

# 加水分解反応を触媒しないカルボキシエステラーゼ

## 「チューリップシド変換酵素」の構造解析と有用物質生産への応用

富山県立大学工学部生物工学科 野村 泰治

### 【略歴】

- 1999年 3月 京都大学農学部生物機能科学科卒業
- 2004年 3月 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻博士課程修了・博士（農学）
- 2001年 4月～2004年 3月 日本学術振興会 DC1 特別研究員（京都大学）
- 2004年 4月～2007年 3月 日本学術振興会 PD 特別研究員（京都大学）
- 2007年 4月～2009年 4月 米国 Donald Danforth Plant Science Center, Postdoctoral Fellow
- 2009年 5月～2009年 9月 日本学術振興会海外特別研究員（Donald Danforth Plant Science Center）
- 2009年 10月～2014年 3月 富山県立大学工学部生物工学科 助教
- 2014年 4月～現在 富山県立大学工学部生物工学科 講師

### はじめに

植物二次代謝産物の生理学的存在意義には不明な点が多いが、病原体に対する生物活性を示す二次代謝産物は植物体の化学防御に関与していると考えられている。筆者が研究対象としているチューリップには、グルコースエステルであるチューリップシド (Pos) 類が主要二次代謝産物として著量蓄積している。一方、Pos 類のアグリコンのラクトン化体はチューリップリン (Pa) 類とよばれ、抗菌活性や殺虫活性を示すが、その含有量は健常植物では低く、病原体の侵入に伴って増加する。Pos 類（貯蔵体）から Pa 類（活性体）への変換反応は、従来は pH 依存的な非酵素的反応であると考えられていたが、筆者らはこの変換反応を触媒する「Pos 変換酵素」をチューリップ組織中に見いだした。この変換反応は分子内エステル転移反応であるが、意外なことに「Pos 変換酵素」の分子実体はカルボキシエステラーゼファミリー酵素であった。すなわち、本酵素が「加水分解反応を触媒しないカルボキシエステラーゼ」であることが明らかとなった。筆者らは、チューリップの二次代謝研究の過程で“偶然”巡り合ったこのユニークな酵素に着目し、酵素反応機構とチューリップ植物体における発現機構の解明、さらには有用物質生産への利用を目指して研究を進めている。

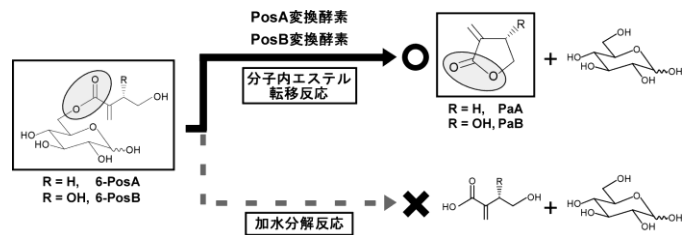


図 Pos変換酵素が触媒するPos類からPa類への変換反応

### チューリップシド変換酵素の同定と機能解析

チューリップには主要 Pos 類として 6-PosA と 6-PosB の 2 種類が存在しており、各々に対応する Pa 類は PaA, PaB とよばれる。筆者らは、6-PosA と 6-PosB に対する Pos 変換酵素活性の比が組織によって大きく異なることに着目し、Pos 変換酵素には、6-PosA から PaA、6-PosB から PaB への変換反応をそれぞれ触媒する「PosA 変換酵素」と「PosB 変換酵素」の 2 種類が存在するとの仮説を立て、チューリップ組織からの酵素精製による同定を試みた。その結果、PosA 変換酵素を花卉から、PosB 変換酵素を花粉から精製するとともに、酵素遺伝子の単離にも成功した<sup>1,2,5)</sup>。両 Pos 変換酵素の一次配列は、植物のカルボキシエステラーゼと 40% 程度の相同性を有し、同ファミリーの酵素を特徴付けるモチーフ配列や Ser-Asp-His からなる catalytic triad を保持しており、これらが酵素活性に必須であることも確認し

た。しかしながら、Pos 変換酵素は 6-Pos 類の加水分解反応は一切触媒せず、Pos 類から Pa 類への変換反応のみを触媒した。このことから、Pos 変換酵素は、分子内エステル転移によるラクトン形成反応のみを触媒する、新しいタイプのカルボキシルエステラーゼであることが明らかとなった。さらに、PosA および PosB 変換酵素にはそれぞれ複数のアイソザイムが存在しており、組織によって異なるアイソザイムが発現しているという分子多様性の存在を、酵素、遺伝子の両面から明らかにした<sup>3,5)</sup>。同時に、Pos 変換酵素が全組織で構成的に発現していることを見いだすとともに、本酵素が細胞内のプラスチドに特異的に局在していることを実験的に証明した。この発見に基づいて、健全細胞では 6-Pos 類と Pos 変換酵素は、液胞とプラスチドという異なるオルガネラに存在することによって不必要な酵素反応を回避し、感染や摂食による細胞破碎に伴い両者が接触すると、酵素反応によって速やかに活性物質である Pa 類を生成するという、チューリップの化学防御機構を新たに提唱した。

### チューリップシド変換酵素を用いた物質生産

Pa 類は  $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ブチロラクトンと総称され、抗菌物質としてだけではなく、機能的な高分子材料の単量体や生物活性物質の合成中間体、さらには抗変異原性剤として、各種分野への利用の可能性が多数報告されている化合物である。特に PaB は、PaA にみられるアレルギー性が無いことから、天然抗菌剤としての産業利用が以前から注目されているが、簡便な化学合成法は確立されていない。そこで筆者らは、Pos 変換酵素を用いた酵素法による PaB 調製プロセスを確立した<sup>4)</sup>。本プロセスは、酵素および基質原料にチューリップの球根生産過程で副生する未利用バイオマスを用いることを特徴とする。酵素は廃球根の粗酵素を繰り返し使用が可能な固定化酵素とし、基質には 100 品種以上のスクリーニングから見いだされた 6-PosB 高含有品種花部の含水エタノール抽出物を使用した。さらに、酵素反応液からの PaB の精製では、活性炭と含水エタノールのみを用いることで、簡便、低コストでなおかつ石油由来溶媒を一切使用しないクリーンな環境での PaB の調製を可能とした。

### 今後の展望

Pos 変換酵素の結晶構造解析を進め、反応機構を分子レベルで解明する。並行して、PosA および PosB 両変換酵素の基質特異性の決定要因を解明するとともに、エタノール耐性型 PosB 変換酵素を創製し、上記の PaB 生産プロセスへ適用することで、プロセスの効率化を図りたいと考えている。さらに、基質特異性の改変による新規有用物質生産への応用も展望している。組換え Pos 変換酵素は中性緩衝液中 4℃ において、精製後 4 年以上にわたってほぼ完全に活性を維持できるほど高い安定性を有している。この特性は本酵素の産業利用を図る上で大きなアドバンテージとなり得るので、高い安定性に寄与している構造要因の解明も進めていきたい。本酵素が今後産業界で利用される酵素となることを期待しつつ、これらの課題に取り組んでいきたいと考えている。

### 謝辞

本研究は富山県立大学工学部生物工学科植物機能工学講座において行われたものです。本研究の機会を与えていただき、日頃から惜しみないご指導とご協力を賜っている当講座教授・加藤康夫先生に厚く御礼申し上げます。また、現所属への着任以来ご支援いただいている荻田信二郎先生（現 県立広島大学 教授）に感謝申し上げます。

### 参考文献

1. Nomura T, Ogita S, Kato Y, *Plant Physiol*, 159, 565-578 (2012)
2. 野村泰治, 加藤康夫, *バイオサイエンスとインダストリー*, 70, 360-364 (2012)
3. Nomura T, Tsuchigami A, Ogita S, Kato Y, *Biosci Biotechnol Biochem*, 77, 1042-1048 (2013)
4. Nomura T, Hayashi E, Kawakami S, Ogita S, Kato Y, *Biosci Biotechnol Biochem*, 79, 25-35 (2015)
5. Nomura T, Murase T, Ogita S, Kato Y, *Plant J*, 83, 252-262 (2015)