

審査の結果の要旨

氏名 張 驪駢

本学位論文において張驪駢は「複雑骨格天然物のモジュール型生合成マシナリーの機能解析と再設計」と題しポリケタイドペプチド複合型化合物アンチマイシンとアミノポリオール化合物類の生合成研究を行った。モジュール型合成酵素はポリケタイド類やポリペプチド類の生合成にしばしば用いられ、様々な生物活性を示す二次代謝産物を生み出すことから、生合成改変による新規化合物創出の試みが盛んに行われてきた。しかしそれらは多くの場合、構造の改変は限定的でありまた著しい産量の低下が見られるなど、自由な分子設計を達成することは困難であった。張はモジュール型ポリケタイド合成酵素（PKS）に着目し、ポリケタイドの構成単位に多様性をもたらす非天然型伸長基質の供給系の確立を、抗生物質アンチマイシンの生合成研究を例に取り組み、またポリケタイドの伸長縮合反応における構造多様性をもたらす PKS モジュール構造の改変方法を、アミノポリオール類の生合成を例に取り組み、それぞれにおいて以下の成果を挙げた。

1. 多様な伸長基質の供給を可能とするクロトニル CoA 炭酸化酵素 AntE の構造機能解析

アンチマイシンは抗真菌活性を有する天然化合物であり放線菌により生合成される。その生合成ではポリケタイド合成酵素により様々な側鎖構造を持つ置換マロニル CoA が伸長基質として用いられ、これら伸長基質の供給を担う鍵酵素がクロトニル CoA 炭酸化酵素 AntE であることが知られている。張は、多様な伸長基質を供給できる分子認識機構の解明と、構造に基づく酵素触媒機能改変を目的に、AntE の X 線結晶構造解析及び点変異導入を行い、その活性の変化を評価した。その結果、AntE の全体構造を 2.1 Å の分解能で取得し、その活性部位を cinnabaramide 生合成に関与するクロトニル CoA 炭酸化酵素 CinF と比較したところ、Ala182 により AntE の基質結合ポケットが十分な空間を確保していることで基質特異性が寛容となる一方で Val350 が基質結合ポケットの大きさを制限していることが示唆された。点変異を導入した Val350Gly 変異体酵素の *in vitro* 活性評価では野生型では受け入れないインドール置換基を有する α,β -不飽和 CoA 基質の炭酸化も触媒可能であることが判明、構造に基づく合理的機能改変により新規触媒能を獲得することに成功した。

また Val350Gly 変異体を用いたポリケタイド生合成の再設計を目的とし、張は同変異体酵素をアンチマイシン産生菌株 *Streptomyces* sp. NRRL2288 Δ antBE 株に導入し発酵生産を行い代謝産物の変化を分析した。同株に非天然基質を培地添加した発酵生産の結果から、非天然基質が取り込まれた置換芳香環やヘテロ環を側鎖に持つ新規アンチマイシン類縁体の産生が確認された。これらの構造を有する伸長基質が PKS に利用する生合成反応は新規であり、以上の結果は AntE が非天然基質の炭酸化による伸長基質を供給するだけでなく実際にポリケタイドの構造多様性の拡張に応用できることを示したものである。

2. モジュール型 PKS の配列解析

モジュール型 PKS は遺伝子上のドメインの並びと産生される化合物の構造が一对一に対応することが大きな特徴である。これまで合理的なドメインの組み替えにより目的の非天然化合物を産生させることができると期待されてきたが、どのように具体的に生合成遺伝子や酵素を組み替えるかの理論的基盤は未だに確立されていない。そこで張は、自然界でそれぞれの構造の違いが如何に生み出されたかに着目し、遺伝子を比較することで組み替えの理論的基盤を見出すことができると考えた。具体的には、100 kbp を超える巨大 PKS から生合成される 4 種の類似しているものの構造に複数の相違があるアミノポリオール化合物の遺伝子の配列比較解析を行った。系統樹解析の結果より、4 化合物の構造の相違は、遺伝子組み換えにより PKS が分化し構造多様性が生まれていることを解明し、その組み替え単位が ketosynthase ドメインとその上流の β 位修飾ドメインからなること、また組み替えが acyltransferase 後方のリンカー領域の保存配列で起こることを示した。また、遺伝子配列からポリケタイドの立体中心が予想できることがこれまでに報告されていたが、張はアミノポリオール化合物でも適応できるかを調べるべく、メディオマイシンのオゾン分解と誘導體化、改良モッシャー法により遺伝子配列による立体予測が正しいことを分析化学的に示した。

本研究は、ポリケタイド生合成においてその生合成単位として非天然基質を供給できる酵素を開発したのみならず、モジュール型 PKS 酵素の組み替えの理論基盤を提示するものである。これらの業績は合成生物学を利用した新規活性物質の産生や創薬化学に大きく貢献するものであり、よって本論文は博士（薬科学）の学位論文として合格と認められる。