

古細菌膜脂質合成に関わるフラビン酵素の分子機構解明と応用

名古屋大学 大学院生命農学研究科 邊見 久

【緒言】

古細菌はリボソーム小サブユニット RNA の配列に基づく全生物の分類において、真核生物、真正細菌と並ぶ第3の生物群として知られている。古細菌を他の生物から区別する特徴は他にもいくつか存在するが、膜脂質はその最も代表的なものである。古細菌の膜脂質は、そのグリセロール部分に付加したアルキル側鎖が完全飽和したイソプレノイドアルコールであるという特徴を持ち、これは他生物の膜脂質で見られる脂肪酸とは大きく異なる。その生合成には複数のフラビン酵素が関与している(図)。その1つはイソプレノイド生合成の活性単位であるイソペンテニルニリン酸(IPP)とジメチルアリルニリン酸(DMAPP)の間の異性化反応を触媒するイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ(IDI)であり、古細菌や一部の真正細菌が有する同酵素は、既知の非フラビン酵素であるタイプ1 IDI と区別するため、タイプ2 IDI と呼称されている。また、これらの活性イソプレン単位4分子の重合的縮合により生じるゲラニルゲラニル基がグリセロール部分に付加された後、これを完全飽和するゲラニルゲラニル基還元酵素(GGR)もまたフラビン酵素である。我々はこれらの酵素についてその分子機構の詳細な解明を進め、応用の可能性を探ることを目的としているが、本発表においてはこれまでに得られた知見について報告を行いたい。

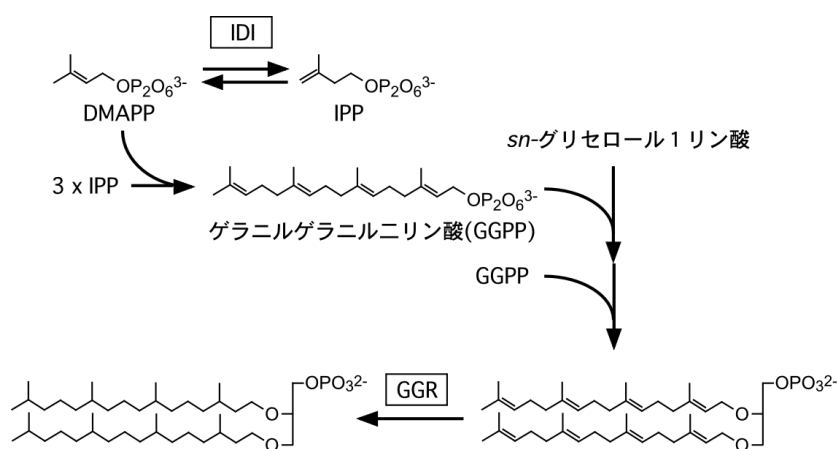


図 古細菌膜脂質の生合成系路

【タイプ2 IDI の反応機構】

タイプ2 IDI は異性化酵素でありながら、フラビンモノヌクレオチド(FMN)と還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(リン酸)[NAD(P)H]という、一般的に酸化還元反応に必要とされる補酵素を活性に要求するという奇妙な性質を持ち、発見以来、その反応機構に興味を持たれて来た。我々は好熱性古細菌 *Sulfolobus shibatae* 由来の同酵素を用いて、反応機構に関する研究を進め、まず NAD(P)H が他の還元剤で置換可能であり、還元型の FMN が真に必要な補酵素であることを明らかにした¹⁾。さらに、アポ化した同酵素を 5-deaza FMN というフラビンアナログにより再構成することで、酵素活性が完全に失われることを示した²⁾。当初、我々はこれらの結果をもとに、同酵素の触媒する反応はラジカル中間体を介すると予想し、還元型 FMN が酸化還元的な役割を果たす機構を提唱した。しかしながら、近年他の研究グループにより、タイプ2 IDI でのラジカル中間体の存在を否定し、プロトン転移機構を支持する結果が報告された。この矛盾を解消すべく、我々は *S. shibatae* 由来タイプ2 IDI の結晶構造解析と部位特異的変異導入を行った³⁾。結晶構造解析については、オスミウム浸漬結晶を用いた多波長異常分散法により基質フリー(FMN は結合している)の構造を明らかにした。同構造は既に報告されている *Bacillus subtilis* や *Thermus thermophilus* のタイプ2 IDI と同様にテトラマーであり、 β/α バレル構造をとる各サブユニットに1分子ずつ FMN が結合していた。我々はさらに IPP、DMAPP を浸漬した結晶についても解析を行い、これらの基質複合体の構造を世界に先駆けて明らかにすることができた。さらに、各結晶を還元剤溶液に浸漬することで還元型の結晶を得、それらの構造解析にも成功した。特に還元型の基質複合体は活性状態の構造を示すと考えられるため、反応機構の解明にはきわめて重要であった。得られた基質複合体の

活性部位中において基質は FMN の *si* 面上に密着して存在しており、酸化還元状態や基質の違いによる周辺構造の変化はほとんど観察されなかった。一方、部位特異的変異導入は、基質と FMN の周辺に存在する、高度に保存された荷電アミノ酸もしくは極性アミノ酸をそれぞれアラニンに置換する形で行い、十数個の変異体を構築した。立体構造におけるアミノ酸残基の位置と、それらの置換による活性変化を総合して考察した結果、基質周辺には一般酸塩基触媒として基質とのプロトンのやり取りを行えるアミノ酸残基は存在しないことが分かった。すなわちこの結果は、タイプ 2 IDI において還元型 FMN が一般酸塩基触媒として機能していることを示している。立体構造に基づいてさらに詳細な反応機構を推察した結果、同酵素の厳密な立体特異性を説明するには、還元型 FMN の N5 窒素が触媒だと考えるのが最も都合が良いことが分かった。この仮説は、我々が以前示した 5-deaza FMN によるタイプ 2 IDI の失活という結果とも合致するものである。

1) Yamashita S. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* (2004) **271**, 1087-1093. 2) Hemmi H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) **322**, 905-910. 3) Unno H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2009) in press.

【GGR の反応特異性とその意義】

古細菌膜脂質におけるゲラニルゲラニル基の二重結合の還元は、不安定なアリルエーテル結合を安定なエーテル結合に変換し、脂質分子の化学的安定性を向上させる重要な反応である。古細菌膜脂質では、中間体におけるゲラニルゲラニル基の 4 つの二重結合が全て還元され、フィタニル基が生じる。我々は既に、好熱性アーキアである *Archaeoglobus fulgidus* の呼吸鎖キノンであるメナキノン-7(14H)の生合成において、同じくイソプレノイド側鎖の還元に関わるメナキノン特異的プレニル基還元酵素をクローニングしていた⁴⁾。同菌におけるそのホモログの 1 つが、亜ジチオン酸を電子供与体とした際に、ゲラニルゲラニル基を有する膜脂質生合成前駆体に対して還元活性を示したため、これを GGR として報告した⁵⁾。同酵素はフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を結合しており、グリセロール部分に付加したゲラニルゲラニル基のみならず、その生合成前駆体であるゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) に対しても弱い活性を示した。我々はこの結果を踏まえ、GGPP を基質とした場合の生成物が何かを *Sulfolobus acidocaldarius* 由来の GGR を用いて明らかにした⁶⁾。もし二重結合全てが還元されるのであれば、その後のグリセロール部分への転移反応に適さない dead-end 生成物であるフィタニルニリン酸が生じるはずであるが、詳細な検討を行ったところ、同酵素は GGPP の α 末端側に存在するアリル性二重結合を還元せず、生じるフィチルニリン酸は転移反応の基質となることが分かった。すなわち、GGR の二重結合に対する反応特異性が基質により異なるのは、無駄な化合物を合成しないための合理的な機構だと考えられる。

4) Hemmi H. *et al.*, *J. Bacteriol.* (2005) **187**, 1937-1944. 5) Murakami M. *et al.*, *FEBS J.* (2007) **274**, 805-814. 6) Sato S. *et al.*, *J. Bacteriol.* (2008) **190**, 3923-3929.

【今後の課題】

タイプ 2 IDI に関しては立体構造に基づいた部位特異的変異導入が可能であるため、現在さらに詳細な反応機構の解明を目的としていくつかの変異体を構築し、その特性評価を行っている。タイプ 1 IDI との違いが明らかとなれば、反応機構に基づく阻害剤の開発も可能になるかもしれない。タイプ 1 IDI がヒトに存在するのに対し、タイプ 2 IDI は黄色ブドウ球菌や腸球菌といった医療上の大きな問題となっている病原菌に存在している。したがって、タイプ 2 IDI 特異的な阻害剤の開発は創薬につながると期待される。GGR に関しても立体構造解析を進めており、現在精密化の途中にある。同酵素が複数の二重結合を連続して還元する機構、特に還元力の供給の仕組みは興味深く、立体構造とそれに基づく変異導入により、同酵素の反応機序が明らかになることを期待している。また、GGR を用いれば自然界に数多く存在するゲラニルゲラニル基を有する化合物を新規化合物に変換可能であり、そのようにして作出された新規化合物に有用な機能が見出せるのではないかと考えている。