

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 管 立軍

本論文は、キラルアミン生産に有用な ω -トランスアミナーゼ RTA の分子改変の基盤となる立体構造解析を目的とし、X線結晶構造解析によって基質、自殺基質との共結晶構造や変異体構造を決定したこと、および立体構造から明らかにした基質認識機構、基質特異性及び立体選択性の反応機構について述べている。本論文は4章からなる。

第1章序論では、キラルアミン及びキラルアミン合成方法に関するこれまでの先行研究についてまとめている。キラルアミンは、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。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 ω -アミン：ピルビン酸アミノ基転移酵素 (ω -TA) が注目されてきた。この酵素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 ω -TA 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 ω -TA 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。*R* 体選択的な ω -TA 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 *R* 体選択的な ω -TA (RTA と略す) はホモ二量体のピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性の酵素である。RTA は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 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し、さらに高温や有機溶媒への耐性を獲得させた。最終的に得られた変異体 (ATA-117-Rd11, 本研究で RTA^{Mut28}) 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。

第2章では、RTA の基質認識機構と基質特性を決定する構造基盤の解明について論じている。申請者は最高分解能 1.65Å で RTA の X 線結晶構造を決定し、世界で初めて *R* 体選択的な ω -TA の結晶構造を報告したことになる。結晶構造に基づく推定と変異による活性への影響について述べ、基質認識の構造基盤を論じた。具体的には、活性部位が二量体を形成する2分子の RTA から形成されていることを明らかにし、報告例の少ない反応中間体 *R*-external aldimine との複合体またアミノ基アクセプターであるピルビン酸とメトキシアセトンとの複合体の立体構造を決定し、基質結合部位を構成する大結合ポケットと小結合ポケットが基質特異性を決定していることを明らかにし、とくに Arg138 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。以上の成果は、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 の作製に役に立つと期待できる。

第 3 章では、先行研究における基質特異性改変のメカニズム解明について述べられている。申請者は先行研究において開発された改変体 ATA-117-Rd11 (RTA^{Mut28}) の結晶構造を決定し、RTA^{WT} 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を発見した。このループの構造の違いが 136 番目のアミノ酸残基のみによって決定されることを見出し、変異体 G136F の結晶構造および各種変異体の活性測定によってこのことを確かめた。そして、このループの構造の違いによって基質特異性の改変を説明することに成功した。この成果は、RTA においてこのループが基質選択性の改変、高機能化のための標的となり得ることを示した。

第 4 章では、RTA の立体選択性の解明について論じている。申請者は K188Q 変異体に対して反応できない *S* 体化合物 *S*-フェニルエチルアミン (MBA) と PLP から反応中間体である *S*-external aldimine が形成されることを見出し、*S*-external aldimine との複合体の結晶構造を決定することに成功した。その結果、*R*-external aldimine の場合には、*R*-MBA の C α 水素原子は 188 番目のアミノ基と近接していたが、*S*-external aldimine の場合には、*S*-MBA の C α 水素原子は 188 番目のアミノ酸残基の側鎖から距離が離れていた。そこで、*R*-MBA が結合した場合には C α 水素原子と Lys188 のアミノ基が近接するために、Lys188 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 Lys188 のアミノ基の距離が離れ過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。この成果は、酵素改変において立体選択性を失わせないために重要な情報であり、また、RTA ほど立体選択性が高くない *R* 体選択的 ω -TA の立体選択性を高める研究に寄与することが期待される。

以上、本研究は、RTA の基質認識機構、基質特異性及び立体選択性の反応機構の構造基盤を解明しただけでなく、RTA を用いた産業応用も見据えて研究を行っており学術上、応用上貢献するところ大であると考えられる。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。