

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鮎 信学

カルコン合成酵素 (CHS)は、naringenin chalcone の合成を行うポリケタイド合成酵素 (PKS) である。CHS は高等植物以外の生物種から発見された例がなく、高等植物に特異的な酵素であると考えられていた。本研究は、放線菌 *Streptomyces griseus* からクローニングされた CHS に相同な遺伝子 (*rppA*)に関するものであり、その *in vitro* 及び *in vivo* における機能の解明を述べている。さらに、*S. coelicolor* A3(2)から新規なタイプ III PKS を見出し、その機能についても述べている。

(1) *S. griseus* の RppA は、5 分子の malonyl-CoA から 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN) の生成を触媒する新規な PKS であることを明らかにした。微生物の PKS は 2 つのタイプしか知られていなかったが、この発見を皮切りに微生物の CHS 相同蛋白が多数報告され、現在 CHS 相同蛋白は"III 型 PKS"と呼ばれるようになった。また、RppA を *S. griseus* で高発現したところ、宿主の培養抽出物から THN の自然酸化物が検出された。以上より、RppA は放線菌の THN 生合成酵素であることが明らかとなった。

(2) 一般に III 型 PKS は反応の進行にスターター基質が必要であり、スターター基質が酵素に結合してから malonyl-CoA の縮合が行われる。RppA は種々の脂肪酸のアシル-CoA をスターター基質とし、テトラ及びトリケタイドの  $\alpha$ -ピロンを与えた。特に octanoyl-CoA をスターター基質とすると、ヘキサケタイドを与えた。これは III 型 PKS がヘキサケタイドを与えた初めての例である。以上のように RppA の基質特異性は寛容であり、III 型 PKS の生成物のサイズにスターター基質の構造が重要であることが判明した。

(3) RppA の Tyr224 を、CHS 型の Gly に置換した変異酵素 Y224G は、マロニル-CoA 単独からは生成物を与えなかったが、hexanoyl-CoA をスターター基質とする反応の活性は有していた。これに対し、Y224F 及び Y224W は野生型と同様の活性を示し、Tyr224 の芳香環がマロニル-CoA をスターター基質とする活性に重要であることが分かった。また、Ala305 をかさ高い Ile に置換すると変異酵素は hexanoyl-CoA をスターター基質とした時、トリケタイドのみを与えることから、Ala305 が生成物のサイズを決定していることが判明した。

(4) RppA は放線菌に広く分布しているが、生理的機能は不明であった。*S. griseus* の *rppA* を破壊すると破壊株がアルビノ形態を示し、*rppA* がメラニン生合成の鍵であることを明らかにした。また、*rppA* のすぐ上流に存在する P450 と相同な遺伝子 (*P450mel*) を破壊すると、放線菌はメラニン生産能を失い菌糸に THN の酸化物を蓄積した。また、*rppA* と *P450mel* を多コピーベクターによ

り放線菌に導入し、宿主が生産するポリケタイドに保護基を導入することで、4,9-ジヒドロキシ-1,6,7,12-テトラメトキシペリレン-3,10-キノンを単離した。したがって、P-450mel が THN を酸化的カップリングし 1,4,6,7,9,12-ヘキサヒドロキシペリレン-3,10-キノンを生成すると予想された。これは放線菌に RppA と P-450mel による新規なメラニン生合成経路が存在することを示している。

(5) データベースの検索により *S. coelicolor* A3(2)のゲノム上に、*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)を見出した。SC2H12.20c を放線菌で高発現したところ、宿主は germicidin 及びその類縁体を生産した。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る。また *S. coelicolor* A3(2)において SC2H12.20c 遺伝子を破壊したところ、破壊株は germicidin 及びその類縁体の生産能を失った。以上より SC2H12.20c は germicidin 生合成酵素であることが明らかとなった。

以上、本論文は放線菌が有する CHS 相同蛋白質が、III 型ポリケタイド合成酵素であることを証明し、さらに複数の CHS 相同遺伝子についてもその反応機構を明らかにしたものである。また、本研究の副次的成果として、放線菌の新規メラニン生合成経路も発見した。従って、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。