

令和 2 年 4 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02203

研究課題名(和文) DABBファミリー酵素を素材とした新規ポリケタイド閉環酵素の創出

研究課題名(英文) Engineering of DABB-family enzymes to novel polyketide cyclase

研究代表者

森田 洋行 (Morita, Hiroyuki)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：20416663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：新たな化合物を創出することを目的とし、DABBファミリータンパクであるアサ由来オリベトール閉環酵素、ヤマナラシ由来boiling stable protein、及びシロイズナズナ由来At5g22580に変異を導入し、それらの酵素反応生成物について解析した。その結果、OACの59番目のバリンをイソロイシンに変換すると、新たに炭素数10から12までの長鎖脂肪酸アシル基を有するポリケタイドCoAを基質とし、対応するオリベトール酸アナログを生産することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然化合物の生合成に関わる生合成酵素を、本来の生物とは異なった生物内において発現することで、目的化合物を作ることが可能になっている。本手法を用いれば微量な天然化合物や新規化合物を効率的に生産することも可能である。今回我々は、医薬品としても重要なテトラヒドロカンナビノイドの生合成において鍵中間体の生産に関わる酵素に変異を導入することで、この酵素に新たな化合物を生産する能力を付与することに成功した。本機能改変酵素をテトラヒドロカンナビノイドの生合成に人為的に組み込むことで、テトラヒドロカンナビノイド類似化合物の安価で容易な創出が実現することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to generate new compounds, site-directed mutagenesis studies were carried out on olivetolic acid cyclase (OAC) from *Cannabis sativa*, boiling stable protein from *Populus tremula*, and At5g22580 from *Arabidopsis thaliana*. As a result, a substitution of valine 59 with isoleucine in OAC led to production of new olivetolic analogs by accepting polyketide-CoAs with C10 to C12 fatty acyl moieties as substrates, respectively.

研究分野：天然物化学

キーワード：生合成 酵素工学 ポリケタイド アルカロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然物の生合成に関わる二次代謝酵素の中には、酵素としては異例ともいえる広範な基質特異性を有するものがある。これまで我々は、植物由来型ポリケチド合成酵素 (PKS) に多様な構造の非生理基質を与えることで、新規ポリケチドやアルカロイドを創出してきた。本来、8 分子のマロニル CoA を縮合して芳香族オクタケチドへの変換を触媒するキダチアロエ由来オクタケチド合成酵素 (OKS) に、ヘキサノイル CoA とマロニル CoA を作用させることで新規フロログルシノールやレゾルシノール等を創出している。そこで、さらなる化合物多様性の創出を目指し、ヘキサノイル CoA とマロニル CoA を基質とした OKS の反応液にアサ由来オリベトール酸閉環酵素 (OAC) を共存させた結果、OKS が生産した反応中間体を OAC が基質とし、OKS 単独とは異なった新たな閉環反応が生じて新規ナフタレンが生産されることを見いだした。しかし、種々基質アナログを検討した結果、OAC はヘキサノイル CoA とは異なったアシル基を有する基質アナログを基質として用いることができなかった。OAC は型 PKS が生産したポリケチド CoA を基質とする現状唯一の酵素であり、その代用となる酵素はない。また、OAC は、医薬品としても重要なテトラヒドロカンナビノイドの生合成に関わる酵素である。OAC の機能改変酵素をテトラヒドロカンナビノイドの生合成に組み込むことで、生合成酵素を利用したテトラヒドロカンナビノイドアナログを生産することが期待される。そのため、OAC の機能改変酵素や基質特異性の異なる OAC 様の反応を触媒する新規ポリケチド閉環酵素が必要とされた。

2. 研究の目的

我々は、既に、OAC は、(1) Tyr72 と His78 を触媒残基としてこと、及び、(2) 基質認識と触媒には直接関わらないものの His5 と Tyr27 を触媒残基の空間的保持に利用し、基質のペンチル基の結合については、ペンチル結合ポケットを利用していることを見いだしている。このことから、OAC のペンチル結合ポケットに変異を導入することで、OAC の基質特異性が変化することが期待される。一方、立体構造が既に報告された機能未知の植物由来 DABB ファミリータンパクであるヤマナラシ由来 boiling stable protein (SP1) やシロイズナズナ由来 At5g22580 の構造を見てみると、これらのタンパクは OAC の Tyr78-His72-His5-Tyr27 モチーフの一部を有し、形状や大きさは異なるが、OAC のペンチル結合ポケットに相当する疎水性ポケットを有することが判明した。これらのタンパクがポリケチド閉環酵素として機能しないことを我々は既に確認しているが、これらのタンパクは、その構造類似性から、新たなポリケチド閉環酵素を生み出す素材と見なすことができる。そこで本研究では、OAC の基質特異性を改善した機能改変酵素の創出に取り組むとともに、SP1 と At5g22580 を非天然型新規ポリケチド閉環酵素へと変換することで、新たなポリケチドやアルカロイドを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) OAC のペンチル結合ポケットへの変異の導入と酵素反応生成物の解析

ペンチル結合ポケットへのアミノ酸変異の導入は、PCR 法を用いて行った。PCR の鋳型には、OAC の結晶構造を得る際にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との N 末融合蛋白質として OAC を発現させるように構築した pQE80L-GSTOAC を用いた。次に、作成した各プラスミドを大腸菌 M15 に各々形質転換し、IPTG を用いて OAC 変異酵素を GST との N 末融合蛋白質として大腸菌にて発現した。可溶性酵素として発現が確認された OAC 変異酵素については、GST アフィニティーカラムを用いて精製し、プレジジョンプロテアーゼ (PSP) を用いて GST を切断・除去した後、ゲル濾過カラムを用いて精製し、これを酵素反応に用いた。酵素反応は、テトラカンナビノイドの生合成において、OAC の前駆体を生成するトリケチド合成酵素 (TKS) との共反応液にヘキサノイル CoA 等の脂肪酸 CoA とマロニル CoA を基質として作用させることにより行った。酵素反応生成物を LC-MS や NMR を用いて解析した。

(2) OAC 変異酵素の結晶化

上記と同様にして大腸菌にて発現・精製した OAC 変異酵素を 10 mg/mL に濃縮し、市販の結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化を行った。次に、結晶が得られた条件をもとに、沈殿剤などの濃度を変化させることで、結晶化条件を最適化した。

(3) SP1 と At5g22580 の発現プラスミドの構築と変異酵素の作成及び酵素反応生成物の解析

SP1 と At5g22580 の遺伝子配列は、受託合成により取得した。次に、これらの遺伝子を、GST との N 末融合タンパク質として発現させるように常法を用いて pQE80L に挿入した。また、これらの遺伝子を 6 残基のヒスチジンとの N 末融合タンパク質として発現するように pET28a に挿入した。塩基配列を確認後、pQE80L については、大腸菌 M15 に、pET28a については、大腸菌 BL21(DE3)pLysS に形質転換し、IPTG にて目的酵素の発現を誘導した。発現した SP1 と At5g22580 の GST との融合タンパク質については、OAC と同様にして、SP1 と At5g22580 の 6 残基のヒスチジンとの融合タンパク質については、Ni-キレートアフィニティーカラムとゲル濾過カラムを用いて精製した。各々の酵素の変異酵素の作成は、上記の ORS と同様にして行った。

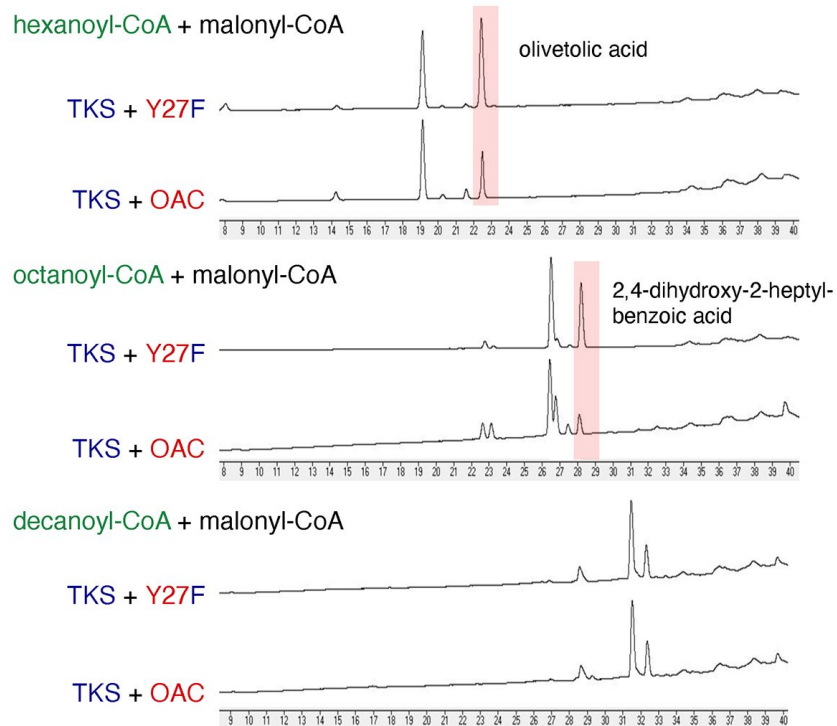
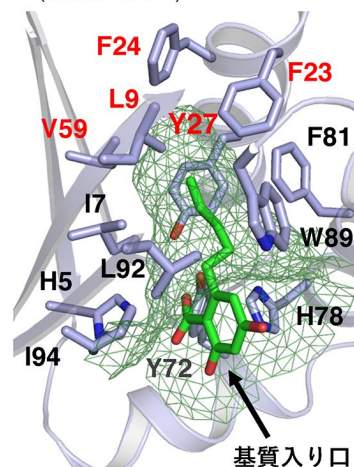
4. 研究成果

(1) OAC 変異酵素の酵素反応生成物の解析

OAC のペンチル結合ポケットの底部を形成する L9, F23, F24, V59, 及び側面を形成する Y27 を, 1 アミノ酸につき, イソロイシン (Ile), バリン (V), アラニン (Ala), グリシン (Gly) に変換した 4 種の変異酵素遺伝子を作成し, 大腸菌にて GST との N 未融合タンパク質として発現させた。また, Y27 については, フェニルアラニン (Phe) に置換した変異酵素も作成した。これらの発現について, SDS-PAGE にて分析したところ, V59 を Ile (OAC V59Ile) に, Y27 を Phe (OAC Y27Phe) に変換した OAC 変異酵素が可溶性として得られることが確認できた。一方, 他の OAC 変異酵素については, 可溶性酵素として得ることができず, 種々発現条件の検討を行ったものの, 改善することができなかった。そこで, まず, OAC Y27Phe 変異酵素を, ヘキサノイル CoA とマロニル CoA を基質として加えた TKS の酵素反応液に加え, 共反応を行い, その酵素反応生成物について解析を行った。その結果, 本変異酵素が共存すると, 生成物であるオリベオール酸の生成量が約 1.5 倍上昇することが確認された。

さらに, 我々の先行研究においては, これまで確認することができなかったが, 酵素反応条件の最適化を行ったところ, OAC がペンチル基よりも炭素数が 2 個長いヘプチル基を有するポリケタイド CoA を基質として対応するオリベトール酸アナログ 2,4-dihydroxy-2-heptylbenzoic acid を生成することが判明した。しかも, OAC Y27Phe 変異酵素においては, その生成量が約 3 倍上昇していることが明らかになった。本結果は, 本変異酵素が基質のペンチル基を野生型よりも受け入れやすくなったことを示唆する。しかしながら, さらに炭素数の 2 つ長いアシル基を有するデカノイル CoA とマロニル CoA を基質として, OAC や OAC Y27Phe と TKS の共反応を行ったが, 対応するオリベトール酸アナログの生成は確認されなかった。本変異酵素においては, Y27 を Phe に変換してチロシンの水酸基が欠損したことで, その側鎖に若干のずれが生じ, ペンチル結合ポケットの側面を僅かながら拡大するとともに, 疎水性も増したことで, 基質のペンチル基との結合力が増し, 結果としてオリベトール酸への変換能力が上昇したものと考察している。

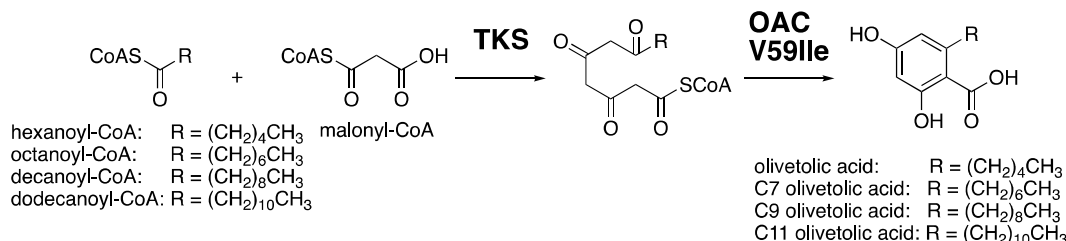
OAC の活性中心キャビティー
(分解能 1.70 Å)



次に, OAC V59Ile について, 同様に酵素反応生成物の解析を進めた。その結果, 興味深いことに, オクタノイル CoA, デカノイル CoA, ドデカノイル CoA を各々, マロニルとともに基質として作用させた OAC と TKS の酵素反応生成物中に, 対応するオリベトール酸アナログの生成を確認することができた。これらの結果は, OAC の V59 を Ile に変換したことで, ペンチル結合ポケットの底部付近が拡大し, これにより, 野生型よりも炭素数が 6 個長いアシル基のポ

リケタイド CoA を基質として受け入れ、結果として対応するオリベトール酸アナログを生産できるようにしたと考察される。

そこで、OAC 野生型を鋳型として、OAC V59Ile 変異酵素の 3 次元構造モデルを作成し、その理由について解析した。しかしながら、モデル構造上では、V59 を Ile に置換してもペンチル結合ポケットが拡大するようには判断できなかった。



(2) OAC 変異酵素の結晶化

OAC V59Ile において、本変異酵素が炭素数 10 から 14 までの長鎖アシル基を有するポリケタイド CoA をも基質として、対応するオリベトール酸アナログを生成できることが確認されたものの、OAC V59Ile のモデル構造からはその理由を明確にすることはできなかった。本変異によって OAC が機能を拡張することができた理由が明らかになれば、その常法をもとに、芳香族を有するポリケタイド CoA をも基質とする OAC 機能改変酵素の創出へと繋がる可能性がある。そこで、高純度に精製した本変異酵素について、市販の結晶化スクリーニングを用いて結晶化を行った。しかし、いずれにおいても結晶を得ることができなかった。一方、OAC 野生型の結晶構造解析では、OAC は生成物であるオリベトール酸が結合していない状態では、酵素構造がふらついていることが確認されている。OAC 野生型においては、基質や生成物が共存していなくても結晶構造を得ることができたものの、本変異酵素においては、ペンチル結合ポケットが大きくなったため、そのふらつきが大きくなり、結果として結晶を得ることができないものと判断した。そこで、OAC V59Ile のタンパク質溶液に生成物であるオリベトールを加えた後、市販のスクリーニングキットを用いて結晶化を行った。その結果、ポリエチレングリコールの入っている条件で、小さいながらも結晶を確認することができた。現在、これについては、結晶化条件の最適化を行っているところである。また、同時に、本変異酵素の他の基質に対する機能拡張についても評価を進めている。

(3) SP1 と At5g22580 の酵素反応生成物の解析

OAC と同一の DABB ファミリーに属する植物由来機能未知タンパク質 SP1 と At5g22580 について、上記の OAC と同様に、ヘキサノイル CoA とマロニル CoA を TKS との共反応液に加え、酵素反応生成物の解析を行った。また、ヘキサノイル CoA 以外にも、それよりも炭素鎖長の短いアセチル CoA やブチリル CoA、芳香族を有する桂皮酸との CoA エステルなども基質として酵素反応を行った。しかし、ポリケタイド閉環酵素としての機能はいずれの酵素においても確認できなかった。新規ポリケタイド閉環酵素への素材としての可能性があらためて示唆された。

(4) SP1 と At5g22580 の変異酵素の大腸菌内発現の解析

OAC の Tyr72-His78-His5-Tyr27 モチーフの中で、SP1 は OAC の触媒残基である His78 を Leu で、At5g22580 は Tyr72 と Tyr24 を各々 Phe と Ile でコードしている。これらのアミノ酸の主鎖構造は OAC のそれらのアミノ酸の主鎖構造と空間的に同じ位置にある。そこで、SP1 と At5g22580 のこれらのアミノ酸残基を OAC のアミノ酸に置換し、大腸菌にて異種発現した。しかしながら、これについては、大腸菌内で封入体を作成するのみで、可溶性酵素として得ることができなかった。GST やヒスチジンとの融合タンパク質として発現したとしても効果が得られず、培養条件を種々検討したが、改善はされなかった。変異の導入により、タンパク質が折りたたまれ画が正常に行われなくなったことが原因であると推察される。現在、これらについては、酵母での発現を検討しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 14件 / うち国際学会 13件）

1. 発表者名 H. Morita
2. 発表標題 Synthesis of unnatural compounds by enzyme engineering
3. 学会等名 International Symposium on the 80th Anniversary of Natural Products Research Institute at Seoul National University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Morita
2. 発表標題 Synthesis of unnatural compounds by enzyme engineering
3. 学会等名 2019 International Conference of The Plant Resources Society of Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Morita
2. 発表標題 Engeering of olivetolic cyclase to generate new compounds
3. 学会等名 JST-CRSC「日中分野別ハイレベル研究者交流会2019」医薬・健康編 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Morita
2. 発表標題 Synthesis of unnatural compounds by enzyme engineering
3. 学会等名 11th International Symposium on Chromatography of Natural Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Morita
2. 発表標題 Synthesis of unnatural compounds by enzyme engineering
3. 学会等名 Seminar Nasional Kefarmasian Indonesian Pharmaceutical Update (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 B. Woo., H. Morita
2. 発表標題 Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic cyclase
3. 学会等名 第5回富山・パール医薬品研究開発シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Morita
2. 発表標題 Synthesis of unnatural compounds by enzyme engineering
3. 学会等名 Seminar on Ho Chi Minh Medicine and Pharmacy University (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Morita
2. 発表標題 Synthesis of unnatural compounds by enzyme engineering
3. 学会等名 Seminar on Cantho University (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Morita
2. 発表標題 Synthesis of unnatural compounds by exploiting secondary metabolite enzyme
3. 学会等名 The 60th Anniversary of School of Chinese Materia Medica Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Morita
2. 発表標題 Synthesis of unnatural compounds by enzyme engineering
3. 学会等名 The 10th KSP-JSP-CSP Joint Symposium on Pharmacognosy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 B. Woo, S. Hoshino, N. N. Win, I. Abe, H. Morita
2. 発表標題 Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase
3. 学会等名 The 10th KSP-JSP-CSP Joint Symposium on Pharmacognosy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morita Hiroyuki
2. 発表標題 Characterization of two novel plant type III polyketide synthases from <i>Evodia rutaecarpa</i>
3. 学会等名 9th US-Japan Seminar on the biosynthesis of Natural Products (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ju Ye, Hoshino Shotaro, Win Nwet Nwet, Yang Xinmei, Abe Ikuro, Morita Hiroyuki
2. 発表標題 Combinatorial biosynthesis of aloeson analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morita Hiroyuki
2. 発表標題 2-Alkylquinolone alkaloid biosynthesis in the medicinal plant <i>Evodia rutaecarpa</i>
3. 学会等名 International Symposium on Strategy for the future of Natural Product Resources (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Woo Bokyoung, Ju Ye, Yang Xinmei, Win Nwet Nwet, Morita Hiroyuki
2. 発表標題 Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase
3. 学会等名 International Symposium on Strategy for the future of Natural Product Resources (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morita Hiroyuki
2. 発表標題 Combinatorial biosynthesis of an unnatural novel aloeson analog by exploiting type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase
3. 学会等名 The 1st Japan-China Biosynthesis seminar (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Woo Bokyoung、Ju Ye、Yang Xinmei、Win Nwet Nwet、Morita Hiroyuki
2. 発表標題 Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase
3. 学会等名 International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morita Hiroyuki
2. 発表標題 Manipulation of plant polyketide-producing enzymes to produce new compounds
3. 学会等名 Seminar in Jinan University (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morita Hiroyuki
2. 発表標題 Manipulation of plant polyketide-producing enzymes to produce new compounds
3. 学会等名 Seminar in South China Institute of Oceanology (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学和漢医薬学総合研究所 天然物化学分野 http://www.inm.u-toyama.ac.jp/napc/index.html 富山大学和漢医薬学総合研究所 天然物化学分野 http://www.inm.u-toyama.ac.jp/napc/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----