

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710235

研究課題名 (和文) III型ポリケタイド合成酵素のX線結晶構造解析を基盤とする
触媒機能の制御

研究課題名 (英文) Structure-based engineering of type-III polyketide synthase

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：

ダイオウ由来ベンザルアセトン合成酵素 (BAS) とイネ由来クルクミノイド合成酵素 (CUS) 及びトウゲシバ由来ポリケタイド合成酵素 (HsPKS) の X 線結晶構造解析に成功した。さらに CUS と HsPKS については、結晶構造解析に基づき、部位特異的変異を導入することにより、あらたな機能を付加させることに成功した。また、BAS がアミノ酸から調製した人工基質にマロニル CoA を縮合してテトラミン酸誘導体を生産することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We solved crystal structures of benzalacetone synthase (BAS) from *Rheum palmatum*, curcuminoid synthase (CUS) from *Oryza sativa* and polyketide synthase (HsPKS) from *Hupersia serrata*. Furthermore, by carrying out the structure-based site-directed mutagenesis studies, we succeeded to add a new function against CUS and HsPKS, respectively. We also revealed that BAS produces tetramic acid derivatives from a condensation of aminoacyl-CoA with malonyl-CoA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、タンパク工学、ポリフェノール、アルカロイド、クルクミン、テトラミン酸

1. 研究開始当初の背景

植物由来III型ポリケタイド合成酵素 (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、さらにはウコンのクルクミンに至まで、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ポリフェノール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III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III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)。また、クロモンの骨格を構築する全く新しいタ

イプのIII型 PKS の X 線結晶構造解析およびそれに基づく合理的変異の導入により、3 環性ナフトパイロン骨格を有する非天然型新規化合物の創出に成功した (*JACS* 127, 1362, 2005; *Chem. Biol.* 14, 359, 2007; *JACS* 129, 5976, 2007)。一方、III型 PKS は、互いに 50%以上の高いアミノ酸相同性を示し、しかも活性部位の微妙な構造の違いによって、その活性が大きく変化してしまうため、機能の異なるIII型 PKS の酵素触媒機能を拡張して非天然型新規化合物を創出していくには、構造機能活性相関や酵素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

III型 PKS が示す広範な基質特異性と触媒ポテンシャルは注目に値する。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、一連の人工基質を作用させることにより、創薬シードとなりうる有用物質生産系の構築が可能になる。また、酵素タンパク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、酵素の機能制御に向けては、酵素の活性中心アミノ酸残基及び酵素反応中間体の静的適正配置と酵素反応の進行に伴う動的变化の解明が基盤として重要である。本研究では、ダイオウ由来 (*Rheum palmatum*) ベンザルアセトン合成酵素 (BAS) とトウゲシバ由来 (*Huperzia seratta*) III型 PKS (HsPKS) を取り上げ、構造生物学を基盤として、有機化学や分子生物学、計算科学、タンパク工学の技術を駆使することにより、BAS と HsPKS の結晶構造の解明と、結晶構造を基盤とした酵素触媒機能の拡張を目指した。

3. 研究の方法

(1) BAS の X 線結晶構造解析

先行研究において X 線回折データ取得済みの BAS 野生型について (*Acta Cryst F* 64, 304, 2008)、分子置換法により初期構造を得、CNS と MIFit を用いて立体構造を精密化し、アポ型の結晶構造を取得した。また、活性中心システイン残基に酵素反応中間体が共有結合した BAS 野生型結晶を、化学合成した開始基質である 4-クマロイル CoA を加えた結晶化リザーバーにソーキングすることにより得、大型放射光施設 SPring-8 を用いて X 線回折データを取得し、BAS アポ型構造を鋳型として分子置換法を行うことにより、その立体構造を取得した。化学合成は、文献記載の方法に基づき (*Z Naturforsch* 30c, 352, 1975)、カルボン酸をまず DCC を縮合剤として NHS 活性化エステルに変換した後、CoA とのエステル交換により行った。これらと並行し、先行研究においてカルコン合成活性を回復した BAS の I214L/L215F 変異型についても野生型と同様

にして結晶化用試料の調製と結晶化を行い、結晶構造を解明した。

次にこれら立体構造と、他の機能を有するIII型 PKS の立体構造を比較することにより、BAS に特徴的な活性中心構造とアミノ酸残基の立体的配置を明らかとし、変異導入実験を行うことにより、その構造機能活性相関と触媒機構を解析した。変異の導入には Stratagene 社の QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用い、大腸菌に異種発現させ精製した酵素に、クマル酸や脂肪酸 (C₄~C₂₀) の CoA エステル、より一層の生物活性が期待できるヘテロ芳香環を導入した人工基質などをマロニル CoA やメチルマロニル CoA とともに作用させ、NMR や LC-MS などの分析手段を用いて反応生成物の構造を解析し、酵素機能を確定した。

(2) イネ由来クルクミノイド合成酵素 (CUS) の X 線結晶構造解析と酵素触媒機能の拡張

大腸菌に GST との N 末融合タンパク質として異種発現させ、3 種のカラムクロマトを組み合わせることで高純度に精製した。次にこれを用いて結晶化を行い、得られた結晶についてインハウスで X 線回折データを得、BAS の場合と同様にして酵素反応機構の解析と変異導入実験および変異酵素の反応生成物の解析と酵素機能の確定を行った。

(3) HsPKS の X 線結晶構造解析と酵素触媒機能の拡張

カルバモイル基を有する人工基質を上述の 4-クマロイル CoA の場合と同様にして調製し、大腸菌に異種発現させ精製した HsPKS にマロニル CoA とともに作用させ、NMR や LC-MS などの分析手段を用いて反応生成物の構造を決定した。

次に先行研究において X 線回折データ取得済みの HsPKS 野生型について (*Acta Cryst F* 63, 576, 2007)、BAS の場合と同様にして精密化を行い、アポ型の結晶構造を取得した後、推定酵素反応中間体を CNS プログラムを用いてドッキングさせ、活性中心アミノ酸残基との多点水素結合による反応中間体の静的適正配置及び酵素反応の進行に伴う動的变化を解析した。

これら知見に基づき変異導入を行い、変異酵素の反応生成物の解析と酵素機能の確定を行った。

(4) アミノ酸との CoA チオエステルを用いた生物活性テトラミン酸誘導体の酵素合成

アミノアシル CoA を文献記載の方法により調製し (*PNAS* 99, 12715, 2002)、大腸菌に異種発現させ精製した BAS にマロニル CoA とともに作用させ、NMR や LC-MS などの分析手段を用いて反応生成物の構造を決定した。

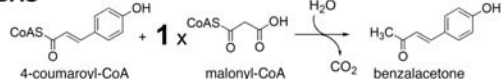
4. 研究成果

(1) BAS の X 線結晶構造解析

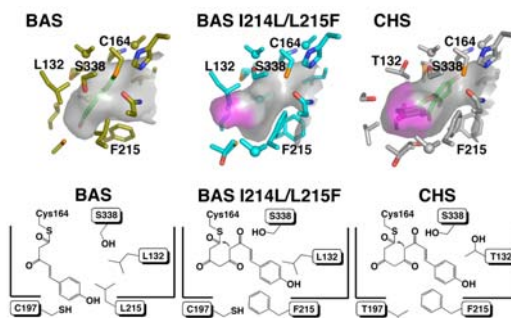
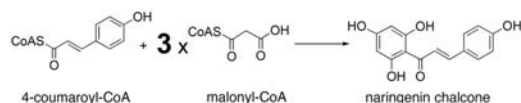
BAS は、1 分子のクマロイル CoA と 1 分子のマロニル CoA との脱炭酸縮合により、ジケタイトの骨格を構築する比較的単純な反応を触媒する III 型 PKS である (*EJB*, 268, 3354, 2001)。先行研究において、L215F 部位特異的変異導入により、カルコン合成能が回復することが報告されている (*JBC*, 278, 25218, 2003)。野生型とその I214L/L215F 変異型の X 線結晶構造解析を行ったところ、1.8 Å の分解能で野生型とその I214L/L215F 置換体のアポ型、および 1.6 Å の分解能で活性中心システイン残基にクマロイル基がチオエステル結合した野生型の複合体結晶構造を得ることに成功した (*PNAS*, 107, 669, 2010)。

まず、アミノ酸レベルで 70% の相同性を示すメディカゴ由来カルコン合成酵素 (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、ほとんどの活性中心アミノ酸残基を重ね合わせることが可能であった。一方、BAS 野生型では、上述した L215 残基により、BAS のキャビティの大きさと形状が CHS や BAS I214L/L215F 変異型のそれとは大きく変化することが示された。即ち、BAS 野生型では、CHS で見いだされたクマロイル結合ポケットの入り口が閉じ、その結果、中間体の芳香環が CHS とは異なり、活性部位の下側に向かって伸長し、これによりポリケタイト鎖の伸長が停止してジケタイトが生成するのに対して、その I214L/L215F 置換体では、L215F 置換により、野生型 BAS では閉じていたクマロイル結合ポケットの入り口が開き、CHS と同様にして酵素反応が進行し、カルコン合成能が回復することが解明された。また、変異導入実験により、L215F に加え、L132 残基も BAS のベンザルアセトン合成活性に重要な役割を演じていることが明らかになった (*BMCL*, 20, 5099, 2010)。III 型 PKS によるジケタイトへの触媒メカニズムの解明は、これが最初であり、しかも酵素反応中間体の構造取得に成功したことは特筆に値する。多段階反応を触媒する III 型 PKS の酵素反応機構を考える上で極めて重要な知見といえる。

BAS



CHS & BAS I214L/L215F

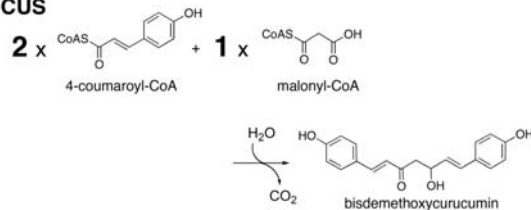


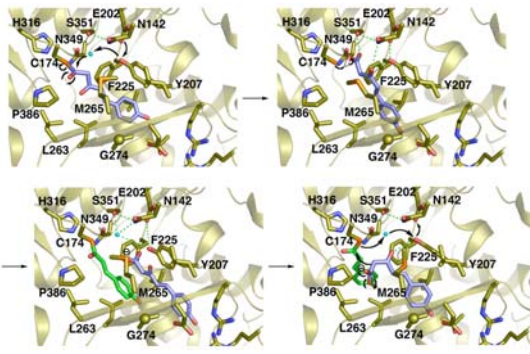
(2) CUS の X 線結晶構造解析と酵素触媒機能の拡張

CUS は、2 分子のクマロイル CoA と 1 分子のマロニル CoA の縮合により、ジアリルヘプタノイド骨格への変換を一挙に触媒する唯一の III 型 PKS である (*JBC*, 282, 37702, 2007)。CUS の触媒機構の解明をめざして X 線結晶構造解析を行ったところ、2.5 Å の分解能で CUS のアポ型結晶構造の取得に成功した (*PNAS*, 107, 19778, 2010)。その結果、CUS の活性部位キャビティの形状と大きさが CHS のそれとは大きく異なることが判明した。しかもそれは、2 分子のクマロイル基と 1 分子のマロニル基を受容するのに十分な容積であった。また、活性中心システイン残基近傍に求核的水分子となり得る水分子の存在を見いだした。CUS では、活性中心キャビティ内において、加水分解によりジケタイトカルボン酸が生成し、次いで、活性中心キャビティ内に保持されたジケタイトカルボン酸のクマロイル中間体への脱炭酸縮合が進行して、ジアリルヘプタノイド骨格を形成することが示唆された。

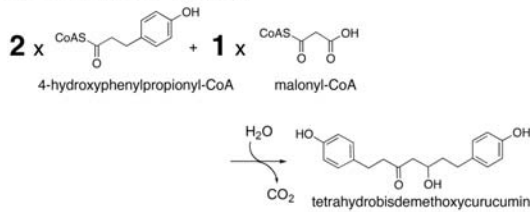
そこで、CUS の酵素触媒機能の拡張を目指して、本知見に基づき、活性中心キャビティを構成するアミノ酸残基のうち、その側面を形成する M265 と G274 をロイシンとフェニルアラニンに置換した点変異体を各々作成し、その酵素反応生成物について精査した。その結果、これら変異体が、野生型では受容することができなかったフェニルプロピオニル CoA を開始基質として受容し、テトラヒドロビスデメトキシクルクミンを生産することが明らかとなった (*PNAS*, 107, 19778, 2010)。単一酵素によるテトラヒドロビスデメトキシクルクミンへの変換はこれが最初の例であり、非天然型クルクミン誘導体を酵素合成していく上で、重要な知見であるといえる。

CUS





CUS M265L & CUS G274F

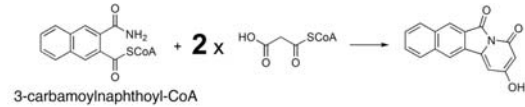
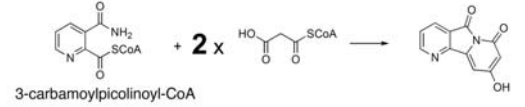
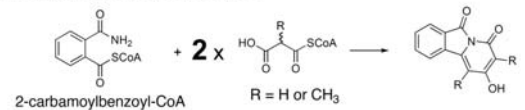


(3) HsPKS の X 線結晶構造解析と酵素触媒機能の拡張

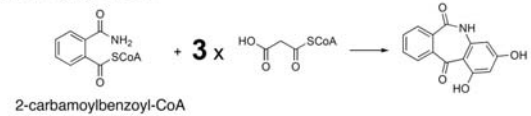
HsPKS1 は特に広範な基質特異性と触媒ポテンシャルを有する III 型 PKS である (*FEBS J*, 274, 1073, 2007)。非天然型新規アルカロイド骨格の創出をめざして、化学合成したカルバモイル基を有する安息香酸やピコリン酸などの CoA チオエステルを開始期質として作用させたところ、2 分子のマロニル CoA (またはメチルマロニル CoA) の縮合による炭素鎖伸長の後、反応性に富む β -ポリケトメチレン中間体からシッフ塩基の形成を介した C-N 結合形成と閉環反応が進行して、6-5-6 縮合環構造の非天然型新規ピリドインゾンドール (またはピリドインドリジン) 骨格を生成することが判明した (論文投稿中)。そこでさらなる非天然型新規アルカロイド骨格の創出を目的として、PKS1 が触媒する酵素の X 線結晶構造解析と酵素反応中間体とのドッキングシミュレーションを行った結果、2.0 Å の分解能で HsPKS の結晶構造の解明に成功し、さらに活性中心キャビティを構成する Ser348 が、マロニル CoA 縮合数と閉環反応の制御に重要な役割を演ずる可能性を見いだした。結果、これにもとづき Ser348 をグリシンに変換した点変異体を作成することにより、2-カルバモイル安息香酸の CoA チオエステルに、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ジベンゾアゼピン骨格をあらたに生成することに成功した (論文投稿中)。しかも本化合物は、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌に対して、バイオフィーム形成阻害活性を示した (MIC = 12 $\mu\text{g/ml}$)。バイオフィーム形成

阻害活性を示すジベンゾアゼピン誘導体としてはこれが最初の例である。

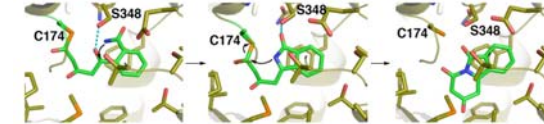
HsPKS & HsPKS S348G



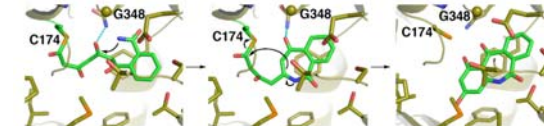
HsPKS S348G



HsPKS



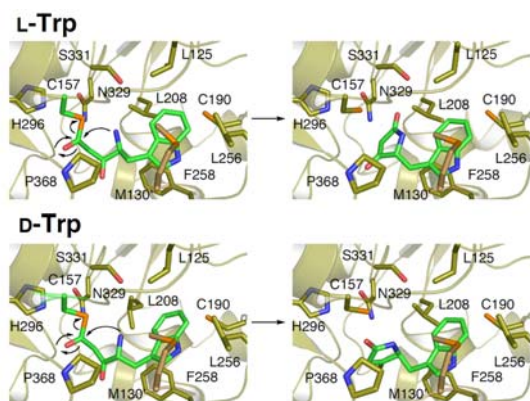
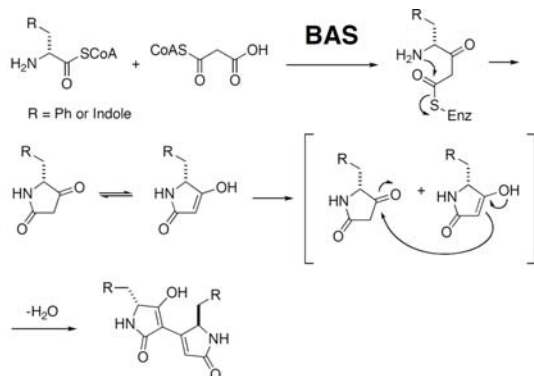
HsPKS S348G



(4) アミノ酸との CoA チオエステルを用いた生物活性テトラミン酸誘導体の酵素合成

テトラミン酸は陸上や海洋生物由来の生物活性物質に見出される天然物に特徴的な骨格の一つである。一見すると γ -ラクタムの β 位にカルボニル基が存在するだけの単純な骨格に見えるが、求電子性の高い α 位炭素、求核性の β 位炭素で構成され、特異な反応性を示すことが知られている。アミド結合を内包するテトラミン酸はペプチドをミミックする創薬リード化合物としても着目されており、プロテアーゼやノイラミニダーゼを標的分子とするテトラミン酸骨格をもとにした阻害剤の設計、合成が報告されている。天然物に見出される興味深い骨格であるテトラミン酸の生合成は、III 型 PKS とは構造的に異なる繰り返し型 PKS と非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) とのハイブリッド経路によってなされることが判明している。即ち、PKS によって伸長した β -ポリケトメチレン鎖に NRPS によってアミノ酸が縮合し、活性メチレン基からの分子内 Claisen 縮合反応 (Dieckmann 縮合反応) によってチオエステルの開裂を伴い環化反応が進行し、テトラミ

ン酸が生成する。一方、上述した BAS が、天然アミノ酸から調製したアミノアシルCoAを開始基質として受容し、これに1分子のマロニルCoAを縮合の後、チオエステル中間体のγ位のアミノ基から分子内ラクタム化を進行させることができれば、テトラミン酸を創出することが可能になる。そこで、本酵素に化学的に合成したL-型およびD-型のフェニルアラニンおよびトリプトファン由来アミノアシルCoAチオエステルを開始基質としてマロニルCoAとともに作用させたところ、実際にテトラミン酸を生成することが判明した (*JACS*, *133*, 4746, 2011)。さらに興味深いことに、生成したテトラミン酸が2分子縮合した新規化合物も同時に生成していることが見出された。生成した化合物の収率にはL-型およびD-型による差はほとんど見られず、基質の立体化学の違いによるBASの基質特異性に有為な差は認められなかった。またBASとの反応により得られた4種のテトラミン酸2量体についてマウス白血病細胞を用いて細胞毒性試験を行った結果、D-型のフェニルアラニンのCoAチオエステルから生成したテトラミン酸2量体のみが細胞毒性活性を示した (IC₅₀ = 1 μg/ml)。化合物の立体化学および置換基の違いが細胞毒性活性に大きく影響していることを示唆しており、構造活性相関に興味を持たれる。天然において植物由来III型PKSがテトラミン酸を生合成する報告例はなく、III型PKSのさらなる可能性を示した成果であるといえる。



上述したように、III型PKSの異例とも言える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、また、合理的な人工基質の設計と結晶構造に基づく機能改変酵素を組み合わせることにより、新規生体触媒と非天然型新規生物活性化合物の効率的な生産が可能になる。今後、酵素による閉環・芳香環形成反応機構の解明と制御を進めるとともに、更なる複雑骨格分子の創製に挑戦していきたい。

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. Hariyanti Baharum, Hiroyuki Morita, Akifumi Tomitsuka, Fong-Chin Lee, Kim-Yong Ng, Raha Abdul Rahim, Ikuro Abe, Chai-Ling Ho “Molecular Cloning, Modeling and Site-directed Mutagenesis of Type III Polyketide Synthase from *Sargassum binderi* (Phaeophyta)” *Marine Biotechnology*, In press (2011). 査読有
2. Toshiyuki Wakimoto, Takahiro Mori, Hiroyuki Morita, Ikuro Abe “Cytotoxic Tetramic Acid Derivative Produced by A Plant Type-III Polyketide Synthase” *J. Am. Chem. Soc.*, *67*, 409-411 (2011). 査読有
3. Kiyofumi Wanibuchi, Hiroyuki Morita, Hiroshi Noguchi, Ikuro Abe “Enzymatic Formation of An Aromatic Dodecaketide by Engineered Plant Polyketide Synthase” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *21*, 2083-2086 (2011). 査読有
4. Hiroyuki Morita, Takahiro Mori, Kiyofumi Wanibuchi, Ryohei Kato, Shigetoshi Sugio, Ikuro Abe “Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of 4-Coumarate:CoA Ligase from *Arabidopsis thaliana*” *Acta Cryst.*, *F67*, 409-411 (2011). 査読有
5. Hiroyuki Morita, Kiyofumi Wanibuchi, Hirohiko Nii, Ryohei Kato, Shigetoshi Sugio, Ikuro Abe “Structural basis for the one-pot formation of the diarylheptanoid scaffold by curcuminoid synthase from *Oryza sativa*” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *107*, 19778-19783 (2010). 査読有
6. Yoshihiko Shimokawa, Hiroyuki Morita, Ikuro Abe “Structure-based Engineering of Benzalacetone Synthase” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *20*, 5099-5103 (2010). 査読有

7. Hiroiyuki Morita, Kiyofumi Wanibuchi, Ryohei Kato, Shigetoshi Sugio, Ikuro Abe “Expression, Purification and Crystallization of A Plant Type III Polyketide Synthase that Produces Curcuminoid” *Acta Cryst., F66*, 948-950 (2010). 査読有
8. Ikuro Abe, Hiroiyuki Morita “Structure and Function of The Chalcone Synthase Superfamily of Plant TypeIII Polyketide Synthases” *Nat. Prod. Rep.*, 27, 809-838 (2010). 査読有
9. Hiroiyuki Morita, Yoshihiko Shimokawa, Michikazu Tanio, Ryohei Kato, Hiroshi Noguchi, Shigetoshi Sugio, Toshiyuki Kohno, Ikuro Abe “A Structure-based Mechanism for Benzalacetone Synthase from *Rheum palmatum*” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 669-673 (2010). 査読有
10. 森田洋行、阿部郁朗「植物ポリケタイド合成酵素研究の最前線」*化学と生物*, 47, 772-780 (2009). 査読有

[学会発表] (計 21 件)

1. 森田洋行 “A Structure-based Mechanisms for Plant Polyketide Biosynthesis” JSPS-DGHE JOINT RESERCH PORJECT, 2011/1/18、Bandung (Indonesia)
2. 森田洋行、下川良彦、阿部郁朗 “Structure-based mechanism for benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*” PACIFICHEM2010, 2010/12/17、Hawaii (USA)
3. 森田洋行 「植物ポリケタイド合成酵素の構造と機能」第 47 回植物化学シンポジウム、2010/11/8、静岡県立大学 (静岡県)
4. 森田洋行、阿部郁朗 “Crystal Structure Analysis of The Type III Polyketide Synthase That Produces Curcuminoid” 25th Symposium on Natural Products, 2010/11/5、Tainan (Taiwan)
5. 森田洋行 「植物ポリケタイド合成酵素の触媒機能の拡張と非天然型化合物の創出」第 3 回日本薬学会関東支部若手シンポジウム、2010/10/2、東京薬科大学 (東京都)
6. 鰐淵清史、森貴裕、庭野智子、張剛、脇

本敏幸、森田洋行、阿部郁朗「クマロイル CoA 合成酵素の新規触媒機能と構造解析：チオエステルからアミドリガーゼ、ペプチド合成酵素への機能拡張」第 52 回天然有機化合物討論会、2010/9/29、グランシップ静岡 (静岡県)

7. 森田洋行 「植物ポリフェノールの生合成に関する研究」第 57 回日本生薬学会年会、2010/9/26、徳島文理大学 (徳島県)
8. 森田洋行 「植物ポリケタイド合成酵素の機能制御と超天然型新規生体触媒の開発」第 11 回酵素応用シンポジウム、2010/6/11、メルパルク NAGOYA (愛知県)
9. 山下誠、鰐淵清史、史社坡、森田洋行、野口博司、阿部郁朗「植物ポリケタイド合成酵素の潜在的触媒能力を活用した非天然型新規アルカロイド骨格の創出」第 51 回天然有機化合物討論会、2009/10/8、名古屋市公会堂 (愛知県)
10. 森田洋行「植物ポリケタイド合成酵素の X 線結晶構造解析と新たな酵素触媒機能の開拓」第 44 回天然物化学談話会、2009/7/9、つくばグランドホテル (茨城県)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：植物ポリケタイド合成酵素を用いた 3 環性非天然型アルカロイドの生産
 発明者：阿部郁朗、脇本敏幸、森田洋行、山下誠
 権利者：国立大学法人東京大学
 種類：特願
 番号：2010-212208
 出願年月日：2010 年 9 月 22 日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし