

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

東京大学大学院薬学系研究科 森田 洋行



はじめに

医薬資源として重要な天然物の生合成に関わる二次代謝酵素の中には、活性部位の微妙な構造の違いで基質特異性や反応様式などが大きく変化するものがあり、これが天然物の分子多様性を生み出す大きな要因となっている。本講演では、人為的な酵素機能の制御と分子多様性創出の格好の材料ともいえる植物由来Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) をとりあげ、酵素結晶構造の解明と、それに基づく合理的な機能改変酵素の作成、および、人工基質をプローブとした非天然型化合物の創出について紹介する。

ペンタケタイドクロモン合成酵素とオクタケタイド合成酵素の結晶構造解析と酵素触媒機能の拡張

薬用植物キダチアロエ (*Aloe arborescens*) から得られたペンタケタイドクロモン合成酵素 (PCS) とオクタケタイド合成酵素 (OKS) は、これまでに例のない全く新しいタイプのⅢ型ポリケタイド合成酵素である (*JACS* 127, 1362, 2005, Abe et al., *JACS* 127, 12709, 2005) (図1)。この2つの酵素は、互いに微妙に異なる配列を有し、それぞれ5分子あるいは8分子のマロニル CoA を直接縮合して芳香族ポリケタイドを生成する。そこでまず筆者らは、PCS 野生型と、8分子のマロニル CoA 縮合能を獲得した PCS M207G 変異型の X 線結晶構造を 1.6 Å の分解能で解明し、さらに結晶構造に基づく合理的な酵素機能の改変へと研究を進めた結果、本来5分子のマロニル CoA を縮合する PCS から、トリプル変異 F80A/Y82A/M207G の導入により、マロニル CoA 9 分子縮合からなる、非天然型新規ナフトパイロンの生成に成功した (*Chem. Biol.* 14, 359, 2007, *JACS* 129, 5976, 2007)。

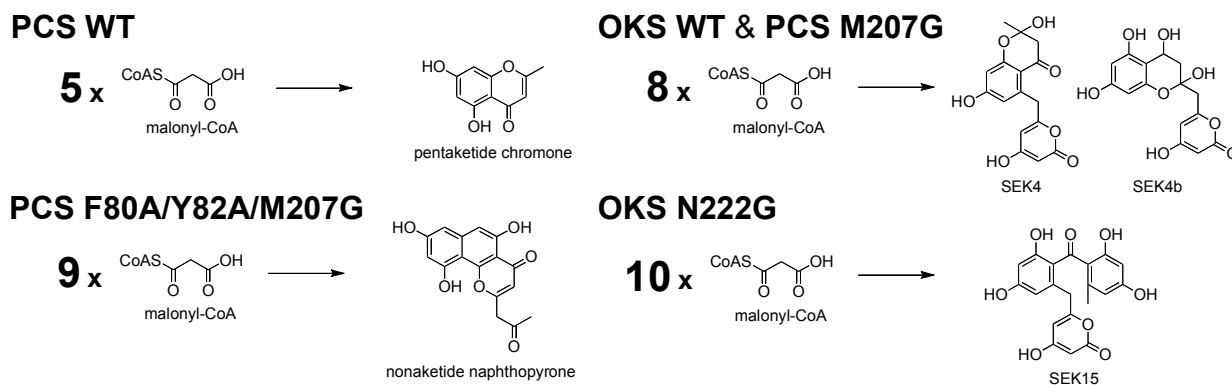


図1 ペンタケタイドクロモン合成酵素およびオクタケタイド合成酵素の反機構

一方、OKSについては、2.6 Åの分解能で、野生型酵素の結晶構造の取得に成功した。その結果、9分子以上のマロニルCoA縮合が、活性中心キャビティの下側に存在する2つのポケットの境界に位置したAsn222によって妨げられている可能性があらたに見いだされた (*Org. Lett.* 11, 551, 2009)。そこでAsn222をGlyに置換した点変異酵素を作成し、その酵素反応生成物についてLC-MSを用いて分析した結果、マロニルCoA 10分子縮合からなる非天然型ベンゾフェノン誘導体SEK15を高収率で生成することが判明した (*Org. Lett.* 11, 551, 2009) (図1)。OKS N222G変異酵素が触媒する10分子縮合は、これまで知られているⅢ型PKSでは最多である。既に筆者らは、N222G変異型の結晶構造の取得にも2.8 Åの分解能で成功しており (図2)、現在、これらの知見をもとに、さらなるOKS酵素の触媒機能の拡張を試みている。

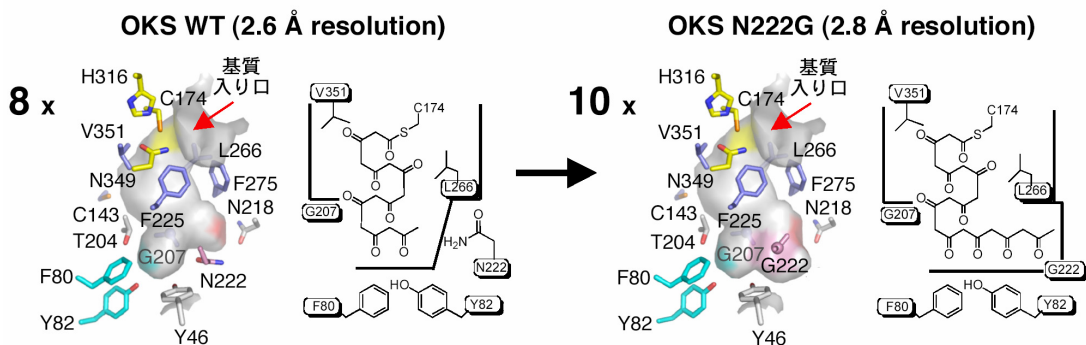


図2 オクタケタイド合成酵素とその変異型の活性中心構造と模式図

非天然型 C_{21} カルコンおよび C_{19} スチルベン骨格の構築

「鍵と鍵穴」に例えられるように、一般に酵素の基質特異性は厳密で自由度が低いものとされているが、III型 PKS が示す広範な基質特異性と潜在的触媒能力は特筆に値する。こうした特徴を利用して、筆者らは、各種合成人工基質をプローブとして酵素に作用させることにより、一連の非天然型新規化合物の生産に成功し、酵素触媒機能の拡張と新規骨格創出への展望を与えてきた (*JACS* 122, 11242, 2000). そこでOKS 野生型およびN222G 変異型に、クマロイル CoA とマロニル CoA を同時に基質として作用させた。その結果、それぞれクマロイル CoA に5分子あるいは6分子のマロニル CoA が縮合した、これまでに例のない非天然型新規 C_{21} カルコン及び C_{19} スチルベン骨格の生成に成功した (*Org. Lett.* 11, 551, 2009) (図3). また、非天然型 C_{21} カルコンの生成量は、結晶構造に基づき活性中心キャビティを拡大したN222G 変異酵素において飛躍的に増大した。現在、非天然型新規アルカロイドの創出をめざし、含窒素芳香環などを有する人工基質をプローブとした酵素反応を行っている。

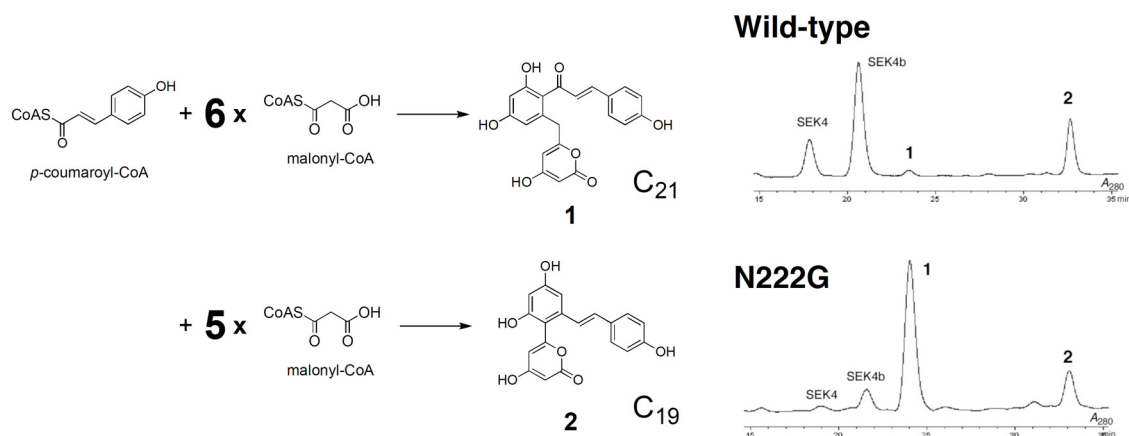


図3 オクタケタイド合成酵素と変異型による非天然型新規ポリケタイド骨格の生成

今後の展望

筆者らは結晶構造に基づく合理的な変異の導入により、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の操作にも展望を与えつつある。今後、多段階反応を触媒する III 型 PKS の酵素反応中間体あるいは中間体アナログとの複合体結晶構造解析のみならず、ドッキングシミュレーションの手法も新たに取り入れるることにより、遷移状態での時間軸を加えた四次元的な酵素反応機構の解析とさらなる酵素触媒機能の拡張に取り組んでいきたい。またプレニル基転移酵素や酸化還元酵素など、二次修飾酵素を組み合わせることにより、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にも挑戦していきたい。