

新潟大学大学院 自然科学研究科 生命・食料科学専攻 平成 26 年 博士論文

β -アミリン合成酵素の触媒機構 に関する研究

新潟大学大学院 自然科学研究科 博士後期課程

生命・食料科学専攻 応用生命・食品科学コース

F11M010C 伊藤 遼介

主指導教員 星野 力 教授

β-アミリン合成酵素の触媒機構に関する研究

第1章	緒論	1
1-1.	テルペン環化酵素	2
1-2.	トリテルペン環化酵素について	9
1-3.	スクアレン-ホペン環化酵素 (SHC)	12
1-4.	オキシドスクアレン環化酵素 (OSC)	17
1-5.	<i>Euphorbia tirucalli</i> L. 由来 β-アミリン合成酵素 (EtAS) について	40
第2章	実験方法	45
2-1.	実験の概要	47
2-2.	実験材料	47
2-3.	分析機器	54
2-4.	培養および保存	55
2-5.	基本的な遺伝子操作法	56
2-6.	<i>S. cerevisiae</i> の培養と誘導	69
2-7.	ケン化とヘキササン抽出	69
2-8.	ホモロジーモデリング	70
2-9.	基本的なタンパク操作法	71
2-10.	酵素の精製	74
2-11.	精製 OSC を用いた酵素反応検定	76
2-12.	Western blotting	79
第3章	β-アミリン合成酵素の酵素学的諸性質	81
3-1.	背景と目的	82
3-2.	酵素学的諸性質	82
3-3.	速度論定数の決定	87
3-4.	高次構造	92
3-5.	阻害剤を用いた酵素反応	96
3-6.	環化開始部位への部位特異的変異導入	110

第 4 章	F728 残基の機能解析	119
4-1.	背景と目的	120
4-2.	マルチプルアラインメント	121
4-3.	ホモロジーモデリング	122
4-4.	SHC F601 残基	123
4-5.	<i>S. cerevisiae</i> ラノステロール合成酵素 F699 残基	125
4-6.	変異株の作製	127
4-7.	プロダクトプロファイル	129
4-8.	野生株に対する変異株の相対活性	140
4-9.	CD 測定	146
4-10.	F728 残基のまとめ	148
4-11.	プロダクトのスペクトルデータ	149
第 5 章	F474 残基の機能解析	165
5-1.	背景と目的	166
5-2.	SHC F365 残基	168
5-3.	<i>S. cerevisiae</i> ラノステロール合成酵素 F445 残基	170
5-4.	変異株の作製	172
5-5.	プロダクトプロファイル	174
5-6.	野生株に対する変異株の相対活性	181
5-7.	CD 測定	189
5-8.	F474 残基のまとめ	190
4-9.	プロダクトのスペクトルデータ	191
第 6 章	イネ由来 OsOSC6 の進化過程	201
6-1.	背景と目的	202
6-2.	OsOSC6 について	205
6-3.	OsOSC6 の微量成分の同定	206
6-4.	OsOSC6 のプロダクトプロファイル	209
6-5.	OsOSC6 の進化過程	214
6-6.	OsOSC6 のプロダクトデータ	218

第7章 総括	225
7-1. <i>EtAS</i> 酵素学的諸性質	226
7-2. F728、F474 残基の機能	229
7-3. イネ由来 <i>OsOSC6</i> の進化過程	235
7-4. まとめ	239
謝辞	240
参考文献	241

略語(アルファベット順)

Amp	ampicillin
bAS	β -amyrin synthase
bp	base pairs
CAS	cycloartenol synthase
CD	circular dichroism
DNA	deoxyribonucleic acid
DiOXSQ	dioxidosqualene
DTT	dithiothreitol
EtAS	β -amyrin synthase from <i>Euphorbia tirucalli</i> L.
FPP	francetyl diphosphate
GC	gas chromatography
GGPP	geranyl geranyl diphosphate
GPP	geranyl diphosphate
HPLC	high performance liquid chromatography
hr	hour
IPP	isopentenyl diphosphate
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LAS	Lanosterol synthase
LB	Luria-Bertani
LUS	Lupeol synthase
MS	mass spectrometry
min	minute
ORF	open reading frame
OXSQ	oxidosqualene
OSC	oxidosqualene cyclase
PAGE	polyacrylamido gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
R.T.	retention time
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE	squalene epoxidase
SHC	squalene hopene cyclase
SQ	squalene
TLC	thin layer chromatography

第1章

諸論

1-1. テルペン環化酵素	2
1-1-1. 天然有機化合物 (天然物) について	2
1-1-2. イソプレノイドについて	4
1-1-3. テルペン環化酵素について	7
1-2. トリテルペン環化酵素について	9
1-3. スクアレン-ホペン環化酵素 (SHC)	12
1-3-1. SHC について	12
1-3-2. SHC への部位特異的変異導入実験について	13
1-4. オキシドスクアレン環化酵素 (OSC)	17
1-4-1. OSC 研究の背景	17
1-4-2. OSC の機能解析について	19
1-4-3. ラノステロール合成酵素	21
1-4-4. β -アミリン合成酵素	24
1-4-5. シロイヌナズナ OSC	29
1-4-6. OSC の系統解析	32
1-5. <i>Euphorbia tirucalli</i> L. 由来 β -アミリン合成酵素について	40
1-5-1. <i>Euphorbia tirucalli</i> L. について	40
1-5-2. 当研究室でのこれまでの EtAS 研究	41
1-5-3. 本研究の目的	43

1-1. テルペン環化酵素

1-1-1. 天然有機化合物（天然物）について

天然有機化合物（天然物）とはその名の通り、生物由来に由来する有機化合物である。その中でも天然物化学・生物有機化学では下に示したような主に比較的低分子量の有機化合物を追求する学問であり、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、核酸などは主に生化学において取り扱われる。

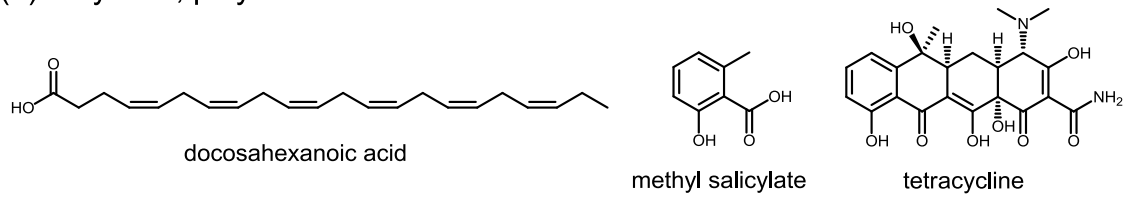
天然物の性質は多岐にわたり、例として次のようなものが挙げられる。生体機能調整（ホルモン、ビタミンなど）、情報伝達（フェロモン）、毒・薬、香料（バニリン、リモネン、メントールなど）、色素（カロテノイド、フラボノイドなど）である。そして、天然物はその分子構造、生合成機構から以下のように大きく4つに分類することができ、当研究室で主にターゲットとしているイソプレノイド（テルペノイド）もこの分類に含まれる。

- (1) 脂肪酸、ポリケタイド（プロスタグランジン、マクロライド）
- (2) イソプレノイド（テルペノイド、ステロイド、カロテノイド）
- (3) 芳香族化合物（フェニルプロパノイド）
- (4) 含窒素化合物（アルカロイド）

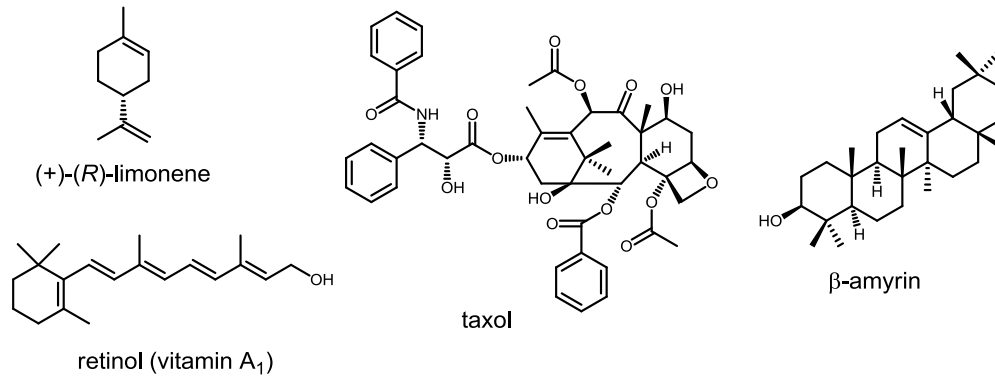
近年では分類の異なる成分を一つの分子内に併せ持つハイブリッド分子の研究も盛んに行われており、メロテルペノイド（ポリケタイド+テルペノイド）やインドール-テルペン（インドール+テルペノイド）などはその代表である。

Figure 1-1 には天然物の代表例を示した。

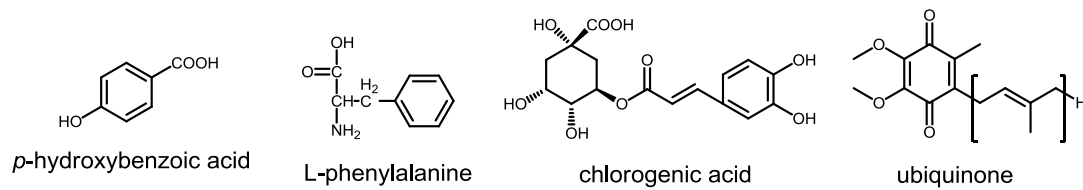
(1) fatty acid, polyketide



(2) isoprenoid



(3) phenylpropanoid



(4) Alkaloid

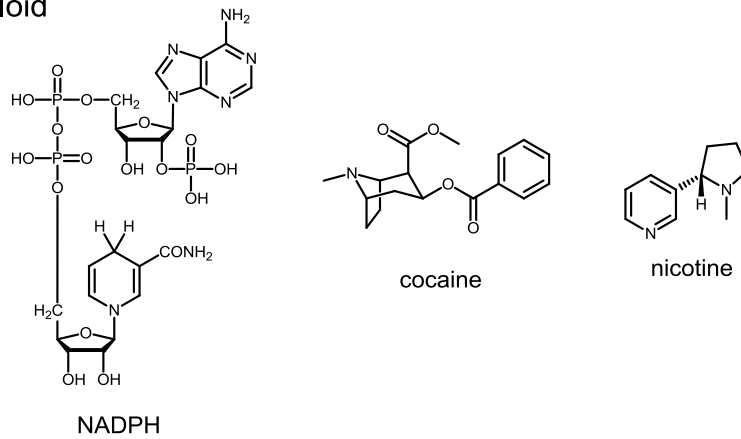


Figure 1-1. 代表的な天然物の構造

1-1-2. イソプレノイドについて

イソプレノイドは、動植微生物の産生する有機化合物の一群であり、その種類は非常に多様である。テルペン、ステロイドやカロテンなどはイソプレノイド系化合物の代表である。自然界において植物は光合成により、二酸化炭素と水から糖やアミノ酸などを生成し、更に種々な生命維持のために必要な物質を作っていく。動物も生命維持のために必要な物質を生合成するが、大部分は飲食により原料物質を摂取し、必要な物質に変換している。これらの生合成経路は一次代謝と二次代謝に大別できる (Figure 1-2)。一次代謝は、動植物にとって基本的な生命エネルギー獲得の代謝産物である。この一次代謝と二次代謝にイソプレノイドは深く関わっている。

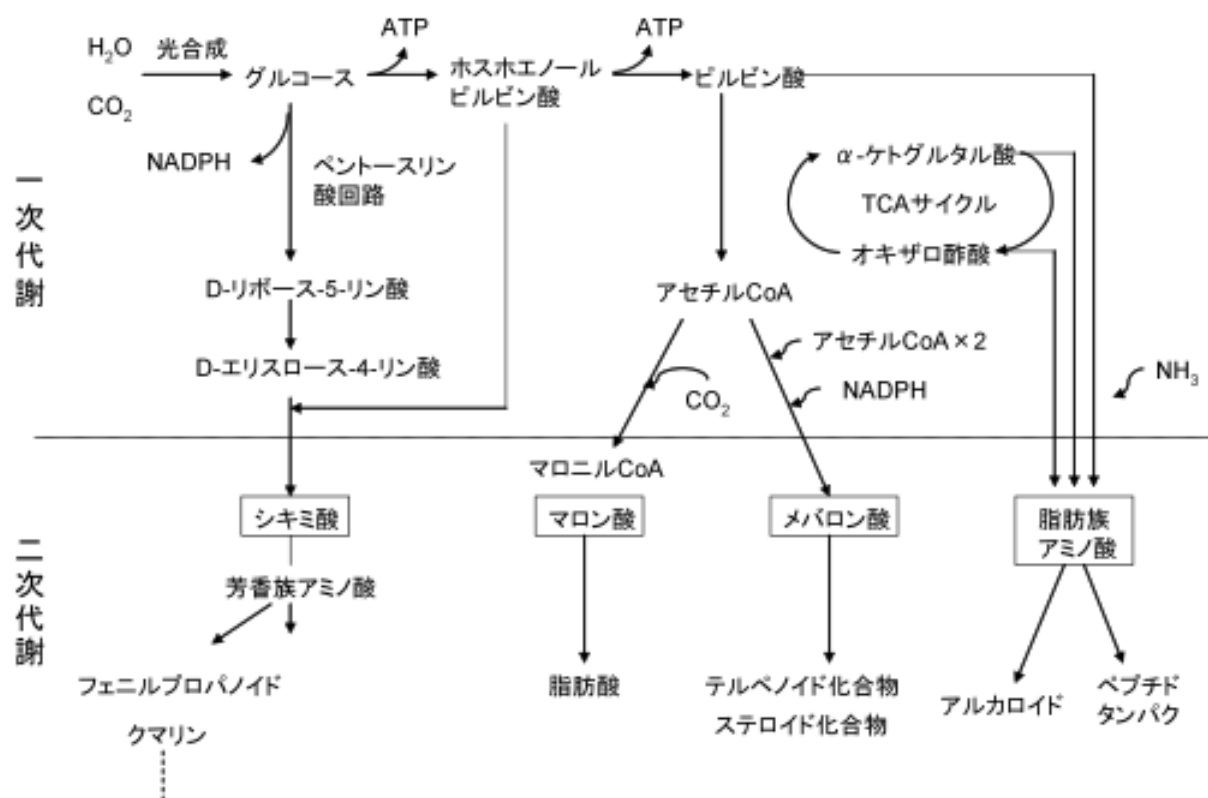
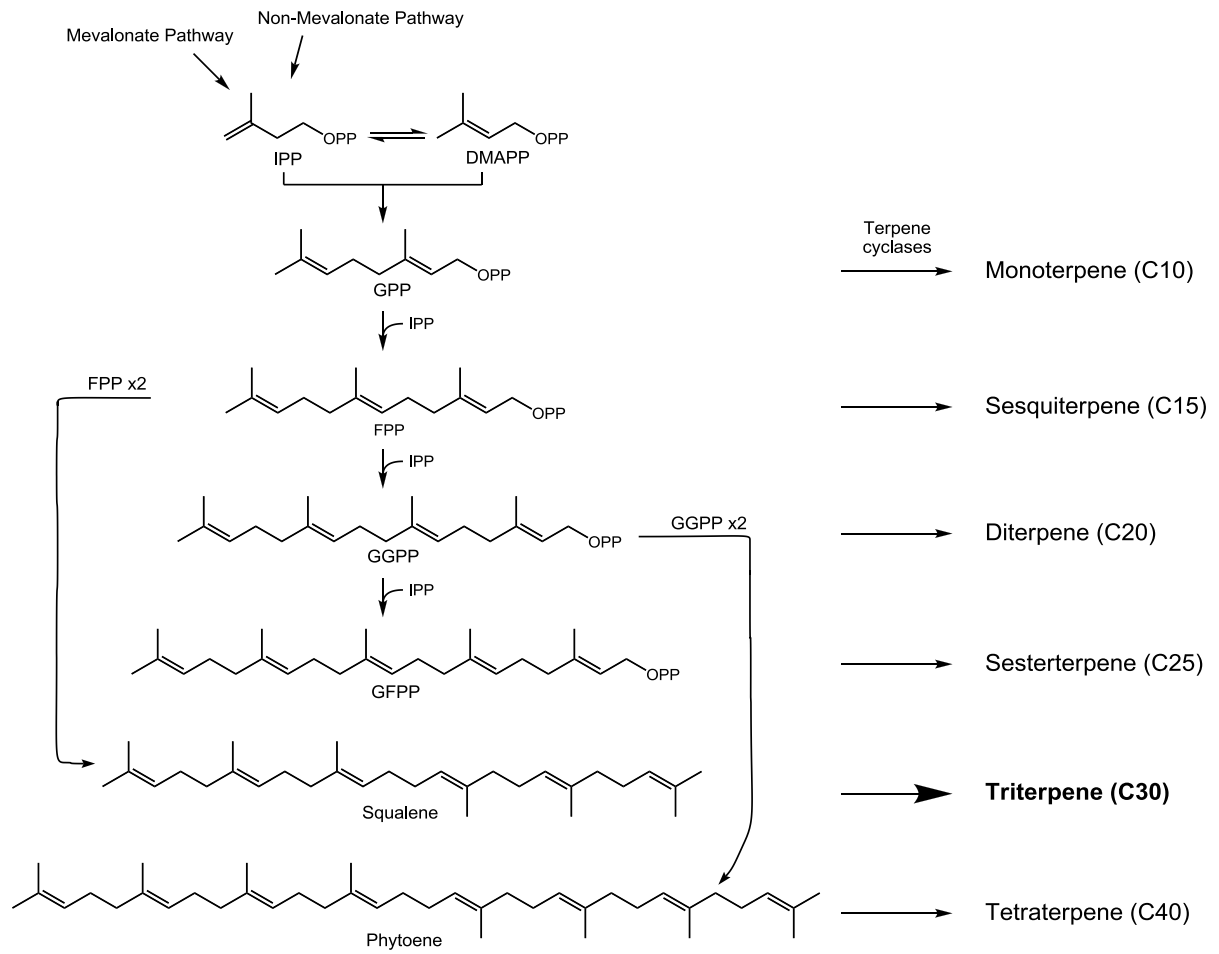


Figure 1-2. 天然物の代謝と生合成

イソプレノイドは枝分かれした炭素数 5 個のイソプレン $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ がくり返し重合してできる物質群の総称である。このくり返し単位によってヘミテルペン (C_5)、モノテルペン (C_{10})、セスキテルペン (C_{15})、ジテルペン (C_{20})、セスタテルペン (C_{25})、トリテルペン (C_{30})、およびテトラテルペン (C_{40}) に分類される (Figure 1-2)。1950 年代に多くの天然物がイソプレン単位により形成されるという「イソプレン則」が提唱された。生体内での重合反応は、イソプレンそのものが反応するのではなく、同じく C_5 のイソペンテニルニリン酸 (IPP) が反応する。この IPP はメバロン酸中間体経路で生合成されることから、メバロン酸経路と呼ばれ、イソプレノイド生合成経路が確立した (Scheme 1-1)。しかし、1993 年、メバロン酸を経ない新規な経路で IPP が生合成されることが発見された。この経路は「非メバロン酸経路 (MEP 経路)」と呼ばれ、原核生物や植物の色素体で広く見いだされている。⁷¹

1970 年代からの研究により、機能類似の酵素グループの存在が示され、テルペノイド経路の初期段階を触媒するテルペン生合成酵素として認知された。テルペン生合成遺伝子のクローニングは、テルペノイド生合成と機能の研究にとって現在ますます重要な役割を果たしてきている。テルペン生合成遺伝子は現在、放線菌や真菌、植物を材料としてクローニングされ、酵素の構造や進化に対して知見が得られている。さらにテルペン生合成遺伝子の異種発現は、構造-機能相関の研究のための部位特異的突然変異株などの分子生物学的手段を使用するための大量の酵素を得ることを可能にした。



Scheme 1-1. イソプレノイド代謝経路

1-1-3. テルペン環化酵素について

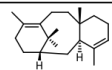
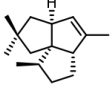
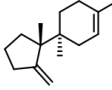
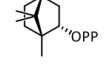
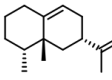
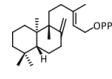
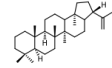
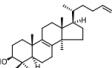
環状テルペン化合物は分子内に複数のキラルセンターを有する場合が多い。そのためテルペン環化酵素の反応は非常に複雑であるが、テルペン環化酵素はこれを厳密に制御し、特定の化合物を生成する。この非常に複雑なテルペンの環化反応を達成するために重要なステップとして次の4つが挙げられる。(1) 基質を正確に折りたたむ、(2) 反応開始、(3) 中間体カチオンの安定化、(4) 反応集結。

特に(2) 反応開始について、その様式によってテルペン環化酵素が主に下の2つに分類できることがわかってきた (Table 1-1)。¹⁻⁴

- ・クラス I 環化酵素：ニリン酸脱離により反応開始し、反応は Mg^{2+} に依存する
- ・クラス II 環化酵素：末端二重結合またはエポキシ環へのプロトン付加により反応開始

これらの酵素には反応開始のために重要な異なるモチーフがそれぞれ保存されていることもわかってきた。クラス I 環化酵素においては、ニリン酸を酵素がトラップするための DDxxD モチーフや NSE (DTE) モチーフ、クラス II 環化酵素においては反応開始のプロトン付加を担う DxDD (DCTAE) モチーフがそれぞれ相当する。クラス I 環化酵素としては、セスキテルペン環化酵素のアリストロチエン合成酵素⁵、ペンタレネン合成酵素⁶ やジテルペン環化酵素のフシコッカジエン合成酵素⁷、タキサジエン合成酵素⁸ などがある。クラス II 環化酵素としては、ジテルペン環化酵素の *ent*-コパリルニリン酸合成酵素⁹ やトリテルペン環化酵素 (スクアレナーホペン環化酵素 ; SHC^{1,10}、オキシドスクアレニン環化酵素 ; OSC¹¹) などがある。そして、クラス I と II 環化酵素活性を共有する 2 機能性の環化酵素の存在も明らかとなっており、アビエタジエン合成酵素¹² や *ent*-カウレン合成酵素¹³ がそれに当たる。また、これらの環化酵素の X 線結晶構造解析が明らかにされてきており、クラスごとに 3 次構造が構造的に保存されていることがわかってきた⁸。それらの 3 次構造は α ~ γ ドメインと名付けられており、クラス I 環化酵素では α ドメインが、クラス II 環化酵素では β 、 γ の 2 つのドメインが保存されている。それぞれの環化酵素の活性部位は、クラス I 環化酵素では α ドメインに、クラス II 環化酵素では β と γ ドメインの境界に位置していることも X 線結晶構造解析から明らかになっている⁸。また、タキサジエン合成酵素 (クラス I 環化酵素) や *ent*-コパリルニリン酸合成酵素 (クラス II 環化酵素) は単機能性環化酵素であるが、その X 線結晶構造解析から 3 次構造ではいずれも α ~ γ ドメインを有していることが明らかにされた^{8,9}。このことは、テルペン環化酵素がもともとクラス I、II の 2 機能性環化酵素活性を有する酵素に一部突然変異や構造的欠損が起こることで進化的に派生してきたと考えられる。クラス I と II 環化酵素の分類を Table 1-1 に示した。

Table 1-1. クラス I およびクラス II 環化酵素の分類⁸

Class	Enzyme	Number of carbons	Containing domain	Active domain	Motif	Metal ion dependency	Structure of product
I	Taxadiene synthase	C ₂₀	αβγ	α			
I	Pentalenene synthase	C ₁₅	α	α			
I	Trichodiene synthase	C ₁₅	α	α	DDXXD (N,D)DXX(S,T)XXXE	dependent	
I	Bornyl-PP synthase	C ₁₀	αβ	α			
I	5- <i>epi</i> -aristolochene synthase	C ₁₅	αβ	α			
II	ent-Copalyl-PP synthase	C ₂₀	αβγ	βγ	DXDD	requirement	
II	SHC	C ₃₀	βγ	βγ	DXDD	independent	
II	OSC	C ₃₀	βγ	βγ	DCTAE	independent	

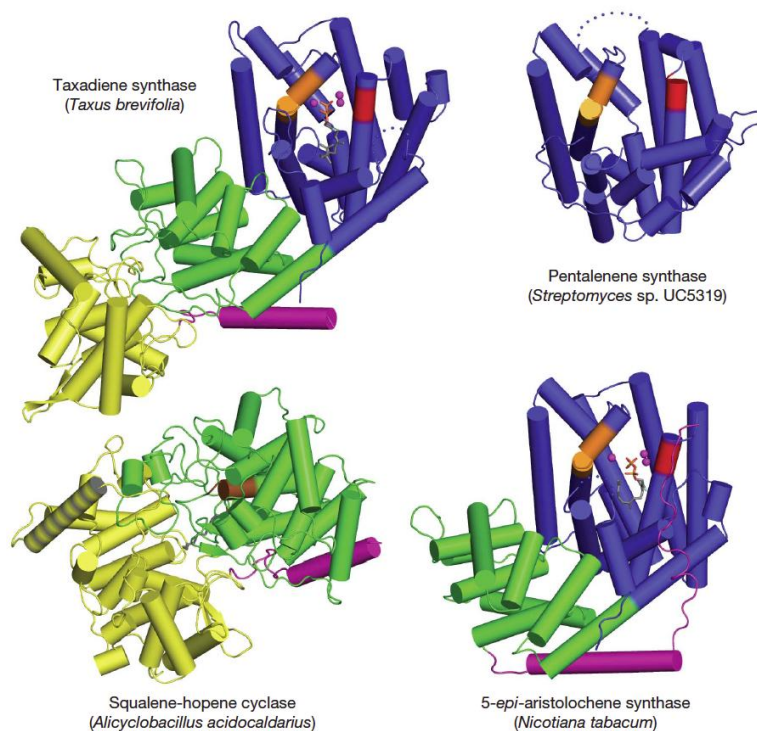


Figure 1-3. テルペン環化酵素間の構造的相関⁸

(M. Kksal et al., *Nature*, **2007**, *469*, 116-120.より引用)

青色領域 : αドメイン、緑色領域 : βドメイン、黄色領域 : γドメイン

1-2. トリテルペン環化酵素について

スクアレンを基質として環化するものは、主にバクテリア（ホペン、ホパノール）や原生動物（テトラヒマノール）などの下等生物に限られる。特に当研究室において、バクテリアのスクアレンをホペン、ホパノールへと環化するスクアレン-ホペン環化酵素（SHC）は、部位特異的変異酵素を用いた分子生物学的手法、基質アナログと反応させることによる有機化学的手法などにより、触媒機構の解明が進められてきた。

一方、動物、真菌、植物などの高等生物では、スクアレンがエポキシ化された(3*S*)-2,3-オキシドスクアレンを基質とする、オキシドスクアレン環化酵素（OSC）がトリテルペン環化酵素として機能している。OSC の機能は生物種ごとに異なり、動物や真菌では膜ステロール（コレステロール、エルゴステロール）前駆物質であるラノステロールに唯一変換され、植物では膜ステロール（ β -シトステロール、スティグマステロールなど）前駆物質であるシクロアルテノールの他に、 β -アミリン、ルペオールなどへと変換される（Figure 1-4）。

トリテルペン環化酵素は膜タンパク質で不安定なため、酵素レベルの研究はなかなか進まなかった。1988 年以降、酵素の可溶化に用いる種々の界面活性剤が開発され、様々な生物種で酵素精製が行われた^{14,15}。時を同じくして、分子生物学の技術の急速な発展に伴い遺伝子クローニングが可能となり、トリテルペン環化酵素においても遺伝子研究が活発に行われた。SHC では、1992 年に Ochs らにより *A. acidocaldarius* 由来の SHC のクローニングが最初の報告であった¹⁶。OSC では Matsuda および海老塚らにより数多くの遺伝子の機能が同定されてきた。特にシロイヌナズナ由来 OSC 遺伝子は 2011 年までにその全ての機能同定が完了された。数多くのトリテルペン環化酵素のクローニングが報告されてきた過程で、トリテルペン環化酵素には相同性があることが明らかになってきた。

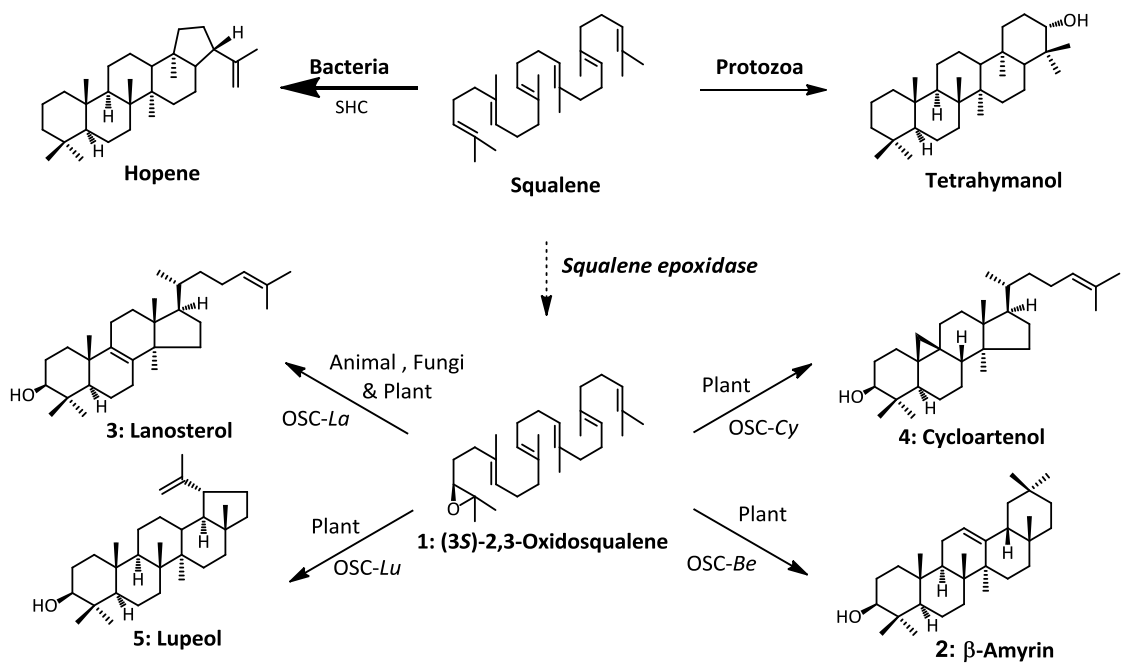


Figure 1-4. 様々な生物種から生産されるトリテルペン

原核生物や原生動物ではスクアレンを基質としてホペンやテトラヒマノールが生合成される。主に動植物や真菌類は基質としてオキシドスクアレンを用い、ラノステロール（動物、真菌、植物）、シクロアルテノール（植物）、β-アミリン（植物）、ルペオールが生合成される。

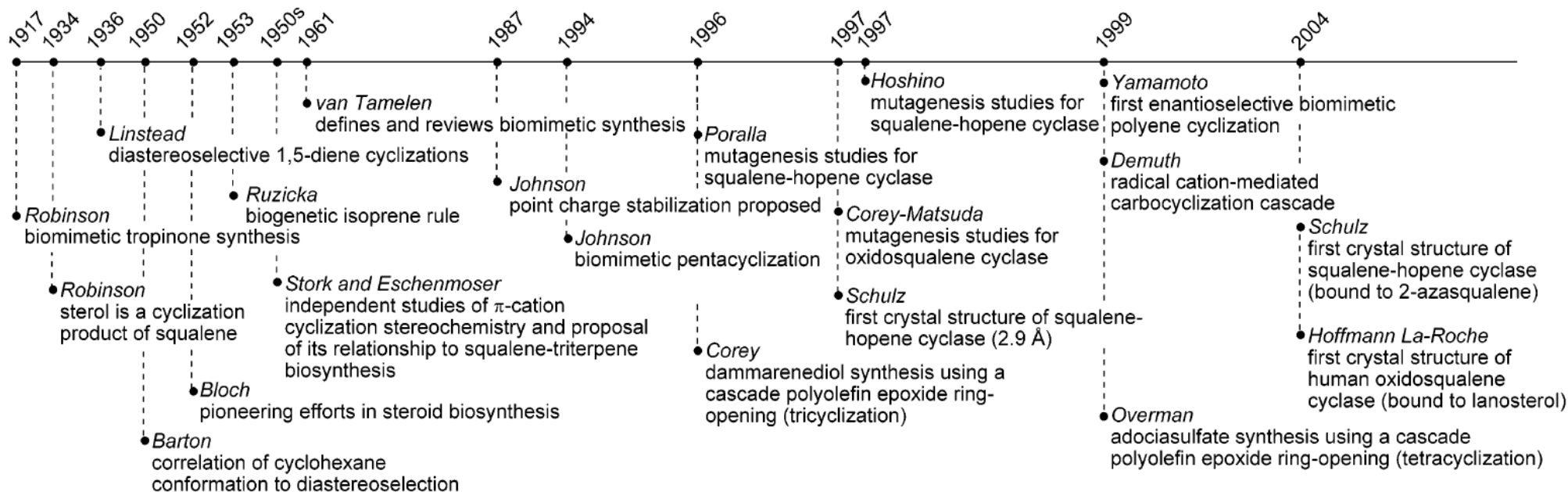


Figure 1-5. テルペン生合成および全合成研究の歴史¹⁷

(R.A. Yoder and J.N. Johnston, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 4730-4756 より引用)

テルペン研究の開始は 1917 年の Robinson まで遡る。研究初期は主に有機合成からテルペン研究が行われ、Barton (1950 年) や Stork、Eschenmoser (1950 年代) や van Tamelen (1961 年) や Corey (1996 年) など著名な科学者も多数研究に参画した。1990 年代後半になると酵素学的手法によりテルペン生合成が研究されてきた。Poralla (1996 年) や当研究室 (1997 年) は部位特異的の変異導入実験から、Schulz (1997 年) は SHC の X 線結晶構造解析から、それぞれ SHC の触媒機構を明らかにしてきた。

1-3. スクアレン-ホペン環化酵素 (SHC)

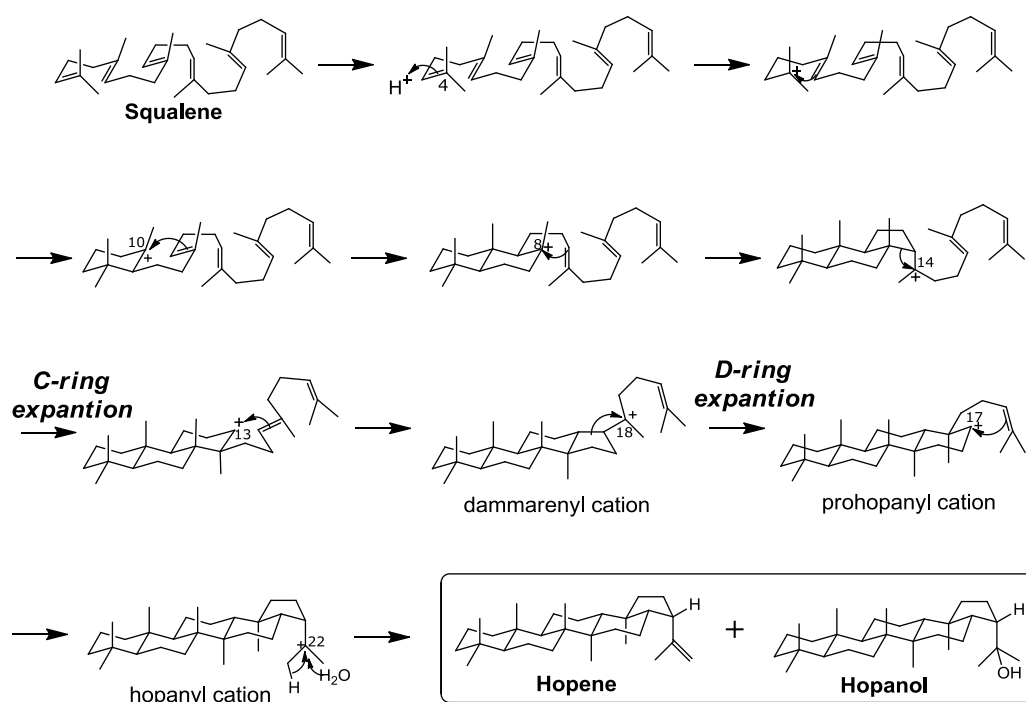
1-3-1. SHC について

【SHC 研究の背景】

OSC は主に真核生物由来であり、原核生物のものとは比べて酵素精製や遺伝子取得が難しかった。一方 SHC は主に細菌由来であり、OSC と類似の反応を触媒する。このため、SHC 研究は OSC に関する酵素情報を得るための有効な手段として考えられ、盛んに研究がなされてきた。SHC 研究の中でも、好熱菌 *A. acidocaldarius* 由来の SHC が数多く取り扱われてきた。それは最適温度が 60°C と常温で安定して存在することから、取り扱いやすさの面で優れていたためであった。このような背景から、*A. acidocaldarius* 由来の SHC はトリテルペン環化酵素の研究において先導的な役割を担ってきた。

【*A. acidocaldarius* 由来 SHC】

SHC はスクアレンを基質としてホペンとホパノールを 5:1 の割合で生成する (Scheme 1-2)。1997 年には Wendt らにより X 線結晶構造が報告された。また、SHC 研究において当研究室の果たしてきた役割は非常に大きく、部位特異的変異酵素および基質アナログの両面からの実験を行うことで、活性部位残基の機能や基質認識など数多くの知見を報告してきた。中でも、テルペン環化酵素の機能として今日では一般的になっているカチオン- π 相互作用はテルペン環化酵素においては当研究室で初めて証明された。カチオン- π については本章 1-3-2 で詳細に述べた。



Scheme 1-2. SHC の反応機構

1-3-2. SHC への部位特異的変異導入実験について

【カチオン- π 相互作用】

1994年、Griffinらは、他の一般的なタンパク質と比較して、トリテルペン環化酵素が芳香族アミノ酸を異常に多く含んでいるという事実に着目し、カルボカチオンの安定化部位に芳香族アミノ酸を想定した¹⁸。SHCの触媒反応においても、酵素キャビティー内を取り巻くように芳香族アミノ酸が存在しており、芳香族アミノ酸の持つ豊富な π 電子がカルボカチオンを安定化するという「カチオン- π 相互作用」が提案された。カチオン- π 相互作用は非共有結合性の二次的親和力を指し、Doughertyらによりイオンチャネルの受容体が神経伝達物質を認識する際に働いていることが証明されている¹⁹。電子密度の高い芳香環ほどカチオンを安定化することから、天然のアミノ酸の中では、Trp>Phe \approx Tyrの順でカチオン安定化効果が高い。

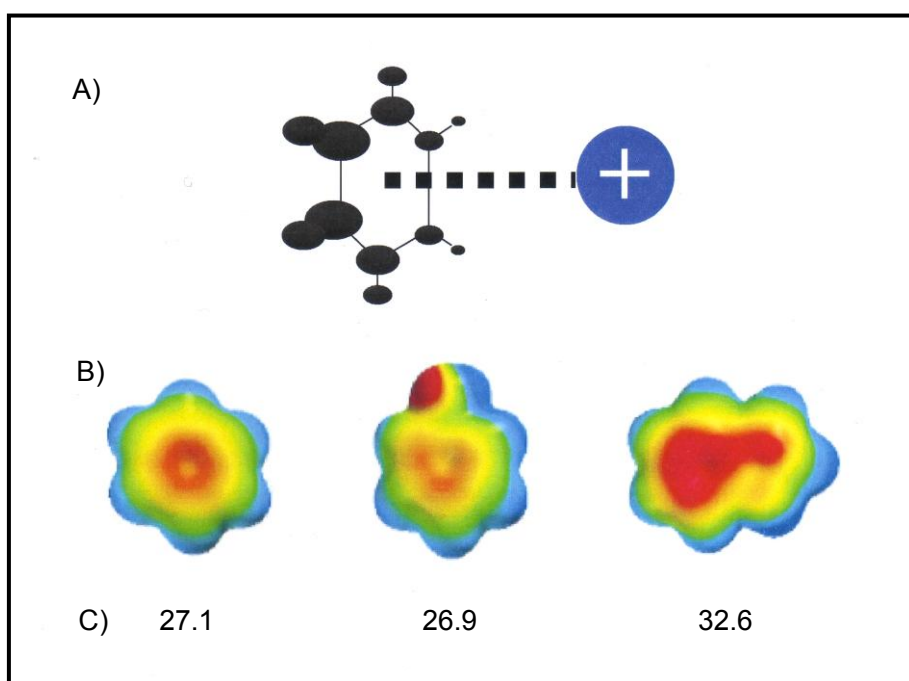


Figure 1-6. カチオン- π 相互作用の概念図⁸⁷

(S. Mecozzi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 10566-10571 より引用)

- A) カチオンと相互作用している一般的な正電荷
- B) Phe, Tyr, Trp の electrostatic potential surfaces
- C) Cation- π binding energy(kcal/mol)

SHCのカチオン- π 相互作用の解明は、芳香族アミノ酸(Phe、Tyr、Trp)を異なる芳香族アミノ酸へ部位特異的に置換した変異酵素を用いて行われてきた。しかし、バルクサイズの大きなアミノ酸への置換は、酵素の立体構造に影響を及ぼすという問題点があり、実際このような変異酵素は K_m 値の異常な増加や至適温度の低下を引き起こしてしまい、明確

な証明には至らなかった。

実験的なカチオン- π 相互作用の証明は、当研究室の森久保によって行われた²⁰。これまでの問題点は、2000年に Shultz らによって報告された非天然型アミノ酸の導入という技術を用いて、Pheの水素をF(フッ素)に置換することで解決された²¹。非天然型アミノ酸は、天然のアミノ酸とサイズをほとんど変えずに、 π 電子密度を変えることができるため、酵素の立体構造に影響を及ぼさない。この技術により完全なカチオン- π 相互作用が確立された (Figure 1-7)。

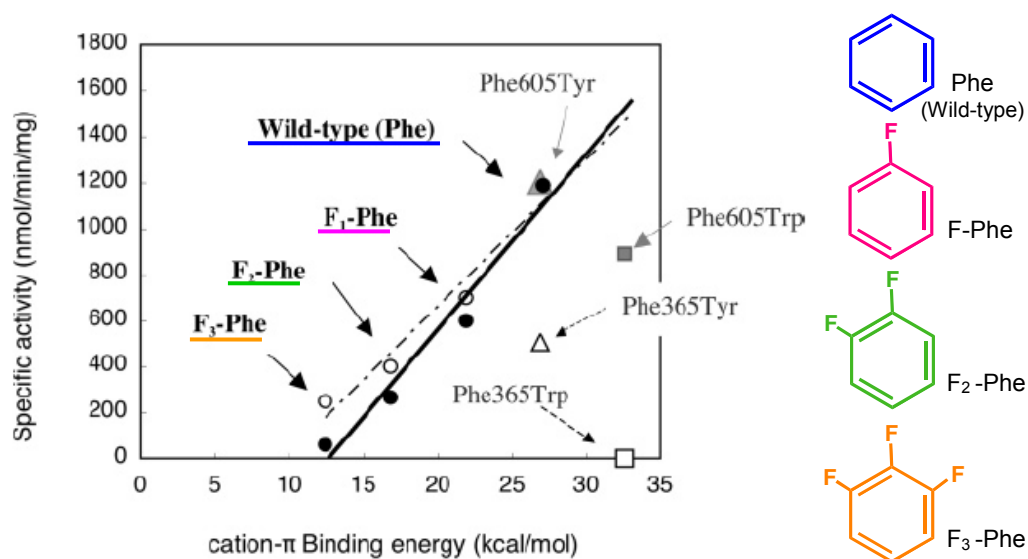


Figure 1-7. 非天然型アミノ酸導入変異酵素の Fluorination plot⁵⁵

(N. Morikubo, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13184-13194 より引用)

横軸にカチオン- π Binding energy、縦軸に specific activity をとったプロット。カチオン- π Binding energy の減少に伴い、specific activity も直線的に減少していることが分かる。これにより、specific activity と芳香環 π 電子密度が関連していることが分かる。

以上のようなカチオン- π 相互作用の証明の他にも当研究室ではこれまでに SHC の部位特異的変異導入実験を数多く行ってきた。Table 1-2 には SHC の活性部位残基で変異導入例のある残基とその機能を示した。そして Figure 1-8 のように SHC 活性部位で環化開始、カルボカチオンの安定化、基質の立体化学制御、基質結合に関わる残基などの模式図が報告された。²²

Table 1-2. SHC の活性部位残基で部位特異的変異導入例のある残基とその機能

amino acid position	SHC
R127 ³⁹	反応終結に関与
F129 ⁴¹	基質の入り口のチャンネルに存在し、直接環化には関与しない
W169 ^{42,43}	基質結合に関与
I261 ³⁹	立体化学制御
Q262 ³⁹	反応終結に関与
P263 ³⁹	反応終結に関与
A306 ⁷³	立体化学制御
W312 ⁵⁴	基質結合に関与
F365 ^{43,55}	2 環性カチオンの安定化 (カチオン- π 相互作用)
D374 ⁵⁷	環化開始のプロトン付加を担う D376 の酸性度を高める (DxDD モチーフ)
D376 ^{57,59,61}	環化開始のプロトン付加 (DxD $\color{red}{D}$ モチーフ)
D377 ^{57,59,62}	単環性カチオンの安定化 (DxD $\color{red}{D}$ モチーフ)
Y420 ^{64,65}	Carbocation stabilization and/or substrate binding
F434 ³⁹	チャンネルの一部を構成
C435 ³⁹	チャンネルの一部を構成
F437 ³⁹	チャンネルの一部を構成、反応集結に関与
D447 ⁵⁷	環化開始に関与
W489 ⁴²	Carbocation stabilization and/or substrate binding
Y495 ^{41,65,67}	環化開始に間接的に関与
F601 ^{43,68}	3 環性および 4 環性カチオンの安定化 (カチオン- π 相互作用)
F605 ⁵⁵	4 環性および 5 環性カチオンの安定化 (カチオン- π 相互作用)
Y609 ^{41,65,67}	中間体カチオン安定化に間接的に関与
Y612 ^{41,65,67}	中間体カチオン安定化に間接的に関与

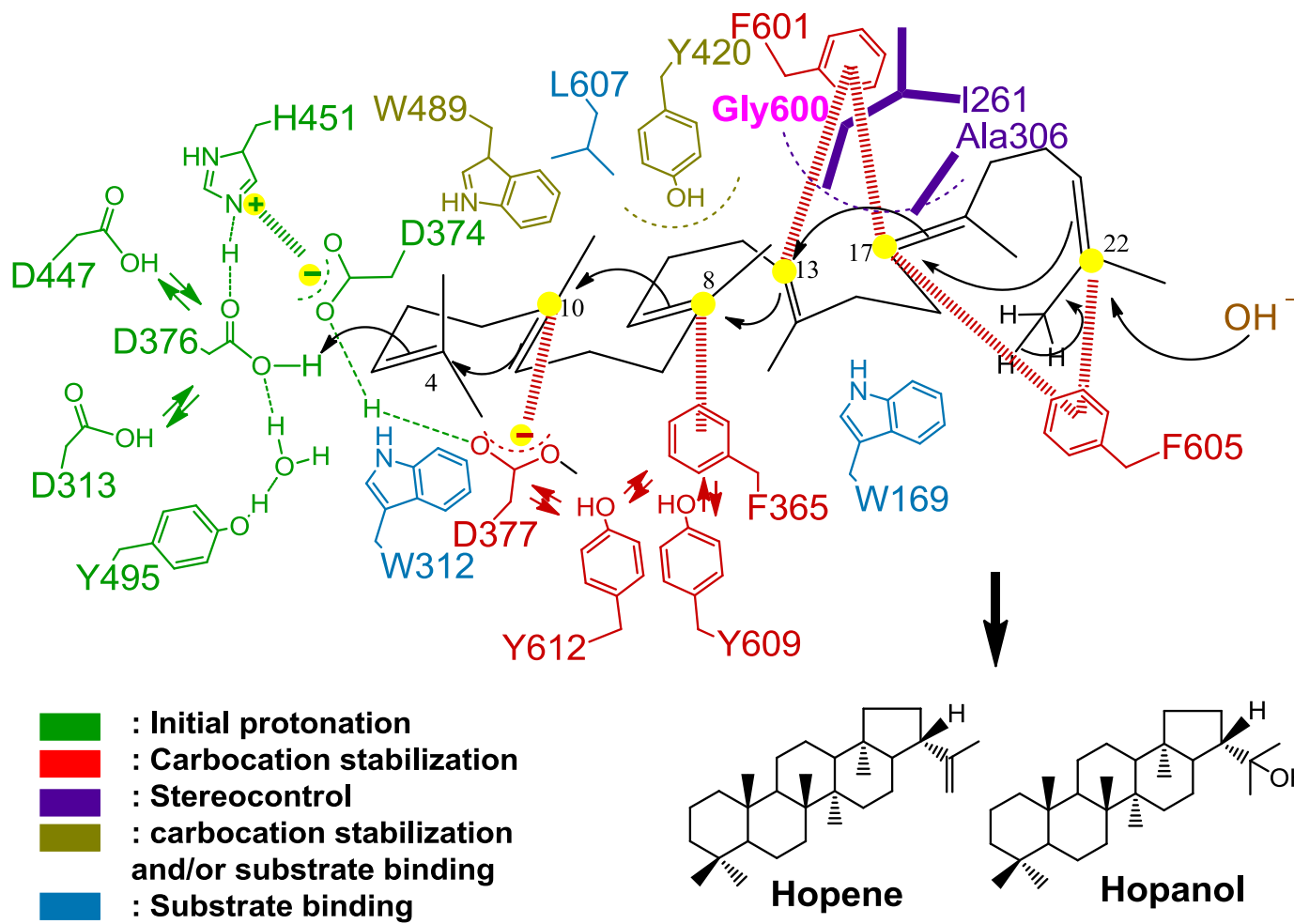


Figure 1-8. SHC 活性部位残基の機能²²

(T. Hoshino and T. Sato, *Chem. Commun.*, **2002**, 291-301 より引用)

1-4. オキシドスクアレン環化酵素 (OSC)

1-4-1. OSC 研究の背景

OSC は(3S)-2,3-oxidosqualene (OXSQ) を複数の不斉中心をもつ複雑なステロイドやトリテルペンの基本骨格を一挙に構築することで、多様な産物へと変換する。動物においては生命活動に必須（一次代謝系）なコレステロール生合成に関与している。コレステロールのおおまかな生合成経路は、アセチル-CoA→HMG-CoA→メバロン酸→IPP、DMAPP→GPP→FPP→スクアレン→オキシドスクアレン→ラノステロール→コレステロールのようになっている (Figure 1-9)。OSC はオキシドスクアレンからラノステロールへの変換を担っている。現在の高コレステロール血症治療薬に使用されているスタチン系薬剤は、ラノステロール合成酵素よりも上流のステップである HMG-CoA 還元酵素 (HMGR) を阻害する。そのため、ステロール以外の生体維持に必須な FPP から生じるユビキノンなどの一次代謝産物の生成も阻害してしまい、重篤な副作用も報告されている。一方、ラノステロール合成酵素はステロール生合成に特異的なステップであるため、阻害してもユビキノンなどの非ステロール性一次代謝産物の生成を妨げない。このような背景から、スタチンに代わるより副作用の少ない薬剤の創薬を目的として OSC 研究が盛んに行なわれてきた。

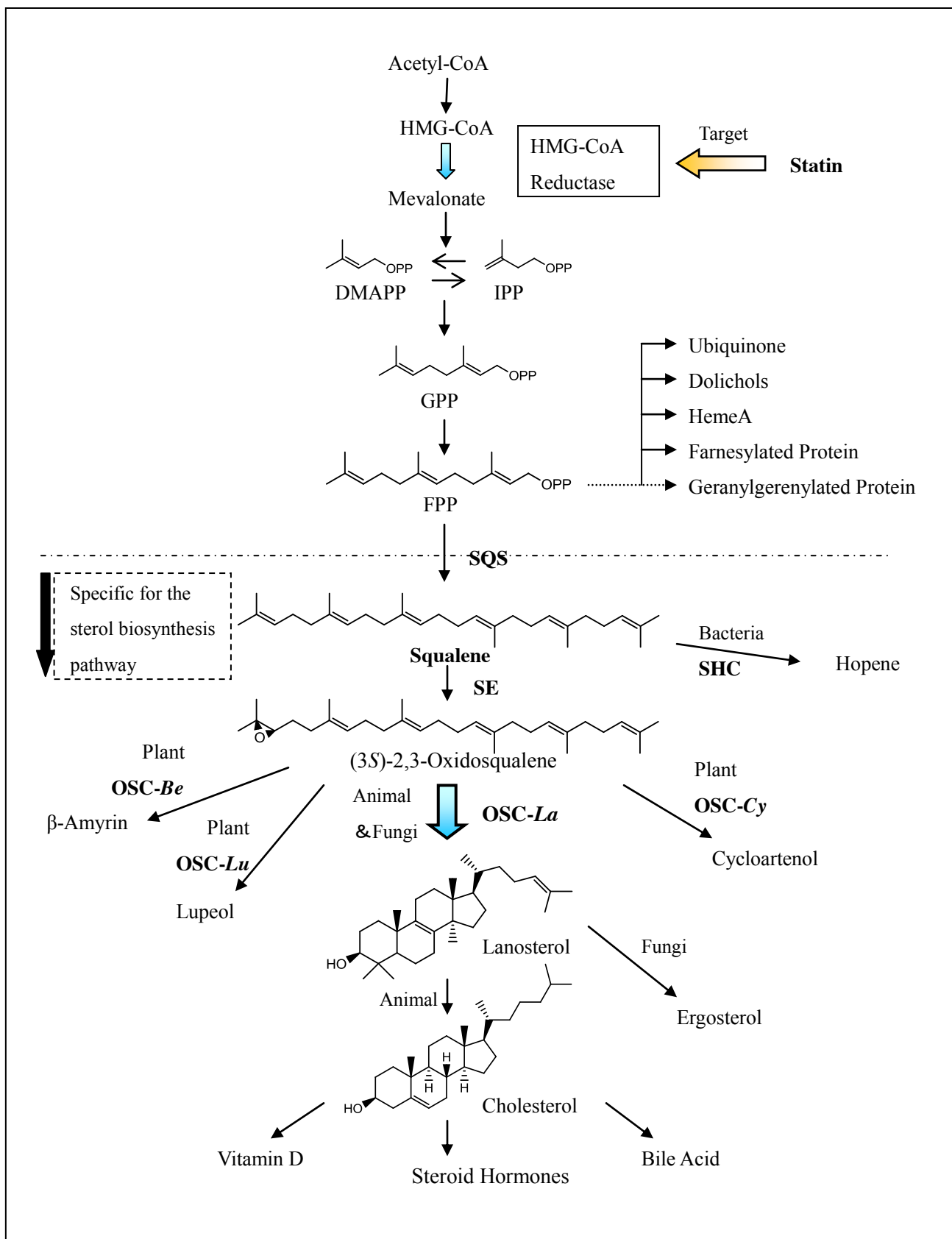


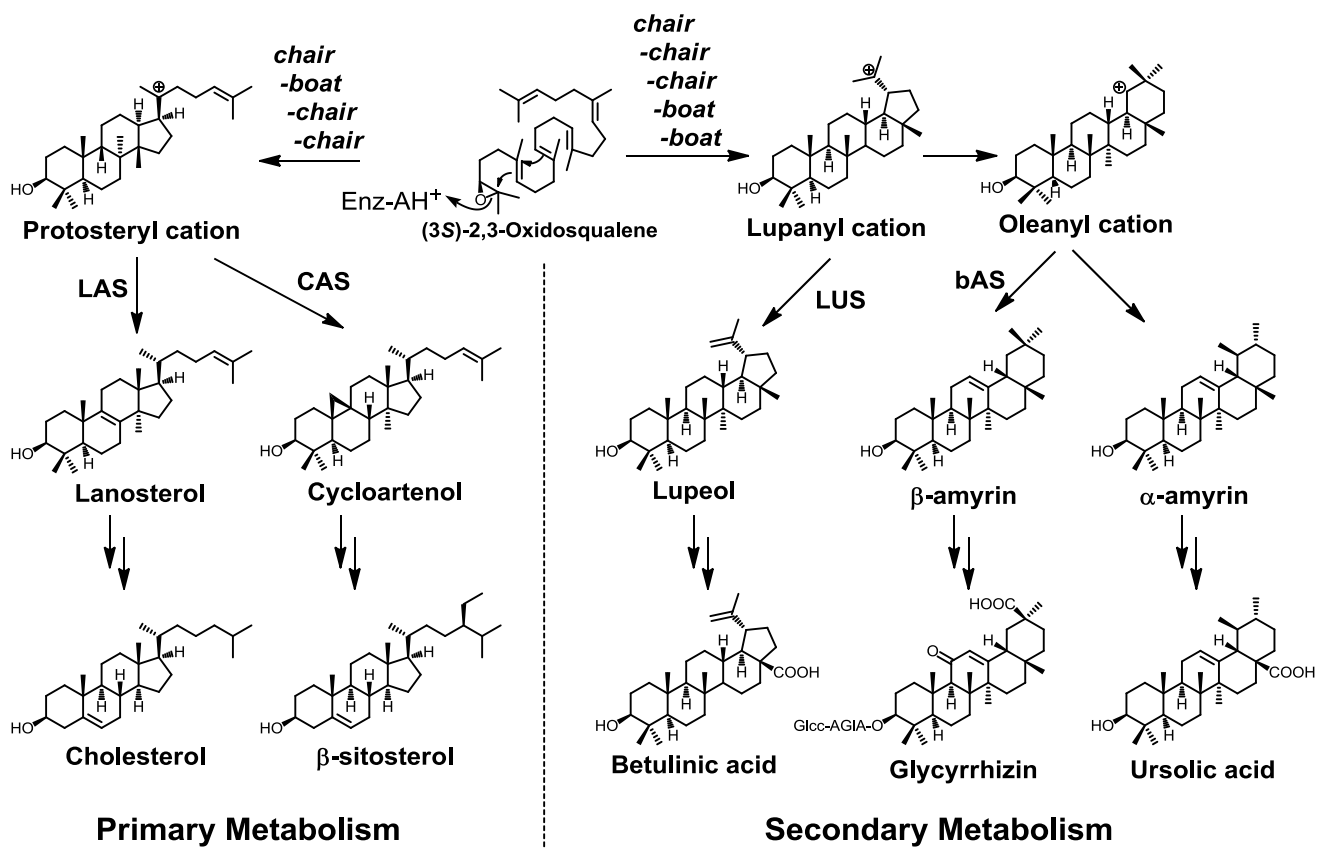
Figure 1-9. ステロール生成経路の概略

1-4-2. OSC の機能解析について

OSC は非常に複雑な反応を厳密に制御することで特定のトリテルペンを生産するため、古くから著名な科学者を惹きつけ、研究が進められてきた。また、バクテリアなどの下等生物から高等動物や植物に至るまで、生物界に広く分布し、しかも生物の進化の度合いに応じて、その環化様式に大きな違いがあることも知られている。

Scheme 1-3 には OSC 産物とその代謝産物の生合成経路を示した。一次代謝産物であるコレステロールや β -シトステロールは OSC 産物であるラノステロールやシクロアルテノールを経由してそれぞれ生合成される。二次代謝産物であるベツリン酸、グリチルリチン、ウルソル酸は OSC 産物であるルペオール、 β -アミリン、 α -アミリンを経由してそれぞれ生合成される。OSC は動植物ステロイド前駆体（一次代謝系）と生薬の有効成分であるサポニン等の前駆体（二次代謝系）を分岐する重要な酵素である。特に動物の一次代謝系 OSC はコレステロールの生合成に関わるため、創薬や触媒機構の解明を目的とした研究などが盛んに行われてきた。二次代謝系産物の植物トリテルペンやサポニンには薬理活性を有する人体にとっても有用な化合物が多いにもかかわらず、その生合成機構及び生理的役割の解明はあまり進んでいない。

これまでのトリテルペン研究は植物体そのものからトリテルペンを抽出する *in situ* 成分分析や、ラノステロール合成酵素遺伝子をノックアウトさせた *S. cerevisiae* を宿主とした *in vivo* での成分分析が主であった。特にシロイヌナズナの OSC の機能解析は盛んに行われてきた。シロイヌナズナには 13 個の OSC 遺伝子が存在し、2009 年までにその全ての機能が同定された。これは東京大 海老塚らや米国ライス大 Matsuda らなどによる功績が大きい。²³ また、ラノステロール合成酵素およびシクロアルテノール合成酵素への部位特異的変異導入実験、更には基質アナログ・阻害剤実験など盛んに行われてきた。2004 年にはヒト由来ラノステロール合成酵素の X 線結晶構造が報告され (Figure 1-9、1-10)^{11,24}、触媒機構が明らかになってきた。しかしながら、OSC は膜タンパクであり、活性のある精製酵素を得ることが困難であったため、*in vitro* での速度論解析例が非常に少なく、報告されたものも非常に活性の低いものだった。また、変異株の酵素活性はこれまで見積もられた例がないため、カチオン- π 相互作用などの機能の厳密な証明には至っていなかった。



Scheme 1-3. OSCによる一次代謝系と二次代謝系の分岐

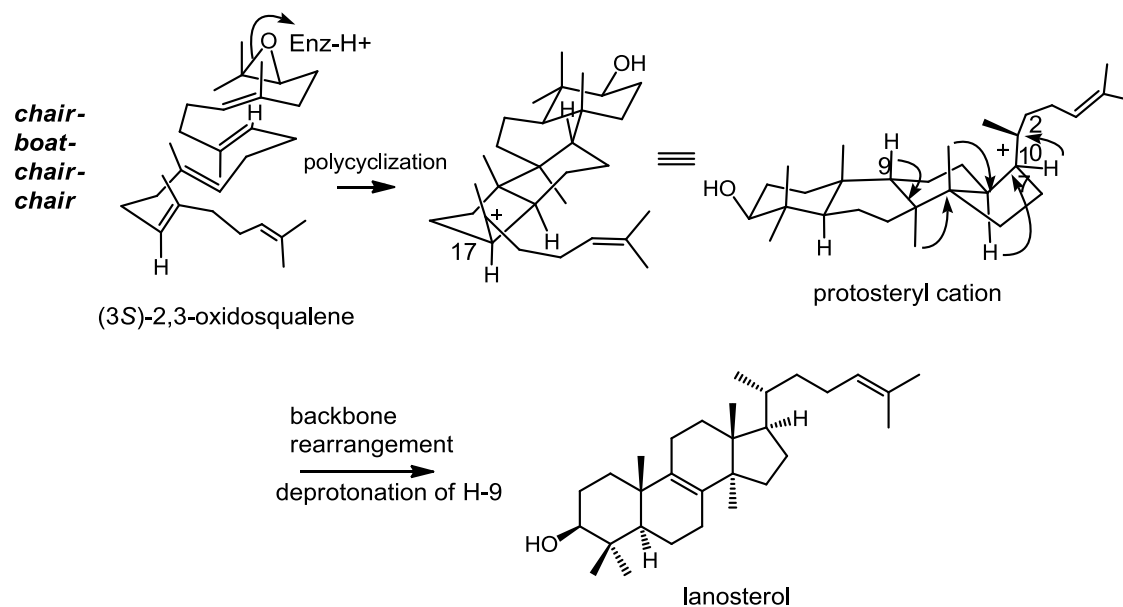
LAS：ラノステロール合成酵素、CAS：シクロアルテノール合成酵素、LUS：ルペオール合成酵素、bAS：β-アミリン合成酵素。一次代謝系では、OSCはラノステロールやシクロアルテノールの生合成に関与し、それらは生体内で膜ステロールであるコレステロールやβ-シトステロールにそれぞれ代謝される。二次代謝系では、OSCはルペオール、β-アミリン、α-アミリンの生合成に関与し、それらは生体内で様々な修飾を受けることでベツリン酸、グリチルリチン、ウルソル酸にそれぞれ代謝される。

1-4-3. ラノステロール合成酵素

【反応機構】

ラノステロール合成酵素によって生じるラノステロールは、ヒトや酵母で膜ステロールとして働くコレステロールの前駆物質である。ラノステロール合成酵素は基質である(3*S*)-2,3-オキシドスクアレン (OXSQ) を、*chair-boat-chair-chair* 型のコンフォメーションで取り込み、末端エポキシ環へのプロトン付加によって反応が開始する。そして、Markownikoff 則に従った一連の環化反応および環拡張を経てプロトステリルカチオンを生じる。そこから、分子内転移反応 (Wagner-Meerwein shift) を経て、9 位の炭素からプロトンが脱離することで反応が終結し、ラノステロールが生じる (Scheme 1-4)。

プロトステリルカチオンを経由する OXSQ 環化産物としては、ラノステロールの他にシクロアルテノールやパルケオールやキュキュビタジエノールなどがある。



Scheme 1-4. オキシドスクアレンからラノステロールへの環化機構

【ヒト ラノステロール合成酵素 (HsLAS) の結晶構造^{11,24)}】

HsLAS の結晶構造は 2004 年に Roche のグループによって明らかにされた。Figure 1-10 と Figure 1-11 がそれである。

OSC の N 末端は他の環化酵素では欠落しており、その空間は 2 つのバレルドメインの間に挟まれ、ドメインの相対的配向の安定化に機能していると考えられている。

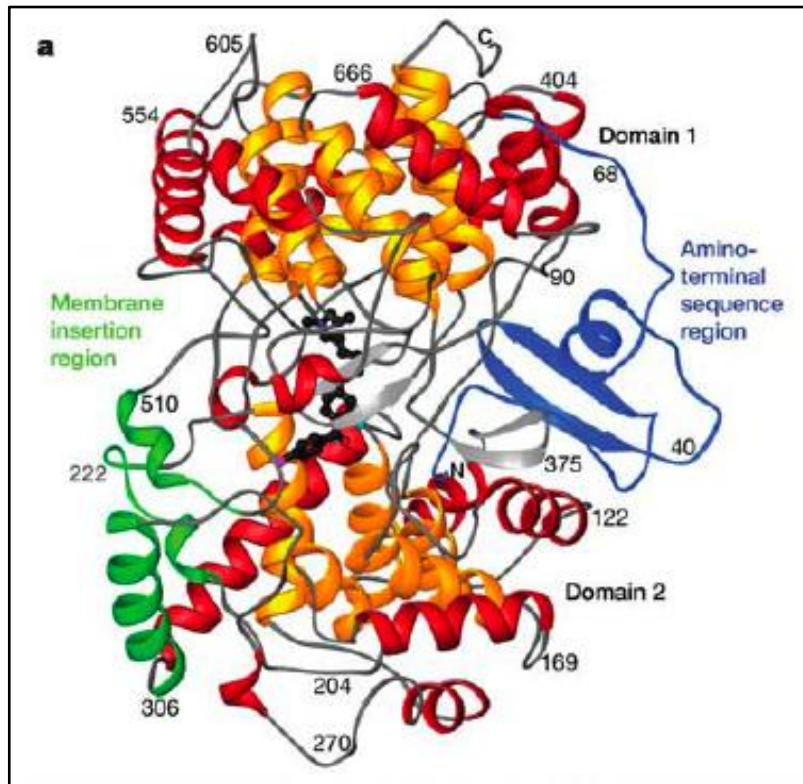


Figure 1-10. HsLAS の X 線結晶構造¹¹⁾

(R. Thoma *et al.*, *Nature*, 2004, 432, 118-122 より引用)

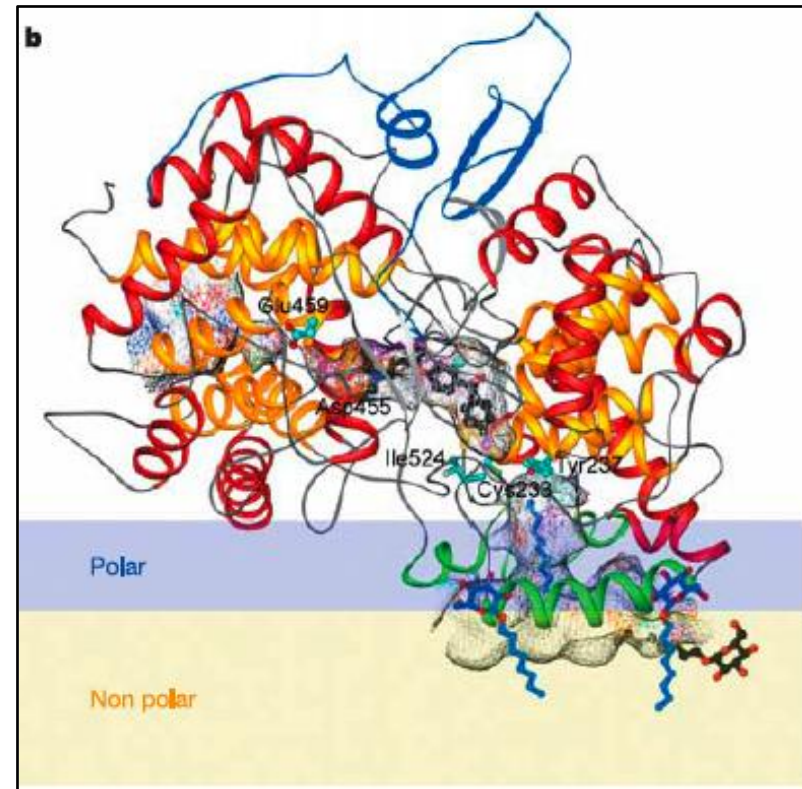


Figure 1-11. HsLAS の膜結合様式¹¹⁾

(R. Thoma *et al.*, *Nature*, 2004, 432, 118-122 より引用)

【ラノステロール合成酵素への変異導入例】

HsLAS の結晶構造を基に、*Saccharomyces cerevisiae* 由来ラノステロール合成酵素 (ScLAS) において、現在までに、16 か所のアミノ酸残基の変異導入実験例が報告されている。変異酵素の中には、本来の酵素産物であるラノステロール以外のプロダクトを産生するものが多く、それらのプロダクトの構造から、変異箇所の触媒における役割が特徴づけられた (Table 1-3)。

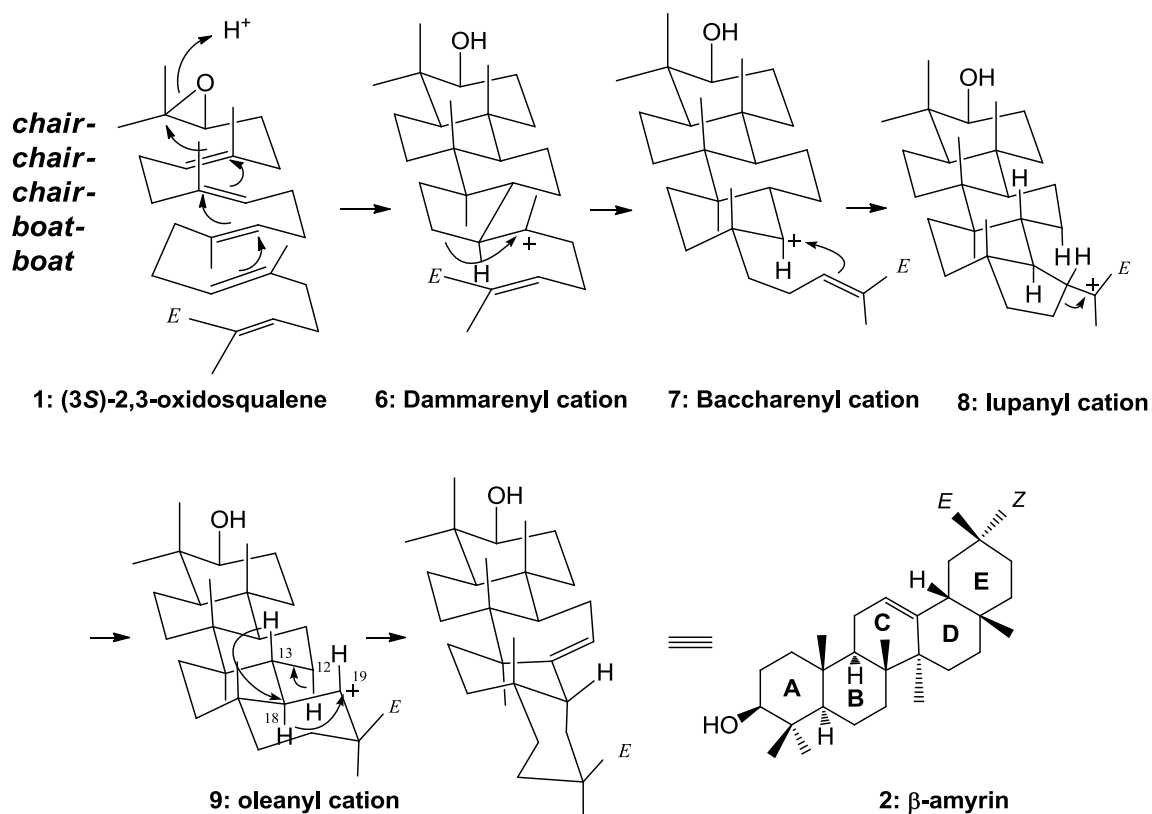
Table 1-3. 酵母ラノステロール合成酵素で変異導入されてきた残基とその機能

amino acid position	残基の機能
Y99 ^{11,38}	3 環性 C14 カチオンの安定化 ³⁸ B 環をボート型にするのに関与すると予想された ¹¹
W194 ⁴⁰	活性に変化なし (W194F)
W232 ⁴⁴	転移プロセス、脱プロトンに関与
H234 ^{45,46}	単環性および 3 環性カチオンの安定化、脱プロトン制御
T384 ⁴⁸⁻⁵³	ラノステロール、シクロアルテノールの作り分けに関与
F445 ⁵⁶	3 環性カチオンおよびラノステリルカチオンの安定化
V454 ^{48,58}	ラノステロール、シクロアルテノールの 作り分けに関与
D456 ⁴⁶	酵母の生存検定によりラノステロール生合成に必須な残基 であることがわかった。
C457 ⁶³	70%程度の活性に低下
Y510 ^{50-53,66}	単環性およびラノステリルカチオンの安定化、 脱プロトンの位置の制御
C540 ⁴⁶	酵母の生存検定ではその生存が確認された
W587 ⁴⁰	活性に変化なし (W194F)
F699 ^{69,70}	基質のコンフォメーションの制御、 プロトステリルカチオンの安定化、 側鎖の立体化学の制御
C703 ⁷⁴	F699 との相互作用を介して中間体カチオンの安定化やコン フォメーション、側鎖の立体化学の制御に間接的に関与
I705 ⁷⁰	3 環性カチオンおよびプロトステリルカチオンの安定化、 側鎖の立体化学制御
Y707 ⁷²	2 環性カチオンおよびラノステリルカチオンの安定化、 B 環の折りたたみに関与

1-4-4. β-アミリン合成酵素

【反応機構】

まず、β-アミリン合成酵素は、OXSQ **1** を *chair-chair-chair-boat-boat* 型のコンフォメーションで取り込む。反応開始は、末端エポキシ環へのプロトン付加により反応が開始し、引き続く一連の環化反応によりダンマレニルカチオン **6** を形成する。ダンマレニルカチオン **6** は環拡張してカチオン **7** を経由して更に閉環しルパニルカチオン **8** を生じる。カチオン **8** は更に環拡張し、オレアニルカチオン **9** となり、2回のヒドライドシフトを経て、12位から脱プロトンすることでβ-アミリン **2** が形成される (Scheme 1-5)。



Scheme 1-5. オキシドスクアレン **1** から β-アミリン **2** への環化機構

【β-アミリンについて】

植物において β-アミリンは最もよく知られているトリテルペンである。β-アミリンやその誘導体は植物体内において病原菌や虫などからの防衛手段として利用されているほか、根の伸長に関与しているという報告もある²⁵。β-アミリンは植物体内で生成されるとその後、修飾と糖の付加を受け、グリチルリチンやソヤサポニンという物質になる。グリチルリチンは漢方薬や人工甘味料として多くの人の生活に役立っている天然物のひとつである。特に人工甘味料として大変注目されており、その甘さは通常の砂糖の 150~300 倍である。それにも関わらず、ほとんどカロリーがなく近年メタボリック対策として世界的に需要が高くなっている。しかしながら、現在グリチルリチンは甘草（カンゾウ）という植物から抽出するしか供給源がなく、安定的な供給は期待できない。さらに、カンゾウは産地が限られており、且つ近年の需要に応えるための乱獲により絶滅も危惧されている。安定的なグリチルリチンの供給を確保し、さらにカンゾウを絶滅の危機から救うためにも、グリチルリチンの工業的生産手法の開発が期待されている。そのために、β-アミリン合成酵素を含むグリチルリチン生合成機構の解明が進展している。

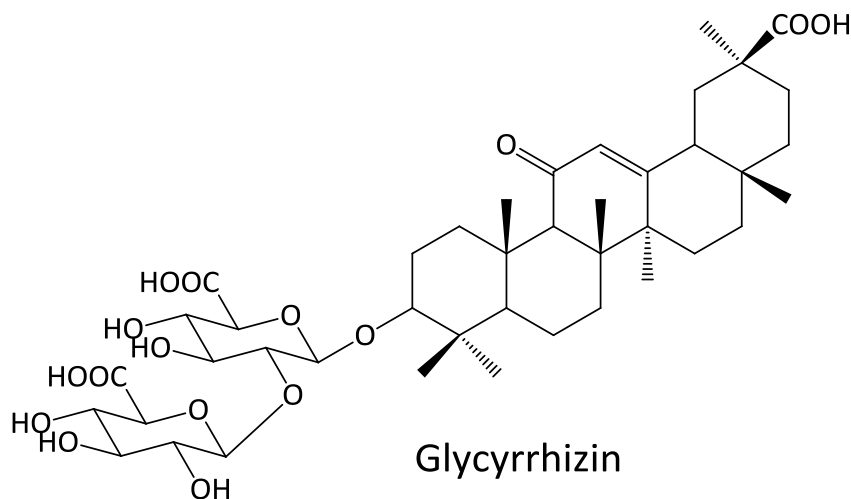


Figure 1-12. グリチルリチンの構造

グリチルリチンはβ-アミリンが酸化され、糖が修飾することで生合成されるサポニンの一種である。

【β-アミリン合成酵素への変異導入例】

β-アミリン合成酵素への部位特異的変異導入例は東京大学 海老塚らにより報告されたチョウセンニンジン由来 β-アミリン合成酵素 (PNY) の W259 残基と Y261 残基の 2 箇所のみである³⁴。

<i>S. cerevisiae</i> ERG7	223	SLPMHPGRWVHTRGVYIPVSYLSLVKIFSC	252
<i>P. ginseng</i> PNY	250	FLPMHPAKMWCYCRMVYMPMSYLYGKRFVG	279
<i>P. ginseng</i> PNY2	248	FLPMHPAKMWCYCRMVYMPMSYLYGKRFVG	277
<i>P. sativum</i> PSY	248	FLPMHPAKMWCYCRVLVYMPMSYLYGKRFVG	277
<i>G. glabra</i> GbAS1	248	FLPMHPAKMWCYCRVLVYMPMSYLYGKRFVG	277
<i>O. europaea</i> OEW	247	FSPIHPGKMLCYCRVLVYMPMSYLYGKRFVG	276
<i>T. officinale</i> TRW	249	FFPIHPGKMLCYCRVLVYMPMSYLYGKRFVG	278
<i>A. thaliana</i> LUP1	246	FLPIHPGKILCYSRMVSI PMSYLYGKRFVG	275

Figure 1-13. PNY W259 残基と Y261 残基付近のマルチプルアライメント³⁴

(T. Kushiro et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6816-6824.より引用)

S. cerevisiae ERG7 : 酵母由来ラノステロール合成酵素

P. ginseng PNY : チョウセンニンジン由来 β-アミリン合成酵素 1

P. ginseng PNY2 : チョウセンニンジン由来 β-アミリン合成酵素 2

P. sativum PNY : エンドウ由来 β-アミリン合成酵素

G. glabra GbAS1 : スペインカンゾウ由来 β-アミリン合成酵素 1

O. europaea OEW : オリーブ由来ルペオール合成酵素

T. officinale TRW : セイヨウタンポポ由来ルペオール合成酵素

A. thaliana LUP1 : シロイヌナズナ由来 LUP1 (マルチファンクショナル OSC)

PNY Y261H 変異株から 84%見出された **12**、**13**、**14** はダンマレニルカチオンから直接プロトンが引きぬかれたプロダクトである。これは His のイミダゾール環が塩基として働いたことによるものと考察された。このため、PNY Y261 残基は D 環の近傍でカチオン- π 相互作用によりルパニルカチオンの安定化に関与していることが指摘された (Figure 1-15)。

PNY W259 残基は β-アミリン合成酵素では Trp が、ルペオール合成酵素では Leu が保存される部位である。そこで、PNY (β-アミリン合成酵素) をルペオール合成酵素様の W259L に、OEW (ルペオール合成酵素) を β-アミリン合成酵素様の L256W に置換された。この結果、PNY W259L はルペオールを多く生産し、OEW L256W は β-アミリンを多く生産するようになった。ルペオールはルパニルカチオンから直接脱プロトンして形成されるのに対し、β-アミリンはルパニルカチオンが更に環拡張したオレアニルカチオンを経て形成される。オレアニルカチオンは 2 級カチオンであるため、その付近に何らかのカチオンを安定化させるための残基が存在すると考えられる。Trp は Leu より側鎖 (インドール) の π 電子密度が高いため、カチオン- π 相互作用により中間体カチオンを

安定化する能力が高い。そのため、PNY W259 残基がオレアニルカチオンを安定化し、 β -アミリンの形成に貢献していると考えられた (Figure 1-15)。

Table 1-4. PNY W259L、Y261H、OEW L256W 変異株のプロダクト生成比率³⁴

	β -amyrin	lupeol	10	11	12/13/14
PNY W259L	30.3	54.6	3.6	3.4	
PNY Y261H		2.4		13.6	84.0
OEW L256W	74.8	6.9	9.9	8.4	

PNY : *P. ginseng* (チョウセンニンジン) 由来 β -アミリン合成酵素、OEW : *O. europaea* (オリーブ) 由来ルペオール合成酵素

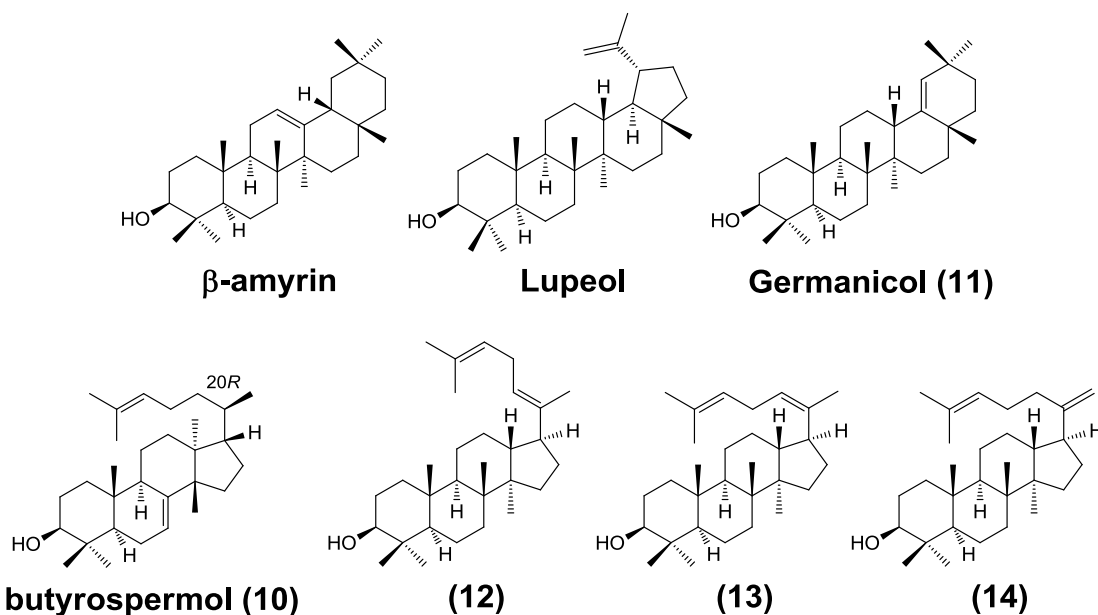


Figure 1-14. β -アミリン、ルペオール、プロダクト 10~12 の構造³⁴

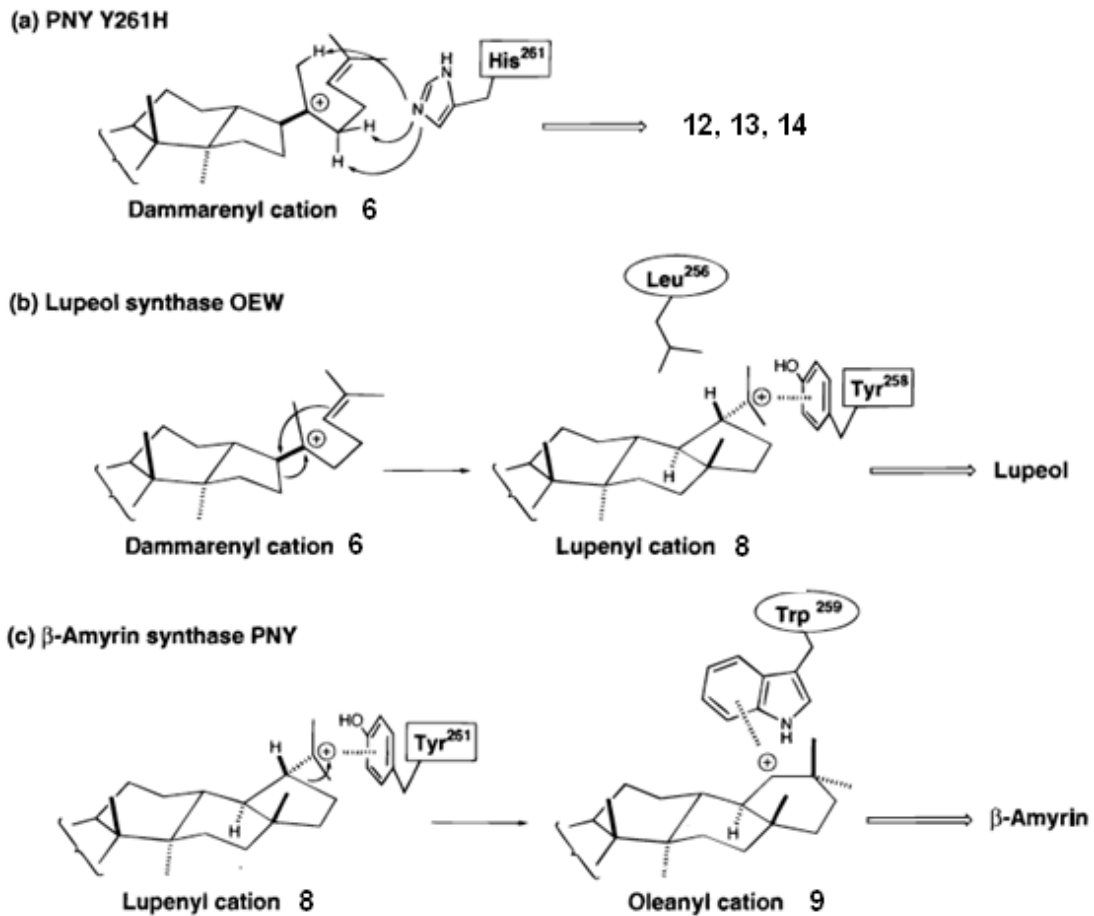


Figure 1-15. PNY Y261 残基と W259 残基の機能³⁴

(T. Kushiro et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 6816-6824.より引用)

(a) PNY Y261はD/E環の近傍に存在するため、Hisに置換することで塩基として機能し、ダンマレニルカチオンから直接プロトンが引きぬかれたプロダクト7~9が生産されたと報告された。

(b) ルペオール合成酵素 OEWはダンマレニルカチオン形成後、Y258がカチオン- π 相互作用によりルパニルカチオンの形成を助ける。その後、オレアニルカチオンを安定化させる残基が存在しないため、ルパニルカチオンから直接脱プロトンしたルペオールが形成された。

(c) β -アミリン合成酵素 PNYにおいて、ルパニルカチオンはY261 (OEW Y258に相当)により安定化されるため、ルパニルカチオンの形成まではルペオール合成酵素と同様の経路をたどる。そして、PNYではW259 (OEW L256に相当)が存在するため、カチオン- π 相互作用によりオレアニルカチオンの形成が促進され、 β -アミリンが生じた。

1-4-5. シロイヌナズナ OSC

シロイヌナズナには Figure 1-16 に示した 13 個の OSC が存在し、その機能解析は 2009 年までに完了された²³。シロイヌナズナ OSC 研究から OSC は大きく以下の 3 つに分類できることがわかった。

- 1) OXSQ を単一のトリテルペンに環化するモノファンクショナル OSC
- 2) OXSQ を複数のトリテルペンに環化するマルチファンクショナル OSC²⁶⁻²⁸
- 3) 環化反応において一旦形成した C-C 結合を解裂 (Grob 解裂) したトリテルペンを生成するセコ型トリテルペン合成酵素^{29,30}

それまで、OSC は 1) のような基質特異性が高く一酵素一産物しかないと考えられてきたが、LUP1 に代表される 2) のマルチファンクショナル OSC も数多く存在することがわかってきた。

そして、3) については、セコ型トリテルペンはそれまで OSC ではない別の酵素によって生産されるトリテルペンだと考えられていたが、シロイヌナズナの PEN5 や PEN6 の報告から、OSC には C-C 結合の形成の他に C-C 結合の解裂も触媒するものも存在することがわかってきた。これまで植物の化学成分分析から数多くのセコ型トリテルペンが見出されていることから、今後、セコ型トリテルペン合成酵素の研究が進むことが予想される。

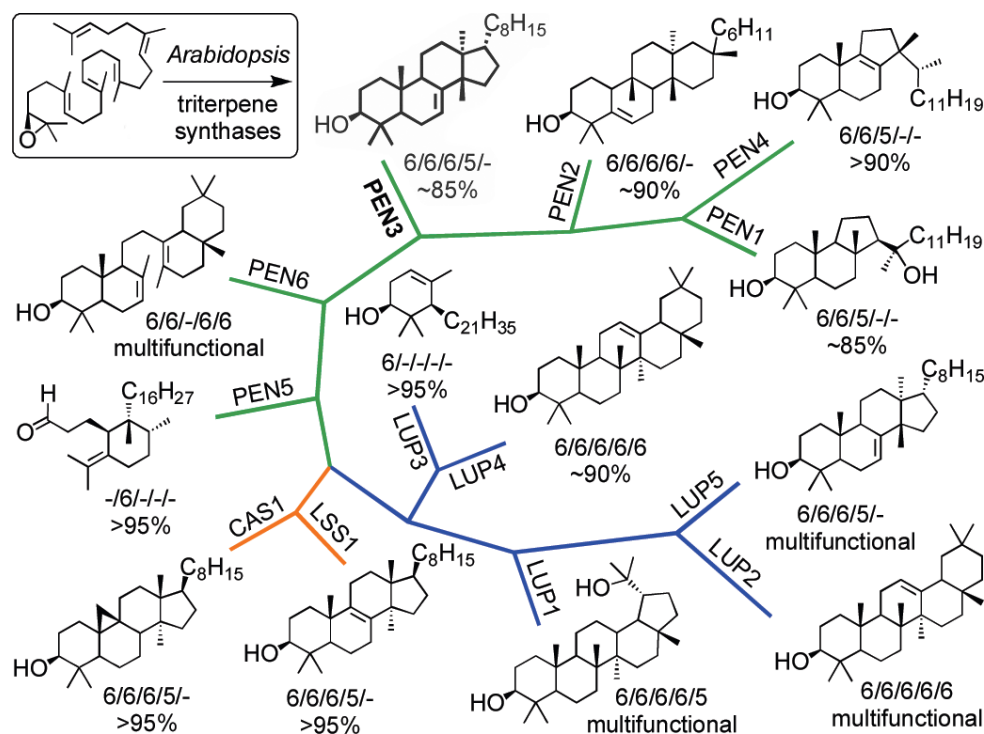


Figure 1-16. シロイヌナズナに存在する 13 個の OSC の機能とその主産物²³

(P. Moriacchi *et al.*, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 2627-2630 より引用)

また、それまで植物には存在しないと思われていたラノステロール合成酵素の存在がシロイヌナズナから明らかとなった^{31,32}。その後、理研 村中氏らによりシロイヌナズナ体内でのラノステロールやラノステロール合成酵素遺伝子の解析が行なわれ、ストレスに応答してラノステロール合成酵素の発現量が増大したことが報告された。³³

以下にはシロイヌナズナ OSC に関する文献を記載した。

Figure 1-17 にはシロイヌナズナ OSC の生成する全てのトリテルペンを示した。

Arabidopsis cyclases:

CAS1: Corey, E. J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 11628-11632.

Lodeiro, S. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14132-14133.

LSS1: Kolesnikova, M. D. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *447*, 87-95.

Suzuki, M. *et al.*, *Plant Cell Physiol.* **2006**, *47*, 565-571.

Ohyama, K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 725-730.

LUP1: Herrera, J. B. R. *et al.*, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1905-1911.

Segra, M.J. R. *et al.*, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2257-2259.

LUP2: Husselstein-Muller, T. *Plant Mol. Biol.* **2001**, *45*, 75-92.

Kushiro, T. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7705-7710.

LUP3: Kolesnikova, M. D. *et al.*, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5223-5226.

LUP4: Shibuya, M. *et al.*, *Plant Physiol Biochem.* **2009**, *47*, 26-30.

LUP5: Ebizuka, Y. *et al.*, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 369-374.

PEN1: Xiang, T. *et al.*, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2835-2838.

Kolesnikova, M. D. *et al.*, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2183-2186.

PEN2: Matsuda, S. P. T. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11213-11222.

PEN3: Morlacchi, P. *et al.*, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2627-2630.

PEN4 (THAS1): Fazio, G. C. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5678-5679.

PEN5 (MRN1): Xiong, Q. *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1285-1288.

PEN6: Ebizuka, Y. *et al.*, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 369-374.

Shibuya, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1450-1455.

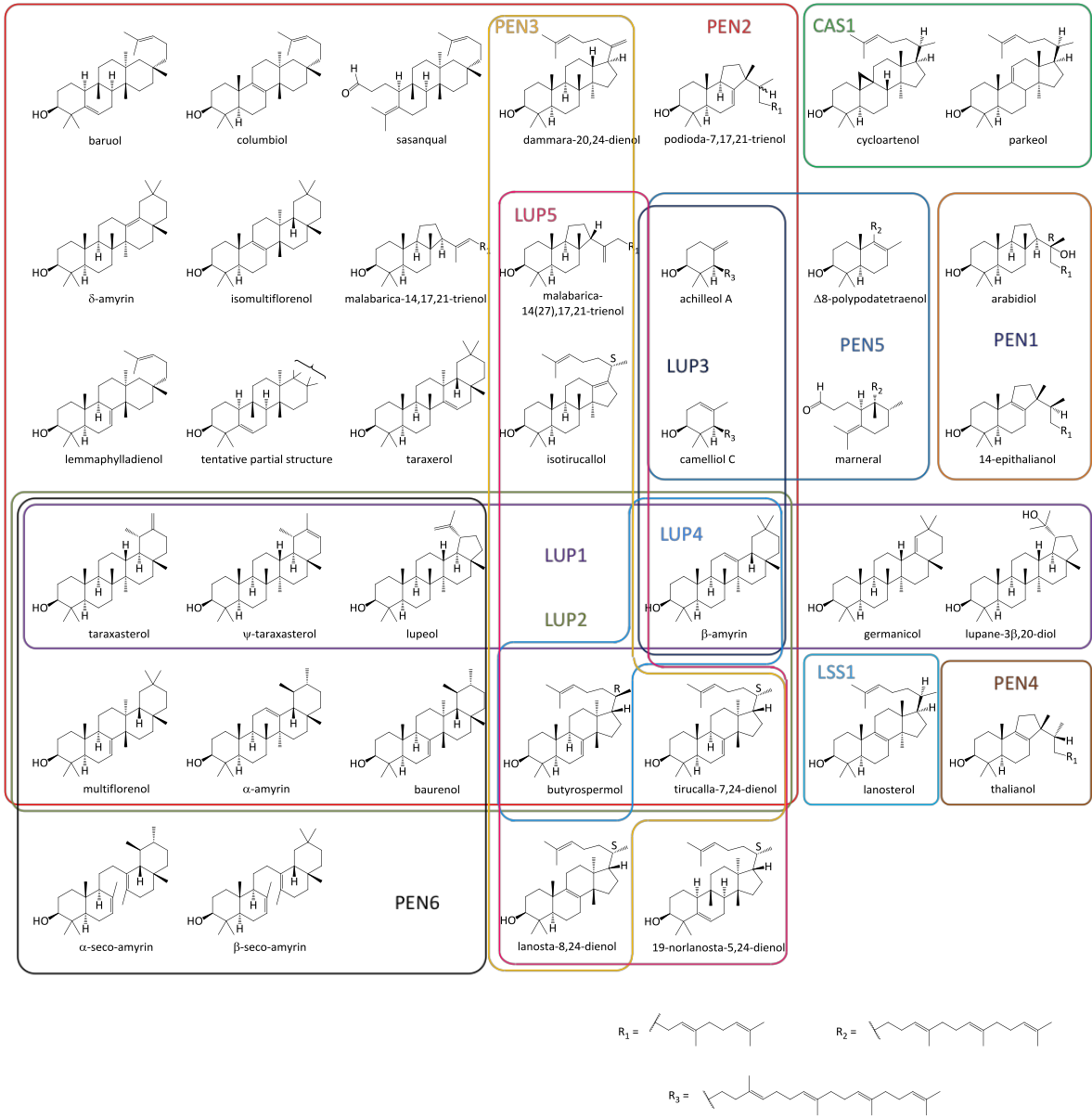
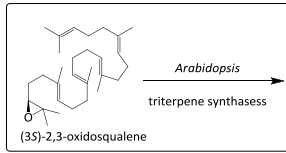


Figure 1-17. シロイヌナズナ OSC の生成するトリテルペン²⁶

(S. Lodeiro *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 11213-11222 より引用)

1-4-6. OSC の系統解析

植物 OSC について Figure 1-18 にマルチプルアライメントを、Figure 1-19 に系統樹を示した。近年、数多くの OSC 遺伝子の機能解析が行われ、それにより、OSC の系統解析が行なわれるようになってきた。Figure 1-18 のように、OSC を系統解析すると、プロトステリルカチオンを経由する *chair-boat-chair-chair* (C-B-C-C) 型 OSC (ラノステロール合成酵素、シクロアルテノール合成酵素など) と *chair-chair-chair-boat-boat* (C-C-C-B-B) 型 OSC (β -アミリン合成酵素、ルペオール合成酵素など) は反応機構だけでなく、進化的にも異なっていることがわかった。また、これまでは植物にはラノステロール合成酵素は存在しないと考えられていたが、シロイヌナズナやミヤコグサからラノステロール合成酵素が発見された。理研 村中らによると、シロイヌナズナ由来ラノステロール合成酵素はストレス環境下で発現が誘導されるため、耐ストレスへの関与が示唆された³³。他の植物にもラノステロール合成酵素遺伝子が存在していることが予想されるため、植物におけるラノステロールの役割に興味もたれる。

また、 β -アミリン合成酵素が単子葉植物と双子葉植物とで系統的には遠縁であり、活性部位アミノ酸の保存性がそれほど高くないこともわかってきており、単子葉と双子葉とで異なる進化過程を有している可能性が指摘されている。³⁵

[Amino acid alignment of various oxidosqualenes]

```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *          100
EtAS  : MWKlKLiAE-----GG-NDEYLYSTN-NYVGRQTWVnEDPQ-PPTPQnEnLAQVQnQARLNnFYNnNRnYHVKPSSnDLnLnWnRFnQnFLREK-NFKQTInPQAKINEGE : 87
PNY1  : MWKlKLiAE-----GNKNDPYLYSTN-NFVGRQTWnBEDnPDYVASnPGnEnLEEVEnQVRRQnFWDNRnYQVKPSGnDLnLnWnRMnQnFLREK-NFRQTInPQVKVGnDDE : 89
BPY   : MWRLlKLiAD-----GG-SDPYIYSTN-NFVGRQTWnBEDnPQ-AGSnPQnEnRAEVEnEARnNFYDNnRYQVKPSGnDLnLnWnRMnQnFLREK-NFKQTInPPVKVEDGE : 87
PSY   : MWRLlKLiAE-----GG-NDPYLFSTN-NFVGRQTWnEYDnPE-AGSnEEnRAQVEnEARnNFYNnNRnYEVKPCGnDLnLnWnRFnQnVLREN-NFKQTInGGVKIEDEE : 87
AtLUP1 : MWKlKLiGK-----GNGEDPHLFSSN-NFVGRQTWnKEDnHK-AGSnPEnRAAVEnEARnRGFLDNnRRnRVKGCnDLnLnWnRMnQnFLREK-KFEQGInPQnLKATNIE : 88
TRW   : MWKlKLiAE-----GG-DDEWLTnTTN-NHVGROHWnQEDnPD-AGTnEEnRAEIEnKIRLNnFKLNnRRnYQFKQSADnLLnMnRTnQLRnKEN-PINKInPDnAIKnNETE : 87
OEW   : MWKlKLiAD-----G--TGPWLTnTTN-NHIGROHWnEEDnPE-AGTnPDnERVEVERLnREEnFKNRnRTnKQSADnLLnMnRMnQLVnKEN-QRVQInPPAIKnKETE : 86
BPW   : MWKlKLiAE-----GG-PG--LVSGN-DFIGROHWnEEDnPD-AGTnPQnEnRAEVEnKVREEnFTKNnRRnYQMKQSADnLLnMnRMnQLRnKEN-PCQPInPPVnKVnKETE : 85
AtCAS1 : MWKlKLi-AE-----GGSPWLnRnTTN-NHVGROFWnEEDnPN-LGTnPEnDnLAAVEnEARnKSEnSDNRnFVQKHSADnLLnMnRLnQnFSREN-LISnPVLPnQVKIEDTD : 86
HsLAS : MTEGTCnLRnRRGGnPPYKTE-PATDLGRWRLN-CERGRQTWnTYLQ-DEnRAGREnQTGLEAYALGLDnTKNnY-----FKDLP : 68
ScLAS : MTEF-----YSDTIGLPKTDPRnLWRLRTnDELGRESnWEYL-----TPQQA-----NDPPSTFTQWnLLQDPKFnPQPHnPERNKHSnPDFSAFD-- : 75
SHC   : M-----A : 2
AtLUP2 : MWKlKLiGE-----GNGEDPYLFSSN-NFVGRQTWnEEDnPK-AGTnPEnRAAVEnDARnNYLDNRnPRVKGCnDLnLnWnRMnQnFLKEA-KFEQVInPPVKIDDGE : 88
OsOSC6 : MWRLlKLiAAESGG-----GSGSSPLnLHTGN-GFLGRAVnEEDnPD-AGTnPEnRAEVARLnRDEnTRHREnQRKESQnDLnLnMnRMnQYAK-LGHLQnPDLSAVIVEDNQ : 92
Mw lki          n   N119  v F125          r   nr   k   dll r q

      *          120          *          *          140          *          160          *          180          *          200
EtAS  : D--ITnYEKATTAnLRRnAVHFFSALQASD-GHWnPAENAGnPLEnFLPPLVMnCnLYITGHnLDTnVPnAPHRLEnILRYInYCHQNE-DGGWGLHIEGHSTMECTVLSYI : 183
PNY1  : A--VTnYEAATTTnLRRnAVHFFSALQASD-GHWnPAENSnGLEnFLPPLVMnCVYITGHnLDTnVPnAEHRKEnILRYInYCHQNE-DGGWGLHIEGHSTMECTLSYI : 185
BPY   : E--ITnYEKSTAAnLRRnAVHFFSALQASD-GHWnPAENAGnPLEnFLPPLVMnCMYITGHnLNTnVPnAEHQKEnILRYInYCHQNE-DGGWGLHIEGHSTMECTALSnYI : 183
PSY   : E--ITnYEKTTTTnLRRnGTHHLATnLQTSnD-GHWnPAQIAGnLEnFLPPLVnFCVYITGHnLDSnVPnPEHRKEnILRYInYCHQNE-DGGWGLHIEGHSTMECTALNnYI : 183
AtLUP1 : E--ITnYETTTNnALRRnGVRYFTALQASD-GHWnPEGITnGLEnFLPPLIFnCnLYITGHnLEEnVFDAEHRKEnMLRnHIYCHQNE-DGGWGLHIESKSVMECTVLNnYI : 184
TRW   : E--VTnNDAVTTTnLKRAISFYSTIQAHnD-GHWnPAESAGnLEnFLPPLVnInALYVTGAMNDnILTPAHQLEnIKRYInYNHQNE-DGGWGLHIEGHSTIEGnSVLSYI : 183
OEW   : G--ITnEEAVITTnLRRnRAISFYSTIQAHnD-GHWnPAESAGnLEnFLPPLVnLALYVTGAINVnLSREHQKEnITRYInYNHQNE-DGGWGLHIEGHSTMEGnSVLSYI : 182
BPW   : V--ITnEEAVITTnLRRnSLSFYSSIQAHnD-GHWnPEGESAGnLEnFLQPFVMALYITGDnINTnIFSPAnHQKEnILRYInYNHQNE-DGGWGLHIEGHSTMEGSALSnYI : 181
AtCAS1 : D--VTEEMVETTnLKRGLDFYSTIQAHnD-GHWnEGDYGGnEMnFLPGLLIITLSITGALNTnVLSEQHKQEMRRYLYNHQNE-DGGWGLHIEGPSTMEGSVLNnYV : 182
HsLAS : KAHTAFEGAL---NGMTFYVGLQAEnD-GHWnTGDYGGnLEnFLPGLLIITCHVA---RIPLPAGYREnIVRYLRSVQLP-DGGWGLHIEDKSTVEGTALNnYV : 159
ScLAS : -----ACHNGASFnEKLLQEnPDSCnIEnFCQYKnGEMnMTIGYVAVNYIAG---IEIPEHERIEnILRYIVNTAHPVDGGWGLHSVDKSTVEGTVLNnYV : 161
SHC   : EQLVEAPAYARTnLDRAVEYLLSCQ-KDEGYWnGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDRVD----RDRMEKIRRYLLHEQRE-DGTWALYPGGPPDLDTTIEAYV : 96
AtLUP2 : G--ITnYKNATDALRRnAVSEFYSAIQSSD-GHWnPAEITnGLEnFLPPLVnFCFYITGHnLEKIFDAEHRKEnMLRnHIYCHQNE-DGGWGLHIEGKSVMECTVLNnYI : 184
OsOSC6 : N--VTEETILSSLRRnALNOYSTIQAHnD-GHWnEGDYSnGILEnIMPLLInFSMHVTGTLnLDVLSLEHKREnITCRYIYNHQNE-DGGWGLTQVLGQSTMEGnSCLNYA : 188
t          l r          Q D Gh5p          gp6f  p 16          6tg          h   e6 Ry6y hqne DGgWg h eg st6f 3 l Y

```

```

                                W219                                W257    Y264
                                *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
                                220                                240                                260                                280
EtAS : CMRLILGEGPNG-GQDNACSRARKWIIDHGGATYIPSWGKTWLSILGVYEWISGNSNPMPEFEWILPTELPMHPAKMWYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITPL : 282
PNY1 : CMRLILGEGPDG-GVNNACARGRKNILDHGSVTAIPSWGKTWLSILGVYEWIGSNPMPEFEWILPSELPMHPAKMWYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITPL : 284
BPY : CMRLILGEGPDG-GQDNACARARKWILDHGGVTHMPSWGKTWLSILGIREWIGSNPMPEFEWILPSELPMHPAKMWYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITPL : 282
PSY : CMRLILGEGPDG-GE DNACVRARNWIRQHGGVTHIPSWGKTWLSILGVEDWLGSNPMPEFEWILPSELPMHPAKMWYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITPL : 282
AtLUP1 : CLRMLGENPE----QDACKRARRQWILDRGGVIFIPSWGKFWLSILGVYDWSGTNPTPEPELLMPLSELPIHPGKILYCRMVYSIPMSYLYGKRFVGPITPL : 280
TRW : TLRLLGEBADSVABDMALVKGGRKNILDHGGAVGI PSWGKFWLTLILGVYEWGGCNPMPEFEWLLMPKEFPIHPGKMLYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITPL : 283
OEW : TLRLLGEGQED-GE DKAVARGRKNILDHGGAVGI PSWGKFWLTVLGVYEWGDCNPMPEFEWLLNENESPIHPGKMLYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITGL : 281
BPW : ALRILGEGLED-GE DGAMAKSRKNILDHGGCLVAIPSWGKFWVTVLGLIYEWSGCNPLPEFEWFLEDIFPIHPGKMLYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITGL : 280
AtCAS1 : TLRLLGEGPNDG--DGDMEKGRDMLLNHGCAATNITSWGKMWLWLVGLAEWISGNNPLPEIWLLELYELPIHPGRMWYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITST : 280
HsLAS : SLRILGVGPD----DPDLVRARNILHKKGGCAVAIPSWGKFWLAVLNVSWEGLNTLEPEMWLFEDWAPAHPSLWYCRQVYMEPSYCYAVRLSAAEDPL : 255
ScLAS : ILRLLGLPKD----HPVCAKARSTLLRLLGCAIGSPHWGKTWLSALNLYKWEGVNPAPEPTWLLPYSLPMHPGRMWYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITPL : 257
SHC : ALKYLIGMSRD----EPPMQKALRFIQSQGGIESSRVETRMWLLALVGEYPMKEVPMVPEIMFLLGKRMPLNIYEFGMARATVVALSTVMSRQ---PVFPL : 189
AtLUP2 : CLRMLGEGPNG-GRNNACKRARRQWILDHGGVTYIPSWGKTWLSILGIYDWSGTNPMPEIWLLEPSEFPIHLGKTLYCRMVYMEPSYLYGKRFVGPITPL : 283
OsOSC6 : TLKLLGEALHN---NDALAQGRMILSHGSATAAPQMAKTIWLSVIGVYDWSGNKALIPELWMPVHELPIHPARFWYCRMIYMSMAYLYGKRFVGPITPT : 285
        64 6Ge           r 6 Gg       ps5g4 W6 6g 5 W g np pPE w p      P hq  PNY1 Y261  sp6sy y~ f~p t l
                                   V371
                                *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
                                320                                340                                360                                380                                400
EtAS : ILQLR-QELHTQPYHHINWTKTRHLCAHEDVYYPHPLIQDLMWDSLYIFTPELLTRWPFNKIIRKKALEVTMKHIIHYEDENSRYITIGCVEK--VLCMLA : 379
PNY1 : ILQLR-EELYGQPYNEINWRKTRVCAKEDIYYPHPLIQDLLWDSLYVLTPELLTRWPFNKL-REKALQTTMKHIIHYEDENSRYITIGCVEK--VLCMLV : 380
BPY : ILQLR-EELYTQPYHQVNWKKVRHLC AKEDIYYPHPLIQDLLWDSLYIFTPELLTRWPFNKLVRKALQVTMKHIIHYEDENSRYITIGCVEK--VLCMLA : 379
PSY : ILQLR-EELHTEPYEKINWTKTRHLC AKEDIYYPHPLIQDLIWDLSLYIFTPELLTRWPFNKLVRKALQVTMKHIIHYEDENSRYITIGCVEK--VLCMLA : 379
AtLUP1 : ILLLR-EELYLEPYEEINWKKSRRLYAKEDMYAHPLVQDLLSDTLQNFVEPLLTRWPLNKLVRKALQVTMKHIIHYEDENSHYITIGCVEK--VLCMLA : 377
TRW : VRDLR-QELYTDPYDEINWNKARNTCAKEDLYYPHPLAQDMLWGFLHHEAE PVLTRWPF SKL-REKALKVAMDHVHYEDKSSRYLCIGCVEK--VLCLIA : 379
OEW : VLSLR-QEIIYEPYHGINWNKARNTCAKEDLYYPHPLAQDMLWGFLHHEAE PVLTRWPF SKL-REKALKVAMEHVHYEDMNSRYLCIGCVEK--VLCLIA : 377
BPW : IQSLR-QELYNEPYHQINWNKARSTVAKEDLYYPHPLIQDLLWGFLHHEAE PVLTRWPF SML-REKALKAAIGHVHYEDENSKYLCIGSVK--VLCLIA : 376
AtCAS1 : VLSLR-KELFTVPYHEVNWNEARNLCAKEDLYYPHPLVQDILWASLHKIIVE PVLMRWPGANL-REKAI RTAIEHIIHYEDENTRYICIGPVNK--VLNMLC : 376
HsLAS : VQSLR-QELYVEDEASIDWLAQRNNVAPDELYTPHSWLLRVYALLN-----LYEHHS AHL-RQRAVQKLYEHI VADDRFTKSI SIGPI SK--TINMLV : 346
ScLAS : LEELR-NEIYTKPEDKINFSKNRNTVCGVDLYYPHSTTLNIA-NSLVVEYKYLNRNRFIYSLSKKKVYDL----IKTELQNTDSLCLAPVWQ--AFCALV : 349
SHC : PERARVPELYETDV-----PERRRGAKGG----GGWIFDADLRALHGYQ--LSVHFRRAAEIRALDWLLERQAGD-----SWGGLQPPWFYALIA : 271
AtLUP2 : IMLLR-KELHLQPYEEINWNKARLCAKEDMIYPHPLVQDLLWDTLHNEVEPIITNWFLKKLVRKALRVAMEHIIHYEDENSHYITIGCVEK--VLCMLA : 380
OsOSC6 : ILEIR-EELYNI PYSEIDWKKARDCCAKEDLRYPCSWIQDIVWVTYLNKYVDPMFNWPFNKL-REISLRNLMKHIYEDENTKYIGLCPINK--ALNMIC : 381
        R  E6  p           R  aked yph  q    L    ep l  p           a      h yed n y g 6 k 6

```

F413 W418

F474

```

EtAS      : CM-AEDPNGVPEKKHLARIIPDYMWVAEDGMKMQSF-GSQQWDTGFATQALLASNLTE--EIGQVLKKGHDFIKKSQVKENP-SGDFKSMHRHISKGSWTF : 474
PNY1      : CM-VEDPNGDYFRKHLARIIPDYIWVAEDGMKMQSF-GSQBWDTGFSIQALLSDSLTH--EIGPTLMKGHDFIKKSQVKDNP-SGDFKSMYRHISKGSWTF : 475
BPY       : CM-VEDPNGDYFKKHLARIIPDYIWVAEDGIKMQSF-GSQBWDTGFAIQALLASNLTD--EIGPTLARGHDFIKKSQVKDNP-SGDFESMHRHISKGSWTF : 474
PSY       : CM-VEDPNGDAFKKHLARVPDYLWISSEDMTMSQSF-GSQBWDAGFAVQALLATNLIE--EIKPALAKGHDFIKKSQVTENP-SGDFKSMHRHISKGSWTF : 474
AtLUP1    : CM-VENPNGDYFKKHLARIIPDYMWVAEDGMKMQSF-GCQLWDTGFATQALLASNLPD--ETDDALKRGHNYIKASQVRENK-SGDFERSMYRHISKGSWTF : 472
TRW       : TW-VEDPNGDAYKRHLARIIPDYFWVAEDGMKMQSF-GCOMWDAFAIQAIFFSSNLTE--EYGPTLKKAHAEFVKASQVQVRENK-SGDFSKMYRHTSKGSWTF : 474
OEW       : CM-VEDPNSEAYKRHLARIIPDYFWVAEDGLKMQSF-GCOMWDAFAIQAILSSNLAE--EYGPTLMKAHAEFVKASQVQENK-SGDFENEMYRHTSKGSWTF : 472
BPW       : CM-AEDPNGEAYKHLHLGRIPDNYFWVAEDGLKIQSF-GCOMWDAFAIQAILSCNLNE--EYWPTLRKAHAEFVKASQVQENK-SGDFKAMYRHTSKGSWTF : 471
AtCAS1    : CM-VEDPNSEAFKHLHLPRIHDELWLAEDGMKMQYNGSGLWDTGFATQAILLATNLVE--EYGPVLEKAHAEFVKASQVLEDC-PGDLNYWYRHISKGSWTF : 472
HsLAS     : RMVVDGEPASTAEQEHVSRIPDYLWMLDGMKMQGTGSGQLWDTAFATQALLLEAGGHRPEFSSCLQKAHEFLRLSQVQVRENK-P-DYQKYYRQMRKGGF : 444
ScLAS     : TLIEEGVDSEAFQRLQYRFKDALFHGPGQMTIMGTGVTWDCAFATQYFFVAGLAERPEFYNTIVSAYKELCHAQFDTECVPGS----YRDKRKGSWTF : 445
SHC       : LKILDMTQHPAEIKGWEGLELYGVLDYGGWVFCASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHD---RLVRAGEWLLDROIT---VPGDWAVKRPNLKPGGF : 365
AtLUP2    : CM-IENPNGDHFKKHLARIIPDFMWVAEDGLKMQSF-GSCLWDTVFATQALLACDLSLSD--ETDDVLRKGHSEFVKASQVRENK-SGDFKSMYRHISKGSWTF : 475
OsOSC6    : CM-IEDPNSDAFKRHLPRIYDFELWLAEDGMKAQVYDGCQTWETAEIFVQAI CSTGLVD--EFSTTLERKAYGELKNSQVQLHDLNPG--KSFYRHRSKGSWTF : 476
  
```

S475 w e p 5 h r d edG k q g Wd fa6qa l e 6 h 56 sq gd rh kg 5 r EtAS F413 A533 T549 I555 C564 EtAS F474

```

EtAS      : SDQDHGWQVSDCTAEGLKCCLLFSMMPPEIVGKEMDAQHLYNAVNILISLQS----KNGGLAAWE PAGAQQWLEMLNPTFEFEADIVIEHEHYVECTASAI : 569
PNY1      : SDQDHGWQVSDCTAEGLKCCLLFSTMPPEIVGKKIKPERLYDSVNVLLSLQR----KNGGLSAWE PAGAQEWLEMLNPTFEFEADIVIEHEHYVECTSSAI : 570
BPY       : SDQDHGWQVSDCTAEGLKCCLLFSIMPPPEIVGKEMEPEQLYDSVNVLLSLQS----KNGGLAAWE PAGAQEWLEMLNSTEFEFEADIVIEHEHYVECTASAM : 569
PSY       : SDQDHGWQVSDCTAEGLKCCLLLSLPPPEIVGKEMEPEQLYDSVNVLLSLQS----KNGGLAAWE PAGAQEWLEMLNPTFEFEADIVVEHEHYVECTGSAM : 569
AtLUP1    : SDRDHGWQVSDCTAEGALKCCLLLSMMSA-DIVGQKIDDEQLYDSVNVLLSLQS----GNGGVNAWE PSRAYKWLEMLNPTFEFMANTMVEREFVECTSSVI : 567
TRW       : SIQDHGWQVSDCTAEGLKVSLLYSQMNP-KLVGKEKIVTEHLYDAVNVILSLQS----ENGGFPAWE PQRAYAWLEMLNPTFEFEEDVLIEREHYVECTSSAI : 569
OEW       : SMQDHGWQVSDCTAEGLKAALLFSQMPPPEIVGAEIETGHLIYDAVNVILTQS----ASGGFPAWE POKAYRWLEMLNPTFEFEEDVLIERYVECTSSAV : 567
BPW       : SMQDHGWQVSDCTAEGLKVAILFSQMPP-DLVGKEKIEKERLYDAVNVILSLQS----SNGGFPAWE PQRAYGWLEMLNPTFEFEEDTLIEREYVECTSPAV : 566
AtCAS1    : STADHGWPI SDCTAEGLKAALLLSKVPK-AIVGEPIDAKRLYEAVNVII SLQN----ADGGLATYB LTRSYPWLEMLINPAETE GDIVIDYYPVECTSAAI : 567
HsLAS     : STLDCGWIIVSDCTAEGALKAVLLLQEKCP-HVT-EHIPRERLCAVAVLLNMRN----PDGGFATYBTKRGGHLLLEMLNPTSEVVBG DIMIDYTYVECTSAVM : 538
ScLAS     : STKTQSYTVADCTAEAIKAILMVKNSPVFSEVHHMISSERLFE GIDVLLNLQNI GSEFYGSFATYB KIKAPLAMB TLNPAEVBG DIMVEYYPVECTDSSV : 545
SHC       : QFDNVYYPDVDDTA-----VWVWALNTRLIPDERRRRDAMTKGFRWIVGMS----SNGGWGAYDNDNTSDLENHI-PFCDEGEVT-DPPSEIVTAHVL : 453
AtLUP2    : SDRDHGWQVSDCTAEGALKCCMLLSMMPPEVVGQKIDPEQLYDSVNVLLSLQG----EKGGLTAME PVRAQEWLEMLNPTDFEETCVMAEREYVECTSAVI : 570
OsOSC6    : STADNGWSVPECTGETLQALLGLSKISP-KLVGDPIKEKSLYDAVDCLLSFSN----KDGTFFSSYE CTRTASWTEMLNPTSESRNIVVDYPHVECTSSAI : 571
  
```

D485C486TAE involved in EtAS β-amyrin synthase

EtAS 564C

W612 Y618

```

EtAS : HALIMEKKLYPGHRKKEIENFIITNAVKYLEDVQIADGGWYGNWGVCFITYGTWFVAVGGLAAAGKNNYNN---CAAMRKAVDFELLRTQKQDGGWGESYLSCPH : 666
PNY1 : QALVLEKKLYPGHRKKEIDNFIITNAVRYLEDTQMPDGSWYGNWGVCFITYGSSWFALGGLAAAGKTYYN---CAAVRKAVEFLLKSOQDDGGWGESYLSCPK : 667
BPY : QTLVLEKKLYPGHRKKEIENFIKNAAQFLQVIQMPDGSWYGNWGVCFITYGTWFALGGLAAAGKTYNN---CLAVRRVAVDFLLRAQRDNGGWGESYLSCPK : 666
PSY : QALVLEKKLYPGHRKKEIENFIENAVRELEDTQTEDGSWYGNWGVCFITYGSSWFALGGLAAAGKTYTN---CAATRKGVKFLLTTOREDGGWGESYLSSPK : 666
AtLUP1 : QALDDEKLYPDHRKKEINRSIEKAVQFIQDNQTPDGSWYGNWGVCFITYATWFALGGLAAAGETYND---CLAMRNGVHFLLTTORDDGGWGESYLSLSCSE : 664
TRW : QGLTLEKKLHPGHRKKEIEHCISRAVKYVEDTQESDGSWYGCWGIQYTYGTWFVAVDALVACGKNYHN---CPALQKACKFLLSKQLPDGGWGESYLSLSSN : 666
OEW : QALKLEKQLHPGHRKKEIASCTSKAIQYIEATONPDGSWYDGSWGIQYTYGTWFVAVGGLVACGKNYHN---SPTLRRACEFLLSKQLPDGGWGESYLSLSSN : 664
BPW : HGLADEKRFYPRHRGTEIDSSIYRGIQYIEDVQEPDGSWYGHWGIQYTYGTWFVAVGALAACGRNYKN---CPALRKSCEFLLSKQLPNGGWGESYLSLSSN : 663
AtCAS1 : QALISEKLYPGHRKKEVDECTEKAVKEIESIQAADGSWYGSWAVCFITYGTWFGVKGGLVAVGKTLKN---SPHVAKACEFLLSKQPPSGGWGESYLSLSCQD : 664
HsLAS : QALKYEHKRFPEHRAAEIRETLTQGLEFCRRQQRADGSWEGSWGVCFITYGTWFGLEAFACMGQTYRDGTACAEVSRACDFLLSRQADGGWGEDFESCEE : 638
ScLAS : LGLTYEHKYF-DYRKEIIRTRIRIAIEEIKKSQLPDGSWYGSWGIQYTYAGMFALEADHTVGETYEN---SSTVRRGCDFELVSKQMKDGGWGESMKSSSEL : 641
SHC : ECFGSE-----GY--DDAWKVIIRRAVEYLLKREQKPDGSWEGRWGVNYLYGTGAVVSALKAVGIDTRE----PYIQKALDWVEQHONPDGGWGEDCRSYED : 542
AtLUP2 : QALVLEKQLYPDHRKKEIKSIEKGVQFIEISKQTPDGSWYGNWGIQYTYATWFALSGLAAAGKTYKS---CLAVRKGVDPELLAIQEEEDGGWGESHLSCPE : 667
OsOSC6 : QGLISETELYPGYRGVIEIESCIKNVAMTEENKQONDGSWYGTWGIQYTYGAFFAIRGLIAGRNYEN---SQAIRNGCKELLSKOLSAGGWGEHYSSSEI : 668

```

l F p hr e 6 a 5 Q DGsW G Wg6c5tYg fa6 l a G y 6 56 Q GGWgEs s

```

EtAS : KKYVPLEDNRSNLVHTSWALMGLISAGQMDRDP TPLHRAAKLLINSQLEBDGDFPQOEITGV-FIKNCMLHYAAYRNIYPLWALAEYRNRVPLPSTTL--- : 762
PNY1 : KVVVPLEGNRSNLVHTGWALMGLIHSEAERDPTPLHRAAKLLINSQMBDGDFFPQOEISGV-FIKNCMLHYAAYRNIYPLWALAEYRRRVPLPSLGT--- : 763
BPY : KEYVPLEGNKSNLVHTAWAMMGLIHAGQAEERDPTPLHRAAKLLINSQLEBDGDFPQOEITGV-FIKNCMLHYAAYKNIYPLWALAEYRKHVPLP-LGKNLN : 764
PSY : KIIVVPLEGNRSNVVHTAWALMGLIHAGQSERDPTPLHRAAKLLINSQLEBQGDWVQOEITGV-FIKNCMLHYPMYRDIYPLWALAEYRRRVPLP----- : 758
AtLUP1 : QRYIIPSEGERSNLVQTSWAMMALIHTGQAEERDLIPLHRAAKLLINSQLEBNGDFFPQOEIVGA-FINTCMLHYATYRNTFPLWALAEYRKVV----- : 753
TRW : KVVYTNLEGNRSNLVHTSWALISLISKAGQAEIDPTPIHNGVRLINSQMBEGDFFPQOEITGV-FIKNCNLNYSSERNIFPIWALGEYRRIV----- : 755
OEW : KVVYTNLEGNRSNLVQTSWALLSLISKAGQVEIDPGPIHRGIRLLVNSQMBDGDFFPQOEITGA-FIKNCNLNYSSEYRNIFPIWALGEYRRRI----- : 753
BPW : KVMVTNLEGNRANLVQTAWALLSLIDARQAEIDPTPIHRGVRVRLINSQMBDGDFFPQOEITGV-FIRNCTLNYSSEYRNIFPIWALGEYRRRV----- : 752
AtCAS1 : KVVSNLDGNRSHVNTAWAMMALIGAGQAEVDRKPLHRAARYLINAQMBNGDFFPQOEIMGV-FVRNCOMITYAAYRNIFPIWALGEYRCQV----- : 753
HsLAS : RRY--LQSAQSQHNTCWMAMMGLMAVRHP--DIEAQERGVRCLEKQLPENGDWPOENLAGV-FNKSCAISYTSYRNIFPIWALGRFSQLYPERALAGHP- : 732
ScLAS : HSYVDSE--KSLVVQTAWALIALLFAEYPNKEV--IDRGIDLLKNRQEESEGEMKFESEVGV-FVHSCAIEYPSYRFLFPKALGMYSRAYETHTL----- : 731
SHC : PAYAGKGASTPS--QTAWALMALIAGGRAESEA--RRGVQYLIVETQRPDGGWDEPYTYTGTQEPGDFYLGTYMYRHVFTLALGRYKQATERR----- : 631
AtLUP2 : QRYIIPLEGNRSNLVQTAWAMMGLIHAGQAEERDPTPLHRAAKLLIITSQLEBNGDFFPQOEILGV-FINTCMLHYATYRNIYPLWALAEYRKA----- : 756
OsOSC6 : EVYV--DSGSPHAVNTSLAMIALLYSGQIERDPTPLYRAAKOLLTSMOLBTGEFPQOEHVGC-FVSSLYFNYPENYRNIYPIWALGEFVHRL----- : 755

```

5 s v T wA66 L6 q e d p r 6 Q e Gd5p e G F c Y 54 5P wAL e5

EtAS F728

```

          *
EtAS      : ----- : -
PNY1     : ----- : -
BPY      : QVVNCIGQSLYKKYK : 779
PSY      : ----- : -
AtLUP1   : -----FIVN--- : 757
TRW      : -----QNI-- : 758
OEW      : -----LHAQT : 758
BPW      : -----LFA-- : 755
AtCAS1   : -----LLQQGE : 759
HsLAS    : ----- : -
ScLAS    : ----- : -
SHC      : ----- : -
AtLUP2   : -----FATHQDL : 763
OsOSC6   : -----VASKD : 760

```

Figure 1-18. 種々のトリテルペン環化酵素のマルチプルアラインメント

Clustal W によりマルチプルアラインメントを作成し、GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>)に図を作成した。用いたトリテルペン環化酵素は次のとおりである。EtAS: *Euphorbia tirucalli* β -amyrin synthase (AB206469), PNY1: *Panax ginseng* β -amyrin synthase (AB009030), BPY: *Betula platyphylla* β -amyrin synthase (AB055512), PSY: *Pisum sativum* β -amyrin synthase (AB034802), AtLUP1: *Arabidopsis thaliana* multifunctional triterpene cyclase (At1g78970), TRW: *Taraxacum officinale* lupeol synthase (AB025345), OEW: *Olea europaea* lupeol synthase (AB025343), BPW: *Betula platyphylla* lupeol synthase (AB055511), AtCAS1: *Arabidopsis thaliana* cycloartenol synthase (At2g07050), HsLAS: *Homo sapiens* lanosterol synthase (P48449), ScLAS: *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol synthase (P38604), SHC: *Alicyclobacillus acidocaldarius* squalene-hopene cyclase, AtLUP2: *Arabidopsis thaliana* multifunctional triterpene cyclase (At1g78960), OsOSC6: *Oryza sativa* Achilleol B synthase (AK070534)

図中の表記は以下の通りである。黄色下線：QW モチーフ、*：トリテルペン環化酵素の活性部位残基³⁶、赤線部分：環化開始モチーフ（OSC：DCTAE モチーフ、SHC：DxDD モチーフ）、赤枠：EtAS C564 残基に相当する部位、水色枠：本研究でターゲットとした EtAS F728、F474、F413 残基に相当する部分

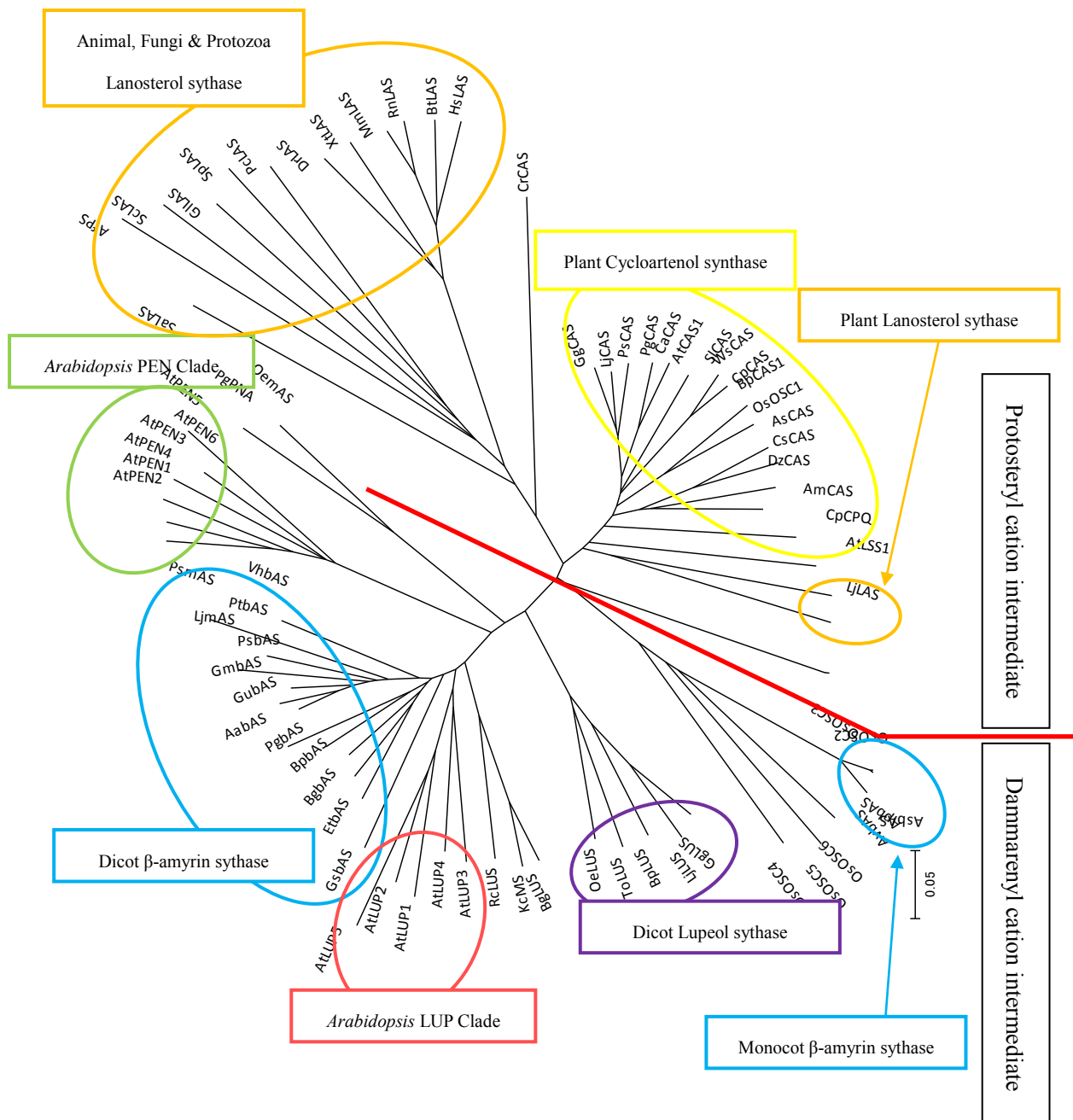


Figure 1-19. OSC の系統樹

OSCのアミノ酸配列をNCBIのProtein検索から機能同定されているOSCタンパクを抽出した。マルチプルアライメントをClustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)により作成し、系統樹をMEGA 4¹⁰⁰における近接結合法 (neighbor-joining method) により構築した。赤線：プロトステリルカチオン型OSCとダンマレニルカチオン型OSCの分岐線、橙色枠：ラノステロール合成酵素のクレード、黄色枠：植物シクロアルテノール合成酵素のクレード、緑色枠：シロイヌナズナPENクレード、赤枠：シロイヌナズナLUPクレード水色枠：β-アミリン合成酵素のクレード、紫色枠：双子葉植物ルペオール合成酵素のクレード EtASは双子葉植物β-アミリン合成酵素のクレードに分類された。略語の説明は次頁に記載した。

Figure 1-19 に示した OSC の略字は、語頭の 2 文字は種名を表しており、そのあとに続く文字は酵素名を表している。

種名は以下の通りの略字である。

At: *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)、Os: *Oryza sativa* (イネ)、Cr: *Chlamydomonas reinhardtii* (コナミドリムシ)、Lj: *Lotus japonicus* (ミヤコグサ)、As: *Avena strigosa* (セイヨウチャヒキ)、Dz: *Dioscorea zingiberensis* (黄姜 (生姜の一種))、Cp: *Cucurbita pepo* (ペポカボチャ)、*Betula platyphylla* (シラカンバ)、Ca: *Centella asiatica* (ツボクサ)、Pg: *Panax ginseng* (オタネニンジン)、Gg: *Glycyrrhiza glabra* (スペインカンゾウ)、Ps: *Pisum sativum* (エンドウ)、Ws: *Withania somnifera* (アシユワガンダ)、Sl: *Solanum lycopersicum* (トマト)、Am: *Abies magnifica* (カリフォルニアアカモミ)、To: *Taraxacum officinale* (セイヨウタンポポ)、Oe: *Olea europaea* (オリーブ)、Kc: *Kandelia candel* (メヒルギ)、Rc: *Ricinus communis* (トウゴマ)、Gs: *Gentiana straminea* (リンドウ科リンドウ属)、Aa: *Artemisia annua* (クソニンジン)、Gu: *Glycyrrhiza uralensis* (カンゾウ (ウラルカンゾウ))、Gm: *Glycine max* (ダイズ)、Pt: *Polygala tenuifolia* (イトヒメハギ)、Vh: *Vaccaria hispanica* (ドウカンソウ)、Et: *Euphorbia tirucalli* (ミドリサンゴ)、Bg: *Bruguiera gymnorhiza* (オヒルギ)、Hs: *Homo sapiens* (ヒト)、Bt: *Bos taurus* (ウシ)、Rn: *Rattus norvegicus* (ドブネズミ)、Mm: *Mus musculus* (ハツカネズミ)、Xt: *Xenopus (Silurana) tropicalis* (アフリカツメガエル)、Dr: *Danio rerio* (ゼブラフィッシュ)、Sp: *Schizosaccharomyces pombe* (分裂酵母)、Pc: *Pneumocystis carinii* (カリニ肺炎を引き起こす原虫)、Gl: *Ganoderma lucidum* (マンネンタケ)、Af: *Aspergillus fumigatus* Af293 (子嚢菌)、Sc: *Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母)、Sa: *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (バクテリア)、Av: *Avena ventricosa* (カラスムギ属)、Mt: *Medicago truncatula* (タルウマゴヤシ)

酵素名は以下の通りの略字である。

PEN1~6: シロイヌナズナ PEN クレードに分類される OSC

LUP1~5: シロイヌナズナ LUP クレードに分類される OSC

CAS1: シロイヌナズナ シクロアルテノール合成酵素

LSS1: シロイヌナズナ ラノステロール合成酵素

OSC1~6: イネの OSC

CAS: シクロアルテノール合成酵素

LAS: ラノステロール合成酵素

LUS: ルペオール合成酵素

bAS: β -アミリン合成酵素

1-5. *Euphorbia tirucalli* L.由来 β -アミリン合成酵素について

1-5-1. *Euphorbia tirucalli* L.について

Euphorbia tirucalli L.は、トウダイグサ科の植物で東アフリカ原産である。その見た目からミドリサンゴやアオサンゴと呼ばれる。また、茎を切ると白い有益のような樹液がでることからミルクブッシュとも呼ばれる。その樹液成分が石油に近いことから、石油の代替エネルギー源として注目されたこともあった。しかし、ミドリサンゴは成長速度が非常に遅く、エネルギー効率が悪かったことから、産業に応用されるには至らなかった。

Euphorbia tirucalli L.の樹液には β -アミリンなどのトリテルペンやステロールが多く含まれているとの報告があり、京都大学の大山教授（現石川県立大学）らのグループが *Euphorbia tirucalli* L.の β -アミリン合成酵素遺伝子の同定に成功した³⁷。当研究室では、その同定された *Euphorbia tirucalli* L.の β -アミリン合成酵素遺伝子を恵与して頂き、触媒機構の解明に向けた研究を行うに至った。

1-5-2. 当研究室でのこれまでの EtAS 研究

大山教授より EtAS 遺伝子を恵与していただき、EtAS 機能解析を行ってきた。まず、当研究室の橋本は大山教授と同様の *P. pastoris* を用いた発現系の構築を目指したが、*in vivo* 解析で β -アミリンを検出することができなかった。これは、用いたホストの違いによるものと考えられた。同じ *P. pastoris* でも大山教授らは PPY1 株を、当研究室 橋本は X-33 株を用いていた。*P. pastoris* での発現系の構築ができなかったため、東京大学 海老塚教授から恵与いただいたラノステロール合成酵素遺伝子欠損 *S. cerevisiae* GIL77 株をホストとする EtAS 発現系の構築を行った。その結果、Figure 1-20、21 に示したように GIL77 株 *in vivo* で β -アミリンと微量の 4 環性トリテルペン (butyrospermol と tirucalla-7,24-dien-3 β -ol) の生産が確認された。

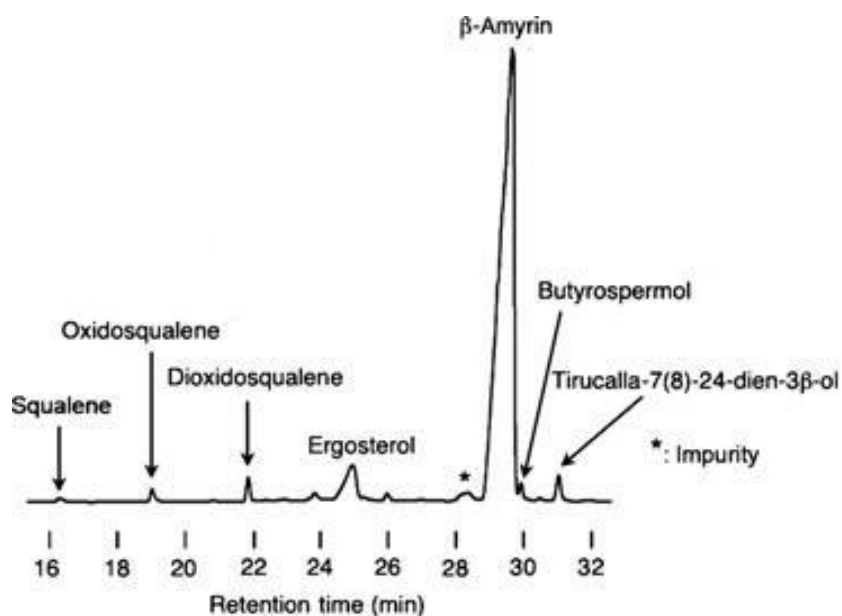


Figure 1-20. EtAS を導入した GIL77 株菌体へキサン抽出物の GC チャート

GC条件：注入口 270°C、カラム温度 220–270°C (2°C/min)、GCカラム J&W, DB-1, capillary (length, 30 m; internal diameter, 0.32 mm; film thickness, 0.25 μ m).

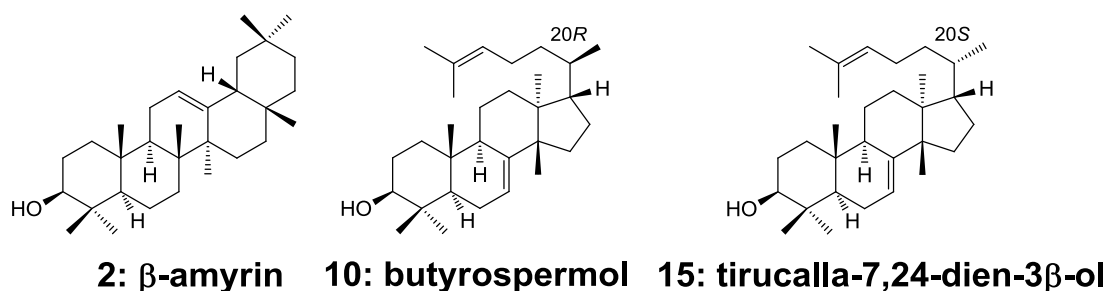


Figure 1-21. 野生株 EtAS により生産される環状トリテルペン

橋本はこれまでに当研究室により数多くの知見を得てきた SHC との比較から、EtAS への変異導入を行ってきた。β-アミリン合成酵素は反応開始時に基質 OXSQ を chair-chair-chair-boat-boat 型に折りたたむが、SHC は all-chair (chair-chair-chair-chair-chair) 型に折りたたむ。また、β-アミリンは全て 6 員環の 5 環性トリテルペンであるのに対し、SHC の生産するホペンやホパノールは同じ 5 環性トリテルペンであるが、E 環が 5 員環である。以上のように β-アミリン合成酵素と SHC では D/E 環の形成に違いがある。そこで、橋本は E 環形成への関与が予想されるアミノ酸残基に焦点を当て、F728 と C732 残基に変異導入実験を実施した。

EtAS F728 残基は SHC F601 残基に相当する。SHC F601 残基はカチオン- π 相互作用により 3 環性および 4 環性カチオンを安定化していることが当研究室により報告された。^{43,68} EtAS F728 残基は橋本により F728H 産物の同定がなされた。同定されたプロダクトの構造から EtAS F728 残基は D/E 環の近傍に存在していることが示唆され、カチオン- π 相互作用を担うことが予想された。しかしながら、F728 変異株の酵素活性は見積もられていなかったため、カチオン- π 相互作用の証明には至っていなかった。

EtAS C732 残基は SHC F605 残基に相当する。SHC F605 残基は非天然型のフルオロフェニルアラニン変異株を用いることでカチオン- π 相互作用により 4 環性および 5 環性カチオンを安定化していることが当研究室により完全に証明された。⁵⁵ しかしながら、EtAS C732 残基は変異導入によるプロダクトプロファイルに大きな変化が見られなかったことから、酵素活性に大きな影響は与えておらず、カチオン- π 相互作用のような機能は有していないことが報告された (橋本 2009、修士論文)。

また、増川により SHC F365 に相当する EtAS F474 残基への変異導入が行われた。SHC F365 残基も F605 残基と同様にカチオン- π 相互作用により 3 環性および 4 環性カチオンを安定化していることが完全に証明された。⁵⁵ EtAS F474 残基も同様の機能を有するか検討された。増川は F474A 産物から F474 残基が B 環の近傍に存在することを示したが、変異株の酵素活性は不明確であったため、カチオン- π 相互作用か否かの証明には至らなかった。(増川 2013、修士論文)

1-5-3. 本研究の目的

これまでの OSC の同定および部位特異的変異実験はラノステロール合成酵素遺伝子欠損酵母を用いた *in vivo* 成分分析により行われてきた。しかし、OSC は膜タンパクであり、活性のある精製酵素をえることが困難であったため、*in vitro* での速度論解析は 2 例（ウシとラットのラノステロール合成酵素）のみであり、この 2 例の酵素活性は非常に低いものであった。^{82,89} また、 β -アミリン合成酵素に関しては速度論解析例がなかった。

Figure 1-20 の結果から、EtAS は β -アミリンの生産能が非常に高いことがわかった。よって、EtAS は酵母内で高い酵素発現量や活性を有していると予想した。そこで、本研究では EtAS に His-tag を導入し、酵素精製を行い、*in vitro* で速度論解析、阻害剤を用いた酵素反応を実施した。そして、環化開始を担う D485、C486、C564 残基への変異導入実験から、変異株の酵素活性を *in vitro* 速度論解析に加えて酵母 *in vivo* で野生株に対する変異株の相対活性を算出する手法を確立した。In vivo での活性測定法の確立により、*in vitro* で酵素活性が弱い変異株の活性を見積もることが可能となった。

次に部位特異的変異導入により EtAS の触媒機構を解析した。これまでの OSC への部位特異的変異導入例はラノステロール合成酵素やシクロアルテノール合成酵素を対象としたものが主であり、 β -アミリン合成酵素への部位特異的変異導入実験例は東京大学 海老塚らによる 1 報のみであった。ラノステロール合成酵素やシクロアルテノール合成酵素は反応開始時の基質の折りたたみが *chair-boat-chair-chair* 型であるが、 β -アミリン合成酵素は *chair-chair-chair-boat-boat* 型である点、そしてラノステロール、シクロアルテノールは 4 環性トリテルペンであるのに対し、 β -アミリンは 5 環性トリテルペンである点で異なる。そのため、ラノステロール合成酵素やシクロアルテノール合成酵素の知見だけでは β -アミリン合成酵素の触媒機構を完全に理解することは難しいと考えた。また、変異株の酵素活性が見積もられた例はなかった。OSC でも SHC のようにカチオン- π 相互作用が働いているかどうかを調べるためにトリテルペン環化酵素で高度に保存される芳香族残基である F728 と F474 残基に変異導入を行った。

Figure 1-22 の EtAS ホモロジーモデリングから、F728 と F474 は D/E 環および B 環の近傍にそれぞれ存在することが予想された。F728 や F474 は SHC F601 や F365 に相当する。SHC の F601、F365 変異株の速度論解析から、これらの残基がカチオン- π 相互作用を担う残基であることが当研究室により報告された。^{43,55,68} 酵母ラノステロール合成酵素では F699 と F445 残基が EtAS F728 と F474 残基にそれぞれ相当し、変異株の酵母 *in vivo* 成分分析からカチオン- π 相互作用を担うことが推定されてきた。^{56,69,70} しかしながら、変異株の酵素活性は見積もられてこなかった。カチオン- π 相互作用などは変異株の酵素活性を見積もらなければその証明ができないため、OSC ではカチオン- π 相互作用がこれまで証明されていなかった。そのため、本研究では EtAS の触媒機構を明らかにするために、EtAS F728 や F474 残基の変異株の酵素活性に着目して実験を行った。そして、酵母 *in vivo* で変異株の酵素活性を見積もることでカチオン- π 相互作用 (F728 残基) およびバルクサイズの重要性 (F474 残基) の証明に至った。

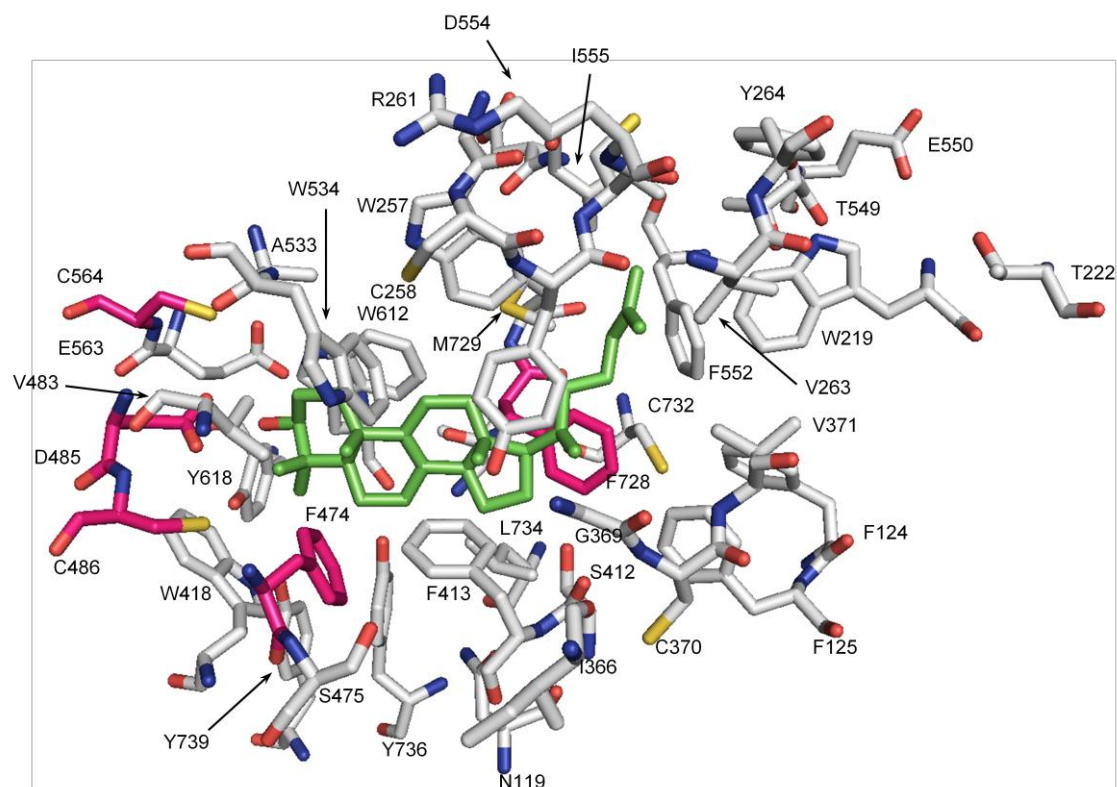


Figure 1-22. EtAS ホモロジーモデリング

EtAS アミノ酸配列をモデリングサーバ CPHModels (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) でホモロジーモデリングを作成し、EtAS ホモロジーモデリングとヒト OSC の X 線結晶構造を PyMOL (<http://www.pymol.org>) で重ねあわせて表示した。緑色化合物はラノステロールを表し、基質のおおよその位置を示している。表示した残基は S. Racolta らにより報告されたトリテルペン環化酵素の活性部位残基である。³⁶ 赤色の残基は本研究でターゲットとした D485、C486、C564、F728、F474 残基である。D485、C486、C564 残基は環化開始に関わる残基である。F728 残基は D/E 環、F474 残基は B 環の近傍にそれぞれ位置していることが予想された。

第2章

実験方法

2-1. 実験の概要	47
2-2. 実験材料	47
2-2-1. 試薬	47
2-2-2. 使用菌株	47
2-2-3. ベクター	47
2-2-4. 使用培地	51
2-3. 分析機器	54
2-3-1. ガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography: GC)	54
2-3-2. GC/QMS	54
2-3-3. GC/TOFMS	54
2-3-4. HPLC	54
2-3-5. NMR	54
2-3-6. 旋光度計	54
2-4. 培養および保存	55
2-4-1. 大腸菌	55
2-4-2. 酵母	55
2-5. 基本的な遺伝子操作法	56
2-5-1. アルカリミニプレップ法	56
2-5-2. DNA 精製法	57
2-5-3. アガロースゲル電気泳動	60
2-5-4. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)	61
2-5-5. 部位特異的変異導入法 (QuikChange 法)	62
2-5-6. 制限酵素による DNA の切断	64
2-5-7. アガロースゲルからの DNA 抽出	64
2-5-8. ライゲーション反応	64
2-5-9. 形質転換	65
2-5-10. キャピラリーシーケンサーによる DNA 塩基配列の決定	68
2-6. <i>S. cerevisiae</i> の培養と誘導	69

2-7. ケン化とヘキサン抽出	69
2-8. ホモロジーモデリング	70
2-9. 基本的なタンパク操作法	71
2-9-1. SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)	71
2-10. 酵素の精製	74
2-10-1. His-tag 融合タンパク質の酵素精製法	74
2-10-2. タンパク質の定量法	75
2-11. 精製 OSC を用いた酵素反応検定	76
2-11-1. 基質の作製	76
2-11-2. OXSQ の可溶化	77
2-11-3. SQ の可溶化	77
2-11-4. 精製 OSC による基質との酵素反応	78
2-12. Western blotting	79

2-1. 実験の概要

本研究に関わる基本的な実験操作をこの章にまとめて述べる。詳しい研究内容については、次章以降に述べていく。

2-2. 実験材料

2-2-1. 試薬

本研究で用いた試薬は、特に記述がない限り全て和光の特級試薬である。

2-2-2. 使用菌株

1) *Escherichia coli* JM109 (α -相補性選択宿主)

Genotype: *recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻m_k⁺), e14⁻(mcrA⁻), supE44, relA1, $\Delta(lac-proAB)/F'$ [*traD36, proAB*⁺, *lacI^q, lacZ* Δ M15]*

※プラスミド回収を主な目的として使用した。

2) *Escherichia coli* DH5 α (α -相補性選択宿主)

Genotype: F⁻, Φ 80d*lacZ* Δ M15, $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, *deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), phoA, supE44, λ^- , thi-1, gyrA96, relA1*

※プラスミド回収を主な目的として使用した。

3) *Saccharomyces cerevisiae* GIL77

Genotype: *Gal2 hem3-6 erg7 ura3-167*

※pYES2 ベクターの導入の宿主として使用した。

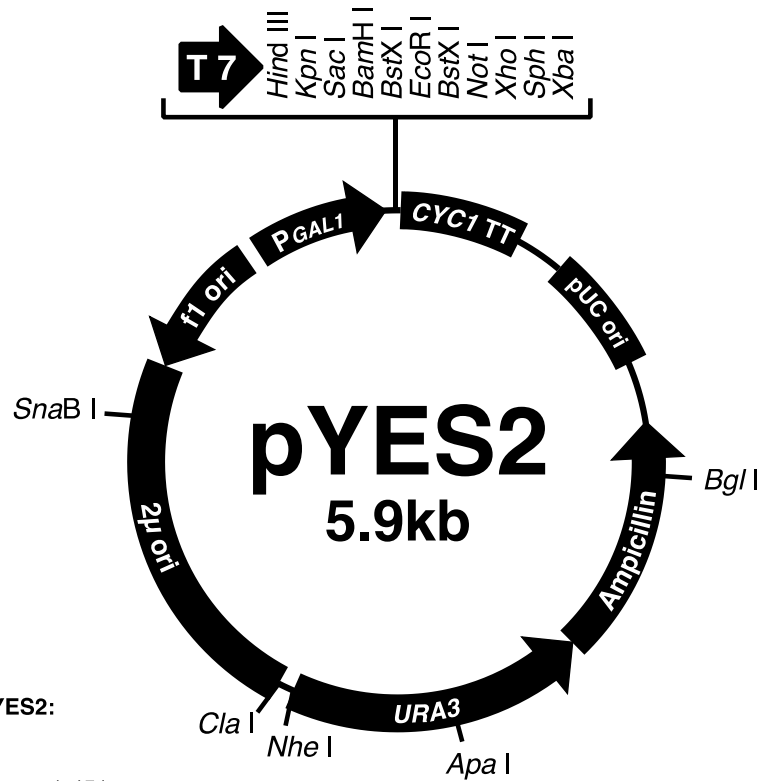
2-2-3. ベクター

1) pYES2 (Invitrogen)

2) pYES2/CT (Invitrogen)...C 末端に His6-tag をもつ

3) pYES2/CT/lacZ (Invitrogen)...C 末端に His6-tag をもち、ポリリンカーに *lacZ* 遺伝子をもつ

次頁以降に各ベクターのベクターマップを記載した。

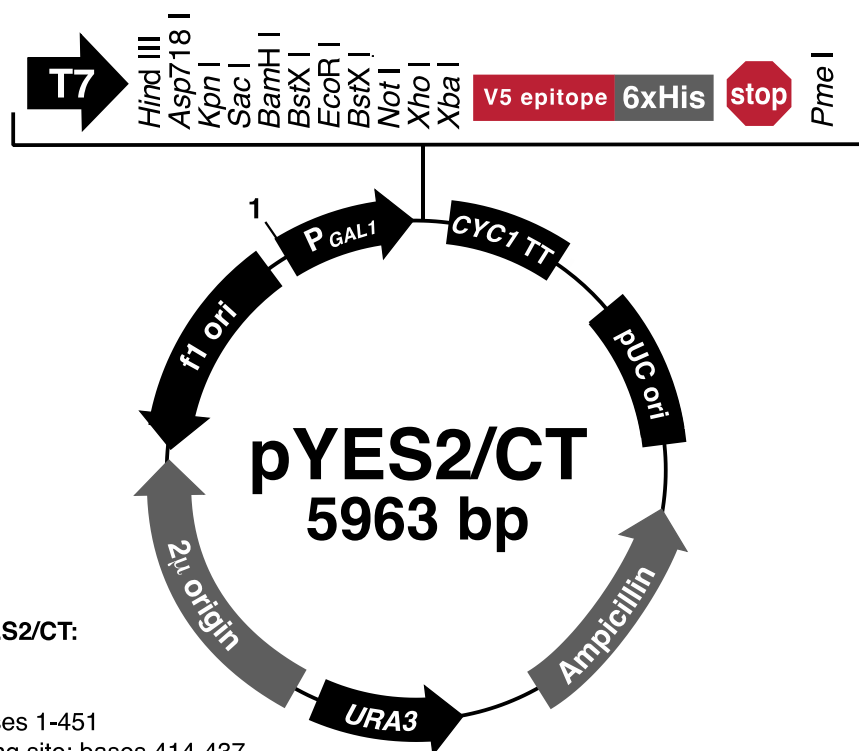


**Comments for pYES2:
5856 nucleotides**

- GAL1 promoter: bases 1-451
- T7 promoter/priming site: bases 475-494
- Multiple cloning site: bases 501-600
- CYC1 transcription terminator: bases 608-856
- pUC origin: bases 1038-1711
- Ampicillin resistance gene: bases 1856-2716 (C)
- URA3 gene: bases 2734-3841 (C)
- 2 micron (μ) origin: bases 3845-5316
- f1 origin: bases 5384-5839 (C)
- (C) = complementary strand



Figure 2-1. pYES2 ベクターマップ



**Comments for pYES2/CT:
5963 nucleotides**

GAL1 promoter: bases 1-451

GAL1 forward priming site: bases 414-437

T7 promoter/priming site: bases 475-494

Multiple cloning site: bases 501-594

V5 epitope: bases 607-648

Polyhistidine (6xHis) region: bases 658-675

CYC1 transcription termination signal: bases 708-961

CYC1 reverse priming site: bases 725-743

pUC origin: bases 1145-1818

Ampicillin resistance gene: bases 1963-2823 (complementary strand)

URA3 gene: bases 2841-3948 (complementary strand)

2μ origin: bases 3952-5423

f1 origin: bases 5491-5946 (complementary strand)



Figure 2-2. pYES2/CT ベクターマップ

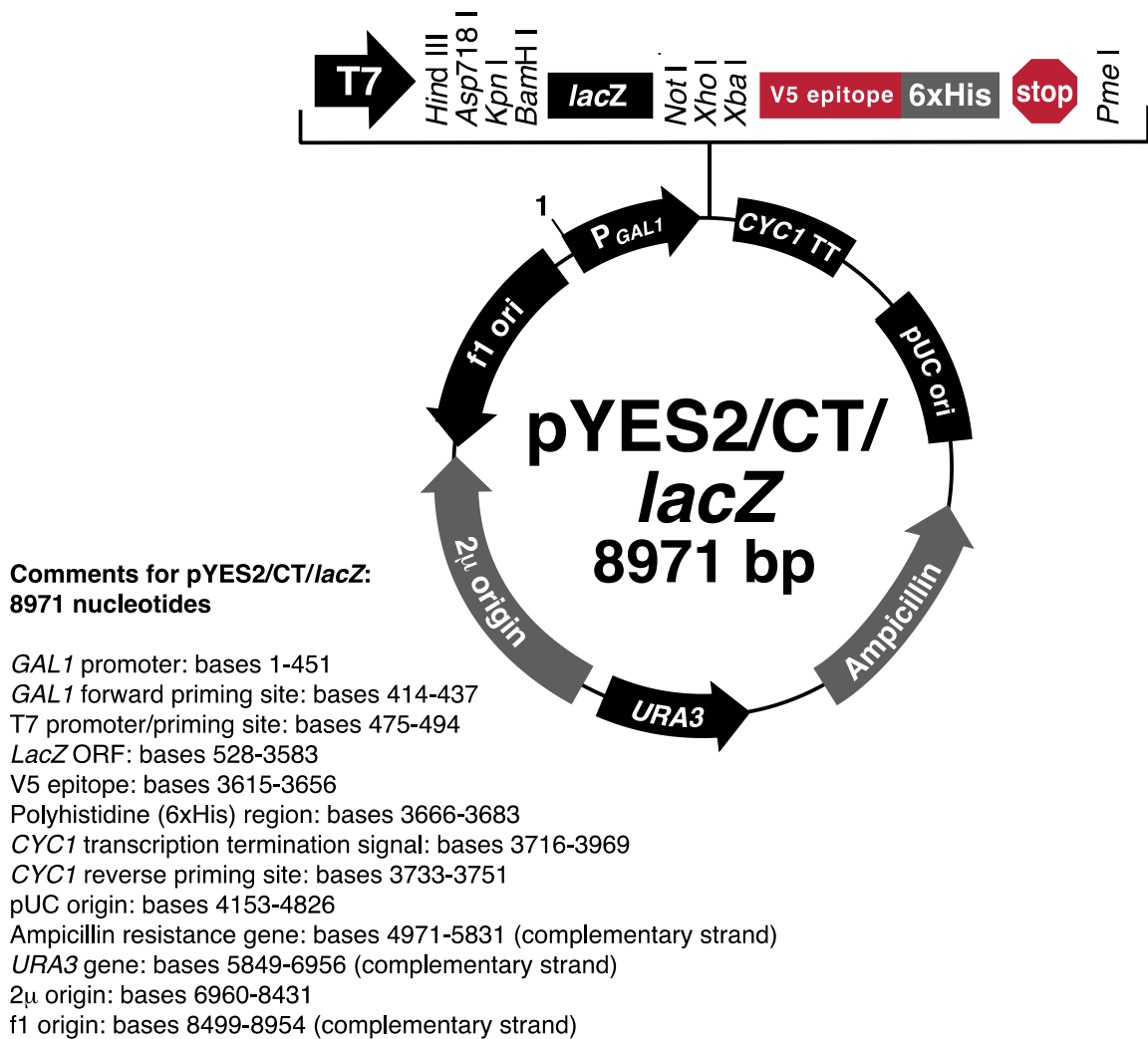


Figure 2-3. pYES2/CT/*lacZ* ベクターマップ

2-2-4. 使用培地

2-2-4-1. ストックソリューション

ここで調製した水溶液は、培地作製の際に 1×になるように調製できるように示した。

(例: 「10x D を添加」 → 使用培地に対して 1/10 倍量の 10x D を添加した。)

1) 500x Amp (50 mg/ml ampicillin solution)

水 50 mL に対してアンピシリン 50 mg を溶かし、ろ過滅菌した。(Store at -20°C)

2) 100× H

65 mL クロロヘミンおよび 500 μL 1 M NaOH を 50%エタノール 50 mL に加えよく攪拌し、4°C で保存した。

3) 50× ET

12 mL Tween 80 に 38 mL エタノールおよび 50 mg エルゴステロールを加えよく攪拌し、4°C で保存した。

4) 10× Uracil

水 100 mL に対してウラシル 93.7 mg を溶かし、オートクレーブした。

2-2-4-2. 培地

1) Luria-Bertani(LB)培地

水溶液 (1%ペプトン、0.5% Yeast extract、0.5% NaCl、pH 7.2) をオートクレーブ滅菌した。プラスミドを形質転換した大腸菌を培養する際には、500× Amp を添加した。また、個体培地は 2% agar. を加えて調製した。

2) SOB 培地

水溶液 (2%ペプトン、0.5% Yeast extract、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、pH 7.0) をオートクレーブ滅菌した後、滅菌した水溶液 (1 M MgCl₂、1 M MgSO₄) を各々5% (v/v) 加えて終濃度が 5 mM になるように添加して調製した。

3) SOC 培地

SOB 培地に滅菌済みの 2 M グルコース溶液を 0.5% (v/v) 加えて、終濃度が 10 mM になるように添加して調製した。

4) SCD-U 培地 (Synthetic Complete Medium lacking Uracil)

水溶液 (0.67% YEAST NITROGEN BASE WITHOUT AMINO ACIDS (FMD)、0.2% Dropout-Mix (ウラシル)、2% Dextrose) をオートクレーブ滅菌した。培養の際は、100× Hemin と 50× Ergosterol を必要に応じて加えた。また、個体培地は 2.5% agar. を加えて調製した。

5) SCG-U 培地 (Synthetic Complete Medium lacking Uracil)

SCD-U 培地の 2% Dextrose を 2% Galactose に置換し、オートクレーブ滅菌し、誘導用培地とした。培養の際は、100× Hemin と 50× Ergosterol を必要に応じて加えた。また、個体培地は 2.5% agar. を加えて調製した。

※ Dropout-Mix (ウラシル)

下に示したアミノ酸をそれぞれ秤量し、よく攪拌し、-80°C にて保存した。

Adenine	0.5 g	Alanine	2.0 g	Arginine	2.0 g
Asparagine	2.0 g	Aspartic acid	2.0 g	Cysteine	2.0 g
Glutamine	2.0 g	Glutamic acid	2.0 g	Glycine	2.0 g
Histidine	2.0 g	Inositol	2.0 g	Isoleucine	2.0 g
Leucine	2.0 g	Lysine	2.0 g	Methionine	2.0 g
Phenylalanine	2.0 g	Proline	2.0 g	Serine	2.0 g
Threonine	2.0 g	Tryptophan	2.0 g	Tyrosine	2.0 g
Valine	2.0 g	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.2 g		

6) 0.1 M KPB (Potassium Phosphate Buffer) + 3% Glc (pH 7.0)

0.1 M K_2HPO_4 と 0.1 M KH_2PO_4 を混合し、pH 7.0 に調製後、3%グルコースを加え、オートクレーブ滅菌した。培養の際は、100× Hemin を必要に応じて加えた。

7) Synthetic Complete Medium (SC 培地)

SC-U 培地に 10× Ura を加えた。

2-3. 分析機器

2-3-1. ガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography: GC)

GC: SHIMAZU GC-2014

Integrator: SHIMADZU, Chromatopac CR-8A

GC column: J&D, DB-1, capillary (Length 30 m, I.D.0.32 mm, Film Thickness 0.25 μ m)

2-3-2. GC/QMS

GC: Agilent technology, 6890N

GC column: Zebron, ZB-5ms, capillary (Length 30 m, I.D. 0.25 mm, Film Thickness 0.25 μ m)

QMS: JOEL, Jms-Q1000GC K9

2-3-3. GC/TOFMS

GC: Agilent technology, 7890A GC System

TOFMS: The AccuTOF GCv JMS-T100GCV

GC column: , J&W, DB-1, capillary (Length 30 m, I.D.0.32 mm, Film Thickness 0.25 μ m)

2-3-4. HPLC

HITACHI

Pump: HITACHI, L-7100

UV Detector: HITACHI, L-7400

Integrator: HITACHI, D-2500 Chromat-Integrator

SHIMAZU

Pump: SHIMAZU, LC-10AS

UV Detector: SHIMAZU, SPD-10A

Integrator: SHIMADZU, Chromatopac CR-6A

2-3-5. NMR

BRUKER, DPX400

BRUKER, DPX600

2-3-6. 旋光度計

HORIBA, HIGH SENSITIVE POLARIMETER SEPA-300

2-4. 培養および保存

2-4-1. 大腸菌

通常、大腸菌 (JM109, DH5 α) は LB 液体培地で 37°C、 \sim 16 時間振盪培養した。保存はグリセロールを 20% (v/v) になるように加えて、1.5 mL チューブに分注し、 -80°C で凍結保存した。

2-4-2. 酵母

通常、酵母は SCD-U+HET 液体培地で 30°C、約 20 時間振盪培養した。保存はグリセロールを 15% (v/v) になるように加えて、1.5 mL チューブに分注し、 -80°C で凍結保存した。

2-5. 基本的な遺伝子操作法

2-5-1. アルカリミニプレップ法

[用途] 大腸菌 (JM109、DH5 α) 由来のプラスミドの調製

[試薬]

Solution I

50 mM グルコース	2 M を 2.5 mL
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M を 2.5 mL
10 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 M を 2 mL
滅菌水	<u>93 mL</u>
	100 mL

※ろ過滅菌あるいはオートクレーブ後、4°C で保存

Solution II

0.2 N NaOH	2 N を 1
1% SDS	10 % を 1
滅菌水	<u>8</u>
	10

※使用時に調製

Solution III

5 M 酢酸カリウム	60 mL
酢酸	11.5 mL
蒸留水	28.5 mL

※オートクレーブ後、室温で保存

[方法]

- 1) 目的のプラスミドをもつ大腸菌 (JM109、DH5 α) を、抗生物質を含む LB 試験管培地 (5 mL) にて 37°C、 \sim 16 時間振盪培養した。
- 2) 培養液 1.5 mL を、1.5 mL チューブにとり、遠心分離 (12,300 rpm、5 min) にて集菌した。
- 3) 菌体のペレットを氷冷した Solution I 100 μ L を加え、ボルテックスにて懸濁した。
- 4) Solution II 200 μ L を加え数回 (2 \sim 3 回) 上下反転させた後、2 \sim 5 分放置した。
- 5) Solution III 150 μ L を加え十分 (6 \sim 10 回) 上下反転させた。
- 6) 遠心分離 (12,300 rpm、5 min、4°C) した後、上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。
- 7) フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行なった。
- 8) 沈殿を真空乾燥し、適当量の RNase 溶液に溶解した。

2-5-2. DNA 精製法

2-5-2-1. フェノール/クロロホルム抽出

[用途] タンパク質の除去

[試薬]

フェノール/クロロホルム混合液 又は
フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液 (PCI)

フェノール/クロロホルム混合液

TE 飽和フェノールとクロロホルムを 1:1 の割合で混合したもの

※遮光して 4°C で保存

PCI

イラストレイテッド 1 p.110 を参照

[方法]

- 1) DNA 溶液に等量のフェノール/クロロホルム混合液または PCI を加えボルテックスで混合した。
- 2) 遠心分離 (12,300 rpm、5 min) した後、水層 (上層) を回収した。

2-5-2-2. エタノール沈殿

[用途] DNA 溶液の濃縮、緩衝液の交換

[試薬]

3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.3)

100% エタノール

70% エタノール

[方法]

- 1) DNA 溶液に 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液および 2 倍量の 100% エタノールを加え、数回上下反転した。
- 2) 遠心分離 (14,000 rpm、20 min、4°C) にて核酸をペレットにし、上清を除去した。
- 3) 70% エタノールで 2 回洗浄した。
- 4) 沈殿を真空乾燥し、適量の滅菌水もしくは RNase 溶液に溶解した。

2-5-2-3. RNase A 処理

[用途] RNA の分解

[試薬]

RNase A 溶液 (終濃度 10 µg/mL)

[方法]

- 1) DNA 溶液に RNase 溶液を加えた。
- 2) 37°C、20〜40 分インキュベートした。

2-5-2-4. PEG 沈殿

[用途] RNA の除去

[試薬]

PEG 溶液

ポリエチレングリコール (PEG6000) 20% (w/v)

NaCl 2.5 M

※オートクレーブ後、室温で保存

[方法]

- 1) DNA 溶液の 3/5 容量の PEG 溶液を加え、よく混合した。
- 2) 氷上で 1 時間放置した。
- 3) 遠心分離 (14,000 rpm、20 min、4°C) にて DNA をペレットにし、上清を除去した。
- 4) 70% エタノールで 2 回洗浄した。
- 5) ペレットを真空乾燥し、適当量の滅菌水に溶解した。

2-5-2-5. AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER) を用いた DNA 精製法

[用途] 大腸菌からのプラスミド DNA 抽出、精製

[試薬]

AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER)

[方法]

- 1) 目的のプラスミドをもつ大腸菌 (JM109、DH5 α) を、抗生物質を含む LB 試験管培地 (5 mL) にて 37°C、 \sim 16 時間振盪培養した。
- 2) 培養液 1.5 mL を、1.5 mL チューブにとり、遠心分離 (12,300 rpm、5 min) にて集菌した。
- 3) 菌体のペレットに氷冷した Buffer 1 を 250 μ L 加え、ボルテックスで溶解した。
- 4) Buffer 2 を 250 μ L 加えゆっくりと数回上下反転させた。
- 5) Buffer 3 を 350 μ L 加え十分 (6 \sim 10 回) 上下反転させた。
- 6) 遠心分離 (14,000 rpm、10 min、4°C) した後、上清を付属のカラムに移し、遠心分離 (13,000 rpm、1 min、4°C) した。
- 7) 廃液を除去し、カラムに Buffer 4 を 750 μ L 加え、遠心分離 (13,000 rpm、1 min、4°C) した。
- 8) 廃液を除去した後、Buffer 4 を完全に除くために再び遠心分離 (13,000 rpm、1 min、4°C) した。
- 9) カラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、遠心分離 (13,000 rpm、1 min、4°C) した。
- 10) カラムに Buffer 5 50-100 μ L 加え、5 分静置した後、遠心分離 (13,000 rpm、1 min、4°C) して、DNA を溶出した。

2-5-3. アガロースゲル電気泳動

[用途] 制限酵素による DNA 断片のパターンやサイズの確認、目的 DNA 断片の抽出

[試薬]

Agarose (TaKaRa)

TAE buffer (pH 8.0)

Tris (GIBCO BRL 社) 40 mM

氷酢酸 40 mM

EDTA 1 mM

10× Loading Dye Solution (東洋紡)

エチジウムブロマイド溶液

TAE buffer 300 mL

エチジウムブロマイド 30 µg

[方法]

- 1) TAE buffer に 1%アガロース、2 µL エチジウムブロマイド溶液を加え、電子レンジで加熱融解した。60°C 前後まで冷ました後、ゲル作製器に注ぎ込んだ。
- 2) 気泡を取り除いた後、ゲル溶液にコームを差し込み、十分にゲルが固まるまで放置した。
- 3) コームを外して泳動槽にのせ、ゲルの表面が覆われるように TAE buffer を注いだ。
- 4) サンプル DNA 溶液に対して 1/10 倍量の 10× Loading Dye Solution を加え、ウェルに入れた。
- 5) 100 V の定電圧で泳動を行なった。
- 6) トランスイルミネータ (302 nm) を用いて DNA を確認した。

2-5-4. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

[用途] 目的遺伝子の増幅

[試薬]

DNA polymerase: KOD -Plus- (東洋紡)

10× KOD -Plus- buffer (東洋紡)

2.0 mM dNTP mix (東洋紡)

2.5 mM MgSO₄ (東洋紡)

20% DMSO

sense-/antisense-primer

[方法]

PEG 沈殿により得た DNA のペレットを滅菌水 50 μL に溶解し、Template とした。

- 1) Table2-1. に示した通りに PCR 用チューブに調製した。
- 2) Table2-2. に示した条件で反応させた。
- 3) 反応終了後、電気泳動により特異的増幅を確認した。

Table 2-1. 試薬の調製

滅菌水	10.5 μL
5 ng/μL Template	2 μL
2.0 mM dNTP mix	5 μL
20% DMSO	2.5 μL
2.5 mM MgSO ₄	4 μL
10x KOD -plus- buffer	5 μL
10 μM sense primer	10 μL
10 μM anti-sense primer	10 μL
KOD -plus-	1 μL
Total	50 μL

Table 2-2. サイクル条件

98°C	3 min	
98°C	1 min	
60°C	1 min	30 cycle
68°C	3 min	...1min/kb
68°C	10 min	
4°C	∞	

2-5-5. 部位特異的変異導入法 (QuikChange 法)

[用途] Stratagene の QuickChange Site-Directed Mutagenesis 法に従い、部位特異的に遺伝子に変異を導入する

[試薬]

DNA polymerase: KOD -Plus- (東洋紡)

10× KOD -Plus- buffer (東洋紡)

2.0 mM dNTP mix (東洋紡)

2.5 mM MgSO₄ (東洋紡)

20% DMSO (Sigma の DMSO を希釈)

sense-/ antisense- primer

[方法]

PEG 沈殿により得た DNA のペレットを滅菌水 50 μL に溶解し、Template とした。

- 1) Table2-3. に示した通りに PCR 用チューブに調製した。
- 2) Table2-4. に示した条件で反応させた。
- 3) 反応終了後、電気泳動により特異的増幅を確認した。
- 4) Dpn I 1 μL を加え、37°C、2 時間インキュベートした。

反応液 2 μL を *E. coli* (JM109、DH5α) に形質転換 (エレクトロポレーション法) し、LB/amp プレートにプレーティングした。

Table 2-3. 試薬の調製

滅菌水	20.5 μL
5 ng/μL Template	2 μL
2.0 mM dNTP mix	5 μL
20% DMSO	12.5 μL
2.5 mM MgSO ₄	2 μL
10x KOD -plus- buffer	5 μL
10 μM sense primer	1 μL
10 μM anti-sense primer	1 μL
KOD -plus-	1 μL
Total	50 μL

Table 2-4. サイクル条件

98°C	5 min	16 cycle ...1min/kb
98°C	30 sec	
60°C	1 min	
68°C	9 min	
68°C	9 min	
4°C	∞	

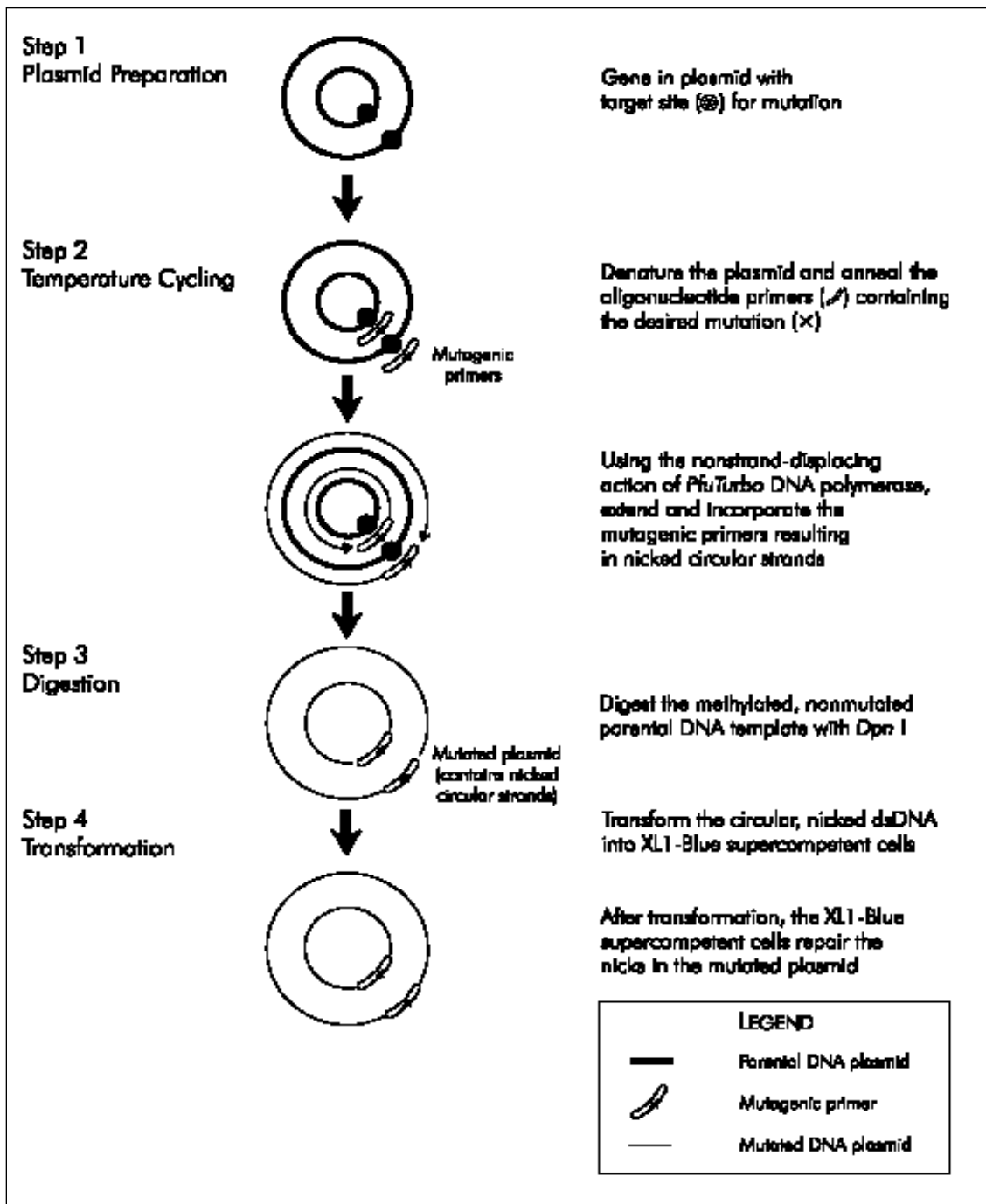


Figure 2-4. QuikChange 法

Mutation の入った相補的な primer を使用し、PCR でプラスミド全体を増幅する。その後、大腸菌由来の template プラスミドを *Dpn I* で切断し、変異プラスミドのみにする (*Dpn I* はメチル化した 4 塩基認識の制限酵素。大腸菌で増幅されたプラスミドはメチル化されているため、選択的に template を切断することが可能)。これを *E.coli* JM109 に形質転換し、ベクターに挿入された Amp 耐性を利用して選択することで、変異プラスミドの導入された菌株が得られる。

2-5-6. 制限酵素による DNA の切断

DNA の塩基配列を制限酵素により特異的に切断した。各酵素に合った Buffer を用いて適温で反応させた。また、必要に応じて BSA を添加した。

※各社の添付プロトコール参照して行なった。

2-5-7. アガロースゲルからの DNA 抽出

[用途] 目的 DNA の抽出

[試薬]

アガロースゲル

TE 飽和フェノール

[方法]

- 1) TAE アガロースゲル電気泳動を行なった後、カッターナイフで目的のバンドを切り出し、1.5 mL チューブに移した。
- 2) TE 飽和フェノールをゲルと等量(目分量)加えてボルテックスし、スピンドウンした後、 -80°C で 30 分放置した。
- 3) 室温で約 20 分放置し、融解させた。
- 4) 遠心分離 (12,300 rpm、20 min、 4°C) した後、水層 (上層) を新しい 1.5 mL チューブに移した。
- 5) フェノール/クロロホルム抽出を行ない、エタノール沈澱を行なった。70% エタノールで洗浄し、遠心分離 (12,300 rpm、5 min、 4°C) し、上清を除去した。
- 6) ペレットを真空乾燥し、適当量の滅菌水に溶解した。

2-5-8. ライゲーション反応

[用途] ベクターDNA とインサート DNA の結合

[試薬]

TaKaRa Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa)

[方法]

- 1) ベクターDNA とインサート DNA を 1:1-1:10 程度にインサート DNA 量が多くなるように計 10 μL の滅菌水に混合した。
- 2) Solution I 10 μL を加え、ピペッティングでよく混合した。
- 3) 16°C で 30 分〜16 時間インキュベートした。

2-5-9.形質転換

2-5-9-1. コンピテントセル作製(大腸菌)

[用途] プラスミド導入用のホスト

[試薬]

10% グリセロール

[方法]

- 1) 抗生物質を含まない LB プレート培地に作製済みコンピテントセルを植菌し、シングルコロニーを単離した。
- 2) ピックアップしたシングルコロニーを LB 培地 5 mL に植菌し、37°C で 7~10 時間培養し、これをシードとした。
- 3) 上述のシードを SOB 培地 1 L に植菌し、O.D₆₀₀ が 0.4-0.5 に達するまで振盪培養した。
- 4) 培養液を氷上に約 10 分置き、完全に冷やした。
- 5) 遠心分離 (6,000 rpm、10 min、4°C) して集菌した。
- 6) 冷却した滅菌水(100mL)に懸濁し、遠心分離 (6,000 rpm、10 min、4°C) して集菌した。
- 7) 氷冷した 10% グリセロール 20 mL を加えて再懸濁し、遠心分離 (6,000 rpm、10 min、4°C) して集菌した。
- 8) 氷冷した 10% グリセロール 4 mL を加えて再懸濁し、1.5 mL チューブに 100 μ L ずつ分注した。
- 9) -80°C で保存した。
- 10) 1 本は抗生物質耐性をもたないことを確認するために、抗生物質含有寒天培地にて生えてこないことを確認した上でコンピテントセルとした。

2-5-9-2. コンピテントセル作製 (酵母)

[用途] プラスミド導入用のホスト

[試薬]

Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit

[方法]

以下の操作は、無菌的に行なうためにクリーンベンチ内で菌を扱った。

- 1) 作製済みコンピテントセル 50 μ L を SCD+HET 試験管培地 (5 mL) に植菌し、30°C、約 16 時間オーバーナイトで振盪培養し、シードとした。
- 2) シード 200 μ L を SCD+HET 試験管培地 (5 mL) に植菌し、30°C で OD₆₀₀=1.0 になるまで 5 時間程度振盪培養した。
- 3) オートクレーブ済み 1.5 mL チューブに 1 mL ずつ分注し、遠心分離 (6,000 rpm、5 min、室温) した。
- 4) 上清を除去し、各チューブに Solution I 1 mL 加えた後、ボルテックスし、ペレットを懸濁した。
- 5) 遠心分離 (6,000 rpm、5 min、室温) した後、上清を少量残すようにしてピペットマンで除去した。
- 6) Solution II 100 μ L を加え、ピペッティングにてペレットを溶解した。
- 7) 50 μ L ずつ分注し、-80°C 保存した。
- 8) 1 本はコンピテントセルにウラシル生産能がないことを確かめるために SCD-U+HET プレートに植菌し、生えてこないことを確認した上でコンピテントセルとした。

2-5-9-3. エレクトロポレーション法

[用途] 大腸菌 (JM109、DH5 α) へのプラスミドの導入

[試薬]

コンピテントセル (*E.coli* JM109、DH5 α)

SOC 培地

[方法]

- 1) キュベットを予め氷上で冷やしておいた。
- 2) コンピテントセルを氷上で融解した後、2-5 μ L の DNA 溶液を添加した。
- 3) 混合液をキュベットに移した。
※この際、混合液に気泡ができないように注意した。
- 4) *E.coli* Pulser (BIO-RAD) でパルス (1.8 kV) をかけた。
- 5) SOC 培地 0.9 mL を含む 1.5 mL チューブに混合液を素早く移し懸濁した。
- 6) 37°C で 1 時間インキュベート後、抗生物質 (Amp) を含む LB 寒天培地に混合液を 50-500 μ L 撒いた。
- 7) 37°C、~14 時間インキュベートした。

2-5-9-4. Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit を用いた酵母への形質転換

[用途] *S.cerevisiae* GIL77 へのプラスミド導入

[試薬]

Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit

コンピテントセル *S.cerevisiae* GIL77

SCD-U+HET 寒天培地

[方法]

以下の操作は、無菌的に行なうためにクリーンベンチ内で菌を扱った。

- 1) コンピテントセルを解凍した。
- 2) 精製済み DNA の入った 1.5 mL チューブにコンピテントセル 50 μ L を移した。
- 3) Solution III 500 μ L を加え、ボルテックスした後、30°C、45 min インキュベートした。
- 4) 遠心分離 (12,300 rpm、30 sec、室温) し、菌体を沈殿させ、上清 200 μ L 程度除去した。
- 5) ピペッティングしてペレットを溶かし、200 μ L 植菌した。
- 6) 30°C で 2~4 日間インキュベートした。

2-5-10. キャピラリーシーケンサーによる DNA 塩基配列の決定

[用途] インサート挿入確認 / 変異導入の確認

2-5-10-1. シーケンスサンプルの調製

[試薬]

CEQ DTCS Quick Start Mix

[方法]

- 1) AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER) を用いてプロトコルに従って DNA を精製した。
- 2) DNA 溶液 10 μL を滅菌水 90 μL で希釈し、吸光度計で DNA 濃度を決定した。
- 3) 100 fmol 分の鋳型 DNA と滅菌水を全量が 5 μL となるように混合した。
- 4) サーマスサイクラーで 96°C、1 min プレヒートした。
- 5) 3.2 pmol/ μL 、Master Mix 4 μL を加えて静かにピペッティングし、以下の条件でシーケンス反応を行なった。

Table 2-5. シーケンス反応条件

96°C	20 sec	45 cycle
50°C	20 sec	
60°C	3 min	
4°C	∞	

- 5) シーケンス反応後、シーケンス反応液 (10 μL) に Stop Solution 2.5 μL (3 M NaOAc 1 μL 、100 mM EDTA 1 μL 、20 mg/mL Glycogen 0.5 μL)を加えた。
- 6) 100% エタノール 30 μL を加え、混合し、遠心分離 (14,000 rpm、15 min、4°C) した (エタノール沈澱)。
- 7) 上清を除き、70 % エタノール 200 μL を加えて遠心分離 (14,000 rpm、2 min、4°C) した (この操作は 2 回繰り返した)。
- 8) 真空乾燥 (5-10 min)
- 9) サンプルローディングソリューション (SLS) 30 μL 加え、暗所・室温で 10 min 静置した。

2-5-10-2. キャピラリーシーケンサーによる分析

[使用機器]

Beckman Coulter CEQ8000

[方法]

Beckman Coulter CEQ8000 のプロトコルに従い行なった。

2-6. *S. cerevisiae* の培養と誘導

[用途] 目的遺伝子の発現

Saccharomyces cerevisiae GIL77 の培養と誘導

[方法]

- 1) SCD-U+HET 試験管培地 (5 mL) に目的の遺伝子をインサートしたプラスミドをもつ *S. cerevisiae* GIL77 を植菌し、30°C、20 時間振盪培養し、これを Seed とした。
- 2) **本培養** : SCD-U+HET 培地 (100 mL) に Seed 1 mL を加え、30°C、2 日間振盪培養した。
- 3) 遠心分離 (9,000 rpm、5 min、4°C) にて集菌し、上清をデカントで除去した。
※集菌はクリーンベンチ内でローターチューブに移すなど、無菌状態で行った。
- 4) **誘導** : SCG-U+HET 培地 (100 mL) に菌体を懸濁し、30°C、24 時間振盪培養した。
- 5) 遠心分離 (9,000 rpm、5 min、4°C) にて集菌し、上清をデカントで除去した。
※集菌はクリーンベンチ内でローターチューブに移すなど、無菌状態で行った。
- 6) **後培養** : 0.1M リン酸 buffer (100 mL) に菌体を懸濁し、30°C、24 時間振盪培養した。
- 7) 遠心分離 (9,000 rpm、5 min、4°C) にて集菌し、上清をデカントで除去した。
- 8) 菌体を脱塩水で洗浄し、遠心分離 (9,000 rpm、5min、4°C) にて集菌した。8)の操作は2回繰り返した。

2-7. ケン化とヘキサン抽出

[方法]

- 1) 集菌した菌体を 15% KOH / methanol (w/v) に懸濁し、沸騰してから 1 時間、ホットスターラーにて攪拌しながらケン化した。
- 2) ケン化後、菌体を吸引濾過し、菌体と濾液を回収した。
- 3) 濾液を分液ろうとに移し、50 mL のヘキサンを加えて 3 回抽出した。
- 4) 菌体に 15% KOH / methanol を加えて再びケン化した。
- 5) 1)~4)の操作を 2~5 回繰り返した。

2-8. ホモロジーモデリング

[用途]

既知の酵素の立体構造から、よく似た（40%以上あれば十分）1次構造を持つタンパク質の立体構造を推測して作り出すことができる。それによって結晶構造解析が行われていない酵素でも、酵素タンパク質の立体構造と機能の関係について考察をすることができる。

[方法]

演算サーバ: CPHmodels (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>)

使用ソフトウェア: MacPyMOL、PyMOL (<http://www.pymol.org/>)

- 1) CPHmodels で目的タンパクのアミノ酸配列を入力あるいは fasta 形式のファイルをアップロードする。
- 2) PyMOL で解析する。

2-9. 基本的なタンパク操作法

2-9-1. SDS ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

[用途] タンパク発現の確認

2-9-1-1. ゲルの作製

[試薬]

A 液 (30% アクリルアミド)

アクリルアミド 58 g

N,N'-メチレンビスアクリルアミド 2 g /超純水で 200 mL にメスアップ

*遮光して 4°C 保存

B 液 (1.5 M Tris-HCl pH8.8)

C 液 (0.5 M Tris-HCl pH6.8)

D 液 (10% 過硫酸アンモニウム (APS))

0.01 g APS を 100 μ L 超純水に溶かす

*用事調製

10% SDS

tetra ethyl metylene diamine (TEMED)

[方法]

- 1) ゲル板を組み立てた。
- 2) 下記の Table 2-6. の組成で分離ゲルを調製した。

Table 2-6. SDS-PAGE 用ゲルの作製 (10%アクリルアミド)

	分離ゲル	濃縮ゲル
超純水	7.32 mL	3.54 mL
A 液	6 mL	900 μ L
B 液	4.5 mL	—
C 液	—	1.5 mL
10% SDS	180 μ L	60 μ L
D 液	70 μ L	18 μ L
TEMED	20 μ L	10 μ L
Total	18.09 mL	6.028 mL

- 3) ゲル板に分離ゲルを流し込み、表面に静かに超純水を重層した。
- 4) 室温で 30 分放置し、ゲルを重合させた。
- 5) 重層した超純水を除去し、超純水で 3 回洗浄した。
- 6) Table 2-6 の組成で濃縮ゲルを調製した。
- 7) ゲル板いっぱいまで濃縮ゲルを流し込み、コームを差した後、室温で 1 時間放置した。

2-9-1-2. サンプルの調製

[試薬]

2× SDS-サンプルバッファー(-20°C で保存)

0.5M Tris-HCl (pH6.8)	2.5 mL
10% SDS	4 mL
β-Mercaptoethanol	1 mL
Glycerol	2 mL
Bromophenol blue (10 mg/mL)	0.4 mL
超純水	0.5 mL

[方法]

- 1) 全タンパク質、可溶性タンパク質、不溶性タンパク質の各画分を用意した。
- 2) 全タンパク質、可溶性タンパク質の2つの画分には、等量の2× SDS-サンプルバッファーを加えた。不溶性タンパク質画分には1/2倍量の2× SDS-サンプルバッファーを加えた。
- 3) 90°C、5分湯浴で熱処理した。
- 4) 以上の3種類を泳動用サンプルとした。

2-9-1-3. 電気泳動の開始と終了

[試薬]

10× 泳動バッファー

Tris	30 g
Glycine	144 g
SDS	10 g /超純水で1 Lにメスアップ

*4°C で保存

[方法]

- 1) 作製したゲルをゲル板ごと泳動槽にセットして、泳動槽の上下に泳動バッファーを入れた。
- 2) ゲル板の下の気泡をできるだけ除き、コームを取り外した。
- 3) シリンジでウェルに適当量のサンプルをアプライした。
- 4) 25 mA、最大電圧で泳動し、濃縮ゲル通過時にサンプルを濃縮させた。
- 5) 30-60 mA、最大電圧で泳動し、分離ゲルを通過させた。
- 6) 色素がゲルの下端まで移動したら電流を止めた。

2-9-1-4. タンパク質の染色

[試薬]

全固定液

メタノール	20 mL
酢酸	7.5 mL /水で 100 mL にメスアップ

CBB 染色液

Coomasie Brilliant Blue R-250	2.5 g
エタノール	250 mL
酢酸	100 mL /水で 100 mL にメスアップ

*ろ過して使用

脱色液

エタノール	25 mL
酢酸	10 mL
水	70 mL

[方法]

- 1) ゲルを容器に移して全固定液 100 mL に浸し、30 分以上振盪した。
- 2) 全固定液を捨てて染色液に浸し、30 分振盪した。
- 3) 染色液を回収し、脱塩水で数回ゲルを洗浄し、脱色液に浸した。この際、キムワイブを 2~3 枚一緒に入れた。
- 4) 数時間してバックグラウンドの色が抜け、タンパクのバンドがはっきり見えるようになったところで脱色液を回収した。
- 5) 脱塩水で 5 分以上振盪した。
- 6) ゲル前面が下を向くようにしてラップにのせ、さらに画用紙をかぶせた。
- 7) ゲル乾燥機にかけた。(60°C、1 時間)

2-10. 酵素の精製

2-10-1. His-tag 融合タンパク質の酵素精製法

His-tag 融合タンパク質と Ni²⁺カラムとのアフィニティーを利用した酵素の精製法を記した。

使用 buffer

- Binding buffer (10 mM imidazole, 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1 % Triton X-100, pH 7.9)
- Wash buffer (40 mM imidazole, 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1 % Triton X-100, pH 7.9)
- Elute buffer (250 mM imidazole, 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1 % Triton X-100, pH 7.9)
- Enzyme buffer (5 mM KPB, 0.1 % Triton X-100, pH7.0)
- Charge buffer (50 mM NiSO₄)

[方法]

<培養・誘導・集菌>

- 1) EtAS/CT-pYES2 プラスミドを導入した酵母 GIL77 株を培養・誘導した。
- 2) 集菌後、菌体を脱塩水と Binding buffer で1回ずつ洗浄した。
- 3) 1 L 培養酵母あたり 10 mL の Binding buffer を加え、懸濁した（ペレットと合計 20 mL 程度になる）。
- 4) 15 mL チューブに 10 mL（0.5 L 培養分）ずつ分注し、-80°C 保存した。

<菌体破碎・酵素精製>

- 5) 中ローター用チューブに菌体懸濁液 3.33 mL、Binding buffer (Triton X-100 なし) 1.66 mL、10% Triton X-100 50 μL とガラスビーズ 10 g を混合した。
- 6) ボルテックス 30 sec、氷中 30 sec を6回繰り返した。
- 7) 遠心分離 (12,300 rpm, 20 min, 4°C) し、菌体とガラスビーズを除去した。
- 8) 菌体ペレットに再び Binding buffer を 5 mL 加えて懸濁し、6)-7)の操作を繰り返した。
- 9) 菌体ペレットに Binding buffer を 10 mL 加えて懸濁し、遠心分離 (12,300 rpm, 20 min, 4°C) した。
- 10) 7)-9)の上清をまとめて再び遠心分離 (12,300 rpm, 20 min, 4°C) し、完全に細胞片を除き、無細胞抽出液とした。
- 11) His-tag カラムに Ni NTA agarose (Qiagen) を 1 mL 充填し、Charge buffer 6 mL で Ni²⁺をチャージした。
- 12) Binding buffer 10 mL を流し、平衡化した。
- 13) 無細胞抽出液を流して樹脂に His-tag 融合タンパク質を吸着させた。
- 14) Binding buffer 15 mL、Wash buffer 13 mL 流し、吸着した酵母由来のタンパク質を洗い流した。
- 15) Elute buffer 3 mL で、His-tag 融合タンパク質を溶出した。
- 16) Enzyme buffer で平衡化したゲル濾過樹脂(Sephadex G-10 from Pharmacia Fine Chemicals) に溶出液をのせ、3.0~6.0 mL の画分を回収した。

2-10-2. タンパク質の定量法

タンパク質の定量は、Bio-Rad Protein Assay を用いて以下の方法で行なった。

[方法]

- 1) Bio-Rad 試薬 1 容に対して超純水を 4 容の割合にて混合した。これを定量試薬とした。
- 2) 終濃度 0、0.1、0.25、0.5、0.75、0.9 mg/mL の BSA 溶液を調製し、それぞれ試験管に 100 μ L 加えた。希釈したタンパク質溶液を試験管に 100 μ L 加えた。
- 3) 定量試薬にて全量 5 mL にしてボルテックスした。
- 4) 5〜30 分程度放置した。
- 5) BSA 溶液を吸光度 595 nm で測定し、検量線を作成した。
- 6) タンパク質溶液の吸光度を測定し、作成した検量線からタンパク質濃度を決定した。

2-11. 精製 OSC を用いた酵素反応検定

2-11-1. 基質の作製

2-11-1-1. 2,3-Oxidosqualene(OXSQ)の合成 (阿部、花岡により作製)

[試薬]

Dry THF

THF に金属ナトリウムを加え、水素ガスが出なくなるまで静置した。

Dry メタノール

メタノール中にモレキュラーシーブ 3Å (MERCK) を 10% (w/v)程度加え、時々攪拌し、気泡が出なくなるまで静置した。

[方法]

- 1) 0°C、窒素気流下で三ツロフラスコ (1000 mL 容) 中で、スクアレン 6.0 g を dry テトラヒドロフラン (THF) 240 mL に溶かし攪拌し、その後、溶液が濁るまで少量ずつ脱塩水を加え、そのまま 10–15 分攪拌した。
- 2) さらに反応液が透明になるまで dry THF を加え、透明になったら N-ブロモコハク酸イミド (NBS) 2.88 g を 10 分くらいかけてゆっくりと加え、よく攪拌しながら 3 時間反応させた。
- 3) TLC (展開溶媒; *n*-hexane:EtOAc=100:10) により、スクアレンブロモヒドリンが生成していることを確かめてから、反応液をナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレータで約半分の溶液量になるまで減圧濃縮した。
- 4) 脱塩水を少量加え、分液漏斗 (500mL 容) に移して *n*-hexane で抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。
- 5) ろ過により無水硫酸ナトリウムを除去し、ロータリーエバポレータで減圧濃縮して、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (展開溶媒; *n*-hexane:EtOAc=100:3) により、精製した。
- 6) 得られたブロモヒドリン 1.55 g を三ツロフラスコ (300 mL 容) 中での dry メタノール 67 mL に無水炭酸カリウム 0.66g を窒素気流下で加えた (ブロモヒドリンは無水炭酸カリウムが完全に溶けてから加えた)。
- 7) 3 時間後、TLC で反応が進まなくなったことを確認してから、脱塩水を少量加えた。*n*-hexane 200 mL × 3 回抽出し、無水硫酸ナトリウムで一晩脱水した。
- 8) シリカゲルカラムクロマトグラフィ (*n*-hexane : EtOAc = 100:1) で精製した。

2-11-2. OXSQ の可溶化

OXSQ は疎水性の物質であるため、酵素活性の検定には界面活性剤を用いて可溶化したものを用いなければならない。

可溶化時に OXSQ と Triton X-100 の比重を考慮して調製した。OXSQ の比重は 0.882 g/mL、Triton X-100 の比重は 1.07 g/mL である。

[用途] 1 mg OXSQ / mL in 0.5% Triton X-100 の調製

[試薬]

50 mM potassium phosphate buffer (KPB) pH 8.0

Triton X-100

[方法]

- 1) OXSQ 中のヘキサンをエバポレータで減圧濃縮し、真空乾燥 30 min で完全にヘキサンを蒸発させた。
- 2) OXSQ 1 mg に対して、Triton X-100 を 5mg 加えた。
- 3) OXSQ 1 mg に対して、全量が 1mL になるよう、OXSQ と Triton X-100 の比重を考慮して 50 mM KPB (pH 8.0) で Fill up した。
- 4) 超音波洗浄機で 15 分処理し、基質を完全に可溶化させた。
- 5) 可溶化後は液体の状態では保存すると数日で基質のエマルジョンが生じるため、-20°C で凍結保存した。

2-11-3. SQ の可溶化

SQ は酵素反応後に内部標準物質として抽出の前段階で加えるために用いた。

可溶化時に SQ と Triton X-100 の比重を考慮して調製した。SQ の比重は 0.857 g/mL、Triton X-100 の比重は 1.07 g/mL である。

[用途] 4 mg SQ / mL in 8 % Triton X-100 の調製

[試薬]

Triton X-100

[方法]

- 1) SQ 1 mg に対して、Triton X-100 を 20 mg 加えた。
- 2) SQ 4 mg に対して、全量が 1mL になるよう、SQ と Triton X-100 の比重を考慮して超純水で Fill up した。
- 3) 超音波洗浄機で 15 分処理し、基質を完全に可溶化させ、4×SQ 内部標準液とした。
- 4) 可溶化後、常温暗所で保存した。
- 5) 使用時には 4 倍希釈して 1×SQ 内部標準液として必要量の SQ を酵素反応液に添加した。

2-11-4. 精製 OSC による基質との酵素反応

[方法]

- 1) Table 2-7 に示した酵素反応系について、酵素を除いた反応混合液を調製した。

Table 2-7. EtAS 酵素反応条件

	終濃度
EtAS enzyme	2 μ g
(3 <i>R,S</i>)-OXSQ	最大 240 μ g/ 2.5 mL (226 μ M)
DTT	1 mM
Potassium phosphate buffer (pH7.0)	0.1 M
Triton X-100	0.05% (w/v)
Total	2.5 mL

- 2) 酵素を除いた反応混合液を 30°C (反応させる温度) で 3 分間プレインキュベーションし、反応混合液を 30°C にした。
- 3) 酵素を添加して 20 分インキュベーションした。
- 4) 煮沸した湯に 3 分間湯浴させて酵素反応を停止させた。
- 5) 内部標準物質としてスクアレン 30 μ g を反応混合液に添加した。
- 6) 1.2 倍量 (3 mL) の 15% (w/v) KOH/MeOH で鹼化した。
- 7) ヘキサン抽出 (この操作は 3 回繰り返した)
- i. 蒸留ヘキサン 4 mL を加えた
 - ii. 30 秒間ボルテックスした。
 - iii. ヘキサン層を小試験管に回収した。
 - iv. 遠心エバポレータでヘキサンを飛ばした。
- 6) SiO₂ ショートカラムクロマトグラフィーにより Triton X-100 を除去した。
- i. パスツールピペットに脱脂綿を詰め、ヘキサンで洗浄した。
 - ii. シリカゲルをヘキサンで懸濁し、パスツールピペットに詰めた。
 - iii. サンプルを蒸留ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 20 でパスツールピペットへ流した。
 - iv. 小試験管に 12 mL 分くらいまで流した後、遠心エバポレータにてヘキサンを飛ばした。
- 7) GC にて解析した。

2-12. Western blotting

1. 乾燥酵母 0.05 g を 1 mL の超純水に溶かし（溶かすと 1.065 mL になる）、ガラスビーズ 1 g と混ぜた。
2. ボルテックス 30 sec + 氷中 1 min を 12 回繰り返し、菌体を破碎した。
3. 破碎した菌体（全タンパク）と SDS-PAGE サンプルバッファー等量で混合し、90°C、15 min で処理し、SDS-PAGE サンプルとした。
4. SDS-PAGE（7.5% アクリルアミドゲル）で泳動させた。
5. タンパクをゲルから PVDF 膜に 144 mA、60 min で転写した。
6. PVDF 膜を TBS-Tween + 5% スキムミルクでブロッキングした（O/N）。
7. PVDF 膜を TBS-Tween で振盪しながら洗浄した（10 min x 3 回）。
8. Anti-V5-FITC Antibody（Life Technologies）3 μ L を TBS-Tween 15 mL に加え、室温で 1 h 抗原抗体反応させた。
9. PVDF 膜を TBS-Tween で振盪しながら洗浄した（10 min x 3 回）。
10. FUJIFILM LAS3000 で励起光を照射して、蛍光を検出した。
11. MultiGauge で解析した。

第3章

β -アミリン合成酵素の酵素学的諸性質

3-1. 背景と目的	82
3-2. 酵素学的諸性質	82
3-2-1. 酵素精製	82
3-2-2. 酵素反応	83
3-2-3. 結果	83
3-3. 速度論定数の決定	87
3-3-1. 速度論解析について	87
3-3-2. 酵素反応	90
3-3-3. 結果と考察	91
3-4. 高次構造	92
3-4-1. 高次構造決定	92
3-4-2. CD測定	94
3-5. 阻害剤を用いた酵素反応	96
3-5-1. 阻害剤とその阻害様式における概説	96
3-5-2. 阻害剤を用いた酵素反応	105
3-5-3. 結果と考察	105
3-6. 環化開始部位への部位特異的変異導入	110
3-6-1. 背景と目的	110
3-6-2. 変異株の作製	111
3-6-3. 変異株 EtAS を用いた <i>in vitro</i> での酵素反応	112
3-6-4. 変異株 EtAS の野生株 EtAS に対する酵母 <i>in vivo</i> での相対活性	113
3-6-5. CD測定	114
3-6-6. 結果と考察	114

3-1. 背景と目的

修士論文研究において β -アミリン合成酵素発現系および酵素精製法を確立し、酵素学的諸性質（定常状態をとる反応時間、至適温度、至適 pH、至適界面活性剤濃度、至適 DTT 濃度、凍結融解の酵素活性に及ぼす影響）を調べた。そして、 β -アミリン合成酵素の速度論定数 (K_m 、 k_{cat} 、比活性) を決定することに成功した (伊藤 2011、修士論文)。

そこで博士論文研究では、 β -アミリン合成酵素の (1) 高次構造の決定、(2) CD 測定 (増川が担当)、(3) 阻害剤を用いた酵素反応、(4) 環化開始部位への部位特異的変異導入を行った。

3-2. 酵素学的諸性質

修士論文研究において報告した β -アミリン合成酵素の酵素学的諸性質をここでは挙げる。

3-2-1. 酵素精製

- 1) pYES2/CT-EtAS を導入した酵母 GIL77 株を培養・誘導した。
- 2) 第 2 章 2-10-1 に従って酵素精製した。
- 3) 第 2 章 2-9 に従って SDS-PAGE を行ない、酵素純度を調べた。
- 4) 第 2 章 2-10-2 に従って Bradford 法による酵素濃度測定を行った。

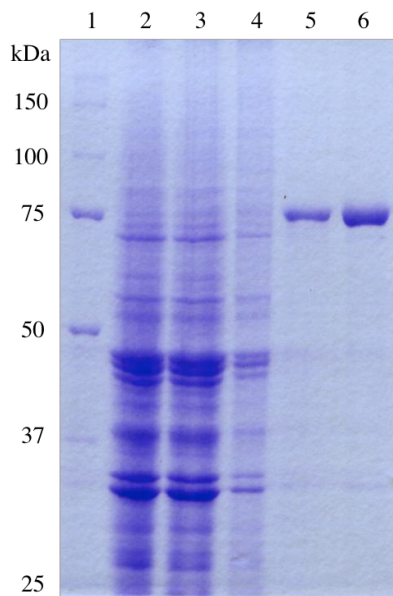


Figure 3-1. EtAS 精製確認の SDS-PAGE

レーン 1: 分子量マーカー、レーン 2: 全タンパク、レーン 3: 可溶性タンパク、レーン 4: 不溶性タンパク、レーン 5: 精製 EtAS タンパク (酵素精製時に Triton X-100 を使用)、レーン 6: 精製 EtAS タンパク (酵素精製時に Brij 35 を使用)

3-2-2. 酵素反応

- 1) Table 3-1 に示した組成について、酵素を除いた反応混合液を調製した。
- 2) 30°C、3 min プレインキュベーションした。
- 3) 酵素を添加して 20 min インキュベーションした。
- 4) 100°C、3 min で酵素反応を停止させた。
- 5) 内部標準としてスクアレン 30 µg を添加した。
- 6) 1.2 倍量 (3 mL) の 15% KOH/MeOH でケン化した。
- 7) 4 mL のヘキサンで 3 回抽出した。
- 8) SiO₂ ショートカラムクロマトグラフィーにより界面活性剤を除去した。
- 9) GC で定量解析した。

Table 3-1. EtAS 酵素反応条件

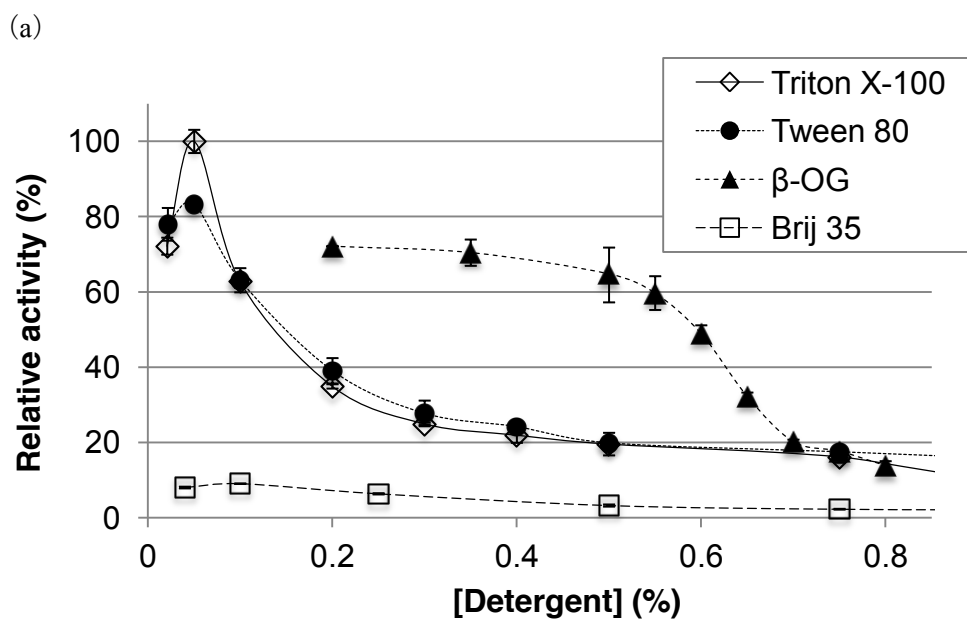
	終濃度
EtAS enzyme	2 µg
(3S)-OXSQ	120 µg (113 µM)
DTT	1 mM
Potassium phosphate buffer (pH7.0)	0.1 M
Triton X-100	0.05% (w/v)
Total	2.5 mL

3-2-3. 結果

Figure 3-2~3-7 に結果を示した。界面活性剤は Triton X-100、Tween 80、β-OG、Brij 35 の 4 種を検討した。最も高い活性を示したのは 0.05% Triton X-100 のときであった。Tween 80 における活性は Triton X-100 の場合と類似していた。β-OG の場合は、CMC である 0.6% 以下では高い活性が観測されたが、CMC 以上では急激に活性が低下した。(Figure 3-2) Brij 35 では非常に低い活性を示したが、この酵素を Brij 35 から Ni-NTA カラムを用いて界面活性剤を Triton X-100 に置換したところ、活性が回復した。このことは Brij 35 による活性は酵素の変性によるものではなかったことを示している。至適反応温度を決定するために反応温度を 5~40°C (5°C 間隔) で酵素反応を行った結果、30°C が至適であることがわかった。また、30°C を超えると急激に活性が低下した (Figure 3-3)。至適 pH の決定には Mes バッファー (pH 5.5-6.0)、リン酸カリウムバッファー (pH 6.5-7.5)、Tris-HCl バッファー (pH 8.0-9.0) を用い、pH 7.0 の時に最大活性を示した (Figure 3-4)。また、Figure 3-5 から、DTT は活性に影響を及ぼさないことがわかった。Figure 3-6 で反応時間 35 min まで反応速度が維持されたことから、定常状態は 35 min までであることが示唆された。そして、凍結解凍が活性に影響を及ぼすかを検討するために、50% Glycerol で -20°C 保存 (凍結解凍 0 回) と凍結解凍 1~3 回で酵素活性を比較したが、凍結解凍 3 回まで優位な活性の低下は見られなかった。

以上から EtAS 至適反応条件は 0.05% Triton X-100、30°C、pH 7.0、30 分まで定常状態であることがわかった。また、DTT や凍結融解 (3 回まで) は活性に影響を及ぼさないこ

とも示唆された。



(b)

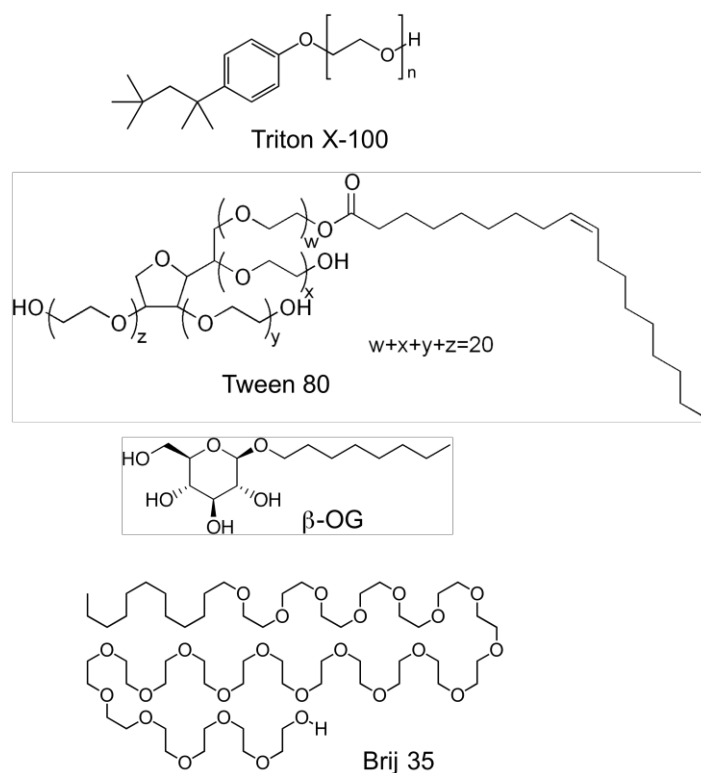


Figure 3-2. 至適界面活性剤濃度

(a) 4種の界面活性剤 (Triton X-100、Tween 80、 β -OG、Brij 35) の EtAS 活性に及ぼす影響

(b) 用いた界面活性剤の構造

各界面活性剤の臨界ミセル濃度 (CMC) は次のとおりである。Triton X-100 : 0.015%、Tween 80 : 0.0016%、 β -OG : 0.6%、Brij 35 : 0.011%

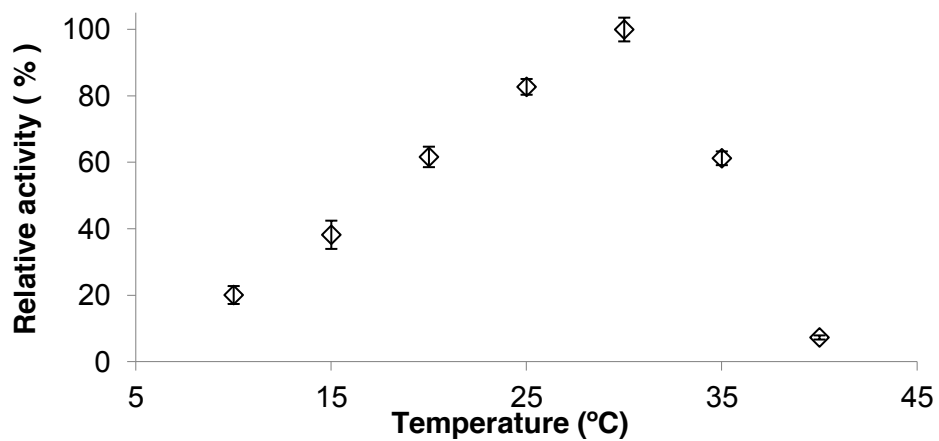


Figure 3-3. 至適反応温度

反応温度 5~40°C (5°C 間隔) で測定した。

30°C での活性を 100%として各温度での活性を相対値で表した。

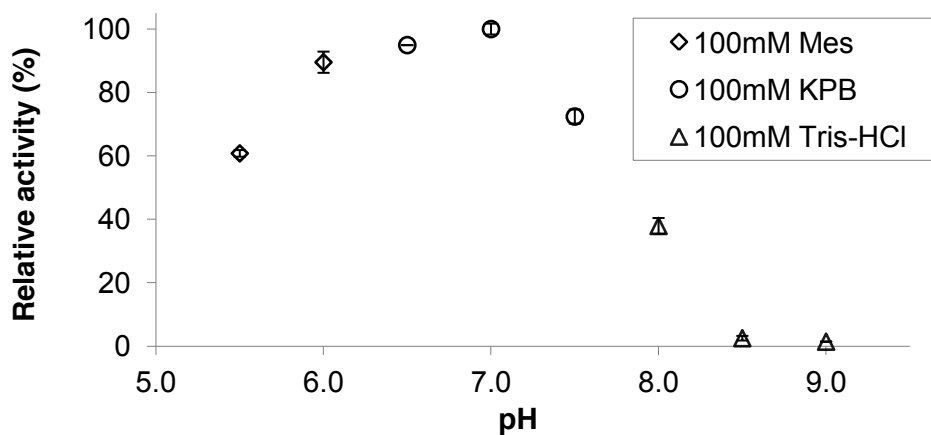


Figure 3-4. 至適 pH

用いたバッファーと pH の設定は以下のように行った。

pH 5.5-6.0 : 100 mM Mes バッファー

pH 6.5-7.5 : 100 mM リン酸カリウムバッファー

pH 8.0-9.0 : 100 mM Tris-HCl バッファー

pH 7.0 での活性を 100%として各 pH での活性を相対値で表した。

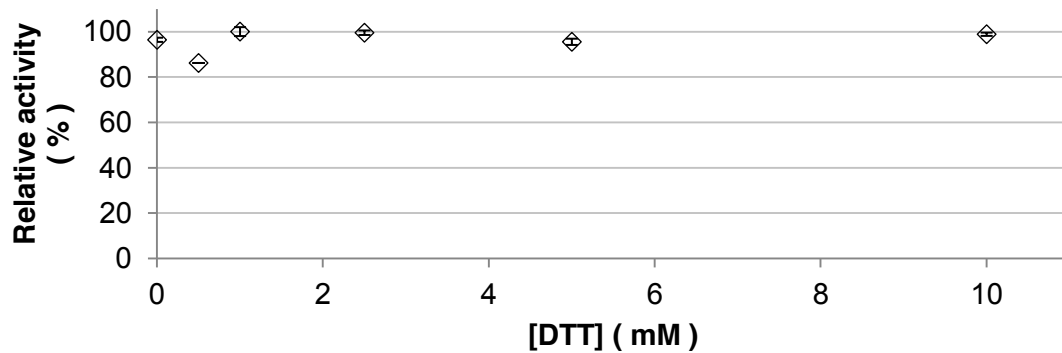


Figure 3-5. 至適 DTT 濃度

検討した DTT 濃度は 0、0.5、1、2.5、5、10 mM であった。1 mM の活性を 100% として、各濃度の活性を相対値で表した。

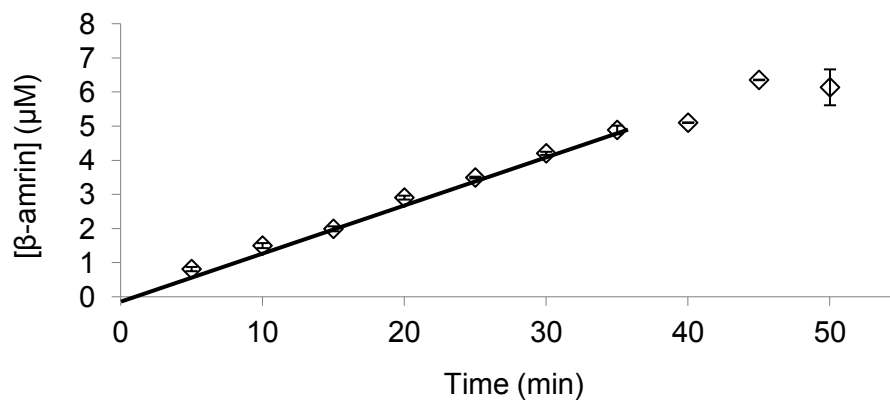


Figure 3-6. 定常状態をとる反応時間

x 軸に反応時間を、y 軸に生成された β-アミリン濃度をプロットした。プロットの傾きが一定の反応時間は一定の反応速度（定常状態）であることを表している。

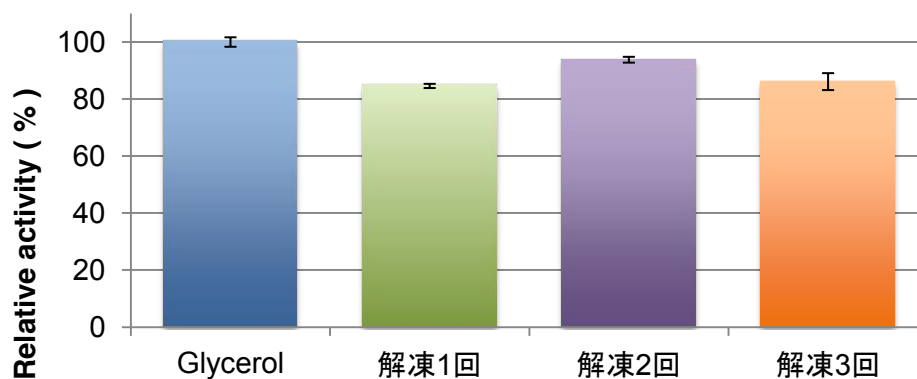


Figure 3-7. 凍結解凍の酵素活性に及ぼす影響

Glycerol : 50% Glycerol で -20°C 保存（凍結解凍 0 回）した精製酵素、解凍 1~3 回 : 凍結解凍を 1~3 回した精製酵素

Glycerol の活性を 100% として凍結解凍回数ごとの活性を相対値で表した。

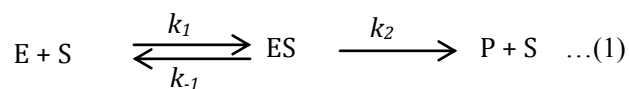
3-3. 速度論定数の決定

3-3-1. 速度論解析について

次に前述の至適反応条件下で速度論定数 (K_m 、 k_{cat} 、比活性) を決定した。そして、これまでに当研究室で研究してきた SHC や既に報告されている他の OSC との比較、考察を行った。

そこでまず、ここでは反応速度に関する最も基本的な計算式である Michaelis-Menten 式について述べる。

Michaelis-Menten 式



E : 酵素

S : 基質

ES : 酵素-基質複合体

P : 生成物

k_{-1}, k_1, k_2 : それぞれの反応における速度定数

酵素反応は、酵素と基質が一度、酵素-基質複合体を形成してから、プロダクトを生成、放出するという上記のようなモデルに基づいて起こると仮定する。各素反応はそれぞれ決まった速度定数を持ち、 k_1 と k_{-1} は ES 生成反応(第 1 段階)のそれぞれ前向きと逆向き反応の速度定数、 k_2 は ES から P を生成する反応(第 2 段階)の速度定数を表す。数学的取扱いを簡単にするため、第 2 段階は不可逆としておく。

生成物ができる速度は、生成反応の速度定数と直接生成物を生じる複合体の濃度の積で表される。よって反応(1)の速度は、

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad \dots(2)$$

となる。

ES の差引き生成速度は ES を生じる素反応と消滅する素反応の速度の差であるから、次のように表される。

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad \dots(3)$$

この(3)式を積分することで[ES]を算出することができるが、そのままでは積分できないため、次の 2 つの仮定が提案された。

1. 平衡仮定

$k_1 \gg k_2$ とすることで、第 1 段階の反応は平衡にあるという仮定である。この仮定は 1913 年、Leonor Michaelis と Maud Menten によって提案された。

第1段階が平衡であるとき、

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] \quad \dots(4)$$

であるから、その解離定数 K_s は、

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \dots(5)$$

と表される。(この仮定は、いつも成り立つとは限らない)

2. 定常状態仮定

酵素に対し基質が大過剰 ($[S] \gg [E]$) のとき、反応のごく初期 (数ミリ秒間) を除き、基質がほとんどなくなるまで ES の濃度はほぼ一定であるという仮定である。つまり、反応の進行中、 ES ができる速さとなくなる速さは相等しい定常状態をとり、見かけの $[ES]$ は一定の値をとる。よって、

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad \dots(6)$$

これは、1925年 G.E. Briggs と John B.S. Haldane により提唱されたものである。

実際に応用するためには、速度論の式を実験的に測れる量で表す必要がある。そのため、測定可能である酵素の全濃度 $[E]_T$ を直接測れない $[ES]$ や $[E]$ の濃度で表すと、

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad \dots(7)$$

ここから、反応速度式を計算していく。

(3)式に定常状態仮定の(6)式を代入すると、

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad \dots(8)$$

(7)より $[E] = [E]_T - [ES]$ だから、

$$\frac{([E]_T - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \dots(9)$$

ここで、ミカエリス定数 K_m を

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \dots(10)$$

と定義すると(9)式は、

$$K_m[ES] = ([E]_T - [ES])[S] \quad \dots(11)$$

(11)式を[ES]について解くと、

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}]_{\text{T}}[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \quad \dots(12)$$

反応の初速度 v_0 は、(2)式の $t=0$ のときだから、

$$v_0 = \left(\frac{d[\text{P}]}{dt}\right)_{t=0} = k_2[\text{ES}] = \frac{k_2[\text{E}]_{\text{T}}[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \quad \dots(13)$$

[S]も[E]_Tも実験的に測れる量である。ただの速度ではなく初速度を使えば、逆反応や酵素の生成物による阻害、実際に伴う酵素の不活性化などはすべて最小にできる。

最大速度 V_{max} は酵素が基質で飽和したとき、つまりすべての E が ES となったときの速度だから、

$$V_{\text{max}} = k_2[\text{E}]_{\text{T}} \quad \dots(14)$$

(13)式と(14)式より、

$$v_0 = \frac{V_{\text{max}}[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \quad \dots(15)$$

これが、酵素速度論の最も基本的な式、ミカエリス・メンテンの式である。

ミカエリス定数の意味

基質濃度が K_m のとき ($[\text{S}]=K_m$)、(15)式は $v_0 = \frac{V_{\text{max}}}{2}$ となるため、 K_m は反応速度が最大速度の半分のときの基質濃度を表す。 K_m 値が小さい酵素は基質濃度が低いところで、触媒能が最大値に達する。この K_m は、各酵素-基質の組合せによって特有の値をもち、一つの酵素がいくつかの基質に作用するとき、一つ一つの基質に対し K_m が異なる。

(10)式より、 K_m は次のように表現される。

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1} \quad \dots(16)$$

K_s はミカエリス複合体 ES の解離定数なので、 K_s が小さいほど酵素の基質に対する親和性が高い。 k_2/k_1 が K_s より小さければ、 $k_2 < k_{-1}$ なので $\text{ES} \rightarrow \text{P}$ 反応が ES から $\text{E} + \text{S}$ への逆反応よりも遅い。この場合、 K_m は K_s と類似した値と見なすことができるため、酵素と基質の親和性を示す。

3-3-2. 酵素反応

- 1) Table 3-2 に示した組成について、酵素を除いた反応混合液を調製した。
- 2) 30°C、3 min プレインキュベーションした。
- 3) 酵素を添加して 20 min インキュベーションした。
- 4) 100°C、3 min で酵素反応を停止させた。
- 5) 内部標準としてスクアレン 30 µg を添加した。
- 6) 1.2 倍量 (3 mL) の 15% KOH/MeOH でケン化した。
- 7) 4 mL のヘキサンで 3 回抽出した。
- 8) SiO₂ ショートカラムクロマトグラフィーにより Triton X-100 を除去した。
- 9) GC で定量解析した。
- 10) Excel の Solver により K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} を算出した。

Table 3-2. EtAS 酵素反応条件

	終濃度
EtAS enzyme	2 µg
(3S)-OXSQ	0-120 µg (0-113 µM)
DTT	1 mM
Potassium phosphate buffer (pH7.0)	0.1 M
Triton X-100	0.05% (w/v)
Total	2.5 mL

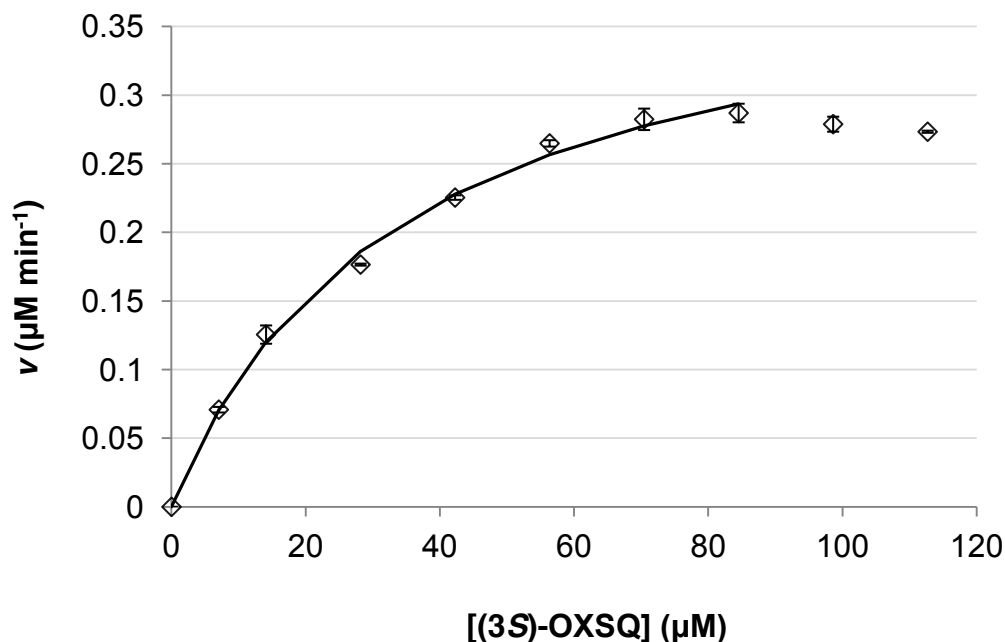


Figure 3-8. EtAS の Michaelis-Menten plot

基質濃度は 0、7.0、14、28、42、56、70、85、99、113 µM で測定した。

基質濃度 99 と 113 µM ではわずかに活性が低下したため、高濃度の基質を添加すると SHC と同様に基質阻害を受ける可能性が示唆された。そのため、 K_m 、 k_{cat} は基質濃度 0~85 µM の範囲で算出した。

3-3-3. 結果と考察

	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Specific activity ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
EtAS	33.8 ± 0.53	46.4 ± 0.68	1.37 ± 0.21	352 ± 11.8
Bovine lanosterol synthase ⁸²	11	1.6×10^{-2}	1.45×10^{-3}	1.747
	15 ⁸⁹	3.0×10^{-2} ⁸⁹	2×10^{-3} ⁸⁹	8.8×10^{-2} ⁸⁹
Rat lanosterol synthase ^{89,90,83}	55 ⁹⁰	NR	NR	26.16 ⁹⁰
	86 ⁸³	NR	NR	NR
<i>S. cerevisiae</i> lanosterol synthase ⁹¹	18	NR	NR	40.8
	16.7 ⁵⁷	289 ⁵⁷	17.3 ⁵⁷	1910 ⁵⁷
SHC ^{57,83,85}	1.6 ⁸³	2.4 ⁸³	1.5 ⁸³	NR
	38 ⁸⁵	72 ⁸⁵	1.89 ⁸⁵	NR

NR: not reported.

EtAS の速度論定数を Table 3-3 にまとめた。EtAS の K_m 値はこれまでに報告されてきたトリテルペン環化酵素と類似の値を示した一方、EtAS の k_{cat} 値や比活性はこれまでに報告されてきた OSC のそれより非常に高い値を示した。このことは、酵素精製の段階で酵素の活性が維持されていることを示唆している。また、SHC では基質を高濃度添加すると基質阻害が生じることが当研究室の実験で明らかになっている（論文未報告）が、EtAS では基質阻害の有無は判断できなかった。それは、基質 OXSQ を反応系に 112.7 μM 以上は添加できなかったためである。しかしながら、98.6 μM 以上でわずかに活性の低下が見られたため、EtAS でも同様に基質阻害が生じる可能性が考えられる。

3-4. 高次構造

β -アミリン合成酵素の高次構造について、ゲルろ過 HPLC から何量体として存在するかを決定し、CD 測定から温度変化による高次構造変化を調べた。なお、CD 測定は当研究室 増川により実施された（増川 2013、修士論文）。

3-4-1. 高次構造決定

- 1) pYES2/CT-EtAS を導入した酵母 GIL77 株を培養・誘導した。
- 2) 第 2 章 2-10-1 に従って酵素精製した。
- 3) 分子量マーカーと β -アミリン合成酵素をゲルろ過 HPLC に流し、Figure 3-9～10 のようにして β -アミリン合成酵素の分子量を決定した。なお、ゲルろ過 HPLC の条件は以下のとおりであった。

カラム：TSKgel G3000SWXL

移動相：50 mM リン酸バッファー（pH 7.0）、0.005% Brij 35、0.2 M KCl

流速：0.5 mL/min

検出波長：280 nm

分子量マーカー：グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（290 kDa）、乳酸デヒドロゲナーゼ（142.0 kDa）、エノラーゼ（67 kDa）、ミオキナーゼ（32.0 kDa）、シトクロム c（12.4 kDa）

- 4) 得られた β -アミリン合成酵素の分子量（実測値）と理論分子量（計算値）との比較から β -アミリン合成酵素の高次構造を決定した。

結果

Figure 3-9 から、 β -アミリン合成酵素の分子量（実測値）が 94.8 kDa であることを決定した。そして理論分子量（計算値）が 91.1 kDa であることから、 β -アミリン合成酵素はモノマーであることがわかった。これは、ヒト ラノステロール合成酵素で報告された結果²⁴と同様の結果となった。

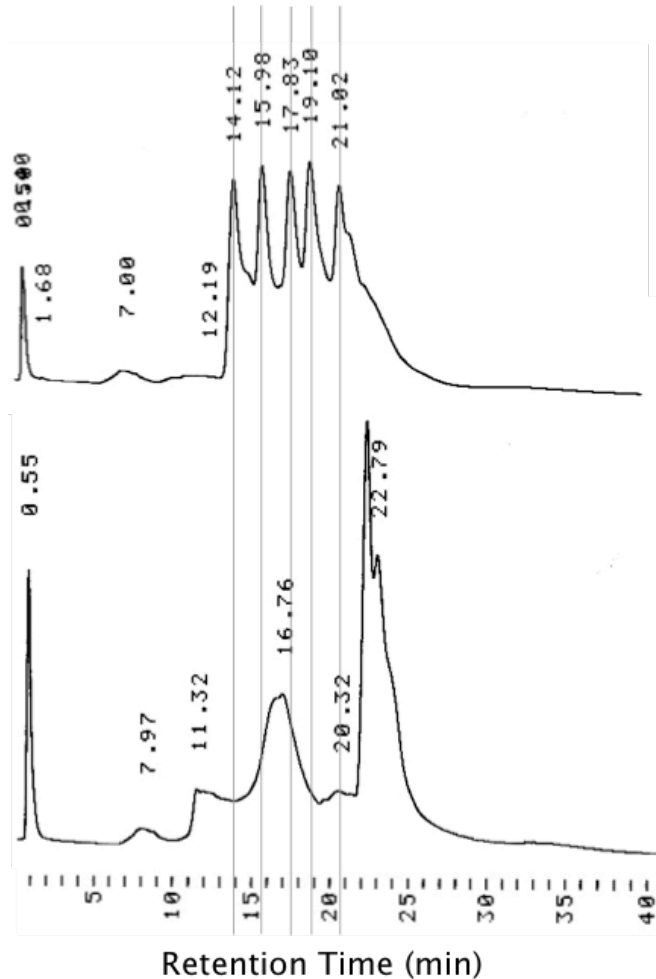


Figure 3-9. EtAS の高次構造の決定（ゲルろ過 HPLC）

上図：分子量マーカー

用いた分子量マーカーは次のとおりであった。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（290 kDa）、乳酸デヒドロゲナーゼ（142.0 kDa）、エノラーゼ（67 kDa）、ミオキナーゼ（32.0 kDa）、シトクロム *c*（12.4 kDa）

下図：EtAS 精製酵素

16.76 min に EtAS のピークが検出された。22.79 min のピークは塩などの不純物のピークであった。

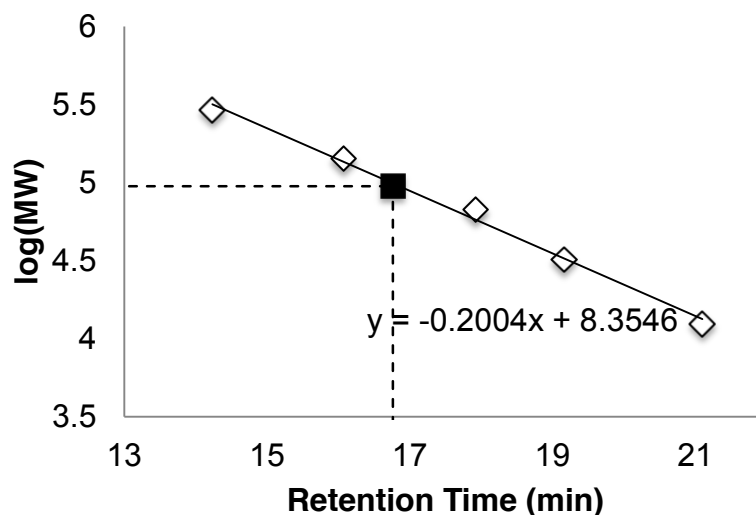


Figure 3-10. β -アミリン合成酵素の分子量測定（ゲルろ過 HPLC）

Figure 3-9の実測値について、x軸を保持時間、y軸をlog（分子量）でプロットした。

分子量マーカーから検量線（ $y = -0.2004x + 8.3546$ ）を作成し、EtASの観測された保持時間（16.76 min）を代入することで \log （分子量）= 5.32 であることがわかった。そこから、分子量（実測値）= 94.8 kDa を算出した。

3-4-2. CD 測定

本実験は増川により実施された。

CD 測定について

CD（Circular Dichroism）とは、円偏光二色性のことであり、内部構造がキラルな物質が円偏光を吸収する際に左円偏光と右円偏光に対して吸光度に差が生じる現象のことである。偏光とは電場および磁場が特定の方向にのみ振動する光のことである。CD スペクトルはタンパク質のフォールディングや二次構造を示す。

プロトコル

- 1) 第2章に従って酵素精製した。その際に Wash buffer（10 mM Tris-HCl（pH 7.9）、80 mM imidazole、250 mM NaCl、0.01% Brij 35）を 80 mL、Elute buffer（10 mM Tris-HCl（pH 7.9）、250 mM imidazole、250 mM NaCl、0.01% Brij 35）を 3 mL 用いた。
- 2) 0.01% Brij 35 を含む 50 mM リン酸カリウムバッファー（pH7.0）で透析した。
- 3) タンパク濃度が 0.1 mg/mL になるように調製した。
- 4) 5-40°C の範囲で CD スペクトルを測定した。

結果

Figure 3-11 の CD スペクトルから、野生株 β -アミリン合成酵素の高次構造は 5~30°C の範囲では変化がなく、30°C を超えると構造が崩れることがわかった。そしてこの CD スペクトルは SHC のそれと類似しており、更に異なる界面活性剤である β -OG でも同様のスペクトルが得られた。本研究は β -アミリン合成酵素で CD スペクトルを報告した初めての例となった。

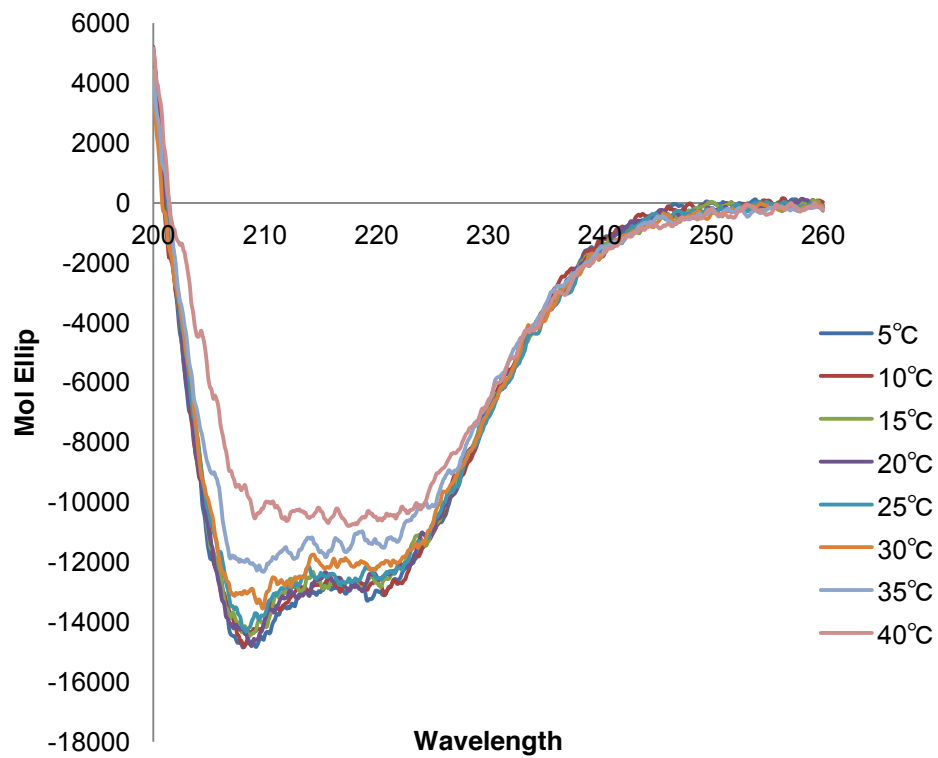


Figure 3-11. 野生株 β -アミリン合成酵素の CD スペクトル

3-5. 阻害剤を用いた酵素反応

本研究では3種の阻害剤 (2,3-iminosqualene; iminoSQ、Ro 48-8071、U18666A) について検討した。3種の阻害剤の構造を Figure 3-12 に示した。iminoSQ は基質(3S)-2,3-oxidosqualene をミミックした阻害剤である。Ro 48-8071 はヒト ラノステロール合成酵素の X線結晶構造解析にも用いられたトリテルペン環化酵素阻害剤の代表である。¹¹ また、U18666A も OSC 阻害剤として知られている。それぞれの阻害剤について IC₅₀、K_i、阻害様式を決定した。なお、iminoSQ は市販品がなかったため、有機合成により調製した。

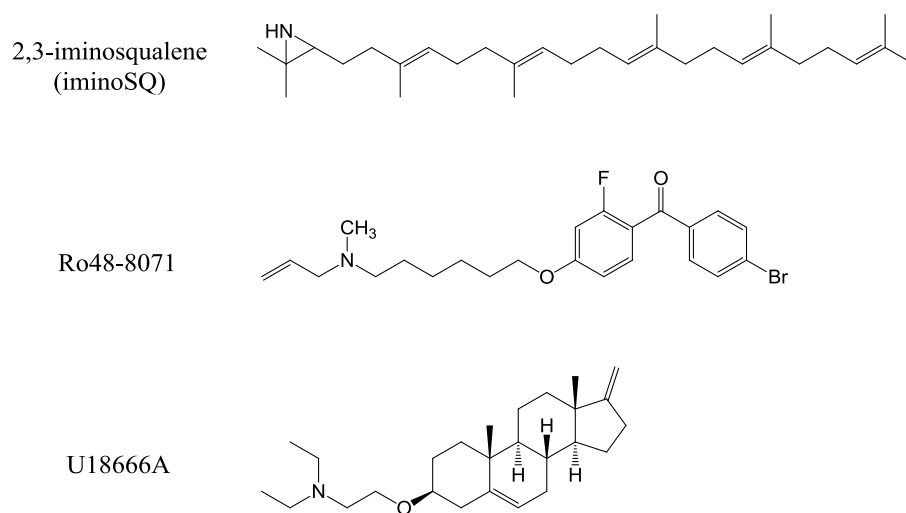


Figure 3-12. 用いた阻害剤の構造

iminoSQ は基質 OXSQ をミミックした阻害剤である。Ro48-8071 はヒト OSC の X線結晶構造解析にも使用されたトリテルペン環化酵素阻害剤の代表である。U18666A もトリテルペン環化酵素阻害剤として知られている。

3-5-1. 阻害剤とその阻害様式における概説

可逆的阻害

可逆的阻害様式とは、阻害剤が酵素と結合して反応を阻害しても、阻害剤が酵素から離れることによってその酵素が活性を取り戻すことができる阻害様式である。つまり、阻害剤が酵素と結合しているときは反応できないが、離れることによって反応を触媒することができるのである。この中で、酵素のみと結合して阻害する様式を**拮抗阻害**、酵素-基質複合体のみと結合して阻害する様式を**不拮抗阻害**という。そして、これら2つの様式を併せ持つ阻害様式には**非拮抗阻害**と**混合型阻害**がある。非拮抗阻害では基質と阻害剤の酵素に対する結合は完全に独立しているが、混合型阻害ではこれらの結合が完全に独立していない。Figure 3-13 に簡略図を示した。これらの阻害様式は両逆数プロット (Lineweaver-Burk plot) を用いることによって判別できる。

Enzyme Inhibition (Mechanism)

	拮抗阻害 competitive inhibition	非拮抗阻害 non-competitive inhibition	不拮抗阻害 uncompetitive inhibition
Cartoon Guide	<p>Substrate Inhibitor Compete for active site</p>	<p>Different site</p>	
Equation and Description	$E + S \xrightleftharpoons[K_M]{k_{cat}} ES \rightarrow E + P$ $I \rightleftharpoons KI \quad \downarrow K_i$ EI <p>[I] binds to free [E] only. And competes with [S]; increasing [S] overcomes Inhibition by [I].</p>	$E + S \xrightleftharpoons[K_M]{k_{cat}} ES \rightarrow E + P$ $I \rightleftharpoons KI \quad \downarrow K_i \quad I \rightleftharpoons \alpha KI$ $EI + S \rightleftharpoons EIS$ <p>[I] binds to free [E] or [ES] complex; Increasing [S] can not overcome [I] inhibition. Non-competitive : $\alpha = 1$ Mixed non-competitive inhibition : $\alpha \neq 1$</p>	$E + S \xrightleftharpoons[K_M]{k_{cat}} ES \rightarrow E + P$ $I \rightleftharpoons KI' \quad \downarrow K_i'$ EIS <p>[I] binds to [ES] complex only; increasing [S] favors the inhibition by [I].</p>

Enzyme Inhibition (Mechanism)

	非拮抗阻害 non-competitive inhibition	
Cartoon Guide		
Equation and Description	$E + S \xrightleftharpoons[K_M]{k_{cat}} ES \rightarrow E + P$ $I \rightleftharpoons KI \quad \downarrow K_i \quad I \rightleftharpoons \alpha KI$ $EI + S \rightleftharpoons EIS$ <p>[I] binds to free [E] or [ES] complex; Increasing [S] can not overcome [I] inhibition. Non-competitive : $\alpha = 1$ Mixed non-competitive inhibition : $\alpha \neq 1$</p>	

Figure 3-13. 酵素阻害剤のメカニズム

Lineweaver-Burk plot を用いた可逆的阻害様式の判別

Lineweaver-Burk plot は x 軸に基質濃度の逆数、y 軸に反応速度の逆数をとったプロットである。このプロットは拮抗阻害の場合において、 V_{\max} が一定なので $1/V_{\max}$ に収束し、阻害剤濃度が増すごとに近似直線の傾きが増すという特徴を持つ。反拮抗阻害の場合、阻害剤濃度が増しても近似直線の傾きが変化しないが、 $1/V_{\max}$ が増加するため平行する。そして非拮抗阻害及び混合型阻害の場合は、阻害剤濃度が増すごとに $1/V_{\max}$ が増加し、近似直線の傾きも増加するという特徴となる。非拮抗阻害の場合、x 軸上にて収束する。このとき $K_S=K_i$ となり、酵素は基質と阻害剤に対して同じ親和性を示す。これらの変動について Figure 3-14 にまとめた。

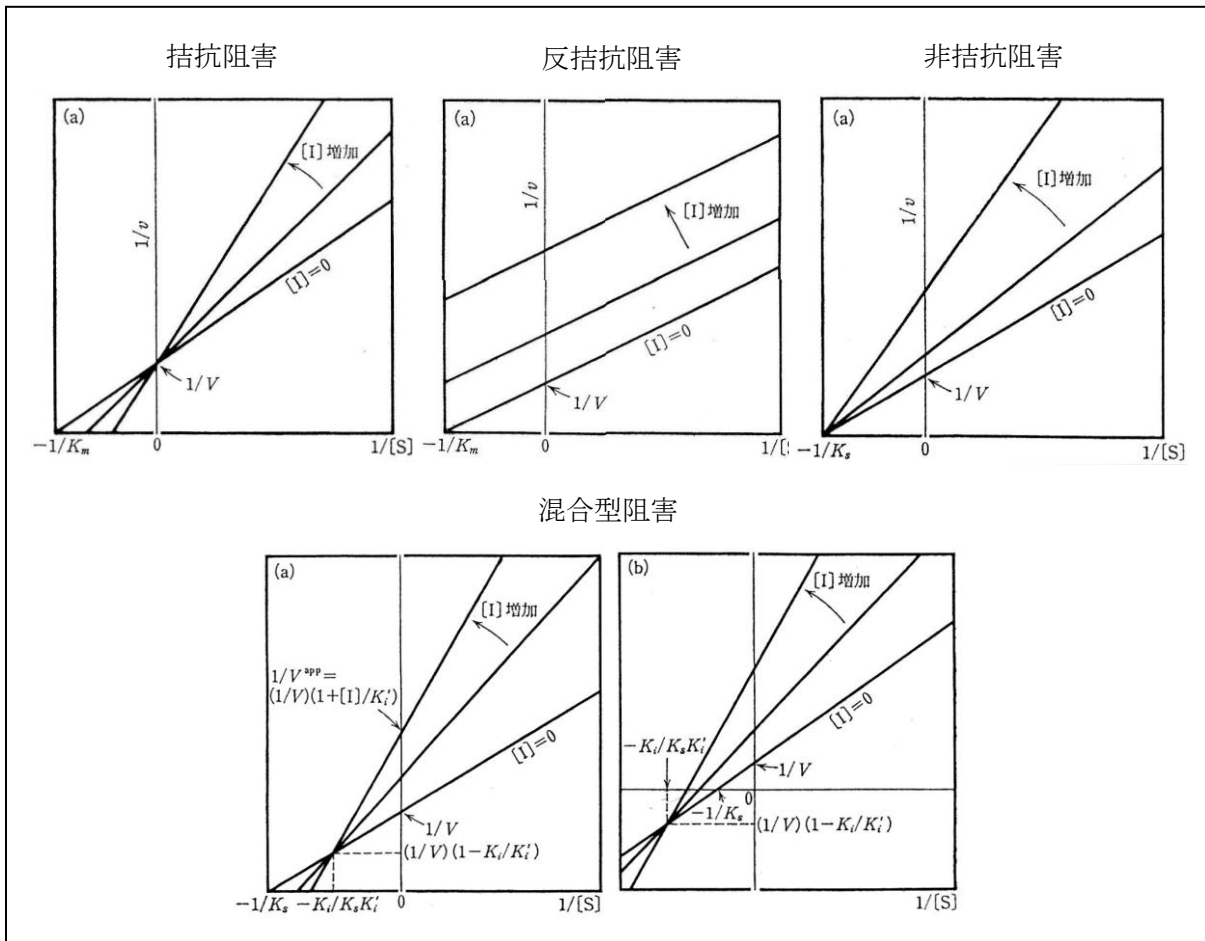


Figure 3-14. 可逆的阻害様式による Lineweaver-Burk-plot の変動

(酵素キネティクス「中村隆雄 著」より引用)

Dixon plot による可逆的阻害の K_i の決定⁷⁷

2 つ以上の基質濃度で、種々の濃度の阻害剤を酵素に作用させて速度論解析する。 $1/v$ と阻害剤濃度でプロットし、その交点が $-K_i$ となる (Figure 3-15a)。不拮抗阻害の場合は $[S]/v$ と阻害剤濃度でプロットし、その交点が $-K_i$ となる (Figure 3-15b)。

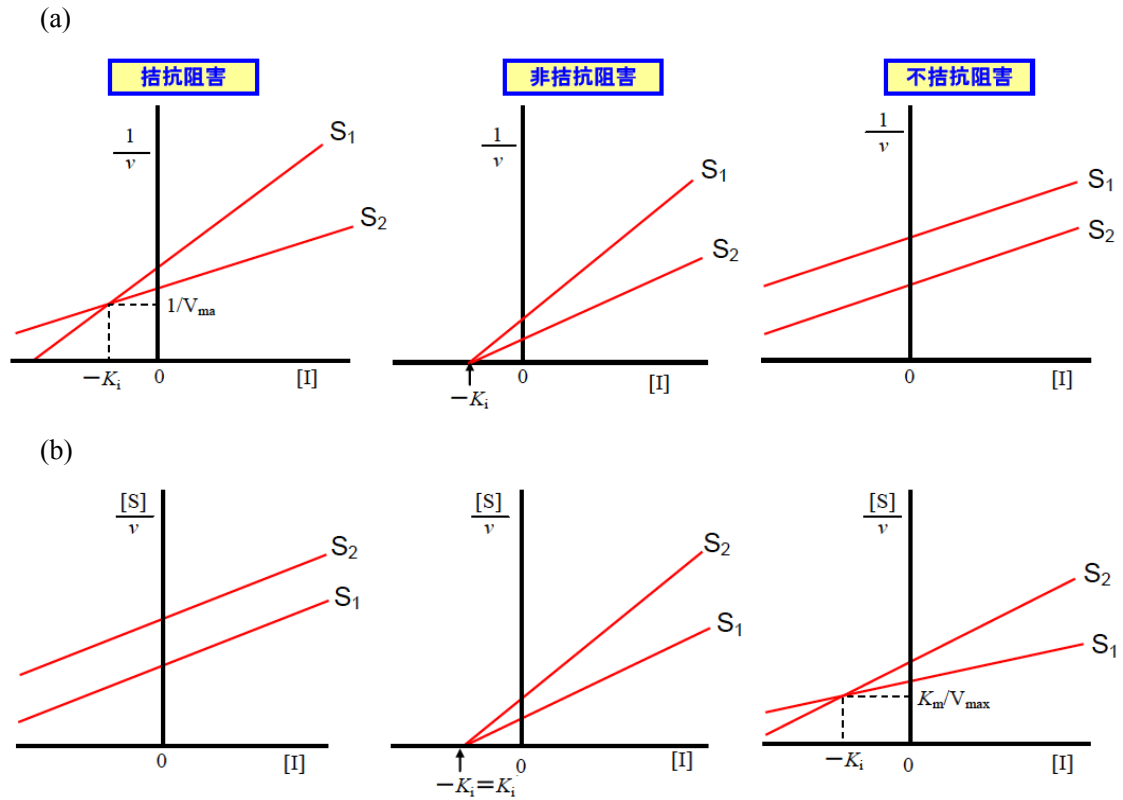
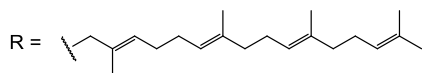
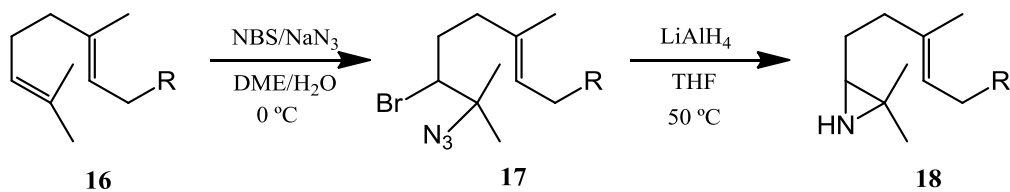


Figure 3-15. Dixon plot による K_i の決定

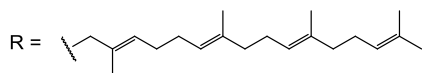
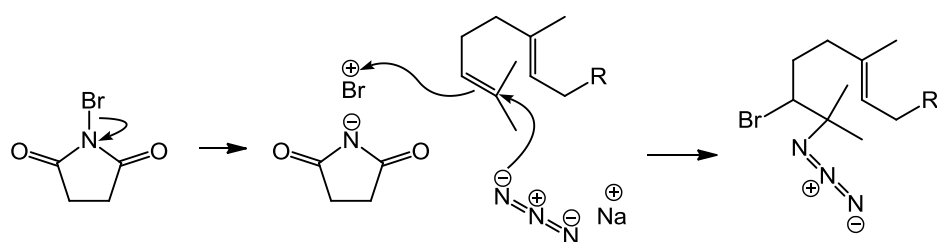
- (a) x 軸：阻害剤濃度、y 軸： $1/v$
 (b) x 軸：阻害剤濃度、y 軸： $[S]/v$

図は <http://www.sc.fukuoka-u.ac.jp/~bc1/Biochem/EnzInh.htm> より引用した。

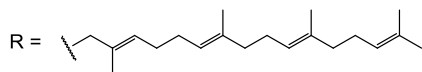
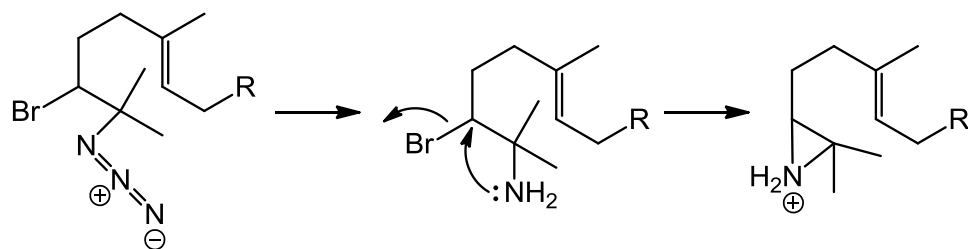
3-5-2. iminoSQ の合成⁷⁸⁻⁸⁰



Scheme 3-1. iminoSQ の合成スキーム



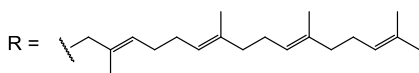
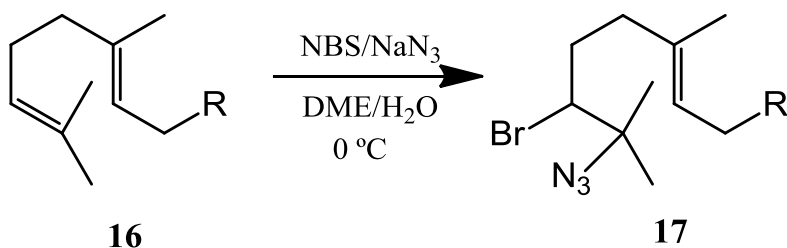
Scheme 3-2. Br/N₃ 17 の合成の反応機構



Scheme 3-3. Br/N₃ 17 の LAH 還元反応機構

アジドからアミンを生成する反応機構は解明されていないため、示さなかった。

Br/N₃の合成



Scheme 3-4. Br/N₃の合成スキーム

原料

スクアレン **16** (M.W.=410) 1000 mg (2.44 mmol)

試薬

N-bromosuccinimide (M.W.=178) 608 mg (3.42 mmol ; 1.4 等量)

Sodium azide (M.W.=65) 793 mg (12.2 mmol ; 5 等量)

反応操作

- 1) 窒素気流下、0°Cでスクアレン **16** を dimethoxyethane 20 mL に溶解させ、そこに脱塩水 2.4 mL に溶解させた NaN₃ 793 mg を加え、10分攪拌した。
- 2) NBS 608 mg を少しずつ加えた。
- 3) 3時間後、TLCで反応を確認し、反応液を氷水中にあけた。
- 4) 酢酸エチル 30 mL で3回抽出した。
- 5) 有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮した。

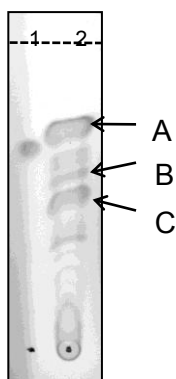


Figure 3-16. Br/N₃ **17** 反応確認の TLC

展開溶媒 ヘキサン : 酢酸エチル=100 : 1、発色試薬 ヨウ素

レーン 1 : 原料スクアレン **16** (Rf 値 = 0.68)、レーン 2 : 反応液 (スポット A : スクアレン、スポット B : Rf 値 = 0.57、スポット C : Rf 値 = 0.49)

精製 SiO₂ カラムクロマトグラフィー (ヘキサンのみ) により精製した。

収率 173.3 mg (13.3%) (スポット C)

Figure 3-16 のスポット B と C について

スポット B と C は GC/MS では、熱分解され、正確なチャートを得ることができなかった。そのため、各スポットを単離し、Direct LC-TOFMS で測定した結果、スポット C から Br/N₃ 17 の分子量が検出された。なお、Br/N₃ は臭素をもつため、M+H⁺=532、534 が分子イオンピークとして検出された。(Figure 3-17)

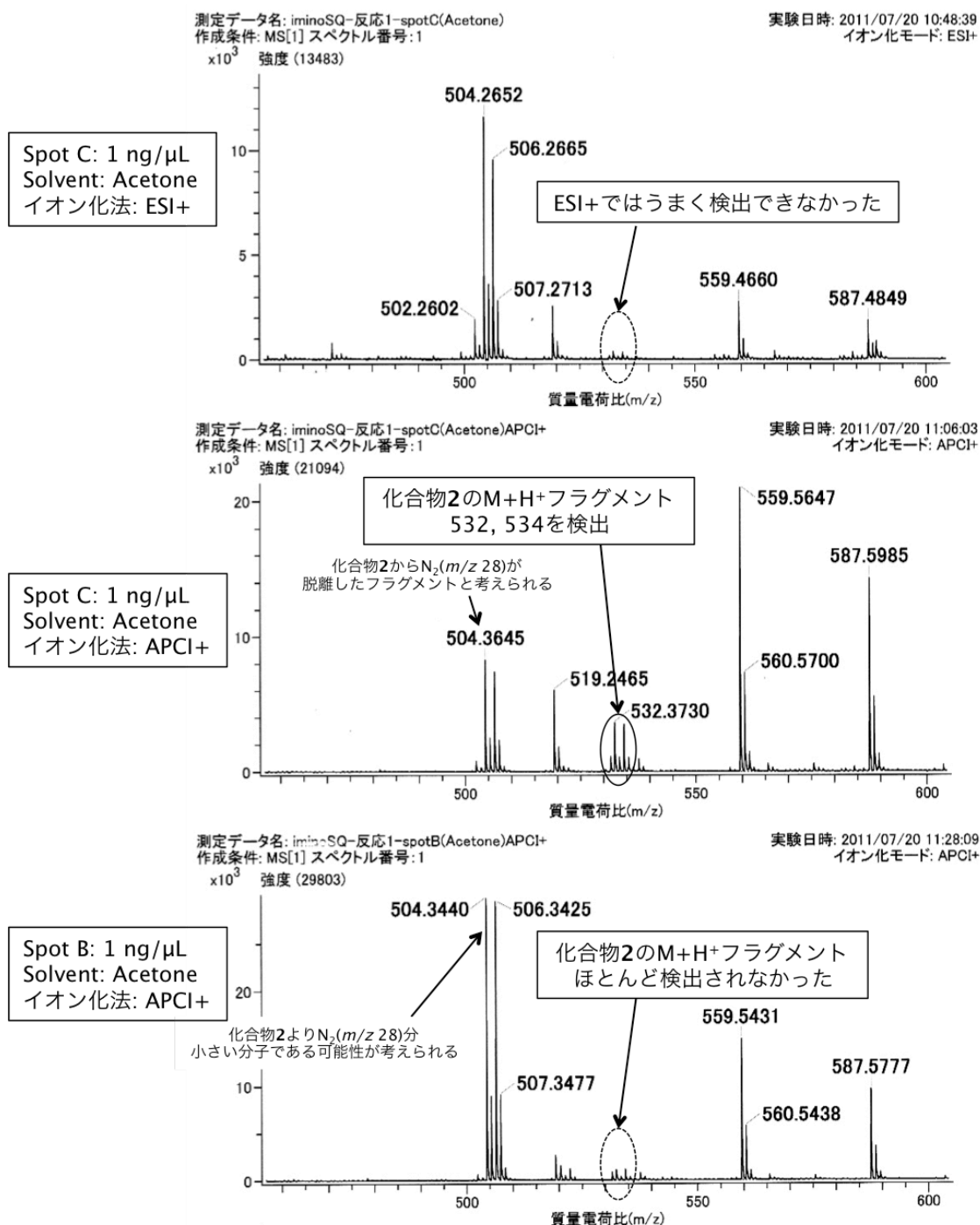
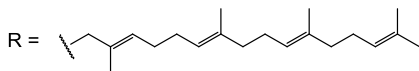
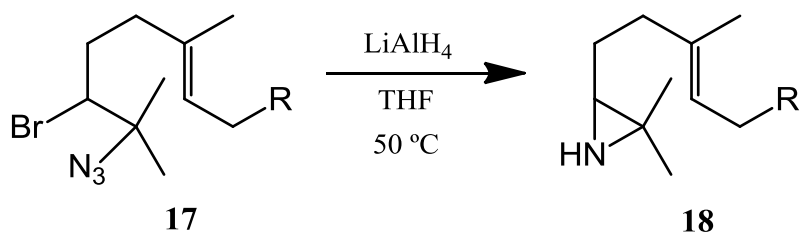


Figure 3-17. スポット B と C の Direct LC-TOFMS 結果

LAH 還元



Scheme 3-5. Br/N₃ **17** の LAH 還元

原料

化合物 **17** (M.W.=542) 36.9 mg (68.3 nmol)

試薬

Lithium aluminium hydride (M.W.=38) 64.9 mg (1.71 mmol ; 25 等量)

反応操作

- 1) 窒素気流下で化合物 **17** 36.9 mg を THF 20 mL に溶解し、50°C で湯せんして攪拌した。
- 2) LAH 64.9 mg を少しずつ加えた。
- 3) 1.5 時間経、TLC で反応が進まなくなったことを確認し、酢酸エチル : 28%アンモニア水 = 1 : 1 (50 mL) を加えて一晚攪拌し、試薬を失活させた。
- 4) ミリポアろ過で固体を取り除いた。
- 5) ろ液を分液し、水層を酢酸エチル 20 mL で 3 回抽出した。
- 6) 有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮した。

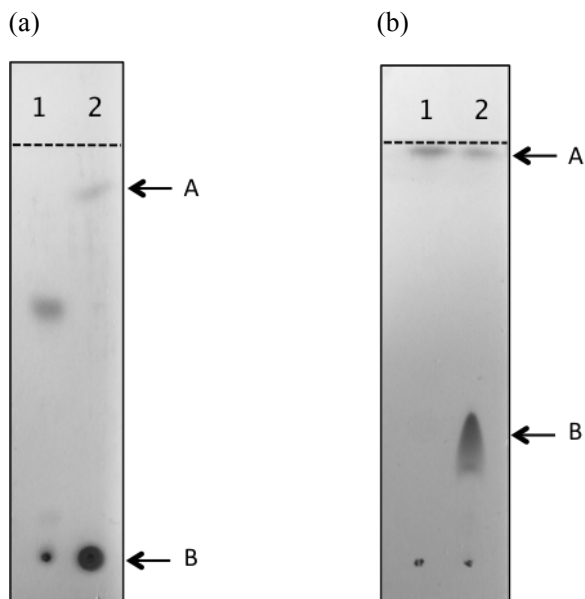


Figure 3-18. LAH 還元確認の TLC

(a) 展開溶媒 ヘキサン：酢酸エチル=100：1、ヨウ素発色

レーン 1：原料（化合物 **17**；Rf 値=0.61）、レーン 2：反応液（スポット A：スクアレン；Rf 値=0.89、スポット B：iminoSQ **18**；Rf 値=0）

(b) 展開溶媒 酢酸エチル：28%アンモニア水=100：0.35、ヨウ素発色

レーン 1：原料（化合物 **17**；Rf 値=0.98）、レーン 2：反応液（スポット A：スクアレン；Rf 値=0.98、スポット B：iminoSQ **18**；Rf 値=0.33）

精製

SiO₂ カラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル：28%アンモニア水=100：20：0.42～酢酸エチルのみ）により分画し、逆相 HPLC によりスポット B を精製した（Figure 3-19）。なお、精製したスポット B を NMR、Direct-LC/HRMS で iminoSQ **18** であることを確認した。

収率

21.8 mg (73.9%)

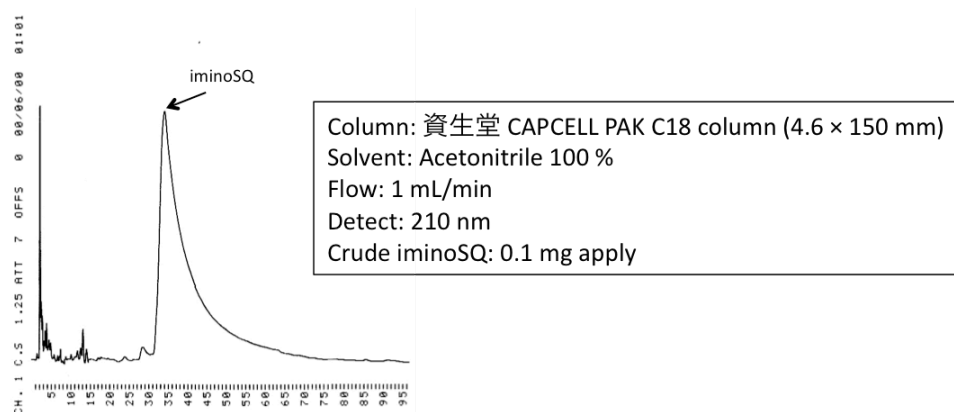


Figure 3-19. iminoSQ **18** の精製（逆相 HPLC）

3-5-2. 阻害剤を用いた酵素反応

- 1) Table 3-4 に示した組成について、酵素を除いた反応混合液を調製した。
- 2) 30°C、3 min プレインキュベーションした。
- 3) 酵素を添加して 20 min インキュベーションした。
- 4) 100°C、3 min で酵素反応を停止させた。
- 5) 内部標準としてスクアレン 30 µg を添加した。
- 6) 1.2 倍量 (3 mL) の 15% KOH/MeOH でケン化した。
- 7) 4 mL のヘキサンで 3 回抽出した。
- 8) SiO₂ ショートカラムクロマトグラフィーにより Triton X-100 を除去した。
- 9) GC で定量解析した。
- 10) Excel の Solver により K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} を算出した。

Table 3-4. EtAS 酵素反応条件

	終濃度
EtAS enzyme	2 µg
(3S)-OXSQ	0-113 µM
inhibitor	0-500 nM
DTT	1 mM
Potassium phosphate buffer (pH7.0)	0.1 M
Triton X-100	0.05% (w/v)
Total	2.5 mL

3-5-3. 結果と考察

各阻害剤の阻害定数を Table 3-5~3-7 にまとめた。 K_i 値は Dixon plot から算出した。

iminoSQ は基質 OXSQ をミミックした阻害剤であるにもかかわらず、その阻害実験例は少なく、本研究が 3 例目の報告となった。そして、iminoSQ は従来の 2 例と比べて EtAS 活性を強力に阻害し、30.9 nM の IC_{50} 値と 13.4 nM の K_i 値を示した。Corey らは iminoSQ によるブタ肝臓ラノステロール合成酵素の強力な阻害を最初に報告した。⁷⁸ また、Duriatti らは、iminoSQ はエンドウの β -アミリン合成酵素 (IC_{50} : 0.3 µM、 K_i : 0.2 µM) やラット肝臓ラノステロール合成酵素 (IC_{50} : 0.3 µM、 K_i : 0.4 µM) もまた阻害し、両酵素は iminoSQ により非拮抗阻害を受けたと報告した。⁸¹ これに対し、本研究では EtAS は iminoSQ により拮抗阻害を受け、Duriatti らの報告した阻害定数よりも非常に低い値を示した。iminoSQ の N 原子は生理的 pH ではプロトン化され、アジリジウムイオンとなっており、これはプロトン化されたオキシラン環をミミックしている。故に、阻害は非拮抗阻害ではなく、拮抗阻害であるように思われる。

Ro48-8071 もまた強力な阻害剤であった (IC_{50} : 10.7 nM、 K_i : 7.0 nM)。Ro48-8071 はウシ⁸²、ラット^{81,83}、ヒト^{11,24,84} 由来のラノステロール合成酵素や SHC^{83,85} に対しても強力な阻害を示した。EtAS に対する IC_{50} (10.7 nM) はラノステロール合成酵素や SHC に対するそれと同様の値であった。Lineweaver-Burk plot では混合型阻害であると示唆された。Abe らにより報告された Lineweaver-Burk plot からは Ro48-8071 はラット ラノステロ

ール合成酵素に対しても混合型阻害を示したと考えられたが、論文では非拮抗阻害として報告されていた⁸³。混合型阻害は活性部位以外にも結合サイトを有する阻害様式である。しかしながら、Ro48-8071 とヒト ラノステロール合成酵素との複合体について、蛍光滴定実験から 1 : 1 の結合比率をもち²⁴、X-線結晶構造解析から活性部位に存在していることが示された。¹¹これはつまり、Ro48-8071 がヒト ラノステロール合成酵素に対して拮抗阻害を示すことを意味している。そのため、EtAS においても Ro48-8071 は拮抗阻害を示す可能性が考えられる。この速度論解析と X-線データとの間の不一致について、Ruf ら²⁴や Lenhart ら⁸⁵は、酵素活性において、ミセル中での基質や阻害剤の異なるアクセシビリティの結果として、キネティックに影響したのかもしれないと説明している。ヒト ラノステロール合成酵素結晶構造解析から、Ro48-8071 は活性部位において次のように結合していることが報告された¹¹。(1) D455 とアミンの N 原子との水素結合、(2) F696 と H232 によるフルオロフェニル基の固定、(3) W192、W230 と F521 と末端プロモフェニル基との相互作用。これらの Asp、Trp や Phe 残基は EtAS、ウシ OSC、ラット OSC や SHC 間でも高度に保存されている。これら高度に保存されている残基と Ro48-8071 の相互作用のためにこの阻害剤が強力な阻害を示した可能性が考えられる。

U18666A はラット肝臓 OSC とエンドウの β -アミリン合成酵素で IC₅₀ の報告はあるが、阻害様式の報告はなく、EtAS はトリテルペン環化酵素として U18666A により受ける阻害様式（非拮抗阻害）を決定した初めての例となった。非拮抗阻害は阻害剤が活性部位以外に結合する阻害様式であるため、U18666A は EtAS の活性部位以外に結合し、酵素の高次構造を変化させたために酵素活性を低下させたと考えられる。

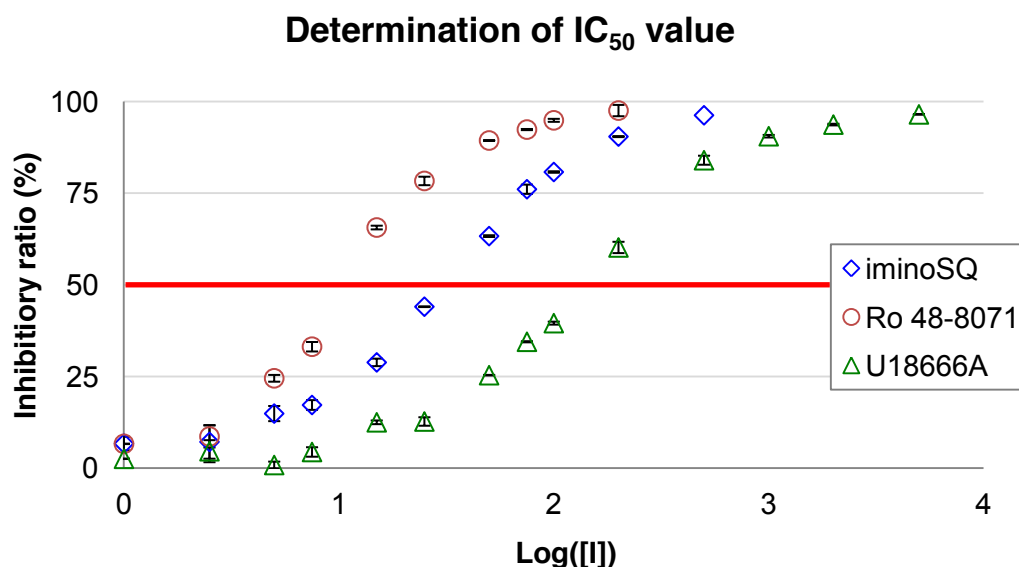


Figure 3-20. 3種の阻害剤の EtAS に対する IC₅₀ 値

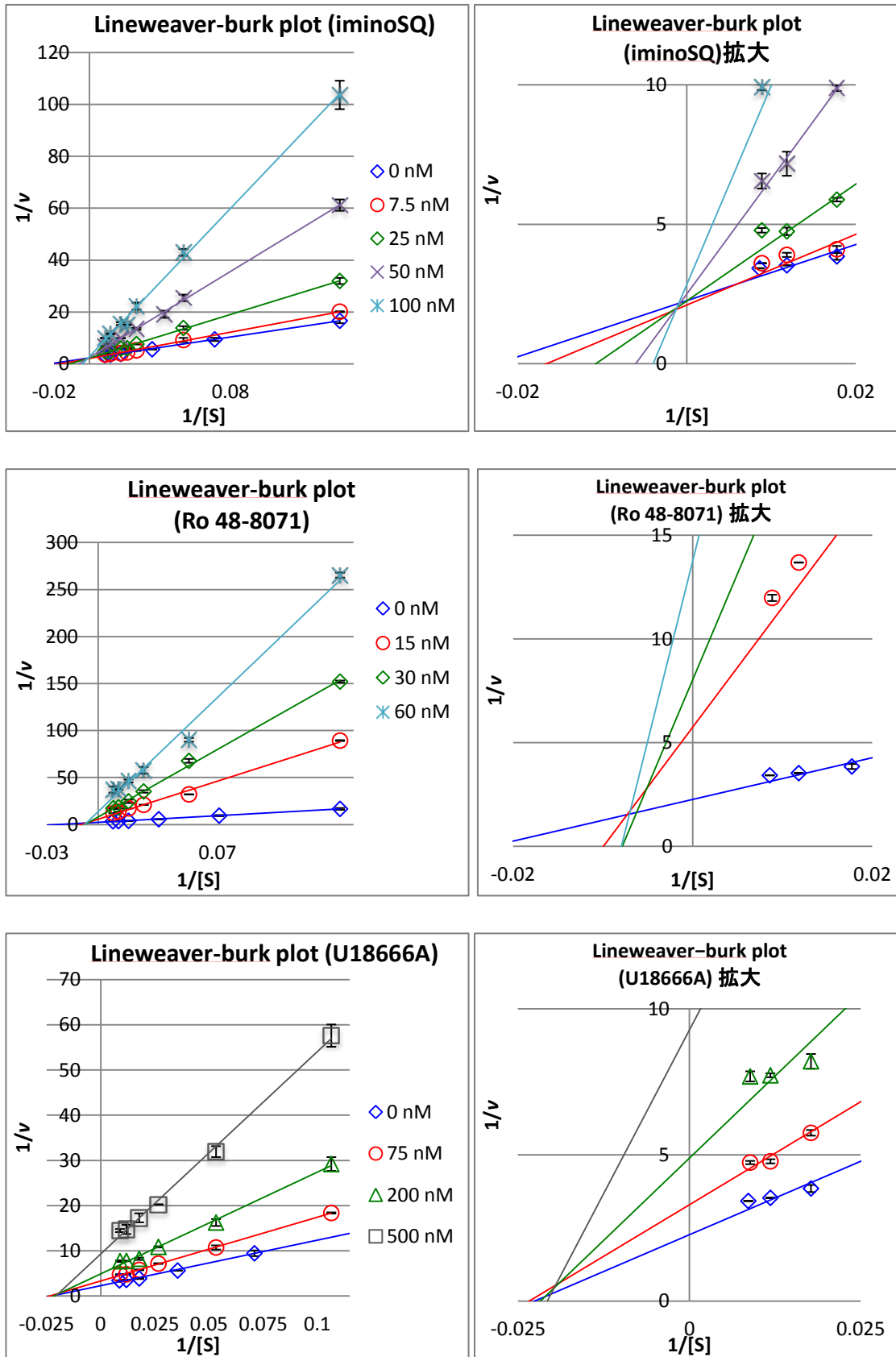


Figure 3-21. 3種の阻害剤のEtASに対する阻害様式の決定 (Lineweaver-Burk plot)

iminoSQ: 拮抗阻害、Ro48-8071: 混合型非拮抗阻害、U18666A: 非拮抗阻害とわかった。

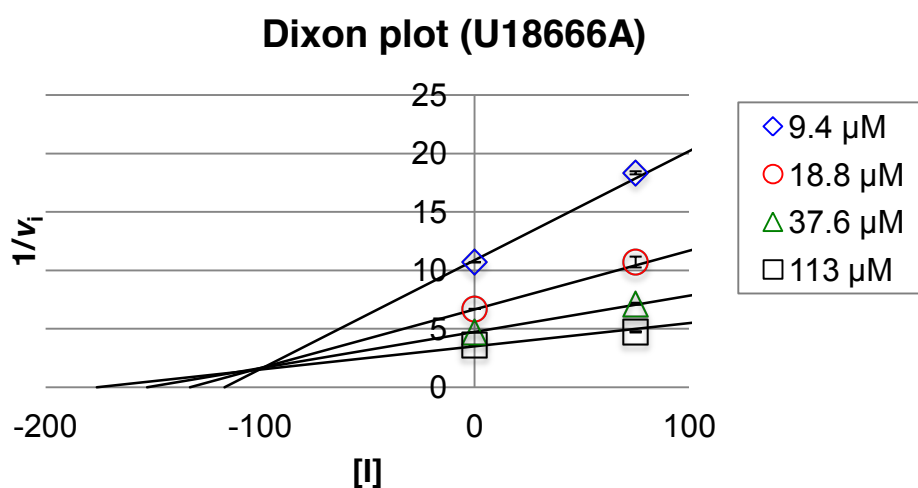
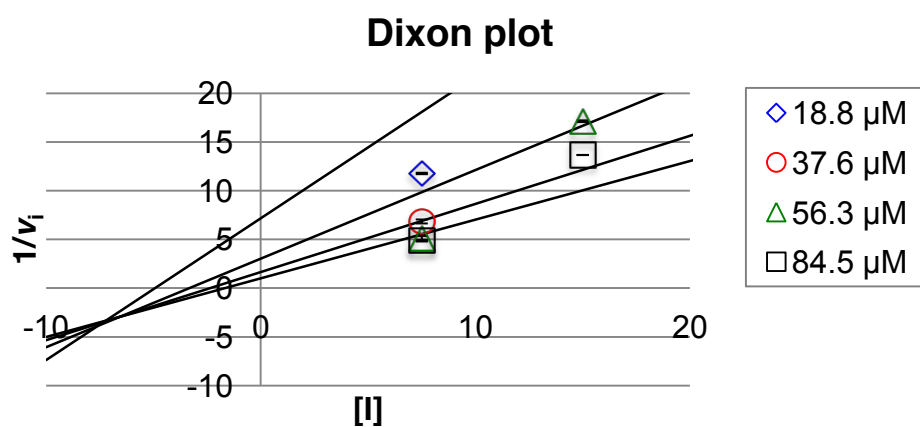
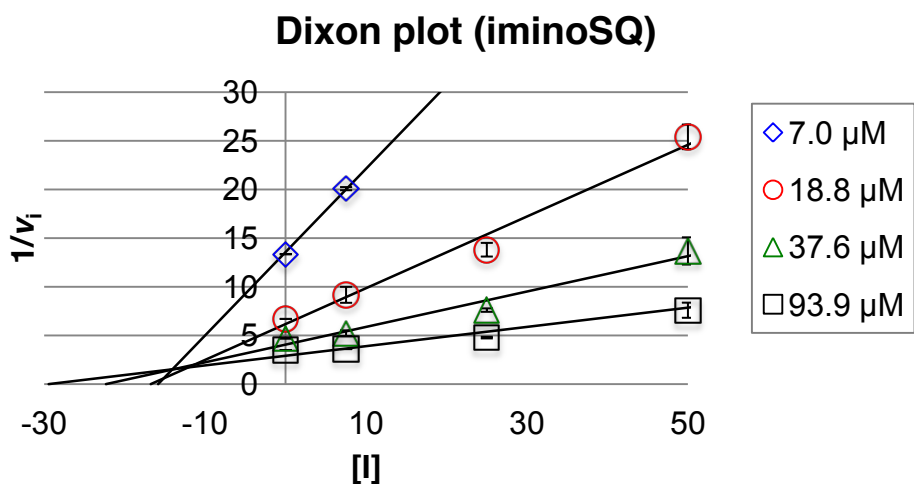


Figure 3-22. 3種の阻害剤の K_i 値の決定 (Dixon plot)

Dixon plot の交点の x 座標が $-K_i$ を示しているため、各阻害剤の K_i 値は、iminoSQ : 13.4 ± 1.3 nM、Ro48-8071 : 6.98 ± 0.42 nM、U18666A : 102 ± 4.4 nM であることがわかった。

Table 3-5. iminoSQ の種々のトリテルペン環化酵素に対する阻害定数

	iminoSQ		
	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	Inhibitory type
EtAS	30.9	13.4 ± 1.3	competitive
pea β-amyrin synthase ⁸¹	300	200	non-competitive
bovine lanosterol synthase ⁸²	NR	NR	NR
rat lanosterol synthase ^{24,81}	300 ⁸¹	400 ⁸¹	non-competitive
human lanosterol synthase ^{11,24}	NR	NR	NR
squalene-hopene cyclase ^{83,85}	NR	NR	NR

iminoSQ は基質 OXSQ をミミックした阻害剤であるにもかかわらずその阻害実験例が少なかった。また、これまでに報告されていたものは拮抗阻害であったが、本研究では拮抗阻害を示した。

Table 3-6. Ro48-8071 の種々のトリテルペン環化酵素に対する阻害定数

	Ro48-8071		
	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	Inhibitory type
EtAS	10.7	6.98 ± 0.42	mixed non-competitive
pea β-amyrin synthase ⁸¹	NR	NR	NR
bovine lanosterol synthase ⁸²	11	NR	NR
rat lanosterol synthase ^{24,81}	40 ²⁴	22 ²⁴	non-competitive ⁸¹ mixed non-competitive ²⁴
human lanosterol synthase ^{11,24}	6.5 ¹¹ (cf. 8.0 ²⁴ for NR recombinant)		Competitive ²⁴
squalene-hopene cyclase ^{83,85}	9.0 ⁸³ 61.0 ⁸⁵	6.6 ⁸³ NR ⁸⁵	non-competitive ⁸³ mixed non-competitive ^{24,85}

Ro48-8071 はトリテルペン環化酵素で幅広く阻害実験が行われてきた。トリテルペン環化酵素に対して普遍的におおよそ 10 nM 程度の IC₅₀ を示す非常に強い阻害剤である。

Table 3-7. U18666A の種々のトリテルペン環化酵素に対する阻害定数

	U18666A		
	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	Inhibitory type
EtAS	142	102 ± 4.4	non-competitive
pea β-amyrin synthase ⁸¹	250	NR	NR
bovine lanosterol synthase ⁸²	NR	NR	NR
rat lanosterol synthase ^{24,81}	800 ⁸¹	NR	NR
human lanosterol synthase ^{11,24}	NR	NR	NR
squalene-hopene cyclase ^{83,85}	NR	NR	NR

U18666A は阻害実験例が少なく、本研究で初めて阻害様式を決定することができた。

3-6. 環化開始部位への部位特異的変異導入

3-6-1. 背景と目的

OSCでのDCTAEモチーフやSHCでのDXDDモチーフはいずれも高度に保存されている。当研究室ではSHCでのDXDDモチーフを部位特異的変異導入した変異酵素の速度論解析から、このモチーフがSHCの環化開始のプロトン付加を担うことを証明した⁵⁷。OSCでのDCTAEモチーフはSHCでのDXDDモチーフに相当することから、OSCでのDCTAEモチーフも同様の機能があり、この中でDがプロトン付加を担うことが推測されてきた。そこでCoreyらは酵母ラノステロール合成酵素においてこのモチーフのDをNに置換して酵母の生存試験を行うことでこの推測を実証した⁴⁶が、これまでにこのモチーフの部位特異的変異酵素を用いた速度論解析例はなかった。

また、ヒトラノステロール合成酵素X線結晶構造解析に基づき、ThomaらはDCTAEモチーフのD455の酸性度がC456とC533との水素結合により高められていることを提唱した¹¹が、Cys残基の役割について速度論的な根拠はこれまでに報告されていなかった。

そこで本研究ではこれらの残基の機能を確かめるためにEtASにおいて4つの変異株(D485N、D485E、C486A、C564A)を設計した。

3-6-2. 変異株の作製

- 1) 変異を導入するためのプライマーを設計した。(Table 3-8)
- 2) アルカリミニプレップ法にて pYES2-EtAS/CT を抽出し、RNase 処理、PEG 沈し、精製した。
- 3) Table 4-3 に示したプライマーを用いて QuikChange 法により部位特異的変異導入した。
- 4) 電気泳動し、特異的増幅を確認した。
- 5) PCR 反応液に *DpnI* 1 μ L 添加し、37°C、2 h インキュベートした。
- 6) エレクトロポレーション法により *E. coli* DH5 α に形質転換した。
- 7) シングルコロニーからプラスミドをキットミニプレにより精製した。
- 8) キャピラリーシーケンサーにて変異導入を確認した。
- 9) 酢酸リチウム法により *S. cerevisiae* GIL77 へプラスミドを形質転換した。

Table 3-8. QuikChange 用プライマー (下線: 変異導入箇所)

導入残基		Sequence	塩基数
D485N	Forward	5'-CATGGTTGGCAAGTTTCT <u>AAT</u> TGCACTGCTGAAGG-3'	35
	Reverse	5'-CCTTCAGCAGTGCA <u>ATT</u> AGAACTTGCCAACCATG-3'	
D485E	Forward	5'-GGTTGGCAAGTTTCT <u>GAG</u> TGCACTGCTGAAGG-3'	32
	Reverse	5'-CCTTCAGCAGTGCA <u>CTC</u> AGAACTTGCCAACC-3'	
C486A	Forward	5'-GATCATGGTTGGCAAGTTTCTGAT <u>GCC</u> ACTGCTGAAGG-3'	38
	Reverse	5'-CCTTCAGCAGT <u>GGC</u> ATCAGAACTTGCCAACCATGATC-3'	
C564A	Forward	5'-GAACATGAATATGTAGAG <u>GCC</u> ACAGCATCTGCAATCCATG-3'	40
	Reverse	5'-CATGGATTGCAGATGCTGT <u>GGC</u> CTCTACATATTCATGTTC-3'	

Table 3-9. 設計した変異株

	野生株の構造	置換後の残基	置換後の残基の構造	機能
D485	$\text{C}-\text{C}(\text{OH})-\text{OH}$	Asn	$\text{C}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$	中性にする
		Glu	$\text{C}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{O})-\text{OH}$	鎖長を長くする
C486 C564	$\text{C}-\text{SH}$	Ala	$\text{C}-\text{CH}_3$	SH 基を除去

3-6-3. 変異株 EtAS を用いた *in vitro* での酵素反応

- 1) 第2章 2-10-1 に従って酵素精製した。
- 2) Table 3-10 に示した組成について、酵素を除いた反応混合液を調製した。
- 3) 30°C、3 min プレインキュベーションした。
- 4) 酵素を添加して 20 min インキュベーションした。
- 5) 100°C、3 min で酵素反応を停止させた。
- 6) 内部標準としてスクアレン 30 µg を添加した。
- 7) 1.2 倍量 (3 mL) の 15% KOH/MeOH でケン化した。
- 8) 4 mL のヘキサンで3回抽出した。
- 9) SiO₂ ショートカラムクロマトグラフィーにより Triton X-100 を除去した。
- 10) GC で定量解析した。
- 11) Excel の Solver により K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} を算出した。

Table 3-10. EtAS 酵素反応条件

	終濃度
Site-directed mutated EtAS enzyme	2 µg
(3S)-OXSQ	0-120 µg (0-113 µM)
DTT	1 mM
Potassium phosphate buffer (pH7.0)	0.1 M
Triton X-100	0.05% (w/v)
Total	2.5 mL

3-6-4. 変異株 EtAS の野生株 EtAS に対する酵母 *in vivo* での相対活性

【培養】

- 1) pYES2-EtAS/CT (野生株および変異株) プラスミドを導入した酵母 GIL77 株を培養、誘導した (100 mL 系)。
- 2) 集菌後、ペレットを超純水 6-7 mL に懸濁し、大試験管で凍結させた。
- 3) 凍結乾燥により完全に水分を飛ばした。
- 4) 菌体重量を測定し、ウェスタンブロッティング用に 0.05 g、プロダクト定量用に 0.2 g の菌体を量り取った。

【ウェスタンブロッティング】

- 1) ウェスタンブロッティング用菌体 0.05 g に超純水 1 mL、ガラスビーズ 1 g を加えた。
- 2) ボルテックス (30 sec x 12) により菌体を破碎した。
- 3) 破碎液 50 μ L と SDS-PAGE サンプルバッファー 50 μ L を混合した。
- 4) 90°C、15 min で処理し、SDS-PAGE サンプルとした。
- 5) 検量線用として野生株精製酵素を濃度調製し、同時に SDS-PAGE サンプルを作製した。
- 6) SDS-PAGE (ミニゲル、7.5%ポリアクリルアミドゲル) を行った。
- 7) ウェスタンブロッティングを行った。
- 8) FUJIFILM LAS3000 で撮影した。
- 9) Multi Gauge で解析した。

【プロダクト定量】

- 1) 菌体 0.2 g に対して内部標準 GGOH 100 μ g を加えた。
- 2) 15% KOH/MeOH 100 mL を加え、ケン化した。
- 3) 菌体をろ過し、ろ液を等量 (100 mL) のヘキサンで 3 回抽出した。
- 4) 抽出物を減圧濃縮し、1 mL の蒸留ヘキサンに溶かした。
- 5) GC で解析した (Injection 量は 1-3 μ L)。

【相対活性の算出】

以下の式の通りにして野生株に対する変異株の相対活性を算出した。

$$\frac{\text{(変異株の単位酵素量あたりのプロダクト生産量)}}{\text{(野生株の単位酵素量あたりのプロダクト生産量)}} \times 100 (\%)$$

3-6-5. CD 測定

【目的】

変異株の活性の変化が酵素高次構造の崩れによるかどうかを調べるため。

【方法】

- 1) 第2章に従って酵素精製した。その際に Wash buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、80 mM imidazole、250 mM NaCl、0.01% Brij 35) を 80 mL、Elute buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、250 mM imidazole、250 mM NaCl、0.01% Brij 35) を 3 mL 用いた。
- 2) 0.01% Brij 35 を含む 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) で透析した。
- 3) タンパク濃度が 0.1 mg/mL になるように調製した。
- 4) 5-40°C の範囲で CD スペクトルを測定した。

3-6-6. 結果と考察

【*in vitro* での酵素反応について】

Figure 3-23 より、変異株 EtAS の至適反応温度はわずかに低下したが野生株のそれ (30°C) とほとんど同じであった。D485N と D485E の活性は全ての温度で観測されなかった。C486A は野生株 EtAS に対して 50%程度の活性は保持された一方、C564 のそれはほとんど検出されなかった。各変異株の速度論定数を Table 3-11 に示した。D485N 変異株の活性が消失したことから、環化開始のためのプロトンドナーとして酸性カルボン酸残基である Asp が機能することが示唆された。しかし、酸性残基である D485E (Glu 変異株) もまた活性を示さなかった。このことは、Asp よりも CH₂分長い側鎖が影響し、カルボキシル基がエポキシ環にうまく接続できなかったためと考えられる。故に、D485 はその酸性に加え、長さも重要であることが示唆された。

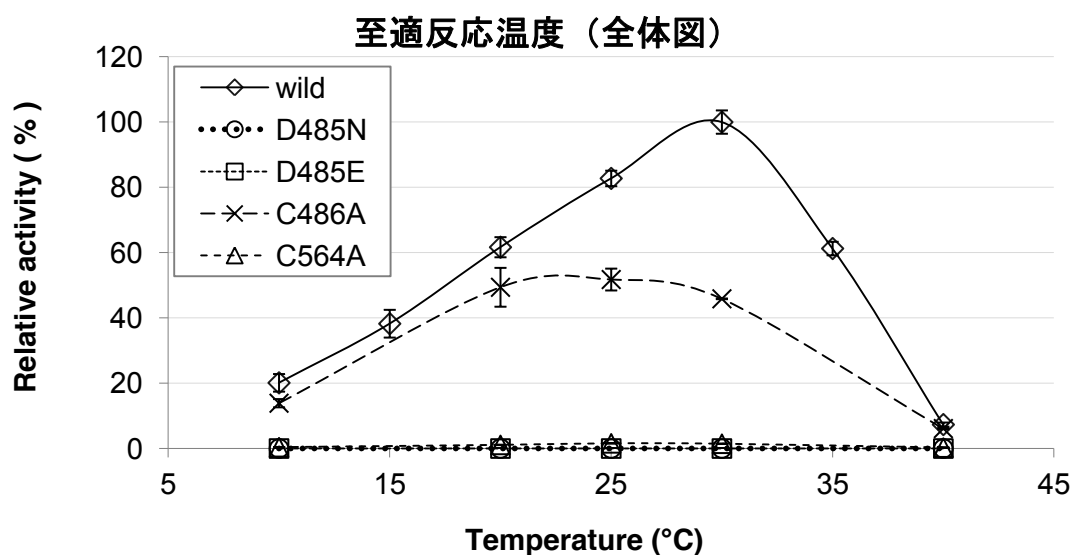
C564 と C486 とを比較すると、C564 の方が D485 とより強く水素結合していることが示唆された。それは、C564A の活性 (野生株の 1.6%) が C486A (~50%) に比べて著しく低下したためである。また、いずれの変異株の CD スペクトルも野生株のそれとほぼ同様の結果を示したことから、変異株の高次構造には変化がなく、酵素活性の低下は部位特異的変異導入によるものであることが示唆された (Figure 3-26)。

【*in vivo* での相対活性について】

OSC 変異株はしばしば活性の低下や消失が見られた。そこで、*in vivo* で部位特異的変異株の機能を調べるためにウェスタンブロッティングにより酵素発現量を定量し、プロダクト生産量との相関関係から酵素活性を見積もる手法を確立した。Figure 3-27 には各変異株の酵素発現量を、Figure 3-28 には酵母 *in vivo* での野生株に対する変異株の相対活性を示した。Figure 3-28 から、酵母 *in vivo* においても D485N と D485E の活性は観測されな

かった。C486A は野生株に対しておよそ 58%の活性が見られ、C564A のそれは 2.5%のみであった。これらの結果は *in vivo* 実験が *in vitro* 実験の結果と一致する。つまりこのことは、*in vitro* で非常に活性が弱く、 K_m や k_{cat} の測定が困難な変異株や発現量が低く活性測定が困難な変異株について、*in vivo* 実験により活性測定を代替できることを意味している。

(a)



(b)

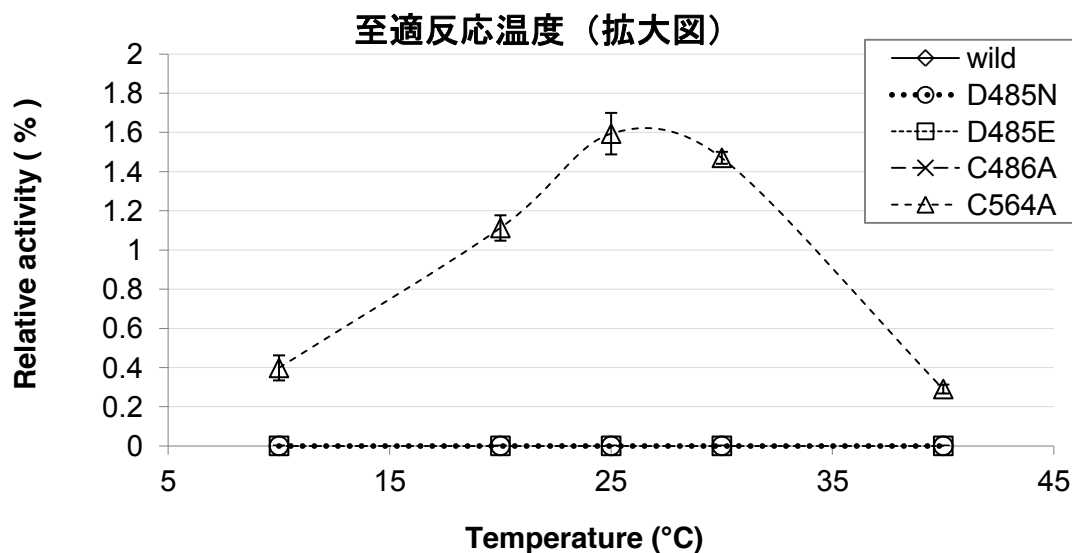


Figure 3-23. D485N、D485E、C486A、C564A の野生株 EtAS に対する相対活性と至適反応温度 (a) 全体図、(b) y 軸 0~2%の範囲の拡大図

反応温度 5~40°C (5°C 間隔) で測定した。野生株の 30°C での活性 (352 nmol/min/mg) を 100%として各温度での活性を相対値で表した。D485N、E 変異株ではどの温度でも活性が示されなかった。C486A、C564A は至適反応温度が 25~30°C と判断し、以降の酵素反応は野生株の至適反応温度である 30°C で行った。

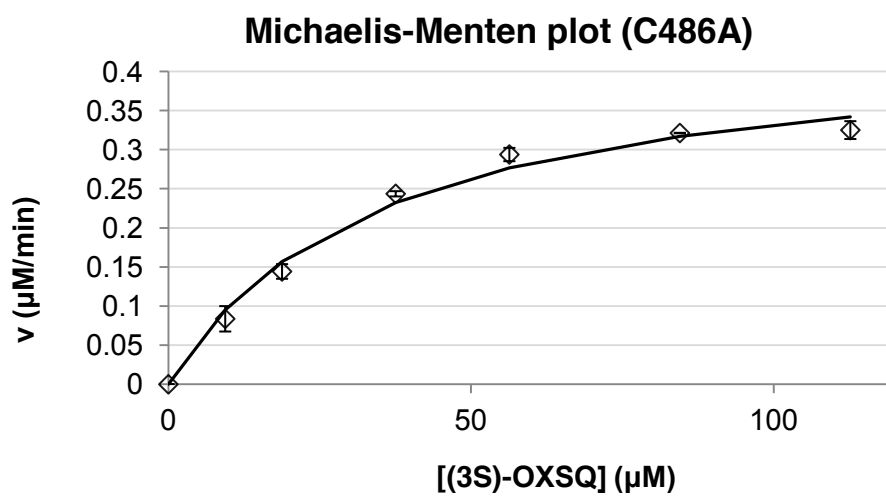


Figure 3-24. C486A の Michaelis-Menten plot
 基質濃度は 0、9.4、19、38、56、85、99、113μM で測定した。

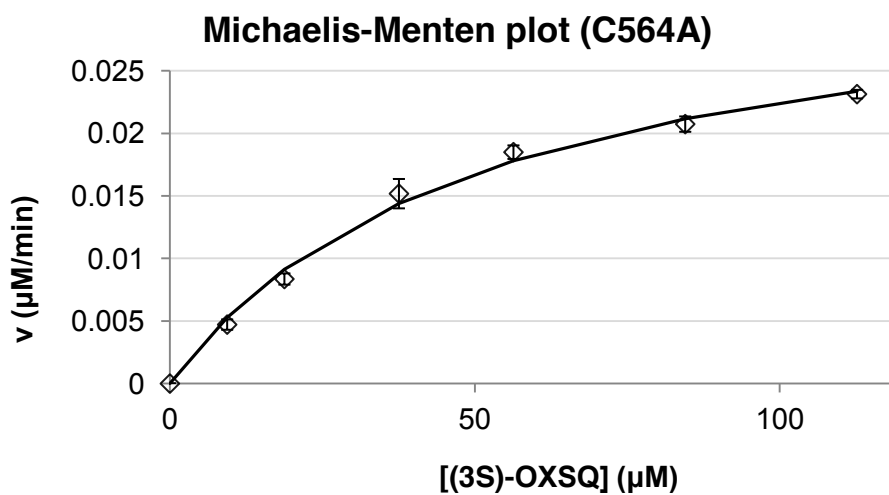


Figure 3-25. C564A の Michaelis-Menten plot
 質濃度は 0、9.4、19、38、56、85、99、113μM で測定した。

Table 3-11. D485N、D485E、C486A、C564A の速度論解析

	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Specific activity ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Relative activity (%) to the specific activity
Wild	33.8 ± 0.53	46.4 ± 0.68	1.37 ± 0.21	352 ± 11.8	100
D485N	ND	ND	ND	ND	0
D485E	ND	ND	ND	ND	0
C486A	34.8 ± 3.4	20.4 ± 1.0	0.59 ± 0.03	163 ± 5.7	46
C564A	51.1 ± 4.1	$0.77 \pm 3.6 \times 10^{-3}$	$0.015 \pm 6.9 \times 10^{-5}$	5.79 ± 0.085	1.6

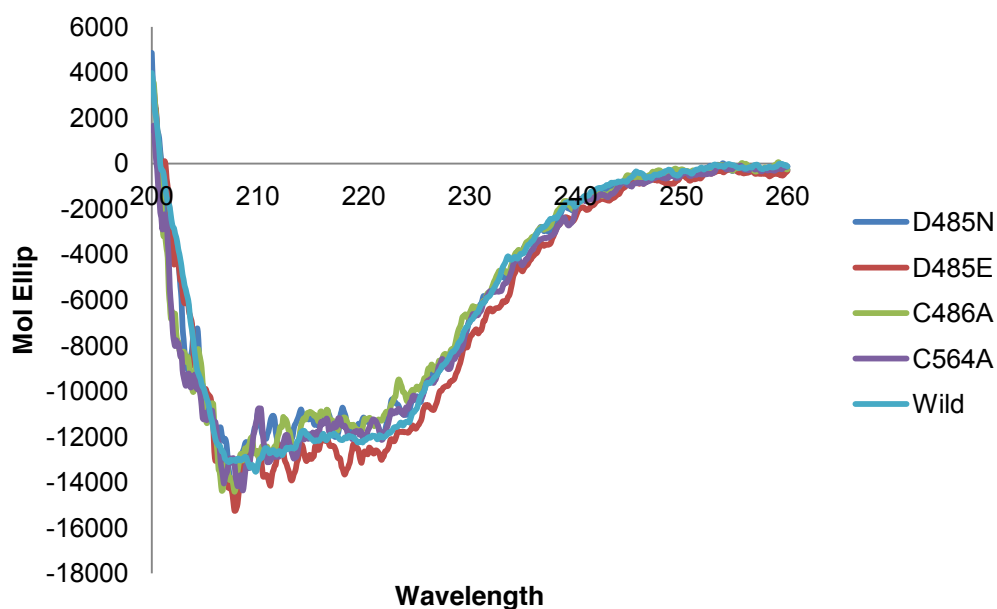


Figure 3-26. 野生株と変異株 β -アミリン合成酵素の CD スペクトル (測定温度 30°C)

野生株と変異株の 30°C での CD スペクトルをプロットし、変異導入によるタンパクの構造に崩れがないことを確認した。

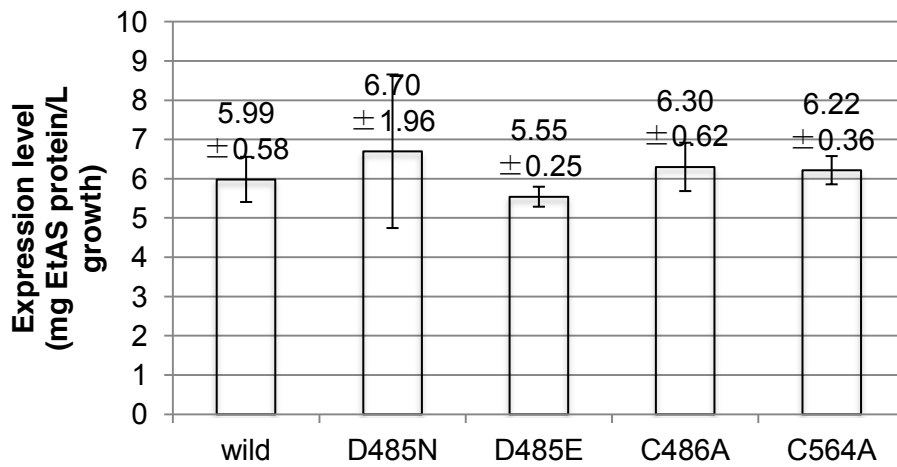


Figure 3-27. 野生株と4種の変異株β-アミリン合成酵素の酵素発現量
1 L培養酵母内で発現されたEtASタンパク量 (mg) をウェスタンプロテイングにより定量した。

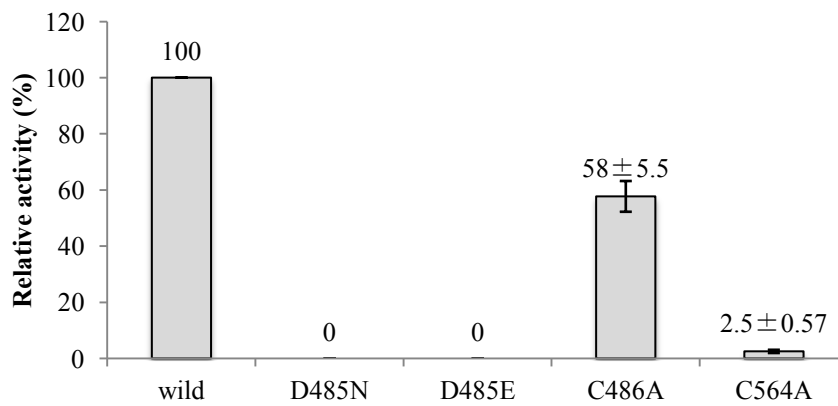


Figure 3-28. 酵母 *in vivo* での野生株に対する変異株の相対活性
野生株 EtAS の活性を 100% として、変異株の活性を相対値で表した。

第 4 章

F728 残基の機能解析

4-1.	背景と目的	120
4-2.	マルチプルアラインメント	121
4-3.	ホモロジーモデリング	122
4-4.	SHC F601 残基	123
4-5.	<i>S. cerevisiae</i> ラノステロール合成酵素 F699 残基	125
4-6.	変異株の作製	127
4-7.	プロダクトプロファイル	129
4-8.	野生株に対する変異株の相対活性	140
4-9.	CD 測定	146
4-10.	F728 残基のまとめ	148
4-11.	プロダクトのスペクトルデータ	149

4-1. 背景と目的

1 次代謝系 OSC であるラノステロールやシクロアルテノール合成酵素に比べ、2 次代謝系 OSC である β -アミリンやルペオール合成酵素では変異導入実験例が非常に少なく、これまでに部位特異的変異導入実験の報告は *P. ginseng* 由来 β -アミリン合成酵素 (PNY1) の W259 と Y261 での 1 報のみであった³⁴。しかしながら、これらの変異株の酵素活性に関する知見は報告されておらず、この他の β -アミリン合成酵素で高度に保存されている残基についての機能解析は報告されていなかった。第 3 章で報告したように、本博士論文研究において酵母 GIL77 株を宿主とした EtAS 発現系の構築に成功し、部位特異的変異株の野生株に対する相対活性測定法を確立した。

そこで、テルペン環化酵素において重要とされるカチオン- π 相互作用が OSC でも働くのかを調べるために F728 残基をターゲットとした。F728 残基は SHC F601 や酵母ラノステロール合成酵素 (ScLAS) F699 に相当する。これらの残基への変異導入実験によりこれらの残基がカチオン- π 相互作用を担うことが示唆されてきた。^{43,68}

本章では、F728 残基への部位特異的変異導入から以下の実験を通して F728 残基の機能を推定した。各変異株の (1) プロダクトプロファイルの決定、(2) 野生株に対する相対活性測定、(3) CD 測定。

4-2. マルチプルアラインメント

NCBI protein search により 8 種のトリテルペン環化酵素アミノ酸配列を入手し、CLC sequence viewer (<http://www.clcbio.co.jp/>) マルチプルアラインメントを作成し、GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>) により図を作成した (Figure 4-1)。

Figure 4-1 から、高度に F が保存されていることがわかった。

β-amyrin synthase	EtAS	:	QEITGV-	F MKNC	:	732
	PNY1	:	QEISGV-	F MKNC	:	733
	PSY	:	QEITGV-	F MKNC	:	732
Lupeol synthase	OEW	:	EEITGA-	F MKNC	:	730
	TRW	:	QEITGV-	F MKNC	:	732
	AtCAS1	:	QEIMGV-	F NRNC	:	730
	ScLAS	:	ESVEGV-	F NHSC	:	703
	SHC	:	PYYTGTG	F PGDF	:	605

Figure 4-1. F728 残基付近のマルチプルアラインメント

EtAS: β-amyrin synthase from *E. tirucalli* (BAE43642)

PNY1: β-amyrin synthase from *P. ginseng* (BAA33461)

PSY: β-amyrin synthase from *P. sativum* (BAA97558)

OEW: lupeol synthase from *O. europaea* (BAA86930)

TRW: lupeol synthase from *T. officinale* (BAA86932)

AtCAS1: cycloartenol synthase from *A. thaliana* (At2g07050)

ScLAS: lanosterol synthase from *S. cerevisiae* (AAB68891)

SHC: squalene-hopene cyclase from *A. acidocaldarius* (ACV59449)

4-3. ホモロジーモデリング

以下のようにしてホモロジーモデリングを作成した。EtAS アミノ酸配列をモデリングサーバ CPHModels (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) でホモロジーモデリングを作成し、EtAS ホモロジーモデリングとヒト OSC の X 線結晶構造を PyMOL (<http://www.pymol.org>) で重ねあわせて表示した。



Figure 4-2. EtAS ホモロジーモデル

緑：膜結合部位、赤：Outer helix、橙色：Inner helix。

中心部にある緑色の化合物はラノステールを示し、基質のおおよその位置を表す。

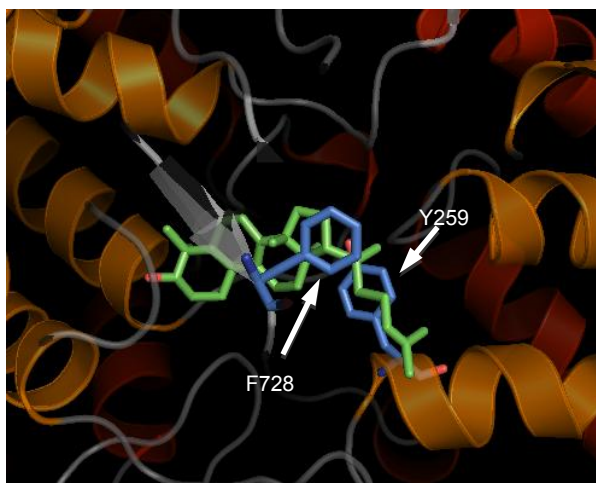


Figure 4-3. F728 残基と Y259 残基の拡大図

緑色分子はラノステロール分子を表し、基質のおおよその位置を示している。F728 残基は D/E 環の近傍に位置していることが示唆された。Y259 残基はチョウセンニンジン β -アミリン合成酵素 PNY Y261 への変異導入から 5 環性ルパニルカチオンの安定化に関与していると報告された残基である。³⁴

4-4. SHC F601 残基^{20,43,68}

SHC F601 残基は、C-14、C-18 付近に位置すると考えられる。当研究室において、*Alicyclobacillus acidocaldarius* 由来の SHCF601 残基へ部位特異的変異導入実験が行われた。

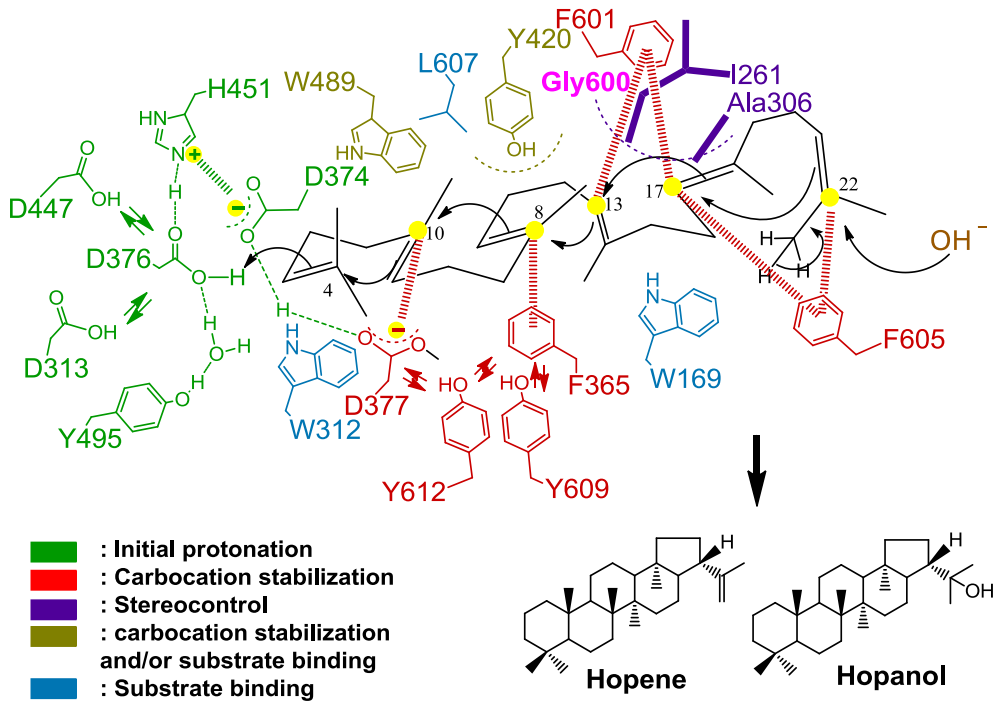


Figure 4-4. SHC の活性部位キャビティーに存在する重要なアミノ酸残基とその機能²²

(T. Hoshino and T. Sato, *Chem. Commun.*, **2002**, 291-301 より引用)

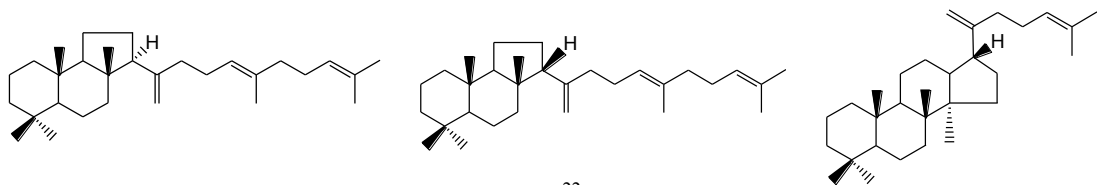
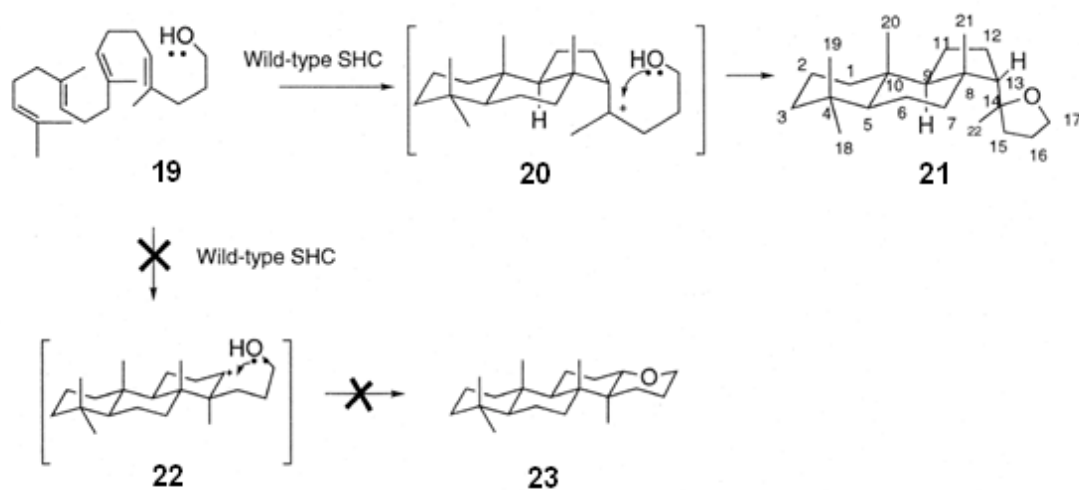


Figure 4-5. SHC F601A 変異酵素からの生成物²²

SHC F601A からは2つの3環性プロダクトと1つの4環性プロダクトが見出された。

F601A 変異酵素から wild-type SHC では見られない 3 環性、4 環性のプロダクトが見出された。プロダクトの構造から、F601 残基は、C 環、D 環の近傍に存在することが示唆された。また、C22-OH アナログを用いた実験から、野生株 SHC がアンチマルコフニコフ則 ($19 \rightarrow 23$ の経路) ではなくマルコフニコフ則 ($19 \rightarrow 21$ の経路) に則って反応が進行することが明らかにされた (Scheme 4-1)。⁶⁸ これにより、F601A で 6/6/5-3 環性産物や 6/6/6/5-4 環性産物が生産されたのは残基が環拡張により生じる熱力学的に不安定な 6/6/6-3 環性 2 級カチオンや 6/6/6/6-4 環性 2 級カチオンを安定化できなかつたためと考えられ、F601 残基がこれらの 2 級カチオンをカチオン- π 相互作用により安定化していることが示された。^{20,43}



Scheme 4-1. C22-OH アナログと SHC との反応機構⁶⁸

(T. Hoshino *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1999**, *63*, 2038-2041 より引用)

C22-OH アナログ **19** はマルコフニコフ則に従って $19 \rightarrow 20 \rightarrow 21$ の経路をたどり、アンチマルコフニコフ則の経路 $19 \rightarrow 22 \rightarrow 23$ の経路は見られなかった。

4-5. *S. cerevisiae* ラノステロール合成酵素 F699 残基^{69,70}

F728 残基は、*S. cerevisiae* 由来のラノステロール合成酵素 (ScLAS) においては、F699 に相当する。台湾交通大学 Wu 氏らによって ScLAS F699 残基への変異導入実験が行われた。作成された 7 種の変異体のうち、F699L、I、P では wild-type と同様にラノステロールのみを産生した。その他の F699N、H、T、M ではラノステロール以外の新規のプロダクトを産生した。新規のプロダクトの中には、B 環が *chair-boat-chair* (C-B-C) 型ではなく C-C-C 型に折りたたまれたプロダクトも同定された。ScLAS F699 各変異株の生産する環状トリテルペンとそのプロダクトプロファイルを図 Figure 4-6 および Table 4-2 にそれぞれ示した。これらの結果から、F699 残基は、プロトステリル C-20 カチオンから 17 位の水素が転移したプロトステリル C-17 カチオンの安定化の役割、他の残基と共同して基質の取り込みの際の C-B-C 型への折りたたみの制御、17 位の炭素の配向の制御を果たしている、と考察された。

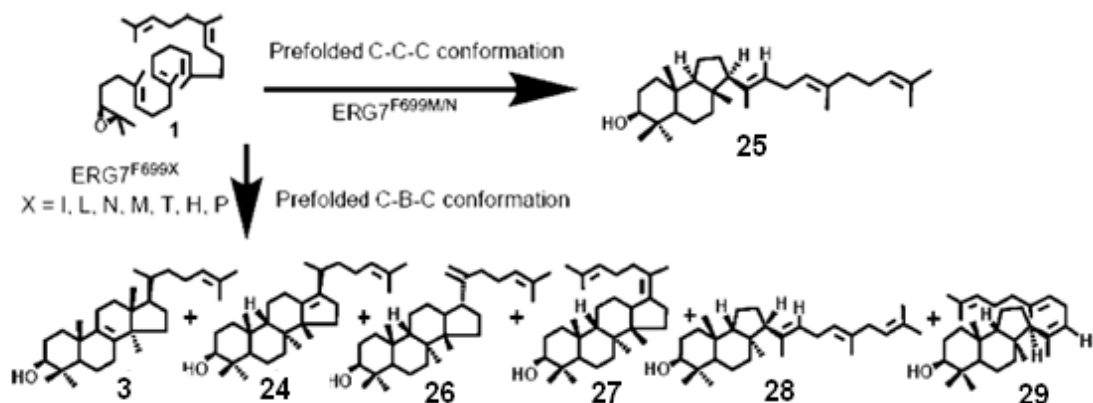


Figure 4-6. ScLAS F699 変異株により産生された環状トリテルペン⁶⁹

(T-K. Wu *et al.*, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 500-503 より引用)

ScLAS F699 変異株からは通常の環化経路 (*chair-boat-chair* 型) で進み、反応終結の脱プロトンの位置が異なる 4 つの 4 環性プロダクトと 2 つの 3 環性プロダクト、そして異常な環化機構 (*chair-chair-chair* 型) から 3 環性プロダクト 4 が形成された。

Table 4-2. ScLAS F699 変異株のプロダクトプロファイル⁶⁹

	3	24	25	26	27	28	29
wild-type	100	-	-	-	-	-	-
F699L	100	-	-	-	-	-	-
F699I	100	-	-	-	-	-	-
F699N	-	55	5	24	16	-	-
F699H	13	70	-	-	17	-	-
F699T	<0.2	>99.8	-	-	-	-	-
F699M	1	46	7	1	10	17	18
F699P	100	-	-	-	-	-	-

F699N、M 変異株から異常な環化機構 (*chair-chair-chair* 型) のプロダクト **25** が見出された。

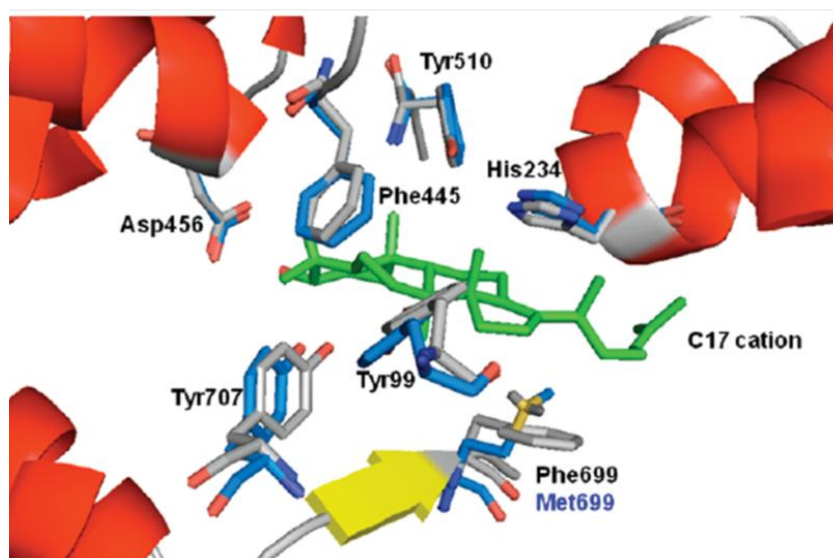


Figure 4-7. ScLAS のホモロジーモデリング⁶⁹

(T-K. Wu *et al.*, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 500-503 より引用)

白色残基：野生株 ScLAS ホモロジーモデリング、青色残基：F699M 変異株ホモロジーモデリング、緑色化合物：ラノステロール分子。異常な環化機構 (*chair-chair-chair* 型) を有していた F699M のホモロジーモデリングを野生株のホモロジーモデリングと比較した。Phe を Met に置換することで周辺の残基の配向に影響が出たことが示唆された。B 環を *boat* 型にする役割があると予想された Y99¹¹ の配向が特に変化していたため、B 環が *chair* 型のプロダクト **25** が形成されたと考察された。

4-6. 変異株の作製

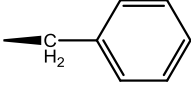
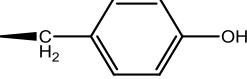
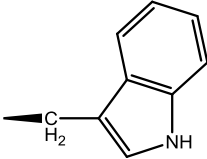
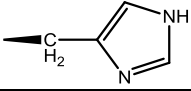

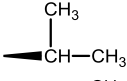
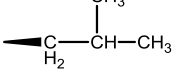
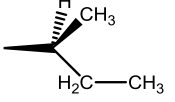
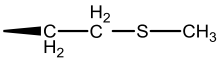
本実験は当研究室 増川、橋本が担当した。

- 1) 変異を導入するためのプライマーを設計した。(Table 4-3)
- 2) アルカリミニプレップ法にて pYES2-EtAS/CT を抽出し、RNase 処理、PEG 沈し、精製した。
- 3) Table 4-3 に示したプライマーを用いて QuikChange 法により部位特異的変異導入した。
- 4) 電気泳動し、特異的増幅を確認した。
- 5) PCR 反応液に *Dpn* I 1 μ L 添加し、37°C、2 hr インキュベートした。
- 6) エレクトロポレーション法により *E. coli* DH5 α に形質転換した。
- 7) シングルコロニーからプラスミドをキットミニプレにより精製した。
- 8) キャピラリーシーケンサーにて変異導入を確認した。
- 9) 酢酸リチウム法により *S. cerevisiae* GIL77 へプラスミドを形質転換した。

Table 4-3. QuikChange 用プライマー (下線: 変異導入箇所)

導入残基		Sequence	塩基数
A	Forward	5'-GATAACGGGTGTG <u>GCC</u> ATGAAGAATTGCATG-3'	31
	Reverse	5'-CATGCAATTCTTCAT <u>GGC</u> CACACCCGTTATC-3'	
H	Forward	5'-CAGCAGGAGATAACGGGTGTG <u>CAC</u> ATGAAG-3'	30
	Reverse	5'-CTTCAT <u>GTG</u> CACACCCGTTATCTCCTGCTG-3'	
I	Forward	5'-GCAGGAGATAACGGGTGTG <u>ATC</u> ATGAAGAATTGCATG-3'	37
	Reverse	5'-CATGCAATTCTTCAT <u>GAT</u> CACACCCGTTATCTCCTGC-3'	
M	Forward	5'-CAGCAGGAGATAACGGGTGTGATG <u>ATG</u> AAGAATTGCATG-3'	39
	Reverse	5'-CATGCAATTCTT <u>CAT</u> CATCACACCCGTTATCTCCTGCTG-3'	
W	Forward	5'-GATAACGGGTGTG <u>TGG</u> ATGAAGAATTGCATG-3'	31
	Reverse	5'-CATGCAATTCTTCAT <u>CCA</u> CACACCCGTTATC-3'	
Y	Forward	5'-CAGCAGGAGATAACGGGTGTG <u>TAT</u> ATGAAG-3'	30
	Reverse	5'-CTTCAT <u>ATA</u> CACACCCGTTATCTCCTGCTG-3'	

Table 4-4. 設計した変異株

	構造	カチオン- π 結合エネルギー ⁸⁷ (kcal/mol)	側鎖の ファンデルワールス体積 ⁹⁴ (nm ³)
wild-type (Phe; F)		27.1	0.55298
芳香族残基 (カチオン-π 相互作用の有無を調べるため)			
Tyr (Y)		26.9	0.6115
Trp (W)		32.6	0.79351
His (H)		21.0	0.37694
脂肪族残基 (バルクサイズの重要性を調べるため)			
Ala (A)			0.05702
Val (V)			0.25674
Leu (L)			0.37876
Ile (I)			0.37671
Met (M)			0.38872

4-7. プロダクトプロファイル

- 1) 各変異株をシード培養・本培養・誘導・後培養（100 mL系）した。
- 2) 集菌後、15% KOH/MeOHにてケン化し、ヘキサンで脂質成分を抽出した。
- 3) 抽出物をエバポレーターにより乾固させた。
- 4) 抽出物をヘキサン 1 mLに溶解し、以下の昇温条件にて GC 及び GC/MS にて解析した。なお、インジェクション量は 0.5 μ Lであった（Figure 4-8）。

GC column: J&W, DB-1, capillary (Length 30 m, I.D. 0.32 mm, Film Thickness 0.25 μ m)

Injection temp.: 300°C

Column temp.: 190-250°C (10°C/min), 250-260°C (0.35°C/min)

- 5) F728H、W の大量培養により F728 変異株産物を同定した。以下に F728W 産物の単離手順を示した。

【F728W 産物の単離手順】

- 1) pYES2/CT-EtAS (F728W) プラスミドを導入した酵母 GIL77 株を 50 L 大量培養した。
- 2) 培養後、菌体を遠心分離 (9,000 rpm, 5 min, 4°C) し、集菌した。
- 3) ペレットを 1 L の 15% KOH/MeOH でケン化 (煮沸後 3 h) した。
- 4) 菌体をブフナー漏斗で濾過し、MeOH 層を等量 (1 L) のヘキサンで 3 回抽出した (合計 3 L)。
- 5) 上記 3)、4) の操作を 3 回繰り返す、合計 3 L の 15% KOH/MeOH と 9 L のヘキサンを使用した。
- 6) 脂質成分をエバポレーターで濃縮した (1089.2 mg)
- 7) SiO₂ カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 5) により 6 つのフラクションに分画した (Figure 4-10 ; プロダクトは Fr. 2 に含まれていた)。
- 8) プロダクトを含むフラクション (Fr. 2) をアセチル化 (Ac₂O/py) し、更に SiO₂ カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0.4) により 2 つのフラクション (A と B) に分画した (Figure 4-11 ; プロダクトは Fr. A に含まれていた)。
- 9) 順相 HPLC によりプロダクト **12**、**34**、**35**、**37**、**38** を単離した (Figure 4-12~4-17)。

Figure 4-9 に上記単離手順のフローチャートを記載した。

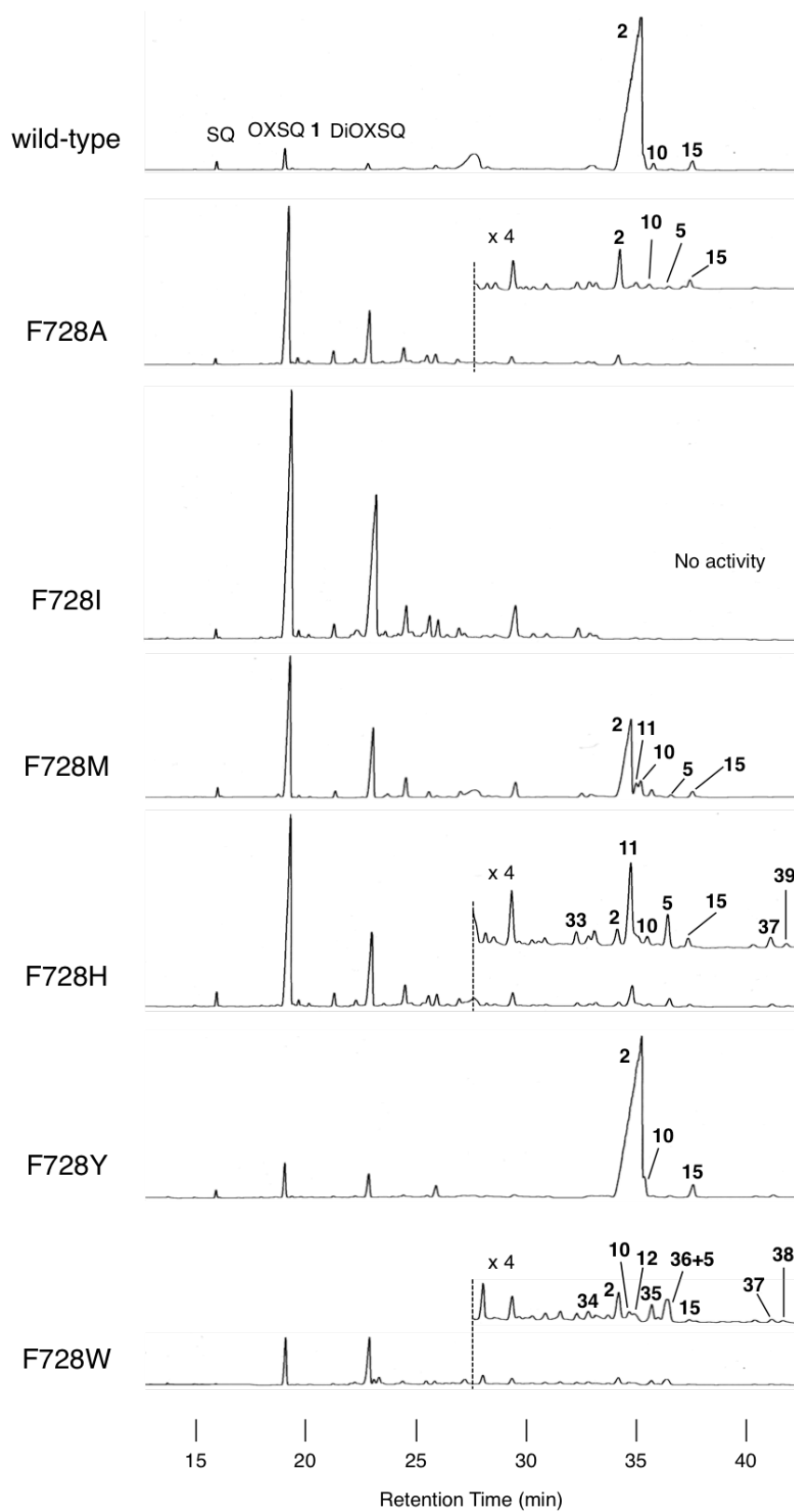


Figure 4-8. 酵母へキサン抽出物 (F728 変異株) の GC 解析結果

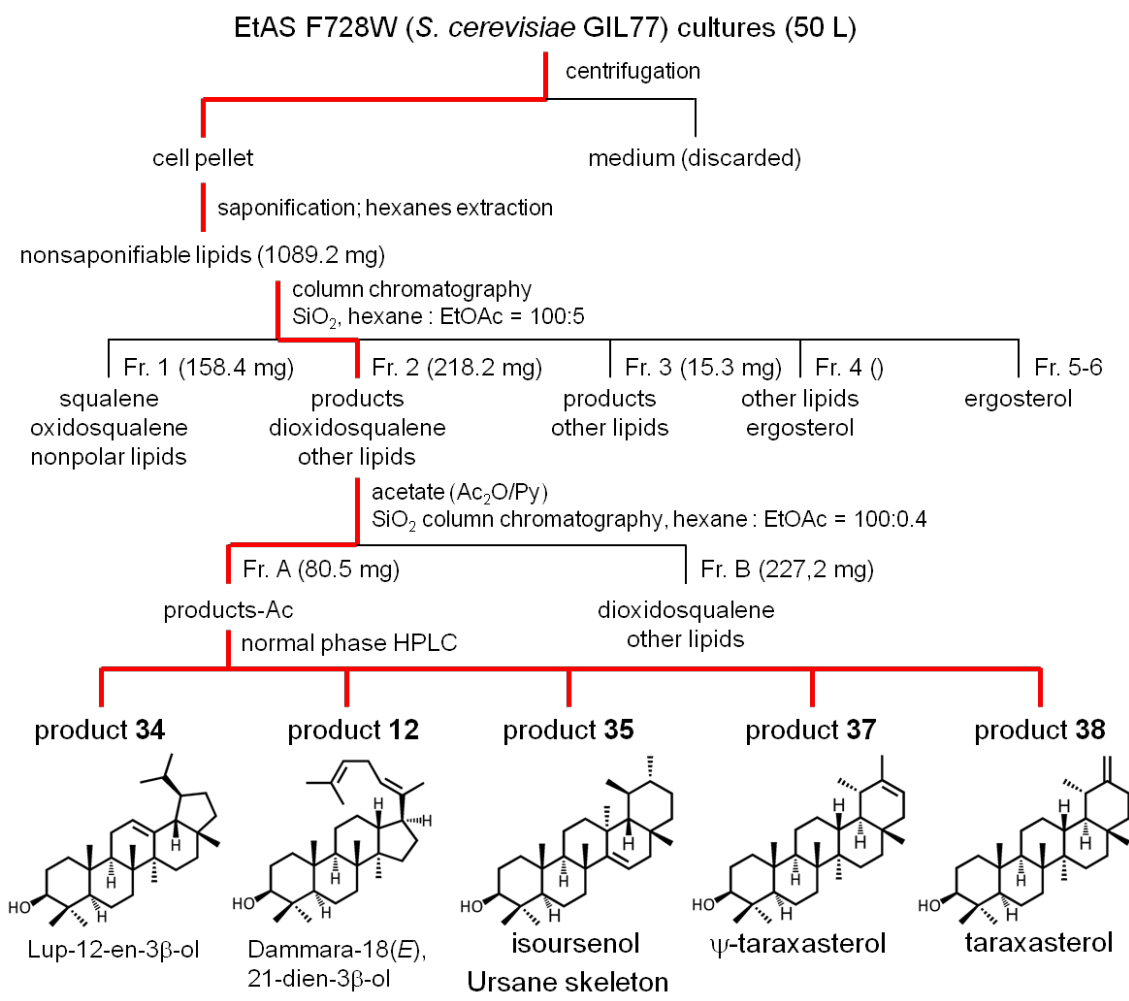


Figure 4-9. F728W 産物の単離手順

TLC analysis of column fractions #1-6;
hexane : EtOAc = 100:20

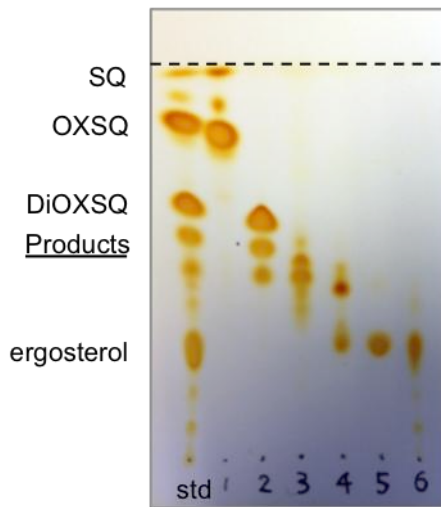


Figure 4-10. SiO₂ カラムクロマトグラフィー1 回目の TLC 結果

展開溶媒 ヘキサン : 酢酸エチル=100 : 20

発色試薬 ヨウ素

左から、F728W 酵母ヘキサン抽出物 (std)、Fr. 1、Fr. 2、Fr. 3、Fr. 4、Fr. 5、Fr. 6

TLC analysis of column fractions #A & B;
hexane : EtOAc = 100:20

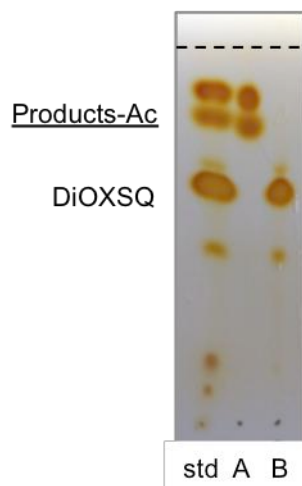


Figure 4-11. SiO₂ カラムクロマトグラフィー2 回目の TLC 結果

展開溶媒 ヘキサン : 酢酸エチル=100 : 20

発色試薬 ヨウ素

左から、F728W 酵母ヘキサン抽出物 (std)、Fr. A、Fr. B

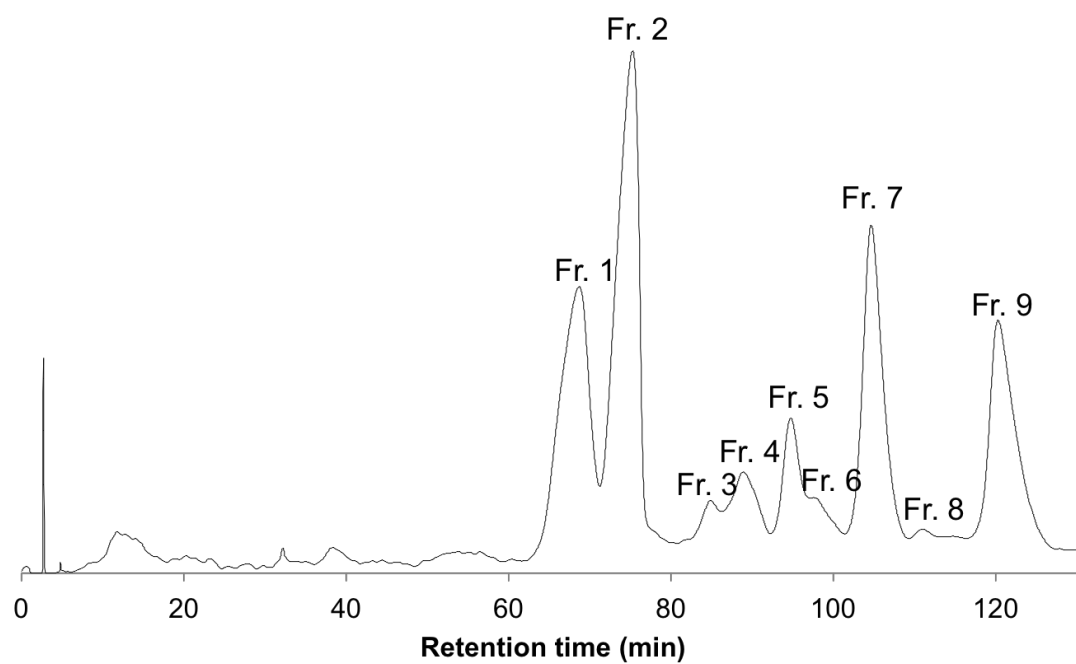


Figure 4-12. 順相 HPLC 1 回目結果

カラム Inertsil® Sil-100A (7.6 x 250 mm)

移動相 ヘキサン : THF = 100 : 0.05

流速 4 mL/min

検出波長 210 nm

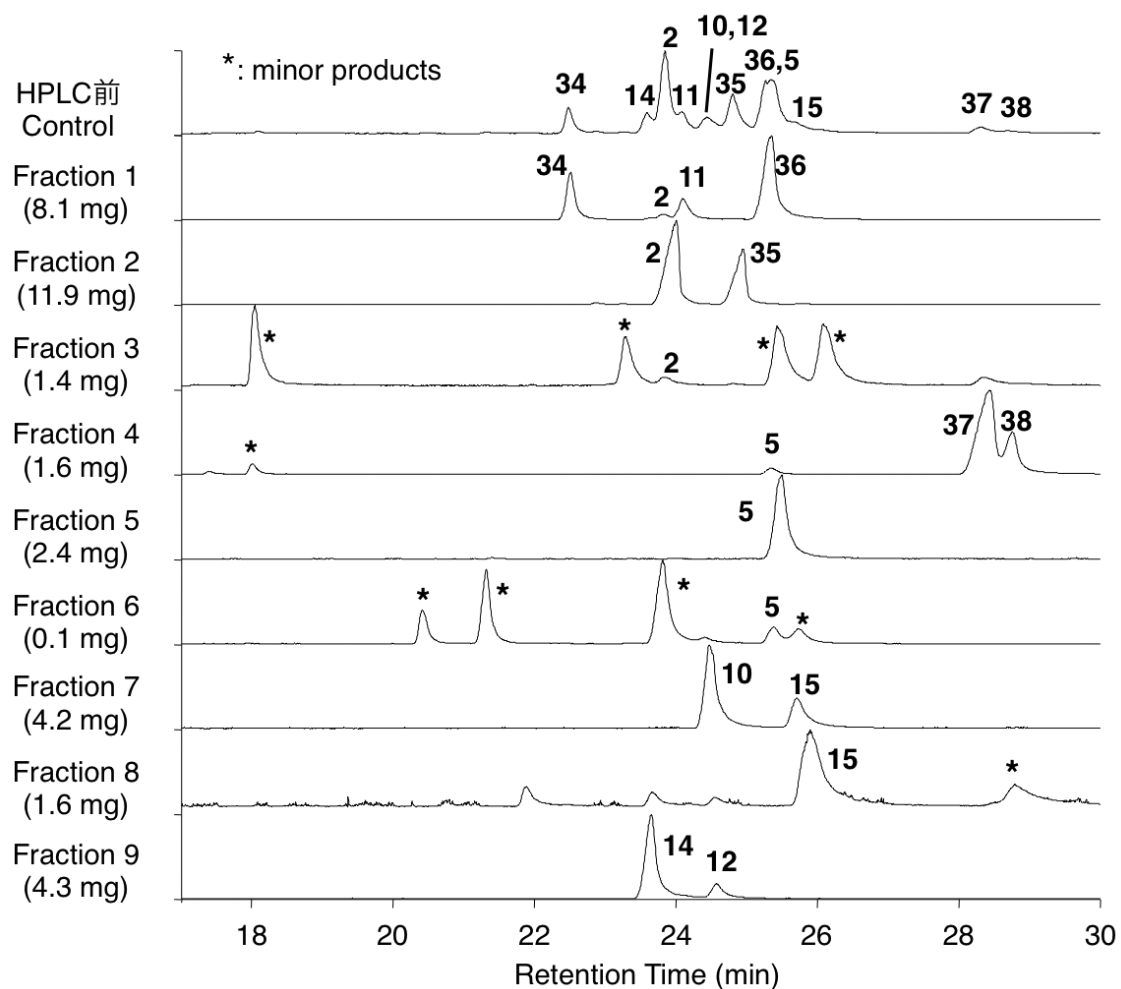


Figure 4-13. 順相 HPLC 1 回目 (Figure 4-12) でのプロダクトの分布 (GC/MS)

上段から順に、HPLCに通す前のプロダクトミクスチャー (Control)、Figure 4-12 の HPLC で分画した Fr. 1~9 の GC/MS 結果となっている。

Fr. 1~9 にはそれぞれ以下のプロダクトが主に含まれていた。

Fr. 1 : 34+11+36、Fr. 2 : 2+35、Fr. 3 : 超微量プロダクト、Fr. 4 : 37+38、Fr. 5 : 5、Fr. 6 : 超微量プロダクト、Fr. 7 : 10+15、Fr. 8 : 15、Fr. 9 : 14+12

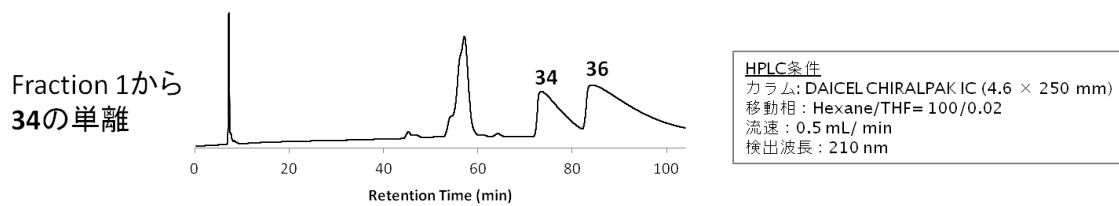


Figure 4-14. HPLC 1回目 Fr. 1 から Prd. 34、36 の単離

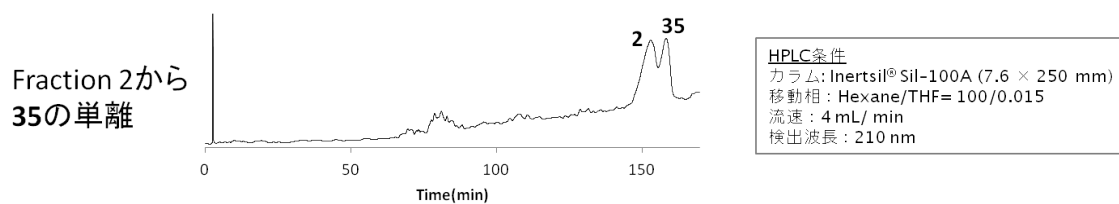


Figure 4-15. HPLC 1回目 Fr. 2 から Prd. 2、35 の単離

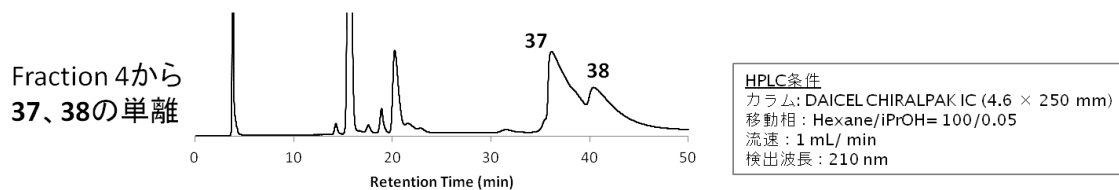


Figure 4-16. HPLC 1回目 Fr. 4 から Prd. 37、38 の単離

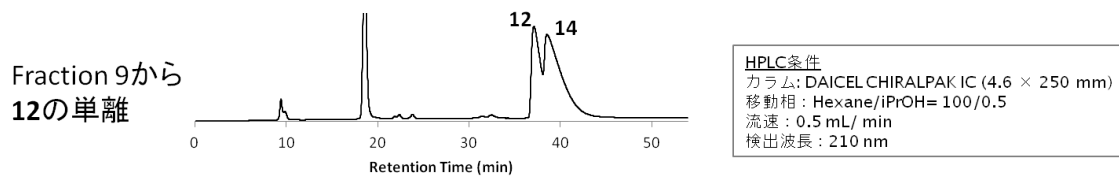


Figure 4-17. HPLC 1回目 Fr. 9 から Prd. 12、14 の単離

【結果と考察】

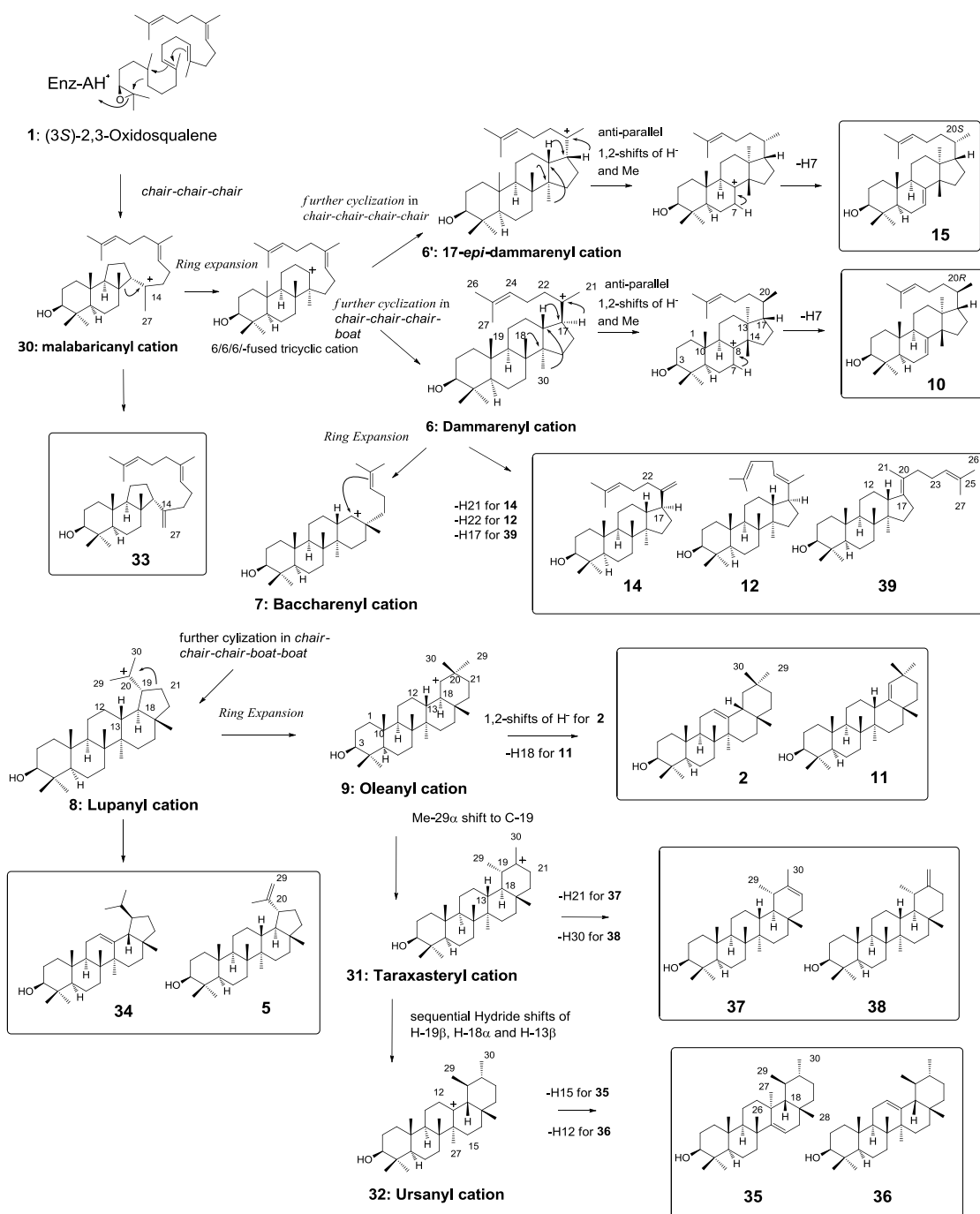
各変異株の GC プロファイルを Figure 4-8 に示した。F728H と W 変異株で多様な環化産物が見られたため、これらの変異株の大量培養 (50 L) により各プロダクトを単離、構造決定した。プロダクト **12** と **14** はチョウセンニンジン由来 β -アミリン合成酵素 (PNY1) の Y261H から単離された化合物と同一であった³⁴。プロダクト **2**、**5**、**10**、**12**、**15**、**33**、**37** は詳細な NMR 解析によりその構造を決定した。プロダクト **10**、**14**、**15**、**36** はイネ由来 OsOSC6 で単離した化合物と一致した。

Scheme 4-2 に F728 変異株産物 **2**、**5**、**10-12**、**14**、**15**、**33-39** の生合成機構を示した。OXSQ **1** が *chair-chair-chair* 型に折りたたまれて環化が開始されることでマラバリカニルカチオン **30** が生成され、引き続く Me-27 の脱プロトンによりプロダクト **33** が形成された。カチオン **30** が 2 つの経路により更に環化することで 17-エピーダンマレニルカチオン **6'** とダンマレニルカチオン **6** が形成された。**6'** は異常な *chair-chair-chair-chair* 型コンフォメーションをとることで、**6** は通常の *chair-chair-chair-boat* 型のコンフォメーションをとることでそれぞれ生じた。2 つのカチオン **6'** と **6** からハイドライドとメチル基が 1,2-転位 (H-17 α , β →C-20、H-13 β →C-17、Me-30 α →C-13、Me-18 β →C-14) し、引き続く H-7 の脱離により **15** と **10** がそれぞれ形成された。**15** と **10** は野生株 EtAS でも微量に生産された。6/6/6/5-4 環性カチオン **6** が環拡張することで 6/6/6/6-4 環性バツカレニルカチオン **7** が生じた。更なる環化により 6/6/6/6/5-5 環性ルパニルカチオン **8** が与えられ、アンチペリプラナー様式での 3 回の 1,2-ハイドライドシフト (H-19 β →C-20、H-18 α →C-19、H-13 β →C-18) と H-12 の脱離により **34** が生成された。カチオン **8** の Me-29 からの脱プロトンによりルペオール **5** が形成された。カチオン **8** の更なる環拡張により E 環に 6 員環をもつ 6/6/6/6/6-5 環性オレアニルカチオン **7** が生じた。H-18 の脱離により **11** が与えられた。アンチペリプラナー様式での 2 回の 1,2-ハイドライドシフト (H-18 α →C-19、H-13 β →C-18) と引き続く H-12 α の脱離により β -アミリン **2** が生じた。EtAS の 728 部位を Phe から His あるいは Trp に置換したことで、タラクサステリル **31**、ウルサニルカチオン **32** を生じる異常環化経路が見られた。この経路は脂肪族残基や Tyr への置換や野生株 (Phe) では見られなかった。カチオン **9** の Me-29 α (末端(Z)-Me) が C-19 に転位することでカチオン **31** が得られ、アンチペリプラナー様式での更なるハイドライドシフト (H19 β →C-20、H-18 α →C-19、H-13 β →C-18) を経てカチオン **32** が生じた。H-21 と Me-30 の脱プロトンにより **37** と **38** がそれぞれ形成された。カチオン **32** におけるメチルシフト (Me-27 α →C-13) と H-15 の脱離によりプロダクト **35** が与えられた。カチオン **32** から H-12 の脱プロトンにより **36** が生じた。

Table 4-4 に F728 変異株のプロダクト生成比率を示した。F728H 変異株では β -アミリン **2** の生産が著しく減少した (3%) 一方、同じオレアナン骨格であり脱プロトンの位置が異なるゲルマニコール **11** を多く生産した。その他、ルパン骨格であるルペオール **5** (15%) やタラクサステリルカチオン由来の **31** (8%) や 4 環性産物や 3 環性産物を生産

した。H 変異株でゲルマニコールが多く生産されたのは、H のイミダゾール環がオレアニルカチオンから直接プロトンを引き抜く塩基として働いたためと考えられる。

F728W 変異株では 12 の環化産物 (2、10-12、14、34-38) が検出された。プロダクト 35 は詳細な NMR 解析からイソウルセノールであることがわかった。イソウルセノールはオリーブ属植物 *Olearia paniculata* から見出されていた⁸⁶ が、天然でも報告例が少ない非常に珍しい化合物であり、変異株 OSC 産物として見出した例は本研究が初めての例となった。また、ウルサニルカチオン 32 由来のプロダクトは W 変異株のみから見られた。これは、W の π 電子リッチな側鎖がウルサニルカチオン 32 を安定化したために生じたと考えられる。なぜなら、芳香族残基のカチオン- π 結合エネルギーは $W > Y \approx F > H$ ⁸⁷ のように、W 残基はカチオンを安定化する能力が最も高いためである。



Scheme 4-2. F728 変異株産物の推定生成経路

以下に化合物名を示した。 **33**: (17*E*)-(13 β H)-malabarica-14(27),17,21-trien-3 β -ol、**34**: lup-12-en-3 β -ol、**14**: dammara-20(21),24-dien-3 β -ol、**11**: germanicol、**10**: butyrospermol、**12**: (20*E*)-dammara-20(22),24-dien-3 β -ol、**35**: isoursenol、**36**: α -amyrin、**5**: lupeol (lup-20(29)-3 β -ol)、**15**: tirucalla-7,24-dien-3 β -ol、**37**: ψ -taraxasterol (urs-20(21)-en-3 β -ol)、**38**: taraxasterol (urs-20(30)-en-3 β -ol)、**39**: (17*E*)-dammara-17(20),24-dien-3 β -ol (新規化合物)

Table 4-4. F728 変異株のプロダクトプロファイル

Product Number	Tricycle from cation 30		Tetracycle from cation 6				Pentacycle from cation 8 (lupanyl cation)			Pentacycle from cation 9 (oleanyl cation)			Pentacycle from cation 31 and 32 (taraxasteryl and ursanyl cations)				Unidentified products %		
	33	14	10	12	15	39	Total % of cation 6	34	5	Total % of cation 8	2	11	Total % of cation 9	35	36	37		38	Total % of cation 31 and 32
Wild-type	-	-	1.8	-	1.6	-	3.4	-	-	-	96.6	-	96.6	-	-	-	-	-	0
F728A	-	-	5.3	-	<u>34.0</u>*	-	<u>39.3</u>*	-	5.6	5.6	52.0	-	52.0	-	-	-	-	-	3.1
F728I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F728M	-	-	4.7	-	11.3	-	16.0	-	-	-	72.9	7.4	80.3	-	-	-	-	-	3.7
F728H	5.6	-	1.8	3.4	6.1	<u>6.0</u>*	17.3	-	<u>15.1</u>*	15.1	3.2	<u>50.9</u>*	54.1	-	-	<u>7.9</u>*	-	7.9	0
F728Y	-	-	1.1	-	3.3	-	4.4	-	-	-	95.6	-	95.6	-	-	-	-	-	0
F728W	-	9.8	11.9	1.9	4.0	-	<u>27.3</u>*	6.7	9.1	15.8	17.2	3.3	20.5	<u>13.2</u>*	<u>18.0</u>*	3.8	1.1	36.1	0.3

*The underlined and bold numerical values highlight the functional features of each of the mutants.

4-8. 野生株に対する変異株の相対活性

F728 残基がカチオン- π 相互作用を担うか否かを推定するためには酵素活性を比較する必要がある。そのため、当研究室 増川により F728 変異株の精製酵素を用いた酵素反応が行われた。しかしながら、変異株では精製酵素の活性が極端に弱く、正確に K_m や k_{cat} を決定することができなかった (Figure 4-18)。そこで、F728 残基の機能をより正確に推定するために酵母 *in vivo* での野生株に対する変異株の相対活性を算出した。その際、酵素発現量はウェスタンブロッティングにより、生成物量を GC によりそれぞれ定量した。

【*in vitro* 酵素反応】 (増川 2013、修士論文)

1. Table 4-5 について、酵素を除いた反応混合液を調製した。
2. 20°C、3 min プレインキュベーションした。
3. 酵素を添加して 20 min インキュベーションした。
4. 100°C、3 min で酵素反応を停止させた。
5. 内部標準としてスクアレン 25 μg を添加した。
6. 1.2 倍量 (3 mL) の 15% KOH/MeOH でケン化した。
7. 4 mL のヘキサンで 3 回抽出した。
8. SiO_2 ショートカラムクロマトグラフィーにより界面活性剤を除去した。
9. GC で定量し、比活性を求めた。

Table 4-5. F728 変異株の *in vitro* 酵素反応組成

	終濃度			
	Wild 2 μg	H,W 100 μg	M 70 μg	Y 15 μg
EtAS F728X				
(3S)-OXSQ	75 μg			
DTT	1 mM			
BSA	1 mg/mL			
TritonX-100	0.05%			
KPB	0.1 M (pH 7.0)			
Total	2500 μL			

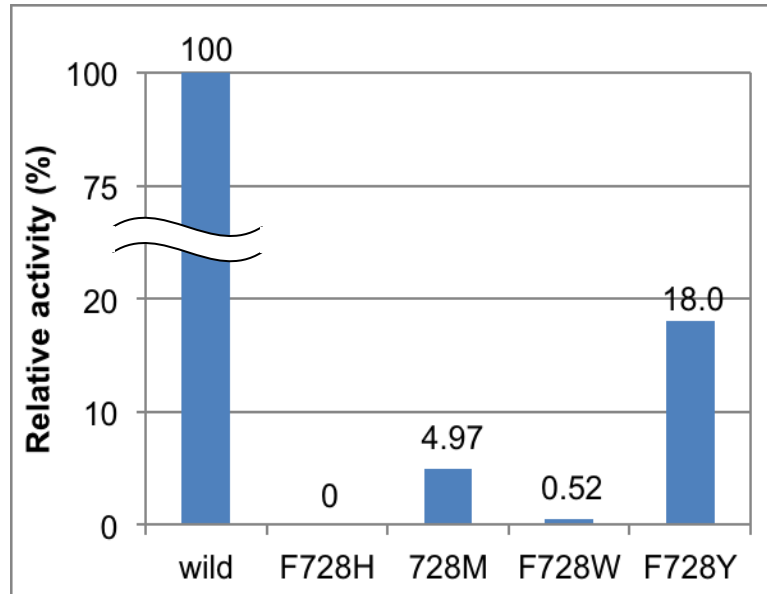


Figure 4-18. F728H、M、W、Y 精製酵素の野生株精製酵素に対する相対活性 (*in vitro*)
 野生株 EtAS の比活性 162.8 nmol/min/mg を 100%とした時の各変異株の活性を相対値で表した。

【培養】

- 1) pYES2-EtAS/CT (野生株および F728 変異株) プラスミドを導入した酵母 GIL77 株を培養、誘導した (100 mL 系)。
- 2) 集菌後、ペレットを超純水 6~7 mL に懸濁し、大試験管で凍結させた。
- 3) 凍結乾燥により完全に水分を飛ばした。
- 4) 菌体重量を測定し、ウェスタンブロッティング用に 0.05 g、プロダクト定量用に 0.2 g の菌体を量り取った。

【ウェスタンブロッティング】

- 1) ウェスタンブロッティング用菌体 0.05 g に超純水 1 mL、ガラスビーズ 1 g を加えた。
- 2) ボルテックス (30 sec x 12) により菌体を破碎した。
- 3) 破碎液 50 μ L と SDS-PAGE サンプルバッファー 50 μ L を混合した。
- 4) 90°C、15 min で処理し、SDS-PAGE サンプルとした。
- 5) 検量線用として野生株精製酵素を濃度調製し、同時に SDS-PAGE サンプルを作製した。
- 6) SDS-PAGE (ミニゲル、7.5%ポリアクリルアミドゲル) を行った。
- 7) ウェスタンブロッティングを行った。
- 8) FUJIFILM LAS3000 で撮影した。
- 9) Multi Gauge で解析した。

【プロダクト定量】

- 1) 菌体 0.2 g に対して内部標準 GGOH 100 μ g を加えた。
- 2) 15% KOH/MeOH 100 mL を加え、ケン化した。
- 3) 菌体をろ過し、ろ液を等量 (100 mL) のヘキサンで 3 回抽出した。
- 4) 抽出物を減圧濃縮し、1 mL の蒸留ヘキサンに溶かした。
- 5) GC で解析した (Injection 量は 1-3 μ L)。

【相対活性の算出】

以下の式の通りにして野生株に対する変異株の相対活性を算出した。

$$\frac{(\text{変異株の単位酵素量あたりのプロダクト生産量})}{(\text{野生株の単位酵素量あたりのプロダクト生産量})} \times 100 (\%)$$

【結果と考察】

Figure 4-19 に各変異株の酵素発現レベルを示した。F728I の発現レベルは非常に低いものだった。Figure 4-20 には各変異株の野生株に対する相対活性を示した。同じ芳香族残基である Y 変異株で野生株とほぼ同じ相対活性を示し、脂肪族残基 (A と M) では側鎖のバルクサイズの大小に拠らず著しく低い相対活性を示した。当研究室ではこれまでに SHC 研究において活性部位の芳香族残基が中間体カチオンをカチオン- π 相互作用により安定化していることを証明してきた²⁰。A と M は π 電子をもたないため、これらの変異株で活性が低下したと考えられる。A と M では M の方が若干高い活性を示したが、これは M の方が F (野生株) に近いバルクサイズであるためと考えられる。このことから、F728 部位はそのバルクサイズも酵素活性に影響することが示唆された。

次に芳香族残基の変異株に着目した。Mecozzi らにより Na^+ と芳香環のカチオン- π 結合エネルギーは His : 21.0、Phe : 27.1、Tyr : 26.9、Trp : 32.6 kcal/mol と報告された。⁸⁷ F728 残基がカチオン- π 相互作用を担うならば、その活性の大小はカチオン- π 結合エネルギーの大小と一致するはずであるため、 $W > F \approx Y > H$ となるはずであった。しかし H と W 変異株で著しく活性が低下した。これは次のことが原因と考えられる。まず H 変異株は、側鎖のイミダゾール環が部分的にプロトン化されることで、芳香環として機能できなくなったため。芳香環でなくなったことでカチオン- π 相互作用を発揮できなくなり、結果相対活性の低下を招いたと考えられる。しかしながら、一部プロトン化されていない F728H によって反応が進行したものは His が脱プロトンを担う塩基として機能したことでゲルマニコール **11** を主生産したと考えられる。そして、W 変異株についてはその非常に大きなバルクサイズによるものと考えられる。W は天然型アミノ酸中で最もバルクサイズの大きな残基である。過去の SHC 研究でカチオン- π 相互作用を担うと完全に証明された F365 残基や F605 残基についても W 変異株では大きな活性の低下が見られた。⁵⁵そこで考えられる活性の低下した理由としては、W の非常に大きな側鎖が周辺の残基の配向にも影響し、活性部位の形状を変化させ、結果として活性の低下を招いたことが考えられる。

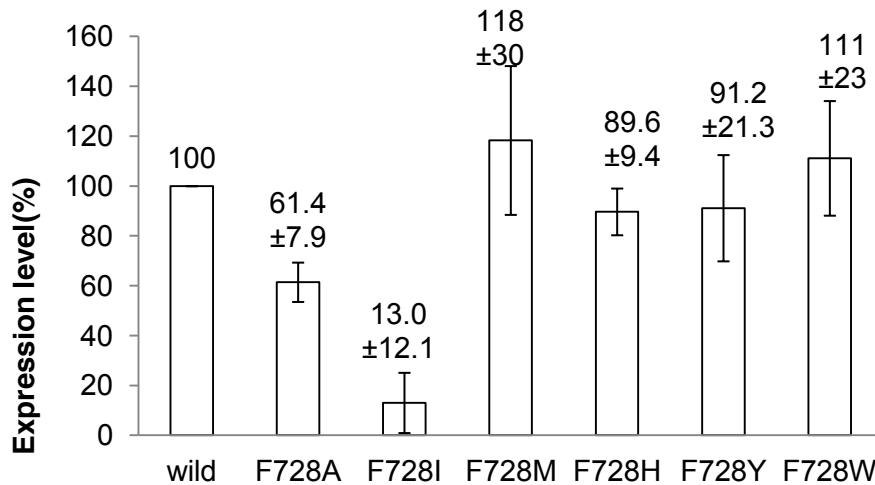


Figure 4-19. F728 変異株の野生株に対する相対発現量

野生株の発現量 (7.23 ± 2.44 mg/L-culture) を 100%として各変異株の相対発現量を示した。

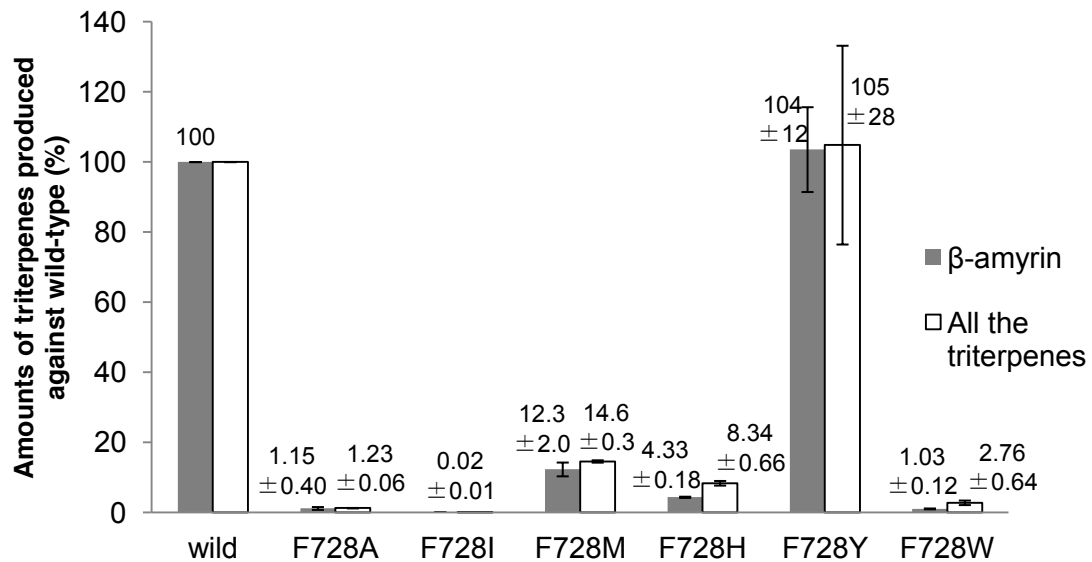


Figure 4-20. F728 変異株のプロダクト相対生産量 (%)

野生株 EtAS の β-アミリン生産量 (42 ± 13 mg/L-culture) および全プロダクトの生産量 (43 ± 17 mg/L-culture) を 100%として各変異株の相対生産量 (%) を示した。F728H ではゲルマニコール **11** は β-アミリン **2** と同様にオレアニルカチオン **7** から生産されるため、β-アミリン **2** と見なして相対生産量を算出した。

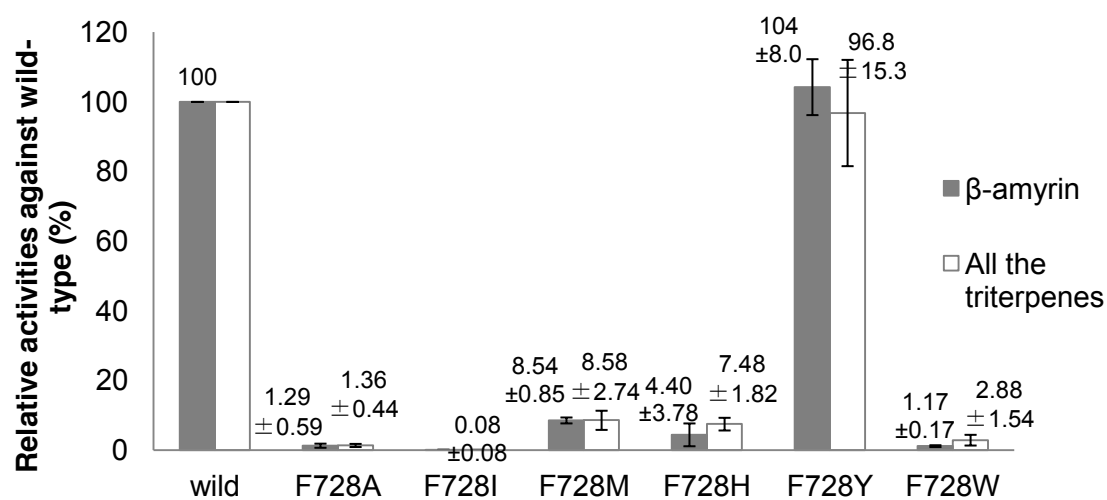


Figure 4-21. F728 変異株の野生株に対する相対活性 (%)

野生株EtASのβ-アミリンおよび全プロダクト形成の活性はそれぞれ 5.02 ± 0.79 、 5.62 ± 0.17 mg/mg EtAS enzymeであった。F728Hではゲルマニコール**11**はβ-アミリン**2**と同様にオレアニルカチオン**7**から生産されるため、β-アミリン**2**と見なして相対活性を算出した。

4-9. CD 測定

【目的】

Figure 4-21 の相対活性の結果では、F728A、H、I、W で有意な活性の低下が見られた。この低下はカチオン- π 相互作用の減少によるものであり、酵素高次構造の崩れによるものではないと推測した。そのため、各変異体ごとの CD スペクトルを測定し、変異の導入による酵素の立体構造への変化があるかどうかを調べた。

【方法】

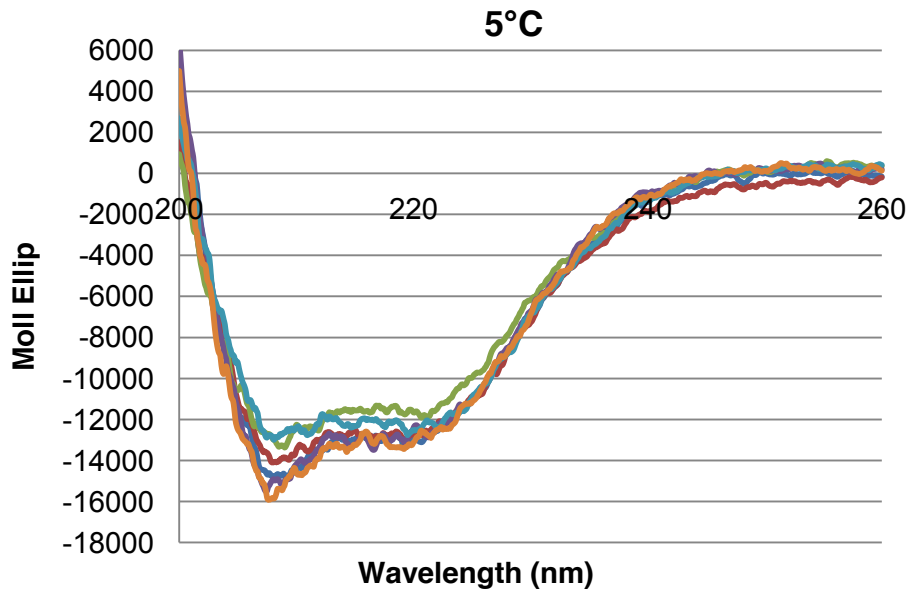
- 1) 第 2 章に従って酵素精製した。その際に Wash buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、80 mM imidazole、250 mM NaCl、0.01% Brij 35) を 80 mL、Elute buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、250 mM imidazole、250 mM NaCl、0.01% Brij 35) を 3 mL 用いた。
- 2) 0.01% Brij 35 を含む 50 mM リン酸カリウムバッファ (pH7.0) で透析した。
- 3) タンパク濃度が 0.1 mg/mL になるように調製した。
- 4) 5-40°C の範囲で CD スペクトルを測定した。

【結果と考察】

Figure 4-22 より、どの変異株も wild とほぼ同じスペクトルを描いたことから、変異導入による酵素高次構造は、構造が壊れていないことが示された。30°C でも 5°C とほぼ同様のスペクトルを描いたことより、*in vivo* での相関係数を求める実験では、純粋にカチオン- π 相互作用の違いが活性に与える影響を検討できる。つまり、F728A、I などの変異酵素の活性の低下の原因は、酵素の高次構造の崩れではなく、カチオン- π 相互作用の消失によるものであると言える。

F728H 変異酵素の分子楕円率がやや大きいのが、これは酵素の一部が壊れている可能性が示唆される。この構造の崩れが、F728H の相対活性の低さに影響を与えているのかもしれない。

(a)



(b)

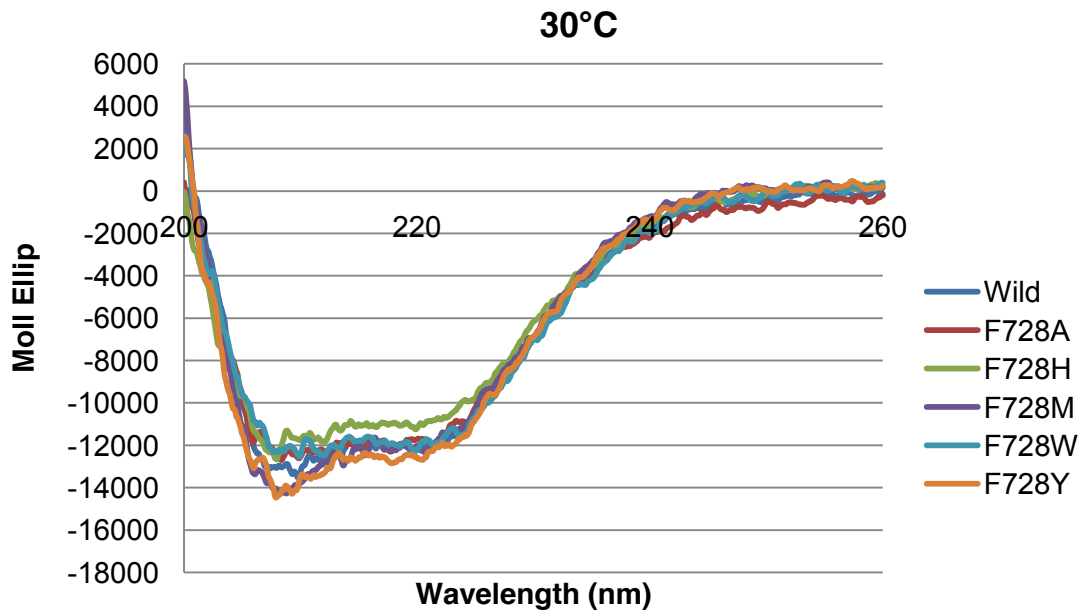


Figure 4-22. CD 測定結果

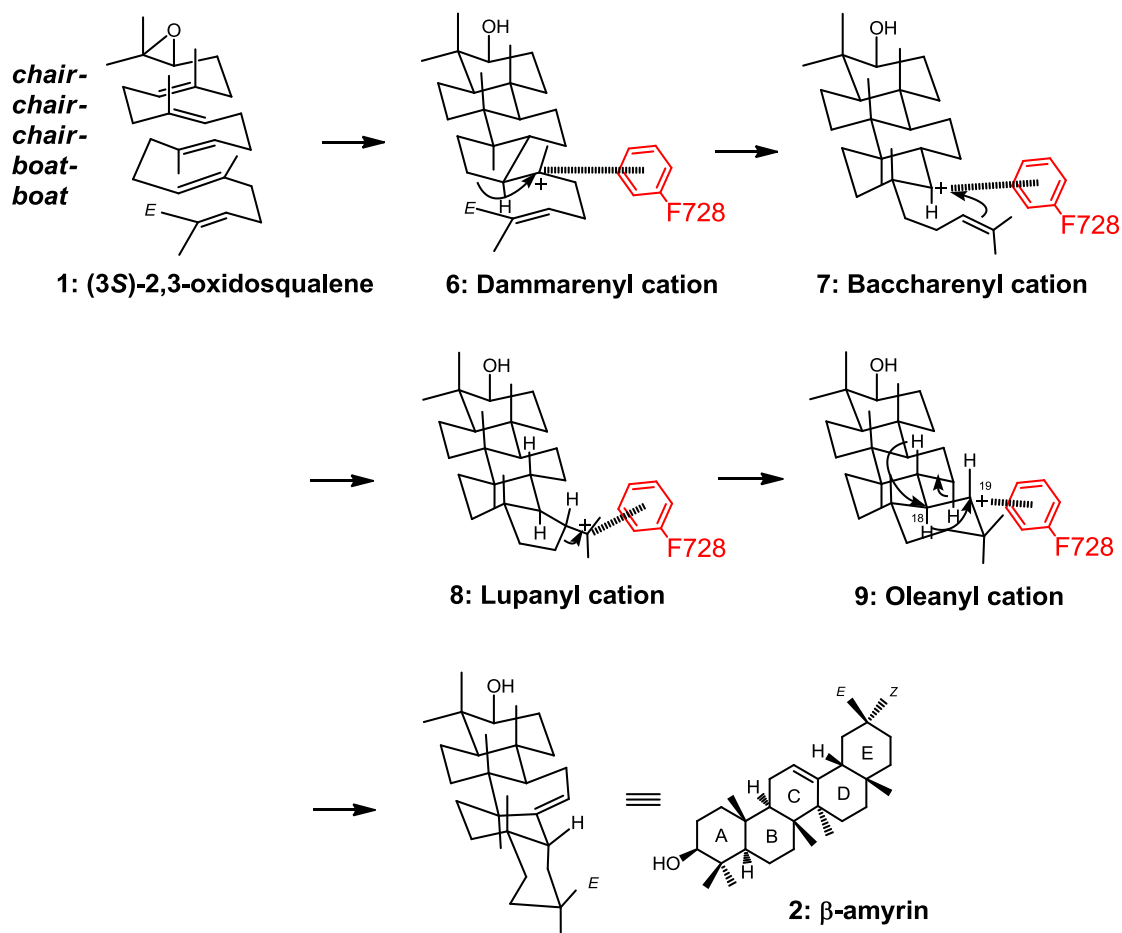
(a) 測定温度 5°C

(b) 測定温度 30°C

4-10. F728 残基のまとめ

F728 変異株産物が主に 4 環性と 5 環性であったことや、F728H が塩基として働くことでオレアニルカチオンから直接脱プロトンしたゲルマニコールが生成されたことから、F728 残基が D/E 間の近傍に位置していることがわかった。そして、野生株に対する変異株の相対活性は同じ芳香族残基である F728Y で維持され、脂肪族残基への置換 (F728A、I、M) ではバルクサイズに拠らず、一様に大きく活性が低下した。そのため、F728 残基がカチオン- π 相互作用を担っていることが示唆された。

そこで、F728 残基の機能を Scheme 4-3 にまとめた。F728 残基のその主たる機能はカチオン- π 相互作用により Scheme 4-3 のように 4 環性および 5 環性カチオンを安定化することであり、特に 2 級カチオンであるバックレニルカチオンやオレアニルカチオンの安定化に関与していると考えられる。



Scheme 4-3. F728 残基の機能

4-11. プロダクトのスペクトルデータ

Product 33 acetate (oil) produced by F728H mutant.

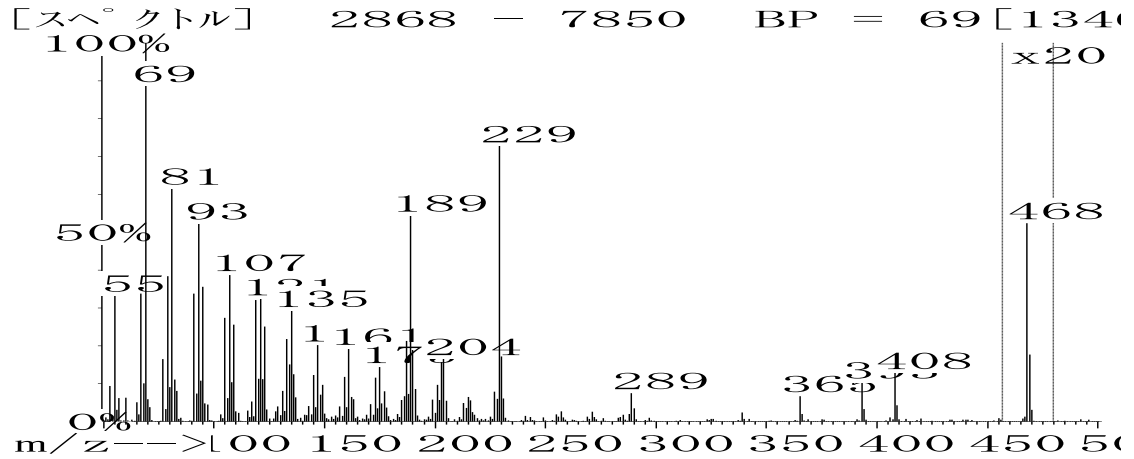
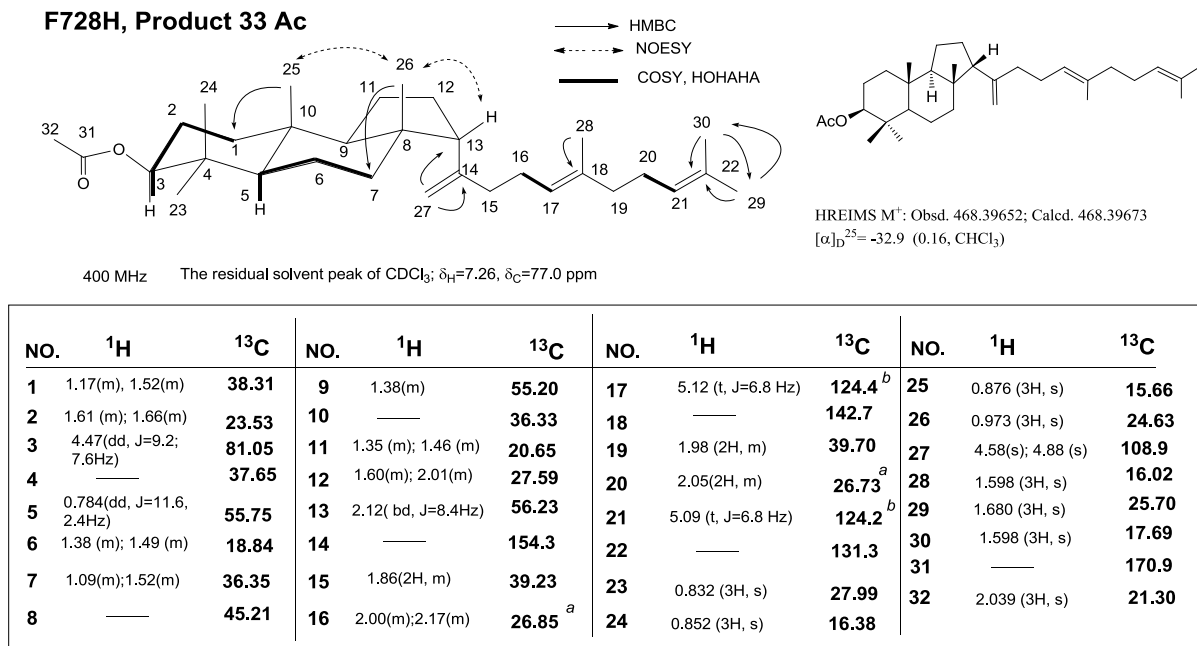


Figure 4-23. 33-Ac の EIMS フラグメントパターン



a, b: These carbon signals may be exchangeable between the same letters.

Figure 4-24. 33-Ac の NMR 解析結果

Product 34-acetate produced by both F728H and F728W mutants (solid)

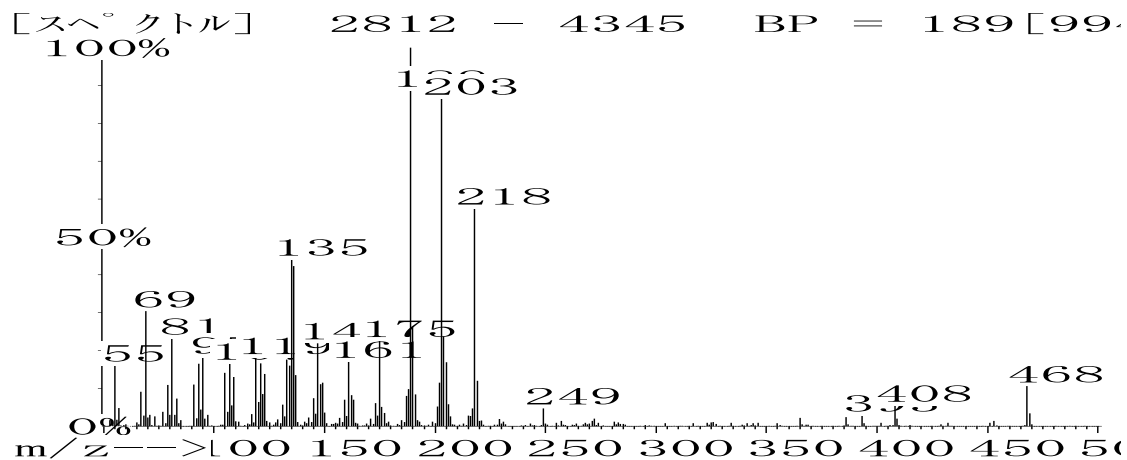


Figure 4-25. 34-Ac の EIMS フラグメントパターン

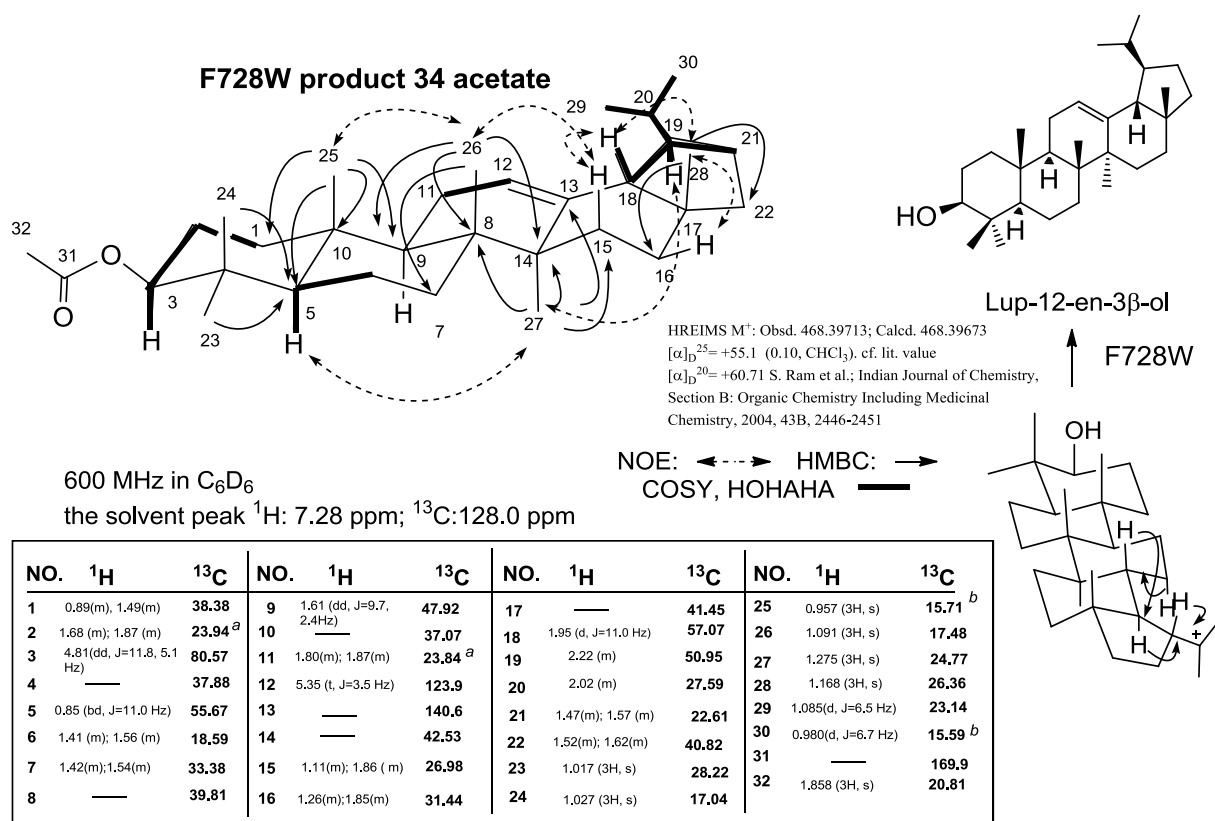


Figure 4-26. 34-Ac の NMR 解析結果

Product 14 acetate by F728W mutant (solid)

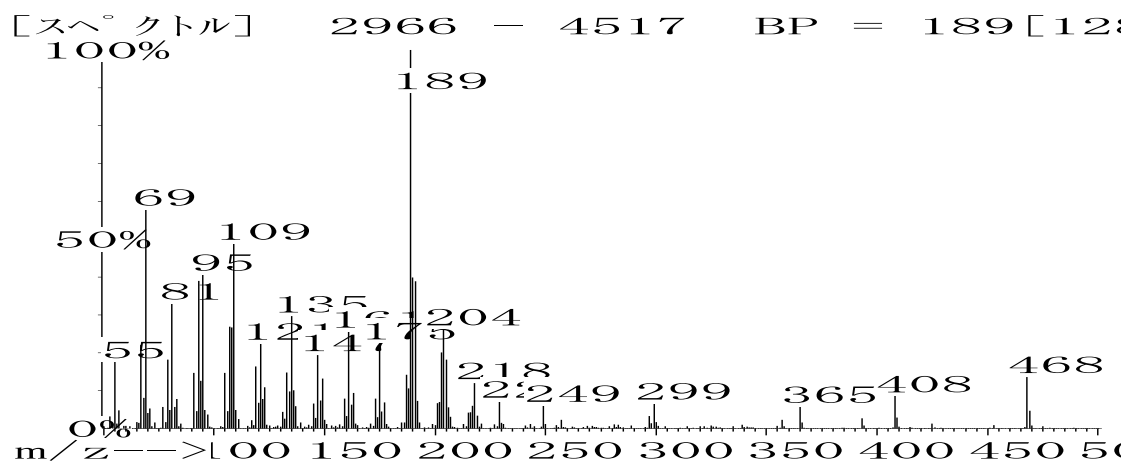


Figure 4-27. 14-Ac の EIMS フラグメントパターン

Product 14 acetate (dammara-20,24-diene-3 β -ol acetate) by F728W

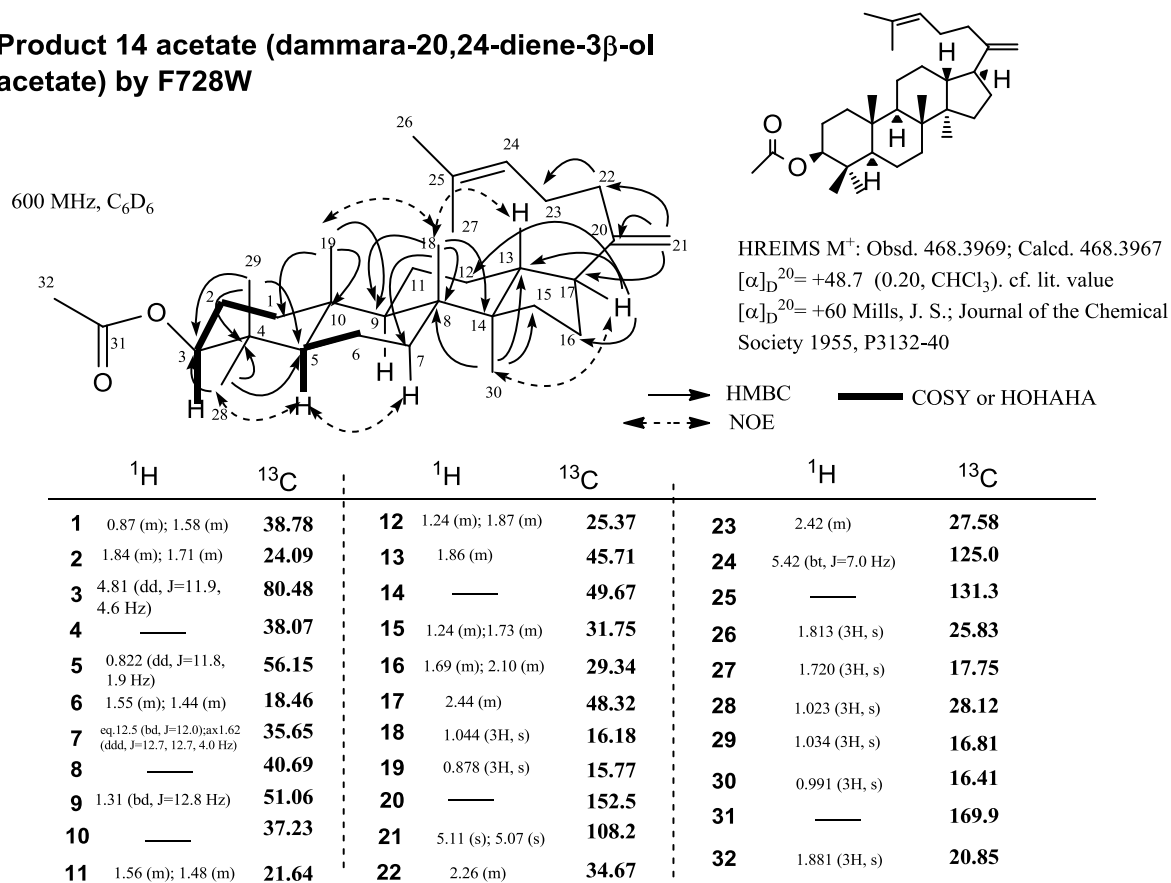


Figure 4-28. 14-Ac の NMR 解析結果

Product 11-acetate produced by both F728H and F728W mutants (solid)

11-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-29、30 にそれぞれ示した。**11-Ac** の構造は次のようにして決定した。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) において、OXSQ **1** の 6 つのビニリックメチル基 ($\delta_{\text{H}}=1.68\text{--}1.60$ ppm) が消失し、8 つの新たな脂肪族メチル基 ($\delta_{\text{H}}=1.01\text{--}0.72$ ppm, each 3H, s) が生じた。このことから、**1** が完全に環化され、5 環性産物が形成されたことが示唆された。オレフィンプロトン (H-19, $\delta_{\text{H}}=4.86$ ppm, 1H, s) と炭素原子 [C-13 ($\delta_{\text{C}}=38.38$ ppm, d)、C-17 (34.33, s)、C-18 (142.7, s)、C-20 (32.35, s)、C-21 (33.32, t)、C-29 (29.17, q)、C-30 (31.33, q)] との間に明確な HMBC クロスピークが観測された。よって、化合物 **11** がゲルマニコールであることが示唆され、その立体化学が NOESY スペクトルにより確認された。他の全ての NMR データはゲルマニコール構造と一致した。**11** と β -アミリン **2** の違いは二重結合の位置のみであった。

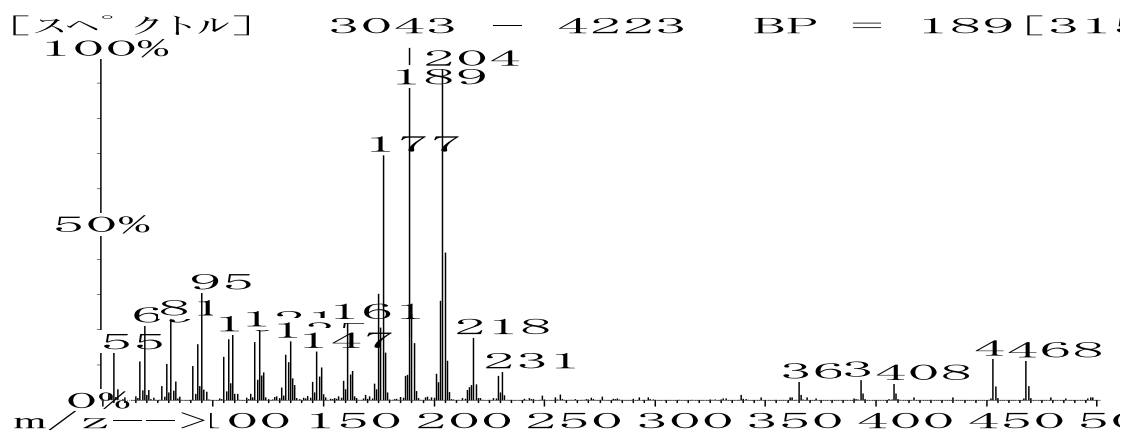


Figure 4-29. **11-Ac** の EIMS フラグメントパターン

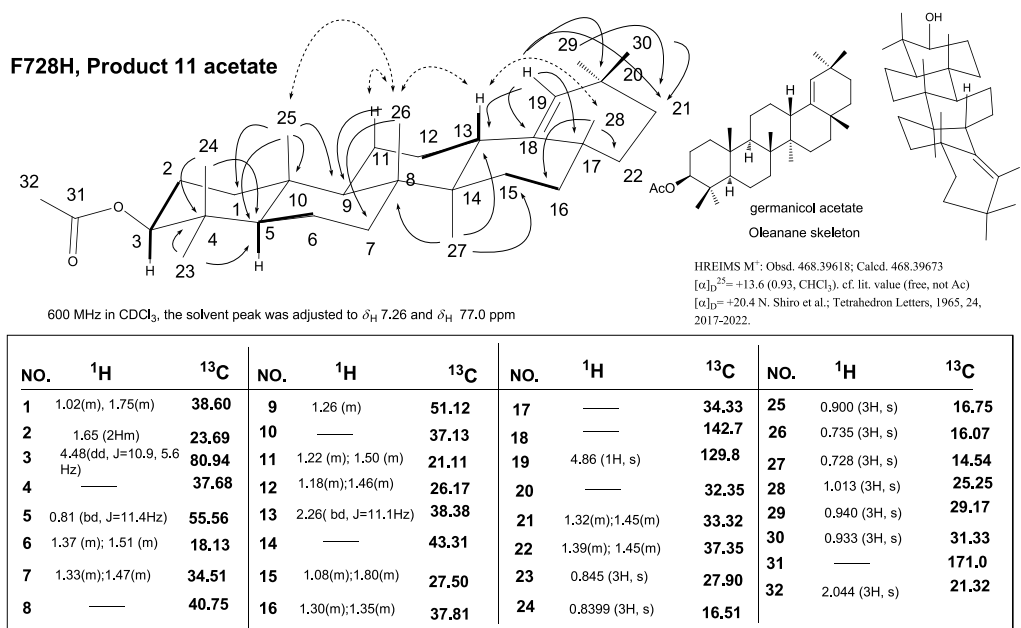


Figure 4-30. **11-Ac** の NMR 解析結果

Product 10 acetate by F728H and F728W (oil)

10-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-31、32 にそれぞれ示した。

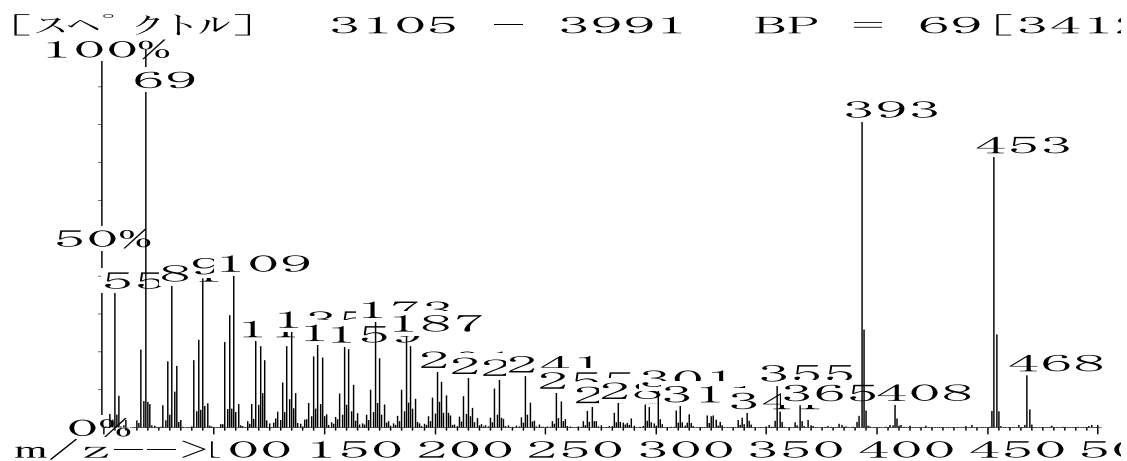
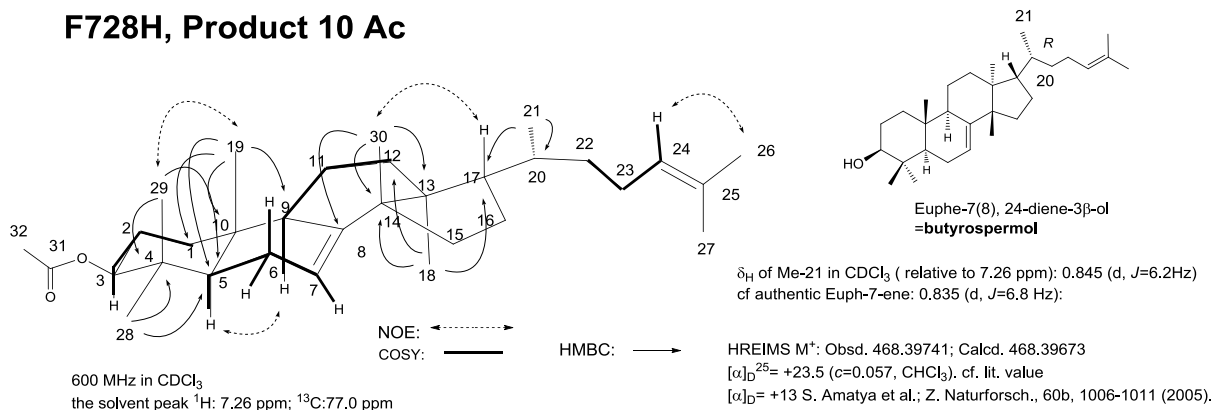


Figure 4-31. 10-Ac の EIMS フラグメントパターン



NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C
1	1.23(m);1.69(m)	36.81	9	2.22(m)	48.79	17	1.47(m)	53.23	25	—	130.9
2	1.62(m);1.66(m)	24.20	10	—	34.81	18	0.7999(3H, s)	22.05	26	1.683(3H, s)	25.73
3	4.51(dd, J=11.4, 3.8Hz)	81.14	11	1.50(2H, m)	18.14	19	0.762 (3H, s)	13.13	27	1.604(3H,s)	17.67
4	—	37.83	12	1.64(m);1.79(m)	33.94 ^a	20	1.40(m)	35.78	28	0.8482(3H,s)	27.57
5	1.42 (1H, m)	50.75	13	—	43.51	21	0.845(d, J=6.2Hz)	18.57	29	0.930(3H,s)	15.86
6	1.97(m);2.15(m)	23.75	14	—	51.28	22	1.00(m);1.60(m)	35.15	30	0.9703(3H,s)	27.31
7	5.24 (very br s)	117.5	15	1.42(m);1.46(m)	33.74 ^a	23	1.87(m);2.06(m)	25.35	31	—	171.0
8	—	146.0	16	1.27(m);1.90(m)	28.46	24	5.10(t, J=7.0Hz)	125.1	32	2.054(3H, s)	21.33

a: The assignments of the carbon signals of C-12 and C-15 were indistinguishable, due to the very close chemical shifts.

Figure 4-32. 10-Ac の NMR 解析結果

Product 12 acetate produced by F728H and F728W (solid)

12-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-33、34 にそれぞれ示した。プロダクト **12** (20*E*)-dammara-20(22),24-dien-3 β -ol は PNY β -アミリン合成酵素の Y261H 変異株から単離されたものと同一化合物だった。³⁴

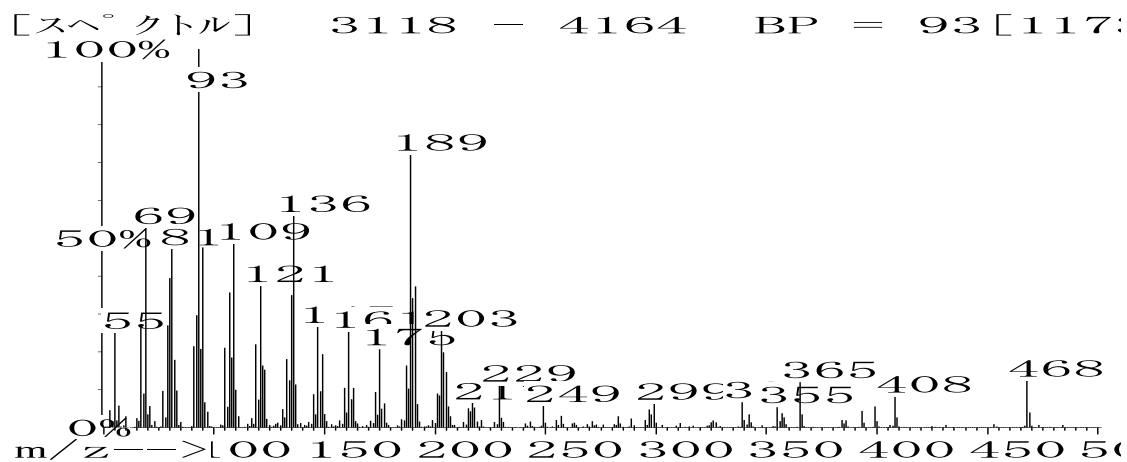
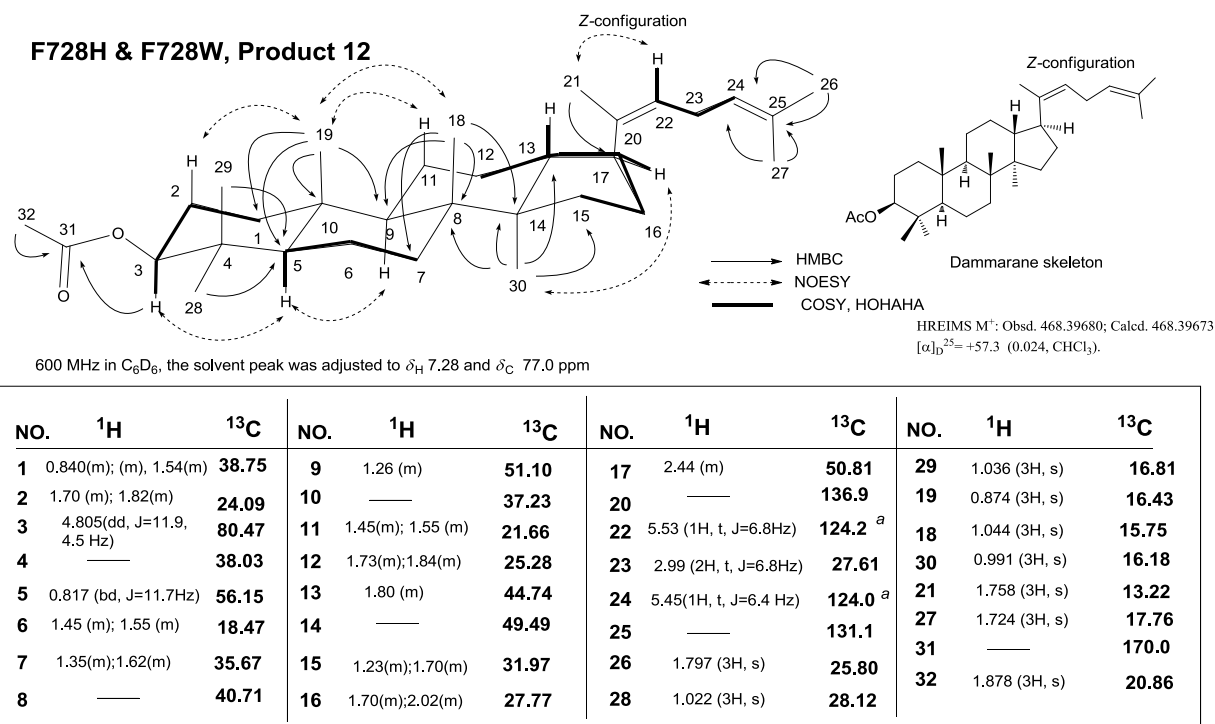


Figure 4-33. 12-Ac の EIMS フラグメントパターン



a: The carbon signals are indistinguishable, due to the very close chemical shifts.

Figure 4-34. 12-Ac の NMR 解析結果

Product 35 acetate produced by F728W (solid)

35-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-35、36 にそれぞれ示した。F728W に特異的に生産されたプロダクト **35** の構造は次のようにして帰属された。

$^1\text{H-NMR}$ 解析 (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{acetone}$) で 8 つのメチルシグナルを高磁場 ($\delta_{\text{H}}=1.08\text{--}0.844$ ppm) で見られたことから、分子内にオレフィンメチル基を含まないことが示唆された。故に、**35** は 5 環性骨格であると帰属された。2 つの Me ダブルレットシグナル ($\delta_{\text{H}}=1.03$ ppm (Me29, 3H, d, $J=7.0$ Hz) and 0.977 ppm (Me30, 3H, d, $J=6.8$ Hz)) と 6 つの Me シングレットシグナルが検出されたため、ウルサニルあるいはタラクサステリル骨格として帰属された。Me26 ($\delta_{\text{H}}=1.08$ ppm, 3H, s) と Me27 (0.968 ppm, 3H, s) が C14 ($\delta_{\text{C}}=160.2$ ppm, s) と明確な HMBC 相関を示した。更に、H15 ($\delta_{\text{H}}=5.52$ ppm, dd, $J=7.7, 2.5$ Hz) が C13 (40.81 ppm, s)、C14 と強い HMBC クロスピークを示した。それゆえ、二重結合は C14-C15 に位置している。Me27 と H16 ($\delta_{\text{H}}=2.08$ ppm, m) の強い NOE および Me26 と Me27 で NOE が観測されなかったことから、Me27 と Me28 がそれぞれ α -および β -配向であることが示唆された。Me28 と Me30 で NOE が観測されなかったことに加えて、Me29 と H18

($\delta_{\text{H}}=0.93$ ppm, m) および Me29 と H12 (1.56 ppm, m) で強い NOE が見られたことから、Me29 が β -配向であり、Me30 が α -配向であることが確認された。以下に示した生合成的観点から、これらの配向は更に支持された。プロダクト **35** は、天然でも珍しく、*Olearia paniculata* の葉から最初に単離された、イソウルセノールと決定された。⁹⁵ 加えて、**35** はこれまでの OSC における数多くの変異導入実験においても報告例がなかった。

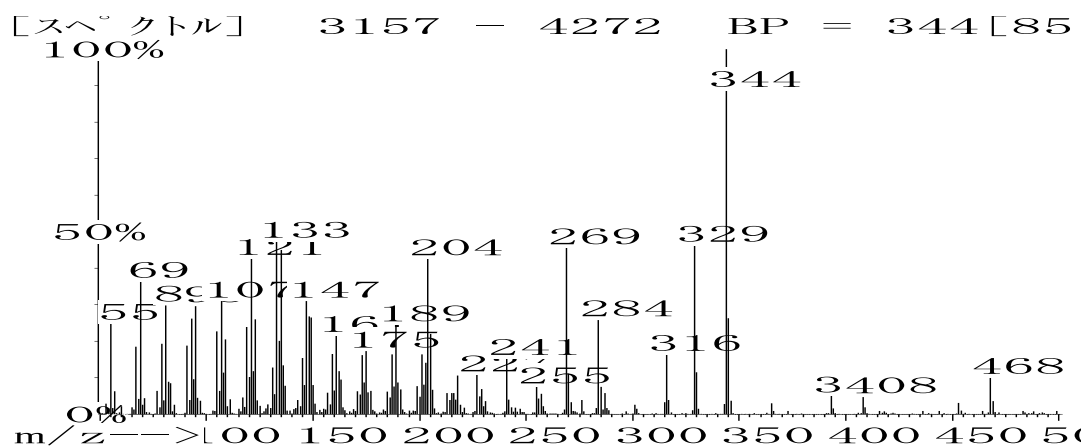
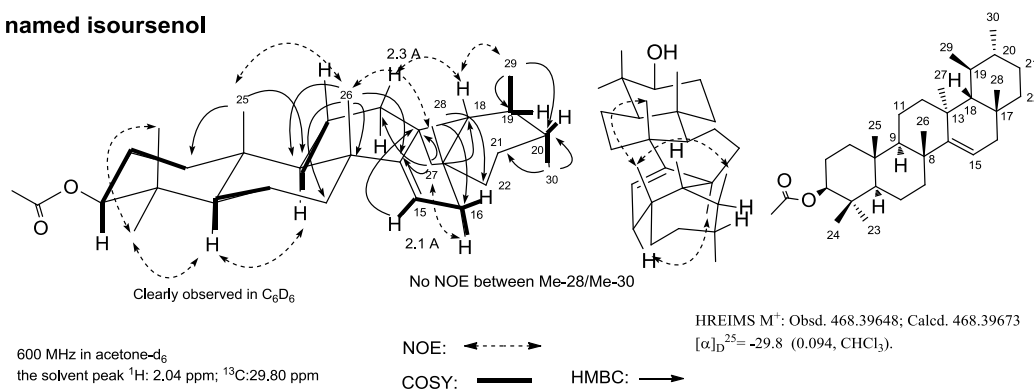


Figure 4-35. 35-Ac の EIMS フラグメントパターン

F728W Product 35 acetate

named isoursenol



NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C
1	1.03(m);1.62(m)	38.02(t)	9	1.35 (m)	49.88(d)	17	—	34.54(s)	25	0.964(3H,s)	15.62(q)
2	1.58(2H, m)	24.17(t)	10	—	38.31(s)	18	0.93 (m)	61.40(d)	26	1.079(3H,s)	26.72(q)
3	4.41(dd, 11.2, 5.0 Hz)	81.17 (d)	11	1.57 (m);1.63(m)	18.09 (t)	19	1.36 (m)	36.19 (d)	27	0.968 (3H,s)	19.83 (q)
4	—	38.59(s)	12	1.56(m);1.72(m)	33.04(t)	20	1.29 (m)	37.37(d)	28	0.933 (3H, s)	37.44(q)
5	0.90 (dd, J=12.5, 2.7 Hz)	56.33(d)	13	—	40.81 (s)	21	1.50(m);1.55(m)	29.09 (t)	29	1.030 (3H, d, J=7.0 Hz)	27.88 (q)
6	1.45(m);1.58(m)	19.39(t)	14	—	160.2 (s)	22	1.29 (m); 1.48 (m)	39.14 (t)	30	0.977(3H, d, J=6.8 Hz)	22.67(q)
7	1.33 (m); 2.02 (m)	42.63 (t)	15	5.52 (dd, J=7.7, 2.5 Hz)	117.1 (d)	23	0.844 (3H, s)	28.27 (q)	31	—	170.9 (s)
8	—	39.68 (s)	16	1.71(m); 2.08 (m)	41.27(t)	24	0.872(3H,s)	16.95(q)	32	1.979 (3H, s)	21.04 (q)

Figure 4-36. 35-Ac の NMR 解析結果

Product 36 acetate produced by F728W (solid)

36-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-37、38 にそれぞれ示した。

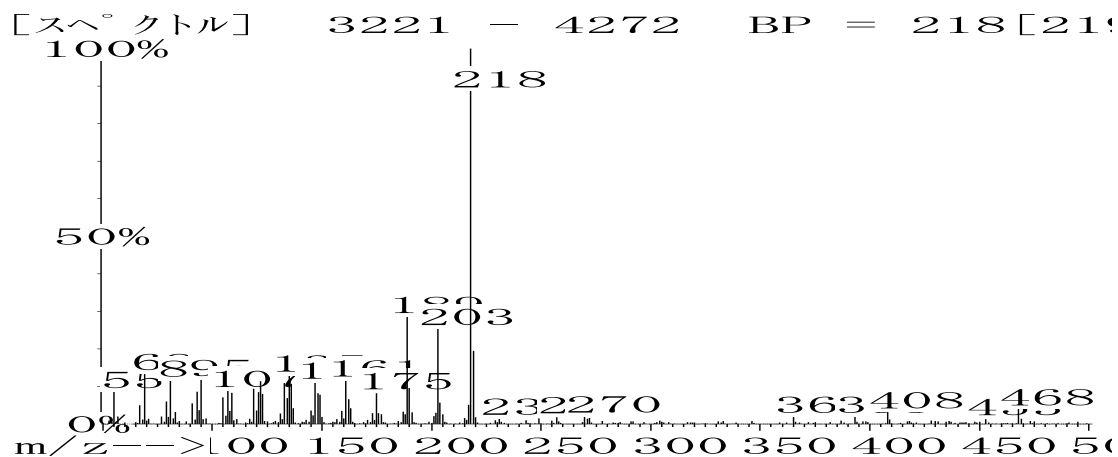
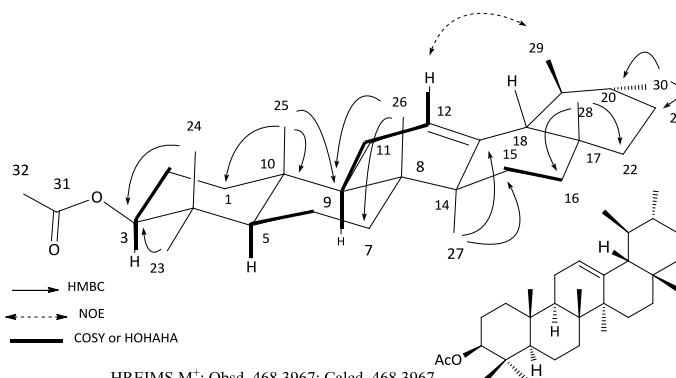
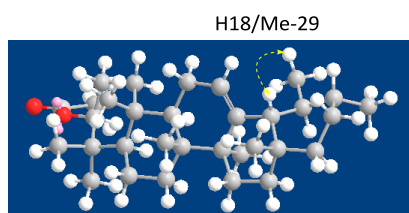


Figure 4-37. 36-Ac の EIMS フラグメントパターン

Product 36, produced by F728W α -amyrin acetate



HREIMS M^+ : Obsd. 468.3967; Calcd. 468.3967

$[\alpha]_D^{20} = +78.6$ (0.03, $CHCl_3$), cf. lit. value

$[\alpha]_D^{20} = +75.7$ Carcache-Blanco, Esperanza J.;

Natural Product Research 2006, V20(4), P327-334

NMR data in C_6D_6 (7.28 ppm for 1H and 128.0 for ^{13}C)
600 MHz

NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C
1	0.84(m);1.48(m)	38.39	9	1.58(m)	47.89	17	—	34.05	25	0.964(3H,s)	15.84
2	1.71(m);1.83(m)	23.93	10	—	36.87	18	1.54(m)	59.45	26	1.161(3H,s)	17.08
3	4.83(dd, J=11.8, 4.6Hz)	80.54	11	1.92(2H, m)	23.60	19	1.57(m) ^a	40.11 ^a	27	1.275(3H, s)	23.58
4	—	37.86	12	5.328(t, J=3.6Hz)	124.9	20	1.04(m) ^a	39.95 ^a	28	1.088(3H, s)	17.75
5	0.85(bd, J=12.6)	55.55	13	—	139.8	21	1.48(m);1.57(m)	31.63	29	1.122(d, J=6.5Hz) ^b	21.59 ^b
6	1.44(m);1.56(m)	18.52	14	—	42.36	22	1.48(m);1.63(m)	41.91	30	1.126(d, J=6.5Hz) ^b	29.04 ^b
7	1.42(m);1.63(m)	33.18	15	1.12(m); 2.00(m)	27.05	23	1.047(3H,s)	28.23	31	—	169.9
8	—	40.29	16	1.01(m);2.19(m)	28.46	24	1.047(3H,s)	17.03	32	1.880(3H,s)	20.83

a and *b*: the assignment of the carbon and proton signals may be reversed.

Figure 4-38. 36-Ac の NMR 解析結果

Product 5 Acetate (produced by F728H and F728W mutants (solid))

5-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-39、40 にそれぞれ示した。

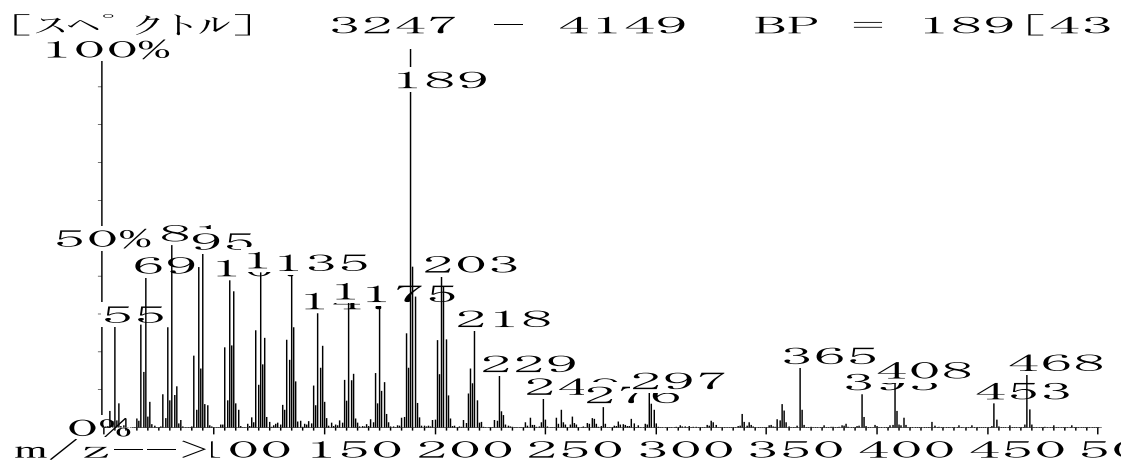


Figure 4-39. 5-Ac の EIMS フラグメントパターン

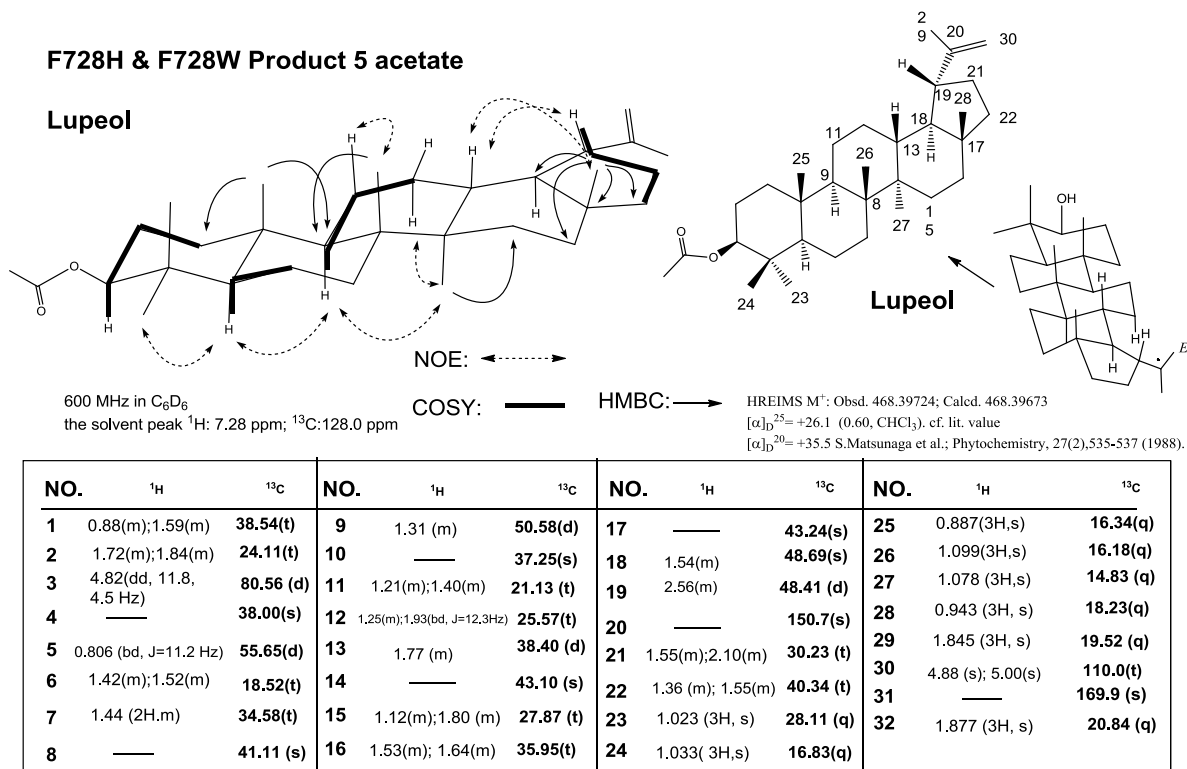


Figure 4-40. 5-Ac の NMR 解析結果

Product 15 acetate produced by F728H and F728W (oil)

15-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-41、42 にそれぞれ示した。

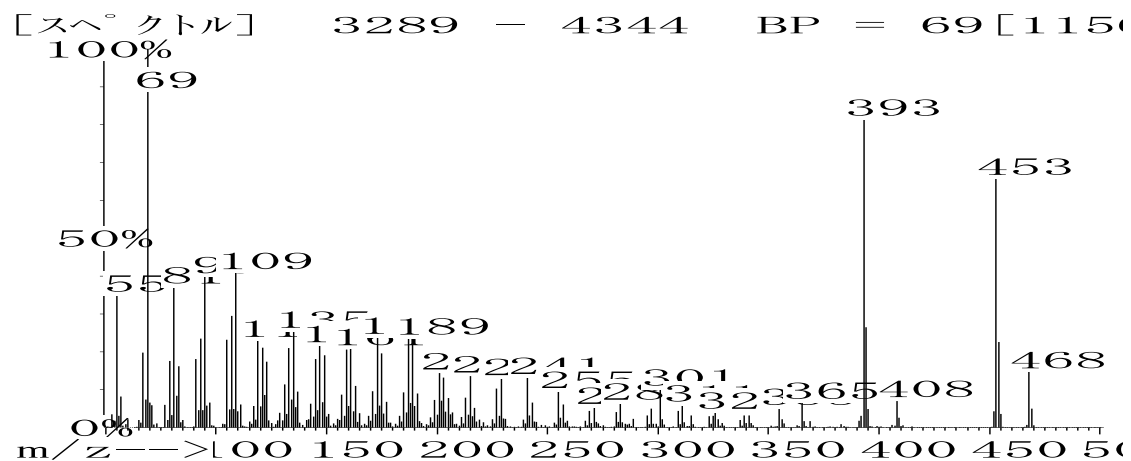


Figure 4-41. 15-Ac の EIMS フラグメントパターン

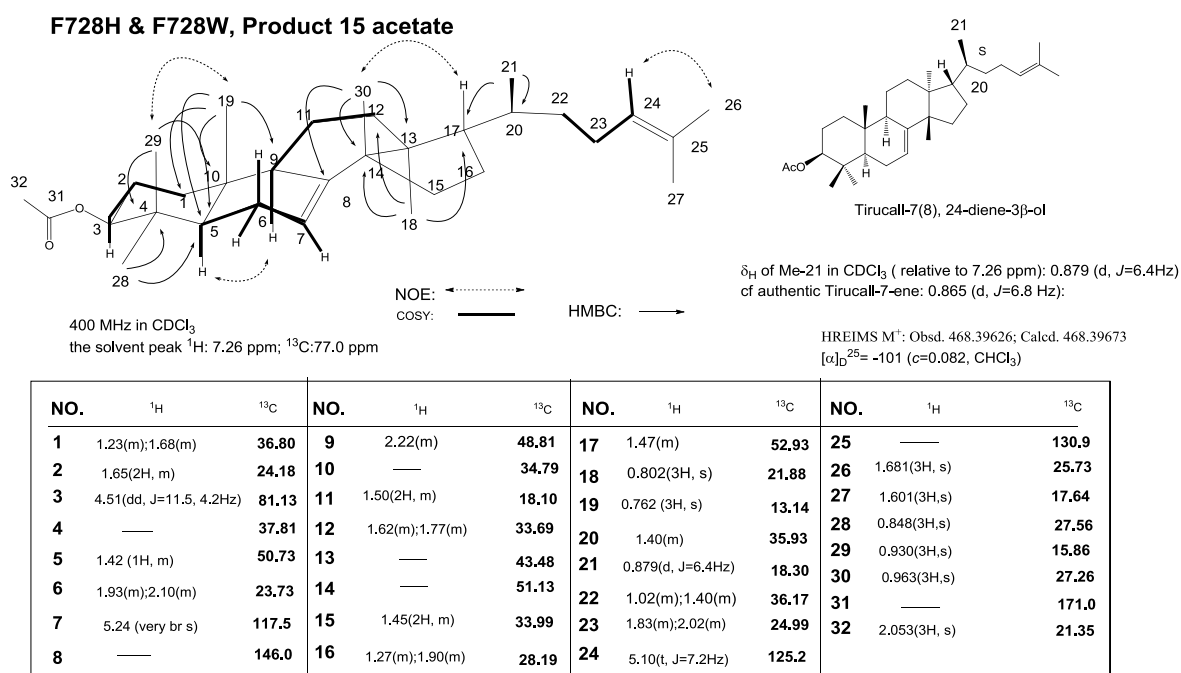


Figure 4-42. 15-Ac の NMR 解析結果

Product 37 acetate produced by F728H and F728W mutants (solid)

37-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-43、44 にそれぞれ示した。

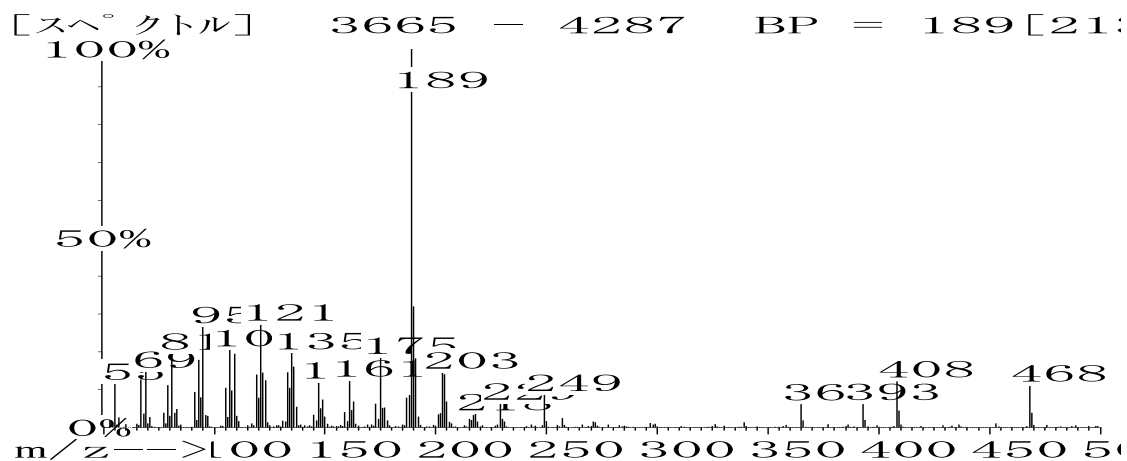
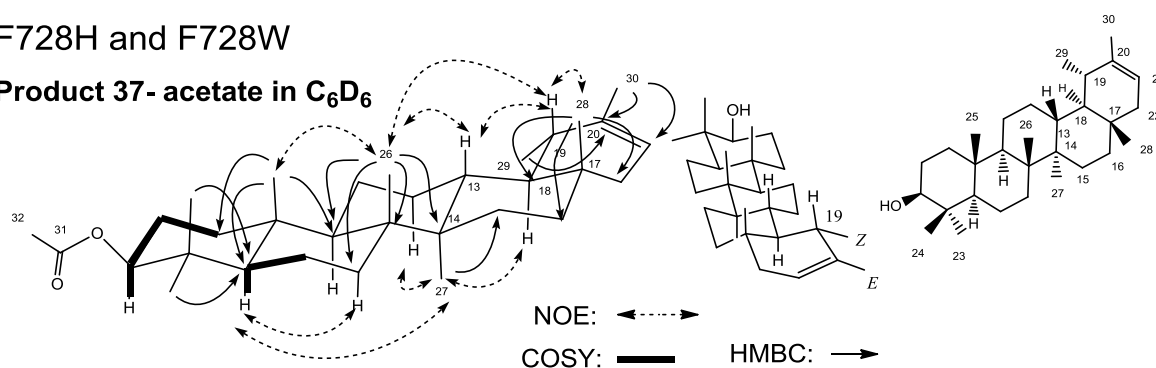


Figure 4-43. 37-Ac の EIMS フラグメントパターン

F728H and F728W

Product 37- acetate in C₆D₆



600 MHz in C₆D₆

the solvent peak ¹H: 7.28 ppm; ¹³C:128.0 ppm

HREIMS M⁺: Obsd. 468.39626; Calcd. 468.39673

[α]_D²⁵ = +43.9 (0.36, CHCl₃). cf. lit. value

[α]_D²⁰ = +53.2 S. Burrows et al.; Journal of the Chemical Society, 1938, 2042-2047.

NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C
1	0.93 (m);1.66(m)	38.57(t)	9	1.32 (m)	50.53(d)	17	—	34.69(s)	25	0.932(3H,s)	16.51(q)
2	1.76(m);1.90(m)	24.12(t)	10	—	37.19(s)	18	1.25(m)	49.15(d)	26	1.124(3H,s)	16.23(q)
3	4.85(dd, 11.8, 4.5 Hz)	80.56 (d)	11	1.30(m);1.53 (m)	21.83 (t)	19	1.70(m)	36.68 (d)	27	1.067 (3H,s)	14.99 (q)
4	—	38.01(s)	12	1.27(m);1.72(m)	27.94(t)	20	—	139.7(s)	28	0.9999 (3H, s)	18.01(q)
5	0.823 (bd, J=11.1 Hz)	55.64(d)	13	1.72 (m)	39.55(d)	21	5.53 (d, J=6.61Hz)	119.5 (d)	29	1.201 (3H, d, J=6.4 Hz)	22.79(q)
6	1.43(m);1.53(m)	18.49(t)	14	—	42.59 (s)	22	1.78 (m); 2.00(bd, 16.0Hz)	42.63 (t)	30	1.831 (3H, s)	21.83 (q)
7	1.45 (2H,m)	34.50(t)	15	1.15(m);1.92 (m)	27.46 (t)	23	1.051 (3H, s)	28.12 (q)	31	—	169.9 (s)
8	—	41.34 (s)	16	1.39(m); 1.49(m)	37.13(t)	24	1.037 (3H,s)	16.86(q)	32	1.895 (3H, s)	20.84 (q)

Figure 4-44. 37-Ac の NMR 解析結果

Product 38 acetate produced by F728W (solid)

38-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-45、46 にそれぞれ示した。

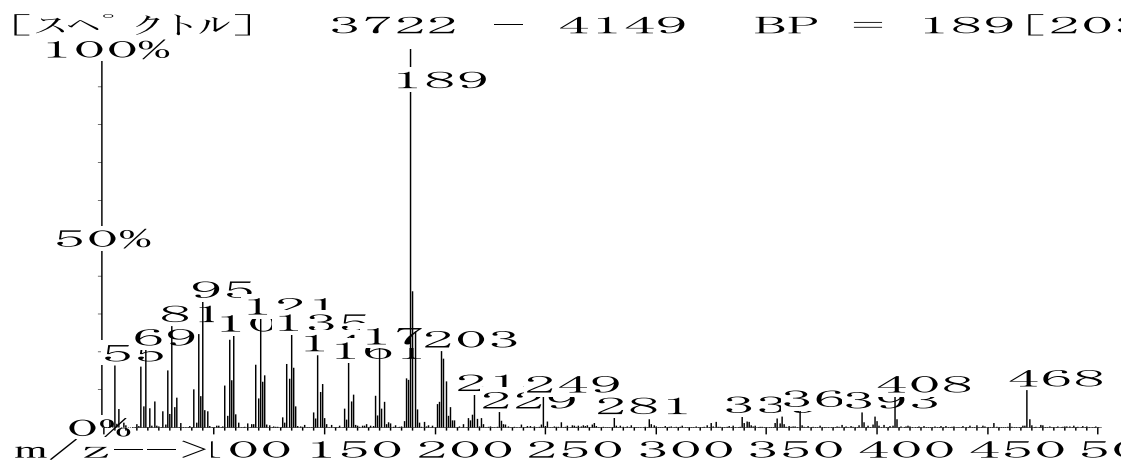
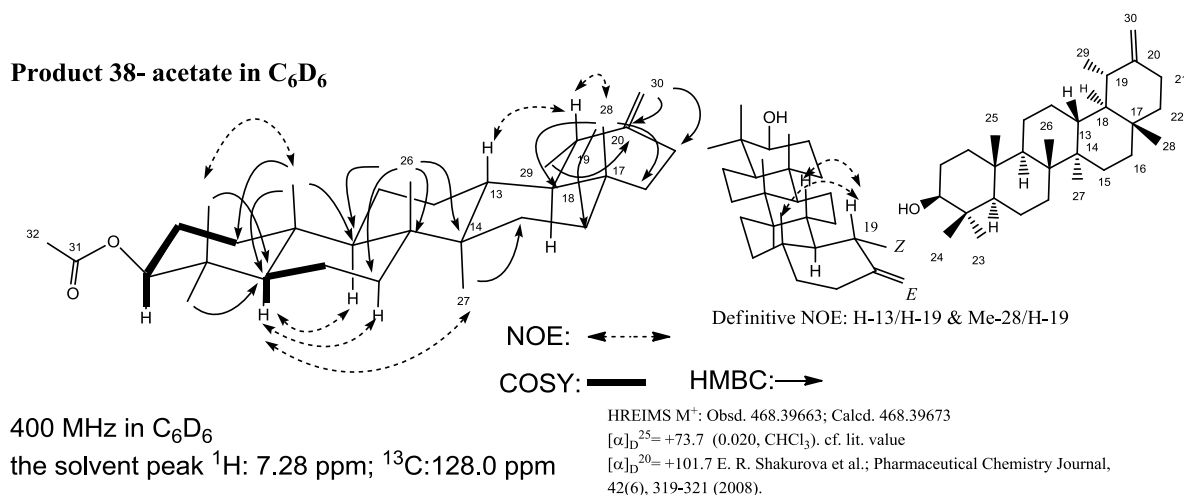


Figure 4-45. 38-Ac の EIMS フラグメントパターン



NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C
1	0.90 (m);1.65(m)	38.49 (t)	9	1.32 (m)	50.53(d)	17	—	34.76(s)	25	0.913(3H,s)	16.02(q)
2	1.76(m);1.90(m)	24.10(t)	10	—	37.15(s)	18	1.08 (m)	48.91(d)	26	1.060(3H,s)	16.83(q)
3	4.85(dd, 11.6, 4.4 Hz)	80.52 (d)	11	1.20(m);1.51 (m)	21.59 (t)	19	2.27(m)	39.76 (d)	27	1.038 (3H, s)	14.98 (q)
4	—	37.98 (s)	12	1.18 (m);1.75(m)	26.48 (t)	20	—	139.7(s)	28	1.127 (3H, s)	19.81 (q)
5	0.823 (bd, J=11.1 Hz)	55.64(d)	13	1.67 (m)	39.42(d)	21	2.36 (m); 2.60 (m)	25.98 (t)	29	1.244 (3H, d, J=6.8 Hz)	25.69(q)
6	1.43(m);1.55(m)	18.44(t)	14	—	42.23 (s)	22	1.47 (m); 1.56(m)	39.19 (t)	30	4.92 (2H, bd, J=6.8 Hz)	107.7 (t)
7	1.43 (2H,m)	34.28(t)	15	1.05(m);1.80 (m)	27.01 (t)	23	1.038 (3H, s)	28.08 (q)	31	—	170.0 (s)
8	—	41.09 (s)	16	1.32 (2H, m)	38.68(t)	24	1.052 (3H,s)	16.47(q)	32	1.891 (3H, s)	20.86 (q)

Figure 4-46. 38-Ac の NMR 解析結果

Product 39 acetate produced by both F728H and F728W (oil)

39-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 4-47、48 にそれぞれ示した。プロダクト **39** の構造は次のようにして決定された。3つのオレフィンメチル基が $\delta_{\text{H}}=1.67$ ppm (Me26, 3H, s)、1.69 (Me21, 3H, br s)、1.60 ppm (Me27, 3H, s) で検出された。HMBC スペクトルにおいて、Me26 と Me27 の両方のプロトンシグナルが C25 ($\delta_{\text{C}}=131.2$ ppm, s) と C24 (124.6 ppm, d) の両方と相関を示した。更に、Me21 ($\delta_{\text{H}}=1.69$ ppm, 3H, br s) と H22 (1.88, 1H, m; 1.99 ppm, 1H, m) でも C20 ($\delta_{\text{C}}=125.9$ ppm, s) と C17 (136.4 ppm, s) と強い HMBC クロスピークが観測された。これらの結果から、二重結合の位置 (C24-C25 と C17-C20) が明らかになった。Me21 と H12 ($\delta_{\text{H}}=2.27$ ppm, 1H, d, $J=15.8$ Hz) および H22 (1.88, m; 1.99, m, each 1H) と H16 (2.22 ppm, 1H, m) との間に明確な NOE が見られたため、二重結合の *E* 異性体の存在が示唆された。H5 ($\delta_{\text{H}}=0.83$ ppm, 1H, m) と H9 (1.37 ppm, 1H, m) との間の強い NOE から、H9 が α -配向であることが示唆された。故に、**39** の構造は (17*E*)-dammara-17(20),24-diene-3 β -ol として帰属された。類似化合物 (17*Z*)-protostadienol が抗生活性を示すヘルボール酸 (フシダン骨格) の生合成前駆体として見出された。⁹⁶⁻⁹⁹。Protostadienol と **39** の構造の相違は次のとおりである。Protostadienol での 9 β -H と **39** での 9 α -H、そして C17-C20 の二重結合は protostadienol は *Z* 配置だが **39** では *E* 配置である。私の知る限りでは、以前に報告例のない化合物 **39** は非天然型天然物である。

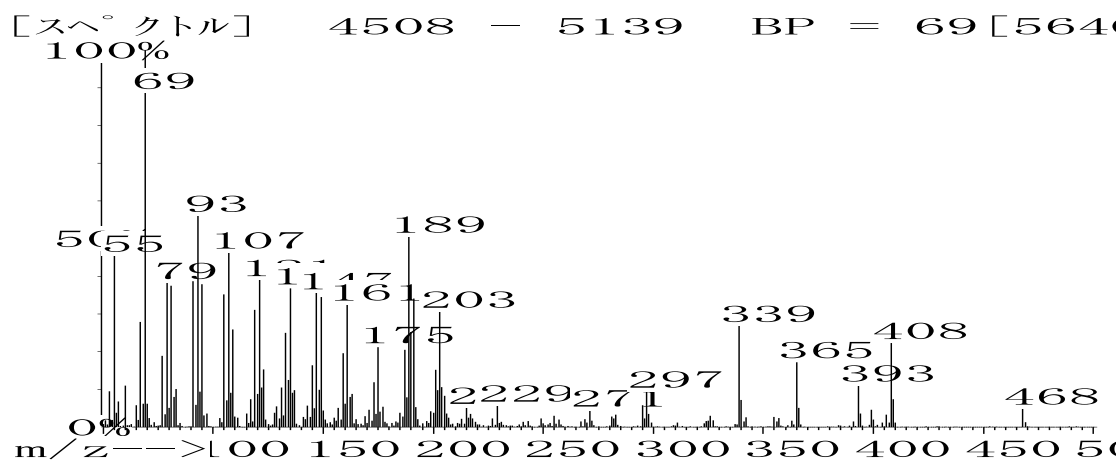
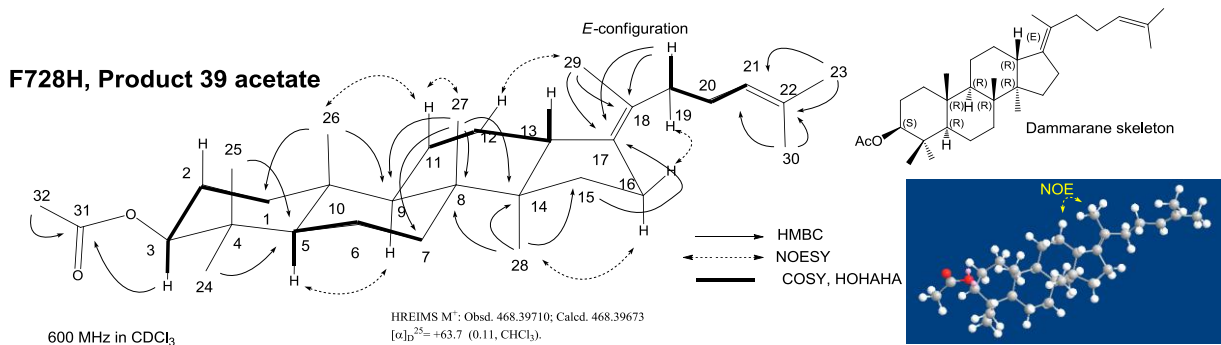


Figure 4-47. **39-Ac** の EIMS フラグメントパターン



NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C
1	1.06(m); (m), 1.62(m)	38.73	9	1.37 (m)	50.48	17	—	136.4	25	0.848 (3H, s)	16.48 ^b
2	1.65(2H,m)	23.70	10	—	36.99	18	—	125.9	26	0.878 (3H, s)	16.44 ^b
3	4.48(dd, J=10.8, 5.5 Hz)	80.93	11	1.33(m); 1.50 (m)	21.57	19	1.88(m);1.99(m)	37.23	27	0.972 (3H, s)	15.58
4	—	37.89	12	1.42(m);2.27 (bd, J=15.8 Hz)	27.09	20	2.03(2H,m)	26.07	28	0.789 (3H, s)	16.43 ^b
5	0.83 (m)	55.98	13	2.31 (bd, J=12.1Hz)	47.06	21	5.12(1H, t, J=6.9 Hz)	124.6	29	1.689 (3H, bs)	17.60 ^a
6	1.44 (m); 1.53 (m)	18.13	14	—	49.53	22	—	131.2	30	1.604 (3H, s)	17.57 ^a
7	1.34(m);1.51(m)	35.43	15	1.10(m);1.0(m)	30.22	23	1.668 (3H, s)	25.72	31	—	171.0
8	—	39.88	16	2.13(m);2.22(m)	28.70	24	0.848 (3H, s)	27.93	32	2.042 (3H, s)	21.31

a,b: The carbon signals are indistinguishable, due to the very close chemical shifts.

Figure 4-48. 39-Ac の NMR 解析結果

第 5 章

F474 残基の機能解析

5-1.	背景と目的	166
5-2.	SHC F365 残基	168
5-3.	<i>S. cerevisiae</i> ラノステロール合成酵素 F445 残基	170
5-4.	変異株の作製	172
5-5.	プロダクトプロファイル	174
5-6.	野生株に対する変異株の相対活性	181
5-7.	CD 測定	189
5-8.	F474 残基のまとめ	190
5-9.	プロダクトのスペクトルデータ	191

5-1. 背景と目的

NCBI protein search により 9 種のトリテルペン環化酵素アミノ酸配列を入手し、CLC sequence viewer (<http://www.clcbio.co.jp/>) マルチプルアラインメントを作成し、GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>) により図を作成した (Figure 5-1)。

β-amyryn synthase	EtAS	:	ISKGSWTF	ESDQ	:	477
	PNY1	:	ISKGSWTF	ESDQ	:	478
	BPY	:	ISKGSWTF	ESDQ	:	477
	PSY	:	ISKGSWTF	ESDQ	:	477
Lupeol synthase	TRW	:	TSKGAWTF	ESIQ	:	477
	OEW	:	TSKGAWTF	ESMQ	:	475
	BPW	:	INKGAWTF	ESMQ	:	474
	AtCAS1	:	ISKGAWTF	ESTA	:	475
	HsLAS	:	MRKGGFSE	STL	:	447
	SHC	:	LKPGGEAE	QFD	:	368

Figure 5-1. F474 残基周辺のマルチプルアライメント (*部分が F474 残基)

EtAS: β-amyryn synthase from *E. tirucalli* (BAE43642)

PNY1: β-amyryn synthase from *P. ginseng* (BAA33461)

PSY: β-amyryn synthase from *P. sativum* (BAA97558)

OEW: lupeol synthase from *O. europaea* (BAA86930)

TRW: lupeol synthase from *T. officinale* (BAA86932)

AtCAS1: cycloartenol synthase from *A. thaliana* (At2g07050)

ScLAS: lanosterol synthase from *S. cerevisiae* (AAB68891)

SHC: squalene-hopene cyclase from *A. acidocaldarius* (ACV59449)

この残基はマルチプルアライメント (Figure 5-1) において、高度に Phe が保存される部位であり、SHC F365 残基や酵母ラノステロール合成酵素 (ScLAS) F445 残基に相当する。SHC F365 残基はカチオン- π 相互作用により 2 環性カチオンの安定化に参与していることを当研究室で報告した。^{43,55} ScLAS においてもその部位特異的変異株のプロダクトプロファイルから、カチオン- π 相互作用を担っていることが推定された。

また、ホモロジーモデリングにおいて F474 残基は B 環の近傍に位置していること示唆された (Figure 5-2)。そこで、F474 残基の芳香環が重要なのか、バルクサイズが重要なのかを決定するために部位特異的変異導入を行った。

本章では、F474 残基への部位特異的変異導入から以下の実験を通してその機能を推定した。

各変異株の（１）プロダクトプロファイルの決定、（２）野生株に対する相対活性測定、（３）CD測定。

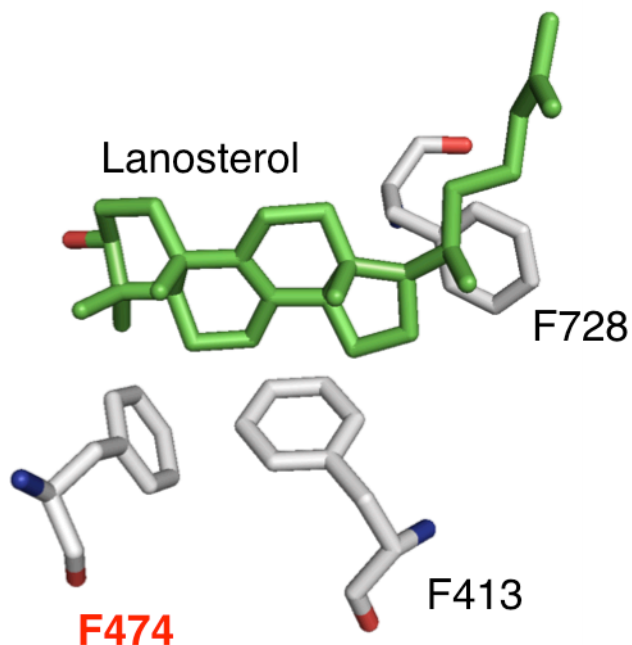


Figure 5-2. EtAS ホモロジーモデリングにおける F474 残基

以下のようにしてホモロジーモデリングを作成した。EtAS アミノ酸配列をモデリングサーバ CPHModels (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) でホモロジーモデリングを作成した。作成したホモロジーモデリングとヒト OSC の X 線結晶構造を PyMOL (<http://www.pymol.org>) で重ねあわせ、ラノステロール分子と EtAS F728、F474、F413 を表示した。緑色化合物はラノステロール分子を表し、基質のおおよその位置を示している。F474 残基は基質のおおよそ B 環の近傍に存在していることが示唆された。

5-2. SHC F365 残基^{43,55}

SHC F365 残基は当研究室により 2 環性カチオンをカチオン- π 相互作用により安定化していることを完全に証明した。これは、Phe のベンゼン環の 1~3 箇所の水素をフッ素に置換した非天然型フルオロフェニルアラニンを用いることで達成された。非天然型フルオロフェニルアラニンは天然型の Phe と変わらないバルクサイズをもち、フッ素の数の増加に従ってカチオン- π 結合エネルギーが低下する。したがって、純粋にカチオン- π 相互作用が働いているか否かを判断することができる。そこで、Figure 5-4 を見てみる。Figure 5-4 は横軸にカチオン- π 結合エネルギーを、縦軸に比活性をプロットしたものである。この図から、カチオン- π 結合エネルギーと比活性は正の相関を示しているため、F365 残基において確かにカチオン- π 相互作用が働いていることが証明された。

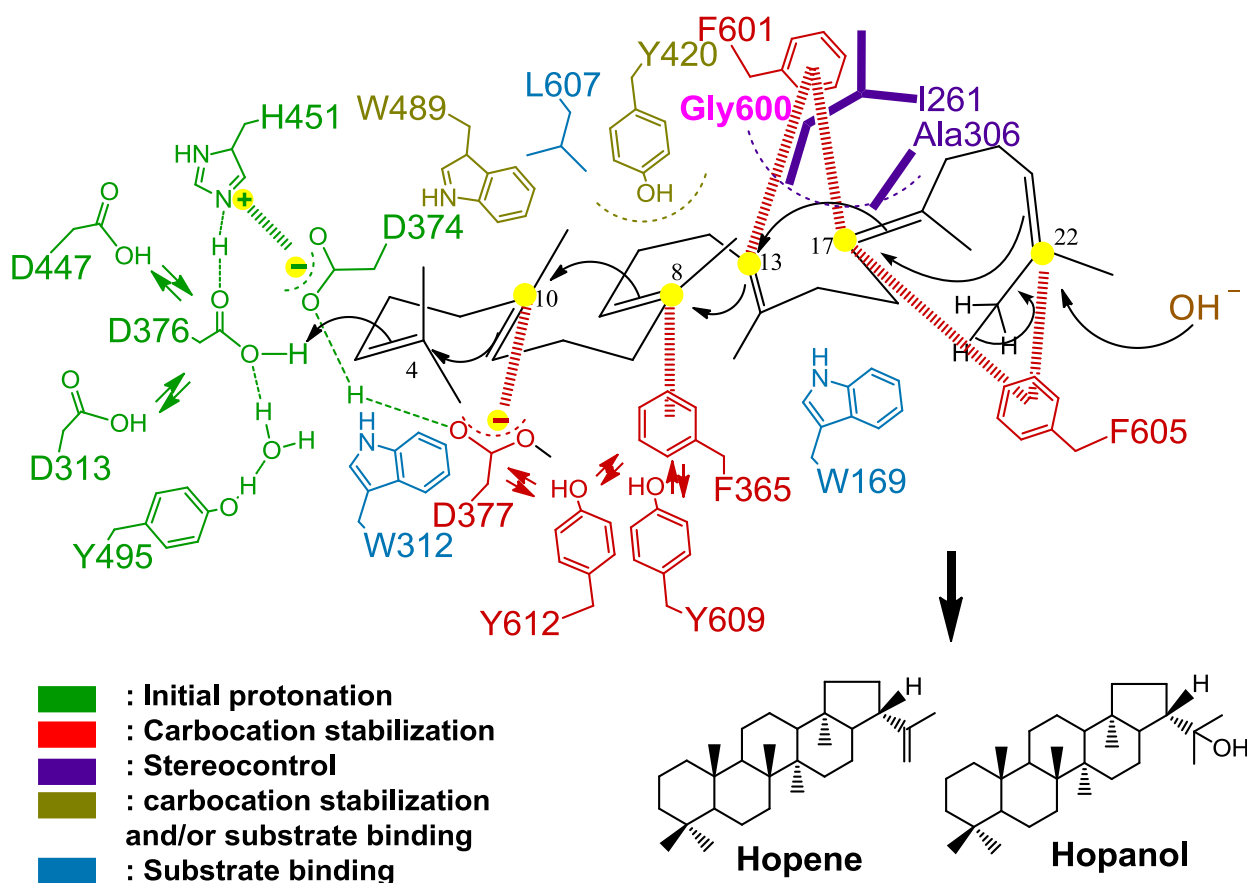

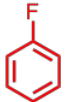
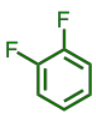
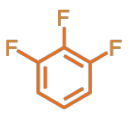


Figure 5-3. SHC の活性部位キャビティーに存在する重要なアミノ酸残基とその機能²²

(T. Hoshino and T. Sato, *Chem. Commun.*, **2002**, 291-301 より引用)

Table 5-1. SHC F365 のフルオロ置換非天然型フェニルアラニン変異株の速度論定数⁵⁵

	Structure	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	cation- π binding energy (kcal/mol)
wild-type (Phe)		24.2	119	27.1
F365F ₁ -F		35.2	65.1	21.9
F365F ₂ -F		41.6	55.2	16.8
F365F ₃ -F		47.9	45.1	12.4

酵素反応条件 (5 mL系) は以下のとおりであった。0.2% Triton X-100、50 μg 精製酵素、60 mM クエン酸バッファー (pH 6.0)、反応時間 60 min、反応温度 50°C。15% KOH/MeOH (6 mL) 添加により反応停止。ヘキサン抽出 (5 mL x 4) の後に GCによりプロダクトを定量。 K_m 、 k_{cat} は Lineweaver-Burk プロットから算出された。

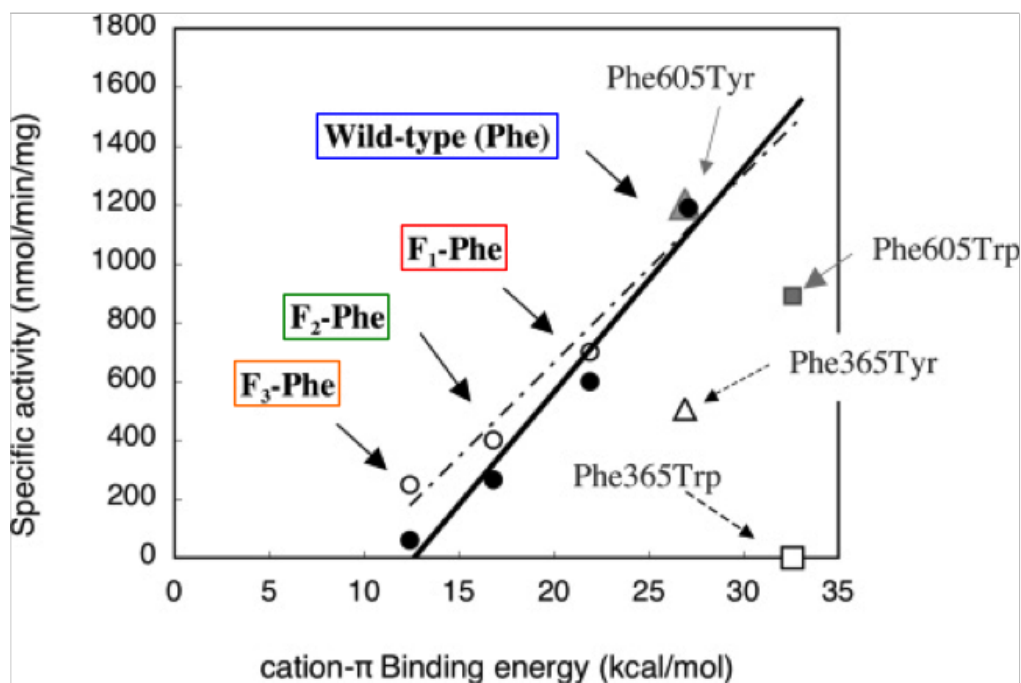


Figure 5-4. SHC F365 のフルオロ置換非天然型フェニルアラニン変異株のカチオン- π 結合エネルギーと比活性の相関関係⁵⁵

(N. Morikubo, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13184-13194 より引用)

x 軸にカチオン- π 結合エネルギーを、y 軸に比活性をプロット

5-3. *S. cerevisiae* ラノステロール合成酵素 F445 残基⁵⁶

F474 残基は、*Sacharomyces cerevisiae* 由来のラノステロール合成酵素 (ScLAS) においては、F445 残基に相当する。Tung-Kung Wu 氏らによって F445 残基への変異導入実験が行われた。この残基を 20 種類のアミノ酸に置換したところ、F445C、M、N、T、D 変異酵素は、三環性のプロダクトと、ラノステロールと脱プロトンの位置が異なった Parkeol や Lanostadienol も生成した。また、非極性残基ではラノステロールの産生が見られなかったことから、この残基は 3 環性の C14 カチオンと最後の脱プロトンの際のラノステリル C8/C9 カチオンの安定化の役割を担っていることが示唆された。

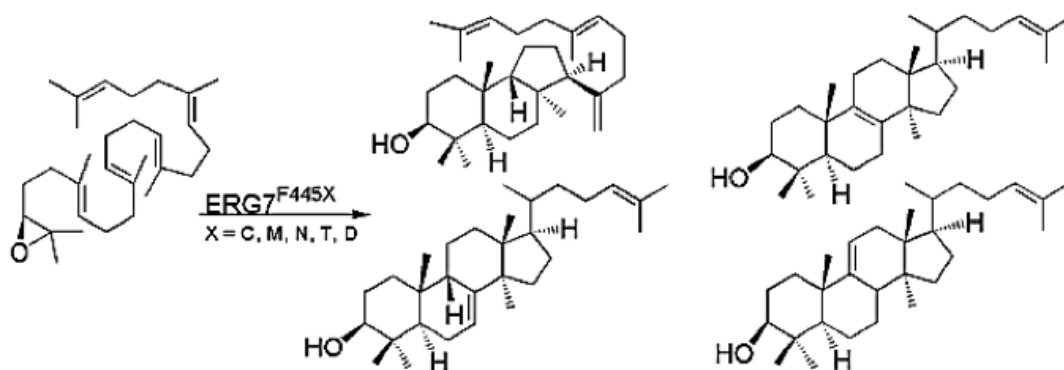


Figure 5-5. ScLAS F445 変異株により産生された環状トリテルペン⁵⁶

(T-K. Wu *et al.*, *Org. Lett.*, **2006**, 8, 4691-4694 より引用)

ScLAS F445 変異株からは通常の環化経路 (*chair-boat-chair* 型) によるプロダクト (1つの3環性産物と3つの4環性産物) のみが見出された。

Table 5-2. ScLAS F445 変異株のプロダクトプロフィール⁵⁶

	(13 α H)-iso-malabarica-14(26)-17E,21-trien-3 β -ol	lanosterol	parkeol	9 β -lanosta-7,24-dien-3 β -ol
wild-type	-	100	-	-
F445C	10	69	13	8
F445M	7	65	18	10
F445N	10	63	9	18
F445T	49	46	-	5
F445D	21	63	11	5

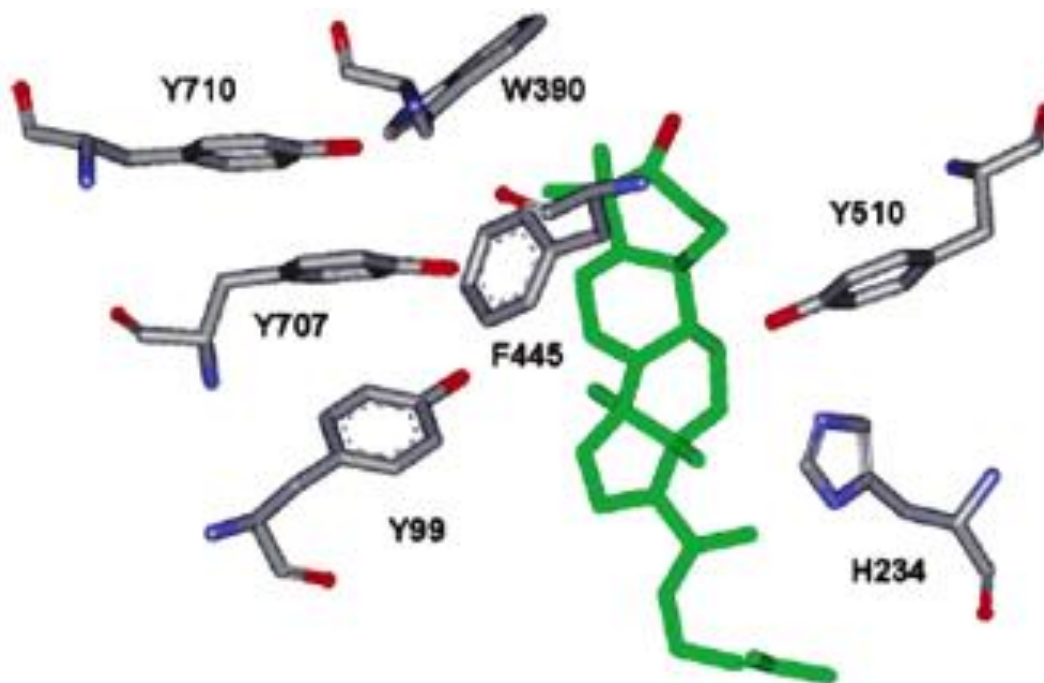


Figure 5-6. ScLAS のホモロジーモデリング⁵⁶

(T-K. Wu *et al.*, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 4691-4694 より引用)

灰色残基：野生株 ScLAS ホモロジーモデリング

緑色化合物：ラノステロール分子

5-4. 変異株の作製

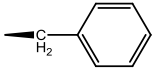
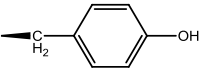
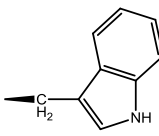
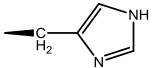

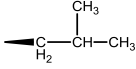
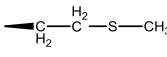

本実験は当研究室 増川、仲田が担当した。

- 1) 変異を導入するためのプライマーを設計した。(Table 5-3)
- 2) アルカリミニプレップ法にて pYES2-EtAS/CT を抽出し、RNase 処理、PEG 沈し、精製した。
- 3) Table 5-3 に示したプライマーを用いて QuikChange 法により部位特異的変異導入した。
- 4) 電気泳動し、特異的増幅を確認した。
- 5) PCR 反応液に *DpnI* 1 μ L 添加し、37°C、2 hr インキュベートした。
- 6) エレクトロポレーション法により *E. coli* DH5 α に形質転換した。
- 7) シングルコロニーからプラスミドをキットミニプレにより精製した。
- 8) キャピラリーシーケンサーにて変異導入を確認した。
- 9) 酢酸リチウム法により *S. cerevisiae* GIL77 へプラスミドを形質転換した。

Table 5-3. QuikChange 用プライマー (下線: 変異導入箇所)

導入残基		Sequence	塩基数
G	Forward	5'-GGATCATGGACT <u>GGC</u> TCTGATCAGGATCATGGTTGG-3'	36
	Reverse	5'-CCAACCATGATCCTGATCAGA <u>GCC</u> AGTCCATGATCC-3'	
A	Forward	5'-CCAAAGGATCATGGACT <u>GCC</u> TCTGATCAGGATC-3'	33
	Reverse	5'-GATCCTGATCAGA <u>GGC</u> AGTCCATGATCCTTTGG-3'	
V	Forward	5'-GGATCATGGACT <u>GTC</u> TCTGATCAGGATCATGGTTG-3'	35
	Reverse	5'-CAACCATGATCCTGATCAGA <u>GAC</u> AGTCCATGATCC-3'	
L	Forward	5'-CCAAAGGATCATGGACT <u>TAC</u> TCTGATCAGGATC-3'	33
	Reverse	5'-GATCCTGATCAGA <u>GTA</u> AGTCCATGATCCTTTGG-3'	
M	Forward	5'-CCAAAGGATCATGGACT <u>ATG</u> TCTGATCAGGATCATGGTTGG-3'	41
	Reverse	5'-CCAACCATGATCCTGATCAGA <u>CAT</u> AGTCCATGATCCTTTGG-3'	
Y	Forward	5'-CCAAAGGATCATGGACT <u>TAC</u> TCTGATCAGGATC-3'	33
	Reverse	5'-GATCCTGATCAGA <u>GTA</u> AGTCCATGATCCTTTGG-3'	
W	Forward	5'-CCAAAGGATCATGGACT <u>TGG</u> TCTGATCAGGATC-3'	33
	Reverse	5'-GATCCTGATCAGA <u>ACC</u> AGTCCATGATCCTTTGG-3'	
H	Forward	5'-CCAAAGGATCATGGACT <u>CACT</u> TCTGATCAGGATC-3'	33
	Reverse	5'-GATCCTGATCAGA <u>GTG</u> AGTCCATGATCCTTTGG-3'	
T	Forward	5'-CCAAAGGATCATGGACT <u>ACCT</u> TCTGATCAGGATC-3'	33
	Reverse	5'-GATCCTGATCAGA <u>GGT</u> AGTCCATGATCCTTTGG-3'	

Table 5-4. 設計した変異株

	構造	カチオン- π 結合エネルギー ⁸⁷ (kcal/mol)	側鎖の ファンデルワールス体積 ⁹⁴ (nm ³)
wild-type (Phe;F)		27.1	0.55298
芳香族残基(カチオン-π相互作用の有無を調べるため)			
Tyr(Y)		26.9	0.6115
Trp(W)		32.6	0.79351
His(H)		21.0	0.37694
脂肪族残基(バルクサイズの重要性を調べるため)			
Gly(G)	—H		0.00279
Ala(A)	—CH ₃		0.05702
Val(V)			0.25674
Leu(L)			0.37876
Met(M)			0.38872
極性残基			
Thr(T)			0.19341

5-5. プロダクトプロファイル

- 1) 第2章に従い、シード培養・本培養・誘導・後培養（100 mL 系）した。
- 2) 集菌後、15% KOH/MeOH にてケン化し、ヘキサンで脂質成分を抽出した。
- 3) 抽出物をエバポレーターにより乾固させた。
- 4) 抽出物をヘキサン 1 mL に溶解し、以下の昇温条件にて GC 及び GC/MS にて解析したなお、インジェクション量は 0.5 μ L であった（Figure 5-9）。

GC column: J&W, DB-1, capillary (Length 30 m, I.D. 0.32 mm, Film Thickness 0.25 μ m)

Injection temp.: 300°C

Column temp.: 190-250°C (10°C/min), 250-260°C (0.35°C/min)

- 5) F474A、M の大量培養により F474 変異株産物を同定した。
- 6) Figure 5-7、5-8 のようにして F474A、M 産物をそれぞれ単離した。

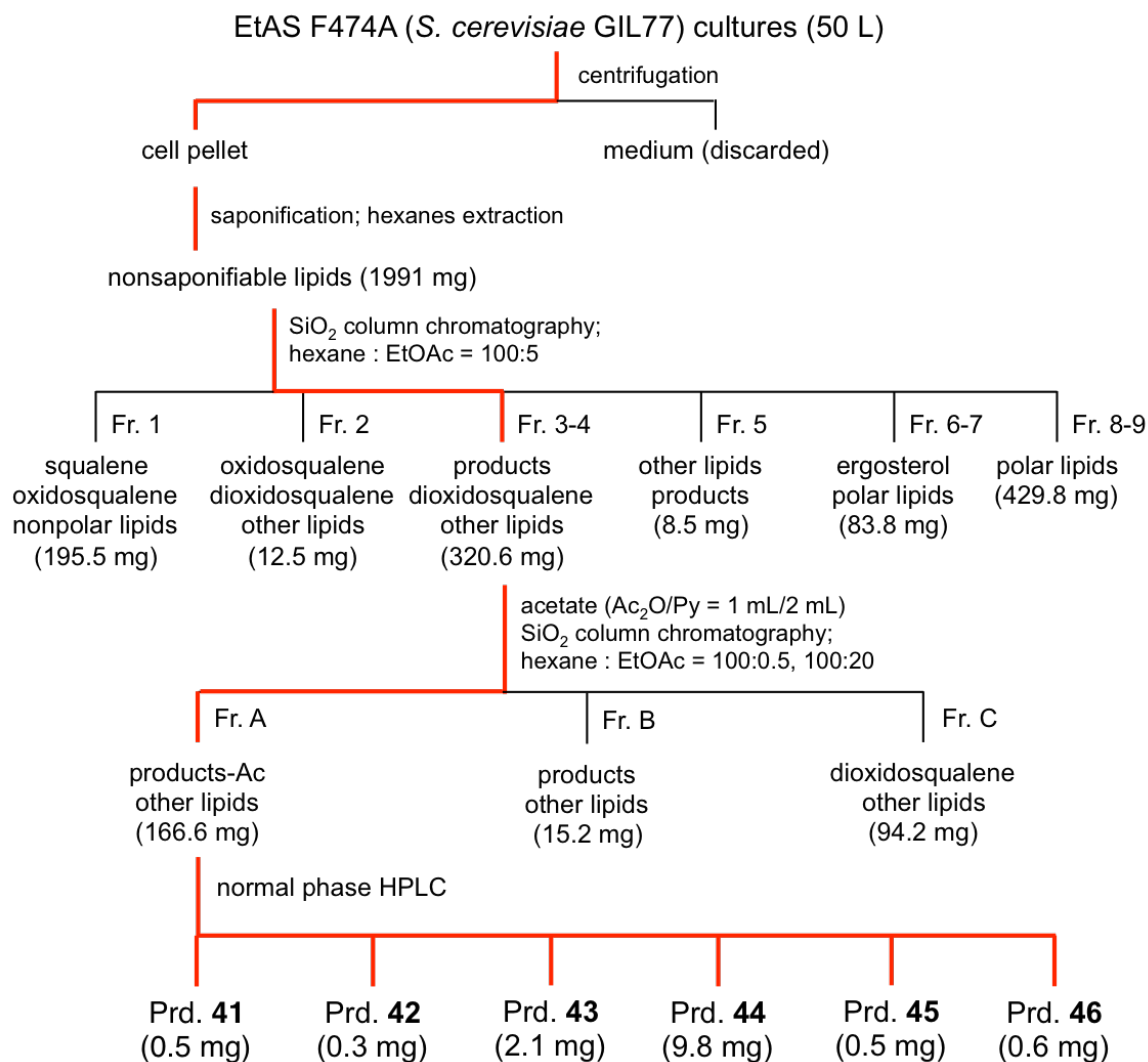


Figure 5-7. F474A 産物の単離手順

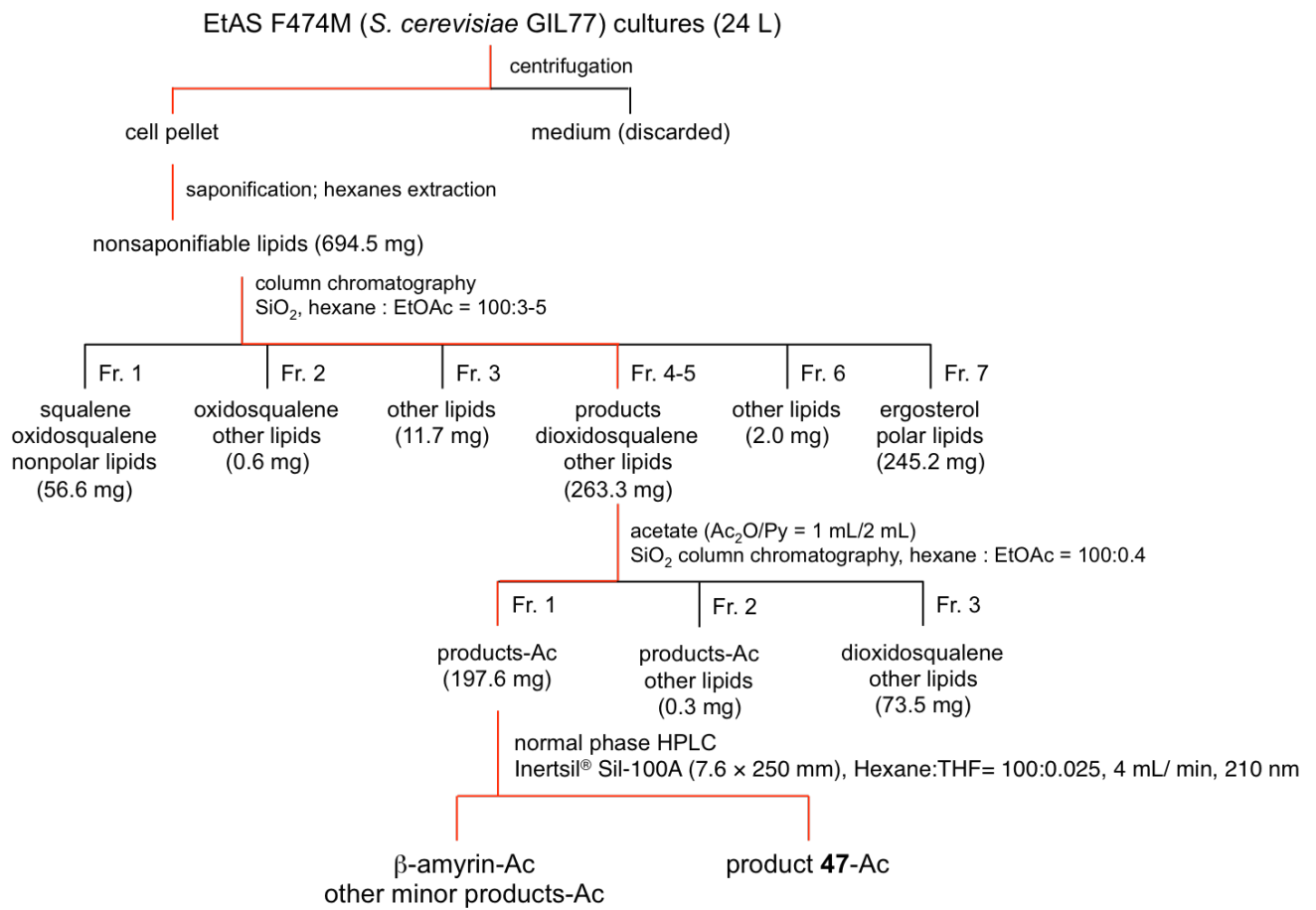


Figure 5-8. F474M 産物の単離手順

菌体抽出物をアセチル化し、GC解析した。

そのため、プロダクトとエルゴステロールがアセチル化されている。

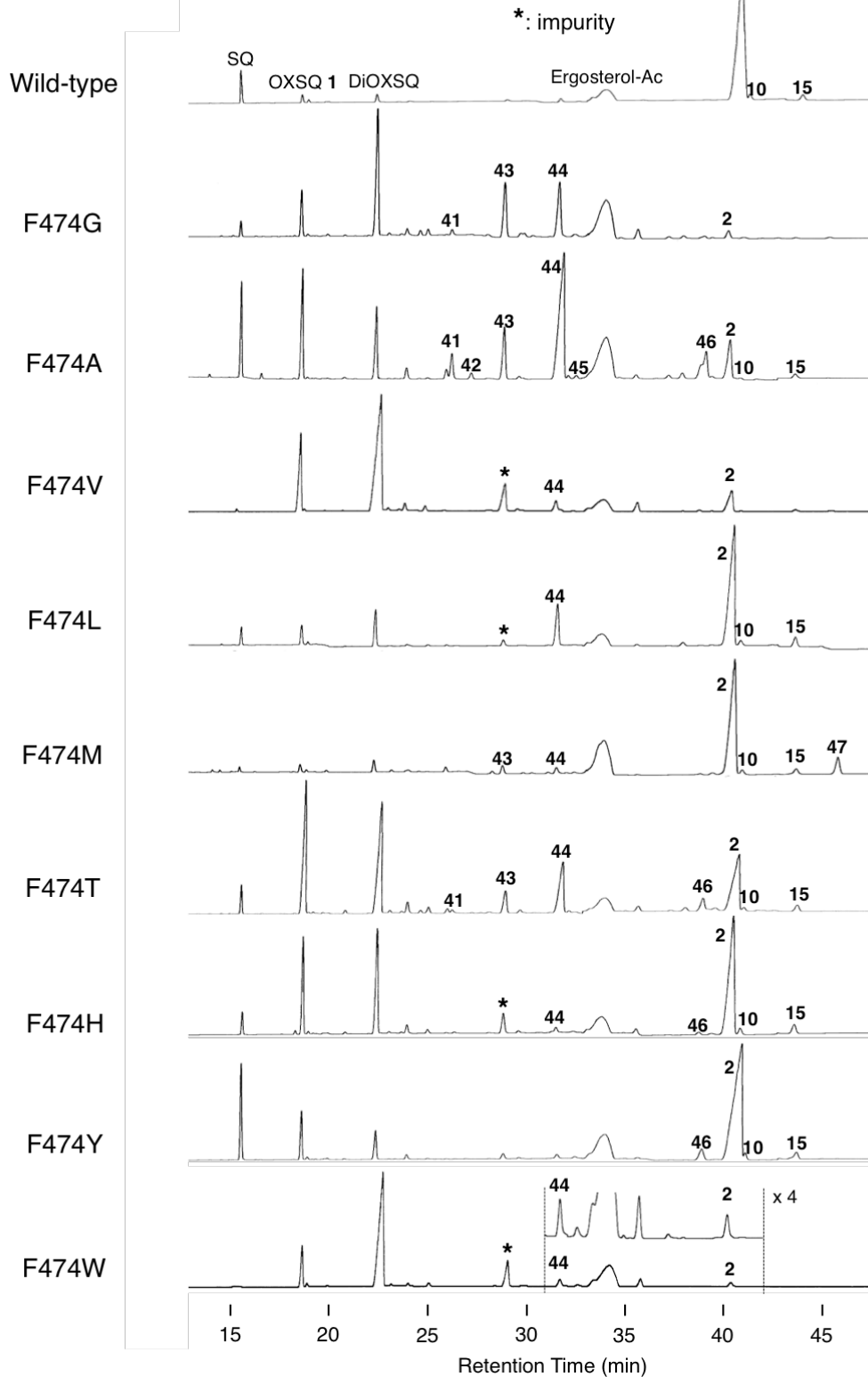


Figure 5-9. アセチル化した酵母へキサン抽出物 (F474 変異株) の GC 解析結果

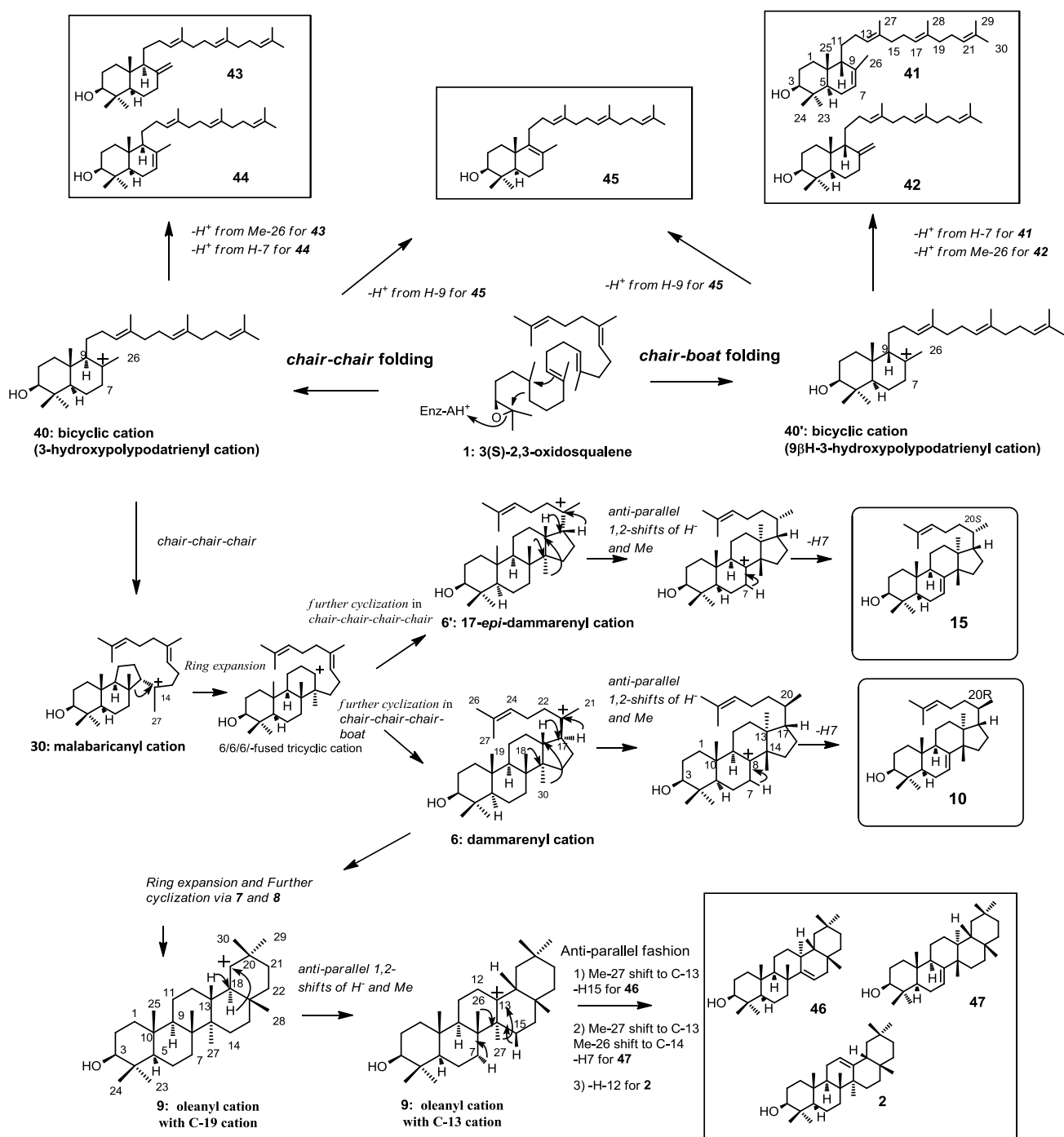
GC カラム : J&W, DB-1, capillary (Length 30 m, I.D.0.32 mm, Film Thickness 0.25 μ m)、注入口温度 : 300°C、カラム温度 : 190-250°C (10°C/min)、 250-270°C (0.35°C/min)

【考察】

Figure 5-9 に各変異株の GC プロファイルを、Scheme 5-1 に F474 変異株産物の推定生合成機構を、Table 5-5 に各変異株のプロダクトプロファイルを示した。F474 変異株からは野生株でも生産される β -アミリン **2** や **15**、**10** の他に、オレアナン骨格を有する **46**、**47** や 2 環性の **41**–**45** が見出された。

Table 5-5 から、野生株では 96.7% の **2** と微量の 4 環性の **15** と **10** (3.3%) を生産した。G と A 変異株では 2 環性産物 (**41**–**44**) を 75~94% 生産したが、**2** は 5.9~21% しか生産されなかった。見出された 2 環性産物は環化開始時に OXSQ **1** が本来の *chair-chair* 型 (C-C 型) に折りたたまれて生産されるもの (**43**、**44**) の他に、熱力学的に不安定な *chair-boat* 型 (C-B 型) の産物 (**41**、**42**) も含まれていた。C-C 型の OSC への変異導入により C-B 型産物が得られた例はなく、本研究が初めての例となった。また、このように環化が途中で停止したプロダクトが見出されたことから、F474 残基は B 環の近傍に存在していることが示唆され、これはホモロジーモデリング (Figure 5-2) による予想を支持する結果となった。脂肪族残基である G や A 変異株で環化が途中で停止したとの結果より、F474 残基もカチオン- π 相互作用を担う可能性が考えられたが、同じ脂肪族残基である V、L、M 変異株では 2 環性産物の比率は大幅に減少し、**2** の比率が上昇した。この結果はカチオン- π 相互作用よりも F474 残基のバルクサイズの重要性が考えられた。また、バルクサイズが A と V の中間である T 変異株でも 2 環性産物の比率が高いこともこの考えを支持していた。

芳香族残基への置換ではそれぞれ異なる生成比率を示した。Y 変異株は野生株と類似した生成比率であったが、少量の **46** (4.9%) を生産した。また、2 環性産物の生産は見られなかった。Y のバルクサイズは F (野生株) と類似しているが、Yの方がわずかに大きい。これがわずかな異常環化産物 **46** の生産につながったと考えられる。W は天然型アミノ酸の中で最も大きな残基である。そのため、キャビティの形状がわずかに変化し、**2** の比率 (70%) の減少と 2 環性産物 **43** の生産をもたらしたと考えられる。この結果より、F474 部位は F のバルクサイズが酵素活性に適切である可能性が考えられた。また、H 変異株では約 90% の **2** と 3% の 2 環性産物 **44** の生産が見られ、これは M や L 変異株と同様の比率であった。H と M、L について見てみると類似したバルクサイズを有していることがわかり (Table 5-3)、このこともバルクサイズの重要性を支持するものであった。



Scheme 5-1. F474 変異株産物の推定生合成経路

化合物名は次のとおりである。 **41**: (9βH)-γ-polypodatetraene-3β-ol (γ-isopolypodatetraene-3β-ol と仮称した) ; **42**: (9βH)-α-polypodatetraene-3β-ol (α-isopolypodatetraene-3β-ol と仮称した) ; **43**: α-polypodatetraene-3β-ol; **44**: γ-polypodatetraene-3β-ol; **45**: polypoda-8(9)-13,17,21-tetraene-3β-ol; **15**: tirucalla-7, 24-diene-3β-ol; **10**: butyrospermol; **46**: taraxerol (13α-methyl-27-norolean-14-en-3β-ol); **47**: multiflorenol (13α-methyl-14β-methyl-26-norolean-7-en-3β-ol)

Scheme 5-1 に F474 変異株産物 **2**、**10**、**15**、**41**–**47** の環化経路を示した。OXSQ **1** は 2 環性カチオン **40** を与えるために *chair-chair* 型で折りたたまれる一方、*chair-boat* 型ではカチオン **40'** が与えられた。カチオン中間体 **40'** および **40** における H-7 の脱離によりプロダクト **41** と **44** がそれぞれ形成された。カチオン **40** は更に環化して 6/6/5-3 環系マラバリカニルカチオン **4** を与えた。4 の環拡張により 6/6/6-3 環性カチオンが形成され、引き続く更なる環化により 6/6/6/5-4 環性ダンマレニルカチオン **6** が与えられた。この環化プロセスの間に 2 つの異なるフォールディングコンフォメーションが考えられる。*chair-chair-chair-boat* 型では **6** を、*chair-chair-chair-chair* 型では **6'** (17-エピ-ダンマレニルカチオン) を与える。ハイドライドとメチル基のアンチ-ペリプラナー1,2-転位と引き続く H-7 の脱離によりプロダクト **15** (偽中間体 **6'** 由来) と **10** (実際の中間体 **6** 由来) が形成された。カチオン **6** の環拡張により 6/6/6/6-4 環性バックレニルカチオン **7** が形成され、**7** の環化により 6/6/6/6/5-5 環性ルパニルカチオン **8** が形成された。**8** の環拡張により 6/6/6/6/6-5 環性オレアニル C-19 カチオン **9** が形成され、引き続く 1,2-ハイドライドシフト (H-18 α →C-19、H-13 β →C-18) によりオレアニル C-13 カチオン **9** が形成された。12 α -H の脱離により β -アミリン **2** が与えられた。Me-27 の C-13 カチオンへの転位と 15 β -H の脱プロトンにより **46** が形成された。2 回のアンチパラレル 1,2-転位 (Me-27→C-13、Me-26→C-14) と引き続く 7 α -H の脱離により **47** が与えられた。

Table 5-5. F474 変異株のプロダクトプロファイル (%)

Product Number	Bicycle (C-B type) from cation 3'			Bicycle (C-C type) from cation 3			Bicycle from 3 or 3'	Tetracycle			Pentacycle from cation 8			
	9	10	Total % of cation 3'	11	12	Total % of cation 3	13	14 from cation 5'	15 from cation 5	Total % of 5' and 5.	2	16	17	Total % of cation 8
Wild	-	-	-	-	-	-	-	1.5	1.8	3.3	96.7	-	-	96.7
F474G	1.6	-	1.6	43.2	49.3	92.5	-	-	-	-	5.9	-	-	5.9
F474A	7.5	1.9	9.4	12.8	53.5	66.3	0.3	0.5	2.5	3.0	12.5	8.7	-	21.2
F474V	-	-	-	-	14.2	14.2	-	4.2	4.4	8.6	71.3	5.9	-	77.2
F474L	-	-	-	-	12.0	12.0	-	2.0	4.1	6.1	81.9	-	-	81.9
F474M	-	-	-	1.1	0.9	2.0	-	3.8	4.6	8.4	80.5	1.1	8.0	89.6
F474T	1.8	-	1.8	8.8	27.8	36.6	-	2.0	4.3	6.3	48.0	7.3	-	55.3
F474H	-	-	-	-	3.0	3.0	-	2.2	3.7	5.9	89.6	1.5	-	91.1
F474Y	-	-	-	-	-	-	-	1.9	3.1	5.0	90.1	4.9	-	95.0
F474W	-	-	-	30.1	-	30.1	-	-	-	-	69.9	-	-	69.9

C-B type : chair-boat 型、C-C type : chair-chair 型をそれぞれ表す。

5-6. 野生株に対する変異株の相対活性

F474 残基の芳香環（カチオン- π 相互作用）あるいはバルクサイズ（基質結合）のどちらが重要なのかを調べるために、*in vitro* で速度論解析を試みた。しかし、*in vitro* では活性が弱く、正確に酵素活性を見積もることが困難であった（Figure 5-10）。そのため、F728 変異株と同様、酵母 *in vivo* での変異株の野生株に対する相対活性を測定した。

【*in vitro* 酵素反応】

酵素精製時に界面活性剤として Tween 80 を使用した（Triton X-100 と β -OG も検討したが、精製段階で酵素が不溶化してしまった）。

1. Table 5-6 について、酵素を除いた反応混合液を調製した。
2. 30°C、3 min プレインキュベーションした。
3. 酵素を添加して 20 min インキュベーションした。
4. 100°C、3 min で酵素反応を停止させた。
5. 内部標準としてスクアレン 25 μ g を添加した。
6. 1.2 倍量（3 mL）の 15% KOH/MeOH でケン化した。
7. 4 mL のヘキサンで 3 回抽出した。
8. SiO₂ ショートカラムクロマトグラフィーにより界面活性剤を除去した。
9. GC で定量し、比活性を求めた。

Table 5-6. F474 変異株の *in vitro* 酵素反応組成

	終濃度
EtAS F474X	30 μ g
(3S)-OXSQ	75 μ g
DTT	1 mM
BSA	1 mg/mL
Tween 80	0.05%
KPB	0.1 M (pH 7.0)
Total	2500 μ L

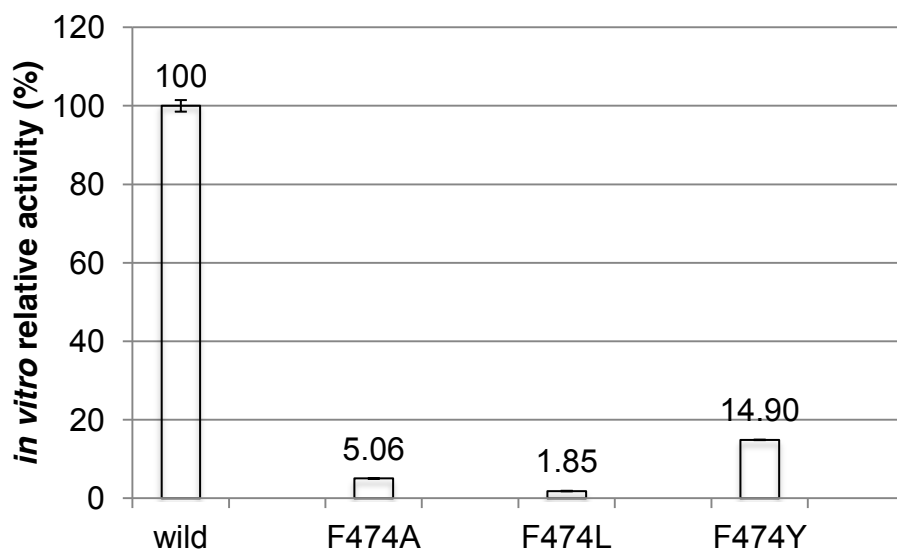


Figure 5-10. 野生株に対する F474A、L、Y 変異株の *in vitro* 相対活性 (%)

野生株 EtAS の比活性 288 nmol/min/mg を 100%とした時の各変異株の活性を相対値で表した。

【方法】

第 4 章の F728 残基の際と同様にして、培養、ウェスタンブロッティング、プロダクトの定量を行い、下記の式によって野生株に対する変異株の相対活性を算出した。

$$\frac{\text{(変異株の単位酵素量あたりのプロダクト生産量)}}{\text{(野生株の単位酵素量あたりのプロダクト生産量)}} \times 100 (\%)$$

【結果と考察】

Figure 5-11 の各変異株の酵素発現量から、変異導入による著しい発現量の低下は見られなかった。Figure 5-12 には各変異株の野生株に対する全プロダクトの相対活性を示した。芳香族残基について見てみると、H と W の相対活性はそれぞれ約 25%と 5%であった一方、Y 変異株のそれは約 92%であった。Mecozzi らは、 Na^+ と芳香環との間のカチオン- π 結合エネルギーは、His : 21.0、Phe : 27.1、Tyr : 26.9、Trp : 32.6 kcal/mol と報告した⁸⁷。F474 残基にカチオン- π 相互作用の機能があると仮定すると、芳香族残基の変異株の相対活性は $W > F \approx Y > H$ となるはずであったが、W と H 変異株で相対活性が低下した。F を W に置換したことで活性が低下した例は第 4 章の F728W の他に SHC F365W 変異株でも報告されている⁵⁵。これは W のバルクサイズの非常に大きな側鎖が周辺の残基の配向にも影響を及ぼし、活性部位の形状を変化させたために活性が低下したと報告され、F474W でも同様の現象が生じたと考えられる。

しかしながら、F474 残基では F728 残基と異なり、脂肪族残基で高い活性が見られた。F728 残基では脂肪族残基への置換ではバルクサイズの大小に拠らず、一様にその相対活性が著しく低下したのに対し、F474 残基では脂肪族残基の中でもバルクサイズの大きな L や M でそれぞれ約 74%と約 91%の高い相対活性が示された。故に、F474 残基はカチオン- π 相互作用よりもそのバルクサイズが重要であることが示唆された。更に、脂肪族残基 (G、A、V、L、M) と Y 変異株について、オレアナン骨格である 5 環性産物の相対活性と側鎖のバルクサイズ (ファンデルワールス体積) との間に正の相関が見られた (Figure 5-12 赤矢印)。このことから、F474 残基のバルクサイズの重要性が示唆された。

活性の低下した H と T について、H は L や M と類似したバルクサイズをもち、T は A と V の中間のバルクサイズである。しかしながら、H と T 変異株はバルクサイズと相対活性との相関が見られず、低い活性となった。そのため、これらの変異株は異なる機構が働いたと考えられる。これらの残基は極性側鎖 (H : イミダゾール環、T : OH 基) を有しており、これらの極性側鎖が周辺の残基と水素結合などのネットワークを形成することで活性部位の形状を変化させ、活性が低下したと考えられる。

そして、G と A 変異株で 2 環性産物の比率が大きくなった理由を次に考察した。これらの残基の側鎖のバルクサイズは非常に小さく、B 環付近に空間的な余裕が生じた可能性がある。そのため、これらの変異株は基質を正確に折りたたむことができず、2 環性産物を多く生産したと考えられる。バルクサイズが大きくなるにつれて 2 環性産物の比率は減少した。T は A と V の中間のバルクサイズであることから、T 変異株で 2 環性産物が多く見られたことも前述の要因を当てはめることができる。

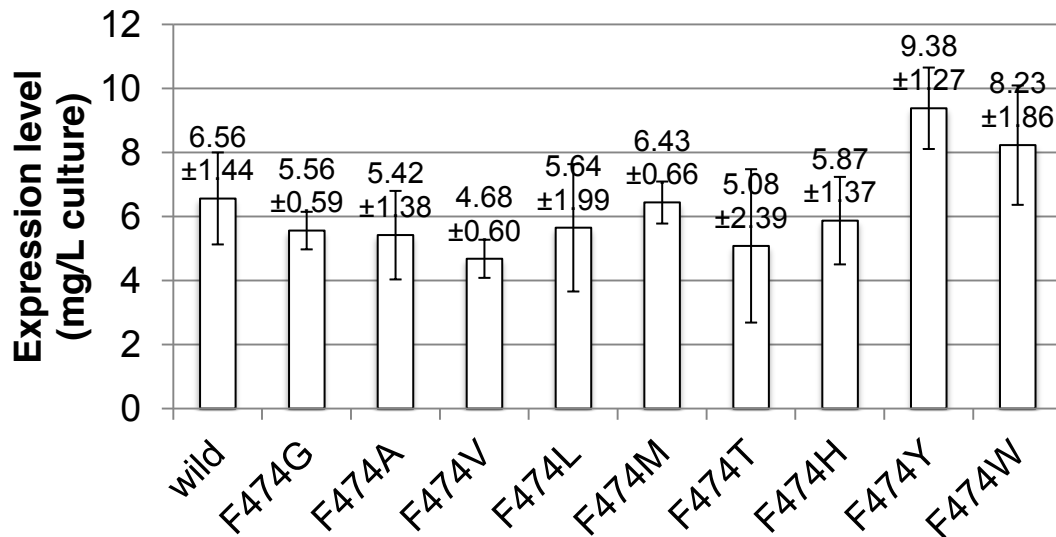


Figure 5-11. F474 変異株の酵素発現量 (mg/L)

1 L 培養酵母内で発現された EtAS タンパク量 (mg) をウェスタンブロッティングにより定量した。

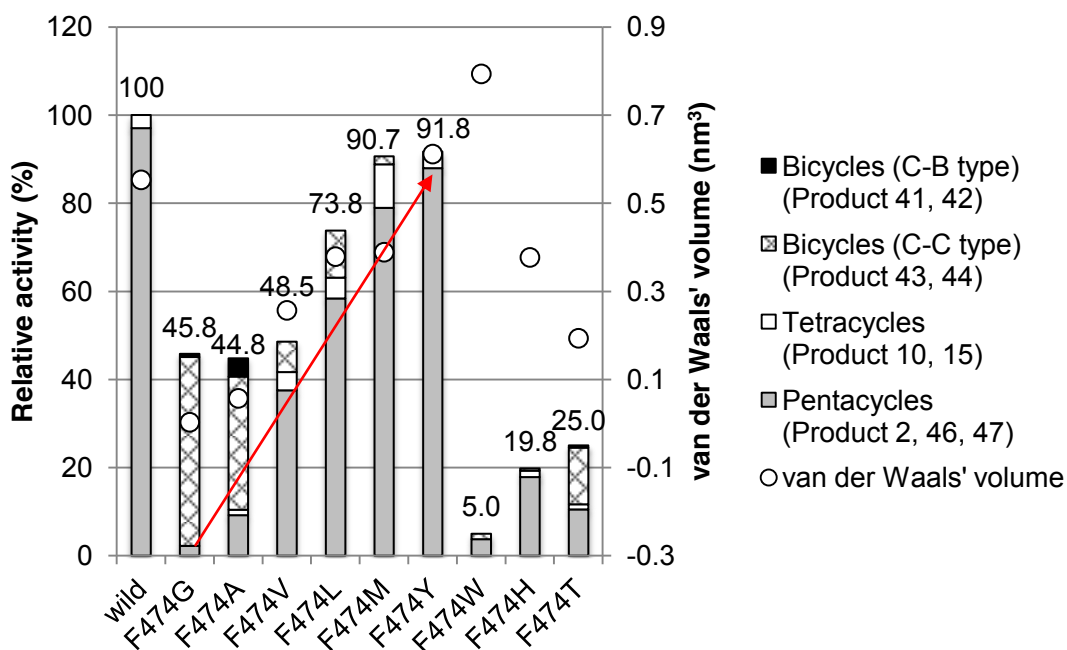


Figure 5-12. F474 変異株の野生株に対する相対活性 (%)

野生株 EtAS の全プロダクトの活性 100%に対して野生株および変異株の 4 つの骨格 (Bicycles (C-B 型)、Bicycles (C-C 型)、Tetracycles、Pentacycles) の活性を相対値で表した。○印は側鎖のファンデルワールス体積を表している。赤矢印から、G、A、V、L、M、Y 変異株の Pentacycle 相対活性と側鎖のファンデルワールス体積が正の相関を示すことがわかった。

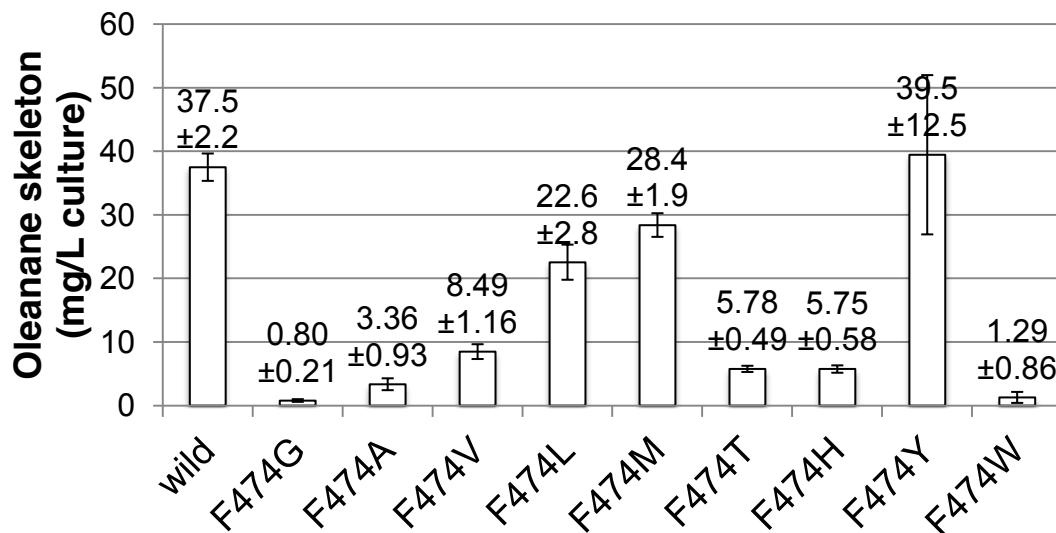


Figure 5-13. F474 変異株の 5 環性産物の生産量

1 L 培養酵母内で生産された 5 環性産物（プロダクト 2、46、47）を GC により定量した。

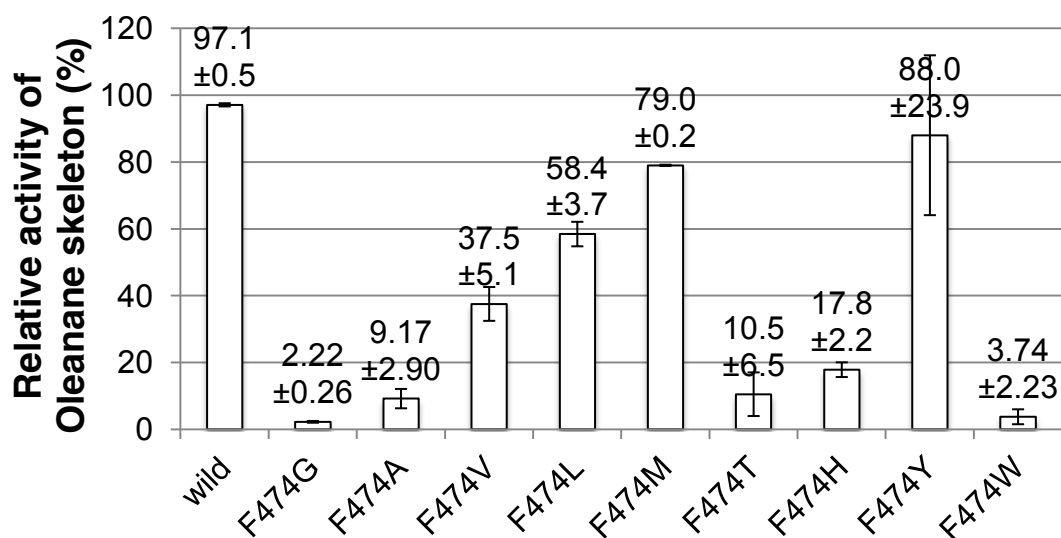


Figure 5-14. F474 変異株の 5 環性産物の野生株全産物生産量に対する相対活性 (%)

Figure 5-12 で算出した相対活性について、Pentacycles（プロダクト 2、46、47）の結果のみを抽出し、測定誤差をエラーバーで表示した。

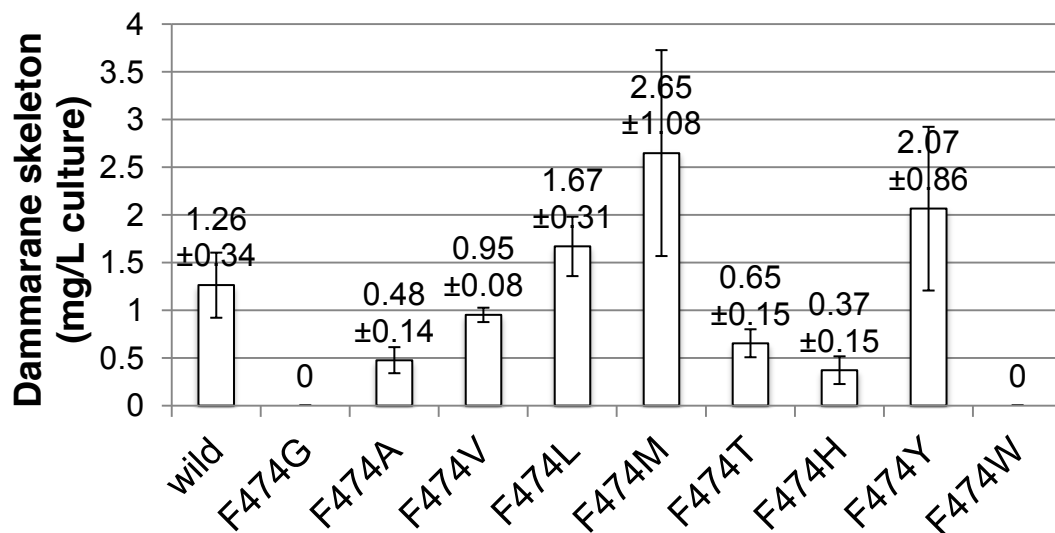


Figure 5-15. F474 変異株の 4 環性産物の生産量

1 L 培養酵母内で生産された 4 環性産物（プロダクト 10、15）を GC により定量した。

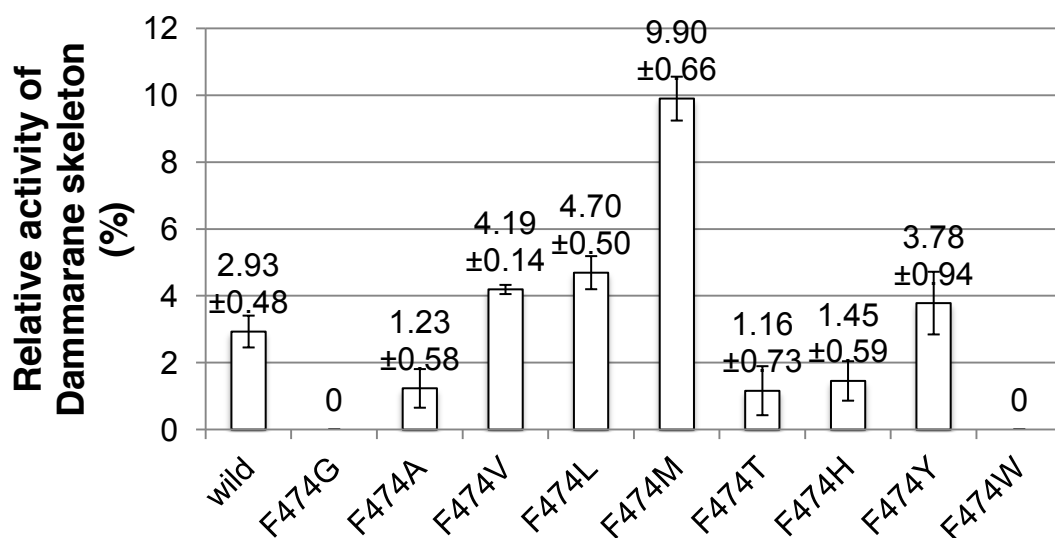


Figure 5-16. F474 変異株の 4 環性産物の野生株全産物生産量に対する相対活性 (%)

Figure 5-12 で算出した相対活性について、Tetracycles（プロダクト 10、15）の結果のみを抽出し、測定誤差をエラーバーで表示した。

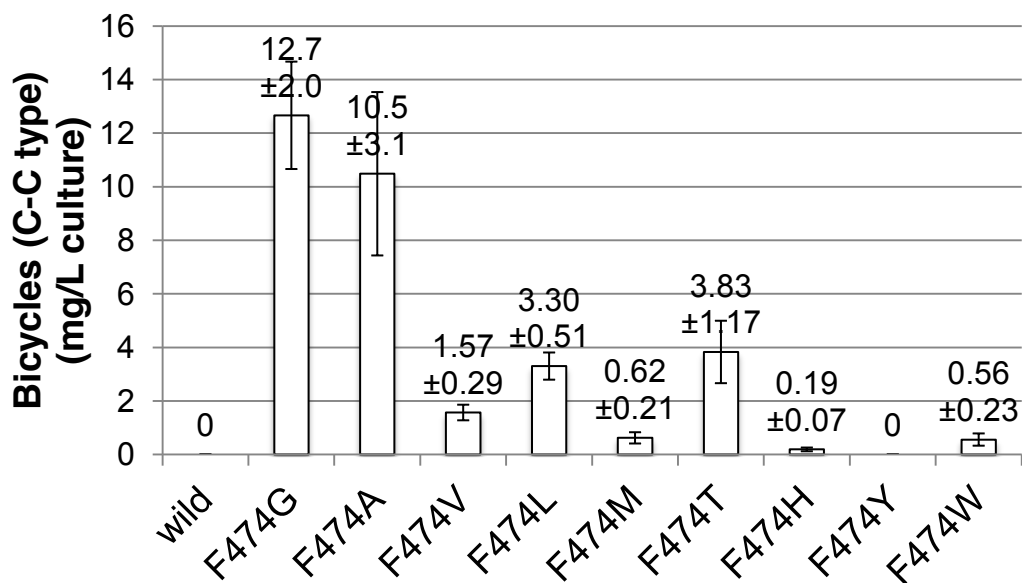


Figure 5-17. F474 変異株の 2 環性産物 (*chair-chair* 型産物) の生産量

1 L 培養酵母内で生産された Bicycles (C-C 型) (プロダクト 43、44) を GC により定量した。

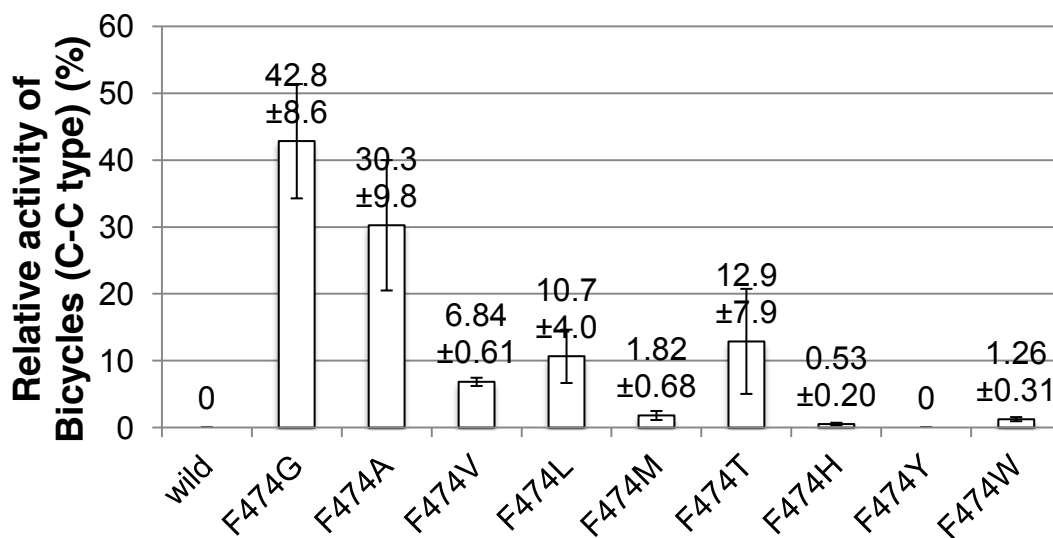


Figure 5-18. F474 変異株の 2 環性産物 (*chair-chair* 型産物) の野生株全産物生産量に対する相対活性 (%)

Figure 5-12 で算出した相対活性について、Bicycles (C-C 型) (プロダクト 43、44) の結果のみを抽出し、測定誤差をエラーバーで表示した。

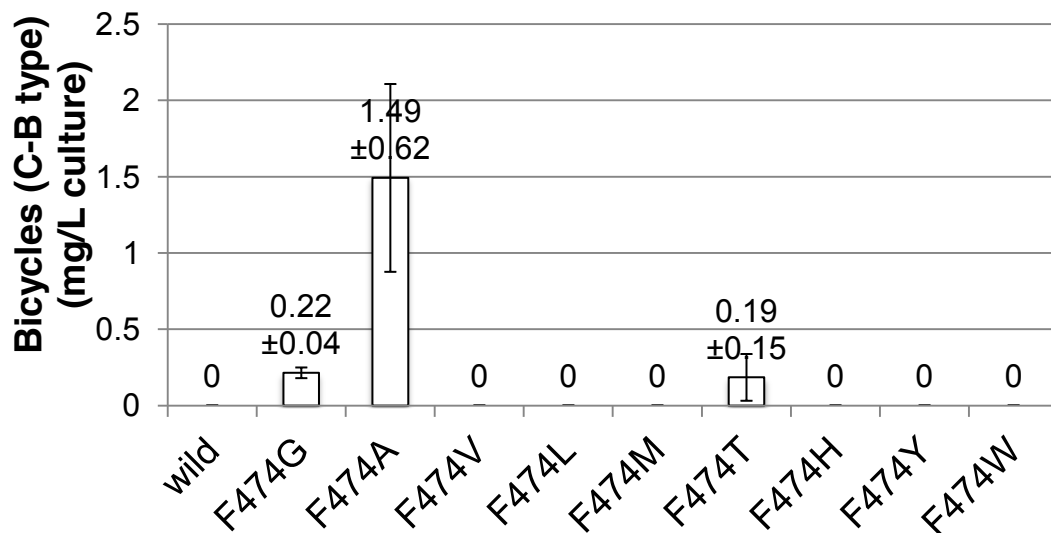


Figure 5-19. F474 変異株の 2 環性産物 (*chair-boat* 型産物) の生産量

1 L 培養酵母内で生産された Bicycles (C-B 型) (プロダクト 41、42) を GC により定量した。

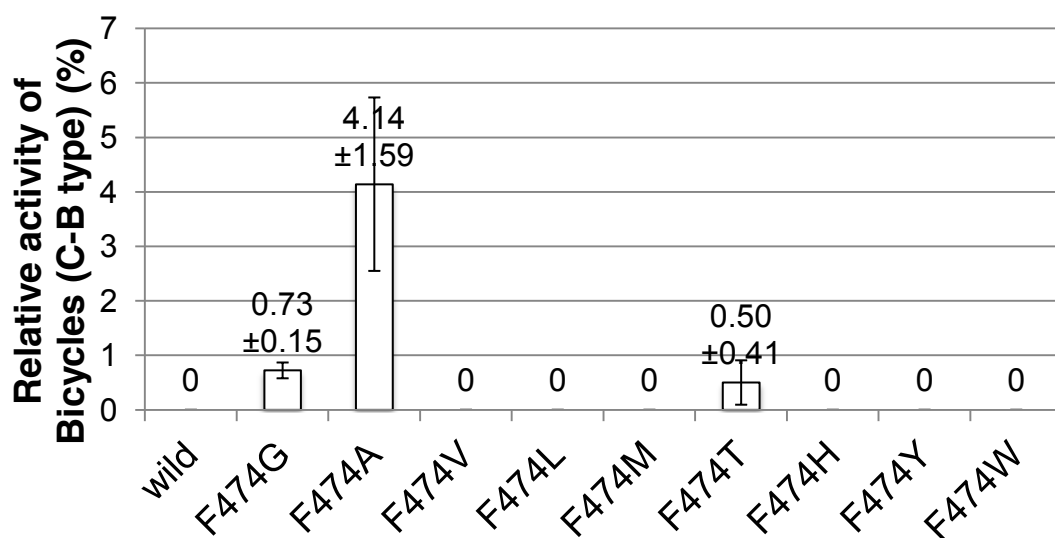


Figure 5-20. F474 変異株の 2 環性産物 (*chair-boat* 型産物) の野生株全産物生産量に対する相対活性 (%)

Figure 5-12 で算出した相対活性について、Bicycles (C-B 型) (プロダクト 41、42) の結果のみを抽出し、測定誤差をエラーバーで表示した。

5-7. CD 測定

【目的】

Figure 5-12 の相対活性で活性の低下が見られた変異株について、活性の低下が酵素の高次構造の変化ではなく、部位特異的変異導入によるものであることを確かめるため。

【方法】

- 1) 第 2 章に従って酵素精製した。その際に Wash buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、80 mM imidazole、250 mM NaCl、0.01% Brij 35) を 80 mL、Elute buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、250 mM imidazole、250 mM NaCl、0.01% Brij 35) を 3 mL 用いた。
- 2) 0.01% Brij 35 を含む 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH7.0) で透析した。
- 3) タンパク濃度が 0.1 mg/mL になるように調製した。
- 4) 5-40°C の範囲で CD スペクトルを測定した。

【結果と考察】

Figure 5-21 のとおり、変異株の CD スペクトルが野生株 EtAS とほぼ一致したため、活性の低下が酵素高次構造の変化ではなく、部位特異的変異導入によるものであると示唆された。

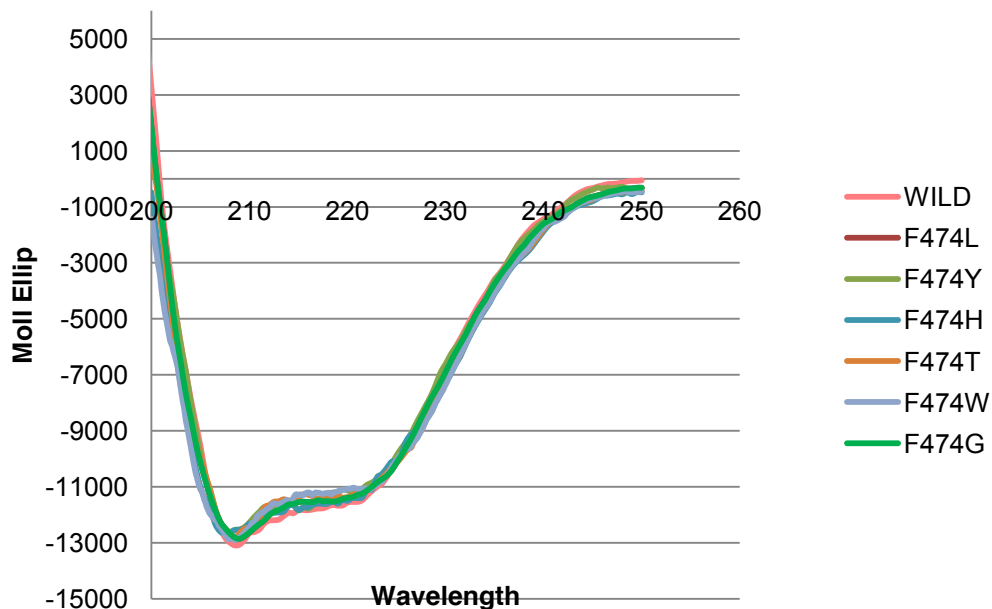
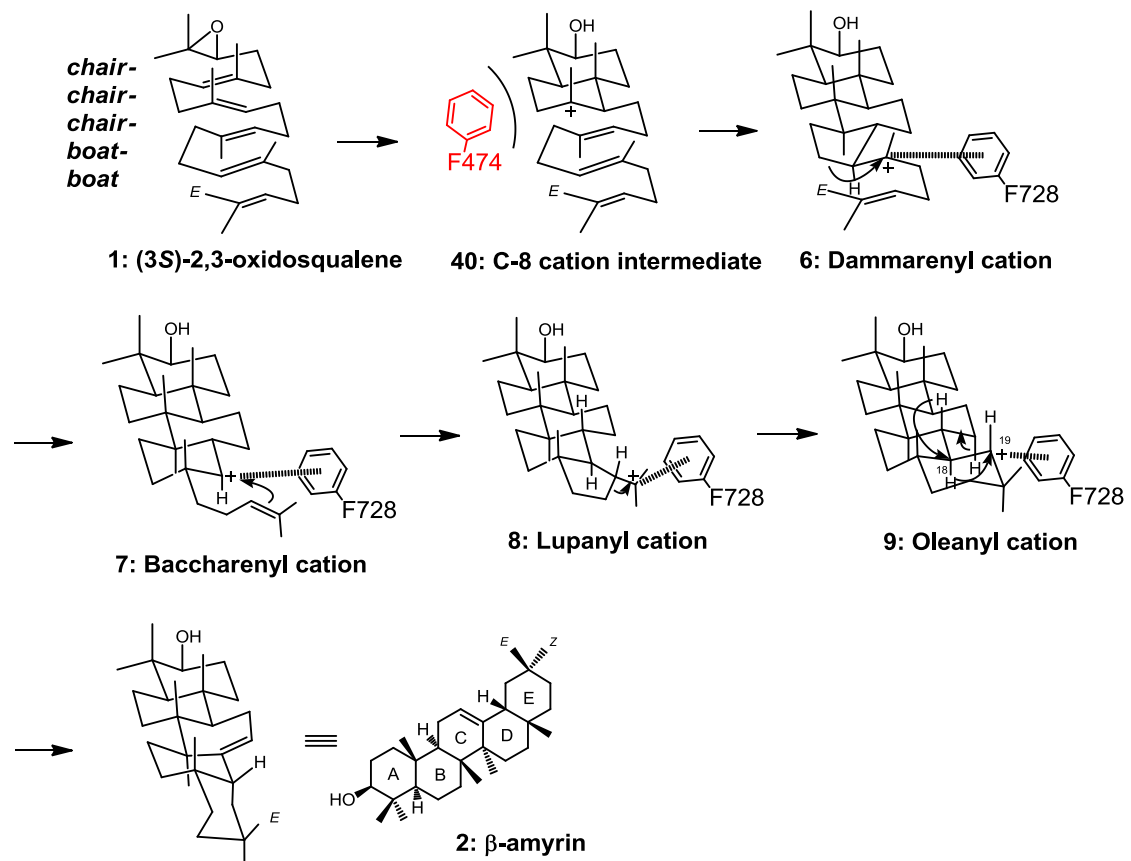


Figure 5-21. CD 測定結果 (30°C)

各変異株の 30°C での CD スペクトルが野生株のそれと同様となったため、変異導入による酵素の構造に崩れが確認された。

5-8. F474 残基のまとめ

Scheme 5-2 に F474 残基の機能をまとめた。F474 では脂肪族残基でもオレオナン骨格の活性が維持されたため、カチオン- π 相互作用の働きは大きくないことが示唆された。そして、Gly、Ala、Val、Leu、Met、Tyr 変異株では側鎖のバルクサイズとオレオナン骨格の相対活性が正の相関を示したため、F474 残基は Phe の適切なバルクサイズが基質の正確な折りたたみに寄与し、通常の前環化反応を助けていることが示唆された。



Scheme 5-2. F474 残基の機能

5-9. プロダクトのスペクトルデータ

Product 41 acetate produced by F474A mutant

41-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 5-22、23 にそれぞれ示した。プロダクト 41 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (600 MHz, CDCl_3) は 5 つのビニリックメチルの存在を示した (δ_{H} (ppm) 1.67, 1.61, 1.61, 1.60, 1.68)。4 つのオレフィンプロトンが δ_{H} (ppm) 5.22 (1H, bs) と 5.12 (3H, m) で観測され、4 つの二重結合が化合物 41 に存在していることを示していた。これにより 41 が 2 環性骨格をもつことが示唆された。HMBC スペクトルにおいて、2 つのメチル基 (Me-23 (δ_{H} 0.865, 3H, s) と Me-24 (δ_{H} 0.934, 3H, s)) は C-3 (δ_{C} 81.28, d)、C-4 (δ_{C} 37.51, s)、C-5 (δ_{C} 41.84, d)、Me-25 (δ_{H} 0.902, 3H, s) との相関および C-5, C-1 (δ_{C} 33.75, t) と C-9 (δ_{C} 53.80, d) とのクロスピークを示した。更に、ビニリック Me-26 (δ_{H} 1.67, 3H, s) は C-9 と C-7 (δ_{C} 118.8, d) との HMBC 相関を示した。これらから、41 が 2 環性骨格をもつことが示された。驚くべきことに、H-9 (δ_{H} 1.23, m) と Me-25 との間に NOE が観測され、9 β -H 配置であることが示唆された。故に、41 はこれまでに天然物としての報告例のない (9 β H)- γ -polypodatetraene-3 β -ol であると決定された。9 α -H 配置へと導く β -アミリン骨格の B 環形成が *chair* 型であるのに対して、この構造は B 環に *boat* 型コンフォメーションをもつことが明らかになった。

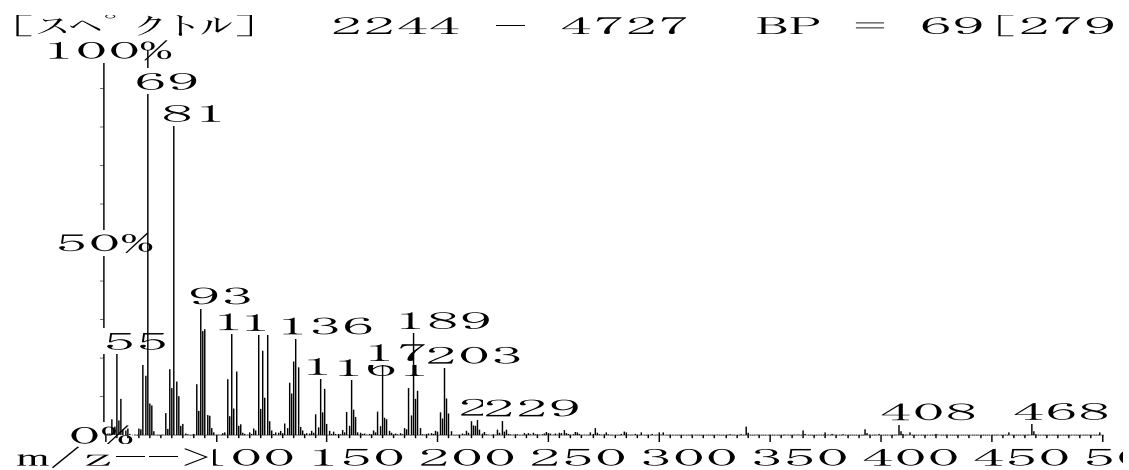
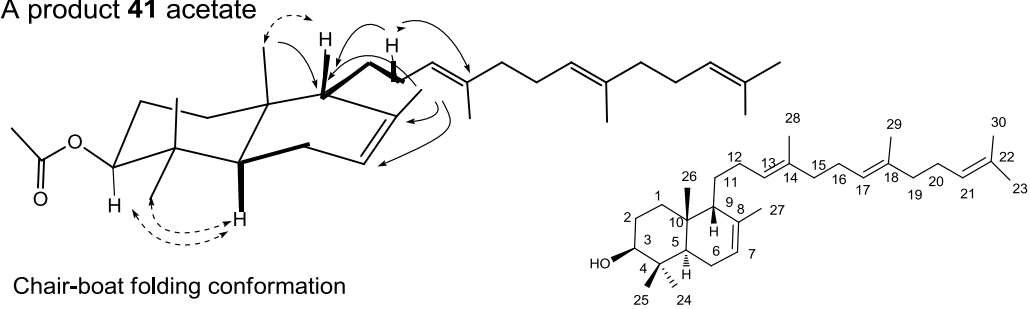


Figure 5-22. 41-Ac の EIMS フラグメントパターン

F474A product **41** acetate



400 MHz in C₆D₆
the solvent peak ¹H: 7.28 ppm; ¹³C:128.0 ppm

NOE: ←-----→ HMBC: →
COSY & HOHAHA: ————

NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C
1	1.32 (m); 1.87(m)	34.08 (t)	9	1.38 (m)	53.82(d)	17	5.44 (tm) ^e	124.7(d) ^f	25	1.108(3H,s)	16.51(q)
2	1.84(m); 1.97 (m)	23.89 (t)	10	—	36.70(s)	18	—	135.1 (s)	26	1.038 (3H,s)	22.32 (q)
3	4.91(dd, 10.8, 4.0 Hz)	81.04 (d)	11	1.40 (m); 1.70(m)	31.99 (t)	19	2.24 (2H, m)	40.17 (t) ^a	27	1.848 (3H,bs)	23.60 (q)
4	—	37.69(s)	12	2.21 (2H, m)	30.27 (t)	20	2.33 (2H, m)	27.08 (t) ^b	28	1.762 (3H, s) ^c	16.24 (q) ^d
5	1.55 (dd, J=10.8, 6.0 Hz)	42.17(d)	13	5.44 (tm)	125.2 (d) ^f	21	5.44 (tm)	124.9 (t)	29	1.748 (3H, s) ^c	16.09 (q) ^d
6	1.98 (2H, m)	24.34(t)	14	—	135.1 (s)	22	—	131.0 (s)	30	1.699 (3H)	17.73 (q)
7	5.40 (1H, m)	119.4 (d)	15	2.24 (2H, m)	40.21 (t) ^a	23	1.812 (3H, s)	25.86 (q)	31	—	169.9 (s)
8	—	136.8 (s)	16	2.33 (2H, m)	27.20(t) ^b	24	1.014 (3H,s)	27.97 (q)	32	1.857 (3H, s)	20.82 (q)

The assignments of the symbols a-f are indistinguishable between the same symbols, due to the very close chemical shifts.

Figure 5-23. 41-Ac の NMR データ

Product 42 acetate produced by F474A mutant

42-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 5-24、25 にそれぞれ示した。プロダクト 42 (600 MHz, CDCl₃) は 1 つのメチリデン基 (CH₂-26: δ_H 4.54, 1H, bs; 4.71, 1H, bs) と 4 つのオレフィンメチル基 (δ_H 1.57, 1.60, 1.60, and 1.68; 3H, s for each of the Me signals) と 3 つのオレフィンプロトン (δ_H 5.12, m, 3H) を示した。よって、42 もまた 2 環性産物であることが示唆された。H-26 は C-8 (δ_C 148.5, s)、C-9 (δ_C 57.44, d)、C-7 (δ_C 30.94, t) と HMBC 相関を示した。Me-25 (δ_H 0.930, 3H, s) と H-9 (δ_H 1.59, m) との間に強い NOE が確認され、42 もまた 9βH 配置をもつと確認された。それ故、42 も A/B 環形成の際に *chair-boat* コンフォメーションから生成された。polypodatetraene 骨格は 9αH 配置をもつ 2 環性産物と帰属されている。¹⁰¹そこで、9βH 配置をもつ 41 と 42 の 2 環性コアを仮に iso-polypodatetraene 骨格と名づけた。化合物 42 は酵母 OSC Tyr707 変異株による酵素産物の 1 つとして報告された。⁷²

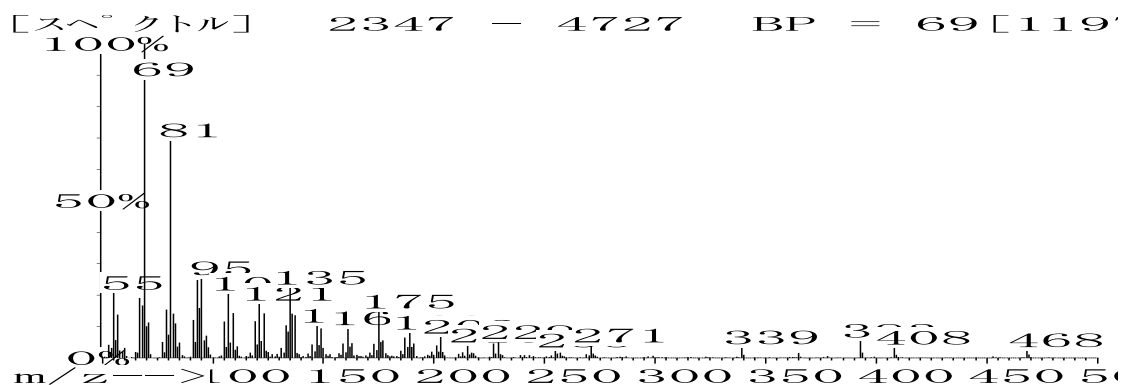


Figure 5-24. 42-Ac の EIMS フラグメントパターン

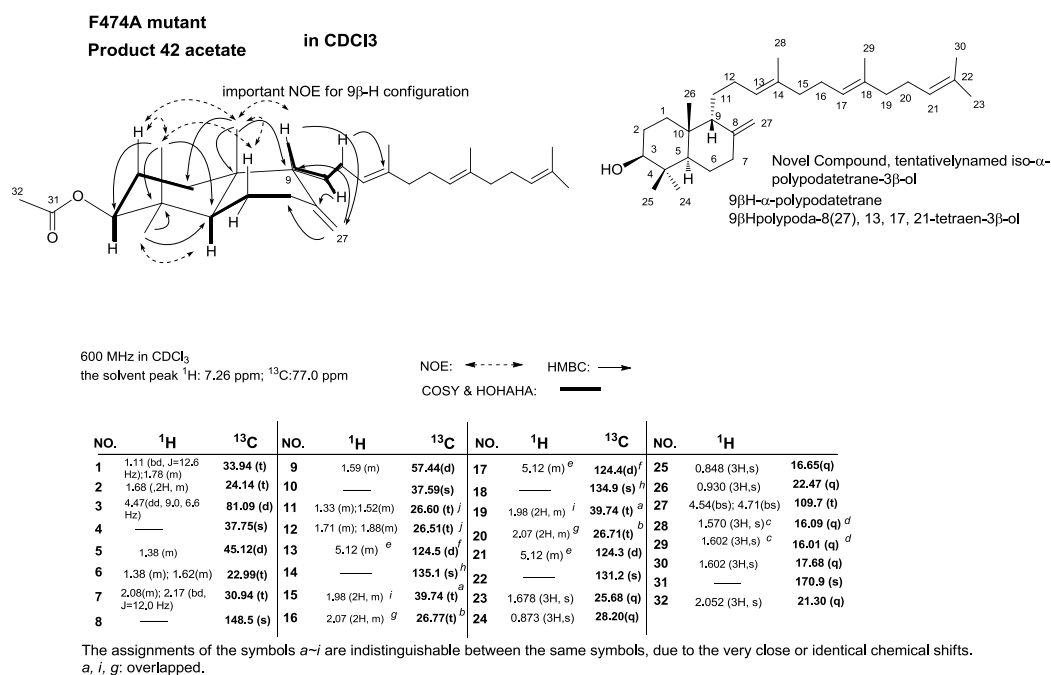


Figure 5-25. 42-Ac の NMR データ

Product 43 acetate produced by F474A mutant

43-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 5-26、27 にそれぞれ示した。詳細な 2D NMR 解析はプロダクト 43 と 44 も 2 環性トリテルペンであることを示した。しかしながら、Me-25 と H-9 との間に NOE は観測されず、H-5 と H-9 との間に明確な NOE が観測されたことから、43 と 44 が 9 α -H 配置をもち、 β -アミリンの生合成経路に従った *chair-chair* コンフォメーションで生産されたことがわかった。プロダクト 11 と 12 は *Cratogeomys cohinchinensis* から単離された。¹⁰² 43 と 44 の 3-デオキシ誘導体は *polypodiaceae* や *aspidiaceae* 植物からシダ成分として最初に単離された。¹⁰¹

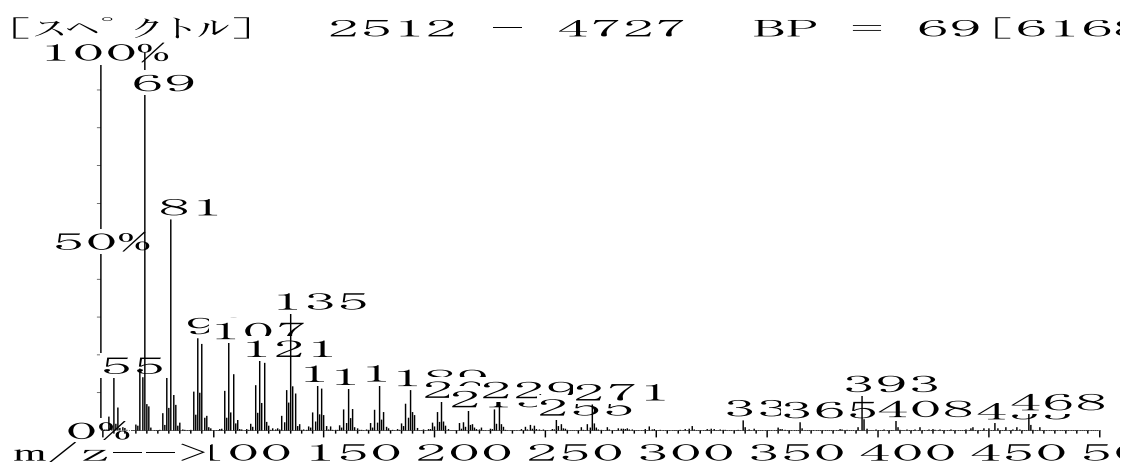
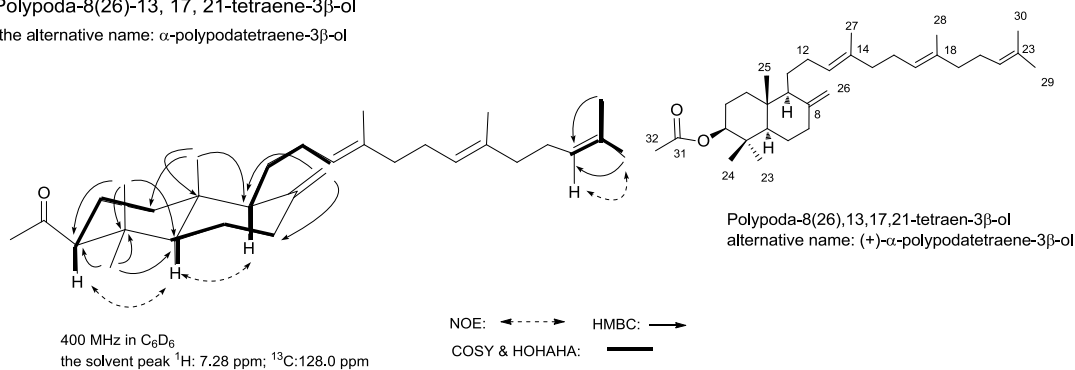


Figure 5-26. 43-Ac の EIMS フラグメントパターン

F474A mutant Product 43 acetate in C₆D₆

Polypoda-8(26)-13, 17, 21-tetraene-3 β -ol

the alternative name: α -polypodatetraene-3 β -ol



NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C
1	1.13 (ddd, J=12.8, 12.8, 3.8 Hz); 1.83(m)	36.79 (t)	9	1.64 (m)	55.92(d)	17	5.46 (t, J=6.4 Hz) ^e	124.7(d) ^f	25	0.787 (3H,s)	14.69(q)
2	1.72(m); 1.90 (m)	24.70 (t)	10	—	39.29(s)	18	—	135.1 (s) ^d	26	5.07(s); 4.82(s)	106.9 (t)
3	4.81(ddd, 11.6, 4.3 Hz)	80.36 (d)	11	1.57(2H, m)	24.35 (t)	19	2.26 (2H, m)	40.27 (t) ^a	27	1.761 (3H,bs) ^d	16.82 (q) ^c
4	—	38.15(s)	12	2.13 (m); 2.42 (m)	27.35 (t) ^b	20	2.33 (2H, m)	27.16 (t) ^b	28	1.789(3H, s) ^d	16.82 (q) ^c
5	1.89 (dd, J=12.8, 2.9 Hz)	54.55(d)	13	5.46 (t, J=6.4 Hz) ^e	125.6 (d) ^f	21	5.38 (bt, J=7.2 Hz) ^f	124.9 (t) ^f	29	2.81 (3H, s)	25.88 (q)
6	1.41 (m); 1.64(m)	24.05(t)	14	—	135.1 (s) ^g	22	—	131.1 (s)	30	1.698 (3H)	17.76 (q)
7	2.01(ddd, J=12.4, 12.4, 5.2Hz); 2.46 (m)	38.35 (t)	15	2.26 (2H, m)	40.27 (t) ^a	23	0.972 (3H, s)	28.24 (q)	31	—	169.9 (s)
8	—	148.2 (s)	16	2.33 (2H, m)	27.24(t) ^b	24	0.994 (3H, s)	16.82(q)	32	1.862 (3H, s)	20.86 (q)

The assignments of the symbols a-f are indistinguishable between the same symbols, due to the very close or inseparable chemical shifts.

a: The carbon signals of C15 and C19 are overlapped. c: The carbon signals of C-27 and C-28 were overlapped.

d: The proton signals of Me-27 and Me-28 are exchangeable. e and f: signals were overlapped.

Figure 5-27. 43-Ac の NMR データ

Product 44 acetate produced by F474A mutant

44-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 5-28、29 にそれぞれ示した。

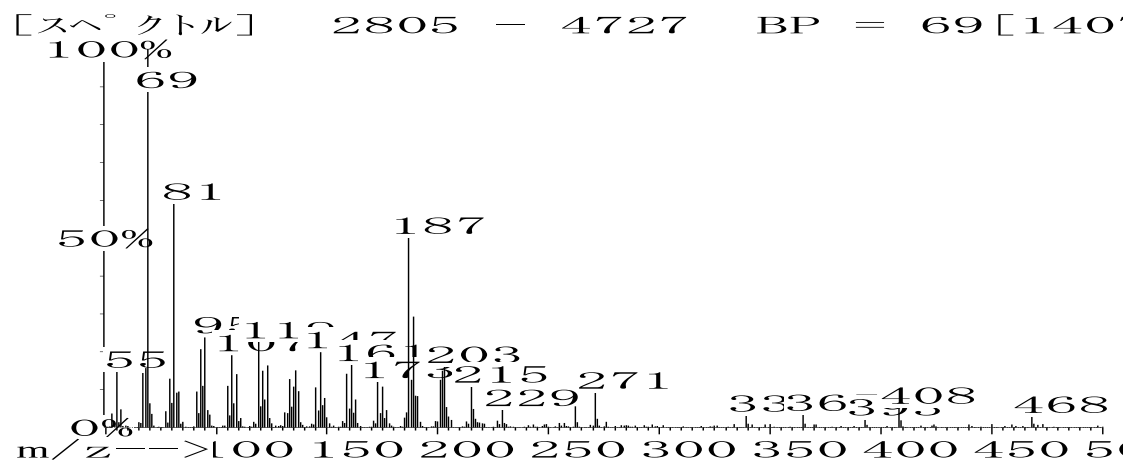
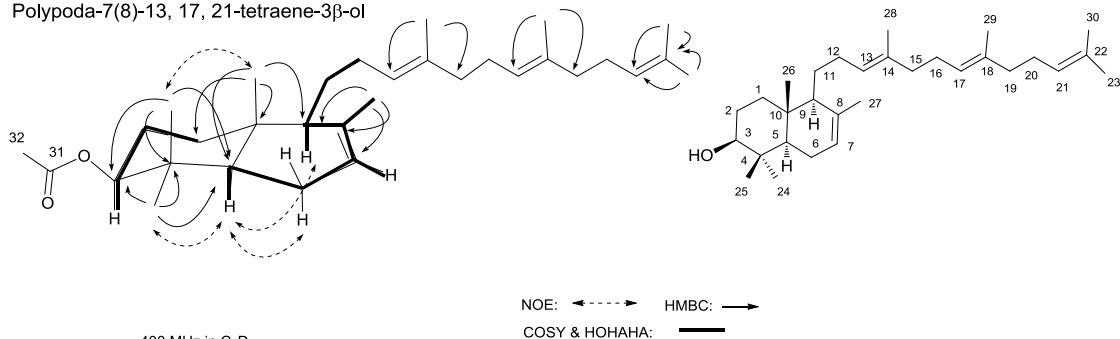


Figure 5-28. 44-Ac の EIMS フラグメントパターン

F474A mutant Product 44 acetate in C₆D₆

The largest amount among various products

Polypoda-7(8)-13, 17, 21-tetraene-3 β -ol



400 MHz in C₆D₆
 the solvent peak ¹H: 7.28 ppm; ¹³C: 128.0 ppm

NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C
1	1.18 (ddd, J=12.8, 12.8, 3.2 Hz); 1.83(m)	36.96 (t)	9	1.66 (m)	54.14(d)	17	5.43 (t, J=6.4 Hz) ^e	124.7(d) ^f	25	1.077(3H,s)	16.48(q)
2	1.70(m); 1.82 (m)	24.30 (t)	10	—	36.57(s)	18	—	135.1 (s)	26	0.863 (3H,s)	13.68 (q)
3	4.83(dd, 11.6, 4.0 Hz)	80.76 (d)	11	1.38 (m); 1.52(m)	27.74 (t)	19	2.26 (2H, m)	40.19 (t) ^g	27	1.878 (3H,bs)	22.24 (q)
4	—	37.69(s)	12	2.15 (m); 2.35 (m)	30.72 (t)	20	2.33 (2H, m)	27.12 (t) ^h	28	1.787(3H, s) ^c	16.26 (q) ^d
5	1.30 (dd, J=10.4, 6.8 Hz)	49.76(d)	13	5.44 (t, J=6.4 Hz) ^e	125.2 (d) ^f	21	5.38 (bt, J=7.2 Hz)	124.9 (t)	29	1.775 (3H, s) ^c	16.14 (q) ^d
6	1.97 (2H, m)	23.57(t)	14	—	135.1 (s)	22	—	131.1 (s)	30	1.696 (3H)	17.74 (q)
7	5.50 (1H, brd s)	122.1 (d)	15	2.26 (2H, m)	40.23 (t) ^a	23	1.809 (3H, s)	25.86 (q)	31	—	169.9 (s)
8	—	135.3 (s)	16	2.33 (2H, m)	27.21(t) ^b	24	0.995 (3H,s)	27.95(q)	32	1.858 (3H, s)	20.84 (q)

The assignments of the symbols a-f are indistinguishable between the same symbols, due to the very close chemical shifts.

Figure 5-29. 44-Ac の NMR データ

Product 45 acetate from F474A mutant

45-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 5-30、31 にそれぞれ示した。プロダクト **45** の $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) は 5 つのビニリックメチル基 (δ_{H} 1.70, 1.72, 1.76, 1.80, 1.80; 3H, s, for each of the signals) 示した。HMBC スペクトルにおいて、Me-26 (δ_{H} 1.72, 3H, s) は C-8 (δ_{C} 126.2, s)、C-9 (δ_{C} 139.9, s) とクロスピークを示した。故に、**13** の構造は polypoda-8(9)-13,17,21-tetraen-3 β -ol として帰属された。Lodeiro らは、**43–45** は SiO_2 で処理された **1** から人工物として生産されたと指摘した。²⁶ しかしながら、**43** と **44** の高い生産が人工物としての可能性を否定した。加えて、**41** と **42** が人工物ではなく、²⁶ 相対的に高収量で生産されたことを示した (Table 5-5)。それゆえ、**41–44** は人工物ではなく、酵素産物であった。プロダクト **45** はシロイヌナズナ At5g42600 遺伝子産物の酵素産物として単離された。²⁹

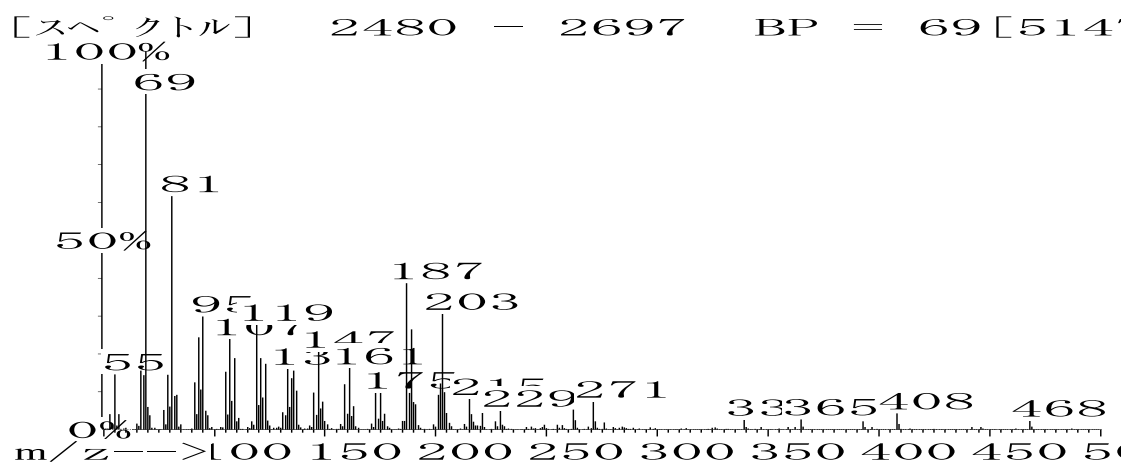


Figure 5-30. 45-Ac の EIMS フラグメントパターン

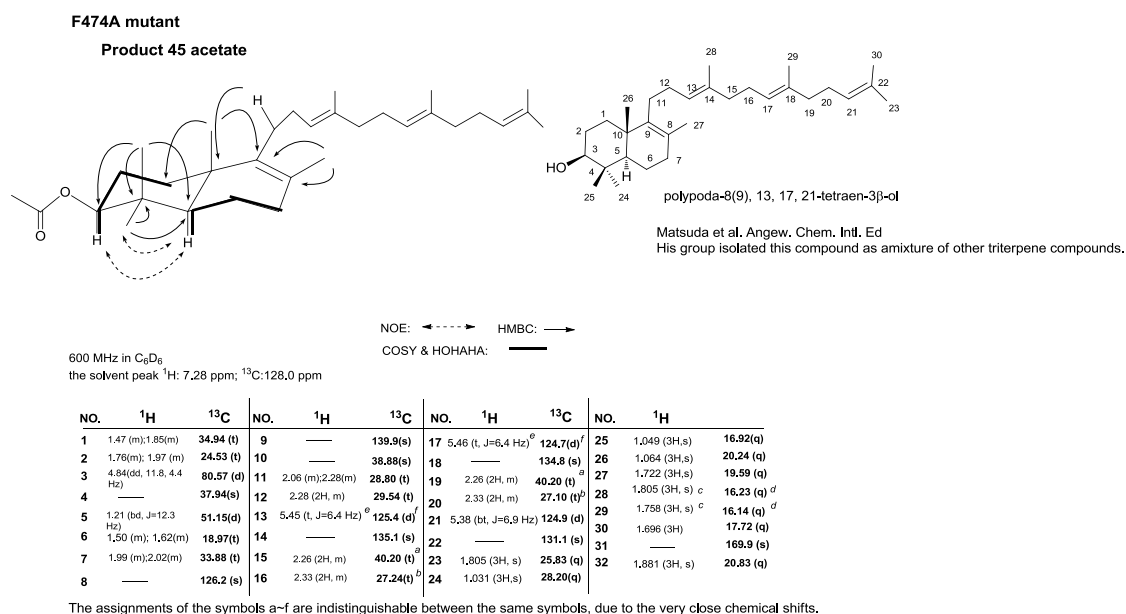


Figure 5-61. 45-Ac の NMR データ

プロダクト **15** と **10** は F728 変異株から単離されたプロダクトと同一化合物であった。そして、イネのゲノムマイニングにおいて単離されたトリテルペンの構造と完全に一致した。(R. Ito *et al.*, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 2678-2681.)

Product 10 acetate from F474A mutant

(butyrospermol acetate)

10-Ac の EIMS フラグメントパターンを Figure 5-31 に示した。

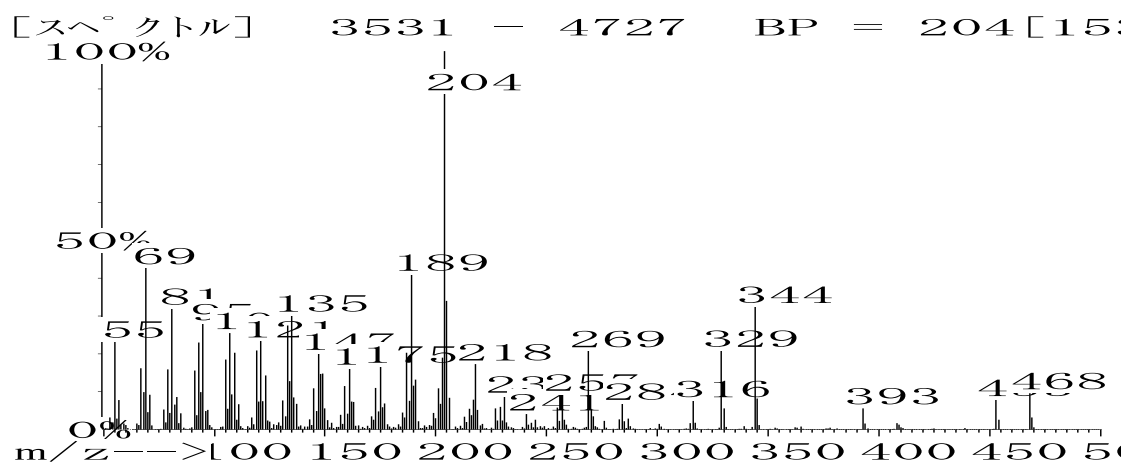


Figure 5-31. 10-Ac の EIMS フラグメントパターン

Product 15 acetate from F474A mutant

(tirucalla-7,24-dien-3 β -ol acetate)

15-Ac の EIMS フラグメントパターンを Figure 5-32 に示した。

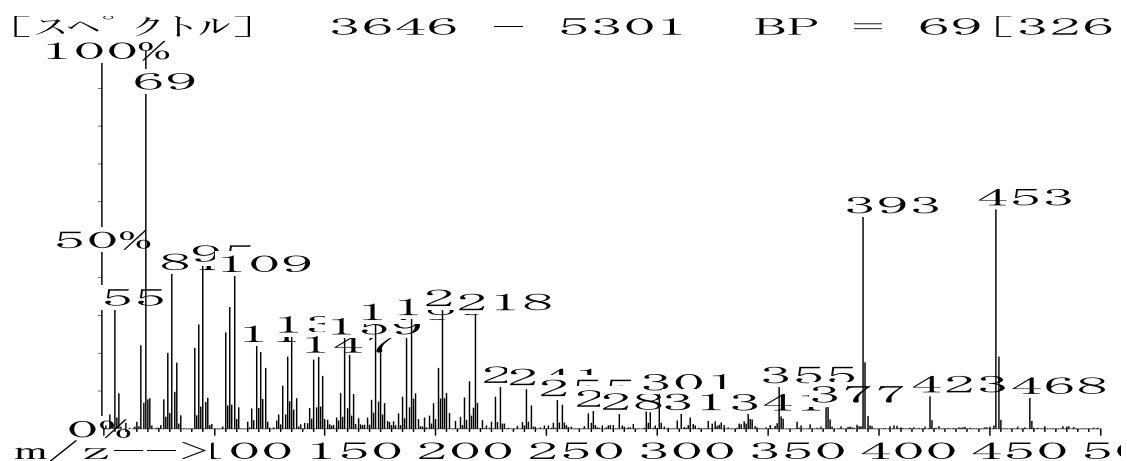


Figure 5-32. 15-Ac の EIMS フラグメントパターン

Product 46 acetate from F474A mutant

46-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 5-33、34 にそれぞれ示した。¹H-NMR スペクトル (400 MHz, C₆D₆) からプロダクト **46** はビニリックメチル基をもたないことが示され、**46** が **1** の完全に環化されたプロダクトであることが示唆された。Me-27 (δ_{H} 1.115, 3H, s) は C-14 (δ_{C} 158.1, s)、C-18 (δ_{C} 49.13, d)、C-12 (δ_{C} 33.97, t) と HMBC 相関を示した。Me-26 (δ_{H} 1.199, 3H, s) もまた C-14 とクロスピークを示した。故に、二重結合は C14-C15 に位置していることがわかった。Me-28 (δ_{H} 0.933, 3H, s) からの HMBC クロスピークが C-16 (δ_{C} 38.02, t)、C-22 (δ_{C} 35.42, t) で強く観測された。Me-29 と Me-30 の両方で C-20 (δ_{C} 28.99, s)、C-19 (δ_{C} 33.43, t)、C-21 (δ_{C} 37.00, t) との HMBC 相関が見られた。明確な NOE が Me-28 (δ_{H} 0.933, 3H, s) と H-18 (δ_{H} 1.17, 1H, ms) との間に観測された。詳細な NMR 解析により、**46** の構造がタラクサステロールであることが示唆された。近年、タラクサステロール合成酵素をコードする遺伝子が *Kalanchoe daigremontiana* からクローニングされた。¹⁰³

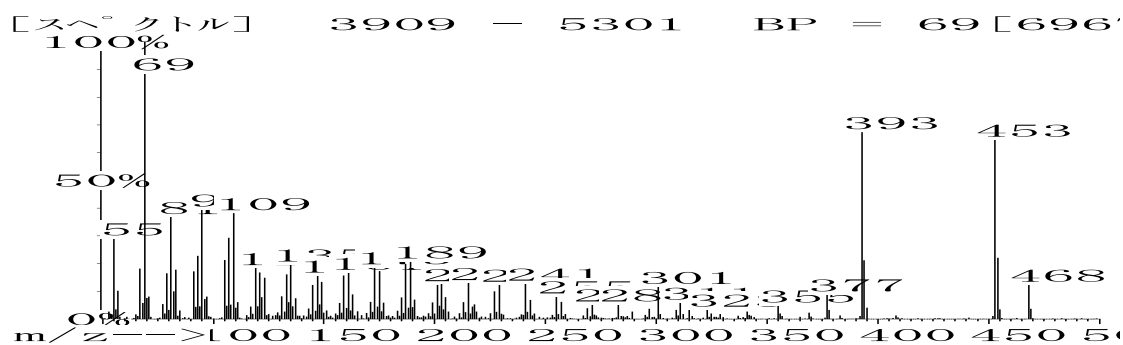


Figure 5-33. 46-Ac の EIMS フラグメントパターン

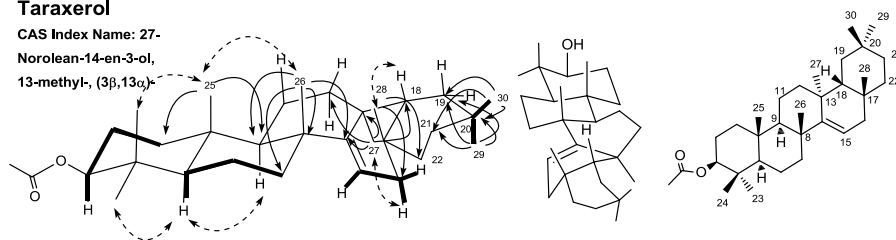
F474A Product 46 acetate

Taraxerol

CAS Index Name: 27-

Norolean-14-en-3-ol,

13-methyl-, (3 β ,13 α)-



400 MHz in C₆D₆
the solvent peak ¹H: 7.28 ppm; ¹³C:128.0 ppm

NOE: \dashrightarrow HMBC: \rightarrow
COSY & HOHAHA: $\rule{1cm}{0.4pt}$

NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C
1	0.83 (ddd, J=13.2, 13.2, 3.8 Hz), 1.48 (m)	37.34(t)	9	1.44 (m)	49.13(d)	17	—	36.06(s)	25	0.944(3H, s)	15.59(q)
2	1.71(m); 1.84 (m)	23.83(t)	10	—	37.76(s) ^a	18	1.17 (m)	49.13(d)	26	1.199 (3H, s)	26.13(q)
3	4.78(ddd, 12.0, 4.8 Hz)	81.17 (d)	11	1.44 (m); 1.64(m)	17.75 (t)	19	1.46 (m); 1.59 (m)	33.43 (d)	27	1.115 (3H, s)	21.48 (q)
4	—	37.82(s) ^a	12	1.67(2H, m)	33.97(t)	20	—	28.99 (s)	28	0.933 (3H, s)	30.09(q)
5	0.79 (m)	55.50(d)	13	—	37.92 (s) ^a	21	1.16(m); 1.51(m)	37.00 (t)	29	1.185 (3H, s)	33.97 (q) ^b
6	1.44(m); 1.57(m)	18.84(t)	14	—	158.1 (s)	22	1.20 (m); 1.57 (m)	35.42 (t)	30	1.155 (3H)	30.09 (q) ^b
7	1.44 (m); 2.07 (dd, 9.6, 3.2 Hz)	41.31 (t)	15	5.75 (dd, J=8.4, 2.6 Hz)	117.3 (d)	23	1.019 (3H, s)	27.99 (q)	31	—	170.0 (s)
8	—	39.19 (s)	16	1.84(m); 2.17 (dd, J=14.4, 3.2 Hz)	38.02(t)	24	1.051 (3H, s)	16.88(q)	32	1.884 (3H, s)	20.86 (q)

a: The three carbon assignments were indistinguishable due to the close chemical shifts.
b: The assignments of Me-29 and Me-30 may be exchangeable.

Figure 5-34. 46-Ac の NMR データ

Product 47 acetate from F474A mutant

47-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 5-35、36 にそれぞれ示した。プロダクトは 47 は F474M 変異株のみにより生産され、他の変異株では生産されなかった。¹H-NMR スペクトル (600 MHz, CDCl₃) において、オレフィンメチルプロトンは観測されなかったことから、47 が 5 環性骨格であることが示唆された。Me-26 (δ_{H} 1.070, 3H, s) は C-8 (δ_{C} 147.6, s)、C-13 (δ_{C} 37.02, s)、C-14 (δ_{C} 41.60, s)、C-15 (δ_{C} 31.66, t) と HMBC 相関を示した。HOHAHA スペクトルにおいて、H-7 (δ_{H} 5.46, 1H, br s) は H-6 (δ_{H} 1.98, 1H, m; 2.12, 1H, m)、H-5 (δ_{H} 1.36, 1H, m) とクロスピークを示した。これらの結果より、二重結合は C7-C8 に位置していることが示唆された。Me-27 (δ_{H} 1.082, 3H, s) は C-12 (δ_{C} 36.06, t)、C-13、C-14、C-18 (δ_{C} 46.84, d) と HMBC 相関を示した。Me-28 (δ_{H} 1.055, 3H, s) は C-16 (δ_{C} 36.08, t)、C-17 (δ_{C} 30.94, s)、C-18、C-22 (δ_{C} 36.57, t) と HMBC クロスピークを示した。M-29 (δ_{H} 0.976, 3H, s) と Me-30 (δ_{H} 0.966, 3H, s) の両方から、C-19 (δ_{C} 34.60, t)、C-20 (δ_{C} 28.23, s)、C-21 (δ_{C} 33.87, t) と明確な HMBC が観測された。NOESY スペクトルにおいて、H-5 と H-9、Me-25 と Me-26、Me-26 と H-18、Me-28 と H-18、H-18 と Me-30 にそれぞれ相関が見られた。故に、プロダクト 47 はマルチフロレンールであると決定された。Kushiro らはシロイヌナズナ LUP5 の酵素産物の 1 つとして 47 を報告した。²⁸

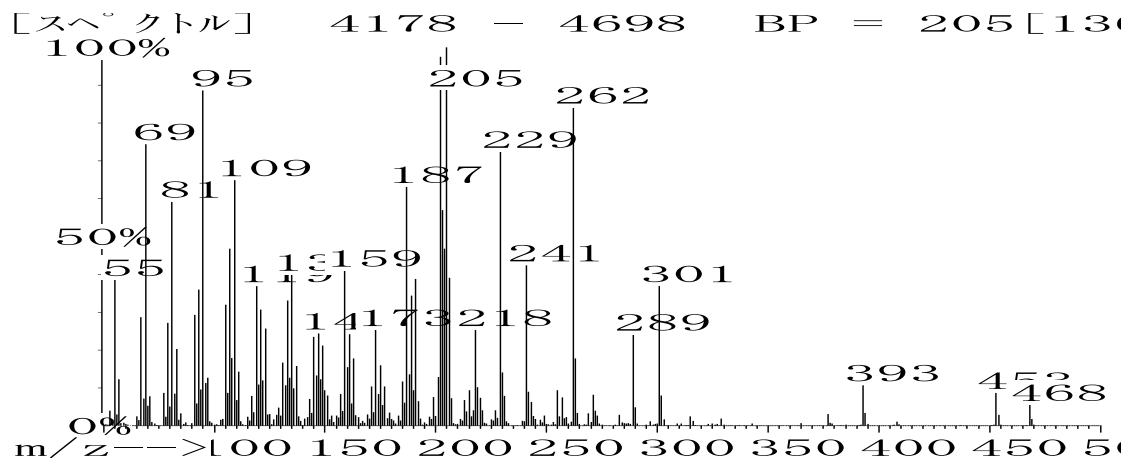
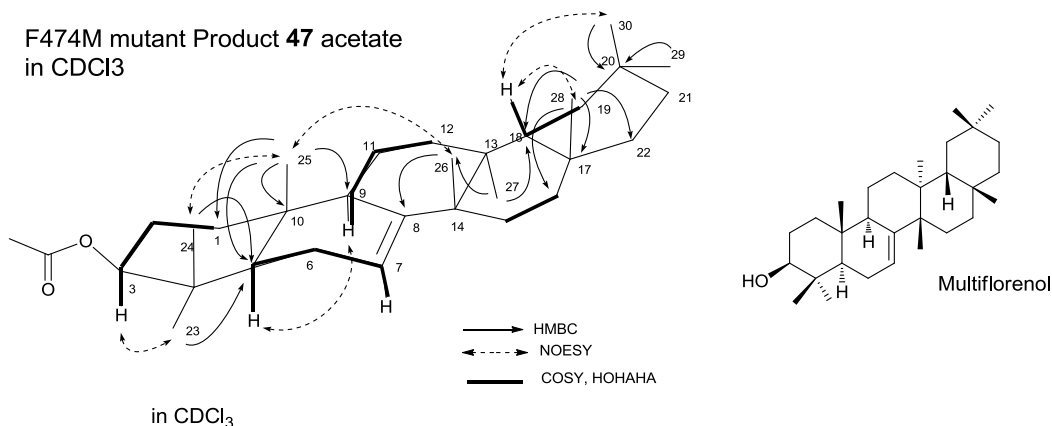


Figure 5-35. 47-Ac の EIMS フラグメントパターン

F474M mutant Product **47** acetate
in CDCl₃



in CDCl₃

600 MHz, the solvent peak: $\delta_H=7.26$, $\delta_C=77.0$ ppm

The ¹³C signals of Me-28 and C-17 were identical each other.

NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C	NO.	¹ H	¹³ C
1	1.19 (m), 1.70(m)	36.80 (t)	9	2.16 (m)	48.72(d)	17	—	30.94 (s) ^b	25	0.761 (3H, s)	13.20 (q)
2	1.64 (2H,m)	24.20(t)	10	—	35.06(s)	18	1.50 (m)	46.84 (d)	26	1.070(3H, s)	27.09(q)
3	4.51(dd, J=11.4; 4.2 Hz)	81.17(d)	11	1.43 (m); 1.54(μ)	17.09 (t)	19	1.38(2H, m)	34.60(t)	27	1.082 (3H, s)	26.16 (q)
4	—	37.69(s)	12	0.87(m); 1.62(m)	36.06(t) ^a	20	—	28.23(s)	28	1.055(3H, s)	30.94(q) ^b
5	1.36 (m)	50.24(d)	13	—	37.02(s)	21	1.24 (m); 1.46(m)	33.87(t)	29	0.976 (3H, s)	33.67(q)
6	1.98 (m); 2.12 (m)	23.94(t)	14	—	41.60(s)	22	1.48(2H,m)	36.57(t)	30	0.965 (3H, m)	34.09(q)
7	5.46(bs)	111.5(d)	15	1.64(m); 1.77(m)	31.66 (t)	23	0.855(3H, s)	27.64(q)	31	—	171.0(s)
8	—	147.6 (s)	16	1.37 (m);1.62 (m)	36.08(t) ^a	24	0.934 (3H, s)	15.96(q)	32	2.051(3H, s)	21.32(q)

^a & These carbon signals may be exchangeable between the same letters
^b : Me-28 and C-17 were overlapped..

Figure 5-36. 47-Ac の NMR データ

第 6 章

イネ由来 OsOSC6 の進化過程

6-1.	背景と目的	202
6-2.	OsOSC6 について	205
6-3.	OsOSC6 微量成分の同定	206
6-4.	OsOSC6 のプロダクトプロファイル	209
6-5.	OsOSC6 の進化過程	214
6-6.	OsOSC6 微量成分のスペクトルデータ	218

6-1. 背景と目的

【*Oryza sativa* L.について】

Oryza sativa L. (イネ) により生産される米は小麦やトウモロコシと並ぶ世界三大穀物の一つであり、世界の半分の人々の主食である。イネゲノム解読は1998年に日本が中心となって世界中の研究機関が結成したプロジェクトが発足した (IRGSP)。その中で、日本はイネ染色体の半数の6本の染色体を担当した。そして2004年12月にイネゲノムの完全解読が終了した。

【イネ由来 OSC】

植物では一次代謝産物として細胞膜成分である β -シトステロールを生合成することが知られている。シクロアルテノールは β -シトステロール生合成の前駆物質であり、2,3-オキシドスクアレンがOSCにより環化されることで生成される。これまでに多くの植物種からシクロアルテノール合成酵素遺伝子が同定されてきた。イネの米ぬかからはシクロアルテノールのフェルラ酸エステル誘導体である γ -オリザノール (Figure 6-1) が同定されており、遺伝子解析からもシクロアルテノール合成酵素遺伝子の存在が示唆されてきた。しかしながら、実験的にシクロアルテノール合成酵素遺伝子の同定には至っていなかった。

また、植物に普遍的に存在している β -アミリンなどのOSC産物はイネの化学成分分析からも未だに見出されていなかった。そこで、当研究室ではイネにシクロアルテノール合成酵素以外のOSCが存在するかどうか調べることを目的として研究を行ってきた。

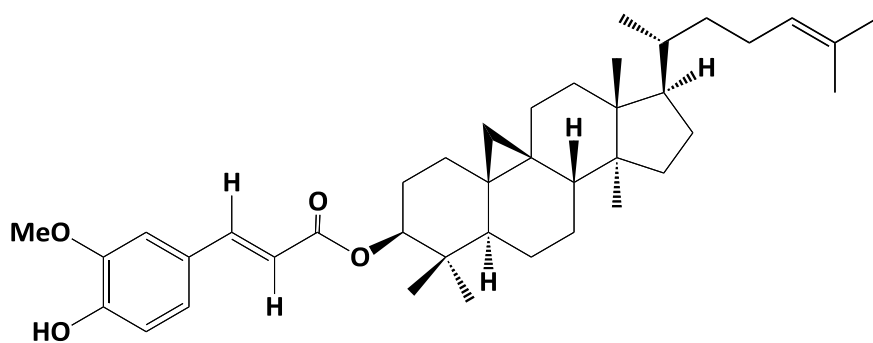


Figure 6-1. Cycloartenol *trans*-ferulate (γ -oryzanol) の構造

γ -オリザノールは米ぬかに特有の成分であり、コレステロールの吸収を抑える作用や更年期障害などの不定愁訴に効用があるとして医薬品として用いられている。また、紫外線防止のために化粧品にも用いられている。

【当研究室でのイネ由来 OSC 研究】

当研究室 宇佐美は既知の OSC のアミノ酸配列を query として BLAST 検索を行い、イネから 6 つの OSC 候補遺伝子を見出した。宇佐美によりこれら 6 つの OSC 候補遺伝子は OsOSC1-6 と名づけられた。

その後、当研究室の橋本、森により OsOSC1-6 の機能解析が行なわれ、それぞれ Table 6-1 に示したように機能が決定された。(宇佐美 卒業論文 2005、橋本 修士論文 2009、森 修士論文 2009)

Table 6-1. イネの 6 つの OSC オーソログとその機能

Gene name	Accession number	Chromosome number	ORF (bps)	Function
OsOSC1	AK121211	2	2280	cycloartenol synthase
OsOSC2	AK066327	11	2280	parkeol synthase
OsOSC3	AK068026	11	2013	偽遺伝子あるいは酵母内で発現しなかった
OsOSC4	AK067451	11	2289	偽遺伝子あるいは酵母内で発現しなかった
OsOSC5	AK072702	11	2271	偽遺伝子あるいは酵母内で発現しなかった
OsOSC6	AK070534	11	2283	achilleol B synthase

Chromosome number は何番目の染色体に位置しているのかを意味している。イネの第 11 番染色体と第 12 番染色体には、耐病性の遺伝子が多くあるという報告があることから、OsOSC2~6 はイネの自己防衛に関連する物質を生産する OSC であるかもしれない。

Parkeol はこれまでに *Gemmata* 属からラノステロールと共に生産される⁹²ことが報告された他に、シロイヌナズナ CAS1 の副産物として 1%程度生産する^{49,93}ことが報告されている。しかしながら、Parkeol のみを生産する OSC が報告された例はなく、OsOSC2 は Parkeol のみを生産する OSC として初めての報告であった。OsOSC6 の生産する Achilleol B は非常に珍しいセコ型トリテルペンであり、セコ型トリテルペンを生産する OSC としては 3 例目の報告であった。

【Osbourn らによるイネ由来 OSC 研究⁸⁸】

また、Osbourn らによってもイネ由来の OSC 遺伝子 (Os11g08569 および Os11g35710 遺伝子産物) が機能解析され、それぞれパルケオール合成酵素 (当研究室の OsOSC2 と同一遺伝子) とイソアルボリノール合成酵素であることが同定された。イソアルボリノールは 5 環性トリテルペンであり、反応機構的にプロトステリルカチオン (*chair-boat-chair-chair* 型; C-B-C-C 型) を経由して生じると推定された。E 環まで形成する C-B-C-C 型 OSC としてはこのイソアルボリノール合成酵素が初めての報告例であった。当研究室でイソアルボリノール合成酵素を見出すことができなかった理由は、この酵素が OSC としては非常に小さなタンパク (422 アミノ酸) であったためであった。従来報告されてきた OSC はおおよそ 600~800 アミノ酸で構成される比較的大きなタンパクであったため、当研究室 宇佐美はイネゲノムから OSC 候補遺伝子をスクリーニングする際に条件の一つとして 500 アミノ酸以上から成るタンパクを発現する遺伝子を候補遺伝子としていた。そのため、イソアルボリノール合成酵素はスクリーニング段階では OsOSC9 としてピックアップされていたが、最終的には候補遺伝子から除外されてしまった。(宇佐美 2005、卒業論文)

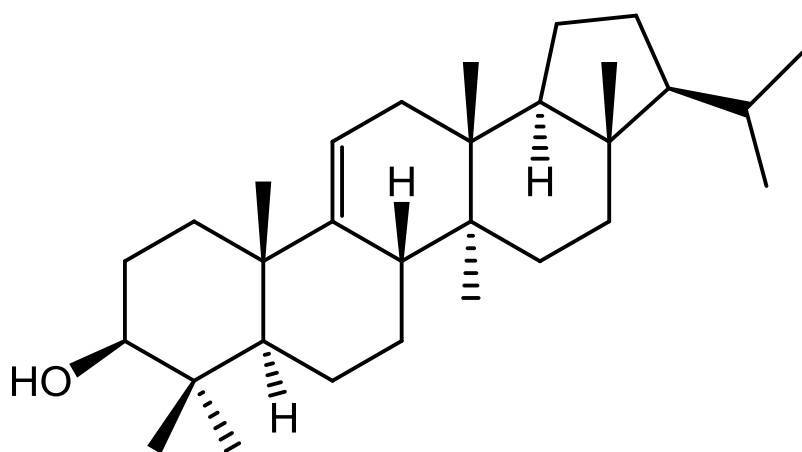
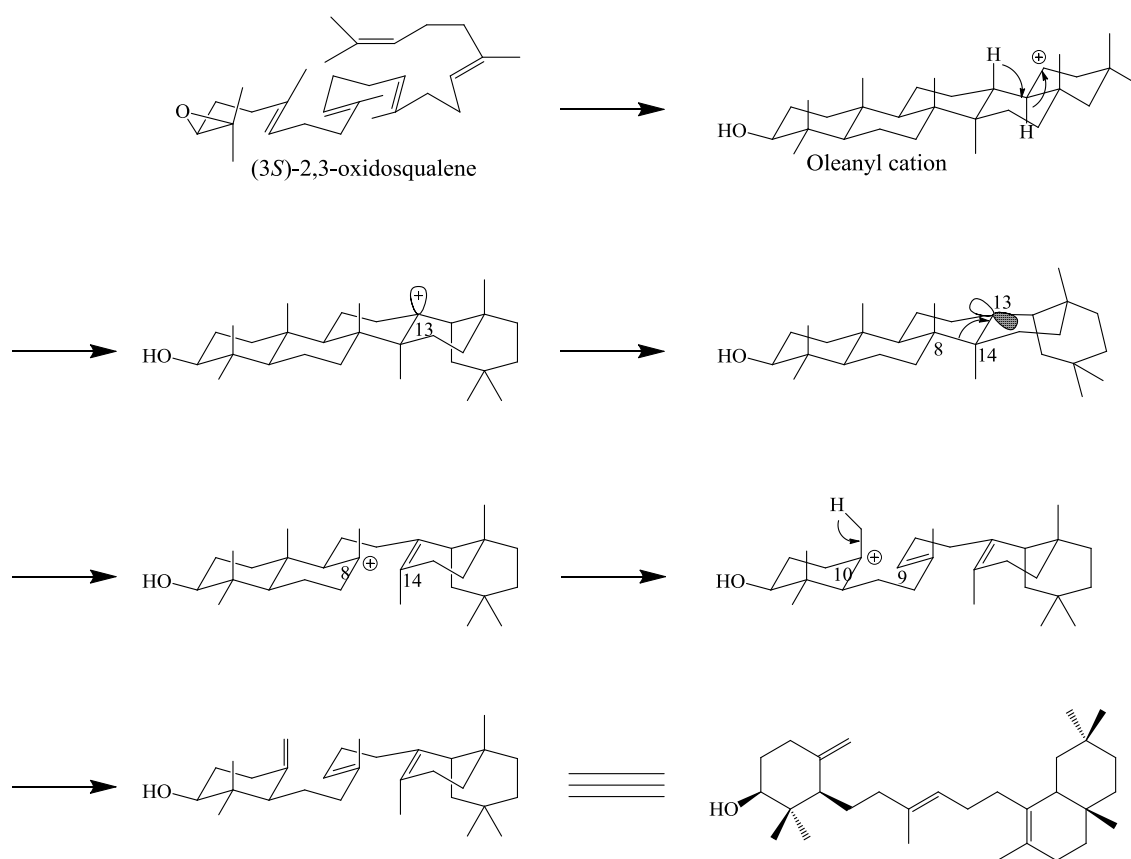


Figure 6-2. イソアルボリノールの構造

6-2. OsOSC6 について

OsOSC6 の機能解析は当研究室の森により行なわれ、そのメインプロダクトが Achilleol B (90%) であり、10%のマイナープロダクトを生産することが報告された。Achilleol B は Scheme 6-1 に示したように、オレアニルカチオンを経由して生成されると予想された。オレアニルカチオンを経由して生成されるトリテルペンには β -アミリンや α -アミリンなどがある。このため、反応機構的に考えた場合、OsOSC6 は β -アミリン合成酵素から派生したのではないかと予想した。10%のマイナープロダクトの中に β -アミリンが含まれれば、この予想がより確かなものになると考え、本研究ではマイナープロダクトの同定を行った。また、系統的な考察も行うためにイネ由来 OSC を含めた植物 OSC の系統樹解析も行った。



Scheme 6-1. OXSQ から Achilleol B を生成する反応機構

6-3. OsOSC6 微量成分の同定

- 1) pYES2-OsOSC6 プラスミドを導入した酵母 GIL77 株を 150 L (森 : 100 L、私 : 50 L) 大量培養した。
- 2) 培養後、菌体を遠心分離 (9,000 rpm, 5 min, 4°C) し、集菌した。
- 3) ペレットを 3 L の 15% KOH/MeOH でケン化 (煮沸後 3 h) した。
- 4) 菌体をブフナー漏斗で濾過し、MeOH 層を等量 (1 L) のヘキサンで 3 回抽出した (合計 9 L)。
- 5) 上記 3)、4) の操作を 3 回繰り返し、合計 9 L の 15% KOH/MeOH と 27 L のヘキサンを使用した。
- 6) 脂質成分をエバポレーターで濃縮した。
- 7) SiO₂ カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0 - 100 : 5) により分画した (Figure 6-3)。
- 8) プロダクトを含むフラクションをアセチル化 (Ac₂O/py) し、更に SiO₂ カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0 - 100 : 3) によりアセチル化されたプロダクトと Dioxidosqualene および極性の高い物質を分離した。
- 9) 順相 HPLC によりプロダクトを単離した (HPLC 前のプロダクトミクスチャー重量 7.0 mg ; 森の 4.8 mg と私の 2.2 mg の合計)。

【結果】

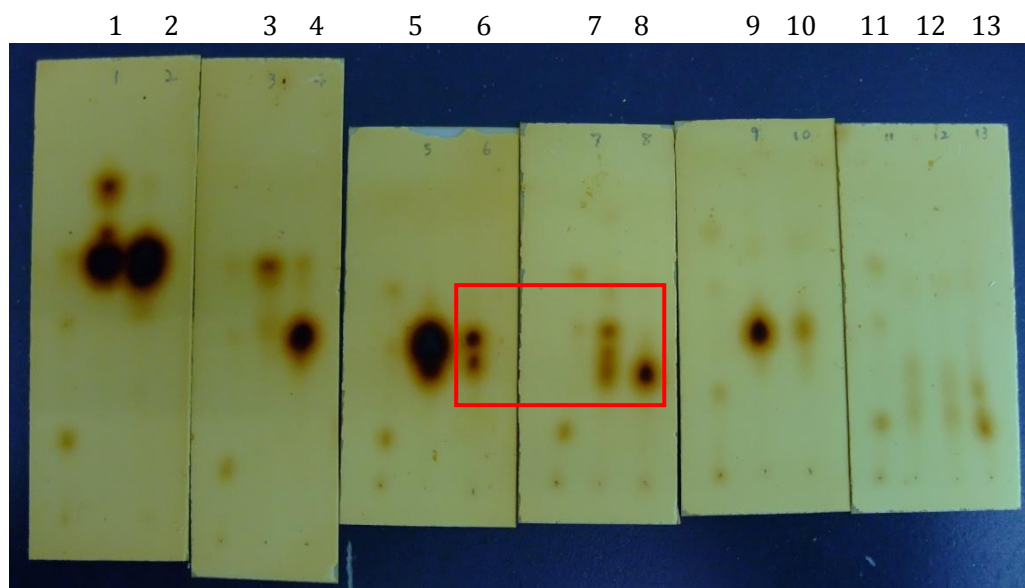


Figure 6-3. SiO₂カラムクロマトグラフィーでの OsOSC6 ヘキサン抽出物の粗分け
展開溶媒 ヘキサン : EtOAc = 100 : 20、Fr 6-8 の重量: 16.7 mg (50 L 培養分)

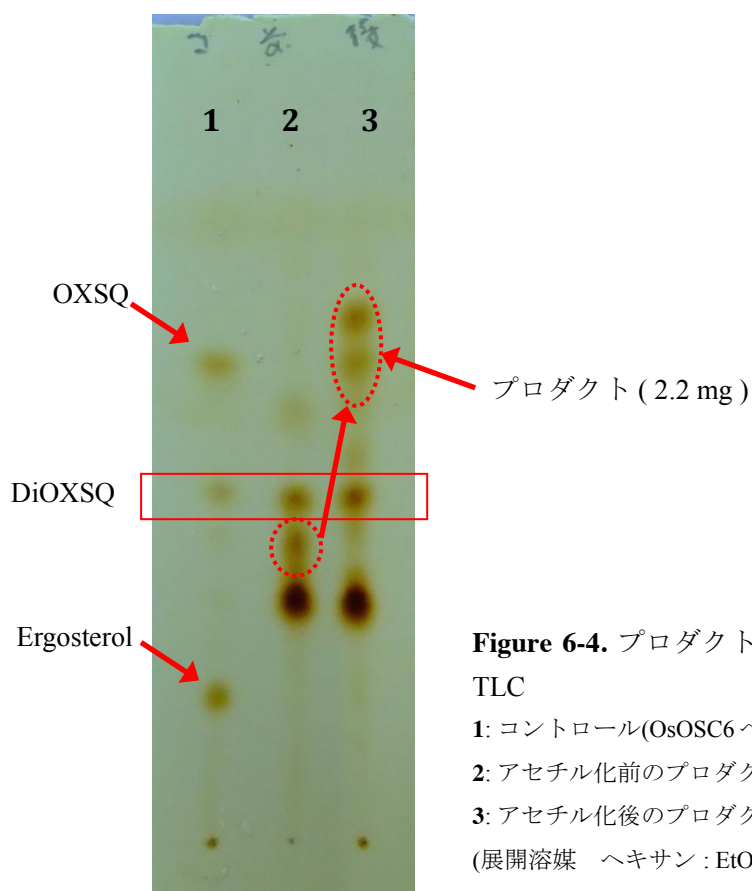


Figure 6-4. プロダクトを含むフラクションをまとめた TLC

1: コントロール(OsOSC6 ヘキサン抽出物)
2: アセチル化前のプロダクトを含むフラクション
3: アセチル化後のプロダクトを含むフラクション
(展開溶媒 ヘキサン : EtOAc = 100 : 20)

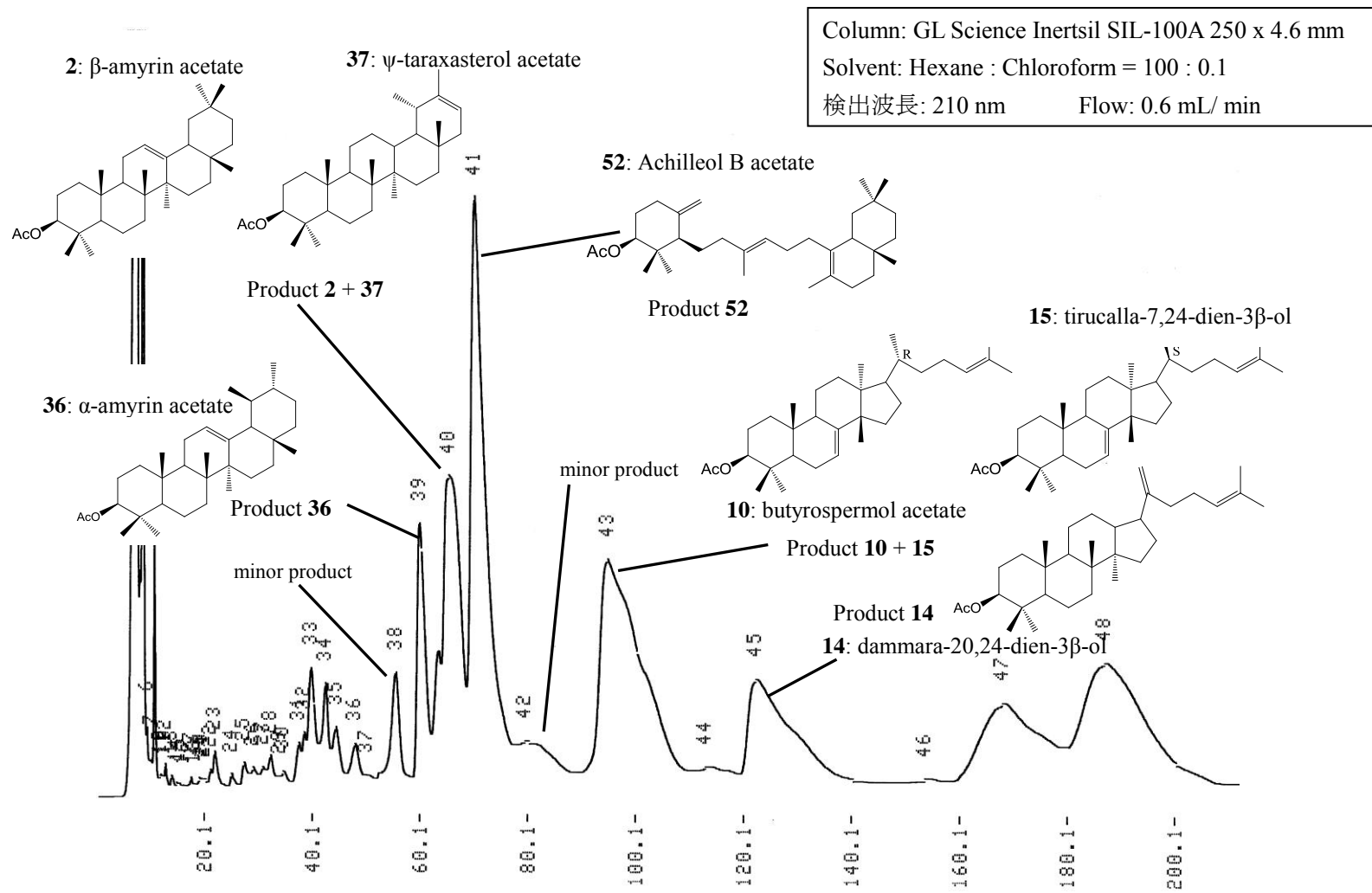


Figure 6-5. HPLC 結果

6-4. OsOSC6 のプロダクトプロファイル

OsOSC6 の微量成分の構造を決定したので、OsOSC6 産物がどのような生成比率で生成されるのかを決定した。また、OsOSC6 のもつ反応機構を推定した。

【方法】

- 1) pYES2_{OsOSC6} を導入した *S.cerevisiae* GIL77 をシード培養、本培養、誘導、後培養した(本培養で 5 L 分の菌体を培養した)。
- 2) 15 % (w/v) KOH/ MeOH 200mL で菌体を懸濁し、ホットスターラーで煮沸してから 2 hr 鹼化した。
- 3) 菌体をブフナー漏斗で濾過した。
- 4) 3)で生じた菌体カスを回収し、2)、3)の操作を 3 回行ない、完全に鹼化した。
- 5) 濾液を等量のヘキサン(600 mL)で 3 回抽出した。
- 6) SiO₂ カラムクロマトグラフィー(ヘキサン: EtOAc= 100: 5)によりヘキサン抽出物からスクアレン、オキシドスクアレン、エルゴステロールを除いた。(結果は Fig. 8-4)
- 7) GC で生成比率を決定した。微量成分の詳細な比率は HPLC 前のサンプルを GC 解析し、決定した。

【結果と考察】

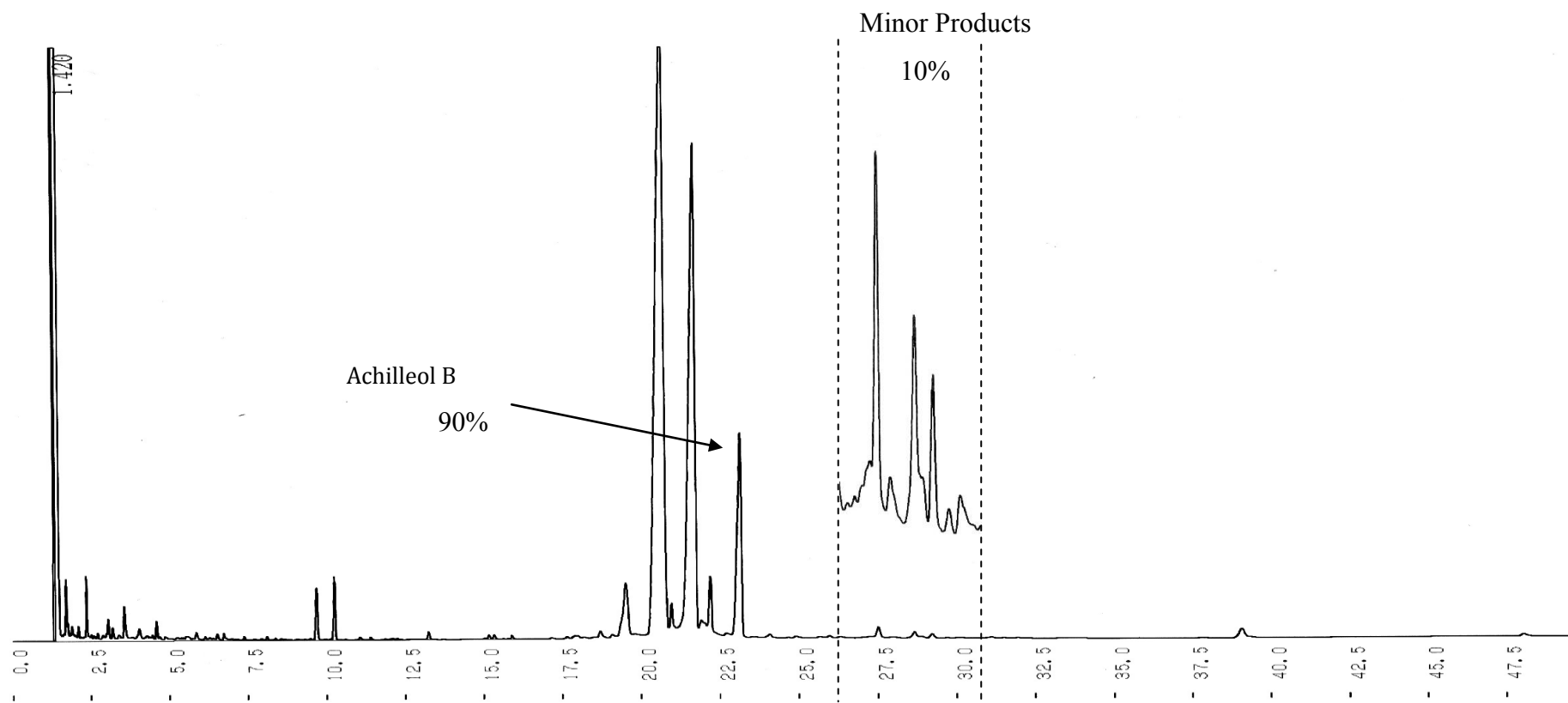


Figure 6-6. OsOSC6 の Achilleol B と微量成分の生成比率(GC chart)

GC カラム : J&W, DB-1, capillary (Length 30 m, I.D.0.32 mm, Film Thickness 0.25 μm)、注入口温度 : 300°C、カラム温度 : 220-270°C (2°C/min)、270°C (20 min)、270-290°C (2°C/min)

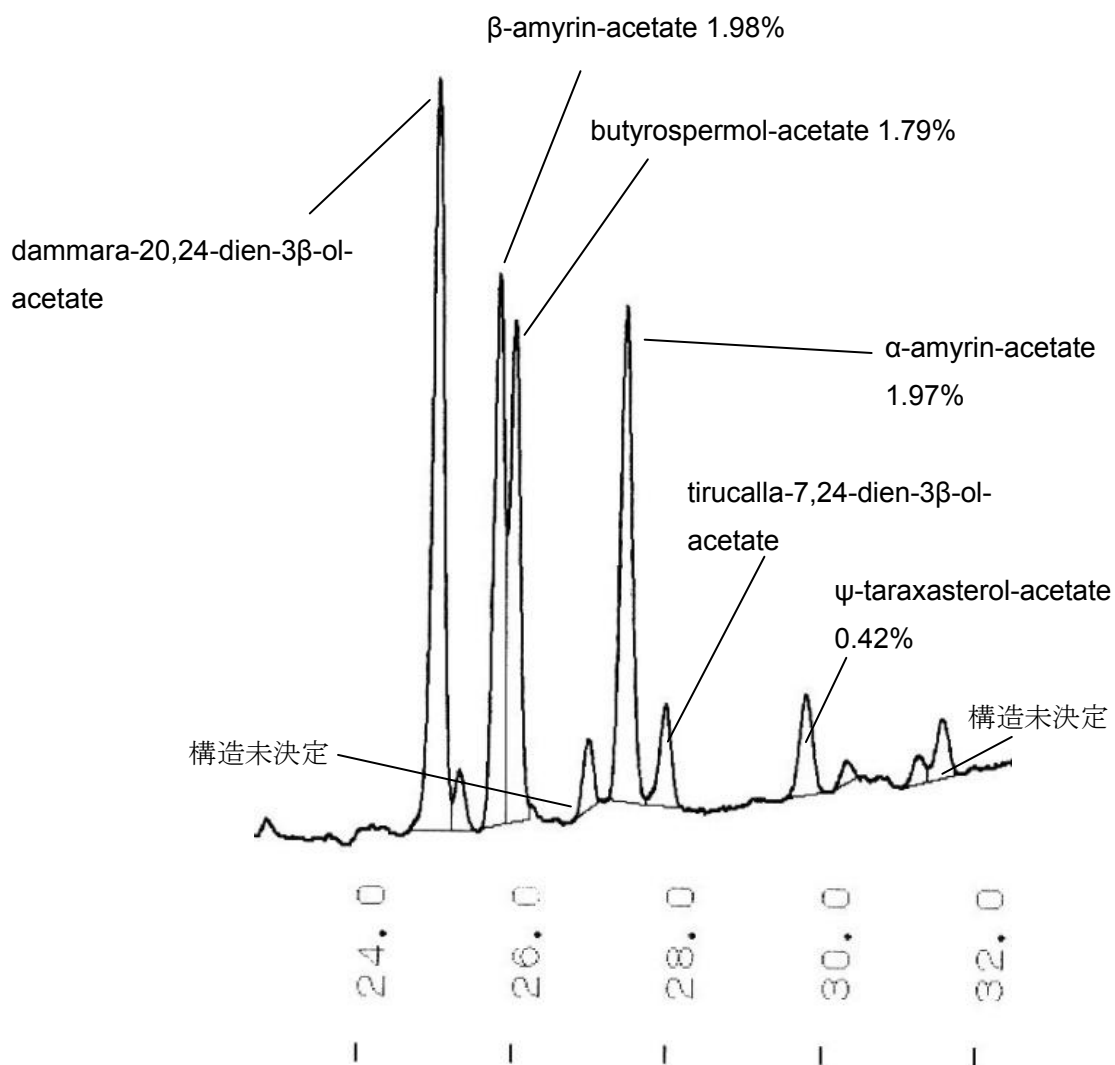
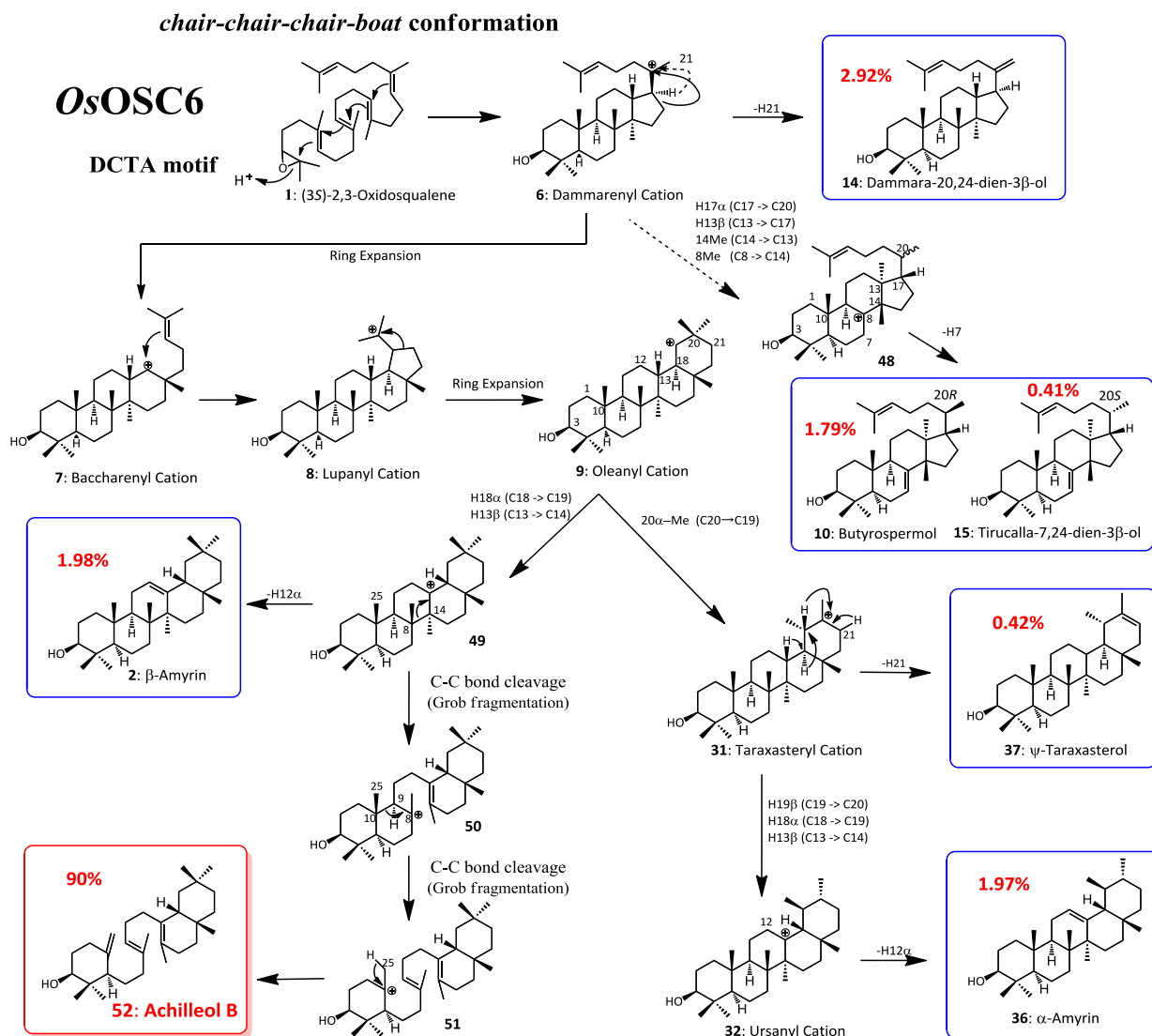


Figure 6-7. OsOSC6 の微量成分の詳細な生成比率(GC chart)

Figure 6-5 に示した HPLC を通す前のサンプルを GC 解析することにより OsOSC6 の微量成分の生成比率を決定した。

GC カラム : J&W, DB-1, capillary (Length 30 m, I.D.0.32 mm, Film Thickness 0.25 μm)、注入口温度 : 300°C、カラム温度 : 220-270°C (2°C/min)、270°C (20 min)、270-290°C (2°C/min)



Scheme 6-2. OsOSC6 の推定反応機構

プロダクト名は以下のとおりである。

52: Achilleol B、**14:** Dammara-20,24-dien-3β-ol、**10:** Butyrospermol、**15:** Tirucalla-7,24-dien-3β-ol、**2:** β-amyrin、**37:** ψ-taraxasterol、**36:** α-amyrin

OsOSC6の生合成機構をScheme 6-2に示した。DCTAモチーフのアスパラギン酸によるOXSQ **1**へのプロトン付加が引き金となり、ダンマレニルカチオン**6**が形成される。Me-21からのプロトン脱離によりDammara-20,24-dien-3 β -ol **14**が生じる。**6**からのハイドライドとMe基の転位によりC-8カチオンである**16**が形成される。16からH-7が脱離することで、butyrospermol **10** (20*R*-配置に由来) とtirucalla-7,24-dien-3 β -ol **15** (20*S*-配置) が生産された。4環性カチオン**6**は環拡張することでバッカレニルカチオン**7**を経由して更に環化することで5環性ルパニルカチオン**8**に変換される。**8**の更なる環拡張によりオレアニルカチオン**9**へと導かれる。C20 α -MeのC19カチオンへの1,2-転位によりタラクサステリルカチオン**31**が与えられた。**31**のH-21が脱プロトンすることで ψ -タラクサステロール**37**が形成された。アンチペリプラナー様式での1,2-ハイドライドシフトによりウルサニルカチオン**32**が形成され、引き続きH-12 α の脱離により α -アミリン**36**が得られた。H-18 α とH-13 β のハイドライドシフトを経てカチオン**49**が与えられた。**49**のH-12 α のプロトン脱離により β -アミリン**2**が形成された。C8-C14とC10-C-9のC-C結合の開裂 (Grob開裂) により**51**が生じ、引き続きMe-25からの脱プロトンによりachilleol B **52** (セコ型トリテルペン) が得られた。OsOSC6による β -アミリン**2** (5環性オレアニルカチオン**9**) の生産が確認されたことから、achilleol Bの形成がたしかにオレアニルカチオン**9**を経由していることが示唆された。

OsOSC6はAchilleol Bをメインプロダクトとして90%生産し、6つのマイナープロダクトを10%生産した。これまでセコ型トリテルペン合成酵素の報告例はシロイヌナズナ由来マルネラール合成酵素と β , α -セコアミリン合成酵素の2例のみであった。^{29,30}そのため、Achilleol B合成酵素はセコ型OSCとして3例目の報告となった。酵素キャビティ内で基質OXSQ **1**はchair-boat-chair-chair型で折りたたまれて環化されるとプロトステリルカチオンを経由してシクロアルテノールやパルケオールが形成されるが、OsOSC6は**1**をchair-chair-chair-boat-boat型に折りたたんで環化し、ダンマレニルカチオン**6**を経由してプロダクト**52**と**2**、**14**、**36**、**37**を生産した。

OSCがC-C結合の開裂 (Grob開裂) を触媒することがわかってきたが、どのような残基がそのような機能の由縁となっているのかは未解明である。植物の化学成分分析からはこれまでに複数のセコ型トリテルペンが見出されてきているだけに、その詳細な機能解析及び植物体内でのどのように働いているのか、今後解明されることが期待される。

6-5. OsOSC6 の進化過程

イネ由来 OSC を含めて OSC の系統樹を作成した (Figure 6-8)。Figure 6-8 から、OSC は系統的にプロトステリルカチオンを経由する OSC (プロトステリル型 OSC) とダンマレニルカチオンを経由する OSC (ダンマレニル型 OSC) とに分類できることがわかった。そして、OsOSC1~3 はプロトステリル型 OSC に、OsOSC4~6 はダンマレニル型 OSC にそれぞれ分類された。また、第 1 章 1-4-9 でも述べたように、 β -アミリン合成酵素は単子葉植物と双子葉植物とで異なる進化過程をもっている可能性が Osbourn らにより指摘されてきた。³⁵ Figure 6-8 のとおり、 β -アミリン合成酵素は単子葉植物と双子葉植物で異なるクレードを構成したことから、本研究においても Osbourn らの指摘を支持する結果が得られた。そして、OsOSC6 は単子葉植物の β -アミリン合成酵素のクレードに属していたため、系統解析的にも β -アミリン合成酵素から派生してきた可能性が支持された。

そして、Table 6-2 にはタンパク相同性 (右上) と活性部位相同性 (左下) を示した。AsbAS1 が単子葉植物であるセイヨウチャヒキの β -アミリン合成酵素である。Table 6-2 において、ダンマレニル型 OSC について着目して考える。青色部分 (双子葉ダンマレニル型 OSC どうしの比較) では、そのタンパク相同性は 60~80%程度、活性部位相同性は 80%以上である。黄色部分 (単子葉 β -アミリン合成酵素どうしの比較) ではタンパク相同性 67%、活性部位相同性 85%であった。このことから、双子葉どうしあるいは単子葉どうしではダンマレニル型 OSC は高い相同性を示すことがわかった。一方、紫色部分 (単子葉 β -アミリン合成酵素と双子葉ダンマレニル型 OSC との比較) を見ると、そのタンパク相同性は 50%程度、活性部位相同性は 40~50%程度であり、類似した反応を触媒する酵素としては低い相同性を示した。この結果は、単子葉植物と双子葉植物の β -アミリン合成酵素が異なる進化過程を有しているとの可能性を更に裏付けるものとなった。

以上のことをまとめると、 β -アミリン合成酵素は単子葉植物と双子葉植物で異なる進化過程を有しており、OsOSC6 は単子葉植物の β -アミリン合成酵素から派生してできたと考えられる。つまり、OsOSC6 が反応機構的にも系統解析的にも β -アミリン合成酵素に由来することを示唆する結果を得ることができた。

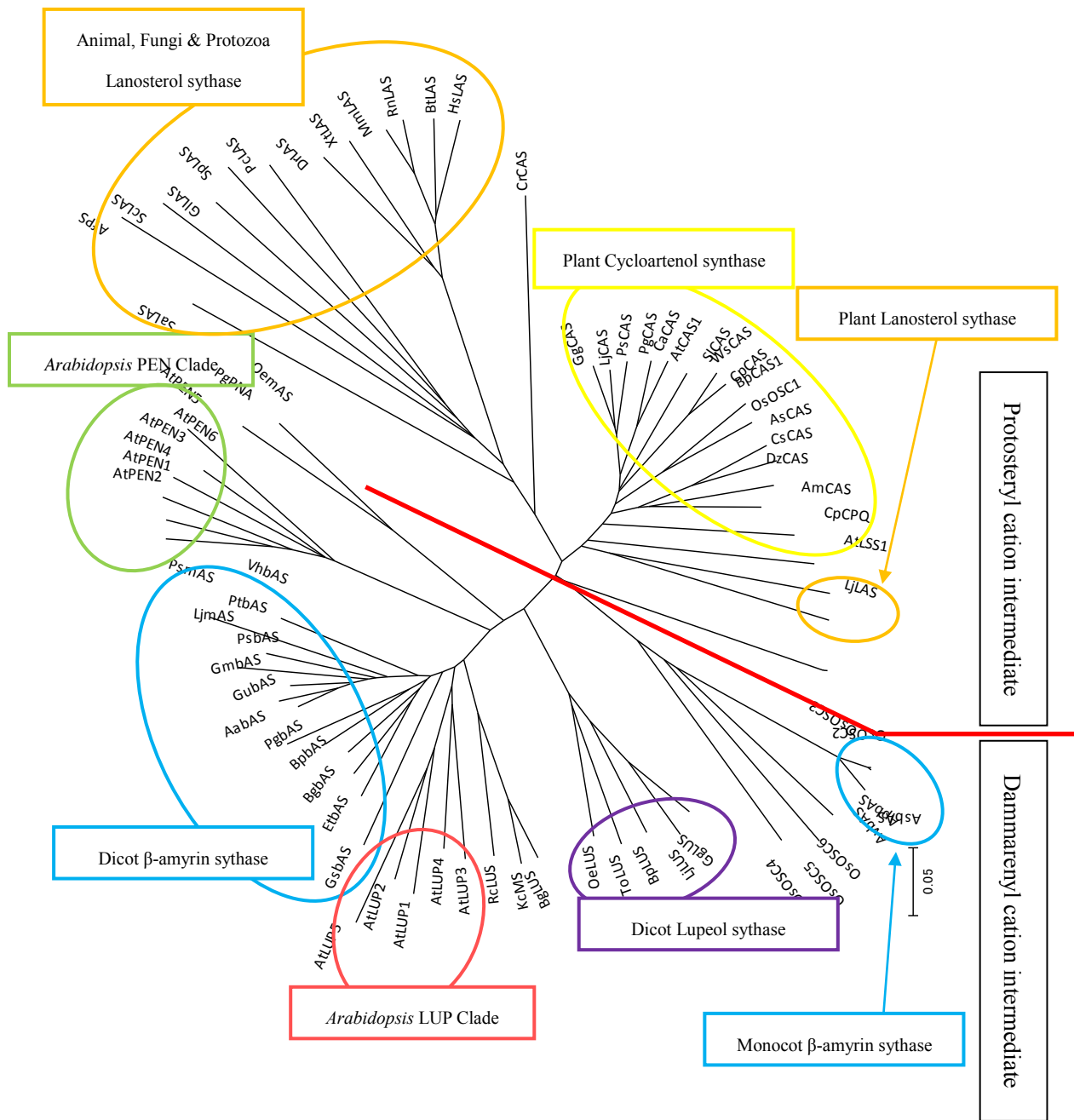


Figure 6-8. OSC の系統樹

OSCのアミノ酸配列をNCBIのProtein検索から機能同定されているOSCタンパクを抽出した。マルチプルアライメントをClustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)により作成し、系統樹をMEGA 4¹⁰⁰における近接結合法 (neighbor-joining method) により構築した。赤線：プロトステリルカチオン型OSCとダンマレニルカチオン型OSCの分岐線、橙色枠：ラノステロール合成酵素のクレード、黄色枠：植物シクロアルテノール合成酵素のクレード、緑色枠：シロイヌナズナPENクレード、赤枠：シロイヌナズナLUPクレード水色枠：β-アミリン合成酵素のクレード、紫色枠：双子葉植物ルペオール合成酵素のクレード OsOSC6は単子葉植物β-アミリン合成酵素のクレードに分類された。略語の説明は次頁に記載した。

Figure 6-8 に示した各酵素の表記法は次のとおりである。語頭の 2 文字は種名を表しており、そのあとに続く文字が酵素名を表している。

種名は以下の通りの略字である。

At: *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)、Os: *Oryza sativa* (イネ)、Cr: *Chlamydomonas reinhardtii* (コナミドリムシ)、Lj: *Lotus japonicas* (ミヤコグサ)、As: *Avena strigosa* (セイヨウチャヒキ)、Dz: *Dioscorea zingiberensis* (黄姜 (生姜の一種))、Cp: *Cucurbita pepo* (ペポカボチャ)、Betula platyphylla (シラカンバ)、Ca: *Centella asiatica* (ツボクサ)、Pg: *Panax ginseng* (オタネニンジン)、Gg: *Glycyrrhiza glabra* (スペインカンゾウ)、Ps: *Pisum sativum* (エンドウ)、Ws: *Withania somnifera* (アシユワガンダ)、Sl: *Solanum lycopersicum* (トマト)、Am: *Abies magnifica* (カリフォルニアアカモミ)、To: *Taraxacum officinale* (セイヨウタンポポ)、Oe: *Olea europaea* (オリーブ)、Kc: *Kandelia candel* (メヒルギ)、Rc: *Ricinus communis* (トウゴマ)、Gs: *Gentiana straminea* (リンドウ科リンドウ属)、Aa: *Artemisia annua* (クソニンジン)、Gu: *Glycyrrhiza uralensis* (カンゾウ (ウラルカンゾウ))、Gm: *Glycine max* (ダイズ)、Pt: *Polygala tenuifolia* (イトヒメハギ)、Vh: *Vaccaria hispanica* (ドウカンソウ)、Et: *Euphorbia tirucalli* (ミドリサンゴ)、Bg: *Bruguiera gymnorhiza* (オヒルギ)、Hs: *Homo sapiens* (ヒト)、Bt: *Bos taurus* (ウシ)、Rn: *Rattus norvegicus* (ドブネズミ)、Mm: *Mus musculus* (ハツカネズミ)、Xt: *Xenopus (Silurana) tropicalis* (アフリカツメガエル)、Dr: *Danio rerio* (ゼブラフィッシュ)、Sp: *Schizosaccharomyces pombe* (分裂酵母)、Pc: *Pneumocystis carinii* (カリニ肺炎を引き起こす原虫)、Gl: *Ganoderma lucidum* (マンネンタケ)、Af: *Aspergillus fumigatus* Af293 (子囊菌)、Sc: *Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母)、Sa: *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (バクテリア)、Av: *Avena ventricosa* (カラスムギ属)、Mt: *Medicago truncatula* (タルウマゴヤシ)

酵素名は以下の通りの略字である。

PEN1~6: シロイヌナズナ PEN クレードに分類される OSC

LUP1~5: シロイヌナズナ LUP クレードに分類される OSC

CAS1: シロイヌナズナ シクロアルテノール合成酵素

LSS1: シロイヌナズナ ラノステロール合成酵素

OSC1~6: イネの OSC

CAS: シクロアルテノール合成酵素

LAS: ラノステロール合成酵素

LUS: ルペオール合成酵素

bAS: β -アミリン合成酵素

Table 6-2. 14 種類の OSC と SHC の相同性比較（右上：タンパク相同性、左下：活性部位残基相同性）

赤色残基：プロトステリルカチオンを中間体にもつ OSC

黄色残基：単子葉の β -アミリン合成酵素

青色残基：双子葉のダンマレニルカチオンを中間体にもつ OSC

	HsLAS	OsOSC1	OsOSC2	LjLAS	AtLSS1	AtCAS1	OsOSC6	AsbAS1	AtLUP1	ToLUS	LjLUS	PgbAS	PsbAS	EtbAS	AaSHC
HsLAS		39	34	37	39	40	33	34	34	35	34	34	33	33	19
OsOSC1	92		71	63	62	74	55	54	54	60	58	58	58	57	17
OsOSC2	58	62		58	56	64	52	50	52	56	54	55	54	53	15
LjLAS	81	81	58		65	65	49	48	50	58	56	53	53	54	15
AtLSS1	92	92	65	88		64	48	48	45	54	54	54	52	54	15
AtCAS1	92	100	62	81	92		53	53	54	60	59	58	56	59	14
OsOSC6	65	65	50	69	73	65		67	45	47	46	48	47	45	13
AsbAS1	65	69	50	50	65	65	85		46	50	48	48	47	46	14
AtLUP1	46	42	54	42	46	42	42	38		57	55	69	69	69	13
ToLUS	58	54	65	65	58	54	42	42	81		73	63	61	63	18
LjLUS	58	54	62	50	58	54	42	42	81	92		60	58	59	15
PgbAS	65	62	62	58	62	62	50	50	77	88	85		79	81	10
PsbAS	65	62	62	58	65	62	50	50	81	88	85	96		81	17
EtbAS	65	62	62	58	69	62	50	50	77	88	85	100	96		17
AaSHC	31	35	38	31	38	35	31	100	35	38	38	38	38	38	

赤色部分：プロトステリルカチオンを反応中間体にもつ OSC 同士の比較

橙色部分：反応中間体にプロトステリルカチオンをもつ OSC と単子葉の β -アミリン合成酵素との比較

黄色部分：単子葉の β -アミリン合成酵素同士の比較

紫色部分：単子葉の β -アミリン合成酵素と双子葉の双子葉のダンマレニルカチオンを反応中間体にもつ OSC との比較

灰色部分：反応中間体にプロトステリルカチオンをもつ OSC と双子葉のダンマレニルカチオンをもつ OSC との比較

青色部分：双子葉のダンマレニルカチオンを反応中間体にもつ OSC 同士の比較

活性部位残基相同性でピックアップした残基は、ヒト OSC 結晶構造解析¹¹で指摘された活性部位残基である。

6-6. OsOSC6 微量成分のスペクトルデータ

Product 14 acetate

(EtAS F413 Product 5-Ac と同一化合物)

14-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 6-9、10 にそれぞれ示した。

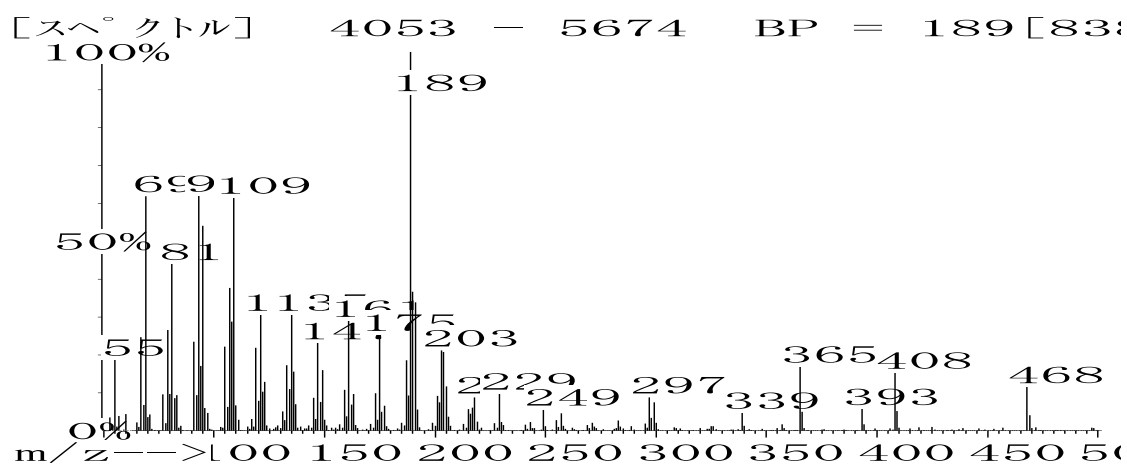


Figure 6-9. 14-Ac の EIMS フラグメントパターン

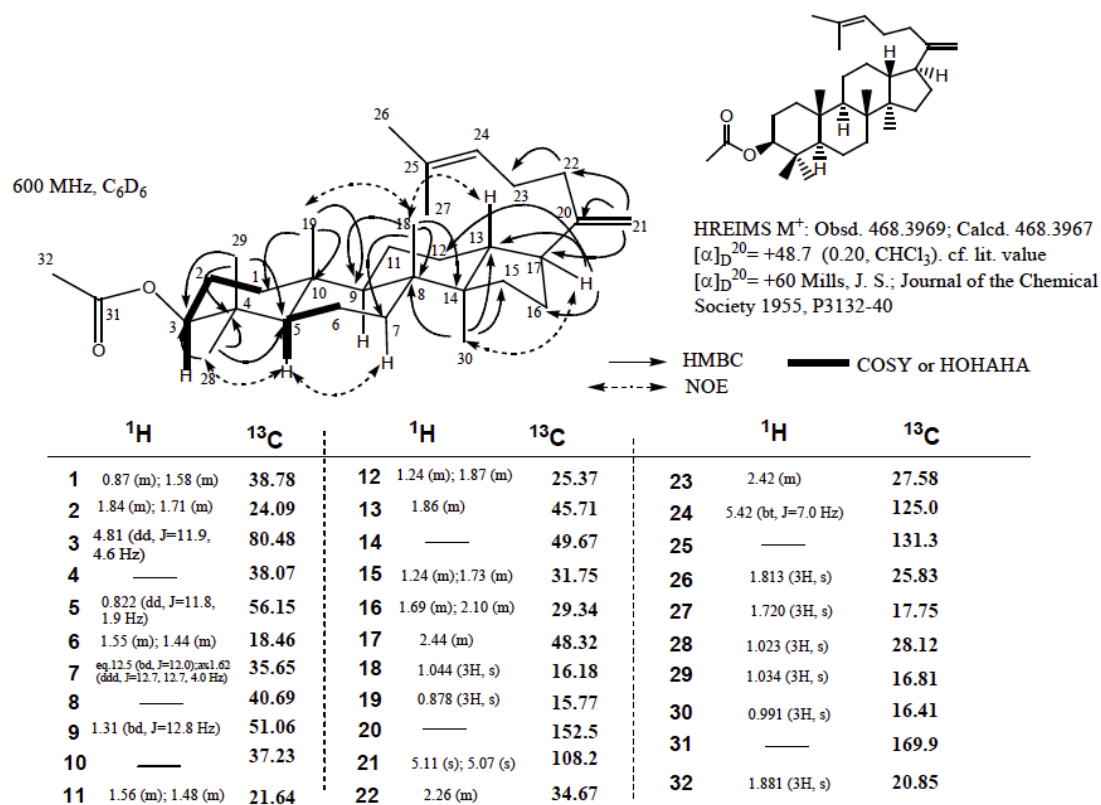


Figure 6-10. 14-Ac の NMR データ

Product 2 acetate

(β -amyrin-Ac)

2-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 6-10、11 にそれぞれ示した。

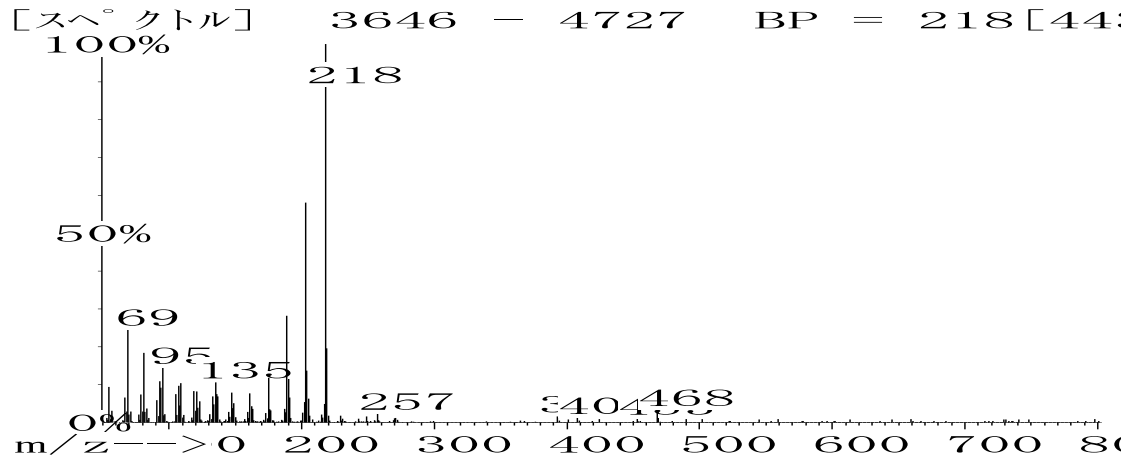
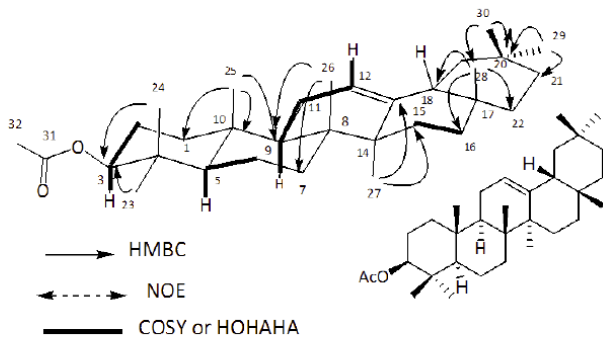
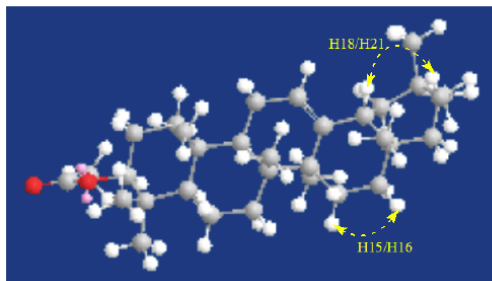


Figure 6-11. 2-Ac の EIMS フラグメントパターン

NMR data, HREIMS and $[\alpha]_D$

Product of *O*sOSC 6
 β -amyrin acetate



HREIMS M^+ : Obsd. 468.3969; Calcd. 468.3967
 $[\alpha]_D^{20} = +65.5$ (0.27, $CHCl_3$), cf. lit. value $[\alpha]_D^{20} = +78.7$ ($c=1.07$) Tanaka, R; Phytochemistry 1988, V27(7), P2273-7

NMR data in C_6D_6 (7.28 ppm for 1H and 128.0 for ^{13}C)
400 MHz

NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C
1	0.95(m);1.50(m)	38.28	9	1.66(m)	47.78	17	—	32.78	25	0.969(3H,s)	15.64
2	1.70(m);1.84(m)	23.92 ^a	10	—	36.99	18	2.22(m)	47.64	26	1.134(3H,s)	17.01
3	4.83(dd, J=11.6, 4.6Hz)	80.51	11	1.91(2H, m)	23.83 ^a	19	1.33(m); 1.92(m)	47.18	27	1.341(3H, s)	26.26
4	—	37.87	12	5.37(t, J=3.6Hz)	122.3	20	—	31.26	28	1.105(3H, s)	28.68
5	0.871(bd, J=11.6)	55.49	13	—	145.1	21	1.29(m); 1.55(m)	35.07	29	1.092(3H,s)	33.56
6	1.44(m);1.56(m)	18.52	14	—	41.92	22	1.42(m);1.64(m)	37.56	30	1.073(3H, s)	23.83
7	1.41(m);1.57(m)	32.82	15	1.10(m); 1.91(m)	26.55	23	1.033(3H, s)	28.18	31	—	169.9
8	—	40.08	16	0.96(m);2.19(m)	27.26	24	1.049(3H, s)	17.05	32	1.877(3H,s)	20.85

^a: assignment of the carbon signals may be exchangeable.

Figure 6-12. 2-Ac の NMR データ

Product 10 acetate

(butyrospermol-Ac)

10-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 6-13、14 にそれぞれ示した。

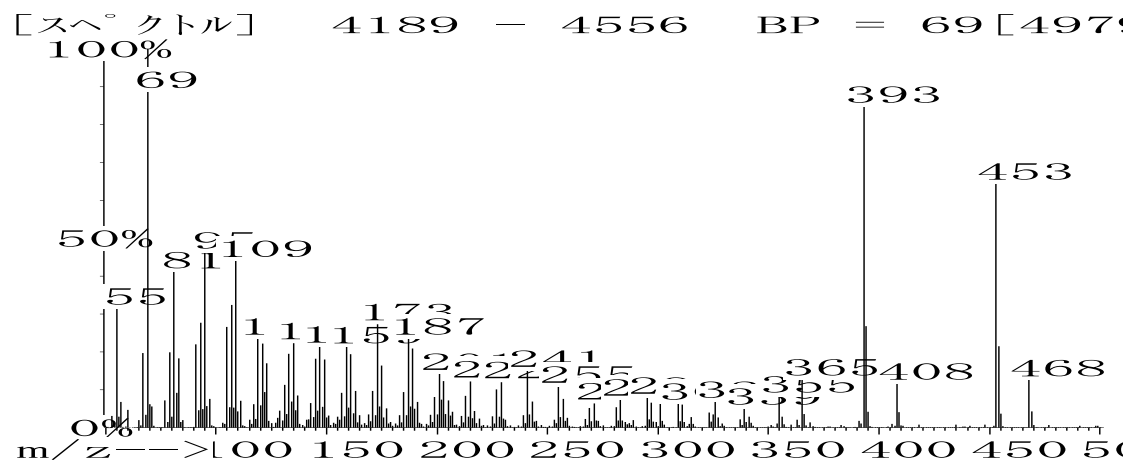
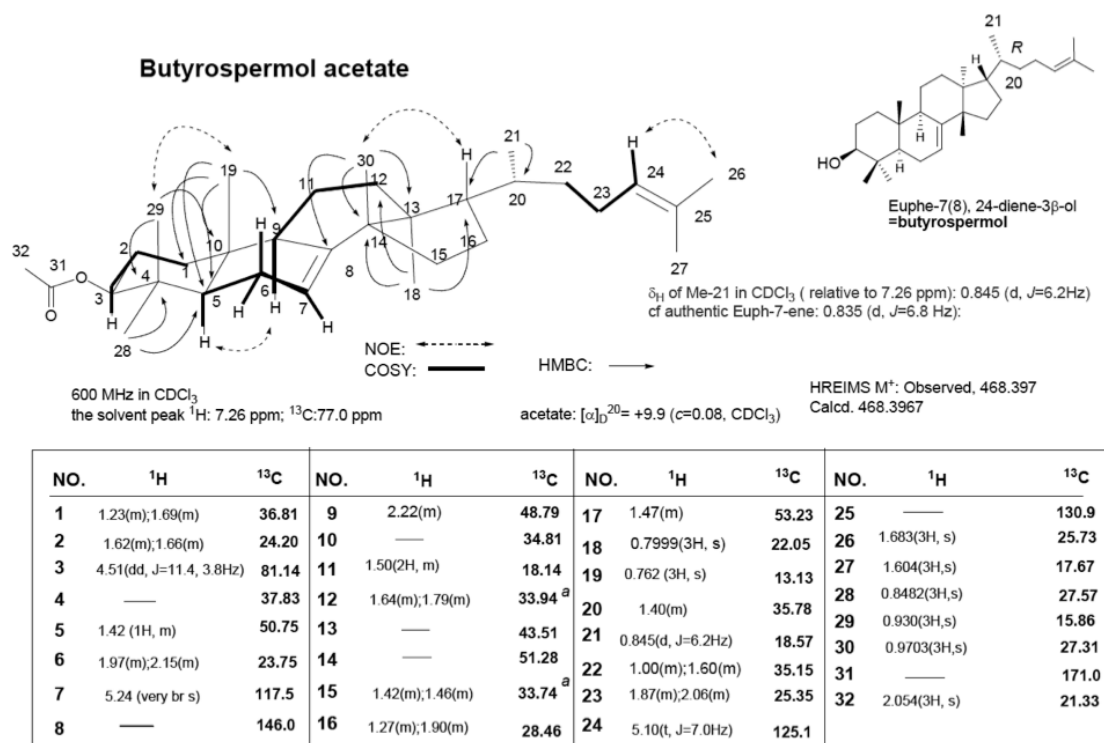


Figure 6-13. 10-Ac の EIMS フラグメントパターン



a: The assignments of the carbon signals of C-12 and C-15 were indistinguishable, due to the very close chemical shifts.

Figure 6-14. 10-Ac の NMR データ

Product 36 acetate

(α -amyrin-Ac)

36-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 6-15、16 にそれぞれ示した。

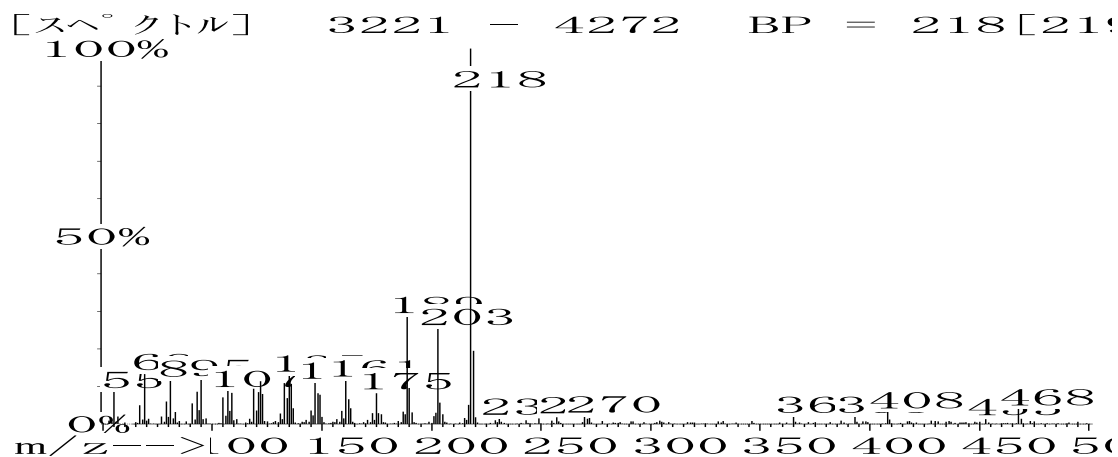
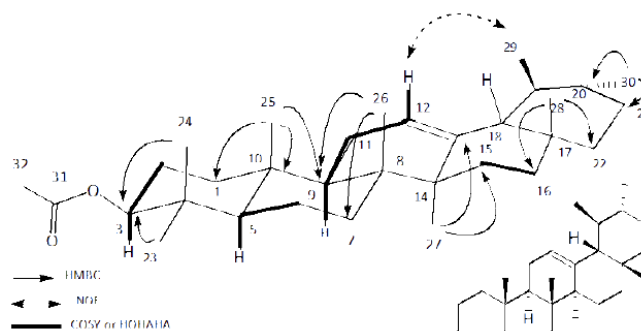
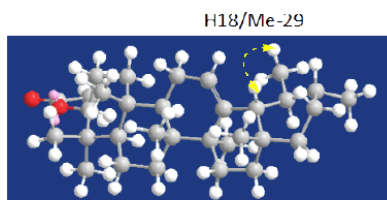


Figure 6-15. 36-Ac の EIMS フラグメントパターン

NMR data, HREIMS and $[\alpha]_D$

Product of *Os*OSC 6
 α -amyrin acetate



HREIMS M^+ : Obsd. 468.3967; Calcd. 468.3967
 $[\alpha]_D^{20}$ +78.6 (0.03, $CHCl_3$), cf. lit. value
 $[\alpha]_D^{20}$ +75.7 Carache-Blanco, Esperanza I.;
 Natural Product Research 2006, V20(4), P327-334

NMR data in C_6D_6 (7.28 ppm for 1H and 128.0 for ^{13}C)
600 MHz

NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C	NO.	1H	^{13}C
1	0.84(m), 1.48(m)	38.39	9	1.58(m)	47.89	17	—	34.05	25	0.964(3H, s)	15.84
2	1.71(m); 1.83(m)	23.93	10	—	36.87	18	1.54(m)	59.45	26	1.161(3H, s)	17.08
3	4.83(d, 1-11.8, 4.6Hz)	80.54	11	1.92(2H, m)	23.60	19	1.57(m) ^a	40.11 ^a	27	1.275(3H, s)	23.58
4	—	37.86	12	5.328(t, J 3.6Hz)	124.9	20	1.04(m) ^a	39.95 ^a	28	1.088(3H, s)	17.75
5	0.85(bd, J 12.6)	55.55	13	—	139.8	21	1.48(m); 1.57(m)	31.63	29	1.122(d, J-6.5Hz) ^b	21.59 ^b
6	1.44(m); 1.56(m)	18.52	14	—	42.36	22	1.48(m); 1.63(m)	41.91	30	1.126(d, J-6.5Hz) ^b	29.04 ^b
7	1.42(m); 1.63(m)	33.18	15	1.12(m); 2.00(m)	27.05	23	1.047(3H, s)	28.23	31	—	169.9
8	—	40.29	16	1.01(m); 2.19(m)	28.46	24	1.047(3H, s)	17.03	32	1.880(3H, s)	26.83

a and *b*: the assignment of the carbon and proton signals may be reversed.

Figure 6-16. 36-Ac の NMR データ

Product 15 acetate

(tirucalla-7,24-dien-3 β -ol-Ac)

15-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 6-17、18 にそれぞれ示した。

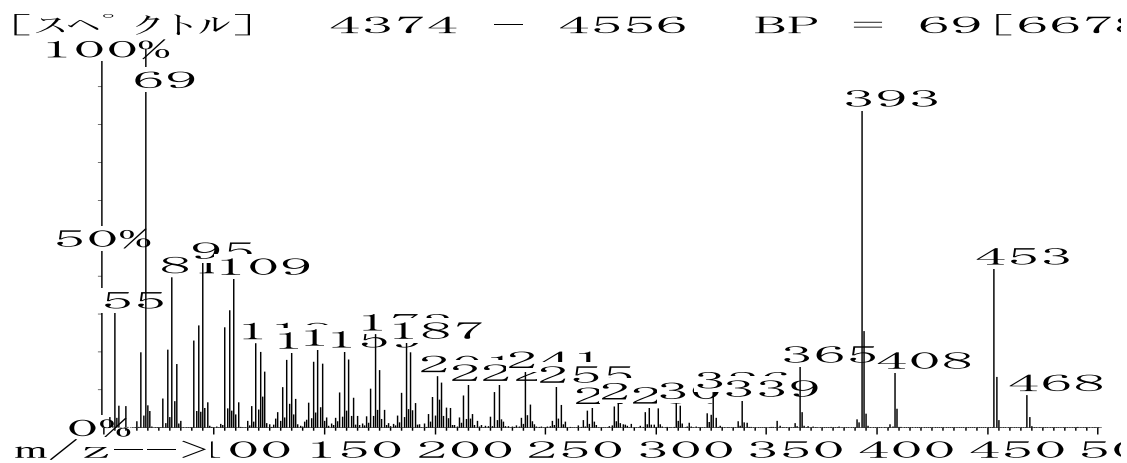


Figure 6-17. 15-Ac の EIMS フラグメントパターン

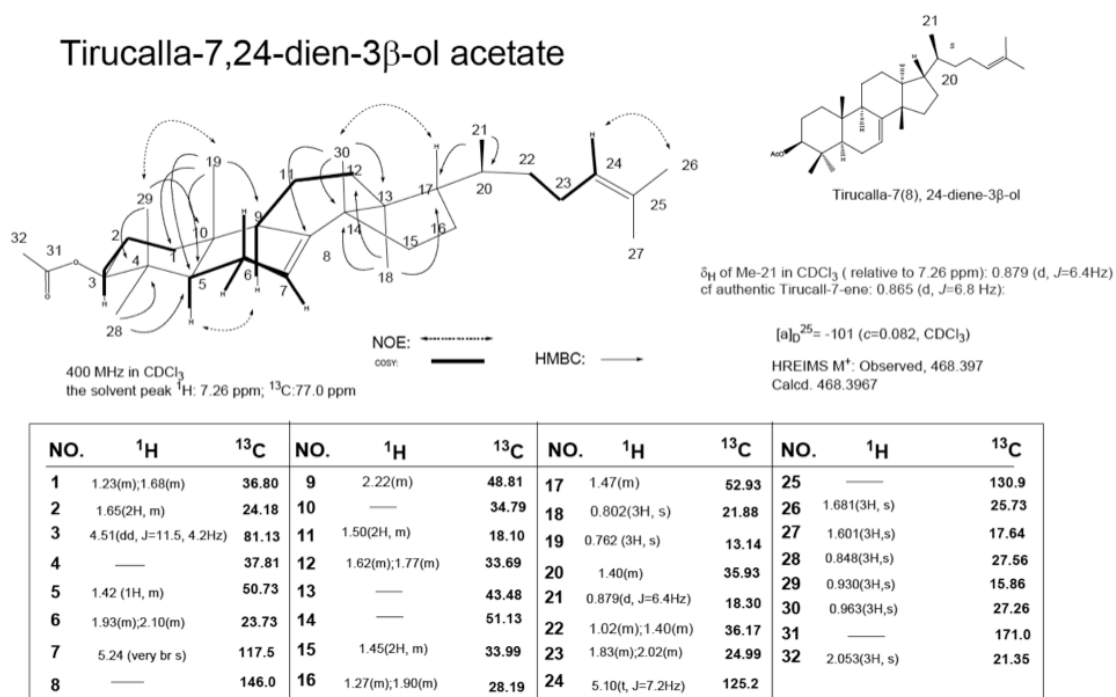


Figure 6-18. 15-Ac の NMR データ

Product 37 acetate

(ψ -taraxasterol-Ac)

37-Ac の EIMS フラグメントパターンと NMR データを Figure 6-19、20 にそれぞれ示した。

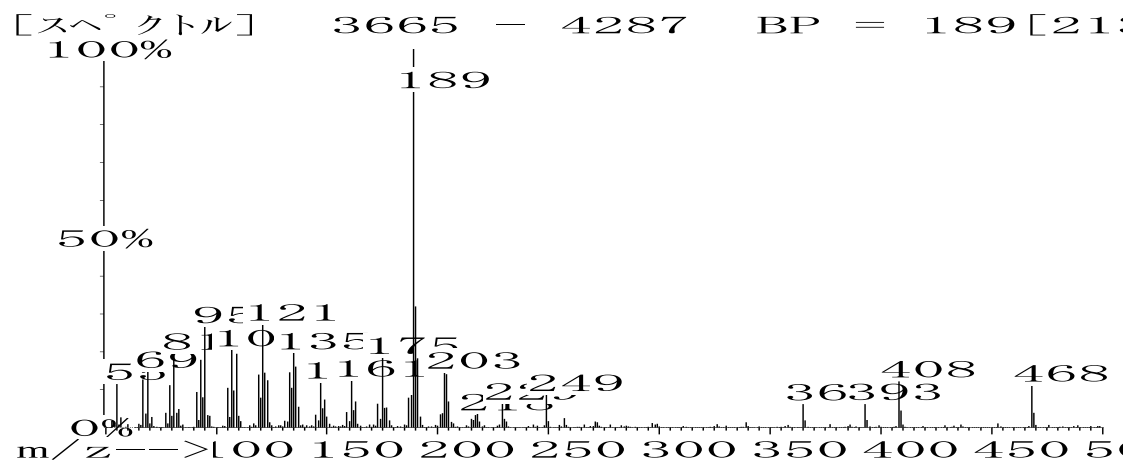


Figure 6-19. 37-Ac の EIMS フラグメントパターン

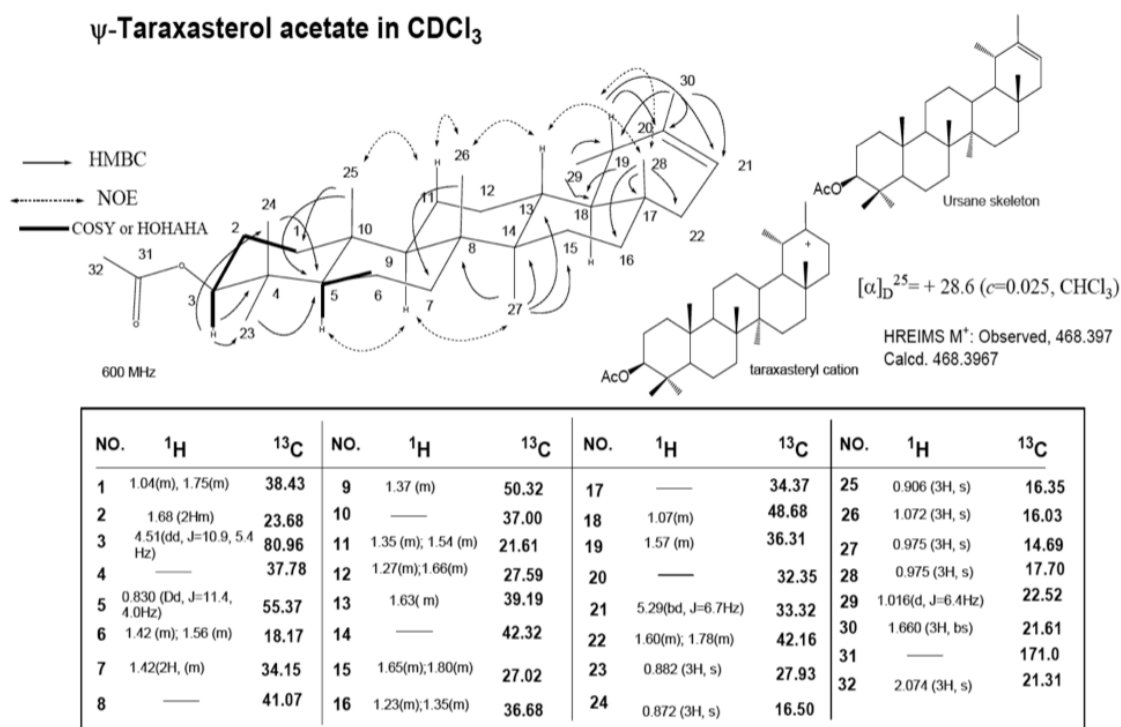


Figure 6-20. 37-Ac の NMR データ

第7章

総括

7-1. EtAS 酵素学的諸性質	226
7-2. F728、F474 残基の機能	229
7-2-1. F728 残基について	230
7-2-2. F474 残基について	232
7-3. イネ由来 OsOSC6 の進化過程	235
7-4. まとめ	239

7-1. EtAS 酵素学的諸性質

【結果の要約】

- EtAS の完全精製に成功し、至適反応条件 (30°C、pH 7.0、0.05% Triton X-100) を決定した。
- 速度論定数 (K_m : $33.8 \pm 0.53 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} : $46.4 \pm 0.68 \text{ min}^{-1}$ 、比活性: $352 \pm 11.8 \text{ nmol/min/mg}$) を決定した。OSC で k_{cat} を決定した 3 例目となり、従来の報告例よりも非常に高い値を示した。
- 5~30°C の範囲ではタンパクの構造に崩れないことを確認した (CD 測定)。
- 3 種の阻害剤 (iminoSQ、Ro 48-8071、U18666A) について阻害定数 (IC_{50} 、 K_i 、阻害様式) を決定した。
- 環化開始部位への変異導入により、D485 はプロトン付加により環化開始に直接関わり、C486 と C564 は D485 の酸性度を高めていることが示唆された。また、C564 の方が C486 よりもその役割が大きいとわかった。また、酵母 *in vivo* 相対活性測定が *in vitro* 速度論解析の代替になり得ることがわかった。

Table 7-1. 種々のトリテルペン環化酵素の速度論定数

	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Specific activity ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)
EtAS	33.8 ± 0.53	46.4 ± 0.68	1.37 ± 0.21	352 ± 11.8
Bovine lanosterol synthase ⁸²	11	1.6×10^{-2}	1.45×10^{-3}	1.747
	15 ⁸⁹	3.0×10^{-2} ⁸⁹	2×10^{-3} ⁸⁹	8.8×10^{-2} ⁸⁹
Rat lanosterol synthase ^{89,90,83}	55 ⁹⁰	NR	NR	26.16 ⁹⁰
	86 ⁸³	NR	NR	NR
<i>S. cerevisiae</i> lanosterol synthase ⁹¹	18	NR	NR	40.8
	16.7 ⁹¹	289 ⁹¹	17.3 ⁹¹	1910 ⁹¹
SHC ^{57,83,85}	1.6 ⁸³	2.4 ⁸³	1.5 ⁸³	NR
	38 ⁸⁵	72 ⁸⁵	1.89 ⁸⁵	NR

NR: not reported.

EtAS とこれまでに報告されているトリテルペン環化酵素の速度論定数を Table 7-1 にまとめた。OSC として k_{cat} を決定した 3 例目となった。EtAS の K_m 値はこれまでに報告されてきたトリテルペン環化酵素と類似の値を示した一方、EtAS の k_{cat} 値や比活性はこれまでに報告されてきた OSC のそれより非常に高い値を示した。このことは、酵素精製の段階で酵素の活性が維持され、天然に近い活性が得られたと考えている。

ゲルろ過 HPLC からは EtAS がモノマーであり、ヒト ラノステロール合成酵素²⁴ と同様の高次構造であることがわかった。また、CD 測定から 5~30°C の範囲ではタンパクの構造に崩れはなく、それ以上ではその構造が崩れていくことがわかった。EtAS は OSC と

して CD 測定を行った初めての例となった。

阻害剤を用いた酵素反応では、3 種の阻害剤 (2,3-iminosqualene; iminoSQ、Ro 48-8071、U18666A) について検討した (Figure 7-1)。なお、iminoSQ は市販品がなかったため、有機合成により調製した。iminoSQ は基質 OXSQ をミミックした阻害剤であるにもかかわらず、その阻害実験例は少なく、本研究が 3 例目の報告となった。そして、iminoSQ は従来の 2 例と比べて EtAS 活性を強力に阻害し、30.9 nM の IC_{50} 値と 13.4 nM の K_i 値を示した。iminoSQ の N 原子は生理的 pH ではプロトン化され、アジリジウムイオンとなっており、これはプロトン化されたオキシラン環をミミックしているために、拮抗阻害により EtAS 活性を阻害したと考えられる。

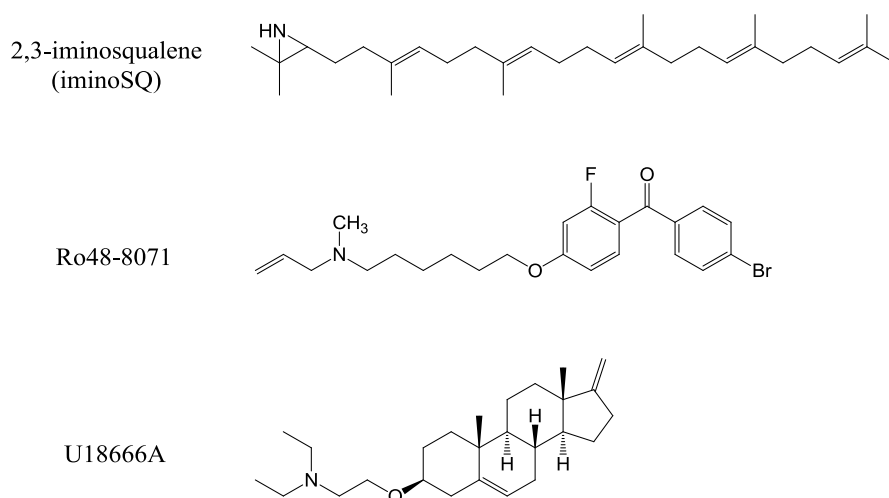


Figure 7-1. 用いた阻害剤の構造

Ro48-8071 もまた強力な阻害剤であった (IC_{50} : 10.7 nM、 K_i : 7.0 nM)。Ro48-8071 はウシ⁸²、ラット^{81,83}、ヒト^{11,24,84}由来のラノステロール合成酵素や SHC^{83,85}に対しても強力な阻害を示した。Lineweaver-Burk plot では混合型阻害であると示されたが、ヒト OSC X線結晶構造解析では拮抗阻害と報告された。この速度論解析と X線データとの間の不一致について、Rufら²⁴や Lenhartら⁸⁵の報告より、EtASでも拮抗阻害を受けている可能性が考えられる。ヒト OSC 結晶構造解析から、Ro48-8071 は活性部位においてトリテルペン環化酵素間で高度に保存されている残基とインタラクションしており、そのために高い阻害活性を示した可能性が考えられる。¹¹

U18666A はラット肝臓 OSC とエンドウの β -アミリン合成酵素で IC_{50} の報告はあるが、阻害様式の報告はなく、EtAS はトリテルペン環化酵素として U18666A により受ける阻害様式 (非拮抗阻害) を決定した初めての例となった。非拮抗阻害は阻害剤が活性部位以外に結合する阻害様式であるため、U18666A は EtAS の活性部位以外に結合し、酵素の高次構造を変化させたために酵素活性を低下させたと考えられる。

OSCでの DCTAE モチーフは SHC の DXDD モチーフに相当し、いずれも高度に保存されている。当研究室では SHC での DXDD モチーフを部位特異的変異導入した変異酵素の速度論解析から、このモチーフが SHC の環化開始のプロトン付加を担うことを証明した。⁵⁷OSC でこのモチーフに関して変異株を用いた速度論解析話されていなかったため、EtASにおいてこのモチーフ内の D485、C486 およびモチーフ外の C564 の変異株の速度論解析を行った。C564 はヒト OSC で D485 の酸性度を高めると予想されていた残基である。
11

これらの残基の変異株の *in vitro* での速度論定数と酵母 *in vivo* での相対活性を Table 7-2 に示した。D485 残基はいずれの変異株でも失活したことから、環化開始のプロトンドナーとして働き、長さも非常に重要であることが示唆された。また、C486A と C564A ともに活性の低下が見られたため、D485 と水素結合して D485 の酸性度を高めていることが示唆された。そして、C564の方が著しく活性が低下したため、その役割が大きいことが考えられる。また、いずれの変異株の CD スペクトルも野生株のそれとほぼ同様の結果を示したことから、変異株の高次構造には変化がなく、酵素活性の低下は部位特異的変異導入によるものであることがわかった。

また、*in vitro* と *in vivo* での結果がほぼ一致したため、*in vivo* 実験が *in vitro* 実験の代替になり得ることを示している。これは、*in vitro* で非常に活性が弱く、 K_m や k_{cat} の測定が困難な変異株や発現量が低く活性測定が困難な変異株について有効であると考えられる。

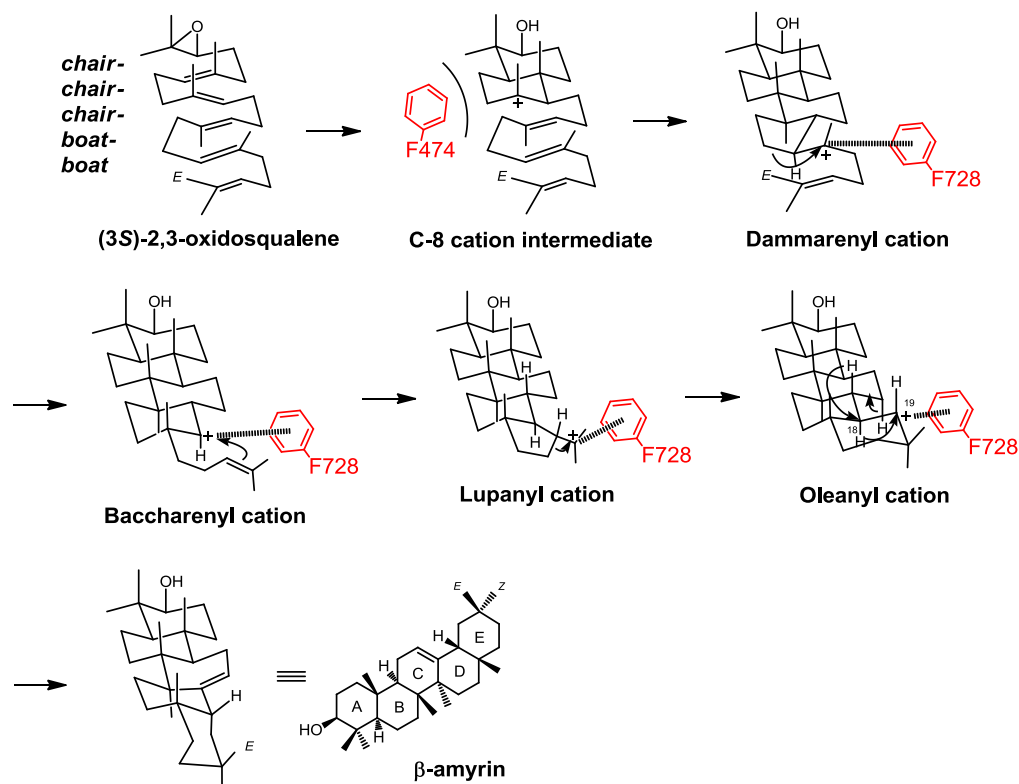
Table 7-2. D485N、D485E、C486A、C564A の酵素活性比較

	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Specific activity ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Relative activity (%) to the specific activity	<i>in vivo</i> relative activity (%)
Wild	33.8 ± 0.53	46.4 ± 0.68	1.37 ± 0.21	352 ± 11.8	100	100
D485N	ND	ND	ND	ND	0	0
D485E	ND	ND	ND	ND	0	0
C486A	34.8 ± 3.4	20.4 ± 1.0	0.59 ± 0.03	163 ± 5.7	46	58 ± 5.5
C564A	51.1 ± 4.1	0.77 ± 3.6 $\times 10^{-3}$	0.015 ± 6.9 $\times 10^{-5}$	5.79 ± 0.085	1.6	2.5 ± 0.57

7-2. F728、F474 残基の機能

【要約】

- Scheme 7-1 に各残基の機能をまとめた。
- F728 残基はカチオン- π 相互作用により 4 環性および 5 環性カチオンを安定化している。特に 2 級カチオンであるバックレニルカチオン、オレアニルカチオンの安定化に関与している。
- F474 残基は B 環の近傍に存在し、そのバルクサイズにより基質の正確な折りたたみに関与している。



Scheme 7-1. F728 と F474 残基の機能

EtAS F728、F474 残基は SHC F601、F365 および酵母ラノステロール合成酵素 (ScLAS) F699、F445 残基にそれぞれ相当する。SHC F601 と F365 や ScLAS F699、F445 がカチオン- π 相互作用の機能を有していることが報告されてきた。^{22,55,56,69} 本研究で EtAS F728 残基には SHC F601 残基や ScLAS F699 残基と同様にカチオン- π 相互作用により中間体カチオンを安定化していることがわかったが、F474 残基にはカチオン- π 相互作用の機能は少なく、Phe の適切なバルクサイズが基質の正確な折りたたみに寄与し、通常の環化反応を助けていることが示唆された。このことから、同じトリテルペン環化酵素で高度に保存されている残基どうしても環化酵素ごとに異なる機能をもつことがあると示された。以下 8-2-1~8-2-2 に EtAS F728、F474 残基個々の機能をまとめた。

7-2-1. F728 残基について

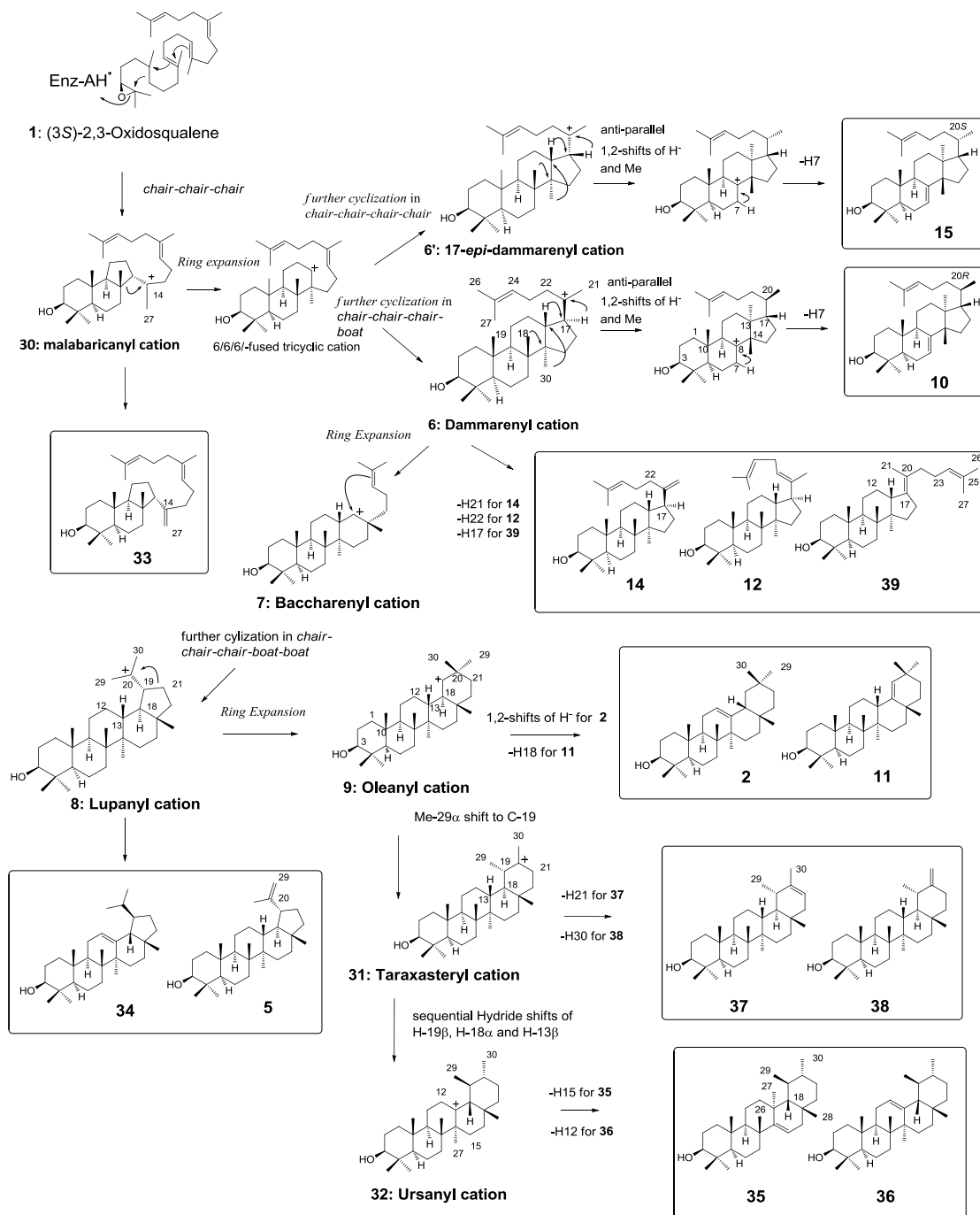
F728 残基は SHC F601 残基に相当する。SHC F601 残基は当研究室によりカチオン- π 相互作用により 3 環性および 4 環性カチオンを安定化していることが報告されてきた。^{43,68}OSC では変異体の酵素活性が見積もられてこなかったため、カチオン- π 相互作用の証明には至っていなかった。そこで F728 残基もカチオン- π 相互作用の機能があると予想し、変異株の酵素活性に着目して研究を行った。

F728 変異株産物の推定生合成機構を Scheme 7-2 に示した。プロダクトが主に 4 環性および 5 環性であったため、F728 残基は D/E 環の近傍に存在することが示唆された。そして、F728H が主生産したゲルマニコールは His がオレアニルカチオンから直接プロトンを引き抜く塩基として働いたために生産されたと考えられる。F728W からは天然でも非常に珍しいイソウルセノールが生産された。

そして酵母 *in vivo* での相対活性測定 (Figure 7-2) から、野生株と同じ芳香族残基である Y 変異株で活性が維持され、脂肪族残基ではサイズに拠らず著しく活性が低下したため、F728 残基の機能がカチオン- π 相互作用による中間体カチオンの安定化であると示唆された。また、芳香族残基である H、W 変異株で活性が低下した理由は、次のように考えられる。H 変異株は His が一部プロトン化され、芳香環として機能しなかったため。W 変異株は大きすぎる側鎖のバルクサイズが周辺の残基の配向にも影響したためと考えられ、SHC F365W や F605W で活性が低下した場合と同様の現象のために活性が低下したと考えられる。

また、変異株の CD 測定結果が野生株のそれと同様の結果を示したことから、変異株の活性の低下が酵素高次構造の崩れではなく、部位特異的なアミノ酸置換によるものであることが確かめられた。

以上の結果から、F728 残基はカチオン- π 相互作用により 4 環性および 5 環性カチオンの安定化に関与しており、特に 2 級カチオンであるバッカレニルカチオンとオレアニルカチオンの安定化に関与していると推定した (Scheme 7-1)。



Scheme 7-2. F728 変異株産物の推定生成経路

以下に化合物名を示した。 **33**: (17E)-(13 β H)-malabarica-14(27),17,21-trien-3 β -ol、**34**: lup-12-en-3 β -ol、**14**: dammara-20(21),24-dien-3 β -ol、**11**: germanicol、**10**: butyrospermol、**12**: (20E)-dammara-20(22),24-dien-3 β -ol、**35**: isoursenol、**36**: α -amyrin、**5**: lupeol (lup-20(29)-3 β -ol)、**15**: tirucalla-7,24-dien-3 β -ol、**37**: ψ -taraxasterol (urs-20(21)-en-3 β -ol)、**38**: taraxasterol (urs-20(30)-en-3 β -ol)、**39**: (17E)-dammara-17(20),24-dien-3 β -ol (新規化合物)

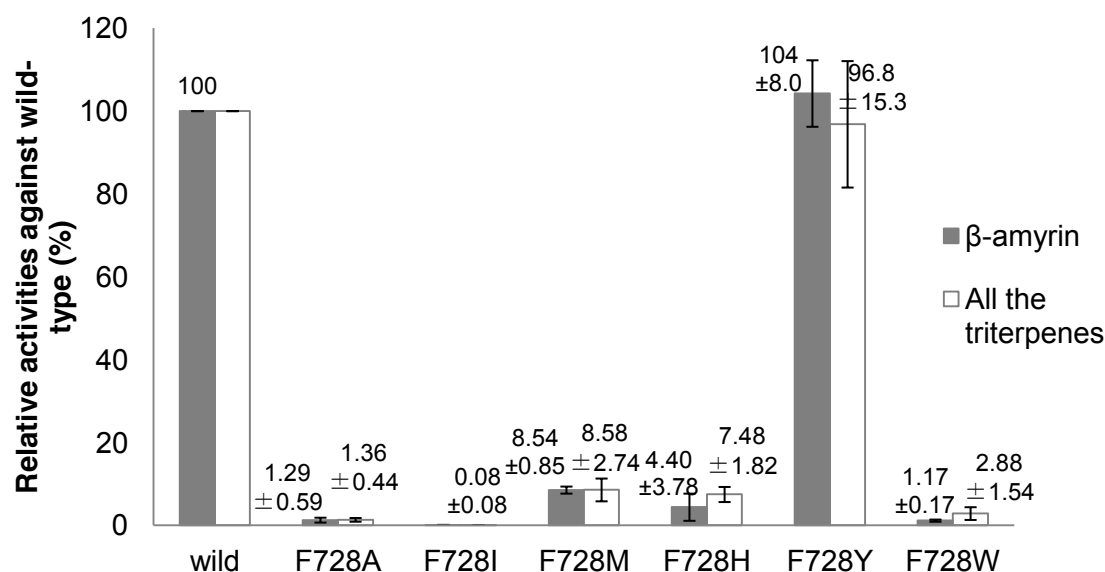


Figure 7-2. F728 変異株の野生株に対する相対活性

野生株 EtAS の β -アミリンおよび全プロダクト形成の活性はそれぞれ 5.02 ± 0.79 、 5.62 ± 0.17 mg/mg EtAS enzyme であった。F728H ではゲルマニコール **11** は β -アミリン **2** と同様にオレアニルカチオン **9** から生産されるため、 β -アミリン **2** と見なして相対活性を算出した。

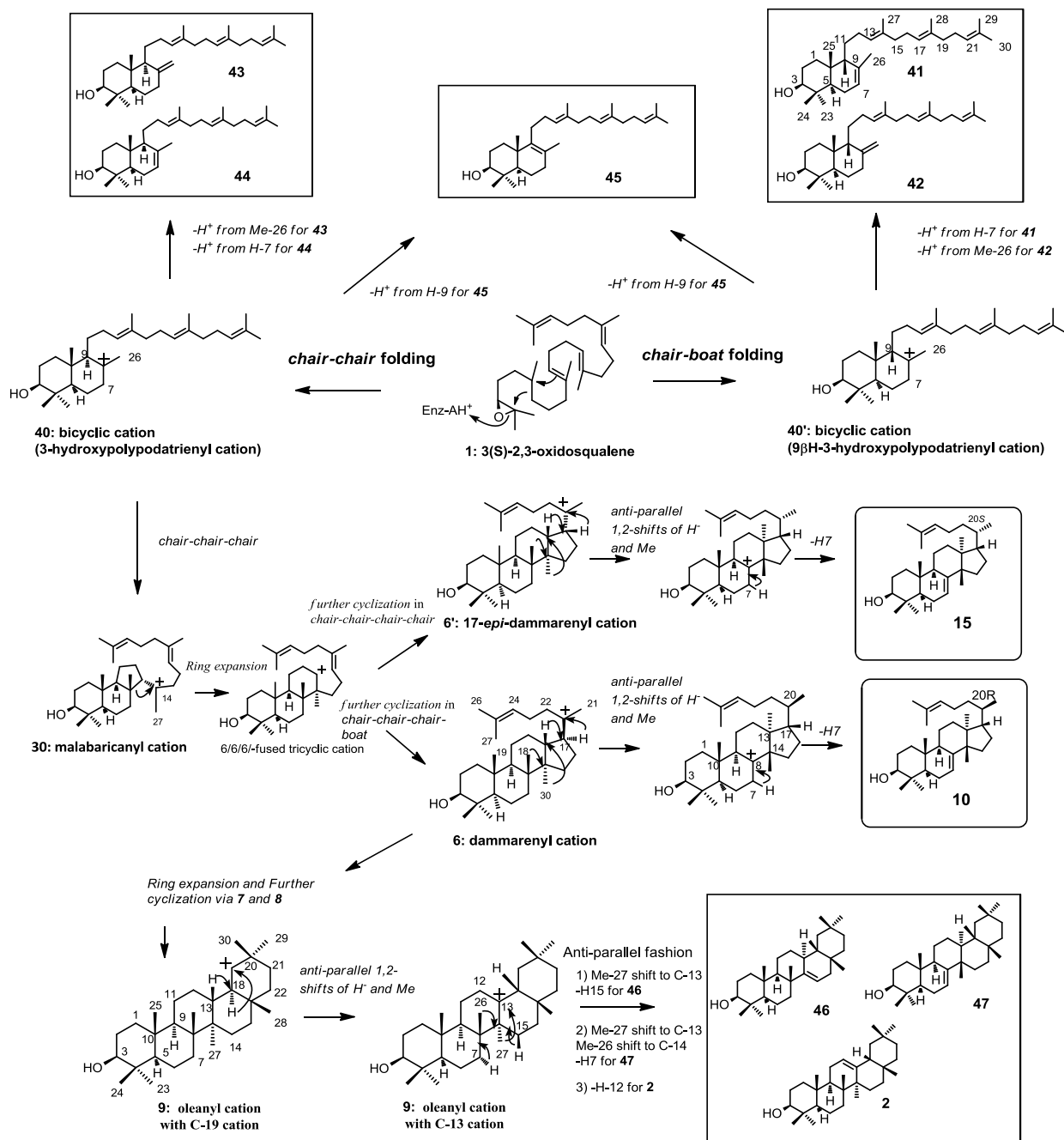
7-2-2. F474 残基について

F474 残基は SHC F365 残基に相当する。SHC F365 残基は当研究室によりカチオン- π 相互作用により 2 環性カチオンを安定化していることが完全に証明された。²⁰ そこで F474 残基にも同様の機能があると予想し、変異導入を行った。

F474 変異株産物の推定生合成機構を Scheme 7-2 に示した。5 種類の 2 環性プロダクトが生産されたことから、F474 残基は B 環の近傍に存在することが示唆された。2 環性産物の中には環化開始時に OXSQ **1** が本来の *chair-chair* 型 (C-C 型) 産物 (**11**、**12**) の他に、熱力学的に不安定な *chair-boat* 型 (C-B 型) 産物 (**9**、**10**) も含まれていた。C-C 型の OSC への変異導入により C-B 型産物が得られた例はなく、本研究が初めての例となった。そして酵母 *in vivo* での相対活性測定 (Figure 7-3) から、脂肪族残基 M や L でも高い活性があり、オレアニル型産物の相対活性は赤矢印で示したように、脂肪族残基と Tyr の側鎖のバルクサイズと正の相関を示した。このことから、F474 残基はカチオン- π 相互作用よりもそのバルクサイズが重要であることが示唆された。活性の低下した W、H、T 変異株については、W 変異株は F728W と同様にその大きすぎるバルクサイズが周囲の残基の配向にも影響したため、H と T 変異株は極性側鎖が周囲の残基と水素結合などのネットワークを形成して活性部位の形状を変化させたためとそれぞれ考えられる。また、G と A 変異株で 2 環性産物の比率が大きくなった理由は、側鎖のバルクサイズが小さすぎたために B 環付近の空間的を埋めることができず、基質の折りたたみが不正確となったためと

考えられる。

以上のことから、F474 残基はカチオン- π 相互作用よりも、そのバルクサイズにより基質を正確に折りたたむことで正確な環化反応に寄与していることがわかった (Scheme 7-1)。



Scheme 7-3. F474 変異株産物の推定生合成経路

化合物名は次のとおりである。 **41:** (9 β H)- γ -polypodatetraene-3 β -ol (γ -isopolypodatetraene-3 β -ol と仮称した) ; **42:** (9 β H)- α -polypodatetraene-3 β -ol (α -isopolypodatetraene-3 β -ol と仮称した) ; **43:** α -polypodatetraene-3 β -ol; **44:** γ -polypodatetraene-3 β -ol; **45:** polypoda-8(9)-13,17,21-tetraene-3 β -ol; **15:** tirucalla-7, 24-diene-3 β -ol; **10:** butyrospermol; **46:** taraxerol (13 α -methyl-27-norolean-14-en-3 β -ol); **47:** multiflorenol (13 α -methyl-14 β -methyl-26-norolean-7-en-3 β -ol)

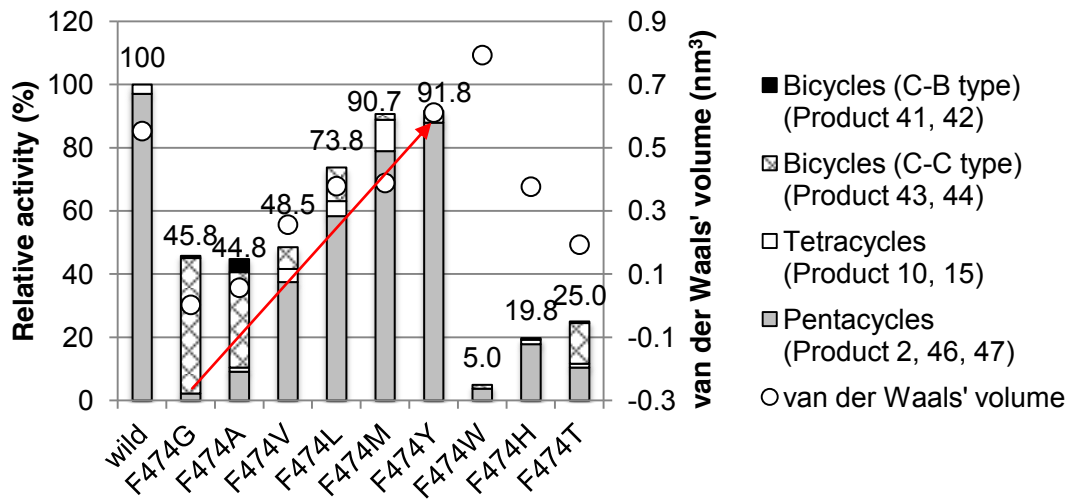


Figure 7-3. F474 変異株の野生株に対する相対活性 (%)

野生株 EtAS の全プロダクトの活性 100%に対して野生株および変異株の 4 つの骨格 (Bicycles (C-B 型)、Bicycles (C-C 型)、Tetracycles、Pentacycles) の活性を相対値で表した。○印は側鎖のファンデルワールス体積を表している。赤矢印から、G、A、V、L、M、Y 変異株の Pentacycle 相対活性と側鎖のファンデルワールス体積が正の相関を示すことがわかった。

7-3. イネ由来 OsOSC6 の進化過程

【結果の要約】

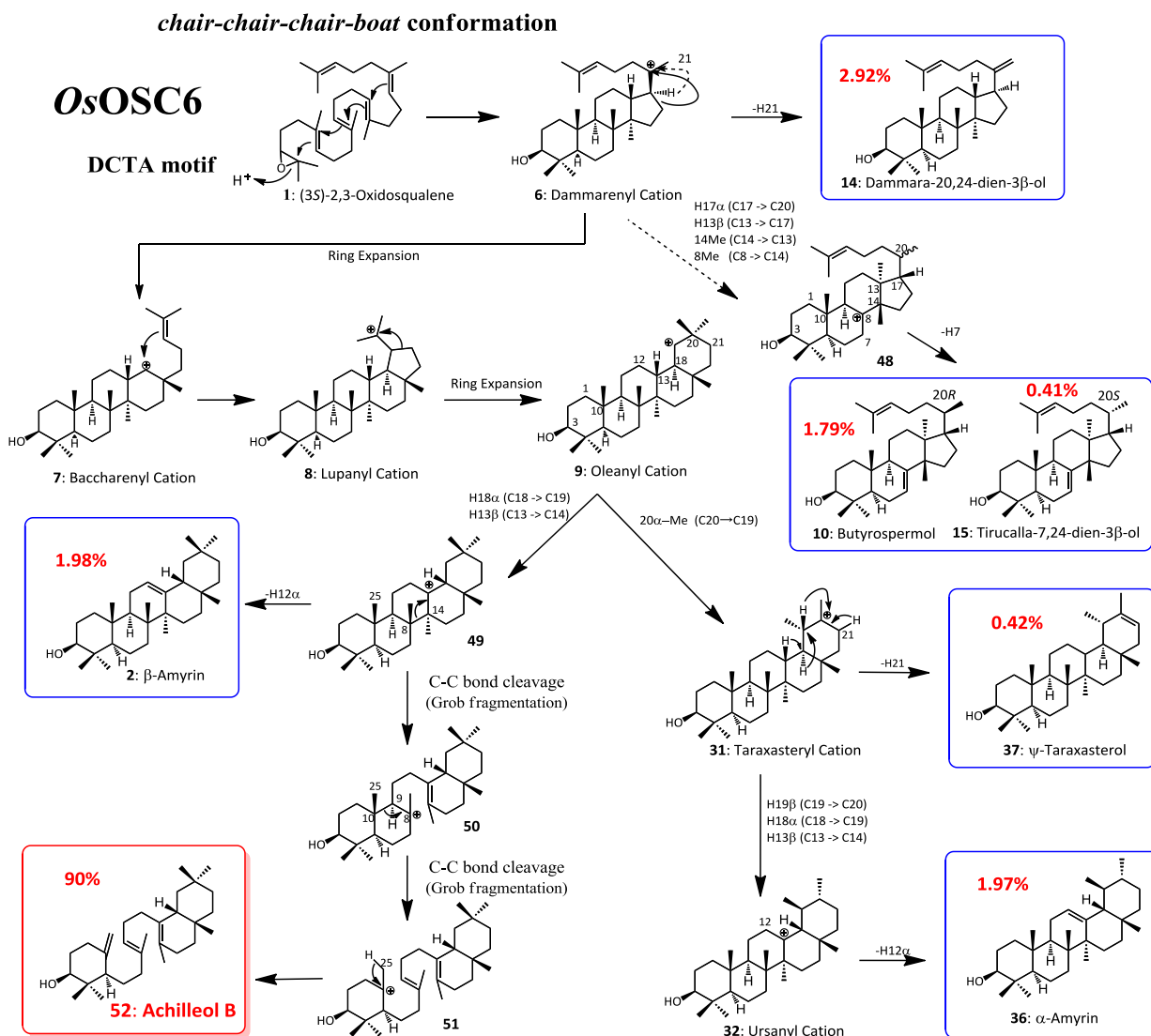
- OsOSC6 は Achilleol B を 90% 生産する Achilleol B 合成酵素である。
- 微量成分として β -アミリン (1.98%)、 α -アミリン (1.97%)、 ψ -タラクサステロール (0.42%)、Dammara-20,24-dien-3 β -ol (2.92%)、Butyrospermol (1.79%)、Tirucalla-7,24-dien-3 β -ol (0.41%) を生産した。
- 反応機構的にも系統解析的にも OsOSC6 が β -アミリン合成酵素から派生してきたことが示唆された。

OsOSC6 の機能解析は当研究室の森により行なわれ、そのメインプロダクトが Achilleol B (90%) であり、10% のマイナープロダクトを生産することが報告された。Achilleol B はオレアニルカチオンを経由して生成されると予想された。そのため、反応機構的に、同じオレアニルカチオンを経由する β -アミリン合成酵素から派生してきたと考え、10% のマイナープロダクトに β -アミリンが含まれると予想し、マイナープロダクトを同定した。また、系統解析からも OsOSC6 の進化過程を調べた。

Scheme 7-4 に OsOSC6 の推定反応機構を示した。6 つの微量成分を同定し、この中には β -アミリンも含まれていた。したがって、予想通り Achilleol B は β -アミリン合成酵素様の酵素であることが実証された。OsOSC6 はセコ型トリテルペンである Achilleol B を 90 % 生成する Achilleol B 合成酵素であり、セコ型トリテルペン合成酵素として 3 例目の発見となった。セコ型トリテルペンは植物から見出されており、それらの合成酵素や植物体内での役割に興味もたれる。

そして、イネ由来 OSC を含めて植物 OSC の系統解析から OsOSC6 の進化過程を調べた (Figure 7-5)。Osbourm らに報告されたように³⁵、 β -アミリン合成酵素は単子葉植物と双子葉植物で異なる進化過程を有していることが示され、OsOSC6 は単子葉植物の β -アミリン合成酵素のクレードに分類された。よって、系統解析的にも β -アミリン合成酵素から派生してきたことが示唆された。

以上から、OsOSC6 が反応機構的にも系統解析的にも β -アミリン合成酵素から派生してきたとの予想を支持する結果を得ることができた。



Scheme 7-4. OsOSC6 の推定反応機構

プロダクト名は以下のとおりである。

52: Achilleol B、**14:** Dammara-20,24-dien-3β-ol、**10:** Butyrospermol、**15:** Tirucalla-7,24-dien-3β-ol、**2:** β-amyrin、**37:** ψ-taraxasterol、**36:** α-amyrin

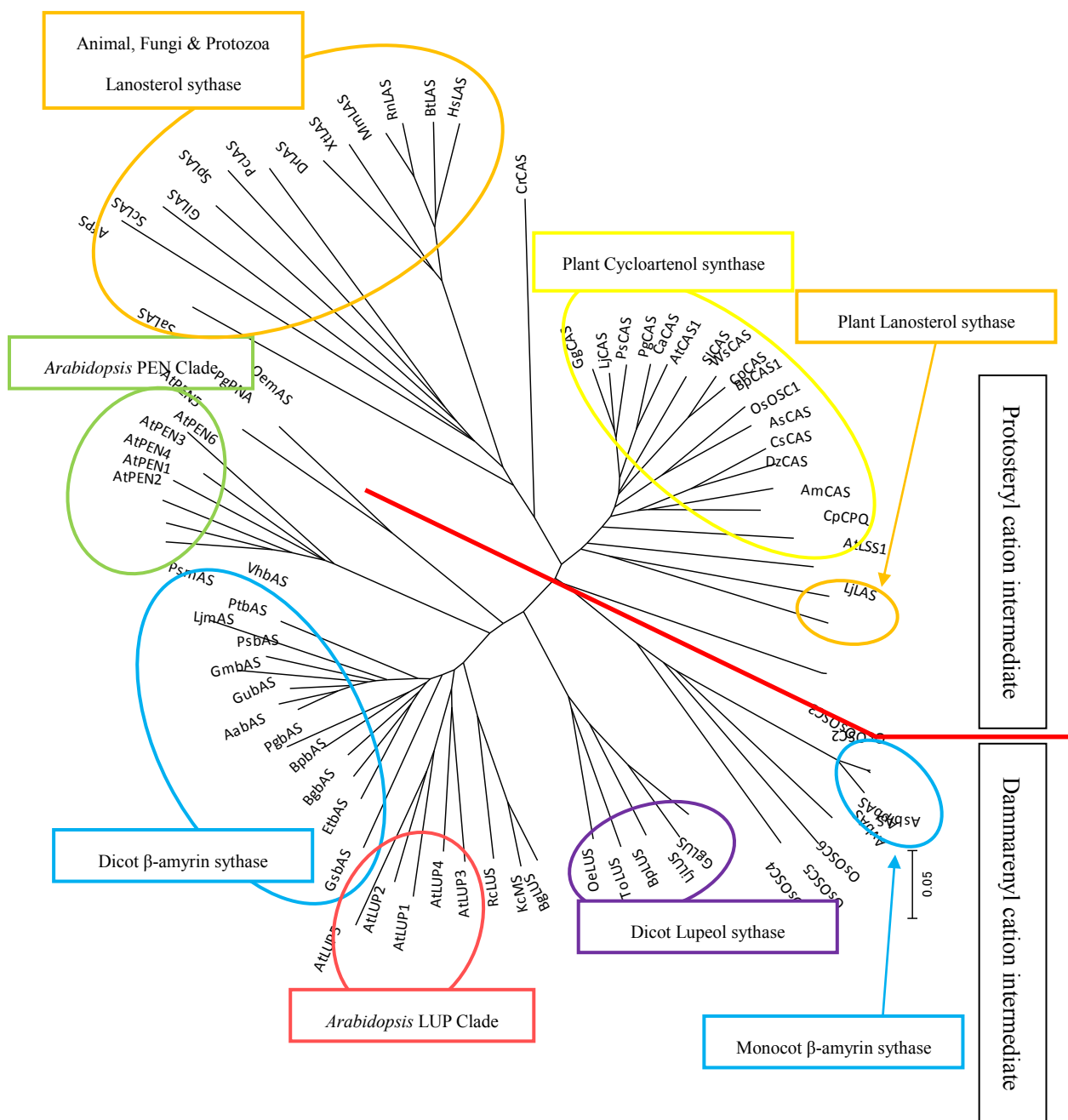


Figure 7-4. OSC の系統樹

OSCのアミノ酸配列をNCBIのProtein検索から機能同定されているOSCタンパクを抽出した。マルチプルアライメントをClustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)により作成し、系統樹をMEGA4¹⁰⁰における近接結合法 (neighbor-joining method) により構築した。赤線：プロトステリルカチオン型OSCとダンマレニルカチオン型OSCの分岐線、橙色枠：ラノステロール合成酵素のクレード、黄色枠：植物シクロアルテノール合成酵素のクレード、緑色枠：シロイヌナズナPENクレード、赤枠：シロイヌナズナLUPクレード水色枠：β-アミリン合成酵素のクレード、紫色枠：双子葉植物ルペオール合成酵素のクレード OsOSC6は単子葉植物β-アミリン合成酵素のクレードに分類された。略語の説明は次頁に記載した。

Figure 7-4 に示した各酵素の表記法は次のとおりである。語頭の 2 文字は種名を表しており、そのあとに続く文字が酵素名を表している。

種名は以下の通りの略字である。

At: *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)、Os: *Oryza sativa* (イネ)、Cr: *Chlamydomonas reinhardtii* (コナミドリムシ)、Lj: *Lotus japonicas* (ミヤコグサ)、As: *Avena strigosa* (セイヨウチャヒキ)、Dz: *Dioscorea zingiberensis* (黄姜 (生姜の一種))、Cp: *Cucurbita pepo* (ペポカボチャ)、*Betula platyphylla* (シラカンバ)、Ca: *Centella asiatica* (ツボクサ)、Pg: *Panax ginseng* (オタネニンジン)、Gg: *Glycyrrhiza glabra* (スペインカンゾウ)、Ps: *Pisum sativum* (エンドウ)、Ws: *Withania somnifera* (アシユワガンダ)、Sl: *Solanum lycopersicum* (トマト)、Am: *Abies magnifica* (カリフォルニアアカモミ)、To: *Taraxacum officinale* (セイヨウタンポポ)、Oe: *Olea europaea* (オリーブ)、Kc: *Kandelia candel* (メヒルギ)、Rc: *Ricinus communis* (トウゴマ)、Gs: *Gentiana straminea* (リンドウ科リンドウ属)、Aa: *Artemisia annua* (クソニンジン)、Gu: *Glycyrrhiza uralensis* (カンゾウ (ウラルカンゾウ))、Gm: *Glycine max* (ダイズ)、Pt: *Polygala tenuifolia* (イトヒメハギ)、Vh: *Vaccaria hispanica* (ドウカンゾウ)、Et: *Euphorbia tirucalli* (ミドリサンゴ)、Bg: *Bruguiera gymnorhiza* (オヒルギ)、Hs: *Homo sapiens* (ヒト)、Bt: *Bos taurus* (ウシ)、Rn: *Rattus norvegicus* (ドブネズミ)、Mm: *Mus musculus* (ハツカネズミ)、Xt: *Xenopus (Silurana) tropicalis* (アフリカツメガエル)、Dr: *Danio rerio* (ゼブラフィッシュ)、Sp: *Schizosaccharomyces pombe* (分裂酵母)、Pc: *Pneumocystis carinii* (カリニ肺炎を引き起こす原虫)、Gl: *Ganoderma lucidum* (マンネンタケ)、Af: *Aspergillus fumigatus* Af293 (子囊菌)、Sc: *Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母)、Sa: *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (バクテリア)、Av: *Avena ventricosa* (カラスムギ属)、Mt: *Medicago truncatula* (タルウマゴヤシ)

酵素名は以下の通りの略字である。

PEN1~6: シロイヌナズナ PEN クレードに分類される OSC

LUP1~5: シロイヌナズナ LUP クレードに分類される OSC

CAS1: シロイヌナズナ シクロアルテノール合成酵素

LSS1: シロイヌナズナ ラノステロール合成酵素

OSC1~6: イネの OSC

CAS: シクロアルテノール合成酵素

LAS: ラノステロール合成酵素

LUS: ルペオール合成酵素

bAS: β -アミリン合成酵素

7-4. まとめ

本研究では EtAS の発現系を構築し、その完全精製に成功した。EtAS は OSC としては初めてその酵母内での発現量を約 5~7 mg と明らかにした。そして、速度論定数や阻害実験など詳細な *in vitro* 解析に成功した。

また、本研究によりこれまで *in vitro* 解析が困難だった変異株について、ウェスタンブロットリングを活用することで酵母 *in vivo* でその活性を見積もる手法を確立することができた。これにより、カチオン- π 相互作用のような変異株 OSC の酵素活性がわからなければ証明できない実験が可能となった。今後より部位特異的変異株 OSC を用いて OSC の詳細な触媒機構が明らかにされることが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始適切なる御指導、御鞭撻を賜りました星野 力教授、佐藤 努准教授、仲野 千秋助教に対し、深く感謝の意を表します。

また、以下の先生方に深謝致します。

ミドリサンゴ由来 β -アミリン合成酵素遺伝子を恵与して頂きました、
石川県立大学 生物資源工学研究所 大山莞爾教授
京都大学大学院 生命科学研究科 福澤秀哉教授

S.cerevisiae GIL77 株を恵与して頂きました、
東京大学大学院 薬学研究科 海老塚豊教授
新潟薬科大学薬学部 渋谷雅明教授

GC/TOFMS の操作指導を賜りました、
新潟大学機器分析センター 中島真美氏

ウェスタンブロットニングの撮影におきまして FUJIFILM LAS3000 を使用させていただきました、
新潟大学農学部 杉山稔恵准教授

また、常に適切な指導をしてくださった橋本一平先輩、森紅也先輩、基質オキシドスクアレンを提供していただきました阿部奈緒美氏、花岡正樹氏、EtAS 変異導入実験を協力してくださいました増川友夏里氏、仲田知佳氏、天利佳奈子氏をはじめとする生物有機化学研究室の諸先輩方、後輩の皆様に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Wendt K.U. & Schulz G.E. *Structure*, **6**, 127–133 (1998).
- 2) Wendt K.U., Schulz G.E., Corey E.J., and Liu D.R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 2812-2833 (2000).
- 3) Christianson D.W., *Chem. Rev.*, **106**, 3412-3442 (2006).
- 4) Christianson D.W., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 141-150 (2008).
- 5) M. Chen, N. Al-lami, M. Janvier, E.L. D'Antonio, J.A. Faraldos, D.E. Cane, R.K. Allemann, and D.W. Christianson, *Biochemistry*, **52**, 5441-5453 (2013).
- 6) C.A. Lesburg, G. Zhai, D.E. Cane, D.W. Christianson, *Science*, **277**, 1820-1824 (1997).
- 7) T. Toyomasu, M. Tsukahara, A. Kaneko, R. Niida, W. Mitsuhashi, T. Dairi, N. Kato, and T. Sassa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3084-3088 (2007).
- 8) M. Koksals, Y. Jin, R.M. Coates, R. Croteau, and D.W. Christianson, *Nature*, **469**, 116-120 (2007).
- 9) M. Koksals, H. Hu, R.M. Coates, R.J. Peters, and D.W. Christianson, *Nature Chemical Biology*, **7**, 431-433 (2011).
- 10) K.U. Wendt, K. Poralla, G.E. Schulz, *Science*, **277**, 1811- 1815 (1997).
- 11) R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D'Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, and A. Ruf, *Nature*, **432**, 118-122 (2004).
- 12) K. Zhou, Y. Gao, J.A. Hoy, F.M. Mann, R.B. Honzatko, and R.J. Peters, *J. Biol. Chem.*, **287**, 6840-6850 (2012).
- 13) M. Koksals, K. Potter, R.J. Peters, D.W. Christianson, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1840**, 184-190 (2014).
- 14) Ochs D., Tappe C.H., Gartner P., Keller R., and Poralla K., *Eur. J. Biochem.* **194**, 75-80 (1990).
- 15) Hoshino T., Williams H.J., Chung Y., and Scott A.I., *Tetrahedron.*, **47**, 5925-5932 (1991).
- 16) Ochs D., Kaletta C., Entian K.D., Beck-Sickinger A., and Poralla K., *J. Bacteriol.*, **174**, 298-300 (1992).
- 17) R.A. Yoder and J.N. Johnston, *Chem. Rev.*, **105**, 4730-4756 (2005).

- 18) Shi Z., Buntel C.J., and Griffin J.H., *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 7370-7374 (1994)
- 19) Beene D.L., Brandt G.S., Zhong W., Zacharias N.M., Lester H.A., and Dougherty D.A., *Biochemistry*, **41**, 10262-10269 (2002).
- 20) Morikubo N., Fukuda Y., Ohtake K., Shinya N., Kiga D., Sakamoto K., Asanuma M., Hirota H., Yokoyama S., and Hoshino T., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13184-13194 (2006).
- 21) Wang Lei., Brock A., Herberich B., and Schultz,P.G., *Science*, **292**, 498-500 (2001).
- 22) T. Hoshino and T. Sato, *Chem. Commun.*, **2002**, 291-301 (2002).
- 23) P. Moriacchi, W.K. Wilson, Q. Xiong, A. Bhaduri, D. Sttivend, M.D. Kolesnikova, and S.P.T. Matsuda, *Org. Lett.*, **11**, 2627-2630 (2009).
- 24) A. Ruf, F. Muller, B. D'Arcy, M. Stihle, E. Kuszniir, C. Handschin, O.H. Morand, and R. Thoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,**315**, 247-254 (2004).
- 25) H. Hayashi, P. Huang, S. Takada, M. Obinata, K. Inoue, M. Shibuya and Y. Ebizuka, *Biol Pharm Bull.*, **27**, 1086–1092 (2004).
- 26) S. Lodeiro, Q. Xiong, W.K. Wilson, M.D. Kolesnikova, C.S. Onak, and S.P.T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 11213-22 (2007).
- 27) Herrera J.B., Bartel B., Wilson W.K., Matsuda S.P., *Phytochemistry*, **49**, 1905-1911 (1998).
- 28) Tetsuo K., Masaaki S., Kazuo M., Yutaka E., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 7705-7710 (2000).
- 29) Xiong Q., Wilson W.K., Matsuda S.P., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1285-1288 (2006).
- 30) Masaaki S., Ting X., Yuji K., Miyuki O., Hong Z., and Yutaka E., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1450-1455 (2007).
- 31) Suzuki M., Xiang T., Ohyama K., Seki H., Saito K., Muranaka T., Hayashi H., Katsube Y., Kushiro T., Shibuya M., and Ebizuka Y., *Plant Cell Physiol.*, **47**, 565-571 (2006).
- 32) Sawai S, Akashi T, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Ayabe S, and Aoki T., *Plant Cell Physiol.*, **47**, 673-677 (2006).
- 33) K. Ohyama, M. Suzuki, J. Kikuchi, K. Saito, and T. Muranaka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 725-730 (2009).
- 34) T. Kushiro, M. Shibuya, K. Masuda, and Y. Ebizuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6816-6824 (2000).
- 35) X. Qi, S. Bakht, M. Leggett, C. Maxwell, R. Melton, and A. Osbourn, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 8233-8238 (2004).

- 36) S. Racolta, P.B. Juhl, D. Sirim, and J. Pleiss, *Proteins*, **80**, 2009-2019 (2012).
- 37) M. Kajikawa, K.T. Yamato, H. Fukuzawa, Y. Sakai, H. Uchida, K. Ohyama, *Phytochemistry*, **66**, 1759-1766 (2005).
- 38) T-K. Wu, W-H. Li, C-H. Chang, H-Y. Wen, Y-T. Liu, and Y-C. Chang, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 5731-5737 (2009).
- 39) T. Sato, M. Kouda, and T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 728-738 (2004).
- 40) E.J. Corey, S.P.T. Matsuda, C.H. Baker, A.Y. Ting, and Hengmiao Cheng, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 327-331 (1996).
- 41) T. Sato and T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2233-2242 (2001).
- 42) T. Sato and T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1171-1180 (1999).
- 43) T. Hoshino, T. Abe, and M. Kouda, *Chem. Commun.*, **2000**, 441-442 (2000).
- 44) T-K. Wu, M-T. Yu, Y-T. Liu, C-H. Chang, H-J. Wang, and E.W-G. Diao, *Org. Lett.*, **8**, 1319-1322 (2006).
- 45) T-K. Wu, Y-T. Liu, C-H. Chang, M-T. Yu, and H-J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6414-6419 (2006).
- 46) Corey EJ, Cheng HM, Baker CH, Matsuda SPT, Li D, and Song XL. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1289-1296 (1997).
- 47) Abe I, Naito K, Takagi Y, and Noguchi H. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1522**, 67-73 (2001).
- 48) Meyer MM, Segura MJ, Wilson WK, and Matsuda SP. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **39**, 4090-4092 (2000).
- 49) Lodeiro S, Schulz-Gasch T, and Matsuda SP. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 14132-14133 (2005).
- 50) Wu TK and Griffin JH. *Biochemistry*, **41**, 8238-8244 (2002).
- 51) Meyer MM, Xu R, and Matsuda SP. *Org. Lett.*, **4**, 1395-1398 (2002).
- 52) Segura MJ, Lodeiro S, Meyer MM, Patel AJ, and Matsuda SP. *Org. Lett.*, **4**, 4459-4462 (2002).
- 53) Wu TK and Chang CH. *Chembiochem*, **5**, 1712-1715 (2004).
- 54) Sato T, Kanai Y, and Hoshino T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 407-411 (1998).
- 55) Morikubo N, Fukuda Y, Ohtake K, Shinya N, Kiga D, Sakamoto K, Asanuma M, Hirota H, Yokoyama S, and Hoshino T. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13184-13194 (2006).

- 56) Wu TK, Liu YT, Chiu FH, and Chang CH. *Org. Lett.*, **8**, 4691-4694 (2006).
- 57) Sato T and Hoshino T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2189-2198 (1999).
- 58) Joubert BM, Hua L, and Matsuda SP. *Org. Lett.*, **2**, 339-341 (2000).
- 59) Feil C, Sussmuth R, Jung G, and Poralla K. *Eur. J. Biochem.*, **242**, 51-55(1996).
- 60) Ceruti M, Balliano G, Rocco F, Lenhart A, Schulz GE, Castelli F, and Milla P. *Lipids*, **40**, 729-735 (2005).
- 61) Milla P, Lenhart A, Grosa G, Viola F, Weihofen WA, Schulz GE, and Balliano G. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2108-2116 (2002).
- 62) Dang T and Prestwich GD. *Chem. Biol.*, **7**, 643-649 (2000).
- 63) Oliaro-Bosso S, Schulz-Gasch T, Balliano G, and Viola F. *Chembiochem*, **6**, 2221-2228 (2005).
- 64) Sato T, Sasahara S, Yamakami T, and Hoshino T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1660-1670 (2002).
- 65) Full C. *FEBS Lett.*, **509**, 361-364 (2001).
- 66) Lodeiro S, Wilson WK, Shan H, and Matsuda SP. *Org. Lett.*, **8**, 439-442 (2006).
- 67) Full C and Poralla K. *FEMS Microbiol. Lett.*, **183**, 221-224 (2000).
- 68) Hoshino T, Kouda M, Abe T, and Ohashi S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2038-2041 (1999).
- 69) Wu TK, Chang CH, Wen HY, Liu YT, Li WH, Wang TT, and Shie WS. *Org. Lett.*, **12**, 500-503 (2010).
- 70) Wu TK, Chang YC, Liu YT, Chang CH, Wen HY, Li WH, and Shie WS. *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 1092-1097 (2011).
- 71) M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, and H. Sahm, *Biochem. J.*, 295, 517 (1993).
- 72) Wu TK, Wang TT, Chang CH, Liu YT, and Shie WS. *Org. Lett.*, **10**, 4959-4962 (2008).
- 73) 出野菜摘 修士論文 (2005)
- 74) Chang CH, Chen YC, Tseng SW, Liu YT, Wen HY, Li WH, Huang CY, Ko CY, Wang TT, and Wu TK, *Biochimie*, **94**, 2376-81 (2012).
- 75) 橋本一平 修士論文 (2009)

- 76) 増川友夏里 修士論文 (2013)
- 77) Dixon M, *Biochem. J.*, **129**, 197–202 (1972).
- 78) Corey EJ, de Montellano PRO, Lin K & Dean PDG, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2797–2798 (1967).
- 79) Van Ende D & Krief A, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **13**, 279, (1974).
- 80) Van Ende D & Krief A, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **13**, 279–280 (1974).
- 81) Duriatti A, Bouvier-Nave P, Benveniste P, Schuber F, Delprino L, Balliano G & Cattel L, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2765–2777 (1985).
- 82) Wu TK, Huang CY, Ko CY, Chang CH, Chen YJ & Liao HK, *Arch. Biochem. Biophys.*, **421**, 42–53 (2004).
- 83) Abe I, Zheng YF & Prestwich GD, *Biochemistry*, **37**, 5779–5784 (1998).
- 84) Morand OH, Aebi JD, Dehmlow H, Ji YH, Gainst N, Lengsfeld H & Hember J, *J. Lipid Res.*, **38**, 373–390 (1997).
- 85) Lehhart A, Weihofen WA, Pleschke AEW & Schulz GE, *Chem. Biol.*, **9**, 639–645 (2002).
- 86) H. Chivers R.E., Corbett R.E., and M. Mitchell, *J. Chem. Soc. C*, **1966**, 1814–1816.
- 87) S. Mecozzi, A.P. West Jr., and D.A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10566–10571 (1996).
- 88) Z. Xue, L. Duan, D. Liu, J. Guo, S. Ge, J. Dicks, P. OMaille, A. Osbourn, and X. Qi, *New Phytologist*, **193**, 1022-1038 (2012).
- 89) Moore WR & Schatsman GL, *J. Biol. Chem.*, **267**, 22003–22006 (1992).
- 90) Kusano M, Abe I, Sankawa U & Ebizuka Y, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 239–242 (1991).
- 91) Corey EJ, Cheng H, Baker CH, Matsuda SPT, Li D & Song X, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1277–1288 (1997).
- 92) A. Pearson, M. Budin, and J.J. Brocks, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 725-730 (2009).
- 93) Corey, E. J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 11628-11632 (1993).
- 94) Z-H. Lin, H-X. Long, Z. Bo, Y-Q. Wang, and Y-Z. Wu, *Peptides*, **29**, 1798-1805 (2008).
- 95) H. Chivers, R. E. Corbett, and R. E. M. Mitchell, *J. Chem. Soc. C*, **1966**, 1814 – 1816 (1966).

- 96) H. Mitsuguchi, Y. Seshime, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka, and T. Kushiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6402–6411 (2009).
- 97) A. Kawaguchi, H. Kobayashi, and S. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 577–583 (1973).
- 98) S. Lodeiro, Q. Xiong, W.K. Wilson, Y. Ivanova, M.L. Smith, G.S. May, and S.P.T. Matsuda, *Org. Lett.*, **11**, 1241–1244 (2009).
- 99) M. Kimura, T. Kushiro, M. Shibuya, Y. Ebizuka, and I. Abe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**, 899–902 (2010).
- 100) K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar, *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596-1599 (2007).
- 101) K. Shiojima, Y. Arai, K. Masuda, T. Kamada, H. Ageta, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 5733-5736 (1983).
- 102) L. H. D. Nguyen and L. J. Harrison, *Photochemistry*, **50**, 471-476 (1994).
- 103) Z. Wang, T. Yeats, H. Han, R. Jetter, *J. Biol. Chem.*, **285**, 29703-29712 (2010).
- 104) 伊藤遼介 修士論文 (2011)
- 105) 森紅也 修士論文 (2009)
- 106) 宇佐美陽子 卒業論文 (2005)

本研究に関係する参考論文など

【投稿論文】

R. Ito, K. Mori, I. Hashimoto, C. Nakano, T. Sato, and T. Hoshino

Triterpene Cyclases from *Oryza sativa* L.: Cycloartenol, Parkeol and Achilleol B Synthases. *Org. Lett.*, **13**, 2678-2681 (2011).

R. Ito, Y. Masukawa, and T. Hoshino

Purification, kinetics, inhibitors and CD for recombinant β -amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli* L and functional analysis of the DCTA motif, which is highly conserved among oxidosqualene cyclases.

FEBS J., **280**, 1267-1280 (2013).

R. Ito, I. Hashimoto, Y. Masukawa, and T. Hoshino

Effect of Cation- π Interactions and Steric Bulk on the Catalytic Action of Oxidosqualene Cyclase: A Case Study of Phe728 of β -Amyrin Synthase from *Euphorbia tirucalli* L.

Chem. Eur. J., **19**, 17150-17158 (2013).

R. Ito, Y. Masukawa, C. Nakada, K. Amari, C. Nakano, and T. Hoshino

β -Amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli*. Steric bulk, not the π -electrons of Phe, at position 474 has a key role in affording the correct folding of the substrate for completion of the polycycization cascade.

Org. Biomol. Chem., *in press*.

【学会発表】

- 伊藤遼介、橋本一平、佐藤努、星野力
ミドリサンゴ由来の β -アミリン合成酵素の酵素学的諸性質
日本農芸化学会 2010 年度大会、東京、3 月 2010 年、262 頁
- 伊藤遼介、橋本一平、森紅也、仲野千秋、佐藤努、星野力
イネ由来のトリテルペン環化酵素
第 52 回天然有機化合物討論会、静岡、2010 年 9 月、511-516 頁
- 伊藤遼介、中島真美、佐藤努、星野力
Euphorbia tirucalli 由来 β -amyrin 合成酵素 F413 残基の機能解析
日本農芸化学会 2011 年度大会、京都、2011 年 3 月、29 頁
- 伊藤遼介、佐藤努、星野力
 β -アミリン合成酵素 F413 残基のバルクサイズ的重要性
第 55 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、つくば、2011 年 11 月、335 頁
- 山口雄生、伊藤遼介、佐藤努、星野力
28-ノルオキシドスクアレンを用いた β -アミリン合成酵素の環化機構の解析
第 55 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、つくば、2011 年 11 月、338 頁
- 伊藤遼介、星野力
ミドリサンゴ由来の β -アミリン合成酵素の酵素学適所性質および阻害剤の検討
農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月、京都、公演番号 2A31a10
- 増川友夏里、橋本一平、伊藤遼介、仲野千秋、佐藤努、星野力
ミドリサンゴ由来 β -amyrin 合成酵素 F728 残基の機能解析
日本農芸化学会 2012 年度大会、京都、2012 年 3 月、1209 頁
- 増川友夏里、伊藤遼介、仲田知佳、仲野千秋、佐藤努、星野力
 β -アミリン合成酵素の *in vivo* 発現量と CD スペクトル
日本農芸化学会関東支部 2012 年度大会、新潟、2012 年 10 月、29 頁

○Ryousuke Ito, Kouya Mori, Ippei Hashimoto, Chiaki Nakano, Tsutomu Sato, and Tsutomu Hoshino.

Triterpene cyclases from *Oryza sativa* L.

13th Tetrahedron Symposium Asia Edition, 2012, Taipei, P1.51.

Ryousuke Ito, Yukari Masukawa, and ○Tsutomu Hoshino.

Chracterization of β -amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli* L.

TERPNET2013, 2013, Greece, p. 172.

○伊藤遼介、増川友夏里、橋本一平、星野力

β -アミリン合成酵素 F728 残基の更なる機能解析

第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、さいたま、2013 年 10 月、
360 頁

○伊藤遼介、増川友夏里、仲田知佳、天利佳奈子、仲野千秋、星野力

β -アミリン合成酵素の F474 残基の機能解析～嵩高さの重要性～

農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月、東京、公演番号 3A04a09