

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 林 貴之

ベンザスタチン類はテトラヒドロキノリン骨格、インドリン骨格、クロル基を有する点を特徴とする天然化合物であり、興味深い生理活性を有するものも報告されているが、その生合成機構はこれまでに明らかにされていなかった。本論文では放線菌 *Streptomyces* sp. RI-18 株におけるベンザスタチン生合成に着目し、ベンザスタチン生合成経路、遺伝子、酵素の解明を目的としている。本論文は全 7 章より構成される。

第一章では、天然物生合成研究の歴史的背景と意義、および生合成酵素について、これまでの知見をまとめている。天然物生合成研究の中でも原核生物由来二次代謝産物を対象にした生合成研究について詳しく述べており、本論文の研究意義、研究戦略が明示されている。

第二章では、研究対象とした天然化合物ベンザスタチンについてまとめている。ベンザスタチンの化学構造は既知の生合成機構では解釈できず、新規な生合成機構が存在していることを示した。

第三章では、RI-18 株の予想ベンザスタチン生合成遺伝子クラスターの発見までの経緯を述べるとともに、生合成遺伝子の機能を予測している。ドラフトゲノムシーケンスを利用してゲノムスキニングを行うことで、ベンザスタチン生合成遺伝子クラスターと予想される配列を見出した。クラスター中の生合成酵素遺伝子の機能予測を行うことで、ベンザスタチン生合成経路の推測を行った。

第四章では、ベンザスタチン生合成遺伝子クラスターの異種発現解析について述べている。異種発現系が確立されている *Streptomyces lividans* を用いて生合成遺伝子の異種発現解析を行い、第三章で着目した遺伝子クラスターが実際にベンザスタチン生合成遺伝子クラスターであることを明らかにした。また、10 種類の酵素遺伝子によりベンザスタチン最終産物である JBIR-67、7-hydroxyl benzastatin D、virantmycin が合成されることを示した。

第五章では、ベンザスタチン生合成における各酵素遺伝子の異種発現解析について述べている。10 種類の酵素遺伝子について様々な組合せで共発現させるため、新たに 22 種類のベンザスタチン生合成遺伝子発現プラスミドを作製した。このプラスミドを用いた異種発現株の代謝物を解析することで、実際にベンザスタチン生産に関与している酵素遺伝子を特定した。また、異種発現により生産されるベンザスタチン中間体を解析することで、ベンザスタチン生合成経路および酵

素機能を明らかにした。

第六章では、ベンザスタチン環化機構を中心としたより詳細な生合成経路の解析について述べている。生合成中間体の投与実験や新たな生合成遺伝子発現株の解析を行い、より詳細な生合成経路を明らかにした。また、ベンザスタチン生合成酵素として新規なベンザスタチン環化酵素およびクロル化酵素が機能していることを示した。

第七章では、本論文で明らかになったベンザスタチン生合成経路、酵素について考察している。また、本論文で用いた研究戦略の有効性と今後の展望について考察している。

以上、本論文は放線菌 *Streptomyces* sp. RI-18 株におけるベンザスタチン生合成に関する研究成果をまとめたものであり、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。