

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660060

研究課題名(和文) 非メバロン酸経路中間体を基質とするプレニル基転移酵素の探索と高分子合成への応用

研究課題名(英文) Search for prenyltransferases that accept as a substrate an intermediate of the non-mevalonate pathway and the application of them for polymer synthesis

研究代表者

邊見 久 (HEMMI, Hisashi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：60302189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌へのカロテノイド生合成遺伝子の導入と阻害剤を用いた検証により、*Corynebacterium glutamicum*由来のプレニル基転移酵素がC40カロテノイド前駆体への4-ヒドロキシ 3-メチルブテニル二リン酸(HMBPP) 2分子の転移反応を触媒し、C50カロテノイドを生合成していることを示した。これはHMBPPをドナー基質とする酵素の2例目の発見である。また、各種プレニル基転移酵素の基質特異性を再検証することにより、同じくHMBPPをドナー基質とする酵素を複数見出した。さらに、通常はドナー基質となるジメチルアリル二リン酸をアクセプター基質として受け入れる酵素も発見した。

研究成果の概要(英文)：The involvement of a prenyltransferase from *Corynebacterium glutamicum* in the biosynthesis of C50 carotenoid from a C40 precursor and two molecules of 4-hydroxy 3-methylbutenyl diphosphate (HMBPP) was shown by the introduction of carotenogenic genes into *Escherichia coli* and by the analysis using an inhibitor. This is the second finding of the enzyme that utilizes HMBPP as a donor substrate. In addition, by reviewing the substrate specificities of various types of prenyltransferases, we found a few enzymes that also accept HMBPP as a donor substrate, and an enzyme that accepts dimethylallyl diphosphate, which usually acts as a donor substrate, as an acceptor substrate.

研究分野：農学

キーワード：酵素経路 プレニルトランスフェラーゼ イソプレノイド メチルエリスリトールリン酸経路 メバロン酸
経路 カロテノイド

1. 研究開始当初の背景

プレニル基転移酵素はアリル性プレニル二リン酸をドナー基質とし、その二リン酸基の脱離にともなったプレニル基のアクセプター基質に対する転移反応を触媒する酵素の総称である。ドナー基質としては、イソペンテニル二リン酸 (IPP) の異性化によって得られるジメチルアリル二リン酸 (DMAPP) および IPP と DMAPP の縮合によって得られるプレニル二リン酸やその修飾化合物 (フィチル二リン酸など) が用いられるが、植物サイトカイニン的一种である *trans* ゼアチンの生合成では、メチルエリスリトールリン酸経路における IPP/DMAPP の生合成前駆体である 4-ヒドロキシ 3-メチルプテニル二リン酸 (HMBPP) がドナー基質となることが報告されていた。これは IPP、DMAPP を経ない例外的なイソプレノイドの生合成であり、きわめて興味深い。我々はイソプレノイドの水酸化反応に関する研究を進めており、その中で、真正細菌 *Corynebacterium glutamicum* が生産するデカプレノキサンチンやフラブキサンチンなどの水酸基を有する C50 カロテノイドが HMBPP をプレニルドナー基質として生合成されている可能性に気づいた (図 1)。

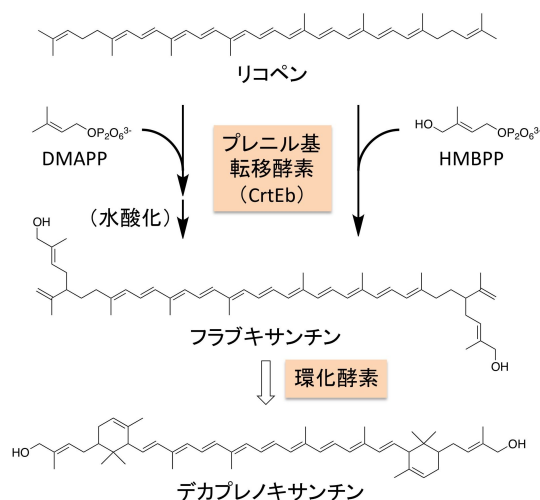


図 1 *C. glutamicum* の C50 カロテノイド生合成経路と CrtEb の予想される機能

2. 研究の目的

C. glutamicum において C50 カロテノイド生合成に関わるプレニル基転移酵素 CrtEb は、*trans* ゼアチン合成酵素とは異なったファミリーに属している。まずは同酵素が HMBPP を基質とするか否かを確認することを本研究の目的とした。もし我々の仮説が正しければ、同酵素は HMBPP を基質とするプレニル基転移酵素の第 2 の発見例となり、さらに、それらの酵素とは異なるファミリーに属する多様なプレニル基転移酵素によっても HMBPP が基質として用いられている可能性が示唆される。そこで、過去の研究によってすでに単離済みの複数種類のプ

レニル基転移酵素について、HMBPP をドナー基質とするか否かを確認することにした。一部のプレニル基転移酵素の反応はアリル性カルボカチオンを経由すると考えられており、もしそのような酵素が、電子吸引基である水酸基を有する HMBPP をドナー基質とするのであれば、それは同種酵素の反応機構の議論に大きく影響する結果である。さらに、アクセプター基質についても、HMBPP をはじめとしたアナログ化合物に対する反応性を調べることにした。これらの試みによってプレニル基転移酵素の基質特異性についての再検証を行うことが本研究の第 2 の目的である。特に、HMBPP をアクセプターとした場合には、プレニル基が水酸基に付加してエーテル結合が形成される可能性も期待した。その場合、連続した HMBPP の縮合は高分子エーテル化合物を与えうるからである。

3. 研究の方法

(1) *C. glutamicum* 由来 CrtEb の遺伝子 *crtEb* を *Pantoea ananatis* 由来のカロテノイド生合成遺伝子 *crtE*, *crtB*, *crtI* とともに同一のプラスミド中に挿入し、これを大腸菌に導入した。この形質転換大腸菌から脂質を抽出し、逆相カラムに接続した HPLC で分析することにより、カロテノイド生産を観察した。また、アフィニティータグを融合した CrtEb を大腸菌に発現させ、その精製と活性測定も試みた。次に、遺伝子破壊によって HMBPP 生産能を失った、もしくは HMBPP を蓄積するようになった大腸菌変異株の作製を試みた。HMBPP を経由しない IPP/DMAPP 生合成経路であるメバロン酸経路の全遺伝子を組み込んだプラスミド pJBEI-2999 をあらかじめ大腸菌に導入し、その後 *dxr*, *ispG*, *ispH* といった大腸菌ゲノムに存在するメチルエリスリトールリン酸経路の遺伝子を RED 組換え法により欠損させることにした。このうち *ispH* のみが HMBPP の下流、その他は上流の反応を触媒する酵素の遺伝子である。また、メチルエリスリトール経路特異的な阻害剤である FR900098 を、同じくメバロン酸経路を組み込み済みの大腸菌の培地に加えることで、同菌におけるカロテノイド生産への影響を調べた。

(2) すでに単離済みの複数種類のプレニル基転移酵素を大腸菌に異種発現させ、各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。in vitro の反応において、HMBPP などの本来の基質以外の化合物を与えることで、それらの基質特異性を再検証した。反応条件は各酵素に合わせたが、例えば DMAPP、もしくはプレニル二リン酸への IPP の連続的縮合を触媒するプレニル二リン酸合成酵素の場合、放射標識した基質を用いて酵素反応を行い、生成物をホスファターゼ処理してアルコー

ル体に変換したのちに逆相 TLC で分析した。興味深い生成物については HPLC を用いて精製を行い、LC-MS や NMR により構造を決定した。

4. 研究成果

(1) *P. ananatis* 由来の3つの遺伝子を有する大腸菌は C40 カロテノイドであるリコペン生産能を示すことが知られている。この大腸菌に *crtEb* 遺伝子を追加導入することにより、水酸基を有する C50 カロテノイドであるフラブキサンチンを生産させることに成功した。そもそも *CrtEb* は DMAPP をドナー基質とするプレニル基転移酵素として報告されており、その後の水酸化反応については、*CrtEb* がプレニル基転移反応と同時に触媒するのか、それとも水酸化酵素が別に存在するのかは曖昧なままであった。今回導入した *C. glutamicum* 由来の遺伝子は *crtEb* のみであり、それ以外の遺伝子は導入していない。さらに、新たに転移されるプレニル基における水酸基の位置は、プレニル基転移反応に連動した水の付加では説明できず、もし転移反応の後に水酸化反応が触媒されるのであれば、ヘムなどの補酵素を要求する酵素による触媒が必要とされる。しかし、*CrtEb* 中には既知水酸化酵素に類似したドメインが存在しない。以上の事実から、フラブキサンチンの水酸基は *CrtEb* によるプレニル転移反応の前にすでに存在していることが強く示唆された。つまり、大腸菌内在のメチルエリスリトールリン酸経路によって得られる HMBPP が C50 カロテノイドの生合成前駆体であることが予想される。なお、メチルエリスリトールリン酸経路は *C. glutamicum* にも存在するため、同菌においても HMBPP が *CrtEb* のドナー基質だと予想される。

しかし、*CrtEb* を上述の大腸菌細胞から精製し、*in vitro* の反応によってプレニル基転移酵素活性を確認することはできなかった。他にも種々の発現系を検討したが、膜酵素ということもあって大量発現には成功しなかった。また、遺伝子破壊により大腸菌における HMBPP 生産量を増減させ、そのカロテノイド生産への影響を確認しようとする試みはいずれも失敗した。おそらくメチルエリスリトールリン酸経路が大腸菌の生育にとって重要であり、pJBEI-2999 を用いたメバロン酸経路の導入によってもその欠損が相補できなかったことが原因だと考えられる。そこでメチルエリスリトールリン酸経路の特異的阻害剤 FR900098 を、メバロン酸経路を導入した C50 カロテノイド生産大腸菌の培地に添加したところ、前駆体である C40 カロテノイドの生産量に比べて C50 カロテノイドの生産量に与える影響がより大きいことが分かった。阻害剤の添加によって大腸菌の生育そのものも悪化してしまったため厳密に判断することは難しいが、この結果はフラブキサンチンが C40 カロテノイド前駆体で

あるリコペンへの2分子の HMBPP の付加により生合成されていることを示唆している。この結果より、*CrtEb* は HMBPP を基質とする2例目のプレニル基転移酵素だと考えられる。

(2) 過去に取得した、様々なファミリーに属するプレニル基転移酵素を精製し、これらの反応に HMBPP を加えてそれらのドナー基質に関する特異性を調べた。その結果、好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素をはじめ、一部の酵素が HMBPP をドナー基質として受け入れることが分かった。その中には過去の研究によってアリル性カルボカチオンを反応中間体とすることが確認されている、全 *trans* 型プレニルニリン酸合成酵素が含まれており、カルボカチオンを不安定化するであろう4位水酸基を持った HMBPP が、それらの基質となることは驚きであった。ドナー基質として HMBPP を受け入れる酵素はいずれもメチルエリスリトールリン酸経路を持たず、メバロン酸経路によって IPP や DMAPP といったイソプレノイド前駆体を合成する生物由来であった。このことは、内在の HMBPP に接触する可能性のある酵素が、本来の基質である DMAPP の代わりに HMBPP を誤って取り込むことのないよう基質特異性を進化させていることを示唆している。それらの酵素には何らかの制御機構が存在すると予想され、現在その解明を進めている。

一方で、HMBPP はプレニル基転移酵素のアクセプター基質としては全く機能しなかった。しかし、アクセプター基質に対する特異性の再検証の結果、ある種のプレニルニリン酸合成酵素が、通常ドナー基質となる DMAPP をアクセプター基質として受容することを新たに見出した。同酵素はメタン生成古細菌 *Methanosarcina acetivorans* 由来の *cis* 型プレニルニリン酸合成酵素であり、主反応であるプレニルニリン酸への head-to-tail 型の IPP の連続的縮合反応に加えて、ファルネシルニリン酸と DMAPP 間の non-head-to-tail 型の縮合反応を触媒する。前者の反応の生成物は糖キャリア脂質の生合成前駆体として用いられると推察される。一方、後者の反応の生成物は、分析の結果、新奇ジテルペン化合物として同定され、ゲラニルラバンジュリルニリン酸(図2)と命名した。この結果は、既知の様々なプレニル基転移酵素が同様の副反応によって新奇化合物を合成する能力を有していることを示唆しており、今後の解明が待たれる。

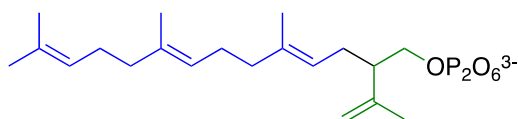


図2 ゲラニルラバンジュリルニリン酸

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Takuya Ogawa, Koh-ichi Emi, Kazushi Koga, Tohru Yoshimura, and Hisashi Hemmi, A *cis*-prenyltransferase from *Methanosarcina acetivorans* catalyzes both head-to-tail and nonhead-to-tail prenyl condensation, FEBS Journal, 査読有、in press
DOI: 10.1111/febs.13749

[学会発表](計 4件)

小川拓哉、吉村 徹、邊見 久、メタン生成アーキア由来のシス型プレニルトランスフェラーゼホモログに触媒される head-to-tail 型 および non-head-to-tail 型縮合、2015年度日本農芸化学会大会、2015年3月27日、岡山大学(岡山県岡山市)

邊見 久、森 健、磯部圭祐、小川拓哉、吉村 徹、*Methanosarcina acetivorans* においてヒドロキシアーキオールコア脂質の生合成に関与する推定ヒドラターゼ遺伝子、日本 Archaea 研究会第28回講演会、2015年7月23日、愛媛大学(愛媛県松山市)

邊見 久、小川拓哉、吉村 徹、メタン生成アーキアのシス型プレニルトランスフェラーゼホモログによる分岐型プレニルニリン酸の合成、第25回イソプレノイド研究会例会、2015年9月14日、東北大学(宮城県仙台市)

邊見 久、小川拓哉、江見晃一、吉村 徹、分岐型プレニルニリン酸を与えるメタン生成古細菌由来酵素の研究、2015年度農芸化学会中部・関西支部合同大会、2015年9月20日、富山県立大学(富山県射水市)

林 佳史、祖父江史明、伊藤智和、吉村 徹、邊見 久、*Corynebacterium glutamicum* 由来 C50 カロテノイド合成酵素 CrtEb のプレニルドナー基質の解明、BMB2015、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

邊見 久(HEMMI, Hisashi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号: 60302189

(4)研究協力者

小川 拓哉(OGAWA Takuya)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生

林 佳史(HAYASHI Yoshifumi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生