

## 審査の結果の要旨

氏名 鄒 仲堯 (チョウ チョンヤオ)

群体性微細緑藻 *Botryococcus braunii* は、大量の液状炭化水素を生産・蓄積するため、石油代替燃料としての利用が考えられている。本藻種は生産する炭化水素のタイプにより、A、B および L の少なくとも 3 品種に分類されている。これらの内 B 品種は、botryococcene 類および methylsqualene 類というトリテルペン系炭化水素を生産する。Botryococcene 類は、B 品種が蓄積する炭化水素の主成分であるのに対し、methylsqualene 類は、微量成分に過ぎない。その一方、本藻種の B 品種は、methylsqualene 類の 10, 11 位の炭素がエポキシ化された、10, 11-oxidomethylsqualene 類を構成要素とする、様々な二次代謝産物を生産する。Squalene あるいは methylsqualene 分子の 10, 11 位の炭素へのエポキシ基の導入は、燃料として有用な炭化水素を、難燃性の化合物へと変換してしまう重要な分岐点である。しかしながら、その反応に関与する酵素は現在まで特定されていない。そこで本研究では、生化学・分子生物学・天然物化学的手法を用い、本藻種における 10, 11-oxidosqualene の生合成に関与する酵素の特定を試み、下記の研究成果が得られた。

まず、ステロールの前駆体である 2, 3-oxidosqualene を生産するスクアレノエポキシダーゼ (squalene epoxidase; 以下 SQE と略) の類似酵素が、*B. braunii* における 10, 11-oxidosqualene の生成に関与するものと仮定し、*in vitro* の酵素アッセイ系の確立を試みた。SQE の反応には NADPH に加え、NADPH-dependent cytochrome P450 reductase (以下 CPR と略) を必要とする。また、SQE と適切な CPR の組合せも、酵素反応の至適化には重要であることが知られている。そこで、SQE の *in vitro* 酵素アッセイに必要な、*B. braunii* 由来 CPR の cDNA クローニングを行った。その結果、酵素活性を有する CPR の組換えタンパク質 (*BbCPR*) の取得に成功し、その酵素学的性状を明らかにする事ができた。

次に 10, 11-oxidosqualene 生合成酵素の候補遺伝子を、*B. braunii* のトランスクリプトームデータから探索した。既往研究において、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の SQE のアミノ酸配列情報を用いて、4 種の SQE 様遺伝子 (*BbSQE-I~IV*) が、*B. braunii* から得られており、これらの内、*BbSQE-I* お

よび II は、2, 3-oxidosqualene の生合成酵素であることが知られていた。一方、*BbSQE-III* および *IV* の機能は不明であり、10, 11-oxidosqualene 生合成酵素をコードしている可能性も考えられた。これらに加え、上記 *BbSQE-I* および II のアミノ酸配列情報を基に、類似遺伝子の再探索を行ったところ、新たに *BbSQE-V* が得られた。そこで *in vitro* のアッセイ系による機能解析を行うべく、大腸菌における *BbSQE-V* の組換えタンパク質の生産を試みた。しかしながら、種々条件検討を行ったにも関わらず、活性を有する可溶性タンパク質として得る事はできなかった。この事を受け、*BbSQE-I~V* を、スクアレンを蓄積する酵母変異株において、それぞれ個別に発現させ、当該酵母のアセトン抽出物につき GC-MS 分析を行った。その結果、*BbSQE-V* を発現している酵母のみにおいて、2, 3-oxidosqualene と類似したマススペクトルを示すものの、保持時間が異なる化合物の蓄積が認められた。

この蓄積した化合物につき、酸加水分解およびトリメチルシリル化を行い、GC-MS 分析を行ったところ、当該化合物は、10, 11-oxidosqualene であることが確認された。また、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C-NMR も上記結論を支持した。また、*BbSQE-V* は 10, 11-oxidosqualene に加え、微量の 6, 7-oxidosqualene も生産することが明らかになった。得られた 10, 11-oxidosqualene におけるエポキシ基の絶対立体配置を、Mosher 法により調べたところ、当該化合物は (10*S*, 11*S*)-oxidosqualene であることが判明した。さらに *BbSQE-V* が、2, 3-oxidosqualene も生産することができるかを、2, 3-oxidosqualene 生産能を欠く酵母変異株を用いて調べたところ、酵母の生育を回復させるのに必要な 2, 3-oxidosqualene の生産は確認できなかった。これらのことから、*BbSQE-V* は、*B. braunii* の B 品種に存在する 10, 11-oxidosqualene の生合成に関与する酵素であると考えられた。

以上、本研究では、微細緑藻 *B. braunii* 由来の新規 SQE を特定することができた。本研究の結果は、将来、生物工学的手法を用いて、本藻種によるバイオ燃料生産を行う際に、炭化水素が燃料として使いにくい化合物へと変換される経路を制御するために非常に重要である。これらの研究成果は、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。