

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560435

研究課題名(和文) 型ポリケタイド合成酵素のアミノ酸欠損追加導入変異によるあらたな触媒機能の開拓

研究課題名(英文) Engineering of type III polyketide synthase by deletion and addition of residues

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 型ポリケタイド合成酵素の機能改変を目的に、8分子のマロニルCoAを縮合し、SEK4/SEK4bへの変換を触媒するオクタケタイド合成酵素(OKS)への欠損変異導入を行った。その結果、OKSの活性中心キャビティー構成アミノ酸である351番目のバリンを欠損させると、開始基質に対する基質特異性が脂肪族CoAに特化することが判明した。本変異酵素のX線結晶構造解析を行った結果、触媒残基システイン近傍の活性中心キャビティーの容積が増大したために基質特異性が脂肪族CoAに特化したことが示された。

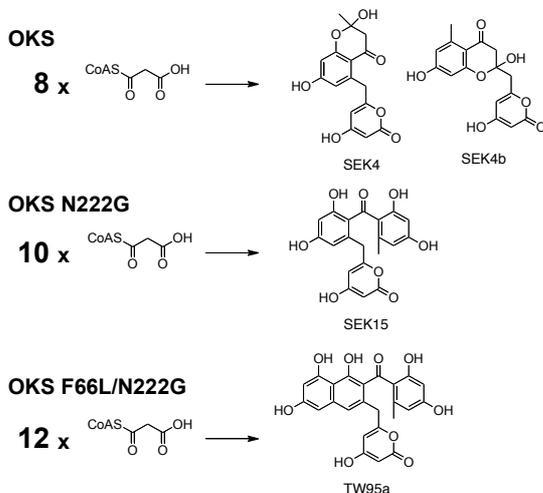
研究成果の概要(英文)： In order to modify the function of type III polyketide synthase, we carried out deletion mutagenesis studies on octaketide synthase (OKS), which catalyzes sequential condensations of eight molecules of malonyl-CoA to produce SEK4/SEK4b. The deletion mutagenesis studies revealed that the loss of Valine351, lining the active site cavity of OKS, results in specializing its starter substrate specificity in fatty acyl CoAs. Furthermore, a crystal structure analysis of the mutant enzyme suggested that an expansion of the active-site cavity near catalytic residue, cysteine, specialized the substrate specificity of the mutant in the fatty acyl CoAs.

研究分野：天然物化学

キーワード：酵素工学 ポリケタイド合成酵素 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

天然資源には、人が医薬品として求める多様な構造と生物活性を有する天然化合物があり、人はこれを単離・同定することで医薬品開発へと発展させてきた。科学技術が格段に進歩した今日にあっても、医薬品の開発は未だ天然化合物の化学構造に寄るところが大きい。一方、悪性腫瘍や神経疾患、自己免疫疾患等の難治性疾患に対する治療薬や耐性株にも有効な抗生物質の早期開発等が求められる現代にあつて、従来の植物や微生物等からのシードの探索だけでこのニーズに応えていくことが困難になりつつある。このような背景のもと、著者らは、フラボノイドや一部のアルカロイド等の基本骨格構築を担うⅢ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) の酵素工学的検討が在来の常識を覆す多様な骨格の化合物を生み出すことを、基質構造にアレンジを加え、活性中心キャビティーの構成アミノ酸を置換してその容積と形状を変化させることにより実証してきた。例えば、本来、8分子のマロニル CoA を縮合して芳香族オクタケタイド SEK4 や SEK4b への変換を触媒するキダチアロエ由来オクタケタイド合成酵素 (OKS) の結晶構造に基づき、活性中心構成アミノ酸である Phe66 と Asn222 を Leu と Gly に置換することにより、12分子のマロニル CoA 縮合を可能にして TW95a の生産などに成功している。



しかしながら、従来の置換型変異だけではさらにマロニル CoA を縮合してあらたな化合物を生み出すことが困難になってきた。その理由の一つとして、拡大した酵素の活性中心キャビティーが既にタンパク質表面近くにまで及んでおり、活性中心キャビティーをさらに掘り下げて拡大することが困難になりつつあるということが挙げられる。そのため、Ⅲ型 PKS の触媒機能を拡張して新規化合物を創出するためには、従来とは異なった概念によって触媒機能を改変することを必要とした。

2. 研究の目的

Ⅲ型 PKS が示す広範な基質特異性と潜在

的触媒能力は注目に値する。従つて、こうした基質特異性の寛容さと触媒能力を利用・拡張し、一連の骨格の異なる人工基質を作用させることによって、創薬シードとなり得る有用物質の生産が可能になる。また、酵素蛋白質の立体構造に基づく合理的な触媒機能の改変により分子多様性と新規骨格のさらなる創出が期待される。本研究では、Ⅲ型 PKS として、著者らがこれまでに特に置換型変異を実施してきた OKS をモデルとして取り上げ、その活性中心キャビティー構成アミノ酸を欠損させて従来とは異なった形状変化をキャビティー構造に施すことにより、新規ポリケタイドやアルカロイドの創出を目指した。

3. 研究の方法

(1) OKS へのアミノ酸欠損変異の導入と変異酵素の精製及び機能解析

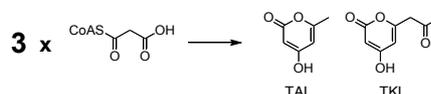
変異の導入は、先行研究において作成した6残基のヒスチジンとのC末融合蛋白質として OKS を大腸菌内で発現させるプラスミドを鋳型とし、PCR 法を用いて行った。次に、OKS 変異酵素を6残基のヒスチジンとのC末融合タンパク質として大腸菌に異種発現させ、Ni-キレートアフィニティーカラムとゲルろ過カラムを用いて精製した。精製した酵素に、クマロイル CoA や N-メチルアントラニル CoA、ベンゾイル CoA、ヘキサノイル CoA 等の構造の異なる CoA エステルとマロニル CoA を基質として作用させ、酵素反応生成物を LC-MS を用いて解析した。

(2) OKS V351 欠損変異酵素の結晶化及び X 線結晶構造解析

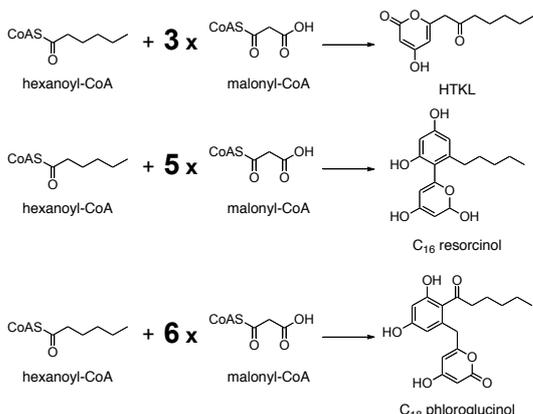
OKS V351 欠損変異酵素を6残基のヒスチジンとのC末融合タンパク質として大腸菌に異種発現させ、Ni-キレートアフィニティーカラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて高純度に精製した。次に、これを用いて、市販のスクリーニングキットにて結晶化スクリーニングを行い、結晶化条件の最適下を経て得た結晶について、筑波・フotonファクトリーにて X 線回折データを得、野生型 OKS を鋳型とした分子置換法により、本変異酵素の X 線結晶構造を取得した。

4. 研究成果

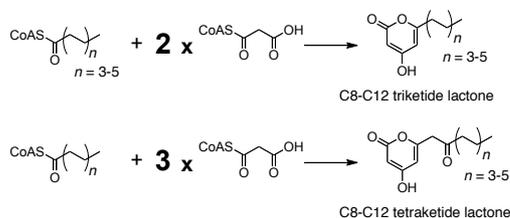
OKS の Val351 を欠損させた変異酵素についてマロニル CoA 単独で酵素反応を行ったところ、OKS 野生型が生産する SEK4 や SEK4b の生産能は消失したものの、OKS 野生型において若干の生成が確認されるマロニル CoA に4分子または3分子のマロニル CoA が縮合したテトラケタイドラクトン (TKL) 及びトリアセティックアシッドラクトン (TAL) を生成することが確認された。



また、OKS 野生型においては、クマロイル CoA をマロニル CoA とともに基質として作用させると、クマロイル CoA に 5 分子あるいは 6 分子のマロニル CoA を縮合してスチルベン誘導体やカルコン誘導体を生成することを著者らは既に報告していたが、本変異酵素においては、マロニル CoA の縮合によって生成する上述した TKL と TAL を生成するのみであった。ベンゾイル CoA やアントラニル CoA をマロニル CoA とともに作用させた場合も同一で、TKL と TAL の生成のみが確認された。一方、ヘキサノイル CoA を開始基質として酵素反応を行った結果、OKS 野生型では、ヘキサノイル CoA にマロニル CoA が 3 分子、5 分子、6 分子のマロニル CoA がそれぞれ縮合したヘキサノイルトリケタイドラクトン (HTKL)、C₁₆ レゾルシノール及び C₁₈ フロログルシノールが、SEK4 や SEK4b とともに生産されるのに対して、OKS の Val351 欠損変異酵素では、HTKL、C₁₆ レゾルシノール、C₁₈ フロログルシノールを特異的に生産することが判明した。



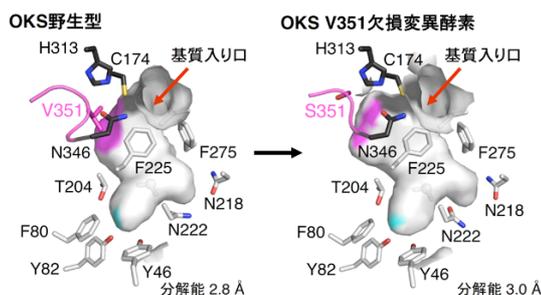
そこで、他の脂肪酸 CoA (炭素数 8~12) を開始基質として酵素反応を行ったところ、これらの場合では、OKS 野生型が SEK4 や SEK4b とともに生産する脂肪酸 CoA に 2 分子または 3 分子のマロニル CoA が縮合したトリケタイドラクトン及びテトラケタイドラクトンを生産することが示された。



このことから、OKS V351 欠損変異酵素は、開始基質に対する基質特異性が脂肪酸 CoA に特化したことが示唆された。そこでさらに著者らは、Ser352 を Val351 と同時に欠損させた OKS の二重欠損変異酵素を作成した。しかし、この場合では、脂肪酸 CoA に基質特異性が特化していることは維持されていた

ものの、マロニル CoA の縮合回数は減少し、脂肪酸 CoA に 2 分子または 3 分子のマロニル CoA を縮合したトリケタイドラクトン及びテトラケタイドラクトンを生成のみであった。また、Thr204、Ileu205、Ileu206 を単独または同時に欠損させた変異酵素の反応生成物についても分析を行った。しかし、各々の酵素蛋白を野生型と同様に取得することはできないものの、いずれにおいても酵素反応生成物を確認することができなかった。OKS へのこれらの部位への欠損型変異の導入は酵素活性を消失させてしまうことが判明した。

そこで、さらなる変異導入のための情報を得ることを目的に、本変異酵素の X 線結晶構造解析を行った。その結果、3.0 Å の分解能で本変異酵素の X 線結晶構造の取得に成功した。OKS V351 欠損変異酵素は、OKS 野生型とほぼ同一の全体構造を有した。一方、OKS V351 欠損変異酵素は、351 番目のバリンを欠損させたことにより、活性中心 Cys 残基近傍で活性中心キャビティーが拡大し、これにより開始基質に対する基質特異性が脂肪酸 CoA に特化した可能性が示された。



この部位で欠損変異を導入すれば、基質特異性がさらに変化してあらたな化合物の創出されることが期待される。そこで、351 番目のバリンと同時に 352 番目のセリン (野生型の番号) を欠損させた OKS 二重欠損変異酵素を作成し、その酵素活性について検討したが、本二重欠損変異酵素においては、ヘキサノイル CoA に 2 分子または 3 分子のマロニル CoA を縮合したヘキサノイルトリケタイドラクトンと HTKL を生産するものの、OKS V351 欠損変異酵素のように C₁₆ レゾルシノールと C₁₈ フロログルシノールは生産できないことは判明した。また、OKS V351 欠損変異酵素のように、本酵素も他の芳香族 CoA を開始基質としないこと、及び本変異酵素においては脂肪酸 CoA をも開始基質としないことが確認された。本結果から、OKS への V351/S352 二重欠損の導入は、V351 単欠損変異の導入よりも、OKS のマロニル CoA 縮合能力を衰退させることが明らかとなった。

今回、III 型 PKS のモデルとして OKS を取り上げ、欠損変異を導入することにより、これまで III 型 PKS では皆無であった欠損変異に関するあらたな情報を得ることができた。今回得た知見を参考に、現在、351 番目のバ

リンとは立体構造上離れた位置に存在するアミノ酸への欠損変異及び他のアミノ酸への置換変異を導入し、OKS のさらなる機能改変とあらたな化合物の創出を試み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 6 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. Xinmei Yang, Takashi Matsui, Takeshi Kodama, 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
6. 森田洋行「植物由来Ⅲ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

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