

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 29 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710246

研究課題名(和文) X線結晶構造解析と計算化学を基盤とした植物ポリケタイド合成酵素の構造基盤の確立

研究課題名(英文) Structural basis for plant-specific type III polyketide synthase based on the X-ray crystal structure analysis and computational chemistry

研究代表者

森田 洋行 (Morita, Hiroyuki)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号：20416663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：型ポリケタイド合成酵素(PKS)の中でも最多の12分子のマロニルCoA縮合を触媒し、TW95aへの変換を触媒するオクタケタイド合成酵素(OKS) F66L/N222G変異酵素のX線結晶構造解析に成功した。さらに、本結果に基づき、TW95aの生産能が約1.5倍に増加したOKS変異酵素の創出に成功した。一方、沖縄県産四季柑からキノリノンへの変換を特異的に触媒する新規型PKSのクローニングに成功した。

研究成果の概要(英文)：We solved crystal structure of an octaketide synthase (OKS) F66L/N222G mutant enzyme that catalyzes the longest number of malonyl-CoA condensations to produce TW95a. Furthermore, we succeeded in producing an OKS mutant enzyme that increased enzyme activity for the formation of TW95a to approximately 1.5 times on the basis of the crystal structure. In addition, we succeeded in cloning a novel type III PKS that specifically catalyzes the formation of quinolinone.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生合成 ポリケタイド合成酵素 酵素工学 ポリフェノール アルカロイド

## 1. 研究開始当初の背景

植物由来型ポリケチド合成酵素(PKS)は、植物に普遍的に存在するフラボノイドから、お茶やワインのポリフェノール、ウコンのクルクミン、さらにはアクリドンアルカロイドに至るまで、これら一見互いに無関係な、実に多岐にわたる化学構造と生物活性を有する植物二次代謝産物の基本骨格を構築する酵素群である。

著者らは、先行研究において、コガネバナ由来のプロトタイプ型PKS等に対して人工基質をプローブとして作用させ、酵素反応生成物とキネティクスを詳細に検討することにより、植物型PKSが異例とも言える広範な基質特異性と多様な触媒機能を示すことを明らかにした(JACS 122, 11242, 2000など)。さらに、クロモンなどの骨格を構築する全く新しいタイプの型PKS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一連の二次代謝産物の生合成に型PKSが広く関与することを明らかにした(JACS 127, 1362, 2005など)。また、型PKSのX線結晶構造解析と、それら結晶構造に基づく変異の導入により、酵素触媒機能を拡張させ、3環性ナフトパイロン骨格やジベンゾアゼピン骨格を有する非天然型新規化合物の創出や、基質を含む結晶化溶液に、ベンザルアセトン合成酵素(BAS)の結晶をソーキングすることにより、型PKSでは初となる、活性中心Cys残基に反応中間体がチオエステル結合した複合体結晶構造の取得に成功するなど、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の人為的な制御にも展望を開きつつある(Chem. Biol. 14, 359, 2007; JACS 129, 5976, 2007; PNAS 107, 19778, 2010; PSNA 108, 13504, 2011; PNAS 107, 669, 2010など)。一方、型PKSは、互いに50%以上の高いアミノ酸相同性を示し、しかも活性中心キャビティの僅かな形状の違いにより、活性が大きく変化してしまうため、型PKSの触媒機能を拡張して非天然型新規化合物を創出するためには、構造機能活性相関と触媒機構に関するさらなる知見を必要とした。

## 2. 研究の目的

型PKSが示す広範な基質特異性と潜在的触媒能力は注目に値する。従って、こうした基質特異性の寛容さと触媒能力を利用・拡張し、一連の骨格の異なる人工基質を作用させることによって、創薬シードとなり得る有用物質の生産が可能になる。また、酵素蛋白質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。一方、酵素の機能制御による物質生産に向けては、静的基質認識だけでなく、活性中心アミノ酸残基の適正配置や反応の進行に伴う動的構造変化の解明が重要である。本研究では、著者らが先行研究において、型PKSでは最多の12分子のマロニルCoAを縮合し、TW95aへの生産能の

獲得に成功したオクタケチド合成酵素(OKS)のF66L/N222G変異酵素を取り上げ、構造生物学を基盤として、計算化学、分子生物学、タンパク質工学に至る幅広い方法論を駆使することにより、本変異酵素の結晶構造の解明と、その結果をもとにした酵素触媒機能の拡張を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) OKS F66L/N222G 変異酵素のX線結晶構造解析

OKS F66L/N222G 変異酵素を6残基のヒスチジンとのC末融合タンパク質として大腸菌に異種発現させ、Ni-キレートアフィニティカラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて高純度に精製した。次に、これを用いて、市販のスクリーニングキットにて結晶化スクリーニングを行い、結晶化条件の最適下を経て得たアポ型結晶について、筑波・フォトンファクトリーにてX線回折データを得、野生型OKSを鋳型とした分子置換法により、OKS F66L/N222G 変異酵素のX線結晶構造を取得した。また、アポ型結晶を、マロニルCoAを含む結晶化溶液に浸すことにより、酵素反応中間体複合体を結合したOKS F66L/N222G 変異酵素のX線結晶構造を得た。

### (2) 四季柑由来新規型PKSのクローニングと機能解析、および、X線結晶構造解析

沖縄県で採取した四季柑(*Citrus microcarpa*)の葉よりフェノールSDS法にてtotal RNAを抽出し、オリゴd(T)プライマーを用いて逆転写反応を行うことにより、1本鎖cDNAライブラリーを得た。次に、これを鋳型として、型PKSのアミノ酸配列の中でも特に保存された領域をもとに設計・作成した縮重入りプライマーを用いて1st PCRおよびnested PCRを行うことにより、四季柑由来型PKS遺伝子のコア配列2種を取得し、各々のコア配列に対して特異的なプライマーを用いて、5'RACE法と3'RACE法を行うことにより、四季柑由来キノロン合成酵素(QNS)とアクリドン合成酵素(ACS)の遺伝子配列を取得した。

得られた酵素遺伝子を大腸菌内発現ベクターpQE80Lに組み込み、6残基のヒスチジンとのN末融合タンパク質として大腸菌に異種発現させ、上記と同様にして3種のクロマトカラムを用いて高純度に精製した。次に、精製した酵素に、N-メチルアントラニルCoAやクマロイルCoA、ベンゾイルCoA、ヘキサノイルCoAの構造の異なるCoAエステルとマロニルCoAを基質として作用させ、酵素反応生成物についてLC-MSを用いて解析した。

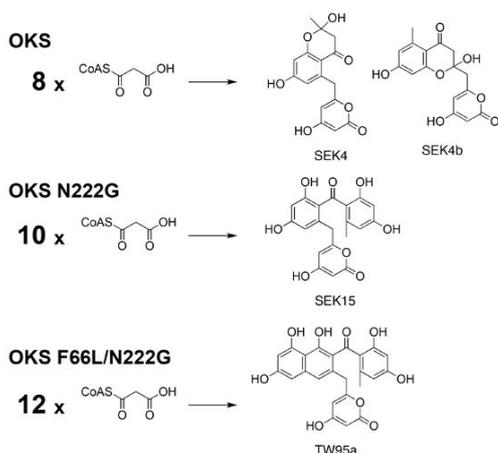
一方、高純度に精製した酵素について、市販のスクリーニングキットにて結晶化スクリーニングを行い、結晶化条件の最適下を経て得た結晶について、筑波・フォトンファクトリーにてX線回折データを得、各々のモデル構造を鋳型とした分子置換法により、QNS

と ACS の X 線結晶構造を取得した。

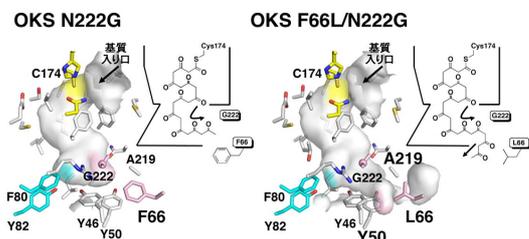
#### 4. 研究成果

##### (1) OKS F66L/N222G 変異酵素の X 線結晶構造解析

OKS は、8 分子のマロニル CoA を縮合して SEK4/SEK4b を生産する。先行研究において、OKS の活性中心キャビティを構成する Asn222 に Gly 変異を導入することで、マロニル CoA 10 分子縮合からなる SEK15 を、さらに、この変異酵素の結晶構造に基づき、Phe66 を N222G 変異と同時に Leu に置換することで、12 分子のマロニル CoA 縮合からなる TW95a の生産に成功した。



本研究では、型 PKS のさらなる触媒機構の拡張を目指して、OKS F66L/N222G 二重変異酵素の X 線結晶構造解析を行ったところ、2.49 Å の分解能でそのアポ型構造を得ることに成功した。その結果、F66L 変異の導入は活性中心キャビティ周辺の二次構造に動的変化をもたらし、これにより、活性中心キャビティを拡大して、12 分子のマロニル CoA 縮合を可能にしている可能性が示された。次に、F66L/N222G 変異酵素と反応中間体複合体が結合した結晶構造を 2.50 Å の分解能で取得し、その活性中心キャビティの形状と二次構造のゆらぎについて検討したところ、やはりこの場合でも、F66L 変異の導入により、その周辺の二次構造に動的変化が起きやすくなっている可能性が示唆された。さらに、本解析では、Tyr50 と Ala219 の後方に新たなポケットが生じる可能性が示された。



そこで、F66L/N222G 変異と同時に、Tyr50 と Ala219 を Phe と Gly に各々変換した 3 重変異体酵素を作成し、マロニル CoA を基質としたそれらの酵素反応生成物について LC-MS

を用いて分析した。その結果、OKS の F66L/A219G/N222G 変異酵素が、SEK4b の生成量を飛躍的に増大し、さらに TW95a の生成量を約 1.5 倍増大することが判明した。他の基質と組み合わせることにより、また、さらなる変異の導入により、新規化合物の創出が期待される。

##### (2) 四季柑由来新規型 PKS のクローニングと機能解析、および、X 線結晶構造解析

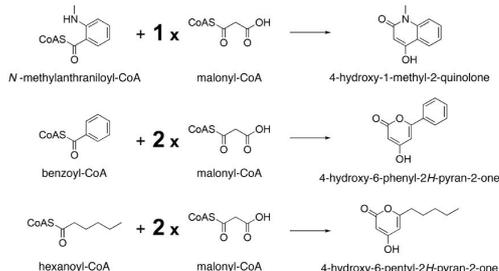
四季柑やリンゴなど限られた植物によって生産されるフロレチンは、癌細胞のアポトーシス誘導作用を有する機能性食品因子として著名なポリフェノールである。その構造類似性から、フラボノイド前駆体ナリンゲニンカルコンと同様、カルコン合成酵素 (CHS) とファミリーを形成する新規植物 III 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) によって生合成されると予想される。また、ミカン科植物は、一般に、キノリノンアルカロイドを生産する。新規機能を有する型 PKS の取得を目指し、四季柑の葉より PCR 法を用いてクローニングを行った。その結果、396 アミノ酸と 391 アミノ酸残基をコードする 2 種の四季柑由来新規型 PKS 全長 cDNA (*qns*, *acs*) の取得に成功した。これらは互いに 60% のアミノ酸相同性を示した。また、QNS は、キノリノン骨格とアクリドン骨格を構築するミカン科ベルノキ (*Aegle marmelos*) 由来 QNS と 59%、ACS は、アクリドン骨格を構築するミカン科ヘンルーダ (*Rura graveolens*) 由来 ACS と 81% の最も高いアミノ酸相同性を示した。また、四季柑由来 QNS と ACS は、型 PKS の 3 つの触媒残基 Cys-His-Asn を保存していた。一方、従来、型 PKS の機能多様性を決めるために重要とされるアミノ酸残基のうち、四季柑由来 QNS においては、132 番目、197 番目、256 番目、265 番目、338 番目の 5 つのアミノ酸残基が Met, Tyr, Ala, Leu, Gly に、四季柑由来 ACS においては、132 番目と 265 番目の 2 つのアミノ酸残基が Ser と Val に置換されているのが特徴的であった。このことから四季柑由来 QNS と ACS は、型 PKS のプロトタイプとも言える CHS とは機能を異にする予想された。

そこで、キノリノンやアクリドン生合成前駆体 *N*-メチルアントラニロイル CoA、フラボノイド生合成前駆体クマロイル CoA、ベンゾフェノン生合成前駆体ベンゾイル CoA、フロログルシノール生合成前駆体ヘキサノイル CoA のいずれかとマロニル CoA を基質として作用させ、その酵素反応生成物について LC-MS を用いて分析を行った。

まず、四季柑由来 QNS の酵素反応生成物について解析を行ったところ、本酵素が、*N*-メチルアントラニル CoA に対して高い基質特異性を示し、これに 1 分子のマロニル CoA を縮合した後にアミド結合を形成して、4-ヒドロキシ-1-メチル-2-キノリノンへの変換を触媒することが判明した。一方、クマロイル

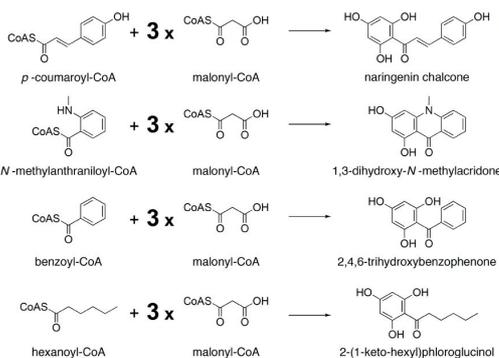
CoA を基質とした場合には、酵素反応生成物は何も確認されず、ベンゾイル CoA とヘキサノイル CoA を基質とした場合には、これらに 2 分子のマロニル CoA が縮合した、CHS などの *in vitro* 酵素反応での副生成物であるパイロン化合物が確認されるのみであった。ベルノキ由来 QNS は、キノリノンの生合成に関わるとして報告されているが、この QNS は、アクリドンへの変換も触媒することが示されている。キノリノンへの変換を特異的に触媒する型 PKS はこれが最初である。

#### C. microcarpa QNS



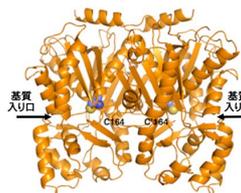
一方、四季柑由来 ACS の酵素反応生成物について解析を行ったところ、ACS が、クマロイル CoA や *N*-メチルアントラニル CoA、ベンゾイル CoA、ヘキサノイル CoA に 3 分子のマロニル CoA を縮合して、カルコン、アクリドン、ベンゾフェノン、フロロゲルシノールを生産することが確認された。通常の CHS は、アクリドンへの変換を触媒しないことが報告されている。四季柑由来 ACS は、アクリドン生合成に関わる新規型 PKS であると推定する。

#### C. microcarpa ACS

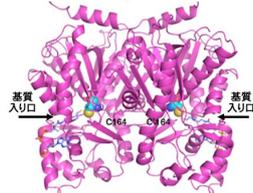


四季柑由来 QNS と ACS の機能について立体構造的知見を得ることを目的に、両酵素の X 線結晶構造解析を行った。その結果、2.47 Å と 2.35 Å の分解能で、QNS と ACS の X 線結晶構造の取得に成功した。これらの全体構造は、他の型 PKS の全体構造をよく保存した。

#### C. microcarpa QNS

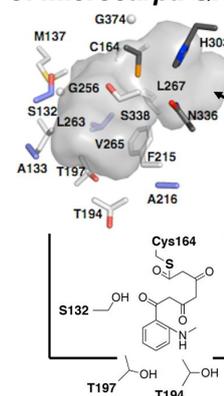


#### C. microcarpa ACS

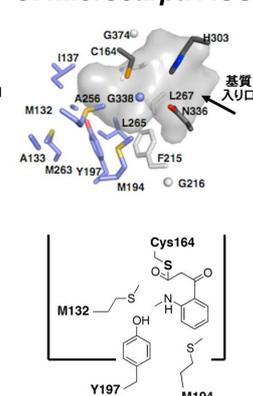


まず、PKS2 と PKS1 の全体構造を比較したところ、開始基質のローディングやマロニル CoA の脱炭酸縮合に直接関与する 3 つの触媒残基 Cys-His-Asn の立体構造も含め、これらは互いによく保存がなされていた。次に、活性中心キャビティの構造について比較を行ったところ、QNS では、132 番目、194 番目、197 番目、256 番目、265 番目のアミノ酸残基が、ACS がコードする Ser、Thr、Thr、Gly、Val よりも嵩高い Met、Met、Tyr、Ala、Leu に置換されていることにより、QNS の活性中心キャビティの容積が、ACS よりも 2.6 倍減少していることが判明した。QNS は、ACS よりも小さな容積の活性中心キャビティを有することにより、*N*-メチルアントラニル酸との CoA エステルを基質として受容できたものの、ACS のように 3 分子のマロニル CoA を縮合できず、マロニル CoA が 1 分子縮合した段階でポリケタイド鎖の伸長が停止して、キノリノンを生産したと考察する。

#### C. microcarpa QNS



#### C. microcarpa ACS



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Dya Fita Dibwe, Suresh Awale, Shigetoshi Kadota, Hiroiyuki Morita, Yasuhiro Tezuka “Two New Diphenylmethyl-Substituted Xanthenes from *Securidaca longepedunculata*” *Nat. Prod. Comm.*, In press (2014). 査読有
2. Dya Fita Dibwe, Suresh Awale, Shigetoshi Kadota, Hiroiyuki Morita, Yasuhiro Tezuka “Muchimangins E and F: Novel Diphenylmethyl-Substituted Xanthenes from *Securidaca longepedunculata*” *Tetrahedron Lett.*, 55, 1916-1919 (2014). 査読有
3. Dya Fita Dibwe, Suresh Awale, Shigetoshi Kadota, Hiroiyuki Morita, Yasuhiro Tezuka “Hepta-oxygenated Xanthenes as Anti-austerity Agents from *Securidaca*

*longepedunculata*” *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 7663-7668 (2013). 査読有

4. Takahiro Mori, Yoshihiko Shimokawa, Takashi Matsui, Keishi Kinjo, Ryohei Kato, Hiroshi Noguchi, Shigetoshi Sugio, Hiroyuki Morita, Ikuro Abe “Cloning and Structure-Function Analyses of Quinolone- and Acridone-Producing Novel Type III Polyketide Synthases from *Citrus microcarpa*” *J. Biol. Chem.*, 288, 28845-28858 (2013). 査読有
5. Jieyin Sun, Hiroyuki Morita, Guoshen Chen, Hiroshi Noguchi, Ikuro Abe “Molecular Cloning and Characterization of Copper Amine Oxidase from *Huperzia serrata*” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 5784-5790 (2012). 査読有
6. Jing Chen, Hiroyuki Morita, Toshiyuki Wakimoto, Takahiro Mori, Hiroshi Noguchi, Ikuro Abe “Prenylation of A Nonaromatic Carbon of Indolylbutenone by A Fungal Indole Prenyltransferase” *Org. Lett.*, 14, 3080-3083 (2012). 査読有

[学会発表](計 22 件)

1. 森田洋行、楊新美、松井崇、阿部郁朗「アサ由来オリベトール酸閉環酵素のあらたな酵素触媒機能の開拓」日本薬学会第 134 年会、2014/3/29、熊本市総合体育館(熊本県)
2. 松井崇、大瀧翔太、孫昊、阿部郁朗、森田洋行「芳香族ドデカケタイドを生産する機能変型アロエ由来□型ポリケタイド合成酵素の X 線結晶構造解析」日本薬学会第 134 年会、2014/3/29、熊本市総合体育館(熊本県)
3. 児玉猛、Dya Fita Dibwe、松井崇、森田洋行「ヒメハギ科植物 *Securidaca longepedunculata* より単離された Muchimangin 類の合成研究」日本薬学会第 134 年会、2014/3/29、熊本市総合体育館(熊本県)
4. Subehan、森田洋行”Polyoxygenated cyclohexane from *Kaempferia rotunda* and their cytotoxic activity” 日本薬学会第 134 年会、2014/3/29、熊本市総合体育館(熊本県)
5. Dya Fita Dibwe、李雪林、松井崇、手塚康弘、森田洋行 “Preferential Cytotoxicity of *Citrus microcarpa* peel against Pancreatic Cancer Cell Lines in Nutrient Deprived Conditions” 日本薬学会第 134 年会、2014/3/29、熊本市総合体育館(熊

本県)

6. Hiroyuki Morita “Structural diversity of plant polyketide scaffolds” Scientific Workshop For Natural Products Chemistry Program、2014/3/12、フエ大学(ベトナム)
7. Hiroyuki Morita “Prenylation of polyketides and alkaloids by exploring indole prenyltransferase for drug discovery” International Conference on Medicinal Chemistry and Timmerman Award 2013 (ICMCTA2013)、2013/11/30、インドネシア大学(インドネシア)
8. 森田洋行「植物ポリフェノールの骨格生合成酵素群に学ぶ化合物の多様性」和漢医薬学総合研究所第 34 回特別セミナー、2013/10/25、富山国際会議場(富山県)
9. Hiroyuki Morita、Ikuro Abe “New insight into substrate promiscuity and catalytic versatility of a fungal indole prenyltransferase” Enzyme Engineering XXII: Emerging Topics in Enzyme Engineering、2013/9/22-26、富山国際会議場(富山県)
10. 森田洋行、大瀧翔太、松井崇、阿部郁朗「芳香族ドデカケタイドを生産する機能変型アロエ由来ポリケタイド合成酵素の結晶構造解析」日本生薬学会第 60 回年会、2013/9/7-8、北海道医療大学(北海道)
11. Hiroyuki Morita “Engineering of plant type III polyketides synthase” Seminar on Campus Asia Program University of Toyama 2013、2013/7/25、慶熙大学校(韓国)
12. Hiroyuki Morita “Structural diversity of plant polyphenol scaffolds” Seminar between International Cooperative Center for Researches of Medicinal Resources at Pekin University & Institute of Natural Medicine, University of Toyama、2013/3/12、北京大学(中国)
13. Hiroyuki Morita “Studies on biosynthesis of plant polyphenol scaffolds” Seminar on Campus Asia Program University of Toyama 2013、2013/2/6、ハサヌディン大学(インドネシア)
14. 森田洋行「植物ポリケタイド合成酵素を利用した分子多様性の創出」文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業「疾患関

連遺伝子及び疾患治療に用いる天然有機化合物の生合成遺伝子の包括的解析」  
2012/12/22、徳島文理大学（徳島県）

15. 森田洋行 「二次代謝酵素の X 線結晶構造解析と非天然型化合物群の創出」第 4 回生合成マシナリー札幌セミナー、  
2012/11/27、北海道大学（北海道）
16. 森田洋行 「植物ポリケタイド合成酵素の結晶構造解析と酵素工学に関する研究」第 68 回酵素工学研究会講演会、  
2012/10/5、東京大学（東京都）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

森田 洋行 (MORITA HIROYUKI)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号：20416663