

天然物の合成生物学

阿部郁朗

東京大学大学院薬学系研究科

はじめに

学生時代、モルヒネやペニシリンなどの薬用天然物に魅せられ、薬学部の三川潮先生、海老塚豊先生の研究室の門をたたいて以来30年、一貫して天然物の生合成研究に取り組んできた。生物がこうした多様な二次代謝産物を生産するのは何故か？どのようにしてあの複雑な構造を作り上げるのか？生物の巧妙なものづくりの仕組みを解き明かし、さらに我々にとって都合の良いように利用、改変することによって、創薬に生かすことができれば、こんなに素晴らしいことはない。化合物の設計図ともいべき遺伝子を微生物に組み込んで一晩も培養すればよい。有機合成の技術が格段に進歩した今日にあっても、とても太刀打ち出来るものではない。

最近の生合成研究の進歩はめざましいものがあり、今まさにルネッサンスの様相を呈している。自分の学生時代、当時はまだ同位体標識化合物のトレーサー実験で生合成経路を推測したり、あるいは生合成の各段階を触媒する酵素を単離精製してその性状を調べたり、最終的にこれら酵素タンパクをコードする遺伝子の設計図にたどり着くまでにはさらに相当の道のりがあった。それが今ではどうであろう。インターネットを検索すれば多くの生物のゲノム情報が容易に入手可能で、微生物を丸ごと次世代シーケンサーにかけて遺伝子配列を決定することすらルーチンになった。バイオインフォマティクスの発展と相まって、ゲノムマイニング（遺伝子探索）が化合物の探索に直結する時代になった。遺伝子の設計図をもとに生合成システムを改変したり、立体構造情報をもとに酵素（生体触媒）の触媒機能を操作、あるいは、人為的に遺伝子を組み合わせ（コンビナトリアル生合成）微生物を生産工場とした物質生産系を構築したり、といったことも既に現実のものになりつつある。これにより希少有用物質の安定供給や天然物に匹敵する創薬シード化合物ライブラリーの構築が可能になる。

自然は驚くほど単純な工程で、しかも短時間のうちにきわめて効率的に、天然物のあの複雑な骨格を作り上げる。まず、一次代謝に由来する限られた数の単純なブロックを材料として基本骨格を構築し、次に酸化、還元、配糖化など、種々の二次修飾の工程を経て、複雑な構造を完成させる。例えば、数ある植物の中でケシだけが産生するモルヒネや、青カビが生産するペニシリンは、それぞれ2分子、あるいは、3分子のアミノ酸を原料として基本骨格が構築される。こうした天然物の分子多様性を生み出す大きな要因の一つが、二次代謝酵素の特異性である。二次代謝酵素の中には、微妙な構造の違いで基質特異性や

生成物の構造が劇的に変化するものがある。一方、二次代謝酵素が示す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って、超天然型新規有用物質の生産が可能になる。それゆえ我々は、二次代謝を担う生合成酵素の研究が、多様な構造と生理活性を示す天然物に匹敵するライブラリー構築に結実し、将来の創薬化学に必ずや貢献するものと信じて、酵素触媒機能の拡張による超天然型新規化合物の創出など、セレンディピティに頼らない合理的な方法論の開発に取り組んできた。

生合成マシナリーの解明と酵素機能の制御

ここでは、その一つの例として、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システムともいえる、高等植物由来Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) をとりあげ、最近の研究成果について紹介する。¹⁾ マクロライドやテトラサイクリンなどの抗生物質の生合成に関わる、微生物由来の巨大で複雑なⅠ型やⅡ型の PKS とは対照的に、Ⅲ型 PKS は分子量 40~45 kDa のタンパクのホモダイマーである。全てのⅢ型 PKS において、Cys-His-Asn からなる活性中心触媒残基は例外なく保存されており、同一のケミストリーで炭素鎖の伸長反応が進行する (図1)。大腸菌において異種発現可能で、比較的安定で取り扱いが容易な酵素であり、その単純な構造ゆえ、酵素反応機構など精密機能解析に適している。我々はまず、既知の酵素との配列相同性を基盤として、天然より新規Ⅲ型 PKS 酵素遺伝子を探索した結果、従来関連の考えられなかった植物二次代謝産物の生合成に一連のⅢ型 PKS が広く関与することを明らかにした。^{2,3)}

植物Ⅲ型 PKS が示す異例ともいえる寛容な基質特異性と潜在的触媒能力は特筆に値する。我々は各種人工基質をプローブとして作用させることにより、種々の非天然型ポリケタイドの生産に成功し、酵素触媒機能の拡張と新規骨格創出への展望を与えた。⁴⁾ また、この

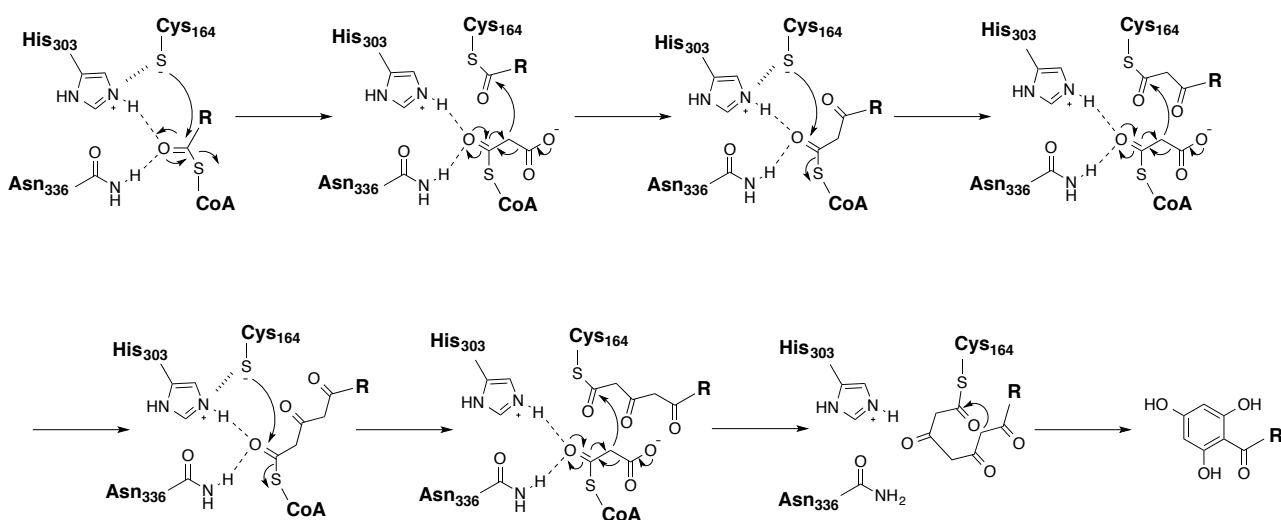


図1 Ⅲ型ポリケタイド合成酵素が触媒する CoA チオエステルの縮合による炭素鎖伸長と環化反応

特異な酵素タンパク質の X 線結晶構造解析の結果から、基質及び生成物特異性を決定する酵素活性中心構造を解明し、⁵⁻⁷⁾ 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などにより、活性中心キャビティ（反応場）を拡大して、C₂ 単位縮合数の増加、非天然型 C-C 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（図 2）。^{8,9)}

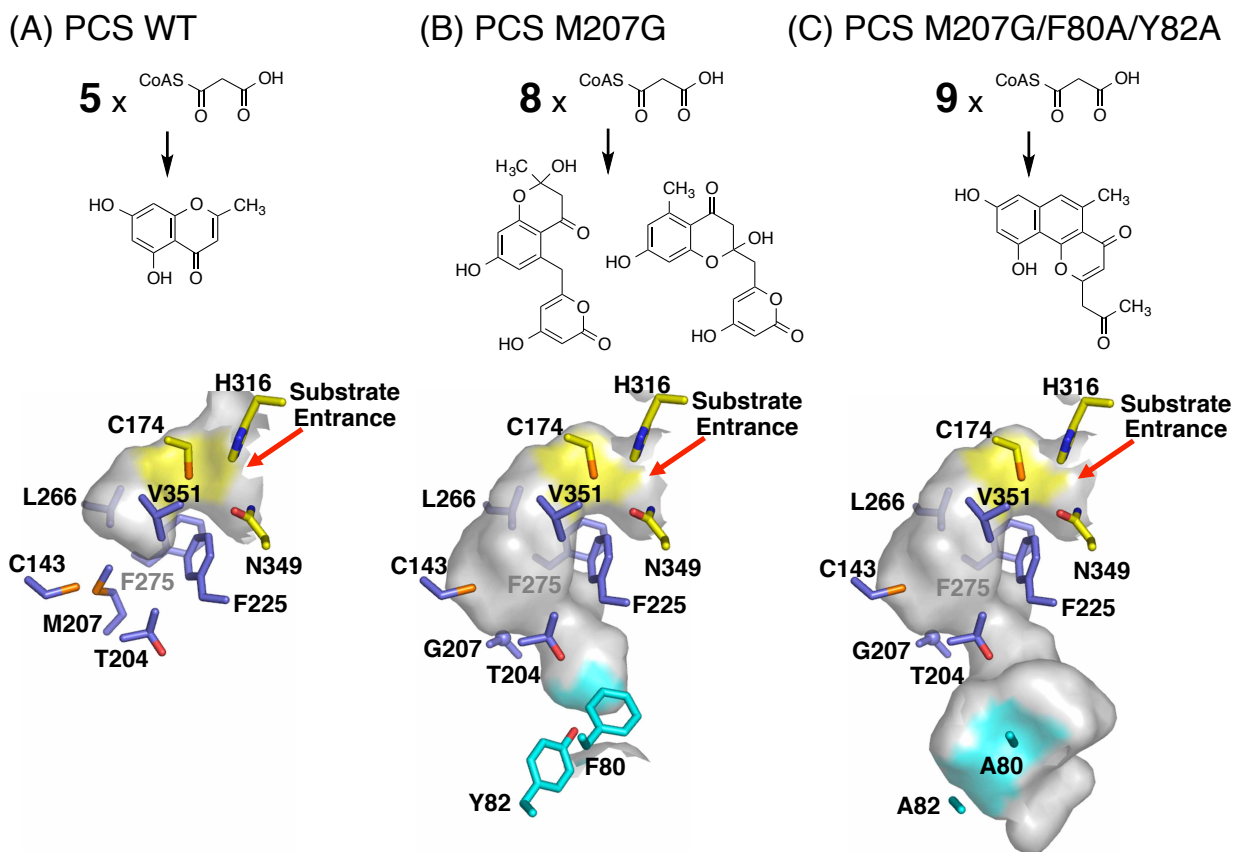


図 2 結晶構造に基づく合理的な酵素触媒機能の拡張と非天然型新規ポリケタイトの創出
アロエ (*Aloe arborescens*) 由来ペンタケタイドクロモン合成酵素 (PCS) の (A) 野生型酵素、(B) M207G、
(C) M207G/F80A/Y82A 変異酵素における活性部位キャビティ構造の比較とマロニル CoA 縮合数の拡大。

ポリケタイト合成酵素は、脂肪酸合成酵素と分子進化的に同一の起源をもつものと考えられており、脂肪酸合成酵素の場合と同様に、CoA チオエステルの縮合反応（アシル基転移）の繰り返しによる炭素鎖伸長反応と、それに引き続く β -ポリケトメチレン中間体の環化反応を触媒する。なかでも植物 III 型 PKS 酵素が触媒する反応は、立体化学が厳密に制御された精巧なものとは言い難く、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」と捉えることができる。逆に言えばそれだけ、酵素エンジニアリングや、超天然型新規生体触媒の開発を考える上で極めて好都合である。

このように炭素、水素、酸素原子からなり、クライゼン縮合やアルドール縮合など、「カルボニルの化学」が中心となるポリケタイト合成酵素の反応に、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、窒素原子の求核性などを利用した新たな C-N 結合や C-C 結合の形成も可能になる。カルボニル化合物をアミンと反応させた Robinson のトロピノン合成や Heathcock のユズリハ・アルカロイドの合成にみられるように、反応性に富んだ β -ポリケトメチレン中間体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、ポリケタイド合成酵素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。⁸⁻¹¹⁾

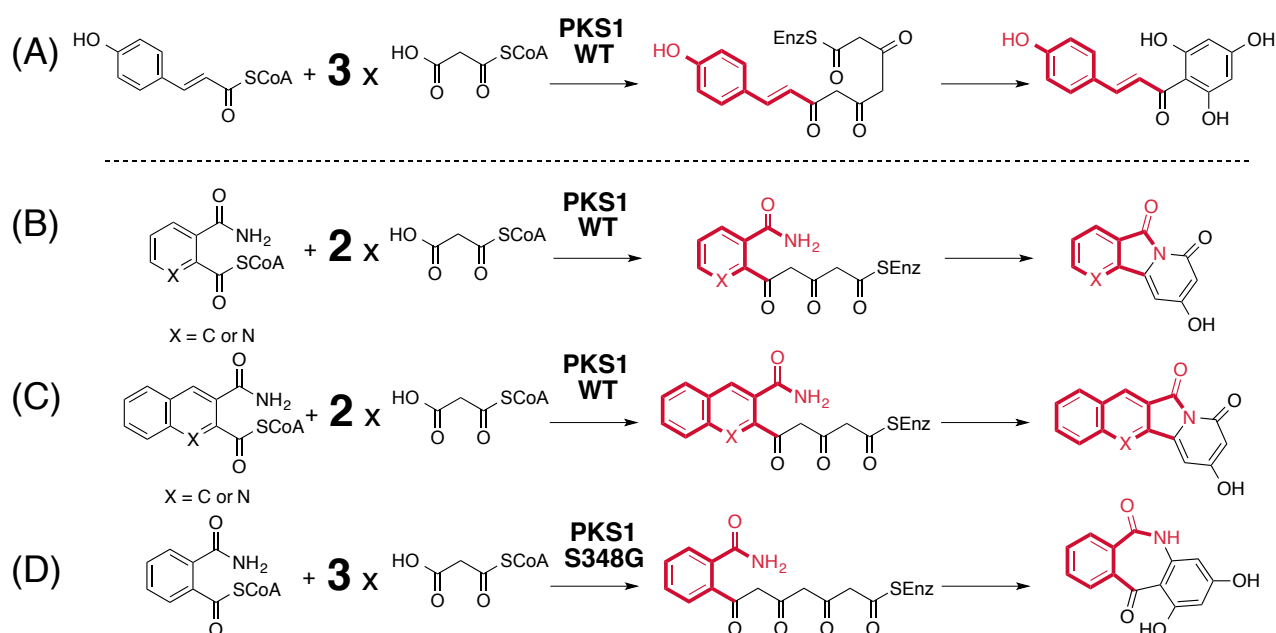


図3 含窒素人工基質を用いた酵素触媒機能の開拓と非天然型新規アルカロイド骨格の創出

トウゲシバ (*Huperzia serrata*) 由来カルコン合成酵素 (PKS1) の野生型酵素による (A) カルコンの生産。種々の含窒素人工基質を用いた (B) 3環性、(C) 4環性非天然型新規アルカロイドの生産、(D) 結晶構造に基づく S348G 変異酵素による環拡大3環性非天然型新規アルカロイドの生産。

例えば、トウゲシバ (*Huperzia serrata*) 由来 PKS1 は、比較的大きな基質結合部位を有する新規 III 型 PKS であり、通常はクマロイル CoA を開始基質として3分子のマロニル CoA を順次縮合してカルコンを生成する (図3 A)。ところが、この酵素に化学合成した人工基質 2-カルバモイルベンゾイル CoA を作用させた場合、2分子のマロニル CoA を縮合の後、これまでに例のない 6-5-6 縮合環構造を有する3環性非天然型新規アルカロイドを、高収率で単一生成物として、与えることを見出した。⁹⁾ さらに、本基質の芳香環をピリジン環やナフタレン環で置換した人工基質を作用させると、同様な炭素鎖の伸長と環化反応が進行して、3環あるいは4環性の新規アルカロイドが高収率で生成する (図3 B, C)。いずれの場合も、2分子のマロニル CoA の縮合による炭素鎖伸長の後、シッフ塩基の形成を介した二度の C-N 結合形成と環化により環状イミドが生成するものと考えられる。⁹⁾ 一方、これとは対照的に、X 線結晶構造解析に基づいて、活性中心キャビティ (反応場) を拡大した S348G 点変異酵素では、今度は3分子のマロニル CoA を順次縮合の後、C-N 結合

と C-C 結合の形成が進行して、B 環が拡大した 6-7-6 縮合環構造をもつ 3 環性非天然型新規アルカロイドを生成することを明らかにした (図 3 D)。⁹⁾

Future is Synthetic Biology

酵素 (生体触媒) を用いた合成法の利点は計り知れないものがあり、グリーンケミストリーの発展に必ずや大きな貢献をするものと期待される。一方、物質生産を考える上で、今後クリアすべき課題の一つに、その生産効率の向上がある。変異や人工基質の構造によっては本来の酵素と同程度の活性が望めるものの、まだまだ実用にはほど遠いものもある。そこでタンパク工学や進化分子工学の手法を駆使することにより、酵素触媒機能の最適化が望まれる。また、醗酵工学や植物代謝工学への展開として、大腸菌や酵母など微生物を生産工場とした物質生産系の構築、遺伝子導入による新機能賦与形質転換生物の作出など、実用に供する物質生産系の構築が待たれている。

資源が枯渇しつつある現代にあって、生合成反応を利用した効率的な物質生産が重要になる。最近、我々の研究室では、糸状菌のゲノムや、^{12,13)} 難培養性海洋微生物のメタゲノムなどから、^{14,15)} 非常に複雑で巨大な分子骨格をもった天然物の生合成遺伝子クラスターの取得に次々に成功している。こうした遺伝子を微生物に異種発現、醗酵生産させることにより、希少有用天然物の大量、安定供給が可能になる。また、生合成システムに改良を加えることによって、天然物を凌ぐ超天然型新規有用物質の創出、天然物に匹敵する創薬シード化合物ライブラリーの構築も可能になる。

しかし、そのためにはまだまだ越えなければならないハードルがいくつもある。いかなる酵素タンパクであろうと、本来の機能をもって自在に発現をコントロールできるような、汎用性のある遺伝子発現系の開発が待たれるが、まだまだ時間がかかりそうなのが現実である。それならばいつまでも「天然」にこだわる必要もない。扱いが容易で、基質自由度の高い、潜在的触媒能力に優れた生合成酵素を改変し、これを人為的に組み合わせること (コンビナトリアル生合成) で、テイラーメイドの生合成遺伝子クラスターを再構築することも一つの解決になる。このためには各生合成段階を触媒する酵素 (生体触媒) の理解が不可欠であり、有機化学、構造生物学、分析化学、分子生物学など、多領域の学問分野の相互理解のうえにたった共同研究が今後ますます重要になる。

最後に、微量酵素反応生成物の単離と構造解析など、天然物化学が長年培ってきた物質の単離構造決定のノウハウを大切に、次世代に伝えていくことが重要である。生命現象を物質レベルで精密に正確に記述できることこそ、我々天然物化学者の生命線であると心得る。

参考文献

1. *Nat. Prod. Rep.*, **27**, 809-838 (2010).
2. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1362-1363 (2005).
3. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12709-12716 (2005).
4. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11242-11243 (2000).
5. *Chem. Biol.*, **14**, 359-369 (2007).
6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 669-673 (2010).
7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19778-19783 (2010).
8. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5976-5980 (2007).
9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13504-13509 (2011).
10. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4746-4749 (2011).
11. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 179-185 (2012).
12. *Nat. Chem.*, **2**, 858-864 (2010).
13. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 10962-10965 (2013).
14. *Nature*, **506**, 58-62 (2014).
15. *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 648 (2014).