

ふりがな なかの ちあき
氏名 仲野 千秋
学位位 博士(農学)
学位記番号 新大院博(農)第84号
学位授与の日付 平成20年3月24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 原核生物由来のジテルペンおよびトリテルペン合成酵素の機能解析

論文審査委員
主査 教授 星野 力
副査 教授 渡邊剛志
副査 教授 三ツ井敏明
副査 准教授 佐藤 努
副査 准教授 原 崇

博士論文の要旨

テルペノイドは天然から見出されている最大の化合物群であり、24,000種類以上が報告されている。テルペノイドは炭素数5つの前駆物質、isopentenyl diphosphate (IPP)から生合成される。IPPの連続的な縮合により GPP(C₁₀)、FPP(C₁₅)、GGPP(C₂₀)、squalene(C₃₀)が生じ、これらは、様々な生物が持つ独自の環化酵素によって環化され、モノ-(C₁₀)、セスキ-(C₁₅)、ジ-(C₂₀)、トリテルペン(C₃₀)の親骨格を生産する。従って、テルペノイドの多様性を導く鍵となる酵素は、テルペノイド環化酵素となる。現在、様々なテルペノイド環化酵素が主に真核生物からクローニングされており、広範囲に研究されているが、原核生物由来のテルペノイド環化酵素の報告例はわずかであり、未解明な点が多い。本論文では、ゲノム情報を基に原核生物由来のテルペノイド合成酵素の取得を行った。*Mycobacterium tuberculosis* と *Methylococcus capsulatus* を生物材料とした。*M. tuberculosis* および *M. capsulatus* の全ゲノム塩基配列の解明がそれぞれ1998年、2004年に終了している。

(1) *M. tuberculosis* 由来のテルペン合成酵素

既知のテルペン環化酵素との相同検索によって、*M. tuberculosis* の Rv3377c 遺伝子がテルペン環化酵素をコードしている可能性が推定された。クローニングし、大腸菌で大量発現系を構築した。シャペロン GroE の共発現系を用いて活性のある可溶性酵素蛋白質を得る事に成功し、種々のテルペン系化合物と酵素反応を行い、GGPPのみが基質となることを明らかにした。生成物は新規物質であったので、tuberculosinol diphosphate と命名した。脱2リン酸化酵素の存在が想定されたので、flanking region の Rv3376c および Rv3378c をクローニングし機能解析した。Rv3378c が tuberculosinol diphosphate を脱リン酸化し、水付加した生成物 isotuberculosinol や tuberculosinol を与えた。Rv3378c 遺伝子産物は従来のテルペン合成酵素とは、全く相同性がなく新規なテルペン合成酵素であると想定された。これを検証するために、Rv3378c の基質等異性を検討した。鎖状の GPP,

FPP や GGPP では全く反応しなかったが、環状ジテルペンのコパリル 2 リン酸(CDP), ent-CDP および syn-CDP とは反応し、tuberculosinol-PP と同様に、脱リン酸を受け水付加によって生成する産物を与えた。ジテルペン合成酵素には、A 型環化酵素および脱プロトン反応を受け二重結合が導入されるジテルペン合成酵素 2 種類のものが知られていたが、Rv3378C はこれらのものと触媒機構が異なる新型のジテルペン合成酵素に分類される事を明らかにした。また、本論文は、Rv3377c および Rv3378c の部位特異的変異実験を含む詳細な酵素学的な諸性質を報告し、DXDT 配列、DDXXD 配列が活性部位であることを明らかにした。なお、Rv3377c および Rv3378c によって生成される tuberculosinol や isotuberculosinol の生理学的機能を追求したところ、抗マクロファージ活性を持っている事を見いだした。10 μ M の tuberculosinol で約 50% 食食作用が阻害され、また isotuberculosinol との相乗効果が認められた (約 80% 阻害)。また、Rv3377c, Rv3378c 両遺伝子は、ゲノム解析が終了している 14 種の Mycobacterium 属を精査したところ、病原性のものにしか存在しない事を見いだした。これらの事実は、Rv3377c および Rv3378c が *M. tuberculosis* の病原性と深く関連していることを示唆している。

(II) *M. capsulatus* 由来のトリテルペン合成酵素のクローニングおよび機能解析

一般には、原核生物はステロール成分をもっていないが、極わずかな一部の細菌にはステロール成分の存在が報告されている。しかし、原核生物のステロール合成を司る遺伝子や酵素学的な機能解析は未だ報告されていなかった。*M. capsulatus* の MCA2872 と MCA2873 遺伝子が、相同性検索からそれぞれスクアレノエポキダーゼ(SE)とオキシドスクアレノ環化酵素(OSC)と推定した。MCA2872 は、FAD 結合配列(GXGXXG, DG および GD 配列)を持っており、また MCA2873 は 5 つの QW モチーフ(蛋白質の構造維持)と環化開始を司る DCTA モチーフを持っている事から、テルペン環化酵素と想定された。種々のベクターを用いた大腸菌でのクローニング・発現系を構築し活性酵素蛋白質を得た。MCA2872 遺伝子産物では、スクアレノからオキシドスクアレノを得た。オキシドスクアレノの立体化学を 3S-form と決定した。この立体化学は真核生物の生成物と同一であった。また、MCA2873 遺伝子産物は、オキシドスクアレノからラノステロール産物への酵素反応を触媒した。これら酵素反応は、立体選択性および立体化学を含めて真核生物由来のものとは完全に一致した。従って、*M. capsulatus* 由来の SE、OSC とともに太古の真核生物から水平伝搬した可能性が示唆された。事実 5-10 億年前の真核生物にステロール成分が見いだされている。

審査結果の要旨

本研究は、真核生物と比較して研究例が少ない原核生物由来のジテルペン合成酵素の詳細な機能解析およびトリテルペン合成酵素の機能を明らかにすることを目的に行った。その手法として、ゲノムマイニングによりテルペン合成酵素を推定し、大腸菌での異種発現系を構築し機能を解析している。*M. tuberculosis* から新規ジテルペン環化酵素および新規に分類されるジテルペン合成酵素を見いだした。また、酵素産物が抗マクロファージ活性を持っているという興味深い事を見だし、両遺伝子が病原性と深い関わりを持っている事も見いだした。また、*M. capsulatus* のトリテルペン合成酵素をとりあげ、スクアレノエポシダーゼやラノステロール合成酵素遺伝子の *in vitro* による実験的証明を報告した。原核生物由来のトリテルペン合成酵素の分子生物学的証明に成功したのは、本論文が最初である。また、分子進化学的にも非常に興味深い知見を論じている。

本論文は、報告例の少ない原核生物由来のジテルペンおよびトリテルペン合成酵素に関する新たな数多くの知見を与えており、極めて価値あるものと判断される。よって、本論文は博士(農学)の学位論文として十分な内容を持つものと判定した。