

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24770096
研究課題名(和文)フラボノイド・メタボロンのX線結晶構造解析

研究課題名(英文)X-ray crystallography of flavonoid metabolon

研究代表者
溝端 栄一(Mizohata, Eiichi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90571183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ブドウのフラボノイド・メタボロンにおいて最終反応を担うフラボノール3位グルクロン酸転移酵素(VvGT5)に着目し、X線結晶構造解析を行った。本酵素と基質またはそのアナログとの複合体の構造を3種類決定することに成功し、それらの構造とすでに構造が報告されているVvGT1との構造を比較することで、VvGT5の反応機構および特徴的な糖供与体の選択性が生み出される構造基盤を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Grapevine glycosyltransferase 5 (VvGT5) is a UDP-glucuronic acid:flavonol-3-O-glucuronosyltransferase, catalyzing the 3-O-specific glucuronosylation of flavonols using UDP-glucuronic acid as a sugar donor to produce flavonol 3-O-glucosides, which are important bioactive phytochemicals. In this study, I determined crystal structures of VvGT5 in three kinds of structural states, and revealed structural basis of the sugar donor selectivity of the enzyme during catalysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

メタボロンは、ある代謝経路において隣り合う一連の反応を触媒する酵素群が非共有結合的な相互作用によって会合した、超分子複合体のひとつの概念である。今日では、糖代謝、核酸代謝、脂質代謝等の約20種類の代謝経路についてメタボロンの存在が指摘されている。植物の二次代謝物を代表するフラボノイド系化合物は7,000以上もの分子種が知られている。これらの生合成を担う酵素の多くは、単独では反応速度が極めて遅い上（毎秒1回転未満）、細胞中の基質濃度も低いために触媒効率が低い。そのため、メタボロンを形成することで、低濃度の出発物から最終生成物への平行を右に傾け、効率的な二次代謝物の生合成を達成している。フラボノイド・メタボロンを構成する主要3酵素は、それぞれがファミリーを形成している。植物は、合成するフラボノイドの分子種に応じて、会合するファミリー酵素の組み合わせを変換していると考えられている。メタボロンの構造と機能は未解明な点が多く、これらの酵素の立体構造の解析が期待されている。

2. 研究の目的

ブドウ (*Vitis vinifera*) のフラボノイド・メタボロンは、その構成要素と考えられる3種の酵素、UDP-グルクロン酸:フラボノール糖転移酵素 (VvGT5)、フラボノイド 3'水酸化酵素 (VvF3'H)、フラボノール合成酵素 (VvFLS1) が会合した分子複合体である。本研究では、これらの酵素のX線結晶構造解析を行い、フラボノイド代謝の反応機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 発現系の構築と精製

3つの酵素について、ポリヒスチジンタグ融合蛋白質として発現するプラスミド構築を行った。これらのプラスミドを、それぞれ、大腸菌に導入して培養し、可溶性画分に目的蛋白質が発現する菌体の種類と温度と培養時間の条件を検討した。

次に、大腸菌に発現させたこれらの蛋白質を、Ni アフィニティーカラムとゲル濾過カラムによるクロマトグラフィーにより行った。特に、VvF3'H の精製では、大腸菌の破碎時に界面活性剤を添加することが成功の鍵であった。

(2) 結晶化と構造解析

VvGT5、VvFLS1、VvF3'H の結晶化条件を、それぞれ、アポ型、複数のリガンド結合型でスクリーニングを行った。その結果、VvGT5 で十分な大きさの良質な結晶が得られた。一方、VvFLS1 と VvF3'H では微細結晶は得られたが、構造解析をするには至らなかった。結晶のX線回折実験は、大型放射光施設 SPring-8 および Photon Factory にて行った。

4. 研究成果

(1) VvGT5 の全体構造

VvGT5 のアポ型構造は、 α ヘリックスと β シートが交互に並んだロスマンフォールドと呼ばれる構造モチーフを二つ持つ GT-B フォールドをとっていた (図1)。向かって左側の N 末端ドメインが糖受容体を認識し、右側の C 末端ドメインが糖供与体の認識を担っていることがわかった。

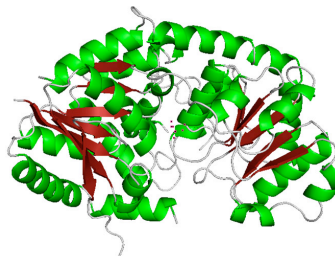


図1. VvGT5 のアポ型の結晶構造.

(2) ケルセチン結合による構造変化

アポ型構造と基質であるケルセチン結合型の構造を比較した (図2)。糖受容体であるケルセチンが活性中心残基の His20 の近くに存在していることが確認された (距離約 3.5Å)。ケルセチンは第四位の酸素原子と Thr19 のヒドロキシル基の水素原子との間で水素結合を形成していた。また、フラバン骨格の芳香環と Phe371 が π - π スタッキングを形成することで安定化されていた。興味深いことに、アポ型にケルセチンが結合することに伴って、Phe198 の配向が回転して、ケルセチンと π - π スタッキングを形成する構造変化を起こすことがわかった。

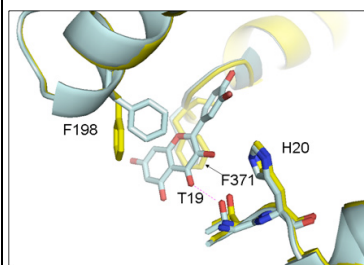


図2. VvGT5 のアポ型(黄色)とケルセチン結合型(水色)の構造比較。

(3) UDP 結合による構造変化

次に、アポ型と UDP 結合型構造を比較した (図3)。UDP の結合は主に、UDP のウラシル基が Ala332 の主鎖と静電相互作用し、 β 位のリン酸基ではループ上の Ser279 の水素原子と水素結合を形成することで安定化されていることが分かった。UDP の結合による大きな構造変化は観察されなかった。

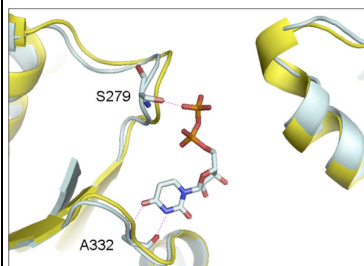


図3. VvGT5 のアポ型(黄色)とUDP結合型(水色)の構造比較。

(4) VvGT5 と VvGT1 のケルセチン結合型構造の比較

VvGT5 のケルセチン結合型構造を、過去に解かれていたアインザイム VvGT1 のケルセチン結合型構造 (PDB ID:2C9Z) と比較した (図4)。大きな特徴として、活性中心残基 His20 に対してケルセチンの結合位置にずれが生じていることが分かった。一次配列を比較すると、VvGT5 では VvGT1 に比べてループを形成しているアミノ酸残基が2残基欠失し、VvGT5 ではループが短くなっていた。これにより、ケルセチンと相互作用するループ構造が変化し、ケルセチンを認識するアミノ酸残基が移動した結果、ケルセチンの相対的な位置にずれが生じたと考えられた。

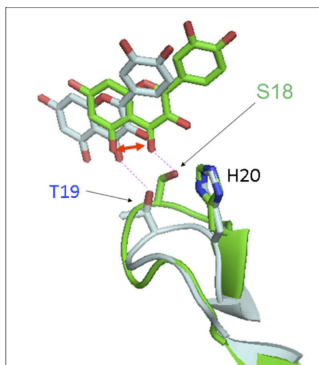


図4. VvGT5(水色)と VvGT1(緑色)のケルセチン結合型構造の比較。

(5) VvGT5 と VvGT1 の UDP 結合型構造の比較

VvGT5 の UDP 結合型構造を、過去に解かれていた VvGT1 の UDP 結合型構造 (PDB ID:2C1X) と比較した (図5)。VvGT1 では、UDP のリン酸基に対して、左右にある二つのループ構造が近づき、ループ上の Thr19 および Thr280 とリン酸基が相互作用をしていた。一方、VvGT5 では、右側のループは、2つのアミノ酸残基の欠失によって VvGT1 よりも短くなっているため、リン酸基から遠く離れた位置に存在していた。そして、左側にあるループの位置も、VvGT1 よりも手前に位置しており、リン酸基と相互作用するアミノ酸残基も Ser279 に置き換わっていた。また、ウラシル基と相互作用するループの位置も VvGT5 と VvGT1 では、大きく異なっていた (約 4Å)。以上から、これら3つのループ構造の変化によって、UDP の結合様式は VvGT5 と VvGT1 で大きく異なっていると考えられた。

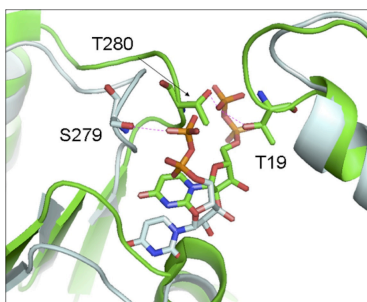


図5. VvGT5(水色)と VvGT1(緑色)のUDP結合型構造の比較。

(6) 糖供与体の選択性に影響を与えるループ領域環境の差異

今回の構造は UDP 結合型であったが、本来の基質である UDP-グルクロン酸が結合する場合、グルクロン酸基は、図6の黄色で示した位置に存在するはずである。今回、UDP の結合様式が VvGT5 と VvGT1 で異なっていたことから、この糖残基の位置と配向も VvGT5 と VvGT1 で大きく異なっていると考えられる。つまり、3つのループ構造の差異が生み出した糖残基の環境の違いが、VvGT5 と VvGT1 の糖供与体の選択性に大きく影響していると考えられた。

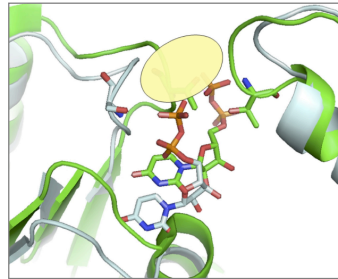


図6. 触媒部位中の予測されるグルクロン酸残基の結合部位。

(7) 予想される VvGT5 の反応メカニズム

VvGT1 で提唱されている糖転移反応では活性中心残基である His20 が Asp119 によって塩基として働き、ケルセチンの第3位のヒドロキシル基を活性化させ、これが糖残基のアノマー炭素に攻撃することで反応が進行すると考えられている。つまり、糖転移反応を行うにはこの His20, ケルセチン, および UDP-糖の距離が重要である。

VvGT5 の3者複合体モデル構造と VvGT1 の3者複合体の結晶構造を重ね合わせてみると、興味深い事に、VvGT5 の糖供与体の位置は、VvGT1 の糖供与体の位置よりも、ケルセチンから4Åも離れていることがわかった (図7)。このことから、VvGT5 は VvGT1 とは異なり、二つの基質が同時に入ることによって、反応の進行過程において、糖供与体と受容体が近づくような構造変化が起こる可能性が示唆された。

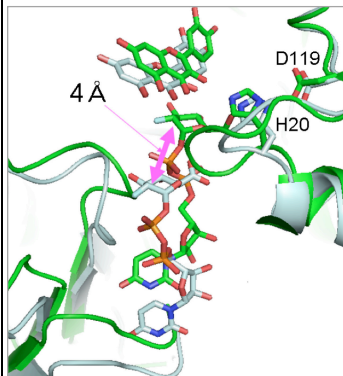


図7. VvGT5(水色)と VvGT1(緑色)の三者複合体構造の比較。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- (1) Mizohata E, Okuda T, Hatanaka S, Nakayama T, Horikawa M, Nakayama T, Ono E, Inoue T: "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of UDP-glucuronic acid:flavonol-3-O-glucuronosyltransferase (VvGT5) from the grapevine *Vitis vinifera*" *Acta Crystal* **F69**, 65-68 (2013), 査読有
- (2) Kawato T, Mizohata E, Shimizu Y, Meshizuka T, Yamamoto T, Takasu N, Matsuoka M, Matsumura H, Kodama T, Kanai M, Doi H, Inoue T, Sugiyama A. Structure-based design of a streptavidin mutant specific for an artificial biotin analogue. *J Biochem* **157**, 467-475. (2015), 査読有
- (3) Kawato T, Mizohata E, Meshizuka T, Doi H, Kawamura T, Matsumura H, Yumura K, Tsumoto K, Kodama T, Inoue T, Sugiyama A. Crystal structure of streptavidin mutant with low immunogenicity. *J Biosci Bioeng* **119**, 642-647. (2015), 査読有
- (4) Fukuda Y, Tse KM, Lintuluoto M, Fukunishi Y, Mizohata E, Matsumura H, Takami H, Nojiri M, Inoue T. Structural insights into the function of a thermostable copper-containing nitrite reductase. *J Biochem* **155**, 123-135. (2014), 査読有

[学会発表] (計5件)

- (1) 溝端栄一, 奥田卓馬, 畑中聖加, 中山泰亮, 松村浩由, 井上豪. ブドウの有用二次代謝物を合成する糖転移酵素の構造解析. 第2回 JACI/GSC シンポジウム(第13回 GSC シンポジウム) (メルパルク大阪), 2013.06.06.
- (2) Eiichi Mizohata, Takuma Okuda, Seika Hatanaka, Taisuke Nakayama, Manabu Horikawa, Toru Nakayama, Eiichiro Ono, Tsuyoshi Inoue: "Crystal structure of UDP-glucuronic acid:flavonol-3-O-glucuronosyltransferase from the grapevine *Vitis vinifera*" *AsCA 12/CRYSTAL 28*, Adelaide, Australia, 2012.12.02.
- (3) 畑中聖加, 溝端栄一, 奥田卓馬, 中山泰亮, 堀川学, 中山亨, 小埜栄一郎, 井上豪. ブドウ由来 UDP 糖依存性グリコシルトランスフェラーゼの基質特異性の構造基盤の解明. 平成 24 年度日本結晶学会年会・東北大学片平キャンパス, 仙台, 2012.10.25.

- (4) 畑中聖加, 溝端栄一, 奥田卓馬, 中山泰亮, 堀川学, 中山亨, 小埜栄一郎, 井上豪. ブドウ由来糖転移酵素 VvGT5 の X 線結晶構造解析. 第 2 回 CSJ 化学フェスタ (2012)・東京工業大学・大岡山キャンパス, 2012.10.14.
- (5) 畑中聖加, 溝端栄一, 奥田卓馬, 小埜栄一郎, 井上豪. ブドウ由来フラボノール 3 位グルクロン酸転移酵素 (VvGT5) の X 線結晶構造解析. 日本農芸化学会関西支部 第 474 回講演会・京都府立大学合同講義棟第三講義室, 2012.05.26.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~inoue-tken/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
溝端 栄一 (MIZOHATA, Eiichi)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 90571183

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: