

# カンナビノイド類縁体の創製に向けたアルキルレゾルシノールのコンビナトリアル生合成

申請代表者	田浦 太志	富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 薬用生物資源学研究室	准教授
所外共同研究者	棚谷 綾介	富山大学大学院医学薬学教育部 (薬学) 薬用生物資源学研究室	大学院生
所外共同研究者	林 望	富山大学薬学部 薬用生物資源学研究室	学部生
所内共同研究者	森田 洋行	資源開発部門天然物化学分野	教授

## ■背景・目的

大麻 (*Cannabis sativa* L.) が生産するカンナビノイドはアルキルレゾルシノールとモノテルペンがカップリングしたテルペノフェノールであり、その特異な生物活性から古くより薬理学的研究が盛んに行われている。申請者はカンナビノイドの生合成研究に取り組み、主成分である THCA 及び CBDA の生合成酵素を初めてクローン化するなど研究領域をリードしてきた (Sirikantaramas and Taura, 2017)。THCA や CBDA はアルキル側鎖として直鎖状のペンチル基 (C5) を含むが、側鎖がプロピル基 (C3) のカンナビノイドも微量成分として確認されており、ペンチルカンナビノイドとは全く異なる薬理活性を示すことが知られている。例えば THCA の脱炭酸で生じる THC は大麻の幻覚活性成分であるが、側鎖がプロピル基の THCv (図 1) は幻覚活性を示さない一方、II 型糖尿病患者に顕著な治療効果を示すことから英国 GW pharmaceuticals により phase 2 の臨床試験が実施されている (Welling et al., 2018)。

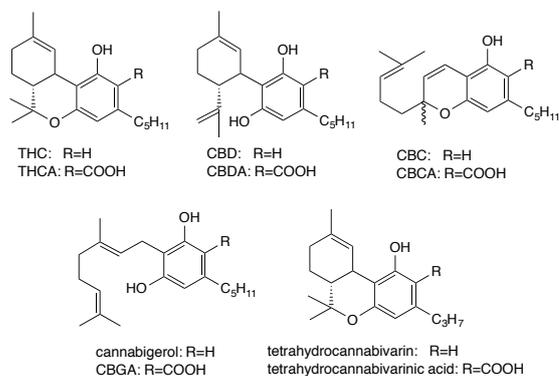


図 1. 主要カンナビノイドの構造

カンナビノイドの側鎖長はアルキルレゾルシノールを生成するポリケタイド合成酵素 (PKS) に制御される。我々は大麻 PKS の olivetol synthase (CsOLS) が olivetol を主生成物として合成する一方、側鎖がプロピル基の divarinol も微量生成することを確認した (Taura et al., 2009)。即ち OLS はカンナビノイド生合成に特化した PKS であるが、同時に化学的多様性の規定因子と言うこともできる。私達は多様な生成物を与える PKS を天然から見出し、生合成経路に組み込むコンビナトリアル生合成を実現することでカンナビノイド類縁体の多様性を拡大できるという着想を持った。そこで本研究では primin を始め各種アルキルレゾルシノール誘導体を含有するトキワザクラ (*Primula obconica*) に着目し、本植物より新規 PKS のクローン化、キャラクターゼーションおよび物質生産への応用を検討した。

## ■結果・考察

### 1. 新規ポリケタイド合成酵素 PoOLS の同定

トキワザクラ若葉より一本鎖 cDNA を調製し、重複 PCR および RACE 法により新規 PKS をコードする cDNA を増幅し、配列を決定した。次いで本遺伝子を発現ベクター pQE80L にサブクローニングして、組換え酵素を発現、精製した後、hexanoyl-CoA および malonyl-CoA を基質としてアッセイを行った。この結果、副生成物の teriketide および tetraketide pyrone とともに、olivetol を主生成物として確認した。Olivetol を生成する PKS は大麻の CsOLS に次いで二例目であり、我々は本酵素を *P. obconica* olivetol synthase (PoOLS) と命名した。また PoOLS のアッセイに大麻の polyketide cyclase である olivetolic acid cyclase (OAC) を共存させたところ、olivetol の生成

量が明らかに減少し、かわって *olivetolic acid* が生成することを確認した。このことから PoOLS はポリケタイド鎖の伸長超反応を触媒し、リリースした *hexanoyl tetra-β-ketide CoA* を OAC が閉環することで *olivetolic acid* が得られたものと推察した。このような反応メカニズムは大麻におけるポリケタイド生合成反応と同様である (Gange et al., 2012)。

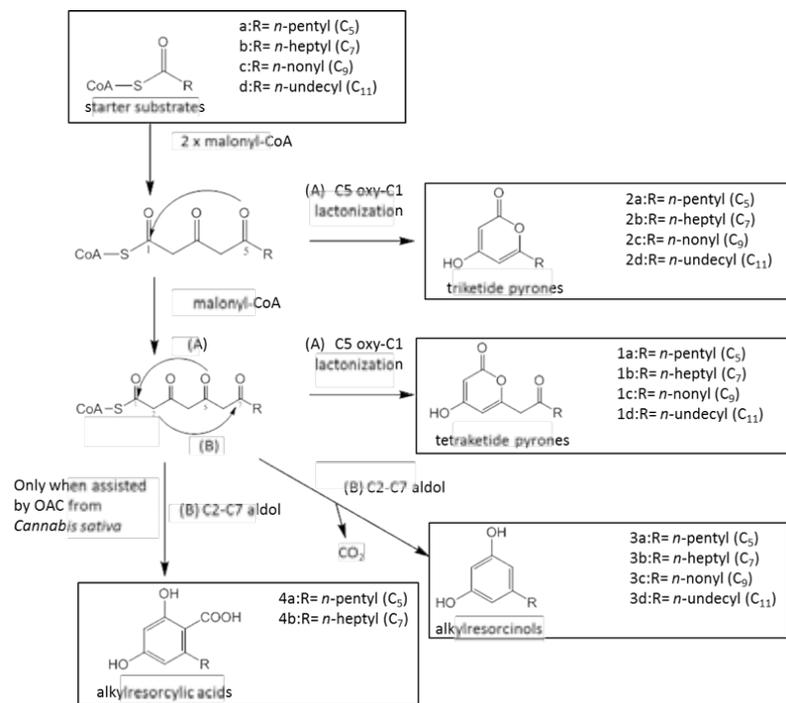


図 2. PoOLS が触媒する酵素反応のまとめ

## 2. PoOLS の立体構造解析

上記の生化学的解析から PoOLS は *hexanoyl-CoA* に特異性を示す大麻の CsOLS に比べて、より長鎖のスターター基質と反応することが判明した。このような基質特異性の構造基盤について知見を得るため、森田教授との共同研究により本酵素の X 線結晶解析を検討した。即ち、大腸菌で発現した組換え PoOLS を各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、14% PEG4000 を含む 100 mM citrate buffer (pH 5.6) 中で結晶化した。得られた結晶について Photon Factory(Beamline BL-1A)にて X 線回折データを取得し、既知植物 PKS を鋳型とする分子置換法により立体構造を決定した。

PoOLS の全体構造は既知植物 PKS と非常によく類似した  $\alpha\beta\alpha\beta$ -thiolase fold を有することが確認された。PoOLS の活性中心キャビティの構造を図 3 に示している。ポリケタイドの伸長反応を触媒する catalytic triad は Cys163, His302 および Asn335 として活性中心の適切な位置に保存されており、PoOLS は既知 PKS と同様の機構にてポリケタイド鎖の伸長反応を触媒し、*tetraketide* を合成すると考えられた。また極めて興味深いことに PoOLS の結晶は活性中心に *lauric acid* を結合した形で得られており、*lauric acid* を取り囲む形で主に芳香族性および疎水性のアミノ酸残基が配置した長いトンネル状のポケットが確認された。*Lauric acid* は精製および結晶化条件で添加したものではないため、大腸菌の成分として存在する本化合物が、活性中心に高い親和性を示したため取り込まれたものと推察した。*Lauric acid* は本酵素のスターター基質の一つである *lauroyl-CoA* の脂鎖を構成する分子であり、また *hexanoyl tetra-β-ketide* に対応する鎖長の分子ということもできる。

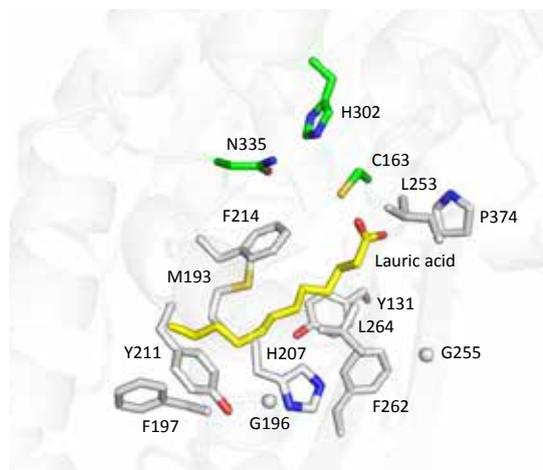


図 3. PoOLS の活性中心構造

本酵素の基質特異性に関し、PoOLS は各種のスターター基質を受容して *pentyl* 基 (C<sub>5</sub>) から *undecyl* 基 (C<sub>11</sub>) に至る各種側鎖長の *alkylresorcinol* を合成することを確認した。さらに OAC と組合せた酵素反応により、OAC の基質特異性に関しても重要な知見を得た。即ち、OAC は *heptyl tetra-β-ketide CoA* を受容し、*resorcylic acid* に閉環することが明らかとなった。我々は以前に、森田教授との共同研究により OAC が *methyl tetra-β-ketide CoA* を受容し、*orsellinic acid* を合成可能であることも確認している (Taura et al., 2016)。

以上から OAC は *methyl* 基から *heptyl* 基までのアルキル側鎖を有する *tetraketide* を受容し、*aldol* 型の閉環反応を触媒すると結論した。以上、PoOLS の酵素反応は図 2 にまとめた通りである。

このことから本酵素は今回観察した長いトンネル状の疎水性ポケットを用いてスターター基質のアルキル側鎖を受容することで各種鎖長のポリケチドを合成可能になったと推察した。植物の PKS は多くが *p*-coumaroyl-CoA をスターター基質として受容することが知られているが、興味深いことに PoOLS は本基質とは反応しない。本研究では活性中心キャビティの立体構造を解明できたことから、今後は部位特異的変異の導入により、本酵素の基質特異性を決定づけるアミノ酸について解明を進める計画である。

### 3. PoOLS のアルキルレゾルシノール生産への応用

本研究では培養が容易で、かつ組換え酵素の生産能力が高いメチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* を宿主としてカンナビノイド関連化合物の前駆物質となるポリケチド生産系を構築した。即ち、PKS として CsOLS あるいは PoOLS を用い、これらをスターターの供給に関わる acyl-activating enzymes (CsAAE1 あるいは CsAAE3, Stout et al., 2009)、さらに OAC と組み合わせ、異なる選択マーカーのベクターを介して *P. pastoris* KM71 のゲノムに組込むことでポリケチド生産株を確立した。

得られた各種組換え体について、液体培養後、メタノールによる発現誘導を行い、hexanoic acid の添加によりポリケチドの生産を試みた。この結果、予想通り PKS 単独の発現株に比べ AAE 共発現株では olivetol の生成量が増大し、また OAC 共発現株では olivetol にかわって olivetolic acid の生成が確認された。Olivetolic acid の生産量は PoOLS- AAE1-OAC 共発現株で最も高く、約 50 mg/Liter と好ましい生産量が確認された。

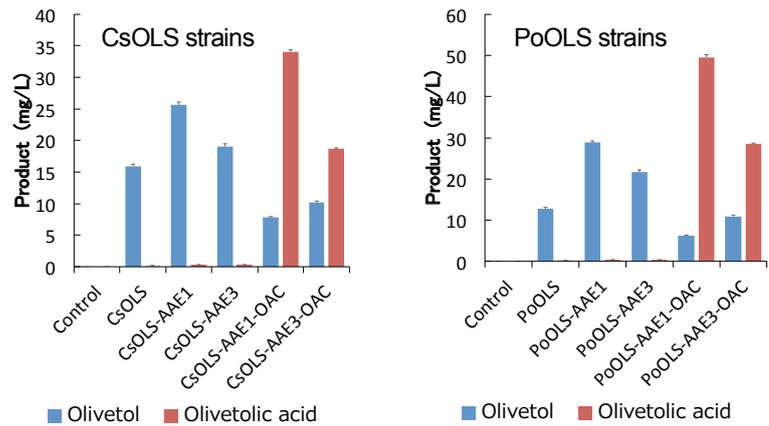


図 4. 組換え *P. pastoris* を宿主とするポリケチドの生産

Hexanoic acid 以外の脂肪酸添加による precursor-directed biosynthesis についても検討を行い、この結果 PoOLS を発現する組換え酵母は本酵素がインビトロの反応で合成した alkylresorcinol を一通り生成可能であり、また OAC 共発現株は octanoic acid 添加により heptyl 基を有する resorcylic acid を生産した。上記の通り OAC の基質特異性は分子多様性の規定因子となるため、heptyl 基以上の長鎖アルキル基を有する resorcylic acid の生産は困難である。しかしながら OAC の立体構造は森田教授らにより解明されていることから (Yang et al., 2016)、OAC に関し論理的な部位特異的変異の導入による基質特異性の改変が望まれる。また現在、上記の各種ポリケチド生産株には我々が同定した大麻プレニル転移酵素遺伝子の導入、発現を検討しており、新規なカンナビノイドの生産が実現できると考えている。

## ■ 結論

本研究ではポリケチド合成酵素 PoOLS をクローン化した。本酵素の触媒活性は大麻の CsOLS に類似するが、より多様な側鎖長の基質と反応するため、本酵素遺伝子はアルキル側鎖が異なるカンナビノイド類縁体の生産に応用可能と考えられる。その第一ステップとして我々はメチロトロフ酵母 *P. pastoris* を宿主として、PoOLS を OAC および AAE と組合せて発現することで各種アルキルレゾルシノールの生産が可能であることを示した。本研究の実施期間に、Keasling らが出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とするカンナビノイドの生産を実現したが (Luo et al., 2019)、最終的に得られたカンナビノイド量は数 mg/Liter にとどまっている。我々は今後も本研究を継続し、新たなカンナビノイド類縁体の効率的生物合成を実現する。

## ■参考文献

- 1) **Sirikantaramas S, Taura F** (2017) Cannabinoids: Biosynthesis and biotechnological applications. *In* S Chandra, H Lata, M ElSohly, eds, *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Springer, Cham, Switzerland, pp183–206
- 2) **Welling MT, Liu L, Raymond CA, Ansari O and King GJ** (2018) Developmental plasticity of the major alkyl cannabinoid chemotypes in a diverse Cannabis genetic resource collection. *Front Plant Sci* **9**: 1510
- 3) **Taura F, Tanaka S, Taguchi C, Fukamizu T, Tanaka H, Shoyama Y, Morimoto S** (2009) Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS Lett* **583**: 2061–2066
- 4) **Gagne SJ, Stout JM, Liu E, Boubakir Z, Clark SM, Page JE** (2012) Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 12811–12816
- 5) **Taura F, Iijima M, Yamanaka E, Takahashi H, Kenmoku H, Saeki H, Morimoto S, Asakawa Y, Kurosaki F, Morita H** (2016) A novel class of plant type III polyketide synthase involved in orsellinic acid biosynthesis from *Rhododendron dauricum*. *Front Plant Sci* **7**: 1452
- 6) **Stout JM, Boubakir Z, Ambrose SJ, Purves RW, Page JE** (2012) The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes. *Plant J.* **71**: 353–365
- 7) **Yang X, Matsui T, Kodama T, Mori T, Zhou X, Taura F, Noguchi H, Abe I, Morita H** (2016) Structural basis for olivetolic acid formation by a polyketide cyclase from *Cannabis sativa*. *FEBS J* **283**: 1088–1106
- 8) **Luo X, Reiter MA, d’Espaux L, Wong J, Denby CM, Lechner A, Zhang Y, Grzybowski AT, Harth S, Lin W, Lee H, Yu C, Shin J, Deng K, Benites VT, Wang G, Baidoo EEK, Chen Y, Dev I, Petzold CJ, Keasling JD** (2019) Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature* **567**: 123–126