

令和3年度農学部特別研究費研究経過報告書

1. 研究者名 伊原 誠
2. 研究課題名 X線結晶構造解析によるピレスリン合成酵素 TcGLIP の基質認識機構の解明
3. 研究目的・内容

近年、環境負荷の少ない害虫防除剤としてピレスリンが着目されている。しかし、その供給はシロバナムシヨケギクに依存している。本研究では、ピレスリン生合成に関わる TcGLIP の触媒機構を解明することで、ピレスリン類の発酵生産に向けた TcGLIP の基質認識機構を明らかにすることを目的に、構造生物学的アプローチを核とした関連研究を行った。

4. 研究の経過

TcGLIP は 2012 年に Kikuta らによって報告されたピレスリン生合成における鍵酵素の一つである。これまでに、酵素学的な観点から重点的な解析が行われ、TcGLIP は基質の絶対立体配置を厳密に認識することが明らかになっている。しかしながら、TcGLIP の基質認識がどのように行われているのかは依然明らかになっていない。

そこで本研究では、構造生物学的アプローチによって、TcGLIP がその基質の化学構造をどのように認識するのかを明らかにするために各種実験を行った。TcGLIP の結晶化には、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌によって発現させ、アフィニティ精製およびイオン交換カラムクロマトグラフィーにより高度に精製した。このようにして精製した TcGLIP は、TcGLIP の反応基質の共存・非共存下での結晶化スクリーニングに供した。

その結果、TcGLIP は酵素基質非共存下においてのみ複数の条件で微結晶を与えた。そこで、SPring-8 タンパク質結晶回折実験用ビームラインにて回折実験を行った。回折実験の結果、逆格子の大きな反射を与える結晶（低分子）も見られたが、大半は、構造解析に供することが不可能な非常に弱い反射、もしくは反射を与えない結晶であることが明らかになったため、継続して結晶構造解析が可能な良質な結晶を与える条件を探索中である。

一方で、近年、計算科学的にタンパク質の構造を予測するという研究手法も取られるようになってきている。そこで、AlphaFold2 を用いた TcGLIP 構造予測と、AutoDock Vina による基質結合部位の探索を実施した（図）。得られた立体構造モデルは、これまでに酵素学的なアプローチにより、その活性発現に重要であると結論付けられている 3 つのアミノ酸（セリン、アスパラギン、ヒスチジン）を活性中心と考えられるコア部分に配置しており、その相対的な位置関係は合理的なものであった。

ドッキングシミュレーションによりモデル基質である菊酸アナログの結合部位を探索したところ、活性中心近傍に位置する疎水的な空間に、菊酸が有する特徴的な化学構造「シクロプロパン部分」が認識されていることが示唆された（図 B）。この結果は、菊酸のシクロプロパン部分をベンゼン環に置き換えた類縁化合物が TcGLIP の基質にならないという報告を合理的に説明できると考えられる。

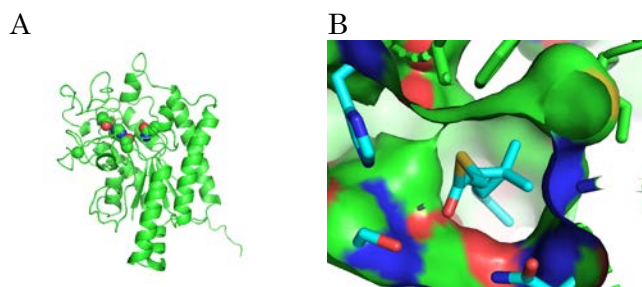


図. TcGLIP の予測構造モデル (A) 全体構造 (B) 基質結合ポケット

5. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究では、当初の目的としていた結晶構造解析による構造解析が未達成である。構造予測とドッキングシミュレーションを組み合わせることで、TcGLIP による菊酸部分の構造認識に重要なアミノ酸のいくつかは推定されたことから、今後は TcGLIP の基質認識を修飾するタンパク質設計、すなわち石油化学に依存しないピレスロイド生産の基盤開発の検討も並行して行っていきたいと考えている。また、TcGLIP はその配列からはリパーゼであることが予測されているタンパク質であり、ピレスリン生合成以外の機能を有する可能性がある。今後は、多機能酵素としての TcGLIP の機能・構造解析研究にも発展させていく予定である。