

研究課題別評価書

1. 研究課題名

二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製

2. 氏名

阿部 郁朗

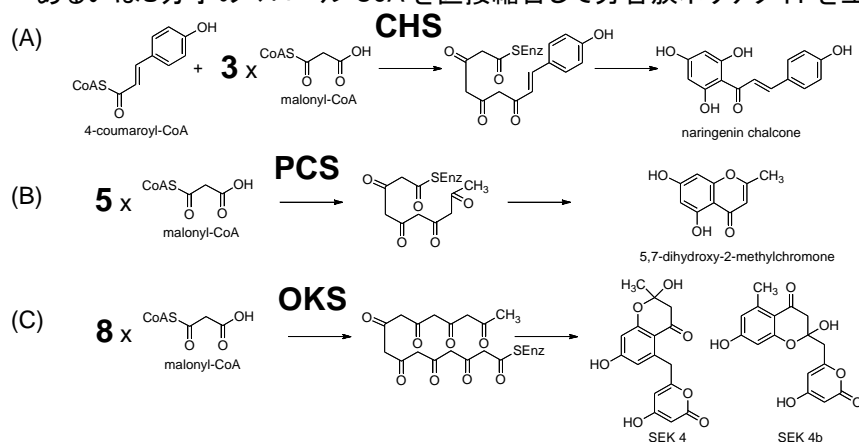
3. 研究のねらい

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潜在的触媒能力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の解明、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。

4. 研究成果

(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) ポリケタイド鎖長と生成物特異性の制御

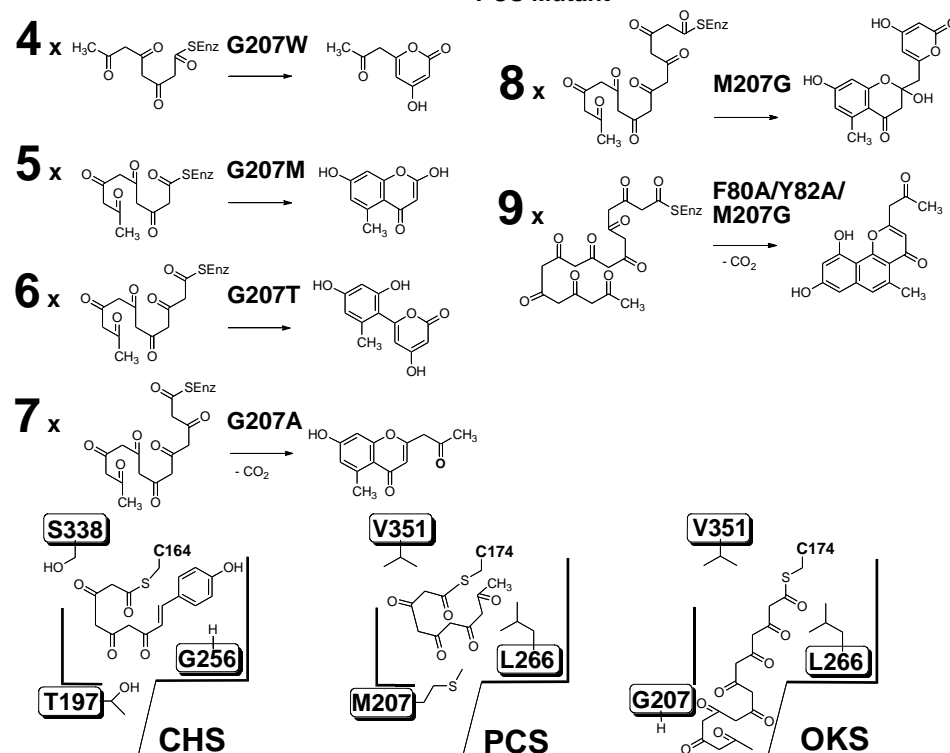
アミノ酸レベルで互いに92%という非常に高い配列相同性を示す両酵素が、このように全く異

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、大変興味を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。

OKS Mutant

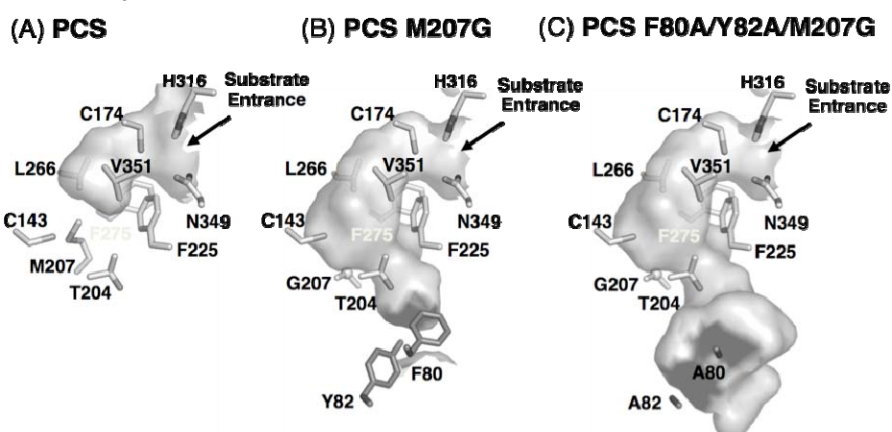
PCS Mutant



(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立体構造を共有する

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ことが可能である。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 の導入により、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, Tyr822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CoA9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。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予想された。

5. 自己評価

当初の計画通り概ね順調に進行した。部位特異的変異実験の結果、基質及び生成物特異性を決定する活性中心アミノ酸残基を明らかにし、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すること、さらに、この単一残基側鎖の立体的嵩高さに応じて、マロニルCoA縮合数の人為的な制御が可能であることを示した。また、この特異な酵素のX線結晶構造解析の結果から、酵素活性中心構造を解明し、さらに結晶構造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-炭素結合の形成、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。一連の生理活性二次代謝産物の基本骨格構築において決定的な役割を演ずるⅢ型PKSの酵素触媒機能の人為的な制御にむけて大きな前進といえる。今後の課題として、酵素反応基質やポリケタイド鎖長の制御に加えて、閉環・芳香環形成反応機構の解明と人為的な制御にも挑戦していきたい。進化分子工学などの手法を取り入れた変異酵素の触媒活性の最適化や、遺伝子導入による新機能賦与と生物の作出など、非天然型新規化合物の生産効率の向上と実用に供する有用物質生産系の構築についても検討を加えたい。

6. 研究総括の見解

ポリケタイド合成酵素の立体構造の知見を取り入れ、反応機構の解析、反応の人為的制御を行った。アミノ酸の変異で反応産物を収納する部位の立体構造の変化と反応産物の分子の大きさとの対応関係が見事に示された。酵素機能を制御することにより効率的に新規有用物質を生産するという、当初の目的は達成できたと考える。今後は、実際に欲しい物を取れるようなブレークスルー的技術進歩、また、合成した新規物質の生物活性やその有用性の検討が望まれる。特に、遺伝子改変植物で、どのように機能や産物が変わるかを示して欲しい。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表 * Corresponding author

1. **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).
2. **I. Abe***, T. Watanabe, H. Morita, T. Kohno, H. Noguchi, "Engineered biosynthesis of plant polyketides: manipulation of chalcone synthase", *Organic Letters* **8**, 499–502 (2006).
3. 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).
4. **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).
5. S.-P. Shi, K. Wanibuchi, H. Morita, K. Endo, H. Noguchi, **I. Abe***, "Enzymatic formation of unnatural novel chalcone, stilbene, and benzophenone scaffolds by plant type III polyketide synthase", *Organic Letters* **11**, in press (2009).

(2)特許

研究期間累積件数:3件

1. 発明者:阿部郁朗, 安部剛史, 野口博司

発明の名称:4-ヒドロキシ-2-キノリノン類の酵素合成法

出願人:独立行政法人科学技術振興機構

出願日:2006年6月22日

出願番号:特願 2006-172160

2. 発 明 者:阿部郁朗, 野口博司
発明の名称:アロエソン合成酵素
出 願 人:独立行政法人科学技術振興機構
出 願 日:2007 年 1 月 24 日
出願番号:特願 2007-014183

3. 発 明 者:阿部郁朗
発明の名称: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
出 願 人:独立行政法人科学技術振興機構
出 願 日:2007 年 3 月 13 日
出願番号:特願 2007-062770

(3)受賞

1. 日本生薬学会 学術貢献賞「天然薬物の生合成工学に関する研究」(2007 年 9 月)
2. 日本薬学会 学術振興賞「天然物の生合成工学に関する研究」(2008 年 3 月)

(4)招待講演

1. I. Abe, "Structure and function of plant type III polyketide synthase", International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2005), Symposium on "Natural Product Biosynthesis", Honolulu, Hawaii, USA, 2005.12.15
2. I. Abe, "Engineered biosynthesis of plant polyketides", ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products, Kyoto (Japan), 2006.7.27
3. I. Abe, "Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes", TERPNET 2007 8th International Meeting on Biosynthesis and Function of Isoprenoids, Strasbourg, France, 2007.5.1
4. I. Abe, "Engineered biosynthesis of plant polyketides", 7th Japan-US Seminar, Biosynthesis of Natural Products, San Diego, USA, 2008.6.22
5. 阿部郁朗、「天然物の生合成工学に関する研究」、第 128 回 日本薬学会年会 学術振興賞受賞講演、横浜、2008.3.28

(5)学会発表

1. 阿部郁朗、「二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製」、植物科学研究プロジェクトシンポジウム-植物生産機能の総合的向上を目指して-、東京、2005.12.2
2. 阿部郁朗、「植物ポリケタイド合成酵素を利用した非天然型新規化合物ライブラリー構築」、日本農芸化学会 2006 年度大会 シンポジウム「21 世紀の新資源分子ライブラリー:酵素合成と化学合成の新しい融合に向けて」、京都、2006.3.25
3. 阿部郁朗、「植物由来 III 型ポリケタイド合成酵素の生合成工学」、第 127 回 日本薬学会年会 シンポジウム「生合成機構の解明から有用物質生産系の合理的構築へ」、富山、2007.3.28
4. 阿部郁朗、「天然薬物の生合成工学」、第 129 回 日本薬学会年会 シンポジウム「創薬をめざした機能性天然分子の探索と開発、ケミカルバイオロジー研究の最前線」、京都、2009.3.28
5. 阿部郁朗、「植物ポリケタイド合成酵素の生合成工学」、日本化学会 第89春期年会 シンポジウム 先端ウォッチング「生合成工学-複雑な構造を持つ生物活性天然物の大量供給を目指して」、千葉、2009.3.27

(B)その他の主な成果

なし