

創薬リード化合物の創製を指向した改変型酵素の創出

富山大学 和漢医薬学総合研究所 天然物化学分野
森田 洋行

1. はじめに

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、植物ポリフェノールの基本骨格構築を担う植物Ⅲ型ポリケチド合成酵素 (PKS) が示す寛容な基質特異性は注目に値する¹⁾。最近我々は、Ⅲ型PKSの中でも特に寛容な基質特異性を示すトウゲシバ *Huperzia serrata* 由来PKS1に、カルバモイル基を有する安息香酸とのCoAエステルをマロニルCoAとともに作用させると、2分子のマロニルCoAの縮合の後、反応性に富むβ-ポリケトメチレン中間体からシッフ塩基の形成を介した2回のC-N結合形成反応が進行して、6.5.6縮合環構造の非天然型新規ピリドイソインドールを生成することを明らかにした²⁾ (図1)。Ⅲ型PKSが2回のC-N結合形成反応を触媒したのはこれが最初である。今回我々は、そのメカニズムを解明することができれば、Ⅲ型PKSのさらなる機能の拡張と新規アルカロイド骨格の創出に繋がると考え、PKS1のX線結晶構造解析とそれに基づく変異導入実験を行った。

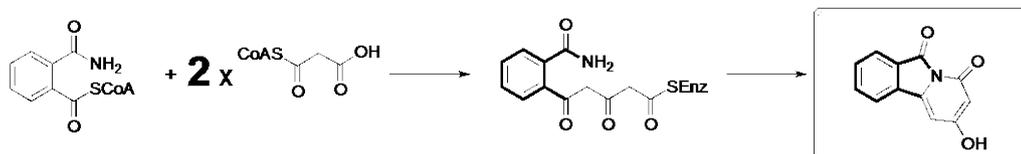


図1 PKS1 野生型による 6.5.6 ピリドイソインドール骨格の生産

2. 方法

PKS1は大腸菌に異種発現させ、3種のカラムクロマトの組み合わせにより高純度に精製した。次に蒸気拡散法により結晶を得、SPring-8にてX線回折強度の測定を行い、*Medicago sativa*由来カルコン合成酵素の結晶構造を鋳型とした分子置換法にて初期構造を得、精密化を行った。

3. 結果

トウゲシバ由来PKS1のX線結晶構造解析と非天然型新規ジベンゾアゼピンの創出

2.0 Åの分解能でPKS1の結晶構造の取得に成功した²⁾ (図2)。そこで、PKS1の活性中心キャビティの構造について精査したところ、上述の非天然型ピリ

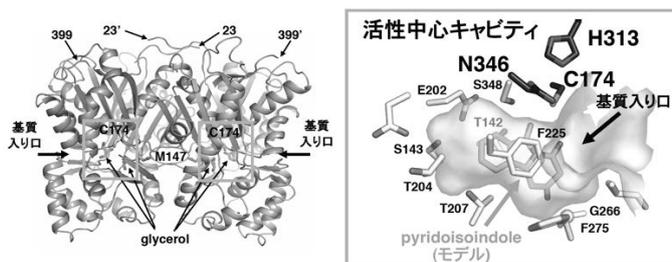


図2 PKS1の全体構造と活性中心キャビティ

ドイソインドールをおさめるのに十分な大きさと形状を有していることが確認された。本結果は、ピロイソインドール骨格の形成に至る全ての反応が、PKS1によってなされている可能性を示唆する。さらに、ピロイソインドール骨格形成に至る酵素反応中間体立体モデルを用いた結晶構造とのドッキングシミュレーションにおいては、PKS1のSer348が、マロニルCoAの縮合回数と閉環反応の制御に重要な役割を演ずる可能性が示された²⁾ (図3)。そこで、Ser348をGly, Cys, Thr, またはValに置換した点変異酵素を作成し、その酵素活性について精査した結果、PKS1のS348G変異酵素が、カルバモイル安息香酸とのCoAチオエステルに3分子のマロニルCoAを縮合の後、シッフ塩基の形成を介したC-N結合とC-C結合の形成を進行して、環拡大した6.7.6縮合環構造の非天然型新規ジベンゾアゼピンをあらたに生成することが判明した²⁾ (図4)。点変異の導入により、マロニルCoA縮合回数を増加させただけでなく、閉環反応様式を変化させたことは注目に値する。現在、さらなる酵素触媒機能の拡張と新規アルカロイドの創出が進行中である。

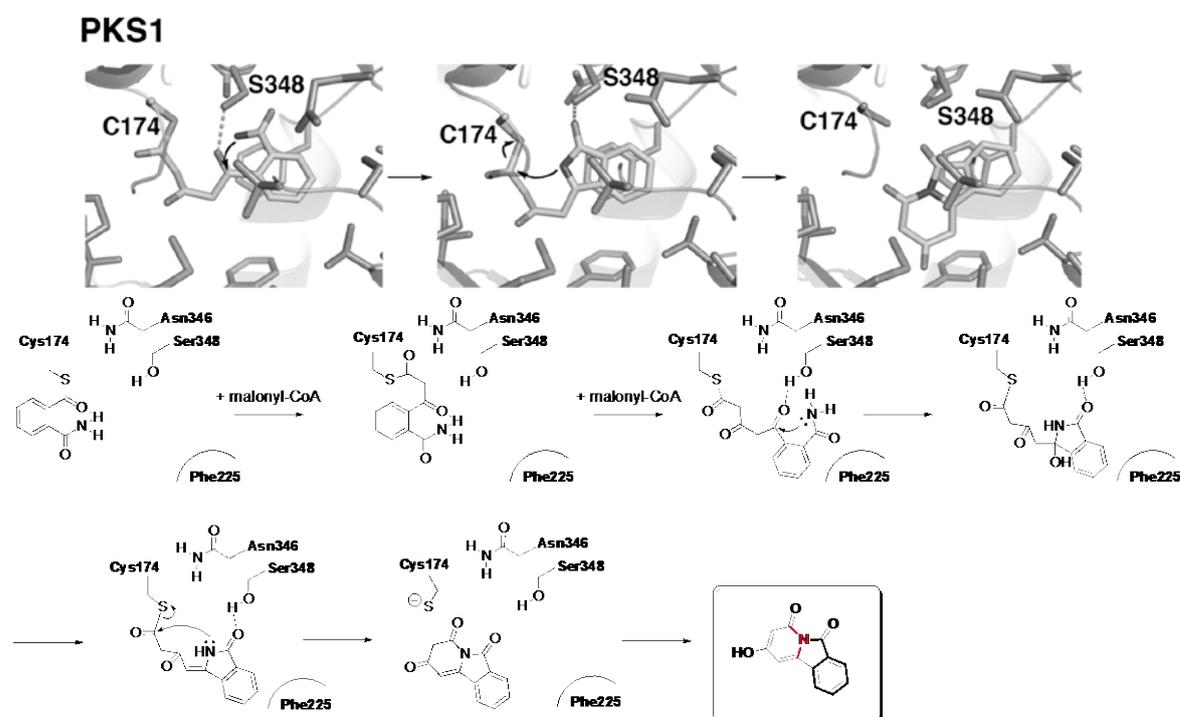


図3 PKS1 野生型による 6.5.6 ピロイソインドール骨格形成への推定酵素反応機構

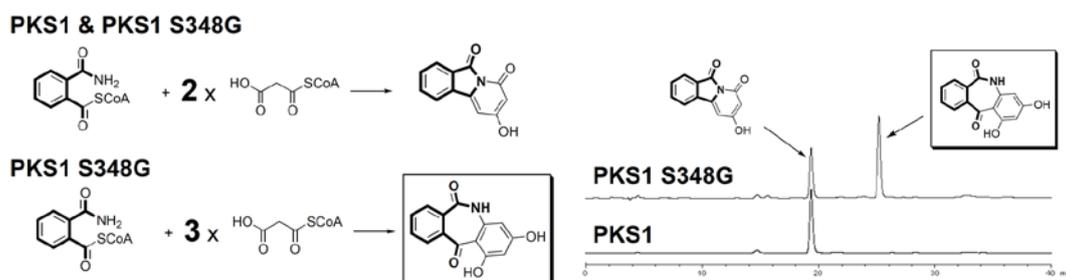


図4 PKS1 S348G 変異酵素による 6.7.6 ジベンゾアゼピン骨格の生産

インドールアクリロイルCoAを開始基質とした非天然型アルカロイド骨格の創出

Ⅲ型PKSが示す最大の特徴の一つに寛容な基質特異性が挙げられる¹⁾。そこで、さらなる新規アルカ

ロイドの創出を目指し、あらたにインドールアクリロイルCoAを調製し、これをダイオウ*Rheum palmatum*由来ベンザルアセトン合成酵素 (BAS) に開始基質として作用させ、その酵素反応生成物について解析を行った。その結果、本来、1分子の4-クマロイルCoAと1分子のマロニルCoAとの脱炭酸縮合によりベンザルアセトン骨格を生成するBASにおいては、本来と同一の反応が進行して、1分子のインドールアクリロイルCoAと1分子のマロニルCoAとの脱炭酸縮合により、インドリルブテノンを生産することが判明した(図5)。

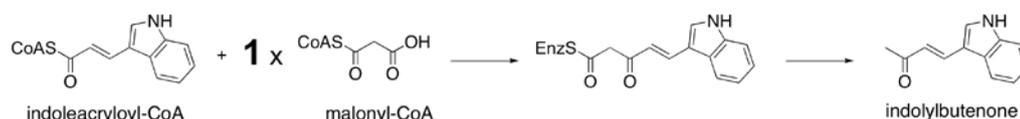


図5 BASによるインドリルブテノンの生産

近年、糸状菌*Aspergillus fumigatus*由来インドールプレニル基転移酵素 (IPT) が、Ⅲ型PKSと同様に、寛容な基質特異性を有することが明らかになってきた。プレニル化された化合物は天然有機化合物の中に多々見られるが、プレニル化はその生理活性の発現において大きな役割を果たす。そこでさらに本研究課題では、IPTの一つであるFtmPT1を取り上げ、本酵素にⅢ型PKSを用いての創出に成功したインドリルブテノンをジメチルアリルジリン酸 (DMAPP) とともに作用させ、その酵素反応生成物について解析を行った(図6)。FtmPT1は、本来、プレビアナミドFのインドール骨格の2位をジメチルアリル化することにより、トリプロスタチンBへの変換を触媒する酵素である。その結果、FtmPT1がインドリルブテノンの α, β 不飽和結合の α 位をプレニル化することが確認された³⁾。IPTが α, β 不飽和結合の α 位をプレニル化できることを示したのはこれが最初である。現在、そのメカニズムの解明を目指し、FtmPT1とインドリルブテノンとの共結晶の作成が進行中である。

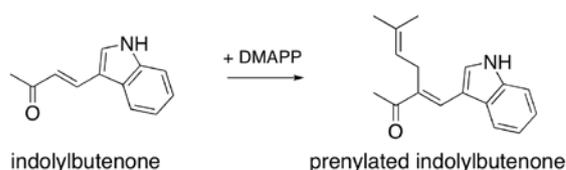


図6 FtmPT 1によるプレニル化インドリルブテノンの生産

4. まとめ

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。一方、その閉環反応メカニズムについては未だ不明な点が多いのが現状である。今後、蛋白質のX線回折法に加え、溶液NMRの手法も取り入れ、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、IPT等の寛容な基質特異性を示す修飾酵素も組み合わせ、さらなる非天然型新規生理活性分子の創製に挑戦したい。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Abe, I., Morita, H., *Nat. Prod. Rep.* **27**, 809 (2010).
- 2) Morita, H., Yamasita, M., Shi, S. -P., Wakimoto, T., Kondo, S., Kato, R., Sugio, S., Kohno, T., Abe, I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13504 (2011).
- 3) Chen, J., Morita, H., Wakimoto, T., Mori, T., Noguchi, H., Abe, I., *Org. Lett.* **14**, 3083 (2012).