

(様式2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 岡本 貴樹 印

題 目 新規な物質生産プロセスを可能にする膜内在性酵素の構造生物学的研究

学位論文の概要及び要旨

酵素は、常温常圧の温和な条件で様々な化学反応の触媒として機能するタンパク質であり、高い基質・反応特異性を示す。これらの特徴は、エネルギー消費の多い工業的な物質生産プロセスから、より省エネルギーなバイオプロセスへの転換を可能とする。このような酵素利用のために、多種多様な酵素の機能解析や立体構造解析が実施され、これらの知見に基づいた合理的な変異体設計による酵素機能の改変が盛んに行われている。しかしながら、これまでにその対象とされてきた酵素は主に水溶性酵素であり、細胞膜に局在する膜内在性酵素はほとんど利用されていない。その主要因として、膜内在性酵素は細胞膜からの界面活性剤による可溶化が容易ではなく、機能・構造解析が困難であることが挙げられる。一方で近年、新たな界面活性剤の開発や、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) 単粒子解析をはじめとする膜タンパク質の構造解析手法が急激に発展し、状況は一変しつつある。これらの手法を用いて膜内在性酵素の立体構造の決定、反応機構の理解、機能改変を行うことで、既に応用されている水溶性酵素群と組み合わせることによる既存の物質生産経路の改良や、水溶性酵素では合成困難な新たな有用物質の生産につながることを期待される。そこで本研究では、工業的な応用が期待されている2種の膜内在性酵素、直鎖状中鎖アルカン水酸化酵素AlkBと、食品保存料に用いられる抗菌性ポリマーの ϵ -ポリ-L-リジン (ϵ -PL) を合成する酵素Plsに着目し、これらが触媒する反応のメカニズムを立体構造から明らかにすることで、機能改変酵素の創製に繋げることを目的とした。

AlkBは炭素数5-12の直鎖状中鎖アルカンを生体環境下で水酸化することができるため、AlkBを用いるバイオプロセスは炭化水素への省エネルギーな官能基導入法として注目されている。しかし野生型AlkBでは適応可能なアルカンは中鎖に限定される。そこで、本研究ではまず始めに変異導入による *Pseudomonas putida* GPo1由来AlkBの基質特異性の改変を試みた。AlkBの基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基はこれまでに明らかにされていないが、55番目のアミノ酸残基であるTrp (Trp55) がポケットの底部に位置し、水酸化可能な直鎖状アルカンの炭素鎖長の上限を決定していると推測されている。そこで、アミノ酸配列に基づく立体構造予測からTrp55近傍に位置すると推

定されるアミノ酸残基に変異を導入し基質特異性の改変を試みた。その結果、59番目のLeuをPheに置換することで水酸化可能な基質炭素数の上限が野生型より短いウンデカンとなった、基質結合ポケットが短縮したと推測される変異体の作成に成功した。しかしながら、さらなる変異導入による基質特異性の改変は困難であった。そこで、構造情報に基づいて効率よく改変体を設計するために、活性を維持したAlkBの高純度試料の大量調製法を確立し、X線結晶構造解析を試みた。膜タンパク質に特化したさまざまな結晶化手法を適用したがAlkBの良質な結晶は得られなかったため、次に、結晶化が不要なCryo-EM単粒子解析法による構造決定を目指した。この手法では測定試料の分子量が大きいほど、また対称性を持つ分子ほど高分解能での立体構造決定が可能である。そこで、三量体を形成する大腸菌由来膜タンパク質であるアンモニア輸送体AmtBにAlkBを融合させることで対称性を高めつつ高分子量化する手法を考案し、その試料調製を試みた。AmtB-AlkBを様々な界面活性剤で可溶化・精製し、試料調製方法を最適化することで、構造解析に十分な量のAmtB-AlkBが得られる手法を確立した。更に、可溶化状態で脂質環境を再現できるNanodisc再構成を行うことで、三量体を維持した高純度試料を得ることができた。この試料を透過型電子顕微鏡で観察したところ、均一な粒子径であることが分かった。今後、Cryo-EM単粒子解析を行いAlkBの立体構造を決定することで、基質特異性改変型AlkBの合理的創成につながることを期待される。

Plsは、L-リジン分子間の α カルボキシル基と ϵ アミノ基をイソペプチド結合で縮合し、25-35量体のアミノ酸ホモポリマー ϵ -PLを合成するマルチドメイン型膜内在性酵素である。Plsにより合成された ϵ -PLは、伸長と同時にPlsの膜貫通ドメインが形成するチャンネルを通り細胞外へ放出されるため、培地から容易に回収可能である。また、新規なポリアミド系バイオプラスチックを生産できる可能性のある酵素であることと合わせて、Plsの機能改変を行うことで機能性ポリアミノ酸のバイオプロセス生産が可能になると期待されている。そこで本研究では、Plsの反応機構の理解に基づく機能改変を行うために、その立体構造決定を目指した。まず初めに基質であるL-リジンのATPによる活性化を担う、アデニル化ドメイン (Pls-A) について結晶構造解析を行った。その結果、2.2 Å分解能でPls-Aの立体構造を決定でき、基質となるL-リジンの ϵ アミノ基と217番目のアミノ酸残基であるGluが塩橋を形成することでL-リジン特異的な認識を可能にしていることを明らかにした。また、基質結合部位がL-リジンの δ 炭素近辺で広がっていることから、Pls-Aが一部の嵩高いリジンアナログを基質として認識する機構を説明することができた。さらに詳細な ϵ -PL合成機構を明らかにするため、Pls全長の構造解析に向けて高純度Plsの調製法を確立し、Cryo-EM単粒子解析を行ったところ、均一なPlsの粒子像を確認することができた。これらの結果は、今後のPls全長の立体構造決定及び立体構造に依拠したPlsによる ϵ -PL合成機構解明につながることを期待される。