

## タマネギ催涙成分が作られる酵素反応の構造・理論基盤

佐藤優太<sup>1</sup>, 荒川孝俊<sup>1,2</sup>, 伏信進矢<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科, <sup>2</sup>東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構

### Structural and Theoretical Bases of the Enzymatic Reaction Producing the Onion Lachrymatory Compound

Yuta SATO<sup>1</sup>, Takatoshi ARAKAWA<sup>1,2</sup>, Sinya FUSHINOBU<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,

<sup>2</sup>Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo

#### Abstract

タマネギの催涙成分はネギ属植物が豊富に持つ含硫化合物に由来し、催涙因子合成酵素 (LFS) によって生成される。LFS が触媒する催涙因子生成反応は、基質が不安定な化合物である、生成物の立体選択性に特徴があるなど、非常に独特である。本稿では、実験のみからのアプローチでは結論の得られにくいタイプの酵素 (= 生体触媒) に対し、X線結晶構造解析、生化学的解析、計算化学的手法を組み合わせることで反応機構の解釈を得た、最新の研究事例について紹介する。

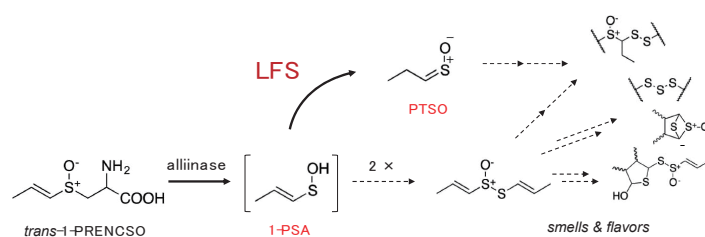
#### 1. はじめに

タマネギやニンニクといったネギ属植物が持つ特徴の1つに、独特な香気が挙げられる。この香気の原因となる化合物はネギ属植物の細胞中に存在する含硫成分が由来となって生成される [1]。生成された含硫化合物は香気と同時に風味や薬効等のさまざまな生理的作用をもたらすとされており、古くから注目を集めてきた [2]。

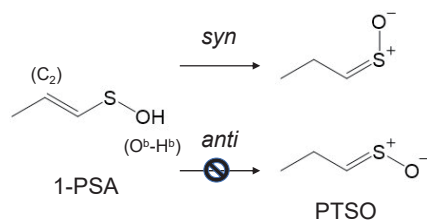
ネギ属植物に共通する含硫成分であるシステインスルホキシド (CSO) は、生体構成アミノ酸の1つであるシステインの側鎖のチオール基に炭化水素基と酸素原子が付加した化学構造をしている。外敵に襲われる、包丁で切られるなどによってネギ属植物の細胞が損傷すると、細胞質に蓄えられていた CSO は別の細胞内区画に存在する酵素アリイナーゼと接触し、その作用によって C-S 結合が切断される。切断で生じるスルフェン酸 (R-SOH) は反応性が極めて高いために、スルフェン酸や活性化化合物同士が自発的に反応する。こうした反応が繰り返され、CSO は香気成分を含む複雑な組成を持った下流の含硫化合物へと代謝されていく (Fig. 1)。

タマネギを切ると涙が出る現象も CSO を起源とする含硫化合物の1つが引き起こす。催涙因子と呼ばれてきたこの原因物質は化学名では *syn*-プロパンチアール-S-オキシド (PTSO) という [3]。PTSO は揮発性の分子で、催涙効果に加えタマネギ臭を我々に感じさせるタマネギのアイデンティティを形作る化合物でもある。PTSO は非酵素的には生成しないという点においても他の CSO 代謝物とは一線を画しており、PTSO の生成反応を担う触媒分子として催涙因子合成酵素 (LFS) が今世紀初頭に発見された [4]。LFS は、タマネギの主要 CSO である *trans*-1-プロペンスルフェン酸 (1-PSA) が分解されて生じる *trans*-1-プロペンスルフェン酸 (1-PSA) に作用し、スルフェン酸基中の水素原子 "H<sup>b</sup>" が分子内の別の炭素原子 "C<sub>2</sub>" に移動する反応を触媒して PTSO を合成する (Fig. 2) [5]。

LFS の作用機序の詳細は発見以来調べられてこなかった。LFS が作用する分子のスルフェン酸は、求核性と求電子性を併せ持つ非常に不安定な化合物であり、解析に困難を伴うことが主な理由に挙げられる [6]。とりわけ、スルフェン酸自身を含む含硫官能基に対して高い反応性を持つ



**Figure 1** Biological degradation pathway of a CSO compound in onion (*Allium cepa*). Solid and dashed arrows represent enzymatic and nonenzymatic reactions, respectively.



**Figure 2** Scheme of reaction catalyzed by LFS. Produced PTSO is strictly regulated to *syn*-configuration (“*syn*-effect”).

ため、2分子以上の縮合や転位反応が生じやすく反応の制御・追跡が非常に難しい [7, 8]。遊離する低分子スルフェン酸に関する知見は極めて乏しいが、LFSはそのようなスルフェン酸を認識し積極的に作用する類例のない酵素である。

一方で、LFSの触媒機構について推測されていることも存在する。LFSによって生成される PTSO 分子には、C=S結合周りでシス型配座を好んで水素転位するという *syn* 効果が認められている [9]。LFSが作用する前の 1-PSA は、溶液中で熱力学的に安定な *anti* 型の構造を取りやすいと考えられる。そのため、LFSは反応初期状態における 1-PSAの配向を *syn* 型に限定し、*syn* 効果を促す機構を持ち合わせていると予想される。

本稿では、以上のように他に類を見ない酵素 LFS の作用機序解明にいたる研究について紹介する。タンパク質 X線結晶回折実験による LFS 立体構造決定と基質アナログ分子が結合した状態の観察に加えて、変異体 LFS を用いた生化学実験、計算化学・分子シミュレーションを組み合わせて LFS 触媒機構を提唱し、その素過程を検証した [10]。

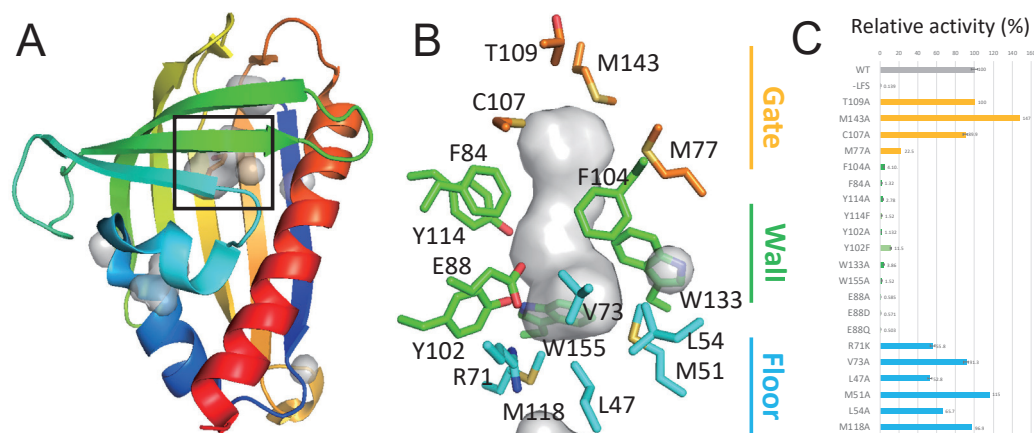
## 2. LFS の X線結晶構造解析および変異体 LFS を用いた生化学的解析

大腸菌を用いて異種発現したタマネギ由来 LFS を精製・結晶化し、得られた結晶を用いて PF の PX ビームライン

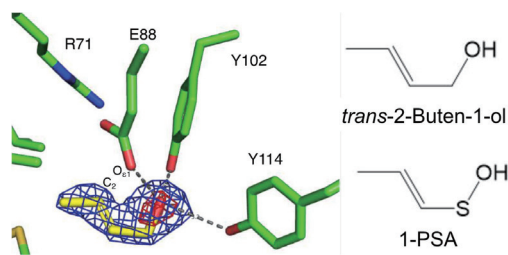
にて X線回折データを収集した。最大分解能 1.7 Å で決定された結晶構造 (Fig. 3A) から、LFS は脂溶性分子の結合タンパク質に多く見られる α グリッフォールドを形成することがわかった。また、分子の中央に向かって活性部位と考えられるポケットが観察された (Fig. 3B)。そこで、ポケットを形成する残基の点変異体を作製し、PTSO 生成能力を野生型 LFS と比較した (Fig. 3C)。ポケット形成残基のうち、芳香族側鎖や荷電側鎖で作られる側面 (“Wall”) にあたる残基の変異体は、軒並み PTSO 生成量が野生型に比べて 10% 未満に減少し、この部位が酵素活性に重要であると示された。

また、基質 1-PSA の安定なアナログ分子であるクロチルアルコール (*cis/trans*-2-ブテン-1-オール混合体) との複合体構造を決定した。クロチルアルコール存在下で結晶化した LFS を用いて X線回折実験を行うと、LFS のポケット内部にクロチルアルコール由来と考えられる U 字型の電子密度が観測された (Fig. 4)。この電子密度に *trans*-2-ブテン-1-オールを当てはめると、ヒドロキシ基がグルタミン酸 88 番 (E88)、チロシン 102 番 (Y102)、チロシン 114 番 (Y114) との間の 3 つの水素結合により認識されている様子が観察された。また炭化水素鎖領域は、熱力学的に安定な直線状の配向ではなく、E88 残基周りで平面状に折れ曲がった配向をしていた。この構造を本来の基質 1-PSA に置き換えると、C-S 結合の周りは *syn* 型の配向となる。1-PSA もクロチルアルコールと同じ様式で LFS に認識されるのであれば、LFS は 1-PSA を結合部位で炭化水素鎖領域の向きを *syn* 型に限定する。このことが *syn* 効果を促す原因であると推測される。

クロチルアルコールとの複合体構造において、E88 側鎖の酸素原子 “O<sub>e1</sub>” は、1-PSA における C<sub>2</sub> にあたる炭素原子とスルフェン酸基の酸素 “O<sup>b</sup>” にあたる酸素原子の 2 つの原子に近い位置に、ほぼ同じ距離だけ離れて存在していた。この状況から、LFS の触媒機構としては H<sup>b</sup> がプロトンとして E88 を経由して C<sub>2</sub> へと戻るといったシャトル機構



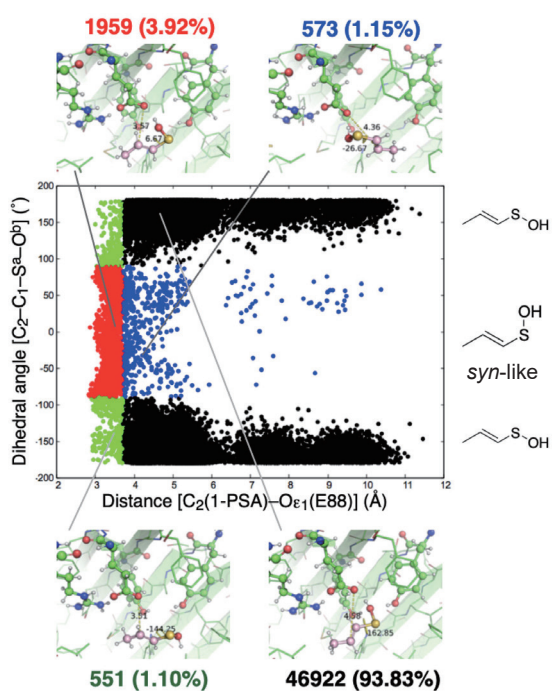
**Figure 3** Structure and functional characterization of LFS. A) Crystal structure of LFS. Putative catalytic pocket exists at the center of the molecule. B) Residues forming putative catalytic pocket (close-up view around the box in Fig. 3A). C) Mutagenesis analyses. Bar graph represents relative yields of PTSO by wild type (WT; colored in grey) and variant LFSs. The yields were severely decreased when residues at “Wall” (colored in green) were substituted.



**Figure 4** Zoom up view of the catalytic center of LFS. *trans*-Isomer of crotyl alcohol (*trans*-2-buten-1-ol) is modeled to the map. Hydroxy group is recognized by the 3 hydrogen bonds, and the carbohydrate chain is situated next to E88.

が仮定された。

ここで、酸性残基である E88 に一時的にとはいえプロトンが移動しうるのかについては検証の必要がある。E88 のグルタミン変異体 (E88Q) やアスパラギン酸変異体 (E88D) の PTSO 生成活性は、アラニン変異体 (E88A) と同程度の対野生型比 1% 未満であった (Fig. 3C)。そのため触媒機構における E88 には、1-PSA に近い位置で電荷的に酸性であるだけでなく、位置的に厳密に調整された役割を担っていると考えられる。また、スルフェン酸の  $pK_a$  はグルタミン酸に比べて高く [11]、加えて E88 には R71 が隣接しておりプロトンの共有によって E88 の  $pK_a$  は更に低下していると予想される [12]。本当に LFS がこの機構で PTSO を生成しているのかを検証するため、次に我々は計算化学的なアプローチを行った。



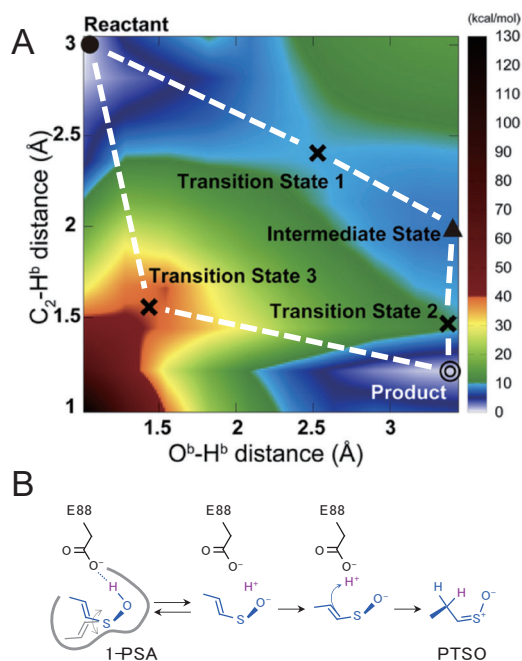
**Figure 5** Distribution plot of 1-PSA during the MD simulation. 1-PSA showed *syn*-like conformation next to E88 in approximately 2,000 poses (colored in red) out of 50,000 poses.

### 3-1. MD シミュレーションによる動的挙動の観察

まず、分子動力学 (MD) 法で LFS および 1-PSA の動的挙動を追跡した (Fig. 5)。1-PSA はポケットの中で高い運動性を示したが、室温条件で計算した 500 ns の時間のうち 20 ns 程度の間は、複合体構造におけるクロチルアルコールと同様に *syn* 型の配向をとっていた。これにより LFS が反応初期状態の 1-PSA を *syn* 型の配向に限定しうることが示唆された。

### 3-2. QM/MM 法による反応経路の探索

次に、量子力学/分子力学計算 (QM/MM 法) を用い反応経路の探索を行った。結晶構造からターゲット構造を作成し、変異体活性解析から最重要と判断された R71, E88, Y102, Y114 と 1-PSA を QM 層に含め、 $H^b$  を動かした際のエネルギー値を描画した結果、2つの反応経路が見つかった (Fig. 6A)。1つは、反応初期状態 (Reactant) と反応終了時の状態 (Product) の間に遷移状態が1つ (Transition State 3) ある経路であるが、こちらはエネルギー障壁が非常に高く現実的に起こりえないと考えられる。もう1つの経路は1つの中間状態 (Intermediate State) と2つの遷移状態 (Transition State 1, Transition State 2) を持つ経路である。この経路は  $H^b$  がプロトンとして E88 経由で  $C_2$  へとシャトルされる機構を再現しており (Fig. 6B),  $H^b$  が  $O^b$  から離れ E88 に近づく段階 (Reactant  $\rightarrow$  Intermediate State) と、 $H^b$  が  $C_2$  に近づく段階 (Intermediate State  $\rightarrow$  Product) から構成されていた。最も高いエネルギー障壁でも TS2



**Figure 6** Proposed pathways of the proton transfer at the catalytic center of LFS. A) Potential energy surface according to two distances ( $C_2-H^b$  and  $O^b-H^b$ ) during QM/MM calculation. Two pathways were found, and the one with two transition states and one intermediate state showed relatively low energy barrier (9.19 kcal/mol). B) Schematic representation of the plausible pathway.



の  $\Delta E = 9.19$  kcal/mol であり、この反応経路が起こりうることを示された。

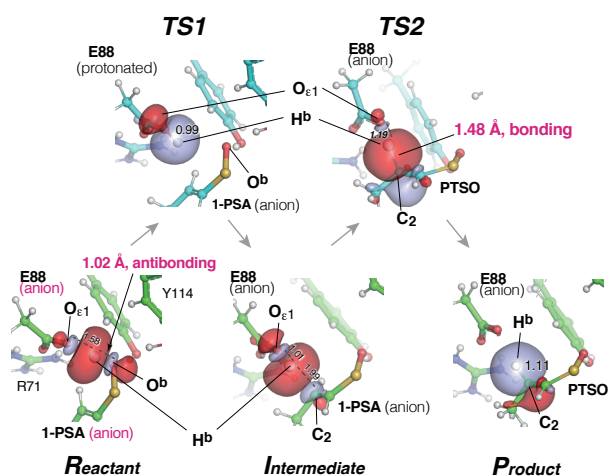
### 3-3. 自然結合軌道計算によるプロトン化状態の観察

最後に、QM/MM によって得られた反応経路上の各電子状態について自然結合軌道を計算し、 $H^b$  のプロトン化状態を観察した (Fig. 7)。これにより、反応開始の定常状態 (Reactant) における  $H^b$  は、 $O^b$  と共有結合距離に存在するものの、その軌道は反結合性であることがわかった。つまり、1-PSA が LFS のポケット内部で *syn* 型の配向で認識された際、脱プロトン化が誘発され、反応を駆動することが示唆された。また  $H^b$  は、Transition State 1 を除いて  $O_{e1}$  と反結合性の軌道を形成することがわかった。つまり、E88 のプロトンを受け取る塩基としての役割は限定的で、スルフェン酸基から送られてきたプロトンを  $C_2$  原子へと即座に送り返していると考えられる。また、Transition State 2 では  $C_2-H^b$  間で  $1.48 \text{ \AA}$  と非常に長い C-H 結合が形成されている点も特徴的である。R71 により強められた E88 の酸としての性質は TS2 のエネルギー障壁低減に大きく寄与すると推定される。

以上の計算化学的アプローチにより、LFS により 1-PSA が *syn* 型に認識されることをきっかけに、 $H^b$  がプロトンとして E88 を経由して  $C_2$  へと素早くシャトルされるという触媒機構が、確かに起こりうるものとして解釈できた。

### 4. まとめ

本研究ではタマネギの催涙成分を合成する酵素 LFS について、構造生物学、生化学、計算化学の手法を用いて解析し、これらを総合することで触媒機構を詳細に提唱した。LFS の基質スルフェン酸についての知見は未だ限られているが、様々な手法を組み合わせることで信用に足る解釈を得た。



**Figure 7** Natural bond orbitals of Reactant, Transition State 1 (TS1), Intermediate State, Transition State 2 (TS2), and Product. Orbitals belonging to  $H^b$  atoms are shown and distances between  $H^b$  and adjacent atoms are labeled. Dashed lines represent the pairs of atoms that do not form covalent bonds.

反応性の高い含硫化合物をさらに酵素的に変換する LFS の存在は、植物が自身の生存に含硫化合物を利用するに至った長い歴史を思わせる。本研究のように含硫化合物と酵素にまつわるしくみを物理的な観点も入れて調べることを通して、我々ヒトとこれら生物や物質との関係性が将来にわたり一段と高まると期待する。

### 5. 謝辞

本研究を行うにあたり、お世話になりました KEK-PF スタッフの皆様へ厚くお礼申し上げます (放射光共同利用実験課題番号 2018G043)。また試料の提供をいただきましたハウス食品グループ本社の今井真介博士、柘植信昭博士、正村典也博士、様々な計算化学的研究を行っていただきました東京大学大学院農学生命科学研究科の山田真行氏、森脇由隆助教、寺田透准教授、清水謙多郎教授に感謝申し上げます。

### 引用文献

- [1] E. Block, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31**, 1135 (1992).
- [2] P. M. Kris-Etherton, K. D. Hecker, A. Bonanome, S. M. Coval, A. E. Binkoski, K. F. Hilpert, A. E. Griel, and T. D. Etherton, *Am. J. Med.* **113**, 71S (2002).
- [3] M. H. Brodnitz and J. V. Pascale, *J. Agric. Food Chem.* **19**, 269 (1971).
- [4] S. Imai, N. Tsuge, M. Tomotake, Y. Nagatome, H. Sawada, T. Nagata, and H. Kumagai, *Nature* **419**, 685 (2002).
- [5] N. Masamura, M. Aoyagi, N. Tsuge, and S. Imai, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1799 (2012).
- [6] V. Gupta and K. S. Carroll, *Biochimica et Biophysica Acta.* **1840**, 847 (2014).
- [7] E. Block, A. J. Dane, and R. B. Cody, *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4617 (2010).
- [8] T. Yoshimura, E. Tsukurimichi, S. Yamazaki, S. Soga, C. Shimasaki, and K. Hasegawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **18**, 1337 (1992).
- [9] E. Block, J. Z. Gillies, C. W. Gillies, A. A. Bazzi, D. Putman, L. K. Revelle, D. Wang, and X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7492 (1996).
- [10] T. Arakawa, Y. Sato, M. Yamada, J. Takabe, Y. Moriwaki, N. Masamura, M. Kato, M. Aoyagi, T. Kamoi, T. Terada, K. Shimizu, N. Tsuge, S. Imai, and S. Fushinobu, *ACS Catal.* **10**, 9 (2020).
- [11] T. Okuyama, K. Miyake, T. Fueno, T. Yoshimura, S. Soga, and E. Tsukurimichi, *Heteroatom Chem.* **3**, 577 (1992).
- [12] A. Gutteridge and J. M. Thornton, *Trends Biochem. Sci.* **30**, 622 (2005).

(原稿受付日: 2020年9月19日)

## 著者紹介

佐藤優太 Yuta SATO



東京大学大学院農学生命科学研究科  
博士後期課程3年  
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1  
TEL: 03-5841-5152  
FAX: 03-5841-5152  
e-mail: sato-yuta463@g.ecc.u-tokyo.ac.jp  
略歴：2018年東京大学大学院農学生命

科学研究科博士後期課程進学

最近の研究：植物由来酵素を利用した高効率な含硫成分合成系の構築，古細菌由来硫黄代謝酵素のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析。

趣味：音楽。最近ピアノを練習し始めました。

荒川孝俊 Takatoshi ARAKAWA



東京大学大学院農学生命科学研究科  
助教  
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1  
TEL: 03-5841-5149  
FAX: 03-5841-5149  
e-mail: arakawa@g.ecc.u-tokyo.ac.jp  
略歴：2007年東京農工大学大学院工

学府博士後期課程修了 博士（工学），科学技術振興機構 ERATO 研究員，京都大学 産官学連携研究員を経て2013年より現職

最近の研究：生体構成分子の構造・機能・物性

趣味：歴史散策，食べ歩き

伏信進矢 Shinya FUSHINOBU



東京大学大学院農学生命科学研究科  
教授  
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1  
TEL: 03-5841-5151  
FAX: 03-5841-5151  
e-mail: asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp  
略歴：1999年 博士（農学），東京大学

大学院農学生命科学研究科 助教，准教授を経て2012年より現職

最近の研究：酵素（特に糖質関連酵素）の構造と機能

趣味：SNS