

(様式 2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 末宗 周憲 印

題 目 微生物の天然物生合成系に見られる機能の多様化 -構造生物学的な視点から-

現在、酵素の多くは基質特異性の高い生体触媒として知られているが、始原細胞が持っていた遺伝子の数は現在よりはるかに少なく、生命活動に必要な最小限の酵素しか持っていなかったと考えられている。現在の生物は様々な基質に対して多様な反応を行う多数の酵素を持つことで、その生命活動が可能となっている。これら酵素分子が進化する過程では、まずそれらの遺伝子のコピーと、改変によって基質特異性や触媒反応が変化し、多様な酵素が生み出されていったと推定されている。また、既存の酵素群によって物質が生産・変換されている系に、新たな酵素が加えられることで新規の代謝系や生合成系が作られる場合もある。このような酵素やタンパク質の機能の多様化や新たな組み合わせによって微生物は多様な構造と生理活性を持つ天然物を生産する能力を獲得したと考えられる。

本研究では酵素が受け入れる基質の多様化について芳香環にプレニル基を付加する酵素を、また、既存の酵素群に新たな酵素が加えられ新たな物質生産系が作り出される例としてアナモックス菌のラダラン脂質生合成経路を取り上げ、構造生物学的な視点から微生物の天然物生合成系に見られる機能の多様化に関する研究を進めた。

一般に二次代謝で良く見られる芳香族基質プレニル基転移酵素 (PTase) は構造的および生物学多様性を生み出す化合物を生産するため過去 20 年ほど、生化学的、分子生物学的、構造生物学的研究が積極的に行われてきた。中でも 2010 年に高橋らによって同定された *Streptomyces* sp. SN-593 由来 PTase, IptA は様々な置換基を持つトリプトファンをプレニル化することができる。この基質寛容なプレニル化メカニズムの解明を目指し、トリプトファンとプレニル基供与体が結合した 3 者複合体の X 線結晶構造解析を行った。IptA は PTase に典型的な ABBA フォールドを持ち、その中心部に 2 つの基質を収めていた。5-メチルトリプトファンとプレニル基供与体が結合した結晶構造では、2 つの基質が互いに離れることで嵩高い 5-メチルトリプトファンが基質ポケットに収められていた。これらの構造からプレニル基を受容する基質に対するこの酵素の寛容性の一端を明らかにすることが出来た。さらに、IptA のプレニル基供与体結合部位を広げるように活性部位を改変すると、長鎖のプレニル基供与体を用いてトリプトファンのプレニル化が可能となり、供与体について寛容性を拡大させることができた。

さらに最近、放線菌が生産する強力な神経保護物質であるカルキノスタチン A の生合成経路において ABBA フォールドを持たない PTase の存在が報告された。この生合成遺伝子クラスターには直鎖のイソプレノイドであるスクアレンを合成する酵素と相同性を示す酵素 CqsB4 が見出され、この酵素が

芳香族基質へのプレニル基転移反応を触媒していることが確認された。また、分子進化系統樹解析などから CqsB4 と 73 % の相同性を示す LvqB4 も見出され、CqsB4 と同様な特徴を持つことが報告された。申請者はスクアレン合成酵素様の構造を持つと考えられる CqsB4 と LvqB4 が芳香族基質のプレニル化を行う分子メカニズムと、酵素機能の多様化の仕組みを明らかにするため、これらの酵素の基質結合型などの X 線結晶構造解析を行った。どちらの酵素も全体構造はスクアレン合成酵素に非常に類似しており、スクアレン合成酵素のプレニル基の結合に必須なアミノ酸モチーフもよく重なる位置に存在していた。また、その基質結合様式は既知の PTase に類似していた。さらに、活性部位のアミノ酸を置換した変異体の酵素活性の測定から、基質結合や酵素活性に重要なアミノ酸残基を明らかにした。これらの結果から、CqsB4, LvqB4 はスクアレン合成酵素の構造を保存しつつ活性部位の構造をわずかに改変することで受け入れる基質と触媒する化学反応を多様化させることで、スクアレン合成酵素にはない芳香族プレニル基転移能を獲得したハイブリッド酵素であると考えられる。

嫌氣的にアンモニアを酸化するアナモックス菌は、生育が極めて遅いという特徴を持ち、4 員環が複数連なった梯子状の炭素骨格を有するラダラン脂質を大量に生産する。ラダラン脂質の梯子状構造には大きな歪みエネルギーが蓄積されているため、バイオジェット燃料として注目されており、ラダラン脂質の効率的な生産はカーボンニュートラルな持続性社会の実現に貢献すると期待される。アナモックス菌の脂肪酸生合成酵素群の遺伝子クラスターには、一般的な微生物と同様の脂肪酸生合成酵素遺伝子に加えて S-アデノシルメチオニン (SAM) 依存性の酵素やフィトエン不飽和化酵素の遺伝子が多く存在していた。このことなどから Rattray らは脂肪酸生合成系に他の酵素が加えられることでラダラン脂質の生産が可能となり、SAM 依存性酵素などがラダラン脂質の梯子状構造を構築していると提案した。そこで、本研究ではこの仮説に基づき、ラジカル反応によって C-C 結合反応など多様な反応を行うことができるコバラミン依存性ラジカル SAM 酵素にまず注目し、その分子的性質の解明を進めた。申請者は、大腸菌を用いたラジカル SAM 酵素の発現系を構築し、コバラミンと鉄-硫黄クラスターの補因子を有したラジカル SAM 酵素の高純度試料調製手法を確立した。また、この酵素の電子常磁性共鳴スペクトルから、鉄-硫黄クラスターが正しく再構成されていることが確認され、SAM 分解活性が確認されたことから本研究で調製した試料は酵素活性を有していると考えられる。またラダラン脂質前駆体推定鍵酵素であるフィトエン不飽和化酵素は大腸菌を用いた発現系の構築が非常に困難なタンパク質である。アナモックス菌はその倍加時間の長さなどのため、遺伝子操作がほぼ不可能である。そこで、アナモックス菌と近縁であり、遺伝子操作技術が確立されている *Planctomyces limnophilus* を用いて異種発現系の構築を試みた。本研究ではまず Tn5 トランスポソーム法を用いてインテグラーゼによる組み換えの標的となる配列 attB を *P. limnophilus* のゲノムへ導入する。続いてインテグラーゼベクターを用いた部位特異的遺伝子導入について試みた。