

審査の結果の要旨

氏名 郭 琳珺

本論文は、糖尿病治療薬として期待されるインスリン分泌促進化合物 (2*S*,3*R*,4*S*)-4-hydroxyisoleucine (HIL) の合成に関わる酵素 asHPAL を対象として、asHPAL の立体選択的な反応機構と基質特異性の構造基盤を解明し、産業応用のために立体選択性を高めた改変酵素、ならびに立体選択性を保持し広い基質特異性を有する改変酵素を設計することを目的としている。本論文は、研究の背景と意義 (第 1 章) を論じた上で、asHPAL の精製・結晶化及び立体構造の決定 (第 2 章)、asHPAL の立体選択的な反応機構の解明及び立体選択性を高めた改変酵素の設計 (第 3 章)、asHPAL の基質特異性の構造基盤の解明及び広い基質特異性を有する改変酵素の設計 (第 4 章) について述べ、得られた結果に基づく総合考察 (第 5 章) を行っている。

第 1 章は序論として、アルドラーゼを用いたキラル合成の産業応用上の有用性を説明し、asHPAL の立体選択性の向上と基質特異性の拡大の必要性について述べている。asHPAL はクラス II HpcH/HpcI aldolase subfamily に属するアルドラーゼであり、asHPAL の立体選択性を利用して、インスリン分泌促進作用をもつ (2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の産業応用が期待されている。しかしながら、asHPAL の立体選択性は 85%(*ee*)であるため、産業応用において重要な合成効率を高めるには立体選択性の向上が不可欠である。また、asHPAL は 2-ケト酸の中で、ピルビン酸と 2-オキソ酪酸のみを基質とするため、実用的なキラル合成に asHPAL を広く利用するには、基質特異性の構造基盤を解明することが重要であると論じている。以上の立体選択性と基質特異性の構造基盤の解明に加え、改変酵素の設計を本研究の目的に設定している。

第 2 章では、大腸菌発現系を用いた asHPAL の発現、精製及び X 線結晶構造解析について述べている。asHPAL の立体構造を 1.60 Å 分解能で決定し、6 量体形成、補因子 Mg²⁺の配位様式、さらに他の酵素との構造類似性について論じている。

第 3 章では、第 1 基質である 2-オキソ酪酸との複合体の X 線結晶構造解析、ドッキングシミュレーションによる第 2 基質のアセトアルデヒドの結合解析、酵素反応速度論的解析について述べ、asHPAL の立体選択的な反応機構を論じている。asHPAL の 2-オキソ酪との複合体の結晶構造を 1.58 Å 分解能で決定し、asHPAL の活性部位を明らかにした。また、計算科学シミュレーション及び変異体の酵素反応速度解析により、既報の反応機構よりも妥

当性の高い反応機構が提案された。さらに、アセトアルデヒドのメチル基と Phe26 のフェニル基との CH- π 相互作用が asHPAL の立体選択性を規定していることが示され、この構造基盤に基づいて、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL に対して 91%(*ee*)に立体選択性を高めた N219Y/F26N 変異体が取得された。

第4章では、asHPAL の3種類の2-ケト酸との複合体の X 線結晶構造解析について述べ、基質特異性の構造基盤を論じている。申請者は 4-メチル-2-オキシ吉草酸との複合体構造を 1.60 Å 分解能で決定し、Phe177 が asHPAL の2-ケト酸に対する基質特異性を規定していることを示した。この構造基盤に基づいて、4-メチル-2-オキシ吉草酸を基質としてアルドール反応を触媒する F177A 変異体を取得した。さらに、4-メチル-2-オキシ吉草酸の結合の配向制御を狙った酵素改変により、F177A 変異体よりも高活性を示す F177A/S181W 変異体を取得した。

第5章では、本研究で得られた結果について総合考察を行い、今後の展望を述べている。asHPAL の立体選択性と基質特異性は独立した異なるアミノ酸残基により認識されることを論じており、今後の課題として立体選択性を実際に確認する必要があるが、F177A/S181W 変異体は立体選択性を規定する Phe26 を保持しているため、野生型と同様の立体選択性が保たれていることが期待される。また、立体選択性と基質特異性の構造基盤に基づいたデータベース検索により、asHPAL と同様の立体選択性を有する8種類の酵素が同定された。しかしながら、本研究で創出された改変酵素は天然には存在しないことが示された。

以上、本研究で得られた知見は反応特異性を保持したまま広い基質選択性を有する酵素設計に役立ち、2つのキラル中心をもつ化合物の立体選択的な合成に貢献するものと期待され、学術上・応用上の寄与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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。