

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2008 ～ 2009  
 課題番号： 20780053  
 研究課題名(和文) イソプレノイド代謝研究におけるアーキアからの新展開  
 研究課題名(英文) New insights from archaea into researches on isoprenoid metabolism

## 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

研究成果の概要(和文)：アーキアが生産するイソプレノイド化合物には、エーテル型膜脂質や糖キャリア脂質、膜内在性の電子伝達体などバクテリアやユーカリアの類縁化合物とは大きく異なった構造を含むものが多い。それらの生合成に関わる新奇酵素を単離し、また、イソプレノイド代謝関連酵素の特性評価や反応機構解析を行うことで、アーキアにおけるイソプレノイド代謝の理解を深めると共に同代謝経路の進化に関する知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Archaea produces many isoprenoid compounds that have structures distinct from those of bacterial or eukaryotic analogues. We isolated novel enzymes involved in their biosynthesis and made characterization or mechanistic analysis of the isoprenoid biosynthetic enzymes, which led us to further understanding of isoprenoid metabolism in archaea and gave us a knowledge of the evolution of the metabolic pathway.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：アーキア、イソプレノイド、膜脂質、糖キャリア脂質、メタノフェナジン、グラニルグラニル基還元酵素、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ、グラニルファルネシルニリン酸合成酵素

## 1. 研究開始当初の背景

アーキアのイソプレノイド膜脂質には様々な種類があり、複雑な炭素骨格を有する大環状双頭型膜脂質など、生合成経路が全く分かっていないものが大半である。また、それ以外のイソプレノイド化合物についても

生合成経路や詳細な構造が不明なものが多い。我々は以前の研究において膜脂質生合成に関わるグラニルグラニル基還元酵素を単離しており、最も単純な構造のアーキア膜脂質であるアーキチジン酸までの生合成経路を明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

(1) ゲラニルゲラニル基還元酵素の単離により、アーキチジン酸の酵素合成が可能になった。そこでこれらの酵素を利用した放射標識基質の合成と取り込み実験によって、大環状双頭型膜脂質など、より複雑な構造を持つアーキア膜脂質の代謝経路を明らかにし、生合成に関わる酵素を探索することを目的とした。また、同様の手法により糖キャリア脂質やその他のイソプレノイドについても代謝経路を調べることとした。

また、アーキア膜脂質へのアフィニティーを指標として、未知代謝関連酵素の単離を試みた。

(2) 既に単離済みの、アーキア由来イソプレノイド生合成酵素について、変異導入や結晶構造解析などに基づく反応機構解析を進めた。また、イソプレノイド代謝に関わる新奇酵素の単離を進め、特性評価を行った。

## 3. 研究の方法

(1) ①アーキア由来の複数のイソプレノイド生合成酵素をそれぞれ大腸菌で発現させ、組換え酵素を得た。それらを精製し、*in vitro*でアーキア膜脂質や糖キャリア脂質生合成前駆体を合成した。なお、その際、放射標識した基質を用いた。放射標識したイソプレノイド化合物を好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* に取り込ませ、数時間培養を行った後に脂質を抽出し、標識化合物がどのように代謝されているか確認した。

②市販のアーキア膜脂質アナログをカラムに固定化し、これに好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* の菌体破砕液を通すことで、膜脂質アナログにアフィニティーを示すタンパク質を精製した。これらをMALDI-TOF MSにより同定し、遺伝子クローニングを行った。組換え酵素を用いてアーキア膜脂質生合成への関与を調べた。

(2) ①好熱性アーキア *Sulfolobus shibatae* 由来タイプ2イソペンテニルニリン酸合成酵素の結晶構造解析に成功したため、同酵素への部位特異的変異導入や活性測定を行った。

②好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* 由来ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素について、生成物鎖長制御機構を明らかにするため部位特異的変異導入と生成物分析を行った。

③メタン生成アーキア *Methanosarcina*

*mazei* のゲノム情報をもとに、膜内在性電子伝達体メタノフェナジンの生合成に関わる酵素を既知酵素との相同性をもとに探索した。

④ゲラニルゲラニル基還元酵素については立体構造解析を進めると共に、基質結合に伴う物性の変化を調べた。

## 4. 研究成果

(1) ①取り込み実験からははっきりした結果は得られなかった。問題点としては取り込み効率の低さが挙げられる。糖キャリア脂質については、予想された還元反応を観察することができなかった。

②アフィニティー精製されたタンパク質の多くは脂溶性化合物に活性を示す酵素のホモログであり、必ずしも膜脂質特異的な精製がなされているわけではないことがわかった。しかしながら、一部のタンパク質についてはイソプレノイド代謝への関与が予想されるため、現在解析を続けている。

(2) ①好熱性アーキア *Sulfolobus shibatae* 由来タイプ2イソペンテニルニリン酸合成酵素の結晶構造および変異解析の結果から、同酵素において補酵素であるFMNが一般酸塩基触媒として機能していることを明らかにすることができた。これはフラビン補酵素の機能としてはきわめて例外的なものと言える。

②好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* 由来ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素において、酵母由来の同酵素で最近見出された生成物鎖長制御領域が、機能していることを明らかにした。これにより生物種を超えた同領域の普遍性を示すことが出来た。

③メタン生成アーキア *Methanosarcina mazei* からメタノフェナジンの生合成に関わるゲラニルファルネシルニリン酸合成酵素を単離し、その特性評価を行った。同酵素はアーキア膜脂質の生合成に関与する既知ゲラニルファルネシルニリン酸合成酵素とは系統的に遠く、メタノフェナジンと同じく膜内在性電子伝達体である呼吸鎖キノンの生合成に関わる酵素に近縁であった。これはメタノフェナジンの分子進化について示唆を与える結果と言える。

④ゲラニルゲラニル基還元酵素の立体構造解析に成功した。未発表なため詳細は省くが、同酵素が基質のゲラニルゲラニル基を

結合し、連続的に二重結合を還元する機構を説明するような構造的特徴が見出せており、現在論文を執筆中である。

#### 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 3 件)

- ① Ogawa, T., Yoshimura, T. & Hemmi, H. (2010) Geranylarnesyl diphosphate synthase from *Methanosarcina mazei*: Different role, different evolution. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読有、vol. 393, pp. 16-20.
- 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 査読有、vol. 107, pp. 235-239.
- ③ Unno, H., Yamashita, S., Ikeda, Y., Sekiguchi, S., Yoshida, N., Yoshimura, T., Kusunoki, M., Nakayama, T., Nishino, T. & Hemmi, H. (2009) Flavin's new role as a general acid-base catalyst with no redox function in type 2 isopentenyl diphosphate isomerase. *Journal of Biological Chemistry*. 査読有、vol. 284, pp. 9160-9167.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 小川拓哉、吉村 徹、邊見 久 「メタン生成アーキア *Methanosarcina mazei* 由来グラニルファルネシルニリン酸合成酵素」、2010年度日本農芸化学会大会、2010年3月28日、東京大学駒場キャンパス
- ② Hisashi Hemmi, Hideaki Unno, Satoshi Yamashita, Yosuke Ikeda, Shin-ya Sekiguchi, Norie Yoshida, Tohru Yoshimura, Masami Kusunoki, Toru Nakayama and Tokuzo Nishino "Type 2 isopentenyl diphosphate isomerase: unusual reaction mechanism of a flavoenzyme", Italy-Japan Symposium of New Trends in Enzyme Science and Technology, 2009年10月26日、Institute of Protein Biochemistry, Naples
- ③ 邊見 久 「アーキア膜脂質の生合成におけるグラニルグラニル基還元酵素の役割」、第61回日本生物工学会大会シンポジウム「脂質工学の将来像」、2009年9月25日、名古屋大学
- ④ 岩田有希、吉村 徹、邊見 久 「好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* 由来グラニルグラニルレダクターゼの酵素学的研究」、日本 Archaea 研究会第22回講演会、2009年7月10日、産業技術総合研究所北海道センター
- ⑤ 邊見 久 「古細菌膜脂質生合成に関わるフラビン酵素の分子機構解明と応用」、第10回酵素応用シンポジウム、2009年6月12日、メルパルク NAGOYA
- ⑥ 邊見 久、長井拓也、海野英昭、吉村 徹 「部位特異的変異導入によるタイプ2イソペンテニルニリン酸イソメラーゼの反応機構解析」、日本ビタミン学会第61回大会、2009年5月31日、京都学園大学
- ⑦ Hisashi Hemmi, Hideaki Unno, Satoshi Yamashita, Yosuke Ikeda, Shin-ya Sekiguchi, Norie Yoshida, Tohru Yoshimura, Masami Kusunoki, Toru Nakayama and Tokuzo Nishino "The reaction mechanism of type 2 isopentenyl diphosphate isomerase", TERPNET 2009 9<sup>th</sup> International Meeting: Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Microorganisms and Parasites, 2009年5月28日、東京大学本郷キャンパス 弥生講堂
- ⑧ Takuya Nagai, Tohru Yoshimura and Hisashi Hemmi "The role of Gln160 in the reaction of type 2 isopentenyl diphosphate isomerase", TERPNET 2009 9<sup>th</sup> International Meeting: Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Microorganisms and Parasites, 2009年5月27日、東京大学本郷キャンパス 弥生講堂
- ⑨ 邊見 久、海野英昭、山下 哲、池田陽介、関口信哉、吉田宜永、吉村徹、楠木正巳、中山 亨、西野徳三 「タイプ2イソペンテニルニリン酸イソメラーゼの反応機構：一般酸塩基触媒としてのフラビンの機能」、

2009年度日本農芸化学会大会、2009年  
3月29日、福岡国際会議場

- ⑩ 邊見 久、海野英昭、山下 哲、池田陽介、関口信哉、吉田宜永、中山 亨、西野徳三、楠木正巳、吉村 徹 「タイプ2イソペンテニルニリン酸イソメラーゼの反応機構」、第18回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会、2008年8月30日、東北大片平さくらホール
- ⑪ 邊見 久、海野英昭、池田陽介、関口信哉、吉田宜永、中山 亨、西野徳三、楠木正巳、吉村 徹 「タイプ2イソペンテニルニリン酸イソメラーゼの結晶構造と予想される反応機構」、第60回日本生物工学会大会、2008年8月27日、東北学院大学
- ⑫ 宮川真仁、高橋義洋、吉村 徹、西野徳三、邊見 久 「好熱好酸性アーキアの糖キャリア脂質」、日本 Archaea 研究会第21回講演会、2008年7月6日、沖縄県男女共同参画センター「ていりる」
- ⑬ Hisashi Hemmi, Motomichi Murakami, Sho Sato, Kyohei Shibuya, Yoshihiro Takahashi, Toru Nakayama, Tokuzo Nishino and Tohru Yoshimura "Geranylgeranyl Reductases Responsible for Archaeal Membrane Lipid Biosynthesis" 7<sup>th</sup> US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products: Enzymology, Structural Biology, and Drug Discovery、2008年6月24日、カリフォルニア大サンディエゴ校
- ⑭ 邊見 久、海野英昭、池田陽介、関口信哉、吉田宜永、中山 亨、西野徳三、楠木正巳、吉村 徹 「好熱性アーキア由来タイプ2イソペンテニルニリン酸イソメラーゼの結晶構造解析」、日本ビタミン学会第60回大会、2008年6月13日、仙台国際センター

## 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