

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 28 年度博士課程進学
氏名 ト タンヤオ
指導教員名 大西 康夫

論文題目

ポリエンの合成を担う II 型ポリケタイド合成酵素の機能解析

第一章 序論

放線菌の二次代謝産物は高い構造多様性を有しており、その多様な構造に応じ様々な生理活性を持ち、医薬品資源として重要な位置を占めてきた。しかし、近年では新規な構造や有用な生理活性を示す化合物の発見が減少傾向にあり、新たな化合物を見出すための有力な手法が求められている。その一例として、細菌のゲノムにコードされているが、通常の実験室培養条件では発現しない休眠生合成遺伝子クラスターを活性化させる手法が挙げられる。本論文ではまず、新規な構造や有用な生理活性を有する化合物の取得を目指し、網羅的な転写活性化因子の強制発現による休眠生合成遺伝子クラスターの活性化を試みた。

有名な放線菌二次代謝産物として、酢酸を基本単位とするポリケタイドが挙げられる。ポリケタイドの生合成研究はその生合成酵素が触媒する様々な化学反応を明らかにすると共に、人工設計による新規化合物の創出のための手段を提供できる。本研究の後半では休眠生合成遺伝子クラスターの活性化により見出された新規ポリケタイド化合物 *ishigamide* の生合成研究を行った。*Ishigamide* 生合成経路を明らかにし、その生合成を担う新規 II 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) の機能同定、触媒分子メカニズムの解明を目的とし、研究を進めた。

第二章 SARP ファミリー転写活性化因子遺伝子の強制発現による休眠生合成遺伝子クラスターの活性化^[1]

本研究の研究対象である放線菌 *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 (JE08 株) のドラフトゲノム解析から、27 個の推定休眠生合成遺伝子クラスターが見出された。そこで、転写活性化因子の強制発現および放線菌培養条件の検討により、これらの遺伝子クラスターを活性化し、その生産物を探索した。具体的には、*Streptomyces* antibiotic regulatory protein (SARP) ファミリー転写因子を JE08 株のドラフトゲノムから探索し、計 8 つの SARP 強制発現株を構築した。これらを 4 種類の培地で培養し、代謝プロファイルを調べた。その結果、特定の培養条件において、4 つの SARP 強制発現株から、計 8 つの未知化合物が見出された。この結果は網羅的な

SARP 強制発現と培地条件の検討の組み合わせが休眠生合成遺伝子クラスターの活性化手法として有用であることを示している。これらの化合物のうち1つを単離、構造解析した結果、それが新規化合物、3-((2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)13-hydroxytetradenca-2,4,6,8-tetraenamido)propanoic acid (ishigamide, Figure 1) であることが明らかになった。

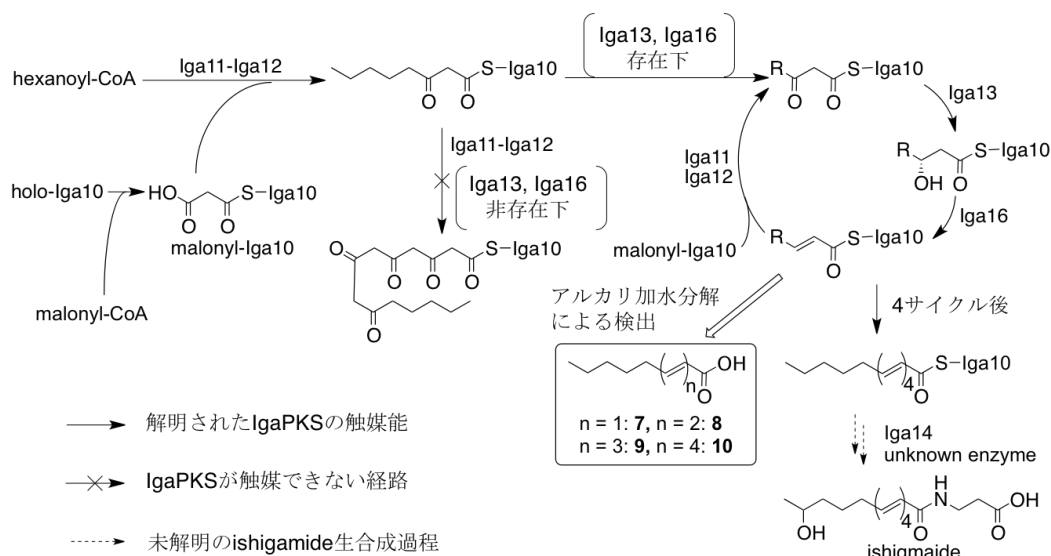


Figure 1. ishigamide 推定生合成経路とその *in vitro* 解析による検証。化合物番号は論文第四章のものと統一している。

第三章 Ishigamide 生合成遺伝子クラスター (*iga* クラスター) の同定と *in silico* 解析^{[1], [2]}

Ishigamide 構造中の不飽和脂肪酸部位は PKS により合成される可能性が高い。それを指標に JE08 株のドラフトゲノムを探索したところ、3つの ishigamide 生合成遺伝子クラスター (*iga* クラスター) 候補が見出された。各候補クラスターに存在する ketosynthase (KS) 遺伝子の破壊により、*iga* クラスターを同定した。予想外なことに、*iga* クラスター中の不飽和脂肪酸部位は II 型 PKS (IgaPKS) により生合成されることが強く示唆された。II 型 PKS は還元度の低い芳香族ポリケタイドの合成に特化したものと長年考えられていたため、IgaPKS が還元度の高いポリエン骨格を合成することは大変興味深い。*In silico* 解析より、IgaPKS 中の Iga11 (KS)、Iga12 (chain length factor, CLF) と Iga13 (ketoreductase, KR) は典型的な II 型 PKS のものとは異なるクレードに分類されることが明らかになった。そこで、IgaPKS をポリエン合成能を有する高還元型 II 型 PKS の代表として提唱し、さらなる機能解析を行うことにした。

第四章 Ishigamide ポリエン骨格生合成の *in vitro* 再構成^[2]

大腸菌を宿主に用いて、ishigamide ポリエン骨格の生合成に関与すると思われる IgaPKS 酵素群をそれぞれ組換えタンパク質として調製し、それらの機能解析と速度論解析を行った。推定生合成経路 (Figure 1) を検証するにあたり、まず修飾酵素である Iga13 と Iga16 (dehydratase) の機能解析を行った。Iga10 (acyl carrier protein, ACP) に結合した反応中間体を模

倣する *N*-アセチルシステアミン (NAC) 体を化学合成し、*in vitro* 解析に供した。その結果、Iga13 は NADPH を補酵素とし、3-oxooctanoyl-NAC (**1**) を (3*R*)-hydroxyoctanoyl-NAC (**2R**) に還元する活性を、Iga16 は **2R** と *trans*-2-octenoyl-NAC (**5**) の相互変換を触媒する活性を示した。以上の結果から、Iga13 と Iga16 は厳密な立体選択性を示し、ポリケタイド中間体のβ-ケト基を *R* 体の水酸基、*E* 体のオレフィンへと変換することが示された。次に、holo-Iga10 を調製し、それが malonyl-CoA に対し自己アシル化能を有することを確認した。Iga11 と Iga12 は複合体としてのみ調製可能だった。Iga11-Iga12 複合体は acyl-CoA 由来のアシル基を Iga11 の活性 Cys に転移させる活性を示した。また、Iga11-Iga12 複合体を holo-Iga10、malonyl-CoA、hexanoyl-CoA と共に反応させたところ、3-oxooctanoyl-Iga10 のみが生成した。このことから、既知の II 型 PKS の KS-CLF が連続的な縮合反応を触媒するのに対し、Iga11-Iga12 複合体は単独では一回の縮合反応のみを触媒することが明らかになった。つまり、反応中間体のβ-ケト基が Iga13、Iga16 による修飾を受けて、オレフィンに変換されない限り、次の縮合反応は起こらないと考えられる。最後に、IgaPKS 全体の触媒反応を調べるために、Iga11-Iga12 複合体、holo-Iga10、Iga13、Iga16 を malonyl-CoA、hexanoyl-CoA、NADPH と共に反応させた。Iga10 に結合しているポリケタイド鎖をアルカリ加水分解により切り離し、分析したところ、4つの不飽和カルボン酸 (Figure 1、7-10) の生成が確認された。この結果から、Iga11-Iga12、Iga13、Iga16 がそれぞれ触媒する縮合、還元、脱水の反応サイクルによりポリエン骨格が伸長していることが明らかになった。また、IgaPKS は異なる長さの acyl-CoA (C₂~C₁₂) をスターター基質として取り込めること、また、この時、伸長回数は acyl-CoA の長さに応じて増減することが *in vitro* 解析により明らかになった。以上の研究により、IgaPKS がポリエン骨格の生合成を担うことが証明された。これは、II 型 PKS は還元度の低い芳香族化合物だけを生合成するという従来の定説を覆すものであり、PKS に関する知見を広げた。

第五章 IgaPKS の X 線結晶構造解析

IgaPKS が触媒するポリエン合成の分子機構を理解するため、IgaPKS の X 線結晶構造解析を行い、Iga11-Iga12 の構造を最高分解能 1.75 Å で、Iga10=Iga11-Iga12 三者複合体の構造を最高分解能 1.98 Å で明らかにすることに成功した (Figure 2)。この

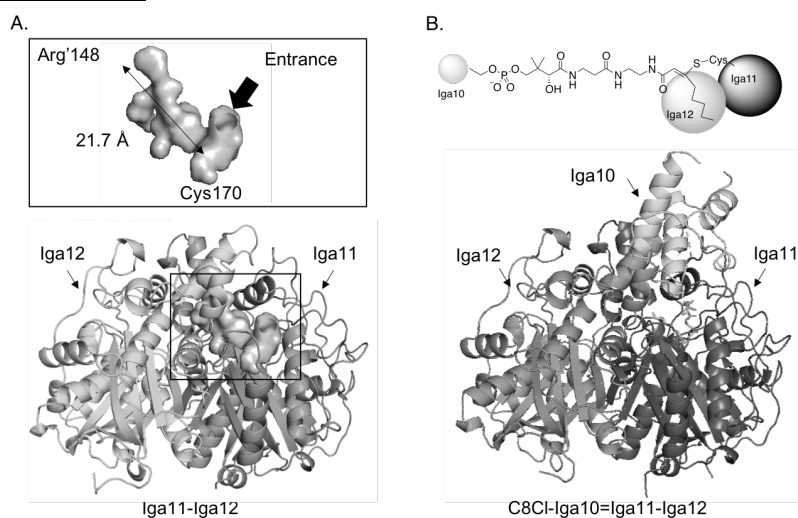


Figure 2. Iga11-Iga12のX線結晶構造 (A)、四角の中に反応ポケットを示す。C8Cl-Iga10=Iga11-Iga12の構造 (B)。

結果は、actinorhodin 生合成経路由来の ActKS-ActCLF に続く KS-CLF 結晶構造の二例目であり、KS-CLF と ACP が形成する三者複合体結晶構造の初めての例である。Iga10=Iga11-Iga12 三者複合体の調製には 4'-phosphopantetheinyl アナログの先端に alkene chloride 構造を付加した crosslink プローブを利用した。Iga11-Iga12 は脂肪酸生合成由来の KS ホモダイマーや ActKS-ActCLF と類似した全体構造を示した。Iga11-Iga12 の反応ポケットの入り口は Iga11 の表面にあり、その真下に KS の触媒三残基 (Cys-His-His) が位置していた。この Cys から Iga12 の方向に向けてポケットが伸展しており、その深さは約 20 Å であった。この反応ポケットのサイズは ishigamide のポリケタイド鎖を収容するのに適切である。ActKS-ActCLF とは異なり、ポケットを構成するアミノ酸には極性のものが多いが、それらの側鎖はポケットの内側を向いておらず、ポケットは適度な疎水的環境を保持していた。また、Iga10 の helix II, III には酸性アミノ酸残基が多くあり、これらが Iga11-Iga12 の塩基性アミノ酸残基と水素結合を形成していた。水素結合を形成する塩基性アミノ酸残基のうち 4 つをそれぞれ Ala に置換すると、いずれの場合も crosslink プローブを付加した Iga10 と Iga11-Iga12 間の crosslink 複合体形成効率が低下したため、これらの水素結合が Iga10 と Iga11-Iga12 間の相互作用に重要であることが示唆された。これらの結晶構造より、Iga11-Iga12 と Iga10 によるポリエン骨格の鎖伸長に関する分子メカニズムが提唱できた。

第六章 Iga10 と Iga11-Iga12 間の相互作用に関する研究

上述した crosslink 複合体形成効率の計測と isothermal titration calorimetry (ITC) 解析を利用し、Iga10 と Iga11-Iga12 間の相互作用を調べた。その結果、IgaPKS システムにおいては、Iga10 の phosphopantetheinyl 基に結合している分子の化学構造 (アシル鎖の長さ、ポリケタイドβ位の修飾) にかかわらず、Iga11-Iga12 は Iga10 を認識し、それと相互作用できることが示唆された。ITC 解析より、両者の K_D は約 10 μM であると算出された。さらに、Iga11-Iga12 は異なる II 型 FAS / PKS システム由来の ACP と相互作用でき、また、Iga10 も II 型 FAS 由来 KS ダイマーや異なる II 型 PKS 由来の KS-CLF と相互作用できることが crosslink 実験により示された。

第七章 総括

本研究は天然物創薬に向けた新規構造を有する化合物の探索及びその生合成機構の解明を目的とした。まず、休眠生合成遺伝子クラスターの活性化より、新規ポリケタイド ishigamide を発見した。次に、その構造中のポリエン骨格の合成を担う新規な還元型 II 型 PKS サブファミリーを提唱し、その触媒能を *in vitro* 解析により明らかにした。さらに、X 線結晶構造解析により、その触媒分子メカニズムを考察した。本研究より得られた知見は、新規有用化合物の創出に向けた酵素工学や合成経路の設計に有用であると考えられる。

[1] Du et al., 2016, *ChemBiochem*, 17, 15.; [2] Du et al., 2018, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 57, 7.