

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590149

研究課題名(和文)薬用植物の活性酸素代謝機構に関する構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural and biological studies on metabolism of active oxygen species in medicinal plants

研究代表者

森元 聡 (Morimoto, Satoshi)

九州大学・薬学研究科(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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物体内で発生した活性酸素種は、植物自身に強いストレスを与えることが知られている。多くの植物が、活性酸素種を解毒するシステムを有しており、パーオキシダーゼが解毒化反応に関わっていることが知られている。解毒化メカニズムを解明するために、ルヒネパーオキシダーゼとバイカレインパーオキシダーゼのX線結晶構造の解明を目指して様々な検討を行った。この結果、両酵素とも大腸菌で不溶化タンパクとして発現させ、巻き戻しにより活性タンパクとして大量に調製することに成功した。また、モルヒネパーオキシダーゼについては、結晶化にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen peroxide, which occurs in plant cells, is known to give serious stress to plant bodies. Many plants construct the systems to detoxify hydrogen peroxide in their bodies, and peroxidases catalyze this detoxification. To precisely understand the mechanism of these detoxifying reactions, I attempted to demonstrate the structures of morphine peroxidase and baicalein peroxidase by X-ray crystallography. As results, I expressed large amounts of recombinant protein in E. coli, whereas they were insoluble and lost the peroxidase activity. Therefore, when I refolded the insoluble and inactive protein, and obtained both peroxidases in the active forms. In addition, we crystallized morphine peroxidase.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：パーオキシダーゼ モルヒネ バイカレイン ケシ コガネバナ

1. 研究開始当初の背景

植物体内で発生した活性酸素種は、パーオキシダーゼ等の酵素によって速やかに代謝され、解毒されることが知られている。この代謝系は植物にとって極めて重要な生体反応であることから、国内外の研究者によって詳細な研究が行われており、本酵素のX線結晶解析による3次元構造の解明にも成功している。また、結晶構造を基にして、酵素反応メカニズムも原子レベルで解明されている。しかしながら、これらの酵素と性質を異にする植物パーオキシダーゼは数多く知られており、興味深い反応を触媒するにもかかわらず、原子レベルでの反応メカニズムは解明されていない。

申請者は、薬用植物の過酸化水素生産・代謝系に関する研究を行ってきたが、この過酸化水素代謝機構が植物の有効成分の分解に関与し、生薬の品質を著しく劣化させることを明らかにしている。例えば、コガネバナのパーオキシダーゼ(バイカレインパーオキシダーゼ、以下BPと略す)やケシのパーオキシダーゼ(モルヒネパーオキシダーゼ、以下MPと略す)は有効成分のバイカレインやモルヒネを分解し、生物活性の低いデヒドロバイカレインやビスモルヒネを生成することを発見している(J. Biol. Chem., 1998, 2001)。これらの反応の詳細なメカニズムに関しては大部分が不明である。また、本酵素の結晶構造も不明である。

BPやMPとは、分泌型の酵素で、いわゆるClass 3に分類される(なおアスコルビン酸パーオキシダーゼは、細胞内酵素でClass 1に分類される)。Class 3のパーオキシダーゼとしては、セイヨウワサビやラッカセイ由来のものが詳細に研究されているが、MPやBPは従来のClass 3と異なる興味深い性質を示すことを証明している。BPおよびMPの特徴を下記に示す。

MPの特徴

)BPはフラボンを基質とするパーオキシダーゼである。フラボンの酸化を触媒するパーオキシダーゼは、ほとんど研究されていない。

)BPはストレスに反応してコガネバナの細胞壁に共有結合し、細胞壁の強化反応に寄与する。すなわち本酵素は過酸化水素の代謝酵素としてのみならず構造タンパクとして機能する初めてのパーオキシダーゼである。

MPの特徴

)MPはモルヒネを基質とするパーオキシダーゼである。モルフィナンアルカロイドを酸化するパーオキシダーゼの研究はこれまでまったく報告されていない。

)Class 3のパーオキシダーゼは一般に様々な基質(例えばピロガロール、カテコール、ABTS等)を酸化することが知られている。しかしながら、MPはモルヒネ以外の基質を酸化せず、極めて高い基質特性を示す。

このようにMPやBPは極めて興味深い性質を有しているが、これらの理由を明らかにするには立体構造を精密に決定することが必須である。また、立体構造を解析することによって、それらの阻害剤の設計も可能となり、バイカレインやモルヒネ等の有効成分の含量低下を抑制することも可能となる。このような研究背景のもとに、申請課題を企図するに至った。

2. 研究の目的

- 1)薬用植物の有効成分の分解を触媒する酵素(パーオキシダーゼ)のX線・中性子結晶構造を明らかにする。
- 2)新規な性質を有するパーオキシダーゼの反応メカニズムを原子レベルで解明する。
- 3)有効成分の分解が起こりにくい薬用植物の栽培法の開発を目指して、結晶構造を基にパーオキシダーゼ阻害剤の開発を試みる。

3. 研究の方法

第一章 カイコを用いたコガネバナパーオキシダーゼ (BP) の発現系の確立

第一節 カイコ パキユロウイルスを用いた BP 発現系の検討

第一項 カイコ発現用ドナープラスミドの構築

2種のBP遺伝子 (BP1 および BP2) の発現系の構築を試みた。まず、コガネバナカルスからクローニングしたBP1 遺伝子とBP2 遺伝子を導入した pGEM-T Easy Vector System (Promega) を鋳型として、制限酵素部位 (BP1 : NotI・XbaI、BP2 : SalI・NotI) を有するプライマーを用いたPCRにより、BP1 遺伝子及びBP2 遺伝子を増幅した。この際、両遺伝子は、C末端側に His6-tag の付加された融合タンパク質として発現するように設計した。His6-tag を有する peroxidase 遺伝子は、増幅、精製後同制限酵素処理 (NotI・XbaI、SalI・NotI) を施した pFB へと導入しドナープラスミドを構築した。BP1 は、pFB への導入が確認されなかった。BP2 は pFB への導入に成功したため、次のステップへ進んだ。

構築したドナープラスミド (pFB/BP2) を用いて大腸菌株 JM109 に形質転換し、LB-A プレートで一晩培養後、得られた耐性コロニーを direct PCR し、peroxidase 遺伝子が組み込まれていると予想されるクローンを選択した。選抜したクローンは、更に LB-A 培地で一晩培養後、プラスミドを抽出し、塩基配列を確認した。その結果、peroxidase は設計通り、ポリヘドリンプロモーターの下流に peroxidase、His6-tag の順に導入されていることが確認された。

第二項 大腸菌 BmDH10Bac を用いたトランスポジション (バクミドの作製)

続いて、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、熱処理法により構築したドナープラスミド (pFB/BP2) を BmDH10Bac に導入し、形質転換を行った。次に、形質転換後の大腸菌を Kanamycin、Tetracycline、Gentamicin、IPTG、X-gal を含有した LB-プレートで 48 時間培養後、得ら

れた耐性コロニーを direct PCR し、BP2 遺伝子が組み込まれていると予想されるクローンを選抜した。本 PCR に用いたユニバーサルプライマーにより増幅される遺伝子は、目的遺伝子より約 2300bp 大きい。そのため、約 3300bp の大きさで検出された PCR 産物を BP2 遺伝子組み換えバクミドと判断した。

第三項 組換え BP の発現

トランスポジション後の組み換えバクミドを、QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いて精製した。次いで精製サンプルの約 1 µg 相当を遺伝子導入用カチオン性試薬 (DMRIE-C 試薬、Invitrogen) と混合後、5 齢のカイコ幼虫の節へインジェクションし、25℃ で飼育した。

感染 144 時間後、カイコ幼虫より体液、脂肪体を回収した。回収時に、カイコ由来のタンパク質の酸化を防止する目的で体液では 5%、脂肪体では 0.5% チオ硫酸ナトリウムを用いた。

第二節 大腸菌を用いた BP の発現

コガネバナカルスからクローニングしたBP1、BP2 をコードした pET28a(+) (Novagen) (pET28a(+)/BP1、pET28a(+)/BP2) を用いて発現用大腸菌 BL21 (DE3) への形質転換を行った。

大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換後 (pET28a(+)/BP1/BL21、pET28a(+)/BP2/BL21)、LB-K プレートで一晩培養後、得られた耐性コロニーから、peroxidase 遺伝子が組み込まれていると予想されるクローンを選抜した。選抜したクローンは、LB-K 培地で一晩培養後、プラスミドの抽出を行った。

次に、pET28a(+)/BP1/BL21、pET28a(+)/BP2/BL21 を用いて IPTG の誘導による両遺伝子の発現を行った。pET28a(+)/BP1/BL21、pET28a(+)/BP2/BL21 組み換え体を LB-K 培地で前培養し、1L の LB-K 培地に加え、37℃ で OD660 が 0.6 になるまで培養した。その後、IPTG を終濃度 1mM になるように添加し、37℃ で約 18 時間培養することにより peroxidase

の発現誘導を行った。

第二章 カイコを用いたモルヒネパーオキシダーゼ (MP) の発現系の確立

第一節カイコ バキュロウイルスを用いたMPの発現系の検討

これまで三種のケシ peroxidase 遺伝子 (MP 1~3) をクローニングしており、このうちMP2 遺伝子がモルヒネ代謝酵素をコードすることを証明している。そこで、カイコバキュロウイルス系を用いてMP2の発現を行った。なお発現系の構築や発現条件については、BP(第一章 第一節)と同様の条件で行った。

第二節大腸菌を用いたMPの発現系の検討

MP2およびMP1 遺伝子をpET28aベクターに導入後、大腸菌 BL21(DE3)にて組換えMPの大量発現を試み、不活性な封入体として発現させた。封入体に含まれるMPを変性条件で精製し、酸化還元溶液を用いて立体構造の再生を行った。すなわち、変性タンパク質を含む溶液を終濃度0.16mg/mLになるように、室温にてタンパク質再生緩衝液[5mM CaCl₂および10% (w/v)のグリセロールを含む0.1M Tris 緩衝液 (pH9.5)]で希釈した後、4で6日間攪拌した。酸化還元剤はタンパク質再生緩衝液に添加して効果を調べた。ヘミン添加の効果は、酸化還元剤(10:2)の条件で検討した。再生溶液を各種クロマトグラフィーに付すことによりMP2を精製した。なお、MP1の精製条件については現在検討中である。

第三節 MP2の結晶化実験

市販のスクリーニングキットを用いて、ハンギングドロップ法にて結晶化を検討した。

4. 研究成果

第一章 コガネバナパーオキシダーゼ (BP) に関する研究

コガネバナはストレスに反応してH₂O₂を、コガネバナの主成分であるBAG代謝とリンクして迅速に解毒するという極めて興味深い

システムを有することが証明されている。この反応を触媒する酵素として、3種のperoxidase (BP1, BP2, BP3) が同定されている。このうち、BP1は、酵素活性を有するのみならず、ストレスに応答して細胞壁に不溶化するのに対し、類似した活性や基質特異性を有するBP2及びBP3ではこの不溶化反応が確認されなかった。この性質の相違は両者の構造上の違いによるものと推察された。

申請課題では、BP1及びBP2の構造の違いを立体的に解明することで、ストレスに対するperoxidaseの不溶化のメカニズムを明らかにすることを目的としてX線結晶構造解析に向けたコガネバナ peroxidaseの大量発現系の検討を行った。

発現方法としては、カイコバキュロウイルス発現系と、大腸菌BL21(DE3)を用いた発現系で発現を検討した。

カイコバキュロウイルス発現系では、発現用のドナープラスミド(pFB/BP1、pFB/BP2)の構築に成功したが、体液、脂肪体いずれからも発現が確認されず、BP1、BP2の結晶化、立体構造の検討には至らなかった。

大腸菌BL21(DE3)を用いた発現系では、両peroxidaseは大部分が不溶性画分に存在し、巻き戻しを要する封入体として発現していることが判明したため、不溶性画分から可溶化後、アフィニティーカラムで精製し、活性体への巻き戻しを行った。Cystamine/Cysteamine系を用いて巻き戻しを行った結果、SS結合を形成した(すなわち巻き戻った)タンパク質の存在が確認された(Fig. 1)。ABTSアッセイにより、巻き戻したタンパク質のperoxidase活性を精査したところ、peroxidase活性を回復できることが明らかとなった。また、BPはコガネバナの内在性のフラボンであるバイカレインを酸化することを証明しているが、巻き戻したBPもこの活性を有することを確認した。

現在、市販の結晶化スクリーニングキット

を用いて、結晶化を行っているが、X線結晶解析に適した結晶を得るには至っていないので、さらに条件を検討中である。

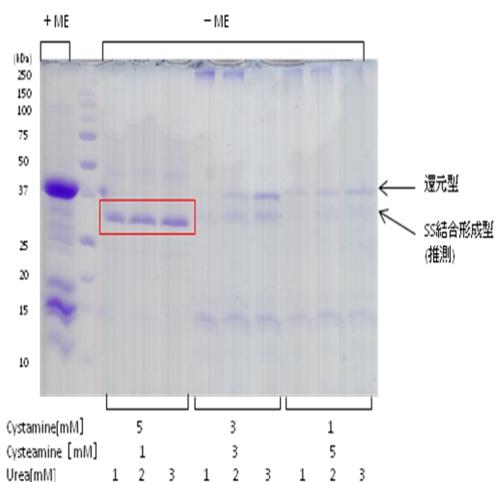


Fig. 1 Refolding of SP1. Lane 1 ,+ mercaptoethanol ; lane2 , Precision Plus Protein Standard ; lane 3~5 , refolded BP1.

第二章 モルヒネパーオキシダーゼ (MP) に関する研究

申請者はケシから3種のパーオキシダーゼ遺伝子MP1からMP3をクローニングし、そのうちMP2がモルヒネのみを酸化する、きわめて基質特異性の高いパーオキシダーゼであることを証明している。

申請課題ではMP2のこの特異な性質を明確にするために、MP2の大量発現系の構築を試みた。カイコを用いて発現を検討した結果、組換えタンパク質がカイコの体液中に発現していることを確認した (Fig. 2)。

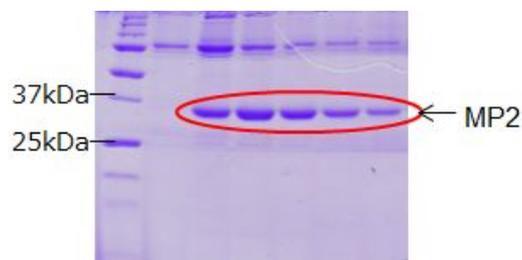


Fig. 2 Expression of MP2 in silkworm

体液を採取しNi-affinityクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーに付すことにより、SDS-PAGEで単一バンドを示す組換えMP2を取得した。このMP2は、morphineからbismorphineへの酸化を触媒するモルヒネ代謝酵素活性を有していた。ついで、この組換えMP2の結晶を獲得するために、結晶化条件を検討したが、十分なMP2を調製してないために、結晶化する条件を決定することが出来なかった。

そこで大腸菌を用いてMP2の発現系を試みた結果、不活性な封入体として発現した。これを可溶化後、巻き戻しを試みた結果、SS結合を形成したMP2の生成が確認された (Fig. 3)。さらに活性測定を行った結果、巻き戻し処理を行ったMP2は過酸化水素の存在下で、morphineをbismorphineに酸化することが判明した。以上のことからパーオキシダーゼ活性を有するMP2の調製に成功したと結論した。

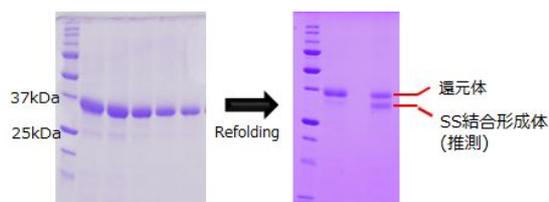


Fig.3 Refolding of MP2

精製後、結晶化実験を試みた。この結果、PEG8000 (18% w/v), 0.1 M カコジル酸ナトリウムバッファー (pH6.5), 0.2 M 酢酸カルシウム溶液において、針状結晶を獲得することに成功した (Fig. 4)。本結晶はX線解析実験に使用する予定である。



Fig.4 Crystals of refolded MP2

申請課題ではさらに機能が不明な MP1 の酵素的な性質の解明実験を行った。MP2 と同様に大腸菌を用いて封入体として発現した後、巻き戻しを行った。この結果、活性MP1として巻き戻すことに成功した。その基質特異性を調べた結果、MP1 は ABTS などのパーオキシダーゼに汎用される基質を酸化することが判明した。

これらの結果から MP1 は MP2 と異なり、他のパーオキシダーゼ類と類似した性質を持つことが予想された。現在、精製条件を検討しており、大量の精製 MP1 を獲得次第、結晶条件を調べる予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 清水瑠美, 安達基泰, 黒木良太, 山下未知, 森元 聡

モルヒネの代謝反応を触媒する組換え型パーオキシダーゼの調製

日本蛋白質科学会, 2012.06.20.

2. 戸切祥恵, 田畑 香織, 田中 宏幸, 森元 聡

ケシにおけるモルヒネ代謝酵素に関する研究

日本生薬学会 第 60 回年会, 2013.09.08.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森元 聡 (九州大学・薬学研究院・教授)

研究者番号: 60191045

(2) 研究分担者

玉田 太郎 (日本原子力研究開発機構・研究員)

研究者番号: 50391248

安達 基泰 (日本原子力研究開発機構・研究員)

研究者番号: 60293958

(3) 連携研究者

佐々木香織 (九州大学・薬学研究院・助教)

研究者番号: 90464388