

## 審査の結果の要旨

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。この PKS 遺伝子を中心に遺伝子改変による新規化合物の生産が試みられコンビナトリアル生合成として注目されているが、この技術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。

本論文では、異なる骨格を持つ複数の生理活性物質を生産する放線菌 *Streptomyces carzinostaticus* から新規 PKS 遺伝子のクローニングを行い、遺伝子発現、遺伝子破壊によりこの遺伝子の機能をネオカルジリン生合成遺伝子クラスターであると同定し、さらにその生合成経路について考察を行っている。

### 【PKS 遺伝子のクローニング】

本論文の著者は、既知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。この PCR 産物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互いにオーバーラップしている 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、マクロライドを与える既知 PKS 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クローニングに成功している。このクラスター中に 3 個のタイプ I 型 PKS を含む計 14 個の ORF を確認した (Fig. 1, 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) などの特徴を見出した。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 が存在することを明らかにした。このよ

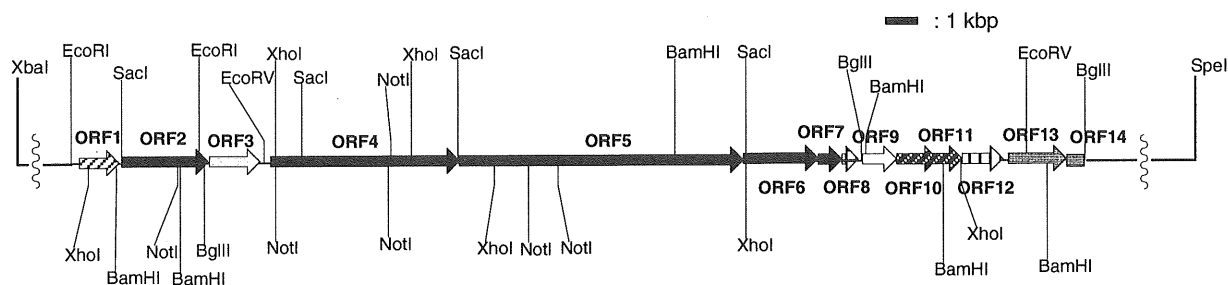


Fig. 1 Type I PKS gene cluster from *S. carzinostaticus*

うに既知 PKS 遺伝子とは異なる特徴を有する遺伝子クラスターの発見は、PKS とその生産物の構造を解析する上で重要な知見である。

#### 【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行っている。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考えられる ORF4 ~ 12 を含む発現プラスミドを構築し、放線菌ホス

ト *Streptomyces lividans* K4-114 株及び *Streptomyces coelicolor* CH999 株に形質転換した。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、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。これらの成分の内、培地上清から成分 A、B を、細胞抽出物から成分 D、E をそれぞれ単離し各種 NMR により構造解析を行った。その結果成分 A、B 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する化合物であることを明らかにし (Fig. 2)、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察している。さらに成分 D、E がネオカルジリン A、B のデクロロ体 (Fig. 2) であることを明らかにし、この遺伝子クラスターがネオカルジリン生合成遺伝子クラスターであると推測している。

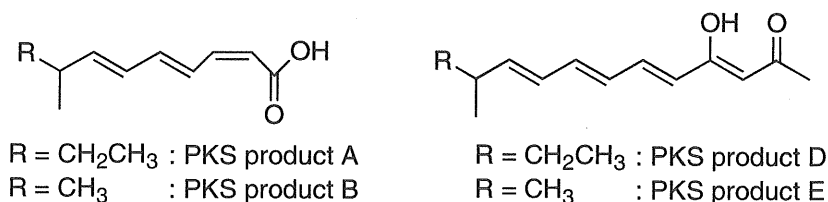


Fig. 2 Structures of PKS products

#### 【遺伝子破壊】

さらに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を確認するために遺伝子破壊実験を行っている。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. carzinostataicus* 野生株で検出される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を明らかにしている。

#### 【ネオカルジリン生合成経路】

ネオカルジリンの生合成経路としてアシルユニットが 4 回縮合して C<sub>1</sub> ユニッ

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 α subuni
ORF11	328 aa	dehydrogenase E1 β subuni
ORF12	442 aa	dehydrogenase E2 subunit
ORF13	623 aa	oxidoreductase
ORF14	>211 aa	oxidoreductase

Table 1. Deduced function of ORFs

トが導入される経路（ルート A）と 5 回縮合して脱炭酸する経路（ルート B）の 2 種類の可能性を考え (Fig. 3)、どちらの経路で生合成されるかを推定するため [2-<sup>13</sup>C] 酢酸ナトリウムの投与実験を行っている。その結果ルート B を経る生合成経路に適合する標識パターンを確認し、この PKS が一部繰り返し型として機能すると考察している。

最後に本論文の著者は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 の機能について Fig. 3 のように結論している。

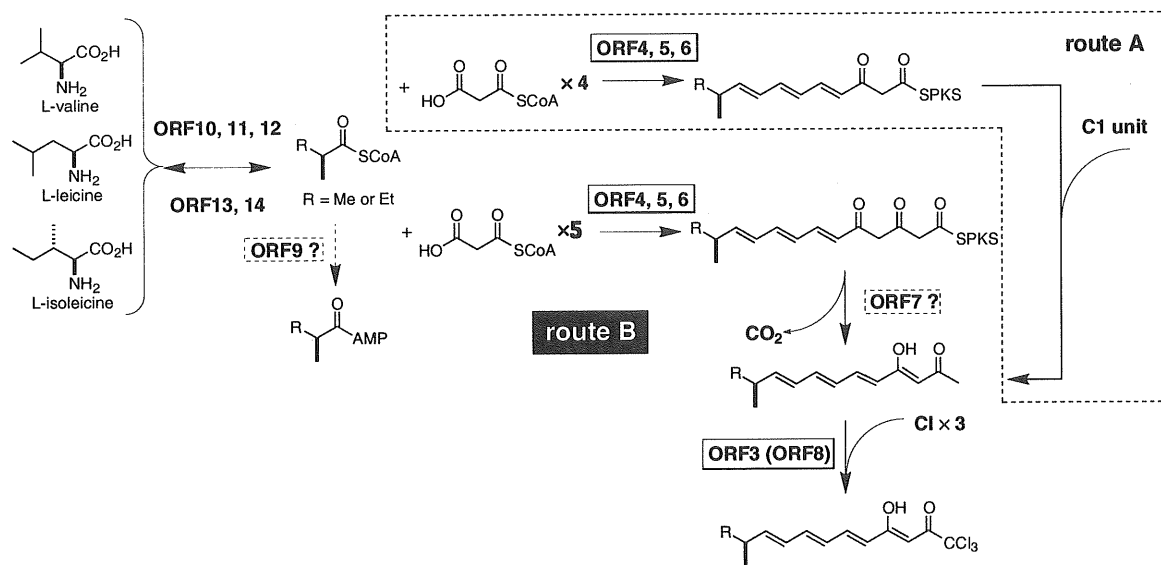


Fig. 3 Proposed pathway for nearzilin biosynthesis

以上本研究は、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、この PKS 遺伝子がモジュラー型と繰り返し型のハイブリッド PKS であることを明らかにしたものである。またこのクラスター中に存在するハロゲナーゼ ORF3 がすでに報告されているハロゲナーゼとは異なる基質特異性を持つ酵素である可能性を示している。このように本研究で得られた知見は新たなポリケタイド炭素骨格生合成、ハロゲン含有天然物生合成メカニズムの解明に寄与し、生合成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。