

審査の結果の要旨

氏名 橋本 拓哉

放線菌は Waksman による streptomycin の発見以来、有用な二次代謝産物のスクリーニング源として用いられており、免疫抑制剤の rapamycin や抗寄生虫薬の avermectin をはじめ多くの臨床薬が放線菌から単離されている。薬剤のリード化合物となり得る二次代謝産物はユニークな分子骨格や官能基によって標的タンパク質との選択的な結合を可能にしている。特徴的な分子骨格形成は放線菌の持つ多彩な酵素反応が組み合わされて形成される。つまり放線菌の二次代謝産物生合成経路はユニークな反応を行う酵素遺伝子や代謝経路の宝庫と見ることができる。本研究では 2 つの放線菌が生産する中分子ポリケタイド、versipelostatin (VST) と bafilomycin (BFM) に注目し、これらの生物活性発現に重要な修飾反応に関与するいずれもユニークな酵素の機能解明を達成している。

本論文は、天然化合物の生物活性や生合成などを記述した序論に続き、第 1 章から第 3 章までは、放線菌の一種である *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 株の生産する VST の生合成機構について記述している。第 4 章では、4083-SVS6 株の未知生合成遺伝子クラスターによって生産される新奇ポリケタイド化合物を同定しており、第 5 章では、放線菌の一種である *Kitasatospora setae* KM-6054 株の生産する BFM 生合成におけるフマル化機構の解明について述べている。

第 1 章では、4083-SVS6 株のドラフトゲノムシーケンスデータから VST 生合成遺伝子クラスター領域を見出し、次いでバクテリアル人工染色体 (BAC) を利用して 4083-SVS6 株の DNA ライブラリーを作製することで 100 kb を越える VST 生合成遺伝子クラスターの全長を含む BAC クローン pKU503DverP10N24 を取得し、さらには *Streptomyces albus* J1074 における VST の異種生産について述べている。この異種発現によって生産菌の 14 倍の VST の生産量を達成したことは、BAC ベクターを利用した異種生産の有用性を示すものである。

第 2 章では糖転移酵素である *vstH* と *vstI* について遺伝子破壊株を用いて中間体の構造解析を行うことで、それぞれの基質となる糖-ヌクレオチドを推定し、さらには *vstH* と *vstI* の糖転移酵素としてのそれぞれの機能を明らかにしてい

る。すなわち、VSTの糖側鎖の生合成は、まずVstIによるVST aglyconeへのD-digitoxoseの転移反応によりVST Gが形成し、次いでVstHによるVST GへのL-olivoseの転移反応により、O-demethyl-VST Dが形成した後、VstB6によるメチル基転移反応が起こり、VST Dへと変換され、最後に再度VstIによってVST DへD-digitoxoseが転移されてVSTが形成する生合成経路を提唱している。今後、多様な構造のデオキシ糖を持つ糖-ヌクレオチドを基質に用いて生物変換や酵素的な合成を行うことで、より生物活性の高いVST類縁体の生産につながる可能性を示した研究成果である。

第3章では、VST生合成におけるスピロテロン酸形成を担う分子内[4+2]環化付加反応を担う酵素VstJを同定し、その反応機構について述べている。既知の分子内[4+2]環化付加反応を触媒する酵素は、反応性の高い化合物を基質として用いるため、[4+2]環化付加反応を触媒する酵素がない条件でも分子内[4+2]環化付加反応が起こり、生成物が生じる例が報告されていたが、VstJの場合には酵素非添加条件での反応は進行しないこと、すなわちVstJは[4+2]環化付加反応を担う酵素として機能することを酵素動力学的解析から示している。本成果は、スピロテロン酸構造形成を介したポリケタイドの新しい大環状化機構を明らかにした重要な知見である。

第4章では第1章で取得した4083-SVS6株のドラフトゲノムシーケンスとBACライブラリーを利用し、87.7 kbにわたる機能未知なtrans-AT type I型PKS生合成遺伝子クラスターの異種発現により、oxazolomycinと類似構造を持つ新奇なポリケタイド化合物の同定について記述している。この新奇ポリケタイドは、4083-SVS6株での生産は観察されなかったことから、BACベクターを用いた機能未知遺伝子クラスターの異種発現法は、ポストゲノム時代における新奇中分子取得のための強力な研究手法になりうる。

第5章では、KM-6054株の生産するBFMの修飾反応を担う生合成酵素BfmIとBfmJ機能解析について記述している。in vitro実験から、BfmJがフマル酸にAMPを付加して活性化した後、BfmIがBFM Aにフマル基を付加することを証明している。さらに、BfmIとBfmJとが相互作用していることをプルダウンアッセイによって示し、両者が相互作用することで水と反応しやすいfumaryl-AMPを受け渡し、反応を効率的に行っていることを考察している。この成果は、BfmIとBfmJが共同して触媒するポリケタイドのフマル化という新しい修飾機構についての知見である。

以上の研究成果は、放線菌の生産する中分子ポリケタイドの生合成における新奇な生化学反応を解明し、中分子化合物の可能性をさらに拡大したものであり、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。