

令和元年6月18日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14911

研究課題名(和文) 既知イソペンテニルニリン酸異性化酵素ホモログが関与しない生合成経路の解明と利用

研究課題名(英文) Elucidation and utilization of biosynthetic pathway not involving known isopentenyl diphosphate isomerase homologs

研究代表者

佐藤 努 (Sato, Tsutomu)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：80334655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ファルネシルニリン酸合成酵素がイソペンテニルニリン酸のみを基質としてファルネシルニリン酸を合成した。この結果は、ファルネシルニリン酸合成酵素がイソペンテニルニリン酸異性化酵素活性を持つことを示唆していた。つまり、二機能性のイソペンテニルニリン酸異性化酵素/ファルネシルニリン酸合成酵素を初めて見出すことができた。現在、触媒機構の解明を目指した研究を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型酵素や二機能性酵素が関与するイソプレノイド生合成の新規基幹経路や新しい触媒機構の解明は、生物有機化学の基礎研究として重要なだけでなく、薬剤・香料・バイオ燃料などのバイオ生産や医薬開発などの応用に新しい展開をもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Farnesyl diphosphate synthetase synthesized farnesyl diphosphate using only isopentenyl diphosphate as a substrate. This result suggested that it also has isopentenyl diphosphate isomerase activity. That is, it turned out that it is a bifunctional enzyme. Currently, we are conducting research aimed at elucidating the catalytic mechanism.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生合成 イソプレノイド テルペノイド

1. 研究開始当初の背景

イソプレノイドは、生命維持に必須な物質のほか、薬剤・香料・バイオ燃料などとして広く利用される化合物群であり、メバロン酸(MVA)経路/非メバロン酸(MEP)経路と呼ばれる2つの経路のどちらかを經由して合成される(図1A)。イソペンテニルニリン酸(IPP)異性化酵素(IDI)は、この両方の経路における律速酵素の一つであり、全てのイソプレノイドの生合成を律速している。このため生物合成による有用イソプレノイドの生産において、IDIの活性向上が重要な課題となっている。

申請者らは、MEP経路遺伝子を所有する60%以上の真正細菌が、既知IDIホモログをもっていないことを見出した(未発表)。また申請者らはIDIのすぐ下流に位置するファルネシルニリン酸(FPP)合成酵素(FPPS)がFPPS活性に加えてIDI活性をもつ、つまり二機能性IDI/FPPSであることを実験的に示した(図1B下、未発表)。これらの事実は、MEP経路におけるIDI反応に従来型のIDIに加えて二機能性IDI/FPPSが関わる事を強く示唆している。

さらに興味深いことに、MVA経路遺伝子を所有する3種類の真正細菌(共生細菌ではない)が、既知のIDIホモログをもっていないことを発見した(図1A上、未発表)。MVA経路においてIDIは必須であることから、既知IDIとは異なる新型IDIが存在するか、またはこの経路上でも二機能性IDI/FPPSが働いているか、のどちらかであることは間違いない(図1B上)。

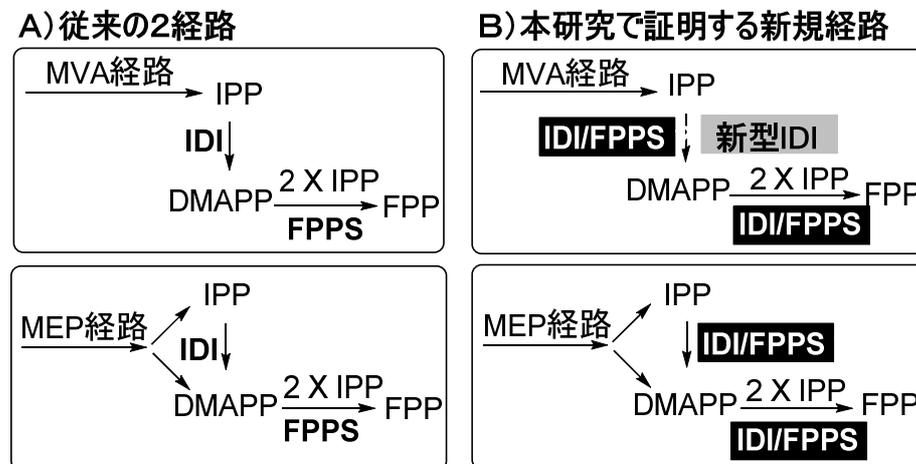


図1 従来の2経路(A)と本研究で証明する新規経路(B)

2. 研究の目的

近年、薬剤・香料・バイオ燃料などの有用イソプレノイドの効率的かつ実用的な生産に向けた取り組みが盛んに行われている。その中で、目的の反応を触媒する酵素群を微生物に組み込むバイオ生産技術が環境調和性から大きな注目を集めているが、その生産効率の向上が大きな課題となっている。

本研究では、60,000種に及ぶイソプレノイド生合成の全てに関わり、イソプレノイド生合成経路の律速段階となっているイソペンテニルニリン酸異性化反応の効率化に挑戦する。具体的には、従来型とは異なる新しいタイプのイソペンテニルニリン酸異性化酵素の同定とその触媒機構の解明から、これまでの壁を打ち破る有効な生物合成系の樹立を目指す。

本研究はイソプレノイドの基幹経路に、既知IDIホモログではなく、新型IDIや二機能性IDI/FPPSが関与する経路が存在する事を証明し、これら新しい酵素をイソプレノイド生物合成

に利用する。

- 1) 新型 IDI や二機能性 IDI/FPPS が関与するイソプレノイドの新規基幹経路が自然界に広く存在する事を示す。
- 2) 新型 IDI や二機能性 IDI/FPPS がどのように反応を触媒するのか(触媒機構)を明らかにする。
- 3) 新型 IDI や二機能性 IDI/FPPS をイソプレノイドの生物合成に利用し、有用イソプレノイドの実用的生産における有効性を示す。

3. 研究の方法

イソプレノイド合成の基幹経路に二機能性 IDI/FPPS や新型 IDI が関与することを示し、これを様々なイソプレノイドの生物合成に利用するため、以下の研究項目を予定している。

- 1) IDI/FPPS 候補の解析を行い、IDI/FPPS が自然界に広く存在する事を示す。
- 2) MVA 経路を有する真正細菌由来の IDI/FPPS 候補が IDI 活性をもたない場合は、新型 IDI の探索を行う。
- 3) IDI/FPPS や新型 IDI の立体構造と部位特異的変異解析を組み合わせ、触媒機構を解明する。
- 4) 大腸菌と酵母のスクアレン(イソプレノイドの一種)大量生産系において IDI/FPPS や新型 IDI を利用する。また、スクアレン以外の有用イソプレノイドの生物合成にも利用する。

4. 研究成果

1) 以前、 $[1-^{14}\text{C}]$ IPP を用いた E-PT1 の伸長反応が行われ、E-PT1 は DMAPP と IPP を基質とした FPPS であることを同定し、さらに IPP のみを基質とした場合においても FPP まで伸長するという実験結果を得た。このことから E-PT1 の IDI 活性が推測された。その時に得られた実験結果の再現性を確認するため、精製した E-PT1 を用いて再現性実験を行った。E-PT1 と $[1-^{14}\text{C}]$ IPP のみ、コントロールとして $[1-^{14}\text{C}]$ IPP と DMAPP を基質にして反応させた。また、同反応を C25/C30/C35 合成酵素 E-PT2S/L でも行い、他酵素で IPP 異性化反応が起きないことと、IPP に DMAPP が混入していないことを確認した。

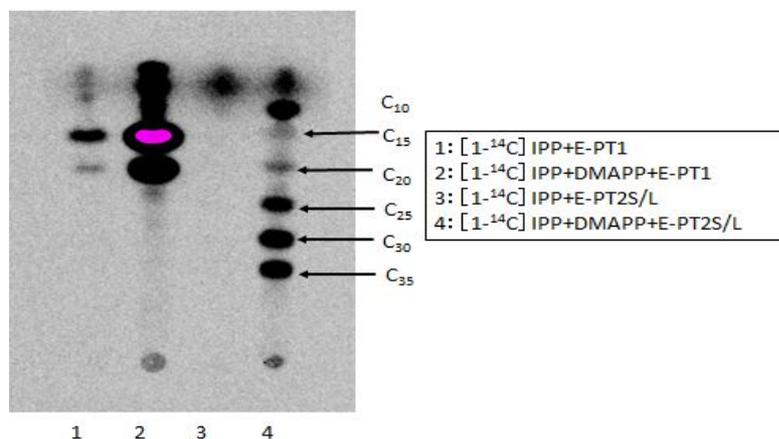


Fig. 1 酵素反応生成物の Radio-TLC による分析

その結果、E-PT1のIPPのみを基質にしても伸長するという再現性を得ることができた (Fig. 1)。また、レーン3では伸長を確認できなかったがレーン4では確認できた (Fig. 1)。これによって使用していた [1-¹⁴C] IPPにはDMAPPが含まれておらず、E-PT1がIPPのみを基質に伸長反応できる、つまりIDI活性を持っていることを明確に示すことができた (Fig. 1)。

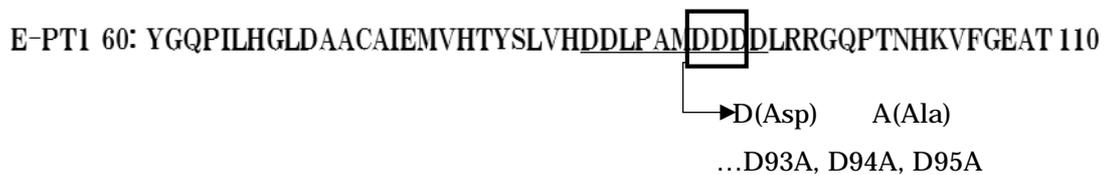
次に、E-PT1の *in vivo*におけるIDI活性を証明するために、pMW118-*idi*, pMW118-*e-pt1*, 及び pMW118 空ベクターを用いて *E. coli* DK331 株を形質転換し、生育テストを行った。*E. coli* DK331 株は、非メバロン酸経路のDXP還元異性化酵素遺伝子 *dxp* とIPP異性化酵素遺伝子 *idi* を欠損させた大腸菌破壊株で、非メバロン酸経路中間体のCDP-MEに相当する2-C-methylerythritol(ME)存在下で生育できる。

今回は、DK331株にメバロン酸経路のMVAキナーゼ、pMVAキナーゼ、DPMVAキナーゼをコードしているpTMV20S Mを形質転換しており、0.005%メバノラクトン(MVL)添加LB培地にてこのDK331株を培養すれば、IPPの生成が可能になっている。つまり、非メバロン酸経路は機能していないものの、メバロン酸経路のMVAより下流の酵素を保持しているため、メバロン酸経路のMVAに相当するMVLを添加すれば、メバロン酸経路が機能しIPPを生成することができ、IDI存在下であれば生育することができる。したがって、生育の有無によってIDIの存在を確認することができる。本実験ではコントロールとしてpMW118-*idi* とpMW118ベクターを、サンプルとしてpMW118-*e-pt1*を形質転換し、生育の有無を観察した。E-PT1のIDI活性を証明するためには以下の結果が予想される。

	+MVL	-MVL
pMW118	-	-
<i>E. coli</i> IDI	+	-
E-PT1	+	-

pMW118-*idi*, pMW118-*e-pt1*, pMW118は、液体培地及びプレートで生育は見られなかった。ポジティブコントロールであるpMW118-*idi*でも生育は見られなかったのでMVLが生育には十分でなかったと考えた。そこで、MVLを0.005%から0.02%に変更して生育テストを再び行った。しかし、すべて生育しなかった。これは、pMW118と菌体との相性が悪く、発現がうまく成されなかったことが要因の1つであると推測している。結果として、*in vivo*におけるE-PT1のIDI活性は証明できなかった。現在、*in vivo*の系での証明を目指して、さらにベクターや培養条件を検討している。

2) DDx₂₋₄Dモチーフ(FARM)は、E型プレニル鎖伸長酵素に共通して見いだされ、触媒機能発現や基質結合に重要である。E-PT1のFARMは、⁸⁶DDXXXDDD⁹⁵であり、Asp残基が多く存在していた。この93残基から95残基のAspがイソメラーゼ活性に関与していると考え、Quickchange法を用いてAsp残基をAla残基にした変異体を作成し、酵素反応生成物の解析を行った。



いずれかの Asp 残基が IDI 活性に関与していれば、[1-¹⁴C] IPP のみの酵素反応において、伸長反応を示さないと推測できる。

D93A、D94A、D95A すべての変異酵素において、[1-¹⁴C] IPP のみの酵素反応から生成物が認められるため、全ての Asp 残基は IDI 活性に関与していないことが示唆された。これまで IPP のみを基質にした場合 FPP までの伸長しか確認できていなかったが、D94A に関しては、IPP のみを基質にした場合でも GGPP まで伸長していた。このことから、94 残基は、鎖長決定に関与していることが示唆された。現在、さらに他のアミノ酸残基をターゲットにして、IDI 活性に関する残基の特定を行っている。

3) 基質アナログが結合した X 線結晶構造解析が成されている 1 種のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素が IDI 活性を持つことが判明した。三次元構造の詳細な解析から、IDI 活性に寄与する残基を推測し、変異酵素の機能解析を行っている。

4) 他の新型 IDI の候補のクローニングを現在進行中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Ueda, D., Matsugane, S., Okamoto, W., Hashimoto, M., Sato, T.*, A non-enzymatic pathway with superoxide in intracellular terpenoid synthesis., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, 57, 10347-10351.
- 2) Fujihashi, M.*, Sato, T.*, Tanaka, Y., Yamamoto, D., Nishi, T., Ueda, D., Murakami, M., Yasuno, Y., Sekihara, A., Fuku, K., Shinada, T., Miki, K.*, Crystal structure and functional analysis of large-terpene synthase belonging to a newly found subclass, *Chem. Sci.*, 2018, 9, 3754–3758.
- 3) Bartels, F., Hong, Y., Ueda, D., Weber, M., Sato, T.*, Tantillo, D.*, Christmann, M.*, Bioinspired synthesis of pentacyclic onocerane triterpenoids, *Chem. Sci.*, 2017, 8, 8285–8290.
- 4) Tenkovskaia, L., Murakami, M., Okuno, K., Ueda, D., Sato, T.*, Analysis of the catalytic mechanism of bifunctional triterpene/sesquiterpene cyclase: Tyr167 functions to terminate cyclization of squalene at the bicyclic step, *ChemBioChem*, 2017, 18, 1910-1913.

〔学会発表〕(計 32 件)

- 1) Bacillus 属細菌の新規イソプレノイド生合成経路, 佐藤 努, 日本農芸化学会, 4S23D6a1, 2019
- 2) クラス IB テルペン合成酵素の触媒反応の解析, 西智之・ラファエラ ステパノフ・菅原啓・上田大次郎・藤橋雅宏・三木邦夫・保野陽子・品田哲郎・佐藤 努, 日本農芸化学会, 1D2a02, 2019
- 3) Large-terpene 合成酵素の酵素的諸性質の解析と部位特異的変異, 西 智之・菅原 啓・小川佳央・高橋宏忠・上田大次郎・藤橋雅宏・三木邦夫・保野陽子・品田哲郎・佐藤 努, 第 62 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 263-265, 2018
- 4) Large-terpene 合成酵素の構造機能相関, 藤橋雅宏・佐藤 努・田中勇真・山本大輔・西 智之・上田大次郎・村上瑞気・保野陽子・関原あい・福 和真・品田哲郎・三木邦夫, イソプレノイド研究会, 20, 2018

- 5) *Bacillus* 属細菌由来テルペノイドのユニークな生合成経路の解析, 上田大次郎・松ヶ根沙織・西 智之・菅原啓・岡本渉・藤橋雅宏・三木邦夫・橋本昌征・保野陽子・品田哲郎・佐藤 努, イソプレノイド研究会, 21, 2018
- 6) Large-terpene 合成酵素の酵素的諸性質の解析と部位特異的変異, 西 智之・菅原 啓・小川佳央・高橋宏忠・上田大次郎・藤橋雅宏・三木邦夫・保野陽子・品田哲郎・佐藤 努, 日本蛋白質科学会, 64, 2018
- 7) スクアレン-アンブレイン環化酵素の創出:アンブレインはスクアレンから二つの経路を経由して一つの酵素により合成される, 山辺陽太・奥野琴音・井上真緒・上田大次郎・佐藤 努, 日本蛋白質科学会, 93, 2018
- 8) Large-terpene 合成酵素の構造と機能, 藤橋雅宏・佐藤 努・田中勇真・山本大輔・西 智之・上田大次郎・村上瑞気・保野陽子・関原あい・福 和真・品田哲郎・三木邦夫, 日本蛋白質科学会, 99, 2018

他 24 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 1 件)

名称:アンブレインの製造方法
発明者:佐藤 努、上田大次郎、星野 力
権利者:国立大学法人新潟大学
種類:特許
番号:特許第 6429243 号
取得年:平成 30 年
国内外の別:国内外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~satot/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:藤橋 雅宏

ローマ字氏名:FUJIHASHI, Masahiro

所属研究機関名:京都大学

部局名:理学研究科

職名:助教

研究者番号(8桁):10397581

(2)研究協力者

研究協力者氏名:葛山 智久

ローマ字氏名:KUZUYAMA, Tomohisa

研究協力者氏名:梅野 太輔

ローマ字氏名:UMENO, Daisuke