

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（工学）	氏名	手島愛子
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
<p>Functional analysis of P450 monooxygenases responsible for production of highly functional secondary metabolites in Actinomycetes (放線菌二次代謝産物の高機能化を司る P450 モノオキシゲナーゼの機能解明)</p>			
論文審査担当者			
主査	准教授	荒川賢治	印
審査委員	教授	秋庸裕	印
審査委員	教授	河本正次	印
審査委員	教授	田中伸和	印
〔論文審査の要旨〕			
<p><i>Streptomyces</i> 属放線菌は多種多様な二次代謝産物を生産することで知られ、これまでに発見された微生物由来有用物質の約7割が放線菌から発見されている。シトクロム P450 は、自然界に存在する最も汎用性の高い生体触媒の一つで、生物活性を持つ天然物の生合成において重要な役割を果たしている。放線菌P450の徹底的機能解析を通して、高機能生理活性物質の創製に資する汎用的生体触媒の構築が期待される。</p> <p>本学位論文では、<i>Streptomyces rochei</i> 7434AN4株の二次代謝生合成に関わるP450のうち、シグナル分子SRBおよびポリケチド抗生物質ランカマイシンの生合成に関わるP450酵素について機能解明を行っている。</p> <p>序論では、放線菌および二次代謝産物、P450酵素に関する研究背景について、具体例を交えて言及し、研究の意義づけと位置づけを行っている。</p> <p>第一章では、シグナル分子 SRB 生合成における P450 酵素 SrrO の機能解析を行っている。本研究で対象としている <i>S. rochei</i> は、2つの抗生物質ランカサイジン (LC) ・ランカマイシン (LM) を生産し、それらはシグナル分子 SRBs (<i>Streptomyces rochei</i> butenolides) により誘導される。SRB の生合成遺伝子 <i>srrX</i> の近傍には P450 水酸化酵素 <i>srrO</i> がコードされていたことから、SRB 生合成に関与することが予想されている。<i>srrO</i> が SRB 生合成に関与するかを調べるため、<i>srrO</i> 破壊株の代謝産物解析を行ったところ、親株と同様に LC・LM を生産していることを明らかにしている。この結果から、<i>srrO</i> は SRB 生合成には関与していない、または $\Delta srrO$ 株が生産する SRB 中間体が抗生物質誘導活性を持つ、という2つの可能性が考えられたため、$\Delta srrO$ 株からのシグナル分子の取得を試みている。30 L の培養液を酢酸エチルにより抽出し、ゲル濾過クロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC により単離・精製を行っている。ESI-MS 解析において、SRB より酸素原子が1つ少なく、水素原子が2つ多い化合物が検出され、NMR 解析では、ブテノライド骨格がよく保存されていたことから、今回得られた SRB 中間体は 6'-deoxo-SRBs であり、<i>srrO</i> は 6'位の酸化反応を触媒していることが示</p>			

唆されている。さらに、ゲルシフトアッセイによりシグナル分子受容体である SrrA タンパクとの親和性解析を行い、6'-deoxy-SRB1 は SRB1 と比べて SrrA との親和性が 100 分の 1 であったことを見いだしている。以上、*srrO* は SRB 生合成の最終段階に関与し、シグナル分子活性の向上に寄与することが示唆されている。

第二章では、ランカマイシン生合成に関与する P450 酵素 LkmK, LkmF の機能解析について述べている。LM 生合成遺伝子クラスターのうち、P450 酵素遺伝子 *lkmK*, *lkmF* および糖転移酵素遺伝子 *lkmL*, *lkmI* の遺伝子破壊株の代謝産物解析により、LM の生合成経路ではアグリコン 8,15-dideoxy lankanolide に対して、LkmK (15 位水酸化)→LkmL (3 位水酸基への L-arcanose 付加)→LkmF (8 位水酸化)→LkmI (5 位水酸基への D-chalcose 付加) の順に酵素反応が進行することが示唆されている。そこで、本研究では *lkmK* および *lkmF* のタンパク発現系を確立し、これらの酵素の基質認識解析及び LM 生合成経路の検証を行っている。まず、両酵素の予想基質を得るために、 $\Delta lkmK$ -*lkmL* 株、 $\Delta lkmF$ -*lkmI* 株を培養・抽出し、それぞれの株から 8,15-dideoxylankanolide、3-O-L-arcanosyl-8-deoxylankanolide を単離し、構造を決定している。発現タンパクに関して、LkmK は大腸菌発現系を用い、LkmF は大腸菌系では反応が進行しなかったため、放線菌発現系を用いて調製している。二重破壊株から得られた基質とタンパク発現系を用いて *in vivo* 反応を行なったところ、8,15-dideoxylankanolide、3-O-L-arcanosyl-8-deoxylankanolide は各々 LkmK, LkmF によって水酸化されることを見い出している。また、ランカマイシン誘導体についても酵素による基質変換反応を行い、*lkmF*, *lkmK* の基質特異性の解析を行っている。LkmK の基質認識は比較的寛容であり、3 位や 5 位のデオキシ糖の有無に関係なく酸化反応が進行すること、LkmF の基質特異性に 3 位デオキシ糖付加が関与することを明らかにしている。

結論として、本研究のまとめおよび今後の展望について言及している。*S. rochei* の二次代謝生合成に関与する P450 の分子基盤解明を目的とし、第一章では、シグナル分子 SRB 生合成における SrrO の機能解析を行い、6'位酸化反応を介した二次代謝誘導活性への関与を明らかにしたこと、第二章では、LkmK, LkmF が抗生物質ランカマイシンの 15 位, 8 位の位置特異的酸化反応に関与すること、さらに両酵素の基質特異性についても明らかにしたことについて要約し、総合討論を行っている。また、本研究により得られた P450 酵素の分子基盤の知見が、分子認識の寛容化に伴う汎用性酵素触媒の構築、さらには生合成系の再設計による高機能生物活性分子の創製など、合成生物学・生合成工学に貢献する可能性について言及している。

本研究によって多様な物質変換反応を司る P450 酵素の分子基盤が明らかにされ、その適用範囲が解明されたのみでなく、遺伝子工学や酵素工学、合成生物学を駆使した汎用性酵素としての可能性も提唱されている。したがって、本論文の著者は、博士 (工学) の学位を受けるのに十分な能力と実績を有するものと認める。

備考 審査の要旨は、1,500 字程度とする。