

審査の結果の要旨

氏名 村井 恵一

テルペンは、約 8 万種の多様な構造の報告例がある天然物最大のグループである。その多様な構造は、テルペン合成酵素の触媒作用による複雑な多環骨格形成と立体化学制御を介して生合成される。この立体化学を含めた構造多様性のため、テルペンは多様な生物活性を示す。例えば、リモネンの香気活性、アルテミシニンの抗寄生虫活性、タキソールの抗ガン活性など、環状構造の違いにより多様な生物活性が生み出されるため、その産業利用や創薬における潜在機能は計り知れない。しかし、細菌由来のテルペン合成酵素は酵素間の配列相同性が著しく低いためその同定が困難であり、またそのほとんどが休眠遺伝子であるため解析例は少なく、現在までに約 60 種類の細菌由来テルペン合成酵素が報告されているのみである。以上のような背景のもと、本論文には、未開拓の細菌由来テルペン合成酵素の大規模発掘と、その環化機構解明に関する研究がまとめられている。

第 1 章の序論では、テルペン化合物に関するこれまでの生合成研究について述べている。第 2 章では、産業技術総合研究所で解析された原核生物ゲノムのデータベースからテルペン合成酵素を探索した結果について述べている。本ゲノムデータベースに含まれる全 140 株、約 120 万個の ORF に対して、隠れマルコフ統計モデルで作成された酵素活性ドメインモデルによる検索と相同性検索を組み合わせることで、最終的に新奇性の高い 53 個の ORF を抽出することに成功している。

第 3 章では、上記の 53 個 ORF の機能解析と反応産物の構造決定について述べている。それぞれの ORF について大腸菌を用いて組換え酵素を精製し、炭素数 10 個、15 個、20 個の 3 種のポリプレニル 2 リン酸基質を用いて *in vitro* テルペン合成活性試験を行なうことで、33 種の新奇酵素から 34 種の主反応産物を得ており、このうち 18 種の反応産物については、ガスクロマトグラフィーのマスマスペクトルパターンライブラリーと各反応産物のマスマスペクトルとの比較により同定している。さらにそのうちの 6 種については、細菌由来テルペン合成酵素によって初めて生産された反応産物であった。また NMR 解析により、得られたテルペン化合物の構造を、Pristinol、10-Deoxytrefolane A [新奇化合

物]、Versipropellanol [新奇骨格化合物]、6-Methylharbanol [新奇天然物]、Fusagraminene [新奇化合物]、(+)-Neointermedeol、Selina-4(14),7-diene、Spata-11(18),14-diene と決定している。さらには、X線単結晶解析と結晶スポンジ法により 5 種類のテルペン化合物の絶対立体配置を決定し、それらの構造に基づき各テルペン化合物の生合成機構を提案している。

第 4 章では、糸状菌 *Trichoderma atroviride* FKI-3849 株由来の Trichobrasilenol 生合成における詳細な環化機構について述べている。まず、同位体標識基質を用いた NMR 法により、Trichobrasilenol の絶対立体配置を決定している。また、Trichobrasilenol 合成酵素と、 ^2H と ^{13}C で標識した基質 farnesyl diphosphate を反応させ、酵素反応カスケードにおける ^{13}C と ^2H の移動を追跡することで、Africanyl cation を経由し、計 4 回のヒドリド転位と、2 回の炭素間結合の切断と 2 回の炭素間結合の再形成を伴って生合成されるユニークな生合成機構を提唱している。これは環状テルペンの生合成における特異な炭素骨格組換え機構を明らかにした重要な知見として評価できる。

第 5 章では、擬天然型合成アナログ基質を用いたテルペン環化反応について述べている。Cyclooctat-9-en-7-ol 合成酵素である CotB2 をモデルケースとして複数の合成アナログ基質を用いた *in vitro* 反応を行い、新規な環化反応産物を取得している。特に geranylgeranyl diphosphate の 6-7 位をアミド結合で置換した合成アナログを基質に用いた場合に、アミド結合を持つ dolabelladiene 型の擬天然環状テルペンアルカロイドが生産されることを見出している。この知見は新奇なテルペンアナログ化合物の人工的な創製につながる重要な成果として評価できる。

総合討論では、結果のまとめと今後の展望が述べられている。

以上のように、村井恵一氏の研究成果は、細菌由来の多くのテルペン環化酵素を新たに発掘して、それらの酵素が生成する新規環状テルペンを同定するとともに、ユニークな反応カスケードを提唱することで、テルペン環化酵素の可能性をさらに拡大したものであり、学術上応用上寄与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。