

二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製

阿部 郁朗
静岡県立大学薬学部

1. 研究のねらい

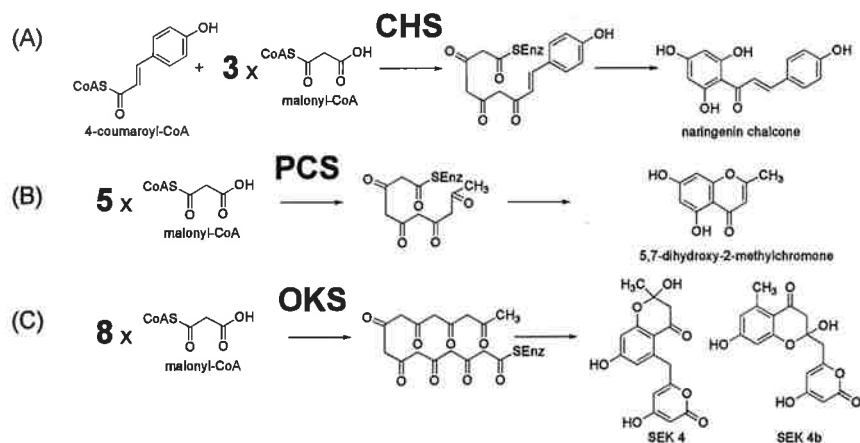
医薬資源として重要な天然物の基本骨格を構築する二次代謝酵素の中には、活性部位の微妙な構造の違いで基質特異性や反応様式が大きく変化するものがあり、これが天然物の分子多様性を生み出す大きな要因となっている。こうした二次代謝酵素が示す広範な基質特異性と触媒ポテンシャルを活用することにより、効率的な物質生産が可能になる。一方、酵素タンパクの立体構造に基づく合理的な触媒機能の改変により、さらなる分子多様性と新規骨格の創出が期待される。

本研究では、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ともいえる植物Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) をとりあげた。マロニル CoA に由来する C₂ 単位の縮合により炭素鎖伸長反応を繰り返し、生成したポリケトメチレン中間体がさらに閉環して芳香環を構築する反応はカルボニルの化学が中心となる。私は、天然より新規酵素触媒活性を探索した結果、これまでにない全く新しいタイプの酵素遺伝子の取得に成功し、従来関連性の考えられなかった植物ポリフェノールの生合成に一連のⅢ型 PKS が関与することを明らかにした。今回、この特異な酵素の X 線結晶構造解析の結果から、基質及び生成物特異性を決定する酵素活性中心構造を解明し、さらに合理的な変異の導入により、C₂ 単位縮合数の拡大、非天然型炭素-炭素結合の形成、また、芳香環縮合系の構築など、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の操作に挑戦した。

2. 研究成果

2-1 アロエ由来新規触媒活性を有する植物ポリケタイド合成酵素

バルバロインなどアンスロン配糖体に加えて、クロモンやパイロンなど、ポリケタイドを豊富に産生する薬用植物キダチアロエ (*Aloe arborescens*) から単離した、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、全く新しいタイプの新規Ⅲ型 PKS 酵素である。互いに微妙に異なる配列を有するこの2つの酵素は、植物に普遍的に存在するフラボノイド生合成の鍵酵素となるカルコン合成酵素 (CHS) とはアミノ酸レベルで 60% 程度の配列相同性を示すものの、クマロイル CoA を基質としてカルコンの合成能は示さず、代わりにそれぞれ5分子あるいは8分子のマロニル CoA を直接縮合して芳香族ポリケタイドを生成する。

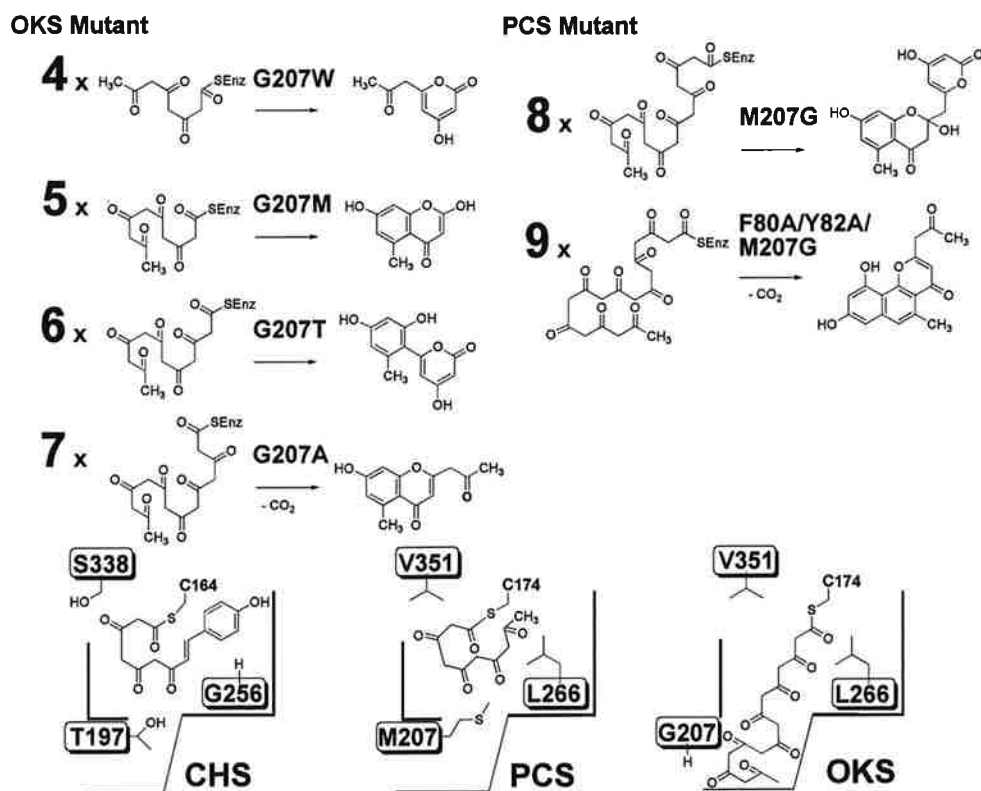


2-2 ポリケタイド鎖長と生成物特異性の制御

アミノ酸レベルで互いに 92% という非常に高い配列相同性を示す PCS と OKS が、このように全く異なる生成物を与えるのは何故か、マロニル CoA 縮合数の違いを決定する要因が何か、大変興味もたれるところである。これら2つの酵素においては、CHS の触媒残基 Cys164, His303, Asn336 がすべて保存されている一方で、活性中心キャビティを構成する3つのアミノ酸残基

Thr197, Gly256, Ser338 (CHS のナンバリング) が置換されているのが特徴的である (PCS では T197M/G256L/S338V, OKS では T197G/G256L/S338V). これら 3 アミノ酸残基は, 機能の異なる III 型 PKS において特徴的に置換されており, 酵素反応の基質や生成物特異性の決定に関与する可能性が考えられる. 私はまず, CHS の Thr197 が, PCS においては Met207 に, また, OKS においては Gly207 に置換されていることに着目し, この残基に部位特異的変異を導入することにより, 酵素活性に及ぼす影響を調べた.

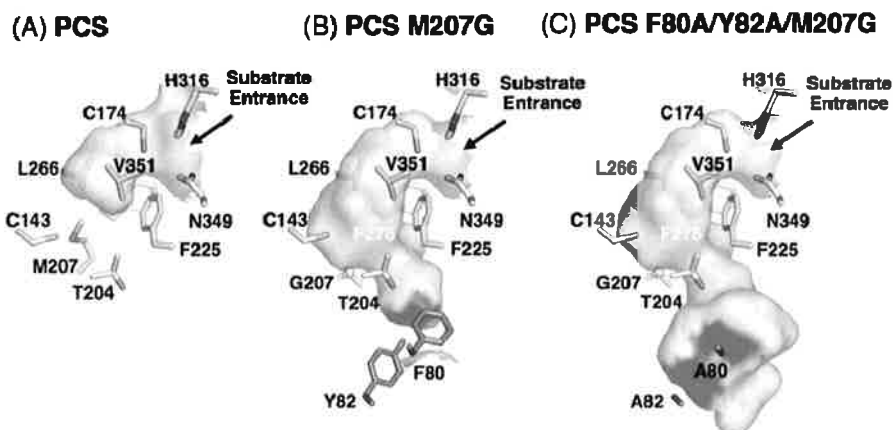
その結果, 驚くべきことに, 本来 5 分子のマロニル CoA の縮合を触媒する PCS の, M207G 置換体では, 酵素活性が劇的に変化して, 8 分子のマロニル CoA から SEK4/SEK4b を生成すること, 逆に, OKS の G207M 置換体ではオクタケタイドの代わりにペンタケタイドを生成することを見出した. 即ち, 単一アミノ酸残基の置換によって, PCS と OKS の酵素機能が相互変換したことになる. そこで次に, 本来 8 分子のマロニル CoA の縮合反応を触媒する OKS について, G207A や G207T 置換体を作成してやると, 今度はそれぞれ 7 分子あるいは 6 分子のマロニル CoA を縮合するが, これらはそれぞれアロエが産生する抗ヒスタミン成分アロエニン及び抗炎症成分アロエシンの生合成前駆体となる. また, 最も嵩高いアミノ酸側鎖を導入した G207W 置換体では, 4 分子のマロニル CoA を縮合するのみであった. 以上きわめて明快な結果であり, 酵素活性中心キャビティを構成する, 化学的に不活性な, 単一アミノ酸残基側鎖の立体的な嵩高さに応じて, ポリケタイド鎖伸長ポケットの大きさとマロニル CoA の縮合数が決定されることが明らかとなった. III 型 PKS におけるこのような縮合数の制御と分子多様性の創出はこれが最初の報告である.



2-3 結晶構造に基づく触媒機能の拡張と新規骨格創出

三菱化学生命科学研究所の河野俊之博士との共同研究により, PCS については, それぞれ 5 分子あるいは 8 分子のマロニル CoA の縮合を触媒する, 野生型及び M207G 変異型酵素の X 線結晶構造解析に 1.6 Å の分解能で成功した. まず, アミノ酸レベルで 60% の相同性を示す CHS の結晶構造との比較により, 両酵素はタンパク全体ではほぼ同一のフォールディングを共有することが示された. しかも驚くべきことに, 活性中心を構成するほとんどのアミノ酸残基を見事に重ね合わせる事が可能である. 一方, 活性中心キャビティの大きさは PCS の方が明らかに小さく, こうしたキャビティの大きさと形状の違いが, 酵素反応の基質及び生成物特異性を決定することに

なる。次に、野生型と M207G 変異型の構造の比較により、Met207 を Gly に置換することで、実際にキャビティの大きさが劇的に変化することが示された。即ち、点変異 M207G の導入で、活性部位の下側に今まで埋もれていたポケットの入り口が開いて、これによりポリケタイド鎖の伸長がさらに進行して、5分子の代わりに8分子のマロニル CoA の縮合反応が進行することになる。



活性中心キャビティを構成する3アミノ酸残基のうち、197番の残基以外にも、256番と338番の残基（CHSのナンバリング）が酵素反応の基質と生成物特異性の決定に重要な役割を担うことを明らかにした。まず、CHSにおいてクマロイル CoA の結合ポケットを構成する Gly256 は、酵素反応の開始基質の特異性を決定する残基である。Gly256 は、PCS や OKS においては嵩高い Leu266 で置換されており、この結果、両酵素はもはやクマロイル CoA を基質として受け入れることが出来ず、代わりにマロニル CoA を開始基質として酵素反応が進行することになる。一方、ポリケタイド鎖伸長の起点となる Cys164 に隣接する Ser338 は、ポリケタイド鎖の伸長方向の制御に寄与するものと考えられる。本来クマロイル CoA を開始基質として3分子のマロニル CoA を順次縮合してカルコンを生成する CHS は、マロニル CoA のみを基質とした場合、その3分子縮合によりトリケタイドパイロンを生成することが知られている。ところが驚くべきことに、CHS に点変異 S338V を導入しただけで、OKS の場合と同様に、マロニル CoA 8分子の縮合反応が進行して、SEK4/SEK4b を微量生成することを見出した。しかも、その生成能は、OKS と同様な T197G/G256L/S338V 三重変異の導入で、さらに顕著に増大した。CHS 結晶構造を精査すると、活性部位キャビティの下側に埋もれているポケットの入り口が既にある程度開いているようにも見える。この結果、点変異の導入で、一部のポリケタイド中間体の先端がこのポケットに向かって伸長したものと考えられる。植物に普遍的に存在し、III型PKSのプロトタイプともいべきCHSが、このような単純な変異の導入によって、触媒活性を劇的に変化させることは、III型PKSスーパーファミリー酵素の分子進化や酵素機能の改変を考える上で大変興味深い。

本来5分子のマロニル CoA の縮合を触媒する PCS の Met207 に点変異を導入することで、マロニル CoA の縮合数を8分子まで拡大することに成功したわけであるが、結晶構造解析の結果に基づいて、活性部位の下側に新たに出現したポケットを掘り進めてキャビティを広げてやることにより、さらなる C₂ 単位縮合数の拡大に挑戦した。即ち、ポケットの底面を形成する Phe80, Tyr82 2つの残基についても同時に Ala で置換した F80A/Y82A/M207G 三重変異酵素を作成したところ、今度は9分子のマロニル CoA を縮合して、これまでに例のない非天然型新規化合物を生成することを見出した。単純な構造の III 型 PKS によるマロニル CoA 9分子の縮合はこれが最初の例であり、しかも変異の導入により、芳香環縮合系の合成能を新たに獲得した点は特筆に値する。驚いたことに、三重変異酵素のホモロジーモデルを作成して活性中心キャビティの構造を比較してみると、僅か3アミノ酸残基の置換により、その大きさが4倍まで拡大することが示された。

2-4 おわりに

植物 PKS 酵素が示す最大の特徴の一つに、その広範な基質特異性と触媒ポテンシャルが挙げられる。III 型 PKS の反応は、立体化学が厳密に制御された精巧な酵素システムとは言い難く、むしろ

る単純なアシル基転移の繰り返しによる「炭素鎖伸長マシン」と捉えるのが適切かもしれない (Cys-His-Asn からなる活性中心触媒残基は、全ての III 型 PKS において例外なく保存されており、同一のケミストリーで炭素鎖伸長反応が進行する)。従って、こうした性質を利用して、一連の人工基質を作用させることにより、効率的な化合物ライブラリーの構築が可能になる。一方、炭素、水素、酸素原子で構成される、単純なカルボニルの化学を触媒する III 型 PKS に、さらに窒素などヘテロ原子を導入した人工基質を作用させれば、窒素原子の塩基性を利用した新たな炭素-炭素結合の形成も可能になる。Robinson のトロピノン合成や Heathcock のユズリハアルカロイドの化学合成にみられるように、ポリケトメチレン鎖からシッフ塩基の形成を介した分子内環化反応が連続的に進行して、複雑なアルカロイドの骨格を一挙に効率的に構築することができれば、III 型 PKS の酵素触媒機能の可能性をさらに大きく拡張することになる。

上述したように、III 型 PKS 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と言える。X 線結晶構造解析に基づく合理的な変異の導入により、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、また、芳香環縮合系の構築など、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の操作にも展望を開きつつあるが、今後はポリケタイド鎖長をどこまで伸ばせるか、また、閉環反応の様式をいかに制御するかといった点が課題になる。結晶構造解析に基づけば、少なくともマロニル CoA 1 2 分子程度の縮合は可能であるものと予想され、実際に最近得られた予備実験の結果はこの予想を裏付けている。一方、閉環・芳香環形成反応の制御に関しては、PCS 三重変異酵素が、3 環性ナフトパイロン骨格の合成能を新たに獲得した結果がヒントになる。アンスロンやアンスラキノン骨格の形成など、III 型 PKS 酵素触媒機能のさらなる拡張と、新規触媒活性を有するスーパー生体触媒の創出に引き続き挑戦したい。

3. 主な発表

論文

- ・ I. Abe*, S. Oguro, Y. Utsumi, Y. Sano, H. Noguchi, Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketidesynthase, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12709-12716 (2005).
- ・ H. Morita, S. Kondo, S. Oguro, H. Noguchi, S. Sugio*, I. Abe*, T. Kohno*, Structural insight into chain length control and product specificity of pentaketide chromone synthase from *Aloe arborescens*, *Chemistry & Biology* 14, 359-369 (2007).
- ・ I. Abe*, H. Morita, S. Oguro, H. Noma, K. Wanibuchi, N. Kawahara, Y. Goda, H. Noguchi, T. Kohno*, Structure-based engineering of a plant type III polyketide synthase: formation of an unnatural nonaketide naphthopyrone, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5976-5980 (2007).

招待講演

- ・ I. Abe, Engineered biosynthesis of plant polyketides, ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products, Kyoto (Japan), 2006.7.27

4. その他

特許

- ・ 阿部郁朗, 安部剛史, 野口博司, 4-ヒドロキシ-2-キノリノン類の酵素合成法, 特願 2006-172160, 出願人: 科学技術振興機構
- ・ 阿部郁朗, 野口博司, アロエソン合成酵素, 特願 2007- 014183, 出願人: 科学技術振興機構
- ・ 阿部郁朗, 非天然型デカケタイドを産生する植物ポリケタイド合成酵素, 特願 2007-062770, 出願人: 科学技術振興機構

受賞

- ・ 日本薬学会 学術振興賞受賞 「天然物の生合成工学に関する研究」 (2008 年 3 月 25 日)