

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882018

研究課題名(和文)微生物由来新規スチルベン合成酵素の機能解析と非天然型スチルベン誘導体の創出

研究課題名(英文)Functional analysis of bacterial stilbene synthase

研究代表者

森 貴裕 (Mori, Takahiro)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60734564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物以外の生物において唯一スチルベン骨格を形成する *Photorhabdus* sp. 由来の、スチルベン骨格形成に関与する二種類の酵素 StID と StIC の機能解析、立体構造解析を行った。結果、両酵素は広範な基質特異性を有しており、これらの酵素を利用した新規有用化合物の創出が期待される。また、StID の立体構造を明らかとし、本酵素が触媒する反応メカニズムを提唱するに至った。今後は、立体構造を基にさらに基質特異性を变化させた機能改変酵素の創出を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Although stilbenes are a class of biologically active compounds distributed in a number of plant families, only *Photorhabdus* sp. produce stilbene compounds in microorganism kingdom. While plantal stilbenes are synthesized by a type III polyketide synthase, stilbene synthase, the bacterial stilbene scaffolds are generated by two enzymes, ketosynthase StID and aromatase StIC. In this study, we characterized StID and StIC in vitro enzyme reaction, and solved the crystal structures of StID complex with substrate at 1.8 Å resolution. The structural analysis and site-directed mutagenesis indicated that Glu154 acts as base-catalyst to activate  $\alpha$ -keto acyl substrate and a water molecule. Surprisingly, StID H302A mutant, one of catalytic residues in all ketosynthases, retains its enzyme activity. This suggested that StID employs novel catalytic machinery for condensing two acyl substrates to produce cyclohexanedione scaffold.

研究分野：生合成

キーワード：生合成 X線結晶構造解析 酵素工学

## 1. 研究開始当初の背景

スチルベンとは、C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> の共役した二つの芳香環を持つ化合物群の総称である (図 1)。スチルベン骨格を有する化合物は抗酸化作用や癌の化学的予防効果など様々な活性を有しており、植物に普遍的に存在している (M. S. Jang *et al.*, *Science*, 1997)。本研究で注目する、昆虫病原性グラム陰性細菌 *Photobacterium luminescens* は、スチルベン化合物 isopropyl stilbene (IPS) を分泌する (K. J. Hu *et al.*, *Can. J. Microbiol.*, 1998) (図 1 B)。この化合物は強い抗菌作用を有する有用化合物である (I. Eleftherianos *et al.*, *PNAS*, 2007)。微生物におけるスチルベン化合物の単離報告例は非常に少なく、*P. luminescens* は唯一生合成遺伝子まで報告されているスチルベン化合物生産菌である。そして、生合成遺伝子群から予想される IPS 生合成経路は植物のスチルベン生合成経路とは大きく異なることが明らかとなった。植物においては、スチルベン骨格は III 型ポリケチド合成酵素である stilbene synthase (STS) によって生合成される。STS は開始基質としてモノフェニルプロパノイドの CoA エステルを受け入れ、3 分子のマロニル CoA を伸張し、閉環することでスチルベン骨格を構築する (図 1 A)。一方、*P. luminescens* の IPS 生合成遺伝子群には STS と相同性を示す酵素は存在せず、遺伝子破壊により機能未知の 2 つの酵素、flavodoxin 様の酵素 SttC 及び ketosynthase (KS) 様の酵素 SttD が生合成に必須であるということが見出されている (S. A. Joyce *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008)。以上の先行研究より、IPS 生合成は、まず SttD が異なる 2 種類のポリケチド鎖の縮合を触媒し、2,5-ジアルキル-1,3-シクロヘキサジオン中間体を生成する。次いで SttC が芳香化を行うことで IPS が形成すると考えられる (図 1 B)。このように、SttD と SttC は植物において 1 つの酵素 STS で生合成するスチルベン骨格を 2 つの酵素を用いて生合成する新規スチルベン合成酵素である。特に、SttD は同じ KS 様酵素でありながら STS

とは異なり、マロニル CoA の伸張反応を触媒するのではなく、二つのポリケチド鎖を Michael 付加反応と Claisen 縮合反応の二つを触媒する事で縮合する新規酵素である。この酵素反応中、活性化されていない 4 位のメチレンからもう一方のポリケチド鎖の 1 位への求核攻撃は化学的にも非常に興味深い。さらに、同じ菌より IPS の誘導体が単離されている一方で、SttD、SttC と高い相同性を示す酵素は *P. luminescens* のゲノム中に存在しない。

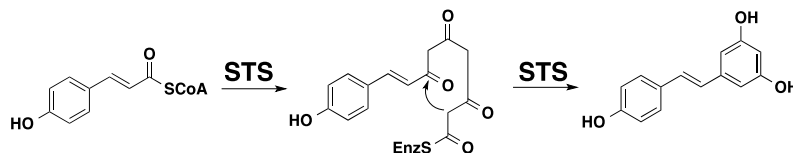
## 2. 研究の目的

このことから SttD および SttC の基質特異性はある程度寛容であることが推測される。この特性を用い、SttD と SttC の反応を組み合わせることにより、スチルベン化合物や 2,5-ジアルキル-1,3-シクロヘキサジオン中間体の構造多様性を増大させることが可能となる。特に、SttD、SttC を用いることで、STS では合成困難な部位に官能基やアルキル基のついたスチルベン骨格が合成可能である。生物活性を有する化合物に対して官能基やアルキル鎖を付加することによってさらに活性が上昇する例は多くあり、様々な置換基を導入することで、さらに活性の向上したスチルベン骨格を創出することが期待される。また、2,5-ジアルキル-1,3-シクロヘキサジオン骨格は天然からは 2009 年に初めて蘭から単離された比較的新しい分類の化合物群であるが、蘭のフェロモン作用のみが知られ、他の生物活性試験は行われていない (S. Franke *et al.*, *PNAS*, 2009)。そのため、こちらの化合物に対しても構造多様性を増大させ、様々な活性評価を行うことで新たな生物活性を有する化合物の発見も期待される。

## 3. 研究の方法

タンパク質の大量発現は pET ベクターを用いて大腸菌内で行い、His-tag を用いたアフィニティー精製や、ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製など、原理の異なるカラムにて精製を行うことで高純度タンパク質を得、

### A. 植物におけるスチルベン生合成経路



### B. *P. luminescens* における IPS 生合成

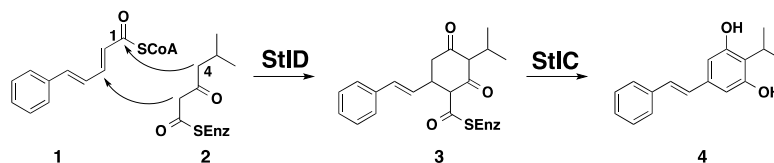


図1. 植物と *P. luminescens* におけるスチルベン骨格の生合成

これを用いて酵素反応、結晶化を行った。開始基質としては、芳香環部分を複素環構造を有する化合物や様々な長さの脂肪鎖、あるいはアルキンを有する化合物へと変え、酵素反応を行った。

得られた結晶に対しては、Photon Factory、Spring-8 にて X 線回折強度の測定を行った。セレノメチオニン置換体を作成し、Se 原子の異常散乱を利用して立体構造を決定した。

#### 4. 研究成果

StlD のみを用いた酵素反応において、両アルキル鎖が縮合し脱炭酸した 2,5-dialkylcyclohexane-1,3-dione に対応する分子量のピークを酵素反応特異的に検出した。反応をスケールアップし酵素反応生成物の構造決定も行った。次に StlD の酵素反応生成物を基質とし StlC の粗酵素抽出液を用いた酵素反応に供したところ、分子量が 2 減少し芳香化が進行したと考えられるピークを酵素反応特異的に検出した。これを生産菌より単離した標品と保持時間及び MS/MS を比較することにより IPS と同定した。以上より、図 1B に示した予想生合成経路を *in vitro* の系で再構築することに成功した。

更に縮合酵素 StlD の基質特異性を調べた。まず基質 1 (図 1B) について、 $\alpha,\beta$ 不飽和カルボニル部位をジケト構造にした基質が受け入れられなかったことから  $\alpha,\beta$ 不飽和カルボニル部位が反応に必須であることが明らかとなった。また crotonyl-NAC (基質 5) や二重結合の一つが還元された基質 7 が受容された一方で基質 6 が受け入れられなかったことから、ベンゼン環は反応に必須ではないものの、 $\alpha,\beta$ 不飽和カルボニル部位とベンゼン環の距離が基質認識に重要であるという知見を得た。更に StlD はベンゼン環を他のヘテロ環(チオフェン、フラン)に変えた基質アナログ、基質 2 についてアルキル鎖長を変更したものや末端に三重結合を持つ基質アナログも受け入れた。

以上より、縮合酵素 StlD は  $\alpha,\beta$ 不飽和カルボニル部位及びジケト部位を厳密に認識する一方で、基質 1 のベンゼン環や基質 2 のアルキル鎖は反応に必須ではなく非天然型の基質を幅広く受け入れることを明らかにした。

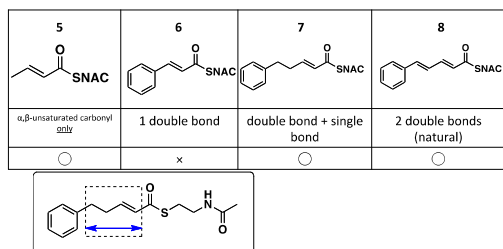


図 2. 使用した基質アナログ

結晶構造解析を行った結果、野生型が 1.8 Å、セレノメチオニン置換体が 2.3 Å の分解能で全体構造を解明することに成功した。StlD の全体構造は、他の同属酵素と同様な thiolase 構造を有していた (図 3)。



図 3. StlD の全体構造

StlD のアミノ酸配列は、*Staphylococcus aureus* の FabH (1ZOW) と 24% の相同性を示すが、Dali program を用いて三次元構造の相同性を検索したところ、StlD の全体構造は *Pseudomonas aeruginosa* の PqsD (3H76) や、*Xanthomonas campestris* の OleA (4KTI) と高い相同性を示した (rmsd. 2.2 Å)。StlD は活性中心残基として必要な 3 種のアミノ酸残基 Cys126、His302、Asn337 を有しており、その位置も他の KS と同様に保存されていた。活性キャビティの大きさは 487 Å<sup>3</sup> と予想より小さい容積を有しており、2 分子の基質を受け入れ、縮合するには不十分と考えられる。Thr96、Ile101、Glu154、Leu193、Ile262、Met 231 など、活性部位を形成するアミノ酸残基に高い残基が多く存在することで、ティの大きさを制限していた (図 4)。一方で、活性キャビティ触媒残基が存在するキャビティとは別に、酵素内部側に二量体を形成することで現れる大きなキャビティが存在していた。このような空間は他の KS には存在せず、StlD に特徴的に見られる。Apo 型の結晶構造では、この二つのキャビティはつながっておらず、Thr96、Ile101、Ile262 がこのポケットとキャビティの間に存在して道を塞いでいた。その為、基質が入ることにより構造変化が生じ、活性残基が存在するキャビティに隣接する大きなキャビティが連結し、反応を行うのに十分な大きさの活性キャビティを構成すると予想される。予想反応上、生成物を得るためには、活性中心の Cys126 に結合した中間体が水分子により切り出される必要がある。そこで、活性化された水分子の存在を探索した結果、Cys126 近傍に Ser340-Glu154-H<sub>2</sub>O の水素結合ネットワークを形成した水分子の存在が見出された (図 5)。この水素結合ネットワークにより水分子が活性化され、Cys126-中間体間のチオエステル結合の切り出しが行われると考えられる。水分子に最も近づいている酸性アミノ酸 Glu154 を Gln に変異させ

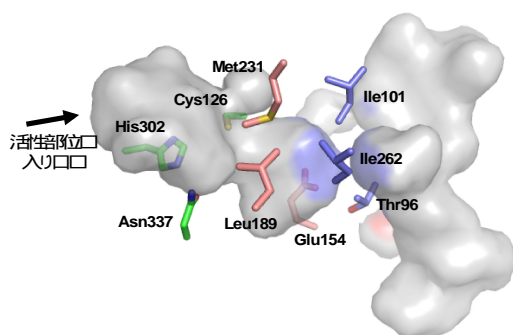


図 4. StID の活性キャビティ

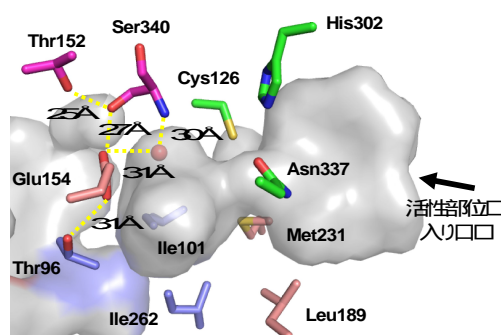


図 5. 水素結合ネットワーク

たところ、1,3-シクロヘキサジオン骨格生成能が失われ、Glu154 が水分子の活性化に重要な役割を担っていることが示唆された。

今後は、得られた結晶構造を鋳型に変異を導入することでさらに基質特異性を变化させた機能改変酵素の創出に取り組むとともに、有用物質生産が可能な機能改変酵素を大腸菌に過剰発現させ、大腸菌内での物質生産に取り組む予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

下村康一郎、森貴裕、斉藤友理、阿部郁朗、「微生物由来スチルベン合成酵素の機能解析」第 4 回生薬学会第 61 回年会、2014 年 9 月、福岡

下村康一郎、森貴裕、斉藤友理、阿部郁朗、「微生物由来スチルベン合成酵素の機能解析」第 4 回 CSJ 科学フェスタ、2014 年 10 月、東京

下村康一郎、森貴裕、斉藤友理、阿部郁朗、「微生物由来スチルベン合成酵素の機能解析」第 20 回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2014 年 11 月、東京

森貴裕、斉藤友理、下村康一郎、脇本敏幸、森田洋行、阿部郁朗、「新規ジアルキル縮合酵素の X 線結晶構造解析」第 20 回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2014 年 11 月、東京

森貴裕、斉藤友理、下村康一郎、脇本敏幸、森田洋行、阿部郁朗、「新規ジアルキル縮合酵素の X 線結晶構造解析」日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月、神戸

〔その他〕

東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室 <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

森 貴裕 (Mori, Takahiro)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60734564