

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 榎 泰 典

（副査） 教授 青 柳 隆 夫

短期大学部教授 西 村 克 史

申請者の研究課題は、生体触媒である酵素の性質と構造との相関を研究するものであり、キラル合成に用いる酵素をデザインする道を開くものである。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。

申請者が選択した酵素スレオニアルドラーゼ（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への応用が可能であるため、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。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。

上記のような状況の下、申請者は、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。

申請論文各章の概要を以下に示す。

第一章 序論

本章では、研究の背景、意義と目的が述べられている。

まず、アミノ酸の光学異性体、アミノ酸・タンパク質・酵素などの構造と生理・生化学的性質が紹介されている。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が述べられている。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がまとめられ、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が紹介された。最後に、*C. reinhardtii*の説明と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の記述により、本研究の位置づけが明確にされた。

第二章 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来D-スレオニ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されている。

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された遺伝子 *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。

申請者は, 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 カラムを用いて均一に精製した。SDS-PAGE 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ーに供した結果, 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。精製された CrDTA を用いて酵素学的諸性質が調べられた。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された。

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 線解析について述べられている。

申請者は, ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて, CrDTA の結晶化を行った。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な棒状結晶を得た。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 が存在することを明らかにした。

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 線回折データの解析と得られた CrDTA の結晶構造が記述されている。

申請者は, CrDTA の結晶構造を細菌由来 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した。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。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が推測された。

第五章 総括

本章で申請者は, 得られた結果を要約し, 本研究の意義と今後の展望を述べている。

以上のように申請者は, 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。また, CrDTA が SH 試薬の影響を受けない, 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を明らかにした。さらに, 結晶化とその

X線結晶構造解析により，CrDTAの立体構造を解明し，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を導き出した。これらの結果を基に，基質複合体モデルが構築され，CrDTAの立体選択性と反応機構が考察された。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大きく貢献するものと考えられる。

このことは，本論文の提出者が自立して研究活動を行い，又はその他の高度な専門的業務に従事するに必要な能力及びその基礎となる豊かな学識を有していることを示すものである。

よって本論文は，博士（工学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成29年2月16日