

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 牧野 拓也

---

低分子化合物の炭素原子に立体・位置選択的に水酸基を導入する反応を触媒するシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450、CYP) は医薬品や化成品原料の微生物変換製造プロセスに有用な酵素として注目されている。放線菌 *Streptomyces griseus* のゲノムには、6 種類の電子伝達タンパク質と 5 種類の電子伝達タンパク質還元酵素 (両者をレドックスパートナータンパク質と呼ぶ)、27 種類の P450 がコードされている。本論文は、*S. griseus* 由来の 27 種類の P450 の基質探索および *S. griseus* 由来のレドックスパートナータンパク質を利用した新たな P450 機能発現系の構築に向けた研究をまとめたものであり、7 章より構成される。

第一章では、P450 の諸性質およびその応用に関するこれまでの知見をまとめている。

第二章では、*S. griseus* 由来の 27 種の P450 について、細菌由来 P450 の汎用的機能解析システムである pRED ベクターを利用した組換え大腸菌によるバイオコンバージョン系を構築し、57 種類の化合物を用いた基質スクリーニングを行った結果について述べている。3 種の P450 (CYP105D2、CYP107CA1、CYP154C3) の基質が見出された。CYP154C3 は、testosterone、 $\beta$ -estradiol、progesterone の 3 種類の steroid 化合物を変換した。testosterone と progesterone の変換産物を大量調製・構造解析し、いずれも steroid 骨格 D 環の 16 $\alpha$  位が水酸化されていることを明らかにした。CYP105D2 は diclofenac sodium (DFNa) を基質としてただ 1 つの変換産物を生成した。CYP107CA1 は indole を基質として変換産物を生成した。紫外可視光吸収スペクトルより、ピロール環に水酸基が導入されていると考えられた。

第三章では、CYP154C3 の酵素学的解析について述べている。26 種類の steroid 化合物を用いて二次基質スクリーニングを行った結果、17 種類の steroid に対して変換産物が検出されたが、6 種類の変換産物の構造を決定し、全て steroid 骨格の D 環 16 $\alpha$  位に水酸基が導入されたものであることを明らかにした。次に、精製酵素を用いた *in vitro* 反応でも、バイオコンバージョン系と同様の変換産物が生成することを確認した。さらに、酵素反応速度論解析の結果、他の *Streptomyces* 属由来 P450 と比較して酵素触媒活性が極めて高いことを示した。

第四章では、基質が判明した3種のP450について、*S. griseus*が保有するレドックスパートナータンパク質と共発現した株(全30通りの組み合わせ x 3種のP450 = 90株)を用いた実験について述べている。組換え大腸菌をバイオコンバージョン実験に供した結果、各P450に対して、効果的なレドックスパートナータンパク質の組み合わせがあることがわかった。最も効果的な組み合わせによる変換試験結果をpREDシステムと比較すると変換率がそれぞれ、1.07倍、5.2倍、4.7倍に向上した。さらに、各P450に共通した次の3つの知見を得た。第1にP450を単独で発現させた場合においても高い基質変換率を示した。過去の研究において大腸菌内在性のフラボドキシシ還元酵素がP450へ電子を供給することは知られていたが、このように高い変換率を示した例はなかった。第2にP450と電子伝達タンパク質還元酵素のみを発現させるとP450単独で発現させた場合より活性が落ちた。この結果は2種類の遺伝子を発現させたことによってP450の発現量が低下したためであると考えられた。第3にP450と電子伝達タンパク質のみを発現させると変換率が向上する場合があった。電子伝達タンパク質を発現させることでP450の発現量は落ちているはずだが、それにもかかわらず変換率が上昇したのは*S. griseus*由来の電子伝達タンパク質とP450の相性が良いためであると推測した。

第五章では、CYP105D2によるDFNa変換産物の構造解析について述べている。CYP105D2に対して最適なレドックスパートナータンパク質を共発現させた大腸菌を宿主としたバイオコンバージョン系を用いて、培養液1L当たり25.9mgのDFNa変換産物を精製し、4'位が水酸化された構造であることを明らかにした。

第六章では、レドックスパートナータンパク質とP450の再構築系を利用した、医薬品や化成品原料の微生物変換製造プロセスの今後の展望について論じている。

以上、本論文は、放線菌*S. griseus*由来P450の網羅的基質探索を通して、新しい反応を触媒するP450を見出すとともに、放線菌由来レドックスパートナータンパク質を利用した新たなP450異種発現系の有用性を示したものであり、学術上貢献するところが少なくない。また、本成果は応用研究にも貢献する可能性が高い。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。