

機関番号：32621
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20510196
 研究課題名（和文） 新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 Steely の構造と機能に関する研究
 研究課題名（英文） Functional and structural analyses of novel hybrid type polyketide synthase Steely
 研究代表者
 齊藤 玉緒 (SAITO TAMAO)
 上智大学・理工学部・准教授
 研究者番号：30281843

研究成果の概要（和文）：

土壌微生物である細胞性粘菌で初めて発見された新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素(PKS)の Steely は今まで別個と考えられていた I 型 PKS と III 型 PKS が融合したものである。本研究ではどのように 2 つの酵素が協調して働くのか、どのような産物を与えるのか、その産物はどのような生物学的機能をもつのかを調べた。

研究成果の概要（英文）：

The soil microorganism, *Dictyostelium*, has novel hybrid-type polyketide synthase (PKS) known as 'Steely'; Steely enzyme is formed by the fusion of type I and type III PKSs. In this study, we examined how these two different enzymes work together and what are the products of Steely enzymes. Finally, we examined the biological functions of these products.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：新複合領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：二次代謝産物、ポリケタイド合成酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) ポリケタイド研究の現状として、ポリケタイドは貴重な医薬品資源としての重要な位置を占めているものの、一方で資源の枯渇が問題となり新たな物質資源開発が解決を迫られる重要な課題であった。

(2) 原生生物のポリケタイドおよびその合成酵素研究は未開発研究分野であり、新たな物質資源開発の観点からもこの分野の開発

が必要であった。

(3) 研究代表者は細胞性粘菌でのみ見られる新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素をゲノム情報の解析から見つけ出し、2 つの Steely 酵素のうちのひとつ SteelyB 酵素が、細胞性粘菌の柄細胞分化誘導分子 DIF-1 の合成を司る事を明らかにした。

(4) しかし、Steely 酵素の産物は DIF-1 だけではない事が示唆されており、さらに

SteelyA 酵素の産物については未解明の状態であった。

(5) 研究開始当初は Steely 酵素の III 型 PKS 領域を大腸菌で発現させ、この機能を解析していたため *in vivo* での機能解析および Steely 酵素の産物の生物学的機能に関する研究はまったくなされていない状態にあった。

2. 研究の目的

別個の酵素と考えられていた I 型 PKS と III 型 PKS がどのように協調して機能しているのか、どのようにして異なるいくつかの産物を作り出しているのかを明らかにする事を目指した。

その第一歩として Steely 酵素全長を使って酵素機能を *in vitro* で再構成する実験を中心としてその作用機構を明らかにする事を目指した。以下の 3 点の解明を研究目的とした。

(1) 精製 SteelyB 酵素を用いた *in vitro* 酵素活性再構成実験による作用機構の理解

(2) Steely 酵素の *in vivo* での未知の合成産物の構造解析とその合成経路の推定

(3) Steely 酵素の合成産物の生物学的機能解析

3. 研究の方法

以下のような方法によって新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素の産物と機能、及び生合成機構の解析を行った。

(1) *stlB* 遺伝子欠損株の表現型の観察及び、マーカー遺伝子の時間的、空間的発現パターンの解析。

これにより SteelyB 酵素の産物 (DIF-1) がどの細胞型の分化を誘導するのかを解析し、産物の生物学的な機能を解析した

(2) 精製 Steely 酵素を用いた *in vitro* 再構成実験。

これにより SteelyB 酵素がどのような機構で柄細胞分化誘導分子の骨格を合成しているかを推定した。

(3) 野生型株と *stlA* 欠損株が細胞外に放出する低分子化合物の分析。

これにより SteelyA 酵素の産物の構造を決定した。

(4) *stlA* 遺伝子欠損株の表現型の観察および、欠損が(3)で同定した化合物で回復するかの観察。

(5) *stlA* 欠損株でのマーカー遺伝子の発現解析。

以上の(4), (5)によって SteelyA 酵素の産物の生物学的な機能を解析した。

4. 研究成果

SteelyA 酵素については、

(1) 産物のひとつとして 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol (MPBD) (図 1) の合成を司っている事を明らかにした。



図 1 SteelyA 酵素の産物 4-Methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol

(2) *stlA* 遺伝子欠損株は孢子細胞の成熟ができず、孢子塊が不完全な細胞からなるという欠損がある事、この孢子形成の欠損が外から 200nM の MPBD を与える事によって回復する事を明らかにした。つまり SteelyA 酵素は MPBD を合成し、MPBD は孢子細胞の成熟を誘導するという生物学的な機能を明らかにした。

下の表 1 は MPBD の量に依存して孢子細胞分化が回復していく事を示したもの。

MPBD (nM)	Encapsulation ratio (%)	
	Ax2	<i>stlA</i> null
None	100	22 ± 17
10	98 ± 7	35 ± 19
100	97 ± 12	65 ± 20
200	102 ± 9	83 ± 17
500	100 ± 7	86 ± 16

表 1 MPBD による *stlA*-株の孢子形成の回復

SteelyB 酵素については

(3) SteelyB 酵素の産物 DIF-1 (図 3) は柄細胞のうちの basal disc と lower cup とよばれる細胞群の分化を誘導する事が明らかにした (図 2)。

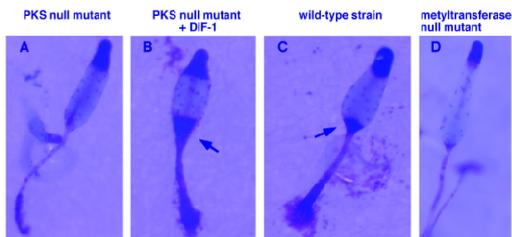


図 2 stlB 欠損株 (A) では basal disc とよばれる柄の基部と、胞子塊を支える lower cup (矢印) が欠損している。

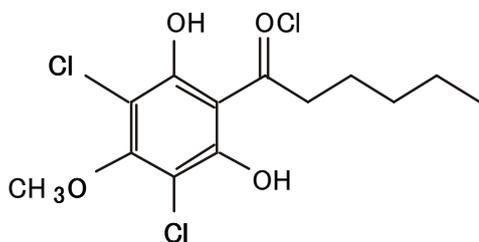


図 3 SteelyB 酵素の産物 DIF-1 の構造

(4) SteelyB 酵素の pull down 画分を用いた *in vitro* 再構成実験の結果、他のタンパク質の介在無しに SteelyB 酵素は単独で DIF-1 のポリケタイド骨格を作った。この結果は I 型酵素と III 型酵素の間をアシルキャリアプロテイン (ACP) ドメインが仲介していると言う考えを支持するものであった (unpublished data)。

(5) SteelyB 酵素の発生後期の DIF-1 以外の産物は III 型 PKS の部分が切り離されて機能している可能性が示唆された (unpublished data)。

以上の研究から、細胞性粘菌で見られる 2 つのハイブリッド型 PKS について、それぞれの酵素の産物とその生物学的な機能についての検証を行った。

細胞性粘菌の細胞分化が他に例をみないハイブリッド型酵素の Steely 酵素によって調節されている事を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Narita, TB., Koide, K., Morita, N., & Saito, T. *Dictyostelium* hybrid polyketide synthase, SteelyA, produces 4-methyl-5-pentylbenzene -1,3-diol and induces spore maturation (2011) **FEMS Microbiology Letters** 319(1):82-87. (査読有り)
- ② Rieu, J-P., Saito, T., Delanoë-Ayari, H., Sawada, Y. and Kay, RR.: Migration of *Dictyostelium* slugs: anterior-like cells may provide the motive force for the prespore zone (2009) **Cell Motility and the Cytoskeleton** 66: 1073-1086 (査読有り)
- ③ 齊藤玉緒「土壌微生物・細胞性粘菌のポリケタイド合成酵素-新規ハイブリッド型酵素 Steely を中心として-」(2009) **化学と生物** 47. 22-27 (査読なし)
- ④ Saito, T., Kato, A., and Kay, RR: DIF-1 induces the basal disc of the *Dictyostelium* fruiting body (2008) **Dev. Biol** 317. 444-453 (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 成田隆明、小出康太、森田直樹、齊藤玉緒 「細胞性粘菌における新規ハイブリッド型酵素 SteelyA の解析」 **日本農芸化学会 2011 年度大会** 2011 年 3 月 27 日 京都女子大学
- ② 原悠樹、田中亨、加藤敦之、齊藤玉緒 「細胞性粘菌における新規ハイブリッド型酵素ポリケタイド合成酵素 Steely の分子進化的解析」 **日本農芸化学会 2011 年度大会** 2011 年 3 月 27 日 京都女子大学
- ③ Akabane, K. & Saito, T.: "Expression profile of Ppolyketide Synthase genes in *Dictyostelium discoideum*" **Annual International Dictyostelium Meeting** 2010 年 8 月 4 日 カーディフ大学 (英)
- ④ Narita T. Akabane K. & Saito T.: "Expression profile of Polyketide Synthase genes in *Dictyostelium discoideum*" **The third Asian plant lipids symposium** 2009 年 11 月 28 日. 横浜

情報文化センター(横浜)

⑤ Saito T: "Functional analysis of Steely polyketide synthase" **The third Asian plant lipids symposium** 2009年11月27日
横浜情報文化センター

⑥ Saito T. & Kay RR.: "Functional analysis of Steely polyketide synthase" **International Dictyostelium Conference**. 2008年9月16日 Tsukuba, Japan

⑦ 齊藤玉緒 「細胞性粘菌のポリケタイド合成酵素」 第3回化学生態学研究会. 2008年7月4日 函館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 玉緒 (SAITO TAMAO)
上智大学・理工学部・准教授
研究者番号: 30281843

(2) 研究分担者

森田 直樹 (MORITA NAOKI)
(独) 産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門分子生物工学研究グループ・研究グループ長
研究者番号: 60371085

(3) 連携研究者

なし