

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 小 川 拓 哉

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

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	邊 見	久
委 員	名古屋大学教授	吉 村	徹
委 員	名古屋大学教授	牧	正 敏
委 員	名古屋大学教授	浅 川	晋

アーキア（古細菌とも言う）はユーカリア（真核生物）やバクテリア（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されているが、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は、他のアーキアにも見られる細胞膜成分や、独特なメタン生成呼吸鎖における電子キャリアなどの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。

本論文は、*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、以下の章立てで実施された酵素学的研究をまとめたものである。以下に各章において得られた成果を要約する。

第2章 膜内在性電子キャリア、メタノフェナジンの生合成に関わるグラニルファルネシル二リン酸合成酵素の酵素学的研究

Methanosarcina mazei とその近縁種のアー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 は同属アーキアに特有の呼吸鎖における電子キャリアとして働くことで ATP 合成に寄与するが、その重要な生理機能にも関わらず生合成経路に関する知見は一切ない。MP のこれらの構造および機能は、ユビキノンに代表される呼吸鎖キノンのものと類似している。このことから、呼吸鎖キノンの生合成反応と同様に、MP の側鎖プレニル基が全 *E* 型グラニルファルネシル二リン酸 (GFPP ; C₂₅) に由来することを予想した。

E 型プレニル基転移酵素 (*E*-PT) ファミリーは全 *E* 型プレニル二リン酸とイソペンテニル二リン酸 (IPP ; C₅) を連続的に縮合することで、C₅ 単位ずつ伸長したより長鎖の全 *E* 型プレニル二リン酸を順次合成する。各酵素メンバーでは最終生成物のプレニル鎖長が厳密に制御されており、一定鎖長のプレニル二リン酸を最終生成物として放出する。ホモロジー検索を行ったところ *M. mazei* ゲノムに *E*-PT ホモログの遺伝子が見出されたため、これをクローニングして組換え酵素を取得し、*in vitro* で GFPP 合成活性を検討した。ラジオ TLC を用いた生成物分析の結果、同ホモログタンパク質に GFPP 合成酵素 (GFPS) 活性が見出され、主に全 *E* 型グラニルグラニル二リン酸 (GGPP ; C₂₀) と IPP から GFPP を合成することが分かった。したがって、*M. mazei* 生体中では同酵素が GGPP 合成酵素と協同的に働き GFPP を合成することが考えられた。また、*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。

さらに、*M. mazei* GFPS において最終生成物鎖長 (C₂₅) を制御する分子機構に興味を持ち、部位特異的変異導入による変異体解析を行った。過去の研究によって、生成物鎖長は基質ポケットのサイズに大きく影響され、このキャビティの底部を構成するアミノ酸残基が鎖長決定に重要であることが報告されている。そこで、*M. mazei* GFPS の既報の結晶構造をもとに二量体構造モデルを計算し、これに基づいて基質ポケットの底部を構成し得るアミノ酸残基の見当を付け、それらをアラニンに置換した変異型酵素を作製した。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。さらに I112A 変異体の立体構造モデルを計算すると、生成物鎖長の増大は、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でプレニル鎖の伸長が可能になったためだと考えられた。

第3章 *Methanosarcina acetivorans* に由来する新奇プレニル基還元酵素の特性評価と応用研究

M. 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。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し、*in vivo* で同脂質分子に対する酵素活性を検討した。脂質抽出物を LC-ESI/MS を用いて分析すると、2つのイソプレノイド鎖が1カ所ずつ飽和したアーキア型脂質の合成が確認された。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。これまでに同定されたアーキア由来の PR はいずれも単一の酵素ファミリーに属するが、本酵素はそれらの酵素群と分子系統的に異なる新奇タイプの PR である。さらに、大腸菌異種発現系を構築してこの新奇 PR の組換え酵素を取得し、*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既知 PR のものと異なり、本酵素の新奇性の1つである。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。同酵素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わ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。GGPP 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。

第4章 *Methanosarcina* 属アーキアに特異的に保存されるプレニル基転移酵素ホモログの機能解析

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利用されているが、その生合成系は不明である。

Z 型プレニル基転移酵素 (Z-PT) は全 E 型プレニル二リン酸と IPP の C1'-C4 間縮合を繰り返し触媒し、生成物として E,Z-混合型ポリプレニル二リン酸を与える。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 分子のプレニル二リン酸を縮合し、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 ホモログが関わるのではないかと考え、組換え酵素の機能解析を通してこの可能性を検討した。

同ホモログの遺伝子をクローニングし、組換え酵素を大腸菌中で異種発現させ、アフニティクロマトグラフィにより均一に精製した。これを用いて *in vitro* アッセイを行った結果、同 Z-PT ホモログが新奇の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。TLC を用いて生成物を分析したところ、本酵素は典型的な Z-PT 活性を示し、全 E 型ファルネシル二リン酸 (FPP ; C₁₅) と IPP から E,Z-混合型ヘキサプレニル二リン酸 (C₃₀) を主生成物として合成した。さらに、IPP の代わりにジメチルアリル二リン酸 (DMAPP; C₅) を FPP とインキュベートすると本酵素存在下で新たに未知生成物が生じた。同生成物の質量分析の結果、これが化学式 C₂₀H₃₆O₇P₂ から成ることが示された。また、同生成物の二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与することが考えられた。

本論文では、*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している。そこで得られた酵素は、例えば 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 間縮合など、非常に新奇性の高いものであり、それらの発見は酵素学的にきわめて価値のある成果である。また、本論文では、それらの酵素による新奇化合物の合成といった、応用的展開も試みられており、博士（農学）の学位にふさわしい内容と認められる。