

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 勝山 陽平

ポリケタイドはその多くが医薬品として実用化されているため産業上有用な化合物群である。中でも植物ポリケタイドであるレスベラトロールやクルクミンはその長寿効果や抗ガン活性から高い注目を集めている。III型ポリケタイド合成酵素 (PKS) はこれら植物ポリケタイドの生合成を担っており、コンパクトで扱いやすいことからコンビナトリアル生合成の有用なツールである。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試みであり、新たな新規医薬品創出系として注目されている。本論文はコンビナトリアル生合成の有用性を示すことを目的とし、微生物の細胞内に植物ポリケタイドの生合成経路を再構築することで様々な植物ポリケタイドの生産を行うとともに、新規 III 型 PKS の探索及び機能解析を行ったものであり、6章よりなる。

第一章ではコンビナトリアル生合成や III 型 PKS について、これまでの知見をまとめている。

第二章では新規な III 型 PKS であるクルクミノイド合成酵素 (CUS) の発見及び機能解析について述べている。新規活性を持つ III 型 PKS の取得を目指し、イネゲノムに存在する III 型 PKS ホモログ遺伝子の解析を行った。これらのうち 11 種の III 型 PKS 遺伝子をクローニングし、これらの組換えタンパク質を大腸菌を用いて調製し、得られたタンパク質を *in vitro* で機能解析を行った。その結果、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 CUS であることを明らかにした。また、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。

第三章ではウコンより取得された III 型 PKS の機能解析について述べている。クルクミンは抗ガン活性等の様々な生理活性を持つことから、大きな注目を集めている。しかし、その生合成経路はこれまで明らかになっていなかった。ハウス食品の喜多智子博士により、III 型 PKS をコードする cDNA、5 種がウコンより取得されていたが、これらの 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 (DCS) であることを明らかにした。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 (CURS) であることを明らかにした。これによりウコンにおけるクルクミン生合成経路の全容が明となった。

第四章では第二章で取得された CURS1 の結晶構造解析について述べている。CURS は

feruloyl-CoA とジケタイド-CoA を縮合するという III 型 PKS にとって極めて特殊な反応を触媒する。そこでこの反応機構を解明することを目指し、CURS1 の X 線結晶構造解析を行った。その結果、最高分解能 2.32 Å で CURS1 の構造を明らかにできた。CURS1 の全体構造は他の III 型 PKS と同様であった。しかし、活性中心付近には他の III 型 PKS にはない特徴があり、この構造より CURS1 の持つクルクミン合成反応の機構が推定された。

第五章では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ついて述べている。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。マルチプラスミド法を利用することで、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。これら的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が生産できた。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。本研究により、105 種の非天然型を含む 149 種の植物ポリケタイドの生産が達成された。

第六章では III 型 PKS の反応機構解明およびコンビナトリアル生合成に関する今後の展望について考察している。

以上、本論文は微生物を利用した新規物質生産に関する研究成果をまとめたものであり、学術上ならびに応用上貢献するところが少なくない。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。