

生合成研究を基盤とした漢方方剤基原薬物の成分に関する研究

(申請代表者) 野口博司 静岡県立大学薬学部 教授
(所内共同研究者) 森田洋行 資源開発研究部門天然物化学分野 教授

【要 旨】

【背景・目的】漢方薬や生薬, その基原薬物から天然有機化合物を中心に, 活性本体の探索が進められてきた. その結果, 主要な生理活性成分と薬物動態の相関について多くの知見が蓄積されてきている. しかしながら, 多成分を用いて複合的に薬効を発現する漢方薬や伝統薬物の薬効発現を解明するためには, 主要成分のみならず, それらに含まれる未知の微量成分を無視することはできない. これらの微量成分が微弱な生理活性を有し, それが補助的に作用して漢方方剤等の症状改善効果を高めていることも十分に予想される. 活性が微弱であった場合, *in vitro*や*in vivo*での薬物動態に関するアッセイ系ではこれらの化合物を検出することは難しい. さらに, 精密分析機器の検出限界で化合物が認識できない可能性もある.

一方, 最近では, 多数の天然化合物の生合成遺伝子情報がデータベースに蓄積され, その情報を基に関連遺伝子をクローニングすることができるようになってきた. 我々は, これまで, 植物ポリフェノールの基本骨格を構築するⅢ型ポリケタイド合成酵素(PKS)について遺伝子を取得して機能解析を行うことで, Ⅲ型PKSが在来の常識を覆す多様な化合物群の基本骨格の構築を担っていること, および, 植物から成分研究を行うことなく関連した微量成分を予想できることを示してきた. 最近では, 沖縄県産四季柑のⅢ型PKS遺伝子を解析することにより, 本植物がキノロンアルカロイドを生産している可能性を示している. そこで我々は, このような生合成研究の方法論を漢方薬配合生薬の基原植物群に応用していけば, これらの植物の未知の微量成分も含めた化学成分情報の蓄積, ひいては, 漢方方剤や生薬の治療効果の解析に有用な情報を与えることになると考えた. 今回我々は, 温経湯, 当帰四逆加呉茱萸生姜湯といった婦人病改善の目的で使用される漢方薬において, 体温を暖める目的で配合され, 四季柑と同属でもある呉茱萸の基原植物ゴシュユを取り上げ, そのⅢ型PKS遺伝子群の取得と機能解析に着手した.

【方法・結果】富山大学薬用植物園で採取したゴシュユ*Evodia rutaecarpa*の蕾から, フェノールSDS-グアニジンチオシアネート法を用いてtotal RNAを抽出した. 次に, これを鋳型として, Ⅲ型PKSのアミノ酸配列の中でも特に保存された領域をもとに設計・作成した縮重入りプライマーを用いてRT-PCRを行い, Ⅲ型PKS遺伝子のコア配列の増幅を行った. その結果, 配列の異なる4種のコア配列の取得に成功した. そこで, 各々のコア配列に対して特異的なプライマーを作成し, 5'RACE法にて, コア配列の5'末端の配列を得, 次いで5'末端に特異的なプライマーを用いて3'RACE法を行うことにより, 約400アミノ酸残基をコードする全長約1400 bpの新規Ⅲ型PKS遺伝子4種の取得に成功した. ゴシュユ由来Ⅲ型PKS遺伝子の報告はこれが最初である. 既知Ⅲ型PKSのアミノ酸配列との比較から, カルコン合成酵素が1種, キノロン合成酵素が2種, 機能未知のⅢ型PKS1種の遺伝子配列が得られたものと考察された. 現在, これら4種の新規Ⅲ型PKSの大腸菌での異種発現の構築とそれら酵素の機能解析が進行中である.

背景・目的

漢方薬や生薬, その基原薬物から天然有機化合物を中心に, 活性本体の探索が進められてきた. その結果, 主要な生理活性成分と薬物動態の相関について多くの知見が蓄積されてきている. しかしながら, 多成分を用いて複合的に薬効を発現する漢方薬や伝統薬物の薬効発現を解明するためには, 主要成分のみならず, それらに含まれる未知の微量成分を無視することはできない. これらの微量成分が微弱な生理活性を有し, それが補助的に作用して漢方方剤等の症状改善効果を高めていることも十分に予想される. 活性が微弱であった場合, *in vitro* や *in vivo* での薬物動態に関するアッセイ系ではこれらの化合物を検出することは難しい. さらに, 精密分析機器の検出限界で化合物が認識できない可能性もある.

一方, 最近では, 次世代シーケンサーの普及とも相まって, 多数の天然化合物の生合成に関わる酵素遺伝子の情報がデータベースに蓄積されるようになってきた. 今後, 益々, 生合成酵素遺伝子の情報が蓄積されていくことが容易に想定される. 従って, これら遺伝子情報を活用し, 漢方方剤の基原薬物に含まれる天然有機化合物の生合成に関わる遺伝子群の機能を同定していけば, 漢方薬等に含まれる未知の微量成分を予測することが可能になる. 実際, これまで我々は, 植物ポリフェノールの基本骨格を構築するⅢ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) について遺伝子を取得して機能解析を行うことで, その植物に未知成分が含まれる可能性を示してきた. 例えば, キダチアロエのⅢ型 PKS 遺伝子について酵素機能を同定し, クロモン骨格へと変換するⅢ型 PKS が存在していることを見いだすことにより, キダチアロエにもアンミ等から単離されているビスナジンやケリンに類似のクロモン誘導体が含まれている可能性を示した¹. 最近では, 沖縄県産四季柑から新規Ⅲ型 PKS 遺伝子を取得し, その酵素機能を解析することによって, 四季柑にコクサギやハクセン等から単離報告がなされている *N*-メチルプリンデルシンやデイクタミンなどのキノリノアルカロイドが含まれている可能性を示している². そこで我々は, このような生合成研究の方法論を漢方薬配合生薬の基原植物群に応用していけば, これらの植物の未知の微量成分も含めた化学成分情報の蓄積, ひいては, 漢方方剤や生薬の治療効果の解析に有用な情報を与えることになると考えた. 今回我々は, 温経湯, 当帰四逆加呉茱萸生姜湯といった婦人病改善の目的で使用される漢方薬において, 体温を暖める目的で配合され, 四季柑と同属でもある呉茱萸の基原植物ゴシユユを取り上げ, そのⅢ型 PKS 遺伝子群の取得と機能解析に着手した.

結果・考察

富山大学薬用植物園で採取したゴシユユ *Evodia rutaecarpa* の蕾から, フェノール SDS-グアニジンチオシアネート法を用いて total RNA を抽出し, これを鋳型としてオリゴ d(T)プライマーを用いて逆転写反応を行うことにより, 1本鎖 cDNA ライブラリーを作成した. 次に, これを鋳型として, Ⅲ型 PKS のアミノ酸配列の中でも特に保存された領域をもとに設計・作成した縮重入りプライマーを用いて 1st PCR および nested PCR を行うことにより, ゴシユユ由来Ⅲ型 PKS 遺伝子のコア配列4種を取得した. そこで, 各々のコア配列に対して特異的なプライマーを作成し, 5'RACE 法にて, コア配列の 5'末端の配列を得, 次いで 5'末端に特異的なプライマーを用いて 3'RACE 法を行うことにより, 約 1400 bp からなり, 約 400 アミノ酸をコードする4種のゴシユユ由来新規Ⅲ型 PKS 遺伝子, ErPKS1, ErPKS2, ErPKS3, ErPKS4 の取得に成功した(図1). これらは互いに 56-76%のアミノ酸相同性を示した. また, Ⅲ型 PKS の3つの触媒残基, システイン, ヒスチジン, アスパラギンをよく保存した. 次に, ゴシユユ由来Ⅲ型 PKS について系統樹解析を行った(図2). その結果, ErPKS1 は, フラボノイド生合成経路の鍵酵素であるカルコン合成酵素 (CHS)とクラスターを形成し, ミカン科のヘンルーダから得られた CHS³ と系統的に最も近いと予測された. ErPKS1 は, ヘンルーダ由来 CHS と 92%のアミノ酸相同性を示した. 一方, ErPKS2, 3, 4 については, 我々がつい最近報告したミカン科四季柑から得たキノロン合成酵素 (QNS)² と系統的に近いことが予測された. ErPKS2, 3, 4 は, 四季柑由来 QNS とそれぞれ 92%, 76%, 57%のアミノ酸相同性を示した. これらのことから, ErPKS1 は CHS, ErPKS2, ErPKS3, ErPKS4 は QNS をコードしていると予想される.

しかし、Ⅲ型 PKS は、互いに高いアミノ酸相同性を示し、しかも活性部位の僅かなアミノ酸の違いによって機能が大きく変化することがあるため、アミノ酸配列の比較や *in silico* 解析で得られた予測と実際の機能が異なる場合がある。

そこで、ゴシュユ由来Ⅲ型 PKS4種を、6残基のヒスチジンとの N 末融合タンパク質として大腸菌に異種発現し、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製した酵素を用いて酵素反応を行い、その酵素反応生成物について LC-MS を用いて分析を行った。Ⅲ型 PKS は、開始基質であるアシル CoA チオエステルと伸長基質であるマロニル CoA の2種の基質を用いて酵素反応を行うが、今回の酵素反応生成物の解析においては、*p*-クマロイル CoA、*N*-メチルアントラニル CoA、ヘキサノイル CoA、ミリストイル CoA の4つの開始基質に対する生成物について分析を行った。

まず、ErPKS1 の酵素反応生成物について解析を行ったところ、本酵素が、*p*-クマロイル CoA を開始基質として、フラボノイド合成の鍵中間体であるナリンゲニンカルコンへの変換を効率的に触媒することが判明した(図3)。また、本酵素が、ヘキサノイル CoA を開始基質としてフロログルシノール、*N*-メチルアントラニル CoA を開始基質としてキノリノン、ミリストイル CoA を開始基質としてミリストイルパイロンを生成することが確認された。このような生成物の与え方は、これまで解析された CHS の *in vitro* での酵素反応において得られた結果と類似している⁴⁶。このことから、ErPKS1 は、CHS をコードしているものと考察された。ゴシュユからは、これまでフラボノイド配糖体の単離・報告がなされている⁷。現時点では、ErPKS1 がこれらの既知フラボノイド類の生成に関与するのか、それとも関与していないのか判断することはできないが、本結果は、今後、この ErPKS1 を指標としたトランスクリプトーム解析などを行い、ErPKS1 と連動する修飾酵素の解析を進めることによって、未同定のフラボノイド類を予測できる可能性がでてきたものと考えている。

次に ErPKS2 について ErPKS1 の場合と同一にして酵素反応生成物の解析を行った(図4)。その結果、ErPKS2 が *N*-メチルアントラニル CoA を基質として受容し、キノリノンを特異的に生成することが判明した。*p*-クマロイル CoA、ヘキサノイル CoA、ミリストイル CoA を開始基質とした場合には、いずれにおいても酵素反応生成物を確認することはできなかった。ゴシュユからは、これまでエボジアミン類やエボカルピン類の単離報告がなされているが^{8,9}、コクサギやハクセン等が生産する *N*-メチルフリンデルシンやディクタミンなどのキノリノンアルカロイドの単離報告例はない。本結果は、ゴシュユにも、このようなタイプのキノリノンアルカロイドが生成されている可能性を示唆していると考察する。

一方、ErPKS3 と ErPKS4 の酵素反応生成物の解析においては、いずれにおいても酵素反応生成物を確認することができなかった(図5)。しかし、ErPKS3 と ErPKS4 は、Ⅲ型 PKS の酵素反応に直接関与する3つの触媒残基、システイン、ヒスチジン、アスパラギンをよく保存していることから、Ⅲ型 PKS としての何らかの機能を有していると予想される。現在、今回用いた4種の開始基質とは異なった骨格を有する CoA チオエステルを用いた酵素機能の解析が進行中である。

結論

今回、生合成研究を基盤とした漢方方剤基原薬物の成分探索法について新たな方法論の開拓を目指し、呉茱萸の基原植物ゴシュユのⅢ型 PKS 遺伝子群に焦点を絞り、遺伝子クローニングを実施することによって、4種のゴシュユ由来Ⅲ型 PKS 遺伝子の取得に成功した。また、その酵素機能を解析することで、ゴシュユがキノリノンアルカロイドを生産している可能性を示した。ゴシュユ由来Ⅲ型 PKS のさらなる酵素機能の解析により、さらなる未知成分の予測が可能になるものと予想される。これらの結果は、生合成研究の方法論を漢方方剤基原薬物について実施していくことにより、未知成分の予測が可能であることをあらためて示したと言える。今後、他の漢方方剤基原薬物にも本方法論を適用し、その有用性と未知成分について検討を行っていきたい。

参考文献

1. I. Abe, Y. Utsumi, S. Oguro, H. Morita, Y. Sano and H. Noguchi “A plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone” *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1362-1363 (2005)
2. T. Mori, Y. Shimokawa, T. Matsui, K. Kinjo, R. Kato, H. Noguchi, S. Sugio, H. Morita and I. Abe “Cloning and structure-function analyses of quinolone- and acridone-producing novel type III polyketide synthases from *Citrus microcarpa*” *J. Biol. Chem.*, **288**, 28845-28858 (2013)
3. K. Springob, R. Lukacin, C. Ernwein, I. Groning, and U. Matern “Specificities of functionally expressed chalcone and acridone synthases from *Ruta graveolens*” *Eur. J. Biochem.* **267**, 6552-6559 (2000)
4. R. Schütz, W. Heller and K. Hahlbrock “Substrate specificity of chalcone synthase from *Petroselinum hortense*” *J. Biol. Chem.*, **258**, 6730-6734 (1983)
5. K. Wanibuchi, P. Zhang, T. Abe, H. Morita, T. Kohno, G. Chen, H. Noguchi and I. Abe “An acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia serrata*” *FEBS Journal* **274**, 1073-1082 (2007)
6. I. Abe, T. Watanabe and H. Noguchi “Enzymatic formation of long-chain polyketides pyrones by plant type III polyketides synthases” *Phytochemistry* **65**, 2447-2453 (2004)
7. C.Q. Hu, X.B. Yang, X.W. Yang and J.X. Liu “Flavonoid glycosides from dried and nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa*” *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **37**, 2571-2575 (2012)
8. C.L. King, Y.C. Kong, N.S. Wong, H.W., Yeung, H.H. Fong and U. Sankawa “Uterotonic effect of *Evodia rutaecarpa* alkaloids” *J. Nat. Prod.* **43**, 577-582 (1980)
9. R. Tschesche and W. Wemer “Evocarpine, ein neues alkaloid aus *Evodia rutaecarpa*” *Tetrahedron* **23**, 1873-1881 (1967)

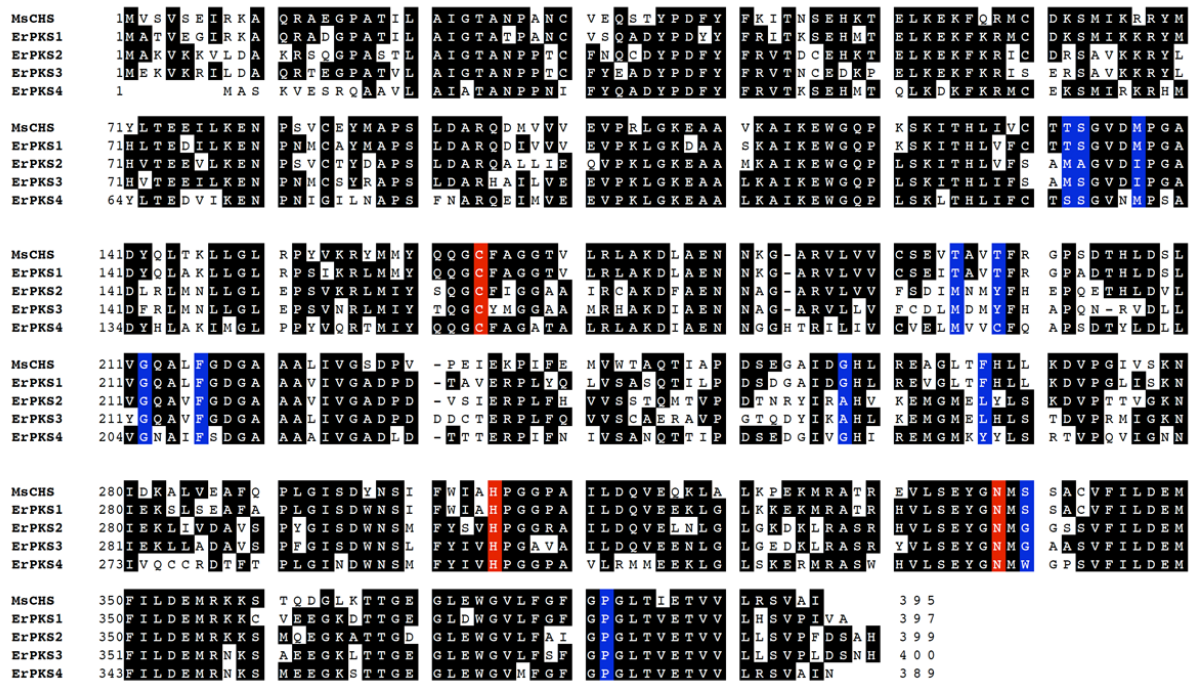


図1 ゴシユユ由来Ⅲ型 PKS とムラサキウマゴヤシ CHS のアミノ酸配列の比較
Ⅲ型 PKS の3つの触媒残基, Cys-His-Asn を赤色で, Ⅲ型 PKS の機能多様性を決めるのに重要であるとされるアミノ酸残基を青色で示した。

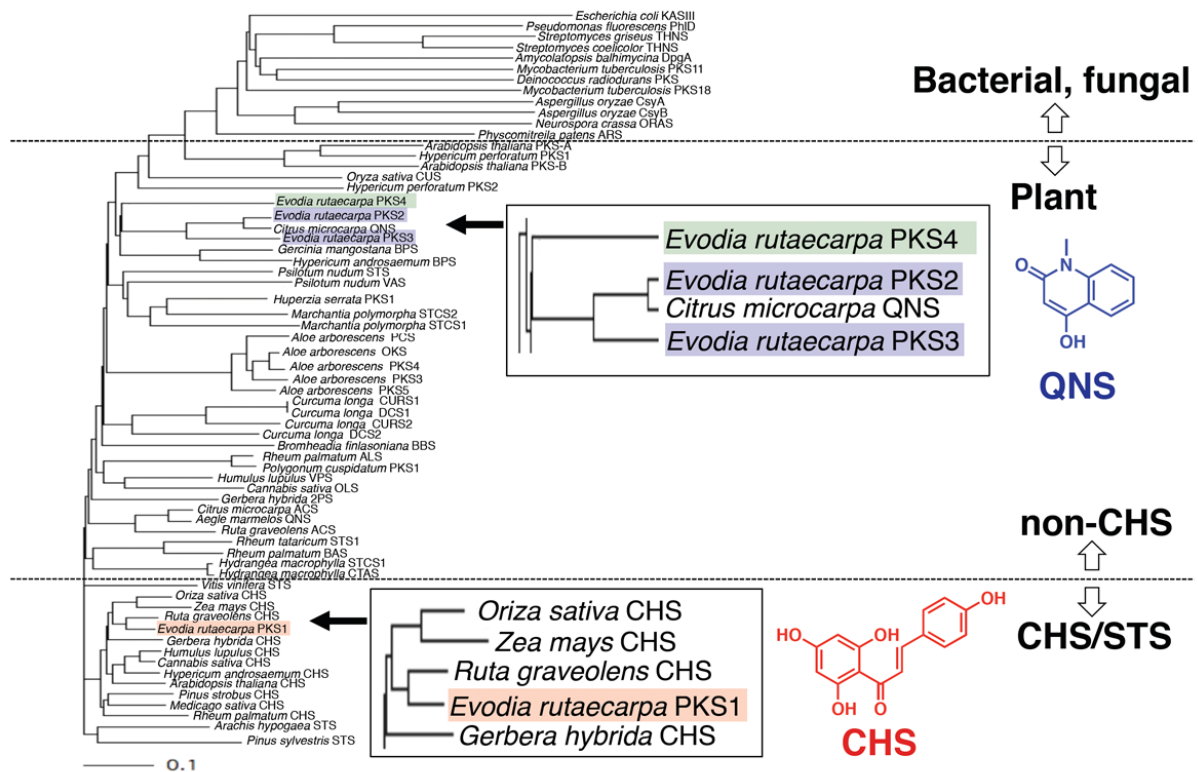


図2 ゴシユユ由来Ⅲ型 PKS の系統樹解析
アウトグループとして, 大腸菌由来 α -ケトアシルキャリアープロテインⅢ (KASIII) を用いた。

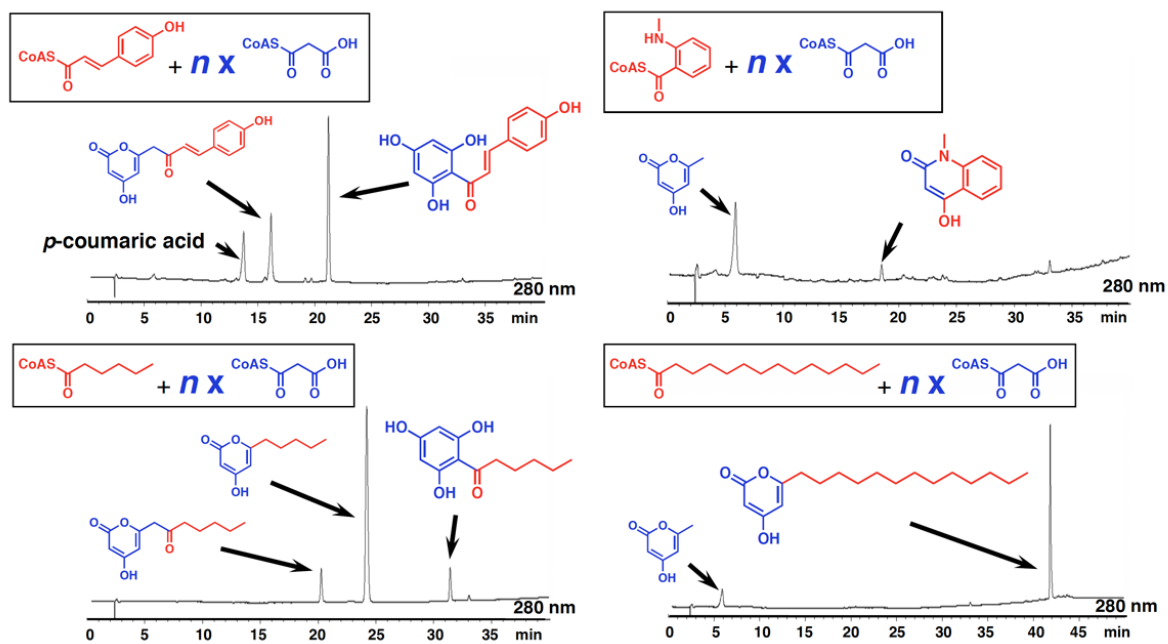


図3 ErPKS1 の酵素反応生成物の解析

酵素反応生成物の分離には ODS-80Ts (4.6 \square x 150 mm, Tosho) を用い、0.1% TFA を含む MeOH-H₂O 系溶媒を用いたグラジエント条件 (0-5 min; 30% MeOH, 5-17 min; 30-60% MeOH, 17-25 min; 60% MeOH, 25-27 min; 60-70% MeOH, 27-35 min; 70% MeOH, 35-40 min; 70-100% MeOH) にて化合物を溶出させた。化合物の同定は、LC-MS の分子量および各標品との比較により行った。

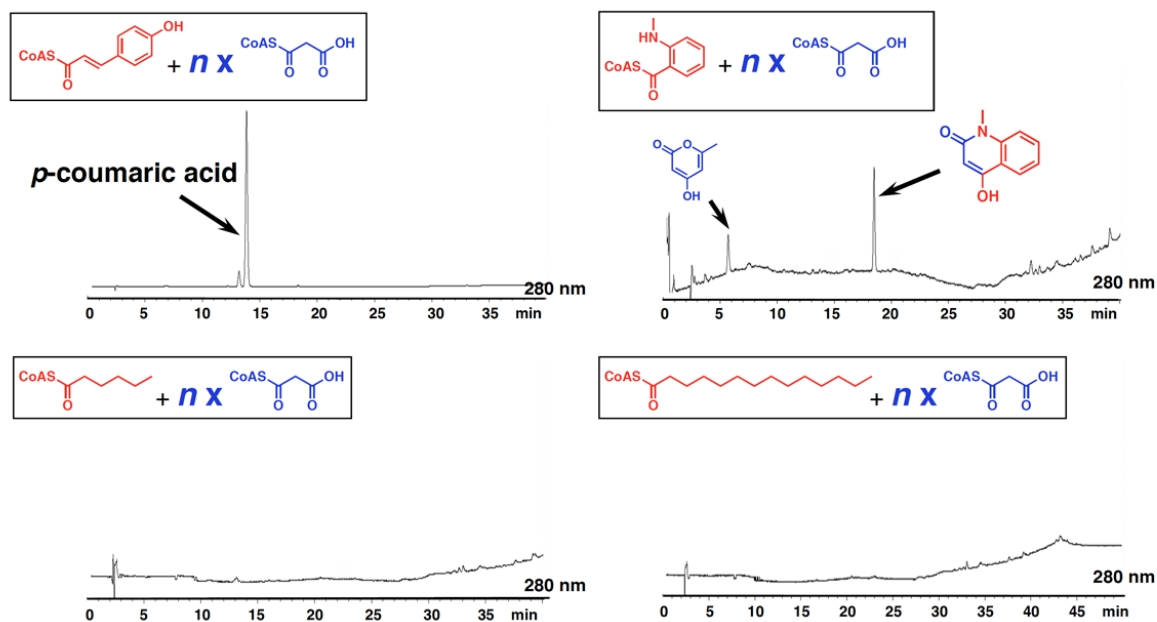


図4 ErPKS2 の酵素反応生成物の解析

酵素反応生成物の分離と化合物の溶出は ErPKS1 の場合と同一にして行った。

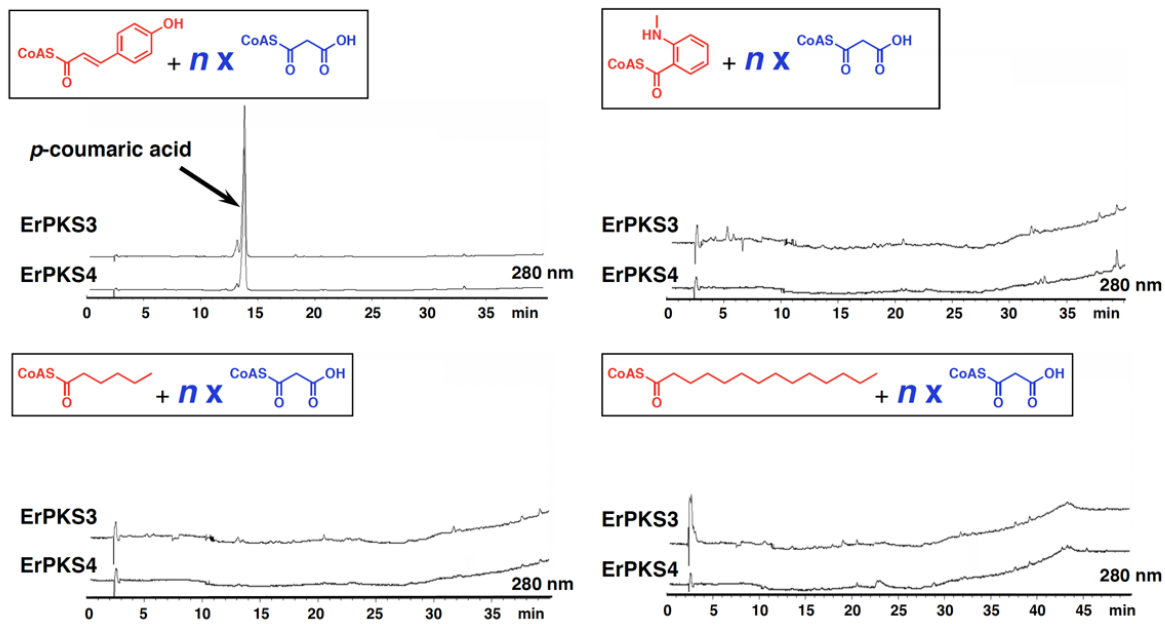


図5 ErPKS3とErPKS4の酵素反応生成物の解析
 酵素反応生成物の分離と化合物の溶出はErPKS1の場合と同一にして行った。