

アミノ酸分析に向けたアミノ酸代謝酵素の熱安定性に関する研究

山口, 浩輝

<https://hdl.handle.net/2324/2236349>

出版情報：九州大学, 2018, 博士（農学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏名	山口 浩輝			
論文名	アミノ酸分析に向けたアミノ酸代謝酵素の熱安定性に関する研究			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	角田 佳充
	副査	九州大学	教授	石野 良純
	副査	九州大学	准教授	西本 悦子

論文審査の結果の要旨

生体内のアミノ酸濃度と疾患は相関しており、いくつかのアミノ酸分析用酵素が臨床分野で既に用いられている。しかし、安定性を十分に満たす分析用酵素が存在しないために、酵素による分析が困難なアミノ酸が数多く存在している。本論文は、トリプトファン分析用酵素とヒスチジン分析用酵素について、実用化に向けた熱安定性向上を検討するとともに、既に実用化されているロイシン分析用酵素の熱安定性の分子メカニズムを構造的観点から考察している。

まず、トリプトファン分析用酵素については高い基質特異性を有している *Chromobacterium violaceum* 由来のトリプトファン酸化酵素(VioA)に着目し、部位特異的変異導入法で変異体を調製した。C395A 変異体は 45°C、15 分間熱処理後の残存活性が野生型の 3.4 倍高く、Tm 値は 49.3°C で野生型より 4.2 度高かった。加速安定性試験の結果、C395A 変異体は 4°C 保存下におけるの酵素活性の半減期が 452 日で、野生型の 49 日より大幅に長かった。C395A 変異体は、ヒト血漿中のトリプトファン濃度を高い正確性と精度で定量可能であったことからトリプトファン分析用酵素として有用であることが分かった。この VioA (C395A)が安定化した分子メカニズムを解明するため、X 線結晶構造解析で立体構造を決定した。立体構造情報から、安定性向上の一因は基質ポケット近傍に位置する溶媒露出した C395 がアラニン残基になることで、周辺の疎水性クラスターが安定化されていることであると考察した。

続いて、ヒスチジン分析用に向けて、*Photobacterium phosphoreum* 由来ヒスチジン脱炭酸酵素 (HisDC) と *Rhizobium* sp. 4-9 由来ヒスタミン脱水素酵素 (HDH) を組み合わせた分析法を新たに構築した。野生型の HisDC は、保存安定性が低かったため、ホモロジーモデリングから溶媒露出していると予想したシステイン残基 C57 をセリン残基に変異させたところ、C57S 変異体は 45°C、15 分間熱処理後の残存活性が野生型の 4.9 倍高く、Tm 値は 52.9°C で野生型より 12.2 度高くなった。また、C57S 変異体は 4°C、遮光条件下で 200 日以上活性の低下が見られず、50 日以内に失活する野生型よりも大幅に安定化していた。HisDC(C57S)は、HDH と組み合わせることによりヒト血漿中のヒスチジン濃度を高い正確性と精度で定量可能であったことから、実用化に十分なヒスチジン分析用酵素の取得に成功したと判断した。

次に、既に臨床応用されている *Geobacillus stearothermophilus* 由来ロイシン脱水素酵素 LeuDH の熱安定性の分子メカニズムを解明するため、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によるアポ体および NAD⁺複合体の立体構造解析を行った。アポ体と NAD⁺複合体の構造比較から NAD⁺の結合によってオリゴマー界面における新たな分子間相互作用が形成され、熱安定性に寄与していると考察された。更に類似の酵素との立体構造比較から LeuDH の分子界面に存在する Ala94、Tyr127 および C 末端の 3 残基を介した分子間相互作用が熱安定性に重要であることが示唆された。これらの知見は LeuDH が属する Glu/Leu/Phe/Val 脱水素酵素ファミリーに広く応用できると考えられる。

以上要するに、本論文は、アミノ酸分析に向けたアミノ酸代謝酵素の熱安定性に関して考察したもので、生物物理化学およびタンパク質工学の発展に寄与する価値ある業績と認める。
よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。