

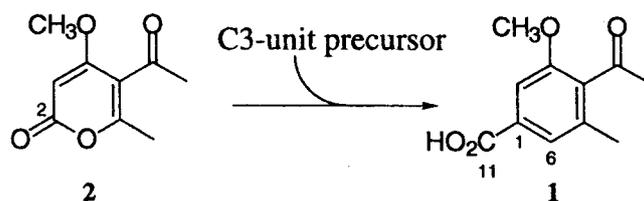
学位論文題名

マクロフォミン酸合成酵素の発見および

その性質と反応機構

学位論文内容の要旨

露草 *Commelina communis* の葉の病斑から単離された糸状菌 *Macrophoma commelinae* (IFO 9570) は、様々な 2-ピロン誘導体を生成することが知られている。本菌培養液から安息香酸誘導体であるマクロフォミン酸 [4-acetyl-3-methoxy-5-methylbenzoic acid (1)] が単離された。その後 5-acetyl-4-methoxy-6-methyl-2-pyrone (2) と未同定の C3 単位前駆体が縮合することで 1 に変換されることが明らかとなった。基質 2 の各種同位体標識化合物を用いた研究で 2 の 2 位の炭素が脱炭酸され、他の炭素骨格はすべて 1 に移行することが明らかにされていた。それに伴い 1 の 1 位、6 位、11 位に C3 単位前駆体が導入されることを予測したが、本反応におけるこの C3 単位前駆体は未同定のままであった。また 2-ピロン 2 から 1 への変換反応においては、C3 単位前駆体とピロン骨格から少なくとも 2 回の炭素炭素結合形成、脱炭酸を経由しなければならないため多段階の反応が関与すると考えられる。これまで複数の反応を触媒する酵素が分離精製されている例は少なく、既知の酵素反応から反応経路を推定するのは困難であった。本研究では、この新規芳香環形成反応における C3 単位前駆体の決定、これを触媒する酵素の精製、およびその反応機構を解明することを目的とし研究を行った。



1) マクロフォミン酸合成酵素の反応

糸状菌 *M. commelinae* の無細胞抽出液に 2-ピロン 2 から安息香酸誘導体 1 を生成する酵素活性を見だし、得られた条件で調製した *M. commelinae* の無細胞抽出液を用い、C3 単位前駆体の候補化合物を調べた結果オキザロ酢酸と決定した。

2) マクロフォミン酸合成酵素の精製および諸性質

2-ピロン 2 から 1 への変換反応は、単一のタンパク質によって触媒されることを明らかにし、酵素を精製し、その性質を明らかにした。精製酵素は SDS-PAGE において分子量約 40,000 の位置に単一バンドを示し、ゲル濾過により分子量約 90,000 であると算出され、等電点は 5.3 と確認された。マクロフォミン酸合成酵素は Mg (II) を固く結合しており、ピルビン酸も弱い基質となった。

3) マクロフォミン酸合成酵素の基質認識の多様性

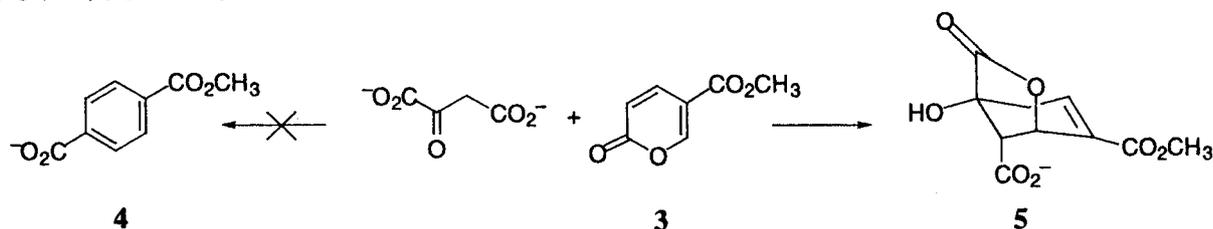
マクロフォミン酸合成酵素は多くの類縁化合物を基質とする。活性には2-ピロン骨格を必要とし、3位に置換基を有するものは全く変換されず、4、5あるいは6位置換体のある程度許容する空間的余地があることが明らかになった。さらに6位置換体に関しては置換基が小さくなるほど変換率が增大した。4あるいは5位置換体に関してはかなり基質特異性が低く、4位置換基としてはアルキル基、ハロゲンあるいはアルコキシ基のものが、5位置換基としてはハロゲンまたはアシル基のものが対応する芳香族化合物に変換された。しかし水酸基やカルボキシル基のような極性の官能基があるものは全く変換が起こらなかった。

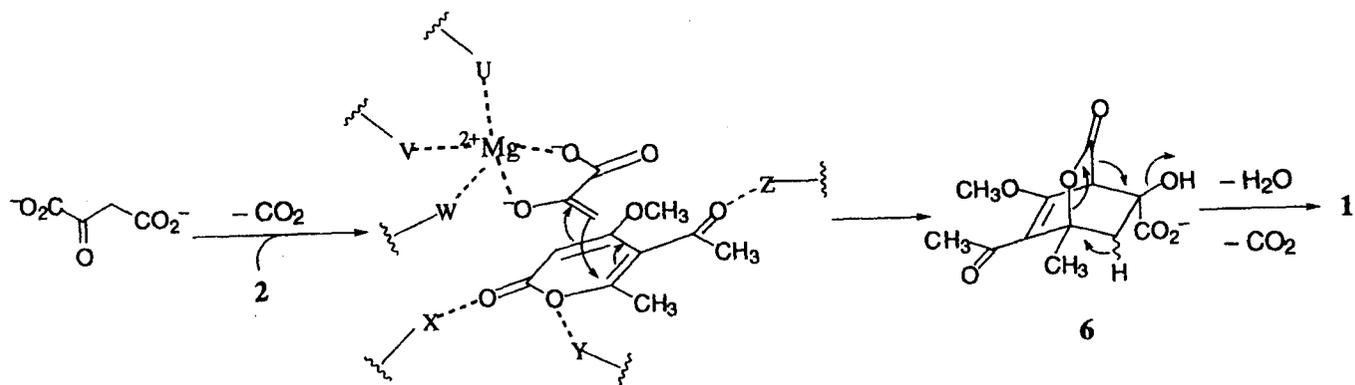
4) マクロフォミン酸合成酵素 cDNA の単離と塩基配列の決定および大腸菌における大量発現系の構築

精製マクロフォミン酸合成酵素のN末端、部分アミノ酸配列からマクロフォミン酸合成酵素に特異的なプローブを合成し *M. commelinae* 菌体から作製した cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、完全長と考えられるクローンを得た。マクロフォミン酸合成酵素 cDNA は内部に 339 アミノ酸をコードする ORF を含み、予想されるタンパク質の分子量は 36,244 と計算された。さらにアミノ酸配列およびそれをコードする cDNA は、相同性の検索で既知のタンパク質および塩基配列から類似したものを指定できなかった。またマクロフォミン酸合成酵素の大量調製を図る目的で大腸菌を宿主とした発現系を構築した。大腸菌抽出液からは一段階のカラムクロマトグラフィーで精製された。精製された酵素の SDS-PAGE における移動度および酵素化学的諸性質は、*M. commelinae* から精製した酵素とほぼ同一であった。したがって、大腸菌を宿主とした発現系により本酵素を大量に調製することが可能となった。

5) マクロフォミン酸合成酵素の反応機構

マクロフォミン酸合成酵素にオキザロ酢酸のみを反応させた場合、オキザロ酢酸脱炭酸活性を示した。したがって、本酵素が触媒する多段階の反応における1番目の反応はオキザロ酢酸の脱炭酸であることが明らかとなった。ただし本酵素が触媒する次の反応は炭素炭素結合形成反応と予想されることから、2-ピロン2に付加する直前の生成物は反応性の高いピルビン酸エノラートであると考えられた。マクロフォミン酸合成酵素の基質認識の多様性を調べる過程でオキザロ酢酸とクマリン酸メチル3を酵素反応させたところ、予想された安息香酸誘導体4ではなく炭素炭素結合形成が生じた後、本来の脱離反応が進行していない環化生成物5が得られた。環化生成物5の絶対配置から1番目の反応で生じたエノラートは、図示したようにピロン環の上側から接近し炭素炭素結合形成反応する。このことから、マクロフォミン酸合成酵素の3番目の反応は予想中間体6からの脱炭酸、脱水反応であると推定され、以上5段階の酵素反応の概要を明らかにすることができた。





学位論文審査の要旨

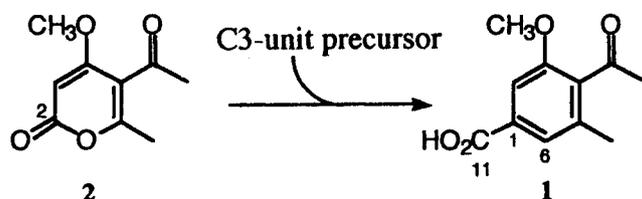
主 査 教 授 本 間 守
副 査 教 授 田 原 哲 士
副 査 助 教 授 及 川 英 秋
副 査 助 教 授 伊 藤 浩 之

学 位 論 文 題 名

マクロフォミン酸合成酵素の発見および その性質と反応機構

本論文は序論と結論を含めて7章で構成され、図40、表7、引用文献86を含む83頁の邦文である。別に参考文献5編が添えられている。

露草 *Commelina communis* の葉の病斑から単離された糸状菌 *Macrophoma commelinae* (IFO 9570) は、様々な2-ピロン誘導体を生成することが知られている。本菌培養液から安息香酸誘導体であるマクロフォミン酸 [4-acetyl-3-methoxy-5-methylbenzoic acid (1)] が単離された。その後5-acetyl-4-methoxy-6-methyl-2-pyrone (2) と未同定のC3単位前駆体が縮合することで1に変換されることが明らかとなった。また2-ピロン2から1への変換反応においては、C3単位前駆体とピロン骨格から少なくとも2回の炭素炭素結合形成、脱炭酸を経由しなければならないため多段階の反応が関与すると考えられる。本論文では、この新規芳香環形成反応におけるC3単位前駆体の決定、これを触媒する酵素の精製、およびその反応機構の解明を目的としている。



1) マクロフォミン酸合成酵素の反応

糸状菌 *M. commelinae* の無細胞抽出液に2-ピロン2から安息香酸誘導体1を生成する酵素活性を見だし、得られた条件で調製した *M. commelinae* の無細胞抽出液を用い、C3単位前駆体の候補化合物を調べた結果オキザロ酢酸と決定した。

2) マクロフォミン酸合成酵素の精製および諸性質

2-ピロン2から1への変換反応は、単一のタンパク質によって触媒されることを明らかにし、酵素を精製し、その性質を明らかにした。マクロフォミン酸合成酵素 (M_r 90,000、2量体) は

Mg(II)を固く結合しており、ピルピン酸も弱い基質となった。

3) マクロフォミン酸合成酵素の基質認識の多様性

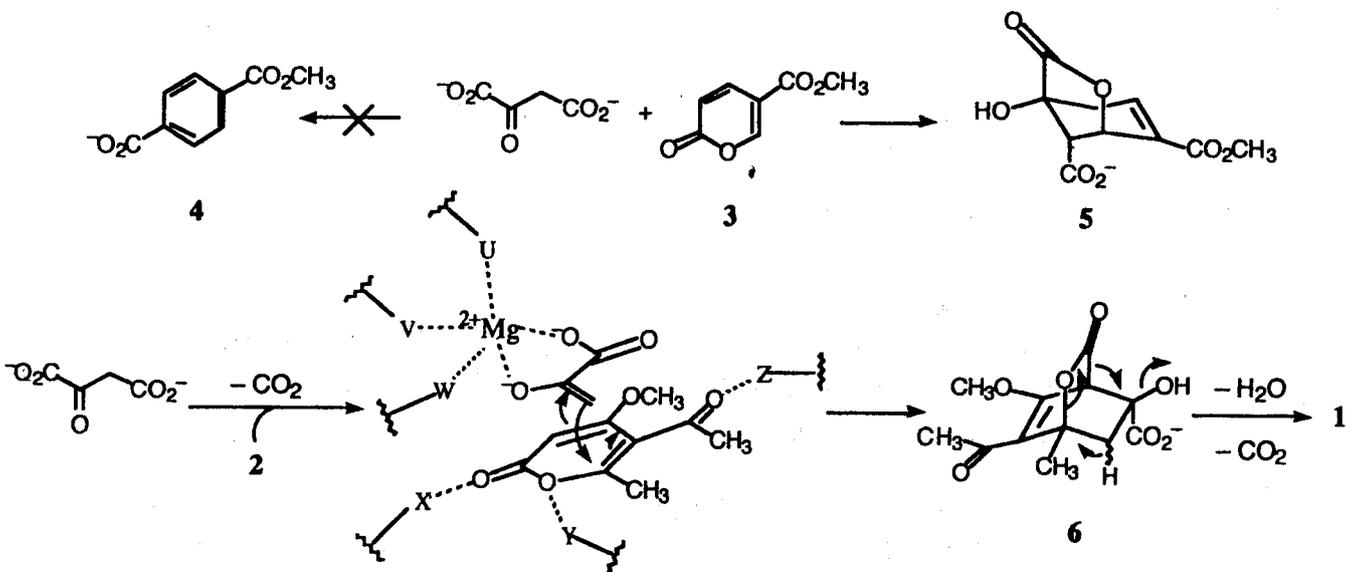
マクロフォミン酸合成酵素は多くの類縁化合物を基質とする。活性には 2-ピロン骨格を必要とし、3 位に置換基を有するものは全く変換されず、4、5 あるいは 6 位置換体のある程度許容する空間的余地があることが明らかになった。6 位置換体に関しては置換基が小さくなるほど変換率が增大した。4 あるいは 5 位置換体に関してはかなり基質特異性が低く、4 位置換基としてはアルキル基、ハロゲンあるいはアルコキシ基のものが、5 位置換基としてはハロゲンまたはアシル基のものが対応する芳香族化合物に変換された。しかし水酸基やカルボキシル基のような極性の官能基があるものは全く変換が起こらなかった。

4) マクロフォミン酸合成酵素 cDNA の単離と塩基配列の決定および大腸菌における大量発現系の構築

精製酵素の N 末端、部分アミノ酸配列からマクロフォミン酸合成酵素に特異的なプローブを合成し *M.commelinae* 菌体から作成した cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、マクロフォミン酸合成酵素残基をコードするクローンを得た。またマクロフォミン酸合成酵素の大量調製を図る目的で大腸菌を宿主とした発現系を構築した。精製された酵素の SDS-PAGE における移動度および酵素化学的諸性質は、*M.commelinae* から精製した酵素とほぼ同一であった。

5) マクロフォミン酸合成酵素の反応機構

マクロフォミン酸合成酵素は、オキザロ酢酸脱炭酸活性を示した。したがって、本酵素が触媒する多段階の反応における 1 番目の反応はオキザロ酢酸の脱炭酸であることが明らかとなった。マクロフォミン酸合成酵素の基質認識の多様性を調べる過程でオキザロ酢酸とクマリン酸メチル 3 を酵素反応させたところ、予想された安息香酸誘導体 4 ではなく炭素炭素結合形成が生じた後、本来の脱離反応が進行していない環化生成物 5 が得られた。環化生成物 5 の絶対配置から 1 番目の反応で生じたエノラートは、図示したようにピロン環の上側から接近し炭素炭素結合を形成する。このことから、中間体 6 の脱炭酸、脱水反応を含む 5 段階の酵素反応の概要を明らかにすることができた。



以上の成果は、新しい種類の芳香環合成酵素を発見し特性と反応機構を明らかにしたもので学術的に高く評価され、特に、重要な代謝中間体オキザロ酢酸の脱炭酸酵素としての特性は植物や微生物による二次代謝産物生合成の理解に応用されるものと考えられる。よって審査員一同は、渡辺賢二が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。