

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 森 貴裕

植物や動物、微生物はアルカロイド、テルペノイド、ポリケタイドなどの複雑な骨格を有する様々な有用二次代謝産物を生産する。その中でも、種々のアミノ酸に由来し構造内に含窒素複素環を含むアルカロイド化合物は少量で顕著な生物活性を示すため、医薬品資源としても重要視されている。このような化合物の生合成を分子レベルで明らかとすることで、遺伝子資源を利用した有用化合物の安定供給、機能改変生合成酵素を用いた新規生物活性化合物の創出へつなげることが可能となる。本研究において森は、ミカン科植物に多く見られるキノロン骨格、アクリドン骨格の生合成を担う酵素、及び天然に広く分布し、様々な生物活性を示すβ-カルボリン骨格の形成を行う酵素の機能解析、立体構造基盤の解明を行った。

第一章において森は、ミカン科植物から多く単離報告のある、キノロン骨格、アクリドン骨格を有するアルカロイドを形成する酵素の X 線結晶構造解析を試みた。

ミカン科植物四季柑 (*Citrus microcarpa*) 由来キノロン合成酵素 (CmQNS)、アクリドン合成酵素 (CmACS) は、*N*-メチルアントラニロイル-CoA を基質にそれぞれ 1 分子、もしくは 3 分子のマロニル-CoA の縮合反応を触媒し、キノロン骨格 (1) とアクリドン骨格 (2) を形成する新規Ⅲ型 PKS である (図 1)。

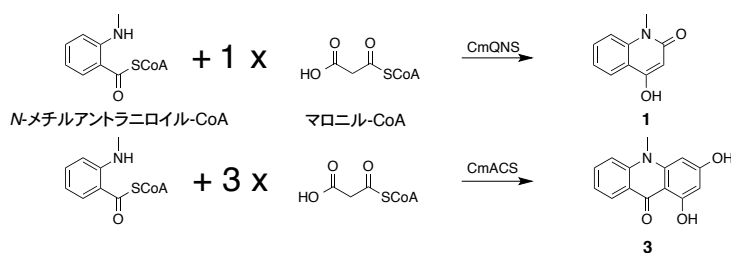


図 1. CmQNS、CmACS の反応

これまでのⅢ型 PKS の機能解析から、植物に普遍的に存在するⅢ型 PKS であるカルコン合成酵素 (CHS) は *N*-メチルアントラニロイル CoA を開始基質として利用できないことが知られており、一方 CmQNS は 4-クマロイル-CoA を開始基質として認識しない事が明らかとなっている。そこで森は、Ⅲ型 PKS におけるキノロン、アクリドン骨格形成に関与する酵素の機能解析、X 線結晶構造解析により、Ⅲ型 PKS によるアルカロイド合成の構造基盤の解明を目的に研究を行った。

結果、CmQNS を 2.47 Å、CmACS を 2.35 Å の分解能で立体構造を解明した。活性部位を *Medicago sativa* 由来カルコン合成酵素 (MsCHS) と比較したところ、多くのⅢ型 PKS で Phe で保存されている 265 番目のアミノ酸がそれぞれ CmQNS では Leu、CmACS では Val に置換され、さらに主鎖のコンフォメーション変化が起きたため、CHS に比べ入口の面積が 2 倍以上にまで拡大していた。また、CmQNS において活性部位を構成するアミノ酸が M132、M194、Y197 と特徴的に置換されており、それらが活性部位に突き出す事で CmQNS の活性部位容積は MsCHS や CmACS の

約 1/3 になっていることを明らかとした。入口の面積が拡大したことにより *N*-メチルアントラニロイル CoA を受け入れることができるものの、その小さい活性部位容積のため、マロニル-CoA を 1 分子しか縮合出来ず、**1** を単一生成物として生産し、4-クマロイル-CoA は受け入れられないと考えられる。一方、CmACS の活性部位は MsCHS とほぼ同程度であり、十分な容積と形状を有しているため、*N*-メチルアントラニロイル-CoA、4-クマロイル-CoA から、3 分子のマロニル-CoA を縮合した化合物を生産できたと考察している。

次に、さらなる CmQNS と CmACS の構造活性相関を明らかとする為、結晶構造を鋳型とした変異導入実験を行った。その結果、CmQNS の Y197A 変異体において、新たに 4-クマロイル-CoA を基質として認識し、1 分子、及び 2 分子のマロニル-CoA を縮合した化合物を生成した。一方、CmACS の S132M、T194M、T197Y 変異体においては 4-クマロイル-CoA を基質として受け入れなくなり、*N*-メチルアントラニロイル-CoA からは、**1** を単一生成物として与えた。以上の結果は活性部位の容積と形状が酵素反応の生成物特異性を決定しているという結晶構造からの仮説を支持している。

本章では、*C. microcarpa* 由来アルカロイドの生合成に関与する酵素 CmACS、CmQNS の構造情報から基質認識及び伸長鎖長制御メカニズムを明らかとした。今後、結晶構造をもとに有用物質生産を目指した合理的な機能改変酵素の創出が期待される。

第二章においては、 $\beta$ -カルボリンアルカロイド、マリナカルボリン類の生産に関わる海洋放線菌 *Marinactinospora thermotolerans* 由来新規 PS 反応触媒酵素、McbB の詳細な機能解析を目的として、McbB の *in vitro* による活性評価と X 線結晶構造解析による反応メカニズム解明を行った。

McbB は、*in vivo* の実験から Pictet-Spengler (PS) 反応を触媒し、テトラヒドロ- $\beta$ -カルボリン骨格を形成した後、酸化反応、脱炭酸反応をも行い、 $\beta$ -カルボリン化合物 **3** および **4** を生成すると提唱された (図 2)。McbB は他の PS 反応触媒酵素と全く相同性を有さず、一方で放線菌由来の機能未知酵素と高い相同性を有している。しかし、未だこれら酵素群の *in vitro* における詳細な機能解析は行われておらず、実際に McbB が PS 反応、酸化反応、脱炭酸反応のすべてを触媒するかについても議論の余地があった。

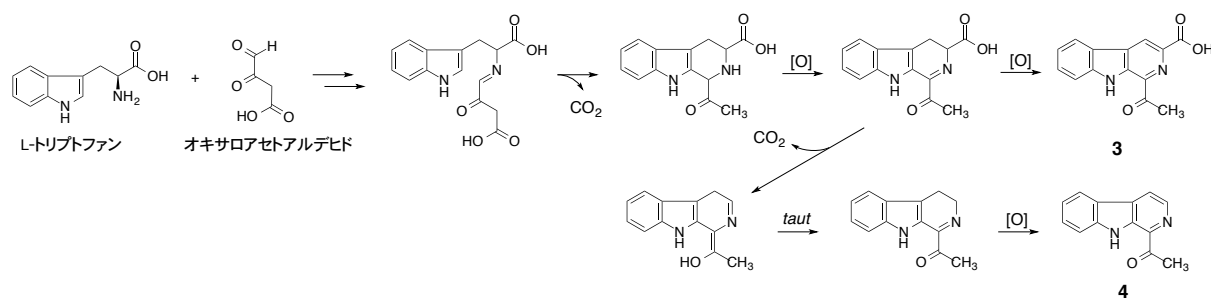


図 2. McbB の反応

まず、森は、精製酵素に推定基質オキサロアセトアルデヒド、もしくはその脱炭酸物メチルグリオキサルと L-トリプトファンを基質に *in vitro* 酵素反応を行い、酵素反応優位に **3** と **4** の生産を確認した。次いで、種々のトリプトファンアナログを用いて McbB の基質特異性を検討した結果、McbB は L-体と D-体を厳密に区別し、L-トリプトファンのカルボン酸部位を強固に認識していることが示唆された。一方、アルデヒドアナログに対しては、広範な基質特異性を示し、テトラヒドロ- $\beta$ -カルボリン化合物を生成した。興味深いことに、酵素生成物の立体選択性は酸性条件下で化学的に合成した場合と異なる選択性を示した。このことは McbB が PS 反応を触媒し、C-C 結合を形成する際の立体制御を行っていることを示している。

さらに、McbB の X 線結晶構造解析に着手した結果、2.48 Å の分解能で McbB の全体構造を得ることに成功した。McbB の全体構造は既知の PS 反応触媒酵素の構造とは大きく異なり、N 末端側に  $\beta$ バレル、C 末端側に 5 本の  $\alpha$ ヘリックスという二つのドメインから構成されていた。また、基質である L-トリプトファンがダイマー境界面に存在し、活性部位構成残基と多くの水素結合、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用を形成することで、L-トリプトファンを基質として厳密に認識していることが判明した。また、活性部位構成残基への変異導入の結果から S48A/V、Y53A/F、E97A、F250A において活性が消失するのに対し、S48T、F250Y/W においては維持されることから、これら残基との相互作用が基質認識に重要であることが示唆された。

次いで、活性部位を構成する塩基性アミノ酸残基、H51、R72、H87 に変異を導入したところ、全ての変異体が活性を維持しており、これらの残基は活性に直接関与していないことが判明した。しかし、R72、H87 は活性部位入口に存在し、活性部位入口の広さを制御することで、基質特異性に大きな役割を担っていると考えられる。そこで、フェニルグリオキサルを基質として酵素反応を行った結果、両変異体とも基質として認識し新規  $\beta$ -カルボリン化合物を生成した。

以上の結果を基に、McbB による PS 反応触媒メカニズムを提唱した (図 3)。活性部位に基質が取り込まれた後に、E97 が L-トリプトファンのアミノ基から水素を引き抜き、活性化されたアミンがアルデヒドカルボニルに求核攻撃することで反応が開始する。カルビノールアミン中間体が生成した後に、脱水反応が進行し、イミンが形成する。このとき、E97 が酸触媒として働き反応を促進していると考えられる。次いで、インドール環の 2 位からイミンへの求核付加反応により閉環し、再度負電荷を帯びた E97 が 2 位の水素を引き抜いて芳香性を回復させ、テトラヒドロ- $\beta$ -カルボリン骨格が形成する。最後に、1 位のアセトアセチル基の脱炭酸反応、酵素外での酸化、脱炭酸反応が進行し、**3** および **4** が生成すると考えられる。

本章では、微生物由来の  $\beta$ -カルボリン生合成に関与する新規 PS 反応触媒酵素 McbB の機能解析、X 線結晶構造解析により、PS 反応触媒機構の解明、及び機能改変を行った。McbB と同一性を有する酵素は他の微生物群にも存在し、それらの酵素機能解析、構造解析から微生物全体における  $\beta$ -カルボリンアルカロイド生合成の構造活性相関研究が進展するものと期待される。

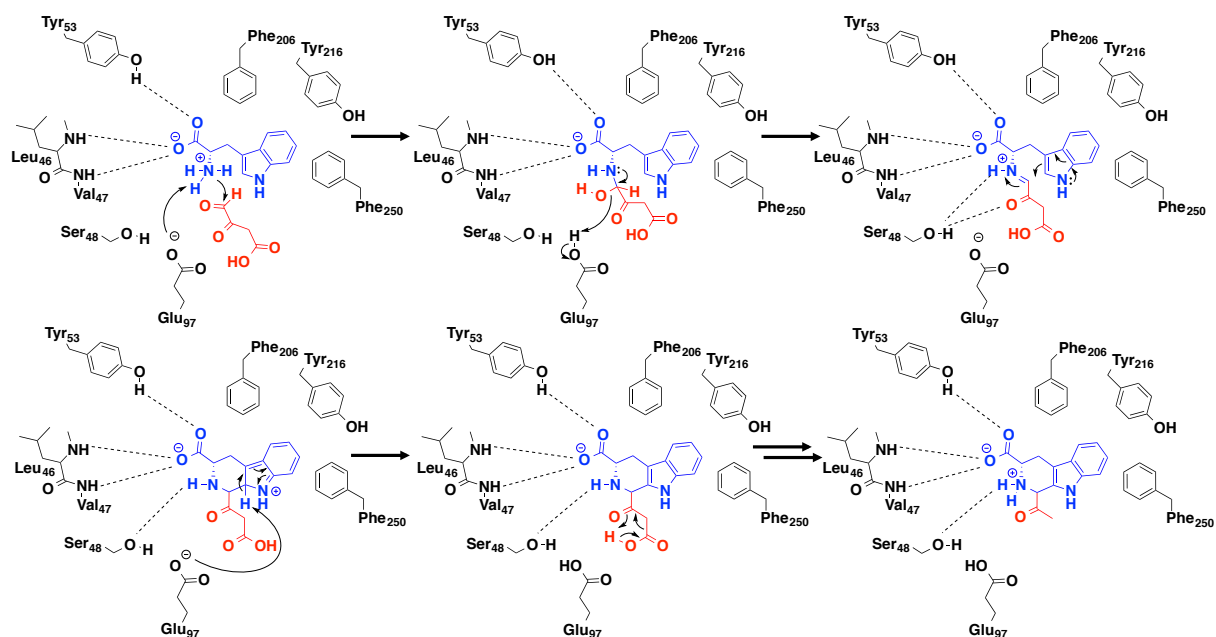


図 3. McbB の触媒機構

本研究では、植物、微生物の二次代謝産物産生、特にアルカロイドの生成に関与する酵素の機能解析、構造解析を行った。今後、酵素の詳細な機能解析から、分子レベルで反応メカニズムを理解し、構造に基づく合理的な変異を導入することで、二次代謝生合成酵素の触媒機能のさらなる拡張と、生体触媒にも利用可能な有用酵素の創出へと研究が期待される。よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。