

博士論文

生物活性アルカロイドの基本骨格を構築する
二次代謝酵素の立体構造基盤の解明

森 貴裕

目次

序論

1. アルカロイド化合物.....	3
2. アルカロイド化合物の生合成.....	4
3. 本研究の目的.....	6

第1章 Quinolone 及び acridone 骨格を構築する植物由来新規ポリケタイド合成酵素

1.1. ミカン科植物由来アルカロイド.....	8
1.2. ポリケタイド合成酵素.....	9
1.3. III 型 PKS の反応.....	11
1.4. カルコン合成酵素 (CHS)	12
1.5. アルカロイドを合成する III 型 PKS.....	15
1.6. 本章の研究の目的.....	19
1.7. 結果	
1.7.1. 酵素発現、精製.....	20
1.7.2. 酵素活性の確認.....	21
1.7.3. 酵素結晶化.....	23
1.7.4. <i>C. microcarpa</i> QNS、 <i>C. microcarpa</i> ACS の全体構造.....	25
1.7.5. <i>C. microcarpa</i> QNS の活性部位.....	27
1.7.6. <i>C. microcarpa</i> ACS の活性部位.....	31
1.7.7. 結晶構造を鋳型とした変異導入.....	32
1.8. 考察.....	34

第2章 β -carboline 骨格を構築する微生物由来新規 Pictet-spengler 反応触媒酵素

2.1. β -carboline アルカロイド.....	40
2.2. β -carboline 骨格の生合成	
2.2.1. β -carboline 骨格の形成.....	41
2.2.2. strictosidine 合成酵素 (STR)	41
2.2.3. strictosidine 合成酵素の構造と触媒反応機構.....	42
2.2.4. norcoclaurine 合成酵素 (NCS)	45

2.2.5.	norcoclaurine 合成酵素の触媒反応機構.....	46
2.2.6.	植物以外での β -carboline 構造の形成.....	47
2.2.7.	marinacarboline 類の生合成.....	48
2.2.8.	McbB と既知の Pictet-Spengrase との系統樹解析.....	51
2.3.	本章の研究の目的.....	51
2.4.	結果	
2.4.1.	McbB の発現.....	53
2.4.2.	酵素活性確認.....	54
2.4.3.	McbB の基質特異性.....	55
2.4.4.	McbB の結晶化.....	63
2.4.5.	McbB の全体構造.....	65
2.4.6.	基質との結合様式 ~L-tryptophan との結合様式~.....	69
2.4.7.	基質との結合様式 ~aldehyde との結合様式~.....	72
2.5.	考察.....	76
	総括.....	85
	実験項.....	86
	参考文献.....	105
	謝辞.....	112

序論

1. アルカロイド化合物

植物や動物、微生物はアルカロイド、テルペノイド、ポリケタイドなどの複雑な骨格を有する様々な有用二次代謝産物を生産する。その中でも、種々のアミノ酸に由来し構造内に含窒素複素環を含むアルカロイド化合物は少量で顕著な生物活性を示すため、医薬品資源としても重要視されている^{1,2}。

アルカロイドとは、2級、3級、4級の窒素元素を含む、二次代謝産物と定義される。これまでに 100,000 種以上のアルカロイドが知られており、植物種の約 20%から見出されている。また、いくつかのアルカロイドはファイトアレキシンや植物と昆虫の相互作用や薬物、毒、麻薬に使用される^{3,4}。例えば、臨床に応用された植物由来のアルカロイドには鎮痛剤の morphine、抗癌剤の vincristine や taxol、痛風抑制剤の colchicine、筋弛緩薬の(+)・tubocurarine 抗生物質としての sanguinarine、鎮静薬の scopolamine などがある⁵ (Figure 1)。

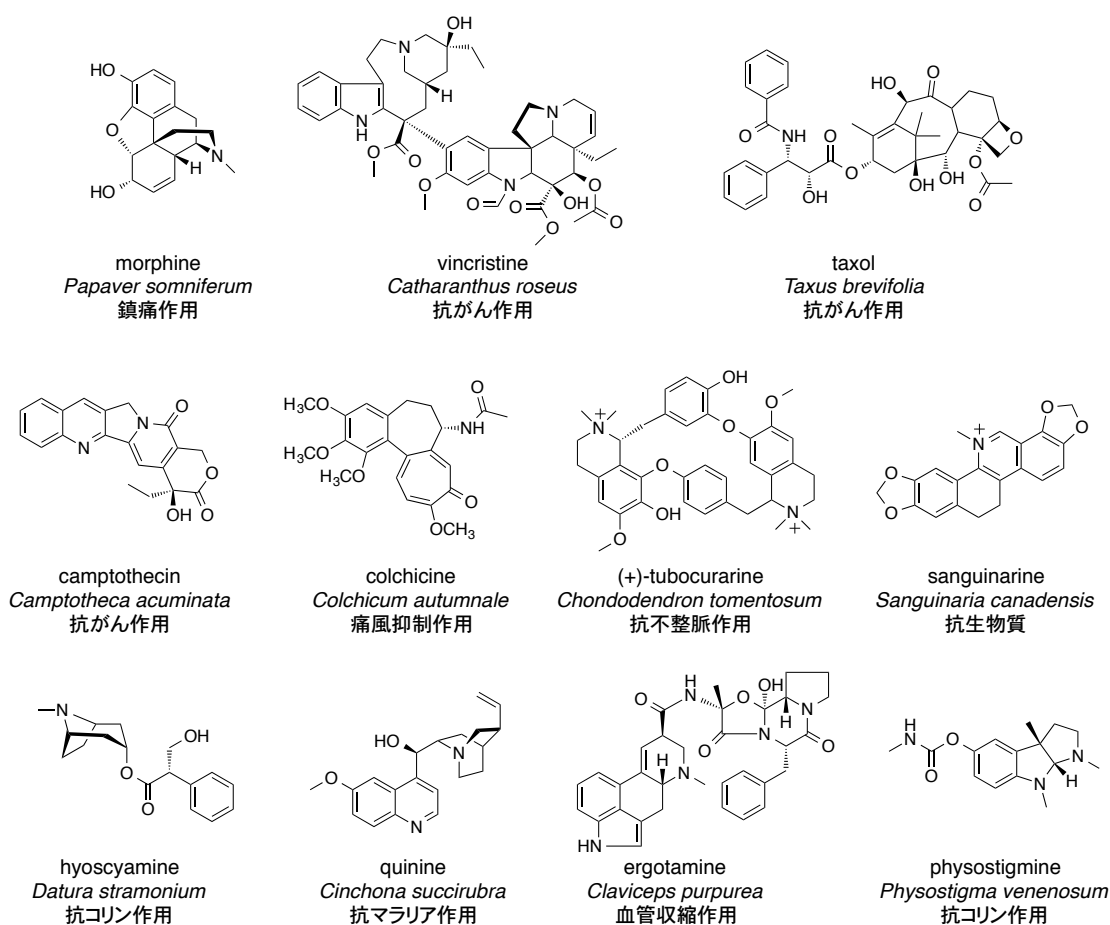


Figure 1. 医薬品として用いられるアルカロイド類

2. アルカロイド化合物の生合成

1806 年にケシ (*Papaver somniferum*) より morphine がアルカロイド化合物として初めて同定されてから様々なアルカロイド化合物が植物、微生物、動物から単離され、その生合成研究も同時に行われてきた⁶。本研究で取り上げるアルカロイド化合物の生合成については各章の序論で詳しく説明し、ここでは、morphine の生合成について紹介する。

Morphine の単離から 200 年以上たった 2015 年、morphine の前駆体である (*S*)-reticuline の異性化を担う酸化酵素の発見により遂に morphine の全生合成遺伝子が解明された⁷ (Figure 2)。また、その生合成遺伝子の一部を酵母に組み込み、安価で単純な化合物である D-glucose から (*S*)-reticuline を生産する酵母⁸、(*R*)-reticuline から morphine を生産する酵母⁹、そして、D-glucose から医薬品としても重要な thebaine や hydrocodone を生産する酵母¹⁰も既に構築されている。このように D-glucose から morphine 誘導体を一挙に生産することが可能となっており、医薬品供給源として morphine の生産が大幅に単純化できると考えられる。しかしながら、現在得られている thebaine や hydrocodone の収量はそれぞれ 6.4 $\mu\text{g/L}$ 、 $\sim 0.3 \mu\text{g/L}$ と、単純に化合物生合成遺伝子を異種宿主に発現させるのみでは医薬品供給に足る生産量が見込めていない。そこで、今後、宿主内の前駆体合成経路を強化する代謝工学的手法や、酵素の反応性、基質特異性を制御する酵素工学的手法により化合物の生産性を向上させ、産業利用にも応用可能な異種宿主を開発することが重要となる。

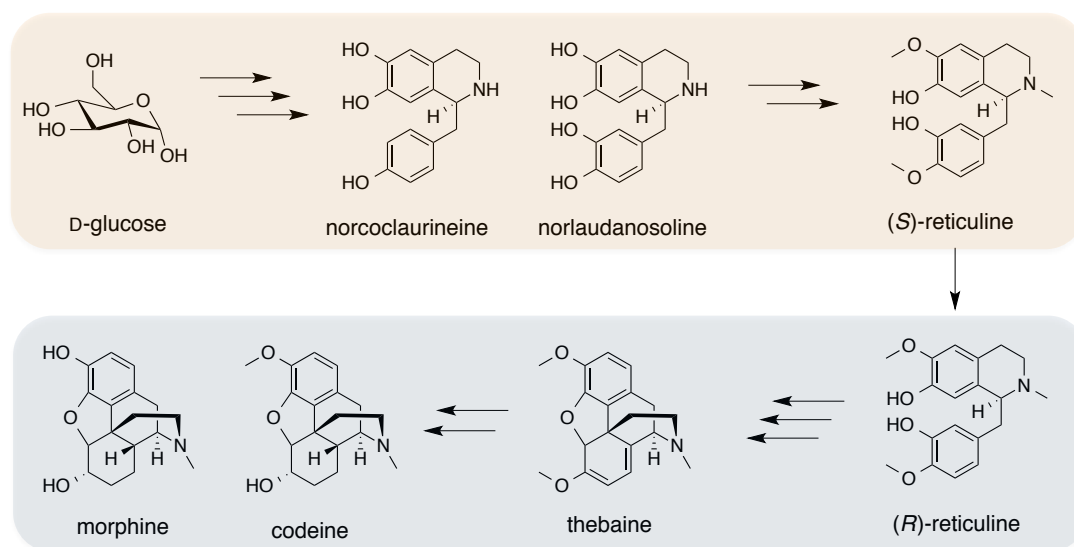


Figure 2. Morphine の生合成

このように有用化合物の生合成を分子レベルで明らかとすることで、遺伝子資源を利用した有用化合物の安定供給が可能となる。また、機能解析、X線結晶構造解析から詳細な酵素の触媒反応メカニズムを明らかとし、その知見に基づき、非天然型の基質を作作用させることで、天然にはない人工的な新規化合物の創出が可能となる。あるいは結晶構造を鋳型として活性に重要なアミノ酸残基に変異導入を行うことで、酵素の基質特異性、触媒反応を変化させた機能改変生合成酵素を作成し、変異酵素を用いた新規生物活性化合物の創出も期待される。

3. 本研究の目的

本研究では、天然二次代謝産物、特にアルカロイド化合物の基本骨格の構築を担う酵素の機能解析、X 線結晶構造解析を行い、酵素の詳細な触媒メカニズムの解明、さらには構造に基づいた変異導入により酵素の基質特異性、生成物特異性を人為的に変化させた機能改変酵素の創出を目的に研究に取り組んだ。

第 1 章では、ミカン科植物に多く見られ、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)、serotonin 5-hydroxytryptamine-3 (5-HT₃) レセプターのアンタゴニストとして、また、抗マラリア薬のリード化合物として重要な、quinolone 骨格、acridone 骨格の生合成を担うⅢ型ポリケタイド合成酵素の X 線結晶構造解析による、アルカロイド合成の構造基盤解明を目的に研究を行った。

第 2 章では、天然に広く分布し、様々な生物活性を示すβ-carboline 骨格の形成を行う新規放線菌由来 Pictet-Spengler 反応触媒酵素の *in vitro* による機能解析と、X 線結晶構造解析による、反応メカニズムの解明を行なった。さらに、結晶構造を基にした機能改変酵素を作成し、新規化合物の創出を目指した。

第 1 章

Quinolone 及び acridone 骨格を構築する
植物由来新規ポリケタイド合成酵素

1.1. ミカン科植物由来アルカロイド

ミカン科植物は、生薬「呉茱萸」(*Euodia ruticarpa*) に含まれる evocarpine など、多くの quinolone 骨格、acridone 骨格を有するアルカロイドを多く生産する¹¹(Figure 1.1)。Quinolone、acridone 化合物は、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)、serotonin 5-hydroxytryptamine-3 レセプターのアンタゴニストとして、また、抗マラリア薬のリード化合物として研究が行われてきた^{12,13}。さらに、その他にも抗アレルギー活性、抗ガン活性等の作用を示す有用アルカロイド化合物である¹⁴。これらの化合物は、*N*-methyl-anthranilic acid を鍵中間体として III 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) より行われることが知られている¹⁵。

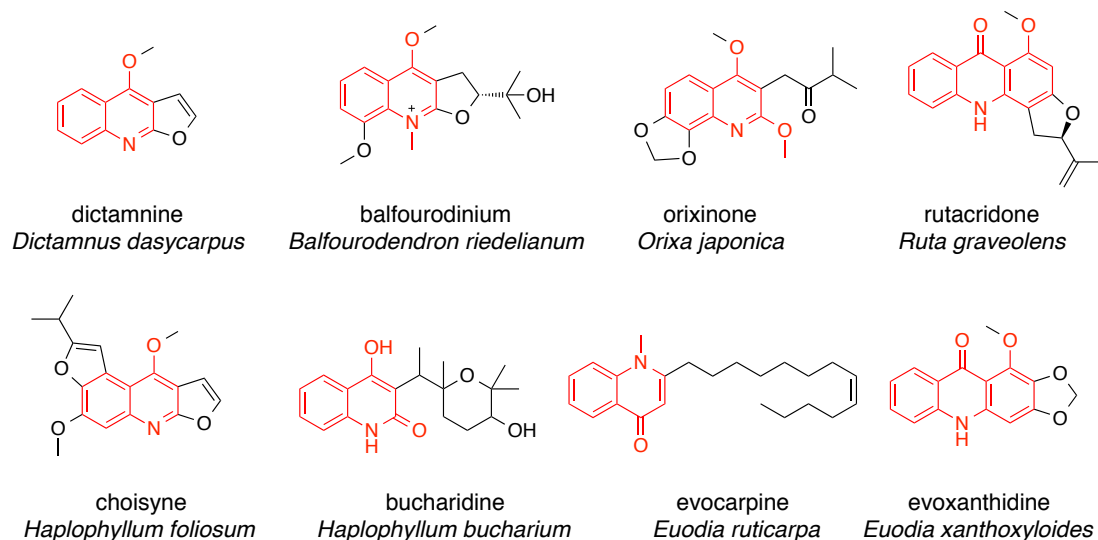


Figure 1.1. ミカン科植物から単離された quinolone、acridone アルカロイド

1.2. ポリケタイド合成酵素

ポリケタイド合成酵素 (PKS) とは、malonyl-CoA に由来する C_2 ユニットの縮合による炭素鎖伸長反応によって生成した β -ポリケトメチレン中間体の閉環反応、修飾反応を触媒する酵素群であり、I 型からIII型に大別される (Figure 1. 2)。

I 型 PKS は触媒ドメインが単一のポリペプチド上に連なって存在するモジュール構造を取る (Figure 1. 2a)。単一のモジュールは1回の伸長反応を触媒する。I 型 PKS には、複数のモジュール間で中間体が受け渡されて最終生成物が生成するモジュール型、単一のモジュールが繰り返し伸長反応を触媒する反復型が存在する。各モジュールの中には、keto synthase (KS)、acyl transferase (AT)、acyl carrier protein (ACP)の基本単位の他に、keto reductase (KR)、dehydratase (DH)、enoyl reductase (ER)が存在することも多く、これらが β -ポリケトメチレン中間体の β 位の構造を決定する¹⁶。

II 型 PKS はそれぞれの触媒ドメインが独立に存在し、集合して一連の伸長反応を触媒するサブユニット型構造を取る (Figure 1. 2b)。II 型 PKS は主に放線菌属の細菌に分布し、芳香族ポリケタイドを合成する。KS は $KS\alpha$ 、 $KS\beta$ のヘテロダイマーとして存在する。環化酵素 (CYC)、芳香化酵素 (ARO) 等によって環化の様式が決定される¹⁷。

III 型 PKS は植物、微生物に広く分布し、KS のみから構成される酵素群である (Figure 1. 2c)。分子量約 42-45 kDa の比較的単純なタンパク質であり、生体内においてはホモダイマー酵素として存在している。III 型 PKS は他の PKS とは異なり、I 型やII 型 PKS では KS がアシル ACP から基質を受け取るのに対し、III 型 PKS はアシル CoA 体を直接の基質として受け入れ、酵素反応を進行させる¹⁵。

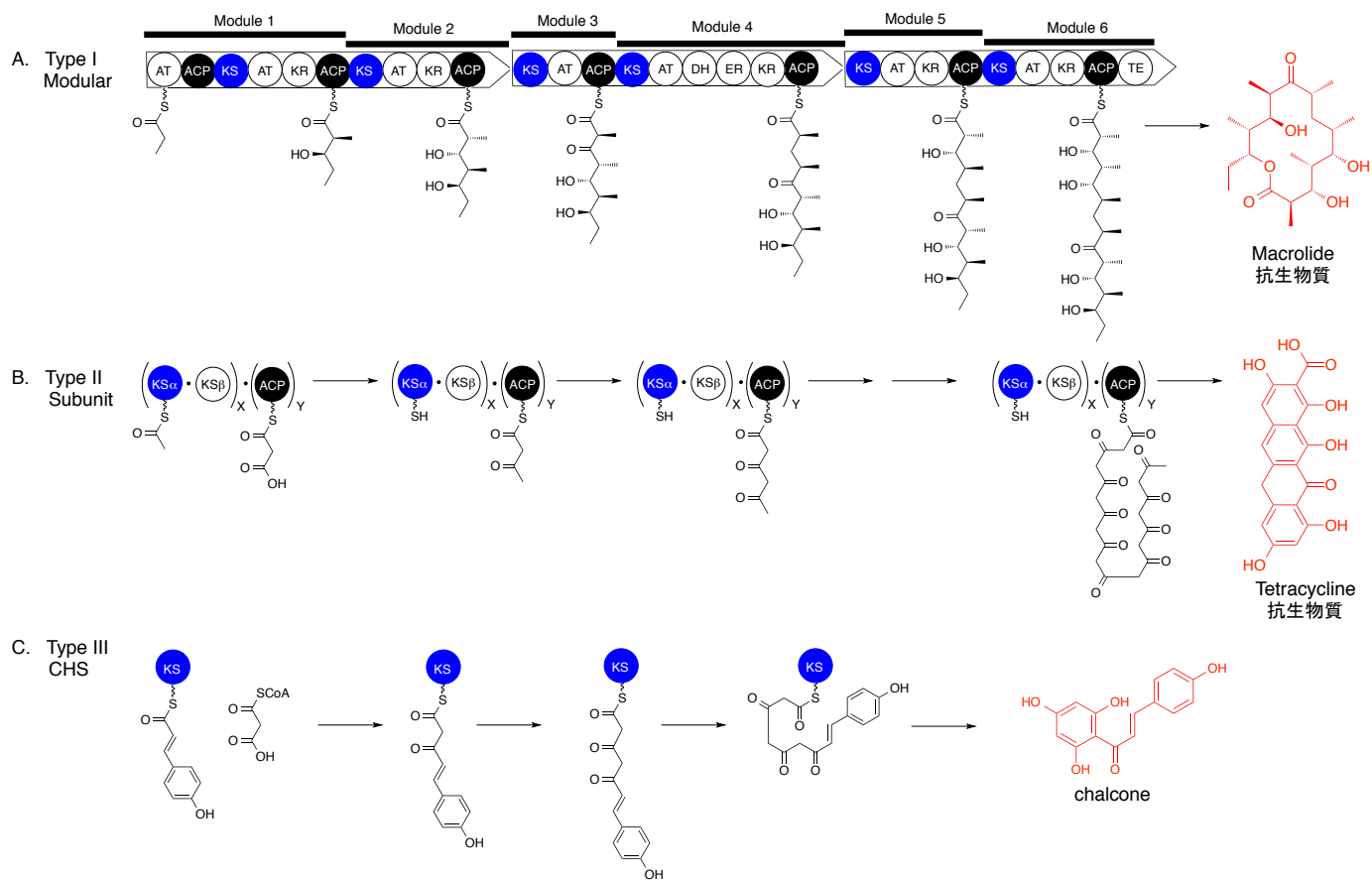


Figure 1.2. ポリケタイド合成酵素反応様式

A. モジュール型 I 型 PKS の反応様式

B. II 型 PKS の反応様式

C. III 型 PKS のカルコン合成酵素の反応様式

AT: acyltransferase, KS: ketosynthase, KR: keto-reductase, DH: dehydrogenase,
ER: enoyl-reductase, ACP: acyl carrier protein, TE: thioesterase

1.3. III型 PKS の反応

III型 PKS によるポリケタイド鎖伸長反応は、開始基質が触媒活性部位に取り込まれた後、His303 との水素結合によって安定化された Cys164 のチオレートアニオンが starter-CoA チオエステルのカルボニル炭素を求核攻撃することにより開始する。His303、Asn336 は伸長基質である malonyl-CoA の脱炭酸とその結果生じたアニオンの安定化に寄与し、Cys164 に結合した starter-酵素中間体への Claisen 型縮合の炭素鎖伸長反応を促進する。基質のローディングと malonyl-CoA 由来の C₂ ユニットの縮合反応が繰り返されて炭素鎖が伸長した後、最後にβ-ポリケトメチレン中間体の閉環反応が進行し、反応が終結する¹⁵ (Figure 1. 3)。

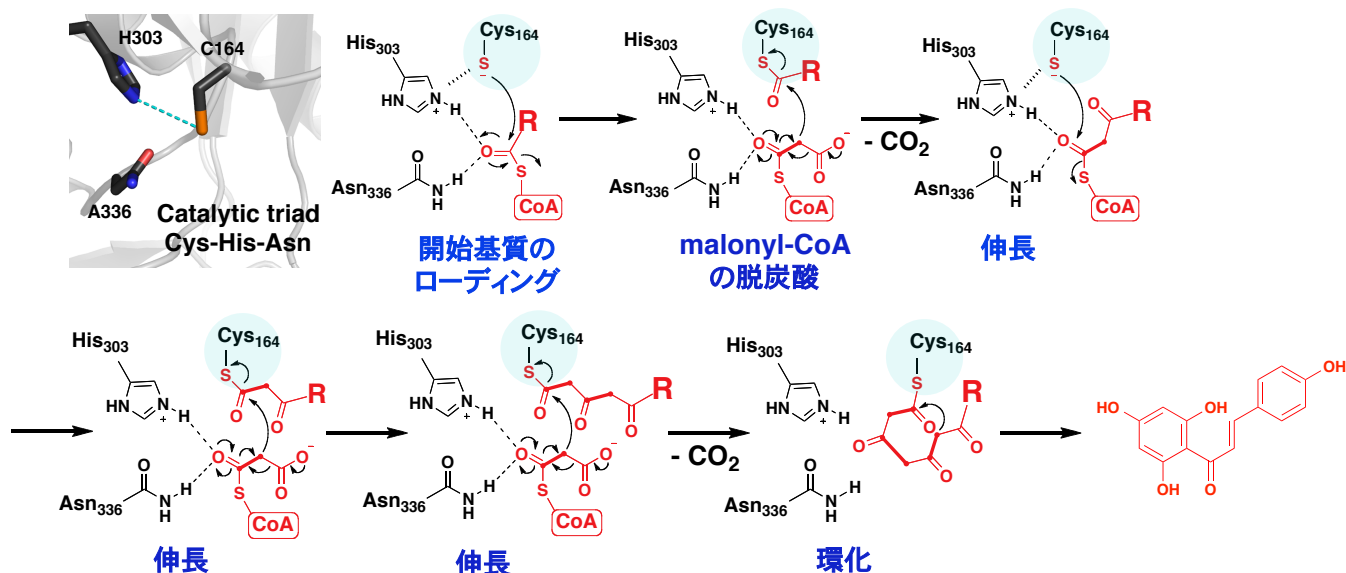


Figure 1.3. III型 PKS の伸長反応機構

このように、III型 PKS の反応は活性中心 Cys164 へのスターター基質のローディング、malonyl-CoA に由来する C₂ ユニットの縮合反応、β-ポリケトメチレン中間体の環化の 3 つのステップにより構成される。この活性中心に存在する 3 つの触媒残基は、機能の異なる III型 PKS においても例外なく保存されており、同一の化学反応が進行しているものと考えられる。このことから、この単純なタンパク質の基質や生成物の特異性を大きく変化させているのは、その活性部位の微妙な構造の違いによるところが大きいと考えられている。

1.4. カルコン合成酵素 (CHS)

Ⅲ型 PKS として、植物内に普遍的に存在するフラボノイド生合成の鍵酵素であるカルコン合成酵素 (CHS) が最も研究されている。本酵素は開始基質として 1 分子の 4-coumaroyl-CoA を受け入れ、そこに 3 分子の malonyl-CoA に由来する C₂ ユニットを順次縮合後、Claisen 型の閉環反応により芳香環を形成し、フラボノイド化合物の基本骨格である naringenin chalcone を生成する¹⁸ (Figure 1. 4)。

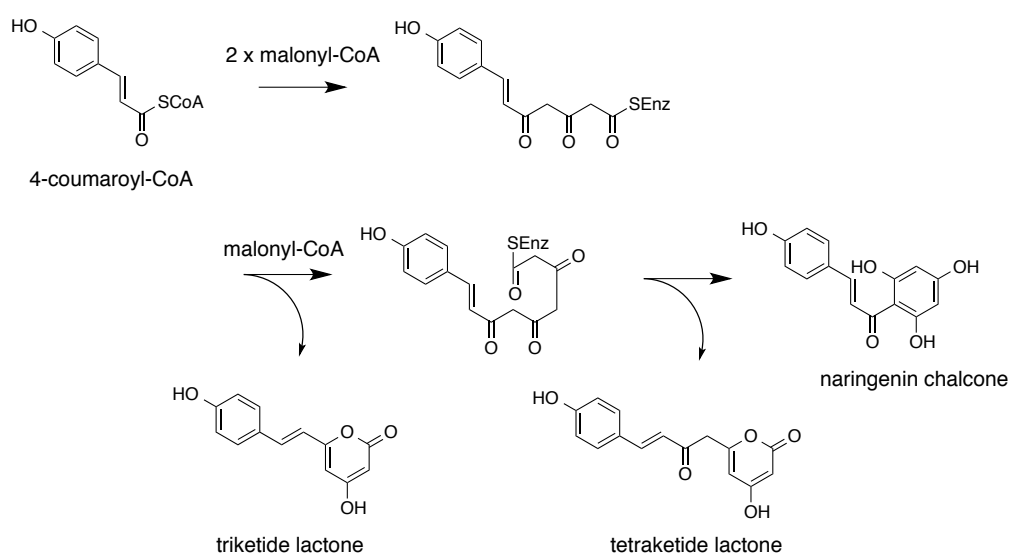


Figure 1.4. CHS の酵素反応

カルコン合成酵素を含む多くのⅢ型 PKS は広範な基質特異性を示すことが報告されている。例えば、CHS に対して、本来の開始基質である 4-coumaroyl-CoA の水酸基をハロゲンに置換した CoA エステルや芳香環をフラン環やチオフェン環に置換した基質アナログ、あるいは benzoyl-CoA などの芳香環 CoA エステルや、各種脂肪酸の CoA エステルを開始基質として作用させた場合、興味深いことに、ほぼすべてのアナログが酵素反応の開始基質として受け入れられ、一連の非天然型新規化合物を生成することが明らかとなった¹⁹ (Figure 1. 5)。ここで注目すべきことは、CHS にフッ素置換アナログ、フラン環やチオフェン環で置換した基質アナログを作用させると、3 分子の malonyl-CoA を順次縮合した後、天然型同様の反応が進行してカルコンおよびスチルベンをパイロン化合物とともに高収率で与えたことがあげられる。また、benzoyl-CoA な

どの芳香環 CoA エステルや脂肪酸 CoA エステルを基質とした場合、CHS においては Claisen 縮合型の閉環反応により新たな芳香環が形成され、フロログルシノール誘導体を与えた。しかしその一方で、CHS は嵩高い *N*-methylantraniloyl-CoA を基質としては受け入れないことが明らかとなっている。

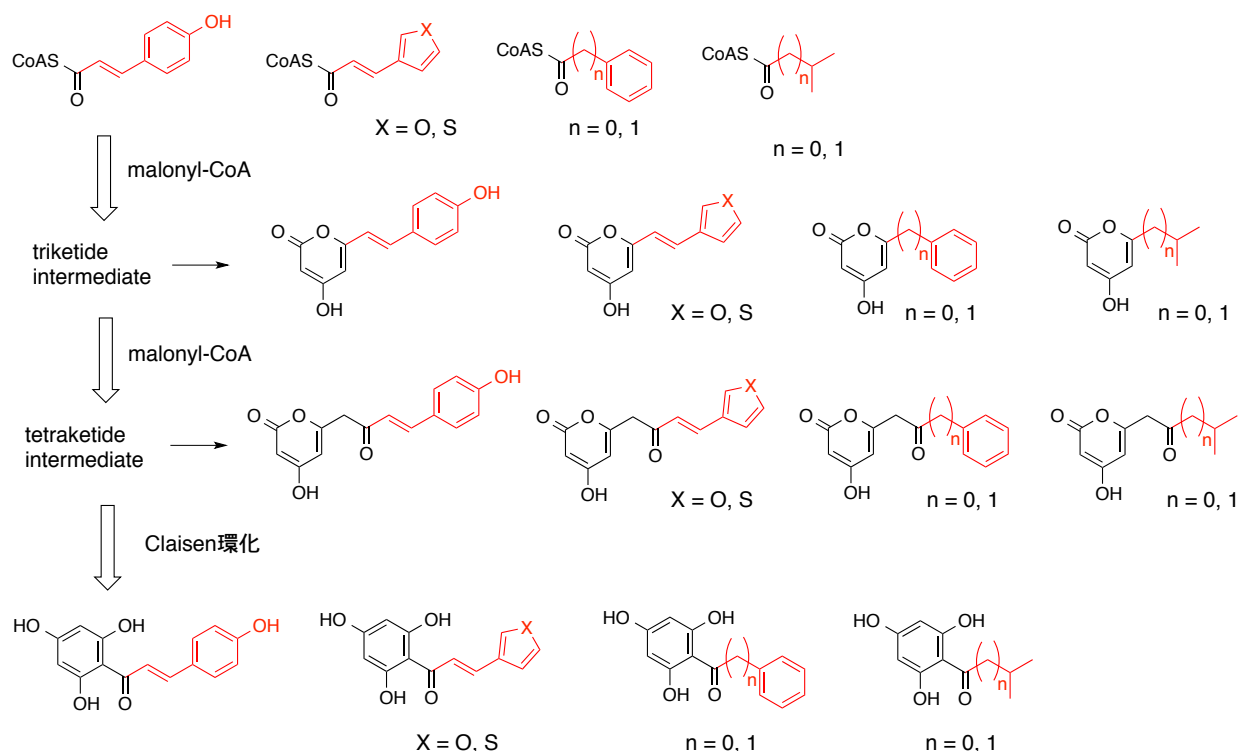


Figure 1.5. CHS の広範な基質特異性

1999 年、Noel らによって *Medicago sativa* CHS の結晶構造が 1.56 Å の分解能で得られた²⁰。その結晶構造から、それぞれのモノマーは、ホモダイメリックな 3-ketoacyl-CoA thiolase などで見られる、 $\alpha\beta\alpha\beta$ 偽対称モチーフを有していることが明らかとなった (Figure 1. 6)。活性部位には 16 Å の長さの “CoA-binding トンネル” が見出され、さらに内部には、ローディング／伸長／環化を担う活性キャビティが存在し、その活性キャビティの一番上に触媒中心の Cys164、His303、Asn336 が位置している (Figure 1. 7)。Thr132-Met137 のループはダイマーのもう一方のモノマーへと延び、特に Met137 はもう一方のモノマーの活性キャビティを構成する。一方で、CoA 結合トンネルはタンパク表面につながっており、基質が活性中心に到達できるようになっている。また、M.

sativa CHS の活性部位において、ローディング／伸長／環化を担う部分とは別に、開始基質である 4-coumaroyl-CoA の芳香環を固定すると言われている“coumaroyl-binding ポケット”の存在が見出された (Figure 1. 7)。

Phe215、Phe265 は CoA 結合トンネルと活性部位キャビティ間の開閉を司るゲートキパーとして知られ、環化反応中の tetraketide 中間体が正しい環化様式を行うよう化合物のフォールディングを制御すると考えられている。また、キャビティを構成する不活性アミノ酸残基として Thr132、Ser133、Thr194、Thr197、Gly256、Phe265、Ser338 が見出された (Figure 1. 7)。これらの残基は CHSs では保存されている一方で、他の機能を有するⅢ型 PKS では特徴的に置換されており、酵素反応の基質特異性、生成物特異性を制御すると考えられている。

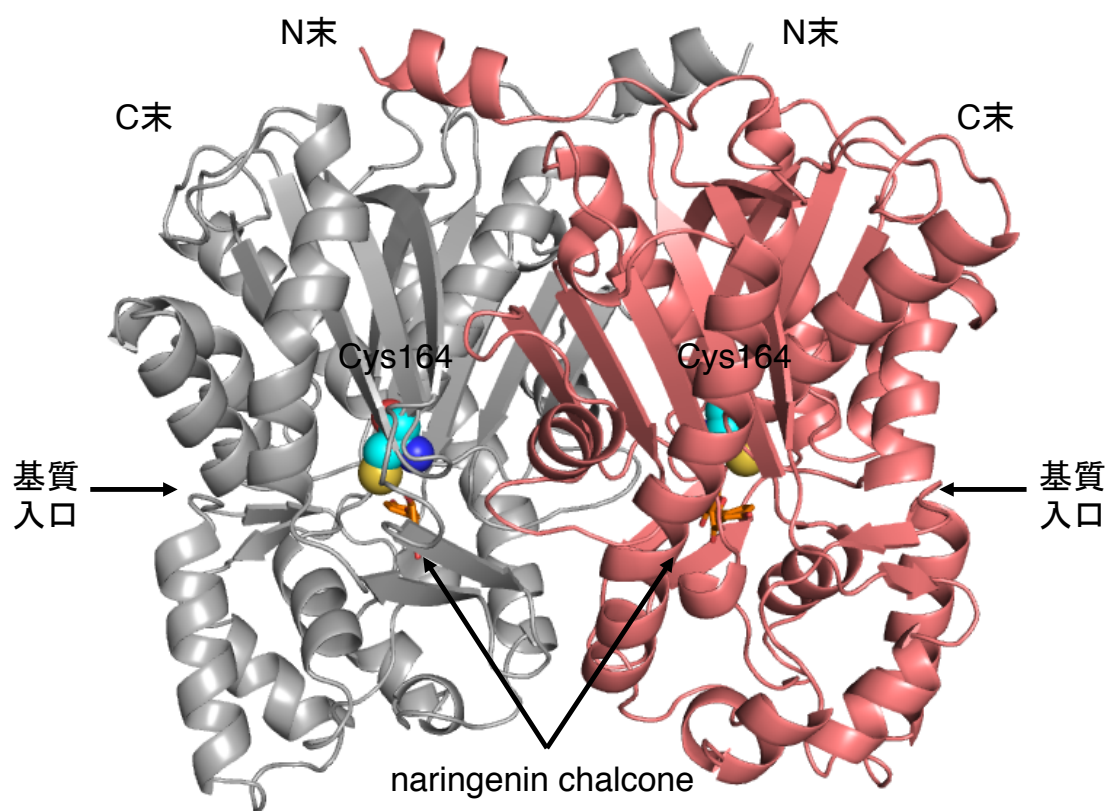


Figure 1.6. *Medicago sativa* CHS の全体構造

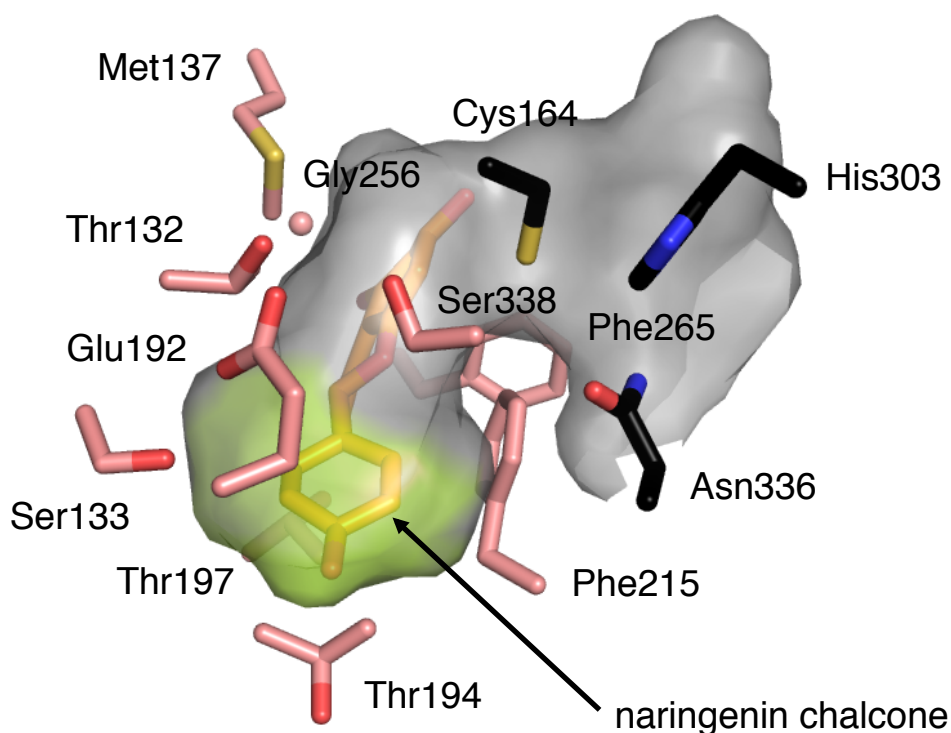


Figure 1.7. *Medicago sativa* CHS の活性キャビティ
*黄色で示した部分が coumaroyl-binding ポケット

1.5 アルカロイドを合成するⅢ型 PKS

多くのⅢ型 PKS が報告された中で、アルカロイド合成に関わるⅢ型 PKS もいくつか報告されている。例えば、1999 年、Matern らのグループにより、ヘンルーダ (*Ruta graveolens*) から acridone 合成酵素 (ACS) の単離が報告された²¹。*R. graveolens* ACS は、*N*-methylantraniloyl-CoA を基質に 1 分子、及び 3 分子の malonyl-CoA を縮合し、4-hydroxy-*N*-methylquinolone と 1,3-dihydroxy-*N*-methylacridone を生成する酵素である (Figure 1. 8A)。上述したように、naringenin chalcone を合成する CHSs は嵩高い *N*-methylantraniloyl-CoA を基質として受け入れないが、*R. graveolens* ACS は 4-coumaroyl-CoA を開始基質として受け入れ、3 分子の malonyl-CoA を縮合した後に、naringenin chalcone を生成することが出来る (Figure 1. 8B)。*Medicago sativa* CHS との比較から S132T/A133S/V265F 変異を導入することにより、カルコン合成酵素への機能変換も報告されている²²。

二つ目のアルカロイド生産Ⅲ型 PKS として、ベルノキ (*Aegle marmelos*) から quinolone 合成酵素 (QNS) のクローニングが報告され、機能解析が行われた²³。*A. marmelos* QNS

は *N*-methylantraniloyl-CoA から 1 分子の malonyl-CoA を縮合し、4-hydroxy-*N*-methylquinolone を生産する (Figure 1. 8A)。また、4-coumaroyl-CoA も基質として認識し、この場合、1 分子の malonyl-CoA を縮合した benzalacetone を生成する (Figure 1. 8B)。これら 2 つの III 型 PKS は、C-C 結合の形成に加え、C-N 結合の形成も触媒する。興味深いことに、*A. marmelos* QNS は *in vitro* の酵素反応において、quinolone 化合物だけでなく、acridone 化合物も生成することが可能である (Figure 1. 8A)。このように、*A. marmelos* QNS は acridone を生成出来る為、実質的には ACS であり、quinolone 化合物は酵素反応の副産物であるとの見方も出来る。

さらに、最近当研究室において沖縄県特産ミカン科植物四季柑 (*Citrus microcarpa*) より、QNS と ACS のクローニングに成功した。*C. microcarpa* QNS は *R. graveolens* ACS と 56%、*A. marmelos* QNS と 59%の相同性を示し、*C. microcarpa* ACS は、*R. graveolens* ACS と 81%、*A. marmelos* QNS と 93%相同性を示した (Figure 1. 9)。*C. microcarpa* QNS は *A. marmelos* QNS と異なり、*N*-methylantraniloyl-CoA から 1 分子の malonyl-CoA のみを縮合し、4-hydroxy-*N*-methylquinolone を単一生成物として与え、4-coumaroyl-CoA を開始基質として認識しないことが明らかとなっている (Figure 1. 8A)。一方 *C. microcarpa* ACS は *R. graveolens* ACS 同様 *N*-methylantraniloyl-CoA、4-coumaroyl-CoA を受け入れ、それぞれから 1,3-dihydroxy-*N*-methylacridone と naringenin chalcone を生成することが判明している (Figure 1. 8A)。

他にも、植物からのキノリノン合成酵素の単離報告例はないが、ダイオウ (*Rheum palmatum*) 由来 benzalacetone 合成酵素 (BAS) は本来 1 段階での脱炭酸を伴った malonyl-CoA の縮合により、ジケタイド骨格を有する benzalacetone への変換を触媒する酵素²⁴である。しかし、*N*-methylantraniloyl-CoA を基質とした場合、1 分子の malonyl-CoA を縮合して、高収率で 4-hydroxy-*N*-quinolinone を生成することが報告されている²⁵ (Figure 1. 8A)。

さらに、*Huperzia serrata*由来PKS1は、4-coumaroyl-CoA、*N*-methylantraniloyl-CoAに加え、2-carbamoylbenzoyl-CoAや、3-carbamoylpicolinoyl-CoAをも受け入れ、6.5.6縮環構造を有する 2-hydroxypyrido[2,1-*a*]isoindole-4,6-dione や 6.6.5.6 縮環構造を有する 9-hydroxypyrido[2,3-*a*]indolizine-5,7-dioneを生成する^{26,27} (Figure 1. 8C, D)。

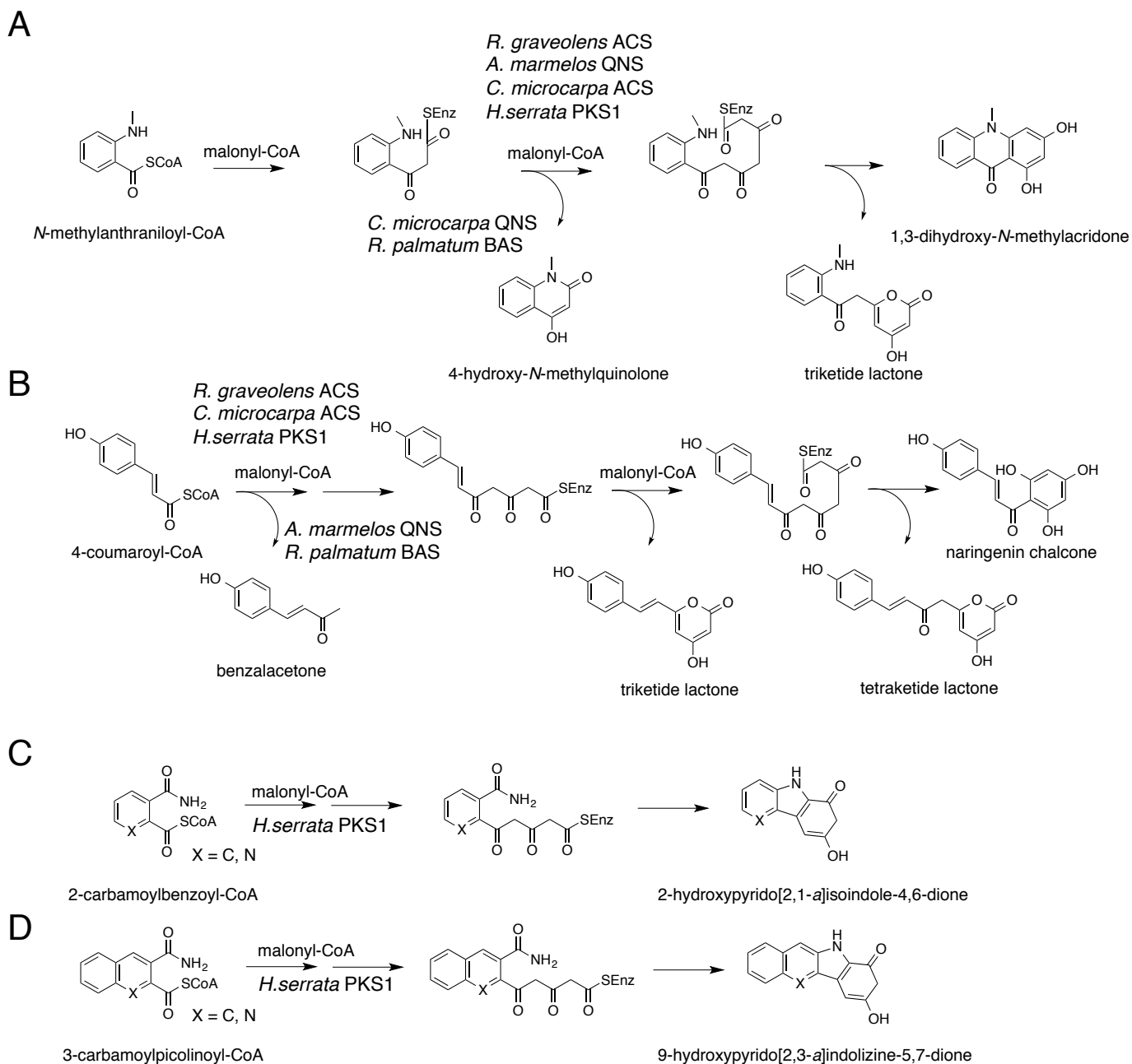


Figure 1.8. アルカロイドを合成するⅢ型 PKS の反応

A. *N*-methylanthraniloyl-CoA を基質とするⅢ型 PKS の酵素反応

B. 4-coumaroyl-CoA を基質とするⅢ型 PKS の酵素反応

C. 2-carbamoylbenzoyl-CoA を基質とする *H. serrata* PKS1 の酵素反応

D. 3-carbamoylpicolinoyl-CoA を基質とする *H. serrata* PKS1 の酵素反応

CmQNS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	M	A	K	V	K	N	F	L	N	A	K	R	S	K	G	P	A	S	I	L	A	I	G	T	A	N	P	P	T	C	F	N	Q	S	D	Y	P	D	F	Y		
CmACS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	M	V	T	M	E	E	I	R	R	A	K	R	A	E	G	L	A	T	I	L	A	A	I	S	T	A	T	P	P	N	C	V	I	Q	A	D	Y	P	D	Y	Y	
AmQNS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	M	V	T	M	E	E	I	R	K	A	Q	R	A	E	G	L	A	T	I	L	A	A	I	S	T	A	T	P	P	N	C	V	I	Q	A	D	Y	P	D	Y	Y	
RgACS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	M	E	S	L	K	E	M	R	K	A	Q	K	S	E	G	P	A	A	I	L	A	A	I	G	T	A	T	P	D	N	V	Y	I	Q	A	D	Y	P	D	Y	Y	
MsCHS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	M	V	S	V	S	E	I	R	K	A	Q	R	A	E	G	P	A	T	I	L	A	A	I	G	T	A	N	P	A	N	C	V	E	Q	S	T	Y	P	D	F	Y	
HsPKS1	1	M	T	I	K	G	S	G	S	A	A	F	E	G	T	R	L	C	P	R	V	I	K	P	D	G	P	A	T	I	L	A	I	G	T	S	N	P	T	N	I	F	E	Q	S	T	Y	P	D	F	Y
RpBAS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	A	T	E	E	M	K	K	L	A	T	V	M	A	I	G	T	A	N	P	P	N	C	Y	Y	Q	A	D	F	P	D	F	Y	

CmQNS	41	F	R	V	T	D	O	E	H	K	T	E	L	K	D	K	F	K	R	I	C	D	R	S	A	V	K	K	R	Y	L	H	V	T	E	E	V	L	K	E	N	P	S	M	R	S	Y	N	A	P	S
CmACS	41	F	G	I	T	N	S	E	H	M	T	E	L	K	E	K	F	R	R	L	C	E	K	S	M	I	R	K	R	H	M	C	L	T	E	E	I	L	K	A	N	P	N	M	G	L	Y	M	G	T	S
AmQNS	41	F	K	I	T	N	S	E	H	M	T	E	L	K	E	K	F	R	R	L	C	E	K	S	M	I	R	K	R	H	M	C	L	T	E	E	I	L	K	A	N	P	N	M	G	L	Y	M	G	T	S
RgACS	41	F	K	I	T	K	S	E	H	M	T	E	L	K	D	K	F	K	T	L	C	E	K	S	M	I	R	K	R	H	M	C	F	S	Q	E	F	L	K	A	N	P	E	V	C	K	H	M	G	K	S
MsCHS	41	F	K	I	T	N	S	E	H	K	T	E	L	K	E	K	F	Q	R	M	C	Y	L	T	E	E	I	L	K	E	N	Y	L	T	E	E	I	L	K	E	N	P	S	V	C	E	Y	M	A	P	S
HsPKS1	51	F	D	V	T	N	C	N	D	K	T	E	L	K	K	K	F	Q	R	I	C	D	K	S	G	I	K	K	R	H	F	H	L	T	D	E	I	L	R	K	N	P	S	I	C	K	F	K	E	A	S
RpBAS	34	F	R	V	T	N	S	D	H	L	I	N	L	K	Q	K	F	K	R	L	C	E	N	S	R	I	E	K	R	Y	L	H	V	T	E	E	I	L	K	E	N	P	N	I	A	A	Y	E	A	T	S

CmQNS	91	L	D	A	R	Q	A	L	L	I	E	Q	V	P	K	L	G	K	E	A	A	A	K	A	I	K	E	W	G	Q	P	L	S	K	I	T	H	L	V	F	S	A	M	A	G	V	D	I	P	G	A	
CmACS	91	L	D	A	R	Q	D	I	S	L	V	E	V	P	K	L	G	K	E	A	A	A	T	K	A	I	K	E	W	G	Q	P	K	S	N	I	T	H	L	I	F	C	T	S	A	G	V	D	M	P	G	A
AmQNS	91	L	N	A	R	Q	D	I	S	L	V	E	V	P	K	L	G	K	E	A	A	A	T	K	A	I	K	E	W	G	Q	P	K	S	K	I	T	H	L	I	F	C	T	S	A	G	V	D	M	P	G	A
RgACS	91	L	N	A	R	Q	D	I	A	V	V	E	T	P	R	I	G	K	E	A	A	A	V	K	A	I	K	E	W	G	H	P	K	S	S	I	T	H	L	I	F	C	T	S	A	G	V	D	M	P	G	A
MsCHS	91	L	D	A	R	Q	D	I	M	V	V	E	V	P	R	L	G	K	E	A	A	A	V	K	A	I	K	E	W	G	Q	P	K	S	K	I	T	H	L	I	V	C	T	S	A	G	V	D	M	P	G	A
HsPKS1	101	L	D	P	R	O	D	I	A	V	L	E	V	P	K	L	A	K	E	A	A	A	I	S	A	I	K	Q	W	G	Q	P	K	S	K	I	T	H	L	V	F	A	T	T	S	G	V	D	M	P	G	A
RpBAS	84	L	N	V	R	H	K	M	Q	V	K	G	V	A	E	L	G	K	E	A	A	A	L	K	A	I	K	E	W	G	Q	P	K	S	K	I	T	H	L	I	V	C	C	L	A	G	V	D	M	P	G	A

CmQNS	141	D	L	R	L	M	N	L	L	G	L	E	P	S	V	K	R	L	M	I	Y	S	O	G	C	F	I	G	G	A	A	I	R	C	A	K	D	F	A	E	N	N	A	G	A	R	V	L	V	V	F		
CmACS	141	D	Y	Q	L	T	R	L	L	I	G	L	N	P	D	V	K	R	M	M	I	Y	Q	Q	G	C	F	I	G	A	T	I	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	S	R	V	L	V	V	C	
AmQNS	141	D	Y	Q	L	T	R	L	L	G	L	L	S	P	E	V	K	R	M	M	I	Y	Q	Q	G	C	F	I	G	A	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	S	R	V	L	V	V	C	
RgACS	141	D	Y	Q	L	T	R	M	L	G	L	L	N	P	S	V	K	R	M	M	I	Y	Q	Q	G	C	F	I	G	A	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	S	R	V	L	V	V	C	
MsCHS	141	D	Y	Q	L	T	K	L	L	G	L	L	R	P	Y	V	K	R	Y	M	M	I	Y	Q	Q	G	C	F	I	G	A	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	V	V	C
HsPKS1	151	D	F	Q	L	A	K	L	L	G	L	L	R	P	T	V	K	R	V	M	L	Y	Y	Q	Q	G	C	F	I	G	A	T	V	L	R	V	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	V	A	C
RpBAS	134	D	Y	Q	L	T	K	L	L	D	L	L	D	P	S	V	K	R	F	M	F	Y	Y	H	L	G	C	F	I	G	A	T	V	L	R	L	A	K	D	I	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	I	V	C

CmQNS	191	S	D	I	M	N	M	Y	F	H	E	P	Q	E	A	H	L	D	I	L	V	G	O	A	V	F	G	D	G	A	A	A	V	I	V	G	A	D	P	E	V	S	I	E	R	P	L	F	H	V	V		
CmACS	191	S	E	N	T	I	P	T	F	R	G	P	S	Y	T	H	I	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	A	L	I	V	G	A	D	P	D	T	S	I	E	R	P	L	Y	H	I	V	
AmQNS	191	S	E	N	T	I	P	T	F	R	G	P	S	D	T	H	I	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	A	L	I	V	G	A	D	P	D	T	S	I	E	R	P	L	Y	H	I	V	
RgACS	191	S	E	L	T	A	P	T	F	R	G	P	S	P	D	A	V	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	A	L	V	V	G	A	D	P	D	T	S	V	E	R	A	L	Y	I	V		
MsCHS	191	S	E	V	T	A	V	T	F	R	G	P	S	D	T	H	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	G	D	G	A	A	A	A	L	I	V	G	S	D	P	V	P	S	I	E	R	P	L	F	E	M	V	
HsPKS1	201	S	E	V	T	A	V	T	F	R	A	P	S	E	T	H	L	D	G	L	V	G	G	S	A	L	F	G	D	G	A	A	A	A	L	I	V	G	S	D	P	V	P	Q	E	E	K	P	L	F	E	I	H
RpBAS	184	S	E	M	T	T	T	C	F	R	G	P	S	E	T	H	L	D	S	M	I	G	Q	A	L	J	L	G	D	G	A	A	A	A	V	I	V	G	A	D	P	D	L	T	V	E	R	P	I	F	E	L	V

CmQNS	241	S	S	T	O	M	S	V	P	D	T	N	K	F	I	R	A	H	V	K	E	M	G	M	E	L	Y	L	S	K	D	V	P	A	T	V	G	K	N	I	E	K	L	L	V	D	A	V	S	P	F			
CmACS	241	S	A	S	O	T	L	L	P	D	S	D	G	A	I	E	G	H	I	R	E	A	A	G	L	T	V	H	L	K	K	D	V	P	E	F	F	S	A	N	I	E	K	S	L	V	D	A	F	T	P	I		
AmQNS	241	S	A	S	O	T	L	L	P	D	S	D	G	A	I	E	G	H	I	R	E	A	A	A	G	L	T	V	H	L	K	K	D	V	P	A	F	F	S	A	N	I	E	K	S	L	V	D	A	F	T	P	I	
RgACS	241	S	A	S	O	M	L	L	P	D	S	D	G	A	I	E	G	H	I	R	E	A	A	A	A	G	L	T	V	H	L	K	K	D	V	P	A	L	F	S	A	N	I	E	T	P	L	V	E	A	F	R	P	L
MsCHS	241	W	T	A	Q	T	I	A	P	D	S	E	G	A	I	D	G	H	L	R	E	A	A	A	G	L	T	F	H	L	L	K	D	V	P	G	I	V	S	K	N	I	D	K	V	L	A	E	P	L	E	Y	V	
HsPKS1	251	W	A	G	E	A	V	L	P	D	S	D	G	A	I	N	G	H	L	R	E	A	A	A	A	G	L	T	F	H	L	L	K	D	V	P	G	L	I	S	K	N	I	D	K	V	L	A	E	P	L	E	Y	V
RpBAS	234	S	T	A	Q	T	I	V	P	E	S	H	G	A	I	E	G	H	L	L	E	A	A	S	G	L	S	F	H	L	Y	K	T	V	P	T	L	I	S	N	N	I	K	T	C	L	S	D	A	F	T	P	I	

CmQNS	281	G	I	S	D	W	N	S	L	F	Y	S	V	H	P	G	G	R	A	I	L	D	Q	V	E	L	N	L	G	L	G	K	E	K	L	R	A	S	R	H	V	L	S	E	Y	G	N	M	G	S	S	
CmACS	281	G	I	S	D	W	N	S	I	F	W	I	A	H	P	G	G	P	A	I	L	L	D	Q	V	E	A	K	L	G	L	K	K	D	K	L	R	A	S	R	H	V	M	S	E	Y	G	N	M	S	S	A
AmQNS	281	G	I	S	D	W	N	S	I	F	W	I	A	H	P	G	G																																			

1.6. 本章の研究の目的

このように、Ⅲ型 PKS はそれぞれ 50%以上と高い相同性を有するにもかかわらず、基質特異性、生成物特異性は酵素により大きく異なっている。これらの基質特異性の分子基盤、さらには、*C. microcarpa* QNS と *C. microcarpa* ACS における伸長鎖長の制御機構についても興味を持たれる。そこで、本研究ではⅢ型 PKS における quinolone、acridone 骨格形成に関与する酵素の機能解析、X 線結晶構造解析により、Ⅲ型 PKS によるアルカロイド合成の構造基盤の解明を目的に研究を行った。

1.7 結果

1.7.1. 酵素発現、精製

C. microcarpa QNS 及び *C. microcarpa* ACS の酵素遺伝子を発現ベクターpQE80L にサブクローニングし、大腸菌株 M15 を用いて両酵素を 6 残基の His との N 末融合タンパク質として大量に異種発現させた (Figure 1. 10)。次に、Ni-キレートアフィニティークラム、陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて精製し、10 mg/ml に濃縮したタンパク質を用いて結晶化を行った (Figure 1. 11)。

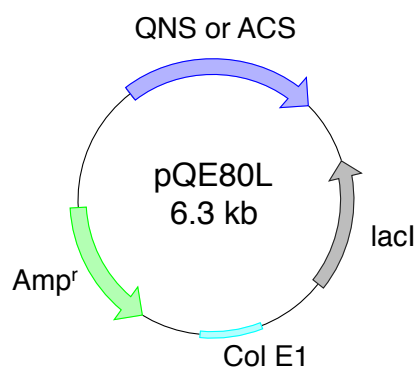


Figure 1.10. 作成したプラスミドマップ

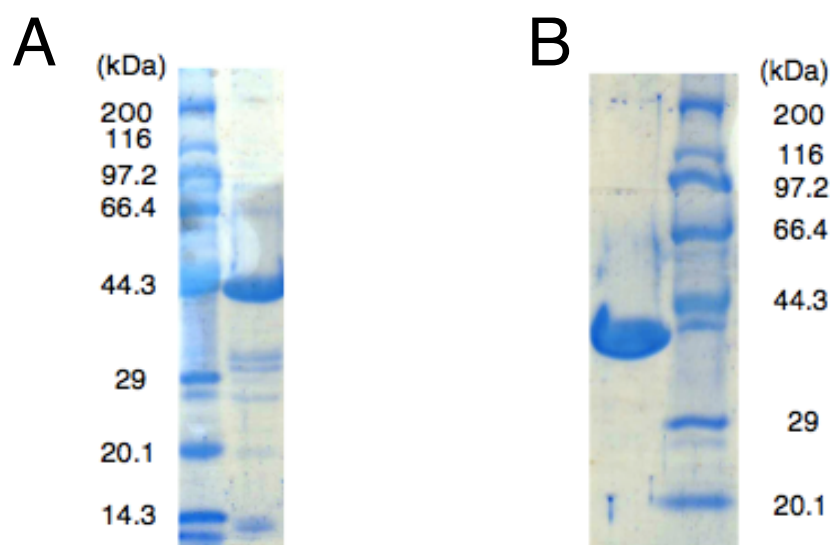


Figure 1.11. 精製後の SDS-PAGE A: QNS B: ACS

1.7.2. 酵素活性の確認

酵素が活性を維持した状態で精製されたかを確認する為、精製酵素を用いた *in vitro* 酵素反応を行った。*N*-methylantraniloyl-CoA と 4-coumaroyl-CoA を基質として酵素反応を行った結果、*C. microcarpa* QNS は *N*-methylantraniloyl-CoA を受け入れ、1 分子の malonyl-CoA を縮合した 4-hydroxy-*N*-quinolinone (**1**) を単一生成物として与えた。その一方でやはり 4-coumaroyl-CoA は基質として認識されなかった。*C. microcarpa* ACS は *N*-methylantraniloyl-CoA、4-coumaroyl-CoA 両方を受け入れ酵素反応生成物を与えた。*N*-methylantraniloyl-CoA から は malonyl-CoA を 1 分子 縮合した 4-hydroxy-*N*-methylquinolone (**1**)、2 分子縮合した triketide lactone 化合物 (**2**)、さらに、3 分子縮合した 1,3-dihydroxy-*N*-methylacridone (**3**)を生成した。4-coumaroyl-CoA からは 2 分子の malonyl-CoA を縮合した triketide lactone 化合物 (**4**)、3 分子の malonyl-CoA を縮合した tetraketide lactone 化合物 (**5**)、naringenin chalcone (**6**)を与えた (Figure 1. 12)。

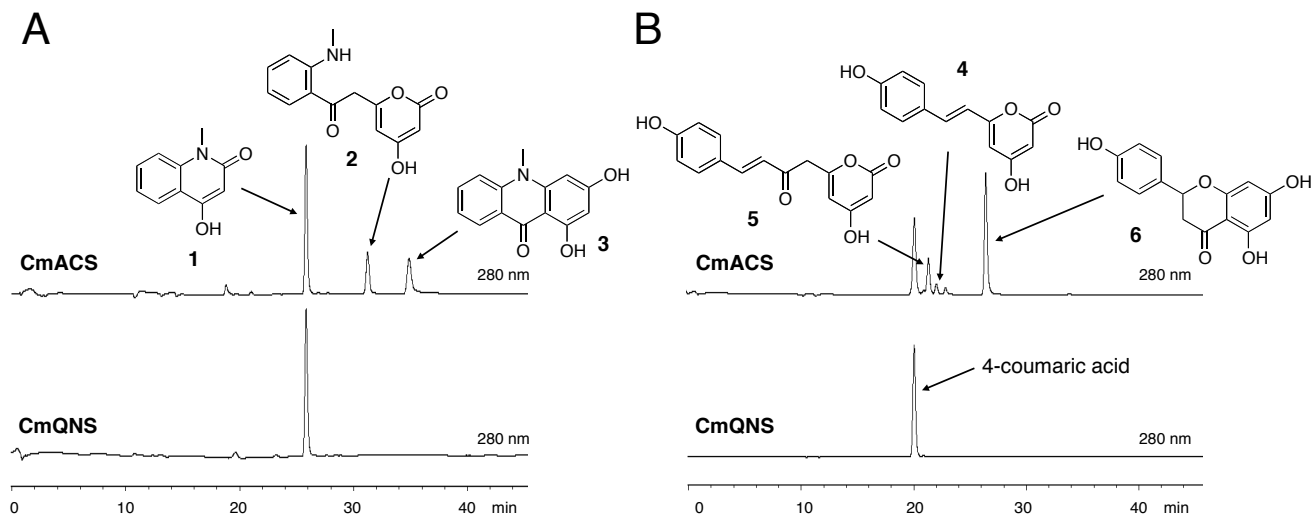


Figure 1. 12. *C. microcarpa* QNS、*C. microcarpa* ACS の酵素反応

A: *N*-methylantraniloyl-CoA を基質とした時の HPLC チャート

B: 4-coumaroyl-CoA を基質とした時の HPLC チャート

キネティクス解析の結果、*C. microcarpa* QNS による quinolone 合成反応において、*N*-methylantraniloyl-CoA に対して $K_M = 37.8 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}} = 15.7 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{\text{cat}}/K_M = 416 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ を示した。*C. microcarpa* ACS による acridone 合成反応は、*N*-methylantraniloyl-CoA に対して $K_M = 4.3 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}} = 1.4 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{\text{cat}}/K_M = 324 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ を示し、quinolone 合成反応においては *N*-methylantraniloyl-CoA に対して $K_M = 34.4 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}} = 4.0 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{\text{cat}}/K_M = 117 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ を示した。また、chalcone 合成反応においては 4-coumaroyl-CoA に対して $K_M = 13.6 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}} = 6.8 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{\text{cat}}/K_M = 500 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ であり、*M.sativa* CHS より 1.7 倍低い値を示した (Table 1)。

Table 1. *C. microcarpa* QNS、*C. microcarpa* ACS の kinetics 解析

<i>N</i> -methylantraniloyl-CoA				
	product	K_M	k_{cat}	k_{cat}/K_M
<i>C. microcarpa</i> QNS WT	quinolone	37.8 ± 3.2	15.7 ± 2.0	415.8
<i>A. marmelos</i> QNS ²³	quinolone	2.9	3.8	1290
<i>R. palmatum</i> BAS ²⁵	quinolone	23.7	1.5	62.4
<i>C. microcarpa</i> ACS WT	quinolone	37.4 ± 2.4	4.0 ± 0.6	117.4
<i>C. microcarpa</i> ACS WT	acridone	4.3 ± 1.7	1.4 ± 0.0	323.8
4-coumaroyl-CoA				
	product	K_M	k_{cat}	k_{cat} / K_M
<i>C. microcarpa</i> ACS WT	naringenin	13.6 ± 3.1	6.8 ± 2.2	499.9
<i>M.sativa</i> CHS ¹⁹	naringenin	5.1	6.1	842.6
<i>C. microcarpa</i> QNS Y197A	benzalacetone	28.3 ± 5.7	1.3 ± 0.2	45.5
<i>R. palmatum</i> BAS ²⁴	benzalacetone	10	1.79	179

1.7.3. 酵素結晶化

C. microcarpa QNS の結晶化

タンパク質濃度	10 mg/ml in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM DTT
結晶化条件	100 mM Tris-HCl (pH7.0), 18% PEG3350
結晶化方法	Sitting-drop vapor diffusion method, 20 °C
抗凍結剤	100 mM Tris-HCl (pH7.0), 18% PEG3350, 20% glycerol

C. microcarpa QNS の結晶は上記の条件、方法によって得た (Figure 1. 13)。

C. microcarpa ACS の結晶化

タンパク質濃度	10 mg/ml in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM CoASH
結晶化条件	100 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 1400 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 mM NiCl ₂
結晶化方法	Sitting-drop vapor diffusion method, 20 °C
抗凍結剤	100 mM Tris-HCl (pH7.0), 18% PEG3350, 20% glycerol

C. microcarpa ACS の結晶は上記の条件、方法によって得た (Figure 1. 14)。

得られた結晶について、Photon factory NW12A にて X 線回折強度の測定を行い、*M. sativa* CHS の結晶構造 (Protein Data Bank code 1CGK) を鋳型とした分子置換法により初期構造を得、精密化を行った (Table 2)。

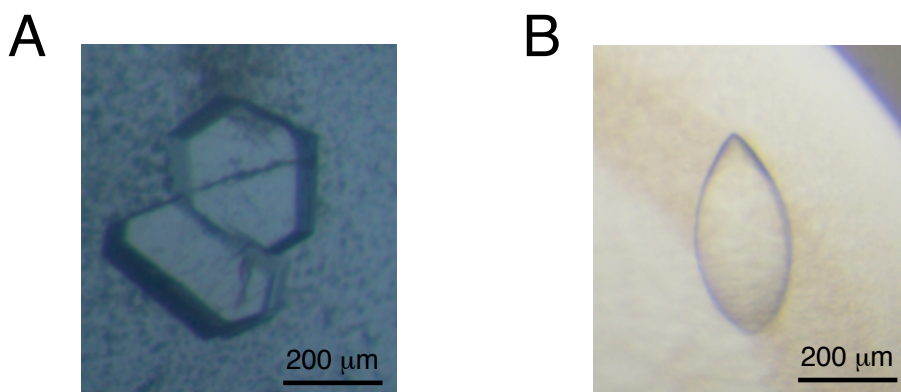


Figure 1. 13 得られた結晶 左 : QNS 右 : ACS

Table 2. *C. microcarpa* QNS と *C. microcarpa* ACS の結晶構造解析データ

	<i>C. microcarpa</i> QNS	<i>C. microcarpa</i> ACS
Data collection		
Space group	$P2_1$	$P6_522$
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	51.7, 135.9, 107.6	106.0, 106.0, 346.5
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 120
Resolution (Å)	50 - 2.47 (2.51 - 2.47)*	50 - 2.35 (2.39 - 2.35)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	10.3 (58.0)	7.4 (36.1)
$I / \sigma I$	10.7 (2.1)	60.9 (10.0)
Completeness (%)	99.4 (98.7)	99.9 (100)
Redundancy	3.85 (3.85)	21.0 (17.2)
Refinement		
Resolution (Å)	20.0 - 2.47	34.5 - 2.35
No. reflections	52852	48865
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	19.5/24.1	118.3/21.8
No. atoms		
Protein	12028	6173
Ligand/ion	12	120
Water	198	331
<i>B</i> -factors		
Protein	39.1	28.6
Ligand/ion	49.6	56.2
Water	33.3	33.3
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.01	0.009
Bond angles (°)	1.301	1.208
Ramachandran plot		
Favored region	97.1%	97.5%
Allowed region	2.9%	2.5%
Outer region	0%	0%

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I(hkl)$ is the intensity of reflection hkl , \sum_{hkl} is the sum over all reflections, and \sum_i is the sum over i measurements of reflection hkl .

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

1.7.4. *C. microcarpa* QNS、*C. microcarpa* ACS の全体構造

C. microcarpa QNS のアポ構造、及び *C. microcarpa* ACS と CoA-SH の複合体構造をそれぞれ 2.47 Å、2.35 Å の分解能で解明に成功した (Figure 1. 14)。Table 2 に結晶構造データと refinement statistics を示す。*C. microcarpa* QNS、ACS の結晶学非対称単位 (ASU) にそれぞれ 4 分子、2 分子のモノマーが存在し、モノマー 2 分子ずつが非結晶学的 2 回転軸の関係にあり、生物学的に活性な 2 量体構造を形成していた。上述したように、*C. microcarpa* QNS と ACS は互いに 56% のアミノ酸相同性を有し、C α 原子の root-mean-square deviations (r.m.s.d.) 値は 0.9 Å と全体構造はよく一致していた。

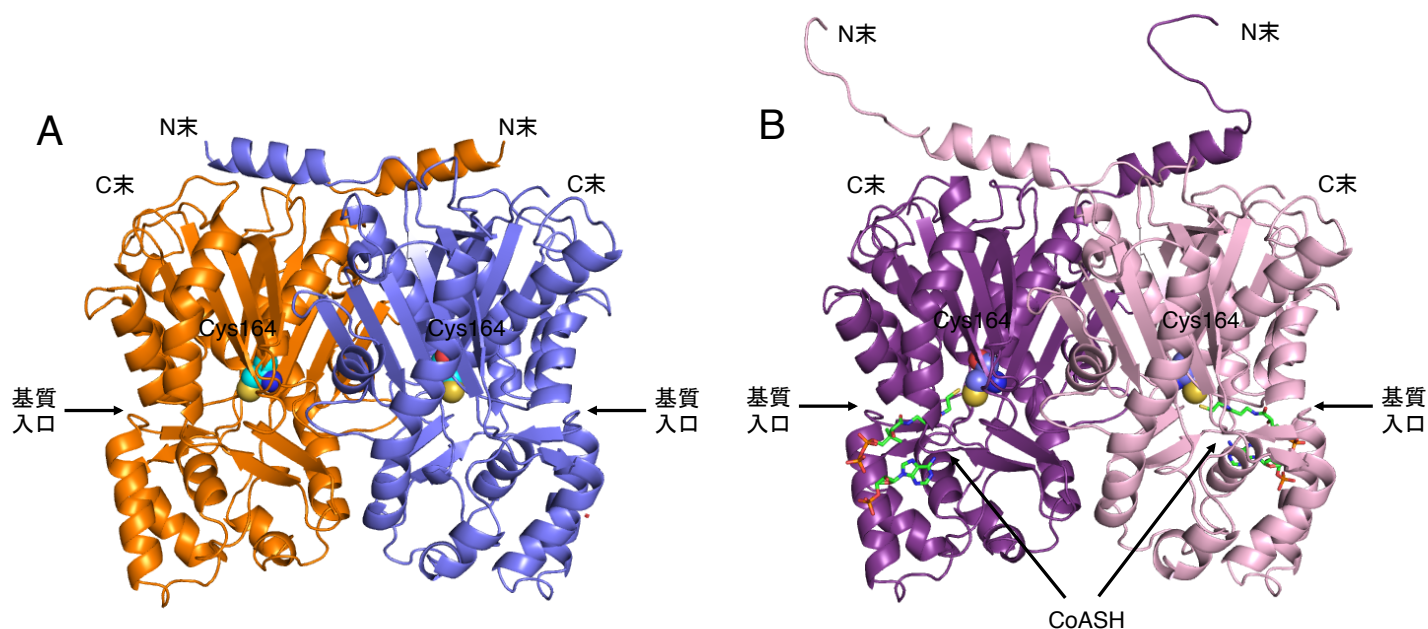


Figure 1. 14. *C. microcarpa* QNS、ACS の全体構造

C. microcarpa QNS、ACS の全体構造は、これまでに構造解析されてきたⅢ型 PKS と同様な $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -フォールドと呼ばれる構造を有し、それぞれのモノマーのほぼ中央に活性中心残基 Cys164、His303、Asn336 の位置していた。また、酵素反応中間体が結合する活性中心キャビティとタンパク質表面を約 16 Å の長さの CoA-結合トンネルが連結していた。これらの位置、配向は *C. microcarpa* QNS、ACS とともに、他のⅢ型 PKS と良く保存されていることが判明した。Dali program を用いて三次元立体構造の相同性検索を行った結果、*C. microcarpa* QNS と ACS の全体構造は、他の構造解析が行われたⅢ型 PKS

と良く一致した全体構造を有していた (r.m.s.d.値 : *C. microcarpa* QNS とは 0.7–1.3 Å、*C. microcarpa* ACS とは 0.5–1.2 Å) (Figure 1. 15)。特に、機能的に関連のある *M. sativa* CHS²⁰, *H. serrata* PKS1²⁷, and *R. palmatum* BAS²⁸ とは r.m.s.d.値がそれぞれ *C. microcarpa* QNS は 0.9、0.9、0.7 Å、そして *C. microcarpa* ACS は 0.5、0.7、0.6 Å と非常に高い相同性を示した。また、*M. sativa* CHS の Met137 同様、*C. microcarpa* QNS の Ile137 と *C. microcarpa* ACS の Met137 は、ダイマーを形成したもう一方のモノマーへ突き出し、活性部位構成残基の一つとなっている。

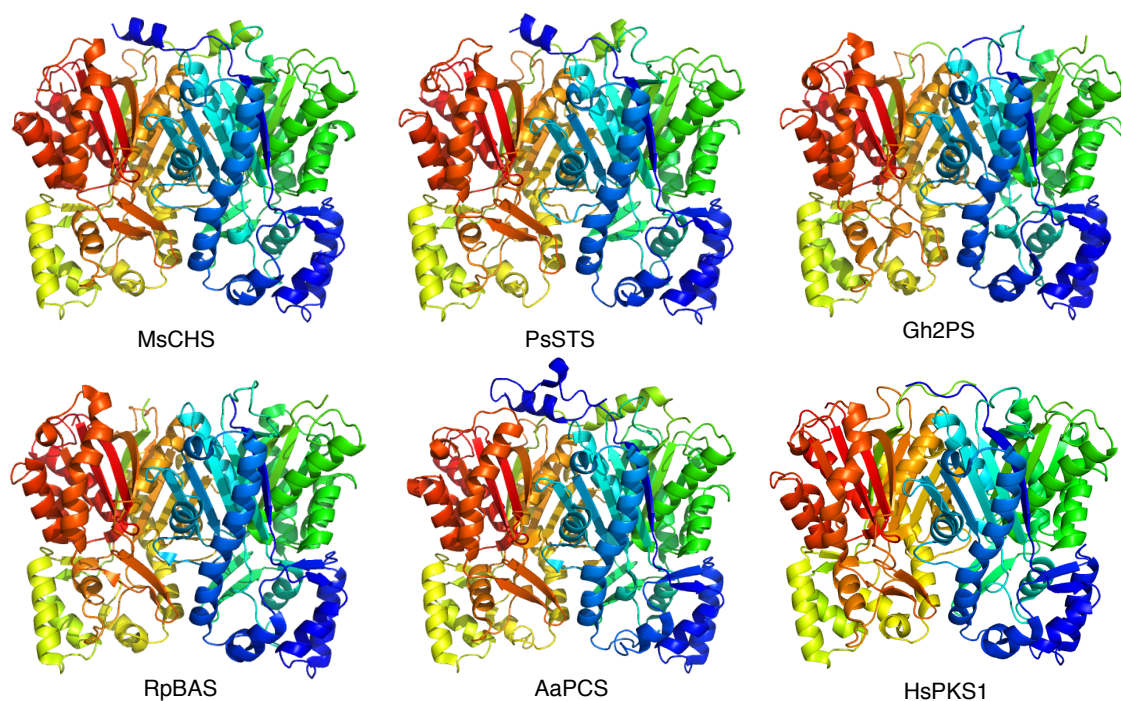


Figure 1. 15. これまでに X 線結晶構造解析がなされたⅢ型 PKS の例

MsCHS²⁰; *Medicago sativa* chalcone synthase, PsSTS²⁹; *Pinus sylvestis* stilbene synthase, Gh2PS³⁰; *Gerbera hybrida* 2-pyrone synthase, RpBAS²⁸; *Rheum palmatum* benzalacetone synthase, AaPCS³¹; *Aloe arborescens* pentaketide chromone synthase, HsPKS1²⁷; *Huperzia serrata* PKS1

1.7.5. *C. microcarpa* QNS の活性部位

C. microcarpa QNS の活性部位を構成するアミノ酸残基のうち、基質認識に重要なアミノ酸残基で、多くのⅢ型 PKS では Phe で保存されている“ゲートキーパー残基” Phe265 が Leu に置換されていた。さらに、*M. sativa* CHS 中の Thr132、Ser133、Met137、Thr194、Thr197、Gly256、Ser338 が、それぞれ Met、Ala、Ile、Met、Tyr、Ala、Gly、と *C. microcarpa* QNS において特徴的に置換されていた (Figure 1. 16A, C)。このように活性部位の構成残基が大きく変異している例は他のⅢ型 PKS では見られず、これらの変異が *C. microcarpa* QNS の基質特異性、生成物特異性の変化に大きな影響を与えている事が考えられる。

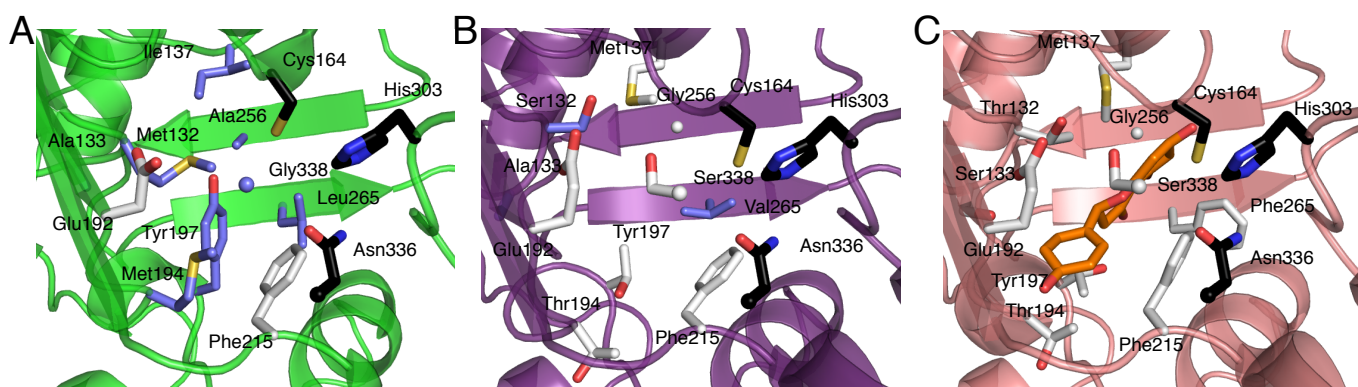


Figure 1. 16. *C. microcarpa* QNS、ACS と *M. sativa* CHS の活性部位比較

A. *C. microcarpa* QNS の活性部位構成残基

B. *C. microcarpa* ACS の活性部位構成残基

C. *M. sativa* CHS の活性部位構成残基

*青で示した残基は CHS の配列と異なる活性部位構成残基

C. microcarpa QNS の活性部位の詳細な解析の結果、F265L の置換により活性部位入口の形状が変化しただけでなく、Leu265 の背後に位置する Leu267 が新たに活性部位の構成残基の一つとなっている事が判明した (Figure 1. 17A)。また、芳香環がなくなった事で立体障害が軽減し Phe215 の側鎖が *M. sativa* CHS の Phe215 側鎖と比べ Leu265 の残基の方へ大きく傾き、活性部位入口の面積が広がっている事が明らかとなった (Figure 1. 17C)。さらに、M159I の嵩高い残基から小さい残基への置換、逆に A166I の小さい残基から嵩高い残基への置換など、周辺残基の変化により、159-164 番目のループ状に存在するアミノ酸残基のコンフォメーション変化、164-179 番目の α -ヘリックス

ス中の主鎖の移動が生じ、活性中心残基 Cys164 の C α 原子が他のⅢ型 PKS に比べ、1.7 Å程度キャビティ外側方向に移動していた (Figure 1. 18)。この変化はローディング／伸長／環化を担う活性キャビティの増大のみならず、活性部位入口の拡大をも引き起こし、結果として *C. microcarpa* QNS の活性部位入口面積は 47 Å² と、*M. sativa* CHS (17 Å²)、*C. microcarpa* ACS (33 Å²) の 2.8 倍、及び 1.5 倍広い入口を有していた (Figure 1. 17)。

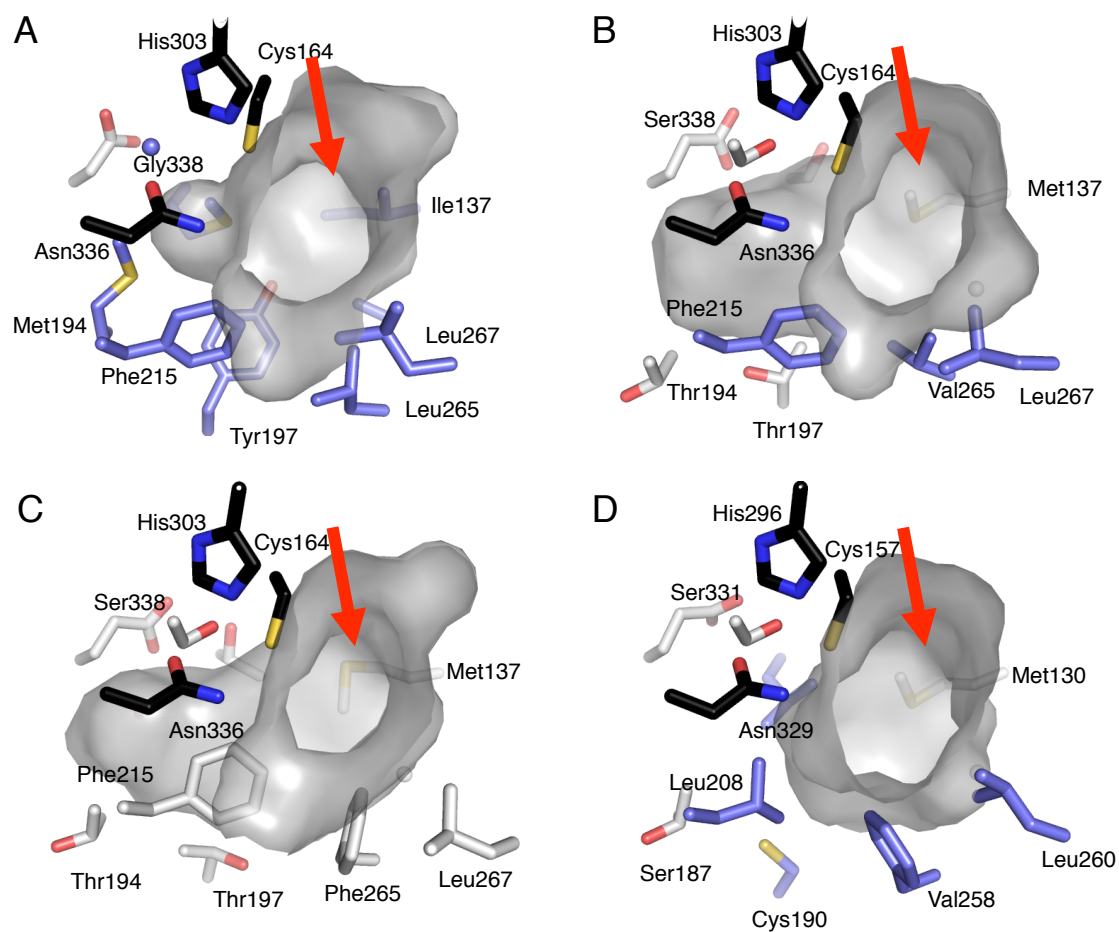


Figure 1. 17.Ⅲ型PKSの活性部位入口比較

- A. *C. microcarpa* QNS の活性部位入口
- B. *C. microcarpa* ACS の活性部位入口
- C. *M. sativa* CHS の活性部位入口
- D. *R. palmatum* BAS の活性部位入口

*赤の矢印は活性部位入口を、青で示した残基は CHS の配列と異なる活性部位構成残基を示す

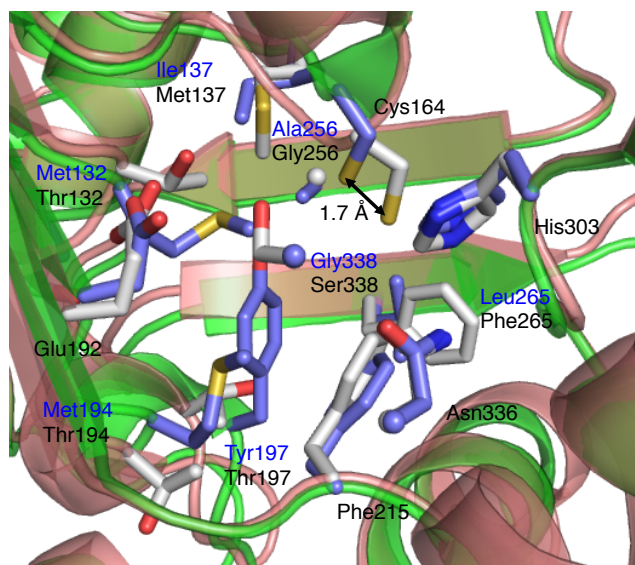


Figure 1. 18. *C. microcarpa* QNS と *M. sativa* CHS の活性部位の重ね合わせ図

*青色の残基、緑色の cartoon 表示は *C. microcarpa* QNS を、
白色の残基、赤色の cartoon 表示は *M. sativa* CHS 残基を示す

しかし、その一方で Met132 (*M. sativa* CHS では Thr132) の側鎖が活性部位へ突き出し、さらに、Met194 (*M. sativa* CHS では Thr194) の側鎖も Gly338 の方向へのびることで、他の周辺残基の置換と相まって *M. sativa* CHS において見出された coumaroyl-binding ポケットと呼ばれる 4-coumaroyl-CoA の芳香環部分を受け入れるポケットが *C. microcarpa* QNS では消失している事が判明した (Figure 1. 19)。

興味深い事に、*C. microcarpa* QNS の Tyr197 (*M. sativa* CHS では活性部位底面を構成する残基 Thr197) の側鎖が Met263 (*M. sativa* CHS では Leu263) の側鎖の前面に位置し、Tyr197 の水酸基が Met132 の硫黄原子と水素結合を形成していた (Figure 1. 19)。さらに、Ala256 (*M. sativa* CHS では Gly256) の側鎖メチル基が Tyr197 の方へ突き出していた。このように、嵩高いアミノ酸残基の側鎖が活性部位に突き出す事で、活性部位キャビティ容積、特に底面部分が劇的に縮小していることが明らかとなった。一方で Gly338、Ile137 (*M. sativa* CHS では Ser338、Met137) のような嵩高い残基から小さい残基への置換により活性部位入口付近の容積は少し拡大していた。結果として、*C. microcarpa* QNS の活性部位容積は 290 \AA^3 と、*M. sativa* CHS (750 \AA^3) や *C. microcarpa* ACS (760 \AA^3) と比較して約 1/2.6 に縮小していることが明らかとなった (Figure 1. 19)。

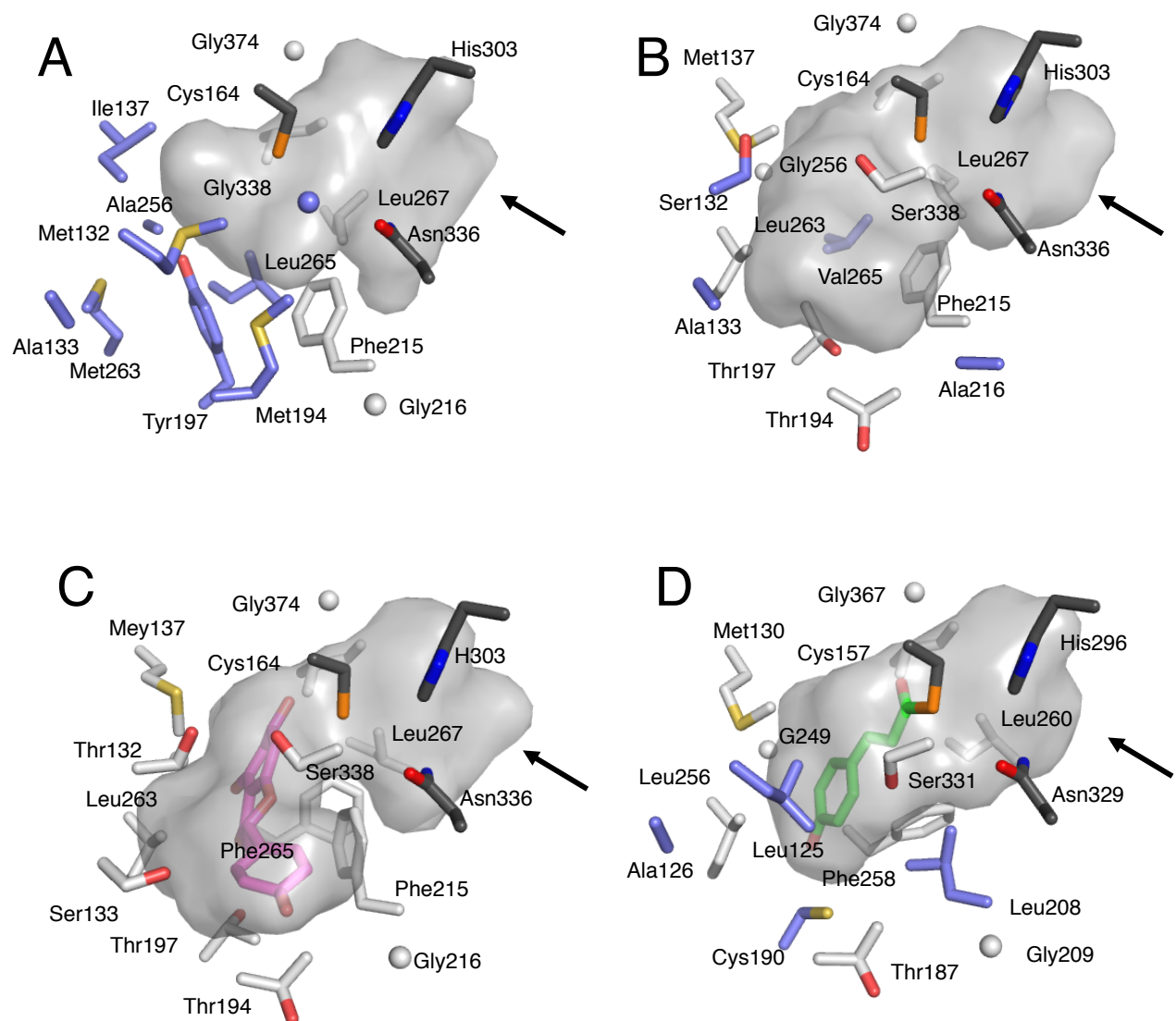


Figure 1. 19. III型PKSの活性キャビティ比較

A. *C. microcarpa* QNS の活性キャビティ

B. *C. microcarpa* ACS の活性キャビティ

C. *M. sativa* CHS の活性キャビティ

D. *R. palmatum* BAS の活性キャビティ

*黒の矢印は活性部位入口を、青で示した残基は CHS の配列と異なる活性部位構成残基を示す。*M. sativa* CHS 活性部位中のマゼンタ色の化合物は naringenin chalcone を、*R. palmatum* BAS 活性部位中の緑色の化合物は活性中心 Cys164 に共有結合を形成した 4-coumaroyl-Cys 中間体を示す。

1.7.6. *C. microcarpa* ACSの活性部位

C. microcarpa ACSのアミノ酸配列においては、多くのCHSにおいて保存されているThr132、Ser133、Phe265がSer、Ala、Valに置換されているところが特徴的である (Figure 1. 16B, C)。 *C. microcarpa* ACS の活性部位においてVal265は *M. sativa* CHSのPhe265と似たところに位置していた。この部分において芳香環部位が消失したことでLeu267の主鎖のC α 原子の移動と側鎖のC δ 1にねじれ角の変化が生じ、Leu267が *C. microcarpa* ACSの活性部位構成残基の一つとなっていた。さらに、芳香環部位の消失に加え、Ala216 (*M. sativa* CHSではGly216) 等の活性部位構成残基の置換により、Phe215のねじれ角が *M. sativa* CHS の $(\phi, \psi) = (-53, 136)$ から *C. microcarpa* ACSにおいては $(\phi, \psi) = (-70, 138)$ と ϕ 角が -26° 、 ψ 角が $+2^\circ$ 変化した。その結果、 *C. microcarpa* QNS同様、Phe215の側鎖がVal265の方向へ大きく傾き、 *M. sativa* CHS と活性部位入口の形状が大きく異なっていた。結果として、 *C. microcarpa* ACSの活性部位入口の面積は、 33 \AA^2 と、 *M. sativa* CHS (17 \AA^2) に比べ1.9倍拡大していることが判明した (Figure 1. 17)。

これらのコンフォメーション変化に加え、 *C. microcarpa* ACS Val265、Ser132の残基の主鎖のC α 原子の移動と側鎖のねじれ角の変化により、これらの残基が *M. sativa* CHSのPhe265、Thr132に比べ、わずかに活性キャビティの内側と外側へ向いていた。その結果、 *C. microcarpa* ACSの活性キャビティの形状が *M. sativa* CHSとは大きく異なっていた。しかし、acridone骨格を形成する酵素、 *C. microcarpa* ACS、 *R. graveolens* ACS、 *A. marmelos* QNSにおいて特徴的に置換されているAla133は、 *M. sativa* CHSの活性部位構成残基Ser133とほぼ同じ位置に存在し、その配向も良く保存されていた (Figure 1. 20)。唯一の違いとして、SerからAlaに置換したことで側鎖のヒドロキシル基が消失し、この部位において立体障害が軽減していることが考えられる。その他に *C. microcarpa* ACSと *M. sativa* CHSの間に大きなコンフォメーション変化は見られなかった。 *C. microcarpa* ACSの活性キャビティの容積は 760 \AA^3 と *M. sativa* CHS (750 \AA^3) とほぼ同程度の大きさを有していた (Figure 1. 19)。

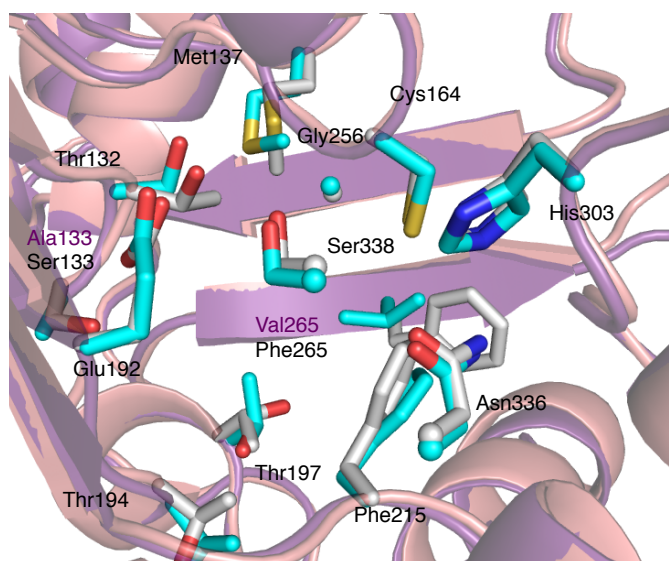


Figure 1. 20. *C. microcarpa* ACS と *M. sativa* CHS の活性部位の重ね合わせ図

*水色の残基、紫色の cartoon 表示は *C. microcarpa* ACS を、
白色の残基、赤色の cartoon 表示は *M. sativa* CHS 残基を示す

1.7.7. 結晶構造を鋳型とした変異導入

更なる *C. microcarpa* QNS と ACS の構造活性相関を明らかにする為、両酵素の結晶構造を鋳型とした変異導入実験を行い、その活性に対する影響を確認した。まず、活性部位に最も嵩高く突き出している Tyr197 が生成物の作り分けに重要な役割を担っていることを確認する為、小さいアミノ酸残基 Ala に置換した、Y197A 変異体を作成した。結果として Y197A 変異体は *N*-methylantraniloyl-CoA から 1 分子の malonyl-CoA が縮合したジケタイド quinolone 化合物 (1) を野生型とほぼ同程度の効率で生成した (Figure 1. 21A)。このように、Y197A 変異体は *N*-methylantraniloylCoA に対しては活性の変化が見られなかったが、新たに 4-coumaroyl-CoA を基質として認識し、1 分子、2 分子の malonyl-CoA を縮合した benzalacetone (7) と、triketide lactone 化合物 (4) を生成した (Figure 1. 21B)。

キネティクス解析の結果、Y197A 変異体による benzalacetone (7) 生成の K_M 、 k_{cat} は、 $K_M = 28.3 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 1.3 \text{ min}^{-1}$, and $k_{cat} / K_M = 45.5 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ と求められた (Table 1)。このように、benzalacetone (7) の生成効率は *R. palmatum* BAS ($K_M = 10.0 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 1.8 \text{ min}^{-1}$, $k_{cat} / K_M = 179 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$) と比較し、1/3.9 の値を示した。

次に、*C. microcarpa* ACS の活性部位構成残基のうち、Ser132、Thr194、Thr197 の位置のアミノ酸残基が QNS 同様 Met、Met、Tyr に置換した、S132M 変異体、T194M 変異体、

T197Y変異体を作成した。結果、全ての変異体において*N*-methylantraniloyl-CoAからはquinolone化合物 (1) を単一生成物として与え、malonyl-CoAを3分子縮合したacridone化合物 (3)やtetraketide lactone化合物 (2) の生成活性は消失した (Figure 1. 21C)。さらに、4-coumaroyl-CoA からnaringenin chalcone (6)、triketide lactone (4)、tetraketide lactone (5) 生成活性が消失し、*C. microcarpa* QNS同様に4-coumaroyl-CoAを基質として認識しなくなることが判明した (Figure 1. 21D)。

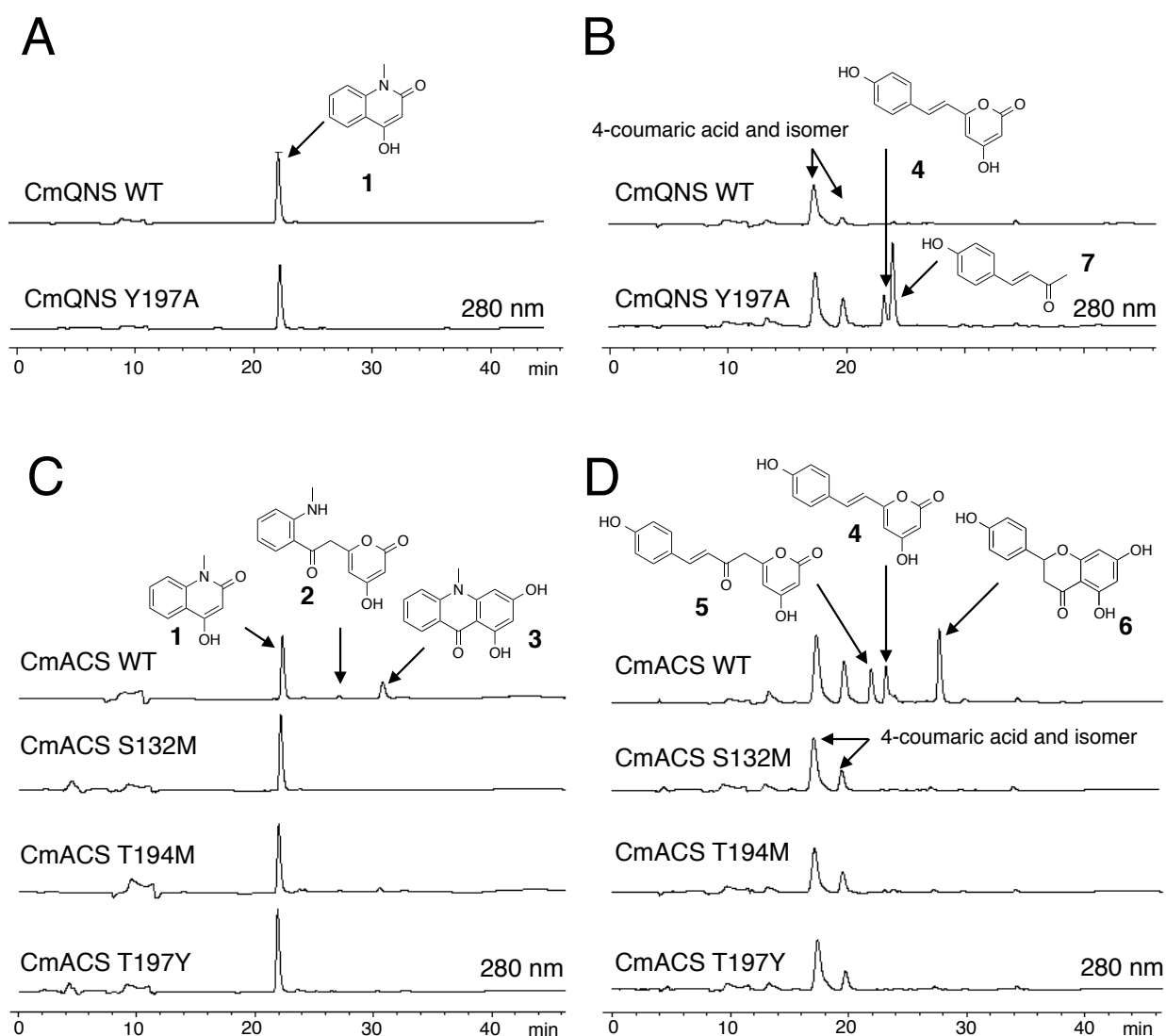


Figure 1. 21. *C. microcarpa* QNS、*C. microcarpa* ACS変異体の酵素反応

- A: *C. microcarpa* QNS 変異体の *N*-methylantraniloyl-CoA を基質とした HPLC チャート
 B: 4-coumaroyl-CoA を基質とした HPLC チャート、
 C: *C. microcarpa* ACS 変異体の *N*-methylantraniloyl-CoA を基質とした HPLC チャート
 D: 4-coumaroyl-CoA を基質とした HPLC チャート

1.8 考察

C. microcarpa QNSのX線結晶構造解析の結果、*C. microcarpa* QNSは他のⅢ型PKSよりも非常に大きな活性部位入口面積を有していることが判明した。同様な活性部位入口の拡大は*N*-methylantraniloyl-CoAを基質として認識可能なⅢ型PKSである、*R. palmatum* BASやacridoneを生成する*M. sativa* CHS F215S変異体においても見られる³²。*R. palmatum* BASと*M. sativa* CHS F215S変異体の活性部位入口面積はそれぞれ34 Å²、41 Å²と、*C. microcarpa* QNSと同程度の面積を有している²⁸。*C. microcarpa* QNSにおいては、F265Lの置換と周辺のコンフォメーション変化、さらにはCys164の活性キャビティ外側へのずれにより活性部位入口が拡大したのに対し、*R. palmatum* BASにおいては、F208Lの置換とそのコンフォメーション変化により活性部位入口が拡大している (Figure 1. 17)。このように、*C. microcarpa* QNSの活性部位入口が十分広がることで嵩高い*N*-methylantraniloyl-CoAを開始基質として活性部位に取り込むことが可能であったと考えられる。また、*C. microcarpa* QNSの活性部位においてはCHSsにおいて良く保存されているThr132、Thr194、Thr197がMet, Met, and Tyrで置換され、CHSsにおいて見出されるcoumaroyl-bindingポケットが消失し、活性部位容積は290 Å³と、4-coumaroyl-CoAにmalonyl-CoAを1分子縮合し、ジケタイドのbenzalacetone (7) を合成する*R. palmatum* BAS (350 Å³) より小さいキャビティを有していた。*R. palmatum* BASは同様にcoumaroyl-bindingポケットを失っているにもかかわらず、CHSsとは異なる新たなポケットを利用してジケタイド化合物benzalacetone (7) を生成する (Figure 1. 19、22)。しかし、*C. microcarpa* QNSにおいては、このcoumaroyl-bindingポケットの消失に加え、BASに見られる新たなポケットも失われている為に炭素鎖の長い4-coumaroyl-CoAを基質として認識することが出来なかったと考えられる。しかし、*C. microcarpa* QNSの活性部位構成残基のうち、立体障害を軽減させたY197A変異体において新たに4-coumaloyl-CoAを受け入れ、benzalacetone (7) とtriketide lactone化合物 (4)を生成したことから、活性部位の容積と形状が開始基質の認識、malonyl-CoAの縮合数の制御、さらには生成物の特異性を決定していることが示唆された。同様な活性部位容積の制限による基質認識は*Gerbera hybrida*由来の2-methylpyrone 合成酵素 (2-PS) においてもみられ、本酵素はその小さな活性部位容積 (250 Å³) ゆえに、coumaroyl-bindingポケットを欠き、小さなacetoacetyl-CoAのみを基質として認識し、2分子のmalonyl-CoAを縮合によってtriketide 2-pyroneを生成することが知られている³⁰ (Figure 1. 22)。

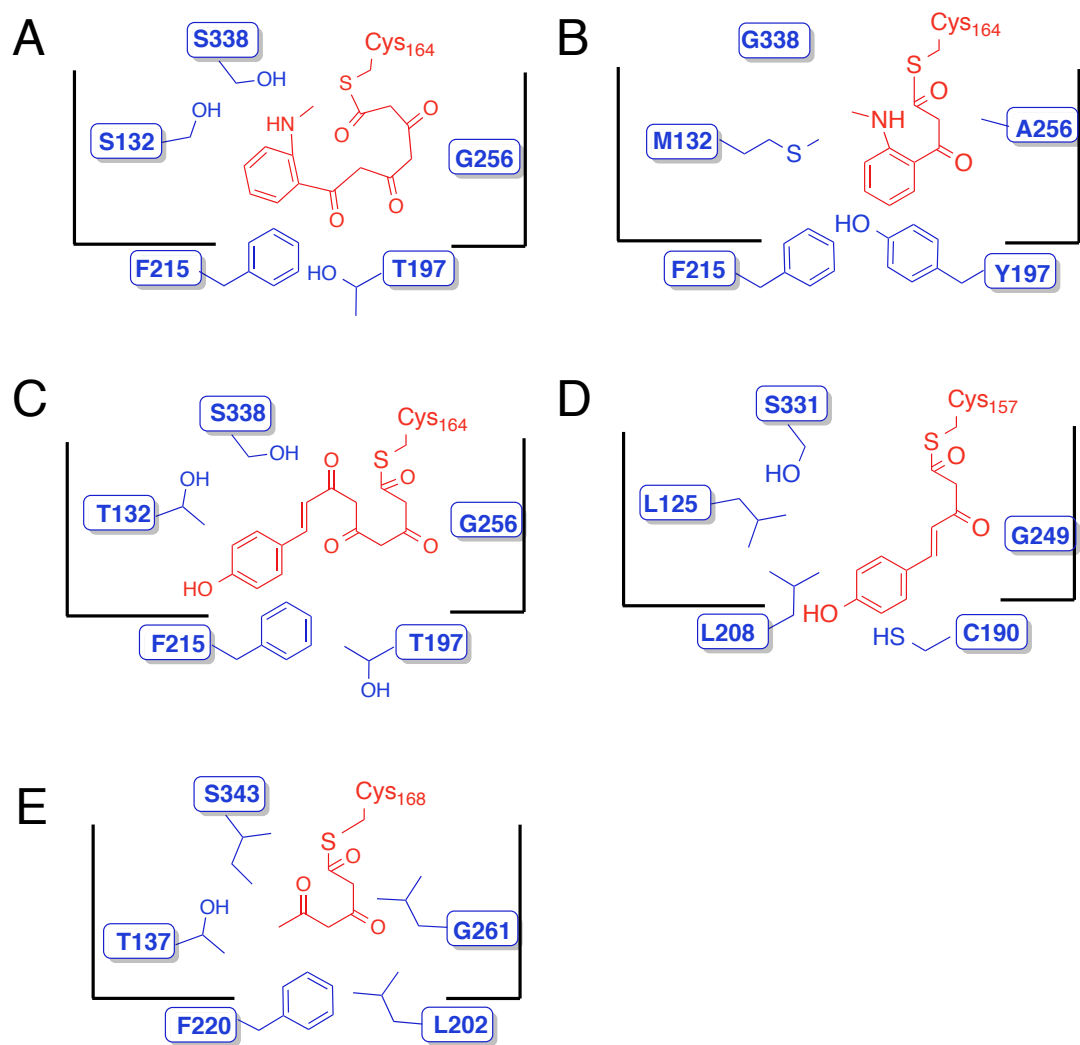


Figure 1.22. III型PKSの活性部位模式図

- A. *C. microcarpa* ACS の活性部位模式図
- B. *C. microcarpa* QNS の活性部位模式図
- C. *M. sativa* CHS の活性部位模式図
- D. *R. palmatum* BAS の活性部位模式図
- E. *G. hybrida* 2-PS の活性部位模式図

以上の知見から、*C. microcarpa* QNSはその広い活性部位入口のため、嵩高い *N*-methylantraniloyl-CoAを開始基質として活性部位に取り込むことが可能であるものの、独特な活性キャビティ容積、形状から1分子のmalonyl-CoAの縮合しか触媒できないものと考えられる。malonyl-CoAの縮合に続くN/C1の分子内ラクタム環化により活性中心 Cys164 とジケタイド中間体間の C-S 結合が開裂し、quinolone 骨格、4-hydroxy-*N*-methylquinolone (**1**) を形成するものと考察する。

C. microcarpa ACSの結晶構造から、*C. microcarpa* QNSと同様にF265Vの変異とPhe215、Leu267のコンフォメーション変化による活性部位入口の拡大が見られ、活性部位入口の面積は33 Å²と *M. sativa* CHSの約2倍になっていることが判明した。また、活性キャビティの容積は760 Å³と *C. microcarpa* QNSの2.6倍大きいことも明らかとなった。*C. microcarpa* ACSの広い活性部位入口と大きな活性キャビティは基質選択性と生成物特異性に大きな影響を及ぼしており、結果としてCHSsとは異なり、*C. microcarpa* ACSは4-coumaroyl-CoAに加え、嵩高い *N*-methylantraniloyl-CoAも基質として認識し、3分子のmalonyl-CoAの縮合を触媒することでtetraketide lactone化合物 (**5**)とnaringenin chalcone (**6**)、さらにはacridone骨格を有する1,3-dihydroxy-*N*-methylacridone (**3**) を形成することが可能であったと考えられる。

C. microcarpa ACSの結晶構造を鋳型とした変異導入の結果、Ser132、Thr194、Thr197、が *C. microcarpa* ACSの酵素活性に決定的な役割を担っていることが示唆された。S132M、T194M、T197Y変異体はacridoneやchalcone生成能を失い、*N*-methylantraniloyl-CoAに対してはmalonyl-CoAを1分子のみ縮合し、quinolone化合物(**1**)を単一生成物として与えた。このように、*C. microcarpa* ACSをQNSへと機能変換することに成功した。以上の結果は、結晶構造からの活性部位の容積と形状が酵素反応の基質特異性、生成物特異性を決定している仮説を明確に支持する結果である。

Acridone骨格の環形成反応中、興味深い点としてB環形成の際のC-N結合形成反応のタイミング、C環形成の際のClaisen型のC-C結合形成とそれに付随する活性中心Cysとtetraketide中間体間のC-S結合の開裂反応があげられる。過去のrutacrydoneの[1-¹³C]-、[2-¹³C]-、[1,2-¹³C]- 標識酢酸を用いた生合成研究の報告において、C4-17位間、5-13位間、12-16位間で¹³C-¹³Cスピン結合定数が等しい場合（パターン1）と、C4-5位間、12-13位間、16-17位間で¹³C-¹³Cスピン結合定数が等しい場合（パターン2）の、2種類のC環標識パターンが見出された³³ (Figure 1. 23)。

この結果は、C環は3分子のアセチルユニットから構成されることを示し、さらに異なる標識パターンはClaisen型のC-C結合形成により環化した *N*-methylaminobenzophenone中間体 (*N*-methylantraniloyl-trione中間体) の6-13位間の結

合が、C-N結合を形成する前は回転可能であることを示唆している。実際のところ、様々なミカン科植物から多くの*N*-methylaminobenzophenone化合物が単離報告されている^{34,35}。

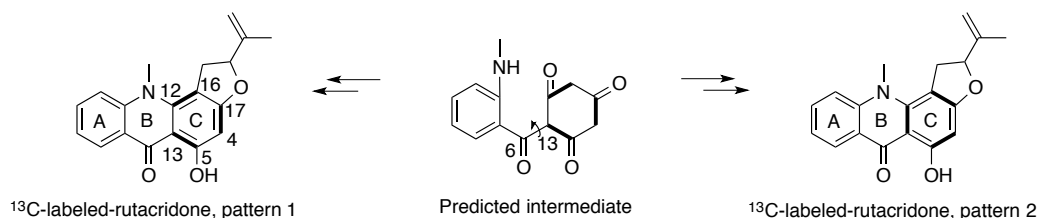


Figure 1. 23. Rutacridoneの酢酸標識実験

また、*C. microcarpa* ACSの結晶構造を基に中間体を活性部位にドッキングしたところ、線状中間体であるtetrakeitide-Cys中間体や、環化中間体である*N*-methylantraniloyl-trione中間体を受け入れるのに十分な容積を有している一方で、6-13位間の結合が回転だけのスペースは有していないことが示唆された（Figure 1. 24A）。また、tetrakeitide-Cys中間体とのドッキングの結果、活性部位内でC-1炭素がC-6炭素の近くに位置することが予想された。以上の知見から、まずtetrakeitide-Cys中間体のClaisen型の縮合により環化し、二環性の*N*-methylaminobenzophenone（もしくは*N*-methylantraniloyl-trione中間体）が生成した後に、酵素外でC-N結合の形成が進行し、三環性のacridone骨格が形成すると提唱する（Figure 1. 24B、25）。

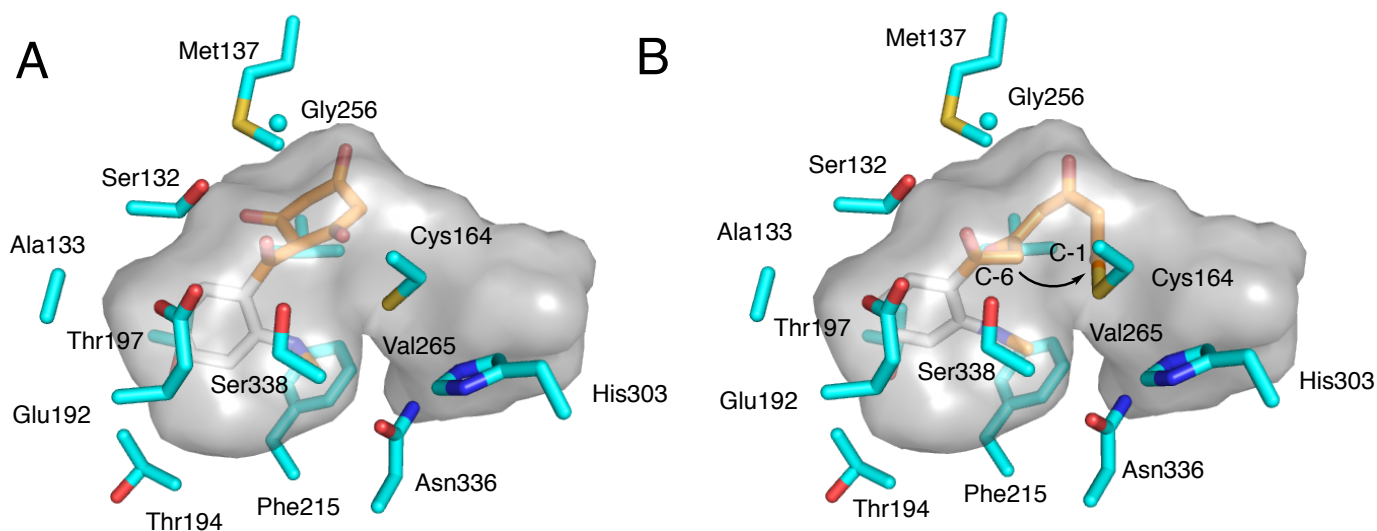


Figure 1. 24. *C. microcarpa* ACSの活性部位のドッキングモデル

A. *N*-methylantraniloyl-trione中間体のドッキング

B. tetrakeitide-Cys中間体のドッキング

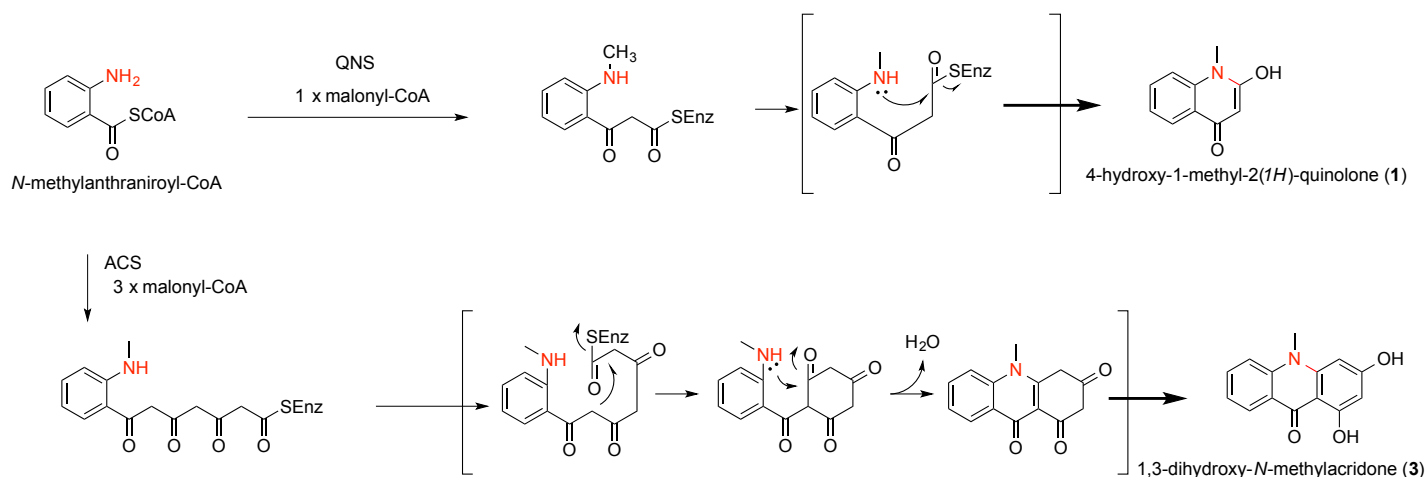


Figure 1. 25. quinolone、acridone生成メカニズム

C. microcarpa ACSと*R. graveolens* ACS、*A. marmelos* QNSは高い配列相同性を示し、どの酵素もCHSsにおいて保存されているThr132、Ser133、Phe265がSer、Ala、Valに置換されている。それにもかかわらず、*C. microcarpa* ACSと*R. graveolens* ACSは4-coumaroyl-CoAを基質として認識してnaringenin chalcone (6) を生成するのに対し、acridone、quinoloneを生成する*A. marmelos* QNSはnaringenin chalcone (6) を生成することが出来ないことが知られている。また、*R. graveolens* ACSと*A. marmelos* QNSの変異体解析の結果、どちらの場合においてもSer132、Ala133、Val265は基質特異性、生成物特異性に重要であることが示唆されている^{22,23}。例えば、*A. marmelos* QNSのS132T/A133S二重変異体は4-coumaroyl-CoAからnaringenin chalcone (6) が生成可能になる一方、S132T/A133S/V265F三重変異体は酵素活性を失い、coumaroyl基質を受け入れず、何も生成物を与えないことが報告されている²³。一方、*R. graveolens* ACSのS132T/A133S/V265F三重変異体は4-coumaroyl-CoAを受け入れるが、N-methylantraniloyl-CoAを受け入れなくなり、CHSへの機能変換することも報告されている²²。これらの結果は、*C. microcarpa* ACS、*R. graveolens* ACS、*A. marmelos* QNSの3つのacridone合成酵素は、構成残基は保存されているにもかかわらず、活性部位の形状がそれぞれ異なっていることを示唆しており、今後酵素の結晶構造を解明することで、構造の観点から酵素の基質特異性、生成物特異性の違いが明らかとなることが期待される。

第 2 章

β -carboline 骨格を構築する微生物由来
新規 Pictet-spengler 反応触媒酵素

2.1. β -carboline アルカロイド

アルカロイドの中でも β -carboline 構造を有するものを特に β -carboline アルカロイドと呼ぶ。植物における strictosidine を介して生合成される化合物群がよく知られているが、それに加え微生物、海綿、昆虫などからも単離されており天然に広く存在する二次代謝産物である。また、 β -carboline という特徴的な構造から光毒性、抗腫瘍活性、催眠作用、神経毒性など幅広い活性を有する。代表的な β -carboline 化合物として harmine (幻覚誘導作用)、eudistomin K (抗白血病活性)、manzamine A (抗癌活性)、などが知られており、医薬品資源としても期待されている³⁶ (Figure 2. 1)。

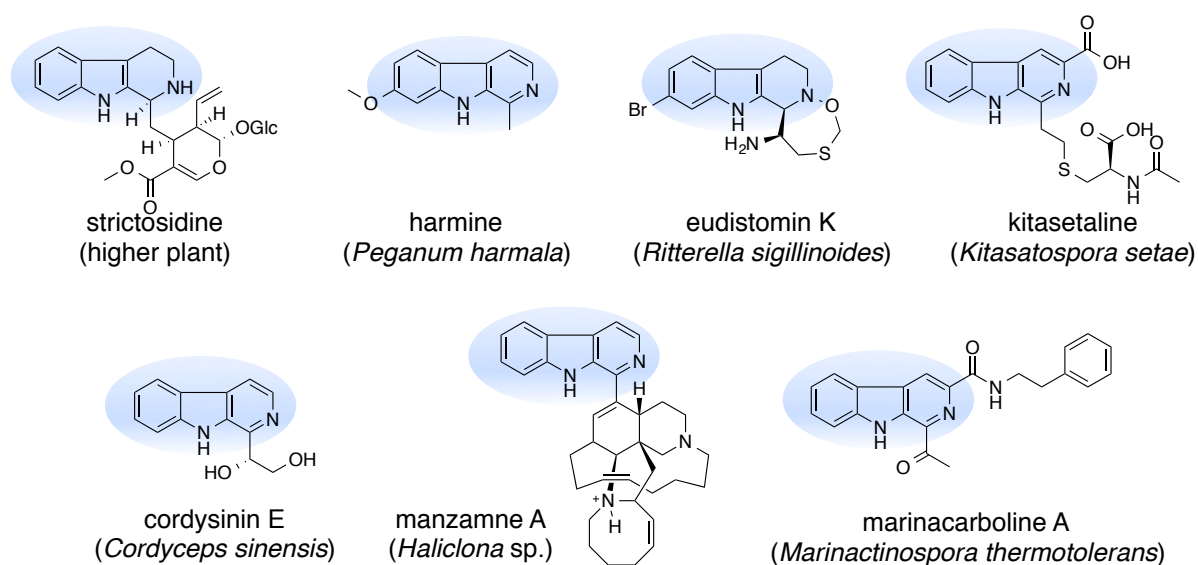


Figure 2.1. β -carboline 構造を有する化合物

*青でハイライトした部分が β -carboline 骨格

2.2 β -carboline 骨格の生合成

2.2.1. β -carboline 骨格の形成

β -carboline 骨格はインドール誘導体とアルデヒド化合物との Pictet-Spengler 反応によって合成される³⁷ (Figure 2. 2)。植物における β -carboline 骨格の生合成も同様の反応により生成されることが明らかとなっており、このような反応を触媒する酵素は Pictet-Spengler 反応触媒酵素と呼ばれている。これまでに植物においては、strictosidine 合成酵素 (STR)³⁸、norcoclaurine 合成酵素 (NCS)³⁹、deacetylpecoside 合成酵素^{40,41} の3種について多くの研究が進められている (Figure 2. 3)。これら3つの Pictet-Spengler 反応触媒酵素のうち *Rauvolfia serpentina* STR1 と *Thalictrum flavum* NCS については機能解析、結晶構造解析が既に報告されており、詳細な反応メカニズムが提唱されている。以下はこれら2つの酵素について詳しく説明する。

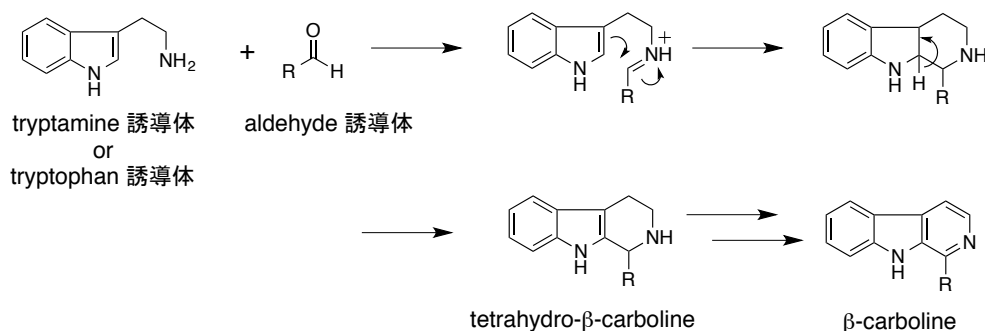


Figure 2.2. Pictet-Spengler 反応による β -carboline の合成

2.2.2. strictosidine 合成酵素 (STR)

Pictet-Spengler 反応触媒酵素の中で最もよく研究が行われている酵素が STR である。STR は tryptamine と secologanin を基質とし、3 α -(S)-strictosidine を立体選択的に合成する (Figure 2. 3A)。合成された 3 α -(S)-strictosidine は ajimaline を始めとした 2,000 種類以上のアルカロイド化合物の生合成前駆体として用いられる⁴² (Figure 2.4)。STR は多くの植物にホモログ酵素が存在していることが明らかになっており⁴³⁻⁴⁵、1979 年に *Catharanthus roseus* から初めて STR が精製された後に、*Rauvolfia serpentina* 由来の STR1 にて基質特異性の評価が行われた⁴⁶。インドール基質として tryptamine、アルデヒド化合物として secologanin を強固に認識し、基質アナログを用いた時に本来の基質に対して 1/10~1/50 に活性が低下することが報告されている^{47,48}。

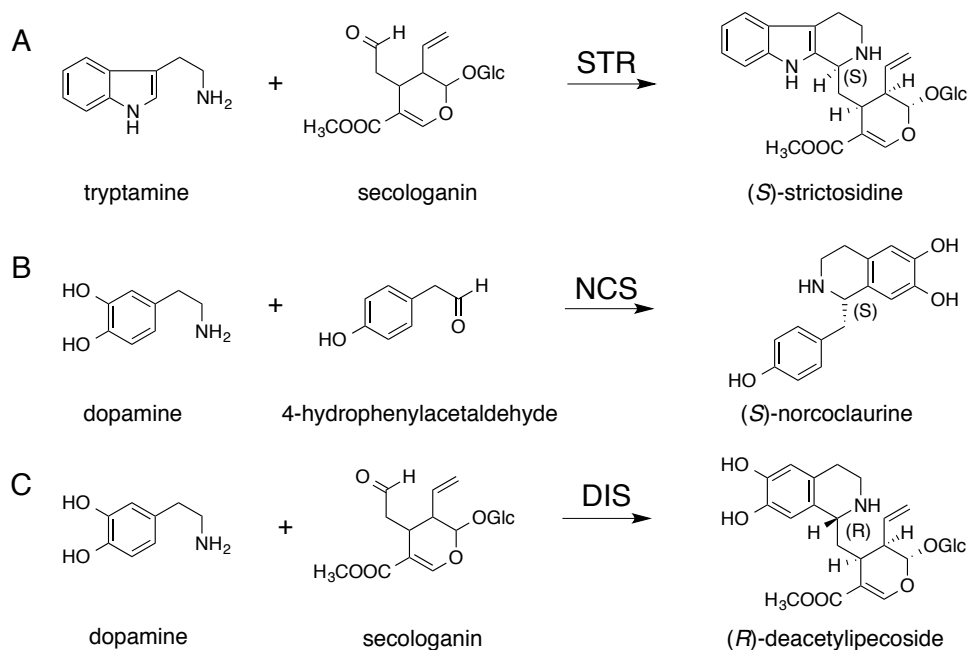


Figure 2.3. Pictet-Spenler 反応による β -carboline の合成

- A. stricitocidine synthase (STR) の反応
- B. norcoclaurine synthase (NCS) の反応
- C. deacetylpecoside (DIS) の反応

2.2.3. strictosidine 合成酵素の構造と触媒反応機構

2006 年に Stöckigt らによって *Rauvolfia serpentina* 由来の STR1 の結晶構造が得られた。その構造は 6 枚の β シートから成るプロペラ構造を有しており、Glu309 が活性中心であると提唱されている^{48,49} (Figure 2. 5)。STR1 のキャビティにおいて 1 つ目の基質である tryptamine は触媒ポケットの底で Glu309 と水素結合を形成すると共に Tyr151 と Phe260 の π - π 相互作用によりインドール部位が挟まれて固定され、2 つ目の基質である secologanin は His207、His307 と水素結合をすることでキャビティ内に固定される (Figure 2. 6)。またこの時、Try149、Tyr151、Val167、Val208、Glu210、Phe226 が tryptamine のインドール結合部位周辺に存在し、これら残基が tryptamine 誘導体に対する基質の受け入れを制限していると考えられている⁴⁸。

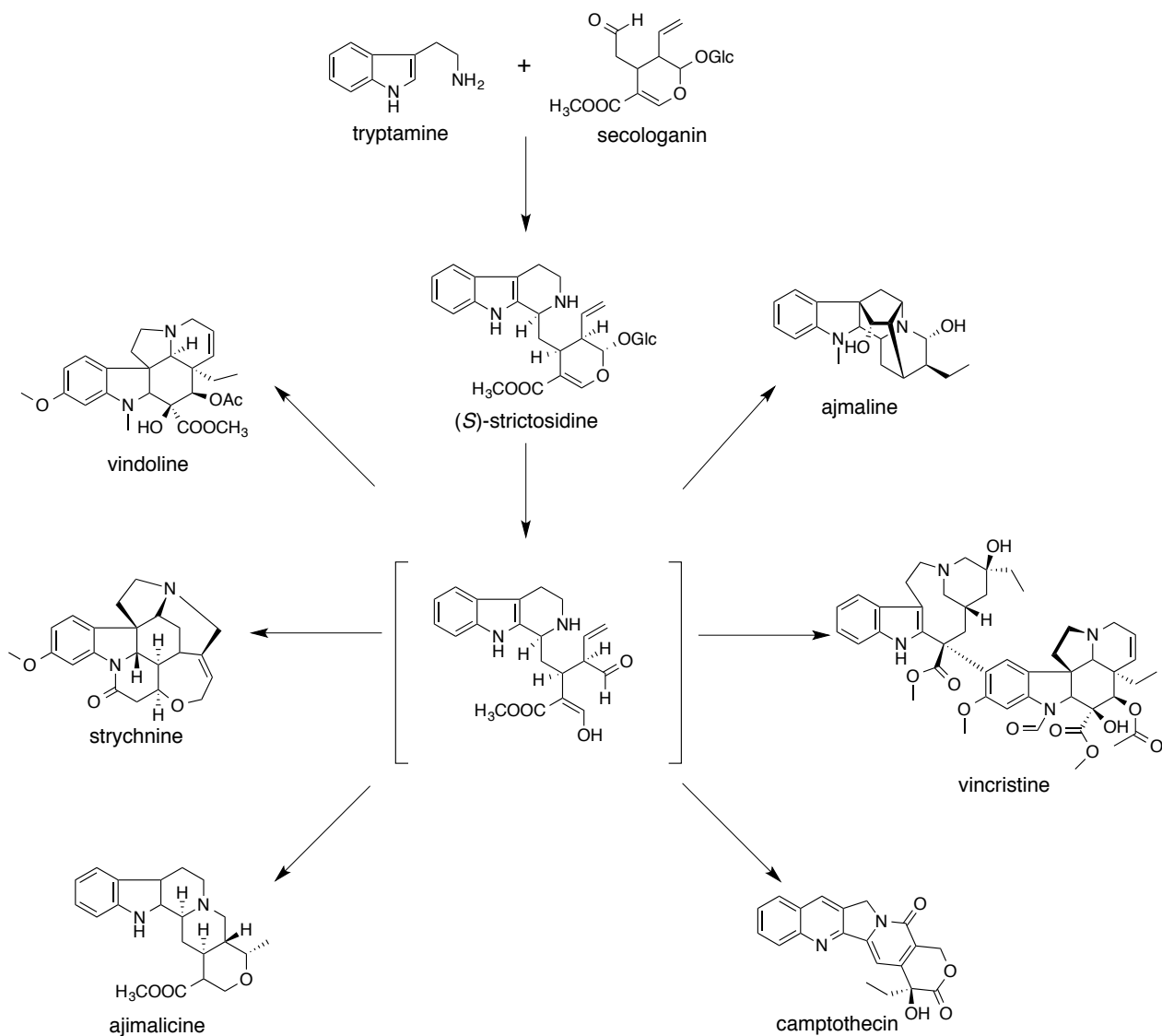


Figure 2.4. strictosidine を前駆体とする天然物の一例

STR1 による strictosidine の合成は、負電荷を帯びた Glu309 が、キャビティ内に固定された tryptamine のアミノプロトンを引き抜き、反応が始まる。これにより tryptamine のアミノ基から secologanin のカルボニル炭素への求核攻撃が促進され、carbinolamine 中間体が形成される。続いて carbinolamine 中間体に Glu309 がプロトンを渡すことでイミニウムイオンの形成が促進される。C-2 位の炭素からの Mannich 型の環化反応が進行し、6 員環形成が行われた後に、再び Glu309 が C-2 位の炭素のプロトンを引き抜くことで反応が終結し、strictosidine が生成される^{49,50} (Figure 2. 7)。

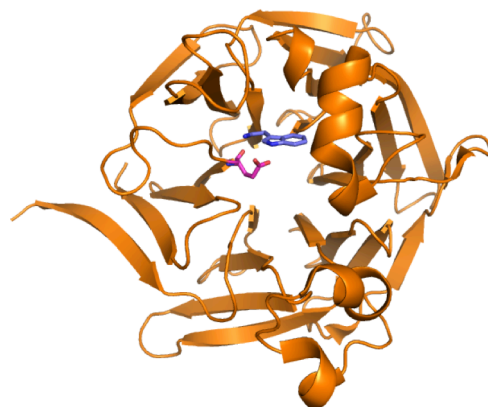


Figure 2.5. STR1 の全体構造

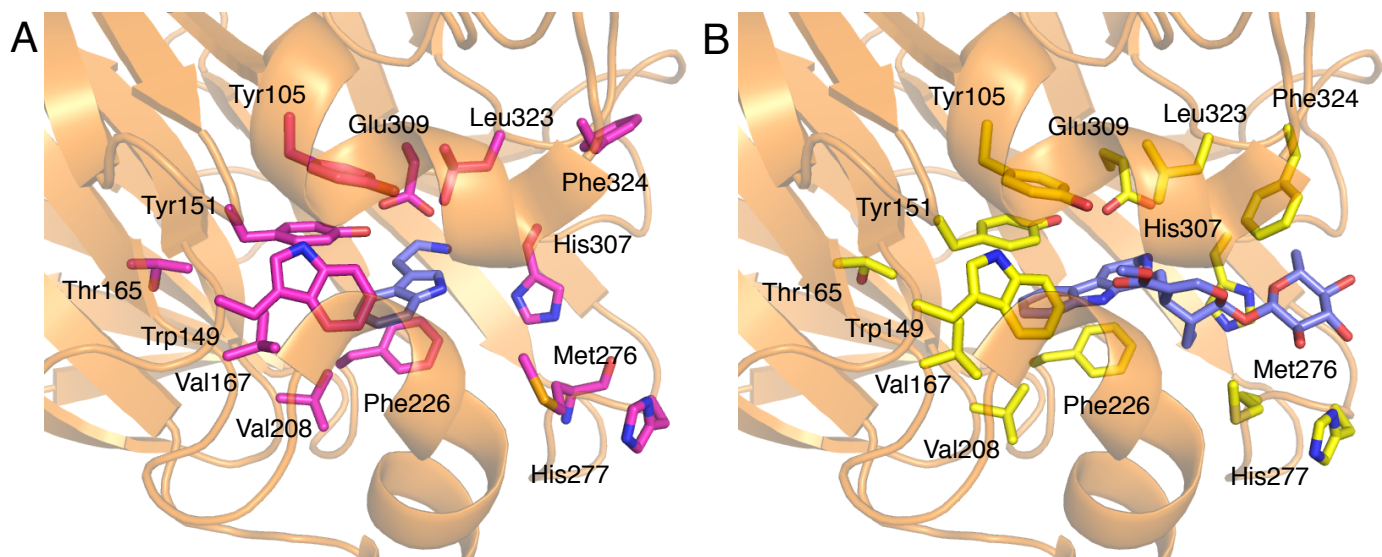


Figure 2.6. STR1 活性部位構造

A. STR1とtryptamineの複合体構造

B. STR1とstrictocidineの複合体構造

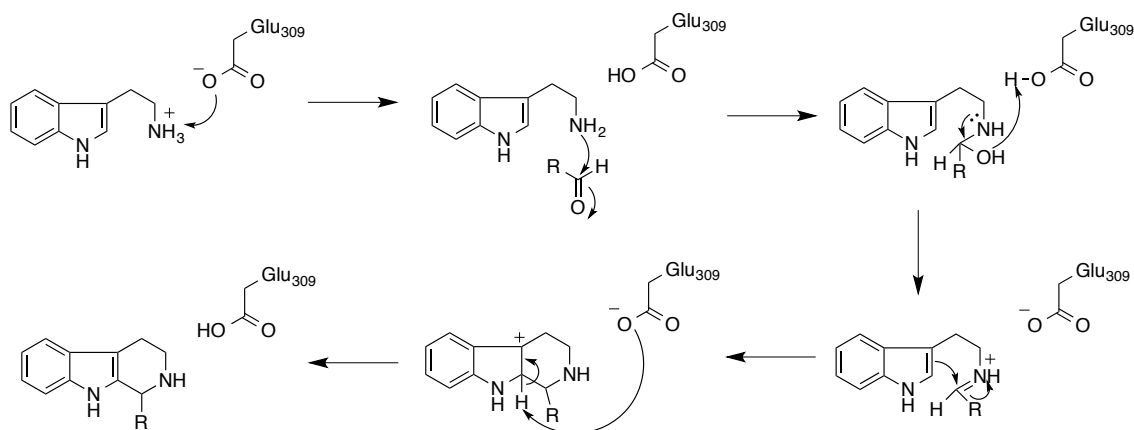


Figure 2.7. STR1 による strictosidine の推定生成経路

2.2.4. norcoclaurine 合成酵素 (NCS)

STR と共に植物由来の Pictet-Spengler 反応触媒酵素で深く研究されているものに NCS がある。NCS はベンジルイソキノリンアルカロイド生合成の鍵中間体である (*S*)-norcoclaurine の生成に関与し、Pictet-Spengler 反応触媒酵素の機能を理解するのに重要な酵素の 1 つである。NCS は 1981 年に Zenk らによりその活性が初めて確認され、dopamine とアルデヒド化合物 4-hydroxyphenylacetaldehyde を基質として受け入れ、立体選択的に (*S*)-norcoclaurine を生合成することが明らかになっている³⁹。こうして合成された (*S*)-norcoclaurine は morphine を始めとした 3,000 種類以上のベンジルイソキノリンアルカロイドの生合成前駆体として用いられる (Figure. 2.8)。STR と同様に NCS においても基質特異性の評価が行われているが、4-deoxydopamine、4-methyldopamine、3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde が酵素に受け入れられるのみで、酵素による基質の認識は厳密に行われていることが判明している⁵¹。

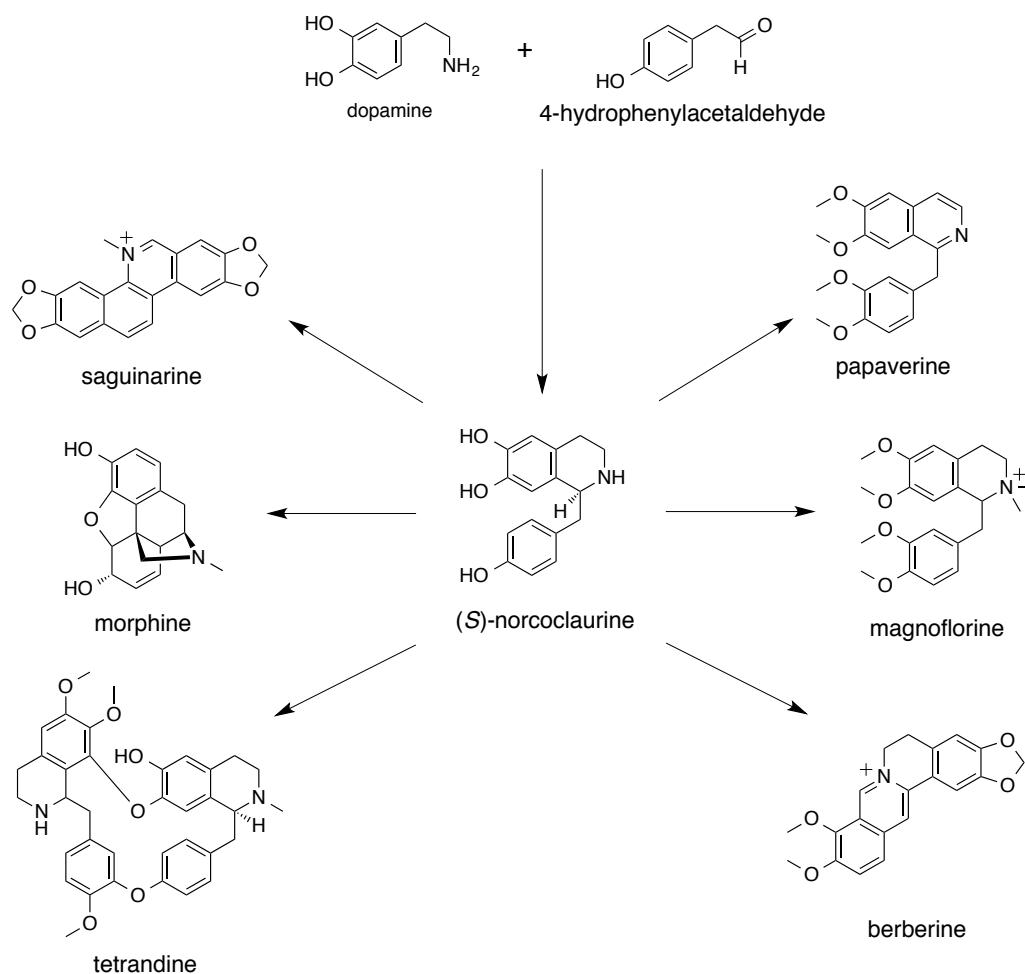


Figure. 2.8. norcoclaurine を前駆体とする天然物の一例

2.2.5. norcoclaurine 合成酵素の触媒反応機構

2006 年に Boffi らによって *Thalictrum flavum* 由来の NCS の結晶構造が 2.1 Å の分解能で得られた⁵²。その構造から、NCS は感染特異的タンパク質 (PR-10) である Bet-v1 によく似た構造を有していることが明らかとなった (Figure 2. 9)。NCS のモノマーは、長さ 23.4 Å の触媒トンネルを有しており、活性中心として Lys122 が 4-hydroxyphenylacetaldehyde から 2.6 Å の距離で存在している (Figure 2. 10)。

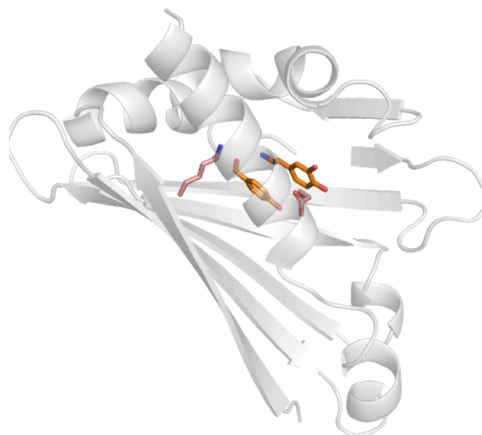


Figure 2.9. NCS の全体構造

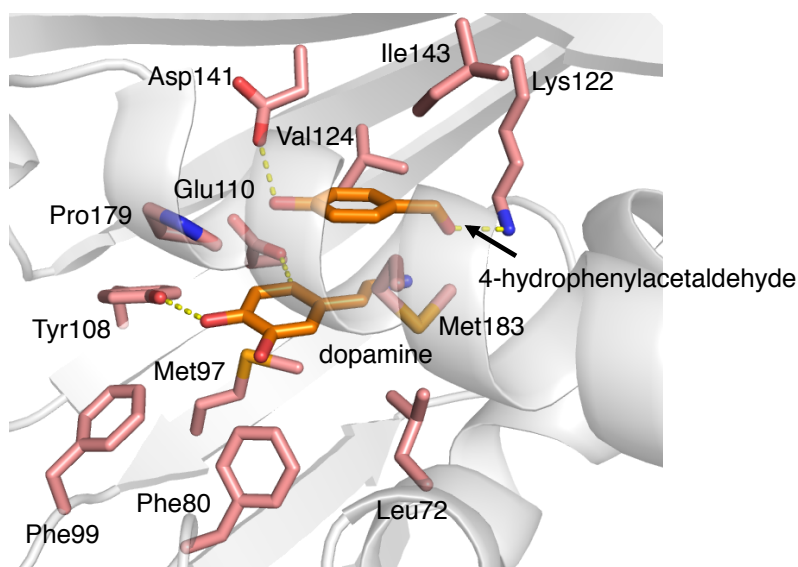


Figure 2.10. norcoclaurine 合成酵素の活性部位構造

(*S*)-norcoclaurine 合成酵素の酵素反応は、STR とは異なる触媒残基が環化反応に関与することが明らかとされている。NCS の反応は dopamine のアミノ基からアルデヒドカルボニルへの求核攻撃により開始し、carbinolamine 中間体が形成した後に活性中心の Lys122 がプロトン供与体として働き、脱水反応によるイミン形成反応を促進している。ついで、イミン中間体のコンフォメーションが変化した後に、イミンの sp^2 炭素に dopamine のヒドロキシル基からの電子移動により芳香性を崩しながら C-5 位からの閉環反応が進行する。最後に、Glu110 が C-5 位のプロトンを引き抜くことで芳香性が回復し、(*S*)-norcoclaurine が生成すると提唱されている⁵² (Figure 2. 11)。

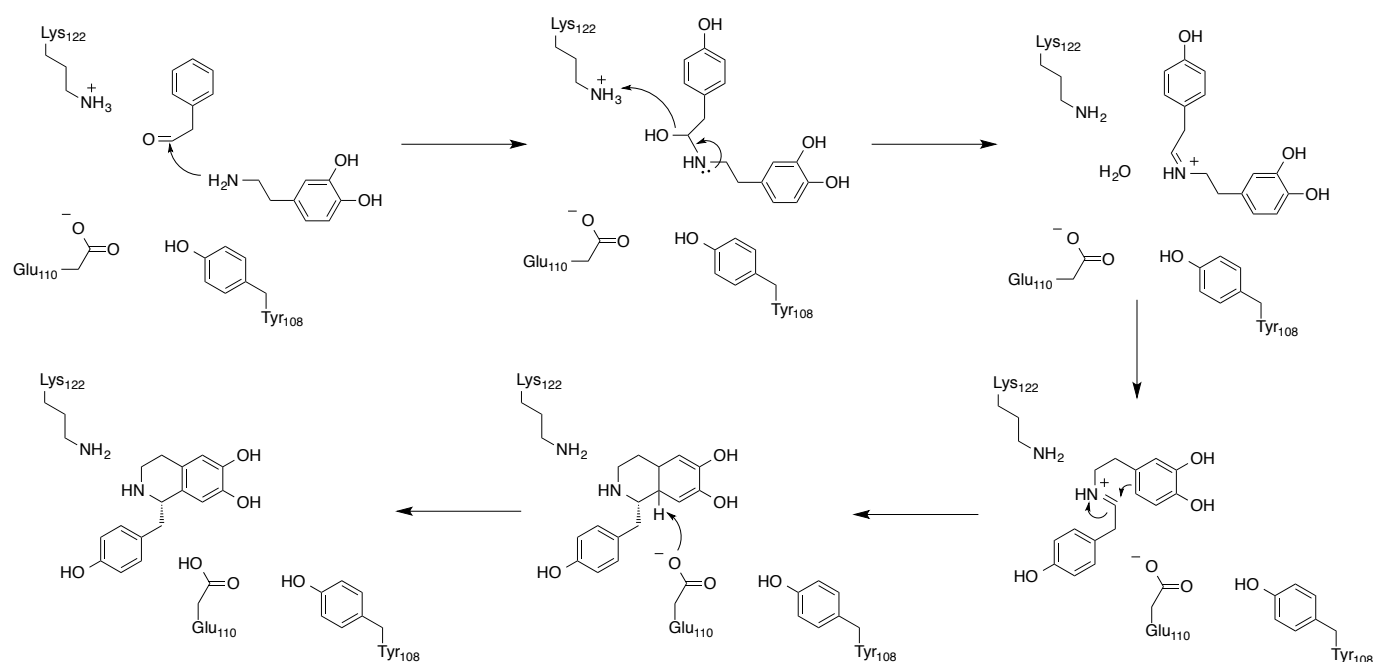


Figure. 2.11. NCS による norcoclaurine の推定生成経路

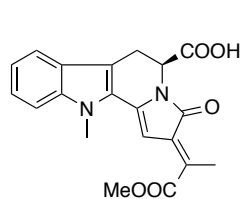
2.2.6. 植物以外での β -carboline 構造の形成

前述のように植物における β -carboline 合成と Pictet-Spengler 反応触媒酵素については多くのことが判明している。一方、微生物における同様の酵素の報告例は極めて少なく未知な部分が多い。最近 *Chaetomium globosum* において 1-methyl-L-tryptophan を培地に添加することで菌体内の Pictet-Spengler 反応触媒酵素 (FPS) が誘導され、 β -carboline 構造を有する新規化合物 chaetogline A-H の生産が誘導されることが報告された⁵³

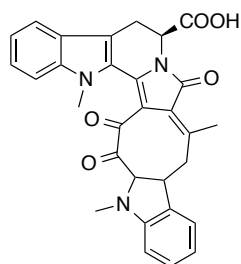
(Figure 2. 12)。これは、微生物内の休眠状態の Pictet-Spengler 反応触媒酵素を活性化させることで、これまで得られていない新たな β -carboline 化合物が見出せる可能性を示した研究であった。また、放線菌 *Kitasatospora setae* と *Marinactinospora thermotolerans* から β -carboline 構造を有する kitasetaline⁵⁴ と marinacarboline A-D⁵⁵ の生合成遺伝子群が同定された。kitasetaline の β -carboline 骨格合成は hypothetical protein と予想された KSE_70640 が、marinacarboline A-D の場合もやはり hypothetical protein と予想された McbB がそれぞれ担っていると推定されている (Figure 2. 12, 13)。

このように、微生物における β -carboline 骨格合成についても少しずつ明らかになりつつあるが、未だこれら酵素群の *in vitro* における詳細な機能解析は行われておらず、これら酵素の性状、立体構造、触媒機構については明らかとなっていない。

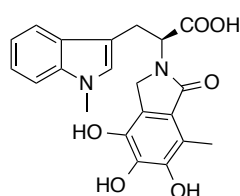
Chaetomium globosum



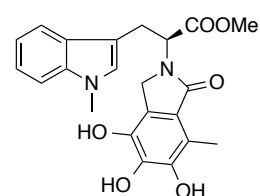
chaetogline A



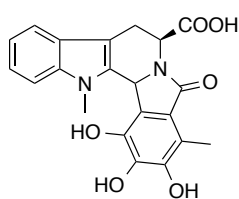
chaetogline B



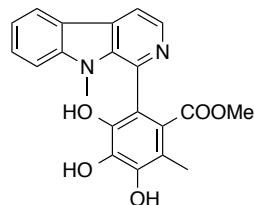
chaetogline C



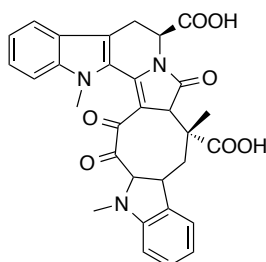
chaetogline D



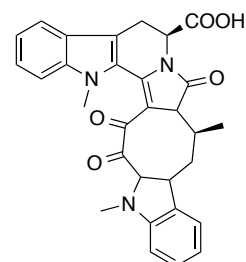
chaetogline E



chaetogline F

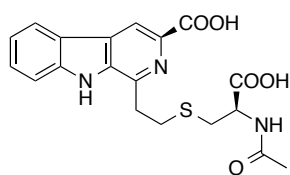


chaetogline G



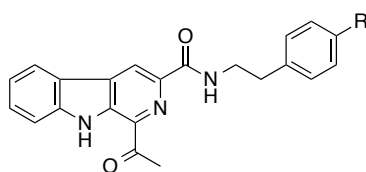
chaetogline H

Kitasatospora setae

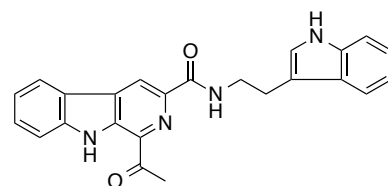


kitasetaline

Marinactinospora thermotolerans



R=H : marinacarboline A
R=OH : marinacarboline B
R=OCH₃ : marinacarboline C



marinacarboline D

Figure 2.12. 微生物由来の β -carboline 化合物

2.2.7. marinacarboline 類の生合成

Marinacarboline 類は、中国南海の深海水から単離された海洋放線菌 *M. thermotolerans* から単離された β -carboline アルカロイドである⁵⁶ (Figure 2. 12)。これら化合物は熱帯熱マラリア原虫である *Plasmodium falciparum* 3D7 株に対して抗マラリア活性を示し、多剤耐性株である *P. falciparum* Dd2 株に対しても活性を示すことで医薬品への応用が期待されている化合物である。また、化合物の生合成経路については2013年に *mcbA*、*mcbB*、*mcbC* の3種の遺伝子が生合成に関与することが明らかとされた⁵⁵ (Table 2. 1, Figure 2. 13)。遺伝子クラスター内の *McbA*、*McbC* はそれぞれ fatty acid-CoA ligase (identity 42%) と glutamate decarboxylase (identity 32%) と相同性を有しているが、*McbB* については保存されているドメインもなく、機能の分かっている酵素とも相同性を有していなかった。しかし、大腸菌を用いて *McbB* を異種発現させた結果、培養上清に marinacarboline 類の生合成中間体である 1-acetyl-3-carboxy- β -carboline とその類縁体の生産が確認されたことから *McbB* は β -carboline 合成に関与する Pictet-Spengler 反応触媒酵素であると考えられた。また、Glu97 を Leu に変換した変異体において活性が消失したことから、Glu97 が活性中心残基であると推測された。

Table 2.1. marinacarboline 類合成酵素遺伝子クラスター

Gene	Size (aa)	Identity/ Similarity (%)	Protein homolog	Predicted function
<i>mcbA</i>	495	42/55	SRIM_40803 (ZP_20970382.1)	fatty acid-CoA ligase
<i>mcbB</i>	314	48/62	BBA_06474 (EJP64480.1)	Unknown function
<i>mcbC</i>	550	32/49	Gad2 (ZP_01998647.1)	glutamate decarboxylase

同時に行われた¹³C ラベル酢酸と 5-fluoro-DL-tryptophan を用いた *in vivo* のフィーディング実験により、*McbB* は L-tryptophan と TCA 経路より派生した oxaloacetaldehyde が基質であることが予想された。

上記の結果と、1-acetyl-3-carboxy- β -carboline が strictosidine のような tetrahydro- β -carboline 構造ではなく飽和した β -calboline 構造を有していることから、*McbB* は β -carboline 構造の形成を触媒するだけではなく酸化による芳香化、脱炭酸化も触媒することが予想された。

現在 marinacarboline 類の生合成は下記の様に予想されている。まず、McbB が L-tryptophan と oxaloacetaldehyde を基質として Pictet-Spengler 反応を触媒し、tetrahydro- β -carboline 形成した後に、C 環の酸化的芳香化、L-tryptophan のカルボン酸部位の脱炭酸化反応をも触媒することで、生合成中間体である 1-acetyl-3-carboxy- β -carboline を形成する。McbC の脱炭酸化反応によって生成された tyramine、tryptamine、phenylethylamine と 1-acetyl-3-carboxy- β -carboline を McbA が縮合することで marinacarboline A-D が生成する⁵⁵ (Figure 2. 13)。

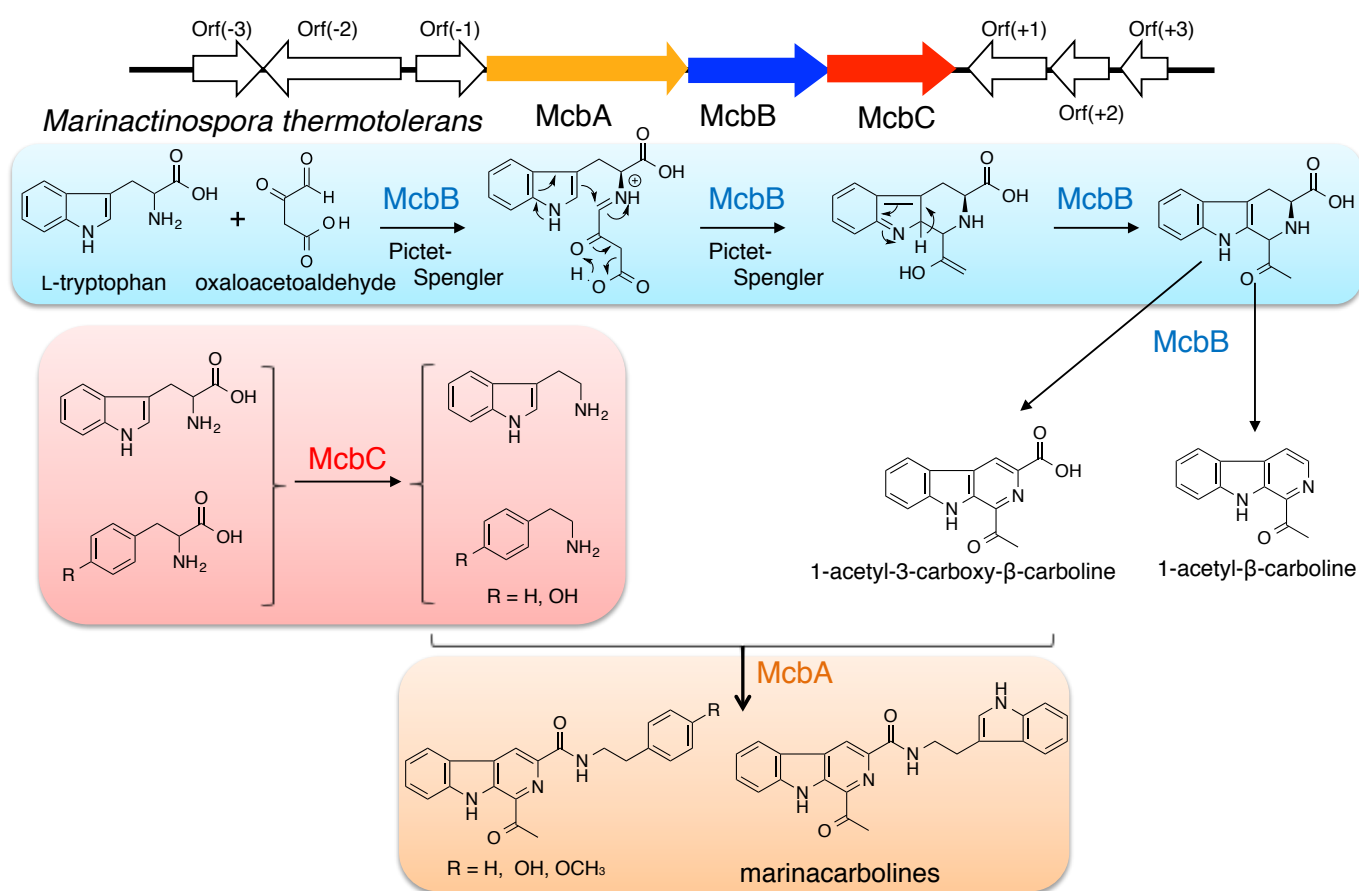


Figure 2. 13. marinacarboline 類の予想生合成経路

2.2.8. McbB と既知の Pictet-Spengrase との系統樹解析

McbB と既知の Pictet-Spengler 反応触媒酵素を用いた系統樹解析の結果、McbB は STR (*Rauvolfia surpentina*, *Catharanthus roseus* 等) や NCS (*Thalictrum flavum*, *Papaver somniferum* 等) とは異なるクレードに属することが分かり、進化の早い段階から分岐していることが明らかとなった (Figure 2. 14)。一方で微生物由来の mikimopine 合成酵素⁵⁷ (hairy root of *Nicotiana glauca*) や cucumopine 合成酵素⁵⁸ (*Agrobacterium rhizogenes*) とは 18%、22% と低い相同性を有していた。興味深いことに、McbB は放線菌由来の機能未知酵素と高い相同性を有し (*Actinoalloteichus spitiensis*: identity 80%, *Actinoalloteichus cyanogriseus*: identity 80%, *Nocardioopsis synnemataformans*: identity 66%)、本酵素がこれまで知られている Pictet-Spengler 反応触媒酵素とは機能的、構造的に異なる酵素であることが期待された (Figure 2. 14)。

2.3. 本研究の目的

本研究では、これまで報告例の少ない微生物由来 β -carboline 骨格の形成に関与する新規 Pictet-Spengler 反応触媒酵素の詳細な機能解析を目的として、McbB の *in vitro* による活性評価と X 線結晶構造解析による反応メカニズム解明、結晶構造を基盤とした酵素の機能改変を試みた。活性に必要な残基の同定を行い、高度に活性残基が保存されている酵素を解析することで、Pictet-Spengler 反応触媒機能を有する新規酵素と新規 β -carboline 化合物を見出すことが可能になる。

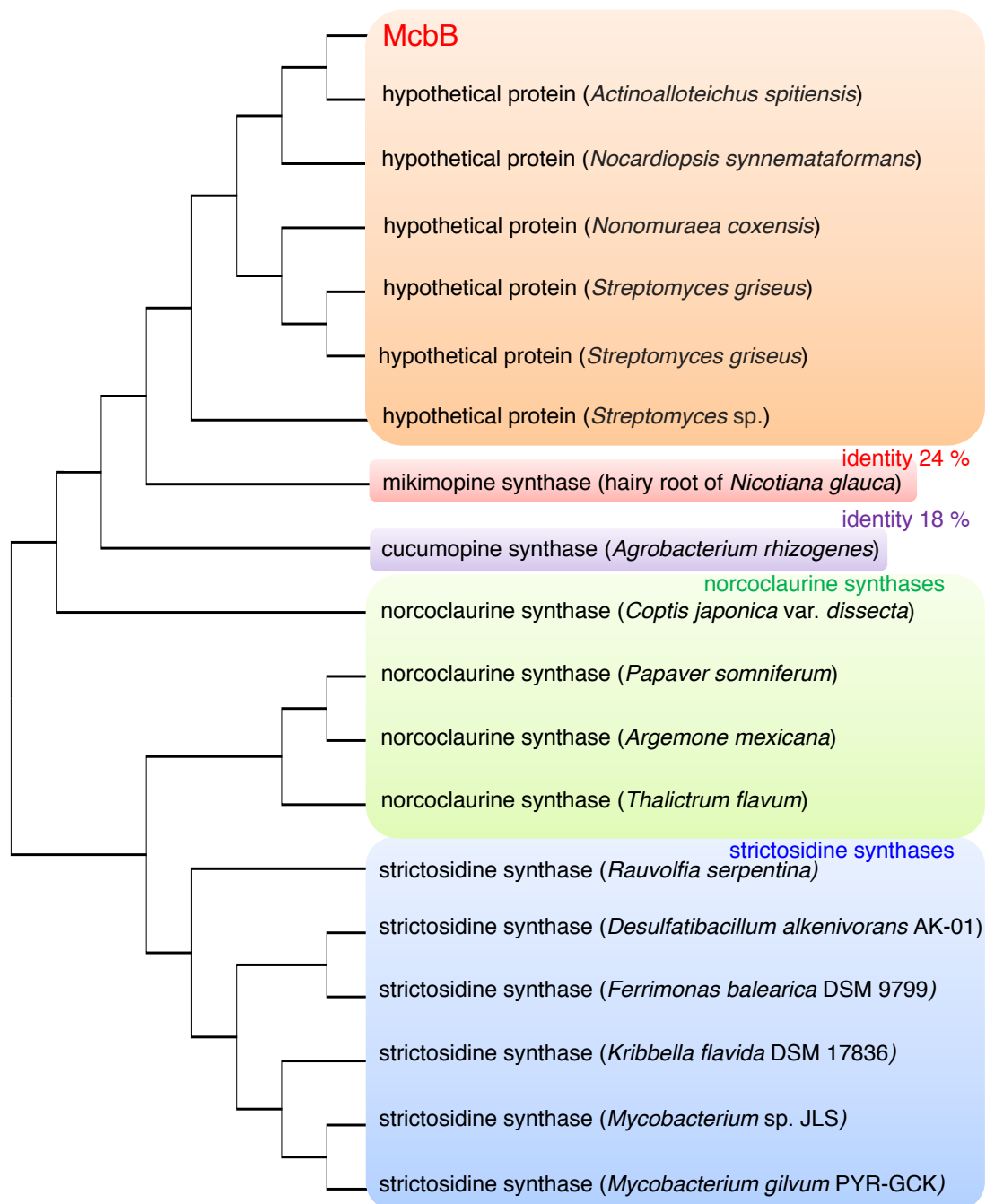


Figure 2. 14. McbB の系統樹解析

2.4. 結果

2.4.1. McbB の発現

McbB の活性評価を *in vitro* にて行うために McbB の発現と精製を試みた。

大腸菌用にコドン最適化した遺伝子を Eurofins Genomics 社より購入し酵素遺伝子を発現ベクターに導入した。大腸菌 BLR を用いて 6 残基の His との N 末端融合タンパク質として大量発現をし、Ni-キレートアフィニティーカラム、ゲルろ過カラムにて精製した。SDS-PAGE の結果、McbB は約 38 kDa の位置に単一バンドとしてえられ、アミノ酸配列から計算した 38.2 kDa と良い一致を示した (Figure 2. 15)。一方、ゲルろ過カラムの溶出時間から分子量を計算した結果、82.6 kDa を示し、ゲルろ過後のサンプルについて動的光散乱を測定した結果、単峰形分布 (多分散性: 20.9%)、分子量 85 kDa を示した。以上の結果から、McbB は溶液中ではホモダイマーとして存在することが判明した (Figure 2. 16, 17)。

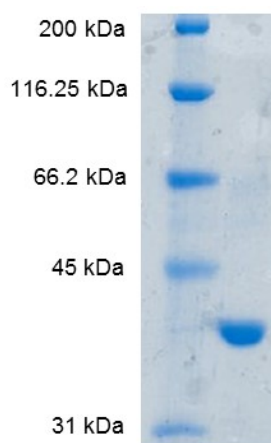


Figure 2.15. 精製後の SDS-PAGE

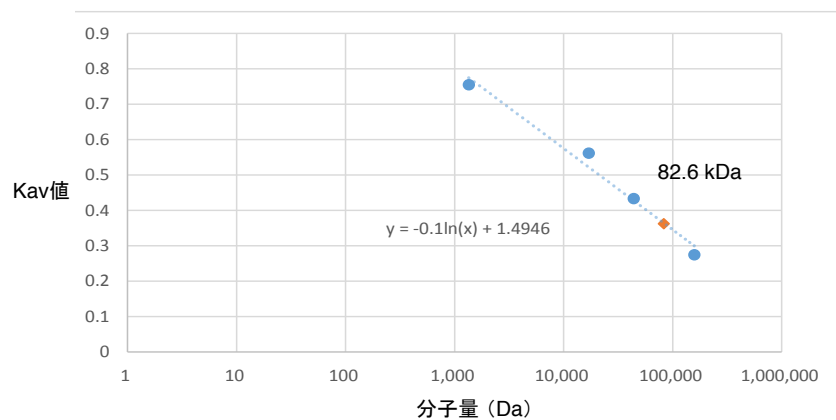


Figure 2.16. ゲル濾過カラムによる分子量推定

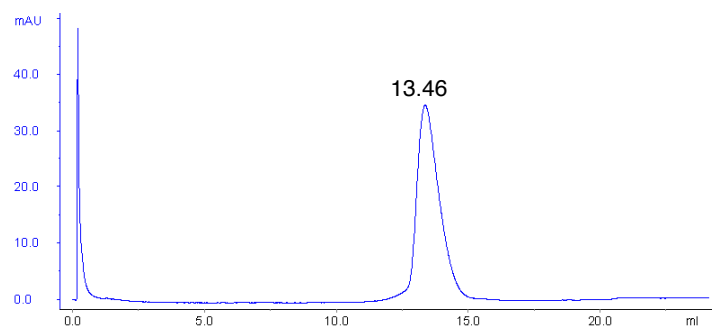


Figure 2.17. ゲル濾過クロマトグラフィ結果

2.4.2 酵素活性確認

次に、精製酵素を用いた *in vitro* 酵素反応を行った。

先行研究において、*in vivo* での ^{13}C ラベル酢酸を用いた投与実験によって McbB の基質は L-tryptophan と oxaloacetaldehyde であると予想されていた⁵⁵。そこで、oxaloacetaldehyde を合成し、L-tryptophan と oxaloacetaldehyde を基質として 52°C、12 時間酵素反応を行った後に LC-MS にて分析を行った。結果、酵素反応優位に m/z 252.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ を示す **8** と、 m/z 210.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ を示す **9** を与えた (Figure 2. 18)。この分子量は 1-acetyl-3-carboxy- β -carboline、1-acetyl- β -carboline と一致した。次に、論文記載の方法に従い、McbB を発現させた大腸菌の培養上清から単離した標品⁵⁵ と酵素生産物とを LC-MS を用いて比較を行ったところ、リテンションタイム及び、マスマスフラグメントパターンが一致したため、**8** が 1-acetyl-3-carboxy- β -carboline であると決定した。

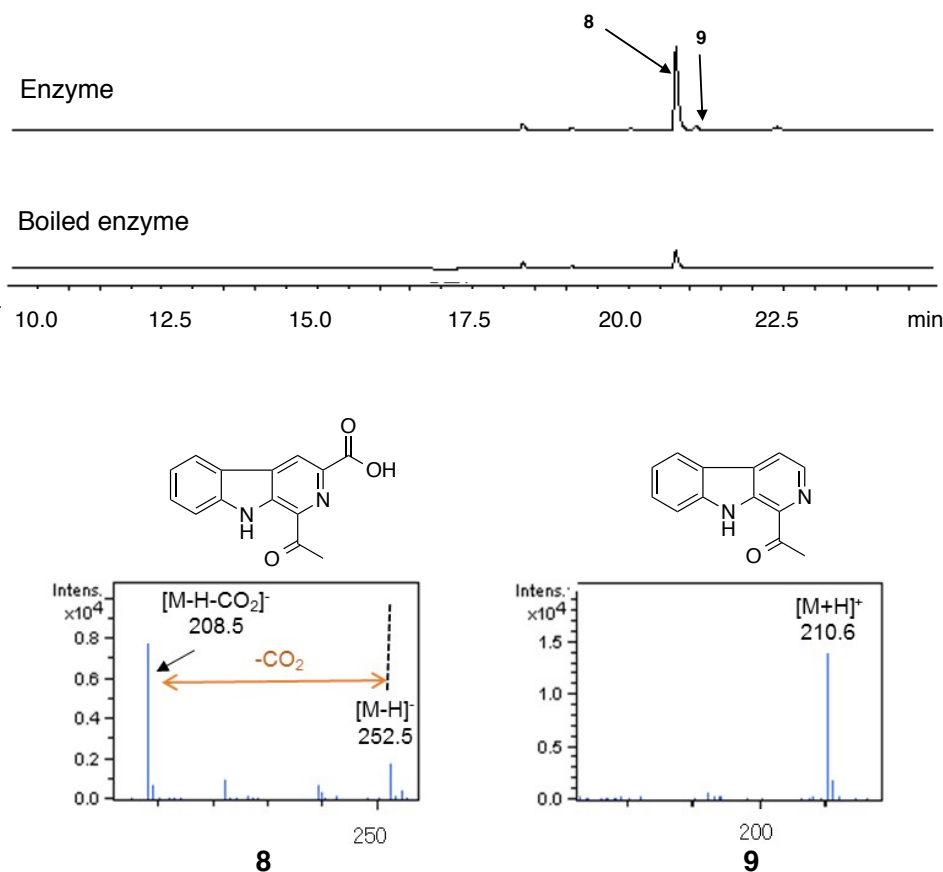


Figure 2.18. McbB の酵素反応生成物の LC-MS

McbB は既知酵素の cucumopine 合成酵素と低い相同性を有している (Figure 2. 19)。McbB が cucumopine 合成酵素と同様の反応を触媒可能か確認すべく、cucumopine 合成酵素の酵素反応条件下⁵⁸において酵素の活性の評価を行った。精製酵素に対して L-tryptophan、L-histidine と α -ketoglutaric acid、oxaloacetic acid を基質、NADH もしくは NADPH を補酵素として用い 30 °C、1 時間酵素反応を行った。AcOEt にて酵素反応を停止させた後に、酵素生産物を HPLC に供した。結果、どの条件においても酵素特異的な生成物は得られず、McbB は cucumopine 合成酵素と同様の条件では反応が進行しないことが判明した (Figure 2. 20)。

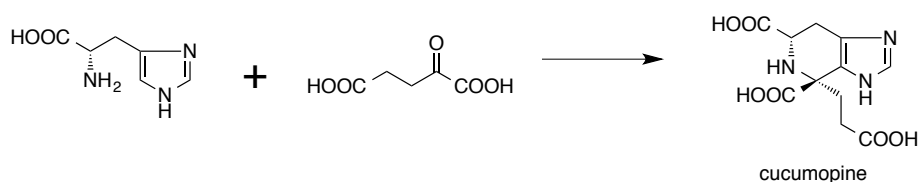


Figure 2. 19. cucumopine 合成酵素の反応

2.4.3. McbB の基質特異性

次に、McbB の tryptophan 基質に対する基質特異性を検討するため、種々の tryptophan 誘導体を用いて酵素反応を行った。Figure 2. 21 に示した 12 種の tryptophan 誘導体を用いた結果、5-methyl-DL-tryptophan、7-methyl-DL-tryptophan のみを基質として認識し、 β -carboline 骨格を有する 1-acetyl-3-carboxy-6-methyl- β -carboline (10)、1-acetyl-6-methyl- β -carboline (11)、1-acetyl-3-carboxy-8-methyl- β -carboline (12)、1-acetyl-8-methyl- β -carboline (13) を生成した。一方、D-tryptophan、 α -methyl-DL-tryptophan、tryptamine、L-tryptophanol、L-tryptophanamide、5-hydroxy-L-tryptophan、5-methoxy-L-tryptophan、5-nitro-DL-tryptophan、6-methyl-DL-tryptophan を受け入れなかった (Figure 2. 22)。以上の結果と先行研究における 5-fluoro-DL-tryptophan を受け入れた結果を合わせると、McbB は L-tryptophan の indole 環が認識に必須であり、L-体、D-体を厳密に認識することが示唆された。さらに、 α -methyl-DL-tryptophan、tryptamine、L-tryptophanol、L-tryptophanamide を受け入れなかったことから、(S)-2-aminopropanoic acid 部分 (アミノ酸部分) を認識していることが考えられる。C-5 位、C-7 位には置換基に対して許容性があるものの、置換基の大きさ、極性、電荷に制限があることが判明した。一方で、C-6 位の置換基に対しては許容性がなく、置換基を導入できないことが明らかとなった。また、tryptamine を用いた場合に酵素特異的な生成物が得られなかったこと

より、*in vivo* 実験において副生成物である 1-acetyl- β -carboline (9) が tryptamine 由来である可能性は否定された。

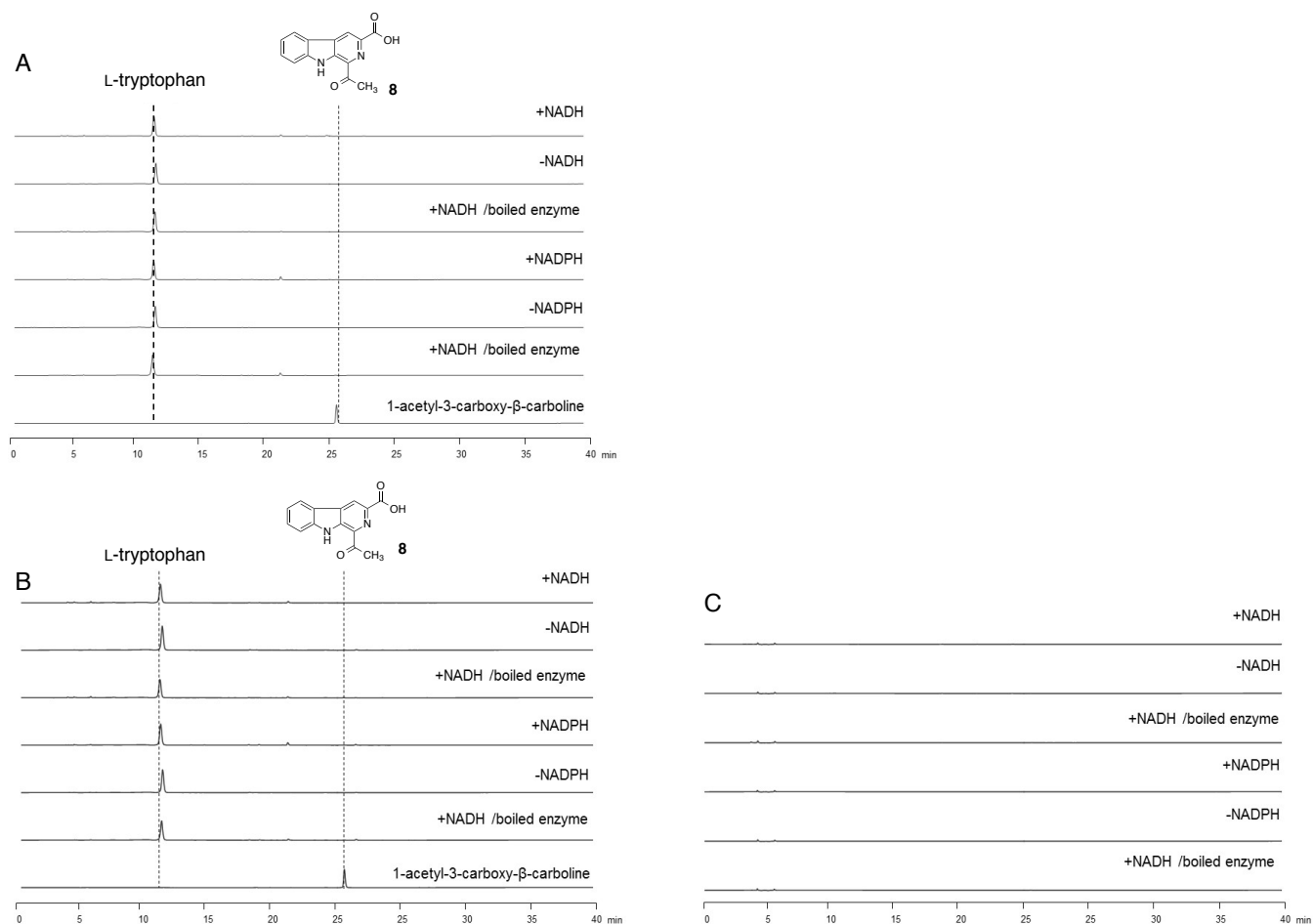


Figure 2. 20. cucumopine 合成酵素条件での McbB の反応

A: L-tryptophan + α -ketoglutaric acid

B: L-tryptophan + oxaloacetic acid

C: L-hisditine + α -ketoglutaric acid

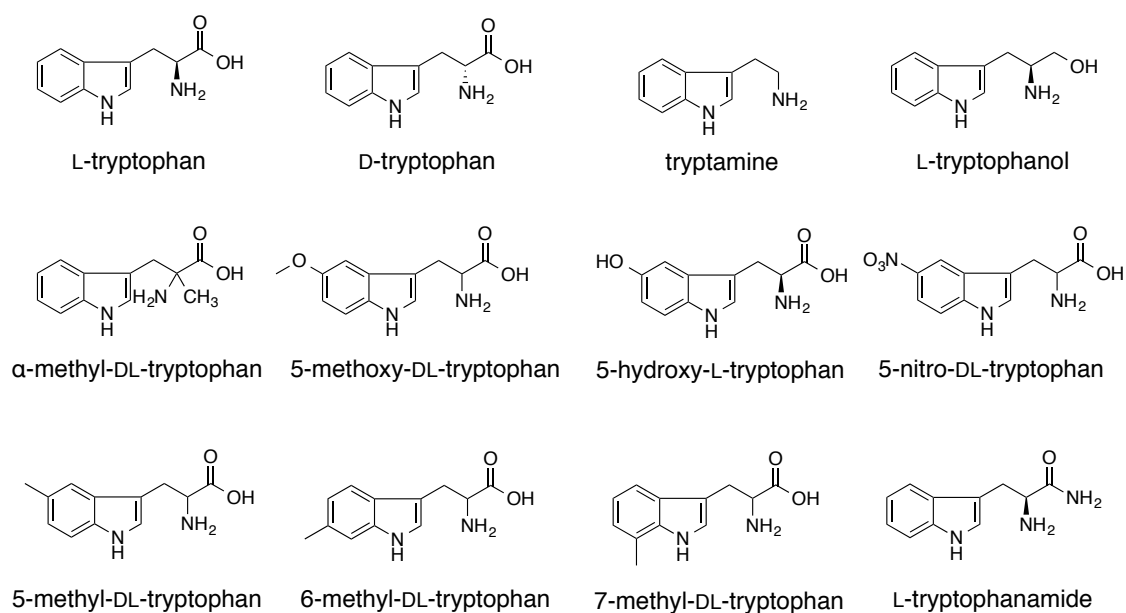


Figure 2. 21. McbB の基質特異性試験に使用した L-tryptophan アナログ

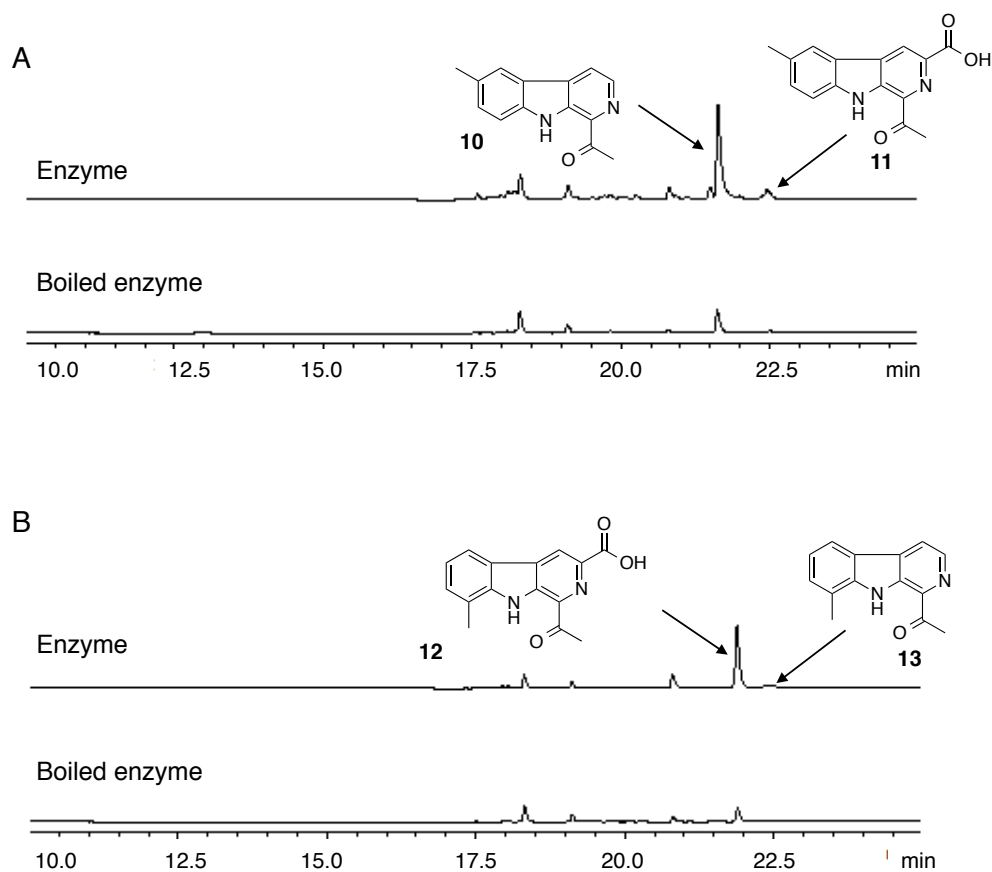


Figure 2. 22. McbB の基質特異性の検討

A: 5-methyl-DL-tryptophan を基質とした時の酵素反応生成物

B: 7-methyl-DL-tryptophan を基質とした時の酵素反応生成物

キネティクス解析の結果、1-acetyl-3-carboxy- β -carboline (**8**) の形成反応において、L-tryptophan に対して $K_M = 26.2 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 1.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ を示した。また、1-acetyl-3-carboxy-6-methyl- β -carboline (**10**) や、1-acetyl-3-carboxy-8-methyl- β -carboline (**12**) の形成反応において 5-methyl-DL-tryptophan、7-methyl-DL-tryptophan に対してそれぞれ活性が L-tryptophan の 1/3.9、1/2.3 に低下し、 $K_M = 526.1 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 7.2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 、 $K_M = 890.3 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 21.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ を示した (Table 2.2)。

Table 2.2. McbB の kinetics 解析

Enzyme	Substrate	$K_M (\mu\text{M})$	k_{cat} ($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$)	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Product
WT	L-tryptophan	26.2 ± 5.16	1.45 ± 0.065	0.55	8
	methylglyoxal	142.5 ± 33.4		0.10	8
	5-methyltryptophan	526.1 ± 85.3		0.14	10
	7-methyltryptophan	890.3 ± 97.6		0.24	12
	formaldehyde	452.7 ± 113.2		0.29	14
R72A	L-tryptophan	5.10 ± 1.49	5.67 ± 0.93	11.13	8
	methylglyoxal	428.4 ± 174		0.13	8
H87A	L-tryptophan	573.1 ± 118	8.09 ± 0.75	0.08	8
	methylglyoxal	737.6 ± 177		0.12	8
R72A/H87A	L-tryptophan	197.8 ± 53.1	6.66 ± 1.13	0.34	8
	methylglyoxal	738.9 ± 276		0.09	8

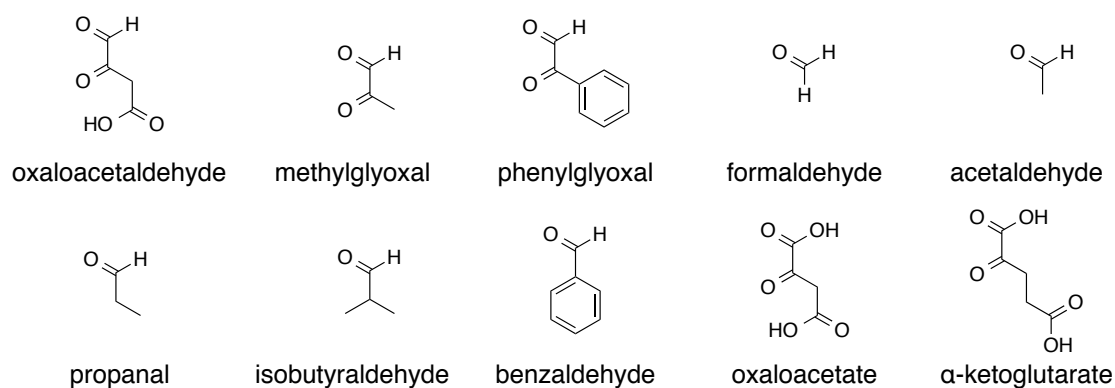


Figure 2. 23. McbB の基質特異性試験に使用した aldehyde アナログ

次に、アルデヒド化合物に対する基質特異性について検討した。

Figure 2. 23 に示したアルデヒド化合物を用いて酵素反応を行った結果、アルデヒド基質に対しては比較的寛容な基質特異性を示し、methylglyoxal、formaldehyde、acetaldehyde、propanal、isobutyraldehyde を基質として受け入れ、酵素反応生成物を与えた。Methylglyoxal を基質として用いた場合、酵素条件下、非酵素条件下共に oxaloacetaldehyde と同じく、Pictet-Spengler 反応に加え、酸化による芳香化が進行した 1-acetyl-3-carboxy- β -carboline (8)とその脱炭酸物 1-acetyl- β -carboline (9)を生産した (Figure 2. 24, 25)。

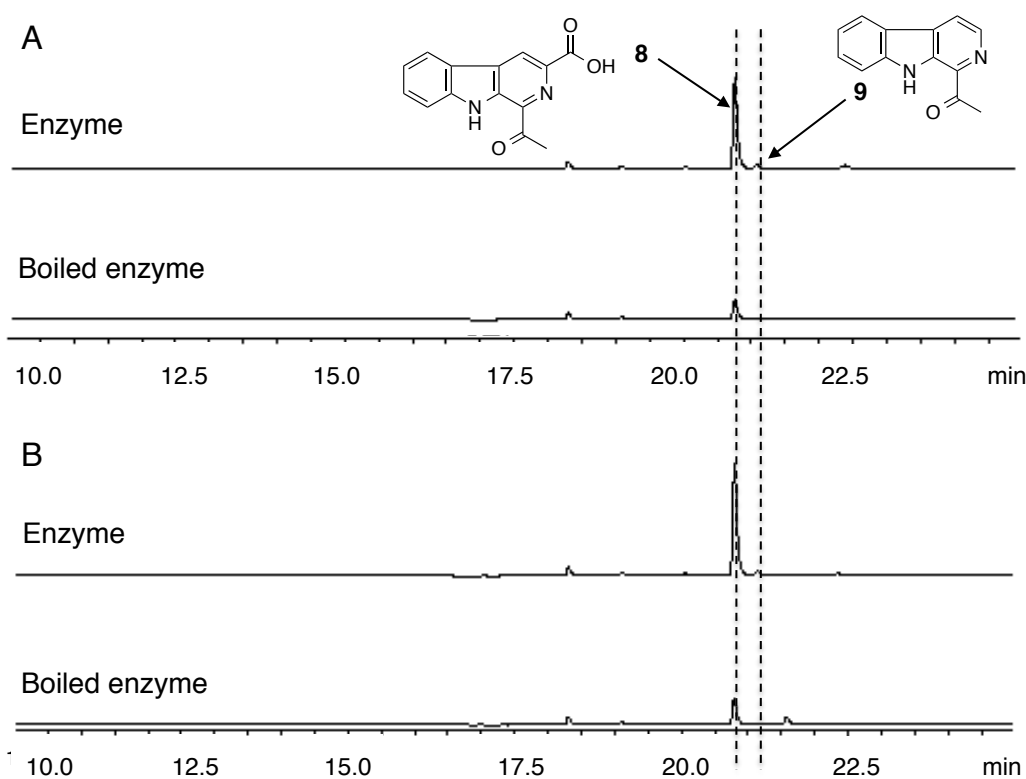


Figure 2. 24. oxaloacetaldehyde と methylglyoxal を用いた反応の HPLC 比較

A: oxaloacetaldehyde を基質とした時の酵素反応生成物

B: methylglyoxal を基質とした時の酵素反応生成物

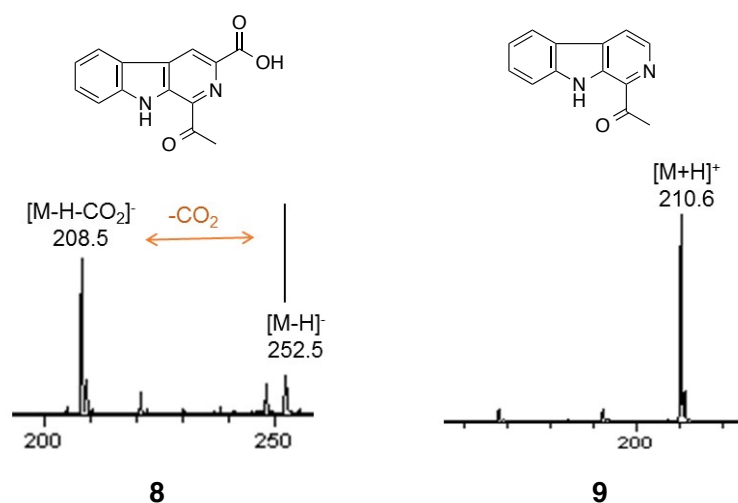


Figure. 2.25. methylglyoxal を用いた時の酵素反応生成物の MS₂ スペクトル

一方、formaldehyde、acetaldehyde、propanal、isobutyraldehyde を基質とした場合は、Pictet-Spengler 反応のみが進行した tetrahydro- β -carboline 化合物 3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (**14**)、(*1S*, *3S*)-1-methyl-3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (**15a**)、(*1R*, *3S*)-1-methyl-3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (**15b**)、(*1S*, *3S*)-1-ethyl-3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (**16a**)、(*1R*, *3S*)-1-ethyl-3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (**16b**)、(*1S*, *3S*)-1-isopropyl-3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (**17a**)、(*1R*, *3S*)-1-isopropyl-3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (**17b**) を生成した (Figure 2. 26-29)。化合物 **14-17** の C-1 位の立体化学は ¹H-NMR と NOE を用いて決定した。しかし、benzaldehyde、benzaldehyde、phenylglyoxal、oxaloacetate、 α -ketoglutarate は基質として受け入れられなかった。

興味深いことに、acetaldehyde、isobutyraldehyde を基質として用いた場合、酵素生成物の立体選択性は硫酸を添加した酸性条件下で室温 2 時間、化学的に合成した場合と異なる選択性を示した。化学合成反応では、(*1S*, *3S*)-tetrahydro- β -carbolines (*cis*-体: **15a**, **17a**) を優先的に生成するのに対し、酵素反応では、(*1R*, *3S*)-tetrahydro- β -carbolines (*trans*-体: **15b**, **17b**) を優位に生成した (Figure 2. 27, 29)。propanal を用いた場合には、酵素反応においても(*1S*, *3S*)-1-ethyl-3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (**16a**)が多く出来てはいるものの、合成反応に比べ、(*1R*, *3S*)-1-ethyl-3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (**17a**)の割合が多くなっていた (Figure 2. 28)。

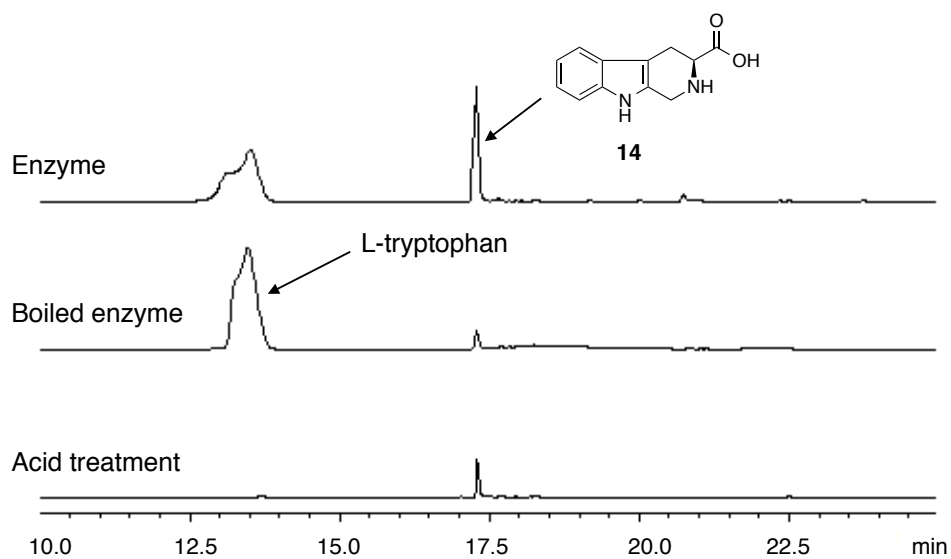


Figure 2. 26. formaldehyde を用いた時の酵素反応生成物の LC-MS 結果

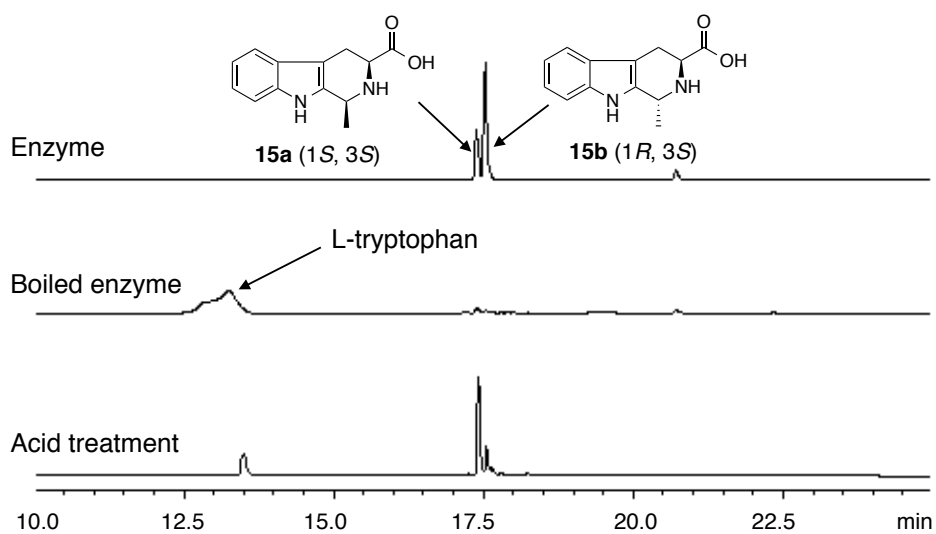


Figure 2. 27. acetaldehyde を用いた時の酵素反応生成物の LC-MS 結果

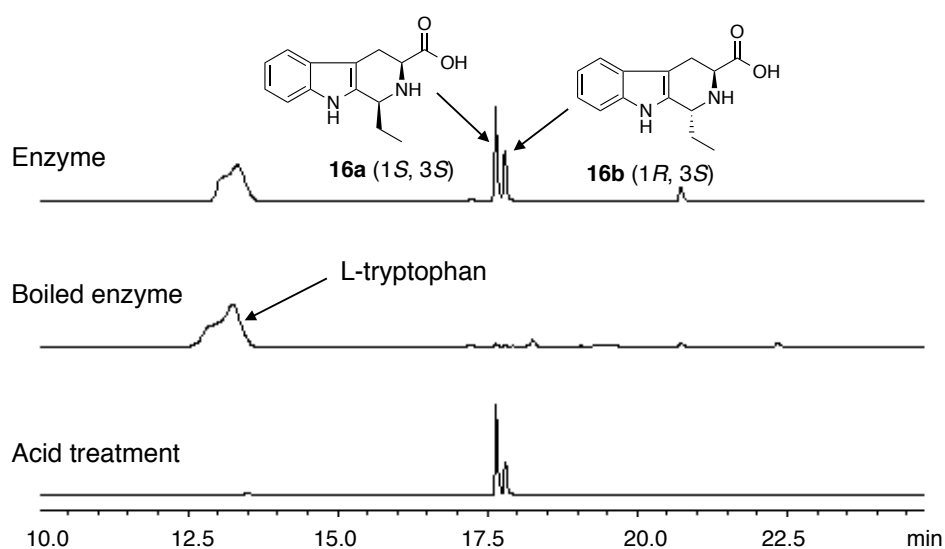


Figure 2. 28. propanal を用いた時の酵素反応生成物の LC-MS 結果

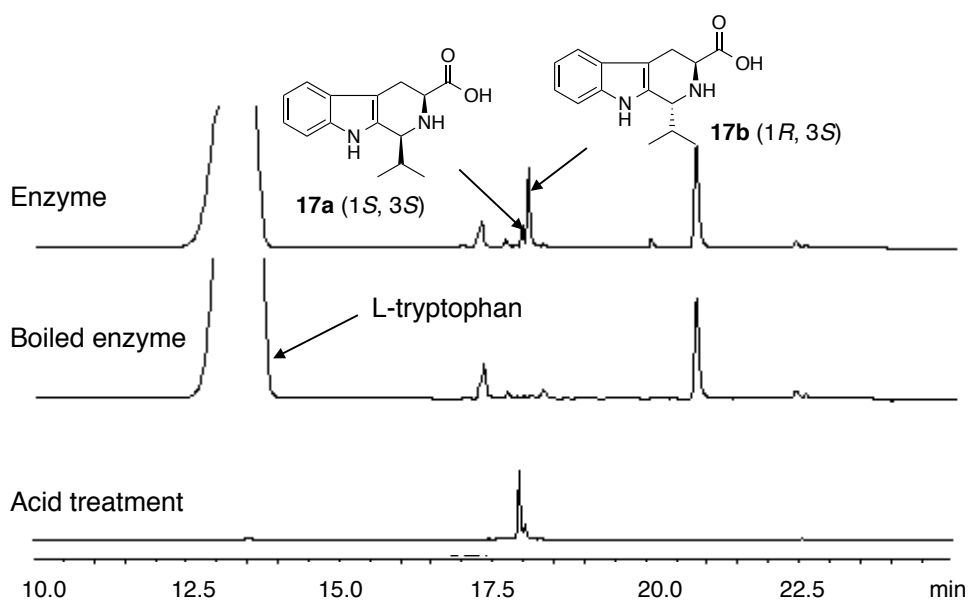


Figure 2. 29. isobutyraldehyde を用いた時の酵素反応生成物の LC-MS 結果

キネティクス解析の結果、1-acetyl-3-carboxy- β -carboline (8) の形成反応において、methylglyoxal に対して $K_M = 142.5 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 1.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ を示した。また、3-carboxy-tetrahydro- β -carboline (14) 形成反応において formaldehyde に対して活性が L-tryptophan の 1/3.9、1/2.3 に低下し、 $K_M = 452.7 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0.13 \text{ min}^{-1}$ を示した (Table 2.2)。

2.4.4. McbB の結晶化

このような基質特異性やMcbBの酵素反応メカニズムを明らかにするためにMcbBのX線結晶構造解析に着手した。McbBはこれまでPDBに登録されているタンパク質と相同性を有さないため、分子置換法による構造決定は不可能であった。そのため、セレンメチオニン標識したMcbB (SeMet-McbB) を用いた。発現、精製は上述の方法で行い、得られた酵素を17 mg/mLまで濃縮し、結晶化に用いた。

McbB の結晶化条件

タンパク質濃度	17 mg/ml in 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM DTT
結晶化条件	100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 18% (W/V) PEG1000
結晶化方法	Sitting-drop vapor diffusion method, 20 °C
抗凍結剤	100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 18% (W/V) PEG1000, 23% glycerol

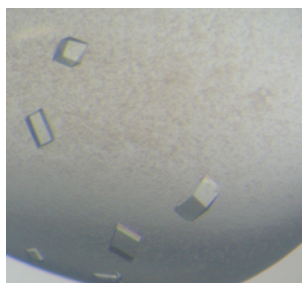


Figure 2.30. SeMet-McbB の結晶

得られた結晶について、フォトンファクトリーNW12AにてX線回析強度の測定を行った。セレンの異常分散を利用したSAD法にて位相の決定を行い、初期構造を得た後に精密化を行った。

Table 2.3. *M. thermotolerans* の結晶構造解析データ

<i>M. thermotolerans</i> McbB	
Data collection	
Space group	$P2_12_12_1$
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	99.8, 108.8, 146.4
α , β , γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	50 - 2.48 (2.63 - 2.48)*
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	8.8 (39.9)
$I / \sigma I$	13.4 (3.4)
Completeness (%)	99.7 (98.5)
Redundancy	3.85 (3.85)
Refinement	
Resolution (Å)	47.8 - 2.48
No. reflections	56923
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	19.5/24.1
No. atoms	
Protein	10035
Ligand/ion	60
Water	531
<i>B</i> -factors	
Protein	18.2
Ligand/ion	22.1
Water	22.1
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.008
Bond angles (°)	1.133
Ramachandran plot	
Favored region	96.7%
Allowed region	3.3%
Outer region	0%

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I(hkl)$ is the intensity of reflection hkl , \sum_{hkl} is the sum over all reflections, and \sum_i is the sum over i measurements of reflection hkl .

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

2.4.5. McbB の全体構造

X 線解析強度を測定した結果 2.48 Å の分解能で全体構造の取得に成功した。結晶構造解析データを Table 2.3 に示す。結晶学的非対称単位 (ASU) には 4 分子のモノマーが存在し、モノマー A-B とモノマー C-D の 2 分子ずつが非結晶学的 2 回転軸の関係にあり、生物学的に活性な 2 量体構造を形成していた。RMSDs は互いに 0.2~0.3 Å でありそれぞれのモノマーに構造的な差異は無かった (Figure 2. 31, 32)。2 量体を形成した境界面の面積は~908 Å² であり、 α -ヘリックスから生じたアミノ酸間による多くの疎水性相互作用や塩橋、水素結合、 π - π 相互作用が見られた (Figure 2. 33)。

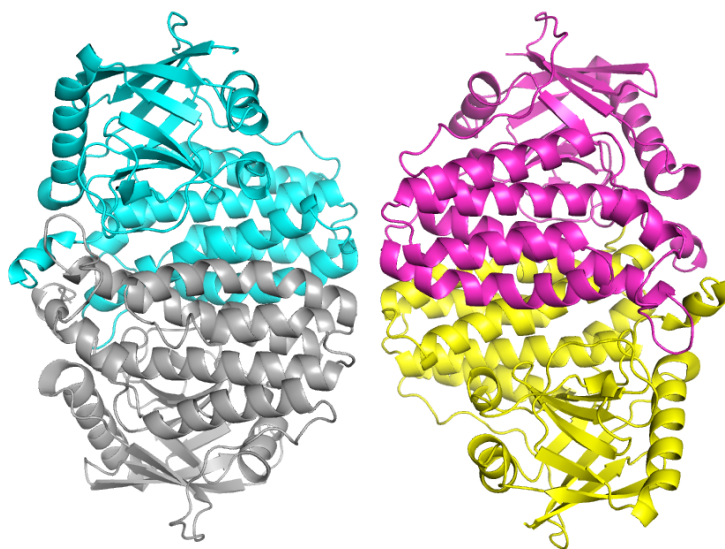


Figure 2.31. McbB の全体構造

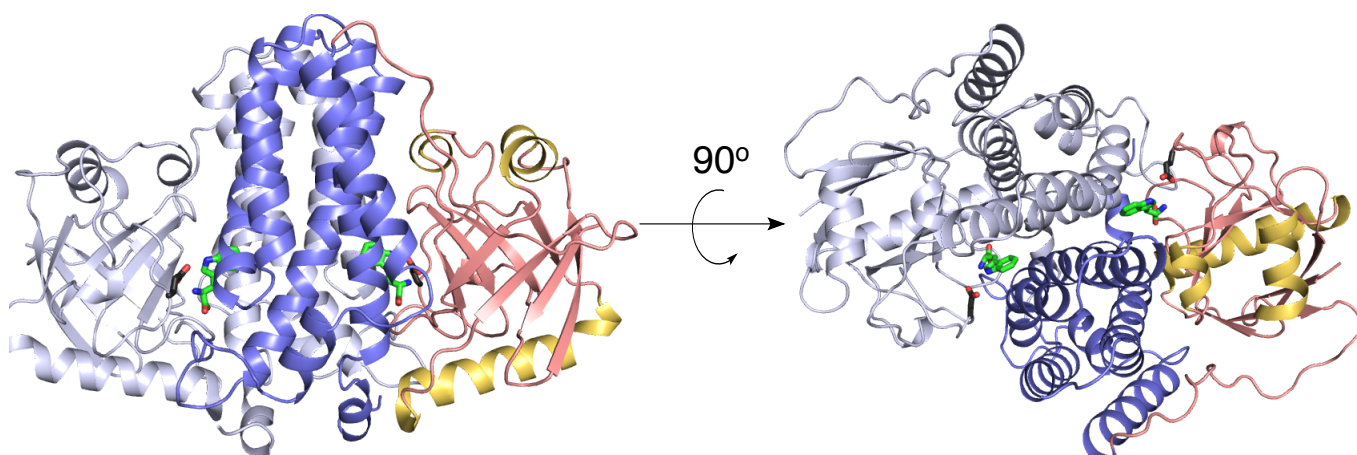


Figure. 2.32. McbB のダイマー構造

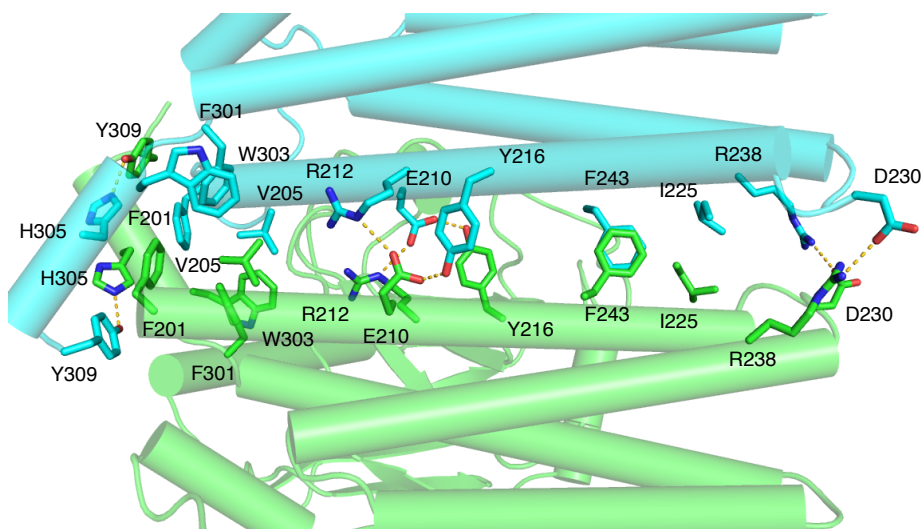


Figure. 2.33. McbB のダイマー境界面

これまでに Pictet-Spengler 反応触媒酵素である *Rauvolfia serpentina* STR1 と *Thalictrum flavum* NCR の 2 種類の構造が明らかとなっている^{48,52}。STR の構造は 4 つの逆平行βシートを 6 枚持つ、β-プロペラ構造を有している (Figure 2. 34)。同様なβ-プロペラ構造を有する酵素として、低比重リポタンパク質受容体 YWTD⁵⁹ (LDLR; PDB code 1HIQ) や、*Loligo vulgaris* 由来の diisopropylfluorophosphatase⁶⁰ (DFPase; PDB code 1E1A)、serum paroxonase⁶¹ (PON1; PDB code 1V04) など数種類の構造が解かれており、単量体で酵素活性を示し、その活性部位はプロペラの中心に位置することが知られている。一方 *Thalictrum flavum* NCS は 2 量体を形成する Bet-v1 like superfamily に属し、その全体構造は 7 つの逆方向βシートが C 末端の 1 つの長いαヘリックスと 2 本のαヘリックスを包み込む構造を持ち、そのトンネル内に活性部位を有する (Figure 2. 34)。他の Bet-v1 like superfamily に属する酵素として、植物の phytohormone carriers や、pathogen-related proteins (PR10)⁶²、MLN64-START ドメイン⁶³、tetracenomycin の aromatase/cyclase⁶⁴ などがある。

興味深いことに、McbB の全体構造はこれらの構造と大きく異なり、N 末端側に 2 本のα-ヘリックスに挟まれた 8 枚の逆平行β-バレル構造、C 末端側に 5 本のα-ヘリックス構造という 2 つのドメインから構成されていた (Figure 2. 34)。

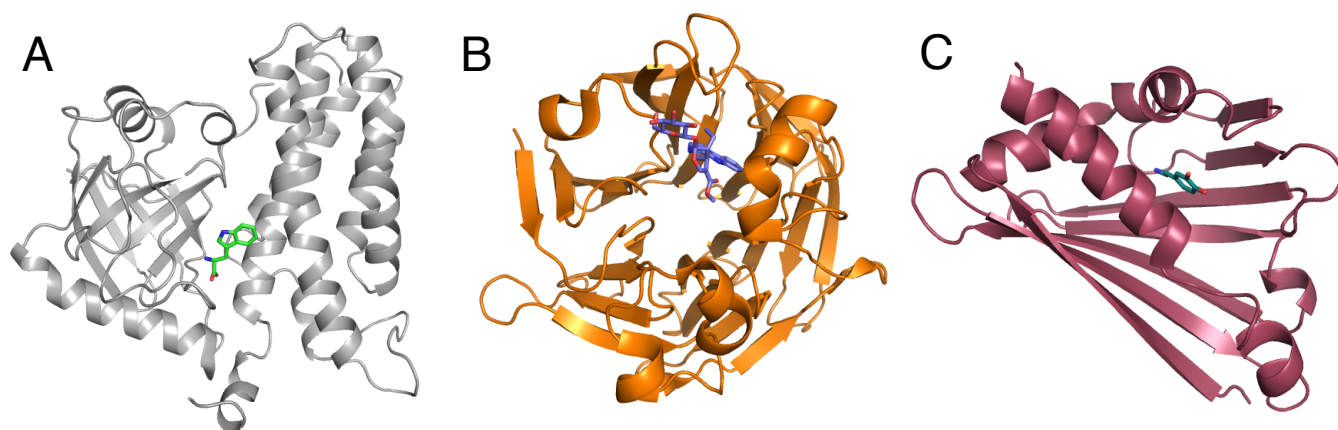


Figure 2. 34. Pictet-Spengler 反応触媒酵素の結晶構造比較

A: McbB モノマー結晶構造

B: STR1 結晶構造

C: NCS 結晶構造

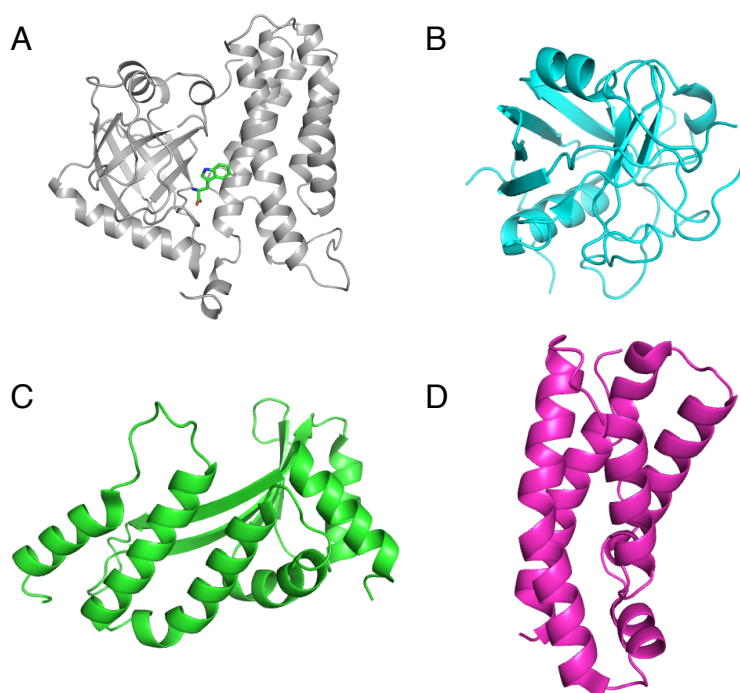


Figure 2. 35. McbB の N 末、C 末と低い類似性を有する構造

A: McbB 結晶構造、B: *H. sapiens* cyclophline A 結晶構造、

C: *E. coli* BarA 結晶構造、D: *Monomastix* sp. MosI 結晶構造

N 末端側は、peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase 活性を示す *Homo sapiens* cyclophilin A⁶⁵ (CypA; PDB code 2X7K) と三次元構造相同性を示した (C α 原子の RMSD 値 2.7 Å)。一方 C 末端側は、*Monomastix* sp. DNA endonuclease I⁶⁶ (MosI; PDB code 1M5X) や *E.coli* signal transduction histidine-protein kinase⁶⁷ (BarA; PDB code 3IQT) と RMSD 値 2.1 Å、3.2 Å と低いながら三次元構造相同性を示した (Figure 2. 35)。しかし、これら C 末端、N 末端に部分的な相同性を示す酵素とは機能的、配列的な類似性は見られなかった。また、McbB 全長の構造に対して三次元構造相同性を示すタンパク質は PDB 上に存在せず、McbB はこれまでに同定されていない新規構造を有することが明らかとなった。

McbB の構造中には精製中に結合したと考えられる L-tryptophan の電子密度が見られ、その複合体構造から、McbB の活性部位は植物由来の *Rauvolfia serpentina* STR1 や *Thalictrum flavum* NCS と異なり、ダイマーの境界面に大きなキャビティを形成し、そこに基質である L-tryptophan は結合することが判明した (Figure 2. 36)。活性中心残基と提唱されている Glu97 は β 5 と β 6 との間のループに存在し、L-tryptophan の方へ突き出していた。他の活性部位を構成するアミノ酸残基として、モノマー1の β 3 と β 4 の間のループ上に位置する Val47 と Ser48、 β 4 上の His51 と Tyr53、 β 5 上の Arg72、Phe81 と Leu85、 β 6 上の His87、Ala89、 β 6 と β 7 間のループ上に位置する Leu99、 α 6 上の Arg212 と Tyr216、 α 9 上の Asn291、Asn294、Thr295 と Leu298、さらに、もう 1 方のモノマー2の α 6 上の Phe206 と Glu210、 α 7 上の Thr246、Pro247 と Phe250 があり、活性部位の容積と活性部位入口の面積はそれぞれ、1,670 Å³ と 57 Å² であった (Figure 2. 36)。

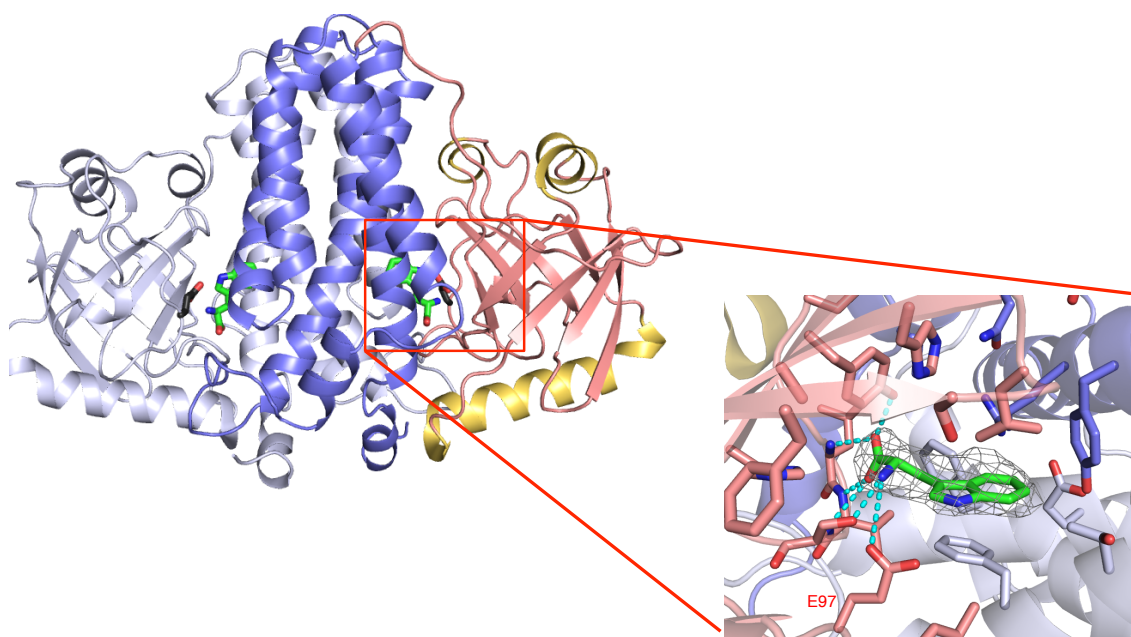


Figure 2. 36. McbB ダイマー境界面の活性部位

先行研究において McbB の変異体解析が行われており、酵素活性に重要な残基として Ile6、Asn24、Leu27、Leu36、Tyr38、Gln42、His44、Asp71、Gln86、Lys91、Tyr92、Glu110、Leu115、Glu170、Glu181、Gly195 が示唆されていたが、これらの残基は McbB の構造中活性部位を構成する残基ではなく、酵素の外側に位置していた (Figure 2. 37)。この結果から、これらの残基は触媒活性ではなく、酵素のフォールディングや、活性部位の形状の維持に重要であると考えられる。

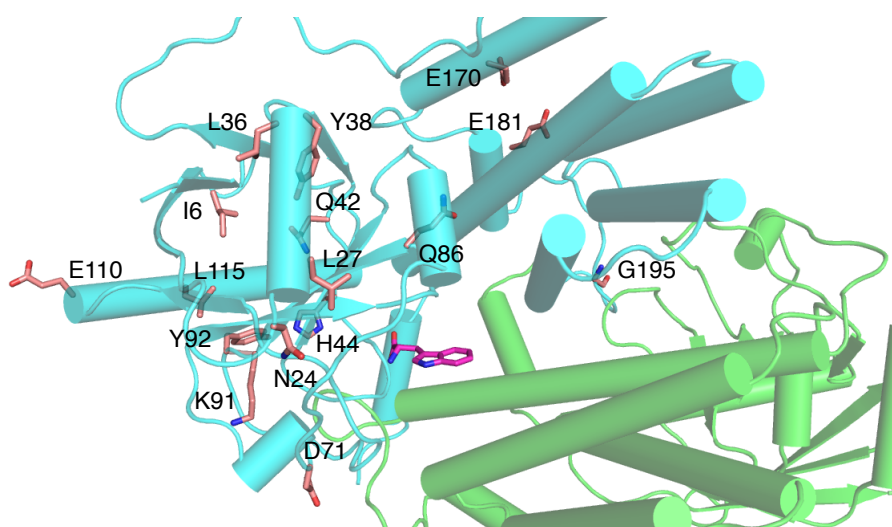


Figure 2. 37. 先行研究において提唱された酵素活性に重要な残基

2.4.6. 基質との結合様式 ~L-tryptophan との結合様式~

活性部位の詳細な解析の結果、McbB の全体構造は植物の Pictet-Spengler 反応触媒酵素とは全く異なっているにも関わらず、McbB と L-tryptophan の結合様式は STR1 と tryptamine の結合様式によく似ていることが判明した。Ser48、Glu97 の側鎖が L-tryptophan のアミノ基部分から 2.6 Å、3.6 Å の距離に位置し、水素結合を形成していた (Figure 2. 38A)。STR1 の場合、活性中心の Glu309 と Phe307 主鎖のカルボニル酸素が tryptamine のアミノ基と水素結合を形成している (Figure 2. 38B)。

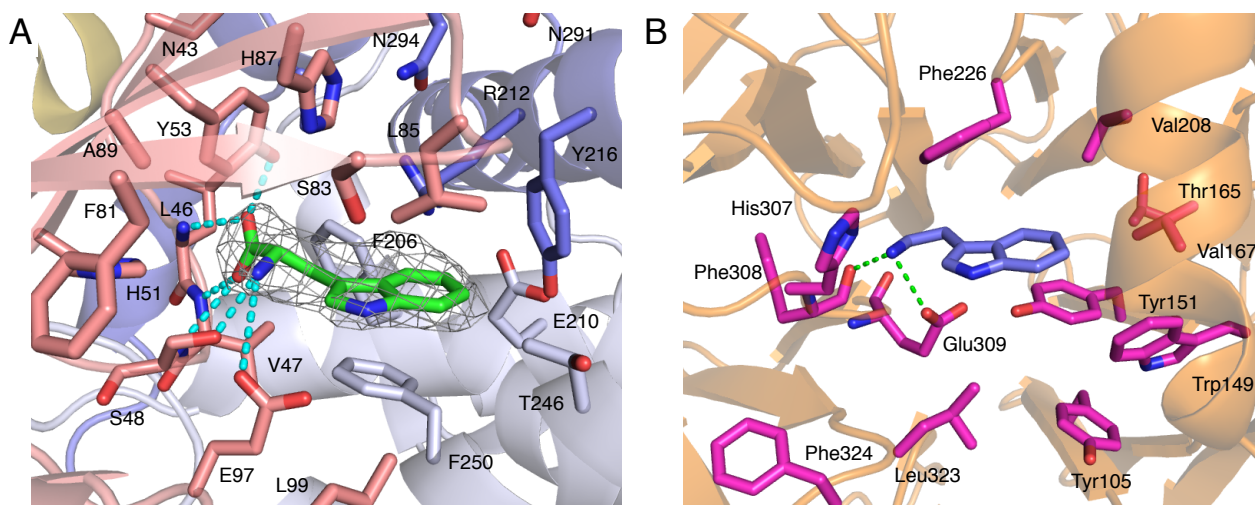


Figure 2. 38. McbB と STR1 の活性部位比較

A: McbB 活性部位

B: STR1 活性部位

また、Tyr53 のヒドロキシル基、Leu46 と Val47 の間のアミドプロトンが L-tryptophan のカルボン酸部分と水素結合を形成し、ここを認識していた（それぞれ 2.7 Å, 3.2 Å）。特に Tyr53 のヒドロキシル基は L-tryptophan の C α の α -プロトンの方向へ突き出しており、ここに立体障害が生じることで L-体と D-体を認識していることが考えられる。さらに、インドール環と Leu85、もう 1 つのモノマーからの Phe250 との疎水性相互作用と π - π 相互作用がみられ、インドール環を挟み込む“インドールサンドイッチ”を形成し、L-tryptophan の配向を強固に固定していた（Figure 2. 38A）。この“インドールサンドイッチ”は STR1 にも見られ、Tyr151 と Phe226 が tryptamine のインドール環と π - π 相互作用により挟み込んでいる⁴⁸（Figure 2. 38B）。

これらの残基の重要性を検証するため、それぞれの残基に変異を導入し、その酵素活性に対する役割を解析した。まず、推定活性中心残基である Glu97 を Ala に置換した結果、E97A 変異体では **8** とその脱炭酸物 **9** の生成が完全に消失することが判明した。また、S48A、S48V 変異体では、活性が劇的に低下した一方で、S48T は野生型と同程度の活性を維持していた。Tyr53 を Ala や Phe に変異したところ、どちらも完全に活性を消失した。さらに、Phe250 を Ala、Tyr、Trp に置換した場合、F250A 変異体では活性が消失したのに対し、F250Y、F250W では活性を維持していた（Figure 2. 39）。

さらに、これらの重要残基に加え、Phe206 の芳香環や Glu210 の側鎖のカルボン酸、

Tyr216 の水酸基が基質の L-tryptophan のインドール環の C-4 位、C-5 位、C-6 位部分とそれぞれ 3.9 Å、3.4 Å、3.1 Å の距離に位置し、L-tryptophan が活性部位の適切な位置に結合できるようにしていると考えられる (Figure 2. 38A)。このようなインドール環の C-5 位と C-6 位と活性部位構成残基との立体障害、静電的相互作用が、5-methyl-DL-tryptophan、7-methyl-DL-tryptophan、5-fluoro-DL-tryptophan を基質として受け入れ可能な一方で、5-hydroxy-L-tryptophan、5-methoxy-DL-tryptophan、5-nitro-DL-tryptophan、6-methyl-DL-tryptophan は受け入れられないという *in vitro* 酵素反応で見られた、基質特異性の要因となっていることが判明した。同様な基質認識機構は STR1 でも見られ、こちらの場合では Trp149、Val167、Val208 の 3 つの疎水性残基が基質である tryptamine やその誘導体の C-5 位、C-6 位に隣接し基質特異性を制御していることが示唆されている⁴⁸ (Figure 2. 38B)。

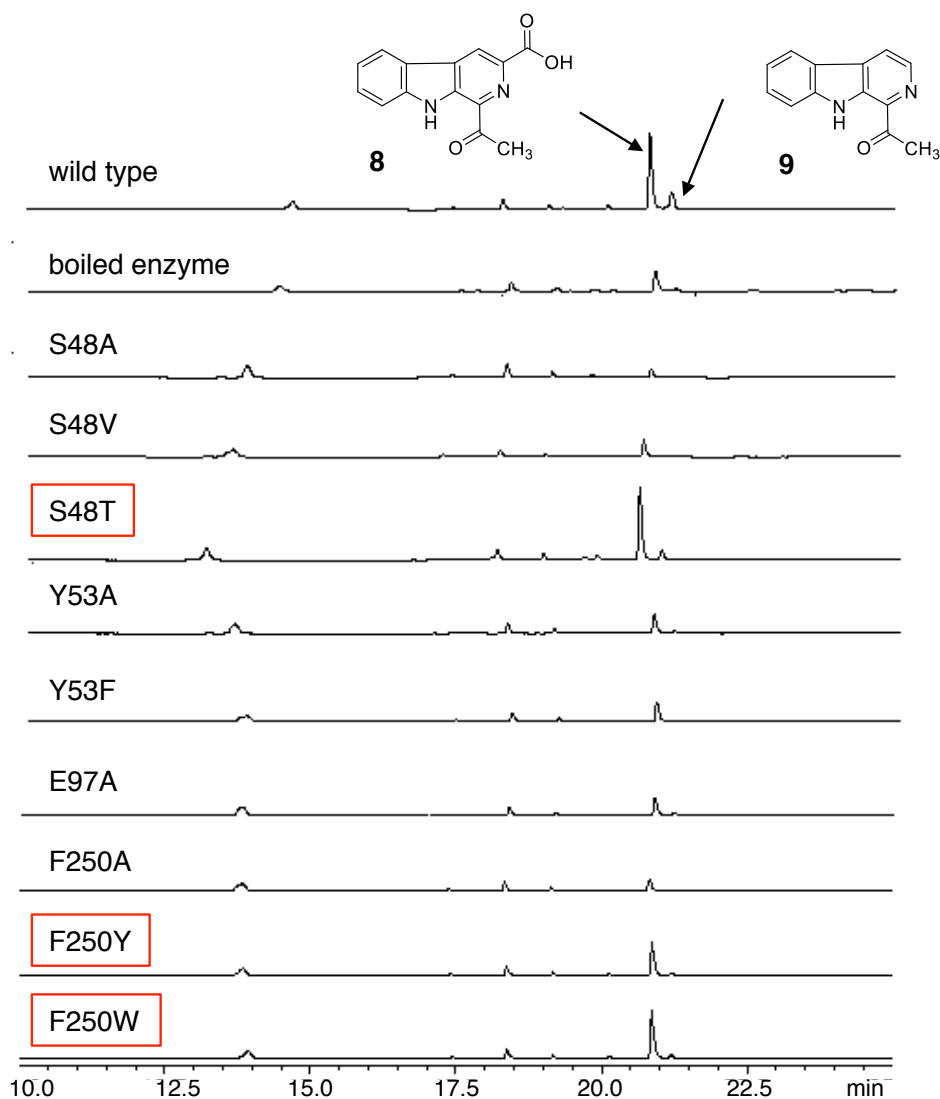


Figure 2. 39. McbB の変異体解析

2.4.7. 基質との結合様式 ~aldehyde との結合様式~

上述したように、*in vitro* の解析から McbB はアルデヒド化合物に対しては比較的寛容な基質特異性を示した。このような基質特異性がどのような要因から現れるのか、さらには、McbB とアルデヒド化合物との結合様式、反応メカニズムを解明する為、McbB-tryptophan-oxaloacetaldehyde の三者結合モデルの構築と、そのモデルから類推される重要アミノ酸残基への変異導入実験を行った。

McbB-tryptophan-oxaloacetaldehyde の三者結合モデルから、oxaloacetaldehyde のアルデヒドカルボニルが L-tryptophan のアミノ基、Ser48、His51、Arg72、Glu97 の近傍に位置し、水素結合を形成出来る距離に存在することが予想された（それぞれ 3.5 Å、3.5 Å、3.1 Å、3.7 Å）。また、oxaloacetaldehyde の α -ケト基は Ser83（3.5 Å）、と His87（3.3 Å）の側鎖近傍に位置することが予想された（Figure 2. 40）。

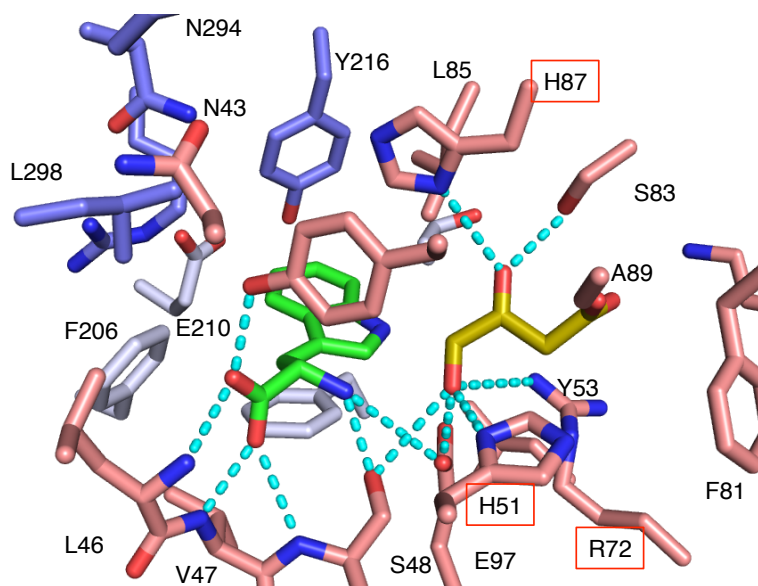


Figure 2. 40. McbB と oxaloacetaldehyde のドッキングモデル

Pictet-spengler 反応の前半の imine を形成する反応においては、まず、アミンがアルデヒドに求核攻撃した後に、carbinolamine 中間体を生成し、その後に脱水反応が進行することで imine を形成する（Figure 2. 41）。NCS においては、dopamine のアミノ基が 4-hydroxybenzaldehyde のアルデヒドに求核攻撃し、生じた carbinolamine に塩基性アミノ酸残基 Lys122 がプロトンを供与することで脱水反応を促進し、イミニウムイオンを形成する。同様に、McbB においても活性部位構成残基であり、アルデヒド基質近傍に

位置する塩基性アミノ酸残基 His51、Arg72、His87 はプロトン供与体として反応中重要な役割を担っている可能性が考えられる (Figure 2. 40)。

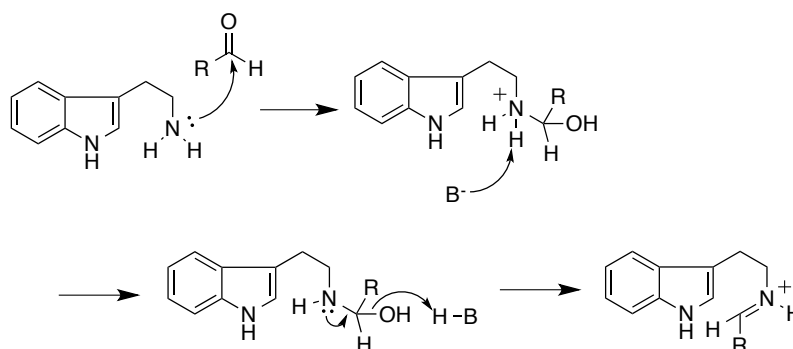


Figure 2. 41. Pictet-Spengler 反応-イミンの形成

そこで、これら 3 種類の塩基性アミノ酸残基に変異を導入しその酵素活性に対する役割を検討した。酵素反応の結果、全ての変異体において活性を維持していた為、これらの塩基性残基は活性に必須ではないことが判明した (Figure 2. 42)。H51A 変異体は野生型と同程度の活性を維持し、R72A 変異体では活性が上昇したが、H87A 変異体や R72A/H87A 二重変異体では活性が低下した。キネティクス解析の結果、R72A 変異体は L-tryptophan に対して $K_M = 5.1 \mu\text{M}$ 、methylglyoxal に対して $K_M = 428.4 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}} = 5.7 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ を示した。一方 H87A 変異体は L-tryptophan に対して $K_M = 573.1 \mu\text{M}$ 、methylglyoxal に対して $K_M = 737.6 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}} = 8.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ を示した。R72A/H87A 変異体は、L-tryptophan に対して $K_M = 197.8 \mu\text{M}$ 、methylglyoxal に対して $K_M = 738.9$ 、 $k_{\text{cat}} = 6.7 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ の値を示した。このように、R72A 変異体は約 20 倍、 β -carboline 骨格形成活性の k_{cat}/K_M が上昇したが、一方 H87A、R72A/H87A 二重変異体では 1/7、1/1.6 に活性が低下した (Table 2.2)。

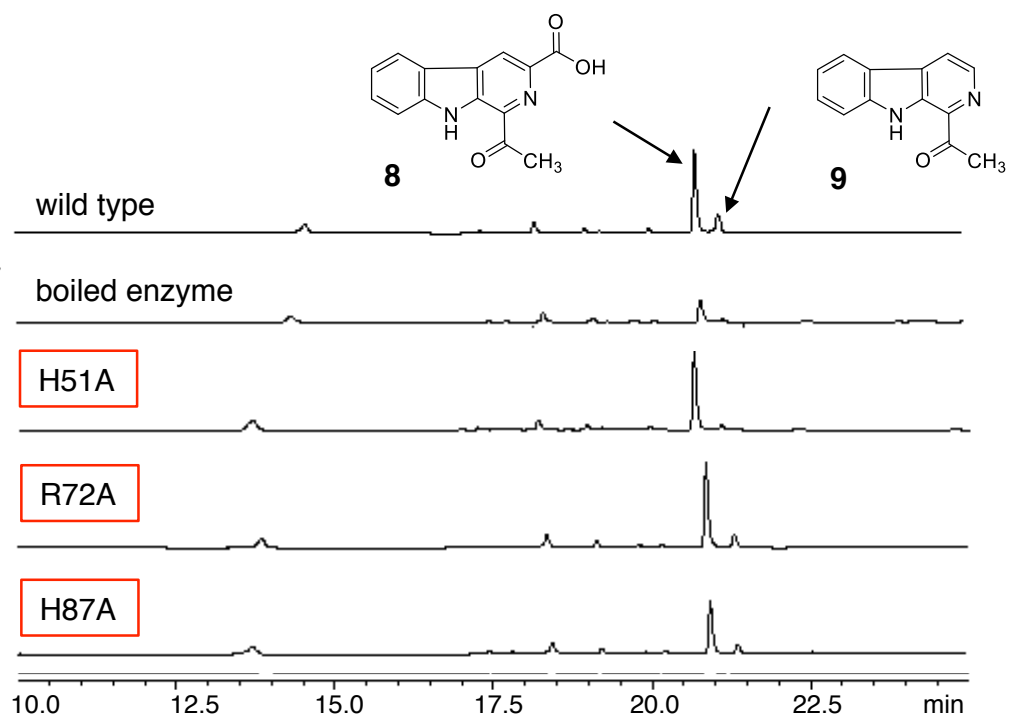


Figure 2. 42. 塩基性残基の変異体解析

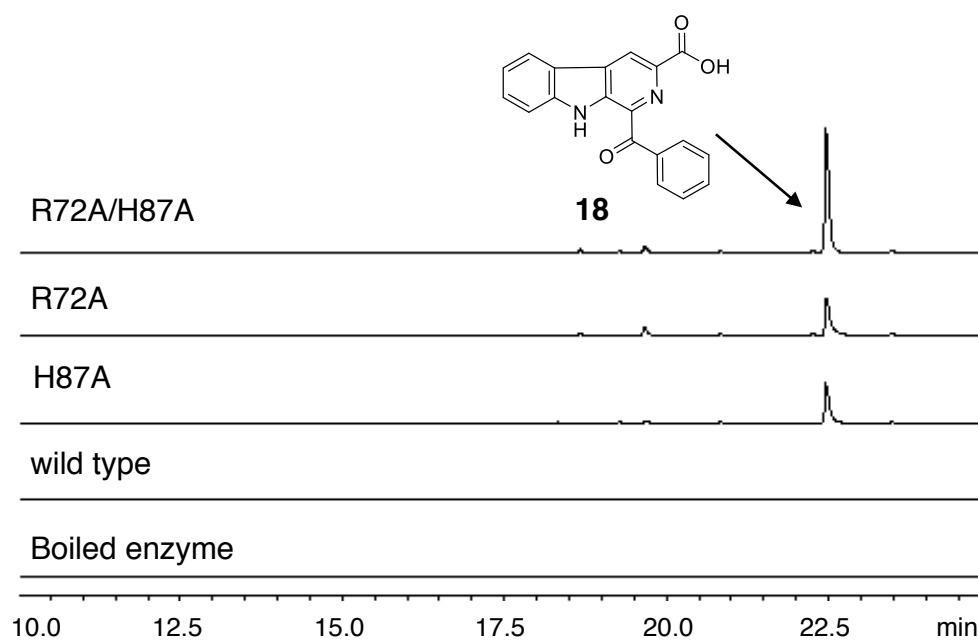


Figure 2. 43. phenylglyoxal を用いた時の酵素反応生成物

以上より、Arg72 と His87 は活性に必須ではないことが判明したが、これらの残基は活性部位の入口に位置しており、R72A 変異体、H87A 変異体では嵩高いアミノ酸残基側鎖がなくなったことで活性部位入口面積が拡大していることが考えられた。さらに、活性部位入口面積に拡大により McbB の基質特異性、特に、活性部位の入口付近に結合し、上述の変異体でアルデヒド化合物に対する親和性が低下していることから、アルデヒド化合物に対する基質特異性が変化することが考えられた。この仮説を検証すべく、野生型では受け入れられなかった、嵩高い側鎖を有する phenylglyoxal を基質として酵素反応を行った。その結果、興味深いことに、R72A、H87A 両変異体共に phenylglyoxal を受け入れ、新たに 1-benzoyl-3-carboxy- β -carboline (**18**) を生成した (Figure 2. 42)。R72A/H87A 二重変異体においては X の生成量が増大したことから活性部位入口の面積がアルデヒド化合物の基質特異性に大きな影響を及ぼしていることが示唆された。

2.5. 考察

本研究では *in vitro* の機能解析から、*M. thermotolerans* McbB が実際に L-tryptophan と oxaloacetaldehyde、もしくは methylglyoxal をアルデヒド基質に Pictet-spengler 反応を触媒し、 β -carboline 骨格を形成することを証明した。また、結晶構造解析、結晶構造を鋳型とした変異導入実験から Glu97 と共に Ser48 も活性中心である可能性が示唆されたが、ホモログ酵素とアミノ酸配列を比較したところ Glu97 はホモログ酵素全てに保存されていたのに対し、Ser48 は一部にしか保存されていなかったことから、活性中心は Glu97 のみであると考えられる。さらに、基質と活性部位構成残基との水素結合、疎水性相互作用が基質の結合に重要であり、酵素の基質特異性を決定していることを明らかとした。

結晶構造から、Arg72 は活性キャビティに突き出し、入口面積を狭めていることが予想された。嵩高い Arg を小さい Ala へと置換した R72A 変異体において基質入口が拡大したことで、基質の結合が容易になり酵素反応の回転率も促進されたため、野生型に対比して 20 倍以上も活性が上昇したと考察する。一方、His87 の側鎖も Arg72 同様、活性部位入口面積の縮小に関与しているものの、H87A 変異体においては His のイミダゾール環がなくなったことですぐ隣に位置する Tyr53 の側鎖が動けるようになり、基質の L-tryptophan との相互作用が弱まることで基質との親和性が低下し、活性が減少したと考えられる。以上の変異体解析の結果は、活性部位の塩基性アミノ酸残基は酸-塩基触媒として働いていないものの、Arg72 と His87 は基質結合部位の形状と容積を制御していることを明確に示し、野生型において嵩高い phenylglyoxal や benzaldehyde を受け入れられないことを説明する結果である。実際、R72A、H87A、R72A/H87A 変異体のモデルを作成したところ、これらの変異体では活性部位入口の面積が拡大し、本来の生理的な基質ではない phenylglyoxal を基質として受け入れるのに十分な空間が作られていることが示唆された (Figure 2. 44)。このように基質結合部位に正電荷を帯びたプロトン供与体となり得る残基が存在しないことから、植物の Pictet-Spengler 触媒酵素 STR1 同様、活性中心の Glu97 が酸触媒としてだけでなく、塩基触媒としても McbB の酵素反応中に働いていると考えられる。

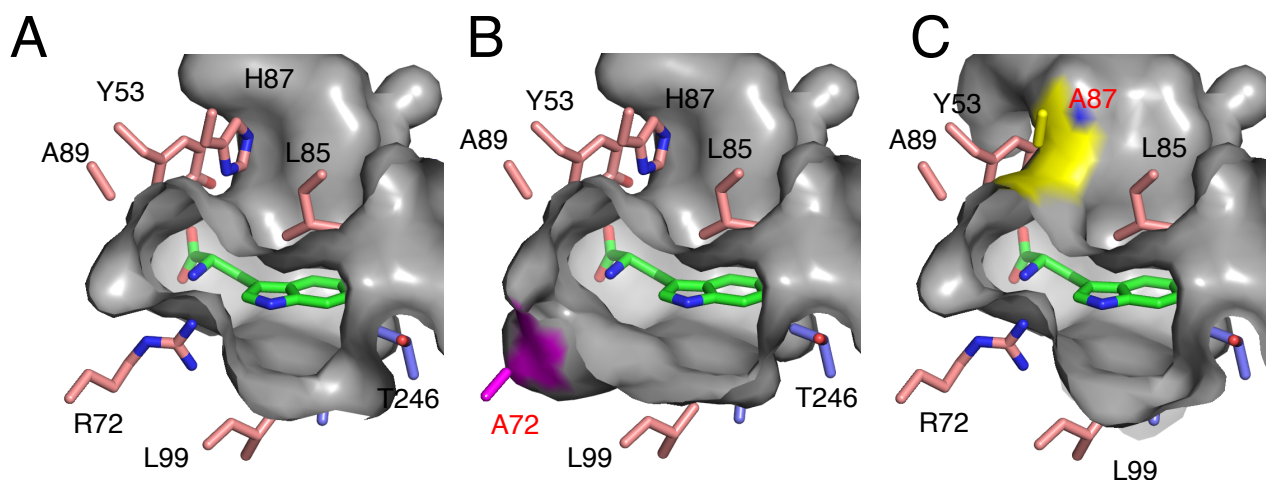


Figure 2. 43. 野生型と変異体の活性部位入口構造の比較

A: McbB 野生型結晶構造

B: R72A 変異体モデル構造

C: H87A 変異体モデル構造

先に述べたように、McbB は多機能酵素として報告され、Pictet-Spengler だけでなく C-3 位の脱炭酸反応や tetrahydro- β -carboline 骨格の酸化による芳香化をも触媒すると提唱されている。実際、*in vitro* における酵素反応中に中間体として考えられる tetrahydro- β -carboline 化合物 (**8a**)、dihydro- β -carboline 化合物 (**8b**) やその脱炭酸化合物 (**9a**) は MS レベルでも見出されなかった。また、結晶構造や変異体解析の結果から、脱炭酸反応や酸化反応を促進させると考えられる酸性、塩基性アミノ酸残基は存在しなかった。さらに、L-tryptophan と oxaloacetaldehyde からリン酸カリウムバッファー pH 7.0、非酵素存在下においても、**8a**、**8b**、**9a** の検出なしに少量の **8**、**9** が生成した。この結果は、過去の Nemet らの報告でも L-tryptophan と methylglyoxal から種々の pH、温度条件において **8**、**9** を化学合成した際 **8a**、**8b**、**9a** が検出されなかった結果と合致している⁶⁸。以上より、L-tryptophan と oxaloacetaldehyde から Pictet-Spengler 反応により tetrahydro- β -carboline 中間体 (**8a**) が生成した後に、還元余因子無しに速やかな自発的酸化による芳香化、及び脱炭酸反応が進行し β -carboline 化合物 **8**、**9** が生成すると考察する (Figure 2. 44)。 α -ケト構造を持たない formaldehyde、acetaldehyde、propanal、isobutyraldehyde を用いた際に酸化反応が進行した dihydro- β -carboline 化合物や β -carboline 化合物は検出されなかったことから、 α -ケト基の電子の引きが自発的な酸化に重要であると考えられる。

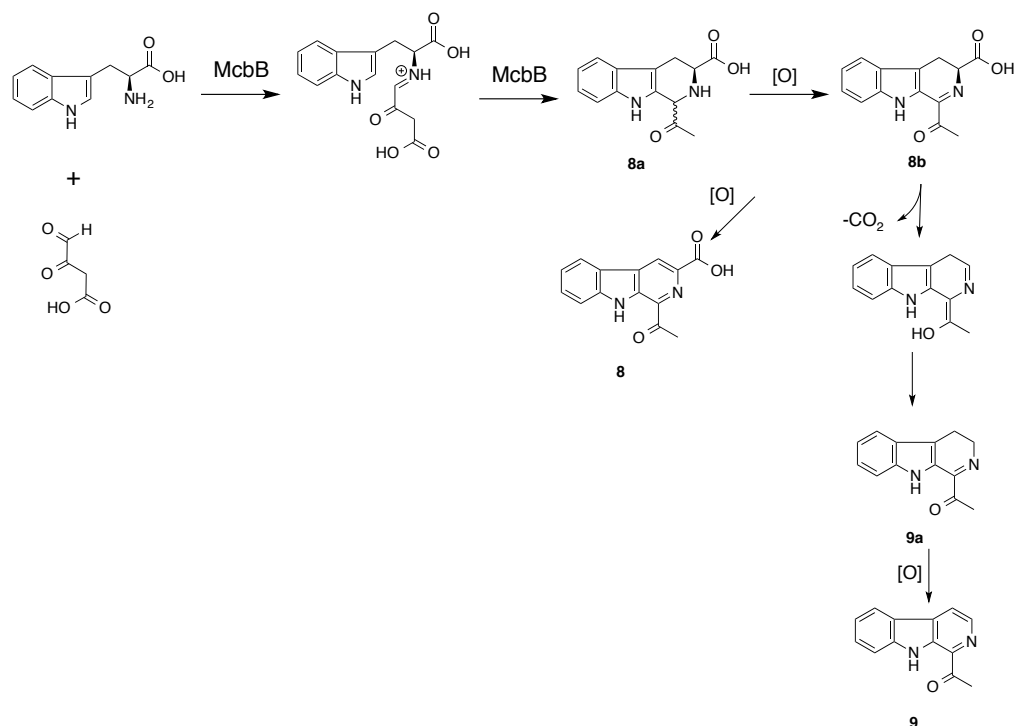


Figure 2. 44. 化合物 8、9 生成の推定反応経路

以上の結果から、McbB の反応は全くアミノ酸配列や立体構造に相同性がないにもかかわらず、STR の反応メカニズムと類似していることが示唆される (Figure 2. 45)。

まず、基質である L-tryptophan と oxaloacetaldehyde が活性部位に取り込まれ、負電荷を帯びた Glu97 が L-tryptophan のアミノ基のプロトンを引き抜き、酵素反応が開始する (Figure 2. 45A)。活性化されたアミンから oxaloacetaldehyde のアルデヒド炭素への求核攻撃により carbinolamine 中間体が生成し、そのヒドロキシル基の脱水反応が進行することで iminium cation が生成する (Figure 2. 45B)。この時、プロトン化されている Glu97 のカルボキシル基が酸触媒としてプロトンを供与し、脱水反応を促進していると考えられる。次いで、インドール環の C-2 炭素からの求核付加反応により 6-endo-trig 環化が進行し、芳香性を失いながら 6-5-6 の縮環構造を形成する (Figure 2. 45C)。再度負電荷を帯びた Glu97 が塩基触媒として C-2 位のプロトンを引き抜き芳香性が回復し、tetrahydro-β-carboline 骨格が生成する (Figure 2. 45D)。その後速やかに、tetrahydro-β-carboline 骨格の C 環 C-1 位のアセトアセチル部位の脱炭酸反応、C 環の酸化による芳香化、C-3 位の脱炭酸反応が進行し、最終産物 **8**、**9** が生成すると提唱する (Figure 2. 45E、F)。

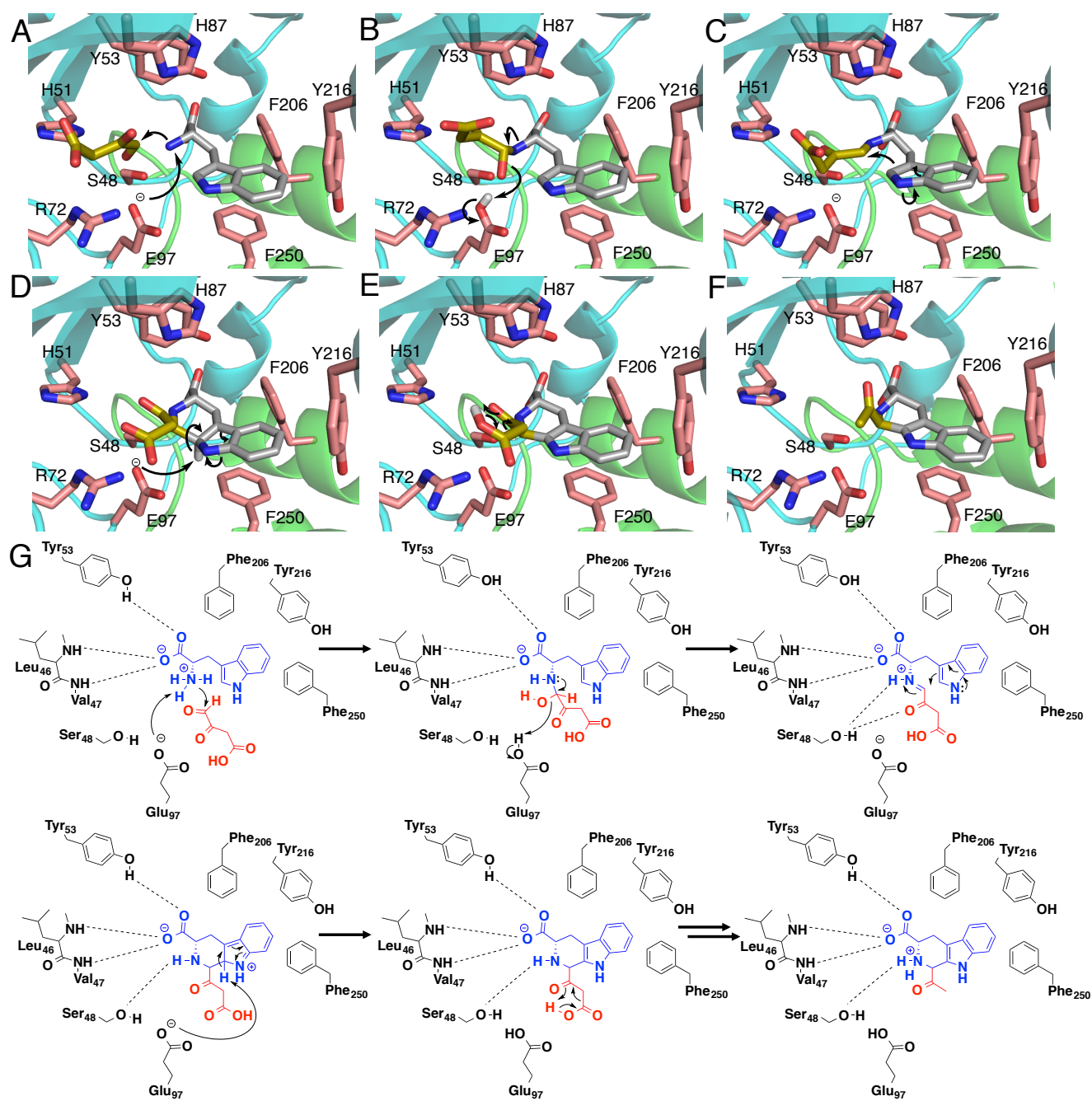


Figure 2.45. McbB の推定触媒反応経路

アルデヒド基質として acetaldehyde、propanal、isobutyraldehyde を用いた場合 McbB は(1*R*, 3*S*)-tetrahydro-β-carbolins を主生成物として生産し、酸性条件中の合成反応における主生成物(1*S*, 3*S*)-tetrahydro-β-carbolins とは異なる立体選択性を示した。C-3 位の偽アキシャルに出るプロトンと C-1 位のアルキル鎖との立体障害により非酵素的には(1*S*, 3*S*)-tetrahydro-β-carbolins が優先して生成すると考えられる (Figure 2. 46)。

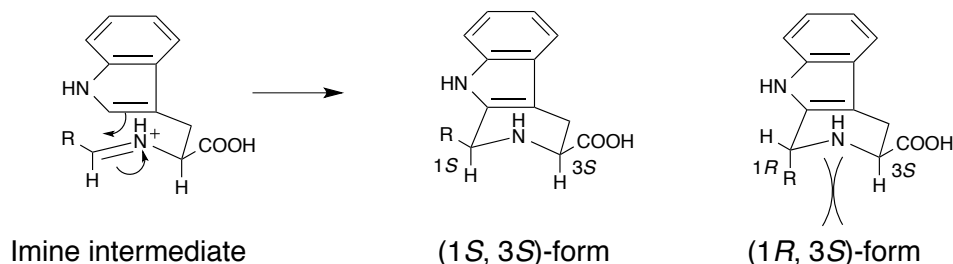


Figure 2. 46. (1*S*, 3*S*)体と(1*R*, 3*S*)体の比較

一方で、McbB の結晶構造においては、Glu97 と Ser48 が活性部位の底面を構築しており、C-1 位のアルキル鎖との間で立体障害が生じることが示唆された。しかし、Glu97、Ser48 の反対側には基質が結合出来るだけの空間が存在していることから、McbB の酵素反応においては(1*R*, 3*S*)-tetrahydro-β-carbolins を主生成物として生成すると考えられる。この結果は McbB が Pictet-Spengler 反応を触媒し、C-C 結合を形成する際の立体を制御していることを示している。また、McbB の立体選択性は(*S*)-strictosidine を生産する STR1 や (*S*)-norcoclaurine を生産する NCS とは異なっていた。これは活性部位、特にアルデヒド化合物の結合部位の構造が大きく異なることによるものと考えられる。

本研究において McbB の機能解析から、これまでに知見の少なかった細菌での β-carboline 生合成酵素の酵素的性質が明らかになった。McbB は植物由来の β-carboline 合成酵素と相同性を有さないが、放線菌、グラム陰性細菌、糸状菌等のタンパク質に高い相同性を有している (Figure 2. 47、48)。特に興味深いことに *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Penicillium rubens* 等の糸状菌にも McbB と 35%, 41%, 42%の相同性を示すタンパク質が存在し、活性部位である Glu 残基やその他のアミノ酸も保存されていることが判明した。最近 *Chaetomium globosum* という糸状菌の 1 種において、1-methyl-L-tryptophan を添加することで Pictet-Spengler 反応触媒酵素遺伝子の発現 (McbB との identity 20%) を活性化し、β-carboline 化合物の生産を誘導することが報告された⁵³。しかし、酵素機能解析は未だ行われておらず、糸状菌における Pictet-Spengler 反応触媒酵素は未知な部分が多く残っている。

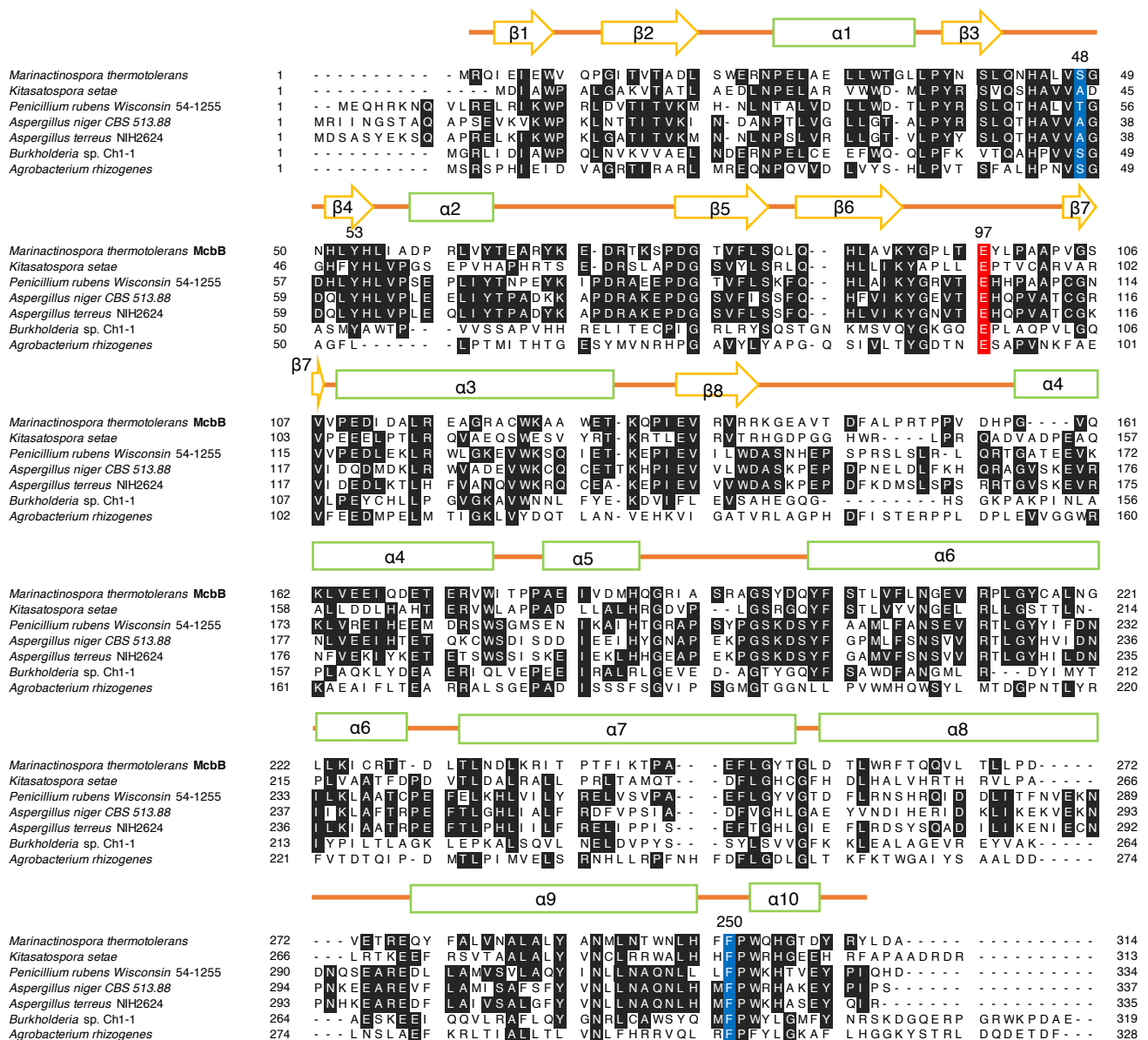


Figure 2. 47. McbB とホモログ酵素のアライメント比較

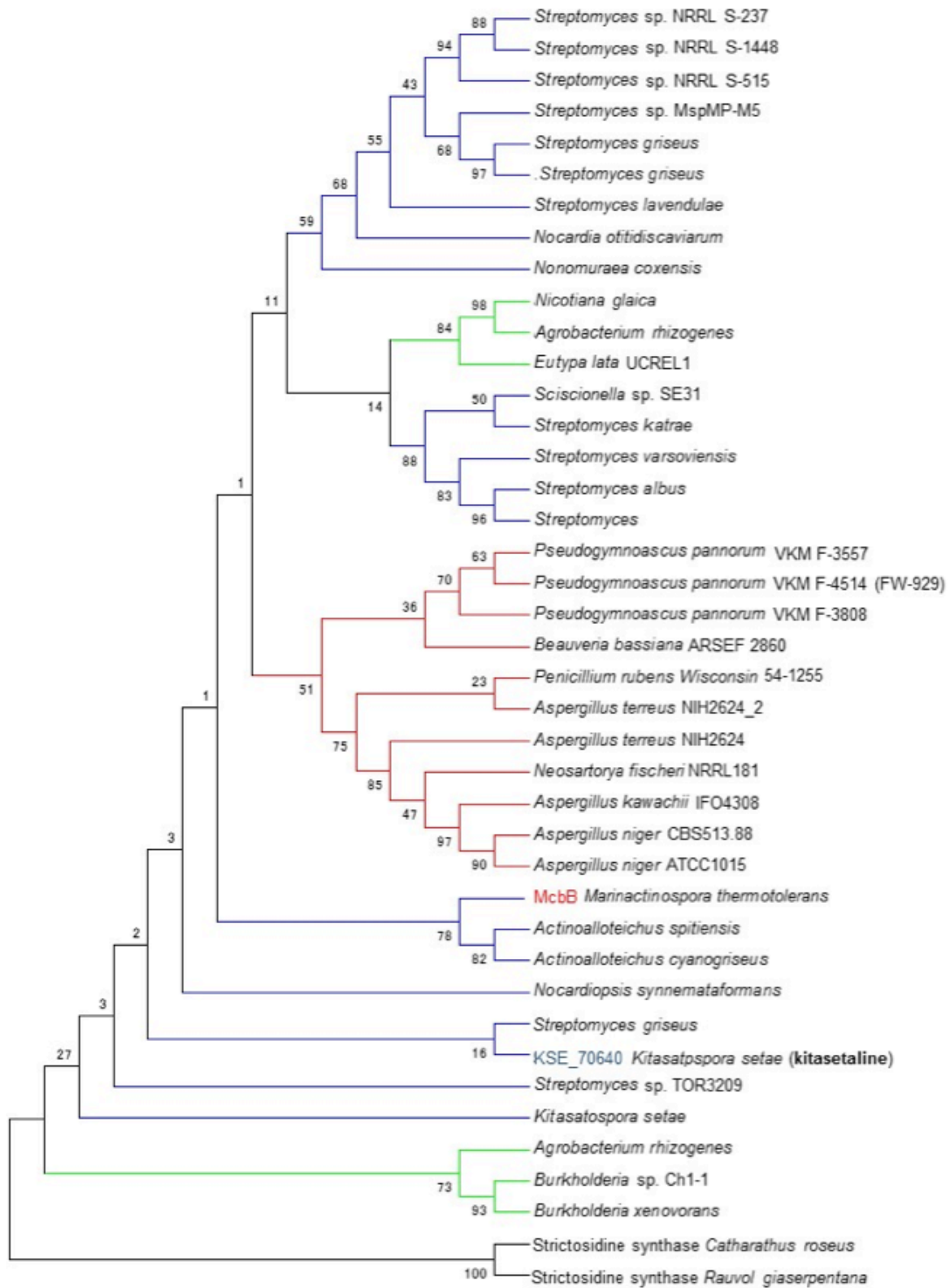


Figure 2. 48. McbB とそのホモログ酵素との系統樹解析

赤: 糸状菌 青: 放線菌 緑: グラム陰性菌

また、糸状菌に存在する繰り返し型の non-reducing type I polyketide synthase (NR-PKS) の中にはアルデヒド化合物を形成するものがあると知られており、このタイプの NR-PKS 産物が糸状菌由来の McbB 類似酵素により基質として受け入れられ、tryptophan もしくは tryptamine 誘導体から β -carboline 化合物を生産していることも期待される。実際、*A. terreus* 内に存在する McbB ホモログ酵素 ATEG06202 (identity 41%) の周辺にも NR-PKS と思われる遺伝子を発見した (Figure 2. 49)。詳しい解析の結果、アルデヒド化合物を形成する PKS に特異的な reductase (還元) ドメインが PKS の末端に存在しており、この PKS 産物はアルデヒド化合物であることが予想される。ATEG06202 はこのアルデヒド化合物を基質として用い、 β -carboline 構造を有する新たな化合物を生産する可能性があり、この酵素についてさらなる研究が行っていきたいと考えている。

抗癌活性、抗マラリア活性を示す β -carboline 化合物である manzamine 類は海洋に生息する海綿からの単離が報告されているものの、その生合成遺伝子は見つかっていない。しかし近年、海綿由来の化合物の多くは海綿共生微生物によって生産されていることが明らかになりつつあり^{69,70}、manzamine 類も同様に共生微生物が生産している可能性は十分考えられる。微生物、特にアグロバクテリウムなどの一部のグラム陰性菌や放線菌は、McbB と相同性を有するタンパク質を多数保持している。これらの菌体中では McbB の類似酵素によって β -carboline 骨格形成行われていることが推測される。そこで今後は、McbB、ホモログ遺伝子を元に高度に保存されている配列部分を用いて縮重プライマーを設計し、海綿共生微生物から McbB ホモログを含む有用 β -carboline 化合物の生合成遺伝子群の探索も行っていきたいと考えている。

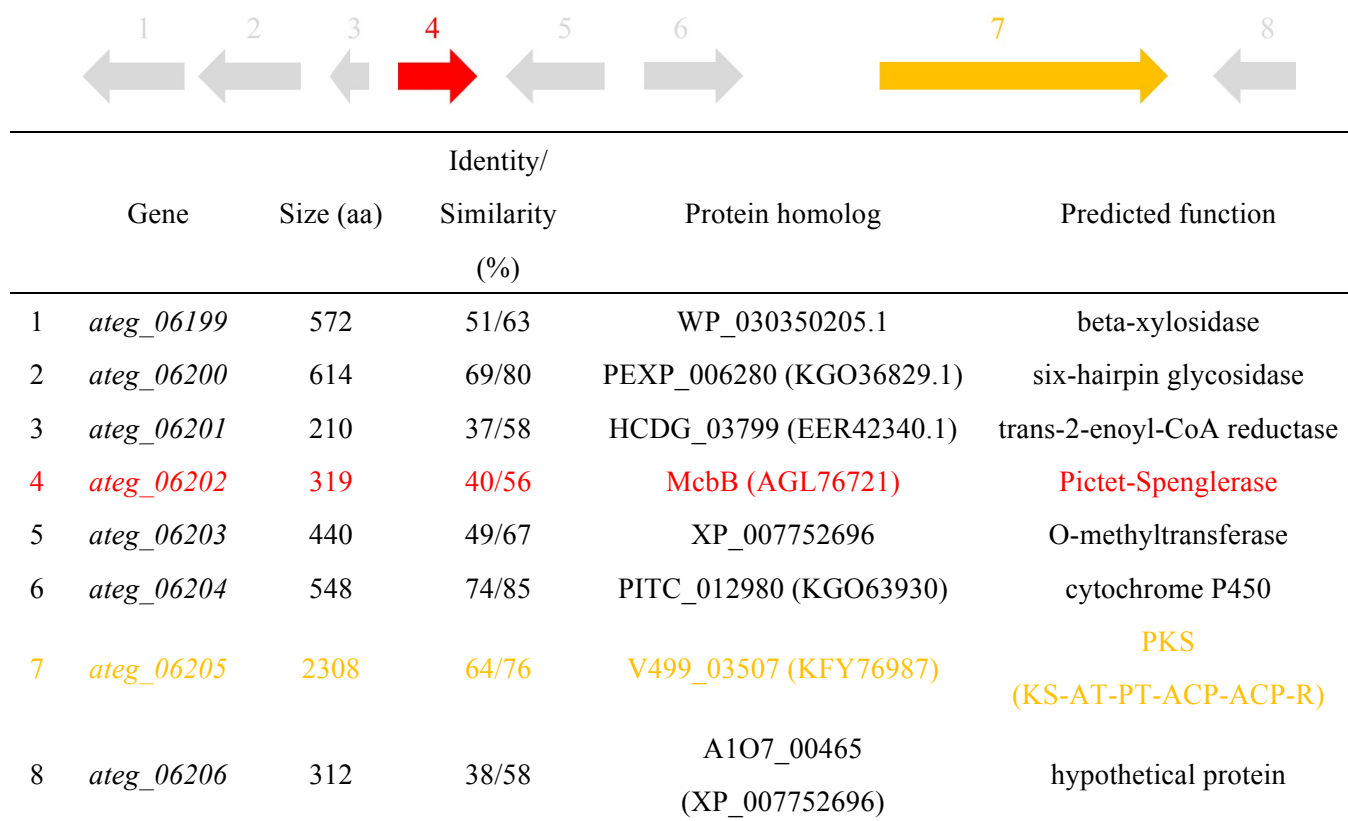


Figure 2. 49. *A. terreus* 内に存在する McbB ホモログ酵素 ATEG06202 の周辺遺伝子

総括

二次代謝産物の中でも大きなグループを形成するアルカロイド化合物の多くは多様な生物活性を示し、医薬品資源としても重要な化合物群である。実際、これまでに鎮痛剤モルヒネを初めとして多くのアルカロイド化合物が医薬品として上市している。

本研究では、植物、微生物の二次代謝産物産生、特にアルカロイド産生に関与する酵素の機能解析、構造解析を行った。

第1章では、*C. microcarpa* QNS、ACSのX線結晶構造解析から、両酵素において活性部位入口の拡大により、嵩高い開始基質である*N*-methylantraniloyl- CoAを受け入れることが可能となり、活性部位の容積がその後の伸長鎖数を制御していることが判明した。

Anthranilate 由来の quinolone、acridone アルカロイド骨格形成の分子基盤を明らかにしたのは本研究が初めての報告であり、今後、結晶構造を基盤とした変異導入により、医薬品リード化合物となりうる新規有用物質の生産を可能とする合理的な機能改変酵素の創出が期待される。

第2章においては、これまで報告例の少ない微生物由来の β -carboline 生合成に関与する酵素 McbB が Pictet-Spengler 反応を触媒する事を *in vitro* で証明した。また、X線結晶構造解析により、McbB の立体構造および、Pictet-Spengler 反応触媒機構の解明、さらには、結晶構造を鋳型とした変異導入により、基質特異性の拡張した機能改変酵素の創出に成功した。今後、McbB と同様の活性残基を有するホモログ酵素を解析することで、植物以外の Pictet-Spengler 反応触媒酵素の機能解析が進展すると期待される。また、ホモログ酵素とのアミノ酸保存領域を元にした縮重プライマーを用いることで、有望な活性を有する β -carboline アルカロイドの遺伝子クラスターの同定が可能になると考える。

酵素の詳細な機能解析から、分子レベルで反応メカニズムを理解することで、二次代謝酵素の触媒機能のさらなる拡張と、新規活性を有する有用酵素の創出への展開が期待される。今後は、タンパク工学や進化分子工学の手法を用いた酵素機能の最適化により、実用に供する物質生産系の構築へと進めていきたいと考えている。

実験項

溶媒

Acetonitrile (Wako、HPLC 用)

Chloroform (Wako、試薬一級)

Chloroform-d, 99.8%(0.05% v/v% TMS 含有) (Wako)

DMSO-d₆, (Wako)

Ethyl acetate (Wako、試薬一級)

Methanol (Wako、試薬一級)

試薬

Acetaldehyde (Wako)

40 (w/v)%-acrylamide/bis 混合液 (29:1) (nacalai tesque)

Alkaline Phosphatase (Shrimp) (TaKaRa)

Alkaline Phosphatase (Shrimp) (TaKaRa)

Ampicillin (nacalai tesque)

3.5 M Ammonium sulfate (Hampton Research)

Benzaldehyde (Wako)

BLR (DE3) (Novagen)

Coenzyme A Trisodium Salt (Wako)

D-Tryptophan (Wako)

Dithiothreitol (DTT) (nacalai tesque)

DNA ligation: DNA Ligation Kit Ver.2.1 (TaKaRa)

DNA Ladder 1 kb (New England Biolabs)

DNA purification: Wizard® SV Gel and Clean-Up System (Promega)

Formaldehyde (Wako)

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (同人化学)

1M HEPES (pH7.5、結晶化用) (Hampton Research)

His-accept (nacalai tesque)

Imidazole (Wako、試薬特級)

Isobutyraldehyde (Wako)

Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (nacalai tesque)

Kanamycin (Wako)

α-Ketoglutaric acid (Wako)

LB agar medium: LB Agar, Miller (nacalai tesque)

LB liquid medium: LB Broth, Miller (nacalai tesque)
[2-¹⁴C] Malonyl-CoA (55 mCi/mmol) (Moravsek Biochemicals (Brea, CA))
Malonyl-CoA (Sigma-Aldrich)
2-Mercaptoethanol (Wako)
Methylglyoxal (Sigma-Aldrich)
5-Methoxy-DL-tryptophan (Wako)
5-Methyl-DL-tryptophan (Wako)
6-Methyl-DL-tryptophan (Wako)
7-Methyl-DL-tryptophan (Wako)
 α -Methyl-DL-tryptophan (Sigma-Aldrich)
Nde I (TaKaRa)
5-Nitro-DL-tryptophan (Wako)
Nova Blue (Novagen)
Oxaloacetate (Wako)
50% PEG1000 (Hampton Research)
50% PEG3350 (Hampton Research)
pET28a(+) (Novagen)
Phenylglyoxal (Sigma-Aldrich)
Plasmid DNA preparation from *E. coli*: Wizard® Plus Minipreps (Promega)
pQE80L (QIAGEN)
PrimeStar HS polymerase (TaKaRa)
1-propanol (Wako)
Propanal (Wako)
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (nacalai tesque)
Tetracycline (nacalai tesque)
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (nacalai tesque)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (nacalai tesque)
1M Tris (pH8.5、結晶化用) (Hampton Research)
Tryptamine (Wako)
L-Tryptophan (Wako)
L-Tryptophanamide (東京化成)
L-Tryptophanol (東京化成)
Xho I (TaKaRa)

共通実験項

・ SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

- 試薬の調製

分離ゲル (10 ml)

40% アクリルアミド/ビス	2.5 ml
1.5 M Tris-HCl pH8.8	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	5 μ l
精製水	4.9 ml

濃縮ゲル (5 ml)

40% アクリルアミド/ビス	1.75 ml
0.5 M Tris-HCl pH6.8	1.75 ml
10% SDS	0.05 ml
10% APS	0.05 ml
TEMED	10 μ l
精製水	2.45ml

分離ゲルを上記組成で調製し、ウェルに流し込む。上に isopropanol をのせ、空気に触れないようにしてゲルを固めた。

ゲルが固まった後に isopropanol をのぞき、濃縮ゲルを注ぎ込み、コームをさしてウェルを作った。

Protein Molecular Weight Marker (Broad)

調製 (100 μ l)

1M DTT	2 μ l
5x Loading Buffer	20 μ l
Protein MW Marker (Broad)	5 μ l
milliQ	73 μ l

均一に混合した後、100℃で 5 分間加熱処理したものを 5 μ l 用いた。

サンプル

各 10 μ l サンプルに対し、1/5 量の Loading buffer を加え、泳動。

10x 泳動バッファー

Tris	30.3 g
glycine	144 g
SDS	10 g

蒸留水で 1000 ml にした。

- SDS-PAGE 泳動

泳動槽にゲルをセットし、1x 泳動バッファーを槽に満たし、各ウェルにサンプルをアプライした。180 V で泳動を行い、分離ゲルから Dye が流れ出る直前に泳動停止。

- 染色

CBB Stain One（ナカライ）で染色。

・変異体作製

- PCR components

DNA template	1.0 μ l
PrimeStar HS polymerase (2.5U/ml)	0.5 μ l
5x PS buffer	10 μ l
2.5 mM dNTPmix	4.0 μ l
10 mM Sense primer	1.0 μ l
10 mM Reverse primer	1.0 μ l
Sterilized distilled water	33.5 μ l
Total	50 μ l

- PCR condition

96 °C	30 sec	} 18 cycle
96 °C	10 sec	
60 °C	10 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

第1章実験項

- ・大腸菌による酵素タンパク質の取得

- ACS、QS の発現

pQE80L-ACS、pQE80L-QS をそれぞれ *E.coli* M15 株へヒートショック法により形質転換をした。10 ml の LB 培地(100 µg/ml アンピシリン含有)で 37 °C、一晩振盪培養を行った。得られた全培養液を 3 L の LB 培地(100 µg/ml アンピシリン含有)に移し、37 °C で OD₆₀₀ = 0.6 になるまで振盪培養した(4 h)。そこに終濃度 1 mM となるように IPTG を加え、20 °C で一晩誘導発現を行った。

- 抽出

菌体を遠心 (6000 rpm x 15 min) により集め、buffer A (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol) に懸濁し、ソニケーターを用いて大腸菌の細胞を破碎した (15 sec x 8)。破碎後、遠心により上清を分離し、可溶性画分を得た。

- Ni-キレートアフィニティーカラムを用いた精製

得られた可溶性画分より、COSMOGEL® His-Accept に酵素を吸着させ、担体の 10 倍量の buffer A + 5 mM imidazol でカラムを洗浄した。担体の 5 倍量の buffer A + 500 mM imidazole で酵素タンパク質を溶出した。

- 陰イオン交換カラムを用いた精製

溶出したタンパク質溶液を buffer B (50 mM Tris-HCl, 5% glycerol, 1 mM DTT) で 5 倍希釈し、Resource-Q column (GE Healthcare)に供した。精製は buffer C (50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 50 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT) と buffer D (50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1 M NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT) を用いて 0-30% (D%) のグラジエントで行った。SDS-PAGE でタンパク質の溶出した画分を確認し、そのフラクションを集め、5 ml まで濃縮した。

- ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた精製

濃縮したサンプルを Superdex 200HR (10/300GL ; GE Healthcare)にアプライし、buffer E(20 mM Tris-HCl (pH7.0), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT)で溶出させた。SDS-PAGE で溶出画分を確認後、10 mg/ml まで濃縮した。

・ *C. microcarpa* QNS and ACS の酵素反応

開始基質 CoA エステル 54 mmol、malonyl-CoA 108 mmol、20 mg の精製酵素を全量 500 ml になるように 100 mM リン酸カリウムバッファー (pH7.0) に混和し、30 °C、1 時間酵素反応を行った。その後、15 μ l の 20% HCl を加え、反応を終結させた。酵素反応生成物を 500 ml の AcOEt で 3 回抽出し、減圧留去した。得られた残査を逆相 HPLC (SHIMADZU) で解析した (COSMOSIL ® 5C₁₈-MS-II column (4.6 x 250 mm) (Nacalai Tesque), flow rate: 0.8 mL/min. Gradient : H₂O and MeOH, both containing 1% AcOH: 0 (30%) – 5 (30%) – 17 (60%) – 27 (70%) – 35 (70%) – 40 (100%) min (MeOH%). 280 nm)。酵素反応生成物は標品と比較することで同定した。

・ 酵素キネティクスの測定

キネティクスの測定には[2-14C]malonyl-CoA (1.8 mCi/mmol)を用いた。Anthraniloyl-CoA もしくは 4-coumaroyl-CoA (54.9, 27.5, 13.7, 6.8, 3.4 mM)と、108 mM の malonyl-CoA、4.2 mg の精製酵素を混合し、100 mM リン酸カリウムバッファー (pH7.0) に加え、全量を 100 μ l とした。酵素反応は 37°C で 1 時間行い、抽出した酵素反応物を TLC (Merck Art. 1.11798 Silica gel 60 F254; ethyl acetate/hexane/AcOH = 63 : 27 : 5, v/v/v) で分離した。放射活性をバイオイメージングアナライザーBAS-2000II (FUJIFILM)で解析した。GraphPad Prism 6 for Mac OS X (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA.) を用いて K_M と k_{cat} 値を算出した。

・ *C. microcarpa* QNS、ACS の結晶化

結晶化のスクリーニングと最適化は 20°C、蒸気拡散法シットティングドロップ法で行った。スクリーニング溶液は三菱化学オリジナルの 96 種類スクリーニングキットを用いた。*C. microcarpa* QNS もしくは ACS のタンパク質 50 μ l を等量のリザーバー溶液と混ぜ、結晶化を行った。QNS の結晶は 100 mM Tris-HCl (pH 7.0)、18%PEG3350 の条件で 1 日後に得られた。一方、ACS の結晶は 100 mM HEPES-NaOH (pH7.5)、1400 mM 硫酸アンモニウム 塩酸塩、2 mM CoASH の条件で 1 日後に得られた。その後に Additive Screen (Hampton Research)、pH の条件検討を行い、最終的に QNS は 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、18% PEG3350、4% (v/v) 1-propanol の条件で、ACS は 100 mM HEPES-NaOH (pH7.5)、

1400 mM 硫酸アンモニウム塩酸塩、2 mM CoASH、2 mM NiCl₂ の条件で蒸気拡散法シッティングドロップ法で得られた結晶を採用し、X 線回折実験を行った。

QNS の抗凍結剤には 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、18% PEG3350、4% (v/v) 1-propanol、18% glycerol、ACS : 100 mM HEPES-NaOH (pH7.5)、1400 mM 硫酸アンモニウム塩酸塩、2 mM CoASH、20% glycerol を使用し、結晶を抗凍結剤に数秒浸した後にナイロンループで拾い上げ、-173°C の窒素ガス気流下、X 線を照射した。QNS の X 線回折データは Photon Factory BL17A (波長: 0.98000Å) detector には、ADSC Quantum 315 CCD detector を用い、250 mm の距離で振動角 1°、露光 1 秒 で 180 フレームのデータを収集した。

ACS の抗凍結剤には 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、18% PEG3350、4% (v/v) 1-propanol、18% glycerol、ACS : 100 mM HEPES-NaOH (pH7.5)、1400 mM 硫酸アンモニウム塩酸塩、2 mM CoASH、20% glycerol を使用し、結晶を抗凍結剤に数秒浸した後にナイロンループで拾い上げ、-173°C の窒素ガス気流下、X 線を照射した。QNS の X 線回折データは Photon Factory-AR NW-12 (波長: 1.00000Å) detector には、ADSC Quantum 315 CCD detector を用い、150 mm の距離で振動角 1°、露光 1 秒 で 180 フレームのデータを収集した。データ処理は HKL2000 program package⁷¹ を用いた。

・分子置換法による位相決定と最適化

処理したデータの分子置換は ccp4 中の MOLREP^{72,73} を用い、構造は Cool⁷⁴、PHENIX⁷⁵ を用いて最適化した。分子置換の鋳型は、*M. sativa* CHS (PDB code : 1CGK)、を用いた。

C. microcarpa QNS の最終構造にはモノマーA-D に 1-389 残基、2 分子の glycerol、198 の水分子が含まれていた。*C. microcarpa* ACS の最終構造にはモノマーA、B に N 末側に人工的に付加した pQE80L ベクター由来の Histag を含む 11 残基と、1-389 残基、2 分子の CoA-SH、9 分子の nickel、2 分子の SO₄、331 の水分子が含まれていた。最終構造の精度は MolProbity⁷⁶ で確認した。*C. microcarpa* QNS 構造中の 97.1%がラマチャンドランプロットの favor 部分、2.9%が allow 部分に位置した。一方、*C. microcarpa* ACS 構造中の 97.5%がラマチャンドランプロットの favor 部分、2.5%が allow 部分に位置した。

最終構造は Protein Data Bank に登録した (*C. microcarpa* QNS apo structure : Protein Data Bank code 3WD8、*C. microcarpa* ACS CoA-SH complexed structure : PDB code 3WD7)。

立体構造の相同性は Dali program⁷⁷ を用いて解析し、キャビティの容積と活性部位入口の面積は CASTP (<http://cast.engr.uic.edu/cast/>) を用いて計算した。全ての結晶構造図は PyMOL (DeLano Scientific, <http://www.pymol.org>) を用いて作成した。

・変異体酵素の作製

変異体酵素は QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて作製した。
また、PCR 反応には Polymerase として Prime Star (Takara)を用いて行った。

- プライマー

C. microcarpa QNS

Y197A_Fw: GATATCATGAACATGGCTTTTCATGAGCCG

Y197A_Rv: CGGCTCATGAAAAGCCATGTTCATGATATC

C. microcarpa ACS

S132M_Fw: CATCTCATTTTCTGCACAATGGCAGGCGTCGACATGCC

S132M_Rv: GGCATGTCTGACGCCTGCCATTGTGCAGAAAATGAGATG

T194M_Fw: GTTTGCTCTGAGAACATGATCCCCACTTTCCGTG

T194M_Rv: CACGGAAAGTGGGGATCATGTTCTCAGAGCAAAC

T197Y_Fw: GAGAACACAATCCCCTATTTCCGTGGGCCG

T197Y_Rv: CGGCCCCACGGAAATAGGGGATTGTGTTCTC

上記の組成、条件で PCR を行った後に Dpn I 1.0 μ l を添加し、37°C 3hr 処理した。
DH5 α に形質転換し、培養後プラスミド抽出、シーケンス解析を行った。確認後 M15
株に形質転換し、酵素を発現、精製の後に活性試験を行った。

第2章実験項

・化合物情報

1-acetyl-9H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid (8).

LC-ESIMS (positive): Rt=22.6 min. MS, m/z 255.2 $[M+H]^+$, MS/MS (precursor ion at m/z 255.0), m/z 236.6, 226.6. UV: λ_{\max} 285, 373 nm HRMS (ESI): found for $[C_{14}H_9N_2O_3]^-$ 253.06231: calcd. 253.06132.

1-(9H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)ethan-1-one (9).

LC-ESIMS (positive): Rt=25.4 min. MS, m/z 210.9 $[M+H]^+$, MS/MS (precursor ion at m/z 210.8), m/z 192.6, 184.5, 168.6. UV: λ_{\max} 283, 307 nm HRMS (ESI): found for $[C_{13}H_9N_2O]^-$ 209.07157: calcd. 209.07149.

1-acetyl-6-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid (10).

LC-ESIMS (positive): Rt=24.8 min. MS, m/z 268.8 $[M+H]^+$. MS/MS (precursor ion at m/z 268.7), m/z 250.7, 240.7. UV: λ_{\max} 291, 380 nm. HRMS (ESI): found for $[C_{15}H_{11}N_2O_3]^-$ 267.07330: calcd. 267.07697.

1-(6-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole-1-yl)ethan-1-one (11).

LC-ESIMS (positive): Rt=27.8 min. MS, m/z 225.5 $[M+H]^+$. MS/MS (precursor ion at m/z 225.4), m/z 206.6, 198.6, 182.6. UV: λ_{\max} 289, 383 nm. HRMS (ESI): found for $[C_{14}H_{11}N_2O]^-$ 223.08657: calcd. 223.08714.

1-acetyl-8-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid (12).

LC-ESIMS (negative): Rt=25.4 min. MS, m/z 268.7 $[M+H]^+$. MS/MS (precursor ion at m/z 268.6), m/z 250.7, 240.6. UV: λ_{\max} 285, 375 nm. HRMS (ESI): found for $[C_{15}H_{11}N_2O_3]^-$ 267.07960: calcd. 267.07697.

1-(8-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole-1-yl)ethan-1-one (13).

LC-ESIMS (positive): Rt=29.1 min. MS, m/z 225.5 $[M+H]^+$. MS/MS (precursor ion at m/z 225.4), m/z 206.7, 198.6, 182.6. UV: λ_{\max} 282, 380 nm. HRMS (ESI): found for $[C_{14}H_{11}N_2O]^-$ 223.08810: calcd. 223.08714.

1,2,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid (14).

LC-ESIMS (positive): Rt=10.2 min. MS, m/z 216.8 $[M+H]^+$. MS/MS (precursor ion at m/z 216.8), m/z 170.6, 143.5. UV: λ_{\max} 270 nm. HRMS (ESI): found for $[C_{12}H_{11}N_2O_2]^-$ 215.08098: calcd. 215.08205.

1-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid (15).

LC-ESIMS (positive): Rt=10.3 min. MS, m/z 230.8 $[M+H]^+$. MS/MS (precursor ion at m/z 230.9), m/z 213.6, 187.5. UV: λ_{\max} 270 nm. HRMS (ESI): found for $[C_{13}H_{13}N_2O_2]^-$ 229.09779: calcd. 229.09770.

1-ethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid (16).

LC-ESIMS (positive): Rt=10.5 min. MS, m/z 244.9 $[M+H]^+$. MS/MS (precursor ion at m/z 244.9), m/z 227.6, 181.6. UV: λ_{\max} 270 nm. HRMS (ESI): found for $[C_{14}H_{15}N_2O_2]^-$ 243.11277: calcd. 243.11335.

1-isobutyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid (17).

LC-ESIMS (positive): Rt=10.9 min. MS, m/z 258.9 $[M+H]^+$. MS/MS (precursor ion at m/z 258.9), m/z 241.7, 187.6. UV: λ_{\max} 270 nm. HRMS (ESI): found for $[C_{15}H_{17}N_2O_2]^-$ 257.12961: calcd. 257.12900.

1-benzoyl-9H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid (18).

LC-ESIMS (positive): Rt=27.6 min. MS, m/z 316.7 $[M+H]^+$. MS/MS (precursor ion at m/z 316.7), m/z 288.7, 228.6. UV: λ_{\max} 292, 388 nm. HRMS (ESI): found for $[C_{19}H_{11}N_2O_3]^-$ 315.07863: calcd. 315.07697.

・ 酵素反応

- cucumopine 合成酵素条件での反応

60 mM L-tryptophan、L-histidine と 60 mM α -ketoglutaric acid、oxaloacetic acid、13 μ g の精製酵素、16 mM NADH もしくは NADPH を 200 mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.8) に加え全量 100 μ L とした。室温で 1 時間酵素反応を行った後、200 μ L の AcOEt で 3 回抽出し、減圧留去した。得られた残渣を HPLC (SHIMADZU) で分析を行った。ODS HPLC (SHIMADZU) on a COSMOGEL[®] 5C₁₈-MS-2 Waters column (ϕ 4.6 x 250 mm, Nacalai Tesque), at a flow rate of 0.8 mL/min. Gradient elution: CH₃CN 10%-90% (30min) and 90%-100% (5 min) with H₂O, both containing 0.1% formic acid, monitor: UV at 280 nm.

- strictosidine 合成酵素条件での反応

1 mM L-tryptophan と 1 mM methylglyoxal もしくは 10 mM oxaloacetaldehyde、50 μ g の精製酵素を 100 mM リン酸カリウム buffer (pH 7.0) に加え全量を 100 μ L とした。52 °C にて 12 時間酵素反応を行った後、200 μ L の AcOEt で 3 回抽出し、減圧留去した。得られた残渣を HPLC (SHIMADZU) もしくは LC-ESIMS (Agilent and Bruker) で分析を行った。COSMOGEL[®] 5C₁₈-MS-2 Waters column (ϕ 4.6 x 250 mm, Nacalai Tesque) or TOSOH ODS-80Ts column, at a flow rate of 0.8 mL/min. Gradient elution: CH₃CN 10%-90% (30min) and 90%-100% (5 min) with H₂O, both containing 0.1% formic acid, monitor: UV at 280 nm.

- 基質特性の評価

0.5 mM L-tryptophan アナログと 0.5 mM methylglyoxal もしくは、0.5 mM L-tryptophan と 10 mM aldehyde アナログ、50 μ g の精製酵素を 100 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) に加え全量を 200 μ L とした。42 °C にて 12 時間酵素反応を行った後、200 μ L の MeOH、20 μ L の 1 M NaOH を加え反応を終結した。100 μ L のサンプル溶液を HPLC (SHIMADZU) で分析を行った。ODS HPLC (SHIMADZU) on a COSMOGEL[®] 5C₁₈-MS-2 Waters column (ϕ 4.6 x 250 mm, Nacalai Tesque), at a flow rate of 0.8 mL/min. Gradient elution: CH₃CN 10% - 100% (12 min), in H₂O containing 0.1% formic acid, 100% (10 min) monitor: UV at 280 nm.

- 変異体の評価

0.1 mM L-tryptophan と 0.1 mM metgylglyoxal、50 μ g の精製酵素を 100 mM リン酸カリウム buffer (pH7.0) に加え全量を 100 μ L とした。37 °C にて 12 時間酵素反応を行った

後、200 μ L の MeOH、20 μ L の 1 M NaOH を加え反応を終結した。100 μ L のサンプル溶液を HPLC (SHIMADZU) で分析を行った。ODS HPLC (SHIMADZU) on a COSMOGEL[®] 5C18-MS-2 Waters column (ϕ 4.6 x 250 mm, Nacalai Tesque), at a flow rate of 0.8 mL/min. Gradient elution: CH₃CN 10% - 100% (12 min) , in H₂O containing 0.1% formic acid, 100% (10 min) monitor: UV at 280 nm.

・ 1-acetyl-3-carboxy- β -carboline の単離

IPTG 発現誘導を行った大腸菌培養液を 8,000 rpm にて 15 分間遠心し上清と菌体に分離した。培養上清に HCl を加え、酸性条件下 (pH 7.0 以下) にて AcOEt で抽出し、減圧留去した。残渣を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 60 N (球状、中性) 40-50 μ m, chloroform/MeOH=100/0-80/20) により精製し、65 mg の黄色粉末を得た。さらに HPLC 分取 (COSMOGEL[®] 5C₁₈-MS-2 Waters column, ϕ 4.6 x 250 mm, Nacalai Tesque, at a flow rate of 3.0 mL/min. Isocratic elution: CH₃CN 50% with H₂O, both containing 0.1% acetic acid, monitor: UV at 280 nm.) を行い 1.16 mg の黄色粉末を得た。これを重 DMSO に溶解し NMR 測定を行ったところ、論文値と H¹-NMR の値が一致したのでこれを 1-acetyl-3-carboxy- β -carboline の標品とした。

・ β -carboline 類の合成

-化合物 10、11 の合成

32 mg (0.15 mmol) の 5-methyl-DL-tryptophan を 6 μ L (0.11 mmol) の硫酸を含んだ 1.0 ml の H₂O に溶解した。そこに 40% methylglyoxal を 17.5 μ L (0.11 mmol in H₂O) を添加し、2 時間室温で反応を行なった。反応溶液を 10 ml まで H₂O で希釈し、10 ml の酢酸エチルで 3 回抽出した。酢酸エチル層を濃縮し、シリカゲルカラムで生成した (hexane/ethyl acetate = 100/0 - 0/100)。結果として、5.3 mg (0.020 mmol) の **10** を 50:50 ヘキサン-酢酸エチル画分から、3.8 mg (0.017 mmol) **11** を 95:5 ヘキサン-酢酸エチル画分から単離した。

-化合物 12、13 の合成

化合物 **12**、**13** の合成は反応温度を 50 $^{\circ}$ C 2 時間にしたこと以外化合物 **10**、**11** と同じ方法で行なった。結果として 3.7 mg (0.014 mmol) の **12** と 3.0 mg (0.013 mmol) の **13** を 32 mg (0.15 mmol) の 7-methyl-DL-tryptophan から得た。

-化合物 **14** の合成

408 mg の L-tryptophan (2.0 mmol) を 1.6 ml の 1.25 M NaOH 水に溶解した。反応溶液に 200 μ l の formaldehyde (37%, 2.7 mmol) を添加し、室温 3 時間反応を行い、その後 3 時間還流した。反応溶液を室温まで冷却し、HCl にて pH = 5~6 まで中和した。結果生じた残渣を遠心路濾取し、10 ml の H₂O で 2 回洗い凍結乾燥した。270 mg (1.3 mmol) の **14** を得た。

-化合物 **15a-17b** の合成

150 mg (0.74 mmol) の L-tryptophan を 2.4 ml の 50 μ l 硫酸 (0.94 mmol) を含む H₂O に溶解し、そこに 0.83 mmol のそれぞれのアルデヒド化合物 (acetaldehyde (**15a** と **15b**), propanal (**16a** と **16b**), isobutylaldehyde (**17a** and **17b**)) を加え 12 時間室温で反応を行った。反応溶液から分取逆層 HPLC カラムにて生成した (Cosmosil cholesteryl column (10 \times 250 mm, Nacalai Tesque, Japan))。

• Oxaloacetaldehyde の合成

- 2,2-diethoxy-*N*-methoxy-*N*-methylacetamide (**19**) の合成

Me₂AlCl (1.0M ヘキサン 3 mL) に 3 mmol MeONHMeHCl (CH₂Cl₂ 20 mL) をアルゴン下、0 °C において 5 分間かけ滴下した後に、溶液が常温に戻るまで 1 時間攪拌を行った。続いて 3 mL の CH₂Cl₂ に溶かした ethyl diethoxyacetate (175 μ L, 1 mmol) を反応溶液に滴下した。TLC にて原料の消失を確認した後に、リン酸バッファー (pH 8.0, 8 mL) を加え 10 分間攪拌し、反応を終結させた。有機層を飽和食塩水で洗浄した後に MgSO₄ にて脱水し、濃縮した⁷⁸。これをシリカカラム (CH₂Cl₂ : Ether = 9 : 1) にて精製を行い、Weinreb amide (**19**) を 190 mg 得た。

- tert-butyl 4,4-diethoxy-3-oxobutanoate (**20**) の合成

2 mL の THF へ溶かした lithium diisopropylamine (150 μ L, 1.1 mmol) に n-BuLi (690 μ L, 1.6 M sol in hexane) を -30 °C 下で加えた。15 分間攪拌の後、-78 °C に冷却した。続いて t-butyl acetate (100 μ L, 1 mmol) を滴下し、-78 °C にて 50 分間攪拌した。1 mL 脱水 tetrahydrofuran に溶かした Weinreb amide (**19**, 190 mg, 1 mmol) をすぐさま加え、5 分間攪拌した後に飽和 NH₄Cl を 2 mL 加え反応を終結し、AcOEt を用いて抽出を行った。得られた AcOEt 層を Na₂CO₃ にて脱水、濃縮した⁷⁸。これをシリカカラム (hexane-AcOEt = 95 : 5) にて精製を行い、tert-butyl 4,4-diethoxy-3-oxobutanoate (**20**, 200 mg) を得た。

- oxaloacetaldehyde の合成

20 (50 mg)をガラス容器に入れ 5%の H_2SO_4 2 mL に溶かし、100 °C のオイルバスに浸しながら 30 分間攪拌を行った⁷⁸。1 M KOH を用いて pH を 7.0 に調整し、得られた溶液を酵素の基質として用いた。

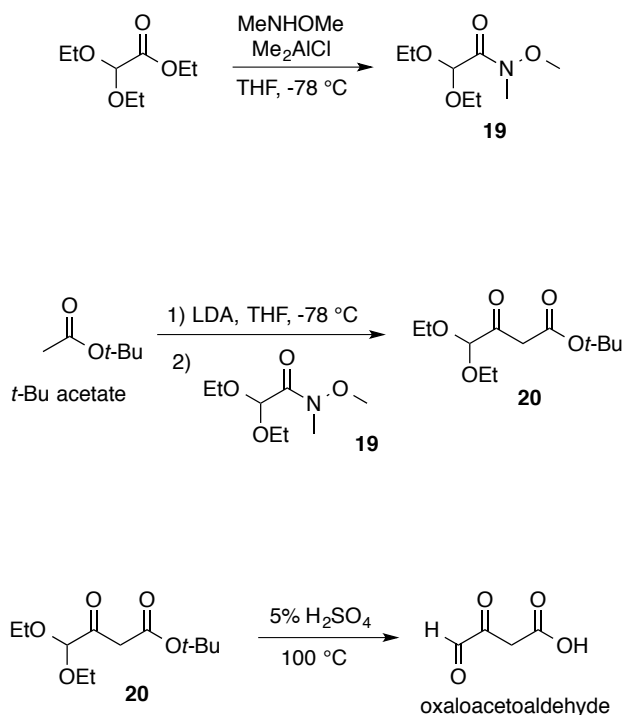


Figure S1. Oxaloacetaldehyde の合成スキーム

・ Se-Met 置換タンパク質の発現

ベクター、発現用大腸菌は野生型と同じものを用いた。野生型と同様に 10 mL の LB 培地 (50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシン含有) で 37 °C、一晚振盪培養を行った。これを 8000 rpm、15 min 遠心することでプレット化し、上清の培地を捨てた後に 10 mL の滅菌水を加えることを 3 度繰り返し、菌体の洗浄を行った。洗浄した菌体を滅菌済み Se-Met 培地 (50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシン含有) に 1 %植菌を行った。37 °C で $\text{OD}_{600} = 1.2$ になるまで振盪培養した。そこに終濃度 0.01 mM IPTG と共に Se-Met 25 mg を加え、15 °C で一晚誘導発現を行った。

- Se-Met 培地

Sol. A (900mL)

Se-Met 特注培地 23 g、イソロイシン 0.115 g、リジン塩酸塩 0.21 g、スレオニン 0.115 g、システイン 0.0015 g、NaOH 0.54 g を蒸留水に溶かした後に、121 °C にて 15 分間滅菌を行った。

-Sol. B (100mL)

D-グルコース 10 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g、FeSO₄ · 7H₂O 4.18 g、硫酸 8.3μL を蒸留水に溶かした後に、0.2μm filter を用いて滅菌した。

- 100x Vitamin mix (100mL)

myo-Inositol 1 g, Thiamine hydrochloride 10 mg, Pyridoxine hydrochloride 10 mg, Folic acid 4 mg, D-Biotin 0.1 mg, L-Ascorbic acid 20 mg, D-Calcium pantothenate 10 mg, Nicotinamide 10 mg, Riboflavin 0.2 mg, Cyancobalamin 0.2mg, *p*-Aminobenzoic acid 0.2 mg を超純水に溶かし、滅菌せずに用いた。

上記 Sol. A、 B を滅菌後 1 つに合わせた後に、25 mg selenomethionin と 100x Vitamin mix 15 mL を加えたものを Se-Met 培地とした。

・ ゲル濾過クロマトグラフィによる分子量の測定

先ず、排除体積を測定行うために 0.22 μm のフィルター濾過した 1 mg/min Blue Dextran 2000 を 250μL のサンプルをゲル濾過用バッファー (20mM HEPES (pH7.5)、200mM NaCl、1mM DTT) を用いて平衡化した Superdex 200 HR10/300 (ベット体積 24 mL) に添加した後に 0.4mL/min で溶出した。続いて Biorad Gel filtration Standard (Biorad) をゲル濾過用バッファーにて 1 mg/mL に調整した後に 250 μL を同様に添加した。最後にゲル濾過精製後の 1 mg/mL の McbB を 250 μL 添加しその溶出容量を測定した。上記の操作で得られた溶出体積、排除体積を用いて Kav 値を求め (Kav 値 = ([溶出体積] - [排除体積]) / ([ベット体積] - [排除体積]))、McbB の推定分子量を 82.6 kDa と求めた。

・結晶用酵素の調整

上記と同様に COSMOGEL[®] His-Accept を用いて酵素を精製、SDS-PAGE による区画の確認の後に脱塩することなく限外濾過膜を用いて 5 mL まで濃縮した。濃縮したサンプルを Superdex 200HR (10/60 pg ; GE Healthcare) にアプライをし、ゲル濾過用バッファー (20 mM HEPES (pH 7.5)、200 mM NaCl、1 mM DTT) を用いて流速 0.2 mL にて溶出を行った。SDS-PAGE を用いて溶出画分を確認後、各画分を 1 つにまとめ 17 mg/mL まで濃縮した。

・McbB の結晶化

結晶化のスクリーニングと最適化は 20 °C、シッピングドロップ蒸気拡散法で行った。スクリーニング溶液は Rigaku Reagent 社の Wizard Classic crystallization screen kit を用い、0.5 μ L の酵素溶液に対して同量のリザーバーを混ぜ合わせた。スクリーニングの結果、100 mM Tris-HCl (pH 7.0)、20% PEG1000 の条件で 1 日後に結晶が得られた。その後、沈殿剤である PEG1000 の条件検討を行い、最終的に 100 mM Tris-HCl (pH 7.0)、12% PEG1000 の条件で得られた結晶を採用した。また結晶化時にプレートを上下逆転させて結晶化させることで、結晶のウェル下部への付着を防止し、分解能の悪化を改善した。抗凍結剤には 100 mM Tris-HCl (pH 7.0)、18% PEG1000、22.5% glycerol を使用し、結晶を抗凍結剤に数秒間浸した後にナイロンループで拾い上げ、-173 °C の窒素ガス気流下、X 線を照射した。X 線回折データはフォトンファクトリー AR の NW12 番にてセレンの吸収端を用いて行った (波長: 0.9790 Å)⁷⁹。

・位相決定と最適化

得られた McbB の回折データの処理は XDS プログラムパッケージ⁸⁰を用いて行った。また、セレンサイトの決定は PHENIX 内の *Auto Sol*⁸¹を用いて行い、セレンサイトの精密化には PHENIX 内の *Auto Build*⁸²を用いた。最終的な構造は *Coot*⁷⁴と *PHENIX*⁷⁵を用いて決定を行った。

McbB の最終構造にはモノマー A-C に 3-311 残基、モノマー D に N 末側に人工的に付加した pET28a 由来の 3 残基と 1-311 残基、4 分子の L-tryptophan、531 の水分子が含まれていた。最終構造の精度は MolProbity⁷⁶で確認した。McbB 構造中の 96.7%がラマチャンドランプロットの favor 部分、3.3%が allow 部分に位置した。

最終構造は Protein Data Bank に登録した (*M. thermotorelance* McbB complex structure : Protein Data Bank code 3X27)。

構造の類似性検索には Dali program⁷⁷にて行った。また、キャビティのサイズの計測には CASTP (<http://cast.engr.uic.edu/cast/>) を用いた。この論文内の結晶の図の作製は全て PyMOL を用いて行った (DeLano Scientific, <http://www.pymol.org>)。

・変異体酵素の作製

変異体酵素は QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて作製した。また、PCR 反応には Polymerase として Prime Star (Takara)を用いて行った。

プライマー

S48A_Fw: 5'-GAACCATGCGCTTGTTGCGGGCAATCACCTCTATC-3'
S48A_Rv: 5'-GATAGAGGTGATTGCCCCGAACAAGCGCATGGTTC-3'
S48V_Fw: 5'-GAACCATGCGCTTGTTGTGGGCAATCACCTCTATC-3'
S48V_Rv: 5'-GATAGAGGTGATTGCCCACAACAAGCGCATGGTTC-3'
S48T_Fw: 5'-GAACCATGCGCTTGTTACGGGCAATCACCTCTATC-3'
S48T_Rv: 5'-GATAGAGGTGATTGCCCCGAACAAGCGCATGGTTC-3'
H51A_Fw: 5'-CGCTTGTTTCGGGCAATGCCCTCTATCACTTGATC-3'
H51A_Rv: 5'-GCGAACAAAGCCCGTTACGGGAGATAGTGAAGTAG-3'
Y53A_Fw: 5'-CGGGCAATCACCTCGCTCACTTGATCGCAGATC-3'
Y53A_Rv: 5'-GATCTGCGATCAAGTGAGCGAGGTGATTGCCCCG-3'
Y53Y_Fw: 5'-CGGGCAATCACCTCTTTCACTTGATCGCAGATC-3'
Y53F_Rv: 5'-GATCTGCGATCAAGTGAAAGAGGTGATTGCCCCG-3'
R72_Fw: 5'-GCCATCCGGACTTTTGGTGGCATCTTCTTTATAGCGTGC-3'
R72A_Rv: 5'-GCACGCTATAAAGAAGATGCCACCAAAAGTCCGGATGGC-3'
H87A_Fw: 5'-GAGCCAGCTGCAGGCTTTAGCCGTGAAATACGGTC-3'
H87A_Rv: 5'-GACCGTATTTACGGCTAAAGCCTGCAGCTGGCTC-3'
E97A_Fw: 5'-CGGTCCGTTGACCGCATATCTGCCGGCTGCAC-3'
E97A_Rv: 5'-GTGCAGCCGGCAGATATGCGGTCAACGGACCG-3'
F250A_Fw: 5'-CAAAACGCCCCGCGGAGGCTCTCGGTTATACCGG-3'
F250A_Rv: 5'-CCGGTATAACCGAGAGCCTCCGCGGGCGTTTTG-3'
F250Y_Fw: 5'-CAAAACGCCCCGCGGAGTACCTCGGTTATACCGG-3'

F250Y_Rv: 5'-CCGGTATAACCGAGGTACTCCGCGGGCGTTTTG-3'

F250W_Fw: 5'-CAAAACGCCCCGCGGAGTGGCTCGGTTATACCGG-3'

F250W_Rv: 5'-CCGGTATAACCGAGCCACTCCGCGGGCGTTTTG-3'

変異体の発現、活性は、野生型と同様の手法にて行った。

- ・ドッキングモデルの作成

基質の三次元構造は Chem3D Ultra 13 program (CambridgeSoft) を用いて作成した。ドッキングの計算は AutoDock4⁸³ を用いた。中間体のモデル図は *Cool*⁷⁴ を用いて McbB の構造内に中間体を入れ、*PHENIX*⁷⁵ を用いてエネルギーの最小化計算を行った。中間体の最小化計算用パラメータは PRODRG サーバーにて作成した。

参考文献

- 1) Tyler, V.E. Herbs of choice. *New York: Haworth Press, Inc.* (1994).
- 2) Southon, I.W., and BuckIngham, J., eds. Dictionary of alkaloids. *London: Chapman and Hall Ltd.* (1989).
- 3) Hartmann, T. Alkaloids. In *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*, 2nd ed., *The Chemical Participants*, G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum, eds. *San Diego: Academic Press*, **1**, 79-121 (1991).
- 4) Caporale L.H., Chemical ecology: A view from the pharmaceutical industry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 75-82 (1995).
- 5) Wink. M. Modes of action of defensive secondary metabolites. *Annual Plant Reviews* **3**, 1-20 (1999).
- 6) Kutchan, T.M., Alkaloid biosynthesis - The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* **7**, 1059-1070 (1995).
- 7) Winzer, T. Kern, M. King, A.J., Larson, T.R., Teodor, R., Donninger, S., Li, Y., Dowle, A.A., Cartwright, J., Bates, R., Ashford, D., Thomas, J., Graham. I.A. Morphinan biosynthesis in opium poppy requires a P450-oxidoreductase fusion protein. *Science* **349**, 309-312 (2015).
- 8) DeLoache, W.C., Russ, Z.N., Narcross, L., Gonzales, A.M., Martin, V.J.J., Dueber, J.E. an enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 465-471 (2015).
- 9) Fossati, E., Narcross, L., Ekins, A., Falgueyret, J. P. Martin, V. J. J. Synthesis of morphinan alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **10**, e0124459 (2015).
- 10) Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I.J., Interrante, M.F., Smolke. C.D. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science* **349**, 1095-1100 (2015).
- 11) Michael. J.P., Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 650 (2004).
- 12) Hayashi, H., Miwa, Y., Ichikawa, S., Yoda, N., Miki, I., Ishii, A., Kono, M., Yasuzawa, T., Suzuki, F. 5-HT₃ receptor antagonists. 2,4-Hydroxy-3-quinolinecarboxylic acid derivatives. *J. Med. Chem.* **36**, 617-626 (1993).
- 13) Dittmer, D. C., Li, Q., Avilov, D. V. Synthesis of coumarins, 4-hydroxycoumarins, and 4-hydroxyquinolinones by tellurium-triggered cyclizations. *J. Org. Chem.* **70**, 4682-4686 (2005).
- 14) Kelly, J.X., Smilkstein, M.J., Brun, R., Wittlin, S., Cooper, R.A., Lane, K.D., Janowsky,

- A., Johnson, R. A., Dodean, R. A., Winter, R., Hinrichs, D. J., Riscoe, M. K. Discovery of dual function acridones as a new anti-malarial chemotype. *Nature* **459**, 270-273 (2009).
- 15) Abe, I., Morita, H. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 809-838 (2010).
 - 16) Smith, S., Tsai, S. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 1041-1072 (2007).
 - 17) Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., Bechthold, A. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 162-190 (2007).
 - 18) Jez, J.M., Ferrer, J-L., Bowman, M.E., Austin, M.B., Schröder, J., Dixon, R.A., Noel, J.P. Structure and mechanism of chalcone synthase-like polyketide synthases. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 393-398 (2001).
 - 19) Abe, I., Morita, H., Nomura, A., Noguchi, H. Substrate specificity of chalcone synthase: enzymatic formation of unnatural polyketides from synthetic cinnamoyl-CoA analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 11242-11243 (2000).
 - 20) Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., and Noel, J. P. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 775-784 (1999).
 - 21) Lukacin, R., Springob, K., Urbanke, C., Ernwein, C., Schröder, G., Schröder, J., Matern, U. Native acridone synthases I and II from *Ruta graveolens* L. form homodimers. *FEBS Lett.* **448**, 135-140 (1999).
 - 22) Springob, K., Lukacin, R., Ernwein, C., Gröning, I., Matern, U. Specificities of functionally expressed chalcone and acridone synthases from *Ruta graveolens*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6552-6559 (2000).
 - 23) Resmi, M.S., Verma, P., Gokhale, R.S., Soniya, E.V. Identification and characterization of a type III polyketide synthase involved in quinolone alkaloid biosynthesis from *Aegle marmelos* correa. *J. Biol. Chem.* **288**, 7271-7281 (2013).
 - 24) Abe, I., Takahashi, Y., Morita, H., Noguchi H. Benzalacetone synthase. A novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3354-3359 (2001).
 - 25) Abe, I., Abe, T., Wanibuchi, K., Noguchi, H. Enzymatic formation of quinolone alkaloids by a plant type III polyketide synthase. *Org. Lett.* **8**, 6063-6065 (2006).
 - 26) Wanibuchi, K., Zhang, P., Abe, T., Morita, H., Kohno, T., Chen, G., Noguchi, H., Abe, I. An acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia*

- serrata. *FEBS J* **274**, 1073-1082 (2007).
- 27) Morita, H., Yamashita, M., Shi, S-P., Wakimoto, T., Kondo, S., Kato, R., Sugio, S., Kohno, T., Abe, I. Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 13504-13509 (2011).
- 28) Morita, H., Shimokawa, Y., Tanio, M., Kato, R., Noguchi, H., Sugio, S., Kohno, T., Abe, I. A structure-based mechanism for benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 669-673 (2010).
- 29) Austin, M.B., Bowman, M.E., Ferrer, J.L., Schröder, J., Noel, J.P. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. *Chem. Biol.* **11**, 1179-1194 (2004).
- 30) Jez, J.M., Austin, M.B., Ferrer, J., Bowman, M.E., Schröder, J., Noel, J.P. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chem. Biol.* **7**, 919-930 (2000).
- 31) Morita, H., Kondo, S., Oguro, S., Noguchi, H., Sugio, S., Abe, I., and Kohno, T. Structural insight into chain-length control and product specificity of pentaketide chromone synthase from *Aloe arborescens*. *Chem. Biol.* **14**, 359-369 (2007).
- 32) Jez, J.M., Bowman, M.E., Noel, J.P. Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 5323-5324 (2002).
- 33) Zschunke, A., Baumert, A., and Gröger, D. Biosynthesis of rutacridone in cell cultures of *Ruta graveolens*: incorporation studies with [¹³C]-acetate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1263-1265 (1982).
- 34) Casey, A.C., Malhotra, A. TECLEANONE: a new alkaloid from *Teclea grandifolia*. *Tetrahedron Lett.* **16**, 401-404 (1975).
- 35) Fish, F., Meshal, I.A., Waterman, P.G. Alkaloid of *Oricia suaveolens*. *Planta Med.* **33**, 228-231 (1978).
- 36) Cao, R., Peng, W., Wang, Z., Xu, A. beta-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Curr. Med. Chem.* **14**, 479-500 (2007).
- 37) Pictet, A., Spengler, T., Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **44**, 2030-2036 (1911).
- 38) Treimer, J.F., Zenk, M.H. Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation. *Eur. J. Biochem.* **101**, 225-233 (1979).

- 39) Rueffera, M., El-Shagi, H., Nagakura, N., Zenka, M.H. (S)-norlaudanosoline synthase: The first enzyme in the benzyloisoquinoline biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* **129**, 5-9 (1981).
- 40) De-Eknamkul, W., Ounaroorn, A., Tanahashi, T., Kutchan, T.M., Zenk, M.H. Enzymatic condensation of dopamine and secologanin by cell-free extract of *Alangium lamarckii*. *Phytochemistry* **45**, 477-484 (1997).
- 41) De-Eknamkul, W., Suttipanta, N., Kutchan, T.M. Purification and characterization of deacetylpecoside synthase from *Alangium lamarckii* Thw. *Phytochemistry* **55**, 177-181 (2000).
- 42) Stöckigt, J., Antonchick, A.P., Wu F., Waldmann, H. The Pictet-Spengler reaction in nature and in organic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 8538-8564 (2011).
- 43) Stevens, L.H., Giroud, C., Pennings, E.J.M., Verpoorte, R. Purification and characterization of strictosidine synthase from a suspension culture of *Cinchona robusta*. *Phytochemistry* **33**, 99-106 (1993).
- 44) Yamazaki, Y., Sudo, H., Yamazaki, M., Aimi, N., Saito, K. Camptothecin biosynthetic genes in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*: cloning, characterization and differential expression in tissues and by stress compounds. *Plant Cell Physiol.* **44**, 395-403 (2003).
- 45) Bracher, D., Kutchan, T.M. Strictosidine synthase from *Rauvolfia serpentina*: analysis of a gene involved in indole alkaloid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 717-723 (1992).
- 46) Mizukami, H., Nordlöv, H., Lee, S.L., Scott, A.I. Purification and properties of strictosidine synthetase (an enzyme condensing tryptamine and secologanin) from *Catharanthus roseus* cultured cells. *Biochemistry* **18**, 3760-3763 (1979).
- 47) McCoy, E., Galan, M.C., O'Connor, S.E. Substrate specificity of strictosidine synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2475-2478 (2006).
- 48) Ma, X. Panjikar, S., Koepke, J., Loris, E., Stöckigt J. The structure of *Rauvolfia serpentina* strictosidine synthase is a novel six-bladed beta-propeller fold in plant proteins. *Plant Cell* **18**, 907-920 (2006).
- 49) Stöckigt, J., Barleben, L., Panjikar S., Loris, E.A. 3D-Structure and function of strictosidine synthase--the key enzyme of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Plant. Physiol. Biochem.* **46**, 340-355 (2008).
- 50) Maresh, J.J., Giddings, L.A., Friedrich, A., Loris, E.A., Panjikar, S., Trout, B.L., Stöckigt, J., Peters, B., O'Connor, S.E. Strictosidine synthase: mechanism of a Pictet-Spengler catalyzing enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 710-723 (2008).

- 51) Luk, L.Y., Bunn, S., Liscombe, D.K., Facchini, P.J., Tanner, M.E. Mechanistic studies on norcoclaurine synthase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis: an enzymatic Pictet-Spengler reaction. *Biochemistry* **46**, 10153-10161 (2007).
- 52) Ilari, A., Franceschini, S., Bonamore, A., Arengi, F., Botta, B., Macone, A., Pasquo, A., Bellucci, L., Boffi, A. Structural basis of enzymatic (*S*)-norcoclaurine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 897-904 (2009).
- 53) Yan, W., Ge, H.M., Wang, G., Jiang, N., Mei, Y.N., Jiang, R., Li, S.J., Chen, C.J., Jiao, R.H., Xu, Q., Ng, S.W., Tan R.X. Pictet-Spengler reaction-based biosynthetic machinery in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 18138-18143 (2014).
- 54) Aroonsri, A. Kitani, S., Hashimoto, J., Kosone, I., Izumikawa, M., Komatsu, M., Fujita, N., Takahashi, Y., Shin-ya, K., Ikeda, H., Nihira, T. Pleiotropic control of secondary metabolism and morphological development by KsbC, a butyrolactone autoregulator receptor homologue in *Kitasatospora setae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 8015-8024 (2012).
- 55) Chen, Q., Ji, C., Song, Y., Huang, H., Ma, J., Tian, X., Ju, J. Discovery of McbB, an enzyme catalyzing the β -carboline skeleton construction in the marinacarboline biosynthetic pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 9980-9984 (2013).
- 56) Huang, H., Yao, Y., He, Z., Yang, T., Ma, J., Tian, X., Li, Y., Huang, C., Chen, X., Li, W., Zhang, S., Zhang, C., Ju, J. Antimalarial β -carboline and indolactam alkaloids from *Marinactinospora thermotolerans*, a deep sea isolate. *J. Nat. Prod.* **74**, 2122-2127 (2011).
- 57) Suzuki, K., Tanaka, N., Kamada, H., Yamashita, I. Mikimopine synthase (mis) gene on pRi1724. *Gene* **263**, 49–58 (2001).
- 58) Brevet, J., Borowski, D., Tempe, J. Identification of the region encoding opine synthesis and of a region involved in hairy root induction on the T-DNA of cucumber-type Ri plasmid. *Mol. Plant Microbe. Interact.* **1**, 75–79 (1988).
- 59) Jeon, H., Meng, W., Takagi, J., Eck, M.J., Springer, T.A., Blacklow, S.C. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 499–504 (2001).
- 60) Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzsche, G., Lücke, C., Rüterjans, H. Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*. *Structure* **9**, 493–502 (2001).
- 61) Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L., Tawfik, D.S. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and

- anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 412–419 (2004).
- 62) Berkner, H., Schweimer, K., Matecko, I., Rösch, P. Conformation, catalytic site, and enzymatic mechanism of the PR10 allergen-related enzyme norcoclaurine synthase. *Biochem J.* **413**, 281–290 (2008).
 - 63) Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F. M., Ipsen, H., Larsen, J. N., van Neerven, R.J.J., Schou, C., Løwenstein, H., Spangford, M.D. X-ray and NMR structure of Bet v1, the origin of birch pollen allergy. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 1040–1045 (1996).
 - 64) Ames, B.D., Korman, T.P., Zhang, W., Smith, P., Vu, T., Tang, Y., Tsai, S.C. Crystal structure and functional analysis of tetracenomycin ARO/CYC: implications for cyclization specificity of aromatic polyketides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5345–5349 (2008).
 - 65) Stegmann, C.M., Luhrmann, R., and Wahl, M.C. The crystal structure of PPIL1 bound to cyclosporine A suggests a binding mode for a linear epitope of the SKIP protein. *PLoS One* **5**, 13–21 (2010).
 - 66) Ashworth, J., Taylor, G.K., Havranek, J.J., Quadri, S.A., Stoddard, B.L., Baker, D. Computational redesign of endonuclease DNA binding and cleavage specificity. *Nature* **441**, 656–659 (2006).
 - 67) Nagasawa, S., Tokishita, S., Aiba, H., and Mizuno, T. A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptive responses in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 799–807 (1992).
 - 68) Nemet, I., and Varga-Defterdarovic, L. The Pictet-Spengler reaction in nature and in organic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 4551–4562 (2008).
 - 69) Wilson, M. C., Mori, T., Rückert, C., Uria, A. R., Helf, M. J., Takada, K., Gernert, C., Steffens, U. A. E., Heycke, N., Schmitt, S., Rinke, C., Helfrich, E. J. N., Brachmann, A. O., Gurgui, C., Wakimoto, T., Kracht, M., Crüsemann, M., Hentschel, U., Abe, I., Matsunaga, S., Kalinowski, J., Takeyama, H., Piel, J. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* **506**, 58–62 (2014).
 - 70) Wakimoto, T., Egami, Y., Nakashima, Y., Wakimoto, Y., Mori, T., Awakawa, T., Ito, T., Kenmoku, H., Asakawa, Y., Piel, J., Abe, I. Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont. *Nature Chem. Biol.* **10**, 648–655 (2014).
 - 71) Otwinowski, Z., Minor, W. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326 (1997).
 - 72) Vagin, A., and Teplyakov, A. Molecular replacement with *MOLREP*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25 (2010).

- 73) Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K. D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S. Overview of the *CCP4* suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242 (2011).
- 74) Emsley, P., Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
- 75) Adams, P.D., *et al.* *PHENIX*: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
- 76) Chen, V.B., Arendall, W.B., 3rd, Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 (2010).
- 77) Holm, L., Sander, C. Dali: A network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 478 – 480 (1995).
- 78) Sibbersen, C. Palmfeldt, J, Hansen, J., Gregersen, N., Jørgensen, K.A., Johannsen, M. Development of a chemical probe for identifying protein targets of α -oxoaldehydes. *Chem. Commun.* **49**, 4012-4014 (2013).
- 79) Rice, L.M., Earnest, T.N., and Brunger, A.T. Single-wavelength anomalous diffraction phasing revisited. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**, 1413–1420 (2000).
- 80) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
- 81) Terwilliger, T.C., Adams, P.D., Read, R.J., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Grosse-Kunstleve, R.W., Afonine, P.V., Zwart, P.H., Hung, L.W. Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the *PHENIX AutoSol* wizard. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **65**, 582–601 (2009).
- 82) Terwilliger, T.C., Grosse-Kunstleve, R.W., Afonine, P.V., Moriarty, N.W., Zwart, P.H., Hung, L.W., Read, R.J., Adams, P.D. Iterative model building, structure refinement and density modification with the *PHENIX AutoBuild* wizard. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **64**, 61–69 (2008).
- 83) Seeliger, D, Groot, B. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **24**, 417-422 (2010).

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室教授 阿部郁朗先生に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、多大なご助言、ご協力を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室准教授 岡田正弘先生、助教 淡川孝義先生、松田侑大先生に感謝致します。

また、以前当研究室のスタッフであり、現在富山大学和漢医薬学総合研究所資源開発部門天然物化学分野 教授になられた森田洋行先生、北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室 教授になられた脇本敏幸先生に感謝致します。

QNS、ACS の X 線結晶構造解析において、ご助力を賜りました、三菱化学 杉尾成俊先生、加藤良平先生に感謝致します。

本研究に際し、ご助言を賜りました天然物化学教室の方々、ともに励まし合い、常に心の支えになって頂きました先輩、同級生、後輩の皆様方に心から感謝致します。

2015 年 11 月 森 貴裕