

## 審査の結果の要旨

氏名 中嶋 優

本学位論文において中嶋優は「糸状菌メロテルペノイドの複雑骨格構築に関わる  $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの構造機能解析」という題目で、糸状菌二次代謝経路に存在する複数の  $\alpha$ -ケトグルタル酸 ( $\alpha$ KG) 依存性ジオキシゲナーゼに対する、X線結晶構造解析及びその機能解析を行った。 $\alpha$ KG 依存性ジオキシゲナーゼはヒト細胞にも多く認められ、生体内で様々な役割を担っている主要酸化酵素である。一方で、これらの酸化酵素は生物活性を示す二次代謝産物の生合成においても利用されることが知られている。興味深いことに、 $\alpha$ KG 依存性ジオキシゲナーゼの中には多段階の酸化酵素を触媒する多機能性を有しているものが報告されており、特に糸状菌メロテルペノイドの生合成に寄与する  $\alpha$ KG 依存性ジオキシゲナーゼの多くはこの多機能性を示していた。そこで、中嶋はこれら糸状菌メロテルペノイド由来の  $\alpha$ KG 依存性ジオキシゲナーゼに着目し、その機能解析を X線結晶構造により取り組み、以下の成果を挙げた。

### 1. Austinol 及び berkeleydione の生合成に寄与する AusE、PrhA の構造機能解析

Austinol 及び berkeleydione は共に糸状菌により生合成されるメロテルペノイドであり、その部分構造にはそれぞれ特異なスピロラクトン環やシクロペンタジエン骨格を有している。先行研究において、これら複雑骨格構築を担う鍵酵素がそれぞれ  $\alpha$ KG 依存性ジオキシゲナーゼ AusE 及び PrhA であることが報告された。興味深いことに、AusE 及び PrhA は共通の基質 preaustinoid A1 を受け入れるものの、全く異なる構造の生成物である preaustinoid A3 及び berkeleydione を連続的な酸化反応により与えることが示された。そこで、中嶋は、両酵素が示す異なる反応性と、その多機能性の解明を目的に、AusE 及び PrhA の X線結晶構造解析及び点変異導入を行い、その活性の変化を評価した。

その結果、両酵素の全体構造を 2.1 Å の分解能で取得し、その活性部位を両酵素間で比較したところ、PrhA において酵素活性に重要なアミノ酸残基、Val150、Ala232、Met241 を見出した。一方で、これらのアミノ酸残基は AusE では Leu150、Ser232、Val241 であることが分かった。その中で PrhA の 150、232 残基に着目し、AusE 型へと点変異導入を行った PrhA-V150L/A232S 変異体酵素の preaustinoid A1 に対する *in vitro* 活性評価を行った結果、AusE 型の活性を持つ酵素へと変換されていることを明らかにした。一方で、AusE に対しても、この 2 残基に対して PrhA 型に点変異導入を行った AusE-L150V/S232A 変異体酵素の preaustinoid A1 に対する *in vitro* 活性評価を行った結果、PrhA 型の活性を示すことを見出した。このように中嶋は AusE と PrhA の preaustinoid A1 に対する活性の違いが僅か 2 つのアミノ酸残基により制御されていることを構造に基づく機能解析により明らかにした。

## 2. 結晶構造に基づく AusE、PrhA が示す多機能性の理解と新規化合物の創出

引き続き、中嶋は、AusE 及び PrhA が示す連続的な酸化反応をもたらす要因を追究すべく、これら酵素が基質として受け入れる複数の化合物と酵素との複合体構造をそれぞれ取得し、各構造の比較検討を行った。その結果、化合物の部分構造は、酵素により厳密に認識されている箇所と、弱く認識されている箇所に二分されることを明らかとした。興味深いことに、基質認識が弱い部分構造においてのみ、様々な酸化酵素反応が生じていた。このことから、酵素反応部位に見られる基質認識の弱さが連続的な酸化反応を引き起こす要因ではないかと示唆された。

そこで、中嶋は、この基質認識の弱さを利用することで、新規メロテルペノイドの創出が可能であると考え、点変異導入による酵素機能改変に着手した。具体的には PrhA の酵素反応部位周辺の 3 残基に着目し、点変異導入した PrhA-V150L/A232S/M241V 変異体酵素の preaustinoid A1 に対する *in vitro* 活性評価を行った。その結果、新たに 4 種類の新規メロテルペノイドの創出に成功した。構造決定を行った結果、驚くべきことに、これら新規化合物は全て中間体 preaustinoid A3 よりさらに酸化反応が進んだ化合物であることが明らかとなり、作成した変異体は preaustinoid A1 から最大 5 回の連続的な酸化反応により最終化合物を生成することを示した。

本研究は、メロテルペノイド生合成に寄与する  $\alpha$ KG 依存性ジオキシゲナーゼの結晶構造に基づき、その機能解明に至っただけでなく、単純な点変異導入により容易に酵素機能改変されることを示した。これらの業績は合成生物学を利用した新規活性物質の産生や、創薬化学に大きく貢献するものであり、よって本論文は博士(薬科学)の学位論文として合格と認められる。