

審査の結果の要旨

氏名 笠原 堅

糸状菌の生産する還元型ポリケタイドは、特異な生理活性と興味深い多様な構造を有する非常に重要な化合物群であるが、その多様な構造を作り出すタイプ I 繰返し型ポリケタイド合成酵素 PKS の産物が同定された例は限られており、その反応制御機構についても未だ不明な点が多い。そこで、笠原は、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ジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani* の還元型ポリケタイドについて、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て本研究を行い、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 環化を触媒する solanapyrone 合成酵素 SPS の発現、精製に成功した。また、ポリエン合成酵素 PKSF の機能を同定するとともに、alternapyrone 合成酵素 PKSN の機能解析を行った。

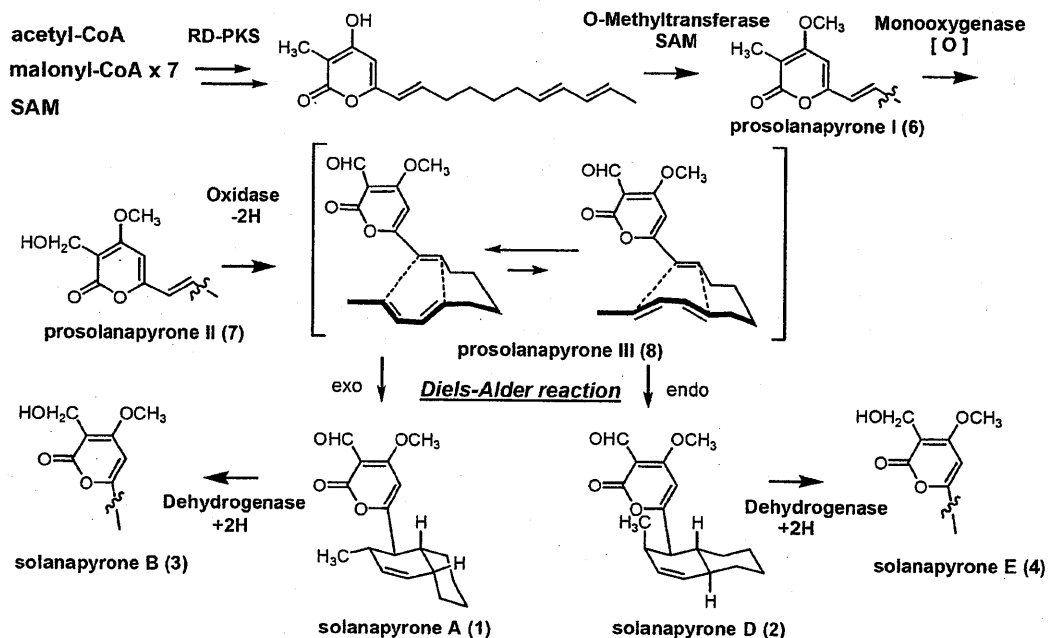
1. Solanapyrone 生合成酵素遺伝子クラスターのクローニング

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 AS1~4 を *A. solani* より取得した。このうち、solanapyrone の生合成が開始される培養 15 日目の *A. solani* 培養菌体に AS2 の強い発現を認めた。そこで、AS2 由来 PKS 遺伝子 *sol1* ならびに、クラスターを構成している遺伝子 *sol2-6* の全塩基配列を決定した。相同性検索により、これらが 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した。次いで、*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、構造決定し、Sol1 PKS 産物を 4-hydroxy-3-methyl-6-undeca-1,7,9-trienyl-pyran-2-one と決定した。本化合物が solanapyrone 生合成前駆体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。

2. Solanapyrone 合成酵素 SPS の同定と精製

Solanapyrone 生合成において、prosolanapyrone II (7) の酸化酵素が、prosolanapyrone III (8) を生成すると同時に、Diels-Alder 環化をも触媒する solanapyrone 合成酵素 SPS であると予想されており、実際、*A. solani* より調製した酵素液に活性は見出されてはいたものの、精製には至っていなかった。笠原は、solanapyrone 生合成遺伝子クラスター中で、FAD 依存的酸化酵素と予想した 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、その発現、精製、機能同定について検討した。大腸菌による Sol15 の発現では、活性は認められなかったものの、完全長の Sol15 を α -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酵素活性の検出に成功した。その後、培養培地中の SPS 比活性がより高いことを見出し、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 Diels-Alder 生成物 solanapyrone A (1) をメジャーに与え、solanapyrone D (2) との比は、親株の生産比と一致し、Sol15 が、prosolanapyrone II (7) を酸化すると共に酵素的に Diels-Alder 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 oxidase 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 Diels-Alder 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、メタノール産化酵母 *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。



3. Polyenepolyketide 合成酵素 PKSF の機能同定

A. solani より遺伝子はクローニングされていたものの、その機能は未同定であった還元型ポリケタイド合成酵素 PKSF について、これを *A. oryzae* で発現し、生成物を LC-HR-MS で解析することにより、これが C_{18} から C_{26} の 10 種以上の化合物を同時に生成する興味深

い PKS であることを明らかにした。その中で、メジャーな 2 種の新規化合物を単離・構造決定し、aslanipyron (C₂₂)、aslaniol (C₂₃) と命名した。PKSF 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 を生成する反応機構を提出した。

4. Alternapyrone 合成酵素 PKSN の機能解析

Alternapyrone は、*A. solani* 由来の還元型ポリケタイド合成酵素 PKSN が生成するデカケタイド化合物であり、S-adenosylmethionine (SAM) に由来する 8 個の側メチル基を有する。この 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 PKS のメチルトランスフェラーゼドメイン MeT とのアラインメントから、メチルトランスフェラーゼ間に保存され SAM との 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するとともに、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 に関わることを示した。

炭素骨格形成に Diels-Alder 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酵素 Diels-Alderase を明確に示した例はなかった。今回、本研究において笠原は、solanapyrone 生合成遺伝子クラスターをクローニングし、Diels-Alder 反応を経て solanapyrone を生成する solanapyrone 合成酵素 SPS の同定に成功した。SPS が、Diels-Alder 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ものである。また、PKSF の機能解析から、鎖長制御におけるケト還元反応の重要性を初めて示すとともに、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。以上のように本研究の成果は、天然物化学、薬学研究に大きく寄与するものであり、博士 (薬学) の学位を授与するに相応しいものと認めた。