

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 27 年度博士課程 進学
氏名 佐藤 啓
指導教員 大西 康夫

論文題目

希少放線菌由来芳香族ポリケタイド fogacin 類の生合成機構の解析

ポリケタイドは酢酸を構造の基本単位とする化合物の総称である。天然物の中でもポリケタイドに属する化合物は数多く存在し、巨大なグループを形成している。自然界において、ポリケタイドは真菌、細菌、植物が持つポリケタイド合成酵素 (PKS) によって生合成される。PKS はその構造に基づいて I 型、II 型、III 型の 3 つのタイプに分類される。II 型 PKS では、独立した遺伝子にコードされた ketosynthase (KS)、chain length factor (CLF)、acyl carrier protein (ACP) 等のサブユニットが複合体を形成する。一般的な II 型 PKS は複数の芳香環が連なった構造を持つ芳香族ポリケタイドを合成するが、その中には抗生物質 tetracycline や抗腫瘍剤 doxorubicin 等、重要な生理活性を有する化合物が多く含まれている。しかしながら、II 型 PKS によるポリケタイド合成反応は、I 型、III 型に比べて明らかになっていない点が多く、II 型 PKS の反応機構を解明することは酵素学や生化学において重要であるだけでなく、新たな医薬品の開発等の応用にもつながると期待される。

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は 1 つの II 型 PKS 遺伝子クラスターを持つ。一般的に II 型 PKS 遺伝子クラスターには KS-CLF の遺伝子は 1 組しか存在しないが、当クラスター中には 2 組の KS-CLF 遺伝子 *fogA10A9*、*fogNO* がコードされていた。また、*fogA10A9* には hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (HCS) カセットと呼ばれる遺伝子群が隣接していた。HCS カセットは HCS ホモログや 2 つの enoyl-CoA hydratase (ECH) ホモログ等の酵素をコードする遺伝子によって構成され、これらの酵素が触媒する一連の反応によってポリケタイド鎖の β -アルキル化が起こる。myxovirescin 合成酵素や bacillaene 合成酵素等、HCS カセット産物と協働する PKS の報告はあるがいずれも I 型であり、II 型 PKS においては報告例がなかった。これらのことから、*A. missouriensis* の II 型 PKS 遺伝子クラスターにコードされる酵素群によるポリケタイド生産には、未知の機構が存在する可能性が高いと考えられた。

1. fogacin 類の同定¹⁾

A. missouriensis を Bennett-Maltose、BE、Q、Mannitol Soya flour、YEME、0.5 % グリシンを含む YEME の 6 種の培地で培養し、培養液中の芳香族ポリケタイドを探索した。その結

果、芳香族ポリケタイドと思われる UV 波長をもつ 3 つの化合物を発見し、単離・精製を行った。質量分析、NMR 分析の結果、これらの化合物が fogacin のラムノース配糖体 (fogacin B, **1**)、fogacin (**2**)、 β -アルキル化された構造を持つ fogacin 類縁体 (fogacin C, **3**) であることが判明した (図 1)。 *A. missouriensis* のゲノム上に存在する II 型 PKS 遺伝子クラスターは上述のクラスターのみであることから、これが fogacin 類の生産を担うと予想し fog クラスターと命名した。 fogacin C の発見により、HCS カセットがポリケタイド合成に関与していることが強く示唆された。

2. 異種発現による 2 組の KS-CLF および HCS カセットの機能解析¹⁾

fog クラスターにコードされた 2 組の KS-CLF と HCS カセットの機能を検証するために、*Streptomyces albus* J1074 株を宿主に異種発現実験を行った。 *fogA9-A11* (KS、CLF、ACP のみ)、 *fogA1-A12* (HCS カセットを含む) を強制発現し生産物を比較した。 *fogA9-A11* 強制発現株は II 型 PKS の一般的なシャント化合物である SEK4 (**4**) と SEK4b (**5**) を生産した。一方、 *fogA1-A12* 強制発現株は上記 2 つの化合物に加え、さらに 2 つの化合物を生産した。これら 2 つの化合物を単離し NMR により構造決定した結果、それらは **4** と **5** の C16 位に (*E*)-2-butene が付加した構造を有する化合物 (**6**、**7**) であることがわかった (図 1)。これらは β -アルキル化を受けた開始基質を使って合成された化合物であると考えられ、HCS カセットは β -アルキル化された開始基質 ((*Z*)-3-methylpent-3-enoyl-ACP) の合成に関与することが示唆された。

また、 *fogA1-A12* 中の *fogA10A9* を *fogNO* に置換したコンストラクトを作製し、 *S. albus* J1074 株で強制発現させたところ、 *fogA1-A12* 強制発現株と比較して、 β -アルキル化された SEK4 類の生産量が低かった。この結果は、FogNO と比較して FogA10A9 の方がより強く HCS カセット産物と協働することを示唆している。

3. fog クラスターの遺伝子破壊実験¹⁾

fogacin 類の生合成における 2 組の KS-CLF の機能を明らかにするため、 $\Delta fogA10$ 、 $\Delta fogN$ 、 $\Delta fogA10fogN$ 株を構築し代謝産物の比較を行った。 $\Delta fogA10fogN$ 株においては、fogacin 類の生産が完全に消失した。 $\Delta fogN$ 株は化合物 **1**、**2** の生産が消失し化合物 **3** のみを生産した。 $\Delta fogA10$ 株は全ての fogacin 類を生産したが、**1** の生産量が野生株よりも増加した一方、**3** の生産は低下した。このことから、*fogA10A9* が **3** を *fogNO* が **1**、**2** を主に生産することが示唆された。

次に ACP に着目した。 *fogA10A9* は近傍に ACP 遺伝子 (*fogA11*) を持つ一方、 *fogNO* 近傍には ACP はコードされていない。このため、FogNO も FogA11 を利用していると予想した。そこで、 $\Delta fogA11$ 株を構築し、解析したところ、fogacin 類全ての生産が消失した。従って、FogA10A9 と FogNO の 2 組の KS-CLF はいずれも FogA11 を ACP として利用し、fogacin 類を合成することが明らかになった (図 1)。

4. (Z)-3-methylpent-3-enoyl 基生合成機構の *in vitro* 解析

HCS カセット (FogA2-A8) と KSIII (FogA12) による (Z)-3-methylpent-3-enoyl-ACP_{FogA11} (MP-ACP_{FogA11}) の生合成機構をより詳細に検証すべく *in vitro* 解析を行った。大腸菌を宿主としてタンパク質を調製した。その結果、KS ホモログ (FogA2)、2つの ECH ホモログ (FogA3、A4)、HCS ホモログ (FogA5)、acyltransferase/decarboxylase (AT/DC) ホモログ (FogA7)、3つの ACP (FogA6、A8、A11)、KSIII ホモログ (FogA12) 等の組換えタンパク質を取得した。また、*Streptomyces lividans* TK21 株を宿主として 2組の KS-CLF (FogA10A9、FogNO) を取得し、計 14 の組換えタンパク質を調製した。

まず、FogA7 の機能解析を行った。その結果、FogA7 が methylmalonyl-CoA の methylmalonyl 基を FogA6 に転移、脱炭酸し、propionyl-ACP_{FogA6} を合成する二機能性酵素であることが明らかになった。次に、枯草菌由来の 4'-phosphopantetheinyl transferase (Sfp) を用いた *in vitro* 反応によって acetoacetyl-ACP_{FogA8} を調製し、FogA3、FogA4 および FogA5 の機能解析を行った。その結果、FogA5 が propionyl-ACP_{FogA6} の propionyl 基を acetoacetyl-ACP_{FogA8} の β-位のカルボニル基と縮合させアルキル化すること、FogA4、FogA3 が形成された 2,3-dimethyl-2-hydroxyglutaryl (DMHG) 基をそれぞれ脱水、脱炭酸化し MP-ACP_{FogA8} を合成することが判明した。

FogA8 に結合した MP 基は KSIII ホモログの FogA12 により FogA11 に転移したあと伸張反応に利用されると予想した。そこで、Sfp と 6 種の acyl-CoA (acetyl-, propionyl-, butyryl-, isovaleryl-, malonyl-, benzoyl-CoA) を用いて 6 種の acyl-ACP_{FogA8} を調製し、FogA12 の活性を検証した。その結果、FogA12 は全ての acyl 基を ACP_{FogA11} へと転移し、この酵素が基質選択性の緩やかな AT 活性を持つことが明らかになった。

5. FogA10A9、FogNO の基質認識機構の *in vitro* 解析

2組の KS-CLF によるオクタケタイトドの合成を *in vitro* で検証した。FogA10A9、FogNO を malony-CoA: ACP transacylase (MAT)、FogA11 と反応させた結果、いずれも SEK4b を合成した。これにより FogA10A9、FogNO が酢酸を開始基質としてオクタケタイトド鎖を合成することが確認された。

次に両 KS-CLF の開始基質認識を検証した。3 種の acyl-CoA (butyryl-, isovaleryl-, benzoyl-CoA) と Sfp を用い 3 種の acyl-ACP_{FogA11} を合成し、これらの acyl 基に対する FogA10A9、FogNO の選択性を調べた結果、FogA10A9 は直鎖、分枝鎖、芳香環を有する acyl-ACP_{FogA11} に高い選択性を示す一方、FogNO は主として acetyl-ACP_{FogA11} を開始基質として認識することが明らかになった。

5. これまでの実験から予想される fogacin 類生合成経路 (図 1)

まず、malonyl-ACP_{FogA8} が FogA2 による縮合反応を受け acetoacetyl-ACP_{FogA8} へと変換される。FogA7 が methylmalonyl-CoA から methylmalonyl 基を FogA6 上に転移させ、これを脱

