［別紙２］

論文審査の結果の要旨

申請者氏名　全　昭映

本論文は、クメン（イソプロピルベンゼン）分解系の一連の酵素群の中で、第四段階の加水分解反応を触媒する酵素（CumD）の変異体の、機能と構造について検討したもので、全三章から構成されている。

第一章は序論であって、環境汚染を引き起こす芳香族炭化水素を分解する微生物のうち、とくにクメンを唯一の炭素源として生育することができる *Pseudomonas fluorescens* IP01株のクメン分解系酵素群の特徴が述べられている。本菌株はクメン以外にトルエンやベンゼンなどの単環芳香族化合物で生育出来るのに対して、ビフェニルのような複環芳香族化合物では生育できない。これは、クメン分解経路の第四段階の酵素であるCumDの基質特異性による。CumDは、単環芳香族化合物由来のメタ開裂物質である6-イソプロピルHODAや、6-エチルHODA、6-メチルHODAをのC-C結合を加水分解出来るのに対して、ビフェニル由来のメタ開裂物質である6-フェニルHODAを分解できない。CumDは、このように、高い基質特異性を示す。

第二章では、CumDの基質結合ポケットに関わるアミノ酸残基を置換した変異体を作成し、その基質特異性などの機能を解析している。CumDについては、活性のないS103A変異体の立体構造が既に明らかになっており、その基質結合ポケットの形成に関わる残基が同定されている。CumDの基質特異性を改変することを目指して、これらの、基質結合ポケット形成残基を中心に、BphD（ビフェニル分解系の加水分解酵素）やTodF（トルエン分解系の加水分解酵素）などを参考に、変異体を作成し、４種類の6-HODA基質（6-イソプロピルHODA、6-エチルHODA、6-メチルHODA、6-フェニルHODA）に対する、変異体のk_{cat}、K_mを決定した。CumDの変異体の中で、基質の横の位置を占めるA129V、I199V、V227Iの変異体は野生型CumDに比べて、単環芳香族由来基質に対するk_{cat}/K_mの値が4-10倍に上がった。k_{cat}/K_mの高い順に基質を並べると、6-エチルHODA > 6-メチルHODA > 6-イソプロピルHODA >> 6-フェニルHODAとなっていた。これら三つの残基は、CumDとTodF（*Pseudomonas putida* F1由来）との比較で、基質側鎖結合ポケット構成残基の中で相違している残基であり、CumDに対応するTodFのアミノ酸残基へと変換したものである。得られた変異体は、野生型CumDより高いk_{cat}/K_mを示しただけでなく、TodFと比較しても6-エチルHODAを基質とした場合2-5倍、6-メチルHODAを基質とした場合4-10倍のk_{cat}/K_mを示した。TodFは6-イソプロピルHODAを殆ど分解しない。以上のことから、A129、I199、V227の三残基を置換することによって、野生型CumDやTodFよりも触媒効率のすぐれた、基質特異性の広い変異体が得られることがわかった。

第三章では、野生型CumDよりも高いk_{cat}/K_mを示した変異体のうち、A129Vを用いて、X線結晶構造解析を行い、活性中心の原子配置や、酵素の反応機構について解析している。従来野生型CumDでは結晶化が困難であったが、A129V変異体は良好な結晶を生じ、そのX

線回折像から、分解能1.65Åで、R=17.3%、R_{free}=19.1%まで精密化された構造を得た。A129V変異体の構造は、これまでに得られたS103A変異体と、全体的に良く似た構造を取っていた。A129V変異体の構造は、非対称単位中にCumD分子(Asn3-Ala273)が1サブユニット、水が372分子と、リガンド原子（塩素イオンx1＋リン酸イオンx2）が11個入っていた。サブユニットの界面に、リン酸と思われる形状の電子密度ピークが、2ヶ所で観測された。リン酸の付近には、アルギニン残基などが存在していた。これらのリン酸分子は活性中心から遠く離れており、活性に与える影響は少ないと考えられる。また、活性中心Ser103付近には、水より大きい単原子分子のものと見られる電子密度ピークが見られた。結晶化溶液中の組成から、この原子を塩素イオンと判断して精密化した。この原子を水として精密化した場合の温度因子は1.0 Å^{2}以下になったが、これを塩素イオンとした場合には、12.05 Å^{2}と通常の範囲内の値になった。塩素イオンは、Ser103とSer34の側鎖、107番目の水分子、Phe104とSer34の主鎖のN原子と3.3 Å以内にあり、これらの原子が配位していると考えられる。活性中心Ser103と変異させた残基であるVal129の側鎖の電子密度はいずれも明瞭に観測された。これまで、CumDの結晶構造は全てS103A変異体で解かれていたために、今回得られたA129V変異体は、初めての活性型の酵素の構造である。これにより、活性中心Serの側鎖のOγ原子の位置を決定することができた。Ser103のOγ原子は、SerとともにCatalytic triadを形成しているHis252のNε2原子と3.2 Åの弱い水素結合を形成していた。

CumDの類似酵素である大腸菌由来のMhpCで提唱されている反応機構を参照すると、Ser103のヒドロキシル原子は、水分子から水素原子を引き抜くと考えられており、His252との水素結合がその反応を助けていると考えられる。さらに、A129V変異体の結晶構造中には、Ser103の付近に塩素イオンが結合していた。提唱されている反応機構では、基質はいったんオキシアニオン中間体を取り、これを安定化するオキシアニオンホールが存在すると考えられる。今回の立体構造では、塩素イオンが結合するサイトがオキシアニオンホールに相当すると考えられる。このサイトは、Phe104、Ser34の主鎖のN原子によって静電的に安定化されていると考えられる。また、CumDのS34AおよびS34G変異体ではk_{cat}が大幅に低下した。これは、Ser34の側鎖のオキシアニオン中間体への配位も、その安定化に関わっていることを示唆するものである。

以上本論文は、クメン分解系加水分解酵素CumDの変異体の機能や、構造の解析を通して、CumDの基質特異性、立体構造、反応機構などを論じたものであって、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。