

## 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 小野田 浩宜

論 文 題 目

Utilizing Substrate Misrecognition for the Functional Modification of Lipid-Specific Peroxygenases and Monooxygenases

(基質誤認識を利用した脂質酸化酵素の機能改変)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学物質科学国際研究センター 教授 理学博士 渡辺 芳人

委 員 名古屋大学大学院理学研究科 教授 博士(薬学) 阿部 洋

委 員 名古屋大学大学院理学研究科 准教授 博士(工学) 荘司 長三

## 論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

申請者は、例外的に過酸化水素によって酸化活性種を生成することが可能なシトクロム P450 に対して、本来の基質が結合した状態を再現する外部添加因子に関する研究を進め、過酸化水素駆動型の P450BS $\beta$  に対して、この酵素が水酸化の対象とする長鎖脂肪酸と同じくカルボキシル基を有する最も単純なカルボン酸の酢酸を加えると、酵素が誤作動し長鎖脂肪酸とは全く構造の異なる芳香族化合物の 1-メトキシナフタレンを水酸化可能になることを明らかにした。酢酸を添加する手法の水酸化活性は、これまでに報告されている基質類似分子よりも高く、過酸化水素駆動型 P450 の潜在的な可能性を引き出す非常に優れた手法であることを示した。さらに、酢酸を用いる手法は、広く過酸化水素駆動型 P450 に適用でき、同じく長鎖脂肪酸を水酸化する P450SP $\alpha$  や P450Ex $\alpha$  の反応溶液の酢酸イオン濃度を上げることで、スチレンの酸化反応が進行することを示した。スチレンの酸化反応では、酸化生成物の不斉選択制が用いる P450 によって大きく変化することも併せて明らかにしている。酢酸を外部添加因子として用いる手法で得られた知見を元に、活性部位にカルボキシル基を配置するために、ヘム近傍のアラニンをグルタミン酸に置換する手法も併せて開発し、僅か一残基の変異導入によって、酢酸などの外部添加因子を用いることなしに過酸化水素駆動型の長鎖脂肪酸以外の基質の酸化反応が進行することを示した。酸素分子を用いる代表的な P450 である CYP101A1 及び CYP102A1、CYP119A1 であっても一残基の変異導入によって、過酸化水素を利用可能になる汎用性の高い手法として確立することにも成功している。申請者は、過酸化水素駆動型 P450 が触媒する長鎖脂肪酸水酸化への過酸化水素濃度の影響についても精査し、通常は長鎖脂肪酸が水酸化されて反応が終了するが、過酸化水素濃度を 1mM 以上まで上げることで、水酸化された脂肪酸がさらに酸化されて、脱炭酸を経て鎖長が短くなった脂肪酸が生成することを見い出した。反応中間体を出発物質とする酵素反応と安定同位体標識過酸化水素を用いることで、 $\alpha$  位の脂肪酸水酸化後の過剰酸化によって生成されるケト酸が、過酸化水素と反応することで炭素数が一つ少ない脂肪酸を生成する反応機構を明らかにしている。過酸化水素駆動型 P450 による脂肪酸の  $\alpha$ -酸化的脱炭酸反応はこれまでに全く報告例のない新規反応であり高く評価できる。さらに、同様の  $\alpha$ -酸化的脱炭酸反応が同じファミリーに属する P450 でも進行することを示し、高濃度過酸化水素条件では、多くの過酸化水素駆動型 P450 が  $\alpha$ -酸化的脱炭酸反応を触媒できることを明らかにした。申請者の示した酵素利用法は、いずれも独創性の高い手法であり高く評価できる。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格があるものと認められる。