

22PO-am056

Actinorhodin 生合成に關与する立体特異的エノイル還元酵素の機能解析

○石川 和樹¹, 小松 薫平¹, 太田 千裕¹, 橋元 誠¹, 田口 貴章², 市瀬 浩志¹ (¹武蔵野大薬, ²国立衛研)

【目的】 Actinorhodin (ACT)は、*Streptomyces coelicolor* A3(2)株が生産する benzoisochromanequinone 系ポリケタイド抗生物質で、その生合成経路には有機化学的に興味深い反応を示す生合成酵素の存在が示唆されている。特に、ACT 生合成中間体 (S)-DNPA から DDHK への立体選択的エノイル還元反応 (下図) は、最終生産物の構造多様性の創出に關与する重要な反応であり、エノイル還元酵素 (ER) 遺伝子として *actVI-2* および *VI-4* の關与が配列相同性と *in vivo* での機能を基に報告されている¹⁾。しかし、*in vitro* での解析は行われていないため、両遺伝子産物の機能解析を目的に、組換え酵素の発現・精製および酵素活性評価を行った。

【方法】 ER 遺伝子 *actVI-2* および *VI-4* を pET-21a(+)に挿入して構築した酵素発現用ベクターを用いて *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 株を形質転換し、酵素発現を行った。得られた His₆-tag 融合タンパクは、Ni-NTA レジンで精製した。基質 (S)-DNPA は、生合成遺伝子を導入した *S. coelicolor* CH999 株の培養液より各種クロマトグラフィーを用いて単離・精製した。DDHK 標準品は、(S)-DNPA を NaBH₄ で還元して調製した。NADPH 存在下、精製酵素と (S)-DNPA を緩衝液中で反応後、HPLC で分析することでそれぞれの酵素によるエノイル還元活性を評価した。

【結果】 精製酵素 ActVI-2 は、(S)-DNPA を立体特異的に還元し、DDHK のみを生成した。本大会では、ActVI-4 を含めた機能解析の結果について報告する。

1) S. Okamoto *et al.*, Chem. Biol., **16**, 226 (2009).

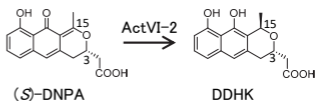


図. ActVI-2による立体選択的エノイル還元