

論文の内容の要旨

氏名：平戸 祐喜

博士の専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの酵素学的諸性質と結晶構造に関する研究

不斉炭素をもつ化合物（キラル化合物）の中で、ジアステレオマーどうしの物理化学的および生化学的性質は異なるが、エナンチオマー（光学異性体）どうしは物理化学的性質が同じである。しかし、医薬品などに用いられるキラル化合物の生物活性は立体構造に強く依存するため、高い光学純度が求められる。しかしながら、一般の有機化学合成の技術では、キラル化合物の光学分割や化学合成は困難である。純度の高いキラル化合物の生産には 2 種類の生物工学的方法が存在する。ひとつは立体選択性をもつ酵素によってキラル化合物を直接合成する方法、他方は化学合成によって生じたラセミ体を光学分割（立体選択的酵素分解）する方法である。これらキラル化合物の生産や分割や分析に関わる世界のキラル技術市場は拡大傾向にあり、2016 年には約 72 億ドルに達すると考えられている。

スレオニンはその α 位と β 位が不斉炭素であるため、4 つの立体異性体、D-スレオニン、L-スレオニン、D-*allo*-スレオニン、L-*allo*-スレオニンが存在する。スレオニンアルドラーゼ (TA) は、スレオニンなどの β -ヒドロキシ- α -アミノ酸と、グリシンと対応するアルデヒドとの相互変換を触媒する酵素であり、様々なキラル化合物の合成や β -ヒドロキシ- α -アミノ酸の光学分割が可能であるため、工業的なキラル化合物生産への応用が期待されている。TA は、基質の α 位の立体特異性によって L 体あるいは D 体特異的な酵素として分類される。L 型の酵素 (LTA) は、基質の β 位の立体特異性によって、L-スレオニンアルドラーゼ、L-*allo*-スレオニンアルドラーゼ、低特異性 L-スレオニンアルドラーゼに分類される。一方 D 型の酵素では、D-スレオニンと D-*allo*-スレオニンのどちらも基質とする低特異性 D-スレオニンアルドラーゼ (DTA) のみが知られており、D-スレオニンまたは D-*allo*-スレオニンを立体特異的に認識する酵素は現在まで見つかっていない。また、DTA の報告例は細菌由来酵素のみであり、その性質や構造の情報が乏しい。

本研究では、真核生物で初めての緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) 由来の DTA (CrDTA) を見出し、その酵素学的諸性質と立体構造を明らかにした。新奇な DTA の酵素学的諸性質と立体構造のデータは、TA の構造活性相関に関する多くの有益な情報を与え、工業的に有用な触媒機能や安定性をもつ酵素の創成につながると考えられる。本論文は、全五章より構成されている。各章の概要を以下に述べる。

第一章 序論

本研究の背景、意義と目的を記述した。まず、アミノ酸の光学異性体、TA の基質となるスレオニンの立体異性体、アミノ酸・タンパク質・酵素などの構造と生理・生化学的性質を紹介した。次に、DTA の補酵素であるピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) と PLP 酵素の基本的な結合および多様な反応と立体構造の関係について述べた。また、4 種類の TA の分類と概略的な立体構造の違い、分布や生理的役割など今まで報告されている事項についてまとめた。不斉炭素を創り出す DTA の工業的価値について述べるために、キラル化合物の生産にかかわる酵素の重要性と工業用酵素などに用いられているタンパク質工学の技術を紹介した。最後に、*C. reinhardtii* について説明し、本章で説明した事項を踏まえて研究の目的や意義について述べることで、本研究の位置づけを明確にした。

第二章 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの酵素学的諸性質

本章では、真核生物由来 DTA の発見とその酵素学的諸性質について記述した。申請者は *C. reinhardtii* のゲノムデータベースより、DTA と同じ fold-type III の PLP 酵素であるアラニンラセマーゼ様のドメインをもつ遺伝子を選択した。この遺伝子の発現とプロセッシング後の配列を確認するため、RNA を抽出し逆転写 PCR によって得られた DNA の配列を解析した。得られた遺伝子 (*dta*) は 1287 bp の長さであり、428 アミノ酸残基（推定分子質量 44,999 Da）のタンパク質をコードしていた。この遺伝子産物を発現するために大腸菌に対してコドン最適化した遺伝子 *dta'* をデザインし、大腸菌発現系を構築した。この遺伝子から発現したタンパク質は、アラニンラセマーゼ活性を示さず、DTA 活性を持っていた。また、*C. reinhardtii* の無細胞

抽出液中には DTA 活性が検出された。これらのことから *C. reinhardtii* は DTA の遺伝子を持つこと、また、それを発現していることが明らかになった。

組換え大腸菌から CrDTA を、硫酸アンモニウム分画と、DEAE-Sepharose と Mono Q カラムクロマトグラフィを用いて均一に精製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、CrDTA のサブユニットの分子質量が 45 kDa であることが分かった。これは、遺伝子情報から算出された分子質量 44,999 Da とよく一致していた。溶液中における分子質量を測定するためにゲルろ過クロマトグラフィに供した結果、CrDTA のピークはモノマー (45 kDa) あるいはダイマー (90 kDa) を示す位置ではなく、60 kDa を示す位置にシングルピークとして現れた。この結果は、CrDTA が溶液中ではモノマー・ダイマーの平衡状態で存在することを示唆するものである。

精製された CrDTA を用いて酵素学的諸性質を調べた。CrDTA の最適 pH は 8.4、最適温度は 70°C 以上であった。CrDTA は 50°C で 180 min のインキュベーションによっても高い活性を保ち、比較的熱に強い酵素であることが明らかになった。CrDTA は細菌由来 DTA と同じく PLP 酵素であり、二価の金属イオンを要求した。また、D-スレオニンおよび D-allo-スレオニンのどちらの基質に対しても活性を示し、グリシンとアセトアルデヒドを基質としたとき D-スレオニンおよび D-allo-スレオニンを生産し、その量比は 1.4 であった。さらに CrDTA は、SH 試薬の影響を受けない、D-スレオニンと D-allo-スレオニンに対する K_m 値や k_{cat} 値に差がある、細菌由来 DTA とのアミノ酸配列が大きく異なるなど、既報の DTA とは異なる特徴を持つことが明らかになった。

第三章 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの結晶化と X 線解析

本章では、CrDTA の結晶構造解析のために行われた、タンパク質結晶化とその予備的な X 線解析について記述した。CrDTA の結晶化にはハンギングドロップ蒸気拡散法を用いた。結晶化条件の初期スクリーニングによって、ポリエチレングリコール (PEG) およびアルコールを結晶化剤に用いたとき CrDTA の結晶が得られることを明らかにした。この条件をもとに結晶化条件を最適化し、最終的に PEG 1540、2-メチル-2,4-ペンタンジオールおよび $Mg(NO_3)_2$ を含むリザーバー溶液と CrDTA の競合阻害剤である DL-2,3 ジアミノプロピオン酸を添加剤として用いた結晶化条件で、X 線回折試験に適する単一の棒状結晶を得た。得られた結晶を X 線回折試験に供試したところ、結晶構造解析に適した回折データ (分解能 1.85 Å) が得られた。CrDTA 結晶における単位胞は空間群 $P1$ に属し、その中に 4 分子の CrDTA が存在した。

第四章 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの結晶構造解析

本章では、第三章で得られた X 線回折データを解析し、CrDTA の結晶構造を明らかにした。CrDTA の結晶構造は、細菌由来 DTA の結晶構造をモデルとして構造解析用プログラムによって解析された。CrDTA のそれぞれのサブユニットは、 β -ストランドドメインおよび fold-type III の PLP 酵素における典型的なドメイン構造であるトリオースリン酸イソメラーゼ (TIM) バレルドメインを構成要素としていた。CrDTA は TIM バレルドメインと他方のサブユニットの β -ストランドドメインが近接するヘッド-トゥ-テール配置のホモダイマー構造であった。CrDTA の活性中心は 2 つのサブユニットの境界面に対称に 2 個存在し、活性中心には補酵素 PLP や補因子である金属イオンとの結合部位が存在していた。酵素反応における重要な残基や反応機構を推定するために、基質である D 型スレオニンを *in silico* で活性部位へ組込んだ。その結果、D 型スレオニンの β -ヒドロキシ基は、活性部位の金属イオンおよびヒスチジン残基と相互作用すると予測され、ヒスチジン残基が触媒残基であると推測された。それらの構造モデルを基にして CrDTA の立体選択性と反応機構を推測した。

第五章 総括

本研究で得られた結果を要約し、本論文の総括とした。本論文では、真核生物では初めての例となる緑藻 *C. reinhardtii* 由来の DTA を発見し、その酵素学的諸性質と結晶構造を明らかにした。酵素学的諸性質では今までに報告されている細菌由来 DTA と同様に PLP と二価の金属イオンを要求した一方で、SH 試薬の影響を受けない、D-スレオニンと D-allo-スレオニンに対する K_m 値や k_{cat} 値に差があるなど、既報の DTA とは異なる特徴を持つことが明らかになった。結晶化とその X 線結晶構造解析の結果、CrDTA の立体構造が解明され、酵素学的諸性質と照らし合わせるにより構造活性相関の情報が得られた。また、基質複合体モデルを基にして、CrDTA の立体選択性と反応機構について考察した。これらの知見は、任意の基質特異性と立体選択性を有する DTA (例: 100% の純度で D-スレオニンを合成する DTA) を自在にデザインする道を開くものであり、キラル化合物産業の発展につながるものと考えられる。