

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石 玄

本論文は、4-HIL (4-hydroxyisoleucine) 合成に有用な 4 種類の AMKP 還元酵素 (HILDH、ARFA547、ARAF 及び ARAP) の結晶構造と、AMKP ラセミ体の還元反応において立体選択的 (光学純度>99%) に 2*S*,3*R*,4*S* 体の 4-HIL を生成する HILDH 変異体の創出について述べている。4-HIL は 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。2*S*,3*R*,4*S* 体の 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、AMKP (2-*amino*-3-*methyl*-4-*ketopentanoic acid*) のラセミ体から 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。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。本論文は 6 章からなる。

第 1 章は序論で、キラル化合物の有用性及び(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の生理機能について説明し、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL 合成の現況を紹介している。次に、4-HIL 合成に有用な 4 種類の AMKP 還元酵素 (HILDH、ARFA547、ARAF 及び ARAP) を説明している。*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 4*R* 体と 4*S* 体の 4-HIL を生成し、ARFA547 (20-14 FA547 由来)、ARAF (*Acremonium fusidioides* IG 305 由来)、ARAP (*Aureobasidium pullulans* NBRC 4466 由来) は 4 種類の 4*S* 体を生成する。

第 2 章では、4 種類の AMKP 還元酵素 (HILDH、ARFA547、ARAF 及び ARAP) の発現と精製、及び反応の立体選択性を調べるための HPLC 分析について述べている。4 種類の AMKP 還元酵素の反応産物を HPLC により分析した結果、HILDH は 8 種類の 4-HIL 立体異性体のうち、2*R*,3*R*,4*R* 体を除いた 7 種類の立体異性体をほぼ同じ比率で生成することが示された。一方、ARFA547、ARAF 及び ARAP においては 4 種類の 4*S* 体を生成することが示された。

第 3 章では、HILDH の立体選択性の制御に関わる構造情報を得るための X 線結晶構造解析について述べている。基質アナログとなるコハク酸と HILDH の複合体構造に基づいて構築した 4*R* 体 4-HIL の結合モデルとドッキングシミュレーションにより予測した (2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の結合モデルから 4-HIL の認識に関わる残基を推定し、各残基の Ala 変異体における反応産物の HPLC 分析により各残基の立体選択性への関与を評価した。その結果、2*S*,3*R*,4*S* 体の選択性の改善が最も顕著に観察されたのは Arg88 であり、この残基を標的

として変異を導入することにより、2*S*,3*R*,4*S* 体 4-HIL の立体選択性を改善できることが期待される。

第4章では、ARFA547、ARAF 及び ARAP の立体選択性の制御に関わる構造情報を得るための X 線結晶構造解析について述べている。解析された AMKP 還元酵素の立体構造の比較から、HILDH の(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL に対する選択性を高める酵素改変の標的残基として、Arg88 と Trp242 を選択した。

第5章では、HILDH の(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL に対する選択性を高める酵素改変の標的残基として選択された Arg88 と Trp242 に対して飽和変異を導入して作った変異体の反応産物の HPLC 分析について述べている。また、これらの変異体の中、4*R* 体に対する選択性が高まっていた R88K 変異体と 2*S*,3*R*,4*S* 体に対する選択性が高まっていた W242E 変異体 X 線結晶構造と立体選択性を規定する構造基盤の解析について述べている。解析された構造基盤に基づいて HILDH の立体選択性制御に関与するアミノ酸残基への変異導入の組合せにより、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL を立体選択的に生成する酵素への機能改変を行い、AMKP ラセミ体から(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL を>99%の光学純度で生成する HILDH 二重変異体 (E144K/W242Q 変異体) を取得することができた。この変異体の X 線結晶構造解析により決定した構造に基づき、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL の立体選択性を高度に制御する構造基盤を考察した。

第6章では、4-HIL 立体異性体の合成に対する HILDH の有効性について述べている。HILDH は4種類の AMKP 還元酵素の中で唯一 NADH を補酵素として(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL を生成する酵素である。工業生産に使われる NADH 再生系は formate dehydrogenase を用いて、NAD⁺を NADH へ再生すると共に反応系に蓄積されない CO₂ が生成される。そのため高価な NADPH を使用して、かつ副産物のさらなる分離が必要な NADPH 再生系よりメリットがある。また、HILDH は AMKP 還元酵素の中で 2*S* 体と 2*R* 体の 4-HIL を生成する唯一の酵素であり、より多様な 4-HIL 異性体を生成できる。したがって、HILDH の立体選択性を規定する構造基盤の解析は、(2*S*,3*R*,4*S*)-4-HIL だけでなくそれ以外の多様な 4-HIL 立体異性体の合成にも応用できるポテンシャルをもつと考えられる。本研究で解析された AMKP 還元酵素の構造基盤は 2*S*,3*R*,4*S* 体以外の 4-HIL 立体異性体の選択性の改善にも有用な情報を提供すると考えられる。

以上、本研究は4種類の AMKP 還元酵素 (HILDH、ARFA547、ARAF 及び ARAP) 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ており学術上、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 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。