

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏名 淡川 孝義
指導教員名 大西 康夫

論文題目

微生物由来ポリケタイドの新規生合成機構に関する研究

第一章 序論

ポリケタイドとは植物、糸状菌、細菌等幅広い生物種より単離される二次代謝産物である。ポリケタイドには、芳香環、ラクトン環、エーテル、ポリエンなど多様な構造の化合物が存在する。微生物より単離されるポリケタイドは多くの生理活性物質を含み、その中には医薬品として実用化された化合物も多い。ポリケタイドの構造多様性は、ポリケタイド合成酵素(PKS)の反応多様性に起因する。PKS は基質の導入、伸長、環化反応、反応中間体の酵素からの解離に多様性を持ち、その反応機構に対する興味は尽きない。これらの反応機構に対する知見はコンビナトリアル生合成、酵素改変による新規化合物創成などの応用研究の基盤となる。また、ポリケタイド修飾酵素はポリケタイドの構造多様性を増幅し、その研究は物質生産への応用という面からも重要である。私は微生物由来 PKS または修飾酵素の新規反応機構の探索を目的として、以下の研究を行った。ターゲット遺伝子は主にゲノム情報に対する相同性検索を行うことで見出した。

第二章 atrochryson carboxylic acid 合成における β -lactamase 型 thioesterase による I 型 PKS からの生成物の解離機構の解明¹⁾

代表的なアントラキノンである emodin の生合成機構の解明を目的として

糸状菌 *Aspergillus terreus* NIH2624 株のゲノムより、相同性検索にて I 型 PKS 遺伝子(atrochrynone carboxylic acid synthase, ACAS 遺伝子)を見出した。I 型 PKS である ACAS は反応中間体と acyl carrier protein(ACP)ドメインがチオエステルで結合した状態でポリケタイトの伸長、環化を行い、チオエステルの分解によって生成物を解離する。ACAS は生成物の解離に関わる thioesterase ドメインを欠く I 型 PKS であったため、その生成物解離機構に興味を持たれた。*Aspergillus oryzae* を用いて、ACAS を組換えタンパク質として調製した。in vitro 反応にて、ACAS は単独では生成物を与えないことが明らかとなった。そこで、ACAS 遺伝子に染色体上隣接して存在する β -lactamase 様タンパク質をコードする遺伝子(atrochrynone carboxyl ACP thioesterase, ACTE 遺伝子)に注目した。ACAS、ACTE タンパク質を用いた in vitro 反応の結果、ACAS は ACTE が共存する時のみ、生成物である atrochrynone、endocrocin、emodin を含むアントラキノン系を合成することが明らかとなった(図 1)。また、ACP 体アナログである *N*-acetylcysteamine を用いて in vitro 反応を行い、ACTE の thioesterase 活性を検出した。本研究により、 β -lactamase 型の thioesterase が I 型 PKS の生成物の解離に関わることが in vitro で初めて示された。

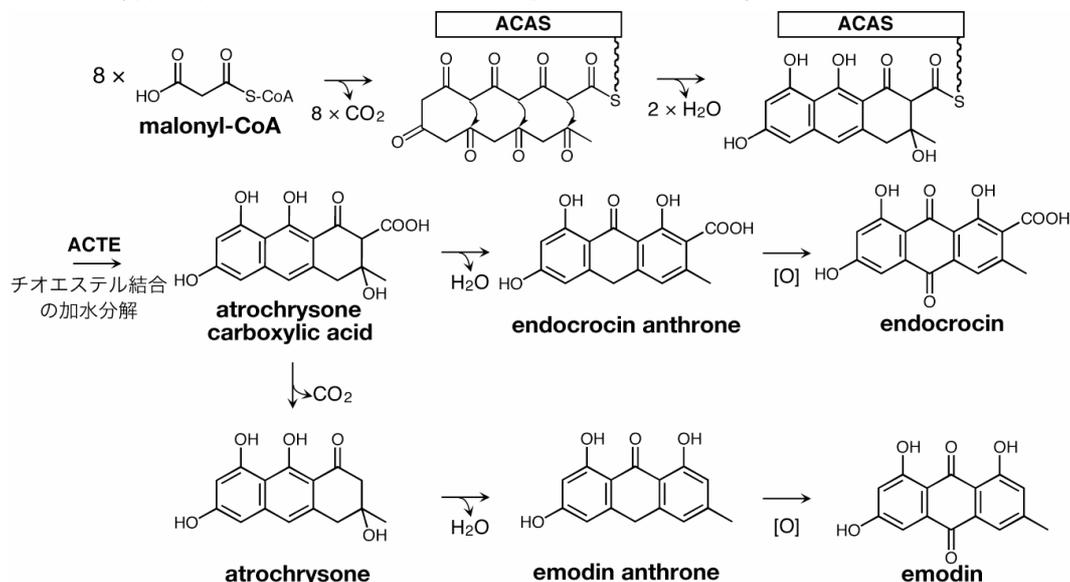


図 1. ACAS、ACTE 反応の生成物

第三章 actinorhodin 生合成における生成物解離機構の解明

actinorhodin は *Streptomyces coelicolor* A3(2)より単離される青色色素であり、II 型 PKS によって合成される。本 II 型 PKS は伸長酵素(ActI)、環化酵素(ActIV)、芳香化酵素(ActVII)、還元酵素(ActIII、ActVI-1)、acyltransferase(AT)等によって構成

され、一連の反応は acyl carrier protein(ACP)上で触媒される。II 型 PKS において ACP からの生成物解離機構が *in vitro* で詳細に研究された例は存在しない。本研究では、actinorhodin 生合成を *in vitro* にて再構成し、ACP からの生成物解離機構を明らかにすることを目的とした。ActI、ActIII、ActVII、ActIV、ActVI-1、AT、ACP を大腸菌または *Streptomyces lividans* を用いて組換えタンパク質を調製した。ActI、ActIII、ActVII、AT、ACP を用いた *in vitro* 反応にて、SEK34 が生成した(図 2)。そこに、ActIV を加えた所、SEK34 は生成せず、DMAC、aloesaponarin II が生成した。これにより、ActIV による B 環の環化反応が *in vitro* で初めて示された。さらに、ActVI-1 を加えたところ、(S)-DNPA が前反応より高収率で生成した。本結果より、ActVI-1 の反応後、生成物が ACP より解離する可能性が示唆された。

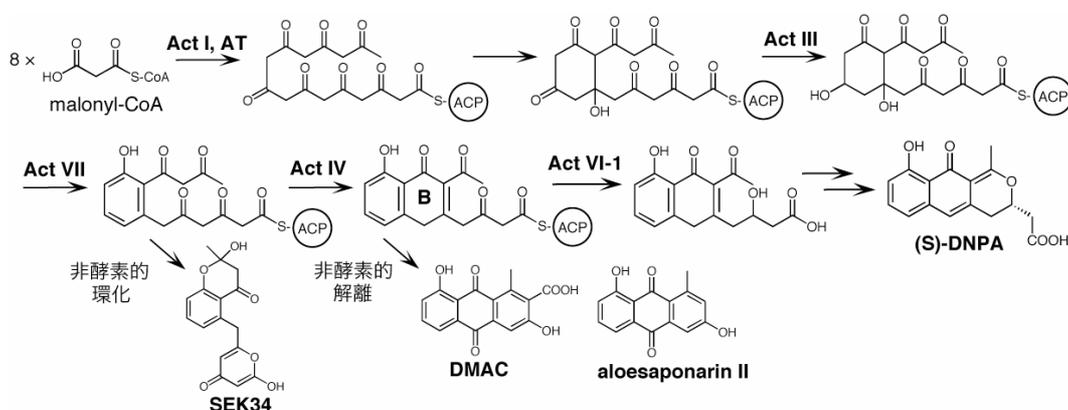


図 2 本研究で *in vitro* で再現した actinorhodin 生合成

第四章 糸状菌 *Neurospora crassa* 由来 III 型 PKS の機能解析²⁾

III 型 PKS は ketosynthase のホモダイマーであり、ポリケタイド鎖の伸長、環化、芳香化の一連の反応を触媒する。III 型 PKS には、フラボノイドの前駆体である naringenin chalcone 合成酵素を含む多様な分子種が存在する。植物、細菌由来の III 型 PKS とは異なり、糸状菌由来 III 型 PKS 反応の解析されていなかった。糸状菌より、新規 III 型 PKS を取得することを目的として実験を行った。相同性検索にて糸状菌 *N. crassa* の III 型 PKS を見出し、*in vitro* 反応を行った。同 III 型 PKS を以下の解析より、2'-oxoalkylresorcylic acid synthase (ORAS) と命名した。大腸菌を用いて ORAS を組換えタンパク質として調製し、*in vitro* 反応に用いた。その結果、ORAS はスターター基質である C₁₈ の脂肪酸 CoA エステルに malonyl-CoA を 4 分子縮合し、生じた pentaketide を aldol 縮合にて環化し、alkylresorcylic acid を主生成物として与える新規 III 型 PKS であることが判明した。

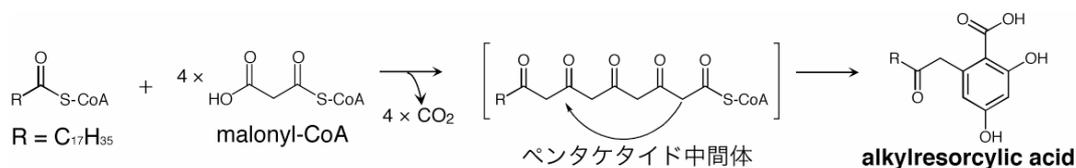


図 3 ORAS の pentaketide の alkylresorcylic acid 合成

第五章 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* 由来の新規テルペノイドーポリケタイド融合化合物合成に関わる遺伝子クラスターの機能解析³⁾

放線菌の二次代謝産物中には、ポリケタイドがプレニル基転移酵素によって修飾された複雑な構造をもつものが存在する。希少放線菌 *A. missouriensis* より III 型 PKS 遺伝子 (*agqA*)、水酸化酵素 (*agqB*)、メチル化酵素 (*agqC*)、UbiA 型プレニル基転移酵素 (*agqD*) を含む遺伝子クラスターを相同性検索によって見出し、解析を行った。同遺伝子クラスターを alkyl-*O*-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinone 合成クラスター (*agq* クラスター) と命名した。*agqA*、*agqAB*、*agqABC*、*agqABCD* を *S. lividans* にて異種発現し、AgqA が合成した alkylresorcinol を、AgqB が水酸化、AgqC がメチル化、AgqD がプレニル基付加して alkyl-*O*-geranylhydroquinone が合成されることを示した。また、*A. missouriensis* の *agqA* 破壊株を構築し、生体内成分を野生株と比較した。その結果、*agq* クラスターが alkyl-*O*-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinone を合成することを示した (図 4)。本研究において、*agq* クラスターを発現した *S. lividans*、*A. missouriensis* より単離された 15 種のテルペノイドキノンはいずれも新規化合物であった。また、本研究は UbiA 型のプレニル転移酵素が III 型 PKS の生成物の修飾を行うことを示した初めての例である。

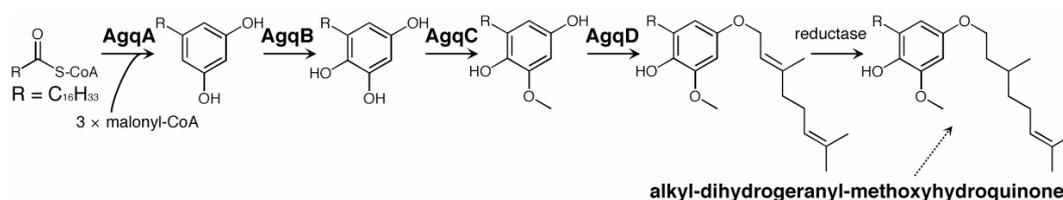


図 4 *agq* クラスターによる alkyl-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinone 合成

1) Awakawa, T., Yokota, K., Funa, N., Doi, F., Mori, N., Watanabe, H., Horinouchi, S. (2009) *Chem. Biol.* **16**, 613-623.

2) Funa, N., Awakawa, T., Horinouchi, S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 14476-14481.

3) Awakawa, T., Fujita, N., Hayakawa, M., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2010) *Chembiochem* in press.