

## 審査の結果の要旨

氏名 タン チャオ ユエン

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 などの補酵素からフェレドキシン還元酵素、フェレドキシンなどの電子伝達タンパク質を介して 2 電子が P450 に供給されることにより活性化される。微生物由来の P450 は様々な二次代謝産物の合成に関与していると考えられており、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。酵素を反応器内に保持して工業的触媒として繰り返し、あるいは連続的に使用するために、担体結合法、架橋法、ゲル包括法などの酵素固定化法が開発されている。しかし、これらの方法は一種類の酵素を固定化するためのものであり、P450 反応システムのようにフェレドキシン還元酵素、フェレドキシン、P450 が電子伝達を効率良く行うために、電子移動複合体の形成と解離を繰り返す複合酵素反応系に適した酵素固定化方法は未だ開発されていない。本論文は、複数のタンパク質が動的に相互作用して反応が進行する P450 反応システムの固定化方法の開発に関する研究であり、全四章から構成されている。

第一章は序論であり、P450 の構造と機能の特徴と触媒反応機構、P450 電子伝達システムの特徴、酵素の固定化技術などに関する既往の研究、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 *Pseudomonas putida* 由来の P450cam とその電子伝達パートナーであるフェレドキシン還元酵素 PdR、フェレドキシン PdX を P450 反応システムのモデル系として、固定化酵素ゲルの構築技術の開発を行っている。具体的には、自己組織的に環状のヘテロ三量体を構成する古細菌 *S. solfataricus* 由来の核内増殖抗原 PCNA の各サブユニットの N 末端に *Pseudomonas stutzeri* 由来の二量体酵素である亜リン酸脱水素酵素 (PTDH) の単量体サブユニットを、また C 末端には PdR、PdX、P450cam を、それぞれリンカーペプチドを介して遺伝子工学的に融合した 3 種類の融合タンパク質を作製している。これらの融合タンパク質を等モル比で混合することによって、自己集合する PCNA を足場としてこれらの PdR、PdX、P450cam が近接した複合体が形成され、さらに各 PCNA サ

ブユニットのN末端に融合したPTDHサブユニットが二量体化することによってPCNAが相互に連結されたネットワーク構造を形成することによって超分子化し、タンパク質のみによって構成される不溶性ゲルを作製することに成功している。また、PCNAサブユニットを少量添加してPTDH融合PCNAサブユニット間の連結を阻害することによって、このゲルのサイズの増加を抑制することにも成功している。このゲルは、補酵素NADHからPdR、PdXを介して効率良くP450camに電子が伝達されて高い触媒活性を示すのみならず、PTDHが亜リン酸を基質としてP450反応システムで生成するNAD<sup>+</sup>をNADHに再生することが可能であり、さらに反応終了後に遠心分離、膜分離などによって回収し、繰り返し反応に用いることができるため、工業的な物質生産用のP450固定化酵素触媒として有望であると結論づけている。

第三章では、第二章で開発した酵素ゲルの作製法では大きさを揃えることが困難であり、大きなゲルサイズの場合にはゲル内の物質移動が反応の律速段階となる問題点を解決し、さらには固定化酵素触媒を反応器内に留めながら連続的に反応を行うことを目的として、上記タンパク質ゲルを構成するコンポーネントを順次添加することによって、磁気ビーズ表面上で厚みを制御してタンパク質ゲル層を作製する技術の開発を行っている。その結果、磁気を利用した簡便な固定化酵素触媒の分離が可能で、物質移動抵抗が極めて低く、遊離の酵素と同等の活性を示すP450固定化酵素触媒を構築することに成功している。このような固定化酵素触媒が示すP450の反応活性は、PdR、PdX、P450camを磁気ビーズ表面にそれぞれ直接固定化した場合には全く見られなかったことから、本研究で開発した磁気ビーズ表層でのタンパク質ゲル化による複合酵素系の固定化技術は、複合酵素反応系の工業的利用の観点から極めて利用価値が高いと述べている。

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、本論文は環状のヘテロ三量体足場蛋白質PCNAと補酵素再生系の二量体酵素PTDHの自己組織的会合特性を利用して、P450反応システムを構成するフェレドキシン還元酵素、フェレドキシン、P450と補酵素再生酵素を複合化し、また、ネットワーク構造を形成することによって超分子化し、P450の反応活性と補酵素再生活性を有する固定化酵素ゲルを構築する技術を開発したものである。これまで、電子移動複合体の形成と解離を繰り返す複合酵素反応系の高効率な固定化方法ならびに固定化酵素触媒の開発例は無く、これらの研究成果は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。