

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 12 年度博士課程 進学
氏名 鮎 信学
指導教官名 堀之内 未治

論文題目 微生物の新規なポリケタイド合成酵素の発見と反応機構の解析

カルコン合成酵素 (chalcone synthase, CHS) は、*p*-coumaroyl-CoA と malonyl-CoA からフラボノイドの前駆体である naringenin chalcone の合成を行うポリケタイド合成酵素 (polyketide synthase, PKS) である。CHS は高等植物以外の生物種から見つかった例がなかったため、高等植物で特異的に進化を遂げた酵素であると考えられていた。ところが、当研究室では以前、放線菌に多コピープラスミドで導入すると茶色素生産を引き起こす遺伝子として、植物の CHS に相同な遺伝子 (*rppA*) を放線菌 *Streptomyces griseus* からクローニングした¹⁾。これまで微生物の PKS としては、真核生物の脂肪酸合成酵素と類似のモジュール型 (type I) PKS と原核生物のそれと類似のサブユニット型 (type II) PKS の 2 種のみが知られていた。本研究は、微生物の "type III PKS" である RppA の *in vitro* 及び *in vivo* における機能の解明を目的としている。

1. RppA の機能²⁾

rppA 遺伝子産物 (RppA) は、CHS と 30% のアミノ酸相同性を有していた。大腸菌によって大量発現させた RppA を可溶性画分から精製したところ、植物の CHS と同様に 42 kDa のサブユニットからなるホモダイマーであることが判明した。

アミノ酸配列の高い相同性から RppA は CHS と同様の反応を行うと予想されたので、*p*-coumaroyl-CoA と [¹⁴C]malonyl-CoA を基質として反応を行った。反応は速やかに進行したが、予想に反し、反応生成物は naringenin chalcone とは薄層クロマトグラフィー上で異なる R_f 値を示した。また、基質として

[¹⁴C]malonyl-CoA のみを反応させても同一の化合物が得られることが判明した。この化合物は標品と保持時間、MS/MS のフラグメントパターンの比較により、1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN, **1**)であると同定した。また、反応系内 malonyl-CoA の脱炭酸により生じた acetyl-CoA が starter 基質となった可能性があったため、[¹⁴C]acetyl-CoA と非ラベル体の malonyl-CoA を基質として反応を行ったが、生成物から放射能は検出されず、acetyl-CoA は RppA の基質とならないことが判明した。

以上より、RppA は植物の CHS とは異なり、5 分子の malonyl-CoA から THN の生成を触媒する新規な PKS であることが判明した(図 1)。RppA の malonyl-CoA に対する K_m 値は $0.93 \pm 0.08 \mu\text{M}$ であり、THN 生成の k_{cat} は $0.77 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ であった³⁾。また、*rppA* 遺伝子を *tipA* プロモーターの制御下に置き、多コピーベクターにより *S. griseus* に導入したところ、宿主の培養抽出物から THN の自然酸化物である flaviolin が検出された。以上より、RppA は放線菌の THN synthase であり、微生物において type I、II 以外の新規な PKS が機能していることが明らかとなった。

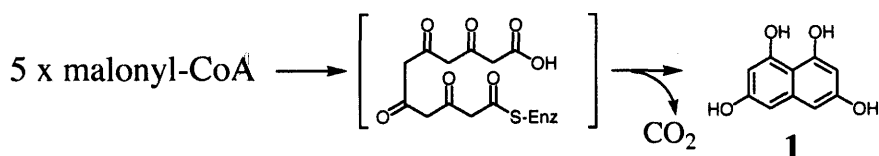


図 1

2. RppA の基質特異性の解析³⁾

上記のように RppA は生理的条件下において 5 分子の malonyl-CoA を縮合し、ペンタケタイドである THN を生成する。一方で type III PKS の基質特異性は寛容で、様々な非生理的な基質と反応する。そこで、malonyl-CoA を伸長基質とした場合の starter 基質の汎用性について調べた。RppA は、acetoacetyl-CoA (**2f**)、butyryl-CoA (**2c**)、isobutyryl-CoA (**2d**)、isovaleryl-CoA (**2e**)、hexanoyl-CoA (**2b**)、octanoyl-CoA (**2a**)を starter 基質として反応し、生成物として malonyl-CoA のみから生成する THN の他に、主にテトラケタイドとトリケタイドの α -ピロンを与えた。octanoyl-CoA (**2a**)を starter 基質とした場合のみ、ヘキサケタイド (**6a**)を与えた(図 2A)。これは、type III PKS

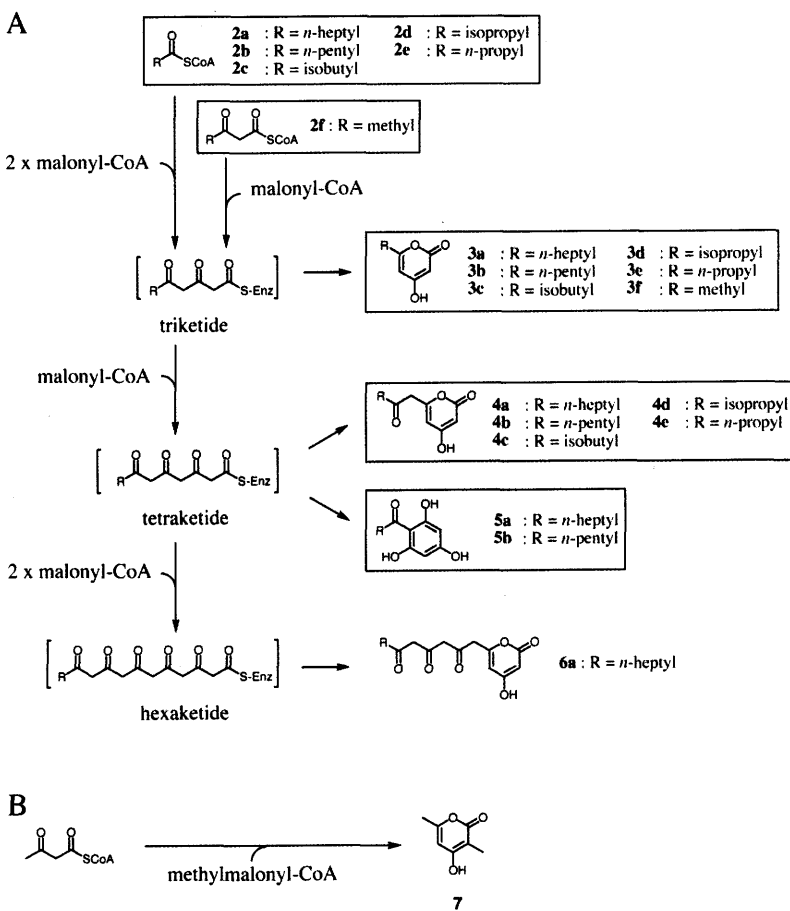


図 2

がヘキサケタイド以上のサイズのポリケタイドを生成した初めての例である。

次に acetoacetyl-CoA (**2f**)を starter 基質、methylmalonyl-CoA を extender 基質とし反応を行ったところ、トリケタイドの α -ピロン (**7**)が生成した(図 2B)。以上のように RppA の基質特異性は寛容で、starter 基質として malonyl-CoA だけではなく、種々の acyl-CoA を受け入れることが分かった。またいずれの starter 基質が取り込まれた場合においても生成物がペンタケタイドではなかったことから、type III PKS の縮合回数の決定に、伸長鎖のスターターユニット部位の構造が重要であると推定される。

3. RppA の部位特異的変異による基質特異性の改変⁴⁾

RppA は malonyl-CoA を starter 基質とする特異な性質を持つ。そこで、RppA の starter 基質選択性を決定するアミノ酸残基の同定を目的に部位特異的変異酵素の活性を検討した。X 線結晶構造解析による CHS の立体構造およびアミノ酸相同配列から、RppA の活性中心近傍にあるアミノ酸残基を予想し、これを変異の対象とした。

Tyr224 を CHS 型の Gly に置換した変異酵素 Y224G は、malonyl-CoA 単独では生成物を与えないことが明らかとなった。Y224G は hexanoyl-CoA (**2b**)を starter 基質、malonyl-CoA を伸長鎖基質とする反応の活性は有していることから、malonyl-CoA を starter 基質とする活性のみを失っていると考えられる。これに対し Y224F 及び Y224W は、野生型と同様の活性を示した。以上のことから、Tyr224 の芳香環が malonyl-CoA を starter 基質とする選択性に重要であると推定される。また、Ala305 をかさ高い Ile に置換すると、hexanoyl-CoA (**2b**)を starter 基質とした反応において野生型がテトラケタイド (**4b**)とトリケタイド(**3b**)の α -ピロンを与えるのに対し、A305I はトリケタイド (**3b**)のみを生成することが判明した。同様な結果が phenylacetyl-CoA を starter 基質とする反応においても得られた。以上より、305 番目のアミノ酸側鎖の構造が RppA の生成物のサイズの決定に寄与していることが分かった。

4. *S. griseus* における RppA の生理的役割

rppA 遺伝子の生態内における機能を解明するために *S. griseus* 野生株の *rppA* 遺伝子を破壊した。破壊株は野生株と比べ生育に差異は見られないが、基底菌糸のメラニン様色素及び胞子の緑色色素の生産能を失い、カビ、植物で言われるところのアルビノ形態を示した²⁾。また、*rppA* 遺伝子破壊株に *rppA* 遺伝子を多コピープラスミドで導入すると、形質転換株のメラニン様色素及び胞子色素の生産能が回復した。したがって、放線菌にはチロシナーゼによる DOPA メラニンの他に、RppA による新しいメラニン生合成経路が存在することが明らかとなった。RppA の *in vitro* の生成物である THN は、カビのジヒドロキシナフタレンメラニンの生合成中間体として知られている。カビにおいて THN は type I PKS によって生成される。放線菌においては type III PKS、カビにおいては type I PKS と、異種の酵素が同一の生成物をメラニン生合成の中間体として生成していることは大変興味深い。

*S. griseus*の染色体からgene walkingにより、*rppA*の上、下流併せて13.5-kbの遺伝子断片クローニングし、その塩基配列を決定した。*rppA*の直前には、様々な化合物の酸化に関わるP450に相同な遺伝子(P450mel遺伝子)が存在していた。同様に、*Streptomyces lividans*から取得した*rppA*と相同な遺伝子を含む11-kbの遺伝子断片の塩基配列を決定したところ、この遺伝子の直後にもP450に相同な遺伝子が存在

していた。次に、相同組み換えにより *S. griseus* 染色体上の P450mel 遺伝子の大部分を欠損させた株を作製した。P450mel 遺伝子欠損株は緑色の胞子色素を生産せず、菌糸は野生株の茶色とは異なる薄い赤色を呈した。また、P450mel 遺伝子と *rppA* を *tipA* プロモーターの制御下に置き、多コピーベクターにより *S. griseus* に導入したところ、深緑色の色素を大量に生産した。同様に *rppA* のみを導入すると、赤色の色素を生産した。従って、P450mel は THN を変換していると推定され、*rppA* と P450mel 遺伝子は多くの放線菌のメラニン生合成の鍵であると考えられる。

5. *S. coelicolor* A3(2) の type III PKS の反応機構の解析

ポストゲノムの時代となり、二次代謝物質の生産に関わると思われる多数の遺伝子群がデータベースに登録されるようになった。これらの遺伝子がコードする酵素は、生合成工学的な手法による非天然型天然物の創製のツールとなり得るが、その機能が特定されているものは少ない。*S. coelicolor* A3(2) のゲノム上には、*S. griseus* の RppA と、アミノ酸配列で 31% の相同性を有する遺伝子 (SC2H12.20c) が存在する。SC2H12.20c を pIJ6021 にクローニングし、*S. coelicolor* A3(2) 及び *S. lividans* に導入したところ、宿主は germicidin 及びその類縁体を生産した。germicidin の構造から触媒機構は図 3 のように推定できた。germicidin は以前、*S. viridochromogenes* から単離された放線菌の胞子発芽阻害剤であり、SC2H12.20c は germicidin の生合成酵素であると推測できた。また、放線菌において生理的条件下で単環性のピロンを生産させる酵素の報告例は無く、SC2H12.20c は放線菌の新規な type III PKS でもある。

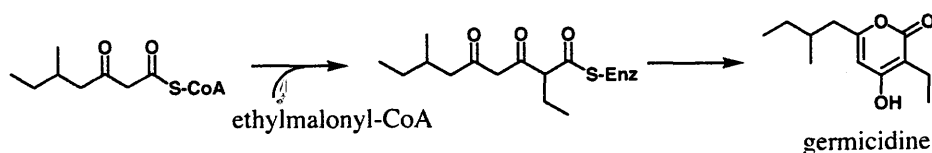


図 3

6. 参考文献

- 1) Ueda, K., Kim, K.-M., Beppu, T. and Horinouchi, S. (1995) *J. Antibiot.* **48**, 638-646
- 2) Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S. (1999) *Nature* **400**, 897-899
- 3) Funa, N., Ohnishi, Y., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 4628-4635
- 4) Funa, N., Ohnishi, Y., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S. (2002) *Biochem. J.* **367**, 781-789