

27G-pm05

糸状菌 *Aspergillus terreus* 由来 6-メチルサリチル酸合成酵素 ATX の機能解析
○森口 智美¹, 藤井 勲², 海老塚 豊¹(¹東大院薬, ²岩手医大薬)

【目的】糸状菌由来ポリケタイド合成酵素は、反応に必要な全ての触媒ドメインが一本のポリペプチド上に存在し、各触媒ドメインが繰返して反応に関与する繰返し型 Iterative (iPKS) であるが、その反応機構の詳細については不明な点が多い。本研究では、*Aspergillus terreus* 由来の 6-メチルサリチル酸 (6-MSA) 合成酵素 ATX を取り上げ、脱水酵素に共通した活性中心配列 HxxxGxxxxP を持つことからこれまで脱水酵素 DH ドメインとされてきたドメイン (DH 様ドメイン) に注目し、その触媒する反応や高次構造の解明を目的とする。

【方法・結果】まず、ATX の大腸菌発現系を構築し、精製 ATX が *in vitro* で 6-MSA 合成活性を示すことを確認した。次いで、ATX の DH 様ドメインの活性中心 His を Ala に変異させた DHm を発現させた。DHm は 6-MSA を生成できないものの、反応中間体を結合したままであることが見出された。そこで、中間体が結合した DHm をアルカリ加水分解処理したところ、6-MSA の遊離が確認された。また、野生型 ATX も DHm から 6-MSA を遊離する活性を示した。これらの結果は、ATX の反応において DH 様ドメインの関与なしにテトラケタイド生成が進行すること、DH 様ドメインが 6-MSA を酵素から遊離させるチオエステラーゼ (TE) 活性を持つことを示していると考えられた。これらを確認するため、酵素結合型中間体の模倣体である、6-MSA の *N*-アセチルシステアミン誘導体を基質として、野生型 ATX、および、DH 様ドメインを含む部分長タンパク ATXDH と反応させたところ、いずれも時間・酵素濃度・基質濃度依存的に、6-MSA を遊離した。以上の結果から、ATX の DH 様ドメインが、従来考えられていた DH ドメインではなく、TE ドメインであると結論した。現在、ATXDH の、X 線結晶構造解析に向けた精製条件を検討中である。