

審査の結果の要旨

氏名 寺本 和矢

テルペノイドは最大の天然有機化合物群であり、多様な構造と生理活性を有することから医薬品だけでなく添加物や工業原料として様々な場面で利用されている。その生合成のうちテルペン合成酵素が担う骨格形成反応は、テルペノイドにおける構造多様性を生み出す鍵反応であるとともに、その反応は厳密な制御下で進行すると推察される。天然から多様な炭素骨格を持つテルペノイドが単離されている一方で、その骨格形成反応を担うテルペン合成酵素が同定されていないものも多く存在し、生合成酵素が同定されている場合においてもその環化機構が解明されていないものも多い。多様な骨格を生み出すテルペン合成酵素を同定しそれらの環化機構を解明することは、テルペン合成酵素による反応制御機構の理解や反応生成物の理論的改変を目指す上で重要である。本研究は、統計モデルを用いたゲノムマイニング、安定同位体標識実験や構造解析、計算科学的手法を組み合わせることで新規テルペン合成酵素の発見と複雑な環状骨格を生み出す CotB2 の反応機構を解明したものである。

本論文は、テルペン合成酵素の反応機構や配列の特徴を記述した序論に続き、第2章は真菌 *Trichoderma atroviride* FKI-3849 の持つテルペン合成酵素のゲノムマイニングと機能解析について記述している。また、第3章は *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 由来ジテルペン合成酵素 CotB2 の環化機構と構造基盤の解明について述べている。

第2章では、FKI-3849 株のドラフトゲノムシーケンスデータから、遺伝子予測プログラム AUGUSTUS を用いた ORF 予測と、オリジナルの統計モデルを用いた HMMER プログラムによるゲノムマイニングを行い、7つの推定テルペン合成酵素を見出している。さらに、ゲノムマイニングで見出した推定テルペン合成酵素のうち5つの *in vitro* 機能解析を行うことで、TaTC1 は cembrene A を生産するジテルペン合成酵素、TaTC3 は(-)-*cis*-piperitol を生産するモノテルペン合成酵素、TaTC5 は eremophilene を生産するセスキテルペン合成酵素、TaTC6 は 5(10)-brasilen-11-ol を生産するセスキテルペン合成酵素、TaTC7 は linalool/nerolidol を合成するモノテルペン/セスキテルペン合成酵素であること

を明らかにしている。これらの推定テルペン合成酵素遺伝子の一部は、本研究で作成したオリジナルの統計モデルを用いることで初めて見出されたものである。また、このオリジナルの統計モデルを他の *Trichoderma* 属真菌ゲノムにも適用することで、より多くのテルペン合成酵素を見出している。本研究で見出した新奇 **brasilane** 型セスキテルペン合成酵素 **TaTC5** の反応産物は、複数回の炭素-炭素結合の組換えを経由して生合成されると推測される特徴的な炭素骨格を有しており、本酵素の発見により新たな環化機構の解明につながることを期待される。*Trichoderma* 属真菌が揮発性テルペノイドを生産することは多数の報告がある一方で、その生合成酵素の報告例はこれまでにない。したがって本研究は、テルペン合成酵素探索の対象としての *Trichoderma* 属真菌の有用性を示すだけでなく、*Trichoderma* 属真菌の生産する揮発性テルペノイドの生理的意義の解明につながることも期待される研究成果と言える。

第3章は、直鎖状基質 **GGPP** から **5-8-5** 員環骨格を持つジテルペンアルコール **cyclooctat-9-en-7-ol** を合成する **CotB2** の詳細な反応機構解析について述べている。合成した重水素標識基質を用いた *in vitro* 機能解析により、三環式骨格が形成されたのちに **1,3-H shift** ではなく2回の連続した **1,2-H shift** が起きることを証明し、環化反応における水素移動の完全な解明に成功している。また、安定同位体を用いた標識実験、基質アナログ **geranylgeranyl thiopyrophosphate (GGSP)** との共結晶構造解析、量子化学計算によって得られた知見に基づき、カチオン中間体に生じたカルボカチオンの安定化を担うと推察されるアミノ酸残基やその周辺に位置する残基を特定し、それらアミノ酸残基に変異を導入した変異体酵素の機能解析を行うことで、分子内カチオン転位反応が途中で終結した化合物の構造を明らかにするとともに、**CotB2** の環化反応カスケードにおける各アミノ酸残基の機能を明らかにしている。すなわち、環化反応中に生じるカルボカチオンの位置と共結晶構造における各アミノ酸残基の配置から、各アミノ酸残基がカチオン中間体の安定化に寄与していることを強く示唆する結果を得ている。

以上の研究成果は、真菌および細菌の生産するテルペノイドの生合成における環状骨格形成反応を担う新奇テルペン合成酵素を発見し、複雑な環化反応を担う酵素の反応機構と構造基盤を明らかにしたものであり、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。