



東京工業大学理学院 宮 永 顕 正

ポリケタイド化合物の分子多様性を生み出す生合成酵素の構造機能研究

はじめに

微生物が生産するポリケタイド化合物は多様な化学構造と生物活性を有しており、医薬品や抗生物質として利用されている。その生合成反応においては、ポリケタイド合成酵素 (PKS) が開始基質となるアシル基に伸張基質を縮合することにより炭素鎖が伸長し、生じたポリケタイド中間体が環化することにより、ポリケタイド化合物の炭素骨格が構築される。PKS が用いる開始基質・伸張基質の違いやポリケタイド中間体の環化様式の違いにより、ポリケタイド骨格の構造多様性が生み出されている。微生物は多様なポリケタイド化合物を生産するために、開始基質の構築や選択に関わる酵素、環化反応に関わる酵素などをそれぞれ進化させてきた。これらポリケタイド生合成に関わる酵素群の機能や構造を明らかにすることができれば、その情報を基に人為的に生合成酵素の改変を行うことにより有用な活性を示す非天然型ポリケタイド化合物の創製など、応用に結びつけることができると考えられる。我々は、ポリケタイド生合成に関わる酵素の構造機能解析に取り組み、多くの重要な知見を得た。以下に研究内容の概要を紹介する。

1. マクロラクタム化合物生合成酵素の構造機能解析

放線菌によって生産されるマクロラクタム化合物は、環状アミド構造を有するポリケタイド化合物であり、独特な抗菌性や抗腫瘍活性を示す。その生合成においては、様々な β -アミノ酸が開始基質として利用され、構造多様性が生み出されている。

Streptomyces halstedii HC34株が生産する vicienistatin は、20員環マクロラクタム配糖体抗生物質であり、ヒト大腸がん細胞に強い細胞毒性を示す。vicienistatin のポリケタイド骨格には、 β -アミノ酸である 3-アミノイソブタン酸部位が含まれて

いる (図1)。我々は、この 3-アミノイソブタン酸部位の構築機構を明らかにするために、鍵となる酵素群の構造機能解析を行った。まず、vicienistatin 生合成において開始基質を選別する役割をしているアデニル化酵素 VinN の結晶構造解析を行った。VinN と基質である 3-メチルアスパラギン酸との複合体構造を決定し、また部位特異的変異解析を行うことにより、アデニル化酵素による β -アミノ酸の認識機構を初めて明らかにした。vicienistatin の生合成では、ポリケタイド鎖伸長反応中における非酵素的な環化反応を防ぐため、 β -アミノ酸の β -アミノ基はアラニル化された状態で I 型 PKS へと受け渡される。その受け渡し反応を触媒するアシル基転移酵素 VinK の結晶構造を決定し、VinK がアラニル化されたジペプチド体のみを基質として選択的に認識する機構を明らかにした。さらに、このアラニル基の除去を担うアミド加水分解酵素 VinJ の構造機能解析を行い、ポリケタイド鎖が十分に伸長した後にアラニル基が除去されることを明らかにした。このように、VinK と VinJ は β -アミノ基の保護と脱保護のタイミングを制御するための厳密な基質特異性を有することが明らかになった。

また、vicienistatin とは異なる β -アミノ酸を開始基質部位に有するマクロラクタム化合物の生合成研究を行った。hitachimycin や fluvirucin B₂ の生合成遺伝子クラスターを同定し、生合成経路を明らかにした。これまでに明らかにしたマクロラクタム化合物の生合成酵素群を比較したところ、保護と脱保護に関わる酵素などは高度に保存されており、共通的な β -アミノ酸運搬機構が示唆された。一方で、 β -アミノ酸の選択的認識を担う VinN 型アデニル化酵素のアミノ酸配列には違いが見られ、これにより各生合成経路に特徴的な β -アミノ酸基質が選択されていると考えられた。

2. ポリケタイド生合成におけるアシルキャリアータンパク質認識機構の解析

ポリケタイド生合成において、アシル基転移酵素は開始基質や伸張基質を適切なアシルキャリアータンパク質 (ACP) へと受け渡すために、ACP を厳密に認識していると考えられている。すなわち、アシル基転移酵素と ACP の間のタンパク質間相互作用は重要であり、ポリケタイド化合物の構成単位となるアシル基の種類を決定付けている。しかし、これらの間のタンパク質間相互作用は一時的で弱く、複合体の構造解析が難しいため、これまでにアシル基転移酵素による ACP の認識機構は不明であった。そこで、我々は、vicienistatin の生合成に関わるアシル基転移酵素 VinK を対象に ACP である VinL との複合体の構造解析を行った。まず、VinK と VinL を混合して結晶化を行ったが、共結晶は得られなかった。そこで、共結晶化に適した安定な複合体を形成させるために 1,2-ビスマレイミドエタンを用いたクロスリンク反応を開発した。このクロスリンク反応により調製した VinK と VinL の複合体を用いて結晶化を

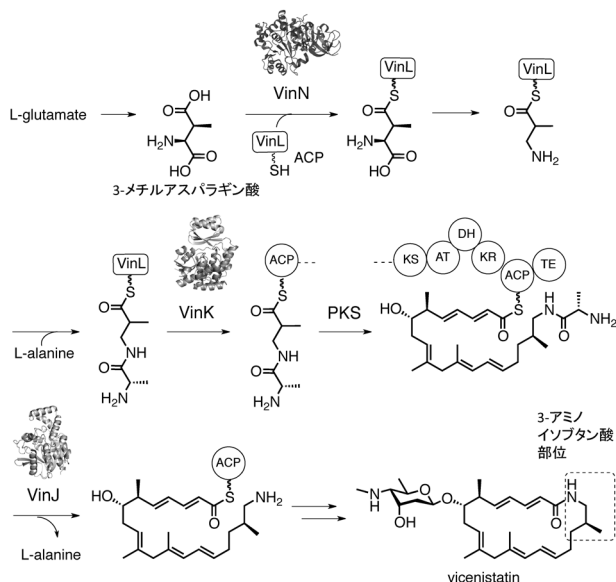


図1 vicienistatin の生合成機構

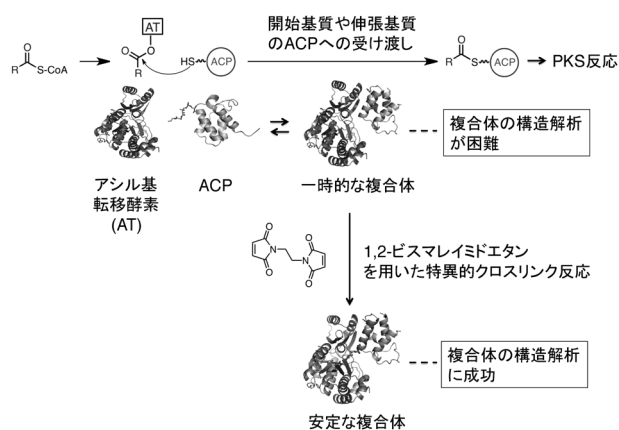


図2 アシル基転移酵素と ACP の複合体の構造解析

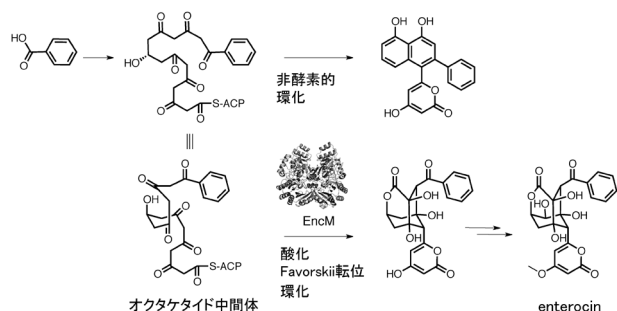


図3 enterocin の生合成機構

行ったところ、共結晶が得られ、VinK と VinL の複合体の結晶構造を決定することに成功した (図2)。これによりアシル基転移酵素による ACP の認識機構が初めて明らかになった。

3. ポリケタイド生合成における環化反応の解析

ポリケタイド生合成においては、PKS によりポリケタイド中間体が生成された後に、環化反応を行う酵素により様々な環構造を持つ化合物へと作り分けられる。環化酵素の改変により、別の骨格構造を持つ化合物を創出できる可能性があるため、環化反応の機構を理解することは重要である。環化酵素が不安定なポリケタイド中間体をどのように適切に制御して環化反応を行っているかを理解するため、芳香族ポリケタイド化合物の生合成に関わる環化反応に注目して研究を行った。

海洋放線菌 *Streptomyces maritimus* が生産する抗生物質 enterocin は、独特なかご状骨格構造を持つポリケタイド化合物である (図3)。その骨格構造形成にフラビン酵素 EncM が関わることが報告されていたが、その詳細な反応機構は不明であった。EncM の結晶構造解析を行った結果、EncM はフラビン活性中心へとつながる細長いトンネルを有していたことから、II 型 PKS 産物であるオクタケタイド中間体を直鎖の状態で結合させ反応を触媒することが示唆された。また、合成基質アナログを用いた解析から、EncM が酸化反応と Favorskii 転位反応を触媒することにより、独特な骨格構造形成へと導いていることを明らかにした。これは酵素的に Favorskii 転位が起こることを示した初めての例である。さらに、EncM の反応を詳細に解析した結果、新規な活性種であるフラビン-N5-オキシド体が反応に関わることも明らかにした。

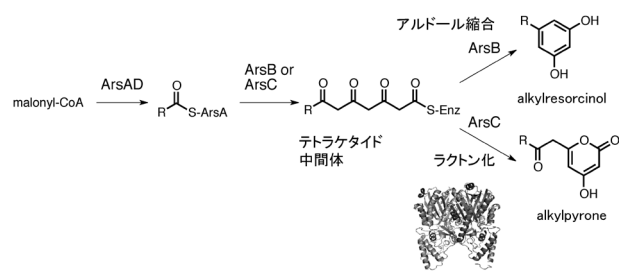


図4 フェノール性脂質の生合成機構

窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* において、III 型 PKS である ArsB と ArsC はそれぞれ異なる環化反応を触媒することにより、フェノール性脂質である alkylresorcinol と alkylpyrone を生産する (図4)。この異なる環化反応の要因を明らかにするため、ArsB と ArsC の結晶構造解析と部位特異的変異解析を行った。その結果、ArsB と ArsC の活性中心近傍に存在する 1 アミノ酸残基が環化反応の様式を制御していることを明らかにすると共に、変異導入によりその活性を入れ替えることにも成功した。また、ArsB と ArsC は、脂肪酸合成酵素 ArsA の ACP ドメインからアシル基を開始基質として直接受け取ることを明らかにした。これは III 型 PKS が ACP に結合した開始基質を利用することを実験的に示した初めての例である。

おわりに

本研究では、ポリケタイド生合成に関わる酵素群について、構造機能解析を行い、これらの酵素の反応機構や基質認識機構を解明してきた。明らかにした結果は、ポリケタイド生合成機構に関する理解を深めただけでなく、非天然型ポリケタイド化合物生産系を構築するための基盤となると考えられる。微生物は新規な反応を触媒する酵素の宝庫であり、今後もこれらの酵素の反応機構の解析に取り組んでいきたいと考えている。

謝 辞 本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科、カリフォルニア大学サンディエゴ校スクリプス海洋研究所、東京工業大学理学院で行われたものです。研究を行う機会を与えていただき、ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学教授・(故)堀之内末治先生、同大学教授・大西康夫先生、静岡県立大学准教授・鮎信学先生、カリフォルニア大学サンディエゴ校教授・Bradley S. Moore 先生、東京工業大学教授・江口正先生、同大学准教授・工藤史貴先生に深甚なる感謝の意を表します。また、酵素学と結晶構造解析の基礎を教えてくださいました東京大学名誉教授・祥雲弘文先生、同教授・若木高善先生、同教授・伏信進矢先生、東京理科大学教授・田口速男先生に心より御礼申し上げます。また、本研究は、多くの方々のご助言、ご協力なくしてはなしえませんでした。ここにすべての方のお名前を挙げることはできませんが、皆様に深く感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・西村敏英先生 (日本獣医生命科学大学) に厚く御礼申し上げます。