

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岡村 英治

チオラーゼスーパーファミリーは、炭素-炭素結合の形成を触媒する酵素の一群である。その代表的な酵素として、メバロン酸経路の初発酵素である acetoacetyl-coenzyme A (CoA) thiolase やそれに続く 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA synthase が挙げられる。また、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-[acyl carrier protein (ACP)] synthase (KAS) I, II, III、さらには、植物が有する超長鎖脂肪酸生合成経路に寄与する β -ketoacyl-CoA synthase (KCS) や、カルボン合成酵素に代表される III 型ポリケタイド合成酵素 (Type III PKS) もこの一群に属する。

放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 株は、ポリケタイド骨格とテルペノイド骨格が融合したユニークな化合物である naphterpin を生産する放線菌であり、そのテルペノイド骨格はメバロン酸経路に由来することが明らかにされている。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のすぐ上流に配置されている。しかしながら、興味深いことに、このメバロン酸経路遺伝子クラスターにはメバロン酸経路の初発反応を触媒するとされている acetoacetyl-CoA thiolase が見出されない一方で、KAS III と相同性を示す読み枠 NphT7 が存在する。本論文では、CL190 株のメバロン酸経路遺伝子クラスターに見出した KAS III ホモログである NphT7 が、これまで報告されていなかったチオラーゼスーパーファミリーの新規酵素であり、acetoacetyl-CoA 合成活性を示すことでメバロン酸経路の初発反応を担うことを明らかにしている。

第一章では、NphT7 の組換えタンパク質の *in vitro* 活性の検討について述べている。まず、NphT7 が KAS III と 30-40% の相同性を示すことから、NphT7 の組換えタンパク質を調製して、伸長基質を malonyl-ACP とした KAS III 活性の検出を検討したが、予想に反して NphT7 は KAS III 活性を示さなかった。そこで、次に、伸長基質を malonyl-CoA として NphT7 の酵素活性を検討した。その結果、acetoacetyl-CoA の合成が検出され、NphT7 が acetyl-CoA と malonyl-CoA を基質とする acetoacetyl-CoA 合成酵素であることを明らかにした。

第二章では、NphT7 の acetoacetyl-CoA 合成活性に関する反応機構について述べている。NphT7 と KAS III のアミノ酸配列比較により、NphT7 の catalytic triad であると推察されるアミノ酸残基へ部位特異的な変異導入を行い、それら変異酵素の活性を検討した。また、伸長基質である malonyl-CoA のみからの acetoacetyl-CoA 合成活性も検討した。その結果、NphT7 がチオラーゼスーパーファミリーに見出される Cys-His-Asn 型の catalytic triad を有しており、脱炭酸型酵素であることを明らかにした。続いて、KAS の阻害剤である cerulenin と thiolactomycin を用いた NphT7 の阻害実験を行った。その結果、NphT7 は、伸長基質である malonyl 基の基質認識残基が KAS III とは異なるという知見を得ている。さらに本章では、NphT7 が acetyl-CoA と malonyl-CoA に対して高い特異性を示す酵素であることを明らかにするとともに、acetyl-CoA から *n*-propionyl-CoA へと NphT7 の基質特異性を変換することにも成功し、さらに基質特異性の検討においては新規

な CoA 誘導体 3 種を取得した。

第三章では、NphT7 の *in vivo* における acetoacetyl-CoA 合成活性について述べられている。まず、*Streptomyces albus* を宿主としたメバロン酸の異種生産系において *nphT7* 発現させ、宿主のメバロン酸生産量に及ぼす効果を検討した。その結果、*nphT7* の導入により、メバロン酸生産量がおおよそ 3.5 倍増加することを見出し、NphT7 が *in vivo* においても acetoacetyl-CoA 合成酵素として機能することを明らかにした。続いて、*nphT7* の naphterpin 生産に対する影響を調べるため、その遺伝子破壊株の naphterpin 生産量を HPLC により定量した。その結果、*nphT7* 破壊株は、野生株と比較して naphterpin の生産量が 5 割減少することを見出し、この実験からも、*nphT7* が *in vivo* においてメバロン酸経路の初発反応を担う重要な酵素であることを明らかにした。

以上、本研究は、メバロン酸経路の初発反応を担うチオラーゼスーパーファミリーの新規酵素 acetoacetyl-CoA synthase を発見するとともに、本酵素をコードする *nphT7* が acetoacetyl-CoA を共通の前駆体とする有用化合物増産のための重要な遺伝子になりうることを示したものであり、学術的、応用的な貢献が少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。