

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660097

研究課題名(和文)タイプIVポリケチド合成酵素の発見と触媒メカニズムの解明

研究課題名(英文)A novel type of polyketide synthase from *Saccharopolyspora erythraea*

研究代表者

鮎 信学 (Funa, Nobutaka)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：70361574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SACE_5946は、放線菌*Saccharopolyspora erythraea*のゲノム上にコードされる脂肪酸合成酵素FabF/Bの相同蛋白質である。SACE_5946は、スターター基質3-oxooctanoyl-ACPと伸長鎖基質methylmalonyl-CoAをSACE_5946と共に反応させたところ、4-hydroxy-3-methyl-6-pentyl-2-pyroneを与えた。以上より、SACE_5946が新規タイプのポリケチド合成酵素であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：A homolog of FabF/B, which is encoded on the genome of the actinomycetes *Saccharopolyspora erythraea*, was expressed in *Streptomyces coelicolor* M1146. An HPLC analysis of the supernatant of the culture medium resulted in the detection of several peaks. The compounds were characterized as 6-alkyl-4-hydroxy-3-methyl-2-pyrone by NMR and MS analyses. 6-alkyl-4-hydroxy-3-methyl-2-pyrone was assumed to be assembled from acyl carrier protein (ACP) ester of β -keto acid and methylmalonyl-CoA in vivo. Therefore, we prepared N-acetylcysteamine (NAC), an analogue for ACP, ester of 3-oxooctanoic acid (3-oxo-C8-NAC). The in vitro reaction of the homologs of FabF/B using 3-oxo-C8-NAC and methylmalonyl-CoA as substrates resulted in the synthesis of 4-hydroxy-3-methyl-6-pentyl-2-pyrone. This is the first demonstration that the single FabF/B homolog synthesized a polyketide in vitro. Thus, we propose that the enzyme system is a novel type of PKS, which we named "type IV" PKS.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ポリケチド 放線菌

1. 研究開始当初の背景

ポリケチドは微生物、植物が生産する天然有機化合物の一群であり、ポリケチド合成酵素 (PKS) により合成される。PKS は、ketosynthase (KS) の配列と酵素全体の型で分類されている (図 1)。type I PKS はモジュール型・FabF/B であり、type II PKS はサブユニット型・FabF/B である。Type III PKS は単独型・FabH とサブユニット型・FabH の二種類がある。モジュール型・FabH、単独型・FabF/B は報告例がない。本研究により単独型・FabF/B の発見に成功すれば、Type IV PKS を提唱できる (図 1)。

	FabF/B様KS	FabH様KS
モジュール型	 DEBS等	未発見
サブユニット型	 Act等	 TKS, OAC等
単独型	SACE_5946 SACE_2968	 RppA等

図 1 PKS の全体構造の型と KS の関係

2. 研究の目的

微生物のゲノム情報は 1 日に 1 株、新規に公開されるほど急速に蓄積している。我々は放線菌の脂肪酸合成酵素 FabF/B と相同な蛋白質データ群から新しい種類のポリケチド合成酵素をスクリーニングする。具体的には、放線菌 *Saccharopolyspora erythraea* のゲノム上に存在する FabF/B 相同蛋白質 SACE_5946 が新規なポリケチド合成酵素であることを証明し、「type IV PKS」を提唱する。また、SACE_5946 のホモログ蛋白質 SACE_2968 の触媒機能を解明することで type IV PKS の多様性を示す。

3. 研究の方法

(1) タイプ IV PKS、SACE_5946 および SACE_2968 の *in silico* 解析

Saccharopolyspora erythraea のゲノムデータベースに対し、BLAST 検索を行い、該当遺伝子を選別した。系統樹の作成には Clustal X を用いた。

(2) SACE_5946 および SACE_2968 の放線菌における異種発現と組換え放線菌が蓄積する化合物の構造決定

放線菌用の高コピープラスミドベクター pIJ6021 に SACE_5946 または SACE_2968 をそれぞれクローニングし、pIJ6021-SACE_5946、pIJ6021-SACE_2968 を作製した。pIJ6021-SACE_5946、pIJ6021-SACE_2968 を放線菌 *S. coelicolor* M1146 株に形質転換し、*S. coelicolor* M1146/pIJ6021-SACE_5946、M1146/pIJ6021-SACE_2968 を作製した。本形質転換体を YEME 液体培地にて培養後、培養液の粗抽出物を HPLC 分析した。

NMR は Bruker Biospin 社 AV400N FT-NMR

spectrometer (400 MHz) で測定し、HRMS は ThermoScientific 社 Q-Exactive を用いた。

(3) SACE_5946 の大腸菌組換え酵素の調製と *in vitro* 反応

pET28a-SACE_5946 を作製し、*E. coli* BL21(DE3)/pET28a-SACE5946 から Ni アフィニティーカラムにより His-tag 融合蛋白質として組換え SACE_5946 を調製した (図 2)。

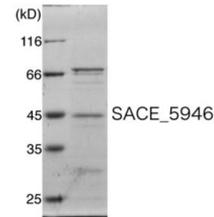


図 2 SACE_5946 の SDS-PAGE

4. 研究成果

(1) タイプ IV PKS、SACE_5946 および SACE_2968 の *in silico* 解析

SACE_5946 および SACE_2968 は、脂肪酸合成酵素遺伝子 FabF および FabB と相同な機能未知の蛋白質である。SACE_5946 および SACE_2968 の系統樹解析の結果、SACE_5946/SACE_2968 は他のホモログ酵素と共に、脂肪酸合成酵素 FabH, F, B または type I, II, III PKS と別のクレードを形成することが判明した (図 3)。また、SACE_2968 (図 4A)、SACE_5946 (図 4B) の周辺には既知の PKS に見られるような修飾酵素等が存在しない。以上より、SACE_5946 および SACE_2968 は新規タイプの PKS である可能性が高い (図 1)。

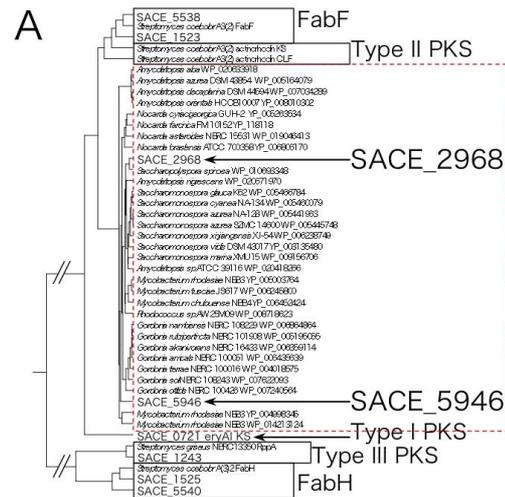


図 3 タイプ IV PKS の系統樹解析

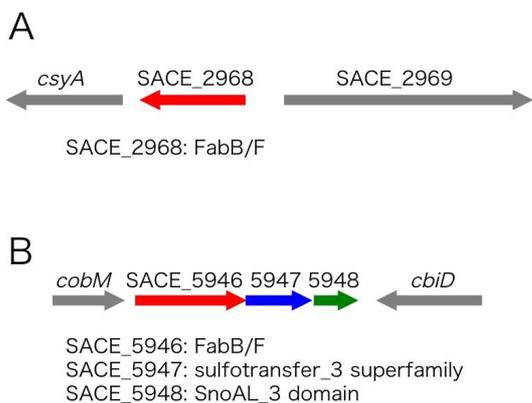


図4 タイプ IV PKS、SACE_5946 および SACE_2968 の概要 (A) SACE_2968 周辺の遺伝子配座。(B) SACE_5946 周辺の遺伝子配座。

(2) SACE_5946 および SACE_2968 の放線菌における異種発現と組換え放線菌が蓄積する化合物の構造決定

S. coelicolor M1146/pIJ6021-SACE_5946、M1146/pIJ6021-SACE_2968 の培養液の粗抽出物を HPLC 分析した。その結果、M1146/pIJ6021-SACE_5946 から化合物 1~6 のピークが観察された (図 5)。また、M1146/pIJ6021-SACE_2968 から化合物 7~9 を含む複数のピークが観察された (図 4)。これらの化合物は空ベクターの形質転換体では生産されていない (図 5)。また、脂肪酸合成酵素 FabF (SACE_1523) を発現させても化合物 1~9 は生産されないことから (図 5)、SACE_5946、SACE_2968 が PKS として機能し、化合物 1~9 が生産された可能性が高い。

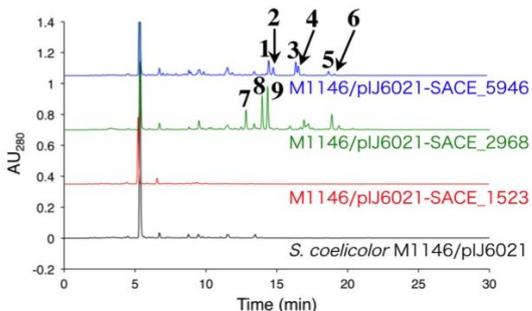


図5 SACE_5946 および SACE_2968 の異種発現株の HPLC 分析。

LC-ESI quadrupole-orbitrap MS を用いた HRMS 解析により、化合物 1 および 2 の分子式は $C_{11}H_{16}O_3$ 、化合物 3 および 4 の分子式は $C_{12}H_{18}O_3$ 、化合物 5 および 6 の分子式は $C_{13}H_{20}O_3$ 、化合物 7 および 8 の分子式は $C_{13}H_{12}O_3$ 、化合物 9 の分子式は $C_{14}H_{14}O_3$ であることが判明した。化合物 1~6 に関しては NMR (1H , ^{13}C , HSQC, HMBC) 解析によりその構造が 6-alkyl-4-hydroxy-3-methylpyrone であることが判明した。化合物 7~9 の構造は 6-benzyl-4-hydroxy-methylpyrone 類であると予想している (図 6)。

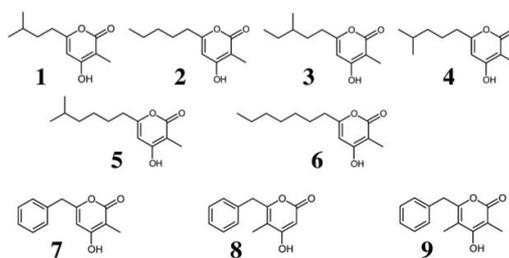


図6 SACE_5946 および SACE_2968 形質転換体が蓄積する化合物

(3) SACE_5946 の大腸菌組換え酵素の調製と *in vitro* 反応

生体内における SACE_5946 のスターター基質は 3-oxooctanoic acid の ACP 体であると考えられる。そこで、その構造アナログである 3-oxooctanoic acid の NAC 体 (以下、3-oxo-C8-NAC) をスターター基質、methylmalonyl-CoA を伸長鎖基質として反応を行ったところ、SACE_5946 は化合物 2 を与えた (図 7)。生体内において 3-oxooctanoic acid の ACP 体は脂肪酸合成経路によって合成される。SACE_5946 は脂肪酸合成経路の中間体に対し、methylmalonyl-CoA 縮合し 6-alkyl-4-hydroxy-3-methylpyrone を与えることが判明した (図 7)。

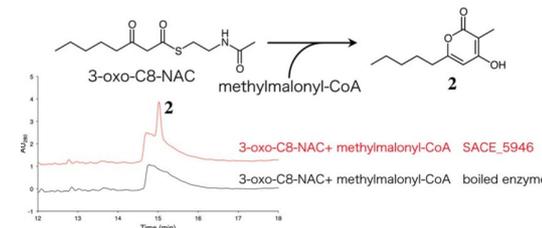


図7 SACE_5946 の *in vitro* 反応 組換え SACE_5946 による反応。プロードに見えるピークは 3-oxo-C8-NAC。

以上より SACE_5946 は FabB/F ホモログであり、新規タイプのポリケチド合成酵素であることが明らかとなった。今後は、SACE_5946 の生体内での本来の基質である 3-oxooctanoic acid の ACP 体を用いて *in vitro* 反応、定常速度論解析を行う必要がある。3-oxooctanoic acid の ACP 体は脂肪酸合成酵素により合成されるため、本化合物の調製には脂肪酸合成経路の一部を *in vitro* で再構築する必要がある。既に脂肪酸合成経路の一部を *in vitro* で再構築に着手しており、必要な酵素群を大腸菌および放線菌から調製している。

また、SACE_5946 の *in vivo* 機能の解明のためには SACE_5946 をコードする遺伝子の破壊が必須である。本実験にも既に取り組みしており、破壊用のプラスミドベクターの構築まで完了している。

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)

[学会発表](計3件)

天野結香子、金承榮、鮎信学：
Saccharopolyspora erythraea 由来の新規ポリケタイド合成酵素の機能解析、
2014年度日本放線菌学会大会、2014年6月(筑波)

Yukako Amano, Seung-Young Kim, and Nobutaka Funa: "A novel type of polyketide synthase from *Saccharopolyspora erythraea*" The 20th Shizuoka Forum on Health and Longevity, Oct 30, Shizuoka, Japan (2015)

天野結香子、鮎信学：
Saccharopolyspora erythraea 由来 FabB/F 様ポリケタイド合成酵素の *in vitro* 解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016年3月(札幌)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鮎信学 (FUNA, Nobutaka)
静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授
研究者番号：70361574

(2)研究協力者

天野結香子 (AMANO, Yukako)