



最前線

多様性の科学：天然物科学

海老塚 豊

YUTAKA EBIZUKA

東京大学大学院薬学系研究科教授

1

はじめに

タイトルにもワープロの変換ミスがあると喜んでいる読者がいるかも知れないが、このタイトルは決してミスではなく意図的につけたものである。本号の特集では天然物化学の最近の進歩がテーマになっているが、最近の進歩の少なからざる部分が化学という武器だけで発展してきたわけではないことには、異論は少ないものと思う。歴史的に、動植物や微生物の生産する天然物、あるいはほぼ同義語として使われる2次代謝産物が、もっぱら有機化学者により研究対象として取り上げられてきたことから、構造解析や全合成等化学的手法による研究だけでなく、天然物の示す生物活性や生合成も天然物化学の一分野として扱われてきた。しかし、天然物の示す多彩な生物活性や複雑な生合成の機構を更に踏み込んで探究しようとする、研究者は受容体や生合成酵素等のタンパク質、またそれらをコードする遺伝子やその遺伝子の発現を制御する遺伝子などについても自らの手で扱う必要性に迫られてくる。そこで、私としては天然物を扱う学問を「天然物科学」と称してはどうかここに提案したい。私の研究室も今のところは天然物化学という看板をかけているが、時期を見て変更しようと思っている。ちなみに、科学研究費補助金の複合領域に天然物化学、生物活性物質、生体機能、分子認識等をキーワードとする「生物有機科学」という細目がある。最初に目にした時は若干違和感を感じたものだが、現在では関連分野の研究者にかなり浸透してきているのではないだろうか。読者諸兄のご意見をお聞かせ頂きたい。

さて、微生物・植物の生産する2次代謝産物は、

極めて構造多様性に富んだ化合物群であり、その多彩な構造と広範な生理活性から、医薬、農薬、食品添加物、香料、色素などとして人類に多大な恩恵をもたらしてきた。現在、また近未来においても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なケミカルプールとして期待されている。天然物は多様な生物種に特異的な代謝産物であり、またそれぞれの構造多様性のゆえに研究対象として魅力があるとすれば、天然物科学を多様性の科学と言って良いだろう。これら天然物の構造多様性は、多段階の酵素反応からなる生合成経路により創出されている。本稿では、天然物の示す構造多様性の根源である生合成経路の最上流の酵素群につき、我々の研究を含めたいくつかの例を挙げ分子生物学的手法による機能解析研究の最近の成果を紹介したい。

2

CHS Super Family

カルコン合成酵素(CHS)は、植物の2次代謝産物生合成に関わる酵素として、最も古くから研究された酵素である。この酵素は、*p*-クマロイル-CoA とマロニル-CoA を基質とし、すべてのフラボノイドの生合成鍵中間体となるカルコンを合成するポリケタイド合成酵素の一種である。現在までに、配列相同性を利用した分子生物学的手法により、多くの植物から200種を超える相同遺伝子が得られておりCHS Super Family と総称されている。¹⁾ これらの遺伝子の産物はいずれも42~43 kDaのタンパクで互いに60%以上の配列相同性を示す。大腸菌や酵母など異種生物で活性タンパクとして発現可能であるが、酵素機能が同定されているクローンは必ずしも多くない。ヨーロッパ産のマツやナンキンマメか

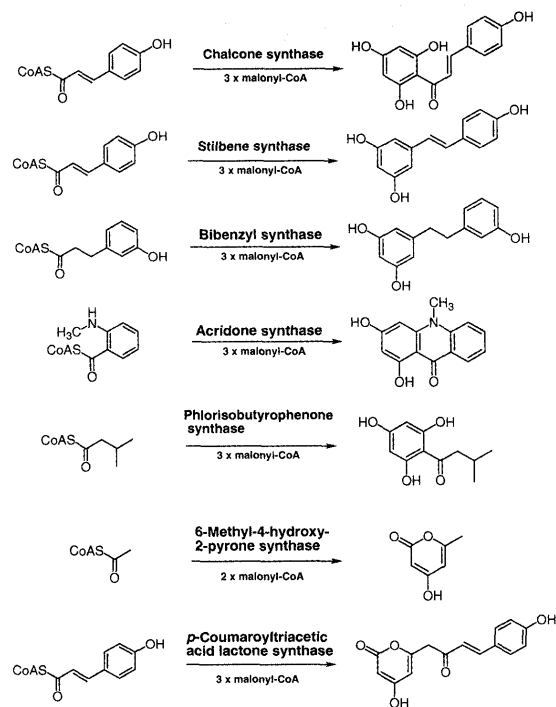


図1 CHS Super Family Member の酵素機能

ら得られるクローンには、CHS 反応と全く同じ基質からスチルベンの骨格を与えるものがある(スチルベン合成酵素, STS)。

また、我々がアマチャから得たクローンは炭素鎖の伸長はするが閉環機能を持たず、結果としてクマロイルトリアセティックラクトンを生成する。²⁾ その他にも基質特異性がかなり異なるクローンが存在する。これらの例を図1に示した。CHSは植物に特異的なものと考えられていたが、放線菌からも約30%の配列相同性を示すクローン(*RppA*)が得られ、大腸菌で発現したタンパクは5分子のマロニル-CoA から1,3,6,8-テトラヒドロキシナフタレン(T4HN)を生成し(図10参照)、この放線菌におけるメラニン合成を担っていることが判明している。³⁾

現在キメラ酵素や変異酵素の作成によりこれらのクローンの示す基質・生成物特異性の制御機構が多くグループにより研究されている。パセリ由来のCHSに続き、昨年にはガーベラ由来の4-ヒドロキシ-6-メチルピロン合成酵素についても約2Åの解像度でX線結晶構造が報告された。⁴⁾ 近々には2種の異なる植物由来のSTSについてもX線結晶構造が報告されると聞いている。CHSとピロン合成酵素

は全体としては良く似た活性部位構造を有しており、また触媒残基も共通に存在するものの、メチルピロン合成酵素においてはスターターを認識する部位の体積が明らかに小さく、これが基質及び生成物特異性を制御しているといわれている。X線結晶構造が得られた2種のSTSのうち一方はむしろCHSに近い活性部位構造を持つといわれており、CHSとSTSの生成物特異性の制御については未だ結論には至っていないようである。⁵⁾

3

オキシドスクワレン閉環酵素

高等植物には80種にのぼるトリテルペン骨格が存在しており、その大部分はオキシドスクワレンの閉環反応で形成される。高等植物では環化生成物のトリテルペンアルコールはさらに骨格上の様々な変換を受けた後、糖転移酵素により配糖化されサポニンとして蓄積されることが多い(図2)。これらの中には、ニンジンのジンセノサイド、カンゾウのグリチルリチン、サイコのサイコサポニン等、漢薬の有効成分となっているものも多い。

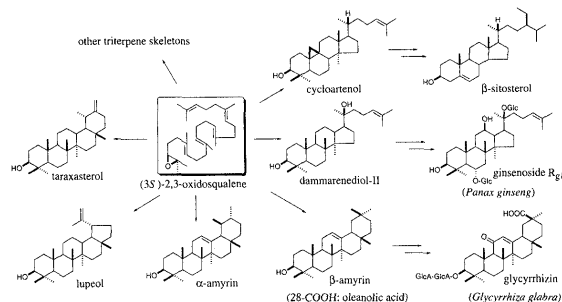


図2 オキシドスクワレン閉環酵素とトリテルペンサポニン

我々のグループでは、トリテルペン生産植物を材料に相同性を利用したPCR法によるオキシドスクワレン閉環酵素cDNAの探索を試み、これまでに約30種のクローンを得ている。得られた遺伝子産物の酵素機能については酵母の発現系で同定した。ルペオール合成酵素,⁶⁾ β-アミリン合成酵素,^{7,8)} ククルビタジエノール合成酵素⁹⁾といった骨格特異的合成酵素と共に、複数の異なる骨格の生成物を与える多機能型酵素が存在することも明らかにした。^{8,10)}

酵素機能未同定のものもあるが、これらのアミノ酸配列は互いに 50% 以上の相同性を示し、系統樹を作成すると¹¹⁾ (一部のクローンを除き) 生成物が同一のクローンがクラスターを形成することから、酵素機能の分化が植物種の分化に先だって起こっていることが明らかとなった(図 3)。また、トリテルペン骨格合成酵素は、植物に普遍的に存在するステロール合成系のサイクロアーテノール合成酵素を遺伝的祖先として進化したことが分かる。シロイヌナズナから得た 1 クローンは、何と 9 種もの異なる骨格の生成物を与える多機能型酵素であるが、このクローンは、同じシロイヌナズナ由来の低特異性ルペオール合成酵素(マイナー生成物として β -アミリンなど 4 種の化合物を生成)、エンドウ由来の多機能型酵素(α -アミリン、 β -アミリンを主生成物とし計 7 種のトリテルペンを生成)と共に系統樹中最も分化の進んだ位置に存在しており、このことが何を意味しているのか興味を持たれる。

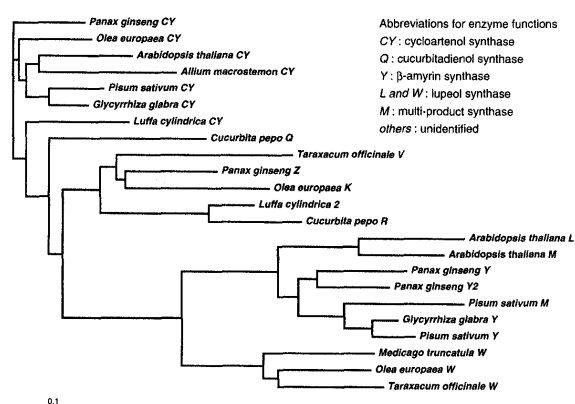


図 3 植物由来オキドスクワレン閉環酵素の系統樹

異なる骨格の生成物を与えるトリテルペン合成酵素のクローニングに成功したことから、生成物特異性をもたらす機構の解析をタンパクレベルで行うことが可能となった。そこで、 β -アミリン合成酵素とルペオール合成酵素を材料に、ポリペプチド上の生成物特異性の制御に関与する領域の特定を試みた。¹²⁾ ルペオールと β -アミリンの骨格生成反応は途中まで全く同じメカニズムで進行し、仮想中間体であるルペニルカチオンにおけるメチル基からの脱プロトン(図 4 経路 a)によりルペオールが、またルペ

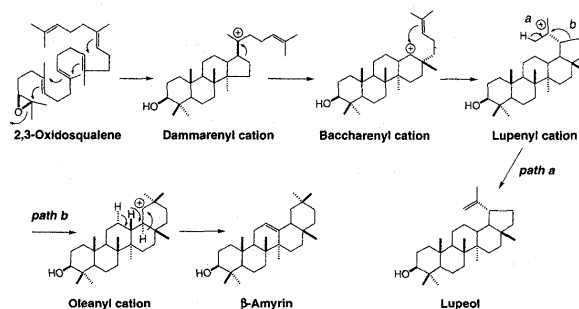


図 4 ルペオールと β -アミリンの生成機構

ニルカチオンに対し 5 員環の C-C 結合が転移し、以下 2 回の 1, 2-ヒドリド転移, 12a プロトンの脱離(経路 b)により β -アミリンが生成すると考えられる。

β -アミリン合成酵素とルペオール合成酵素のアミノ酸配列は全領域にわたり 70% と高い相同性を示す。両者の全長をほぼ均等に 4 等分する共通の制限酵素部位を利用し可能な組み合わせすべてのキメラ体を構築した。また混合 PCR 法によるキメラ体も作成した。その結果、数種のキメラ体による形質転換酵母においてルペオールと β -アミリンの両者を生成していることが分かり、その生成比の違いからポリペプチド全体のうち約 1 割に当たる N 末側から 258~340 残基の領域(図 5☆)が生成物特異性に重要であることを明らかにした。

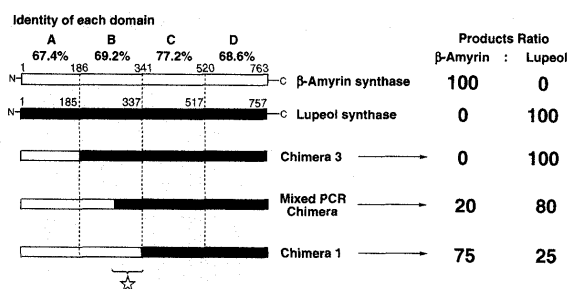


図 5 ルペオール合成酵素と β -アミリン合成酵素間のキメラ酵素

この領域において両酵素間で異なるアミノ酸残基につき、部位特異的変異導入による生成物特異性に関与するアミノ酸残基の特定を試みた。¹³⁾ 今までにクローニングされたすべての β -アミリン合成酵素において保存されている 259 番目の Trp を Leu(ル

ペオール合成酵素の配列)に改変したところ(図6 a), ルペオールと β -アミリンを約2:1の比率で生成し, 逆にルペオール合成酵素のLeuをTrp(β -アミリン合成酵素の配列)に改変したところ(図6 b), β -アミリンをほぼ単一に生成することが明らかとなった. このことはLeuからTrpへの変異がルベニルカチオン以降の環拡大へと反応を進行させたことを意味し, ルペオール合成酵素に新たな機能を付加したものといえる. これらの酵素タンパクの構造についてはアミノ酸配列以上の情報は得られておらず, 現在のところは推定にすぎないが, ルベニルカチオンから環拡大が起こった後のオレアニルカチオンをこのTrpの π 電子が安定化するためと考えている.

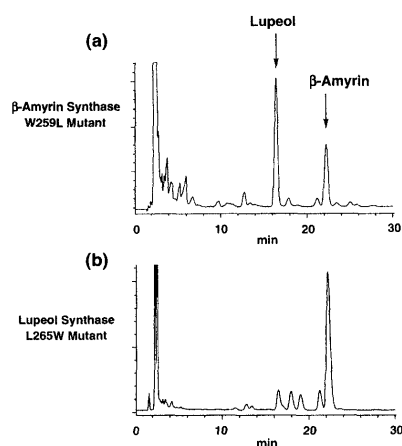


図6 点変異導入によるトリテルペン合成酵素の機能変換

さらにすべての5環性トリテルペン合成酵素において保存されている261番目のTyrをHisに改変したところ, β -アミリン, ルペオールいずれとも異なるトリテルペンが生成した(図7). 各種機器分析を行ったところダンマラン骨格のジエノール3種の混合物であることが明らかとなった. この結果は閉環反応が4環性のダンマレニルカチオンで停止し, 置換したHis残基による脱プロトンが生じたことを意味しており, 一方, 本来のTyr残基はD環が6員環へ拡大した後に生じるカチオン中間体の安定化に寄与していることが示唆された. 以上のように, 約750残基からなるポリペプチドのわずか1アミノ酸残基の置換により生成物特異性を劇的に制

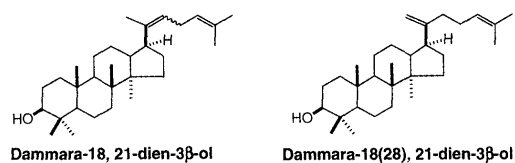


図7 点変異(Y 261 H) β -アミリン合成酵素の生成物

御できることをみだし, またその特異性を支配する化学的原理についても重要な知見を得ることができた. 活性部位構成アミノ酸残基の合理的な置換により, 生成物特異性の異なる合成酵素を自由にデザインし, さらに非天然型トリテルペン骨格の創出にも道が拓けたと考えている.

4

糸状菌由来ポリケタイド合成酵素

糸状菌のポリケタイド合成酵素(PKS)は, いずれも分子量200 kDa前後の多機能型のタイプI型であり, かつ放線菌のマクロライド系PKSがmodule型であるのとは異なり, 炭素鎖伸長のたびごとに同じ活性部位が繰り返し使われるiterative型であることが明らかになってきた(図8).¹⁴⁾ しかし, 実際の生成物が同定されている例はほとんどなく, β -ポリケトメチレン鎖の鎖長や閉環様式をどのように制御しているかは全く不明であった. 我々は, *Aspergillus terreus* よりクローニングしたatX遺伝子¹⁵⁾を例に, 先に構築した異種糸状菌発現系が糸状菌PKSの酵素機能解析に極めて有用であることを明らかにした. この発現系を用い数種の糸状菌由来PKSについて機能解析を行ってきた.

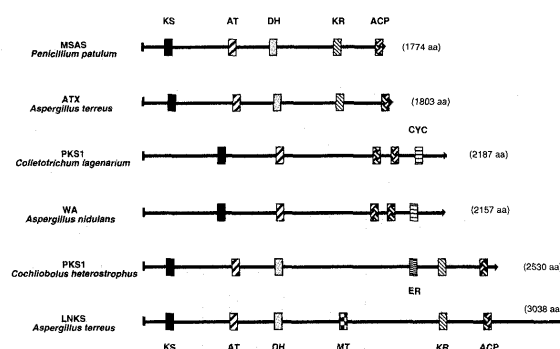


図8 糸状菌タイプI型PKSの遺伝子構造

Aspergillus nidulans よりクローニングされた *wA* 遺伝子は無性世代緑色胞子色素の生合成に関わる遺伝子とされていたが、生成化合物も含めその機能は不明であった。この *wA* 遺伝子を導入した *Aspergillus oryzae* の形質転換体はヘプタケタイド(C-14)のイソクマリン化合物を生産し、*wA* 遺伝子がヘプタケタイド合成酵素をコードしていることが明らかになった。¹⁶⁾ その後、報告されていた *wA* 遺伝子の塩基配列に誤りをみだし、訂正した完全長 *wA* 遺伝子(*mwA*)を同じ発現系で発現させ、完全長タンパクの実際の生成物が同様にヘプタケタイドではあるがナフトピロン化合物であることを明らかにした。¹⁷⁾ このナフトピロンが本来の *A. nidulans* 胞子色素の前駆体である。

C 末領域の欠失により本来のナフトピロンではなく、イソクマリン体が生成したことから、これまでチオエステルとされていた C 末領域が、実際はナフトピロン生成の際のクライゼン型閉環反応を触媒する領域であることが示唆された。そこで、C 末の段階的欠失、部位特異的変異導入を行い、クライゼン型の閉環に Ser-1967, His-2129 が必須であることを証明した。¹⁸⁾ これらの残基は他のクライゼン閉環型 PKS においても保存されており、His 残基によって活性化された Ser 残基に最後の縮合反応を終えたポリケタイド中間体が ACP から転移し、ポリケトメチレン鎖上に生成したカルバニオンがチオエステルのカルボニル炭素を攻撃するという共通の反応機構を提唱している(図 9)。

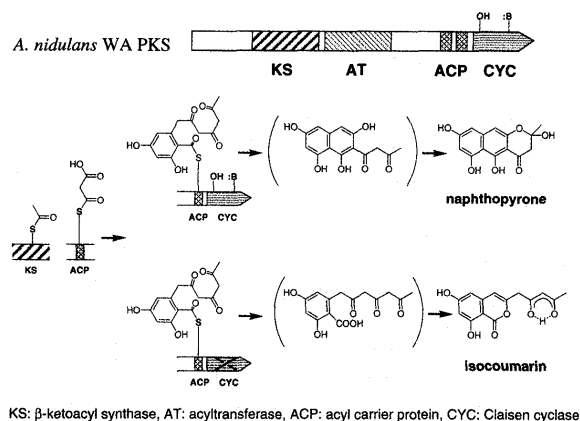


図 9 WA PKS のクライゼン型閉環反応

ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum lagenarium* よりメラニン生合成に関わる遺伝子としてクローニングされた *PKS 1* 遺伝子を、同様に *A. oryzae* で誘導発現させたところ、DHN-メラニン生合成(図 11)の最初の中間体とされている 1,3,6,8-テトラヒドロキシナフタレン(T4HN)を主たる生成物として同定した(上記 RppA の生成物と同じ化合物)。さらにマイナーな生成物を検索したところ、T4HN と同じペンタケタイド(C-10)である単環性のフェノールカルボン酸を同定した。¹⁹⁾ 本化合物は、T4HN 生成反応において、ナフタレン環の 2 環目の閉環が進行せず生成したと考えられた。この化合物が得られたことは 2 環目の閉環がクライゼン型の反応で生成したことを示しており、そうだとすると本反応のスターターがアセチル-CoA ではなくより活性化されたマロニル-CoA であることが想定された。実際に、形質転換体より部分精製した酵素を用いる *in vitro* の系で、マロニル-CoA が伸長単位としてだけでなく、スターターとしてこの反応に関与していることを明らかにした。²⁰⁾

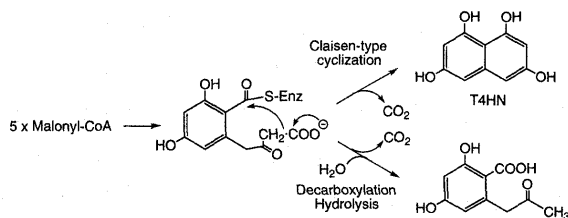


図 10 PKS 1 の反応

ヒトの真菌感染症であるアスペルギルス症の病原菌 *Aspergillus fumigatus* においては、胞子メラニンの生成が、ヒトへの感染の重要な因子であることが明らかにされている。胞子色素変異株の変異相補を指標とし、胞子色素生合成遺伝子クラスターをクローニングしたところ、6 個の ORF が存在しており、PKS(*alb 1*)のほか DHN-メラニン生合成に関与する酵素をコードしているものと考えられた。*Alb 1* の配列は上記ペンタケタイド合成酵素 PKS 1(43%)よりもヘプタケタイド合成酵素である WA(67%)と高い相同性を示し、その生成物に興味をもたれた。*Alb 1* PKS を *A. oryzae* で誘導発現させ生成化合物を同定したところ WA の生成物と同じナフトピロ

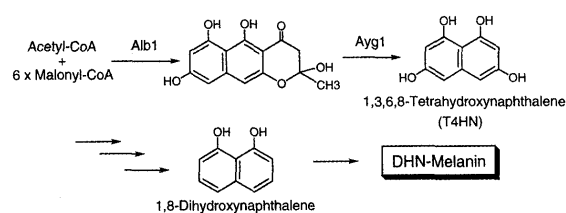


図 11 DHN-メラニン生成と Alb 1 PKS

ンであることが明らかとなった。²¹⁾ このナフトピロンはヘプタケタイド(C-14)であり、ペンタケタイド(C-10)である T4HN とは異なり *A. nidulans* における緑色胞子色素の前駆体である。しかし、*A. fumigatus* の *alb 1* 遺伝子破壊株は全くメラニンを生産せず、また、これに *alb 1* 遺伝子を導入するとメラニンを生産する。このことから、*alb 1* 遺伝子が異種糸状菌 *A. oryzae* では正しく機能せずナフトピロンを与える可能性、あるいは、クラスター中にコードされる他の酵素タンパクと共同で機能することによりペンタケタイド T4HN 合成酵素として機能する可能性が考えられた。そこで、遺伝子クラスター中の機能未知の遺伝子 *ayg 1* を *alb 1* とともに *A. oryzae* に形質転換導入し同時に発現誘導したところ、ナフトピロンの生産は全く認められず T4HN の生産が確認できた。次いで、それぞれ単独で発現した菌体より調製した粗酵素液を用い、*in vitro* での反応を検討したところ、ヘプタケタイドのナフトピロンが Ayg1 により 2 次的に側鎖切断を受け T4HN が生成するというこれまでに例のない新しい DHN-メラニン生成系の存在を実証することができた。²²⁾ この Ayg1 の触媒する反応は、芳香環とカルボニル炭素間の C-C 結合を加水分解的に切断する他に類例のない反応であり、現在本酵素の精製と特性化及び反応機構の解析を進めている。

5

おわりに

ここで紹介した生合成酵素群はいずれも 2 次代謝産物生合成経路の上流に位置し、普遍的に存在する基質を利用しており 1 次代謝との分岐点となっている。これらの生合成酵素はそれぞれのグループ内で

は高い配列相同性を示すが、個々の酵素の示す基質特異性や生成物特異性は、微妙に、また時として劇的に異なっている。このことは、生合成酵素遺伝子が、酵素としての活性を保持しつつ、活性部位の構造を微妙に変化させながら分化し特異性が多様化してきたことを示している。世紀の変わり目になってヒトの、また高等植物としてはシロイヌナズナの全ゲノム配列が報告され、今後も多くの生物種のゲノム解析が加速されるだろう。CHS や STS のように、たとえ遺伝子取得が容易になりタンパクの X 線結晶構造が得られたとしても、酵素タンパクの示す基質生成物特異性が直ちに解明されるわけではない。天然物の示す構造多様性の起源となる生合成酵素の反応特異性については、異種発現タンパクの生化学的解析など従来からの方法論による解析を着実に進めなければならない。その際、起源生物の生産する 2 次代謝産物についての情報が大きな助けになることはいうまでもない。シロイヌナズナはモデル植物として植物関連分野の研究に多大な貢献をしてきたが、残念ながら同定されている 2 次代謝産物の数は、現在でもフラボノイドやテルペノイドなど数えるほどにすぎないのである。

文 献

- 1) Schröder J., *Recent Adv. Phytochem.*, 34, 55 (2000).
- 2) Akiyama T. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 263, 834 (1999).
- 3) Funa N. *et al.*, *Nature*, 400, 897 (1999).
- 4) Jez J. M. *et al.*, *Chem. Biol.*, 7, 919 (2000).
- 5) Schröder J., personal communication.
- 6) Shibuya M. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 266, 302 (1999).
- 7) Kushiro T. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 256, 238 (1998).
- 8) Morita M. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 267, 3453 (2000).
- 9) 足立伸也ほか, 日本生薬学会第46回年会, 講演要旨集, 大阪, 1999, p. 96.
- 10) Kushiro T. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 41, 7705 (2000).
- 11) Shibuya M., *Natural Med.*, 55, 1 (2001).
- 12) Kushiro T. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1208 (1999).
- 13) Kushiro T. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 6816 (2000).
- 14) Fujii I., "Comprehensive Natural Products Chemistry," Pergamon, Vol. 1, Chap. 16, 1999, p. 409.
- 15) Fujii I. *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 253, 1 (1996).
- 16) Watanabe A. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 39, 7733 (1998).
- 17) Watanabe A. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 40, 91 (1999).
- 18) Fujii I. *et al.*, *Chem. Biol.*, 8, 189 (2001).
- 19) Fujii I. *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 63, 1445 (1999).
- 20) Fujii I. *et al.*, *Biochemistry*, 39, 8853 (2000).
- 21) Watanabe A. *et al.*, *FEMS Microbiology Lett.*, 192, 39 (2000).
- 22) Fujii I. *et al.*, submitted for publication (2001).