

学位論文審査の結果の要旨

| | | | | |
|---------|---|--------|------|---------------------|
| 報告番号 | 先端科学技術 | 号 | 氏名 | 加藤 雄己 |
| 論文題目 | N-アセチル-(R)- β -フェニルアラニンアシラーゼの構造機能相関解析 | | | |
| 論文審査委員会 | 委員 (主査) D○合 | 松田 七美男 | 特定教授 | (物質生命理工学専攻) |
| | 委員 (副査) D○合 | 宮坂 誠 | 教授 | (物質生命理工学専攻) |
| | 委員 (副査) D○合 | 根本 航 | 教授 | (物質生命理工学専攻) |
| | 委員 (副査) D○合 | 安部 智子 | 准教授 | (物質生命理工学専攻) |
| | 委員 (副査) | 川崎 寿 | 特任教授 | (東京大学大学院 農学生命科学研究科) |

研究の背景

「 β アミノ酸は、抗生物質や酵素阻害剤など、生理活性物質に存在する物質である。 β アミノ酸の中でも enantio-pure な β -フェニルアラニン(β -Phe)は医薬品の合成に重要な物質である。その中でも *R* 体の β -Phe は Paclitaxel の合成に重要な中間体である。 β -Phe のエナンチオマー分離法として、これまでにいくつかの酵素法が報告されている。著者は、これまでに報告されている酵素法とは別のプロセスで *R* 体の β -Phe を生産し、尚且つ低環境負荷な方法で β -Phe を生成する酵素法およびその反応を触媒する酵素を探索してきた。その結果、アミノ基をアセチル化したラセミ体の β -Phe(*N*-Ac-(*R,S*)- β -Phe)を *R* 体特異的に加水分解し、(*R*)- β -Phe を生成する酵素(*R*)- β -Phe アミノアシラーゼ((*R*)- β -FAA)を用いた酵素法に着目した。(*R*)- β -FAA を生産する微生物として *Burkholderia* sp. AJ110349 および *Variovorax* sp. AJ110348 を単離し、(*R*)- β -FAA をコードする遺伝子領域をクローニングした。また、野生型(*R*)- β -FAA を用いて特性解析を行い、本酵素が優れた反応性を示すことが明らかにしてきた。」という主旨の下に、著者のグループのこれまでの研究の歴史について説明があり、研究背景についての丁寧な説明がなされた。

研究の目的

「*Burkholderia* sp. および *Variovorax* sp. 由来(*R*)- β -FAA の構造情報を得ることや生化学的機能解析から特性を明らかにすることを目的として研究を開始した。」という、研究背景に基づいた極めて明確な研究目的の説明がなされた。これについて議論はなかった。

研究の内容

第1章「 β -フェニルアラニン代謝酵素の発現および精製」については、実験手法や結果が詳細に述べられた。特に著者のグループの前の研究報告では得られなかった高い発現性について「Cold shock システムを利用して組換え発現ができる発現プラスミドを構築した。低温での温度調節と IPTG 誘導を組み合わせて目的タンパク質を高発現させることに成功した。」という説明があり、本研究が大きな成果を収めた理由が理解された。さらに、「His-tag 融合型 B- β -FAA および V- β -FAA の精製試料を用

いてゲルろ過クロマトグラフィーを用いたオンライン静的光散乱法で分子量分析を行ったところ、アミノ酸配列から推定される分子量の約2倍の重量平均分子量が算出され、両酵素が溶液中で二量体であることがわかった。」という説明があった。この事柄は第2章「 β -フェニルアラニン代謝酵素の結晶化、X線結晶構造解析」、第3章「*Variovorax* sp. 由来(*R*)- β -フェニルアラニンアミノアシラーゼのクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析」の実験結果とも整合しており今まで解明できていなかったオリジナルな成果であると認められる。第4章「 β -フェニルアラニン代謝酵素の立体構造」では、より詳細な構造解析結果が説明され、 β -フェニルアラニンの生成反応を司る部位（窪み）についての言及がなされた。生成反応の触媒機能については第5章「 β -フェニルアラニン代謝酵素の生化学的機能解析」に詳細な報告があり、十分な機能が発現していることが確かめられている。また、反応を司る部位の付近のアミノ酸残基をアラニンに置換して、活性度の変化を測定した実験結果より、構造上推定された部位（窪み）が大きな役割を果たしていることが推定されている。すなわち構造と機能について、完全にではないが凡その相関が明らかになっている。この成果は、

- [1] Yuki Kato, Hisashi Kawasaki, Tsuyoshi Nakamatsu, Namio Matsuda, Ryo Natsume, Expression, Purification and Crystallization of the N-acetyl-(*R*)- β -phenylalanine acylase derived from *Burkholderia* sp. AJ110349 and *Variovorax* sp. AJ110348. *Acta Crystallographica Section F* (**in press**)
としてまとめられている。

以上、本論文において著者が検討して得た結論に記された事柄は、抗生物質や酵素阻害剤の環境低負荷な生産技術について、その発展に極めて有用であると判断できることから、本論文の価値は工学的、分子生物学的な観点からも十分に評価できる。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。