

(様式 5)

指導教員 承認印	
-------------	--

平成 28 年 3 月 31 日

学位（博士）論文の和文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学専攻 平成 23 年度入学 学籍番号 11831304 氏名 渡辺 文昭 印
主指導教員 氏 名	養王田 正文 教授
論 文 題 目	<i>Corynebacterium</i> sp. N-1074 由来 Halohydrin hydrogen-halide-lyase の構造と機能に関する研究
<p>論文要旨（2000 字程度）</p> <p>Halohydrin hydrogen-halide-lyase (H-Lyase) は、ハロアルコールからエポキシドを生成する脱ハロゲン反応と、エポキシ開環反応を触媒するユニークな酵素であり、得られる光学活性エポキシドやヒドロキシニトリルは、医薬中間体原料やサプリメントの原料として有用な化合物である。H-Lyase は光学選択性の異なる 3 種のアイソザイムが存在し、アミノ酸配列を基に 3 つのグループ（グループ A、グループ B、グループ C）に分類される。この中で、グループ A に属する HheA_{AD2} と、グループ C に属する HheC の立体構造は決定され、反応機構や基質の結合様式について報告されているが、グループ B 酵素は立体構造が決定されてない。光学活性 R-CHBN ((<i>R</i>)-4-Chloro-3-Hydroxybutyronitrile) は医薬中間体やサプリメント原料として有用な化合物であり、<i>Corynebacterium</i> sp. N-1074 の有する H-Lyase (HheB) を用い、プロキラルな化合物 DCP (1,3-Dichloro-2-propanol) から 90%e. e. の光学純度で合成することができる。</p> <p>本学位論文の目的は、<i>Corynebacterium</i> sp. N-1074 の持つ H-Lyase の立体構造を決定し、光学選択性決定のメカニズムを解明すると共に、産業利用に資する触媒 (HheB 変異酵素) を創出することである。</p> <p>第 1 章「序論」では、H-Lyase に関する情報について概説し、本研究の目的を述べた。</p> <p>第 2 章「HheA、HheB 及び基質アナログ複合体の構造解析」では、<i>Corynebacterium</i> sp. N-1074 由来 HheA、HheB の X 線結晶構造解析の結果について述べた。HheB はグループ B 酵素として初めての構造解析である。HheB はホモテトラマー構造を形成し、全体構造は HheA や HheC とよく似ているが、活性部位を形成する残基で HheB のみ異なる箇所が数か所見られた。また、活性中心トンネルの大きさを比較すると、光学選択性の低い HheA はトンネル</p>	

半径が大きく、光学選択性の高い HheB、HheC は活性中心近傍で狭くなっていた。以上の結果から、HheB の活性中心トンネルで最も狭い場所に位置する残基 (F71) を変えることで、光学選択性が変化すると考えた。さらに、グルーブ B 酵素で光学選択性の低い HheB_{GPI} との比較から、活性中心近傍の 2 残基 (A120、Q125) は光学選択性へ関与する可能性があると考えた。

次に基質アナログである 1,3-Dicyano-2-propanol と HheB の複合体の結晶構造を決定し、基質認識に関連する残基を特定した。その結果、基質の結合様式は R 体生成に合理的な結合様式であること、125 番目のグルタミンは基質結合時に立体衝突を避けるように側鎖が反転することが明らかとなった。以上の結果から、HheB の光学選択性は DCP の結合様式により決定されると推定し、光学選択性に関与するアミノ酸残基として 71 番目と 125 番目の 2 箇所を選抜した。

第 3 章「HheB 変異酵素の作製と性能評価」では、HheB 変異酵素の光学選択性について述べた。立体構造情報から選んだ 2 箇所の残基 (71 番目と 125 番目) について複数のアミノ酸置換体を作製し、性能を評価した。その結果、71 番目のフェニルアラニンはトリプトファン、ロイシン、メチオンへの置換で、125 番目のグルタミンは、セリン、スレオニン、チロシン、システインへの置換で R-CHBN 光学純度は向上した。これら変異酵素の多くは脱クロル活性が低下したが、125 番目のスレオニン置換体 (Q125T) は脱クロル活性を維持していた。

一方、HheB を使用した R-CHBN 工業生産において、触媒生産性を高める事も課題の一つであり、生成物による反応阻害の解除に取り組んだ。簡便に脱ハロゲン活性を評価できる高速スクリーニング系を構築し、2000 株のランダム変異ライブラリーの中から R-CHBN 存在下の反応速度が高い変異株を 6 株選抜した。これらの中で、halide binding site 近傍に位置する Asp199His (D199H) は R-CHBN 反応阻害の低減に加え、脱ハロゲン活性、R-CHBN 光学純度が向上するという特徴を有していた。

更なる光学選択性向上を目的に、71 番目、125 番目、199 番目の変異複合化を検討し、最終的に、脱ハロゲン活性は 1/3 に低下するもの、R-CHBN 光学純度が 98.5e. e. に達する 3 重変異酵素 HheB_{F71W/T125T/D199H} を得た。

第 4 章「HheB 変異酵素の構造解析」では、光学選択性が最も高い 3 重変異酵素 HheB_{F71W/T125T/D199H} の構造解析結果について述べた。得られた立体構造において、F71W と Q125T は活性中心ポケットの構造を変化させ、R 体基質の結合に有利なポケット形成に寄与していると推定した。Halide binding site 近傍の D199H は、基質と直接コンタクトしない場所に位置しており、光学選択性向上や脱ハロゲン活性向上との関連について考察することは困難であった。一方、生化学的実験データから、D199H は halide binding site の CN に対する親和性が変化し、エポキシ開環反応の反応速度が向上していると推定した。

第 5 章「結論」では、得られた結果に基づいて結論を述べるとともに、総合考察を行った。