

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研究テーマ	光学活性化合物の酵素合成が可能な祖先型 L-アミノ酸酸化酵素の X 線結晶構造解析				
研究組織	代表者	所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	中野 祥吾
	研究分担者	所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	中野 祥吾

講演題目	光学活性化合物の酵素合成が可能な祖先型 L-アミノ酸酸化酵素の X 線結晶構造解析
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>今日、特殊環状ペプチドに代表される中分子医薬品が注目されている。同時に原料となるアミノ酸誘導体には、高い光学純度が求められている。有機合成により得られるラセミ体のアミノ酸誘導体は、アミノ酸酸化酵素と還元剤を用いたワンポット合成にて L-或いは D-体への光学分割が可能である。D-アミノ酸誘導体を得るには、基質選択性の広い L-アミノ酸酸化酵素 (LAAO) が必要となる。しかし LAAO は安価な発現系を用いた大量発現が 50 年近く達成されておらず、光学分割への応用利用は進んでいない。本研究では、独自のアミノ酸配列解析手法を用いて開発に成功した、配列データベース由来祖先型 LAAO (AncLAAO) について、その反応性を制御する上で必要となる、構造データの取得を目的とした研究を実施することとした。Protein Data Base 上に類似構造が存在しないことから、初期位相の決定をヨウ素や重原子の異常散乱を利用した手法にて決定することを目指した。</p> <p>これまでに 1.0M NaCl, 0.1M クエン酸 (pH = 3.5) の条件で、AncLAAO の良質な結晶が得られていたが、これに 0.2M NaI を添加した条件でも同様に結晶を得ることができた。高エネルギー加速器研究機構にて放射光実験を行ったのちヨウ素 SAD 法により位相決定に成功し、AncLAAO の結晶構造 (2.4 Å) を得ることができた。また得られた結晶に L-Glu, L-Phe, L-Trp などの基質を Soaking することで、各種基質複合体の構造を決定した。基質複合体を参照しつつ、活性に重要な役割を果たすアミノ酸残基の予測と各種変異体の酵素学的パラメータの測定及び比較実験を行い、AncLAAO の基質認識機構を解明することに成功した。また活性中心に合理的に変異を導入することで、本来基質となり得なかった L-Val に対する反応性を獲得した AncLAAO 変異体 (D249V/Q536L/Y568F) の設計に成功した。</p> <p>現在は得られた AncLAAO の構造を参照しつつ、さまざまな L-アミノ酸に反応可能な変異酵素の創生と酵素法による D-アミノ酸合成系確立に向けた研究を進めている。本酵素の開発で得られた知見を参照しつつ、新たな酵素の発見や開発にも成功している (1)。</p> <p>1. Ishida, C., et al. (2021). <i>ChemCatChem</i> 13(24): 5228-5235. Selected as Hot topic: Biocatalysis, Highlighted by ChemistryViews</p>