

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710178
 研究課題名 (和文) 生体内における糖キャリア脂質の生体膜間輸送に関与するフリッパーゼの分子解析

研究課題名 (英文) Molecular analysis of glycosyl carrier lipid flippase.

研究代表者

野池 基義 (NOIKE MOTOYOSHI)
 東北大学・多元物質科学研究所・助教
 研究者番号：20420010

研究成果の概要：真正細菌の細胞表層の生合成には、細胞質側で生合成されたオリゴ糖鎖と糖キャリア脂質との複合体が細胞質側からペリプラズム側に反転する過程が必須であり、この輸送は反転酵素によって触媒されて行われている。しかし、有効なアッセイ系がないため、その機構の詳細は明らかにされていない。本研究では、同機構の解明を行うことを目的とし、蛍光プローブを用いたアッセイ系の構築を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：糖キャリア脂質、フリッパーゼ

1. 研究開始当初の背景

真正細菌の細胞表層の生合成には、細胞質側で生合成されたオリゴ糖鎖と糖キャリア脂質である炭素数 55 のウンデカプレニルリン酸と呼ばれるポリイソプレノイドの複合体が、細胞質側からペリプラズム側に反転する「フリップ・フロップ転移」と呼ばれる過程が必須であり、この輸送は反転酵素（フリッ

パーゼ）によって触媒されて行われているが、有効なアッセイ系がないため未だフリッパーゼに関する分子レベルでの解明研究はされていない。このフリッパーゼの触媒機構が解明されることにより、新たな有効な抗菌剤の開発につながると考えられ、臨床的な意義は非常に大きいものであると考えられる。ま

た、ポリイソプレノイドを担体とした生体膜間のオリゴ糖反転輸送は、真核生物の小胞体における糖タンパク質生合成にも類似の過程が存在すると考えられているが、その過程で働くフリッパーゼに関する知見は得られていない。近年、この過程が正常になされないことに起因する先天性で重度の代謝異常患者が多く見出されている。真正細菌の膜間糖輸送に関与するフリッパーゼの反応機構が解明されることにより、この病気の治療の手がかりが得られると考えられる。

2. 研究の目的

真正細菌の細胞壁生合成において、フリッパーゼによって細胞質側からペリプラズム側に反転輸送されたオリゴ糖鎖はペプチドグリカン層の合成に使われる一方、糖キャリア脂質であるウンデカプレニルリン酸はペリプラズム側から細胞質側へリサイクルされると予想されている。しかし、有効なアッセイ系がないため、その機構の詳細は明らかにされていない。本研究では、このウンデカプレニルリン酸リサイクル機構のアッセイ系の構築と、この機構へのフリッパーゼの関与を立証することを目的とした。

3. 研究の方法

ウンデカプレニルリン酸の誘導体である蛍光プローブの合成を行い、このプローブと枯草菌 *Bacillus subtilis* の細胞膜を利用したクエンチングアッセイにより細胞膜の内側に取り込まれたプローブの蛍光強度から蛍光プローブの取り込み活性を評価した。また、膜タンパク質が正しい方向を向いている膜小胞と、反対側を向いている反転膜小胞において、プローブの取り込みを比較し、この輸送の方向性について検討を行った。

4. 研究成果

構築したアッセイ系を用いて蛍光プローブの取り込み活性の評価を行ったところ、細胞膜の内部方向への蛍光プローブの取り込み活性を確認することができた。また、この活性はトリプシン処理の影響を受けたことから、糖キャリア脂質のリサイクル機構へのフリッパーゼの関与が示唆された。

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5件)

- ① Ambo T, Noike M, Kurokawa H & Koyama T (2009) Cloning and Functional Analysis of cis-Prenyltransferase from *Thermobifida fusca*. J. Biosci. Bioeng. 107(6), 620-622. 査読有り
- ② Noike M, Katagiri T, Nakayama T, Nishino T & Hemmi H (2009) Effect of mutagenesis at the region upstream from the G(Q/E) motif of three types of geranylgeranyl diphosphate synthase on product chain-length. J. Biosci. Bioeng. 107(3), 235-239. 査読有り
- ③ Noike M, Ambo T, Kikuchi S, Suzuki T, Yamashita S, Takahashi S, Kurokawa H, Mahapatra S, Crick DC & Koyama T (2008) Product chain-length determination mechanism of *Z, E*-farnesyl diphosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 377(1), 17-22. 査読有り

- ④ Ambo T, Noike M, Kurokawa H & Koyama T (2008) Cloning and functional analysis of novel short-chain cis-prenyltransferases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 375(4), 536-540. 査読有り
- ⑤ Noike M, Katagiri T, Nakayama T, Koyama T, Nishino T & Hemmi H (2008) The product chain length determination mechanism of type II geranylgeranyl diphosphate synthase requires subunit interaction. FEBS Journal. 275(15), 3921-3933. 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

- ① 安保貴永、野池基義、黒河博文、古山種俊 「シス型ファルネシルニリン酸合成酵素の基質特異性・生成物鎖長制御機構の解明」、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド
- ② 安保貴永、野池基義、黒河博文、古山種俊 「*cis*-Farnesyl diphosphate synthase における生成物鎖長制御機構の解明」、平成 20 年度化学系学協会東北大会、2008 年 10 月 12 日、八戸工業大学
- ③ 野池基義、関俊輔、小関弘恵知、山下哲、高橋征司、黒河博文、古山種俊 「真正細菌の細胞壁生合成における糖キャリア脂質リサイクル機構の解明」、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月 13 日、

パシフィコ横浜

- ④ 福地さと子、黒河博文、安保貴永、野池基義、槇雄二、古山種俊 「新規基質アナログによるプレニルトランスフェラーゼ阻害機構の研究」、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜
- ⑤ 鈴木俊秀、野池基義、安保貴永、菊地明香、Yugesh Kharel、山下哲、高橋征司、黒河博文、古山種俊 「シス型プレニルトランスフェラーゼの生成物特異性を決定する分子機構の研究」、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜
- ⑥ 安保貴永、黒河博文、野池基義、古山種俊 「糖キャリア脂質前駆体の生合成に関する酵素群の遺伝子クローニング、機能解析」、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜
- ⑦ 鈴木俊秀、野池基義、安保貴永、菊地明香、Yugesh Kharel、山下哲、高橋征司、黒河博文、古山種俊 「シス型プレニルトランスフェラーゼの生成物特異性を決定する分子機構の研究」、平成 19 年度化学系学協会東北大会、2007 年 9 月 23 日、山形大学
- ⑧ 安保貴永、黒河博文、野池基義、古山種俊 「糖キャリア脂質前駆体の生合成に関する酵素群の遺伝子クローニング、機能解析」、平成 19 年度化学系学協会東北

大会、2007年9月23日、山形大学

- ⑨ 野池基義、関俊輔、小関弘恵知、山下哲、高橋征司、黒河博文、古山種俊 「真正細菌の細胞壁生合成における糖キャリア脂質リサイクル機構の解明」、平成19年度化学系学協会東北大会、2007年9月23日、山形大学
- ⑩ Takanori Ambo, Motoyoshi Noike, Hirofumi Kurokawa, Tanetoshi Koyama 「Gene cloning and functional analysis of novel short-chain *cis*-prenyltransferase」、The 8th International symposium on Biocatalysis and Biotransformations、2007年7月12日、スペイン国オビエド市
- ⑪ Motoyoshi Noike, Takanori Ambo, Sayaka Kikuchi, Satoshi Yamashita, Seiji Takahashi, Hirofumi Kurokawa, Tanetoshi Koyama 「Product chain-length determination mechanism of *cis*-farnesyl diphosphate synthase」、The 8th International symposium on Biocatalysis and Biotransformations、2007年7月12日、スペイン国オビエド市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野池 基義 (NOIKE MOTOYOSHI)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号：20420010