

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 金岡 純二 殿

## 助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 :	800 千円
研究代表者 : 伊藤 卓也	所属 : 和漢医薬学総合研究所	職位 : 准教授
研究題目 : 呉茱萸含有アルカロイドの生合成研究と有用アナログの創製		

## 研究概要

漢方薬に処方される呉茱萸は、アルキルキノロンアルカロイドであるエボカルピン類やインドールアルカロイドであるエボジアミン類を多く含有している。これらアルカロイド類は、冠状動脈拡張作用、鎮痛作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用など数多くの生物活性を有している。しかしながら、植物アルカロイドの生合成研究は、他の植物成分であるテルペノイドやフラボノイドのそれと比較して、余り進んでいないのが現状である。このことから、呉茱萸由来アルカロイド類の生合成酵素研究を進展させることは、これまで知られていなかったアルカロイドの生合成経路を特定できるだけでなく、これら酵素を利用した新規有用アルカロイドの創製も期待できる。申請者はこれらアルカロイド類、特にエボカルピンに着目して、この有用アルカロイドの生合成経路の解明、及び生合成酵素を利用した新規類縁体の創製を目指して、分子生物学的及び遺伝子工学的な手法を用いて研究を遂行した。先行研究として、呉茱萸の基原植物である *Eudia ruticarpa* の蕾から取得した cDNA から、アルキルキノロンアルカロイド類の生合成に関わると予測される 2 つのⅢ型ポリケチド合成酵素遺伝子 (ErPKS1 及び ErPKS2) の取得に成功している。

## 成果要約

2 種類の呉茱萸由来Ⅲ型ポリケチド合成酵素 (PKS) である ErPKS1 及び ErPKS2 を用いることで得られた成果について以下に記す。

ErPKS1 は、脂肪酸との CoA エステルと 1 分子のマロニル CoA が縮合することにより  $\beta$ -ケト CoA エステルを生産する機能を有する酵素であることが明らかとなった。また、ErPKS2 は、N-メチルアントラニル CoA と  $\beta$ -ケト酸が縮合し、アルキルキノロンアルカロイドを生産する酵素であることが判明した。機能解析の結果、ErPKS1 及び ErPKS2 は、Ⅲ型 PKS の中でも、非常に珍しい機能を有することを明らかにした。さらに、ErPKS1 及び ErPKS2 の結晶構造をそれぞれ 1.80 Å、2.20 Å の分解能で取得することに成功した。その結果、ErPKS1 では活性中心付近にある Trp332 の存在がキャビティーの大きさや形に影響を与えていることを確認した。また、ErPKS2 では、基質入口部の中腹に存在する Tyr215 の影響で他のⅢ型 PKS と異なる基質認識を示すことを明らかにした。それぞれの結晶構造解析の結果から、ErPKS1 及び ErPKS2 の特徴的なアミノ酸を変異させて作成した組み換え酵素を用いて、酵素反応を行うと酵素の機能に大きな変化が確認された。ErPKS2 は、従来の基質である N-メチルアントラニル CoA の代わりに、フタルアミノ酸由来の非天然型 CoA エステルも基質として受け入れることを確認し、 $\beta$ -ケトデカン酸との縮合によりアルキルキノロンのアナログである 2-(3-オキシデカノイル)ベンズアミドの生産が確認された。現在、酵素によって生産されるアルキルキノロン類や新規アルカロイド類について生物活性評価を行うための量的供給を行っている。

<p>研究成果 発表状況</p>	<p>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Takuya Ito</b>, Takeshi Kodama, Hiroshi Noguchi, Ikuro Abe, Hiroyuki Morita: Precursor-directed biosynthesis of unnatural novel alkaloids by using a plant type III polyketide synthase obtained from <i>Evodia rutaecarpa</i>. The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies; 2015 Dec 15-20; Hawaii, USA. (学会発表)</li> <li>2. <b>Takuya Ito</b>: Biological active constituents from traditional medicinal plants in Southeast Asia. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 Sep 12-13; Toyama. (学会発表)</li> </ol>																				
<p>経費の 執行状況</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="328 887 804 922">区 分</th> <th data-bbox="817 887 1114 922">執行額 (円)</th> <th data-bbox="1120 887 1442 922">備 考</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="328 931 804 1066"> <p>【物品費】 ガラス器具、試薬、クロマトグラフィ ー用カラムなど</p> </td> <td data-bbox="817 931 1114 1066">662,940</td> <td data-bbox="1120 931 1442 1066"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="328 1075 804 1164"> <p>【旅費】 学会参加費、研究打ち合わせ等</p> </td> <td data-bbox="817 1075 1114 1164">137,060</td> <td data-bbox="1120 1075 1442 1164"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="328 1173 804 1263"> <p>【謝金】 なし</p> </td> <td data-bbox="817 1173 1114 1263">0</td> <td data-bbox="1120 1173 1442 1263"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="328 1272 804 1361"> <p>【その他】 なし</p> </td> <td data-bbox="817 1272 1114 1361">0</td> <td data-bbox="1120 1272 1442 1361"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="328 1648 804 1688"> <p>合計</p> </td> <td data-bbox="817 1648 1114 1688">800,000 円</td> <td data-bbox="1120 1648 1442 1688"></td> </tr> </tbody> </table>	区 分	執行額 (円)	備 考	<p>【物品費】 ガラス器具、試薬、クロマトグラフィ ー用カラムなど</p>	662,940		<p>【旅費】 学会参加費、研究打ち合わせ等</p>	137,060		<p>【謝金】 なし</p>	0		<p>【その他】 なし</p>	0		<p>合計</p>	800,000 円			
区 分	執行額 (円)	備 考																			
<p>【物品費】 ガラス器具、試薬、クロマトグラフィ ー用カラムなど</p>	662,940																				
<p>【旅費】 学会参加費、研究打ち合わせ等</p>	137,060																				
<p>【謝金】 なし</p>	0																				
<p>【その他】 なし</p>	0																				
<p>合計</p>	800,000 円																				