

## 新規エノン還元酵素 CLA-ER の X 線結晶構造解析 X-ray Crystallography of novel enone reductase CLA-ER

侯峰<sup>1</sup>, 宮川拓也<sup>1</sup>, 岸野重信<sup>2</sup>, 小川順<sup>2</sup>, 田之倉 優<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

<sup>2</sup> 京都大学大学院農学研究科, 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Feng Hou<sup>1</sup>, Takuya Miyakawa<sup>1</sup>, Shigenobu Kishino<sup>2</sup>, Jun Ogawa<sup>2</sup> and Masaru Tanokura<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

### 1 はじめに

生体内には多様な脂肪酸が存在し、その代謝は生理機能の維持・調節において必要不可欠である。このため、脂肪酸の伸長、不飽和化、水酸化、脂肪酸メディエーターへの変換など、様々な脂肪酸の代謝経路が解析され、近年、新たな脂肪酸代謝経路として *Lactobacillus* 属乳酸菌 *L. plantarum* AKU 1009a がリノール酸から飽和脂肪酸を生成する経路が同定された。この代謝経路で機能する 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid 還元酵素 (CLA-ER) は、不飽和脂肪酸のエノン部分の C=C 結合を飽和化する“エノン還元反応”を触媒する。CLA-ER は NADH oxidase/flavin reductase superfamily においてエノン還元反応を触媒する新規酵素であり、CoA やアシル輸送タンパク質 (ACP) によらず脂肪酸を修飾することができる。本研究では、CLA-ER に特異的な脂肪酸認識と触媒反応の分子機構を解明するため、Photon Factory のビームラインを利用して CLA-ER の X 線結晶構造解析を実施した。

### 2 実験

CLA-ER は大腸菌発現系を用いて生産し、各種クロマトグラフィーにより精製した。FMN 及び生成物である 10-oxo-octadecenoic acid (KetoC) の存在下で CLA-ER の結晶化スクリーニングを行い、CLA-ER/FMN 複合体及び CLA-ER/FMN/KetoC 複合体の結晶を取得した。PF AR-NE3A ビームラインにおいて X 線回折実験を行い、取得した X 線回折データを XDS で処理した。CLA-ER/FMN 複合体の結晶構造は、*Enterobacter cloacae* 由来ニトロ還元酵素 (PDB ID 1KQB) を鋳型として分子置換法により決定し、精密化後の結晶構造を鋳型として CLA-ER/FMN/KetoC 複合体の結晶構造を決定した。

### 3 結果および考察

CLA-ER/FMN 複合体及び CLA-ER/FMN/KetoC 複合体の結晶構造を分解能 2.00 Å 及び 1.95 Å で決定した[1]。CLA-ER は C 末端ループがドメインスワッ

ピングした二量体構造を形成し、プロトマー間に 2 分子の FMN を結合していた。KetoC を結合した構造では、2 つの  $\alpha$  ヘリックスからなるキャップ構造が、非結合状態の構造と比べて約 45° 傾き、KetoC のエノン部分を含むアルキル鎖を挟み込んで溶媒から隔離することが示された。触媒部位には CLA-ER に特徴的な Cys 残基 (C51) が存在し、C51 の主鎖アミノ基と FMN の C2' 位水酸基により、基質のカルボニル基の空間配置が規定されていた (図 1)。また、キャップ構造の閉じた状態への変化に伴い、Phe 残基 (F126) が 180° 回転して C=C 結合付近の空間を占めることにより、二重結合とフラビン環が平行に配置できるようになることが示された。これにより、エノン部分の C=C 結合は、FMNH<sub>2</sub> と C51 からプロトンと電子が供与されて反応が進行することが示唆された。

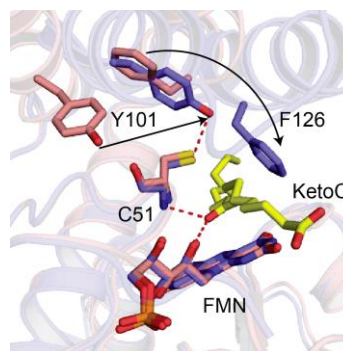


図 1 : CLA-ER の KetoC 結合前 (ピンク) と結合後 (青) の活性部位の比較

### 4 まとめ

本研究は CLA-ER の長鎖脂肪酸に対する基質特異性の構造基盤を解明し、CLA-ER のエノン還元反応機構を明らかにした。

### 参考文献

[1] Hou, F. *et al.*, *FEBS J.* **282**, 1526-1537 (2015).

\* amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp