

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15448

研究課題名(和文)陸上植物に進化的に保存されたカルコン合成酵素の活性制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of chalcone synthase activity evolutionarily conserved in land plants

研究代表者

和氣 駿之(Waki, Toshiyuki)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：10793705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フラボノイド生合成の初発酵素であるカルコン合成酵素(CHS)は、その機能の重要性にも関わらず、試験管内での反応では生成物特異性が低いことが知られていた。近年、我々はCHSとの相互作用タンパク質としてカルコン異性化酵素類似タンパク質(CHIL)を見出し、CHILはCHSの生成物特異性のあいまいさを矯正し、フラボノイド生合成に必要なカルコンを優先的に生成するように作用すること、このCHILの機能が陸上植物に広く保存されていることを明らかにした。本研究では、CHS-CHILの複合体構造およびタンパク質間相互作用を介したCHILによるCHSの活性制御機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラボノイドは陸上植物に普遍的に蓄積する植物特化代謝産物であり、植物の生存戦略だけでなく、食品に含まれる機能性成分としても重要な化合物群である。CHSはこのフラボノイド生合成に必要な鍵酵素であり、CHSもまた陸上植物に普遍的に保存されている。したがって、本研究によるCHSの活性調節機構の解明は、植物において進化的に保存されたフラボノイドの生産機構の理解やその生産制御に重要な知見となる。また、本研究は、タンパク質間相互作用を介した酵素の特異性あいまいさの矯正機構として非常にユニークなものであり、今後、相互作用を介した酵素の活性調節機構を解析する基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Chalcone synthase (CHS) is the first committed enzyme of the flavonoid biosynthetic pathway that catalyzes the condensation of CoA substrates to produce chalcone, a common flavonoid precursor. However, recombinant CHS enzymes are known to produce significant amounts of by-products during their in vitro reaction because of the derailment of the chalcone-producing pathway. Recently, we have shown that the promiscuity of CHS is relieved by the nonenzymatic partner chalcone isomerase-like protein (CHIL), the physical interactions between CHIL and CHS are widely conserved among land plants (bryophyte to angiosperms). In this study, the structure model of CHS-CHIL protein complex was obtained through AlphaFold2, and functional characterization of recombinant CHS mutants revealed one aspect of CHIL's regulatory mechanism of CHS activity.

研究分野：植物生化学

キーワード：フラボノイド カルコン 二次代謝 メタボロン タンパク質間相互作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは C₆-C₃-C₆ の基本骨格を有する植物特化代謝産物の総称であり、紫外線防御を始めとして陸上植物の生育に重要な役割を果たす。フラボノイド合成の初発酵素は植物型ポリケチド合成酵素 (PKS) に分類されるカルコン合成酵素 (CHS) であり、*p*-coumaroyl-CoA を開始基質として malonyl-CoA を 3 回縮合した後、分子内環化反応によりカルコン (2',4,4',6'-tetrahydroxychalcone, THC) を生成する (図 1)。CHS はフラボノイド合成への分岐点を触媒する重要な鍵酵素であるが、その生成物特異性は低く、試験管内の反応では THC の生成とともに環化位置の異なる副生成物も生成する (図 1)。ダイズ (*Glycine max*) の CHS1 の場合、反応生成物の 43% が副生成物である *p*-coumaryltriacyetic acid lactone (CTAL) となる。

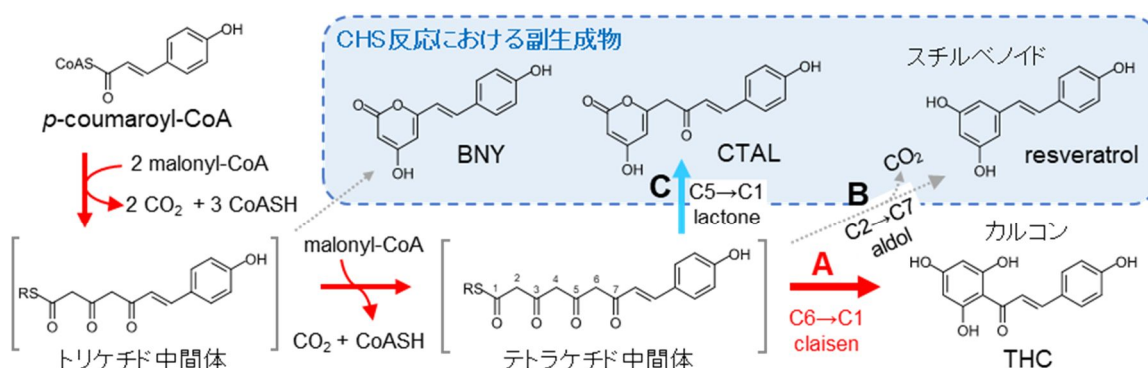


図1 CHSが触媒する反応

我々は、フラボノイド代謝酵素群が植物細胞内で弱いタンパク質間相互作用により生体膜上に集合し、多酵素複合体 (メタボロン) を形成することを示してきた。そして、様々な植物種におけるメタボロン形成の解析から、CHS とカルコン異性化酵素類似タンパク質 (CHIL) の相互作用が陸上植物において広く保存されていることを見出した。CHIL は、カルコン異性化酵素 (CHI) と似た一次構造と立体構造を有するが、CHI としての触媒残基を一部欠損しており CHI 活性を持たない。しかし、CHIL の欠失はフラボノイド蓄積量の大幅な減少に繋がることから (Morita *et al.*, *Plant J.*, 2014), CHIL は何らかの機構によりフラボノイド合成に関わることが示唆されていた。CHIL が組換え CHS の活性に及ぼす影響を解析したところ、CHIL は CHS の比活性を約 10 倍も増大させ、CHS 反応における副生成物 (CTAL) の生成を抑制する (ダイズ CHS1 の場合、43% 10%) ことが明らかになった。

また、CHS は陸上植物に保存される 2 量体型の PKS であり、植物型 PKS の中でスーパーファミリーを形成している。この CHS スーパーファミリーには、CHS と異なるカルボニル求核付加反応を主経路とするスチルベン合成酵素 (STS) (図 1, 反応 B を主に触媒する) やクマロイル三酢酸合成酵素 (CTAS) (図 1, 反応 C を主に触媒する) が存在する。これら PKS と CHS 間の配列類似度は非常に高い (一般に 90% 以上) ことから、STS および CTAS もまた CHIL による制御を受けることを予想した。しかしながら、予想に反して CHIL はこれら型 PKS とは相互作用せず CHIL による機能も発揮されなかった。したがって、CHIL は型 PKS の中でも CHS 特異的に作用することが示唆され、CHS スーパーファミリーにおける PKS の機能分化には CHIL との相互作用が重要な役割を果たしてきたことが想定された。しかし、CHIL がどのように CHS を認識しているのか、なぜ型 PKS の中で CHS のみが CHIL を必要とするのか、不明な点は未だ多く存在する。

2. 研究の目的

本研究では、「(1) CHIL と CHS の相互作用様式の解明」および「(2) CHIL による CHS 活性の制御機構解明」により、陸上植物に進化的に保存された CHIL による CHS の活性化・生成物特異性制御の作用メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CHIL と CHS の相互作用様式の解明

CHS-CHIL の相互作用界面を明らかにするため、CHS および CTAS, STS の配列アライメントから CHS 変異体を作製し、酵母 two-hybrid (Y2H) 法およびバイオレイヤー干渉法による相互作用解析を行った。

また、クロスリンカー試薬を用いて CHS と CHIL を架橋し、LC-MS/MS 解析により架橋ペプチドを同定することで相互作用界面の同定を試みた。クロスリンカー試薬による架橋効率は非常に低かったため、クロスリンカー試薬の種類やタンパク質濃度、反応時間、用いる CHS, CHIL の由

来植物種を検討し、CHS-CHIL を効果的に架橋する反応条件を決定した。SDS-PAGE により架橋タンパク質を分離後、ゲルから切り出してトリプシンにより消化し、LC-MS/MS 解析を行った。

さらに、AlphaFold v2.3 により CHS-CHIL の複合体モデルを作製し、特徴的な CHIL のヘアピン構造に着目して CHIL 変異体を作製し、Y2H による相互作用解析を行った。

(2) CHIL による CHS 活性の制御機構解明

CHIL による CHS の活性化機構を解析するため、CHS の活性阻害剤に着目して大腸菌組換え酵素を用いた活性測定を行った。阻害剤としては apigenin などのフラボノイドや CoA-SH、アセチル CoA などを検討した。また、ダイズ CHS1-CoA の共結晶構造を参照して CoA 結合に重要なアミノ酸残基にアラニン変異を導入した変異型 CHS を作製し、活性測定を行った。活性阻害剤やアミノ酸残基の変異が CHS 活性に及ぼす影響を詳細に解析し、そこに CHIL がどのように CHS 活性に影響を及ぼすかを評価することで CHIL の作用機構を考察した。

4. 研究成果

(1) CHIL と CHS の相互作用様式の解明

Y2H および BLI 法による変異体 CHS と CHIL の相互作用解析から、CHS の基質トンネル入口 (CoA 結合サイト) 周辺領域に変異を導入した複数の CHS 変異体において CHIL との相互作用が非常に弱くなることが示された。したがって、CHS の CoA 結合サイトが CHIL との相互作用に重要であることが示唆された。

クロスリンカー試薬による CHS-CHIL の架橋により、非常に低収率ながら CHS と CHIL が 1 対 1 で架橋されたと推定されるタンパク質バンドを検出することができた。このタンパク質バンドをトリプシン消化後 LC-MS/MS 解析を行うことで 1 対の架橋ペプチドを同定することができた。

AlphaFold v2.3 により CHS-CHIL の複合体モデルを構築し (図 2)、CHIL のヘアピン構造の 1 アミノ酸変異体を用いた Y2H により、CHS-CHIL の複合体形成に重要な CHIL のアミノ酸残基を特定することができた。

上述の Y2H および BLI、クロスリンカー MS による実験結果は、AlphaFold v2.3 により構築された図 2 の CHS-CHIL 複合体モデルにより矛盾なく説明することができた。さらに、最近、X 線結晶構造解析からも CHS-CHIL の複合体構造の詳細が明らかになりつつあり、この結晶構造も図 2 の CHS-CHIL 複合体モデルと非常に類似していることが示された。したがって、図 2 に示す CHS-CHIL 複合体モデルは実際の CHS-CHIL 複合体構造を正しく表現していると考えられる。

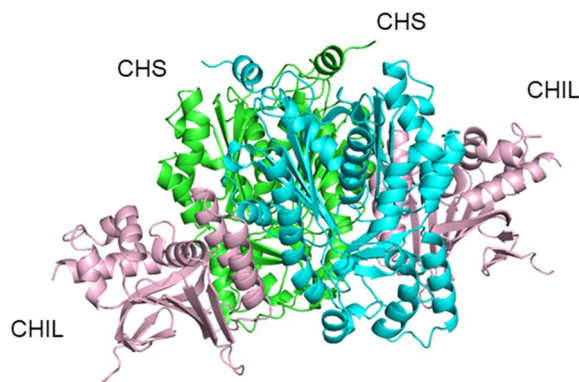


図2 AlphaFold v2.3によるCHS-CHIL複合体モデル

(2) CHIL による CHS 活性の制御機構解明

阻害剤を用いた CHS の活性測定の結果、apigenin は CHS の主生成物であるカルコンおよび副生成物である CTAL の生成をともに大きく阻害するのに対して、CoA-SH はカルコンの生成のみを抑制することが示された (図 3, 左の図)。CHIL は apigenin による阻害を解消することはほとんどできなかったが、CoA-SH による阻害を部分的に解消することが示された (図 3, 右の図)。これら結果から、CoA-SH 阻害の特殊性が示され、CoA-SH は CHS の Claisen 環化 (図 1, 反応 A) を特異的に阻害することが示唆された。

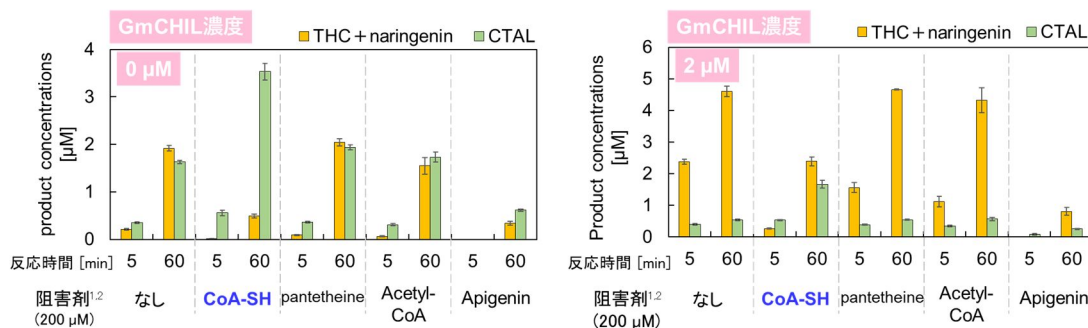


図3 CHSの活性阻害剤の影響

次に CHIL との相互作用や CoA-SH 阻害との関連が強く示唆された CHS の CoA 結合サイトに着目し、CHS1-CoA 共結晶構造を参照して CoA 結合に重要なアミノ酸残基をアラニンに変異させた CHS 変異体を作製して活性測定を行った。3 つのアミノ酸残基に着目してそれぞれの変異体の活

性測定を行ったところ、これら変異体は副生成物である CTAL の生成量が大きく減少した(図4)。これは、CoA 結合残基と CoA-SH との相互作用がアラニン置換により弱められた結果、CHS 反応によりリリースされる CoA-SH による阻害が低下したためであると考えられる。また、CHIL を添加して活性測定を行うと、変異体 B は CHIL による活性矯正を受けないことが分かった。速度論解析から、変異体 B は kcat 値および Km 値ともに大きく増強されることが示された。このように、CHS の CoA 結合重要残基は CHS の活性に大きく影響し、CHIL による活性矯正もこれら残基が関与していることが示唆された。

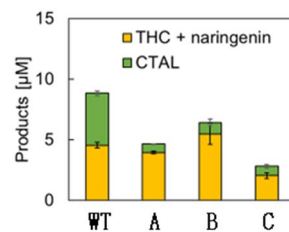


図4 CHS変異体の活性測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------------|
| 1. 著者名 Waki Toshiyuki, Takahashi Seiji, Nakayama Toru | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Managing enzyme promiscuity in plant specialized metabolism: A lesson from flavonoid biosynthesis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BioEssays | 6. 最初と最後の頁 2000164 ~ 2000164 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.202000164 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Imaizumi Riki, Mameda Ryo, Takeshita Kohei, Kubo Hiroki, Sakai Naoki, Nakata Shun, Takahashi Seiji, Kataoka Kunishige, Yamamoto Masaki, Nakayama Toru, Yamashita Satoshi, Waki Toshiyuki | 4. 巻 89 |
| 2. 論文標題 Crystal structure of chalcone synthase, a key enzyme for isoflavonoid biosynthesis in soybean | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics | 6. 最初と最後の頁 126 ~ 131 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prot.25988 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 和氣駿之, 高橋征司, 中山亨 | 4. 巻 84 |
| 2. 論文標題 タンパク質間相互作用によるフラボノイド生合成酵素の活性制御:カルコン合成酵素の特異性あいまいさの矯正 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 酵素工学ニュース | 6. 最初と最後の頁 27 ~ 31 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 和氣 駿之 | 4. 巻 100 |
| 2. 論文標題 フラボノイド生合成における縁の下の力持ち | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 生物工学会誌 | 6. 最初と最後の頁 254 ~ 254 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.100.5_254 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 和氣駿之 |
| 2. 発表標題 フラボノイド生合成に進化的に保存されたカルコン合成酵素の活性制御機構とフラボノイドメタボロン |
| 3. 学会等名 ビタミン学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宇野海地，中野拓也，和氣駿之，高橋征司，中山亨 |
| 2. 発表標題 カルコン異性化酵素類似タンパク質（CHIL）によるカルコン合成酵素（CHS）の活性制御メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第155回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 和氣駿之，土井大和，宇野海地，山田彩友美，今泉璃城，高橋征司，山下哲，中山亨 |
| 2. 発表標題 補酵素Aによるカルコン合成酵素の阻害機構 |
| 3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| 6. 研究組織 | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|