

セサミン代謝酵素に関する研究

岡崎 紗英 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 達彦 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

リグナンとは、フェニルプロパンユニットが2つ縮合することで合成される植物由来化合物の総称であり、セサミンはその一種である。ゴマの種子に多く含まれているセサミンは、抗酸化作用をはじめ、血中コレステロールの低下、脂質低下、抗高血圧、抗炎症などの特性をもつ生理活性物質として知られており、近年では、機能性食品やサプリメントに利用され、注目を集めている。セサミンのこの有用な生理活性は、セサミンが体内で代謝されることで効果が現れる場合もあり、ヒトやマウスの肝臓において、シトクローム P450 酵素により、抗酸化作用の強いカテコール体セサミンへと変換されることが分かっている。しかし一方で、微生物においては、セサミンの代謝に関わる酵素及び遺伝子について同定された例はなかった。

そこで、当研究室では微生物由来のセサミン代謝酵素の精製と同定が行われ、その結果、セサミンをセサミンモノカテコール、ジカテコールへと2段階変換するセサミン代謝酵素 *SesA* を発見した。この酵素はテトラヒドロ葉酸 (THF) を補酵素としてメチレン基転移反応を触媒する新規酵素であることが明らかになった。また、セサミン分解反応の第二段階として、ORF2 と ORF3 がセサミンモノカテコール、ジカテコールの代謝に関与していると示された。ORF2、ORF3 は酸化還元反応に関わると推定されている。

しかし、ORF2 と ORF3 について、pH 及び温度の依存性や安定性、その他の詳細な性質については未だ明らかになっていないことが多い。そこで本研究では、セサミンの *SesA* 以降の代謝に関わる ORF2 と ORF3 の諸性質解明を目的とした。

【方法】

ORF3 の精製

ORF3 を異種発現した大腸菌を培養後、細胞破碎を行い、無細胞抽出液を調製した。その後、抽出液を各種クロマトグラフィーに供することで ORF3 を単離精製した。

アロステリック調節に関する検討

ORF3 はセサミン代謝産物によりアロステリック調節を受ける可能性があることから、そのアロステリック調節のリガンド候補として、セサミン、セサミンモノカテコール、セサミンジカテコールを用いることとした。まず、ORF3 の反応液に、セサミン、セサミンモノカテコール、セサミンジカテコールをそれぞれ添加し、基質の減少量で ORF3 の活性を調べた。

次に、セサミンモノカテコール、セサミンジカテコールの濃度検討を行い、ORF3 の活性を測定した。

ORF3 の結晶化

結晶構造からアロステリック部位と反応メカニズムを特定するため、ORF3 の結晶化を行った。酵素濃度は 12.0 mg/ml と 19.3 mg/ml に調製し、スクリーニングキットを用いて、結晶化プレ-

ートを作製した。プレートを 20°C で 1 週間インキュベートし、その後、観察した。

【結果・考察】

アロステリック調節に関する検討

セサミン、セサミンモノカテコール、セサミンジカテコールを用いたエフェクター分子検討の結果、セサミンモノカテコール及びジカテコールを添加した際に、コントロールと比較して、基質の減少量が上昇した。このことから、セサミンモノカテコール、ジカテコールがアロステリック調節のリガンドとして機能し、ORF3 の活性を上昇させていることが示唆された。

また、セサミンモノカテコール、ジカテコールの濃度検討の結果から、どちらの場合でも、その濃度が高くなるにつれて ORF3 の比活性も上昇するというデータが得られた。その活性上昇効果は、セサミンモノカテコールよりジカテコールの方が高く、セサミンジカテコールの方がリガンドとしての作用が大きいと考えられる。

ORF3 の結晶化

ORF3 の結晶化を試みたところ、スクリーニングキットのうちの 1 条件でタンパク質結晶と思われるものが観察された。しかし、得られた結晶の質及び再現性が低かったため、結晶化条件に関しては現在検討中である。今後は、きれいな結晶が得られ次第、X 線構造解析を行う予定である。