

ツベロン酸グルコシドグルコシダーゼの基質認識機構の解析  
食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野  
姫野奈美

【背景と目的】

病傷害ストレスへの応答に関与する植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) の 12 位が水酸化されたツベロン酸 (TA) およびその配糖体 (ツベロン酸グルコシド, TAG) は植物に普遍的に存在する. TA はバレイショの塊茎誘導物質として単離されたが, トマトにおいて傷害応答遺伝子の発現を誘導する作用があることが報告されており, TA も JA 同様に病傷害応答のシグナル物質として機能する可能性がある. TAG を加水分解する酵素は TA 量の調整に重要であると考えられる. 我々はイネから TAG 加水分解活性を指標としてアミノ酸配列が 85% 同一の 2 つのツベロン酸グルコシドグルコシダーゼ (OsTAGG1 および OsTAGG2) を同定した. OsTAGG2 は病傷害ストレス処理で発現が誘導されることから防御応答に寄与すると推測される. 本研究ではメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて組換え OsTAGG2 を作製し, 生理活性物質の配糖体を含む様々な基質への活性を中心に諸性質を解析した. さらに OsTAGG1 と OsTAGG2 の基質特異性は明確に異なっていたため, OsTAGG2 を用いてこれらの特異性の違いを導く構造因子の特定を目指した.

【結果および考察】

*P. pastoris* による組換え OsTAGG2 を調製した. 組換え OsTAGG2 は病害抵抗性を誘導する植物ホルモンであるサリチル酸の配糖体 (SAG) に対して TAG よりも高い  $k_{cat}/K_m$  を示した. 一方, 組換え OsTAGG1 は TAG に高い  $k_{cat}/K_m$  を示した. OsTAGG2 の立体構造から 6 アミノ酸 (W181, T182, N186, F193, V250 および H252) がアグリコン部位との結合の形成に関わると推測された. このうち W181, N186 および H252 は OsTAGG1 との間で保存されておらず, 対応するアミノ酸はそれぞれ L, A および N であったため, W181L, N186A および H252N を作製した. また, OsTAGG1 のモデル構造の解析から, OsTAGG1 においては, OsTAGG2 にはない G の挿入により M187 が基質と相互作用することが予測された. このため, OsTAGG2 における相当アミノ酸 L192 の直前に G を挿入し L を M に置換した L192M+G を作製した. これら 4 つの変異酵素の基質特異性を検討した. W181L と N186A では *p*-ニトロフェニル  $\beta$ -D-グルコシド (*p*NPG) に対する  $k_{cat}/K_m$  は野生型酵素 (WT) のそれぞれ 48% および 68% であったが, これらの TAG および SAG に対する活性は WT の 3% 以下であった. H252N では *p*NPG および TAG に対する  $k_{cat}/K_m$  が WT の 105% および 89% と WT に近い値であったが, SAG に対する  $k_{cat}/K_m$  は WT の 28% に低下した. これより H252 は OsTAGG2 において SAG への高活性に重要なアミノ酸残基の一つであると考えられた. L192M+G では *p*NPG, TAG および SAG に対する  $k_{cat}/K_m$  が低下し, それぞれ WT の 41%, 59% および 6.7% であった. *p*NPG や TAG と比較して SAG に対する活性の低下が大きかったことから, L192M+G においては直前の G の挿入により基質の近くに配置された M が SAG との結合を妨げたと推測された.