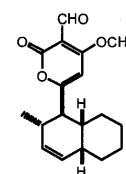


論文の内容の要旨

ジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani* 還元型ポリケタイド生合成酵素の機能解析

笠原 堅

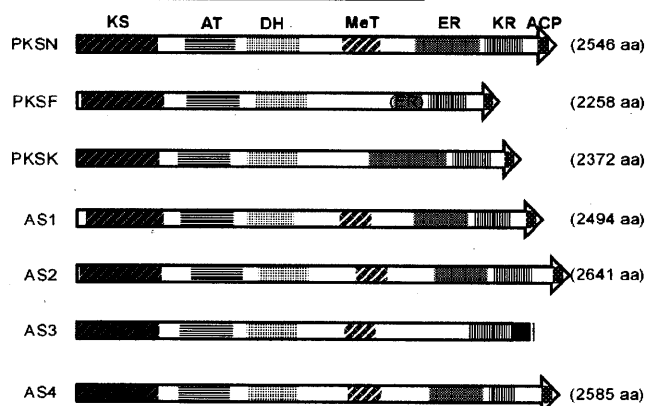
ジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani* は、solanapyrone や alternaric acid など、構造的に、また、生合成的にも興味深い還元型ポリケタイドを生産する。そこで、還元型ポリケタイドの、特に炭素骨格構築反応に注目した生合成機構解明を目指した。これまでに、当研究室では、還元型ポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子 *pksN*、*pksF*、*pksK* を同菌よりクローニングしたが、solanapyrone の生合成酵素は未同定であった。今回、PKSN、PKSF の機能解析を進めるとともに、新たに solanapyrone 生合成遺伝子クラスターをクローニングし、solanapyrone 生合成の鍵酵素であり、Diels-Alder (D-A) 環化を触媒する solanapyrone 合成酵素 SPS の発現、精製にも成功した。



solanapyrone A (1)

1) *A. solani* 由来還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニング

既知の還元型 PKS の保存アミノ酸配列から、新たに縮重入りプライマーをデザインし、PCR 法により新たに 4 種の新規 PKS 遺伝子を取得した。相同性検索の結果、いずれも、炭素骨格を構築する基本ドメイン (KS、AT、ACP) の他に、還元、脱水酵素ドメイン (KR、DH、ER)、C-メチル基転移酵素ドメイン (MeT) などからなる還元型 PKS をコードしていた。



KS: Ketosynthase, AT: Acyltransferase, DH: Dehydratase, MeT: Methyltransferase, ER: Enoylreductase, KR: Ketoreductase, ACP: Acyl carrier protein

Figure 1. PKSs from *A. solani*

2) Solanapyrone 生合成酵素の機能解析

2-1) AS2 の発現と機能同定

solanapyrone の生合成が開始されると予想される培養 15 日目の *A. solani* 培養菌体において AS2 由来 PKS 遺伝子の強い発現が認められた。また、AS2 由来 PKS 遺伝子 (*sol1*) とクラスターを構成している遺伝子 (*sol2*~*6*) は、solanapyrone 生合成に必要な O-メチル転移酵素、P450、酸化酵素、脱水素酵素をコードすると推定された。そこで、*sol1* のコードする PKS を *Aspergillus oryzae* にて発現させ、生成化合物を単離、構造解析し、Sol1 産物を 4-hydroxy-3-methyl-6-undeca-1,7,9-trienyl-pyran-2-one と決定した。これが、solanapyrone の生合成前駆体と予想した (5) と一致したことから、*sol* 遺伝子クラスターが solanapyrone 生合成遺伝子クラスターであると同定した。

Figure 2. *Sol* gene cluster from *A. solani*

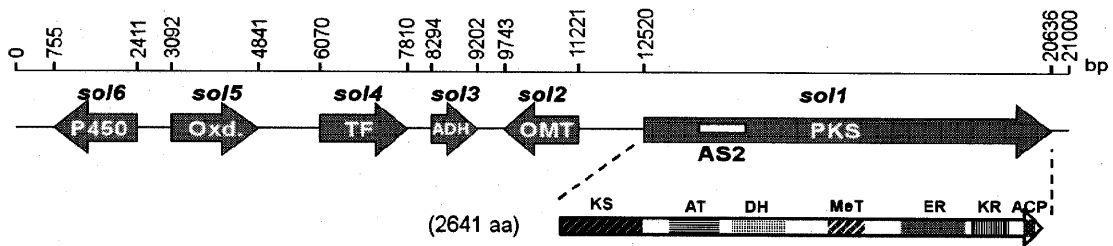


Figure 3. Solanapyrone biosynthesis in *A. solani*

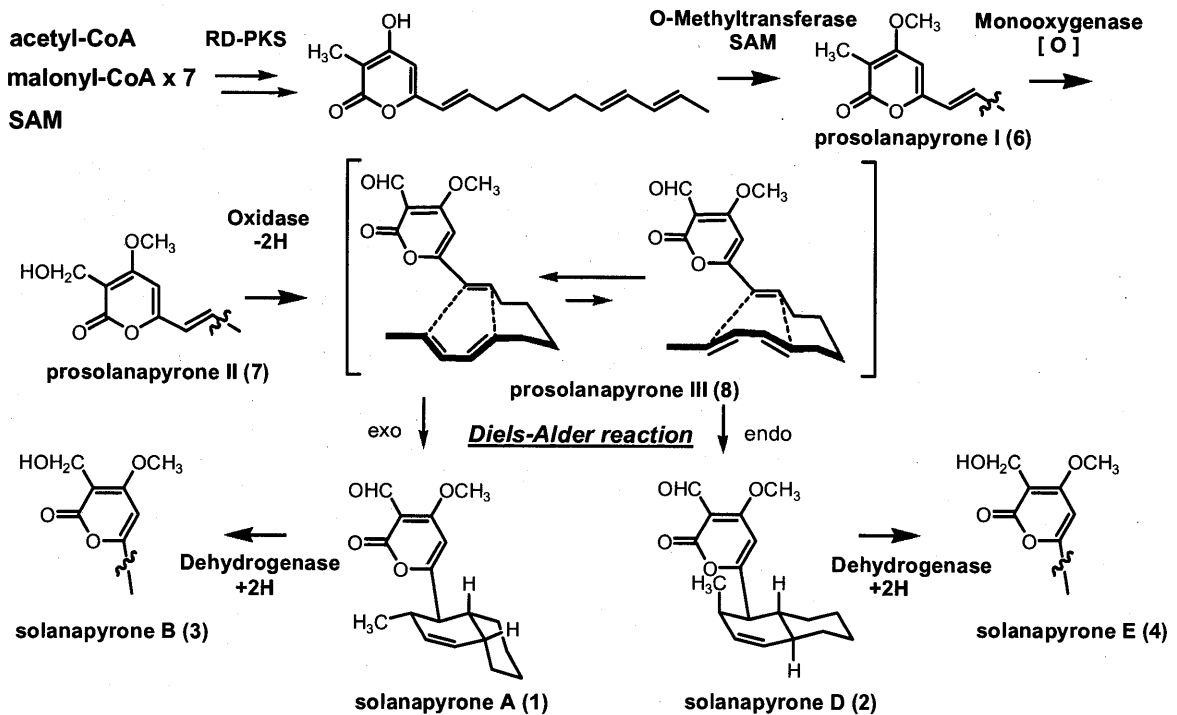


Figure 4. Sol1 product

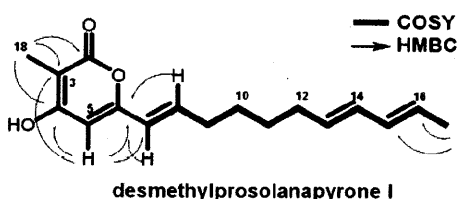


Table 1. NMR data of Sol1 product

Position	¹³ C δ ppm	¹ H (mult., J in Hz) δ ppm	Position	¹³ C δ ppm	¹ H (mult., J in Hz) δ ppm
2	164.1	-	10	28.1	1.47 (m)
3	99.2	-	11	29.8	1.42 (m)
4	164.4	-	12	32.1	2.07 (m)
5	99.7	6.02 (s)	13	130.8	5.54 (m)
6	166.2	-	14	131.4	5.98 (m)
7	122.3	6.06 (d, 16.7)	15	131.9	6.02 (m)
8	137.3	6.50 (dt, 15.7, 6.7)	16	126.4	5.54 (m)
9	32.2	2.22 (dt, 6.7, 6.7)	17	17.3	1.67 (d, 6.2)
			18	7.9	1.86 (s)

¹H-(500 MHz) and ¹³C-(125 MHz) NMR in Acetone-d₆.

2-2) Solanapyrone 合成酵素 SPS の同定と精製

Solanapyrone の直接の前駆体 prosolanapyrone III (8)は、反応性が高く、反応液中で非酵素的にも環化する一方で、*A. solani* より solanapyrone が高い光学純度で得られることから、prosolanapyrone II (7) の酸化酵素が、prosolanapyrone III を生成すると同時に、D-A 環化をも触媒する solanapyrone 合成酵素 (SPS) であると予想され、Figure 2 に示す solanapyrone の生合成経路が提唱された。²⁾

Solanapyrone 生産菌からの SPS の酵素精製実験から、SPS は、prosolanapyrone II (7) を酸化するために分子状酸素を要求し、それ以外の補酵素、金属イオンを必要としないことから、³⁾ FAD 依存的酸化酵素と予想された Sol5 が prosolanapyrone II (7) を酸化すると同時に Diels-Alder 環化を触媒し、solanapyrone を与える SPS であると考えた。なお、SPS は *A. solani* より調製した酵素液に活性は見出されているものの、完全精製には至っていないことから、³⁾ Sol5 の発現、酵素精製、機能同定を検討した。

大腸菌による Sol5 の発現では、活性が見られず、His-tag 付きの Sol5 を *A. oryzae* で発現させた場合も活性は見られなかったものの、完全長の Sol5 をアミラーゼプロモーター制御下、*A. oryzae* で発現させた菌体粗酵素液中にはじめて活性が検出された。その後の条件検討により、培養培地中の SPS 比活性がより高いことがわかり、培地からの精製を試みた。完全精製には至らなかったものの、3 段階の精製で、比活性は約 30 倍上昇し、この部分精製酵素を用いて prosolanapyrone II (7) と反応させた。その結果、*exo* 選択的な D-A 生成物 solanapyrone A (1) をメジャーに与え、solanapyrone D (2) との比は、親株の (1)、(2) の生産比と一致した (Figure 5)。一方、

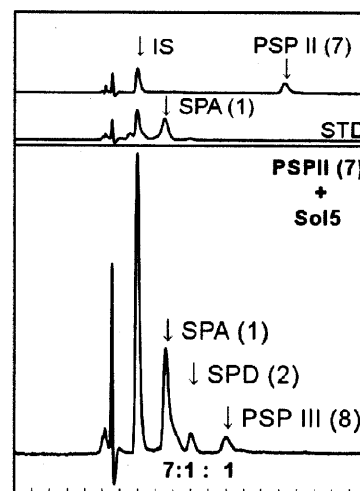


Figure 3 HPLC analysis of SPS products.

IS: coumarin as an internal standard

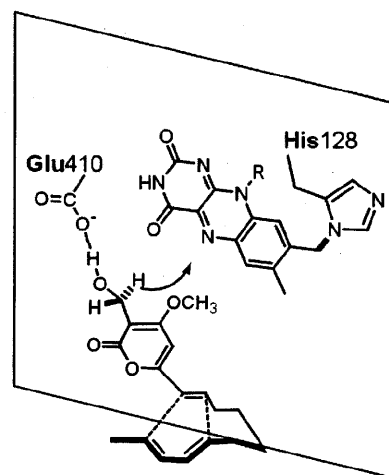


Figure 4 Proposed mechanism of oxidative D-A reaction by SPS

prosolanapyrone III (8)の非酵素的な D-A 反応では、endo 選択的に付加物を与えることから²⁾、Sol5 が、prosolanapyrone II (7) を酸化すると共に酵素的に D-A 環化する SPS をコードすると同定した。

SPS と相同な 6-hydroxy-D-nicotine oxidase⁴⁾との比較から、SPS の His128 に共有結合した FAD が、prosolanapyrone II (7) のピロン部分のメチレン水素を引き抜くと考えられる。この酸化反応によるジエノフィルの LUMO の低下が、SPS の触媒する酵素的 DA 反応に寄与するものと考えられる。より詳細な解析のために、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* にて分泌タンパクとして SPS を発現させ、その精製法を確立した。

Purification step	Total protein (mg)	Total activity ($\mu\text{mol/min}$)	Specific Activity ($\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}$)
1 1 liter culture medium	71	9.2	0.1
2 Phenyl sepharose	20	7.2	0.4
3 80% (NH ₄) ₂ SO ₄ sup	15	3.0	0.2
4 Phenyl sepharose	6.7	2.7	0.4
6 DEAE	2.0	2.1	1.1
6 Endoglycosidase	1.7	2.7	1.4
7 Mono Q	0.6	1.1	1.8
8 Superdex 200	0.3	0.9	3.0

Table 2. SPS purification from *Pichia pastoris*



Figure 7. SDS-PAGE of SPS from *Pichia pastoris*

3) Polyenepolyketide 合成酵素 PKS F の機能同定

機能未同定であった PKS F を *A. oryzae* で発現し、その生成物を LC-HR-MS で解析した結果、C₁₈ から C₂₆ の10 種以上の化合物を生成することが明らかになった。その中で、メジャーな2種の化合物を単離構造決定し、aslanipyron (C₂₂) (I)、aslaniol (C₂₃) (II) と命名した。PKS F は、acetyl-CoA に、10 個の malonyl-CoA を縮合して aslanipyron を生成するが、10 回目の縮合サイクルで、C₂₂ ポリケタイド中間体のβ-カルボニルが還元されると、さらに C₂ ユニットを縮合し、アルドール環化、脱水、脱炭酸を経て aslaniol を生成すると考えられた⁴⁾。

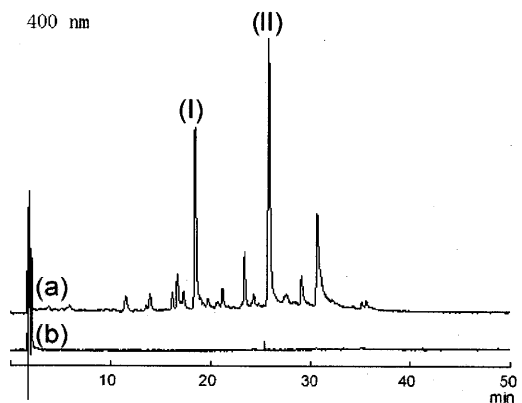


Figure 8. HPLC profiles of the mycelial extracts from a) *A. oryzae* PKS F transformant and b) *A. oryzae* void vector transformant.

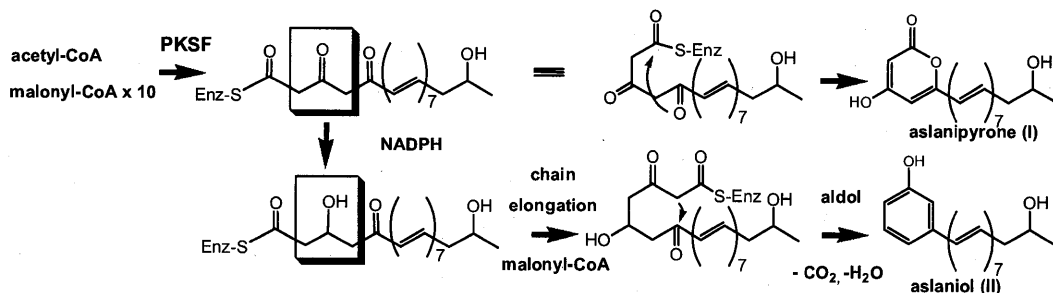


Figure 9. Proposed biosynthesis of PKS F products

4) Alternapyrone 合成酵素 PKSN の機能解析

S-adenosylmethionine (SAM) に由来する 8 個の側メチル基をもつ alternapyrone の合成酵素 PKSN について、酵母による発現系を構築し、そのメチル化反応機構について検討した。

既知の PKS MeT とのアラインメントから、広くメチル基転移酵素間に保存され SAM の binding に関わるとされている Motif I~IV に加え、PKS の MeT に特異的な Motif A、B を見出した。点変異導入実験により、PKS MeT と SAM の binding に重要な Motif I、II、IV のアミノ酸残基を同定した。また、Motif A の His1544 がポリケタイド中間体の α 位の活性化に、また、Motif B の Trp1588 が、ポリケタイド中間体の 1,3-ジケトン部分との binding に関わると考えられる。

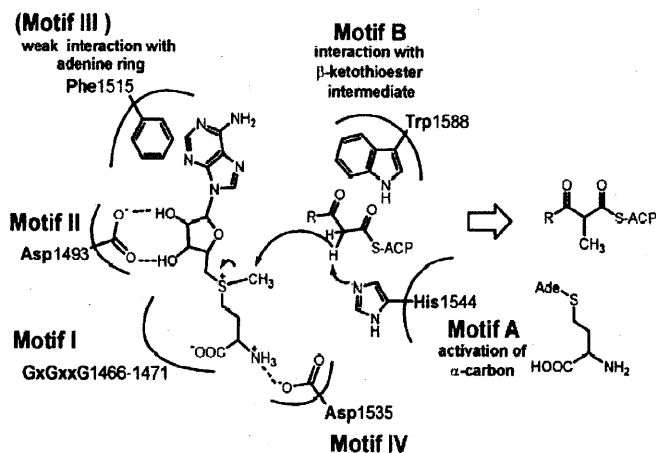


Figure 10. Proposed mechanism of C-methylation by PKSN MeT

炭素骨格形成に D-A 反応が関与すると推定される化合物は、天然から数多く単離されているものの、協奏的に進行する [4+2] 環化付加反応を触媒する Diels-Alderase を明確に示した例はない。今回、solanapyrone 生合成遺伝子クラスターを同定し、D-A 反応を経て solanapyrone を生成する SPS の同定に成功した。SPS が、DA 反応を触媒する要因として、1) 酸化反応によるジエノフィルの LUMO の低下、2) 基質との水素結合による電荷の局在化、3) “hydrophobic effect” による折りたたみ効果、4) ジエンと酵素との疎水性相互作用による *exo* 型遷移状態の安定化、などが挙げられるが、SPS の精製法を確立したことにより、2)~4) を確認するために必要な 3次元構造の解明への途を開くことができた。

還元型 PKS は、還元型ポリケタイドの基本炭素鎖を構築するが、PKSF の機能解析から、PKS は、ケト還元依存して異なる炭素鎖長の化合物を生成しうることが明らかとなり、鎖長制御におけるケト還元反応の重要性を初めて示した。また、PKS の詳細な機能解析に有用な酵母による還元型 PKS 発現系構築に初めて成功し、これを用いて PKSN MeT に必須な motif を明らかにし、ポリケタイド中間体、SAM の binding とメチル化の反応機構を提示した。

【参考論文】

- (1) Fujii, I., Yoshida, N., Shimomaki, S., Oikawa, H., Ebizuka, Y., (2005) *Chem. Biol.*, **12**, 1301-1309
- (2) Oikawa, H., Kobayashi, T., Katayama, K., Suzuki, Y., Ichihara, A., (1998) *J. Org. Chem.*, **63**, 8748-8756
- (3) Katayama, K., Kobayashi, T., Oikawa, H., Honma, M., Ichihara, A., (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1384**, 387-395
- (4) Koetter, J. W. A., Schulz, G. E., (2005) *J. Mol. Biol.*, **352**, 418-428
- (5) Kasahara, K., Fujii, I., Oikawa, H., Ebizuka, Y., (2006) *ChemBioChem*, **7**, 920-924