

審査の結果の要旨

氏名 芳賀 智亮

酵素は、温和な条件下で特異性・選択性の高い反応を触媒することから、醸造、繊維加工、食品加工、有用物質生産、臨床診断、洗剤・化粧品・飼料用添加物など様々な分野に応用されている。実用化されているものの多くは、取り扱いの容易さから、それ単独で機能する酵素である。しかし、自然界に存在する酵素の中には酸化還元タンパク質から電子を受け取って初めて活性を発揮するものが多くあり、それらの中にも有用な酵素が多数存在する。例えば、一原子酸素添加酵素であるシトクロム P450 スーパーファミリーは、基質及び触媒反応の種類が多岐に渡る上に、反応の位置・立体選択性が高いため、医薬品・香料などの有用物質の合成、バイオセンサー、難分解性有害物質の分解など様々な分野への応用が期待されている。しかし、酸化還元タンパク質と酵素の解離定数は一般的に高く、酵素が最大の触媒活性を発揮するためには、 μM オーダー以上の高濃度の酸化還元タンパク質が必要となり、このことが酸化還元タンパク質からの電子の供給を必要とする酵素群の実用化の障壁となっている。そこで、酸化還元タンパク質と酵素を集積した多酵素複合体を人工的に構築し、酵素に対する酸化還元タンパク質の局所濃度を向上させる試みが行われてきた。しかし、これまでに様々な人工多酵素複合体が報告されているものの、多酵素複合体をどのように設計すれば、より効率的に電子を酵素に供給できるか、その設計指針は十分には明らかにされていなかった。

本論文は、グラム陰性桿菌 *Pseudomonas putida* 由来のシトクロム P450 (P450cam) 及びその酸化還元パートナータンパク質 (プチダレドキシ還元酵素 (PdR) 及びプチダレドキシ (PdX)) を、好熱古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来の核内増殖抗原 (PCNA) ヘテロ 3 量体上に集積した人工多酵素複合体をモデルとして、より高い電子伝達活性を示す人工多酵素複合体の設計指針を得ることを目的とした研究であり、全四章から構成されている。

第一章では、本論文の背景として、活性化に酸化還元タンパク質からの電子の供給を必要とする有用な酵素の例やそれらを用いた物質生産プロセスの実用化の際の課題、シトクロム P450 を例とした電子伝達機構の詳細、及び人工多酵素複合体の構築に関する既往の研究について概観し、本論文の意義と目的を述べ、本論文の構成を示している。

第二章では、酸化還元タンパク質の空間配置の制御による効率的な電子伝達を試みている。PCNA と PdX を連結するペプチドリンカーについて、柔軟性及び長さの異なる様々なリンカーが多酵素複合体の触媒活性に与える影響を評価

した結果、プロリンの 20 回繰り返し配列を含む剛直なリンカーで最も高い活性が得られたことを報告している。一方で、グリシンを多く含む柔軟なリンカーでは、いずれの長さのリンカーを用いても、プロリンの 20 回繰り返し配列を含むリンカーで得られた活性には到達しなかったことを確かめている。さらに、以上の結果を考察するため、PCNA ヘテロ 3 量体の共結晶構造及び PdX と P450cam の共結晶構造から、多酵素複合体における PdX と P450cam の結合モデルを構築している。このモデルより、適切な長さの剛直なリンカーを用いることで、リンカーが PdX を PCNA から適切な距離だけ離すスペーサーとして働き、PdX が P450cam と複合体を形成する際の結合部位に近づきやすくなり、PdX-P450cam 間の電子伝達活性が向上したと考察している。以上の考察結果に基づき、剛直なリンカーを用いるなどして、酸化還元タンパク質の空間配置を厳密に制御することが効率的な電子伝達に重要であると結論している。

第三章では、複数の酸化還元タンパク質の導入による効率的な電子伝達を試みている。まず、様々な分子数の PdR 及び PdX をもつ多酵素複合体を設計し、それらが設計通りに構築できたことを確かめている。さらに、PdR 及び PdX の分子数が多酵素複合体の触媒活性に与える影響を評価した結果、PdR 及び PdX のいずれの分子数を増やすことでも触媒活性が向上し、PdR を 3 分子と PdX を 2 分子含む多酵素複合体が、高濃度の PdR、PdX との混合系での P450cam の最大触媒活性の約 90%という非常に高い活性を示すこと、また、反応系に含まれる PdX 分子数当たりの触媒活性は、混合系の最適条件での活性と比較して約 250 倍に向上したと述べている。さらに、吸収スペクトル解析、各種酵素アッセイ、及びそれらの数理モデル解析から、多酵素複合体では酸化型 PdX が P450cam に結合することで還元型 PdR-酸化型 PdX、還元型 PdX-P450cam などの電子伝達複合体の形成が阻害されることを見出している。しかし、PdR 及び PdX の分子数を増やすことで、電子伝達複合体の形成が促進され、P450cam への電子伝達活性を向上できたと考察している。以上の考察結果に基づき、多酵素複体内のすべての種類の酸化還元タンパク質の分子数を増やすことが、効率的な電子伝達に重要であると結論している。

第四章では本論文の総括と今後の展望を述べている。

以上、本論文は効率的な分子間電子伝達を行う人工多酵素複合体の構築のための設計指針を示したものである。多酵素複合体の酸化還元タンパク質の空間配置及び分子数の制御の重要性を明らかにし、この指針をもとに実際に高効率な分子間電子伝達を行う多酵素複合体の構築に成功している。この成果は、シトクロム P450、アルデヒド脱ホルミルオキシゲナーゼ、及びヒドロゲナーゼなど、活性化に酸化還元タンパク質を必要とする酵素を用いた物質生産プロセスの実用化に資するところ大であり、化学生命工学、特に酵素工学分野の発展に寄与するところ大きい。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。