

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06731

研究課題名(和文) 構造生物学を基盤としたマルバタバコのベルベリンブリッジ酵素様蛋白質の網羅的解析

研究課題名(英文) Analyses of berberine-bridge like enzymes in *Nicotiana rustica* based on structural biology

研究代表者

森元 聡 (Morimoto, Sastoshi)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60191045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マルバタバコから3種のベルベリンブリッジ酵素をクローニングし、それらの遺伝子をカイコで発現した。組み換え酵素の活性を調べるために、ニコチンの生合成前駆体と推定されているデヒドロメタニコチンを基質として各種条件下で、反応させたがニコチンの生成は確認されなかった。一方、各種フェニルプロパノイドを基質としてカイコで発現したベルベリンブリッジ酵素の活性を測定した結果、非常に興味深いことにコニフェリルアルコールからコニフェリルアルデヒドやフェルラ酸の生成が確認された。同一の酵素でアルコール類をカルボン酸類に参加する酵素は植物からは確認されてない。さらに本反応で構造未知の化合物の生成も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請課題では、マルバタバコのベルベリンブリッジ酵素の機能を明らかにする目的で研究を遂行したが、ニコチンの生合成にかかわる活性を検出することはできなかった。しかしながら、今回検討した酵素類はフェニルプロパノイドを酸化する機能を有することが証明された。しかも、コニフェリルアルコールを直接フェルラ酸まで直接酸化することを確認した。そのような酵素はこれまで植物から確認されておらず、学術的に重要と思われる。さらに組み換え酵素がフェルラ酸の脱炭酸反応を触媒するという、きわめて新規な反応を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Three genes encoding berberine-bridge enzymes (BBLa, BBLb and BBLd) were cloned from *Nicotiana rustica*, and these genes were expressed in silkworms. Although the activities of these enzymes were measured using the possible biosynthetic precursor of nicotine as a substrate, nicotine production was not observed.

On the other hand, the above recombinant enzymes were shown to oxidize the various phenylpropanoids such as coniferyl alcohol to give coniferyl aldehyde and ferulic acid. The same enzymes catalyzing direct oxidation of the alcohols into carboxylic acids have not been confirmed in the plant kingdoms. In addition, the recombinant enzymes convert the ferulic acid into unknown compound.

研究分野：生薬学

キーワード：ベルベリンブリッジ酵素 マルバタバコ フェニルプロパノイド 酸化酵素

### 1. 研究開始当初の背景

ケシ科植物から発見されたベルベリンブリッジ酵素 (berberine bridge enzyme, BBE) は reticuline を酸化して scoulerine の生成を触媒する酵素である。BBE とホモロジーを示す蛋白質はベルベリンブリッジ酵素様蛋白質 [berberine bridge enzyme-like protein (BBL)] と称され、種々の植物成分の生合成反応を触媒することが知られている。

シロイヌナズナでは BBL が細胞壁成分のフェニルプロパノイド類の酸化を触媒することが報告されている。このように BBL は一次構造が類似しているにもかかわらず、全く異なる基質を酸化するなど、極めて興味深い性質を有している。

近年、シロイヌナズナ BBL と酷似した酵素がタバコにも存在しており、タバコ中で BBL 遺伝子の発現を抑制すると、ニコチン含量が低下することが明らかにされている。しかしながら、タバコ BBL を活性酵素として発現することに成功していないことから、タバコ BBL の機能については、学術的に不明な点が極めて多い。

申請者は、ニコチン含量の高いマルバタバコから BBL 遺伝子のクローニングを試みており、3種の遺伝子 (*rBBLa*, *rBBLb*, *rBBLc*) をクローニングし、*rBBLa* についてはカイコ中で発現することに成功している。そこで本酵素の活性を測定した結果、*rBBLa* はコニフェリルアルコールを酸化してコニフェリルアルデヒドやフェルラ酸に変換することが判明した。

このようにマルバタバコの BBL はフェニルプロパノイドに対して興味深い反応性を示すことから、申請課題により新規な結果が得られる可能性が示唆された。また、ニコチンは図1に示す経路で生合成されると推定されているが、このような pyrrol 環の形成に関与する BBL は報告されてない。本反応に関与する酵素を同定すれば、様々な新規な知見が得られると思われる。

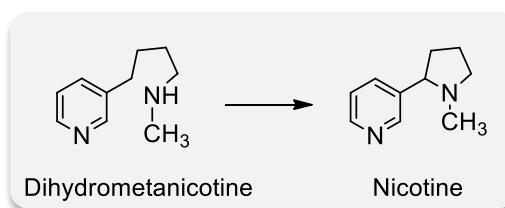


図1 ニコチンの推定生合成経路

申請課題は「*Nicotiana* 属植物の BBL 類の機能と反応機構はどのようなものか」という問いを解決する研究であり、学術的に重要な結果を与えると考えられたので、本課題を企図した。

### 2. 研究の目的

次の (1) ~ (5) の項目を明らかにすることを本研究の目的とする

- (1) マルバタバコ BBL 類の酵素機能の解明
- (2) ニコチン生合成に関わる BBL の探索
- (3) マルバタバコ BBL 類の活性部位の決定
- (4) マルバタバコ BBL 類の結晶構造の解明
- (5) 結晶構造に基づいた BBL 類の酸化反応メカニズムを原子レベルで解明

### 3. 研究の方法

#### (1) BBL 類のクローニング

まず、*Nicotiana rustica* の新鮮葉より total RNA を抽出し、total RNA を鋳型として逆転写酵素を用いた cDNA 合成を行った。続いて、*Nicotiana tabacum* 由来の *tBBLa* (1680 bp), *tBBLb* (1707 bp), *tBBLc* (1689 bp), *tBBLd* (1704 bp) の既知配列を元にそれぞれの遺伝子特異的なセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを設計した。両プライマーを用いて *rBBL* の PCR 法による遺伝子増幅を行った。

#### (2) BBL 類の発現

##### ① 発現ベクターの構築

*rBBL* 遺伝子の発現までの概略を図2に示した。まず、*rBBL* 遺伝子が組み込まれた大腸菌株からそれぞれプラスミドを抽出し、PCR により両末端に制限酵素切断部位 (HindIII、Not I) を有する *rBBLs* 遺伝子を増幅した。その後、増幅した *rBBLs* 及び発現用ベクター pET28a (+) vector を制限酵素処理 (HindIII、Not I) した。これらの制限酵素処理物を用いてライゲーションを行い、JM109 大腸菌株の形質転換、インサートチェック、プラスミド抽出、

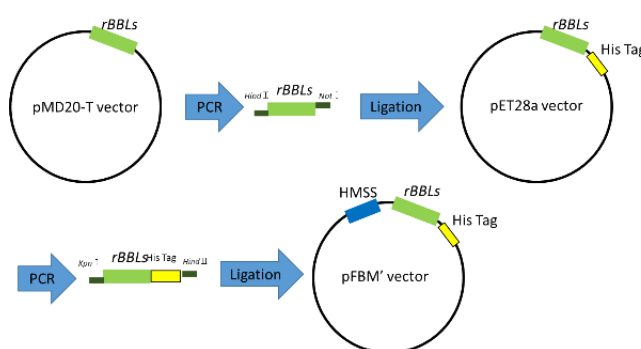


図2 カイコ発現用ドナープラスミドの調製

シークエンス解析を行った。次に、制限酵素切断部位 (Kpn I、HindIII) を有するプライマーを用いて pET28a (+) vector 由来の His Tag と結合した *rBBL* を増幅、精製後、制限酵素処理 (Kpn I、HindIII) を行った。次いで、(Kpn I、HindIII) による制限酵素処理を行った *rBBL*-His Tag を pFBM' vector へと組み込み、JM109 大腸菌株の形質転換、インサートチェック、プラスミド抽出、シークエンス解析を行うことでドナープラスミド (pFBM' *rBBLs*) を構築した。

## ② カイコを用いた組み換え酵素の発現

大腸菌 BmDH10Bac を用いて組み換えバクミドの作製を行った。まず、前項で構築したドナープラスミド (pFBM' *rBBL*) を用いて大腸菌 BmDH10Bac の形質転換、インサートチェックを行った。得られた目的コロニーは LB 培地で増幅後 QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, GER) を用いて精製した。

精製後バクミド約 1 µg 相当を遺伝子導入試薬の DMRIE-C 試薬 (Invitrogen, CA, USA) と混合し、5 齢のカイコ幼虫の節へインジェクションし、25°C の環境で 6 日間飼育した。感染から 144 hr 後、カイコの幼虫より体液を回収した。

今回発現した BBLs は C 末端に 6 残基のヒスチジンが連続している His Tag を有している。ヒスチジンが Ni<sup>2+</sup> とキレート形成する特徴を利用して、Ni-NTA 樹脂、complete His Tag Purification Resin (Roche Diagnostics) をカラム固定相としてカイコ体液から *rBBLs* を精製した。

### (2) *rBBL* 類の酵素活性の検出

モノリグノールの酸化反応の基質としてコニフェリルアルコール、シンナムイルアルコール、*p*-クマリルアルコールを用いた (図 3)。ニコチンの合成活性の検出に関しては、ジヒドロメタニコチンを使用した (図 1)。酵素活性は各基質を含む基質溶液に対してそれぞれの酵素溶液を加え 30°C で 24 hr 反応後、反応溶液を Cosmosil Cholesterol Column (Nakalai, Kyoto, Japan) を用いた逆相 HPLC に付することで反応生成物を分析した。なお、各種標品 (モノリグノール関連化合物) との溶出時間を比較することで、各酵素反応生成物の同定を試みた。

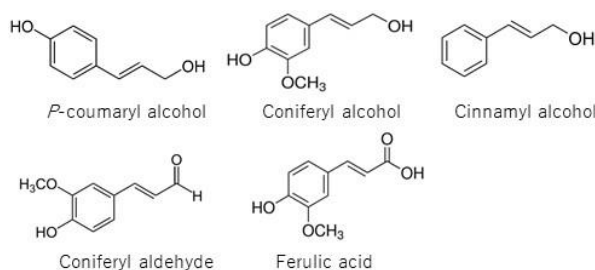


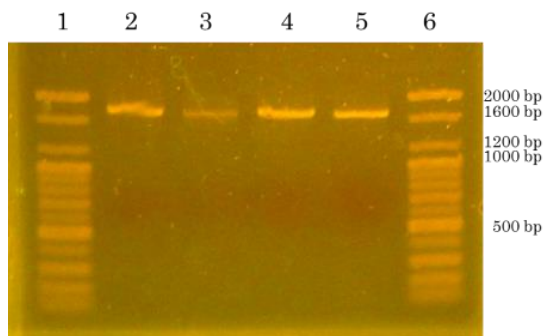
図 3 酵素活性の検出に使用した基質類

## 4. 研究成果

### (1) マルバタバコ BBL (*rBBL*) 遺伝子

プライマーを用いて *rBBLs* の PCR 法による遺伝子増幅を行った結果、それぞれ約 1700 bp の遺伝子が得られた (図 4)。得られた遺伝子をアガロースゲル電気泳動で分離し、目的サイズの遺伝子のみを切り出し精製することで *rBBLs* を得た。精製した *rBBL* それぞれを pMD20-T vector へ組み込み、これを用いて大腸菌 JM109 株の形質転換を行った。

シークエンス解析を行うことで *rBBLa* (1707 bp), *rBBLb* (1725 bp), *rBBLc*, *rBBLd* (1695 bp) の各塩基配列全長を明らかにした。この時 *rBBLc* に関しては二種類の配列が得られたのでそれぞれ *rBBLc-1* (1707 bp), *rBBLc-2* (1725 bp) とした。



Lane 2 *rBBLa*; Lane 3 *rBBLb*; Lane 4 *rBBLc*; Lane 5 *rBBLc*; Lane 6 *rBBLd*

図 4 増幅された *rBBL* 遺伝子

### (2) マルバタバコ BBL (*rBBL*) の一次構造

ClustalW2 による系統解析に基づき *rBBLs* のアミノ酸配列の比較を行った。その結果、*rBBLc-1* と *rBBLa*, *rBBLc-2* と *rBBLb* のアミノ酸配列の相同性がいずれも 99 % と極めて高いことが判明した。一方、*tBBLa* と *tBBLc*, *tBBLb* と *tBBLc* の相同性は 83 %, 86 % であるため、*rBBLc-1* の配列は *rBBLa* のもの、*rBBLc-2* の配列は *rBBLb* 由来であると考えられる。このことから、*Nicotiana rustica* 中には *tBBLc* に相当する遺伝子が存在しないことが示唆された。

さらに *rBBLs*, *tBBLs* のアミノ酸配列の比較を行った。*rBBLs* にはベルベリンブリッジエンザイム (BBE) に必須のフラビン補因子と共有結合するヒスチジン残基を有しており、アサ (*Cannabis sativa*) の THCA 合成酵素やカリフォルニアポピー (*Eschscholzia californica*) の BBE10 にも存在が認められている。*rBBLs* も *tBBLs* と同様に、ヒスチジン残基が保存されていたもののシステイン残基に関しては *rBBLd* においてのみ保存されていた。一次構造の比較により *rBBLs* と

tBBLsには多くの類似点が存在し、互いに同様の機能を有することが示唆された。

(3) マルバタバコ BBL (*rBBL*) の発現バクミド約 1 μg 相当を遺伝子導入試薬の DMRIE-C 試薬 (Invitrogen, CA, USA) と混合し、5 齢のカイコ幼虫の節へインジェクションし、25°C の環境で 6 日間飼育した。感染から 144 hr 後、カイコの幼虫より体液を回収した。

今回発現した BBLs は C 末端に 6 残基のヒスチジンが連続している His Tag を有している。ヒスチジンが Ni<sup>2+</sup> とキレートを形成する特徴を利用して、Ni-NTA 樹脂、complete His Tag Purification Resin (Roche Diagnostics) をカラム固定相としてカイコ体液から rBBL を精製した (図 5)。その結果、rBBL をカイコ幼虫 1 匹当たり約 0.5 mg 精製することに成功した。現在、精製酵素の結晶化を試みている。

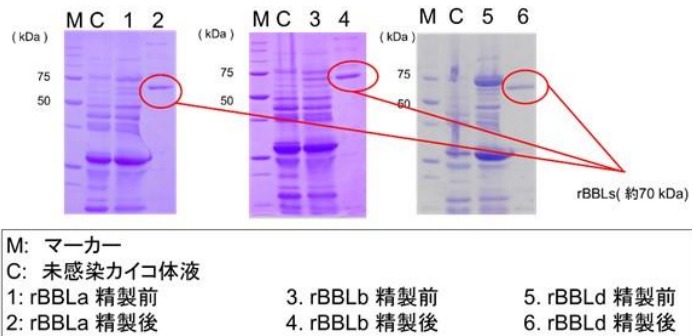


図 5 組み換え rBBL の発現および精製

#### (4) マルバタバコ BBL (*rBBL*) の酵素活性

##### ① コニフェリルアルコールに対する活性

コニフェリルアルコールを基質として rBBL との反応性を検討した。その結果、rBBLd では反応生成物は認められなかったものの、rBBLa 及び rBBLb では、その酸化物であるコニフェリルアルデヒドが生成することが判明した。なお、rBBLa に比べ rBBLb のコニフェリルアルデヒド生成活性は非常に低かった。興味深いことに、コニフェリルアルコールと rBBLa との反応生成物には、コニフェリルアルデヒド以外に二つのピークが認められ、その一つ (10 分付近のピーク) はコニフェリルアルデヒドの酸化物であるフェルラ酸であることが判明した (図 6)。

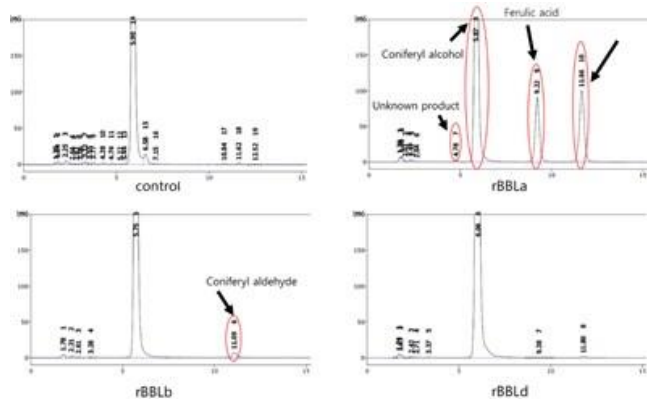


図 6 組み換え rBBL の酵素反応溶液の HPLC

シロイヌナズナの BBL は、コニフェリルアルコールをコニフェリル

アルデヒドに酸化することが報告されているが、フェルラ酸への酸化能については確認されていない。このようにシロイヌナズナとマルバタバコの BBL の性質が異なるのは極めて興味深い。さらに rBBLa は約 5 分の保持時間で溶出される未知化合物の生成を触媒したが、その構造については不明であるが、フェルラ酸の脱炭酸体と推定された。

##### ② シンナミルアルコールに対する酵素活性

シンナミルアルコールはコニフェリルアルコールからフェノール性水酸基とメトキシ基を除いた構造を有する。rBBLa はシンナミルアルコールを酸化し、シンナムアルデヒドを生成する反応を触媒した (図 7)。しかしながら、シンナムアルデヒド以外の酵素反応生成物は確認されず、コニフェリルアルコールを基質とした反応と異なった生成物パターンが認められた。また活性は弱い rBBLb および rBBLd にもシンナムアルデヒド生成活性が認められた

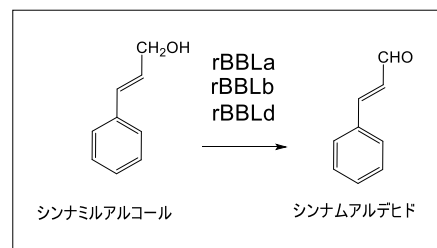


図 7 シンナミルアルコールに対する酸化反応

##### ③ p-クマリルアルコールに対する酵素活性

BBLb 及び rBBLd では反応の進行が認められなかったものの rBBLa を用いた場合には基質以外に三つのピークが確認され、コニフェリルアルコールとの反応生成物に似たパターンのクロマトグラムが得られた。9 分付近に溶出される化合物は、p-クマル酸と同定されたが、他の 2 種については不明である。以上の結果から、rBBLa は p-クマリルアルコールから p-クマル酸への酸化を触媒することが判明した (図 8)。本反応では、p-クマリルアルデヒドを中間体として進行すると考えられる。なお、10 分付近で溶出される化合物は p-クマリルアルデヒドと推定されたが、化合物の詳細については、単離構造決定を検討している。

##### ④ rBBL のニコチン生合成活性

測定には、Kajikawa らの報告によりニコチンの生合成に関与する基質候補として挙げられて



いるジヒドロメタニコチンを用いた。

しかしながら、あらゆる条件を検討したもののニコチンの生成活性は検出されなかった(図9)。今回調製した組換え rBBL は、フェニルプロパノイド類の酸化を触媒する能力を有していることから、活性型酵素としての3次元構造を保持していると思われる。本酵素がニコチンの生合成に関与しないかあるいは別の基質がニコチンの生合成前駆体と推定される。

### (5) 総括

申請課題では精製した組換え rBBL を用いてモノリグノールの酸化反応への寄与を検討した。この結果、rBBLs とモノリグノール(コニフェリルアルコール、シンナミルアルコール、p-クマリルアルコール)との反応では興味深い結果が得られた。特に、コニフェリルアルコールを基質として rBBLa と反応させた場合、酸化反応が一気に進行し、コニフェリルアルデヒド、フェルラ酸が得られることが判明した。通常、アルコールとアルデヒドの酸化にはそれぞれ別の酵素が関与することから、本反応は極めて興味深い反応と言える。また、本反応では、コニフェリルアルデヒドとフェルラ酸の他にフェルラ酸を基質とする生成物の存在も認められた。本生成物の同定は今後の課題である。

rBBLb を用いた反応では、コニフェリルアルコールとシンナミルアルコールをそれぞれ相当するアルデヒドのコニフェリルアルデヒド、シンナムアルデヒドへ酸化する反応が認められたが、rBBLa で確認されたアルデヒドの酸化物は生成されなかった。

rBBLd を用いた反応では、シンナミルアルコールを基質とした場合に僅かなシンナムアルデヒドの存在が認められたのみであった。

rBBLa と rBBLb には一次配列間の類似性が 96% も存在するにもかかわらずその活性には大きな差が認められたことから 4% の相違アミノ酸の中に活性残基が存在すると考えられる。これら活性残基の特定を行うと同時に X 線結晶構造解析を行いモノリグノールの酸化反応機構を詳細に解明することが今後の大きな課題である。

BBLs はニコチン生合成に関与が推定されたことから、生合成前駆体のジヒドロメタニコチンを用いて酵素活性を測定した。様々な条件を検討したが、ニコチンの生成は認められなかった。従って、ニコチンの生合成には他の基質か他の生合成酵素が関与している可能性が推察された。

申請課題の研究により、タバコ属植物の BBL としては、はじめて酵素活性の検出に成功した。この結果から BBL は細胞壁構成成分のモノリグノールの代謝に関与していると考えられた。

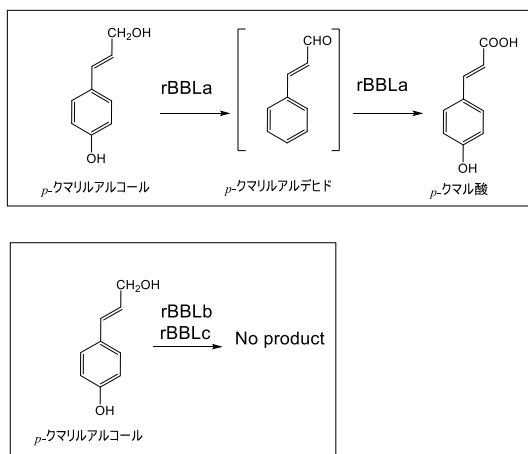


図8 p-クマリルアルコールに対する酸化反応

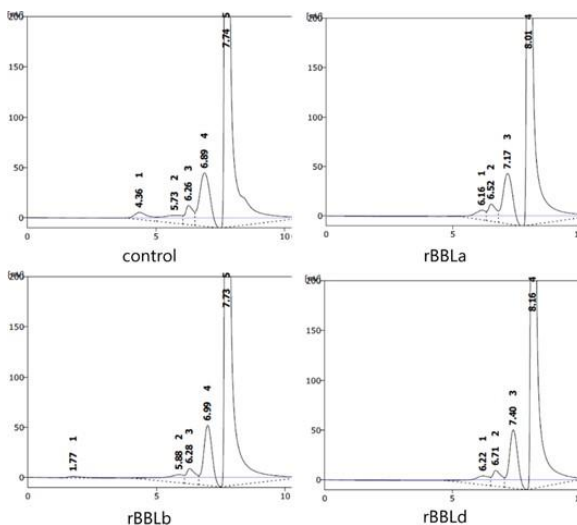


図9 ジヒドロメタニコチンに対する反応性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------