

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 22 年度博士課程 入学  
氏 名 目黒 亜由子  
指導教員名 西山 真

### 論文題目

放線菌由来ジテルペン合成酵素の探索と新規多段階環化機構に関する研究

テルペノイド (イソプレノイド) は、ステロイドやカロテノイドなどに代表される天然に 55,000 種以上の多様な構造の報告例がある化合物群であり、その構造の多様性ゆえに様々な生理活性を持つ化合物が存在する。ジテルペン化合物は、炭素 20 個の直鎖状ポリプレニルジリン酸 geranylgeranyl diphosphate (GGDP) を基質とするテルペノイドであり、その中でも環状ジテルペン化合物は、GGDP がジテルペン合成酵素の触媒作用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。ジテルペン合成酵素は、GGDP を単環または多環といった多様な構造の環状テルペン化合物へと変換するための鍵酵素であり、他のテルペン合成酵素と同様、その反応機構により class I と class II の二種類に分類される。

これまで、ジテルペン合成酵素のほとんどが高等植物と真菌から単離され解析されている。一方 2001 年に最初の放線菌由来のジテルペン合成酵素が報告されて以来、現在では様々な原核生物から 16 種が得られているが、植物や真菌と比較してその数は未だ少ない。しかしながら、これまで多くの生理活性物質が放線菌から単離されてきたことを考えれば、放線菌には未だ発見されていないジテルペン合成酵素が多く潜在していると考えられる。そのような未同定ジテルペン合成酵素を発掘するためには、通常、アミノ酸配列を用いた相同性検索が利用されるが、ジテルペン合成酵素は全

体的に配列の類似性が低く、相同性検索による効率的な発掘は容易ではない。また、反応機構の詳細な解析例は少ないのが現状である。そこで本論文では、新規ジテルペン合成酵素を効率よく探索する方法を開発し、発掘した酵素の機能を解析すること、また放線菌由来のジテルペン合成酵素 CotB2 を対象として、標識ラベル体を用いることによりその詳細な反応機構を解明することを目的とした。

## 第一章 放線菌由来ジテルペン合成酵素 CotB2 の反応機構

CotB2 は、*Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 から単離された原核生物由来で初めての 5-8-5 員環構造を持つジテルペン化合物 cyclooctatin 生合成の鍵酵素である。本酵素は、GGDP の環化と水酸化を触媒して cyclooctat-9-en-7-ol を生成するジテルペン合成酵素である。CotB2 の詳細な反応機構を解明するため、まず、GGDP の重水素ラベル体 [9,9-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GGDP を基質に用いた CotB2 との *in vitro* 反応産物を、GC-MS と <sup>1</sup>H NMR により解析した。その結果、[9,9-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GGDP の 2 つの重水素原子が、CotB2 が触媒する環化反応の過程で 2 つとも 8 位へ移動したことが判明したことから、CotB2 環化反応において 8 位と 9 位の炭素-炭素間に組換えが起こったと考えた。続いて、cyclooctatin を生産する放線菌の培地に [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]glucose を添加し、最終産物である cyclooctatin のラベルパターンを <sup>13</sup>C NMR で分析した結果、CotB2 が触媒する環化反応の過程で 8 位と 9 位の炭素-炭素間の組換えを含む反応機構が強く示唆された。さらに decoupled TANGO-HMBC の測定により 8 位と 10 位の炭素が同一グルコース分子由来であることを証明することで、この推定反応機構の妥当性を示す結果を得ることができた。また、CotB2 と GGDP との反応を重水中で行った結果、環化反応の過程では重水素原子は cyclooctat-9-en-7-ol に取り込まれず、環化反応の過程で水分子が関与した脱プロトン化とプロトン化は起こらないことが示唆された。以上の結果から、CotB2 の反応機構について、10 位から 3 位への分子内プロトン転位を介し、シクロプロパン環を持つ反応中間体を経由する環化機構を提唱した。(図 1)

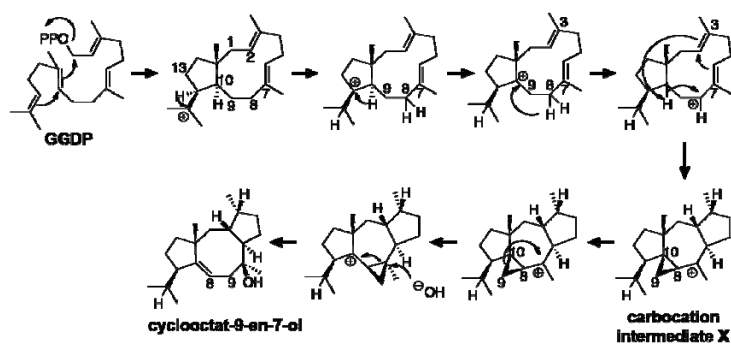


図 1 CotB2 による GGDP の環化反応機構

## 第二章 CotB2 の変異酵素の機能解析

CotB2 単独の結晶構造や CotB2 と GGDP の基質アナログ体との複合体の結晶構造における活性中心ポケットの構造を基に、環化反応に寄与する CotB2 の重要なアミノ酸残基の同定を試みた。最初に、class I ジテルペン合成酵素で保存される motif の一つである、aspartate-rich motif (<sup>110</sup>DDMD) の変異酵素を作製し、環化反応の進行に重要と考えられるアスパラギン酸残基(<sup>111</sup>D)を同定した。続いて、活性中心ポケット内に存在するアミノ酸残基を中心に様々な変異を導入した 22 種の変異酵素と GGDP との *in vitro* 反応産物を GC-MS で分析し、野生型 CotB2 が生成する cyclooctat-9-en-7-ol と異なる複数の新規な反応産物の構造を決定した。その結果、3 種類の変異酵素 (N103A, F149L, W186F) から計 4 種類の新規ジテルペン化合物の取得に成功した(図 II)。さらに、新規化合物の構造に基づいて各変異酵素による GGDP の環化反応機構を推定した。変異を導入したアミノ酸残基は図 I の推定環化反応の過程で生じると考えられる反応中間体(X)の 7 位のカルボカチオンの安定化に寄与しており、変異導入によってカチオンが安定に存在できなくなることで、cyclooctat-9-en-7-ol まで反応が進行せず、より安定な各化合物が生成したと考えている。

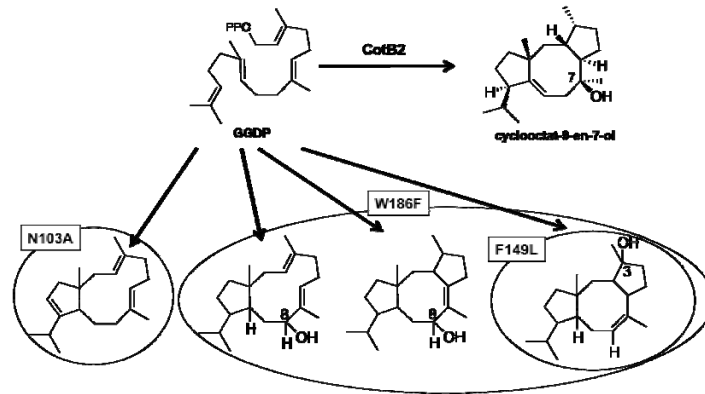


図 II. 各 CotB2 変異酵素により生成する新規ジテルペン化合物の構造

## 第三章 放線菌由来新規ジテルペン環化酵素の機能解析

ヌクレオシド系抗生物質 A-94964 の生産菌である *Streptomyces* sp. SANK60404 株から新規ジテルペン合成酵素を見出すため、まず、比較的類似性の高い GGPP 合成酵素を探索し、次いでその周辺配列を詳細に解析することで class I ジテルペン合成酵素を 2 つ見出した (DtcycA, DtcycB)。GGDP との *in vitro* 反応産物の構造解析の結果、DtcycA からは cembrene C のイソプロピリデン異性体 (1) と nephthenol (2) が、DtcycB からは nephthenol と cembrene A (3) に加えて 15 員環骨格の新規炭化水素化合物 (4) が得られた(図 III(a))。以上の結果から、DtcycA と DtcycB は、GGDP から cembrane 骨

格を生成する原核生物由来の新規 class I ジテルペン合成酵素であることが明らかとなった。一方、プロテアソーム特異的阻害剤 Lactacystin の生産菌である *Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519 株のゲノム解析から、メバロン酸経路遺伝子群、GGPP 合成酵素、およびシトクロム P450 遺伝子を含むクラスター中に class I ジテルペン合成酵素(SlacycA)を見出した。GGDP を用いた *in vitro* 反応産物の構造解析の結果、SlacycA は 5-8-5 員環骨格の新規ジテルペン化合物 cyclooctat-7,10(14)-diene を生合成する新しいタイプのジテルペン合成酵素であることを明らかにした(図 III(b))。

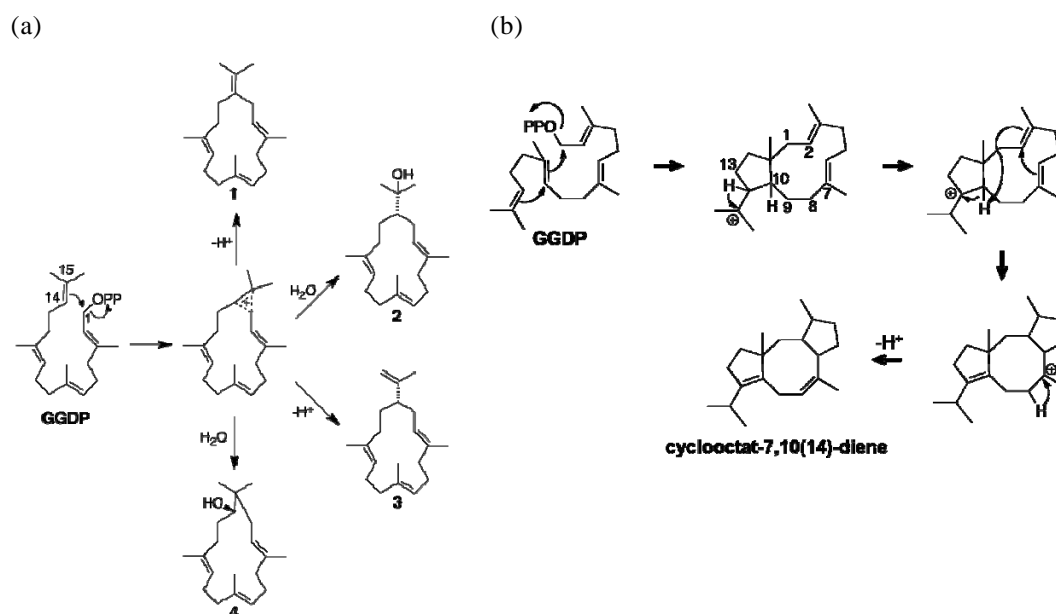


図 III. (a) DtcycA と DtcycB, (b) SlacycA による GGDP の推定環化反応機構

## 総括

本研究では、標識ラベル体を用いた反応産物やトレーサー実験で得られた生産物を GC-MS や NMR で解析することで、ジテルペン合成酵素による詳細な環化反応機構を提唱することができた。また、ジテルペン合成酵素の活性中心ポケットに存在するアミノ酸残基に変異を導入することで、新規ジテルペン化合物の創製が可能であること、膨大なゲノムデータベースから新規ジテルペン合成酵素を発掘することで新規ジテルペン化合物を発見することができることを実証できたと考えている。

1) Ayuko Meguro, Takeo Tomita, Makoto Nishiyama, and Tomohisa Kuzuyama. Identification and Characterization of Bacterial Diterpene Cyclases that Synthesize the Cembrane Skeleton. *ChemBioChem*, DOI:10.1002/cbic.201200651.