ent-カウレン酸を基質とはせず、また CYP88D6 と同じ CYP88D サブファミリーに属する (55% 以上のアミノ酸配列相同性を示す) P450 は、タルウマゴヤシ、ミヤコグサなど、カンゾウと同じマメ科植物からのみ見いだすことができた。このことは、CYP88D サブファミリーがマメ科で特異的に進化し、トリテルペンサポニンの構造多様化に寄与している可能性を示唆している。今後、多くのマメ科植物から新規 CYP88D サブファミリー P450 を単離し、その酵素機能を調べることで、トリテルペンサポニンの構造多様性をもたらす分子機構の一端が明らかになると期待される。

近年、大腸菌や酵母など、微生物を用いた植物有用二次代謝産物の合成生物学研究が脚光を浴びつつある。たとえば、Ro らは、ヨモギ属植物の一種 *Artemisia annua* (和名: クソニンジン) から単離したセスキテルペン合成酵素 (amorpho-4,11-diene synthase) 遺伝子とともに P450 である CYP71A V1 を導入した組換え酵母で、抗マラリア活性をもつセスキテルペノイドの一種であるアルテミシニンの生合成中間体 (アルテミシニン酸) を高生産させることに成功している⁽⁷⁾。一方、筆者らは、ミヤコグサから単離されていた β -アミリン合成酵素遺伝子とともに CYP88D6 を導入した組換え酵母が、11-オキソ- β -アミリンを高生産することをすでに報告している⁽⁵⁾。また、筆者らは最近、同 EST ライブラリーから 11-オキソ- β -アミリンの 30 位を酸化する P450 (仮名、P450-A21) を見いだすと同時に、先に作出した 11-オキソ- β -アミリン生産酵母に P450-A21 遺伝子を導入することで、微量ながらもグリチルリチンの非糖部 (アグリコン) に相当するグリチルレチン酸を生産することができた⁽⁸⁾ (図 1)。グリチルレチン酸は抗炎症作用を有し、皮膚塗り薬・貼付薬、化粧品などに配合されることから、今後

生産性を向上することで、原料供給源になりうるであろう。

今回筆者らが発見したグリチルリチン生合成遺伝子は今後、優良品種の育成や生産性向上に向けた栽培条件の最適化を行なう上での強力なツールになると考えられる。さらに、得られた遺伝子を用いて、組換え酵母においてグリチルリチン生合成中間体を生産することができた。同様の手法は、その他の有用トリテルペノイドにも適用することが可能である。今後、多くの植物種からトリテルペン骨格形成および骨格修飾に関わる酵素遺伝子が単離され、それらを様々な組み合わせで酵母に導入することによって、多様な天然・非天然型トリテルペノイドを生産することが可能となれば、新たな創薬資源となりうるものと期待している。

- 1) P. M. Parker : "The World Market for Licorice Roots : A 2007 Global Trade Perspective", San Diego, CA., ICON Group International Inc, 2006.
- 2) H. Hayashi, A. Hirota, N. Hiraoka & Y. Ikeshiro : *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 947 (1999).
- 3) H. Hayashi, P. Huang, A. Kirakosyan, K. Inoue, N. Hiraoka, Y. Ikeshiro, T. Kushiro, M. Shibuya & Y. Ebizuka : *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 912 (2001).
- 4) H. Sudo *et al.* : *Plant Biotechnol.*, in press.
- 5) H. Seki, K. Ohyama, S. Sawai, M. Mizutani, T. Ohnishi, H. Sudo, T. Akashi, T. Aoki, K. Saito & T. Muranaka : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14204 (2008).
- 6) M. Shibuya, M. Hoshino, Y. Katsube, H. Hayashi, T. Kushiro & Y. Ebizuka : *FEBS J.*, **273**, 948 (2006).
- 7) D. K. Ro *et al.* : *Nature*, **440**, 940 (2006).
- 8) 關 光, 大山 清, 澤井 学, 明石智義, 水谷正治, 大西利幸, 須藤 浩, 青木俊夫, 齊藤和季, 村中俊哉 : 第 26 回日本植物細胞分子生物学会年会 講演要旨集, 2008 p. 156.

(關 光^{*1, 2}, 大山 清^{*2}, 村中俊哉^{*1, 2}, ^{*1}横浜市立大学木原生物学研究所, ^{*2}理化学研究所植物科学研究センター)

真空紫外円二色性による生体分子の高次元構造解析 放射光が拓く CD 分光法のブレイクスルー

円二色性 (Circular Dichroism : CD) は光学活性分子の構造を敏感に反映するため、生体分子の構造解析において欠かせない分光法となっている。しかし、市販の装置では、水溶液中で 190 nm 以下の真空紫外 (VUV) 領域の CD スペクトルを測定することは困難で、得られる情報に限界がある。このため、近年、高輝度光源である放

射光を用いた真空紫外円二色性分散計 (以下 VUVCD と略す) が各国で開発され、160 nm 付近までの CD を利用した生体分子の構造解析が可能になってきた⁽¹⁾。我が国では、広島大学放射光科学研究センター (HSRC/Hi-SOR) で開発され、全国共同利用装置として稼動している⁽²⁾。本稿では、この装置を用いて行なった筆者らのい

図1 ■ 単糖類の VUVCD スペクトル

文献 (3) より一部改変

くつかの研究をもとに、VUVCD 分光法の有効性について紹介する。

中性糖類は 200 nm 以下にしか吸収をもたないため、VUVCD 分散計でのみ CD 測定が可能となる。図1に5種類の単糖の構造と水溶液中での VUVCD スペクトルを示す⁽³⁾。これらの糖の構造は非常によく似ているが、その VUVCD スペクトルは大きく異なる。170 nm 付近のバンドは、主として環状構造内の酸素の吸収 (n-σ* 遷移) に起因するものと考えられ、その電子状態は C1 位の OH 基の α および β-アノマーや、C5 位の CH₂OH 基のゴーシュ・ゴーシュ、ゴーシュ・トランス、トランス・ゴーシュの立体特異性に大きく影響される。NMR より得られたこれらのコンフォマーの組成を用いて VUVCD スペクトルをそれぞれの成分に分解することにより、各コンフォマーの寄与を求めることができる。二糖類も単糖類と同様、170 nm 付近に CD ピークを示す。二糖類では構成単糖の違いだけでなく、グリコシド結合の配向 (α と β) や部位 (1,6 や 1,4) も CD スペクトルに影響を及ぼす⁽³⁾。もちろん、多糖類もそのコンホメーションに応じて VUV 領域に特徴的な CD スペクトル

ルを示し、グルコサミノグリカンでは、硫酸基やカルボキシル基の位置や配向を敏感に反映する⁽⁴⁾。このように、糖類の VUVCD スペクトルにはこれまで知られていない多くの構造情報が含まれている。

VUVCD 分光法は、タンパク質の二次構造に対しても高精度の解析を可能にする。図2にいくつかのタンパク質の VUVCD スペクトルと、二次構造解析のプロセスを示す。160 nm までの波長拡張により、170~180 nm 付近のピークや肩が明確に観測され、これまでの遠紫外 CD スペクトルに比べて情報量が一段と増すことがわかる。種々の構造既知タンパク質の VUVCD スペクトル (データベース) と SELCON3 などの二次構造解析プログラムを用いて、α-ヘリックスの含有率と本数を 94%、β-ストランドの含有率と本数を 83% の精度で予測することができる⁽⁵⁾。

CD スペクトルにはアミノ酸配列情報は含まれていないため、二次構造の部位まで予測することはできない。これらの部位を予測するためには、一次構造と X 線結晶構造との対比から、20 種のアミノ酸の α-ヘリックスや β-ストランドの傾向指数を求める必要がある。古典的には Chou-Fasman の方法が用いられてきたが、近年はニューラルネットワーク法が主流になっている。上述のように、VUVCD からは高精度で二次構造の含有率と本数が予測できるため、これらのデータをニューラルネットワーク法に組み込み、20 種のアミノ酸の α-ヘリックスと β-ストランド傾向指数に制約をかけることにより、二次構造部位の予測精度を 75% まで向上させることができる⁽⁶⁾。CD 分光法は X 線回折や NMR 法のように原子レベルでの立体構造情報は与えないが、結晶化の必要性も分子量制限もないため、VUVCD データとニューラルネットワーク法を組み合わせた二次構造解析法は、多くの構造未知タンパク質の構造・機能の研究にとって重要な手段となるであろう。言うまでもなく、VUVCD スペクトルは様々な溶媒環境下で測定可能であり、タンパク質の天然構造だけでなく非天然 (変性) 構造についても多くの新知見をもたらす。種々の変性条件下 (低温、熱、酸、有機溶媒、還元剤) での VUVCD スペクトルから、変性状態においてもかなりの二次構造が保持されており、それぞれの変性状態の構造の特徴が明らかになってきた⁽⁷⁾。

このように、放射光を用いた VUVCD 分光法は、これまで難しかった生体分子の高次元構造解析を可能にして

図2 ■ タンパク質の VUVCD スペクトルと二次構造解析
ConA: コンカナバリン A

いる。ここでは触れなかったが、アミノ酸やペプチドについても、CD の理論的帰属が可能になってきた⁽⁸⁾。幸い、この VUVCD 分散計は大学キャンパス内に設置され、十分なマシンタイムと研究室に密着した実験が可能であり、生体分子の構造解析において世界に類を見ない大きな威力を発揮している。光学活性をもつ分子は数多く存在するので、今後、広い分野への応用が期待される。

- 1) B. A. Wallace: *Synchr. Rad. News*, **15**, 20 (2002).
- 2) 月向邦彦, 松尾光一: 日本放射光学会誌, **17**, 117 (2004).
- 3) K. Matsuo & K. Gekko: *Carbohydr. Res.*, **339**, 591 (2004).

- 4) K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi & K. Gekko: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
- 5) K. Matsuo, R. Yonehara & K. Gekko: *J. Biochem.*, **138**, 79 (2005).
- 6) K. Matsuo, H. Watanabe & K. Gekko: *Proteins*, **73**, 104 (2008).
- 7) K. Matsuo, Y. Sakurada, R. Yonehara, M. Kataoka & K. Gekko: *Biophys. J.*, **92**, 4088 (2007).
- 8) T. Fukuyama, K. Matsuo & K. Gekko: *J. Phys. Chem. A*, **109**, 6928 (2005).

(月向邦彦*, 松尾光一*, *¹広島大学大学院理学研究科, *²広島大学放射光科学研究センター)

ヘムの脱鉄反応：ヘム合成酵素の逆反応の証明と機能 食肉色素加工への利用と細胞内ヘムリサイクルの新研究に向けて

バクテリアからヒトに至る地球上のほとんどすべての生命体はヘム合成能力を有しており、ヘム分解についても種々のバクテリアから高等生物で知られている。生体内のヘム代謝は全ステップで不可逆反応の one way 経路であるといわれてきた⁽¹⁾。たとえば動物ではヘムは8段階で合成され、初発酵素の δ-アミノレブリン酸合成酵

素 (ALAS) はミトコンドリア内膜に局在して、スクシニル CoA とグリシンを縮合する反応を司る律速酵素として知られている。酵素系はいったん細胞質に出て、6 番目の酵素コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼから再びミトコンドリアに局在して最終酵素フェロケラターゼ (FECH) は内膜に局在してプロトポルフィリンに 2 価鉄