

論文名： ANALYSIS OF THE CATALYTIC MECHANISM OF A BIFUNCTIONAL TRITERPENE/SESQUARTERPENE 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)

新潟大学大学院自然科学研究科

氏名 Liudmila Tenkovskaia

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- β -curcumene (**1**; C₃₅) を基質とした場合には 4 環骨格を形成するが、squalene (**2**; C₃₀) 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。