

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 磯貝 章太

---

放線菌 *Streptomyces* sp. KO-3988 の生産するフラキノシンと、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 の生産するナフトテルピンはともにテルペノイド骨格とポリケタイド骨格が融合したユニークな構造を有するテルペノイド - ポリケタイド融合化合物である。フラキノシンとナフトテルピンの生合成は、テルペノイド骨格の生合成、ポリケタイド骨格の生合成、両者の縮合、テルペノイド骨格の環化の四つの段階に分けることができる。本論文ではテルペノイド - ポリケタイド融合化合物に特異的な生合成機構の解明を目的として、フラキノシンとナフトテルピンのポリケタイド骨格生合成経路、およびフラキノシンの環化機構の解明を試みた研究をまとめたもので、三章より構成される。

第一章ではフラキノシンのポリケタイド骨格生合成に関わると推測される Fur1,2,3 に関する機能解析が行われている。 *In vivo* における解析の結果、新規化合物 8-amino-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (8-amino-flaviolin) が Fur3 反応産物として同定され、この 8-amino-flaviolin がフラキノシン生合成中間体であることが証明された。また、 *in vitro* における解析の結果、Fur2 は THN を酸化して 2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (flaviolin) を生成し、さらに flaviolin を酸化して 2,5,7,8-tetrahydroxynaphthalene-1,4-dione (mompain) を生成する反応を触媒することが明らかにされた。一方、Fur3 はグルタミン酸をアミノ基供与体として mompain の 8 位にアミノ基を転移する反応を触媒することが明らかとされ、Fur3 が mompain の酸化とグルタミン酸からのアミノ基の転移の両方を触媒する新規のアミノ基転移酵素であることが示された。さらに 8-amino-flaviolin の 8 位のアミノ基がその後の生合成におけるメチル化反応において正しい位置にメチル基を導入するために必要であることが明らかにされた。

第二章では、ナフトテルピンのポリケタイド骨格生合成に関わると推測される NphC,D,E に関する機能解析について述べている。 *In vivo* における解析の結果、NphE 反応産物が 8-amino-flaviolin であることが明らかとされ、さらに 8-amino-flaviolin がナフトテルピン生合成中間体であることが示された。次に、 *in vitro* における解析を行った結果、NphD は DTT 依存的に flaviolin を mompain へと酸化し、Fur2 同様に THN から flaviolin への酸化と flaviolin から mompain への酸化の二段階の酸化反応を触媒することが明らかとされた。一方 NphE は、アミノ基受容体として mompain を、アミノ基供与体としてグルタミン酸を用いることが判明し、NphE は Fur3 同様に mompain の酸化反応とグルタミン酸からのアミノ基転移反応の両方を触媒する酵素であることが明らかとされた。この結果から、NphE および Fur3 がともに酸化反応とアミノ基転移反応の両方を触媒することが明らかとされた。次いで、NphE の立体構造モデルから、反応に重要であると推測された二つのアミノ酸残基(Cys157, Arg182)がアラニンへと置換され、NphE 反応に与える影響が観察された。その結果、両変異酵素とも活性が大幅に低下し、両アミノ酸残基が酵素活性に重要な働きを持つことが示された。

第三章ではフラキノシン生合成における環化酵素を探索している。フラキノシンの環化反応の基質は 6-(3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl)-5,7-dihydroxy-2-methoxy-3-methylnaphthalene-1,4-dione (Fur-P1)であると予想される。これまでの研究から Fur-P1 の生合成には、*fur1-7, 16, 19*が必要であると推測されることから、環化酵素の候補遺伝子として *fur17* および *fur18* に着目し *in vivo* における機能解析が行われた。まず、*fur1-7, 16, 19* の異種発現系(pSE\_ *fur-P1*)を構築し生産物を解析したところ、確かに Fur-P1 が生産され、Fur-P1 の生合成にこれらの遺伝子が必要十分であることが示された。次に、*fur17, fur18, fur17-18* をそれぞれ異種放線菌 *Streptomyces albus* において異種発現させ、これらの異種発現株に対する Fur-P1 の添加実験が行われた。しかしいずれの異種発現株においても Fur-P1 が環化した化合物であるフラキノシン C への変換は観察されなかった。そこで、pSE\_ *fur-P1* においてさらに *fur17, fur18, fur17-18* を発現させた異種発現系を作製し、これらの異種発現株においてフラキノシン C が生産されるか検証された。しかし、いずれの異種発現株においてもフラキノシン C の生産は観察されなかった。これらの結果から、*fur17, fur18* が環化酵素ではないことが示唆される。そのことをさらに確認するために、遺伝子破壊株の解析が行われた。*fur17* 破壊株は既にフラキノシンを生産することが示されていたため、*fur18* 破壊株生産物を解析したところ、*fur17* 破壊株同様にフラキノシンが生産された。以上の結果から、Fur17, Fur18 はともに環化酵素ではないことが示された。

以上、本論文はテルペノイド - ポリケタイド融合化合物のポリケタイド骨格部分が、最終産物にはないアミノ基が付加した THN 類縁化合物(8-amino-flaviolin)を経て生合成されること、およびポリケタイド骨格形成に関わる生合成酵素の諸性質を明らかにしたものであり、学術上、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。