

氏名・(本籍)	さいとう ゆきこ 齋藤 由紀子
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第 719 号
学位授与年月日	昭 和 56 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 化学専攻
学位論文題目	メナキノンの生合成における芳香環プレニル化酵素に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 小 倉 協 三      教 授 高 瀬 嘉 平 教 授 田 宮 信 雄

## 論 文 目 次

### 緒 論

第一章 *Micrococcus luteus* における 1,4-Dihydroxy-2-naphthoate : polyprenyltransferase の存在

第二章 酵素の諸性質

第三章 基質特異性(1)  
プレニル基側の基質特異性

第四章 基質特異性(2)  
芳香環側の基質特異性

第五章 まとめと考察

# 論文内容要旨

## 緒論

天然には数多くのイソプレノイドキノン化合物が存在しているが、これらは構造上の特徴から大きく四つのグループに分類される。すなわち、(1)ユビキノ系 (Co Q), (2)プラストキノ系, (3)トコフェロール系 (ビタミンE), (4)メナキノ・フィロキノ系 (ビタミンK) である。中でもユビキノは、細菌から高等動植物に至るまで広く存在しており、生合成や電子伝達の生理機能に関する研究も多くなされている。これに対しメナキノは、特に細菌類に多く見出されているが、その生合成機構や生理機能については不明の点が多く興味深い。

これらのイソプレノイドキノンの生合成を考える時、最終段階として側鎖となるプレニル基の芳香環基質への導入過程が存在すると思われる。しかしながら今までに見出されているプレニル化酵素は三種類のみであり、しかもすべてが膜結合性で可溶化がなされていないことから、得られている知見も少ない。一つはユビキノンの生合成に関する p-Hydroxybenzoate : polyprenyltransferase で、ラット肝のミトコンドリア画分、酵母のミトコンドリア画分、および E. coli に見出されている。メナキノンの生合成に関しては、鶏肝臓のミクロソーム画分に Menadione : polyprenyl transferase が、E. coli には 1, 4-Dihydroxy-2-naphthoate : octaprenyltransferase がそれぞれ見出されているが、これらの酵素が全く異なる種類のものなのかどうか疑問が残っている。

また、メナキノンの生合成については放射性同位体でラベルした前駆体の投与実験から、プレニル化基質の構造やプレニル化の位置について若干の知見が得られている。これらを念頭におき、メナキノンの生合成における可能な最終ルートを図1のA~Dのように考えた。

そこで著者は先づこれらの可能なルートを検証すること、さらにはプレニル化に伴う脱炭酸やメチル化の諸過程の関係を調べることを第一の目的として本研究を行なった。

本研究のもう一つの目的は、側鎖の鎖長規制に関する問題の解決にあった。細菌の種類によってイソプレノイドキノンの側鎖の鎖長は異なっているが、一つの細菌においては常に同一鎖長のもののみ生産し、たとえ鎖長の異なる数種類のキノンを有する場合でもその鎖長の分布は常に一定であると言われている。従って生体内には鎖長を規制する因子が存在すると思われた。

## 第一章

メナキノン生産菌として *Micrococcus luteus* を選び芳香環プレニル化酵素の探索を行なったところ、粗抽出液中に 1, 4-Dihydroxy-2-naphthoate : polyprenyltransferase 活性の存在を確認することができた。酵素活性は膜画分に存在し、界面活性剤やフレンチプレス

処理による可溶化は不可能であった。反応生成物の高速液体クロマトグラフィーやマススペクトルによる分析結果から本酵素が 1, 4-Dihydroxy-2-naphthoic acid を基質とし最終生成物としてデメチルメナキノンを与えるものであることを確認できた。また、高速液体クロマトグラフィーによって、内在性メナキノンと酵素反応生成物であるデメチルメナキノンとの側鎖の鎖長分布に相違があるという興味深い現象を捕えることができ、鎖長規制因子の問題を解く手掛りを得た。

## 第二章

酵素反応の pH 依存性、金属イオンの要求性、EDTA の添加効果、一価カチオンの効果、界面活性剤の添加効果、SH 試薬および SH 阻害剤の効果、脱炭酸補酵素の効果、酸化還元剤の効果について検討した。その結果、多くの膜結合性酵素に見られる界面活性剤の効果や一価カチオンの添加効果は全く観察されず、特に界面活性剤は、試みたすべての試薬が極めて低濃度領域から阻害的にしか作用しなかった。金属イオンとしては  $Mg^{2+}$  が最も良い活性化剤として作用するが、EDTA の添加もまた酵素活性を高める効果を示すことがわかった。また、本酵素は SH 酵素ではないこと、さらに、反応に脱炭酸過程を含むが、一般的な脱炭酸酵素の補酵素は何の効果も示さないことがわかった。これらの諸性質の検討結果から *M. luteus* のプレニル化酵素のアッセイ法を確立した。

## 第三章

本酵素のプレニル基側の基質特異性については三つの観点から検討した。第一に、鎖長に関する特異性を調べるために、炭素数 5, 10, 15, 20, 35~45 のプレニルピロリン酸を用いて酵素反応を行なった。炭素数 10 以下のプレニル基質は全く反応しないが、15 や 20 が非常によい基質となり、*in vitro* の実験では本来の基質である 35~45 のピロリン酸を凌ぐ活性を示した。従ってメナキノンの側鎖の鎖長は、このプレニル化酵素のプレニル基質に対する特異性によって規制されているのではないことがわかった。第二に構造上の比較としてトランス体とシス体、並びに二重結合が部分的に飽和している基質について調べてみた。その結果、O 末端のシス体は全く基質として取り込まれないことがわかり、一部の例外を除いてメナキノンの側鎖が全トランスの立体構造を持つこととよい一致をみた。また飽和度が高くなる程反応性は減少する傾向を示すが、トランス体である限り基質となり得ることがわかった。第三に親水性部分について検討したところ、遊離のアルコール体は全く不活性であるがモノリン酸が低活性ながら基質として取り込まれることが示された。これはプレニルモノリン酸自身がプレニル基転移反応の基質としてはたらいだ最初の例であり、反応機構を議論する上でも意義深い。

以上の実験結果から本酵素はプレニル基側の基質として (1) 全トランス体であること

(2)炭素数 15 以上のプレニル基であること (3)モノリン酸かピロリン酸体であることをその条件として必要とする他は、種々の基質アナログに対して非常に甘い特異性を示していることがわかった。このことからメナキノンの側鎖の鎖長規制に関する因子は、その細菌に存在しているプレニルピロリン酸合成酵素側にあるのではないかと予想された。そこで *M. luteus* に存在するポリプレニルピロリン酸合成酵素 (ソラネシルピロリン酸合成酵素) が反応時の  $Mg^{2+}$  濃度に依存して異なる鎖長のプレニルピロリン酸を生成するという事実を踏まえて、プレニル化酵素によって生成するデメチルメナキノンの側鎖鎖長との関係を調べてみた。その結果、ソラネシルピロリン酸合成酵素による反応生成物の鎖長分布がそのままデメチルメナキノンの側鎖の鎖長に反映していることが明らかになった

#### 第四章

芳香環側の基質特異性に関しては、合成基質を含む 16 種類のアナログについて検討し、次のような知見を得ることができた。

(1) プレニル化にカルボキシル基は必須である。(2) 4 位のヒドロキシル基は必須ではないが、これを欠くものは活性が著しく低下するから酵素との結合等に寄与していると考えられる。(3) メチル置換体が非常に反応性が悪いことからメチル化はプレニル化に先行しないことがわかる。(4) 本酵素は Menadione : polyprenyltransferase 活性を有しないことから、細菌における芳香環プレニル化酵素は動物におけるそれとは違うことがわかる。(5) メナキノンの生合成過程は、カルボキシテトラロンをプレニル化の基質として進行する Catalpalactone の生合成とは異なる。(6) プレニル化におけるカルボキシル基の  $\beta$ -ケト的寄与は否定的である。(7) 本酵素には p-Hydroxybenzoate : polyprenyltransferase 活性が存在しないことから、ユビキノンの生合成系とメナキノンの生合成系においてプレニル化機構は全く別個であろうと考えられる。以上の結果から、プレニル化は先づ 1, 4-Dihydroxy-2-naphthoic acid の 2 位に起こり、一度プレニル付加体を生成した後脱炭酸するのであると考えられる。

#### 第 5 章

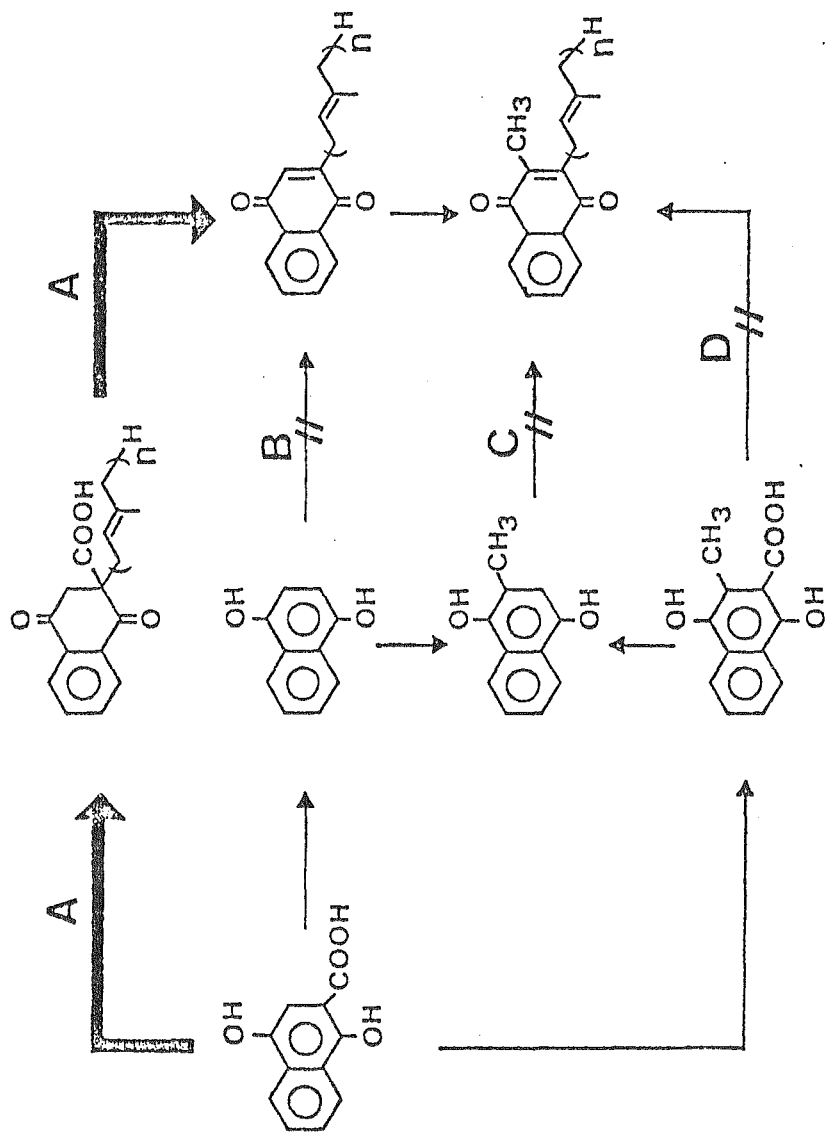
本酵素は膜結合性であるが、種々の界面活性剤が阻害的にしか作用しなかったことから、酵素活性の発現には膜の構造を必要とすると思われる。

基質特異性は、プレニル基側に比較的甘いことが示された。さらにソラネシルピロリン酸合成酵素依存性の実験から、鎖長はポリプレニルピロリン酸合成酵素の生成物特異性に依存し、芳香環プレニル化酵素の基質特異性に依らないことがわかった。

一方芳香環側の基質特異性は極めて厳しいことが示された。種々のアナログを用いた実験結果から (1) プレニル化にカルボキシル基は必須であること、(2) 少なくともメチル化はプレニ

ル化に先立っては起こらないことを明らかにし、図 1 の生合成ルートのうち、B、C、D を否定し、A ルートを支持することができた。

図1. 芳香環プレニル化の可能なルート



## 論文審査の結果の要旨

本論文はメナキノンの生合成における芳香環へのプレニル基導入の機構を研究したものである。メナキノンは細菌のもつイソプレノイドキノンとして重要であるが、その生合成に関する研究は生育細胞への前駆体投与実験によるものが主であったため、不明の点が多かった。そこで著者は鎖延長酵素については研究の進んでいる *Micrococcus luteus* を材料として、ナフタレン環のプレニル化酵素に焦点をしばりその機構解明を目的に研究を行った。

*M. luteus* のリゾチーム処理で得られる抽出液の 10 万 g の沈澱画分に 1, 4-dihydroxy-2-naphthoate : polyprenyltransferase の酵素活性を確認し、この酵素の可溶性を試みたが、常法では酵素の失活を招いたので、この沈澱画分を洗滌して酵素標品とし以下の研究に用いた。

まずこの酵素の基質となるためのプレニルピロリン酸の炭素鎖構造の条件が調べられ、 $C_5$  および  $C_{10}$  体は基質とならないが、 $C_{15}$  以上  $C_{45}$  までのものはすべて基質として作用し、それぞれ相当する demethylmenaquinone 類を生成することが明らかにされた。これにより、本細菌に存在するメナキノンの側鎖の鎖長分布は細菌内で作られるプレニルピロリン酸の鎖長分布を反映しているものと推論されたが、著者は、本細菌の鎖延長酵素が  $Mg^{++}$  イオン濃度で異なる鎖長の生成物を与えるという事実を利用して、鎖延長酵素を含む粗抽出液で、 $Mg^{++}$  濃度に依存して異なる鎖長分布をもつ demethylmenaquinone 類が生成することを確認した。

また  $C_{15}$  以上のプレニルピロリン酸もプレニル化の基質になり得ることを見いだしたことは反応機構上興味深い。しかし 2-位の二重結合が E 型であることが必要条件であることから、天然に存在する Z 型のプレニル基をもつメナキノンの生合成はこの酵素による直接のプレニル化によるものではないと結論した。

次に芳香環側の基質特異性を調べるため、生合成上の中間体として考えられる可能な化合物のみならず、反応機構的に興味ある誘導体を多数合成し、それらとファルネシルピロリン酸との酵素反応を研究した。それらの結果を総合して、メナキノンの生合成ルートに 1, 4-ナフトールや芳香環のメチル化がプレニル化に先行する経路は含まれないと結論した。また、この脱炭酸を伴うプレニル化反応の機構を考察するために貴重な知見を得た。

これらはメナキノンの生合成の研究を大きく進歩させたものであり、著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識をもつことを示している。

よって齋藤由紀子提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。