

論文要旨の内容

応用生命工学 専攻

平成 19 年度博士課程 進学

氏名 岡村 英治

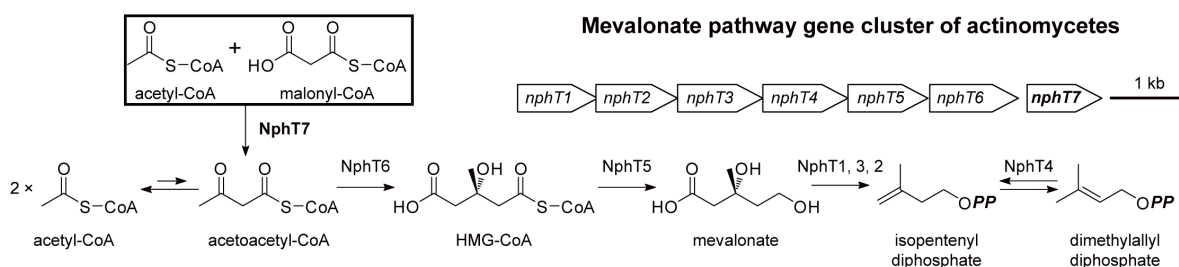
指導教員氏名 西山 真

論文題目 チオラーゼスーパーファミリーにおけるミッシングリンクの発見と機能解明

チオラーゼスーパーファミリーは生体分子の生合成経路において、炭素-炭素結合の形成を触媒する酵素の一群である。それらの基質は、キャリアー分子であるcoenzyme A (CoA)、またはacyl carrier protein (ACP) にチオエステル結合したさまざまな鎖長のacyl基を持つacyl-CoA、またはacyl-ACPであり、これらのacyl基同士のClaisen縮合により炭素-炭素結合が形成される。その代表的な酵素として、メバロン酸経路のacetoacetyl-CoA thiolaseや3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA synthase、バクテリアや植物が有するII型脂肪酸生合成経路の β -ketoacyl-ACP synthase (KAS I, II, III)、油脂植物が特異的に有する超長鎖脂肪酸生合成経路の β -ketoacyl-CoA synthase (KCS)、それにカルコン合成酵素に代表されるtype III polyketide synthase (type III PKS) が挙げられる。

テルペノイドとポリケタイド骨格が融合したユニークな化合物である naphterpin の生産菌として *Streptomyces* sp. CL190 株が単離されている。CL190 株は、テルペンユニットである isopentenyl diphosphate (IPP) と dimethylallyl diphosphate (DMAPP) の生合成経路としてメバロン酸経路と MEP 経路を有しており、naphterpin のテルペノイド骨格は主にメバロン酸経路に由来することが判明している。また、naphterpin の生合成遺伝子クラスターは、メバロン酸経路遺伝子クラスターに隣接していることも明らかになっている。このメバロン酸経路遺伝子クラスターには、acetoacetyl-CoA から IPP と DMAPP までの反応を触媒する 6 つの酵素ホモログが見出されたが、その初発反応である 2 分子の acetyl-CoA から 1 回の Claisen 縮合により acetoacetyl-CoA を合成する

acetoacetyl-CoA thiolase ホモログは見出されなかった。その一方で機能未知の KAS III ホモログである NphT7 が見出された。KAS III は、開始基質である acetyl-CoA と伸長基質である malonyl-ACP から、脱炭酸的な 1 回の Claisen 縮合により acetoacetyl-ACP を合成する酵素である。詳細な立体構造と反応機構が明らかにされている *E. coli* KASIII と NphT7 の一次構造を比較すると、活性中心のアミノ酸残基である Cys-His-Asn が保存されている一方、ACP 認識の鍵となる Arg 残基は保存されていない。本論文では、NphT7 の *in vitro* および *in vivo* における機能解明に取り組み、NphT7 が acetyl-CoA と malonyl-CoA の 1 回の Claisen 縮合により、acetoacetyl-CoA を合成することを見出し、新規酵素 acetoacetyl-CoA synthase であることを提案する。また、その酵素学的特性が、チオラーゼスーパーファミリーにおいて未だ発見されていなかった、「ミッシングリンク」である可能性について考察する。



メバロン酸経路遺伝子クラスターとメバロン酸経路

NphT7 の *in vitro* における機能解析

NphT7 が KAS III ホモログであることから、まず、その KAS III 活性を検討した。KAS III の伸長基質である malonyl-ACP を *in vitro* 反応により調製した後、開始基質である [1-¹⁴C]acetyl-CoA とともに NphT7 と反応させて、その反応溶液を SDS-PAGE により展開した。その後、[3-¹⁴C]acetoacetyl-ACP に由来する放射活性が検出されるか否かを検討した。その結果、*S. coelicolor* A3(2)由来の KAS III を用いた反応溶液の ACP 誘導体には、強い放射活性が検出された一方、NphT7 反応溶液の ACP には、酵素を添加しない反応溶液と同程度の放射活性が検出されたのみであった。以上の結果から、NphT7 は KAS III 活性を持たないことが明らかとなった。

次に、伸長基質を malonyl-CoA に換えて、NphT7 が acetoacetyl-CoA 合成活性を有しているか否かについて、HPLC を用いたイオンペアクロマトグラフィーにより検討した。その結果、反応溶液の acetyl-CoA、および malonyl-CoA の減少に伴い、新たに 2 つの反応産物の生成が観察された。これらの反応産物は、LC-FTMS 分析から、CoA と acetoacetyl-CoA と同定されたことから、NphT7 が acetoacetyl-CoA 合成活性を有していることが判明した。

NphT7 の基質特異性

次に、acetoacetyl-CoA 合成酵素である NphT7 の開始基質特異性、および伸長基質特異性を検

討した。まず、開始基質として 4 種の acyl-CoA、すなわち *n*-propionyl, isobutyryl, butyryl または isovarelyl-CoA を使用して malonyl-CoA 存在下において NphT7 と反応させ、その反応産物について HPLC、および LC-FTMS により同定した。その結果、*n*-propionyl-CoA と isobutyryl-CoA を含む反応溶液では、それら基質の減少に伴い、malonyl-CoA との縮合産物が検出された。また、伸長基質である malonyl-CoA を methylmalonyl-CoA に置換した場合にも、acetyl-CoA との縮合産物が観察された。しかし、これら基質を用いた場合の比活性値は、acetyl-CoA と malonyl-CoA を用いた場合の値と比較して、およそ 1000 倍以下の値であったことから、NphT7 の生理的な基質は acetyl-CoA と malonyl-CoA であることが判明した。

阻害剤を用いた活性測定による活性中心構造の推察

続いて、KAS の阻害剤である cerulenin、および thiolactomycin を用いた NphT7 に対する阻害効果を検討した。Thiolactomycin は malonyl-ACP アナログとなり、KAS I、II、III のすべてを阻害するが、cerulenin は長鎖 acyl 基と酵素の複合体を模倣することで、KAS I と II のみを阻害する一方、KAS III は阻害しない。この知見を踏まえ、それぞれの阻害剤存在下における NphT7 の acetoacetyl-CoA 合成活性を測定して、活性中心の構造についての知見を得ることとした。その結果、cerulenin のみならず thiolactomycin でも阻害されなかったことから、NphT7 は KAS III ホモログでありながら、その活性中心の構造は KAS III とは異なっていることが示唆された。

部位特異的変異導入による基質特異性の改変

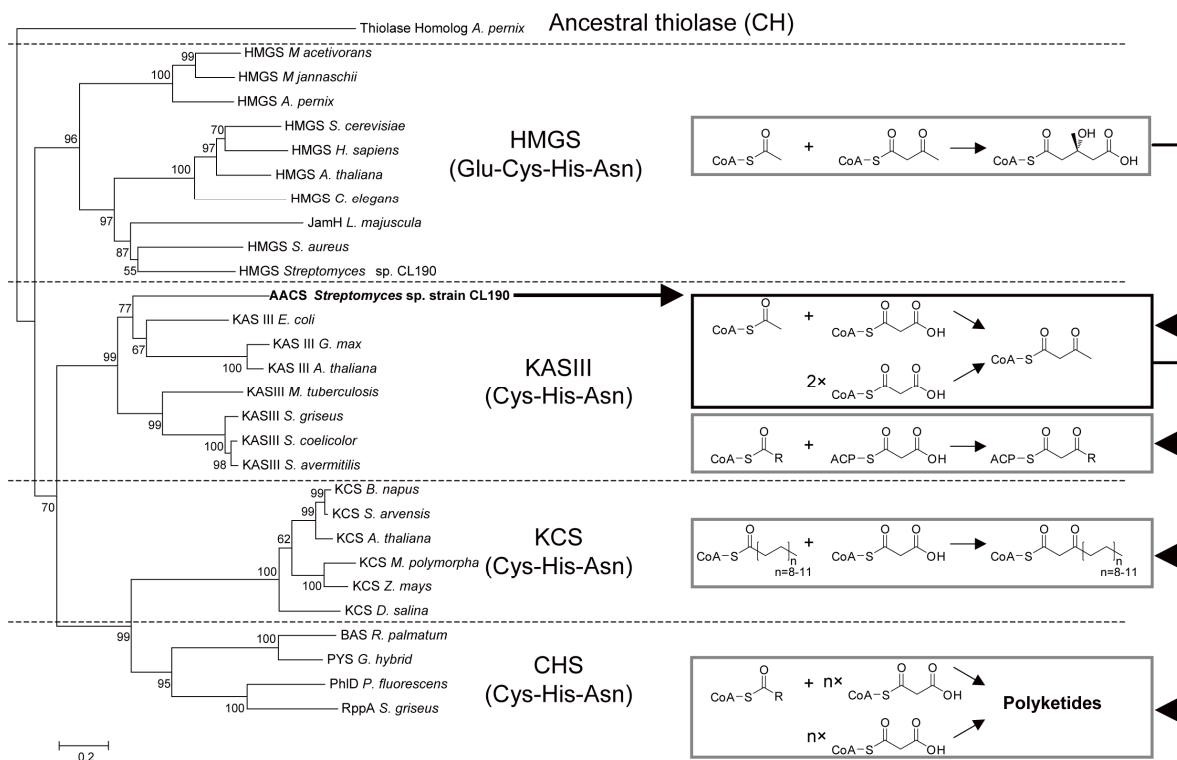
KAS III では、開始基質特異性を決定するとされる複数のアミノ酸残基が明らかにされている。そこで KAS III と NphT7 の一次構造を比較して、より長い鎖長を認識するようにそれらアミノ酸残基に部位特異的変異を導入した。作製した変異酵素である NphT7 Q90F、および Q90T の酵素活性を検討した結果、Q90F 変異酵素では、acetoacetyl-CoA 合成活性を含めてすべての縮合反応が消失した。その一方で、Q90T 変異酵素では、acetyl-CoA に対する特異性が大幅に低下するとともに、*n*-propionyl-CoA に対する特異性が 1.6 倍に上昇し、より鎖長の長い β -ketoacyl-CoA を合成しうる酵素へと改変することに成功した。

NphT7 の *in vivo* における機能解析

NphT7 の *in vivo* での機能を確認するために、放線菌 *Streptomyces albus* を宿主に HMG-CoA synthase をコードする *nphT6* と HMG-CoA reductase をコードする *nphT5* を発現させて、メバロン酸の異種生産を試みた。その結果、*nphT5* と *nphT6* に加えて *nphT7* を発現させた場合には、発現させない場合と比較してメバロン酸の生産量が 4 倍に増加した。この結果は、*nphT7* の発現によりメバロン酸の前駆体である acetoacetyl-CoA が供給されたことにより引き起こされた現象であると解釈できる。一方、*Streptomyces* sp. CL190 株の *nphT7* 破壊株では、その野生株と比較して、naphterpin 生産量が 2 割減少した。この結果は、*nphT7* の破壊によりメバロン酸経路への acetoacetyl-CoA 供給量が減少し、テルペンユニットの生産量が低下、ひいては、naphterpin の生産量減少が引き起こさ

れたと考えられる。これら 2 つの実験結果から、*nphT7* は *in vivo* においても *in vitro* と同様に acetoacetyl-CoA 合成酵素として機能していることが明らかとなった。

in vivo と *in vitro* における結果から、*NphT7* を新規酵素 acetoacetyl-CoA synthase (AACS) と呼ぶことを提案する。AACS は、開始基質として最も単純な化学構造を有する acetyl-CoA を用いて、malonyl-CoA との 1 回だけの Claisen 縮合を触媒する。従って、チオラーゼスーパーファミリーの Cys-His-Asn 型の活性中心を有する酵素として、最も単純な反応機構を持つ酵素であると考えられる。このことは、AACS が、同じ Cys-His-Asn 型の活性中心を有する KAS III や KCS、type III PKS の基質特異性、および縮合回数を規定する構造機能相関を理解するためのモデル酵素になりうると考えている。また AACS は、チオラーゼスーパーファミリーの系統解析において、これまで発見されていなかった分子進化上の HMG-CoA synthase と KAS III 間の「ミッシングリンク」として考えることができるかもしれない。従って、AACS の結晶構造解析や変異酵素を用いた機能解析は、Cys-His-Asn 型の活性中心を有するチオラーゼスーパーファミリーの構造機能相関への理解を深め、ひいては、それら酵素群の触媒機能拡張と新規骨格創出への展望を与えることができると考えている。また、AACS は有用なテルペノイドのみならず、acetoacetyl-CoA を前駆体とするあらゆる有用化合物の発酵生産系において、それらの増産にも有用であると考えられる。



チオラーゼスーパーファミリーにおける AACS の系統関係