

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 林 健文

---

Phosphonothrixin は、1995年、クレハ化学工業社によって、放線菌 *Saccharothrix* sp. ST-888株の培養液から単離され構造決定されたユニークな構造をもつC-P化合物である。このC-P化合物は、イネ科の雑草や広葉性の雑草の発芽を抑制し、葉にchlorosisを誘発して除草活性を示すことが明らかにされている。これまでに、phosphonothrixinの不斉合成の報告例はあるものの、その生合成と分子標的に関する報告はない。本論文は、phosphonothrixin生合成遺伝子クラスターのクローニング、およびその機能解析からphosphonothrixin生合成経路の全容と分子標的の解明に向けた分子基盤について述べたものである。

第1章では phosphonothrixin の生産を確認した ST-888 株のドラフトゲノム配列の解析を行い、phosphonothrixin 生合成遺伝子クラスターのクローニングと異種発現について述べている。まず、C-P化合物である fosfomycin 生産菌の PEP phosphomutase 遺伝子 (*fom1*) の塩基配列をプローブとして利用し、*fom1* ホモログを含むコスミドクローン *cos-1*、*cos-11* と *cos-12* を得た。次に、それぞれのコスミドを *Streptomyces albus* G153 に導入し異種発現を試みた。各形質転換株の培養液を  $^{31}\text{P}$  NMR で分析した結果、*cos-11* と *cos-12* のいずれのコスミドを導入した形質転換体においても phosphonothrixin の生産を確認することができたことから、*cos-11* と *cos-12* が phosphonothrixin の生合成に必要な全ての遺伝子を含むと判断した。そこで次に、*cos-12* のシーケンスを詳細に解析し、*cos-12* が PEP phosphomutase ホモログ (*orf24*) を含む 35 個の *orf* を含んでいることを明らかにした。

第2章においては、*cos-12* 中の複数の遺伝子を欠失したコスミドを作製して、それらの *S. albus* G153 の形質転換体の phosphonothrixin の生産性を調べることにより、*orf21* から *orf33* を phosphonothrixin 生合成遺伝子クラスターと決定した。

第3章においては、ORF30 の *in vitro* での機能解析を行っている。*S. albus/orf30del* 株 (*cos-12* から *orf30* のみを破壊したコスミドを保持する *S. albus*) の培養産物を  $^{31}\text{P}$  NMR で解析すると phosphonothrixin とその一連の中間体の生産性が失われたことから、*orf30* がコードするタンパク質は phosphonopyruvate (PnPy) を基質として、phosphonothrixin 生合成の第二段階目の反応を担う酵素であると推定した。この推定を検証するため、ORF30 の組換え酵素を精製して酵素活性を検討し、組換え ORF30 が NADH を用いて PnPy を還元し 2-hydroxy-3-phosphonopropanoic acid (HPPA) を生成することを示した。また、ORF30 が、PEP phosphomutase と ORF30 とのカップリング反応により、PEP を HPPA に変換することができることを証明した。以上の結果から、ORF30 が phosphonothrixin 生合成の第二段階目の反応

を担う生合成酵素であること、phosphonothrixin 生合成の第二段階目の反応は既知の天然 C-P 化合物生合成経路のそれらとは異なる新規反応であることを示した。さらには、ORF30 が ATP 存在下 L-threonine をアデニル化する活性も検出できたことから、ORF30 が確かに多機能酵素として機能していることも明らかにした。

第4章においては、phosphonothrixin の分子標的を明らかにし、ST-888 株の phosphonothrixin に対する自己耐性機構について討論している。Phosphonothrixin 生合成遺伝子クラスター中には *orf27* がコードする acetolactate synthase (ALS) homolog が存在することから、phosphonothrixin の標的酵素は ALS であり、*orf27* は phosphonothrixin に対する自己耐性遺伝子であるという仮説を立てた。その仮説を検証するため、*Escherichia coli* *ΔtolC* 株と *Bacillus subtilis* 168 株に対して、最小培地を用いて ST-888 株培養上清の抗菌アッセイ試験を行った。その結果、phosphonothrixin を含む ST-888 株培養上清は両菌株に対して抗菌活性を示した。さらには、*B. subtilis* 168 株に対する抗菌活性は valine、leucine、isoleucine の添加で抑制された。以上の結果から、phosphonothrixin の標的酵素は分枝鎖アミノ酸生合成経路の初発反応を担う酵素 ALS であると結論し、*orf27* が ST-888 株の自己耐性遺伝子である可能性を示した。

以上、本研究では、相同検索、遺伝子破壊、異種発現、<sup>31</sup>P NMR 解析により phosphonothrixin 生合成遺伝子クラスターを初めて同定することに成功した。また、大腸菌で phosphonothrixin 生合成遺伝子を発現させ、精製した組換え酵素を用いて酵素反応を検出し、phosphonothrixin 生合成経路の第一段階目の PEP phosphomutase 反応に続く第二段階目の PnPy dehydrogenase 反応を明らかにするとともに、各 *orf* の相同性検索の結果から、phosphonothrixin の生合成経路を提案した。さらには、phosphonothrixin が ALS を阻害することで抗菌活性を示すことを実証した。本研究で得た知見は phosphonothrixin 生合成経路の全容解明につながるものであり、学術上、応用上貢献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。