

## 審査の結果の要旨

氏名 田口 貴章

放線菌が生産する芳香族ポリケタイド化合物は多様な骨格と多彩な生理活性を有する重要な化合物群である。放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の生産するアクチノロジン (actinorhodin, ACT)、*S. violaceoruber* Tü22 の生産するジヒドログラナティシン (dihydrogranaticin, DHGRA) はともにベンゾイソクロマンキノン系抗生物質(BIQ)に属する芳香族ポリケタイドであるが、基本骨格の一部、ピラン環上3位と15位に着目するとACTは (3*S*, 15*R*) であるのに対しDHGRAは (3*R*, 15*S*) と互いに逆の立体化学である。両化合物の生合成は仮想中間体 bicyclic intermediate の生成まで全く同様に進行した後、その3位のケトンが立体特異的還元酵素 RED1、RED2 によって還元され、両化合物3位の立体化学が逆になると考えられていた。本論文の著者は、両化合物の生合成における立体化学制御の解明・比較を目的とし、(1)データベース解析による RED2 遺伝子の予測、(2)相補実験による遺伝子機能の推定、(3)遺伝子再構築系による遺伝子機能の証明、により RED2 をコードする遺伝子を同定し、さらに(4)biotransformation、(5)ホモロジー・モデリングによる RED1・RED2 の3次元構造の予測、(6)in vitro assay 系の構築、を通して RED1・RED2 両酵素の特性を生化学的に検討・比較している。

### 【1. RED2 遺伝子の探索】

ACT 生合成遺伝子クラスター中 RED1 をコードする遺伝子は *act* VI-ORF 1 であることを、本論文の著者はすでに明らかにしていた。一般に、同一化合物を基質とする酵素の間にはアミノ酸一次配列に有意な相同性が期待できるが、DHGRA 生合成遺伝子クラスター中には *act* VI-ORF 1 の相同遺伝子は存在しなかったため、改めて同クラスターについてヌクレオチド結合部位の検索並びに相同性検索を行い、*gra*-ORF 6 が RED2 コードすると予測した。さらに最新の BLAST ツールを用いた相同性比較とタンパクドメイン検索を行い、*gra*-ORF 6 産物は *act* VI-ORF 1 産物とは有意な相同性を持たないこと、両者は異なるデヒドロゲナーゼファミリーに属することを改めて明らかにした。

### 【2. 相補実験】

*gra*-ORF 6 の RED1/2 への関連性を検討するために相補実験を行った。*gra*-ORF 6 は上流にある *gra*-ORF 5 と翻訳共役しているため両遺伝子の共役を保ったままのプラスミドを構築し、*act* VI-ORF 1 変異株 *S. coelicolor* B22 を形質転換したところ、ACT 様色素が生産されることを確認した。さらに *act* VI-ORF 1 変異株が蓄積する shunt product である DMAC、aloesaponarin II は、生合成が bicyclic intermediate で止まっていることを示唆するものであるが、形質転換体からはこの両化合物とも検出できなかったことから、*gra*-ORF 6 を導入したことで RED2 が発現し bicyclic intermediate を還元し、本来の立体化学とは異なる ACT が生産

されたと結論づけている。

### 【3. 遺伝子再構築系による機能証明】

放線菌用発現プラスミド pRM5 には ACT 生合成初期に必要な遺伝子が組み込まれているおり、このプラスミドを ACT 生合成遺伝子クラスター欠損株 *S. coelicolor* CH999 に導入すると、ACT 生合成が bicyclic intermediate で止まり、上述の shunt product である DMAC、aloesaponarin II を蓄積する。この pRM5 に RED1 遺伝子 *act* VI-ORF 1 を加えたプラスミド pIJ5660 を CH999 に導入すると、生合成が先まで進み (S)-DNPA が生産されるという実験事実に基づき、pRM5 に *gra*-ORF 6 を加え CH999 に導入したところ、(R)-DNPA が生産されることを明らかにした。そしてこの結果から *gra*-ORF 6 が RED2 をコードすると同定した。またこれに伴い *gra*-ORF 6 の上流に位置し翻訳共役している *gra*-ORF 5 は *act* III の相同遺伝子であり、オクタケタイド鎖の 9 位を還元するケト還元酵素 KR (Fig. 1) をコードすることも明らかにし、さらに *gra*-ORF 5, 6 が翻訳共役している状態の方が *gra*-ORF 6 単独より DNPA 生産性が高いことも見出した。

以上、DHGRA 生合成遺伝子中 *gra*-ORF6 が RED2 をコードし、3 位の立体化学制御に必須であることを初めて明らかにしたことにより、RED1・RED2 というアミノ酸一次配列上有意な相同性を示さない二つの酵素が、同一化合物を基質とし同一部位を立体化学が逆になるよう還元するという、構造多様性を特徴とする放線菌二次代謝産物の生合成において極めて稀で興味深い例を提示した。

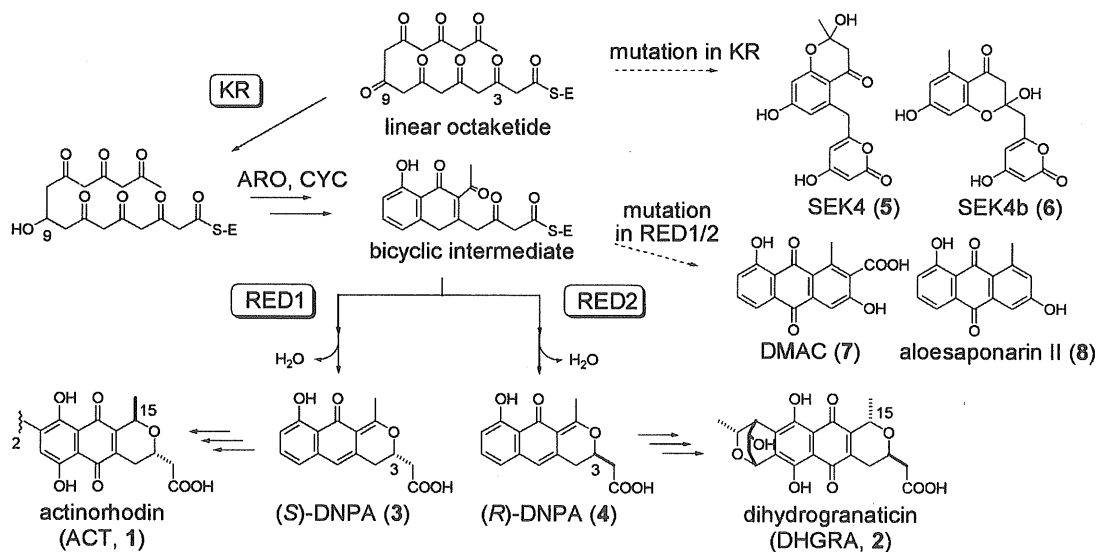


Fig.1 Proposed Biosynthetic Pathway of Act and DHGRA

### 【4. Biotransformation によるアナログ基質還元】

RED1・RED2 をコードする遺伝子を特定できたので、続いて両酵素の特性について生化学的に検討した、前述の pRM5 を応用し RED1・RED2 それぞれを発現する *S. coelicolor* CH999 の形質転換体を作成した。また両酵素の本来の基質である bicyclic intermediate は単離不能なため、これに代わるアナログ基質を合成し形質転換体の液体培養に供した結果、RED1 はアナログ基質を還元するのに対し RED2 は還元しないことが明らかとなった。このことは、RED1 は RED2 同一化合物を基質

とするものの、その基質特異性は大きく異なることを示唆すると判断した。

#### 【5. Homology modelingによる3次元構造予測】

RED1、RED2の基質特異性について考察するに当たり、両酵素の3次元構造をhomology modeling法(FAMS)により予測したところ、RED1はヒト心臓由来L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenaseを、RED2は真菌由来trihydroxynaphthalene reductaseをそれぞれ鋳型とする3次元モデルを得ることができた。アミノ酸一次配列上有意な相同性を示さないRED1、RED2両酵素は、得られた3次元モデルも大きく異なり、さらに基質結合部位と思われる空間について、RED1は比較的大きいがRED2は小さいと予想され、この差が両酵素の基質特異性の差を反映していると推測した。また活性発現に重要と考えられる残基(L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenaseのH158、E170、trihydroxynaphthalene reductaseのS164、Y178、K182)がRED1、あるいはRED2のそれぞれにおいてもよく保存されていることも判明した。

#### 【6. 大腸菌発現系の構築】

両酵素の特性をより直接的に解析するため、RED1・RED2それぞれを大腸菌で発現することに成功した。そしてbiotransformationで用いたアナログ基質を利用し*in vitro* assay系を構築し還元活性を検討した結果、biotransformationの結果と同様、RED1からは還元活性を検出できたが、RED2から検出することはできなかった。このことから、RED1・RED2の基質特異性は大きく異なると判断した。

また還元活性を検出できたRED1について検討を進めたところ、基質であるbicyclic intermediateは従来考えられていたような酵素結合型ではなく、free acidの状態還元される可能性が高いことを新たに見出し、生合成酵素間の基質チャネリングに関する新たな知見を得ることができた。さらにsite directed mutagenesisによりHis129、Glu141が確か活性発現に必須であることを明らかにし、homology modelingで得られた3次元モデルを支持する結果を得た。

以上本研究は、DHGRA生合成遺伝子中gra-ORF6がRED2をコードすることを初めて同定したことによりその生合成経路の一部を実験的に明らかにしたうえで、RED1・RED2というアミノ酸一次配列上有意な相同性を示さない二つの酵素が、同一化合物を基質とし同一部位を立体化学が逆になるよう還元するという、構造多様性を特徴とする放線菌二次代謝産物の生合成において極めて稀で興味深い例を提示したものである。さらに両酵素は同一化合物を基質とするもののその基質特異性は大きく異なり、またRED1については基質がfree acid体で反応している可能性が高いという新しい知見は、今後生合成酵素間の基質チャネリング機構の解明、さらには新規非天然型抗生物質生産系の開発に重要なものであり、今後の天然物化学、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。