

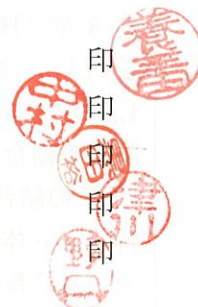
(様式 11)

平成 28 年 2 月 17 日

学 位 論 文 審 査 要 旨 (課程博士)

東京農工大学大学院工学府長 殿

審査委員 主査 養王田 正文
副査 中村 暢文
副査 黒田 裕
副査 津川 若子
副査 野口 恵一



学位申請者	生命工学専攻 平成 23 年度入学 学籍番号 11831304
	氏 名 渡辺 文昭
申請学位	博 士 (工学)
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 Structure and mechanism of Halohydrin hydrogen-halide-lyase from <i>Corynebacterium</i> sp. N-1074
論文審査要旨 (2000 字程度)	
<p>本学位論文は、Halohydrin hydrogen-halide-lyase (H-Lyase) の構造と機能に関する研究をまとめたものである。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酵素であり、医薬中間体原料やサプリメントの原料として有用な光学活性エポキシドやヒドロキシニトリルの生産に利用できることから工業的に注目されている。H-Lyase は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、基質特異性や光学選択性が異なる。申請者らは、<i>Corynebacterium</i> sp. N-1074 が生産する 2 種類の H-Lyase (HheA と HheB) について研究を行い、構造解析などにより光学選択機構の解明と工業的に重要な高い光学選択性を有する変異体の構築を行っている。</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ている。</p> <p>第 2 章「HheA、HheB の構造解析」では、<i>Corynebacterium</i> sp. N-1074 由来 HheA、HheB の X 線結晶構造解析を行っている。HheA は既に構造が報告されている HheA_{AD2} とほぼ同じ構造であった。一方、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</p>	

(様式 11)

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、グループ B 酵素で光学選択性の低い HheB_{GP1} 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られている。

第 3 章「HheB 基質アナログ複合体の構造解析」では、基質アナログ複合体の構造解析を行い、選択性に関与する残基について考察している。基質アナログとして 1,3-Dicyano-2-propanol を使用し、HheB との複合体の結晶構造を決定した。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された。また、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。さらに、HheC での基質複合体の構造を HheB に当てはめた時、71 番目の残基と立体衝突を起こした。以上の結果や第 2 章での考察から、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 箇所を選抜している。

第 4 章「HheB 変異酵素の作製と性能評価」では、HheB 変異酵素の脱ハロゲン活性と光学選択性の結果について述べている。立体構造情報から特定した 2 箇所の残基 (71 番目と 125 番目) について全てのアミノ酸置換体を作製し、性能を評価している。その結果、71 番目は Trp、Leu、Met への置換で、125 番目は、Ser、Thr、Tyr、Cys への置換で R-CHBN 光学純度は向上した。これら多くの変異酵素は脱クロル活性が低下したが、125 番目の Thr 置換体 (Q125T) は野生株と同等の脱クロル活性を維持していた。また、触媒生産性改善の目的で、生成物による反応阻害が解除された変異酵素のスクリーニングを行った。簡便に脱ハロゲン活性を判別できる高速スクリーニング系を構築し、約 20,000 株の中から 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 の近傍に位置する 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 番目の変異複合体を検討し、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} を得ている。

第 5 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。一方、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、光学選択性向上との関連について考察することは困難であったが、CN に対する親和性が向上し、エポキシ開環反応の反応速度が向上していると推定している。

第 6 章「まとめと今後の展望」では、得られた結果に基づいて結論を述べるとともに、総合考察を行っている。

以上の成果は、工業的に重要な酵素の光学選択機構を X 線結晶構造から詳細に解明したものであり、博士学位論文として十分高いレベルのものであると評価した。