

炭素骨格構築を触媒するポリケタイド合成酵素

藤井 勲

酢酸などの低級脂肪酸を組立単位として、植物や微生物により生産されるポリケタイド化合物には、単環性の6-メチルサリチル酸(6MSA)から多員環マクロライド類まで、化学構造的にも多様で、かつ、抗菌、抗真菌作用や免疫抑制作用、抗高脂血症作用などの生物活性を示すさまざまな化合物が含まれている。これらポリケタイド化合物の炭素骨格は、ポリケタイド合成酵素 polyketide synthase (PKS) により構築されるが、各 PKS の生成化合物の炭素骨格はきわめて多様であるにもかかわらず、PKS の触媒する反応は共通の基本反応から成り立っている。

ポリケタイド合成酵素 PKS

脂肪酸合成酵素 fatty acid synthase (FAS) は、一つのポリペプチド上に各触媒酵素ドメインが存在する多機能型 type I 型と、各酵素が独立のポリペプチドとして存在し、多酵素複合体として機能する type II 型とに大きく分類されるが、PKS もそのタンパク構造の特徴から、FAS と同様の I 型、II 型と、植物のカルコン合成酵素のような縮合酵素 KS 単独型の type III とに分けられる。また、type I 型 PKS はバクテリアのマクロライド生合成に見られるモジュール型 modular type と糸状菌などに見られる繰返し型 iterative type にさらに分類される。¹⁾

PKS 反応の概略を図 1 に示すが、1) スターターの選択、2) 伸長単位を選択、3) 縮合反応回数の制御、4) β -カルボニルの還元制御、5) 閉環様式の制御、により、各 PKS に特異的で多種多様な炭素骨格の化合物が生成する。このように高い化合物合成ポテンシャルをもつ酵素である PKS の反応制御機構を明らかにすることができれば、所望の化合物を生成する PKS をデザインすることが可能になるものと期待され、PKS を主たる対象として生合成工学 Engineered biosynthesis、あるいはコンビナトリアル生合成 Combinatorial biosynthesis などと呼ばれる新しい手法として展開しつつある。本稿では、筆者らが研究対象としている糸状菌の繰返し型 iterative type I PKS について紹介する。

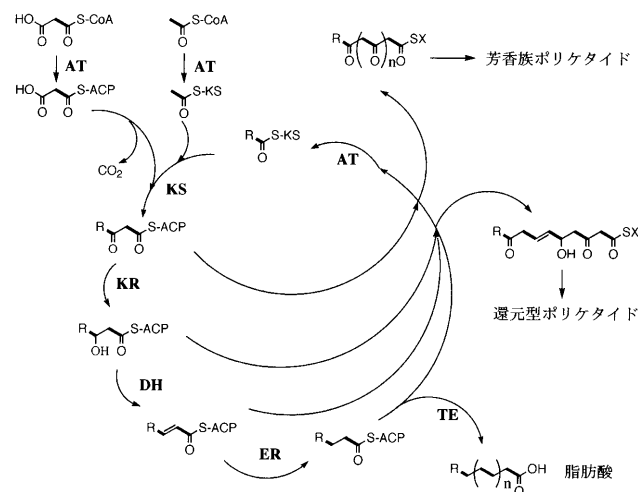


図 1. ポリケタイド合成酵素の基本反応

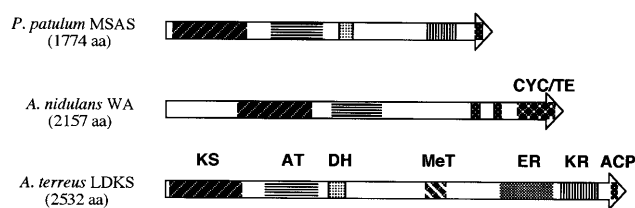


図 2. 繰返し型 type I PKS のアーキテクチャー。KS, ketosynthase; AT, acyl transferase; KR, ketoreductase; DH, dehydratase; ER, enoyl reductase; ACP, acyl carrier protein; TE, thioesterase; MeT, methyltransferase; CYC, claisen cyclase.

繰返し型 iterative type I PKS

糸状菌の PKS 遺伝子は 1990 年に MSAS (6MSA 合成酵素) 遺伝子が *Penicillium patulum* よりクローニングされて以来、²⁾ ゲノム解析の進展と相まってデータベース上に登録される糸状菌 PKS 遺伝子の数は年々増大しているが、いずれも哺乳類の FAS と類似の繰返し型 iterative type I 型の PKS をコードしており、PKS 産物が芳香族か還元型かにはよらない (図 2)。しかし、PKS 直接の生産化合物が化学的に同定されている例は数少ない。また、放線菌においても iterative type I PKS の存在が見いだされており、オルセリン酸合成酵素 AviM や、エンジイン抗生物質の母核の生合成に関わると考えられている PKS 遺伝子のクローニングが報告されている。

糸状菌発現系を用いた芳香族型 iterative type I PKS の機能解析

筆者らは *Aspergillus terreus* よりクローニングした *atX* 遺伝子を α -アミラーゼプロモーターを利用して異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* を宿主として発現させ、*atX* が MSAS をコードすること、また、形質転換体の 6MSA 生産量が ~ 1 g/l にも及ぶことを確認した。³⁾ 糸状菌の遺伝子は ORF 中、数十 bp 程度ながらもいくつかのイントロンを含む場合があること、また、PKS が活性型となるためにはアシルキャリアータンパク ACP ドメインの Ser 残基がホスホパンテテイン化される必要があるが、異種糸状菌を宿主として糸状菌 PKS を発現させた場合には、ホスホパンテテイン転移酵素を共発現させなくても、ホストの酵素により PKS が修飾、ホロ化されるという利点がある。

我々は、この糸状菌発現系を用いることにより、芳香族ペンタケタイド合成酵素である *Colletotrichum lagenarium* の PKS1,⁴⁾ 同ヘプタケタイド合成酵素である *Aspergillus nidulans* の WA,⁵⁾ *Aspergillus fumigatus* の Alb1p⁶⁾ や、*Phoma* sp. 糸状菌よりクローニングしたノナケタイド合成酵素 PNK2⁷⁾ などの発現に成功している。WA PKS は、*A. nidulans* の緑色胞子色素生成の中間体である黄色色素生成に関わる PKS として、Timberlake らによりクローニングされたものであるが、彼らの報告では、KS- $\rightarrow$ AT- $\rightarrow$ ACP1- $\rightarrow$ ACP2 のドメイン構造を持つ全長 1986 aa のタンパクをコードするものとされていた。⁸⁾ 筆者らは、この報告に従い、発現プラスミドを構築し、*A. oryzae* で発現させたところ、予想に反して、可視部にほとんど吸収をもたないヘプタケタイド化合物シトレオイソクマリン類が生成することを確認した。⁹⁾ 当初、この化合物がさらに二次的変換を受けて黄色中間体となり、重合して緑色胞子色素が生成するものと考えたが、*wA* の塩基配列を再確認したところ、報告されていた配列の C-末端に塩基の見落としがあり、これを訂正した ORF は ACP2 よりさらに下流に伸び、チオエステラーゼ TE ドメインの存在も確認された。先の発現プラスミド構築においては、ACP2 のすぐ下流で *wA* 遺伝子を切断しており、C-末端が切断された変異体を発現させていたことが判明した。そこで、全長発現用のプラスミドを再構築し、発現させたところ、黄色ヘプタケタイド YWA1 の生成を確認し、*wA* が YWA1 合成酵素をコードすることを明らかにするとともに、ACP2 の下流の TE を含む領域が、単に酵素から生成物を加水分解的に切り出す TE ではなく、YWA1

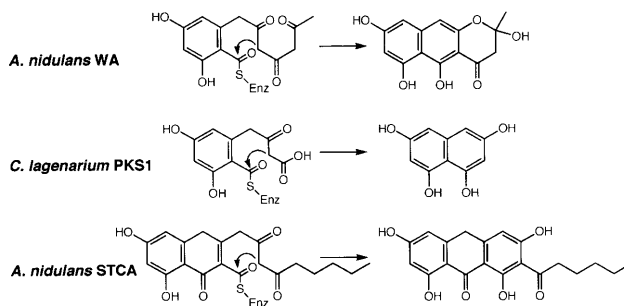


図3. 芳香族 PKS の CYC ドメインが触媒する閉環反応

の中央の芳香環のクライゼン型閉環に関わる機能ドメインであることを明らかにすることができた。¹⁰⁾ 糸状菌の多環性芳香族化合物の生成においては、このクライゼン型の閉環反応の関与が考えられるものが多いが、これまでに遺伝子がクローニングされている *C. lagenarium* の PKS1 や *A. nidulans* の STCA などいずれも C-末端にこの TE 様のドメインをもっており、これをクライゼンサイクラゼドメイン CYC として提唱できるものと考えている (図3)。

糸状菌の還元型 PKS 遺伝子としては、*A. terreus* よりロバスタチン合成に関わる PKS 遺伝子がクローニングされ、その生合成遺伝子クラスターの解析から、2つの PKS 遺伝子、*lovB*、*lovF* が同定された。¹¹⁾ ロバスタチンは二本のポリケタイド鎖、つまり、主鎖であるノナケタイド鎖にダイケタイド鎖がエステル結合しており、*lovB* がノナケタイド合成酵素である LNKS をコードすること、*lovF* がダイケタイド合成酵素 LDKS をコードすることが明らかにされている。興味深いことに LNKS を単独で *A. nidulans* で発現させた場合、ヘプタケタイドおよびペンタケタイドのピロン化合物が生成するのに対し、エノイル還元酵素をコードすると考えられる *lovC* とともに *A. nidulans* で共発現させた場合、本来のデカリン骨格を持つジヒドロモノコリン L が生成することが示されている。これは、PKS 上で伸長中のポリケトメチレン鎖に独立の酵素タンパクがモジュレーターとして作用することにより PKS としての本来の機能を発揮することが示された最初の例である。また、Diels-Alder 反応によるデカリン骨格生成が *lovB* と *lovC* の共発現で確認されたことは、*lovB* のコードする PKS タンパク LNKS 自身が Diels-Alder 反応をも触媒することを示唆していたが、実際、LNKS 精製酵素を用いた *in vitro* の実験により確認されている。¹²⁾ (図4)

筆者らは、ロバスタチンと同様、その生合成に Diels-Alder 反応の関与が示されているソラナピロンを生産す

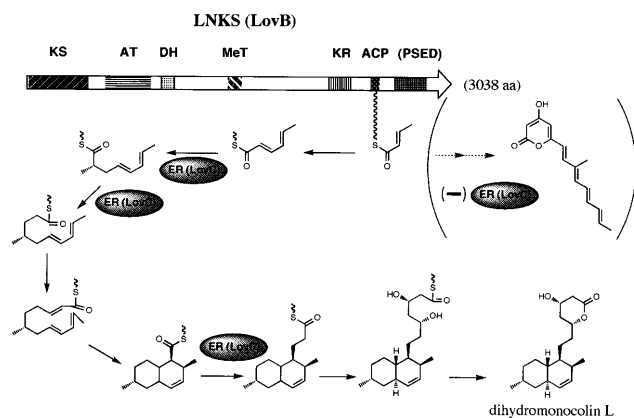


図4. LNKs と LovC の触媒する反応

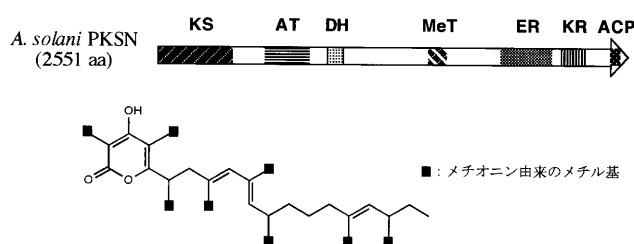


図5. PKSNとその生産化合物アルタナピロン

る馬鈴薯夏疫病菌 *Alternaria solani* より、還元型 PKS 遺伝子のクローニングを試み、これまでに *pksN*, *pksF*, *pksK* と名付けた 3 種類の遺伝子を取得しているが,¹³⁾ *pksN* を *A. oryzae* で発現させたところ、新規化合物アルタナピロンが生産された。アルタナピロンは、標識酢酸およびメチオニンの投与実験から、デカケタイド鎖にメチオニン由来の 8 個の側メチルが導入され生合成される化合物であることを確認した。¹⁴⁾ PKSN 酵素タンパクは、そのほぼ中央にメチルトランスフェラーゼ MeT ドメインを持っており、これが 9 回の縮合反応のうち、8 回の各縮合反応後に ACP 上の β -ケトアシルチオエステルに S-アデノシルメチオニンを基質としてメチル基を導入するものと考えられ、還元型 PKS に特徴的な β -位の還元制御とともに縮合サイクル特異的なメチル基導入の機構に興味を持たれる (図 5)。なお、前出の LNKs は MeT ドメインを持つが、ノナケタイド鎖にメチル基を一つだけ導入する。

酵母発現系を用いた iterative type I PKS の発現と機能解析

上記のように異種糸状菌発現系は機能解析系としても、また、化合物生産のための生物合成系としてもすぐ

れた系ではあるが、糸状菌の形質転換効率が低く、かつ、形質転換体を得られるまでに 7~10 日前後の時間を要することが問題点となる。そこで、遺伝学、遺伝子工学的に詳細に研究されている酵母や大腸菌を宿主とする発現が iterative type I PKS についても試みられている。その最初の報告は、Kosan 社による *P. patulum* の MSAS の発現であった。¹⁵⁾ ただし、外来性 PKS の ACP ドメインは、酵母や大腸菌のホスホパンテテイン転移酵素ではほとんど修飾を受けないことが知られており、そこで、NRPS (non-ribosomal peptide synthase) の ACP 修飾において基質特異性の広いことが知られていた *Bacillus subtilis* サーファクチン生合成のホスホパンテテイン転移酵素 Sfp が用いられ、これを PKS と共発現させることにより、酵母や大腸菌においても外来性 PKS の機能発現が可能となった。酵母を宿主した発現では、ADH2 (alcohol dehydrogenase 2) プロモーターを用いることにより、培養 1 l あたり、1.7 g の 6MSA の生産が達成されており、これはもともとの生産菌 *P. patulum* の約 2 倍の生産量である。

糸状菌発現系を利用した芳香族型 iterative type I PKS WA の機能解析についてはすでに述べたが、*A. fumigatus* の Alb1p PKS について、酵母発現系を用いた機能解析の例を最後に紹介する。ヒトのアスペルギルス症病原菌である *A. fumigatus* の孢子色素生合成遺伝子クラスターに見いだされた PKS 遺伝子 *alb1* は当初、ペンタケタイド 1,3,6,8-テトラヒドロキシナフタレン (T4HN) の合成酵素をコードするものと考えられたが、筆者らによる *A. oryzae* での発現により、WA と同様、ヘプタケタイド YWA1 の合成酵素であることが確認された。*A. fumigatus* においては、この YWA1 が加水分解的に C-C ボンドを切断する酵素 Ayglp により T4HN へと二次的に変換され、メラニンが生成することが明らかになっている。¹⁶⁾

この Alb1p PKS を Sfp とともに酵母で共発現させたところ、糸状菌を宿主とした場合と同様に YWA1 が生産され、酵母においても多環性芳香族型 PKS が機能的に発現することを確認した。次いで、Alb1p の C-末端から順次 deletion をかけた変異体を発現させたところ、CYC の活性中心と考えられるセリン残基 (Ser¹⁹⁶²) の下流を欠く変異体 Cd-1、ACP2 の下流を欠く変異体 Cd-2、ACPI の下流を欠く変異体 Cd-3 のいずれにおいても、生成産物が YWA1 ではなくクライゼン型の閉環を受けず酵素から遊離されたデヒドロシトレオイソクマリン (DHCI) が生産された。YWA1 は生産されなかったものの、Alb1p PKS の N-末端から ACPI まで領域のみで、ヘプタケタ

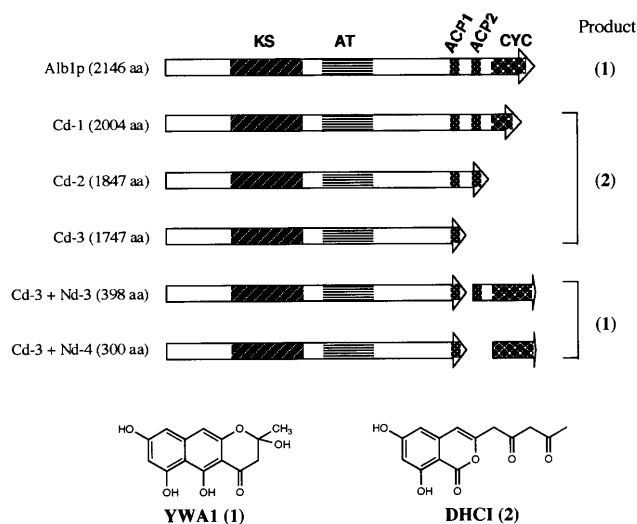


図6. Alb1p C-末端欠失体とその生産化合物

イド鎖の生成と1環目の閉環までが正常に進行することが明らかになった。

次にC-末端欠失体 Cd-3 とその欠失した領域を含むC-末端断片とが機能的に相互作用するか否かを両者の共発現により検討した。Cd-3とATドメインより下流のC-末端断片(Nd-1)との共発現では、CYCが機能したYWA1の生産がわずかに認められたが、ACP2以下からなるNd-3と共発現させるとYWA1の生産はNd-1との場合の約6倍に達し、CYCドメインのみからなるNd-4との共発現では、YWA1の生産は約8倍に増大した。この結果は、iterative type I PKSにおいて、CYCドメインを独立のタンパクとして発現させた場合でも、PKSのACP上のヘプタケタイド中間体に作用し、CYCとして機能し得ることを示している。また、Cd-3単独でのDHCI生産性と比べ、Cd-3とNd-4との共発現ではYWA1生産性が著しく高いことから、CYCドメインを欠くCd-3単独では縮合反応は正常に進行するものの、生成チオエステルの非酵素的な加水分解による酵素からの遊離が律速となりDHCIの生産性が押さえられているものと考えられる(図6)。¹⁷⁾

この結果は、糸状菌に見られるiterative type I PKSにおいて、その機能ドメインを分離・独立して発現させ、これがPKS本体と相互作用し、全長PKSと同等の機能を再構成できることを示した最初の例と考えられる。

PKSは非常に巨大なタンパクであったり、あるいは酵素複合体であったりするため、直接*in vitro*での反応に用い化合物を得ることは、少なくとも現在のところ実用的ではない。しかし、アシルCoAを基質として、非常に複雑な炭素骨格の化合物を生み出すことができるPKSの合成ポテンシャルは高い。今後、発現系の改良やドメイン交換などの遺伝子工学的手法を基盤として論理的にPKSをエンジニアリングする方法論をさらに発展させ、生物をホストとした生物合成系の主役として医薬原料の供給などに貢献できるようになることを願っている。

文 献

- 1) Hopwood, D. A.: *Chem. Rev.*, **97**, 2465 (1997).
- 2) Beck, J. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **192**, 487 (1990).
- 3) Fujii, I. *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 1 (1996).
- 4) Fujii, I. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1445 (1999).
- 5) Watanabe, A. *et al.*: *Tetrahedron Lett.*, **40**, 91 (1999).
- 6) Watanabe, A. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **192**, 39 (2000).
- 7) 柏 延之ら: 第3回糸状菌分子生物学コンフェレンス講演要旨集, p. 37 (2003).
- 8) Mayorga, M. E. and Timberlake, W. E.: *Mol. Gen. Genet.*, **235**, 205 (1992).
- 9) Watanabe, A. *et al.*: *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7733 (1998).
- 10) Fujii, I. *et al.*: *Chem. Biol.*, **8**, 189 (2001).
- 11) Kennedy, J. *et al.*: *Science*, **284**, 1368 (1999).
- 12) Auclair, K. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11519 (2000).
- 13) 笠原 堅ら: 第3回糸状菌分子生物学コンフェレンス講演要旨集, p. 34 (2003).
- 14) 下牧重樹ら: 日本薬学会第122年会講演要旨集, p. 107 (2002).
- 15) Kealy, J. T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 505 (1998).
- 16) Tsai, H.-F. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **31**, 29292 (2001).
- 17) 藤井 勲ら: 第45回天然有機化合物討論会講演要旨集, p. 13 (2003).