

Title	Crystal Structure of 2, 3 -Butanediol Dehydrogenases toward Understanding of Chiral Substrate Recognition Mechanisms
Author(s)	小田切, 正人
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42501">https://hdl.handle.net/11094/42501</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	小田切 正 人
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 15994 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	Crystal Structure of 2, 3-Butanediol Dehydrogenases toward Understanding of Chiral Substrate Recognition Mechanisms. (2, 3-ブタンジオール脱水素酵素のキラル認識機構に関する構造化学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 月原 富武  (副査) 教授 上山 憲一 助教授 楠木 正己 助教授 松浦 良樹

### 論文内容の要旨

2, 3-ブタンジオール (BD) には D(-)、L(+), meso 体と複数の光学異性体が天然に存在する。これらの BD は微生物による糖代謝の副産物として知られている。一方、2, 3-ブタンジオール脱水素酵素 (BDH) は基質の立体特異性に様々なタイプが存在することが知られている。少なくとも、D体認識 (D(-)-BDH)、L体認識 (L(+)-BDH)、meso 体認識 (meso-BDH) の存在することがわかっている。本酵素群は NAD<sup>+</sup> を補酵素とし、2, 3-ブタンジオールとアセトイン (AC) の酸化還元反応を可逆的に触媒する。本酵素群の立体特異性は酵素反応の立体化学と構造の相関を研究する上で有用な研究対象であると考え、本酵素群の立体構造の解明、および基質の光学異性体認識機構を原子レベルで解明することを目指して X線結晶構造解析を行った。

異なる立体特異性を持つ 2 種の BDH、meso-BDH (meso-BD と D-AC 間を触媒：Klebsiella pneumoniae 由来) および L-BDH (L-BD と L-AC 間を触媒：Brevibacterium saccharolyticum 由来) の X線結晶構造解析を行い、それらの結晶構造を 1.7 Å および 2.0 Å 分解能で決定した。得られた meso-BDH と L-BDH の立体構造から、両 BDH における二次構造やトポロジーは全く同じように保存されており、それらの高次構造が非常に類似していることが明らかになった。現在までに、D、L 異性体認識における構造解析が行われた例として、アミノ酸トランスアミナーゼ、および乳酸脱水素酵素などがあるが、これらは全く異なる蛋白質のフォールドを持つものである。しかし、本研究にて構造解析を行った両 BDH に関しては分子種が異なるにも関わらず、その D、L 異性体認識において同一のフォールドを持つことが両 BDH の立体構造から明らかとなった。さらに、補酵素結合部位および触媒残基における両 BDH の比較の結果、NAD<sup>+</sup> の結合に関わる残基は構造的に同じ位置に保存されており、NAD<sup>+</sup> の結合様式は両 BDH で同様であることが明らかになった。また、BDH はアミノ酸配列上の相同性から短鎖型脱水素酵素/還元酵素ファミリーに属すると推察されるが、その触媒残基と推察されている Ser、Tyr、Lys 残基も、meso-BDH および L-BDH 両者で構造的に同じ位置に保存されていた。これらの結果から、meso-BDH と L-BDH は同じ反応機構で反応が進行すると考えられ、両酵素のキラル分子認識の違いは、基質結合部位での結合様式の違いによるものと推察された。

そこで、基質結合部位の構造を両 BDH に結合している基質類似体の結晶解析から実際の基質の結合様式を予測した結果、基質の水酸基への水素結合様式に異なるアミノ酸が関与していることがわかった。さらに、両酵素の分子表面とモデリングした基質の分子表面を計算したところ、両 BDH の基質結合部位は、結合する基質に対して相補的な形状をしていた。また、基質結合部位には、疎水性アミノ酸残基が存在し、基質の結合には疎水相互作用が寄与して

いることが示唆された。以上の結果から、両 BDH は、基質結合部位の高次構造の違い、それに加え基質と結合部位の水素結合の違いによって基質の結合方向を固定していると推察された。本研究による立体選択性を決める特定の高次構造やアミノ酸配列の存在が一つのモデルとなり、その他の酵素の立体選択性を変えることや立体選択性のない酵素に選択性を付与することが可能になるのではないかと期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

小田切君の論文は酵素反応のキラル認識の機構に関する構造化学的研究にであり、異なった立体異性体に作用する2種類の酵素タンパク質のX線結晶構造解析を行った。この研究によって、立体異性体を区別して特異的に結合する仕組みを原子レベルで解明した。よって、この論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。