

ベラドンナコン由来トロパンアルカロイド生合成酵素の同定 およびその結晶構造解析

(申請代表者) 淡川孝義 東京大学大学院薬学系研究科 助教
(所内共同研究者) 森田洋行 資源開発研究部門天然物化学分野 教授

【要 旨】

【背景・目的】ナス科の植物から単離されるトロパンアルカロイドは、ヒヨスチアミンやコカインのような医薬品として貴重な成分を含む。これらの化合物は2位置換ピロリジン骨格を元に合成されると考えられるが、この骨格はmalonyl-CoAの脱炭酸によって生じるエノラートアニオンが*N*-methylpyrrolinium cationへと攻撃するMannich反応によって合成されるものと予想されている。この置換ピロリジン骨格の2位が*S*配座のものからヒヨスチアミンが、*R*配座のものからはコカインが合成される。多くの植物アルカロイド生合成において、このMannich反応は保存されており、鍵反応といえる。また、この生合成酵素によるMannich反応の立体配座の制御機構は酵素学的観点からも非常に興味深い。しかしながら、これまでトロパンアルカロイドの生合成鍵中間体への変換を触媒する生合成酵素については全く報告がなされていない。そのため、植物からトロパンアルカロイドの生合成鍵中間体への変換を触媒する生合成酵素の取得は極めて困難であると予想された。そこで我々は、そのモデルとなり得る微生物由来のMannich反応触媒酵素を探索し、トロパンアルカロイド生合成鍵中間体の生成を確認した上で、これを鋳型として植物からトロパンアルカロイド生合成鍵酵素の探索を行うほうが近道であると考え、微生物由来の酵素であるCarBに着目し、その機能解析を行った。

【方法・結果】CarBはL-glutamate semialdehydeとmalonyl-CoAを基質とし、Mannich反応を触媒する酵素である。L-glutamate semialdehydeは*N*-methylpyrrolinium cationと構造が似ており、CarBによるトロパンアルカロイド合成への応用が期待された。まず、CarBをHis-tagとの融合タンパク質として大腸菌に異種発現させ、その酵素標品を得た。次に、プロリンと*Bacillus subtilis*由来プロリン脱水素酵素を作用させて、L-glutamate semialdehydeを酵素合成し、そこにmalonyl-CoAとCarBを加えてインキュベートした。その結果、LC-ESIMS解析において、carboxymethylprolineの生成が確認された。

アルカロイド合成系ではMannich反応生成物はCoA体として放出され、それをPKSが基質として炭素鎖を伸長することで次の生合成経路へと受け渡されると予想されている。一方、CarBはMannich反応触媒後、ピロリジン骨格とCoA間のチオエステルを加水分解して生成物を与える。そこで、CarBの生成物をCoA体として取得するために、チオエステルの加水分解を担うと予想されているE131を種々のアミノ酸に置換した変異型CarBを構築し、これらを様々なタイプの植物由来III型PKSと共に加え、L-glutamate semialdehydeを基質として酵素反応を行った。その結果、トウゲシバ由来のHsPKSとともに酵素反応を行うと、酵素特異的な未知化合物が生産されることが判明した。本結果は、発酵工学的手法による植物アルカロイド生産系の構築の観点からも興味深い。現在、本化合物について構造決定を行っているところである。

・背景・目的

漢方薬の活性成分研究はこれまで単離、精製と言った天然物化学的な手法が主であった。しかし、これらの手法においては、検出が不可能な微量成分の同定は難しい。また近年、長年研究されてきた生薬から新たな成分を見出すのは困難である。そのような問題を解決するために、生薬成分の生合成酵素の同定、およびその利用といった手段に注目が集まっている。このような酵素反応によって、漢方薬中の微量成分の供給が可能となる。生合成酵素遺伝子を利用して、微生物生体内で化合物の生合成経路が構築できれば、醗酵法による微量成分の安定供給、ならびに非天然型基質の投与による *precursor-directed biosynthesis* 法を用いた非天然型化合物の生産につなげることができる。本研究では、ベラドンナコンに含まれるヒヨスチアミン、アトロピン等のトロパンアルカロイドを合成する生合成経路に注目する。

ナス科の植物から単離されるトロパンアルカロイドは、ヒヨスチアミンやコカインのような医薬品として貴重な成分を含む。これらの化合物は2位置換ピロリジン骨格を元に合成されると考えられるが、この骨格は *malonyl-CoA* の脱炭酸によって生じるエノラートアニオンが *N-methylpyrrolinium cation* へと攻撃する Mannich 反応によって合成されるものと予想されている。この置換ピロリジン骨格の2位が *S* 配座のものからヒヨスチアミンが、*R* 配座のものからはコカインが合成される。多くの植物アルカロイド生合成において、この Mannich 反応は保存されており、鍵反応といえる。また、この生合成酵素による Mannich 反応の立体配座の制御機構は酵素学的観点からも非常に興味深い。しかしながら、これまでトロパンアルカロイドの生合成鍵中間体への変換を触媒する生合成酵素については全く報告がなされていない。そのため、植物からトロパンアルカロイドの生合成鍵中間体への変換を触媒する生合成酵素の取得は極めて困難であると予想された。そこで我々は、そのモデルとなり得る微生物由来の Mannich 反応触媒酵素を探索し、トロパンアルカロイド生合成鍵中間体の生成を確認した上で、これを鋳型として植物からトロパンアルカロイド生合成鍵酵素の探索を行うほうが近道であると考え、微生物由来 CarB (Sleeman, M.C. & Schofield, C. J. *J. Biol. Chem.* (2003) 279, 6730-6736.) に着目し、その機能解析を行った(図1)。CarB は結晶構造も報告されているため(Sleeman, M. C. *et. al. J. Biol. Chem.* (2005) 280, 34956-34965.)、その反応改変による物質生産へも利用が容易であると考えられる。

・結果・考察

まず、CarB 酵素を調製し、その本来の基質である *pyrroline-5-carboxylate* を与えることによって活性型の酵素が単離されていることの確認を試みた。*pyrroline-5-carboxylate* の供給のために、*proline* を脱水素し、*pyrroline-5-carboxylate* を与える活性が同定されている *Bacillus subtilis* 由来の *proline dehydrogenase*(PDH) (Huang, T. C. *et. al. J. Agric. Food. Chem.* (2007) 55, 5097-5102.) を調製した。生成物を *O-aminobenzaldehyde* と反応させることにより、誘導体化し、MS と UV が検出できる状態に変換して、活性試験を行った。Ni-affinity 精製した組替え型 PDH を *proline* と FAD と共にインキュベートし、生じた生成物を誘導体化することで反応を検出した。その結果、ネガティブコントロールでは検出されない *m/z* 217 の化合物が検出されたことにより、PDH 反応を再構成し、その生成物を検出することに成功したことが分かった(図2)。また、より植物アルカロイド前駆体に構造が類似した *methyl proline* も脱水素反応に供したが、この場合 *negative control*、反応生成物間に差異が生まれず、PDH はこの基質を受け入れないことが明らかとなった。

以上より基質を供給する系の構築を達成したため、次に CarB 酵素の反応を試験することにした。CarB 遺伝子を Operone 社の人工 DNA 合成によって取得し、pET22a の T7 promoter 下にクローニングすることで発現プラスミドを得た。これを大腸菌に導入、IPTG 誘導による発現後、Ni-affinity 精製することによって CarB の精製酵素を取得した。得られた CarB 酵素を、*proline* を基質とした PDH 反応生成物とともにインキュベートすることにより反応を試験した。この結果、保持時間 17分付近に反応特異的な生成物ピークを検出した。このピークの *m/z* が生成物である *carboxymethylproline* の *m/z* と一致したため、活性型の CarB が得られたことを確認することに成功した。

CarB は *malonyl-CoA* を Mannich 反応にて縮合した直後、CoA に結合した中間体を加水分解することによって *carboxymethylproline* を与えると考えられている(Sleeman, M. C. *et. al. J. Biol. Chem.* (2005) 280, 34956-34965.)。一方、アルカロイド合成系を考えた際に、放出された中間体が PKS に受け入れられ、アルカロイド生産

に供されるためには、CarB 生成物は CoA エステルである必要がある。そこで、この反応をアルカロイド合成に応用するために、CoA エステルの加水分解を抑えた CarB 変異酵素の調製を試みた。CarB と同様の crotonase ファミリーに属する酵素 3-hydroxyisobutyl-CoA hydrolase の反応では、E143 がチオエステルの炭素原子を求核攻撃し、その後生じた E143 とのエステル結合を加水分解することによって生成物を与えることが知られている (Sleeman, M.C. et. al. *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 34956-34965.)。そこでチオエステルの加水分解せず、生成物を CoA として与える酵素の取得を目指し、CarB E131A, E131C, E131Q の変異酵素を調製した。これらの CarB 変異酵素を pyroline-5-carboxylate を基質として反応を行った所、CarB 変異体はいずれも carboxymethylproline 生成能が大きく減少していることが明らかとなった。一方、CarB 野生株の反応において、CoA エステルが生成物として与えられることも確認されたが、CarB 変異体の反応では CoA エステルの生成量が増大することは確認されなかった(図3)。この結果より、E131 は基質の認識に重要な残基であり、この変異体による CoA エステル合成能は期待できないことがわかった。一方、野生型 CarB 反応では CoA エステル体に相当する分子量ピークが検出されることがわかった。

以上の CarB 反応において検出された CoA エステルが、III 型 PKS のポリケタイド伸長反応に基質として用いられることが期待された。そこで、CarB の生成物である methylcarboxyl pyrroline-5-carboxylate CoA ester が PKS によって受け入れられ、炭素数が2増えた化合物が生成することを期待して、数種の III 型 PKS と CarB のカップリング反応を計画した。本研究では、当研究室で保有する植物由来の III 型 PKS のうち、1回縮合型のもの、あるいは、かさ高い基質を受け入れることが知られている DCS (Katsuyama, Y. et. al. *J. Biol. Chem.* (2009) 284, 11160-11170)、HsPKS1 (Morita, H. et. al. *PNAS* (2011) 108, 13504-13509)、ACS、QS (Mori, T. et. al. *J. Biol. Chem.* (2013) 288, 28845-28858)を選び、カップリング反応に用いた。CarB 反応に、malonyl-CoA と III 型 PKS を新たに追加して、そのカップリング反応を試験した。生成物を LC-ESIMS で検出した所、HsPKS と CarB のカップリング反応において、ネガティブコントロールにない化合物がごく少量生成することが分かった(図4)。今後、酵素反応の改変を行い生成物の収量を上げることで、これらの構造を明らかにすることを計画中である。

最後に、植物アルカロイドの基質である *N*-methyl pyrolium cation を有機合成により調製し、CarB の反応に供することで CarB が基質として受け入れるかどうか試験した。*N*-methyl proline と塩化ホスホリルを反応させ、酸クロリドを合成し、それを高温でインキュベートすることによって *N*-methyl pyrolium cation を調製した。その ¹H NMR スペクトルを測定し、期待した化合物が得られたことを確認した。このようにして得られた *N*-methyl pyrolium cation を malonyl-CoA と共に CarB をインキュベートした。しかし、反応液とネガティブコントロール間の差異が見られないことより、LC-ESIMS では CarB 反応生成物が検出できないことが明らかとなった。そこで、より高い検出感度を期待して ¹⁴C ラベルの malonyl-CoA を用いて CarB 反応を行った。その結果、やはりネガティブコントロールと違いが見られなかったことより、やはり反応は進行しないことが明らかとなった。

結論

PDH を用いた微生物由来 CarB 酵素への基質供給を行い、CarB のアッセイ系を確立した。これによって、酵素を用いた化合物生産、または醗酵法によるアルカロイド生産の足がかりを築くことに成功した。また、CarB の E131 変異体を作製し、それらが Mannich 反応を触媒しないことを明らかにした。これより、今後の CarB 酵素反応の物質生産への利用に有益な知見を得たこととなる。次に、CarB 酵素が生成物を CoA 体として放出することを示し、それが植物由来 III 型 PKS へ受け入れられることを示した。この結果を通して、植物アルカロイド合成に III 型 PKS が関わる可能性を初めて生化学的に立証した。今後、アルカロイド生産植物よりアルカロイド合成に関わる III 型 PKS の発見が期待される。

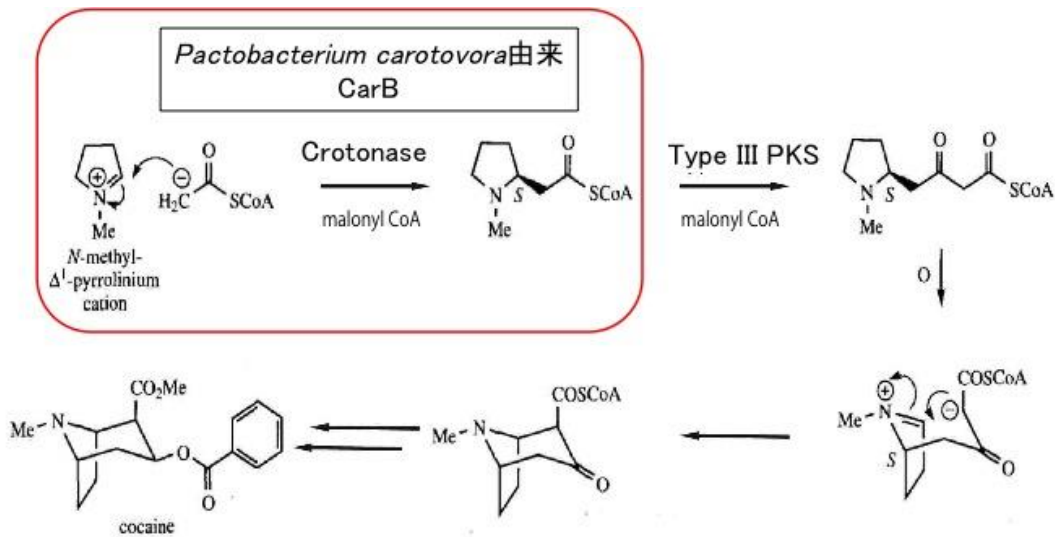
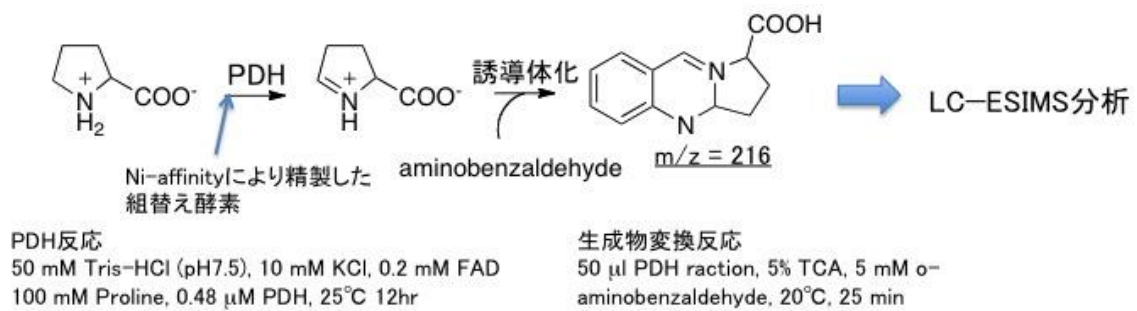


図1 CarB 反応のアルカロイド合成への利用



・ Extracted ion chromatogram $[M+H]^+ = 217$

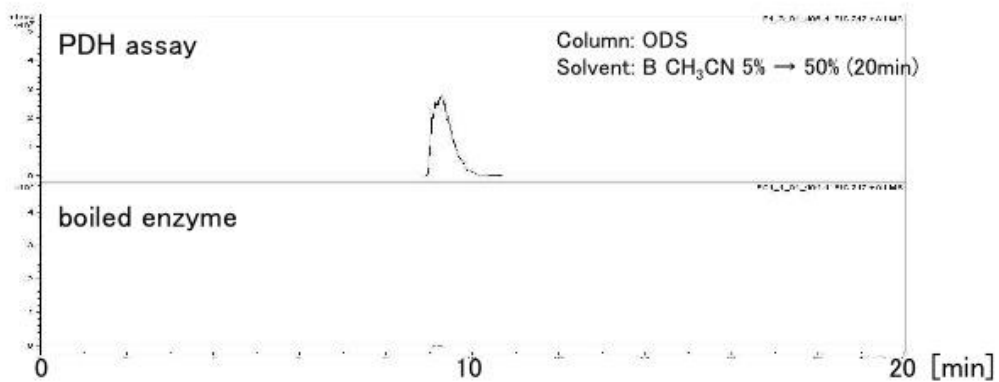
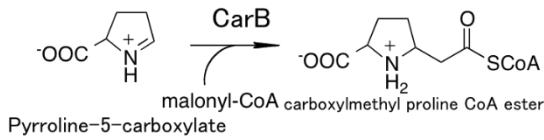
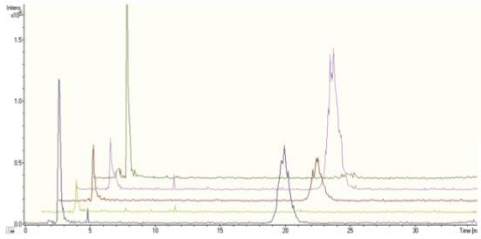


図2 PDH 反応の検出

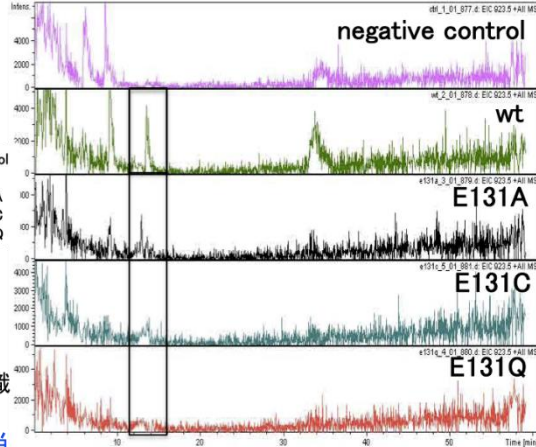


5 mM proline, 5 mM KCl, 100 μM FAD, 400 μM malonyl CoA, 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.48 μM Bn-PDH, 5 μM CarB, 50 μL scale, 37°C, 12 hr
 → precipitation of protein by methanol
 → LC-ESIMS analysis
 Column: ODS
 Solvent: A. 10 mM CH₃COONH₄, B. CH₃CN
 B 10% → 40% (40 min), 40% → 70% (5 min)

• Extracted ion chromatogram [M+H]⁺ = 174
 carboxymethyl proline

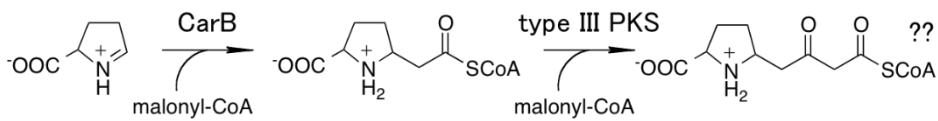


• Extracted ion chromatogram [M+H]⁺ = 923.5
 methylcarboxyl proline CoA ester



CarB変異体はいずれもcarboxymethylproline生成能を大きく減少していた。また、CoAエステル生成能も確認されなかった。よって、E131は基質の認識に重要なアミノ酸残基であったためと考えられる。一方、野生型CarB反応ではCoAエステル体に相当する分子量ピークが検出された。

図3 CarB またはその変異体反応の検出



5 mM proline, 5 mM KCl, 100 μM FAD, 400 μM malonyl CoA, 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.48 μM Bn-PDH, 5 μM CarB, + 5 μM type III PKS, 50 μL scale, 37°C, 12 hr
 → precipitation of protein by methanol
 → LC-ESIMS analysis Column: ODS-NH₂, Solvent: A. 0.1% CH₃COOH, B. CH₃CN (B 5% → 70%, 20 min)

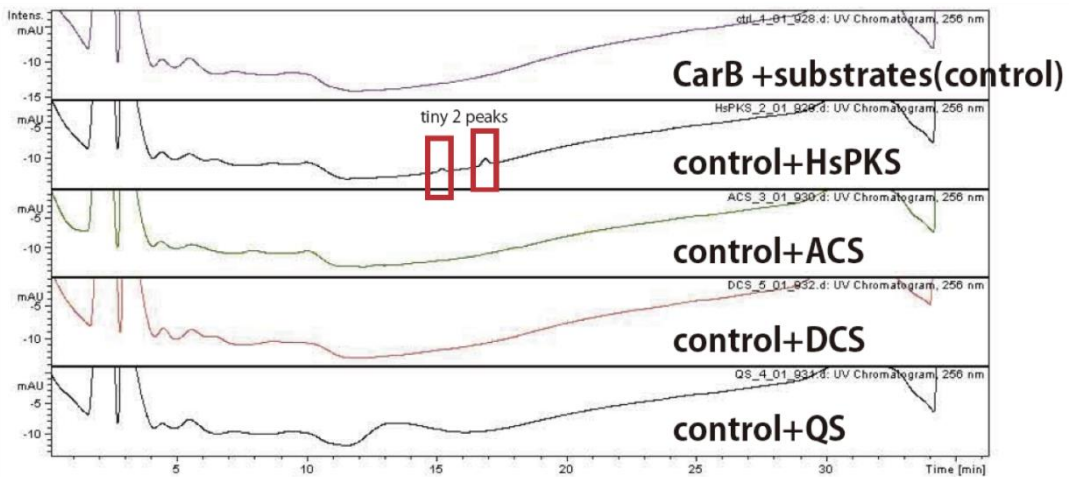


図4 CarB と III 型 PKS のカップリング反応の検出