

元素状硫黄と元素状セレンのバイオジェネシスを司る NifS 相同タンパク質： 鉄-硫黄クラスター形成能の解明

加藤 伸一郎, 三原 久明, 栗原 達夫, 吉村 徹, 江崎 信芳
(京都大学・化学研究所*)

NifS-like proteins play a role in biogenesis of elemental sulfur and elemental selenium: Investigation into biosynthesis of iron-sulfur cluster

Shin-ichiro KATO, Hisaaki MIHARA, Tatsuo KURIHARA, Tohru YOSHIMURA, Nobuyoshi ESAKI
Institute for Chemical Research, Kyoto University

NifS, a pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme which catalyzes the desulfurization of L-cysteine to yield L-alanine and elemental sulfur, has a role in the formation of the metallocluster of nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. Genes with sequence similarity to *nifS* have been found in various organisms. *Synechocystis* sp. PCC6803 contains two *nifS*-like genes, *slr0387* and *sl10704*. We cloned these *nifS*-like genes, and overexpressed them in *Escherichia coli*. We purified and characterized their gene products, which were named SsCsd1 and SsCsd2. These enzymes acted on L-selenocysteine, L-cysteine sulfinic acid, and L-cysteine. The activities of the enzymes with L-selenocysteine and L-cysteine sulfinic acid were enhanced by pyruvic acid. The ability to reconstitute iron-sulfur cluster of ferredoxin from *Spirulina* sp. was examined *in vitro*. The apoferredoxin was converted to holoferredoxin by SsCsd1 and SsCsd2 in the presence of L-cysteine, ammonium iron (II) sulfate, PLP and dithiothreitol. The result suggests that these cysteine desulfurases play a role in the biosynthesis and repair of iron-sulfur clusters in *Synechocystis* sp. PCC6803.

鉄-硫黄クラスターは、生体内において、呼吸や光合成における電子伝達体や酵素の活性中心などとして極めて重要な働きを担っている。しかしながら、クラスターの形成および修復機構に関しては不明な点が多い。米国のDeanらのグループは、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* のニトロゲナーゼの鉄-硫黄クラスターの生合成に *nifS* 遺伝子が関与することを明らかにした¹⁾。NifSは、L-システインをL-アラ

* 所在地：宇治市五ヶ庄（〒611-0011）

ニンと硫黄に分解するシステインデスルフラゼ活性を持つピリドキサル酵素で、生成した硫黄がニトロゲナーゼの鉄-硫黄クラスターに取り込まれることが明らかとなった²⁾。nifS相同遺伝子は、細菌から高等生物に至るまで幅広く存在しているものの、その生理的意義はほとんど明らかにされていない。近年、鉄-硫黄クラスターの生合成以外にもチアミン、4-チオウリジンなどの含硫化合物の生合成に際し、硫黄供給系として機能する可能性が示唆されている^{3), 4)}。さらに、NifS相同タンパク質はL-セレノシステイン分解活性も有するため、含セレン化合物の生合成に関与している可能性もある。本研究では、全ゲノム配列が決定された*Synechocystis* sp. PCC6803の二つのNifS相同タンパク質に着目し、これらの酵素学的性質を調べるとともに、*in vitro*における鉄-硫黄クラスター形成能を検討した。

実験方法

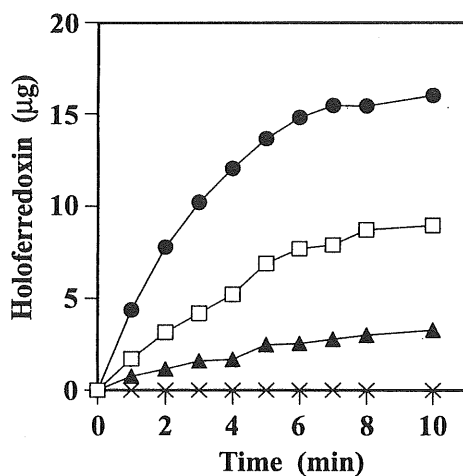
Synechocystis sp. PCC6803の二つのNifS相同タンパク質をコードする遺伝子断片をゲノムDNAを鋳型としたPCRにより増幅した。これらの断片をそれぞれpUC118のEcoRI-BamHIサイトに挿入後、pKK223-3にサブクローニングし、高発現プラスミドを構築した。これらを用い、NifS相同タンパク質(SsCsd1, SsCsd2)を大腸菌内で高発現させ、硫安分画、Phenyl-TOYOPEARL, DEAE-TOYOPEARL等のカラムクロマトグラフィーによりそれぞれ均一に精製した。活性測定の実験液は5 mM基質, 50 mMジチオスレイトール, 0.02 mM PLP, 120 mM トリシン緩衝液 (pH 7.5) 及び酵素を含み、既報の方法に従って測定した⁵⁾。また、基質特異性はアミノ酸分析機を用いて測定した。鉄-硫黄クラスター再構成は、1 mM L-システイン, 1 mM硫酸第一鉄アンモニウム, 5 mMジチオスレイトール, 0.02 mM PLP, 20 µgアポフェレドキシン (*Spirulina* 由来), 50 mMトリシン緩衝液 (pH 7.5) 及び酵素を含む反応液中で行い、生成したホロフェレドキシンをHPLCにより定量した。

結 果

クローン化した遺伝子の塩基配列は、データベースのものと一致することが確認された。SsCsd1およびSsCsd2はいずれも同一のサブユニットからなる二量体で、L-セレノシステイン, L-システイン, L-システインスルフィン酸に作用してL-アラニンを生成する反応を触媒するピリドキサル酵素であった。各基質に対する反応性および速度論的解析の結果、SsCsd1はL-セレノシステインを最も良い基質とするのに対し、SsCsd2はL-システインスルフィン酸を最も良い基質とすることが明らかとなった (Table 1)。また、SsCsd1およびSsCsd2は、5 mMピルビン酸存在下でL-セレノシステインを基質とした場合、それぞれ2倍、6倍に活性化されることが分かった。同様の活性化は、L-システインスルフィン酸を基質とした際にもみられたが、L-システインを基質とした場合には、このような活性化が認められなかったため、L-システインに対しては異なった触媒機構により反応が進む可能性が示唆された。また、これらのNifS相同タンパク質を鉄-硫黄クラスター再構成反応に用いた場合、硫化ナトリウムを用いた非酵素系より速やかにホロフェレドキシンを生成することが分かった。(Fig.1) SsCsd1は、SsCsd2よりも鉄-硫黄クラスター形成能が高いが、これは、システインに対する活性の高さが反映されたものと思われる。

Table 1. Kinetic parameters of SsCsd1 and SsCsd2 for L-selenocysteine and L-cysteine sulfinic acid

Substrate	SsCsd1			SsCsd2		
	k_{cat} s^{-1}	K_m mM	k_{cat}/K_m $mM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{cat} s^{-1}	K_m mM	k_{cat}/K_m $mM^{-1} \cdot s^{-1}$
without pyruvate						
L-selenocysteine	15	0.43	35	4.0	0.59	6.8
L-cysteine sulfinic acid	3.2	17	0.19	3.4	0.28	12
with 1 mM pyruvate						
L-selenocysteine	28	0.70	40	25	0.67	37
L-cysteine sulfinic acid	10	27	0.37	21	0.46	46

**Fig. 1** Reconstitution of ferredoxin with SsCsd1, SsCsd2, and Na₂S.

The reaction mixture contained 10 µg apoferredoxin, 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.5), 5 mM DTT, 1 mM L-cysteine, 1 mM ammonium iron (II) sulfate, 20 µM PLP, and 1 µg of SsCsd1 (■) or SsCsd2 (□) in 100 µl. For reconstitution with Na₂S (▲), the enzyme and L-cysteine in the reaction mixture were replaced by 1 mM Na₂S. The reconstitution mixture devoid of the enzyme, L-cysteine, and Na₂S was used for a negative control experiment (×).

考 察

Synechocystis sp. PCC6803の二つのNifS相同タンパク質は、システイン以外にもセレノシステインとシステインスルフィン酸に対して高い活性を示した。*Synechocystis* sp.には、セレンタンパク質およびその生合成関連遺伝子 (*selA*, *selB*, *selC*, *selD*) が存在しない。また、生体内におけるシステインスルフィン酸の存在とその意義に関しても不明である。これらの活性の持つ生理的意義の理解に関しては、今後の研究課題である。大腸菌において *nifS* 相同遺伝子は、フェレドキシンや熱ショックタンパク質などの遺伝子とオペロンを形成しており、鉄-硫黄クラスター形成において協同的に働くと考えられている⁶⁾。SsCsd1 および SsCsd2 の遺伝子は、このようなオペロンを形成しておらず、SsCsd1 および SsCsd2 は、それぞれ単独で鉄-硫黄クラスター形成を行う能力を持つことが示唆された。

文 献

- 1) Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L. and Dean, D. R. (1993) *Biochemistry* 33 : 4714
- 2) Zheng, L. and Dean, D. R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269 : 18723
- 3) Kambampati, R. and Lauhon, C. T. (1999) *Biochemistry* 28 : 16561
- 4) Schwartz, C. J., Djaman, O., Imlay, J. A. and Kiley, P. J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 9009
- 5) Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K., and Esaki, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272 : 22417
- 6) Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. and Dean, D. R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 : 13264