

***Thermus thermophilus* HB8 のシステム生物学へ向けて:酸化ストレス防御システム
Towards systems biology of oxidative stress protection in *Thermus thermophilus* HB8**

海老原章郎¹, 満足美穂¹, 柳楽武志¹, 倉光成紀^{1,2,3}

Akio Ebihara¹, Miho Manzoku¹, Takeshi Nagira¹, Seiki Kuramitsu^{1,2,3}

(¹理研播磨研 放射光科学総合研究センター, ²阪大 院理, ³理研 GSC)

(¹RIKEN SPring-8 Center, Harima Inst., ²Osaka Univ., ³RIKEN Genome Sciences Center)

e-mail: ebihara@spring8.or.jp

酸素分子は、ヒトを含めた好気性生物の生命維持に最も重要である。好気代謝の副産物として酸素分子から生成する活性酸素種は、様々な生体分子に傷害を与える。遺伝情報が書き込まれているゲノム DNA と DNA の原材料であるヌクレオチドは、活性酸素種による酸化ストレスを絶えず受けており、細胞は酸化ストレスに対する防御システムと、傷害を受けた DNA やヌクレオチドを修復するシステムを有す。タンパク質が安定で構造・機能解析に適した高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 を利用して、酸化ストレス防御システムの解明を行なっている。

活性酸素種と酸化ストレス

酸素原子(O)は原子番号が8であり、8個の電子を持っている。最外殻にある6個の電子のうち、4個は電子対を作るが、残る2個は不対電子である。酸素分子(O₂)では、2個の酸素原子に存する計4個の不対電子のうち、2個は電子対を作り、残る2個は不対電子のままである(図1)。

この不対電子の存在は、酸素分子に多彩な反応性を与える[1,2,3]。好気性生物の代謝では、酸化リン酸化による高効率 ATP 生産のために酸素分子が電子受容体として機能する(電子伝達系末端のシトクロム *c* オキシダーゼによって酸素分子は4個の電子を迅速に受け取り、水分子まで還元される)。酸素分子を利用したエネルギー生産の一方で、酸素分子の4電子還元が不完全に終わる場合や、遷移金属やフラビンタンパク質から漏れ出した電子によって酸素分子が部分的に還元されると、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルが生成する(図1)。これらの酸素分子種と、酸素の励起状態である一重項酸素は、「反応性(特に酸化力)の高い酸素を含んだ物質」という意味で、活性酸素種(reactive oxygen species)と呼ばれている。

活性酸素種は、過酸化水素を除き極めて短寿命であるが、様々な連鎖反応の引き金となる[1,2,3] (図1)。スーパーオキシドは、電子を与える性質と受け取る性質の両方を持っているので、2分子のスーパーオキシドが互いに電子をやり取りし、過酸化水素を発生する(図1-①)。スーパーオキシドは、鉄イオン貯蔵タンパク質フェリチンの鉄イオンを還元し Fe²⁺として放出させ、加えて、鉄硫黄クラスタータンパク質から Fe²⁺を取り出しうる(図1-②)。過酸化水素は比較的安定で、細胞内を拡散する。そして、Fe²⁺と過酸化水素が同時に存在すると、ヒドロキシラジカルが発生する(図1-③、フェントン反応)。ヒドロキシラジカルは極めて反応性が高く、発生後最初に出会った生体分子(DNA、ヌクレオチド、タンパク質、脂質等)と非特異的に反応し傷害を与え(図1-④)、細胞に大きなダメージを与える。

細胞内では、活性酸素種の生成と消去のバランスが維持されている[4]。代謝制御の乱れや活性酸素消去酵素の能力低下などの様々な内因性の要因あるいは環境要因によって、細胞内の活性酸素濃度が上昇すると、細胞内の酸化還元バランスが酸化状態に傾き、DNA を始めとする生体分子が非特異的に酸化されはじめる。このような状態を酸化ストレスと呼ぶ。生物は、酸化ストレスからの防御のため、生成した活性酸素種を消去するシステムと、酸化された細胞成分(特にDNA)を修復するシステムを進化の過程で獲得してきた。一方で、活性酸素種のいくつかは細胞内シグナル伝達のメッセンジャーとして働くことも知られている[5]。

T. thermophilus HB8 の酸化ストレス防御システム

活性酸素を消去するシステムには、酵素系と非酵素系が存在する。生物種によって獲得した酵素の種類と数は異なるが、どの好気性生物でも共通した酵素群が関与している[6,7]。高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 のゲノム解析から、古くから研究されているスーパーオキシドジスムターゼとカタラーゼは容易に同定できたが、機能未知タンパク質群にも活性酸素消去に関与が予想されるものが含まれていた。そこで約 15 種類のタンパク質からなる酸化ストレス防御システムを推定した(図 1)。立体構造情報はタンパク質分子の詳細な理解に加え、機能未知タンパク質の機能推測の手がかりになるので、これらのタンパク質の三次元構造解析を試みた。

スーパーオキシドジスムターゼ(superoxide dismutase, SOD)は、図 1-①を触媒する金属酵素である。活性中心の金属の種類によって、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD が知られているが、*T. thermophilus*は、Mn-SODであった。大腸菌で発現した本タンパク質の Mn 含有量は低かったが、熱処理により塩化マンガンとの再構成を行い、高活性標品を得ることが出来た。

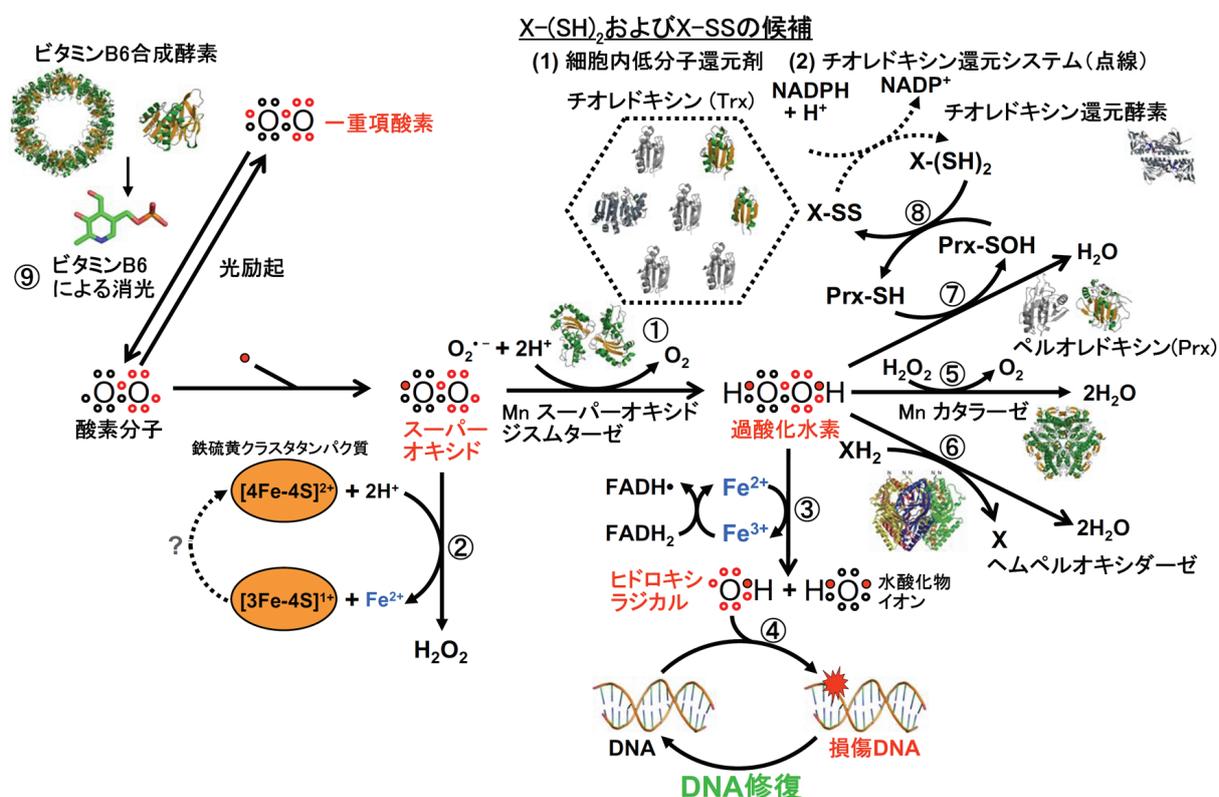


図 1 *T. thermophilus* HB8 の酸化ストレス防御システム *T. thermophilus* HB8 のゲノム解析の情報と文献[1-4; 6-8]の内容を統合した。外来電子を赤丸で示す。約 15 種類のタンパク質群からシステムが構成される。*T. thermophilus* で立体構造解析済みの 8 種類のタンパク質をカラーの模式図で示し、他生物由来のホモログの構造 7 種類を灰色の模式図で示す。①Mn スーパーオキシドジスムターゼ (PDB ID:3MDS) によるスーパーオキシドの還元、②スーパーオキシドによる鉄硫黄クラスターの損傷と二価鉄イオンの放出、③フェントン反応によるヒドロキシラジカルの発生、④ヒドロキシラジカルによる DNA 傷害、⑤Mn カタラーゼ (PDB ID:2CWL) による過酸化水素の還元、⑥ヘムペルオキシダーゼ (PDB ID:1VDH) による過酸化水素の還元、⑦ペルオレドキシニンによる過酸化水素の還元 (PDB ID:2CVB)、⑧ペルオレドキシニンの酸化型から還元型への変換における、細胞内低分子還元剤あるいはチオレドキシニン (PDB ID:2CVK, 1V98) とチオレドキシニン還元酵素の関与、⑨ビタミン B6 による一重項酸素の消光。ビタミン B6 の合成は、2 種類のタンパク質 (PDB ID:2YWD, 2YZZ) からなる酵素複合体で行なわれる。

過酸化水素を還元する酵素のうち、カタラーゼは過酸化水素を酸素と水に変換する(図 1-⑤)。 *T. thermophilus* には活性部位に Mn を有するカタラーゼが存在した。大腸菌で発現した本タンパク質の Mn 含有量は低い状態だったが、熱処理により塩化マンガンとの再構成を行い、高活性標品を得ることが出来た。図 1-⑥を触媒する酵素ペルオキシダーゼは、活性部位がヘム結合型とセレンシステイン型(グルタチオンペルオキシダーゼ)がある。立体構造解析から、 *T. thermophilus* の機能未知タンパク質の一つがヘム結合型ペルオキシダーゼとして機能することが示された[8]。

ペルオレドキシン(peroxiredoxin)は、酸素発生を伴わず過酸化水素を還元する別の酵素である(図 1-⑦)。本酵素は、アミノ酸配列の特徴から、2 個の保存システイン残基を有する 2-Cys 型と 1 個の保存システイン残基を有する 1-Cys 型に大別されるが、 *T. thermophilus* には 1-Cys 型のペルオレドキシン(bacterioferritin comigratory protein)が存在した。本タンパク質の回折データ(分解能 2.5 Å)を取得し、構造解析が進行中である。さらに機能未知タンパク質群の中に存在したペルオレドキシン様タンパク質 1 種類に対し、立体構造を明らかにした。ペルオレドキシンの酵素サイクルは、細胞内チオールを還元状態に保つチオレドキシン還元システムにより回転する可能性がある(図 1-⑧)。約 7 種類のチオレドキシンのうち 2 種類の立体構造が明らかになり、チオレドキシン還元酵素は結晶化に成功した。

非酵素系の代表例には、ビタミン類(ビタミン B6、C、E による一重項酸素の消光、図 1-⑨)や Mn 低分子複合体がある。 *T. thermophilus* HB8 由来のビタミン B6 合成酵素複合体を構成する 2 種類の各サブユニットの構造を決定し、複合体の調製を試みている。

これまでに、 *T. thermophilus* HB8 の酸化ストレス防御システムに関わる分子のうち、 *T. thermophilus* で立体構造解析が完了したものが 8 種類、ホモログで解析完了したものが 7 種類であり、大部分の分子に関する立体構造情報が明らかになった。同システムによって活性酸素濃度の調節される仕組みを理解するため、立体構造解析と共に、得られている 11 種類のタンパク質の精製標品を使って、試験管再構成を目標に機能解析を進めている。特に、最も細胞毒性が強い活性酸素種であるヒドロキシラジカルの形成を抑える分子機構を明らかにしたい。

参考文献

- [1] Nakamura, M. (2005) *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 50, 297-300.
- [2] Imlay, J. A. (2003) *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418.
- [3] Henle, E. S. and Linn, S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 19095-19098.
- [4] Zhang, Q. M. *et al.* (2005) *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 50, 322-329.
- [5] Rhee, S. G. *et al.* (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 183-189.
- [6] Michal, G., ed. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*. New York: Wiley and Spektrum.
- [7] Wood, Z. A. *et al.* (2003) *Trends Biochem. Sci.* 28, 32-40.
- [8] Ebihara, A. *et al.* (2005) *J. Struct. Funct. Genomics* 6, 21-32.