

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成12年度博士課程 進学

氏名 清水 知宏

指導教官名 早川 洋一

論文題目 原核生物におけるイソプレノイドの生合成に関する研究

生体の構成成分として、また種々の生理活性物質として、生体内で多様な役割を担っているステロイドやカロテノイドなどのいわゆるイソプレノイドは、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) を基本単位とした縮合反応によって生成される。酵母などの真核生物を用いた詳細な研究成果から、これらの基本単位は全ての生物においてメバロン酸経路を経て生合成されると信じられてきた。しかし、Rohmer らはメバロン酸経路とは異なる全く新しい IPP の生合成経路、すなわち 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) 経路 (非メバロン酸経路) の存在を提唱し、それが高等植物の色素体や緑藻、多くの真正細菌といった広範囲の生物に分布していることを報告した。次いで MEP 経路の初発反応である pyruvate と D-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) の縮合による 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) の生成が報告され、多数のグループによる精力的な研究が開始された。当研究室では DXP の生成に続く第2段階から第5段階の反応の解明に成功したが、それ以降の経路については未解明のままである。また、大腸菌や枯草菌をはじめとする多くの真正細菌が MEP 経路を利用する一方、一部のグラム陽性菌はメバロン酸経路を利用すること、さらに、両経路を併せ持つ放線菌が存在することが判明してきており、原核生物におけるイソプレノイド生合成経路の多様性が注目を集めている。

本研究は、真核生物に比べて研究の遅れていた原核生物におけるイソプレノイドの生合成に関して、MEP 経路およびメバロン酸経路の詳細を解析するとともに、これを応用した特異的

阻害剤の探索を目的として行ったものである。

## 1. MEP 経路特異的阻害剤の探索

ヒトを含めた高等動物はメバロン酸 (MVA) を経るメバロン酸経路のみを利用していると考えられる。さらに、MEP 経路を利用する微生物の生育には同経路が必須であること、植物のクロロフィル合成にも MEP 経路が必須であることより、MEP 経路の阻害剤は安全な抗菌剤や除草剤のリード化合物になり得ると期待される。また、未解明の MEP 経路の生合成研究においても、MEP 経路の阻害剤は極めて有用なツールとして利用できると考えられる。以上の理由から、MEP 経路特異的阻害剤の取得を目的として探索を行った。

まず、特徴的な抗菌スペクトルを指標に MEP 経路特異的阻害剤の候補として、これまで標的未知であった fosmidomycin (FMM) を見出した。その作用について検討したところ、FMM は MEP 経路の第二段階の酵素である DXP reductoisomerase (DXR) に対して、強い阻害活性を持つことが判明した。次いでその  $K_i$  値を 9.4 nM と決定し、拮抗型の阻害型式であることを明らかにした。また、FMM は実際に大腸菌の野生株の生育を阻止したが、この生育阻害は DXR の反応生成物 MEP のアルコール体、2-C-methyl-D-erythritol の添加によって消失し、生育が回復した。さらに FMM は、*dxr* 遺伝子を破壊した大腸菌に対しては全く阻害活性を示さなかった。これらの結果から、FMM は DXR の反応を特異的に阻害すると結論づけ、初の MEP 経路特異的阻害剤を見出すことができた。

## 2. 放線菌のメバロン酸経路生合成遺伝子クラスターの解析と特異的阻害剤の探索系への応用

一般に放線菌は MEP 経路のみを利用して生育するが、当研究室で発見された naphterpin 生産菌 *Streptomyces* sp. CL190 株を含む幾つかの放線菌はメバロン酸経路をも利用し、二次代謝産物としてイソプレノイドを生産することが明らかになってきた。当研究室では放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 株のメバロン酸経路生合成遺伝子クラスターのクローニングに成功しており、このクラスター内には、アミノ酸配列の相同検索から IPP isomerase (IDI) を除くメバロン酸経路の全ての酵素、すなわち 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) synthase、HMG-CoA reductase、MVA kinase (MVAK)、phosphomevalonate kinase (PMVAK)、diphosphomevalonate decarboxylase (DPMVAD) が含まれていることが示唆されていた。さらに、同クラスター内に新しいタイプ (type2) の IDI が存在することが当研究室にて明らかにされた。そこで、これまで原核生物においては詳細な解析が行われていなかった MVAK、PMVAK、DPMVAD について、まず大量発現系の構築を行い、酵素学的諸性質を明らかにした。その結果、これらの酵素の最大反応速度は、細胞膜成分としてイソプレノイドを大量に必要とするカビや酵母のそれらと比較すると 10 倍以上小さいことが判明した。

次いで、これらのメバロン酸経路の遺伝子を利用して MEP 経路特異的阻害剤の探索系を構築した。この系の有効性について先述した FMM を用いて確認したところ、MEP 経路特異的な抗菌活性を極めて高い感度で検出できることが判明した。現在、この系を用いて当研究室でスクリーニングを実施しており、有用な特異的阻害剤の発見が期待される。

### 3. MEP 経路の未知段階の解明

当研究室では継続して MEP 経路の全貌の解明に向けて取り組んできており、既に DXP の生成に続く 4 段階の反応によって 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) が生成するまでを明らかにしていたが、最終生成物である IPP および DMAPP に至るまでの後半部分の反応については依然として不明であった (図 2)。MECDP からは少なくとも 2 段階以上の反応が残されていることが予想されたが、これまで候補遺伝子として取得していたのは *gcpE* 遺伝子のみであり、関与する反応についても不明であったため、さらに候補遺伝子を取得し、検討する必要があった。

一方、当研究室や他の研究グループの結果から、MEP 経路は後半部分のある段階で IPP と DMAPP のそれぞれを生成する経路に分岐していることが裏付けられた。そこで分岐以降の反応に関与する新しい遺伝子を取得するため、次のような探索系を構築した。まず大腸菌の *idi* をコードしている *idi* 遺伝子の破壊株 (DK310) を作製し、さらに MVAK、PMVAK、DPMVAD 遺伝子を導入した (図 1 左)。本菌において、MVA の添加時のみメバロン酸経路により、IPP の供給が可能になる。この探索系 I を用いて、変異処理後の MVA 要求性を指標に、分岐以降の IPP に至る経路に関与する遺伝子の探索を行った。

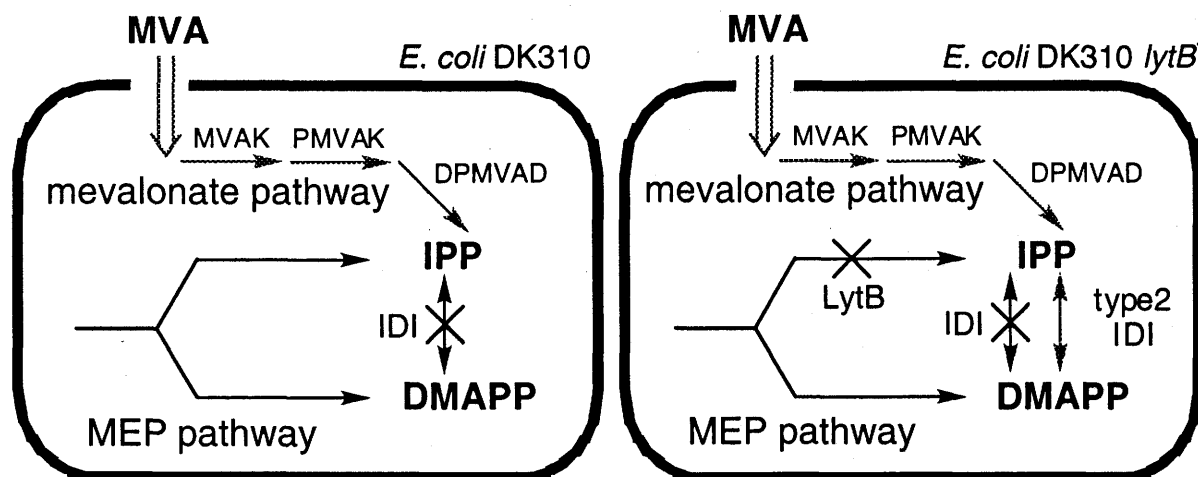


図 1 MEP 経路に関与する遺伝子の探索系 ((左) 探索系 I (右) 探索系 II)

探索の結果、機能未知の *lytB* 遺伝子が候補として得られた。ゲノムプロジェクトが終了した生物を対象に *lytB* 遺伝子と高い相同性を持つ遺伝子の分布を調べたところ、MEP 経路を利用することが判明している生物種の分布に一致した。また、取得した *lytB* 変異株に type2 IDI を導入した菌株 (図 1 右) は、MVA 要求性が消失したが、これは分岐後の DMAPP への経路から IPP isomerase を経て迂回した IPP の供給によるものだと考えられた。以上の理由から、*lytB* 遺伝子が MEP 経路の分岐後の IPP への経路に関わることが強く示唆された。

一方、他の研究グループによって、*gcpE* 遺伝子産物が MECDP を (E)-4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl diphosphate (HMBDP) に変換する反応に関与することが示唆された (図 2)。次いで、*lytB* 遺伝子産物が HMBDP を IPP と DMAPP のそれぞれに変換することが示唆され、MEP 経路の後半は HMBDP から分岐していることが予想された。しかしながら、これらの研究で用いられた

酵素反応系には菌体の粗抽出液の添加が必要であったことから、酵素レベルでの完全な証明には、反応に関与する何らかの蛋白質あるいは補酵素などの低分子を同定する必要があった。

また、大腸菌や結核菌などの微生物の非蛋白性低分子化合物がヒト免疫系の $\gamma\delta$  T 細胞を刺激し、増殖を促進する活性を持つことが知られていたが、その様な強い増殖促進活性を持つ化合物として HMBDP が報告された。そこで、先述した *lytB* 変異株について $\gamma\delta$  T 細胞に対する増殖促進活性を測定した結果、野生株と比較して約 300 倍強い活性を持つことが判明し、*lytB* 遺伝子産物の反応が阻害されることによって菌体内に HMBDP が蓄積していることが示唆された。したがって、この $\gamma\delta$  T 細胞に対する増殖促進活性の変化を指標にすることにより、分岐前ならびに分岐後の DMAPP への経路に関わる遺伝子が取得できると考えられた。そこで、C. T. Morita らが探索系 II (図 1 右) を用いてトランスポゾンによる MEP 経路変異株の探索を実施したところ、新たに *fldA* 遺伝子破壊株を取得した。この *fldA* 破壊株は $\gamma\delta$  T 細胞に対する増殖促進活性が野生株とほぼ同程度まで低下しており、生育に MVA を要求したため、HMBDP 以前の段階で MEP 経路が遮断されていると考えられた。さらにこの破壊株の MVA 要求性は、*fldA* 遺伝子を挿入したプラスミドで形質転換することにより相補された。大腸菌において *fldA* 遺伝子がコードする flavodoxin I は、種々の酵素反応において電子伝達体として作用し、*fpr* 遺伝子がコードする flavodoxin reductase と対になって生体内の還元反応に関与することが知られている。以上の理由から、FldA が GcpE と共同して MECDP から HMBDP への変換反応に関与していることが示唆された。

現在、MEP 経路に関与することが判明した *gcpE*、*lytB*、*fldA* および *fpr* の各遺伝子産物を大量発現させて得た組換え蛋白質と、予想される種々の補酵素とを組み合わせ、MECDP や HMBDP を基質とした酵素反応の進行について検討中である。

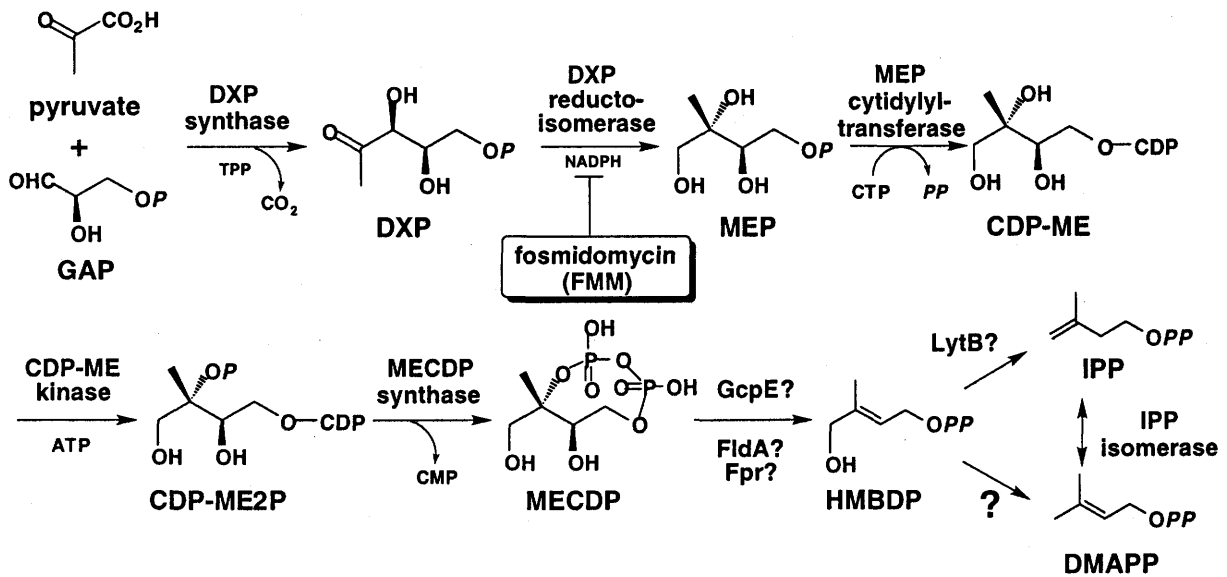


図 2 MEP 経路