序論

■ 成果

■ 展望

研究領域2

題のあることが顕在化している。

植物の遺伝子情報を利用した新機能タンパクの作出 Generating an Array of Novel Compounds by the Engineered Type III Polyketide Synthase

野口 博司 Hiroshi NOGUCHI

医薬品資源を高等植物に負っていることは、全処方中25%以上

の医薬品は高等植物成分を含んでいるという事実の示す通りであ

る。在来高等植物成分の多くは既に探索され尽くしたとする説もあっ

たが、微量で精査を免れていたものの少ないことが却って明らかに

なりつつある。高等植物成分は近未来において医薬品をはじめとす

る有用物質の探索源・供給源として最も有望視されるケミカルプール

であることは疑う余地はないが、未開拓生物資源を探索する従来型

のアプローチには、探索労力の割にヒット数が減少するなど様々な問

天然物の構造多様性を創出する生合成鍵反応を担う酵素の生物

高等植物の成分の中でも最も特徴的とされてきたフラボノイドの骨

格構築酵素として知られ、現在はIII型ポリケチド合成酵素(PKS)

の一つに分類されるカルコン合成酵素(CHS)とそのホモログに焦点

を絞り検討を開始した。先ずカルコンを生合成するCHS(プロトタイプ

CHS)に、非生理的基質と鎖伸長単位のマロニルCoAを与えると芳

香環を形成し新規化合物の生じることを示した。同様に実験を実施

すると、スチルベン合成酵素を含めた各種III型PKSは多様な基質

を受容し多様な新規化合物を産生することが判明した。次にフラボ

ノイドやスチルベンのみならずナフタレン・アントラセン誘導体を生成す

るダイオウのIII型PKS遺伝子を探索したところ、生姜などショウガ科

の成分やラズベリーの香気成分であるC6-C4型の化合物を与える

III型PKS遺伝子の単離に成功した。本遺伝子による形質転換シロ

イヌナズナについて成分研究と環境への影響も検討した。ダイオウや

アロエよりアセチルCoAあるいはマロニルCoAを開始基質として6つ

のマロニルCoAを縮合し、芳香環を与えるPKS(アロエソン合成酵

素ALS)を手始めとして、それらの植物種内の遺伝子ファミリーの

コードする酵素の触媒機能を検討し、X線結晶解析データのあるム

ラサキウマゴヤシの典型的PKS、CHSIIにおいてはアミノ酸残基番

号で197番目に相当するアミノ酸残基の種類がポリケトメチレン鎖長

の制御に関わり、338番目に相当するアミノ酸残基が開始基質の大

きさを決定している可能性を示した。アロエからは2メチルクロモンを

生合成するPKS遺伝子(PCS)の単離と、8つのマロニルCoA縮合し

て形式的にはオクタケチド、即ちセンノシドやバルバロインと基本的に

は同様の大きさのポリケチドを生合成するPKS遺伝子(OKS)を得、

組換え酵素体において、酵素機能の変換とこれまで知られていな

III型PKSについては、このファミリーが果たしてナフタレンの様な

縮合環系や、フタリド類の生合成にも関わっているのかどうか、あるい

はアクリドン以外のアルカロイドのポリケチド由来部分の生合成に関

わっているのかを明らかにすることが今後の一つの課題である。これ

までの検討から、生物多様性に依拠した情報に基づく、則ちバイオイ

ンフォマティクスに基づくとも言い得るが、合理的なアミノ酸残基の置

換により生成物特異性の異なる合成酵素をデザインし、基質の分子

設計と組み合わせて新規骨格の作出が可能となった。そしてこのよ

うな酵素をコードする遺伝子を植物に導入することにより、高効率か

つ環境に易しい新規化合物ライブラリー作成が実現するであろう。

かった12個の縮合数を達成できる組換え酵素体の確保ができた。

多様性に基づく機能多様性を、組換え酵素の考案あるいは人工基質

の適用によって拡大し、新規化合物ライブラリーが構築できると考えた。

薬学研究科薬学専攻牛薬学教室 教授

Professor, Laboratory of Pharmacognosy, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka



Profile

2004年

1994年

1985年

1979年

1977年

静岡県立大学薬学研究科長

米国ロードアイランド州プロビデンス、ブラウン大学化学科博士研究員

カナダ国アルバータ州エドモントン、アルバータ州立大学化学科博士研究員

1995年 静岡県立大学薬学部教授

東京大学薬学部講師

東京大学薬学部助手

Although approximately half of the drugs currently in clinical use were originally naturally derived, many pharmaceutical companies are now neglecting the development of natural products as potential drug candidates in favor of high-throughput synthesis of large compound libraries. This is probably because the traditional process of natural product drug discovery was slow, inefficient, and labor intensive, and it did not guarantee that a lead from screening would be chemically workable in quantity or even patentable. An alternative approach to drug discovery lies in combinatorial biosynthesis, which is an application of molecular skeleton constructing enzymes involved in secondary metabolism to create an array of novel compounds. This method offers access to a pre-selected range of fairly structurally complicated molecules based around a common core, which is a biosynthetic

Results

Flavonoids, which are a class of plant specific natural products involved in various

The three unprecedented type III PKSs cloned from medicinal plants (Rhubarb and Aloe) catalyze formation of an aromatic pentaketide (PCS), heptaketide (Aloesonesynthase) and octaketides (OKS). These three type III PKSs had interchanging functionality with one another by steric modulation of the chemically inert single to triple residues lining the active-site cavity accompanied by conservation of the Cys-His-Asn catalytic triad.

On the basis of the crystal structures of wild-type and M207G mutant of PCS, produced by the structurally simple type III PKS.

Rerspectivess

Further, in contrast to wild-type OKS, the OKS N222G mutant efficiently accepts A homology model based on the N222G mutant predicted that the active-site cavity dodecaktide naphthophenone TW95a, which is known to be a product of the minimal type II PKS (whiE from S. coelicolor) and structurally related to the C20 decaketide benzophenone SEK15, the product of OKS N222G point mutant. This is the first demonstration of the production of the C24 dodecaketide by a structurally simple

With the knowledge of the detailed structures and functions of those enzymes, we can judiciously engineer "artificial" versions of the biosynthetic pathways linking to an artificial gene or a set of genes.

Introduction

intermediate, enables compound libraries to be generated in a relatively short time.

health-promoting effects in humans, are biosynthesized through the intermediacy of chalcone skeleton from phenylpropionyl-CoAs and malonyl-CoA via the action of a plant type III PKS or chalcone synthase (CHS). Using the prototype CHS, the enzyme known to be promiscuous with substrates, novel products were synthesized using aromatic, aliphatic and fluorinated starter units to create an array of tri- and diketide by-products as well as the expected fully formed chalcone and stilbene type structures. The engineering of novel compounds has been developed with both non-physiological starter and extender units to result novel products.

F80A/Y82A/M207G triple mutant has released an unnatural novel nonaketide naphthopyrone through the nine molecules of malonyl-CoA condensation. A homology model predicted that the active-site cavity volume of the triple mutant is increased to four times of that of the wild-type PCS. On the other hand, large-to-small Asn222G substitution at the bottom of the polyketide chain elongation tunnel, let to decaketide-producing enzyme from octaketide-producing OKS, resulting in the formation of unnatural decaketide benzophenone, SEK15 previously reported as a product of genetically engineered type II PKSs, and now the longest polyketide

p-coumaroyl-CoA as a starter, and yields the unnatural hexaketide stilbene and heptaketide chalcone as major products. Similar profile was also obtained when n-hexanoyl-CoA was used as a starter, and the heptaketide phloroglucinol was efficiently provided. Structure-based engineering of type III PKSs would thus lead to further production of chemically and structurally disparate unnatural novel polyketides. volume is increased to 748 Å3 in the F66L/N222G double mutant to afford the 2000- Dean of Graduate School of Pharmaceutical Sciences.

University of Shizuoka Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka Lecture, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo Ph. D., Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo 1980 Research Associate, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Iniversity of Tokyo M. Sc., Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences,

東京大学薬学部薬学研究科修士課程修了 University of Tokyo

1975 B. Sc., Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo 1975年 東京大学薬学部薬学科卒業

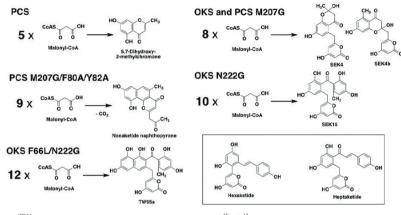
Contact

T E L 054-264-5664 +81-54-264-5664

noguchi@mail.u-shizuoka-

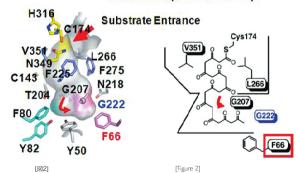
ken.ac.ip

http://w3pharm.u-shizuokaken.ac.jp/shoyaku/



[Figure I] ||型ポリケタイド合成酵素組換え酵素体による新規非天然型ポリケタイド類 Construction of novel unnatural polyketides by mutant PKS III

OKS N222G(2.8Å resolution)



組換えオクタケタイド合成酵素(OKS)の活性部位 Active site cavity of OKS N222G mutant

■ 代表的な発表論文と研究業績 / Major Publications and Achievements

- I. K. Wanibuchi, H. Morita, H. Noguchi, I. Abe: Enzymatic formation of an aromatic dodecaketide by engineered plant polyketide synthase, Biographics and Company of the Com & Med. Chem. Lettr., 21(7), 2083 - 2086, (2011)
- 2. H. Morita, Y. Shimokawa, M. Tanio, R. Kato, H. Noguchi, S. Sugio, T., I. Abe; A structure-based mechanism for benzalacetone synthase from Rheum palmatum, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107(2), 669-73 (2010)
- 3. S. P. Shi, K. Wanibuchi, H. Morita, K. Endo, H. Noguchi and I. Abe; Enzymatic formation of unnatural novel chalcone, stilbene, and benzophenone scaffolds by plant type III polyketide synthase, Organic. lettr., 10., 55 I-554 (2009)
- 4. I. Abe, H. Morita, S. Oguro, H. Noma, K. Wanibuchi, N. Kawahara, Y. Goda, H. Noguchi, and T. Kohno; Structure-based engineering of a plant type III polyketide synthase: formation of an unnatural nonaketide naphthopyrone, J. Am. Chem. Soc., 129, 5976-5980 (2007)
- 5. H. Morita, S. Kondo, S. Oguro, H. Noguchi, S. Sugio, I. Abe, and T. Kohno; Strucstural insight into chain-length control and product specificity of pentaketide chromone synthase from Aloe arborescens, Chemistry & Biology, 14, 1–11, (2007)

24 25