

審査の結果の要旨

氏名 森口 智美

糸状菌の生産するポリケタイド化合物の基本炭素骨格は、一本のポリペプチド鎖上に反応に必要な触媒ドメインを全て併せ持ち、それらが繰返し反応に関与する多機能型酵素 (iPKS) により構築される。本研究では、*Aspergillus terreus* 由来 6-メチルサリチル酸 (6-MSA) 合成酵素 ATX をモデルに、iPKS の反応制御機構および高次構造の解明を目指した。

ATX は、縮合酵素 (KS)、アシル基転移酵素 (AT)、アシルキャリアープロテイン (ACP) の他、ケト還元酵素 (KR)、脱水酵素 (DH) の各触媒ドメインを有しており (Fig. 1)、そのドメイン構成から、2 段階の縮合反応による C6 中間体の形成、還元、脱水、もう一段階の縮合反応による C8 中間体の形成という一連の反応を触媒すると提唱されていた。この反応スキームでは、酵素にチオエステル結合した C8 中間体が、いかにして 6-MSA として酵素から遊離するか説明できない (Fig. 2)。本研究では、これまで脱水酵素と考えられていたドメイン、以下、DH 様ドメインが、6-MSA の遊離に関与するのではないかと仮説をたて、その検証に着手した。

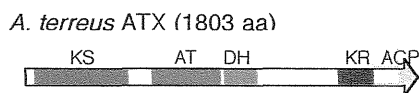


Fig. 1 Domain Architecture of ATX

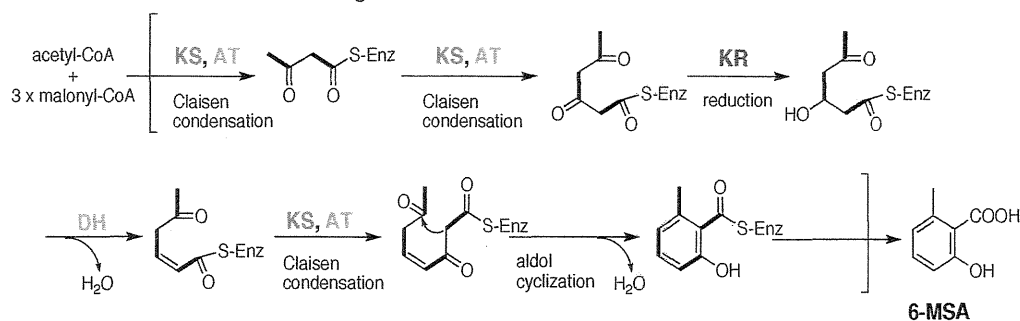


Fig. 2 Proposed Reaction Mechanisms of ATX

1. 活性 ATX タンパクの大量調製と *in vitro* アッセイ

まず *in vitro* 実験のため、活性 ATX の大腸菌での発現を試みた。ACP をホスホパンテテイル化してホロ型とする *Bacillus subtilis* 由来 SFP と C 末端に His₁₀ タグを付した ATX を共発現し、アフィニティー精製した ATX タンパクが 6-MSA 合成活性を有することを放射活性基質を用いた *in vitro* の反応で確認した。

2. DH 様ドメイン変異体 (DHm) への中間体の結合

DH 様ドメイン変異体 DHm (H972A) を作成し、DH 様ドメインが 6-MSA 合成において必須のドメインであることを先ず確認した。次いで、[2-¹⁴C]malonyl-CoA を基質とする反応で、DHm が放射標識されるか

どうかを SDS-PAGE により解析した。CBB 染色 (Fig. 3 left) およびオートラジオグラフィーにより、野生型 ATX は放射標識されず、DHm のみが放射標識されていることを確認した (Fig. 3 right)。この結果から、DH 様ドメインが機能しないと 6-MSA は遊離せず、反応中間体は酵素に結合したままとなることを明らかとなった。

3. DHm に結合した中間体の加水分解

DHm に結合した反応中間体は ACP 上のホスホパンテチニル基にチオエステル結合していると考えられた。そこで、 $[2-^{14}\text{C}]$ malonyl-CoA を基質として incubation した DHm をアルカリ処理することで 6-MSA が遊離することを確認した。さらに、野生型 ATX の持つ活性 DH 様ドメインが、DHm 上のテトラケタイド中間体を 6-MSA として遊離することも確認した。この結果により、DH 様ドメインは、アルカリ加水分解と等価な加水分解反応を触媒するチオエステラーゼ (TE) 活性を有することを実証した。

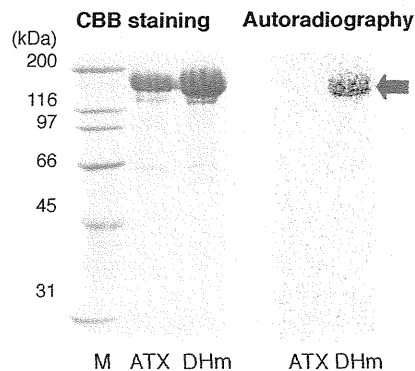


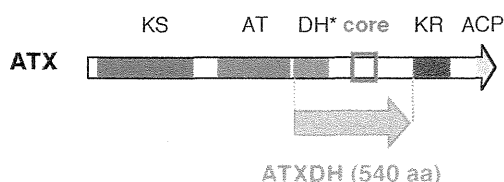
Fig. 3 SDS-PAGE Profiles of ^{14}C Labeled Protein

4. 酵素結合型中間体の模倣体との反応

6MSA-SNAC 体を基質とした反応では、 $K_m=12.3 \text{ mM}$, $k_{cat}/K_m=0.12 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ であり、ポリケタイド化合物の合成に関わる既知の TE とほぼ同程度であることを示した。また、ATX の TE 活性は Ser 特異的修飾剤である PMSF 存在下でも全く阻害されず、Ser を活性残基とする既知 TE とは異なる新しいタイプの TE であることを示した。

5. DH を含むモノドメイン酵素の発現

ATX の DH 様ドメインは、これまでに機能同定された TE と一次構造上の相同性はほとんどない。そこで、この領域の X 線結晶構造解析を目指し、DH 様ドメインと、その下流に存在し高次構造維持に必須な core 領域を併せ持つ ATXDH (540aa) を大腸菌にて発現させた。N 末端に His₆ タグを付した ATXDH を精製し、TE 活性を維持していることを確認し、結晶化条件を検討した。



以上、糸状菌由来 iPKS 反応における生成物遊離機構を解明した本研究は、ポリケタイド系天然物の生合成研究に大きなインパクトを与え、今後の天然物化学に大きく貢献することから、博士 (薬学) に値するものと認められた。