

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Yasmeen Yousif Ahmed Elyas
審査委員	<p>主査 有馬 二郎 (印)</p> <p>副査 阿座上 弘行 (印)</p> <p>副査 地阪 光生 (印)</p> <p>副査 石原 亨 (印)</p> <p>副査 岩崎 崇 (印)</p>
題目	Mutational studies on catalytic domain of D-stereospecific amidohydrolase from <i>Streptomyces</i> sp. 82F2
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>Yasmeen Yousif Ahmed Elyas 氏から提出された表題の学位論文について、平成30年9月11日に実施した口頭発表も踏まえて、5名の審査委員で審査を行った。</p> <p>土壌放線菌 <i>Streptomyces</i> sp. 82F2 が生産する D 体特異的アミド加水分解酵素 (DAH) は、セリン型 D 体特異的ペプチダーゼに属する酵素である。DAH は D-アミノ酸エステル誘導体を加水分解し、その特徴的な性質として、加水分解の副反応としてアミノリシス活性を示す。またアミノリシスでは、L-アミノ酸及びその誘導体をアシル受容体基質として認識するため、D-/L-配列を有するジペプチドを制御よく合成する。</p> <p>DAH の立体構造解析から、DAH は活性中心へと続く大きなくぼみの底に基質結合部位と思われるポケットが存在し、その側に活性中心 Ser があると明らかとなっている。DAH の全体構造は同属の酵素と比較的似たものであるが、このくぼみとポケットの構造は、他の酵素とは大きく異なっていた。この構造が、制御よいジペプチド合成能とアミノリシス反応を引き起こす要因であると考えられた。また、DAH のポケットを構成するアミノ酸の多くは疎水性であり、これらが酵素の基質認識に対し何らかの役割を果たすことも予想できる。しかし、それらの機能やメカニズムは明らかではない。</p> <p>このような背景の下、Yasmeen Yousif Ahmed Elyas 氏はポケット構造やポケットを構成するアミノ酸に焦点を当て、DAH のアシル酵素中間体形成や加水分解、アミノリシス活性などの変異による影響を調べ、以下のような優れた成果を挙げた。本研究で得られた成果は、ポケット構造と触媒活性との関係に迫るものであり、DAH をベースとしたジペプチド合成ツールとしての生体触媒の構築に大きく寄与できる可能性を秘めている。</p> <p>1. DAH のポケットを構築する 8 つの残基に変異を加え、それぞれのアミノリシスにおける基質認識における役割を検証し、ポケットの広さがアミノリシス活性に大きく影響することを明らかにした。本実験において、Ile338 を Ala に置換することで、Ac-D-Phe-OMe と 1,8-diaminooctane を基質としたときのアミノリシス活性が顕著な上昇が観察された。同様の効果は Ile338 を Gly や Ser に置換することでも観察されたことから、大きな側鎖を持つ Ile から小さなアミノ酸への置換によるポケットの拡大と柔軟性向上が、アミノリシス活性の基質認識に影響を与えたといえる。</p>	

2. DAH のポケット形状の改変が与える立体選択性や疎水性基質選択性への影響について調べた。DAH の立体構造と D-アミノ酸アミダーゼの構造比較から、DAH ポケットの底に存在する残基 (Ala267、Gly271) が、基質としての D-Phe の認識に大きく関わっていると推定された。それぞれの側鎖は小さいため、Phe に置換してスペースを埋めて検証した結果、Ala267 を Phe に置換すると、立体選択性が変化し、疎水基質に対する特異性が維持されたほか、一律に反応速度が向上した。一方で、Ala267 を Val や Trp、Gly271 を Phe に置換すると、活性が極端に低下したため、ポケットの底の形状や疎水環境が立体選択性や基質認識に大きく関わることが示唆された。

3. 上記検討によって得られた A267F が、高いジペプチド合成活性を示すことが見出されたため、Ala267 の Phe への変異の優位性を立証した。G271F DAH と野生型を比較対象とし、D-アミノ酸-OMe 及び L-アミノ酸を使用したジペプチド合成反応の第一段階である MeOH 遊離活性を調べた結果、G271F は野生型の半分程度であったことに対し、A267F は野生型より 3 倍高い結果となった。しかし、いずれの酵素の加水分解活性は同程度であった。一方で生成ジペプチド量は A267F が顕著に高く、G271F は野生型より低い結果となった。同様の効果は、殺虫剤のリード化合物 cyclo(D-Pro-L-Arg) の合成においても観察された。以上の結果から、Ala267 の Phe への変異は本酵素のジペプチド合成活性に対し優位な効果が認められ、DAH をベースとした生理活性ジペプチド合成用高機能生体触媒の構築において、有用となる情報が得られた。

以上、本学位論文は、DAH の変異解析による機能改変に向けた研究において、その領域の構造と機能との全容を紐解く重要な知見について詳細に述べられている。また得られたデータは新奇で独創性に富むものであり、酵素化学・タンパク質化学分野での研究の発展に大きく貢献することは間違いなく、学位論文として高く評価できると判断された。