



ユニークなフラビン酵素：タイプ2 イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ

はじめに

イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (IDI) は、イソプレノイド生合成の基本構成単位であるイソペンテニルニリン酸 (IPP) と、その異性体である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酵素である¹⁾ (図1)。イソプレノイドは最大の天然化合物群であり、呼吸鎖キノンや糖キャリア脂質など重要な化合物を含むため、イソプレノイド代謝経路の欠損は一般に致死的な影響を与える。但し IPP と DMAPP までの生合成経路は自然界に2種類存在しており、そのうちメチルエリスリトールリン酸経路では IPP と DMAPP が共に生じるため、同経路を有する生物にとって IDI は生育に必須ではない。しかしもう一方のメバロン酸経路を有する生物にとって IDI は必要不可欠な存在であり、同酵素無しでは DMAPP を合成できず、当然それに続くイソプレノイド生合成も行えない。

IDI には進化的な関連性の無い二つのタイプが存在し、互いに全く配列相同性を持たない。真核生物や、大腸菌など一部の真正細菌に存在するタイプ1 IDI が二価金属イオンのみを活性に要求するのに対し、古細菌や、黄色ブドウ球菌など一部の真正細菌が持つタイプ2 IDI はフラビンモノヌクレオチド (FMN) と還元型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (リン酸) [NAD(P)H]、および二価金属イオンを要求するフラビン酵素である²⁾。非フラビン酵素であるタイプ1 IDI の反応機構は既に解明が進み、高度に保存されたシステイン残基とグルタミン酸残基がそれぞれ一般酸塩基触媒として機能し、プロトン化一脱プロトン化機構により第三級カルボカチオン中間体を経て異性化反応が進行することが示されている。一方タイプ2 IDI は、反応全体としては非酸化還元的な異性化反応を触媒す

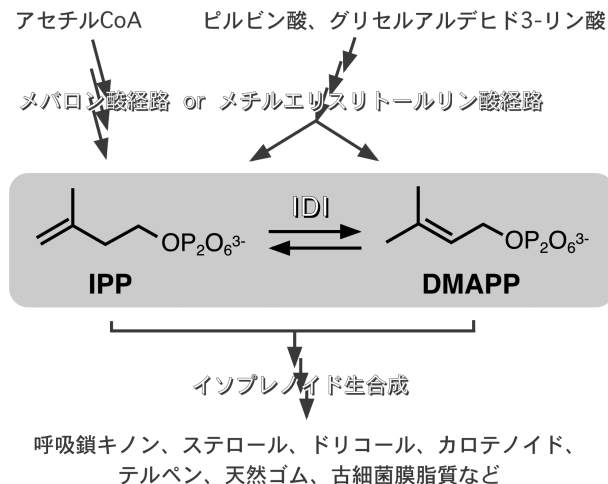


図1 IDIが触媒する異性化反応

一部の例外を除き、生物はメバロン酸経路とメチルエリスリトールリン酸経路のどちらか一方を有している。大半の真核生物と古細菌、および一部の真正細菌はメバロン酸経路により IPP を合成する。

るにもかかわらず、酸化還元補酵素として知られる FMN と NAD(P)H を要求することから、発見直後よりその反応機構に興味を持たれていた³⁾。最近の研究により、同酵素においてフラビン酵素としてはきわめてまれな反応機構の存在が見出され、その詳細が明らかにされつつある。本稿ではこれまでのタイプ2 IDI に関する研究の経緯と、その発見がフラビン酵素研究に与えたインパクトについて概説する。

1. タイプ2 IDI における真の補酵素要求性

なぜタイプ2 IDI の反応機構が注目されたのか、まずはその理由を説明しておく必要があるだろう。同酵素が触媒する異性化反応はきわめて単純な水素転移反応に過ぎない。しかし、酸化還元補酵素である FMN と NAD(P)H の介在により、タイプ2 IDI ではその単純な反応を①ヒドリド転移、②ラジカル転移、③プロトン転移という異なった様式のいずれによっても説明できるのである。そこで筆者らは、好熱性古細菌 *Sulfolobus shibatae* 由来のタイプ2 IDI を用い、真に必要な補酵素が何かを明らかにしようと試みた。IPP を基質とした異性化反応に伴って消費される NADH の化学量論を求めたところ、NADH の消費量は触媒量に過ぎないことが明らかになった⁴⁾。さらに、NAD(P)H を一般的な還元剤で置換した場合にも同酵素は異性化反応を触媒でき⁵⁾、したがって NAD(P)H は直接反

応に関与しないことが示された。また、異性化反応基質の非存在下において、タイプ2 IDIはNADHオキシダーゼ活性を示した⁴⁾。これはFMNがNADHから酸素への電子移動を仲介していることを示唆するものであり、実際に嫌気条件下においては、NADHの添加によって酸化型から還元型へのFMNのスペクトル変化が観察された。以上の結果は、還元型FMNこそが真に必要な補酵素だということを示している。

2. 酵素学的研究による反応機構の解明

次いで、過去のフラビン酵素研究で用いられた手法がタイプ2 IDIの研究に適用された。アポ化したタイプ2 IDIをFMNの構造アナログ5-deazaFMNにより再構成すると完全に活性が失われるという事実は、FMNが酵素の活性構造の維持以上の役割を担っていることを明確に示した^{5,6)}。このアナログはフラビン酵素の反応機構を調べる手がかりとして古くから用いられてきたもので、1電子転移は触媒できないが2電子転移は触媒できるという性質を有している。したがって、伝統的な解釈によれば、この完全な失活はタイプ2 IDIにおけるヒドリド転移機構を否定し、ラジカル転移機構を支持するものである。但しこの解釈は、フラビンが酸化還元的な役割を有するという前提に立っている。

一方で、タイプ1 IDIの研究に用いられた基質アナログがタイプ2 IDIの反応機構解明にも応用され、異なった結論を導き出した⁷⁻⁹⁾。例えばタイプ1 IDIの触媒残基であるシステインとの間に共有結合を形成して不可逆的に活性を阻害する基質アナログ、エポキシIPPをタイプ2 IDIと反応させると、エポキシ環が開裂した同アナログと還元型FMNの共有結合物（アダクト）が得られることが報告された。同様のアダクト形成はビニル基やフッ素基を有する基質アナログにおいても観察され、いずれの共有結合形成もFMNのN5位で起きていた。しかし、これらの結果は必ずしも二つのタイプのIDIが同じ反応機構を有することを意味するものではない。還元型FMNを触媒としたラジカル転移機構においてもアダクト形成は説明できるし、もしくは還元型FMNが触媒ではなく、単に反応中間体に近接してその安定化に寄与しているといった場合でも同様のアダクト形成は起きうるからである。反応機構解明の決定打となったのは、同じく基質アナログであるシクロプロピルIPPを用いた実験であった。このアナログはラジカルクロックと呼ばれる類いの化合物であり、ラジカル転移によりそのシクロプロピル基が容易に開環する。しかし同基質

アナログとタイプ2 IDIとの反応では、開環は起きず異性化反応が進行した。したがって同酵素の反応においてラジカル中間体は存在し得ず、すなわちプロトン転移機構により異性化反応が触媒されていることが示されたのである。

加えて、電子スピン共鳴解析において基質由来のラジカルが観察されなかった、また、重水素置換した基質を用いて測定された同位体効果が1.8~2.3、重水中での反応における溶媒同位体効果がおおよそ1.4であった、といった報告もまた、ラジカル転移機構を否定しプロトン転移機構を支持するものであった¹⁰⁾。

3. 立体構造解析が明らかにしたFMNの役割

それではプロトン転移機構において還元型FMNはどのような役割を果たしているのだろうか。同反応機構はタイプ1 IDIと同様にアミノ酸残基によっても触媒可能である。一方でFMNの還元が重要なことは明らかであり、さらに基質アナログとアダクトを形成することから還元型FMNは基質近傍に位置していると考えられる。これらの知見を説明可能なFMNの役割は以下の二つに絞られる。第1の可能性は、還元型FMNが一般酸塩基触媒として機能するというものである。そのようなフラビンの機能は報告例が無いものの、還元型FMNはプロトンの解離によってアニオン体になりうるため、タイプ1 IDIの触媒残基と同様に酸塩基として機能しうる。第2の可能性は、触媒はアミノ酸残基などFMN以外のものであり、基質がプロトン化されて生じるカルボカチオン中間体を還元型FMNのアニオン体が安定化するというものである。これらのいずれが正しいかを判断するためには、酸塩基触媒が何かを明らかにする必要があった。

触媒残基の特定のためには、立体構造データが不可欠である。タイプ2 IDIの結晶構造解析は*Bacillus subtilis* および*Thermus thermophilus* という2種の真正細菌由来の酵素を用いて既に行われており、一次構造から推定された通りグリコール酸オキシダーゼなどのFMN依存性酸化還元酵素に相同な $\alpha 8\beta 8$ バレル構造が示されていた^{11,12)}。しかしそれらの構造中にはFMNは結合していたものの基質が結合しておらず、触媒残基に関する情報は全く得られていなかった。

そこで筆者らは*S. shibatae*由来の同酵素を用いて結晶構造解析を進め、基質-酵素複合体の立体構造を酸化状態、還元状態の双方において解明することに成功した¹³⁾ (図2)。同酵素の構造は既知の真正細菌由来のタイプ2酵素に相同であり、テトラマー構造を有していた。同酵素とFMNの

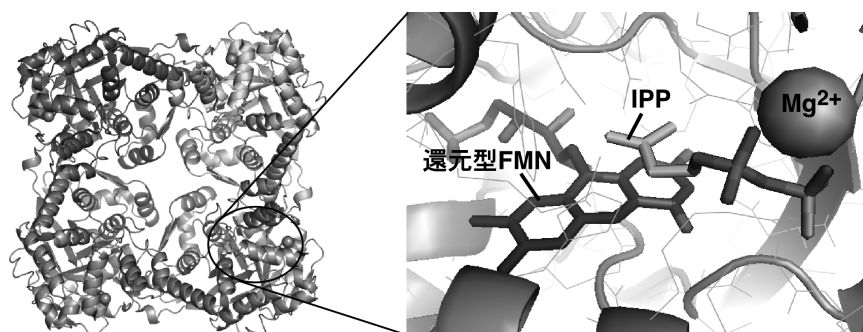


図2 *S. shibatae* 由来タイプ2 IDI の結晶構造

還元状態における IPP との複合体の構造をリボンモデルで示した。左はホモテトラマー構造全体を、右は一サブユニット中の活性部位を拡大して示したものである。還元型 FMN と IPP をスティックで、 Mg^{2+} イオンを球で表した。また、活性部位の図においてのみ周辺アミノ酸残基をワイヤーフレームで示した。

親和性は高く、精製によって FMN は解離しない。このため結晶生成時に FMN を添加しなかったにもかかわらず、全てのサブユニットに 1 分子ずつ FMN が結合していた。基質は予想された通り FMN のイソアロキサジン環に近接して結合していた。したがって還元型 FMN は、触媒としてプロトン転移に関与することも、中間体を安定化することも可能な位置にある。酸化還元による構造変化は基質-酵素複合体ではほとんど観察されず、基質、FMN、およびその周辺残基がほぼ同様の配置を維持していた。

結晶構造解析と並行して、筆者らはタイプ2 IDI 間で高度に保存され、かつ活性部位近傍に位置すると予想される極性アミノ酸残基を選択し、それらを各々アラニンに置換した *S. shibatae* タイプ2 IDI の変異体を十数個構築した¹³⁾。実際の結晶構造中でそれらの残基は全て FMN もしくは基質の近傍に位置しており、さらに、構造情報から判断してプロトン転移に関わりうる残基の全てをカバーしていた。これらの変異体の酵素活性と立体構造を照らし合わせた結果、同酵素において直接酸塩基触媒として機能する、もしくは水素結合ネットワークを介してプロトン転移に関わるアミノ酸残基は存在しないことが結論付けられ、還元型 FMN がプロトン化と脱プロトン化の双方を担う一般酸塩基触媒として特定された。

おわりに

タイプ2 IDI において明らかにされたフラビン酵素の反応機構、すなわちフラビンが酸化還元的な役割無しに一般酸塩基触媒として働くという機構はこれまでに報告例の無いものである。但し、フラビンによる類似の触媒機構が過去に他の異性化酵素において予想されており¹⁴⁾、また、あ

る酸化還元酵素の反応において、フラビンが酸化還元触媒として働くと同時に酸塩基触媒としても機能していることが提唱されている¹⁵⁾。したがって、アミノ酸残基で触媒可能な反応をなぜ補酵素を使う必要があるかはさておき、フラビンの一般酸塩基触媒としての機能は無理のないものとも言える。よって今後タイプ2 IDI と類似した反応機構を持つフラビン酵素が見出される可能性は高い。また、これまで反応機構が未解明であったフラビン酵素において同様の触媒機構が同定される可能性もあるだろう。研究され尽くした感のあるフラビン酵素において、このような新たな発見がなされたのは驚きであり、今後フラビンの化学に新展開をもたらすものと期待している。

- 1) Kuzuyama, T., Hemmi, H., & Takahashi, S. (2010) *Comprehensive Natural Products Chemistry II*, vol. 1, pp. 493–516, Elsevier, Oxford.
- 2) Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa, Y., & Seto, H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 932–937.
- 3) Bornemann, S. (2002) *Nat. Prod. Rep.*, **19**, 761–772.
- 4) Yamashita, S., Hemmi, H., Ikeda, Y., Nakayama, T., & Nishino, T. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1087–1093.
- 5) Hemmi, H., Ikeda, Y., Yamashita, S., Nakayama, T., & Nishino, T. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **322**, 905–910.
- 6) Kittleman, W., Thibodeaux, C.J., Liu, Y.N., Zhang, H., & Liu, H.W. (2007) *Biochemistry*, **46**, 8401–8413.
- 7) Hoshino, T., Tamegai, H., Kakinuma, K., & Eguchi, T. (2006) *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 6555–6559.
- 8) Johnston, J.B., Walker, J.R., Rothman, S.C., & Poulter, C.D. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 7740–7741.
- 9) Rothman, S.C., Helm, T.R., & Poulter, C.D. (2007) *Biochemistry*, **46**, 5437–5445.
- 10) Thibodeaux, C.J., Mansoorabadi, S.O., Kittleman, W., Chang, W.C., & Liu, H.W. (2008) *Biochemistry*, **47**, 2547–2558.

- 11) Steinbacher, S., Kaiser, J., Gerhardt, S., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., & Rohdich, F. (2003) *J. Mol. Biol.*, **329**, 973–982.
- 12) de Ruyck, J., Rothman, S.C., Poulter, C.D., & Wouters, J. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1515–1518.
- 13) Unno, H., Yamashita, S., Ikeda, Y., Sekiguchi, S., Yoshida, N., Yoshimura, T., Kusunoki, M., Nakayama, T., Nishino, T., & Hemmi, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 9160–9167.
- 14) Maclean, J. & Ali, S. (2003) *Structure*, **11**, 1499–1511.
- 15) Edmondson, D.E., Mattevi, A., Binda, C., Li, M., & Hubalek, F. (2004) *Curr. Med. Chem.*, **11**, 1983–1993.

邊見 久

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

A unique flavoenzyme: type 2 isopentenyl diphosphate isomerase

Hisashi Hemmi (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan)

RIG-I 様受容体シグナルの負の制御

1. はじめに

ウイルス等の病原体に対する感染防御機構の第一段階として、病原体由来構造物 (pathogen associated molecular patterns: PAMPs) を異物として認識することが必須である。それらを検知する受容体として Toll 様受容体 (TLR), RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptor: RLR), NOD 様受容体 (NLR) ファミリーなどの多くのタイプの受容体が同定されている^{1,2)}。いずれのタイプの受容体においても PAMPs の検知がサイトカイン等の分泌/危険信号, 病原体の駆逐につながり, 我々を感染症からまもっている。その一方, サイトカイン分泌の制御にブレーキがかからない状態に陥るとショック, 慢性的な細胞毒性, 自己免疫疾患に陥ることも示されており, 不必要となったサイトカイン分泌は速やかに中断されなければならない³⁾。2004年に同定された RNA ウイルス由来の RNA 細胞内受容体である RIG-I の発見以来⁴⁾, その RNA 認識から 1 型インターフェロンの産生までのシグナリングに関わる因子, 特に活性化に関わる因子の同定とそのメカニズムの解明は飛躍的に進んでいる。一方それと同時にそのブレーキをかける負の制御因子においても近年その同定が進んでいる⁵⁾。

本ミニレビューでは RLR の負の制御因子, 特に最近注

目され, 多くの負の制御因子が同定されているユビキチン化に関わる制御を中心に述べてみたい。

2. RLR によるウイルス, RNA の認識

RLR ファミリーは, DExD/H box RNA ヘリカーゼである RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1), MDA5 (melanoma differentiated-associated gene-5), LGP2 (laboratory of genetics and physiology-2) の三つからなっており (図 1A), 細胞内で二本鎖 RNA ウイルス由来のゲノミック RNA, 一本鎖 RNA ウイルス由来の複製の中間体として産生される二本鎖 RNA を結合する。共通の構造として, DExD/H box RNA ヘリカーゼドメインと C 末端側に存在する RNA 結合に重要な C 末端ドメイン (CTD) があげられる^{1,2)}。RIG-I, MDA5 の N 末端側には IPS-1 (interferon positive stimulator-1) の活性化に必要なドメインである二つの CARD ドメイン (caspase activation and recruitment domain) が存在するのに対し, LGP2 には存在しないことから, LGP2 は RIG-I, MDA5 の負の制御因子と考えられていた⁵⁾。ところがその後の研究により正の制御因子であることが明らかになった^{6,7)}。それぞれの RLR はウイルスの種類によってその仕事で分類されている。RIG-I はセンダイ, インフルエンザウイルスなどの認識, MDA5 はピコナウイルスの認識に必須である¹⁾。LGP2 は RIG-I, MDA5 による認識を助けていると考えられている。

3. RLR シグナリング

シグナルの第一ステップとして, RIG-I がウイルス由来の RNA を CTD により認識すると立体構造の変化を起こし, 活性化ドメインである N 末端の CARD ドメインが IPS-1 にアクセスしやすい状態になると考えられている。その後ユビキチンリガーゼである TRIM25, Ripet がユビキチンの Lys63 がアミド結合する (K63) 結合様式で CARD ドメインをユビキチン化し^{1,2)}, それがミトコンドリアアダプタータンパク質である IPS-1 との結合を誘導する。さらに E3 ユビキチンリガーゼ TRAF3, アダプタータンパク質 TRADD, STING (stimulator of interferon genes) が IPS-1 と結合し, FADD, RIP, カスパーゼ 8/10 との複合体を形成し, 下流のリン酸化酵素である TBK1, IKKi の活性化により, 1 型 IFN プロモーターを誘導する転写因子群 NF- κ B, IRF-3, IRF-7 の活性化につながり, インターフェロンの発現を誘導する^{1,2)} (図 1B)。

以上の活性化シグナルをふまえ, RLR の負の制御因子について以下に紹介したい。