

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03806

研究課題名(和文) コエンザイムQの新規生合成経路の解明

研究課題名(英文) Novel pathway of coenzyme Q biosynthesis

研究代表者

川向 誠 (Kawamukai, Makoto)

島根大学・学術研究院農生命科学系・教授

研究者番号：70186138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：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働くと同時に、補酵素として、あるいは抗酸化物質としての機能を有している。CoQは生体内の重要な機能物質でありながら、その生合成経路が完全解明されていない。CoQ生合成の全容解明に向けた研究を進めるため、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。一連の研究で、グルコース濃度やプロテインキナーゼAの機能が低下するとCoQ合成量が増加すること、生合成にPHB以外にPABAを前駆体として利用すること、Benzoic acidがCoQ生合成の阻害効果を示すことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。そのような背景の基、酵母を用いてCoQ10の生合成を解明することは、病気の原因の解明にも繋がる重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：Coenzyme Q (CoQ, ubiquinone) is an essential component of the electron transport system in aerobic organisms. Human type CoQ10, which has 10 units of isoprene in its quinone structure, is especially valuable as a food supplement. Therefore, studying the biosynthesis of CoQ10 is important not only for increasing metabolic knowledge, but also for improving biotechnological production. Herein, we show that *Schizosaccharomyces pombe* utilizes p-aminobenzoate (PABA) in addition to p-hydroxybenzoate (PHB) as a precursor for CoQ10 synthesis. We explored compounds that affect the synthesis of CoQ10 and found benzoic acid inhibited CoQ biosynthesis without accumulation of apparent CoQ intermediates. This inhibition was counteracted by incubation with a 10-fold lower amount of PABA or PHB. Overexpression of PHB-polyprenyl transferase encoded by *ppt1* (*coq2*) also overcame the inhibition of CoQ biosynthesis by benzoic acid.

研究分野：遺伝子工学

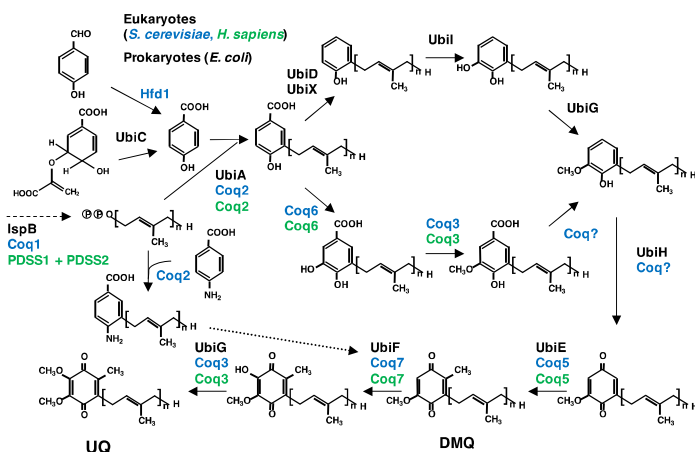
キーワード：coenzyme Q ubiquinone *S. pombe* fission yeast PHB PABA

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 (Saiki et al. FEBS J. 2005)。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のが現状である。酵母は、遺伝学的な解析、生化学的な解析、代謝物解析の全てが適用できることから優れた生物種であり、そこで得られた知見がヒトや植物の機能解析に大きく貢献する。コエンザイム Q の生合成解析においても、まず酵母での代謝が理解され、それを基にヒトの代謝経路を理解することで研究が発展してきた。そのような背景から、未知の反応経路は酵母での解析を優先的に進めることは重要であり、本研究の意義が高い。

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 (Kawamukai, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2018)。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* やヒトは側鎖のイソプレニル単位が 10 の CoQ₁₀ を生合成する。本研究の目的は、ヒトと同じコエンザイム Q₁₀ を生合成する分裂酵母を中心的な材料として、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。



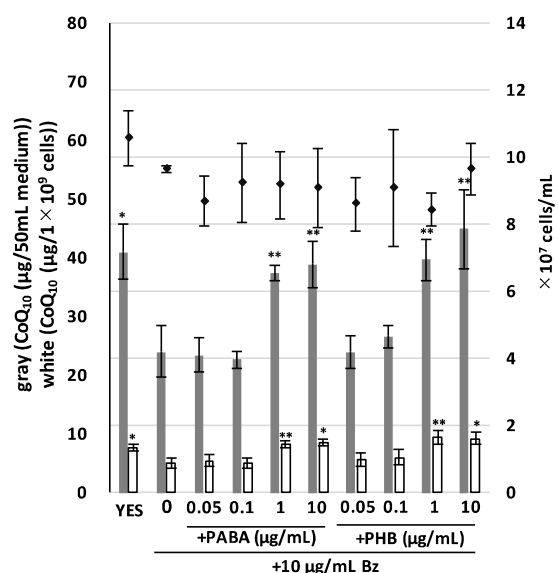
コエンザイム Q 生合成の全容解明に向けた研究を進めるため、特に 3 つの方向で研究を推進した。第一に分裂酵母の CoQ₁₀ を合成できない株を利用し、その株で蓄積してくる前駆体の解析を進めた。第 2 に分裂酵母内で、他の生物種で知られている遺伝子を発現させ機能的な相補性を検討した。第 3 に分裂酵母の 3400 種の破壊株ライブラリーを活用し、CoQ を合成できないあるいは合成能力が低下している株のスクリーニングを行ない、その中から顕著に合成量が低下している新規の CoQ₁₀ 合成に関わる遺伝子破壊株の解析を進めた。

3. 研究の方法

分裂酵母の遺伝学的手法は、標準的な方法によった (Moreno et al., Meth. Enzymol. 1991)。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。

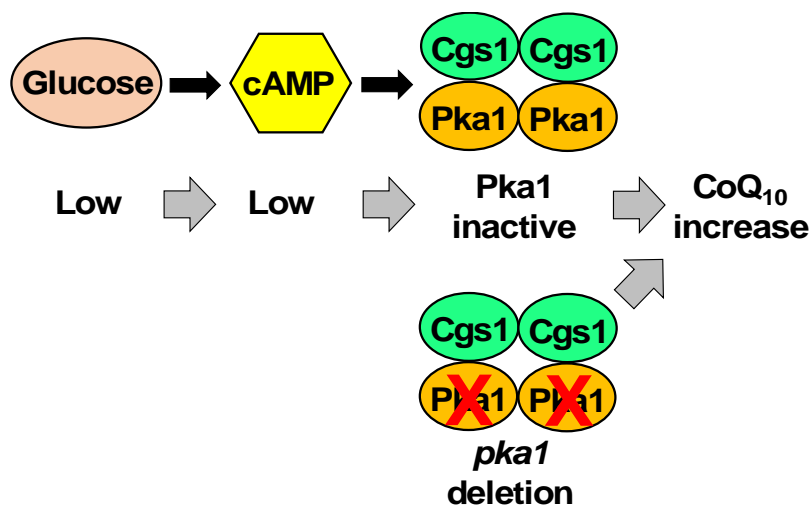
4. 研究成果

本研究では主に 3 つの方向の実験を行い、それぞれの課題を進展させることができた。(1) 分裂酵母 *S. pombe* が CoQ₁₀ の前駆物質として *p*-ヒドロキシ安息香酸 (PHB) だけではなく *p*-アミノ安息香酸 (PABA) も利用することを明らかにした (Nishida et al., PLoS One. 2019)。次に、CoQ₁₀ の生産性に影響を与える化合物を探索したところ、5 μg/mL 以上の安息香酸 (Bz) 添加により CoQ 生合成が顕著に阻害されることを見出だした。この阻害は、Bz よりも 10 倍低濃度の PABA もしくは PHB の同時添加により抑圧された。また、PHB-ポリプレニル基転移酵素をコードする *ppt1* (*coq2*) の過剰発現株において Bz による CoQ 生合成の阻害が緩和された。さらに、ヒトの *COQ2* を過剰発現する *S. pombe* の *ppt1* (*coq2*) 破壊株においても Bz は CoQ₁₀ 生合成を阻害し、またこの菌株でも PABA が CoQ₁₀ の前駆物質として利用されることを見出だした。このため、Bz は Coq2 によって触媒される PHB や PABA へのプレニル化反応を阻害することが示唆された。加えて、Coq4 の発現解析より、Bz が CoQ 生合成複合体を不安定化させることを推察した。



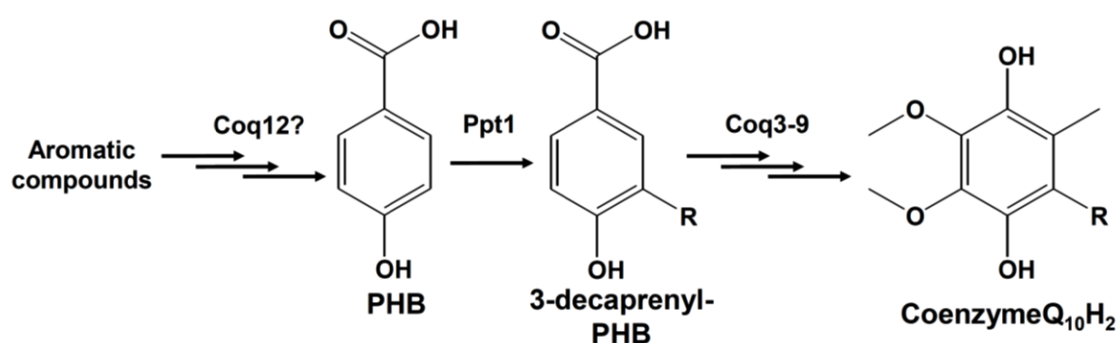
(2) 分裂酵母の破壊株ライブラリーを活用し、CoQ を合成できないあるいは合成能力が低下している株のスクリーニングを行なった。その際、CoQ 合成に直接関与する新規の遺伝子の発見を目指すと同時に、CoQ 合成の制御に関わる遺伝子を探索した。その結果、プロテインキナーゼ A が CoQ 合成に影響することを見いだした。さらに、分裂酵母の CoQ 合成を制御する機構を知るために、各種条件や各種遺伝子の影響を調べたところ、特にグルコースの影響が大きく、その制御機構にはプロテインキナーゼ A が中心的に関与していた (Nishida et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019)。分裂酵母は低濃度のグルコース存在下では増殖が停止し、それに伴い細胞内 CoQ₁₀ 量が増加する。分裂酵母における CoQ₁₀ の生合成はグルコース応答により制御されていることが示唆されたため、その主要経路である cAMP/PKA 経路に着目した。3%グルコースを含む YES 完全培地で *cgs1*、*cyr1*、*git3*、*gpa2*、*pka1* の各遺伝子単独破壊株の CoQ₁₀ 量を測定したところ、*cyr1*、*git3*、*gpa2*、*pka1* の CoQ₁₀ 量は野生株の約 1.5~2 倍に増加した。一方、

cgs1 は野生株の約 0.7 倍に CoQ₁₀ 量が減少した。この結果はグルコース濃度依存的に CoQ₁₀ 量が増加する結果と一致する。分裂酵母において CoQ₁₀ の生合成は PKA によって負に制御されている。



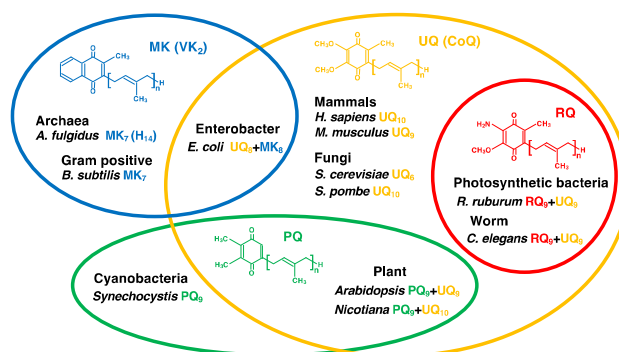
(3) *S. pombe* では、*dps1*、*dlp1*、*ppt1*、*coq3~coq9* の少なくとも 10 種の遺伝子が CoQ₁₀ の生合成に関与しており、それらの遺伝子破壊株は、CoQ₁₀ の生合成が欠損あるいは著しく低下しており、呼吸欠損、酸化ストレス感受性、最少培地上での生育遅延、硫化水素の発生などの表現型を示す。分裂酵母の CoQ 合成を上昇させるために、CoQ 合成に直接関わる遺伝子の増強を行なったが、あまり効果はなく、むしろ CoQ 生合成の初発物質として知られる *p*-ヒドロキシ安息香酸より上流の代謝経路を改変することが有効であった。CoQ の生合成経路は未知の反応ステップが複数存在しており、非必須遺伝子破壊株コレクションを用い、CoQ のキノン骨格部分に由来する *p*-ヒドロキシ安息香酸 (PHB) の生合成経路に関わるミトコンドリアの因子を探索した。その結果、CoQ₁₀ 含量

が明確に低下する菌株が得られ、CoQ 生合成に関与する新しい遺伝子を複数見出した。その中で PHB の代謝経路に関わる新しい遺伝子を *coq12* と命名した。*coq12* の破壊株は、他の CoQ 欠損株と同様の表現型を示したが、培地中への PHB や *p*-ヒドロキシベンズアルデヒド (PHBALD) の添加でそれらの表現型が抑圧され、CoQ₁₀ 生産性も回復した。また、GFP を融合させた Coq12-GFP は、ミトコンドリアに局在した。さらに、*coq12* 破壊株における様々な Coq タンパク質の発現を解析したところ、Coq4 や Coq5 の発現が低下した。これらのことから、Coq12 がミトコンドリアにおいてキノン骨格部分の生合成経路に関与する酵素であり、他の様々な Coq タンパク質の発現にも影響を与えることが示唆された。



これまでの研究成果を包括的に概観し、コエンザイム Q (ユビキノン) のみならず、メナキノン、プラストキノン、ロドキノン含め、生物が持つ多様なキノン類の生合成に関して、総説に纏めた (Kawamukai Biosci. Biotechcnol Biochem. 2018)。その中で、生物の有する多彩なプレニルキノンはその生物の電子伝達系の目的のために利用し、イソプレノイド側鎖長は様々な種類を有すること、生物種によっては 2 種類のキノンを利用していること、メナキノンは、古くから生存している生物に多く、好気的環境になるとコエンザイム Q に置き

換わっていることや、コエンザイム Q 合成酵素複合体形成のモデル、生合成に関わる酵素の立体構造が次々と決定されてきていること、コエンザイム Q と遺伝病との関連に最新の進展状況について記載した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 戒能智宏、川向誠	4. 巻 34
2. 論文標題 コエンザイムQ10増産技術の開発	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 バイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 63-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino Kohei, Kushima Misaki, Kaino Tomohiro, Matsuo Yasuhiro, Kawamukai Makoto	4. 巻 81
2. 論文標題 Urea enhances cell lysis of Schizosaccharomyces pombe ura4 mutants	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1444 ~ 1451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1303360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noothalapati Hemanth, Ikarashi Ryo, Iwasaki Keita, Nishida Tatsuro, Kaino Tomohiro, Yoshikiyo Keisuke, Terao Keiji, Nakata Daisuke, Ikuta Naoko, Ando Masahiro, Hamaguchi Hiro-o, Kawamukai Makoto, Yamamoto Tatsuyuki	4. 巻 197
2. 論文標題 Studying anti-oxidative properties of inclusion complexes of -lipoic acid with - cyclodextrin in single living fission yeast by confocal Raman microspectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 237 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.saa.2018.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawamukai Makoto	4. 巻 82
2. 論文標題 Biosynthesis and applications of prenylquinones	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 963 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1433020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morisada Shiho, Nishida Ikuhisa, Kawamukai Makoto, Horiuchi Hiroyuki, Fukuda Ryouichi	4. 巻 82
2. 論文標題 Suppression of respiratory growth defect of mutant deficient in mitochondrial phospholipase A1 by overexpression of genes involved in coenzyme Q synthesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1633 ~ 1639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1476124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaino Tomohiro, Tonoko Kai, Mochizuki Shiomi, Takashima Yuriko, Kawamukai Makoto	4. 巻 82
2. 論文標題 <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> has low levels of CoQ10 synthesis, respiration deficiency, and efficient ethanol production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1031 ~ 1042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1401914	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Ikuhisa, Yokomi Kazumasa, Hosono Kouji, Hayashi Kazuhiro, Matsuo Yasuhiro, Kaino Tomohiro, Kawamukai Makoto	4. 巻 103
2. 論文標題 CoQ10 production in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> is increased by reduction of glucose levels or deletion of <i>pk1</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 4899 ~ 4915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-09843-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Ikuhisa, Yanai Ryota, Matsuo Yasuhiro, Kaino Tomohiro, Kawamukai Makoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Benzoic acid inhibits Coenzyme Q biosynthesis in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0242616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wattanavichean Nungnit, Nishida Ikuhisa, Ando Masahiro, Kawamukai Makoto, Yamamoto Tatsuyuki, Hamaguchi Hiro o	4. 巻 13
2. 論文標題 Organelle specific simultaneous Raman/green fluorescence protein microspectroscopy for living cell physicochemical studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biophotonics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbio.201960163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomita Keisuke, Yashiroda Yoko, Matsuo Yasuhiro, Piotrowski Jeff S, Li Sheena C, Okamoto Reika, Yoshimura Mami, Kimura Hiromi, Kawamura Yumi, Kawamukai Makoto, Boone Charles, Yoshida Minoru, Nojiri Hideaki, Okada Kazunori	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome-wide Screening of Genes Associated with Momilactone B Sensitivity in the Fission Yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/g3journal/jkab156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kawamukai, M., Tonoko, K., Narahara, T., Nishida, I., Kaino, T
2. 発表標題 Biosynthesis of Coenzyme Q and its role in <i>S. pombe</i> and <i>S. japonicus</i>
3. 学会等名 The 10th international fission yeast meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishida, I., Yokomi, K., Hosono, K., Hayashi, K., Matsuo, Y., Kaino, T., Kawamukai, M
2. 発表標題 Coenzyme Q10 production in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> is increased by reduction of glucose levels or deletion of <i>pka1</i> .
3. 学会等名 The 10th international fission yeast meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 檜原拓之, 渡子 開, 西田郁久, 戒能智宏, 川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母 <i>S. japonicus</i> の CoQ 欠損株は, 最少培地でも生育し, 硫化水素を発生しない
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019 年度西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西原 昇瑚、西田 郁久、柳井 良太、戒能 智宏、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> のCoQ生合成に関するPos5の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020 年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田 郁久、戒能 智宏、松尾 安浩、川向 誠
2. 発表標題 安息香酸は分裂酵母のCoQ生合成を顕著に阻害する
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020 年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Kawamukai
2. 発表標題 A novel gene involved in CoQ biosynthesis in fission yeast
3. 学会等名 The 9th conference of the international Coenzyme Q10 association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Kawamukai
2. 発表標題 Coenzyme Q biosynthesis and application in yeasts and plants
3. 学会等名 The 23rd international symposium on plant lipids (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川向 誠
2. 発表標題 コエンザイムQの生合成と生産
3. 学会等名 第29回イソプレノイド研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田郁久、戒能智宏、川向誠
2. 発表標題 分裂酵母のCoQ生合成に関わる新規遺伝子
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川向 誠
2. 発表標題 コエンザイムQ生合成の新規遺伝子
3. 学会等名 日本農芸化学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田郁久、大森夕貴、柳井良太、松尾安浩、戒能智宏、川向誠
2. 発表標題 新規なコエンザイムQ生成遺伝子の発見
3. 学会等名 第27回イソプレノイド研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西田郁久、柳井良太、松尾安浩、戒能智宏、川向誠
2. 発表標題 コエンザイムQ10の生合成に関わる新規因子の発見
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jomkwan Jumphong , Ikuhisa Nishida , Kohei Nishino , Yasuhiro Matsuo , Tomohiro Kaino , Makoto Kawamukai
2. 発表標題 Investigation of coenzyme Q species in naturally isolated yeast
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川向誠
2. 発表標題 コエンザイムQ10と老化
3. 学会等名 日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 戒能智宏、川向誠	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 264
3. 書名 酵母によるコエンザイムQ10の生産	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村井 正俊 (Murai Masatoshi) (80543925)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	戒能 智宏 (Kaino Tomohiro) (90541706)	島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授 (15201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------