

植物由来含硫化合物代謝酵素の構造機構解明

Structural and functional studies on plant enzymes for catalyzing organosulfur compounds

荒川孝俊^{1,2}, 佐藤優太¹, 東條裕紀¹, 伏信進矢^{1,2*}

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科、² 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構、〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Takatoshi ARAKAWA^{1,2}, Yuta Sato¹, Yuki Tojo¹, and Shinya FUSHINOBU^{1,2*}

¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

²Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

1 はじめに

タマネギを切ると涙が出る現象は以前から研究されてきたが、2002年にハウス食品の今井らにより、イソアリインの加水分解産物である不安定な化合物1-プロペンスルフェン酸(1-PSA)が催涙因子合成酵素(LFS)により触媒されて催涙因子PTSOが生成することが明らかにされた(図1A)[1]。我々は今井らのハウス食品の研究グループと共同研究を行い、タマネギ(*Allium cepa*)由来LFSの結晶構造を決定し、その反応機構に関して詳細に解明した論文を発表した[2]。本研究課題ではこの研究をさらに発展させ、植物由来の含硫化合物代謝酵素の構造生物学的研究を行った。タマネギ以外の植物のゲノムにもLFSとアミノ酸配列で20~30%の同一性を持つ遺伝子がいくつか存在する。モデル植物あるいは重要な作物よりこれらのLFS様の遺伝子産物の構造機能解析を試みた。一方、植物由来の含硫化合物であるシステインスルホキシド(CSO)に注目し、その代謝酵素の研究を行った。イソアリインもCSOの1種であり、CSOはネギ属植物に豊富に含まれている。CSOおよびその代謝物はネギ属独特な味、風味、さらには様々な生理活性が認められており、植物の含硫化合物の中でも特に注目を集めている。近年、CSO生合成酵素としてシロイヌナズナより新規なフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)が発見された[3]。FMOはCSO生合成の最終段階で硫黄原子への立体選択的な酸素添加を触媒する(図1B)。我々はFMOの立体構造解析と機能解析を行った。

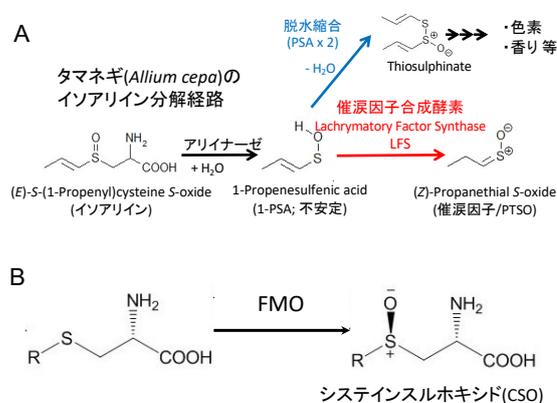


図1

2 実験

5種のモデル植物および作物(シロイヌナズナ、トウモロコシ、ダイズ、ポプラ、イネ)より11種のLFS様遺伝子を合成し、その遺伝子産物(タンパク質)を生成して機能解析を行った。さらに、そのうちのいくつかで立体構造解析を目指して結晶化を試みた。

大腸菌およびメタノール資化性酵母(*Pichia pastoris*)を用いて異種発現したFMOを精製し、分光測定、HPLC、ESI-MSにより活性測定を行った。さらに、立体構造解析を目指して結晶化を行った。得られた結晶について、Photon FactoryおよびSwiss Light Source(KEK-PSI間のMOUに基づくビームタイム)を利用してX線回折データ測定を行った。

3 結果および考察

LFS様遺伝子の機能解析をHPLCを用いて行った結果、そのうち5種でPTSOと思われるピークが観測された。これらのサンプルについて結晶化を試みたが、データ測定可能な結晶は得られなかった。

大腸菌で発現したFMO(FMO-E)の活性測定を行ったが、FMO活性は検出されなかった。*P. pastoris*で発現したFMO(FMO-P)においても同様で

あった。これらのサンプルを結晶化し、KEK-PF および SLS でデータ測定を行い、最大分解能 2.16 Å で結晶構造を得ることに成功した (表 1)。FMO-E と FMO-P では FAD 複合体が得られた。さらに、FMO-P の結晶に NADPH をソーキングしたところ、FAD-NADP⁺複合体構造が得られた (図 2)。FMO-P の結晶にと基質である S-アシルシステイン (SAC) を NADPH とともにソーキングして四者複合体を得ることを目指したが、得られた構造中に SAC 分子と思われる電子密度は観測されなかった。

雅博、鴨井 享宏、正村 典也、柘植 信昭、今井 真介、伏信 進矢

* asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

表 1: FMO の X 線結晶構造データセット

Data set	FMO-E (FAD)	FMO-P (FAD)	FMO-P (FAD-NADP ⁺)	FMO-P (FAD-NADP ⁺ -SAC)
Beamline	PF-BL5A	PF-BL5A	PF-NW12A	SLS-X06SA
Max. resol. (Å)	2.16	2.28	2.60	2.76
R/R_{free}	0.229/ 0.261	0.232/ 0.257	0.216/ 0.267	0.205/ 0.251

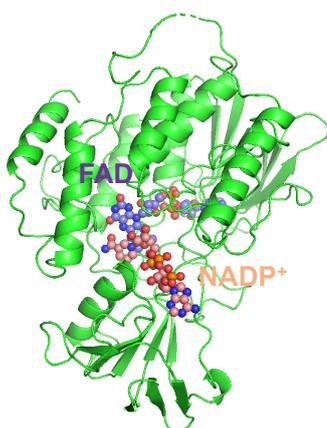


図 2 : FMO-P (FAD-NADP⁺複合体)。

4 まとめ

LFS 様遺伝子産物および FMO の機能解析は今後も続ける予定である。

謝辞

実験をサポートして下さった KEK および PF のみなさん、そして、ハウス食品の皆様をはじめとする共同研究者のみなさんに感謝いたします。

参考文献

- [1] Imai *et al.*, *Nature* **419**, 685 (2002)
- [2] Arakawa *et al.*, *ACS Catal.* **10**, 9 (2020)
- [3] Yoshimoto *et al.*, *Plant J.* **83**, 941 (2015)

成果

1. 日本農芸化学会 2019 年度大会 トピックス賞「タマネギ由来催涙因子合成酵素の触媒機構」佐藤 優太、荒川 孝俊、高辺 潤平、青柳 守紘、加藤