

## 鉄-硫黄クラスターとモリブデン補因子の生合成経路

柴 田 克 己・伊 美 友紀子

## Biosynthetic Pathways of Iron-sulfur Clusters and Molybdenum Cofactors

SHIBATA Katsumi and IMI Yukiko

**Abstract** : It is well known that vitamins exert their functions in cooperation with enzymes after being converted into the active form in cells. Also in some minerals, after being converted to the active forms, cooperate with enzymes to exert their functions. In this review, we focused on and addressed the “iron-sulfur cluster biosynthesis machine” and the “molybdenum cofactor biosynthesis pathway” including with our speculation. In humans, the synthesis of iron-sulfur clusters is carried out by the ISC (iron-sulfur cluster) machinery. The ISC machinery consists of 7 types of proteins (IscS, IscU, IscA, HscB, HscA, Fdx, IscX). It is estimated that 6 types except IscA are involved in the [2Fe-2S] cluster, and all 7 types are involved in the biosynthesis of the [4Fe-4S] cluster. In the synthesis of molybdenum cofactor (Moco), in humans, Moco can be synthesized by a three-step reaction ( $\text{GTP} \rightarrow \text{cPMP} \rightarrow \text{MPT} \rightarrow \text{Moco}$ ) from GTP and  $\text{MoO}_4^{2-}$ . Moco can bind with the two apoenzymes of sulfite oxidase and amidoxime reducing complex to make the holoenzymes. However, Moco cannot bind with the apoenzymes of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. To insert to the active sites of the two apoenzymes, Moco require a reaction in which Moco is further sulfurized. As the result, MocoS can bind with the two apoenzymes of xanthine oxidase and aldehyde oxidase to make the holoenzymes.

**Key Words** : mitochondria, mineral, cofactors, ferrous, molybdenum

**抄録** : ビタミンは細胞内で活性型に変換されたのち、酵素タンパク質と協働して機能を発揮することは周知されてる。ミネラルにおいても、活性型に変換されたのち、酵素タンパク質と協働して機能を発揮するものがある。本総説では、ヒトにおける「鉄-硫黄クラスター生合成マシン」と「モリブデン補因子生合成経路」を、我々の推察も含めてまとめた。鉄-硫黄クラスターの合成は、ヒトにおいては、ISC (iron-sulfur cluster) マシナリーによって行われている。ISC マシナリーは、7種類のタンパク質 (IscS, IscU, IscA, HscB, HscA, Fdx, IscX) からなり、[2Fe-2S] クラスターの生合成には IscA を除く 6 種類が、[4Fe-4S] クラスターの生合成には 7 種類すべてが関与していると推定される。モリブデン補因子 (Moco) の合成は、ヒトにおいては、GTP から 3 段階の反応 ( $\text{GTP} \rightarrow \text{cPMP} \rightarrow \text{MPT} \rightarrow \text{Moco}$ ) で Moco を生合成することができる。Moco は Sulfite oxidase と Amidoxime reducing complex のアポ酵素に直接結合することで、各々の酵素をホロ化できる。しかしながら、Xanthine oxidase と Aldehyde oxidase のアポ酵素には、Moco の形態では活性中心に挿入されず、挿入される前に、さらに Moco 中のモリブデンが硫黄化される反応が必要で、MocoS となったのち、各々の酵素をホロ化する。

**キーワード** : ミトコンドリア, ミネラル, 補因子, 鉄, モリブデン

## はじめに

体内には、正常な代謝を行うために種々の微量生体必須成分が栄養素から生合成されている。栄養学では、第一に摂取したビタミンやミネラルが体内で機能を果たすことができる活性体に変換されるまでのプロセスが正常か否か、第二に遺伝子の情報に基づいて合成されたアポタンパク質の活性中心にその活性体が正しく組み込まれてホロ酵素となるプロセスが正常か否か、そして、第三に、期待される代謝が正常か否かを考えている。つまり、栄養学は食物学を支える理論である。

ビタミンが活性型に変換されるプロセスに関する研究は順調に成果を上げており、専門書や一部の教科書にも記載され始めた。一方、ミネラルに関しては、活性型に変換される研究が微生物学領域や植物学領域で急速に進展しているが、ヒトを含む哺乳類においては、いまだ不明の部分も多い。本総説では、比較的研究が進んでいる「鉄-硫黄クラスター生合成マシン」と「Moco 生合成経路」をまとめた。

なお、鉄には、他の活性型「ヘム」が存在する。ヘムは、グリシンとスクシニル-CoA から生合成された5-アミノレブリン酸を基にプロトポルフィリン IX が生合成され、さらに、 $\text{Fe}^{2+}$ が配位結合した物質である。ヘム生合成に関しては、別の総説としてまとめた<sup>1)</sup>。

### 1. 鉄-硫黄クラスター

鉄は生理的 pH の弱アルカリ性 (pH 7.4) では、容易に  $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$  間で電子の授受が起きやすい物理化学的性質を有している。そのため、鉄は、酸化還元反応を触媒する酵素の活性中心として最適な性質を有する。 $\text{Fe}^{2+}$ は生理的 pH での溶解度は  $10^{-1} \text{ mol/L}$  であり、水に易溶性である。逆に、 $\text{Fe}^{3+}$ は生理的 pH では難溶性である ( $10^{-17} \sim 10^{-18} \text{ mol/L}$  の溶解度)。

鉄-硫黄クラスターは、鉄原子と硫黄原子を組み合わせ、 $[\text{2Fe-2S}]$ 、 $[\text{4Fe-4S}]$ などの形で酵素タンパク質の内部のシステイン残基に配位結合している。 $\text{O}_2$ に対して脆弱な性質をもつ。この脆弱性は、 $\text{O}_2$ によるタンパク質の構

造変化の引き金となるので、鉄-硫黄タンパク質は  $\text{O}_2$  センサーの機能を有する。さらに、反応性の高さから、種々の酵素の活性中心に存在し、また電子キャリアとしても機能しているため、鉄-硫黄クラスターの生合成系は生物の生存に必須である。いわゆる微量生体必須成分である。鉄-硫黄クラスターを含むタンパク質には、①ミトコンドリアの内膜に組み込まれた電子伝達系の複合体 I である NADP デヒドロゲナーゼ複合体、複合体 II であるコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体 (コハク酸ユビキノールレダクターゼ)、複合体 III であるシトクロム *bc1* 複合体、②電子伝達体として機能するフェレドキシン ( $2 \text{ Fe}^{3+} (\text{酸化型}) \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{2+} (\text{還元型})$ )、③TCA 回路のアコニターゼ、④S-アデノシルメチオニン (SAM) から生成するラジカル SAM を利用するラジカル SAM 酵素スーパーファミリー、⑤DNA ポリメラーゼ  $\alpha, \delta, \epsilon$ 、⑥DNA プライマーゼ、⑦トリプトファン-NAD 転換経路の酵素である 3-ヒドロキシアンスラニル酸 3,4-ジオキシゲナーゼなどがある。

#### 1-1. 鉄-硫黄クラスターの種類

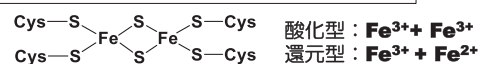
##### (1) $2\text{Fe-2S}$ クラスター

2 個の鉄イオンが 2 個の硫化物イオンで架橋され、タンパク質中の 4 つのシステインが配位した構造をとる (図 1 A)。このクラスターは、 $\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{3+}$  (酸化型) と  $\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{2+}$  (還元型) との間で、電子が行き来する。

##### (2) $4\text{Fe-4S}$ クラスター

4 個の鉄イオンと 4 個の硫化物イオン [ $4\text{Fe-4S}$ ] がキューバン (cubane) のように頂点に配置した構造である (図 1 B)。このクラスターは  $2 \text{ Fe}^{3+} + 2 \text{ Fe}^{2+}$  (酸化型) と  $\text{Fe}^{3+} + 3 \text{ Fe}^{2+}$  (還元型) との間で、電子が行き来する。

#### A. $[\text{2Fe-2S}]$ クラスタータンパク質



#### B. $[\text{4Fe-4S}]$ クラスタータンパク質

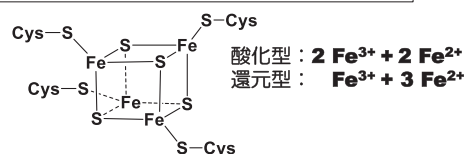


図 1 鉄-硫黄クラスターの種類

型)」との間で、電子が行き来する。

## 1-2. 生合成経路

鉄-硫黄クラスターの生合成は、遺伝生化学的な解析により、3種の異なる生合成系が確認されており、それぞれ NIF (nitrogen fixation) マシナリー、SUF (sulfur) マシナリー、ISC (iron-sulfur cluster) マシナリーと名付けられている。このうち、NIF マシナリーは窒素固定細菌のニトロゲナーゼの生合成に、SUF マシナリーは古細菌、真正細菌全般と真核生物の葉緑体に、ISC マシナリーはプロテオバクテリアから真核生物のミトコンドリアに存在している。

ヒトにおいては、ミトコンドリアに存在している ISC マシナリーによって鉄-硫黄クラスターが合成されている。

ISC マシナリーは、7種類の構成成分 (IscS, IscU, IscA, HscB, HscA, Fdx, IscX) からなる<sup>2)</sup>。(図2)。IscS はシステインデスルフラゼ活性をもつ PLP (Pyridoxal phosphate) 依存性酵素 (ビタミン B<sub>6</sub> 酵素) である。システインから、元素状硫黄 (S<sup>0</sup>) の形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<sup>3)</sup>。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) タンパク質である IscU へと転移される。その後、IscU 上で、IscX の手助けにより鉄が入りこむ<sup>4)</sup>。そして、安定な [2Fe-2S] クラスターを活性中心に持つタンパク質であるフェレドキシン (Fdx) から電子が渡され、S<sup>0</sup> の硫黄原子が S<sup>2-</sup> に還元されることで<sup>5)</sup>、[2Fe-2S] クラスターが組み立てられる。[2Fe-2S] クラスターから [4Fe-4S] クラスターが形成されるには IscA が必要である。最後に IscU に結合した不

安定なクラスターを壊さないように、HscA (シャペロンとして機能)/HscB (コシャペロンとして機能) の手助けで、種々のアポタンパク質の内部のシステイン残基に鉄-硫黄クラスターが渡され、ホロ酵素となる。

上述のように、[2Fe-2S] クラスターの生合成に関与している ISC マシナリーの酵素は IscA を除く 6 種類である<sup>6)</sup>。IscA は、IscU で形成された [2Fe-2S] クラスターを [4Fe-4S] クラスターに変換する段階に必要なタンパク質と考えられている。

IscU は、鉄原子や硫黄原子、還元力をそれぞれ、IscS, IscA, Fdx, IscX の各タンパク質から受け取り、鉄-硫黄クラスター中間体に組み立て、この不安定な中間体を一時的に保管する機能をもつ。そして、最終的に、HscA/HscB の手助けで、保管していた鉄-硫黄クラスターをアポタンパク質に提供するという機能を果たしているものと考えられる。アーキアでは、鉄-硫黄クラスターを保持した IscU は非対称な三量体として存在している。そのうち一つのサブユニットだけが鉄-硫黄クラスターを結合しており、他の二つのサブユニットが鉄-硫黄クラスターを覆い隠すように会合して、鉄-硫黄クラスターを安定化している。一方、鉄-硫黄クラスターを保持していない IscU は単量体あるいは二量体の平衡状態として存在している。IscU は単量体の状態で鉄原子と硫黄原子を受け取り、複数の IscU 分子の間で協調して、鉄-硫黄クラスターを作り上げ、最終的に完成した 1 分子の鉄-硫黄クラスターを三量体の内部に覆い隠すように保管して IscU が完成するものと思われる。

そして、IscU 三量体内部のクラスターを鉄-硫黄クラスターを必要とするアポタンパク質に移行させる段階では、HscA/HscB のシャペロンシステムが三量体構造を解離させ、クラスターを露出させて、移行を促進するものと思われる。

## 1-3. 非ヘム鉄の吸収機構と体内動態

鉄イオンは、通常、Fe<sup>3+</sup> として存在するが、膜のトランスポーターを通過するためには、必ず難溶性の Fe<sup>3+</sup> から易溶性の Fe<sup>2+</sup> への還元が、通過後は易溶性の反応性の高い Fe<sup>2+</sup> から難溶

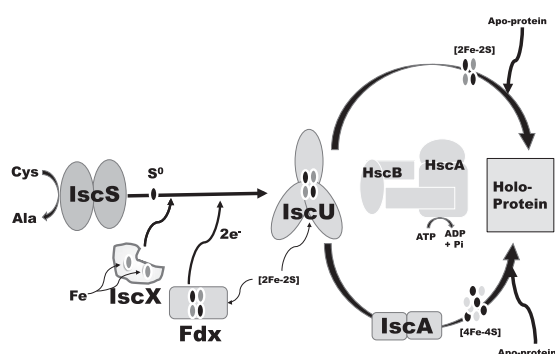


図2 ヒトにおける鉄-硫黄クラスターの推定生合成経路

性の反応性の低い  $\text{Fe}^{3+}$  へ酸化されることが必須である。 $\text{Fe}^{3+}$  を  $\text{Fe}^{2+}$  に還元するタンパク質として腸管内腔側細胞膜上に存在する NADPH-ferrihemoprotein reductase (フェリレダクターゼ = duodenal cytochrome b = Dcytb), 肝細胞膜表面に存在する ferrireductase やエンドソーム膜に存在する Steap 3 (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3) がある。一方,  $\text{Fe}^{2+}$  を  $\text{Fe}^{3+}$  に酸化するフェロオキシダーゼとして, 含銅酵素セルロプラスミン (ceruloplasmin) およびセルロプラスミンと相同性を示す含銅酵素ヘファスチン (hephaestin) の存在が知られている<sup>7)</sup>。

鉄の吸収に関しては, 非ヘム鉄とヘム鉄の二つの吸収機構が存在する。ヘム鉄の吸収機構と体内動態は他の総説にまとめた<sup>1)</sup>。

非ヘム鉄の吸収は十二指腸で行われる(図3)。非ヘム鉄の吸収は小腸上皮細胞(小腸内腔側細胞膜上)の刷子縁膜に存在する Dcytb により,  $\text{Fe}^{3+}$  から  $\text{Fe}^{2+}$  に還元される。 $\text{Fe}^{2+}$  は細胞表面に存在する DMT1 (divalent metal transporter 1) と呼ばれる鉄を含めた2価の金属イオンを輸送するタンパク質を介して細胞内に吸収される。次に, 側底膜側に存在するフェロポーチン (Ferroportin = FPN) により, 血管に放出される。 $\text{Fe}^{2+}$  は放出される際に, FPN 近傍に存在するヘファスチンによって  $\text{Fe}^{3+}$  に酸化され, トランスフェリン (Transferrin = Tf) と結合し, トランスフェリン鉄として(1分子のトランスフェリンは2分子の  $\text{Fe}^{3+}$  と結合できる), 血流にのって, 各組織に送られる。

トランスフェリン鉄の細胞内への取り込みに

関わる受容体はトランスフェリン1型受容体 (Transferrin receptor 1 = TfR1) である<sup>8)</sup>。細胞膜表面でトランスフェリン鉄-TfR1 複合体が形成されると, エンドサイトーシスにより, 細胞内に取り込まれる。エンドソーム内の酸性環境下 (pH 5.5) で,  $\text{Fe}^{3+}$  がトランスフェリンから遊離する。エンドソーム内に取り込まれた  $\text{Fe}^{3+}$  は Steap 3 によって  $\text{Fe}^{2+}$  に還元され, エンドソーム表面の DMT1 を介して細胞質に輸送される。さらに, 鉄はミトコンドリアに運ばれて, 鉄-硫黄クラスターやヘムの合成に利用される。余剰の鉄は細胞質に存在する鉄貯蔵タンパク質であるフェリチン (Ferritin = Ft) に貯蔵される。

$\text{Fe}^{3+}$  を遊離したアポトランスフェリン (トランスフェリン-鉄と区別を強調するためにアポトランスフェリンともいう) は酸性環境下でも TfR1 と親和性を有しているため, TfR1-アポトランスフェリン複合体の状態でもリサイクリングエンドソームを介して細胞表面へと再輸送される。細胞外の弱アルカリ性 (生理的 pH の 7.4) 環境下では, アポトランスフェリンは TfR1 との親和性を持たないため, 二つのタンパク質複合体は解離する。アポトランスフェリンは再び  $\text{Fe}^{3+}$  と結合し再利用される。

細胞内から細胞外への放出には消化管細胞と同様に FPN を介して行われ, その際には FPN 近傍に存在するフェロオキシダーゼ活性を有するセルロプラスミンやヘファスチンにより  $\text{Fe}^{2+}$  に酸化され, そしてトランスフェリンと結合し, トランスフェリン鉄として血流にのって再循環する。

#### 1-4. 鉄代謝調節ホルモンであるヘプシジン

ヘプシジン (Hepcidin = Hpc) は, 肝臓で産生されるペプチドホルモンであり, FPN の作用を抑制し, 鉄を再利用する鉄代謝制御の中心的役割を担っている因子である。Hpc は, 血清鉄量, 肝細胞内の鉄量, 腸上皮での吸収鉄量などの変動で刺激され, 血清鉄濃度の恒常性を保つように, また, 体が鉄過剰に陥らないように作用している。ヒト Hpc 遺伝子は染色体 19 に位置し, 2.5 kb の3つのエクソンから転写された 0.4 kb の mRNA で 84 アミノ酸からなるプレプロヘプシジンをコードしている<sup>9)</sup>。

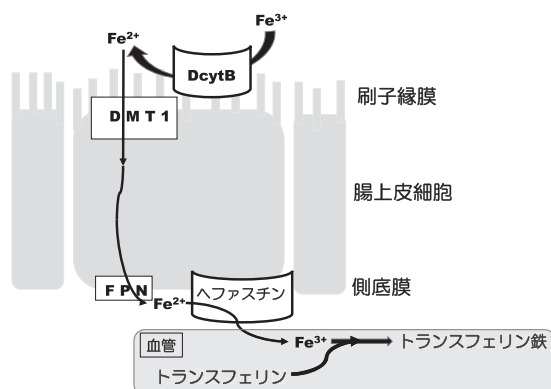


図3 非ヘム鉄の吸収機構

Dcytb = NADPH-ferrihemoprotein reductase = duodenal cytochrome b. DMT1 = divalent metal transporter 1. FPN = Ferroportin.

N 末端からのシグナルペプチドが切断され 60 アミノ酸のプロヘプシジンが形成され、C 末端から 30~26 位のアルギニン配列部がフリン酵素で開裂され、25 アミノ酸の活性型の Hcpc-25 が産生される。切断点の違いで、Hcpc-22、Hcpc-20 も産生される。Hcpc は 8 個のシステインをもち、4 個の S-S 結合を階段状に有した折りたたまれたヘアピン構造をとっている<sup>10,11)</sup>。

## 2. モリブデン補因子

モリブデン補因子 (Moco) と硫黄化されたモリブデン補因子 (MocoS) (図 4) に含まれるモリブデン Mo は、ミネラルに分類される必須栄養素であり、Mo 自体の必要量は 30 µg/日程度である。もう一つの成分であるプテリン環はヌクレオチドの一つである GTP 由来である。

### 2-1. Moco を補因子とする酵素

ヒトにおいては、亜硫酸オキシダーゼ (SO) とミトコンドリアアミドキシム還元因子 (mARC) が Moco を (図 5 A)、キサンチンデヒドロゲナーゼ (XH)/オキシダーゼ (XO) とアルデヒドオキシダーゼ (AO) が MocoS を (図 5 B) を補因子とする。

Moco の生合成過程の異常は様々な疾患に関

係する。例えば、Moco 欠損症 (MOCOD) は、小児の早期死亡につながる稀な常染色体劣性遺伝性疾患である。三つの遺伝子 (*MOCS1*, *MOCS2*, *GEPH*) の変異が確認されている<sup>12)</sup>。

### (1) 亜硫酸オキシダーゼ (sulfite oxidase=SO [EC 1.8.3.1])

本酵素は図 5 A に示したように、酵素タンパク質中のシステイン残基の硫黄原子が Mo に配位している。本酵素はミトコンドリアに存在しており、ヘムも含む。ヒトにおける遺伝子名は *SUOX* である。

以下の反応を触媒する。

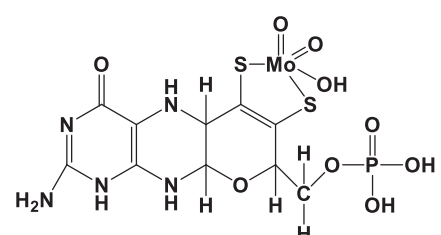


なお、亜硫酸が硫酸に酸化されることで生じた電子は、シトクロム *c* を経由して電子伝達系に流れる。

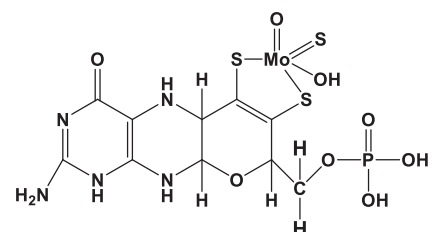
### (2) Mitochondrial amidoxime reducing component (mARC)

本酵素は図 5 A に示したように、SO と同じく酵素タンパク質中のシステイン残基の硫黄原子が Mo に配位している。ミトコンドリア外膜に存在する。ヒトゲノムには 2 つの mARC 遺伝子 *hmARC-1/MTARC-1* と *bhmARC-2/MTARC-2* がある。本酵素はアミドキシム類の還元代謝に関与する酵素として見いだされた。それゆえ、ミトコンドリアアミドキシム還元因子 (mARC) と名付けられた<sup>13)</sup>。

真核生物の mARC1 は二つのドメイン、C-末端の MTARC1 ドメイン (MARC1 ドメインあるいは MOSC ドメインとも呼ばれる) と N-末端の β-バレルドメインからなる<sup>14)</sup>。不思議なこ



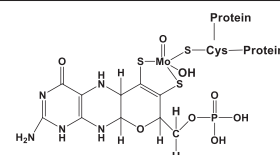
**Molybdenum cofactor = Moco**



**Sulfurated molybdenum cofactor (MocoS)**

図 4 モリブデン補因子の Moco と MocoS の化学構造式

### A Molybdenum cofactor (Moco) of SO and mARC



### B Sulfurated molybdenum cofactor (MocoS) of XH/O and AO

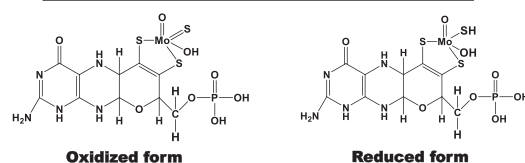


図 5 (A) SO と mARC の補酵素である Moco の酵素タンパク質との結合形式と (B) XH/XO と AO のモリブデン補酵素である MocoS の酸化型と還元型の化学構造式



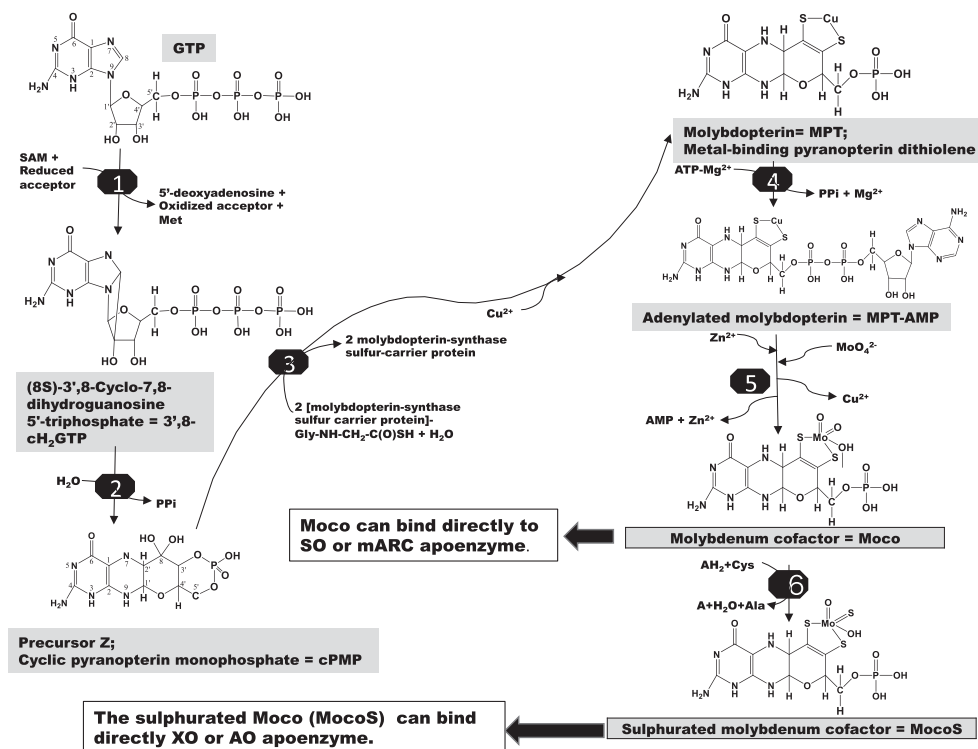


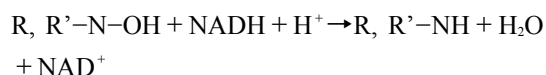
図6 ヒトにおける Moco と MocoS の生合成経路

(1) GTP 3',8-cyclase [EC: 4.1.99.22], (2) cyclic pyranopterin monophosphate synthase [EC 4.6.1.17], (3) molybdopterin synthase (MPT synthase) catalytic subunit [EC: 2.8.1.12], (4) molybdopterin adenyltransferase [EC: 2.7.7.75], (5) molybdopterin molybdotransferase [EC: 2.10.1.1], (6) molybdenum cofactor sulfoxidoreductase (Moco sulfurylase) [EC: 2.8.1.9].

とに、C-末端の MTARC1 ドメインは MOS (Moco sulfurase) 活性を有し、Moco に硫黄を転移する反応を触媒する。図6の⑥の反応を触媒する酵素でもある。N-末端のβ-バレルドメインは基質との結合に関わっている。

アミドキシム類の還元を行うには、mARC1 は他の種類のタンパク質と複合体を形成する必要がある。それゆえ、mARC とその結合タンパク質との複合体は ARCO (Amidoxime Reducing Complex) と命名され、反応のタイプが結合タンパク質の種類により変わることから、Moonlighting enzyme と呼ばれている<sup>15)</sup>。ヒトにおいては、mARC はミトコンドリアの外膜に存在し、触媒部位の C-末端ドメインを細胞質に出している<sup>16)</sup>。C-末端ドメインの結合タンパク質はシトクロム b5 とシトクロム b5-R である<sup>17)</sup>。

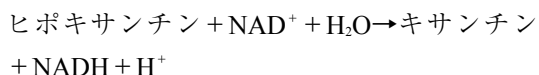
シトクロム b5 とシトクロム b5-R 結合 ARCO は、以下に示したようにアミドキシムの還元反応を NADH 依存的に触媒する。



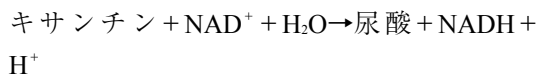
(3) キサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼ (Xanthine dehydrogenase/oxidase=XH/XO): キサンチン脱水素酵素「Xanthine dehydrogenase=XDH, EC 1.17.1.4」とキサンチン酸化還元酵素 (xanthine oxidoreductase=XOR, [EC 1.17.3.2])

本酵素は図5Bに示したように Mo が硫黄化された MocoS を含む酵素であり、細胞質に存在する。図5Bの左が酸化型でモリブデンの酸化数は+6である。図5Aの右が還元型でモリブデンの酸化数は+4である。プテリンのリガンド部位を除くとモリブデンに2個の酸素原子と1個の硫黄原子が配位している。なお、XH/XO は補因子として、FAD, ヘム, さらに2個の [2Fe-2S] を含有する酵素でもある。ヒトにおける遺伝子名は *XDH* である。

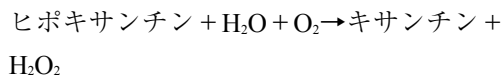
XH/XO は特異な酵素である。この酵素は、通常では NAD<sup>+</sup> を電子受容体とするキサンチン脱水素酵素 (XH) 「EC 1.17.1.4」として存在し、以下の反応を触媒する。



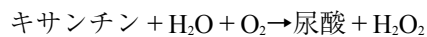
および



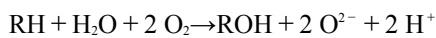
ところが、酵素分子内にジスルフィド結合が形成されると酸素を電子受容体とするキサンチン酸化還元酵素 (XO) [EC 1.17.3.2] に変身する<sup>18)</sup>。すると  $\text{NAD}^+$  との反応性を失い、以下の反応を触媒するようになる。



および

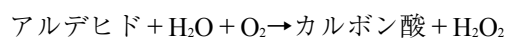


あるいは、

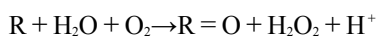


#### (4) アルデヒドオキシダーゼ (aldehyde oxidase=AO, [EC 1.2.3.1])

本酵素は図 5 B に示したように Mo が硫黄化された MocoS を含む酵素であり、細胞質に存在する。アルデヒドオキシダーゼは補因子として、さらに FAD, ヘムと 2 種の  $[\text{2Fe-2S}]$  を含有する酵素でもある。ヒトにおける遺伝子名は *AOX1* である。以下の反応を触媒する。



あるいは



## 2-2. 生合成経路

Moco 生合成に関する遺伝子の名前はヒトでは、*MOCS* (Mo Cofactor Synthesis) が使われる。Moco (図 6) は、GTP と  $\text{MoO}_4^{2-}$  (モリブデン酸塩) から作られる。 $\text{MoO}_4^{2-}$  はモリブデン酸輸送体によって細胞内に取り込まれる<sup>19)</sup>。植物では、MOT1 (Molybdate transporter type 1) が報告されている<sup>20)</sup>。

ヒトでは、遺伝子としては 6 個、酵素タンパク質としても 6 種類が Moco 生合成に関わっている。図 6 において、反応①と反応②は二つの酵素タンパク質、GTP 3',8-cyclase と cyclic pyranopterin monophosphate synthase が複合体を形成して触媒する。したがって、GTP から環状ピラノプテリンモノリン酸 (cPMP) へのステップは、一つの反応と考えることもできる。また、反応④と反応⑤の反応も、二つの酵素タンパク質、molybdopterin synthase (MPT synthase) catalytic subunit と molybdopterin adenylyltrans-

ferase が複合体を形成して触媒する。したがって、モリブドプテリン (MPT) の活性化と Mo の挿入反応を一つの反応としてとらえることもできる。すると、GTP から 3 段階の反応 ( $\text{GTP} \rightarrow \text{cPMP} \rightarrow \text{MPT} \rightarrow \text{Moco}$ ) で Moco を生合成することができることになる。Moco は SO と mARC のアポ酵素に直接結合することで、各々の酵素をホロ化できる。しかしながら、XO と AO のアポ酵素には、Moco の形態では活性中心に挿入されず、挿入される前に、さらに Moco 中の Mo が硫黄化される反応⑥が必要で、MocoS となったのち、アポ XO あるいはアポ AO をホロ化する。

#### (1) GTP 3',8-cyclase [EC : 4.1.99.22]

初発反応、 $\text{GTP} \rightarrow (8\text{S})\text{-3',8-Cyclo-7,8-dihydroguanosine 5'-triphosphate (3',8-cH}_2\text{GTP)}$ 、を触媒する酵素は GTP 3',8-cyclase であり、ミトコンドリアのマトリックスに存在する。この反応において、グアニンの 8 位の炭素とリボースの 3'位の炭素が結合して、不安定な 3',8-cH<sub>2</sub>GTP が生成する。

ヒトにおいては、遺伝子名 *MOCS1* によってコードされる MOCS1 タンパク質の MOCS1 A ドメイン (GTP 3',8-cyclase [EC : 4.1.99.22]) が触媒する<sup>21-23)</sup>。本酵素は、ラジカル S-アデノシルメチオニン酵素 (ラジカル SAM) のスーパーファミリーである。二つの酸素感受性の鉄-硫黄クラスターを含む<sup>24, 25)</sup>。ラジカル SAM 酵素の反応では、第一段階として還元型  $[\text{4Fe-4S}]^+$  クラスターから 1 電子が SAM に受け渡され、SAM の S-C 5' 結合の還元的開裂により 5'-デオキシアデノシルラジカル (5'-dAdo•) とメチオニンが生じると考えられている。第二段階ではこのラジカルを利用して GTP から水素原子の引き抜きを行い、GTP ラジカルと 5'-デオキシアデノシンが生じる。

なお、類似の反応として、ビタミン B<sub>12</sub> 補酵素がある。ビタミン B<sub>12</sub> 補酵素は活性中心にアデノシルコバラミンを持つ。ビタミン B<sub>12</sub> の酵素反応ではコバルト Co-C 5' 結合の開裂により生じる 5'-dAdo•ラジカルを利用して、基質より水素原子引き抜き反応を行う。また、同じファミリーに属する酵素に、リポ酸の生合成に関わる鉄-硫黄-クラスター依存性リポイルシンターゼ (ion-sulfur-cluster-dependent lipoyl syn-

thase=LIAS)がある。この反応においては、オクタノイル基の6位と8位にSH基が入り、H-Protein 6*N*-dihydrolipoyllysineが生成する<sup>26, 27)</sup>。

## (2) cyclic pyranopterin monophosphate synthase [EC 4.6.1.17]

第二番目の反応を触媒する酵素はcyclic pyranopterin monophosphate synthaseである。初発反応を触媒する酵素GTP 3',8-cyclaseとの複合体としてミトコンドリアのマトリックスに存在する。ヒトにおいては、GTP 3',8-cyclaseと同じく、遺伝子名*MOCS1*によってコードされるMOCS1タンパク質の一部であるMOCS1Bドメインがcyclic pyranopterin monophosphate synthase活性を有する<sup>28)</sup>。本酵素活性は、MOCS1タンパク質のMOCS1Aドメインが触媒する初発酵素であるGTP 3',8-cyclase活性よりも数倍高い。したがって、GTPがGTP 3',8-cyclaseによって不安定な3',8-cH<sub>2</sub>GTPが生成すれば、本酵素が素早くcPMPに変換する。すなわち、GTPからcPMP変換反応における重要な反応部分であるピラノプテリン骨格構築に関する複雑な反応は本酵素が担当している。しかし、本酵素の反応には補因子は必要ではなく、一般的な酸塩基触媒反応によって進行する。本酵素は、まず、3',8-cH<sub>2</sub>GTPのプリン骨格の6位のカルボニル結合を活性化することで、C8-N9結合を開裂させて反応を開始させ、環拡大反応と環化反応が起こり、そしてピロリン酸結合の解離へと続き、産物としてcPMPが生成する。

生成したcPMPは、ミトコンドリア内膜の膜輸送タンパク質のABCB7によって細胞質に輸送される<sup>29)</sup>。

## (3) molybdopterin synthase (MPT synthase) catalytic subunit [EC : 2.8.1.12]

第三番目の反応を触媒する酵素はmolybdopterin synthase (MPT synthase)であり、細胞質に存在する<sup>30)</sup>。MPT synthaseは、ヒトにおいては、遺伝子名*MOSC2*によってコードされるMOSC2Aタンパク質とMOSC2Bタンパク質の複合体として存在しており、2つの大きなサブユニットMOSC2B(触媒部位)と2つの小さなサブユニットMOSC2A(モリブドプテリンシンターゼ硫黄担体タンパク質)から構成されるヘテロテトラマーとして存在している。本

酵素反応において、cPMPに2つの硫黄原子が転移され、ジチオレン基が形成され、MPTが生成する。なお、MPTのジチオレン基の二つの硫黄には銅Cuが結合している<sup>31)</sup>。Cuがどのようにして、挿入されるのかは不明であるが、ジチオレン基が形成された直後に未知の銅シャペロンによって導入されるものと推察される。Cuの役割は、おそらく、次の反応において起こるMoの挿入前の準備段階であるものと考えられる。また、ジチオレン基の酸化を抑制するためとも、考えられている。

なお、MOSC2AのC末端はチオカルボキシル化されているが、この反応は、molybdopterin synthase sulfurtransferase [EC 2.8.1.11] (MOSC3)によって触媒される<sup>32, 33)</sup>。その反応は、[molybdopterin-synthase sulfur-carrier protein]-Gly-Gly-AMP + [cysteine desulfurase]-S-sulfanyll-L-cysteine + reduced acceptor → AMP + [molybdopterin-synthase sulfur-carrier protein]-Gly-NH-CH<sub>2</sub>-C(O)SH + [cysteine desulfurase]-L-cysteine + oxidized acceptorである。

## (4) molybdopterin adenyltransferase [EC : 2.7.7.75]

ヒトでは、遺伝子名*GPHN*がコードし、産物のタンパク質名はゲフィリン(Gephyrin)である。ゲフィリンは、二つのドメイン、Gドメイン(molybdopterin adenyltransferase)とEドメイン(molybdopterin molybdotransferase)から構成されている<sup>34)</sup>。本酵素は細胞内に広く存在している。

molybdopterin adenyltransferase(ゲフィリンのGドメイン)は、MoをMPTに挿入するための前段階の反応を触媒し、ATP-Mg<sup>2+</sup>依存的にadenylated molybdopterin (MPT-AMP)を作る<sup>35)</sup>。活性中心はG-ドメインのN末端部分にある<sup>36)</sup>。生成したMPT-AMPは、ゲフィリンのmolybdopterin adenyltransferaseを有するGドメインからmolybdopterin molybdotransferase活性を有するEドメインに移行する。

## (5) molybdopterin molybdotransferase [EC : 2.10.1.1]

ゲフィリンのEドメインがmolybdopterin molybdotransferaseである。本酵素が、MPT-AMPをAMPとMPTに加水分解し、MPTの



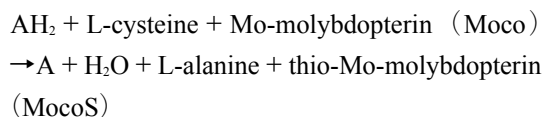
ジチオレン基に結合した Cu を  $\text{MoO}_4^{2-}$  と交換する反応を触媒し、モリブデン補因子 (Moco) を作る。なお、この反応は、 $\text{Zn}^{2+}/\text{MnO}_4^{2-}$  依存性の反応である<sup>37)</sup>。活性中心は E-ドメインの C-末端部分である<sup>36)</sup>。Moco は、SO と mARC のアポ型に結合し、それぞれホロ型となる。

なお、遊離状態の Moco は酸化に対して非常に不安定であり、in vitro での半減期は数分である<sup>38)</sup>。不安定な Moco を守るために Moco binding proteins (MCP) が存在する<sup>39)</sup>。

#### (6) molybdenum cofactor sulfurtransferase (Moco sulfurase) [EC : 2.8.1.9]

XH/XO と AO の補酵素として機能するためには、Moco は、さらに、硫黄化された sulphurated molybdenum cofactor (MocoS) となる必要がある。molybdenum cofactor sulfurtransferase (Moco sulfurase) は、ヒトにおいては、遺伝子名 *MTARCI* によってコードされるタンパク質である。この反応を触媒する酵素はビタミン B<sub>6</sub> の活性型 PLP を必要とする<sup>40)</sup>。上述 (2-1. (2)) のように、mARC の C-末端ドメインが本酵素の触媒部位である<sup>41)</sup>。

本酵素は以下の反応を触媒する。



### 2-3. モリブデンの吸収機構

食品中の Mo は、モリブデン酸塩として、胃と小腸から受動輸送と能動輸送により吸収される。食品中の Mo の吸収率は、他の微量ミネラルに比較して高く、90% 程度であるとされている<sup>42)</sup>。Mo の尿中排泄量は Mo の摂取量と高い相関関係がある<sup>43)</sup>。なお、微生物<sup>44, 45)</sup>と植物<sup>46-48)</sup>では Mo 輸送体が同定されているが、哺乳動物での報告はない。

#### 謝辞

本総説の執筆にあたり、科学研究費補助金 (基盤研究 (B)、課題番号 20H02943、次世代型フレイル予防食品開発をめざすミトコンドリア機能制御の基盤研究、研究代表者 柴田克己) の一部を使用した。関係各位に感謝する。

#### 文 献

- 1) 伊美友紀子, 柴田克己. ミトコンドリアにおけるヘム合成機構とその役割. 甲南女子大学紀要Ⅱ, 第16号, 67-76 (2021).
- 2) Tanaka N, Kanazawa M, Tonosaki K, Yokoyama N, Kuzuyama T, Takahashi Y. Novel features of the ISC machinery revealed by characterization of Escherichia coli mutants that survive without iron-sulfur clusters. *Mol Microbiol*, **99**, 835-848 (2016).
- 3) Mihara H, Esaki N. Bacterial cysteine desulfurases : their function and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, **60**, 12-23 (2002).
- 4) Pastore C, Adinolfi S, Huynen MA, Rybin V, Martin S, Mayer M, Bukau B, Pastore A. YfhJ, a molecular adaptor in iron-sulfur cluster formation or a frataxin-like protein? *Structure*, **4**, 857-867 (2016).
- 5) Kim S, Park S. Structural changes during cysteine desulfurase CsdA and sulfur acceptor CsdE interactions provide insight into the trans-persulfuration. *J Biol Chem*, **288**, 27172-27180 (2013).
- 6) Laftah AH, Latunde-Dada GO, Fakih S, Hider RC, Simpson RJ, McKie AT. Haem and folate transport by protoncoupled folate transporter/haem carrier protein (SLC 46 A 1). *Br J Nutr*, **101**, 1150-1156 (2009).
- 7) Jiang R, Hua C, Wan Y, Jiang B, Hu H, Zheng J, Fuqua BK, Dunaief JL, Anderson GJ, David S, Vulpe CD, Chen H. Hephaestin and ceruloplasmin play distinct but interrelated roles in iron homeostasis in mouse brain. *J Nutr*. **145**, 1003-1009 (2015).
- 8) Wang S, He X, Wu Q, Jiang L, Chen L, Yu Y, Zhang P, Huang X, Wang J, Ju Z, Min J, Wang F. Transferrin receptor 1-mediated iron uptake plays an essential role in hematopoiesis. *Haematologica*. 2020 Aug ; 105 (8) : 2071-2082. doi : 10.3324/haematol.2019.224899.)
- 9) Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, **276**, 7806-7810 (2001).
- 10) Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, **102**, 783-788 (2003).
- 11) Pandur E, Nagy J, Poór VS, Sarnyai A, Huszár A, Miseta A, Sipos K. Alpha-1 antitrypsin binds preprohepcidin intracellularly and prohepcidin in the serum. *FEBS J*, **276**, 2012-2021 (2009).
- 12) Reiss J, Johnson JL. Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH. *Hum Mutat*, **21**, 569-576 (2003).
- 13) Havemeyer A, Bittner F, Wollers S, Mendel R, Kunze T, Clement B. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem*, **281**, 34796-34802 (2006).
- 14) Anantharaman V, Aravind L. MOSC domains : Ancient, predicted sulfur-carrier domains, present in diverse

- metal-sulfur cluster biosynthesis proteins including Molybdenum cofactor sulfurases. *FEMS Microbiol Lett*, **207**, 55-61 (2002).
- 15) Llamas A, Chamizo-Ampudia A, Tejada-Jimenez M, Galvan A, Fernandez E. The molybdenum cofactor enzyme mARC : Moonlighting or promiscuous enzyme? *Biofactors*, **43**, 486-494 (2017).
  - 16) Klein JM, Busch JD, Potting C, Baker MJ, Langer T, Schwarz G. The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, **287**, 42795-42803 (2012).
  - 17) D'Arrigo A, Manera E, Longhi R, Borgese N. The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b5 suggests novel targeting pathways. *J Biol Chem*, **268**, 2802-2808 (1993).
  - 18) Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase—mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J*, **275**, 3278-3289 (2008).
  - 19) Mendel RR, Leimkuhler S. The biosynthesis of the molybdenum cofactors. *J Biol Inorg Chem*, **20**, 337-347 (2015).
  - 20) Tejada-Jimenez M, Llamas A, Sanz-Luque E, Galvan A, Fernandez E. A high-affinity molybdatetransporter in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 20126-20130 (2007).
  - 21) Hanzelmann P, Schwarz G, Mendel RR. Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem*, **277**, 18303-18312 (2002).
  - 22) Hanzelmann P, Schindelin H. Binding of 5'-GTP to the C-terminal FeS cluster of the radical S-adenosylmethionine enzyme MoaA provides insights into its mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 6829-6834 (2006).
  - 23) Schwarz G, Mendel RR, Ribbe MW. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature*, **460**, 839-847 (2009).
  - 24) Hanzelmann P, Hernandez HL, Menzel C, Garcia-Serres R, Huynh BH, Johnson MK, Mendel RR, Schindelin H. Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem*, **279**, 34721-34732 (2004).
  - 25) Hanzelmann P, Schindelin H. Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 12870-12875 (2004).
  - 26) Cronan JE. Assembly of Lipoic Acid on Its Cognate Enzymes : an Extraordinary and Essential Biosynthetic Pathway. *Microbiol Mol Biol Rev*, **80**, 429-450 (2016).
  - 27) Solmonson A, DeBerardinis RJ. Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. *J Biol Chem*, **293**, 7522-7530 (2018).
  - 28) Hanzelmann P, Schwarz G, Mendel RR. Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem*, **277**, 18303-18312 (2002).
  - 29) Kruse I, Maclean AE, Hill L, Balk J. Genetic dissection of cyclic pyranopterin monophosphate biosynthesis in plant mitochondria. *Biochem J*, **475**, 495-509 (2018).
  - 30) Daniels JN, Wuebbens MM, Rajagopalan KV, Schindelin. Crystal structure of a molybdopterin synthase-precursor Z complex : insight into its sulfur transfer mechanism and its role in molybdenum cofactor deficiency. *Biochemistry*, **47**, 615-626 (2008).
  - 31) Kuper J, Llamas A, Hecht HJ, Mendel RR, Schwarz G. Structure of the molybdopterin-bound Cnx 1 G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature*, **430**, 803-806 (2004).
  - 32) Leimkuhler S, Freuer A, Araujo JA, Rajagopalan KV, Mendel RR. Mechanistic studies of human molybdopterin synthase reaction and characterization of mutants identified in group B patients of molybdenum cofactor deficiency. *J Biol Chem*, **278**, 26127-26134 (2003).
  - 33) Matthies A, Rajagopalan KV, Mendel RR, Leimkuhler S. Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 5946-5951 (2004).
  - 34) Reiss J, Gross-Hardt S, Christensen E, Schmidt P, Mendel RR, Schwarz G. A mutation in the gene for the neurotransmitter receptor-clustering protein gephyrin causes a novel form of molybdenum cofactor deficiency. *Am J human Gene*, **68**, 208-213 (2001).
  - 35) Nichols JD, Rajagopalan KV. In vitro molybdenum ligation to molybdopterin using purified components. *J Biol Chem*, **280**, 7817-7822 (2005).
  - 36) Kasaragod VB, Schindelin H. Structural Framework for Metal Incorporation during Molybdenum Cofactor Biosynthesis. *Structure*, **24**, 782-788. (2016).
  - 37) Llamas A, Otte T, Multhaup G, Mendel RR, Schwarz G. The Mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin. A novel route toward metal cofactor assembly. *J Biol Chem*, **281**, 18343-18350 (2006).
  - 38) Ataya FS, Witte CP, Galvan A, Igeno MI, Fernandez E. Mop 1 encodes the molybdenum cofactor carrier protein in *Chlamydomonas reinhardtii* and participates in protection, binding, and storage functions of the cofactor. *J Biol Chem*, **278**, 10885-10890 (2003).
  - 39) Kruse T, Gehl C, Geisler M, Lehrke M, Ringel P, Hallier S, Hansch R, Mendel RR. Identification and biochemical characterization of molybdenum cofactor-binding proteins from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **85**, 6623-6635 (2010).
  - 40) Ichida K, Matsumura T, Sakuma R, Hosoya T, Nishino T. Mutation of human molybdenum cofactor sulfuryase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Bio-*

- chem Biophys Res Commun*, **282**, 1194-1200 (2001).
- 41) Havemeyer A, Bittner F, Wollers S, Mendel R, Kunze T, Clement B. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem*, **281**, 34796-34802 (2006).
  - 42) Turnlund JR, Keyes WR, Peiffer GL. Molybdenum absorption, excretion, and retention studied with stable isotopes in young men at five intakes of dietary molybdenum. *Am J Clin Nutr*, **62**, 790-796 (1995).
  - 43) Yoshida M, Hattori H, Ota S, Yoshihara K, Kodama N, Yoshitake Y, Nishimuta M. Molybdenum balance in healthy young Japanese women. *J Trace Elem Med Biol*, **20**, 245-252 (2006).
  - 44) Wagner UG, Stupperich E, Kratky C. Structure of the molybdate/tungstate binding protein mop from *Sporomusa ovata*. *Structure*, **8**, 1127-1136 (2000).
  - 45) Hoffmann MC, Ali K, Sonnenschein M, Robrahn L, Strauss D, Narberhaus F, Masepohl B. Molybdate uptake by *Agrobacterium tumefaciens* correlates with the cellular molybdenum cofactor status. *Mol Microbiol*, **101**, 809-822 (2016).
  - 46) Tomatsu H, Takano J, Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Shibagaki N, Fujiwara T. An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 18807-18812 (2007).
  - 47) Duan G, Hakoyama T, Kamiya T, Miwa H, Lombardo F, Sato S, Tabata S, Chen Z, Watanabe T, Shinano T, Fujiwara T. LjMOT1, a high-affinity molybdate transporter from *Lotus japonicus*, is essential for molybdate uptake, but not for the delivery to nodules. *Plant J*, **90**, 1108-1119 (2017).
  - 48) Huang XY, Liu H, Zhu YF, Pinson SRM, Lin HX, Guerinot ML, Zhao FJ, Salt DE. Natural variation in a molybdate transporter controls grain molybdenum concentration in rice. *New Phytol*, **221**, 1983-1997 (2019).