

# 研究終了報告書

## 「酵素群の細胞内集合による代謝制御機序の解明」

研究期間：2020年10月～2024年3月

研究者：三浦 夏子

### 1. 研究のねらい

出芽酵母やヒトの細胞では、20を超える代謝酵素群が低酸素条件下で集合し、“G body”と呼ばれる集合体を形成する。本研究では申請者が2013年に酵母で初めて報告したこの代謝酵素集合体について、集合体形成の機序を明らかにするとともに、集合体形成機構を利用した多段階生合成経路の効率化を目指した。具体的には、G body 形成ペプチドタグを用いて代謝酵素集合体を形成し、多段階反応からなる人工代謝経路を効率化するとともに、細胞内で G body を構成する代謝酵素の集合を誘導あるいは阻害するプローブを取得することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

本研究では、酵素集合体形成機構の制御による多様な多段階整合経路の効率化に必要な知見とツールを得ることを目的とし、「計画1：集合体形成を時空間的に制御する分子ツールの開発」、「計画2：集合体形成ペプチドタグの利用および評価」、「計画3：生合成反応を迅速に測定するための手法開発」の3点について進めた。それぞれの成果概要について以下にまとめて示す。

「計画1：集合体形成を時空間的に制御する分子ツールの開発」では、小スケール低酸素培養系を用いた代謝酵素の動態解析により、解糖系酵素による集合体形成は一度に起こるのではなく、酵素ごとに集合順序が厳密に制御されていることを示唆する結果を得た。また、最初期に集合する解糖系酵素であるエノラーゼを標的として、低分子化合物ライブラリ・各種ペプチド・タンパク質等について、集合体形成を阻害もしくは促進できるツール候補を探索したところ、集合体形成を阻害できる分子候補を複数見出した。

「計画2：集合体形成ペプチドタグの利用および評価」では、集合体形成タンパク質から取得した、任意のタンパク質で集合体形成を誘導するペプチドタグを複数用いて、いくつかのモデル代謝経路について出芽酵母の細胞内で酵素集合体を人為的に形成することに成功した。なかでも、G-body にアルコールデヒドロゲナーゼを共局在させたモデル系では、酢酸とエタノールいずれかを生産する代謝経路において、エタノール／酢酸の生成比を有意に上昇させることに成功した。一方で、エタノール生産量には課題が残り、ペプチドを用いた際の集合体形成率を上昇させる必要が考えられた。また、別のモデル代謝経路である Deoxyviolacein 生合成系を出芽酵母に導入した場合は、ペプチドタグにより人為的な酵素集合体を誘導することで、集合体を形成していない場合に比べて目的産物の収量を2倍以上に増大させることに成功した。

「計画3：生合成反応を迅速に測定するための手法開発」では、新たに構築した NMR 用バイオリアクターを用いて、酵素ならびに微生物の代謝計測を行った。この項目では領域外のプロジェクトと連携し、新しい代謝測定手法の開発に貢献した。

以上より、研究開始当初の目標は概ね達成しており、新たな知見を多数見出した。さらに、本研究を進めるにあたって領域外の研究者との連携を開始し、深化させることができた。

## (2) 詳細

上記に挙げた 3 つの計画について、成果の詳細を以下に示す。

### **計画1: 集合体形成を時空間的に制御する分子ツールの開発**

#### **計画1-① 低酸素条件下における代謝酵素集合体形成の経時解析**

G-body は 20 以上の酵素により形成されるが、G-body 形成時における各酵素の動態は不明である。そこでまず、各酵素の集合体形成率の変化を経時的に解析することで、G-body の制御に必要な実験条件を検討した。その結果

- 各酵素の集合順序が厳密に制御されていること
  - 最初期に集合するタンパク質が解糖系酵素エノラーゼ(ENO2)であること
- を明らかにした(成果論文 1, 一部未発表)。そこで、最初期に集合するエノラーゼを対象としたツール開発を検討した。

#### **計画1-② エノラーゼの集合体形成を制御する分子ツールの開発**

##### **1-②-a. エノラーゼの集合体形成を抑制するタンパク質**

G-body 局在化シグナルペプチドを用いて、様々なタンパク質をエノラーゼ集合体に共局在させ、エノラーゼの集合体形成率を調べたところ、全てのタンパク質がエノラーゼ集合体と共局在した一方で、集合体形成を阻害する特定のタンパク質を見出すことに成功した。このタンパク質はまた、エノラーゼ以外の酵素集合体形成も部分的に阻害することが示唆された。

##### **1-②-b. エノラーゼの集合体形成を抑制する低分子**

化合物ライブラリ等を用いて集合体形成阻害剤のスクリーニングを行ったところ、低分子化合物 A がエノラーゼの集合体形成を濃度依存的に、かつ長時間にわたって阻害することを見出し、化合物 A が細胞内/試験管内でエノラーゼ集合体の形成を抑制する可能性を示唆した。これまでに見出した G-body 形成阻害剤は、全て G-body 形成を遅延させるのみであり、長期間にわたって G-body 形成を阻害し、かつ細胞毒性が低い特異的阻害剤として、低分子化合物 A は初の候補である。

### **計画2: 集合体形成ペプチドタグの利用および評価**

複数のモデル代謝経路について、それぞれ集合体形成ペプチドタグを用いた酵素集合体形成の効果について検証した。

#### **計画2-① エタノール生成酵素の G-body への局在化**

G-body と共局在するペプチドタグ3種、G-body と共局在しないが細胞内で液滴を形成する RNA 結合タンパク質の一部(FUSN)、酵母プリオンタンパク質の集合体形成部位(Sup35)を、G-body に含まれないと考えられているアルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)に融合して発現し、それぞれの細胞内局在を確認したところ、ペプチドタグのみで G-body と ADH の共局在が認められた。エタノールと酢酸の生産量を測定したところ、Sup35 タグにおいてエタノールの生産量が低下し、その他の条件ではタグなしの場合と生産量に差は認められなかった。一方で、エタノール生産量と酢酸生産量の比をとった場合、一つのペプチドタグについて、エタノール生産量比の有意な上昇が認められた。ペプチドタグで期待されたほどの効果が出なかった原因とし

では、ペプチドタグを用いた場合の集合体形成率が 10%程度であったこと、発現量を増加させた場合、ADH 自体が G-body と異なる集合体を形成したことが考えられ、ペプチドタグを用いた場合の集合体形成率の増加と、用いる酵素の適性を検証する必要性が課題として挙げられた（成果論文 2）。

#### **計画2-② Violacein 生合成経路における酵素集合体形成の効果**

5 つの生合成酵素によってトリプトファンから violacein を生合成する経路において、2 つの生合成酵素を集合体形成させると副生成物である deoxyviolacein の合成量が増大するという先行研究に着目し、出芽酵母を用いて単純化した系で再現性の検証を行った。その結果、FUSN を用いた酵素集合体形成により、先行研究の結果を再現することに成功した。さらに、一部のペプチドタグを用いることでさらに deoxyviolacein の合成量を増大させることができることを見出した。この結果は、細胞に新規な代謝経路を組み込む際に、人為的な酵素集合体を形成させることで物質生産の収量を増大させることが可能であることを示唆している。

#### **計画3: 生合成反応を迅速に測定するための手法開発**

ペプチドタグを用いて酵母で酵素集合体を構築し、リアルタイム代謝測定法に供することで、微生物の代謝をとらえることに成功した。

### **3. 今後の展開**

G-body の役割として捉えられている、酵素群の集合体形成による多段階酵素反応の効率化は、細胞内におけるタンパク質のふるまいや代謝制御についての基礎的な興味を集めてきた。加えて最近では、酵素電池や人工細胞の動力調達、微生物の発酵プロセス全般の効率化等の、多様な応用面からも興味を集めつつある。

これまでの研究で、集合体形成酵素の内部配列から、集合体形成を誘導するシグナルペプチドを見出し、酵母細胞内で人為的にタンパク質群の集合体を形成させることを可能にしてきたが、実際に細胞内でどのようにシグナルペプチドやその他の要因、特に低酸素状態が集合体形成に寄与しているのかについてはほとんど不明である。また、厳密に溶存酸素量をコントロールした低酸素培養によって、G-body の各構成酵素が順次集合する様子を初めてとらえたが、既存の酵素集合体形成技術では複数の酵素について集合順序を決めて順次集合させることは不可能であり、G-body の制御には未知の機構が存在することが強く示唆されている。G-body 形成機構を丁寧かつ詳細に明らかにすることで、これまでに生み出されてこなかったタンパク質の制御技術をも開発することが可能である。複数の酵素群の集合順序を制御しながら、細胞内局在を時空間的に自在に操作する技術が実現すれば、酵素・タンパク質に関連したあらゆる分野に大きな影響を与えうる。

本 ACT-X 研究により、G-body 形成を制御しうる新たな分子ツールを得た。シグナルペプチドとこれらの分子ツール、各種低酸素培養系を組み合わせることで、今後 G-body の制御機構を明らかにするための研究はさらに加速することが可能である。

### **4. 自己評価**

本研究を通じて、代謝酵素の集合体形成による代謝調節機構について、自身が見出した解糖系酵素の低酸素条件下における集合体形成について、新たな知見を報告した。また、これを利用して、酵素集合体の形成原理と応用への展開に向けて、領域内外と連携しながら

基礎的な知見を積み重ねており、他の研究グループと様々な技術・情報を共有しながら将来展開への突破口を見出しつつある。当初の研究目的は達成できており、領域内外との共同研究等により今後の展望を拓いたという点において、当初の計画を達成できたと考えられる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Yoshimura Y, Hirayama R, <b>Miura N*</b> , Utsumi R, Kuroda K, Ueda M, Kataoka M. Small-scale hypoxic cultures for monitoring the spatial reorganization of glycolytic enzymes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Cell Biology International</i> . 2021;45(8):1776–1783. doi:10.1002/cbin.11617 <b>*Corresponding author</b>                                                   | 1. |
| 本論文では培地量を従来の約 500 分の 1 (150 $\mu$ L) に抑えた小スケール低酸素培養法を構築し、G-body 関連実験のスループットと再現性を大幅に向上した。本手法により G-body を形成する 3 つの酵素について経時的な動態を追跡した結果、各酵素の集合順序が厳密に規定されていること、エノラーゼが 3 つの酵素の中で最も早く集合すること、を明らかにした。さらに、本手法を用いて集合体形成に関する物質のスクリーニングが可能であることを実証した。                                                                                                                                              |    |
| 2. Utsumi R, Murata Y, Ito-Harashima S, Akai M, <b>Miura N*</b> , Kuroda K, Ueda M, Kataoka M. Foci-forming regions of pyruvate kinase and enolase at the molecular surface incorporate proteins into yeast cytoplasmic metabolic enzymes transiently assembling (META) bodies. <i>PLOS ONE</i> , 2023;18(4):e0283002. doi: 10.1371/journal.pone.0283002. <b>*Corresponding author</b> | 2. |
| ピルビン酸キナーゼのアミノ酸配列を断片化することで、配列中に含まれる集合体形成シグナルペプチドを新たに4つ取得した。また、取得した配列とエノラーゼ由来のシグナルペプチドを用いて、アルコールデヒドロゲナーゼを酵母の G-body に共局在させることができること、特定の条件下で G-body に他の酵素を共局在させることで、代謝フラックスを人為的に調節可能であることを示した。                                                                                                                                                                                            |    |

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

### (1)(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞:

2023 年 4 月 2022 年度 酵素工学奨励賞  
酵素工学会

2023 年 3 月 2023 年度 農芸化学若手女性研究者賞

公益社団法人日本農芸化学会

著作物:

三浦夏子, 低酸素条件下で形成する代謝酵素集合体の観察. 加藤昌人・白木賢太郎・中川真一編, フロントランナー直伝 相分離解析プロトコール (pp.135-145), 羊土社 2022 年 7 月

三浦夏子, 生体内の代謝を知る・みる・使う. 生物工学会誌 100(5) 240-245 2022 年 5 月

学会発表:

三浦夏子, 出芽酵母のムーンライティングな解糖系酵素. 第 46 回日本分子生物学会年会シンポジウム「3PS-08: 未来へ:微生物学ルネサンス」, 神戸ポートピアホテル, 2023 年 12 月 8 日. 招待講演          その他 27 件