

学位論文内容の要旨

報告番号	先端科学技術甲第 179 号	氏名	加藤 雄己
論文題目	N-アセチル-(R)- β -フェニルアラニンアシラーゼの構造機能相関解析		

β アミノ酸は、抗生物質や酵素阻害剤など、生理活性物質に存在する物質である。 β アミノ酸の中でも enantio-pure な β -フェニルアラニン(β -Phe)は医薬品の合成に重要な物質である。その中でも R 体の β -Phe は Paclitaxel の合成に重要な中間体である。 β -Phe のエナンチオマー分離法として、これまでにいくつかの酵素法が報告されている。著者は、これまでに報告されている酵素法とは別のプロセスで R 体の β -Phe を生産し、尚且つ低環境負荷な方法で β -Phe を生成する酵素法およびその反応を触媒する酵素を探索した。その結果、アミノ基をアセチル化したラセミ体の β -Phe(*N*-Ac-(*R,S*)- β -Phe)を R 体特異的に加水分解し、(*R*)- β -Phe を生成する酵素(*R*)- β -Phe アミノアシラーゼ((*R*)- β -FAA)を用いた酵素法に着目した。これまでに、(*R*)- β -FAA を生産する微生物として *Burkholderia* sp. AJ110349 および *Variovorax* sp. AJ110348 が単離され、(*R*)- β -FAA をコードする遺伝子領域がクローニングされた。また、野生型(*R*)- β -FAA を用いて特性解析が行われ、本酵素が優れた反応性を示すことが明らかにされた。単離された両微生物由来(*R*)- β -FAA と相同なアミノ酸配列を有する *Alcaligenes* sp. KUFA-1 や *Paracoccus* sp. strain DMF 由来 *N,N*-dimethylformamidase と比較したところ、認識する基質が異なるものの、類似した一次構造を持つことや両酵素とも加水分解反応を触媒することから、類似するフォールドを持っていることが想定された。以上のことから著者は、*Burkholderia* sp. および *Variovorax* sp. 由来(*R*)- β -FAA の構造情報を得ることや生化学的機能解析から特性を明らかにすることを目的として研究を開始した。*Burkholderia* sp. および *Variovorax* sp. 由来(*R*)- β -FAA の組換え発現および精製をし、結晶化を行った。*Burkholderia* 酵素の結晶構造解析に成功した。*Variovorax* 酵素については単粒子解析で全体構造を明らかにした。得られた構造は想定通り相同タンパク質と類似したフォールドをとっていた。また、生化学的機能解析から *Burkholderia* sp. および *Variovorax* sp. 由来(*R*)- β -FAA が高いエナンチオ選択性、耐熱性を有しており、高性能で非常に魅力的な酵素であることがわかった。

論文は、序論、第 1 章～第 6 章の 7 部構成になっている。

序論は、 β -Phe の有用性やこれまでに報告されている酵素法に触れた上で、筆者がどのような経緯で研究を開始したのかについて述べている。さらに、本研究で取り扱っている酵素(*R*)- β -FAA について、筆者が本学で研究を開始する以前までに行われていた研究からわかっていることや当時の研究課題を述べた。最後にそれらを踏まえて設定した本研究の目的について述べている。

第一章は、*Burkholderia* sp. および *Variovorax* sp. 由来(*R*)- β -FAA の組換え発現、精製について述べている。両微生物由来酵素の遺伝子をクローニングし、Cold shock システムを利用できる発現プラス

ミドを構築した。発現プラスミドはアミノ末端およびカルボキシ末端に His-tag が融合した酵素、Tagfree 型酵素が発現するように設計した。発現系は、低温での温度制御と IPTG 誘導を組み合わせることで目的タンパク質を高発現させた。精製では、数種類のカラムクロマトグラフィー精製を組み合わせることで高純度な精製試料を得ることに成功した。*Burkholderia* 酵素については、セレノメチオニン置換酵素の発現、精製も行った。また、両酵素の分子量分析を行い、溶液中では二量体であることを明らかにした。

第二章は、*Burkholderia* sp. および *Variovorax* sp. 由来 (R)- β -FAA の結晶化、X 線結晶構造解析について述べている。精製した試料を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。結晶化溶液に含まれる沈澱剤の濃度、緩衝液の種類や pH、添加剤の濃度、精製試料の濃度を細かく変更して結晶化溶液条件を最適化し、良質な結晶を得ることに成功した。得られた結晶を用いて X 線回折実験を行った。まず、セレノメチオニン置換 *Burkholderia* 結晶で回折データを収集し、セレンの異常散乱を用いた単波長異常分散法で初期位相を決定し、初期モデルを構築した。次に Native 結晶の回折データを収集し、セレノメチオニン置換 *Burkholderia* 酵素の分子モデルをもとに、分子置換法で結晶構造を決定した。*Burkholderia* 酵素の結晶は、正方晶系に属し、空間群 $P4_12_12$ 、unit cell 長が $a=b=112 \text{ \AA}$ 、 $c=341 \text{ \AA}$ であることがわかった。また、*Burkholderia* 酵素は 3 つのドメインからなる 2 量体を形成していることがわかった。*Variovorax* 酵素については、結晶化に成功し、回折データを収集したところ結晶が双晶であり構造解析を断念した。

第三章は、*Variovorax* sp. 由来 (R)- β -FAA のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析について述べている。*Variovorax* 酵素については結晶構造解析には失敗したものの、純度の高い精製試料が得られていたため単粒子解析を試みた。KEK でイメージデータを収集し、得られたイメージから 890,844 粒子をピックアップして 3 次元再構成した。その結果、 3.26 \AA 分解能のマップが得られた。得られたマップを用いて *Variovorax* 酵素の初期モデルを構築した。*Variovorax* 酵素は $C2$ 対称性であり、2 量体を形成していることがわかった。

第四章は、*Burkholderia* sp. および *Variovorax* sp. 由来 (R)- β -FAA の基本構造について述べている。両酵素ともに 3 つのドメインからなる 2 量体を形成していた。構造精密化が進んでいた *Burkholderia* 酵素の結晶構造について、相同タンパク質である *paracoccus* sp. 由来 *N,N*-Dimethylformamidase の Large subunit と構造を比較したところ、各ドメインにおいて類似したフォールドをとっていることがわかった。

第五章は、*Burkholderia* sp. および *Variovorax* sp. 由来 (R)- β -FAA の生化学解析について述べている。精製試料を用いて、酵素反応時の至適 pH や至適反応温度、耐熱性、エナンチオ選択性を解析した。その結果、両酵素ともに高い耐熱性、エナンチオ選択性を有していた。また、酵素学的パラメーターを算出したところ、非常に高性能な酵素であることがわかった。

第六章は、本研究の総括を述べている。*Burkholderia* sp. および *Variovorax* sp. 由来 ((R)- β -FAA の立体構造を明らかにした。また、生化学解析から本酵素が高いエナンチオ選択性を有し、高性能な酵素であることを明らかにした。