

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 *Methanosarcina* 属メタン生成アーキアのイソプレノイド代謝
酵素に関する研究

氏名 小川 拓哉

論文内容の要旨

アーキア（古細菌とも言う）は真核生物や真正細菌と進化的に離れた“第3の生物ドメイン”をなす微生物群である。このうち一群のアーキアは二酸化炭素＋水素や酢酸などをメタンに変換する固有の嫌気呼吸に特徴づけられ、メタン生成アーキアと呼ばれる。メタン生成アーキアの活動で発生するメタンは推定で年間10億トンに上り、その約2/3が酢酸に由来すると言われているが、酢酸からのメタン生成能はごく一部の種に限られる。*Methanosarcina* 属メタン生成アーキアは他種にはない多彩な代謝経路を有する特異な分類群であり、酢酸をメタン生成に利用することができる。温室効果ガスあるいはエネルギー資源としてメタンが注目を集める今日、*Methanosarcina* 属アーキアは実質的なメタン生産者の1種として重要な研究対象であり、同属特異的な代謝システムの包括的な解明が求められている。

Methanosarcina 属アーキアは構造的にユニークなイソプレノイドを生産することが報告されている。イソプレノイドとはイソプレン [構造式： $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2-$] を構成単位とする化合物の総称であり、多様な構造のイソプレノイドがさまざまな生命活動に関わる。*Methanosarcina* 属アーキアに見出されるイソプレノイド化合物もまた細胞膜成分や呼吸鎖における電子キャリアとして重要な生理機能を担うが、それらの生合成に関する知見はほとんどない。一方で、同属アーキアのゲノムは非常に大きく、イソプレノイド代謝関連遺伝子とアノテーションされた機能未知遺伝子を多数含む。これらの遺伝子は、生合成経路が未解明の既知イソプレノイドの代謝に関わるほか、未同定のイソプレノイドの存在を示唆している。そこで本研究では、*Methanosarcina* 属アーキアにおける多様なイソプレノイド代謝の実態解明を目指し、以下の酵素学的研究に取り組んだ。

1. *Methanosarcina mazei* とその近縁種のアークキアはメタノフェナジン (MP) を特異的に生産する。MP はフェナジン頭部基と、これにエーテル結合を介して結合した、炭素数 25 (C₂₅) の部分飽和型プレニル側鎖から構成される。MP は同属アークキアに特有の呼吸鎖の電子キャリアとして働くが、その重要な生理機能にも関わらず生合成経路は不明である。本研究では MP とユビキノン等の呼吸鎖キノンとの構造的・機能的類似性に着目し、MP の側鎖が全 E 型ゲラニルファルネシルニリン酸 (GFPP; C₂₅) に由来することを予想した。*M. mazei* 由来の E 型プレニル基転移酵素 (E-PT) ホモログをクローニングして組換え酵素を取得し、*in vitro* でラジオ TLC アッセイを行ったところ、同ホモログタンパク質に GFPP 合成酵素 (GFPS) を見出した。同酵素は MP 生合成酵素として初の例である。E-PT ファミリーの分子系統解析の結果、興味深いことに、*M. mazei* GFPS と既報の超好熱性アークキア由来の GFPS は、同じ酵素活性を持ちながら進化の起源が異なることが示唆された。

E-PT ファミリーは全 E 型プレニルニリン酸とイソペンテニルニリン酸 (IPP) を連続的に縮合することで、C₅ 単位ずつ伸長した長鎖の全 E 型プレニルニリン酸を合成するが、各酵素では最終生成物のプレニル鎖長は厳密に制御されている。そこで、*M. mazei* GFPS において最終生成物鎖長 (C₂₅) を決定する分子機構に興味を持ち、同酵素の二量体構造モデルに基づいて変異体解析を行った。変異体の生成物分析の結果、二量体界面に位置する Ile112 をアラニンに置換すると著しく伸長した生成物 (≧C₇₀) が合成され、鎖長決定機構における同残基の重要性が示唆された。I112A 変異体の立体構造モデルを計算すると、二量体間で反応キャビティが連結し、サブユニット界面をまたいだプレニル鎖の伸長が可能になったことが考えられた。

2. *Methanosarcina acetivorans* はカロテノイドを生産しないにも関わらず、フィトエン脱水素酵素ホモログの遺伝子を有する。本研究では同酵素ホモログの機能に興味を持ち、*in vivo* および *in vitro* で機能解析を行った。当研究室では以前に、遺伝子改変した大腸菌中でアークキア特有のイソプレノイド脂質を合成することに成功しているが、この菌株に当該ホモログタンパク質をコードする遺伝子を導入するとイソプレノイド鎖が一部飽和したアークキア型脂質が合成された。このことから、同タンパク質を新奇のプレニル基還元酵素 (PR) として同定した。本酵素はアークキア由来の既知 PR と分子系統的に異なる新しいタイプの PR である。さらに、組換え酵素を取得して *in vitro* アッセイにより基質特異性を分析した。HPLC および TLC を用いた生成物分析の結果、本酵素は鎖長 C₂₀ のゲラニルゲラニル基に高度に特異的であり、かつその 4 つの二重結合のうち 1 カ所のみを還元することが示唆された。組換え酵素とゲラニルゲラニオールとの反応生成物を GC-MS で分析し、その結果から還元部位が ω-末端に位置することを決定した。この還元パターンは過去に例のない新奇なものである。以上のことから、本酵素が ω-末端特異的なゲラニルゲラニル基還元酵素 (GGR) であることが明らかになった。この基質特異性および還元部位特異性から、生体中では糖キャリア脂質の生合成に関与することが予想された。また、本酵素のオーソログは機能未知タンパ

ク質として既に結晶構造解析がなされており、これに本実験データを照らし合わせることで反応特異性の分子メカニズムを推定した。

最近の酵素研究では、酵素反応を応用した有用な新奇化合物の創出が課題となっている。そこで、 ω -末端特異的 GGR の反応特性を利用して非天然型化合物の酵素合成に取り組んだ。ゲラニルゲラニルニリン酸に本酵素とテルペン環化酵素を順次反応させ、生成物を GC-MS で分析した結果、本来の環化生成物と異なる新奇生成物が合成されたことが示唆された。

3. 天然由来のイソプレノイドのほとんどは、イソプレン単位が規則的に C1'-C4 間で連結した炭素骨格を有する。これに対して、*Methanosarcina* 属等の一部のメタン生成アーキアが特異的に生産する 2,6,10,15,19-ペンタメチルイコサン (PMI) は、C₁₀と C₁₅のプレニル鎖が C1'-C1 間で連結した不規則型のイソプレノイドである。地球化学の分野では、PMI は地質中のメタン生成アーキアの存在を示すバイオマーカーとして広く利用されているが、その生合成系は不分明である。

Z 型プレニル基転移酵素 (Z-PT) は全 E 型プレニルニリン酸と IPP の C1'-C4 間縮合を繰り返すことで E,Z-混合型ポリプレニルニリン酸を合成する。一方で、ごく一部の Z-PT ホモログはこれとは異なる結合様式で 2 分子のプレニルニリン酸を縮合し、不規則な骨格のイソプレノイドを与える。ホモロジー検索の結果、*Methanosarcina* 属アーキアが Z-PT ホモログの遺伝子を複数有し、そのうちの 1 つがアーキアの中でも同属にのみ保存されることを見出した。同じく *Methanosarcina* 属アーキアに特異的な PMI の生合成に同 Z-PT ホモログが関わる可能性を考え、組換え酵素を用いた *in vitro* アッセイにより機能解析を行った。反応生成物のラジオ TLC 分析の結果、本酵素が Z-PT に典型的なプレニルニリン酸と IPP の縮合反応に加えて、変則的なプレニルニリン酸どうしの縮合反応も触媒するユニークな二機能性プレニル基転移酵素であることが明らかになった。本酵素は後者の反応様式によってジメチルアリルニリン酸 (DMAPP ; C₅) とファルネシルニリン酸 (C₁₅) から未知生成物を与えたが、質量分析の結果、これが化学式 C₂₀H₃₆O₇P₂ から成ることが示された。また、同生成物のニリン酸基は酸に不安定であったため、アリル位に位置することが示唆された。これらを併せて考えると、DMAPP の C2 位にファルネシル基の C1'位が結合した炭素数 20 の分枝型イソプレノイドが合成されたことが推定された。この構造は過去に自然界から見つかっていない新奇化合物である。したがって、本酵素は PMI とは異なる未同定のイソプレノイドの代謝に関わるということが考えられた。

本研究では *Methanosarcina* 属アーキアから、おそらく別個のイソプレノイド代謝経路を担う 3 つの新奇酵素を同定し、同属アーキアのイソプレノイド代謝の多様性の一端を明らかにすることができた。また、 ω -末端特異的 GGR の部位特異的還元や、Z-PT ホモログによる C1'-C2 間縮合の反応メカニズムは酵素学的に非常に興味深い。これらの発見が本研究の成果である。