

## 162. [NiFe]ヒドロゲナーゼの動的な成熟化過程の解明

渡部 聡

Key words : X線結晶構造解析, 金属タンパク質,  
タンパク質複合体

東北大学 多元物質科学研究所  
生体分子構造研究分野

### 緒言

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、プロトン (H<sup>+</sup>) から水素分子への可逆的な酸化還元反応を触媒するタンパク質である。細菌から古細菌に至るまで広く分布しており、ピロリ菌などの一部の病原性細菌では生育に必須なタンパク質である。[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性中心は、Ni および Fe で構成されており、Fe 原子には、さらに二つのシアノ基と一酸化炭素が配位しているのが特徴である。これまでの研究から、[NiFe]ヒドロゲナーゼに金属イオンを組み込み、活性型へと成熟化させる過程においては、6種類の Hyp タンパク質 (HypA, B, C, D, E, F) が中心的な役割を果たしていることが分かっている。まず4つの因子 HypC, D, E, F によって、Fe(CN)<sub>2</sub>CO リガンドが生合成され、ヒドロゲナーゼのラージサブユニット (LS) に組み込まれる。次に、HypA および HypB によって Ni が組み込まれ、特異的なプロテアーゼによる切断修飾を受け、活性型に成熟化される<sup>1,2)</sup>。

我々は、これまでに6つの Hyp タンパク質について全ての結晶構造を決定し、各 Hyp タンパク質の分子機構を明らかにしてきた<sup>3-6)</sup>。しかし、成熟化過程において一時的に形成される複合体の構造については一部しか明らかにされておらず、本機構には未だ不明な点が多い。そこで本研究では、Ni 組み込みにおいて過渡的に形成されると考えられてきた HypA-HypB 複合体について、構造機能解析を行った。

### 方法、結果および考察

超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来の HypA および ATPase 型 HypB (HypB<sub>AT</sub>) について、大腸菌を用いて組換えタンパク質を発現させ、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによって精製サンプルを調製した。ヌクレオチド存在下または非存在下における HypA と HypB<sub>AT</sub> の相互作用をゲルろ過クロマトグラフィー (SEC) によって解析した。二つタンパク質の当量混合サンプルを SEC によって解析した結果、ヌクレオチドフリー状態と ADP 結合状態の HypB<sub>AT</sub> では、HypA との相互作用が確認できなかった。一方、ATP  $\gamma$  S を加えた条件において、それぞれ単独成分のピークに加え、HypB<sub>AT</sub> 2分子と HypA 2分子からなるヘテロ4量体に相当するピークが確認でき、ATP 結合状態の HypB のみが HypA と過渡的な複合体を形成することが明らかになった。

そこで、ATP  $\gamma$  S 存在下で HypA と HypB<sub>AT</sub> を等量ずつ混合したサンプルを結晶化サンプルとし、各種スクリーニングキットを利用して結晶化条件のスクリーニングを行った。複合体の結晶は、PEG3500 と MgCl<sub>2</sub> を主な沈殿剤に用いた条件で得られた。得られた結晶を用いて Photon Factory の BL1A または SPring-8 の BL41XU において回折実験を行い、1.6-3.1Å 分解能の反射強度データを収集した。位相決定は、我々が既に構造解析に成功した HypA と HypB<sub>AT</sub> の単独構造をモデル分子と利用した分子置換法によって決定した。

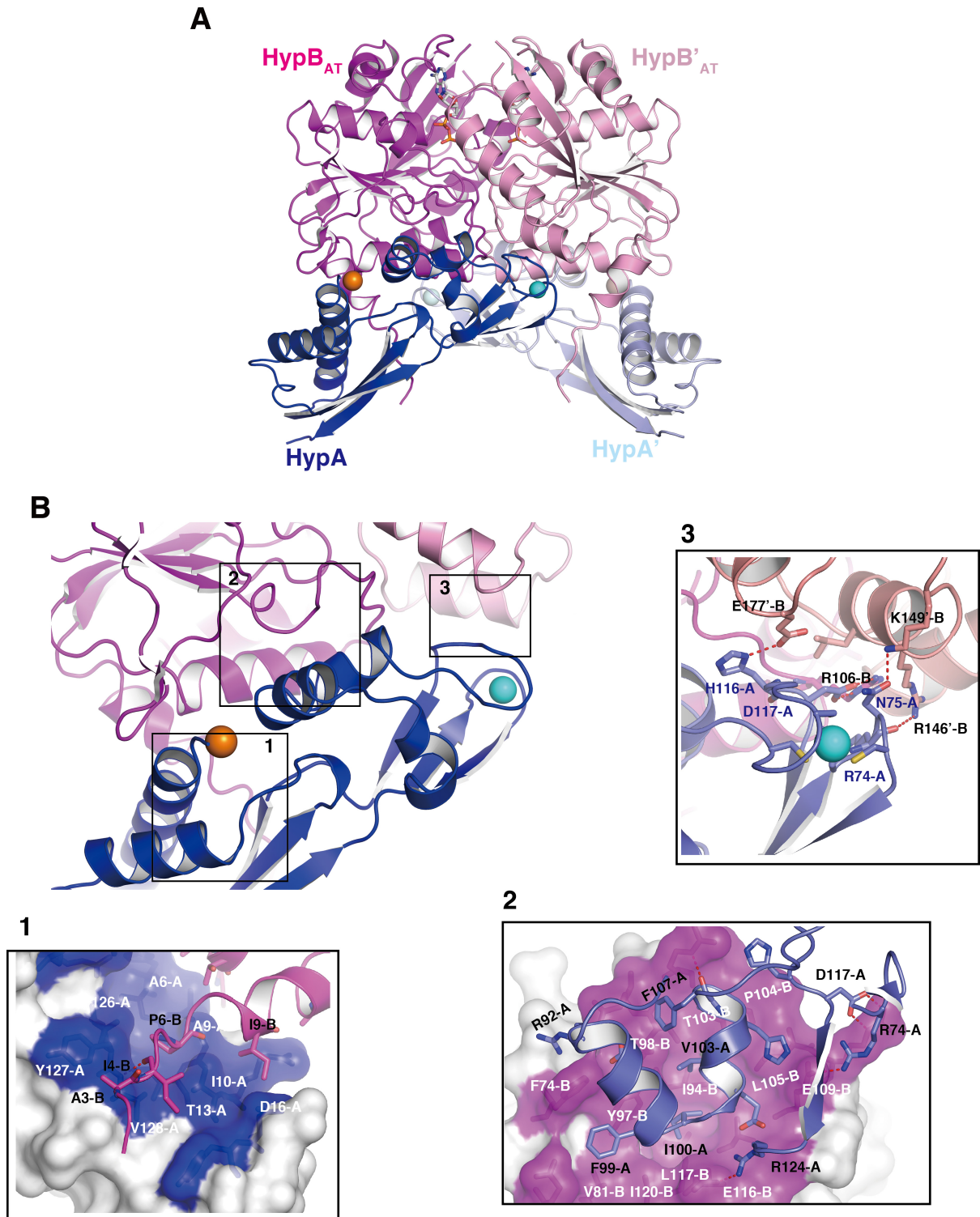


図1. HypAB<sub>AT</sub> 複合体の全体構造.

A) HypAB<sub>AT</sub> 複合体の全体構造. B) 複合体における3箇所の相互作用部位とそれらの拡大図.

HypAB<sub>AT</sub> 複合体は、HypB<sub>AT</sub> 二分子と HypA 二分子で構成されており、各一分子が結晶学的二回軸によって関係づけられている (図1A)。以前決定した HypB<sub>AT</sub> の単独構造と同様に、HypB<sub>AT</sub> はヌクレオチドを挟み込むようにして二量体を形成しており、HypA がヌクレオチド結合部位とは反対の側面からそれぞれ結合していた。

HypA と HypB<sub>AT</sub> は主に3つの領域で相互作用している (図1B)。領域1は、HypA の Ni 結合ドメインと HypB の N 末端の残基間の疎水性相互作用および水素結合で形成されている。領域2は、HypA の Zn 結合ドメインの疎水性残基が、HypB<sub>AT</sub> の疎水クレフトに入り込んでおり、さらに周辺では、複数の水素結合や塩橋が形成されている。領域2の疎水クレフトは、HypB<sub>AT</sub> の ADP 結合型では、形成されておらず、ATP 加水分解に伴う領域2の構造変化によって、HypA-HypB<sub>AT</sub> 間の相互作用が制御されていることが示唆される。領域3は、HypA の Zn フィンガーモチーフ周辺ともう一方の HypB<sub>AT</sub> との間で形成されている。

今回決定した複合体中の HypA 構造と、以前に決定した単独の HypA 構造を比較したところ、HypA の Zn 結合ドメインが大きく構造変化していることが明らかになった (図2A)。単独 HypA では、Zn 結合ドメインは大部分がループ構造を取っていたが、複合体形成によって、HypB<sub>AT</sub> の方向に折りたたまれ、よりコンパクトな構造を取っていた。興味深いことに、この構造変化により HypA の保存されたヒスチジン残基 (His98) が HypA の N 末端に接近し、保存された N 末端のメチオニン (Met1) とヒスチジン (His2) と共に、Ni イオンの結合サイトを形成していることが明らかになった (図2B)。

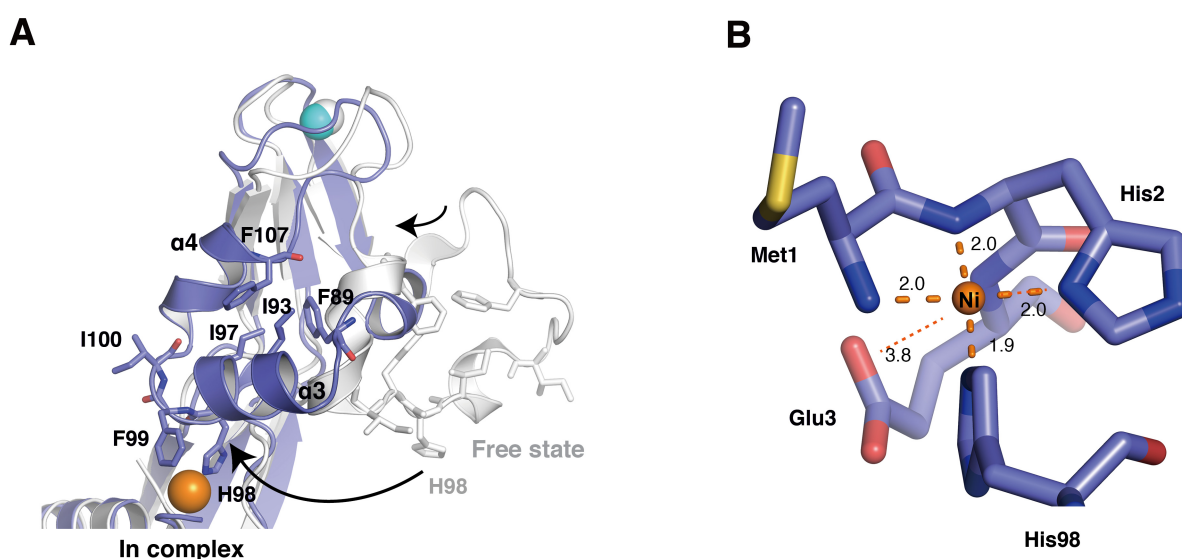


図2. 複合体形成による HypA の構造変化。

A) HypB<sub>AT</sub> との複合体形成に伴う HypA-Zn 結合ドメインの構造変化。 B) Ni 結合サイトの拡大図。

構造解析によって明らかになった HypA<sub>AT</sub> 複合体における新たに Ni 結合サイトについて、等温滴定熱量計 (ITC) を用いて Ni イオンとの結合実験を行った。HypA 単独での、Ni に対する親和性が  $K_d = 4 \mu\text{M}$  であり、他の種由来の HypA と同等の結果であった。HypB 単独では、ほとんど Ni イオンとの結合は確認できなかった。一方、HypA と HypB の共存下では、 $K_d = 7 \text{nM}$  と非常に高い親和性を示した。つまり、HypB との複合体形成によって HypA の構造変化が誘導され、Ni に対する親和性が約 600 倍近く上昇することが明らかになった。

以上の結果に基づき、次のような反応機構を提唱した。まず、ATP 結合状態の HypB が ATP と結合し、HypA と複合体を形成する。複合体形成によって、HypA の Zn 結合ドメインは構造変化を誘導され、保存されたヒスチジン残基が N 末端に近接し、高親和性の Ni 結合サイトが形成される。Ni が取り込まれると、HypB<sub>AT</sub> の ATP 加水分解が促進され、HypB の ATP 加水分解依存的な HypA<sub>AT</sub> 複合体は解離する。その後、解離した ADP 結合型 HypB は ADP と ATP を交換することで再び反応サイクルへと戻ることができる。一方、解離した HypA はヒドロナーゼそのまま Ni を保持し続け、HyhL へと Ni を受け渡す。今回の結果から、HypB<sub>AT</sub> はメタロシャペロンである HypA の Ni 結合を調節するエンハンサーとして機能していることが明らかになった。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院理学研究科の三木邦夫教授である。最後に、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Böck, A., King, P. W., Blokesch, M. & Posewitz, M. C. : Maturation of hydrogenases. *Adv. Microb. Physiol.*, **51** : 1-71, 2006.
- 2) Watanabe, S., Sasaki, D., Tominaga, T. & Miki, K. : Structural basis of [NiFe] hydrogenase maturation by Hyp proteins. *Biol. Chem.*, **393** : 1089-1100, 2012.
- 3) Watanabe, S., Matsumi, R., Arai, T., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. : Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: insights into cyanation reaction by thiol redox signaling. *Mol. Cell*, **27** : 29-40, 2007.
- 4) Watanabe, S., Arai, T., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. : Crystal structure of HypA, a nickel-binding metallochaperone for [NiFe] hydrogenase maturation. *J. Mol. Biol.*, **394** : 448-459, 2009.
- 5) Tominaga, T., Watanabe, S., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. : Structure of the [NiFe]-hydrogenase maturation protein HypF from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **68** : 1153-1157, 2012.
- 6) Sasaki, D., Watanabe, S., Matsumi, R., Shoji, T., Yasukochi, A., Tagashira, K., Fukuda, W., Kanai, T., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. : Identification and structure of a novel archaeal HypB for [NiFe] hydrogenase maturation. *J. Mol. Biol.*, **425** : 1627-1640, 2013.
- 7) Watanabe, S., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. : Crystal structures of the HypCD complex and the HypCDE ternary complex: transient intermediate complexes during [NiFe] hydrogenase maturation. *Structure*, **20** : 2124-2137, 2012.