

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870425

研究課題名(和文)トロパン骨格の生合成に関与する酵素の構造機能研究および非天然型化合物群の創出

研究課題名(英文)Cloning, expression and characterization of polyketide synthase gene from *Scopolia Japonica*

研究代表者

田畑 香織(佐々木香織)(Tabata, Kaori)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90464388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ナス科植物であるダツラにはアトロピンのようなトロパン骨格を持つ薬理的に重要な化合物が含まれている。これらの化合物はオルニチンをスターターとして合成されることが分かっており、中間生成物であるトロピノン合成するステップについてはポリケタイド合成酵素(PKS)が関与すると考えられるが、まだ明らかとなっていない。そこでPKSの構造および機能を解明することを目的とし研究を開始した。ダツラやハシリドコロからPKSと考えられる4種の新規遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現系の構築、様々な基質を用いて酵素反応条件の検討、さらにはハシリドコロ由来PKSの約2オングストロームでの結晶構造解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：Various important pharmacological compounds such as atropine and scopolamine are included in *Scopolia japonica*. These compounds are synthesized using ornithine as a starting material, however, it's unclear which enzyme catalyzes the tropinone synthesis reaction. Hence, in the present study we aimed to identify function and structure of novel polyketide synthase (PKS) from *S. japonica*. Two novel genes of PKS from *S. japonica* were obtained. The recombinant PKSs expressed in *E. coli* as a soluble fraction was highly purified using affinity and ion exchange column and the enzyme assay with HPLC showed that new compounds were synthesized using some substrates. Moreover, crystallization screening resulted in obtaining needle or plate crystals. We could get single crystals in an optimized condition. The crystal diffracted to 2.0 angstrom at KEK-PF and the structures of PKS were determined using molecular replacement method.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：ポリケタイド合成酵素 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ナス科植物であるダツラやハシリドコロには、アトロピンやスコポラミンといった重要な薬理作用をもつ化合物が含まれており、これらの化合物はアセチルコリンによる神経伝達を抑制することにより、副交感神経遮断薬として作用する。適切な濃度で用いれば安全に使用することができるが、大量に服用することにより、幻覚や錯乱といった中枢作用を示すことが知られている。

アトロピンやスコポラミンはオルニチンをスターター基質として合成されると考えられており、この合成経路において、putrescine *N*-methyl transferase、tropinone reductase I、tropinone reductase II、hyoscyamine 6 β -hydroxylase 等が関与することが明らかになっているが、トロピノンの合成に関与する酵素についてはまだ同定されていない。この反応は、*N*-methylpyrrolinium cation にアセトアセチル CoA が縮合しトロピノンが生成すると考えられる。炭素鎖の伸長や環化を伴う反応であるため PKS が触媒するのではないかと予想される。

PKS は細菌や植物など種々の生物に存在しており、CoA エステル縮合のくり返しによる炭素鎖の伸長反応を触媒する。III型 PKS は主に植物で見つかっており、カルコン合成酵素 (CHS) スーパーファミリーに属し、互いに高い相同性を示しているが、活性部位のアミノ酸残基の僅かな差異により基質特異性や反応生成物が大きく変化することが分かっている。また PKS のキャビティの大きさや活性部位の一つであるフェニルアラニン残基によって炭素鎖の長さがコントロールされることも明らかにされている。

数多くの III型 PKS に関して詳細な研究がなされており、1999 年にアルファルファの CHS の立体構造が解明され (Ferrer, et al., *Nat. Struct. Biol.* (1999))、また活性部位のアミノ酸も明らかにされている。また、キダチアロエの III型 PKS に関して、野生型では 5 分子のマロニル CoA を縮合するのに対し、キャビティを構成するアミノ酸のうち 3 残基に変異を入れたところ、9 分子のマロニル CoA を縮合し、天然では存在しないナフトパイロン骨格の合成が可能となったという報告もある (Abe, et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2007))。

III型 PKS は大腸菌で可溶性に発現し、比較的安定なタンパク質である。CHS ファミリー間で高い相同性を示すものの、活性残基の僅かな違いで基質や生成物が異なるので、アミノ酸配列からどのような機能を持つのかを推定するのは難しい。また、III型 PKS は広い基質特異性を示し、人工的な基質とも反応するので、ダツラやハシリドコロ由来 PKS の立体構造を解明し、その構造を基にした機能改変酵素を用いて新規な骨格を有する有用な化合物群を作出できるのではないかと考え、本研究課題を企図した。

2. 研究の目的

ナス科植物であるダツラにはトロパン骨格を持つ薬理的に重要な化合物が含まれている。中でもアトロピンやスコポラミンは抗コリン作用を示すことが知られており、散瞳や鎮痙、鎮痛薬として用いられている。これらの化合物はオルニチンより合成されることが分かっており、いくつかのステップに関与する酵素は同定されているが、トロピノンを合成するステップに関してポリケタイド合成酵素が関与すると考えられるが、まだ明らかとなっていない。

そこで、本研究ではダツラまたはハシリドコロ由来ポリケタイド合成酵素の遺伝子クローニングを行い、大腸菌を用いて大量発現系を作製し、構造および機能を解明する。さらに、変異体酵素を調製し、新規非天然型化合物群の創出を試みる。

3. 研究の方法

(1) ダツラ PKS の遺伝子クローニング

植物から total RNA を抽出し、逆転写により合成した cDNA を鋳型として PCR を行った。CHS スーパーファミリー間でよく保存されている領域からプライマーを作製し、PCR に用いた。

5' および 3' 末端に関しては各メーカーから販売されているキット等を用いて、末端の未知領域をクローニングする方法である RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法によるクローニングを行い、遺伝子配列を決定した。

(2) 大量発現系の構築

(1) で得られたダツラ PKS 遺伝子が大腸菌発

現用プラスミドに挿入し、大腸菌での大量発現系を構築した。

(3) 結晶化条件検討

(2)で得られた組換えタンパク質をアフィニティーカラムやイオン交換カラムクロマトグラフィー等を用いて SDS-PAGE で単一バンドを示すまで精製し、結晶化条件を検討した。

(4) ハシリドコロ PKS の機能解析

(2)で得られた PKS がトロピノン合成する機能を持っているかどうかについて、*N*-methylpyrrolinium cation を基質として用いて反応溶液を調製し、生成物について HPLC で解析した。

CHS の基質であるマロニル CoA 等も検討した。

(5) 野生型ハシリドコロ PKS の結晶構造解析

(3)で得られた結晶を用いて高エネルギー加速器研究機構の放射光施設にてX線データを収集した。アルファルファ由来CHSをモデルとして分子置換法で立体構造を決定した。

4. 研究成果

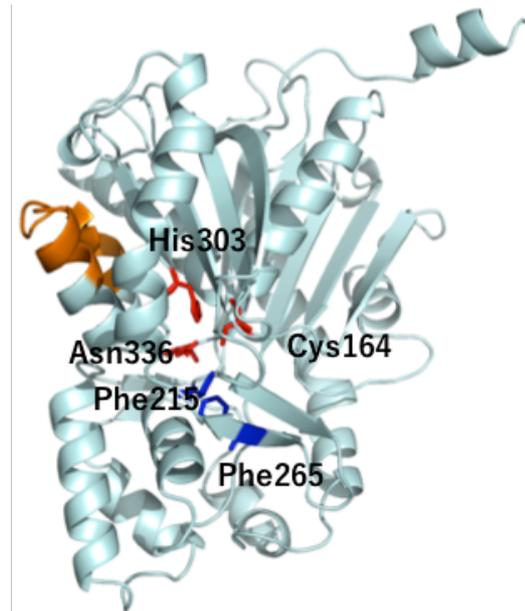
ダツラ及びハシリドコロの葉から total RNA を抽出し、逆転写により合成した cDNA を鋳型として degenerate PCR、5' 及び 3' RACE 法によるクローニングを行い、遺伝子配列を決定した。ハシリドコロから 2 種、ダツラから 2 種の計 4 種の PKS をコードすると考えられる新規遺伝子のクローニングに成功した。ハシリドコロ由来 PKS (SJPKS) はどちらも 1,167bp の ORF からなり、ナス科植物の CHS と高いホモロジーを示した。

これらの遺伝子を大腸菌発現用ベクターに挿入し、発現条件を検討した。どの遺伝子も可溶性画分に発現することが判明した。

次に、これらの組換えタンパク質について精製条件の検討を行った。ヒスチジンタグを融合させ発現させたので、アフィニティーカラムにより精製を行ったところ、SDS-PAGE でほぼ単一のバンドを示していたが、結晶化条件の検討にはより純度の高いタンパク質溶液が必要なため、さらにイオン交換カラムやゲルろ過カラムを用いて精製した。

精製した組換え酵素を用いて結晶化条件の

初期のスクリーニングを行ったところ、いくつかの条件で針状やプレート状の結晶が得られた。この条件をもとに最適化を行った結果、柱状の結晶が得られた。この結晶を用いて放射光施設にて測定したところ、約 2 Å の反射データが得られ、アルファルファのカルコン合成酵素をモデルとして分子置換法により立体構造を決定することに成功した。



ハシリドコロPKS1の結晶と立体構造

また、酵素活性に関して、様々な種類の基質の組み合わせや酵素反応液の pH 等について詳細な条件検討を行った。

p-マロイル CoA とマロニル CoA を基質として添加し、HPLC で分析すると約 5.0 分及び 5.8 分に新しいピークが見られた。この溶出位置からナリングニンが生成したと考えられる。また、ヘキサノイル CoA とマロニル CoA を基質として添加すると約 9.2 分及び 11.1 分にピークが見られ、これらはトリまたはテトラケタイドピロンと考えられる。さらに *N*-methylpyrrolinium cation とアセトアセチル CoA を基質として加えた場合、約 4.0 分にピークが見られた。

この酵素反応によって得られた生成物が何であるかについて LC/MS を用いて詳しく調べたところ、生成すると推定していたトロピノンの分子量とは異なることが判明した。今

後、大量にこの酵素反応溶液を調製し、NMRを用いて生成物の構造を明らかにしたいと考えている。

アルファルファのカルコン合成酵素の立体構造と、ハシリドコロの立体構造はかなり類似したものであったが、基質特異性や反応至適 pH 等様々な性質が異なることが判明した。この原因として、活性部位や基質結合部位に存在するアミノ酸残基の違いが考えられる。今後は、CHS ファミリーの他の酵素とハシリドコロ PKS の間で異なるアミノ酸残基等に注目し、変異体酵素の作製を行い、アナログ基質との相互作用解析及び結晶構造解析などを行うことによって反応メカニズムを明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1 : Sasaki-Tabata K, Matsuo A, Fuchida H, Ojida A, Tanaka H and Morimoto S, Cloning, expression and characterization of polyketide synthase gene from *Scopolia Japonica*, The 9th CSP-KSP-JSP Joint Symposium on Pharmacognosy, 2016 年 5 月 30 日、Shanghai (China)

2 : 田畑香織、松尾彩加、田中宏幸、森元聡、ハシリドコロ由来新規ポリケタイド合成酵素の構造および機能に関する研究、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

3 : 田畑香織、松尾彩加、湊田大和、王子田彰夫、田中宏幸、森元聡、ハシリドコロ由来新規ポリケタイド合成酵素に関する研究、日本生薬学会第 62 回年会、2015 年 9 月 12 日、長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 香織 (TABATA, Kaori)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号 : 9 0 4 6 4 3 8 8