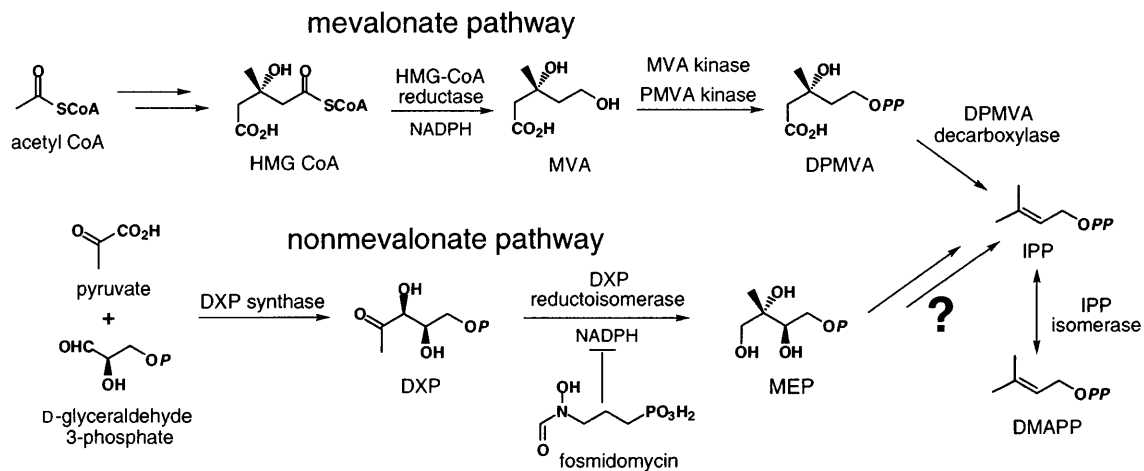


論文の要旨

応用生命化学専攻
平成 10 年度博士課程入学
氏名 高木 基樹
指導教官 早川 洋一

論文題目 非メバロン酸経路に関する研究

イソプレノイド化合物の生合成基本単位である isopentenyl diphosphate (IPP) とそのアイソマーである dimethylallyl diphosphate (DMAPP) は、全ての生物において、acetyl CoA を出発基質としメバロン酸 (MVA) を経由する、いわゆるメバロン酸経路で生合成されるとこれまでの長い間信じられてきた。しかしながら、高等植物の色素体、緑藻、大腸菌や枯草菌をはじめとする多くの真正細菌においては、メバロン酸経路とは全く異なる新規経路、非メバロン酸経路が存在することが近年明らかにされた。この非メバロン酸経路の初発の反応は、pyruvate と D-glyceraldehyde 3-phosphate から 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) が生成する縮合反応であり、この反応を触媒する酵素 DXP synthase をコードする遺伝子 (*dxs*) が数種の生物からクローニングされている。第 2 段階目の反応は、DXP から 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) が生成する分子内転位と還元が同時に起こる反応であり、この反応を触媒する酵素 DXP reductoisomerase をコードする遺伝子 (*dxr*) については、当研究室で、大腸菌からクローニングすることに成功した。また、標的未知であった抗菌剤 fosmidomycin が DXP reductoisomerase の特異的阻害剤であることも明らかにした。しかしながら、MEP 以降の生合成反応については、全く判明していない。そこで、非メバロン酸経路の MEP から IPP に至る本経路の全貌の解明を目指して研究を行った。



メバロン酸経路と非メバロン酸経路

1. 非メバロン酸経路の変異株の取得

非メバロン酸経路の MEP から IPP に至る経路の解明を行うために、MEP 以降の非メバロン酸経路の欠損変異株の取得を試みた。非メバロン酸経路の欠損変異株は致死であるため、外部から最終産物である IPP を供給しなければならない。しかしながら、IPP のようなリン酸化合物は細胞内への透過性が悪いいため、外部から IPP を供給することは難しいと考えた。実際、*dxr* 破壊株に IPP を添加して培養したが生育は認められなかった。そこで、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 株よりクローニングしたメバロン酸経路遺伝子クラスターを利用し、大腸菌にメバロン酸経路のメバロン酸以降の遺伝子 mevalonate kinase、phosphomevalonate (PMVA) kinase、diphosphomevalonate (DPMVA) decarboxylase、IPP isomerase を導入し、メバロン酸添加時には IPP および DMAPP をメバロン酸経路で供給できる系を構築した。次に、この形質転換株を変異処理することにより、非メバロン酸経路の欠損変異株をメバロン酸要求変異株としてスクリーニングした。約 60,000 コロニーをスクリーニングしたところ、17 株のメバロン酸要求変異株を取得することができた。これらの変異株は、目的通り、メバロン酸非存在下では生育できず、メバロン酸存在下では野生株と同等の生育を示した。

次に、非メバロン酸経路の欠損変異株の変異を相補する遺伝子の取得を試みた。大腸菌のゲノミックライブラリーで変異株を形質転換し、メバロン酸非存在下で生育が回復することを指標に、相補遺伝子として機能未知遺伝子であった 4 つの遺伝子 *gcpE*、*YACM*、*ygbB*、*ychB* を取得することに成功した。これらの遺伝子は、*dxs* 遺伝子や *dxr* 遺伝子と同様に、酵母、古細菌やメバロン酸経

路を有する真正細菌からは検出されず、多くの真正細菌に見出された。従って、これらの遺伝子は、生物における分布からも非メバロン酸経路の遺伝子であることが示唆された。

2. 非メバロン酸経路の欠損変異株の相補遺伝子の機能解析

取得した4つの遺伝子 *YACM*、*ygbB*、*ychB*、*gcpE* の非メバロン酸経路における機能解析を行った。それぞれの遺伝子を大腸菌で大量発現させ、遺伝子産物を精製した。それぞれの遺伝子産物と生合成中間体である MEP を様々な条件下で反応させた。その結果、*YACM* 遺伝子産物と MEP を CTP 存在下で反応したときのみ、反応の進行が確認できた。この反応産物を精製後、各種分析機器を用いて構造解析を行い、反応産物の構造を 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME)と決定した。このことから、*YACM* 遺伝子産物は、MEP を CTP 存在下で CDP-ME に変換する酵素 2-C-methyl-D-erythritol cytidyltransferase (MEP cytidyltransferase)であることが明らかとなった。

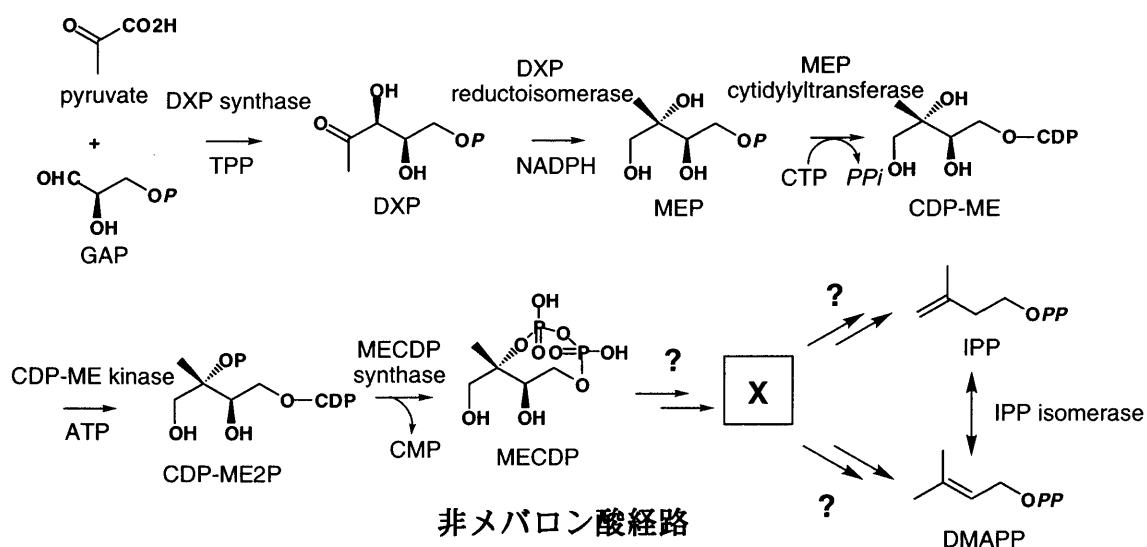
次に、CDP-ME と *ygbB*、*ychB*、*gcpE* 遺伝子産物を様々な条件下で反応させた。その結果、*ychB* 遺伝子産物と CDP-ME を ATP 存在下で反応させたときのみ、反応の進行が確認でき、この反応産物の構造を 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME2P)と決定した。このことから、*ychB* 遺伝子産物は、CDP-ME を ATP 存在下で CDP-ME2P に変換する酵素 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase (CDP-ME kinase)であることが明らかとなった。

さらに、CDP-ME2P と *ygbB*、*gcpE* 遺伝子産物を様々な条件下で反応させた。その結果、*ygbB* 遺伝子産物と CDP-ME2P を反応させたときのみ、反応の進行が確認でき、この反応産物の構造を 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP)と決定した。このことから、*ygbB* 遺伝子産物は、CDP-ME2P を MECDP に変換する酵素 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MECDP synthase)であることが明らかとなった。

以上のように、非メバロン酸経路の MEP 以降 MECDP に至る3段階の反応を解明し、*YACM* 遺伝子産物が MEP cytidyltransferase であること、*ychB* 遺伝子産物が CDP-ME kinase であること、*ygbB* 遺伝子産物が MECDP synthase であることを明らかにした。しかしながら、*gcpE* 遺伝子産物と MECDP を反応させたが、反応の進行は観察できなかった。*gcpE* 遺伝子の機能についてはいまだ解明されていない。

3. 非メバロン酸経路の後半部分の解析

本研究の進行中、IPP と DMAPP の相互変換を行う IPP isomerase 遺伝子 (*idi*) は、大腸菌においては必須ではないことが報告された。このことは、1. 非メバロン酸経路では、IPP 経路と DMAPP 経路に分岐している、2. 大腸菌は *idi* 遺伝子以外にも IPP isomerase 遺伝子を有している、という2つの可能性を示唆していた。そこで、*dxr* と *idi* の両遺伝子破壊株 (*E. coli* DK331)に、メバロン酸経路のメバロン酸以降の3つの遺伝子 MVA kinase、PMVA kinase、DPMVA decarboxylase を導入し、IPP のみを供給したときの生育を検討することにより、MECDP 以降の反応経路について解析を行った。その結果、*E. coli* DK331 に IPP のみを供給した場合には、生育が確認できなかったが、*E. coli* DK331 に前述の3つのメバロン酸経路遺伝子に加えて、外来の IPP isomerase 遺伝子を導入した場合には、生育を示した。このことから、大腸菌は、IPP isomerase として *idi* 遺伝子のみを有していることが証明され、非メバロン酸経路は IPP 経路と DMAPP 経路とに分岐していることが強く示唆された。



以上のように、非メバロン酸経路の MEP 以降 MECDP に至る 3 段階の反応を明らかにし、それらの反応を触媒する酵素をコードする遺伝子のクローニングに成功した。また、MECDP 以降、IPP 経路と DMAPP 経路に分岐することを示した。しかしながら、MECDP 以降の反応経路およびそれらの反応を触媒する酵素や関連する遺伝子については、不明のままである。現在、さらに MECDP 以降の経路の解明を目指し研究を展開している。