

# リグナン類生合成中の骨格変換に関わる酵素の立体構造基盤の解明 Structural analysis of the C-C bond forming enzymes in lignan biosynthesis

森貴裕, 牛丸理一郎, 阿部郁朗  
東京大学大学院薬学系研究科

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Takahiro MORI<sup>1</sup>, Richiro USHIMARU<sup>1</sup>, and Ikuro ABE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo  
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

## 1 はじめに

ノルリグナン類は C6-C5-C6 骨格を特徴とする植物由来のフェニルプロパン二量体であり、その生合成経路には特徴的な炭素-炭素結合形成反応が含まれる。これらの化合物は抗真菌活性やエストロゲン様作用を有し、植物における防御物質として機能すると考えられている。

アスパラガス (*Asparagus officinalis*) においては、(Z)-ヒノキレジノールの生合成最終段階を触媒する酵素として、ヒノキレジノール合成酵素 (HRS) が同定されている (図 1)。HRS は  $\alpha$  および  $\beta$  の 2 つのサブユニットから構成される異種二量体型酵素であり、その特異な C-C 結合形成反応は高い立体選択性を示す。

本研究では、HRS の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにし、酵素の活性部位構造と基質認識機構を分子レベルで解明することを目的とした<sup>1)</sup>。

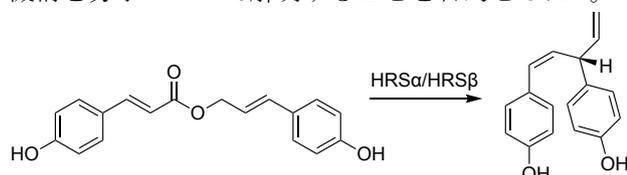


図 1 . HRS の酵素反応

## 2 実験

N 末端に His<sub>6</sub> タグを付加した HRS $\beta$  と、タグを付加しない HRS $\alpha$  を大腸菌で共発現させ、Ni-NTA アフィニティカラムにより複合体として精製した。その後のサイズ排除クロマトグラフィーにより、溶液中で HRS $\alpha/\beta$  複合体が安定なヘテロ二量体を形成していることを確認した。100 mM Tacsimite (pH 6.0), 20% (w/v) PEG4000, and 1 M LiCl<sub>2</sub> の条件で、10 mg/mL の酵素を用いた際に結晶を得た。X 線回折強度の測定の結果、HRS $\alpha/\beta$  複合体の結晶構造を 2.0 Å の分解能で得ることに成功した。

## 3 結果および考察

HRS $\alpha$  および HRS $\beta$  は共に  $\beta$  サンドイッチフォールド構造をとり、それぞれが 4 本のアンチパラレル  $\beta$  シートをもっていた。構造類似性のある PP2 ファミリータンパク質 Cus17 (PDB ID: 7VWB) との比較

により、HRS 各サブユニットはそれぞれ Cus17 と 0.95~1.35 Å の C $\alpha$  RMSD を示した。しかし、HRS と Cus17 では二量体化様式に顕著な違いが見られた。Cus17 では、モノマー間が側面の  $\beta$  シートを介して接触し、連続した 8 本鎖の  $\beta$  シート構造を形成するが、HRS では  $\beta$  シート I が互いに正対し、ねじれた形で中央に 220 Å<sup>3</sup> の空洞を形成するという特異な構造をとっていた。この空洞が酵素の触媒反応空間として機能していると考えられる。

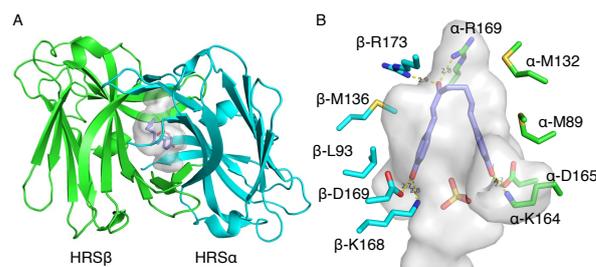


図 2 . HRS の酵素構造 (A) HRS $\alpha/\beta$  複合体の全体構造、(B) 阻害剤結合型の HRS $\alpha/\beta$  複合体の活性部位

さらに、基質類似体である合成阻害剤との複合体構造も 2.2 Å 分解能で取得した。阻害剤は、基質である 4-coumaryl 4-coumarate のエステル酸素をメチレンに置換した構造をもち、反応性を失っているが、HRS の活性部位に結合しやすい性質を有する。この構造解析により、基質が HRS の空洞内で屈曲したコンフォメーションをとり、C8 および C7' の位置が近接することで C-C 結合形成が可能な配向をとっていることが明らかとなった。活性部位では、 $\alpha$ -Lys164、 $\alpha$ -Arg169、 $\beta$ -Lys168、 $\beta$ -Arg173 などの塩基性残基が、阻害剤のフェノール性ヒドロキシ基やカルボニル基と水素結合を形成していた。また、 $\alpha$ -Trp13、 $\beta$ -Leu93、 $\beta$ -Met136 などの疎水性残基が、フェノール環と  $\pi$ - $\pi$  もしくはメチル- $\pi$  相互作用を介して基質の結合ポケットを構築していた。これらの結果は、HRS が基質の立体配座を厳密に制御することにより、非常に高い立体選択性をもって (Z)-ヒノキレジノールを生成する分子基盤を提供していることを示している。

#### 4 まとめ

本研究においては、(Z)-ヒノキレジノールの生合成最終段階を触媒する複合体酵素の構造を取得し、基質の結合様式および、反応機構に関する知見を得ることに成功した。このような構造的知見は、将来的な酵素改変による反応制御や人工合成経路の再構築に有用な情報を提供するものである。

#### 参考文献

[1] Ushimaru, R., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **145**, 21966-21973 (2023)

\* tmori@mol.f.u-tokyo.ac.jp