

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 承榮

サイクロオクタチン (cyclooctatin) は *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 から単離された、5-8-5 員環構造を有する原核生物由来ではじめてのジテルペン化合物であり、lysophospholipids の脂肪酸エステル結合を加水分解して脂肪酸とグリセリンを生成する lysophospholipase を阻害する。サイクロオクタチンのような環状テルペノイドは、プレニル鎖長を決定するポリプレニルジリン酸合成酵素により生成した直鎖状ポリプレニルジリン酸がテルペン環化酵素によって環化されて炭素骨格が形成された後、酸化や還元等の化学修飾を受けて生合成されると考えられる。しかしながら、本生理活性物質の生合成経路やその生合成酵素遺伝子に関する情報はまったくなかった。

本論文は、サイクロオクタチン生合成の全容解明を目的として、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 からのサイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターのクローニング、および生合成遺伝子クラスターの機能解析、特に環化酵素の同定と環化反応機構の解明についてまとめたものである。また、ジテルペン環化酵素としては初めての結晶構造解明にも成功しその結果についてもまとめている。

第1章では、サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターをクローニングし、その最小単位の決定について述べている。すなわち、サイクロオクタチンは C₂₀ からなる geranylgeranyl diphosphate (GGDP) を共通の生合成中間体とするジテルペン化合物であることから、その生合成遺伝子は GGDP synthase 遺伝子とクラスターを形成していると推察して、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 のゲノム DNA から GGDP synthase 遺伝子の部分配列のクローニングを行い、次いで、この GGDP synthase 遺伝子をプローブにして、MI614-43F2 株のコスミドライブラリーから2種の陽性クローンを選抜した。さらに、デリーションプラスミドを作製して *S. albus* を用いた異種発現によりサイクロオクタチンの生産を確認することで、サイクロオクタチンが CotB1-4 と命名した4つの遺伝子によってコードされる酵素によって生合成されることを明らかにした。

第2章では、サイクロオクタチンの骨格形成に関わる鍵酵素、GGDP cyclase (CotB2) の機能解析について述べている。すなわち、大腸菌を用いて CotB2 の精製酵素を調製し、GGDP を基質とした *in vitro* 反応産物を silica gel chromatography により精製し、ついで、その精製物質の HR-ESI-MS、および各種 NMR スペクトルを解析することで、CotB2 反応産物の構造を 5-8-5 員環構造を持つ新規なジテルペンアルコール、cycloocta-9-en-7-ol と決定した。cycloocta-9-en-7-ol の化学構造と、CotB2 の触媒する環化反応が Mg²⁺ 依存的事であることから、この環化反応は、まず、GGDP のジリン酸部分の引き抜きによってカルボカチオンが生成し、次いで、生じた二重結合の protonation によって cycloocta-9-en-7-ol が生

成する水酸化を伴うユニークな反応機構で反応が進行すると考察した。

第3章では、サイクロオクタチン生合成における水酸化反応を触媒する P450 遺伝子産物 CotB3 と CotB4 の機能解析について述べている。すなわち、GGDP synthase、GGDP cyclase、CotB3 を含むプラスミドを *S. albus* で異種発現させた場合にのみ検出される未同定化合物を silica gel chromatography と HPLC を用いて精製し、ついで、その精製物質の HR-ESI-MS、および各種 NMR スペクトルを解析することで、未同定化合物の構造を C-5 に水酸基を持つ新規なサイクロオクタチン中間体である cycloocta-9-en-5,7-diol であると決定した。また、CotB4 については大腸菌で発現させて微生物変化により、cycloocta-9-en-5,7-diol の 18 位に水酸基を付加してサイクロオクタチンを合成することを明らかにした。以上の結果から、サイクロオクタチンの生合成経路の全容を解明した。

第4章では、terpene cyclase (CotB2) の結晶構造解析とその構造基盤について述べている。すなわち、CotB2 は、 α -helix のみから構成される homodimer 構造であり、既知のテルペン環化酵素で保存されている DDXD モチーフと NSE モチーフが基質結合ポケットを構築し、その基質結合ポケットは基質非結合型の open form を形成していることを明らかにした。

以上、本研究は、立体選択的なジテルペン環化反応と、位置選択的かつ立体選択的な水酸化反応を含むサイクロオクタチン生合成経路の全容解明と、新規なジテルペン環化酵素の結晶構造解析から A-B 型反応を行う同酵素の構造的基盤を明らかにしたものであり、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。