

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25242067

研究課題名(和文)多様な植物ポリケチド生合成機構の統合化

研究課題名(英文)Unification of biosynthetic pathways of a variety of plant polyketides

研究代表者

野口 博司(Noguchi, Hiroshi)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：60126141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、アサ由来オリベトール酸閉環酵素(OAC)とその生成物であるオリベトール酸との複合体X線結晶構造の解析と変異導入実験から、チロシン72とヒスチジン78がOACの触媒残基である可能性を示した。さらに、OACの活性中心キャビティー内に見いだした疎水性に富んだペンチル結合ポケットを形成するアミノ酸残基を高いアミノ酸に置換したところ、酵素活性が減弱することを明らかにした。これらの変異酵素についてX線結晶構造解析を行った結果、変異の導入によりペンチル結合ポケットの容積が減少し、基質が結合しにくくなったため、酵素活性を減弱することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We showed the possibility that tyrosine 72 and histidine 78 was a catalyst residue of OAC from analysis and a variation introduction experiment of the complex X-rays crystal structure with the Oribe Thor acid which was Oribe Thor acid closure enzyme (OAC) derived from hemp and the product. Furthermore, We clarified what enzyme activity attenuated when bulky substituted the amino acid residue which formed a pentyl-binding pocket full of the hydrophobicity that we found in an active site of OAC for a higher bulky residue. Based on the X-ray crystallographic analysis about these variation enzymes, the capacity of the pentyl-binding pocket decreased by introduction of the variation, and a substrate became hard to be connected, it became clear to attenuate enzyme activity.

研究分野：天然物化学

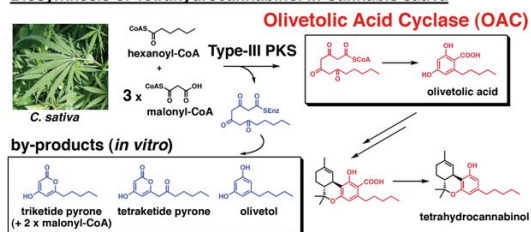
キーワード：ポリケチド 生合成 反応機構 タンパク質結晶構造解析 植物 酵素工学

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、さらには機能改変することによって、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オリベトール酸を生成するものであった。この補助因子となる OAC は植物に広く存在する通用性の高いファミリーのタンパクである。近年、フラボノイド生合成系中のカルコンフラバノン異性化酵素 (CHI) ホモログで本来の異性化作用を示さないタンパクが、その系の CHS 機能の増幅に働いているかのような結果を示す報告も見られている。これまで単一酵素で最終産物に至ると考えられてきた PKS III の系において、補助的なタンパクの関与に関して信頼できる報告が急速に増加してきた。そのため、新規化合物の創出に有用な新たな PKS III の探索とともに、これらの補助因子の物質生産へ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 (C₁₆ レゾルシノール) やフロログルシノール誘導体 (C₁₈ 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 から生成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。本研究では、新規機能を有する植物由来 PKS III の探索を引き続き行うとともに、これまで申請者が単離してきた PKS III 群と 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) ゴシユコ由来新規 PKS III のクローニングと異種発現系の構築及び酵素反応生成物の解析

ゴシユコ由来新規 PKS III 遺伝子は、富山大学薬用植物園で採取したゴシユコ *Evodia rutaecarpa* の蕾から、グアニジンチオシアネート法を用いて得た total RNA を鋳型し、RT-PCR を行うことにより、コア配列を得、次いで、各々のコア配列にもとに作成した特異的なプライマーを用いて、5'RACE と 3'RACE 法を行うことにより得た。次に、6 残基のヒスチジンとの N 未融合タンパク質として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。精製した酵素に、N-メチルアントラニロイル CoA, マロニル CoA, デカノイル CoA 等の CoA エステルを基質として作用させ、酵素反応生成物を LC-MS を用いて解析した。

(2) 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。

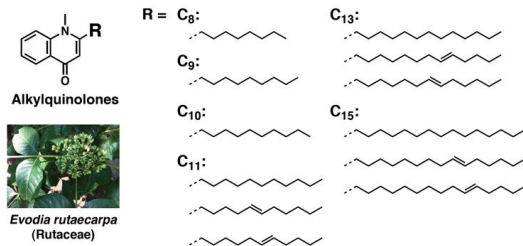
(3) OAC の X 線結晶構造解析

OAC を 6 残基のヒスチジンとの C 未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、本変異酵素の X 線結晶構造を取得した。変異の導入は、PCR 法にて行った。

4. 研究成果

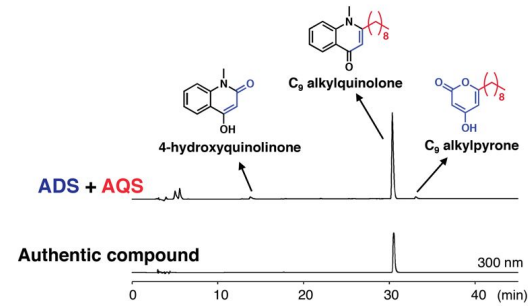
(1) ゴシユユ由来新規 PKS III のクローニングと機能解析

生薬呉茱萸の基原植物であるミカン科のゴシユユはキノロンアルカロイドのエボカルピンを生成する。エボカルピンは、カルシウム拮抗作用、強心作用、子宮収縮作用を有する有用天然物である。また、ゴシユユからはエボカルピン以外にも脂肪酸の炭素鎖長や飽和・不飽和の位置と数が異なるアルキル基がキノロン骨格に結合したアルキルキノロンアルカロイドも単離されている。



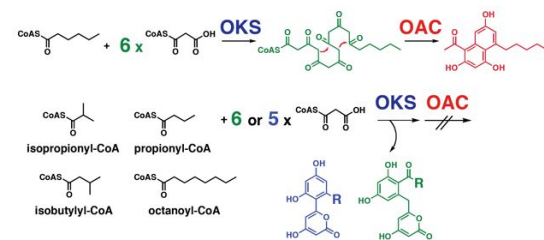
一方、アルキルキノロンアルカロイドは緑膿菌からも単離されている。このうち、*Pseudomonas aeruginosa* が生産する 4-ヒドロキシ-2-アルキルキノロン (HAQ) は、FabH 様酵素である PqsB, PqsC, 及び PqsD により生合成されることが報告されている。しかし、植物においては、FabH 様酵素の関与により生合成されるアルカロイドは報告されていない。一方、PKS III であるキノロン合成酵素はキノロンアルカロイドを生合成する。また、ウコンのクルクミンは、PKS III であるジケタイド CoA 合成酵素がフェルロイル CoA とマロニル CoA からジケタイド CoA を生成し、その加水分解産物である β-ケト酸を、同じく PKS III であるクルクミノイド合成酵素がフェルロイル CoA と縮合することで生成する。このことから、エボカルピン類は N-メチルアントラニロイル CoA, 長鎖脂肪酸 CoA, マロニル CoA の 3 種の基質から 2 種の PKS III の触媒によって生合成されると予想された。そこで、ゴシユユの蕾から得た total RNA を鋳型として RT-PCR 法を行うことにより 2 種のゴシユユ由来新規 PKS III, ErADS と ErAQS を得た。これらは互いに 61% のアミノ酸相同性を示した。さらに、ErADS と ErAQS は、PKS III の 3 つの触媒残基 Cys, His, Asn を保存した。ErADS は、PKS III の基質特異性と生成物特異性を決めるのに重要であるとされるアミノ酸残基のうち、191 番目と 259 番目及び 332 番目が Cys, Tyr, Trp, ErAQS は、それらが Tyr, Leu, Gly に置換されていた。他の PKS III と相同性比較を行った結果、ErADS はカルコンを生合成する *Medicago sativa* CHS (MsCHS) と 63%, ErAQS はキノロンを生合成する *Citrus microcarpa* QNS (CmQNS) と 60% の最も高い配列相同性を示した。次に、大腸菌に異種発現させ精製した ADS と AQS の共反応液に N-メチルアントラニロイル CoA, デカノイル CoA, マロ

ニル CoA を基質として作用させた。その結果、1-methyl-2-nonyl-4(1H)-quinolone (C₉ アルキルキノロン) を生成することが確認された。現在、C₉ アルキルキノロンの生成における各々の酵素の役割や基質特異性の検討が進行中である。



(2) OAC と OKS の酵素反応生成物の解析

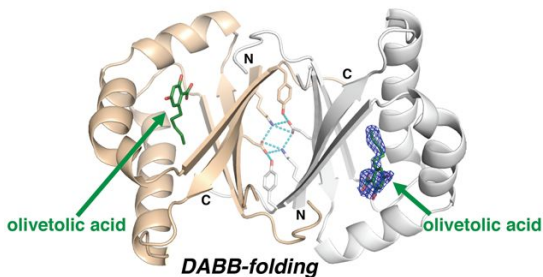
大腸菌にて異種発現し精製した OKS と OAC の酵素反応液に、ヘキサノイル CoA とマロニル CoA を基質として作用させ、その酵素反応生成物について、LC-MS 及び NMR を用いて解析を行った。その結果、OKS と OAC の共反応により、新規ナフタレンを生合成することが判明した。本化合物は、OKS がヘキサノイル CoA と 6 分子のマロニル CoA から生産したヘキサノイルヘプタケタイド CoA を OAC が基質として受容し、OKS とは異なった閉環反応を触媒することにより生じたと考察できる。そこで、ヘキサノイル CoA よりも炭素数の短い、もしくは長いアシル基を有する CoA 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と考察された。



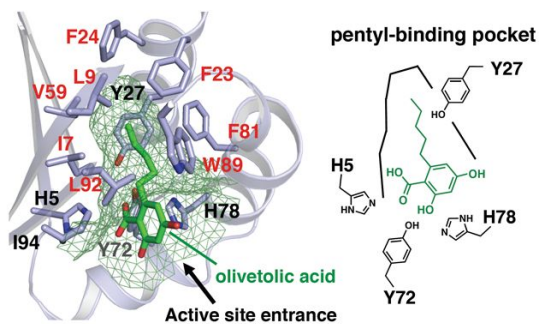
(3) OAC の X 線結晶構造解析

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、1.7 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した。OAC は 2 量体を形成することにより、α-β-β-α 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 α - β 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。

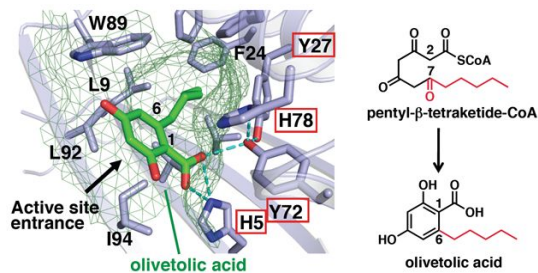


そこで、OAC の活性中心キャビティーについて解析を行った。その結果、OAC の活性中心キャビティーは、疎水性残基で囲まれた約 9 Å ストロームの長さからなるペンチル結合ポケットを有し、ここにオリベトール酸のペンチル基を結合することが判明した。また、ペンチル結合ポケットを構成するアミノ酸残基のうち、その底部を形成する 24 番目のチロシンと 59 番目のバリン、及び入り口付近に位置する 7 番目のイソロイシンをより高いフェニルアラニン、ロイシン、メチオニンにそれぞれ置換すると、オリベトール酸生成活性が 36%、51%、35%減少することが判明した。さらに、OAC の I7F 及び V59M 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、変異の導入により、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、野生型の活性中心キャビティーにより突き出し、それにより、野生型よりも活性中心キャビティーを小さくしていることが示された。これらの結果は、これらの変異酵素においては、ペンチル結合ポケットの容積が小さくなったことにより、基質の結合がされにくくなったため、これらの変異酵素は酵素活性を減弱したと考察される。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。



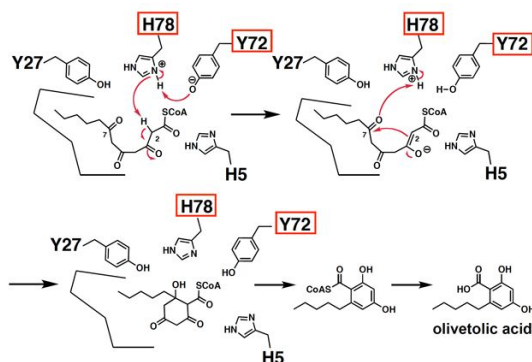
一方、オリベトール酸の芳香環とカルボキシル基は、OAC の活性中心キャビティーの入り口付近に結合しており、この周辺において、27 番目のチロシンと 78 番目のヒスチジン、72 番目のチロシンが水素結合によるネットワークを形成し、このうちの 72 番目のチロ

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 位に向かってつきだしていることが明らかとなった。本部位は、OAC によるオリベトール酸への変換において、アルドール縮合させる部位に一致する。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で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ターゼ活性を消失しており、OAC

は,72番目のチロシンによって活性化された78番目のチロシンが基質の2位のプロトンを引き抜くことにより,C2-C7アルドール縮合が進行して閉環した化合物を生成し,この化合物を最終産物として生産しているものと考察される.



これらのことから,OACは,ペンチル結合ポケットの長さが9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ことが明らかとなった.また,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.このことから,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つたと考察する.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5件)

1. Takahiro Mori, Lihan Zhang, Takayoshi Awakawa, Shotaro Hoshino, Masahiro Okada, Hiroyuki Morita, Ikuro Abe “Manipulation of prenylation reactions by structure-based engineering of bacterial indolactam prenyltransferases”, *Nature Communications*, 7, 10849 (2016). 査読有
DOI: 10.1038/ncomms10849
2. Xinmei Yang, Takashi Matsui, Takeshi Kodama, Takahiro Mori, Xiaoxi Zhou, Futoshi Taura, Hiroshi Noguchi, Ikuro Abe, Hiroyuki 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

3. Xinmei Yang, Takashi Matsui, Takahiro Mori, Futoshi Taura, Hiroshi Noguchi, Ikuro Abe, Hiroyuki Morita “Expression, purification, and crystallization of a plant polyketide cyclase from *Cannabis sativa*”, *Acta Crystallographica Section F*, 71, 1470–1474 (2015). 査読有
DOI: 10.1107/S2053230X15020385
4. Takahiro Mori, Dengfeng Yang, Takashi Matsui, Makoto Hashimoto, Hiroyuki Morita, Isao Fujii, Ikuro Abe “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). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.626416
5. 森田洋行「植物由来型ポリケタイド合成酵素の触媒機能の拡張」,日本応用酵素協会誌, 査読有, Vol. 49, 2014, 1–8
DOI及びURL無

[学会発表](計12件)

1. 森田洋行,楊新美,松井崇,児玉猛,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(神奈川県)
2. 松井崇,楊新美,児玉猛,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(茨城県)
3. Hiroyuki Morita “Crystal structure analysis of the novel plant polyketide cyclase”, International Conference on Natural Products (ICNP) 2016, 2016/3/15–3/17, クアラタレンガヌ(マレーシア)
4. Hiroyuki Morita “Structural basis for novel plant polyketide cyclase”, 32nd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences, 2016/3/10–3/11, バンコク(タイ)
5. 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)
6. Takuya Ito, Takeshi Kodama, Hiroshi Noguchi, Ikuro Abe, Hiroyuki Morita

“Precursor-directed biosynthesis of unnatural 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)

7. Takeshi Kodama, Takashi Matsui, Takahiro Mori, 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)
8. 森田洋行, 楊新美, 松井崇, 児玉猛, 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 (東京都)
9. Yang Xinmei, Takashi Matsui, Takeshi Kodama, Ikuro Abe, Hiroyuki Morita “Structural basis of polyketide cyclase from *Cannabis sativa*”, ISPSA2015, 2015/8/30–9/2, 徳島文理大学 (徳島県)
10. 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, 横浜理研 (神奈川県)
11. 森田洋行 「植物ポリケタイド合成酵素へのアミノ酸欠損/導入変異による多環性化合物群の創出」, とやま産学官金交流会 2014, 2014/12/2, 富山国際会議場 (富山県)
12. 森田洋行 「植物ポリケタイド合成酵素へのアミノ酸欠損/導入変異による多環性化合物群の創出」, 富山大学コラボフェスタ 2014, 2014/9/19, 富山大学 (富山県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 博士 (NOGUCHI HIROSHI)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号: 60126141

(2) 研究分担者

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

梅原 薫 (UMEHARA KAORU)
静岡県立大学・薬学部・講師
研究者番号: 40185070

渡辺 賢二 (WATANABE KENJI)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号: 50360938