# アロエの美白成分クロモン類の生合成研究

東京大学大学院薬学系研究科

# 阿部郁朗

Octaketide synthase (OKS) from *Aloe arborescens* is a plant-specific type III polyketide synthase (PKS) that catalyzes iterative condensations of eight molecules of malonyl-CoA to produce the C<sub>16</sub> aromatic octaketides SEK4 and SEK4b. On the basis of the crystal structures of OKS, the F66L/N222G double mutant was constructed and shown to produce an unnatural dodecaketide TW95a by sequential condensations of twelve molecules of malonyl-CoA. The C<sub>24</sub> naphthophenone TW95a is a product of the minimal type II PKS, and is structurally related to the C<sub>20</sub> decaketide benzophenone SEK15, the product of the OKS N222G point mutant. The C<sub>24</sub> dodecaketide naphthophenone TW95a is the first and the longest polyketide scaffold generated by a structurally simple type III PKS. A homology model predicted that the active-site cavity volume of the F66L/N222G mutant is increased to 748 Å<sup>3</sup>, from 652 Å<sup>3</sup> of the wild-type OKS. The structure-based engineering thus greatly expanded the catalytic repertoire of the simple type III PKS to further produce larger and more complex polyketide molecules.

# 1. 緒 言

多彩な生理活性と構造多様性を有する植物ポリフェノー ルは、医薬品原料や健康食品以外にも、美肌、シミ抑制効 果など化粧品原料としても重要な天然資源である。特に静 岡県特産の薬用植物であるアロエに含まれるクロモン類に は、抗炎症や抗アレルギー作用に加えて、メラニン色素生 産の原因となる酵素チロシナーゼの阻害活性やメラノサイ トそのものの増殖抑制によるシミの生成抑制効果などが報 告され注目を集めている。筆者は、長年にわたり植物ポリ フェノールの生合成と生理活性に関する研究に従事してき たが<sup>1,2)</sup>、最近、アロエよりペンタケタイドクロモン合成 酵素やアロエソン合成酵素など、アロエクロモン類の生合 成に関わる数種の酵素遺伝子のクローニングに世界に先駆 けて成功した<sup>3,4)</sup>。これにより、多様な骨格を有し薬用成 分として著名な植物ポリフェノールの生合成に、一連の植 物ポリケタイド合成酵素スーパーファミリーが広く関与す ることを明らかにし、これまで関連性が考えられなかった 植物二次代謝産物の生合成に統一的な視点を与えた。また、 これら酵素の部位特異的変異実験の結果から、基質及び生 成物特異性を決定する活性中心アミノ酸残基を同定し、さ らに、X線結晶構造解析及び分子モデリングの結果に基づ 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 酵素触媒機能の拡張にも展望を開きつつある<sup>5.6)</sup>。

本研究では、こうした一連の研究成果を踏まえ、人為的



Engineered biosynthesis of Aloe chromones

Ikuro Abe

The University of Tokyo Graduate School of Pharmaceutical Sciences

な酵素機能の制御と分子多様性創出の格好のモデルともい える、薬用植物キダチアロエ由来オクタケタイド合成酵素 をとりあげ、酵素結晶構造に基づく合理的な部位特異的変 異の導入により、酵素触媒機能のさらなる拡張と非天然型 新規化合物の創出をめざした<sup>7)</sup>。

## 2. 実験

薬用植物のキダチアロエ (Aloe arborescens) からクロー ニングに成功した、オクタケタイド合成酵素 (OKS) は、 8分子のマロニルCoAの縮合により芳香族オクタケタイ ドの骨格を構築する新規Ⅲ型ポリケタイド合成酵素(PKS) である (Fig. 1A, Fig. 2A)<sup>4)</sup>。これまでに大腸菌において 異種発現した組み替え酵素を用いて、OKSの活性中心キ ャビティを構成するGly207への部位特異的変異の導入に より、マロニルCoA縮合数と生成物特異性が決定される ことを明らかにした<sup>4)</sup>。またOKSとアミノ酸レベルで92% 相同性を示し、本来5分子のマロニルCoAの縮合反応を 触媒する、キダチアロエ由来ペンタケタイドクロモン合成 酵素 (PCS) についても、活性中心キャビティを構成する アミノ酸残基への点変異M207G、及び、結晶構造に基づ くトリプル変異F80A/Y82A/M207Gの導入により、マロ ニルCoAの縮合数をそれぞれ8分子、及び、9分子まで伸 長することに成功している<sup>5,6)</sup>。

そこで本来8分子のマロニルCoAを縮合するOKSについても、PCSの場合と同様に、X線結晶構造解析、そして、結晶構造に基づく合理的な酵素機能の改変へと研究を展開した<sup>77</sup>。まず、Cysを起点としてポリケタイド鎖が伸張していく際に壁となるAsn222にランダムミューテーションを導入した結果、Gly置換体でマロニルCoA縮合数が10分子まで拡大して、非天然型デカケタイド・ベンゾフェノン化合物SEK15を単一生成物として与えることを見出した(Fig. 1B, Fig. 2B)。また、X線結晶構造解析の結果、

変異の導入によってCAVが実際に拡大することも確認し た。このように、合理的な部位特異的変異導入により酵素 機能が拡大し最大で10分子のマロニルCoAの縮合が可能 となった<sup>7)</sup>。そこで今回、更なるポリケタイド鎖長の増大 による新規ポリケタイドの創出を目的としてX線結晶構 造に基づく部位特異的変異導入を行った。即ち、Asn222 近傍に位置するF66残基にも同時に変異を導入したF66L/ N222G二重変異酵素を設計した。大腸菌において異種発 現、精製した組み替え酵素を用いて、この部位特異的変異 の導入が酵素活性に与える影響を精査した<sup>70</sup>。

# 3. 結果

本来8分子のマロニルCoAの縮合により芳香族オクタ ケタイドの骨格を構築する新規Ⅲ型PKSである。本来8 分子のマロニルCoAを縮合するキダチアロエ由来OKSに ついて、X線結晶構造解析に基づく合理的な酵素機能の改 変へと研究を展開した。その結果、Cysを起点としてポリ ケタイド鎖が伸張していく際にキャビティの壁となる Phe66とAsn222に同時に変異を導入した二重変異酵素 F66L/N222Gが、マロニルCoA縮合数を12分子まで拡大 して、非天然型ドデカデカケタイド・ナフトフェノンTW95a を高収率で生成することを見出した(Fig. 1C, Fig. 2C)<sup>7)</sup>。 炭素数24からなる非天然型ナフトフェノンTW95aは、単 純な構造をもつⅢ型PKSが生産するポリケタイドの中で、 炭素鎖長が最大であり、しかも興味深いことに、上述した 非天然型デカケタイド・ベンゾフェノン化合物SEK15と 構造類似性を示す。また、酵素反応のキネティクスを比較 した場合、野生型酵素と比較して顕著な活性の低下は認め られなかった<sup>7)</sup>。一方、二重変異酵素F66L/N222Gについ て、結晶構造に基づくホモロジーモデルを構築したところ、 活性中心キャビティの大きさが、野生型酵素の652 Å<sup>3</sup>か ら、748 Å<sup>3</sup>に拡大していることが予想された (Fig. 3) <sup>7)</sup>。

以上、筆者らは、この特異な酵素の立体構造を基盤とし て、酵素活性中心構造を解明し、さらに結晶構造に基づく 合理的な部位特異的変異の導入により、C<sub>2</sub>単位縮合数の 拡大、非天然型炭素-炭素結合の形成、芳香環縮合系の構 築など、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の操作に も展望を開いた。即ち、本研究により、ポリケタイド鎖長 及び生成物特異性を決定する活性中心アミノ酸残基を明ら かにし、活性中心キャビティの大きさと形状に応じて、マ ロニルCoA縮合数の人為的な制御が可能であることを示 した。一連の生理活性二次代謝産物の基本骨格構築におい て決定的な役割を演ずるⅢ型PKSの酵素触媒機能の人為 的な制御にむけて大きな前進といえる。今後の課題として、



Figure 1 Proposed mechanism for the formation of (A) SEK4 and SEK4b by the wild-type OKS, (B) SEK 15 by the N222G mutant OKS, and (C) TW95a by the F66L/N222G mutant OKS.



Figure 2 HPLC elution profiles of the enzyme reaction products of (A) the wild-type OKS, (B) the N222G mutant OKS, and (C) the F66L/N222G mutant OKS.

酵素反応基質やポリケタイド鎖長の制御に加えて、閉環・ 芳香環形成反応機構の解明と人為的な制御にも挑戦してい きたい。進化分子工学などの手法を取り入れた変異酵素の 触媒活性の最適化や、遺伝子導入による新機能賦与生物の 作出など、非天然型新規化合物の生産効率の向上と実用に 供する有用物質生産系の構築についても検討を加えたい。

### 4. 考察

植物PKS酵素が示す最大の特徴の一つに、その広範な 基質特異性と触媒ポテンシャルが挙げられる。Ⅲ型PKS の反応は、立体化学が厳密に制御された精巧な酵素システ ムとは言い難く、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」と捉えるのが適当かもしれない (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 リーで炭素鎖伸長反応が進行する)。従って、こうした性 質を利用して、一連の人工基質を作用させることにより、 効率的な化合物ライブラリーの構築が可能になる。一方、 炭素、水素、酸素原子で構成される、単純なカルボニルの 化学を触媒するⅢ型PKSに、さらに窒素などヘテロ原子 を導入した人工基質を作用させれば、窒素原子の塩基性を 利用した新たな炭素-炭素結合の形成も可能になる。 Robinsonのトロピノン合成やHeathcockのユズリハアル カロイドの化学合成にみられるように、ポリケトメチレン 鎖からシッフ塩基の形成を介した分子内環化反応が連続的 に進行して、複雑なアルカロイドの骨格を一挙に効率的に 構築することができれば、Ⅲ型PKSの酵素触媒機能の可 能性をさらに大きく拡張することになる。

上述したように、Ⅲ型PKSは人為的な酵素機能の制御 と分子多様性創出の格好のモデルと言える。X線結晶構造



Figure 3 Surface and schematic representations of the active-site architectures of the wild-type and mutant OKSs. Crystal structure of (A) the wild-type OKS, and (B) the N222G mutant OKS, and homology model of (C) the F66L/N222G mutant OKS. The substrate entrances are indicated with arrows. The bottoms of the active-site are indicated by purple surfaces. The Cys-His-Asn catalytic triads are shown as yellow stick models. The mutated residues Asn222 (Gly222) and Phe66 (Leu66) are highlighted as blue and purple stick models, respectively.

解析に基づく合理的な変異の導入により、C₂単位縮合数 の拡大、非天然型炭素-炭素結合や炭素-窒素結合の形成、 また、芳香環縮合系の構築など、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開きつつあるが、今後は ポリケタイド鎖長をどこまで伸ばせるか、また、閉環反応 の様式をいかに制御するかといった点が課題になる。結晶 構造解析に基づけば、少なくともマロニルCoA16分子程 度の縮合は可能であるものと予想される。一方、閉環・芳 香環形成反応の制御に関しては、今回OKS二重変異酵素 が、ナフトフェノン骨格の合成能を新たに獲得した結果が ヒントになる。アンスロンやアンスラキノン骨格の形成など、 Ⅲ型PKS酵素触媒機能のさらなる拡張と、新規触媒活性 を有するスーパー生体触媒の創出に引き続き挑戦したい。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援をいただきましたコ スメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

#### (参考文献)

1) Abe I, Morita H, :Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases, Nat. Prod. Rep., 27, 809-838, 2010.

- 2) Abe I., :Engineered biosynthesis of plant polyketides: structure-based and precursor-directed approach, Top. Curr. Chem., 297, 45-66, 2010.
- 3) Abe I, Utsumi Y, Oguro S, et al., :A plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone, J. Am. Chem. Soc., 127, 1362-1363, 2005.
- 4) Abe I, Oguro S, Utsumi Y, et al., :Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketide synthase, J. Am. Chem. Soc., 127, 12709-12716, 2005.
- 5) Morita H, Kondo S, Oguro S, et al., :Structural insight into chain-length control and product specificity of pentaketide chromone synthase from Aloe arborescens, Chem. Biol., 14, 359-369, 2007.
- 6) Abe I, Morita H, Oguro S, et al., :Structure-based engineering of a plant type III polyketide synthase: formation of an unnatural nonaketide naphthopyron, J. Am. Chem. Soc. 129, 5976-5980, 2007.
- 7) Wanibuchi K, Morita H, Noguchi H, Abe I, Enzymatic formation of an aromatic dodecaketide by engineered plant polyketide synthase, Bioorg. Med. Chem. Lett., 21, 2083-2086, 2011.