

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282210

研究課題名(和文)植物ポリケタイド骨格形成酵素群の触媒機能の拡張と分子多様性の創出

研究課題名(英文)Engineering of plant-specific polyketide scaffold synthetic enzymes to produce structural diversity of compounds

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：化合物の多様性を創出することを目的とし、様々な構造のCoAチオエステルを基質として、キダチアロエ由来のIII型ポリケタイド合成酵素であるオクタケタイド合成酵素(OKS)とアサ由来ポリケタイド閉環酵素、オリベトール酸閉環酵素(OAC)の共反応を行った。その結果、ヘキサノイルCoAとマロニルCoAを基質としてOKSとOACの共反応を行うと新規ナフタレンが生産されることが判明した。さらに、OACアポ型とOAC-オリベトール酸複合体のX線結晶構造を取得し、変異導入実験を行った結果、OACは基質の結合に重要なペンチル結合ポケットを有し、Tyr72とHis78を触媒残基として用いることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In order to produce structural diversity of compounds, combinatorial biosyntheses of the polyketide cyclase, olivetolic acid cyclase (OAC) and the type III polyketide synthase, octaketide synthase from *Aloe arborescens* using structurally distinct various CoA thioesters as the substrates were carried out. As a result, we found that the co-incubation of the enzymes using hexanoyl-CoA and malonyl-CoA as the substrates led to a production of novel naphthalene. Furthermore, we solved OAC apo and OAC-olivetolic acid binary complex structures at 1.4 angstrom and 1.7 angstrom resolutions, respectively. The crystallographic and site-directed mutagenesis studies of OAC revealed that the enzyme possesses the pentyl-binding pocket that plays an important role to bind the pentyl moiety of the substrate and employs Tyr72 and His78 as the catalytic residues.

研究分野：天然物化学

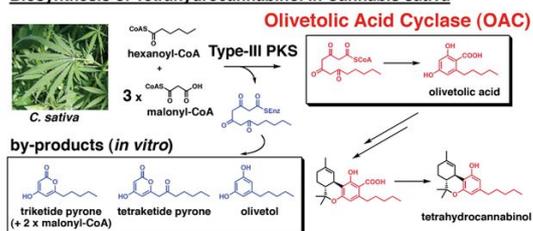
キーワード：ポリケタイド 酵素工学 X線結晶構造解析

## 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と触媒ポテンシャルを有するものがある。これらの酵素に一連の人工基質を作用させることにより、厳密な基質特異性を示す酵素を利用するよりも、遥かに容易に、分子多様性と生物活性を備えた化合物ライブラリーの構築が可能である。著者らは、これまで多様な構造と生理活性を示す植物ポリケタイドの骨格を構築する植物型ポリケタイド合成酵素 (PKS III) に、人工基質を作用させ、さらには機能を改変していくことによって、非天然型新規ポリケタイドやアルカロイドを創出してきた。

一方、最近になって、カナダの Page 教授らにより、生薬大麻の基原植物アサ *Cannabis sativa* が生産するカンナビノイドのポリケタイド部分の生合成に関して新規知見が報告された。アサから単離された PKS III であるオリベトール合成酵素のみでは、カンナビノイドのポリケタイド部分のオリベトール酸を生成できず、脱炭酸を経てシャント化合物のオリベトールを生じることが知られていたが、今回報告されたオリベトール酸閉環酵素 (OAC) は、多くの植物に存在するストレス応答性タンパク質 (DABB) の一つで、アサの PKS III が生成したテトラケタイド鎖中間体に作用して、PKS III とは異なった閉環反応を生じさせることにより、オリベトール酸へと変換する新規閉環酵素であった。そのため、OAC は、新規化合物の創出に有用な補助因子としての応用が期待された。

### Biosynthesis of Tetrahydrocannabinol in *Cannabis sativa*



## 2. 研究の目的

今回のアサに関する報告は、補助因子となる OAC がほぼ確実にポリケトメチレン鎖中間体に作用することを示す。一方、著者らは、本来 8 分子のマロニル CoA を縮合して SEK4 や SEK4b への変換を触媒するキダチアロエ *Aloe arborescens* の PKS III, オクタケタイド合成酵素 (OKS) に、ヘキサノイル CoA をマロニル CoA とともにさせると、ヘキサノイル CoA に 5 分子または 6 分子のマロニル CoA を縮合して、レゾルシノール誘導体 (C<sub>16</sub> レゾルシノール) やフロログルシノール誘導体 (C<sub>18</sub> フロログルシノール) を生産することを見いだしている。OAC は、アサ由来 PKS III がヘキサノイル CoA と 3 分子のマロニル CoA から生成したペンチルテトラケタイド CoA を基質とすることから考えると、OKS がヘキサノイル CoA とマロニル CoA から生産した

ペンチル基を有する反応中間体を OAC が基質として受容し、OKS とは異なった部位で閉環反応を生じさせることにより新たな化合物の生産が期待される。そこで、本研究では、OKS と OAC を組み合わせることで、新規化合物の創出を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) OAC と OKS の酵素反応生成物の解析

OKS と OAC を大腸菌に各々異種発現させ、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製した。精製した OAC と OKS 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、酵素反応生成物を LC-MS や NMR を用いて解析した。

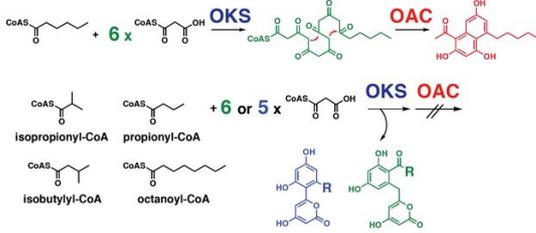
### (2) OAC の X 線結晶構造解析

OAC 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ーカラム、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、SAD 法により、本酵素のアポ型 X 線結晶構造を取得した。OAC とオリベトール酸との共結晶は、アポ型の OAC 結晶を得た結晶化条件に、オリベトール酸を添加することによって得た。変異の導入は、PCR 法にて行った。

## 4. 研究成果

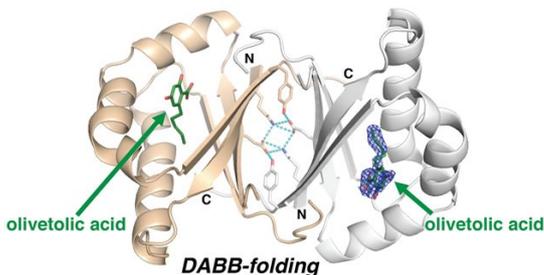
### (1) OAC と OKS の酵素反応生成物の解析

大腸菌にて異種発現し精製した OKS と OAC の酵素反応液に、ヘキサノイル CoA 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 及び NMR を用いて解析を行った。その結果、OKS と OAC の共反応により、新規ナフタレンを生成することが判明した。本化合物は、OKS がヘキサノイル CoA と 6 分子のマロニル CoA から生産したヘキサノイルヘプタケタイド CoA を OAC が基質として受容し、OKS とは異なった閉環反応を触媒することにより生じたと考察できる。そこで、ヘキサノイル CoA よりも炭素数の短い、もしくは長いアシル基を有する CoA チオエステルをヘキサノイル CoA の代わりに基質として OKS と OAC の共反応を行った。しかしながら、いずれにおいても、OKS が単独で生産するレゾルシノールやフロログルシノールの生産が確認されるのみで、OAC が共存したことにより生産すると考えられる新たな化合物の生産は確認できなかった。このことから、OAC の基質特異性は、基質のペンチル基に特化しているため、OAC を用いて新規化合物をさらに創出していくには機能改変が必要であると考察された。



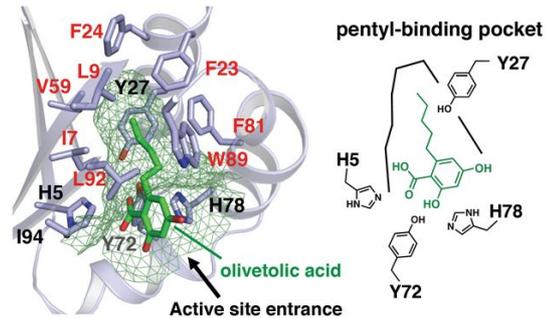
## (2) OAC の X 線結晶構造解析

OAC の基質特異性の変換に有用な情報を得ることを目的として、OAC の X 線結晶構造解析を行った。その結果、1.4 Å の分解能で OAC のアポ型の結晶構造を、1.7 Å の分解能で OAC と生成物であるオリベトール酸との複合体結晶構造を取得することができた。これにより、OAC は 2 量体を形成することにより、 $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  モチーフを形成することが示された。先に提唱されていたように OAC は DABB ファミリーに属する酵素であることが明らかとなった。また、本結晶構造中で、オリベトール酸は  $\alpha$ - $\beta$  モチーフの間に結合することが示された。OAC の活性中心キャビティーは、この位置に存在することが強く示唆された。

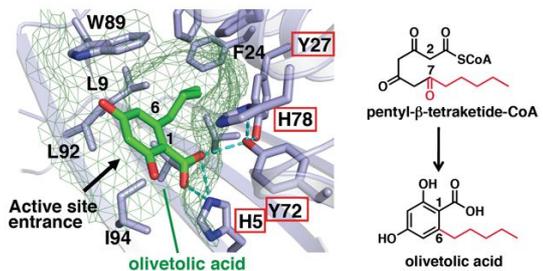


そこで、OAC の活性中心キャビティーの構造について詳細に解析を行った。その結果、OAC の活性中心キャビティーは、疎水性残基で囲まれた約 9 Å の長さからなるペンチル結合ポケットを有し、ここにオリベトール酸のペンチル基を結合することが判明した。そこで、ペンチル結合ポケットを構成するアミノ酸残基のうち、その底部を形成する 24 番目のチロシンと 59 番目のバリン、及び入り口付近に位置する 7 番目のイソロイシンをより高いフェニルアラニン、ロイシン、メチオニンにそれぞれ置換し、変異が酵素活性に及ぼす影響について精査したところ、これらの変異酵素は、オリベトール酸生成活性を野生型よりも 36%、51%、35%減少することが確認された。さらに、OAC の I7F 及び V59M 変異酵素について X 線結晶構造解析を行い、それらの活性中心キャビティーについて解析を行ったところ、置換した 7 番目のフェニルアラニンと 59 番目のメチオニンが、野生型のそれらよりも活性中心キャビティーに突き出し、それにより、これらの変異酵素の活性中心キャビティーが野生型よりも小さくなっていることが確認できた。これらの結果は、これらの変異酵素は、ペンチル結合ポケットの容積が小さくなったために、基質を

結合することが困難になり、結果として酵素活性を減弱したと考えられる。このことから、ペンチル結合ポケットは OAC の酵素反応において、基質のペンチル基の結合に重要な機能を有していることが強く示唆された。

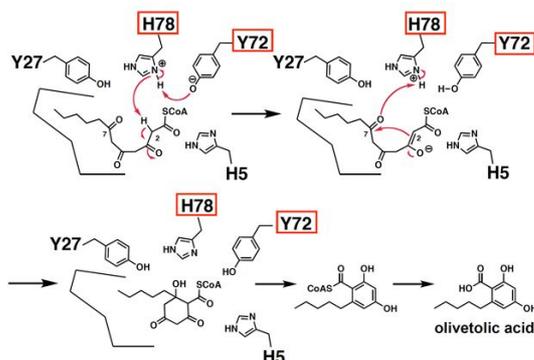


一方、オリベトール酸の芳香環とカルボキシル基は、OAC の活性中心キャビティーの入り口付近に結合していた。この周辺に位置するアミノ酸を見てみると、27 番目のチロシン、78 番目のヒスチジン、72 番目のチロシンが水素結合によるネットワークを形成し、このうちの 72 番目のチロシンがオリベトール酸のカルボキシル基を水素結合により認識していることが確認された。また、これに加えて、活性中心キャビティーの入り口に位置する 5 番目のチロシンが、オリベトール酸のカルボキシル基を水素結合により結合していることが確認できた。大変興味深いことに、本解析により、78 番目のチロシンの側鎖が、オリベトール酸の 1 位と 6 位に向かって突きだしていることが明らかとなった。本部位は、OAC によってオリベトール酸が生産する際に、アルドール縮合による閉環反応が生じる部位に一致する。これらのことから、これら 4 つのアミノ酸残基が OAC の触媒残基であることが想定された。



そこでこの 4 つのアミノ酸残基に変異を導入し、変異が酵素活性に及ぼす影響について検討した。まず、78 番目のヒスチジンと 72 番目のチロシンについて変異導入実験を行った結果、これらの残基に変異を導入するとオリベトール酸生成活性が完全に消失することが確認できた。さらに、OAC の H78S 及び Y72F 変異酵素について X 線結晶構造を取得し、その活性中心キャビティーについて解析を行ったところ、変異の導入により、これまで野生型で見られていた 78 番目のヒスチジンと 72 番目のチロシンの水素結合がこれら変異酵素では消失しているのに対して、他のアミノ酸残基の立体構造は野生型のそれらとほぼ同一に保持されていることが確認

できた。このことから、OACの酵素反応において、78番目のヒスチジンと72番目のチロシン間の水素結合は必須であり、この2つのアミノ酸はOACの触媒残基であることが強く示唆された。一方、5番目のヒスチジンをグルタミンやロイシンに置換した場合は、酵素活性がそれぞれ78%、64%減弱することが確認されるのみであった。また、27番目のチロシンについても同様に酵素活性の減弱が確認されるのみであった。これらのことから、この2つのアミノ酸は、OACの触媒残基というよりも、むしろOACの酵素反応において基質の結合に重要なアミノ酸であると考察された。しかしながら、これまでOACの最終生成物は、オリベトール酸であると提唱されてきたが、著者らのX線結晶構造解析及び推定酵素反応中間体とのドッキングシミュレーションでは、CoAの開裂や芳香環化に直接関わると考えられるアミノ酸、金属イオン、水分子は見いだすことはできなかった。このことから、OACはチオエステラーゼ活性及びアロマテース活性を消失していると考察される。以上のことから、著者らは、OACは、72番目のチロシンによって活性化された78番目のチロシンを用いて、基質の2位のプロトンを引き抜き、C2-C7アルドール縮合を進行させて閉環した化合物を生成するものの、オリベトール酸までの変換を触媒していないものと考察している。



また、OACはペンチル結合ポケットの長さが9Åであったため、ペンチル基よりも長いアシル基を有する基質を結合することができなかつたと考察できる。一方、オリベトール酸の芳香環とカルボキシル基は活性中心キャビティーの入り口付近に結合し、その多くは蛋白質表面に露出していることから、OACのポリケタイド部分との結合は弱く、OACの基質の結合はペンチル結合ポケットに大きく依存していると想定される。ペンチル基よりも短いアシル基を有するポリケタイドCoAは、OACのペンチル結合ポケットとの結合力が弱く、そのため、OACはペンチル基よりも短いアシル基を有するポリケタイドCoAを基質とすることができず、反応生成物を与えることができなかったと考察する。現在、これらの情報をもとに、OACの機能改変を進行しているところである。

## 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10件)

1. T. Matsui, S. Lallo, K. Nisa, H. Morita. Filamenting temperature-sensitive mutant Z inhibitors from *Glycyrrhiza glabra* and their inhibitory mode of action. *Bioorg Med Chem Lett*, 27, 1420–1424 (2017). 査読有  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.01.095
2. T. Mori, K. T. Awakawa, Shimomura, Y. Saito, D. Yang, H. Morita, I. Abe. Structural insight into the enzymatic formation of bacterial stilbene. *Cell Chem Biol*, 23, 1468–1479 (2016). 査読有  
DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.10.010
3. F. Taura, M. Iijima, E. Yamanaka, H. Takahashi, H. Kenmoku, H. Saeki, S. Morimoto, Y. Asakawa, F. Kurosaki, H. Morita. A novel class of plant type III polyketide synthase involved in orsellinic acid biosynthesis from *Rhododendron dauricum*. *Front. Plant Sci.* Vol. 7, Article 1452 (2016). 査読有  
DOI: 10.3389/fpls.2016.01452
4. T. Mori, L. Zhang, T. Awakawa, S. Hoshino, M. Okada, H. Morita, I. Abe. Manipulation of prenylation reactions by structure-based engineering of bacterial indolactam prenyltransferases. *Nature Commun.*, 7, 10849 (2016). 査読有  
DOI: 10.1038/ncomms10849
5. X. Yang, T. Matsui, T. Kodama, T. Mori, X. Zhou, F. Taura, H. Noguchi, I. Abe, H. Morita. Structural basis for olivetolic acid formation by a polyketide cyclase from *Cannabis sativa*. *FEBS J*, 283, 1088–1106 (2016). 査読有  
DOI: 10.1111/febs.13654
6. X. Yang, T. Matsui, T. Mori, F. Taura, H. Noguchi, I. Abe, H. Morita. Expression, purification, and crystallization of a plant polyketide cyclase from *Cannabis sativa*. *Acta Cryst*, F71, 1470–1474 (2015). 査読有  
DOI: 10.1107/S2053230X15020385
7. T. Mori, S. Hoshino, S. Sahashi, T. Wakimoto, T. Matsui, H. Morita, I. Abe. Structural basis for the  $\beta$ -caroline alkaloids production by the microbial homodimeric enzyme McbB. *Chem&Biol.*, 22, 898–906 (2015). 査読有  
DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.06.006

8. D. Yang, D. T. Mori, T. Matsui, M. Hashimoto, H. Morita, I. Fujii, I. Abe. Expression, purification, and crystallization of a fungal type III polyketide synthase that produces the cspyrone. *Acta Cryst F70*, 730–733 (2014). 査読有  
DOI: 10.1107/S2053230X14008516
9. D. F. Dibwe, S. Awale, S. Kadota, H. Morita, Y. Tezuka. Muchimangins G-J, fully substituted xanthenes with a diphenylmethyl substituent, from *Securidaca longepedunculata*. *J Nat Prod*, 77, 1241–1244 (2014). 査読有  
DOI: 10.1021/np5000445
10. Subehan, S. Lee, D.F. Dibwe, Y. Tezuka, H. Morita. A new polyoxygenated cyclohexane and other constituents from *Kaempferia rotunda* and their cytotoxic activity. *Nat Prod Res*, 28, 1754–1759 (2014). 査読有  
DOI: 10.1080/14786419.2014.945175
- 〔学会発表〕(計 17 件)
1. Hiroyuki Morita “Manipulation of plant polyketide-producing enzymes to produce new compounds”, The 1<sup>st</sup> International Conference on Environmental Science and Pollution for 96<sup>th</sup> Anniversary of University of Yangon, 2016/12/12-12/13, ヤンゴン (ミャンマー)
2. Hiroyuki Morita “Structure basis for novel plant polyketide cyclase”, The 6<sup>th</sup> International Symposium in Phytochemicals and Natural Products for Health, 2016/11/25-11/26, 嘉義 (台湾)
3. 松井崇, 楊新美, 周曉希, 兎玉猛, 森貴裕, 野口博司, 阿部郁朗, 森田洋行 「アサ由来ポリケタイド閉環酵素のポリケタイド閉環機構の解明」, 日本結晶学会平成 28 年度年会および会員総会, 2016/11/18, 茨城県立県民文化センター (水戸)
4. Hiroyuki Morita “Manipulation of plant polyketide-producing enzymes to produce new compounds”, International Meeting 2016 of the Plant Resources Society of Korea, 2016/9/29, Jecheon (韓国)
5. Hiroyuki Morita “Crystal structure analysis of novel plant cyclase”, Korea-China-Japan Joint Symposium in Pharmaceutical Sciences, 2016/9/28, Jecheon (韓国)
6. 森田洋行 「植物ポリケタイド骨格形成酵素群の機能多様性に関する研究」, 第 63 回日本生薬学会年会, 2016/9/24-9/25, 富山国際会議場 (富山)
7. Hiroyuki Morita “Prenylation of alkaloids by exploiting indole prenyltransferase for drug discovery”, 55<sup>th</sup> Anniversary of National Institute of Medicinal Material Conference, 2016/4/13-4/14, ハノイ(ベトナム)
8. 森田洋行, 楊新美, 松井崇, 兎玉猛, 森貴裕, 周曉希, 野口博司, 阿部郁朗 「アサ由来ポリケタイド閉環酵素の X 線結晶構造解析」, 日本薬学会第 136 年会, 2016/3/27-3/29, パシフィコ横浜 (横浜)
9. Hiroyuki Morita “Crystal structure analysis of the novel plant polyketide cyclase”, International Conference on Natural Products 2016, 2016/3/15-3/17, クアラルンプール (マレーシア)
10. 松井崇, 楊新美, 兎玉猛, 周曉希, 森貴裕, 野口博司, 阿部郁朗, 森田洋行 「アサ由来ポリケタイド閉環酵素の X 線結晶構造解析」, 2015 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2016/3/15-3/16, つくば国際会議場 (つくば)
11. Hiroyuki Morita “Structural basis for novel plant polyketide cyclase”, 32<sup>th</sup> International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences, 2016/3/10-3/11, チュラロンコン (タイ)
12. Hiroyuki Morita “Characterization of two novel plant type III polyketide synthases obtained from medicinal plant *Evodia rutaecarpa*”, Pacificchem 2015, 2015/12/15-12/20, ホノルル (USA)
13. Takuya Ito, Takeshi Kodama, Hiroshi Noguchi, Ikuro Abe, Hiroyuki Morita “Precursor-directed biosynthesis of unnatural novel alkaloids by using a plant type III polyketide synthase obtained from *Evodia rutaecarpa*”, Pacificchem 2015, 2015/12/15-12/20, ホノルル (USA)
14. Takeshi Kodama, Takashi Mastui, Takahiro Mori, Tetsuo Tadakoshi, Hiroshi Noguchi, Ikuro Abe, Hiroyuki Morita “Structure-function analyses of two novel plant type III polyketide synthases obtained from medicinal plant *Evodia rutaecarpa*”, Pacificchem 2015, 2015/12/15-12/20, ホノルル (USA)
15. 森田洋行, 楊新美, 松井崇, 兎玉猛, 周曉希, 森貴裕, 野口博司, 阿部郁朗 「ア

サ由来ポリケタイド閉環酵素の X 線結晶構造解析」酵素工学研究会第 74 回講演会，2015/10/16，山上会館（東京）

16. Xinmei Yang, Takashi Matsui, Takeshi Kodama, Ikuro Abe, Hiroyuki Morita “Structural basis for polyketide cyclase from *Cannabis sativa*”, ISPSA2015, 2015/8/30-9/02, 徳島文理大学（徳島）
17. 森田洋行 「植物ポリケタイド骨格形成酵素群を利用した非天然型化合物群の創出」理研NMR天然物シンポジウム，2015/8/21，理化学研究所（横浜キャンパス）（横浜）

## 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

### (2)連携研究者

松井 崇（MATSUI Takashi）  
富山大学和漢医薬学総合研究所・助教  
研究者番号：30463582

### (3)連携研究者

児玉 猛（KODAMA Takeshi）  
富山大学和漢医薬学総合研究所・特命助教  
研究者番号：40710207