



$\alpha$ -KG の 5-カルボキシル基はこれまで報告されているジオキシゲナーゼとは異なる残基 (Tyr143, Arg141, Arg255, Thr257) により認識されているも示している。

第 3 章では、基質結合に関わるアミノ酸残基の結晶構造に基づく推定と各種変異による活性への影響について述べ、基質認識の構造基盤を論じている。また、この構造基盤に基づいて基質選択性を拡大した改変酵素の取得についても示している。申請者は第二基質である *N*-スクシニル-L-ロイシン等やそれらの生成物との複合体構造を取得できなかったが、SadA.Zn(II). $\alpha$ -KG 複合体の構造に基づいて *N*-スクシニル-L-ロイシンと *N*-スクシニル-L-フェニルアラニンの結合モデルを構築し、基質の認識に重要な構造基盤の推定を試みた。MOE ドッキングシミュレーションより基質の結合部位を予測し、基質結合に関わる残基として Thr77, Gly79, Arg83, Arg163, Arg203, Phe261 等を推定した。これら残基の変異体の活性測定により、基質特異性への影響を検証した。*N*-スクシニル-L-ロイシンに対する各変異体の活性は野生型 SadA と比較して 5~78%程度に低下していた。一方、T77S 変異体については活性が野生型 SadA と同程度であった。これらの結果は、SadA の Arg83, Arg163, Arg203 が基質の *N*-スクシニル部分のカルボキシル基を結合することで、3 位の炭素原子が亜鉛イオンと近接することを示唆していた。また、Gly79 及び Phe261 がロイシン部分のイソブチル基を認識し、Thr77 が基質のロイシン部分のカルボキシル基を認識して基質特異性を規定していることが示唆された。*N*-スクシニル-L-フェニルアラニンに対しても同様の結果が得られ、申請者は最終的に基質結合モデルを構築することに成功した。さらに、このモデルを SadA の基質特異性を拡大するための分子改変に応用した。その結果、産業上有用なある種の *N*-スクシニル-アミノ酸に対して、高い活性を示す変異酵素を取得することに成功した。この結果に基づいて、産業上有用な水酸化アミノ酸を合成する実用化酵素の取得が期待される。

以上のように、本研究で得られた知見は、学術上、応用上貢献するところ大であると考えられる。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。