

# 植物二次代謝に関わるアシル基転移酵素およびエステラーゼの結晶構造解析 Crystal structures of the acyltransferase and esterase involved in plant secondary metabolism

須恵雅之<sup>1\*</sup>, 竹野谷美穂子<sup>1</sup>, 矢嶋俊介<sup>1</sup>

<sup>1\*</sup>東京農業大学、〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

Masayuki SUE<sup>1\*</sup>, Mihoko TAKENOYA<sup>1</sup>, and Shunsuke Yajima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo, 156-802, Japan

## 1 はじめに

植物は自己防御物質として様々な構造と生物活性を持つ低分子二次代謝化合物を蓄積している。その構造多様性の要因を、生合成酵素の構造から明らかにするため、本課題では、2つの二次代謝化合物に注目して研究を行った。

植物の二次代謝産物には、構造中にエステルやアミド結合をもつものが多くある。芳香族アミノ酸とアルコールまたはアミンとの縮合反応により生じる化合物が代表的なものであり、この縮合を触媒する酵素群に BAHD スーパーファミリーとよばれるアシル基転移酵素群がある。オオムギの耐病性二次代謝産物として桂皮酸類とアミン類のアミド(HCAA)があり、この生合成の最終段階では、BAHD に属する *N*-アシル基転移酵素のひとつ、ACT (HvACT)が関わっている。これまでに、非常に多くの BAHD アシル基転移酵素に関する報告がなされているが、立体構造が解明されているものは少なく、また一部の機能を持つものに限られている。さらに、アミド形成を触媒する *N*-アシル基転移酵素については、最近、われわれが ACT について最初の報告をしたものを含めてごくわずかしかない[1]。そのため、アシル基転移酵素がどのような機構で、アシル基受容体としてアミンとアルコールを使い分けているのかは、これまでに分かっていない。そこで本課題では、引き続き ACT の基質認識および反応機構について解析することを目指した。

チューリップはチューリップリン類を防御物質として蓄積するが、この化合物はチューリップシドがチューリップシド変換酵素(TgTCE)と作用することにより生じる。TgTCE は一次構造的にはカルボキシエステラーゼに属

するが、エステルの切断と同時に分子内環化を触媒する[2]。このような活性を持つカルボキシエステラーゼはこれまで知られていないため、その反応機構を明らかにするために TgTCE の立体構造解析を目指した。

## 2 実験

ACT に関しては HvACT1 に加えて、基質特異性の異なるコムギ由来の ACT (TaACT2)を用い、TgTCE についても基質特異性の異なる TgTCEA および TgTCEB の解析を行った。いずれの酵素も N 末端 His tag 融合タンパク質として大腸菌 (B834(DE3)pLysS または BL21 CodonPlus(DE3)RP)を用いて発現させ、TALON による精製後に His-tag の切断、さらに Superdex 200 increase および Capto Q による精製を行った。ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化し、主に PF の BL-1A を用いて X 線回折強度データを収集した。ACT は分子置換法、TgTCE は SeMet 置換体を作製して位相決定を行った。

## 3 結果および考察

ACT は、基質である桂皮酸類 CoA、アグマチンとの複合体構造を得るために、結晶を基質溶液にソーキングし、データ取得を行った。その結果、桂皮酸類 CoA のみが結合した構造は得ることができたが、アシル基受容体であるアグマチンとの複合体構造を得ることはできなかった。そこで、不活性変異体などを用いた共結晶による構造取得も試みたが、リガンドが結合した構造を得ることはできなかった。そこで、アグマチンの炭素鎖を短縮したものと、アミンをアルコールに変更したもの(グアニジノブタノール)を合成し、アグマチンの代わりとして用いたところ、グ

アニジブタノールが結合した構造を取得することができた。

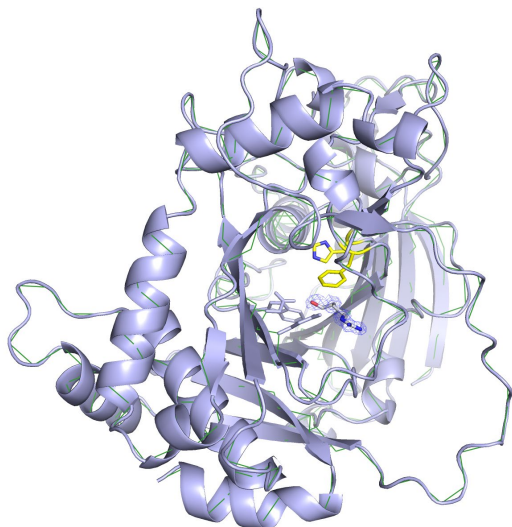


図 1. リガンドの結合した HvACT1 の構造

TgTCEB については、非対称単位に 4 つのサブユニットを有する構造を得た。各サブユニットは植物体から精製された酵素と同様に 2 量体を形成しており、C-末端付近には、他のカルボキシエステラーゼにはない特徴的な  $\alpha$ -ヘリックス構造が認められた。また、基質や阻害剤を用いて共結晶による複合体構造の解析を試みたが、これまでのところリガンドの結合した構造は得られていない。

TgTCEA についても複数の条件で結晶が得られたため、データ取得を試みたが、分解能の低いデータしか得られなかった。特に酵素の外側部分にあるドメインについて明確な電子密度が観察できず、その部分の構造的不安定さのために均質な結晶が得られないものと考えられた。

#### 謝辞

PF ビームラインスタッフの方々におきましては、回折データの収集にあたり、大変お世話になりました。心より感謝致します。

#### 参考文献

- [1] M. Yamane, et al. *Phytochemistry* **189** 112825 (2021).
- [2] T. Nomura, et al. *Plant J.* **83** 252 (2015).

\* sue@nodai.ac.jp