

氏 名                   リー ユアン イー  
LEE YUAN-E

学位の種類            博士 (薬科学)

学位記番号            富医薬博甲第 426 号

学位授与年月日        令和 5 年 3 月 23 日

学位授与の要件        富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名            富山大学大学院医学薬学教育部  博士後期課程  
薬科学専攻

学位論文題目           Dual engineering of olivetolic acid cyclase and tetraketide synthase  
for the formation of longer alkyl-chain olivetolic acid analogs and  
their antibacterial activities  
(長鎖アルキルオリベトール酸アナログを創出するための  
オリベトール酸閉環酵素とテトラケタイド合成酵素の機能改変  
およびアナログの抗菌活性)

論文審査委員

(主査)            教授     水口 峰之  
(副査)            准教授   田浦 太志  
(副査)            教授     森田 洋行   (指導教員)

論文題目 Dual engineering of olivetolic acid cyclase and tetraketide synthase for the formation of longer alkyl-chain olivetolic acid analogs and their antibacterial activities

課程·專攻名 博士後期課程·薬科学専攻

氏名 : LEE YUAN-E

$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) and cannabidiol (CBD) are the two most studied, and pharmacologically interesting phytocannabinoids that are prospective treatments for chronic pain, stress, anxiety, depression, and insomnia (**Fig. 1**). Furthermore, cannabigerol (CBG) (**1b**), which is the decarboxylated derivative of cannabigerolic acid (CBGA) (**2b**) (**Figs. 1 and 2**), a common precursor of  $\Delta^9$ -THC and CBD, is a recently remarkable phytocannabinoid, due to its potency towards several ligand-gated cation channels of the transient receptor potential (TRP) superfamily and the 5-hydroxytryptamine receptor subtype 1A (5-HT<sub>1A</sub>) for serotonin stimulation. Compound **1b** was also reported to be a promising antibacterial agent, due to its strong activities against Gram-positive bacteria. Interestingly, recent study revealed that variation of the *n*-pentyl group of natural cannabinoids is shown to modulate their pharmacological potencies. For examples, the elongation of the side-chain at C-3 of  $\Delta^9$ -THC increases its receptor-binding affinity and a structural analog with a phenylethyl moiety at the C-3 position of  $\Delta^9$ -THC readily penetrates the brain and shows reduced  $\Delta^9$ -THC-related side effects. These observations suggest that the C-3 alkyl side-chain is one of the most critical pharmacophores and it is therefore interesting to create  $\Delta^9$ -THC and **1b**-analogs with different alkyl-chain length for the development of better medicines. However, complicated structure with two stereocenters prevented effective chemical production of  $\Delta^9$ -THC and its analogs. In contrast, a yeast expression system producing  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid ( $\Delta^9$ -THCA) was recently developed by incorporating four biosynthetic genes, tetraketide synthase (TKS), olivetolic acid cyclase (OAC), geranylpyrophosphate:olivetolate geranyltransferase (PT4), and tetrahydrocannabinolic acid synthase (THCAS) into *Saccharomyces cerevisia*. Among them, TKS is the type III polyketide synthase (PKS) that catalyzes the sequential condensations of three malonyl-CoAs with hexanoyl-CoA to produce a linear pentyltetra- $\beta$ -ketide intermediate, while OAC is the polyketide cyclase that catalyzes C2-C7 aldol-type cyclization of the linear pentyltetra- $\beta$ -ketide intermediate to form olivetolic acid (**3b**), the initial core of  $\Delta^9$ -THC with a pentyl moiety (**Fig. 1**). However, previous study demonstrated that this system cannot be utilized to generate CBGA and  $\Delta^9$ -THCA analogs with alkyl side-chain more than *n*-octyl moiety. This observation suggested that OAC and/or TKS are the limiting factors for further production of alkyl side-chain analogs of CBG and  $\Delta^9$ -THC. Thus, this study aims to create mutant enzymes, which can give rise to longer alkyl-chain **3b**-analogs, as well as to evaluate the antibacterial activities of the generated **3b**-analogs (**3c–e**) and their derivatives (**3a**, **3f**, **1a–f**, **2a–f**, and **4a–f**) (**Fig. 2**) against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* as a preliminary investigation of their biological activities.

## 1. Engineering of OAC and TKS<sup>(1)</sup>

OAC is the only known plant polyketide that accepts the polyketide-CoAs to generate olivetolic acid. In view of the important role of OAC to generate **3b** in the biosynthesis of cannabinoids, I firstly conducted the mutagenesis study on OAC. The engineering of OAC is focused on the pentyl binding pocket, which reportedly showed to accommodate the alkyl moiety of olivetolic acid (**Fig. 3**). Residues F24, Y27, and V59 lining the side and the bottom of OAC pentyl-binding pocket were substituted with sets of I/L/V, F/L/M/W, and I/L/M, respectively. The OACs were heterologously expressed in *Escherichia coli* M15 (pREP4) as *N*-terminally GST-tagged fused proteins and purified by a glutathione-affinity column and size-exclusion chromatography and used for the enzyme reaction. The LC-MS analyses revealed that wild-type OAC also has an ability to produce **3c** and this activity is slightly increased when OAC F24I was used for the reaction (**Fig. 4**). However, the production of **3d** was not observed, suggesting that further engineering of the OAC mutant may be required. To obtain information for further engineering, crystal structure of OAC F24I complexed with **3c** was solved. The crystal structure indicated that the F24I substitution significantly expanded the pentyl-binding pocket to accommodate the **3c** molecule (**Fig. 3**). Furthermore, the crystal structure also indicated a remaining space that can accommodate alkyl-moiety longer than C<sub>8</sub>. Indeed, further structure analysis unveiled that OAC F24I mutant can bind **3d**, indicating that this mutant enzyme has an ability to produce **3d** (**Fig. 3**). However, this is not consistent with the previous results obtained from the *in vitro* enzyme reaction, where no production of **3d** was observed (**Fig. 4**). It thus shed a light that TKS was also the limiting factor, which prevented the formation of **3d**. Thus, I shifted my focus on the engineering of TKS. In the previous study, the residue corresponding to L190 in TKS was suggested to control the starter substrate chain length in various type III PKS. Accordingly, the large-to-small L190G substitution in TKS was conducted. Crystal structure analysis of the TKS L190G mutant complexed with lauroyl-CoA (**5e**) clearly indicated that the substitution indeed opened up the space to a hidden pocket, thus significantly expanding its active-site cavity (**Fig. 5**).

The co-incubation assay of TKS L190G with wild-type OAC showed the production of **3d**, and its production was dramatically increased with the use of TKS L190G in the combination with OAC F24I. Remarkably, the co-incubation of TKS L190G and OAC F24I resulted in generating **3e**, suggesting that the engineering approach successfully expanded the substrate promiscuity of both enzymes for the alkyl chain of the substrates up to C<sub>11</sub>. Interestingly, the engineering of TKS also led to production of the pentaketides **9b–e** in the co-incubation reaction of TKS L190G and OAC wild-type or its F24I mutant (**Fig. 6**). Structure elucidations of **9b–e** may unveil further catalytic properties of OAC to accept penta- $\beta$ -ketide substrates.

## 2. Antibacterial properties of **3b** and its derivatives<sup>(2)</sup>

Compound **1b** reportedly shows strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria, especially *S. aureus*. It is of particular interesting to find out if the **3b** as well as other cannabinoid biosynthetic intermediates also possess antibacterial properties. As such, **3b**, olivetol (**4b**), **1b**, and **2b**, along with their analogs with *n*-propyl (C<sub>3</sub>), *n*-pentyl

(C<sub>5</sub>), *n*-heptyl (C<sub>7</sub>), *n*-nonyl (C<sub>9</sub>), *n*-undecyl (C<sub>11</sub>), and *n*-tridecyl (C<sub>13</sub>) moieties (**Fig. 2**) were evaluated on their antibacterial activities against two Gram-positive bacteria: *S. aureus* and *B. subtilis*. In this part of the study, compound **1b**, **3b**, and **4b** and their analogs were synthesized to obtain sufficient amount for the antibacterial assay. On the other hand, **2b** and its analogs were obtained by exploiting NphB G286S/Y288N mutant enzyme, which catalyzes the regiospecific prenylation of **3a–f** to yield **2a–f**, respectively. This study demonstrated for the first time the ability of NphB G286S/Y288N to accept **3c–f** for the formation of corresponding **2c–f**.

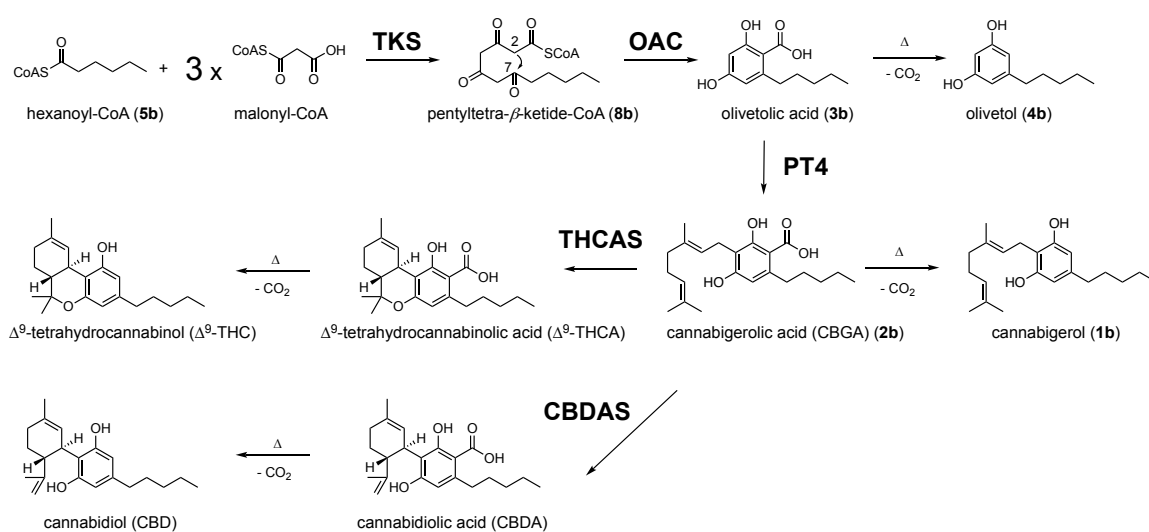
The assay revealed that although **3a** and **3b** lacked antibacterial activities, **3c–f** newly conferred the ability to inhibit the growth of *S. aureus* and *B. subtilis* in the chain-length dependent manner (**Fig. 2**). Furthermore, **4c–f** showed the same chain-length dependent patterns of antibacterial activity against *S. aureus* as those of the **3**-series. The prenylated form of the **3**- and **4**-series also demonstrated antibacterial activities against *S. aureus* and *B. subtilis*. Compounds **1b/c** and **2b/c** showed most and second most potent antibacterial activities against *S. aureus* in all the tested compounds. In the case of *B. subtilis*, the highest antibacterial activities were observed at **2c** in all tested compounds. Remarkably, the activities of **3e** and **3f** were the second highest and were comparable to that of **2b** against *B. subtilis*. Thus, despite the lack of the geranyl moiety, **3e** and **3f** could be possible candidates for further development of antibacterial agents. Furthermore, **1**- and **2**-series showed optimized alkyl chain length, suggesting that the optimization of the balance between the lengths of prenyl and alkyl moieties might be also beneficial for further drug development.

## Conclusion

The present engineering approach successfully created OAC and TKS mutants that can facilitate the formation of the cannabinoid core with a linear fatty acyl moiety up to C<sub>11</sub>. Furthermore, the antibacterial activities described here have corroborated that the incorporation of a longer alkyl chain at the C-6 position in the resorcylic acid structure confers antibacterial properties against *S. aureus* and *B. subtilis* to the resultant **3b** derivatives, even if the hydrophobic geranyl moiety was absent from the C-3 position. Thus, the findings provide beneficial insights into not only the further development of various alkylcannabinoid analogs by synthetic biological approaches, but also the antibacterial activities of **3b** derivatives.

## Reference

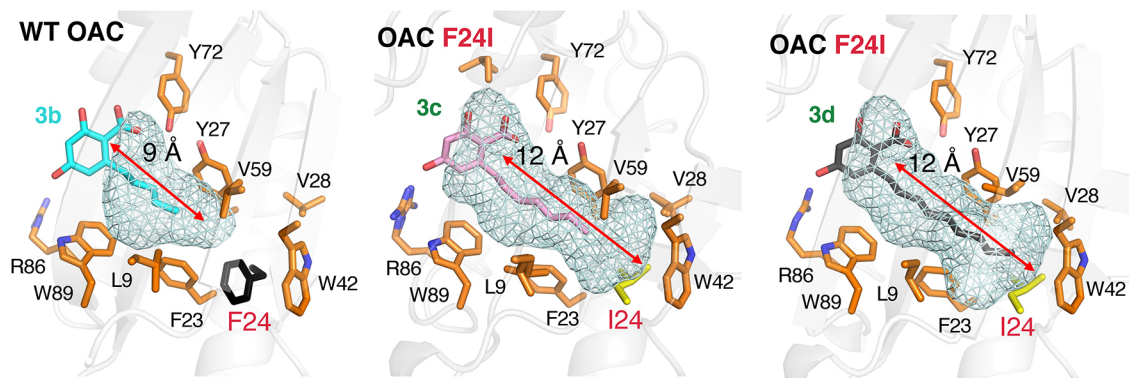
1. [Lee YE](#), Nakashima Y, Kodama T, Chen X, Morita H. (2021) Dual engineering of olivetolic acid cyclase and tetraketide synthase to generate longer alkyl-chain olivetolic acid analogs. *Organic Letters*, 24: 410–414.
2. [Lee YE](#), Kodama T, Morita H. (2022) Novel insights into the antibacterial activities of cannabinoid biosynthetic intermediate, olivetolic acid, and its alkyl-chain derivatives. *Journal of Natural medicine*, 77: 298–305.



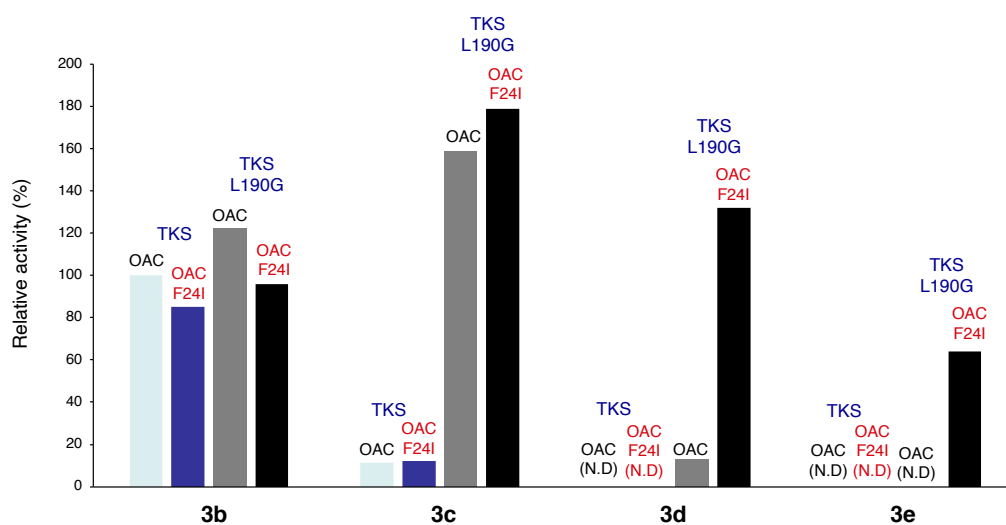
**Figure 1.** Biosynthesis of  $\Delta^9$ -THCA and CBDA and decarboxylative productions of **1b**, **4b**,  $\Delta^9$ -THC, and CBD.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MIC, $\mu\text{M}$ ( <i>S. aureus</i> )	MIC, $\mu\text{M}$ ( <i>B. subtilis</i> )		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MIC, $\mu\text{M}$ ( <i>S. aureus</i> )	MIC, $\mu\text{M}$ ( <i>B. subtilis</i> )
<b>1a</b>	H	<i>n</i> -propyl (C <sub>3</sub> )	25	25	<b>3a</b>	COOH	<i>n</i> -propyl (C <sub>3</sub> )	25	25
<b>1b</b>	H	<i>n</i> -pentyl (C <sub>5</sub> )	2.5	3.13	<b>3b</b>	COOH	<i>n</i> -pentyl (C <sub>5</sub> )	2.5	3.13
<b>1c</b>	H	<i>n</i> -heptyl (C <sub>7</sub> )	2.5	6.25	<b>3c</b>	COOH	<i>n</i> -heptyl (C <sub>7</sub> )	2.5	6.25
<b>1d</b>	H	<i>n</i> -nonyl (C <sub>9</sub> )	6.25	>200	<b>3d</b>	COOH	<i>n</i> -nonyl (C <sub>9</sub> )	6.25	>200
<b>1e</b>	H	<i>n</i> -undecyl (C <sub>11</sub> )	25	>200	<b>3e</b>	COOH	<i>n</i> -undecyl (C <sub>11</sub> )	25	>200
<b>1f</b>	H	<i>n</i> -tridecyl (C <sub>13</sub> )	>200	>200	<b>3f</b>	COOH	<i>n</i> -tridecyl (C <sub>13</sub> )	>200	>200
<b>2a</b>	COOH	<i>n</i> -propyl (C <sub>3</sub> )	12.5	12.5	<b>4a</b>	H	<i>n</i> -propyl (C <sub>3</sub> )	12.5	12.5
<b>2b</b>	COOH	<i>n</i> -pentyl (C <sub>5</sub> )	3.13	2.5	<b>4b</b>	H	<i>n</i> -pentyl (C <sub>5</sub> )	3.13	2.5
<b>2c</b>	COOH	<i>n</i> -heptyl (C <sub>7</sub> )	3.13	1.25	<b>4c</b>	H	<i>n</i> -heptyl (C <sub>7</sub> )	3.13	1.25
<b>2d</b>	COOH	<i>n</i> -nonyl (C <sub>9</sub> )	12.5	3.13	<b>4d</b>	H	<i>n</i> -nonyl (C <sub>9</sub> )	12.5	3.13
<b>2e</b>	COOH	<i>n</i> -undecyl (C <sub>11</sub> )	25	6.25	<b>4e</b>	H	<i>n</i> -undecyl (C <sub>11</sub> )	25	6.25
<b>2f</b>	COOH	<i>n</i> -tridecyl (C <sub>13</sub> )	>200	50	<b>4f</b>	H	<i>n</i> -tridecyl (C <sub>13</sub> )	>200	50

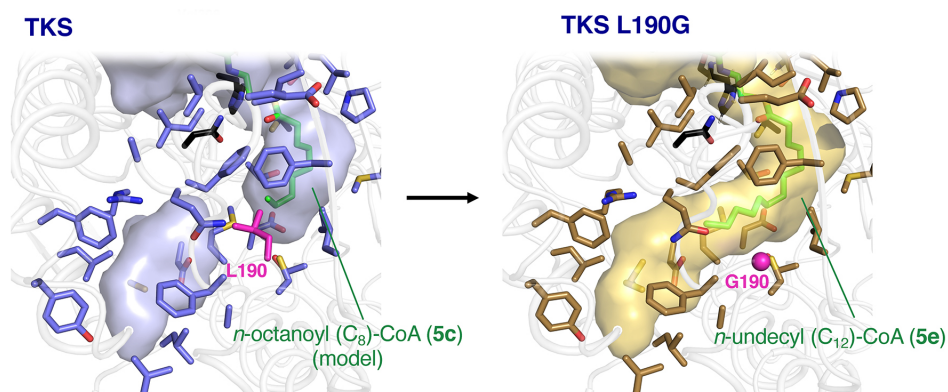
**Figure 2.** Structures of **1a–f**, **2a–f**, **3a–f**, and **4a–f** and their antibacterial activities.



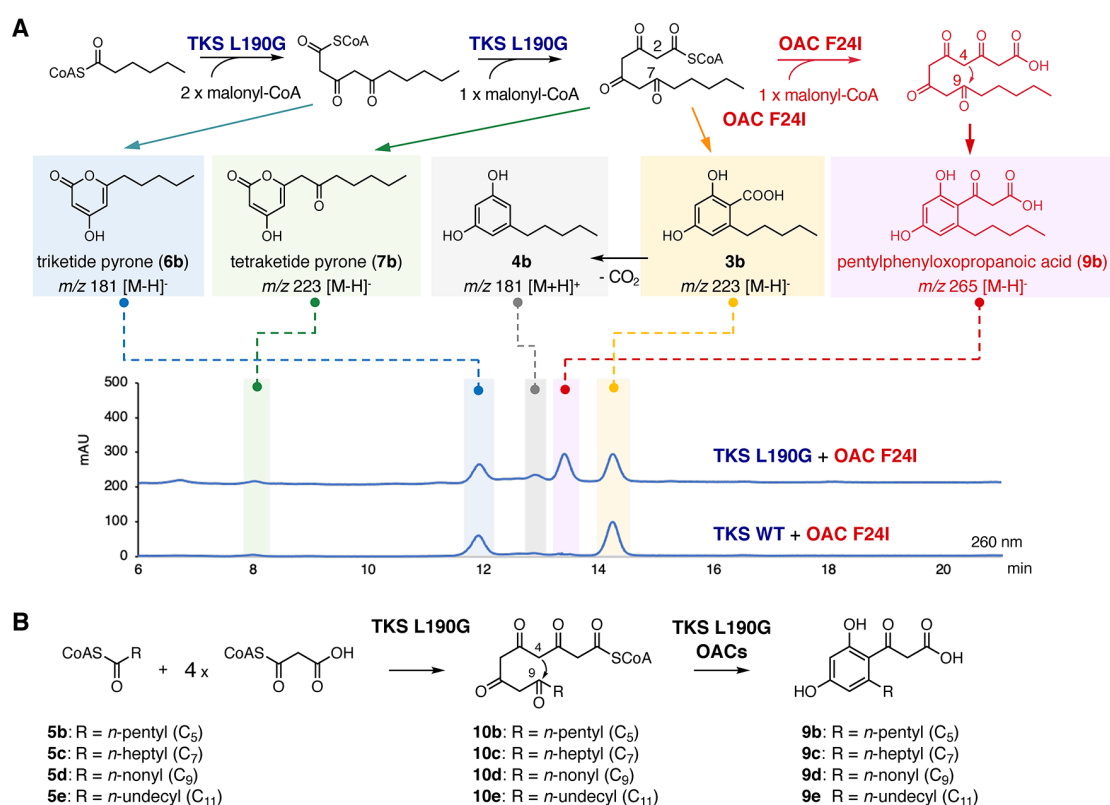
**Figure 3.** Structure-based mutagenesis study of OAC and TKS.



**Figure 4.** Relative activities for the formation of **3b–e** by co-incubation of wild-type OAC or its F24I mutants with wild-type TKS or its L190G mutant relative to that of wild-type OAC and wild-type TKS.



**Figure 5.** Active-site architectures of TKS and its L190G mutant.



**Figure 6.** Plausible structures of **9b–e** and the proposed pathway for their formation by TKS L190G and wild-type OAC or its OAC F24I mutant. (A) HPLC elution profiles of the products obtained from co-incubation of OAC F24I and wild-type TKS or its L190G mutant, and proposed pathway for the formation of **3b**, **4b**, **6b**, **7b**, and **9b**. (B) Proposed pathway for the formation of **9b–e**.

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	LEE YUAN-E
審査委員	職 名 (主査) 教 授 (副査) 准教授 (副査) 教 授	氏 名 水口 峰之 田浦 太志 森田 洋行	
<p>(論文題目) (英語の場合は和訳, 日本語の場合は英訳を付記すること。英語(訳)は, 最初の文字のみを大文字で表記し, 他は小文字で表記すること(ただし, 学名等を除く。))</p> <p>Dual engineering of olivetolic acid cyclase and tetraketide synthase for the formation of longer alkyl-chain olivetolic acid analogs and their antibacterial activities</p> <p>(長鎖アルキルオリベトール酸アナログを創出するためのオリベトール酸閉環酵素とテトラケタイド合成酵素の機能改変およびアナログの抗菌活性)</p>		(判定)  合格	
<p>(論文審査の要旨) (2頁以内)</p> <p><math>\Delta^9</math>-テトラヒドロカンナビノール (<math>\Delta^9</math>-THC) は, アサが生産するテトラヒドロカンナビノール酸 (<math>\Delta^9</math>-THCA) の1位カルボン酸熱脱炭酸産物である。本カンビノイドは, 鎮痛, 鎮吐, 抗炎症及び抗痙攣等の有用な薬理活性を示すことが報告されている。しかし, 強い副作用のため, 我が国では医薬品として用いられるには至っていない。一方, 最近になって, <math>\Delta^9</math>-THCAの生合成前駆体カンナビゲール酸 (CBGA) の脱炭酸産物であるカンナビゲール (CBG) が, <math>\Delta^9</math>-THCで問題となる幻覚作用を示さずに<math>\Delta^9</math>-THCと類似の薬理活性を示し, また, グラム陽性菌に対して強力な抗菌活性を示すことが示された。そのため, 最近では, CBGが<math>\Delta^9</math>-THCに変わる新たな医薬品開発シードとして注目されている。興味深いことに, これまでの研究において, <math>\Delta^9</math>-THCの<i>n</i>-ペンチル基 (炭素数5) の伸長は受容体への結合力を増加させることが示されている。また, 最近では, その<i>n</i>-ペンチル基をフェニルエチル基で置換すると, <math>\Delta^9</math>-THCで見られる幻覚作用等の副作用が減少することが示されている。よって, <math>\Delta^9</math>-THCやCBGのアルキル側鎖誘導体の創出は, 医薬品として有望な新たなカンビノイドの創出へと繋がることを期待される。そこで, 申請者は, 生合成工学的に, 長鎖アルキル側鎖を有する<math>\Delta^9</math>-THCアナログの生産を可能にすることを指向し, <math>\Delta^9</math>-THCAの生合成において, その骨格であるオリベトール酸の形成に必須な2種の生合成酵素, テトラケタイド合成酵素 (TKS) とオリベトール酸閉環酵素 (OAC) に変異を導入することで, 炭素数11までのアルキル鎖を有するオリベトール酸アナログの生産を可能にした。さらに, そのアルキル鎖炭素数が7以上になると <i>Staphylococcus aureus</i> および <i>Bacillus subtilis</i> に対する抗菌活性を新たに獲得すること, 及びそのアルキル鎖炭素数が9と11になると, <i>B. subtilis</i> に対してCBGAと同等の抗菌活性を示すことを明らかにした。本研究に関する内容の骨子と審査結果は, 下記に示すとおりである。</p> <p><b>1. OACとTKSの機能改変</b></p> <p>OACは, TKSがヘキサノイルCoAと3分子のマロニルCoAから生成するテトラケタイドを基質として, オリベトール酸への変換を触媒する唯一の植物ポリケタイド閉環酵素であり, その基質のペンチル基の結合には活性中心キャビティー内にあるペンチル結合ポケットが重要な役割を</p>			



担っていることが申請者所属研究室にて報告されている。一方、TKSは幅広い基質特異性を有することが知られている植物III型ポリケタイド合成酵素（PKS）の一つである。申請者は、まず、OACのペンチル結合ポケットの側面と底面を形成するPhe24, Tyr27, 及びVal59を、それぞれIle/Leu/Val, Phe/Leu/Met/Trp, Ile/Leu/Metに置換した変異酵素を作成し、LC-MSを用いて変異が酵素の基質特異性に及ぼす影響について解析した。その結果、野生型OACにおいても、炭素数7のオリベトール酸アナログを生産する能力を有することが明らかになった。しかも、その活性は、OAC Phe24Ieu変異酵素を用いた時に僅かながら上昇することが判明した。しかし、炭素数9のオリベトール酸アナログの生産は観察されなかったため、TKSの機能改変に着手した。これまでのIII型PKSの研究において、TKSのLeu190に相当する残基がIII型PKSの基質アルキル鎖長に関する特異性を制御していることが報告されている。そこで、申請者は、TKSのLeu190をGlyに変換した。その結果、OAC Phe24IeuとTKS Leu190Gly変異酵素を用いると、炭素数11までのアルキル鎖を有するオリベトール酸アナログまでの生産が可能であることが明らかになり、 $\Delta^9$ -THCやCBGの長鎖アルキル誘導体の酵素合成に新たな展望を得た。

## 2. オリベトール酸アナログ及びその類縁体の抗菌活性

上述したように、CBGについては、*S. aureus*や*B. subtilis*等のグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を有していることが報告されている。これまでにオリベトール酸には顕著な生物活性は報告されていないが、アルキル鎖の伸長により疎水性を増すことで、菌や膜への結合力を増強して生物活性を獲得することが期待される。そこで、申請者は、炭素数3から13までのアルキル鎖を有するオリベトール酸アナログ及び同じ長さのアルキル基を有するCBG及びCBGAアナログを合成し、その*S. aureus*と*B. subtilis*に対する抗菌活性について評価した。その結果、そのアルキル鎖炭素数が7以上になると、CBGやCBGAのようにゲラニル基を有しなくても、*S. aureus*と*B. subtilis*に対する抗菌活性を新たに獲得すること、しかも、そのアルキル鎖炭素数が9と11になると、*B. subtilis*に対してCBGAと同等の抗菌活性を示すことが明らかになった。さらに、これらの解析により、CBGAのアルキル鎖を炭素数7に伸長することで、*B. subtilis*に対する抗菌活性を上昇することができることを明らかにするとともに、アルキル鎖の長さと同プレニル基の長さのバランスを最適化することによって、今後の薬剤開発に有効なより強い活性を示すCBGやCBGAのアナログを創出できる可能性を示すに至った。

以上のように、LEE-YUAN-E氏は、OACとTKSの機能を拡張することで、長鎖アルキル基を有するオリベトール酸アナログの酵素合成に新たな知見を与えた。さらに、アルキル基の炭素数を伸長したオリベトール酸アナログが新たに抗菌活性を獲得すること、及び、天然型よりも炭素数を2伸長したCBGAアナログが天然型のCBGAよりも強い抗菌活性を有することを明らかにした。ここで得た機能改変酵素は、 $\Delta^9$ -THCやCBGアナログの創出にも転用可能であり、これらの酵素合成が可能になることが期待される。また、新たな医薬品シードの開発において、本成果は、その多様性の拡大にも貢献したと言える。

主査及び副査は、論文内容と面接試験を通して、申請者 LEE-YUAN-E氏に、博士（薬科学）の学位を授与するに十分に値すると判定した。

(学位論文のもとになる論文 著者名, 論文題目, 掲載誌名, 巻, 最初の頁と最後の頁, 年を記載)

1. Lee YE, 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. *Organic Letters*, 24, 410-414.
2. Lee YE, Kodama T, Morita H. (2022) Novel insights into the antibacterial activities of cannabinoid biosynthetic intermediate, olivetolic acid, and its alkyl-chain derivatives. *Journal of Natural medicine*, 77, 298–305.