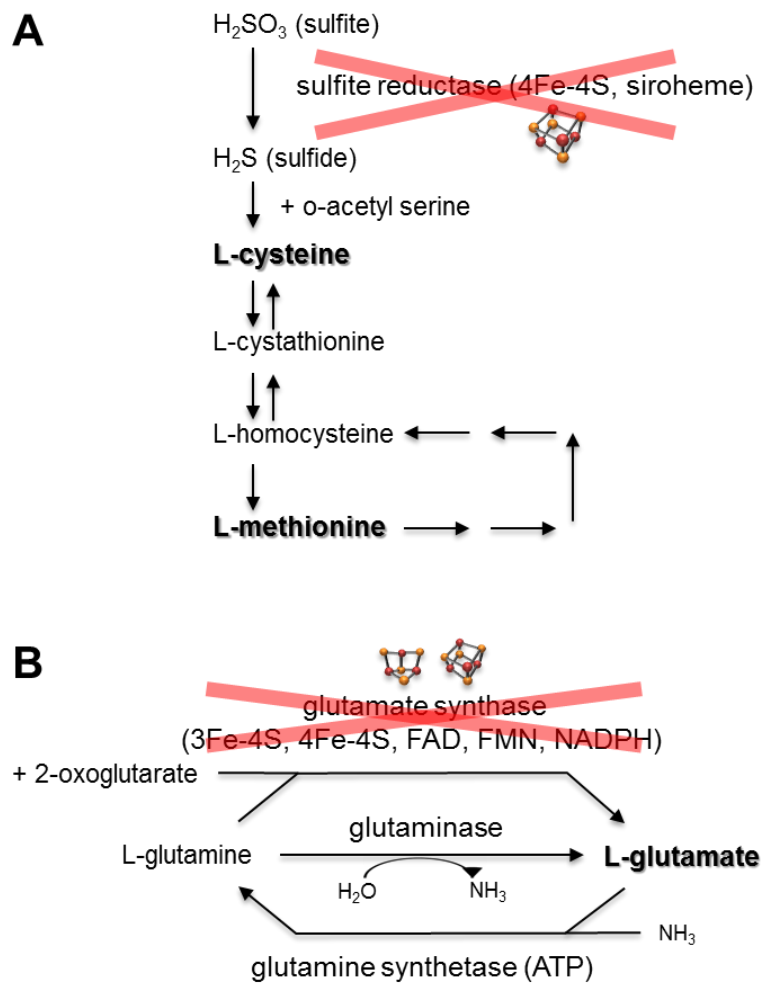
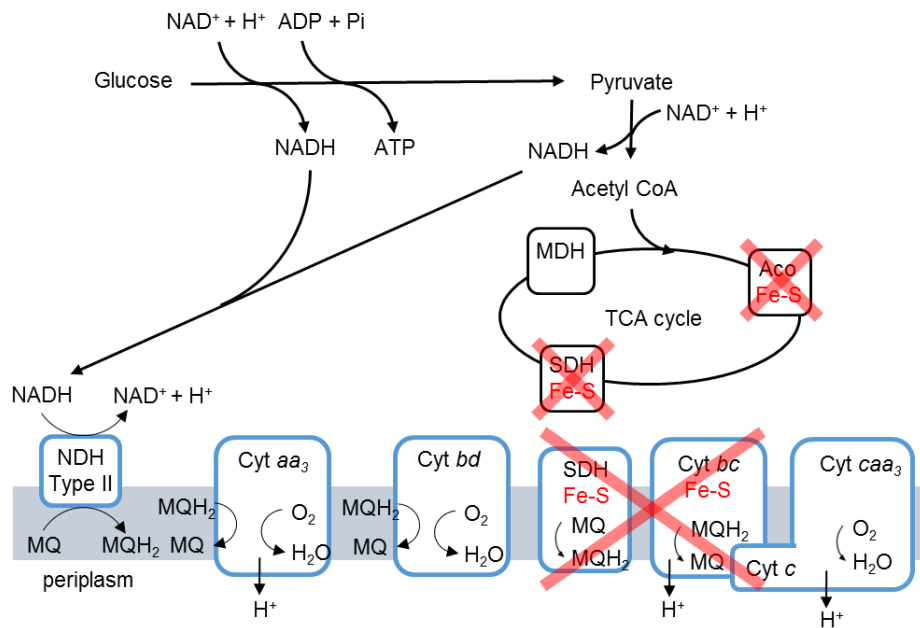


Fig. 21 枯草菌における硫黄同化ならびに窒素同化経路と関与する Fe-S 酵素

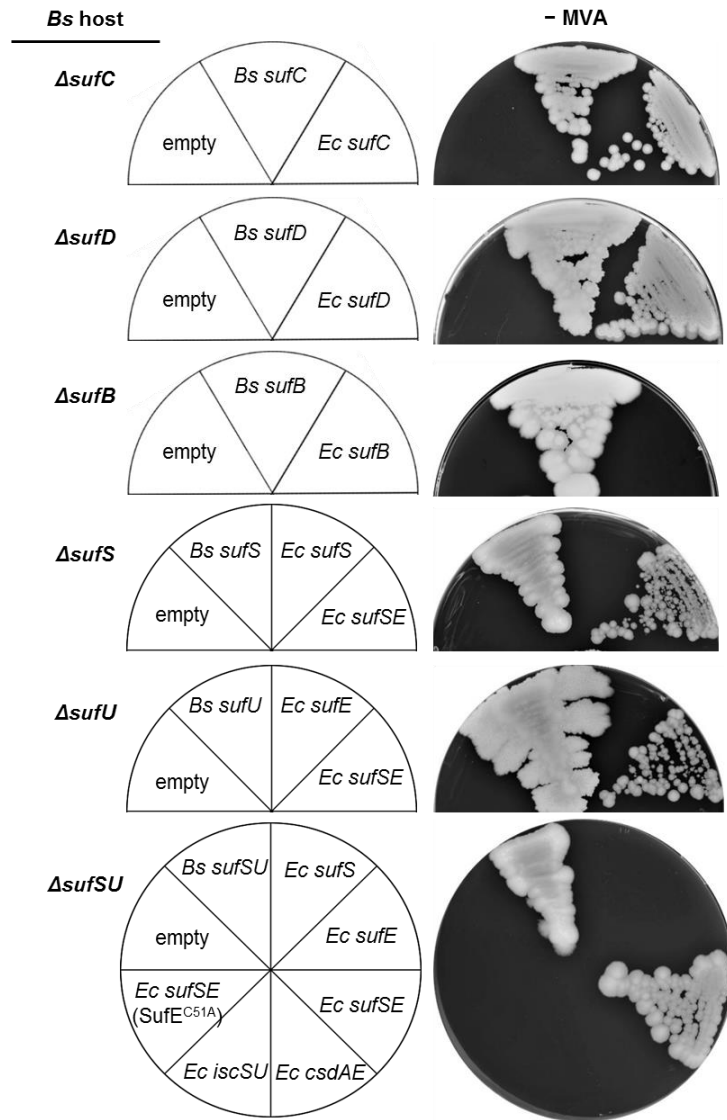
A. システインとメチオニンの生合成ならびにそれらの相互変換

B. グルタミン酸とグルタミンの生合成ならびにそれらの相互変換



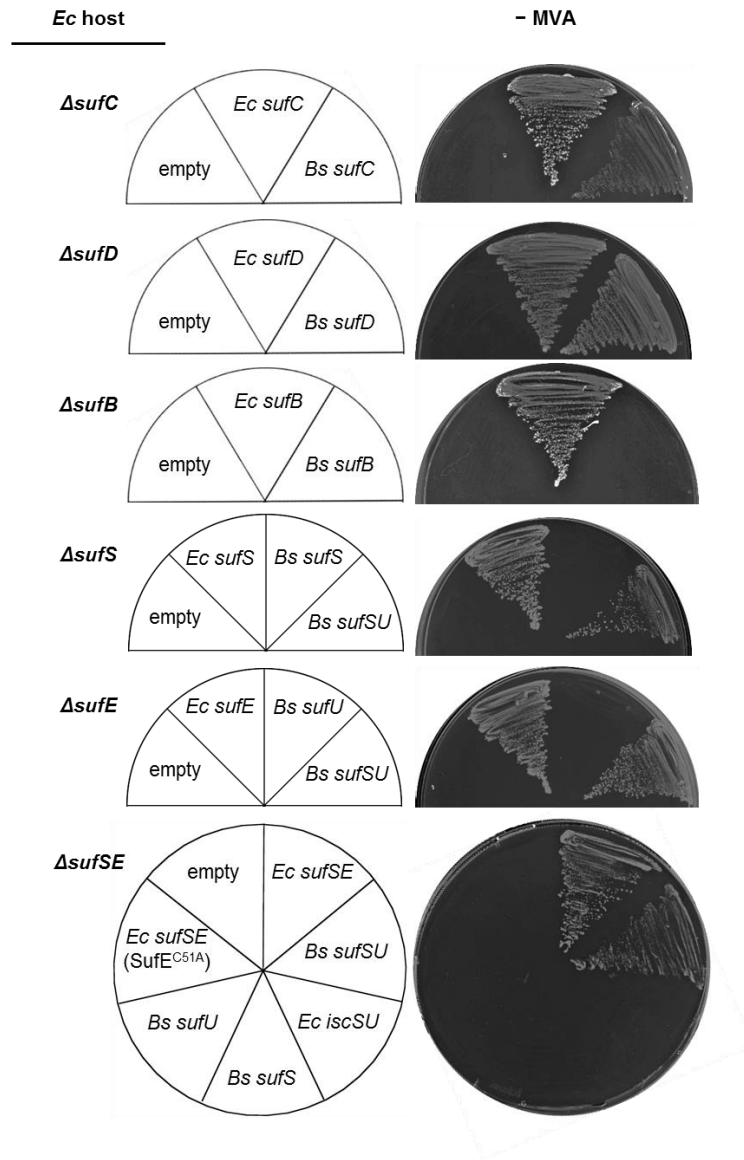
**Fig. 22 枯草菌におけるエネルギー代謝と関与する Fe-S 酵素**

略号 : SDH, succinate dehydrogenase (コハク酸脱水素酵素); MDH, malate dehydrogenase (リンゴ酸脱水素酵素); Aco, aconitase (アコニターゼ)



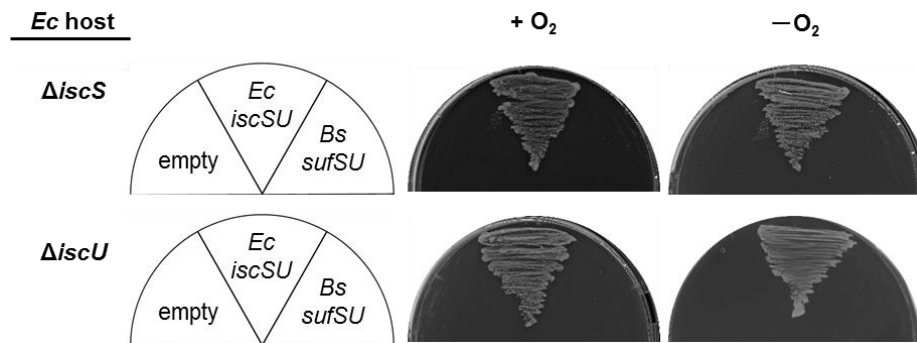
**Fig. 23 枯草菌 *suf* 様オペロン破壊株の相補実験**

枯草菌 $\Delta$ *sufC* 株、 $\Delta$ *sufD* 株、 $\Delta$ *sufB* 株、 $\Delta$ *sufS* 株、 $\Delta$ *sufU* 株、 $\Delta$ *sufSU* 株に対して、それぞれ破壊した遺伝子をプラスミド pHCMC05 につないで導入した。また、関連する大腸菌の遺伝子も同様に pHCMC05 につないで導入し、異種間での相補能を検討した。これらの形質転換体を、MVA を含まない 2×YT complete 寒天培地に植菌し、37°C で 48 時間培養して生育を観察した。



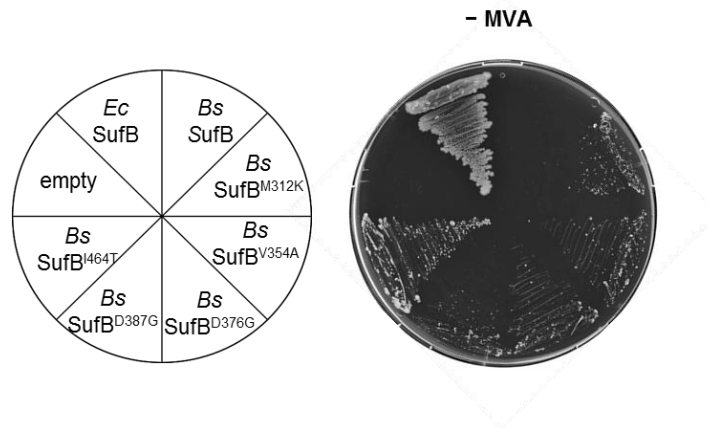
**Fig. 24 大腸菌 *suf* 欠失株の相補実験**

大腸菌 UT109 変異株 ( $\Delta$ *suf*ABCDSE  $\Delta$ *iscUA-hscBA*) に、大腸菌 *suf*ABCDSE オペロンの遺伝子をひとつずつ（または *sufSE* をまとめて）欠失させたプラスミドを導入して、 $\Delta$ *suf*C、 $\Delta$ *suf*D、 $\Delta$ *suf*B、 $\Delta$ *suf*S、 $\Delta$ *suf*E、 $\Delta$ *suf*SE 細胞とした。これらに、枯草菌の関連遺伝子群を pBBR ベクターにつないで導入し、異種間での相補能を検討した。これらの形質転換体は、MVA を含まない LB 寒天培地（0.4% グルコースを含む）で、37°C で 48 時間培養して生育を観察した。



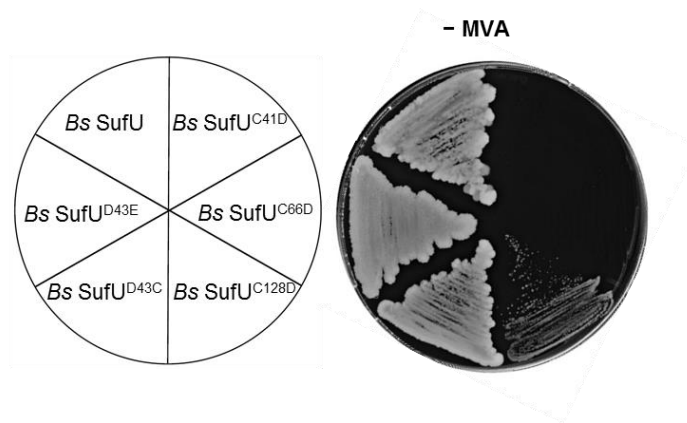
**Fig. 25 大腸菌  $\Delta iscS$  株と  $\Delta iscU$  株を用いた異種間相補実験**

pUMV22 Sp<sup>r</sup>を持つ大腸菌変異株 NT1401 ( $\Delta iscS \Delta sufABCDSE$ ) あるいは NT2001 ( $\Delta iscU \Delta sufABCDSE$ ) に、枯草菌 *sufSU* を pBBR-*Bs sufSU* の形で導入した。これらの形質転換体を、MVA を含まない LB 寒天培地 (0.4% グルコースを含む) に植菌し、好気条件と嫌気条件で 37°C、48 時間培養して生育を観察した。



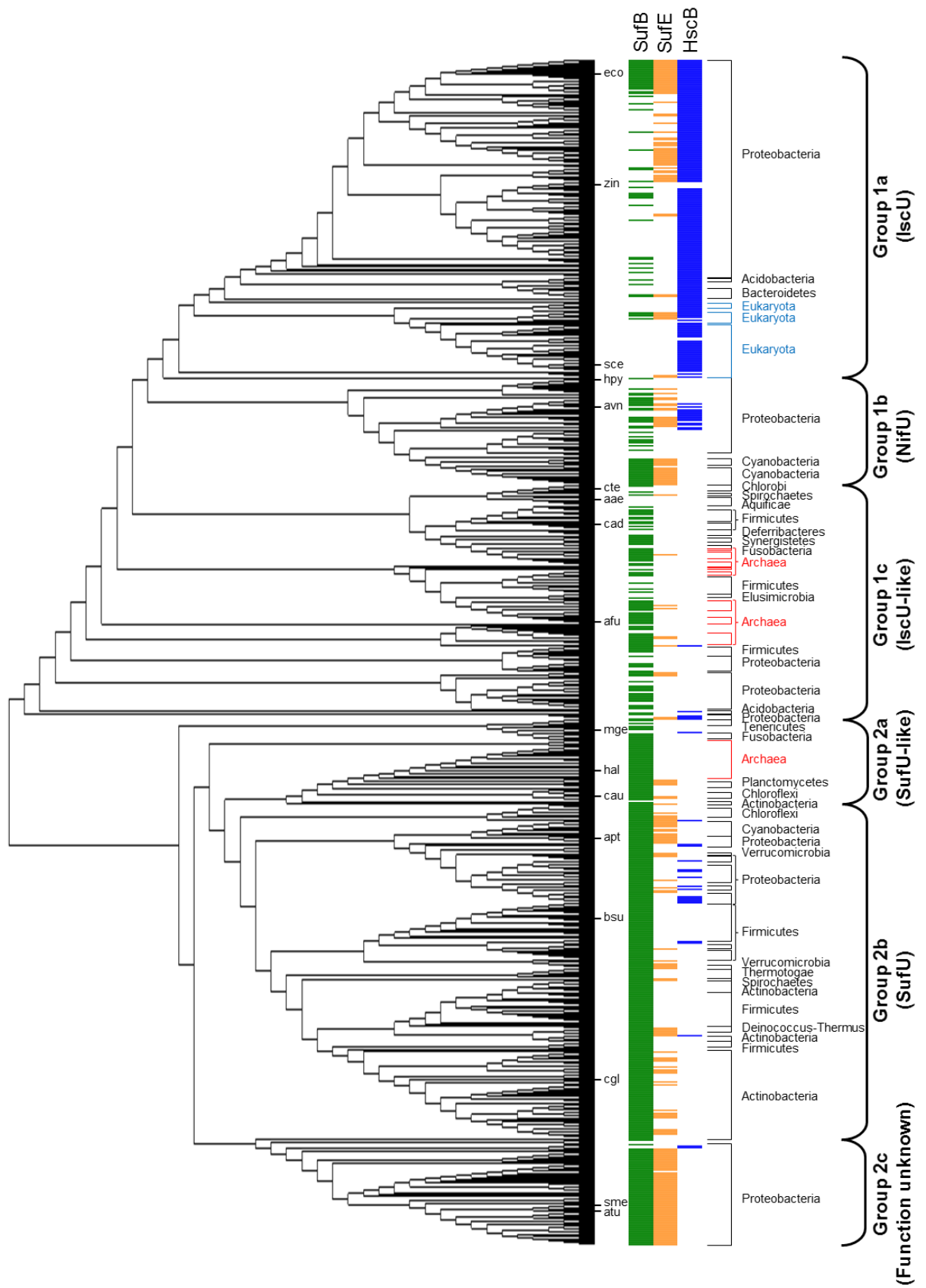
**Fig. 26 枯草菌 *sufB* 内のサプレッサー変異による大腸菌  $\Delta$ *sufB* 株の相補**

Error-prone PCR によって枯草菌 *sufB* にランダムな変異を導入し、pBBR ベクターにつ  
ないで大腸菌  $\Delta$ *sufB* 細胞に導入した。MVA を含まない LB 寒天培地でも生育するよう  
になったコロニーからプラスミドを調製し、塩基配列を決定したところ、SufB の中に  
M312K または V354A、D376A、D387G、I464T のいずれかの 1 アミノ酸置換が生じてい  
た。これらのプラスミドを大腸菌  $\Delta$ *sufB* 細胞に再導入して、その形質転換体を、MVA を  
含まない LB 寒天培地で 37°C、48 時間培養して生育を観察した。



**Fig. 27 枯草菌 SufU 内の部位特異的変異の影響**

pHCMC05-*Bs sufU* を鋳型として枯草菌 SufU 内に部位特異的変異を導入し、これらのプラスミドを枯草菌 $\Delta$ *sufU* 株に導入した。形質転換体を、MVA を含まない 2×YT complete 寒天培地に植菌し、37°C で 48 時間培養して生育を観察した。





**Fig. 28 IscU / NifU / SufU とそれらの類似タンパク質の一次構造に基づいた系統樹**

653 種類のゲノム配列（真正細菌 559 種、古細菌 55 種、真核生物 39 種を含む）から、IscU/SufU に相同な 794 種類の配列を取得し、MEGA7 ソフトウェア内の Clustal W (Gap penalty = 4) でアラインメントして、近隣結合法 (Neighbor-joining method) で系統樹を作成した。また、これら 653 種類のゲノム配列において、SUF マシナリーに特徴的な成分 (SufB, SufE) または ISC マシナリーに特徴的な成分 (HscB) を BLAST 検索で調べ、その有無を系統樹の横に記載した。生物種の略号 : eco, *Escherichia coli*; sce, *Saccharomyces cerevisiae*; zin, *Zinderia insecticola*; avn, *Azotobacter vinelandii*; hpy, *Helicobacter pylori*; cte, *Chlorobium tepidum*; aae, *Aquifex aeolicus*; afu, *Archaeoglobus fulgidus*; cad, *Clostridium acidurici*; cau, *Chloroflexus aurantiacus*; hal, *Halobacterium* sp.; mge, *Mycoplasma genitalium*; atu, *Agrobacterium tumefaciens*; sme, *Sinorhizobium meliloti*; apt, *Acetobacter pasteurianus*; cgl, *Corynebacterium glutamicum*; bsu, *Bacillus subtilis*.

Group *eco*

1a *eco* ..... M A Y S E K V I D H Y E N P R N V G S F D N N D ..... E N V G S G M V G A P A C G D V M K L Q I K V N D . E G I I E D A R F

1a *sce* M L P V I T R F A R P A L M A I R P V N A M G V L R A S S I . T K R L Y H P K V I E H Y T H P R N V G S L D K K L ..... P N V G T G L V G A P A C G D V M K L Q I K V N D S T G V I E D V K F

1a *zin* ..... M T F Y S K K L I K Y C E K P K N I G S F L K N N ..... R K I G T G I T S P S C G D V M K L Q I K I Y . K G I I K N I R F

1b *avn* ..... M W D Y S E K V K E H F Y N P K N A G A V E G A ..... N A I G D V G S L S G D A L R L T L K V D P E T D V I L D A G F

1b *hpy* ..... M A K H D L V G S V L W D A Y S K E V O R R M D N P T H I G V I T E E Q A K A K N A K L I V A D Y G A E A C G D A V R L Y W L V D E S T D R I V D A K F

1c *cte* ..... M L Q S . G E W A Y T E K L K E H F E S P K N V I Q G N D T S ..... A F D G V G M E G N L Q C G D Q M V V A I K V D K E S E K I T D C Q W

1c *aae* ..... M S F E Y N E K V L D H F L N P R N V G V L E D A ..... N G V G Q C C N P A C G D A M L F T I K V N P E N D V I E D V R F

1c *afu* ..... M Y S D K V F D H F Q N P R N V G K I E D A ..... D G V G T V G N P V C G D L M T I Y I K V . K D N R I E D I K F

1c *cad* ..... M M Y S E K V M E H F S N P R N V G E I Q D A ..... D G I G E V G N A K G D I M K M Y L K I . . D N D V I T D V K F

2a *cau* ..... M D D I Y R E Q I L E H A R H P R N F G H L P A P T ..... V . . I R E R N P L C G D Q I R L E L A I T D D . . V I T D V R F

2a *hal* ..... M S M G S D M Y R Q Q I L D H Y R N P R N O G E L P E P S ..... F . . T H E G Y N P S C G D E L E F D V A L D D D G E T I A H V A F

2a *mge* ..... M D I R A R T K I I D I Y S N L K Y K K P L K S F Q ..... K . . I L T T S D S D N C E D F F N I G L N I D K N . . K I T A I G F

2c *atu* ..... M D D I Y N N R I L E F A G N I P L T G V L D D A D ..... A . . S A E K H S R L C G S K L K V Y L K V E D G . . T V T A F S H

2c *sme* ..... M I D D Y N S R I L E F A G N I P R I G M L A D A D ..... A . . E A A H S K L C G S K V R I V L K M D S D . . V T D F A H

2b *apt* ..... M T Q T V P D S D A L Y D R V I V E R A R A P O Y A G K L E A P S ..... V . . Q G E G K N P M C G D K K T R V I A L D A T . . H I Q S V R H

2b *cgl* ..... M N L E O M Y Q E V I L D H Y K N P O H K G L R D F F D ..... A . . E V H H V N P S C G D E L T L R V K L S E D G S T V E D V S Y

2b *bsu* ..... M S F N A N L D T L Y R Q V I M D H Y K N P R N K G V L N D S ..... I . . V V D M N N P C G D R I T L R T M K L . L D G D I V E D A K F

Group *eco*

1a *eco* K T Y G C G S A I A S S S L V T E W V K G K S L D E A Q A I K N T D I A E E L E . . . . . L P P V K I H C S I L A E D A I K A A I A D Y K S K R E A K . . . . .

1a *sce* K T F G C G S A I A S S S Y M T E L V O G M T L D D A A K I K N T E I A K E L S . . . . . L P P V K L H C S M L A E D A I K A A I K D Y K S K R N T P T M L S .

1a *zin* K T Y G C G S A I A S S Y L T K I I K N R T I E E T L L K N L D I A N F L L . . . . . L S P I K I H C S I L A E E V I K F S I K N Y Y K N N Y K Y D . .

1b *avn* Q T F G C G S A I A S S S A L T E M V K G L T L D E A L K I S N Q D I A D Y L D . . . . . G L P P E K M H C S V M G R E A L Q A A V A N Y R G E T I E D D H E E G

1b *hpy* K S F G C G T A I A S S D M M V E L C L N K R V Q D A V K I T N L V E R G L R D D P . . . . . D T P A V P G Q K M H C S V M A Y D V I K K A A G M Y L G K N A E D F E E E I

1c *cte* K T Y G C A S A I A S T S I L S E M V K G M T L D Q A F N I S P K E V A K E L G . . . . . G L P E N K I H C S V L G D K L A R A A I N D Y F I R N G M S D R V Q K

1c *aae* K T F G C G S A I A S S M L T E M V K G K P I Q Y A L N L T Y K D I F E E L G . . . . . G L P P Q K I H C S T N L G L E T L H V A I K D Y L M K Q G R V E E A S K

1c *afu* Q T F G C A A A I A T S S M A T E M A K G K T I E E A L K I T R D A V A E A L G . . . . . G L P P Q K M H C S N L A A D A L R R A I V D Y F R K N G K I . D K I K

1c *cad* K T F G C G S A I A S S S M A T E M I K G K T I K E A L E E T N K A V V E A L D . . . . . G L P P A K I H C S V L A E Q A V K S A L I D Y A K N N I D I P E L E

2a *cau* S R G G C A I S C A S A S L L T E A I K G M P V A A A K O E S K D D L L D L I G . . . . . I P L A H N P T R L K C A L L S L K A L K A G L Y G V S Q M D E D M . . . . .

2a *hal* R G D G C A I S C A S A S M L S E E L P G M T L A E V D A L D R D D I L D M L G . . . . . V E V . T P M R I K C A V L S E K V V Q D G A E I Y T G D G D E A D R T T T

2a *mge* D G D G C I I S T I A T E L S I K A I E N K T I N Q A K K I L S D L I A T Y K D K N . . . . . S A N Q V V E E L K L L I E M N V T E K R L Q C L L L T P S N L L Q W F K N F . . . . .

2c *atu* E V R A C A L G Q A S A S I M A H H I V G A S G E I R Q A R E D M L A M L K Q D G . . . . . E G P T G R F E D M R V L L P V R D F K A R H A S T M L T F E A V D V A L D Q I E G R P A L N V A G . .

2c *sme* D V K A C A L G Q A S S S I M A R H V V G A H A D E I R Q A R E D M L A M L K A D G . . . . . E G P S D R F E D M R F L K P V K D Y K A R H A S T M L T F P A V D V A L I G Q E A R R L A A A V . .

2b *apt* T T R G C A I C A A A A D L M A Q Q V S G L D V A C A V S L S G R F A M L V G E T S P A A T A D T S L G P L E V F Q P L R S H K A R I R C A E L P W I A L K E A L S H A D V . . . . .

2b *cgl* E A V G C S I S O A S T S V M A E E I V G Q P V D K A L E L T E F E K M I V S R G . Q V F G D E D L I G D G V A F S G V A K Y P A R V K C A L L G W K A F Q A A T A D A V A H A H . . . . .

2b *bsu* E G E G C S I S M A S A S M M T Q A L K G K D I E T A L S K I F S D M M Q . . . . . G . K E Y D D S I D L G D I E A L Q G V S K F P A R I K G A T L S W K A L E R G V A K E E G G N . . . . .

Group *eco*

1a *eco* . . . . .

1a *sce* . . . . .

1a *zin* . . . . .

1b *avn* A . . . L I C K C F A V D E V M V R D I R A N K L S T V E D V T N Y T . K A G G G C S A C H E A I E R V L T E E L A A R G E V F V A A P I K A K K V K V L A P E P A P A P V A E A P A A P K

1b *hpy* . . . . . I V C E C A R V S L G T I K E V I K L N D L K S V E E I T N Y T . K A G A F C K S C V R P G G H E K R D Y I L V D I L K E V R E E M E A E K . L K A T A N K S . . . . . Q S G E L A P R E

1c *cte* V Q A R T V C Q M N V T D H I E E A V L E G A R . T F Y E L Q E H T . K I S T V C G Q C R E D A E N E L Q K Y I H L H F G S . . . . .

1c *aae* I . . . . . P D C Y E E E E E Q E . . . . . E S K E F E F L S G T . . . . .

1c *afu* E . . . . . L G L E K E L E K . M . . . . . E K G E M D . D H G E Y C E A . . . . .

1c *cad* K . . . . . F E L . . . . . I . . . . . D D E D L H . A H G H D E E . . . . .

2a *cau* . . . . .

2a *hal* E D D A . . . . .

2a *mge* . . . . .

2c *atu* . . . . .

2c *sme* . . . . .

2b *apt* . . . . .

2b *cgl* . . . . .

2b *bsu* . . . . .

Group *eco*

1a *eco* . . . . .

1a *sce* . . . . .

1a *zin* . . . . .

1b *avn* L S N L Q R I R R I E T V . L A A I R P T L Q R D K G D V E L I D V D G K . . . . . N V Y V K L T G A C T G C Q M A S M . T L G G I Q O R L I E E L G E F V K V I P V S A A A H A Q M E V

1b *hpy* M T M V Q K I K A V D K V I D E N I R P L M M D G G D L E I L D I K E S D D Y I D V Y I R Y M G A C D G C M S A T T G T L F A I E N A L Q E L L D R S I R V L P I . . . . .

1c *cte* . . . . .

1c *aae* . . . . .

1c *afu* . . . . .

1c *cad* . . . . .

2a *cau* . . . . .

2a *hal* . . . . .

2a *mge* . . . . .

2c *atu* . . . . .

2c *sme* . . . . .

2b *apt* . . . . .

2b *cgl* . . . . .

2b *bsu* . . . . .

### Fig. 29 IscU / NifU / SufU とそれらの類似タンパク質の一次構造の比較

これらの配列は、Clustal Omega でアラインメントした。保存された残基を赤、類似の残基を黄色で示している。また、大腸菌 IscU と枯草菌 SufU の二次構造を、それぞれアラインメントの上下に、らせん ( $\alpha$ -ヘリックス) と矢印 ( $\beta$ -ストランド) で示す。生物種の略号は Fig. 28 に同じ。

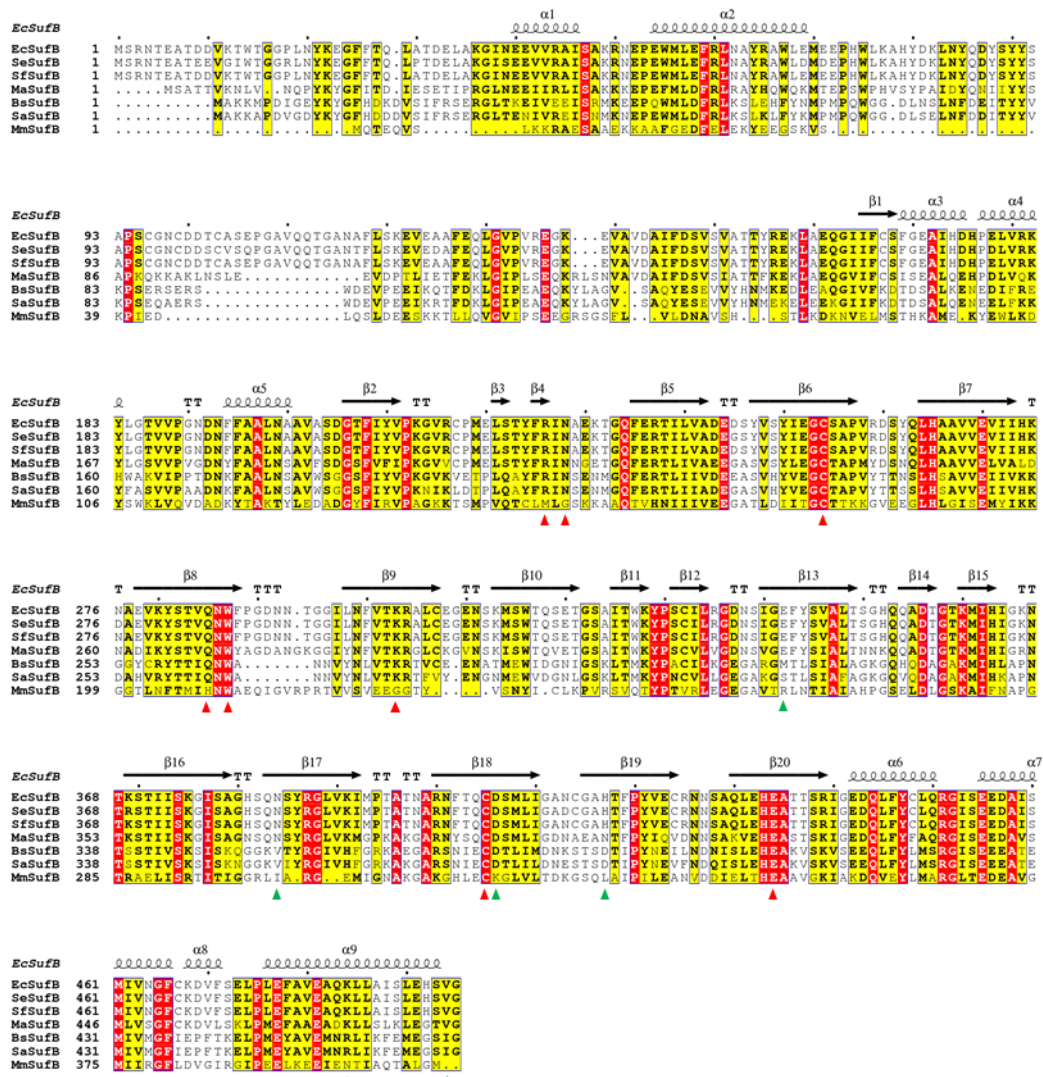


Fig. 30 SufB の一次構造の比較

Clustal Omega を用いてアミノ酸配列のアライメントを行い、保存された残基を赤、類似の残基を黄色で示す。大腸菌 SufB の二次構造は、配列の上になせん (α-ヘリックス) と矢印 (β-ストランド) で、また SufB の機能残基を赤三角で示す。SufB の種特異性を変化させるサプレッサー変異のうち、枯草菌 SufB 内のものを緑三角、大腸菌 SufB 内のものを青三角で示す。生物種の略号 : Ec, *Escherichia coli*; Se, *Salmonella enterica*; Sf, *Shigella flexneri*; Ma, *Microcystis aeruginosa*; Bs, *Bacillus subtilis*; Sa, *Staphylococcus aureus*; Mm, *Methanosarcina maez*.

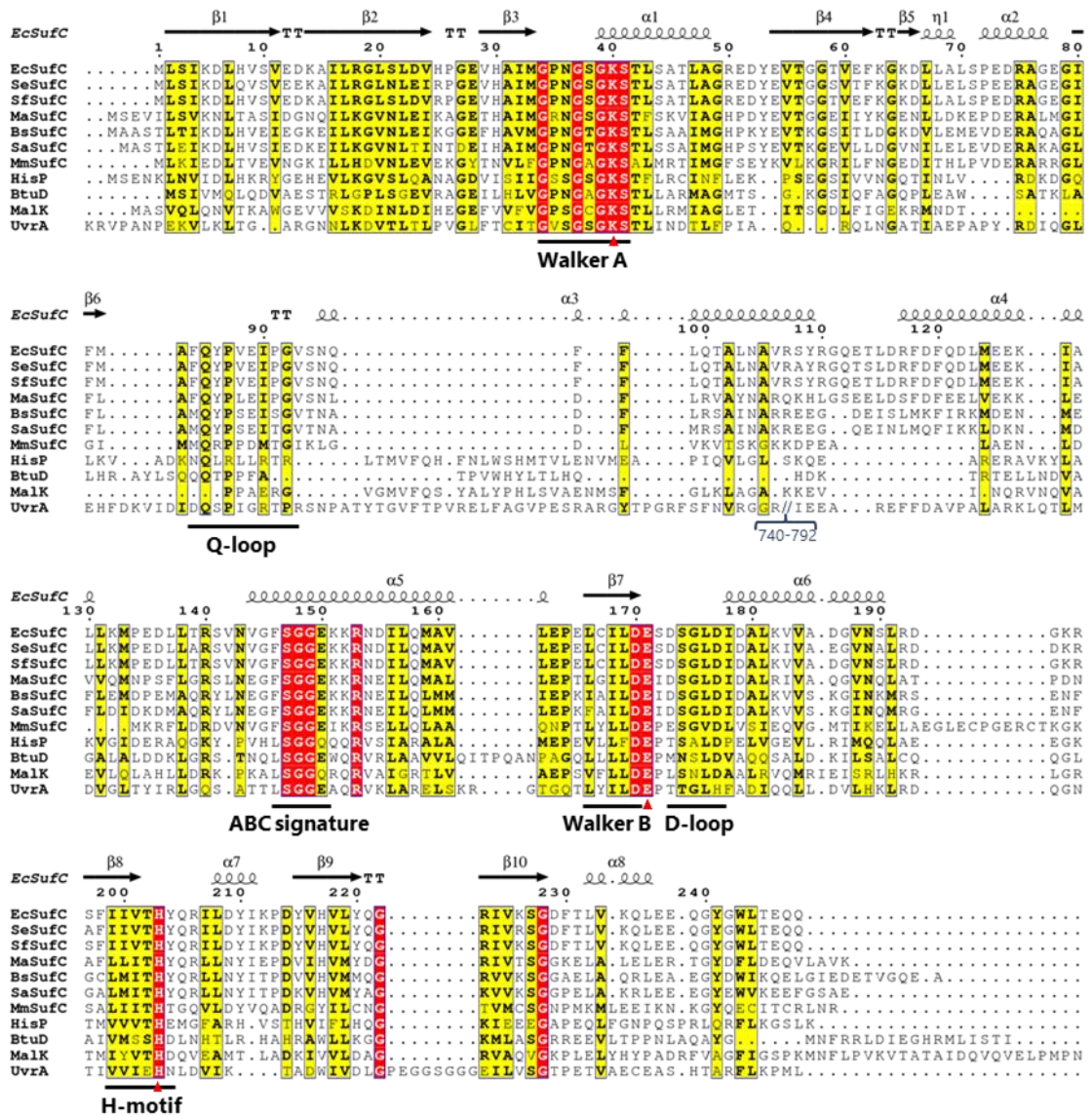


Fig. 31 SufC の一次構造の比較

様々な生物種の SufC と 3 種類の ABC-ATPase (HisP、BtuD、MalK) ならびに SMC タンパク質である UvrA の一次構造について、Clustal Omega を用いてアライメントを行った。保存された残基を赤、類似の残基を黄色で示す。また SufC の必須残基を赤三角で、二次構造をらせん ( $\alpha$ -ヘリックス) と矢印 ( $\beta$ -ストランド) で示す。保存されたモチーフは配列の下に示している。生物種の略号は Fig. 30 に同じ。

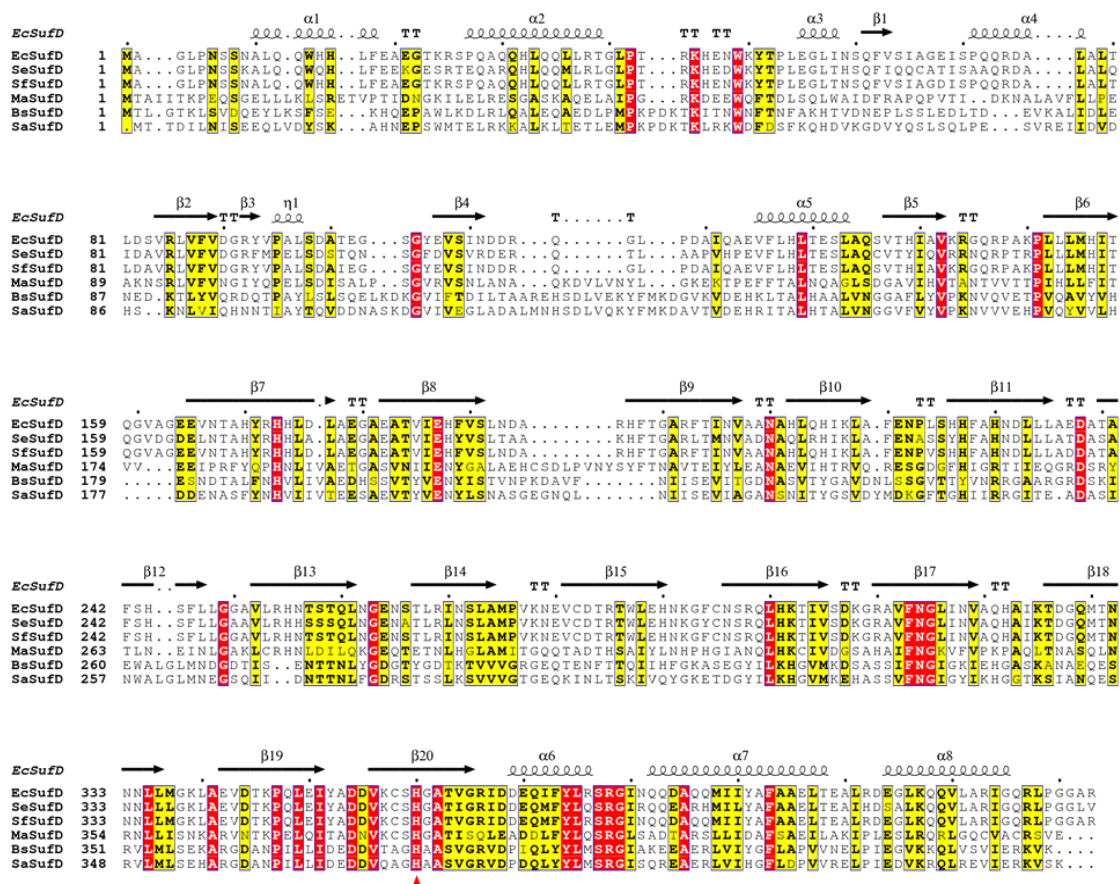
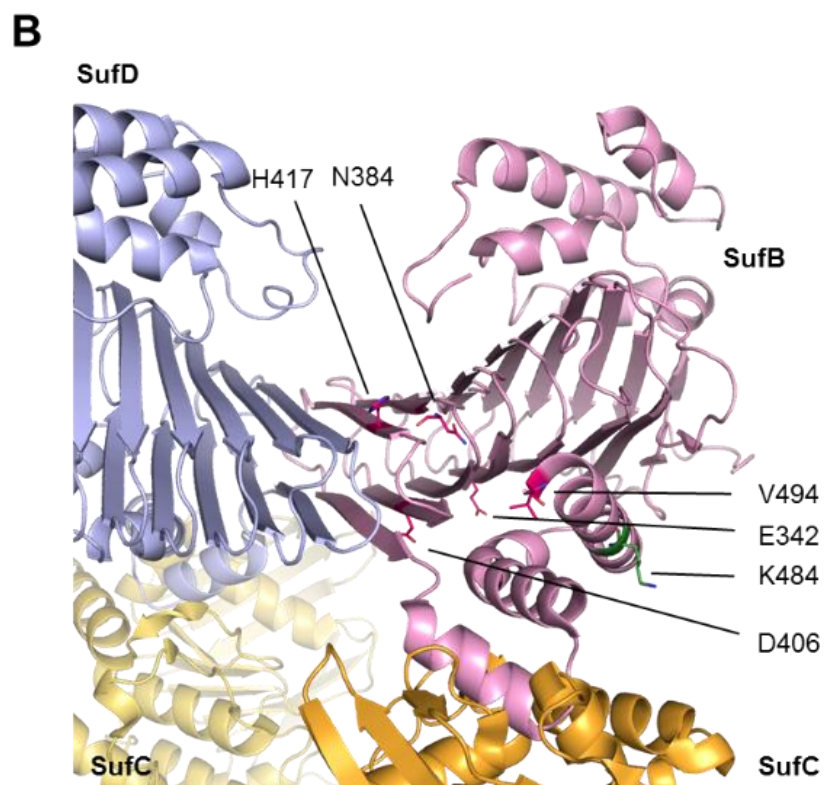
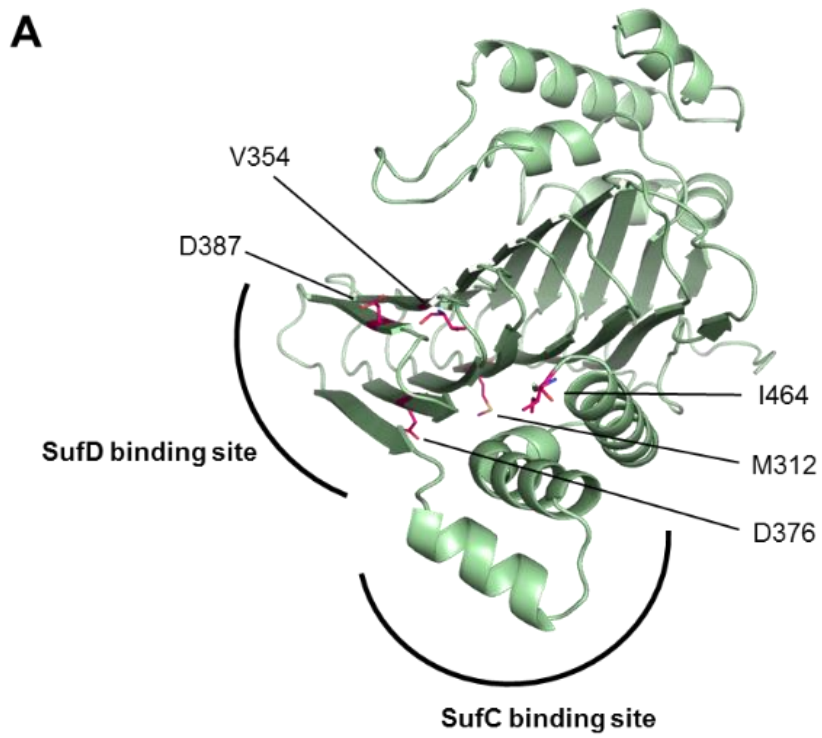


Fig. 32 SufD の一次構造の比較

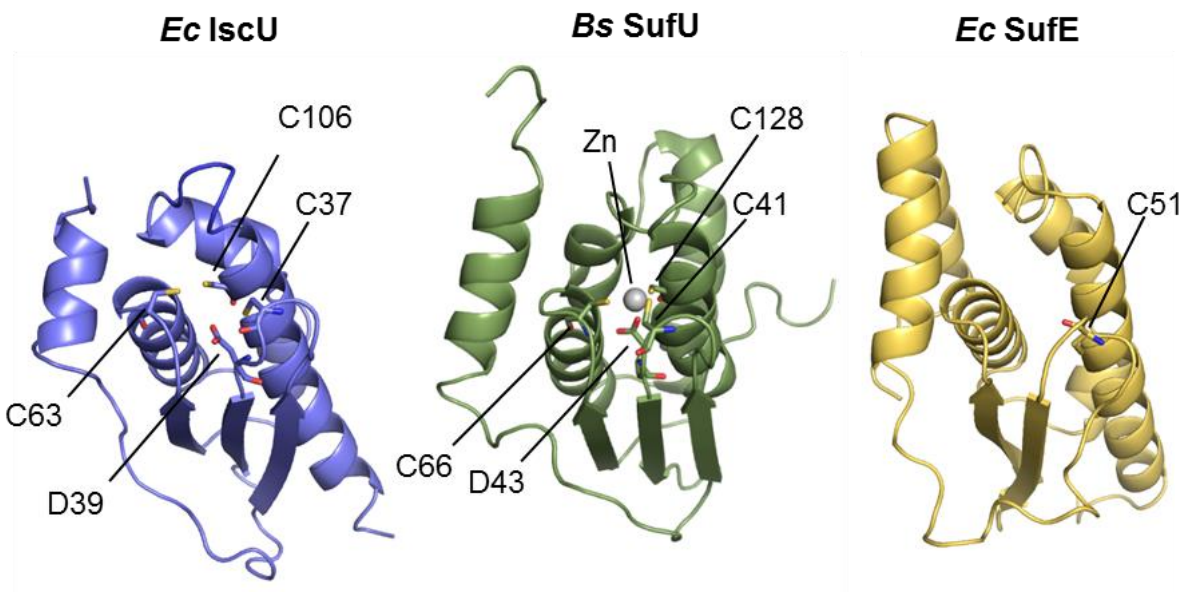
Clustal Omega を用いてアミノ酸配列のアライメントを行い、保存された残基を赤、類似の残基を黄色で示す。大腸菌 SufD の二次構造は、配列の上になせん (α-ヘリックス) と矢印 (β-ストランド) で、また SufD 必須残基を赤三角で示す。生物種の略号は Fig. 30 に同じ。



### Fig. 33 種の壁を越える SufB 内のサブレッサー変異

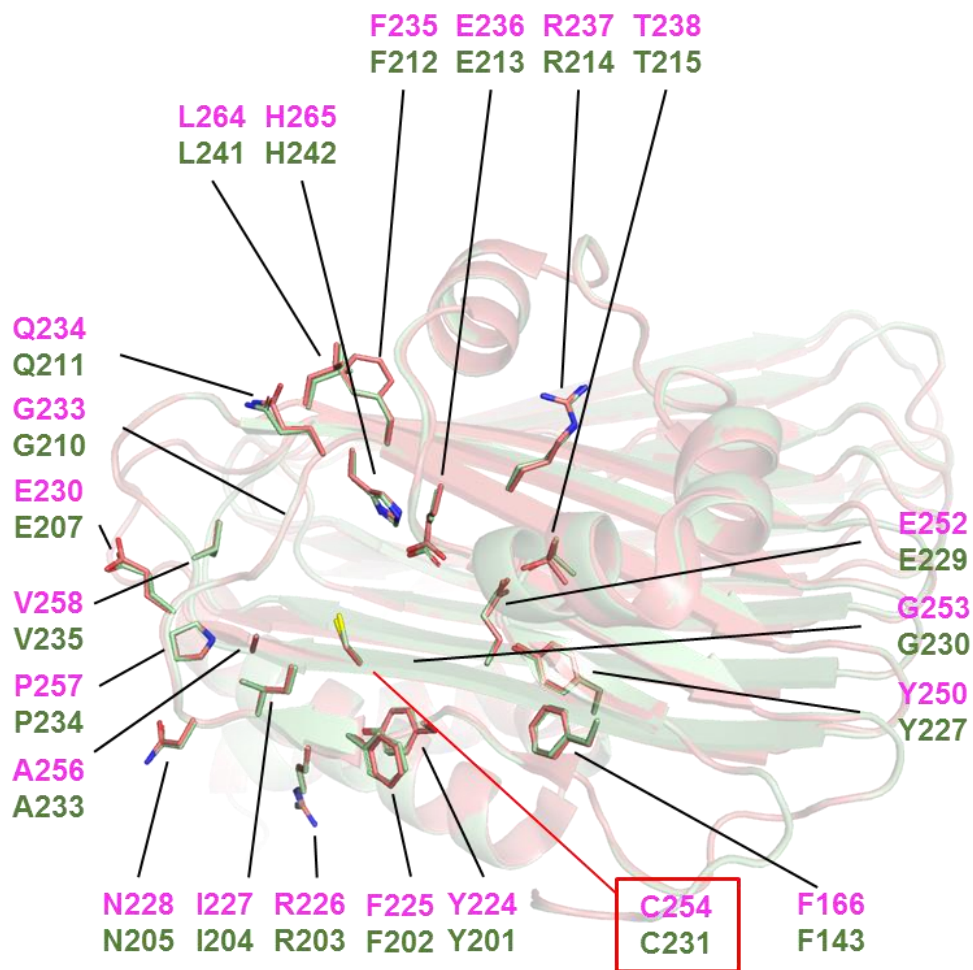
- A. 枯草菌 SufB におけるアミノ酸の置換部位: 枯草菌 SufB のホモロジーモデリングは、大腸菌 SufBCD 複合体 (PDB ID: 5AWF) 内の SufB の構造に基づいて、SWISS-MODEL サーバー (<https://swissmodel.expasy.org>) を用いて行った。大腸菌の SufB 欠損を相補できるように変化したアミノ酸の置換部位をスティックモデルで示す。
- B. 大腸菌 SufB におけるアミノ酸の置換部位: 大腸菌 SufBCD 複合体の結晶構造において、枯草菌の SufB 欠損を相補できるように変化したアミノ酸置換を緑のスティックモデルで示す。また、A の枯草菌 SufB 生じたアミノ酸置換に対応する部位を赤いスティックモデルで示す。





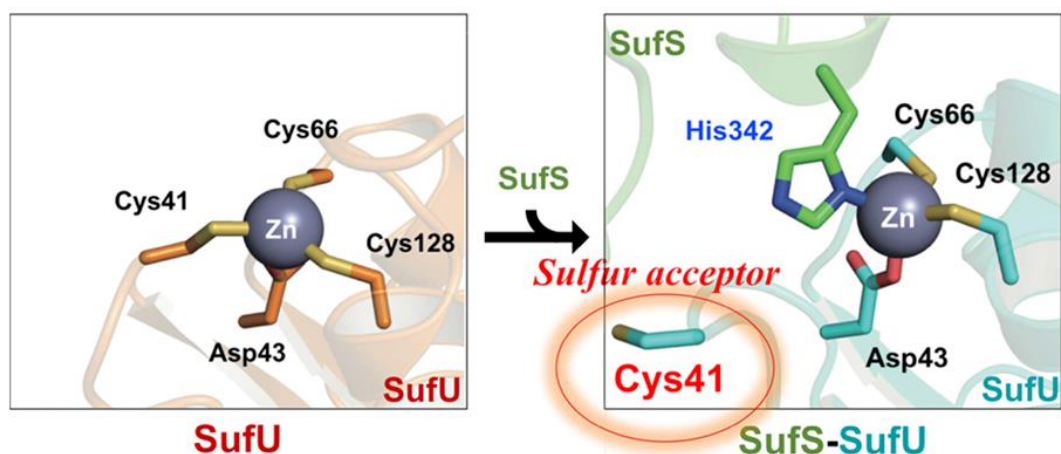
**Fig. 34 IscU / SufU / SufE の立体構造の比較**

大腸菌 IscU (PDB ID: 3LVL)、枯草菌 SufU (PDB ID: 2AZH)、大腸菌 SufE (PDB ID: 1MZG) の構造をリボンモデルで示す。IscU で Fe-S クラスターに結合する残基、SufU で亜鉛に配位する残基、SufE で硫黄を結合する残基をスティックモデルで示している。



**Fig. 35 SufB において SufE または SufU との相互作用が予想される領域の構造比較**

大腸菌 SufB の結晶構造（緑）と枯草菌 SufB のモデル構造（ピンク）を重ねて、β-ヘリックスコアドメインの N 末端側の領域を示した。この領域において、大腸菌 SufB では Cys254 が SufE からの硫黄原子を受け取る残基である。大腸菌と枯草菌で保存されている残基をスティックモデルで示す。



**Fig. 36 枯草菌の SufU と SufS における Zn 配位子の置換を介した相互作用**

枯草菌 SufU 単体の構造（左、PDB ID: 2AZH）と SufS-SufU 複合体構造（右、PDB ID: 5XT5）との比較。SufU の Cys41 は単体では亜鉛に配位しているが、SufS との会合時にはこれに代わり SufS の His342 が亜鉛に配位することで、両者の結合に寄与している。Cys41 は亜鉛から離れることで、フリーな -SH の状態で動くことができるようになり、SufS の Cys361 から硫黄原子を受け取れるようになる。論文 (Fujishiro *et al.*, 2017) より改変。

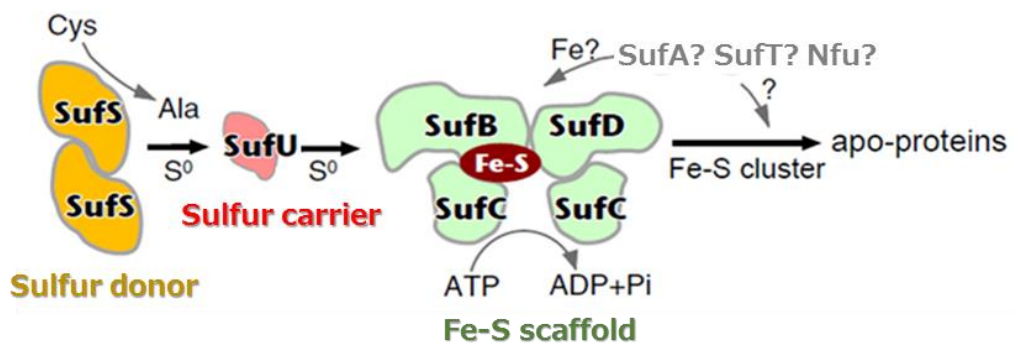
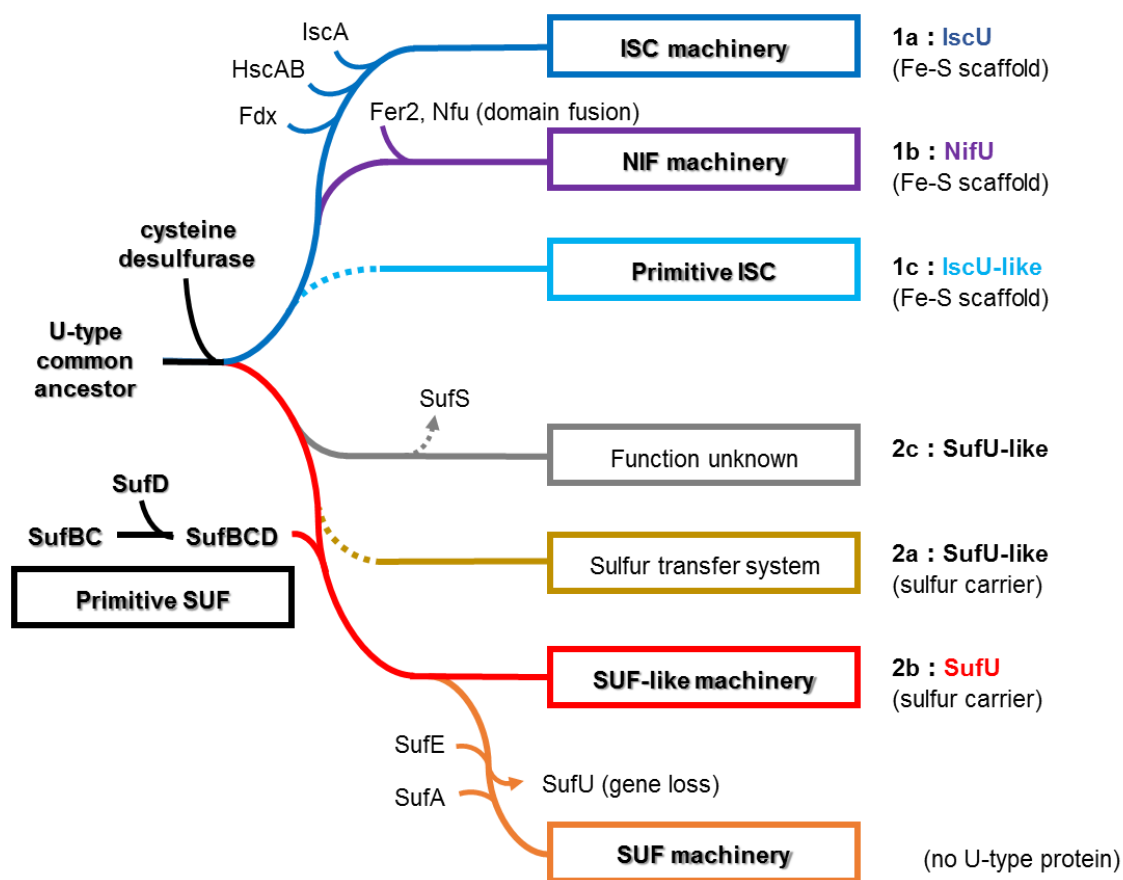


Fig. 37 枯草菌のSUF様マシナリーの作動モデル

枯草菌のSUF様マシナリーでは、SufUがSufSシステイン脱硫酸酵素からSufBCDへの硫黄転移タンパク質として機能する。Fe-Sクラスターは、SufBCD複合体上に組み立てられる。



**Fig. 38** IscU / SufU タンパク質の分子進化と Fe-S クラスター生合成系の変遷

IscU と SufU のサブファミリーは、進化の初期段階で分岐した後、Group 1 は Fe-S クラスターの新規形成部位として、Group 2 は硫黄のキャリアタンパク質として、独自の機能を持つように進化してきたと推定される。単系統ではなく、複数の系統から生じたサブグループは点線で示している。SUF 様マシナリーにおける SufU の硫黄キャリアとしての役割は、いくつかの細菌の系統 ( $\alpha$ -、 $\gamma$ -プロテオバクテリアと一部のシアノバクテリア) で SufE に置換した可能性が高い。

## 謝辞

本書は、埼玉大学理工学研究科分子統御研究室の高橋康弘教授、藤城貴史助教、東京農業大学農学部朝井計教授のご指導の下、実施した研究をまとめたものです。高橋教授には、実験の基礎、論理、論文の執筆方法などの親切丁寧なご指導にとどまらず、研究生生活など多方面で支えていただき、人間としても成長する機会をいただきました。朝井教授には、枯草菌等の実験材料の分譲だけでなく、実験から研究生生活に関することまで多くのご助言を何度もいただきました。藤城助教には、化学、構造生物学の分野からの多くの的確なご助言、励ましの言葉をいただきました。心より厚く感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたり、東京大学生物生産工業研究センターの葛山智久准教授には、放線菌 MVA 経路の遺伝子群（プラスミド pBMV4、pUMV22）を提供していただきました。学会等では、毎度、ご助言や励ましの言葉をいただきました。深くお礼申し上げます。

分子統御研究室立ち上げと同時に始まった、この枯草菌 Fe-S クラスター生合成系に関する研究プロジェクトには多くの学生が関わってきました。研究室の先輩方が積み重ねてきてくださった研究の礎、また、後輩の皆さんとの議論・試行錯誤があったからこそ、このようにまとめることができました。また、旧遺伝情報研究室の皆様には、日々、多くの議論、助言、叱咤激励の言葉をいただきました。本当にありがとうございました。

最後に、これまで私を様々な面で支えてくれた友人、両親をはじめとする家族の皆に（一員である犬、猫にも）、心より感謝します。

横山 奈央