

## 論文の内容の要旨

論文題目 *Streptomyces carzinostaticus* 由来新規ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニング及び機能解析

氏名 大塚みゆき

ポリケタイド合成酵素 (polyketide synthase; PKS) は酢酸などの低級脂肪酸の CoA エステルを基質として、さまざまな天然物の基本骨格を生合成する重要な酵素群である。マクロライド化合物・芳香族化合物を生合成する PKS を中心に、遺伝子、酵素レベルでの詳細な解析が進められており、近年ではその産物が高度に構造修飾を受けた様々な化合物の生合成に関わる PKS 遺伝子がクローニングされており、天然物生合成における PKS の重要性が再認識されている。遺伝子改変による新規化合物のデザインの可能性を広げるためにも、今後さらに新たな炭素骨格の生合成に関わる PKS 遺伝子のクローニングが期待されている。

放線菌 *Streptomyces carzinostaticus* はエンジン系抗生物質であるネオカルチノスタチンを生産することで知られているが、この他にもネオカルジリン類、ピンクラマイシンといった生理活性物質を生産する (Figure. 1)。そこで本研究ではこれら化合物の生合成に関わる新規 PKS 遺伝子のクローニング、及び機能解析を試みた。

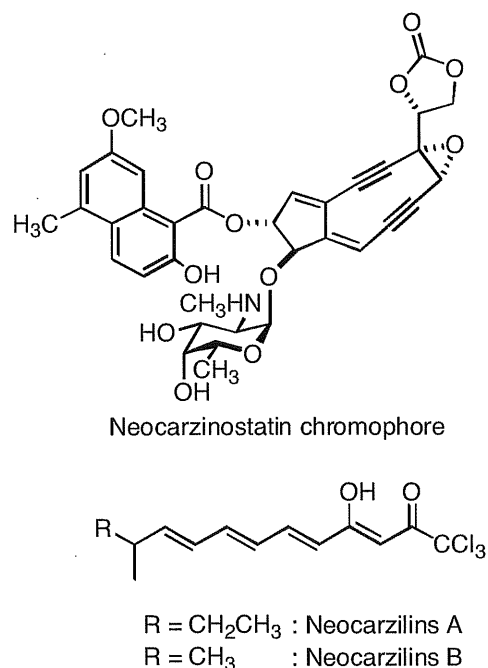


Figure 1. Products of *S. carzinostaticus*

## 【PKS 遺伝子のクローニング】

既知の放線菌由来モジュール型 (Type I) PKS 遺伝子において高い相同性を示す ketosynthase(KS)領域から縮重プライマーをデザインし、*S. carzinostaticus* ゲノム DNA を鋳型とした PCR を行ったところ、予想されるサイズの断片が特異的に増幅された。配列解析の結果、既知 PKS と高い相同性を示す一種類の配列が確認された。さらに、この断片をプローブとしてゲノムライブラリーをスクリーニングし PCR 産物の配列をカバーする 2 種類のコスミドクローンを得た。これらのクローンのインサート、約 33 kbp について配列を決定したところ、マクロライドを与える既知生合成遺伝子とは異なる特徴を有するタイプ I 型 PKS 遺伝子クラスターの存在が確認された。

## 【*S. carzinostaticus* 由来タイプ I 型 PKS 遺伝子クラスター】

このクラスター中には 3 個のタイプ I 型 PKS を含む計 14 個の ORF が確認された (Figure 2, Table 1)。これらのタイプ I 型 PKS (ORF4, 5, 6) には通常の PKS にみられるスターターユニットを活性化するローディングモジュールが欠失しており、また生合成された

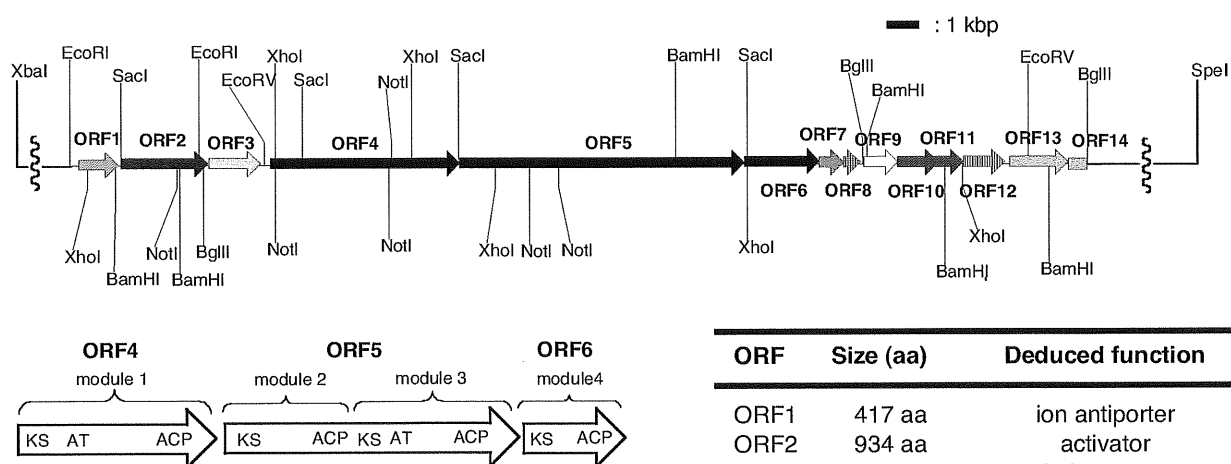


Figure 2. Type I PKS gene cluster from *S. carzinostaticus*

ポリケタイド鎖を加水分解して切り出すチオエステラーゼドメインが独立して存在する (ORF7) などの特徴がみられた。3 つのタイプ I 型 PKS には計 4 個のモジュールが存在し、それぞれに既知 PKS と高い相同性を示す KS ドメインが確認できる。しかし 2 つのモジュールではポリケタイド生合成に必須であると考えられる AT (acyltransferase) ドメインが、確認されなかった。

さらにこれら PKS 遺伝子の前後にはハロゲナーゼ (ORF3)、ノンリボゾーマルペプチド合

ORF	Size (aa)	Deduced function
ORF1	417 aa	ion antiporter
ORF2	934 aa	activator
ORF3	547 aa	halogenase
ORF4	2105 aa	type I PKS
ORF5	3088 aa	type I PKS
ORF6	812 aa	type I PKS
ORF7	268 aa	thioesterase
ORF8	173 aa	flavin reductase
ORF9	377 aa	adenyl transferase
ORF10	385 aa	dehydrogenase E1 $\alpha$ subuni
ORF11	328 aa	dehydrogenase E1 $\beta$ subuni
ORF12	442 aa	dehydrogenase E2 subunit
ORF13	623 aa	oxidoreductase
ORF14	>211 aa	oxidoreductase

Table 1. Deduced function of each ORFs

成酵素のアデニレーションドメイン (ORF9) に相同性を示す ORF が存在する。特に ORF3 はテトラサイクリンやトリプトファンに塩素を導入する FADH<sub>2</sub> 型ハロゲナーゼと高い相同性を示した。芳香環にハロゲンを導入する FADH<sub>2</sub> 型ハロゲナーゼはまだ報告例が少なく、この ORF3 産物の酵素機能について興味を持たれる。

#### 【タイプ I 型 PKS 遺伝子クラスターの発現】

クローニングした PKS 遺伝子クラスターの機能を解析するために、異種放線菌を宿主とした発現系を用い、遺伝子クラスターの発現、その生産物の同定を試みた。

遺伝子クラスターのうち基本的なポリケタイド骨格を生合成するために必要と思われる ORF4 ~ 12 を含む *EcoRV* 断片、ハロゲナーゼを含む *EcoRI* - *SpeI* 断片、クラスター全体を含む *XbaI* - *SpeI* 断片をそれぞれチオストレプトン誘導性 *tipA* プロモーターの下流に組み込んだ発現プラスミドを構築し、放線菌宿主 *Streptomyces lividans* K4-114 株及び *Streptomyces coelicolor* CH999 株を形質転換、*attP* サイトを介して宿主ゲノムに組み込んだ。形質転換体を誘導培養後、培地上清成分及び細胞抽出物を HPLC で分析したところ、*EcoRV* 断片形質転換体においてコントロールにはみられないいくつかの成分が大量に生産されることを見出した。

培地上清中に見られた複数の成分はいずれも 300 nm に吸収極大を持つ同じ UV 吸収パターンを示すことから共通するクロモフォアをもつことが予想された。これらの成分のうち成分 A、B が培養初期に主成分となるが、時間の経過とともにしだいにこれらのピークが小さくなり、代わって他の同様な UV 吸収をもつ複数のピークが現れた。

また細胞抽出物には成分 A、B の UV 吸収パターンが長波長側にシフトし、360 nm に吸収極大を持つ四つの成分 D、D'、E、E' が検出された。

#### 【PKS 産物の単離・構造決定】

成分 A、B を単離し、各種 NMR を測定し構造を決定した (Figure 3) 結果、この二つの成分はすでに *S. carzinostaticus* から単離されているネオカルジリン A、B それぞれの末端の構造に一致する構造を有していた。これはネオカルジリンのケトエノール部分が開裂し、培地上清に分泌されたもの、または生合成中間体と考えられた。

また細胞抽出物の GC-MS 分析の結果成分 D、D' 及び E、E' はそれぞれ同様の MS パターンを示し、分子

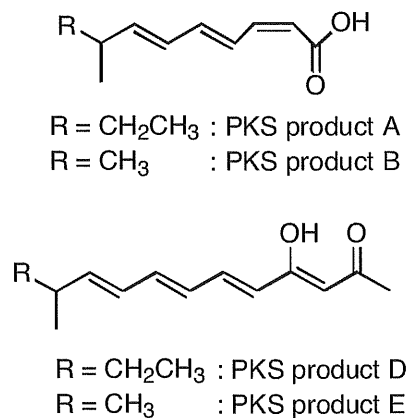


Figure 3. Structures of PKS products

量がネオカルジリン A、B のデクロロ体に一致したためそれぞれデクロロネオカルジリン A

のケト型 (D')、エノール型 (D)、B のケト型 (E')、エノール型 (E) であることが予想された。さらに成分 D、E を単離、NMR で構造解析を行いこの二つの成分がデクロロネオカルジリンであることを確認した。

#### 【遺伝子破壊】

クローニングした PKS 遺伝子の発現の結果から、この遺伝子クラスターがネオカルジリン生合成遺伝子であることが強く示唆された。これをさらに確認するために遺伝子破壊実験を行った。相同性組み換えにより ORF5 (PKS) 及び ORF3 (ハロゲナーゼ) の破壊株を作成し、その菌体抽出物を HPLC で分析した。*S. carzinostaticus* 野生株では検出されたネオカルジリン類のピークが検出されず、これらの ORF がネオカルジリン生合成に関与することが証明された。

#### 【[2-<sup>13</sup>C] 酢酸ナトリウムの投与実験】

ネオカルジリンの生合成経路としては isobutyryl-CoA、(S)-2-methylbutyryl-CoA をスターターとして malonyl-CoA が 4 回縮合して合成されたポリケタイド鎖に C1 ユニットが導入されて生合成される経路 (ルート A) と malonyl-CoA が 5 回縮合して脱炭酸する経路 (ルート B) の 2 種類の可能性がある (Figure 5)。どちらの経路で生合成されるかを推定するために [2-<sup>13</sup>C] 酢酸ナトリウムの投与実験を行った。この結果デクロロネオカルジリン A、B ともに C1、3、5、7、9 位に <sup>13</sup>C の同レベルでの取り込みが観測され、ルート B を経て生合成されることが支持された (Figure 4)。

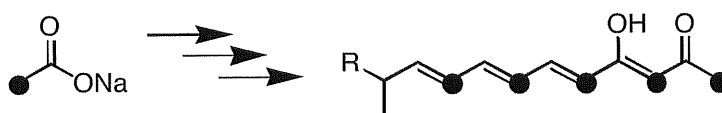


Figure 4. Labelling pattern of labelled dechloroneocarzilins by [2-<sup>13</sup>C]acetate

#### 【ネオカルジリン生合成経路】

以上の実験からネオカルジリン生合成経路とクローニングした遺伝子クラスター中の各 ORF の機能を考察した。ネオカルジリンは isobutyryl-CoA、(S)-2-methylbutyryl-CoA をスターターとして ORF4、5、6 がコードする PKS による malonyl-CoA の 5 回の縮合を経て生合成されたデクロロネオカルジリンが ORF3 にコードされるハロゲナーゼによってハロゲン化され生合成されると考えられる (Figure 5)。

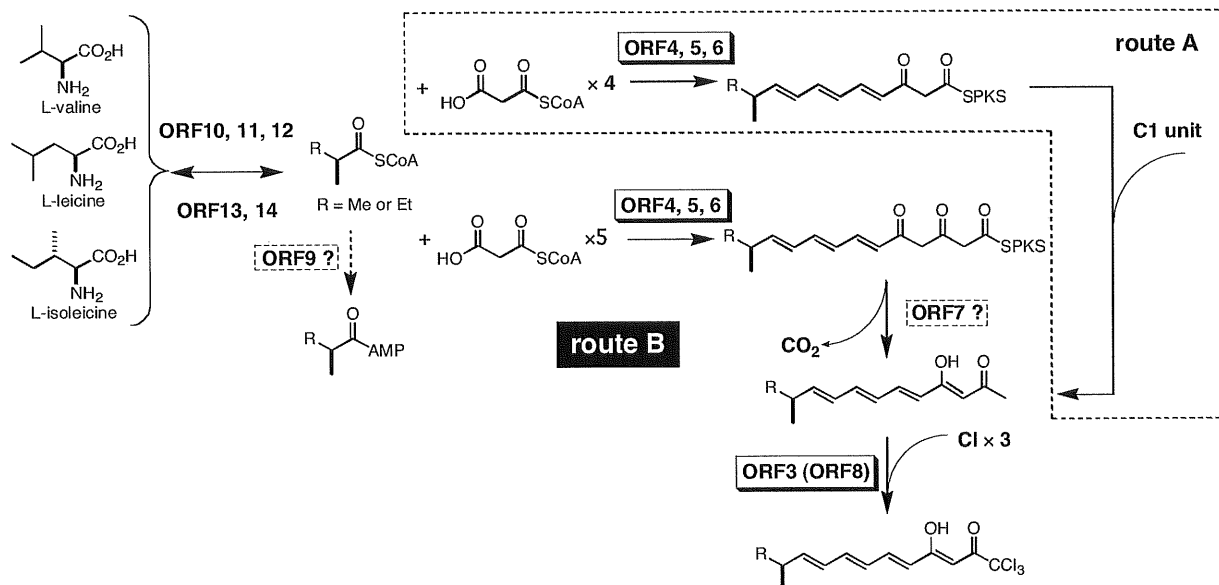


Figure 5. Proposed pathway for neoarziilin biosynthesis

### 【まとめ】

様々な生理活性物質を生産する放線菌 *S. carzinostaticus* よりネオカルジリンを生合成する新規ポリケタイド合成酵素遺伝子をクローニングした。

この遺伝子クラスター中に存在する PKS は四つの KS ドメインしかもたないにもかかわらず、5 回のアシルユニットの縮合を触媒する。これはこの PKS がモジュラー型と繰り返し型のハイブリッド PKS であることを示唆しており貴重な知見である。このような PKS はこのネオカルジリン生合成遺伝子の他にはまだ一例しか報告例がない。このような新しい型の PKS 遺伝子のクローニングは、遺伝子改変による新規ポリケタイド化合物のデザインの幅を広げるものである。

またハロゲナーゼ ORF3 はネオカルジリンのトリクロロメチル基の生成に関与すると考えられる。この ORF が相同性を示す FADH<sub>2</sub> 型ハロゲナーゼは主に芳香環へのハロゲン導入を触媒することが報告されており、ネオカルジリンのような aliphatic な炭素へのハロゲン導入はこの型の酵素としては初めての基質特異性である。この遺伝子のクローニングが天然に広く存在するハロゲン含有天然物生合成メカニズムの解明の一助となることが期待される。