

審査の結果の要旨

氏名 トタンヤオ

放線菌の二次代謝産物は高い構造多様性を有し、その多様な構造に応じ様々な生理活性を持つため、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。本論文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、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と、それにより見出された新規なポリケタイド化合物の生合成経路の解明、生合成酵素の機能解析を行ったものである。

第一章序論に続く第二章では、放線菌休眠生合成遺伝子クラスターの活性化を行っている。*Streptomyces* sp. MSC090213JE08 (JE08 株) のドラフトゲノム解析から見出された計 8 つの *Streptomyces* antibiotic regulatory protein (SARP) ファミリー転写因子の強制発現株を構築し、それらの代謝プロファイルを調べた結果、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。これらの化合物のうち 1 つを単離、構造解析し、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 であることを明らかにしている。本化合物は *ishigamide* と名付けられた。

第三章では *ishigamide* 生合成遺伝子クラスター (*iga* クラスター) の同定を行っている。*Ishigamide* 構造中の不飽和脂肪酸部位がポリケタイド合成酵素 (PKS) により合成されると予想し、それを指標に JE08 株のドラフトゲノムを探索し、3 つの *iga* クラスター候補を見出した。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。*iga* クラスターには II 型 PKS (IgaPKS) 遺伝子が含まれ、この II 型 PKS が *ishigamide* のポリエン骨格の合成に関与していると考えられた。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。系統樹解析では、IgaPKS 中の Iga11 (KS) と Iga12 (chain length factor, CLF) 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から、IgaPKS がポリエン合成能を有する高還元型 II 型 PKS の代表として提唱された。

第四章では、IgaPKS 酵素群を組換えタンパク質として取得し、試験管内反応により、その機能解析および反応速度論的解析を行っている。その結果、Iga13 (ketoreductase) と Iga16 (dehydratase) 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。また、IgaPKS 構成要素のすべてを用いた試験管内反応から、Iga10 を足場に、Iga11-Iga12 複合体、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することが明らかになった。さらに、IgaPKS は異なる長さの acyl-CoA (C_2 ~ C_{12}) をスターター基質として取り込み、最終的に C_{14} のポリケタイド鎖を合成することや Iga10 が自己アシル化能をもつことが確認された。

第五章では 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 線結晶構造解析が行われている。Iga11-Iga12 の構造を最高分解能 1.75 Å で、アシル化された C6-Iga11-Iga12 の構造を最高分解能 1.81 Å で、Iga10=Iga11-Iga12 三者複合体の構造を最高分解能 1.98 Å で明らかにした。この結果は、KS-CLF 結晶構造の二例目であり、アシル化された KS-CLF、及び 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。なお、Iga10=Iga11-Iga12 三者複合体の調製には 4'-phosphopantetheinyl (Ppant) アナログの先端に alkene chloride 構造を付加した crosslink プロブが利用されている。これらの結晶構造をもとに、部位特異的変異酵素が作製され、その解析結果も含めて、Iga11-Iga12 が Iga10 を足場にポリエン骨格の鎖伸長を触媒する分子機構や Ppant-Iga10 と Iga11-Iga12 の相互作用様式が考察されている。

第六章では 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 間の相互作用解析を行っている。その結果、IgaPKS システムにおいては、Iga10 の Ppant 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 μ M であると算出された。さらに、Iga11-Iga12 は異なる II 型脂肪酸合成酵素 (FAS) / PKS システム由来の ACP とも相互作用でき、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。

以上の研究成果は、学術上応用上寄与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。