

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 本 山 賢 人

論 文 題 目

好熱好酸性アーキアのメバロン酸経路に含まれるATP依存性脱炭酸酵素ホモログの研究

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	下 村 吉 治
委 員	名古屋大学教授	牧 正 敏

論文審査の結果の要旨

イソプレノイドは自然界最大の天然有機化合物群であり、現在までに 80,000 種以上の化合物が見出されている。この中には生命活動において重要な生理作用を示す化合物や、産業利用価値の高い化合物が多数含まれており、それらすべてのイソプレノイドは生体内においてイソペンテニルニリン酸 (IPP)、およびその構造異性体であるジメチルアリルニリン酸を共通の前駆体としている。これら前駆体の生合成を担う代謝経路の 1 つとして、メバロン酸 (MVA) 経路が知られている。近年、真核生物やバクテリアに並ぶ第 3 の生物ドメインであるアーキアに関する研究により、真核生物などが有する古典的 MVA 経路とは一部異なる代謝中間体を経由する複数の変形 MVA 経路の存在が明らかにされた。このような MVA 経路の多様性が生じた一因に、古典的 MVA 経路中のジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (DMD) とアミノ酸配列相同性を有しながらも、それとは異なる機能を有する多様な DMD ホモログの存在が挙げられる。DMD の反応では、5-ジホスホメバロン酸 (MVA-5-PP) の 3 位水酸基がリン酸化され、推定反応中間体 3-ホスホ-5-ジホスホメバロン酸 (MVA-3-P-5-PP) が生じる。その後、触媒作用によって同中間体の 3 位リン酸基が脱離し、これに伴う脱炭酸反応が進行し、IPP が生じる。これに対し、サーモプラズマ目アーキアの変形 MVA 経路に含まれる DMD ホモログの 1 つである、メバロン酸 3-キナーゼ (M3K) の反応では MVA が基質となり、その 3 位水酸基がリン酸化されて 3-ホスホメバロン酸 (MVA-3-P) が生じる。したがって M3K は、DMD のような 3 位リン酸基の脱離および脱炭酸反応を触媒しない。M3K の反応は、DMD の反応の前半部分である、MVA-5-PP の 3 位水酸基のリン酸化と MVA-3-P-5-PP の生成によく似ている。これまでに、好熱好酸性アーキアである *Sulfolobus solfataricus* 由来 DMD (SsoDMD) と、同じく好熱好酸性アーキアである *Thermoplasma acidophilum* 由来 M3K (TacM3K) の結晶構造が明らかにされている。これらの酵素の触媒機能および基質特異性の違いがどのような構造的差異に由来するかは大変興味深い。本論文は、結晶構造の比較をもとにした変異導入により、それらの酵素の機能変換ならびに物質生産への応用を目指し、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 触媒機構の解明を目的とした好熱好酸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変異解析

SsoDMD の活性部位では、基質である MVA-5-PP の 3 位水酸基に近接する位置に DMD 間で高度に保存されているアスパラギン酸残基 Asp281 が存在しているが、TacM3K ではそれが Thr275 に置き換わっている。過去に提唱された DMD の触媒反応に関する仮説であるプロトン引き抜き機構では、このアスパラギン酸残基が塩基触媒として働き、MVA-5-PP の 3 位水酸基からプロトンを引き抜くことで、基質である

MVA-5-PP の 3 位リン酸化反応が促進され、MVA-3-P-5-PP を推定反応中間体として生じる。その後、同中間体の 3 位リン酸基が酵素触媒によって脱離し、カルボカチオン中間体を経て脱炭酸反応が進行し、IPP が生じるとされている。この反応機構では、最初に水酸基からのプロトンの引き抜きが起こらなければ、その後の 3 位リン酸化反応、および 3 位リン酸基の脱離に伴う脱炭酸反応は進行しないとされていた。しかし、TacM3K の活性部位では同アスパラギン酸残基と対応する位置に、塩基触媒として働き得ないスレオニン残基が存在しているにもかかわらず、MVA の 3 位リン酸化反応が触媒される。この事実はプロトン引き抜き機構と明らかに矛盾している。そこで第 2 章では、DMD の構造中でこのアスパラギン酸残基が反応のどの段階 (MVA-5-PP の 3 位ヒドロキシ基のプロトン引き抜き、リン酸化、リン酸基の脱離と脱炭酸) に寄与しているのかを調べるため、SsoDMD の Asp281 への部位特異的な変異導入を行い、SsoDMD (D281N)、SsoDMD (D281T) および SsoDMD (D281V) をそれぞれ構築した。放射標識基質 (MVA 経路の代謝中間体) および順相 TLC を用いて各変異体酵素の反応生成物を分析することにより、それらの機能評価を行った。その結果、SsoDMD (D281N) は、アスパラギン酸残基が一般塩基触媒として機能できないアスパラギンに置換されているにも関わらず DMD 活性を保持しており、野生型酵素には劣るものの IPP 合成活性が確認された。この結果より、DMD においてもアスパラギン酸残基によるプロトン引き抜き機構の存在が強く否定された。一方、Asp281 を非極性アミノ酸残基であるスレオニンまたはバリンに置換した SsoDMD (D281T) および SsoDMD (D281V) は脱炭酸活性を失い、MVA-5-PP より極性の高い化合物を生成した。この変異体生成物を ^{13}C -NMR および ESI-MS 分析に供した結果、MVA-3-P-5-PP であることが示された。同化合物は、1959 年に Bloch らが DMD の反応中間体として提唱して以来、実に半世紀以上の間その存在が推測の域を出なかったが、本研究で初めて酵素反応生成物として同定する事に成功した。これらの結果から、SsoDMD の Asp281 はリン酸基の脱離と脱炭酸の触媒に寄与していることが強く示唆された。

第 3 章 好熱好酸性アーキア由来メバロン酸 3-キナーゼの基質特異性改変

TacM3K の活性部位では、基質である MVA の 5 位水酸基と近接する位置に Glu140 が存在しているのに対し、SsoDMD の活性部位で対応する位置には Gly140 が存在している。さらには、既知の DMD ホモログのアミノ酸配列を用いた多重配列アライメントによって示されたように、好塩性アーキアの変形 MVA 経路に関わる DMD ホモログであり、5-ホスホメバロン酸 (MVA-5-P) を基質とするホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (PMD) では、それらのアミノ酸残基と対応する位置にアラニンが保存されていた。これらの知見から、TacM3K および SsoDMD 構造中でそれらのアミノ酸残基が規定する空間的な広さの差が、両酵素間における基質特異性の違いを生じさせる

原因であることが予想された。そこで第 3 章では、TacM3K の Glu140 に対して部位特異的な変異導入を施し、TacM3K (E140A)、TacM3K (E140S)、および TacM3K (E140G) をそれぞれ構築した。第 2 章と同様にこれら変異体酵素の機能評価を行った結果、興味深いことに全ての変異体が TacM3K 本来の基質では無い MVA-5-P に反応性を示し、極性の高い化合物を生成した。同生成物を ^{13}C -NMR および ESI-MS 分析に供した結果、MVA-5-P の 3 位水酸基がリン酸化された 3,5-ビスホスホメバロン酸 (MVA-3,5-BP) である事が示された。特筆すべきは、これらの TacM3K 変異体が触媒する、MVA-5-P の 3 位水酸基のリン酸化という反応を触媒できる酵素はこれまで自然界からは見出されていないという点である。そこで著者は、この非天然の反応を触媒する TacM3K 変異体と既知の MVA 経路関連酵素を組み合わせた人工 MVA 経路の、大腸菌における構築を試みた。実際にこの人工 MVA 経路が大腸菌内で機能するのかをイソプレノイドであるリコペンの生産を指標として評価した結果、特に TacM3K (E140G)を用いた同経路が大腸菌内で効率的に機能し、リコペン生産を大幅に増強する事が示された。以上の研究成果から、TacM3K および SsoDMD の間で基質特異性に違いが生じる原因の一端を解明することができた。

第 4 章 人工酵素メバロン酸デカルボキシラーゼの作製に向けたスクリーニング系の構築

第 4 章では、次世代バイオ燃料として有望視されている化合物、イソプレノールに着目し、同化合物を MVA から直接合成する人工酵素 MVA デカルボキシラーゼ (MVD) の作製に向けたスクリーニング系の構築を行った。著者は、第 2 章および第 3 章の研究から得られた知見から、野生型 TacM3K 遺伝子あるいは DMD の構造を模倣する目的で構築した TacM3K (T275D) 遺伝子へのランダム変異導入により、MVD に必要な構造的要素を獲得させて、同人工酵素を作製するという発想に至った。そこでそれに先立ち、膨大なランダム変異ライブラリーから MVD 活性を示す変異体を効率よく選抜する方法を考案した。実際には、プレノールキナーゼ、イソペンテニルリン酸キナーゼ、およびリコペン合成酵素群を大腸菌に導入し、イソプレノールからリコペンを合成するイソプレノール検出大腸菌、ST-IT 株を構築した。同菌株の利用により、MVD 活性を有する変異酵素をリコペン生産によるコロニーの呈色によって効率的にスクリーニングできると期待される。

本研究は、MVA 経路の多様性が生じた一因である DMD ホモログ酵素に着目し、SsoDMD と TacM3K の構造比較から得られた知見を基に両酵素の変異解析を行ったものである。これにより、過去に提唱された仮説を覆し、新たな DMD の触媒メカニズムを提唱した。同時に、DMD ホモログ間の基質特異性に違いが生じる原因の一端

を解明し、その分子進化の歴史を辿るための新たな知見を提示した。さらに、構築した TacM3K 変異体と既知の酵素を組み合わせることで人工 MVA 経路を構築し、大腸菌内で機能させることに成功した。また、産業的有用性の高い人工酵素 MVD の作製に向けたスクリーニング系の構築を行った。上記の高い新規性と独自性を有する成果を含むことから、本論文は高度の学術的価値を有し、かつ農学分野に関する学術研究に大きく貢献するものであり、博士（農学）の学位にふさわしい内容と認められる。