

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山村 昭裕

本論文は、D-パントイルラクトン合成酵素 CPR-C1 および CPR-C2 の X 線結晶構造解析と、得られた X 線結晶構造に基づいた変異体作製および活性測定の結果について述べている。CPR-C1 と CPR-C2 は、*Candida parapsilosis* IFO 0708 に由来する、NADPH 依存的にケトパントイルラクトン (KPL) を立体選択的に還元して D-パントイルラクトン (D-PL) を産生する反応を触媒する酵素である。本研究では CPR-C1 と CPR-C2 の構造生物学的解析、生化学的解析を行い、両酵素の NADPH 依存性機構、KPL の立体選択的還元機構を明らかにし、両酵素の工業応用に向けた展望を示している。本論文は 5 章からなる。

第 1 章では、まずキラル化合物の有用性について説明し、酵素法を用いたキラル化合物の不斉合成技術を紹介している。次に、CPR-C1 と CPR-C2 に関する現在までの知見を説明している。CPR-C1 と CPR-C2 はそれぞれ 304 および 307 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、AKR スーパーファミリーのファミリー 3C に属する。両酵素は NADPH 依存的に KPL を立体選択的に還元して D-PL を産生する反応を触媒する酵素であるため、両酵素を用いた D-PL の工業的生産が期待される。D-PL の有用性と D-PL 生産の現状を説明したうえで、両酵素を用いた D-PL の工業的生産への課題、すなわち NADH を利用可能な酵素へと改変する必要性が説明されている。

第 2 章、第 3 章では、apo 型、NADPH 結合型 CPR-C2 および NADPH 結合型 CPR-C1 の X 線結晶構造解析について記述されている。構造解析の結果、CPR-C1 と CPR-C2 が他の AKR スーパーファミリーと同様の TIM バレル構造を有していること、NADPH 結合に伴い CPR-C2 の立体構造が変化することが見出された。この構造変化には、CPR-C2 の Thr27 と Lys28 が関与していることが示唆された。これらの残基は CPR-C1 の Thr25、Lys26 に相当する。また、NADPH のアデノシンに結合した 2'-リン酸基は CPR-C1 では Lys26、Lys261、Arg264、CPR-C2 では Lys28、Lys264、Arg267 により認識されており、これが NADPH 依存性の要因であることが示唆された。CPR-C1 では Asp55、Tyr60、Lys85、His125、CPR-C2 では Asp58、Tyr63、Lys88、His125 が catalytic tetrad を形成していた。ラット肝臓由来 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase (3- α -HSD) の基質テストステロンとの複合体構造と構造を重ね合わせることより、基質 KPL の CPR-C1 および CPR-C2 への結合様式が予測された。その結果、KPL において還元される 3 位のカルボニル基は catalytic tetrad を形成している Tyr60/63、His125/125 と水素結合可能な位置に、2 位のカルボニル基は Thr25/27 の主鎖の N と水素結合可能な位置に存在することが示唆された。また、KPL 認識にはこれら以外に CPR-C1 では Phe28、Arg30、Phe126、Phe296、CPR-C2 では Lys30、

Phe299、Phe300 が関わっていることが示唆された。

第4章では、第2章、第3章で得られた構造情報に基づき NADPH のアデノシンに結合した 2'-リン酸基の認識に関わるアミノ酸残基と、基質結合に関わるアミノ酸残基を選定し、それらのアラニン置換と活性測定の結果について述べている。まず、CPR-C1 および CPR-C2 において catalytic tetrad であると考えられた残基 (CPR-C1 の Asp55、Tyr60、Lys85、His125、CPR-C2 の Asp58、Tyr63、Lys88、His125) をアラニン置換することによる大幅な活性低下を確認し、これらの残基が触媒残基として働くことを確認している。次に NADPH のアデノシンの 2'-リン酸基近傍に位置するアミノ酸残基 (CPR-C1 の Lys26、Lys261、Arg264、CPR-C2 の Lys28、Lys264、Arg267) をアラニン置換し、それぞれの NADPH 依存性への寄与について考察している。また、基質結合に関わる残基 (CPR-C1 の Thr25、Phe28、Arg30、Phe126、Phe296、CPR-C2 の Thr27、Lys30、Phe299、Phe300) をアラニン置換し、それぞれの活性への寄与を考察している。この結果、CPR-C1 の R30A、F126A 変異体が野生型酵素よりも高い比活性を有することが示されている。

第5章では、CPR-C1 と CPR-C2 の X 線結晶構造解析と変異体の活性測定の結果について総合考察が述べられている。まず CPR-C2 が NADPH 結合に伴い構造変化することを示し、その意義を考察している。また、CPR-C1 と CPR-C2 の構造比較を行い、両酵素の共通点と異なる点が示されている。両酵素に共通した KPL 認識機構より、両酵素の KPL の立体選択的還元機構が明らかになり、それに大きく寄与する GXGTX モチーフを提唱している。また、両酵素と NADH を利用可能な *Candida tenuis* 由来キシロース還元酵素との比較から、CPR-C1 と CPR-C2 の NADPH 依存性に関わる構造要因が明らかになった。その結果を踏まえ、NADH を利用可能な CPR-C1、CPR-C2 改変体の創製が試みられている。現在までに十分な活性を有する変異酵素は得られていないものの、今後さらなる高活性化に向けた展望を示している。

以上、本研究は CPR-C1 および CPR-C2 の構造と機能の相関を明らかにしただけでなく、両酵素を用いた D-PL 生産という工業応用も見据えて行っており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して判断した。