

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 堀田 彰一郎

本論文は、基質特異性の異なる 2 種類の旧黄色酵素 CYE と TYE の X 線結晶構造解析、ならびに得られた結晶構造に基づいて作製された変異体の活性測定の結果について述べている。CYE と TYE はそれぞれ、*Candida macedoniensis* AKU4588 と *Pichia* sp. AKU4542 に由来する NADPH 依存性の脱水素酵素であり、エノン化合物を立体選択的に不斉還元する。本研究では、2 種類の旧黄色酵素 CYE と TYE の構造生物学的解析と生化学的解析を行った結果、基質選択性と触媒効率に関するループ領域を明らかにし、両酵素の工業的応用に向けた展望を示している。本論文は 7 章からなる。

第 1 章は序論で、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、CYE と TYE に関する現在までの知見を説明している。CYE と TYE はそれぞれ 403 および 405 アミノ酸残基から成り、KIP から(4*R*,6*R*)-actinol を合成する過程で単離された酵素である。KIP から(4*R*,6*R*)-actinol のワンポット合成において、CYE を用いた場合、反応中間産物である(4*S*)-phorenol がある一定の割合で蓄積するが、TYE を用いた場合、(4*S*)-phorenol が蓄積しないことから、CYE と TYE の基質特異性の違いについて述べている。CYE と TYE の基質特異性の違いが、KIP から(4*R*,6*R*)-actinol の合成にどのような影響を与えるのかを説明した上で、基質特異性の異なる 2 種類の旧黄色酵素の構造基盤解明の重要性が説明されている。

第 2 章から第 4 章では、CYE と CYE-*p*-HBA の X 線結晶構造解析および構造比較について述べられている。構造比較の結果、Loop 6 とよばれるループ領域において大きな構造変化があることが述べられており、Loop 6 が運動性を有した活性部位の蓋として働くことを記述している。次に、論文中では、CYE-*p*-HBA 複合体構造から CYE-(4*S*)-phorenol の構造モデルを構築している。その結果、(4*S*)-phorenol のジメチル基が Pro²⁹⁵、Phe²⁹⁶ 残基と近接することを示し、Pro²⁹⁵ 残基を Gly²⁹⁵ 残基に置換することによって、KIP への活性を 2.4 倍、(4*S*)-phorenol に対する活性を 190 倍上昇させることに成功したことを述べている。Pro²⁹⁵ 残基を Gly²⁹⁵ 残基に置換することにより活性が上昇した要因として、Loop 6 が活性部位の蓋として働き、還元反応が進行するための適した閉構造をとることで酵素活性が上昇することを示唆している。また活性部位の蓋が失われた場合、酵素活性に対する影響を検証するため、Loop 6 を欠損させた変異体の作製を試みている。その結果、Loop 6 を欠損させ閉構造を取れなくしたような変異体であってもある程度の活性は保持されることを述べている。第 2 章から第 4 章の解析を総括すると、Loop 6 が閉構造をとれなくても反応は進行するが、Loop 6 が閉構造をとることによって、より効率的に反応が進むことを示唆している。

第5章から第6章では、TYEのX線結晶構造解析およびCYEとTYEの構造比較について述べられている。CYEとTYEの異なる基質特異性の構造基盤を解明するため、CYEとTYEの結晶構造からLoop6を置換して活性測定を行いTYEのLoop6の役割について考察するという戦略をとっている。その結果、KIPへの活性を3.0倍、(4S)-phorenolに対する活性を300倍上昇させることに成功しており、TYEにおいてもLoop6が酵素活性に非常に重要な役割を果たしていることを示している。また、CYEとTYEの活性部位の比較からLoop5に存在するPhe残基の位置が異なっており、この位置の違いが酵素活性に影響を与えていることを示している。

第7章では、CYEとTYE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、CYEとTYEの異なる基質特異性を有する構造基盤の解明によって、Loop5とLoop6が重要であること述べている。その結果を踏まえ、Loop5やLoop6に注目し改変体の創製を試みている。現在までにTYEを超える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CYEとTYEの異なる基質特異性を有する構造基盤を解明しただけでなく、両酵素を用いた工業応用も見据えて研究を行っており学術上、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判断した。