

チオラーゼスーパーファミリーにおける  
ミッシングリンクの発見と機能解明

応用生命工学専攻  
平成19年度 博士課程 進学  
氏名 岡村 英治  
指導教員名 西山 真

## 目次

略語一覧	1
序論	3
第一章 NphT7 の <i>in vitro</i> における機能解析	18
第一節 NphT7 の KAS III 活性検討	19
第二節 Acetoacetyl-CoA 合成活性の検討	27
第三節 NphT7 の acetoacetyl-CoA 合成におけるストイキオメトリー	31
第四節 酵素学的パラメーターの算出	34
第五節 考察	37
第二章 NphT7 の活性中心の構造推察に関する研究	38
第一節 Catalytic triad 変異酵素解析	39
第二節 伸長基質のみによる acetoacetyl-CoA 合成	45
第三節 Acetoacetyl-CoA 合成における acetyl 基取り込みの検討	50
第四節 基質特異性解析	52
第五節 Thiolactomycin 及び cerulenin による阻害実験	59
第六節 基質特異性改変	62
第七節 考察	69
第三章 NphT7 の <i>in vivo</i> における機能解析	70
第一節 メバロン酸の異種生産における <i>nphT7</i> 発現の効果	71
第二節 Naphterpin 生産における <i>NphT7</i> の機能解析	75
第三節 考察	81
総括	82
実験の部	90
引用文献	102
謝辞	108

## 略語一覽

### 試薬名

Acetyl-CoA	Acetyl coenzyme A
Acetoacetyl-CoA	Acetoacetyl coenzyme A
Butyryl-CoA	Butyryl coenzyme A
CoA	Coenzyme A
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Isobutyryl-CoA	Isobutyryl coenzyme A
Isovaleryl-CoA	Isovaleryl coenzyme A
Malonyl-CoA	Malonyl coenzyme A
MeOH	Methanol
Methylmalonyl-CoA	Methylmalonyl coenzyme A
<i>n</i> -propionyl-CoA	<i>n</i> -propionyl coenzyme A
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TFA	Trifluoroacetate
Tris	Tris (Hydroxymethyl) aminomethane
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

### 化合物名

Acyl-CoA	Acyl coenzyme A
Acyl-ACP	Acyl [acyl carrier protein]
$\beta$ -ketoacyl-CoA	$\beta$ -ketoacyl coenzyme A
$\beta$ -ketoacyl-ACP	$\beta$ -ketoacyl [acyl carrier protein]
DMAPP	Dimethylallyl diphosphate
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
IPP	Isopentenyl diphosphate
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate

その他

HPLC	High performance liquid chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometer
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
TIC	Total ion chromatogram
UV	Ultra Violet

# 序論

1

チオラーゼスーパーファミリーは、生体分子の代謝経路において Claisen 縮合によって炭素-炭素結合の形成を触媒する酵素の一群である。このチオラーゼの基質は、多様な炭素骨格の acyl 基がキャリアー分子である coenzyme A (CoA) または acyl carrier protein (ACP) のホスホパンテテイン基に由来するチオール基にチオエステル結合した acyl-CoA または acyl-ACP である。これらの acyl 基に $\alpha$ -anion が生成され、この $\alpha$ -anion が、もう一つの基質のカルボニル炭素を求核攻撃することで、炭素-炭素結合が形成される<sup>(1, 2)</sup>。その代表的な酵素として、メバロン酸経路の初期反応を担う acetoacetyl-CoA thiolase や 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA synthase が挙げられる。また、バクテリアや植物が有する II 型脂肪酸生合成経路<sup>(3)</sup>の酵素である  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase (KAS I, II, III) や植物が有する超長鎖脂肪酸生合成経路<sup>(4, 5)</sup>の酵素である  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase (KCS) があげられる。さらに、chalcone synthase (CHS) に代表される III 型ポリケタイド合成酵素 (type III PKS) や、単一のポリペプチド鎖に複数の触媒ドメインが存在する type I PKS および type II PKS の keto synthase ドメインもチオラーゼスーパーファミリーに含まれる<sup>(1-3, 6, 7)</sup>。これらの酵素は、 $\alpha$ -anion 生成機構の相違により、非脱炭酸型と脱炭酸型に分類される。非脱炭酸型に分類される代表的な酵素は、acetoacetyl-CoA thiolase と HMG-CoA synthase であり、脱炭酸型に分類される酵素は KAS、KCS と PKS である<sup>(1, 6, 7)</sup>(**図 1**)。

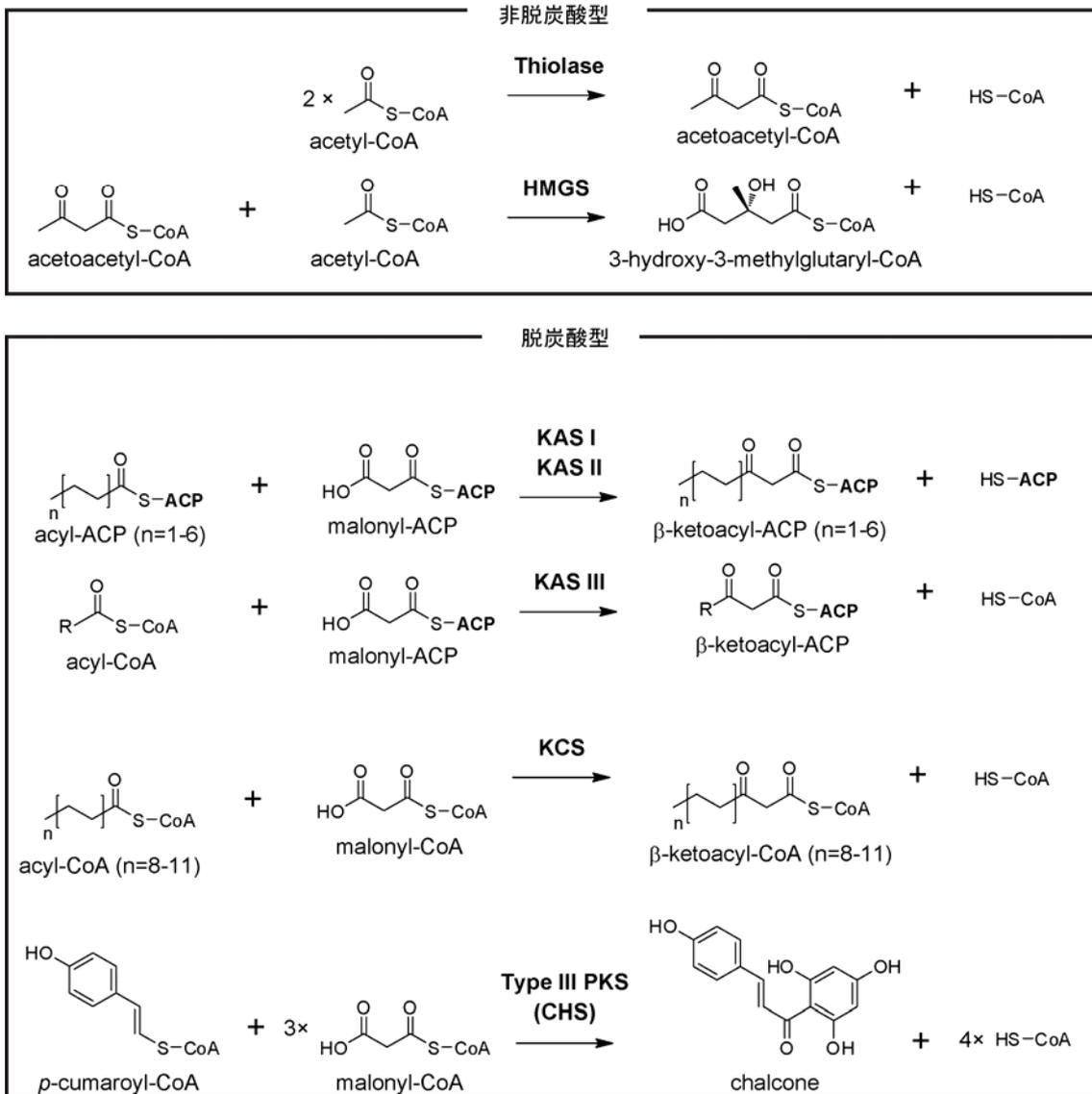
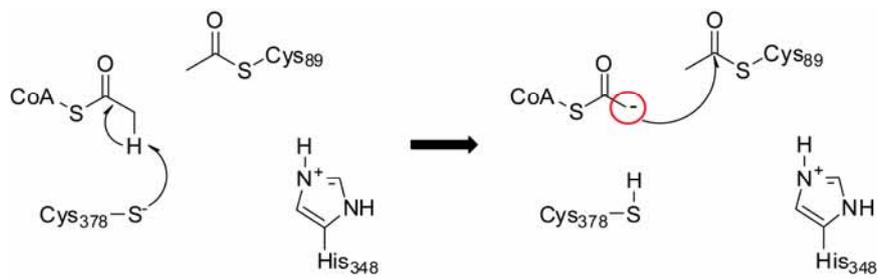


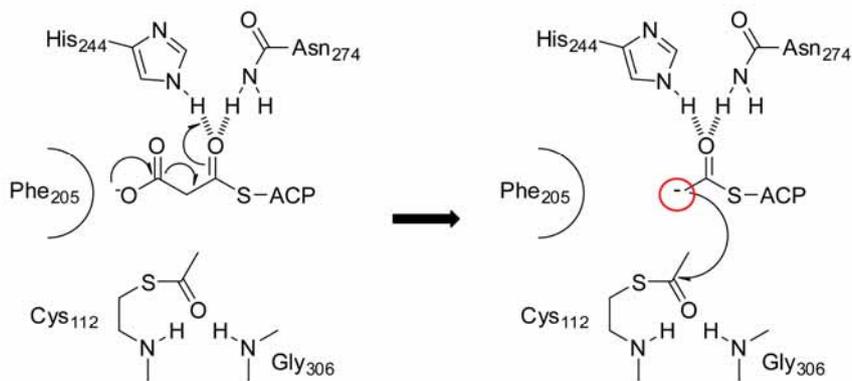
図1 チオラーゼスーパーファミリーの酵素が触媒する反応と分類

図中において、矢印上部の略語は以下の酵素を示す。**Thiolase**, acetoacetyl-CoA thiolase, **HMGS**, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, **KAS (I, II, III)**,  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase, **KCS**,  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase, **CHS**, chalcone synthase.

非脱炭酸型の酵素は、活性中心の Cys 残基 (HMGS の場合は Glu 残基) によって acyl 基の $\alpha$ 位炭素からプロトンを脱離させて、 $\alpha$ -anion を生成する。一方、脱炭酸型の酵素は、活性中心の His 残基および Asn 残基によって malonyl 基の $\beta$ 位炭素で脱炭酸反応を生じさせて、 $\text{CO}_2$  の脱離とともに $\alpha$ -anion を生成する<sup>(1, 2)</sup>。特に、脱炭酸型酵素の基質に関して、di-keto 化合物である malonyl-CoA や malonyl-ACP を伸長基質 (extender substrate)と呼び、その対となる acyl-CoA を開始基質 (primer substrate) と呼ぶ (図 2)。脱炭酸型酵素は、開始基質に由来する acyl 基の鎖長に対する基質特異性や、伸長基質の縮合回数に多様性があり、さまざまな炭素骨格を有する化合物が生み出される。その中で、KAS IIIとtype III PKSはもっとも盛んに研究されている酵素である。



非脱炭酸型酵素の  $\alpha$ -anion 生成  
(*Zoogloea ramigera* 由来 acetoacetyl-CoA thiolase)



脱炭酸型酵素の  $\alpha$ -anion 生成  
(*Escherichia coli* 由来 KASIII)

## 図 2 非脱炭酸型および脱炭酸型における $\alpha$ -anion 生成反応

非脱炭酸型酵素では、活性中心の Cys 残基 (HMGS の場合は Glu 残基) によって acyl 基の  $\alpha$  位炭素からプロトンを脱離させて、 $\alpha$ -anion (図中の赤丸) を生成する。一方、脱炭酸型の酵素は、活性中心の His 残基および Asn 残基によって malonyl 基の  $\beta$  位炭素で脱炭酸反応を生じさせて、 $\text{CO}_2$  の脱離とともに  $\alpha$ -anion を生成する。なお、非脱炭酸型酵素の反応モデルは *Zoogloea ramigera* 由来 acetoacetyl-CoA thiolase<sup>(1, 8)</sup> であり、脱炭酸型酵素の反応モデルは *Escherichia coli* の KAS III<sup>(1, 9, 10)</sup> である。

KAS III は開始基質である acyl-CoA と伸張基質である malonyl-ACP の 1 回の Claisen 縮合により、 $\beta$ -ketoacyl-ACP を合成する酵素であり、開始基質特異性に多様性がある。例えば、*Escherichia coli* 由来の KAS III は、炭素数 2 (C2) の acetyl-CoA を基質とするが、*Mycobacterium tuberculosis* 由来の KAS III は、直鎖 C12 の lauroyl-CoA を基質とする<sup>(11, 12)</sup>。また *Streptomyces glaucescens* の KAS III は直鎖 C4 の butyryl-CoA を基質とし<sup>(13)</sup>、*Staphylococcus aureus* 由来の KAS III は butyryl-CoA とともに直鎖 C6 の hexanoyl-CoA や分岐鎖 C4 の isobutyryl-CoA も基質とする<sup>(14)</sup>。さらに、*Bacillus subtilis* は基質特異性が異なる 2 種類の KAS III を有しており、一方は acetyl-CoA を基質とするが、もう一方は分岐鎖 C5 と C6 の isobutyryl-CoA や isovaleryl-CoA を基質とする<sup>(15)</sup>(**図 3**)。このような基質特異性が、多様な脂肪酸生合成の中間体である  $\beta$ -ketoacyl-ACP を生みだし、ひいてはその生物の膜脂質および脂肪酸を構成する炭素鎖の多様性を生み出す。この知見は、in vivo の観点からも明らかにされており、*Streptomyces coelicolor* M511 株において、その KAS III 遺伝子を破壊して、*E. coli* 由来の KAS III で相補した場合、本来 M511 株が生産する分岐鎖脂肪鎖が *E. coli* と同じ直鎖脂肪鎖へと置換されることが報告されている<sup>(16)</sup>。また、KAS III の遺伝子破壊は致死であり、生育に必須の遺伝子であることが明らかにされている<sup>(17, 18)</sup>。

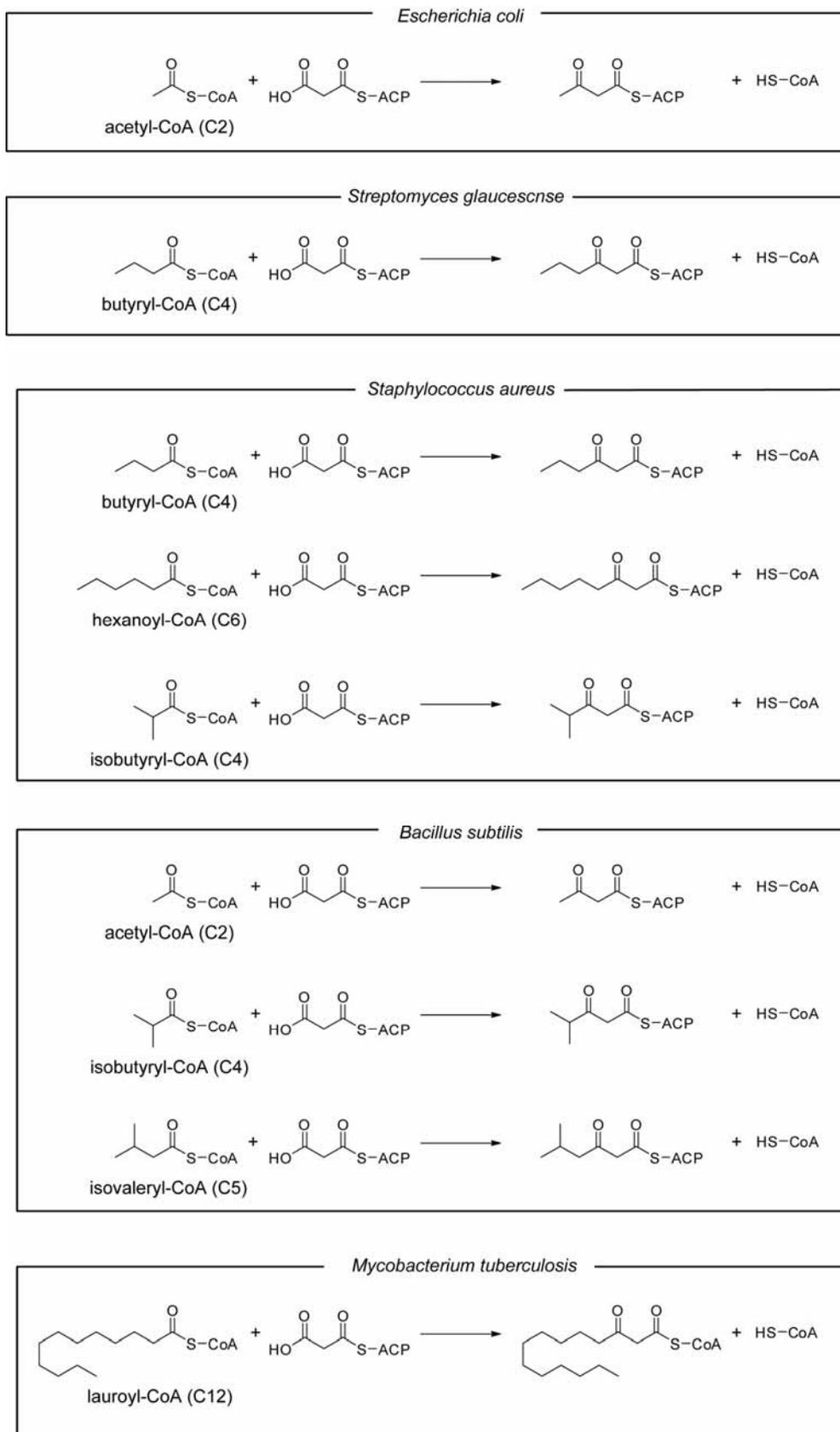


図3 KAS IIIの開始基質多様性

KAS III およびそのホモログは一次代謝のみならず、それが生産する  $\beta$ -ketoacyl-ACP が type I PKS および type II PKS の基質となることから、二次代謝にも寄与する。例えば、*Streptomyces coelicolor* A3(2)が生産するポリケタイド化合物である undecylprodiginine<sup>(19)</sup> 生合成経路における RedP<sup>(20)</sup> や *S. peucetius* の doxorubicin<sup>(21)</sup> (抗悪性腫瘍剤) 生合成経路における DpsC<sup>(22, 23)</sup>、*S. roseofulvus* の frenolicin<sup>(24)</sup> 生合成経路における FmI、*Streptomyces* sp. R1128 株の R1128<sup>(25, 26)</sup> 生合成経路における ZhuH<sup>(27)</sup> は KAS III ホモログである。これらの経路において、それぞれの KAS III もしくは KAS III ホモログにより合成された  $\beta$ -ketoacyl-ACP が、type I、もしくは type II PKS の基質となり、それぞれの二次代謝産物が生合成される。これらの二次代謝産物において、ポリケタイド骨格に付属する炭素鎖が、それら KAS III ホモログの開始基質特異性を反映している (図 4)。

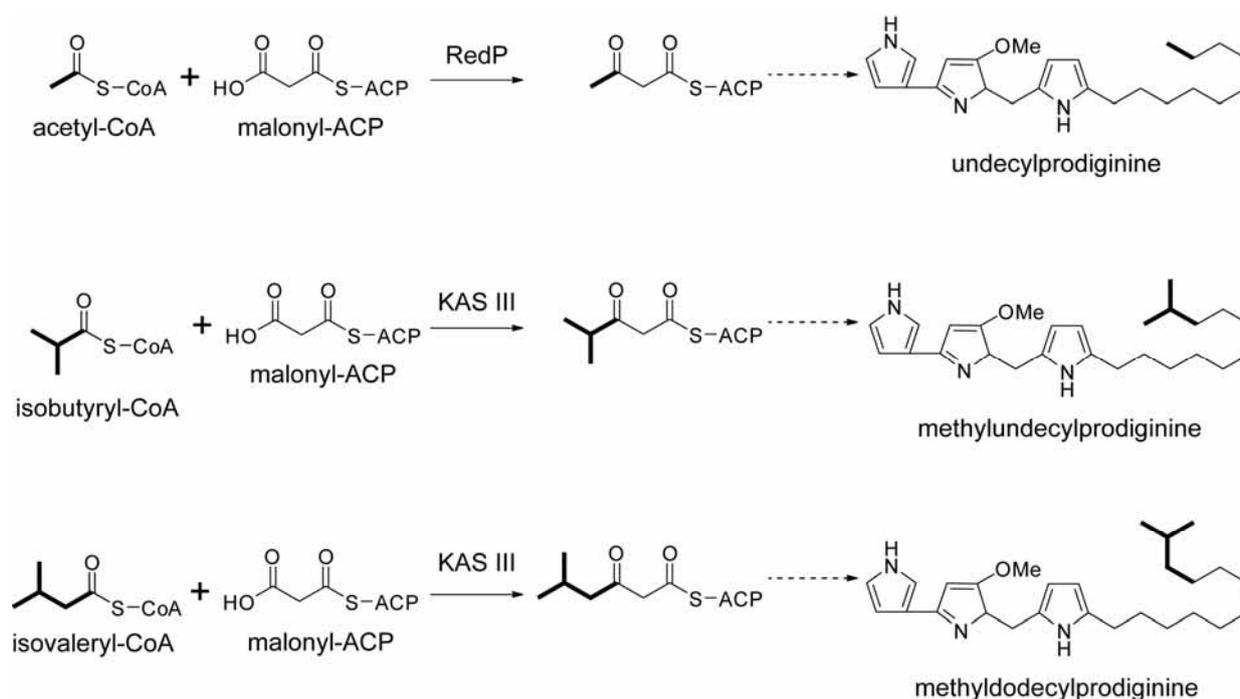
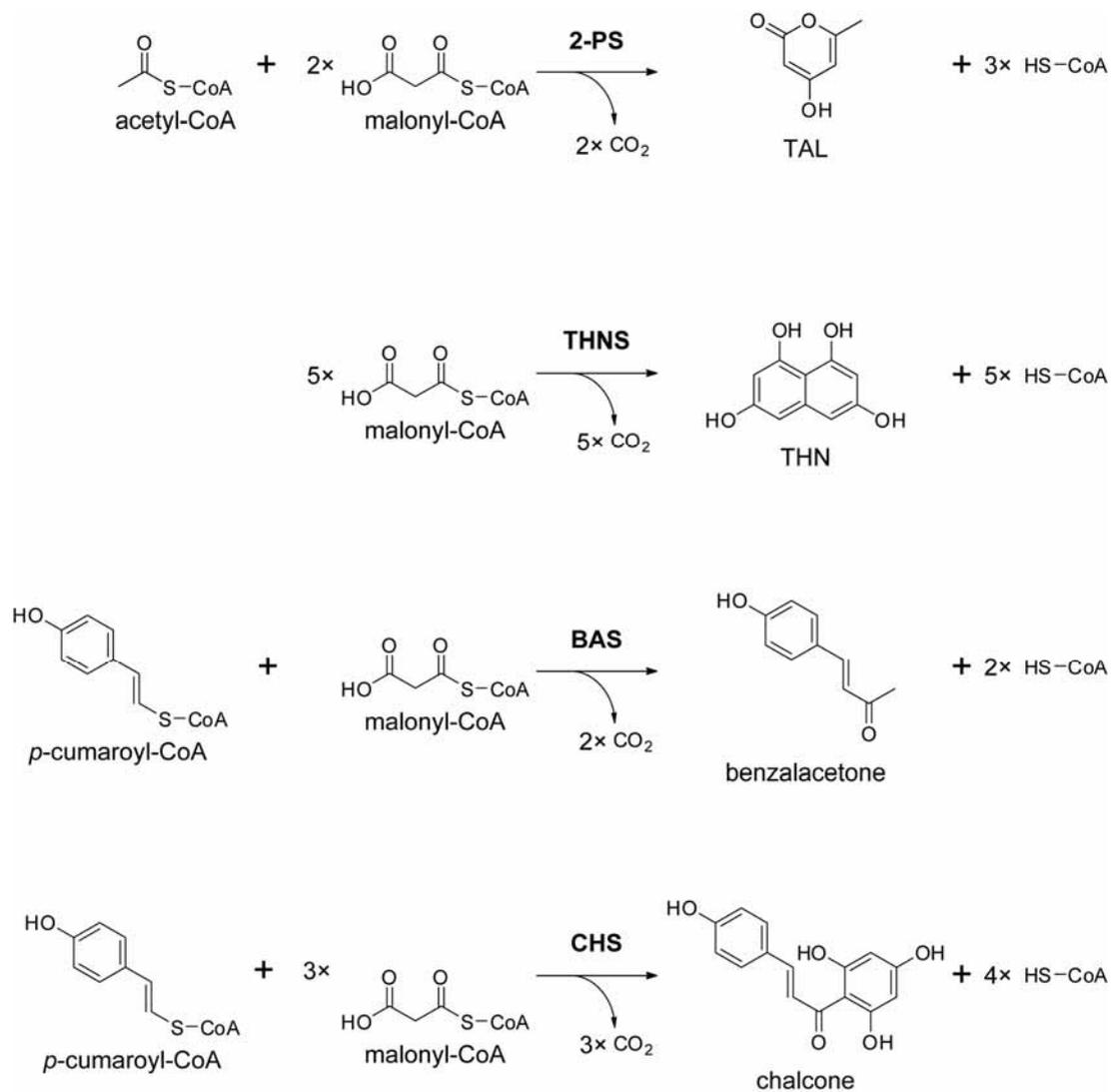


図 4 Undecylprodiginine の生合成経路における KAS III と RedP

*Streptomyces coelicolor* が生産する undecylprodiginine 類縁体と、その生合成における開始基質を示す。RedP の開始基質は acetyl-CoA であるのに対して、KAS III は分岐鎖の acyl-CoA である isobutyryl-CoA や isovaleryl-CoA であり、合成された  $\beta$ -ketoacyl 基が undecylprodiginine 類縁体の多様性をもたらす。

脱炭酸型酵素として、KAS III と並び盛んに研究されているものは type III PKS である。Type III PKS に属する酵素は、チオラーゼスーパーファミリーにおいて、単一のドメインからなる酵素としてはもっとも多様な化学構造の炭素骨格を生み出す酵素群であり、それを反映するように、その開始基質特異性や伸長基質の縮合回数にも多様性がみられる。Type III PKS において最少の縮合回数を有する酵素として、benzalacetone を合成する benzalacetone synthase (BAS) が挙げられる。BAS は *p*-cumaroyl-CoA を開始基質として、1 分子の malonyl-CoA を縮合させて benzalacetone を合成する<sup>(6, 28)</sup>。一方、acyl 基の化学構造が最も単純な開始基質を用いる酵素としては 4-methyl-6-hydroxy-2-pyrone (TAL) を合成する 2-pyrone synthase (2-PS) が挙げられる。2-PS は、1 分子の acetyl-CoA を開始基質として、2 分子の malonyl-CoA を 2 回縮合させることで 2-pyrone を合成する<sup>(6, 29)</sup>。また、1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN) の合成酵素であり、バクテリアにおいてはじめて発見された type III PKS である THN synthase は開始基質を必要とせず、伸長基質である malonyl-CoA のみを 4 回縮合させて THN を合成する<sup>(6, 30)</sup>。さらに、type III PKS の代名詞とも言える chalcone synthase は *p*-cumaroyl-CoA を開始基質として、3 分子の malonyl-CoA を縮合させて chalcone を合成して、これが、さらに環化や水酸化などの化学修飾を経て多様な多価フェノールが生み出される<sup>(6)</sup> (図 5)。このように、type III PKS は多様な化学構造を生み出すことから、その縮合回数の制御や開始基質特異性の改変を目的とした研究もなされている。



### 図5 Type III PKS の代表的な酵素群

図において、矢印上部の略語は以下の酵素を示す。**2-PS**、2-pyrone synthase。**THNS**、THN synthase。**BAS**、benzalacetone synthase。**CHS**、chalcone synthase。

近年、テルペノイドとポリケタイドが融合したユニークな化合物 naphterpin を生産する放線菌として、*Streptomyces* sp. CL190 株が単離された<sup>(31)</sup>。CL190 株は、テルペノイドの基本単位である isopentenyl diphosphate (IPP)と dimethylallyl diphosphate (DMAPP)の生合成経路として、MEP 経路とメバロン酸経路を有しており<sup>(32-35)</sup>、naphterpin のテルペノイド骨格はメバロン酸経路に由来する<sup>(36)</sup>。Naphterpin の生合成研究において、その生合成遺伝子クラスターとともに、メバロン酸経路遺伝子クラスターが取得された<sup>(34)</sup>。このメバロン酸経路遺伝子クラスターには、acetoacetyl-CoA から IPP と DMAPP までの合成を触媒する 6 つのホモログが見出された。しかし、メバロン酸経路の初発反応<sup>(37)</sup>であり、2 分子の acetyl-CoA から acetoacetyl-CoA を合成する acetoacetyl-CoA thiolase のホモログは見出されず、機能未知の open reading frame である NphT7 がこのメバロン酸経路遺伝子クラスターのすぐ下流に見出された。NphT7 のアミノ酸配列を用いて、構造およびその機能が明らかにされているタンパク質のデータベース (Protein Data Bank、<http://www.pdb.org/pdb/>) をもとにした BLAST 検索を行ったところ、KAS III のホモログであることが示唆された (表 1)。CL190 株と同様に、メバロン酸経路遺伝子クラスターを有する放線菌として、*Streptomyces* sp. KO-3988 株や *Actinoplanes* sp. A40644 株、*S. anulatus* が報告されており、これらはそれぞれテルペノイド骨格を有する furaquinocin や BE-40644、endophenazine を生産する<sup>(38-42)</sup>。また、その生合成遺伝子はメバロン酸経路遺伝子クラスターに隣接して存在している。さらに、これら放線菌のメバロン酸経路遺伝子クラスターでは、acetoacetyl-CoA thiolase のホモログが見出されず、NphT7 とおよそ 60-70% の identity を有するホモログである Orf-F、Orf-B および ppzT が共通して存在している(表 1、図 6)。

表 1 NphT7 の BLAST 検索結果

Name	PDB Code	Origin	Identity (%)	E-value
Orf-F	———	<i>Streptomyces</i> sp. strain KO-3988	73	8.0e <sup>-131</sup>
Orf-B	———	<i>Streptomyces</i> sp. strain A40644	59	7.0e <sup>-91</sup>
ppzT	———	<i>Streptomyces anulatus</i> 9663	75	1.0e <sup>-122</sup>
KAS III	1NHJ	<i>Escherichia coli</i>	35	4.8e <sup>-28</sup>
KAS III	1MZJ	<i>Streptomyces</i> sp. R1128	31	9.3e <sup>-28</sup>
KAS III	1UB7	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	37	2.1e <sup>-27</sup>
KAS III	1HZP	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32	2.8e <sup>-27</sup>
KAS III	1ZOW	<i>Staphylococcus aureus</i>	32	3.0e <sup>-27</sup>

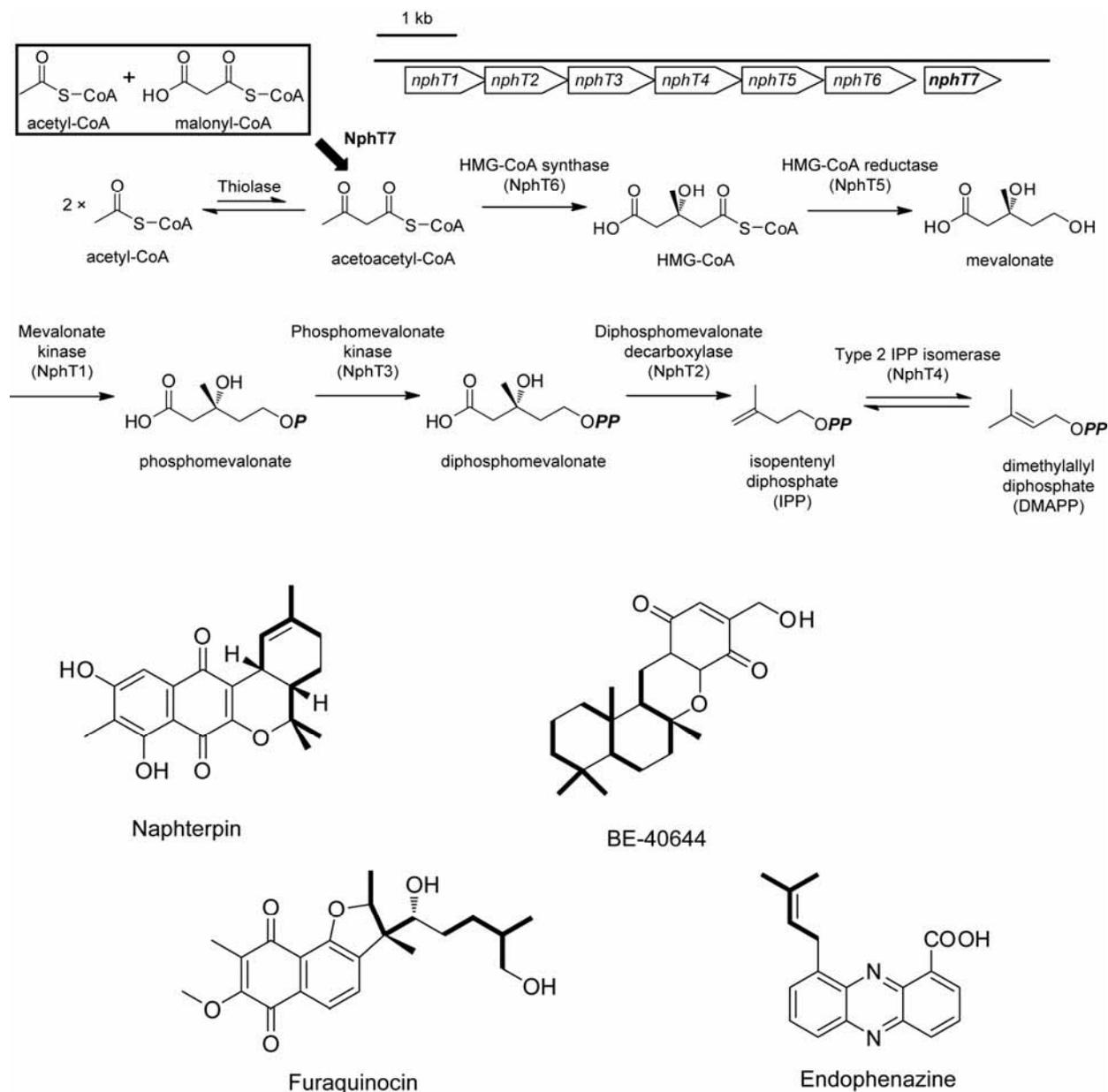


図6 放線菌のメバロン酸経路遺伝子クラスターとテルペノイド化合物

図は *Streptomyces* sp. CL190 株のメバロン酸経路遺伝子クラスターであり、他の放線菌においても同じ遺伝子配置である。また、メバロン酸経路遺伝子クラスターをもつ放線菌が生産するテルペノイド化合物を示す。構造式の強調部位がテルペノイド骨格であり、主にメバロン酸経路に由来する。

NphT7 の機能をより詳細に推測するため、そのアミノ酸配列を用いて結晶構造が明らかにされている *Escherichia coli* 由来 KAS III とのアラインメントを行った。その結果、活性中心の Cys-His-Asn 残基 (catalytic triad) が保存されていた。一方、malonyl-ACP の ACP 認識に寄与することが示されている Arg 残基<sup>(43)</sup> は NphT7 においては Val 残基へと置換されていた (図 7)。このことから、NphT7 は KAS III と同じく 1 回の Claisen 縮合を触媒するチオラーゼスーパーファミリーの脱炭酸型酵素であることが示唆された。また、その伸長基質は malonyl-ACP ではなく type III PKS や KCS と同じく malonyl-CoA であり、縮合産物は acetoacetyl-CoA であると推測した。NphT7 がメバロン酸経路遺伝子クラスターと同じクラスターに存在していることから同様の推測をした (図 6)。

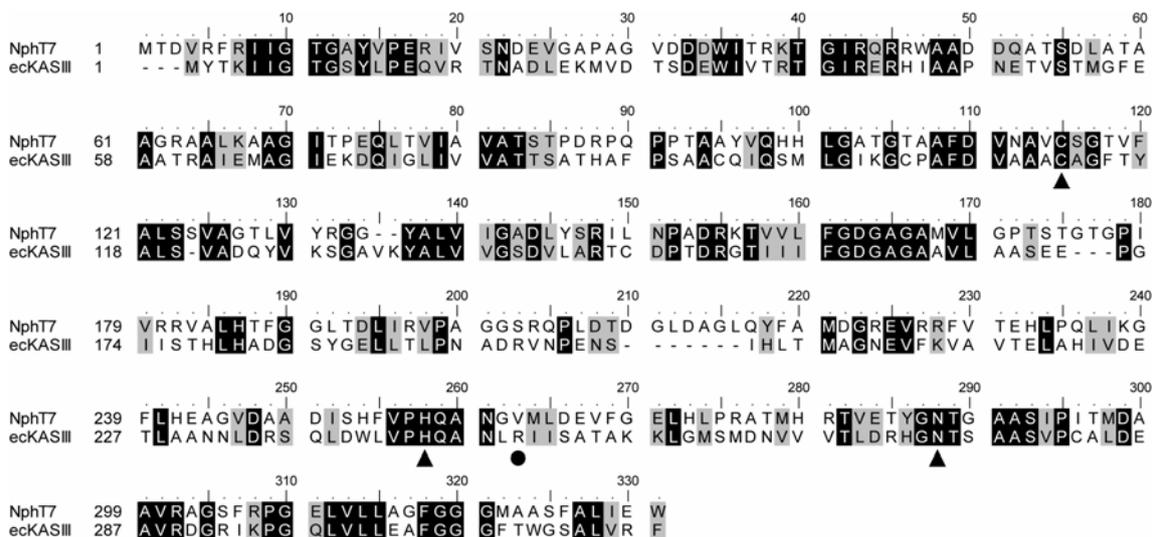


図 7 NphT7 と *E. coli* KAS III (ecKASIII) のアラインメント

図中において、▲ は活性中心の Cys-His-Asn 残基を示す。また ● は、ACP 認識に寄与する Arg 残基を示す。図の左に示した略語は以下の酵素を示す。ecKASIII、*E. coli* 由来 KAS III (PDB ID、1HN9)

本論文では、NphT7 組換えタンパク質の *in vitro* における活性を検討した。その結果、NphT7 は KAS III 活性を示さず、acetyl-CoA と malonyl-CoA を基質として acetoacetyl-CoA を合成することを明らかにした。さらに、その酵素学的パラメーターを検討した(第一章)。続いて、NphT7 の活性中心の構造を推察するため、複数の実験を行った。まず、開始基質と伸長基質に対する基質特異性検討して、acetyl-CoA 及び malonyl-CoA を特異的に基質とする酵素であることを明らかにした。さらに、その開始基質特異性の変換を試みて、acetyl-CoA から炭素数が 1 つ多い *n*-propionyl-CoA に対する基質特異性の向上に成功した。続いて、KAS III とのアラインメントにより提示された活性中心のアミノ酸残基に、部位特異的な変異を導入して、構築した変異酵素の活性を検討した。その結果、NphT7 はチオラーゼスーパーファミリーの脱炭酸型酵素であることが強く示唆された。これとは別に、KAS 酵素群の阻害剤を用いた実験を行った結果、その活性中心の構造は KAS III とは異なることが示唆された。従って、NphT7 は KAS III と同じ catalytic triad を有しているにも関わらず、malonyl 基の認識機構に関しては KAS III とは異なるという興味深い知見が得られた(第二章)。以上の *in vitro* における実験に加えて、NphT7 の *in vivo* における機能を検討した。まず、*Streptomyces albus* を宿主としたメバロン酸の異種生産系における *nphT7* 発現の効果を検討した。その結果、同生産系における *nphT7* の共発現はメバロン酸生産量を向上させた。さらに、*Streptomyces* sp. CL190 株においてその破壊株を構築して、naphterpin 生産に及ぼす影響を検討した。その結果、破壊株では野生株と比較して naphterpin の生産量が減少した。これらの結果はそれぞれ、各化合物の前駆体である acetoacetyl-CoA の供給量が *nphT7* に依存することを示し、その活性は *in vitro* の結果を支持するものであった(第三章)。

以上の結果から、本論文は NphT7 が未だ報告されていないチオラーゼスーパーファミリーの新規酵素である「acetoacetyl-CoA synthase」であることを提案する。Acetoacetyl-CoA synthase は、その縮合回数が 1 回であること、さらに開始基質としては最も単純な化学構造の acetyl-CoA を基質とすることから、チオラーゼスーパーファミリーの脱炭酸型酵素における構造機能相関を考察する上で重要な酵素であると考えられる。

Acetoacetyl-CoA synthase の遺伝子 (*aacs*)は、同じチオラーゼスーパーファミリーの酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase の遺伝子 (*hmgs*)と隣接して存

在しており、このことから *aacs* は *hmgs* の重複や一部欠損などの分子進化上のイベントにより登場したと推測している。現在、チオラーゼスーパーファミリーの分子進化において、KAS III から HMGS へと進化したことがアミノ酸配列をもとにした系統解析により示されている<sup>(7)</sup>。しかし、本論文では HMGS から KAS III への進化を仮定して、acetoacetyl-CoA synthase が HMGS から KAS III への分子進化をつなぐ「ミッシングリンク」である可能性を生化学的な観点から提案する。

## 第一章

### NphT7 の in vitro における機能解析

## 第一節 NphT7 の KAS III 活性検討

まずNphT7のKAS III活性を検討するために、組換えタンパク質を取得した。本実験では、*Streptomyces* sp. CL190株由来のNphT7およびACP、*Streptomyces coelicolor* A3(2)株由来のKAS III (FabH)、malonyl-CoA-ACP transacylase (FabD)およびholo-ACP synthase (ACPS) の組換えタンパク質を取得した。その後、ACP、FabDおよびACPSを用いてin vitroでのmalonyl-ACP合成反応を行い、その生成をLC-MS分析により確認した。次いで、malonyl-ACPと[1-<sup>14</sup>C]acetyl-CoAを基質とする反応溶液において、positive controlである*S. coelicolor* A3(2)のKAS IIIまたはNphT7を反応させて、[3-<sup>14</sup>C]acetoacetyl-ACPの生成にともなうACPの放射活性を検出した。(図1-1-1)。

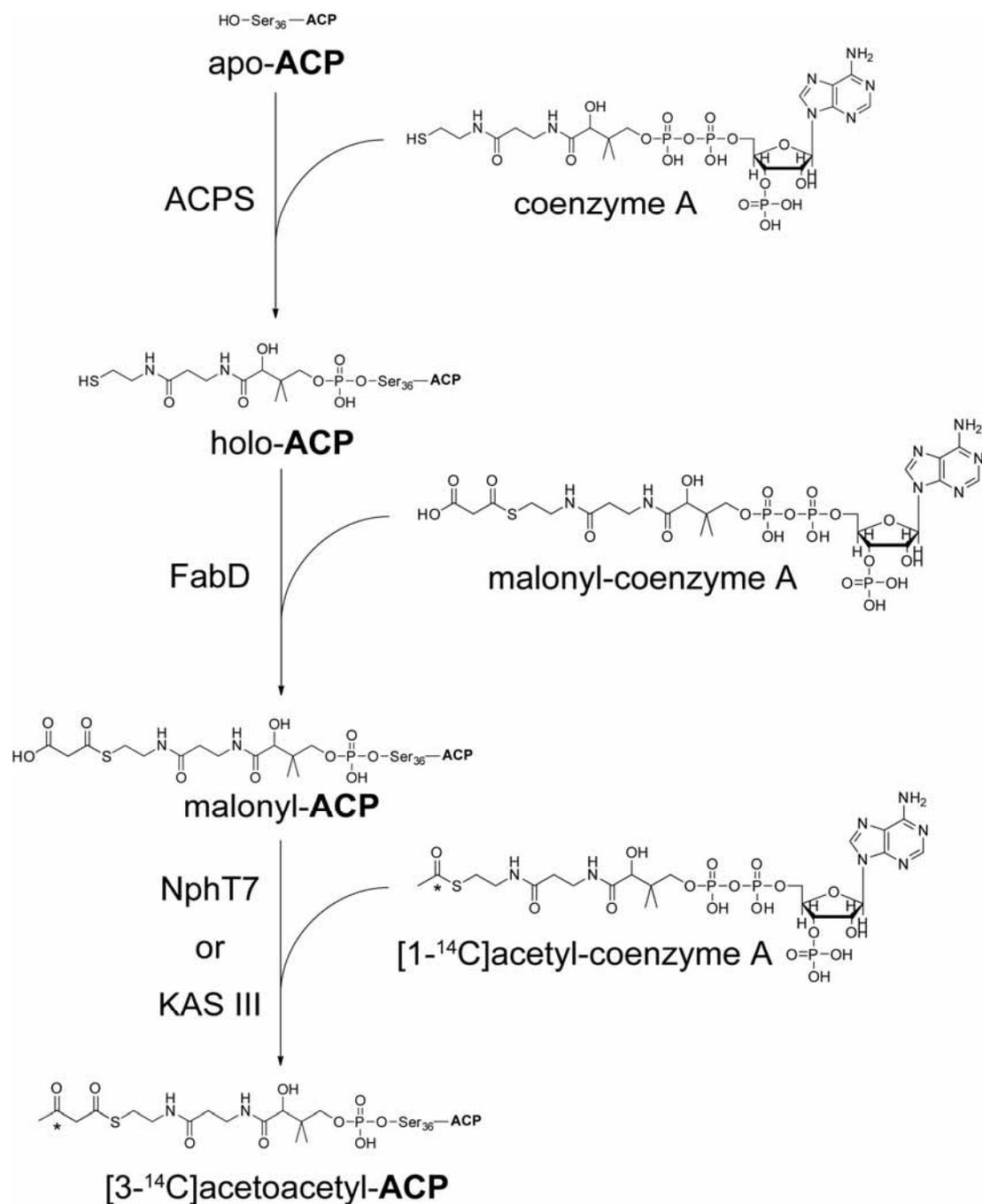


図 1-1-1 Malonyl-ACP の生合成反応と KAS III 反応

図中においてアスタリスクは  $^{14}\text{C}$  で標識された炭素を示す。また、図中における略語は以下の酵素を示す。**ACPS**、*S. coelicolor* 由来 holo-[acyl carrier protein] synthase、**FabD**、*S. coelicolor* 由来 malonyl-CoA-[acyl carrier protein] transacylase、**KAS III**、*S. coelicolor* 由来  $\beta$ -ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase。本実験では、in vitro で調製した malonyl-ACP と  $[1-^{14}\text{C}]$ acetyl-CoA を基質として KAS III もしくは NphT7 と反応させ、反応溶液を SDS-PAGE で展開した後、 $[3-^{14}\text{C}]$ acetoacetyl-ACP に由来する放射活性を検出した。

## 実験

### 組換えタンパク質の取得

*Streptomyces* sp. CL190 株のメバロン酸経路遺伝子クラスターをクローニングしたコスミドベクターである pCLC7<sup>(34)</sup>の塩基配列を参照して、*nphT7* 増幅用の N 末端および C 末端プライマーを設計した。また、*fabD*、*acp* 及び *acps* のプライマーは、全ゲノム配列が明らかにされている *Streptomyces coelicolor* A3(2)株の II 型脂肪酸生合成遺伝子クラスターの塩基配列を参照して設計した<sup>(16, 17)</sup> (表 1-1-1)。これらのプライマーを用いて、*Streptomyces* sp. CL190 株 (*nphT7*、*acp*)もしくは *S. coelicolor* A3(2)株 (*fabD*、*acps*)のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、目的の遺伝子を増幅させた。その後、クローニングベクターである pT7Blue vector へのクローニングを行い、シーケンスにより塩基配列の確認を行った。続いて、プライマーに付加した制限部位 (表 1-1-1 強調部位)での制限処理を行い、クローニングベクターから DNA を切り出した。これらを発現用ベクターである pHis8<sup>(29, 44)</sup>(*nphT7*、*fabD*、*acps*)もしくは pET15b (*acp*)の対応する制限部位にサブクローニングして、発現用プラスミドである pHis\_*nphT7*、pHis\_*fabD*、pHis\_*acps* および pET\_*acp* を構築した。なお、*S. coelicolor* 由来の KAS III (scKAS III) 発現プラスミド、pQE-*fabH* (pQE30 の Sall-HindIII サイトにクローニング) は、東京大学大学院農学生命科学研究科醗酵学研究室の鮎信学先生より御分与していただいた。発現プラスミドで *E. coli* BL21 (DE3) (pHis8-*nphT7*、*acps*、*acp*、*fabD*) または JM109 (pQE-*fabH*) を形質転換し、IPTG 誘導により組換えタンパク質を発現させた。その後、Ni-NTA アフィニティー精製により目的の組換えタンパク質を取得した。なお、NphT7 組換えタンパク質に関してはゲルろ過クロマトグラフィーにより native の分子量を測定した。詳細は実験の部に記載した。

表1-1-1 増幅用プライマー

プライマー名	制限部位	塩基配列 (5'→3' )
NPHT7_N	BamHI	GGGGGATCCACCGACGTCCGATTCCGC
NPHT7_C	EcoRI	GGGGAATTC TACCACTCGATCAGGGCGC
ACP_N	NdeHI	GGGGCATATG GCCGCCACTCAGGAAGAGAT
ACP_C	BamHI	GGGGATCCTCAGGCCTGGTGGTTCGAGGATG
ACPS_N	BamHI	GGGGATCCAGCATCATCGGGGTCGGGATCG
ACPS_C	HindIII	GGGGAAGCTTCTATCCCTCCGCGATCACCA
FABD_N	BamHI	GGGGATCCTCGTACTCGTTCGCTCCCGGCC
FABD_C	HindIII	GGGGAAGCTTCAGGCCTGGGTGTGCTCGGC

## Malonyl-ACPの調製

表1-1-2に示した組成の反応溶液 100  $\mu$ Lを25°Cで12時間反応させてapo-ACPをholo化した。

表 1-1-2 Holo 化反応溶液組成

100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM	CoA
5 mM	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
1 mM	Dithiothreitol
76 $\mu$ M	ACPS
100 nM	ACP

続いて、反応溶液にFabDとmalonyl-CoAを終濃度1 nMおよび1 mMとなるように添加して、30°Cで12時間反応させた。この反応溶液をアセトニトリル-水分析系のLC-MSにより分析してmalonyl-ACPの生成を確認した後に、malonyl-ACPに由来するピーク画分を分取した。分取したピーク画分を濃縮して、これをKAS IIIの活性検討に用いた。詳細は実験の部に記載した。

## KAS III 活性の検討

以下の組成の反応溶液 10  $\mu$ L (表1-1-3) に0.3  $\mu$ g (終濃度30  $\mu$ g / mL) のKAS IIIまたは3.9  $\mu$ g (終濃度390  $\mu$ g / mL) のNphT7組換えタンパク質を添加して、37°Cで12時間反応させた。なお、反応は[1-<sup>14</sup>C]acetyl-CoAの添加により開始させた。また、negative controlとして、酵素を添加しない反応溶液も同一の条件で反応させた。反応溶液をSDS-PAGE (18%ポリアクリルアミドゲル)により展開して、乾燥させたゲルのACP部位に由来する放射活性を計測した。

表 1-1-3 反応溶液組成

100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
84.7 $\mu$ M	[1- <sup>14</sup> C]acetyl-CoA
13.5 $\mu$ M	Malonyl-ACP
1 mM	Dithiothreitol

## 結果

### 組換えタンパク質の取得

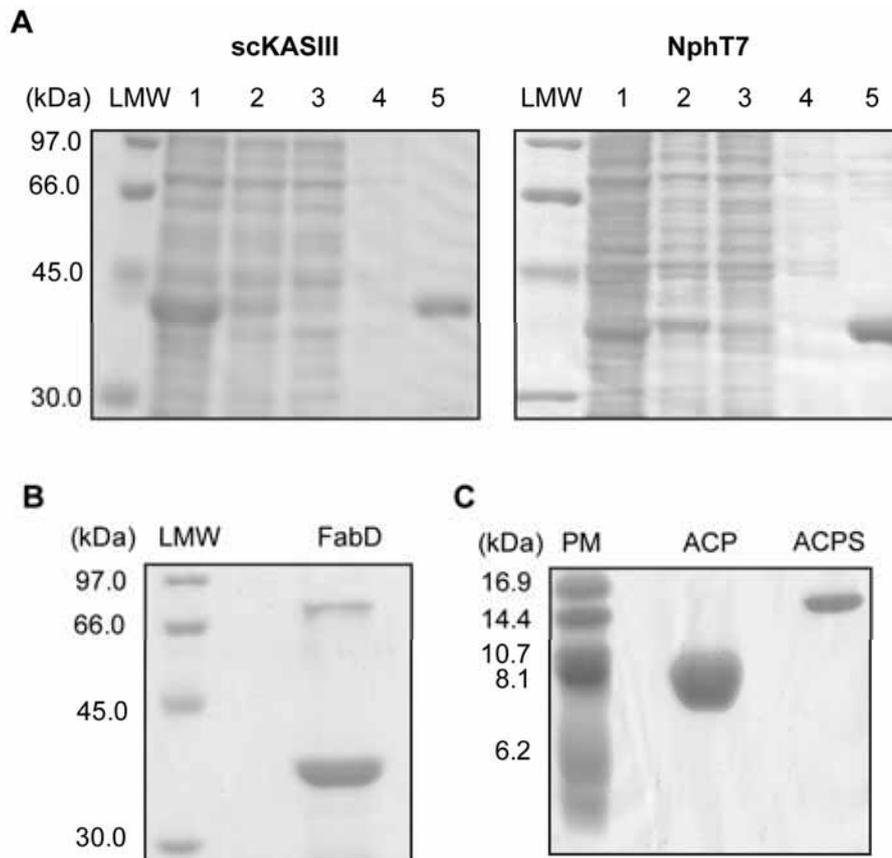
すべての目的とする His タグの組換えタンパク質を取得した (図 1-1-2)。これらは、アミノ酸配列から推定されるモノマー分子量 (NphT7, 38 kDa; KAS III, 37kDa; ACPS, 16 kDa; ACP, 10.9 kDa; FabD, 36 kDa)に一致した。また、ゲルろ過による分子量測定の結果、NphT7 は 63 kDa であり、二量体であった。なお、*Streptomyces* sp. CL190 株由来の *acp* 塩基配列は、*S. coelicolor* 由来の II 型脂肪酸合成遺伝子クラスターに存在する *acp* と同一の配列であった。

### Malonyl-ACP の調製

Malonyl-化反応溶液を LC-MS により分析した結果、保持時間 21.2 分 (1) と 21.5 分 (2) において 2 つのピークが観察された (図 1-1-3)。ピーク 1 と 2 はそれぞれ 2276.5 および 2258.9 の  $[M+5H]^{5+}$  値を示し、それぞれの値を deconvolution により再計算して 11377.4 と 11289.7 の  $[M]$  値を得た。これは、malonyl-CoA と holo-ACP のモノアイソトピック質量である 11375.6 Da と 11289.3 Da と良く一致した (malonyl-ACP  $[M (C_{490}H_{778}N_{135}O_{168}PS_3)] = 11375.6$ , holo-ACP  $[M (C_{487}H_{776}N_{135}O_{165}PS_3)] = 11289.3$ )。以上の結果から、malonyl-ACP の生成を確認した。

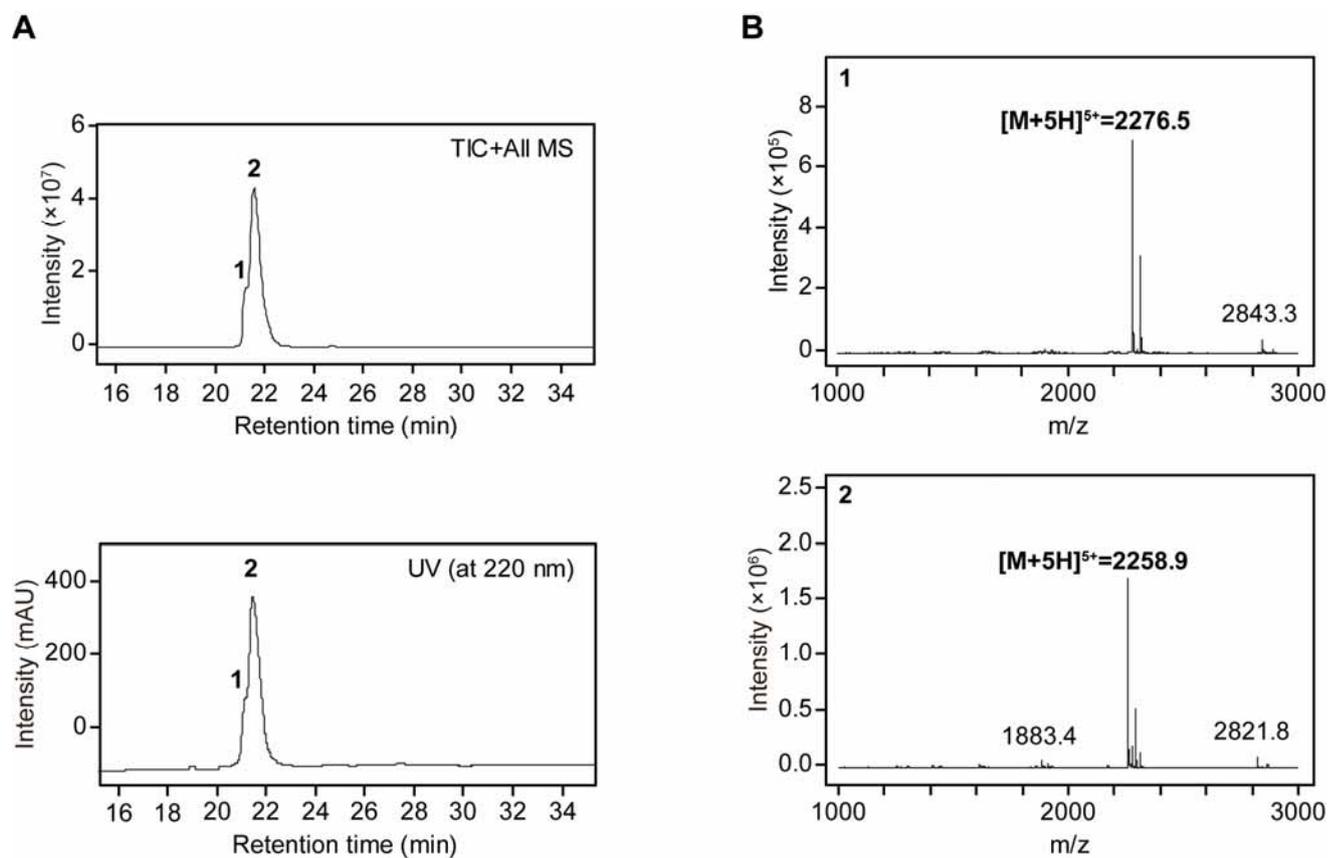
### KAS III活性の検討

KAS III活性を検討した結果を図1-1-4に示す。その結果、positive controlである KAS III反応溶液のACPに強い放射活性が検出された。一方、negative controlである酵素を添加しない反応溶液のACPでは弱い放射活性が検出されるのみであった。NphT7反応溶液のACPでは、negative controlと同じ強度の弱い放射活性が検出された。興味深いことに、NphT7自体にも放射活性が検出された。これは、適切な伸長基質がないためにacetyl-CoAに由来する $[1-^{14}C]$ acetateがNphT7のCys残基に結合したまま、反応が停止していることを示唆している。以上の結果から、NphT7はmalonyl-ACPを伸長基質として利用できず、KAS III活性を持たないことが明らかとなった。



**図 1-1-2 SDS-PAGE の結果**

**A**、NphT7 (右)、scKAS III (左)組換えタンパク質の SDS-PAGE (10%ポリアクリルアミドゲル)。**B**、FabD 精製組換えタンパク質の SDS-PAGE。**C**、ACPS、ACP 精製組換えタンパク質の SDS-PAGE (18%ポリアクリルアミドゲル)。各レーンの番号および略語は以下の試料を示す。**LMW**、Low molecular weight marker。**PM**、Peptide marker。1、超音波破碎画分。2、上清画分。3、Ni-NTA 非吸着画分。4、洗浄画分。5、溶出画分。**FabD**、FabD 精製組換えタンパク質。**ACP**、ACP 精製組換えタンパク質。**ACPS**、ACPS 精製組換えタンパク質。



**図 1-1-3** LC-MS 分析による malonyl-ACP 生成の確認

**A**、Total ion クロマトグラム (上) と 220 nm の追跡波長における UV クロマトグラム (下)。ピーク 1 の保持時間は 21.2 分、ピーク 2 の保持時間は 21.5 分であった。**B**、ピーク 1 及び 2 の MS スペクトル。各ピークの  $[M+5H]^{5+}$  値をもとに deconvolution を行い再計算した結果、11377.4 (1) と 11289.7 (2)の[M]値が得られた。これらの値は、malonyl-ACP および holo-ACP のモノアイソトピック質量である 11375.6 Da と 11289.3 Da に一致した。

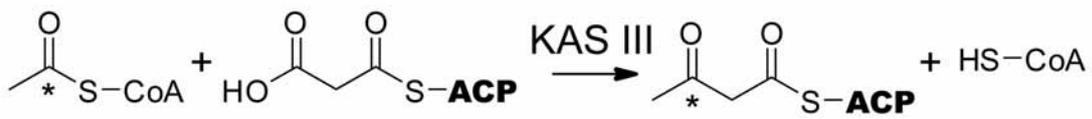
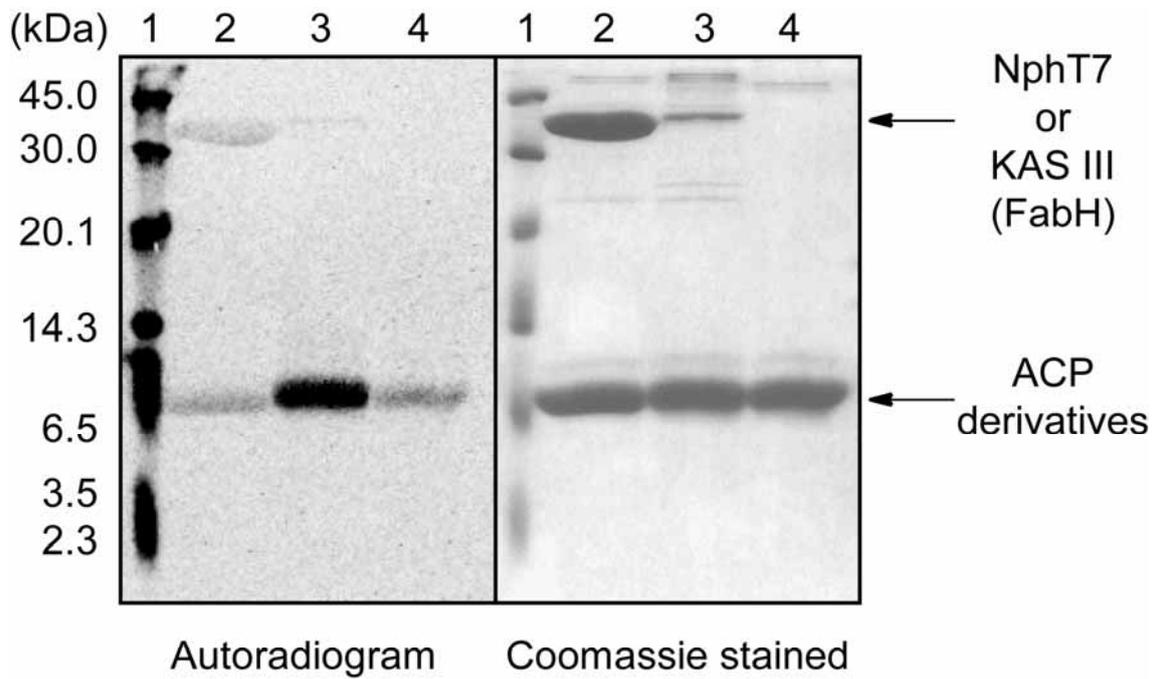


図 1-1-4 KAS III 活性検討の結果

SDS-PAGEは18%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。図上に示した番号は、以下の試料を示す。

1、Rainbow maker。2、NphT7反応溶液。3、KAS III反応溶液(positive control)。4、酵素非添加反応溶液 (negative control)。また、図下に示したKAS III反応模式図において、アスタリスク(\*)は<sup>14</sup>Cで標識された炭素を示す。

## 第二節 Acetoacetyl-CoA 合成活性の検討

第一節の結果から、NphT7はKAS III活性を示さないことが明らかとなった。そこで、伸長基質をmalonyl-CoAにして、NphT7反応溶液をHPLCとLC-MSにより分析、そのacetoacetyl-CoA合成活性を検討した。

### 実験

以下の反応溶液 (表1-2-1) 50  $\mu$ Lに、15  $\mu$ g (終濃度0.3 mg / mL) のNphT7を添加して30°Cで2分間反応させた。その後、100%飽和トリクロロ酢酸5  $\mu$ Lを添加して反応を停止させ、1 M MES緩衝液 (pH6.0)で10倍に希釈した。これを15,000 g、4°Cで10分間の遠心分離を行い、得られた上清10  $\mu$ LをHPLCにより分析した。反応により出現した新たなピークは、分取した後にLC-MS分析を行った。なおHPLCおよびLCでは、イオンペア試薬であるdibutylammonium acetateを用いたイオンペアクロマトグラフィーにより分析した。HPLC及びLC-MSの分析条件を表1-2-2に示した。クロマトグラフはCoAに由来する259 nmのUVを追跡した。また、MSはnegative modeで測定した。なお、以降の節ならびに章では、特に記載がない限り本節と同様の条件で分析試料の調製を行い、HPLCおよびLC-MS分析を行った。

表1-2-1 反応溶液組成

100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM	Acetyl-CoA
1 mM	Malonyl-CoA
1 mM	Dithiothreitol

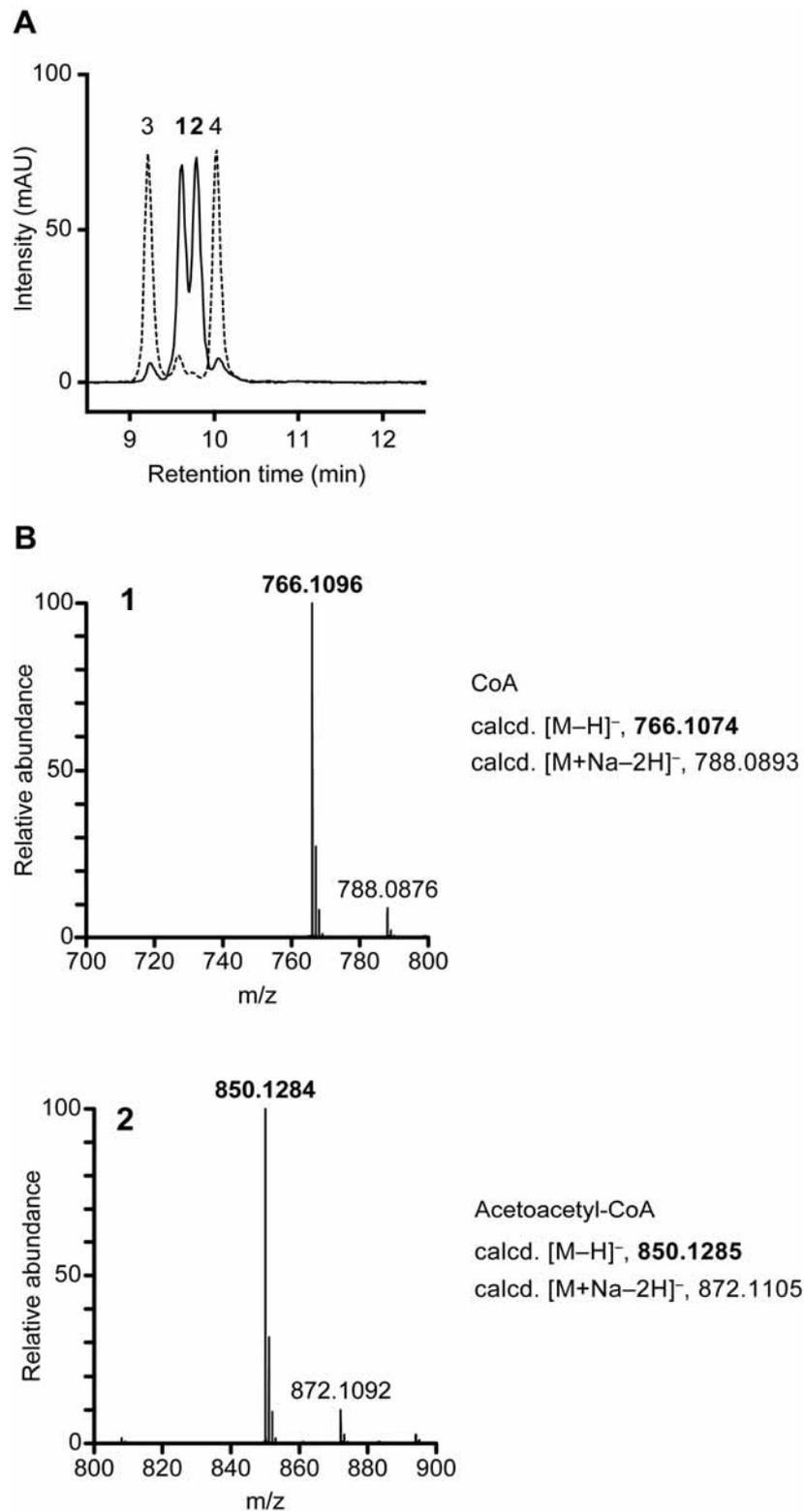
**表1-2-2 HPLCおよびLC-MS分析条件**

カラム	Shiseido Capcellpak C18 MGII 4.6×250 mm、5 μm、(HPLC、資生堂) Shiseido Capcellpak C18 MGII 2.0×250 mm、5 μm、(LC-MS、資生堂)	
分析温度	25°C (HPLC) 40°C (LC-MS)	
溶媒 A	5 mM dibutylammonium acetate + 5 mM ammonium acetate (pH 6.5)	
溶媒 B	MeOH	
溶出条件	liner gradient	
流速	1.0 mL / min (HPLC) 0.2 mL / min (LC-MS)	
溶出プログラム		
時間 (分)	溶媒 A 濃度 (%)	溶媒 B 濃度 (%)
0	90	10
15	20	80
16	90	10
36	90	10

## 結果

分析結果を **図 1-2-1** に示す。反応により acetyl-CoA(4、保持時間 10.1 分)と malonyl-CoA(3、9.1分)の消費にともない、保持時間9.3分と9.5分に新たな2つのピーク**1**と**2**を検出した。これらは、標品のCoAとacetoacetyl-CoAの保持時間と一致した。さらに、これらをLC-MSにより分析した結果、766.1096と788.0876(**1**)および850.1284と872.1092(**2**)の m/z 値を検出した。これらの結果から、**1**を CoA([M (C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>N<sub>7</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S)-H]<sup>-</sup> m/z 766.1096, C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>N<sub>7</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S, calcd 776.1074; [M (C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>N<sub>7</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S)+Na-2H]<sup>-</sup> m/z 788.0876, C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>7</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>SNa, calcd 788.0893)、**2**を acetoacetyl-CoA([M (C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub>P<sub>3</sub>S)-H]<sup>-</sup> m/z 850.1284, C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub>P<sub>3</sub>S, calcd 850.1285; [M (C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub>P<sub>3</sub>S)+Na-2H]<sup>-</sup> m/z 872.1092, C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub>P<sub>3</sub>SNa, calcd 872.1105)と決定した。

以上の結果から、NphT7はacetyl-CoAとmalonyl-CoAを基質としてacetoacetyl-CoA合成活性を示すことが明らかとなった。



**図1-2-1** NphT7反応溶液のHPLCおよびLC-MSによる分析結果

A、クロマトグラム (259 nm)。B、ピーク1と2のマスペクトル(negative mode)。Aにおいて、破線は熱失活させたNphT7の反応溶液、実線はNphT7の反応溶液を示す。また、各ピークの保持時間は以下の通り。1 (CoA)、9.3分。2 (acetoacetyl-CoA)、9.5分。3 (malonyl-CoA)、9.1分。4 (acetyl-CoA)、10.1分。

### 第三節 NphT7のacetoacetyl-CoA合成におけるストイキオメトリー

NphT7のacetoacetyl-CoA合成反応において、基質であるacetyl-CoAとmalonyl-CoAおよび産物であるCoAとacetoacetyl-CoAがどのような割合で反応および生成しているかを明らかにするために、そのストイキオメトリーを検討した。

#### 実験

第二節と同じ組成の反応溶液と酵素量、反応条件で反応を行った。反応開始から10、20、30、60、120秒の各時間で100% 飽和トリクロロ酢酸5  $\mu$ Lを添加して反応を停止させた。その後、各分析試料をHPLCにより分析した。得られたクロマトグラムのピーク面積から、熱失活させたNphT7の反応溶液に由来するmalonyl-CoAを基準として、他のCoA誘導体の濃度を算出した。なお、同一の実験を3回行い、測定誤差を算出した。

#### 結果

反応溶液のHPLC分析結果を**図1-3-1**に示す。また、各ピーク面積をもとに算出したストイキオメトリーのデータを**図1-3-2**に示す。実験の結果、NphT7は1分子のacetyl-CoAに1分子のmalonyl-CoAを縮合させて、1分子のCoAとacetoacetyl-CoAを合成することが明らかとなった。

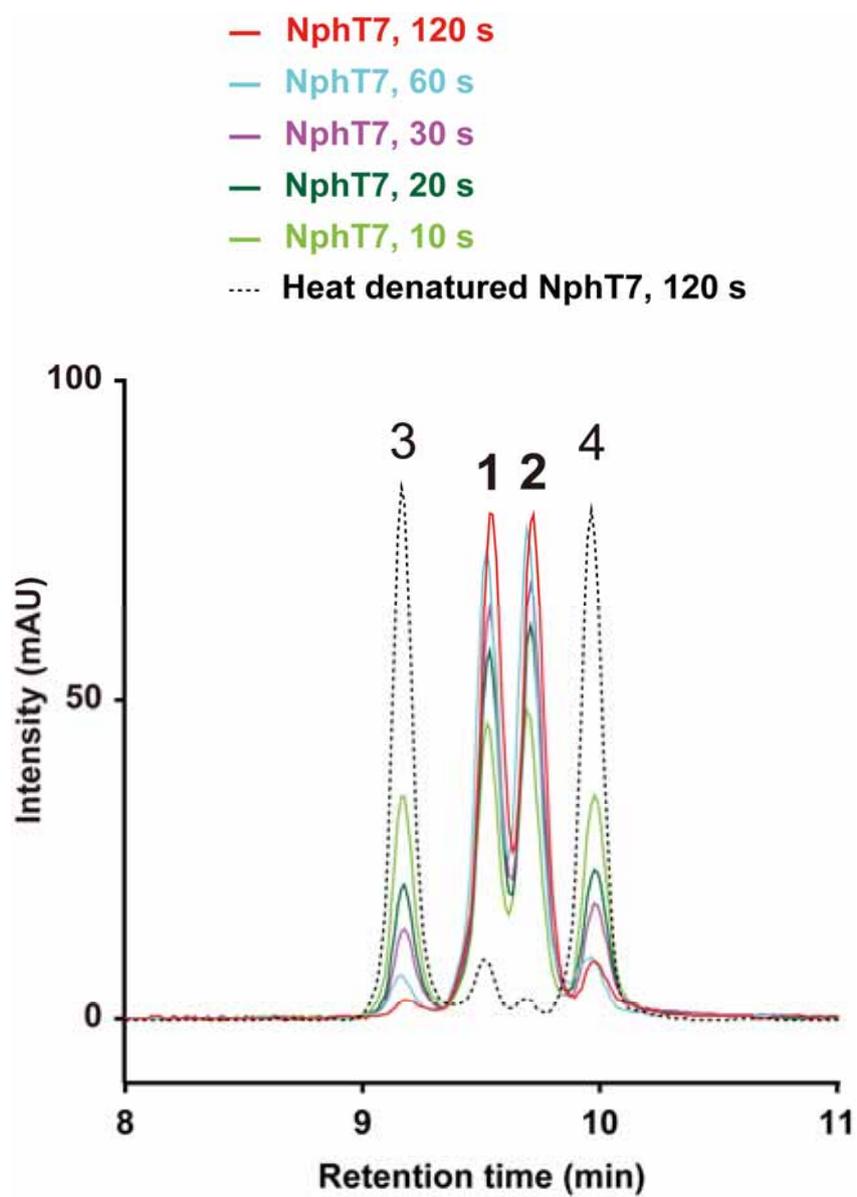


図1-3-1 各反応溶液のHPLC分析結果

図において、各ピーク上に示した番号は以下の化合物を示す。1、CoA。2、acetoacetyl-CoA。3、malonyl-CoA。4、acetyl-CoA。また、クロマトグラム上部に、対応する反応溶液を示した。

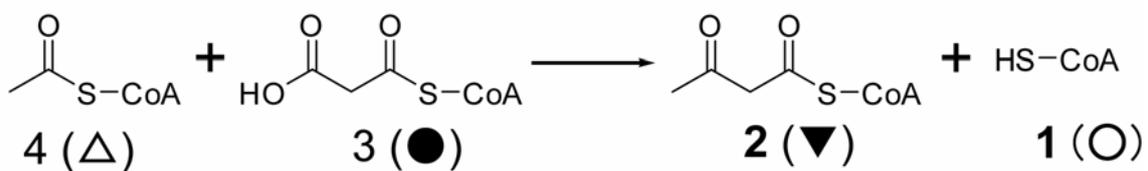
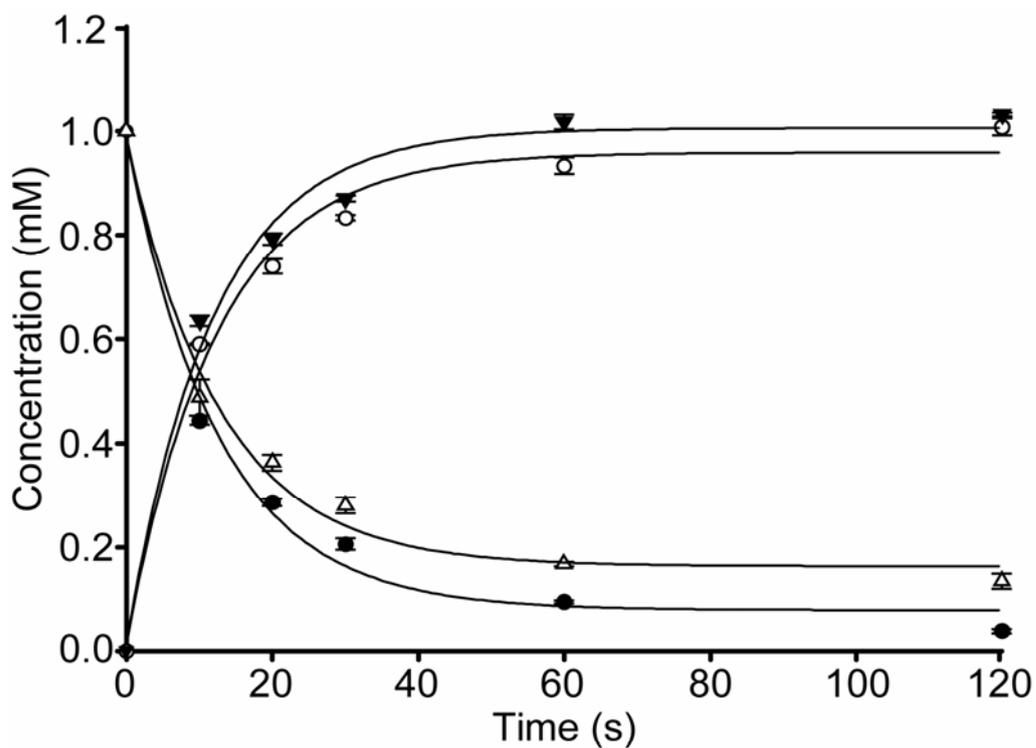


図1-3-2 Acetoacetyl-CoA合成におけるストイキオメトリー

図1-3-1で示したクロマトグラムのピーク面積をもとに、熱失活させたNphT7の反応溶液に由来する malonyl-CoAを基準として、各CoA誘導体の濃度を算出した。なお、同一の実験を3回行い、測定誤差を算出した。各番号と記号は以下のCoA誘導体を示す。1 (○)、CoA。2 (▼)、acetoacetyl-CoA。3 (●)、malonyl-CoA。4 (△)、acetyl-CoA。

#### 第四節 酵素学的パラメーターの算出

Acetoacetyl-CoA 合成活性の酵素学的パラメーターを算出した。

#### 実験

活性の検出は、反応溶液中の $\beta$ -ketoacyl-CoA (acetoacetyl-CoA)とマグネシウムイオンの複合体に由来する303 nmの吸収極大を測定した(図1-4-1)<sup>(45, 46)</sup>。反応溶液(100 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM Dithiothreitol、5 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、acetyl-CoAおよびmalonyl-CoA)に5  $\mu$ gのNphT7(終濃度5  $\mu$ g / mL)を添加して30°Cで反応を行い、303 nmにおける吸収極大の変化を1分間追跡した。このマグネシウム濃度におけるacetoacetyl-CoA- $Mg^{2+}$ 複合体のモル吸光係数 ( ) は8,300であった。Acetyl-CoAの $K_m$ 算出では、malonyl-CoAの濃度を100  $\mu$ Mに固定し、malonyl-CoAの $K_m$ 算出ではacetyl-CoAの濃度を200  $\mu$ Mに固定した。得られた初期速度をもとにLineweaver-Burkプロットを用いて $K_m$ と $k_{cat}$ 値を算出した。基質濃度は図1-4-2に示した。

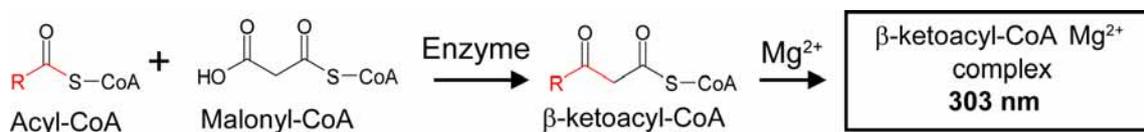


図 1-4-1  $\beta$ -ketoacyl-CoA (acetoacetyl-CoA) とマグネシウムイオン複合体

$\beta$ -ketoacyl-CoA はケト-エノール互変異性を有しており、そのエノール型とマグネシウムイオンの複合体が 303 nm における吸収極大をもつ。本実験では、 $\beta$ -ketoacyl-CoA が acetoacetyl-CoA である。

## 結果

各条件において算出した酵素学的パラメーターを表 1-4-1 に示す。また Michaelis-Menten グラフおよび Lineweaver-Burk プロットを図 1-4-2 に示す。検討の結果、開始基質存在下において、acetyl-CoA および malonyl-CoA に対する見かけの  $K_m$  は  $68.3 \pm 4.2$  および  $28.3 \pm 2.6$   $\mu\text{M}$  と算出された。さらに  $k_{\text{cat}}$  値は  $10.3 \pm 0.2$   $\text{s}^{-1}$  と算出された。

表 1-4-1 酵素学的パラメーター

$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ )	$K_m^{\text{Acetyl CoA}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_m^{\text{Malonyl CoA}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{S}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}} / K_m^{\text{Malonyl CoA}}$ ( $\text{S}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ )
$8.9 \pm 0.3$	$68.3 \pm 4.2$	$28.3 \pm 2.6$	$10.3 \pm 0.2$	0.3

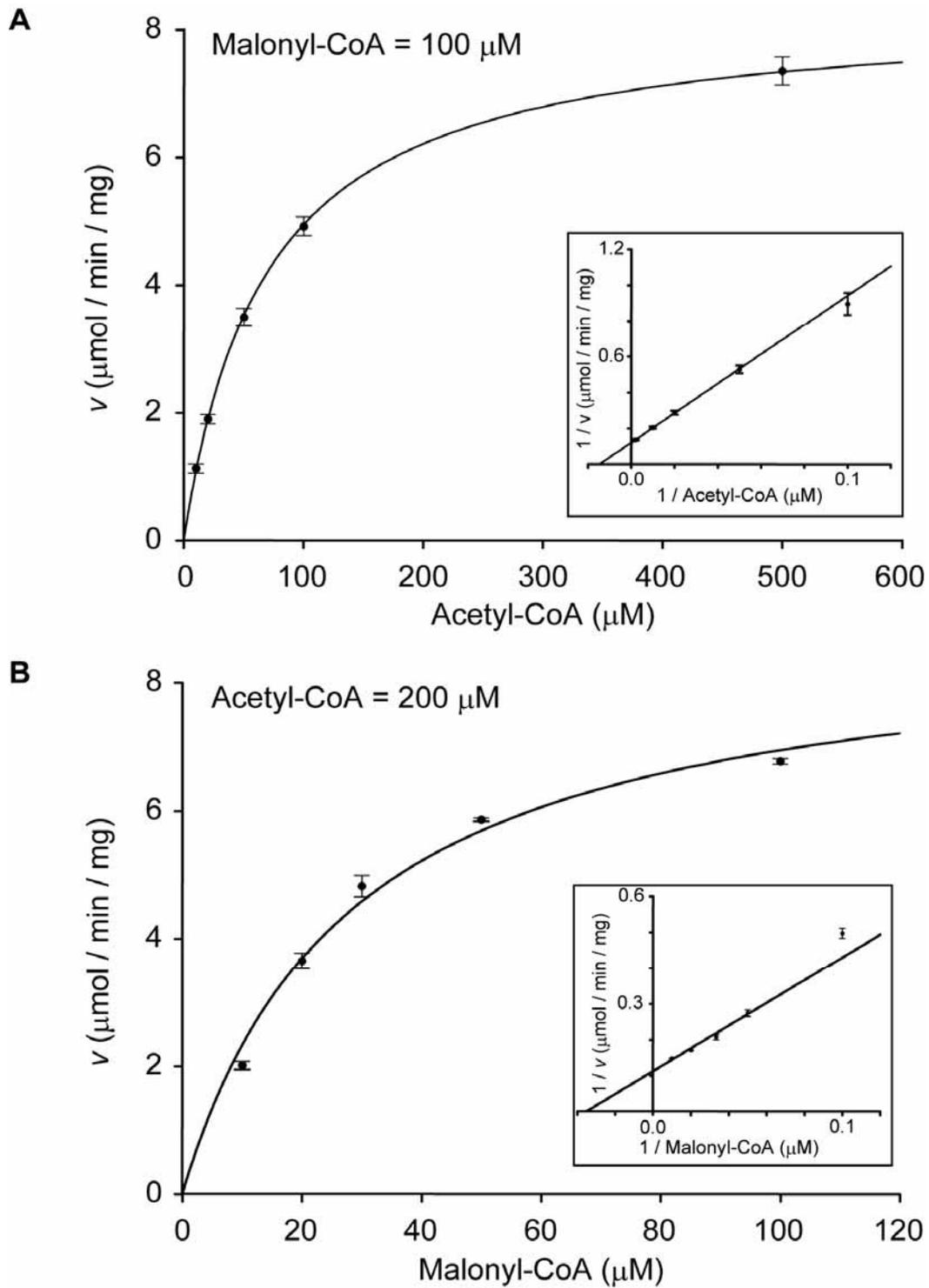


図 1-4-2 Michaelis-Menten グラフと Lineweaver-Burk プロット

**A**、Acetyl-CoA に対する  $K_m$  の算出。基質濃度は、10、20、50、100、500  $\mu\text{M}$  とした。また、malonyl-CoA の濃度は 100  $\mu\text{M}$  に固定した。**B**、malonyl-CoA に対する  $K_m$  の算出。基質濃度は 10、20、30、50、100  $\mu\text{M}$  とした。また、acetyl-CoA の濃度は 200  $\mu\text{M}$  に固定した。なお、同一の実験を 3 回行い、測定誤差を算出した。

## 第五節 考察

近年、*E. coli* KAS III(ecKAS III)を用いて、本論文と同一の測定方法によりその acetoacetyl-CoA 合成活性が検討された<sup>(43)</sup>。そこで算出された比活性は 0.093  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  であり、NphT7 と比較しておよそ 100 倍低い値となっている。また、hexanoyl-CoA を第一の開始基質とする *Staphylococcus aureus* の KAS III(saKAS III) 組換えタンパク質を用いて、その $\beta$ -ketoacyl-CoA 合成活性を検討した結果、比活性は 0.014  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  であり、NphT7 と比較しておよそ 630 倍低い値となった(表 1-5-1)。

表 1-5-1 KAS III 及び NphT7 の $\beta$ -ketoacyl-CoA 合成活性

酵素名	Vmaxまたは比活性( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ )	測定条件の基質濃度
ecKASIII	0.093 (比活性)	0.1 mM acetyl-CoA、5 mM malonyl-CoA
saKASIII	0.014 (比活性)	0.1 mM hexanoyl-CoA、1 mM malonyl-CoA
NphT7	8.9 $\pm$ 0.3 (Vmax)	本文参照

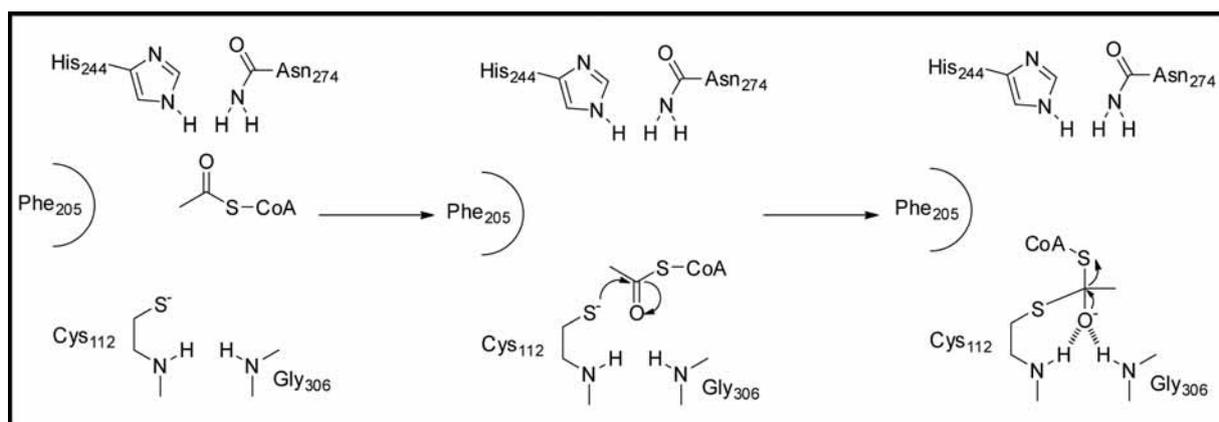
これらの比活性の相違は、NphT7 ホモログと KAS III ホモログを区別するための in vitro アッセイにおいて、ひとつの指標になると考えられる。

## 第二章

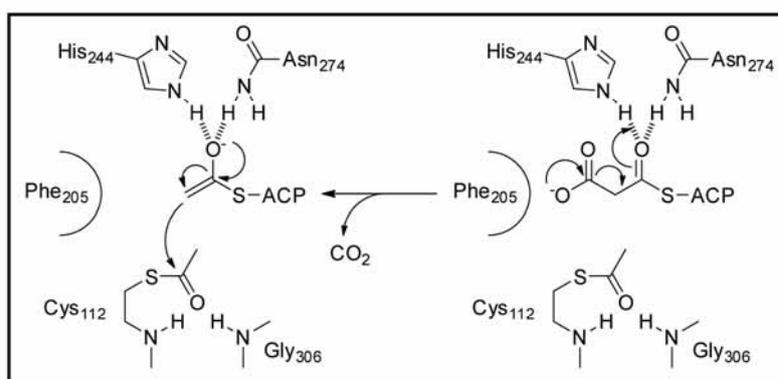
### NphT7 の活性中心の構造推察に関する研究

## 第一節 Catalytic triad 変異酵素解析

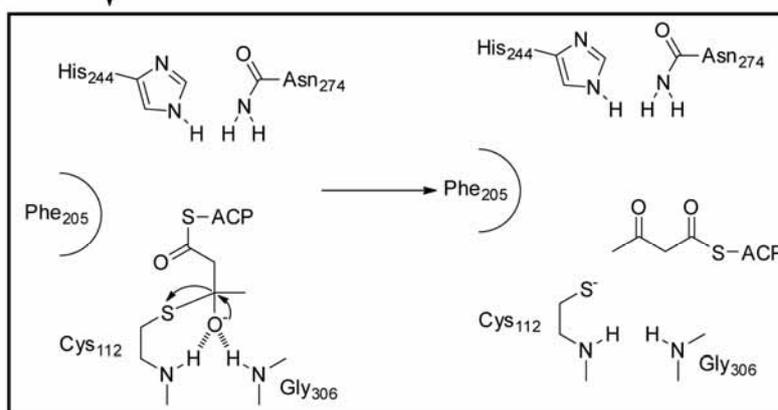
*E. coli* 由来 KAS III とのアラインメントにより、NphT7 はその活性中心に Cys-His-Asn 残基(catalytic triad)を有する脱炭酸型の酵素であることが示唆された(序論)。また、in vitro における活性検定の結果からも同様のことが示された(第一章)。*E. coli* 由来の KAS III では、一連の反応における catalytic triad の機能が詳細に解析されている(図 2-1-1)<sup>(1, 9, 47)</sup>。Cys 残基は開始基質の acyl 基とチオエステル結合を形成して、Claisen 縮合における acyl 基のアンカーとして機能する。一方、His-Asn 残基は malonyl 基から脱炭酸反応により $\alpha$ -anion を生成する役割を担う。Cys 残基に部位特異的な変異を導入した変異酵素では、開始基質の acyl 基が活性中心へと導入されず、 $\beta$ -ketoacyl-ACP が合成されない。しかし、His-Asn 残基による脱炭酸活性は残存するため、malonyl-ACP の脱炭酸により生じた $\alpha$ -anion 中間体が、水溶液中からプロトンを得て、acetyl-ACP が合成される。また、His 残基もしくは Asn 残基に変部位特異的な変異を導入した変異酵素は、malonyl-ACP の脱炭酸反応の活性低下によりその比活性が低下するものの、 $\beta$ -ketoacyl-ACP は合成される<sup>(9)</sup>。そこで、NphT7 の catalytic triad を構成すると推測される Cys 残基(C115)と His 残基(H256)、Asn 残基(N286)を部位特異的な変異の導入により Ala 残基へと置換した変異酵素酵素である NphT7-C115A、NphT7-H256A および NphT7-N286A を作成して、その活性検定を試みた。



Cys 残基への acyl 基導入



His-Asn 残基による脱炭酸反応と  $\alpha$ -anion の生成



Claisen 縮合と  $\beta$ -ketoacyl-ACP の生成

図 2-1-1 KAS III の反応機構

KAS III の反応機構は大きく三段階に分けられる。第一は Cys 残基への acyl 基導入である。第二は His-Asn 残基による malonyl 基の脱炭酸反応により、 $\alpha$ -anion を生成する。第三は  $\alpha$ -anion と Cys 残基に導入された acyl 基の Claisen 縮合により  $\beta$ -ketoacyl-ACP を生成する。図は *E. coli* 由来 KAS III の反応機構。

## 実験

### 組換えタンパク質の取得

変異導入プライマー(表2-1-1)を設計した。これらのプライマーとQuickchange® XL Site Directed Mutagenesis Kit を用いたPCRにより部位特異的な変異導入を行った。なお、鋳型としてpHis-nphT7を用いた。PCR産物により*E. coli* DH5αを形質転換させた後、プラスミドを回収してインサートのシーケンスを行い、部位特異的な変異の導入を確認した。その後、*E. coli* BL21 (DE3)株を形質転換させてTB培地で培養、IPTG誘導により目的の組換えタンパク質を発現させた。発現させたタンパク質は、Ni-NTAアフィニティー精製により精製した。

表 2-1-1 部位特異的な変異導入用プライマー

プライマー名	塩基配列 (5' →3' )
NphT7-C115A_N	GACGTCAACGCGGTCGCGTCCGGCACCCTGTTC
NphT7-C115A_C	GAACACGGTGCCGGACGCGACCGCGTTGACGTC
NphT7-H256A_N	AGCCACTTCGTGCCGGCGCAGGCCAACGGTGTC
NphT7-H256A_C	GACACCGTTGGCCTGCGCCGGCAGCAAGTGGCT
NphT7-N286A_N	GTCGAGACCTACGGCGCGACGGGAGCGGCCTCC
NphT7-N286A_C	GGAGGCCGCTCCCGTCGCGCCGTAGGTCTCGAC

### 酵素活性検定

1 mM acetyl-CoAと1 mM malonyl-CoAの基質を含む反応溶液50 μL (表1-2-1参照)に70 μgのNphT7-H256 (終濃度1.4 mg / mL)もしくは50 μgのNphT7-C115A (終濃度1.0 mg / mL)変異酵素を添加して、30°Cで5分間(NphT7-H256A) または10分間(NphT7-C115A)反応させた。その後、分析試料をHPLCにより分析した。

NphT7-H256Aに関しては、acetyl-CoAのピーク面積を基準として、その消費量から比活性を算出した。

## 結果

### 組換えタンパク質の取得

NphT7-C115A および NphT7-H256A を可溶性の精製組換えタンパク質として取得した。一方、NphT7-N286A は可溶性酵素としては取得できなかったため、以降の実験では使用しなかった。(図 2-1-2)。

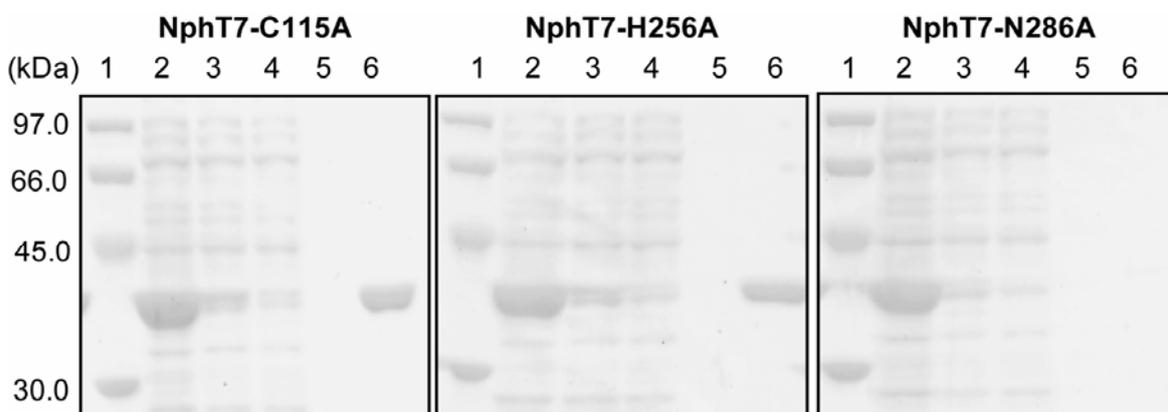


図 2-1-2 変異酵素の SDS-PAGE

ゲル上の番号は以下の試料を示す。1、Low molecular weight marker。2、超音波波碎画分。3、上清画分。4、Ni-NTA 非吸着画分。5、洗浄画分。6、溶出画分。SDS-PAGE では 10%ポリアクリルアミドゲルを用いた。

## 酵素活性検定

NphT7-C115A および NphT7-H256A 反応溶液のクロマトグラムを図 2-1-3 に示す。NphT7-C115A では、NphT7 の反応産物である acetoacetyl-CoA および CoA の生成は観察されなかった。しかし、malonyl-CoA の消費と acetyl-CoA の生成が検出された。これは、His-Asn 残基の脱炭酸活性により malonyl-CoA が脱炭酸して $\alpha$ -anion 中間体が生成され、さらに溶媒からプロトンを得て acetyl-CoA が生成したと考えられる。従って、NphT7 の Cys 残基は acyl 基の導入を担うことが示された。

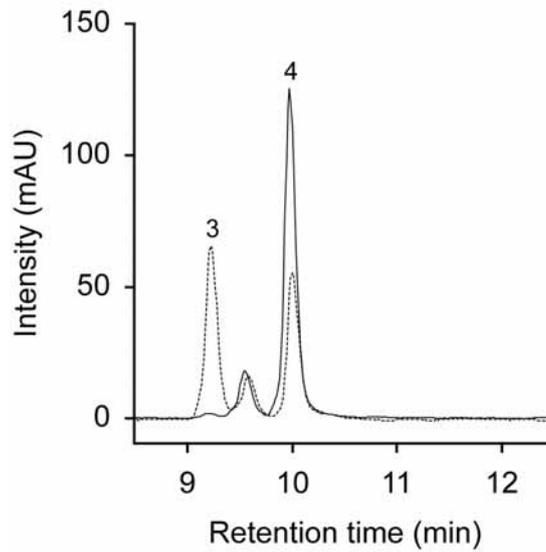
NphT7-H256A では CoA と acetoacetyl-CoA の合成活性が検出された。これは、Asn286 に由来する脱炭酸活性が残存しており、 $\alpha$ -anion が生成され縮合反応が進行するためであると推測される。この結果は、他の KAS III 変異酵素における解析結果からも支持される。ただし、その比活性は  $0.2 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  と算出され、著しく低下した (表 2-1-2)。この比活性は、NphT7 の比活性  $8.9 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  (第一章第三節、32 ページ、図 1-3-1 に示したクロマトグラムの acetyl-CoA 消費量から算出) よりも 44 倍低い値である。

表 2-1-2 ピーク面積を基にした NphT7 および NphT7-H256A の比活性

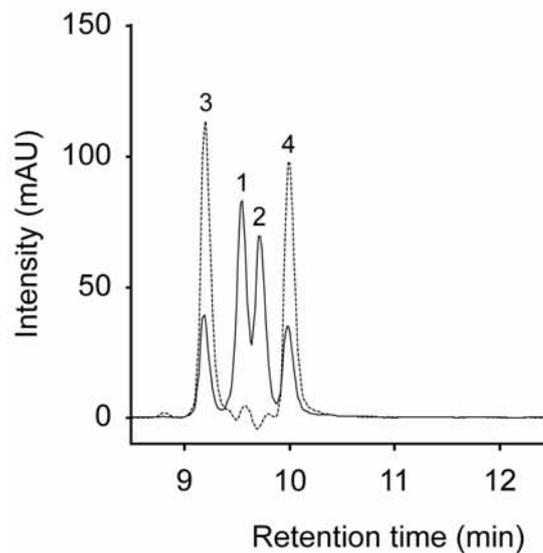
酵素名	基質条件	比活性 ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ )
NphT7-H256A	1 mM acetyl-CoA + 1 mM malonyl-CoA	0.2
NphT7	1 mM acetyl-CoA + 1 mM malonyl-CoA	8.9

この結果は、NphT7 の H256 が脱炭酸反応の鍵となる残基であることを示唆している。今回、取得できなかった N286A についても、H256A と同様に脱炭酸反応に関与していると推測される。従って、今回明らかにした結果は NphT7 が Cys-His-Asn 型の catalytic triad を有する脱炭酸型酵素であることを強く支持している。

### A (NphT7-C115A)



### B (NphT7-H256A)

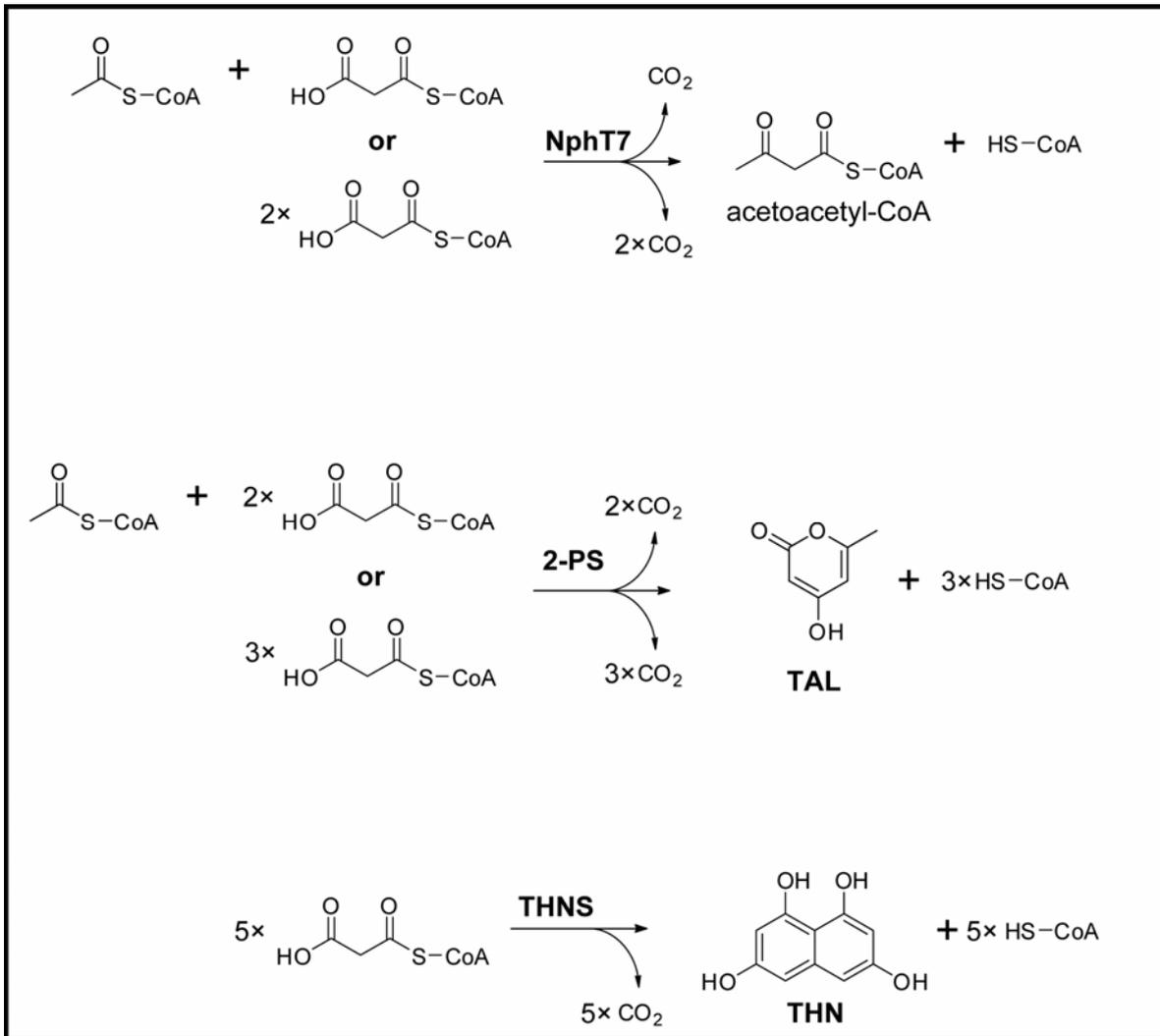


**図 2-1-3** NphT7-C115A および H256A 反応溶液の HPLC 分析結果

**A**, NphT7-C115A 反応溶液の HPLC 分析結果。 **B**, NphT7-H256A 反応溶液の HPLC 分析結果。 1 mM acetyl-CoA と 1 mM malonyl-CoA を含む反応溶液で反応を行った。 NphT7-C115A 反応溶液は 10 分間、 NphT7-H256A 反応溶液は 5 分間反応を行った。 各番号は以下の化合物を示す。 1、 CoA、 2、 acetoacetyl-CoA、 3、 malonyl-CoA、 4、 acetyl-CoA。 クロマトグラムは CoA 誘導体に由来する 259 nm の極大吸収を追跡して作成した。

## 第二節 伸長基質のみによるacetoacetyl-CoA合成

本章第一節の実験結果から、NphT7がCys-His-Asn型の活性中心を持つ脱炭酸型の酵素であることが強く示唆された。Cys-His-Asn型の脱炭酸酵素であるKAS IIIは、開始基質であるacyl-CoAの非存在下において、開始基質であるmalonyl-ACPを脱炭酸反応によってacetyl-ACPへと変換することが知られている<sup>(1, 12)</sup>。また、同型のtype III PKSである2-PSは、acetyl-CoAの非存在下において、開始基質であるmalonyl-CoAを脱炭酸反応によりacetyl-CoAへと変換して開始基質を合成した後に、産物である6-methyl-4-hydroxy-2-pyrone (TAL)を合成する活性をもつことが知られている<sup>(29)</sup>。さらに、THNSは、伸長基質であるmalonyl-CoAのみから1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN) を合成する<sup>(6, 30)</sup>。これらの事実から、NphT7はacetyl-CoAの非存在下において、開始基質であるmalonyl-CoAのみからacetoacetyl-CoAを合成すると推測して、そのストイキオメトリーを検討した(図2-2-1)。



**図2-2-1** NphT7の推定されるmalonyl-CoAのみからのacetoacetyl-CoA合成活性  
 図において、NphT7 および 2-PS の矢印上部の脱炭酸は開始基質存在下での反応を示す。また、下部の脱炭酸は非存在下での反応を示す。

## 実験

1 mM malonyl-CoAのみ含む反応溶液(表1-2-1参照) 50  $\mu$ Lに、30  $\mu$ gのNphT7(終濃度0.6 mg / mL) を添加して、反応開始から30、60、90、120秒で100%飽和トリクロロ酢酸5  $\mu$ Lを添加して反応を停止させた。その後、分析試料をHPLCにより分析した。得られたクロマトグラムのピーク面積から、熱失活させたNphT7の反応溶液に由来するmalonyl-CoAを基準として、他のCoA誘導体の濃度を算出した。なお、同一の実験を3回行い、測定誤差を算出した。また、malonyl-CoAの消費量から比活性を算出した。

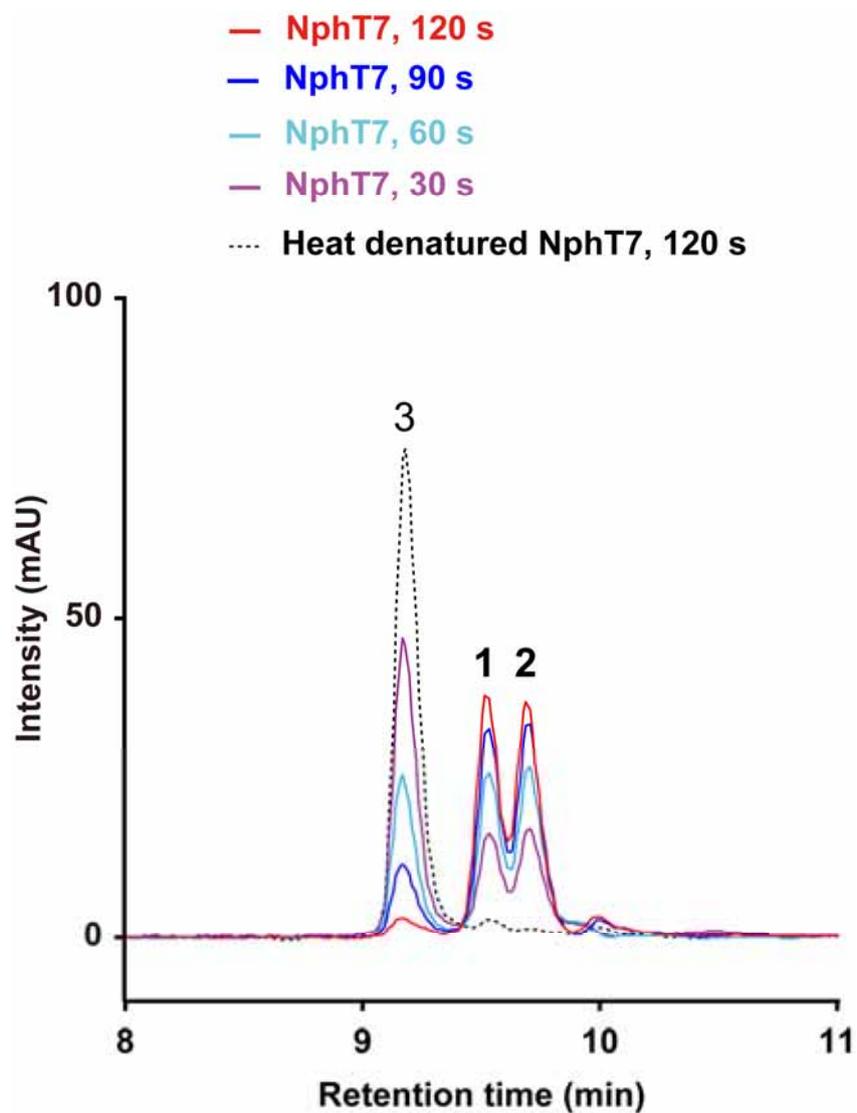
## 結果

反応溶液の HPLC 分析結果を図 2-2-2 に示す。また、各ピーク面積をもとに算出したストイキオメリーのデータを図 2-2-3 に示す。実験の結果、NphT7 は malonyl-CoA のみからも acetoacetyl-CoA を合成することが明らかとなり、本条件下では 2 分子の malonyl-CoA から 1 分子の CoA と acetoacetyl-CoA を合成することが明らかとなった。この結果は、NphT7 が KAS III や type III PKS と同様の活性を示すことを意味しており、本章第一節の結果とともに脱炭酸型の酵素であることを強く支持する。

本条件下における比活性を開始基質存在下における比活性と比較すると、およそ 5 倍低い値となった (表 2-2-1)。しかし、それでもなお KAS III の比活性 (第一章第五節表 1-5-1 より抜粋) と比較した場合には高い活性を示す。従って、NphT7 の伸長基質は malonyl-CoA であり、KAS III とは異なることが強く示唆された。

表 2-2-1 NphT7 と KAS III の比活性の比較

酵素名	基質条件	比活性 ( $\mu$ mol / min / mg)
NphT7	1 mM acetyl-CoA + 1 mM malonyl-CoA	8.9
NphT7	1 mM malonyl-CoA	1.8
ecKASIII	0.1 mM acetyl-CoA + 5 mM malonyl-CoA	0.093
saKASIII	0.1 mM hexanoyl-CoA + 1 mM malonyl-CoA	0.014



**図 2-2-2** 各反応溶液の HPLC 分析結果

図中において、ピーク上部の番号は以下の化合物を示す。1、CoA。2、acetoacetyl-CoA。3、malonyl-CoA。また、クロマトグラムの上部に、対応する分析試料を示した。クロマトグラフは CoA 誘導体に由来する 259 nm の吸収極大の追跡により作成した。



### 第三節 Acetoacetyl-CoA 合成における acetyl 基取り込みの検討

本章第二節の実験結果から、NphT7 は acetyl-CoA の有無関わらず acetoacetyl-CoA を合成することを明らかにした。そこで、開始基質存在下において、真に acetyl 基が産物の acetoacetyl-CoA に取り込まれているか否かを検討した。

#### 実験

1 mM の[1,2-<sup>13</sup>C]acetyl-CoA (99% atom)と 1 mM malonyl-CoA の基質を含む反応溶液(本章第二節、表 1-2-1 参照) 50  $\mu$ L に、15  $\mu$ g の NphT7 (終濃度 0.3 mg / mL) を添加して、30°C で 2 分間反応させた。その後、分析試料 100  $\mu$ L を HPLC により分析して、分取した acetoacetyl-CoA に由来するピークを LC-MS により分析した。

#### 結果

LC-MS の分析結果を図 2-3-1 に示す。分析の結果、852.1353 の m/z 値が検出された。これは、[1,2-<sup>13</sup>C]acetyl-CoA と malonyl-CoA の縮合産物である [3,4-<sup>13</sup>C] acetoacetyl-CoA の m/z 理論値から計算した[M(C<sub>23</sub><sup>13</sup>C<sub>2</sub>H<sub>40</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub>P<sub>3</sub>S)-H]<sup>-</sup> = 852.1352 と一致した。従って、NphT7 は acetyl-CoA 存在下では、真にその acetyl 基を取り込むことが確認できた。興味深いことに、850.1302 の m/z 値が同時に検出された。これは、<sup>13</sup>C で標識されていない acetoacetyl-CoA の m/z 理論値から計算した [M(C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub>P<sub>3</sub>S)-H]<sup>-</sup> = 850.1285 と一致する。これは、malonyl-CoA の脱炭酸により生成された acetyl-CoA の取り込みにより合成されたと考えられる。従って NphT7 は、1 mM の基質存在下では開始基質と伸長基質からの acetoacetyl-CoA と、伸長基質のみからの acetoacetyl-CoA 合成を平行して触媒することが示唆された。しかし、1 mM という基質濃度は in vivo では実現が難しい高い濃度であり、in vitro における人工的な活性であることが推測される。

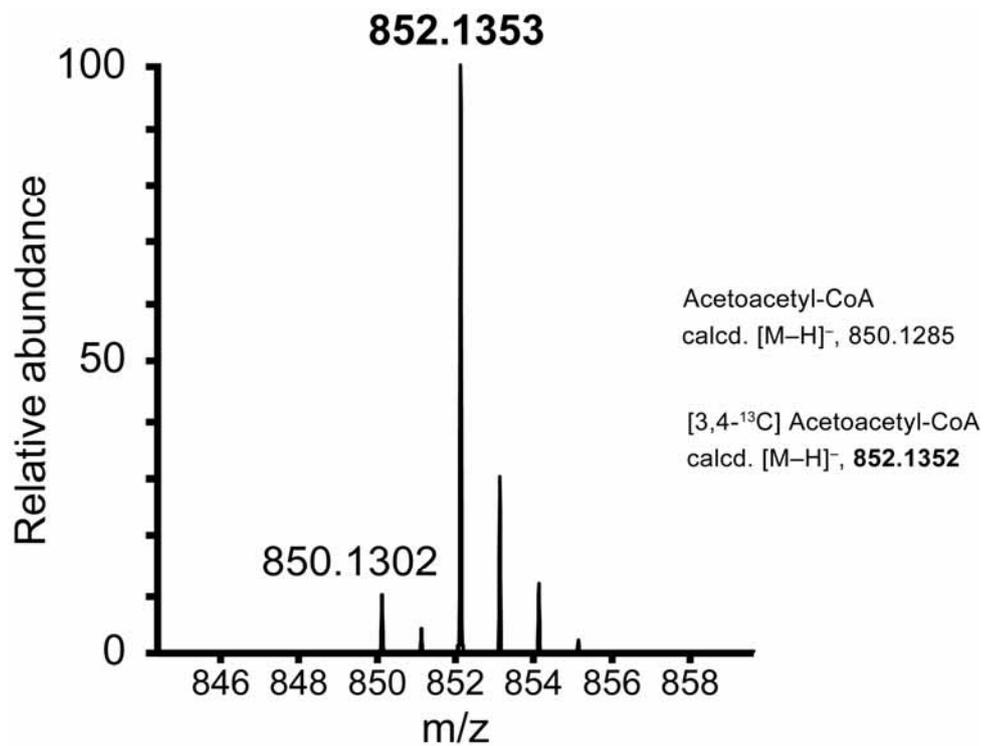
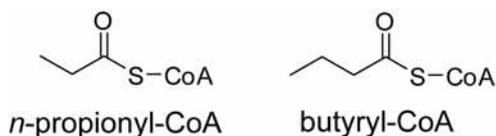


図 2-3-1 LC-MS 分析結果

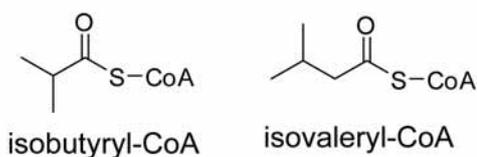
図は[1,2-<sup>13</sup>C]acetyl-CoA と malonyl-CoA の縮合により生成された acetoacetyl-CoA の MS スペクトルを示す。産物である[3,4-<sup>13</sup>C]acetoacetyl-CoA と <sup>13</sup>C 非標識の acetoacetyl-CoA 合成が検出された。検出は negative mode で行った。

#### 第四節 基質特異性解析

脱炭酸型の酵素は多様な開始基質特異性を有している (序論参照)。NphT7 は脱炭酸型の酵素であることが強く示唆されたことから、その開始基質特異性を検討した。また、伸長基質特異性についても検討した。開始基質特異性の検討では、acetyl-CoA の代替として *n*-propionyl-CoA、butyryl-CoA、isobutyryl-CoA または isovaleryl-CoA を用いた。また伸長基質特異性の検討では malonyl-CoA の代替として methylmalonyl-CoA を用いた (図 2-4-1)。



直鎖 acyl-CoA (開始基質)



分岐鎖 acyl-CoA (開始基質)

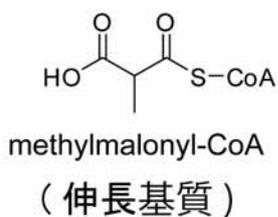


図 2-4-1 基質特異性の検討に用いる開始基質および伸長基質

## 実験

反応溶液50  $\mu\text{L}$  (表2-4-1) に150  $\mu\text{g}$  のNphT7 (終濃度3 mg / mL) を添加して、30°Cで10分間反応させた。その後、分析試料をHPLCにより分析した。開始基質と伸長基質の縮合産物が観察された場合には、そのピークを分取してLC-MS分析を行った。なお、開始基質特異性の検討では伸長基質としてmalonyl-CoAを用いた。また伸長基質特異性の検討では開始基質としてacetyl-CoAを用いた。

表 2-4-1 反応溶液組成

100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM	開始基質
1 mM	伸長基質
1 mM	Dithiothreitol

## 結果

分析の結果、*n*-propionyl-CoA を開始基質に用いた場合、そのピーク(5、保持時間10.8分)消費にともない、未知のピーク(6、保持時間10.4分)が検出された(図2-4-2 A)。このピークを分取してLC-MSにより分析したところ、864.1450 および 886.1252 の *m/z* 値が検出された(図2-4-3 A)。これらはそれぞれ、*n*-propionyl-CoA と malonyl-CoA の縮合産物である 3-oxo-pentanoyl-CoA の *m/z* 理論値から計算した  $[\text{M} (\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_{18}\text{P}_3\text{S})-\text{H}]^- = 864.1442$  と  $[\text{M} (\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{NaO}_{18}\text{P}_3\text{S})+\text{Na}-2\text{H}]^- = 886.1261$  に一致した。また、isobutyryl-CoA を開始基質に用いた場合、そのピーク(7、保持時間11.6分)消費にともない、未知のピーク(8、保持時間11.2分)が検出された(図2-4-2 B)。このピークからは、878.1589 および 900.1401 の *m/z* 値が検出された(図2-4-3 B)。これらはそれぞれ isobutyryl-CoA と malonyl-CoA の縮合産物である 4-methyl-3-oxo-pentanoyl-CoA の *m/z* 理論値から計算した  $[\text{M} (\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_{18}\text{P}_3\text{S})-\text{H}]^- = 878.1598$  と  $[\text{M} (\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{NaO}_{18}\text{P}_3\text{S})+\text{Na}-2\text{H}]^- = 900.1418$  に一致した。

開始基質に *n*-propionyl-CoA や isobutyryl-CoA を用いた場合とは対照的に、butyryl-CoA および isovaleryl-CoA を用いた場合には、それら基質の消費と未知のピークは検出されなかった(図2-4-2 D、E)。

Methylmalonyl-CoA を伸長基質に用いた場合、そのピーク(9)の保持時間は CoA と同一であったため、変化は検出できなかった。しかし、開始基質である acetyl-CoA の

ピーク消費にともない、*n*-propionyl-CoA と同一の保持時間であるピーク(5)と未知のピーク(10、保持時間 10.3 分)検出された(図 2-4-2 C)。これらのピークを LC-MS により分析したところ、5 のピークから 822.1304 および 844.1139 の *m/z* 値が検出された(図 2-4-3 C)。これらはそれぞれ *n*-propionyl-CoA の *m/z* 理論値から計算した  $[M(C_{24}H_{40}N_7O_{17}P_3S)-H]^- = 822.1336$  と  $[M(C_{24}H_{40}N_7NaO_{17}P_3S)+Na-2H]^- = 844.1155$  に一致しており、methylmalonyl-CoA の脱炭酸によって生成したと推測される。一方、10 のピークからは 864.1436 および 886.1239 の *m/z* 値が検出された(図 2-4-3 D)。これは、acetyl-CoA と methylmalonyl-CoA の縮合により生成したと推測される 2-methyl-3-oxo-butanoyl-CoA の *m/z* 理論値から計算した  $[M(C_{26}H_{42}N_7O_{18}P_3S)-H]^- = 864.1442$  と  $[M(C_{26}H_{42}N_7NaO_{18}P_3S)+Na-2H]^- = 886.1261$  に一致した。

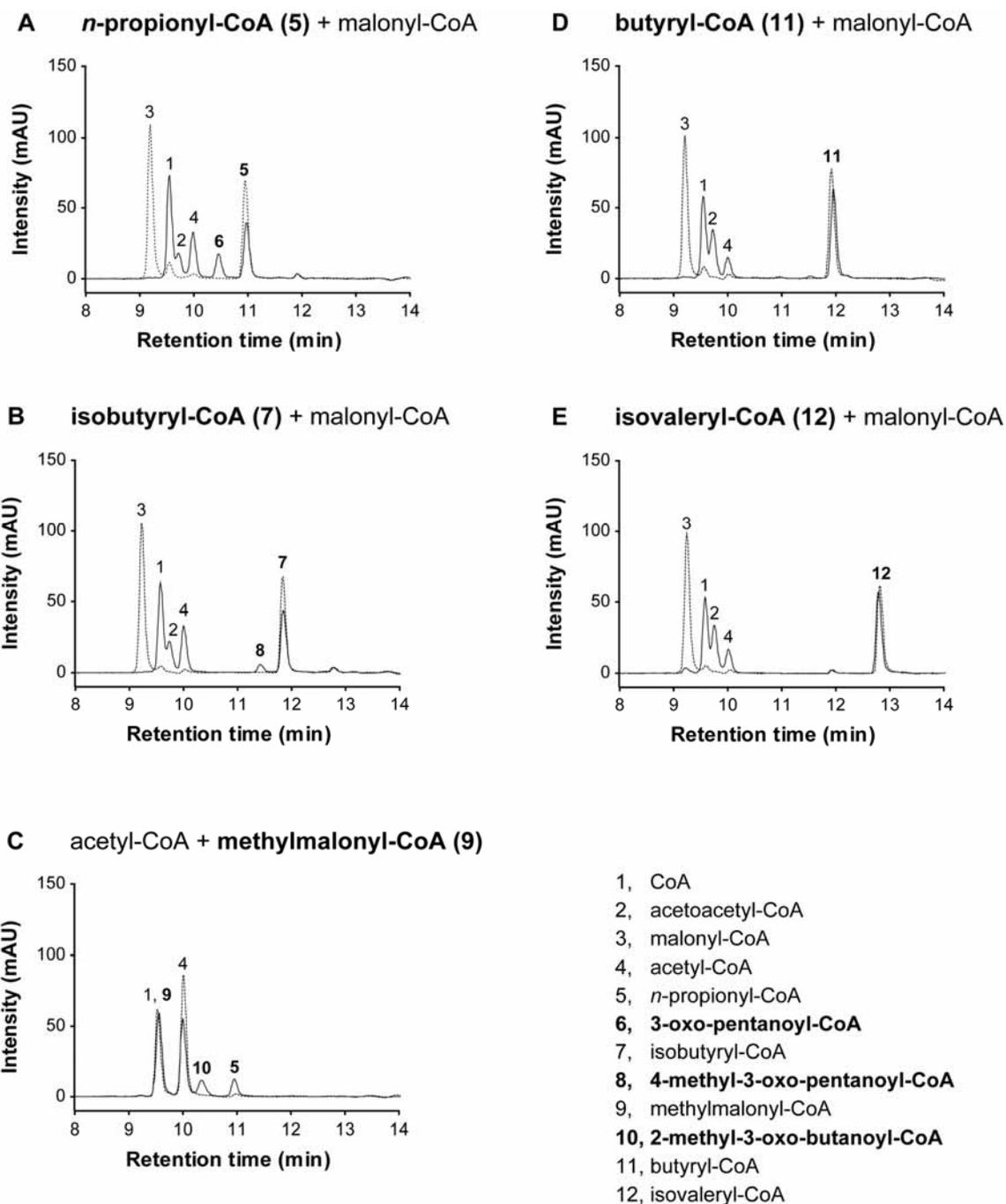


図 2-4-2 反応溶液の HPLC 分析結果

1 mM の開始基質と伸長基質において反応させた。反応溶液における開始基質と伸長基質の組み合わせを各クロマトグラム上部に示した。また各ピーク番号に対応する化合物名を図右最下部に示した。なお、太字の番号はマススペクトル (図 2-4-3) から推測される化合物名を示す。

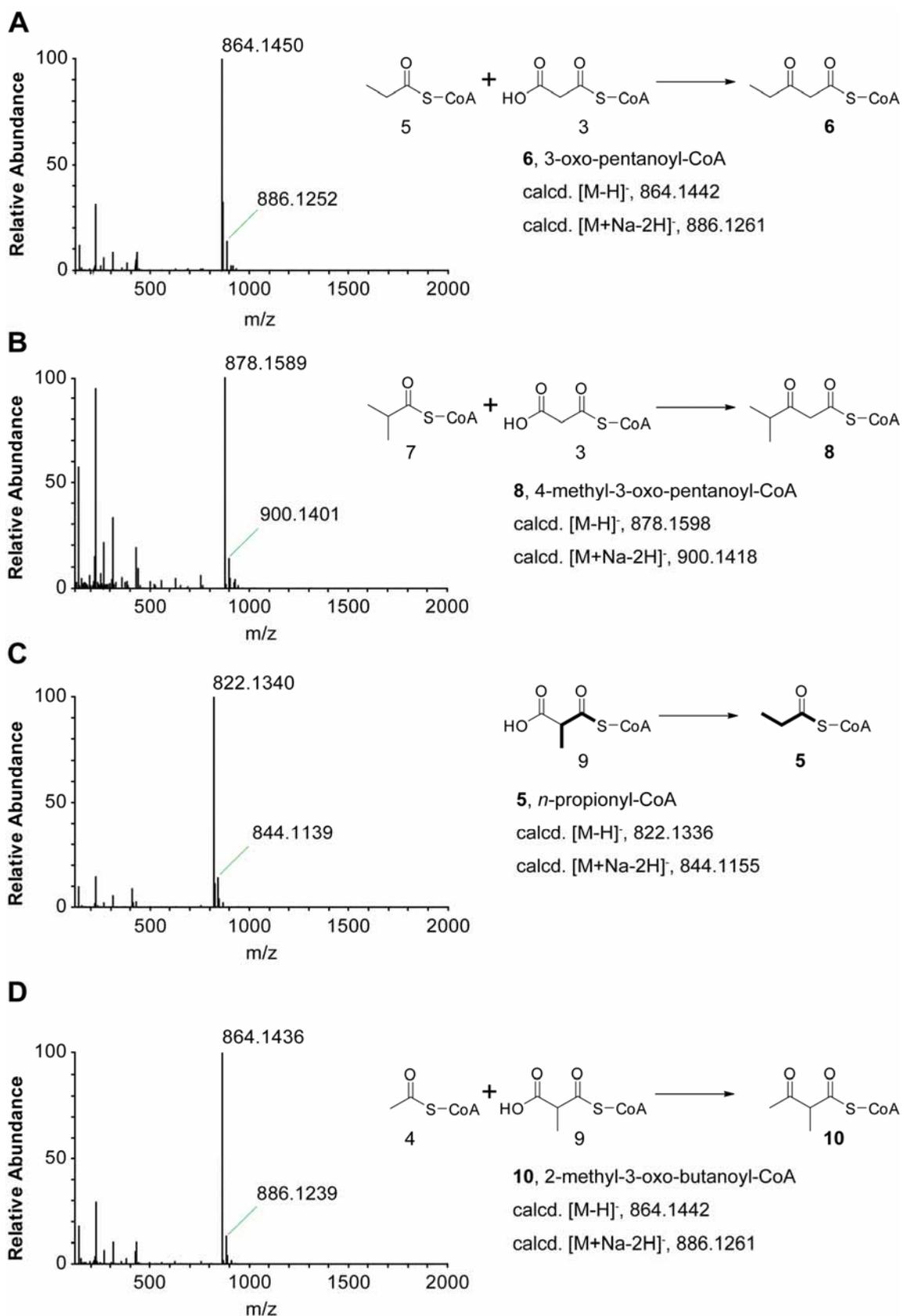


図 2-4-3 未知ピークの LC-MS 分析結果

マススペクトルの右側に反応産物生成の推定反応を示した。また、各化合物の下部に示した番号は、

図 2-4-2 のピーク上部に示した番号に対応する。

*n*-propionyl-CoA および isobutyryl-CoA を開始基質として用いた場合には反応産物が検出されたので、ピーク面積からそれら開始基質の消費量を求めて、比活性を算出した。また、methylmalonyl-CoA に関しては、acetyl-CoA の消費量をもとに比活性を算出した。これらの比活性を、acetyl-CoA と malonyl-CoA を基質とした場合の比活性と比較すると、NphT7 は acetyl-CoA と malonyl-CoA を特異的に利用する酵素であることが判明した(表 2-4-2)。なお、マススペクトルの結果から 3-oxo-pentanoyl-CoA および 2-methyl-3-oxo-butanoyl-CoA と推測される化合物は、化学式が同一であるため、NMR による構造決定を行う必要がある。

表 2-4-2 各基質条件下における NphT7 の比活性の比較

開始基質	伸長基質	比活性 ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ )
<i>n</i> -propionyl-CoA	malonyl-CoA	0.012
isobutyryl-CoA	malonyl-CoA	0.009
acetyl-CoA	methylmalonyl-CoA	0.012
acetyl-CoA	malonyl-CoA	8.906

全反応溶液において、2 分子の malonyl-CoA を基質とする acetoacetyl-CoA 合成活性が検出されるとともに、acetyl-CoA が検出された。この acetyl-CoA は malonyl-CoA の脱炭酸反応により生成した $\alpha$ -anion 中間体が、開始基質と縮合できずに水溶液中からプロトンを得て生成したと考えられる。これは、本来の開始基質である acetyl-CoA とその他の開始基質が、NphT7 の活性中心において競合した結果引き起こされた現象であると推測される。縮合産物が検出されなかった butyryl-CoA や isovaleryl-CoA を開始基質として反応系に添加した場合においても acetyl-CoA が検出されたことは、これら 2 つの開始基質が NphT7 の活性中心において、malonyl-CoA の脱炭酸によって生成した acetyl-CoA と競合することを示唆している。つまり、これらの開始基質は NphT7 の活性中心によって認識されることを示唆している。しかし、butyryl-CoA と malonyl-CoA の縮合産物である 3-oxo-hexanoyl-CoA や isovaleryl-CoA と malonyl-CoA の縮合産物である 5-methyl-3-oxo-hexanoyl-CoA は主鎖の炭素数が 6 であり(図 2-4-4 F G)、この炭素数が活性中心により認識可能な炭素数を超過しているために、それら縮合産物が合成されないと推測される。従って、NphT7 は縮合産物の

主鎖炭素数が5以下となるような組み合わせの開始基質と伸長基質のみを認識することができると考えられる(図2-4-4, A-D)。ただし、縮合産物の主鎖炭素数が5となるような基質の組み合わせでも、 $\alpha$ 位にメチル基が形成される基質の組み合わせは認識できない。これは acetyl-CoA と methylmalonyl-CoA の反応溶液において、methylmalonyl-CoA の脱炭酸反応により生成された *n*-propionyl-CoA と methylmalonyl-CoA の縮合により合成される 2-methyl-3-oxo-pentanoyl-CoA (主鎖炭素数5) が検出されないことから示される (図2-4-2 C、図2-4-4 E)。

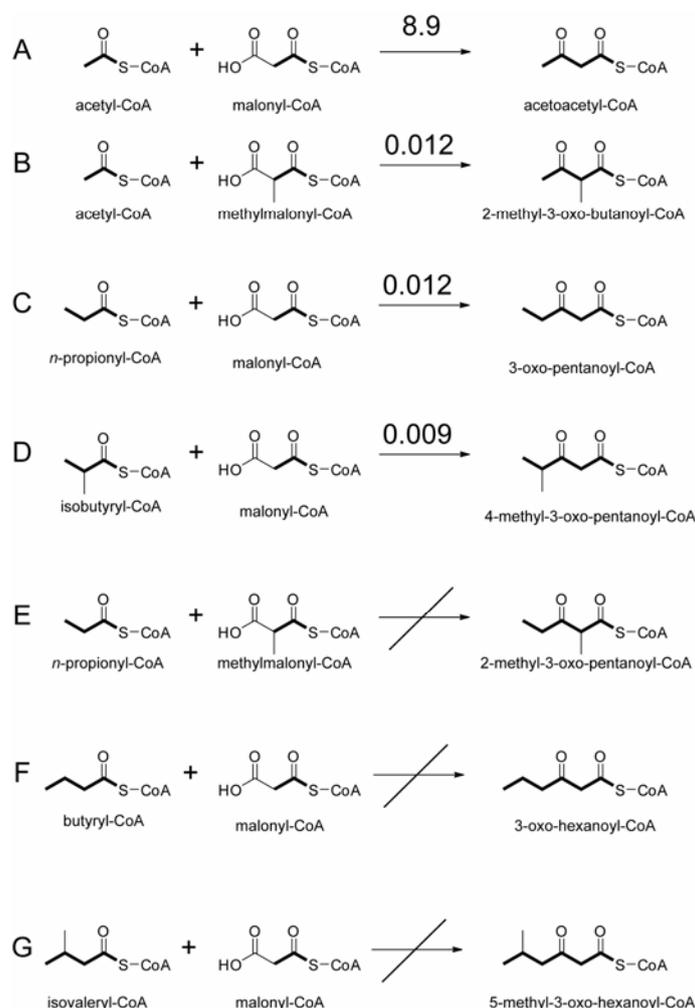


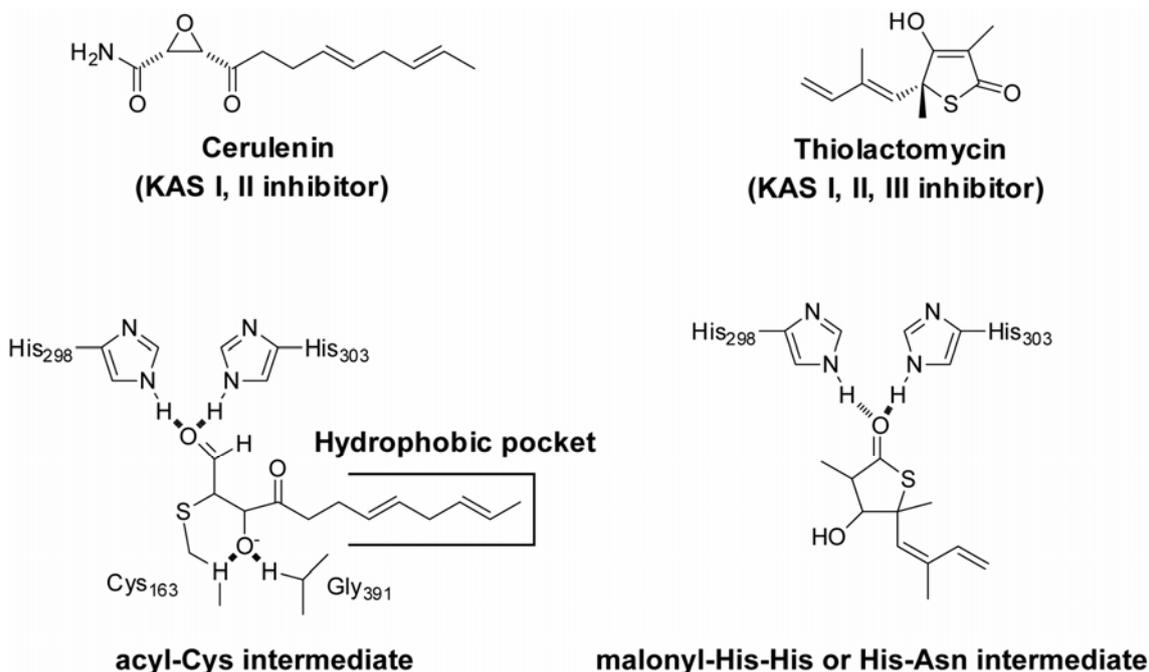
図2-4-4 NphT7の基質特異性

反応における開始基質と伸長基質、およびそれらの縮合により合成される $\beta$ -ketoacyl-CoAを示した。図中において、 $\beta$ -ketoacyl-CoAの主鎖を構成する炭素鎖を強調して示した。また、各基質の組み合わせにおいて反応産物が検出されたものに関しては、矢印の上部に比活性 ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ , 表2-4-2参照)を示した。

## 第五節 Thiolactomycin 及び cerulenin による阻害実験

Cerulenin 及び Thiolactomycin は II 型脂肪酸生合成の酵素である KAS ( $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase) の阻害剤である。Cerulenin は、KAS の活性中心において、Cys-acyl 中間体を模倣することで、KAS I、II を阻害する。KAS I と KAS II は、脂肪酸鎖の伸長反応を担い、その開始基質は長鎖 acyl-ACP である。Cerulenin は不飽和脂肪酸を有しており、KAS I、II ではこの脂肪酸が acyl 基の基質ポケットによって認識される。しかし、KAS III は KAS I および KAS II と比較してこの基質ポケットが小さいために阻害されない。一方、thiolactomycin は malonyl-ACP の malonyl 基と脱炭酸反応を担うアミノ酸残基 (KAS I と KAS II; His-His, KAS III; His-Asn) の中間体を模倣することで KAS のすべての酵素を阻害する<sup>(1, 48)</sup>(**図 2-5-1**)。

NphT7 は KAS III と相同性を示し、acetyl-CoA を開始基質とするため、cerulenin では阻害されず thiolactomycin によって阻害されると推測した。そこで、両阻害剤存在下での NphT7 の活性を検討した。



**図 2-5-1** Cerulenin 及び thiolactomycin による KAS の阻害

図上に各阻害剤の化学構造を示し、その下に阻害機構を示した。なお、阻害機構は活性中心に Cys-His-His 型残基をもつ KAS I および KAS II をモデルとして示した。KAS III の His-Asn は KAS I、II の His-His と同じ役割を担う。

## 実験

反応溶液(表2-5-1) 100  $\mu$ Lに0.6  $\mu$ gのNphT7 (終濃度 6  $\mu$ g / mL) を添加して30°Cで3分間保温した。その後、ceruleninを含む反応溶液にはacetyl-CoAを、thiolactomycinを含む反応溶液にはmalonyl-CoAを終濃度70  $\mu$ Mおよび30  $\mu$ Mとなるように添加して、30°Cで1分間反応させた。なお、negative controlおよびpositive controlとして阻害剤の溶液と等量のDMSOを添加して、熱失活させたNphT7もしくはNphT7を添加して同一の反応条件において反応させた。基質濃度はNphT7の見かけの $K_m$ 値に設定した。反応溶液を1 M MES緩衝液(pH 6.0)で2倍に希釈して15,000 g、4°Cで10分間遠心分離を行い、上清20  $\mu$ LをHPLCにより分析した。得られたクロマトグラムのピーク面積をもとに、熱失活させたNphT7の反応溶液に由来するmalonyl-CoAを基準として他のCoA誘導体の相対量を算出した。

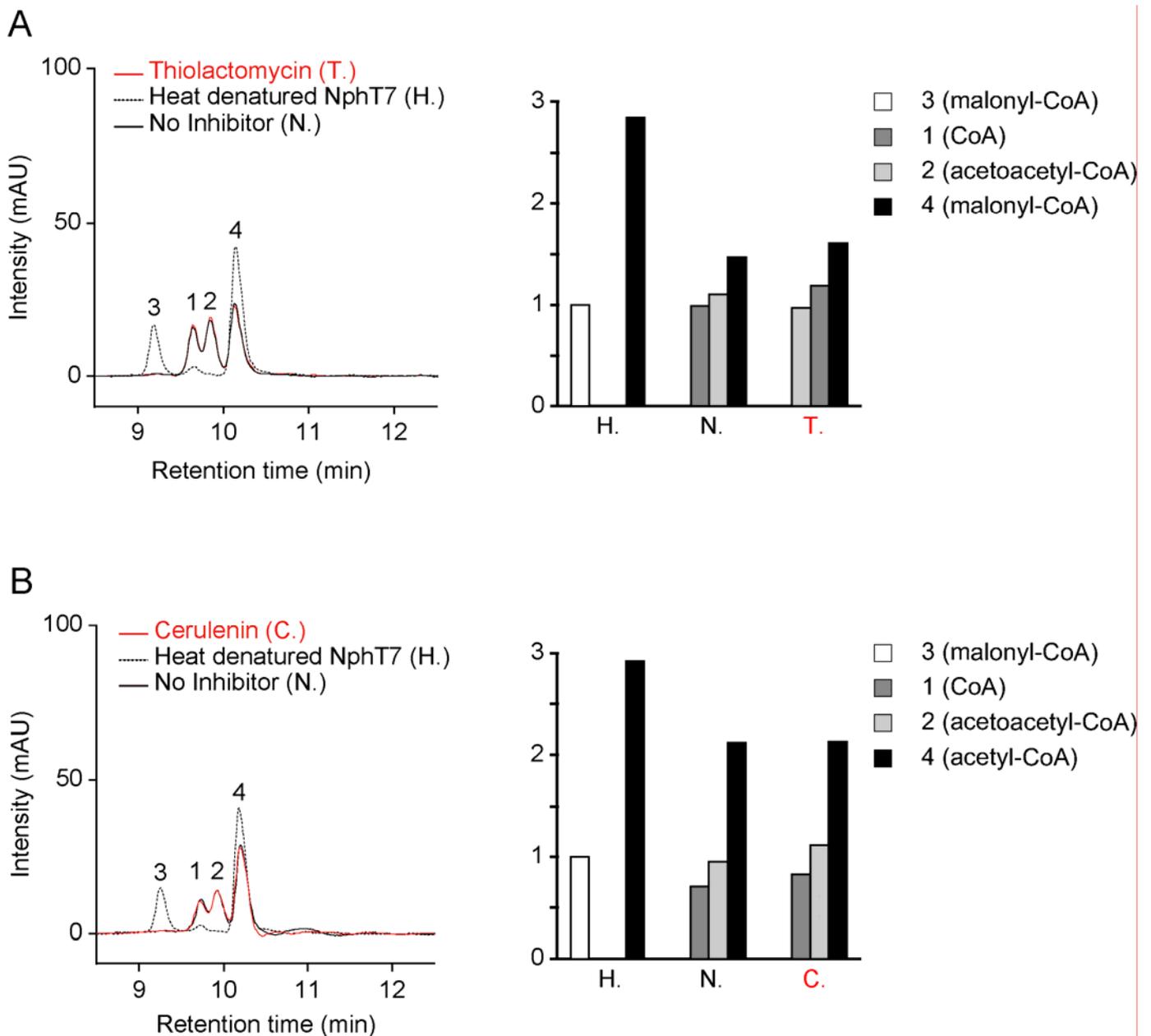
表 2-5-1 反応溶液組成

100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
70 $\mu$ M	acetyl-CoA (cerulenin の場合は最後に添加)
30 $\mu$ M	malonyl-CoA (thiolactomycin の場合は最後に添加)
1 mM	Dithiothreitol
1 mM	Cerulenin or Thiolactomycin in DMSO

## 結果

HPLC による分析の結果、cerulenin および thiolactomycin を添加した反応溶液の基質消費量は、添加しない反応溶液と変わらなかった(図 2-5-2)。本章第一節において、NphT7 が Cys-His-Asn 型の活性中心を持つことを示した。しかし、本実験により、その活性中心の構造は Cys-His-Asn 型であるものの、活性中心の空間的な配置は KAS III と異なることが示唆された。

Ceruleninを添加した反応溶液のacetyl-CoA消費量は、thiolactomycinを添加した反応溶液と比較して少ない。これは、malonyl-CoAとNphT7を先に3分間反応させることにより、malonyl-CoAのみからacetoacetyl-CoAが合成されることに由来する。



**図 2-5-2** Thiolactomyacin(A)または cerulenin(B)存在下における NphT7 の活性検討

70  $\mu$ M acetyl-CoA と 30  $\mu$ M malonyl-CoA の基質濃度において、1 mM の各阻害剤を添加して反応させた。クロマトグラムは CoA 誘導体由来の 259 nm の吸収極大をもとに作成した。各クロマトグラムの上部に、分析試料の種類を示した。また、右に熱失活させた NphT7 の反応溶液由来の malonyl-CoA のピーク面積を基準に算出した各 CoA 誘導体の相対量を示した。ピーク上部および相対量のグラフに示した番号は以下の CoA 誘導体を示す。1、CoA。2、acetoacetyl-CoA。3、malonyl-CoA。4、acetyl-CoA。

## 第六節 開始基質特異性の改変

KAS III の結晶構造解析により、その開始基質特異性を決定するアミノ酸残基に関する知見が得られている<sup>(49, 50)</sup>。NphT7 は、開始基質の消費量から算出した比活性から (本章第四節、58 ページ、**図 2-4-4**)、acetyl-CoA を特異的に開始基質とすることを示した。そこで、その開始基質に対する特異性の改変を目的として、特異性を決定するとされるアミノ酸残基に部位特異的な変異導入を行い、より長鎖の acyl-CoA を認識する酵素の作製を試みた。

結晶構造が明らかにされている *M. tuberculosis* 由来の KAS III (mtKAS III) と *E. coli* 由来 KAS III (ecKAS III)、*S. aureus* 由来 KAS III (saKAS III) の一次構造を比較した (**図 2-6-1**)。その結果、acyl 基の鎖長認識アミノ酸は(**図 2-6-1**、 印)、*M. tuberculosis* 由来の KAS III では Thr 残基であり、*E. coli* および *S. aureus* では Phe 残基であった。また、NphT7 では Gln 残基であった。そこで、NphT7 の Q90 を T もしくは F に変異させた変異酵素を作製して、その開始基質に対する特異性を検討した。

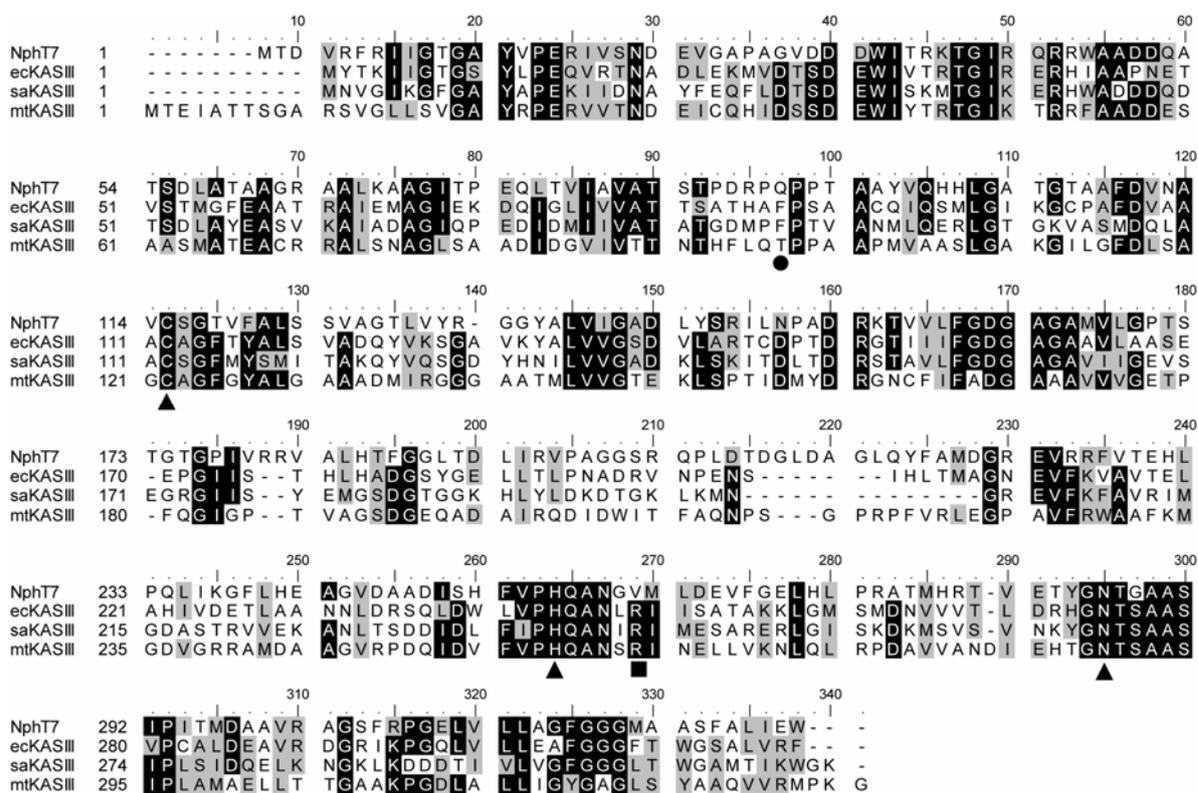


図 2-6-1 KAS III および NphT7 の一次構造比較

図において、▲ は Cys-His-Asn 残基を示す。● は ACP 認識の Arg 残基を示す。■ は開始基質の炭素鎖長を決定するとされるアミノ酸残基を示す。また、図の左に示した酵素の略語は以下の酵素を示す。なお、括弧内にその開始基質と PDB ID を示す。ecKASIII、*E. coli* 由来 KAS III (acetyl-CoA, 1HN9)。saKASIII、*S. aureus* 由来 KAS III (butyryl-CoA, 1ZOW)、mtKAS III、*M. tuberculosis* 由来 KAS III (lauroyl-CoA, 1HZP)。

## 実験

### 組換えタンパク質の取得

変異導入プライマー(表2-6-1)を設計して、QuickChange® XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いたPCRにより部位特異的な変異導入を行った。なお、鋳型としてNphT7発現用ベクターであるpHis-nphT7を用いた。PCR産物を用いて*E. coli* DH5αを形質転換させた後、プラスミドを回収してインサートのシーケンスを行い、部位特異的な変異導入を確認した。その後、*E. coli* BL21 (DE3)株を形質転換させてTB培地で培養、IPTG誘導により目的の組換えタンパク質を発現させた。その後、発現させたタンパク質NphT7-Q90TおよびNphT7-Q90FをNi-NTAアフィニティー精製により精製した。詳細は実験の部に記載した。

表 2-6-1 部位特異的な変異導入用プライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3' )
NphT7-Q90T_N	CCGGACCGGCCGACGCCGCCACGGCG
NphT7-Q90T_C	GGCCTGGCCGGCTGCGGCGGGTGCCGC
NphT7-Q90F_N	CCGGACCGGCCGTCCCCGCCACGGCG
NphT7-Q90F_C	GGCCTGGCCGGCAAGGGCGGGTGCCGC

### 酵素活性検定

1 mMの開始基質とmalonyl-CoA (伸長基質) を含む反応溶液 (53ページ、表2-4-1参照) 50 μLに、70 μg のNphT7-Q90T (終濃度1.4 mg / mL) もしくは80 μgのNphT7-Q90F (終濃度1.6 mg / mL) を添加して、30°Cで10分間反応させた。その後、分析試料をHPLCにより分析した。開始基質とmalonyl-CoAの縮合産物が検出された場合には、ピーク面積からそれら開始基質の消費量を求め、その比活性を算出した。本実験では開始基質として*n*-propionyl-CoA、butyryl-CoA、isobutyryl-CoAまたはisovaleryl-CoAを用いた(52ページ、図2-4-1参照)。

## 結果

### 組換えタンパク質の取得

発現精製の結果、NphT7-Q90T および NphT7-Q90F を可溶性の精製組換えタンパク質として取得した(図 2-6-2)。

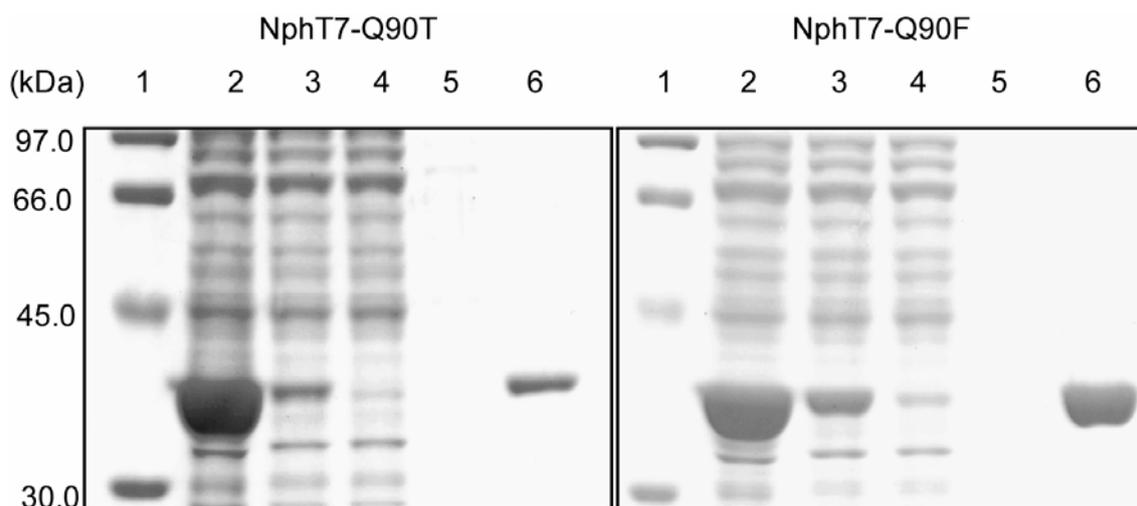


図 2-6-2 組換えタンパク質の SDS-PAGE

ゲル上の番号は以下の試料を示す。1、Low molecular weight marker。2、超音波波砕画分。3、上清画分。4、Ni-NTA 非吸着画分。5、洗浄画分。6、溶出画分。SDS-PAGE では 10%ポリアクリルアミドゲルを用いた。

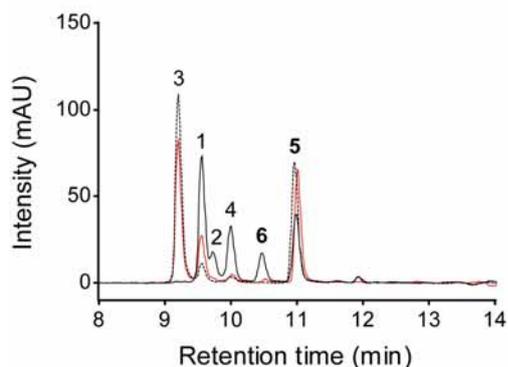
## 酵素活性検定

NphT7-Q90F と NphT7-Q90T 反応溶液のクロマトグラムを、**図 2-6-3** と **図 2-6-4** に示す。なお、これらのクロマトグラムには、野生型酵素と比較するために本章第四節 (55 ページ、**図 2-4-2**) において取得した NphT7 反応溶液のクロマトグラムを重ねて示した。NphT7-Q90F 反応溶液では、開始基質の消費と縮合産物の合成は検出されなかった (**図 2-6-3 A-D**)。これには NphT7 が本来有している malonyl-CoA のみからの acetoacetyl-CoA 合成も含まれる。一方、NphT7-Q90T 反応溶液では、*n*-propionyl-CoA を開始基質として含む場合にのみ、その縮合産物と考えられる 3-oxo-pentanoyl-CoA の合成が検出された。そのピーク面積は NphT7 と比較して増大しており (**図 2-6-4 A**)、比活性を算出した結果、0.041  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  であった。この値は、NphT7 と比較して 3.3 倍高い値である (**表 2-6-2**)。NphT7-Q90T 反応溶液において、malonyl-CoA のみからの acetoacetyl-CoA 合成と副反応である acetyl-CoA の生成が検出されないことを考えると、NphT7-Q90T の活性中心は *n*-propionyl-CoA を特異的に認識するように変化したと考えられ、その特異性変換に成功したと考えられる。

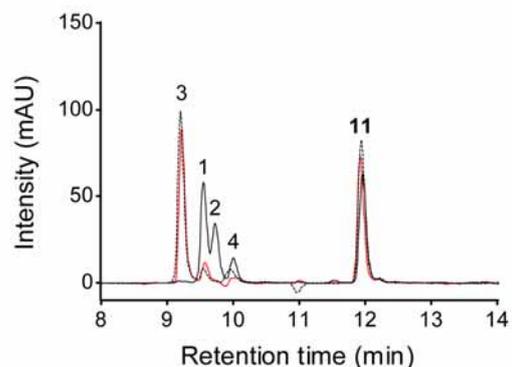
**表 2-6-2** NphT7 および NphT7-Q90T の *n*-propionyl-CoA 消費に基づく比活性

酵素名	基質濃度	比活性 ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ )
NphT7	1 mM <i>n</i> -propionyl-CoA + 1 mM malonyl-CoA	0.012
NphT7-Q90T	1 mM <i>n</i> -propionyl-CoA + 1 mM malonyl-CoA	0.041

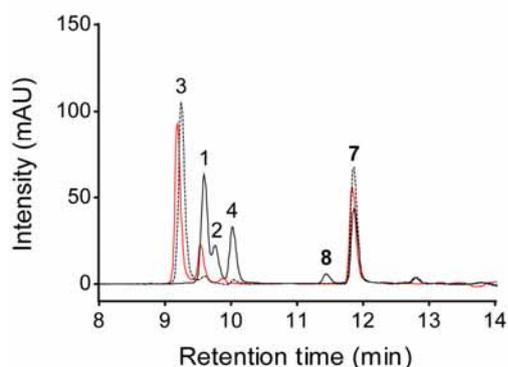
**A** *n*-propionyl-CoA (5) + malonyl-CoA



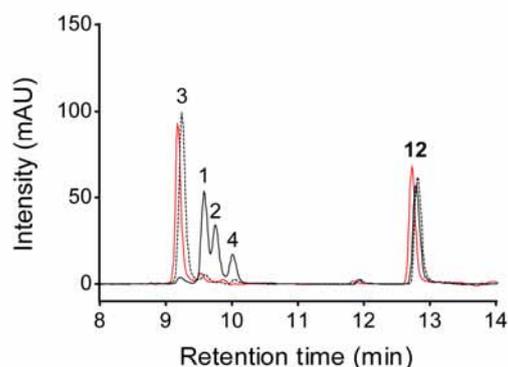
**C** butyryl-CoA (11) + malonyl-CoA



**B** isobutyryl-CoA (7) + malonyl-CoA



**D** isovaleryl-CoA (12) + malonyl-CoA



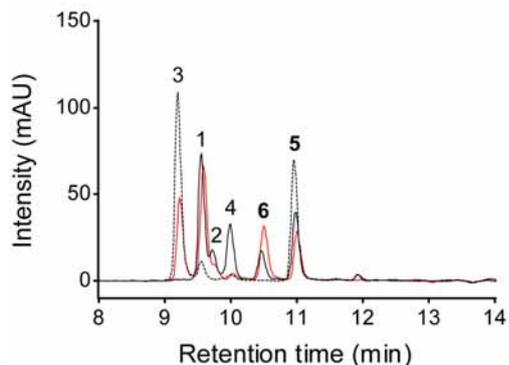
— NphT7-Q90F 反応溶液  
— NphT7 反応溶液  
..... 熱失活NphT7 反応溶液

- 1, CoA
- 2, acetoacetyl-CoA
- 3, malonyl-CoA
- 4, acetyl-CoA
- 5, *n*-propionyl-CoA
- 6, 3-oxo-pentanoyl-CoA
- 7, isobutyryl-CoA
- 8, 4-methyl-3-oxo-pentanoyl-CoA
- 11, butyryl-CoA
- 12, isovaleryl-CoA

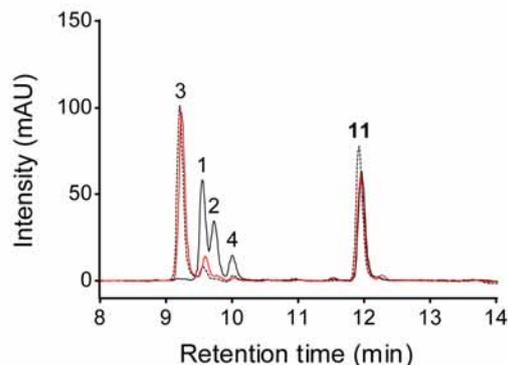
**図 2-6-3** NphT7-Q90F 反応溶液の HPLC 分析結果

各クロマトグラムの上部に、基質の組み合わせを示した。また、図の左最下部にクロマトグラムの線種が示す反応溶液を示した。また右最下部にピーク番号が示す CoA 誘導體名を示した。ピーク番号は、本章第四節 (55 ページ、**図 2-4-2**)に準じた。クロマトグラムは CoA 誘導體に由来する 259 nm の吸収極大を追跡して作成した。

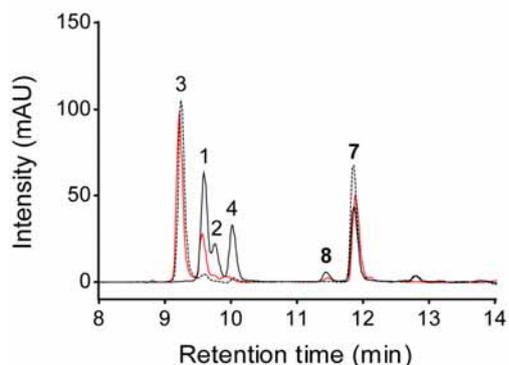
**A** *n*-propionyl-CoA (5) + malonyl-CoA



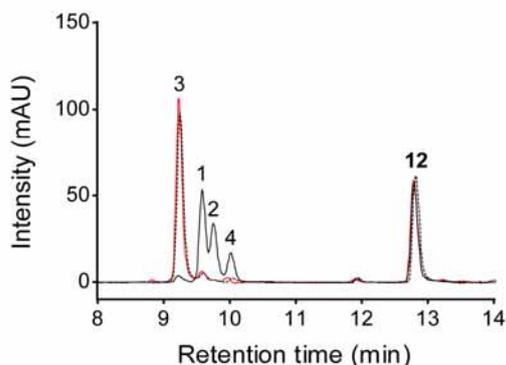
**C** butyryl-CoA (11) + malonyl-CoA



**B** isobutyryl-CoA (7) + malonyl-CoA



**D** isovaleryl-CoA (12) + malonyl-CoA



— NphT7-Q90T 反応溶液  
— NphT7 反応溶液  
..... 熱失活NphT7 反応溶液

1, CoA  
2, acetoacetyl-CoA  
3, malonyl-CoA  
4, acetyl-CoA  
5, *n*-propionyl-CoA  
6, 3-oxo-pentanoyl-CoA  
7, isobutyryl-CoA  
8, 4-methyl-3-oxo-pentanoyl-CoA  
11, butyryl-CoA  
12, isovaleryl-CoA

**図 2-6-4** NphT7-Q90T 反応溶液の HPLC 分析結果

各クロマトグラムの上部に、基質の組み合わせを示した。また、図の左最下部にクロマトグラムの線種が示す反応溶液を示した。また右最下部にピーク番号が示す CoA 誘導体名を示した。ピーク番号は、本章第四節 (55 ページ、**図 2-4-2**)に準じた。クロマトグラムは CoA 誘導体に由来する 259 nm の吸収極大を追跡して作成した。

## 第七節 考察

NphT7 は、比活性の比較により acetyl-CoA と malonyl-CoA を特異的に利用する酵素であることが示された。さらに、Cys 残基と His 残基を Ala 残基に変異させた酵素の活性は、NphT7 が Cys-His-Asn 型の活性中心を有する脱炭酸型の酵素であることを強く示唆する。開始基質の認識に関しては、acyl 基認識に関与すると考えられているアミノ酸に変異を導入することで、より長鎖の開始基質を認識する酵素の作製に成功した。一方で、Q90F 変異酵素が活性を完全に消失したことは予想外であった。なぜならば、NphT7 の開始基質特異性は *E. coli* KAS III と同一であるにも関わらず、同じアミノ酸残基に置換したことにより酵素活性が失われたことになるからである。この実験結果と、KAS III は thiolactomycin により阻害されるのに対して NphT7 は阻害されないことから考えて、その細部の反応機構は KAS III と異なることが推測される。

KAS III はバクテリアが特異的に有する酵素であることから抗生物質の標的分子として古くから注目されており、その阻害剤の探索が盛んに行われている<sup>(51)</sup>。本章の実験結果、ならびに NphT7 の結晶構造は、KAS III の阻害剤をデザインする上で潜在的に有用な情報を提供することができると思われる。

## 第三章

### NphT7 の in vivo における機能解析

## 第一節 メバロン酸の異種生産における *nphT7* 発現の効果

*NphT7* の in vivo における活性を検討するため、acetoacetyl-CoA からメバロン酸までの合成を担う酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA synthase (*nphT6*) および HMG-CoA reductase の遺伝子 (*nphT5*) を *nphT7* とともに *S. albus* において発現させて、その形質転換体によって生産されるメバロン酸量を比較した。

## 実験

*Streptomyces* sp. CL190 株由来のメバロン酸経路遺伝子クラスターを保持するクローニングベクターである pUMV181 を *nphT7* の下流に存在する AccIII で制限酵素処理した。その後平滑化を行い、*nphT6* に存在する Sse8387I で制限酵素処理して、*nphT6* の C 末端部分配列と *nphT7* を保持する 2.1 kb の DNA 断片を取得した。一方、大腸菌-放線菌シャトルベクターである pSE101 (thiostrepton 耐性マーカー)<sup>(52)</sup> に *nphT5* と *nphT6* のクラスターをクローニングした pSEMV25<sup>(53)</sup> を、pSE101 に存在する HindIII で制限酵素処理して平滑化した後、さらに Sse8387I で制限酵素処理して 8.7 kb の DNA 断片を得た。pSE101 のベクター配列、*nphT7* および *nphT6* の N 末端部分配列を保持する本断片と 2.1 kb の断片をライゲーションして、*nphT5* から *nphT7* を保持する pSEMV40 を構築した (図 3-1-1)。

構築した pSEMV40、pSEMV25 および空ベクターである pSE101 により放線菌 *Streptomyces albus* G153 株をプロトプラスト法により形質転換させた。各形質転換体を thiostrepton の重層および *nphT6* と *nphT7* のプライマー (表 3-1-1) を用いた colony directed PCR により選択した後、目的の形質転換体を YEME-thiostrepton 液体培地 10 mL (試験管、thiostrepton 終濃度 30 µg / mL) で 30°C、3 日間前培養した。この前培養液を KG-thiostrepton 培地 10 mL (試験管、thiostrepton 終濃度 30 µg / mL) に 1% 植菌して 30°C で 9 日間培養した。培養期間中の 4 日目から 9 日目まで、1 日ごとに培養液を回収して、培養液中のメバロン酸量を分析した。

培養液中のメバロン酸は以下の方法により抽出分析した。培養液の遠心分離により得た上清 1 mL に、リン酸を滴下して pH 2.0 に調整した。その後、2 mL の酢酸エチルにより 2 回抽出を行い、有機層を回収した。有機層に硫酸ナトリウムを添加して脱水を行い、遠心エバポレーターにより有機層を除去した。残渣を 100 µL の 2-プロパノールで溶解させた後、これを HPLC により分析した。HPLC の分析条件を表 3-1-2 に示す。

分析により得られたピーク面積をもとに、上清中のメバロン酸濃度を算出して、各培養日数での菌体乾重量あたりのメバロン酸生産量を算出した。なお、各培養は3連で行い、測定誤差を算出した。

**表 3-1-1 増幅用プライマー**

プライマー名	塩基配列 (5' →3' )
NphT7_N	GGGGGATCCACCGACGTCCGATTCCGC
NphT7_C	GGGGAATTCTACCACTCGATCAGGGCGC
NphT6_N	GGGGCATGCTCCATCTCCATAGGCATTAC
NphT6_C	CCCAAGCTTCTAGCGCGCCTCGTAGATGCG

**表 3-1-2 メバロン酸の分析条件**

カラム	AQUASIL C18 (4.0×150 mm、5 μm、センシユウ科学)
分析温度	40°C
溶媒 A	0.1% acetate + 0.1% triethylamine in water
溶出条件	isocratic (100% A、30 分)
流速	1.0 mL / min
検出器	示唆屈折率検出器 (RI-74、昭和電工)

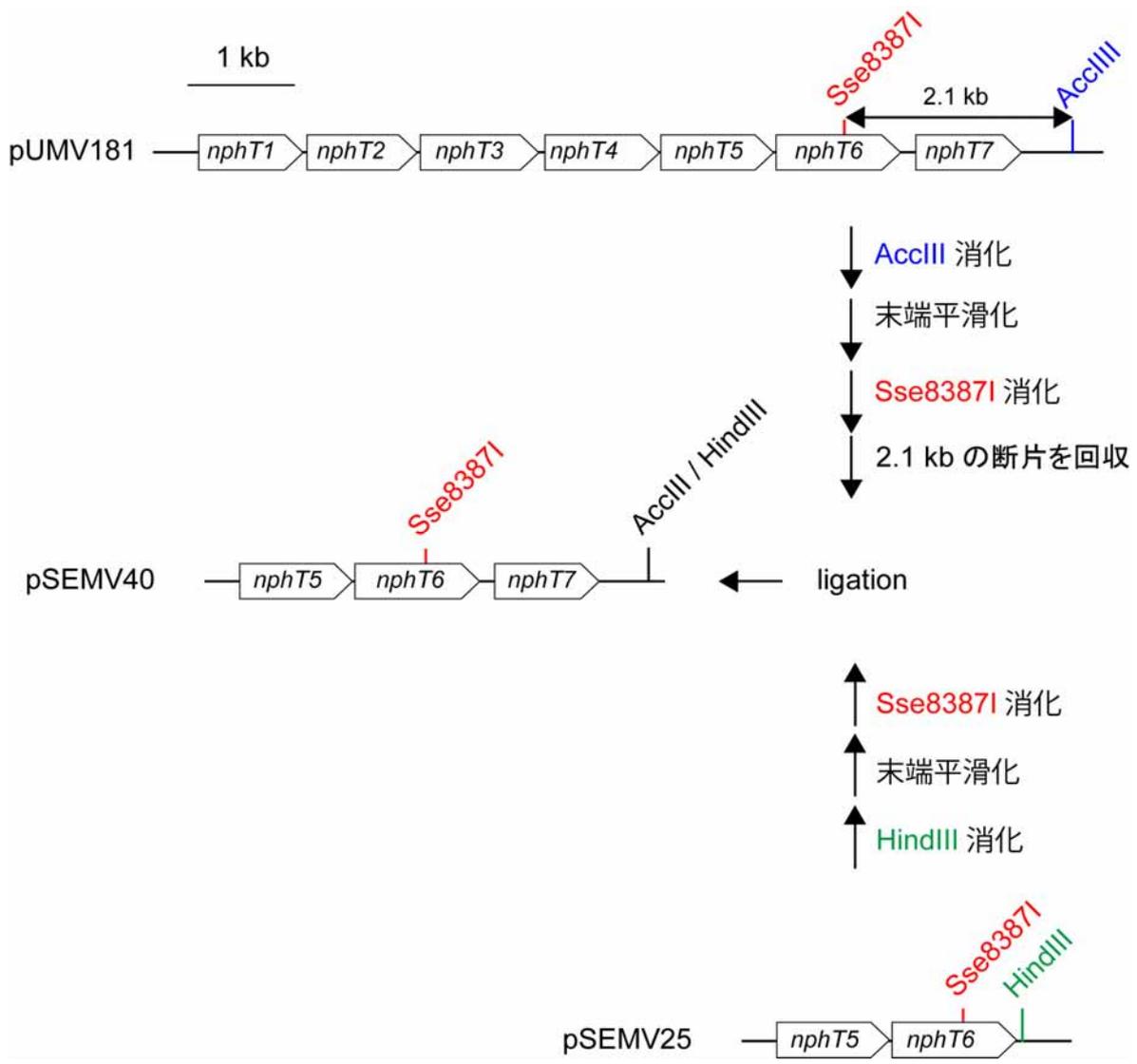


図 3-1-1 pUMV181、pSEMV25 および pSEMV40 のベクターマップ

pUMV181 から切り出した *AccIII*-*Sse8387I* 断片 (*AccIII* は平滑化) を pSEMV25 の *Sse8387I*-*HindIII* 部位 (*HindIII* は平滑化) に挿入して構築した。

## 結果

各培養日数における菌体乾重量あたりのメバロン酸生産量を図 3-1-2 に示す。pSE101 を保持した形質転換体ではメバロン酸の生産は検出されなかった。一方、pSEMV25 を保持した形質転換体では培養 9 日目において、 $109 \pm 9$  mg / g のメバロン酸を生産していた。pSEMV40 を保持した形質転換体では培養 8 日目において、 $379 \pm 55$  mg / g のメバロン酸を生産しており、pSEMV25 と比較しておよそ 3 倍高い生産量であった。これは、宿主内においてメバロン酸の前駆体である acetoacetyl-CoA が *nphT7* により供給されたことを示し、in vitro と同様に in vivo においても acetoacetyl-CoA 合成酵素として機能したことを示している。

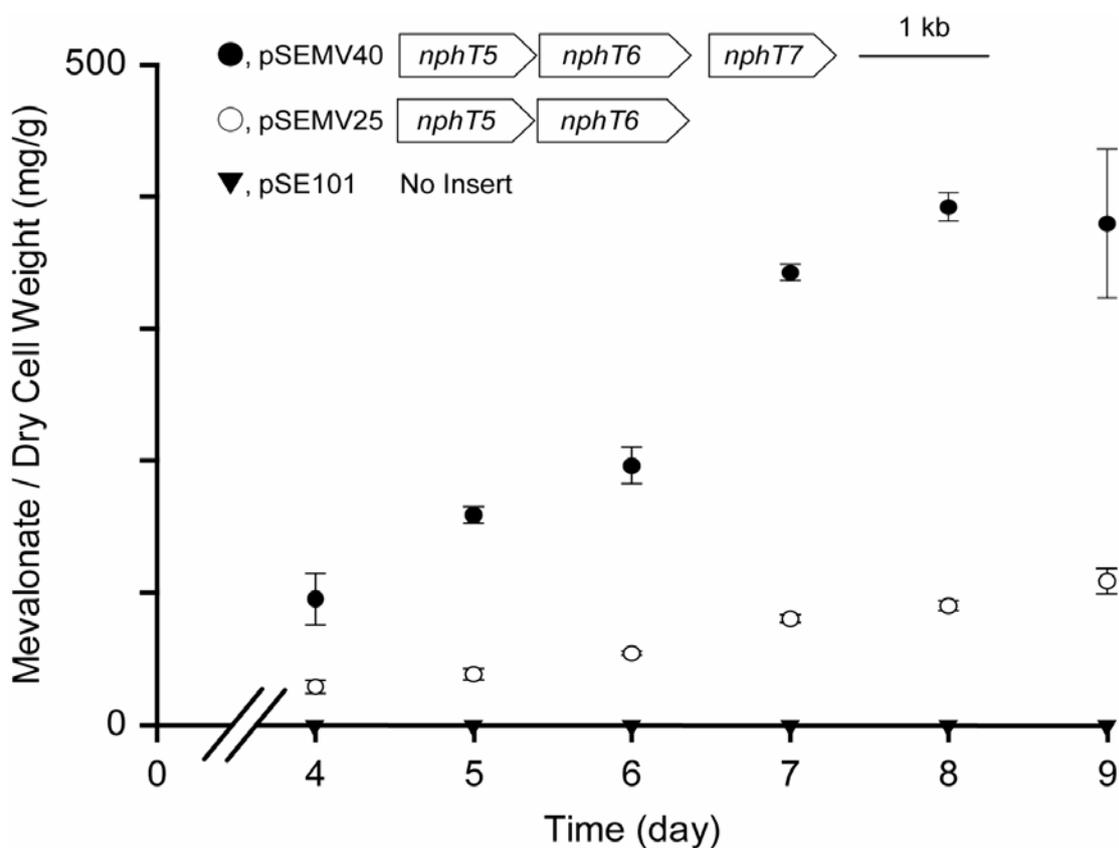


図 3-1-2 菌体乾重量あたりのメバロン酸生産量の比較

上部に、形質転換体が保持するプラスミドとその標識を示した。各形質転換体は 9 日まで培養を行い、4 日から培養上清を回収した。

## 第二節 Naphterpin 生産における *nphT7* の機能解析

Naphterpin のテルペノイド骨格はメバロン酸経路に由来する。そこで、*nphT7* が本来の宿主である CL190 株において acetoacetyl-CoA 合成酵素として機能しているか否かを検討するために、その破壊株を作製して naphterpin 生産量を測定した。

CL190 株における *nphT7* の破壊は、in vitro における活性の検討結果、および本章第一節における in vivo の結果から、テルペンユニットの減少を引き起こし、ひいては naphterpin の生産量が減少すると期待して実験を行った (図 3-2-1)。

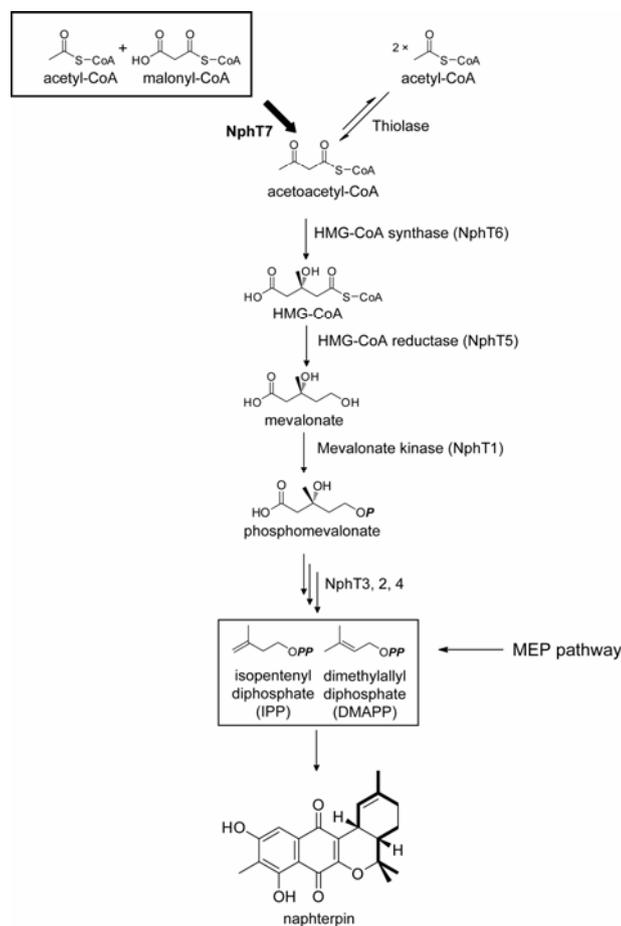


図 3-2-1 *NphT7* の CL190 株における推定機能

Naphterpin の生合成経路において、*nphT7* は、IPP および DMAPP の前駆体である acetoacetyl-CoA の供給を担うと考えられる。従って、その破壊は、IPP と DMAPP の減少を引き起こし、ひいては naphterpin の生産量も減少すると考えられる。なお、IPP と DMAPP は MEP 経路からも供給されている<sup>(54)</sup>。本実験では *nphT7* の破壊株を、野生株および mevalonate kinase をコードする *nphT1* の破壊株と比較して、その naphterpin 生産における機能を検討した。

## 実験

### 破壊株作成用プラスミドの作製

*Streptomyces* sp. CL190 株由来のメバロン酸経路遺伝子クラスターをクローニングしたプラスミドである pUMV181 を SmaI で制限処理して、*nhpT6* と *nphT7* を保持する 2.5 kb の DNA 断片を取得した。この断片を pUC119 の HincII サイトにライゲーションした後、*nphT7* の N 末端に存在する SnaBI で制限処理を行い、BglIII リンカーを同制限部位に挿入した。得られたプラスミドを BglIII により制限処理してリンカーが 1 断片挿入され、*nphT7* がフレームシフトした変異遺伝子を構築した。このベクターから HindIII と XbaI の制限処理によりインサート DNA を切り出し、pSE101 の同サイトにクローニングして破壊株作成用のプラスミド pSEΔ*nphT7* を構築した(図 3-2-2)。

### pSEΔ*nphT7* による *Streptomyces* sp. CL190 株の形質転換

pSEΔ*nphT7* を用いて、CL190 株をプロトプラスト法により形質転換した。その後、2 回交差により *nphT7* の In frame deletion が生じた株から Instagene matrix (stratagen) を用いてゲノムを抽出した。このゲノムを鋳型として *nhpT6* の N 末端と *nphT7* の C 末端プライマー(72 ページ、表 3-1-1 参照)により *nhpT6* と *nphT7* を保持する 2.2 kb の DNA 断片を増幅した。その後、この DNA 断片を BglIII により制限処理して 0.9 kb および 1.3 kb の DNA 断片に消化された株を *nphT7* 破壊株とした。詳細は実験の部に記載した。

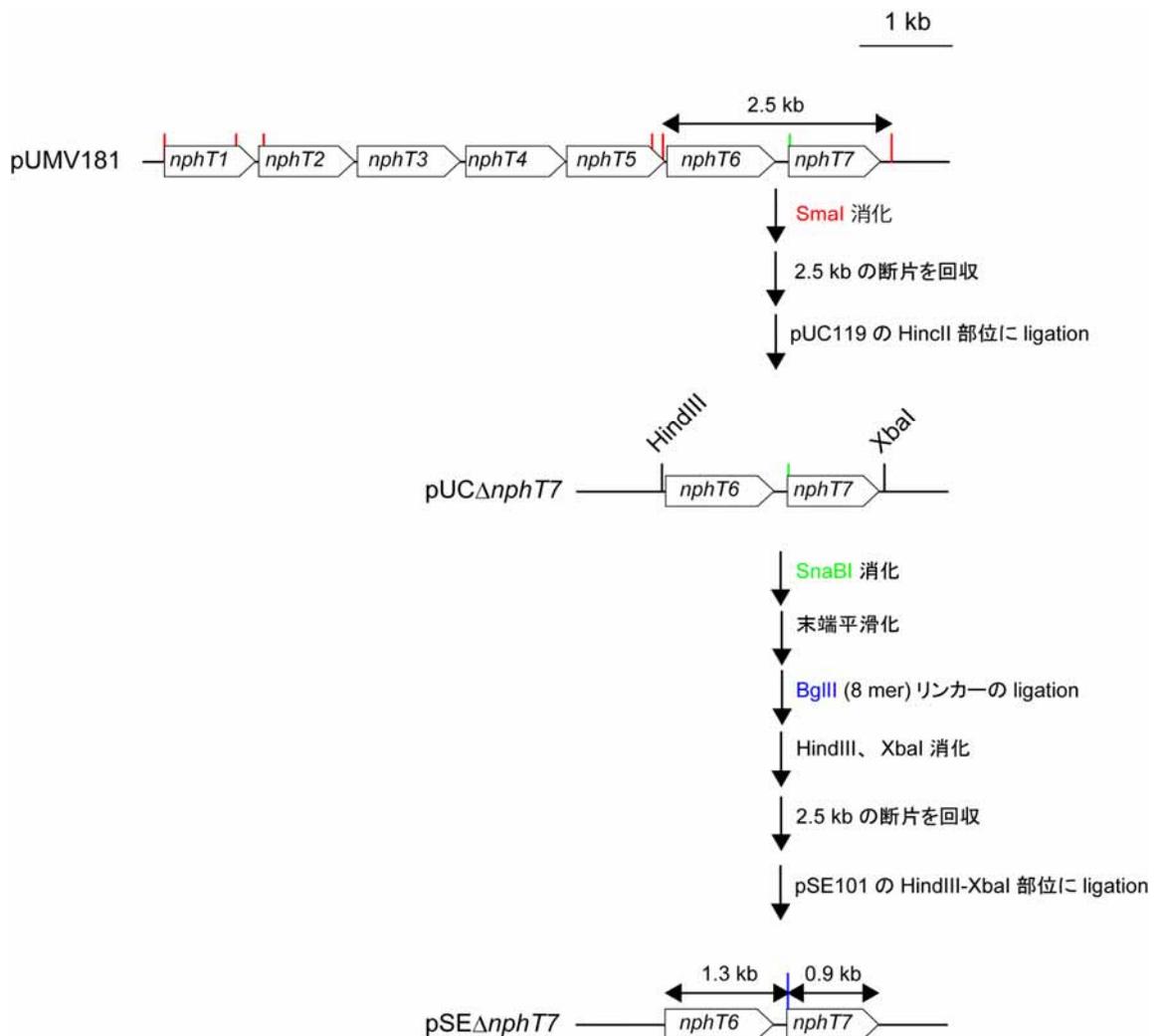
### 破壊株の培養と naphterpin 生産量の分析

*NphT7*破壊株を 10 mL の KG 培地で 3 日間、28°C で培養した。その後、培養上清を 100 mL の KG 培地 (500 mL 容バツフル) に 1% 植菌して、3 日間、28°C で培養した。なお control として、mevalonate kinase をコードする *nphT1* 破壊株(T. kuzuyama, unpublished result) および野生株を同一の条件で培養した。これらの培養液から菌体を回収してその重量を計量した。その後、菌体と上清をあわせて 100 mL のアセトンによる抽出を 2 回行い、有機層を回収した。有機層をエバポレーターにより除去して、残渣を 2 倍量の酢酸エチル 2 回抽出した後、有機層を回収した。有機層を硫酸ナトリウムにより脱水した後、エバポレーターで除去した。その後、残渣を 100 μL のメタノールに溶解して、5 μL を HPLC により分析した。HPLC の分析条件を表 3-2-1 に示す。なお、検出では naphterpin に由来する 265 nm の吸収極大を追跡した。得られたクロマトグラムのピーク

面積を標品 (100 mg / mL in MeOH) であるnaphterpinのピーク面積と比較してその濃度を算出した後、菌体湿重量あたりのnaphterpin生産量を算出した。なお、本実験は3連で行い、その生産量の測定誤差を算出した。

**表 3-2-1 HPLC 分析条件**

カラム	PEGASIL ODS C18 (4.6×250 mm、5 μm、センシユー科学)
分析温度	30°C
溶媒 A	0.1% acetate in MeOH
溶媒 B	0.1% acetate in water
溶出条件	isocratic (80% A - 20% B、30 分)
流速	1.0 mL / min



### 図 3-2-2 *nphT7* 破壊株作成用プラスミドの作成

図において *Sma*I、*Sna*BI および *Bgl*III を赤、緑および青で示した。それらに対応する制限部位も同色で示した。メバロン酸経路遺伝子クラスターをクローニングしたベクターである pUMV181 を *Sma*I で消化したのち、2.5 kb の DNA 断片を回収した。その後、断片を pUC119 の *Hinc*II 部位にライゲーションして、pUCΔ*nphT7* を構築した。次に、pUCΔ*nphT7* の *Sna*BI 消化と末端平滑化を行い、得られた DNA 断片を 8 mer の *Bgl*III リンカーとライゲーションした。得られたプラスミドの *Bgl*III による制限処理と再ライゲーションを行って、リンカーが 1 断片挿入されたベクターを構築した後、これを *Hind*III-*Xba*I で制限消化した。得られた 2.5 kb の DNA 断片を pSE101 の同部位にライゲーションし、*nphT7* 破壊用プラスミドである pSEΔ*nphT7* を構築した。

## 結果

HPLC分析の結果を図3-2-3に示す。結果、すべての株においてnaphterpinの生産が観察された。菌体湿重量あたりのnaphterpin生産量を図3-2-4に示す。野生株のnaphterpin生産量は $0.91 \pm 0.05$  mg / g (naphterpin / 菌体湿重量) であり、*nphT1*破壊株は $0.34 \pm 0.03$  mg / gであった。一方、*nphT7*破壊株は $0.69 \pm 0.03$  mg / gであった。従って、*nphT7*破壊株においてnaphterpin生産量が低下したことが示され、本来の宿主であるCL190株においてもacetoacetyl-CoA合成酵素として機能しており、naphterpinのテルペノイド骨格の生合成に寄与していることが示唆された。

*NphT7* 破壊株は、*nphT1* 破壊株と比較して naphterpin を多く生産している。これは、acetoacetyl-CoA thiolase の相補によるものと推測される。Acetoacetyl-CoA thiolase はすべての生物が普遍的に有する酵素であり、全ゲノム配列が明らかとなっている *S. coelicolor* A3(2)や *S. avermitilis*, *S. griseus* などの放線菌においても、そのホモログが複数存在する。さらに、CL190 株からもその遺伝子が取得されている<sup>(53)</sup>。

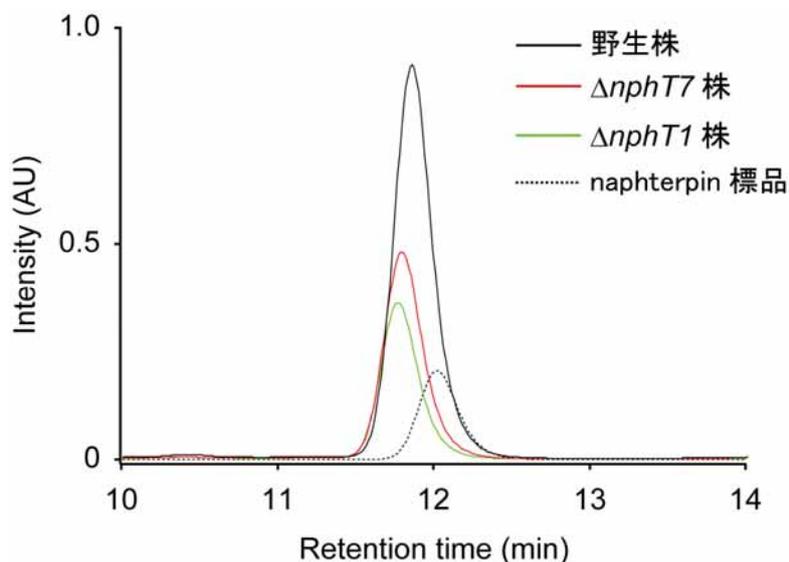


図3-2-3 HPLC 分析結果

クロマトグラムは naphterpin に由来する 265 nm の吸収極大を追跡して作成した。また図右上に、クロマトグラムの線種が示す分析試料を示した。

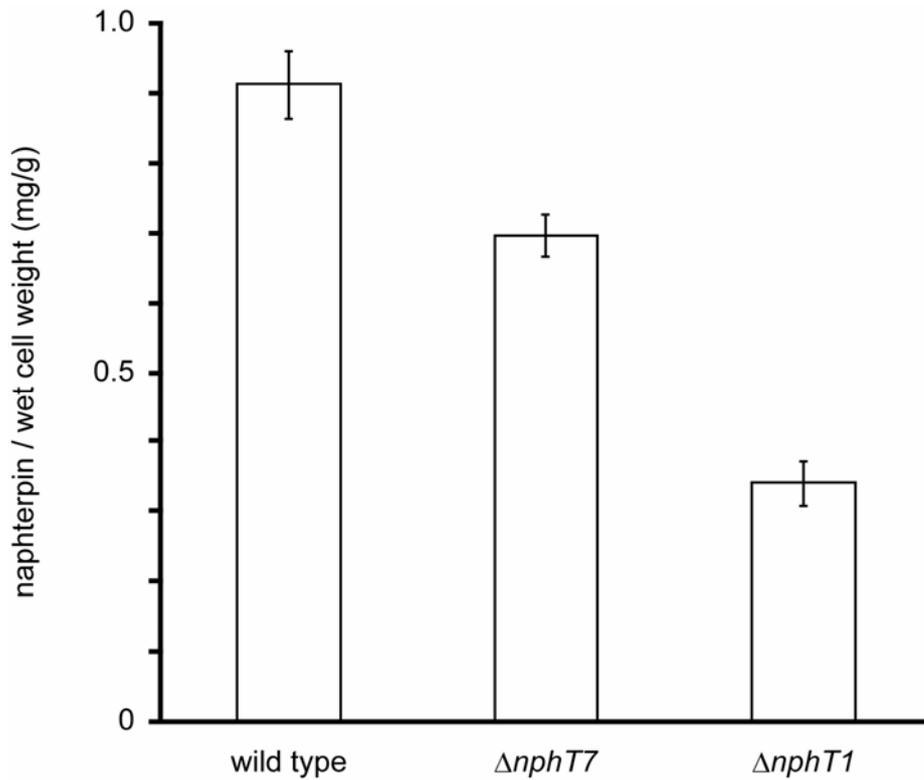


図 3-2-4 野生株と *nphT1*、*nphT7* 破壊株の naphterpin 生産量の比較

Naphterpin の生産量は菌体湿重量あたりの生産量として評価した。図下に示した略語は以下の株を示す。wild type、野生株。  $\Delta nphT7$ 、*nphT7* 破壊株。  $\Delta nphT1$ 、*nphT1* (mevalonate kinase 遺伝子)破壊株。

### 第三節 考察

NphT7 は in vivo においても acetoacetyl-CoA 合成酵素として機能することが示された。Acetoacetyl-CoA 合成活性を有する酵素として最もよく知られている acetoacetyl-CoA thiolase は、in vitro においてその合成活性よりも thiolysis による分解反応が優位であることが知られている<sup>(1)</sup>。一方、KAS III や type III PKS のように脱炭酸反応により  $\beta$ -ketoacyl-ACP または  $\beta$ -ketoacyl-CoA を合成する反応は、malonyl-ACP または malonyl-CoA が acetyl-CoA から ATP 依存的な炭酸固定により合成されているため、thiolase の非脱炭酸反応と比較して自由エネルギー変化( $\Delta G$ )が小さい<sup>(1)</sup>。従って、NphT7 の acetoacetyl-CoA 合成反応は thiolase と比較して、エネルギー的に有利であると言える (図 3-3-1)。このことから、*nphT7* を含むメバロン酸経路遺伝子クラスターは、タキソールなどに代表される有用なテルペノイドの発酵生産系において有効な増産の手段になると考えられる。また、生分解性プラスチックの原料として知られる poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) は acetoacetyl-CoA が前駆体であり、その増産にも有効な手段であると考えられる。さらに PKS のマイナーな伸長基質として知られる methylmalonyl-CoA や ethylmalonyl-CoA は acetoacetyl-CoA が前駆体であることから<sup>(55)</sup>、これらを基質とするポリケタイドの増産にも有用な手段であると考えられる。

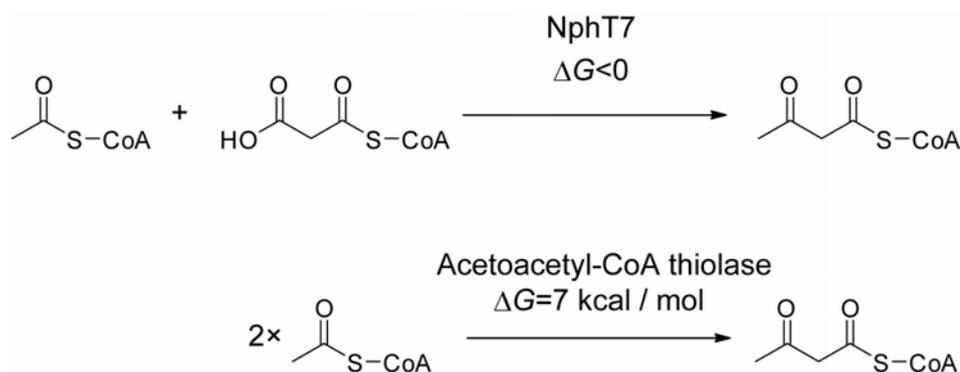


図 3-3-1 acetoacetyl-CoA 合成における自由エネルギー

2 分子の acetyl-CoA を非脱炭酸反応により縮合させて acetoacetyl-CoA を合成する反応は、その自由エネルギー変化( $\Delta G$ )が高いために進行しにくい。一方、malonyl-CoA の脱炭酸反応を介した合成は、その自由エネルギー変化が小さいために容易に進行する。

## 総括

本論文では、NphT7の機能解明に *in vitro* および *in vivo* の両面から取り組み、開始基質として acetyl-CoA を、伸長基質として malonyl-CoA を用い、1回の Claisen 縮合により acetoacetyl-CoA を合成する酵素であることを明らかにした。本酵素の活性を有する酵素はこれまでに報告がないことから、NphT7 をチオラーゼスーパーファミリーの新規酵素「acetoacetyl-CoA synthase」として提案する。

Acetoacetyl-CoA synthase による acetoacetyl-CoA 合成反応は、自由エネルギー的に有利な反応である。従って、acetoacetyl-CoA synthase は、抗マラリア剤であるアーテミスインや抗腫瘍活性をもつタキソール、カロテン誘導体などに代表される有用なテルペノイド<sup>(56-60)</sup>や、生分解性プラスチックとして知られる poly- $\beta$ -hydroxybutyrate などに代表されるポリヒドロキシアルカン酸の誘導体<sup>(61-63)</sup>、*n*-butanol に代表される次世代のバイオ燃料<sup>(59, 64, 65)</sup>など、acetoacetyl-CoA を前駆体とするさまざまな有用化合物の発酵生産系において、thiolase に変わる、または thiolase と組み合わせた次世代の増産手段になると考えられ、今後の幅広い発酵生産系での活用が期待される。

Acetoacetyl-CoA synthase は、チオラーゼスーパーファミリーの Cys-His-Asn 型脱炭酸酵素群において最も単純な化学構造の acetyl-CoA を開始基質とし、また、1回のみ縮合反応を触媒することから、同酵素群の開始基質特異性および縮合回数の構造機能相関を考察する上でモデルになると考えられ、その結晶構造は新規骨格を有するポリケタイドの非天然型合成酵素創出において有用な知見を提供するだろう。

Acetoacetyl-CoA synthase のホモログはいくつかの放線菌のゲノム上に見出されている(表 2-1)。Mycobacterium 属ではテルペノイドを生産する放線菌と同様、メバロン酸経路遺伝子クラスターとともに存在している(図 2-1)。また、その他の Streptomyces 属では、CoA 誘導体の酸化還元や異性化などを担うと推測される機能未知遺伝子とクラスターを形成しており、ほとんどの場合それらクラスターとともにモジュール型ポリケタイド合成酵素と推測される遺伝子が存在している(図 2-2 A-C)。従って、これらのクラスター内に存在する NphT7 ホモログは、二次代謝に関わる PKS の開始基質もしくは伸長基質の合成を担うと推測され、今後の研究が期待される。

表 2-1 放線菌のゲノム上に見出される NphT7 ホモログ

生物名	Score	Identity (%)	E-value	Accession No.
<i>Streptomyces</i> sp. strain KO-3988	470	73	8e <sup>-131</sup>	BAD86806
<i>Streptomyces anulatus</i>	443	75	1e <sup>-122</sup>	CAX48662
<i>Streptomyces</i> sp. strain KO-3988	431	72	6e <sup>-119</sup>	BAE78983
<i>Actinoplanes</i> sp. strain A40644	338	59	7e <sup>-91</sup>	BAD07381
<i>Streptomyces</i> sp. C	331	54	6e <sup>-89</sup>	ZP_05511702
<i>Streptomyces flavidofuscus</i>	313	55	2e <sup>-83</sup>	ZP_04335288
<i>Mycobacterium ulcerans</i> Ag99	311	52	8e <sup>-83</sup>	YP_907152
<i>Mycobacterium marinum</i> M	309	53	3e <sup>-82</sup>	YP_001851502
<i>Streptomyces</i> sp. Mg1	307	51	1e <sup>-81</sup>	ZP_05002626
<i>Streptomyces</i> sp. AA4	298	51	6e <sup>-79</sup>	ZP_05478992
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998	252	47	5e <sup>-65</sup>	ZP_04696763
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736	233	45	1e <sup>-59</sup>	ZP_05529691

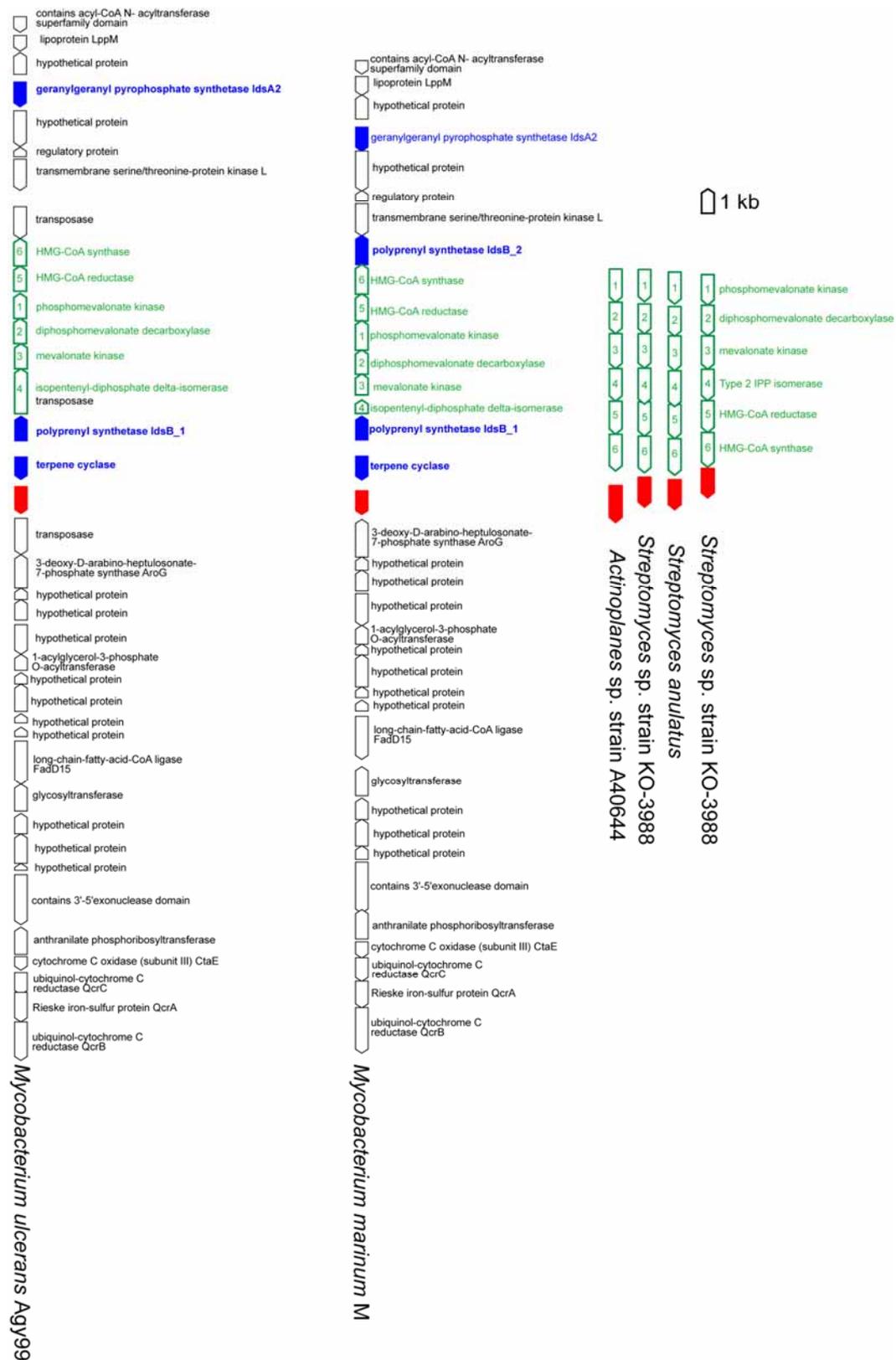


図 2-1 メバロン酸経路遺伝子クラスターと NphT7 ホモログ

図において NphT7 ホモログを赤、メバロン酸経路遺伝子クラスターのホモログを緑で示した。また、テルペンの生合成に関わると推測されるホモログを青で示した。なお、*Mycobacterium* 属のクラスター右にアミノ酸配列から推測される酵素名を示した。メバロン酸経路遺伝子クラスターの数字は序論図 6 に順ずる。

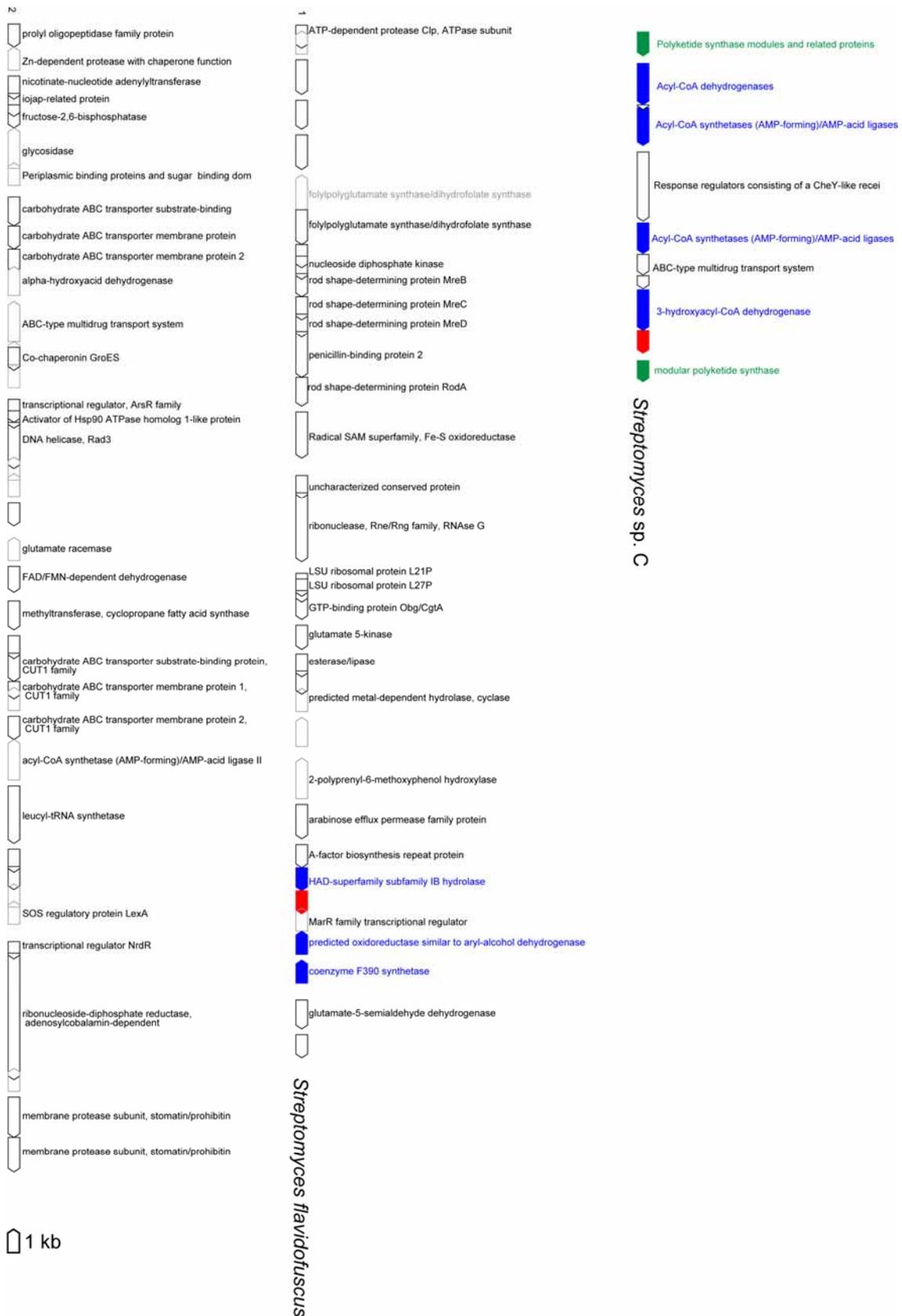


図 2-2 A CoA 代謝酵素と NphT7 ホモログ 1

図において NphT7 ホモログを赤、CoA 代謝の酵素遺伝子と推測される ORF を青で示した。また、ポリケチド合成酵素と推測される ORF を緑で示した。なお、クラスター右にアミノ酸配列から推測される酵素名を示した。

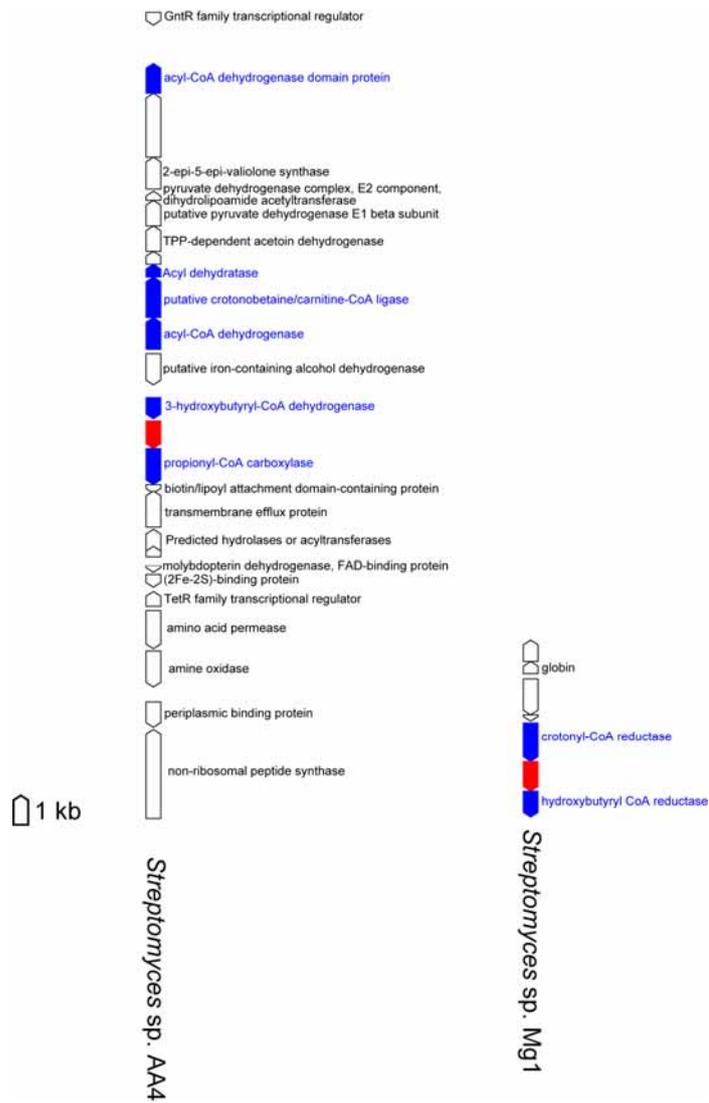


図 2-2 B CoA 代謝酵素と NphT7 ホモログ 2

図において NphT7 ホモログを赤、CoA 代謝の酵素遺伝子と推測される ORF を青で示した。なお、クスター右にアミノ酸配列から推測される酵素名を示した。

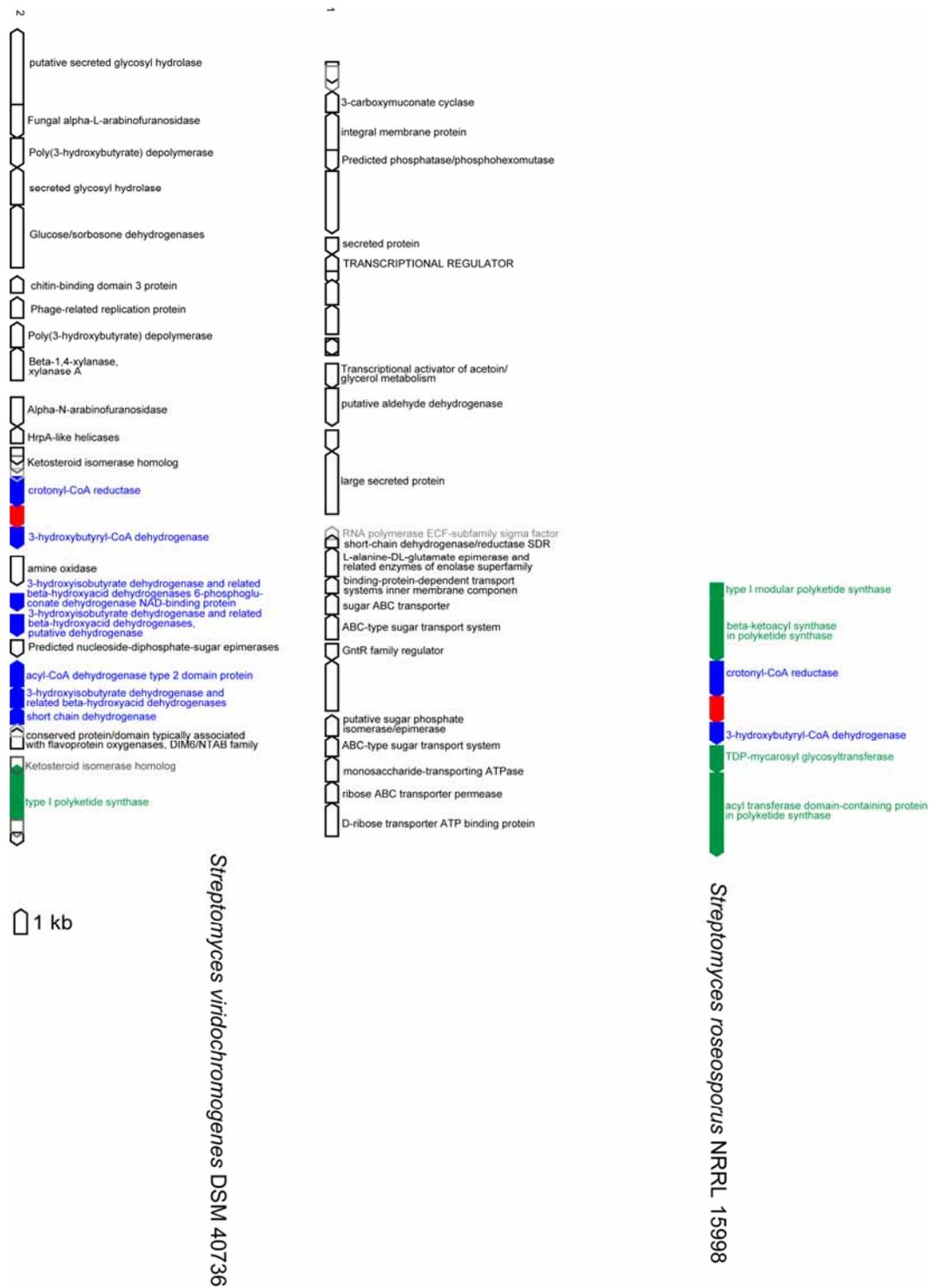
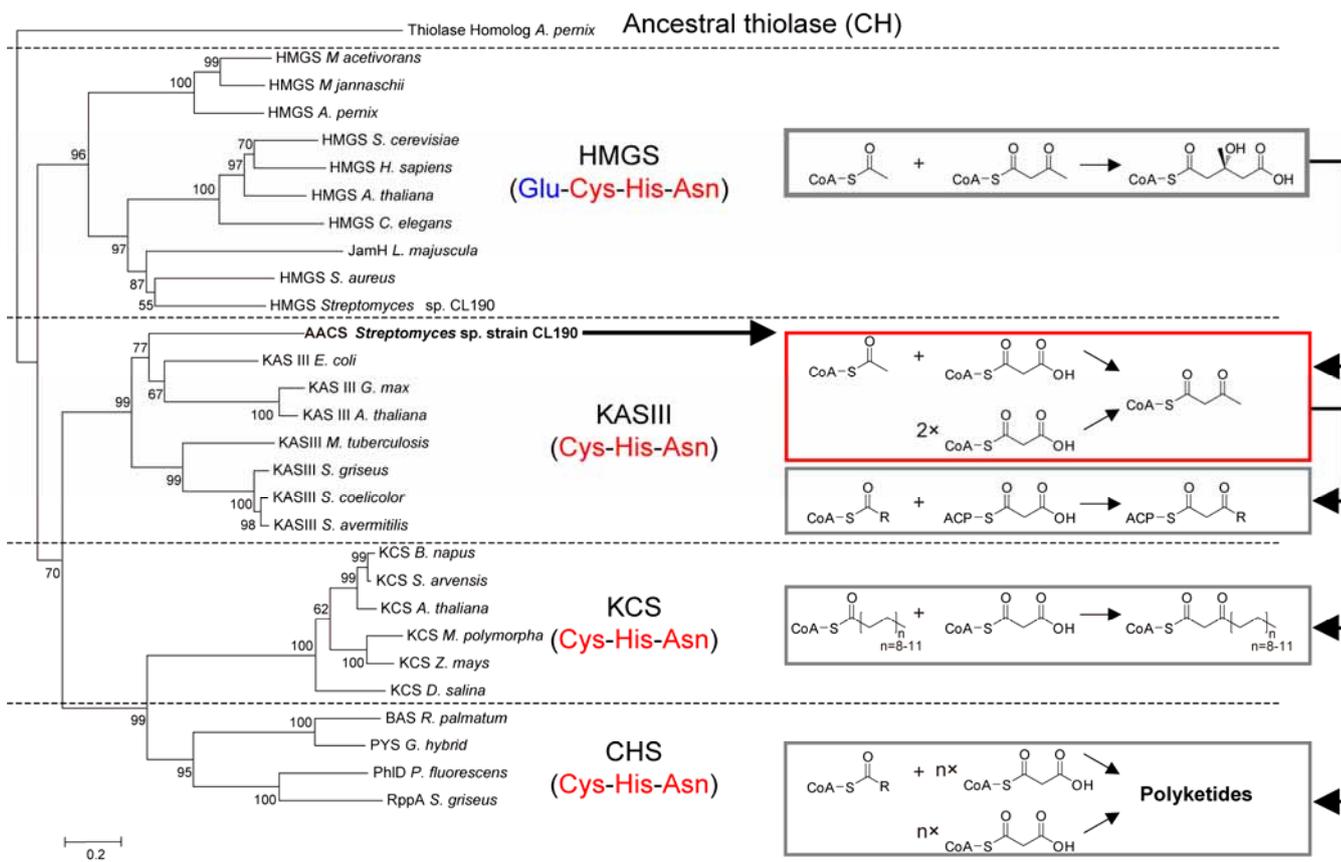


図 2-2 C CoA 代謝酵素と NphT7 ホモログ 3

図において NphT7 ホモログを赤、CoA 代謝の酵素遺伝子と推測される ORF を青で示した。また、ポリケチド合成酵素と推測される ORF を緑で示した。なお、クラスター右にアミノ酸配列から推測される酵素名を示した。

NphT7 と HMGS の基質特異性に着目すると、「ACP 誘導体を基質としない」点が共通している。近年、チオラーゼスーパーファミリーの系統解析が行われ、HMGS は KAS III から進化したと推測されている<sup>(7)</sup>。すなわち、KAS III の Cys-His-Asn 残基に Glu 残基が加わることで、脱炭酸型の酵素から非脱炭酸型の酵素が誕生したと考えられている<sup>(7)</sup>。ここで、生命の歴史において最古の生物と考えられているアーキアの膜脂質に着目すると、KAS 由来の脂肪酸ではなくメバロン酸経路由来のテルペノイドである<sup>(66, 67)</sup>。アーキアのゲノム上では II 型脂肪酸生合成経路の KAS が見出されないことを考えると、生物進化の初期では II 型脂肪酸生合成経路は存在せず、KAS III はメバロン酸経路の酵素よりも後期に誕生したことが推測される。このことから、KAS III は HMGS の触媒残基である Glu-Cys-His-Asn から非脱炭酸的に $\alpha$ -anion を生成する Glu 残基が変異することで Cys-His-Asn の触媒残基をもつ原始的な脱炭酸型の酵素が誕生、その後、この酵素が ACP 認識機構を獲得することで KAS III へと進化したと推測される。その HMGS から KAS III への進化において誕生した原始的な酵素が「acetoacetyl-CoA synthase」であり、脱炭酸型酵素の誕生における「ミッシングリンク」であるのかもしれない (図 2-3)。



**図 2-3** AACS (NphT7)と Cys-His-Asn 活性中心を有する脱炭酸型酵素の系統関係  
 KAS III や KCS、CHS などの Cys-His-Asn 型の活性中心を有する脱炭酸型酵素は、HMGS の Glu 残基 (図中青色)変異により誕生した原始的な酵素である AACS ホモログを祖先として分子進化したのかもしれない。

## 実験の部

## 培地

本論文で使用した培地を以下に示す。

### LB 液体培地 (寒天培地)

Bacto-tryptone	1.0 %
Bacto-yeast extract	0.5 %
NaCl	0.5 %
(Bacto-Agar	1.5%)

### TB 培地

Bacto-tryptone	1.2 %
Bacto-yeast extract	2.4 %
Glycerol	0.504 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *	0.231 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *	1.254 %

\*別滅菌して添加

### KG 培地

Glucose	2.5%
Soy bean meal	1.5%
Dry yeast(エビオス)	0.2%
CaCO <sub>3</sub>	0.4%

保温して攪拌した後、pH を 6.2 に調整してオートクレーブ。

## **SK II**

Soluble starch	2%
Yeast extract	0.5%
Polypeptone	0.2%
Meat extract	0.3%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.06%

pH 7.6 に調整

## **YEME 液体培地**

Bacto Yeast Extract	0.3%
Bacto Polypeptone	0.5%
Oxoid Malt Extract	0.3%
Glucose	1.0%
Sucrose	34%

## **R2YE 寒天培地**

Sucrose	51.5 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.125 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5.06 g
Glucose	5.0 g
Bacto Casamino Acid	0.05 g
Trace Element Solution	1 mL
Bacto Yeast Extract	2.5 g
寒天末	11 g
	/ 400 mL

オートクレーブ後、別にオートクレーブした 5.73% TES Buffer (pH7.2)を 50 mL、3.68% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 溶液を 40 mL、0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液を 5 mL 添加して混合し、最後に 20% L-Proline 溶液を 7.5 mL 添加。

**Trace element Solution**

ZnCl <sub>2</sub>	40 mg
FeCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	200 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>4</sub> · 10H <sub>2</sub> O	10 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg
	/1 L

## 試薬

[1-<sup>14</sup>C]acetyl-CoA は GE healthcare より購入した。Coenzyme A およびその誘導体である [1,2-<sup>13</sup>C]acetyl-CoA と acetyl-CoA、*n*-propionyl-CoA、butyryl-CoA、isobutyryl-CoA、isovaleryl-CoA、malonyl-CoA、methylmalonyl-CoA はシグマアルドリッチジャパンより購入した。また、阻害剤実験に用いた cerulenin および thiolactomycin はシグマアルドリッチジャパンから購入した。HPLC 分析に用いた HPLC グレードのアセトニトリル、メタノールおよび水は関東化学より購入した。また、トリフルオロ酢酸(TFA) と酢酸は和光純薬から購入した。イオンペアクロマトグラフィーに用いた Di-*n*-butylammonium acetate と ammonium acetate は東京化成 および和光純薬より購入した。Naphterpin およびメバロン酸の抽出に用いた酢酸エチルとアセトン、リン酸、無水硫酸ナトリウムは関東化学より購入した。ベクターのライゲーションには Ligation High (東洋紡)を用いた。制限酵素はタカラバイオより購入した。DNA の末端平滑化には DNA Blunting kit (タカラバイオ)を用いた。Colony directed PCR では PCR master mix (Promega)を用いた。また *nphT7*、*acp*、*acps*、*fabD* の増幅を目的とした PCR では、Expand High Fidelity PCR system (Roche)を用いた。部位特異的な変異導入を目的とした PCR では、QuickChange® XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いた。形質転換体からの 10 kb 以下のプラスミド精製には QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN)を用いた。アガロースゲルからの DNA 精製には QIAGEN より購入した、Minielute Gel Extraction Kit (4 kb まで)、Qiaquick (4-10 kb まで) もしくは QiaexII (10 kb 以上) を用いた。放線菌からのゲノム簡易抽出では Instagene matrix (Bio-RAD)を用いた。組換えタンパク質の Ni-NTA アフィニティー精製では Ni-NTA Superflow (QIAGEN)を用いた。Bradford 法による精製組換えタンパク質の定量には Protein assay kit (Bradford)を用いた。

## 第一章

### プライマーの設計とPCR

II 型脂肪酸生合成に寄与する ACP (*acp*)と holo-ACP synthase (*acps*)、malonyl-ACP transferase (*fabD*) の遺伝子増幅用プライマーは、全ゲノム配列が明らかにされている *Streptomyces coelicolor* A3(2)のデータベースに登録された塩基配列をもとに設計した(Genome Information Broker、<http://gib.genes.nig.ac.jp/>)各遺伝子の登録番号は以下。*acp*、SCO2389。*acps*、SCO4744。*fabD*、SCO2378。*Acp* は *Streptomyces* sp. CL190 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR により増幅させた。*Acps* と *fabD* は *Streptomyces coelicolor* A3(2) のゲノム DNA を鋳型とした PCR により増幅させた。PCR の条件はキットに付属の取扱説明書に従い設定した。

### 組換えタンパク質発現用プラスミドの構築

発現用プラスミドの構築は以下の手順で行った。PCR反応溶液のアガロース電気泳動を行い、目的の増幅断片を切り出してMiniElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) により精製した。精製した増幅断片をpT7 Blue Vector (アンピシリン耐性マーカー、Novagen) にクローニングした。クローニングベクターにより*E. coli* DH5 $\alpha$ を形質転換させた後、LB寒天培地 (50 mg IPTG、20 mg X-Gal、50  $\mu$ g / mL ampicillin) で37 $^{\circ}$ C、12時間培養した。その後、青白選択ならびにM13 M4およびM13 RVユニバーサルプライマーを用いたcolony direct PCRを行い、インサートを有するコロニーを選択した。陽性のコロニーをLB培地 (50  $\mu$ g / mL ampicillin)に植菌して37 $^{\circ}$ C、12時間培養した後、プラスミドを回収した。プラスミドのインサートをシーケンスにより確認して、プライマーに付加した制限部位で消化した。その後、アガロールゲル電気泳動を行い、得られたDNA断片を発現用プラスミドであるpHis8(29)(カナマイシン耐性マーカー) もしくはpET15b(アンピシリン耐性マーカー、Novagen) の同一制限部位にサブクローニングして、発現用ベクターを構築した。コンピテントセルの作成と形質転換はMolecular cloning (3rd Edition)に記載の方法に従った<sup>(68)</sup>。

### 組換えタンパク質の発現

*E. coli* BL21(DE3) (pHis-*nphT7*、pHis-*fabD*、pHis-*acps*、pET-*acp*)もしくは*E. coli* JM109 (pQE-*fabH*) を発現用プラスミドで形質転換させて、マーカーを添加したLB

寒天培地で37°C、12時間培養した。その後、インサートのプライマーを用いて、colony direct PCRによりコロニーを選択した。陽性のコロニーを、マーカーを添加したLB培地に植菌して37°C、12時間培養した。得られた培養上清を、TB培地に1%植菌して37°CでOD<sub>600</sub>=1.0まで培養した。その後、コールドショックを10分間行い、終濃度1 mMとなるようにIPTGを添加して18°Cで12時間誘導して、組換えタンパク質を発現させた。なお、各マーカーは以下の濃度に設定した。Ampicillin、100 µg / mL。Kanamycin、50 µg / mL。

### 組換えタンパク質の精製

培養液 100 mL を 5,000 g にて 10 分間遠心して菌体を回収し、菌体を lysis buffer に懸濁した。その後、懸濁液を超音波破碎し、40,000 g にて 20 分間遠心した。遠心により得た上清を Ni-NTA resin カラム 2 mL (QIAGEN) に添加したのち、20 mL の wash buffer で洗浄した。その後、20 mL の elution buffer を添加して resin に吸着している組換えタンパク質を溶出させた。得られた溶出液をセロハン膜に注入し、1 L の透析液を用いて 2 時間透析した。その後、透析した溶出液を VIVA SPIN 20 (VIVA SCIENCE) により濃縮して、組換えタンパク質を取得した。なお、NphT7 と KAS III の組換えタンパク質はすべての buffer および透析液に 1 mM の dithiothreitol を添加して、還元条件下での精製を行った。Buffer と透析液の組成を以下に示す。

#### Wash Buffer (pH8.0)

50 mM Tris-HCl

0.5 M NaCl

20% (v/v) Glycerol

20 mM Imidazol

#### Lysis Buffer (pH 8.0)

Wash Buffer + 1% (v/v) Tween 20

### **Elution Buffer (pH 8.0)**

50 mM Tris-HCl

0.5 M NaCl

20% (v/v) Glycerol

250mM Imidazol

### **KAS III 透析液 (pH 7.5)**

50 mM HEPES (pH7.5)

200 mM NaCl

20% (v/v) Glycerol

### **NphT7、ACP、FabD、ACPS 透析液 (pH 7.5)**

50 mM HEPES (pH7.5)

50 mM NaCl

20% (v/v) Glycerol

### **タンパク質分子量の決定と定量**

取得した組換えタンパク質の分子量と定量は以下の方法により行った。SDS-PAGE では、10%ポリアクリルアミドゲル (NphT7、FabD、KAS III) もしくは 18%ポリアクリルアミドゲル (ACP、ACPS) を用い、100 V の定電流で電気泳動を行った。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィーでは、HiLoad 26 / 60 Superdex 200 prep grade カラム (GE Healthcare) を用いた。分析試料は 1 mg / mL の組換えタンパク質溶液 1 mL をシリンジフィルタ (膜孔 0.2  $\mu$ m、Millipore) でろ過して作成した。カラムを 600 mL の buffer (50 mM NaCl, 100 mM HEPES, 20% Glycerol, pH7.5) で平衡化した後 (流速 1.0 mL / min)、分析試料を添加してゲルろ過クロマトグラフィーを行った。分子量マーカーとして Chymotrypsinogen A (232 kDa) と Alubmin (67 kDa)、Catalase (25 kDa) (1 mg / mL、GE Healthcare) を用いた。

タンパク質の定量は Bovine Serum Alubmin (SIGMA) をスタンダードとして、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いた Bradford 法により定量した。

## Malonyl-ACP の調製

Malonyl 化反応溶液を以下の表に示した分析条件により分析および分取した。

カラム	PEGASIL-300 C4 2.0×150 mm、5 μm、( センシユー科学 )	
分析温度	25°C	
溶媒 A	acetonitrile + 0.1% TFA	
溶媒 B	water + 0.1% TFA	
溶出条件	gradient	
流速	1.0 mL / min	
溶出プログラム		
時間 ( 分 )	溶媒 A 濃度 (%)	溶媒 B 濃度 (%)
0	5	95
5	5	95
10	30	70
40	70	30
45	100	0
46	5	95
51	5	95

分取した ACP を透析液 ( ACP の Ni-NTA アフィニティー精製時に用いたものと同一組成 ) により希釈して、Amicon Ultrafree-MC ( 5,000 NMWL、日本ミリポア ) により濃縮する操作を 2 回行い、これを malonyl-ACP として用いた。

## 第二章

### 部位特異的変異導入と組換えタンパク質の取得

PCR の条件設定は付属の取扱説明書に従った。また、組換えタンパク質の取得は第一章の NphT7 精製と同様に行った。

## 第三章

### 放線菌の形質転換

放線菌の形質転換はプロトプラスト法<sup>(69)</sup>により行った。まず、各放線菌のグリセロールストックを TSB 寒天培地 [1% Tryptone soya broth (関東化学)、2.2%寒天末] にストリークして、30°C で 3 日間培養した。その後、シングルコロニーを TSB 液体培地に植菌して 30°C で 3 日間培養した。培養液を YEME 液体培地 (+0.5% Glycine、5mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、*Streptomyces* G153 株) もしくは SK II 液体培地 (+1% Glycine、pH 7.6、*Streptomyces* sp CL190 株) に 1%植菌して、30°C で 3 日間培養した。

培養液を 10% Sucrose 溶液で 2 倍に希釈して、遠心分離 (5,000 g、4°C、10 分間、以下同) を行う操作を 2 回行い、菌体を回収した。その後、protoplast buffer に懸濁して遠心分離により菌体を回収する操作を 2 回行い、再度 protoplast buffer に懸濁した。この懸濁液に protoplast buffer に溶解させた lysozyme (生化学工業、2 mg / mL) を等量添加 (終濃度 1mg / mL)して、30°C で 30 分間反応させた。反応後、懸濁液を光学顕微鏡により観察して、放線菌のプロトプラスト化を確認した。

プロトプラスト化された懸濁液を綿栓によりろ過する操作を 2 回行い、遠心分離によりプロトプラストを回収した。その後、protoplast buffer により懸濁して、これにプラスミド DNA と 10 倍量の 33%PEG 溶液 (PEG1000 を protoplast buffer に溶解)を加えて 1 分間室温にて反応を行った。その後、反応溶液の 10 倍量の protoplast buffer を添加して遠心分離を行い、形質転換させたプロトプラストを回収した。これを再度 protoplast buffer に懸濁して、R2YE 寒天培地に塗抹した後、30°C で 14 時間培養した。その後、プラスミドのマーカである thiostrepton を重層 (終濃度 30 µg / mL) して、30°C で 3 日間培養した。Protoplast buffer の組成と調製方法を以下に示す。

### Protoplast buffer 組成

a. Sucrose	10.3 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.025 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.202 g
Trace element	0.2 mL
	/ 80 mL
b. 0.5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mL
c. 3.68% CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 mL
d. 5.73% TES Buffer (pH7.2)	10 mL

a から d を別にオートクレーブした後、これらを混合して protoplast buffer を調製した。

### *Streptomyces* sp. CL190 株の *nphT7* 破壊株作成

破壊株は In frame deletion 法<sup>(69)</sup>により作成した。NphT7 破壊株作成用プラスミドである pSE $\Delta$ *nphT7* (クローニングした *nphT7* は、N 末端に存在する SnaBI 制限部位に 8 mer の BglIII リンカー(タカラバイオ)を 1 断片挿入してフレームシフトさせた) により、*Streptomyces* sp. CL190 株を形質転換させた。その後、R2YE 寒天培地上でのプロトプラスト再生とプラスミドのマーカである thiostrepton により選択を行い、プラスミドとゲノムの相同領域における 1 回の相同組換えにより thiostrepton 耐性を獲得したコロニーを複数取得した。これらを再度プロトプラスト化して、R2YE 寒天培地で再生した。出現したシングルコロニーを、thiostrepton を含む TSB 寒天培地と含まない寒天培地にそれぞれ同時に植菌した。その後、2 回目の相同組換えにより thiostrepton 耐性を消失したコロニーを複数選択して、これらのコロニーからゲノムを簡易抽出法により取得した。取得したゲノムを鋳型として、*nphT6* の N 末端プライマーと *nphT7* の C 末端プライマーを用いた PCR を行い、2.2 kb の DNA 断片を取得した。その後、DNA 断片を BglIII により消化して 0.9 kb と 1.3 kb の断片が得られた株を、 $\Delta$ *nphT7* 破壊株とした。

## 使用機器

### 分光光度計

UV-1600PC (島津製作所社製)

### HPLC

LC-2000 system (日本分光社製)

送液ポンプ	PU-2080
検出器 1(CoA 誘導体分析)	UV-2070
検出器 2(メバロン酸分析)	RI-74 (示差屈折率検出器、昭和電工社製)
オートサンプラー	AS-2050
カラムオープン	CO-2060

### LC-FTMS (CoA 誘導体分析)

LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher scientific 社製)

### ゲルろ過クロマトグラフィー関連装置 (FPLC、GE Healthcare)

フラクションコレクター	Fraction Collector FRAC-100
送液制御装置	Gradient Programmer GP-250 Plus
送液ポンプ	High Precision Pump P-500
吸光度記録装置	Recorder Rec 102 (Amersham Biosciences)
検出器	Monitor UV-1

## 引用文献

1. Heath RJ Rock CO (2002) The Claisen condensation in biology. *Nat Prod Rep* 19(5):581-596.
2. Haapalainen AM, Merilainen G Wierenga RK (2006) The thiolase superfamily: condensing enzymes with diverse reaction specificities. *Trends Biochem Sci* 31(1):64-71.
3. White SW, Zheng J, Zhang YM Rock (2005) The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 74:791-831.
4. Blacklock BJ Jaworski JG (2006) Substrate specificity of Arabidopsis 3-ketoacyl-CoA synthases. *Biochem Biophys Res Commun* 346(2):583-590.
5. Ghanevati M Jaworski JG (2002) Engineering and mechanistic studies of the Arabidopsis FAE1 beta-ketoacyl-CoA synthase, FAE1 KCS. *Eur J Biochem* 269(14):3531-3539.
6. Austin MB Noel JP (2003) The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* 20(1):79-110.
7. Jiang C, Kim SY Suh DY (2008) Divergent evolution of the thiolase superfamily and chalcone synthase family. *Mol Phylogenet Evol* 49(3):691-701.
8. Modis Y Wierenga RK (2000) Crystallographic analysis of the reaction pathway of Zoogloea ramigera biosynthetic thiolase. *J Mol Biol* 297(5):1171-1182.
9. Davies C, Heath RJ, White SW Rock CO (2000) The 1.8 Å crystal structure and active-site architecture of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from Escherichia coli. *Structure* 8(2):185-195.
10. Qiu X, Janson CA, Konstantinidis AK, Nwagwu S, Silverman C, Smith WW, Khandekar S, Lonsdale J Abdel-Meguid SS (1999) Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. A key condensing enzyme in bacterial fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem* 274(51):36465-36471.
11. Choi KH, Kremer L, Besra GS Rock CO (2000) Identification and substrate specificity of beta-ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem* 275(36):28201-28207.
12. Heath RJ Rock CO (1996) Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in Escherichia coli. *J Biol Chem* 271(18):10996-11000.
13. Han L, Lobo S Reynolds KA (1998) Characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from Streptomyces glaucescens and its role in initiation of fatty acid biosynthesis. *J*

- Bacteriol* 180(17):4481-4486.
14. Qiu X, Choudhry AE, Janson CA, Grooms M, Daines RA, Lonsdale JT Khandekar SS (2005) Crystal structure and substrate specificity of the beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from *Staphylococcus aureus*. *Protein Sci* 14(8):2087-2094.
  15. Choi KH, Heath RJ Rock CO (2000) beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *J Bacteriol* 182(2):365-370.
  16. Li Y, Florova G Reynolds KA (2005) Alteration of the fatty acid profile of *Streptomyces coelicolor* by replacement of the initiation enzyme 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH). *J Bacteriol* 187(11):3795-3799.
  17. Revill WP, Bibb MJ, Scheu AK, Kieser HJ Hopwood DA (2001) Beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 183(11):3526-3530.
  18. Lai CY Cronan JE (2003) Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for bacterial fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 278(51):51494-51503.
  19. Cerdano AM, Bibb MJ Challis GL (2001) Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chem Biol* 8(8):817-829.
  20. Mo S, Kim BS Reynolds KA (2005) Production of branched-chain alkylprodiginines in *S. coelicolor* by replacement of the 3-ketoacyl ACP synthase III initiation enzyme, RedP. *Chem Biol* 12(2):191-200.
  21. Grimm A, Madduri K, Ali A Hutchinson CR (1994) Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene* 151(1-2):1-10.
  22. Bao W, Sheldon PJ, Wendt-Pienkowski E Hutchinson CR (1999) The *Streptomyces peucetius* dpsC gene determines the choice of starter unit in biosynthesis of the daunorubicin polyketide. *J Bacteriol* 181(15):4690-4695.
  23. Bao W, Sheldon PJ Hutchinson CR (1999) Purification and properties of the *Streptomyces peucetius* DpsC beta-ketoacyl:acyl carrier protein synthase III that specifies the propionate-starter unit for type II polyketide biosynthesis. *Biochemistry* 38(30):9752-9757.
  24. Bibb MJ, Sherman DH, Omura S Hopwood DA (1994) Cloning, sequencing and deduced functions of a cluster of *Streptomyces* genes probably encoding biosynthesis of the polyketide

- antibiotic frenolicin. *Gene* 142(1):31-39.
25. Hori Y, Abe Y, Ezaki M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M (1993) R1128 substances, novel non-steroidal estrogen-receptor antagonists produced by a *Streptomyces*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 46(7):1055-1062.
  26. Marti T, Hu Z, Pohl NL, Shah AN, Khosla C (2000) Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for R1128, a non-steroidal estrogen receptor antagonist. Insights into an unusual priming mechanism. *J Biol Chem* 275(43):33443-33448.
  27. Pan H, Tsai S, Meadows ES, Miercke LJ, Keatinge-Clay AT, O'Connell J, Khosla C, Stroud RM (2002) Crystal structure of the priming beta-ketosynthase from the R1128 polyketide biosynthetic pathway. *Structure* 10(11):1559-1568.
  28. Abe I, Takahashi Y, Morita H, Noguchi H (2001) Benzalacetone synthase. A novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum*. *Eur J Biochem* 268(11):3354-3359.
  29. Jez JM, Austin MB, Ferrer J, Bowman ME, Schroder J, Noel JP (2000) Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chem Biol* 7(12):919-930.
  30. Funa N, Ohnishi Y, Fujii I, Shibuya M, Ebizuka Y, Horinouchi S (1999) A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* 400(6747):897-899.
  31. Shin-ya K, Imai S, Furihata K, Hayakawa Y, Kato Y, Vanduyne GD, Clardy J, Seto H (1990) Isolation and structural elucidation of an antioxidative agent, naphterpin. *J Antibiot (Tokyo)* 43(4):444-447.
  32. Kaneda K, Kuzuyama T, Takagi M, Hayakawa Y, Seto H (2001) An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3):932-937.
  33. Kuzuyama T, Takagi M, Takahashi S, Seto H (2000) Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J Bacteriol* 182(4):891-897.
  34. Takagi M, Kuzuyama T, Takahashi S, Seto H (2000) A gene cluster for the mevalonate pathway from *Streptomyces* sp. Strain CL190. *J Bacteriol* 182(15):4153-4157.

35. Takahashi S, Kuzuyama T Seto H (1999) Purification, characterization, and cloning of a eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a key enzyme involved in biosynthesis of terpenoids. *J Bacteriol* 181(4):1256-1263.
36. Shin-ya K, Furihata K, Hayakawa Y Seto H (1990) Biosynthetic studies of naphterpin, a terpenoid metabolite of streptomyces. *Tetrahedron Letters* 31(42):6025-6026.
37. Hiser L, Basson ME Rine J (1994) ERG10 from *Saccharomyces cerevisiae* encodes acetoacetyl-CoA thiolase. *J Biol Chem* 269(50):31383-31389.
38. Dairi T (2005) Studies on biosynthetic genes and enzymes of isoprenoids produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 58(4):227-243.
39. Saleh O, Gust B, Boll B, Fiedler HP Heide L (2009) Aromatic prenylation in phenazine biosynthesis: dihydrophenazine-1-carboxylate dimethylallyltransferase from *Streptomyces anulatus*. *J Biol Chem* 284(21):14439-14447.
40. Kawasaki T, Hayashi Y, Kuzuyama T, Furihata K, Itoh N, Seto H Dairi T (2006) Biosynthesis of a natural polyketide-isoprenoid hybrid compound, furaquinocin A: identification and heterologous expression of the gene cluster. *J Bacteriol* 188(4):1236-1244.
41. Kawasaki T, Kuzuyama T, Furihata K, Itoh N, Seto H Dairi T (2003) A relationship between the mevalonate pathway and isoprenoid production in actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 56(11):957-966.
42. Kawasaki T, Kuzuyama T, Kuwamori Y, Matsuura N, Itoh N, Furihata K, Seto H Dairi T (2004) Presence of copalyl diphosphate synthase gene in an actinomycete possessing the mevalonate pathway. *J Antibiot (Tokyo)* 57(11):739-747.
43. Zhang YM, Rao MS, Heath RJ, Price AC, Olson AJ, Rock CO White SW (2001) Identification and analysis of the acyl carrier protein (ACP) docking site on beta-ketoacyl-ACP synthase III. *J Biol Chem* 276(11):8231-8238.
44. Jez JM, Ferrer JL, Bowman ME, Dixon RA Noel JP (2000) Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* 39(5):890-902.
45. Beinert H (1953) Studies on the fatty acid oxidizing system of animal tissues. II. beta-Ketoacyl derivatives of coenzyme A. *J Biol Chem* 205(2):575-584.
46. Stern JR (1956) Optical properties of aceto-acetyl-S-coenzyme A and its metal chelates. *J Biol*

- Chem* 221(1):33-44.
47. Qiu X, Janson CA, Smith WW, Head M, Lonsdale J Konstantinidis AK (2001) Refined structures of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *J Mol Biol* 307(1):341-356.
  48. Price AC, Choi KH, Heath RJ, Li Z, White SW Rock CO (2001) Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin. Structure and mechanism. *J Biol Chem* 276(9):6551-6559.
  49. Musayev F, Sachdeva S, Scarsdale JN, Reynolds KA Wright HT (2005) Crystal structure of a substrate complex of Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) with lauroyl-coenzyme A. *J Mol Biol* 346(5):1313-1321.
  50. Scarsdale JN, Kazanina G, He X, Reynolds KA Wright HT (2001) Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *J Biol Chem* 276(23):20516-20522.
  51. Wang J, Kodali S, Lee SH, Galgoci A, Painter R, Dorso K, Racine F, Motyl M, Hernandez L, Tinney E, Colletti SL, Herath K, Cummings R, Salazar O, Gonzalez I, Basilio A, Vicente F, Genilloud O, Pelaez F, Jayasuriya H, Young K, Cully DF Singh SB (2007) Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18):7612-7616.
  52. Dairi T, Aisaka K, Katsumata R Hasegawa M (1995) A self-defense gene homologous to tetracycline effluxing gene essential for antibiotic production in Streptomyces aureofaciens. *Biosci Biotechnol Biochem* 59(10):1835-1841.
  53. Kuzuyama T, Dairi T, Yamashita H, Shoji Y Seto H (2004) Heterologous mevalonate production in Streptomyces lividans TK23. *Biosci Biotechnol Biochem* 68(4):931-934.
  54. Seto H, Watanabe H Furihata K (1996) Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in Streptomyces aerioovifer. *Tetrahedron Letters* 37(44):7979-7982.
  55. Erb TJ, Berg IA, Brecht V, Muller M, Fuchs G Alber BE (2007) Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25):10631-10636.
  56. Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MC, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R Keasling JD (2006) Production of

- the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440(7086):940-943.
57. Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K Harashima K (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172(12):6704-6712.
  58. Chang MC, Eachus RA, Trieu W, Ro DK Keasling JD (2007) Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat Chem Biol* 3(5):274-277.
  59. Keasling JD (2008) Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem Biol* 3(1):64-76.
  60. Chang MC Keasling JD (2006) Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol* 2(12):674-681.
  61. Aldor I Keasling JD (2001) Metabolic engineering of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composition in recombinant *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Biotechnol Bioeng* 76(2):108-114.
  62. Aldor IS Keasling JD (2003) Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol* 14(5):475-483.
  63. Aldor IS, Kim SW, Prather KL Keasling JD (2002) Metabolic engineering of a novel propionate-independent pathway for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 68(8):3848-3854.
  64. Lee SK, Chou H, Ham TS, Lee TS Keasling JD (2008) Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Curr Opin Biotechnol* 19(6):556-563.
  65. Mukhopadhyay A, Redding AM, Rutherford BJ Keasling JD (2008) Importance of systems biology in engineering microbes for biofuel production. *Curr Opin Biotechnol* 19(3):228-234.
  66. De Rosa M Gambacorta A (1988) The lipids of archaeobacteria. *Prog Lipid Res* 27(3):153-175.
  67. Murakami M, Shibuya K, Nakayama T, Nishino T, Yoshimura T Hemmi H (2007) Geranylgeranyl reductase involved in the biosynthesis of archaeal membrane lipids in the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *FEBS J* 274(3):805-814.
  68. J Sambrook DWR (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* THIRD EDITION.
  69. T KIESER MB, MJ, BUTTNER, KF CHATER, DA HOPWOOD (2000) *Practical Streptomyces Genetics*.

## 謝辞

最良の研究環境と得難き仲間、そして多大なる御指導を賜りました、東京大学生物生産工学研究センター西山真先生に心より厚く御礼申し上げます。また、日々密に接していただき、的確な御助言と御指導を賜りました東京大学生物生産工学研究センター、葛山智久先生ならびに富田武郎先生に心より御礼申し上げます。また、*Streptomyces coelicolor* A3(2)株由来 KAS III の発現用プラスミドである pQE-*fabH* を快く御分与していただきました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻醗酵学研究室、鮎信学先生に御礼申し上げます。

CoA 体の分析においてご指導賜りました財団法人微生物化学研究センターの澤竜一博士に心より感謝申し上げます。また、メバロン酸の分析においてご指導賜りました株式会社 ADEKA の山下治之博士に心より感謝申し上げます。最後に、共に研究に励んだ細胞機能工学研究室の仲間に感謝します。