

植物由来III型ポリケタイド合成酵素の機能拡張による非天然型化合物の創製

淡川 孝義・森 貴裕・阿部 郁朗*

天然物の基本骨格を構築する二次代謝酵素は、活性部位の微妙な構造の違いで基質特異性や反応様式が大きく変化するものがあり、これが天然物の分子多様性を生み出す要因の一つとなっている。こうした二次代謝酵素の機能を、酵素タンパク質の立体構造をもとに改変し、潜在的触媒能力を引き出すことにより、さらなる新規骨格の創出が期待される。本稿では、人為的な酵素機能の制御と分子多様性創出の格好のモデルシステムともいえる、植物由来III型ポリケタイド合成酵素（PKS）を取り上げ、最近の研究成果について紹介する。

III型ポリケタイド合成酵素スーパーファミリー

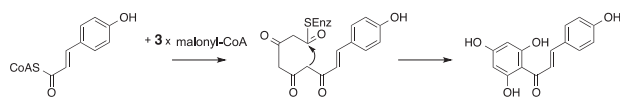
植物由来III型PKSは、植物に普遍的に存在するフラボノイドや赤ワインのレスベラトロール、ウコンのクルクミン、さらには大麻のカンナビノイドに至るまで、多様な構造と生理活性を有する二次代謝産物を生産する。本酵素群は、分子量約40,000のホモダイマー酵素であり、開始基質に伸長基質マロニルCoAの縮合反応を複数回繰り返すことにより、ポリケトメチレン鎖の伸長と環化反応を触媒する¹⁾。たとえば、カルコン合成酵素（CHS）とスチルベン合成酵素（STS）は、ともにクマロイルCoAを開始基質として3分子のマロニルCoAを順次縮合することにより、それぞれカルコンとスチルベンの骨格を構築する（図1）。これら以外にも、さまざまなIII型PKSが報告されており、それぞれ異なる縮合反応や環化反応を触媒する。また、これまでに数種の酵素

のX線結晶構造解析が報告されており、いずれの酵素も、タンパク全体としては、ほぼ同一の立体構造を共有することが知られている¹⁾。我々はこれら立体構造をもとに、酵素の基質認識、伸長回数、閉環様式など、複数の触媒段階の反応機構の理解と、人為的な機能制御、さらには、合理的な機能改変酵素の設計によって、複雑な骨格を持つ非天然型化合物の創製に取り組んできた。

Malonyl-CoA 縮合数の制御

各III型PKS酵素によって異なるマロニルCoAの縮合反応の回数を、自在に制御することができれば、さらなる生成物の構造多様性を生み出すことが可能になる。薬用植物キダチアロエ（*Aloe arborescens*）由来、ペンタケタイドクロモン合成酵素（PCS）とオクタケタイド合成酵素（OKS）は、それぞれ5分子と8分子のマロニルCoAからクロモンを生成するIII型PKSである（図2A, B）^{2,3)}。この二つの酵素はまったく異なる生成物を与えるにも関わらず、アミノ酸レベルでは互いに92%と非常に高い配列相同性を示す。PCSとOKSにおいては、マロニルCoAの縮合に関わる三つの主要な触媒残基Cys164, His303, Asn336が保存されている一方で、活性中心キャビティを構成する三つのアミノ酸残基Thr197, Gly256, Ser338（以上CHSのナンバリング）が特徴的に置換されている（PCSではT197M/G256L/S338V, OKSではT197G/G256L/S338V）。我々は、CHSの197番目に相当するアミノ酸残基がPCSではMet207, OKSではGly207に置換されていることに着目し、このアミノ酸残基に部位特異的変異を導入した。その結果、驚くべきことに、OKSを模したPCS M207G変異体では、8分子のマロニルCoAを縮合し、SEK4/SEK4bを生成し（図2B）²⁾、一方、逆にPCSを模したOKS G207M変異体では5分子のマロニルCoAからペンタケタイドクロモンを生成することを見いだした（図2A）³⁾。この結果、207番目のアミノ酸残基の高さが、酵素の縮合回数を決定する可能性が示唆された。そこで次に、OKSのG207W, G207TおよびG207A変異体を作成したところ、今度はそれぞれ4分子、6分子、7分子のマロニルCoAを縮合したクロモン誘導体を生成し

(A)カルコン合成酵素



(B)スチルベン合成酵素

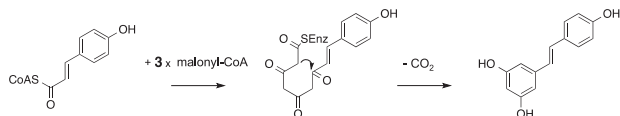


図1. カルコンおよびスチルベン合成酵素の反応機構

* 著者紹介 東京大学大学院薬学系研究科（教授） E-mail: abei@mol.f.u-tokyo.ac.jp

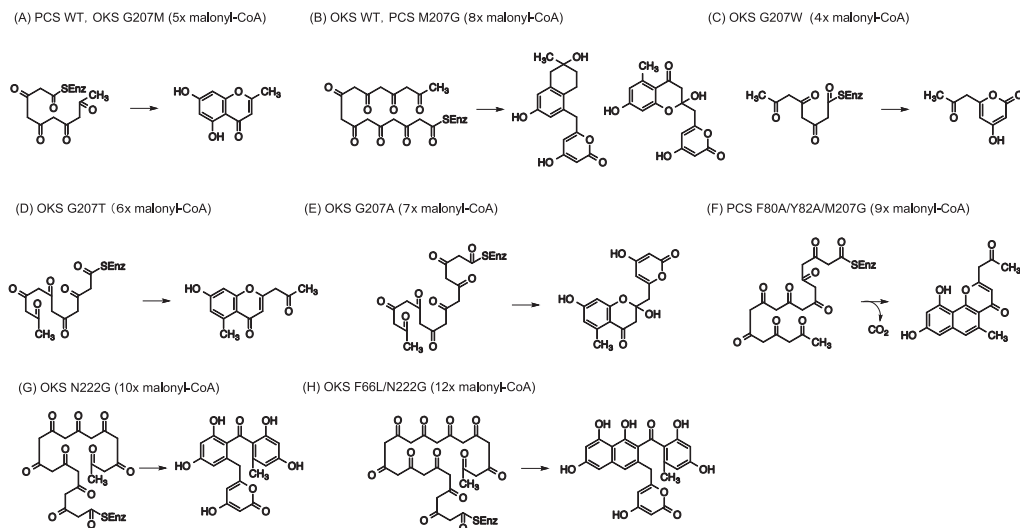


図2. PCS, OKS野生型, および変異型酵素の反応

た(図2C, D, E)³⁾. すなわち, たった一つのアミノ酸残基の違いにより活性が劇的に変化することが明らかとなった.

立体構造を基盤とした機能改変酵素の設計

上述した新規III型PKSの酵素反応機構の解明と, さらなる触媒機能の拡張をめざし, PCS野生型, および, PCS M207G変異型について, X線結晶構造解析を行った⁴⁾.

その結果, 両酵素の立体構造の比較により, Met207をGlyに置換することで, 実際にキャビティの容積が約2.6倍に増大することが示された(図3A, B). すなわち, M207Gの導入により, 今まで塞がれていた活性部位ポケットへの入り口が開き, スペースの拡大によりマロニルCoA8分子の縮合が可能になったと考えられる. そこで我々は, 次にPCS M207G変異体において新たに出現したキャビティの底面を形成する二つの高い残基Phe80, Tyr82を同時にAlaに置換することで, さらなるキャビティの拡大を試みた(図3C). その結果実際に, このF80A/Y82A/M207G三重変異体に, 今度は9分子のマロニルCoAの縮合によって, 非天然型新規ナフトパイロン化合物を生産させることに成功した(図3E)⁵⁾.

同様に, 本来8分子のマロニルCoAを縮合するOKSについても, 結晶構造解析をもとに, 部位特異的変異を導入し, 活性部位キャビティを拡大したところ, キャビティ底面を構成する高いAsn222のGly置換体で, マロニルCoAの縮合が10分子まで可能となり, 非天然型ベンゾフェノン誘導体を生成した(図2G, 3E)⁶⁾. また, OKS N222G変異酵素のX線結晶構造解析をもと

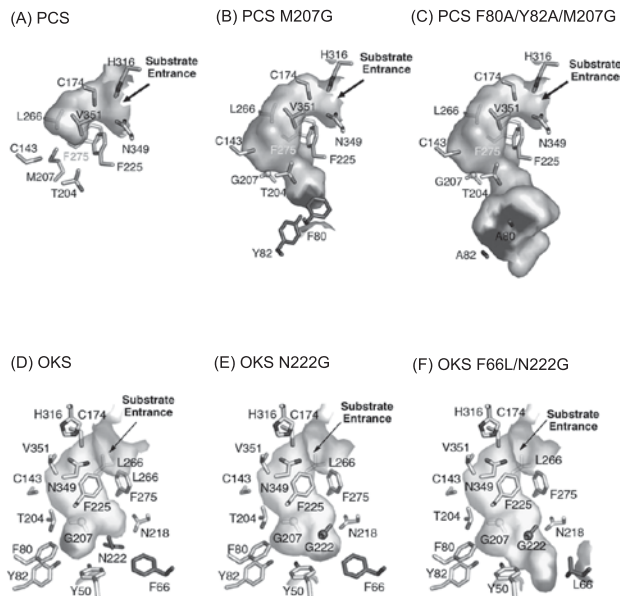


図3. PCS, OKSの活性中心キャビティの比較

に, Asn222近傍の高いPhe66をLeuに置換してやると, 縮合数がさらに増大して, マロニルCoAが12分子縮合した化合物が生成することも見いだしている(図2H, 3F)⁷⁾. 結晶構造とホモロジーモデリングからは, 野生型, N222G, N222G/F66L変異体のキャビティ容積は652, 693, 748 Å³と増加することが予想され, スペースの拡大が伸長回数の増加に繋がることが明確に示された.

このように, X線結晶構造解析を基盤として, 活性に重要な役割を担っているアミノ酸残基を同定することで, 合理的な機能改変酵素の設計と, その触媒機能の制御が可能になる.

非天然型人工基質を用いた化合物合成

非天然型化合物生産のもう一つのアプローチとして、我々は、III型PKSが示すきわめて寛容な基質特異性に着目した。すなわち、本来の基質とは異なる非天然型人工基質を作用させることにより、新たなポリケタイド化合物の生産が可能になる。たとえば、カルコン合成酵素に、開始基質としてクマロイルCoAの芳香環を修飾した人工基質、あるいは、各種脂肪酸エステルを作用させると、一連の非天然型新規カルコンが高収率で生成する⁸⁾。また、伸長基質であるマロニルCoAに代えて、メチルマロニルCoAやエチルマロニルCoAなどを作用させることでも同様にして、非天然型新規化合物が生成することも見いだしている⁹⁾。

異なる縮合回数や環化反応を触媒する酵素と、上述した人工基質を組み合わせることで、生産可能な非天然型化合物はさらに飛躍的に増大する。たとえば、8分子のマロニルCoAの縮合を触媒するOKSに、開始基質としてクマロイルCoAやヘキサノイルCoAを作用させたところ、いずれの場合においても5分子、6分子のマロニルCoAを順次縮合の後、非天然型新規カルコンおよびスチルベン誘導体を収率よく生成することが示されている(図4)⁶⁾。カルコンおよびスチルベンには、これまでも非常に重要で多様な生物活性が報告されており、これら非天然型カルコンおよびスチルベン誘導体の生物活性にも、非常に興味をもたれるところである。このように、開始基質や伸長基質に加え、異なる触媒活性をもつIII型PKS酵素を組み合わせることで、非天然型化合物ライブラリーの構築が可能になる。

アルカロイド合成への展開

炭素原子、酸素原子、水素原子からなるカルボニルの化学を触媒するIII型PKSに、窒素原子などを導入した人工基質を作用させれば、窒素原子の求核性を利用した新たな炭素-炭素結合、炭素-窒素結合の形成が可能になる。

薬用植物ダイオウ (*Rheum palmatum*) 由来ベンザルアセトン合成酵素 (BAS) は、1分子のクマロイルCoAと1分子のマロニルCoA縮合を触媒し、C₆-C₄骨格をもつベンザルアセトンを生産するIII型PKSである(図5A)¹⁰⁾。窒素原子を含むN-メチルアントラニルCoAを開始基質としてBASに作用させた場合、1分子のマロニルCoAを縮合して、4-ヒドロキシ-N-メチルキノロンを80%以上の高収率で生成する(図5B)¹¹⁾。我々はさらに、BASに開始基質としてL,D-型のフェニルアラニン、トリプトファンから合成したアミノアシルCoAをそれ

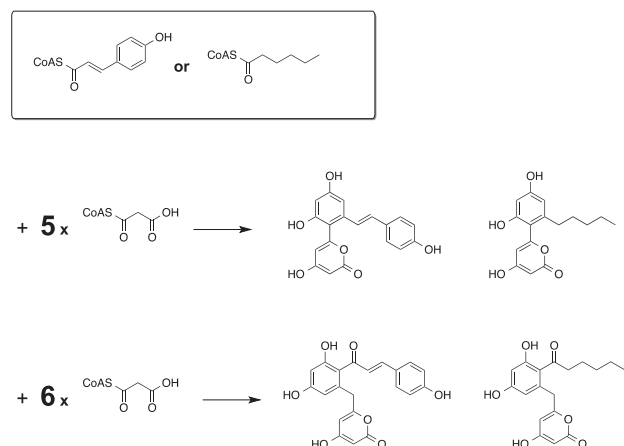
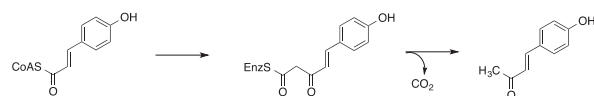
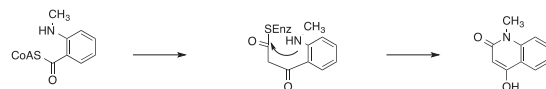


図4. 非天然型基質を用いたOKSの酵素反応

(A) BASによるベンザルアセトン合成



(B) アミノ基置換ベンゼン基質を用いたキノロン合成



(C) アミノ酸基質を用いたテトラミン酸合成

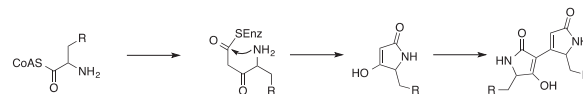


図5. BASを用いたアルカロイド合成

ぞれ作用させると、1分子のマロニルCoAを縮合した後に分子内ラクタム化反応が進行し、テトラミン酸誘導体が生成することを見いだした(図5C)¹²⁾。しかも興味深いことに、生成したテトラミン酸誘導体が2分子縮合した新規化合物も自発的に生成した。このうち、D-型のフェニルアラニン由来のテトラミン酸二量体は、細胞毒性活性を示した(IC₅₀ = 1 μg/ml)。このように、アミノ酸やアントラニル酸のような窒素原子を含む化合物を基質として受容するIII型PKSの寛容な基質特異性は特筆に値する。近年、我々はN-メチルアントラニルCoAと1分子のマロニルCoAを縮合してキノロン骨格を合成するキノロン合成酵素(QNS)、3分子のマロニルCoAを縮合してアクリドン骨格を合成するアクリドン合成酵素(ACS)のX線結晶構造解析にも成功している¹³⁾。この結果、嵩高い開始基質を受け入れ、ポリケタイド鎖の伸

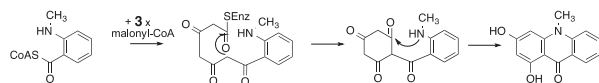
長を触媒するIII型PKSの基質受容メカニズムが明らかとなり、これら酵素についても、触媒機能の拡張と有用物質生産への利用が期待される。

非天然型新規アルカロイド骨格の創製

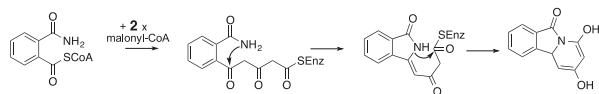
ここまで、X線結晶構造解析を基盤とした酵素触媒機能の拡張と、人工基質を用いた非天然型新規化合物の生産についてそれぞれ紹介した。最後に、これらの両方の手法を組み合わせ、非天然型新規生物活性化合物を効率的に生産した例を紹介する。

トウゲシバ (*Huperzia serrata*) 由来HsPKS1はN-メチルアントラニルCoAを開始基質として作用させると、3分子のマロニルCoAを縮合してアクリドンを与える(図6A)¹⁴⁾。そこで、この基質と同程度の分子サイズを有する2-カルバモイルベンゾイルCoAを開始基質として酵素反応を行った。その結果、マロニルCoAを2分子縮合した後に、窒素原子が2回求核攻撃して閉環した、6, 5, 6縮環構造をもつ3環性非天然型新規アルカロイド骨格が生成した(図6B)¹⁵⁾。さらに、芳香環部分をナフタレン環に代えた3-カルバモイル-2-ナフトイルCoAを開始基質として作用させると、同様に二つの炭素-窒素結合の形成が進行し、今度は6, 6, 5, 6縮環構造をもつ4環性非天然型新規アルカロイド骨格の合成に成功した(図6C)。

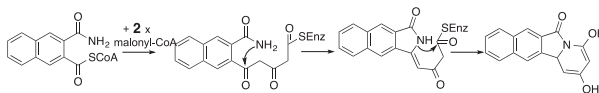
(A) アミノ置換ベンゼン基質を用いたアクリドン合成



(B) カルバモイル置換ベンゼン基質を用いた新規6,5,6環アルカロイド合成



(C) カルバモイル置換ナフタレン基質を用いた新規6,6,5,6環アルカロイド合成



(D) カルバモイル置換ベンゼン基質と変異酵素を用いた新規6,7,6環アルカロイド合成

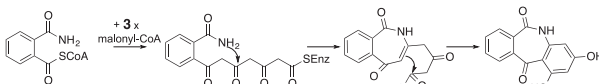


図6. HsPKS1を用いたアルカロイド合成

HsPKS1のアルカロイド合成触媒機構を精査するため、本酵素の結晶構造をもとに反応中間体と酵素とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、活性中心残基Cys174の近傍に位置するSer348の水酸基が中間体の5位のカルボニル酸素と水素結合を形成し、環化様式を制御していることが示唆された。そこで、S348G変異体を作成し、2-カルバモイルベンゾイルCoAを開始基質として反応を行った。その結果、驚くべきことに、伸長基質の縮合回数が増加、炭素-窒素結合と炭素-炭素結合の形成が進行し、中央の環が拡大した6, 7, 6縮環構造をもつジベンゾアゼピン骨格が生成することを見いだした(図6D)¹⁵⁾。

このような非天然型新規アルカロイド骨格の酵素合成は、III型PKSによる炭素-炭素結合、炭素-窒素結合形成を組み合わせ化合物生産が可能であることを実証し、さらなる複雑骨格をもった非天然型新規化合物の酵素合成へと道を拓くことになる。また、立体構造に基づいて環化反応や縮合回数を合理的に制御することが可能であることを示唆している。

おわりに

X線結晶構造解析に基づく合理的な部位特異的変異の導入により、C₂単位縮合数の拡大、非天然型炭素-炭素結合や炭素-窒素結合の形成、芳香環縮合系の構築など、III型PKS酵素の触媒機能のさらなる拡張と、新規活性を有する「超天然型」生体触媒の創出に展望を開きつつある。今後、タンパク工学や進化分子工学の手法を用いて、これら改変酵素の触媒機能を最適化することにより、生産効率の高い、実用に供する物質生産系の構築が可能になる。

文 献

- 1) Abe, I. and Morita, H.: *Nat. Prod. Rep.*, **27**, 809 (2010).
- 2) Abe, I. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1362 (2005).
- 3) Abe, I. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12709 (2005).
- 4) Morita, H. et al.: *Chem. Biol.*, **14**, 359 (2007).
- 5) Abe, I. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5976 (2007).
- 6) Shi, S.-P. et al.: *Org. Lett.*, **11**, 551 (2009).
- 7) Wanibuchi, K. et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 2083 (2011).
- 8) Abe, I. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11242 (2000).
- 9) Abe, I. et al.: *Org. Lett.*, **5**, 1277 (2003).
- 10) Morita, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 669 (2011).
- 11) Abe, I. et al.: *Org. Lett.*, **8**, 6063 (2006).
- 12) Wakimoto, T. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4746 (2011).
- 13) Mori, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **288**, 28845 (2013).
- 14) Wanibuchi, K. et al.: *FEBS J.*, **274**, 1073 (2007).
- 15) Morita, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13504 (2011).