

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	富 永 大 河
論文題目	Structural studies on cyano group biosynthesis by [NiFe] hydrogenase maturation proteins ([NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質によるシアノ基生合成過程の構造学的研究)		
(論文内容の要旨)			
ヒドロゲナーゼは、バクテリアやアーキアにおいて水素の酸化還元反応を触媒する酵素で、プロトン濃度の調節や、エネルギー代謝を円滑に進める役割を担っている。ヒドロゲナーゼのうち、金属として Ni と Fe を含む [NiFe] ヒドロゲナーゼにおいては、Ni 原子と Fe 原子が活性部位のシステイン残基と結合しており、Fe 原子には二つのシアノ基と一酸化炭素が配位し、NiFe クラスターを形成している。NiFe クラスターの生合成および配位子の導入においては、六種類の Hyp タンパク質 (HypA-HypF) が関与して Ni や Fe が段階的に組み込まれ、ヒドロゲナーゼの成熟化が完了する。最初に、HypF がカルバモイルリン酸のカルバモイル基を HypE の C 末にあるシステイン残基に転移させる。転移されたカルバモイル基は、HypE の ATP 依存的な脱水反応によってシアノ基に変換される。その後、HypC と HypD による Fe 原子の組み込み、HypA と HypB による Ni 原子の組み込みが行われる。本研究の開始時には、HypF を除く五種類の Hyp タンパク質の立体構造が決定されており、[NiFe]ヒドロゲナーゼの成熟化機構に関する知見が多く得られていた。HypF は、N 末に存在するアシルホスファターゼ (ACP) ドメインを除き、その構造は未知であった。また HypE に関しては、立体構造はすでに決定されていたものの、カルバモイル基を認識して脱水する機構については、構造学的な根拠に基づいた議論は行われていなかった。本研究では、HypE と HypF が担うシアノ基生合成過程に着目し、その反応機構を分子レベルで解明するため、HypF の全体構造ならびに HypE のカルバモイル化およびシアノ化状態の結晶構造解析を行った。 HypF の結晶構造解析においては、超好熱性古細菌 <i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1 由来の HypF (TkHypF) の発現、精製、結晶化、X 線回折実験を行った。種の異なる HypF の構造をモデルとした分子置換法と、セレノメチオニンで標識した TkHypF による単波長異常分散法を組み合わせ位相を決定したところ、4.5 Å 分解能での電子密度において、HypF の ACP, Zn フィンガー、ミドル、C 末の各ドメインをはっきり確認することができた。他種の HypF との構造比較では、C 末ドメインに対する他のドメインの相対位置が異なることがわかり、とくに ACP ドメインの揺らぎが比較的大きいことが示唆された。ACP ドメインと Zn フィンガードメインの間には、保存性が高く、強く正に帯電しているポケットが存在しており、このポケットにおいてカルバモイルリン酸が加水分解されると考えられた。また、ポケットの大きさが基質の選択性に影響すると考えられるので、ACP ドメインの揺らぎが HypF の基質認識を制御している可能性が示唆された。 HypE のカルバモイル化およびシアノ化状態の結晶構造解析においては、<i>T. kodakarensis</i> 由来の HypE (TkHypE) にシアン酸カリウムを加えることで、C 末システイン残基のカルバモイル化を行った。AMPPNP および ATP との共結晶化を行い、それぞれ 1.53 Å, 1.64Å 分解能の結晶構造を決定した。AMPPNP 結合型の結晶の電子密度からは、C 末のシステイン残基 (Cys338) は部分的にカルバモイル化されており、50%がカルバモイル化、50%が未反応という状態で混在していることが分かった。ATP 結合型のデータにおいても、同様に 50%のシステインがシアノ化されていた。ATP/AMPPNP 結合部位においては、ATP のリン酸基は四つのマグネシウムイオンに取り囲まれ、マグネシウムイオンは五つのアスパラギン酸残基によって配位されていた。			

ATP 結合型のデータにおいては、ATP の γ リン酸だけでなく β リン酸の占有率も低くなっていた。HypE が属する PurM ファミリーで、ATP を AMP に加水分解する human selenophosphate synthetase 1 (*hSPS1*) と構造を比較したところ、ADP 加水分解で求核的役割を果たす水分子周囲の構造がよく似ていたことから、HypE も ADP を加水分解できる可能性が示唆された。これまでの研究においては、モチーフ IV の保存されたグルタミン酸 (TkHypE では Glu272) が最初にカルバモイル基からプロトンを引き抜くと考えられていたが、TkHypE の構造では、Glu272 はカルバモイル基の窒素原子に近い位置にあるものの、その角度の面から直線的な攻撃には不利であった。一方で、カルバモイル基の酸素原子の近くには水分子が存在し、酸素原子およびモチーフ II の Lys134 と水素結合を形成していた。これらの結果から、Lys134 が水分子を介してプロトンを引き抜き、その後 Glu272 がイミノリン酸中間体からプロトンを引き抜くことで、カルバモイル基の脱水が行われるという新しい反応機構を提唱した。

(論文審査の結果の要旨)

多くのバクテリアやアーキアにおいて、プロトンの濃度調節やエネルギー代謝を円滑に進める役割を担っているヒドロゲナーゼは、水素の可逆的な酸化還元反応を触媒する。Ni と Fe を含む [NiFe] ヒドロゲナーゼにおいては、Ni 原子と Fe 原子が活性部位のシステイン残基に結合しており、Fe 原子には二つのシアノ基と一酸化炭素が配位して、NiFe クラスターを形成している。NiFe クラスターの生合成と配位子の導入には、六種類の Hyp タンパク質 (HypA-HypF) が関与して、このタンパク質の成熟化を完了する。HypF によって、カルバモイルリン酸のカルバモイル基が HypE の C 末システインに転移した後、HypE の ATP 依存的な脱水反応によってシアノ基に変換される。その後、HypC と HypD によって Fe 原子が組み込まれる。本研究は、HypE と HypF によるシアノ基合成過程に着目し、HypF および HypE のカルバモイル化あるいはシアノ化状態の結晶構造を決定して、カルバモイル基の認識と脱水に関する反応機構を分子レベルで解明しようとしたものである。

超好熱性古細菌由来 TkHypF の発現、精製、結晶化、X 線回折実験を行い、4.5 Å 分解能での結晶構造の決定に成功している。その結果、ACP, Zn フィンガー、ミドル、C 末という四つのドメインの相対的配置が明らかになり、ACP ドメインの揺らぎが比較的大きく、ACP ドメインと Zn フィンガードメイン間のポケットで、カルバモイルリン酸の加水分解、カルバメート中間体の生成が行われる可能性を見いだしている。また、ACP ドメインの揺らぎが TkHypF の基質認識を制御している可能性も示唆されている。

また、超好熱性古細菌由来 TkHypE にシアン酸カリウムを加えて、C 末システインをカルバモイル化し、AMPPNP および ATP と共結晶化することで、それぞれ 1.53 Å, 1.64 Å 分解能での結晶構造の決定に成功している。その結果、AMPPNP 結合型の結晶構造では 50% の C 末システインがカルバモイル化されていること、ATP 結合型の結晶構造においても同様に 50% のシステインがシアノ化されていることを明らかにしている。類縁の酵素との構造比較などから、TkHypE も ADP を加水分解できる可能性が示唆されている。これらの結果から、TkHypE の構造におけるカルバモイル基の窒素原子の近くにある Glu272 の配置から、カルバモイル基の脱水について Lys134 が関わる新たな反応機構を提唱している。

これらの重要な知見を得た本論文は、博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成 25 年 10 月 7 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認められた。