

## 論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻  
平成 25 年度博士課程 進学  
氏 名 石 玄  
指導教員名 田之倉 優

論文題目：4-HIL 合成に有用な AMKP 還元酵素の構造基盤に基づく立体選択性の改変

### 1. 緒言

4-ヒドロキシイソロイシン (4-hydroxyisoleucine, 4-HIL) は、タンパク質を構成しない天然アミノ酸の 1 つであり、3 つの不斉炭素をもつため 8 種類のジアステレオマーを取り得る。天然型 4-HIL はフェヌグリークの種子から最初に単離され、2*S*,3*R*,4*S* 体であることが明らかにされている。(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL はグルコース依存的なインスリン分泌活性をもつことが実証され、骨格筋と肝臓のインスリン抵抗性を改善する効果が知られている。一方、2*S*,3*R*,4*S* 体以外の 4-HIL 異性体はインスリン分泌活性を示さない。このように (2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL のみが、糖代謝改善作用を有することにより、糖尿病治療薬や抗肥満薬として期待されている。

フェヌグリークから抽出される 4-HIL の収量は約 0.56 wt% とわずかであり、産業利用においては非経済的である。そのため、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の製造法として化学合成法や微生物酵素による触媒反応を併用した合成法などが検討されてきた。しかし、こうした合成戦略は特定のキラリティーをもつ基質からの不斉誘導またはラセミ体の酵素速度論的分割に依存しており、複雑な多段階反応を必要とするため、より簡便な合成法として、酵素を用いたキラル化合物の不斉合成技術が求められている。

(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の不斉合成に有用な生体触媒として、2-アミノ-3-メチル-4-ケトペンタン酸 (2-amino-3-methyl-4-ketopentanoic acid, AMKP) のラセミ体から 2*S*,3*R*,4*S* 体の 4-HIL を生成する 4 種類の AMKP 還元酵素 (HILDH、ARAP、ARAF 及び ARFA547) が同定されている。これらの AMKP 還元酵素は 2*S*,3*R*,4*S* 体の 4-HIL 合成のバイオプロセス構築のためのポテンシャルをもつが、その立体選択性は厳密ではない。京都大学大学院農学研究科小川順教授らの研究グループにより、微生物の菌体から粗精製した AMKP 還元酵素を AMKP ラセミ体に反応させ、その反応産物が分析された。*Bacillus thuringiensis* 2e2 由来 AMKP 還元酵素 HILDH は AMKP ラセミ体の還元反応にお

いて 4S体と 4R 体の 4-HILの両方を生成する。一方、ARFA547 (20-14 FA547 由来)、ARAF (*Acremonium fusidoides* IG 305 由来)、ARAP (*Aureobasidium pullulans* NBRC 4466 由来) はAMKP ラセミ体から 4 種類の 4S体を生成する。本研究では、AMKP還元酵素の立体選択性を 2S,3R,4S 体に対して厳密に制御した酵素の創出を目的とし、AMKP還元酵素の結晶構造を解析し、得られた構造基盤に基づいて酵素改変を行った (図 1)。

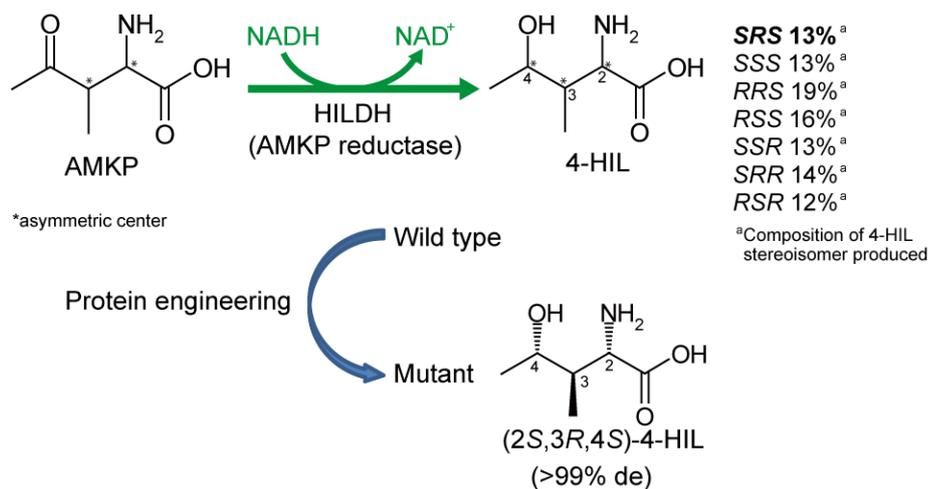


図 1. AMKP 還元酵素 HILDH による AMKP から 4-HIL への還元反応と改変酵素による(2S,3R,4S)-4-HIL の立体選択的合成

## 2. 結果及び考察

### (1) AMKP還元酵素の調製及び反応産物の分析

タンパク質の N 末端にポリヒスチジンタグを付加した発現ベクターを構築して大腸菌を宿主として各種 AMKP 還元酵素を生産し、可溶性発現した酵素を Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。基質として AMKP のラセミ体、補酵素として NADPH (HILDH の場合は NADH) を用いて、37°C で各酵素と 24 時間反応させた。反応産物は 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC) により誘導化させた後、キラルカラムを用いた HPLC 分析に供した。その結果、HILDH は 8 種類の 4-HIL 立体異性体のうち、2R,3R,4R 体を除いた 7 種類の立体異性体をほぼ同じ比率 (12–19%) で生成することが示された (図 1)。一方、ARFA547、ARAF 及び ARAP は先行研究と同様に 4 種類の 4S 体を生成した。

### (2) AMKP還元酵素のX線結晶構造解析

各 AMKP 還元酵素を Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、及びゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製し、補酵素 NADPH (HILDH の場合は NADH) を添加して結晶を取得した。放射光施設 Photon Factory のタンパク質 X 線結晶構造解析用ビームラインで各結晶の X 線回折測定を行い、HILDH は 2.2 Å、ARFA547 は 2.4 Å、ARAF は 1.6 Å、ARAP は 2.0 Å の分解能の回折データを取得した。分子置換法により位相と初期構造

を決定し、モデル構築の精密化を行って最終構造を決定した。HILDH、ARFA547 及び ARAF では補酵素の電子密度が明瞭に観測されたが、ARAP では補酵素の電子密度は観られなかった。

### (3) 立体選択性を規定する構造基盤の解析

各酵素と基質 AMKP もしくは目的反応産物 (2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL との共結晶化実験を試みたが、複合体構造は得られなかった。そこで、基質アナログとしてコハク酸 (succinic acid, SA) との共結晶化を行い、分解能 2.2 Å で HILDH-NADH-SA 複合体の結晶構造を決定した。非対称単位に含まれる 4 分子の HILDH の 2 分子において、活性部位に 1 分子の SA が結合していることが観察された。活性部位における SA と NADH の位置関係から、SA は 4*R* 体が生成可能な AMKP の結合を模倣していたため、この複合体構造に基づいて 4*R* 体 4-HIL の結合モデルを構築した。一方、AMKP 還元酵素と 4*S* 体 4-HIL の結合様式については、活性部位における 4*S* 体 4-HIL の結合モデルをドッキングシミュレーションにより予測し、その中から既知の触媒反応機構によって説明される最安定の結合モデルにより推定した。これらの結合モデルから、HILDH の活性部位における 4-HIL の配向は 1 位のカルボキシル基を認識する残基により規定されていることが示唆された。4*R* 体 4-HIL のカルボキシル基は Arg88、Arg147 及び Tyr191 の 3 残基により認識されていた。一方、4*S* 体 4-HIL のカルボキシル基は Arg147 と Tyr191 の 2 残基により認識されており、Arg88 が 4*R* 体と 4*S* 体の選別に寄与していると推定した。これらの残基は 4*S* 体の 4-HIL を選択的に生成する ARFA547、ARAF 及び ARAP では保存されておらず、代わりに基質結合ポケットの入口付近に保存された Arg 残基で 4*S* 体のカルボキシル基を認識することが、各酵素に対する 4*S* 体 4-HIL の結合モデルから推定された。この Arg 残基の位置には HILDH で Trp242 が配置しており、HILDH と 4*S* 体 4-HIL の結合モデルにおいて、Trp242 は 4*S* 体 4-HIL のカルボキシル基から離れていた。このことは HILDH と他の 3 種類の AMKP 還元酵素においてカルボキシル基の認識機構が異なることを示唆するが、Trp242 は HILDH の 4*S* 体に対する選択性を高める酵素改変の標的残基の一つと考えられた。

HILDH の Arg88 と Trp242 を標的として他の 19 種類のアミノ酸残基への飽和変異を導入し、各変異体の反応産物を HPLC により分析した。その結果、Arg88 が負電荷をもつ Asp 残基に置換された場合に 4*R* 体に対する選択性が著しく低下し、2*S*,3*R*,4*S* 体を 93% の高い選択性で生成できることが示された。また 2*S*,3*R*,4*S* 体の選択性は R88D よりも低いものの、他の 4 種類の変異体でも同様の選択性変換が生じた。一方、R88K 変異体では 4*R* 体に対する選択性が高まっていた。HILDH R88K 変異体の結晶構造を解析し、野生型 HILDH の *R* 体 4-HIL 結合モデルと比較した結果、Lys 残基のアミノ基が *R* 体 4-HIL のカルボキシル基との塩橋形成に適した配置をとることが示された。これらの結果は、Arg88 及びその静電的特性が 4*R* 体のカルボキシル基の認識に重要である考えに矛盾せず、Arg88 における残基の極性を変化することにより 4-HIL の立体選択性の制御が可能であることを明らかにした。Trp242 の Arg 残基への置換では、予想したような 4*S* 体に対する特異性の向上は認められなかったが、2*S*,3*R*,4*S* 体と 2*S*,3*S*,4*R* 体の 2 種類のみを同等の割合で生成することが示された。同様の立体選択性の変換は、他の 4 種類の変異体で示され、その中で W242E 変異体の 2*S*,3*R*,4*S* 体に対する選択性は 93%

に向上した。W242E 変異体の結晶構造に基づいて (2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の結合モデルを構築した結果、置換された Glu 残基は 2*S* 体のアミノ基を認識している可能性が示唆され、アミノ基の立体認識の強化が 2*S*,3*R*,4*S* 体に対する選択性を向上させる構造基盤の一つであることが推定された。

#### (4) (2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の立体選択性を改善する酵素改変

上記の 5 種類の W242 変異体に対して、2*S*,3*R*,4*S* 体に高い選択性を示す 4 種類の Arg88 変異を組み合わせ、各二重変異体の反応産物を HPLC により分析した。その結果、2*S*,3*R*,4*S* 体に対する選択性は最大で 95% までと十分な改善は認められなかった。産業利用可能な光学純度 (>99%) を達成するため、これまで得られた立体選択性を規定する構造基盤に基づいて 4-HIL のカルボキシル基及びアミノ基を認識する残基の導入位置を検討し、新たに 4-HIL のカルボキシル基の周辺に位置する Glu144 を標的残基として選択した。Arg88、Glu144、Trp242 の三重変異体では酵素活性が失われたため、Arg88 の 4 種類の変異体と Trp242 の 5 種類の変異体に対して、Glu144 への変異導入を検討し、最終的に (2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL に対して >99% の選択性示す HILDH 変異体 (HILDH<sup>SRS</sup>) を取得することができた。

HILDH<sup>SRS</sup> が 4-HIL の立体選択性を制御する構造基盤を解明するため、HILDH<sup>SRS</sup> の結晶構造を分解能 1.9 Å で決定し、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の結合モデルを構築した。変異導入した 2 つの残基は水分子を介して水素結合を形成しており、4*R* 体の反応が可能なカルボニル基の配向を制限していた。さらに、これらの残基は (2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL のカルボキシル基及び 2*S* 体アミノ基を水素結合ネットワークにより結合することで、4*S* 体の反応が可能なカルボキシル基の配向と 2*S* 体アミノ基の認識を同時に可能にし、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL に対する選択性を高めていることが示唆された。

### 3. まとめと今後の展望

本研究では、4 種類の AMKP 還元酵素 (HILDH、ARFA547、ARAF 及び ARAP) と、HILDH と基質アナログの複合体、また 3 種類の HILDH 変異体の結晶構造を解析し、立体選択性を規定する構造基盤を解析した。これに基づいて作製した HILDH 変異体は、AMKP ラセミ体の還元反応において光学純度 >99% で 2*S*,3*R*,4*S* 体の 4-HIL を生成し、解明した構造基盤の妥当性も支持した。今回解析された AMKP 還元酵素の構造基盤及び酵素改変アプローチは、AMKP の不斉還元反応により、2*S*,3*R*,4*S* 体以外の 4-HIL 立体異性体の合成にも有効であることを期待する。