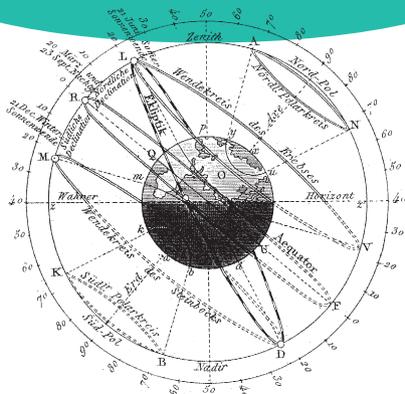


【解説】



メタン生成と嫌気メタン酸化の酵素化学

嶋 盛吾

メタンは強力な温室効果ガスであり、その大気中濃度の変化は地球環境に重要な影響を及ぼすと考えられている。メタン生成古細菌によって嫌気環境で生産されたメタンは、好気環境に拡散し、好気性メタン酸化性微生物によって分解されることが知られている。最近の研究により、嫌気環境でも硫酸塩や硝酸塩などの還元反応と共役した代謝により、顕著な量のメタンが酸化分解されることが明らかになってきた。嫌気条件下でメタンを酸化する古細菌（嫌気メタン酸化性古細菌）は、メタン生成の逆方向の代謝で、メタンを CO_2 にまで酸化すると考えられている。メタン中のC-H結合を嫌気的に分解することは難しいが、メタン生成古細菌でメタン生産を触媒する酵素（メチル補酵素M還元酵素）が、逆反応でこの反応を触媒する。嫌気メタン酸化によって得られた電子は硫酸塩や硝酸塩に伝達され、エネルギーが保存されるが、その詳細はわかっていない。ここでは、この分野の最近の進展を解説するとともに、メタゲノム情報をもとに嫌気メタン酸化代謝系を考察する。

地球環境でのメタンの変遷

光合成によって年間70ギガトンもの炭素が地球上で固定される⁽¹⁾。その2～3%は嫌気的な環境で微生物によって分解される。まず嫌気性の原生生物や細菌などによって酢酸などの有機酸や H_2 が生産され、これらの中から中間代謝物からメタン生成古細菌によって年間1ギガトンのメタンが生成する。メタン生成はメタン生成古細菌のエネルギー代謝である。嫌気環境で生産されたメタンの多くは好気的環境に拡散し、好気的メタン酸化性菌によって CO_2 にまで酸化される。この場合、酸素を使ったメタンモノオキシゲナーゼによって酸化される。大気中に放出されたメタンのほとんどは光化学反応によって分解されるが、一部大気中に蓄積される。メタンハイドレートは高压低温の海底で形成される。嫌気環境でもメタンは硫酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩、 Fe^{3+} や Mn^{4+} などの還元反応と共役した反応によって酸化される。亜硝酸塩還元と共役した嫌気メタン酸化性細菌および、硫酸塩あるいは硝酸塩還元と共役した嫌気メタン酸化性古細菌を含む集積培養が知られている。いずれの嫌気メタン酸化性微生物も増殖速度が遅く、純粋培養は得られていな

Enzyme Chemistry of Methanogenesis and Anaerobic Oxidation of Methane

Seigo SHIMA, マックスプランク陸生微生物学研究所, 日本科学技術振興機構さきがけ, 北海道大学低温科学研究所

い。亜硝酸塩還元メタン資化性細菌の場合は、亜硝酸から生成した分子状酸素を利用してメタンモノオキシゲナーゼでメタンを酸化すると報告されている。一方、硝酸塩や硫酸塩と共役した古細菌の系では、メタン生成の逆方向の代謝でメタンが分解されるという説が提案されている⁽²⁾。

メタン生成代謝

メタン生成古細菌は2種類に分類できる。*Methanobacterium*や*Methanococcus*などチトクロームを含まないタイプのもの、*Methanosarcina*などチトクロームを含むタイプである⁽³⁾。前者は主にH₂と炭酸ガスからのメタン生成しかできないが、後者はそれ以外にメタノールなどのC1化合物や酢酸を基質として利用することが

できる。チトクロームを含まないタイプのメタン生成古細菌におけるH₂と炭酸ガスからのメタン生成代謝を図1に示した。メタン生成代謝はメタン生成古細菌の唯一のエネルギー獲得代謝であり、この代謝特有の補酵素がC1運搬体あるいは電子運搬体として使われている。

CO₂はフェレドキシンを還元剤とする反応によりホルミル基として第1のC1運搬体メタノフラン (MFR) に固定される。つづいてホルミル基は第2のC1運搬体であるテトラヒドロメタノプテリン (H₄MPT) に転移した後、脱水縮合と還元型F₄₂₀を電子供与体とする2段階の還元反応によりメチル基になる (F₄₂₀はメタン生成古細菌で見いだされた電子運搬体、デアザフラビン環を含む)。メチル基は第3のC1運搬体である補酵素Mに転移するが、この反応は強い発エルゴン反応であり ($\Delta G^{\circ} = -30 \text{ kJ/mol}$)、その反応はナトリウムイオンの汲み出し反応 ($\Delta G^{\circ} = +30 \text{ kJ/mol}$) と共役している。イオン勾配として保存されたエネルギーはATP合成酵素の駆動力となりATPを生産する。メチル基転移反応で生成したメチル補酵素Mがメタン生成反応の直接の基質である。メチル補酵素M還元酵素 (Mcr) に触媒される反応 ($\Delta G^{\circ} = -30 \text{ kJ/mol}$) で還元型の補酵素Bによって還元されメタンを生じる。メタン生成反応の副産物である補酵素Mと補酵素Bからなるヘテロジスルフィドは、H₂によって還元され、還元型の補酵素Mと補酵素Bが再生される ($\Delta G^{\circ} = -39 \text{ kJ/mol}$)。この反応はヘテロジスルフィド還元酵素 (Hdr) とヒドロゲナーゼ (Mvh) の複合体 (Hdr複合体) によって触媒される。最近の研究で、Hdr複合体は、ヘテロジスルフィドとともにフェレドキシンを還元することが明らかとなった⁽⁴⁾ (以下に詳述)。生成した還元型フェレドキシンはメタン生成代謝の最初の反応 (炭酸ガスの還元反応) に使われる。CO₂からのメタン生成には8電子必要だが、半分の4電子はヘテロジスルフィド還元酵素複合体を通じて供給され、残りの4電子はF₄₂₀還元性ヒドロゲナーゼ (Frh) から還元型F₄₂₀としてメタン生成代謝に供給される (図1)。ニッケル制限条件ではFrhの代わりに [Fe] ヒドロゲナーゼが使われる⁽⁵⁾。この代謝サイクルで得られた還元力の一部は生合成に使われるため、サイクルを維持するためには、さらに還元力を供給する必要がある。膜結合型ヒドロゲナーゼ (EhaおよびEhb) が、イオン勾配を利用してH₂によるフェレドキシ還元を行う。

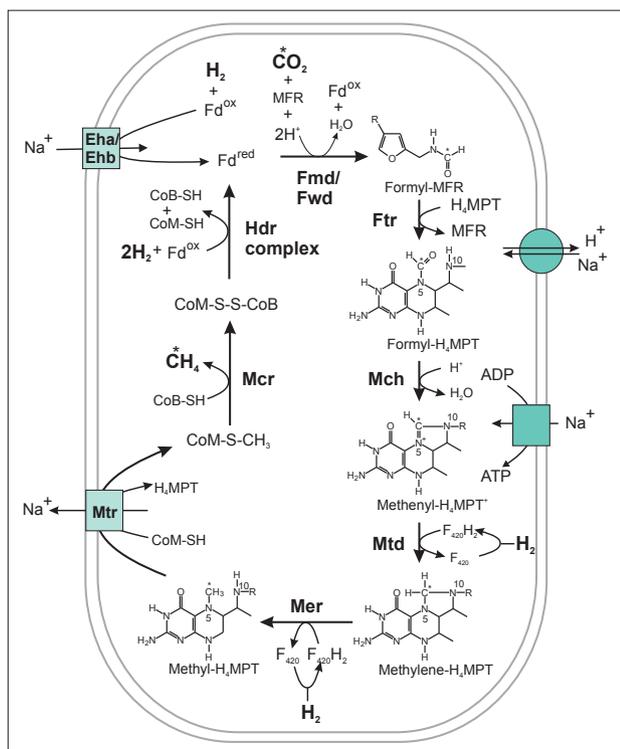


図1 ■ 水素ガスとCO₂からの標準メタン生成経路

チトクロームを含まないメタン生成古細菌での例^(2,17)。MFR: メタノフラン, H₄MPT: テトラヒドロメタノプテリン, F₄₂₀H₂: 還元型F₄₂₀, CoM-SH: 補酵素M, CoB-SH: 補酵素B, CoM-S-S-CoB: ヘテロジスルフィド, Fd^{ox}/Fd^{red}: 酸化型および還元型フェレドキシリン, Fmd/Fwd: モリブデン型およびタンゲステン型ホルミルメタノフラン脱水素酵素, Ftr: ホルミルトランスフェラーゼ, Mch: シクロヒドロラーゼ, Mtd: F₄₂₀依存性メチレンH₄MPT脱水素酵素, Mer: F₄₂₀依存性メチレンH₄MPT還元酵素, Mtr: 膜結合メチルトランスフェラーゼ, Mcr: メチル補酵素M還元酵素, Hdr complex: ヘテロジスルフィド還元酵素とMvhヒドロゲナーゼの複合体, Eha/Ehb: 2種類の膜結合エネルギー変換ヒドロゲナーゼ。

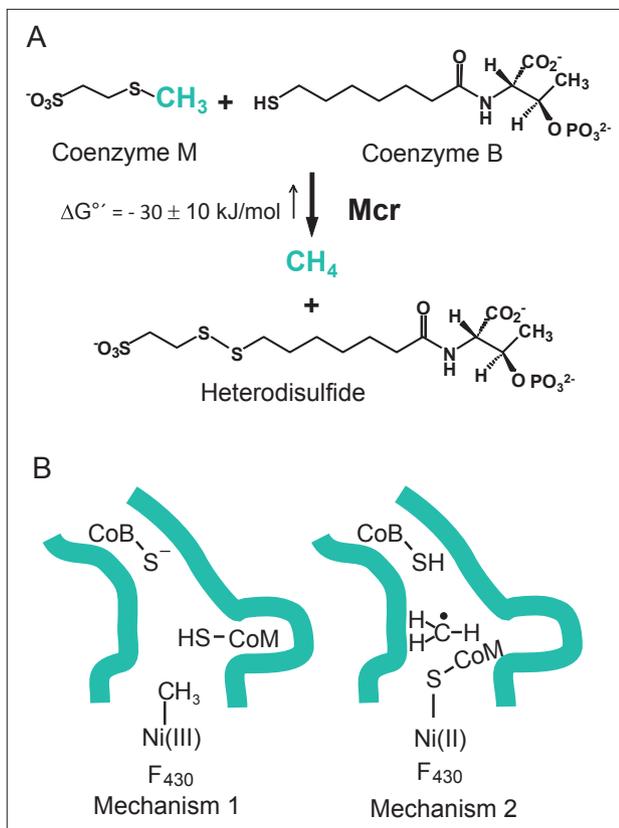


図2 ■ メチル補酵素M還元酵素 (Mcr) の触媒反応 (A) と推定反応中間体 (B)

緑色の太線で囲まれた部分は疎水性チャンネルを示す。触媒機構1ではメチル-ニッケル複合体、触媒機構2ではメチルラジカルが中間体として生成する。

メチル補酵素M還元酵素 (Mcr)

メタンを生成する酵素であるMcrはすべてのメタン生成古細菌で使われている⁽⁶⁾。3つのサブユニット、 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 構造からなる分子量約30万のタンパク質で、補欠分子属としてニッケルポルフィノイドF₄₃₀を活性中心に含む。F₄₃₀はタンパク質内部の疎水的領域に埋め込まれ、チャンネルを通じて外部とつながっている (図2)。大きく分けて2種類の触媒機構が提案されている。一つの機構ではメチル-ニッケル中間体を形成した後、メタンが生成される⁽⁷⁾。一方の反応機構では、中間体としてメチルラジカルが生成する⁽⁸⁾ (図2)。どちらか一方を特定する確かな実験結果は得られていないが、最近発表されたプロトン交換反応の実験結果はメチルラジカル機構に分が良さそうである⁽⁹⁾。

ヘテロジスルフィド還元酵素 (Hdr) 複合体

ヘテロジスルフィド還元反応の酸化還元電位は比較的高く ($E^\circ' = -140 \text{ mV}$)、H₂ ($E^\circ' = -414 \text{ mV}$) などを還元剤とした反応で、比較的大きなエネルギーを得ることができる⁽¹⁰⁾。チトクロームを含むタイプのメタン生成古細菌では、Hdrは膜タンパク質として存在し、Hdr反応がプロトンの膜輸送と共役し、エネルギー保存に使われている。一方、チトクロームを含まないタイプのメタン生成古細菌では、Hdr複合体は細胞質に局在し、H₂から

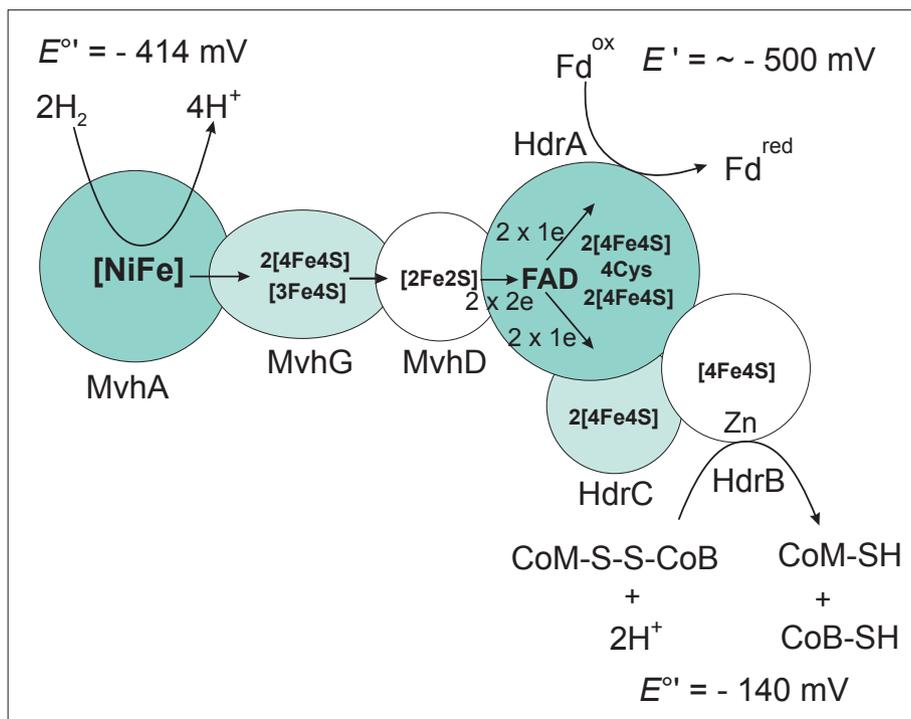


図3 ■ ヘテロジスルフィド還元酵素複合体の触媒反応と構成

Methanothermobacter marburgensis の例。ヒドロゲナーゼ (MvhAGD) とヘテロジスルフィド還元酵素 (HdrABC) が複合体を形成している。一次構造からコファクターの結合位置と電子の流れを推定⁽¹⁰⁾。HdrAに含まれるFADで電子が振り分けられる。

の電子で、ヘテロジスルフィドとフェレドキシンの還元を行う^(4,10)(図3)。フェレドキシンの酸化還元電位は低く($E' = \sim -500$ mV), H_2 で還元することは困難である。しかし, Hdr複合体はFADを介した電子パイフリケーション機構によって, 2分子の H_2 からの4つの電子を振り分け, 発エルゴニックなヘテロジスルフィド還元反応と吸エルゴニックなフェレドキシン還元反応を行うと考えられている。提案されている電子パイフリケーション機構での重要なポイントは, FADが酸化還元電位のより低いセミキノラジカル($FADH\bullet$)を経由することである。セミキノラジカルからの活性化された電子によってフェレドキシンが還元されると考えられている⁽¹⁰⁾。FADを含むサブユニットHdrAは多くの微生物ゲノムに認められている。HdrAのホモログを活用した電子パイフリケーション反応が微生物で広く使われていることを意味しているのだろう。

嫌気メタン酸化代謝

硝酸還元あるいは硫酸還元と共役した嫌気メタン酸化性古細菌(Anaerobic Methanotrophic archaea, あるいはANME古細菌)が知られている⁽²⁾。ANME古細菌はメタン生成古細菌の系統Methanomicrobiales(ANME-1古細菌)とMethanosarcinales(ANME-2およびANME-3古細菌)に分類され, 嫌気メタン酸化性古細菌のゲノムにはメタン生成代謝に含まれるほとんどの酵素のホモログが存在する。これらの知見から, ANME古細菌はメタン生成の逆代謝でメタンを分解するという仮説が提案された。その仮説に従えば, メタン生成代謝のメタン生成酵素Mcrが, 逆反応の嫌気メタン酸化反応を触媒するはずである。Mcrの逆反応は吸エルゴニック(+30 kJ/mol)である(図2)。理論的にも実験的にも, 逆反応(メタン酸化反応)の速度は, 正反応よりもはるかに遅い⁽²⁾。(メタン生成古細菌由来のMcrの場合, 11 nmolメタン min^{-1} mg^{-1} タンパク質というメタン酸化活性が得られている⁽¹¹⁾。)このようにMcrの逆反応は非常に遅く, 微生物マットでのメタン酸化反応速度(約7 nmol min^{-1} mg^{-1} タンパク質)を実現するには, 高濃度のMcrが必要である。実際に黒海の微生物マット中には全タンパク質の10%以上にも及ぶ大量のMcrが検出された⁽¹²⁾。この嫌気メタン酸化性古細菌からのMcrは結晶化され, X線構造解析がなされている⁽¹³⁾。

逆向きのメタン代謝では, メチル補酵素M上のメチル基はMtr反応によって H_4 MPTに転移する。この反応は吸エルゴニックだが, ナトリウムイオン勾配が存在すれ

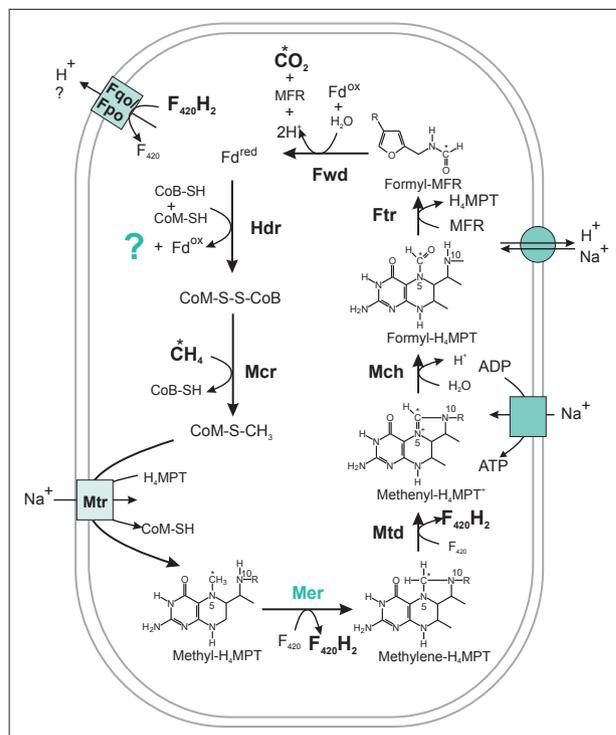


図4 ■ 嫌気メタン酸化の推定代謝経路

このサイクルを回転するには, ヘテロジスルフィド還元酵素(Hdr)と電子運搬体 F_{420} が鍵となる。ANME古細菌にはヒドロゲナーゼが含まれない。硫酸還元酵素系との共役機構は本文参照。Fqo/Fpo型膜酵素によるプロトン勾配としてのエネルギー保存が予想される。ANME-1のゲノムにMerは認められてない。

ば, 問題なく進行する(図4)。それ以降, CO_2 生成までの反応はエネルギー的に特に問題がない⁽²⁾。ヘテロジスルフィドをどのように再生するかが嫌気メタン代謝の最大の問題である。図1に示したHdr複合体の逆反応では, 還元型フェレドキシンおよび補酵素Mと補酵素Bからの電子がプロトンに渡され, 2分子の H_2 が生成することになる。しかし, この逆反応は吸エルゴニック(+39 kJ/mol)すぎて, ほとんど不可逆である⁽²⁾。この逆反応を可能にするために, 嫌気メタン酸化代謝では, プロトン以外の比較的酸化還元電位の高い電子受容体が使われていると予想される。実際, メタン酸化性古細菌のメタゲノム中にはヒドロゲナーゼは見つかっていない。興味深いことに, 嫌気メタン酸化性古細菌のゲノムのhdr遺伝子はメタン生成古細菌のものとはかなり異なる。嫌気メタン酸化性古細菌のゲノムにコードされるHdr遺伝子クラスターは複数あり, 遺伝子クラスター中に2つのhdrA遺伝子が並んだものや, 2つのHdrAが融合したサブユニットを含む遺伝子クラスターが存在する⁽¹⁴⁾。また, F_{420} 結合サブユニットのホモログが一つのHdr遺伝子クラスターに含まれている⁽¹⁴⁾。メタン

酸化代謝で生成する2分子の還元型 F_{420} とあわせて、 F_{420} が嫌気メタン酸化経路で重要な役割をすることが考えられる。ANME-1のゲノムには膜結合型の F_{420} ：メナキノン酸化還元酵素 (Fqo) や F_{420} ：メタノフェナチン酸化還元酵素 (Fpo) のホモログが存在する⁽¹⁴⁾。これらの膜タンパク質によって触媒される $F_{420}H_2$ の酸化反応はプロトン輸送と共役している。これらの膜タンパク質ホモログが、ANME古細菌でのエネルギー保存に関与していることが予想される (図4)。

硫酸還元と共役した嫌気メタン酸化は栄養共生か？

これまで、硫酸塩還元と共役した嫌気メタン酸化は、嫌気メタン資化性古細菌と硫酸還元菌の栄養共生であると考えられてきた。この反応を行う生物は常にこれらの2種類の微生物を含む集積培養として見いだされ、これらの微生物を分離培養できなかつたからである。しかし、2012年にドイツ、マックスプランク海洋微生物学研究所のグループが、興味深い結果を報告した⁽¹⁵⁾。ANME-2古細菌は単独でメタンを酸化し、独自の硫酸還元酵素系を使って、硫酸塩をゼロ価の硫黄に還元する。共存する細菌はメタン資化性古細菌の生産したゼロ価硫黄を不均化反応によって硫化水素と硫酸塩に変換し、その代謝で得られるエネルギーで生育するという。この報告ではANME-2古細菌についての知見しか述べていないが、ANME-1古細菌やANME-3古細菌でも同様の代謝が行われていても不思議はない。硝酸還元と共役した嫌気メタン酸化古細菌 (ANME-2d) が単独で嫌気メタン酸化と硝酸還元を行うことも最近報告された⁽¹⁶⁾。

ANME古細菌で予想される硫酸還元共役系

ANME型の嫌気メタン資化性古細菌がメタン酸化から硫酸還元まで行うという仮定のもと、硫酸還元共役系を考察してみよう。通常の硫酸還元細菌では、硫酸イオンはATPスルフリラーゼの触媒する反応でATPを使って活性化されアデニリル硫酸 (APS) となる。APS還元酵素反応によってAPSから亜硫酸が生成し、亜硫酸は亜硫酸還元酵素の触媒反応で硫化水素にまで還元される。それぞれの反応の酸化還元電位は、APS/(亜硫酸水素イオン+AMP) 共役で $E^{\circ'} = -60$ mV、亜硫酸水素イオン/硫化水素イオン共役の場合 $E^{\circ'} = -120$ mVであり、これら硫酸還元中間体はプロトン/ H_2 ($E^{\circ'} = -414$ mV) よりも優れた電子受容体である⁽²⁾。Hdr複合体か

らの電子をこれらの硫酸還元中間体に渡すことができれば、メタン酸化代謝を問題なく進めることができるだろう。前述のように、Hdr複合体からの電子がまず F_{420} ($E^{\circ'} = -360$ mV) に渡され、続いて硫酸還元系に渡されるのかもしれない。この場合、還元型 F_{420} に依存したAPS還元酵素や亜硫酸還元酵素の存在が予想される。いずれにしても、新規な硫酸還元系酵素が使われていることになる。実際、ANME古細菌には通常のATPスルフリラーゼ、APS還元酵素および亜硫酸還元酵素は見つかっていない。還元型フェレドキシン ($E^{\circ'} = -500$ mV) やホルミルメタノフラン ($E^{\circ'} = -500$ mV) を還元剤として、硫酸イオンを亜硫酸に直接還元する酵素系も提案されている^(2, 15)。

おわりに

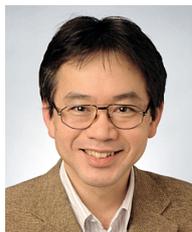
微生物によるメタン生成と嫌気メタン酸化をさらに理解するための共通の鍵はHdr複合体であろう。X線結晶構造解析を含めた酵素化学的研究の進展が待たれる。ANME古細菌が、単独でメタン酸化から硫酸還元まで行えるのであれば、硫酸還元系を含めた嫌気メタン酸化代謝を想定することが比較的容易であり、酵素活性アッセイ系を組むこともできる。嫌気メタン酸化微生物はいまだ純粋培養が得られていないが、天然の微生物マットや集積培養菌体を用いた活性測定や酵素精製、大腸菌などでの異種発現酵素を使った研究でブレイクスルーが期待される。

文献

- 1) R. K. Thauer: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 6712 (2010).
- 2) R. K. Thauer: *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 292 (2011).
- 3) R. K. Thauer, A. K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel & R. Hedderich: *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 579 (2008).
- 4) A. K. Kaster, J. Moll, K. Parey & R. K. Thauer: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **108**, 2981 (2011).
- 5) S. Shima, O. Pilak, S. Vogt, M. Schick, M. S. Stagni, W. Meyer-Klaucke, E. Warkentin, R. K. Thauer & U. Ermler: *Science*, **321**, 572 (2008).
- 6) S. Shima & R. K. Thauer: *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 643 (2005).
- 7) U. Ermler, W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud & R. K. Thauer: *Science*, **278**, 1457 (1997).
- 8) S. L. Chen, M. R. A. Blomberg & P. E. M. Siegbahn: *Chem. Eur. J.*, **18**, 6309 (2012).
- 9) S. Scheller, M. Goenrich, R. K. Thauer & B. Jaun: *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 14975 (2013).
- 10) W. Buckel & R. K. Thauer: *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics*, **1827**, 94 (2013).
- 11) S. Scheller, M. Goenrich, R. Boecher, R. K. Thauer & B. Jaun: *Nature*, **465**, 606 (2010).
- 12) M. Krüger, A. Meyerdierks, F. O. Glockner, R. Amann,

- F. Widdel, M. Kube, R. Reinhardt, J. Kahnt, R. Böcher, R. K. Thauer & S. Shima : *Nature*, **426**, 878 (2003).
- 13) S. Shima, M. Krueger, T. Weinert, U. Demmer, J. Kahnt, R. K. Thauer & U. Ermler : *Nature*, **481**, 98 (2012).
- 14) A. Meyerdierks, M. Kube, I. Kostadinov, H. Teeling, F. O. Glockner, R. Reinhardt & R. Amann : *Environ. Microbiol.*, **12**, 422 (2010).
- 15) J. Milucka, T. G. Ferdelman, L. Polerecky, D. Franzke, G. Wegener, M. Schmid, I. Lieberwirth, M. Wagner, F. Widdel & M. M. M. Kuypers : *Nature*, **491**, 541 (2012).
- 16) M. F. Haroon, S. H. Hu, Y. Shi, M. Imelfort, J. Keller, P. Hugenholtz, Z. G. Yuan & G. W. Tyson : *Nature*, **500**, 567 (2013).
- 17) R. K. Thauer : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 15084 (2012).

プロフィール



嶋 盛 吾 (Seigo SHIMA)

<略歴> 1983年大阪府立大学農学部農芸化学科卒業/1985年電力中央研究所研究員/1991年博士(農学), 東京大学/1993年ドイツフンボルト財団奨学生/1995年マックスプランク陸生微生物学研究所研究員/1997年同グループリーダー/2008年日本科学技術振興機構さきがけ兼任研究員/2012年北海道大学低温科学研究所客員教授<現在の研究テーマと抱負>メタン生成および嫌気メタン酸化にかかわる酵素とコファクターの生化学<趣味>音楽鑑賞, 史跡巡り, 大工仕事