

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03938

研究課題名(和文) 酵素複合体メタボロン研究の新展開：酵素群の膜上提示技術がもたらすブレイクスルー

研究課題名(英文) Frontiers in metabolon research: a breakthrough using methods of protein anchoring to membranes

研究代表者

中山 亨(Nakayama, Toru)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：80268523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,200,000円

研究成果の概要(和文)：フラボノイドメタボロンの構成と小胞体膜上の形成様式を明らかにし、代謝チャネリングにおけるメタボロン形成の重要性を検証した。フラボノイド生合成の鍵酵素カルコン合成酵素CHSの生成物特異性を矯正し、陸上植物において普遍的に保存されているタンパク質CHILを見出した。CHSとCHILの立体構造をX線結晶構造解析により明らかにし、得られた構造を用いてフラボノイドメタボロンの構造モデルを構築した。ナノディスクへの膜タンパク質の提示技術の基盤を構築し、膜タンパク質の膜上提示を高速AFMにより観察した。また高速AFM観察によるCHS/CHIL複合体を直接的に観察し、構造モデルと比較した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラボノイドは、農業、食品工業、医学・薬学・栄養学領域で極めて重要な天然化合物群である。フラボノイドの生合成において、生合成酵素群が複合体(メタボロン)を形成するものと推定されていたが、実証に乏しかった。本研究では、フラボノイドメタボロンの形成様式を具体的に明らかにし、小胞体膜上に形成されるメタボロン解析に必要な、膜タンパク質のナノディスクへの提示技術の基盤を構築した。また、膜タンパク質のナノディスクへの提示やタンパク質間相互作用を、高速AFMにより直接的に観察した。本研究の成果は、この重要な化合物群の進化的側面の理解や生産制御に重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Formation of flavonoid metabolons were clarified in several plant species and significance of metabolon formation in metabolite channeling during flavonoid biosynthesis was discussed. CHIL, which is widely conserved among land plants and narrows product specificity of chalcone synthase (CHS), was identified and characterized. Crystal structures of CHS and CHIL were clarified and a structural model of a flavonoid metabolon was built. Membrane proteins were successfully introduced onto nanodiscs, which were subjected to direct observation by means of high-speed AFM. The CHS/CHIL protein complex was also observed by means of high-speed AFM and the results were compared with the structural model.

研究分野：生化学 酵素科学 植物特化代謝

キーワード：フラボノイド メタボロン

## 1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは、アミノ酸のフェニルアラニンを前駆体として導かれるフェニルプロパノイドの一群で、植物の生存、生殖、生長の必須因子として機能し、作物生産上きわめて重要な化合物群である。フラボノイドはまた、その構造に応じてそれを摂取したヒトにさまざまな生理活性を示すため、医学・薬学・栄養学領域においても注目を集め、それらを代謝工学的に量産化する試みも活発に行われてきた。しかしながらほとんどの場合、植物を凌駕する量産化は達成できていない。そのもっとも大きな理由は、植物細胞内で酵素群がどのようなかたちで配置されどのように相互作用し合うことによりフラボノイド生合成が達成されるのか、その具体像を理解しないまま代謝工学研究が進められてきたことによる。この課題の解決の鍵となるのは「フラボノイドメタボロン」に関する理解である。フラボノイドメタボロンとはフラボノイド生合成酵素群によって植物細胞内に形成される多酵素複合体のことである。細胞内では酵素どうしが、フラボノイドメタボロン形成により、代謝中間体の直接的な受け渡し(代謝チャネリング)が可能で近さで配置され、高効率な代謝フローが達成されていると考えられるようになった。しかしながら、メタボロンの重要性とは裏腹に、フラボノイドメタボロンの具体像はほとんど不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、フラボノイドメタボロンの小胞体膜上への形成を立証し、タンパク質の膜上提示技術、タンパク質間相互作用解析技術、各種の構造解析技術を駆使することにより、膜上に形成されるフラボノイドメタボロンをマクロおよび原子レベルで可視化し、その機能を理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

系統的に遠縁な関係にあるキンギョソウ (*Antirrhinum majus*) とダイズ (*Glycine max*) のフラボノイドメタボロンをおもな解析対象として、研究タスク (1) ~ (5) を実施した。

(1) タンパク質間相互作用ネットワーク解析によるフラボノイドメタボロンの小胞体膜上形成の立証

フラボノイド生合成酵素間の相互作用を、酵母ツーハイブリッド法、スプリットユビキチン酵母ツーハイブリッド法、2分子蛍光補完法、およびバイオレーヤー干渉法などにより網羅的に調べた。

(2) カルコン異性化酵素類似タンパク質 CHIL の発見と機能解析

本研究課題の遂行中に、キンギョソウとダイズにおけるフラボノイドメタボロン形成において CHIL が重要であることが明らかになってきたが、CHIL の重要性はこれらの植物のみならず、陸上植物に普遍的であることが強く示唆されたため、コケ植物から被子植物にいたる幅広い系統範囲の陸上植物に対して、同タンパク質の詳細な解析を行った。CHIL と各種のフラボノイド生合成酵素との相互作用は酵母ツーハイブリッド法、スプリットユビキチン酵母ツーハイブリッド法、2分子蛍光補完法、およびバイオレーヤー干渉法などにより調べた。また CHS 活性や特異性に及ぼす CHIL 結合の影響を HPLC を用いた酵素活性測定により評価した。

(3) フラボノイド関連酵素・タンパク質の立体構造解析

① X線結晶構造解析 フラボノイド酵素やその生成物複合体の立体構造を X線結晶構造解析により明らかにした。結晶は 20°C で蒸気拡散法により取得した。X線回折データは、SPring-8 (播磨) のビームライン (BL32XU) において EIGER 9M を用いて波長 1.00000 Å で取得し、KAMO および XSCALE により解析した。立体構造は、既往の結晶構造をサーチモデルとして、MOLREP を用いた分子置換法により構築した。構造の精密化は Coot および REFMAC を用いて実施した。

② 2価性架橋試薬の利用による酵素間相互作用界面の検索 研究タスク (1) において相互作用が確認された酵素タンパク質ペアについて、2価性架橋試薬を用いて架橋反応を行なったのち タンデムマス質量分析を行い、分子間架橋ペプチドを同定することにより、酵素間相互作用界面を検索した。

(4) 膜タンパク質の各種の膜上提示技術の検討

可溶化ポリマー (DIBMA glucosamine 等) や膜スキヤフォールドタンパク質 (MSP 等) によるナノディスク (ND) の形成、ならびに ND 上への膜・タンパク質複合体の再構成と単離を検討した。これらの膜上提示系の妥当性を評価するため、まず、膜貫通タンパク質である GPCR の一種  $\beta 2$  アドレナリン受容体 ( $\beta 2AR$ ) や植物起源の膜結合型脂質合成酵素タンパク質

(LS) を用い、酵素タンパク質の膜上提示を高速 AFM により確認した。また、メタボロン形

成の核となるシトクロム P450（フラボン合成酵素 FNS やイソフラボン合成酵素 IFS）と P450 還元酵素（CPR）を、スケールアップが容易なメタノール酵母 *Pichia pastoris* に異種発現させ、同様の検討をおこなっている。

(5) 高速 AFM による複合体の直接観察

基板上にフラボノイド酵素を配置させ、相互作用パートナーとなる酵素タンパク質に添加により形成された複合体を高速 AFM で直接した。

4. 研究成果

(1) タンパク質間相互作用ネットワーク解析によるフラボノイドメタボロンの小胞体膜上形成の立証

キンギョソウ、トレニア、ダイズのフラボノイドメタボロンについて、それらの構成と小胞体膜上の形成を網羅的に解析し、図 1 に示すような形成様式を立証した。

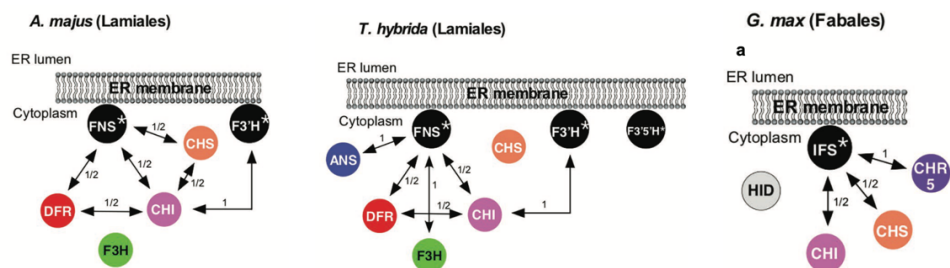


図 1. キンギョソウ（左）、トレニア（中央）、ダイズ（右）におけるフラボノイド酵素のメタボロン形成。

さらに、ダイズについて立証したフラボノイドメタボロンの構成（図 1 右）に基づいて、長年の謎とされていた 5-デオキシ型イソフラボノイド（ダイゼイン）の高効率生合成の仕組みを説明した。

(2) カルコン異性化酵素類似タンパク質 CHIL の発見と機能解析

CHIL は CHS やシトクロム P450（キンギョソウでは FNS, ダイズでは IFS）と相互作用し、この性質はすべての陸上植物種において保存されていることがわかった。CHIL は CHS のあいまいな生成物特異性を矯正し、副成物の生成を抑制してもっぱら THC を生成するようにする役割を担い、しかもその役割は陸上植物において普遍的に保存されていることが明らかになった。陸上植物における CHIL の存在の普遍性はこのタンパク質の機能の必須性を物語っている。

(3) フラボノイド関連酵素・タンパク質の立体構造解析と複合体の構造モデル構築

GmCHS1 のアポ体およびその生成物 (naringenin) との複合体をそれぞれ 2.52 Å, 1.83 Å の分解能で決定した (PDB ID: 7BUS, 7BUR)。また、GmCHS1 の生成物と阻害剤 (naringenin, CoA) との三者複合体の結晶構造を 1.83 Å の分解能で決定した (図 2)。また、ヒメツリガネゴケの CHIL (PpCHIL) の結晶構造を 1.85 Å の分解能で決定した (図 3)。さらに、ヒメツリガネゴケの CHS (PpCHS) の結晶構造解析も進行中である。

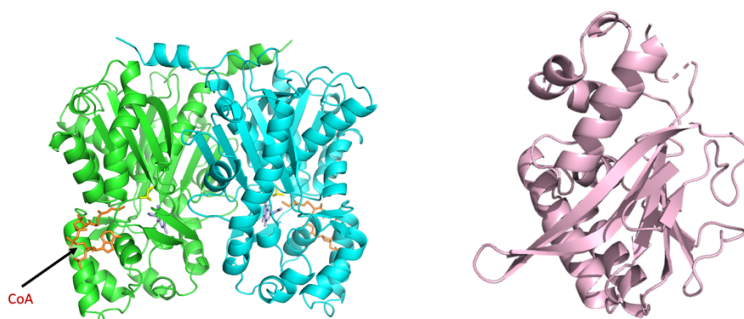


図 2. GmCHS1/naringenin/CoA 複合体の結晶構造（左）と PpCHIL の結晶構造（右）

AmCHS-AmCHIL 系で架橋ペプチドを検出・同定できた。この結果のみで相互作用界面の詳細を知ることは困難であったが、酵素の精密立体構造モデルを用い、計算化学によるタンパク質構造のドッキングモデルを検討することにより、相互作用モデルの構築に向けて重要な情報が得られた。

上述のようにして得られた CHS と CHIL の結晶構造、および IFS について構築した立体構造

モデルを用いて、AIによるディープラーニングを利用した構造予測プログラムである AlphaFold2 を実行可能な高速計算機環境を整備し、CHS-CHIL-IFS の複合体の構造予測をおこなった。その結果、CHS:CHIL:IFS=2:2:1 の比率で解が得られた (図3)。この構造モデル中では、CHS と CHIL の会合は CHS-CHIL の複合体予測と同等な様式であった。

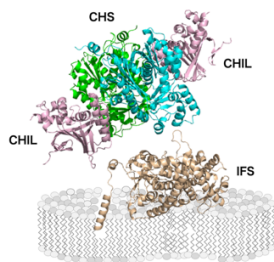


図3. AlphaFold2により予測されたCHS-CHIL-IFSの複合体の構造モデル

#### (4) 膜タンパク質の各種の膜上提示技術の検討

まず、膜スキャフォールドタンパク質 (MSP) によるナノディスク (ND) の形成と ND 上への膜・タンパク質複合体の再構成と単離を検討した。これらの膜上提示系の妥当性を評価するため、膜貫通タンパク質である GPCR の一種  $\beta 2$  アドレナリン受容体 ( $\beta 2AR$ ) や植物起源の膜結合型脂質合成酵素タンパク質 (LS) を用い、酵素タンパク質の膜上提示を高速 AFM により確認した。その結果、ND は既報にあるようなサイズの円形構造として観察され、 $\beta 2AR$  を導入したものはナノディスクそのものと形状は変わらなかった (図4)。一方、LSを導入したナノディスクは集積しやすく、酵素の可溶性領域と思われる構造が膜-溶液界面を高速で移動している様子が観察された (図5)。

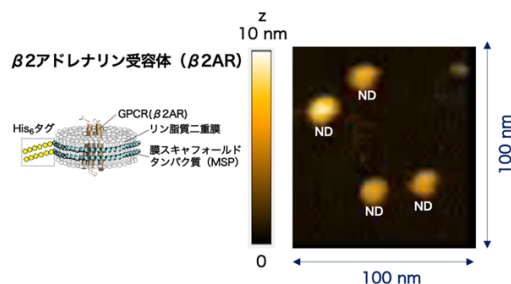


図4. MSPにより形成されたND上への $\beta 2AR$ の提示 (高速AFM観察)

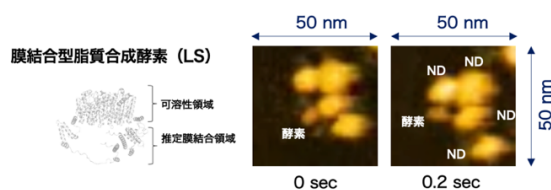


図5. MSPにより形成されたND上へのLSの提示 (高速AFM観察)

また、ダイズアゾレクチンで調製したりポソームでは、ナノディスクは水平方向が 500 nm 以上の巨大構造体として観察されたが、マイカ基盤上では嵩高さは低い (30 nm 程度) ことがわかった。本構造に CHS や CHIL の添加を試みたが、膜面との共存は観察されなかった。また現在、フラボノイドメタボロン形成の核となる P450 (FNS, IFS) を、P450 還元酵素 (CPR) とともに異種発現させ、同様の検討をおこなっている。

#### (5) 高速 AFM による複合体の直接観察

CHS 単独系、CHIL 単独系、および CHS+CHIL 共存系について、マイカ上のタンパク質を高速 AFM にて観察した。それぞれの観察像を図6～図8に示す。CHS と CHIL の共存時には z 軸方向の高さ (平均) が CHS 単独よりも 1 nm ほど高いことがわかった (図8)。また、CHS+CHIL 共存系では、CHS 単独系または CHIL 単独系とは明らかに異なる形状が多く見られたが、複合体の計算予測モデル (上述) よりもゆるく結合している可能性が示唆された。

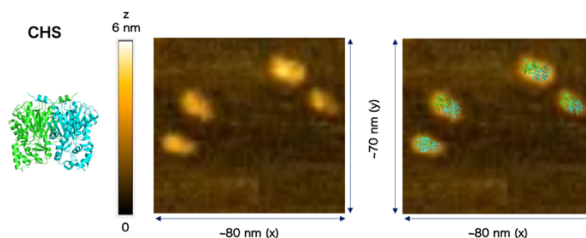


図 6. CHS 単独系の高速 AFM 観察像. CHS モデル (左) の下側を基盤に向けて配向している場合が多いように見える. 右図は, 高速 AFM 観察像と本研究で得られた X 線結晶構造との重ね合わせである.

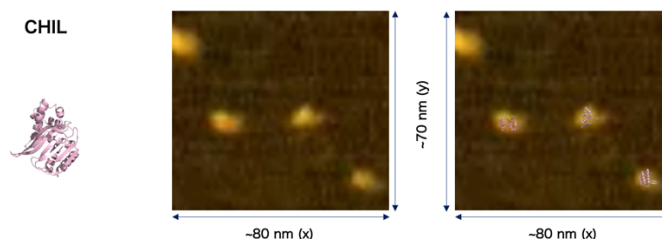


図 7. CHIL 単独系の高速 AFM 観察像. CHS よりも嵩高くない粒子として観察されている. CHS と比較して基盤に対しランダムな配向をとっているように見える (左上は不明粒子). 右図は, 高速 AFM 観察像と本研究で得られた X 線結晶構造との重ね合わせである.

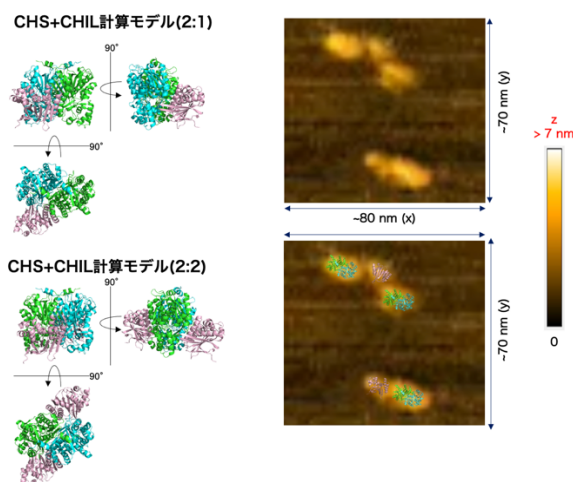


図 8. CHS+CHIL 共存系の高速 AFM 観察像. 下図は, 高速 AFM 観察像と本研究で得られた X 線結晶構造との重ね合わせである.

#### (6) 総括

フラボノイドメタボロンの構成と小胞体膜上の形成様式を明らかにし, 代謝チャネリングにおけるメタボロン形成の重要性を検証した. フラボノイド生合成の鍵酵素カルコン合成酵素 CHS の生成物特異性を矯正し, 陸上植物において普遍的に保存されているタンパク質 CHIL を見出した. CHS と CHIL の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにし, 得られた構造を用いてフラボノイドメタボロンの構造モデルを構築した. ナノディスクへの膜タンパク質の提示技術の基盤を構築し, 膜タンパク質のナノディスクへの提示の高速 AFM により観察した. また高速 AFM 観察による CHS/CHIL 複合体を直接的に観察し, 構造モデルと比較した. 本研究の成果は, この重要な化合物群の進化的側面の理解や生産制御に向けて重要な知見を提供するものである.

## 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 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 T. Waki, R. Mameda, T. Nakano, S. Yamada, M. Terashita, K. Ito, N. Tenma, Y. Li, N. Fujino, K. Uno, S. Yamashita, Y. Aoki, K. Denessiouk, Y. Kawai, S. Sugawara, K. Saito, K. Yonekura-Sakakibara, Y. Morita, A. Hoshino, S. Takahashi, T. Nakayama	4. 巻 11
2. 論文標題 A conserved strategy of chalcone isomerase-like protein to rectify promiscuous chalcone synthase specificity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14558-9	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 該当する

1. 著者名 Toshiyuki Waki, Seiji Takahashi, Toru Nakayama	4. 巻 NA
2. 論文標題 Managing enzyme promiscuity in plant specialized metabolism: A lesson from flavonoid biosynthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 e2000164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bies.202000164	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 中山 亨, 高橋征司, 和氣駿之	4. 巻 58
2. 論文標題 酵素の特異性のあいまいさと植物特化代謝の進化: フラボノイド生合成から示唆されること 特異性を矯正する影武者タンパク質の発見	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 354-361
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 和氣駿之, 高橋征司, 中山 亨	4. 巻 84
2. 論文標題 タンパク質間相互作用によるフラボノイド生合成酵素の活性制御: カルコン合成酵素の特異性あいまいさの矯正	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 酵素工学ニュース	6. 最初と最後の頁 27-31
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 Naoto Fujino, Natsuki Tenma, Toshiyuki Waki, Keisuke Ito, Yuki Komatsuzaki, Keigo Sugiyama, Tatsuya Yamazaki, Saori Yoshida, Masayoshi Hatayama, Satoshi Yamashita, Yoshikazu Tanaka, Reiko Motohashi, Konstantin Denessiouk, Seiji Takahashi and Toru Nakayama	4. 巻 94
2. 論文標題 Physical interactions among flavonoid enzymes in snapdragon and torenia reveal the diversity in the flavonoid metabolon organization of different plant species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 372-392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13864	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 Ryo Mameda, Toshiyuki Waki, Yosuke Kawai, Seiji Takahashi and Toru Nakayama	4. 巻 96
2. 論文標題 Involvement of chalcone reductase in the soybean isoflavone metabolon: identification of GmCHR5, which interacts with 2- hydroxyisoflavanone synthase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 56-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14014	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 和氣 駿之 高橋 征司 中山 亨	4. 巻 76
2. 論文標題 フラボノイドメタボロン 代謝工学へのインパクト	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 390-394
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 Riki Imaizumi, Ryo Mameda, Kohei Takeshita, Hiroki Kubo, Naoki Sakai, Shun Nakata, Seiji Takahashi, Kunishige Kataoka, Masaki Yamamoto, Toru Nakayama, Satoshi Yamashita, Toshiyuki Waki	4. 巻 89
2. 論文標題 Crystal structure of chalcone synthase, a key enzyme for isoflavonoid biosynthesis in soybean	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proteins	6. 最初と最後の頁 126-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prot.25988	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 Toru Nakayama	4. 巻 86
2. 論文標題 Biochemistry and regulation of aurone biosynthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 557-573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac034	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 Toru Nakayama, Toshiyuki Waki and Seiji Takahashi	4. 巻 56
2. 論文標題 Metabolon formation in plant specialized metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regulation of Plant Growth & Development	6. 最初と最後の頁 14-25
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 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中山 亨
2. 発表標題 タンパク質間相互作用を介したカルコン合成酵素の生成物特異性の制御
3. 学会等名 酵素補酵素研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山 亨
2. 発表標題 Enhancer of flavonoid productionの機能と進化
3. 学会等名 ビタミンB研究委員会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔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	飯嶋 益巳 (Iijima Masumi) (40390728)	東京農業大学・応用生物科学部・准教授  (32658)	
研究分担者	山下 哲 (Yamashita Satoshi) (70361186)	金沢大学・物質化学系・准教授  (13301)	
研究分担者	黒田 俊一 (Kuroda Shunichi) (60263406)	大阪大学・産業科学研究所・教授  (14401)	

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
---------	---------