植物ポリケタイド合成酵素の触媒機能の制御

阿部 郁朗*

Engineering of Plant Polyketide Synthases

Ikuro Abe*

Recent progress of our research on the plant-specific type III polyketide synthases (PKSs) is described. First, our studies demonstrated that the enzymes accept a variety of substrate analogues to synthesize products chemically and structurally different from the natural products. Manipulation of the enzymes by artificial substrates could thus lead to development of a chemical library of pharmaceutically important novel polyketides. Second, a growing number of functionally divergent type III PKSs have been cloned and characterized, which include recently obtained pentaketide chromone synthase and octaketide synthase from the aloe plant. Structure function analysis revealed that a chemically inert single residue lining the active-site cavity determines the polyketide chain length and the product specificity. The functional diversity of type III PKSs is thus evolved from the simple steric modulation of the active-site cavity accompanied by conservation of a Cys-His-Asn catalytic triad. These results provided novel strategies for the engineered biosynthesis of plant polyketides.

Key words: plant polyketide, type III polyketide synthase, chalcone synthase super family, polyphenols, crystal structure, catalytic potential, substrate specificity, engineered biosynthesis

はじめに

自然は複雑な天然物の骨格を、驚くほど単純な工程で、短時間のうちに作り上げることが可能である。微生物であれば3日も培養すれば十分であるので、有機合成の技術が格段に進歩した今日にあっても、とても太刀打ちできるものではない。こうした生合成の仕組みを解き明し、物質生産に役立てることができればというのが、そもそも筆者が生合成研究を志した理由である。さて、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

の格好のモデルともいえる高等植物由来Ⅲ型ポリケタイド合成酵素(PKS)をとりあげる^{1,2)}。マロニル CoA に由来する C₂ 単位の縮合により炭素鎖の伸長反応を繰り返し、生成した β-ポリケトメチレン中間体が、さらにクライゼンあるいはアルドール型の縮合により、閉環して芳香環を構築する PKS 酵素反応は「カルボニルの化学」が中心となる。筆者らはまず、化学的に合成した人工基質をプローブとして酵素に作用させることにより、Ⅲ型 PKS が異例ともいえる広範な基質特異性と触媒ポテンシャルを示すことを明らかにした。その結果、種々の非天然型新規化合物の生産に成功し、酵素触媒機能の拡張と新規骨格創出への展望を与えた。一方、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。また、この特異な酵素の X 線結晶構造解析の結果から、基質およ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。以下に、最近の研究成果を紹介する。

* 静岡県立大学薬学部, 科学技術振興機構 PRESTO (422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

* School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, and PRESTO, Japan Science and Technology Agency (52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan)

1. カルコン合成酵素スーパーファミリー

植物に普遍的に存在するフラボノイドの骨格を構築するカルコン合成酵素(CHS)は、これまでに最もよく研究がなされているⅢ型 PKS である³⁾。1分子のクマロイル CoA を開始基質として、3分子のマロニル CoA に由来する C₂ 単位を順次縮合の後、クライゼン型の芳香環形成反応により 4, 2', 4', 6'-テトラヒドロキシカルコン(ナリンゲニンカルコン)を生成する。一方、ブドウなど限られた植物に分布するスチルベン合成酵素(STS)では、共通のテトラケタイド中間体から脱炭酸を伴ったアルドル型の閉環反応が進行して、3, 4', 5-トリヒドロキシスチルベン(レスベラトロール)が生成する(図1)⁴⁾。

これ以外にも、植物からは様々な触媒活性を有するⅢ型 PKS が報告されている(図1)^{1, 2)}。例えば、オトギリソウのベンゾフェノン合成酵素(BPS)は、ベンゾイル CoA を基質としてベンゾフェノンの骨格を構築するが、このベンゾフェノンはさらに代謝されてキサントン誘導体に変換される。また、ミカン科植物のアクリドン合成酵素(ACS)は、アントラニル CoA を基質として3分子のマロニル CoA を順次縮合してアクリドン・アルカロイドの骨格を生成する。一方、芳香環をもたない脂肪酸

のエステルを開始基質とするものも知られており、大麻のカンナビノイド生合成の鍵酵素となるオリベトール酸合成酵素(OAS)は、ヘキサノイル CoA を基質としてレゾルシノール誘導体を、また、ホップのパレロフェノン合成酵素(VPS)は、イソバレリル CoA を基質としてビール苦味成分の前駆体となるフロログルシノール誘導体を生産する。他にも、パイロン環を形成する酵素として、トリ酢酸ラクトン(4-ヒドロキシ-6-メチル-2-パイロン)を産生するガーベラの2-パイロン合成酵素(2-PS)⁵⁾、また、カバラクトン(ポリネシアの麻酔性嗜好飲料の主成分)の生合成に関わるスチリルパイロン合成酵素(SPS)などが知られている。

こうした植物ポリフェノールの分子多様性を生み出す要因として、酵素反応の開始基質と最終的な閉環反応様式の違いが挙げられる。一方、ポリケタイド鎖長を決定するマロニル CoA の縮合数についてみると、ほとんどのⅢ型 PKS が CHS と同様に3分子のマロニル CoA を順次縮合するのに対し、2-PS や SPS では2分子、ベンザルアセトン合成酵素(BAS)に至っては、1分子のマロニル CoA のみを縮合して、脱炭酸の後に C₆-C₄ 骨格をもつジケタイドを生成する⁶⁾。また、ごく最近、大変興味深いことに、2分子のクマロイル CoA

Fig. 1 Proposed mechanism for the formation of plant polyketides by CHS-superfamily type III polyketide synthases. CHS; chalcone synthase, STS; stilbene synthase, BAS; benzalacetone synthase, SPS; styrylpyrone synthase, BPS; benzophenone synthase, ACS; acridone synthase, OAS; olivetolic acid synthase, VPS; valerophenone synthase, 2 PS; 2-pyrone synthase, CUS; curcuminoid synthase.

と1分子のマロニル CoA からクルクミンの C₆-C₇-C₆ 骨格を構築する新規Ⅲ型 PKS も報告されている⁷⁾。これら一連の植物由来の CHS スーパーファミリー酵素は、アミノ酸レベルで互いに 50% 以上の高い配列相同性を示すことが明らかにされている。ポストゲノムの時代であって、多くの関連酵素遺伝子の同定が容易にはなったものの、活性部位の微妙な構造の違いで基質や生成物の特異性が大きく変化するため、その配列から酵素機能を推定するのは困難であるのが現状である。

主に植物に特異的に存在するⅢ型 PKS は、マクロライドやテトラサイクリンなどの骨格を構築する、微生物由来のⅠ型(複数の機能ドメインが1本のポリペプチド鎖に連続して存在する)やⅡ型(個々の機能を有する酵素サブユニットの複合体からなる)の巨大で複雑な PKS とは違って、ケト合成酵素(KS)のみで構成される比較的単純なタンパクである(図2)^{1,2)}。酵素反応にアシルキャリア・プロテイン(ACP)を要求せず、活性中心の Cys 残基が CoA エステルから直接アシル基を受け取って、ポリケタイド鎖の伸長反応を触媒する。大腸菌において異種発現可能で、比較的安定で取り扱いの容易なⅢ型

PKS は、酵素反応機構など精密機能解析に適しているといえる。特に、PKS 酵素研究の中心的な課題となる基質の分子認識や炭素鎖伸長と閉環反応のメカニズム、さらに、その人為的な制御による物質生産を考える上で優れたモデルシステムとなりうる。

分子量 42–45 kDa の単純なタンパクのホモダイマーからなるⅢ型 PKS については、これまでに CHS や STS を含め、数種の酵素の X 線結晶構造解析が報告されており、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明らかにされている^{1,2)}。活性部位は、catalytic triad を構成する 3 つの触媒残基 Cys 164, His 303, Asn 336(CHS のナンバリング)を中心とする大きなキャビティに存在し、開始基質が結合するポケットと、伸長基質マロニル CoA に由来する C₂ 単位の新結合による炭素-炭素結合の形成と閉環反応が進行するポケットとからなる^{3a)}。すなわち、酵素反応は、まず開始基質が酵素活性部位にとりこまれ、隣接する His との水素結合により安定化された Cys のチオレートアニオンが、これを求核攻撃することによって開始される(図3)。次いでマロニル CoA の脱炭酸を伴ったクライゼン型の縮

(A) Type I PKS

(B) Type II PKS

(C) Type III PKS

Fig. 2 Reaction mechanisms for formation of (A) macrolide by type I, (B) tetracycline by type II, and (C) chalcone by type III polyketide synthase. KS; ketosynthase, ACP; acyl carrier protein, AT; acyltransferase, KR; ketoreductase, DH; dehydratase, ER; enoylreductase, TE; thioesterase.

合による炭素鎖の伸長反応を繰り返し、最後に β -ポリケトメチレン中間体が閉環、新たに芳香環を形成して反応が終了する。この間、HisとAsnは、オキシアニオン・ホールを形成し、マイナスに荷電した遷移状態中間体を安定化することにより、マロニル CoA の脱炭酸とその結果生じるエノラートアニオンの求核攻撃を促進する。一方、Cys-His-Asn かなる活性中心触媒残基は、機能の異なるすべての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の伸長反応が進行するものと考えられる。

2. 広範な基質特異性を利用した酵素触媒機能の開拓

一般に酵素の基質特異性は厳密で自由度が低いものとされているが、Ⅲ型 PKS が示す広範な基質特異性(いい加減さ！)と触媒ポテンシャルは特筆に値する⁸⁾。そこでこうした特徴を利用して、人工基質をプローブとして酵素に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。天然型基質の場合と同様な酵素反応の進行が予想される一方で、修飾基質の構造に対応して、反応性に富んだ β -ポリケトメチレン中間体の、活性部位におけるフォールディング・コンフォメーションが微妙に影響を受け、在来見られない骨格を有する「超天然型」化合物を与える可能性も期待される。

筆者らはまず、1 分子のクマロイル CoA と 3 分子のマロニル CoA の縮合により、それぞれカルコンとスチルベンを生成する CHS と STS (図 1) に、化学的に合成した人工基質を作用させることにより、新たな酵素触媒機能の開拓を試みた⁸⁾。すなわち、本来の基質であるクマロイル CoA 芳香環の水酸基をハロゲンで置換したエステル、あるいは、ベンゼン環をフランやチオフエンなどヘテロ芳香環で置換した基質アナログ、さらに、ベンゾイル CoA などの芳香族エステルや、各種脂肪酸エス

テルを作用させて、酵素反応生成物を詳細に解析した(図 4)。

その結果、驚いたことに、ほとんどすべてのアナログが、酵素反応の開始基質として機能し、一連の非天然型新規化合物を生成することを見出した(図 4A)。まず、CHS, STS の場合とも、フッ素置換アナログでは 3 分子のマロニル CoA を順次縮合の後、最後の芳香環の形成まで酵素反応が進行して、カルコンおよびスチルベンのフッ素置換体がパイロン誘導体とともに得られた。一方、立体的に嵩高い塩素や臭素などの置換体では、2 分子あるいは 3 分子のマロニル CoA との縮合の後、反応が停止して生じるパイロン誘導体只得られるのみで、このことからクマロイル CoA の芳香環置換基の立体電子的な要因が酵素反応に大きな影響を及ぼすことが示された^{8a,c)}。

次に、クマロイル CoA の芳香環をフランやチオフエンで置換したアナログを作用させた場合、意外なことに、これら修飾基質も同様に開始基質として機能して、ヘテロ芳香環を含有する非天然型新規テトラケタイドが、パイロン誘導体とともに、高収率で生成した^{8a,c)}。さらに驚くべきことに、CHS においては、ベンゾイル CoA などの芳香族エステルのみならず、芳香環をもたない脂肪酸エステルまでもが、同様に基質として受け入れられ、3 分子のマロニル CoA を順次縮合の後、クライゼン型の閉環により新たな芳香環を形成したフロログルシノール誘導体(カルコンと同じ 2,4,6-トリヒドロキシフェニル骨格)を与えた^{8b)}。これに対し、STS では、ベンゾイル CoA や脂肪酸 CoA を作用させた場合には、脱炭酸を伴ったアルドール型の閉環により、芳香環を形成したレゾルシノール誘導体(スチルベンと同じ 3,5-ジヒドロキシフェニル骨格)の生成は認められず、両酵素間で若干の違いが認められた^{8c)}。

Fig. 3 Proposed enzyme reaction mechanism for type Ⅲ polyketide synthases.

Fig. 4 Enzyme reaction products from (A) various starter substrate analogues, (B) extender substrate analogues, (C) alternate starter and non-physiological extender, and (D) enzymatic formation of quinolinones.

それでは、脱炭酸を伴ったクライゼン縮合の繰り返しにより、酵素反応の伸長基質として機能するマロニル CoA に代えて、炭素数が 1 つ多いメチルマロニル CoA やスクシニル CoA を作用させた場合はどうかであろうか。CHS に、クマロイル CoA と (2*RS*)-メチルマロニル

CoA を作用させた場合、1 分子のメチルマロニル CoA を縮合した段階でポリケタイド鎖の伸長が停止してしまい、脱炭酸の後に C₆-C₅ 骨格をもつ非天然型ジケタイドが主生成物として得られた(図 4B)^{8d}。これに対して、スクシニル CoA を作用させた場合には、酵素反応は全

く進行せず、これは立体的な要因に加えて、スクシニル CoA の α 位炭素の求核性が、 β -ケト基をもつマロニル CoA に比べて、確実に落ちることがその原因として考えられた(図 4B)^{8d)}。また、CHS に、伸長基質として (2RS)-メチルマロニル CoA を、開始基質としてベンゾイル CoA やヘキサノイル CoA を「同時に」作用させると、驚いたことに、酵素はこれら非生理的な基質を同時に受け入れて、2 分子のメチルマロニル CoA の縮合により非天然型新規トリケタイドパイロンを生成する(図 4C)^{8e)}。さらに、(2RS)-メチルマロニル CoA のみを基質とした場合にも、3 分子の脱炭酸的縮合により C₉ メチル化トリケタイドパイロンを単一生成物として与えた(図 4C)^{8j)}。

一方、薬用植物のダイオウ(*Rheum palmatum*)より単離した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 との脱炭酸を伴った縮合により、C₆-C₄ 骨格をもつジケタイドの骨格を構築する CHS スーパーファミリー酵素である(図 1)⁶⁾。Ⅲ型 PKS のうちで、3 分子のマロニル CoA のみを縮合するものとしては、BAS が唯一の例であり、ダイオウの抗炎症成分であるリンドレインなど、一連の生理活性フェニルブタノイド生合成の鍵酵素となる。最近、筆者らは、アントラニル酸のエステルをマロニル CoA(またはメチルマロニル CoA)とともに BAS に作用させた場合、ジケタイド中間体から新たな炭素-窒素結合の形成が進行して、4-ヒドロキシ-2-キノリノンを単一生成物として 80%以上の収率で生成することを見出した(図 4D)^{8k)}。興味深いことに、BAS にとって非生理的な基質であるはずの(2RS)-メチルマロニル CoA の方が、マロニル CoA に比べてより良く反応する。すでに述べたように、天然には *N*-メチルアントラニル CoA と 3 分子のマロニル CoA の縮合により、アクリドンの骨格を生成するⅢ型 PKS が知られているが(図 1)、マロニル CoA 1 分子のみの縮合によるキノリノン・アルカロイドの生成はこれが最初の例である。この結果は天然におけるキノリノン骨格の生合成が、BAS に類似したⅢ型 PKS によるものであることを強く示唆している。また、4-ヒドロキシ-2-キノリノン類には、NMDA レセプターやセロトニンレセプターに対する拮抗作用などが知られており、医薬品開発の見地からも注目を集めている^{8k)}。今後、醗酵工学などの技術を駆使することにより、安価で効率的な大量生産にも道を拓くことが期待される。

3. 新規触媒活性を有する植物ポリケタイド合成酵素

筆者らは、天然より新規酵素触媒活性を探索した結果、従来見られない全く新しいタイプのⅢ型 PKS 酵素

遺伝子のクローニングに成功し、これまで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 CHS スーパーファミリー酵素が関与することを明らかにしてきた²⁾。その代表が、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、静岡県特産の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)である⁹⁾。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 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(図 5)、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新規Ⅲ型 PKS である(図 6)。

PCS が産生する 5,7-ジヒドロキシ-2-メチルクロモンは、抗喘息・抗アレルギー薬のリード化合物として有名なケーリンなど生理活性フロクロモンの前駆体であり、Ⅲ型 PKS によるこのような芳香族ペンタケタイドの生成は、これが最初の例である^{9a)}。一方、OKS が産生する芳香族オクタケタイド SEK 4/SEK 4b は、放線菌のⅡ型の minimal PKS(還元酵素などのサブユニットを欠落させた最小単位の酵素複合体)が、産生する非天然型の代謝産物として知られてはいるものの、実際に植物から単離された報告はなく、このような生成物を与えるのはなぜか非常に興味をもたれるところである^{9b)}。1 つの可能性として、OKS は本来アロエが豊富に産生する(同じく 8 分子のマロニル CoA の縮合により生成するバルバロインなど)アンスロンやアンスラキノンの生合成に関与するものの、還元酵素など相互作用すべき酵素タンパクの不在などの理由で、SEK 4/SEK 4b を生成物として与えたとも考えられる^{9b)}。現在、さらに詳細に解析を進めているが、もし CHS スーパーファミリー酵素がアンスロンやアンスラキノンの骨格構築にも広く関与することになれば、植物二次代謝産物の生合成の相当部分をⅢ型 PKS で説明できることになり、今後の生合成工学の可能性を考える上で大変意義がある。

それでは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なぜか、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 3 つの触媒残基 Cys 164, His 303, Asn 336 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 Thr 197, Gly 256, Ser 338(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 T 197 M/G 256 L/S 338 V, OKS では T 197 G/G 256 L/

S 338 V) (図 5)。これら 3 つのアミノ酸残基は、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⁵⁾。筆者らはまず、CHS の Thr 197 が、PCS においては Met 207 に、また、OKS においては Gly 207 に置換されていることに着目し、この残基に部位特異的な変異を導入することにより、酵素活性に及ぼす影響を精査した。

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、M 207 G 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 SEK 4/SEK 4b を生成すること、逆に、OKS の G 207 M 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(図 7)⁹⁾。すなわち、活性中心キャビティを構成する、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、G 207 A や G 207 T 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 を縮合して芳香族ヘプタケタイド、ヘキサケタイドを生成するが(図 7A)、これらは、それぞれアロエが著量に産生する抗ヒスタミン成分アロエニンおよび抗炎症成分アロエシンの生合成前駆体となる^{9b)}。一方、最も高いアミノ酸側鎖を導入した G 207 W 置換体では、4 分子のマロニル CoA が縮合したテトラケタイド・パイロンが得られるのみであった。以上、極めて明快な結果であり、PCS と OKS の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 C₂ 単位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。

ところで、化学的に不安定で反応性に富んだ β -ポリケトメチレン中間体から、実際にどのようにして閉環反応が進行するのか興味深い点である。この場合、チオエステル結合の開裂による活性中心 Cys 残基からのポリケタイド鎖の切り出しと閉環反応のタイミングなどが問題になるが、少なくともすべての場合に共通して起こる、メチル末端におけるアルドール型の縮合を介した最初の芳香環の形成までは、反応は酵素的に進行するものと考えている⁹⁾。ただし、ポリケタイド中間体の閉環反応に関与するアミノ酸残基(芳香環の構築につながる最初の炭素-炭素結合の形成は、PCS においてはクライゼン型の縮合により、また、OKS においてはアルドール型の縮合により進行する)については、不明で今後の研究が待たれているのが現状である。

4. 結晶構造に基づく触媒機能の拡張と新規骨格創出

キダチアロエ由来 PCS については、三菱化学生命科学研究所の河野俊之博士、森田洋行博士らとの共同研究により、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、および M 207 G 変異型酵素の X 線結晶構造解析に 1.6 Å の分解能で成功している(図 8)¹⁰⁾。まず、アミノ酸レベルで互いに 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、CHS と PCS の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

(A) OKS Mutant

(B) PCS Mutant

Fig. 7 Proposed mechanism for the formation of unnatural polyketides by mutants of (A) OKS and (B) PCS.

基質および生成物特異性を決定することになる。次に、野生型と M 207 G 変異型の立体構造の比較により、Met 207 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(図 8)。すなわち、点変異 M 207 G 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(図 6C)^{10a)}。PCS においては、CHS や STS にみられるような、閉環反応に重要とされる、Ser 338 近傍の水分子を介した水素結合のネットワークは観察されず^{3a,4)}、単に活性中心キャビティの大きさや形状の変化によって酵素反応生成物の特異性が決定されるものと考えられる^{10a)}。

活性中心キャビティを構成する 3 つアミノ酸残基のうち、197 番のアミノ酸残基以外に、256 番と 338 番の残基(CHS のナンバリング)も、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が明らかにされている(図 5)¹¹⁾。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 Gly 256 は、酵素反応の開始基質の特異性を決定するアミノ酸残基である^{11a)}。Gly 256 は、PCS や OKS においては立体的により、嵩高い Leu 266 で置換されており、この結果、両酵素はもはや C₆-C₃ 骨格を有するクマロイル CoA を基質として受け入れることができず、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(図 6C)。

一方、チオエステル結合の形成を介してポリケタイド鎖伸長の起点となる触媒残基 Cys 164 に隣接する Ser 338 は、上述したように、水分子を介した水素結合のネットワークを形成することにより、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(図 6C)^{3a,4)}。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、筆者らはコガネバナ由来 CHS に点変異 S 338 V 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、オクタケタイド SEK 4/SEK 4b を微量生成することを見出した^{11b)}。しかも、その生成能は、OKS と同様な T 197 G/G 256 L/S 338 V 三重変異を導入することで、さらに顕著に増大する。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、CHS ではすで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、一部のポリケトメチレン中間体の先端が、このポケットに向かって伸長したものと考えられる^{11b)}。植物に普遍的に存在し、Ⅲ型 PKS のプロトタイプともいえるべき 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、CHS 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。

さて、本来 5 分子のマロニル CoA の縮合によりクロモンの骨格を構築する、PCS の Met 207 残基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、筆者らは X 線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、さらに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。すなわち、ポケットの底面を形成する Phe 80, Tyr 82 の 2 つの芳香族残基についても同時に Ala で置換した F 80 A/Y 82 A/M 207 G 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

Fig. 8 Comparison of the active-site cavities of (A) wild-type PCS (PDB code 2 D 3 M), (B) PCS M 207 G mutant (PDB code 2 D 52), and (C) PCS F 80 A/Y 82 A/M 207 G mutant (homology model).

して、これまでに例のない非天然型ノナケタイドを生成することを見出した(図 7B)¹²⁾。KS のみで構成される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って、芳香環が縮合したナフトパイロン骨格の合成能を新たに獲得した点は特筆に値する。これまで放線菌由来のⅢ型 PKS が 5 分子のマロニル CoA を基質として 1,3,6,8-テトラヒドロキシナフトレンを生成することが知られているが¹³⁾、このような 3 環性ナフトパイロン縮合系の構築は、Ⅲ型 PKS のさらなる触媒ポテンシャルを明示している。上述したように、アンスロンやアンスラキノンの生合成にも、一連の CHS スーパーファミリーⅢ型 PKS が広く関与する可能性を強く示唆している。驚いたことに、上述した三重変異酵素のホモロジーモデルを作成して酵素活性中心キャビティの構造を比較してみると、わずか 3 つの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(図 8C)¹²⁾。

おわりに

植物 PKS 酵素が示す最大の特徴の 1 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、むしろ単純なアシル基転位の繰り返しによる「炭素鎖伸長マシン」と捉えるのが適当かもしれない(すでに述べたように、Cys-His-Asn からなる活性中心触媒残基は、すべての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の伸長反応が進行する)。従って、こうした基質特異性の「いい加減さ」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。ジカルボニル化合物をアミンと反応させた Robinson のトロピノン合成^{14a)}や Heathcock のユズリハアルカロイドの化学合成^{14b)}にみられるように、 β -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。

一方、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、 C_2 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 12 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筆者らの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 の三重変異酵素が、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の骨格の形成など、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挑戦したい。

物質生産を考える上で、今後クリアすべき課題の 1 つに、その生産効率の向上がある。変異や人工基質の構造によっては本来の酵素と同程度の活性が望めるものの、まだまだ実用にはほど遠いものもある。そこで、結晶構造に基づいて、キャビティの大きさやアミノ酸残基の配置をさらに変化させることにより、酵素機能の最適化が望まれる。また、醗酵工学や植物代謝工学への展開として、大腸菌など微生物を生産工場とした物質生産系の構築や形質転換植物のメタボローム解析など、実用に供する物質生産系の構築を進めている。

最後に、これら生合成酵素が触媒する反応は、有機合成の技術が格段に進歩した今日にあっても、酵素のみが唯一効率よく行うことの可能なものであることを強調しておきたい。クリーンかつマイルドな条件下、驚くほど単純な工程で、複雑な分子骨格を作り上げることが可能である。保護・脱保護あるいは官能基変換の繰り返しを必要としない、生体触媒を用いた合成法の利点は計り知れないものがあり、次世代の環境調和型の新合成手法の発展に必ずや大きな貢献をするものと期待される。

謝 辞 本稿執筆にあたり、静岡県立大学・野口博司教授、三菱化学生命科学研究so・河野俊之博士、森田洋行博士をはじめとする共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。本研究は、文部科学省、日本学術振興会、ならびに、科学技術振興機構の研究助成により行われたものであり、ここに深く感謝する。

(2008 年 2 月 18 日受理)

文 献

- (a) M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.*, 20, 79 (2003); (b) J. Schröder, "Comprehensive Natural Products Chemistry", Vol. 2, Elsevier, Oxford, 1999, p 749; (c) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.*, 18, 380 (2001)
- (a) I. Abe, "ACS Symposium Series 955, Polyketides: Synthesis, Biological Activity and Genetic Engineering", American Chemical Society, Washington DC, 2006, p 109; (b) 阿部郁朗, 蛋白質核酸酵素, 48, 2275 (2003); (c) 阿部郁朗, 蛋白質核酸酵素, 52, 996 (2007); (d) 阿部郁朗, ファルマシア, 42, 563 (2006)
- (a) J. L. Ferrer, J. M. Jez, M. E. Bowman, R. A. Dixon, J. P.

- Noel, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 775 (1999); (b) J. M. Jez, J. L. Ferrer, M. E. Bowman, R. A. Dixon, J. P. Noel, *Biochemistry*, **39**, 890 (2000); (c) J. M. Jez, J. P. Noel, *J. Biol. Chem.*, **275**, 39640 (2000); (d) J. M. Jez, M. E. Bowman, J. P. Noel, *Biochemistry*, **40**, 14829 (2001); (e) S. Tropf, B. Kärcher, G. Schröder, J. Schröder, *J. Biol. Chem.*, **270**, 7922 (1995); (f) D. Y. Suh, K. Fukuma, J. Kagami, Y. Yamazaki, M. Shibuya, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Biochem. J.*, **350**, 229 (2000); (g) D. Y. Suh, J. Kagami, K. Fukuma, U. Sankawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 725 (2000); (h) J. M. Jez, M. E. Bowman, J. P. Noel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5319 (2002)
- 4) M. B. Austin, M. E. Bowman, J.-L. Ferrer, J. Schröder, J. P. Noel, *Chem. Biol.*, **11**, 1179 (2004)
- 5) (a) S. Eckermann, G. Schröder, J. Schmidt, D. Strack, R. A. Edrada, Y. Helariutta, P. Elomaa, M. Kotilainen, I. Kilpeläinen, P. Proksch, T. H. Teeri, J. Schröder, *Nature*, **396**, 387 (1998); (b) J. M. Jez, M. B. Austin, J. Ferrer, M. E. Bowman, J. Schröder, J. P. Noel, *Chem. Biol.*, **7**, 919 (2000)
- 6) (a) I. Abe, Y. Takahashi, H. Morita, H. Noguchi, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3354 (2001); (b) I. Abe, Y. Sano, Y. Takahashi, H. Noguchi, *J. Biol. Chem.*, **278**, 25218 (2003); (c) T. Abe, H. Morita, H. Noma, T. Kohno, H. Noguchi, I. Abe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3161 (2007)
- 7) Y. Katsuyama, M. Matsuzawa, N. Funa, S. Horinouchi, *J. Biol. Chem.*, **282**, 37702 (2007)
- 8) (a) I. Abe, H. Morita, A. Nomura, H. Noguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11242 (2000); (b) H. Morita, Y. Takahashi, H. Noguchi, I. Abe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 190 (2000); (c) H. Morita, H. Noguchi, J. Schröder, I. Abe, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3759 (2001); (d) I. Abe, Y. Takahashi, H. Noguchi, *Org. Lett.*, **4**, 3623 (2002); (e) I. Abe, Y. Takahashi, W. Lou, H. Noguchi, *ibid.*, **5**, 1277 (2003); (f) I. Abe, T. Watanabe, H. Noguchi, *Phytochemistry*, **65**, 2447 (2004); (g) S. Oguro, T. Akashi, S. Ayabe, H. Noguchi, I. Abe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 561 (2004); (h) I. Abe, Y. Utsumi, S. Oguro, H. Noguchi, *FEBS Lett.*, **562**, 171 (2004); (i) I. Abe, T. Watanabe, H. Noguchi, *Proc. Japan Acad., Ser. B.*, **81**, 434 (2005); (j) T. Abe, H. Noma, H. Noguchi, I. Abe, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 8727 (2006); (k) I. Abe, T. Abe, K. Wanibuchi, H. Noguchi, *Org. Lett.*, **8**, 6063 (2006); (l) K. Wanibuchi, P. Zhang, T. Abe, H. Morita, T. Kohno, G. Chen, H. Noguchi, I. Abe, *FEBS J.*, **274**, 1073 (2007)
- 9) (a) I. Abe, Y. Utsumi, S. Oguro, H. Morita, Y. Sano, H. Noguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1362 (2005); (b) I. Abe, S. Oguro, Y. Utsumi, Y. Sano, H. Noguchi, *ibid.*, **127**, 12709 (2005)
- 10) (a) H. Morita, S. Kondo, S. Oguro, H. Noguchi, S. Sugio, I. Abe, T. Kohno, *Chem. Biol.*, **14**, 359 (2007); (b) H. Morita, S. Kondo, T. Abe, H. Noguchi, S. Sugio, I. Abe, T. Kohno, *Acta Crystallogr.*, **F62**, 899 (2006); (c) H. Morita, S. Kondo, R. Kato, K. Wanibuchi, H. Noguchi, S. Sugio, I. Abe, T. Kohno, *ibid.*, **F63**, 576 (2007); (d) H. Morita, S. Kondo, R. Kato, K. Wanibuchi, H. Noguchi, S. Sugio, I. Abe, T. Kohno, *ibid.*, **F63**, 947 (2007)
- 11) (a) I. Abe, T. Watanabe, W. Lou, H. Noguchi, *FEBS J.*, **273**, 208 (2006); (b) I. Abe, T. Watanabe, H. Morita, T. Kohno, H. Noguchi, *Org. Lett.*, **8**, 499 (2006)
- 12) I. Abe, H. Morita, S. Oguro, H. Noma, K. Wanibuchi, N. Kawahara, Y. Goda, H. Noguchi, T. Kohno, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5976 (2007)
- 13) N. Funa, Y. Ohnishi, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka, S. Horinouchi, *Nature*, **400**, 897 (1999)
- 14) (a) R. Robinson, *J. Chem. Soc.*, **111**, 762 (1917); (b) C. H. Heathcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14323 (1996)

PROFILE

阿部郁郎 静岡県立大学薬学部・准教授 薬学博士

〔経歴〕1984年東京大学薬学部卒、1989年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了、同年仏政府給費留学生、1991年ニューヨーク州立大学ストーニーブルック校化学科上級博士研究員、生化学科研究助教授、1996年ユタ大学医薬化学科研究助教授、1998年静岡県立大学薬学部講師、2008年より現職、2005年より科学技術振興機構さきがけ兼任。
〔専門〕生物有機化学、天然物化学。〔連絡先〕Tel. & Fax: 054-264-5662 e-mail: abei@u-shizuoka-ken.ac.jp

他機関賞のお知らせ

徳山科学技術振興財団 平成21年度研究助成の募集

(財)徳山科学技術振興財団は平成21年度(第21回)研究助成の募集をします。

詳細は下記ホームページをご参照、あるいは下記連絡先へお問い合わせ下さい。

1. 助成対象：無機材料、有機材料、高分子材料、複合材料、その他の分野で、新規材料開発の基礎ならびに応用を指向する独創的な研究。大学等に常勤する45才未満の研究者。
2. 助成額：1件最高200万円(15件程度)
3. 応募方法：所定の申請書に必要事項記載。学長、学部長または研究所長の推薦が必要。
4. 募集期間：平成20年8月1日～9月30日必着
5. ホームページ：http://www.tokuyama.co.jp/zaidan/

連絡先：〒150-8383 東京都渋谷区渋谷3-3-1 渋谷金王ビル (財)徳山科学技術振興財団
(TEL 03-3499-8483, FAX 03-3499-8958, e-mail: zaidan@tokuyama.co.jp)