

植物メロテルペノイド生合成酵素の立体構造解析を基盤とする新規天然薬物資源の開拓

申請代表者	田浦 太志	富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 薬用生物資源学研究室	准教授
所外共同研究者	飯島 未宇	富山大学大学院医学薬学教育部 (薬学) 薬用生物資源学研究室	大学院生
所外共同研究者	中川 竜一	富山大学大学院医学薬学教育部 (薬学) 薬用生物資源学研究室	大学院生
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

■背景・目的

メロテルペノイドとは部分テルペノイドを意味し、おもにイソプレノイドとフェノール類がカップリングして生じる一群の化合物であり、その構造多様性と特徴的な生理活性から高い注目を集める天然医薬資源である。本研究ではカンナビノイド及びダウリクロメン酸という代表的な植物有用メロテルペノイドの生合成酵素を研究対象とする。カンナビノイド合成酵素及びダウリクロメン酸合成酵素の反応機構は類似しているが、基質のアルキル側鎖及びプレニル基の鎖長が異なっており、また各酵素はそれぞれ単一の閉環反応産物を与えることから「基質を正確に認識し、独特な閉環反応を触媒するための構造因子」を備えていると推察される。

各生合成酵素が触媒する反応の構造基盤を X 線結晶解析により詳細に解明し、論理的な触媒活性コントロールにつなげることは天然及び非天然型有用メロテルペノイドの効率的生産に発展する可能性を有している。

本研究は未だ途上ながら興味深い成果を得るに至っており、本レポートでは研究基盤となるメロテルペノイド生合成マシナリーに関する成果を中心とし、構造生物学的な知見についても可能な限り紹介する。

■結果・考察

1. カンナビノイド合成酵素に関する基礎研究及び結晶化

大麻 (*Cannabis sativa*) のカンナビノイドはポリケチドとモノテルペンから構成され、その強い生理活性から古くより薬理学的研究が盛んに行われてきた。従来申請者はカンナビノイドの生合成研究を推進し、主成分である THCA 及び CBDA の生合成酵素 (THCA synthase 及び CBDA synthase) の遺伝子クローニングに成功した (Sirikantaramas and Taura, 2017)。両酵素は補酵素 FAD と共有結合したオキシダーゼであり、共通の基質 cannabigerolic acid の酸化閉環により異なる環構造を形成する。各酵素の反応は FAD によるヒドリドの引き抜きに始まりイオン性の中間体を経て進行すると推察しているが、プロトンの引き抜き位置が異なる環構造を構築する鍵となる。なお FAD オキシダーゼは生物種を問わず広く分布するが、プレニル基を酸化閉環する事例はカンナビノイド合成酵素が初めてである。

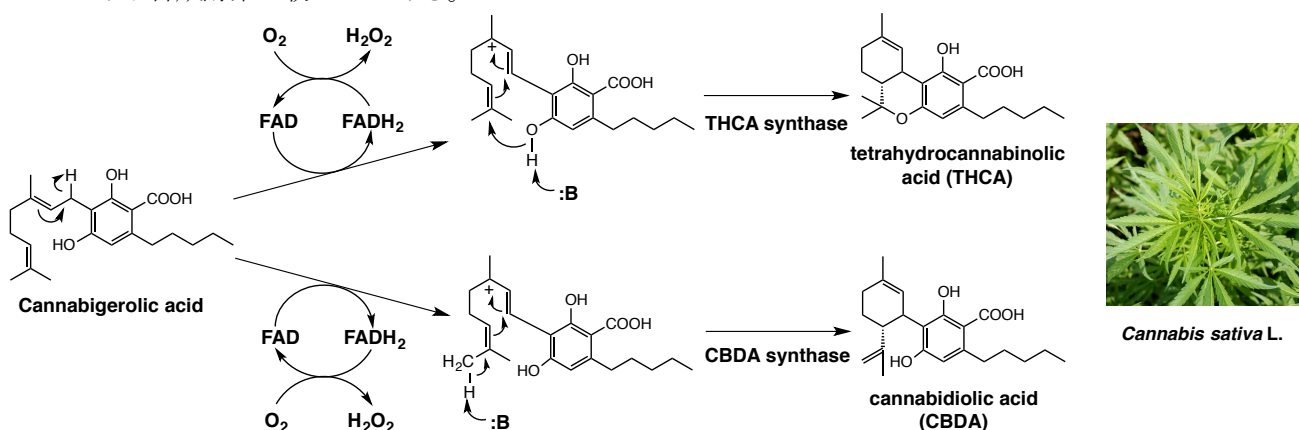


図1 カンナビノイドの生合成反応

様式 1-5 種目 (一般研究 I)

近年 THCA synthase に関して昆虫細胞で発現した組み換え酵素の X 線結晶解析が報告されたが、リガンド複合体の解析には至っておらず、酵素反応の詳細な構造基盤は未解明である (Sirikantaramas and Taura, 2017)。カンナビノイド合成酵素は後述する DCA synthase とともに分泌タンパクであり、高度に糖鎖修飾されていることが安定な結晶化を妨げていた。そこで本研究では発現系の再検討を行うとともに糖鎖除去の方策に重点を置いて試料調製を行うこととした。これまでに得られた知見は以下の通りである。

- 1) 植物細胞 BY-2 発現系では昆虫細胞以上の発現量 (4~5 mg/L) を安価に得ることができた。しかしながら昆虫細胞発現系と同様、hybrid 型の糖鎖を除去することは不可能であった。
- 2) N 型糖鎖結合配列 (Asn-x-Ser, or Thr) を除いた人工遺伝子を用い BY-2 での発現を試みたが、発現量が著しく低下した。糖鎖付加は分泌経路における正常な sorting に必須と考えられた。
- 3) 酵母 *Pichia pastoris* での発現量は 100 µg/L 程度であるが、カンナビノイド合成酵素及び DCA synthase はともに、活性を完全に保持したまま Endo H で糖鎖除去可能であった。

以上から *Pichia* を主な宿主として結晶化試料の調製に取り組んでいる。なお *Pichia* では組込む遺伝子コピーを増やすことが発現量の増大に直結する。そこで Gibson Assembly により発現カセットを 3 コピー含むベクターを調製し、最近 *Pichia* への導入を完了した。また効率的糖鎖除去のため Endo H の共発現を計画、準備している。

2. ダウリクロメン酸の生合成マシナリー解明

エゾムラサキツツジ (*Rhododendron dauricum*) が生産するダウリクロメン酸 (DCA) は orsellinic acid とセスキテルペンから構成されるメロテルペノイドであり、強力な抗 HIV 活性を示すことから注目を集めてきた。DCA とカンナビノイドの生合成経路は互いに類似し、ポリケチド形成、プレニル化、及び酸化閉環の三つのステップを経て生成する。以下、近年私に取り組んできた DCA 生合成マシナリーに関する成果を紹介する。

DCA synthase の遺伝子クローニング及び生化学的性質 (Iijima et al., 2017)

DCA synthase は基質 grifolic acid の farnesyl 基を立体選択的に酸化閉環することにより DCA を合成する (図2)。各カンナビノイド合成酵素とは約 50% のアミノ酸が一致する高いホモロジーを示し、これらと同様、FAD 及び酸素に依存した反応機構で DCA を産生する。

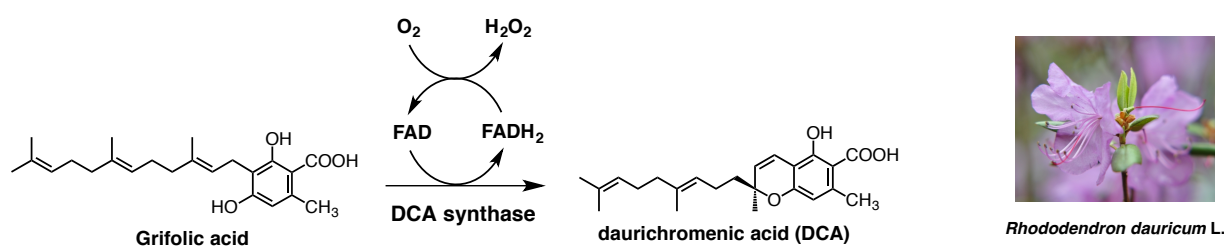


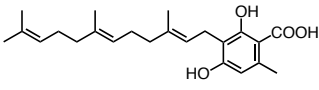
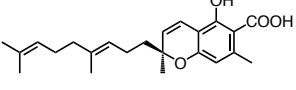
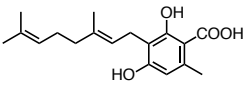
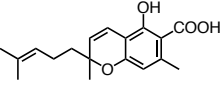
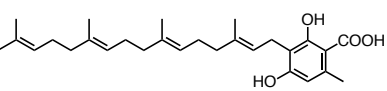
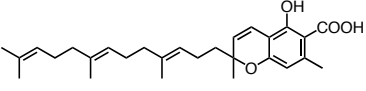
図2 ダウリクロメン酸の生合成反応

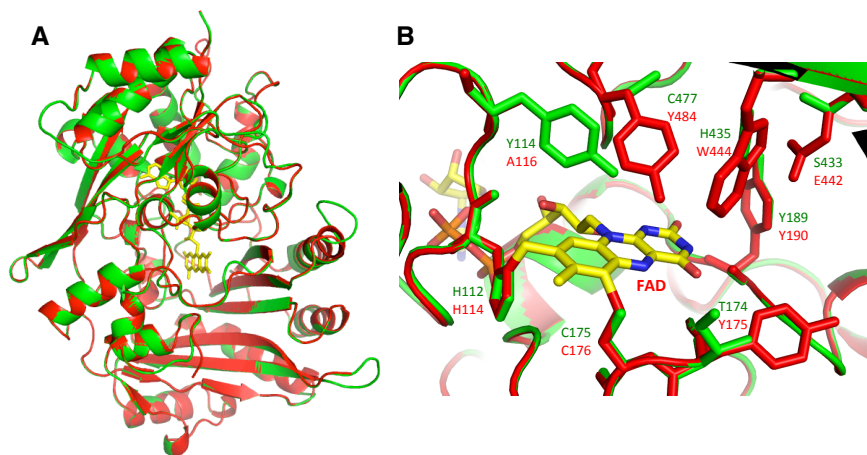
Table 1 に各種の基質類似体を用いた際の生成物の構造及び反応速度定数を示している。本酵素は生理的な基質で、farnesyl 基 (C15) を有する grifolic acid に対して最も高い活性を示した一方、プレニル基が geranyl (C10) 及び geranylgeranyl (C20) の各基質アナログに対しても弱いながら活性を示し、側鎖長の異なる DCA アナログを生成した。本酵素の基質特異性から DCA 類縁体が植物中に存在するか興味を持たれたため、エゾムラサキツツジ若葉エキスを LC-ESI-MS で詳細に分析した結果、本植物は各 DCA アナログを微量成分として含有することを確認した。なおイソプレノイド部分が diterpene の diterpenodaurichromenic acid は新規化合物であった。このように複数の基質を酸化閉環する FAD オキシダーゼは DCA synthase が初めてである。

DCA synthase の構造基盤について手がかりを得るためカンナビノイド合成酵素 THCA synthase の結晶構造を鋳型に分子モデルを作製した。図 3A に示す両メロテルペノイド合成酵素の全体構造は良く類似していたが、活性部位には多くのアミノ酸置換が観察された (図 3B)。例えば THCA synthase においてプロトン脱離に関与する Y484 は DCA synthase では Cys に置換しており、一方 DCA synthase の Y114 は活性中心に存在し、プロトンの引き抜きに機能する可能性が考えられた。

様式 1-5
種目 (一般研究 I)

Table 1. Steady state kinetic parameters of DCA synthase

Substrate structures	Product structures	K_m (mM)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_m (sec ⁻¹ mM ⁻¹)
 Grifolic acid	 DCA	1.19	6.53	5.61
 Cannabigerorcinic acid	 Cannabichromeorcinic acid	66.1	2.14	0.032
 3-Geranylgeranyl orsellinic acid	 Diterpenodaurichromenic acid	7.46	0.131	0.018



DCA synthase 及び各カンナビノイド合成酵素の基質特異性及び反応性の違いを論理的に解釈するためには結晶構造解析が必須であり、上記の通り高品質な結晶を得るための各種検討を行っている。

図3 THCA synthase 結晶構造 (赤) 及び DCA synthase 分子モデル (緑)

(A) 全体構造 (B) FAD を含む活性部位

また有鱗片シャクナゲの一種であるエゾムラサキツツジの鱗片と DCA 生合成の関連について興味深い知見を得た。本植物の若葉は鱗片と称される表皮組織に覆われているが、私は DCA が鱗片のみに蓄積することを確認した。DCA は蛍光性物質のため UV 照射下図 4 に示す自家蛍光を示し、本蛍光が網目状に観察されたことから DCA は鱗片のアポプラストに局在することが示唆された。

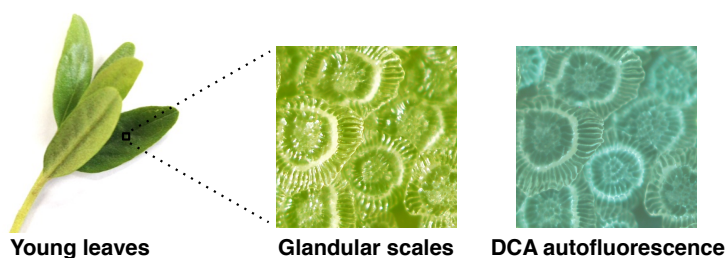


図4 エゾムラサキツツジの鱗片 明視野 (左) 及び自家蛍光 (右)

DCA は抗菌、抗カビ活性を有することから鱗片のアポプラストという植物の最外層に蓄積することで効率的な生体防御に寄与すると推察した。また DCA はエゾムラサキツツジ自身に細胞毒性を示すことを確認しており、分泌タンパクの DCA synthase により細胞外で生合成され、蓄積することで自己毒性を回避していると考えられる。(Taura et al., 2018)

プレニル転移酵素の遺伝子クローニング及びイソプレノイドの由来

本研究の最終的な目標は酵素を用いたメロテルペノイド生産であり、生合成経路の全貌解明は合成生物学という呼称とともに近年注目される微生物生産を可能とする。そこで私は生合成経路上流のプレニル転移酵素及びポリケチド合成酵素についても検討を行った。先ずプレニル転移酵素に関しては、トランスクリプトームデータのスクリーニングを基盤として、RdPT1 と称する新規酵素の cDNA クローニングに成功した。

RdPT1 組み換え酵素は芳香族基質として orsellinic acid のみを受容し、プレニルドナーに関しては FPP を基質として grifolic acid を生成する反応に最も活性を示した一方 GPP 及び GGPP に対してもある程度の反応性を示した (図 5)。従って本酵素はエゾムラサキツツジにおいて DCA synthase と協調的に働くことで C10、C15 及び C20 メロテルペノイドの生合成に関与すると考えられた (Saeki et al., submitted 2018)。

様式 1-5
種目 (一般研究 I)

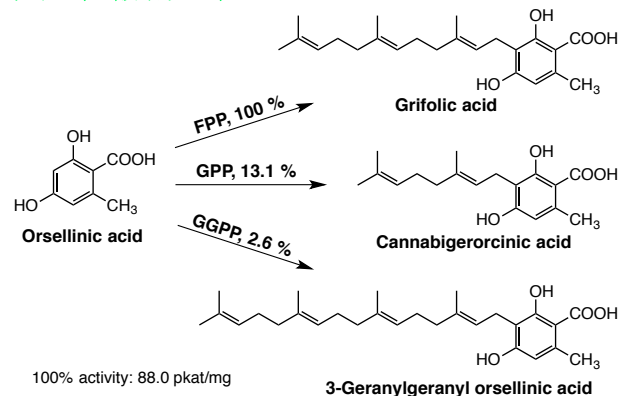


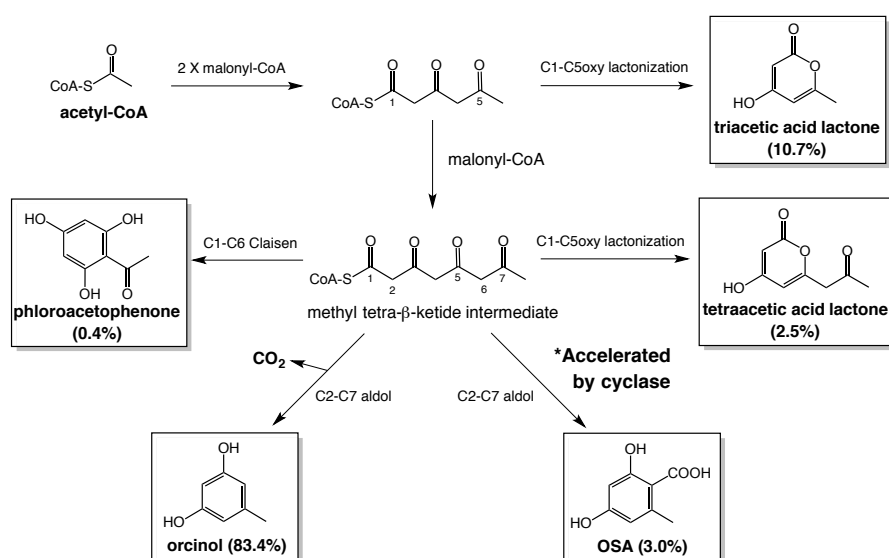
図5 プレニル転移酵素 RdPT1 の反応

RdPT1 は植物二次代謝における初めてのファルネシル転移酵素として興味深い研究対象である。また基質の FPP は一般に植物細胞の細胞質 (メバロン酸経路) で合成されるが、各種生化学的検討から RdPT1 は MEP 経路由来の基質を用い、鱗片のプラスチドで生合成反応を触媒することが示唆された (Saeki et al., submitted 2018)。

このため本植物におけるイソプレノイド供給経路は極めて興味深く、FPP synthase の構造機能を含め詳細な検討を行っている。

ポリケチド合成酵素の遺伝子クローニング及び orsellinic acid 生合成機構 (Taura et al., 2016)

Orsellinic acid (OSA) 生合成に関与するポリケチド合成酵素の候補として、orcicol synthase と称する新規酵素の cDNA をクローン化した。Orcicol synthase は acetyl-CoA をスターター基質とし OSA 脱炭酸体の orcicol を主



生成物として合成した他、OSA を含む 5 種の化合物を与える多機能酵素であった。また興味深いことに orcicol synthase の酵素反応に大麻由来ポリケチド環化酵素 olivetolic acid cyclase を共存させると OSA の合成が著しく促進された。以上から orcicol synthase はエゾムラサキツツジにおいて未知の cyclase と共に OSA の生合成に関与すると結論した。

図6 orcicol synthase の反応
(%は生成量の比率を表す)

■ 結論

以上最近の研究を通じ、特にメロテルペノイド生合成経路のマシナリー解明には興味深い成果を得ており、これらの研究により得られた知見及び各酵素遺伝子は合成生物学的研究への応用が期待される。また発現系のセットアップに時間を要したものの植物メロテルペノイド合成酵素の立体構造解明と論理的機能改変という本研究の目標達成に向けて研究期間終了後も最大限の-effort をもって取り組む。

■ 参考文献

- 1) Sirikantaramas S, Taura F (2017) Cannabinoids: Biosynthesis and biotechnological applications. In S Chandra, H Lata, M ElSohly, eds, *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*. Springer, Cham, Switzerland, pp183–206
- 2) Iijima M, Munakata R, Takahashi H, Kenmoku H, Nakagawa R, Kodama T, Asakawa Y, Abe I, Yazaki K, Kurosaki F, Taura F. (2017) Identification and characterization of daurichromenic acid synthase active in anti-HIV biosynthesis. *Plant Physiol* 174: 2213–2230
- 3) Taura F, Iijima M, Kurosaki F (2018) Daurichromenic acid and grifolic acid: Phytotoxic meroterpenoids that induce cell death in cell culture of their producer *Rhododendron dauricum*. *Plant Sig Behav* 13: e1422463
- 4) Saeki H et al., submitted for publication
- 5) Taura F, Iijima M, Yamanaka E, Takahashi H, Kenmoku H, Saeki H, Morimoto S, Asakawa Y, Kurosaki F, Morita H (2016) A novel class of plant type III polyketide synthase involved in orsellinic acid biosynthesis from *Rhododendron dauricum*. *Front Plant Sci* 7: 1452