

# 植物ポリケタイド合成酵素へのアミノ酸欠損変異の導入

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

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であっても、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って、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、我々は、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<sup>1)</sup>。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<sup>2,3)</sup>（図1）。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が既にタンパク質表面近くにまで及んでおり、そのため、活性中心キャビティ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。そこで、本研究では、想を新たに、Ⅲ型PKSの活性中心キャビティ構成アミノ酸残基を欠損させ、従来とは異なった形状変化をキャビティ構造に施すことにより、非天然型新規ポリケタイドやアルカロイドの創出を目指した。

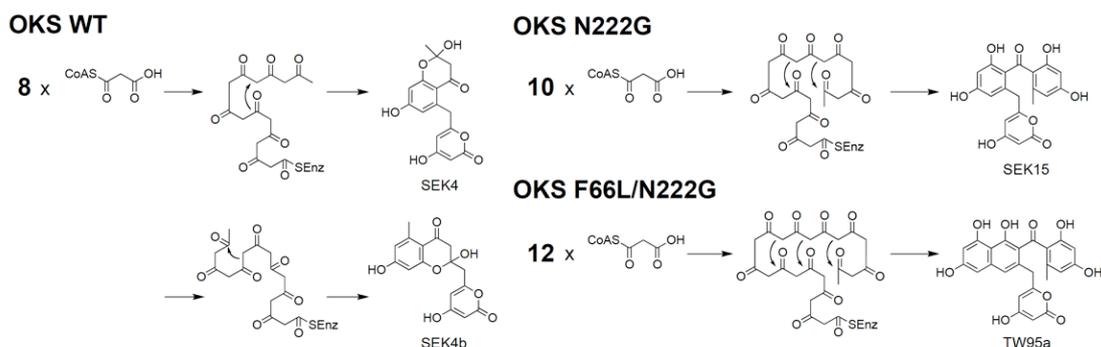


図1. OKSの部位特異的変異導入によるマロニルCoA縮合回数拡大

## 2. 方法

これまでの我々の機能改変実験において、特に知見が蓄積されているOKSの活性中心キャビティ

構成アミノ酸Val351を欠損させた変異酵素、及びThe204, Ile205, Ile206を単独または同時に欠損させた変異酵素をPCR法にて作成した。次に、これらの変異酵素を大腸菌に異種発現させ精製した後、マロニルCoA単独、またはクマロイルCoA等の芳香族CoAやヘキサノイルCoA等の脂肪族CoAのいずれかとマロニルCoAを同時に作用させ、酵素反応生成物についてLC-MSを用いて解析を行った。

### 3. 結果

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生成するマロニル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 (図 2 A)。他の芳香族CoAを開始基質とした場合でも同一の化合物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)、C<sub>16</sub>レゾルシノール、及びC<sub>18</sub>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<sup>2)</sup>、OKSのVal351欠損変異酵素では、HTKL、C<sub>16</sub>レゾルシノール、C<sub>18</sub>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 (図 2 B)。他の脂肪族CoA (炭素数 8~12) を開始基質としても同様に、OKS野生型がSEK4やSEK4bとともに生産する脂肪族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特異的に生産することが示された (図 2 C)。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族CoAに特化したことが示唆された。そこでさらに我々は、Ser352をVal351と同時に欠損させたOKSの2重欠損変異酵素を作成した。しかし、この場合では、脂肪族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、脂肪族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が、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ず、OKSへの本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。

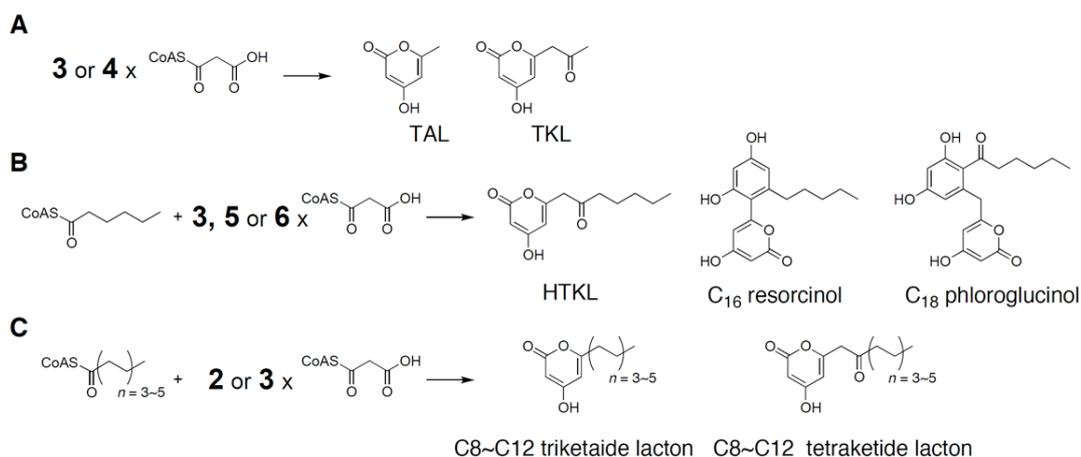


図 2. OKSのVal351欠損変異酵素の反応生成物

OKSのV351欠損変異酵素の活性中心キャビティの形状と容積に関する情報は、Ⅲ型PKSにさらに変異を導入し、機能改変を進めていく上で貴重な情報となり得る。そこで、本変異酵素のX線結晶構造解析を行った結果、V351欠損変異の導入により、活性中心Cys残基近傍でキャビティが拡大し、これにより、開始基質に対する基質特異性が脂肪族CoAに特化した可能性が示された。現在、これまでに得た知見をもとに、OKSのVar351欠損変異酵素にさらなる置換型及び欠損型変異の導入が進行中である。

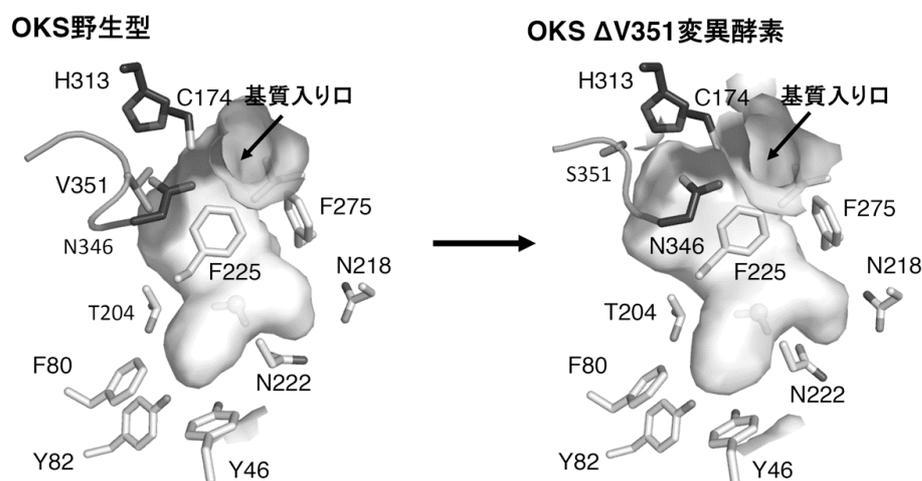


図3. OKSとそのVal351欠損変異酵素の活性中心キャビティの比較

#### 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。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が得られてきた。今後、今回得た知見を参考に、機能の異なる他のⅢ型PKSについても欠損変異を導入し、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) Shi, S., Wanibuchi, K., Morita, H., Endo, K., Noguchi, H., Abe, I., *Org. Lett.*, **11**, 551 (2009).
- 3) Wanibuchi, H., Endo, K., Noguchi, H., Abe, I., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 2083 (2011).