

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4568833号
(P4568833)

(45) 発行日 平成22年10月27日(2010.10.27)

(24) 登録日 平成22年8月20日(2010.8.20)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/10 (2006.01) C 1 2 N 9/10
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P 17/12 (2006.01) C 1 2 P 17/12

請求項の数 2 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2001-226075 (P2001-226075)	(73) 特許権者	504132272
(22) 出願日	平成13年7月26日(2001.7.26)		国立大学法人京都大学
(65) 公開番号	特開2002-291487 (P2002-291487A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公開日	平成14年10月8日(2002.10.8)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成19年8月6日(2007.8.6)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	特願2000-382166 (P2000-382166)	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成12年12月15日(2000.12.15)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100116311
			弁理士 元山 忠行
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(72) 発明者	佐藤 文彦
			京都府京都市左京区北白川追分町 京都大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コクラウリン-N-メチルトランスフェラーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の理化学的性質を有するコクラウリンN-メチルトランスフェラーゼ。

- (1) 至適pH 7.0
- (2) 等電点 4.2
- (3) 4量体
- (4) 分子量 160 k Da (ゲル濾過クロマトグラフィー)
- (5) サブユニットの分子量 45 k Da (SDS-PAGE)

【請求項2】

請求項1の酵素を用いて植物二次代謝産物を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、N-メチルコクラウリンの生合成酵素であるコクラウリン-N-メチルトランスフェラーゼ(以下「CNMT」と略記することがある)、該酵素をコードするDNA該DNAを用いて、N-メチルコクラウリンおよび/またはこのN-メチルコクラウリンから生合成される各種アルカロイド、ならびにCNMTによって生成するN-メチル化合物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ベルベリンは、イソキノリンアルカロイドに分類される植物二次代謝産物の一種で、キンポウゲ科のセリバオウレン (*Coptis japonica* Makino var. *Dissecta* (Yatabe) Nakai) やアキカラマツ (*Thalictrum minus* var. *hypolencum*)、ミカン科のキハダ (*Phellodendron amurense* Rupr)、メギ科のセイヨウメギ (*Berberis wilsoniae*) などによって産生され、抗菌、健胃、抗炎症活性を持つ。現在のところ、ベルベリンは前記植物種を始めとするベルベリン含有植物天然品からの抽出によって製造されており、また当該植物の培養細胞を用いた工業的な製造法が研究されている [K. Matsubara et al., *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 46, 61-69 (1989)]。

バイオテクノロジーを応用する素材として、またアルカロイド生合成の代謝制御に関する基本的な興味から、培養細胞におけるベルベリン生合成は酵素レベルでよく研究されている [T. M. Kutchan, In *The alkaloids*. Vol 50 (G. Cardell, ed.), San Diego, Academic Press, pp257-316(1998); F. Sato et al., *Phytochemistry* 32, 659-664 (1993); F. Sato et al., *European Journal of Biochemistry* 225, 125-131 (1994)]。ベルベリンは、チロシンを生合成における出発化合物とし、(S)-ノルコクラウリンを経由して13段階の異なる酵素反応により生合成される (図1)。この13段階の反応には、1つのN-メチルトランスフェラーゼ (NMT) [T. Frenzel and M. H. Zenk, *Phytochemistry* 29, 3491-3497 (1990); C. K. Wat and M. H. Zenk, *Zeitschrift fuer Naturforschung* 41c, 126-134 (1986)]、3つのO-メチルトランスフェラーゼ (OMTs) [M. Ruffer et al., *Planta Medica* 49, 131-137 (1983); S. Muemmler et al., *Plant Cell Reports* 4, 36-39 (1985); T. Frenzel and M. H. Zenk, *Phytochemistry* 29, 3505-3511 (1990); F. Sato et al., *Phytochemistry* 32, 659-664 (1993); F. Sato, et al. *European Journal of Biochemistry* 225, 125-131 (1994)]、1つのヒドロキシラーゼ [S. Loeffler and M. H. Zenk, *Phytochemistry* 29, 3499-3503 (1990)]、1つのベルベリン架橋酵素 [P. Steffens et al., *Tetrahedron Letters* 25, 951-952 (1984)]、1つのメチレンジオキシ環形成酵素 [M. Rueffer and M. H. Zenk, *Tetrahedron Letters* 26, 201-202 (1985)]、1つのテトラヒドロプロトベルベリンオキシダーゼ [Y. Yamada and N. Okada, *Phytochemistry* 24, 63-65 (1985); E. Galnder et al., *Plant Cell Reports* 7, 1-4 (1988)] が含まれる。しかしながら、これら酵素のうち高度に精製され、その酵素学的性質が明らかにされたものは、6-O-メチルトランスフェラーゼ [M. Ruffer et al., *Planta Medica* 49, 131-137 (1983); F. Sato, et al. *European Journal of Biochemistry* 225, 125-131 (1994)]、3'-ヒドロキシ-N-メチルコクラウリン 4'-O-メチルトランスフェラーゼ [T. Frenzel and M. H. Zenk, *Phytochemistry* 29, 3505-3511 (1990)]、(S)-スコウレリン 9-O-メチルトランスフェラーゼ [F. Sato et al., *Phytochemistry* 32, 659-664 (1993)] の3種にすぎない。

これら生合成に関わる酵素群の酵素学的性質、さらには該酵素遺伝子を明らかにし、バイオテクノロジーを応用することは、ファインケミカルズの生物変換する上で有用である。しかしながらベルベリン生合成経路上の酵素精製における困難な点は、これら酵素の反応メカニズムや基質が似ているために、それぞれの酵素の特性が類似していることにある。

【0003】

メチルトランスフェラーゼ cDNA の単離およびこれらの大腸菌における発現に関する最近の研究は、O-メチルトランスフェラーゼに関する更なる情報を供給している [Frick et al., *Plant J.* 17(4), 329-339 (1999); Morishige et al., *J. Biol. Chem.* 275(30), 23398-23405 (2000)]。しかしながら、ベルベリン生合成におけるユニークなN-メチルトランスフェラーゼであるコクラウリン N-メチルトランスフェラーゼに関してはほとんど報告がない。N-メチルトランスフェラーゼでは、ニコチン生合成でのプトレシン N-メチルトランスフェラーゼのみがよく研究されており、cDNA が単離されている [N. Hibi et al., *Plant Cell* 6, 723-735 (1994)]。ベルベリン生合成のN-メチル化反応を触媒するCNMTは、S-アデノシル-L-メチオニン (以下「SAM」と略記する) をメチル基供与体として(S)-コクラウリンのアミノ基をメチル化し、N-メチルコクラウリンを生成する酵素である。本酵素と同じ反応を触媒する酵素がメギ科 *Berberis koeineana* から既に単離されており、その酵素学的性質が調べられているが [T. Frenzel and M. H. Zenk, *Phytochemistry* 29, 3491-3

10

20

30

40

50

497 (1990)]、本酵素はノルラウダノソリン、6,7-ジメトキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン、メチル-6,7-ジヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリンは基質として認識されず、そのN-メチル化反応を触媒しない。一方、オウレン細胞由来CNMTの単離精製、酵素化学的性質および該酵素遺伝子に関しては、それを解明しようとする研究はこれまでのところ全くなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、CNMTを用いて、医薬品として有用なイソキノリンアルカロイドを効率よく生産することを目的とする。また、CNMTをコードするDNAをクローン化し、その塩基配列を決定し、更にクローン化した組換えDNAを発現させた細胞を用いてCNMT、該酵素をコードするDNAおよびN-メチルコクラウリンおよび/またはこのN-メチルコクラウリンから生合成される各種アルカロイド、さらにはCNMTによって触媒される種々のN-メチル化化合物を製造することを目的とする。

10

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、誠意研究の結果、オウレンの培養細胞からCNMTの酵素活性(ノルレチクリンとS-アデノシルメチオニンからのレチクリンの生成)を指標にCNMTの単離精製を試み、硫安沈殿および各種カラムクロマトグラフィーにより、およそ340倍に精製した酵素を疎抽出液の1%の収量で得た(表1)。本精製酵素の酵素学的性質を調べたところ、オウレン培養細胞から得られたCNMTは、Berberisから単離されたCNMTでは酵素反応の基質とならなかったノルラウダノソリン、6,7-ジメトキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン、メチル-6,7-ジヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリンについても基質として利用され、メチル化反応が触媒されることから、BerberisからのCNMTに比べて基質特異性が低く、より多くの化合物をメチル化できることを確認した。

20

また、本酵素のN末端アミノ酸配列ならびに発明者がこれまでに解析してきたオウレンのコドンの使用頻度を手がかりとして、PCR法によりCNMT cDNAをクローニングした。本cDNAの全長ORFを大腸菌発現ベクターに組込み、形質転換して機能解析をした結果、該大腸菌においてノルレチクリンとS-アデノシルメチオニンからのレチクリンの生成、すなわちN-メチルトランスフェラーゼ活性が認められたことから、本cDNAがCNMTをコードしていることを確認した。

30

【0006】

すなわち、本発明の第1の態様は、コクラウリンN-メチルトランスフェラーゼの酵素活性を有し、更にはノルラウダノソリン、6,7-ジメトキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン、メチル-6,7-ジヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリンなどのイソキノリンとともにフェニールエタノールアミンなどのフェノールアミンを含む広範な化合物群を酵素反応の基質としてメチル化反応を触媒する酵素および/または配列番号1に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。また、第2の態様は、CNMT酵素活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAおよび/または配列番号1に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAであり、配列番号1に記載のヌクレオチド配列を含むDNAが挙げられる。本発明の第3の様態は、第2の様態に記載のDNAを含むベクターである。本発明の第4の様態は、上記ベクターで形質転換された細胞である。また、本発明の第5の様態は、上記形質転換細胞を用いて、植物二次代謝産物を製造する方法である。この植物二次代謝産物はN-メチルコクラウリンから生合成されるアルカロイドならびにCNMTによって生成するN-メチル化化合物であってもよい。

40

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、ベルベリン型アルカロイド産生植物の一つであるオウレンの培養細胞からCNMTを単離したが、SAMをメチル基供与体としてコクラウリンをN-メチルコクラウリンに

50

変換する反応を有する植物であれば、本発明のCNMTと実質的に同一の酵素が含まれていると推測され、本明細書に記載の方法を用いればそれら植物からでも、本発明のCNMTと実質的に同一のを単離することができる。SAMをメチル基供与体としてコクラウリンをN-メチルコクラウリンに変換する反応を有する植物としては、セリバオウレンなどのキンポウゲ科Coptis属植物、アキカラマツなどのキンポウゲ科Thalictrum属植物、キハダなどのミカン科Phellodendron 属植物、セイヨウメギなどのメギ科Berberis属植物、ケシなどのケシ科Papaver属植物などを例示することができる。

【 0 0 0 8 】

さらに、本発明のCNMTは、表 2 および図 2 に示したようにコクラウリンの他にもノルラウダノソリンやノルレティクリンといった構造類似化合物をもメチル化することができるので、前記の植物種以外であってもこれらコクラウリンの構造類似化合物を含む植物であれば、本発明の方法を適用することができる。

【 0 0 0 9 】

【表 1】

セリバオウレン CNMTの基質特異性

基質	比活性	
(R)-コクラウリン	122	
(S)-コクラウリン	100	
(R, S)-ノルレティックリン	55	10
(R, S)-ノルラウダノソリン	48	
(R, S)-6-0-メチルノルラウダノソリン	38	
(R, S)-スコーレリン	0	
6, 7-ジメトキシ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン	39	
1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン	0	
1-メチル-6, 7-ジヒドロキシ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン	10	
1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-3-イソキノリンカルボン酸	0	20
(+)-エメチン	0	

なお、酵素学的な検討の結果、本発明にかかるCNMTは以下の基本的性質を有することが明らかになっている。

4 量体

分子量：160,000 (ゲル濾過クロマトグラフィー)

サブユニットの分子量：45,000 (SDS/PAGE)

等電点：4.2 (Mono-P)

至適pH：7.0

K_m値 (図3)： 0.65 mM (S-アデノシル-L-メチオニン)

0.38 mM ((R, S)-ノルレティックリン)

阻害剤 (表3)：Co²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺

反応機構 (図4)：典型的ミカエリス-メンテン型

【 0 0 1 0 】

次に、CNMTをコードするcDNAを単離し、その塩基配列を決定した。まず、ベルベリン高生産オウレン培養細胞から単離精製したCNMT標品のN末端アミノ酸配列を決定し、この配列に対する縮重プライマーを用いて、アルカロイド高生産オウレン培養細胞cDNAライブラリーを鋳型としたPCR法により、このアミノ酸配列に相当するcDNAを増幅、単離し、この塩基配列を決定した。更に、決定した内部塩基配列より設計したプライマーとcDNAライブラリーのアダプター領域に対するプライマーを利用したPCR法により、本酵素のC末端及

10

20

30

40

50

びN末端部分に相当する塩基配列を得たことで、全長塩基配列を決定した。本cDNAの全長のORFを大腸菌発現ベクターに組み込み、大腸菌に形質転換して機能解析を行った結果、該大腸菌において本来存在しないN-メチルトランスフェラーゼ活性が認められたことから、本cDNAがN-メチルトランスフェラーゼをコードしていることを確認した。また、本組換え酵素は、単離精製したCNMTが有する上記基質に対するN-メチルトランスフェラーゼ活性に加え、4-O-メチルドーパミンやノルエピネフリンなどをN-メチル化する活性を弱いながら有していた。

【0011】

【実施例】

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

[実施例1] CNMTの抽出、精製

まず、セリバオウレンからベルベリン高生産培養細胞を以下のようにして誘導した。

【0012】

セリバオウレンの葉および葉柄を、70%エタノールおよびアンチホルミン溶液で殺菌した後、切片を作成し、 $10^{-5}M$ ナフタレン酢酸および $10^{-8}M$ 6-ベンジルアデニンを含むリンスマイヤー・スクーグの寒天培地に床置き、25℃、暗所で培養した。培養開始後3週間目頃から、当該切片の切り口に生じた黄色カルスを採取して、前記と同様の寒天培地に移植しさらに増殖を図った。こうして得られたカルスを前記と同様の組成の液体培地に懸濁し、前記と同じく25℃、暗所で、回転型のロータリーシェーカーを用いて100rpmで振盪培養し、2～3週間毎に移植を繰り返した。

【0013】

得られた液体培養細胞は、直径が数十 μm ～数mmの細胞塊からなるので、これら細胞塊を単位として、ベルベリン高生産株の選抜を実施した。すなわち、細胞塊の一部を前記の寒天培地上に均一に広げて培養し、各細胞塊からコロニーを増殖させた。得られたコロニーを同じ寒天培地に個別に増殖させ、その一方で液体クロマトグラフィーを用いてベルベリンの含有量を測定し、含有量の高いものを高生産細胞として選抜し、この系統をあらたな親株として液体培養、次いで前記操作による選抜を繰り返し、高生産株を得た。

【0014】

このベルベリン高生産培養細胞を $10\mu M$ のナフタレン酢酸と $0.01\mu M$ の6-ベンジルアデニンを含むリンスマイヤー・スクーグの液体培地で3週間ごとに継代し、25℃、暗所で、回転型のロータリーシェーカーを用いて100rpmで振盪培養した。培養14日目の細胞を収穫し、直ちに液体窒素中で凍結後、 $-80^\circ C$ で保存した。

【0015】

この細胞を用いてCNMTの単離精製を実施した。特に断らない限り、全ての操作は0-4℃で行われ、全ての緩衝液に20mMの β -メルカプトエタノールと10%グリセロールを添加した。約200gの凍結オウレン培養細胞を、450mlの0.2Mトリス塩酸緩衝液中で、ワーリングブレンダーを用いて最高速度で2分間破碎し、その後20分間超音波処理を行って、酵素を抽出した。懸濁物を濾過し、濾液を $10000\times g$ で50分間遠心分離した。上清をNAP-10カラム(Pharmacia社)で脱塩し、疎抽出液とした。酵素は30-50%飽和の硫酸で沈殿させた。沈殿した蛋白を60mlの抽出緩衝液に溶解し、遠心した。蛋白溶液はPD-10カラム(Pharmacia社)で脱塩し、初動緩衝液(30%硫酸を含む200mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5))で平衡させたフェニルセファロースCL-4Bカラムにのせた。黄色のアルカロイドを除去するために、同じ緩衝液で十分にカラムを洗浄した後、CNMTは120mlの30%から0%の直線的グラジエントをかけた硫酸溶液で溶出した。CNMTフラクションを、200mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で予め平衡させたQ-Sepharose FFカラム(Pharmacia社)によるイオン交換クロマトグラフィーにかけた。カラムを同じ緩衝液で洗浄した後、CNMTを120mlの0から0.5Mの直線的グラジエントをかけた塩化ナトリウム溶液で溶出した。活性フラクションを集め、脱塩し、20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で予め平衡させたMono-Qカラム(HR5/5、Pharmacia社)によるFPLCシステムで精製した。CNMTは40mlの0から0.35Mのグラジエントをかけた塩化ナトリウム溶液で

10

20

30

40

50

段階的に溶出した。更に活性フラクションを集め、Mono-Pカラム(HR5/5、Pharmacia社)によるFPLCシステムでのクロマトフォーカシングした(初動緩衝液; 25mM Bis Tris-イミノ二酢酸緩衝液(pH7.1)、溶出緩衝液; イミノ二酢酸でpH4に調製した10%ポリ緩衝液74)。溶出したフラクションのpHは直ちに、100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で調整した。精製された酵素は50%グリセロール中、-20 で保存した。尚、凍結融解のくり返しによりCNMT活性はかなり減少したことから、融解したサンプルについては再凍結を行わなかった。精製酵素は50%グリセロール中、-20 で保存した場合、1年後でもCNMT活性を保持していた。また、全てのFPLCステップは室温で実施した。

【0016】

CNMT活性の測定は以下条件で行った。表2に精製過程をまとめた。

10

アッセイ溶液

ノルレチクリン	0.1mM
SAM(S-アデノシル-L-メチオニン)	1 mM
アスコルビン酸ナトリウム	25 mM
カリウム-リン酸緩衝液(pH7.0)	100 mM
酵素液	20 μ l
計	50 μ l

20

酵素反応条件

温度	: 30℃
時間	: 60分間
反応停止	: 50 μ lのメタノール添加

HPLC分析条件

サンプル	: 上記反応液を4℃、10000×gで50分間遠心した上清
カラム	: LiChrosper 100RP-18(250mm×4mm, Cica Merck)
検出	: UV 280 nm
流速	: 1.0 ml/min
移動相	: 22%アセトニトリル+1%酢酸

30

【0017】

【表2】

40

Purification step	Total protein (mg)	Total Activity (pkat)	Specific activity (pkat/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	512	428	0.83	1.0	100
30-50% Ammonium sulfate	151	240	1.59	1.91	54
Phenyl Sepharose	65.1	369	5.66	6.81	82
Q-Sepharose	13.2	204	15.4	18.6	45
Mono Q	0.76	34.4	45.3	54.5	8
Mono P	0.02	5.7	285	343	1.2

Two hundred grams of cultured *Coptis* cells was homogenized for purification of the enzyme.

【 0 0 1 8 】

[実施例 2] CNMTの酵素特性

コクラウリンN-メチルトランスフェラーゼが高純度で精製され、酵素特性が調べられたのは、これが初めてである。SDS-PAGE分析でのCNMTモノマーの分子量は45kDaであった。一方、Superose 12カラムでのゲル濾過クロマトグラフィーでは、天然のCNMTの分子量は約160kDaであった。これらの結果より、CNMTは4量体の酵素である。Mono-Pカラムでのクロマトフォーキングより、CNMTの等電点は4.2であった。酵素活性の至適pHは7.0であり、50%活性のpHは6.0と9.0であった。CNMTは活性発現に2価カチオンを必要とせず、EDTA添加はCNMTの活性を阻害しなかった(表3)。5mMの Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} の添加は、活性をそれぞれ、75、47、57%阻害した。いくつかのO-メチルトランスフェラーゼ活性を阻害するSH-

10

20

30

40

50

阻害剤であるp-クロロメリクリベンゾイトとヨードアセタミドは、5mMではCNMT活性を阻害しなかった。

【 0 0 1 9 】

【 表 3 】

Inhibitors	Conc. of Inhibitors (mM)	Relative activity (%)	
Control (none)	0	100	
CaCl ₂	5	125	
CoCl ₂	5	25	
CuCl ₂	5	53	10
FeCl ₂	5	99	
LiCl ₂	5	93	
MgCl ₂	5	98	
MnCl ₂	5	43	
NiCl ₂	5	92	
ZnCl ₂	5	93	
EDTA	1	95	
	5	93	
IOA	1	96	
	5	91	
PCMB	1	94	
	5	92	20

CNMT activity was measured with norreticuline as the substrate as described in Experimentals using [³H-methyl]SAM.

IOA; iodoacetamide, PCMB; *p*-chloromercuribenzoate

【 0 0 2 0 】

[実施例 3] CNMTの基質特異性

広範囲のイソキノリンアルカロイドにおいて、酵素の基質特性を調べた。酵素活性は、S-adenosyl-L-[methyl-³H] methionineから生成物への放射能の編入を測定した。以下の条件で酵素反応を行った。

30

アッセイ溶液

基質	1 mM	
[methyl- ³ H]SAM(7.4dpm/ μ mol)	1 mM	
アスコルビン酸ナトリウム	25 mM	
カリウム-リン酸緩衝液(pH7.0)	100 mM	
酵素液	20 μ l	40
計	50 μ l	

酵素反応条件

温度	: 30℃
時間	: 20分間

酵素反応後、150 μ lの炭酸2ナトリウムと400 μ lのイソアミルアルコールを添加して反応を停止した。激しく混合した後、室温、10000 \times gで5分間遠心し、150 μ lの有機層を取り

50

、放射能を測定した。酵素液の入っていないアッセイ溶液をコントロールとして用いた。

【 0 0 2 1 】

結果を表 1 に示す。(S)-コクラウリンの活性を100%とした場合、(R)-コクラウリン、ノルレチクリン、ノルラウダノソリンおよび6-O-メチルノルラウダノソリンの比活性はそれぞれ、122%、55%、48%、および38%であった。興味深いことに、6,7-ジメトキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリンは39%の比活性でメチル化されたが、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリンはメチル化されなかった。オウレンのCNMTは、かなり広い範囲の基質にメチル基を転移し、立体特異性を示さなかった。

【 0 0 2 2 】

オウレンCNMTの基質特異性は、BerberisのN-メチルトランスフェラーゼの基質特異性とよく似ており、どちらの酵素も立体特異性を示さず、それぞれ(R)-コクラウリン、(S)-コクラウリン、ノルレチクリン、6-O-メチルノルラウダノソリンに広い基質特異性を示す。しかし、オウレンのCNMTはノルラウダノソリンをN-メチル化するが、BerberisのN-メチルトランスフェラーゼはノルラウダノソリンをN-メチル化しない。オウレン由来CNMTは、Berberis由来CNMTに比べ、より広い基質特異性を持つ。

【 0 0 2 3 】

[実施例 4] CNMTの酵素動力学

CNMTの最適基質は(R)-コクラウリンであるが、CNMTの酵素特異性を調べるのには、最も利用しやすいノルレチクリンを用いた。オウレン細胞のCNMTは、ノルレチクリンとSAMとでミカエルス-メンテン型の動力学を示した。見かけのKm値は、ノルレチクリンが0.38mM、SAMが0.68mMであった。これは、BerberisのCNMTのKm値(ノルレチクリンで0.02mM、SAMで0.04mM) [T. Frenzel and M. H. Zenk, *Phytochemistry* 29, 3491-3497 (1990)] やSanguinariaのCNMTのKm値((R,S)-テトラヒドロベルペリンで0.02mM、SAMで0.012mM) [B. R. O'keefe and C. W. W. Beecher, *Plant Physiology*, 105, 395-403 (1994)] よりもやや大きい、ノルコクラウリン6-O-メチルトランスフェラーゼのKm値((R,S)-ノルラウダノソリンで2.23mM、SAMで3.95mM) [F. Sato, et al. *European Journal of Biochemistry*, 225, 125-131(1994)] よりも小さい。

【 0 0 2 4 】

[実施例 5] CNMTのN末端アミノ酸配列の決定

実施例 1 に記載のベルペリン高産生セリバオウレン培養細胞から単離精製したコクラウリンN-メチルトランスフェラーゼをSDS - PAGEにより分離し、Bio-Rad blotting装置によりPVDFプロットングメンブレンフィルター(ミリポア製)へ電気泳動的に移した。メンブレンフィルターを洗浄した後、CBB試薬による発色でタンパクの位置を検出した。目的のバンドを切り出し、乾燥させた後、アミノ酸シーケンサー477A/120A (Applied Biosystems製)により分析を行った。結果を配列番号 2 に示す。

【 0 0 2 5 】

[実施例 6] cDNAライブラリーの作成

実施例 1 のようにして得られた培養10日目のセリバオウレン培養細胞から、グアニジンチオシアネート/ホットフェノール法により全RNAを抽出し、更にmRNA精製キット(Pharmacia製)を用い、製造者の説明書に従ってPoly(A)⁺RNAを精製した。精製したPoly(A)⁺RNAを用い、Gubler and Hoffman (*Gene* 25: 263 (1983))の方法に従ってセリバオウレン培養細胞cDNAライブラリーを作成した。

【 0 0 2 6 】

[実施例 7] CNMTのN末端アミノ酸配列に相当する cDNA断片の取得

実施例 5 で決定したN末端アミノ酸配列をもとに、配列番号 3 に記載の塩基配列を推定し、この配列に相当する cDNA断片をオウレンのコドン使用頻度により予測した縮重プライマーを用いたPCRにより増幅した。PCRは実施例6に記載のセリバオウレン培養細胞cDNAライブラリーを鋳型とし、配列番号 4 と配列番号 5 で示される塩基配列の縮重プライマーを用い、94 で30秒間のディネーチャー、50 で30秒間のアニール、72 で45秒間の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル反応させた。得られたPCR産物はpGEM - Tベクターにサブ

10

20

30

40

50

クローニングした。いくつかのクローンをシークエンスした結果、配列番号6で示される塩基配列から成る目的のcDNA断片を取得した。

【0027】

[実施例8] CNMTをコードする全長塩基配列の決定

配列番号6に記載の塩基配列をもとに、本酵素のC末端アミノ酸配列に相当するcDNA部分をセリバオウレンcDNAライブラリーを鋳型にネスティッドPCRにより増幅した。初めは配列番号7で示される塩基配列のプライマーと配列番号8で示されるcDNAライブラリーのアダプター領域に対するプライマーを用いて、94 で30秒間のディネーチャー、50 で30秒間のアニール、72 で45秒間の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル反応させた。二回目は配列番号9で示される塩基配列のプライマーとオリゴdTプライマーを用いて、94 で30秒間のディネーチャー、50 で30秒間のアニール、72 で45秒間の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル反応させた。得られたPCR産物はpGEM-Tベクターにサブクローニングした。いくつかのクローンをシークエンスした結果、配列番号10で示される塩基配列から成る目的のcDNA断片を取得した。

配列番号10に記載の塩基配列をもとに、本酵素のN末端アミノ酸配列に相当するcDNA部分をセリバオウレンcDNAライブラリーを鋳型にネスティッドPCRにより増幅した。初めは、配列番号11で示される塩基配列のプライマーと配列番号12で示されるcDNAライブラリーのアダプター領域に対するプライマーを用いて、94 で30秒間のディネーチャー、50 で30秒間のアニール、72 で45秒間の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル反応させた。二回目は、配列番号13で示される塩基配列のプライマーと初めのPCRに使用した配列番号12で示されるプライマーを用いて、94 で30秒間のディネーチャー、50 で30秒間のアニール、72 で45秒間の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル反応させた。得られたPCR産物はpGEM-Tベクターにサブクローニングした。いくつかのクローンをシークエンスした結果、配列番号14で示される塩基配列から成る目的のcDNA断片を取得した。既に決定していた配列と合わせて、配列番号1に示す1274塩基よりなる塩基配列が得られ、その配列より、アミノ酸配列が推定された。

【0028】

[実施例9] 機能確認

実施例8で決定したアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能を明らかにするため、該ポリペプチドをコードするcDNAの全長ORFをPCRにより増幅し、大腸菌での発現プラスミドpET-T-21d(Novagen社)に組込んだ。PCRはセリバオウレンcDNAライブラリーを鋳型とし、配列番号15と配列番号16で示される塩基配列のプライマーを用い、94 で30秒間のディネーチャー、60 で30秒間のアニール、72 で90秒間の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル反応させた。得られたPCR産物は制限酵素NcoIとEcoRIで処理し、発現プラスミドpET-T-21dのNcoIとEcoRIサイトに組込み、これをpET-21d-CNMTとした。これによりCNMTはT7プロモーターの下流にセンス方向に導入される。更に得られたpET-21d-CNMTプラスミドを大腸菌株BL21(DE3)に導入した。培養条件、IPTGによる発現誘導、発現した酵素の調整方法はMorishige, T. et al. 文献に記載されている方法と同様に行った[J. Boil. Chem. 275, 23398-23405(2000)]。なお、誘導後の培養は30、3時間行った。発現したタンパク質を用いて実施例1に従い、CNMT活性を測定した。生成したアルカロイド画分はHPLCにより分析した。生成した化合物であることはLC-MS(島津製作所製)により行った。

【0029】

尚、メチル化合物のLC-MS分析の結果、ノルレチクリン(m/z 316, m/z 178)からレチクリン(m/z 330, m/z 192)が生成していることを確認した。よって本cDNAは、高等植物から得られたN-メチルトランスフェラーゼの1つに位置づけられるコクラウリン-N-メチルトランスフェラーゼ(CNMT)をコードしているものと結論づけた。

【0030】

さらに、上記大腸菌より実施例1により組換えCNMTを精製したところ、その比活性はオウレン細胞からの精製物よりはるかに高い活性(18 nkat/mg)を示し、かつ、この酵素はnoreticulineを基質にした時の活性を100として表示すると、1-methyl-6,7-dihydroxy-1,

10

20

30

40

50

2,3,4-tetrahydroisoquinolineを180メチル化し、phenylethanolamineを20、3-hydroxy-4-methoxyphenylethylamineを11、norphenylephrine (noradrenarine)を16メチル化するなど、イソキノリンアルカロイドに限らず、一般的なフェニールアミンに対してもN-メチル化活性を示すことを明かとした。

【0031】

【発明の効果】

以上記載の如く、本発明によりCNMTおよびCNMTをコードするDNAが提供される。本願発明の酵素を用いることにより医薬品として有用なイソキノリンアルカロイドを効率よく生産することが可能で、更にクローン化した組換えDNAを発現させた細胞を用いてCNMT、該酵素をコードするDNAおよびN-メチルコクラウリンおよび/またはこのN-メチルコクラウリンから生合成される各種アルカロイド、あるいはN-メチル化フェニールアミン類縁体を製造することも可能である。

【0032】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUI CHEMICALS, INC

<120> A coclaurine N-methyltransferase and a gene encodes the coclaurine
N-methyltransferase

10

<130> coclaurine N-methyltransferase

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20

<211> 1274

<212> DNA

<213> Coptis japonica

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1077)

30

<400> 1

atg gct gtg gaa gca aag caa aca aag aag gca gcc ata gta gag ttg 48

Met Ala Val Glu Ala Lys Gln Thr Lys Lys Ala Ala Ile Val Glu Leu

1

5

10

15

tta aaa cag ttg gag ctg ggc ttg gtt cca tat gat gat att aag cag 96

Leu Lys Gln Leu Glu Leu Gly Leu Val Pro Tyr Asp Asp Ile Lys Gln

40

20	25	30	
ctc ata agg agg gaa ctg gca agg cgc ctg caa tgg ggt tat aaa cct			144
Leu Ile Arg Arg Glu Leu Ala Arg Arg Leu Gln Trp Gly Tyr Lys Pro			
35	40	45	
act tat gaa gaa caa ata gct gaa atc caa aac tta act cat tct ctg			192
Thr Tyr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Ile Gln Asn Leu Thr His Ser Leu			10
50	55	60	
cga caa atg aaa att gca aca gag gtt gag acc ttg gat tca caa ttg			240
Arg Gln Met Lys Ile Ala Thr Glu Val Glu Thr Leu Asp Ser Gln Leu			
65	70	75	20
tac gag att cct att gag ttt cta aag att atg aat gga agt aac tta			288
Tyr Glu Ile Pro Ile Glu Phe Leu Lys Ile Met Asn Gly Ser Asn Leu			
85	90	95	
aaa gga agt tgt tgc tac ttc aaa gaa gat tca aca aca tta gat gaa			336
Lys Gly Ser Cys Cys Tyr Phe Lys Glu Asp Ser Thr Thr Leu Asp Glu			30
100	105	110	
gct gag ata gcg atg ctg gat tta tac tgc gag aga gct caa atc caa			384
Ala Glu Ile Ala Met Leu Asp Leu Tyr Cys Glu Arg Ala Gln Ile Gln			
115	120	125	
gat gga cag agt gtt ctt gat ctt gga tgt ggg caa gga gct ctt aca			432
Asp Gly Gln Ser Val Leu Asp Leu Gly Cys Gly Gln Gly Ala Leu Thr			40
130	135	140	

tta cat gtt gca cag aaa tat aaa aac tgt cgc gta aca gca gta aca	480	
Leu His Val Ala Gln Lys Tyr Lys Asn Cys Arg Val Thr Ala Val Thr		
145	150	155
160		
aat tca gtt tca caa aaa gag tac att gaa gaa gaa tca agg aga cgt	528	
Asn Ser Val Ser Gln Lys Glu Tyr Ile Glu Glu Glu Ser Arg Arg Arg		10
165	170	175
aat ttg ttg aat gtg gaa gtc aaa ttg gca gac ata acc aca cat gag	576	
Asn Leu Leu Asn Val Glu Val Lys Leu Ala Asp Ile Thr Thr His Glu		
180	185	190
atg gct gag aca tac gat cgt att ttg gta ata gag ttg ttt gag cac	624	20
Met Ala Glu Thr Tyr Asp Arg Ile Leu Val Ile Glu Leu Phe Glu His		
195	200	205
atg aag aac tat gaa ctt ctc ctg agg aaa atc tca gag tgg ata tcg	672	
Met Lys Asn Tyr Glu Leu Leu Leu Arg Lys Ile Ser Glu Trp Ile Ser		
210	215	220
aaa gat ggg ctt ctc ttt cta gag cac ata tgc cac aag acc ttt gct	720	
Lys Asp Gly Leu Leu Phe Leu Glu His Ile Cys His Lys Thr Phe Ala		
225	230	235
240		
tac cac tat gag cct cta gac gac gac gat tgg ttt aca gag tac gtg	768	
Tyr His Tyr Glu Pro Leu Asp Asp Asp Asp Trp Phe Thr Glu Tyr Val		40
245	250	255

ttt cct gct ggg act atg atc ata cca tct gca tcg ttc ttt ttg tat 816
 Phe Pro Ala Gly Thr Met Ile Ile Pro Ser Ala Ser Phe Phe Leu Tyr
 260 265 270

ttc cag gat gac gtt tcg gtt gtg aac cat tgg act ctt agt ggg aag 864
 Phe Gln Asp Asp Val Ser Val Val Asn His Trp Thr Leu Ser Gly Lys
 275 280 285

10

cac ttt tcg cgt acc aat gag gaa tgg ttg aag aga ttg gac gca aac 912
 His Phe Ser Arg Thr Asn Glu Glu Trp Leu Lys Arg Leu Asp Ala Asn
 290 295 300

ctt gat gtt att aaa cca atg ttt gag act tta atg gga aat gag gaa 960
 Leu Asp Val Ile Lys Pro Met Phe Glu Thr Leu Met Gly Asn Glu Glu
 305 310 315 320

20

gag gca gtg aag ttg att aac tat tgg aga gga ttt tgt tta tct gga 1008
 Glu Ala Val Lys Leu Ile Asn Tyr Trp Arg Gly Phe Cys Leu Ser Gly
 325 330 335

atg gaa atg ttt gga tat aac aat ggt gaa gaa tgg atg gca agt cat 1056
 Met Glu Met Phe Gly Tyr Asn Asn Gly Glu Glu Trp Met Ala Ser His
 340 345 350

30

gtt ctg ttc aag aaa aaa tga ttttgcctcaa cagtgatttt ctttcattag 1107
 Val Leu Phe Lys Lys Lys
 355

40

tagcattact tgaataagtt tggaagagtc ttcataatac tgctacatcc agaaaggact 1167

agcagcacag ttigtatgac gattgtcccc tgcctacattt gtatgagtta ttttggagat 1227

gaaataaaat atatctttgg atgggcacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1274

<210> 2 10

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:N-terminal amino acid sequences of CNMT 20

<400> 2

Ala Val Glu Ala Lys Gln Thr Lys Lys Ala Ala Ile Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Lys Gln Leu Glu Leu Gly Leu Val Pro Tyr Asp Asp Ile Lys Gln Leu
20 25 30 30

Ile

<210> 3 40

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Nucleotide sequences
corresponding to N-terminal amino acid sequences of CNMT

<400> 3

10

gcngtngarg cnaarcacac naaraargcn gcnathgtng arytnytnaa rcarytngar 60
ytnggnytng tncctayga ygayathaar carytnath 99

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward degenerate primer
for PCR to amplify cDNA fragment corresponding to
N-terminal amino acid sequences of CNMT

30

<400>4

gcngtngarg cnaarcacac 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Reverse degenerate primer
for PCR to amplify cDNA fragment corresponding to
N-terminal amino acid sequences of CNMT

<400> 5

arytgyttta trtrtercta

20

10

<210> 6

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Nucleotide
sequences of cDNA fragment obtained from PCR

<400> 6

gctgtggaag caaagcaaac aaagaaggca gctatagtag agttgttaaa acagttggag 60
ctgggcttgg ttccataatga tgatattaag cagct 95

30

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer
for the first PCR to amplify 3'-end of CNMT gene

<400> 7

acgactcact atagggcgaa ttgg

24

10

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence:Reverse primer
corresponding to adaptor region

<400> 8

acgactcact atagggcgaa ttgg

24

30

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer
for the second PCR to amplify 3'-end of CNMT gene

40

<400> 9

gttgttaaaa cagttggagc tgggc

25

<210> 10

<211> 1230

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Nucleotide sequences of 3'-end cDNA

20

<400> 10

gttgttaaaa cagttggagc tgggcttggc tccatgat gatattaagc agtcataag 60
gaggaactg gcaaggcgcc tgcaatgggg ttataaacct acttatgaag aacaaatagc 120
tgaatccaa aacttaactc attctctgcg acaaatgaaa attgcaacag aggttgagac 180
cttggattca caattgtacg agattcctat tgagittcta aagattaiga atggaagtaa 240
cttaaaagga agttgttgc tcttcaaaga agattcaaca acattagatg aagctgagat 300
agcgatgctg gatttatact gcgagagagc tcaaatccaa gatggacaga gigtcttga 360
tcttggatgt gggcaaggag ctcttacatt acatgttgca cagaaatata aaaactgtcg 420
cgtaacagca gtaacaaatt cagtttcaca aaaagagtac attgaagaag aatcaaggag 480
acgtaatttg ttgaatgtgg aagtcaaatt ggcagacata accacacatg agatggctga 540
gacatacgat cgtattttgg taatagagtt gtttgagcac atgaagaact atgaacttct 600
cttgaggaaa atctcagagt ggatatcgaa agatgggctt ctctttctag agcacatatg 660
ccacaagacc ttigcttacc actatgagcc tctagacgac gacgatitgt ttacagagta 720
cgtgtttcct gctgggacta tgatcatacc atctgcatcg ttctttttgt atttccagga 780
tgacgtttcg gtttgaacc attggactct tagtgggaag cacitttcgc gtaccaatga 840

30

40

ggaatgggtg aagagattgg acgcaaacct tgatgttatt aaaccaatgt ttgagacttt 900
 aatgggaaat gaggaagagg cagtgaagtt gattaactat tggagaggat ttgtttatc 960
 tggaatggaa atgtttggat ataacaatgg tgaagaatgg atggcaagtc atgttcigt 1020
 caagaaaaaa tgattttgcc caacagigta ttctttcat tagtagcatt acttgaataa 1080
 gtttggaga gtcctcatat atctgctaca tccagaaagg actagcagca cagttttag 1140
 atcgattgtc ccttgctaca ttgtatgag ttattttgga gatgaaataa aatatactt 1200
 tggatgggca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1230

10

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Reverse primer
for the first PCR to amplify 5'-end of CNMT gene

<400> 11

caacttcctt ttaagttact tcc

23

30

<210> 12<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Foward primer
corresponding to adaptor region

40

<400> 12

gaaagaaaa aaatataccc cagc

24

<210> 13

<211> 33

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Reverse primer
for the second PCR to amplify 5'-end of CNMT gene

20

<400> 13

caattgtgaa tccaaggtct caacctctgt tgc

33

<210> 14

<211> 299

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Nucleotide sequences of 5'-end
cDNA

<400> 14

atggctiggg aagcaaagca aacaaagaag gcagccatag tagagtgtt aaaacagttg 60

40

gagctgggct tggttcata tgatgatatt aagcagctca taaggagga actggcaagg 120
 cgccctgcaat ggggttataa acctacttat gaagaacaaa tagctgaaat ccaaaactta 180
 actcattctc tgcgacaaat gaaaatigca acagagggtg agaccttga ttacaatig 240
 tacgagattc ctattgagtt tctaaagatt atgaatggaa gtaacitaaa aggaagttg 299

<210> 15

10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Foward primer for PCR (CNMT)

20

<400> 15

gttgccatgg ctgtggaagc aaagcaaaca aagaaggc 38

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Reverse primer for PCR (CNMT)

<400> 16

gcggaattca cgactcacta tagggcgaat tgg 33

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】ベルベリン生合成経路を示す図である。図中、1～13は示される反応を触媒する酵素をそれぞれ表している。各酵素は以下のとおりである。1：L-チロシンデカルボキシラーゼ、2：フェノラーゼ、3：L-チロシントランスアミナーゼ、4：p-ヒドロキシフェニルピルベートデカルボキシラーゼ、5：(S)-ノルコクラウリンシンターゼ、6：ノルコクラウリン-6-O-メチルトランスフェラーゼ(6-OMT)、7：コクラウリンN-メチルトランスフェラーゼ(NMT)、8：フェノラーゼ、9：(S)-3'-ヒドロキシ-N-メチルコクラウリン4'-O-メチルトランスフェラーゼ(4'-OMT)、10：ベルベリン架橋酵素(BBE)、11

50

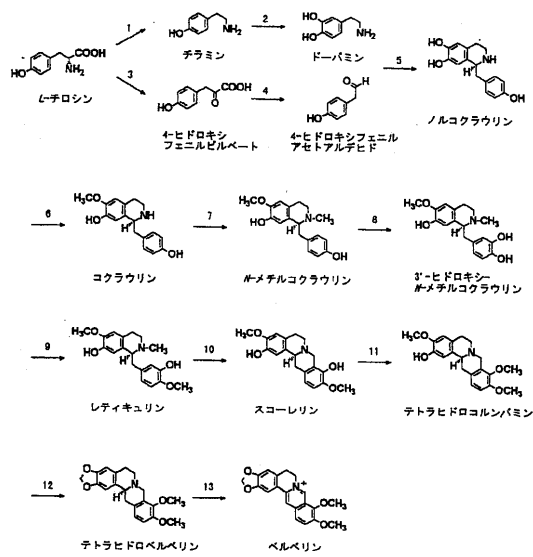
: (S)-スコウレリン9-O-メチルトランスフェラーゼ(SMT)、12:メチレンジオキシ環形成酵素、13:テトラヒドロベルベリンオキシダーゼ(THBO)

【図2】CNMTの基質特異性を調べた化合物群の化学構造を示す図である。

【図3】CNMT反応速度とノルレティックリン、SAM濃度の関係を示すグラフである。

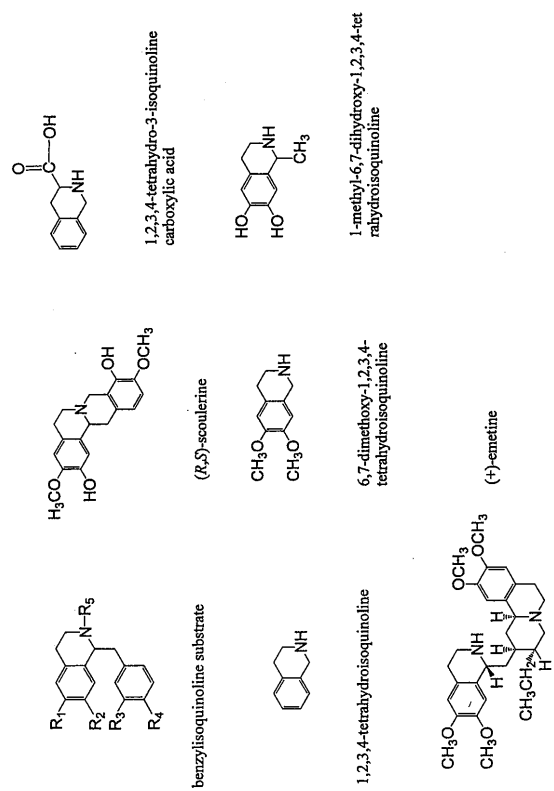
【図4】CNMT活性の二重逆数プロットを示すグラフである。(a)はノルレティックリンの各濃度における1/v対1/[SAM]のプロットを示し、(b)はSAMの各濃度における1/v対1/[ノルレティックリン]のプロットを示す。

【図1】

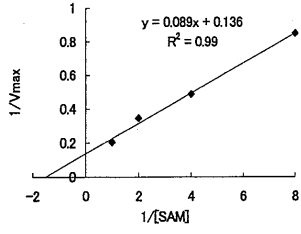
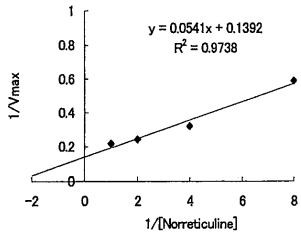


ベルベリン生合成経路

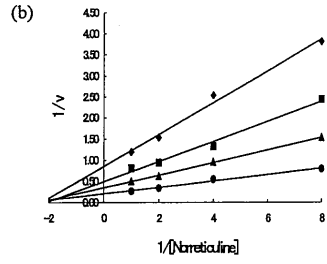
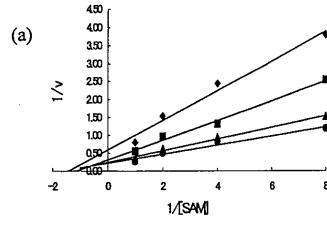
【図2】



【 3 】



【 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 崔 琴富

京都府京都市左京区北白川追分町 京都大学内

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 特開平 1 1 - 1 7 8 5 7 9 (J P , A)

特開平 1 1 - 1 7 8 5 7 7 (J P , A)

Phytochemistry, Apr. 2001, Vol.56, p.649-655

Phytochemistry, 1990, Vol.29, p.3491-3497

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 9/00-9/99

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

WPI

BIOSIS(STN)

CAplus(STN)

MEDLINE(STN)