

論文の内容の要旨

論文題目 糸状菌ポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析

氏名 渡辺 彰

糸状菌が生産する芳香族ポリケタイドは多様な骨格と多彩な生物活性を有する重要な化合物群である。これら化合物の生合成は、酢酸単位の縮合の繰り返しによるポリケトメチレン鎖の生成と、それに引き続く閉環反応により行われ、これら一連の反応を触媒、制御するのがポリケタイド合成酵素 (PKS) である。しかし糸状菌芳香族系 PKS においては、鎖長や閉環様式の制御機構は全く不明である。そこで私は、本制御機構を解明することを目的とし、研究を行った。

PKS の機能解析は、構築した各種変異体 PKS 遺伝子を、異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* に導入し、得られた形質転換体を誘導培地で培養後、その培地を逆相 HPLC および LC-ESIMS で分析し、生産化合物を比較することにより行った。

1. 糸状菌芳香族系 PKS C 末ドメインの機能解析

糸状菌芳香族系 PKS は、動物のタイプ I 型脂肪酸合成酵素に類似した、200KDa 前後の多機能型酵素であり、なかでも *Aspergillus nidulans* の WA や *Colletotrichum lagenarium* の PKS1 では、N 末端およびタンパク中央部の機能未知ドメインと、チオエステラーゼ (TE) に相同性を示す C 末ドメインが特徴的である。(Fig. 1)

私はこれまでに、ヘプタケタイドナフトピロン合成酵素である *A. nidulans* の WA において、C 末ドメインが TE ではなく、

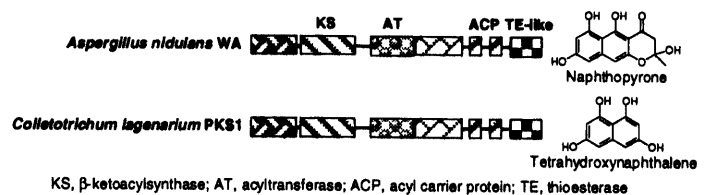


Fig. 1 Domain architecture of fungal aromatic PKSs

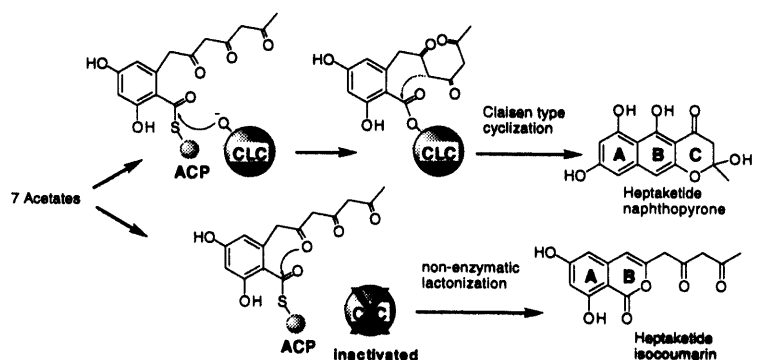


Fig. 2 Claisen Type Cyclase of *A. nidulans* WA

ナフトピロン B 環のクライゼン型閉環を触媒するクライゼン型サイクラーゼ (CLC) として機能していることを明らかにしている。この CLC は鎖長の制御には全く関与せず、WA の CLC 変異体では B 環は非酵素的なラクトン化によって形成し、ヘプタケタイドイソクマリンが生産される。

(Fig. 2) そこで今回、WA と同じくクライゼン型閉環産物を合成する PKS1 においても C 末ドメインが CLC として機能しているのかを、C 末ドメインの変異体を発現させることで確認することにした。構築した変異体は C 末ドメイン全体を欠質させた PKS1-dC と、WA CLC の活性中心に相当する 2009 番目のセリンを部位特異的にアラニンに置換した PKS1-S2009A の 2 種類である (Fig. 3)。野生型 PKS1 はペンタケタイドナフトレンが主生産物であることから、C 末変異体はペンタケタイドイソクマリンが主生産物となることが予想された。しかし実際には酢酸単位が 1 つ多いヘキサケタイドイソクマリンが特異的に生産された。(Fig. 4) クライゼン型閉環産物が生産されなくなることから、PKS1 の C 末ドメインも CLC として機能していることが確認されたが、CLC が機能することによって主生産物の炭素鎖長がヘキサケタイドからペンタケタイドへと短くなっており、WA の場合と異なり PKS1 の CLC は炭素鎖長の制御にも関与していることが明らかとなった。活性中心と推定されるセリンをアラニンに置換しただけの PKS1-S2009A では生産化合物の炭素鎖長は短くならないことから、PKS1 の CLC による鎖長短縮は、ポリケトメチレン中間体が、伸長途中で ACP から CLC に転移して縮合ユニットから切り出され、結果としてそれ以上の伸長を阻止されてしまうためと考えられる。

しかし WA や PKS1 では CLC ドメインを欠質させても、それぞれヘプタケタイドおよびヘキサケタイドイソクマリンを特異的に合成することから、本質的な鎖長の制御

や最初の閉環 (A 環の閉環) の制御は CLC ドメイン以外のドメインが行っていることは明らかで、CLC による炭素鎖の伸長阻止は二次的な鎖長制御である。

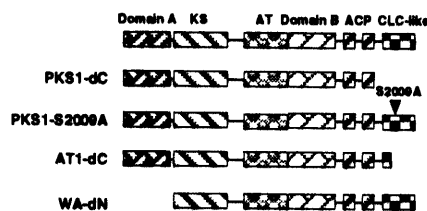


Fig. 3 Mutant PKSs in C- and N-terminal domain

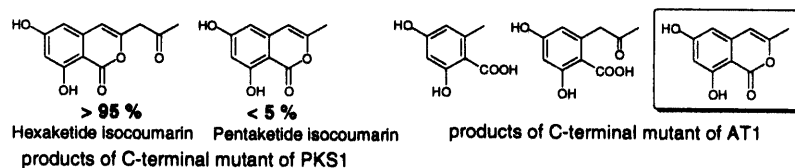


Fig. 4 Products of C-terminal mutants of PKS1 and AT1

今回、*A. terreus* のゲノムから *atl* 遺伝子を新規にクローニングした。本遺伝子



Fig. 5 *A. terreus* AT1

が *A. terreus* のどの生合成経路に関与するのことは未同定であるが、コードするタンパク AT1 が、WA や PKS1 と同一のドメイン構造を示し、C 末ドメインも CLC と高い相同性を示したことから、当初クライゼン型閉環産物を生産するものと思われた。しかし発現の結果、クライゼン型閉環産物ではないオルセリン酸とペンタケタイドカルボン酸が主生産物であった (Fig. 5)。このことから AT1 の C 末ドメインは CLC ではなく TE として機能しているものと考えられ、これを確認するため AT1 の C 末端ドメインの変異体 AT1-dC (Fig. 3) を発現させた。その結果、加水分解

ではなく非酵素的なラクトン化によって生成するペンタケタイドイソクマリンも生産されるようになり、AT1のC末ドメインはTEとして機能していることが示された。(Fig. 4)以上のことから、糸状菌芳香族系PKSにおけるC末ドメインの機能は多様であること、またこのC末ドメインの機能の多様性が糸状菌芳香族ポリケタイドの骨格の多様性に密接にかかわっていることが明らかとなった。(Fig. 6)

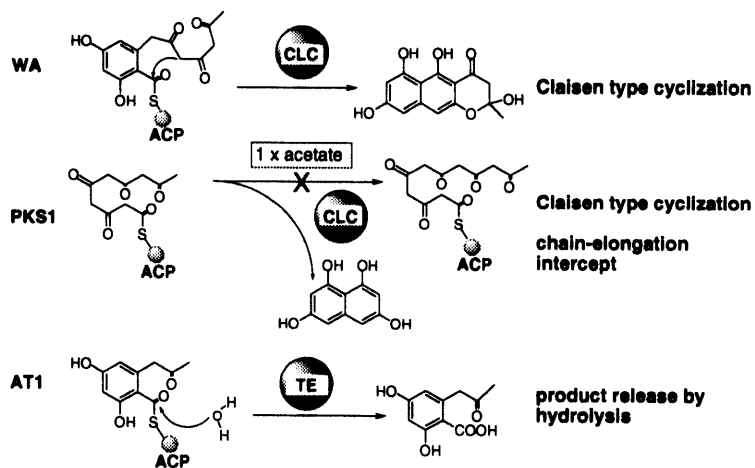


Fig. 6 Function of C-terminal domain of fungal aromatic PKSs

2. *A. nidulans* WAの機能未知ドメインの機能解析

WAについて、N末端とタンパク中央に位置する機能未知ドメインAとBの機能を検討することにした。まずドメインA全体を欠失させたWA-dN (Fig. 3)を発現させたところ、化合物の生産は認められなくなったことからドメインAがWAの活性に必須であることが明らかとなった。しかしその具体的な機能は今回は明らかにすることはできなかった。

次にドメインBの機能を検討するため、WAとPKS1からなるキメラ体SW-BとSW-ATを構築した。SW-BはPKS1のACPとCLCドメインをWAのものに入れ替え、SW-ATは更にドメインBもWAのものに入れ替えたものである (Fig. 7)。両キメラ体を発現させた結果、標品との比較から複数の化合物が同定されたが、主生産物の黄色色素は未知化合物であった。そこで本黄色色素を単離、各種機器分析を行った結果、新規化合物 2-acetyl-1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (ATHN) であると同定した (Fig. 8)。ペンタケタイドナフタレンやヘプタケタイドナフトピロン類縁体は細菌から植物に至るまで広く存在しているが、ヘキサケタイドアセチルナフタレン (ATHN) の類縁体は天然では極めて稀な存在であり、単離については、棘皮動物において spinochrom A (Fig. 9) のような 2, 3 のナフタザリンが報告されているのみである。ATHN の同定により、主な生産化合物すべてが同定されたことから、両キメラ体の生産化合物を炭素鎖長に注目して比較した。いずれもヘキサケタイ

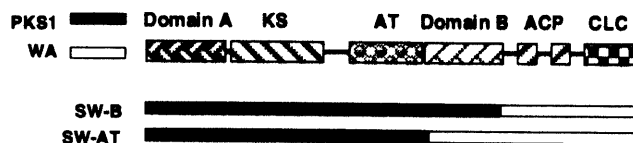


Fig. 7 Chimeric PKSs composed of WA and PKS1

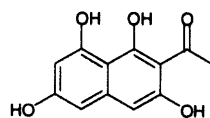


Fig. 8 Structure of ATHN

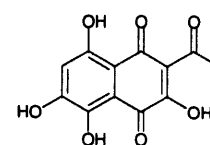


Fig. 9 Spinochrom A

PKS1	Domain A	KS	AT	Domain B	ACP	CLC	ratio of each product
WA	████████	████████	████████	████████	████████	████████	Penta : Hexa : Hepta
SW-B	████████	████████	████████	████████	████████	████████	1 : 3 : 0
SW-AT	████████	████████	████████	████████	████████	████████	1 : 2 : 0.2

Fig. 10 Comparison of SW-B and SW-AT

ド次いでペンタケタイドが主な生産物で、その生成比は両キメラ体ではほぼ同等であった。ところが SW-B ではヘプタケタイドの生産は認められないが、SW-AT ではヘプタケタイドナフトピロンの生産が認められたことから、WA のドメイン B はヘプタケタイド生産に必須であり、鎖長の制御に関与していることが明らかとなった (Fig.10)。しかし、SW-AT においても WA のようなヘプタケタイド特異性はみられないことから、ドメイン B は単独で鎖長を制御しているのではなく、AT よりも上流にある他のドメインと共同で鎖長を制御しているものと考えられた。

3. WA CLC の基質特異性

SW-B および SW-AT の発現により、ATHN がかなり生産されていることから、WA の CLC は本来の基質であるヘプタケタイド中間体

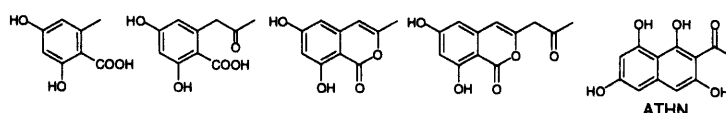


Fig. 11 Products of SW-B

だけでなく、ヘキサケタイド中間体に対してもクライゼン型閉環を効率よく触媒できることが明らかとなった (Fig.11)。一方、ペンタケタイド中間体に対しては、クライゼン型閉環産物であるナフタレンが生産されていないことから WA CLC の基質にはならないものと考えられる。

4. CLC によるポリケトメチレン鎖伸長阻止機能の検討

PKS1 の CLC によるポリケトメチレン鎖伸長阻止機能についてさらに検討するため、SW-AT の CLC 変異体を発現させ、WA、PKS1、SW-AT において、CLC が機能している場合 (+CLC) としない場合 (-CLC) とで、生産化合物の炭素鎖長がどのように変化するかを比較した (Fig.12)。WA では CLC

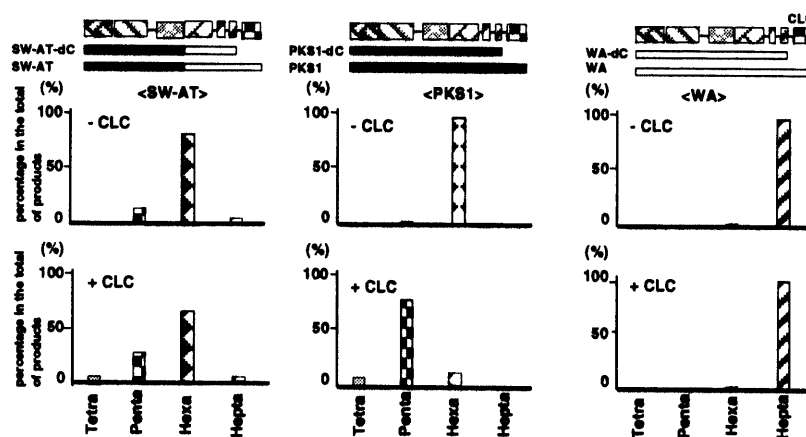


Fig. 12 Effect of CLC Domain on Product Chain Length

が機能するしないにかかわらずヘプタケタイドを極めて特異的に生産し、CLC は炭素鎖長の制御には全く関与していない。一方、PKS1 では CLC が機能することにより鎖長は短い方に移行する。そして SW-AT でも CLC が機能することによりヘキサケタイドに対するペンタケタイドの割合が増加し、更に鎖長の短いテトラケタイドの生産もはっきりと認められるようになり、PKS1 の場合と同じく生産化合物の炭素鎖長が短くなる傾向がみられる。SW-AT の CLC は WA 由来であることから、このことは、WA の CLC も、PKS1 とのキメラ体では炭素鎖の伸長を阻止するようになることを示している。したがって、炭素鎖の伸長阻止は、PKS1 CLC 自体に独立に備わった機能ではなく、むしろ PKS1 の AT よりも上流の N 末側半分の領域にその機能を生み出す要因があることが示唆される。そして、この領域と CLC が相互作用することによって初めてポリケトメチレン鎖の伸長阻止が起こると考えられる。

5. *A. fumigatus* におけるナフタレン生合成経路の解析

糸状菌 *A. fumigatus* はアスペルギルス症の病原菌であり、その病原性には胞子が生産する DHN-メラニンが必須である。私は米国 NIH の Tsai らのグループとの共同研究により、DHN-メラニン前駆体であるペンタケタイドナフタレン合成について、*A. fumigatus* では、従来から知られていた、酢酸単位から PKS によって直接合

成される経路ではなく、PKS によって先ず酢酸単位の多いヘプタケタイドナフトピロンを生成してから、これを分解してペンタケタイドナフタレンを生成するという新規な生合成経路が存在することを明らかにした。(Fig. 13)

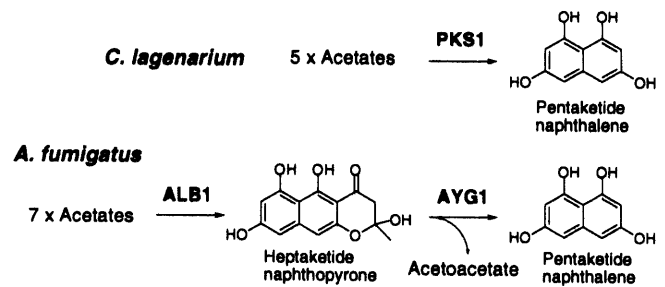


Fig. 13 Naphthalene biosynthetic pathway in Fungi

まとめ

私は今回、糸状菌芳香族系 PKS の C 末ドメインが多様な機能を有することを示し、これが糸状菌芳香族ポリケタイドの骨格の多様性に密接にかかわっていることを明らかにした。また、WA においてこれまで機能未知であったタンパク中央付近のドメインが、本質的な鎖長の制御に関与していることを明らかにした。これは糸状菌芳香族系 PKS において、本質的な鎖長制御因子として同定された最初の例である。これらのことから、全く不明であった糸状菌芳香族系 PKS の炭素鎖長および閉環様式の制御機構についてその一端を明らかにし、バクテリアの PKS にはみられない多彩で複雑な制御機構が存在することを明らかにした。また、*A. fumigatus* においてペンタケタイドナフタレンの新規な生合成経路の存在を明らかにし、生合成経路についても糸状菌は予想外の多様性を秘めていることを示した。以上のことから、糸状菌ポリケタイド生合成系が新規活性物質生産系として非常に有望なものになる可能性を示すことができた。