

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23241068

研究課題名(和文) 二次代謝酵素の機能制御と物質生産

研究課題名(英文) Enzyme engineering for natural product biosynthesis

研究代表者

阿部 郁朗 (ABE, IKURO)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40305496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポリケチド合成酵素やクマロイルCoAリガーゼなど、天然物の生合成に関わる二次代謝酵素の中には、極めて寛容な基質特異性と潜在的触媒能力を有するものがあり、人為的な機能制御と分子多様性創出の格好のモデルとなりうる。本研究では、X線結晶構造解析を基盤として、タンパク工学の手法を駆使することにより、さらなる酵素触媒機能の拡張に成功した。また、人工基質を作用させることなどにより、一連の新規超天然型天然物を創出した。加えて、カリクリン、テレオシジン、アンチマイシンなど、一連の複雑骨格生物活性二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターのクローニングと生合成マシナリーの詳細の解明に成功した。

研究成果の概要(英文)：Several enzymes involved in the biosynthesis of natural products, such as plant polyketide synthase and CoA-ligase, exhibit remarkable catalytic versatility and substrate promiscuity. This makes the enzymes an excellent platform for enzyme engineering and further production of structurally divergent molecules. In this study, on the basis of the X-ray crystal structures of the enzymes, we succeeded in production of chemically and structurally divergent unnatural natural products, by structure-based enzyme engineering and precursor directed biosynthesis. In addition, we succeeded in elucidation of biosynthetic machinery of complex natural products including calyculin, teleocidin, and antimycin.

研究分野：天然物化学、生物有機化学

キーワード：生合成 二次代謝酵素 機能制御 物質生産 酵素工学

1. 研究開始当初の背景

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。一方、二次代謝酵素が示す寛容な基質特異性と潜在的触媒能力を活用することにより、新規有用物質の生産が可能になる。我々は、これまで一貫して天然物の生合成に関する研究を精力的に進めており、多様な構造と生物活性を示す二次代謝産物の基本骨格構築を担う酵素の研究が、天然物を基盤とする将来の創薬化学に貢献をすることを予見し、酵素タンパク立体構造情報に基づく合理的な触媒機能の改変による非天然型新規化合物の創出を実現している。

我々は、植物ポリフェノールの基本骨格を構築するⅢ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) が、異例とも言える広範な基質特異性を示すこと、また、クロモンなどの骨格を構築する全く新しいタイプのⅢ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Ⅲ型 PKS が広く関与することを明らかにしてきた。さらに、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活性中心アミノ酸残基を同定し、部位特異的変異を導入することにより、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の拡張にも展望を開きつつある。加えて、結晶構造に基づき、酵素活性中心キャビティの形状を合理的に修飾することにより、マロニル CoA 縮合数やポリケタイド鎖長を人為的に制御し、これまでにない骨格をもつ超天然型新規化合物の生産に成功している。このような酵素触媒機能の合理的改変は世界的にもほとんど例がなく、本研究ではこうした一連の成果を踏まえ、さらなる二次代謝酵素の触媒機能の制御と高機能性生体触媒の創製に挑戦した。

2. 研究の目的

(1) ポリケタイド合成酵素

Ⅲ型 PKS が示す最大の特徴の一つに、その広範な基質特異性と潜在的触媒能力が挙げられる。本酵素反応は立体化学が厳密に制御された精巧なシステムであるとは言い難く、むしろ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ことができる。このような単純なカルボニルの化学を触媒するⅢ型 PKS に、さらに N などヘテロ原子を導入した人工基質を作用させれば、N 原子の塩基性を利用した新たな C-N あるいは C-C 結合の形成も可能になるはずである。反応性に富む中間体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骨格を一挙に構築することも可能になる。本研究では、こうした含窒素人工基質などを作用させることで、さらなる非天然型新規化合物の創出と酵素触媒機能の拡張、最

適化をめざした。また、結晶構造に基づくドッキングシミュレーションなどより、活性中心キャビティにおける中間体の静的配置及び酵素反応の進行に伴う動的变化を解明し、閉環反応化学の制御に挑戦する。

(2) 4-クマロイル CoA リガーゼ

4-クマロイル CoA リガーゼ (4CL) が本来の CoA とのチオエステル結合に加えて、広くアミンを基質としてアミド結合の形成をも触媒する多機能型酵素であるとの予備データに基づき、さらなる酵素機能の制御と反応機構の解明をめざした。4CL を含む一連のアデニル化酵素は、C 末端に特徴的なループ構造を有しており、酵素反応の進行に伴い C 末端ドメインが大きな動的構造変化を起こすことが知られている。こうした構造変化が上述したチオエステルやアミド、ジペプチドの形成に大きな意味を持つことになる。そこでシロイヌナズナ由来 4CL 野生型および変異型酵素の X 線結晶構造解析、また、遷移状態中間体アナログ等との共結晶により、酵素反応の立体構造基盤を明らかにすることを目的とした。また、結晶構造に基づく酵素触媒機能の拡張により、新たな生体触媒の創製をめざした。

3. 研究の方法

(1) ポリケタイド合成酵素

結晶構造解析に基づく酵素触媒機構の解明と閉環反応の化学の制御。トウゲシバ *Huperzia serrata* 由来 PKS1 は、比較的大きな基質結合部位を有する新規Ⅲ型 PKS であり、クマロイル CoA を開始基質として 3 分子のマロニル CoA を順次縮合の後、カルコンを生成する。本酵素に化学合成した 2-カルバモイルベンゾイル CoA を開始基質として作用させた場合、2 分子のマロニル CoA を縮合して、6-5-6 縮合環構造を有する 3 環性非天然型新規アルカロイドを単一生成物として高収率で与えることを見出している。

本研究では、こうした結果を踏まえ、大腸菌に異種発現させた PKS1 野生型及びその各種変異酵素の X 線結晶構造解析を行い、また、6-5-6 縮合環構造を有する非天然型新規アルカロイドなど酵素反応生成物との共結晶、さらに、結晶構造と酵素反応中間体とのドッキングシミュレーションなどにより、活性中心キャビティにおける反応中間体の静的配置及び酵素反応の進行に伴う動的变化を解明し、閉環反応の化学の合理的な制御に挑戦する。結晶構造に基づき、活性中心キャビティの大きさや形状を変化させ、マロニル CoA 縮合数や閉環反応の化学を制御することにより、さらなる酵素触媒機能の拡張と最適化をはかる。

また、フェニルアラニンやトリプトファン、また、リジンやオルニチン、プロリンなど、一連の光学活性アミノ酸の CoA チオエステルを新たに化学合成し、各種Ⅲ型 PKS と反応

させることにより、さらなる非天然型新規化合物の創出と新たな酵素触媒機能の開拓を実現する。カルボニルの化学を触媒するⅢ型 PKS に、N 原子を導入した人工基質を作用させ、N 原子の塩基性を利用して新たな C-N、C-C 結合の形成を起こさせることにより、非天然型新規アルカロイドの生産が予想される。基質の構造に対応して、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非天然型化合物の生産が期待される。

(2) 4-クマロイル CoA リガーゼ

野生型および変異型酵素の X 線結晶構造解析。シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* 由来 4CL (At4CL2) は、大腸菌に異種発現可能な、分子量 60 kDa の単量体からなる可溶性タンパクであり、比較的安定で良く研究がなされている酵素である。上述したように、4CL を含むアデニル化酵素は、酵素反応の進行に伴い C 末端ドメインが大きな動的構造変化を起こすことが知られており、こうした構造変化がチオエステルやアミド結合、ジペプチドの形成に大きな意味を持つことになる。そこで本酵素反応の立体構造基盤を解明するため、At4CL2 について、野生型及び、ジペプチド合成酵素活性を新たに獲得した、Y253F、Q345A 両変異型酵素の X 線結晶構造解析を行う。

4. 研究成果

以下に主な研究成果について簡潔に記述する。詳細については、印刷公表した下記の論文を参照されたい。

(1) ポリケタイド合成酵素

Huperzia serrata 由来 PKS1 に、カルバモイル基を有する安息香酸やピコリン酸などの CoA チオエステルを開始期質として作用させた場合、炭素鎖伸長の後、シッフ塩基の形成を介した C-N 結合形成と閉環反応が進行して、非天然型新規アルカロイド骨格を生成することを見出した。そこで、X 線結晶構造解析に基づく変異酵素との組み合わせにより、さらなる酵素触媒機能の拡張と非天然型新規化合物の創出を試みた。その結果、S348G 変異体において、2-カルバモイル安息香酸の CoA チオエステルを開始基質として 3 分子のマロニル CoA を縮合の後、シッフ塩基の形成を介した C-N 結合形成と C-C 結合形成が進行して、環拡大した 6-7-6 縮合環構造をもつ非天然型新規アルカロイドを新たに生成することを見出した。一方、光学活性アミノ酸誘導体をプローブとした新規酵素触媒機能の開拓にも取り組んだ。その結果、光学活性アミノ酸誘導体をプローブとして、非天然型新規化合物の創出と酵素触媒機能の拡張に成功した。

加えて、キノリノンやアクリドン・アルカロイドの骨格を構築する新規酵素、また長鎖

アルキルゾルシノールの骨格を構築する新規酵素の結晶構造の取得に成功した。また、今回新たに、ポリケタイド還元酵素、プレニル転位酵素などとのコンビナトリアル生合成に関する研究に着手した。ポリケタイド合成酵素に還元酵素をカップリングさせることができれば、また、プレニル転位酵素とのカップリングにより、天然有機化合物のさらなる分子多様性創出と物質生産の能力の飛躍的な増大が期待される。

(2) 4-クマロイル CoA リガーゼ

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* 由来 4CL (At4CL2) について、野生型および変異型酵素の X 線結晶構造解析に成功した。上述したように、本酵素は、C 末端に特徴的なループ構造を有しており、酵素反応の進行に伴い C 末端ドメインが大きな動的構造変化を起こすことが知られている。こうした構造変化がチオエステルやアミド結合、ジペプチドの形成に大きな意味を持つことになる。そこで本酵素反応機構の構造基盤を確立するため、4CL 野生型および変異型酵素の共結晶に用いる酵素阻害剤の開発に着手した。まず、阻害剤についてはクマル酸アデニル化体の遷移状態中間体アナログを化学合成し、予想通り本化合物が酵素反応を nM レベルで阻害することが示された。一方、大腸菌に異種発現した組み換え酵素の結晶化にも成功し、現在さらに精密化を進めている。

(3) その他の二次代謝酵素

上海有機化学研究所の Wen Liu 教授との共同研究を進め、放線菌由来 PKS/NRPS ハイブリッド型抗生物質アンチマイシンの生合成遺伝子クラスターのクローニング、またコンビナトリアル生合成による非天然型新規アンチマイシン誘導体ライブラリーの構築に成功した。現在さらに、アンチマイシン生合成に関わる鍵酵素の結晶構造解析を進め、その構造基盤の解明をめざしている。

一方、各種有用二次代謝産物の生合成において重要な役割を演じる、プレニル転移酵素、メチル化酵素、酸化酵素、Pictet-Spengler 酵素等についても、同様に、その精密機能解析、X 線結晶構造解析による立体構造基盤の解明、酵素機能制御、物質生産系の構築に関する研究を進めた。酵素の精密機能解析、X 線結晶構造解析による立体構造基盤の解明に成功した。

最後に、海綿メタゲノムより強力な細胞毒性物質であるカリクリン、また、放線菌が生産する強力な protein kinase C (PKC) 活性化作用を示す発癌プロモーターであるテレオシジンなど、一連の複雑骨格生物活性二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターの同定とその生合成マシナリーの解明にも成功した。現在、これら遺伝子を異種発現系に再構成す

ることにより、構造多様性の拡大と物質生産系の構築を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計59件) 全て査読あり

1. Matsuda, Y., Iwabuchi, T., Wakimoto, T., Awakawa, T., Abe, I.: Uncovering the unusual D-ring construction in terretinin biosynthesis by collaboration of a multifunctional cytochrome P450 and a unique isomerase. *J. Am. Chem. Soc.*, *137*, 3393-3401 (2015). DOI: 10.1021/jacs.5b00570
2. Mori, T., Yang, D., Matsui, T., Hashimoto, M., Morita, H., Fujii, I., Abe, I.: Structural basis for the formation of acylalkylpyrones from two β -ketoacyl units by the fungal type III polyketide synthase CsyB. *J. Biol. Chem.*, *290*, 5214-5225 (2015). DOI: 10.1074/jbc.M114.626416
3. Matsuda, Y., Wakimoto, T., Mori, T., Awakawa, T., Abe, I.: Complete biosynthetic pathway of anditomin: nature's sophisticated synthetic route to a complex fungal meroterpenoid. *J. Am. Chem. Soc.*, *136*, 15326-15336 (2014). DOI: 10.1021/ja508127q
4. Wakimoto, T., Egami, Y., Nakashima, Y., Wakimoto, Y., Mori, T., Awakawa, T., Ito, T., Kenmoku, H., Asakawa, Y., Piel, J., Abe, I.: Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont. *Nature Chemical Biology*, *10*, 648-655 (2014). DOI: 10.1038/nchembio.1573
5. Awakawa, T., Zhang, L., Wakimoto, T., Hoshino, S., Mori, T., Ito, T., Ishikawa, J., Tanner, M. E., Abe, I.: A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, *136*, 9910-9913 (2014). DOI: 10.1021/ja505224r
6. Wilson, M. C., Mori, T., Rückert, C., Uria, A. R., Helf, M. J., Takada, K., Gernert, C., Steffens, U. A. E., Heycke, N., Schmitt, S., Rinke, C., Helfrich, E. J. N., Brachmann, A. O., Gurgui, C., Wakimoto, T., Kracht, M., Crüsemann, M., Hentschel, U., Abe, I., Matsunaga, S., Kalinowski, J., Takeyama, H., Piel, J.: An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature*, *506*, 58-62 (2014). DOI: 10.1038/nature12959
7. Matsuda, Y., Awakawa, T., Wakimoto, T., Abe, I.: Spiro-ring formation is catalyzed by a multifunctional dioxygenase in austinol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, *135*, 10962-10965 (2013). DOI: 10.1021/ja405518u
8. Yan Y., Chen, J., Zhang, L., Zheng, Q., Han, Y., Zhang, H., Awakawa, T., Abe, I., Liu, W.: Multiplexing of combinatorial chemistry in antimycin biosynthesis expands the molecular diversity and utility. *Angew. Chem. Int. Ed.*, *52*, 12308-12312 (2013). DOI: 10.1002/anie.201305569
9. Mori, T., Shimokawa, Y., Matsui, T., Kinjo, K., Kato, R., Noguchi, H., Sugio, S., Morita, H., Abe, I.: 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). DOI: 10.1074/jbc.M113.493155
10. Abe, I.: Novel applications of plant polyketide synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, *16*, 179-185 (2012). DOI: 10.1016/j.cbpa.2011.12.016
11. Abe, I.: Biosynthesis: an HR-PKS stereo surprise. *Nature Chemical Biology*, *8*, 322-323 (2012). DOI: 10.1038/nchembio.924
12. Morita, H., Yamashita, M., Shi, S.-P., Wakimoto, T., Kondo, S., Kato, R., Sugio, S., Kohno, T., Abe, I.: Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *108*, 13504-13509 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1107782108
13. Wakimoto, T., Mori, T., Morita, H., Abe, I.: Cytotoxic tetramic acid derivative produced by a plant type III polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, *133*, 4746-4749 (2011). DOI: 10.1021/ja2006737
14. Wakimoto, T., Kondo, H., Nii, H., Kimura, K., Egami, Y., Oka, Y., Yoshida, M., Kida, E., Ye, Y.-p., Akahoshi, S., Asakawa, T., Matsumura, K., Ishida, H., Nukaya, H., Tsuji, K., Kan, T., Abe, I.: Furan fatty acid as an anti-inflammatory component from green-lipped mussel *Perna canaliculus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *108*, 17533-17537 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1110577108

〔学会発表〕(計80件)

以下、すべて発表者：阿部郁朗(招待講演)

1. TERPNET 2015: International Meeting on Biosynthesis, Functions and Synthetic Biology of Isoprenoids, Vancouver, Canada, 2015/6/1-5, "Biosynthesis of fungal meroterpenoids".
2. International Conference on Natural Products 2015, Johor Bahru, Malaysia, 2015/3/24-25, "Engineered biosynthesis of medicinal natural products".
3. 97th Canadian Chemistry Conference and Exhibition, Vancouver, Canada, 2014/6/1-5, "Biosynthesis of fungal meroterpenoids".

4. 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin, Poland, 2014/5/26-29, "Engineered biosynthesis of medicinal natural products".
5. International Conference on Medicinal Chemistry and Timmerman Award 2013, Jakarta, Indonesia, 2013/10/29,30, "Engineered biosynthesis of medicinal natural products".
6. Enzyme Engineering XXII: Emerging topics in Enzyme Engineering, Toyama, Japan, 2013/9/22-26, "Expanding the catalytic repertoires of biosynthetic enzymes".
7. TERPNET2013: International Meeting on Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms, Crete, Greece, 2013/6/1-5, "Biosynthesis of fungal meroterpenoids".
8. Banbury Center Conference on the Evolution of Plant Metabolism, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2013/3/3-6, "Engineered biosynthesis of plant polyphenols".
9. Directing Biosynthesis III, Nottingham, UK, 2012/9/19-21, "Expanding the catalytic repertoires of biosynthetic enzymes".
10. 8th U.S.-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, Awajishima, Hyogo, Japan, 2012/6/17-22, "Engineering plant polyketide synthases".
11. Enzyme Engineering XXI, Veil, Colorado, USA, 2011/9/18-22, "Engineering plant polyketide synthases".
12. Phytochemical Society of North America 50th Anniversary Symposium, Kohala Coast, Hawaii, USA, 2011/12/10-15, "Engineering plant polyketide synthases".

[図書] (計4件)

1. Matsuda, Y., Abe, I.: "Chapter 13 Meroterpenoids", In *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*; Martín, J.-F., Carlos, G.-E., Susanne, Z., Eds.; Springer, 2014; pp. 289-301.
2. Abe, I. "Chapter 16 The oxidosqualene cyclases: one substrate, diverse products", In *Natural Products: Discourse, Diversity and Design*; Osbourn, A., Goss, R., Carter, G. T., Eds.; Wiley, 2014; pp. 297-316

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 郁朗 (ABE, Ikuro)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：40305496

(2) 研究分担者

脇本 敏幸 (WAKIMOTO, Toshiyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：70363900

淡川 孝義 (AWAKAWA, Takayoshi)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：80609834

松田 侑大 (MATSUDA, Yudai)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：10720766

森田 洋行 (MORITA, Hiroyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：20416663

(2012年より連携研究者)

(3) 連携研究者

杉尾 成俊 (SUGIO, Shigetoshi)

三菱化学・バイオ技術研究所・主幹研究員

研究者番号：10537343

野口 博司 (NOGUCHI, Hiroshi)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：6012641

久城 哲夫 (KUSHIRO, Testuo)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：80373299