

植物二次代謝酵素の潜在的触媒活性を基盤とするカンナビノイド関連化合物の生合成工学

申請代表者	田浦 太志	富山大学学術研究部薬学・和漢系	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	博士後期課程 1年
所外共同研究者	林 望	富山大学大学院医学薬学教育部	博士前期課程 2年
研究統括者	森田 洋行	研究開発部門資源開発分野天然物創薬学領域	教授

■背景・目的

大麻 (*Cannabis sativa*) のカンナビノイドはポリケチドとモノテルペンで構成される特異な二次代謝産物であり、中でも Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) や cannabidiol (CBD) は鎮痛、鎮吐、抗炎症及び抗痙攣など種々の興味深い薬理作用を示すことから、多発性硬化症や小児てんかんなど各種難治性疾患の治療薬として欧米を中心とした約 30 カ国で医薬品応用されている。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 や CBDA の生合成酵素を同定するなど、本研究領域をリードしてきた (Taura et al., 2019)。

カンナビノイドは 100 種類以上が知られており、またその生物活性は微細な構造の違いにより大きく変化する。例えば 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 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)。このような非幻覚性カンナビノイドの生物活性に関する報告は数多く、今後医薬資源として非常に期待できる研究分野と考えられる。またカンナビノイド関連化合物はオオケビラゴケなどの苔類からも得られており、これら化合物の生物活性にも近年注目が集まっている (Chicca et al., 2018)。

カンナビノイドの生合成経路は、1) ポリケチド骨格の形成、2) プレニル基の転移、及び 3) 立体選択的酸化閉環の 3 ステップで構成される (図 1)。酵素と基質の関係は一般に「鍵と鍵穴」と言われるほど厳密であるが、近年我々は、各ステップの酵素がフレキシブルに基質アナログを受容する「潜在的触媒活性」を有することを確認している。即ち、これら生合成酵素は、新規なカンナビノイド類縁体の酵素合成や微生物生産に応用できる可能性が考えられる。ここでは本共同研究を通じて我々が明らかにした生合成酵素の性質ならびに新規化合物生産への取り組みについてについて概説する。

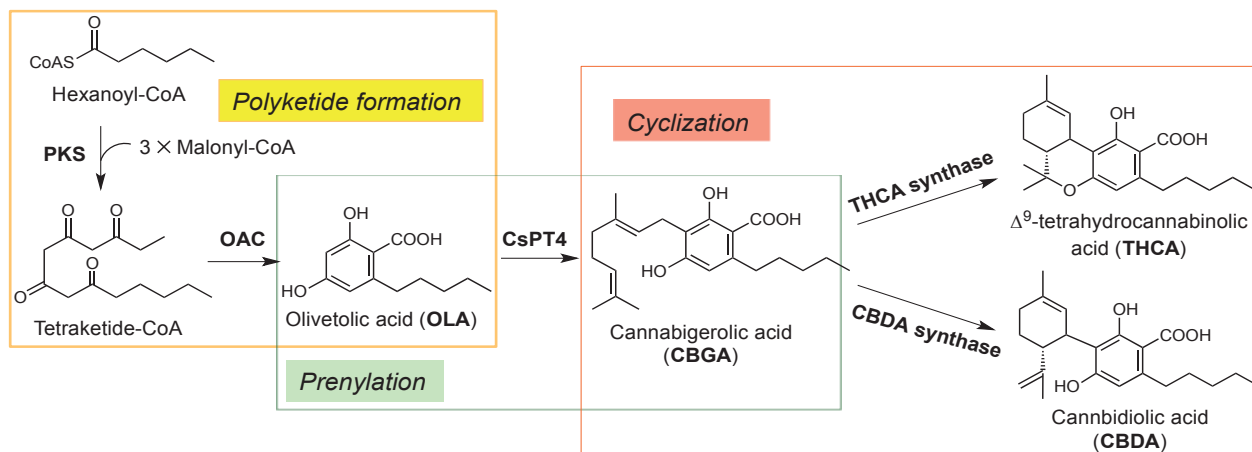


図 1. カンナビノイドの生合成経路

■結果・考察

1. 大麻プレニル転移酵素 CsPT4 の構造機能研究

プレニル基転移酵素 (PT) は芳香族基質にプレニル二リン酸由来のプレニル基を転移する酵素であり、一般に基質選択性が厳密と考えられているが、我々は先の共同研究において複数のプレニル基質と反応する新規な PT を同定報告しており、天然物の構造多様性を創出する PT の触媒ポテンシャルには非常に興味をもたれる (Saeki et al., 2018)。そこで我々は、大麻由来 CsPT4 組換え酵素の基質特異性を詳細に検討した。

はじめに芳香族基質として OLA を用い、各種プレニル基質との反応を検討した結果、本酵素は炭素数 10 の GPP を受容して CBGA を生成するばかりでなく、DMAPP (C5) から GGPP (C20) に至る 4 種のプレニル基質を受容し、側鎖長の異なる CBGA 類縁体を合成するという驚異的な触媒ポテンシャルを有することを確認した (図 2)。また興味深いことに、酵素反応で得られるセスキテルペン型及びジテルペン型 CBGA は新規化合物であり、それぞれ sesqui-CBGA および diterpeno-CBGA と命名した。各プレニル基質に対する反応速度論解析を行った結果、本酵素は GPP に対して最も高い V_{max}/K_m 値を示したことから、GPP を最適なプレニル基質として受容することが判明した。

次いで図 2 に構造を示した各種の芳香族基質を用いて、さらなる基質特異性の検討を行った。この結果、本酵素はアルキル側鎖の異なる OLA 類縁体のみならず、フロログルシノール (phlorocaprophenone) やビベンジル (dihydropinosylvin acid) といった、異なる骨格の化合物にもプレニル基を転移可能であることを確認した。即ち CsPT4 は芳香族基質に対しても柔軟な基質特異性を示し、合計 14 種もの生成物を与える能力を有していた。

特に、生成物の一つである 3-geranyl dihydropinosylvin acid は苔類オオケビラゴケ (*Radula perrottetii*) に由来し、近年その生物活性が注目されるビベンジルカンナビノイドの前駆体であり、CsPT4 はビベンジルカンナビノイドのバイオテクノロジーにも応用可能と言える。

CsPT4 は植物二次代謝 PT としては例外的な幅広い基質特異性を示したことから、酵素合成や合成生物学への展開が期待されるが、一方で CBGA 合成反応以外の反応速度には改善の必要があると考えられた。このため、本酵素活性中心への部位特異的変異により、触媒活性の向上について現在検討を行っている。

また得られた生成物の生物活性に関しては、Suresh 准教授のご協力のもと膵癌 PANC-1 細胞を用いた抗緊縮アッセイを検討し、CBGA よりも新規化合物の sesqui-CBGA および diterpeno-CBGA の方が高い活性を示すという興味深い結果を得ている。

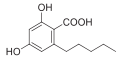


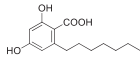
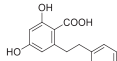
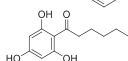
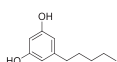


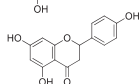
Name	Substrate Structures	DMAPP	GPP	FPP	GGPP
Olivetolic acid (OLA)		+	+	+	+
Orsellinic acid		-	-	-	-
Divarinic acid		-	+	+	+
6-Heptylresorcylic acid		-	+	+	-
Dihydropinosylvin acid		-	+	+	+
Phlorocaprophenone		-	+	+	-
Olivetol		-	-	-	-
Umbelliferone		N.D.	-	N.D.	N.D.
Homogentisic acid		N.D.	-	N.D.	N.D.
Naringenin		N.D.	-	N.D.	N.D.

図 2. CsPT4 の基質特異性

+ : Activity was detected. - : Activity was not detected.

2. カンナビノイド合成酵素の基質特異性

本研究ではカンナビノイド合成酵素による酸化閉環反応を活用したカンナビノイド関連化合物の構造多様性拡大を最終目標としている。本項では THCA synthase をモデルとして、その触媒ポテンシャルについて検討した。はじめに、CsPT4 が生成した sesqui-CBGA とタバコ BY-2 細胞で発現した組換え THCA synthase をインビトロで反応させ、生成物を HPLC で分析したところ、コントロールには見られない生成物のピークを確認した。本生成物を

種目 (特定研究)

LC-ESI-MS で分析した結果、酸化生成物と予想される $m/z = 425$ の分子イオンピークを示すことを確認した(図 3A)。したがって、THCA synthase は少なくとも sesqui-CBGA を酸化する能力を有していることを明確にした。生成物が微量であったことから、その NMR 解析はできていないものの、本生成物の UV 吸収は既知カンナビノイドの cannabichromenic acid とほぼ一致するものであり、THCA 型の閉環反応ではなくクロメン環の形成が進行した可能性が考えられた(図 3B)。

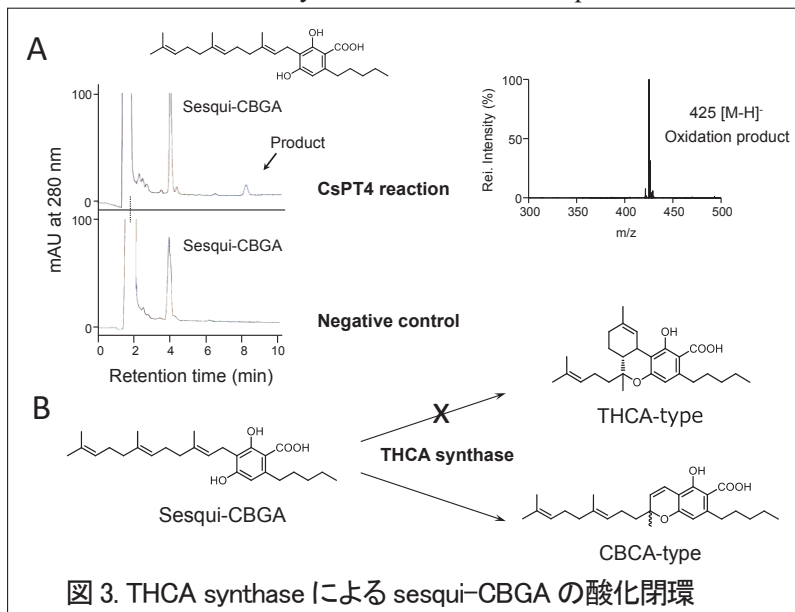


図 3. THCA synthase による sesqui-CBGA の酸化閉環

以上のように THCA synthase は CBGA のみならず、長鎖プレニル基を有する sesqui-CBGA を受容し、酸化する能力を有することを確認した。プレニル鎖長の違いが生物活性に与える影響は極めて興味深いところであり、ラージスケール反応による sesqui-CBGA 閉環産物の調製及び生物活性について今後検討する計画としている。

以上のように THCA synthase は CBGA のみならず、長鎖プレニル基を有する sesqui-CBGA を受容し、酸化する能力を有することを確認した。プレニル鎖長の違いが生物活性に与える影響は極めて興味深いところであり、ラージスケール反応による sesqui-CBGA 閉環産物の調製及び生物活性について今後検討する計画としている。

3. オオケビラゴケが生産するビベンジルカンナビノイド生合成マシナリーの解明

希少苔類オオケビラゴケ (*Radula perrottetii*) が生産するビベンジルカンナビノイドの perrottetinic acid (PETA) は THCA に類似した興味深い構造を有する(図 4) (Asakawa et al., 2013)。しかしながら、PETA は微量成分であることから、その生物活性および生合成メカニズムはほとんど検討されていない。本研究ではビベンジルカンナビノイド生合成酵素の遺伝子クローニングおよび構造機能解析を目的とした。

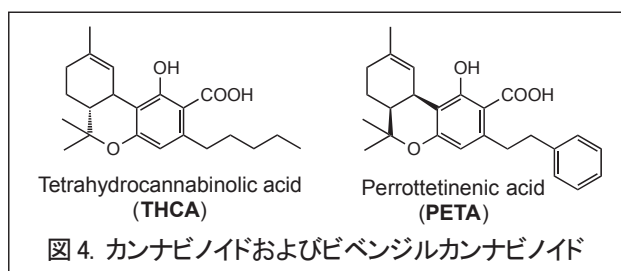


図 4. カンナビノイドおよびビベンジルカンナビノイド

即ち、オオケビラゴケのトランスクリプトームデータを構築し、生合成酵素の候補遺伝子としてカンナビノイド合成酵素をはじめとする FAD オキシダーゼと高いホモロジーを示す RpOx1~3 をコードする配列を同定した。次いで *Pichia pastoris* を宿主として各組換え酵素を発現し、酵素活性の測定により生合成酵素遺伝子の同定、機能解析を検討した。PETA の前駆体と推定される 3-geranyl dihydropinosylvin acid を基質とする酵素アッセイを行い、生成物を LC-MS により分析した結果、いずれの組換え酵素を用いた場合も PETA の生成は確認されなかった一方、RpOx3 の反応液に PETA 以外の酸化生成物の明確なピークが確認された。ラージスケールの酵素反応により本生成物を調製し、分取 HPLC で精製した後 NMR により構造解析した結果、本化合物はクロメン環を有する PETA の異性体であることを確認し、新規化合物であったことから、オオケビラゴケの学名にちなんで radulachromenic acid と命名した(図 5)。なお本化合物は文献未記載であるが、オオケビラゴケエキスの LC-ESI-MS 分析から、本植物の微量成分として存在することも確認している。

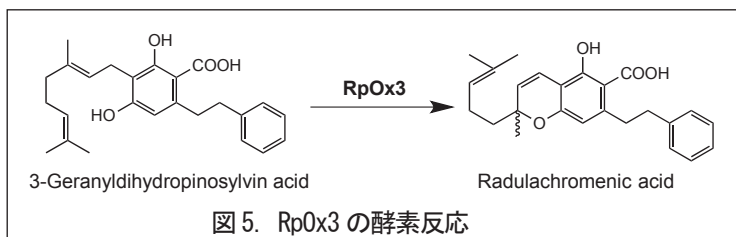


図 5. RpOx3 の酵素反応

以上のように、RpOx3 は期待された PETA ではなく、新規なクロメン化合物 radulachromenic acid を合成するという予想外の結果を得た。また、生成物のキラル HPLC 分析から、radulachromenic acid は酵素反応でありながらラセミ体として生成するという、これもまた意外な結果が得られている。このことから、RpOx3 は基質を酸化した後

種目 (特定研究)

に、閉環しないままリリースしている可能性が考えられる。即ち、オオケビラゴケ植物内には RpOx3 のパートナー酵素が存在して、未閉環の中間体を PETA に閉環する可能性を想定している。パートナー酵素の候補として各種二次代謝産物の骨格形成に関わる dirigent protein (Uchida et al., 2017) の類縁タンパクを想定した遺伝子スクリーニングを開始したところである。

■結論

本研究ではカンナビノイド生合成酵素の触媒ポテンシャルを詳細解明し、これを新規カンナビノイド関連化合物の酵素合成に応用する目的で各種検討を行った。この結果、CsPT4 が示す驚異的なまでの潜在的触媒活性に加えて、THCA synthase もまたプレニル鎖長の異なる基質アナログを受容可能なことを確認した。いずれも基質アナログに対する反応性には改善の必要があるものの、これらを組み合わせた反応を行うことで、従来想像されることのなかった非天然カンナビノイドの生産が可能になると考えられる。さらに本研究では近年注目されるビベンジルカンナビノイド生合成酵素の候補として、オオケビラゴケより RpOx3 の発見に成功した。これを足がかりとして、ビベンジルカンナビノイドの生合成機構に関しても究明したいと考えている。

■参考文献

- 1) **Taura F, Tanaya R, Sirikantaramas S** (2019) Recent advances in cannabinoid biochemistry and biotechnology *Science Asia* **45**: 399–407
- 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) **Chicca A, Schafroth MA, Reynoso-Moreno I, Erni R, Petrucci V, Carreira EM, Gertsch J** (2018) Uncovering the psychoactivity of a cannabinoid from liverworts associated with a legal high. *Sci Adv* **4**: eaat2166
- 4) **Saeki H, Hara R, Takahashi H, Iijima M, Munakata R, Kenmoku H, Fuku K, Sekihara A, Yasuno Y, Shinada T, Ueda T, Nishi T, Sato T, Asakawa Y, Kurosaki F, Yazaki K, Taura F** (2018) An aromatic farnesyltransferase functions in biosynthesis of the anti-HIV meroterpenoid daurichromenic acid. *Plant Physiol* **178**: 535–551
- 5) **Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F** (2013) Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry* **91**: 52–80
- 6) **Uchida K, Akashi T, Aoki T** (2018) The missing link in leguminous pterocarpan biosynthesis is a dirigent domain-containing protein with isoflavanol dehydratase activity. *Plant Cell Physiol* **58**: 398–408