

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	MOHAMED MUTASIM ELTAYEB ELEBEID
審 査 委 員	<p style="text-align: center;">主 査 有馬 二朗 ㊟</p> <p style="text-align: center;">副 査 森 信寛 ㊟</p> <p style="text-align: center;">副 査 澤 嘉弘 ㊟</p> <p style="text-align: center;">副 査 藪田 行哲 ㊟</p> <p style="text-align: center;">副 査 阿座上 弘行 ㊟</p>
題 目	<p style="text-align: center;">Mutagenesis studies of L-carnitine dehydrogenase for development of biomolecule measurement tool</p> <p style="text-align: center;">(生体分子測定ツールの創製に向けたカルニチン脱水素酵素のタンパク質工学的研究)</p>
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>MOHAMED MUTASIM ELTAYEB ELEBEID 氏から提出された表題の学位論文について、平成 26 年 1 月 28 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>第 4 級アンモニウム化合物の一つである L-カルニチン (L-Car) は、脂肪代謝において脂肪酸をミトコンドリアに運ぶ担体の役割を果たし、脂肪酸の β 酸化に必須とされる化合物である。先天性有機酸代謝異常の患者では、蓄積した脂肪酸が L-Car と結合して排出されると共に、L-Car 不足が心臓血管疾患や高コレステロール血症といった様々な欠乏症を引き起こす原因となるため、L-Car 含量の測定は、診断や食品分析に利用される。L-Car 脱水素酵素 (CDH) は特異的に L-Car を酸化する酵素であり、これを利用した比色的な L-Car 含量の測定の実現は、医療や食品分野における飛躍的な L-Car 分析の簡便化に繋がる。これまでにいくつかの微生物から CDH が単離され、その性質が明らかとされているが、その機能と構造に関する知見は未だ乏しい。こうした状況の中 MOHAMED MUTASIM ELTAYEB ELEBEID 氏は、<i>Xanthomonas translucens</i> 及び <i>Rhizobium</i> sp. 由来の CDH (Xt-CDH 及び Rs-CDH) の実用化と高機能化を目指し、主に 2 つの研究を実施し、以下のような優れた成果を挙げている</p> <p>1. 予測構造と配列比較による CDH の基質認識に重要な残基の同定： これまで明らかとなっている酵素、Xt-CDH と Rs-CDH の L-Car に対する K_m 値は、それぞれ 10 mM 及び 1 mM であり、その性質の違いがどの構造に起因しているのかが不明であった。そこで、1 次構造上類似性を示すヒトの 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (h-HAD) の立体構造 (PDB code: 1FOY) を参考に、基質アセトアチル領域を取り巻く残基の中で、両酵素で異なる残基をピックアップした。続いて、それぞれの対応する残基を入れ替えた交互変異の酵素を作成し、精製した後に酵素反応速度論的解析を行った。Rs-CDH では、全て変異で基質親和性にわずかな変化しか見られなかったが、Xt-CDH は、いくつかの変異酵素で顕著な K_m 値の上昇が確認され、中でも Xt-F143Y が最も K_m 値が上昇していた。上記残基を Tyr 以外の残基に置換した変異酵素を使用した解析から、芳香族アミノ酸以外のアミノ酸に置換した全ての変異酵素において、完全に活性が失われた。本研究結果は、CDH の特定の部位の芳香環が L-Car 結合に関わることを証明したものである。一方で、上記アミノ酸残基が基質認識や活性強度に関わる唯一のファクターではないため、その詳細の検討が今後の課題である。</p>	

2. アラニンスキャンニングによる CDH の保存領域の機能解析：

類似酵素間で保存された領域は、酵素の基本的な機能と直接関係していることが多い。そこで CDH とその類似酵素間で保存された領域に着目し、Xt-CDH の酵素触媒機能に重要な残基を探索した。CDH と細菌の 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase の間で保存される 42 残基を選択し、全ての残基を Ala に置換した。37 の変異酵素で CDH 活性が保持していたため、それらについて L-Car に対する親和性を分析した。その結果、変異酵素の性質は次の 3 つのグループ化された；① k_{cat} のみ変化した変異、② k_{cat} 及び K_m 共に変化した変異、③性質に変化が見られなかった変異酵素。これらの中で、 K_m 値に影響を及ぼす変異箇所は、活性中心に近い傾向が示された。本実験のデータは、触媒部位全体の基質親和性に関わる重要な残基は酵素間で保存されているものも存在し、その構造置換により触媒機能と基質親和性の向上が期待される。

以上、本学位論文は、微生物 CDH の実用化と高機能化に向け、L-Car への親和性や触媒活性に関わるアミノ酸残基を対象とした構造-機能相関の詳細な知見が得られており、基礎研究から応用研究につながる広く有意義な内容となっている。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。