

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	小 園 伊 織
論文題目	Biochemical studies and applications of microbial cytochrome P450 monooxygenases and molybdenum-containing oxidoreductases (微生物由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼならびにモリブデン含有酸化還元酵素に関する生化学的研究とその応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>微生物の医療分野への応用として、①微生物の 2 次代謝産物、②微生物が保有する酵素、③微生物そのものの利用、が注目されている。①としては、いわゆる天然物創薬があり、近年費用対効果の観点から撤退する製薬会社が多いものの、その人智を超えた構造から発揮される機能は非常に魅力的である。②としては、グリーンケミストリーに代表されるように、環境汚染リスクの低い合成方法として微生物触媒が利用されている。また、酵素の高い立体選択性を活用すべく化学合成では難しい不斉合成へ利用されることも多く、目覚ましい進歩を遂げた分子進化工学もバイオプロセス開発の後押しとなっている。さらに、消化剤のように古くから酵素自体が医薬品として利用されており、診断用試薬としても活用されている。③としては、プロバイオティクスなどの有用な腸内微生物を利用することによる疾病予防、管理の可能性が研究されている。また、近年急速に発展しているマイクロバイオーム研究から、体内の微生物叢が様々な疾患に関与していることが判明しており、腸内細菌自体が医薬品として利用され始めている。</p> <p>本論文では、微生物のバイオプロセス開発への応用に関して、医薬品中間体として有用なマルトール誘導体の酵素合成法の開発、また、微生物の酵素剤・プロバイオティクスとしての応用に関して、高尿酸血症予防に向けた体内プリン体量低減作用を持つ微生物ならびに酵素の探索・評価を行った。</p> <p>マルトール誘導体はその構造から金属キレート剤として働くことが知られており、メタロプロテインをターゲットとする様々な医薬品の合成中間体として利用されている。しかし、キレート剤としての結合力だけでは酵素阻害活性が弱く、薬効としては不十分であると同時に、酵素間の選択性も低いため安全性の懸念も大きい。そのため、マルトール母核に加え更なるファーマコフォアを付加することによる結合活性ならびに選択性の向上が望まれている。また、マルトールの 2 位側鎖を伸長させることで新たなファーマコフォアを獲得できることが分かっており、マルトールの 2 位カルボン酸体は種々の化合物の合成中間体として用いられている。一方、ルテニウムなどの無機触媒を利用して本 2 位カルボン酸体を合成することができるものの、非常に高いコストがかかることが問題となっている。そこで、本論文では安価なマルトールのベンジル保護体 (BMAL) を原料とし、生体触媒を活用する酸化反応によりそのカルボン酸体 (BMAL-COOH) に変換することを試みた。</p> <p>第一章では、BMAL 水酸化活性を有するシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) の機能向上を試みた。BMAL を 2 位水酸化体 (BMAL-OH) へと変換する <i>Novosphingobium</i> sp. SB32149 株を単離し、本変換に関与する P450 (P450nov) を同定した。分子進化工学的手法により P450nov に複数の変異を導入し、高機能化変異体 P450 (L188P/F218L/L237M) を構築するとともに、<i>Novosphingobium</i> sp. SB32149 株に由来する電子伝達系 FDXnov (A10T)/FDRnov との共役が効率的であることを見出した。高機能化 P450nov ならびに高機能化 FDXnov/FDRnov を利用し、8.0 g/L の BMAL から 5.2 g/L の BMAL-OH の生産を実現した。また、本酵素が BMAL-OH を BMAL の 2 位アル</p>			

デヒド体 (BMAL-CHO) へ酸化する反応も触媒することを見出した。

第二章では、BMAL-CHO を酸化するアルデヒドデヒドロゲナーゼの諸性質を解明した。BMAL-CHO を BMAL-COOH へと変換する *Pseudomonas nitroreducens* SB32154 株を単離し、本変換に関与するアルデヒドデヒドロゲナーゼを同定した。本酵素はモリブドプテリン含有タンパク質と鉄硫黄クラスター含有タンパク質の 2 つのサブユニットからなる酸化酵素であった。電子受容体としてフェナジンメソサルフェートを利用でき、ベンズアルデヒド類縁体に対して広い基質特異性を示した。本酵素の BMAL-CHO に対する速度論的解析を実施したところ、 K_M 、 V_{max} はそれぞれ 25 mM、0.36 μ mol/min/mg であった。本酵素と第一章の P450nov を組み合わせることで BMAL を 1pot で BMAL-COOH に変換するプロセスを構築した。

高尿酸血症は血中尿酸値の上昇に起因する疾病であり、痛風を併発する。原因の一つとして食事由来のプリン体による体内尿酸量の増加があり、予防策として食事中のプリン体を低減する方法が挙げられる。食事療法によるプリン体制限では食品の旨みが減少し、栄養が偏るなどの問題を抱えている。また、ヒト体内の代謝における尿酸排泄量の低下や尿酸生産量の増加も高尿酸血症の主な原因であり、それらに対して尿酸排泄促進剤や尿酸生産酵素 (キサンチンオキシダーゼ) 阻害剤を用いるのが主流であるが、肝障害、腎障害などの副作用を伴う可能性がある。本論文ではプリン体代謝を促進する酵素や微生物を医療用酵素剤やプロバイオティクスとして用いることで、高尿酸血症を予防する方法の開発を目指した。

腸管においては、ヒポキサンチンが尿酸よりも吸収されやすいため、腸管においてヒポキサンチンを尿酸へ変換することは、プリン体の吸収抑制につながる。第三章では、ヒポキサンチンを尿酸へと酸化するキサンチンオキシダーゼの諸性質を解明した。ヒポキサンチンをキサンチン、尿酸へと変換する *Cellulosimicrobium funkei* A153 株を単離し、本変換に関与するキサンチンオキシダーゼを同定した。本酵素もモリブドプテリン含有タンパク質と FAD 結合タンパク質の 2 つのサブユニットからなる酸化酵素であった。本酵素の *Rhodococcus erythropolis* での異種発現に成功し、His タグ精製タンパク質として基質特異性を評価したところ、第二章で述べたアルデヒドデヒドロゲナーゼとは異なり、プリン塩基に対して高い基質特異性を示した。

第四章では、プリン塩基代謝能を有する乳酸菌と、薬物の腸管膜透過性評価に用いられる Caco-2 細胞の共培養系による、腸管プリン体吸収モデル系を作製し、各種乳酸菌のプロバイオティクスとしての可能性を評価した。乳酸菌ライブラリよりヒポキサンチンを代謝もしくは吸着しうる *Lactobacillus paracasei* N103 株を見出した。播種量や培養条件を最適化することで、本乳酸菌と Transwell 上に分化させた Caco-2 細胞の共培養に成功した。本共培養系に各種プリン体を添加し腸管側・血管側に相当する各層のプリン体量を定量することで、*L. paracasei* N103 株のプリン体吸収抑制効果を検証した。その結果、*L. paracasei* N103 株が各種ヌクレオシドならびにプリン体を吸着または取り込むことでプリン体吸収抑制効果を示すことを認め、加えて、腸管膜の tight junction を強化することを確認した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

微生物ならびに微生物酵素の医療分野への応用が注目されている。本論文は、医薬品中間体として有用なマルトール誘導体の酵素合成法の開発と、高尿酸血症予防に向けた体内プリン体量低減作用を持つ微生物ならびに酵素の探索・評価を試みたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. BMAL を BMAL-OH へと変換する *Novosphingobium* sp. SB32149 株を見出し、責任酵素として P450 を特定した。本 P450 に複数の変異を導入し、最適電子伝達系を組み合わせることで、大幅な活性向上を実現した。
2. BMAL-CHO を BMAL-COOH へと変換する *Pseudomonas nitroreducens* SB32154 株を見出し、責任酵素としてアルデヒドデヒドロゲナーゼを特定した。本酵素がモリブドプテリン含有タンパク質と鉄硫黄クラスター含有タンパク質の 2 つのサブユニットから成ること、フェナジンメソサルフェートを電子受容体としてベンズアルデヒド類縁体に幅広く作用することを見出した。また、上述の P450 と組み合わせることで、BMAL を 1pot で BMAL-COOH に変換するプロセスを構築した。
3. プリン塩基特異的な分解活性を有する *Cellulosimicrobium funkei* A153 株を見出し、ヒポキサンチンを尿酸まで酸化する酵素としてモリブドプテリン含有タンパク質と FAD 結合タンパク質の 2 つのサブユニットからなるキサンチンオキシダーゼを特定した。本酵素の異種発現に成功し、精製酵素を用いた検討によりプリン塩基に対して高い基質特異性を有することを明らかにした。
4. プリン体を分解もしくは吸着する *Lactobacillus paracasei* N103 株を見出し、Caco-2 細胞との共培養系による腸管プリン体吸収モデル系を用いて、プロバイオティクスとしての可能性を示した。

以上のように、本論文は、微生物由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼならびにモリブドプテリン含有酸化還元酵素（アルデヒドデヒドロゲナーゼ）を高機能化し組み合わせることで医薬品中間体の合成に利用できることを示した。また、プリン体量低減作用を持つ微生物ならびにモリブドプテリン含有酸化還元酵素（キサンチンオキシダーゼ）を見出すとともに、Caco-2 細胞を用いたプリン体腸管吸収評価系により乳酸菌が高尿酸血症予防に有用なツールとなりうることを示したものであり、発酵生理学、応用微生物学、分子微生物科学、生体機能化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 2 年 2 月 7 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）