

審査の結果の要旨

氏名 三橋 隆章

テルペノイドは、自然界において最大とも言われる構造多様性を有する天然物の一群である。また、生物活性を持つ化合物が数多く含まれることから、薬科学の観点からも非常に重要な化合物群の1つと考えられている。テルペノイドの多様かつ複雑な構造が生体内で生み出される過程は、大きく2つに分けることができる。1つ目は、テルペノイドの炭素骨格が形成される過程、2つ目は、炭素骨格の形成後に修飾される過程である。三橋は、特に前者に注目し、テルペノイドの炭素骨格形成に関わる酵素、すなわちテルペン合成酵素の研究を行った。

テルペノイドの炭素骨格形成には、プレニル基転移酵素並びにテルペン環化酵素と呼ばれる2種類の酵素が大きな役割を果たしている。多くの場合、これら2種類の酵素は独立して存在する別々の酵素であるが、近年になり、これら2種類の酵素が結合し、1つの酵素として存在している例が知られるようになった。こうした酵素はキメラ型テルペン合成酵素と呼ばれる。キメラ型テルペン合成酵素は、解析例が少なく、テルペン合成酵素の中でも特に知見の拡充が求められている酵素群である。

そこで三橋は、糸状菌由来のキメラ型テルペン合成酵素2件について機能解析を行った。また、研究の手法として、ゲノムマイニングと呼ばれる手法を用いた。これは、ゲノム情報を利用し、目的の酵素をコードする遺伝子を探索する手法である。更に、ゲノムマイニング法により見出した遺伝子に対しては、異種発現の手法を用い、機能解析をおこなった。この手法では、解析対象となる遺伝子を宿主となる別種の生物に導入し、強制発現させることによって、遺伝子がコードする酵素の機能を調べる。本研究では特に、解析対象の酵素がどのような構造の化合物を産生するかについて詳細に議論した。テルペン合成酵素が作り出す化合物の構造は、酵素ごとに様々であり、また多数の環構造や不斉中心を持つなど複雑な場合が多々ある。このことが、テルペノイドの構造多様性を生み出している一方、酵素産物の構造決定を困難にしている。しかし、テルペン合成酵素のアミノ酸配列と酵素産物の構造との相関関係は未解明な部分が多いことから、より多くのテルペン合成酵素に関して、酵素産物の構造を決定していくことは、非常に重要であると考えられる。

本研究の前半部分では、糸状菌 *Penicillium chrysogenum* MT-12 のゲノム情報中からゲノムマイニングの手法を用い、キメラ型テルペン合成酵素をコードすると推定される遺伝子を見出した。さらに、異種発現の手法を用いることで、異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* NSAR1 にて、本遺伝子を強制発現させることで、実際に見出した酵素が活性をもつことを確認し、酵素産物の構造決定に取り組んだ。本酵素産物の構造決定において、当初、三橋はNMRによる解析を試みた。NMR解析は、低分子の構造解析において、非常に強力な手法として広く利用されている。しかし、本酵素産物の場合、NMR測定によって得られたシグナルがブロードニングを起こすという問題に突き当たった。このようなシグナルが得られた場合、NMR解析による構造決定は困難なことが多く、別の方法を模索する必要がある。そこで三橋は、結晶スポンジ法による構造決定を試みた。結晶スポンジ法とは、多孔性の金属錯体結晶の内部の空間に解析対象となる化合物を導入し、3次元的に整列させることで、対象化合物の結晶化を行うことなくX線結晶構造解析を可能とする手法である。その結果、本酵素産物の構造解析に成功し、6-5-5-5員環構造を持つジテルペンであることを突き止めている。また、本化合物は、cyclopiane-type ジテルペノイドと呼ばれる一連のテルペノイドの共通前駆体であることが推定された。更に、三橋は、計算化学の手法を用いることで、本化合物の配座解析を行い、NMRシグナルのブロードニングが、本酵素産物の特定の

部分の配座が変換することに因ると推察している。

次に、本研究の後半部分において三橋は、前半部分と同様の手法を用いることで、糸状菌 *Emericella varicolor* NBRC 32302 からキメラ型テルペン合成酵素を見出だし、機能解析を行った。酵素産物の構造決定においては、NMR 解析により平面構造と相対立体配置を求め、絶対立体配置については結晶スポンジ法により決定した。その結果、本化合物は、6-8-6-5 員環構造に特徴づけられる新規炭素骨格を有する化合物であることが明らかとなった。続いて、三橋は、この新規炭素骨格が形成されるメカニズムを明らかにする為、安定同位体を用いた標識実験を行った。具体的には、安定同位体標識した酢酸ナトリウムを、本酵素遺伝子を強制発現している *A. oryzae* NSAR1 形質転換体を培養する際の培地に添加し、酵素産物への安定同位体の取り込みパターンを検証した。また、精製酵素を用いた *in vitro* における酵素反応を、重水の存在下にて行い、酵素産物が形成される過程において重水由来の重水素が酵素産物内に取り込まれることを明らかにしている。こうした実験結果を元に、三橋は、本酵素産物の新規炭素骨格が形成される際の合理的な機構を提唱している。

本研究を通して三橋は、2つの新規キメラ型テルペン合成酵素の同定並びに機能解析を達成した。また、その酵素産物の構造について、NMR 測定や結晶スポンジ法を駆使することで決定を行った。今後、本研究の知見を元に、さらに多くのテルペン合成酵素の同定が進み、酵素のアミノ酸配列と酵素産物の対応関係が明らかされていくことが期待される。また、将来的には、テルペン合成酵素が作り出す化合物の正確な予測や、酵素の合理的な機能変換などの達成が期待されるが、こうした将来的な目標を達成するにあたって、本研究の結果は、多くの情報を与えるものである。

以上のことから、本博士論文はテルペン合成酵素の研究に大きく寄与するものであり、ひいては今後の天然物化学の発展に資するものであると考えられる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。