

## 審査の結果の要旨

氏名 楊 登峰

ケトシンテースは脂肪酸、ポリケタイド、メバロン酸の生合成に関わる酵素群である。これらは I 型脂肪酸合成酵素(FAS)、ポリケタイド合成酵素(PKS)の構成ドメインであると共に、II 型 FAS、PKS、III 型 PKS、thiolase II といった酵素を構成する重要な触媒部分である。ケトシンテースの反応は Claisen 縮合を触媒し、C-C 結合を形成する反応を触媒するが、その際に、脱炭酸を伴い生じたアニオンが求核攻撃するもの(脱炭酸型)、 $\alpha$ 位のプロトンが引き抜かれ生じたアニオンが求核攻撃するもの(非脱炭酸型)の二通りが存在する。通常、脂肪酸合成、ポリケタイド合成に関わるものはすべて脱炭酸型であり、これらの酵素はその結晶構造解析が進んでおり、その触媒機構がよく理解されている。その一方で、非脱炭酸型のケトシンテースは、これまで thiolase II、III 型 PKS の OleA、MxnB、CorB が知られているものの、その触媒機構に関する研究は進んでおらず、その反応に関する知見は乏しい。

本研究で、楊は二つの非脱炭酸型ケトシンテース、CsyB、StlD に注目した。CsyB は糸状菌 *Aspergillus oryzae* 由来の酵素であり、fatty acyl-CoA (1)に脱炭酸を伴う Claisen 縮合にて malonyl-CoA を一回縮合した後、非脱炭酸型の反応で acetoacetyl-CoA (2)を縮合することで、3-acetyl-4-hydroxy-6-alkyl- $\alpha$ -pyrone (4)を合成する(Fig. 1A)。一方、StlD は isovaleryl  $\beta$ -ketoacyl-SNAC (5)と  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated acyl thioester 5-phenyl-2, 4-pentadienoyl-SNAC (6)を非脱炭酸型反応で縮合し、シクロヘキサン骨格を与える。この生成物は、StlC によって芳香化され、isopropylstilbene が生成する(Fig. 1B)。

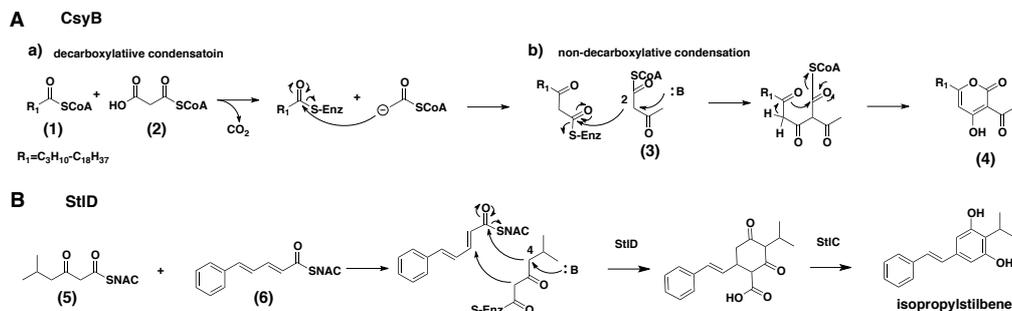


Fig.1 CsyB、StlDの触媒反応

これらは、そのClaisen反応の特殊さの他に、

- 1) acetyl-CoAではなく $\beta$ -ketoacyl thioesterを基質として受け入れること
- 2) 脱炭酸型の触媒残基である Cys-His-Asn を持つこと、が通常のケトシンテースとの差異として上げられる。

さらに、CsyB と StlD はそれぞれ、

- 1) CsyBが脱炭酸型、非脱炭酸型の両方の反応を触媒する一方、StlDは非脱炭酸型とMichael付加の反応を触媒すること
- 2) CsyB が基質である化合物 3 の C2 プロトンを引き抜き活性化するのに対し、StlD はより酸

化度が低い C4 位のプロトンを引き抜き活性化する、という点でそれぞれ異なる。

そこで楊は、1) CsyB と SttD の構造活性相関 2) CsyB、SttD の触媒の差異の解明、3) 酵素エンジニアリングによる非天然型化合物の生産、を目的として CsyB、SttD の結晶構造解析を行った。

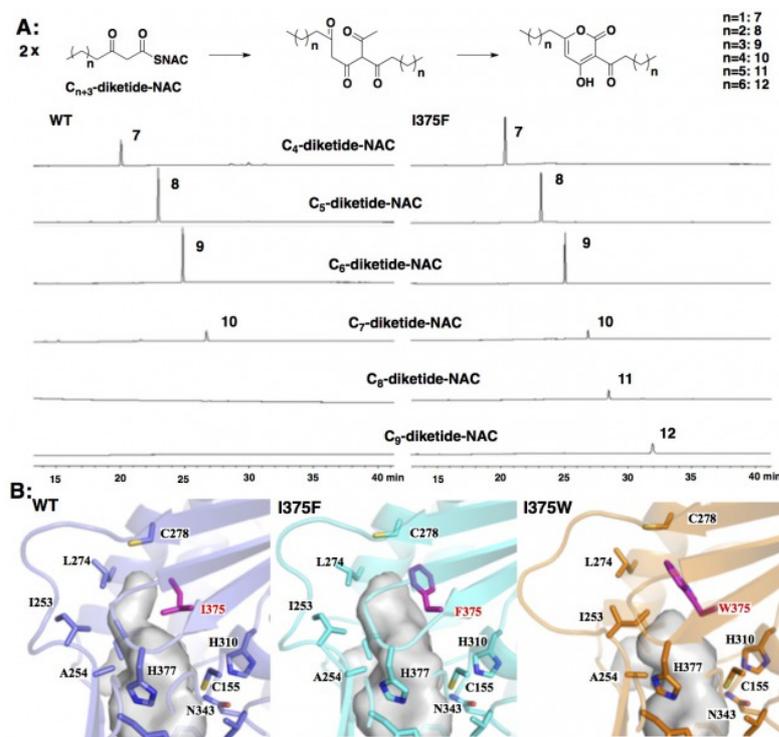


Fig.2 A: The substrate specificities of WT CsyB and I375F; B: Close-up views of novel pockets of CsyB and its mutants

を規定する I375、3) A254、I271、L274、I375、L381 で構成される CsyB 特有の基質結合キャビティ、の3つが挙げられた(Fig. 2B)。このキャビティは、他の III 型 PKS には見られず、長鎖脂肪酸由来の alkyl  $\beta$ -ketoacyl-SNAC を受け入れるための、CsyB 特有の酵素部位であると考えられた。

そこで、これら特徴的なアミノ酸部位の機能を試験するために、アミノ酸変異導入実験と種々の  $\beta$ -ketoacyl-SNAC 基質を用いた *in vitro* 反応が行われた。その結果、野生型 CsyB は二分子の  $C_4$ ~ $C_7$   $\beta$ -ketoacyl-SNAC を受け入れ、7-10 の生成物を与えた。一方で、CsyB I375F は  $C_4$ ~ $C_7$  に加えて、 $C_8$ ~ $C_9$  の  $\beta$ -ketoacyl-SNAC を受け入れ、この変異導入によって CsyB の基質特異性を拡大することに成功したことが分かった(Fig. 2A)。この結果は、CsyB の特異なキャビティが  $\beta$ -ketoacyl-SNAC のアシル鎖の受け入れに関わり、I375 残基がその容積の増減に関わっていることを示している。さらに I375 の機能を明らかとすべく、楊は I375F の結晶構造を明らかとした。その結果、I375F のキャビティ容積は野生型と比べて大きいことが分かり、*in vitro* 反応の結果と一致することが分かった(Fig. 2B)。

また、活性中心における水分子の役割を明らかとするために、 $H_2^{18}O$  ラベル体を用いた反応が行われた。LC-MS 分析の結果、 $^{18}O$  原子は生成物に取り込まれることが明らかとなり、そのため水分子とそれを介した水素結合ネットワークを介して反応が起きることが示唆された。

以上より、CsyB の反応機構が提唱された。まず、Cys155 に  $\beta$ -ketoacyl group がチオエステル結合

楊は、CsyB の野生型酵素、CoA との複合体構造について分子置換法で結晶構造を明らかにし、1.7 Å の解像度でその立体構造情報を得た。その結果、CsyB はホモダイマーであり、 $\alpha\beta\alpha$  thiolase フォールドをとることを明らかにした。活性中心の C155、H310、N343 はそれぞれのモノマー間の領域に存在した。また、いくつかの活性に重要なアミノ酸残基、酵素部位が見出された。これらは、1) 反応を開始する H377、2) CsyB 特有の基質結合キャビティのサイ

する。次に、結合した $\beta$ -ketoacyl基がCsyB特異的なキャビティに結合するように反転する。続いて、H377、C155との水素結合によって保持された水分子がチオエステル結合を加水分解する。それによって、一番目の基質が $\beta$ -keto acidとして解離する。次に、acyl-CoAがCys155にロードされ、malonyl-CoAと縮合して、二つ

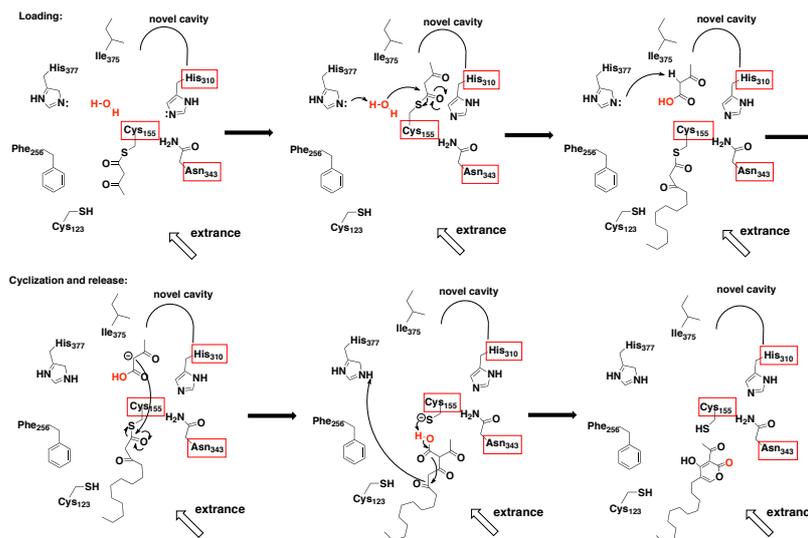


Fig.3 Proposed catalytic mechanism of CsyB

目の $\beta$ -ketoacyl基が生成する。生成した $\beta$ -ketoacyl基は始めの $\beta$ -keto acidの $\alpha$ 位より求核攻撃を受け、生成した中間体がラクトン環化することによって、最終生産物が生産する(Fig. 3)。

さらに、楊は分子置換法でSttD野生型の結晶構造を明らかにし、2.3 Åの解像度でその立体構造情報を得た。CsyBと同様に、SttDも $\alpha\beta\alpha\beta$  thiolase フォールドをとることが明らかとされ、その活性中心であるC126、H302、N337が見出された。同時に1) 酵素反応の初発に関わるE154、2) 水素結合を介して、反応の中間体を保持するS340が見出された。

SttDの構造機能活性相関を調べるために、SttDの野生型、各種変異酵素についてin vitro反応が行われた。その結果、C126A、C126S、C126D、H302R、N337A、N337Q、E154A、E154D、E154Q、S340A、S340T、S340D変異型は完全に活性を失うことが明らかとなった。この結果は、SttDはその小さいキャビティサイズを反映して、アミノ酸変異に非常に敏感であることを示すものである。また、H302Aは野生型酵素と同等の活性を示すことが明らかとなった。この結果より、通常脱炭酸や中間体の保持に関わるH302がSttDでは、活性残基として働かないことが明らかとなった。本研究では、非天然型のalkyl  $\beta$ -ketoacyl-SNACを用いてSttDとSttC反応を行い、いくつかの新規スチルベン合成も達成された。この結果は、SttDとSttCの基質特異性が寛容であることを示し、さらなる物質生産への応用の可能性が示された。

以上より、楊は、2つの非脱炭酸型ケトシンテースの構造を明らかとし、非天然型前駆体を用いたin vitro反応によって、新規化合物が合成された。その結果、反応機構に関する新たな知見が数多く得られた。本研究成果は、非脱炭酸型ケトシンテースの立体構造を元にした精密機能解析に成功した最初の事例であり、同様の反応を触媒する酵素の機能解明につながり、ケトシンテースファミリーの反応多様性の理解に寄与する。これらは、非脱炭酸型ケトシンテース反応の開拓と、本研究で得られた知見を元にした変異酵素の作製、物質生産への応用に繋がり、その中より医薬品としての活性を持つ化合物が見出されることが期待される。以上のことより、博士(薬科学)の学位を授与するに値するものと認めた。