

スコポラミン生合成とその発現制御

橋本 隆*

(1991年5月9日受理)

植物由来の二次代謝産物、特に有用化合物を組織・細胞培養法を用いて大量生産しようとする試みは植物組織培養法が注目を集め始めた70年代初期から日本、ドイツなどの国々で盛んに行なわれている。最近までは未分化の細胞培養系を用いる研究が主流であったが、培養細胞で効率良く産生される化合物はむしろ稀であること、さらに80年代後半になって根の器官培養法が見直されるに至り分化組織を用いた生産系が好んで利用されるようになった。こうした研究動向は取りも直さず多くの二次代謝産物においては形態的分化と生化学的代謝経路の発現が密接な関係にあることを我々に再認識させる結果となり、代謝経路の組織・細胞特異的発現制御機構を分子レベルで解明することがこれからの二次代謝研究の中心課題となるであろうと予想できる。二次代謝の発現制御に関する分子生物学的研究はその遺伝学的バックグラウンドの広さからトウモロコシ等のアントシアニン生合成において最も進んでおり、生合成酵素の構造遺伝子のみならず、一群の生合成遺伝子の組織・細胞特異的発現を制御する遺伝子についても解析が進んでいる¹⁾。他の二次代謝産物の生合成に関しては最近ようやく幾つかの生合成酵素の遺伝子が単離され、その発現制御が分子レベルで研究され始めたばかりである。本ミニ・レビューではその中でも比較的研究が進んでいるトロパン系のアルカロイドの生合成に関する我々の研究室における研究成果をいくつか紹介する。

1. ヒオスチアミン6 β 水酸化酵素 (H6H)

スコポラミン (scop) は *Hyoscyamus niger* (ヒヨス)、*Duboisia myoporoides*, *Datura sanguinea* 等のナス科植物に蓄積するトロパンアルカロイドであり、ヒオスチアミン (hyos) のトロパン骨格の6位と7位がエポキシ化されて生成する。両アルカロイドのトロピン部分はオルニチン又はアルギニンから、トロパ酸部分はフェニルアラニンに由来する²⁾ (図1)。hyos から scop へのエポキシ化は6 β ヒドロキシヒオスチアミン (hyosOH) を経由して行なわれるが、我々はこの経路の最初の水酸化反応を触媒する酵素としてヒオスチアミン6 β 水酸化酵素 (H6H; EC 1.14.11.11) を発見した³⁾。本酵素は2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼであり、反応に2-オキソグルタル酸、二価鉄、アスコルビン酸、分子状酸素を必要とする (図2)。2-オ

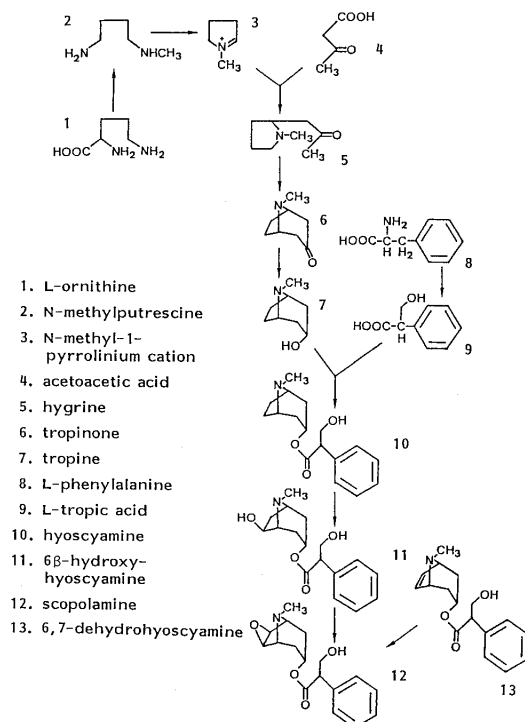


図1. トロパンアルカロイドの生合成経路。1本の矢印は必ずしも1つの反応を意味しない。

* Takashi HASHIMOTO: Scopolamine Biosynthesis and its Regulation.

京都大学農学部農芸化学科

(〒606 京都市左京区北白川追分町)

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto University (Oiwake-cho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606)

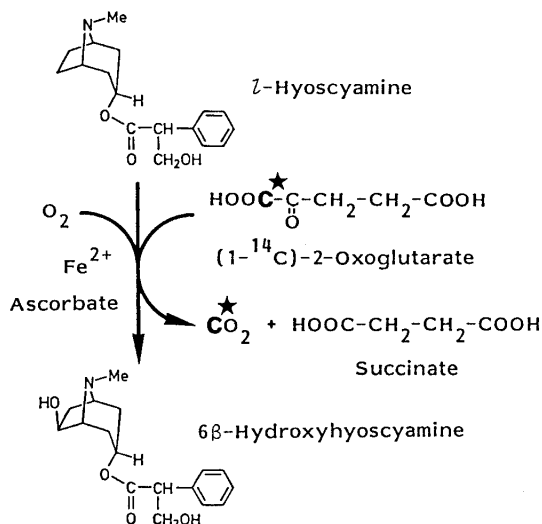


図2. ヒヨスチアミン 6 β 水酸化酵素の触媒する反応. 1 位を ¹⁴C で標識した 2-オキソグルタル酸を補基質として用いた場合はヒヨスチアミンの水酸化に対応して放射性二酸化炭素の発生が見られる.

キソグルタル酸は反応に伴い、コハク酸と二酸化炭素に酸化的に分解され、この脱炭酸の速度と hyos の水酸化速度を測定してみるとほぼ等しい値が得られる. H6H はヒヨス培養根から比較的簡単に均一タンパク質にまで精製できる⁴⁾. 高度に精製した H6H を用いてアルカロイド基質に対する特異性を調べてみると、H6H はいくつかの hyos 類縁体のトロパン骨格の 6 β 位を水酸化することが判明した⁵⁽⁶⁾. 特にトロパ酸部分の構造変化については比較的寛容でベンゼン環などの疎水性側鎖をもつ化合物はある程度水酸化された. しかし、トロパ酸の 2 位が非天然型の立体配置である [R] hyos は基質とならず、H6H の基質結合部位は天然の [2S] トロパ酸の結合に都合の良い構造をしているものと想像できる³⁾.

驚くべきことに H6H は scop の前駆体と推測されていた 6,7 デヒドロヒヨスチアミン (Dehyos)⁷⁾ を酸化 (エポキシ化) し scop を生成する強い活性も合わせて持っていた⁵⁾. しかし、このことは Dehyos を植物体へ投与すると scop へ変換されるという実験結果⁷⁾ を説明するのみであり、Dehyos が scop 生合成の前駆体であるとする説を支持する訳ではない. 6 β 位の水酸基を ¹⁸O で標識した hyosOH を合成し、植物体 (*Duboisia* 培養茎葉) へ投与すると生成した scop に ¹⁸O が 100% 保持されていたことから⁸⁾, hyosOH から scop へ至る経路には脱水反応は関与せず、Dehyos は scop の前駆体ではないことが証明された. 現在までに Dehyos が植物体から単離されていないことも、植物体における投与した

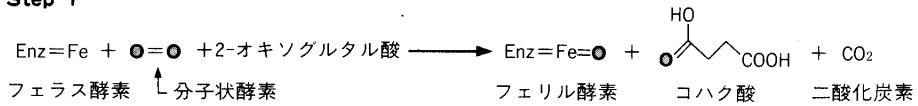
Dehyos の scop への変換が H6H の反応性が広い為に見られる一種の artifact であるという結論と一致している.

H6H は水酸化活性の弱 1/50 という弱い活性ながら、hyosOH を scop へエポキシ化することができる. この反応において hyosOH の 7 β 水素は引き抜かれ、6 β 水酸基の酸素は保持される⁹⁾. この脱水素反応によるエポキシ架橋の形成は植物体における scop の生合成機構と同じである^{10,11)}.

すなわち H6H は水酸化と 2 通りのエポキシ化反応を触媒する. 他の 2-オキソグルタル酸依存型酵素における研究 (特に動物のプロリルヒドロキシラーゼ) を参考にして H6H の反応機構を推定してみると⁸⁾, 第 1 段階としてまず二価鉄を含む酵素 (ferrous enzyme; Enz = Fe) が分子酸素により酸化されフェリル酵素 (ferryl enzyme; Enz = Fe=O) が生成すると同時に、2-オキソグルタル酸が酸化的に脱炭酸しコハク酸が生成する (図 3). この型のジオキシゲナーゼで報告されている様に第 2 段階に示す酸化反応が起こらず 2-オキソグルタル酸が脱炭酸される場合が時々起こるが、この様な uncoupled 反応ではアスコルビン酸が特異的な代替酸素受容体として働く. 生成した酸化反応性に非常に富むフェリル酵素は近傍のプロトンをラジカルとして引き抜くことが知られている. hyos が基質の場合、酵素は C₆-H β 結合を切断しフェリル酸素を挿入する結果 6 位が水酸化される (経路 A). hyosOH のように 6 β 位が水酸基等でブロックされている場合、C₇-H β 結合がゆっくりと切断され、生成した炭素ラジカルは 6 β 水酸基の攻撃を受けることによりエポキシ化が起こる (経路 C). エポキシ架橋形成の別経路は Dehyos の 6,7-2 重結合に直接フェリル酸素が挿入される場合であり、この時も scop が生成する (経路 B).

通常の植物体では hyosOH が蓄積することなく scop が生合成される事実は、上述の H6H の反応特異性からだけでは説明がつかない. すなわち、H6H のエポキシ化活性 (経路 C) が水酸化活性 (経路 A) よりもはるかに弱いならば植物体中では hyosOH が蓄積するはずではないか? 植物体中における H6H の役割を調べる一つの方法は、H6H を持たない植物に H6H 遺伝子を導入し前駆体の投与と実験を行なうことである. 我々はヒヨス由来の H6H cDNA (後述参照) をカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35 S プロモーター下流に連結した H6H 遺伝子をバイナリー法を用いてタバコに導入し、得られた形質転換タバコに hyos と hyosOH を投与すると地上部では両化合物共、効率良く scop に変換されていた (未発表). この *in vitro* と *in vivo* にお

Step 1



Step 2

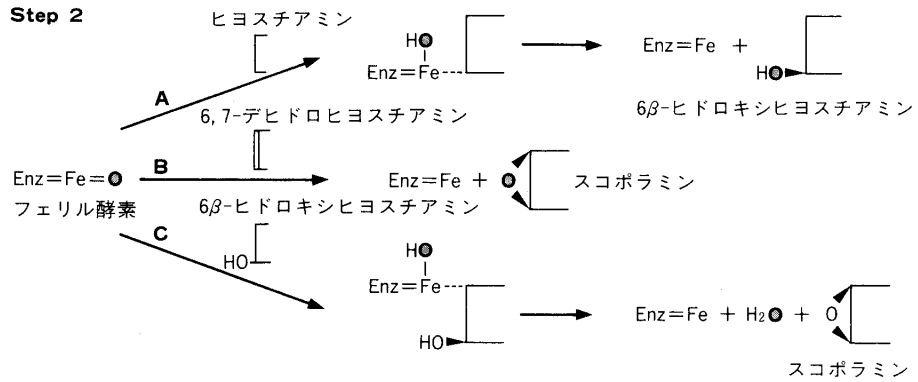


図3. ヒヨスチアミン 6 β 水酸化酵素の推定反応機構。反応 A 及び B は反応 C よりも約 50 倍の速度で起こる。詳細は本文参照。

ける H6H の反応性の違いの実体は現在のところ不明であるが、H6H は植物体においては hyos から scop へ至る生合成の律速酵素となっていることは間違いなさそうである。

ヒヨス培養根より H6H を均一タンパク質にまで精製し、エンドペプチダーゼにより部分分解後、いくつかの内部ペプチドのアミノ酸配列を決定した。この情報を基に合成オリゴヌクレオチド・プローブを作製しヒヨス培養根の mRNA 由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、全長の H6H cDNA クローンが得られた¹²⁾。cDNA 塩基配列より予想される H6H の分子量は 38,999 であり、ゲルろ過から求めた分子量が 41 kDa⁵⁾であることを考え合わせると、H6H は単量体で酵素活性を持つと推定できる。

プロテイン・データベースを検索したところ、いくつ
 かのタンパク質の一次構造に H6H とホモロジーが認め
 られ (図 4), これらは 3 つのグループに分類できた。
 第 1 のグループは 2-オキソグルタル酸依存型ジオキシ
 ゲナーゼに分類されている酵素で、放線菌やカビが生産
 する抗生物質セファロsporin の生合成酵素であるデア
 セトキシセファロsporin C シンターゼ (DAOCS) が
 現在のところ唯一のメンバーである。カビでは単一の
 bifunctional な酵素が DAOCS 活性とデアセチルセファ
 ロsporin C シンターゼ活性を持っているが、放線菌
 では両反応は別々の酵素により触媒される。第 2 のグ
 ループは 2-オキソグルタル酸依存型以外の酸化酵素で、
 これも β -ラクタム系抗生物質の生合成酵素であるイソ
 ペニシリン N シンターゼ (IPNS) にホモロジーが見つ

かった。IPNS も反応に二価鉄とアスコルビン酸を必要とするが、2-オキソグルタル酸は必要でない。IPNS の場合も活性型酵素としてフェリル酵素中間体が推定されており、この反応機構の類似性が一次構造の相同性に反映しているのかも知れない。また、IPNS と 2-オキソグルタル酸依存型酵素は共通の祖先から進化してきたと推測できる。第 3 のグループは一次構造とその触媒する反応は推定されているが *in vitro* での酵素活性は測定されていないタンパク質で、植物起源の 2 種のタンパク質にホモロジーがあった。トマト果実の成熟過程で誘導される一群の遺伝子は最近のアンチセンス RNA 実験によりアミノシクロプロパン 1 カルボン酸からエチレンを生成する反応に関与するものと推定された。トウモロコシの A2 遺伝子はフラバン 3, 4 シスジオールからアントシアンを生成する酵素をコードすることが知られており、最近トランスポゾン・タグging法を用いて遺伝子がクローニングされた。これらのエチレン及びアントシアン生合成酵素の活性が *in vitro* で測定されない原因は、これらの酸化酵素が反応に 2-オキソグルタル酸、二価鉄、アスコルビン酸を要求する為である可能性が十分ある。

H6H とホモロジーが認められたタンパク質の一次構造を比較してみると、3ヶ所ホモロジーが高い部分が存在した(図4)。特に2つのヒスチジン残基が良く保存されており、これらは鉄の配位に関与しているのかも知れない。興味あることに、2-オキソグルタル酸依存型酵素として動物のプロリルヒドロキシラーゼとリジルヒドロキシラーゼ¹³⁾の塩基配列が既に決定されているが、こ

H6H	51	ITKACQDRGLFQVINHGFPPEEIMLETME	78
TOME8	80	VRDASEKWGEFQVNHGIPPTSVIDRTLO	107
pTOM13	4	IKDACEWGEFELVNHGIPHEVMD-TVE	30
GTOMA	24	INDACENWGEFELVNHGIPHEVMD-TVE	50
A2	83	VRPAAADWGVMMIAGHGIPAEIMDRLRA	110
DAOCS-CA	22	LAEEAVTTRGIFMLTIESGLVDDDHTSARE	49
DAOCS-SC	22	FRRCRLRDHGLFMYLTDGLTDTETKSAKD	49
IPNS	34	TDPAARFDIGEFYAVNHGVDLPWLSRETN	60

H6H	217	HMDGNLITLLQQD	229
TOME8	236	HIDIGFVITLLQD	248
pTOM13	157	HIDAGGIILLFQD	169
GTOMA	177	HIDAGGIILLFQD	189
A2	254	HIDVSAISFILHN	266
DAOCS-CA	184	HMDLSTITLVHQT	196
DAOCS-SC	183	HMDLSMTLLQQT	195

H6H	254	VVNLGLTLHVITNEKFEGSIHRV	276
TOME8	272	VVNIQDFLQLLSNDKYLISVEHRA	294
pTOM13	194	VVNLGQDLHVITNGKYKSVLHRV	216
GTOMA	214	VVNLGQDLHVITNGKYKSMVHRV	236
A2	290	IVHVGDALEHILSNGRYTSVLHRG	312
DAOCS-CA	224	VVFCGAVGTILEGGKVAPKPHRV	246
DAOCS-SC	223	LVFCGAIAITLVTTGGQVAPPHRV	245
IPNS	252	LINCSSYMAHITDDYYHAPTHRV	274

図4. H6H と他の類似タンパク質とのアミノ酸配列の比較. トマト果実の成熟関連遺伝子 (TOME8, pTOM13, GTOMA) は文献 (15), (16), (17) より. トウモロコシの A₂ 遺伝子は文献 (18) より. DAOCS のアミノ酸配列は *Cephalosporium acremonium* (DAOCS-CA; 文献 19) 及び *Streptomyces clavuligerus* (DAOCS-SC; 文献 20) のもの. IPNS 遺伝子は 7 種の微生物からクローニングされているが²¹⁾, ここでは *C. acremonium* の IPNS²²⁾ を例として示した. IPNS の配列の下に示した●印は 7 種の IPNS 配列で同一のアミノ酸, ○印は類似のアミノ酸を表わしている. 図に示したアミノ酸のうち 7 つの配列以上において保存されているアミノ酸を白ワックで囲んだ. 矢印は鉄の結合に関与している可能性のある保存されたヒスチジン残基.

これらのヒドロキシラーゼと図4に示したタンパク質は一次構造上の相同性はほとんどない. プロリルヒドロキシラーゼとリジルヒドロキシラーゼも互いに相同性はあまり高くないが, 鉄と配位すると考えられているシステイン残基は両者間で良く保存されている. このことは, 同じ 2-オキソグルタル酸依存型酵素であっても動物のヒドロキシラーゼとその他の酵素では起源が異なり, 両者は集束的進化を遂げて同様の反応を触媒するようになった可能性を示唆している.

2. H6H の発現制御

トロパンアルカロイドの生合成は他の多くの二次代謝と同様に組織特異的に発現する. 植物体における生合成

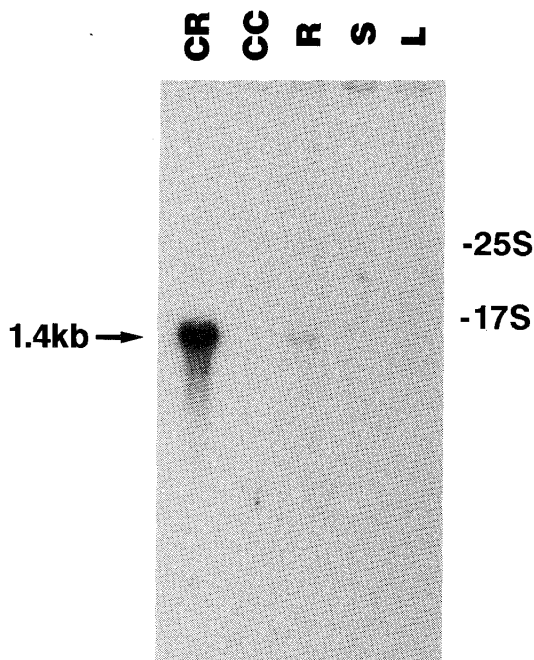


図5. ヒオス H6H mRNA のノーザン・プロット分析.

培養根 (CR), 培養細胞 (CC), 植物体の根 (R), 茎 (S), 葉 (L) から抽出した総 RNA 15 μ g をホルムアルデヒド含有 1, 2% アガロースゲルで分離後, メンブレンに移し ³²P でラベルした H6H cDNA の XhoI 断片をプローブとしてハイブリした. H6H mRNA は約 1.4 kb の大きさに検出される.

部位の決定は古くはアルカロイドを含むナス科植物と含まないナス科植物の地上部と地下部を相互に接ぎ木することにより交換し, アルカロイドの各部位における蓄積を調べることににより行われた. 近年では地上部と地下部を別々に試験管内で培養することにより生合成部位が決定された. 生合成酵素が発見されている場合は各組織における酵素活性を測定することができる. 最も研究の進んでいる H6H の場合, 抗体を用いた実験と分子生物学的研究によりアルカロイド生合成の組織・細胞特異的発現の制御機構が明らかになりつつある.

トロパンアルカロイドは主に根組織で合成される. H6H cDNA をプローブとしてノーザン分析を行うと H6H mRNA は植物体の根と培養根に存在するが, 葉, 茎, 培養細胞には検出されなかった (図5)¹¹⁾. 培養根において植物根よりはるかに H6H mRNA 量が多かった. 根組織における H6H の発現を細胞レベルで調べるために H6H 特異的モノクローナル抗体を作製して免疫組織化学を行ったところ, H6H タンパク質は培養根および植物体のひげ根の内鞘細胞に特異的に存在していた

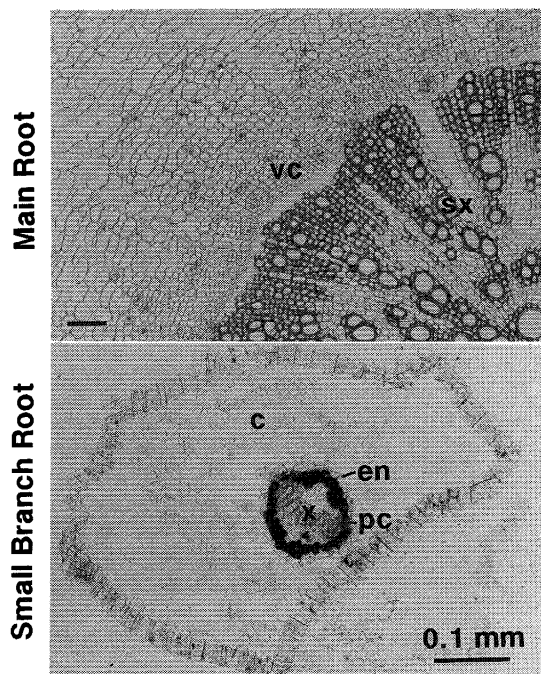


図6. ヒヨス植物根における H6H タンパク質の免疫組織化学的検出。

凍結横断切片を H6H 特異的モノクローナル抗体で処理した後、金コロイド標識抗マウス抗体を反応させ、シグナルを銀増感法で増大させた。上図：主根。二次成長が見られる。下図：ひげ根。内鞘 (pericycle: pc) にシグナルが観察できる。vc: 形成層 (vascular cambium), sx: 二次木部 (secondary xylem), c: 皮層 (cortex), en: 内皮 (endodermis), x: 木部 (xylem)。

(図6)¹⁴⁾。内鞘細胞は二次成長の認められない根の維管束において一番外側の単細胞層を形成しており、一般的に二次成長が起こらない培養根において H6H の発現 (およびアルカロイド生合成活性) が高い理由が理解できる。scop は植物体ではひげ根の内鞘細胞で合成されたあと、すぐ内側に位置する維管束系 (導管又は篩部) を通って地上部へ転流され葉に蓄積するのであろう。現在、我々は H6H 遺伝子のプロモーター領域 (約 0.8 kbp) を GUS レポーター遺伝子に接続した融合遺伝子を作製し、数種の植物に導入して GUS 活性が内鞘細胞に特異的に認められるか実験を行っている。H6H プロモーターがアルカロイド生合成植物でのみ機能するのか、それともどの植物においても細胞特異的発現が見られるのか、興味深いところである。

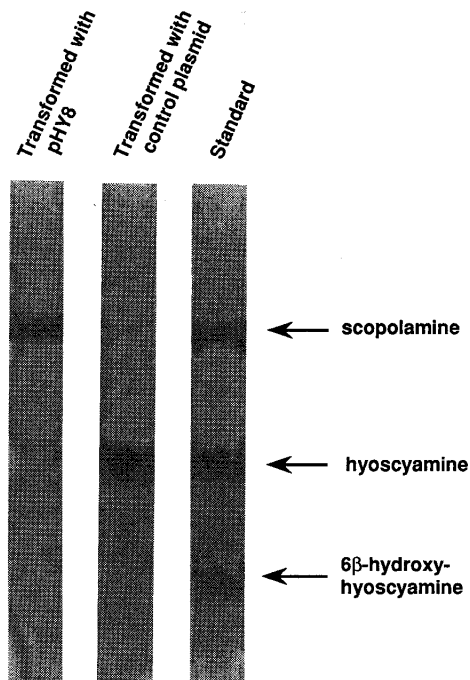


図7. 形質転換ペラドンナ植物葉におけるトロパンアルカロイド。ペラドンナはヒヨス H6H 遺伝子を含む植物発現ベクター (pHY8) 又はコントロールベクターで形質転換した。葉から抽出したアルカロイドは薄層クロマトグラフィーで分離後、ドラゲンドルフ試薬を用いて検出した。

3. 薬用植物の分子育種

hyos と scop は共に副交感神経末梢を抑制する重要な医薬化合物であるが、中枢神経系に対しては hyos が興奮作用を示すのに対し scop が鎮静作用を示すこと、および scop 高含量植物の種類が少ないこと等の理由により、scop の安定した供給量の増大が望まれている。そこで hyos 蓄積型植物を遺伝子工学的手法により scop 蓄積型植物に改変できることを実証する為に、hyos を主アルカロイドとして蓄積し形質転換と再分化が容易な *Atropa belladonna* (ペラドンナ) にヒヨス由来の H6H 遺伝子を導入し、構成的に発現させた (未発表)。H6H cDNA を CaMV 35 S プロモーターの下流につなぎ、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーターをもつ植物発現用バイナリー・ベクターを構築した。 *Agrobacterium tumefaciens* を用いてこの H6H 遺伝子を導入した形質転換ペラドンナでは植物の全組織において H6H 遺伝子が発現しており、葉と茎のアルカロイドを分析すると scop がほぼ 100% を占めていた (図7)。同様の手法を現在トロパンアルカロイドの供給源となっている *Duboisia* 等の植物に応用することにより、近い将来遺

伝子工学により分子育種された薬用植物が実用化されるものと期待される。

最後に、以上の一連の研究を行うにあたり、ご指導を賜った京都大学農学部教授山田康之先生に深く感謝するとともに、共同研究者として多大な協力をいただいた分子細胞育種学教室の学生ならびに研修員の方々に厚くお礼申し上げます。なお、本稿で未発表データとして紹介した H6H 遺伝子を用いた形質転換植物の仕事は、同教室大学院生の尹大珍さんの研究成果であることを付け加えておきます。

文 献

- 1) Edwards, J. W., Coruzzi, G. M., 1990. *Annu. Rev. Genet.*, **24** : 275-303.
- 2) Leete, E., 1991. *Planta Med.*, **56** : 339-352.
- 3) Hashimoto, T., Yamada, Y., 1986. *Plant Physiol.*, **81** : 619-625.
- 4) Yamada, Y., Okabe, S., Hashimoto, T., 1990. *Proc. Japan Acad. Sci., Ser. B*, **66** : 73-76.
- 5) Hashimoto, T., Yamada, Y., 1987. *Eur. J. Biochem.*, **164** : 277-285.
- 6) Yamada, Y., Hashimoto, T., 1989. *Proc. Japan Acad. Sci., Ser. B*, **65** : 156-159.
- 7) Fodor, G., Romeike, A., Janzso, G., Koczor, I., 1959. *Tetrahedron Lett.*, **7** : 19-23.
- 8) Hashimoto, T., Kohno, J., Yamada, Y., 1987. *Plant Physiol.*, **84** : 144-147.
- 9) Hashimoto, T., Kohno, J., Yamada, Y., 1989. *Phytochemistry*, **28** : 1077-1082.
- 10) Leete, E., Lucast, D. H., 1976. *Tetrahedron Lett.*, **38** : 3401-3404.
- 11) Hashimoto, T., Yamada, Y., 1989. *Agric. Biol. Chem.*, **53** : 863-864.
- 12) Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1991. *J. Biol. Chem.*, **266** : 9460-9464.
- 13) Myllylä, R., Pihlajaniemi, T., Pajunen, L., Turpeeniemi-Hujanen, T., Kivirikko, K. I., 1991. *J. Biol. Chem.*, **266** : 2805-2081.
- 14) Hashimoto, T., Hayashi, A., Amano, Y., Kohno, J., Iwanari, S., Usuda, S., Yamada, Y., 1991. *J. Biol. Chem.*, **266** : 4648-4653.
- 15) Deikman, J., Fisher, R. L., 1988. *EMBO J.*, **7** : 3315-3320.
- 16) Holdsworth, M. J., Bird, C. R., Ray, J., Schrch, W., Grierson, D., 1987. *Nucleic Acids Res.*, **15** : 731-739.
- 17) Holdsworth, M. J., Schuch, W., Grierson, D., 1987. *Nucleic Acids Res.*, **15** : 10600.
- 18) Menssen, A., Hohmann, S., Martin, W., Schnable, P. S., Peterson, P. A., Saedler, H., Grierl, A., 1990. *EMBO J.*, **9** : 3051-3057.
- 19) Samson, S. M., Dotlaf, J. E., Slisz, M. L., Becker, G. W., van Frank, R. M., Veal, L. E., Yeh, W.-K., Miller, J. R., Uueener, S. W., Ingolia, T. D., 1987. *Bio/Technology*, **5** : 1207-1214.
- 20) Jensen, S. E., Westlake, D. W. S., Wolfe, S., 1985. *J. Antibiot.*, **38** : 263-265.
- 21) Cohen, G., Shiffman, D., Mevarech, M., Aharonowitz, Y., 1990. *Trends Biotechnol.*, **8** : 105-111.
- 22) Samson, S. M., Belagaje, R., Blankenship, D. T., Chapman, J. L., Perry, D., Skatrud, P. L., van Frank, R. M., Abraham, E. P., Baldwin, J. E., Queener, S. W., Ingolia, T. D., 1985. *Nature*, **318** : 191-194.