

行われました。また、本研究の共同研究者である瀬谷司教授・押海裕之助教（北海道大学）、柳雄介教授・竹田誠准教授（九州大学）、及び石原直忠講師（東京医科歯科大学）にはここに深く感謝致します。最後に、本稿を査読していただき、貴重なコメントを頂きました中條信成助教（九州大学）には厚く御礼申し上げます。

- 1) Kawai, T. & Akira, S. (2006) *Nat. Immunol.*, 7, 131–137.
- 2) Akira, S. & Takeda, K. (2004) *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 499–511.
- 3) Yoneyama, M. & Fujita, T. (2009) *Immunol. Rev.*, 227, 54–65.
- 4) Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., & Chen, Z.J. (2005) *Cell*, 122, 669–682.
- 5) Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005) *Nat. Immunol.*, 6, 981–988.
- 6) Xu, L.G., Wang, Y.Y., Han, K.J., Li, L.Y., Zhai, Z., & Shu, H. B. (2005) *Mol. Cell*, 19, 727–740.
- 7) Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., & Tschopp, J. (2005) *Nature*, 437, 1167–1172.
- 8) Kumar, H., Kawai, T., Kato, H., Sato, S., Takahashi, K., Coban, C., Yamamoto, M., Uematsu, S., Ishii, K.J., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006) *J. Exp. Med.*, 203, 1795–1803.
- 9) Sun, Q., Sun, L., Liu, H.H., Chen, X., Seth, R.B., Forman, J., & Chen, Z.J. (2006) *Immunity*, 24, 633–642.
- 10) Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., Kawabata, S., & Kishimoto, T. (2009) *Sci. Signal.*, 2, ra47.
- 11) Chan, D.C. (2006) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 79–99.
- 12) de Brito, O.M. & Scorrano, L. (2008) *Nature*, 456, 605–610.
- 13) Chen, K.H., Guo, X., Ma, D., Guo, Y., Li, Q., Yang, D., Li, P., Qiu, X., Wen, S., Xiao, R.P., & Tang, J. (2004) *Nat. Cell Biol.*, 6, 872–883.
- 14) Züchner, S., Mersianova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battololu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schröder, J.M., & Vance, J.M. (2004) *Nat. Genet.*, 36, 449–451.
- 15) Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., & Chan, D.C. (2003) *J. Cell Biol.*, 160, 189–200.
- 16) Kishimoto, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., & Chan, D.C. (2004) *Science*, 305, 858–862.

小柴 琢己

(九州大学大学院理学研究院生物科学部門)

Regulation of antiviral immunity on the mitochondrial outer membrane

Takumi Koshiba (Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, 6–10–1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan)

超分子マシナリーが担う鉄硫黄クラスターの生合成

1. はじめに

Wächtershäuserが提唱した“Iron-Sulfur World”という仮説では、海底の熱水孔の周辺で硫化鉄などの鉱物が鋳型、触媒、かつエネルギー源 ($\text{FeS} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ の発エルゴン反応) となって、原始代謝ひいては原始生命が生じたとされている¹⁾。その説の真偽はともかく、太古の生き物は当時豊富に存在した鉄原子と硫黄原子を組み合わせ、 $[\text{2Fe-2S}]$ や $[\text{4Fe-4S}]$ などの鉄硫黄クラスターの形で利用することを始め、それらは多彩かつ際だった有用性のゆえに、おびただしい種類のタンパク質にコファクターとして採用されるようになった^{2,3)}。呼吸鎖電子伝達複合体 I, II, III や光化学系 I 複合体、フェレドキシンなどのタンパク質では、 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ の酸化還元を利用して鉄硫黄クラスターを電子伝達に用いているが、それらの酸化還元電位は -600 mV から $+500 \text{ mV}$ と実に広い幅の中から特定の値に設定されている。これはクラスターの電位がそれを取り巻くタンパク質側の環境によって自在に制御されているためである⁴⁾。一方、アコニターゼのような(デ)ヒドラーゼ類では、 $[\text{4Fe-4S}]$ クラスターを酸化還元ではなくルイス酸として触媒反応に用いている。また、鉄硫黄クラスターを酸素濃度や鉄イオン濃度のセンサーとして用いる発現制御タンパク質も知られている。近年では、 $[\text{4Fe-4S}]$ クラスターと S-アデノシルメチオニン (SAM) からラジカルを生成して酵素反応に利用するラジカル SAM スーパーファミリーの酵素群が続々と報告され、そのメンバーは 2000 種類以上とも言われている。さらに最近では、DNA ヘリカーゼ、RNA ポリメラーゼ、RNA プライマーゼといった酵素の中にも鉄硫黄クラスターが存在することが示されている⁵⁾。大腸菌だけを見ても、鉄硫黄タンパク質は 120 種類を超えており、その数は今なお増加しつつある。

鉄硫黄クラスターについては、1960 年代の後半に鉄イオンと硫化物イオン (S^{2-}) を DTT などのチオール化合物の存在下でアポタンパク質に加えると再構成されることが示され、以来、細胞の中でも化学的(非酵素的)に生じるものと考えられてきた。しかし現在では、鉄硫黄クラスターの生合成に多成分酵素系(マシナリー)が関与するこ

とが広く認知されるに至った^{2,3)}。本稿では、この10年間に急速に展開したクラスター生合成研究の流れを概説するとともに、マシナリーの中核となる足場タンパク質の立体構造に基づいて反応機構の一端を紹介する。

2. 鉄硫黄クラスターの生合成を担う3種類のマシナリーの特性と微生物の生存戦略

筆者らは1980年代に、システインを硫黄源とし、ATPに依存する鉄硫黄クラスター合成活性を葉緑体の粗抽出液に見出していた⁹⁾が、実体の解明が進んだのは2000年前後で、ゲノムの配列情報を利用した分子生物学的研究によるところが大きい。きっかけになったのは窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* を用いたDeanのグループの研究で、彼らはニトロゲナーゼの3種類の鉄硫黄クラスター（[4Fe-4S]、Pクラスター、FeMoco）の合成にNifS（システイン脱硫フラゼ）とNifU（鉄硫黄クラスター形成の足場タンパク質）が関与することを見出した²⁾。これをNIF（nitrogen fixation）マシナリーと称する（図1）。彼らはまた、*nifS* と *nifU* に類似の遺伝子 *iscS* と *iscU* を同じバクテリアで見出し、これらを含む *isc* オペロン全体（*iscRSUA-hscBA-fdx-iscX*）が窒素固定を行わない大腸菌などでも保

存されていることから、その機能をニトロゲナーゼ以外の鉄硫黄クラスター合成に関係するものと推定した⁶⁾。この仮説は間もなく、大腸菌や出芽酵母でのさまざまな実験から証明され²⁾、少なくとも6種類の成分から成る複雑なISC（iron-sulfur cluster）マシナリーとして認知された（図1）。例えば、大腸菌で *isc* オペロンの発現量を増加させると、細胞内の鉄硫黄クラスター合成能が著しく上昇したのである⁷⁾。

大腸菌からはISCマシナリー以外にも、新たな生合成マシナリーが発見された。*isc* オペロン全体を欠失した大腸菌変異株では鉄硫黄タンパク質の活性が著しく低下していたが、筆者らは復帰変異株を単離・解析して、*sufABC-DSE* オペロン（それまで機能未知）の発現量が増加すると鉄硫黄タンパク質の生合成が回復することを見出した。また *suf* オペロンの遺伝子群は単独で破壊してもほとんど影響がないが、*isc* オペロンとの二重変異は合成致死となった⁸⁾。これらの実験から、ISCと重複かつ独立した機能を持つクラスター生合成系として、SUF（sulfur）マシナリーを位置づけることができた（図1）。これら二つのマシナリーの間でアポタンパク質などに対する特異性/反応性の違いはほとんど認められない。

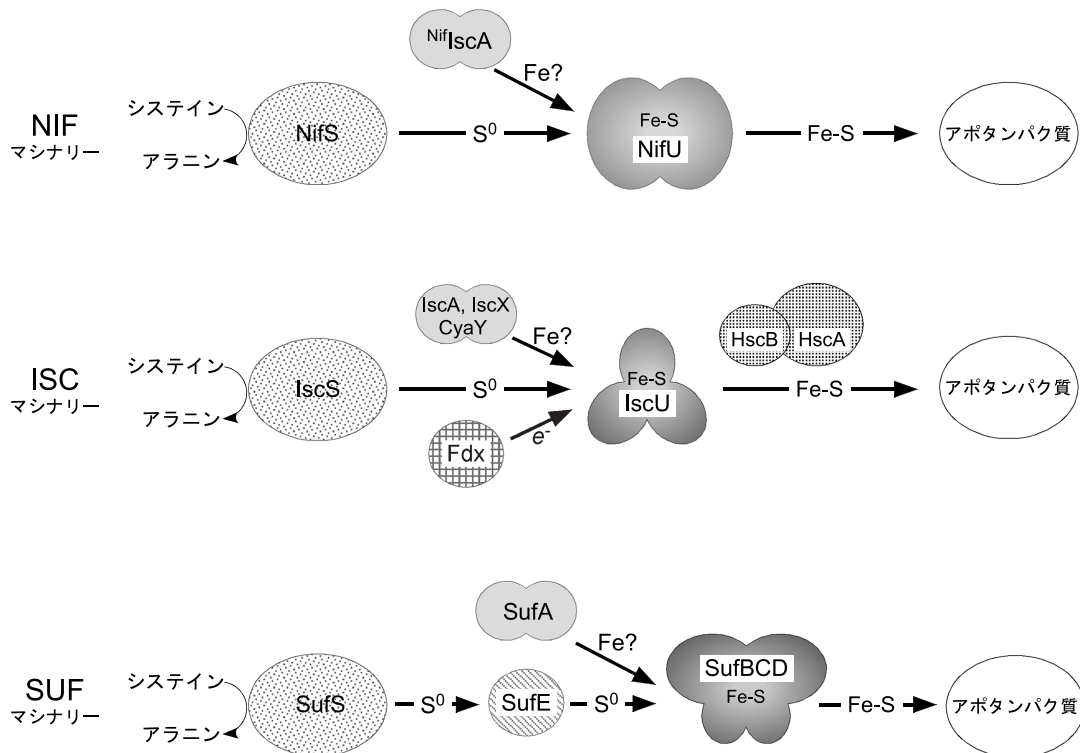


図1 3種類の鉄硫黄クラスター生合成マシナリー

ISC マシナリーは主に α , β , γ 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。一方の SUF マシナリーは古細菌を含む原核生物全般に広く分布しており、真核生物では葉緑体に見られる⁹⁾。ISC と SUF の二つのマシナリーを併用しているのは γ プロテオバクテリアのエンテロバクター科に属する大腸菌の近縁種に限られている。これらのバクテリアでは通常 *isc* オペロンが主に発現しており、*suf* オペロンは Fur と OxyR の制御下で、鉄不足かつ過酸化水素存在下といったストレス条件で発現する。加えて、*isc* オペロンの先頭の遺伝子 *iscR* は鉄硫黄クラスターをセンサーとする転写制御タンパク質をコードしており、これはアポ型とホロ型の変換を利用して細胞内のクラスター合成能をモニターし、*isc* と *suf* 両オペロンの発現を制御している¹⁰⁾。

前述のように、窒素固定細菌では NIF マシナリーがニトロゲナーゼの鉄硫黄クラスター形成に特異的に機能すると考えられていた。しかし、例外的にピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) など窒素固定を行わない微生物の中にも、ISC や SUF の代わりに NIF マシナリーを有するものがある。筆者らは大腸菌の *isc* と *suf* の両オペロンをピロリ菌などの *nif* オペロンに置き換えるという実験によって、NIF マシナリーもまたアポタンパク質に対する特異性の広い Fe-S クラスター生合成系として機能することを見出した⁹⁾。さらに3種類のマシナリーについて比較を重ね、次のような特性を明らかにした。1) NIF マシナリーは酸素に対して感受性が高く、通常の酸素濃度では十分機能することができない。窒素固定細菌や一部の嫌気性/微好気性の生物に限定的に分布する NIF は、低酸素環境への適応進化と捉えることができる。2) SUF マシナリーは酸素や活性酸素の存在下で最も安定である。この特性は、大腸菌における発現調節機構、さらには酸素発生の光合成を行うシアノバクテリアや葉緑体に SUF が分布することとも符合している⁹⁾。

3. 鉄硫黄クラスター形成の分子機構

3種類の生合成マシナリーに共通しているのはシステインデスルフラゼ (NifS, IscS, SufS) というピリドキサル酵素で、基質 L-システインから元素状硫黄 (S^0) のかたちで硫黄原子を引き抜いて活性部位のシステイン残基に渡し、ペルスルフィド (-SSH) を生成する¹¹⁾。この硫黄原子は、特異的なタンパク質-タンパク質相互作用によってクラスター形成の足場 (scaffold) タンパク質 NifU, IscU, SufBCD へと転移される。その後の反応には不明な点が多

いが、足場タンパク質の上で鉄硫黄クラスターが組み立てられ、次いで様々なアポタンパク質へ渡されるというのが大筋である (図 1)。これらの段階にマシナリーの残りの成分が関与することになる。比較的研究の進んでいる ISC マシナリーでは、クラスターの鉄原子は特異的なメタロシャペロンによって運ばれて来ると推定されており、その候補として挙げられているのは IscA, IscX と、*isc* オペロンから離れてコードされている CyaY である。もっとも IscA については鉄シャペロンではなく、鉄硫黄クラスターのキャリアという説もある。Fdx は安定な [2Fe-2S] クラスターを持つフェレドキシンで、鉄または硫黄原子の還元機能すると考えられている¹²⁾。HscA は Hsp70 タイプの分子シャペロン、HscB はそのコシャペロンで、これらは協調して足場タンパク質 IscU の構造を変化させ、IscU の鉄硫黄クラスターをアポタンパク質へ移行させると考えられている^{2,3)}。こういった反応の理解はなかなか進んでいないが、その理由として、鉄硫黄クラスター自体が不安定であるのに加えて、*in vitro* の実験では鉄イオン/クラスターが非酵素的に結合/移行してしまうという内因的な問題があり、*in vivo* の反応を忠実に再現することが難しいことが挙げられる。

ISC マシナリーの中心になるのは足場タンパク質 IscU であり、ここに非常に不安定な鉄硫黄クラスター中間体が形成される²⁾。筆者らは、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* IscU の鉄硫黄クラスターが他のものより安定であることを見出し、さらに安定性を高める変異 (D38A) を導入し、嫌気的な条件を保つことによって、クラスターを保持したホロ型 IscU の結晶構造解析に初めて成功した^{13,14)}。IscU は3枚羽のプロペラ様の三量体を形成していたが、驚いたことにこの三量体は非対称で、その中の一つのサブユニット (B プロトマー) だけが [2Fe-2S] クラスターを保持していた (図 2)。このクラスターは3残基のシステインと1残基のヒスチジンに結合しており、この配位様式もユニークである。また、B プロトマーだけを見るとクラスターの半分近くが分子表面に露出しているが、三量体ではこれが会合面のなかで他のプロトマーによって完全に覆われている。興味深いことに、三量体の会合面ではプロトマーの構造が大きく異なっており、これが非対称の要因である。中でも N 末端の α ヘリックスは柔軟性に富んでおり、会合面でヘリックスの巻き数と角度を変えることによって、3種類のプロトマーを非対称に繋ぎ止めている。このヘリックス領域の一次構造は IscU ホモログの間で高度に保存されており、大腸菌 IscU でこの領域を変異させると *in vivo* 機能が

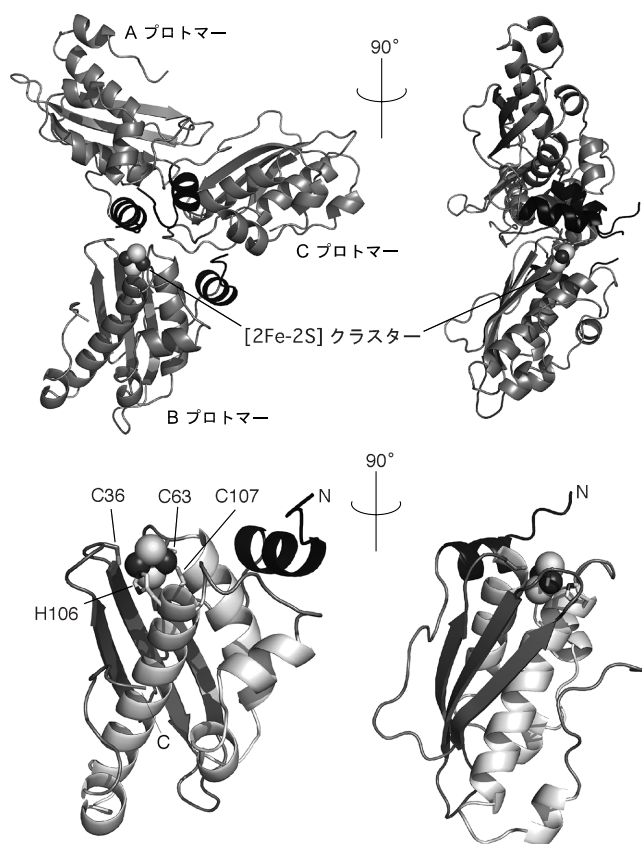


図2 ホロ型 IscU の結晶構造

上図は全体構造で非対称な三量体を示す。下図は [2Fe-2S] クラスタを配位している B プロトマーの構造。N 末端の α ヘリックスは三量体の会合面で構造を大きく変化させており、これを濃灰色で表示する。[2Fe-2S] クラスタは空間充填モデルで示しており、色の濃い方が鉄原子である。

消失することからも、三量体形成の重要性が理解できる¹⁴⁾。

ホロ型 IscU は結晶中・溶液中ともに三量体だが、アポ型はオリゴマー状態が変化し、溶液中で単量体/二量体の平衡となる¹³⁾。これらを考え合わせると、IscU は単量体/二量体の状態で硫黄原子と鉄原子を受け取り、複数の IscU 分子の間で協調して鉄硫黄クラスタに作り上げ、構造変化を利用して三量体に会合することで新生クラスタを安定に保持するという過程が想定される。一方、クラスタを取り出す段階では、HscA と HscB のシャペロンシステムが三量体を解離に導くことでクラスタが溶液に露出し、アポタンパク質へ移行しやすくなると予想される。それらの具体的なメカニズムについては今後の実験で理解を深めてゆかなければならないが、この結晶構造は IscU の三次/四次の構造変化がマシナリー全体の反応の

中核となることを示している。

IscU については、鉄原子と硫黄原子をドナータンパク質から受け取り、それらを硫化鉄 (副産物) に凝集させることなく鉄硫黄クラスタの形に組み立て、[2Fe-2S] と [4Fe-4S] の間でクラスタ変換を行い、これら不安定なクラスタを一時的に保管し、その後、無傷な形でクラスタをアポタンパク質に受け渡すという複雑な諸過程が想定されている。IscU のダイナミックな三次/四次の構造変化には、そのような作動機構を理解するための鍵情報が含まれており、今後の研究の進展が期待される。紙面の関係で詳しく述べなかったが、NIF マシナリーの足場タンパク質 NifU では、N 末端ドメインが IscU と相同である²⁾。一方、SUF マシナリーでは SufBCD 複合体が鉄硫黄クラスタ中間体の形成部位と考えられており、この複合体の中では SufC が ATP の加水分解を利用して SufB-SufD に大きな構造変化を引き起こすと考えられている¹⁵⁾。すなわち、3 種類の生合成マシナリーはそれぞれ異なる足場タンパク質を用いているが、それらには共通して柔軟性/可動性という特性が備えられており、一連の複雑な生合成反応には三次/四次の大きな構造変化が利用されるという可能性が浮かび上がってきた。

4. おわりに

鉄硫黄クラスタの形成は一見単純な化学反応だが、細胞内では複雑なマシナリーがこれを担っており、マシナリーの中心成分である足場タンパク質は予想を超えた柔軟性を持つことが明らかになってきた。しかしながら、アポタンパク質をいかにして認識し、不安定なクラスタをどのように渡すのかといった、根本的な反応機構には未解明な部分が多く残されている。本稿では触れなかったが、真核生物の細胞質の鉄硫黄タンパク質のクラスタ合成においては、ミトコンドリア内の ISC マシナリーとミトコンドリアから細胞質への輸送系 (輸送される物質は未だ不明)、さらに細胞質に局在する CIA (cytosolic iron-sulfur assembly) マシナリーのいずれもが必要である³⁾。それらの成分の異常は神経変性疾患や鉄代謝異常などの疾患の病態とも密接に関わっており、生合成機構の解明がいつそう望まれる。

謝辞：本稿で述べた研究成果は、多くの方々との共同研究によるものであり、ここに深謝いたします。なかでも、中村実、徳本梅千代、下村喜充の3氏により、それぞれの局面で重要な展開がもたらされたことを記して感謝します。

- 1) Wächtershäuser, G. (2007) *Chem. Biodivers.*, 4, 584–602.
- 2) Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., & Johnson, M.K. (2005) *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 247–281.
- 3) Lill, R. (2009) *Nature*, 460, 831–838.
- 4) Dey, A., Jenney, F.E., Jr., Adams, M.W., Babini, E., Takahashi, Y., Fukuyama, K., Hodgson, K.O., Hedman, B., & Solomon, E.I. (2007) *Science*, 318, 1464–1468.
- 5) Takahashi, Y., Mitsui, A., Hase, T., & Matsubara, H. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 2434–2437.
- 6) Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., & Dean, D.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 13264–13272.
- 7) Nakamura, M., Saeki, K., & Takahashi, Y. (1999) *J. Biochem.*, 126, 10–18.
- 8) Takahashi, Y. & Tokumoto, U. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 28380–28383.
- 9) Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K., & Takahashi, Y. (2004) *J. Biochem.*, 136, 199–209.
- 10) Giel, J.L., Rodionov, D., Liu, M., Blattner, F.R., & Kiley, P.J. (2006) *Mol. Microbiol.*, 60, 1058–1075.
- 11) Mihara, H. & Esaki, N. (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 12–23.
- 12) Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y., & Fukuyama, K. (2001) *Biochemistry*, 40, 11007–11012.
- 13) Shimomura, Y., Kamikubo, H., Nishi, Y., Masako, T., Kataoka, M., Kobayashi, Y., Fukuyama, K., & Takahashi, Y. (2007) *J. Biochem.*, 142, 577–586.
- 14) Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., & Takahashi, Y. (2008) *J. Mol. Biol.*, 383, 133–143.
- 15) Wada, K., Sumi, N., Nagai, R., Iwasaki, K., Sato, T., Suzuki, K., Hasegawa, Y., Kitaoka, S., Minami, Y., Outten, F.W., Takahashi, Y., & Fukuyama, K. (2009) *J. Mol. Biol.*, 387, 245–258.

高橋 康弘¹, 和田 啓², 福山 恵一²

(¹ 埼玉大学大学院理工学研究科分子生物学領域)

(² 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻)

Biogenesis of iron-sulfur clusters mediated by complex machineries

Yasuhiro Takahashi¹, Kei Wada², and Keiichi Fukuyama²
 (¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, 255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama City 338-8570, Japan; ²Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan)

ゲノム DNA の核内配置と遺伝子発現制御

1. はじめに

細胞核には、核小体、promyelocytic leukemia (PML) ボディー、核スペckルなどのいわゆる核ボディーをはじめとした種々の構造物に加え、いうまでもなくゲノム DNA が収納されている。これら核を構成する構造物の核内での配置、いわば核構造は分化、組織特異的機能など細胞の状態と密接に関連していることが分かりつつある^{1,2)}。特に、ゲノム DNA はヒトでは全長2メートルにもおよぶ巨大な構造物であり、これを直径10ミクロンほどの細胞核にどのように収納するかというのは生物にとって非常に重要な問題であるといえる。単一のゲノム DNA 配列から発生、分化、恒常性維持など異なる生命現象の局面に応じて異なる遺伝子群を発現する機構として、近年 DNA メチル化、ヒストン修飾などのエピジェネティック修飾が注目されている。このエピジェネティック修飾制御とゲノム DNA の核内配置が密接に関連することで遺伝子発現調節を行っているとする報告が散見されつつある³⁾。本稿では、徐々に明らかになりつつあるゲノム DNA の核内配置と機能との関連に関する最新の知見を紹介するとともに、我々の研究についても言及したい。

2. 染色体の核内相対的配置

細胞周期の間期における染色体は、通常イメージされる凝縮した X 字型ではなく、ある特定の領域を占め他の染色体とは混じり合わない塊として存在する (図 1A)。この間期細胞核において個々の染色体が占有する固有の領域は染色体テリトリー (chromosome territory) と定義される。各染色体特異的プローブによる蛍光 *in situ* hybridization (FISH) いわゆる染色体ペインティング法の開発により各染色体を区別して可視化できるようになり、染色体テリトリーの核内配置にはある規則性が存在する、すなわちノンランダムであることが分かっている²⁾。

異なる染色体間の距離は細胞種特異的であることが知られている。例えば、マウス肝細胞では染色体5番と6番は、12番と15番よりも高い確率で隣接しているが、リンパ球ではこれとは逆の傾向が認められる⁴⁾。ヒトの脂肪細胞では、分化に伴い染色体12番と16番とが隣接する頻度