

研究テーマ

植物ポリケタيد合成酵素を用いた生理活性アルカロイドの効率的酵素合成

1. はじめに

天然物の基本骨格を構築す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反応様式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の一つとなっている。一方、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、植物ポリフェノールの基本骨格を構築するIII型ポリケタيد合成酵素（PKS）が示す広範な基質特異性と触媒能力は特筆に値する^{1,2)}。これらは、反応の立体化学が厳密に制御された「精巧な酵素システム」であるとは言い難く、むしろ単純なアシル基転移の繰り返しによる「炭素鎖伸長マシン」と捉えることができる。Cys-His-Asnからなる活性中心触媒残基は、全てのIII型PKSにおいて例外なく保存されており、同一のケミストリーで、マロニルCoAの脱炭酸を伴ったClaisen縮合の繰り返しによる炭素鎖伸長反応が進行するものと考えられる。従って、こうした酵素が示す寛容な基質特異性と潜在的触媒能力を活用して、一連の人工基質を作用させることにより、非天然型新規化合物の効率的な生産が可能になる。また、C, H, O原子で構成される単純な「カルボニルの化学」を触媒するIII型PKSに、さらにNなどへテロ原子を導入した人工基質を作用させれば、N原子の塩基性を利用して新たなC-NあるいはC-C結合の形成も可能になる。反応性に富むβ-ポリケトメチレン中間体からシップ塩基の形成を介した分子内環化反応が進行して、複雑なアルカロイドの骨格を一举に効率的に構築することができれば、III型PKS酵素触媒機能の可能性をさらに大きく拡張することになると考え、本研究に着手した。

2. 方法

当研究室でクローニングに成功したトウゲシバ*Huperzia serrata*由来PKS1は、比較的大きな基質結合部位を有する新規III型PKSであり、クマロイルCoAを開始基質として3分子のマロニルCoAを順次縮合の後、カルコンを生成する（Fig. 1A）^{3,4)}。本酵素に化学合成した2-カルバモイル安息香酸のCoAチオエステルなどを開始基質として作用させ、酵素反応生成物を単離、構造決定を行った。

3. 結果

本酵素に化学合成した2-カルバモイル安息香酸のCoAチオエ斯特ルを開始基質として作用させた場合、場合、2分子のマロニルCoA（またはメチルマロニルCoA）を順次縮合の後、6-5-6縮合環構造を有する3環性非天然型新規アルカロイドを収率80%で单一生成物として与えることを見出した（Fig. 1B, 2A）。一方、これとは対照的に、後述するキダチアロエ*Aloe arborescens*由来オクタケタيد合成酵素（OKS）では、2-カルバモイル安息香酸CoAはほとんど開始基質として受け入れられず、8分子のマロニルCoAの縮合によりオクタケタードSEK4/SEK4bが主生成物として、また、2-カルバモイル安息香酸CoAに3分子のマロニルCoAが縮合したラクトンが副生成物として得られるのみであった（Fig. 2B）。

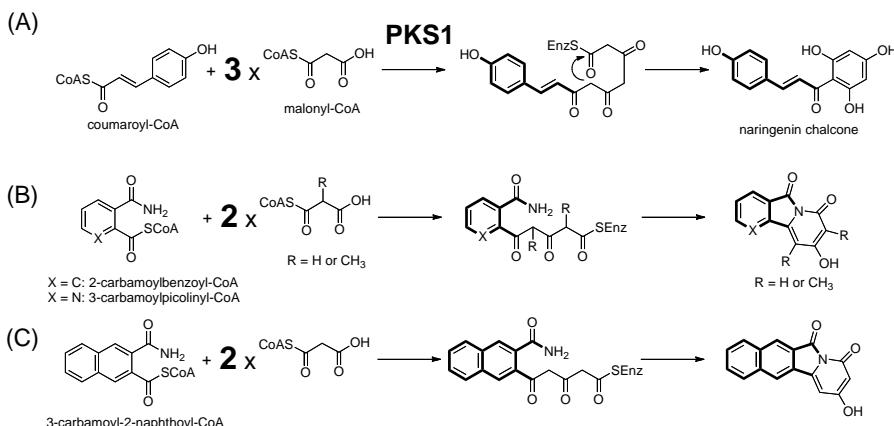


Fig. 1 *H. serrata* PKS1 が示した潜在的触媒能力と非天然型新規アルカロイド骨格の創出

次に、2-カルバモイル安息香酸CoAの芳香環を、ピリジン環やナフタレン環で置換した修飾基質を化学合成し、トウゲシバ由来PKS1に作用させた場合、同様にして、2分子のマロニルCoAを順次縮合の後、閉環反応が進行して、3環性および4環性の非天然型新規アルカロイドを高収率で单一生成物として生成することを見出した (Fig. 1B, 1C)。いずれの場合も、トリケタイド中間体へ炭素鎖伸長の後、シップ塩基の形成を介して、酵素的にC-N結合形成と閉環反応が進行するものと考えられる (Fig. 3)⁵⁾.

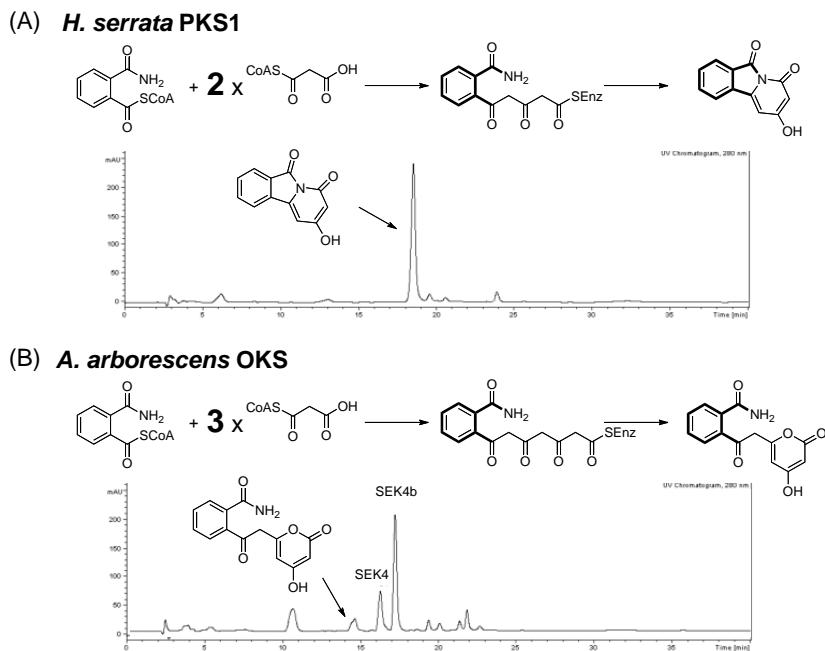


Fig. 2 *H. serrata* PKS1 と *A. arborescens* OKS との酵素反応生成物 (HPLC) の比較

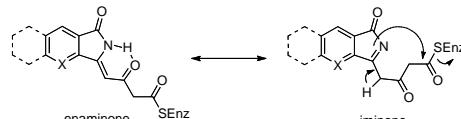


Fig. 3 予想される *H. serrata* PKS1 酵素反応トリケタイド中間体と閉環反応機構

4.まとめ

以上、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、さらなる複雑骨格を有するアルカロイド分子の創製へ挑戦したい。

5.参考文献

1. (a) 阿部郁朗, "植物ポリケタイド合成酵素の触媒機能の制御", 有機合成化学協会誌, **66**, 683 (2008).
(b) I. Abe, "Chemistry and biochemistry of type III polyketide synthases", *Nat. Prod. Rep.*, in preparation (2009).
(c) I. Abe, "Engineered biosynthesis of plant polyketides: structure-based and precursor-directed approach". *Topics in Current Chemistry*, in press (2009).
2. I. Abe, H. Morita, A. Nomura, H. Noguchi, "Substrate specificity of chalcone synthase: enzymatic formation of unnatural polyketides from synthetic cinnamoyl-CoA analogs". *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11242 (2000).
3. K. Wanibuchi, P. Zhang, T. Abe, H. Morita, T. Kohno, G. Chen, H. Noguchi, I. Abe, "An acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia serrata*", *FEBS J.*, **274**, 1073 (2007).
4. H. Morita, S. Kondo, R. Kato, K. Wanibuchi, H. Noguchi, S. Sugio, I. Abe, T. Kohno, "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of an acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia serrata*". *Acta Crystallogr.*, **F63**, 576 (2007).
5. M. Yamashita, H. Morita, H. Noguchi, I. Abe, manuscript in preparation (2009).