

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 孝暲

テルペノイドは炭素数 5 のイソプレヌユニットを基本骨格にもつ化合物群である。テルペン合成酵素 (terpene synthase, TS) は、直鎖の二リン酸テルペノイドである geranyl diphosphate (GPP, C₁₀) や farnesyl diphosphate (FPP, C₁₅) を基質にして、様々な構造のテルペノイドを合成する酵素である。TS の多様な反応特異性は、テルペノイドの構造多様性を生み出すための重要なファクターの 1 つである。植物や菌類などの真核生物が多様なテルペノイドを生産していることはよく知られており、それらを合成する TS については多くの研究が報告されてきた。一方、原核生物が生産するテルペノイドやそれを合成する TS については、これまであまり研究されてこなかった。しかしながら、近年のゲノム解析によって、土壌細菌である放線菌が機能未知の TS 遺伝子を数多く保有していることが明らかになり、放線菌が多様なテルペノイドを生産する能力を有していることが示唆されていた。本研究はこのような背景のもと、新規テルペノイドや新規反応を触媒する TS の取得を目指し、放線菌由来機能未知 TS の機能解析を行ったものである。

第 1 章序論では、テルペノイドの分類と生合成、テルペン合成酵素の酵素機能、既知の細菌由来モノテルペン合成酵素およびセスキテルペン合成酵素についてまとめられている。また、本研究で用いられた研究手法であるゲノムマイニングについての詳しい解説とともに、本研究を着想するに至った経緯、研究目的および意義について述べられている。

第 2 章においては、放線菌 *Streptomyces clavuligerus* 由来の TS についての研究結果が述べられている。公開されている *S. clavuligerus* ゲノムからは、12 個もの TS 遺伝子が見出され、そのうち 6 個 (SCTS1, 2, 3, 6, 7, 10) について機能解析が行われ、以下に記す 3 つの酵素の機能が明らかにされた。

SCTS1 遺伝子を異種放線菌で発現し、培養抽出液を GC-MS で解析した結果、モノテルペンである 1,8-cineole の生産が確認された。また、組換え酵素を用いた *in vitro* 解析によって、SCTS1 が GPP を基質にして、1,8-cineole を合成することが示された ($K_m = 169.9$ nM, $k_{cat} = 0.079$ s⁻¹)。1,8-cineole 合成酵素は植物から取得されているが、原核生物からの取得は本研究が初めての例であった。また、GPP を直接の基質とするモノテルペン合成酵素はこれまで原核生物では見つかっておらず、SCTS1 が初めての例となった。

組換え酵素を用いた *in vitro* 解析によって、SCTS2 が GPP を基質にして (3*R*)-linalool ($K_m = 12.9$ μM, $k_{cat} = 0.084$ s⁻¹) を、FPP を基質にして (3*R*)-*E*-nerolidol ($K_m = 9.6$ μM, $k_{cat} = 0.311$ s⁻¹) を、それぞれ合成することが示された。また、SCTS2 遺伝子を異種放線菌で発現させたところ、linalool とその類縁体の生産が確認された。linalool および nerolidol

は直鎖状テルペノイドであり、SCTS2 は原核生物で初めて見つかった直鎖状テルペノイドの合成酵素となった。

SCTS7 遺伝子を異種放線菌で発現した時に生産される化合物を精製し、NMR および旋光度解析によって、本化合物が二環性セスキテルペン(-)- δ -cadiene であることが示された。さらに、組換え酵素を用いた *in vitro* 解析によって、SCTS7 が FPP を基質にして(-)- δ -cadiene を合成することが示された。

第 3 章においては、ドラフトゲノム解析が行われた *Streptomyces* 属放線菌 3 株を対象に行った TS のゲノムマイニング研究の結果が述べられている。5 つの TS (TS1, 2, 3, 4, 5) の機能解析に取り組んでいる。

TS1 遺伝子を異種放線菌で発現した時に生産される化合物を精製し、NMR、旋光度および X 線単結晶構造解析によって、本化合物が 5-7-3 員環からなる三環性新規セスキテルペン (debromo-neomeranol) であることが示された。また、重水中で *in vitro* 酵素反応を行い、反応産物への重水素の取り込みを MS 解析により調べることで反応機構が予想された。速度論的解析も行われた ($K_m = 1.17 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0.0196 \text{ s}^{-1}$)。

TS3 および TS5 に関しては、異種発現解析および *in vitro* 酵素反応解析によって、いずれも構造新規であると考えられるセスキテルペンが生産されていることが示された。一方、TS2 と TS4 は互いにアミノ酸配列の相同性が 71% と高く、同じ反応を触媒することが予想されていたが、それぞれの遺伝子の異種発現により同一の化合物が生産されていることが示された。生産物の GC-MS 解析における MS フラグメントをデータベースと照合した結果、本化合物は二環性セスキテルペンである α -muurolene であることが強く示唆された。

第 4 章総括においては、本研究の結果を総括するとともに、今後の展望について述べられている。

以上、本論文は原核生物由来の TS に関して新たな知見をもたらすものであり、学術上貢献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。