

別紙 1 - 1

## 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 唐 澤 昌 之

論 文 題 目

Activation of a Cytochrome P450-Based Whole-Cell Biocatalyst  
by Substrate Mimics

(シトクロム P450 と基質模倣物を利用した菌体触媒の開発)

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) 荘司長三

委 員 東海国立大学機構 糖鎖生命コア研究所 教授

名古屋大学大学院理学研究科 教授 博士(薬学) 阿部洋

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

申請者は、酸化酵素を発現させた細菌を触媒する反応を、外部添加した化合物によって制御する手法を開発した。P450BM3 は長鎖脂肪酸を特異的に水酸化する酵素であり、先行研究からデコイ分子と呼ばれる基質模倣物によって基質特異性を変換可能なことが明らかとなっている。しかし、P450BM3 は反応に際し化学両論量の高価な NADPH を消費するため、精製した酵素を用いた反応系は実用性に欠けていた。学位論文では、P450BM3 を発現させた大腸菌を反応容器とすることで、生体内の NADPH 再生系を活用し、安価なグルコースの供給のみで P450BM3 による水酸化を行う菌体反応系に関する報告がなされた。

申請者は、P450BM3 を過剰発現させた大腸菌の懸濁液にデコイ分子を添加することで、ベンゼンからフェノールへの水酸化が進行することを見出した。また、添加するデコイ分子の構造に応じてフェノールの生成量は大きく変化した。デコイ分子が大腸菌に対し低毒性であること、反応時に顕著な濃度依存性を示すことを突き止め、デコイ分子の菌体への取り込み効率の差が菌体触媒の活性に寄与しているとの機構を提案した。菌体触媒は不均一系触媒として再利用でき、一置換ベンゼンの水酸化にも適用可能であった。菌体反応系に最適なデコイ分子 C7-Pro-Phe の存在下、ベンゼンの 75% がベンゼン水酸化物へと変換され、フェノールの選択性は 78% であった。

遺伝子欠損のある大腸菌を用いたベンゼン水酸化の調査から、C7-Pro-Phe は大腸菌の外膜タンパク質である OmpF を通過して菌体に取り込まれていることが示唆され、双極性のデコイ分子が菌体反応系に適している可能性が提示された。一方、先行研究で開発されたデコイ分子のほとんどがモノアニオン性であり、菌体反応に適用可能なデコイ分子は限られていた。これらの化合物の菌体への取り込みを促進するために、野生型 OmpF と比較してより広いチャネルと異なる孔の電荷を有する OmpF 変異体を設計した。ピレンを部分構造に持つデコイ分子を模した蛍光分子を用い、OmpF 変異体がこの蛍光分子を通過させることを明らかとした。OmpF 変異体によって様々なデコイ分子がベンゼンの水酸化を効果的に促進するようになり、最も顕著なデコイ分子では 38 倍生成物量が増加した。本反応系はベンジル位の立体選択的な水酸化にも適用でき、菌体内という複雑な環境であっても、デコイ分子が P450BM3 の活性部位を精密に制御可能であることを明らかとした。さらに、グラム陰性細菌のシグナル伝達物質であるアシルホモセリンラクトンとその代謝産物であるアシルホモセリンがデコイ分子として機能することを明らかとし、デコイ分子を生合成するという新しい反応系を提案した。

これまで、菌体触媒の活性を変換するには、菌体に発現させる酵素そのものを変える必要があり、望みの活性を示す新しい酵素を探索するか、酵素の変異体を作成する必要があった。一方、本報告では、外部添加した化学物質によって活性の調整が可能な新しい菌体触媒が開発された。標的とする基質に適したデコイ分子を反応溶液を添加するのみで、単一の菌体触媒によって様々な基質を変換可能な汎用性の高い菌体触媒の開発につながることを期待される。また、開発された OmpF 変異体は、デコイ分子に限らず様々な化合物の取り込みを促進する人工膜タンパク質として応用の可能性を秘めている。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。