

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 19 年度博士課程 進学
氏名 勝山 陽平
指導教員名 大西 康夫

論文題目

微生物を宿主とした非天然型植物ポリケタイドの生産に関する研究

第一章 序論

ポリケタイドは微生物や植物を含む幅広い生物種が生産している二次代謝産物である。その多くは有用な生理活性を持ち、医薬品として実用化されている例が数多く存在する。高脂血症治療薬であるプラバスタチンや免疫抑制剤であるタクロリムスはその一例である。また、植物由来のポリケタイドであるレスベラトロール、クルクミンやイソフラボンはその長寿効果、抗ガン活性やエストロゲン様活性から高い注目を集めている。しかし、自然界より新たに単離同定されるポリケタイドは年々減少しており、新たな新規物質創出系の確立が望まれている。コンビナトリアル生合成法とは生合成経路を人為的に改変することによって新規化合物を創出する方法であり、新たな新規医薬品創出系として注目されている。コンビナトリアル生合成法の発展には、広範な酵素ライブラリーとそれらに関する詳細な機能情報が必要不可欠である。そこで本研究では新規 III 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) の探索およびその機能解析と III 型 PKS を用いたコンビナトリアル生合成法による新規化合物生産を行った。III 型 PKS はケトシンテースのホモダイマーから成る酵素であり主に植物ポリケタイドの生合成を担っている。長大なタンパク質である I 型 PKS や複数の酵素の複合体から成る II 型 PKS に比べコンパクトで遺伝子工学的に取り扱いやすいため、コンビナトリアル生合成にとって魅力的なツールである。

第二章 イネ由来クルクミノイド合成酵素 (CUS) の機能解析¹⁾

新規活性を持つ III 型ポリケタイド合成酵素の取得を目指し、イネゲノムに存在する III 型 PKS

ホモログ遺伝子の網羅的解析を行った。イネゲノムには 31 種もの III 型 PKS 遺伝子があり、これほど多くの III 型 PKS が単一の生物種に存在した例はこれまでなく、それらの活性に興味を持たれた。これらのうち 11 種の III 型 PKS 遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて組換えタンパク質を調製した。得られた調製タンパク質を *in vitro* で様々な基質と反応させることで機能解析を行った結果、これらの酵素のうちの 1 つが 2 分子の *p*-coumaroyl-CoA と 1 分子の malonyl-CoA を縮合することで bisdemethoxycurcumin を合成するクルクミノイド合成酵素 (CUS) であることが明らかとなった (図 1)。反応中間体やそのアナログを用いて CUS の反応メカニズムを推定した。イネがクルクミノイドを生産すると報告されていないため、この発見は予想外であった。

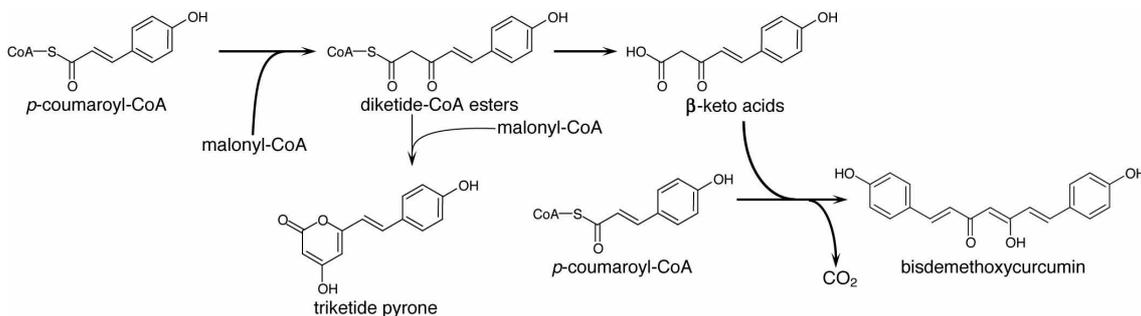


図 1. クルクミノイド合成酵素 (CUS) の触媒する反応

第三章 ウコン由来クルクミン合成酵素 (CURS)、ジケタイド CoA 合成酵素 (DCS) の機能解析^{2,3)}

クルクミンは古くから生薬や食品添加物として用いられてきたウコンの根茎より単離された生理活性物質であり、抗ガン活性を始めたとした様々な生理活性を持つため、多方面で注目を集めている。しかし、その生合成経路の全容はこれまで明らかとなっていなかった。そこで、ウコンにおけるクルクミン生合成経路の全容を明らかにするため、ウコン由来 III 型 PKS の機能解析を行った。

ウコンより III 型 PKS をコードする cDNA が 5 種、ハウス食品の喜多により取得された。これらの cDNA がコードする III 型 PKS の組換えタンパク質を大腸菌を用いて調製し、*in vitro* において様々な基質と反応させることで機能解析を行った。その結果、これらのうち 2 つは feruloyl-CoA と malonyl-CoA を縮合することでジケタイド CoA を合成するジケタイド CoA 合成酵素 (DCS1, 2) であった (図 2)。また、残り 3 つの酵素は feruloyl-CoA とジケタイド CoA を縮合することで curcumin を合成するクルクミン合成酵素 (CURS1, 2, 3) であった (図 2)。CURS1, 2 は feruloyl-CoA との反応性が *p*-coumaroyl-CoA との反応性よりも 10 倍程度高かったが、CURS3 は feruloyl-CoA と同程度の反応性で *p*-coumaroyl-CoA とも反応した。これらの酵素の発見によりイネ由来 CUS が単一の酵素で触媒できる 2 つ反応をウコンにおいては 2 種の酵素がそれぞれ触媒していることが明らかとなった。(図 2)。

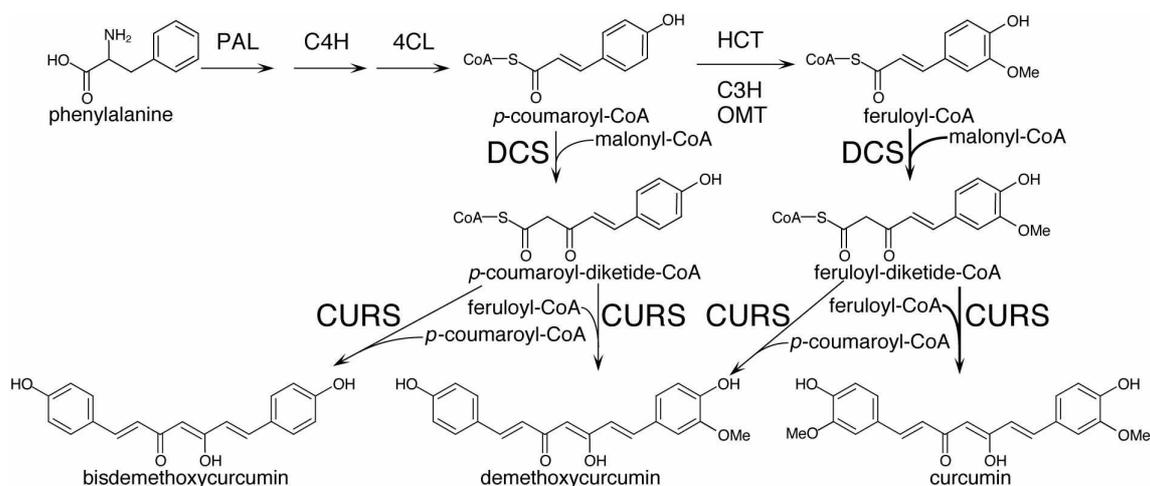


図 2. ウコンにおけるクルクミンの生合成経路

第四章 ウコン由来クルクミン合成酵素 (CURS1) の X 線結晶構造解析

通常 III 型 PKS はアシル CoA と複数分子の malonyl-CoA を縮合する反応を触媒する。一方、CURS は feruloyl-CoA とジケタイド CoA を縮合する。このような反応を触媒する III 型 PKS は CUS と CURS の他には報告されておらず、この反応は III 型 PKS にとって極めて特殊な反応であるといえる。そこでこの反応の機構を解明するために CURS1 の X 線結晶構造解析を行った。CURS1 の結晶は PEG3350 を沈殿剤とする条件で得られた。得られた結晶を用いて放射光施設 Photon Factory のビームライン AR-NW12 にて最高分解能、2.32 Å で X 線回折データの取得に成功した。結晶の空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a = 77.210$, $b = 115.750$, $c = 221.270$ であった。この X 線回折データを用い分子置換法により CURS1 の構造を決定した。CURS1 は他の III 型 PKS と同様に $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ フォールドをとっていた。しかし、活性中心付近の構造には他の III 型 PKS にはない特徴がいくつか見られた。特にほぼ全ての III 型 PKS に保存されている Phe265 の配向が他の III 型 PKS と大きく異なっており、この特徴が CURS1 の反応に重要な役割を担っている可能性がある。

第五章 コンビナトリアル生合成法による天然型及び非天然型植物ポリケタイドの微生物生産^{4, 5, 6, 7)}

マルチプラスミド法と precursor directed biosynthesis 法を組み合わせることで様々な非天然型植物ポリケタイドの生産を行った。Precursor directed biosynthesis 法とはある二次代謝産物の生合成経路の基質供給系を破壊し、代わりに基質もしくは中間体のアナログを投与することで、二次代謝産物のアナログを生産する手法である。マルチプラスミド法は異なる薬剤耐性と異なる複製起点を持つプラスミドを用いることで複数のプラスミドを一つの大腸菌に同時に保持させる手法である。植物ポリケタイド生合成経路を基質供給、III 型 PKS によるポリケタイド骨格の

合成、ポリケタイド骨格の修飾の 3 つの段階に分けた。これらの段階に含まれる酵素をそれぞれ異なる複製起点及び、薬剤耐性をもつプラスミドにクローニングした。これにより、異なる生合成段階の酵素を同時形質転換により容易に組み合わせることが可能になり、迅速に様々な生合成経路を持つ大腸菌を構築することができる。この手法により、フラバノン、フラボン、フラボノール、スチルベン、スチルベンメチルエーテル、クルクミノイド、ジングロール類縁体を生産する大腸菌を構築した (図 3)。これらの大腸菌に様々な構造のカルボン酸を投与することで様々な構造を持つ植物ポリケタイドの生産を行った。また、大腸菌と出芽酵母の共培養によるイソフラボン生産系を構築した。現在までに 105 種の非天然型を含む 149 種の植物ポリケタイドの生産に成功している。

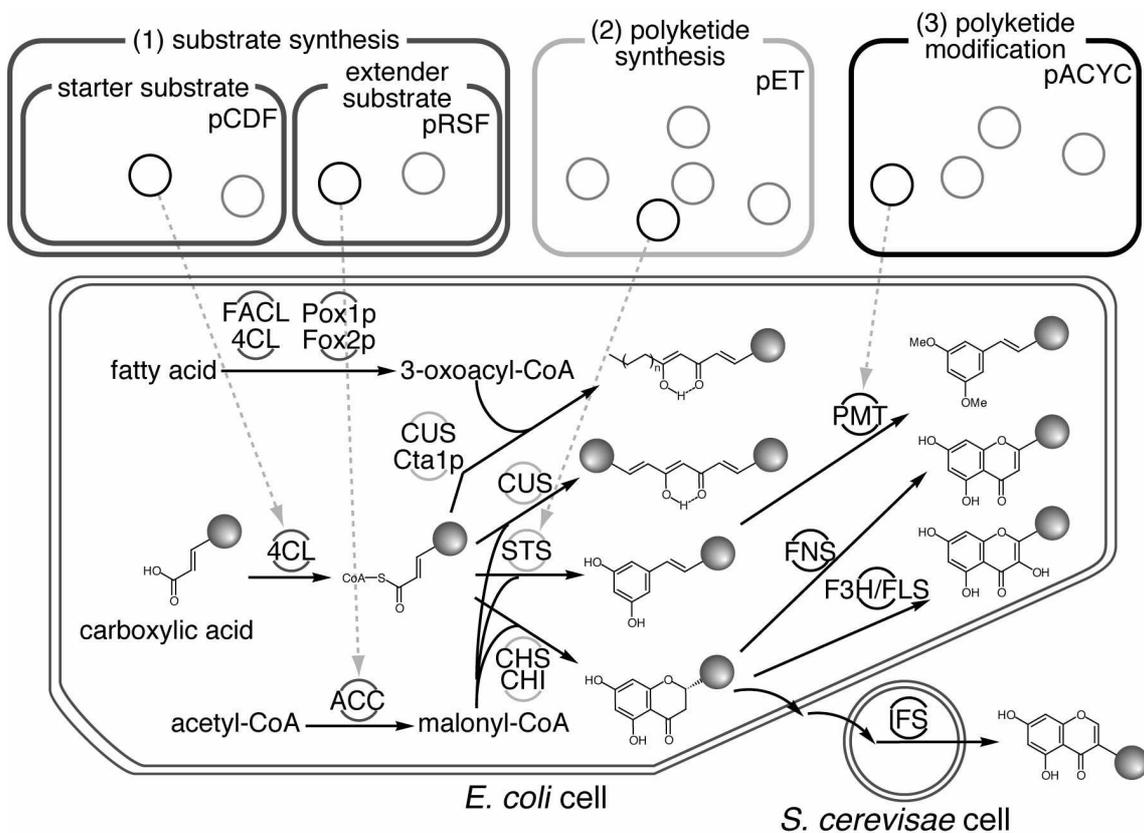


図 3. 大腸菌を宿主とした植物ポリケタイドの生産

発表論文

- 1) Y. Katsuyama, M. Matsuzawa, N. Funa, S. Horinouchi, *J. Biol. Chem.* **282**, 37702-9 (2007);
- 2) Y. Katsuyama, T. Kita, N. Funa, S. Horinouchi, *J. Biol. Chem.* **284**, 11160-70 (2009);
- 3) Y. Katsuyama, T. Kita, S. Horinouchi, *FEBS letter* **583**, 2799-2803 (2009);
- 4) Y. Katsuyama, I. Miyahisa, N. Funa, S. Horinouchi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1143-9 (2007);
- 5) Y. Katsuyama, I. Miyahisa, N. Funa, S. Horinouchi, *Chem. Biol.* **14**, 613-21 (2007);
- 6) Y. Katsuyama, N. Funa, S. Horinouchi, *Biotechnol. J.* **2**, 1286-93 (2007);
- 7) Y. Katsuyama, M. Matsuzawa, N. Funa, S. Horinouchi, *Microbiology* **154**, 2620-8 (2008)