

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 平川 秀彦

酸化還元酵素は立体選択的、位置選択的の反応を触媒することができ、化合物にキラリティーを付与することができる。近年、キラル化合物は医薬品などのファインケミカルのビルディングブロックとして重要性が増しつつある。酸化還元酵素の中でもシトクロム P450 は分子状酸素を利用した様々な酸化反応を触媒することができるため、有機合成用触媒として注目を集めている。シトクロム P450 による酸化反応の特徴として、①基質のほとんどが疎水性である、②電子供与体として NADH, NADPH などの水溶性補酵素を要求する、③水溶性補酵素からシトクロム P450 へ電子を伝達するために電子伝達タンパク質が必要である、という点が挙げられる。疎水性基質の溶解度を上げるためには非水溶媒を利用せざるを得ないが、有機溶媒中では酵素が失活する場合が多い。水溶性補酵素は高価であり、生産コストの観点からは何らかの方法によって再生する必要がある。また、電子伝達はタンパク質の結合解離を介して進行するため、補酵素からシトクロム P450 へ効率の良い電子伝達を行うには過剰量の電子伝達タンパク質が必要となる。シトクロム P450 を有機合成用酸化酵素として利用するためにはこれらの問題点を解決することが不可欠であり、これまでシトクロム P450 が有機合成用触媒として用いられている例は極めて少ない。

本研究では、シトクロム P450 を有機溶媒系の一つである逆ミセル系で利用するために、シトクロム P450 と 2 種類の電子伝達タンパク質を連結した分岐型シトクロム P450 システムを構築し、分子内電子伝達によって電子が極めて効率的に供給される新規酵素反応系の開発に取り組み、成功している。さらに、安定に補酵素を再生するための酵素として新規な超好熱古細菌由来のアルコールデヒドロゲナーゼに着目し、この酵素の大腸菌を用いた発現系の構築、精製法の確立を行うとともに、その諸性質を検討している。これらの 2 つの酵素を用いた逆ミセル反応系を構築することにより、補酵素再生を伴う疎水性基質の立体選択的水酸化反応に成功している。

第 1 章では研究の背景、研究目的について述べている。

第 2 章では、逆ミセル系において、酵母菌由来のアルコールデヒドロゲナーゼを用いて補酵素 NAD^+ から NADH への再生反応を行えることを、市販の酵素を用いて示している。逆ミセル中では水溶液中よりも酵素の安定性は若干向上し、補酵素の再生反応は水系よりも長時間行うことができるものの、中温菌由来のデヒドロゲナーゼの安定性は低く、安定に補酵素を再生し続ける触媒として用いるのには不十分であることを明らかにしている。

第 3 章では安定な補酵素再生を行うために、熱安定性の高い酵素を入手することを目的として、超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来のアルコールデヒドロゲナーゼの大腸菌を用いた発現系の構築、精製法を確立し、pH 依存性、温度依存性、熱安定性、基質特異性、エナンチオ選択性、有機溶媒耐性などの諸性質について検討している。その結果、*A. pernix* 由来のアルコールデヒドロゲナーゼは、これまで報告されたアルコールデヒドロゲナーゼの中で最も高い熱安定性を有していることを明らかにしている。また、基質特異性に関しては長いアルキル鎖を有する基質、すなわち、疎水性の高い基質を良い基質とし、ケトンの還元反応では高いエナンチオ選択性を示し、キラルアルコールの生産用酵素としても有望であると述べている。さらに、*A. pernix* 由来アルコールデヒドロゲナーゼは高い有機溶媒耐性を示すのみならず、有機溶媒の添加により活性が向上するという極めて稀な性質を持つことを見出している。この活性化の度合いは溶媒の $\log P$ 値に対して強い正の相関を示すことを明らかにしている。超好熱菌由来の酵素は水溶液中において高い安定性を獲得するために内部の疎水度を高めコンフォメーションのフ

レキシビリティを低下させていると考えられているが、有機溶媒の添加による活性化は $\log P$ の上昇、すなわち、溶媒の極性の低下により疎水相互作用を低下させレキシビリティが増すためであると述べている。この有機溶媒の添加による活性化は反応の活性化エネルギーの減少によるものであり、有機溶媒の添加効果は温度が低いほど大きいことを明らかにしている。超好熱菌由来の酵素は熱安定性が高い一方で、室温付近では活性が低いという問題点が指摘されているが、有機溶媒の添加はこの問題に対する解決の糸口となると述べている。本研究で明らかにした *A. pernix* 由来アルコールデヒドロゲナーゼの①高い熱安定性、②疎水性基質に対する高い親和性、③有機溶媒耐性、④有機溶媒による活性化などの性質により、本酵素が非水溶媒系において安定に補酵素 NADH を再生するのに適した酵素であると結論づけている。

第4章では、シトクロム P450 を逆ミセル系で利用するために、まず、シトクロム P450cam と補酵素 NADH から電子伝達を行うのに必要な電子伝達タンパク質 putidaredoxin reductase および putidaredoxin の3つのタンパク質からなる新規な3元系融合タンパク質を構築している。すなわち、トランスグルタミナーゼによる部位特異的な架橋化反応を利用することによって、分岐型構造を有する融合タンパク質の構築に成功している。この分岐型シトクロム P450cam について諸性質を速度論的、分光学的手法を用いて検討している。その結果、この分岐型シトクロム P450cam は分子内で電子伝達が起こるため、新たに電子伝達タンパク質を加える必要のない自己完結型 (self-sufficient) シトクロム P450 であると述べている。そのため、低タンパク質濃度においても十分な触媒活性と極めて高い反応のカップリング効率を得られ、シトクロム P450 を利用する際に過剰量の電子伝達タンパク質を必要とするという大きな課題を解決することができたとしている。この手法を他のシトクロム P450 系に応用することで様々な化合物の様々な酸化反応に応用可能であり、分岐型シトクロム P450 はシトクロム P450 を実用的な触媒として利用する道を開くものであると述べている。最後に本研究で得られた分岐型 P450cam と *A. pernix* 由来アルコールデヒドロゲナーゼを利用した逆ミセル反応系を構築している。逆ミセル系における分岐型シトクロム P450cam の触媒活性は、シトクロム P450cam 系を構成する3つのタンパク質を独立した逆ミセル中に封入した場合に比べて非常に高く、分岐型シトクロム P450cam の有効性を逆ミセル系においても示すことに成功している。また、逆ミセル系における *A. pernix* 由来アルコールデヒドロゲナーゼの触媒活性は、逆ミセル中に溶解している有機溶媒の活性化効果により、水系よりも5倍以上も高くすることができたと述べている。分岐型シトクロム P450cam と *A. pernix* 由来アルコールデヒドロゲナーゼを組み合わせた共役酵素系を利用して、逆ミセル中における NADH の再生を伴う *d*-カンファーの効率的な立体選択的水酸化反応に成功している。

第5章では本論文の総括と展望を述べている。

以上、本論文は新規な超好熱性アルコールデヒドロゲナーゼの発現・精製と、分岐型構造を有する3元系シトクロム P450 システムの構築を行い、これらの酵素の諸性質を明らかにした上で逆ミセル系での補酵素再生を伴う疎水性化合物の酸化反応系に応用し、*d*-カンファーの立体選択的水酸化反応を例にその有効性を実証したものである。これらの成果は、酵素工学の発展、環境負荷の小さい酸化還元反応プロセスの開発、ならびに化学生命工学分野の発展に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格であると認められる。