

植物由来植物由来芳香族ポリケタイド合成酵素の X 線結晶構造解析 X-ray crystal structure analysis of aromatic polyketide synthases from plants.

森貴裕, 阿部郁朗*

東京大学薬学系研究科, 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Takahiro Mori and Ikuro Abe*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

1 はじめに

天然物の基本骨格を構築する二次代謝酵素は、活性部位の微妙な構造の違いで基質特異性や反応様式が大きく変化するものがあり、これが天然物の分子多様性を生み出す要因の一つとなっている。こうした二次代謝酵素の機能を、酵素タンパク質の立体構造をもとに改変し、基質特異性や反応性を人為的に拡張して利用する事により、さらなる新規骨格の創出が期待される。

ポリケタイド化合物とは、植物、微生物等、様々な生物から単離される、医薬品資源としても重要な化合物群である。このポリケタイド化合物の基本骨格構築を行うのがポリケタイド合成酵素 (PKSs) であり、 C_2 のアセチルユニットの伸張反応を触媒する。III型ポリケタイド合成酵素は分子量約 40kDa のホモダイマー酵素であり、構造的、機能的にモジュールタイプの I 型、サブユニットタイプの II 型 PKS とは大きく異なる。III型 PKS は、I 型や II 型 PKS に必要なアシルキャリアプロテイン (ACP) を必要としない独立型の PKS である。植物においては、植物内に普遍的に存在している chalcone などのポリフェノールの合成に関与するカルコン合成酵素 (CHS) がよく研究されている。CHS は、1 分子の p-coumaroyl-CoA を受け入れ、3 分子の malonyl-CoA を縮合し、naringenin chalcone を生産する酵素である。その他にも様々な芳香族化合物の CoA エステルや、脂肪酸の CoA エステルを受け入れる III 型 PKS が同定、機能解析が行われている。

沖縄県特産蜜柑科植物 *Citrus microcarpa* から同定された *Citrus microcarpa* キノロン合成酵素 (QNS) とアクリドン合成酵素 (ACS) は、開始基質として通常の CHS が受け入れることのできない N-methylanthraniloyl-CoA を受け入れ、QNS は 1 分子の malonyl-CoA を縮合し、キノロン骨格を、ACS は 3 分子の malonyl-CoA を縮合し、アクリドン骨格を生成する酵素である。QNS と ACS は CHS と約 60% と高い相同性を有しているにもかかわらず、基質特異性や触媒する反応は大きく異なっている。これらの違いが、酵素構造のどのような要因によってもたらされるのかに興味を持たれる。そこで、両酵素の構造活性相関と酵素反応機構の解明を目指し、X 線結晶構造解析に着手した。

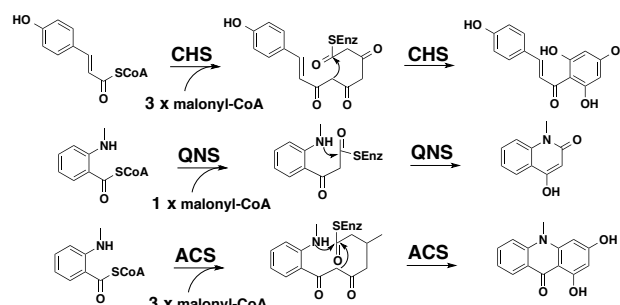


図 1 III型 PKS の反応

2 実験

C. microcarpa QNS と *C. microcarpa* ACS の精製と結晶化は参考文献[1]で報告した方法で行った。X 線回折強度データの収集は、Photon Factory の構造生物学ビームライン (PF-AR NW12A, PF-17A) を利用した。両酵素の結晶構造は、*M. sativa* CHS をモデルとした分子置換法により決定した。

3 結果および考察

C. microcarpa QNS のアポ型構造を 2.47 Å、*C. microcarpa* ACS と CoA の複合体構造を 2.35 Å の分解能で決定した (表 1)。両酵素の全体構造は他の III 型 PKS と同様な $\alpha\beta\alpha\beta$ 構造を有しており、活性中心のアミノ酸残基、Cys、His、Asn の位置もよく保存されていた (図 2)。

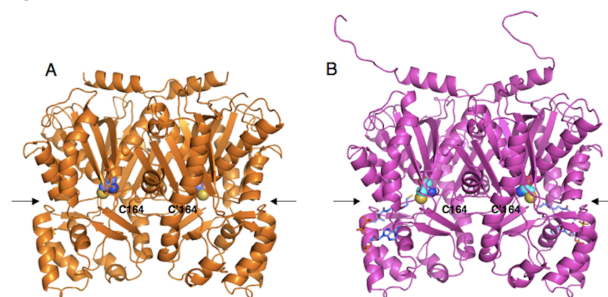


図 2 (A) QNS、(B) ACS の全体構造

M. sativa CHS と構造を比較したところ、CHS の Phe265 が QNS では Leu に、ACS では Val とそれぞれ側鎖の小さいアミノ酸残基に置換されていた。また、これらの側鎖および、Phe215 の側鎖が CHS と

比べ、活性キャビティの外側へ傾くことで入り口の広さを拡大していた。その結果、CHS は入り口の広さ、 17 \AA^2 に対し、QNS は 47 \AA^2 、ACS は 33 \AA^2 まで入り口が拡大していることが明らかとなった。このキャビティ入り口の拡大により、QNS、ACS では高い *N*-methylantraniloyl-CoA を受け入れることが可能になったと考察する。

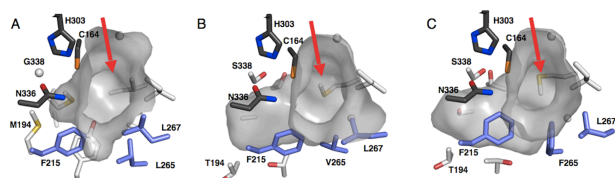


図3 (A) QNS、(B) ACS、(C) CHS のキャビティ入り口の比較

次に、QNS と ACS の活性キャビティの形状を比較した。ACS の活性キャビティを構成するアミノ酸残基、S132、T194、T197 が、QNS では高いアミノ酸残基、M132、M194、Y197 に置換されていた。このアミノ酸残基の置換により、活性キャビティの大きさが、ACS では 760 \AA^3 に対し、QNS では 290 \AA^3 まで減少していることが明らかとなった。この部分について ACS S132M、ACS T194M、ACS T197Y の3種類の変異体を作成し、活性を評価したところ、いずれにおいてもアクリドン合成能が消失し、キノロンを単一生成物として生産した。

以上の結果から、ACS では3分子の malonyl-CoA を縮合し、アクリドン合成できるのに十分なキャビティサイズを有しているのに対し、QNS では活性キャビティの制限により、1分子の malonyl-CoA しか縮合できず、キノロンを生成物として生産したと考察する。

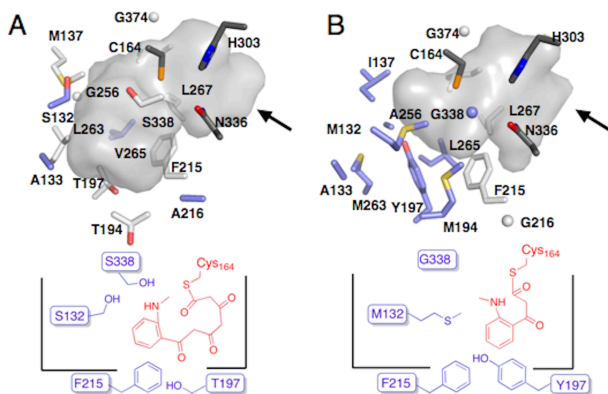


図4 (A) ACS、(B) QNS の活性キャビティ比較

表1 リファインメントテーブル

Data collection	QNS	ACS
Beam line	PF 17A	PF-AR NW12A
Wavelength (Å)	0.9800	1.0000
Unit cell parameter		
Space group	P2 ₁	P6 ₅ 22
a,b,c (Å)	51.7, 135.9, 107.6	106.0, 106.0, 346.5

Resolution range (Å)	50 - 2.47 (2.51 - 2.47)	50 - 2.35 (2.39 - 2.35)
Completeness	99.4 (98.7)	99.9 (100)
<I/σI>	10.7 (2.10)	69.9 (10.0)
R _{merge} (%)	10.3 (58.0)	7.4 (36.1)
Redundancy	3.85 (3.85)	21.0 (17.2)
No. of observed reflections	188,726	1,031,666
No. of unique reflections	49,068	49,243
Refinement		
Resolution (Å)	20 - 2.47	34.5 - 2.35
Overall R _{work} (%)	19.5	18.3
Overall R _{free} (%)	24.1	21.8
Total atoms	12238	6624
No. of protein atoms	12028	6173
No. of waters	198	331
No. of ligand	12	120
Average B-factors		
Protein atoms (Å ²)	39.1	33.2
Waters	33.3	33.3
Ligands	49.6	56.2
r.m.s.d. from ideal		
Bond length (Å)	0.01	0.009
Bond angles (°)	1.301	1.208

4 まとめ

Citrus microcarpa QNS と ACS の X 線結晶構造解析から、両酵素が *N*-methylantraniloyl-CoA を受け入れる理由、および、触媒する反応が異なる要因を明らかにした。

参考文献

[1] Mori, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 288, 28845 (2013).