

# ゴシュユと緑膿菌におけるキノロンアルカロイド生合成研究と機能改変酵素を用いた物質生産系の確立

申請代表者 森 貴裕 東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室 助教  
所内共同研究者 森田 洋行 天然物化学分野 教授

## 【報告セミナー要旨】

### 【目的】

生薬呉茱萸の基原植物であるミカン科のゴシュユ (*Euodia ruticarpa*) はキノロンアルカロイドのエボカルピン類を生成する。エボカルピンは、カルシウムチャネル拮抗作用を有する有用天然物である。一方、キノロンアルカロイドは緑膿菌からも単離されている。このうち、*Pseudomonas aeruginosa* が生産する 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) は、FabH 様酵素である PqsB、PqsC、及び PqsD により生合成されることが報告されている。しかし、植物においては、FabH 様酵素の関与により生合成されるアルカロイドは報告されていない。一方、Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) であるキノロン合成酵素はキノリノンアルカロイドを生合成する。また、ウコンのクルクミンは、Ⅲ型 PKS であるジケタイド CoA 合成酵素が feruloyl-CoA と malonyl-CoA から diketide-CoA を生成し、その加水分解産物である  $\beta$ -keto acid を、同じくⅢ型 PKS であるクルクミノイド合成酵素が feruloyl-CoA と縮合することで生成する。このことから、エボカルピン類は N-methylanthraniloyl-CoA、長鎖脂肪酸 CoA、malonyl-CoA の 3 種の基質から 2 種のⅢ型 PKS の触媒によって生合成されると予想される。本研究では、本作業仮説のもと、ゴシュユが生産するエボカルピン類の生合成酵素を明らかとし、さらにエボカルピン類生合成酵素と HAQ 生合成酵素の触媒メカニズムの詳細を解明することで、植物と微生物間でのキノロンアルカロイド生合成の相違を明らかにすることを目指した。

### 【結果、考察】

ゴシュユの蕾から得た total RNA を鋳型とし、RT-PCR 法を行うことにより 2 種のゴシュユ由来新規Ⅲ型 PKS、ADS と AQS を得た。次に、大腸菌に異種発現させ精製した ADS と AQS の共反応液に N-methylanthraniloyl-CoA、decanoyl-CoA、malonyl-CoA を基質として作用させた。その結果、エボカルピン類縁体の生成が確認された。さらに詳細に機能解析を進めたところ、ADS は decanoyl-CoA と malonyl-CoA を縮合して diketide-CoA への変換を触媒する新規Ⅲ型 PKS であることが判明した。一方、AQS は N-methylanthraniloyl-CoA と diketide-CoA の加水分解産物である  $\beta$ -keto acid を縮合させることで、エボカルピン類縁体へと変換する新規Ⅲ型 PKS である事が明らかとなった。ADS と AQS の立体構造を 2.02 Å と 2.20 Å の分解能で取得し、得られた立体構造情報をもとに変異導入実験を行ったところ、ADS では活性中心キャビティー構成アミノ酸である Trp332 が、AQS では活性中心キャビティーと蛋白質表面を結ぶ CoA 結合トンネルの構成アミノ酸、Tyr215 が各酵素の基質特異性と生成物特異性を制御していることが示された。現在、AQS に基質アナログを作用させることによる新規化合物の創出が進行中である。

一方、緑膿菌の PqsB、PqsC の複合体構造を取得するため、両酵素を個々に大腸菌に異種発現、同一菌内に発現、あるいは融合タンパク質としての発現等を試みた。しかし、いずれも封入体を形成し可溶性酵素として得ることが出来なかった。現在、分子シャペロンとの共発現や、酵母での発現を試みているところである。

## ■背景・目的

生薬呉茱萸の基原植物であるミカン科のゴシュユ (*Evodia ruticarpa*) はキノロンアルカロイドのエボカルピン類を生成する (図1)。エボカルピンは、カルシウム拮抗作用、強心作用、子宮収縮作用を有する有用天然物である。また、ゴシュユからはエボカルピン以外にも脂肪酸の炭素鎖長や飽和・不飽和の位置と数が異なるアルキル基がキノロン骨格に結合したアルキルキノロンアルカロイドも単離されている (図1)。一方、アルキルキノロンアルカロイドは緑膿菌からも単離されている。このうち、*Pseudomonas aeruginosa* が生産する4-ヒドロキシ-2-アルキルキノロン (HAQ) は、FabH様酵素であるPqsB, PqsC, 及びPqsDにより生合成されることが報告されている。しかし、植物においては、FabH様酵素の関与により生合成されるアルカロイドは報告されていない。一方、Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) であるキノロン合成酵素はキノリノンアルカロイドを生合成する。また、ウコンのクルクミンは、Ⅲ型PKSであるジケタイドCoA合成酵素がフェルロイルCoAとマロニルCoAからジケタイドCoAを生成し、その加水分解産物であるβ-ケト酸を、同じくⅢ型PKSであるクルクミノイド合成酵素がフェルロイルCoAと縮合することで生成する。このことから、エボカルピン類はN-メチルアントラニロイルCoA, 長鎖脂肪酸CoA, マロニルCoAの3種の基質から2種のⅢ型PKSの触媒によって生合成されると予想された。そこで、今回我々は、本作業仮説のもと、ゴシュユが生産するエボカルピン類の生合成酵素を明らかとし、さらにエボカルピン類生合成酵素とHAQ生合成酵素の触媒メカニズムの詳細を解明することで、植物と微生物間でのキノロンアルカロイド生合成の相違を明らかにすることを旨とした。

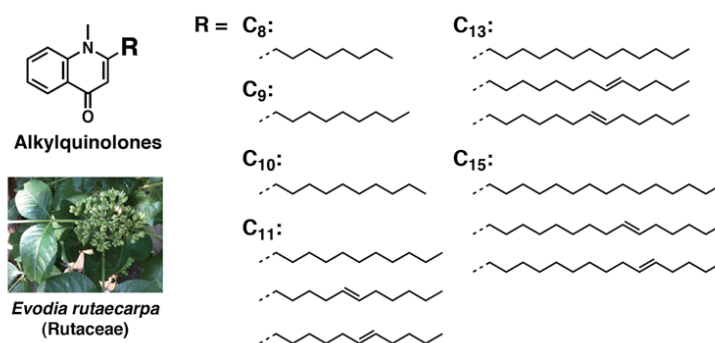


図1 ゴシュユが生産するアルキルキノロン

## ■結果・考察

富山大学薬用植物園で採取したゴシュユ *Evodia ruticarpa* の蕾から、グアニジンチオシアネート法を用いてtotal RNAを抽出し、これを鋳型としてオリゴd(T)プライマーを用いて逆転写反応を行うことにより、1本鎖cDNAライブラリーを作成した。次に、これを鋳型として、Ⅲ型PKSのアミノ酸配列の中でも特に保存された領域をもとに設計・作成した縮重入りプライマーを用いて1st PCRおよびnested PCRを行うことにより、ゴシュユ由来Ⅲ型PKS遺伝子のコア配列2種を取得した。そこで、各々のコア配列に対して特異的なプライマーを作成し、5'RACE法にて、コア配列の5'末端の配列を得、次いで5'末端に特異的なプライマーを用いて3'RACE法を行うことにより、2種のゴシュユ由来新規Ⅲ型PKS遺伝子、アルキルジケタイド合成酵素 (ErADS) とアルキルキノロン合成酵素 (ErAQS) 遺伝子の取得に成功した (図2)。ErADSとErAQSは、それぞれ397と390アミノ酸をコー

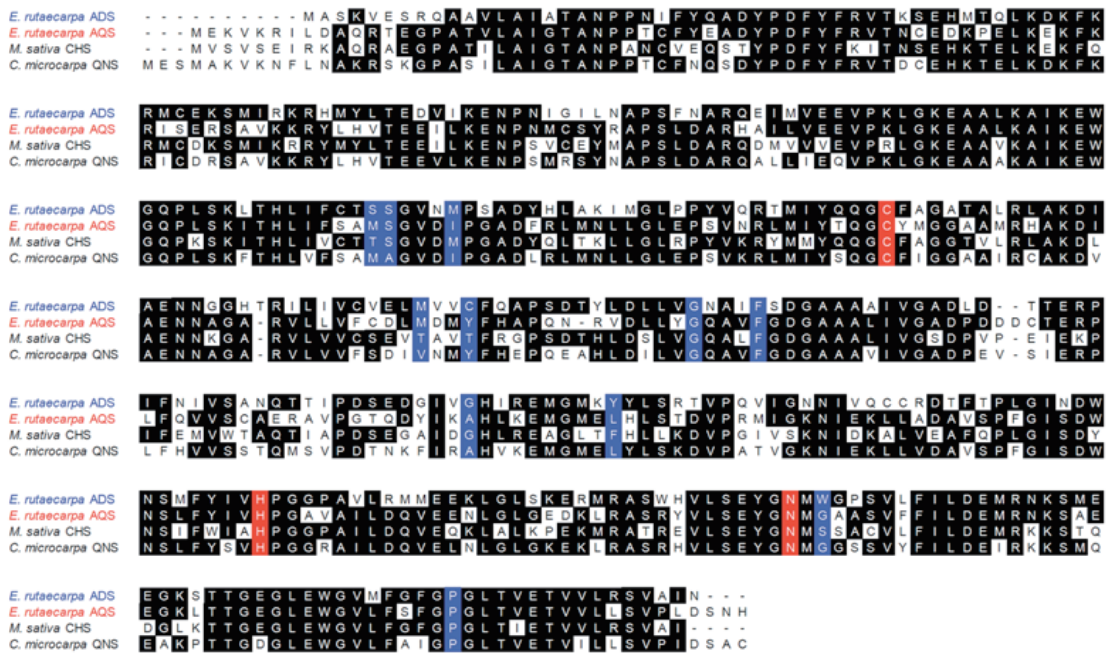


図2 ゴシュユ由来Ⅲ型PKSとムラサキウマゴヤシCHS及び四季柑QNSのアミノ酸配列の比較

Ⅲ型PKSの3つの触媒残基, Cys-His-Asnを赤色で, Ⅲ型PKSの機能多様性を決めるのに重要であるとされるアミノ酸残基を青色で示した。

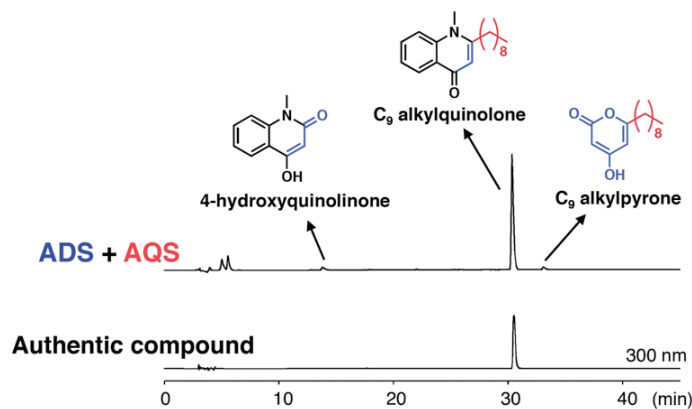


図3 *N*-メチルアントラニロイル CoA, デカノイル CoA, 及びマロニル CoA を基質とした ErADS と ErAQS の共反応生成物 酵素反応生成物の分離には ODS-80Ts (4.6φ x 150 mm, Tosho) を用い, 0.1% TFA を含む CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 系溶媒を用いたグラジエント条件 (0-5 min ; 20% CH<sub>3</sub>CN, 5-45 min ; 20-100% CH<sub>3</sub>CN) にて化合物を溶出させた。化合物の同定は, LC-MS の分子量および各標品との比較により行った。

トした。これらは互いに61%のアミノ酸相同性を示した。さらに, ErADSとErAQSは, Ⅲ型PKSの3つの触媒残基Cys, His, Asnを保存した。ErADSは, Ⅲ型PKSの基質特異性と生成物特異性を決めるのに重要であるとされるアミノ酸残基のうち, 191番目と259番目, 及び332番目がCys, Tyr, Trp, ErAQSは, それらがTyr, Leu, Glyに置換されていた。他のⅢ型PKSと相同性比較を行った結果, ErADSはカルコンを生合成する *Medicago sativa* CHS (MsCHS) と63%, ErAQSはキノロンを生合成する *Citrus microcarpa* QNS (CmQNS) と60%の最も高い配列相同性を示した。

そこで、ErADSとErAQSを、6残基のヒスチジンとのN末融合タンパク質として大腸菌に異種発現し、Ni-NTAアフィニティーカラムを用いて精製した。次に、*N*-メチルアントラニロイル CoA, デカノイル CoA, 及び、マロニル CoA を基質としてErADSとErAQSの共反応を行い、その生成物についてLC-MSを用いて解析を行った。その結果、 $m/z$  286  $[M+H]^+$ を示す未知の化合物を生成することが確認された(図3)。本化合物と標品1-methyl-2-nonyl-4(1*H*)-quinolone ( $C_9$ アルキルキノロン)の保持時間、UVスペクトル及びマススペクトルを比較したところ、これらは互いによく一致した。このことから、 $m/z$  286  $[M+H]^+$ を示す未知化合物は $C_9$ アルキルキノロンであることが判明した。

本結果は、アルキルキノロンが当初の作業仮説のように、2種のⅢ型PKSによって生成したことを示す。そこで、各々の酵素のアルキルキノロンの生成における役割を明らかとすることを目的に、まず、ErADSとErAQSの酵素反応の一部をHPLCに供して解析を行った(図4)。その結果、ErADSの反応液中に、 $C_9$ アルキルジケタイド-CoAと $C_9$ アルキル- $\beta$ -ケト酸が生成していることが明らかとなった。

クルクミン生合成においては、フェルロイル- $\beta$ -ケト酸がフェルロイルジケタイド CoAから非酵素的に加水分解して生じることが明らかになっている。そこで $C_9$ アルキル- $\beta$ -ケト酸を、酵素を含まな

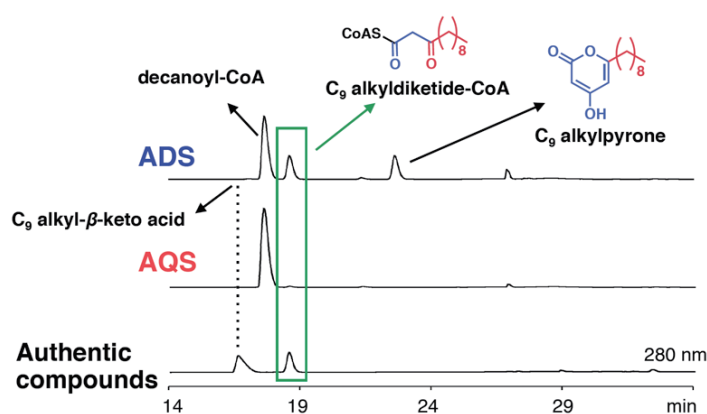


図4 デカノイル CoA とマロニル CoA を基質としたErADS とErAQS が各々生産する水溶性化合物

酵素反応生成物の分離にはOctyl-80Ts (4.6φ x 150 mm, Tosho) を用い、 $CH_3CN$ -25 mM KPB 系溶媒を用いたグラジエント条件 (0-5 min ; 30%  $CH_3CN$ , 5-21 min ; 30-42%  $CH_3CN$ , 21-26 min ; 42-80%  $CH_3CN$ , 26-40 min ; 80%  $CH_3CN$ ) にて化合物を溶出させた。化合物の同定は、各標品との比較により行った。

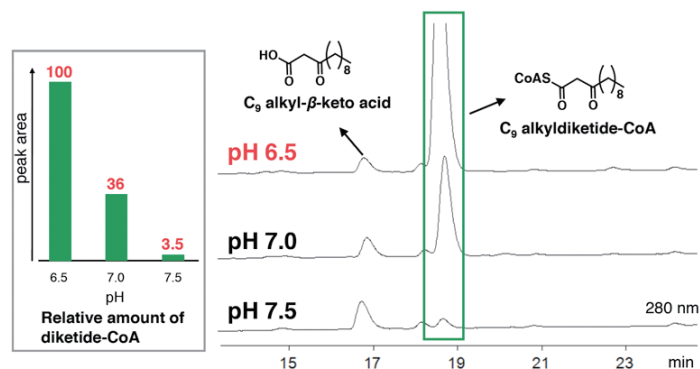


図5  $C_9$ アルキルジケタイド CoA の安定性

酵素反応生成物の分離はデカノイル CoA とマロニル CoA を基質としたErADS とErAQS が各々生産する水溶性化合物の解析の場合と同一にして行った。

いpHの異なる溶液に加え、37 °Cで16時間放置した。その結果、pHの上昇に伴い、C<sub>9</sub>アルキルジケタイド-CoAはC<sub>9</sub>アルキル-β-ケト酸へと変換することが示された(図5)。このことから、ErADSの反応液中に確認されたC<sub>9</sub>アルキル-β-ケト酸はC<sub>9</sub>アルキルジケタイドCoAの加水分解により生じた産物であり、ErADSの生成物はそのCoA体であることが示唆された。一方、ErAQSと煮沸により失活させたErAQSのジケタイドCoAとβ-ケト酸の消費量について比較したところ、CoA体の消費量に変化はみられないのに対して、CoA体の加水分解産物であるC<sub>9</sub>アルキル-β-ケト酸は、ErAQSの反応に伴い、95%が消費されて、C<sub>9</sub>アルキルキノロンへと変換されていることが明らかとなった(図6)。また、予想合成経路に基づき、C<sub>9</sub>アルキルジケタイド-CoAを化学合成し、これと*N*-メチルアントラニロイルCoAをErAQSに作用させ、C<sub>9</sub>アルキルキノロンの生成における各々の酵素の役割について検討した結果、ErAQSはC<sub>9</sub>アルキルキノロンを生成することが判明した(図7)。ErAQSはジケタイドCoAの加水分解活性を欠損し、基質としてβ-ケト酸を用いることが強く示唆された。以上のことから、ErADSは脂肪酸CoAとマロニルCoAを縮合し、ジケタイドCoAへの変換を、ErAQSは*N*-メチルアントラニロイルCoAとジケタイドCoAの加水分解によって生じたβ-ケト酸を縮合させることで、アルキルキノロンへと変換する新規Ⅲ型PKSであることが判明した(図8)。

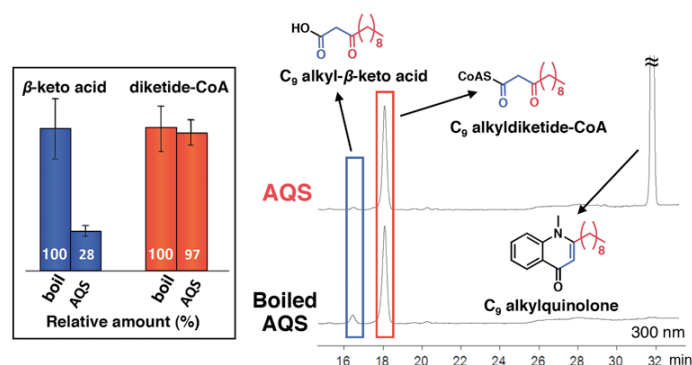


図6 ErAQSの基質の同定

酵素反応生成物の分離はデカノイルCoAとマロニルCoAを基質としたErADSとErAQSが各々生産する水溶性化合物の解析の場合と同一にして行った。

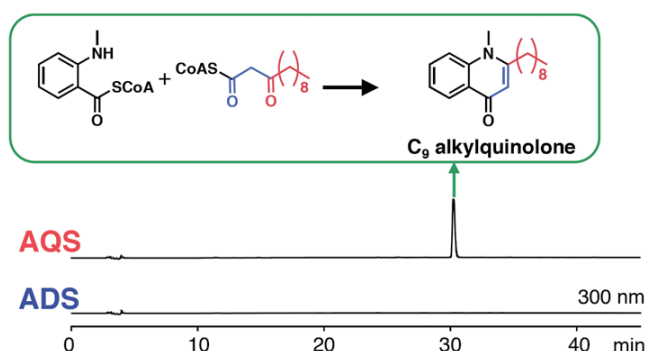


図7 C<sub>9</sub>アルキルジケタイドCoAと*N*-メチルアントラニロイルCoAを基質としたErADSとErAQS各々の酵素反応生成物  
酵素反応生成物の分離は*N*-メチルアントラニロイルCoA、デカノイルCoA、及びマロニルCoAを基質としたErADSとErAQSの共反応生成物の解析の場合と同一にして行った。

そこで、各々の酵素の基質特異性と生成物特異性に関するメカニズムの解明を目指し、ErADSとErAQSの結晶構造解析を行った。その結果、2.10 Åの分解能でErADSとCoASHの複合体X線結晶構造を、2.20 Åの分解能で、ErAQSのアポ型結晶構造の取得に成功した。いずれの酵素においても、他のⅢ型PKSの全体構造を共有した。一方、ErADSの活性中心キャビティーと、MsCHSの活性中心キャビティーを比較した結果、ErADSは、332番目のアミノ酸残基がより嵩高いTrpに置換されていることにより、MsCHSよりも小さな容積の活性中心キャビティーを有し、また形状も異なっていることが示された(図9)。そこで、ErADSのTrp332をAsnに置換した変異酵素を作成し、デカノイルCoAとマロニルCoAを基質とし場合の酵素反応生成物について解析を行ったところ、C<sub>9</sub>アルキルジケタイドCoAの生成が劇的に減少し、代わりに野生型において副生成物として確認されていたC<sub>9</sub>アルキルパイロンを主生成物とすることが確認された(図10)。さらに、ErADS W332N変異体の結晶構造を取得し、その活性中心キャビティーについて検討したところ、W332N変異体では、332番目のTrpをAsnに置換したことにより、キャビティーの容積が拡大していることが示され

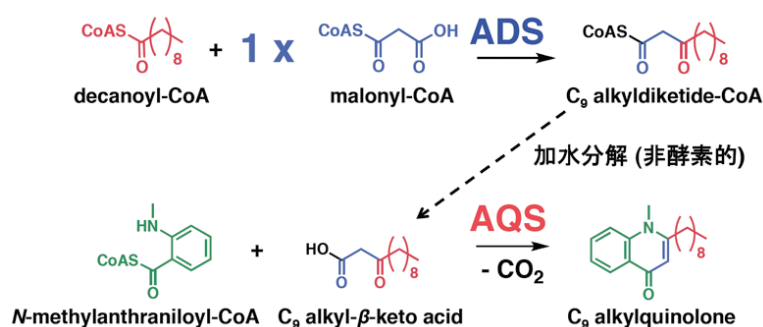


図8 ErADSとErAQSによるC<sub>9</sub>アルキルキノロンの推定生合成経路

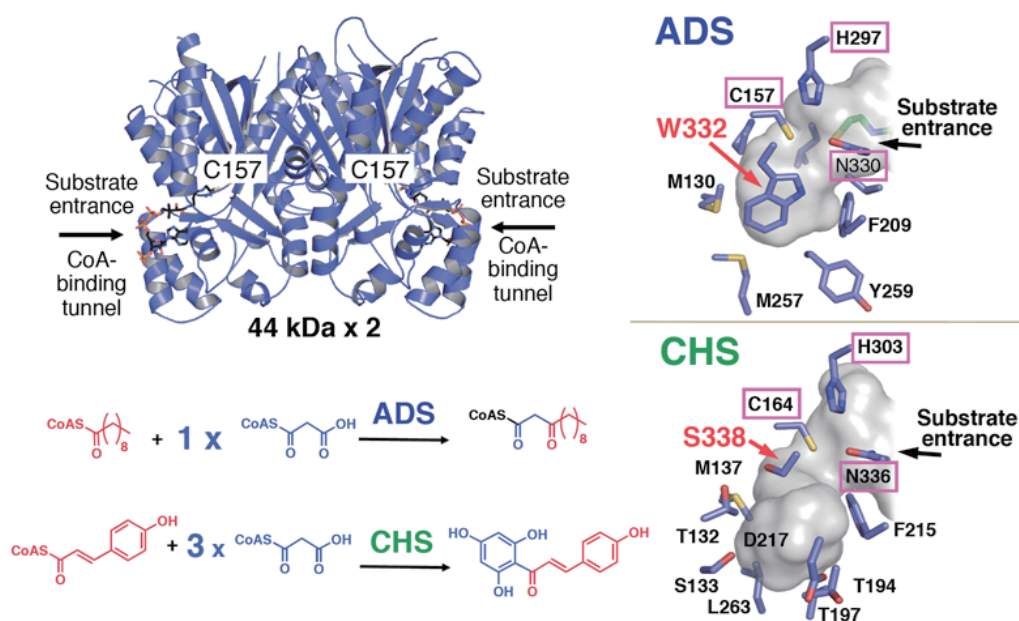


図9 分解能2.1 ÅでのErADSのX線結晶構造とErADSとCHSの活性中心キャビティーの比較

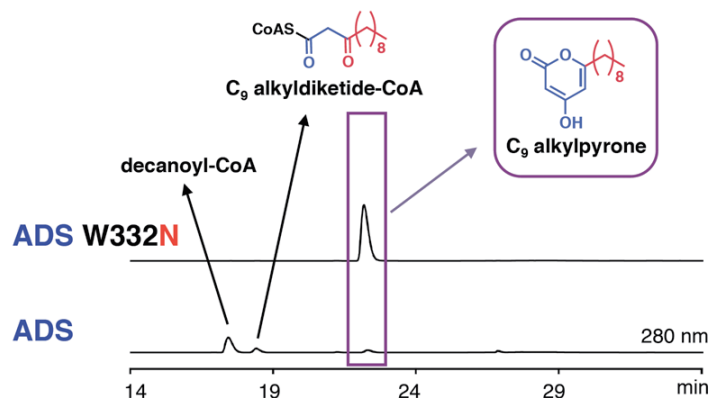


図10 デカノイル CoA とマロニル CoA を基質とした ErADS と ErADS W332N 変異酵素の酵素反応生成物  
 酵素反応生成物の分離はデカノイル CoA とマロニル CoA を基質とした ErADS と ErAQS が各々生産する水溶性化合物  
 の解析の場合と同一にして行った。

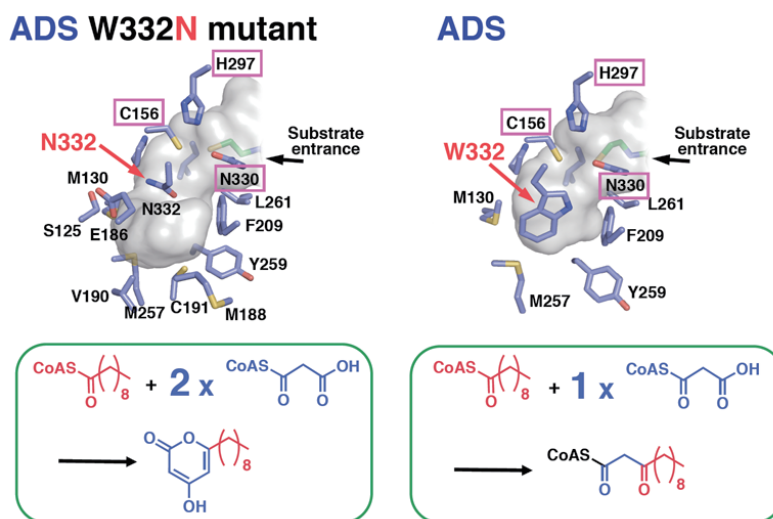


図11 ErADS と ErADS W332N 変異酵素の活性中心キャビティーの比較

た (図11). また, W332N変異体の活性中心キャビティーの深い場所に位置する Met188の側鎖が, W332N変異体では90°近く傾き, キャビティー底部の反対方向を向くことにより, 本変異体の活性中心キャビティーの底部の容積を増大させていることが明らかとなった. C<sub>9</sub>アルキルパイロンは, デカノイル CoAに2分子のマロニル CoAが縮合することによって生成した化合物である. W332N酵素は, 変異の導入により, 活性中心キャビティーの容積が拡大したため, 野生型よりもマロニル CoAの縮合回数を増大させてC<sub>9</sub>アルキルパイロンを主生成物として生成するようになったと考察される. このことから, Trp332はErADSの基質特異性と生成物特異性を決める重要なアミノ酸であることが判明した.

次に, ErAQSの活性中心キャビティーについてCmQNSと比較することにより解析を行った. その結果, ErAQSとCmQNSはほぼ同程度の大きさの活性中心キャビティーを有するのに対して, ErAQSでは, CmQNSの215番目のValが高高いTyrにコードされているために, 活性中心キャビティーと蛋白質表面を結ぶCoA結合トンネルがCmQNSよりも細くなっていることが確認された (図

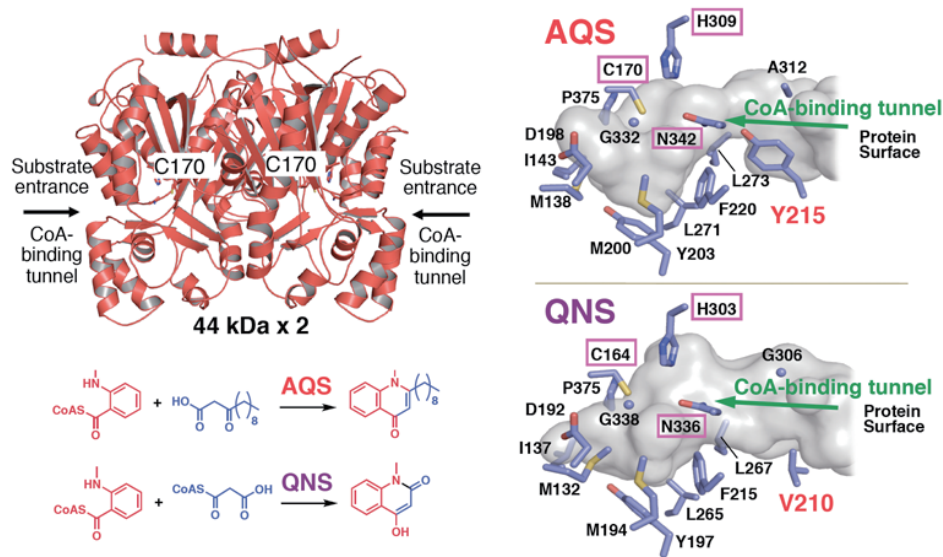


図 1 2 分解能 2.2 Å での ErAQS の X 線結晶構造と ErADS と QNS の活性中心キャビティーの比較

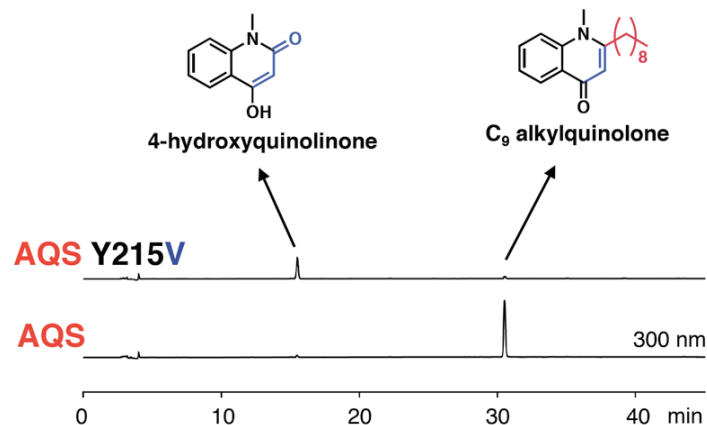


図 1 3 *N*-メチルアントラニロイル CoA,  $C_9$  アルキル- $\beta$ -ケト酸, 及びマロニル CoA を基質とした ErAQS と ErADS Y215V 変異酵素の反応生成物

酵素反応生成物の分離は *N*-メチルアントラニロイル CoA, デカノイル CoA, 及びマロニル CoA を基質とした ADS と AQS の共反応生成物の解析の場合と同一にして行った。

12). そこで, ErAQS の Y215V 変異体を作成し, *N*-メチルアントラニロイル,  $C_9$  アルキル- $\beta$ -ケト酸, 及びマロニル CoA を基質とした場合の酵素反応生成物について解析を行ったところ, 4-ヒドロキシ-1-メチル-2(1*H*)-キノロンを主生成物として生成することが確認された (図 13). 本結果は, Y215V 変異の導入により, CoA 結合トンネルが広がったため, 4-ヒドロキシ-1-メチル-2(1*H*)-キノロンを主生成物として生成したと考察できる. このことから, Y215 は ErAQS の基質特異性と生成物特異性を決めるアミノ酸であることが判明した.

一方, 緑膿菌の PqsB, PqsC の複合体構造を取得するため, 両酵素を個々に大腸菌に異種発現させた. しかし, いずれも封入体を形成し可溶性酵素として得ることはできなかった. また, 同一菌内での共発現や様々な融合蛋白質としての発現を試みたが, これらの場合でも可溶性酵素として得ることはできなかった. 現在, これらに関しては, 分子シャペロンとの共発現や酵母での発現を試みてい



るところである。

## ■結論

PCR 法により、ゴシユユから2種類の新規Ⅲ型PKS, ErADSとErAQSをクローニングすることに成功した。ErADSは伸長基質であるマロニルCoAを受け入れ、アシル- $\beta$ -ケト酸を生成するアシルジケチドCoA合成酵素であった。一方、ErAQSは、ErADSが生成するジケタイドCoAの非酵素的加水分解生成物である $\beta$ -ケト酸を伸長基質として受け入れ、アルキルキノロンを生成するアシルキノロン合成酵素であった。アルキルキノロンがⅢ型PKSにより生成することを示したのは本研究が最初である。しかし、ゴシユユはC<sub>15</sub>までの炭素鎖長に加え、不飽和脂肪酸を含む様々なタイプのアルキルキノロンを生産する。ErADSはC<sub>6</sub>からC<sub>10</sub>までの飽和脂肪酸CoAへの変換を触媒することが既に確認されているが、ErADSとErAQSの共反応からだけでは生合成が説明できないアルキルキノロンが天然のゴシユユより生産されていることになる。ErADSやErAQS以外の類似酵素がゴシユユに含まれていることが十分に予想され、ゴシユユが生産するアルキルキノロンの生合成の解明を解明するためには、これらの酵素についても解析を進めることが必要である。

一方、Ⅲ型ポリケタイド合成酵素の最大の特徴として、酵素としては異例とも言える曖昧な基質特異性が挙げられる。これまで、Ⅲ型PKSに基質アナログを作用させることで、非天然型新規ポリケタイドやアルカロイドが創出されている。今後、芳香族ジケタイドCoAを産生可能なDCSとErAQSを組み合わせ、これに基質アナログを作用させていくことによって、非天然アルカロイドの創出にも取り組んでいきたい。