

(別紙1)

論文内容の要旨

申請者氏名 Bach Thi Mai Hoa

プロリンのアナログである *cis*-4-ヒドロキシ-L-プロリン (CHOP) は、コラーゲン合成の際に L-プロリンと競合して取り込まれ、正常なコラーゲン構造の形成を妨げるため、抗腫瘍剤などの原料として期待されている。しかしながら、CHOP は、安定性、溶解性、細胞選択性などの点で問題があり、また非コラーゲン性タンパク質への取込みによる毒性もある。これまでに、CHOP のポリエチレングリコール修飾により溶解性や毒性を改善した例が報告されており、CHOP の化学修飾 (アセチル化など) は新しいプロドラッグの開発に繋がる可能性がある。そこで本研究では、プロドラッグとして未だ報告のない CHOP の *N*-アセチル化に着目し、煩雑な化学合成ではなく、微生物で L-プロリンから CHOP を経由して *N*-アセチル CHOP を生産することを目的とした。

まず、当研究室で L-アゼチジン-2-カルボン酸 (プロリンアナログ) を解毒する酵素として見出した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 について、種々のプロリンアナログを用いて基質特異性を検討したところ、新たな基質として CHOP が *N*-アセチル CHOP に変換されることを *in vitro* および *in vivo* で確認した。また、Mpr1 を発現する大腸菌は CHOP に対する耐性を示した。さらに、NaCl を培地に添加すると、細胞内への CHOP の取込みが促進され、その結果、Mpr1 発現株では NaCl を添加しない場合に比べて、*N*-アセチル CHOP の生産量が増加し、2%NaCl の存在下で細胞湿重量 g あたり最高 52 μmol の *N*-アセチル CHOP が生成した。

次に、安価な基質の L-プロリンを用いて *N*-アセチル CHOP の微生物生産を試みた。共同研究先で見出された土壌細菌 *Sinorhizobium meliloti* 由来の L-プロリン *cis*-4-ヒドロキシラーゼ SmP4H は L-プロリンを CHOP に変換する酵素である。そこで、大腸菌の L-プロリンオキシダーゼ PutA の遺伝子破壊株で SmP4H と Mpr1 を共発現させたところ、L-プロリン添加培地で培養することで著量の *N*-アセチル CHOP を検出できた。また、培養条件を検討した結果、培地中の L-プロリンの取込みを促進する NaCl、SmP4H の触媒反応に必要な L-アスコルビン酸、2-オキシグルタル酸を添加することで、42 時間培養後に細胞湿重量 g あたり最高 26 μmol の *N*-アセチル CHOP が生成した。しかしながら、定常期の細胞では *N*-アセチル CHOP 生産量が低下しており、分解が示唆された。

最後に、*N*-アセチル CHOP の生産性向上を目的に、大腸菌の細胞内における *N*-アセチル CHOP の分解に関する解析を行い、代謝経路の推定を試みた。*N*-アセチル CHOP に大腸菌の細胞抽出液を添加すると、*N*-アセチル CHOP 量が減少し、分解産物と思われる 5 種類の未同定化合物が検出された。そこで、大腸菌に存在する 8 種類の脱アセチル化酵素に着目し、解析を行ったが、分解に関与する脱アセチル化酵素は同定できなかった。また、高濃度 CHOP の存在下で大腸菌を培養すると赤色色素が生成することを見出し、酸化酵素を介した五員環化合物 (ピロール) への変換経路が示唆された。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Bach Thi Mai Hoa

プロリンのアナログである *cis*-4-ヒドロキシ-L-プロリン (CHOP) は、抗腫瘍剤などの医薬品や香粧品の原料として期待されている。しかしながら、CHOP は、血中での安定性、溶解性の点で問題がある。また、CHOP はタンパク質が合成される際、L-プロリンと競合してペプチド鎖に取り込まれ、タンパク質の正常な構造形成を妨げると考えられ、細胞毒性も無視できない。これまでに、ポリエチレングリコール修飾により CHOP の溶解性や毒性を改善した例が報告されており、CHOP の化学修飾 (アセチル化など) は新しいプロドラッグの開発に繋がる可能性がある。申請者は、プロドラッグとして報告のない CHOP の *N*-アセチル化に着目し、微生物で L-プロリンから CHOP を経由して *N*-アセチル CHOP を生産することを試み、以下に示す新たな知見を得た。

- 1) 酵母由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の基質として、種々のプロリンアナログの中から CHOP を新たに同定し、既知の基質 (L-アゼチジン-2-カルボン酸) と同程度の触媒活性を示すことを明らかにした。また、*in vitro* での酵素反応および大腸菌内での発現実験から、Mpr1 が CHOP を *N*-アセチル CHOP に変換することで、CHOP の細胞毒性を緩和することを見出した。さらに NaCl が細胞内への CHOP の取込みを促進し、*N*-アセチル CHOP の生産に有効であることを示した。
- 2) 土壌細菌 *Sinorhizobium meliloti* 由来の酵素で L-プロリンを CHOP に変換する L-プロリン *cis*-4-ヒドロキシラーゼ SmP4H と Mpr1 を大腸菌の細胞内で共発現させることで、培地に添加した L-プロリンから *N*-アセチル CHOP が生産されることを初めて示した。また、培地中の L-プロリンの取込みを促進する NaCl、SmP4H の触媒反応に必要な L-アスコルビン酸、2-オキソグルタル酸の添加によって、42 時間培養後に細胞湿重量 g あたり最高 26 μmol の *N*-アセチル CHOP 生産量を達成した。
- 3) 上記 *N*-アセチル CHOP 生産菌の培養過程で得られた知見に基づき、大腸菌内における *N*-アセチル CHOP の分解を想定し、代謝経路の推定を試みた。その結果、未同定酵素による脱アセチル化を介した分解経路、および酸化酵素を介した五員環化合物 (ピロール) から赤色色素への変換経路の存在を示唆することができた。

現在、*N*-アセチル CHOP は化学合成が可能であるが、構造異性体の生成、アセチル基の分子内移動などの問題点があり、微生物の酵素反応を利用した製法は有用である。

以上のように、本論文はアセチル化酵素 Mpr1 の基質として CHOP を同定するとともに、大腸菌内で L-プロリン *cis*-4-ヒドロキシラーゼと Mpr1 を共発現させ、プロリンから *N*-アセチル CHOP が高生産される培養条件を見出した。また、大腸内における *N*-アセチル CHOP の代謝経路の推定を試み、生理機能の理解や生産性向上に繋がる知見を得たものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。