

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*, 竹野谷美穂子, 矢嶋俊介
東京農業大学、〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

Masayuki SUE*, Mihoko TAKENOYA, and Shunsuke YAJIMA

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。

オオムギには桂皮酸類とアミン類のアミド(HCAA)が防御物質として蓄積されている。この生合成の最終段階では、BAHDスーパーファミリーに属する*N*-アシルトランスフェラーゼのひとつ、ACTが関わっている。しかし、これまでBAHDアシルトランスフェラーゼについて立体構造が解明されているものは一部の機能を持つものに限られており、アミド形成を触媒する*N*-アシルトランスフェラーゼについては、最近、われわれがACTについて最初の報告をしたばかりである[1]。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ポシドがチューリップポシド変換酵素(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オルソログ産物のTaACT2(コムギ由来)を用い、TgTCEについては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, 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およびMonoQ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、BL-5Aを用いてX線回折強度データを収集し

た。TgTCEB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。アグマチンが結合するためには、CoA側基質が酵素と結合する必要がある可能性もあるため、不活性変異体やアグマチン構造類縁体を用いて、構造の取得を目指す予定である。

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 α -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。

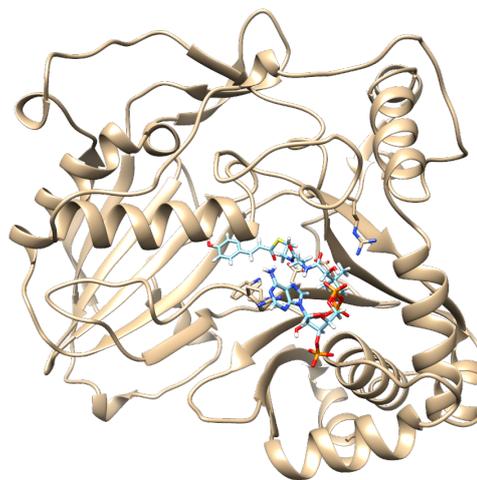


図1: HvACT1-p-coumaroyl-CoA 複合体構造

4 まとめ

ACT はアシル基供与体との複合体構造を得ることができ、結合に関与する残基の特定をすることができたが、受容体側基質との複合体は得ることができなかった。N-アシルトランスフェラーゼ特有の機能解析には受容体との作用を明らかにする必要がある。また、TgTCE はアポ酵素の構造を取得することができたが、リガンドとの複合体を得られていない。今後、新たな結晶化条件の検討も含めて、構造取得を目指す。

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