

審査の結果の要旨

氏名 張 捷

本論文は、放線菌 *Streptomyces* sp. SANK 60404 が生産する 2-amino-3-hydroxycyclopent-2-enone (C₅N) が付加した 2 つのジアルキルベンゼン含有天然化合物、CBT-1 [(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-*N*-(2-hydroxy-5-oxocyclopent-1-en-1-yl)-9-(*o*-tolyl)nona-2,4,6,8-tetraenamide] と CBT-2 [(*E*)-*N*-(2-hydroxy-5-oxocyclopent-1-en-1-yl)-5-(*o*-tolyl)pent-4-enamide] の生合成に関するものであり、序論、本論 (4 章からなる)、総括から構成されている。

CBT-1 と CBT-2 は、安定同位体標識した酢酸ナトリウムを用いたトレーサー実験から、ポリケタイド合成酵素によって生合成されることが証明されていた。しかしながら、その生合成機構の詳細は解析されておらず、特に、天然には極めて稀なジアルキルベンゼン構造を構成する *o*-tolyl 基の生合成機構に関する知見は、他の天然化合物を含めても全く無かった。本研究は、CBT-1 と CBT-2 の生合成研究を通して、ペリ環状反応の一つである 6 π -電子環状反応を触媒する酵素を初めて同定し、その反応機構を提唱している。

序論では、天然化合物に関する一般論と、ポリケタイド化合物の生合成、ペリ環状反応について記述し、本研究の目的を述べている。続く第 1 章では、CBT-1 と CBT-2 の生合成遺伝子群である *mbg* クラスターの各遺伝子破壊株の作製と、それらの解析結果について記述している。加えて、バイオインフォマティクス解析により各 *mbg* 遺伝子の機能を推定している。

第 2 章では、19 個の *mbg* 遺伝子 (*mbg0-3*, *mbg5-10*, *mbg14-17*, *mbg21-25*) と C₅N 部位の生合成を担う 3 個の生合成遺伝子を合わせた合計 22 個の遺伝子を、大腸菌または放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株を宿主として発現させて、可溶性タンパク質として調製することに成功している。ついで、これら 22 個の可溶性タンパク質と malonyl-CoA、NADPH などの基質を加えてインキュベートすることで、CBT-1 が合成されることを確認し、CBT-1 とその C₅N 非付加カルボン酸である (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-9-(*o*-tolyl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid (**6**) の acyl carrier protein (ACP) 体 (**6**-ACP) を合成するための *in vitro* 再構成系を確立している。

第 3 章においては、前章で確立した **6**-ACP の *in vitro* 再構成系から、一つずつ酵素や基質を取り除いてインキュベートし、蓄積する中間体を同定することで、各酵素の機能

を同定すると同時に、**6-ACP** の生合成経路を明らかにしている。また、その過程で **6-ACP** の中間体である **(2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienoic acid (3)** の ACP 体 (**3-ACP**) を合成するのに必要な酵素を同定するとともに、**3-ACP** から *o*-tolyl 基を持つ **(E)-3-(*o*-tolyl)acrylic acid (4)** の ACP 体 (**4-ACP**) への生合成系も決定している。

第 4 章では、前章で決定した **4-ACP** 生合成系を精査することで、**4-ACP** の *o*-tolyl 基の生合成機構を提唱している。すなわち、この生合成機構ではまず、Mbg6-Mbg5 複合体が **3-ACP** と malonyl-CoA の縮合反応を触媒し、C₂ 単位を一回だけ伸長して C₁₀ の **(4E,6E,8E)-diketo-triene** 中間体を生成する。次に、Mbg2 が、その活性中心ポケットに、この **diketo-triene** 中間体を取り込み、**6E** から **6Z** へのシストランス異性化反応とその後の **6π**-電子環状反応を触媒することで、**(E)-3-(6-methylcyclohexa-2,4-dien-1-yl)acrylic acid (11)** の ACP 体 (**11-ACP**) を生成する。最後に、Mbg17 が FAD 存在下、**11-ACP** の cyclohexadine 部の隣り合う 2 つの sp³ 炭素を不飽和化して **4-ACP** を生成する。

総括では、CBT-1 と CBT-2 の生合成機構の全容について述べている。また、他のジアルキルベンゼン含有天然化合物の生合成遺伝子を精査することで、Mbg2 と Mbg17 のホモログが関与するジアルキルベンゼン構造の生合成機構の普遍性について考察している。最後に、本研究で見出した Mbg2 は、生体反応で見出されるペリ環状反応の酵素レパートリーを拡大する “**electrocyclase**” と称すべき新しい **pericyclase** であると総括している。

以上、本研究は、ジアルキルベンゼン含有天然化合物 CBT-1 と CBT-2 の生合成経路の全容を明らかにするとともに、**6π**-電子環状反応を触媒する “**electrocyclase**” を世界で初めて同定し、その反応機構を提唱している。さらには、本研究は、この “**electrocyclase**” による反応が、ジアルキルベンゼン含有天然化合物に共通の生産システムであることも洞察しており、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。