

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380056

研究課題名(和文) 真核生物のコエンザイムQ生合成反応の解明

研究課題名(英文) Analysis of coenzyme Q biosynthesis in eukaryotes

研究代表者

川向 誠 (KAWAMUKAI, MAKOTO)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70186138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：コエンザイムQは生体内において電子伝達系の必須成分としてエネルギー生産に関わるが、生合成経路が完全には解明されていない。酵母におけるコエンザイムQ生合成の全容解明とその知見をヒトの遺伝病の理解に貢献させようとするを目的として研究を行なった。酵母はヒトの相同遺伝子を有していることから、ヒトやアラビドプシスで知られているCoQ合成に関わる遺伝子を分裂酵母内で発現させ、機能的な相補性が高い事を見いだした。分裂酵母のCoQ合成遺伝子の破壊株で蓄積する前駆体をLC-MS解析により見いだした。CoQ結合タンパク質Coq10の結合部位の推定ができた。

研究成果の概要(英文)：Coenzyme Q is essential for energy production through the electron transfer system and also acts as antioxidant. This study aims to understand the biosynthetic pathway of coenzyme Q in fission yeast. This analysis also contributes an understanding of human disease involved in CoQ synthesis. When we expressed genes for CoQ biosynthesis from human or plant into fission yeast, they complemented the function of fission yeast corresponding deletion mutants. The analysis of intermediate compounds accumulated in coq mutant was succeeded. The binding site of CoQ10 protein was unveiled in this study.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：コエンザイムQ ユビキノン 分裂酵母 抗酸化物質

1. 研究開始当初の背景

コエンザイム Q (ユビキノン、CoQ) は生体内において電子伝達系の必須成分として重要な機能を果たしていると同時に抗酸化物質としての機能が注目されている。イソプレニル側鎖 10 単位を有する CoQ10 は 1974 年から医薬品として、虚血性心不全、筋ジストロフィー、貧血等に効果があることで使用されていたが、2001 年に食品として認可されてからは食品サプリメントとして、幅広く市場に普及している。CoQ10 は人間の体内でも合成されているが、その量は加齢とともに減少することから、食品サプリメントとして補うと効果的である。最近の研究により CoQ10 の合成量が低下している患者は、ミトコンドリア脳筋症になり、重篤な症状を示すということが報告され、遺伝病との関連性が注目されている。実際に、リー症候群の原因は、我々がその機能を明らかにした *PDSS2* 遺伝子の変異である。CoQ10 と遺伝病との関連性が蓄積している一方で、実際は CoQ 生合成が未だ完全解明されていない現状である (引用文献①)。

2. 研究の目的

コエンザイム Q は生体内において電子伝達系の必須成分として重要な機能を果たしている物質でありながら、その生合成経路が完全解明されていない。むしろ、最近の研究から、当初考えられていた以上に、多数の酵素が CoQ の合成経路に関与していることが少しずつ明らかになってきている (引用文献②)。そこで、本研究の目的は、酵母におけるコエンザイム Q 生合成の全容解明とその知見をヒトの遺伝

病の理解に貢献させようとするものである。

コエンザイム Q 生合成の全容解明に向けた研究を進めるため、特に 4 つの方向で研究を推進した。第一に分裂酵母の CoQ10 を合成できない株を利用し、その株で蓄積してくる前駆体の解析を進めた。第 2 に分裂酵母内で、他の生物種で知られている遺伝子を発現させ機能的な相補性を検討した。第 3 に分裂酵母の破壊株ライブラリーを活用し、CoQ を合成できないあるいは合成能力が低下している株のスクリーニングを行なった。第 4 に CoQ 結合タンパク質の解析を進めた。

3. 研究の方法

分裂酵母の遺伝学的手法は、スタンダードな方法によった。コエンザイム Q の分析は HPLC によって行なった。中間体生成物の解析には、質量分析機、MALDI Synapt G2 HDMS (Waters) あるいは Xevo TQ MS (Waters) を使用した。

4. 研究成果

本研究では下記の実験を行い、それぞれの課題で進展させることができた。

(1) CoQ を合成できない分裂酵母の破壊株を 10 種類作成し、それぞれの破壊株の性質を調べ、反応直前の前駆体らしきものの蓄積を詳細に調べた。その結果、*coq3*, *coq4*, *coq8*, *coq9* の破壊株では直前の前駆体を検出できず、PHB プレニルニリン酸が蓄積していた。一方、*coq7* 破壊株では直前の前駆体であるデメトキシユビキノンが蓄積していた。分裂酵母の *coq5* 破壊株では 2 つの前駆体が蓄積することを LC-

MS 解析により見いだしたことから、さらに MS/MS 解析や同位体を用いた解析を行なった。Coq5 はメチルトランスフェラーゼとして、キノン骨格の修飾に関わる酵素であることから、1 つは、直前の前駆体であるデメチルデメトキシユビキノンであった。もう 1 つの中間体は、さらに反応が進行した物質であった。安定同位体を用いた実験により、分裂酵母において、pABA と PHB の両方を初発物質とした経路が存在することを明らかにした (図 1)。

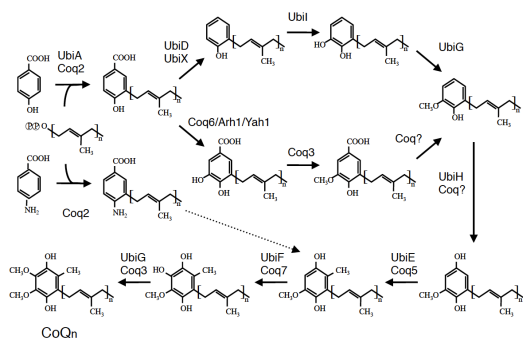


図 1 コエンザイム Q 生合成経路

(2) これまでに CoQ の合成に関わる遺伝子に関しては原核生物よりは多数の遺伝子をクローン化しているが、ヒトや植物ではその全容は解明されていない。そこで、すでに決定されているヒトやアラビピシスの cDNA を分裂酵母内で発現させ、機能的な相補性試験を行なった。特にヒト由来の CoQ 合成酵素遺伝子を酵母内で発現させその機能を調べる実験を進めた。それぞれの生物由来の遺伝子を分裂酵母内で発現させたところ、*coq2* から *coq8* までの各種遺伝子は、その機能を相補することができた (発表論文 3)。一種類の遺伝子だけで機能しない場合があるので、2 種類の遺

伝子を同時発現させる実験も検討し、Dps1 と Dlp1 は両方発現させて初めて機能することを見いだした。アラビピシスには *coq7* に相当する遺伝子の存在は認められなかった。ヒトやアラビピシスの *COQ9* 遺伝子だけは、分裂酵母の *coq9* 欠損株での相補性を示さなかった。その理由ははっきりとしないが、線虫などでは *COQ9* 遺伝子が存在しないことから生物種に特有の反応を担っていると考えている。ヒトの遺伝病において、*COQ2* 変異が見いだされていることからその変異体の影響を調べた。ヒトの *COQ2* 遺伝子は分裂酵母内で機能し、活性に重要な変異の位置も明らかにした。

(3) 分裂酵母の破壊株ライブラリーを活用し、CoQ を合成できないあるいは合成能力が低下している株のスクリーニングを行なった。その際、CoQ 合成に直接関与する新規の遺伝子の発見を目指すと同時に、CoQ 合成の制御に関わる遺伝子を探索した。その結果、プロテインキナーゼ A が CoQ 合成に影響することを見いだした。さらに、分裂酵母の CoQ 合成を制御する機構を知るために、各種条件や各種遺伝子の影響を調べたところ、特にグルコースの影響が大きく、その制御機構にはプロテインキナーゼ A が中心的に関与していた。分裂酵母の CoQ 合成を上昇させるために、CoQ 合成に直接関わる遺伝子の増強を行なったが、あまり効果はなく、むしろ CoQ 生合成の初発物質として知られる p-ヒドロキシ安息香酸より上流の代謝経路を改変することが有効であった (発表論文 2)。

(4) CoQ 結合タンパク質 (Coq10) の解析を進めた。CoQ 結合タンパク質は、大腸菌からヒ

トまで保存されているタンパク質であることから、その機能は非常に重要であると考えている。そこで Coq10 タンパク質の機能について、変異体解析を進めることによって、結合能力への影響、呼吸鎖への影響、酵素活性の変動などを調べた。CoQ 結合タンパク質の変異体の作成と CoQ 結合部位の同定を進めたところ、その結合部位の推定ができた。その部位の変異体を作成したところ、結合活性が著しくて以下したことから、CoQ の結合に重要なアミノ酸残基が同定できた（発表論文 4）。

これまでの研究成果を包括的に概観し、それを纏めたレビューを執筆した（発表論文 1）。その中で、コエンザイム Q 合成酵素複合体形成のモデル（図 2）や、遺伝病との関連について記載した。さらに、コエンザイム Q をシクロデキストリンで包括させ、分裂酵母の *coq* 欠損株に投与した時に、最小培地における生育の回復が見られ、部分的に機能が相補できることを示した（公表論文 5）。

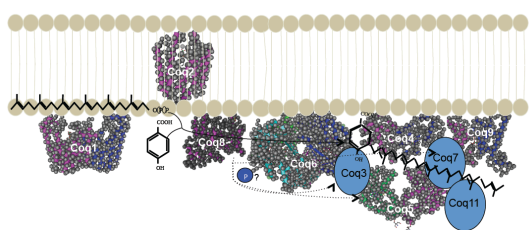


図 2. コエンザイム Q 合成酵素複合体

<引用文献>

- ①川向 誠、コエンザイム Q10 生産微生物の開発、生物工学会誌、2011. 89:323-325
- ②Allan CM, Awad AM, Johnson JS, Shirasaki DI, Wang C, Blaby-Haas CE, Merchant SS, Loo JA, Clarke CF. Identification of Coq11, a

new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 2015. 290, 7517-7534.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- 1) Makoto Kawamukai. Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes. 2016. 80:23-33 *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 DOI:10.1080/09168451.2015.1065172
- 2) Daisuke Moriyama, Kouji Hosono, Makoto Fujii, Motohisa Washida, Hirokazu Nanba, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai. Production of CoQ10 in fission yeast by expression of genes responsible for CoQ10 biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 2015. 79(6):1026-1033. DOI: 10.1080/09168451.2015.1006573.
- 3) Kazuhiro Hayashi, Yuko Ogiyama, Kazumasa Yokomi, Tsuyoshi Nakagawa, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai. Functional conservation of coenzyme Q biosynthetic genes among yeasts, plants, and humans. PLoS One. 査読有 2014. 9(6):e99038. DOI: 10.1371/journal.pone.0099038. eCollection 2014.
- 4) Masatoshi Murai, Kohei Matsunobu, Sawako Kudo, Kentaro Ifuku, Makoto Kawamukai, and Hideto Miyoshi. Identification of the binding site of the quinone-head group in mitochondrial Coq10 by

photoaffinity Labeling. *Biochemistry*
査読有 2014. 53:3359-4003 DOI:
10.1021/bi500347s

- 5) Tatsuro Nishida, Tomohiro Kaino, Ryo Ikarashi, Daisuke Nakata, Keiji Terao, Masahiro Ando, Hiroo Hamaguchi, Makoto Kawamukai, Tatsuyuki Yamamoto. The effect of coenzyme Q10 included by gamma-cyclodextrin on the growth of fission yeast studied by microscope Raman spectroscopy. *J. Molecular Structure*. 査読有 2013. 375-381

[学会発表] (下記3件他、計18件)

1. 川向 誠・戒能智宏、コエンザイム Q10 の生合成と微生物生産、日本農芸化学会 2016 年度大会、(札幌コンベンションセンター、札幌)、2016 年 3 月 29 日
2. Makoto Kawamukai. Biosynthesis of CoQ10 in fission yeast. The 8th international CoQ10 association. (Bologna, Italy), 9th, Oct., 2015
3. Shiomi Mochizuki, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai. CoQ and respiration in *Schizosaccharomyces japonicus*. The 8th fission yeast international meeting, (Ikuta Kaikan, Kobe), 22nd, Jun, 2015

[図書] (計3件)

- 1) 川向 誠, 戒能智宏, CoQ の生合成と欠損症 (第 4 章) 「コエンザイム Q10 の基礎と応用」(山本順寛編) 査読有、丸善、(2015)

- 2) 川向 誠, 戒能智宏, 太田明徳, 福田良一, 脂質の代謝、「酵母の生命科学と生物工学: 原島 高木編」査読有、化学同人 (2013)

- 3) 山本達之、川向 誠、寺尾啓二、濱口宏夫、第 17 章 シクロデキストリン包摂体が分裂酵母の生育に及ぼす効果、「シクロデキストリンの化学と技術」(寺尾、池田監修第 5 編)、査読有、CMC 出版、170-175 (2013)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川向 誠 (KAWAMUKAI Makoto)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 70186138

(2) 研究分担者

戒能 智宏 (KAINO Tomohiro)
島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 90541706

(3) 連携研究者

松尾 安浩 (MATSUO Yasuhiro)
島根大学・生物資源科学部・助教
研究者番号: 70596832

(4) 研究協力者

柳井 良太 (YANAI, Ryota)
望月 汐美 (MOCHIZUKI, Shiomi)
横見 和誠 (YOKOMI, Kazumasa)