

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580111

研究課題名(和文)代謝工学利用を目指したアーキア由来新奇メバロン酸経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel archaeal mevalonate pathways oriented to metabolic engineering application

研究代表者

邊見 久 (HEMMI, Hisashi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：60302189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：一部反応が未同定であったアーキアのメバロン酸経路について、無細胞抽出液による放射標識基質の変換試験や、既知酵素ホモログの機能同定を行った。その結果、Sulfolobus属アーキアからはアーキアにおいて例外的な古典的メバロン酸経路を、Thermoplasma属アーキアからは3-ホスホメバロン酸を経由する新奇な変形メバロン酸経路を見出した。

また、Sulfolobus属アーキア由来のタイプ2イソペンテニルニリン酸イソメラーゼとジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼについてX線結晶構造解析を進め、得られた構造および種々の分析結果から、新奇な触媒機構や活性制御機構、および耐熱化機構を見出した。

研究成果の概要(英文)：A part of reactions in the archaeal mevalonate pathways were unidentified. Thus we performed the conversion assay of radio-labeled substrates by cell-free extract from archaea and functional characterization of archaeal homologs of known mevalonate pathway-related enzymes. As the result, we discovered the classical mevalonate pathway, which is rare in archaea, from an archaeon of genus Sulfolobus, and a novel modified pathway, which passes through 3-phosphomevalonate, from an archaeon of genus Thermoplasma.

We also performed X-ray crystal structural studies on type 2 isopentenyl diphosphate isomerase and diphosphomevalonate decarboxylase from archaea of genus Sulfolobus. The obtained structures and the results of various analyses showed novel mechanisms of catalysis, regulation of activity, and thermostabilization.

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：酵素 微生物 生体分子 イソプレノイド メバロン酸経路 アーキア

1. 研究開始当初の背景

アーキアはメバロン酸経路によりイソプレノイド生合成を行うことが知られている。しかし、古典的メバロン酸経路の後半部分の連続する過程をそれぞれ触媒する、ホスホメバロン酸キナーゼとジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼのホモログ遺伝子が大半のアーキアのゲノムには欠けており、アーキアにおけるメバロン酸経路の全容は謎であった。その後、大部分のアーキアで保存された新奇酵素、イソペンテニルリン酸キナーゼの発見により、イソペンテニルリン酸を経るアーキア特異的な変形経路の存在が提唱された。同経路ではホスホメバロン酸の脱炭酸によりイソペンテニルリン酸が生じると予想されていたが、同反応を触媒する酵素は未特定であった。

2. 研究の目的

(1) 大部分のアーキアにおいて存在が示唆されている変形メバロン酸経路は、古典的な同経路には存在しない未知の酵素反応をその一部に利用していると考えられる。これらの酵素、および新奇代謝経路は有用イソプレノイド化合物の生物生産を代謝工学的な手法で増進させる場合に高い利用価値を持つ可能性がある。また、アーキアの種によっては、例外的に他のアーキアには存在しない酵素ホモログを持つものも存在し、古典的メバロン酸経路を有する可能性のあるアーキアも存在する。そこで比較ゲノム解析などのアプローチにより見出されたそれらの酵素ホモログの機能を明らかにし、複数種のアーキアにおけるメバロン酸経路の全体像を解明することを目的とした。

(2) アーキアのメバロン酸経路関連酵素について構造生物学的、および酵素化学的な解析を行うことも本研究の目的である。特に、アーキアのメバロン酸経路の最終反応を触媒するイソペンテニルニリン酸イソメラーゼはタイプ2に分類され、2価金属イオンのみを要求するタイプ1酵素とは異なり、還元型フラビンモノヌクレオチドを要求する。我々はこれまで、このフラビン補酵素が酸塩基触媒として働く新奇な触媒機構を提案しているが、その詳細な理解には至っていない。そこで同酵素の反応におけるフラビンの電子状態や、触媒における分子機構を、阻害剤や変異導入を駆使して明らかにする。また、それ以外の新奇酵素についても構造解析や反応機構解析を進める。

3. 研究の方法

(1) 好熱性アーキアである *Sulfolobus solfataricus* および *Thermoplasma acidophilum* を実験対象とし、それらの無細胞抽出液に対して放射標識したメバロン酸経路中間体と ATP、Mg イオンを与えることで、菌体内に存在する酵素によりそれらがイソ

プレノイドへと変換されるか否かを観察した。また、それらのアーキアがもつメバロン酸経路関連酵素ホモログを遺伝子クローニングし、大腸菌による異種発現系を構築した。精製タンパク質と放射標識基質を用いてその酵素活性、基質特異性を明らかにし、それぞれのメバロン酸経路を推定した。生成物として得られた新奇化合物については、MS や ^{13}C -NMR によりその構造を明らかにした。

(2) 大腸菌に異種発現させた *Sulfolobus shibatae* 由来のタイプ2 イソペンテニルニリン酸イソメラーゼおよびその変異体を精製し、ハンギングドロップ法により結晶化した。その結晶を還元剤と反応機構依存性阻害剤を含むドロップに浸すことで、結晶中で阻害剤とフラビンのアダクトを形成させ、それを構造解析に用いた。さらに、同酵素への変異導入によって過去に提案された反応機構を提唱した。また、変異導入や X 線小角散乱、動的散乱などの手法により、同酵素の多量体形成に関するデータを得た。これに加え、新たに見出された *S. solfataricus* 由来ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼについても結晶化条件を探索し、得られた結晶について構造解析を行った。同酵素については変異導入や還元処理を行うことで、ジスルフィド結合と耐熱性の関係を調べた。耐熱性の評価は CD による直接観察、および残存酵素活性の測定により行った。また、ウェスタンブロットティングにより菌体内における同酵素の酸化還元状態を調べた。

4. 研究成果

(1) *S. solfataricus* を用いた実験結果はいずれも古典的メバロン酸経路の存在を示すものであった。アーキアにおける古典的経路の存在はきわめて例外的なものであり、それが実証されたのは初めてである。さらに、同菌から単離されたホスホメバロン酸キナーゼおよびジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼはアーキア酵素としては初の単離例となった。一方、*T. acidophilum* からは、新奇酵素であるメバロン酸 3-ホスホトランスフェラーゼが見出された。この発見と、無細胞抽出液による放射標識中間体の変換実験の結果から、同菌においては、これまでに知られていない新たな形状のメバロン酸経路が存在することが明らかとなった。同経路は古典的経路や、近年その存在が証明されたアーキア特異的な変形経路とは異なり、ホスホメバロン酸(5-ホスホメバロン酸)を経由せず、その異性体である 3-ホスホメバロン酸を中間体とする。さらに、放射標識した同中間体の変換実験の結果から、おそらく同経路はその後、3,5-ビスホスホメバロン酸とイソペンテニルリン酸を経てイソペンテニルニリン酸を合成すると予想された。

(2) *S. shibatae* タイプ2 イソペンテニルニ

リン酸イソメラーゼの阻害剤複合体結晶の構造解析の結果、反応機構依存性阻害剤は還元型フラビンモノヌクレオチドのC4a位においてアダクトを形成していた。これは以前に予測されていたN5位とは異なっており、我々はこの結果から、C4a位に負電荷が集中し、それによって近傍に位置するカルボカチオン中間体が安定化されるという機構を提唱した。すなわち、この機構において還元型フラビン補酵素は双性イオン状態を取り、N5位が一般酸として働いて基質をプロトン化する。これにより生じたカルボカチオン中間体を、同じくプロトン供与により生じたアニオン性還元型フラビンが安定化する。最終的にN5位が一般塩基として中間体からプロトンを引き抜き、異性化反応が進行すると共に双性イオン型の還元型フラビンが再生される、というものである。また、新たな条件での構造解析の結果、同酵素は基質の非存在下において8量体を、基質結合時に4量体を形成することが示唆された。この仮説は種々の機器分析の結果からも支持され、おそらく多量体構造の変化により酵素活性が制御されていると予想される。また、*S. solfataricus*のジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼの構造解析にも成功した。同酵素はホモダイマーで、そのサブユニット間にジスルフィド結合が存在していた。このジスルフィド結合は、同酵素の耐熱性に大きく寄与していることが示され、また、*S. solfataricus*の細胞内においても形成されていることが示唆された。

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 4件)

Azami, Y., Hattori, A., Nishimura, H., Kawaide, H., Yoshimura, T. & Hemmi, H. (2014) (R)-mevalonate 3-phosphate is an intermediate of the mevalonate pathway in *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Biological Chemistry*. 査読有、in press.

Nishimura, H., Azami, Y., Miyagawa, M., Hashimoto, C., Yoshimura, T. & Hemmi, H. (2013) Biochemical evidence supporting the presence of the classical mevalonate pathway in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Biochemistry*. 査読有、vol. 153, pp. 415-420.

Nakatani, H., Goda, S., Unno, H., Nagai, T., Yoshimura, T. & Hemmi, H. (2012) Substrate-induced change in the quaternary structure of type 2 isopentenyl diphosphate isomerase from *Sulfolobus*

shibatae. *Journal of Bacteriology*. 査読有、vol. 194, pp. 3216-3224.

Nagai, T., Unno, H., Janczak, M.W., Yoshimura, T., Poulter, C.D. & Hemmi, H. (2011) Covalent modification of reduced flavin mononucleotide in type-2 isopentenyl diphosphate isomerase by active-site-directed inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 査読有、vol. 108, pp. 20461-20466.

〔学会発表〕(計 13件)

Hisashi Hemmi, Yasuhiro Azami, Ai Hattori, Hiroshi Kawaide and Tohru Yoshimura, "A third alternative mevalonate pathway from *Thermoplasma acidophilum*", 1st US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers, 2014年3月2-3日、Tokyo Institute of Technology

服部 愛、海野英昭、吉村 徹、邊見 久、
「好熱好酸性アーキア *Sulfolobus solfataricus* 由来ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼの立体構造」、第23回イソプレノイド研究会例会、2013年9月14日、東京大学農学部中島董一郎ホール

服部 愛、海野英昭、吉村 徹、邊見 久、
「好熱性アーキア由来ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼの結晶構造解析」、第86回日本生化学会大会、2013年9月11-13日、パシフィコ横浜

邊見 久、「タイプ2イソペンテニルニリン酸イソメラーゼにおけるフラビン補酵素の触媒機能」、2013年度日本農芸化学会大会、2013年3月24-27日、東北大学

中谷仁美、郷田秀一郎、海野英昭、長井拓也、吉村 徹、邊見 久、「基質により誘導される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四次構造変化」、第22回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会、2012年9月29日、新潟大学駅南キャンパス「ときめいと」

Hisashi Hemmi, "Substrate-induced change in the quaternary structure of type 2 isopentenyl diphosphate isomerase from *Sulfolobus shibatae*", 新学術領域「生合成マシナリー」第4回若手シンポジウム(第8回生合成勉強会)、2012年8月25日、静岡県立大学

邊見 久、「mechanism-based inhibitorを用いたタイプ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」、2012年度酵

素・補酵素研究会、2012年7月27-28日、
名古屋大学野依記念学術交流館

生明靖裕、西村泰斗、吉村 徹、邊見 久、
「*Sulfolobus solfataricus*におけるメバロン酸経路の酵素学的研究」、日本 Archaea 研究会第25回講演会、2012年7月20-21日、
関西学院大学西宮上ヶ原キャンパス

中谷仁美、郷田秀一郎、海野英昭、長井拓也、吉村 徹、邊見 久、「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四次構造に対する基質結合の影響」、2012年度日本農芸化学会大会、2012年3月22-25日、京都女子大学

西村泰斗、橋本知佳、吉村 徹、邊見 久、
「*Sulfolobus* 属アーキアにおける古典的メバロン酸経路の酵素学的研究」、第21回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会、2011年11月4日、島根大学学生会館

Hisashi Hemmi, “Non-redox catalysis by reduced flavin mononucleotide in type 2 isopentenyl diphosphate isomerase”, 17th International Symposium on Flavins and Flavoprotein, 2011年7月24-29日、University of California, Berkeley

邊見 久、「タイプ2イソペンテニルニリン酸イソメラーゼにおけるフラビン補酵素の機能」、新学術領域「生合成マシナリー」第2回若手シンポジウム(第6回生合成勉強会)、2011年7月2日、理研鈴木梅太郎ホール(和光市)

邊見 久、長井拓也、海野英昭、吉村 徹、「不可逆阻害剤となる基質アナログを用いたタイプ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63回大会、2011年6月4-5日、安田女子大学(広島市)

〔図書〕(計 1件)

Hemmi, H. et al. Walter de Gruyter, “Handbook of Flavoproteins: Volume 1 – Oxidases, Dehydrogenases and Related Systems”, 2012, pp. 57-73

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