

- (1999) *Nature*, **399**, 700–704.
- 6) Yang, W. & Woodgate, R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **104**, 15591–15598.
 - 7) Masuda, Y. & Kamiya, K. (2002) *FEBS Lett.*, **520**, 88–92.
 - 8) Auerbach, P., Bennett, R.A., Bailey, E.A., Krokan, H.E., & Demple, B. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 17711–17716.
 - 9) Acharya, N., Johnson, R.E., Prakash, S., & Prakash, L. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 9555–9563.
 - 10) Murakumo, Y., Roth, T., Ishii, H., Rasio, D., Numata, S., Croce, C.M., & Fishel, R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4391–4397.
 - 11) Masuda, Y., Ohmae, M., Masuda, K., & Kamiya, K. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12356–12360.
 - 12) Haracska, L., Unk, I., Prakash, L., & Prakash, S. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **103**, 6477–6482.
 - 13) Wood, A., Garg, P., & Burgers, P.M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 20256–20263.
 - 14) Guo, C., Sonoda, E., Tang, T.S., Parker, J.L., Bielen, A.B., Takeda, S., Ulrich, H.D., & Friedberg, E.C. (2006) *Mol. Cell*, **23**, 265–271.
 - 15) Masuda, Y. & Kamiya, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 24314–24321.

増田 雄司, 神谷 研二
(広島大学原爆放射線医科学研究所
分子発がん制御研究分野)

Induced mutagenesis and translesion DNA synthesis—structure and function of REV1—

Yuji Masuda and Kenji Kamiya (Department of Experimental Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan)

[Fe]-ヒドロゲナーゼ (Hmd) の構造解析 から見てきたヒドロゲナーゼ活性中心の 収斂進化

はじめに

ヒドロゲナーゼは水素ガス (H_2) を活性化し、ヒドリドとプロトンに分解する反応を触媒する酵素である。多くのヒドロゲナーゼはヒドリドをさらに分解し、二つの電子とプロトンにする。その触媒反応は可逆であり、逆反応では H_2 が生産される¹⁾。ヒドロゲナーゼのバイオテクノロジーへの応用として、燃料電池電極や水素生産の触媒としての活用が注目されている²⁾。

自然界において、ヒドロゲナーゼは微生物生態系の水素

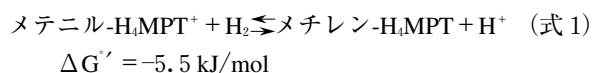
代謝で重要な役割を担っている。嫌気条件下、有機物は細菌や原生動物などによって分解され、有機酸や H_2 になる。ここで大量の H_2 が発生するが ($\sim 10^8$ トン/年)³⁾、 H_2 はメタンや酢酸の生産および硫酸塩の還元に使われるため、環境中に存在する H_2 濃度は低く保たれている。一部の H_2 は好気環境に分散し、そこで好気性細菌によって酸化される⁴⁾。ヒドロゲナーゼはこれらの水素代謝系で、 H_2 の生産と酸化を触媒する。

ヒドロゲナーゼはおよそ 80 年前に発見され、これまでに [NiFe] ヒドロゲナーゼと [FeFe] ヒドロゲナーゼという 2 種類がよく研究されてきた。名称からも明らかのように、活性中心に含まれる金属の種類が異なり、前者はニッケルと鉄を、後者は 2 原子の鉄を含んでいる (図 1)^{5–7)}。20 年ほど前、メタン菌から新しいタイプのヒドロゲナーゼが発見された。この新規酵素はひとつの鉄のみを活性中心に含んでいることから、[Fe] ヒドロゲナーゼ (Hmd) と呼ばれている (図 1)⁴⁾。

本稿では、Hmd の活性中心に関する知見を概説した後、ヒドロゲナーゼの特徴的な鉄錯体構造から、3 種類のヒドロゲナーゼの進化について述べる。

1. [Fe]-ヒドロゲナーゼ (Hmd) の機能と性質

[Fe] ヒドロゲナーゼの分類名は H_2 -forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase で、略称は Hmd である。その触媒反応では、 H_2 を活性化してヒドリドとプロトンに分解し、ヒドリドをメチルテトラヒドロメタノプテリン (メチル- H_4 MPT⁺) に転移し、メチレンテトラヒドロメタノプテリン (メチレン- H_4 MPT) をつくる。逆反応では、メチレン- H_4 MPT とプロトンから水素ガスを発生する (式 1)⁴⁾。



テトラヒドロメタノプテリンはメタン菌の C1 キャリヤーであり、Hmd の触媒する反応はメタン生成代謝に含まれる。Hmd は水素利用性のメタン菌のいくつかに見出されているが、*Methanothermobacter marburgensis* 由来の酵素がよく研究されている。このメタン菌では、培地中のニッケルが制限された条件 (50nM 以下) で Hmd が大量に生産され、全タンパク質の 5% を超えることが知られている⁸⁾。

Hmd は分子量 38,000 のサブユニットのホモ二量体となり、2 分子の鉄コファクター (FeGP コファクター) を含んでいる。FeGP コファクターはピリジノール環が GMP

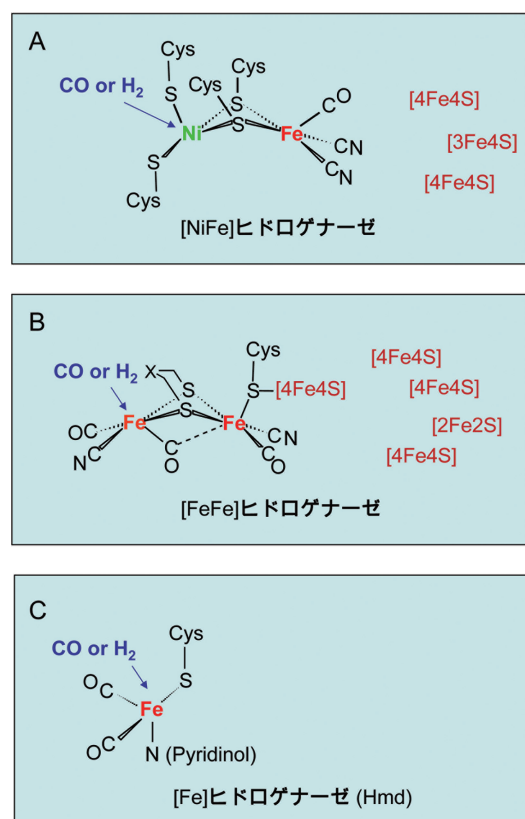


図1 3種類のヒドロゲナーゼの活性中心の構造

(A) [NiFe]ヒドロゲナーゼ, (B) [FeFe]ヒドロゲナーゼ, (C) [Fe]ヒドロゲナーゼ. これらの酵素において, COはH₂に対して競合的に阻害するので, 実験で示されたCO結合部位にH₂が結合すると推定されている.

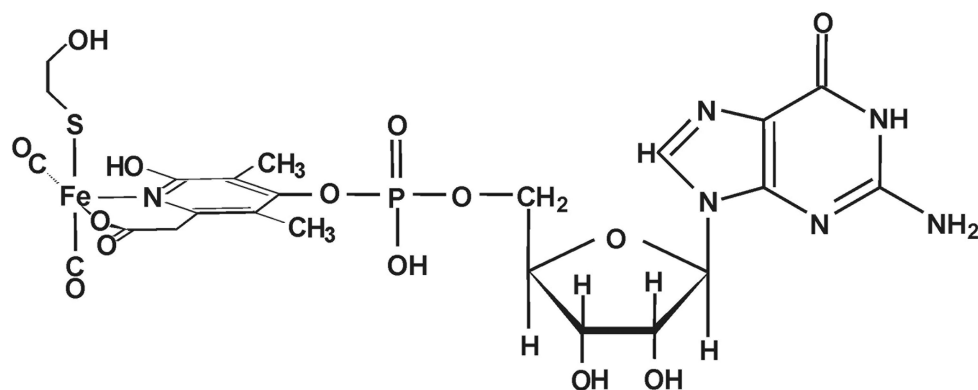


図2 [Fe]ヒドロゲナーゼ (Hmd) から抽出分離された遊離 FeGP コファクターの推定構造

グアニリルピリジノール部分の構造は, 核磁気共鳴および質量分析によって解析されている. 鉄錯体部分の構造は, 赤外, メスbauerおよびX線吸収分光分析の結果から推定した.

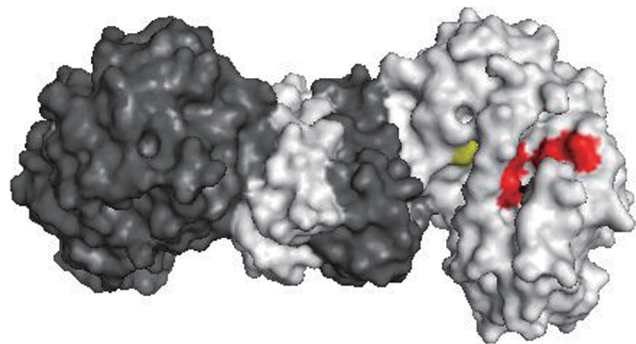


図3 *Methanopyrus kandleri* 由来の [Fe]-ヒドロゲナーゼ (Hmd) アポ酵素の結晶構造

FeGP コファクター結合部位のアミノ酸残基を色で示した (鉄に結合するシステイン残基, 黄; モノヌクレオチド結合部位の残基, 赤).

のリン酸に結合した構造を有し、ピリジノール環に鉄が結合している (図2)^{9,10}。このコファクターはホロ酵素から抽出することができる。また、遊離したコファクターをアポ酵素に再結合して、活性なホロ酵素を再構築することも可能である。赤外分光¹¹とX線吸収分光分析¹²により、その鉄部位には4分子の配位子 (2分子のCO, タンパク質からのシステインチオール, およびピリジノール環の1原子) が配位していることが示された (図1, 2)。FeGP コファクターに含まれる鉄の酸化状態は、低スピン Fe(0) もしくは低スピン Fe(II) であることが、メスバウアー分光法で示された¹³。

2. X線結晶構造

最近, Hmd アポ酵素の結晶構造が発表された¹⁴。大腸菌で生産した *Methanocaldococcus jannaschii* および *Methanopyrus kandleri* 由来のタンパク質の結晶構造で, FeGP コファクターは含まれていない。これらの二量体構造は二つのN末ドメインとひとつの中央ドメインからなり, この中央ドメインはサブユニットのC末ドメインが絡み合って形成されている (図3)。これら三つのドメインは二つのくぼみを形作っており, それらのくぼみにはモノヌクレオチド結合構造が存在する。その部位にコファクターをモデリングすると, ピリジノール部位がCys176の近傍に位置することがわかった。部位特異的変異実験で, このシステインをアラニンに変異させると活性を失うことから, このシステインのチオール基がコファクターの鉄に配位していると考えられた¹²。基質であるメテニル-H₂MPT⁺の結合部位はまだ不明であるが, コファクター結合部位付近には, 基質結合に十分な広さがある。

3. ヒドロゲナーゼ活性中心の収斂進化

[NiFe]ヒドロゲナーゼと[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性中心は, X線結晶構造解析や各種分光学的手法によって, 詳細な構造が明らかにされている (図1)⁵⁻⁷。これらの2核金属活性中心はともに低スピンの鉄を含み, その鉄原子にはチオール, カルボニル (CO) およびシアン (CN⁻) が, 配位子として結合している。COおよびCN配位子は他の金属酵素では見られない。これらの配位子は鉄中心の性質を微調整して, ヒドロゲナーゼとしての触媒活性を可能にしていると考えられている。

Hmdの場合, 前述のように二つのCOとシステインからのチオールに加えて, もうひとつの配位子 (窒素もしくは酸素原子) が低スピンの鉄に結合していることが分光学

的に示された¹¹⁻¹³。最近, 筆者らは, Hmd ホロ酵素 (FeGP コファクターとの複合体) の結晶構造を得ることに成功した¹⁵。その結晶構造によって, ピリジノールが鉄に配位していることが証明されるとともに, それぞれの配位子の立体配置が明らかになった。この錯体構造から, ピリジノール配位子はCNと同様な電子の性質を持っていることが予想されている。

これらの結果から, すべてのヒドロゲナーゼは, いずれもチオール, COおよびCNもしくはそれに類似したピリジノールを配位子としてふくみ, その立体配置もよく似ていることがわかった。タンパク質の一次構造に類似性が見られないことから, これら三つの酵素が先祖を異にすることは明らかなので, これらのヒドロゲナーゼの機能発現にとって重要な鉄錯体構造が, 収斂進化によって形成されたと考えられる。このような錯体構造を生物が合成するには, 複雑な酵素系が必要である¹⁶。そのようなシステムが自然界において少なくとも3度も出現し, 同様な鉄錯体構造を有するヒドロゲナーゼが生成されてきたことは大変興味深い。

謝辞

Max-Planck Society, Fonds der Chemischen Industrie および Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (BioH₂ project) からの援助に感謝する。

- 1) Vignais, P.M., Billoud, B., & Meyer, J. (2001) *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 455-501.
- 2) Karyakin, A.A., Morozov, S.V., Karyakina, E.E., Zorin, N.A., Perelygin, V.V., & Cosnier, S. (2005) *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 73-75.
- 3) Conrad, R. (1996) *Microbiol. Rev.*, **60**, 609-640.
- 4) Shima, S. & Thauer, R.K. (2007) *Chem. Rec.*, **7**, 37-46.
- 5) Volbeda, A., Charon, M.H., Piras, C., Hatchikian, E.C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. (1995) *Nature*, **373**, 580-587.
- 6) Ogata, H., Mizoguchi, Y., Mizuno, N., Miki, K., Adachi, S., Yasuoka, N., Yagi, T., Yamauchi, O., Hirota, S., & Higuchi, Y. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11628-11635.
- 7) Peters, J.W., Lanzilotta, W.N., Lemon, B.J., & Seefeldt, L.C. (1998) *Science*, **282**, 1853-1858.
- 8) Afting, C., Hochheimer, A., & Thauer, R.K. (1998) *Arch. Microbiol.*, **169**, 206-210.
- 9) Lyon, E.J., Shima, S., Buurman, G., Chowdhuri, S., Batschauer, A., Steinbach, K., & Thauer, R.K. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 195-204.
- 10) Shima, S., Lyon, E.J., Sordel-Klippert, M., Kauß, M., Kahnt, J., Thauer, R.K., Steinbach, K., Xie, X., Verdier, L., & Griessinger, C. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2547-2551.
- 11) Lyon, E.J., Shima, S., Boecher, R., Thauer, R.K., Grevels, F.

- W., Bill, E., Roseboom, W., & Albracht, S.P.J. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 14239–14248.
- 12) Korbas, M., Vogt, S., Meyer-Klaucke, W., Bill, E., Lyon, E.J., Thauer, R.K., & Shima, S. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 30804–30813.
- 13) Shima, S., Lyon, E.J., Thauer, R.K., Mienert, B., & Bill, B. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 10430–10435.
- 14) Pilak, O., Mamat, B., Vogt, S., Hagemeyer, C.H., Thauer, R.K., Shima, S., Vornheim, C., Warkentin, E., & Ermler, U. (2006) *J. Mol. Biol.*, 358, 798–809.
- 15) Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M.S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R.K. & Ermler, U. (2008) *Science*, 321, 572–575.
- 16) Böck, A., King, P.W., Blokesch, M., & Posewitz, M.C. (2006) *Adv. Microbial Physiol.*, 51, 1–71.

嶋 盛吾

(マックスプランク陸生微生物学研究所)

The structure of the [Fe]-hydrogenase and the convergent evolution of the active site of hydrogenases
Seigo Shima (Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, Karl-von-Frisch Strasse, D-35043 Marburg, Germany)

GnIH と GnIH 同属ペプチド (LPXRFamide ペプチド)：構造と機能の普遍性と多様性

はじめに

ホルモン (hormone) はギリシャ語の *harmao* (Iexcite, “呼び覚ますもの”) を語源とする。古くは、特殊な構造を持った内分泌腺から血液中に分泌され、標的器官に到達してその作用を発揮するものをホルモンとして定義した。従って、内分泌細胞の分泌物をホルモン、ニューロンの分泌物を神経伝達物質または神経調節因子として、区別した。しかし、脳のニューロンがホルモンを分泌する現象である“神経分泌”が発見されると、それまでの古いホルモンの定義が見直されるようになった。

“神経分泌”の概念は 1920 年代に Scharrer により提唱され、その後 1949 年に Bargmann により確立された。間脳の一部である視床下部のニューロンには、その終末が効果器官とシナプスを持たず、下垂体後葉 (神経葉) に終末しているものが存在する。Scharrer は、視床下部にある視索上核や室傍核のニューロンが下垂体後葉 (神経葉) に投射している構造に着目して、このニューロンは“ホルモンのようなもの (神経葉ホルモン)”を下垂体後葉 (神経葉) か

ら分泌していると考えた。この考えは当時の研究者や学会からは受け入れられず、むしろ異常な現象の観察として批判された。しかし、Scharrer の学説は Bargmann の精力的な研究により実証された。1953 年に、下垂体後葉から分泌されるホルモンがバソプレッシンやオキシトシンなどの短鎖のニューロペプチドであることが明らかになった。脳がつくるペプチドホルモンの中で最初にその構造が明らかにされたのがこのバソプレッシンとオキシトシンである。

一方、やや遅れて、視床下部ニューロンが合成するホルモンが腺性下垂体 (主葉) の機能を調節していることも明らかにされた。視床下部の腹側には下垂体後葉とよく似た構造を持つ正中隆起と呼ばれる領域がある。ある種の視床下部ニューロンは血管壁に接する正中隆起に終末しており、終末内には分泌顆粒が多く存在する。Green と Harris は、視床下部ニューロンが神経液性物質を正中隆起の終末から下垂体門脈に分泌することで、腺性下垂体のホルモン分泌機能を調節していると考えた。この学説を証明したのが“The Nobel Duel (ノーベル賞の決闘)”で知られる 1969 年の Schally のグループと Guillemin のグループによる甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH)、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone; GnRH; 当初は放出因子として LHRH と呼ばれた)¹⁾、成長ホルモン抑制ホルモン (ソマトスタチン, GIH) などのニューロペプチドの発見である。これらの発見により、Schally と Guillemin は共に 1977 年にノーベル生理学医学賞を受賞した。彼らが発見した脳ホルモンはいずれも短鎖のニューロペプチドであり、視床下部のニューロンでつくられ、腺性下垂体 (主葉) の機能を調節する重要な役割を持つ。発見されたニューロペプチドは腺性下垂体ホルモンの放出を調節することにより、動物の生殖、成長、代謝などの調節に中心的な役割を果たす重要な脳ホルモンである。これらの脳ホルモンは視床下部ニューロンが合成・分泌することから、視床下部ホルモンとも呼ばれる。

1. GnIH の発見

1970 年代初めに Schally と Guillemin により生殖腺刺激ホルモンの放出を促進させる脳ホルモンである GnRH¹⁾ が視床下部から発見されて以来、脊椎動物の生殖腺の発達と機能は視床下部ニューロンの GnRH に支配されていると考えられてきた。一方、生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制する脳ホルモンの存在は長く不明であった。2000 年に、筆者らのグループは生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制する新規の脳ホルモンを鳥類のウズラの視床下部から発見し