

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 TENKOVSKAIA Liudmila  
 学位 博士 (学術)  
 学位記番号 新大院博 (学) 第 215 号  
 学位授与の日付 平成 30 年 9 月 20 日  
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
 博士論文名 Analysis of the catalytic mechanism of a bifunctional triterpene/sesquiterpene cyclase  
 (二機能性トリテルペン/セスクアテルペン環化酵素の触媒機構の解析)

論文審査委員 主査 准教授・佐藤 努  
 副査 教授・三ツ井 敏明  
 副査 教授・鈴木 一史  
 副査 教授・末吉 邦  
 副査 教授・伊藤 紀美子

博士論文の要旨

当研究室では *Bacillus* 属細菌におけるテルペン生合成について研究しており、これまでに *Bacillus megaterium* から二機能性セスクアテルペン/トリテルペン環化酵素 (TC) を発見した。TC は tetraprenyl- $\beta$ -curcumene (**1**; C<sub>35</sub>) を基質とした場合には 4 環骨格を形成するが, squalene (**2**; C<sub>30</sub>) を基質とした場合には 2 環骨格の中間体を形成する。最近の当研究室の研究によって, TC が 2 環構造の中間体を基質としてさらに受容し, 残っている側鎖から環化して 4 環と 5 環性のオノセロイド (スクアレンの両末端から生合成されるトリテルペン) を生合成することが判明した。オノセロイド合成酵素の初めての同定であった。加えて, 当研究室は TC を用いることによって龍涎香の主成分 ambrein の酵素合成に成功した。

本研究において, 基質 **1** と **2** に対して異なる環化モードで触媒するユニークな TC の触媒機構を解析した。特に, オノセロイド生合成において最初の環化が 2 環で止まる要因を追求した。触媒機構の解明はアンブレイン生産を増加させるためにも重要であると考えられる。TC と 30% の配列相同性を有する Squalene-hopene 環化酵素 (SHC) の触媒機構についての研究は非常に進んでいる。本研究において, SHC 活性部位内で C 環付近に位置する W169 に相当する, TC の Y167 をターゲットに変異実験を行った。Y167A と Y167G 変異体と **2** の反応から, 未知化合物 **3** の生産が確認され, 構造解析によって **3** が非天然型の 3 環性トリテルペノールであることがわかった。Y167L, Y167F および Y167W が 3 環性化合物を生産していないことから, Y167 残基のバルクサイズが **2** の環化を 2 環で止めるために重要であることが示唆された。一方, 野生型および全ての変異型 TC は基質 **1** から正常な生成物 **2** のみを生産した。**2** の pre-C 環のメチル基の位置は **1** と異なっている。Y167 は **2** の C 環の環化を妨げるために C-15 のメチル基と相互作用し, **1** の C-14 のメチル基とは相互作用しないことによって, 生成物の環状構造の違いが起きていると現在考えている。

本研究はオノセロイド合成酵素の触媒機構について変異酵素を用いて初めて解析したものであり, Y167 の位置でのバルクサイズが 2 環段階で **2** の環化反応を止めるために重要であることを明らかにした。

#### 審査結果の要旨

本論文では、二機能性セスクアテルペン/トリテルペン環化酵素の変異酵素を解析した。第一段階目の反応が二環で止まる要因が Y167 の位置でのバルクサイズであることを明らかにした。オノセロイド合成酵素の触媒機構に関する初めての研究である。

以上の結果は、天然物の生合成に関して新たな知見を提供するものであり、希少生理活性物質の生物合成に貢献できると評価される。本論文の主な内容は、申請者を筆頭著者として以下1つの論文に掲載済みである。

**L. Tenkovskaia, M. Murakami, K. Okuno, D. Ueda, T. Sato.** Analysis of the catalytic mechanism of bifunctional triterpene/sesquiterpene cyclase: Tyr167 functions to terminate cyclization of squalene at the bicyclic step, *ChemBioChem* 2017, 18, 1910 – 1913.

よって、本論文は博士（学術）の博士論文として十分であると認定した。