

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 伊藤 遼介
 学位 博士 (農学)
 学位記番号 新大院博 (農) 第 138 号
 学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 博士論文名 β -アミリン合成酵素の触媒機構に関する研究

論文審査委員 主査 教授・星野 力
 副査 教授・渡邊 剛志
 副査 教授・三ツ井 敏明
 副査 准教授・佐藤 努
 副査 准教授・鈴木 一史

博士論文の要旨

トリテルペン環化酵素は、別名オキシドスクアレン環化酵素(OSC)とも呼ばれ、一次代謝及び二次代謝両者に深く関わっている。全ての真核生物に存在する。動物・カビはラノステロールを、植物はシクロアルテノールを一次代謝物として生産する。植物では、 α,β -アミリンやルペオールが典型的な二次代謝産物として知られ、それらの配糖体 (サポニン) は、医薬品等で広く使用されている。OSC は、膜結合型タンパク質のため、精製の段階で活性が低下してしまい、酵素学的なパラメーターが報告されているのは、2 例のみであった。しかし、高い活性を有しているとは、言い難い状況である。本研究は、ミドリサンゴ由来の β -アミリン合成酵素 (EtAS) をクローニングし、その遺伝子を発現ベクター pYES2/CT に連結し、ラノステロール欠損酵母に形質転換した。申請者は、異種発現した酵素の完全精製に成功し、酵素の諸性質を明らかにし、また活性部位の同定を行った。また、イネ由来のアキレオール B は、 β -アミリン合成と密接に関連していることも見出した。

I. ミドリサンゴ由来の β -アミリン合成酵素(EtAS)

1. 酵素学的諸性質の決定。至適反応条件 (30°C、0.05% Triton X-100、pH 7.0) を決定した。速度論定数は、 $K_m=33.8 \mu\text{M}$ 、 $k_{cat}=46.4 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{cat}/K_m=1.37 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ と決定した。既報の OSC (bovine と rat 由来) の k_{cat}/K_m と比較して 500~1000 倍と格段に高い活性を示した。また、OSC として初めて CD の測定に成功し、活性部位の触媒機構解析を行う際、部位特異的変異酵素の二次構造の変化があるかどうか調べることができる手法を得た。また、3 種の阻害剤 (iminosqualene、Ro 48-8071、U18666A) を用いた酵素反応により、各阻害剤の阻害定数および阻害様式を決定した。いずれの阻害剤も EtAS を強力に阻害することがわかった。Iminosqualene は、市販されてなく、申請者が独自に化学合成した。

2. 活性部位の同定・触媒機能。

(1) 環化開始を担う D485、C486、C564 への変異導入を行い、*in vitro* と *in vivo* での活性の比較を行った。なお、*in vivo* での活性は酵素発現量をウェスタンブロット法により定量することで算出した。機能解析の結果、D485 が環化開始のプロトン付加、C564 は D485 と水素結合して D485 の酸性度を高めていることがわかった。*in vitro* と *in vivo*

で同等の結果が得られたことから、*in vivo*での相対活性測定は*in vitro*実験の代替になり得ることがわかった。従来のOSCの触媒機構解明の研究は、酵素活性が見積もられておらず、申請者が変異株を始めて見積もった例となった。

(2)芳香族アミノ酸 F728 および F474 残基の機能解析

F728 残基を脂肪族および芳香族アミノ酸に置換して *in vivo* 酵素活性を見積もった。脂肪族アミノ酸の変異体は、活性が非常に低下したが、ほぼ同サイズの Tyr 変異株は、野生株とほぼ同程度の活性を示した。変異株が生産する新規トリテルペンの構造を NMR で決定することにより、F728 の局在部位を決定した。その結果、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ことがわかった。F474 残基は、種々の変異株を解析することによって、B 環形成の近傍に存在し、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ことがわかった。

II. イネ由来のアキレオール B 合成酵素の生合成経路の決定

イネ由来のトリテルペン環化酵素の同定を進める中で、C-C 結合を解裂する珍しい OSC を見出した。その生成経路を解明するために、微量成分を単離・同定を行い、アキレオール B は β -アミリン骨格から生合成されることを見出した。

以上、申請者はトリテルペン環化酵素(OSC)の中でも研究の遅れている β -アミリン合成酵素を取り上げ種々の独創的な成果を世界に発信した。よって本論文は博士(農学)の博士論文として十分であると認定した。

審査結果の要旨

トリテルペン環化酵素(OSC)の触媒機構については、酵母のラノステロール合成酵素が最も進展している。しかし、膜結合タンパク質のため、変異株の *in vitro* 及び *in vivo* での酵素活性が報告されたことはなかった。このため、正確な触媒機構を提案することが難しかった。また、植物に普遍的に存在する β -アミリン合成酵素に関しては、活性部位の同定研究はほとんど報告されてない。本研究では、ミドリサンゴ由来の β -アミリン合成酵素を取り上げ、*in vitro* での酵素学的諸性質を明らかにした。現時点での OSC 研究は、*in vitro* で取り扱うことは、極めて難しく、高い活性をもつ OSC としては、初めての例である。また、部位特異的な変異酵素を作成し、*in vivo* での酵素活性を見積もって、活性部位の同定を進め、正確な触媒機構を提案することに成功した。例えば、Phe728 残基は、カチオン/ π 相互作用により反応中間体カチオンを安定化し円滑な触媒反応を担うこと実証した。一方、Phe474 残基は、カチオン/ π 相互作用ではなく、そのバルクサイズ (van der Waals volume) が、反応キャビティーの中で、基質の正確なフォールディングを行わせる機能を担っていることを明らかにした。すなわち、同じ芳香族アミノ酸であっても、その機能が異なるという興味深い結論を得ている。また、OSC による環化反応開始部位の触媒残基は推定されていたが、変異株を作成し機能解析を実際に行った例はなく、本研究によって初めて実証された。本論文は、研究が遅れている膜結合型タンパク質 OSC の一つ β -アミリン合成酵素の酵素学的諸性質、活性部位の触媒機構解明に多大な貢献をした。

なお、本研究は、欧州生化学会の FEBS Journal (2013, 280(5):1267-80)、欧州化学会 Chemistry

-A European Journal (2013, 19(50):17150-8)、アメリカ化学会 Organic Letters

(2011,13(10): 2678-81) 及び英国化学会 Organic & Biomolecular Chemistry (2014, doi: 10.1039/C4OB00064 A) に筆頭著者として発表した。

以上のことから、本申請論文は、博士(農学)の学位論文として十分な内容を持つものと認定した。