

## 「植物生合成酵素の機能改変と物質生産系の確立」

研究期間:2020年11月～2024年3月

研究者:森貴裕

## 1. 研究のねらい

植物が生産する二次代謝産物はその構造の複雑さ、高い生物活性、多様な物理化学的特性から現在利用されている医薬品やバイオ産業品として大きな役割を担っている。遺伝子操作技術の進歩とシーケンサーの発展により、植物二次代謝産物生合成遺伝子の報告例も増加してきている。しかし、二次代謝産物を生合成する酵素の中には、活性部位を構成する数残基のアミノ酸の違いにより大きく機能が変化するものがあるため、その配列から機能を推測することは難しく、精製酵素による機能解析と、酵素立体構造を基盤とした反応機構の解析が植物分子生合成を完全に理解するには重要である。さらに、いくつかの植物分子生合成においては、生体内において酵素間で相互作用し、細胞内で特異的な巨大複合体、メタボロンを形成することで、チャネリング効果により生合成反応の効率化が行われていると提唱されている。しかし、メタボロンを立体構造的に解析し、詳細な原子レベルでの相互作用を明らかとした研究例は少なく、そのチャネリングの分子基盤は明らかとされていない。また、二次代謝酵素の中には、広範な基質特異性を示すものが多く、設計した合成基質を作用させたり、酵素遺伝子を他の生合成経路のものと置き換えることで非天然型新規化合物の創出が可能となる。しかしながら、適用できる生合成経路は限られ、多くの場合において収量が著しく減少することが報告されている。

このような背景のもと本研究では、X線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡を用いた酵素立体構造解析を利用し、生体内における酵素複合体や基本骨格構築に重要な代謝酵素の詳細な構造機能を理解した上で、有用物質の生産に利用可能な生体触媒の創出と、生体内におけるメタボロンに倣ったチャネリング効果を考慮した物質生産系の確立を目指した。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

本研究では、植物二次代謝産物生合成の「解析、改変、利用」を目的とし、生合成鍵酵素や生合成、代謝に関わる酵素複合体の立体構造解析と、構造を基盤とした酵素の人為的制御、高効率有用物質生産系の確立を試みた。

生合成酵素利用した非天然型植物分子の生産としては、ベンジルイソキノリンアルカロイドの生合成中、分子多様性の構築に関わる CYP450 酵素に対し、推定反応機構をもとにデザインした基質アナログを作用させることで新規化合物の創出に成功した。また、基質選択性と生成物の比較から反応機構に関する知見を取得した。

植物分子の生合成、代謝に関わる酵素複合体の構造解析として、C-配糖化フラボノイド植物分子化合物の代謝に関わるヒト腸内細菌由来の脱配糖化酵素複合体の構造機能の解明、テルペノイド生合成系におけるプレニル基転移酵素とテルペン環化酵のキメラ型酵素の機能解析、構造解析を行い、スクアレンを介さずトリテルペノイドを生産する新規酵素の反

応機構、反応中におけるドメイン間のチャンネルリング効果の構造基盤を解明した。

さらに、局在化を考慮したコンビナトリアル生合成の効率化技術の確立を目的に、生合成経路をタンパク質で形成されたシェル内に内包させ、代謝反応効率を向上させる系の構築も行なった。植物分子クルグミンの生合成系をモデルとして、シェル内へ目的酵素を取り込むための認識ペプチド最適化を行い、作成した新規認識ペプチドを付加した酵素群利用することで局在を考慮した物質生産系を最適化した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A) 植物由来化合物の生合成基盤の解明と非天然型植物分子の生産

本研究項目では、植物分子の基本骨格構築に関与する酵素、特にこれまでに研究報告例の少ない CYP450 酸化酵素を中心に、化学合成した人工基質を作用させることで非天然型の植物分子類縁体の創出を試みた。

ベンジルイソキノリン化合物、magnoflorine の生合成に関わる corytuberine synthase (CYP80G2) に対して、本来の基質である reticuline の芳香環上の水酸基をニトロ基やアミノ基へと置換した合成基質アナログを作用させた結果、ニトロ基へと置換した化合物は基質として認識されなかった一方で、アミノ基へと置換した化合物からは 2 種類の生成物を確認した。生成物の UV スペクトルおよび MS/MS フラグメントの比較から、生成物の一つは corytuberine 型の環化反応が進行した化合物であると決定した。CYP80G2 の酵素反応は、reticuline の構造中、芳香環上の水酸基の水素原子がヘム活性中心により引き抜かれると考えられており、水素原子を持たないニトロ基へ変換した化合物は受け入れられず、水素原子を有するアミノ基では活性を維持していたことから、置換した位置における水素原子の重要性が示唆され、提唱されている CYP80G2 の推定反応機構を支持する結果であると考えている(論文投稿準備中)。

### 研究テーマ B) 天然物を生合成/代謝する酵素群の複合体立体構造解明

酵素複合体の立体構造解析として、大豆や葛に多く含まれる C-配糖体化合物の脱配糖化に関わる複合体酵素の構造機能解析、および、トリテルペノイド生合成に関与するプレニル基転移酵素とテルペン環化酵素のキメラ型酵素のドメイン間相互作用の立体構造解明に成功した。

植物に含まれるイソフラボン類グリコシド化合物は、腸内細菌によって脱糖化反応や変換反応が進行した後に吸収され、エストロゲン様活性を示す。C-グリコシド化合物 puerarin や orientin の脱糖化は、酸化還元酵素による糖部分の酸化反応と、引き続き hypothetical protein/sugar phosphate isomerase の複合体による C-C 結合切断反応により脱グリコシル化を行うことが判明していた。しかし、これらの酵素の基質特異性や、生化学的性質、立体構造などは明らかとされていなかった。本研究においては、巨大複合体を形成する脱糖化酵素複合体(DgpBC および DfgAB)に着目し、クライオ電子顕微鏡や X 線結晶構造解析を用いた酵素立体構造の解明を行い、その複合体の立体構造基盤および、酵素反応中における

活性部位構造の動きについて解析し、複合体酵素が触媒する C-C 結合の切断反応機構を考察した(図1)。本成果により、生体内においてイソフラボン類を吸収するための酵素的機構を明らかとした。エクオールをはじめとするイソフラボン類はその効果から特定保健用食品や健康食品にも利用されており、その吸収を促進する酵素の触媒反応メカニズムや生化学的特性を明らかとする事は、新たなプロドラッグ様化合物の創出や酵素の医薬品、食品添加などに対する利用へとつながり、薬学、食品化学の発展への貢献が期待される。

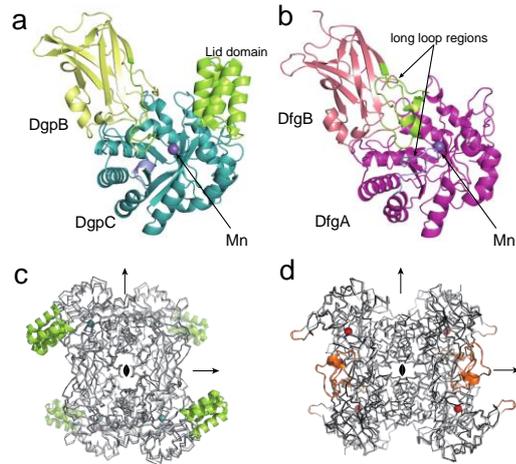


図1. C-脱グリコシル化酵素複合体の立体構造

テルペノイド生合成に関与するプレニル基転移酵素とテルペン環化酵素のキメラ型酵素の構造機能解析として、植物病原性糸状菌からスクアレンを介さずトリテルペノイドを生合成する新規トリテルペン合成酵素 TvTS および MpMS を発見、機能解析した。さらに、新規トリテルペノイド生合成経路における酵素反応の分子機構の解明とプレニル基転移酵素ドメインとテルペン環化酵素ドメイン間の相互作用による反応効率化機構の構造基盤解明にも成功した。

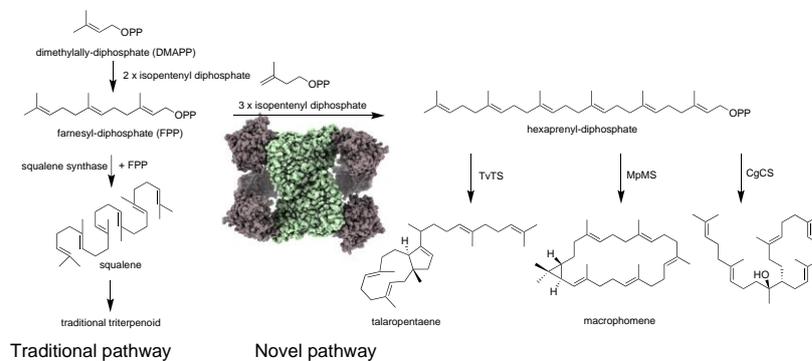


図2. 新規トリテルペノイド合成酵素の反応と構造

本成果は既存の常識を覆す新たな生合成経路と画期的な新奇酵素の発見であり、今後、植物に存在する酵素の機能解析および構造解析から同様なトリテルペン生合成経路の発見が期待される。また、このプレニル基転移酵素とテルペン環化酵素の相互作用様式を他の酵素において摸倣し、合成生物学の手法を用いた生合成マシナリーの再設計により、創薬研究に幅広く貢献することも期待される。

### 研究テーマ C) コンビナトリアル生合成の効率化技術の確立

本研究項目では、微生物において見出される Bacterial MicroCompartment (BMC) に着目し、生合成酵素の局在化による物質生産効率の向上を試みた。BMC は、微生物の細

胞内に存在し、脂質膜ではなくタンパク質のみで形成される多面体のシェル構造であり、ペプチドタグを認識してシェルケーシング内に様々な生合成酵素群を内包することで、酵素間でのチャネリング効果を増大させ、毒性生成物から細胞を保護し、不安定中間体の分解や内部酵素のプロテアーゼによる分解を軽減している。本研究では、*Salmonella enterica* の由来 propandiol 生合成中の BMC (Pdu シェル酵素群) を用いた。

まず、生合成酵素を BMC 内に取り込むための認識ペプチドの最適化を行い、進化工学的手法により野生型より効率的に取り込まれる認識ペプチドタグを創出した。次に、クルクミノイドの生合成をモデルとして、最適化した認識ペプチドタグを利用し、効率的な物質生産系の確立を行なった。クルクミノイドの生合成を行う 3 種の酵素に加え、補酵素の生合成遺伝子群等をマイクロチューブ型の構造を形成する Pdu シェル (Pdu\_MT) とともに発現させることで、タグを付加しない発現系と比較して最大 2.4 倍にまでクルクミノイド生産量が增大することに成功した。また、構築した発現系が他のポリケタイド合成系にも応用可能であることを確認するため、CUS を naringenin chalcone の生合成に関わる III 型 PKS、HsPKS1 に置き換え、物質生産を行った結果、認識ペプチドなしの発現系から 3.7 倍向上し、約 11 mg/L のナリンゲニンの生産を達成した (論文投稿準備中)。

以上、ポリケタイド化合物の生合成酵素群と基質生合成経路酵素の局在化により、代謝経路の効率化に成功した。今後、培地に *p*-coumaric acid のアナログ体を添加し、生合成酵素群と共局在化を行うことで、非天然型化合物の物質生産系の構築へと繋げていく予定である。

### 3. 今後の展開

生合成酵素を利用した非天然型分子の生産としては、今後、さらに置換基や骨格を変えた基質アナログ化合物を合成し、それらと酵素やその変異体を組み合わせて反応を行うことで、非天然型新規化合物の創出を継続していく予定である。さらに、酵素合成した新規化合物対して生合成の下流酵素や植物の粗抽出液を作用させることで、さらなる化学変換反応を行い、修飾された化合物群の取得へと繋げる。このようにして 2024~2025 年度にかけて多数の基質アナログを用いた非天然型分子を創出する。それらの生物活性を評価し有用化合物を選抜することで、さらなる構造活性相関による創薬化学研究にも展開することが期待される。

酵素群の複合体立体構造解明としては、キメラ型酵素におけるプレニル基転移酵素とテルペン環化酵素間の相互作用構造基盤の解析同様、植物、微生物、動物に見出される独立型のテルペン合成酵素群における相互作用の解析を行うことで、生物種間におけるテルペノイド生合成反応効率化機構の一般性の解明へと発展させる。また、自然界にはテルペノイドのみならず、ポリケタイド、アルカロイドなど、生物種間を超えて類似した生合成機構で合成される天然物グループが多く存在する。引き続き、さまざまな天然物生合成経路において、酵素-酵素間相互作用を原子レベルで詳細に解明し、生物間における代謝効率化戦略の分布や相違性を明らかとしていく。これらの知見は今後の計算化学による酵素間相互作用予測の分野を発展させていくためにも重要な基礎的データとなり、さらに自然界における天然物生合成経路や酵素進化に関する新たな基本原理の知見の取得にもつながることが期待される。

コンビナトリアル生合成の効率化技術の確立としては、ポリケタイドの生合成経路における BMC へのコンパートメント化の有効性は示せたと考えているため、今後はテルペノイドやアルカロイドな

ど、さまざまな天然物物質生産系に対する有効性を示していきたいと考えている。その一方で、本手法は、膜結合型の酵素は BMC に取り込むことができないという制限を有しているため、その解決法を模索し、局在化を考慮した物質生産系をさらに発展させることで、これまでに解析されてきた天然物の生合成遺伝子群の知見を有用化合物の生産へと利用する、クリーンかつ経済的な新しい技術基盤の構築と社会実装を目指す。

#### 4. 自己評価

研究テーマ A においては、当初の研究目標として、ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成における CYP450 酵素の立体構造解析と酵素を利用した新規化合物の創出を上げていたが、合成基質アナログを用いた新規化合物の創出は一部達成できたものの、立体構造解析は発現、精製に難航し結晶構造が得られておらず、目標を達成することはできなかった。さきがけ研究期間内に達成できなかったことは残念であるが、さきがけ領域内での共同研究をきっかけに自身のテーマにおける酵素の発現、精製に関しても進み始めたため、引き続き植物 CYP450 酵素の立体構造解析を継続し、将来的に植物分子生合成におけるラジカルカップリングの反応機構解明につなげていきたいと考えている。研究テーマ B については、2 種類の生合成/代謝酵素群における酵素複合体を解明し、十分に目標は達成できたと考えている。特に、全ての生物が保有しているテルペノイド化合物生合成中の酵素ドメイン間相互作用の構造基盤の解明に成功したことは、自然界に広く分布する独立型テルペノイド合成酵素群におけるメタボロン形成について重要な知見を与え、今後の酵素-酵素間相互作用の研究に対する貢献が期待される。また、これらの酵素構造解析研究において、X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡の単粒子解析の両方を行い、どちらか一方の解析からでは解明が困難な、酵素の動きに関する知見と、溶液状態での酵素複合体構造を明らかとすることに成功した。このような知見は、酵素の構造解析から詳細に反応機構を理解するのに重要な要素であり、今後は計算化学と合わせて酵素構造機能解析研究に多く用いられると期待される。研究テーマ C においては、局在化を考慮した物質生産系を確立し、ポリケチド合成系についてその有用性を示すことに成功したため、目標の一部は達成できたと考えている。本成果については論文投稿準備中であるが、今後のコンビナトリアル生合成に役立つ知見を供給しうるものと期待している。将来的に、本手法と代謝工学的手法を組み合わせ発展させていくことで、有用天然物の発酵生産による創薬研究にもつながり、社会的にも大きな影響を与えると期待される。研究の進め方としては、研究成果が効率的に得られる研究実施体制及び研究費執行状況であったと考えている。特に、LC-MS は酵素反応による微量成分の検出に必須であり、基質アナログを作用させた際の生成物の検出及び、酵素構造解析後の変異体解析に大いに役立った。また、複合体構造解析研究を遂行するには、高い使用費のかかるクライオ電子顕微鏡を多数利用することが必須であったため、さきがけの支援により気兼ねなく本設備を使用できたことは研究遂行に重要な役割を果たした。また、本さきがけ領域で得られたネットワークを生かして、共同研究も多数展開することができており、将来的な科学イノベーションの基礎を築くことができたのではないかと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 19件

1. Tao, H.,<sup>#</sup> Lauterbach, L.,<sup>#</sup> Bian, G.,<sup>#</sup> Chen, R.,<sup>#</sup> Hou, A.,<sup>#</sup> Mori, T.,<sup>#</sup> Cheng, S., Hu, B., Lu, L., Mu, X., Li, M., Adachi, N., Kawasaki, M., Moriya, T., Senda, T., Wang, X., Deng, Z., Abe, I., Dickschat, J. S., Liu, T. “Discovery of non-squalene triterpenes” *Nature* **606**, 414-419 (2022) **# co-first author**

植物病原性糸状菌由来のプレニル基転移酵素とテルペン環化酵素のドメインからなるキメラ型テルペン合成酵素の機能解析を行い、スクアレンに由来せず、C30トリテルペンの主骨格を一挙に構築するという、新奇合成酵素を発見した。さらに、酵素のX線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析、変異実験から、酵素反応の立体構造基盤や、反応中におけるドメイン間相互作用とチャネリング効果の構造基盤を解明することに成功した。

2. Mori, T., Kumano, T., He, H., Watanabe, S., Senda, M., Moriya, T., Adachi, N., Hori, S., Terashita, Y., Kawasaki, M., Hashimoto, Y., Awakawa, T., Senda, T., Abe, I., Kobayashi, M. “C-Glycoside metabolism in the gut and in nature: Identification, characterization, structural analyses and distribution of C-C bond-cleaving enzymes.” *Nature Commun.* **12**, 6294 (2021)

植物由来ポリフェノールC-配糖体の炭素-炭素結合切断を触媒する酵素複合体に着目し、in vitro 機能解析やクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析、X線結晶構造解析による酵素複合体立体構造解析を行い、反応中の酵素の動きに関する知見と、溶液状態での酵素複合体構造を明らかとし、腸内細菌によるポリフェノール類配糖体の活性化機構の解明に成功した。このような腸内細菌による天然薬物の代謝機構の理解は、医薬品候補化合物を設計利用する上で重要な知見を与える。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものも含む)

1	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	
2	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待公演

1. Mori, T. “Function, structure, and engineering of biosynthetic enzymes.” 16th Asian Congress on Biotechnology 2023, Ho Chi Minh city, Vietnam, Oct. 2023.

2. Mori, T. “Structure-function analysis of C-N bond forming P450 enzyme in the biosynthesis of teleocidin” 日本薬物動態学会第 138 回年会/第 23 回シトクロム P450 国際会議国際合同大会、名古屋、シンポジウム 30, oxygenase in natural product biosynthesis. Sep. 2023.
3. 2022/12/22 日本薬学会関東支部、オンライン受賞記念講演会、オンライン、「天然薬物生合成酵素の機能解析と有用物質生産への応用」
4. 2022/12/1 第 45 回 日本分子生物学会年会、千葉、「クライオ電顕と X 線結晶構造解析による二次代謝産物生合成酵素の構造機能解析」
5. 2022/3/27 日本薬学会 第 142 年会、名古屋/オンライン、受賞講演「天然薬物生合成酵素の機能解析と有用物質生産への応用」
6. 2022/3/26 日本薬学会 第 142 年会、名古屋/オンライン、シンポジウム S08「タンパク質工学による創薬化学の新展開」、「酵素立体構造を基盤とした二次代謝産物生合成酵素の酵素工学」
7. 2021/6/4 第 23 回 酵素応用シンポジウム、オンライン、受賞講演、「C-N 結合形成酵素の反応機構解明と C-S 結合形成への応用」

#### 受賞

- 2021 年 6 月 第 22 回 酵素応用シンポジウム 研究奨励賞
- 2022 年 3 月 日本薬学会 奨励賞
- 2022 年 7 月 天然物化学談話会 奨励賞
- 2023 年 4 月 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
- 2023 年 10 月 第 65 回天然有機化合物討論会 奨励賞
- 2024 年 2 月 第 16 回 井上リサーチアワード