

論文の内容の要旨

論文題目 Analyses of Biosynthetic Mechanisms and Cloning of Biosynthetic Genes
for Polyether Compounds
(ポリエーテル化合物の生合成経路及び生合成遺伝子の解析)

氏名 泉川 美穂

渦鞭毛藻 *Prorocentrum lima* の生産するオカダ酸は、タンパク質脱リン酸化酵素に対する特異的な阻害作用を示すことから薬理学及び生化学分野で研究試薬として使用されており、現在最も重要な海洋天然物のひとつである。一方で、その生合成に関して酢酸などの早期前駆体を用いた ^{13}C 取り込みパターンが解明された結果、放線菌などでの単純な C_2 伸長反応を主とするポリケチド生合成経路との顕著な相違がみられ注目されているが、詳細は不明である。筆者は修士課程において、分子状酸素、及び酢酸態酸素による酸素標識パターンを Collision-induced dissociation tandem mass spectrometry (CID-MS/MS) を用いて決定し、エーテル環形成経路、及び酸素官能基の形成に関する新たな知見を得ることが出来た。そこで博士課程において、同化合物の水分子酸素による標識パターンを決定し、放線菌 *Streptomyces albus* の生産するポリエーテル化合物サリノマイシンの標識パターンと比較することで、これらの生合成経路での相違を推定した。さらにこの相違を生合成酵素レベルで考察することを目的に、両者の生合成遺伝子のクローニングを試みた。

【オカダ酸の水分子酸素による酸素標識パターン】

オカダ酸生合成における骨格形成と官能基変換、特にエーテル環構築に関する知見を得る目的で、*P. lima* を 17% H_2^{18}O 中で培養し、 H_2^{18}O 由来酸素の標識位置の帰属を試みた。その結果、オカダ酸全酸素の 12% に ^{18}O の取り込みが認められ、MS/MS 解析より、標識位置及び取り込み率を決定することができた (Figure 1)。この標識パターンにおいて、各々の酸素原子間で顕著な取り込み率の差がみられることから、水和による交換が可能なカルボニルの還元が生じる時期の差が、水分子酸素による標識率の差に反映されていると考えられた。このことから、 H_2^{18}O による標識パターンを解析することによって、ポリケチド合成酵素 (PKS) 中での反応とその後起こるエーテル環形成などの反応とが区別出来る可能性が示された。

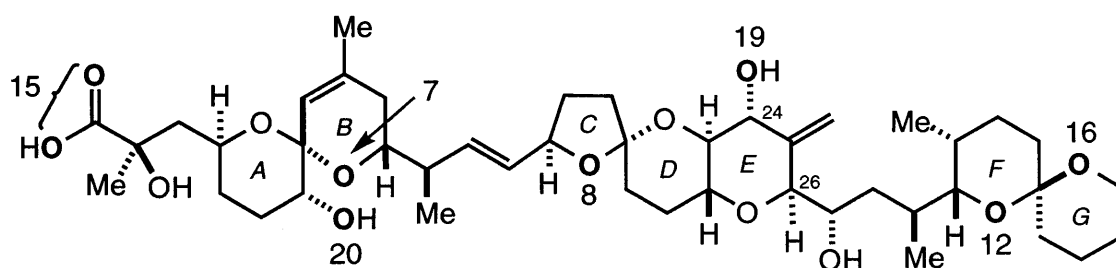


Figure 1. ^{18}O -Incorporation pattern of okadaic acid from H_2^{18}O . Figures on oxygen atoms denote incorporation ratios for mono[^{18}O]okadaic acid anion (m/z 805) in %.

【サリノマイシンの酸素標識パターン】

渦鞭毛藻と比較する目的で、PKS 中での炭素鎖伸長反応がより解明されている放線菌由来のポリエーテル化合物について酸素標識パターンを決定することとした。このうち放線菌 *Streptomyces albus* が生産し、グラム陽性菌に対する抗菌活性を有するポリエーテル抗生物質サリノマイシンの生合成に関しては、酢酸及びプロピオン酸による ^{13}C 標識パターンが決定されており、主鎖の一つおきにカルボニル炭素が取り込まれたポリケチド骨格を有していることが分かっているが、エーテル環形成に関しては不明である。そこでオカダ酸と同様に ^{18}O 含有の分子状酸素、酢酸、及び水分子のいずれかの存在下での培養、及びそれぞれより単離した生産物の酸素標識パターンを CID-MS/MS により決定し (Figure 2)、渦鞭毛藻由来のオカダ酸と比較した。

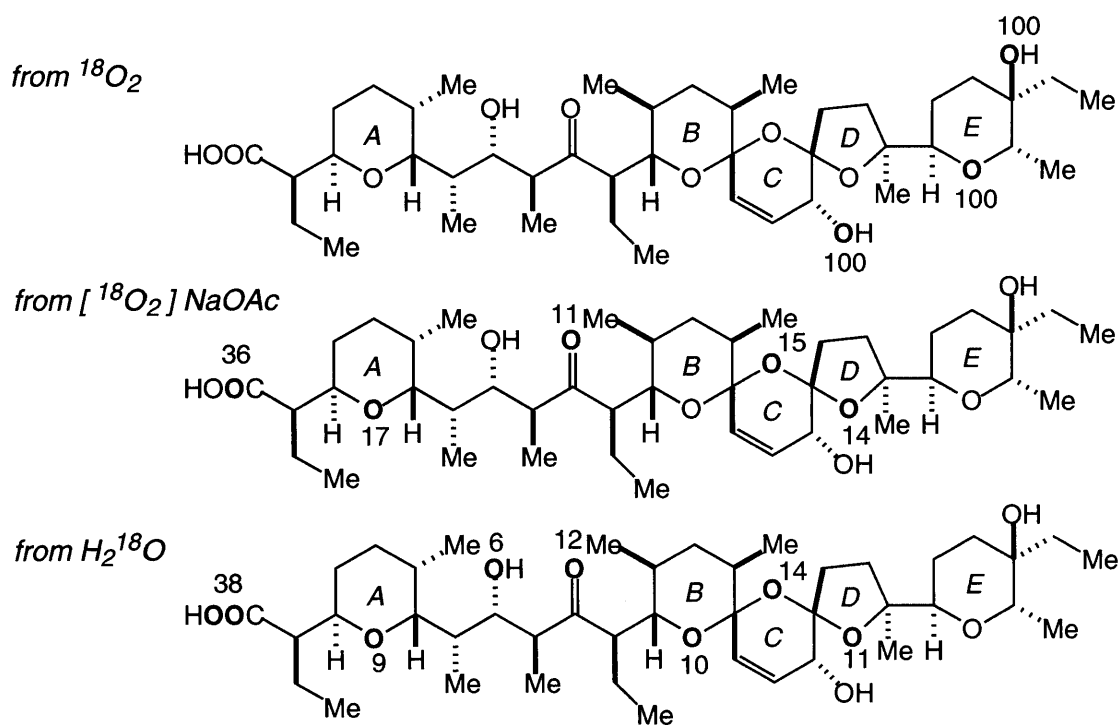


Figure 2. ^{18}O -Labeling pattern of salinomycin. Figures on oxygen atoms denote incorporation ratios for $\text{tri}[^{18}\text{O}]\text{salinomycin anion } m/z 755$ (from $^{18}\text{O}_2$) in %. Those for the other two are as in Figure 1.

この標識パターンから、分子状酸素については予想どおり、前駆体のオレフィンに対して分子状酸素が付加してエポキシを形成したと推定される箇所に100%の ^{18}O の取り込みがみられた。酢酸態酸素については、酢酸由来の酸素に顕著な ^{18}O の取り込みがみられ、これに対してプロピオン酸由来の酸素には取り込みがみられなかった。水については、オカダ酸での酢酸由来の酸素は水によっては標識されず、分子状酸素と水分子酸素の両者から標識を受ける酸素があるのに対し、サリノマイシンについては、酢酸及びプロピオン酸由来の酸素が均一に水からの標識を受けており、アシルCoAの段階で既に水和による酸素の交換が起こっている可能性が示唆された。また、サリノマイシンの3箇所の分子状酸素由来酸素には、水分子酸素の取り込みは認められなかった。これらの結果から、渦鞭毛藻におけるオカダ酸の生合成経路が、アシルCoA生合成の場や分子状酸素による酸化といった基本的反応においても、放線菌とは顕著に異なっている可能性が示された。

【生合成遺伝子のクローニング】

渦鞭毛藻と、放線菌それぞれについて、ポリエーテル生合成経路の相違を酵素レベルで解析することを目的に、両者の生合成遺伝子のクローニングを試みた。これまでに生合成遺伝子の研究がほとんどなされていない渦鞭毛藻については、既知PKSをプローブとしたサザンハイブリダイゼーション、また渦鞭毛藻のゲノムDNAやmRNAより逆転写したcDNAを鋳型としたPCRによるスクリーニングを試みたが、目的とする遺伝子断片を得るには至らなかった。そこで、既存のPKS遺伝子の、基本的な縮合酵素の保存性の高い領域からデザインしたプライマーを用いて5' RACEによる増幅を試みたところ、いくつかの増幅断片を得ることが出来た。これらの配列解析をおこない既存のPKSとの相同性を検索したところ、タイプI型PKSと相同性を有することが分かった。

放線菌に関しては、既知のタイプI型PKS遺伝子において保存性の高い縮合酵素領域(KS)に基づいてプライマーをデザインし、ゲノムDNAを鋳型としたPCRによる増幅を試みた結果、679 bpのDNA断片2種類を得た。これらをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを用いて*S. albus*のコスミドゲノムライブラリよりスクリーニングを行い、強くハイブリダイズするクローンを選択した。このクローンについて制限酵素 *Bam* H1 で消化後、サザンハイブリダイゼーションを行い、縮合酵素領域を含むと考えられる約4.5 kbpのDNA断片をサブクローニングした。これについて塩基配列及び対応するアミノ酸配列を決定し、既知の放線菌由来PKS遺伝子と比較した結果、タイプI型PKSのKS、AT、KR領域をコードする遺伝子断片であると推定された。さらに、この4.5 kbpの遺伝子断片がサリノマイシン生産に関わるかどうかを以下の遺伝子破壊によって確認した。すなわち、4.5 kbpの遺伝子断片の中間に、生産菌である*S. albus*が感受性を示すストレプトマイシンに対する耐性遺伝子 *aad* を挿入し、形質転換のためのプラスミドを構築した。このプラスミドをエレクトロポレーションによって*S. albus*に導入した結果、ストレプトマイシン耐性を示すクローンを得ることができた。このクローンがサリノマイシン生産能を示さなかったことから、得られた4.5 kbpの断片がサリノマイシン生合成におけるPKSの一部であると考えられ、ポリエーテル化合物に関して始めてその生合成遺伝子の一部を得ることに成功した。