

プレニル基転移酵素の機能的リデザインを基軸とする生合成工学

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	西垣 奈緒	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

天然物の生合成において、芳香族化合物のプレニル化反応は疎水性や膜透過性ととともに生物活性を劇的に変化させるステップであり、プレニル化ポリフェノールは強力かつ特異な生物活性を示すものが多く、医薬資源としての有用性に注目が集まっている。例えば Fig. 1 の *cannabigerolic acid* (CBGA) は *tetrahydrocannabinol* など薬理活性カンナビノイドの前駆体であり、大麻では微量成分ながら鎮痛、抗炎症、食欲増進および細胞毒性など多様な生物活性を有することから、医薬資源として期待される希少カンナビノイドである¹。またセリ科およびミカン科植物に分布する *O*-プレニル化クマリンの *umbelliprenin* はがん細胞に対する強力な細胞毒性が知られており、近年はその作用機序の解明や効率的な薬物送達に関する研究が進展している^{2,3}。

本研究ではこれらプレニル化ポリフェノールの生合成に関わるプレニル基転移酵素 (PT) の構造機能研究を、新たな医薬資源の開拓に結びつける。即ち 1) CBGA を生合成する大麻 (*Cannabis sativa*) 由来 CsPT4、および 2) *umbelliprenin* を生成するアギ (*Ferula assa-foetida*) 由来の新規酵素 FaPT1 に焦点を絞り、基質特異性などの生化学的性質を明確にするとともに、酵素反応により多様な天然型および非天然型メロテルペノイドを獲得し、それらの生物活性を解明する。

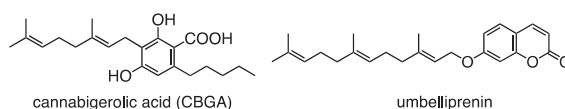


Fig. 1 Biologically active prenylated polyphenols

■結果・考察

1. 大麻由来 CsPT4 の詳細機能解析

CsPT4 はポリケチドの *olivetolic acid* (OLA) に GPP 由来のゲラニル基を転移することで CBGA を合成するプレニル基転移酵素である。本酵素は近年 Keasling のグループにより見出され、酵母を宿主とするカンナビノイドの合成生物学的に応用されているが、基質特異性をはじめ酵素機能の詳細は不明確である⁴。

本研究では始めに、各種のプレニル基質に対する特異性を検討した結果、驚くべきことに CsPT4 は GPP のみならず、DMAPP から GGPP にいたる 4 種のプレニル基質と反応できることを明らかにした (Fig. 2)。

次いで OLA および関連化合物 (1~15, Fig. 2) を用いて芳香族基質に対する特異性を検討したところ、本酵素は下図に示す多数の芳香族化合物を受容可能であることを確認し、新規化合物を含む多様な生成物を与えることが判明した。興味深いことにそれらの芳香族基質には、アルキル側鎖の異なる OLA 類縁体のみでなく、ビベンジル型やフロログシノール型の基質も含まれている。ビベンジルに関しては、Fig. 2 のジヒドロピノシルビン酸 (DPA, 8) を受容し、苔類オオケビラゴケの二次代謝産物であるビンベンジルカンナビノイド前駆体を合成可能なことを確認した。近年、ビベンジルカンナビノイドは新たな生物活性天然物

として注目されており⁵⁾、CsPT4 はその酵素合成にも応用可能と考えられる。また、フロログルシノール型の基質としては、OLA の異性体であるフロロカプロフェノン (9) や、DPA の異性体であるジヒドロカルコン誘導体 (10) を受容して、それぞれのゲラニル化体を与えることを明らかにした。一般に酵素による基質認識は厳密な場合が多く、植物二次代謝 PT も例外ではない。このように多様なプレニル基質および芳香族基質と反応するプレニル基転移酵素は CsPT4 が初めてであり、バイオテクノロジーへの展開に極めて好適であると考えられた。

CsPT4 の生化学的性質を詳細に解明するため、本酵素の反応速度論的解析を検討した。Table 1 に各種のプレニル基質に対する速度定数を示している。 K_m 値より判断して、本酵素の GPP に対する親和性は中程度であるが、反応速度が極めて高いことから、反応効率の指標である V_{max}/K_m が最も高く、GPP が最適なプレニル基質であると確認できた。これは植物体において CBGA の生成に機能する酵素として適切な結果である。

その他の各プレニル基質への触媒機能について、本酵素は FPP に対しても高い活性および親和性を示したが、より長鎖の GGPP に対しては、非常に高い親和性を示した一方で、反応速度が著しく低いことが示唆された。さらにサイズの小さい DMAPP に関しては、親和性および活性がいずれも低く、生物学への展開は困難と推察された。このため、GGPP や DMAPP との反応性を高めるためには、本酵素の立体構造を基盤として、論理的な変異導入を行うことで、酵素機能を改変する必要があると考えられる。

次に、芳香族基質に対する速度論的解析を行った。この結果、Table 2 に示す通り本酵素の生理的な基質 OLA に対する K_m 値は約 31 μM と、既知の植物由来芳香族 PT と同程度であったが、DPA に対する K_m 値は約 17 μM と判明し、OLA よりもビベンジル型の DPA に対して高い親和性を示すことが確認された。また本酵素の反応速度は、OLA と DPA を用いた場合同程度であった。さらに本酵素はアルキル側鎖の短いディバリン酸 (DVA, 4) に対して、OLA の場合よりも 4 倍程度高い反応速度を示すことを確認した。反応効率の指標である V_{max}/K_m のレベルで見ても、本酵素は OLA よりむしろ DPA や DVA に高い選択性を示すことが確認された。

さらに現時点で正確な反応速度は測定できていないものの、CsPT4 はアルキル側鎖の長い OLA アナログに関して、炭素数 11 の側鎖を持つものまで受容可能であることを確認している。近年、共同研究者の森田洋行教授により、OLA 生合成酵素の部位特異的改変によって、炭素数 11 までのアルキル側鎖を有する

	DMAPP	GPP	FPP	GGPP
1. olivetolic acid (OLA)	+	+	+	+
2. olivetol	—	—	—	—
3. orsellinic acid	—	—	—	—
4. divaricic acid (DVA)	—	+	+	+
5. 6-heptyl resorcylic acid (HRA)	—	+	+	—
6. 6-nonyl resorcylic acid	—	+	—	—
7. 6-undecyl resorcylic acid	—	+	—	—
8. dihydropinosyllic acid (DPA)	—	+	+	+
9. phlorocaprophenone	—	+	—	—
10. dihydropinocembrin chalcone	—	+	—	—
11. umbelliferone	—	—	—	—
12. naringenine	—	—	—	—
13. resveratrol	—	—	—	—
14. <i>p</i> -coumaric acid	—	—	—	—
15. homogentisic acid	—	—	—	—

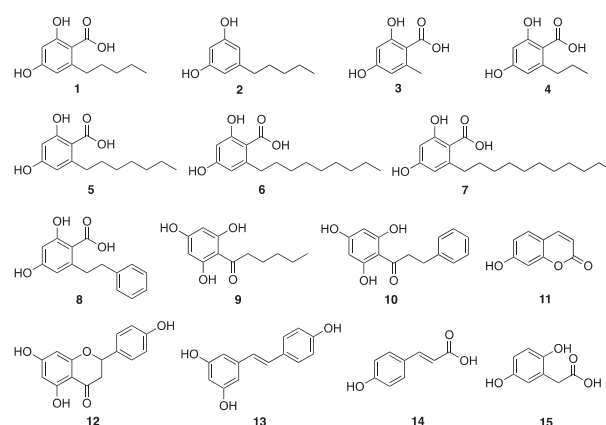


Fig. 2 Substrate specificity of CsPT4. The enzyme activities were assayed using all combinations of 14 aromatic and 4 prenyl substrates.

に関しては、親和性および活性がいずれも低く、生物学への

Substrate	Apparent affinity (K_m) μM	Catalytic rate (V_{max}) $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Catalytic efficiency (V_{max}/K_m) $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
GPP	64.0 ± 0.7	$1,435 \pm 16$	21.0 ± 0.01
FPP	21.4 ± 0.4	146 ± 0.7	6.8 ± 0.1
GGPP	6.30 ± 0.4	31.0 ± 1.2	4.9 ± 0.5
DMAPP	$1,439 \pm 506$	7.46 ± 1.15	0.0055 ± 0.0013

Table 1 Steady-state kinetic parameters of CsPT4 for prenyl substrates. OLA was used as the aromatic substrate.

Substrate	Apparent affinity (K_m) μM	Catalytic rate (V_{max}) $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Catalytic efficiency (V_{max}/K_m) $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
OLA	31.3 ± 0.05	$2,493 \pm 38$	79.6 ± 1.3
DVA	78.1 ± 1.9	$10,421 \pm 121$	134 ± 2
HRA	156 ± 28	158 ± 13	1.0 ± 0.1
DPA	16.9 ± 0.5	$2,727 \pm 17$	162 ± 4

Table 2 Steady-state kinetic parameters of CsPT4 for aromatic substrates. GPP was used as the prenyl substrate.

OLA アナログの酵素合成が達成されている⁶⁾。当該変異酵素との組み合わせにより、多様な OLA アナログの酵素合成やバイオテクノロジーが可能になると考えている。

2. CsPT4 反応生成物の生物活性

先に述べた通り CsPT4 は新規化合物を含む多数の生成物を与えたことから、以下に示した代表的な酵素反応生成物 (**16-22**, Fig. 3) について生物活性試験を検討した。カンナビノイドは多様な薬理活性が注目された化合物群であるが、膵がんに関わる報告は多くない。そこでヒトすい臓癌細胞 PANC-1 に対する抗緊縮活性を検討することとした。すい臓癌細胞は多くの場合細胞増殖に血管新生が追いつかず、低酸素、低栄養といった栄養飢餓状態にさらされている。しかしながら、膵がん細胞は栄養飢餓に対して耐性を持ち、このことががんの活発な増殖や転移に結びつく。従って、栄養飢餓条件の膵がん細胞に毒性 (抗緊縮活性) を示す薬剤は、新たな抗がん剤の候補として期待される⁷⁾。

抗緊縮活性試験の結果は極めて興味深いものであり、フェノール骨格の OLA (**1**) が全く活性を示さなかったのに対して、プレニル化により抗緊縮活性が発現し、CBGA 類縁体の中では炭素数 15 のファルネシル基と結合した新規化合物 sesqui-CBGA (**18**) が最も高い活性を示した。プレニル化により疎水性が高まることで、膜透過性が亢進し、これにより細胞毒性を発現した可能性が考えられる。プレニル基は長鎖ほど良いわけではなく、炭素数 20 のゲラニルゲラニル基と結合した Diterpeno-CBGA (**19**) よりも Sesqui-CBGA の方が活性が高かったことから、最適値があることが確認できた。なお Sesqui-CBGA に対して、抗緊縮活性の指標となる PC₅₀ 値は 2.4 μ M であった (Fig. 4)。これは本学の Suresh Awale 博士らを中心に現在臨床試験が進行しているゴボウ成分 arctigenin の活性 (PC₅₀ 値 0.7 μ M) より低いものの、ファーストスクリーニングとしては極めて有望であり、今後さらに多くの酵素反応生成物を試験することで、さらに強力な活性化合物の探索につなげたい。

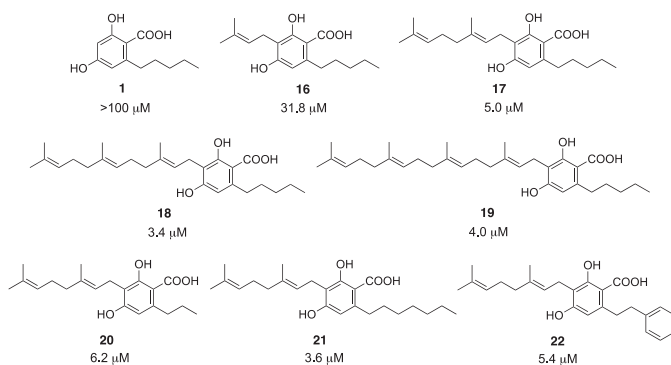


Fig. 3 Preferential cytotoxicity index (PC₅₀) of enzymatically-synthesized prenylated polyphenols against PANC-1 human pancreatic cancer cells.

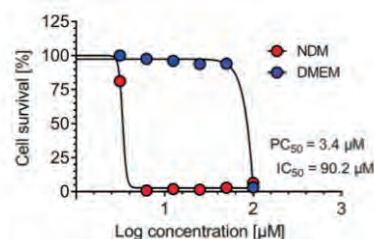


Fig. 4 Preferential cytotoxicity of sesqui-CBGA against PANC-1 human pancreatic cancer cells. NDM, nutrition-deprived medium; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium.

3. アギ由来 FaPT1 の同定および機能解析

アギ (*Ferula assa-foetida*) は、中近東やインドに分布するセリ科植物で、本植物から得られる樹脂はアサフェティダと称され、香辛料とする他、インドの伝統医学アーユルヴェーダでは喘息、神経衰弱および腹痛などの治療に適用されてきた。アサフェティダの成分である umbelliprenin は、がん細胞に対する強い細胞毒性や、抗炎症およびメラニン生合成阻害など興味深い生物活性を示すことが報告されており、医薬資源として期待されている²⁾。Umbelliprenin は umbelliferone の *O*-プレニル化によって生成すると予想される。しかしながら現時点で植物二次代謝に関与する *O*-プレニル基転移酵素 (*O*-PT) についての研究例は極めて少数で⁸⁾、umbelliprenin の生合成を触媒する酵素も未解明である。

本研究ではトランスクリプトーム解析に基づく *O*-PT の cDNA クローニングより検討を開始した。始めに、アギの若葉より RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを調製した後、次世代シーケンシングにより取得したショートリードについて de-novo assembly を行うことで、アギのトランスクリプトームデータを確立した。次いで、既知 PT をクエリとしてホモロジー検索を行ったところ、3 種の PT 候補遺伝子 *FaPT1* ~3 の部分配列を確認した。そこで、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により、これらの末端配列を決定し、cDNA 全長を確定した。*FaPT1* ~3 の推定アミノ酸配列について、植物由来既知 PT との分子系統樹解析を

種目 (特定研究)

行ったところ、FaPT1 は一次代謝に関わるクレードから独立し、クマリン特異的プレニル基転移酵素とクレードを形成した (Fig. 5)。従って、FaPT1 がアギの二次代謝に関与する *O*-PT であると推察し、構造機能解析を検討することにした。

既知 PT の多くはプラスチドに局在し、MEP 経路由来のプレニル基質を利用することが知られているが、その一方でファルネシル基のもとになる FPP は一般にサイトゾルのメバロン酸経路で供給される。従って、FaPT1 の細胞内局在性は極めて興味深い。そこで、FaPT1-GFP 融合遺伝子を構築し、アグロバクテリウム LBA4404 株を介したアグロインフィルトレーション法により、ベンサミアナタバコの葉に融合タンパク質を一過的に発現させ、得られたプロトプラストについて、共焦点レーザー顕微鏡による観察を試みた。この結果、FaPT1-GFP 融合タンパク質の蛍光は、プラスチドに存在するクロロフィルの蛍光とは一致せず、主にサイトゾルにてドット状に観察された (Fig. 6)。このような局在パターンは小胞体タンパクに類似したものである。従って FaPT1 は小胞体膜に結合した形で存在し、メバロン酸経路から供給される FPP を利用していることが示唆された。

次いで、酵素機能の確認のため、酵母 *Pichia pastoris* での FaPT1 組換え酵素の発現と活性測定を検討した。このため、発現ベクター pPICZA に FaPT1 遺伝子を組み込み、エレクトロポレーション法により *P. pastoris* KM71H 株に導入した後、メタノールを含む培地で培養して組換え酵素の発現を誘導した。FaPT1 は膜タンパク質であると予測されたため、ミクロソーム画分を調製し、これを粗酵素液として、FPP および umbelliferone を基質とする酵素反応に供したところ、HPLC により umbelliprenin 標品と一致する明確なピークが確認された。以上から、FaPT1 が umbelliprenin の生合成反応を触媒する *O*-PT であることを確認した。植物二次代謝に関わる *O*-PT はグレープフルーツ由来の bergamottin 合成酵素⁸⁾に次いで二例目であり、またファルネシル転移酵素は初めての例である。

本酵素の基質特異性については、Fig. 7 に示した 8 種の芳香族化合物をプレニルアクセプターとし、FPP との酵素反応を行ったところ、umbelliferone のみならず、bergaptol についても反応生成物が確認された。このため、本酵素は多様なクマリン化合物と反応する可能性があり、さらに多くの芳香族基質を用いて解析を進めている。また Fig. 7 に示した 4 種のプレニル基質をプレニル基ドナーとして酵素反応に用いた結果、極めて興味深いことに GPP、FPP および GGPP に関して反応生成物を確認することができた。以上の結果から FaPT1 はプレニルアクセプターとしてクマリン骨格を有する芳香族化合物を認識し、また多様なプレニル基質を受容する酵素であると確認した。FaPT1 は広範な基質を受容可能であるため、プレニル化クマリンの酵素合成に応用可能と考えられる。今後は部位特異的変異による酵素機能の拡張も含めて、さらに多様な生成物の合成を試み、それらの生物活性を検討する計画である。

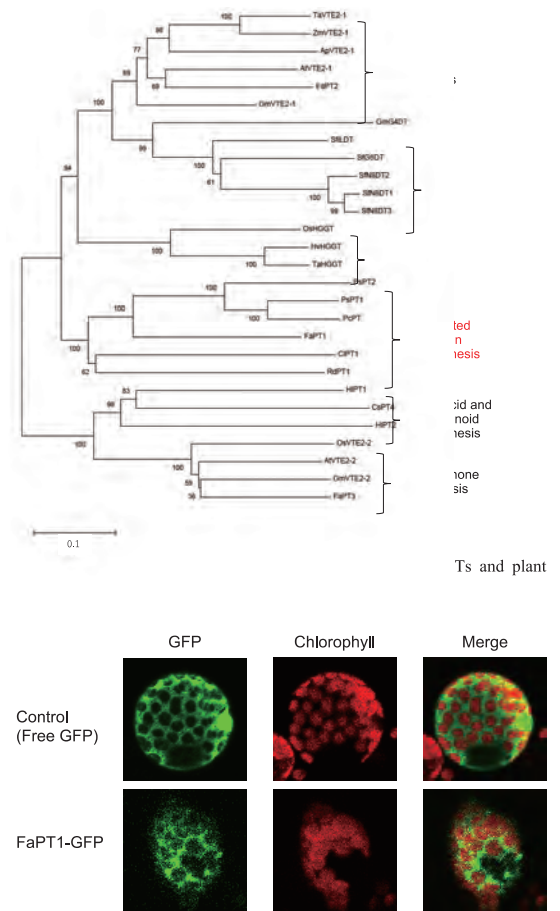


Fig. 6 Subcellular localization of FaPT-GFP fusion protein transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* mesophyll cells.

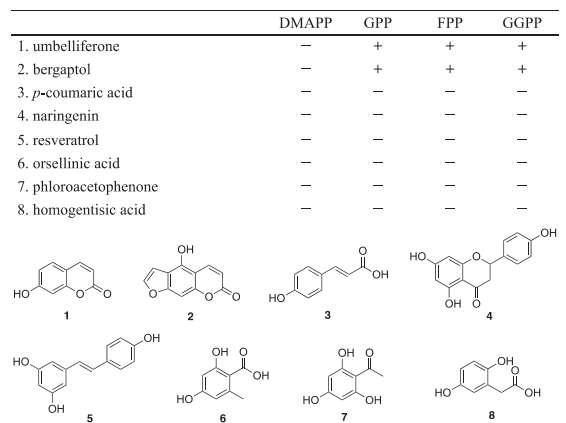


Fig. 7 Substrate specificity of FaPT1. The enzyme activities were assayed using all combinations of 8 aromatic and 4 prenyl substrates.

次いで umbelliprenin の生合成部位について RT-PCR により検討した。この結果、umbelliprenin の含量が根や側根に多いのに対して、本酵素遺伝子の発現は意外なことに若葉や葉柄などの地上部に集中しており、地下部ではほとんど観察できなかった。このことから、umbelliprenin は地上部で合成され、維管束（おそらく篩管）を通じて地下部に輸送されると結論した。

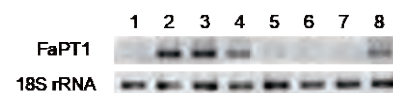


Fig. 8 RT-PCR analysis of tissue-specific expression of FaPT1. 1, flower; 2, leaf; 3, petiole; 4, pedicel; 5, stem; 6, main root; 7, lateral root; 8, achine.

■結論

本研究では大麻由来 CsPT4 およびアギ由来の新規酵素 FaPT1 のキャラクタリゼーションにより、これらプレニル基転移酵素が極めて広範な基質を受容して多様な生成物を合成可能であることを示し、また CsPT4 の産物については膀胱がん細胞に対する顕著な抗緊縮活性を有することを明らかにした。一般に酵素と基質は鍵と鍵穴の関係とされ、特に植物の二次代謝 PT は基質特異性が厳密なものが多い中で、これらの酵素は異例で、ゆえに物質生産に有用と考えられる。酵素により得られるプレニル化ポリフェノールの生物活性については助成期間終了後も追求し、医薬品応用に結びつく成果の創出につなげたい。

■参考文献

- 1) Russo, E.B. (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1344–1364.
- 2) Fiorito, S., Prezioso F., Sharifi-Rad, M., Marchetti, L., Epifano, F., Genovese, S. (2020) Auraptene and umbelliprenin: a review on their latest literature acquisitions. *Phytochem. Rev.* <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09713-5>.
- 3) Eda, S., Nasibullin, I., Vong, K., Kudo, N., Yoshida, M., Kurbangalieva, A., Tanaka, K. (2019) Biocompatibility and therapeutic potential of glycosylated albumin artificial metalloenzymes. *Nature Catalysis* **2**, 780–792.
- 4) Luo, X., Reiter, M.A., d'Espaux, L., Wong, J., Denby, C.M., Lechner, A., Zhang, Y., Grzybowski, T., Harth, S., Lin, W., Lee, H., Yu, C., Shin, J., Deng, K., Benites, V.T., Wang, G., Baidoo, E.E.K., Chen, Y., Dev, I., Petzold, C.J., Keasling, J.D. (2019) Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature* **567**, 123–126.
- 5) Chicca, A., Schafroth, M.A., Reynoso-Moreno, I., Erni, R., Petrucci, V., Carreira, E.M., Gertsch, J. (2018) Uncovering the psychoactivity of a cannabinoid from liverworts associated with a legal high. *Sci. Adv.* **24**, eaat2166.
- 6) Lee, Y.-E., Nakashima, Y., Kodama, T., Chen, X., Morita, H. (2021) Dual engineering of olivetolic acid cyclase and tetraketide synthase to generate longer alkyl-chain olivetolic acid analogs. *Org. Lett.* **24**, 410–414.
- 7) Sun, S., Kim, M.J., Omar, A.M., Phan, N.D., Aoike, M., Awale, S. (2021) GDP induces PANC-1 human pancreatic cancer cell death preferentially under nutrient starvation by inhibiting PI3K/Akt/mTOR/autophagy signaling pathway. *Chem Biodivers.* **18**, e2100389.
- 8) Munakata, R., Olry, A., Takemura, T., Tatsumi, K., Ichino, T., Villard, C., Kageyama, J., Kurata, T., Nakayasu, M., Jacob, F., Koeduka, T., Yamamoto, H., Moriyoshi, E., Matsukawa, T., Grosjean, J., Krieger, C., Sugiyama, S., Mizutani, M., Bourgaud, F., Hehn, A., Yazaki, K. (2021) Parallel evolution of UbiA superfamily proteins into aromatic *O*-prenyltransferases in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**, e2022294118.