

## 審査の結果の要旨

氏名 佐藤 啓

ポリケタイドは酢酸を構造の基本単位とする化合物であり、自然界では植物、真菌、細菌等が有する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 つのクラスに分類される。II 型 PKS は独立した酵素群が複合体を形成し、主に複数の芳香環を構造内にもつ芳香族ポリケタイドを合成するが、その機構は I 型、III 型と比較して明らかになっていない点が多い。希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* のゲノム配列中から発見された II 型 PKS 遺伝子クラスター (*fog* クラスター) は、それまで I 型 PKS でのみ報告されていたポリケタイドの $\beta$ -アルキル化を担う HCS カセットと呼ばれる遺伝子群を有していた。また、ポリケタイド合成に必須の酵素である ketosynthase-chain length factor (KS-CLF) を 2 組コードしていた。本論文は、これらの特徴をもつ *fog* クラスターの機能を *in vivo* および *in vitro* 実験により解明したものであり、6 章より構成される。

第 1 章では、研究背景と先行研究についてまとめられている。

第 2 章では、*fog* クラスターの生産物を単離・同定している。培養条件検討を行い、廃糖蜜を含む Q 培地で *A. missouriensis* を培養すると *fog* クラスターが生産物である芳香族ポリケタイドの *fogacin* が生合成されることが示された。さらに、*fogacin* に $\alpha$ -rhamnose が結合した *fogacin* B、 $\beta$ -アルキル化された部分構造を有する *fogacin* C の 2 つの新規 *fogacin* 類縁体が同定された。

第 3 章では、異種発現実験によって、HCS カセットと 2 組の KS-CLF 遺伝子 (*fogA10A9* と *fogNO*) の機能解析が行われている。HCS カセットと *fogA10A9* または *fogNO* を共に強制発現した結果、II 型 PKS の生産するオクタケタイドの一般的なシャント化合物である SEK4、SEK4b と共に (Z)-3-methylpent-3-enoyl 基 (MP 基) 由来と予想される部分構造を有する SEK4、SEK4b 類縁体が生合成された。これらの SEK4、SEK4b 類縁体の生産量の比較から *FogA10A9* と *FogNO* は MP 基を開始基質として利用できる能力に違いがある可能性が示された。

第4章では、遺伝子破壊実験による解析が行われている。*fog* クラスターにコードされた2組のKS遺伝子 (*fogA10*、*fogN*) それぞれの破壊株に加え、両KS遺伝子の二重破壊株およびKS-CLFとともに働く acyl carrier protein (ACP) 遺伝子 (*fogA11*) を破壊した株が作製された。これらの破壊株と野生株の代謝産物の比較を行い、*fog* クラスターが *fogacin* 類の生合成を担っていることが確認された。また、FogA10A9が *fogacin* Cのみの生合成を担い、FogNOは主に *fogacin* と *fogacin* Bの生合成を担うことが示された。これにより2組のKS-CLFが開始基質に対して異なる選択性を有することが改めて示唆された。一方、*fogA11* 破壊株は全ての *fogacin* 類に対する生産能を失っており、FogA11がFogA10A9とFogNOにとって共通のACPとして機能していることが示された。

第5章では、*fog* クラスターにコードされた酵素によるII型PKSにおける開始基質のプライミング機構について、各酵素の組換えタンパク質を用いた *in vitro* 反応による解析が行われている。その結果、HCSカセットにコードされた酵素群がポリケタイド鎖の $\beta$ -アルキル化を経由してMP-ACPを合成することが確認されるとともに、KSIIIホモログFogA12が多様なアシル基に対する転移反応を触媒し、開始基質のPKSへの導入を担っていることが示された。また、FogNOが一般的なKS-CLFと同様に *acetyl* 基を開始基質とする傾向が強いものに対して、FogA10A9は *acetyl* 基よりも *isovaleryl* 基や *benzoyl* 基のような分枝炭素鎖や芳香環を持つ *acyl* 基を選択的にオクタケタイド合成に活用することが示された。さらに、精製した酵素を用いて *fogacin* 類生合成経路上のプライミング機構、すなわちMP基の形成からこれを開始基質とするII型PKSによるオクタケタイドの合成までを再構築することに成功し、FogA10A9が *acetyl* 基よりもMP基を優先的に開始基質として利用し、 $\beta$ -アルキル化構造を有する *fogacin* 類縁体を合成すること、FogNOはMP基に対する選択性がFogA10A9よりも低く、主に *acetyl* 基を開始基質として $\beta$ -アルキル化構造を持たない *fogacin* を合成することが示された。

第6章では、研究を総括するとともに、将来展望を述べている。本研究成果によって、HCSカセットを活用するII型PKS遺伝子クラスターが初めて報告された。また、本遺伝子クラスターが担う *fogacin* 類生合成経路では、HCSカセットにコードされた酵素群と基質選択性の異なる2組のKS-CLFの作用によって *fogacin* 類の構造を多様化させる機構が存在することが示された。

以上、II型PKSによる生合成機構に新規な知見を与えた本研究成果は、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。