

論文内容の要旨

申請者氏名 川原 寛弘

これまでに微生物、植物、節足動物におけるニトリル・アミノ酸代謝に関与する酵素の研究が活発に行われており、ニトリルヒドラターゼ、アルドキシムデヒドラターゼなどの新酵素や、アミダーゼ、ヒドロキシニトリルリアーゼ、P450などの新しい構造と機能を有する多くの酵素が発見され、有用物質の生産に用いられている。本研究では、ニトリル・アミノ酸関連化合物に作用する酵素（ヒドロキシニトリルリアーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ）に着目し、タンパク質工学による酵素の機能改変および有機合成への応用を目指した反応条件の最適化を行うことで、以下のような結果が得られた。

植物 *Baliospermum montanum* 由来ヒドロキシニトリルリアーゼ (*BmHNL*) はケトンまたはアルデヒドとシアン化合物から医薬品中間体などに利用できる光学活性シアノヒドリンの合成反応を触媒する。希少な S 立体選択性を有し、熱耐性が高く、広範囲の芳香族化合物に活性を有するなど産業利用が期待される酵素であるが、その比活性および立体選択性が低いことが課題であった。そこでタンパク質工学により *BmHNL* の変異体ライブラリーを構築し、ハイスループットアッセイを用いて、各変異体の活性を測定したところ、最も高活性を示す *BmHNL*-H103C/N156G 変異体を取得した。次に、この変異体の解析を進めると、Asn156 のアミノ酸置換により酵素の基質に対する親和性と触媒効率が変化することで (S)-マンデロニトリルに対する立体選択性を向上させることが判明した。野生型酵素による合成反応と比較して、鏡像体過剰率 (ee) が 40% 向上し、最大 93% の ee を示した。タンパク質工学ではこれまで困難だった立体選択性の改善をランダム変異導入によって実現した。

アミノニトリルは、アミノ酸の前駆体として有用であるが、酵素による合成は報告されていない。そこでイミンを経由する酵素反応に着目し、ブタ腎臓由来アミノ酸オキシダーゼの変異体 (pkDAO-Y228L/R283G) を用いると、シアン存在下で (R)- α -methylbenzylamine ((R)-MBA) から 2-methyl-2-phenylglycinonitrile (2MePGN) が生成することを確認し、一級アミンからアミノニトリルを合成する新規な酵素反応を見出した。さらに、反応条件の検討や最適化によって、高収率 (96%) でのアミノニトリル合成が、ニトリラーゼとの組合せによってアミノニトリルから複数の非天然アミノ酸の合成がそれぞれ可能になった。

イミンは多種多様な反応の中間体として合成され、様々な求核剤の標的になるため有用であるが、pkDAO-Y228L/R283G を用いると、副生成物の中に基質の (R)-MBA が二量化した 1-phenyl-N-(1-phenylethylidene)ethanamine (PPEA) が生成されることも明らかになった。また、反応条件の検討や最適化によって、PPEA を主成分として最大収率 90% での合成が、 NaBH_4 を用いた還元により PPEA から bis(1-phenylethyl)amine (BPEA) への変換がそれぞれ可能になった。さらに、基質であるアミンに (R)-MBA と pkDAO-Y228L/R283G の基質でないヘキシルアミンを用い、新規な酵素反応であるヘテロな二量体イミンの合成を見出した。

□ やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 川原 寛弘

シアノヒドリンやアミノニトリル、イミン化合物は医薬品や農薬などの合成やアミノ酸合成に有用である。植物 *Baliospermum montanum* 由来ヒドロキシニトリルリアーゼ (*BmHNL*) は芳香族シアノヒドリンの合成に有用な *S* 立体選択的なヒドロキシニトリルリアーゼであるが、その活性や立体選択性が低いことが課題であった。申請者は、ランダム変異導入によりその活性および立体選択性の向上を試み、以下のような新規な知見を得た。

- 1) 大腸菌内で発現した組換え *BmHNL* の可溶性を向上させる変異体 (*BmHNLH103C*) を鑄型とし、エラープローン PCR を用いたランダム変異導入により作製した約 6,000 の変異体ライブラリーから、活性および立体選択性が向上した変異体をスクリーニングし、Asn156 のアミノ酸置換が活性および立体選択性の向上に寄与することを明らかにした。
- 2) 得られた変異体の中では、Asn156 が Gly に置換した変異体 (*BmHNLH103C/N156G*) が最も高い活性を示し、元の *BmHNLH103C* 変異体と比較して約 7 倍の (*S*)-マンデロニトリル (MAN) 合成活性を示した。また、鏡像体過剰率 (ee) は 40% 向上し、最大で 93% の ee を示した。さらに、酵素の反応速度論的解析から、Asn156 置換は (*S*)-MAN に対する触媒効率の向上と (*R*)-MAN に対する触媒効率の低下に寄与することを明らかにした。
- 3) 野生型 *BmHNL* の X 線結晶構造から、Asn156 は α -ヘリックス構造に含まれ、タンパク質表面に位置する残基であるため、基質と直接相互作用できないと考えられたが、Gly など他のアミノ酸への置換により、その α -ヘリックス構造が柔軟になった結果、 α -ヘリックス構造に含まれる基質と相互作用する残基と基質との相互作用が変化することで酵素の活性および立体選択性が向上した可能性を提唱した。

また、申請者はブタ腎臓由来アミノ酸オキシダーゼの変異体 (pkDAO-Y228L/R283G) を利用したアミノニトリルやイミンの合成反応に着目し、以下のような新規な知見を得た。

- 4) pkDAOY228L/R283G が (*R*)-MBA を酸化し、生成したイミンにシアンを付加することで 2MePGN が合成されることを見出した。また、その反応条件の最適化により高収率 (96%) な酵素反応系を新規に構築した。さらに、ニトリラーゼを組み合わせたカスケード反応により第一級アミンから様々な非天然 α -アミノ酸が合成できる反応系を構築した。
- 5) pkDAOY228L/R283G が (*R*)-MBA を酸化し、生成したイミンに第一級アミンを付加することで 1-phenyl-*N*-(1-phenylethylidene)ethanamine (PPEA) やヘテロな二量化イミンが合成されることを見出した、また、その反応条件の最適化により最大収率 90% の PPEA 合成を可能にした。

以上のように、本論文はニトリル・アミノ酸代謝酵素の機能改変および反応条件の最適化により、有用物質の新規な酵素合成法を確立したものであり、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 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】