

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 23 年度博士課程 入学
氏 名 管 立軍
指導教員名 田之倉 優

論文題目

Structural Basis for Substrate Recognition and Specificity of a Novel (*R*)-stereoselective
 ω -transaminase

(新規 *R* 体選択的 ω -トランスアミナーゼの基質認識および基質特異性の
構造基盤の解明)

序

キラルアミンは、不斉炭素とアミノ基を有する化合物の総称であり、医薬、農業、および化学工業において世界的に需要が高まっている。キラルアミンは光学異性体の 1 種のみが望ましい活性を有する場合が多いことから、立体選択的にキラルアミンを生産する手法の開発が望まれている。化学触媒法と比べて環境にやさしいキラルアミン生産法を実現するためのツールとして、酵素 Amine : pyruvate aminotransferase が注目されてきた。Amine : pyruvate aminotransferase はアミン化合物とカルボニル化合物との間でアミノ基転移反応を触媒する酵素である。*S* 体選択的な Amine : pyruvate aminotransferase に関しては機能解析、構造解析、実用化も進んでいる。しかし、*R* 体選択的な Amine:pyruvate aminotransferase は希少であり、注目度が非常に高いにもかかわらず研究が進んでおらず、立体構造の報告がなされないままに機能解析や高機能化が進められてきた。キラルアミンは(*R*)-エナンチオマーのみが有用なものも多数知られていることから、*R* 体選択的な Amine:pyruvate aminotransferase の諸性質を理解することが、生体触媒法による *R* 体のキラルアミン生産技術の開発において必須である。

本研究が対象とする Amine : pyruvate aminotransferase は土壌から分離された菌 *Arthrobacter* sp. KNK168 (FERM-BP-5228) が有する *R* 体選択的なアミノ基転移酵素(以下、RTA と略す)として発見された。RTA はホモ二量体 (サブユニット分子量約 37,000) のピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性の酵素である。RTA はメチ

ルケトンと一部の環状ケトンに作用できると報告されている。たとえば、抗糖尿病薬と抗肥満薬の合成中間体として重要な(R)-3,4-ジメトキシアンフェタミンを合成することができる。2010年、米国 Codexis 社と Merck 社では既存の RTA のホモログである ATA-117 の高機能化に成功した。ATA-117 の本来の小さな基質の代わりに、複雑なケトンを認識することができるようになり、さらに高温や有機溶媒耐性を獲得させた。最終的に得られた変異体(ATA-117-Rd11, 本研究では RTA^{Mut28} と呼ぶ)を用いることにより、従来の化学触媒法と比べ血糖降下薬 sitagliptin の最終収率は 10-13%増加し、一日当たりの生産力は 53%増加した。また製造コストは 19%減少した。RTA はこのように産業上重要な酵素である。

以上のような背景から、本研究では RTA を対象として、X 線結晶構造解析を中心としたアプローチにより、1) 世界初となる R 体選択的な Amine : pyruvate aminotransferase (RTA) の立体構造を決定し、基質結合部位の形状や構成するアミノ酸残基の寄与を調べることによって、RTA が有する基質認識機構および基質特異性を決定する構造基盤を解明し、2) 先行研究において成功した基質特異性改変のメカニズムを立体構造から明らかにし、さらに 3) 立体構造情報を用いて R 体選択的に反応を触媒するメカニズムを説明することに成功した。

基質認識機構と基質特異性を決定する構造基盤の解明

RTA の基質認識機構およびそれによって実現される基質特異性のメカニズムを明らかにするため、大腸菌発現系を用いて RTA を発現し、精製と結晶化を行い、X 線結晶構造を決定した。世界で初めての R 体選択的な Amine:pyruvate aminotransferase の結晶構造である。活性部位は二量体を形成する 2 分子の RTA から形成されていた。報告例の少ない反応中間体 external aldimine の立体構造が決定できたことにより、基質結合部位を構成する Large binding pocket と Small binding pocket が基質特異性を決定していることを明らかにした。活性部位を構成するアミノ酸残基のうち、Arg が幅広い基質特異性の実現に寄与していることを示した。

先行研究における基質特異性改変のメカニズムの解明

先行研究において開発された改変体 RTA (RTA^{Mut28}) がどのようにして複雑なケトン化合物(血糖降下薬 sitagliptin の前駆体)を基質にすることができるようになったのかを明らかにするため、RTA^{Mut28} の発現、精製、結晶化を行い、結晶構

造を決定した。野生型 RTA の構造と比較することにより、129 番残基から 146 番残基までのアミノ酸残基が形成しているループの構造に大きな違いがあることが明らかとなった。変異体の結晶構造解析および各種変異体の活性測定によって、このループの構造の違いが 1 残基のアミノ酸残基のみによって決定されることが示唆された。このループの構造変化が活性部位の形と大きさを大きく変化させたため、野生型 RTA では基質にすることができなかつた複雑なケトン化合物を認識できるようになったことが示唆された。

立体選択性の解明について

R 体選択的なアミノ基転移酵素の立体選択性が、S 体化合物が活性部位に結合すると、立体障害によって反応中間体 external aldimine を形成することができないことによって生じるというモデルが過去に提唱されている。一方で、PLP を補酵素としてアミノ基転移反応を触媒する酵素の立体選択性を説明するモデルとして、反応中間体における C α 水素原子が PLP の *re*-face に向けられているか *si*-face に向けられているかによって、立体選択性が決定されるというモデルも提唱されている。本研究では、これらのモデルを検証することによって、RTA の立体選択性のメカニズムを明らかにすることを試みた。

まず、external aldimine 形成の段階で反応が止まる変異体において、反応できない S 体化合物 S-MBA と PLP から反応中間体である external aldimine が形成されることを見出した。このことにより、external aldimine を形成する段階では RTA の立体選択性が決定されないことが示唆された。次に、S-MBA と PLP から形成された external aldimine との複合体の結晶構造を決定することに成功した。既に述べた R-MBA と PLP で形成された external aldimine との複合体の結晶構造の場合には、R-MBA の C α 水素原子は Lys のアミノ基と近接していることが明らかとなったが、S-MBA と PLP で形成された external aldimine との複合体の結晶構造の場合には、S-MBA の C α 水素原子は Lys 残基の側鎖から距離が離れていることが明らかとなった。これらの変異体を用いた結晶構造情報により、R-MBA が結合した場合には C α 水素原子と Lys のアミノ基が近接しているために、Lys のアミノ基によって基質 MBA の C α 水素原子が引き抜かれる反応が起こりやすく external aldimine から先のステップへ反応が進み、一方で S-MBA が結合した場合には C α 水素原子と Lys のアミノ基の距離が離れすぎているためにこの反応が起こらないことが推測された。以上の推論は、RTA が有する高い立体選択性を説明するモデルとして十分な説得力を持つとともに、先に述べた 2 つの立体選択性のモデルのうち、後者が

RTA の場合に成立することを支持する。

総括

本研究では RTA の 9 種類の X 線結晶構造を決定し、また、各種変異体の機能解析を行ったことにより、基質認識機構および基質特異性・立体選択性を実現するメカニズムを明らかにした。また、先行研究において成功した酵素改変において RTA がどのような進化を遂げたのかを立体構造から明らかにすることに成功した。これらの成果は、現時点では生体触媒法を適用できないキラルアミン前駆体ケトンに対して高活性を示すような改変体 RTA の創出を、その立体選択性を失わずに成功させるための構造基盤であり、また、取得済みの有用酵素の立体選択性を高める研究にも寄与することが期待される。