

## 審査の結果の要旨

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）であるが、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等その機能解析はほとんど行われていない。本論文は、異種糸状菌発現系を用い、各種PKSの反応制御機構、特に(1) C末ドメインの機能、(2) N末およびポリペプチド中央部分に保存される領域の機能、(3) 新たに見いだしたC末ドメインによる炭素鎖制御機構、の解明を主目的とした研究であり、また、同様の異種糸状菌発現系を用いた (4) 糸状菌メラニン生合成に関わる新規PKSの同定、についても記載している。

### 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は多機能型酵素をコードし、*Aspergillus nidulans* のWAや *Colletotrichum lagenarium* のPKS1では、既知のチオエステラーゼ（TE）に高い相同性を示すC末ドメインが存在する（Fig. 1）。本論文の著者は、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、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すでに明らかにしていた。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、C末ドメインの変異体を発現させて分析したところ、予想に反し酢酸単位が1つ多いヘキサケタイドイソクマリンを特異的に生産していることを見いだした（Fig. 2）。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は確認されたが、WAの場合と異なり、PKS1の場合はCLCが機能することで主生産物の炭素鎖長が短くなることから、PKS1のCLCはポリケトメチレン中間体を伸長途中でACPから切り出し、炭素鎖のそれ以上の伸長を阻止するものと結論している。（Fig. 2）

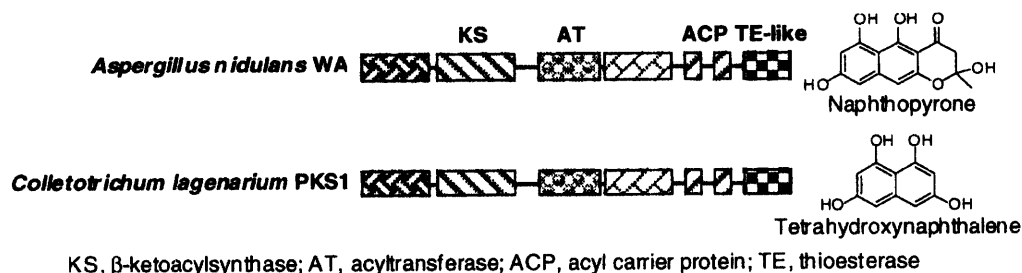
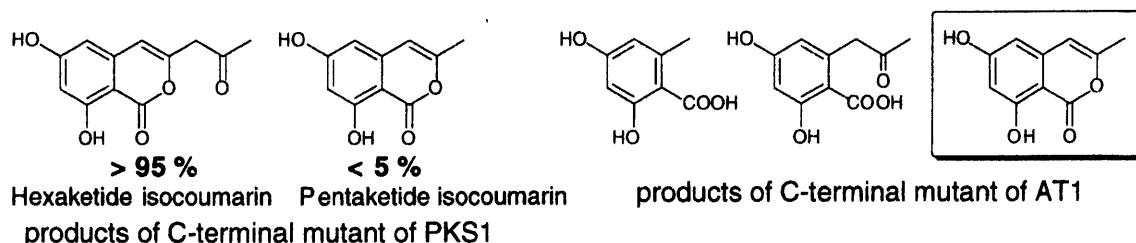


Fig. 1 Domain architecture of fungal aromatic PKSs

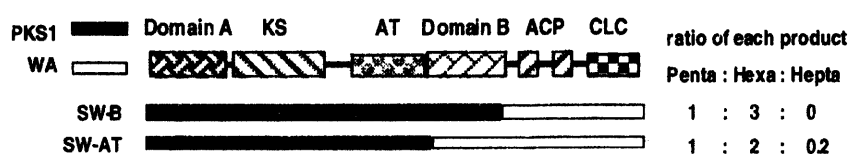
次いで、WAと同一のドメイン構造を示す*A. terreus*由来のAT1についても同様の解析を行い、実際の生成物がクライゼン型閉環産物ではなく、さらにそのC末ドメイン変異体の解析から、AT1のC末ドメインはTEとして機能していることを明らかにした(Fig. 2)。以上のことから、糸状菌芳香族系PKSのC末ドメインは、互いに高い相同性を示すにもかかわらず、その機能は多様であることが明らかとなった。



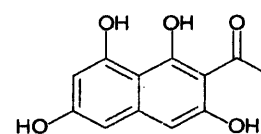
**Fig. 2 Products of C-terminal mutants of PKS1 and AT1**

### 2. *A. nidulans* WAの機能未知ドメインの機能解析

機能未知であるWAタンパク中央部のドメイン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(Fig. 3)。両キメラ体を発現させた結果、複数の化合物が同定されたが、主生成物の黄色色素が新規ヘキサケタイド2-acetyl-1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (ATHN)であると同定した(Fig. 4)。また、両キメラ体の生産化合物の比較から、WAのドメインBはヘプタケタイド生産に必須であり、鎖長の制御には関与しているが、ドメインB単独で鎖長を制御しているのではなく、他のドメインと共同で鎖長を決定しているものと結論している。



**Fig. 3 Chimeric PKSs composed of WA and PKS1**



**Fig. 4 Structure of ATHN**

### 3. CLCドメインによる炭素鎖伸長阻止機能の検討

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CLC変異体を用いて比較した。WAではCLCによる炭素鎖の伸長阻止はみられないが、PKS1やSW-ATでは、CLCが機能することにより生産化合物の鎖長は短い方に移行し、炭素鎖長が短くなる傾向を見いだした。このことはWAのCLCも、PKS1とのキメラ体ではポリケトメチレン中間体を伸長途中でACPから切り出し、炭素鎖の伸長を阻止できるようになることを示しており、CLCによる炭素鎖の伸長阻止は、CLC自体に独立に備わった機能ではなく、他のドメインとの相互関係の結果初めて生じる付加的な機能であることを示唆した。

#### 4. *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、ヒト真菌感染症であるアスペルギルス症の病原菌であり、その病原性には孢子が生産するDHN-メラニンが必須である。米国 NIH のグループによりクローニングされた PKS 遺伝子 *Alb1* を同様の異種糸状菌発現系により解析し、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、本PKSにより先ずヘプタケタイドナフトピロンが生成し、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. 5)。

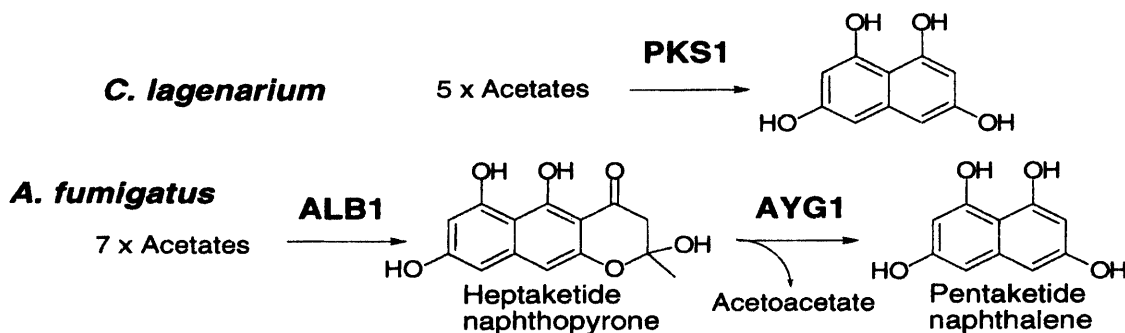


Fig. 5 Naphthalene biosynthetic pathways in fungi

以上本研究は、これまで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、また、生合成経路自身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ものである。本研究で見いだされた糸状菌PKSの機能についての新知見は、新規生物活性物質生産系として糸状菌ポリケタイド生合成系の利用が非常に有望であることを示しており、天然物化学、応用微生物学の進展に寄与するところが大きく、博士（薬学）の学位に相応しいものと認めた。