

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 里沙

シトクロム P450 (P450) は生物界に広く分布する一酸素添加酵素であり、NAD(P)H などの補酵素から電子伝達タンパク質群を介して 2 電子が供給されることにより活性化される。P450 は動物の副腎皮質でのステロイド水酸化、コレステロール合成、肝臓での薬物代謝、植物での色素やホルモン合成など多様な反応を触媒することが知られている。また、近年のゲノム解析の結果、微生物にも 7000 種類を越える多くの P450 の遺伝子が見出されている。これらの P450 は微生物の様々な二次代謝産物の合成に関与していると考えられ、水酸化、エポキシ化、脱ハロゲン化など多様な反応を触媒する機能を有しているため、工業的触媒としての利用に期待が高まっている。しかし、多くの微生物由来 P450 の本来の電子伝達パートナーが未知であるため、これらの P450 を効率良く活性化することが難しく、その基質や生成物、触媒機能はほとんど解明されておらず、これが P450 を工業的に利用する際の大きなボトルネックとなっている。

本論文では、P450 を効率良く活性化するために、自己組織的に環状のヘテロ三量体を構成する古細菌由来の核内増殖抗原 PCNA の各サブユニットに P450、電子伝達タンパク質などの P450 システムの各コンポーネントをそれぞれ遺伝子工学的に融合することによって、PCNA を足場としてこれらのタンパク質を近接させ、各コンポーネントの複合体形成を促進するというアプローチを取っている。本論文はこのようなアプローチにより、本来のパートナーではない電子伝達タンパク質を用いた P450 の機能解明のための汎用的な P450 の活性化システムの構築を行った研究であり、全六章から構成されている。

第一章は序論であり、P450 の触媒特性、細菌由来の P450 の利用価値および利用する際の問題点と、P450 活性化の既往の研究、知見について概観し、本研究の背景と意義を述べ、本研究の目的と構成を示している。

第二章では、還元ドメインとヘムドメインが一分子内に存在する P450BM3 について、PCNA を足場に用いて各ドメインの再構成を試みている。還元ドメインを FMN ドメインと FAD ドメインに分割しただけではそれらを混合しても還元ドメインとしての機能を発揮できなかった。一方、PCNA を足場として FMN ドメインと FAD ドメインをヘテロ二量化させると、天然の還元ドメインと同程度の機能を発揮した。また、このアプローチで P450BM3 を再構成することも成功し、FMN ドメインに対するヘムドメインの空間配置を厳密に制御しなくても、PCNA 上で FMN ドメインを FAD ドメインとヘムドメインに近接させるだけで効率の良い電子伝達を達成できたと述べている。

第三章では、PCNA のヘテロ三量体形成能を利用し、本来の電子伝達タンパク質パートナーが明らかとなっていない *S. acidocaldarius* 由来 P450 (CYP119) の活性化を、*P. putida* 由来の電子伝達タンパク質であるフェレドキシン還元酵素 PdR、フェレドキシン PdX を用いて試みている。PCNA の複合体形成能によって、各タンパク質を近接させた場合のみ、ラウリン酸の水酸化が確認された。また、PdX と親和性を高めた CYP119 の変異体を用いることでさらなる活性の向上が見られたことから、PdX と CYP119 の安定な複合体形成が CYP119 の活性化には重要であることを明らかにしている。

第四章では、好熱性の P450 である CYP119 の活性化には熱安定性の高い電子伝達タンパク質の利用が効果的ではないかと考え、55°C で最大活性を示す超好熱性細菌 *T. thermophilus* 由来フェレドキシン還元酵素 tFNR、フェレドキシン tFdX を用いた CYP119 の活性化を試みている。その結果、CYP119 を効率良く活性化し反応を持続させることは成功したが、NADPH の消費量に対する生成物の収率の低下が新たな問題となった。この原因は、tFNR による tFdX の還元速度に対して、tFdX からの P450 への電子伝達速度が著しく遅いことにより還元型 tFdX が蓄積し、NADPH の還元力が活性酸素の生成に浪費されたことに起因する。そこで、補酵素再生系を導入し、NADPH の供給速度を制限することにより、反応時間の持続および生成物収率を増加させることに成功したと述べている。

第五章では P450 の汎用的な活性化システムの構築のために、電子伝達タンパク質ライブラリーを作製し、最適な電子伝達システムを選択する際の指針について実験的に検討している。その結果、P450 の活性化には、フェレドキシンと P450 の複合体形成の親和性が高いこと、次いで温度などの P450 の触媒反応条件に適合する性質を有するフェレドキシン還元酵素、フェレドキシンの選択が重要であると考察している。また、異なる表面電荷分布を有するフェレドキシンや温度依存性を有する電子伝達タンパク質のライブラリーの構築は、汎用的な P450 の活性化に有効であると述べている

第六章では本論文の総括と今後の展望を述べている。

以上、本論文は電子伝達タンパク質パートナーが未解明であるため活性化できなかった P450 の汎用的な活性化方法の開発を目的として、パートナーではない電子伝達タンパク質群と P450 を足場蛋白質 PCNA に融合することによって複合体を形成させ、汎用的な P450 の活性化システムの構築を行ったものである。さらに、補酵素再生系の導入、電子伝達タンパク質ライブラリーの構築により、電子伝達、反応条件に適した電子伝達蛋白質をハイスループットに選択することに成功している。これらの研究成果は、微生物由来の P450 の関わる二次代謝産物の代謝経路の解明や工業的な物質生産への P450 の応用に資するところ大であり、ケミカルバイオエンジニアリング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。