

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 熊野 匠人

一部の放線菌はナフトテルピンやフラキノシン、ナピラジオマイシンなど、ポリケタイドとテルペノイドの融合した二次代謝産物を生産することが知られており、その生合成遺伝子クラスター中には、一次代謝に関与するプレニルトランスフェラーゼとは相同性を示さないユニークな芳香族基質プレニルトランスフェラーゼが見出されている。これらのプレニルトランスフェラーゼは、互いに類似したポリケタイド骨格に対し異なった位置をプレニル化することから、ポリケタイド-テルペノイド融合化合物の構造多様性を創出する鍵酵素であるにもかかわらず、これらプレニルトランスフェラーゼの生理的基質およびその反応産物は未同定であった。

本論文ではナフトテルピン、フラキノシン生合成に関与するプレニルトランスフェラーゼの生理的基質と反応産物を同定し、天然化合物の構造多様性創出メカニズムの一端を明らかにしている。また、プレニルトランスフェラーゼの広範な基質特異性を利用して、希少または新規なプレニル化化合物の合成に成功している。

第1章では *Streptomyces* sp. KO-3988 株の生産するフラキノシンの生合成に関与するプレニルトランスフェラーゼ Fur7 の生理的基質、および反応産物を同定したことについて述べている。すなわち、*fur7*破壊株培養液から Fur7 の生理的基質 5,7-dihydroxy-2-methoxy-3-methylnaphthalene-1,4-dione (2-methoxy-3-methyl-flaviolin) を単離し、その構造からフラキノシンの二か所のメチル基が Fur7 によるゲラニル化の前に導入されることを明らかにした。また、2-methoxy-3-methyl-flaviolin を基質に Fur7 によるゲラニル化反応を行い、2 つの反応産物を得た。ついで、NMR により 6-(3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl)-5,7-dihydroxy-2-methoxy-3-methylnaphthalene-1,4-dione (fur-P1) と (*E*)-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyloxy)-5-hydroxy-2-methoxy-3-methylnaphthalene-1,4-dione (fur-P2) の構造を決定した。さらに、fur-P1 が *fur7*破壊株によってフラキノシンへと変換されることを明らかにし、fur-P1 生合成中間体であることを証明した。

第2章では *Streptomyces* sp. CL190 株の生産するナフトテルピンの生合成に関与するプレニルトランスフェラーゼ NphB の反応産物の同定について述べている。*nphB*破壊株培養上清中には NphB の生理的基質の顕著な蓄積は検出されなかったが、破壊株培養液に NphB の組換え酵素とゲラニルニリン酸、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O を加えることで反応産物を 3 つ検出し、それらの構造を決定した。さらにそのうちのひとつ (*E*)-2-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-3,5,7-trihydroxy-6-methylnaphthalene-1,4-dione (*nph*-P3) が *nphB*破壊株によってナフトテルピンへの変換されることを確認し、*nph*-P3 が生合成中間体であることを証明した。

第3章では NphB と Fur7 に加えて *Streptomyces coelicolor* A3(2) の有する NphB ホモログ SCO7190 を用いたプレニル化化合物の合成について述べている。すなわち、

dihydroxynaphthalene (1,3-DHN, 1,6-DHN, 2,7-DHN) や、フラボノイドであるナリンゲニン、アピゲニン、ゲニステイン、ダイゼインや、植物ポリケタイドであるオリベトール、レスベラトロールと反応するかを検討し、生成したプレニル化化合物の構造決定を行うことで、いずれのプレニルトランスフェラーゼも寛容な基質特異性を有し、プレニル化化合物合成のツールとなりうることを示した。さらに、本研究で得たプレニル化化合物の *Staphyrococcus aureus* に対する抗菌活性を調べ、プレニル基の付加によってフラボノイドや植物ポリケタイドが抗菌活性を獲得することを示した。

第4章では放線菌由来プレニルトランスフェラーゼのうち、NphB と NapT9 がマグネシウムイオン依存性酵素であり、Fur7 と NapT8 が非依存性酵素であることに注目し、マグネシウムイオン依存性、非依存性を決定しているアミノ酸残基の特定について述べている。まず、これら4種のプレニルトランスフェラーゼの配列を比較し、51番目と64番目のアミノ酸残基についてマグネシウムイオン依存性酵素ではセリン、非依存性酵素ではアルギニンが保存されていることを見出した。次に NphB と Fur7 について、セリンとアルギニンを交換した変異酵素を作製し、マグネシウムイオン依存性を調べることで Fur7 のマグネシウムイオン非依存性の要因の一つが、アルギニン残基によるマグネシウムイオンを介さないリン酸基認識であることを明らかにした。また、NphB については51番目のセリン残基をアルギニン残基に置換することでマグネシウム非依存性の変異酵素を取得し、マグネシウムイオン依存性決定基の一つであることを明らかにした。

第5章では第3章において合成したプレニル化化合物を標品として用いることで、形質転換植物に含まれるプレニル化化合物の同定を可能にしたことが述べられている。形質転換体抽出物に含まれるプレニル化化合物は極微量であることから、単離、精製は困難であるが、プレニルトランスフェラーゼを用いて合成したプレニル化化合物を標品とすることで、LC-MS により生産物を迅速に同定することを可能にした。なお、プレニルトランスフェラーゼを発現させたミヤコグサ、ダイズ、トマトの形質転換体、およびその抽出物は京都大学生存圏研究所矢崎一史教授の研究室より提供された。

以上、本研究は、プレニルトランスフェラーゼ反応を生合成の鍵反応とする天然有機化合物の構造多様性創出メカニズムの一端を明らかにするとともに、放線菌のプレニルトランスフェラーゼが有用プレニル化化合物合成のためのツール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。