

未解明一次代謝経路、非メバロン酸経路に関する遺伝子の機能解析

● 葛山 智久

東京大学分子細胞生物学研究所（現所属：東京大学生物生産工学研究センター）

〈研究の目的と進め方〉

イソプレノイドは、動物のステロイドホルモン、植物のカロテノイド、微生物のエビキノンやメナキノンなど、様々な生物において重要な役割を担っている。これらの全てのイソプレノイドは、炭素5個からなる基本単位であるdimethylallyl diphosphate (DMAPP)にisopentenyl diphosphate (IPP)が複数個縮合することによって合成される。これらDMAPPとIPPの生合成経路としては、2つの生合成経路が存在することが分かってきた。1つは、いわゆるメバロン酸経路であり、真核生物、古細菌、高等植物の細胞質ゾルで機能している。もう1つは、近年発見された非メバロン酸経路であり、大腸菌や結核菌、ピロリ菌、緑膿菌を含む多くの真正細菌、マラリア原虫であるPlasmodium falciparum、高等植物の色素体が本経路を利用していることが判明している。研究開始当初、非メバロン酸経路に関する情報は限定的なものであったが、我々は、大腸菌を用いて、本経路の生合成中間体である1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP)から2-C-methyl-D-erythritol 2,4-diphosphate (MECDP)に至る4段階の生合成反応を世界に先駆けて解明するとともに、それらの反応を触媒する4つの酵素、DXP reductoisomerase、MEP cytidyltransferase、CDP-ME kinase、MECDP synthaseの性質を明らかにし、また対応する4つの遺伝子、*yaem*、*ygbP*、*ygbB*、*ygbB*のクローニングにも成功した。さらに、非メバロン酸経路の酵素の一つであるDXP reductoisomerase阻害剤のスクリーニングを実行し、これまで標的分子が明らかにされていなかったfosmidomycin（本物質は元は微生物代謝産物から発見された）が本酵素の特異的阻害剤であることを明らかにするとともに、非メバロン酸経路が、抗菌剤や除草剤開発のための新しいターゲットになり得ることを示した。その後、fosmidomycinが抗マラリア剤としても有効であることが報告され（Science 285, 1573, 1999.）、非メバロン酸経路特異的阻害剤の探索研究が注目されるようになった。

一つの細胞をシステムとして完全に理解するためには、その細胞が利用している一次代謝経路と、それに関わる全ての遺伝子を同定することが必要不可欠である。しかしながら、全ゲノム配列が明らかにされた大腸菌や枯草菌をはじめとする微生物ですら、上述した「非メバロン酸経路（最近では、2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate経路と言われている）」の全貌は解明されていなかった。

本研究では、非メバロン酸経路の遺伝子を同定、その機能解析を行うことにより、本経路の全容解明を目指す。この研究によって、これまで未解明であった真正細菌におけるイソプレノイド生合成経路の全体像を、ひいては、細胞壁合成という細菌にとっては必須の機能を、細胞という一つのシステムにおいて捉えることを目指す。

〈研究開始時の研究計画〉

まず、非メバロン酸経路に関与する遺伝子の取得を大腸菌を材料に行う。我々は、メバロン酸経路と非メバロ

ン酸経路の両方を持つ放線菌からメバロン酸経路に関与する遺伝子群をクローニングし、それらを大腸菌内で誘導剤を用いて誘導発現できる系を確立した。つまり、この形質転換体は誘導剤存在下で、メバロン酸経路と非メバロン酸経路の両方の経路でIPPを合成することが可能である。大腸菌は、非メバロン酸経路を欠損した場合、IPPを合成することができず、リピッド中間体が合成されないため細胞壁合成を行えず致死となる。従って、大腸菌をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを用いて変異処理後、誘導剤存在下では生育可能であるが非存在下では生育不可能な菌株を取得することにより、理論上全ての非メバロン酸経路の欠損株の取得が可能となる。実際、我々は、本方法を用いて非メバロン酸経路上の3、4、5番目の反応を触媒する酵素をコードする遺伝子、*ygbP*、*ygbB*、*ygbB*の同定に成功している。次いで、得られた変異株を宿主に用いるショットガンクローニングを行い、誘導剤非存在下で生育する形質転換株を選択することにより、目的とする非メバロン酸経路に関与する遺伝子を取得する。枯草菌の遺伝子に関しては、相同検索からそれらのホモログを同定する。

本方法と平行して、真正細菌における遺伝子の分布を利用して、非メバロン酸経路に関わる遺伝子を絞り込む。これまでに同定されている非メバロン酸経路の5つの遺伝子はいずれも、大腸菌、枯草菌などの真正細菌には存在するが、黄色ブドウ球菌や酵母などのようにメバロン酸経路を利用することが明らかになっている生物には存在しないことが判明している。従って、そのような分布を有する遺伝子を検索することにより、非メバロン酸経路に関わる遺伝子を絞り込むことが可能であると考えられる。

次に、取得した遺伝子の機能解析を行う。取得した遺伝子をPCR法を用いて増幅し、適当な発現ベクターと連結することにより、組換え酵素を大量に調製する。次に、これら酵素を非メバロン酸経路の生合成中間体と反応させ、まずは、反応が進行する至適条件を検討する。その条件で酵素反応を行い、反応産物を各種クロマトグラフィーを用いて精製する。次に、精製物の構造をNMRとMSスペクトルを用いて決定する。取得遺伝子の酵素としての機能が判明した後は、酵素学的パラメーターを測定する。この結果からは、非メバロン酸経路における律速段階を推定することが可能である。

〈研究期間の成果〉

上述した目的変異株のスクリーニングを実施した結果、既にクローニング済みの*ygbP*、*ygbB*、*ygbB*遺伝子の欠損株の他に*gcpE*遺伝子欠損変異株が6株得られた。そこで、この遺伝子が真に非メバロン酸経路に関与していることを、[1-13C]glucoseを利用した標識実験により確認することにした。

[1-13C]glucoseは、解糖系により[3-13C]pyruvate及び[3-13C]glyceraldehyde 3-phosphateへ変換されるので、両者を出発物質とする非メバロン酸経路では、13CはIPPの

1位と5位に取り込まれる。それに対して、メバロン酸経路では、[3-13C]pyruvateが脱炭酸を経て[2-13C]acetyl CoAへと変換され、IPPの2、4、5位に取り込まれる。そこで、大腸菌の一次代謝産物であるubiquinoneのイソプレノイド側鎖における標識パターンの相違により、非メバロン酸経路の欠損を確認することにした。

E. coli W3110(pTMV19)、非メバロン酸経路の2番目の酵素遺伝子であるdxrの遺伝子破壊株*E. coli* DK223(pTMV19)を変異株と同様の条件で培養して、ubiquinoneを単離し、同位体の存在比を算出した。pTMV19にはメバロン酸経路の遺伝子クラスターを含んでいる。その結果、予想通り、*E. coli* W3110(pTMV19)では非メバロン酸経路により、[1-13C]glucoseがIPPの1、5位に取り込まれていた。しかしながら、メバロン酸経路により取り込まれるはずのIPPの2、4、5位の取り込みが観測されなかった。これは、培地にメバロン酸を添加したために同位体が希釈されたためだと考えられる。*E. coli* DK223(pTMV19)は、非メバロン酸経路が破壊されておりメバロン酸経路でのみ生育しているために、非メバロン酸経路による取り込みが観測されなかった。また、*E. coli* W3110(pTMV19)と同様にメバロン酸存在下で培養したため、メバロン酸経路での取り込みも観測されなかった。変異株についても両経路による取り込みが観測されなかった。この結果、取得したgcpE遺伝子変異株では、非メバロン酸経路が全く働いていないことが判明し、メバロン酸要求変異株として選択した変異株は、非メバロン酸経路が欠損していることが確認できた。gcpE遺伝子のクローニングについては、以前に同方法で取得したygbP、ychB、ygbB遺伝子と併せて、成果発表リスト1.1で報告した。

以上のように、当初計画どおり非メバロン酸経路に関与する新規遺伝子gcpEをクローニングすることができた。しかしながら、さらにスクリーニングを続けてもgcpE遺伝子以外には取得することができなかった。

非メバロン酸経路の生合成中間体であるDXPの4位の水素がDMAPPに保持されたままubiquinoneのイソプレノイド側鎖の末端に生合成されるのに対して、IPPには保持されないという報告がされている。また、大腸菌のIPPとDMAPPを変換する酵素IPP isomerase (idi)遺伝子は必須ではないという報告もされた。これらの結果を考慮すると、大腸菌において、非メバロン酸経路がIPP経路とDMAPP経路の2つの経路に分岐する可能性が示唆された。これを証明するためには、idi遺伝子以外にもIPP isomerase遺伝子が存在する可能性を否定することが必要であると考えられた。そこで、idi遺伝子破壊株*E. coli* DK310を作製したところ、DK310は野生株と同様の生育を示し、菌の形態の変化も観察されなかった。従って、IPP isomeraseは大腸菌にとって必須ではないことが確認できた。このことから、上述したスクリーニング系では分岐後の反応に関与する遺伝子は取得できないと考えられた。そこで、次のようなスクリーニング系を新たに構築した。

まず、*E. coli* DK310にメバロン酸添加時にのみメバロン酸経路でIPPを供給できる形質転換体を作製した。次に、この形質転換体を親株として、メバロン酸の要求性を指標に、分岐以降のIPPに至る経路に関与する遺伝子の欠損変異株を探索した。その結果、2株のメバロン酸要求株を取得することに成功した。さらに、これらの変異を相補する遺伝子としてlytB遺伝子を取得した。ゲノムプロジェクトが終了している微生物でのlytB遺伝子の分布を調べたところ、非メバロン酸経路のその他の5つの遺

伝子と同様に、酵母や古細菌やメバロン酸経路を利用する真正細菌、黄色ブドウ球菌には存在せず、枯草菌などの多くの真正細菌に存在しており、非メバロン酸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、lytB遺伝子のアミノ酸配列は生物間で高い相同性を示した。

次に、得られた変異株のgcpEとlytBの変異点の同定を行った。gcpEの2種類の変異株では、遺伝子内には変異は見つからなかった。おそらくプロモーター領域などに変異が導入されていると考えられる。残りの4種類のgcpE変異株では、32S (TCC) → 32F (TTC)、139G (GGA) → 139Q (GAA)、133R (CGT) → 133C (TGT)、221S (TCC) → 221F (TTC)の変異が導入されていることが判明した。

次に、取得したgcpE遺伝子とlytB遺伝子の機能解析を行った。取得した遺伝子をPCR法を用いて増幅し、適当な発現ベクターと連結することにより、組換え酵素を大量に調製した。次に、これら酵素を非メバロン酸経路の生合成中間体、MECDPと反応させ、反応が進行する条件を検討した。しかしながら、検討したいずれの条件においても、反応の進行は検出できなかった。

このような状況下、Rohmerらは、gcpE遺伝子産物がMECDPを新規生合成中間体、E-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate (HMBDP)に変換することを報告した。

また、大腸菌や結核菌などの微生物の非タンパク性低分子化合物がヒト免疫系のVg2/Vd2レセプターを発現したT細胞(gdT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、非メバロン酸経路の中間体がそのような強い増殖促進活性を示す可能性が報告された。さらに、lytB欠損株から、gdT細胞に対する増殖促進活性を有する化合物としてHMBDPが報告された。そこで、共同研究者であるIowa大学のC. T. Moritaらは、我々が取得したlytB変異株培養液中の、gdT細胞に対する増殖促進活性を測定し、lytB変異株が野生株と比較して約300倍強い活性を持つことを明らかにした。これは、変異型lytB遺伝子産物による反応が進行しないことによって、HMBDPが蓄積していることが原因と考えられた。このことから、このgdT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た。そこで、上記のlytB変異株を用いて、gdT細胞に対する増殖促進活性とメバロン酸経路要求性を指標にして、トランスポゾンによる非メバロン酸経路変異株の探索を実施した。その結果、既知の非メバロン酸経路の変異株の他に、fldA破壊株が取得された。この破壊株の性質を調べてみると、予想どおり、gdT細胞に対する増殖促進活性が野生株と同等まで低下していた。これまで、fldA遺伝子がコードするフラボドキシンは必須遺伝子であることは判明していたが、生体内のどの酵素反応に関わっているのは未知であった。今回、我々は、フラボドキシンが非メバロン酸経路の後半の反応、おそらくgcpEとlytB遺伝子産物の触媒する反応に必須の補酵素であることをin vivoで証明した。これらの結果は、成果発表リスト3.1の論文で報告した。

次に、フラボドキシンがgcpEとlytB遺伝子産物の触媒する反応に必須の補酵素であることをin vitroで証明することを試みた。gcpEまたはlytB遺伝子産物と、フラボドキシンとフラボドキシン還元酵素とを混合し、様々な反応条件で反応の検出を試みたが、活性の検出には至らなかった。

以下のことは、研究計画にはなかったが研究過程で枯草菌の機能未知遺伝子ygpAの機能解析を行ったので報告する。データベースに登録されていたygpA遺伝子の開始コドンの411塩基上流に真の開始コドンを見出した。新たに見出した開始コドンからの読み枠を大腸菌内で高発現させ、その組換えタンパク質の機能解析を行ったところ、このタンパク質は、FMNとNADPHの存在化でIPP isomerase活性を示すtype 2 IPP isomeraseであることが分かった。そこで、この酵素の酵素学的性質を詳細に解析し、我々が以前解析した他の生物のtype 2 IPP isomeraseの性質と比較した。また、このygpA遺伝子破壊株を培養し、通常培養下ではygpA遺伝子は必須ではないことを明らかにした。これらの結果は、成果公表リスト2.の論文で報告した。

これまで述べたように、我々は、大腸菌の非メバロン酸経路に関わる遺伝子のすべての欠損変異株を取得した。〈国内外での成果の位置づけ〉でも述べるが、現在、植物を研究材料としている研究者と、植物の非メバロン酸経路に関わる遺伝子の機能解析について共同研究を行っている。その一つについて、以下に報告する。

いちよう (*Ginkgo biloba*) は、イソプレノイドの一種であるギンコライドを生産している。ギンコライドは高い抗酸化活性を有しているため健康食品などとして使用されている。また、ギンコライドは、非メバロン酸経路から供給されるIPPとDMAPPから生合成されることも判明している。いちようを研究材料にしている研究者らは、ギンコライドの生産性向上を目指して、非メバロン酸経路の機能解析を進めている。現在、*Ginkgo biloba*のゲノム情報は報告されていないため、非メバロン酸経路の遺伝子は、アラビドプシスやイネの遺伝情報を利用してクローニングされている。しかしながら、クローニング後の*in vitro*における機能解析に関しては、大腸菌での高発現を試みても、発現しない、またはインクルージョンボディを形成してしまうなどの理由から、困難なことが多い。一方、我々の大腸菌の変異株を使って相補実験をすれば、比較的容易に機能解析をすることができる。そこで、韓国ソウル大学のKim教授と、いちようの非メバロン酸経路の遺伝子に関して共同研究を開始した。その結果、最近、いちようからクローニングした2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MECS)と考えられる遺伝子が、確かに大腸菌の欠損変異株を相補することができることを示すことができた。この成果は、成果発表リスト4.の論文で報告した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

非メバロン酸経路は生育に必須な一次代謝経路であり、その大部分を解明できたことは、天然物化学分野のみならず、生化学分野にもインパクトを与えた。我々は、変異株や生合成中間体といった非メバロン酸経路に関する材料を持っているため、それらの分与に関する請求が国内外から多いことは特筆に値すると考えている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

計画で述べたスクリーニング法で変異株取りを続けたが、gcpE遺伝子以外に新たな変異株の取得は出来なかった。また、研究の過程において、予想外の結果であったが、IPPとDMAPPが別経路で独立に生合成されることが判明した。これらのことは、非メバロン酸経路において、MECDPまたはそれ以降の中間体のところで経路が分岐していることを示唆していた。そこで、我々は、大腸菌のIPP isomerase破壊株にメバロン酸経路の遺伝子群を導

入した形質転換株を作製し、非メバロン酸経路のMECDP以降の変異株を取得するための新たなスクリーニング系を新たに構築し、スクリーニングを開始した。その結果、lytB遺伝子を取得することができた。しかしながら、様々な補因子や反応条件を検討したにもかかわらず、*in vitro*におけるgcpE遺伝子産物とlytB遺伝子産物の機能解析には至らなかった。これは、これらの遺伝子産物が酸素に対してきわめて弱いため、通常の酸素存在下では失活してしまうためであることが、外国の研究者らによって後に明らかにされた。

また、これらの反応に必要な還元剤が、フラボドキシンであることはきわめて意外な結果であったが、これにより、フラボドキシンの生体内における役割が明らかになった。

〈今後の課題〉

植物 (アラビドプシス、イネ、いちよう、ゴムの木など) の非メバロン酸経路の遺伝子の同定と機能解析を共同研究により進める。

これまでの研究は、非メバロン酸経路を解明するという基礎研究であったが、今後は、非メバロン酸経路が、抗菌剤や除草剤、抗マラリア剤開発のための新しいターゲットになり得ることから、そのような薬剤のリード化合物を探索するといった応用研究を展開すべきだと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Kuzuyama, T., and Seto, H. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat. Prod. Rep.* 20: 171-183 (2003).
2. Takagi, M., Kaneda, K., Shimizu, T., Hayakawa, Y., Seto, H., and Kuzuyama, T. *Bacillus subtilis* ygpA gene is *fni*, a nonessential gene encoding type 2 isopentenyl diphosphate isomerase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 132-137 (2004).
3. Puan, K. J., Wang, H., Dairi, T., Kuzuyama, T., and Morita, C. T. *fldA* is an essential gene required in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* 579: 3802-3806 (2005).
4. Kim, S. M., Chang, Y. J. Kuzuyama, T., and Kim, S. U. Cloning and characterization of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MECS) gene from *Ginkgo biloba*. *Plant Cell Reports.* in press.