

氏名	大久保 真哉		
学位の種類	博 士 ( 生物工学 )		
学位記番号	博 甲 第 10306 号		
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	遺伝子発現変動解析によるCytochrome P450およびレドックスパートナー遺伝子の同定に関する研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	小林 達彦
副査	筑波大学教授	博士(農学)	臼井 健郎
副査	筑波大学准教授	博士(工学)	橋本 義輝
副査	筑波大学助教	博士(農学)	熊野 匠人

## 論 文 の 要 旨

製薬業界において、微生物や微生物の酵素を用いた生体触媒反応は新規合成経路の開発に貢献しており、医薬品候補化合物の探索、医薬品原料の製造、あるいは医薬品の薬物代謝物研究に利用されている。また、*Streptomyces*属由来のCytochrome P450を用いたプラバスタチンの製造を始め、放線菌は種々の医薬品原料や産業酵素の供給に活用されている。放線菌のCytochrome P450は様々な化合物に対して水酸基を導入し、それを起点に各種誘導体が合成され得ることから、新たな医薬品候補化合物の探索において有用酵素として期待されている。

グルタミン酸受容体の一つであるmGluR5を活性化すると、N-メチル-D-アスパラギン(NMDA)受容体のシグナル伝達が増強あるいは正常化され、神経変性疾患の治療効果が期待できることから、mGluR5を活性化するポジティブアロステリックモジュレーター(CPD-1)は医薬開発上、重要な化合物である。また、CPD-1のC4(R)位水酸化体であるCPD-2は、薬物の代謝物研究および構造活性相関の把握や周辺化合物の探索の起点となる有用化合物である。

このような背景のもと、著者は、CPD-1をCPD-2に効率的に水酸化する酵素に着目し、本酵素活性を有する*Streptomyces* sp. EAS-AB2608株から、この水酸化反応を触媒するCytochrome P450を同定することを目的として研究を行った。

はじめに著者は、緒論において酵素や放線菌の産業利用の現状と、有用酵素遺伝子を取得する手段の問題点について記載している。

次に第1章において、著者は、CPD-1水酸化反応に関与する候補遺伝子の選抜について記載している。バクテリアのCytochrome P450は、NADHおよびNADPHから還元エネルギーを伝達するFerredoxinおよびFerredoxin reductaseをレドックスパートナーとして要求することが多い。そこで著者は、*Streptomyces* sp. EAS-AB2608株のゲノムシーケンズを行い、Cytochrome P450候補遺伝子を45種、FerredoxinおよびFerredoxin reductase候補遺伝子を各々8種、見出した。さらにRNAシーケンシングを用いた遺伝子発現変動解析を行った結果、培地へのCPD-1添加によって、easab2608\_00800 (Cytochrome P450) と easab2608\_00799 (Ferredoxin) の2種の遺伝子の発現量が優位に上昇していることを明らかにしている。

続いて第2章において、著者は、*Streptomyces avermitilis*異種発現系を利用した水酸化機能の解析について記載している。著者は*S. avermitilis*を用いた異種発現系を用いて上記の2種の遺伝子の単独、あるいは共発現株を作製し、各形質転換株のCPD-1に対する水酸化活性を解析した。その結果、easab2608\_00800 (Cytochrome

P450) と easab2608\_00799 (Ferredoxin) を共発現させた形質転換株が元のEAS-AB2608株と同等の高い変換効率を示すことを明らかにした。他の実験結果と併せ、easab2608\_00800 (Cytochrome P450) がCPD-1の水酸化に関与する責任酵素遺伝子の1つであることを明らかにするとともに、この水酸化の増強にeasab2608\_00799 (Ferredoxin) が関与している可能性を示した。

最後に結論において、著者は、一般的に20から40種ほどのCytochrome P450遺伝子を有しているために目的の遺伝子を同定することが難しい*Streptomyces*属放線菌において、既存の手法と比較して今回のRNAシーケンシングを用いた遺伝子発現変動解析と*S. avermitilis*を用いた異種発現系のコンビネーションが目的Cytochrome P450の探索に有効であった結果から、他の微生物酵素探索についても応用であることを述べている。

## 審 査 の 要 旨

酵素反応は官能基の保護・脱保護処理を行うことなく目的とする化学反応を達成できるため、異性化が生じ得る可能性がある有機合成反応の回避や合成ステップ数の削減などに貢献できる。生体触媒反応は、特に複雑な構造を有する医薬品原料の製造コスト低下に寄与し、結果として人々が医薬品にアクセスする機会を向上させる効果が期待できる。mGluR5の活性化に関わるCPDの関連化合物を合成することは、神経変性疾患の治療薬開発上、重要であることから、CPD-1をCPD-2に効率的に水酸化する活性を示す酵素および本構造遺伝子を同定するための研究が行われた。

本研究によって、CPD-1のCPD-2への水酸化反応活性を示す*Streptomyces* sp. EAS-AB2608株から、本反応を触媒するCytochrome P450が同定されたことは高く評価できる。また、RNAシーケンシングを用いた遺伝子発現変動解析と*Streptomyces avermitilis*を用いた異種発現系の組み合わせが、本Cytochrome P450の探索に有効な方法であることが示されたことは意義深い成果である。これら一連の知見は、Cytochrome P450を始めとする酵素のスクリーニングや、酵素を用いた有用物質生産法の開発に貢献できると期待される。

以上のように、本研究の成果は、微生物学のみならず応用酵素学領域において大きく貢献するものと結論した。

令和4年1月18日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。