

論文 / 著書情報
Article / Book Information

| | |
|-------------------|--|
| 題目(和文) | マクロラクタム配糖体抗生物質クレマイシンの生合成に関する研究 |
| Title(English) | |
| 著者(和文) | 天貝啓太 |
| Author(English) | Keita Amagai |
| 出典(和文) | 学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9255号, 授与年月日:2013年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:江口 正,藤本 善徳,植草 秀裕,工藤 史貴,大森 建 |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9255号, Conferred date:2013/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,, |
| 学位種別(和文) | 博士論文 |
| Category(English) | Doctoral Thesis |
| 種別(和文) | 審査の要旨 |
| Type(English) | Exam Summary |

(博士課程)

論文審査の要旨及び審査員

| 報告番号 | 甲第 | 号 | 学位申請者氏名 | | 天貝 啓太 | |
|-------------|-----|-------|---------|-----|-------|-----|
| | | 氏名 | 職名 | | 氏名 | 職名 |
| 論文審査 審査員 | 主査 | 江口 正 | 教授 | 審査員 | 大森 建 | 准教授 |
| | 審査員 | 藤本 善徳 | 教授 | | | |
| | | 植草 秀裕 | 准教授 | | | |
| | | 工藤 史貴 | 准教授 | | | |

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「マクロラクタム配糖体抗生物質クレマイシンの生合成に関する研究」と題し、以下の5章から構成されている。第1章「序論」では、本研究の背景となる抗生物質生合成研究の概要、特に有用な生理活性物質が多く見出されているポリケチド化合物を取り上げ、その生合成研究の重要性について述べている。ポリケチド化合物の開始基質の構造には多様性がありながらも、 β -アミノ酸を開始基質とするポリケチド生合成の遺伝子・酵素レベルでの知見は少なく、遺伝子操作による新規化合物創製の基盤を構築するには、より多くの知見が必要であることを指摘している。その上で、放線菌 *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 より単離された 19 員環マクロラクタム配糖体抗生物質であるクレマイシンの開始基質を含めた興味深い構造上の特徴を述べ、その生合成機構を解明することの重要性を述べている。

第2章「投与実験による生合成前駆体の解明」では、クレマイシン生合成前駆体を解明するための安定同位体標識化基質を用いた投与実験について述べている。ポリケチド化合物の一般的な生合成前駆体として知られている $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸、 $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 酢酸、 $[1-^{13}\text{C}]$ プロピオン酸をそれぞれ投与し、クレマイシンのアグリコン骨格部分の全炭素の由来を解明している。さらに $\text{D-[6,6-}^2\text{H}_2]$ グルコースを投与することによってシマロース部分が D- グルコース由来であることも明らかにしている。また、プロピオン酸が取り込まれる部分に酢酸も取り込まれるという現象については、酢酸がクエン酸回路に取り込まれ、コハク酸を経由してメチルマロニル-補酵素 A (CoA) が生合成されることを予想し、コハク酸- d_4 を投与することによってこの仮説を実証している。

第3章「生合成遺伝子の探索と同定」では、クレマイシン生合成遺伝子クラスターの取得と、遺伝子破壊実験、遺伝子翻訳産物の相同性解析によるクレマイシン予想生合成機構の推定を行っている。生産菌ゲノム DNA を制限酵素で部分消化して得られた遺伝子断片をベクターに組み込んで作製したコスミドライブラリーから、ジデオキシ糖生合成遺伝子をプローブとしたスクリーニング、染色体歩行、ゲノム DNA ドラフトショットガンシーケンスを行うことにより、生産菌ゲノム DNA 上、約 95 kbp の遺伝子領域のクレマイシン生合成遺伝子クラスターを見出している。さらにその全塩基配列を解読するとともに、40 個の酵素遺伝子を見出し、そのうち 33 個の遺伝子がクレマイシン生合成に関わると推定し、この遺伝子群を *cmi* 遺伝子クラスターと命名している。特に開始基質である 3-アミノノナン酸は、ポリケチド合成酵素 (PKS) により炭素鎖が構築され、未知の機構によりアミノ基が導入されると推定している。また、この遺伝子クラスターには、他の β -アミノ酸含有型マクロラクタム抗生物質であるピセニスタチンおよびインセドニンの開始基質の活性化と運搬に関わる酵素遺伝子群と相同性を有するものが保存されていたことから、3-アミノノナン酸の構築後はこれらと同様の機構で、アグリコン骨格構築を触媒する PKS へと導入されると推定している。

第4章「開始基質のアミノ基導入機構の解明」では、開始基質生合成におけるアミノ基導入機構について、酵素レベルでの解析を行っている。3-アミノノナン酸と類似の開始基質を有するマクロラクタムの生合成遺伝子クラスターと、第3章で決定した *cmi* 遺伝子クラスターとの比較を行い、両方で保存されているフラビンアデニンジヌクレオチド依存型グリシン酸化酵素 CmiS2 と脂肪酸-CoA チオエステラーゼ CmiS1 が、開始基質のアミノ基導入に関わることを予想している。これらの酵素の単独発現系を構築し、*in vitro* での反応解析を行い、CmiS1 は 2-ノネン酸-N-アセチルシステアミンチオエステルに対してグリシンをマイケル付加させた後にチオエステルの加水分解を行い、CmiS2 は CmiS1 酵素反応生成物のカルボキシメチル部位を酸化して 3-アミノノナン酸とグリオキシル酸を形成する酵素であることを見出している。従って、クレマイシンスターター部である 3-アミノノナン酸は、PKS のアシルキャリアータンパク質上の 2-ノネン酸チオエステルが CmiS1 によるグリシンのマイケル付加、続いてのチオエステルの加水分解を受け、その後 CmiS1 によるグリシン部位の酸化的分解を受け生成するものと結論づけ、これまでに無い β -アミノ酸生合成機構であると述べている。

第5章「総括」では、本研究で得られた知見を総括すると共に、 β -アミノ酸の生合成および修飾に関わる酵素遺伝子を利用する新規 β -アミノ酸含有型マクロラクタムの創製に関する展望について述べている。

以上要するに、本論文はマクロラクタム抗生物質クレマイシンの生合成機構を遺伝子・酵素レベルで明らかにしたもので、特にその特異な開始基質である 3-アミノノナン酸の構築に関わる生合成酵素群の機能を解明したことにより、二次代謝系における新規機能を有する酵素の存在を示すと同時に、二次代謝生合成マシナリーの多様性を示したものである。これらの知見は天然物有機化学、生物有機化学的に重要な知見であり、理学上の貢献は大きい。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値があるものと認められる。