

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450150

研究課題名(和文)トリテルペン環化酵素の活性評価及び基質アナログによる触媒・基質認識機構の解明

研究課題名(英文)Triterpene cyclases: catalytic mechanism and substrate recognition by evaluating activities and substrate analogs

研究代表者

星野 力(Hoshino, Tsutomu)

新潟大学・自然科学系・フェロー

研究者番号：20102709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は、トリテルペン環化酵素、特にβ-アミリン合成酵素の触媒機構と基質認識機構を解明することを目的とした。この酵素研究は非常に遅れており、重要なトリテルペンにも関わらず、ほとんど未解明であった。膜タンパク質のため酵素は不安定であり、酵素活性を評価する手法が限られていたのが大きな障害であった。独自の活性評価法を提案して、活性部位の同定とその触媒機構に新たな提案をすることが出来た。例えば、カチオン-π及び従来報告されてなかったCH-π相互作用を提案できた。また、基質アナログ実験から、30位のメチル基の重要性やTrp257とのCH-π相互作用を実証できた。すべて国際誌に発表した。

研究成果の概要(英文)：This study is to elucidate the catalytic mechanism and substrate recognition for beta-amylin synthase. Studies on the triterpene cyclase has encountered a difficulty, because of the unstability of the membrane-bound protein. We developed a new strategy to evaluate the enzyme activity in vivo by estimating the expression amount of the cyclase enzyme and the quantities of triterpene produced. By this procedure, we identified many active site residues, especially, Trp257 residue works not only to stabilize the cationic intermediate via cation-π interaction, but also to tightly hold the Methyl-30 of the substrate via CH-π interaction. In the substrate analog experiments revealed the importance of methyl-30 for the normal folding conformation leading to beta-amylin skeleton.

研究分野：生物有機化学

キーワード：トリテルペン β-アミリン オキシドスクアレン 部位特異的変異実験 基質アナログ 酵素反応
ホペン

1. 研究開始当初の背景

シクロアルテノールやラノステロール合成酵素を含めたオキシドスクアレノ環化酵素 (OSC) 研究は、種々の変異株が産生する様々なトリテルペンの構造決定とその生成比率に基づいて機能が推定されてきた。しかし、その変異体の酵素活性を見積もった事例は、*in vivo* や *in vitro* 実験を含めて全く報告されていない。この事は、正確な機能解析に至っていないことを示している。我々は、機能解析がほとんど進んでない β -アミリン合成酵素を取り上げ、クローニング及び機構解析を数年前から開始してきた。Western blotting 法による *in vivo* によるタンパク質の発現量と *in vitro* で活性のある膜たんぱく質として単離する方法を確立し、 K_m や k_{cat} を求めることにも成功した。本研究では、部位特異的な変異酵素の酵素活性評価を通して活性部位の同定を進める。一方、基質アナログを化学合成し酵素反応に付して、基質のどの構造ユニットが正常な環化反応に必須か検討し、基質認識機構解明に迫る。

2. 研究の目的

トリテルペン環化酵素は、直鎖状のオキシドスクアレノを基質とし、一つの酵素として多段階の環化反応を一挙に触媒する多機能型酵素である。トリテルペン骨格は少なくとも 150 種以上存在するといわれている。このような構造多様性を生み出す要因はなにか？この環化反応の際、基質が *chair* あるいは *boat* 型に折り畳まれ、生成するキラルセンターの立体化学が厳密に制御されている。このような多環性骨格を一挙に構築することは、現代有機化学の手法を用いても化学合成で模倣する事は不可能である。この環化反応機構については、スイスの ETH グループが発表した 1955 年に遡る [文献 1 及び図 1 b]。その後ノーベル賞受賞者を含めた著名な化学者が解明に取り組んできた。1990 年代になると幾つかの OSC のクローニングとアミノ酸配列が明らかとなった。分子生物学的手法による異種発現が試みられたが、*E. coli* での発現は封入体を形成し活性がなく、*S. cerevisiae* による *in vivo* のみにしか酵素活性が確認されていない。これは、OSC は膜たんぱく質のため、*vitro* で酵素活性を保つことが困難なためである。そのため、従来の OSC の触媒機構の解析は、部位特異的な変異株 (酵母) の *in vivo* での解析しか行われてない。即ち、変異体で生産されるトリテルペンの構造決定とそれらの生成比率のみを基にして機能解析が報告されているのが現状であり、*in vivo* での酵素発現量とトリテルペン生成量との相関を見積もった報告例は皆無である。ましてや変異酵素を単離して酵素活性を見積もった事例も皆無である。変異体の機能解析には酵素活性 (K_m や k_{cat}) を見積もることが必須である。我々は、従来の OSC 研究のこの欠点を克服するために、数年前から本研究を開始してきた。

シクロアルテノール合成酵素 (Matsuda ら、Rice 大 USA [2]) やラノステロール合成酵素 (Wu ら、台湾交通大 [3]) は、変異株の機能解析が先行しているが、 β -アミリン合成酵素は研究されていない。本研究では、既にクローニングに成功したミドリサンゴ由来の β -アミリン合成酵素 (EtAS) を用いて、下記の (1) や (2) の課題に取り組む。

(1) 各変異体の酵素活性の評価に基づく触媒活性部位及び立体化学を制御するアミノ酸の同定

真核生物由来の OSC と対比される原核生物由来のトリテルペン環化酵素 (スクアレノ-ホペン環化酵素 SHC は *E. coli* で活性たんぱく質が得られる) に関しては、我々は種々の部位特異的な変異酵素の詳細な速度論的解析を報告しており、我々は世界的にその先導役を果たしてきた [5, 6]。相同性の比較から F728 残基が SHC の F601 残基に相当することから、EtAS の F728 残基もカチオン/ π 相互作用として働く可能性があるのかどうか検討した。しかし、その変異酵素は、あまりにも活性が低く K_m や k_{cat} を決定することが困難であり、カチオン/ π 相互作用の証明は不可能であった。そこで、変異株が wild-type に対してどの程度の活性を維持しているのかを *in vivo* での酵素発現量を Western blotting により定量し、各変異体の発現量と産物の生成量を wild-type と比較し、相関係数で表した相関係数は変異酵素の wild-type に対する相対的な酵素活性を示すため、*in vivo* での酵素活性の強さを比較できる。従来の OSC 研究では、酵素活性を全く算出せずに、カチオン/ π 相互作用を論じており、大きな問題点であった。変異株によっては発現量が非常に低下する場合があり、産物量の比較だけでは酵素活性を見積もったことにはならない。これらの成果を 2012 年 54 回天然有機化合物討論会 (要旨集 pp453~458) で報告した。本研究では、酵素活性 (変異酵素の K_m , k_{cat} あるいは *in vivo* 発現量) を決定し触媒機能活性部位の同定を更に進め、活性部位の詳細な触媒機能の全容を解明する。また、 β -アミリン骨格の立体化学を制御する重要なアミノ酸を同定し、更に steric bulk size をアミノ酸置換によって変更し、*chair* $\rightleftharpoons$ *boat* の相互変換を達成し、新規物質 (非天然型天然物) の創製に取り組む。

(2) 基質アナログの合成と基質認識の分子機構の解明及び新規物質の創製

ラノステロール合成酵素による基質アナログによる研究は、van Tamelen や EJ Corey らの先駆的な報告がなされた 1960 年代にまで遡る。図 1 で示したように oxidosqualene (OXSQ) は *chair/boat/chair* 型で folding されるが、Me-27 と -28 が欠如した 27, 28-bisnorOXSQ は *chair/chair/boat* 型へと変わったことから、Corey らは 10 位のメチル基が最も重要であると結論づけた [7a]。しかし、我々は 29-norOXSQ を合成し、酵素反応を行っ

たところ、chair/chair/boat/chair へと folding が大きく変わり、D 環が 6 員環となった新規骨格の創出に成功した (Hoshino et al. *Chem. Eur. J.* 2012, 18, 13108-13116, IF=5.98)。従って、Me-29 がラノステロール骨格構築の folding に最も重要であることを実証した。Corey らは、20-oxa-analog の酵素反応から、中間体 protosteryl cation は 17 β -side chain であることを証明した [7b]。従って、Eschenmoser や Arigoni らが提唱し

al. *Helv Chim Acta* 1955, 38, 1890 [2] Matsuda et al. *J Am Chem Soc.* 2007, 129, 11213 [3] Wu et al. *Chem. Rec.* 2008, 8, 302 [4] Ito and Hoshino et al, submitted [5] Hoshino et al. *Angew Chem Int1 Ed* 2004, 43, 6700 [6] Hoshino et al. *J Am Chem Soc* 2006; 128, 13184 [7] a) Corey et al, *J Am Chem Soc.* 1991, 113, 4025; b) 1992, 114, 1524.

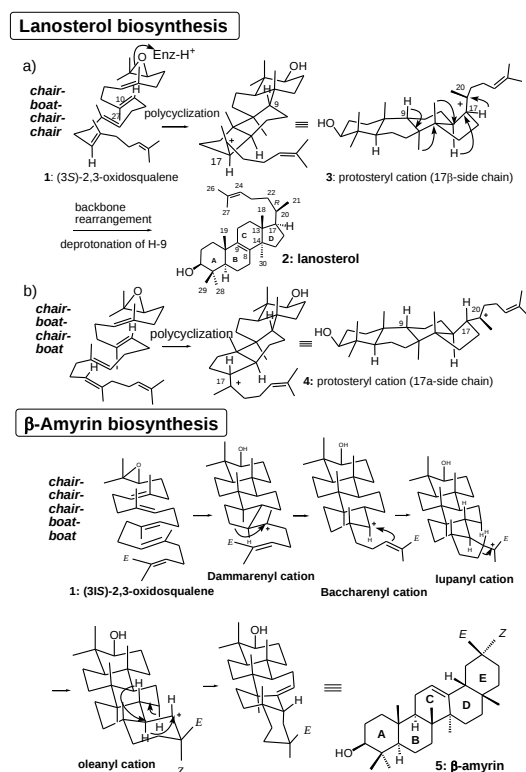


図 1. ラノステロールと β -アミリンの生成経路

た図 1 b (chair/boat/chair/boat) は間違っており、図 1 a (chair/boat/chair/chair) が正しいことを示している。しかし、Corey らは正しい conformation を指摘しなかったため、現在でも海外の学術書や著名な化学者の総説でも間違った図 1 b が記載されている。我々は、今後正しい conformation で議論されることを期待して、この点についても指摘した (*Chem. Eur. J.* 2012, 18, 13108)。以上記したように基質アナログ研究は重要な知見をもたらしている。しかし、 β -アミリン合成酵素による基質アナログ研究は進展してない。これは、 β -アミリン合成酵素をもつ植物材料の cell-free での酵素活性が微々たるためであったと考えられる。我々の構築した EtAS を用いて基質認識の分子機構の解明に迫ることが十分可能であり、新規骨格の創出も期待できる。

文献 [1] Eschenmoser and Arigoni et

3. 研究の方法

本研究では、(1) quick change による部位特異的変異体の作成 (ラノステロール合成酵素を欠損している *S. cerevisiae* に形質転換) 及び酵素活性を *vivo* and/or *vitro* で見積もる。 K_m や k_{cat} を求め活性部位残基の触媒機能を提案する。 β -アミリン以外にも幾つかのトリテルペンが生成する筈であるので、単離・構造決定する。これら産物の生成比率を GC で定量することにより、活性アミノ酸残基の局在を提案する (例えば、B 環近傍に存在するとか)。また、(2) 基質アナログを化学合成し、どの構造ユニットが正常なフォールディングに必要な検討する。種々の位置で分岐したメチル基が欠損したノル体を合成する。精製酵素を用いて反応産物を HPLC 等で単離し、NMR で構造決定する。生成物の構造が大きく変化する場合、folding conformation も大きく変化したことになり、基質認識機構の解明につながる。

(1) 各種部位特異的変異酵素の作成による活性部位と反応産物の同定

β -アミリン合成酵素の X 線による 3 次元構造が解明されていない。現在、トリテルペン環化酵素で X 線構造解析に成功しているのは SHC と human lanosterol のみである。 β -アミリンは、hopene や lanosterol とは異なった生成機構で構築される (図 1)。そのため、homology modeling で活性部位を正確に同定することは困難である。Clustal W による種々の OSC のアミノ酸配列に基づいて、保存された箇所の部位特異的変異株の作成を通して活性部位の同定を進める。現在、種々の β -アミリン合成酵素やルペオール合成酵素がクローニングされているので、変異箇所として幾つかの活性部位の候補を絞り込んだ。また、D⁴⁸⁵C⁴⁸⁶TA motif が環化開始のプロトン供与部位として広く認められているが、驚くことに実験的証明が未だ報告されていない。DCTA motif が SHC の DXDDTA motif に相当することから、推定されているに過ぎない (DXDDTA motif の機能解析は我々が初めて報告した: *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63, 2189-2198, 被引用数 48 編)。重要な事は、各変異酵素を精製して速度論定数を OSC として初めて決定できた点である。以上、我々は *in vitro* や *in vivo* の両面から酵素活性を見積もる手法を確立したので、正確な機能解析が

提案できる状態となっている。更に OSC として初めて CD 測定にも成功した。活性残基の酵素内での局在については、変異株が産生するトリテルペンの構造から考察できるので、生成物の単離と構造決定に取り組む。

(2) 基質アナログの合成と酵素産物の同定
上記したように、ラノステロール合成酵素による基質アナログ研究はかなり進展している。しかし、 β -アミリン合成酵素については、ほとんど知見が得られていない。化学合成法により各ノル体を合成し、酵素産物の単離・構造決定する。まず、どのメチル基が正常な folding conformation を取る上で必要か調べる。また、同様な方法で C1 ユニット大きいエチル体アナログを合成し、酵素反応に付し、生成物を単離同定し、立体的なかさ高さが環化反応に及ぼす影響について考察する。

4. 研究成果

下記の論文に成果を発表した。数多くの成果を得ることができた。内容を (1) 活性部位の同定とその機能 (2) 基質アナログ実験に分けて記載する。

(1) 活性部位の同定とその機能

① DCTA motif の機能解析 (発表論文①)
野生株の k_m と k_{cat} の算出に成功し、かつ DCTA motif の変異酵素を作成し、機能解析に成功した。オキシドスクアレノ環化酵素としてはじめて CD 測定に成功した。

② Phe728 残基の機能 (発表論文②)

活性測定は、酵素発現量を Western blot 法で、生産されたトリテルペン量を GC 分析で定量した。実験誤差もあるが、十分解釈できる信頼性を得ることが可能であることを確認した。脂肪族アミノ酸置換体では β -アミリン合成活性が大きく低下したが、Tyr 置換体はほぼ野生株と同等な活性を得た。この事は、Phe 残基が cation- π 相互作用の役割を示している。脂肪族アミノ酸置換体が生産する化合物から、baccharenyl cation の安定性に関与する残基と同定できた。

③ Phe474 残基の機能 (発表論文③)

上記の活性測定法を用いて機能評価した。脂肪族置換体 Leu や Met 置換体は野生株の活性に近い高い活性を示した。この事は、Phe474 の π 電子は反応には関与しないことを表している。立体サイズの小さな Gly や Ala 置換体では、 β -アミリン生成量は大幅に低下したが、2 環性化合物が多く生産された。これらの事実は、Phe474 残基は β -アミリン骨格の A/B-環近傍に存在することを示唆している。

④ Phe413, Tyr259 及び Trp257 残基の機能 (発表論文⑧)

Phe413 の機能は、相対的な活性比較から Phe474 残基と同様に立体的なサイズが反応に重要であることを実証できた。Val や Met 置換体は、野生株に近い活性を示したので、その π 電子は反応には関与しない。立体サイ

ズの小さな Ala 変異株は、4 環性化合物を多く生産した。したがって、Phe413 残基は D-環近傍に位置することを証明できた。Tyr259 残基の機能も同様に、相対活性を算出した。脂肪族の変異株はほとんど活性を示さなかったが、Phe 置換体は、野生株と同等な活性を示した。この事は、Tyr259 残基は、カチオン- π 相互作用で中間体カチオンの安定化に寄与することを明確にした。V, L や I 変異株は 4 環性の dammarenyl cation を多く生産することから、6/6/6/6-fused の 4 環性の baccharenyl cation の安定化に関与することを実証できた。即ち、カチオン- π 相互作用として関与する。Trp257 残基は、カチオン- π 相互作用と CH- π 相互作用を併せ持っていることが分かった。脂肪族変異株 Ala, Val や Leu 置換体は大幅に活性低下し、6/6/6/6/5-fused の 5 環性の lupeol が分布比率的に多く生産した。この事は、この Trp 残基は、6/6/6/6/6-fused の oleanyl cation の安定化に関与することを示している。しかし、同じ芳香族置換体の Phe や Tyr も多くの lupeol を生産した。これは、 π 電子密度が $\text{Trp} \gg \text{Tyr} \geq \text{Phe}$ のためとも考えられる。発表論文⑤と⑦で、我々は、Me-30 (23Z-me) が酵素に強く捕捉されることを証明した。基質の周りにあるアミノ酸を Ala 変異株にしても β -アミリンの生成のみであり、反応中間体から由来する他の化合物は生産されなかった。従って Me-30 基は、Trp257 残基が CH- π 錯体の機能があると提案した。

その他、Val483, Trp583, Met729 残基の機能も特定している (投稿論文執筆中)。

(2) 基質アナログ実験

① 基質の Me-30 が酵素に強く捕捉される。

末端の部位 (23 位) に存在する Me-24 と Me-30 がそれぞれ欠如した基質を化学合成した。それぞれの基質を野生株の精製酵素を用いて、反応を行った。24-noroxidosqualene (Me-30 は保持されている) は、正常な反応がおきほぼ 100% β -アミリン骨格が生産された。一方、Me-30 が欠如した 30-noroxidosqualene の反応では、 β -アミリン骨格がわずか 19% であった。この事実は、23Z-Me (Me-30) が酵素に強く捕捉されることを意味している。

② 23 位に存在する Me 基の立体サイズの許容性 (発表論文⑤及び⑧)

末端の 23 位の E と Z 配置に ethyl 基, propyl 基を置換した基質を合成し、酵素反応を行った。Ethyl 及び propyl 基を基質とし許容することが分かった。しかし、E と Z 配置に水素置換体の酵素反応を比較したとき、Z 配置が水素のとき活性が大幅に低下した。また、23Z-Me を 23Z-CH₂OH にすると反応が途中で停止し、そのカチオンに OH 基が求核攻撃したエーテル環を持つ新規物質を見出した。一方 23E-CH₂OH 基の場合は、最終カチオンの

oleanyl cation に求核攻撃した新規物質を生産した。これらの事実は、正常な反応が進行するためには 23 位に疎水性残基が必須であることを示している。Trp257 残基と Me-30 基との CH- π 相互作用があることを提案した。

③ 19 位のメチル基の立体サイズが反応に及ぼす影響 (発表論文④)

基質の 19 位の Me 基を水素およびエチル基に置換したアナログの酵素反応産物は、それぞれ 6/6/6/6-fused の 4 環性新規化合物を、エチル基アナログは、 β -アミリン骨格と 6/6/6/5-fused 4 環性 (dannmarenyl cation 由来) を与えた。従って、19 位の立体サイズを許容するクレフトは、23 位よりも狭いことを意味している。

④ 基質の 6 位、10 位および 15 位の立体サイズ (発表論文⑨)

基質の 6 位、10 位および 15 位を水素、エチル基に置換したアナログを検討した。水素置換体はすべて最終カチオン由来の産物であったが、エチル体はすべて反応しなかった。従って、6 位、10 位および 15 位を受け入れるクレフトは 19 位のものよりも更に狭いことが判明した。

⑤ 基質アナログ反応のまとめ
環化開始部位は狭く、後半部位はすこし広いという知見が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Hoshino T. β -Amyrin biosynthesis: catalytic mechanism and substrate recognition. *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 2869-2891. doi: 10.1039/c7ob00238f. 査読有
- ② Terasawa Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Takahashi, K, Hoshino T. β -Amyrin Biosynthesis: Effect of steric bulk at the 6-, 10- and 15-positions in the 2,3-oxidosqualene backbone on polycyclization cascade. *Eur. J. Org. Chem.*, 2017, 287-295, DOI: 10.1002/ejoc.201601306、査読有
- ③ Ito R, Nakada C, Hoshino T. β -Amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli* L. functional analyses of the highly conserved aromatic residues Phe413, Tyr259 and Trp257 disclose the importance of the appropriate steric bulk, and cation- π and CH- π interactions for the efficient catalytic action of the polyolefin cyclization cascade. *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 177-188. 査読有
- ④ Kaneko I, Hoshino T. β -Amyrin Biosynthesis: Promiscuity for Steric

Bulk at Position 23 in the Oxidosqualene Substrate and the Significance of Hydrophobic Interaction between the Methyl Group at Position 30 and the Binding Site. *J. Org. Chem.*, 2016, **81**, 6657-6671. doi: 10.1021/acs.joc.6b01313. 査読有

- ⑤ Cheng J, Nakano C, Shi GL, Hoshino T., Further Insight into Polycyclization Cascades of Acyclic Geranylarnesol and its Acetate by Squalene-hopene Cyclase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Nat. Prod. Commun.* 2016, **11**, 163-167. <http://www.naturalproduct.us>. 査読有
- ⑥ Hoshino T., Miyahara Y, Hanaoka M, Takahashi K, Kaneko I., β -Amyrin Biosynthesis: The Methyl-30 Group of (3S)-2,3-Oxidosqualene Is More Critical to Its Correct Folding To Generate the Pentacyclic Scaffold than the Methyl-24 Group. *Chem. Eur. J.*, 2015, **21**, 15769-15784. doi: 10.1002/chem.201502389. 査読有
- ⑦ Hoshino T., Yamaguchi Y, Takahashi K, Ito R. β -Amyrin biosynthesis: the critical role of steric volume at C-19 of 2,3-oxidosqualene for its correct folding to generate the pentacyclic scaffold., *Org. Lett.*, 2014, **16**, 3548-3551. doi: 10.1021/ol501498q. 査読有
- ⑧ Ito R, Masukawa Y, Nakada C, Amari K, Nakano C, Hoshino T., 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 to complete the normal polycyclization cascade. *Org. Biomol. Chem.* 2014, **12**, 3836-3846. 査読有
- ⑨ Ito R, Hashimoto I, Masukawa Y, Hoshino T. 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.*, 2013, **19**, 17150-17158. doi: 10.1002/chem.201301917. 査読有
- ⑩ Ito R, Masukawa Y, Hoshino T. 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.*, 2013, **280**, 1267-1280. doi: 10.1111/febs.12119. 査読有

〔学会発表〕（計 27 件）

- ① 相場悠圭里・渡邊拓海・星野 力、寺澤有里、仲野千秋、 β -アミリン合成酵素：W534, L734 及び Y736 残基の機能解析～CH- π 相互作用の可能性について～日本農芸化学会、講演番号 LE1099, 2017, 3.17-3.20 京都女子大（京都市）
- ② 寺澤有里・金子一輝・星野 力、ホペンと β -アミリン合成酵素：基質（オキシド）スクアレンの 23 位メチル基の認識機構の比較について、第 60 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会要旨集, pp. 227-232, 2016, 10.29-10.31, 東京農大オホーツク校（網走、北海道）
- ③ 渡邊拓海・南野 舞・仲野千秋・星野 力、27-ノルオキシドスクアレンとホペン環化酵素による酵素反応生成物の同定、第 60 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会要旨集, pp 224-226, 2016, 10.29-10.31, 東京農大オホーツク校（網走、北海道）
- ④ 相場悠圭里・中川和也・伊藤大地・仲野千秋・星野 力、 β -アミリン合成酵素：環化開始部位の近傍残基 V483, W612 と Y736 の機能解析、第 60 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会要旨集, pp. 221-223, 2016, 10.29-10.31, 東京農大オホーツク校（網走、北海道）
- ⑤ T. HOSHINO, C. NAKADA, I. KANEKO, β -Amyrin biosynthesis: catalytic function of the highly conserved aromatic amino acid residues, 2016, Sept. 11~14. 47th International symposium on essential oils, Abstract p.82. Nice (France)
- ⑥ 仲野千秋・渡邊拓海・南野 舞・星野 力、スクアレンーホペン環化酵素による 27-noroxidosqualene の酵素反応産物、日本農芸化学会講演番号 2B092, 2016. 3.27~30, 札幌教育文化会館（札幌市、北海道）
- ⑦ 金子一輝・笹川智弘・仲野千秋・星野 力、 β -アミリン合成酵素：基質末端メチル基の疎水性相互作用による環化制御、日本農芸化学会講演番号 2B090, 2016. 3.27~30, 札幌教育文化会館（札幌市、北海道）
- ⑧ 相場悠圭里・仲野千秋・中川和也・伊藤遼介・星野 力、ミドリサンゴ由来 β -Amyrin 合成酵素の W612 残基の機能解析、日本農芸化学会、講演番号 2B030, 2016. 3.27~30, 札幌教育文化会館（札幌市、北海道）
- ⑨ C. Nakada, K. Amari, R. Ito and T. Hoshino, Cation- π interaction as the catalytic mechanism found in β -amyrin synthase, 40th FEBS Congress, 2015, 7.4~7.9 (Berlin, ドイツ)
- ⑩ 中川和也、仲田知佳、伊藤遼介、仲野千秋、星野 力、 β -アミリン合成酵素：L734 及び V483 部位のかさ高さが環化反応に及ぼす影響、日本農芸化学会、講演

番号 2E11a06, 2015. 3. 26~3. 30. 岡山大学（岡山市）

- ⑪ 仲田知佳、中川和也、伊藤遼介、星野 力、その他 2 名、日本農芸化学会、講演番号 E11a07, 2015. 3. 26~3. 30. 岡山大学（岡山市）
- ⑫ 高橋一成、山口雄生、星野 力、その他 2 名、日本農芸化学会、2015. 3. 26~3. 30. 岡山大学（岡山市）
- ⑬ 金子一輝、宮原悠里、星野 力、その他 2 名、日本農芸化学会、講演番号 3E21a11, 2015. 3. 26~3. 30. 岡山大学（岡山市）
- ⑭ 高橋一成、渡邊拓海、仲野千秋、星野 力、スクアレンーホペン環化酵素：基質スクアレン 19 位の立体サイズが環化反応におよぼす影響、日本農芸化学会 3E21a12, 2015. 3. 26~3. 30. 岡山大学（岡山市）
- ⑮ 寺澤有里、高橋一成、佐々木勇介、仲野千秋、星野 力、 β -アミリン合成酵素：10 位、15 位のエチル基置換体および 26-ノルオキシドスクアレンの環化反応、日本農芸化学会 3E21a13, 2015. 3. 26~3. 30. 岡山大学（岡山市）
- ⑯ 金子一輝・宮原悠里・花岡正樹・仲野千秋・星野 力、 β -アミリン合成酵素における基質末端のバルクサイズが環化反応に与える影響 2014、第 58 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会講演要旨集, pp.327-329, 2014, 9.20-9.22, 和歌山大(和歌山市)
- ⑰ 高橋 一成・山口 雄生・伊藤遼介・星野 力、第 58 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会講演要旨集, pp.330-332, 2014, 9.20-9.22, 和歌山大(和歌山市)
- ⑱ 佐々木 勇輔・南野 舞・仲野 千秋・星野 力、スクアレンーホペン環化酵素による 10 (15) 位がエチル基に置換したスクアレン基質の環化反応、日本農芸化学会 2014, 3.27-3.30, 講演番号：2A07p09, 明治大農（生田キャンパス、東京）
- ⑲ R. Ito, Y. Masukawa and T. Hoshino, Characterization of β -amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli* L TERPNET2013, Abstracts p. 172, 2013.6.1-6.5, Creta (Greece).
- ⑳ その他 8 報の学会発表あり。

〔図書〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 力 (HOSHINO, Tsutomu)
新潟大学・自然科学系・フェロー
研究者番号：20102709

(2) 研究分担者

(なし)

(3) 連携研究者

(なし)

(4) 研究協力者

(なし)