

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 大村 慧太

論 文 題 目

Development of Domain-ligation Method for the Reconstitution of Full-length P450BM3 and Evaluation of Monooxygenase Activity of Heme-substituted P450BM3

(ドメイン連結による再構成手法の開発およびヘム置換 P450BM3 の活性評価)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学大学院理学研究科 教授 博士(工学) 莊司長三

委 員 名古屋大学物質科学国際研究センター

教授 博士(理学) 唯美津木

委 員 理化学研究所 専任研究員 博士(理学) 杉本宏

委 員 名古屋大学大学院理学研究科 准教授 博士(工学)愛場雄一郎

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

申請者は、シトクロム P450BM3(P450BM3)の新規再構成手法の開発に成功し、その再構成手法を利用することにより、従来の手法では実現できなかった全長 P450BM3 のヘム置換体の調製を達成した。この再構成手法は、P450BM3 を構成する各ドメイン（ヘムドメインと還元ドメイン）を個別に調製した後、ドメイン間を連結することによって全長体を再構築するという前例のない手法である。申請者はペプチド形成反応を触媒する酵素であるソルターゼを用いた場合に、P450BM3 本来の高い活性が損なわれないことを実験的に確認し、ドメイン連結のためのツールとして有効であることを示した。ヘム置換を行った P450BM3 のヘムドメインに対し還元ドメインを連結することによって、その全長体の作成に成功し、本手法が P450BM3 のヘム置換体の調製に有効であることを実証した。

申請者は種々のポルフィリン錯体を用いて P450BM3 の再構を検討し、マンガンプロトポルフィリン IX によって再構成した P450BM3 (Mn-P450BM3) が酸化活性を示すことを発見した。Mn-P450BM3 によって触媒される酸化反応の酸素分子依存性の調査や、酸素 18 安定同位体標識実験を行うことによって、この反応が酸素分子を末端酸化剤として進行していることが明らかになった。基質類似体であるデコイ分子を反応系に添加することにより様々な非天然基質に対する触媒活性を向上させ、Mn-P450BM3 の種々の基質に対する活性評価を行った。Mn-P450BM3 がオレフィンのエポキシ化、スルフィドのスルホキシド化に加え、高難度酸化反応である脂肪族 C-H 結合の水酸化、芳香族 C-H 結合の水酸化も達成可能であることを明らかにした。また、Mn-P450BM3 による反応がデコイ分子の存在下で高い立体選択性で進行していることを発見した。これらの結果をもとに、高い反応性を有するマンガノキソ種を酸化活性種とする反応メカニズムを提案した。さらに、反応機構プローブであるラジカルクロック分子を利用することによって、Mn-P450BM3 によって触媒される水酸化反応が、C-H 結合のホモリティックな切断と C-O 結合形成によって達成されることを明らかにした。また、マンガノキソ種を活性種とする想定反応機構を支持する結果として、ラジカルクロック実験から推定される C-O 形成速度が密度汎関数法 DFT での予測と相関があることを示した。

当研究において開発されたドメイン連結を用いる再構成手法の利用は、ヘム置換体の調製には限定されず、複数のドメインから構成されるタンパク質に対しドメイン毎に異なる改変手法を適用するのに有効であり、より広範な応用が期待される。また、申請者が取り組んだ P450BM3 のヘム置換体に関する研究は、ヘム以外の錯体によって再構成したヘムタンパク質によって効率的な酸素分子の活性化を実現した初の例であり、この結果から P450BM3 の酸素分子活性化機能がヘム以外のポルフィリン錯体に対しても有効であることが明らかになった。この結果は、強力な酸化剤を必要とせず大気中の酸素分子を利用可能な環境調和型の酸化触媒の開発に重要な知見をもたらすものと見込まれる。以上の理由により、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資質があるものと認められる。