

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小川 徳之

シトクロム P450 (以下 P450)の酵素機能は、環境負荷の小さな化成品合成法として魅力的であるが、応用に際して困難な障壁が存在する。過酸化水素 (H_2O_2) の酸素原子を用いて基質を酸化するペルオキシゲナーゼ (Pox) 反応は、P450 の工業的利用に際しての欠点を克服することが期待される。Pox を生理反応とする酵素としてヘム-チオレート含有酸化酵素であるカビ *Caldariomyces fumago* 由来 Chlorperoxidase(CPO)を始めとしたハロペルオキシダーゼ、数種の P450 が知られる。P450 の中で工業的利用にもっとも期待されているものはバクテリア *Bacillus megaterium* 由来の P450BM3 であり、P450 と還元酵素が融合しているため self-sufficient であり、また turn-over が速いという特長を持つ。カビ *Fusarium oxysporum* より見出された P450foxy は P450BM3 と同じく還元酵素融合型 P450 であり、真核生物由来でありながらバクテリア由来の P450BM3 と多くの類似点を持つ。本論文では、カビゲノム上のヘム-チオレート含有有用酸化酵素の探索を行い、クローニング・性状研究を行った。また、カビ由来の還元酵素融合型 P450foxy の変異体作製による機能改変を行ったものである。

第一章で、麹菌 *Aspergillus oryzae* ゲノム上より CPO 類似タンパク質 *Aspergillus oryzae* peroxidase (AOPE)を見出した。CPO とのアミノ酸配列アライメントを行った結果、AOPE は CPO におけるヘム結合領域が高度に保存されたヘム-チオレート含有酵素であり、CPO と比較して一部内部配列 H-helix 及び末端配列が短縮された構造を持つことを予想した。*A. oryzae* AOPE 過剰発現株を作製し、C 末端に 6 His tag を付加したりコンビナント AOPE の発現に成功した。部分精製 AOPE を用いて性状研究を行った。SDS-PAGE 上で、AOPE の予想分子量 31 kDa に一致するバンドを検出した。還元 CO 結合型のスペクトルで、ヘム-チオレート含有酵素の特徴である 446 nm の吸収極大を見出した。活性試験で、ABTS を電子供与体としたペルオキシダーゼ反応を見出した。AOPE はペルオキシダーゼ反応を触媒し、ヘム第五配位子としてチオレートを持つ、細胞内に局在する新規タンパク質であった。また、AOPE は CPO と配列相同性を持つ一方、相違点が多いことが明らかにした。さらに同様のタンパク質が、カビに広く分布していることを明らかにした。

第二章では、カビ *F. oxysporum* 由来還元酵素融合型 P450foxy の機能改変を試みた。P450 ドメイン及び還元酵素ドメインを分離した発現系を構築することで、P450foxy は、溶液中で還元酵素ドメイン間での相互作用により二量体で存在しており、分子間における電子伝達が必須であることを示した。脂肪酸が還元酵素ドメインに相互作用すること

で、還元活性が上昇することを見出し、融合型 P450 の高い turn-over に関連すると考えられた。

P450foxy において F88 の変異体を作製した。アラニンに置換した F88A 変異体は、長鎖飽和脂肪酸に対する反応性を失う一方、大腸菌発現系における発現培養中に、培地中にインディゴ色素を生成し、インドール酸化能が付与されたことが推測された。色素量を活性の指標とし、活性部位内部に焦点を当てた部位特異的ランダム変異導入、Error Prone PCR を行い、色素生産能を 7 倍向上させた F88A V83L 変異体を取得した。インドールに対する解離定数 K_d の測定を行うと、F88A 変異体よりさらに強い値となり、インドールに対する親和性の差が、色素蓄積量に反映されることを明らかにした。一箇所のアミノ酸置換により基質特異性を大きく変化させることに成功し、融合型 P450foxy を工業的に応用するにあたり、有用な知見といえる。

以上、本論文はカビ菌体内に機能未知の新規ヘム-チオレート含有タンパク質 AOPE を見出し、クローニング・発現に成功し、そのスペクトルの性質、ペルオキシダーゼとしての性状の解明を初めて行ったものである。この成果は、ハロペルオキシダーゼにおける反応機構解明に繋がる可能性があり、非常に意義深いといえる。P450foxy の機能改変により、新規反応性付与の可能性を示した。これらのカビ由来のヘム-チオレート含有タンパク質による酸化反応は工業応用が期待でき、学術上ならびに応用上の貢献が大きいと考えられる。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学術論文として価値あるものと認めた。