［ 別 紙 ２ ］

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名　目黒　亜由子

テルペノイドはステロイドやカロテノイドなどに代表される多様な構造を持つ化合物群の総称であり、様々な生理活性をもつ化合物である。ジテルペン化合物は 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。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解析されてきたが、放線菌からの単離解析例は少ない。本論文は、放線菌由来で特異な 5-8-5 員環構造を持つジテルペンを合成する CotB2 の反応機構の解析を行うとともに、放線菌からのジテルペン合成酵素の発掘を行い、それらの機能を解析したもので四章より構成される。

序論でテルペノイド及びジテルペン合成酵素についての概要を述べた後、第一章では、放線菌由来ジテルペン合成酵素 CotB2 の反応機構の解析結果について述べられている。CotB2 は、*Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 が生産する、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 cyclooctatin の生合成において、GGDP の環化と水酸化を同時に触媒して中間体 cyclooctat-9-en-7-ol を生成するジテルペン合成酵素であり、5-8-5 員環骨格を決定する鍵酵素である。GGDP の重水素ラベル体[9,9-$^{2}H_{2}$]GGDP と CotB2 との *in vitro* 反応産物が GC-MS と ^{1}H NMR により分析し、CotB2 による環化反応の過程で [9,9-$^{2}H_{2}$]GGDP の重水素原子が 2 つとも 8 位へ移動したことが判明したことから、8 位と 9 位の炭素-炭素間に組換えが起こったと考えられた。続いて、cyclooctatin 生産の過程での ^{13}C の取り込み実験による反応産物の分析の結果、環化反応の過程で 8 位と 9 位の炭素-炭素間の組換えが起こるという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 位の炭素は同一グルコース分子由来と証明でき、これは推定反応機構を支持する結果であった。また、重水中での CotB2 と GGDP との反応産物の分析の結果、環化反応の過程で CotB2 のアミノ酸残基はプロトンの受渡しに直接関与しないことが示唆された。以上の結果から、CotB2 による反応機構について、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未同定の反応中間体を経由する経路が提唱された。

第二章では CotB2 の変異酵素を作製し、それらの機能解析について述べられている。CotB2 単独や CotB2/GGDP アナログ複合体の結晶構造に基づいて変異酵素が作製され、機能解析が行われた。活性中心ポケット近傍の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 や NMR で分析し、3 種類の変異酵素 (N103A, F149L, W186F)から、野生型 CotB2 の反応産物とは異なる新規構造を持つ 4 つの主反応産物を単離し、

その構造を決定した。環状構造や水酸基の位置が異なる 4 種類の反応産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ている。変異を導入したアミノ酸残基は、第一章で提唱した反応中間体の 7 位や 8 位のカルボカチオンの安定化に寄与しており、変異導入によりカチオンが安定に存在できなくなり、cyclooctat-9-en-7-ol まで反応が進行せずに各化合物が生成したものと結論している。

第三章では、放線菌由来新規ジテルペン環化酵素の発掘と機能解析について述べられている。*Streptomyces* sp. SANK60404 のゲノム解析から、最初に比較的類似性の高い GGDP 合成酵素が探索され、次いでその周辺配列を詳細に解析することで 2 種類のジテルペン合成酵素(DtcycA, DtcycB)を見出している。GGDP との *in vitro* 反応産物の構造解析の結果、DtcycA から cembrene C のイソプロピリデン異性体と nephthenol が、DtcycB から nephthenol と cembrene A に加えて 15 員環骨格の新規ジテルペンが得られ、DtcycA と DtcycB は、cembrane 骨格を生成する原核生物由来の新規ジテルペン合成酵素であることが明らかにされた。一方、*Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519 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ジテルペン合成酵素(SlacycA)が見出された。GGDP との *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も明らかにしている。

以上、本論文は、既知の反応例からは推定できなかったジテルペン合成酵素の詳細かつユニークな環化反応機構が提唱するとともに、結晶構造に基づいた酵素の改変により新規ジテルペンの創製が可能であること、および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の発見が可能であることを実証したものであり、学術上、応用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。