

# 植物ポリケタイド合成酵素の触媒機能の拡張と非天然型化合物群の創出

富山大学和漢医薬学総合研究所 天然物化学分野

森田洋行

## 1. はじめに

医薬資源としても重要な天然物の基本骨格を構築する二次代謝酵素の中には、活性部位の微妙な構造の違いにより基質特異性や反応様式が大きく変化するものがあり、これが天然物の多様性を生み出す大きな要因になっている。また、一般に、酵素の基質特異性は厳密で自由度が低いものとされているが、これらの中には寛容な基質特異性や潜在的触媒能力を有するものもある。我々は、二次代謝産物の構造多様性の創出に関わる限られた数の C-C 結合形成能を有する生合成酵素の生物有機科学と構造生物学の複合的検討が、*de novo* 合成にも応用可能な新たな生体触媒の開拓と無限の分子多様性の創出に結実することを信じ、二次代謝酵素の機能解析と新規化合物群の酵素合成法の開拓に取り組んでいる。

本稿では、フラボノイドやスチルベン等、医薬資源としても重要な植物ポリフェノールの基本骨格を構築する植物由来Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) を取り上げる。これらは、反応の立体化学が厳密に制御された「精巧な酵素システム」であるとは言い難く、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<sup>1,2)</sup>。Cys-His-Asn からなる活性中心触媒残基は、全てのⅢ型 PKS において例外なく保存されており、同一のケミストリーで、マロニル CoA の脱炭酸を伴った Claisen 縮合の繰り返しによる炭素鎖伸長反応が進行する。我々は、Ⅲ型 PKS の酵素工学的検討が創薬シードともなり得る無限の骨格多様性を生み出し得ることを、Ⅲ型 PKS の基質構造にアレンジを加え、かつ、Ⅲ型 PKS の酵素触媒機能を改変してⅢ型 PKS が触媒するマロニル CoA の縮合回数を拡張することによって実証してきた。今回は、Ⅲ型 PKS の X 線結晶構造解析と、それを基盤とした合理的な酵素触媒機能の拡張による新規化合物の創出について紹介する。

## 2. 植物ポリフェノールの基本骨格を構築するⅢ型 PKS について

植物由来Ⅲ型 PKS は、分子量約 4 万のサブユニットからなる、ケト合成酵素 (KS) のみで構成されたホモダイマー酵素であり、フラボノイドやレスベラトロール等、植物が生産するポリフェノール類の基本骨格を構築する酵素群である<sup>1,2)</sup>。例えば、植物に普遍的に存在するフラボノイドの骨格を構築するカルコン合成酵素 (CHS) は、1 分子のクマロイル CoA を開始基質として、3 分子のマロニル CoA に由来する C<sub>2</sub> 単位を順次縮合の後、クライゼン型の閉環反応が進行して、芳香環を形成し、ナリンゲニンカルコンを生成する (図 1)。これ以外にも、ブドウ等の限られた植物に分布するスチルベン合成酵素 (STS) やホップのバレロフェノン合成酵素 (VPS) 等、様々な機能を有するⅢ型 PKS が知られてい

る (図 1). このような分子多様性を生み出す要因として, 酵素反応の開始基質, ポリケタイド鎖長を決定するマロニル CoA の縮合回数, そして最終的な閉環反応様式の違いが挙げられる.

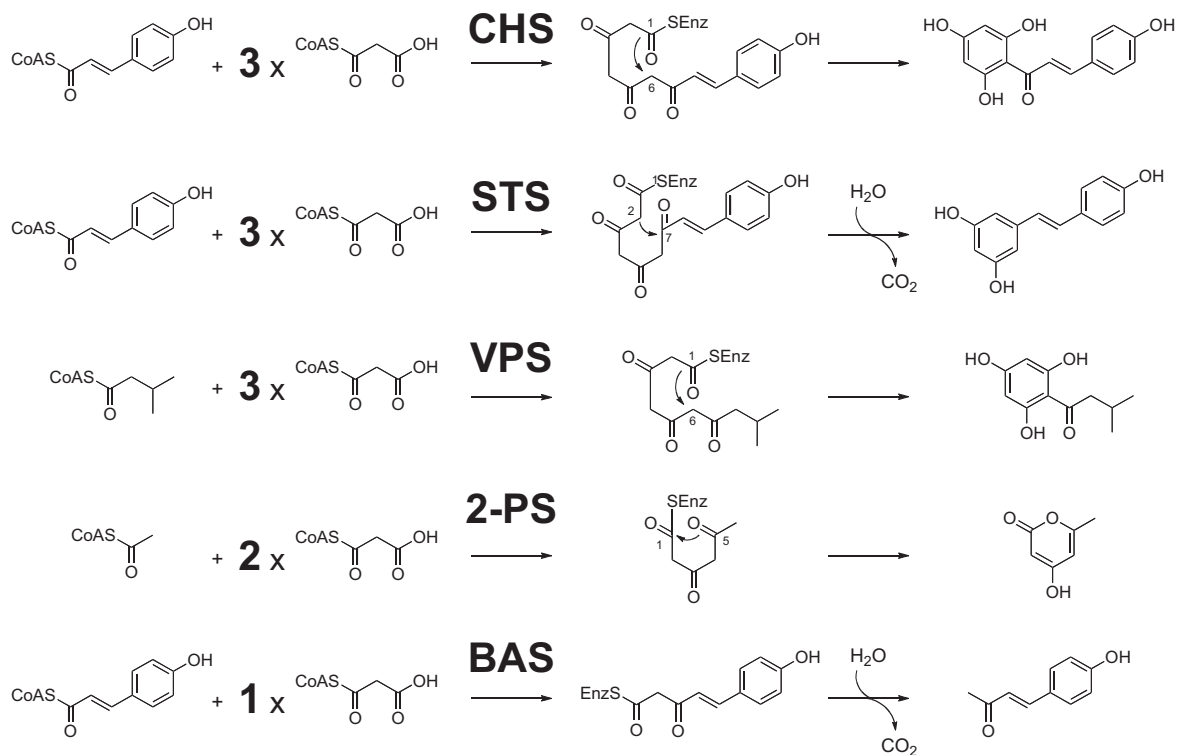


図 1 植物ポリフェノール類の生合成に関わる代表的なⅢ型 PKS

CHS ; カルコン合成酵素, STS ; スチルベン合成酵素, VPS ; バレロフェノン合成酵素, 2-PS ; 2-メチルパイロン合成酵素, BAS ; ベンザルアセトン合成酵素.

Ⅲ型 PKS の酵素反応は, 単量体それぞれのほぼ中央部に一つずつ存在する活性中心キャビティに, アシル基が取り込まれることによって開始する. これにより, 隣接する His との水素結合により安定化された活性中心 Cys のチオレートアニオンが, 開始基質のカルボニル炭素を求核攻撃する. 次いでこの Cys 残基を起点として, 伸長基質マロニル CoA の脱炭酸を伴ったアシル基の転移を繰り返し, 即ち, 炭素鎖伸長の度にいったん形成されたチオエステル結合が開裂して, そこに新たな C<sub>2</sub> 単位の挿入を繰り返し, 最後に β-ポリケトメチレン中間体がクライゼンあるいはアルドール型の縮合により閉環して, 酵素反応を終了する. この間, His と Asn 残基は, オキシアニオン・ホールを形成し, マイナスに荷電した遷移状態中間体を安定化することにより, マロニル CoA の脱炭酸とその結果生じるエノレートアニオンの求核攻撃を促進する (図 2).

この Cys-His-Asn からなる活性中心触媒残基は, 機能の異なる全てのⅢ型 PKS において保存されており, 同一の反応機構でポリケタイド鎖伸長反応が進行するものと考えられている. 今日では, CHS をはじめとして, 既に 12 種類の酵素の X 線結晶構造解析がなされており, いずれの酵素も, タンパク質全

体としては、ほぼ同一の立体構造を共有すること、活性中心キャビティはタンパク質構造の中心部に位置しており、これに CoA エステルの基質結合トンネルがタンパク表面から通じていること、活性中心触媒残基 Cys-His-Asn が活性中心キャビティと基質結合トンネルの境界に位置していること等が明らかになっている<sup>1-5)</sup>。また、これまでの解析により、Ⅲ型 PKS の機能多様性は、活性中心キャビティの大きさと形状によって主として決定されることが示唆されている。一方、Ⅲ型 PKS は互いに 50%以上のアミノ酸配列相同性を示し、しかも活性部位の微妙な構造の違いにより、その反応特異性や生成物特異性が大きく変化するため（同一のアミノ酸残基でコードされていたとしても、空間的な配置や配向に違いが生じている場合がある！）、アミノ酸配列から機能を完全に予測することは不可能である。

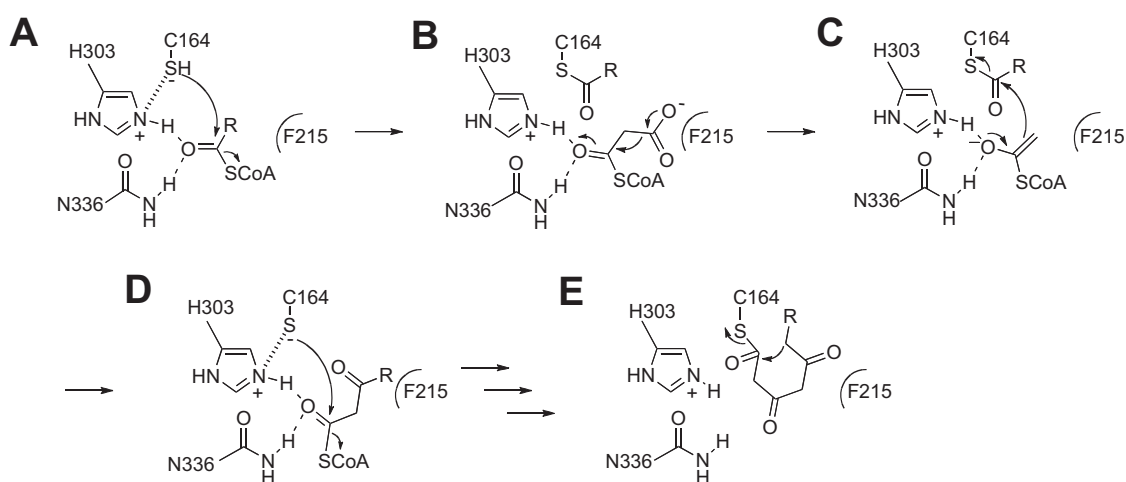


図2 Ⅲ型ポリケタイド合成酵素の酵素反応機構

(A) 活性中心 Cys 残基への開始基質の結合, (B) マロニル CoA の脱炭酸, (C) ポリケトメチレン CoA エステルの生成, (D) 活性中心 Cys 残基へのポリケトメチレンの結合, (E) クライゼン型の閉環反応等。

### 3. キダチアロエ由来新規Ⅲ型 PKS の X 線結晶構造解析と機能の拡張

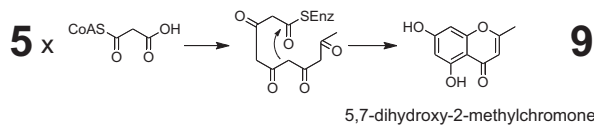
薬用植物キダチアロエ (*Aloe arborescens*) から得られたペンタケタイドクロモン合成酵素 (PCS) とオクタケタイド合成酵素 (OKS) は、これまでに例のない全く新しいタイプのⅢ型 PKS である<sup>6,7)</sup>。互いに微妙に異なる配列を有するこの2つの酵素は、植物に普遍的に存在する CHS とはアミノ酸レベルで約 60%の配列相同性を示すものの、CHS のようにナリンゲニンカルコン合成能は示さず、それぞれ5分子あるいは8分子のマロニル CoA を直接縮合して芳香族ポリケタイドを生成する (図3, 4)。PCS が産生するクロモンは、抗喘息・抗アレルギー薬のリード化合物として有名なケーリン等の生理活性フロクロモンの生合成前駆体となる。一方、OKS が産生する SEK4/SEK4b は、放線菌のⅡ型の minimal PKS (還元酵素等のサブユニットを欠落させたⅡ型 PKS の最小単位の酵素複合体) が産生する代謝産物として知られてはいるものの、Ⅲ型酵素によるマロニル CoA の8分子の縮合はこれが最初であり、最多であった。



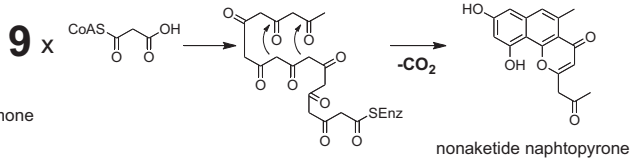
図3 III型 PKS のアミノ酸配列の比較

MsCHS ; *Medicago sativa* CHS, PsSTS ; *Pinus sylvestris* STS, Gh2PS ; *Gebera hybrida* 2-PS, AaPCS ; *Aloe arborescens* PCS, AaOKS ; *A.arborescens* OKS. 触媒残基 Cys-His-Asn を灰色で、キャビティを構成する 197, 256, 338 番残基 (CHS ナンバリング) を矢印で示す。

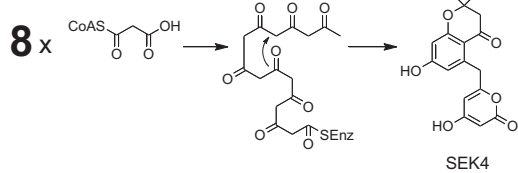
**PCS WT**



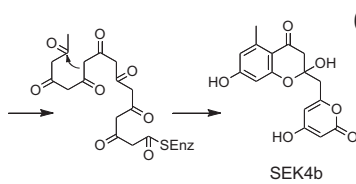
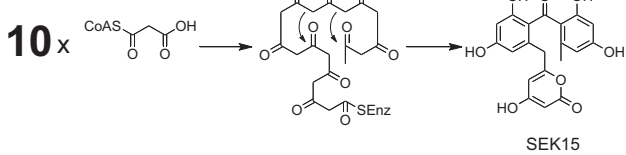
**PCS F80A/Y82A/M207G**



**OKS WT & PCS M207G**



**OKS N222G**



**OKS F66L/N222G**

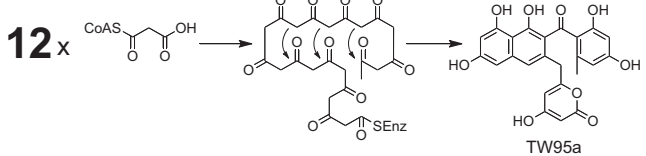


図4 アロエ由来 PCS と OKS の部位特異的変異導入によるマロニル CoA 縮合数の制御

アミノ酸レベルで互いに 92% という非常に高い配列相同性を示すこの 2 つの酵素が、このように全く異なる生成物を与えるのは何故か、マロニル CoA の縮合回数の違いを決定する要因は何か？ これら 2 つの酵素においては、3 つの触媒残基 Cys164, His303, Asn336 がすべて保存されている一方で、III 型 PKS のプロトタイプとも言える CHS の活性中心キャビティを構成するアミノ酸残基 Thr197, Gly256, Ser338 が<sup>5)</sup>、PCS では Met207/Leu266/Val351, OKS では Gly207/Leu266/Val351 に置換されているのが特徴的である (図 3)。そこで我々は、CHS の Thr197 残基が、PCS においては Met207 に、また、OKS においては Gly207 に置換されていることに着目し、PCS の Met207 を Gly に変換した部位特異的変異酵素を作成して変異が酵素活性に及ぼす影響について精査した。その結果、PCS の M207G 置換体の酵素活性が劇的に変化し、5 分子から 8 分子へとマロニル CoA の縮合回数を増加して、OKS の生成物である SEK4/SEK4b を生成することが判明した (図 4)。

次に、PCS 野生型、及び、その M207G 変異型酵素について、1.6 Å の分解能で結晶構造を解明した<sup>8)</sup>。基質特異性と生成物特異性は明らかに異なるものの、アミノ酸レベルで互いに 60% の相同性を示す CHS の結晶構造と、活性中心を構成する殆どのアミノ酸残基を重ねることが可能であった。一方、活性中心キャビティの大きさは PCS の方が明らかに小さく、しかも CHS の活性中心キャビティに見いだされたクマロイル結合ポケットが、PCS の活性中心キャビティから欠損していることが示された (図 5)。

さらに、PCS M207G 変異酵素の X 線結晶構造解析へと研究を進めた結果、Met207 を Gly に置換することで、それまで後方にもともと埋もれていた新規ポケットが、M207G 変異酵素のキャビティの一部となり、その大きさが劇的に変化することが示された (図 5)。本結果は、M207G 変異の導入により、新規ポケットの入り口が開き、この新規ポケットを利用することで、PCS M207G 変異酵素がポリケタイド鎖の伸長をさらに進行させて、8 分子のマロニル CoA 縮合を可能にしたと考察できる (図 5)。また、PCS においては、STS にみられるような閉環反応の制御に重要とされる Ser338 残基近傍の水分子を介した水素結合のネットワーク<sup>9)</sup>は観察されず、単に活性中心キャビティの大きさや形状の変化によって生成物の特異性が決定されるものと考えられた。そこで、PCS のさらなる触媒機能の拡張を目的として、PCS M207G 変異酵素のポケットの底面を形成する Phe80, Tyr82 の 2 つの芳香族残基を、同時に Ala で置換した F80A/Y82A/M207G 三重変異酵素を作成したところ、今度はマロニル CoA 9 分子を縮合して、これまでに例のない 3 環性ナフトパイロン骨格を有する非天然型新規ノナケタイドを生成することに成功した (図 4, 5)<sup>10)</sup>。

一方、本来 8 分子のマロニル CoA を縮合する OKS についても、2.6 Å の分解能で結晶構造を解明し、PCS の M207G 変異酵素とほぼ同一の活性中心キャビティを有することを明らかにした (図 5)<sup>11)</sup>。また、ポリケタイド鎖が伸張していく際に壁となる Asn222 残基に Gly 変異を導入した結果、マロニル CoA の縮合回数が 10 分子まで拡大して、ベンゾフェノン誘導体 SEK15 を単一生成物として高収率で生成することを見出した (図 4)<sup>11)</sup>。さらに、この変異酵素の X 線結晶構造解析にも成功し、N222G 変異の

導入によってキャビティがさらに拡大すること (図5)<sup>12)</sup>, 及び, そのポケットの底部を形成する F66 残基を N222G 変異と同時に Leu に置換することにより, 1 2 分子までマロニル CoA の縮合回数が拡大して, ナフトフェノン誘導体 TW95a を生成することを既に確認している (図4, 5)<sup>12)</sup>.

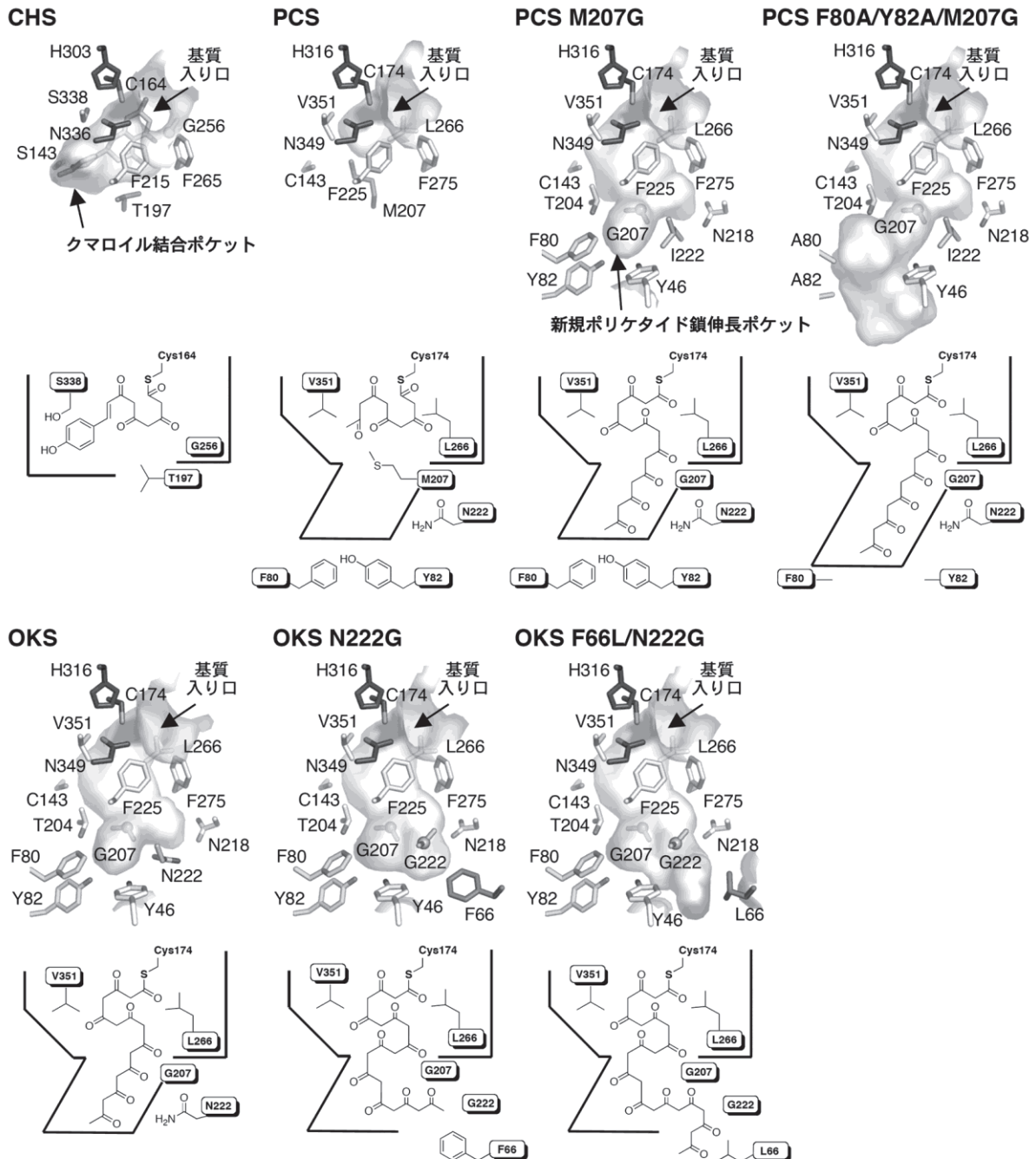


図5 PCS と OKS の野生型及び変異酵素と CHS の活性中心キャビティの比較と模式図

X 線結晶構造解析により得られたタンパク質の立体構造による比較. このうち PCS の F80A/Y82A/M207G 三重変異酵素と OKS の F66L/N222G 二重変異酵素の立体構造は, 分子モデリングにより予測したもの.

#### 4. 人工基質をプローブとした非天然型化合物の創出

上述はしなかったが、我々は、化学的に合成した人工基質をプローブとして酵素に作用させることにより、III型 PKS が酵素としては異例とも言える寛容な基質特異性を示すことを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。例えば、CHS と STS は、本来、クマロイル CoA を開始基質として、それぞれナリングニンカルコンとレスバトロールへの変換を触媒するIII型 PKS であるが (図 1)、クマロイル基の芳香環の水酸基をフッ素やメトキシ基で置換したエステル、あるいは、芳香環をフランやチオフェン等のヘテロ芳香環で置換した基質アナログを作用させると、全てが酵素反応の開始基質として機能し、マロニル CoA を 3 分子まで縮合して、一連の非天然型新規化合物を生成する (図 6)<sup>13,14)</sup>。

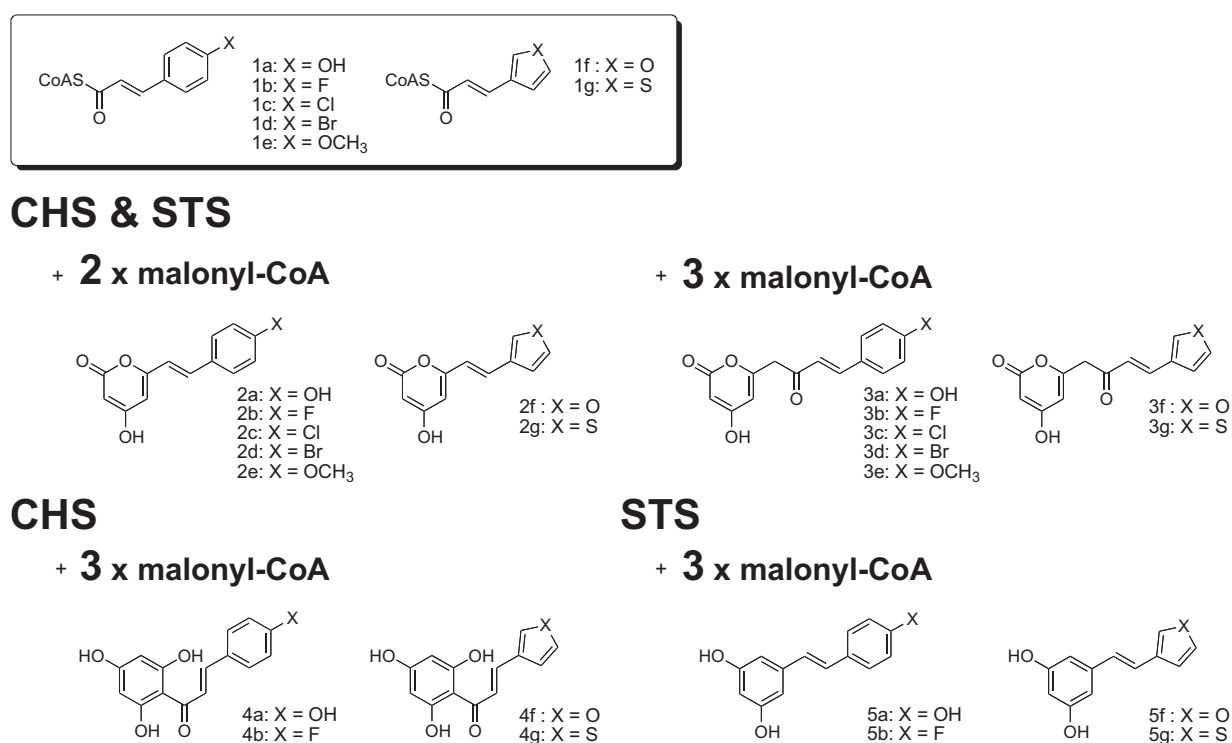
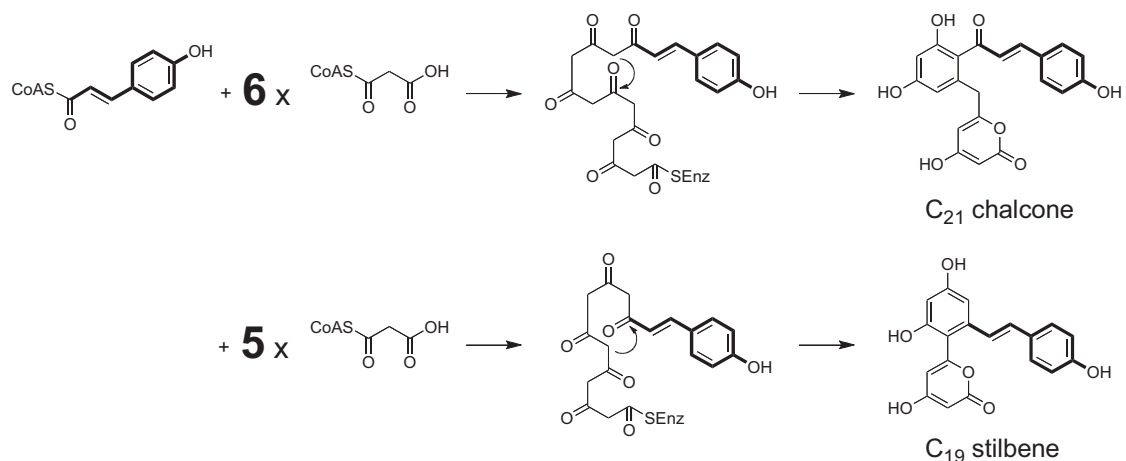


図 6 CHS と STS が示した寛容な基質特異性と潜在能力

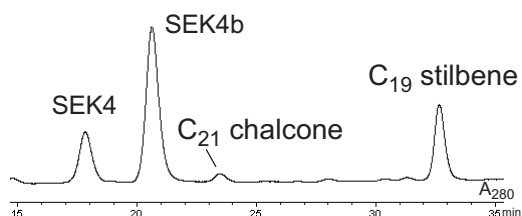
そこで、OKS にクマロイル CoA を開始基質として作用させた結果、クマロイル CoA に 5 分子あるいは 6 分子のマロニル CoA が縮合の後、アルドール型縮合により芳香環を形成した非天然型新規 C<sub>19</sub> スチルベン及び C<sub>21</sub> カルコンが生成されることを見出した (図 7)<sup>11)</sup>。一方、結晶構造に基づき活性中心キヤビティを拡大した OKS の N222G 変異酵素にクマロイル CoA を開始基質として作用させると、生成物の割合が劇的に変化して、SEK4/SEK4b の生成量が減少する一方で、C<sub>21</sub> カルコンの生成量が飛躍的に増大し、主生成物として与えることを見出した (図 7)<sup>11)</sup>。本変異酵素は、C<sub>21</sub> カルコンの生成により

特化したと言える。物質生産を考えるうえで生産性の向上も重要な要素であり、点変異の導入によりマロニル CoA 縮合回数を増加させただけでなく、基質特異性をも大幅に変化させたことは注目に値する。III型 PKS の生体触媒としてのさらなる可能性を示す結果であると考えており、現在、マロニル CoA 縮合回数のさらなる増大と基質特異性の改変を目指し、基質や酵素反応中間体アナログとの複合体立体構造解析とドッキングシミュレーションによる酵素触媒機構の解析と変異導入実験が進行中である。

## OKS WT & OKS N222G



### OKS WT



### OKS N222G

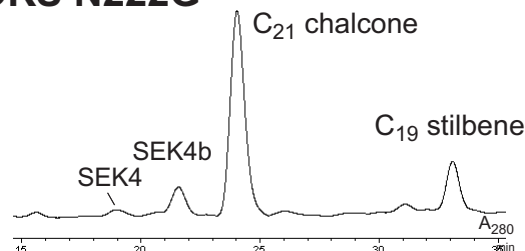


図7 クマロイル CoA を開始基質としたときの OKS 野生型とその N222G 変異酵素の反応生成物

## 5. トウゲシバ由来 PKS1 を利用した非天然型新規アルカロイドの創出

トウゲシバ *Huperzia serrata* 由来 PKS1 は、III型 PKS の中でも特に寛容な基質特異性を有する III型酵素である<sup>15)</sup>。上述したように、III型 PKS は、C, H, O 原子で構成される、単純な「カルボニルの化学」を触媒するが、ここで、さらに N 原子等のヘテロ原子を導入した人工基質を作用させれば、N 原子の塩基性を利用した新たな C-N 結合や C-C 結合の形成も可能になる。そこで、PKS1 に、カルバモイル基を有する安息香酸やピコリン酸等の CoA エステルをマロニル CoA (あるいはメチルマロニル CoA) とともに作用させた結果、2 分子のマロニル CoA の縮合の後、反応性に富む  $\beta$ -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 2 回の C-N 結合形成反応が進行して、6.5.6 縮合環構造をもつ非天然型新規ピリドイソインドール (またはピリドインドリジン) 骨格を生成することが判明した (図 8)<sup>15)</sup>。



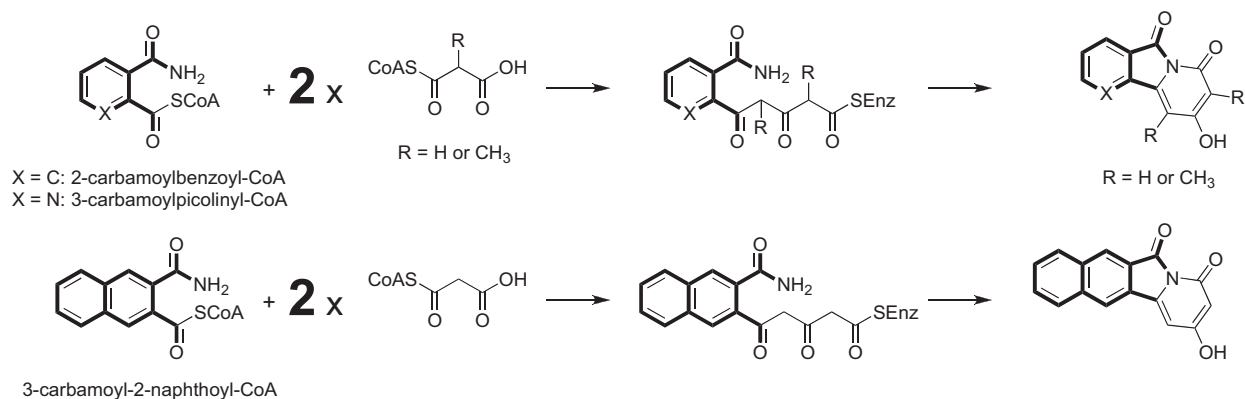


図8 トウゲシバ由来 PKS1 が示した潜在的触媒能力と非天然型新規アルカロイド骨格の生産

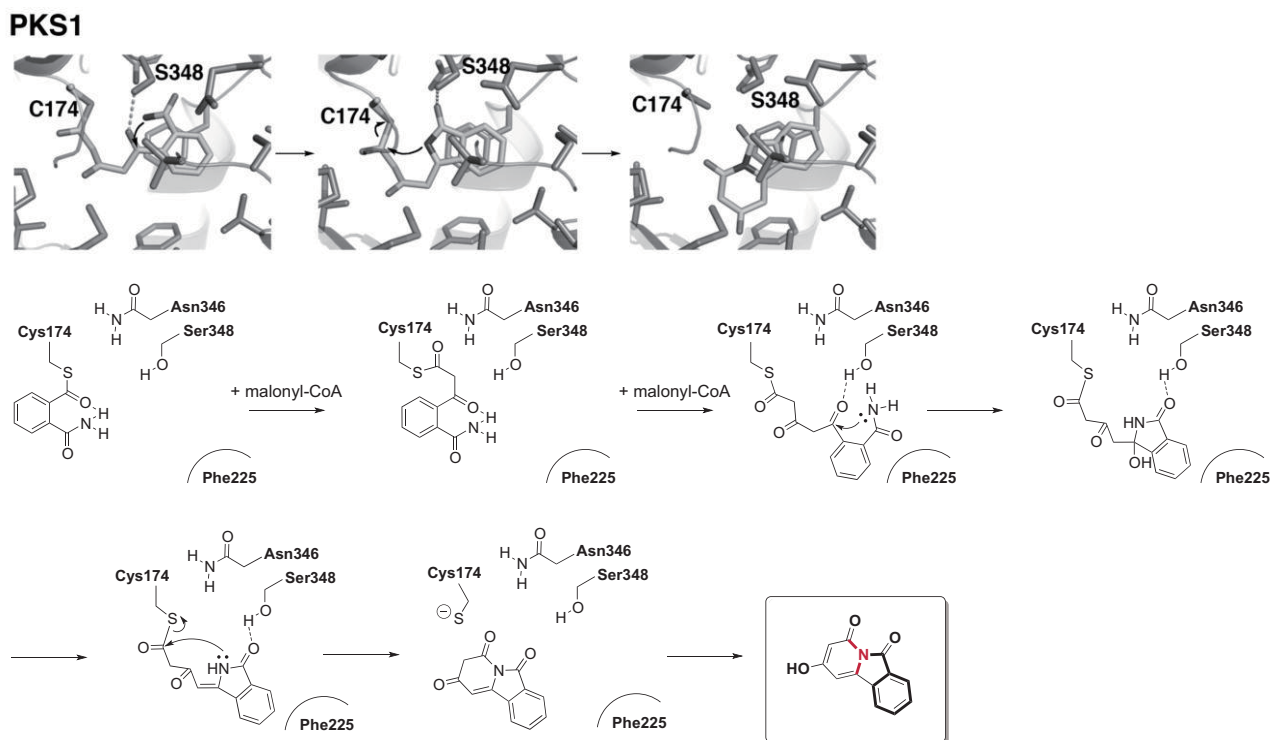


図9 PKS1 野生型による 6.5.6 ピリドイソインドール骨格の生産

Ⅲ型 PKS が 2 回の C-N 結合形成反応を触媒したのはこれが最初である。そこで、PKS1 が触媒するピリドイソインドール骨格への酵素反応機構の解明とさらなる新規アルカロイドの創出を目的として、PKS1 の X 線結晶構造解析と、酵素反応中間体とのドッキングシミュレーションを行った<sup>15)</sup>。まず、2.0 Å の分解能で PKS1 の結晶構造を得た<sup>12)</sup>。次に、ピリドイソインドールへの酵素反応中間体の立体モデ

ルを作成し、PKS1 の結晶構造とのドッキングシミュレーションを行った結果、活性中心キャビティを構成する Ser348 が、マロニル CoA の縮合回数と閉環反応の制御に特に重要な役割を演ずる可能性が示された (図 9)。そこで、Ser348 を Gly, Cys, Thr, Ala または Val に置換した点変異酵素を作成して、その酵素活性について精査したところ、S348G 変異体が、6.5.6 縮合環構造のピリドイソインドールの生成とともに、カルバモイル安息香酸の CoA チオエステルに 3 分子のマロニル CoA を縮合の後、シッフ塩基の形成を介した C-N 結合と C-C 結合の形成を進行して、環拡大した 6.7.6 縮合環構造をもつ非天然型新規ジベンゾアゼピン骨格をあらたに生成することが判明した (図 10)。現在、さらなる酵素触媒機能の拡張と新規アルカロイドの創出が進行中である。一方、このジベンゾアゼピンは、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌に対して、バイオフィーム形成阻害活性を示した (MIC = 12  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>15)</sup>。バイオフィームの形成は、人の免疫や抗生物質に対する細菌の防御機構の一つであり、最近ではバイオフィーム形成阻害をターゲットとした抗生物質の開発にも興味を持たれている。ジベンゾアゼピン誘導体がバイオフィーム形成阻害を示したのはこれが最初であり、構造機能活性相関とともに、バイオフィーム形成阻害機構にも興味を持たれるところである。

### PKS1 & PKS1 S348G

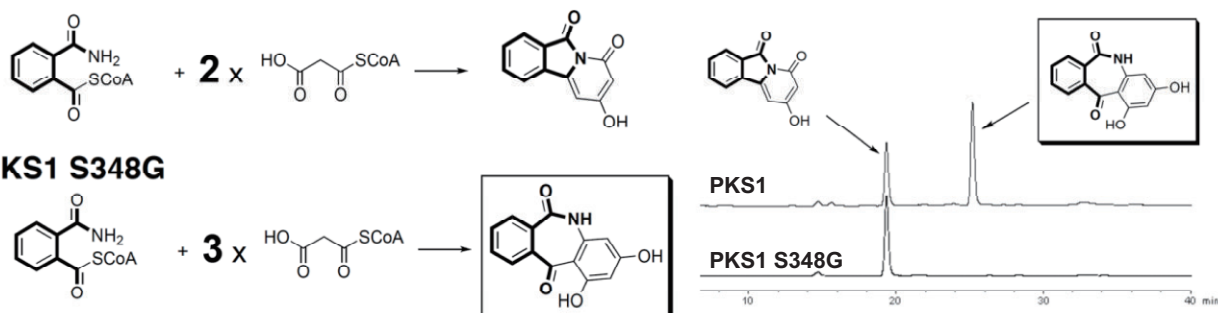


図 10 PKS1 S348G 変異酵素による 6.7.6 ジベンゾアゼピン骨格の生産

## 6. おわりに

Ⅲ型 PKS の異例とも言える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り、また、合理的な人工基質の設計と結晶構造に基づく機能改変酵素を組み合わせることにより、新規生体触媒の開発と非天然型新規生物活性化合物の効率的な生産が可能になる。今回は紹介しなかったが、既に我々は、本来、Ⅲ型 PKS と P450 還元酵素により、2 段階の反応を経て生成するテトラヒドロビスデメトキシクルクミンや、Ⅰ型 PKS と非リボソーム依存性ペプチド合成酵素とのハイブリッド経路によって生合成されるテトラミン酸骨格を、Ⅲ型 PKS のみを用いて創出すること等にも成功している<sup>4,16)</sup>。一方、Ⅲ型 PKS の反応性に富んだポリケトメチレン中間体から、さらに多様な分子内環化反応を引き起こすことができれば、これまで以上に分子多様性に富んだ多環性新規化合物群の創出が可能になる。しかしながら、

Ⅲ型 PKS が触媒する閉環反応機構については未だ不明な点が多いというのが現状であり、実際にどのようにして閉環反応が進行するのかは興味深い点である。炭素鎖伸長反応の起点となる Cys 残基からのチオエステル結合の開裂によるポリケタイド鎖の切り出しとタイミング等が問題となるが、これらについては NMR 法やケミカルバイオロジーの手法を用いて解明していくことを予定している。また、Ⅲ型 PKS のような骨格形成酵素のみならず、プレニル基転移酵素や酸化還元酵素等の修飾酵素の基質特異性や潜在的触媒能力についても解析を進め、将来的には、醗酵工学や植物代謝工学へと展開して、合成生物学的手法による物質生産や遺伝子導入による新機能賦与形質転換体の作出等、実用に供する物質生産系の開発にも挑戦したい。

## 謝辞

本研究は、主として、東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室、静岡県立大学大学院薬学研究科生薬・天然物化学分野、及び、三菱化学生命科学研究soで行われたものである。ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科・阿部郁朗教授、静岡県立大学薬学部・野口博司教授、三菱化学生命科学研究so・河野俊之博士、三菱化学・杉尾成俊博士に深甚なる感謝を申し上げます。また、本研究を行うにあたり中心的役割を担ってくれた静岡県立大学薬学部・鰐淵清史助教をはじめ、尽力下さった多くの方々にお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Austin, M.B. & Noel, J.P. (2003) The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 79-110.
- 2) Abe, I. & Morita, H. (2010) Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.*, **27**, 809-838.
- 3) Morita, H., Shimokawa, Y., Tanio, M., Kato, R., Noguchi, H., Sugio, S., Kohno, T. & Abe, I. (2010) Structure-based mechanism for benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 669-673.
- 4) Morita, H., Wanibuchi, K., Nii, H., Kato, R., Sugio, S. & Abe, I. (2010) Structural basis for the one-pot formation of the diarylheptanoid scaffold by curcuminoid synthase from *Oryza sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19778-19783.
- 5) Morita, H., Yamashita, M., Shi, S.P., Wakimoto, T., Kondo, S., Kato, R., Sugio, S., Kohno, T. & Abe, I. (2011) Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13504-13509.

- 6) Abe, I., Utsumi, Y., Oguro, S., Morita, H., Sano, Y. & Noguchi, H. (2005) A plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1362-1363.
- 7) Abe, I., Oguro, S., Utsumi, Y., Sano, Y. & Noguchi, H. (2005) Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12709-12716.
- 8) Morita, H., Kondo, S., Oguro, S., Noguchi, H., Sugio, S., Abe, I. & Kohno, T. (2007) Structural insight into chain-length control and product specificity of pentaketide chromone synthase from *Aloe arborescens*. *Chem. Biol.*, **14**, 359-369.
- 9) Austin, M.B., Bowman, M.E., Ferrer, J.L., Schröder J. & Noel, J.P. (2004) An aldol switch discovered in stilbene synthase mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. *Chem. Biol.*, **11**, 1179-1194.
- 10) Abe, I., Morita, H., Oguro, S., Noma, H., Wanibuchi, K., Kawahara, N., Goda, Y., Noguchi, H. & Kohno, T. (2007) Structure-based engineering of a plant type III polyketide synthase: formation of an unnatural nonaketide naphthopyrone. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5976-5980.
- 11) Shi, S.-P., Wanibuchi, K., Morita, H., Endo, K., Noguchi, H. & Abe, I. (2009) Enzymatic formation of unnatural novel chalcone, stilbene, and benzophenone scaffolds by plant type III polyketide synthase. *Org. Lett.*, **11**, 551-554.
- 12) Wanibuchi, K., Morita, H., Noguchi, H. & Abe, I. (2011) Enzymatic formation of an aromatic dodecaketide by engineering plant polyketide synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 2083-2086.
- 13) Abe, I., Morita, H., Nomura, A. & Noguchi, H. (2000) Substrate specificity of chalcone synthase: enzymatic formation of unnatural polyketides from synthetic cinnamoyl-CoA analogues. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11242-11243.
- 14) Morita, H., Noguchi, H., Schröder, J. & Abe, I. (2001) Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3759-3766.
- 15) Wanibuchi, K., Zhang, P., Abe, T., Morita, H., Kohno, T., Chen, G., Noguchi, H. & Abe, I. (2007) An acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia serrata*. *FEBS J.*, **274**, 1073-1082.
- 16) Wakimoto, T., Mori, T., Morita, H. & Abe, I. (2011) Cytotoxic tetramic acid derivative produced by a plant type-III polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4746-4749.