

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

名古屋大学大学院生命農学研究科 応用分子生命科学専攻

応用生命化学講座 生体高分子学研究分野

本山 賢人

自然界最大の有機化合物群であるイソプレノイドには、現在までに 80,000 種以上の化合物が見出されており、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いる。これら全てのイソプレノイドは、生体内で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 (DMAPP) を共通の前駆体としている。これらイソプレノイド前駆体の供給を担う代謝経路として、メバロン酸 (MVA) 経路またはメチルエリスリトール 4-リン酸経路が知られているが、生物種に応じてこれらのいずれか、または両方が用いられている。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変形 MVA 経路の存在が明らかにされた。現時点では真核生物などが有する古典的 MVA 経路、好塩性アーキアおよび一部のバクテリアが有する変形 MVA 経路 I、サーモプラズマ目アーキアに特異的な変形 MVA 経路 II、およびアーキアの大部分が有するとされる変形 MVA 経路 III が見出されている。このような MVA 経路の多様性が生じる一因として、古典的 MVA 経路中の ATP 依存性脱炭酸酵素であるジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (DMD)、および同酵素とアミノ酸配列相同性を有しながらも異なる機能を有する複数の DMD ホモログの存在が挙げられる。本研究では、触媒メカニズムの全容が未解明である DMD と、DMD ホモログでありながら DMD とは異なる触媒機能および基質特異性を有するメバロン酸 3-キナーゼ (M3K) に着目し、両酵素の X 線結晶構造を用いた活性部位の比較から得られた知見を基に、それぞれの酵素を用いて変異解析を行った。これにより、これまで知られていなかった DMD の詳細な触媒メカニズムや、DMD ホモログ間で基質特異性に違いが生じる原因の一端を明らかにすることができた。

DMD は、古典的 MVA 経路の後半部分の反応である 5-ジホスホメバロン酸 (MVA-5-PP) から IPP への ATP 依存性脱炭酸反応を触媒する酵素である。現在推定されている反応機構では、基質である MVA-5-PP の 3 位ヒドロキシ基がリン酸化され、3-ホスホ-5-ジホスホメバロン酸 (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 を生じる。このような段階的な化学反応に対し、実際に DMD の活性部位構造中のアミノ酸残基がどのように触媒に関与しているかは不明な点が多かった。好熱好酸性アーキア *S. solfataricus* は、大半が変形 MVA 経路Ⅲを有するとされるアーキアでは例外的に、古典的 MVA 経路を有している。同菌由来の DMD (SsoDMD) は、アーキアで唯一同定された DMD であり、その X 線結晶構造が明らかにされている。一方、サーモプラズマ目アーキアの変形 MVA 経路Ⅱに含まれる *Thermoplasma acidophilum* 由来 M3K (TacM3K) の結晶構造も既に明らかにされており、同酵素は DMD ホモログであるにもかかわらず、MVA-5-PP の代わりに MVA を基質として認識する。さらに、MVA の 3 位ヒドロキシ基のリン酸化のみを触媒し、それ以降の 3 位リン酸基の脱離および脱炭酸反応を触媒しない。この反応は、MVA-5-PP の 3 位ヒドロキシ基がリン酸化されて MVA-3-P-5-PP を生じるとされている DMD の前半部分の反応によく似ているため、これら酵素の共通点と相違点には大変興味を持たれた。そこで両酵素の活性部位の構造を比較したところ、2 つの大きな相違点が見出された。

相違点の 1 つ目として、SsoDMD では MVA-5-PP の 3 位ヒドロキシ基に近接する位置に DMD 間で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ことが挙げられる。過去に提唱された DMD の触媒機構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 位ヒドロキシ基からプロトンを引き抜くことが必須とされ、これが起こらなければその後のリン酸化反応、および 3 位リン酸基の脱離に伴う脱炭酸反応が進行しないと考えられていた。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 位ヒドロキシ基のリン酸化が触媒される。これはプロトン引き抜き機構とは明らかに矛盾していた。そこで第 2 章の研究では、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、脱炭酸反応) 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った。具体的には、Asp281 を塩基触媒として働くことのできないアスパラギンに置換した SsoDMD (D281N)、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) をそれぞれ構築した。なお、SsoDMD (D281T) は TacM3K の構造を模倣する変異体である。これら SsoDMD 変異体を構築後、大腸菌を用いた組換え発現および酵素精製を行い、放射標識した MVA 経路代謝中間体と反応後、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) では、アスパラギン酸残基が塩基触媒として

機能できないアスパラギンに置換されても 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 構造中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、DMD の脱炭酸活性を消失し、MVA-5-PP をより極性の高い化合物へ変換した。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化合物を同定する事に成功した。これらの結果から、SsoDMD の Asp281 は脱炭酸反応の触媒に寄与していることが強く示唆された。そこで筆者は、この Asp281 の果たす役割を以下のように推定した。仮説①：SsoDMD の Asp281 は MVA-3-P-5-PP のコンフォメーションを変化させ、3 位のリン酸基の脱離に寄与する。仮説②：SsoDMD の触媒反応において、Asp281 はカルボカチオン中間体の正電荷の安定化に寄与する。これらの仮説はあくまで予想に過ぎず、正確な触媒機構は不明である。そこで今後は、DMD の活性部位中の MVA-3-P-5-PP のコンフォメーションが明らかになることを期待して、SsoDMD (D281T) および SsoDMD (D281V) と同化合物との基質酵素複合体の構造解析に取り組む必要があるだろう。また、TacM3K の Thr275 を酸性アミノ酸残基へ置換することで、同酵素へ DMD のような脱炭酸活性の付与ができるのかを検証するため、TacM3K (T275D) および TacM3K (T275E) を構築し、同様に機能評価を行った。しかし、いずれの変異体も MVA 経路中間体に反応性を示さなかったため、TacM3K へ脱炭酸活性を付与させるには別の構造的要素が必要である事が示唆された。

TacM3K および SsoDMD の構造比較から見出された相違点の 2 つ目に、TacM3K の活性部位では基質である MVA の 5 位ヒドロキシ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 が存在している事が挙げられる。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が示すように、MVA-5-P を基質とする好塩性アーキア *Haloferax volcanii* 由来のホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (HvoPMD) では上記のアミノ酸残基と対応する位置にアラニンが存在していた。これらの知見から、TacM3K および SsoDMD 構造中で 140 番目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と予想した。そこで第 3 章における研究では、TacM3K の Glu140 に対する部位特異的な変異導入を施し、HvoPMD で対応するアミノ酸残基であるアラニンへ置換した TacM3K (E140A)、側鎖の短い極性残基であるセリンへ置換した TacM3K (E140S)、お

よび SsoDMD を含む多くの DMD で対応するアミノ酸残基であるグリシンへ置換した TacM3K (E140S) をそれぞれ構築した。第 2 章と同様にこれら変異体酵素を MVA 経路中間体基質と反応させ、その生成物を順相 TLC で分析することで、機能評価を行った。その結果、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 と反応性を示し、極性の高い化合物を合成した。同化合物の構造を明らかにするため、 ^{13}C -NMR および ESI-MS 分析に供した結果、MVA-5-P の 3 位ヒドロキシ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。つまり、これら TacM3K 変異体は MVA-5-P の 3 位ヒドロキシ基のリン酸化活性を有しており、TacM3K の基質特異性改変に成功したと言える。HvoPMD の構造を模倣する目的で構築した TacM3K (E140A) では、期待通り PMD 反応の前半部分と同じ反応を触媒した。一方で、筆者の予想に反し、DMD の構造を模倣した変異体である TacM3K (E140G) は、DMD の基質である MVA-5-PP を MVA-3-P-5-PP に変換する反応を触媒しなかった。TacM3K に MVA-5-PP のような大きな基質を認識させるには、この 140 番目のアミノ酸残基の置換だけでは不十分であり、その他の構造的要素が必要であると考えられた。特筆すべきは、TacM3K 変異体が触媒する MVA-5-P の 3 位ヒドロキシ基のリン酸化反応と同一反応を触媒する酵素はこれまで自然界からは同定されていないという点であり、同反応は非天然の酵素反応と言える。自然界で同一化合物を合成する唯一の酵素は、変形 MVA 経路 II の M3P5K であり、MVA-3-P の 5 位ヒドロキシ基をリン酸化することで MVA-3,5-BP を合成する。つまり、TacM3K 変異体と M3P5K は、それぞれ異なる反応で同一化合物を合成する。そこで筆者は、この TacM3K 変異体が触媒する非天然の酵素反応と既知の MVA 経路関連酵素を組み合わせれば、現在自然界からは見つかっていない人工 MVA 経路の設計ができるという着想に至った。実際にこの人工 MVA 経路を大腸菌内に構築し、リコペン生産を指標とした評価を行った結果、同経路が大腸菌内で機能する事が強く示唆された。既知の MVA 経路とのリコペン生産性の比較を行ったところ、人工 MVA 経路のリコペン生産性は、最も生産性の高かった酵母由来の古典的 MVA 経路と比較しても大きく引けを取ることはなく、今後、同経路を構成する遺伝子発現系の最適化を行う事で、その他の MVA 経路よりも優れたイソプレノイド生産性を示すことが期待された。ちなみに、SsoDMD の Gly140 を TacM3K で対応するグルタミン酸へ置換した SsoDMD (G140E) の構築と機能評価も行った。同変異体は MVA とわずかに反応性を示し、MVA-3-P を合成した。しかし、野生型 SsoDMD が有する 3 位リン酸基の脱離および脱炭酸反応を同変異体は触媒せず、MVA の脱炭酸反応は起こらなかった。以上の第 3 章における研究の結果から、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が解明されたが、両酵素を含む DMD ホモログの基質特異性に関わる構造的要素には未解明な部分が多く残されている。これらが解明できれば、DMD ホモログの分子進

化の歴史を理解することに繋がり、さらには MVA 経路に多様性が生じた原因を解き明かす糸口となるだろう。そのためには、M3K および DMD を用いた更なる変異解析や、PMD および BMD といったその他の DMD ホモログを用いた変異解析にも取り組む必要があるように思える。

第 4 章における研究では、バイオ燃料として実用化されているエタノールよりも優れたエネルギー密度を有していることから、ガソリンの代替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た。同化合物の微生物生産を目指す研究が数多く行われているが、既存の最も生産性の高いイソプレノール生産大腸菌株では、多段階にわたる代謝段階と複数の ATP が消費される代謝経路が用いられている。これらが解消できれば生産性の向上が期待できるが、そのためには MVA からイソプレノールへの直接的な脱炭酸反応を触媒する必要がある。しかし、MVA の 3 位リン酸化および 3 位リン酸基の脱離に伴う脱炭酸反応を触媒する酵素メバロン酸デカルボキシラーゼ (MVD) は自然界からは同定されていない。そこで、第 2 章および第 3 章で行った TacM3K および SsoDMD の構造比較および変異解析の結果から、これら酵素の持つそれぞれの機能的要素を組み合わせることで、人工酵素 MVD が作製できるという着想に至った。具体的には、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ることを考えた。しかし、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の構築が課題となっていた。そこで、MVD 反応産物となるイソプレノールを、最近同定されたリン酸化酵素を用いることでリコペン生合成経路とリンクさせ、リコペンの蓄積による大腸菌コロニーの赤色の呈色を指標としたポジティブスクリーニング法を考案した。これにより、MVD 活性を持つ変異体を赤色のコロニーとして選抜できる。これに先立ち、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 株の構築に取り組み、これに成功した。その後、同株を利用して実際に TacM3K 遺伝子を用いたランダム変異導入およびスクリーニングにも取り組んだが、偽陽性コロニーの出現という課題が浮上し、MVD の作製には至っていない。今後は同スクリーニング法の改良および新たな手法の開発に取り組み、MVD の作製へ繋げていきたい。

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、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。以上から、本研究は学術的な側面だけでなく、応用研究への広がりも視野に入れた研究と言えると言える。