

博士論文

大麻プレニル基転移酵素 CsPT4 の触媒能力の解明
および酵素反応生成物の生物活性に関する研究

Studies on the catalytic potential of *Cannabis* prenyltransferase CsPT4
and the biological activity of its enzymatic reaction products

2024 年

富山大学大学院 医学薬学教育部 薬科学専攻

棚谷 綾介

目次

緒論.....	4
第一章 CsPT4 の基質特異性の解明.....	10
第一節 組換え CsPT4 の発現系構築.....	11
第二節 組換え CsPT4 の活性確認.....	13
第三節 組換え CsPT4 の一般的性質.....	15
第一項 至適 pH.....	15
第二項 金属イオン要求性.....	16
第三項 温度依存性.....	17
第四節 CsPT4 の基質特異性.....	18
第一項 プレニル基質に対する CsPT4 の特異性.....	18
第二項 芳香族基質に対する CsPT4 の特異性.....	22
第三項 多様なカンナビノイド類縁体を合成する CsPT4.....	29
第四項 考察.....	37
第五節 反応速度論解析.....	41
第一項 プレニル基質に対する親和性および反応性.....	41
第二項 レゾルシノール酸誘導体に対する親和性および反応性....	42
第三項 考察.....	44
第二章 カンナビノイドのヒトすい臓がん細胞に対する抗緊縮活性.....	46
第一節 カンナビノイド類縁体の抗緊縮活性.....	47
第三章 基質依存的に変化する CsPT4 のプレニル化様式.....	51
第一節 フロログルシノール誘導体に対する CsPT4 の基質特異性.....	52
第二節 反応速度論解析.....	60
第三節 考察.....	62

第四節 プレニル化アシルフロログルシノールの抗緊縮活性.....	64
総括.....	66
実験項.....	70
引用文献.....	104
謝辞.....	113
付録.....	115

緒論

アサ (*Cannabis sativa* L.) はアサ科アサ属に属する中央アジア原産の一年草で、最も古い繊維作物の一つである (図 1)。本植物の葉、花穂、あるいは未熟花穂を乾燥したものは「大麻」と称され、鎮痛薬や鎮静薬として使用されてきた。大麻の薬としての歴史は長く、中国では 2,700 年前に薬用を目的に使用された大麻が発掘されており、また中国最古の薬物学書である「神農本草経」に薬草として使われていたことも記されている¹⁾。日本国内で栽培されているアサは主に幻覚成分をほとんど含んでいないトチギシロと呼ばれる改良品種であり、種子は食用に、繊維は麻糸・布、衣類などの製品となるほか、神事にも利用されている。大麻は鎮静、鎮痛、および催眠薬として第五改正日本薬局方に収載されていたが、以後削除され、現在では日本での医薬品としての用途はない²⁾。また、大麻の所持、譲受、譲渡、およびアサの栽培は大麻取締法で禁止されている。



図 1. アサ (*Cannabis sativa* L.)

大麻はカンナビノイドと称される二次代謝産物を生産する (図 2)。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構造を有し、現在までに 150 種類以上のカンナビノイドが大麻から単離され、それらの薬理学的特性について幅広く研究が行われている^{3,4)}。

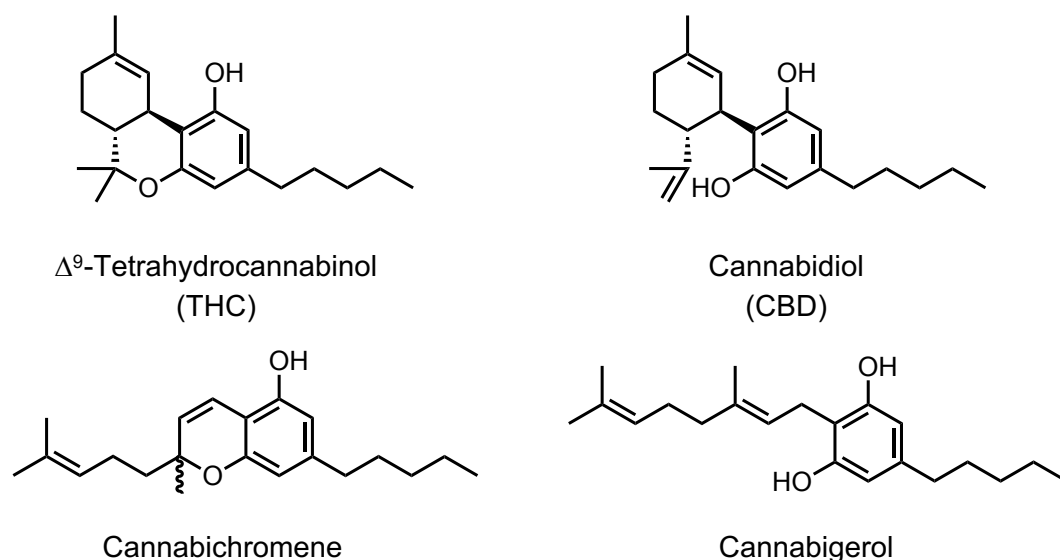


図 2. 代表的なカンナビノイドの構造.

大麻の幻覚成分である Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) には、鎮痛、鎮吐、抗炎症、および食欲増進等の興味深い薬理作用が報告されており^{5,6)}、創薬リード化合物としての可能性も注目を集めている。一方で、THC 以外の非幻覚成分にも興味深い薬理作用が報告されている。例えば、環構造が異なる THC の異性体である cannabidiol (CBD) は抗炎症および神経保護作用があり、精神神経疾患の治療薬として期待されている⁶⁾。また CBD は、THC の幻覚作用を抑制する効果も有することから、THC と CBD の合剤である舌下スプレー「Nabiximols (Sativex®)」は、カナダおよびヨーロッパ諸国で多発性硬化症患者の神経因性疼痛を改善する目的で使用されている。一方アメリカ合衆国では、アメリカ食品医薬品局が Dravet 症候群や Lennox-Gastaut 症候群といった難治性小児てんかんの治療薬と

して、CBD 製剤である「Epidiolex®」を承認した⁷⁻⁹⁾。さらに、近年は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 perrottetinene についても薬理学的研究が進展し、新たな鎮痛薬のリード化合物となり得る可能性が示唆されている (図 3)¹⁰⁾。以上のように、カンナビノイドは注目すべき化合物群であり、その構造多様性を拡張することは新たな医薬資源の開拓につながる重要な課題である。

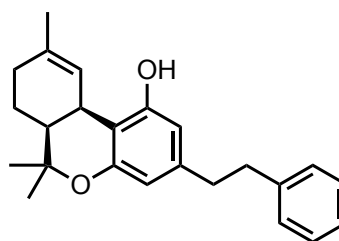


図 3. オオケビラゴケ (*Radula perrottetii*) および perrottetinene の構造.

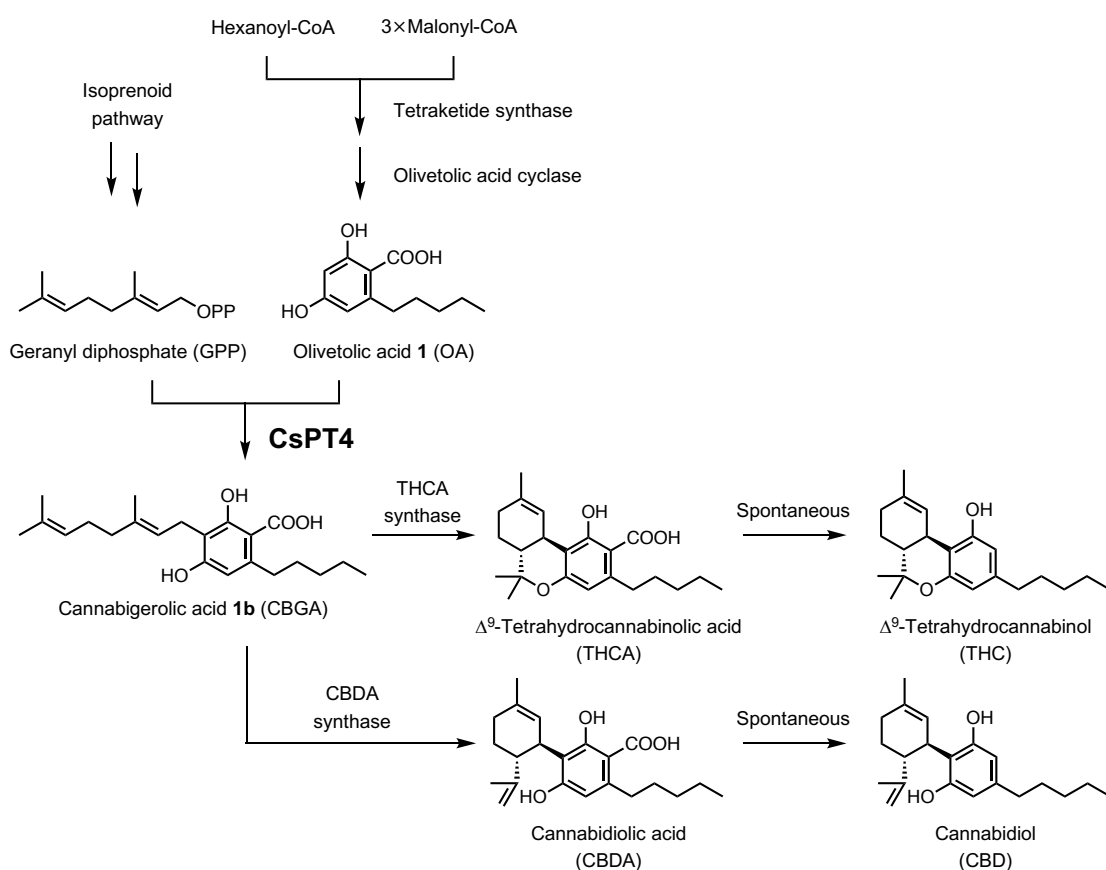


図4. 大麻における主要カンナビノイドの生合成経路.

カンナビノイドは、1) ポリケチド骨格の形成、2) プレニル基の転移、および 3) 立体選択的酸化閉環の三段階の酵素反応によって生合成され、これに関与する生合成酵素は全て同定されている。生合成経路は図4に示す通りであり、はじめに tetraketide synthase および olivetolic acid cyclase の共触媒によってポリケチドの olivetolic acid 1 (OA) が合成される^{11,12}。次いで、プレニル基転移酵素 (PT) の CsPT4 が触媒する OA 1 と geranyl diphosphate (GPP) の縮合反応により cannabigerolic acid 1b (CBGA) が生成する¹³。最後に、THCA synthase および CBDA synthase が CBGA 1b のゲラニル部分の立体選択的酸化閉環反応を触媒することにより THC および CBD の前駆体である Δ⁹-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) および

cannabidiolic acid (CBDA) が生合成される¹⁴⁻¹⁷⁾。これら生合成酵素の中で、CsPT4 はカンナビノイドの基本的な炭素骨格である生物活性カンナビノイド前駆体 **1b** を合成する重要な酵素である。CsPT4 が GPP 以外のプレニル基質を受容し、かつ多様なアルキル側鎖を有する芳香族基質を認識することが可能であれば、カンナビノイドの構造多様性を大きく拡大できる。近年、CsPT4 はカンナビノイドの合成生物学にも応用されている¹³⁾。しかし、基質特異性を含む詳細な機能解析は行われていない。

本研究では、CsPT4 のプレニル基質と芳香族基質に対する特異性について検討し、酵素反応生成物の生物活性を調査した。第一章では、CsPT4 を用いて、多様な芳香族基質およびプレニル基質から、これまでに存在しなかったカンナビノイドを合成できることを証明した¹⁸⁾。第二章では、CsPT4 の酵素反応により得られたカンナビノイド類縁体がヒトすい臓がん細胞 (PANC-1) に顕著な毒性を示すことを明らかにした¹⁸⁾。第三章では、フロログルシノール骨格を有する芳香族基質を合成して CsPT4 の基質特異性について再検討し、CsPT4 が基質構造に依存してプレニル化様式を変化させる興味深い性質を見出した¹⁹⁾。

第一章 CsPT4 の基質特異性の解明

第一節 組換え CsPT4 の発現系構築

大麻プレニル基転移酵素 CsPT4 の生化学的解析にあたり、組換え酵素の発現系構築を行った¹⁸⁾。植物二次代謝経路の PT は、多くが葉緑体局在型の膜タンパク質であり、CsPT4 に関してもアミノ酸配列の解析から葉緑体型トランジットペプチドを有する膜タンパク質であることが予想された (図 5)。膜タンパク質は大腸菌での発現が困難であるため、植物 PT の異種発現は一般に出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) で行われている。本研究では、出芽酵母と同様に培養が簡便で、かつ異種タンパク質の高発現が可能であるメチロトロフ酵母 (*Pichia pastoris*) を宿主とした組換え CsPT4 発現系を作製した。

CsPT4 の人工 DNA を PCR 鋳型とし、トランジットペプチドを除いた成熟型 CsPT4 をコードする遺伝子を、特異的プライマーを用いて PCR で増幅後、pPICZA ベクターに組込み、*P. pastoris* KM71H 株に形質転換した。組換え体はゼオシンを含むプレートで選抜し²⁰⁾、グルコースを炭素源とする最小培地で培養後、メタノールを含む最小培地を連続的に添加して組換え酵素を発現誘導した²¹⁾。96 時間培養後に菌体を回収し、zymolyase 処理で溶菌した後、超遠心 ($100,000 \times g$) によりミクロソーム画分を調製した²¹⁾。膜タンパク質の可溶化および精製には極めて煩雑な操作が必要であることから、 Mg^{2+} を含む Tris-HCl バッファーに懸濁した CsPT4 のミクロソーム画分を粗酵素溶液として酵素反応に使用した。

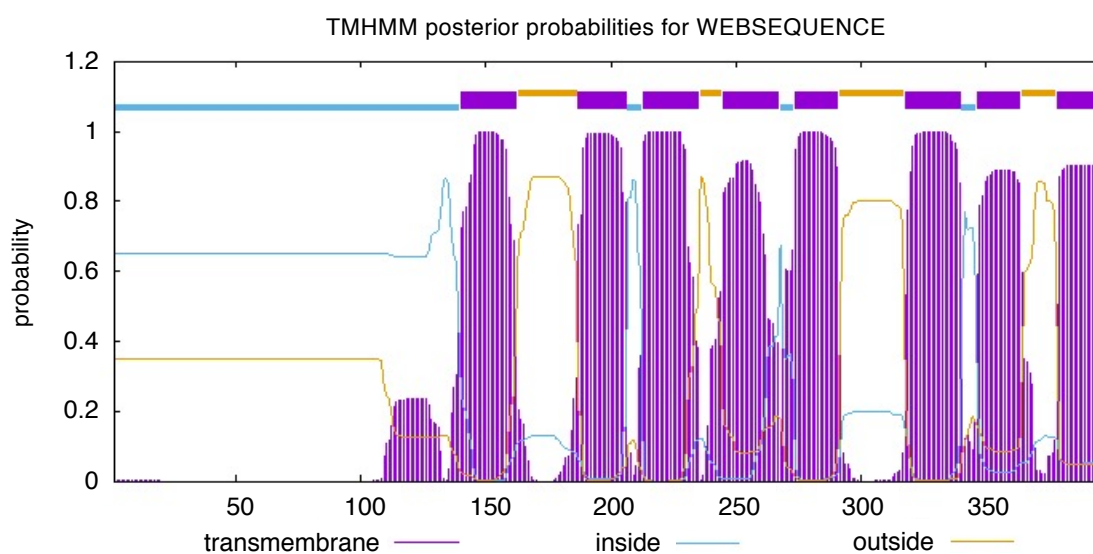


図 5. CsPT4 の膜貫通領域の予測.

膜貫通領域予測ツール (TMHMM) により解析した.

(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)

transmembrane: 膜貫通領域 (紫)

inside: 細胞質 (青)

outside: 細胞外 (橙)

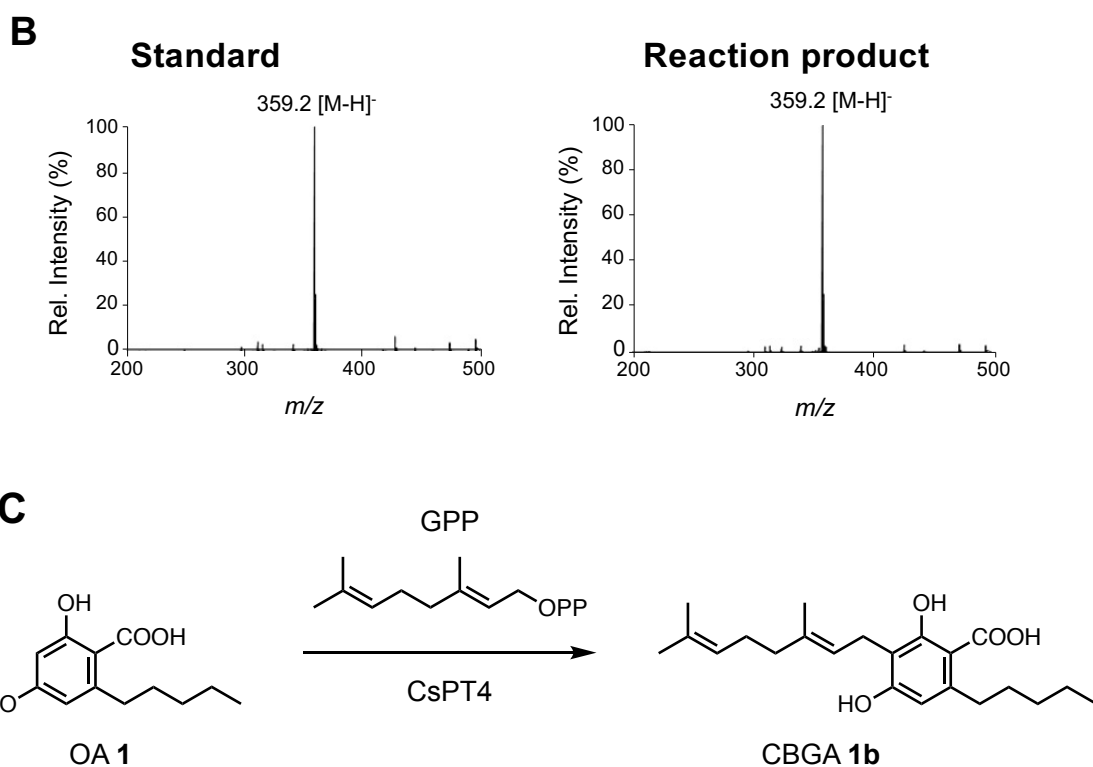


図 6. **1** および GPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **1b** 標品, 中段: **1** および GPP を含む酵素反応: 収率 $2.3 \times 10^{-3}\%$, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (75%). (B) ESI-MS (ネガティブ): 左: **1b** 標品, 右: 酵素反応生成物. (C) CsPT4 が触媒する酵素反応.

第三節 組換え CsPT4 の一般的性質

第一項 至適 pH

4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, pH 6.0–8.0), tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl (Tris-HCl, pH 7.0–9.5), および 3-cyclohexyl-aminopropane-sulfonic acid (CAPS, pH 9.0–11.5) バッファーを用いて、CsPT4 の酵素反応における至適 pH について検討した¹⁸⁾。図 7 に示す通り、CsPT4 は幅広い pH 範囲で活性を示し、特に pH 8.0–9.0 の弱塩基性条件において最も高い活性を示した。植物二次代謝に関与する PT の至適 pH は酵素によって異なるが、一般にアルカリ側に最適 pH を持つことが知られている^{22,23)}。CsPT4 においても、一般的な植物 PT と同様の結果が得られた。

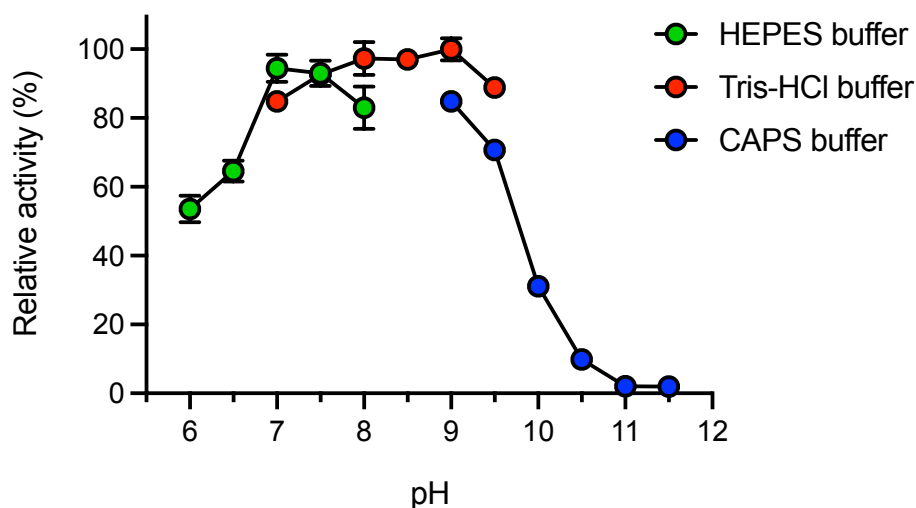


図 7. 組換え CsPT4 の pH 依存性.

CsPT4 の酵素活性は pH 6.0–11.5 の 100 mM HEPES, Tris-HCl, あるいは CAPS バッファー中で測定した. 各実験は 3 回ずつ行い、結果は相対活性 (% , mean \pm SD) で示した.

第二項 金属イオン要求性

植物 PT において、プレニル基質の二リン酸基は Mg^{2+} とのキレート結合を介して酵素に結合することが知られている^{23,24)}。そこで CsPT4 についても金属イオン要求性を検討した¹⁸⁾。その結果、CsPT4 は Mg^{2+} を添加した際に最も活性が高く、 Mn^{2+} および Ca^{2+} を用いた際には明らかに低い活性を示した (図 8)。また、EDTA を用いた反応では活性が見られなかったことから、CsPT4 の酵素反応に金属イオンは必須であり、かつ Mg^{2+} が最適な補因子であると推察された。なお、マグネシウムイオンは植物において、クロロフィルの構成成分である他、多くの酵素の補因子として機能する、生理機能の維持に必須のイオンである。一般に、植物中のマグネシウムイオン濃度は乾燥重量当たり 0.15–0.5% であり²⁵⁾、アサにおいても恒常的に存在すると考えられる。

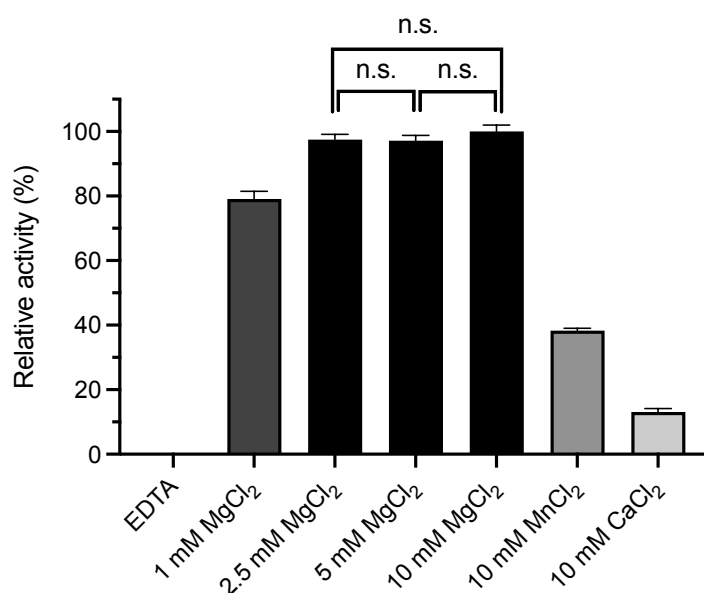


図 8. 組換え CsPT4 の金属イオン依存性.

各実験は 3 回ずつ行い、結果は相対活性 (%、mean ± SD) で示した。

n.s.: Student's *t* 検定により有意差は見られなかった ($P > 0.05$).

第三項 温度依存性

次いで、CsPT4 の温度依存性について検討した。20°C–50°C まで温度を変化させて酵素反応を行ったところ、CsPT4 は 25°C および 30°C で最大の活性を示した (図 9)。第一項および第二項の結果と併せて、以降の実験では 5 mM の MgCl₂ を含む Tris-HCl バッファー (pH 8.5) を使用し、30°C の条件で酵素反応を行うこととした。

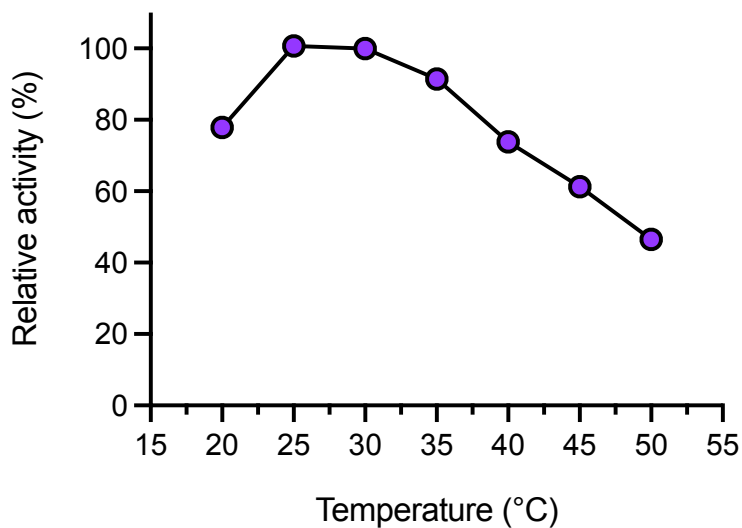


図 9. 組換え CsPT4 の温度依存性.

各実験は 3 回ずつ行い、結果は相対活性 (% , mean ± SD) で示した.
酵素反応は 25°C で調製した Tris-HCl バッファー (pH 8.5) を使用した.

第四節 CsPT4 の基質特異性

第一項 プレニル基質に対する CsPT4 の特異性

CsPT4 の基質特異性を明らかとするため、はじめに 5 種のプレニル基質、すなわち dimethylallyl diphosphate (DMAPP, C₅), GPP (C₁₀), farnesyl diphosphate (FPP, C₁₅), geranylgeranyl diphosphate (GGPP, C₂₀), および geranylfarnesyl diphosphate (GFPP, C₂₅) を用いてプレニル基質に対する CsPT4 の特異性について検討した¹⁸⁾。

1 を共基質とし、第一節で作製した組換え CsPT4 を用いて各種プレニル基質との酵素反応を行ったところ、本酵素は GFPP を除く 4 種のプレニル基質を受容し、それぞれ単一の生成物を合成した。次いで、HPLC および LC-ESI-MS により、有機合成した標品と各生成物を比較した結果、それぞれプレニル鎖長の異なる CBGA 類縁体であることが判明した (図 6, 10-12)。ファルネシル基およびゲラニルゲラニル基を有する **1c** および **1d** は新規化合物であり、それぞれ sesqui-CBGA **1c** および diterpeno-CBGA **1d** と命名した (図 13)。また、DMAPP との反応により生じた 3-dimethylallyl-OA **1a** は大麻成分としては報告されていないものの、結核菌において pH 感受性を高める合成化合物として報告されている²⁶⁾。

以上の結果より、CsPT4 はプレニル基質に対して非常に寛容な酵素であることが証明された。また、カンナビノイドはアルキル側鎖および閉環様式の違いにより分類されている。本研究により、CsPT4 がカンナビノイド構造にプレニル側鎖の違いをもたらす酵素であることを明らかとした。

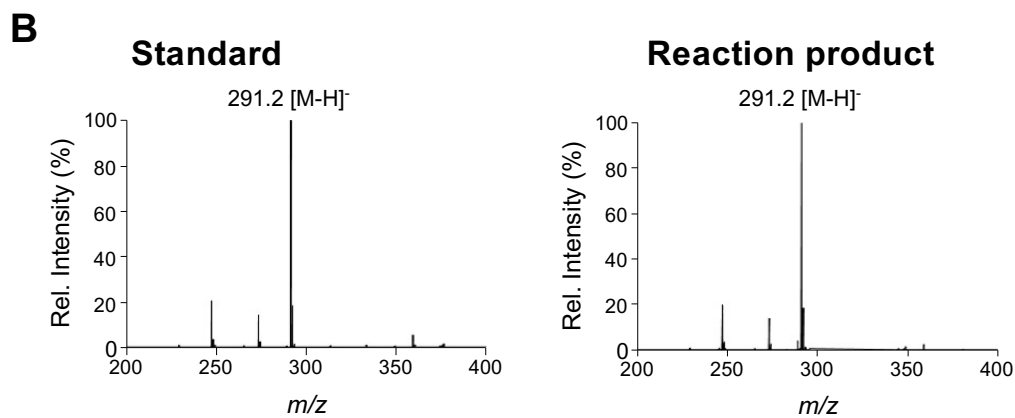
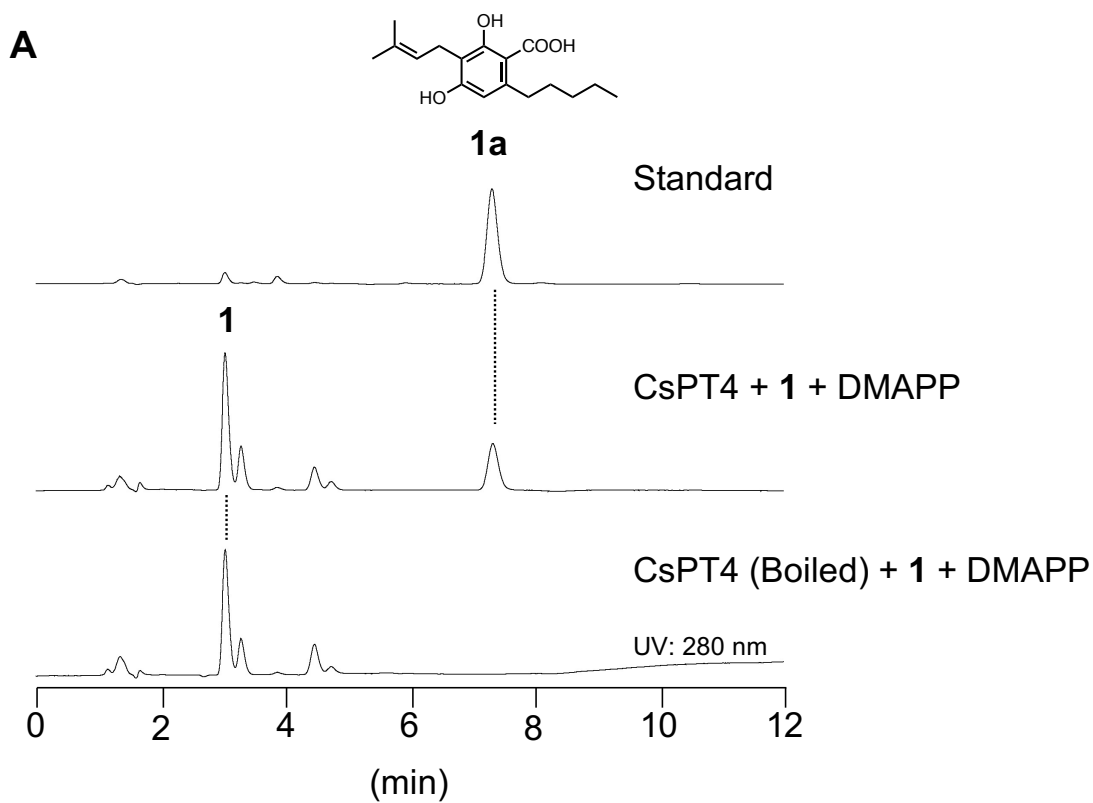


図 10.1 および DMAPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **1a** 標品, 中段: **1** および DMAPP を含む酵素反応: 収率 $1.5 \times 10^{-7}\%$, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (60%). (B) ESI-MS (ネガティブ): 左: **1a** 標品, 右: 酵素反応生成物.

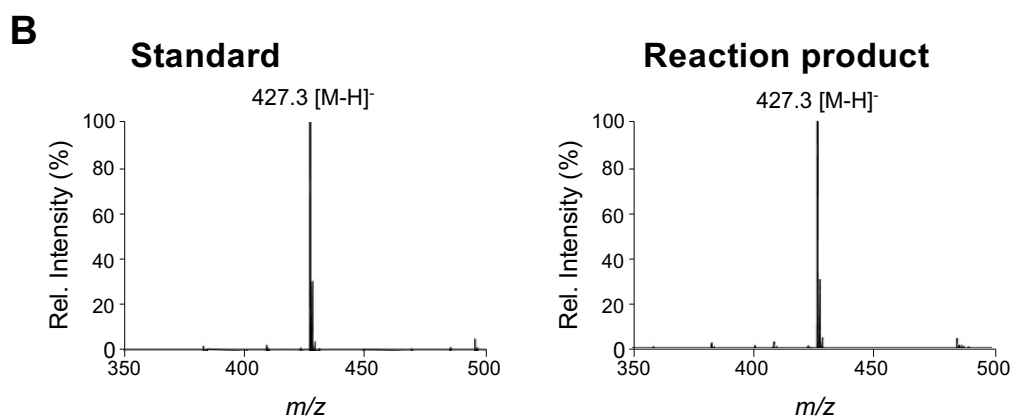
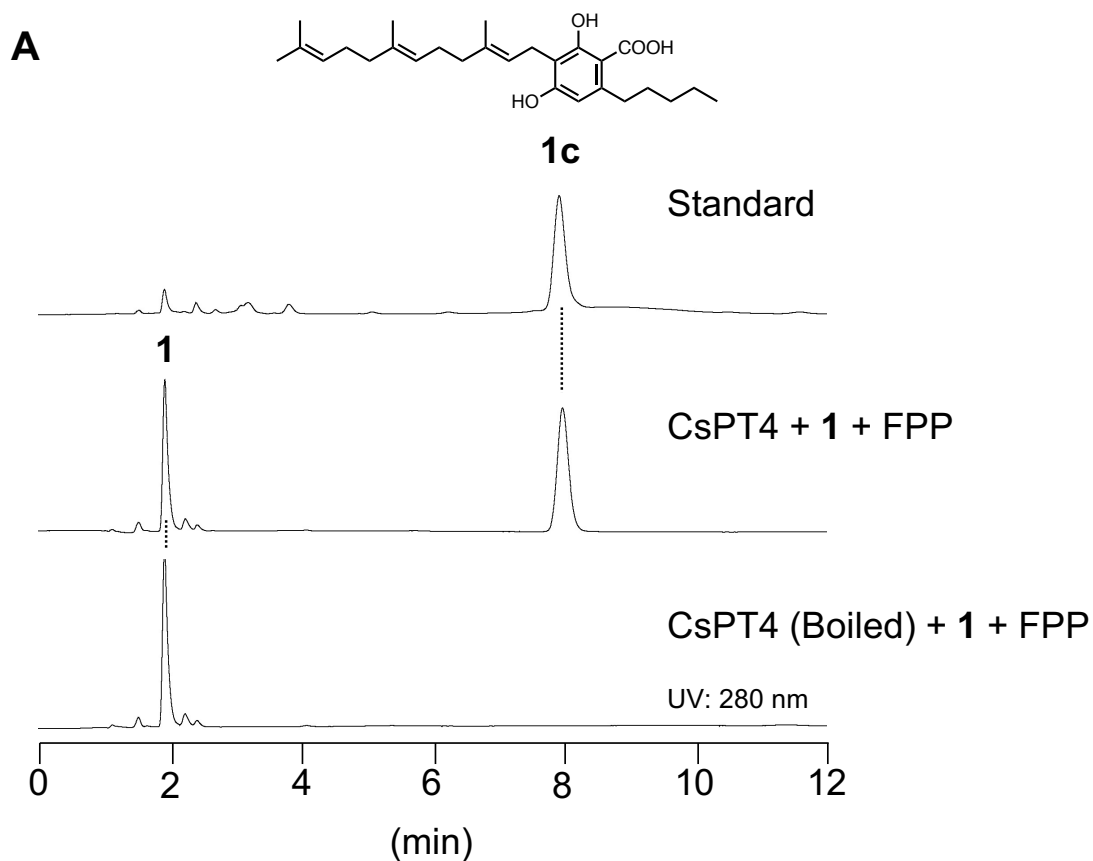


図 11.1 および FPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.
 (A) HPLC チャート: 上段: **1c** 標品, 中段: **1** および FPP を含む酵素反応: 収率 $1.1 \times 10^{-5}\%$, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (85%). (B) ESI-MS (ネガティブ): 左: **1c** 標品, 右: 酵素反応生成物.

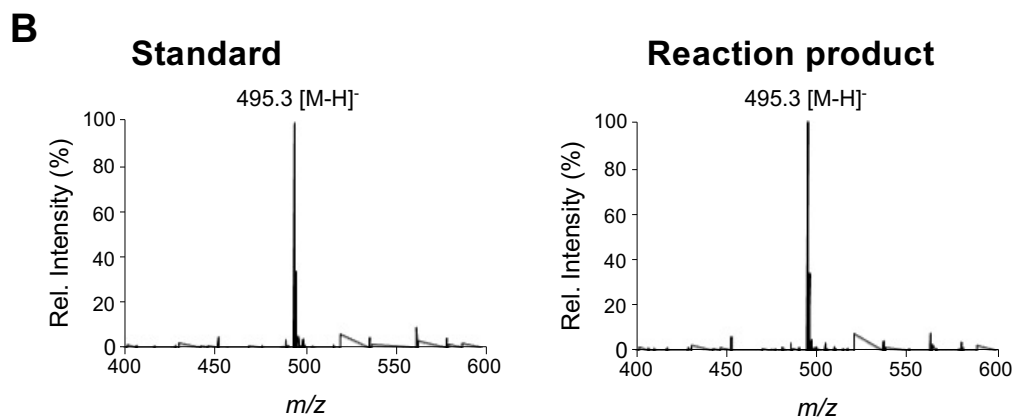
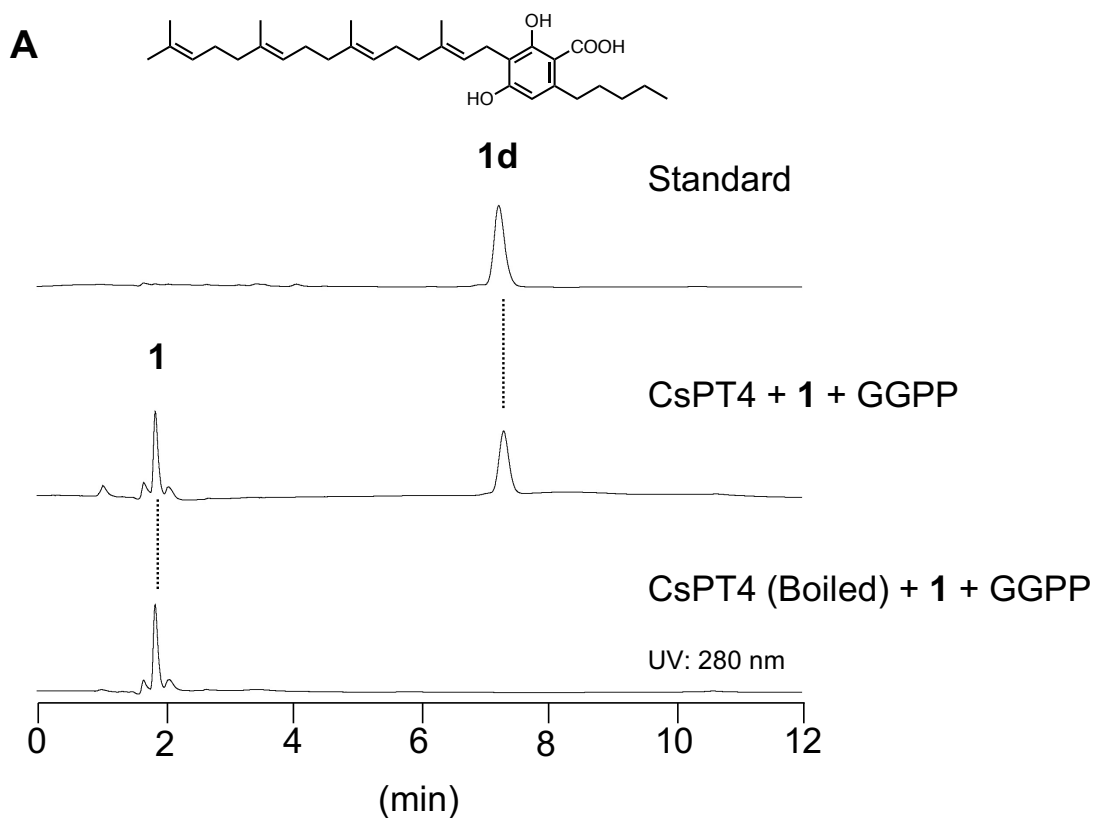


図 12.1 および GGPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **1d** 標品, 中段: **1** および GGPP を含む酵素反応: 収率 $2.6 \times 10^{-6}\%$, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (95%). (B) ESI-MS (ネガティブ): 左: **1d** 標品, 右: 酵素反応生成物.

第二項 芳香族基質に対する CsPT4 の特異性

芳香族基質に対する CsPT4 の特異性について検討した¹⁸⁾。GPP を共基質とし、レゾルシノール誘導體 (2-8)、およびその他の植物由来芳香族基質 (9-13) を用いた酵素反応を実施した (図 13)。その結果、CsPT4 は C₃-C₁₁ のアルキル側鎖を有するレゾルシノール酸 (2-5) から、それぞれ 3 位ゲラニル化体 (2b-5b) を単一の生成物として生成した (図 14-17)。また興味深いことに、CsPT4 はビベンジル骨格を有する 2,4-dihydroxy-6-phenylethylbenzoic acid 6 (DPA) をも受容し、オオケビラゴケが生産する perrottetinene^{27,28)} の前駆体である、3-geranyl-DPA 6b を生成した (図 18)。6b はオオケビラゴケの微量成分であり、生物活性は検討されていない²⁸⁾。一方で、その他の芳香族基質 (9-13) や、1 の脱炭酸体である olivetol 7 およびアルキル側鎖が短い orsellinic acid 8 との酵素反応では生成物は確認されなかった。

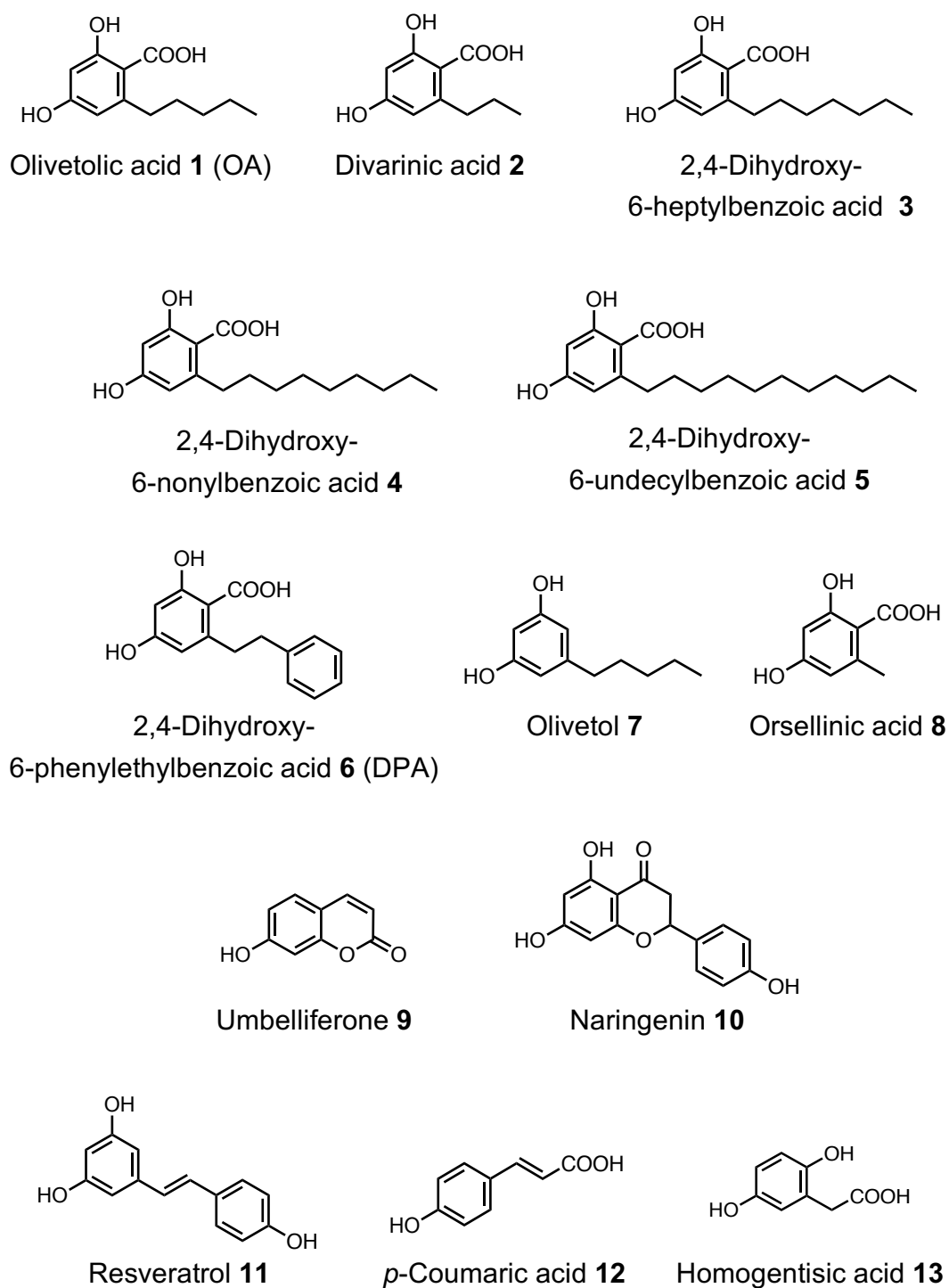


図 13. 本研究で使用した基質の構造.

1-8: レゾルシノール誘導体, 9-13: 芳香族基質.

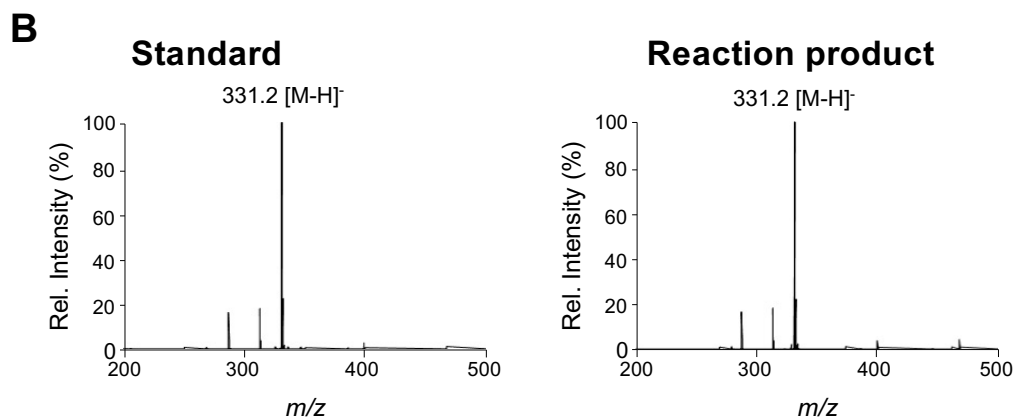
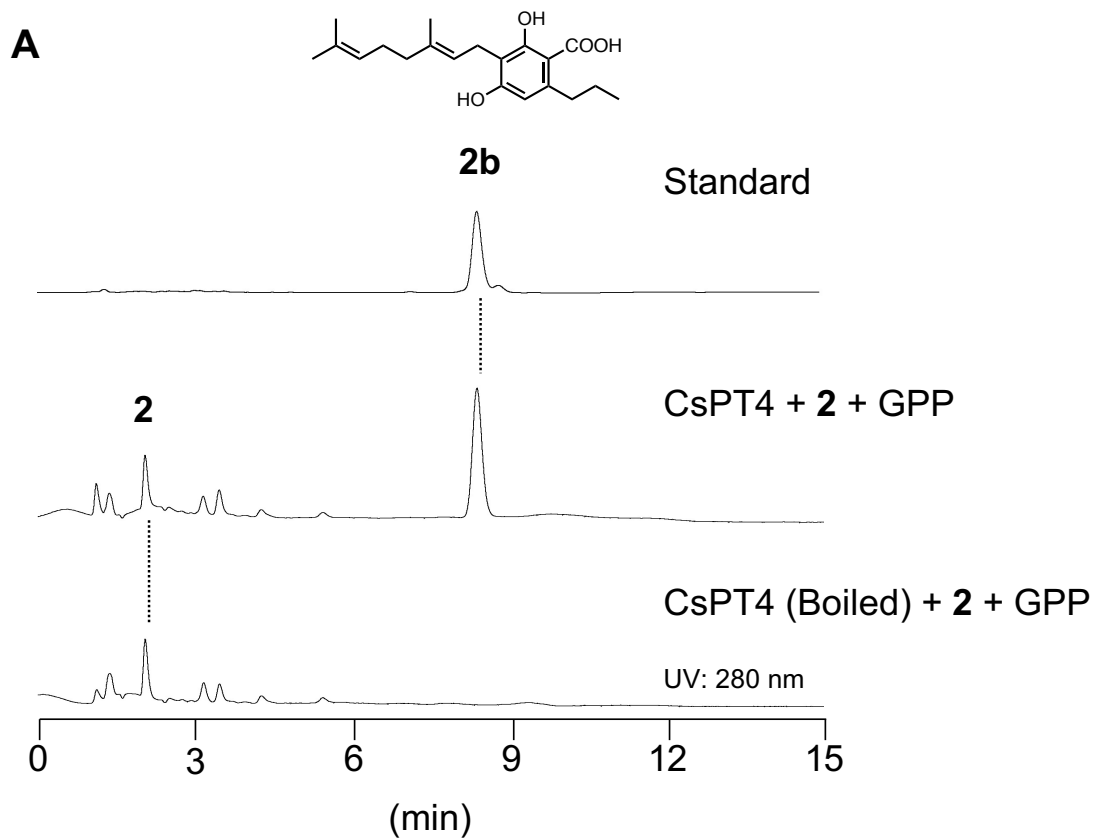


図 14. 2 および GPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **2b** 標品, 中段: **2** および GPP を含む酵素反応: 収率 $1.6 \times 10^{-4}\%$, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (65%). (B) ESI-MS (ネガティブ): 左: **2b** 標品, 右: 酵素反応生成物.

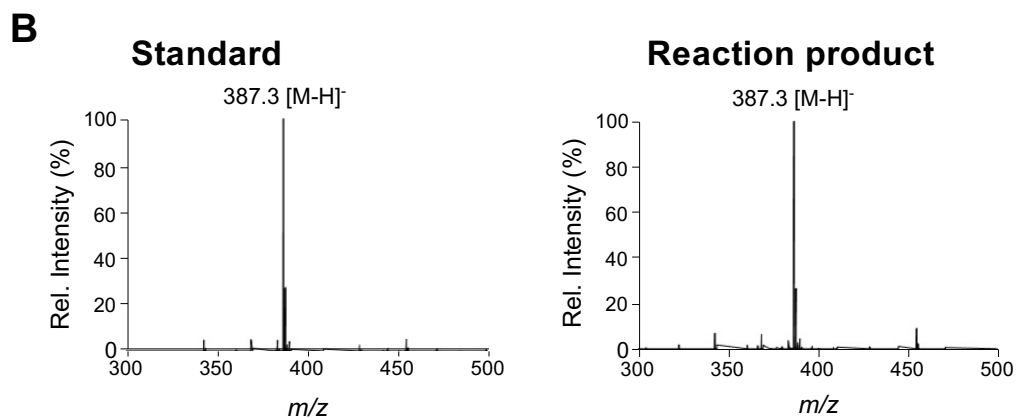
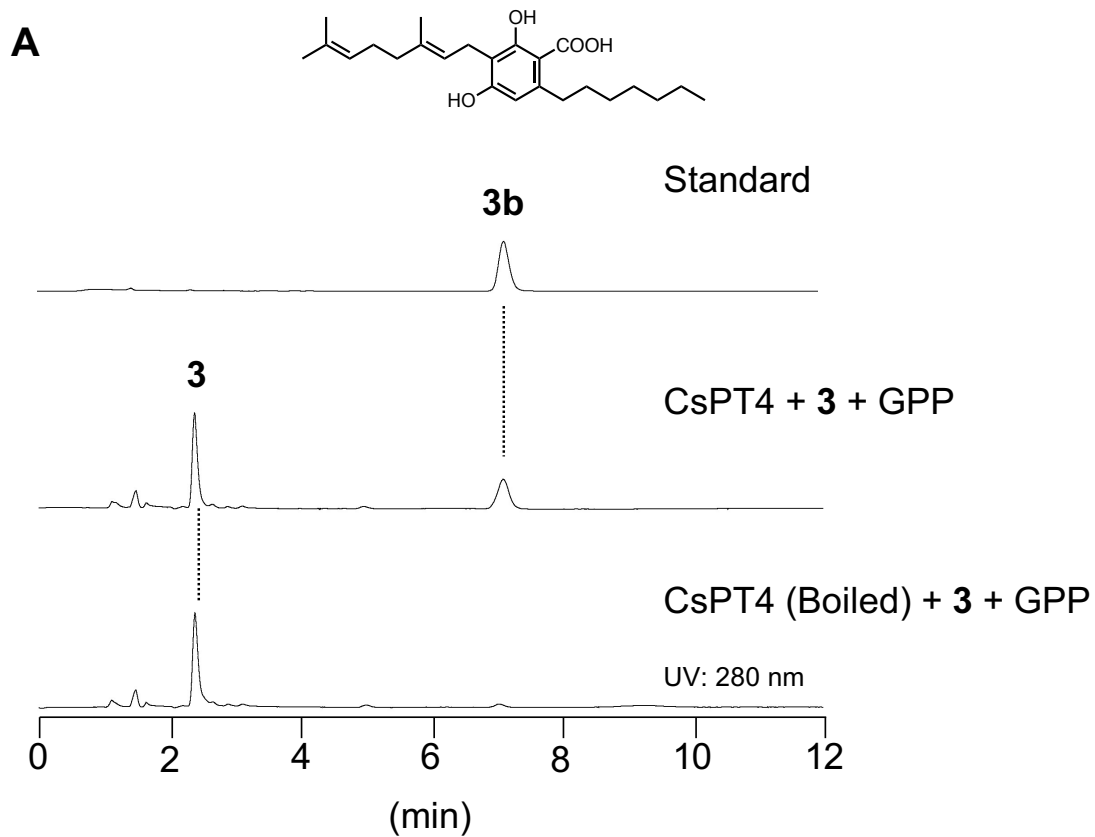


図 15. **3** および GPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **3b** 標品, 中段: **3** および GPP を含む酵素反応: 収率 $3.1 \times 10^{-6}\%$, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (80%). (B) ESI-MS (ネガティブ): 左: **3b** 標品, 右: 酵素反応生成物.

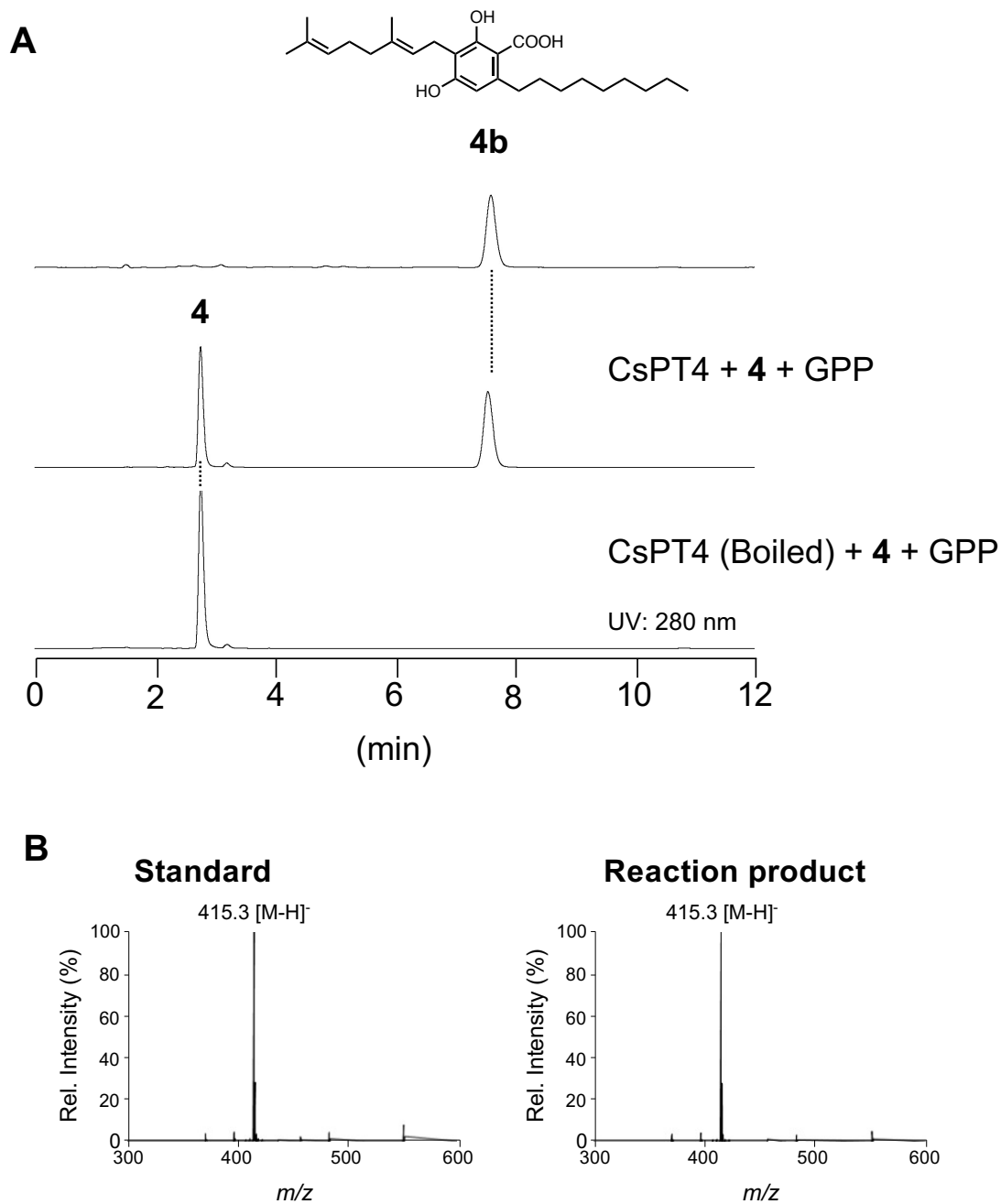


図 16. 4 および GPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **4b** 標品, 中段: **4** および GPP を含む酵素反応: 収率 $2.4 \times 10^{-5}\%$, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (85%). (B) ESI-MS (ネガティブ): 左: **4b** 標品, 右: 酵素反応生成物.

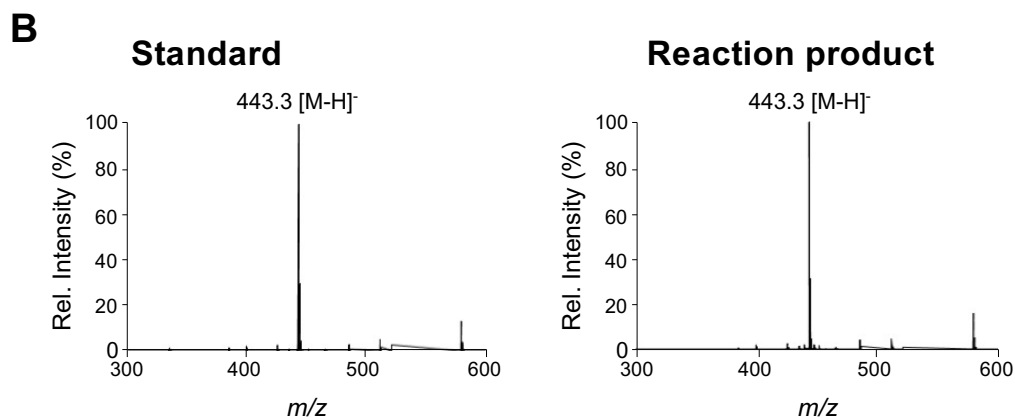
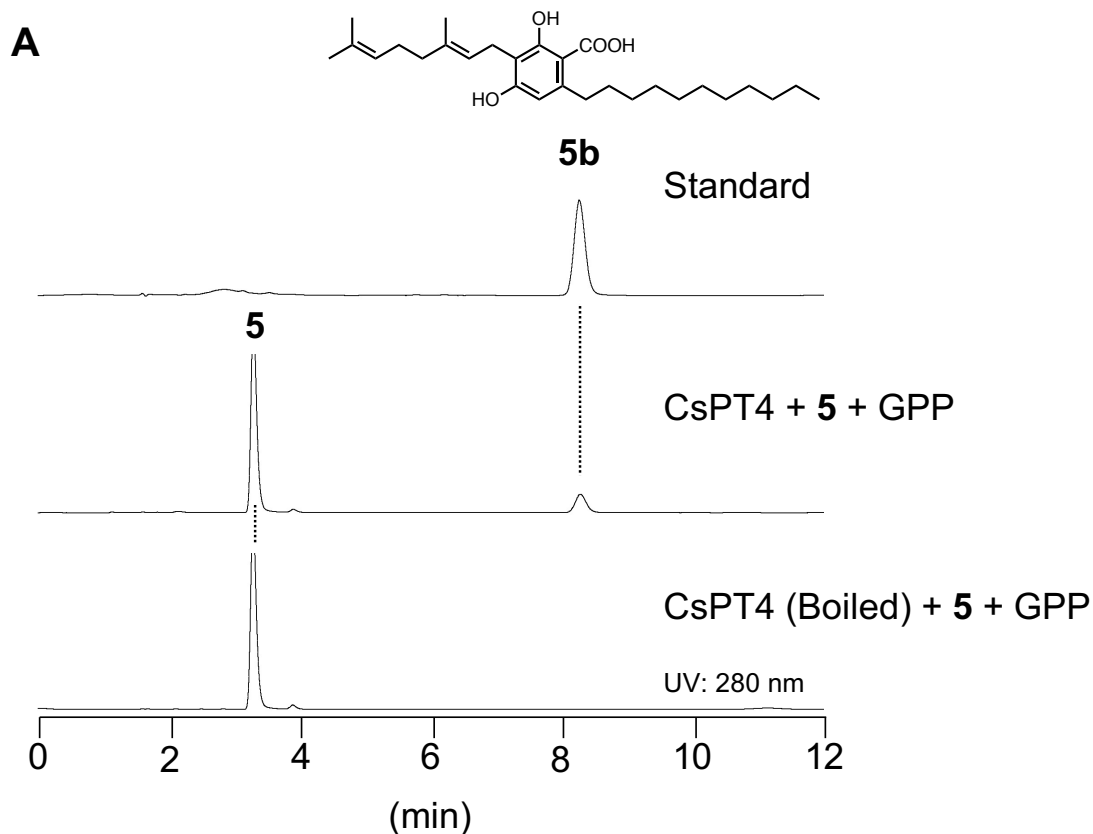


図 17. 5 および GPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **5b** 標品, 中段: **5** および GPP を含む酵素反応: 収率 $7.1 \times 10^{-7}\%$, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (90%). (B) ESI-MS (ネガティブ): 左: **5b** 標品, 右: 酵素反応生成物.

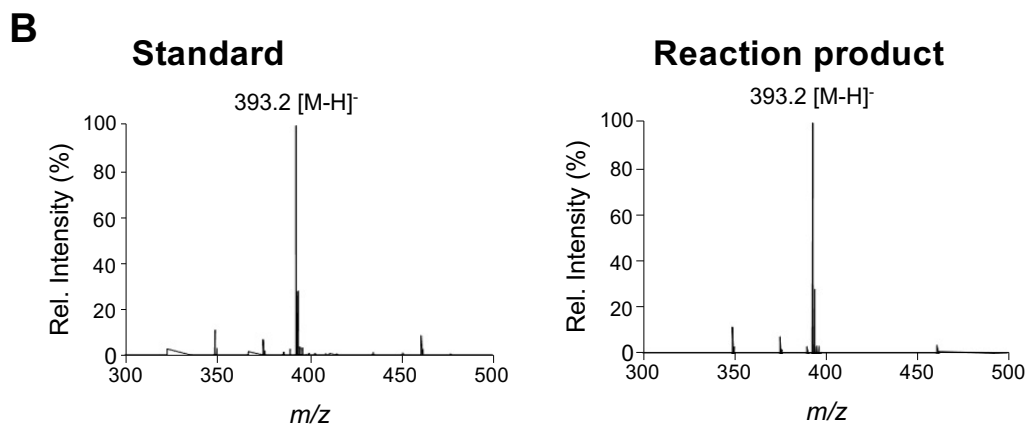
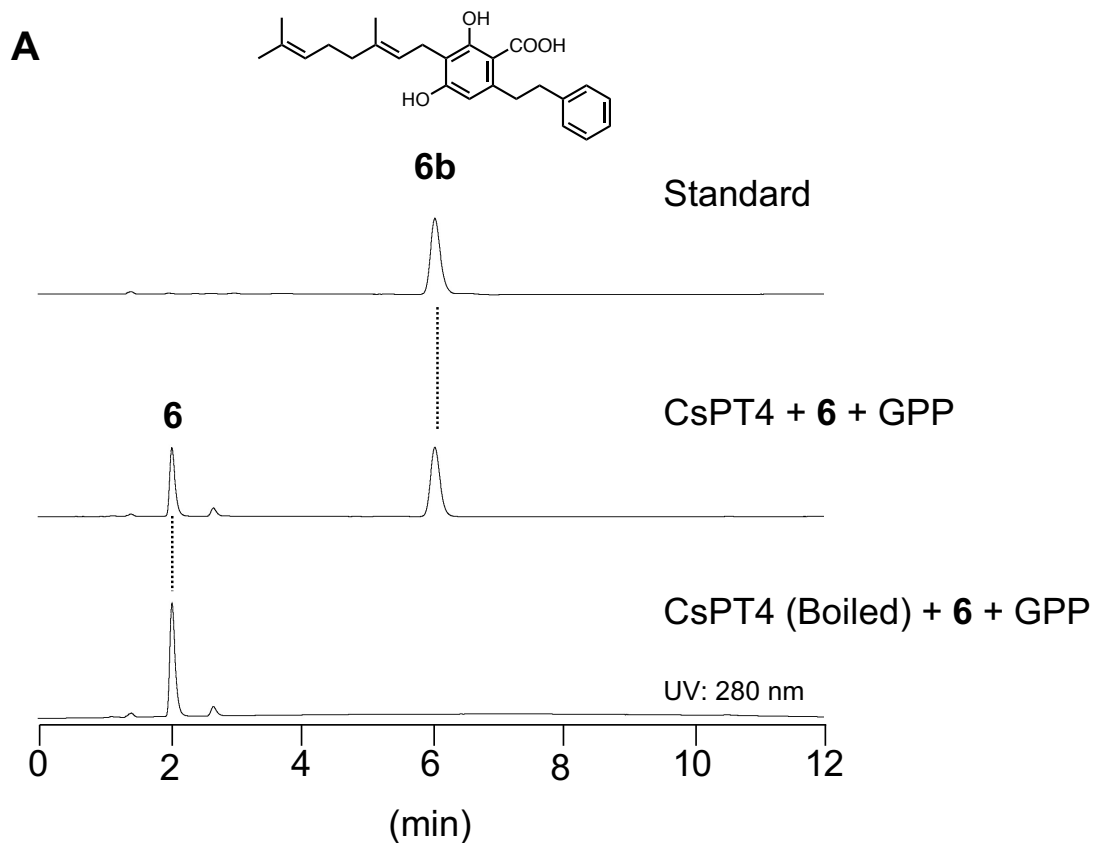


図 18. 6 および GPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

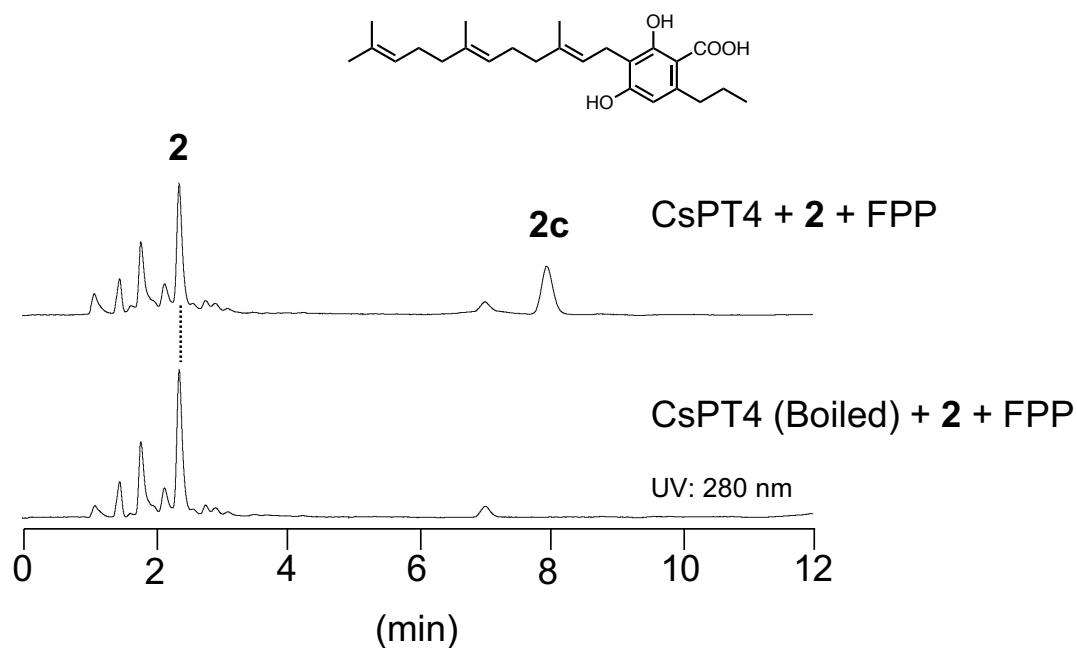
(A) HPLC チャート: 上段: **6b** 標品, 中段: **6** および GPP を含む酵素反応: 収率 $6.0 \times 10^{-5}\%$, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (75%). (B) ESI-MS (ネガティブ): 左: **6b** 標品, 右: 酵素反応生成物.

第三項 多様なカンナビノイド類縁体を合成する CsPT4

CsPT4 の基質となり得た芳香族化合物 (2-6) に対し、GPP 以外のプレニル基質との組み合わせによる酵素反応を行った¹⁸⁾。CsPT4 は divarinic acid **2** (C₃), 2,4-dihydroxy-6-heptylbenzoic acid **3** (C₇), および **6** を芳香族基質とした反応において、ファルネシルあるいはゲラニルゲラニル化体 (**2c**, **2d**, **3c**, **6c**, および **6d**) を合成可能であることを確認した。これら化合物の構造を決定するには至らなかった。しかし、HPLC および LC-ESI-MS により、いずれも単一の生成物であることが確認され、かつ生成物の分子量が酵素反応に用いたプレニル基の 1 分子量だけ増加していたことから、それぞれモノプレニル化化合物であることが示唆された (図 19-23)。

本研究では、CsPT4 がアルキル鎖長の異なるレゾルシノール酸およびビベンジルを芳香族基質として、複数のプレニル基を転移する広範な基質認識能力を有しており、それにより多様なカンナビノイド類縁体を合成可能であることを証明した (図 24)。各基質の組み合わせによる生成物の有無に関しては表 1 にまとめた通りである。

A Estimated structure of reaction product



B

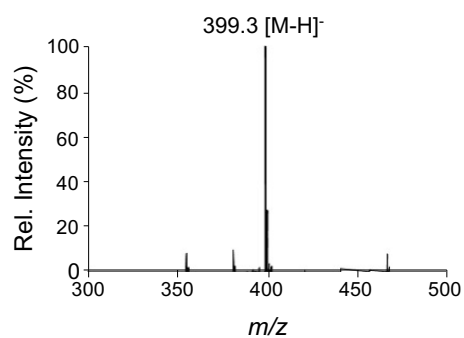
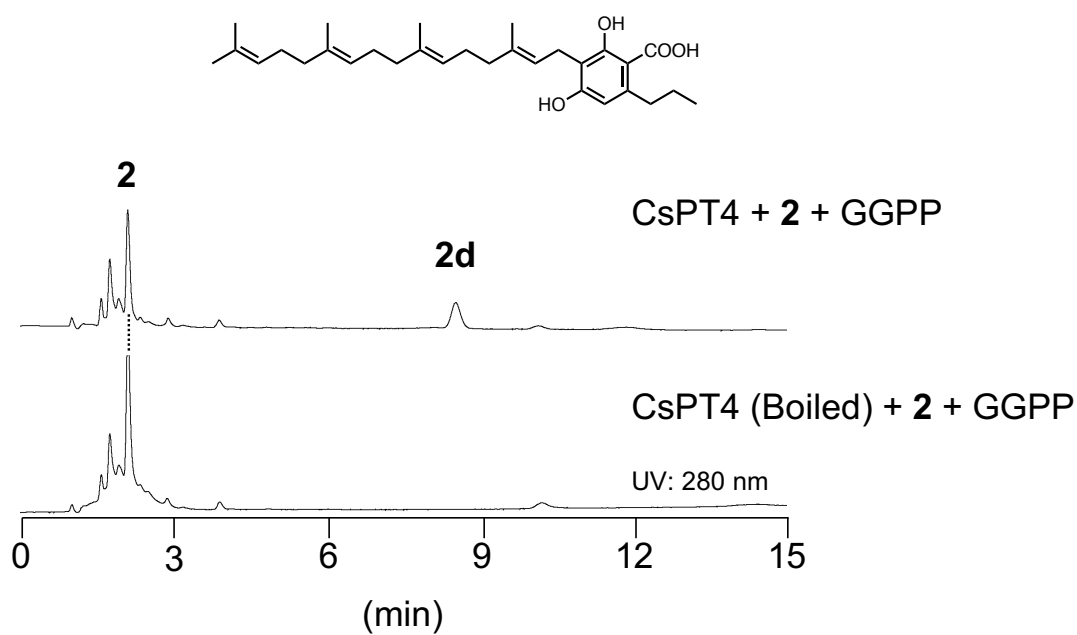


図 19. **2** および FPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **2** および FPP を含む酵素反応, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (80%). (B) 酵素反応生成物の ESI-MS (ネガティブ).

A Estimated structure of reaction product



B

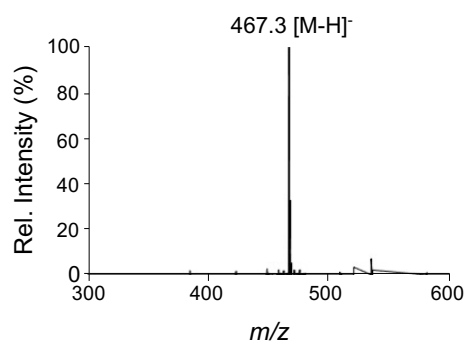
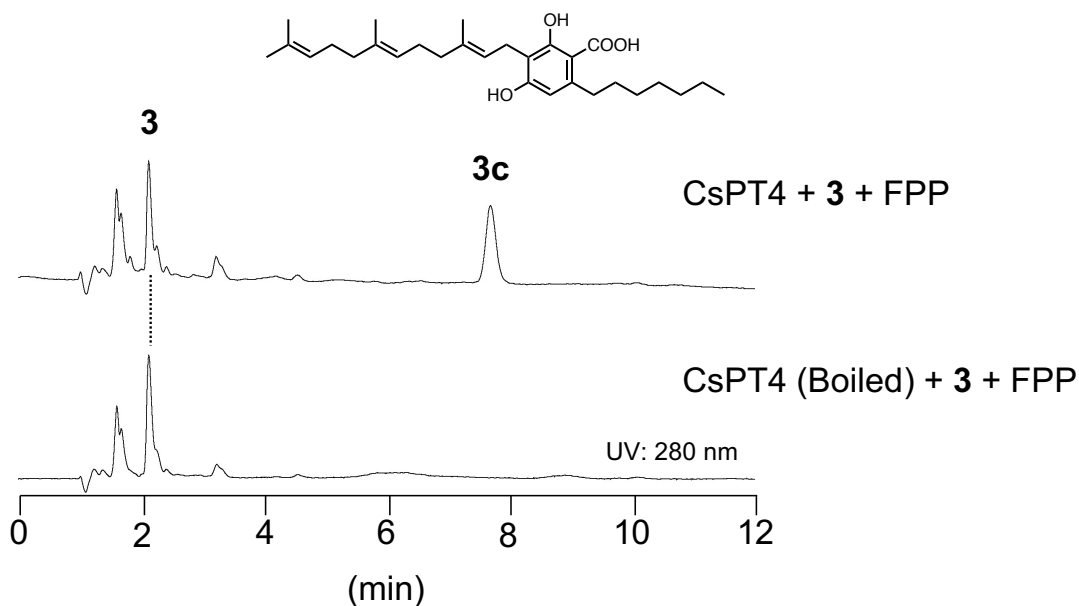


図 20. 2 および GGPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **2** および GGPP を含む酵素反応, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (90%). (B) 酵素反応生成物の ESI-MS (ネガティブ).

A Estimated structure of reaction product



B

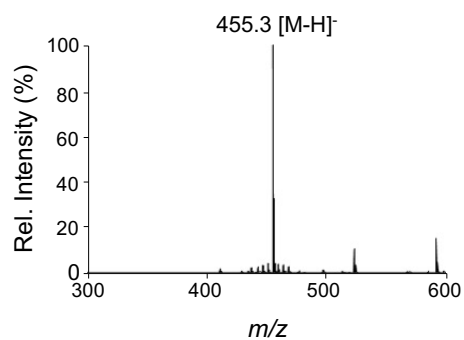
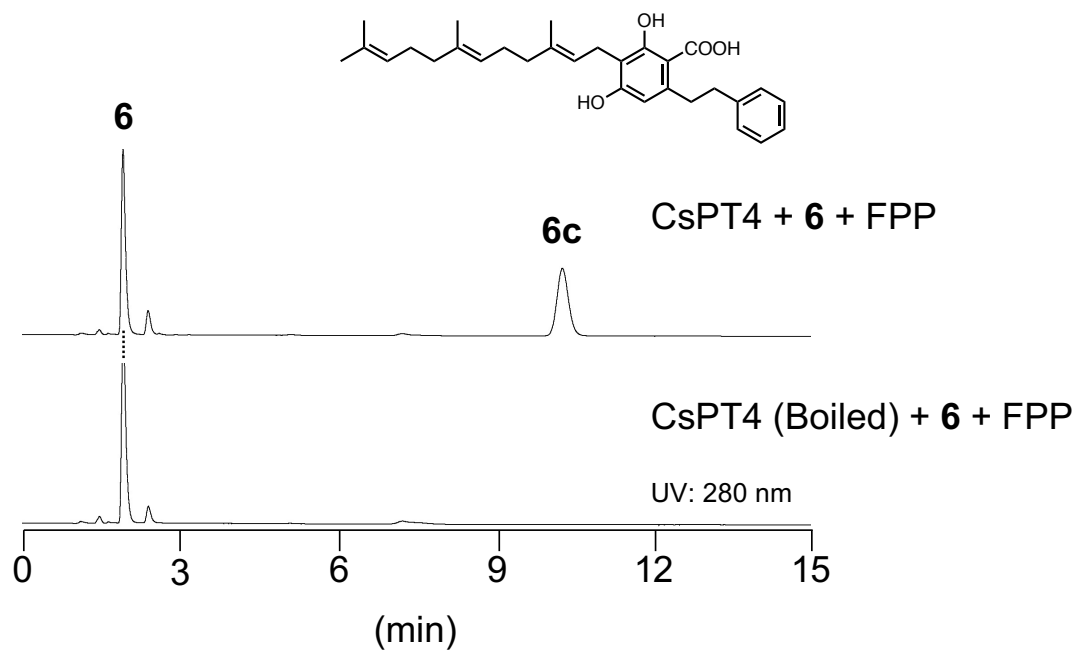


図 21. **3** および FPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **3** および FPP を含む酵素反応, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (90%). (B) 酵素反応生成物の ESI-MS (ネガティブ).

A Estimated structure of reaction product



B

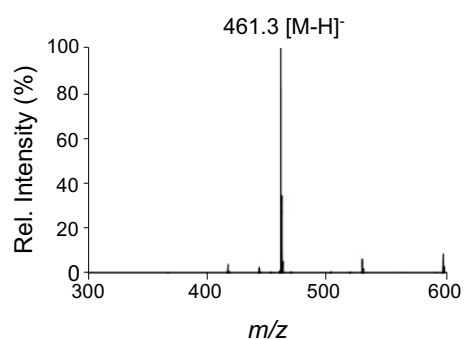


図 22. **6** および FPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **6** および FPP を含む酵素反応, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (80%). (B) 酵素反応生成物の ESI-MS (ネガティブ).

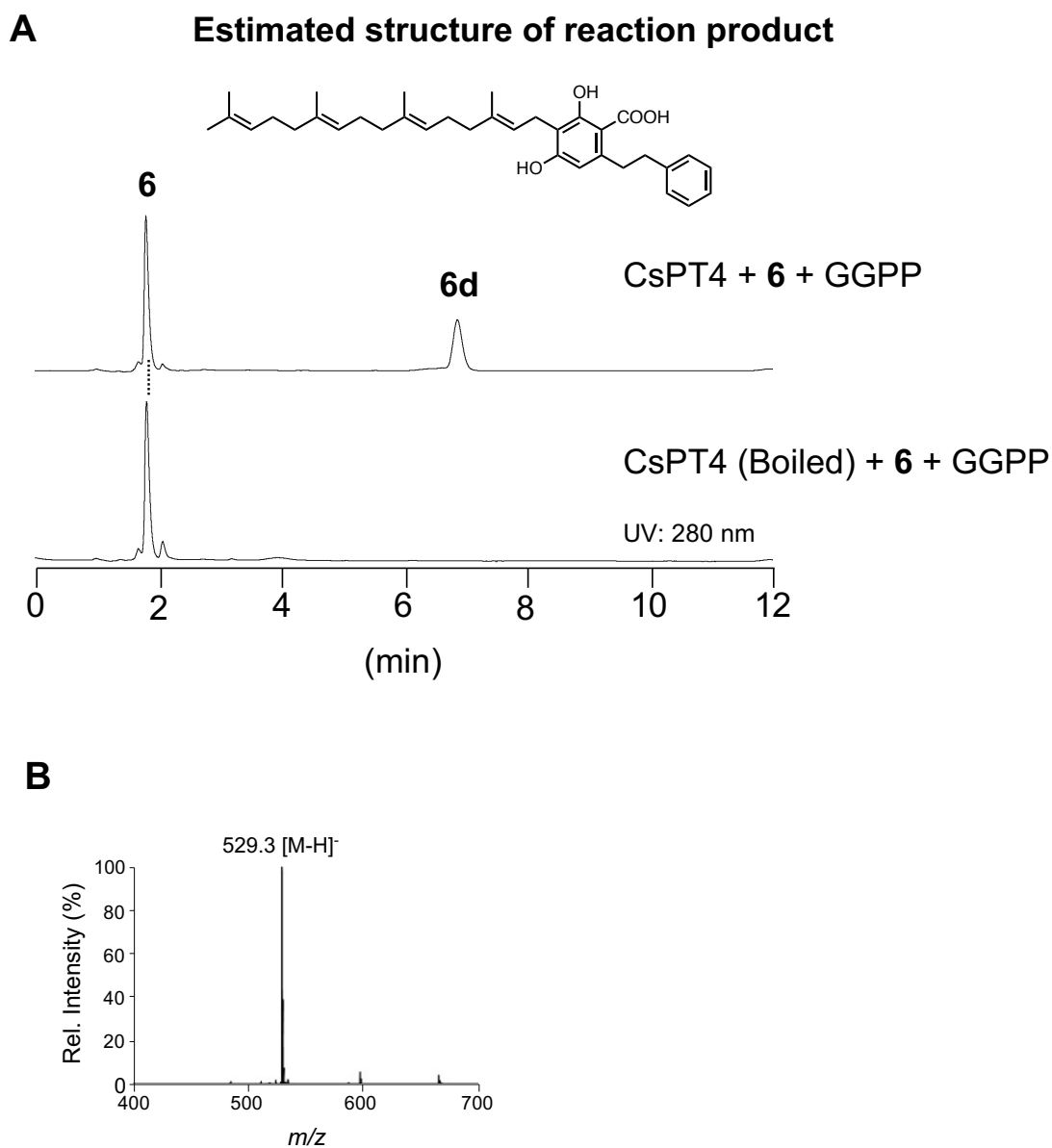


図 23. 6 および GGPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **6** および GGPP を含む酵素反応, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (95%). (B) 酵素反応生成物の ESI-MS (ネガティブ).

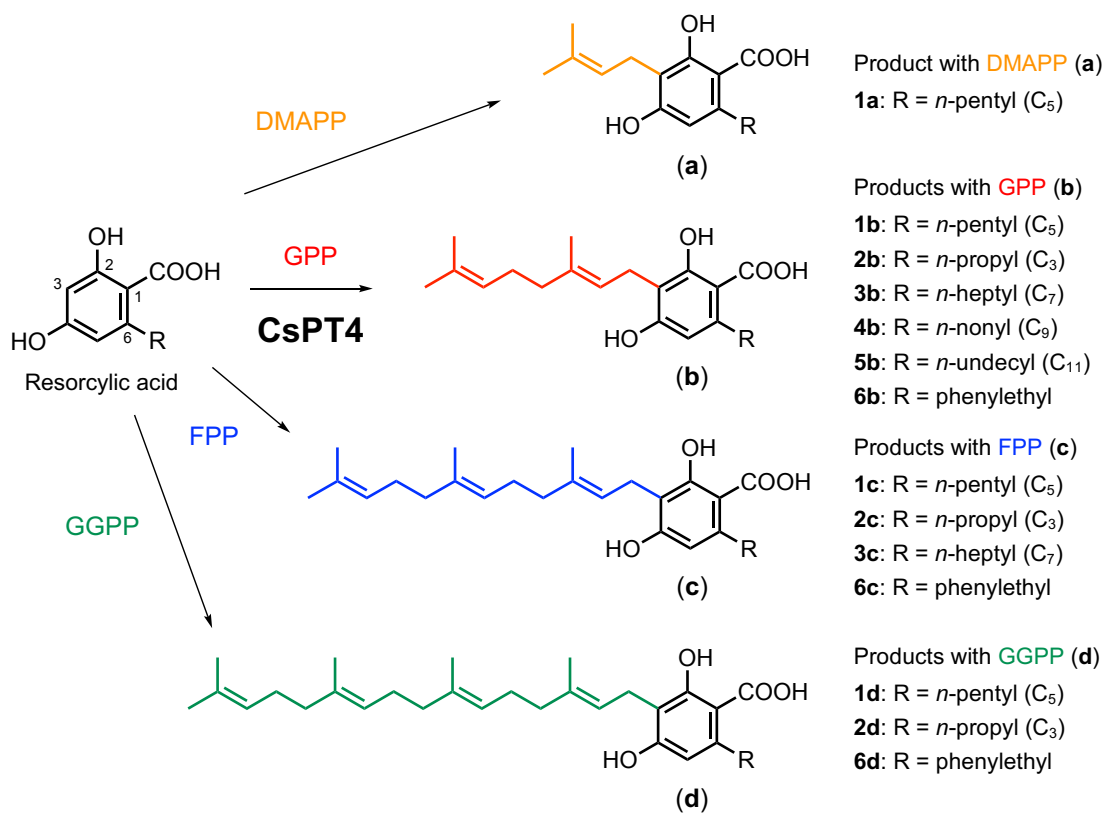


図 24. 多様なカンナビノイド誘導体を合成する CsPT4 の基質特異性.

Compd.	Name	DMAPP	GPP	FPP	GGPP	GFPP
1	Olivetolic acid (C ₅)	+	+	+	+	-
2	Divarinic acid (C ₃)	-	+	+	+	-
3	2,4-Dihydroxy-6-heptylbenzoic acid (C ₇)	-	+	+	-	-
4	2,4-Dihydroxy-6-nonylbenzoic acid (C ₉)	-	+	-	-	-
5	2,4-Dihydroxy-6-undecylbenzoic acid (C ₁₁)	-	+	-	-	-
6	2,4-Dihydroxy-6-phenylethylbenzoic acid	-	+	+	+	-
7	Olivetol	-	-	-	-	-
8	Orsellinic acid (C ₁)	-	-	-	-	-
9	Umbelliferone	-	-	-	-	-
10	Naringenin	-	-	-	-	-
11	Resveratrol	-	-	-	-	-
12	<i>p</i> -Coumaric acid	-	-	-	-	-
13	Homogentisic acid	-	-	-	-	-

表 1. 組換え CsPT4 の基質特異性のまとめ.

+: 生成物が得られた組み合わせ, -: 生成物が得られなかった組み合わせ.

第四項 考察

植物二次代謝に関与する PT の基質選択性は一般に厳密であることが知られているが、一部に例外的な酵素の存在も報告されている。例えば、エゾムラサキツツジ (*Rhododendron dauricum*) においてカンナビノイドと構造が類似した daurichromenic acid の生合成に関与する RdPT1 は、芳香族基質として **8** を特異的に認識する一方、GPP から GGPP までのプレニル基質を受容し、プレニル側鎖の異なる **8** の誘導体を合成する (図 25)²³⁾。また、アサ科に属するホップ (*Humulus lupulus*) 由来の HIPT-1 は、DMAPP 存在下、フロログルシノールおよびナリングニンカルコンの両者を芳香族基質として受容し、酵素反応を触媒する (図 26)²⁴⁾。さらに、アサ科と近縁なクワ科のクワ (*Morus alba*) およびハリグワ (*Cudrania tricuspidata*) にそれぞれ由来する MaIDT および CtIDT は、芳香族基質としてカルコンおよびイソフラボンを受容し、DMAPP および GPP 由来のプレニル基を転移することが報告されている²⁹⁾。CsPT4 は、これら近縁植物由来の PT と関連した分子進化の過程を経由して、より広範な基質認識能力を獲得するよう機能分化した PT であると考えられる。植物芳香族 C-PT の分子系統樹 (図 27) において、CsPT4 および HIPT-1 はともに terpenophenol を基質とする同一のクレードに属しており、本クレードは MaIDT および CtIDT を含むクワ科植物のフラボノイド PT のクレードと互いに分岐する形で存在している。その一方、エゾムラサキツツジの RdPT1 はクマリン特異的な PT と同一のクレードに分類されており、CsPT4 とは独立的に基質特異性を進化させたものと考えられる。

CsPT4 が広範な基質特異性を持つことが、大麻にとってどのような意義を有するのかは不明であるが、一つの可能性として、進化の過程で多様な

二次代謝産物を生産していたアサの祖先において、生存に有益であった主要カンナビノイドの生合成経路が選択され、その一方 CsPT4 の基質特異性が広範なまま残存している可能性も考えられる。

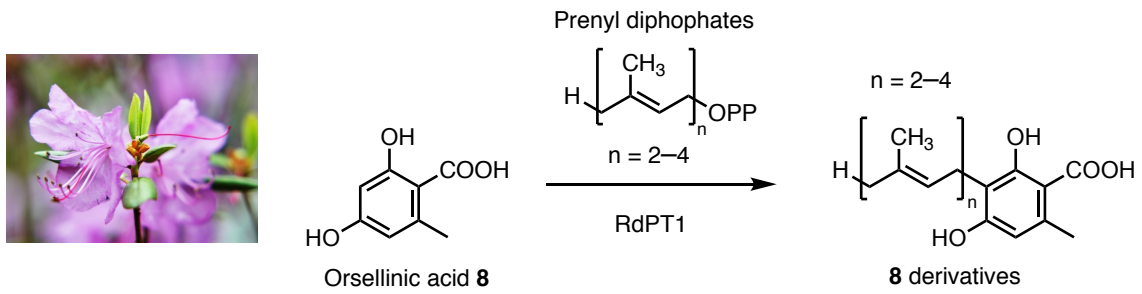


図 25. エゾムラサキツツジ (*Rhododendron dauricum*) および RdPT1 が触媒する酵素反応²³⁾.

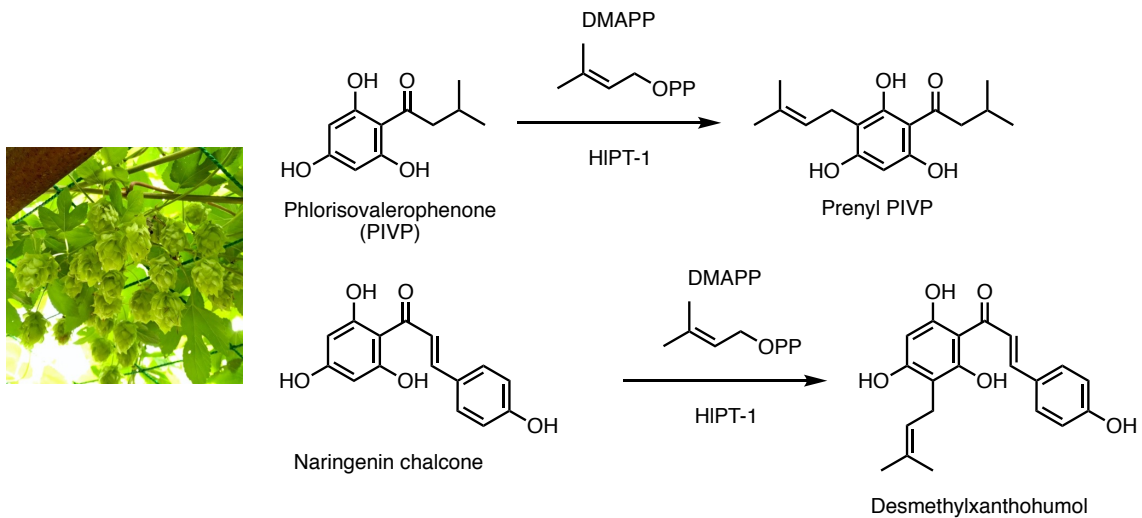


図 26. ホップ (*Humulus lupulus*) および HIPT-1 が触媒する酵素反応²⁴⁾.

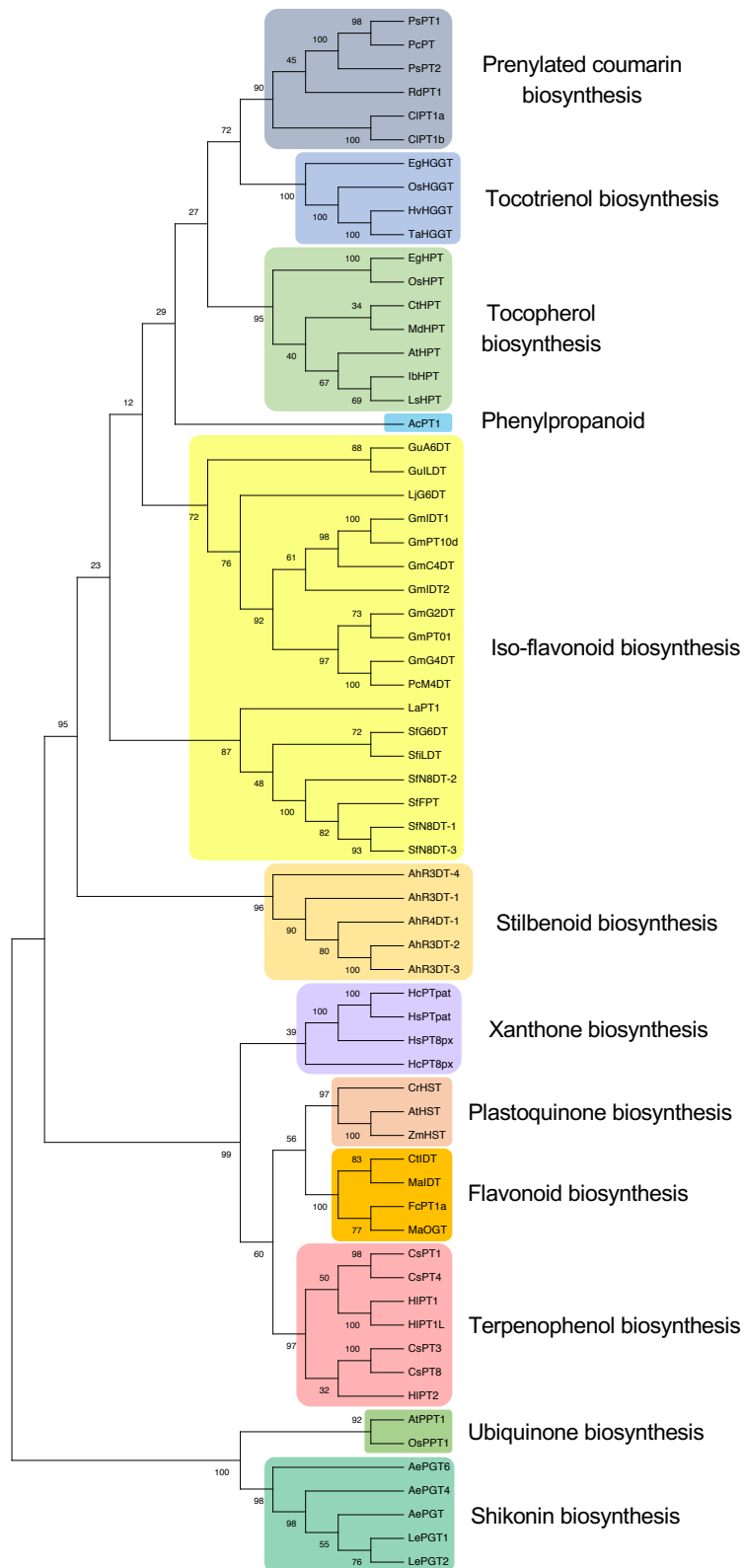


図 27. 植物芳香族 C-PT の系統樹解析.

各酵素は次頁のリスト (表. 2) にまとめた.

Species	Enzyme	NCBI
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtPPT1	BAB20818
	AtHPT (AtVTE2-1)	AAM10489
	AtHST (AtVTE2-2)	ABB70127
<i>Arachis hypogaea</i>	AhR3DT-1	AQM74173
	AhR3DT-2	AQM74174
	AhR3DT-3	AQM74175
	AhR3DT-4	AQM74176
	AhR4DT-1	AQM74172
<i>Amebia euchroma</i>	AePGT	ABD59796
	AePGT4	ANC67957
	AePGT6	ANC67959
<i>Artemisia capillaris</i>	AcPT1	BBG56301
<i>Cannabis sativa</i>	CsPT1	DAC76711
	CsPT3	DAC76713
	CsPT4	DAC76710
	CsPT8	XP_030491742
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CrHST (CrVTE2-2)	CAL01105
<i>Citrus limon</i>	CiPT1a	BAP27988
	CiPT1b	BAP27989
<i>Clitoria tematea</i>	ClHPT	ALR81009
<i>Cudrania tricuspidata</i>	ClIDT	AJD80983
<i>Elaeis guineensis</i>	EgHGGT	ALA65417
	EgHPT	AHL26474
<i>Ficus carica</i>	FcPT1a	LC369744
<i>Glycine max</i>	GmC4DT	BAW32575
	GmG2DT	BAW32578
	GmG4DT	BAH22520
	GmIDT1	BAW32576
	GmIDT2	KRH30855
	GmPT01 (GmG2DT-2)	KRH76146
	GmPT10d (GmIDT3)	KRH32719
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	GuA6DT	AIT11912
	GuILD	AMR58303
<i>Hordeum vulgare</i>	HvHGGT	AAP43911
<i>Humulus lupulus</i>	HiPT1	BAJ61049
	HiPT1L	AJD80254
	HiPT2	AJD80255
<i>Hypericum calycinum</i>	HcPT8px	AZK16226
	HcPTpat	AZK16227
<i>Hypericum sampsonii</i>	HsPT8px	AZK16224
	HsPTpat	AZK16225
<i>Ipomoea batatas</i>	IbHPT	ALG62646
<i>Lactuca sativa</i>	LsHPT	ACN78585
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	LePGT1	BAB84122
	LePGT2	BAB84123
<i>Lotus japonicus</i>	LjG6DT (LjPT1)	ARV85585
<i>Lupinus albus</i>	LaPT1	AER35706
<i>Malus domestica</i>	MdHPT	ACT75571
<i>Morus alba</i>	MaIDT	AJD80982
	MaOGT	AXN57307
<i>Oryza sativa</i>	OsHGGT	AAP43913
	OsHPT (RTD1)	BAS98961
	OsPPT1	BAE96574
<i>Pastinaca sativa</i>	PsPT1	AJW31563
	PsPT2	AJW31564
<i>Petroselinum crispum</i>	PcPT	BAO31627
<i>Psoralea corylifolia</i>	PcM4DT	AYV64464
<i>Rhododendron dauricum</i>	RdPT1	BBD96134
<i>Sophora flavescens</i>	SfFPT	AHA36633
	SfG6DT	BAK52291
	SfILD	BAK52290
	SfN8DT-1	BAG12671
	SfN8DT-2	BAG12673
	SfN8DT-3	BAK52289
	TaHGGT	AAP43912
<i>Triticum aestivum</i>	TaHGGT	AAP43912
	ZmHST (w3)	ONM24667
<i>Zea mays</i>	ZmHPT	ABB70122

表 2. 系統樹解析で使した植物芳香族 C-PT のリスト.

NCBI: アメリカ国立生物工学情報センターに登録されている各酵素のアクセスナンバー.

第五節 反応速度論解析

第一項 プレニル基質に対する親和性および反応性

各基質に対する CsPT4 の反応性の違いを明らかとするため、反応速度論解析を実施した (表 3)¹⁸⁾。CsPT4 は膜結合型酵素であり精製が困難であることから、ミクロソーム画分を粗酵素として使用し、得られた V_{\max} を酵素活性の指標として用いた³⁰⁾。1 を共基質とし、DMAPP (C₅) から GGPP (C₂₀) までの 4 種のプレニル基質に対する CsPT4 の反応性について評価した。

CsPT4 と FPP および GGPP との反応により算出された K_m 値は、GPP に対する K_m 値よりも低く、一方で DMAPP に対する K_m 値は非常に高いものであった。以上の結果は、FPP および GGPP に対する CsPT4 の結合親和性は、大麻における生理的なプレニル基質である GPP に対する結合親和性よりも高いことを示唆している。

反応速度に関しては、CsPT4 は GPP との反応で最も高い V_{\max} 値を示し、それ以外のプレニル基質に対する V_{\max} 値は非常に低いことが判明した。また、反応効率の指標である V_{\max}/K_m 値も GPP との反応において最大となることを確認した。以上のことから、CsPT4 は広範なプレニル基質と反応が可能である一方で、GPP が本酵素にとって最適なプレニル基質であることが明らかとなった。

第二項 レゾルシノール酸誘導体に対する親和性および反応性

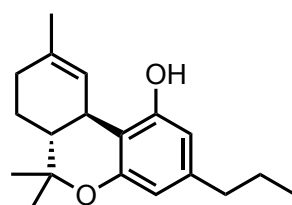
GPP を共基質とし、芳香族基質 (**1-6**) に対する反応速度論解析を検討した (表 3)¹⁸⁾。CsPT4 は、**1** (C₅) よりも 2,4-dihydroxy-6-nonylbenzoic acid **4** (C₉) および 2,4-dihydroxy-6-undecylbenzoic acid **5** (C₁₁) に対して低い K_m 値を示し、長鎖アルキル基を有するレゾルシノール酸に高い親和性を有する傾向が示唆されたが、 V_{max} 値の比較から、本酵素の **4** および **5** に対する反応性は **1** に対する反応性よりも明確に低いことが確認された。一方で、アルキル鎖長の短い **2** (C₃) に対する CsPT4 の K_m 値は比較的高いものであったが、**2** を用いた反応の V_{max} 値は **1** に対する V_{max} 値よりも 4 倍程度高いことが判明した。また、ビベンジル骨格を有する **6** を基質とした反応の K_m 値および V_{max} 値は、いずれも **1** に対する数値とほぼ同等であった。さらに、**2** と **6** に対する CsPT4 の反応効率 (V_{max}/K_m) は、**1** を基質とした反応と同等、あるいはより高い値を示した。

以上の結果から、**2** および **6** は **1** と同様に CsPT4 の好適な基質であることが明らかとなった。プロピル基を有する **2** は、一部のアサに含まれる tetrahydrocannabivarin (図 28)³¹⁾ など天然カンナビノイドの前駆体であり、CsPT4 が **2** に高い活性を示したことは妥当な結果であると考えられる。一方で、**6** は生物活性が注目されているオオケビラゴケ由来のビベンジルカンナビノイド perrottetinene の前駆体であり、**6** の生合成酵素は報告されていない。CsPT4 は、**6** に対して高い反応効率を示したことから、本酵素が perrottetinene を含むビベンジルカンナビノイドの微生物生産に応用できる可能性がある。

Substrate (Co-substrate)	K_m [μM]	V_{max} [pmol s^{-1}]	V_{max} / K_m [$\text{fmol s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$]
DMAPP (1)	3930 \pm 530	0.099 \pm 0.008	0.025 \pm 0.001
GPP (1)	67.3 \pm 2.1	13.7 \pm 0.2	203 \pm 4
FPP (1)	24.4 \pm 0.3	1.49 \pm 0.01	61.1 \pm 0.5
GGPP (1)	4.71 \pm 0.46	0.278 \pm 0.007	59.1 \pm 6.6
1 (GPP)	26.8 \pm 0.8	24.3 \pm 0.4	906 \pm 10
2 (GPP)	77.6 \pm 12.7	103 \pm 6	1330 \pm 140
3 (GPP)	37.2 \pm 5.3	0.447 \pm 0.026	12.0 \pm 1.0
4 (GPP)	9.96 \pm 1.17	3.00 \pm 0.22	306 \pm 15
5 (GPP)	2.65 \pm 0.78	0.075 \pm 0.010	28.6 \pm 5.9
6 (GPP)	27.9 \pm 1.9	28.2 \pm 0.2	1020 \pm 70

表 3. プレニル基質およびレゾルシノール酸に対する組換え CsPT4 の定常状態反応速度パラメータ.

いずれの酵素反応も同一のミクロソーム画分を粗酵素として使用した.
プレニル基質: DMAPP, GPP, FPP, および GGPP. レゾルシノール酸: 1-6.



Tetrahydrocannabivarin

図 28. Tetrahydrocannabivarin の構造.

第三項 考察

プレニル基質に対する反応速度論解析より、CsPT4 が GGPP に最も高い親和性を示したことは意外であったが、同様の傾向はエゾムラサキツツジの RdPT1 に関しても報告されている。RdPT1 の分子モデリング解析では、GGPP の長鎖プレニル基が反応ポケットの結合部位に存在する Ile, Phe, Gly, および Ala などの疎水性アミノ酸から構成される二つの疎水性領域と強く相互作用することが示唆されている (図 29A)²³⁾。CsPT4 のホモロジーモデルには、芳香族基質およびプレニル基質を受容するに十分なサイズの活性中心ポケットが観察された (図 29B)。また、現時点で基質とのドッキングモデルを得るには至っていないものの、CsPT4 の活性中心ポケットには、RdPT1 のプレニル結合サイトに対応する位置に Ala, Val, および Ile などによって構成される疎水性領域が存在している。このため、これらアミノ酸との疎水性相互作用により GGPP が安定に結合する可能性が考えられる。しかし、 V_{\max} 値が低いことから、GGPP の結合様式は **1** との C-C 結合の形成には適していないと考えられる。

芳香族基質との反応で算出された K_m 値は、長鎖アルキル基を有するレゾルシノール酸で低く、短鎖アルキル基では高くなる傾向を示した。すなわち、芳香族基質の結合部位には疎水性領域が存在しており、アルキル基と疎水性アミノ酸が相互作用している可能性が考えられる。また、**6** のフェニルエチル基は **1** のペンチル基と同様に CsPT4 にとって適切なサイズの側鎖であることが示唆された。さらに、RdPT1 においては芳香族基質である **8** のカルボキシ基が活性中心の Arg と 2 本の水素結合を形成し、結合の方向性が固定されることが示唆されている (図 29A)²³⁾。したがって、CsPT4 においても **1** を含むレゾルシノール酸誘導体のカルボキシ基と塩

基性アミノ酸の相互作用が予想される。

CsPT4 を微生物生産等のバイオテクノロジーに応用し、その触媒能力を十分に活用するためには、CsPT4 の立体構造を明らかにして、反応メカニズムを解明する必要がある。

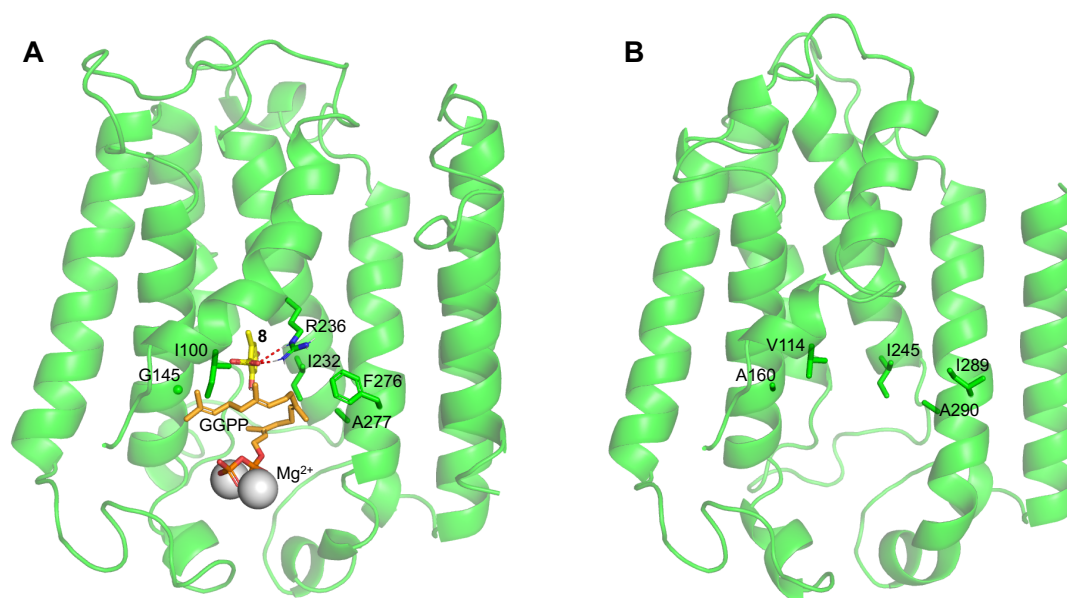


図 29. RdPT1 (A) の立体構造および CsPT4 (B) のホモロジーモデル.

RdPT1 (A) の立体構造は文献記載のデータを PyMOl で描画したものである. CsPT4 (B) のホモロジーモデルは *Aeropyrum pernix* K1 由来の UbiA ホモログ (PDB ID: 4OD5) を鋳型として SWISS-MODEL で作成した.

第二章 カンナビノイドのヒトすい臓がん細胞に 対する抗緊縮活性

第一節 カンナビノイド類縁体の抗緊縮活性

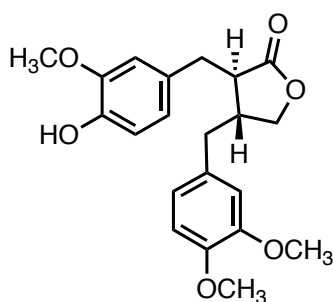
カンナビノイドには多様な生物活性が報告され、近年は抗がん作用にも注目が集まっている。例えば THC や CBD は、メラノーマ細胞に対するプロテインキナーゼ B (Akt) の阻害作用や、胃がん、非小細胞肺癌、および肝細胞がんに対するアポトーシスシグナルを介した腫瘍増殖阻害作用が報告されており、さらに現在使用されている化学療法とカンナビノイドの併用による相乗効果を示す研究なども行われている³²⁾。

一方で、**1b** の脱炭酸体である cannabigerol (CBG) に関する抗がん作用も報告されている。例えば、温度感受性 TRP チャネルは様々な疾患に関与することが明らかとなっており、CBG が TRP チャネルを遮断することにより、結腸・直腸がん細胞の発生や増殖を抑制する可能性が示唆されている³³⁾。また、CBG および **1b** 類縁体は抗がん作用のほか、抗酸化および抗炎症作用などの有用な生物活性が報告されている一方で、幻覚作用などの人体に対する有害な作用は報告されていない。従って、**1b** 類縁体は有望な医薬資源と考えられている。

本研究では、カンナビノイドの抗がん作用、特にすい臓がんに対する効果を検討することとした。すい臓がんは 5 年相対生存率が 10% 以下の難治性がんであり、ほとんどの薬剤に対して耐性を示し、短期間で増殖および転移を起こす³⁴⁾。治癒の可能性のある唯一の治療法は手術であり、標準薬物治療としてはフォルフィリノックス療法やゲムシタビン・ナブパクリタキセル療法などが、進行性のすい臓がんに対する緩和療法としては、5-フルオロウラシル (5-FU) などが使用されている。また、ヒトすい臓がん細胞はがん微小環境の低酸素・低栄養状態でも生存できる特徴的な活性 (緊縮活性)³⁵⁾ を有することが知られており、抗緊縮作用は従来のすい臓がん

治療薬とは作用メカニズムが異なるため、近年がん治療への新しいアプローチとして、抗緊縮化合物の開発に注目が集まっている。すなわち、CsPT4の酵素反応により得られたカンナビノイド類縁体がヒトすい臓がん細胞に対して抗緊縮作用を示せば、新たなすい臓がん治療薬の候補になり得る。

本研究では、栄養飢餓に対して最も耐性のあるヒトすい臓がん細胞株 PANC-1 human pancreatic cancer cells (PANC-1)³⁵⁾ を使用した。PANC-1 は栄養飢餓 (グルコース、アミノ酸、および血清が全く存在しない) 状態でも長時間生存することができるすい臓がん細胞株である。**1** およびカンナビノイド類縁体 (**1a-1d**, **2b-6b**) の、栄養欠乏培地 (nutrient-deprived medium: NDM) および栄養豊富培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) で培養した PANC-1 に対する細胞毒性試験を行った^{18,36)}。抗緊縮活性は PC₅₀ 値 (NDM 培地中での 50% 致死濃度) で、一般的な細胞毒性は IC₅₀ 値 (DMEM 培地中での 50% 致死濃度) で評価した。また、5-FU は NDM 条件下で抗緊縮活性を示さないことから³⁷⁾、ポジティブコントロールとして、最も研究が進展している抗緊縮化合物 arctigenin³⁶⁾ を使用した (図 30)。Arctigenin は、キク科ゴボウ (*Arctium lappa*) の果実 (牛蒡子) に含まれる天然物である。本化合物は、細胞の増殖、遊走、および浸潤に関与する Akt を阻害することで細胞死を誘導することが示唆されており、2016 年にすい臓がんに対する第一相臨床試験が行われている³⁸⁾。



Arctigenin



図 30. ゴボウ (*Arctium lappa*) および細胞毒性試験で使用した
ポジティブコントロール arctigenin³⁶⁾ の構造.

試験の結果 (表 4)、ほとんどのカンナビノイド類縁体が NDM 条件下で選択的な細胞毒性を示し、抗緊縮活性を有していることが明らかとなった。また、試験化合物の中で、新規カンナビノイドである **1c** が最も高い活性 (PC₅₀ 3.4 μM) を示し、ビベンジルカンナビノイドである **6b** についても良好な抗緊縮活性が得られた。一方で、プレニル鎖長が短い **1a** の活性は弱く (PC₅₀ 32 μM)、またプレニル基を持たない **1** は全く活性を示さなかった (PC₅₀ > 100 μM)。すなわち、プレニル基の存在が活性に大きく寄与しており、ファルネシル基が最も効果的であることが示唆された。

本研究では、カンナビノイドがヒトすい臓がん細胞に対して抗緊縮活性を示すことを初めて証明した。本研究で確認されたカンナビノイド類縁体の活性は、arctigenin (PC₅₀ 0.82 μM) と比較してやや弱いものであった。これら生物活性カンナビノイドは、CsPT4 の活性中心を構成するアミノ酸に変異を導入し、各基質に対する活性を向上させた機能改変酵素を作製することで、より効率的に得られることが期待される。

Compound	PC ₅₀ [μM] (NDM)	IC ₅₀ [μM] (DMEM)	Compound	PC ₅₀ [μM] (NDM)	IC ₅₀ [μM] (DMEM)
1	> 100	> 100	2b	6.2	> 100
1a	32	> 100	3b	5.4	> 100
1b	5.0	93	4b	4.5	> 100
1c	3.4	90	5b	4.1	> 100
1d	4.0	81	6b	3.6	> 100
			Arctigenin ^a	0.82	> 100

表 4. ヒトすい臓がん細胞 PANC-1 に対するカンナビノイド類縁体の
選択的細胞毒性.

^a ポジティブコントロール.

第三章 基質依存的に変化する CsPT4 の プレニル化様式

第一節 フロログルシノール誘導体に対する CsPT4 の基質特異性

植物二次代謝経路の芳香族 PT はそのほとんどが C-PT であり³⁹⁾、O-PT は数例報告されているのみである (図 31)^{40,41)}。また、C-および O-プレニル化反応の両者を触媒する唯一の PT として、ミカン科ゲッキツ (*Murraya exotica*) 由来の MePT1 が同定されており、本酵素は C-ゲラニル化生成物とともに微量の 7-O-geranylumbelliferone を合成することが報告されている (図 32)⁴²⁾。これらの前例と CsPT4 の広範な基質許容性を踏まえると、CsPT4 にはさらなる潜在的な能力があることが期待される。CsPT4 がさらに広範な基質を受容し、かつ C 位のみならず O 位をプレニル化する潜在的触媒能力を有している可能性も十分考えられる。

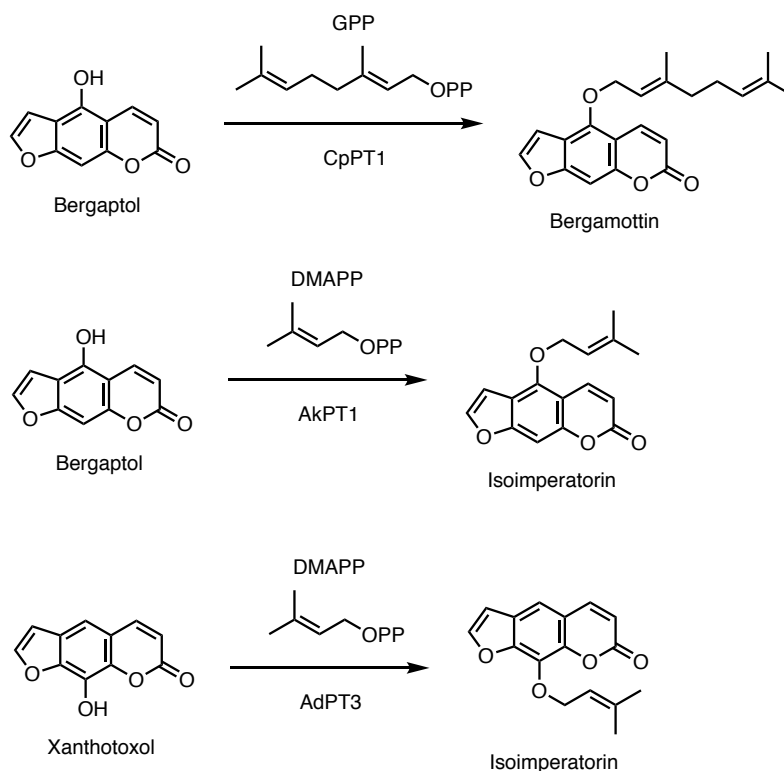


図 31. グレープフルーツ (*Citrus paradisi*) 由来 CpPT1⁴⁰⁾, アシタバ (*Angelica keiskei*) 由来 AkPT1⁴⁰⁾, およびヨロイグサ (*Angelica dahurica*) 由来 AdPT3⁴¹⁾ が触媒する O-プレニル化反応.

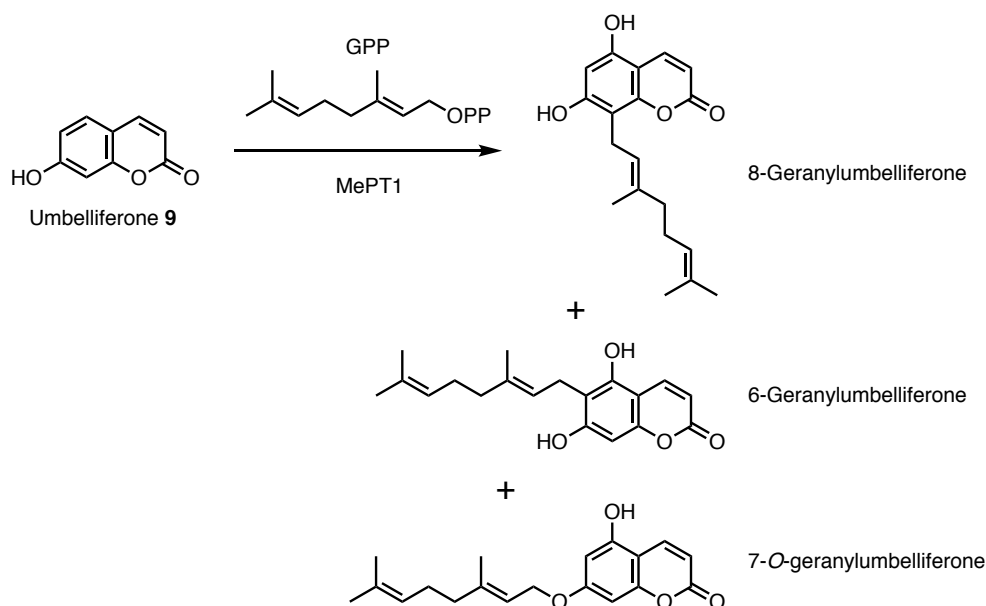


図 32. ゲッキツ (*Murraya exotica*) 由来 MePT1 が触媒する C-/O-プレニル化反応⁴²⁾.

CsPT4 の基質特異性をより深く理解するためレゾルシノール酸と構造が類似する基質に対する CsPT4 の反応性を精査した。第一章で述べた通り、植物芳香族 C-PT の系統樹 (図 27) において、CsPT4 と同一のクレードに属する HIPT-1 はフロログルシノールおよびカルコンを芳香族基質として受容する。そこで、カンナビノイドおよびビベンジルカンナビノイドの前駆体である **1** および **6** に着目し、それぞれの異性体で、フロログルシノール骨格を有する phlorocaprophenone **14** (PCP) および 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone **15** (THDC) を合成し、構造的にシンプルな phloroacetophenone **16** とともに (図 33) CsPT4 との反応性を検討した¹⁹⁾。本章では、第一章と同様に組換え CsPT4 を発現し、マイクロソーム画分を調製して酵素反応を行った。

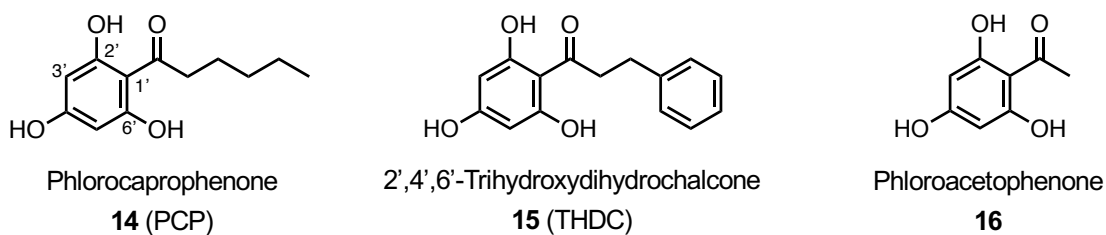


図 33. 本研究で使用したフロログルシノール誘導体の構造.

GPP を共基質とし、フロログルシノール誘導体 (14-16) との酵素反応を行ったところ、予想に反し、CsPT4 は 14 および 15 の両基質から 2 種の生成物をそれぞれ合成した。LC-ESI-MS による分析の結果、これらの生成物はいずれもモノゲラニル化合物であることが示唆された。次いで、合成した標品の保持時間および分子量を生成物と比較した結果、各種生成物は *C*-および *O*-ゲラニル化合物である、3'-*C*-geranyl-PCP 14e, 4'-*O*-geranyl-PCP 14f, 3'-*C*-geranyl-THDC 15e, および 4'-*O*-geranyl-THDC 15f であることが明らかとなった (図 34, 35)。これら化合物はいずれも文献未報告の新規化合物である。一方で、CsPT4 は 16 に対して反応性は示さなかった。

レゾルシノール酸およびアシルフロログルシノール誘導体に対する基質特異性の結果から、CsPT4 が基質を認識する条件として、1) レゾルシノール骨格を有すること、2) カルボキシ基あるいはカルボニル基を有すること、3) 一定以上のサイズの側鎖構造を有することが必要であると推察される。しかし、厳密な条件を特定するためには、レゾルシノール酸のカルボキシ基をメチルエステル化した基質、あるいはアシルフロログルシノールのカルボニル基を除いた基質等を用いた酵素反応を行い、その反応性を検討する必要があると考えられる。

GPP 以外のプレニル基質とフロログルシノール誘導体との組み合わせ

に対する CsPT4 の反応性を検討した。その結果、FPP のみが反応性を示し、GPP を基質とする反応と同様にそれぞれ 2 種の生成物が確認された。生成物の同定には至らなかったが、LC-ESI-MS による分析の結果、いずれもモノフェルネシル化合物であることが示唆された (図 36, 37)。一方で、DMAPP および GGPP を用いた反応では生成物が検出できなかったことから、これらは 14 および 15 と併用する基質としては適切ではないことが明らかとなった (表 5)。

本章および第一章における基質特異性の結果を総括すると、CsPT4 はレゾルシノール酸を基質とした場合、3 位で位置選択的な C-プレニル化反応を触媒するが、アシルフロログルシノールを基質とした場合、C-および O-プレニル化反応の両者を触媒するという興味深い活性を有していることが明らかとなった。

以上の結果より、CsPT4 が基質の構造に依存してプレニル化様式を変化させる酵素であることを明らかとした。このような特性を有する植物 PT は初めての報告である。一方で、既知の C-および O-PT である MePT1 はクマリンおよび GPP に特異的な酵素であり⁴²⁾、CsPT4 とは明確に基質特異性が異なっている。

骨格の異なる芳香族基質を認識し、基質によりプレニル化様式を変化させる CsPT4 の性質は、放線菌 (*Streptomyces sp.*) 由来の NphB⁴³⁾ など微生物由来 PT について報告されたものと類似している。NphB は 1 を含む多様な芳香族基質と反応することから、近年、合成生物学への応用が検討されている^{44,45)}。しかしながら、NphB は GPP に対する親和性が高いため、CsPT4 のようにプレニル側鎖の多様性を作り出すには不向きであると考えられる。

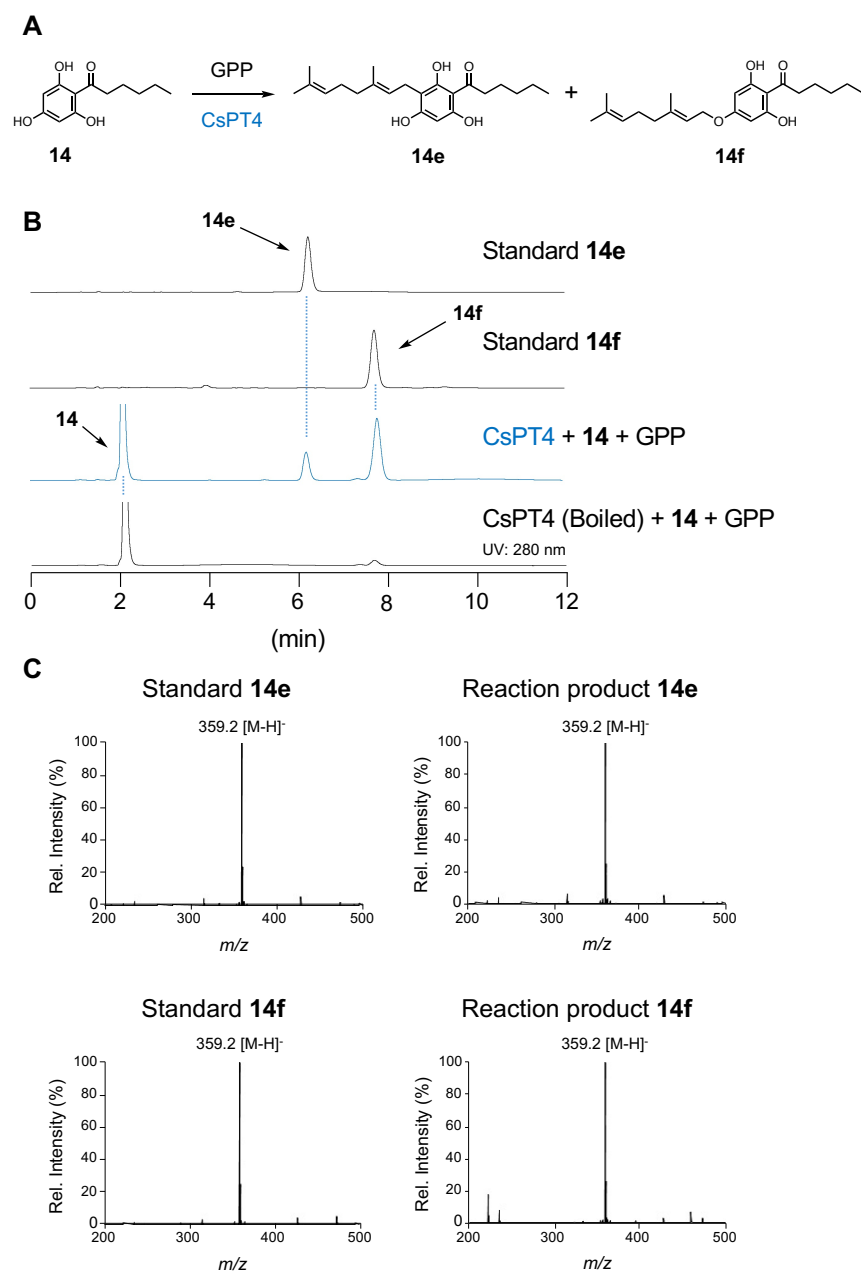


図 34. **14** および GPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) CsPT4 が触媒する反応 (B) HPLC チャート: 最上段: **14e** 標品, 二段目: **14f** 標品, 三段目: **14** および GPP を含む酵素反応: 収率 $1.5 \times 10^{-5}\%$ (**14e**), $1.9 \times 10^{-5}\%$ (**14f**), 最下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (85%). (C) ESI-MS (ネガティブ): 左上: **14e** 標品, 左下: **14f** 標品, 右上: 酵素反応生成物 (**14e**) 右下: 酵素反応生成物 (**14f**).

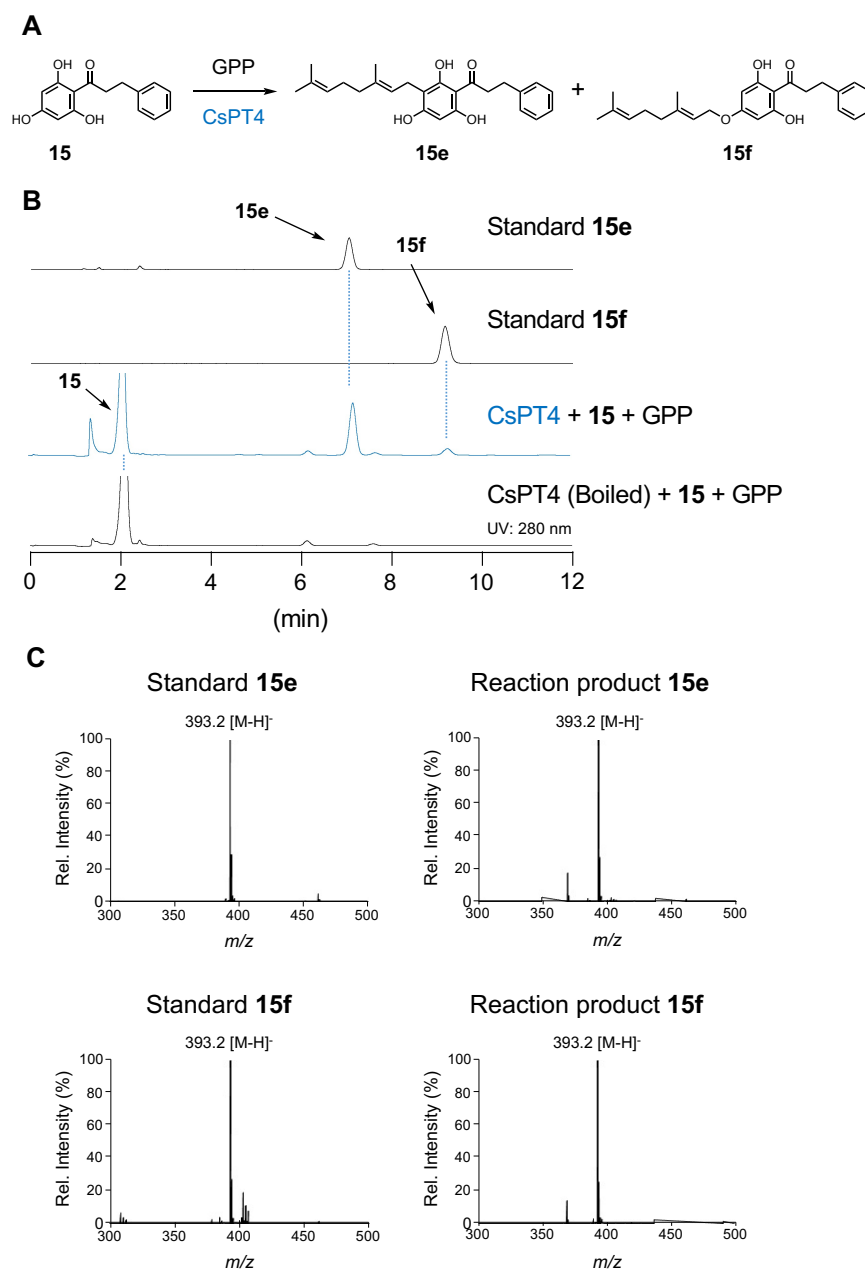


図 35. **15** および GPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) CsPT4 が触媒する反応 (B) HPLC チャート: 最上段: **15e** 標品, 二段目: **15f** 標品, 三段目: **15** および GPP を含む酵素反応: 収率 $2.5 \times 10^{-7}\%$ (**15e**), $5.9 \times 10^{-7}\%$ (**15f**), 最下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (80%). (C) ESI-MS (ネガティブ): 左上: **15e** 標品, 左下: **15f** 標品, 右上: 酵素反応生成物 (**15e**) 右下: 酵素反応生成物 (**15f**).

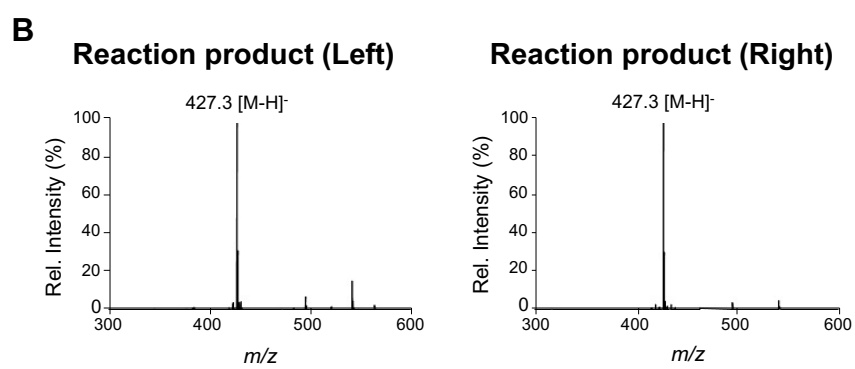
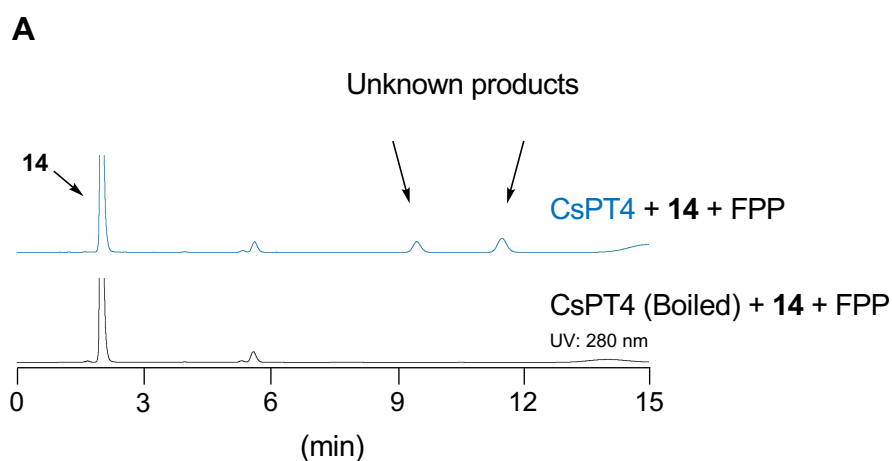


図 36. **14** および FPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.
(A) HPLC チャート: 上段: **14** および FPP を含む酵素反応, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (90%). **(B)** 酵素反応生成物の ESI-MS (ネガティブ).

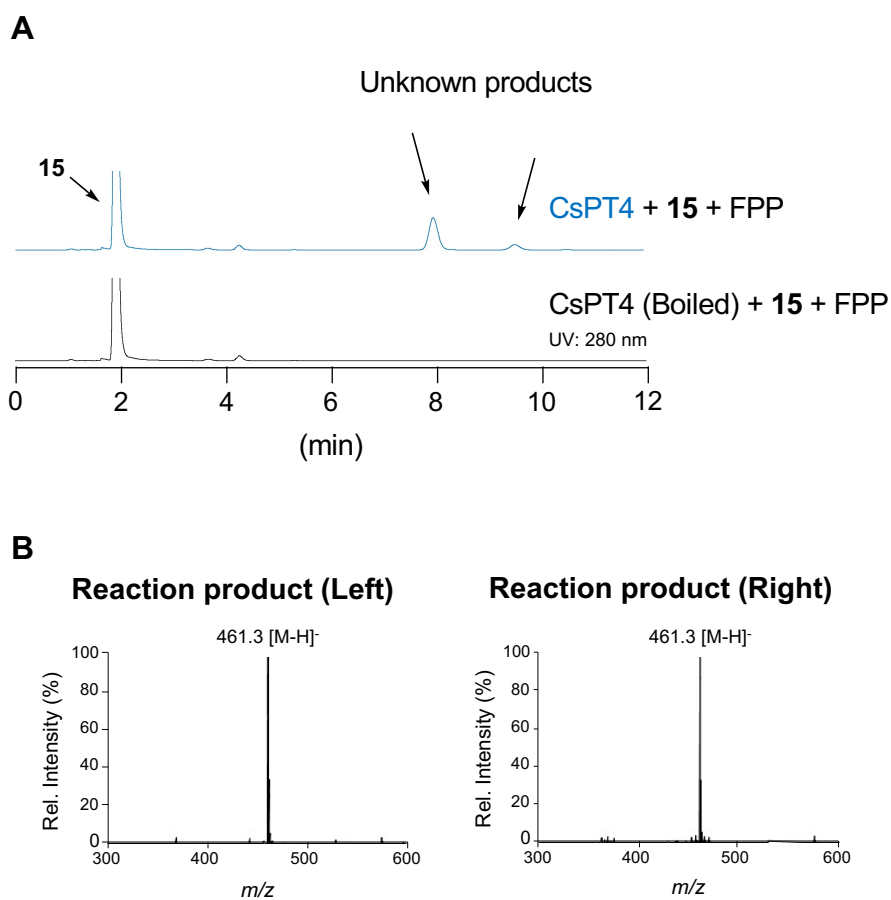


図 37. **15** および FPP を基質とした組換え CsPT4 反応の生成物解析.

(A) HPLC チャート: 上段: **15** および FPP を含む酵素反応, 下段: 高温で失活させた CsPT4 を用いた酵素反応. HPLC の移動相: ギ酸 (0.1%) を含むアセトニトリル (90%). (B) 酵素反応生成物の ESI-MS (ネガティブ).

Compd.	Name	DMAPP	GPP	FPP	GGPP
14	Phlorocaprophenone (PCP)	-	+	+	-
15	2',4',6'-Trihydroxydihydrochalcone (THDC)	-	+	+	-
16	Phloroacetophenone	-	-	-	-

表 5. アシルフロログルシノール誘導体に対する組換え CsPT4 の基質特異性.

第二節 反応速度論解析

フロログルシノール誘導体に対する CsPT4 の反応性を理解するため、C-および O-プレニル化反応のそれぞれについて反応速度論解析を実施した (表 6)¹⁹⁾。

GPP を共基質とし、**14** および **15** に対する K_m 値を算出したところ、C-プレニル化反応に関しては、いずれの基質も構造異性体である **1** および **6** を用いた反応と同程度の K_m 値を示した。また **14** を基質とした O-プレニル化反応の K_m 値も類似していることを確認した。一方で、**15** の O-プレニル化反応における K_m 値は、同基質の C-プレニル化反応よりも 20 倍以上高い値を示した。すなわち、**15** の C-および O-プレニル化反応において、同じ基質の反応であるにも関わらず別の基質が用いられているかのような結果が得られた。

また興味深いことに、CsPT4 は、**14** を基質とした O-プレニル化反応および **15** を用いた C-プレニル化反応において、それぞれ同じ基質を用いた他方のプレニル化パターンよりも高い反応速度を有し、それぞれ **1** および **6** の C-プレニル化反応と同等の V_{max} 値を示すことが明らかとなった。さらに反応効率の指標である V_{max}/K_m 値も、各基質で同様の傾向であった。以上の結果より、CsPT4 が **14** を基質とした反応では O-プレニル化反応を、**15** を基質とした反応では C-プレニル化反応を優先的に触媒することを明らかとした。基質によってプレニル化様式の優先性が変化するの、CsPT4 のユニークな特徴である。

Substrates	Products (Prenylation pattern)	K_m [μM]	V_{max} [$pmol s^{-1}$]	V_{max} / K_m [$fmol s^{-1} \mu M^{-1}$]
1	1b (C)	12.7 \pm 0.9	8.27 \pm 0.20	651 \pm 32
6	6b (C)	16.9 \pm 0.7	8.31 \pm 0.13	492 \pm 19
14	14e (C)	14.2 \pm 2.0	0.944 \pm 0.037	67.1 \pm 7.5
14	14f (O)	19.0 \pm 1.5	7.81 \pm 0.09	412 \pm 29
15	15e (C)	11.0 \pm 0.2	6.00 \pm 0.29	546 \pm 30
15	15f (O)	259 \pm 49	0.612 \pm 0.067	2.37 \pm 0.21

表 6. フロログルシノール誘導体に対する組換え CsPT4 の
定常状態反応速度パラメータ.

いずれの酵素反応も同一のミクロソーム画分を粗酵素として使用した.

第三節 考察

第一節および第二節の結果より、CsPT4 が基質の構造に依存してプレニル化様式を変化させる酵素であることを明らかとしたが、本酵素の反応効率は、プレニルカチオン中間体と芳香族基質の位置関係によって決まるのではないかと考えられる。すなわち、マグネシウムイオンとのキレート結合を介して CsPT4 に結合しているプレニル基質から二リン酸基が脱離してプレニルカチオンが生じた際、アシルフロログルシノールの 3'位が反応ポケットに存在する触媒残基に近ければ C-プレニル化反応が、一方で 4'位が触媒残基に近ければ O-プレニル化反応が優先的に起こると考えられる。14 および 15 は 2 種の結合様式を取ることができるため、その中で基質が活性部位に結合する確率の違いが各プレニル化反応で異なる反応性を示す要因であると推察される。一方で、THDC の O-プレニル化反応が起こりにくいのは、4'位と反応する際の反応点距離が遠く、フェニルエチル基が立体障害により上手く固定されないからではないかと考えられる。C- および O-プレニル化反応のメカニズムは現在解明されていないが、C-プレニル化反応は初めにフェノール性ヒドロキシ基が脱プロトン化することによりプレニル化反応が進行する説が提唱されている⁴⁶⁾。

これまでの結果より、CsPT4 が多様な化合物を合成することが可能な酵素であることが明らかとなった。カンナビノイド類縁体の酵素合成に関しては NphB が検討されているが、GPP 以外の側鎖を有するカンナビノイド類縁体やビベンジルカンナビノイドに関しては CsPT4 が効率的に生産できると考えられる。また、フロログルシノールを芳香族基質とする植物 PT は HIPT-1 のみが報告されているが、本酵素は C-PT であり、DMAPP のみを認識する²⁴⁾。よって、O-プレニル化、あるいは長鎖プレニル基を有する

フロログルシノールの生産に関しては CsPT4 が有用であると考えられる。

本研究では、触媒効率の高い組換え CsPT4 発現系を構築することができたが、物質生産に応用するためには宿主細胞内での酵素の発現量や基質の供給量、生成物の細胞毒性など、多くの課題が残されている。一方で、CsPT4 を用いた酵素合成により長鎖アルキル基を有する **4b** および **5b** の標品を効率的に作成することが可能であったことから、CsPT4 が酵素合成に適用可能であることも示唆されたため¹⁸⁾、今後、本研究分野の進展に期待したい。

第四節 プレニル化アシルフロログルシノールの抗緊縮活性

CsPT4 の酵素反応により得られたプレニル化アシルフロログルシノールは新規化合物であり、その生物活性に興味を持たれた。そこで第二章と同様に、**14**、**15**、およびそれらの C-および O-プレニル化化合物 (**14e**, **14f**, **15e**, および **15f**) に関して、PANC-1 に対する抗緊縮活性を調査した¹⁹⁾。

試験の結果、**14** はプレニル基が存在しないにも関わらず、高い選択的細胞毒性を示した (PC₅₀ 4.4 μM)。一方で、**14** のプレニル化体である **14e** および **14f** では、それぞれ PC₅₀ 値が 2.4 μM および 2.7 μM であり、**14** と比較してわずかに活性の上昇が見られた。また **15** に関しては、プレニル化化合物である **15e** および **15f** は、それぞれ PC₅₀ 値が 4.8 μM および 0.99 μM と、**15** (PC₅₀ 14 μM) よりも高い活性を示した (表 7)。これら化合物の中でも特に注目すべきは **15f** であり、本化合物の PC₅₀ 値は第二章で試験したカンナビノイド類縁体よりも数倍低く、強力な抗緊縮活性を有する arctigenin に匹敵する活性であった。以上の結果から、CsPT4 の触媒能力により、強力な抗緊縮活性を有する抗癌リード化合物の発見に至った。

また **15f** は、プレニル化カルコンに分類される化合物である。従来の研究から、ショウガ科の薬用植物オオバンガジュツ (*Boesenbergia pandurata*) 由来の nicolaioidesin C⁴⁷⁾ や (+)-panduratin A⁴⁸⁾ などのプレニル化カルコン類 (図 38) が強力な抗緊縮活性を有しており、細胞の増殖やアポトーシスに参与する PI3K/Akt/mTOR (ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/プロテインキナーゼ B/哺乳類ラパマイシン標的タンパク質) およびオートファジーシグナル伝達経路を阻害することが報告されている。したがって、これら化合物群は医薬資源として有用であると考えられる。

さらに、抗緊縮活性を示すプレニル化カルコン類や arctigenin にはメト

キシ基が存在しているため、例えばプレニル化アシルフロログルシノールのヒドロキシ基をメチル化することで活性が上昇する可能性がある。今後、CsPT4により得られた化合物をベースとして、より高い抗緊縮活性を持つ化合物の創出につながることを期待される。

Compound	PC ₅₀ [μM] (NDM)	IC ₅₀ [μM] (DMEM)
14	4.4	> 100
15	14	> 100
14e	2.4	51
14f	2.7	94
15e	4.8	29
15f	0.99	93
Arctigenin ^a	0.82	> 100

表 7. ヒトすい臓がん細胞 PANC-1 に対する
プレニル化アシルフロログルシノールの選択的細胞毒性.

^a ポジティブコントロール.

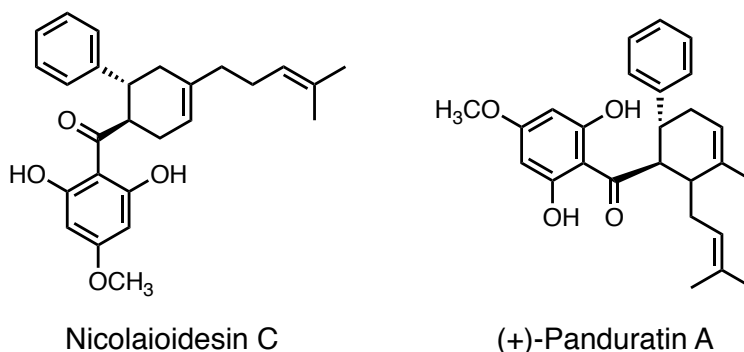


図 38. オオバンガジュツ (*Boesenbergia pandurata*) 由来の
nicolaoidesin C⁴⁷⁾ および (+)-panduratin A⁴⁸⁾ の構造.

総括

大麻が生産するカンナビノイドは多種多様な薬理活性が報告されており、近年欧米諸国を中心に医薬品として臨床応用されるなど、注目すべき化合物群である。したがって、カンナビノイドの構造多様性を拡張することは新たな医薬資源の開拓につながる重要な課題である。カンナビノイドは3段階の酵素反応により生合成され、これに関与する酵素はすべて同定されている。中でも大麻プレニル基転移酵素 CsPT4 は、カンナビノイドの基本的な炭素骨格を構築し、生物活性カンナビノイド前駆体の **1b** を合成する重要な酵素である。近年、CsPT4 はカンナビノイドの合成生物学にも応用されているが、その一方で基質特異性を含む詳細な機能解析は行われていない。そこで本研究では、CsPT4 の基質特異性を明らかとし、得られた酵素反応生成物の生物活性試験を検討した。また、CsPT4 が基質の構造に依存してプレニル化様式を変化させる、興味深い性質を見出した。

第一章では、酵母 (*P. pastoris*) 組換え CsPT4 を作製し、酵素の生化学的解析を検討した。CsPT4 の一般的性質について調査したところ、至適 pH は 8.5 で、マグネシウムイオン要求性、および 30°C で最大の活性を示し、以上の結果は既報の植物 PT と類似していた。側鎖の異なるプレニル基質を用いて CsPT4 のプレニル基質に対する特性性を検討した。その結果、CsPT4 は C₅ から C₂₀ までのプレニル基質を受容し、側鎖の異なる CBGA 類縁体 (**1a-1d**) を合成した。また、ファルネシルおよびゲラニルゲラニル基を有する CBGA 類縁体は文献未報告の新規化合物であり、それぞれ sesqui-CBGA **1c**、diterpeno-CBGA **1d** と命名した。以上の結果より、CsPT4

がプレニル基質に対して非常に寛容な酵素であることを証明した。また本研究により、CsPT4 がカンナビノイド構造にプレニル側鎖の違いをもたらす酵素であることを明らかとした。様々な側鎖構造を持つ芳香族基質を用いて CsPT4 の芳香族基質に対する特異性について検討したところ、アルキル側鎖が C₃-C₁₁ までのレゾルシノール酸 (2-5) と反応し、それぞれ 3 位ゲラニル化体 (2b-5b) を単一の生成物として合成した。また、CsPT4 はビベンジル骨格を持つ基質とも反応し、オオケビラゴケが生産するビベンジルカンナビノイドの前駆体 (6b) を合成した。さらに、GPP 以外のプレニル基質と反応性を示したレゾルシノール酸誘導体 (2-6) との組み合わせによる CsPT4 の反応性を検討したところ、ファルネシルあるいはゲラニルゲラニル化体 (2c, 2d, 3c, 6c, および 6d) を合成した。以上の結果より、CsPT4 が植物二次代謝経路の PT としては例外的に広範な基質認識能力を有していることを証明した。反応速度論解析を行った結果、CsPT4 は FPP および GGPP に高い親和性を示したものの、反応速度および反応効率は GPP が他の基質よりも明確に高い値を示した。以上のことから、CsPT4 は複数のプレニル基質と反応が可能である一方で、GPP を最適なプレニル基質として認識することが明らかとなった。また芳香族基質に関しては、2 および 6 に対する反応効率は 1 と同等あるいは高い値を示し、これら基質が 1 と同様に CsPT4 の好適な基質であることが示唆された。さらに、CsPT4 は 6 に対して高い反応効率を示したことから、本酵素が perrottetinene を含むビベンジルカンナビノイドの微生物生産に応用できる可能性が示唆された。

第二章では、CsPT4 の酵素反応により得られたカンナビノイド類縁体のヒトすい臓がん細胞 (PANC-1) に対する抗緊縮活性を検討した。試験の結

果、ほとんどのカンナビノイド類縁体が栄養欠乏条件下で選択的な細胞毒性を示し、中でも新規カンナビノイドである **sesqui-CBGA 1c** が最も高い活性 (PC_{50} 3.4 μ M) を有していた。一方で、プレニル側鎖が短い **1a** では活性が低下し、プレニル基を有さない **1** は活性が全く見られなかった。従って、プレニル基の存在が細胞毒性活性に大きく寄与しており、中でもファルネシル基が最も効果的であることが示唆された。本研究では、カンナビノイドがヒトすい臓がん細胞に対して抗緊縮活性を示すことを初めて証明した。

第三章では、レゾルシノール酸の構造異性体であるアシルフロログルシノール誘導体 (**14-16**) を用いて CsPT4 の基質特異性について再検討した。GPP を共基質とした酵素反応を行った結果、CsPT4 は **14** および **15** の両基質から 2 種の生成物を合成し、各生成物は C-および O-プレニル化化合物 (**14e, 14f, 15e, および 15f**) であることが明らかとなった。一方で **16** に対して反応性は示さなかった。以上から、CsPT4 が基質を認識する条件として、1) レゾルシノール骨格を有すること、2) カルボキシ基あるいはカルボニル基を有すること、3) 一定以上のサイズの側鎖構造を有することが必要であることが示唆された。さらに CsPT4 は、アシルフロログルシノール誘導体との反応において GPP 以外にも FPP を受容し、それぞれ 2 種のモノファルネシル化化合物を合成することが示唆された。一方で、DMAPP および GGPP との反応では生成物は確認されず、**14** および **15** と併用する基質としては適切ではないことが明らかとなった。本実験により、CsPT4 はレゾルシノール酸を基質とした場合、3 位で位置選択的な C-プレニル化反応を触媒するが、アシルフロログルシノールを基質とした場合、C-および O-プレニル化を触媒するという活性を有していることが明らかとなっ

た。以上のことから、CsPT4 が基質の構造に依存してプレニル化様式を変化させる酵素であることを明らかとした。このような特徴を持つ植物 PT は初めての報告である。反応速度論解析を行った結果、各基質はプレニル様式の違いによって反応効率に差が表れた。すなわち、CsPT4 は **14** を用いた反応では *O*-プレニル化反応を、**15** を用いた反応では *C*-プレニル化反応を優先的に触媒することが明らかとなった。第三章で得られたプレニル化アシルフロログルシノールに関しても生物活性に興味を持たれた。そこで、第二章と同様に、ヒトすい臓がん細胞 (PANC-1) に対する抗緊縮活性を調査した。いずれの化合物も高い抗緊縮活性を示し、中でも、*O*-ゲラニル化化合物である **15f** の PC₅₀ 値 (0.99 μM) はカンナビノイド類縁体よりも数倍低く、ポジティブコントロールである arctigenin に匹敵する活性であった。以上のことから、CsPT4 の触媒能力により、強力な抗緊縮活性を有する抗癌リード化合物の発見に至った。また、**15f** が属するカルコン類は、有用な医薬資源になりうることが示唆された。

本研究では、大麻プレニル基転移酵素 CsPT4 が広範な基質認識能力を有するだけでなく、基質構造に依存してプレニル化様式を変化させる興味深い性質を見出した。また、カンナビノイド類縁体およびプレニル化アシルフロログルシノールがヒトすい臓がん細胞 (PANC-1) に対して抗緊縮活性を示すことを明らかとした。今後、CsPT4 が物質生産等のバイオテクノロジーに応用され、多数の天然および非天然化合物の創出に繋がることが期待される。

実験項

第一章に関する実験

1. 試薬

特に指定のない限り、全ての試薬は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。Olivetolic acid (1), olivetol (7), DMAPP, GPP, FPP, および GGPP は Sigma-Aldrich から購入した。GFPP は文献⁴⁹⁾に従い合成されたものを新潟大学大学院農学研究科の佐藤努教授よりご恵与いただいた。Divarinol、5-heptylbenzene-1,3-diol、および 6-phenyl-2,4-hexanedione は、Enamine (Kiev, Ukraine) から、Divarinic acid 2 は Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) から、また Ethyl orsellinate は東京化成工業株式会社から購入した。

2. 分析機器

HPLC はポンプとして Hitachi Chromaster 5110 HPLC system を、UV 検出器として Hitachi Chromaster 5410 を使用した。分析用カラムは Cosmosil 5C₁₈-MS-II カラム (4.6 mm I.D. × 150 mm, Nacalai Tesque) を使用した。溶媒には formic acid (0.1%) を含む MeCN を使用した。MeCN の濃度は図 6, 10–12, 14–18, 19–23, および 34–37 に示した。生成物は 280 nm で分析した。LC-MS は質量分析装置として LTQ Orbitrap XL ETD Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Scientific)、PDA 検出器として Accela PDA detector (Thermo Scientific)、LC ポンプとして Accela 600 pump (Thermo Scientific) を用いた。移動相は HPLC 分析で使用したものと同様の条件で行い、カラムは Cosmosil 5C₁₈-MS-II (2.0 mm I.D. × 150 mm, Nacalai Tesque) を用いた。分取 HPLC は、Cosmosil 5C₁₈-MS-II (10 mm I.D. × 250 mm, Nacalai Tesque) または Cosmosil Cholester (10 mm I.D. × 250 mm, Nacalai Tesque) のカラムを用いて行った。

3. 菌株

クローニングに使用した大腸菌の遺伝子型は以下の通りである。

DH5 α : F⁻, Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (r_K⁻, m_K⁺), *phoA*, *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

組換え酵素の発現にはメチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* KM71H (Invitrogen) を用いた。KM71H: *aox1:: ARG4*, *arg4*

4. CsPT4 遺伝子の大腸菌への形質転換

大腸菌の培養には LB 培地を用いた。

LB 培地

1% Tryptone

0.5% Yeast extract

0.5% NaCl

以下、4-1 から詳細な操作について記載する。

4-1. CsPT4 の cDNA 断片の PCR による増幅

CsPT4 をコードする DNA 断片 (Genbank: BK010648.1) を Integrated DNA Technologies 社により購入し PCR 鋳型として用いた (図 39)。トランジットペプチドを除いた CsPT4 のコード領域 (235 番目から 1194 番目に対応する塩基配列) を、以下に示すプライマーおよび KOD-Plus-Neo (TAKARA Bio) を用いた PCR により増幅した。PCR は以下の条件で行った。

PCR 条件

40 cycles of (98°C 15 s, 60°C 30 s, 68°C 45 s)

プライマー

CsPT4-Fw: CAACTAATTATTCGAAACGATGGGTAGCGATCAAA

CsPT4-Rv: GATGATGATGGTCGACTTATATAAATACATATACA

4-2. PCR 産物の精製

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を用いて、プロトコルに従って操作を行った。

4-3. PCR 産物の pPICZA vector へのクローニング

ベクターを制限酵素 *Bsp*T104I, *Sal* I (TAKARA Bio) で切断し、In-Fusion® HD Cloning Kit (TAKARA Bio) を用いて PCR 産物を pPICZA へ組み込み、DH5αコンピテントセルへ形質転換した。制限酵素および In-Fusion 反応はメーカーの定める方法に従った。

4-4. 塩基配列の確認

プラスミド DNA を鋳型とし、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサンプルを調製した。塩基配列の決定は Model 3500 Genetic analyzer (PE Biosystems) により行った。

ATGGGACTCTCATTAGTTGTACCTTTTCATTTCAAACTAATTATCATACTTTATTAAC 60
M G L S L V C T F S F Q T N Y H T L L N 20
CCTCATAATAAGAATCCCAAAAACACTATTATTATCTTATCAACACCCCAAAACACCAATA 120
P H N K N P K N S L L S Y Q H P K T P I 40
ATTAAATCCTCTTATGATAATTTCCCTCTAAATATTGCTTAACCAAGAACTTTTCATTTA 180
I K S S Y D N F P S K Y C L T K N F H L 60
CTTGGACTCAATTCACACAACAGAATAAGCTCACAATCAAGGTCCATTAGGGCAGGTAGC 240
L G L N S H N R I S S Q S R S I R A G S 80
GATCAAATGAAGGTTCTCCTCATCATGAATCTGATAATTCAATAGCAACTAAAATTTTA 300
D Q I E G S P H H E S D N S I A T K I L 100
AATTTTGGACATACTTGTGGAAACTTCAAAGACCATATGTAGTAAAAGGGATGATTCA 360
N F G H T C W K L Q R P Y V V K G M I S 120
ATCGCTTGTGGTTTGTGGGAGAGAGTTGTTCAATAACAGACATTTATTCAGTTGGGGT 420
I A C G L F G R E L F N N R H L F S W G 140
TTGATGTGGAAGGCATTCTTTGCTTTGGTGCCTATATTGCCTTCAATTTCTTTGCAGCA 480
L M W K A F F A L V P I L S F N F F A A 160
ATCATGAATCAAATTTACGATGTGGACATCGACAGGATAAAACAAGCCTGATCTACCACTA 540
I M N Q I Y D V D I D R I N K P D L P L 180
GTTTCAGGGGAAATGTCAATTGAAACAGCTTGGATTTTGAGCATAAATTGTGGCACTAACT 600
V S G E M S I E T A W I L S I I V A L T 200
GGGTTGATAGTAACTATAAAAATTGAAATCTGCACCACTTTTTGTTTTCATTTACATTTTT 660
G L I V T I K L K S A P L F V F I Y I F 220
GGTATATTTGCTGGGTTTGCCTATTCTGTTCCACCAATTAGATGGAAGCAATATCCTTTT 720
G I F A G F A Y S V P P I R W K Q Y P F 240
ACCAATTTTCTAATTACCATATCGAGTCATGTGGGCTTAGCTTTCACATCATATTCTGCA 780
T N F L I T I S S H V G L A F T S Y S A 260
ACCACATCAGCTCTTGGTTTACCATTTGTGTGGAGGCTGCTTTTAGTTTCATCATAGCA 840
T T S A L G L P F V W R P A F S F I I A 280
TTCATGACAGTTATGGGTATGACTATTGCTTTTGCCAAAGATATTTTCAGATATTGAAGGC 900
F M T V M G M T I A F A K D I S D I E G 300
GACCCAAATATGGGGTATCAACTGTTGCAACCAAATTAGGTGCTAGGAACATGACATTT 960
D A K Y G V S T V A T K L G A R N M T F 320
GTTGTTTCTGGAGTTCTTCTCTAAACTACTTGGTTTCTATATCTATTGGGATAAATTTGG 1020
V V S G V L L L N Y L V S I S I G I I W 340
CCTCAGGTTTTCAAGAGTAACATAATGATACTTTCTCATGCAATCTTAGCATTTTGCTTA 1080
P Q V F K S N I M I L S H A I L A F C L 360

ATCTTCCAGACTCGTGAGCTTGCTCTAGCAAATTACGCCTCGGCGCCAAGCAGACAATTC	1140
I F Q T R E L A L A N Y A S A P S R Q F	380
TTCGAGTTTATCTGGTTGCTATATTATGCTGAATACTTTGTATATGTATTTATATA <u>A</u>	1197
F E F I W L L Y Y A E Y F V Y V F I *	398

図 39. CsPT4 の塩基配列およびアミノ酸配列.^a

^a Genbank: BK010648.1

塩基配列は CsPT4 の open reading frame を示している (下線: 開始コドン, 二重下線: 終始コドン). トランジットペプチドを除いた成熟タンパクを Gly (赤マーカ) から Ile まで増幅した (235-1194). トランジットペプチドは Chloro P ソフトウェア ver 1.1 を用いて推定した。

5. 酵母への形質転換

5-1. プラスミドの線状化

4-4 で得られた塩基配列の正しい cDNA を含むプラスミド DNA を、メーカーの定める操作により *Sac* I (TAKARA Bio) で切断した。アガロース電気泳動で完全切断を確認した後、Nucleospin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を用いて精製および濃縮を行った。

5-2. *Pichia pastoris* コンピテントセルの作製と形質転換

YPD 100 mL に KM71H 株を植菌し、OD₆₀₀ が 1.2 になるまで培養した。2,000 × g, 4°C, 5 分の遠心で集菌後、0.2 M HEPES を含む YPD 培地 10 mL で 1 回、滅菌蒸留水で 2 回、さらに 1M sorbitol で 1 回洗浄し、200 μl の 1M sorbitol に懸濁したものをコンピテントセルとした。

5-1 で調製した線状化 DNA 10 μg とコンピテントセル 80 μl を混合し、冷却した 0.2 cm electroporation cuvette (Bio-Rad) に移し、氷上で 5 分間インキュベートした。

Bio-Rad Micropulser を用い、2 kV, 1 pulse の条件でエレクトロポレーションを行い、1M sorbitol 1 mL を加えて 30°C で 2 時間インキュベートした。組換え体は 100 μg/mL のゼオシンを含む YPD プレートで選抜した。

YPD 培地

1% Yeast extract

2% Peptone

20% Dextrose

5-3. 組換え CsPT4 の酵母での発現および抽出

培養法は Weis らの方法で行った²¹⁾。5-2 で得られた酵母 (*Pichia pastoris*) 組換え体を BMD (10 mL) に接種し、60 時間後に BMM 2 (10 mL)、BMM 2 添加から 10 時間後に BMM 10 (2 mL)、その後 BMM 2 添加後から 24 時間おきに BMM 10 (2 mL) を加えた。96 時間後タンパク抽出を開始した。なお、タンパク抽出までの間、25°C で振盪培養を続けた。

培養に用いた培地は以下の通りである。

BMD (buffered minimal dextrose) 培地

1.34% Yeast nitrogen base (w/o amino acids)
200 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.0)
 $4 \times 10^{-5}\%$ D-biotin
10 g/L Glucose

BMM 2 (buffered minimal methanol 2) 培地

1.34% Yeast nitrogen base (w/o amino acids)
200 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.0)
 $4 \times 10^{-5}\%$ D-biotin
1% Methanol

BMM 10 (buffered minimal methanol 10) 培地

1.34% Yeast nitrogen base (w/o amino acids)
200 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.0)
 $4 \times 10^{-5}\%$ D-biotin
5% Methanol

培養液を 4°C、10,000 rpm で 5 分間遠心後、ペレットを蒸留水で洗浄した。Zymolyase-20T (Nacalai Tesque) で細胞壁を溶菌し、ガラスビーズ (アズワン株式会社) を用いて細胞を破碎後、100,000 × g, 30 分で超遠心を 2 回行うことでマイクロソーム画分を調製した。得られたマイクロソームを下記に示すアッセイバッファーに懸濁し、粗酵素として酵素反応に用いた。

アッセイバッファー

Tris-HCl buffer (pH 8.5)	100 mM
MgCl ₂	5 mM
2-Mercaptoethanol	1 mM

6. 標準反応条件

下記の基質溶液に 10 µg のタンパク質を含むマイクロソーム画分を加え、30°C で 5 分間インキュベートした後、メタノール (100 µl) を加えて反応を停止させた。次いで、反応液 (50 µl) を HPLC に付して生成物を分析した。反応液は HPLC および LC-ESI-MS で解析した。

基質溶液の組成 (終濃度)

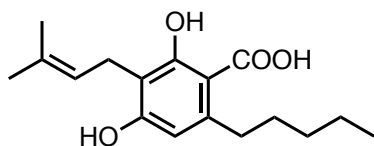
Olivetolic acid (or other aromatic substrates) in DMSO	100 µM
GPP (or other prenyl substrates) in 1 mM Tris-HCl buffer pH 9.0	100 µM
MgCl ₂	5 mM
Tris-HCl buffer (pH 8.5)	100 mM
Total volume	100 µL

7. 基質特異性の検討

7-1. 基質および生成物アナログの有機合成と解析データ

1b は当研究室で保存されていたものを使用した⁵⁰⁾。6-Heptyl-resorcylic acid (**3**), 6-nonyl-resorcylic acid (**4**), および 6-undecyl-resorcylic acid (**5**) は確立された手法に従い合成した^{51,52)}。核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、JEOL ECX-400P Delta or JEOL ECA500II (Japan Electron Optics Laboratory Ltd.) を用いて得た。化合物は chloroform-*d* (CDCl₃) に溶解した。合成した化合物の化学構造は ¹H および ¹³C NMR で確認した。既知化合物 **1a**, **2b–6b**, **6** の化学シフトは文献値と一致することを確認した (図 S1–S22)^{25,53–55)}。新規化合物である **1c** および **1d** の構造は ¹H および ¹³C NMR 実験に加え、HMQC および HMBC 実験からの追加情報を用いて帰属した。HRMS (ESI) は、LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Fisher Scientific) を用いて得た。各種 NMR データは巻末に収載している (図 S1–S22)。

3-Dimethylallyl-OA **1a**

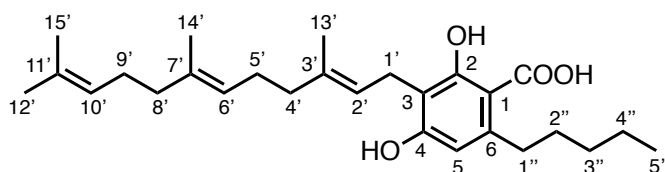


p-Toluenesulfonic acid (PTSA) を酸触媒とした **1** および prenol (Sigma-Aldrich) の縮合反応により合成した (図 40)⁵⁶⁾。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 20:1) および分取 HPLC (MeOH/MeCN/H₂O 60/5/35, flow rate = 3.0 mL/min, λ = 280 nm) による精製後、**1a** (white solid, 1.9 mg, yield: 1.5%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 11.94 (brs, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.29–5.26 (m, 1H), 3.42 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.89–2.86 (m, 2H), 1.82 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.60–1.54 (m, 2H), 1.37–1.33 (overlapped m, 4H), 0.93–0.88 (m, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C

174.9, 163.6, 160.1, 147.2, 135.3, 121.4, 111.6, 111.0, 103.1, 36.5, 32.0, 31.4, 25.8, 22.5, 22.1, 17.9, 14.1. (☒ S1, S2); HRMS (ESI) m/z : $[M - H]^-$ Calcd for $C_{17}H_{23}O_4$ 291.1596; Found 291.1596; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 × 150 mm), MeCN/H₂O 60/40, flow rate = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, t_R = 7.3.

Sesqui-CBGA **1c**

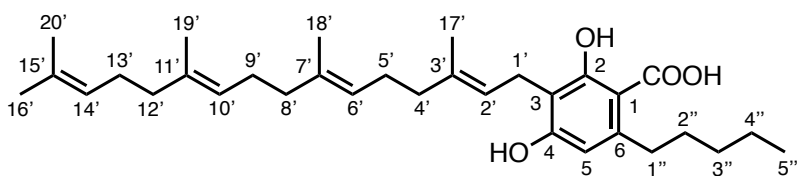


PTSA を酸触媒とした **1** および farnesol (Sigma-Aldrich) の縮合反応により合成した (☒ 40) ⁵⁶). 粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 20:1) および分取 HPLC (MeOH/MeCN/H₂O 90/5/5, flow rate = 3.0 mL/min, λ = 280 nm) による精製後、**1c** (white solid, 6.9 mg, yield: 0.9%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 11.91 (brs, 1H, COOH), 6.27 (s, 1H, H-5), 5.29 (td, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H, H-2'), 5.10–5.06 (overlapped m, 2H, H-6' and H-10'), 3.44 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-1'), 2.87 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H-1''), 2.13–1.95 (overlapped m, 8H, H-4', H-5', H-8' and H-9'), 1.82 (s, 3H, H-13'), 1.67 (s, 3H, H-12'), 1.59 (s, 3H, H-14'), 1.59 (s, 3H, H-15'), 1.63–1.54 (m, 2H, H-2''), 1.37–1.33 (overlapped m, 4H, H-3'' and H-4''), 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H-5''); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 175.1 (COOH), 163.6 (C-2), 160.5 (C-4), 147.3 (C-6), 139.2 (C-3'), 135.6 (C-7'), 131.3 (C-11'), 124.4 (C-10'), 123.5 (C-6'), 121.3 (C-2'), 111.4 (C-3), 111.2 (C-5), 103.0 (C-1), 39.7 (C-4'), 39.6 (C-8'), 36.6 (C-1''), 32.0 (C-3''), 31.4 (C-2''), 26.6 (C-5'), 26.3 (C-9'), 25.7 (C-12'), 22.5 (C-4''), 22.1 (C-1'), 17.7 (C-15'), 16.3 (C-13'), 16.0 (C-14'), 14.1 (C-5''). (☒ S3–S6); HRMS (ESI) m/z : $[M - H]^-$ Calcd for $C_{27}H_{39}O_4$ 427.2848; Found 427.2849; analytical HPLC: Cosmosil

5C₁₈-MS-II (4.6 × 150 mm), MeCN/H₂O 85/15, flow rate = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, t_R = 8.0.

Diterpeno-CBGA **1d**



PTSA を酸触媒とした **1** および geranylgeraniol (Sigma-Aldrich) の縮合反応により合成した (図 40) ⁵⁶). 粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 50:1) および分取 HPLC (MeOH/MeCN 95/5, flow rate = 2.0 mL/min, λ = 280 nm) による精製後、**1d** (white solid, 7.9 mg, yield: 0.6%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 6.27 (s, 1H, H-5), 5.29 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-2'), 5.11–5.06 (overlapped m, 3H, H-6', H-10' and H-14'), 3.43 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-1'), 2.88 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-1''), 2.13–1.96 (overlapped m, 12H, H-5', H-6', H-8', H-9', H-12' and H-13'), 1.82 (s, 3H, H-17'), 1.68 (s, 3H, H-18'), 1.64–1.56 (m, 2H, H-2''), 1.59 (s, 9H, H-16', H-19' and H-20'), 1.36–1.33 (overlapped m, 4H, H-3'' and H-4''), 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-5''). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 163.6 (C-2), 160.5 (C-4), 147.3 (C-6), 139.3 (C-3'), 135.6 (C-7'), 134.9 (C-11'), 131.3 (C-15'), 124.4 (C-14'), 124.2 (C-10'), 123.6 (C-6'), 121.2 (C-2'), 111.4 (C-3), 111.2 (C-5), 103.0 (C-1), 39.7 (C-4'), 39.6 (C-8'), 36.6 (C-1''), 32.0 (C-3''), 31.4 (C-2''), 29.7 (C-12'), 26.8 (C-5'), 26.6 (C-9'), 26.3 (C-13'), 25.7 (C-16'), 22.5 (C-4''), 22.1 (C-1'), 17.7 (C-20'), 16.3 (C-17'), 16.1 (C-18'), 16.0 (C-19'), 14.1 (C-5''). (図 S7–S10); HRMS (ESI) *m/z*: [M - H]⁻ Calcd for C₃₂H₄₇O₄ 495.3474; Found 495.3468; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 × 150 mm), MeCN/H₂O 95/5, flow rate = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, t_R = 7.3.

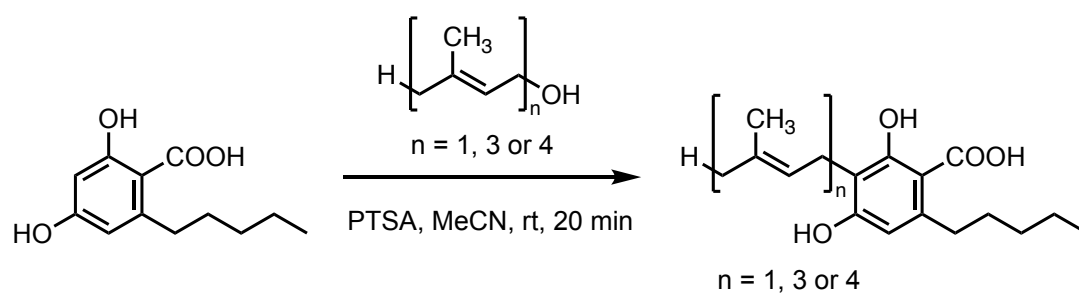
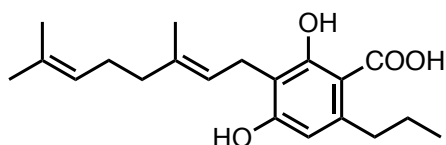


図 40. **1a**, **1c**, および **1d** の合成スキーム.

Cannabigerovarinic acid **2b**



PTSA を酸触媒とした divarinol および geraniol の縮合反応により cannabigerovarin を合成した⁵⁶⁾。次いで、*N,N*-dimethylformamide (DMF) に methyl magnesium carbonate (MMC) を懸濁し、先に得られた cannabigerovarin を添加して 130°C で 1 時間還流し、カルボキシル化反応を行った (図 41)⁵⁷⁾。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 20:1) および分取 HPLC (MeOH/MeCN/H₂O 90/5/5, flow rate = 3.0 mL/min, λ = 280 nm) による精製後、**2b** (white solid, 18.5 mg, yield: 2.0%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 6.27 (s, 1H), 5.28 (td, *J* = 6.8, 0.8 Hz, 1H), 5.07–5.04 (m, 1H), 3.43 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.87 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.14–2.04 (overlapped m, 4H), 1.81 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.62–1.56 (m, 2H), 1.59 (s, 3H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 175.2, 163.6, 160.4, 146.9, 139.2, 132.0, 123.7, 121.3, 111.5, 111.3, 103.2, 39.7, 38.6, 26.4, 25.7, 24.8, 22.1, 17.7, 16.2, 14.3. (図 S11, S12); HRMS (ESI) *m/z*: [M - H]⁻ Calcd for C₂₀H₂₇O₄ 331.1909; Found 331.1906; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 × 150 mm), MeCN/H₂O 65/35, flow rate = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, *t_R* = 8.4.

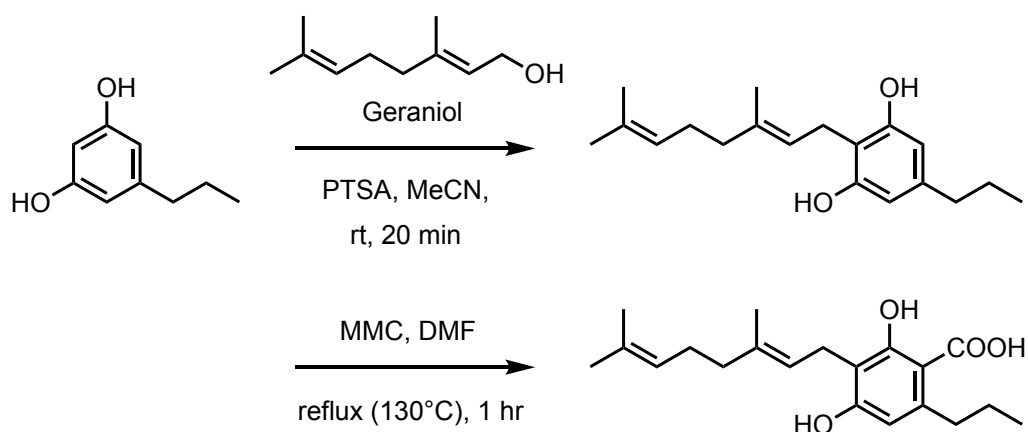
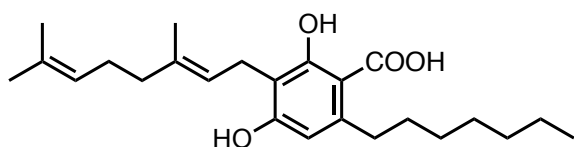


図 41. **2b** の合成スキーム.

Cannabigerophoric acid **3b**



1,2-Dichloroethane (DCE) に 5-heptylbenzene-1,3-diol と geraniol を添加し、Al₂O₃ (acidic) 存在下で 6 時間還流することにより cannabigerophorol を合成した⁵³⁾。次いで、DMF に MMC を懸濁し、先に得られた cannabigerophorol を添加して 130°C で 1 時間還流し、カルボキシル化反応を行った (図 42)⁵⁷⁾。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 20:1) および分取 HPLC (MeOH/MeCN/H₂O 90/5/5, flow rate = 4.0 mL/min, λ = 280 nm) による精製後、**3b** (white solid, 2.2 mg, yield: 0.6%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 6.27 (s, 1H), 5.28 (td, *J* = 7.2, 1.0 Hz, 1H), 5.07–5.04 (m, 1H), 3.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.88 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.13–2.04 (overlapped m, 4H), 1.81 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.57–1.53 (m, 2H), 1.34–1.28 (overlapped m, 8H), 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 175.0, 163.6, 160.4, 147.3, 139.2, 132.0, 123.7, 121.3, 111.5, 111.2, 103.1, 39.7, 36.6, 31.8, 31.8, 29.8, 29.1, 26.4, 25.7, 22.7, 22.1, 17.7, 16.2, 14.1. (図 S13, S14); HRMS (ESI) *m/z*: [M - H]⁻ Calcd for

$C_{24}H_{35}O_4$ 387.2535; Found 387.2539; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 × 150 mm), MeCN/H₂O 80/20, flow rate = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, t_R = 7.1.

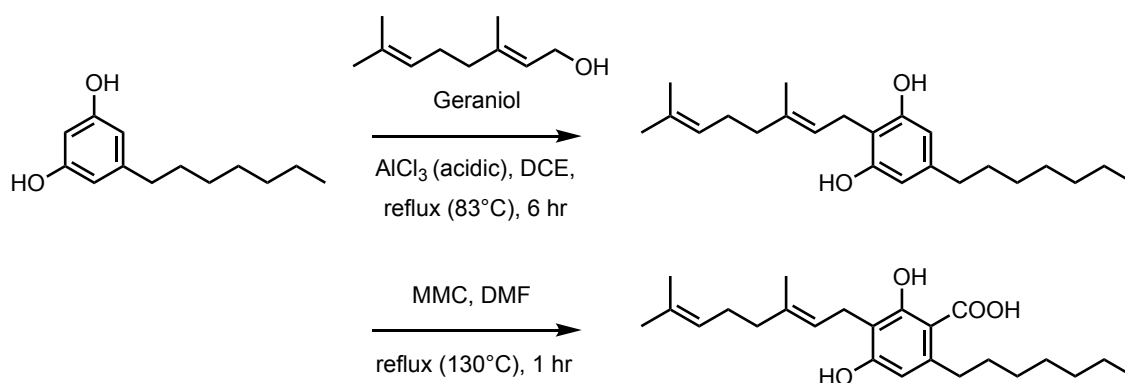
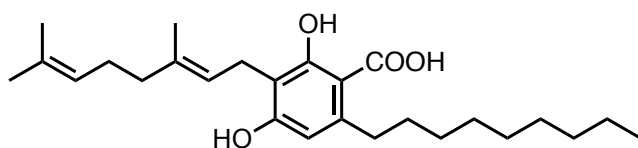


図 42. **3b** の合成スキーム.

3-Geranyl-6-nonylresorcylic acid **4b**

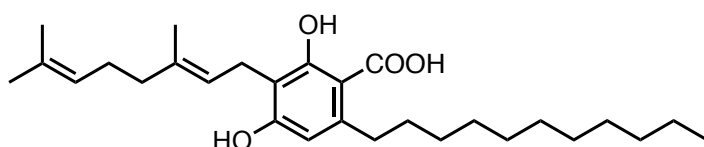


4 および GPP を基質とした CsPT4 の酵素反応により合成した (図 43)¹⁸⁾。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 30:1) および分取 HPLC (MeOH/MeCN 95/5, flow rate = 3.5 mL/min, λ = 280 nm) による精製後、**4b** (white solid, 3.2 mg, yield: 37%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 11.94 (brs, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.28 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 5.07–5.04 (m, 1H), 3.43 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.88 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.13–2.05 (overlapped m, 4H), 1.81 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.62–1.54 (m, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.38–1.23 (overlapped m, 12H), 0.87 (t, J = 7.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C 175.3, 163.6, 160.5, 147.3, 139.2, 132.1, 123.7, 121.3, 111.4, 111.2, 103.0, 39.7, 36.6, 31.9, 31.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.3, 26.3, 25.7, 22.7, 22.1, 17.7, 16.2, 14.1. (図 S15, S16); HRMS (ESI) m/z : [M - H]⁻ Calcd for C₂₆H₃₉O₄ 415.2848; Found 415.2849; analytical HPLC:

Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 × 150 mm), MeCN/H₂O 85/15, flow rate = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, t_R = 7.6.

3-Geranyl-6-undecylresorcylic acid **5b**



5 および GPP を基質とした CsPT4 の酵素反応により合成した (図 43)¹⁸⁾。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 30:1) および分取 HPLC (MeOH/MeCN 95/5, flow rate = 4.0 mL/min, λ = 280 nm) による精製後、**5b** (white solid, 2.4 mg, yield: 24%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 12.00 (brs, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.28 (td, *J* = 7.0, 1.0 Hz, 1H), 5.07–5.04 (m, 1H), 3.43 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.87 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 2.13–2.05 (overlapped m, 4H), 1.81 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.58–1.51 (m, 2H), 1.35–1.26 (overlapped m, 16H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C 174.9, 163.6, 160.4, 147.2, 139.2, 132.7, 123.7, 121.3, 111.4, 111.1, 103.1, 39.7, 36.6, 31.9, 31.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 26.3, 25.7, 22.7, 22.1, 17.7, 16.2, 14.1. (図 S17, S18); HRMS (ESI) *m/z*: [M - H]⁻ Calcd for C₂₈H₄₃O₄ 443.3161; Found 443.3162; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 × 150 mm), MeCN/H₂O 90/10, flow rate = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, t_R = 8.3.

酵素合成の反応条件

Tris-HCl buffer (pH 8.5)	100 mM
MgCl ₂	5 mM
5 or 6 in DMSO	100 μM
GPP in 1 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)	3 mM
Microsomal protein (CsPT4)	800 μg
Total volume	10 mL

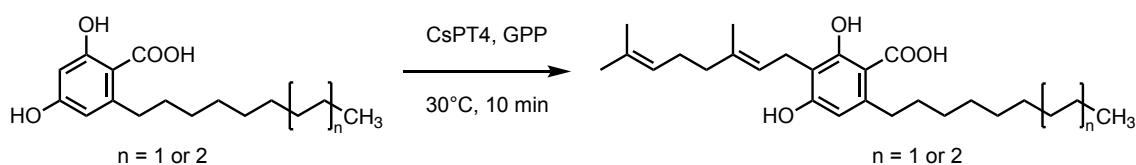
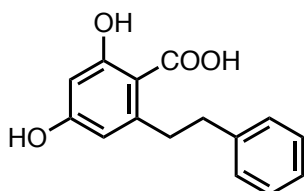


図 43. **4b** および **5b** の酵素合成スキーム.

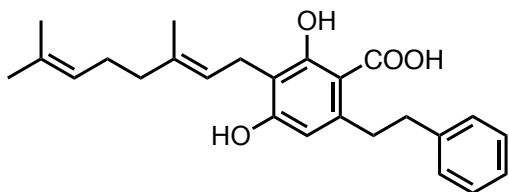
2,4-Dihydroxy-6-phenylethylbenzoic acid **6**



文献に従って⁵⁴⁾ 6-phenyl-2,4-hexanedione から合成されたものを、大阪市立大学理学研究科の品田哲郎教授にご恵与いただいた。

6 (white solid, 4.2 mg, yield: 1.5%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 7.31–7.19 (overlapped m, 5H), 6.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.25–3.22 (m, 2H), 2.92–2.89 (m, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C 173.5, 166.5, 161.2, 148.7, 141.7, 128.4, 126.0, 111.3, 103.6, 38.7, 38.0. (図 S19, S20); HRMS (ESI) *m/z*: [M - H]⁻ Calcd for C₁₅H₂₉O₄ 257.0814; Found 257.0815; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 × 150 mm), MeCN/H₂O 75/25, flow rate = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, *t*_R = 2.1.

3-Geranyl-2,4-dihydroxy-6-phenylethylbenzoic acid **6b**



文献に従って⁵⁵⁾ ethyl orsellinate から合成されたものを、大阪市立大学理学研究科の品田哲郎教授にご恵与いただいた。

6b (white solid, 21.5 mg, yield: 13%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 11.93 (brs, 1H), 7.31–7.19 (overlapped m, 5H), 6.28 (s, 1H), 5.29 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 5.08–5.05 (m, 1H), 3.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.23–3.19 (m, 2H), 2.91–2.88 (m, 2H), 2.14–2.06 (overlapped m, 4H), 1.82 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.60 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C 175.5, 163.7, 160.7, 146.0, 141.9, 139.3, 132.1, 128.4, 128.4, 128.4, 128.4, 125.9, 123.7, 121.1, 111.9, 111.5, 103.1, 39.7, 38.7, 38.1, 26.3, 25.7, 22.1, 17.7, 16.2. (図 S21, S22); HRMS (ESI) *m/z*: [M - H]⁻ Calcd for C₂₅H₂₉O₄ 393.2066; Found 393.2060; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 × 150 mm), MeCN/H₂O 75/25, flow rate = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, *t*_R = 6.1.

7-2. 酵素反応と酵素反応生成物の HPLC および LC-ESI-MS 分析

酵素反応は 6 に記載した標準反応条件で行い、生成物は 2 に記載した HPLC および LC-ESI-MS で分析した。

8. 反応速度論解析

酵素反応は 6 に記載した標準反応条件で行った。芳香族基質 (1–6) は 100 μM の GPP 存在下で、プレニル基質 (DMAPP, GPP, FPP, および GGPP) は 100 μM の 1 存在下で酵素反応を行った。生成物は HPLC で定量し、GraphPad Prism9 (GraphPad Software, USA) で各種反応速度定数を計算した (図 44)。以下に使用した基質の濃度を記載する。

反応速度論解析で使用した基質濃度 (終濃度 in DMSO)

1: 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, and 300 μM

2: 1, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, and 400 μM

3: 5, 10, 25, 50, 100, 150, and 200 μM

4: 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, and 80 μM

5: 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 30, and 40 μM

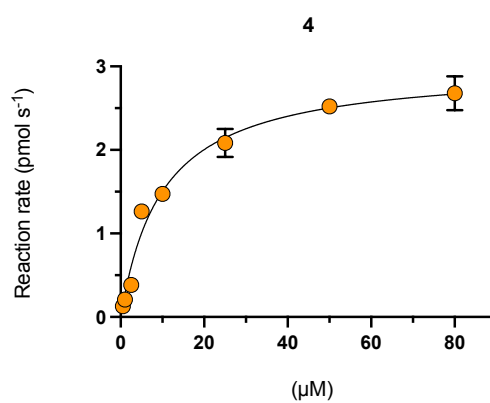
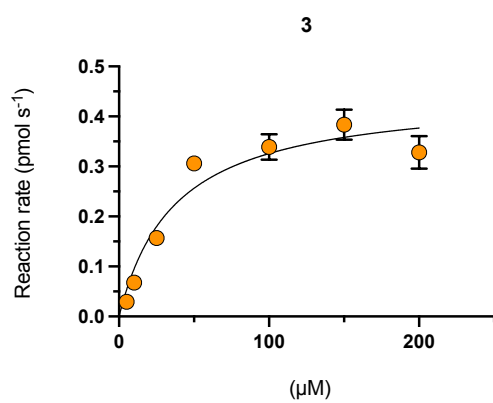
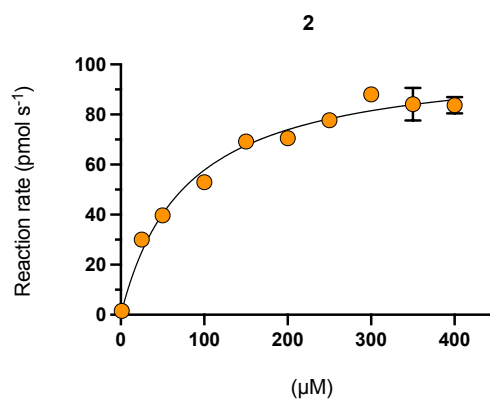
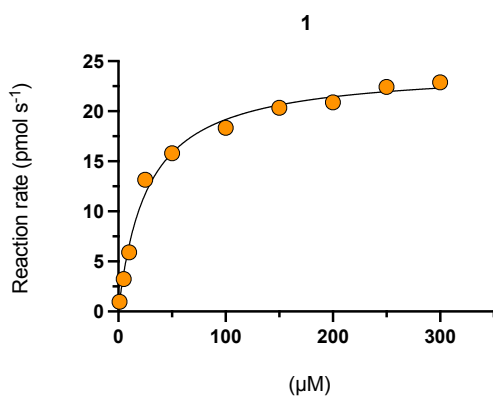
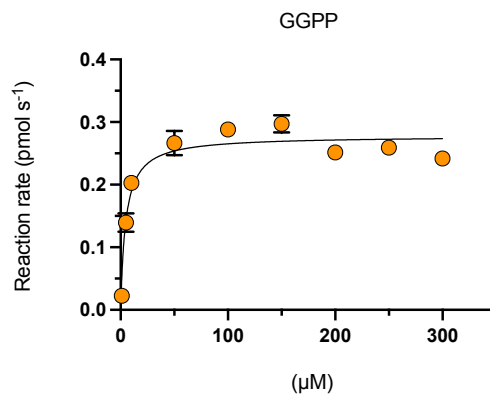
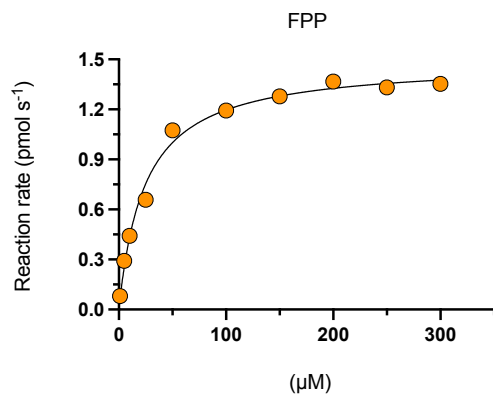
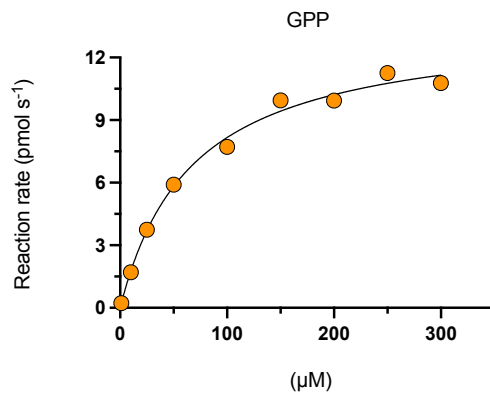
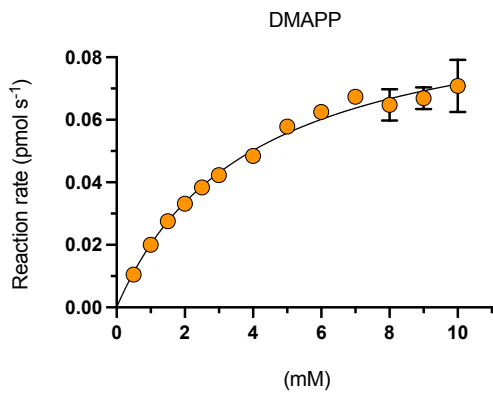
6: 1, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, and 400 μM

GPP: 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, and 300 μM

DMAPP: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 mM

FPP: 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, and 300 μM

GGPP: 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, and 300 μM



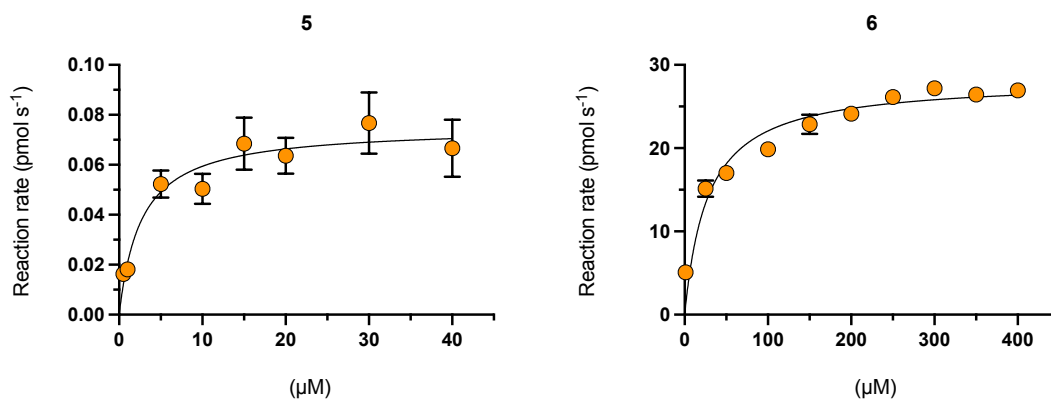


図 44. プレニルおよび芳香族基質に対する CsPT4 の反応速度論解析.

各反応 (1, 6, 14, および 15) は共基質として 1 (GPP, FPP, GGPP, および DMAPP) あるいは GPP (1-6) 存在下で行った.

3 回測定したデータを平均値 \pm SD で表した (n = 3).

第二章に関する実験

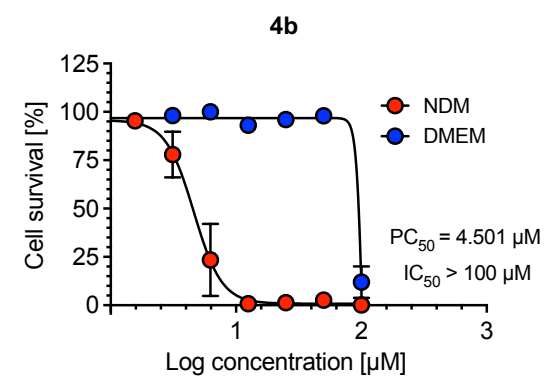
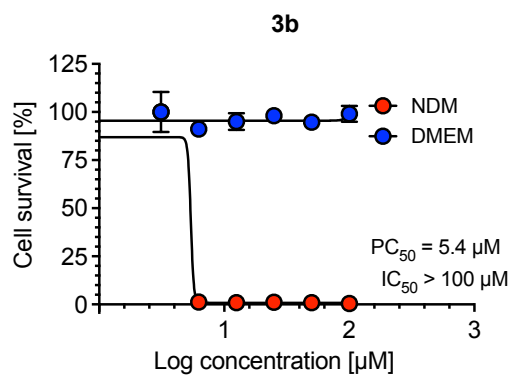
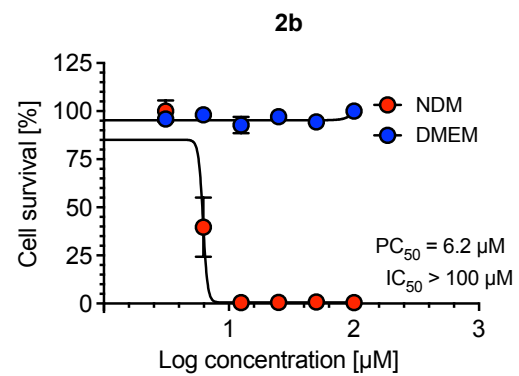
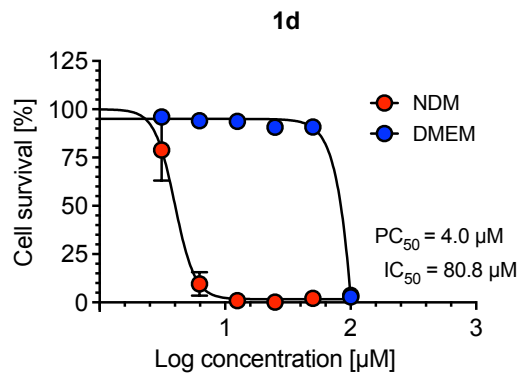
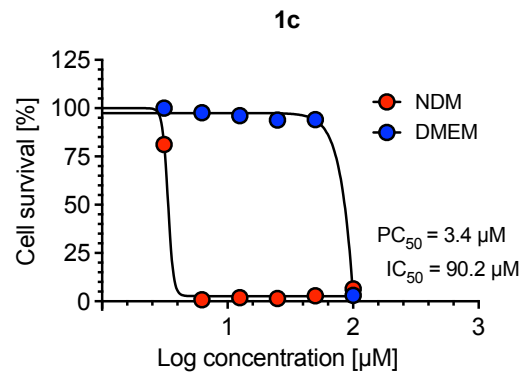
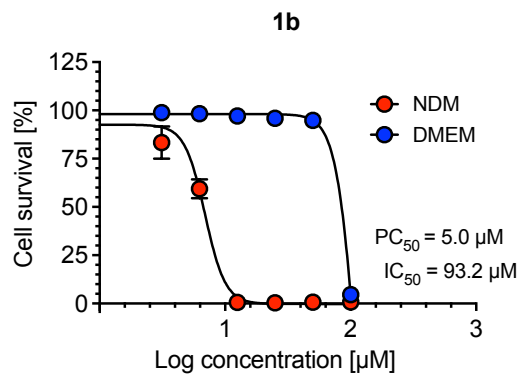
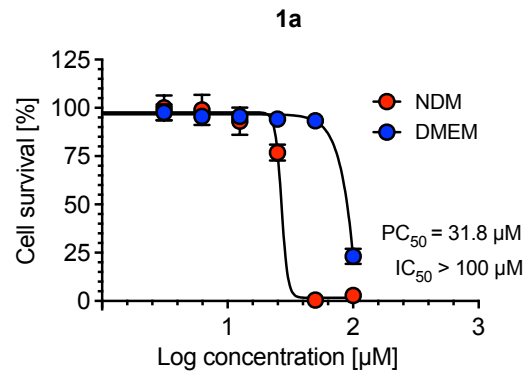
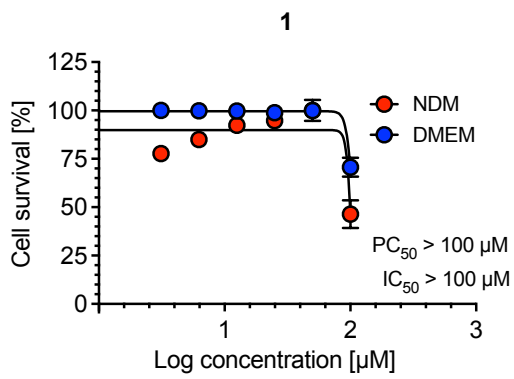
1. PANC-1 細胞に対する Preferential cytotoxicity assay

本実験は、本学薬学部和漢医薬学総合研究所・天然薬物開発研究室の Suresh Awale 准教授ならびに Sun Sijia 博士に依頼し、既存の方法³⁶⁾で行われた。以下、概要について記載する。

PANC-1 細胞 (RBRC-RCB2095) は理化学研究所バイオリソース研究センター (Riken BRC) の細胞材料開発室から入手し、10%ウシ胎児血清を含む標準ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) で維持した。細胞は、5% CO₂ 条件下、37°Cで保存した。細胞を DMEM 中の 96-well plate (2 × 10⁴ cells/well) に播種し、24 時間培養した。その後、細胞をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄し、100 μM から 0.05 μM の範囲で連続希釈したサンプルを含む DMEM または栄養欠乏培地 (nutrient-deprived medium: NDM) で処理した。試験サンプルは、dimethyl sulfoxide 中の 10 mM サンプルから調製した。その後、細胞をさらに 24 時間培養した。培地を 10% WST-8cell counting kit 溶液 (同仁化学研究所) を含む 100 μL の DMEM に交換し、3 時間培養後、450 nm で吸光度を測定した。細胞生存率は、3 well の平均値から以下の式で算出した。

$$\text{Cell viability (\%)} = [\text{Abs}_{(\text{test sample})} - \text{Abs}_{(\text{blank})} / \text{Abs}_{(\text{control})} - \text{Abs}_{(\text{blank})}] \times 100\%$$

抗緊縮活性は、NDM において 50%の細胞が死滅した濃度を示す PC₅₀ 値で表し、一方、通常の細胞毒性は、栄養豊富な培地 (DMEM) 中で細胞の 50%が死滅した濃度を表す IC₅₀ 値で表した (図 45)。



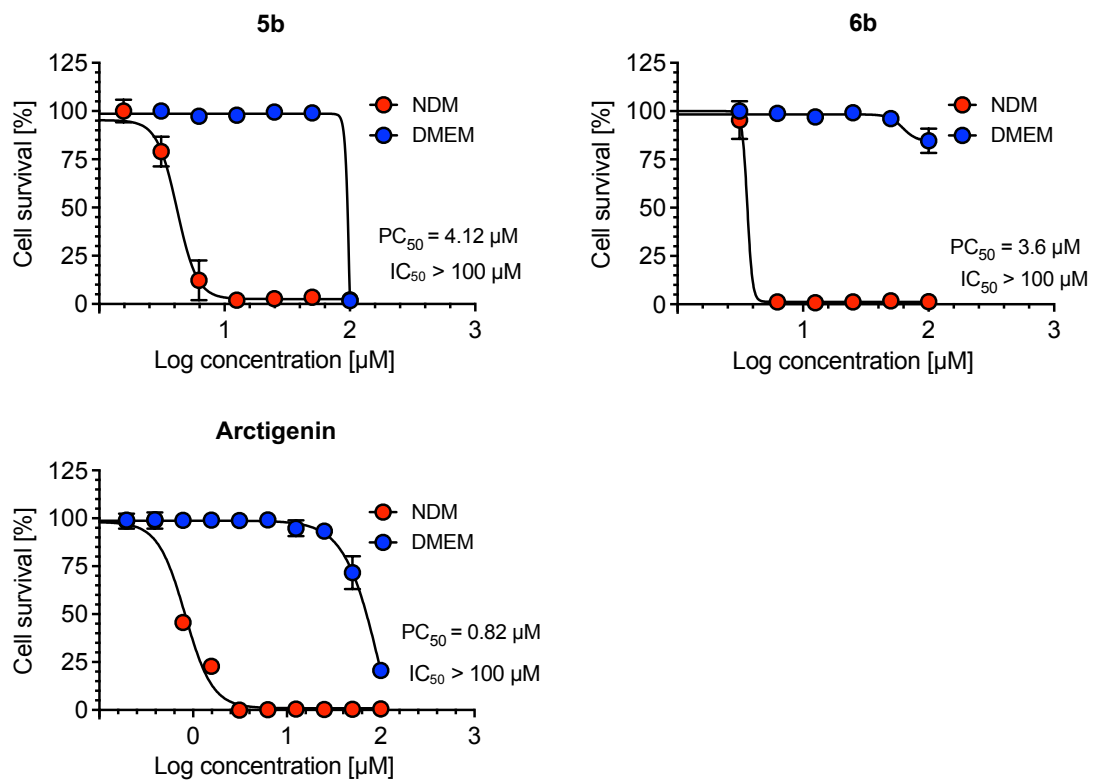


図 45. 栄養欠乏培地 (nutrient-deprived medium: NDM) および栄養豊富培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) におけるヒトすい臓がん細胞 PANC-1 に対する **1**, **1a–1d**, **2b–6b**, および arctigenin の選択的細胞毒性活性.

第三章に関する実験

1. 試薬

特に指定のない限り、全ての化学試薬は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。2',4',6'-Trihydroxydihydrochalcone **15** (THDC) は Enamine (Kiev, Ukraine) から、Phloroacetophenone **16** は Sigma-Aldrich から購入した。

2. 分析機器

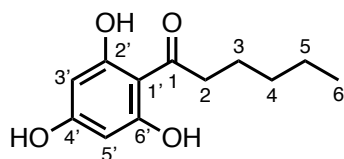
HPLC および LC-ESI-MS 分析は、第一章と同様の機器および手法で行った。

3. 基質特異性

3-1. 基質および生成物アナログの有機合成と解析データ

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、JEOL ECX-400P Delta あるいは JEOL ECA500II (Japan Electron Optics Laboratory Ltd.) を用いて得た。化合物は chloroform-*d* (CDCl₃) あるいは dimethyl sulfoxide-*d*₆ (DMSO-*d*₆) に溶解した。新規化合物である **14**, **14e**, **14f**, **15e**, および **15f** の化学構造は ¹H, ¹³C NMR, HMQC, HMBC, および ¹H-¹H-COSY スペクトルを帰属することで行った。HRMS (ESI) は、LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Fisher Scientific) を用いて得た。各種 NMR データは付録に収載している (図 S23–S44)。

Phlorocaprophenone **14** (PCP)



AlCl_3 を触媒とし、phloroglucinol と hexanoyl chloride の Friedel-Crafts acylation により合成した (図 46)⁵⁸⁾。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/ethyl acetate 5:1) による精製後、**14** (white solid, 1.9 g, yield: 25%) を得た。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.23 (s, 2H, H-2'), 10.30 (s, 1H, H-4'), 5.80 (s, 2H, H-3' and 5'), 2.96 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-2), 1.56 (quin, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-3), 1.31–1.25 (overlapped m, 4H, H-4 and H-5), 0.86 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-6). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 205.3 (C-1), 164.5 (C-4'), 164.3 (C-2' and C-6'), 103.8 (C-1'), 94.7 (C-3' and C-5'), 43.1 (C-2), 31.2 (C-4), 24.2 (C-3), 22.1 (C-5), 13.9 (C-6). (図 S23–S26); HRMS (ESI) m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4$ 223.0970; Found 223.0969; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm), MeCN/ H_2O = 85:15, flow rate = 1.0 mL/min, $\lambda = 280$ nm, $t_R = 2.1$ min.

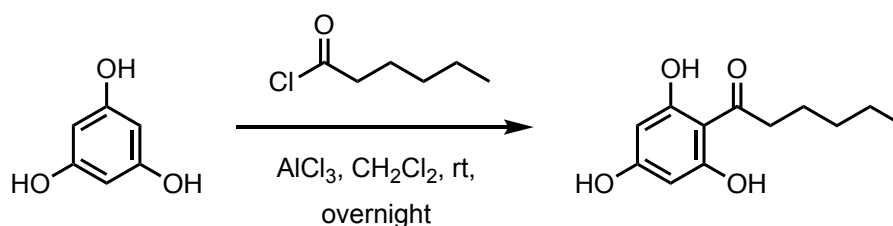
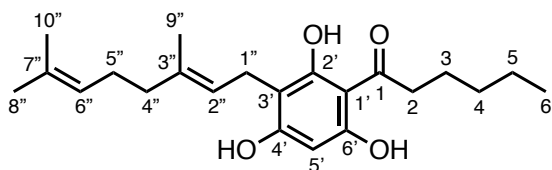


図 46. **14** の合成スキーム.

3'-C-geranyl-PCP **14e**



超脱水 MeOH に **14**、geranyl bromide、および無水 K_2CO_3 を添加し、その混合液を $90^\circ C$ で 8 時間還流した (Friedel-Crafts alkylation, 図 47)⁵⁹⁾。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/ethyl acetate 2:1) による精製後、**14e** (white solid, 46 mg, yield: 19%) を得た。

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.85 (s, 1H, H-5'), 5.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-2''), 5.07–5.03 (m, 1H, H-6''), 3.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-1''), 3.05 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2), 2.15–2.05 (overlapped m, 4H, H-4'' and H-5''), 1.81 (s, 3H, H-10''), 1.72–1.63 (m, 2H, H-3), 1.67 (s, 3H, H-8''), 1.59 (s, 3H, H-9''), 1.36–1.32 (overlapped m, 4H, H-4 and H-5), 0.90 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 206.5 (C-1), 162.4 (C-6'), 160.8 (C-2'), 160.1 (C-4'), 139.9 (C-3''), 132.1 (C-7''), 123.6 (C-6''), 121.5 (C-2''), 105.5 (C-3'), 104.9 (C-1'), 95.3 (C-5'), 44.1 (C-2), 39.7 (C-4''), 31.7 (C-4), 26.3 (C-5''), 25.7 (C-8''), 24.4 (C-3), 22.6 (C-5), 21.5 (C-1''), 17.7 (C-10''), 16.2 (C-9''), 14.0 (C-6). (図 S27–S31); HRMS (ESI) m/z : $[M - H]^-$ Calcd for $C_{22}H_{31}O_4$ 359.2222; Found 359.2219; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm), MeCN/H₂O = 85:15, flow rate = 1.0 mL/min, $\lambda = 280$ nm, $t_R = 6.2$ min.

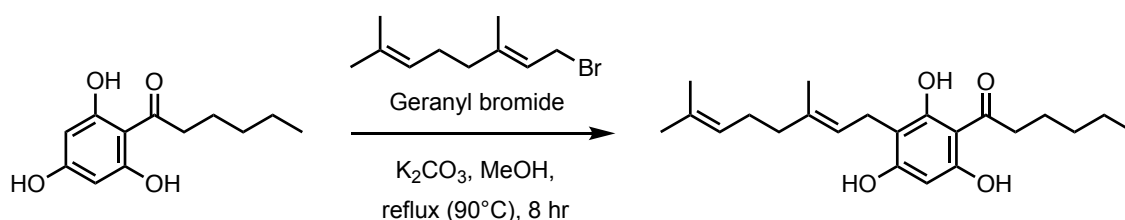
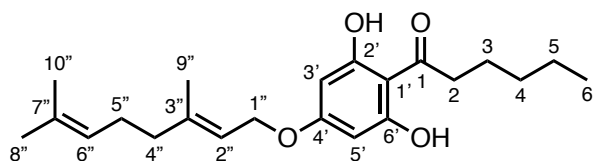


図 47. **14e** の合成スキーム.

4'-*O*-geranyl-PCP **14f**



Triphenylphosphine (Ph_3P) と geraniol を、**14** を含む toluene 中に添加した。次に、diethyl azodicarboxylate (DEAD) を溶液に加え、混合物を 0°C で 30 分間攪拌した (図 48) ⁶⁰。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 100:1) による精製後、**14f** (white solid, 1.4 mg, yield: 0.3%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.92 (s, 2H, H-3' and H-5'), 5.45–5.42 (m, 1H, H-2''), 5.10–5.07 (m, 1H, H-6''), 4.52 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-1''), 3.04 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-2), 2.13–2.06 (overlapped m, 4H, H-4'' and H-5''), 1.72 (s, 3H, H-9''), 1.68 (s, 3H, H-8''), 1.71–1.65 (m, 2H, H-3), 1.60 (s, 3H, H-10''), 1.37–1.33 (overlapped m, 4H, H-4 and H-5), 0.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 206.0 (C-1), 164.7 (C-2' and C-6'), 163.1 (C-4'), 142.2 (C-3''), 131.9 (C-7''), 123.6 (C-6''), 118.4 (C-2''), 104.7 (C-1'), 95.0 (C-3' and C-5'), 65.1 (C-1''), 44.0 (C-2), 39.5 (C-4''), 31.7 (C-4), 26.2 (C-5''), 25.7 (C-8''), 24.4 (C-3), 22.6 (C-5), 17.7 (C-10''), 16.7 (C-9''), 14.0 (C-6). (図 S32–S36); HRMS (ESI-MS) m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_4$ 359.2222; Found 359.2220; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm), MeCN/ H_2O = 85:15, flow rate = 1.0 mL/min, $\lambda = 280$ nm, $t_R = 7.8$ min.

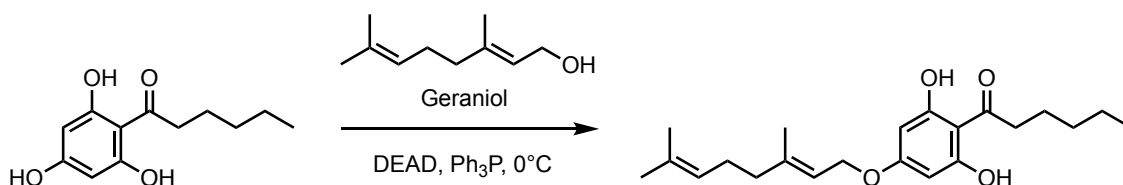
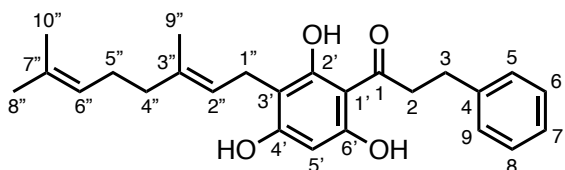


図 48. **14f** の合成スキーム.

3'-C-geranyl-THDC **15e**



PTSA を酸触媒とした **15** および geraniol の縮合反応により合成した (図 49)⁵⁶⁾。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 15:1) による精製後、**15e** (white solid, 9.1 mg, yield: 5.9%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.30–7.18 (overlapped m, 5H, H-5, H-6, H-7, H-8, and H-9), 5.85 (s, 1H, H-3' and H-5'), 5.25 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-2''), 5.06–5.03 (m, 1H, H-6''), 3.40 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2), 3.38 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-1''), 3.02 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-3), 2.12–2.07 (overlapped m, 4H, 4'' and H-5''), 1.81 (s, 3H, H-10''), 1.66 (s, 3H, H-8''), 1.59 (s, 3H, H-9''). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 204.9 (C-1), 162.3 (C-2'), 161.0 (C-4'), 160.2 (C-6'), 141.7 (C-3), 140.1 (C-3''), 132.1 (C-7''), 128.5 (C-5 and C-9), 128.4 (C-6 and C-8), 125.9 (C-7), 123.6 (C-6''), 121.4 (C-2''), 105.5 (C-3'), 104.9 (C-1'), 95.4 (C-5'), 45.7 (C-2), 39.7 (C-4''), 30.7 (C-3), 26.3 (C-5''), 25.7 (C-8''), 21.6 (C-1''), 17.7 (C-10''), 16.2 (C-9''). (図 S37–S40); HRMS (ESI) m/z : [M - H]⁻ Calcd for C₂₅H₂₉O₄ 393.2065; Found 393.2065; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 mm I.D. × 150 mm), MeCN/H₂O = 80:20, flow rate = 1.0 mL/min, $\lambda = 280$ nm, $t_R = 7.2$ min.

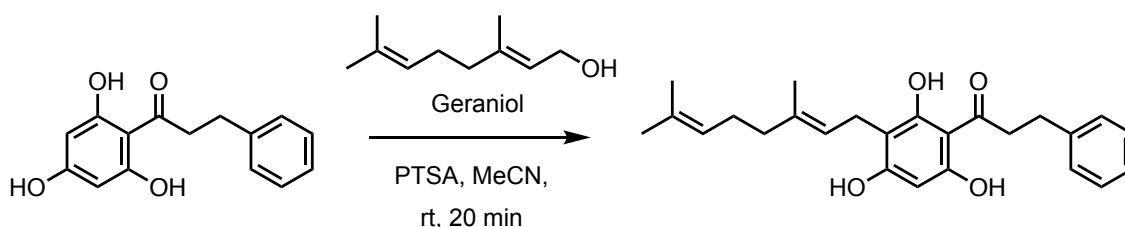
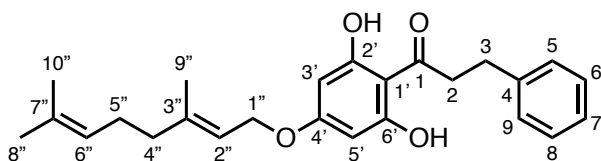


図 49. **15e** の合成スキーム.

4'-*O*-geranyl-THDC **15f**



Ph₃P と geraniol を、**15** を含む toluene 中に添加した。次に、DEAD を溶液に加え、混合物を 0°C で 30 分間攪拌した (図 50) ⁶⁰⁾。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone 60:1) による精製後、**15f** (white solid, 5.0 mg, yield: 1.6%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.31–7.18 (overlapped m, 5H, H-5, H-6, H-7, H-8, and H-9), 5.94 (s, 2H, H-3' and H-5'), 5.45–5.42 (m, 1H, H-2''), 5.10–5.07 (m, 1H, H-6''), 4.52 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-1''), 3.40 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-2), 3.02 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-3), 2.13–2.06 (overlapped m, 4H, H-4'' and H-5''), 1.72 (s, 3H, H-10''), 1.68 (s, 3H, H-8''), 1.60 (s, 3H, H-9''). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 204.5 (C-1), 164.9 (C-2' and C-6'), 163.2 (C-4'), 142.2 (C-3''), 141.6 (C-4), 131.9 (C-7''), 128.5 (C-5 and C-9), 128.4 (C-6 and C-8), 125.9 (C-7), 123.6 (C-6''), 118.4 (C-2''), 104.7 (C-1'), 95.0 (C-3' and C-5'), 65.1 (C-1''), 45.6 (C-2), 39.5 (C-4''), 30.6 (C-3), 26.2 (C-5''), 25.7 (C-8''), 17.7 (C-10''), 16.7 (C-9''). (図 S41–S44); HRMS (ESI) *m/z*: [M - H]⁻ Calcd for C₂₅H₂₉O₄; 393.2065; Found 393.2065; analytical HPLC: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 mm I.D. × 150 mm), acetonitrile/H₂O = 80:20, flow = 1.0 mL/min, λ = 280 nm, *t*_R = 9.3 min.

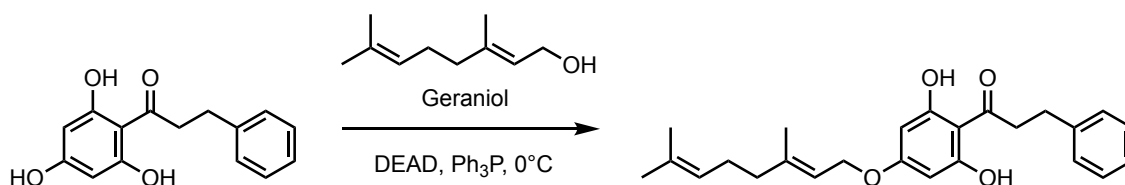


図 50. **15f** の合成スキーム.

3-2. 酵素反応と酵素反応生成物の HPLC および LC-ESI-MS 分析

酵素反応は第一章の 6 に記載した標準反応条件で行い、生成物は第一章の 2 に記載した HPLC および LC-ESI-MS で分析した。

4. 反応速度論解析

酵素反応は第一章の 6 に記載した標準反応条件で行った。酵素反応は 100 μM GPP 存在下で行った。生成物は HPLC で定量し、GraphPad Prism9 (GraphPad Software, USA) で各種反応速度定数を計算した (図 51)。以下に使用した基質の濃度を記載する。

C-prenylation reaction

PCP 14: 1, 10, 20, 50, 100, 150, and 200 μM

THDC 15: 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, and 300 μM

O-prenylation reaction

PCP 14: 1, 10, 20, 50, 100, 150, and 200 μM

THDC 15: 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, and 300 μM

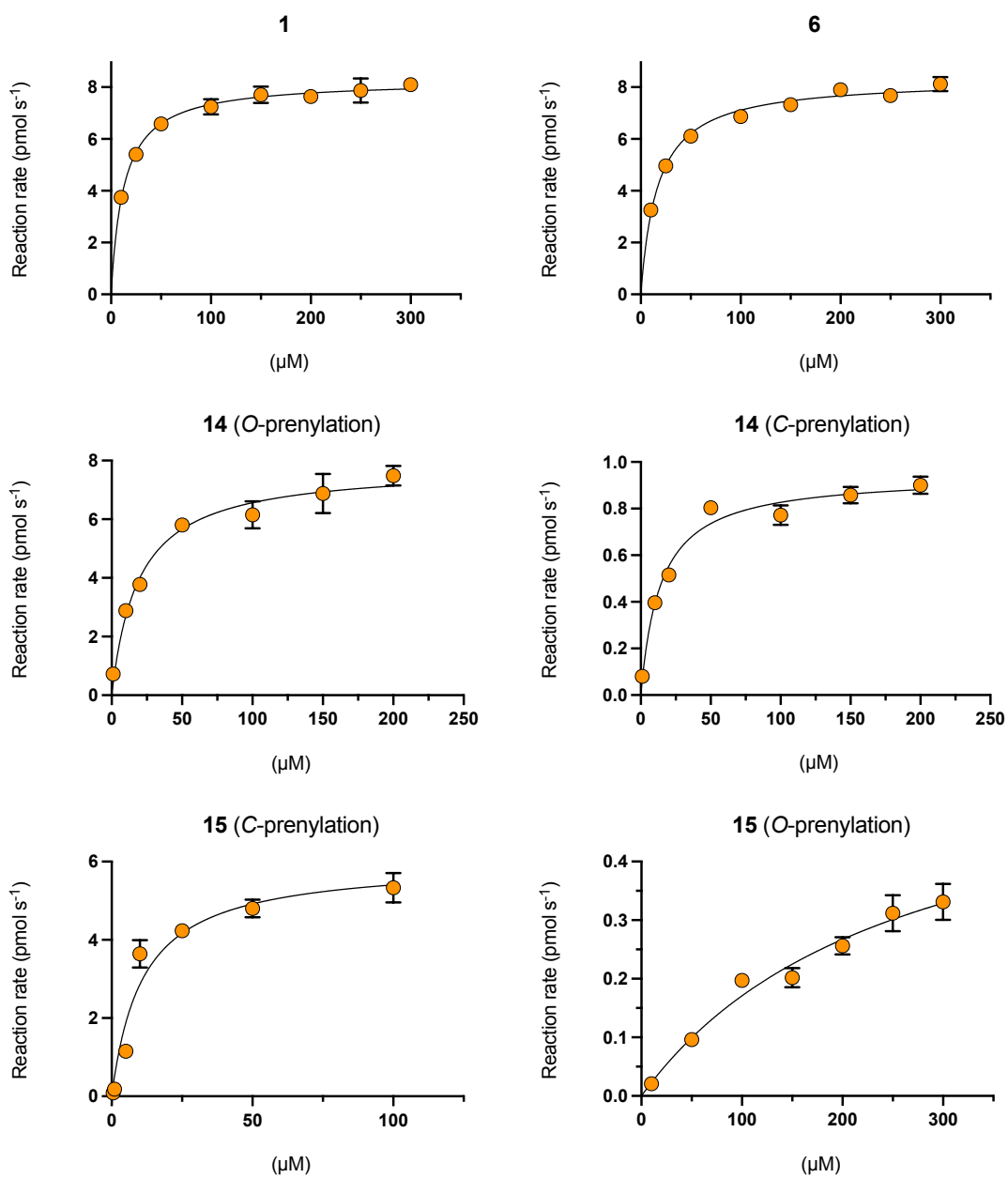


図 51. CsPT4 の反応速度論解析.

各反応 (**1**, **6**, **14**, および **15**) は共基質として GPP 存在下で行った.

3 回測定したデータを平均値 ± SD で表した (n = 3).

5. PANC-1 細胞に対する Preferential cytotoxicity assay

第二章と同様に、本実験は本学薬学部和漢医薬学総合研究所・天然薬物開発研究室の Suresh Awale 准教授ならびに Juthamart Maneenet 博士に依頼した。概要についても第二章と同様である。抗緊縮活性は、PC₅₀ 値および IC₅₀ 値で表した (図 52)。

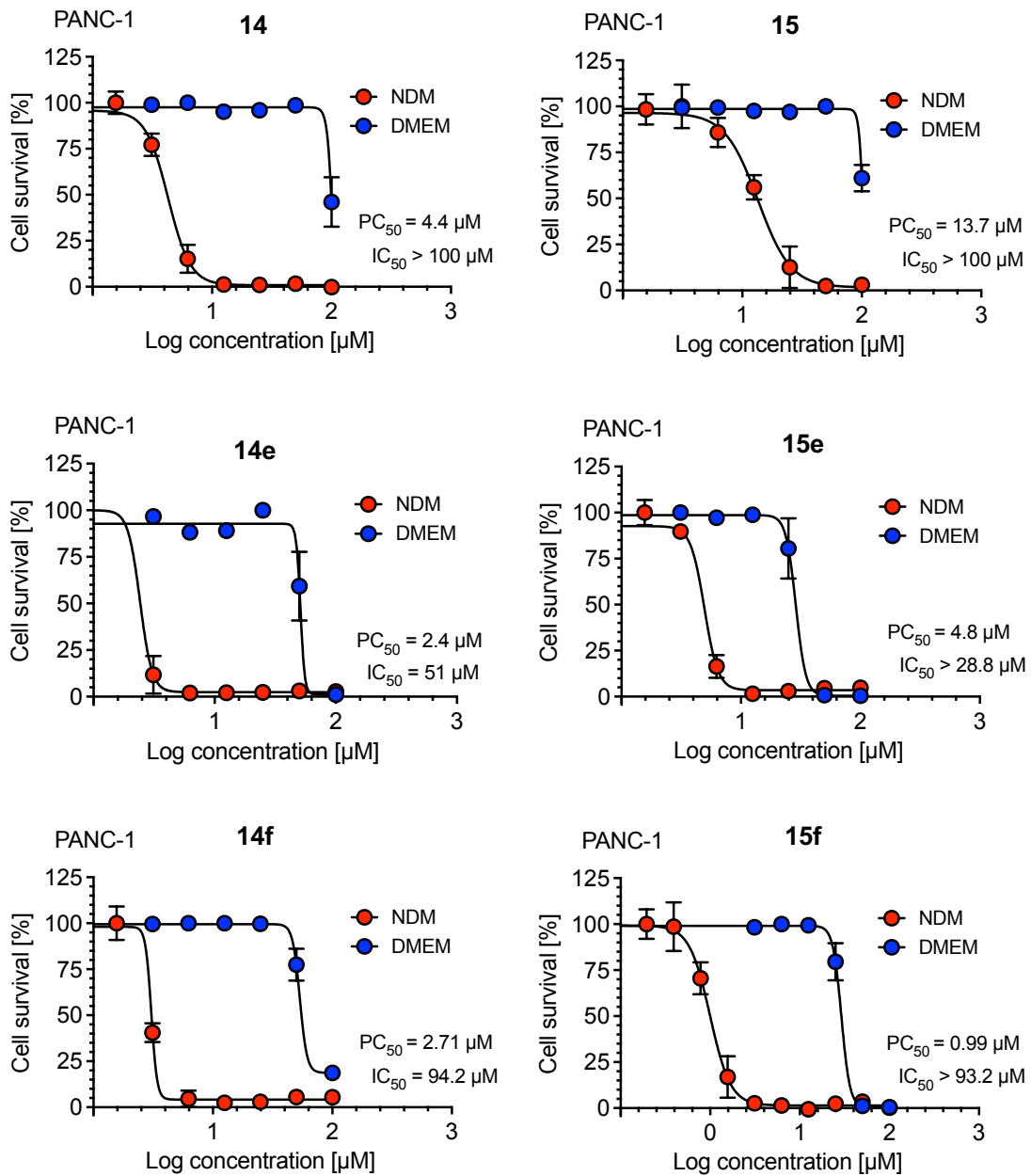


図 52. 栄養欠乏培地 (nutrient-deprived medium: NDM) および栄養豊富培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) におけるヒトすい臓がん細胞 PANC-1 に対する 14, 15, 14e, 14f, 15e, および 15f の選択的細胞毒性活性.

Arctigenin の活性は図 45 と同一である.

Reference

1. Julie, G. The cannabis crop. *Nature*. **2015**, 525, S2–S3.
2. 山本郁男 (2001) 大麻の文化と科学 –この乱用を考える–. 廣川書店
3. Hesami, M.; Pepe, M.; Baiton, A.; Jones A. M. P. Current Status and Future Prospects in Cannabinoid Production through *in vitro* Culture and Synthetic Biology. *Biotechnol. Adv.* **2023**, 62, 108074.
4. Gülck, T.; Møller, B. L. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends Plant Sci.* **2020**, 25, 985–1004.
5. Russo, E. B. Taming THC: Potential Cannabis Synergy and Phytocannabinoid-terpenoid Entourage Effects. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, 163, 1344–1364.
6. Russo, E.; Guy, G. W. A Tale of Two Cannabinoids: The Therapeutic Rationale for Combining Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol. *Med. Hypotheses.* **2006**, 66, 234–246.
7. MacCallum, C. A.; Russo, E. B. Practical Considerations in Medical Cannabis Administration and Dosing. *Eur. J. Intern. Med.* **2018**, 49, 12–19.
8. U.S. Food and Drug Administration. *FDA Approves First Drug Comprised of an Active Ingredient Derived from Marijuana to Treat Rare, Severe Forms of Epilepsy.* June 25, **2018**.
<https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm611046.htm>
(accessed, 2023-10-16).

9. Friedman, D.; French, J. A.; Maccarrone, M. Safety, Efficacy, and Mechanisms of Action of Cannabinoids in Neurological Disorders. *Lancet Neurol.* **2019**, 18, 504–512.
10. Chicca, A.; Schafroth, M. A.; Reynoso-Moreno, I.; Erni, R.; Petrucci, V.; Carreira, E. M.; Gertsch, J. Uncovering the Psychoactivity of a Cannabinoid from Liverworts Associated with a Legal High. *Sci. Adv.* **2018**, 4, eaat2166.
11. Taura, F.; Tanaka, S.; Taguchi, C.; Fukamizu, T.; Tanaka, H.; Shoyama, Y.; Morimoto S. Characterization of Olivetol Synthase, a Polyketide Synthase Putatively Involved in Cannabinoid Biosynthetic Pathway. *FEBS Lett.* **2009**, 583, 2061–2066.
12. Gagne, S. J.; Stout, J. M.; Liu, E.; Boubakir, Z.; Clark, S. M.; Page J. E. Identification of Olivetolic Acid Cyclase from *Cannabis sativa* Reveals a Unique Catalytic Route to Plant Polyketides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, 109, 12811–12816.
13. Luo, X.; Reiter M. A.; d'Espaux, L.; Wong, J.; Denby, C. M.; Lechner, A.; Zhang, Y.; Grzybowski A. 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. Complete Biosynthesis of Cannabinoids and Their Unnatural Analogues in Yeast. *Nature.* **2019**, 567, 123–126.
14. Taura, F.; Morimoto, S.; Shoyama, Y.; Mechoulam R. First Direct Evidence for the Mechanism of Δ^1 -Tetrahydrocannabinolic Acid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 38, 9766–9767.

15. Taura, F.; Morimoto, S.; Shoyama, Y. Purification and Characterization of Cannabidiolic-acid Synthase from *Cannabis sativa* L.: Biochemical Analysis of a Novel Enzyme that Catalyzes the Oxidocyclization of Cannabigerolic Acid to Cannabidiolic Acid. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 17411–17416.
16. Sirikantaramas, S.; Morimoto, S.; Shoyama, T.; Ishikawa, Y.; Wada, Y.; Shoyama, Y.; Taura F. The Gene Controlling Marijuana Psychoactivity: Molecular Cloning and Heterologous Expression of Δ^1 -Tetrahydrocannabinolic Acid Synthase from *Cannabis sativa* L. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 39767–39774.
17. Taura, F.; Sirikantaramas, S.; Shoyama, Y.; Yoshikai, K.; Shoyama, Y.; Morimoto S. Cannabidiolic-acid Synthase, the Chemotype-determining Enzyme in the Fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 2929–2934.
18. Tanaya, R.; Kodama, T.; Lee, Y. E.; Yasuno, Y.; Shinada, T.; Takahashi, H.; Ito, T.; Morita, H.; Awale, S.; Taura, F. Catalytic Potential of *Cannabis* Prenyltransferase to Expand Cannabinoid Scaffold Diversity. *Org Lett.* **2023**, 25, 8601–8605.
19. Tanaya, R.; Kodama, T.; Maneenet, J.; Yasuno, Y.; Nakayama, A.; Shinada, T.; Takahashi, H.; Ito, T.; Morita, H.; Awale, S.; Taura, F. Substrate-dependent Alteration in the C- and O-prenylation Specificities of *Cannabis* Prenyltransferase. *Biol. Pharm. Bull.* **2024**, 47, 449–453.
20. Cregg, J. M.; Russell, K. A. Transformation. Methods in molecular biology: *Pichia* protocols. *Methods Mol Biol.* **1998**, 103, 27–39.
21. Weis, R.; Luiten, R.; Skranc, W.; Schwab, H.; Wubbolts, M.; Glieder, A. Reliable High-throughput Screening with *Pichia pastoris* by Limiting Yeast Cell Death Phenomena. *FEMS Yeast Res.* **2004**, 5, 179–189.

22. Munakata, R.; Inoue, T.; Koeduka, T.; Sasaki, K.; Tsurumaru, Y.; Sugiyama, A.; Uto, Y.; Hori, H.; Azuma, J.; Yazaki, K. Characterization of Coumarin-specific Prenyltransferase Activities in *Citrus limon* Peel. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2012**, *76*, 1389–1393.
23. 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. An Aromatic Farnesyltransferase Functions in Biosynthesis of the Anti-HIV Meroterpenoid Daurichromenic Acid. *Plant Physiol.* **2018**, *178*, 535–551.
24. Tsurumaru, Y.; Sasaki, K.; Miyawaki, T.; Uto, Y.; Momma, T.; Umemoto, N.; Momose, M.; Yazaki, K. HIPT-1, a Membrane-bound Prenyltransferase Responsible for the Biosynthesis of Bitter Acids in Hops. *BBRC.* **2012**, *417*, 393–398.
25. Ishfaq, M.; Wang, Y.; Yan, M.; Wang, Z.; Wu, L.; Li, C.; Li, X. Physiological Essence of Magnesium in Plants and Its Widespread Deficiency in the Farming System of China. *Front. Plant. Sci.* **2022**, *13*, 802274.
26. Darby, C. M.; Ingólfsson, H. I.; Jiang, X.; Shen, C.; Sun, M.; Zhao, N.; Burns, K.; Liu, G.; Ehrt, S.; Warren, J. D.; Andersen, O. S.; Brickner, S. J.; Nathan, C. Whole Cell Screen for Inhibitors of pH Homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* **2013**, *8*, e68942.
27. Toyota, M.; Kinugawa, T.; Asakawa, Y. Bibenzyl Cannabinoid and Bisbibenzyl Derivative from the Liverwort *Radula perrottetii*. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 859–862.
28. Asakawa, Y.; Ludwiczuk, A.; Nagashima, F. Phytochemical and Biological Studies of Bryophytes. *Phytochemistry.* **2013**, *91*, 52–80.

29. Wang, R.; Chen, R.; Li, J.; Liu, X.; Xie, K.; Chen, D.; Yin, Y.; Tao, X.; Xie, D.; Zou, J.; Yang, L.; Dai, J. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Two Novel Regio-specific Flavonoid Prenyltransferases from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 35815–35825.
30. Yang, T.; Fang, L.; Rimando, A. M.; Sobolev, V.; Mockaitis, K.; Medina-Bolivar, F. A Stilbenoid-specific Prenyltransferase Utilizes Dimethylallyl Pyrophosphate from the Plastidic Terpenoid Pathway. *Plant Physiol.* **2016**, 171, 2483–2498.
31. Adams, R.; Loewe S.; Smith, C. M.; McPhee, W. D. Tetrahydrocannabinol Homologs and Analogs with Marijuana Activity. XIII. *J. A. Chem. Soc.* **1942**, 64, 694–697.
32. Hinz, B.; Ramer, R. Cannabinoids as Anticancer Drugs: Current Status of Preclinical Research. *Br. J. Cancer.* **2022**, 127, 1–13.
33. Borrelli, F.; Pagano, E.; Romano, B.; Stefania Panzera, S.; Maiello, F.; Coppola, D.; Petrocellis, L. D.; Buono, L.; Orlando, P.; Izzo, A. A. Colon Carcinogenesis is Inhibited by the TRPM8 Antagonist Cannabigerol, a *Cannabis*-derived Non-psychoactive Cannabinoid. *Carcinogenesis.* **2014**, 35, 2787–2797.
34. Tsuzuki, Y.; Carreira, C. M.; Bockhorn, M.; Xu, L.; Jain, R. K.; Fukumura, D. Pancreas Microenvironment Promotes VEGF Expression and Tumor Growth: Novel Window Models for Pancreatic Tumor Angiogenesis and Microcirculation. *Lab. Invest.* **2001**, 81, 1439–1451.
35. Izuishi, K.; Kato, K.; Ogura, T.; Kinoshita, T.; Esumi, H. Remarkable Tolerance of Tumor Cells to Nutrient Deprivation: Possible New Biochemical Target for Cancer Therapy. *Cancer Res.* **2000**, 60, 6201–6207.

36. Awale, S.; Lu, J.; Kalauni, S. K.; Kurashima, Y.; Tezuka, Y.; Kadota, S.; Esumi, H. Identification of Arctigenin as an Anti-tumor Agent Having Activity to Eliminate Cancer Cell's Tolerance to Nutrient Starvation. *Cancer Res.* **2006**, 66, 1751–1757.
37. Shinzawa, K.; Kageta, D.; Nash, R. J.; Fleet, G. W. J.; Imahori, T.; Kato, A. Azobenzene Derivatives Show Anti-cancer Activity Against Pancreatic Cancer Cells Only under Nutrient Starvation Conditions *Via* G₀/G₁ Cell Cycle Arrest. *Tetrahedron.* **2021**, 85, 132077.
38. Ikeda, M.; Sato, A.; Mochizuki, N.; Toyosaki, K.; Miyoshi, C.; Fujioka, R.; Mitsunaga, S.; Ohno, I.; Hashimoto, Y.; Takahashi, H.; Hasegawa, H.; Nomura, S.; Takahashi, R.; Yomoda, S.; Tsuchihara, K.; Kishino, S.; Esumi, H. Phase I Trial of GBS-01 for Advanced Pancreatic Cancer Refractory to Gemcitabine. *Cancer Sci.* **2016**, 107, 1818–1824.
39. de Bruijn, W. J. C.; Levisson, M.; Beekwilder, J.; van Berkel, W. J. H.; Vincken, J. P. Plant Aromatic Prenyltransferases: Tools for Microbial Cell Factories. *Trends Biotechnol.* **2020**, 38, 917–934.
40. 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, A.; Mizutani, M.; Bourgaud, F.; Hehn, A.; Yazaki, K. Parallel Evolution of UbiA Superfamily Proteins into Aromatic *O*-prenyltransferases in Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2021**, 118, e2022294118.
41. Han, L.; Zhang, L.; He, Y.; Liao, L.; Li, J.; Xu, S.; Zhao, Y.; Bian, X.; Xia, Y. Three Carbon-/oxygen-prenyltransferases Responsible for Furanocoumarin Synthesis in *Angelica dahurica*. *Ind. Crops Prod.* **2023**, 200, 116814.

42. Li, N.; Liu, X.; Zhang, M.; Zhang, Z.; Zhang, B.; Wang, X.; Wang, J.; Tu, P.; Jiang, Y.; Shi, S. P. Characterization of a Coumarin C-/O-prenyltransferase and a Quinolone C-prenyltransferase from *Murraya exotica*. *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20*, 5535–5542.
43. Kumano, T.; Richard, S. B.; Noel, J. P.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. Chemoenzymatic Syntheses of Prenylated Aromatic Small Molecules Using *Streptomyces* Prenyltransferases with Relaxed Substrate Specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8117–8126.
44. Qian, S.; Clomburg, J. M.; Gonzalez, R. Engineering *Escherichia coli* as a Platform for the in vivo Synthesis of Prenylated Aromatics. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116*, 1116–1127.
45. Valliere, M. A.; Korman, T. P.; Woodall, N. B.; Khitrov, G. A.; Taylor, R. E.; Baker, D.; Bowie, J. U. A Cell-free Platform for the Prenylation of Natural Products and Application to Cannabinoid Production. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 565.
46. Nagia, M.; Gaid, M.; Biedermann, E.; Fiesel, T.; El-Awaad, I.; Hänsch, R.; Wittstock, U.; Beerhues, L. Sequential Regiospecific *Gem*-diprenylation of Tetrahydroxyxanthone by Prenyltransferases from *Hypericum* sp. *New. Phytol.* **2019**, *222*, 318–334.
47. Phan, N. D.; Omar, A. M.; Takahashi, I.; Baba, H.; Okumura, T.; Imura, J.; Okada, T.; Toyooka, N.; Fujii, T.; Awale, S. Nicolaoidesin C: An Antiausterity Agent Shows Promising Antitumor Activity in a Pancreatic Cancer Xenograft Mouse Model. *J. Nat. Prod.* **2023**, *86*, 1402–1410.

48. Sun, S.; Kim, M. J.; Omar, A. M.; Phan, N. D.; Awale, S. (+)-Panduratin A Induces PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Death Preferentially under Nutrient Starvation by Inhibiting PI3K/Akt/mTOR/autophagy Signaling Pathway. *Phytomed. Plus.* **2021**, 1, 100101.
49. Sato, T.; Yamaga, H.; Kashima, S.; Murata, Y.; Shinada, T.; Nakano, C.; Hoshino, T. Identification of Novel Sesterterpene/triterpene Synthase from *Bacillus clausii*. *Chem. Bio. Chem.* **2013**, 14, 822–825.
50. Taura, F.; Iijima, M.; Lee, J. B.; Hashimoto, T.; Asakawa, Y.; Kurosaki, F. Daurichromenic Acid-producing Oxidocyclase in the Young Leaves of *Rhododendron dauricum*. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, 9, 1329–1332.
51. Cochrane, R. V.; Sanichar, R.; Lambkin, G. R.; Reiz, B.; Xu, W.; Tang, Y.; Vederas, J. C. Production of New Cladosporin Analogues by Reconstitution of the Polyketide Synthases Responsible for the Biosynthesis of This Antimalarial Agent. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 128, 674–678.
52. Zhu, Y.; Soroka, D. N.; Sang, S. Synthesis and Inhibitory Activities Against Colon Cancer Cell Growth and Proteasome of Alkylresorcinols. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 8624–8631.
53. Jentsch, N. G.; Zhang, X.; Magolan, J. Efficient Synthesis of Cannabigerol, Grifolin, and Piperogalin via Alumina-Promoted Allylation. *J. Nat. Prod.* **2020**, 83, 2587–2591.
54. Hasrris, T. M., Carney, R. L. Synthesis of 3,5,7-Triketo Acids and Esters and Their Cyclizations to Resorcinol and Phloroglucinol Derivatives. Models of Biosynthesis of Phenolic Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 6734–6741.

55. Eicher, T.; Tiefensee, K.; Dönig, R.; Pick, R. Synthese von Bryophyten-Inhaltsstoffen 2. Synthesen von Prenylierten Bibenzyl-derivaten. *Synthesis*. **1991**, 98–102.
56. Crombie, L. W.; Crombie, W. M. L.; Firth, D. F. Synthesis of Bibenzyl Cannabinoids, Hybrids of Two Biogenetic Series Found in *Cannabis sativa*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. **1988**, 1263–1270.
57. Mechoulam, R and Ben-Zvi, Z.; Carboxylation of Resorcinols with Methylmagnesium Carbonate. Synthesis of Cannabinoid Acids. *J. Chem. Soc. D* **1969**, 343–344.
58. Gokan N, Kikuchi H, Nakamura K, Oshima Y, Hosaka K, Kubohara Y. Structural Requirements of *Dictyostelium* Differentiation-inducing Factors for Their Stalk-cell-inducing Activity in *Dictyostelium* Cells and Anti-proliferative Activity in K562 Human Leukemic Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 70, 676–685.
59. Ng CH, Rullah K, Aluwi MFFM, Abas F, Lam KW, Ismail IS, Narayanaswamy R, Jamaludin F, Shaari K. Synthesis and Docking Studies of 2,4,6-Trihydroxy-3-geranylacetophenone Analogs as Potential Lipoxygenase Inhibitor. *Molecules*. **2014**, 19, 11645–11659.
60. Mitsunobu O, Yamada M, Mukaiyama T. Preparation of Esters of Phosphoric Acid by the Reaction of Trivalent Phosphorus Compounds with Diethyl Azodicarboxylate in the Presence of Alcohols. *Bull. Chem. Soc. Japan*. **1967**, 40, 935–939.

謝辞

本学薬学部和漢医薬学総合研究所・天然物化学研究室の森田洋行教授には、論文執筆を初めとし、本研究に有益なご指導・ご助言を頂き、さらに研究室の移動に伴い快く受け入れて下さいましたこと厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、岩手医科大学薬学部・天然物化学研究室の田浦太志教授（元本学薬学部・薬用生物資源学研究室・准教授）には研究の初歩から論文執筆に至るまで終始ご指導賜りましたこと厚く御礼申し上げます。

本研究の主査および副査を引き受けて下さいました、本学薬学部和漢医薬学総合研究所・資源科学領域の庄司翼教授、天然物化学研究室の森田洋行教授、および本学薬学部・構造生物学研究室の水口峰之教授に心より深く感謝申し上げます。

本研究の生化学および有機合成実験のご指導・ご助言を頂きました、本学薬学部和漢医薬学総合研究所・天然物化学研究室の中嶋優助教および児玉猛助教に心より深く感謝申し上げます。

ビベンジルカンナビノイドの有機合成実験でご指導・ご助言を頂きました大阪市立大学・理学部の品田哲郎教授および安野陽子助教に心より深く感謝申し上げます。

本研究の生物活性試験にご協力頂きました本学薬学部和漢医薬学総合研究所・天然薬物開発研究室の Suresh Awale 准教授、Sun Sijia 博士、および Juthamart Maneenet 博士に心より深く感謝申し上げます。

本研究の反応速度論解析にて有益な助言を賜りました本学薬学部・構造

生物学研究室の帯田孝之准教授および京都大学・生存圏研究所の棟方涼介助教に心より感謝いたします。

博士課程在学中にお世話になりました科学技術振興機構（次世代研究者挑戦的研究プログラム）の皆様、またタイ王国チュラロンコン大学理学部の Supaart Sirikantaramas 准教授およびグループメンバーに心より感謝いたします。

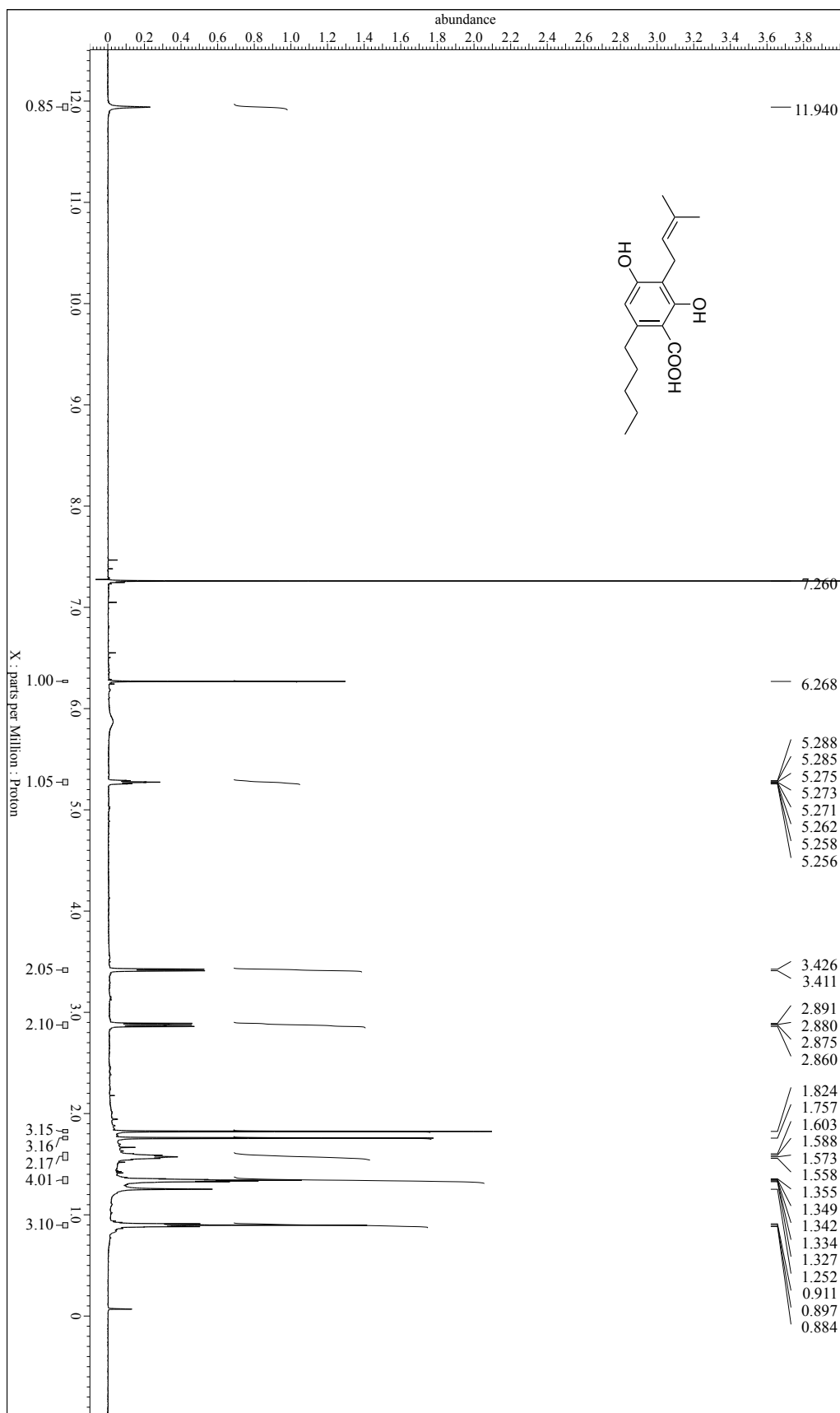
薬用植物に関する有益な知識を御教授頂きました、本学薬学部附属薬用植物園の藤野廣春技術専門職員、辰尾良秋技術専門職員、高尾泰昌技術専門職員、および村上芳哉技術職員の皆様に心より感謝いたします。

数々の御支援、御協力をいただきました薬用生物資源学研究室ならびに天然物化学研究室の皆様深く感謝いたします。

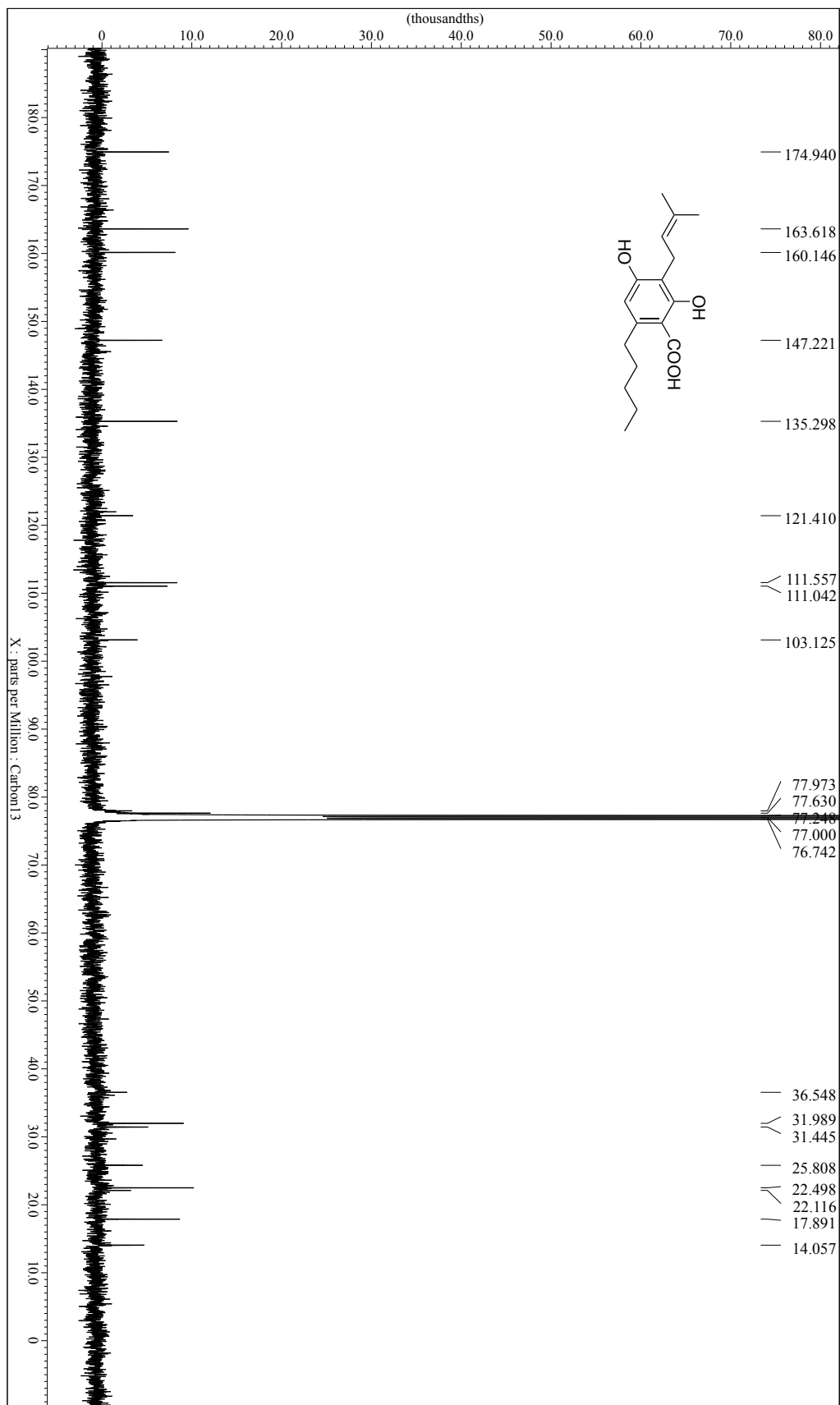
最後に著者の学生生活を暖かく見守り、支えてくれた最愛の家族に心から感謝いたします。

2024年2月 棚谷 綾介

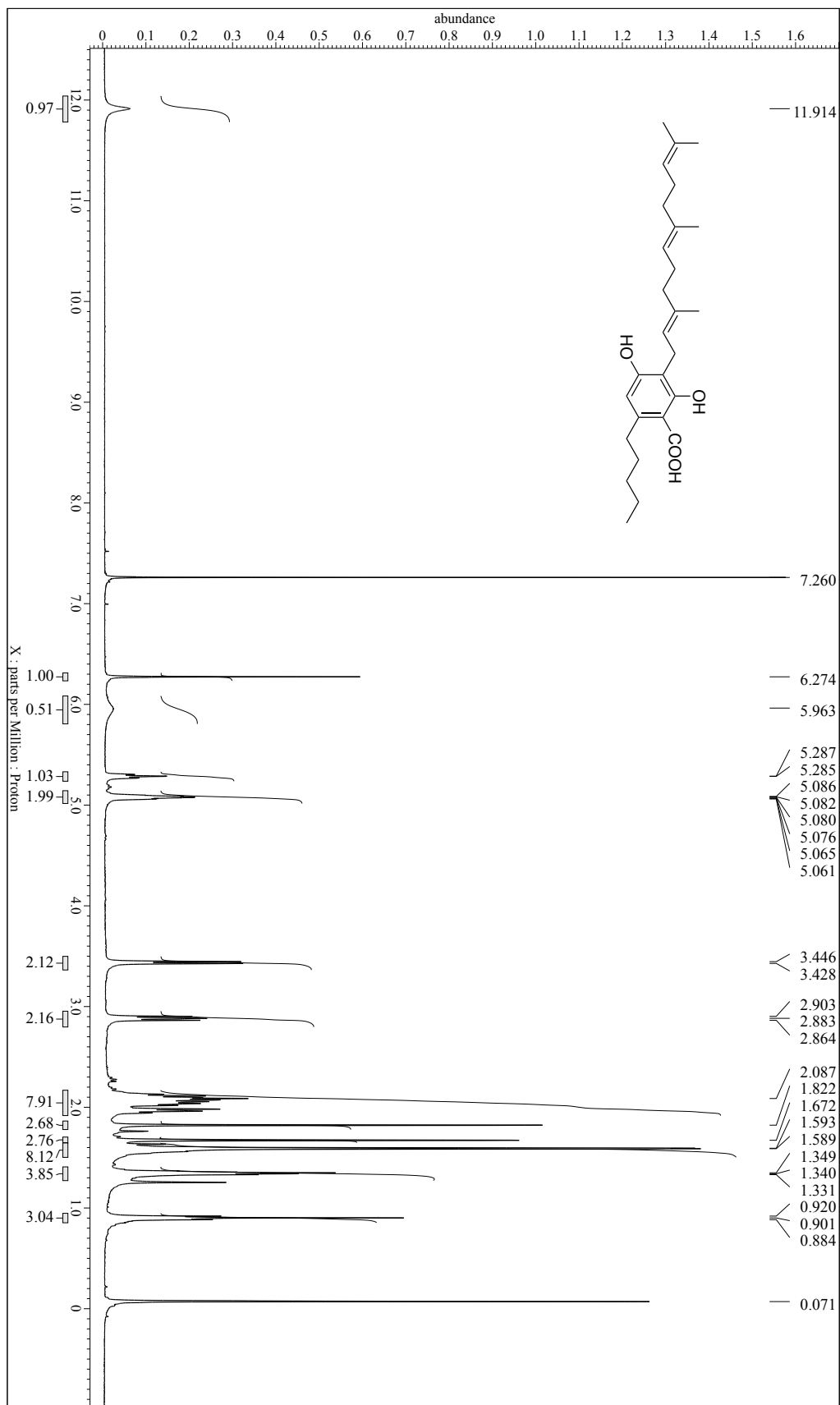
付録



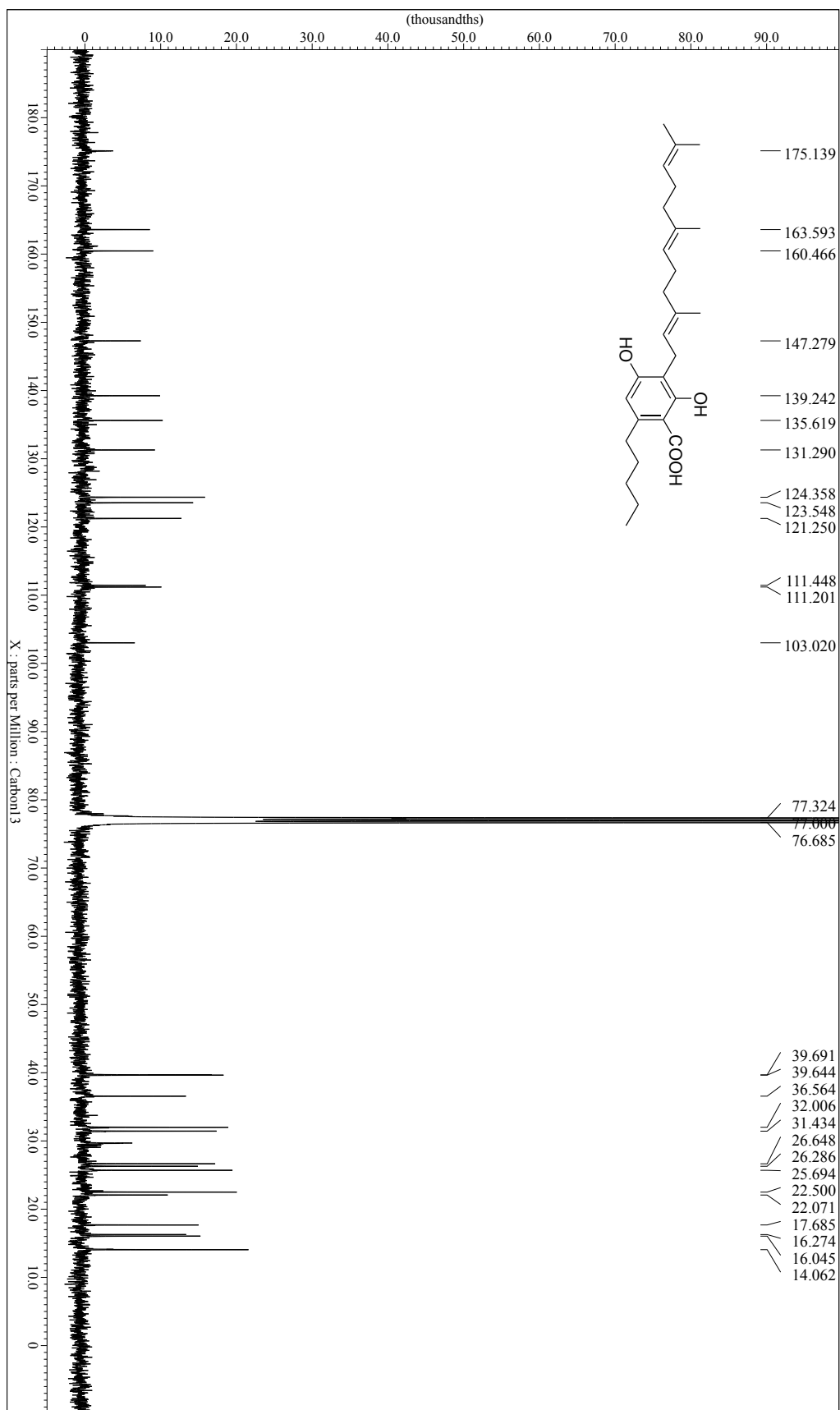
☒ S1. 1a の ^1H NMR (400 MHz) スペクトル (CDCl_3).



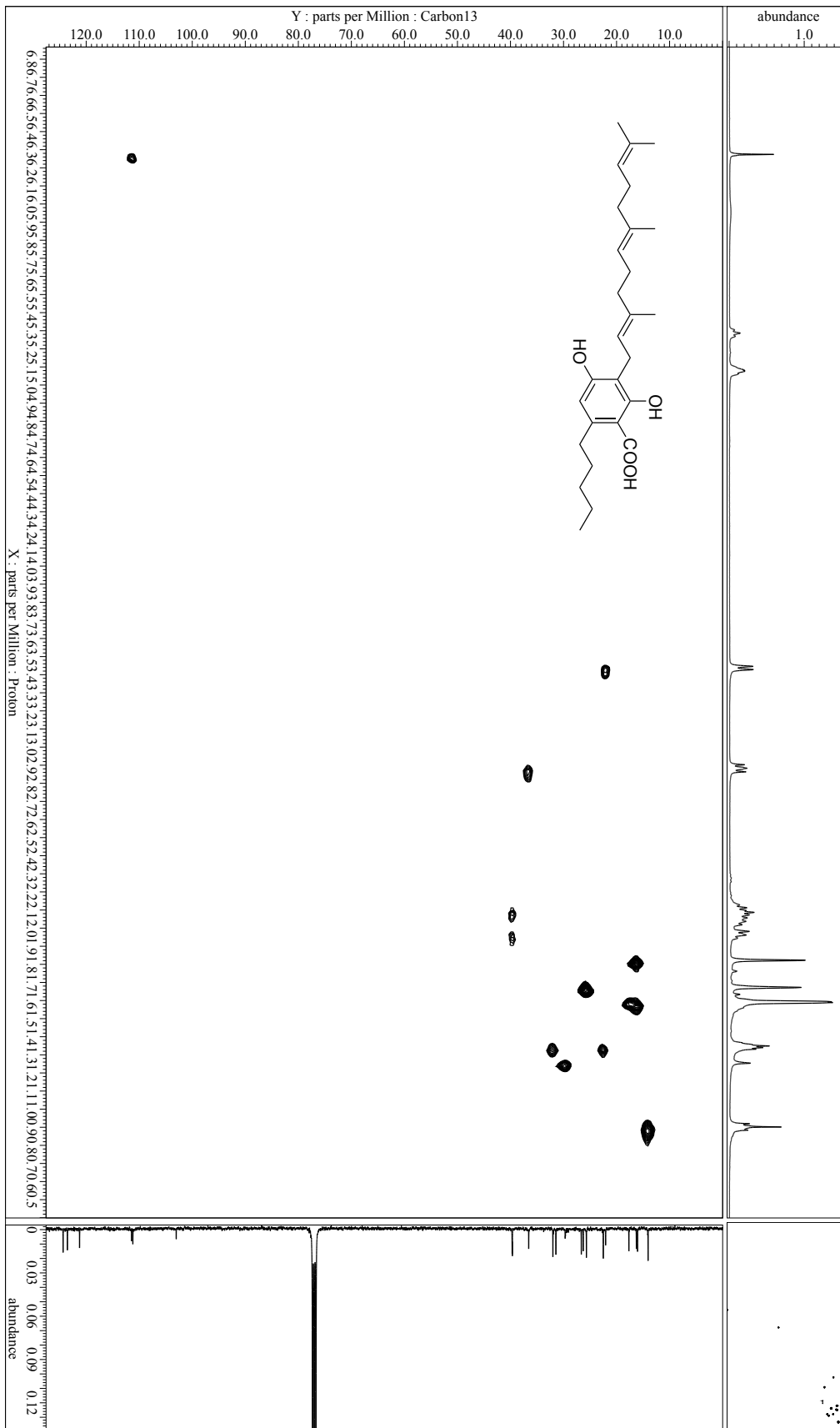
☒ S2. 1a の ^{13}C NMR (100 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S3. 1c の ¹H NMR (400 MHz) スペクトル (CDCl₃).



☒ S4. 1c の ^{13}C NMR (100 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S5.1c の HMQC スペクトル (CDCl₃).

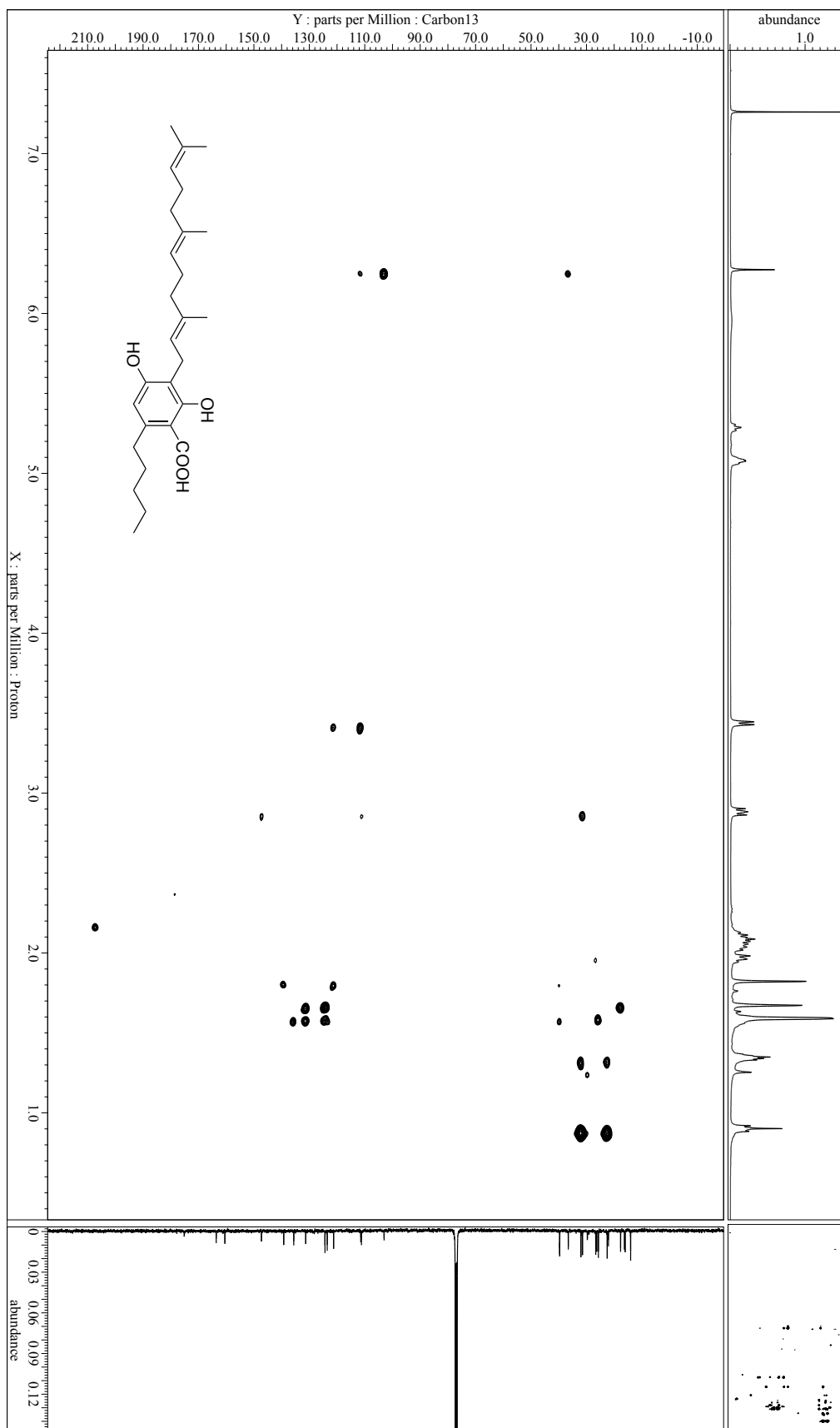


図 S6. 1c の HMBC スペクトル (CDCl₃).

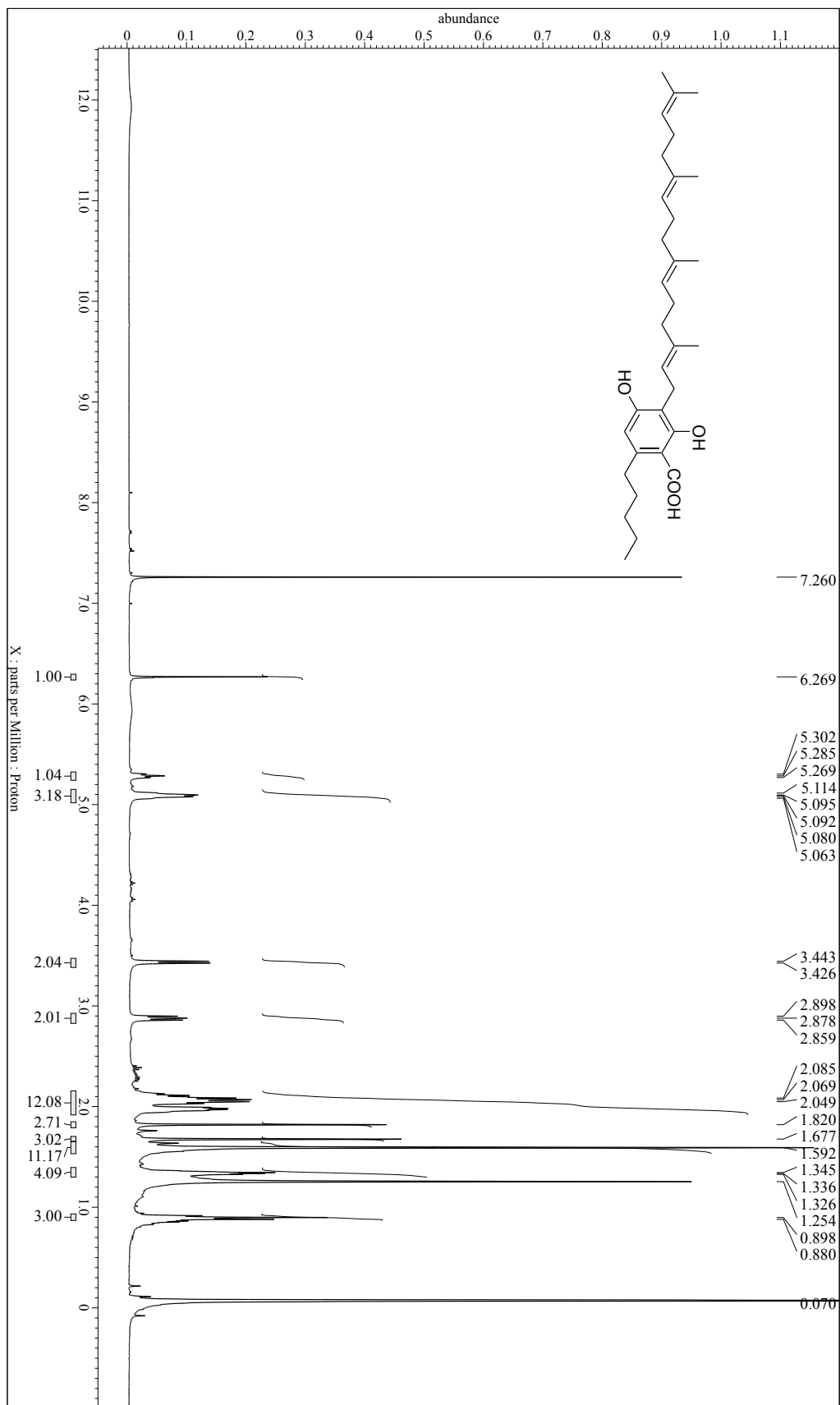
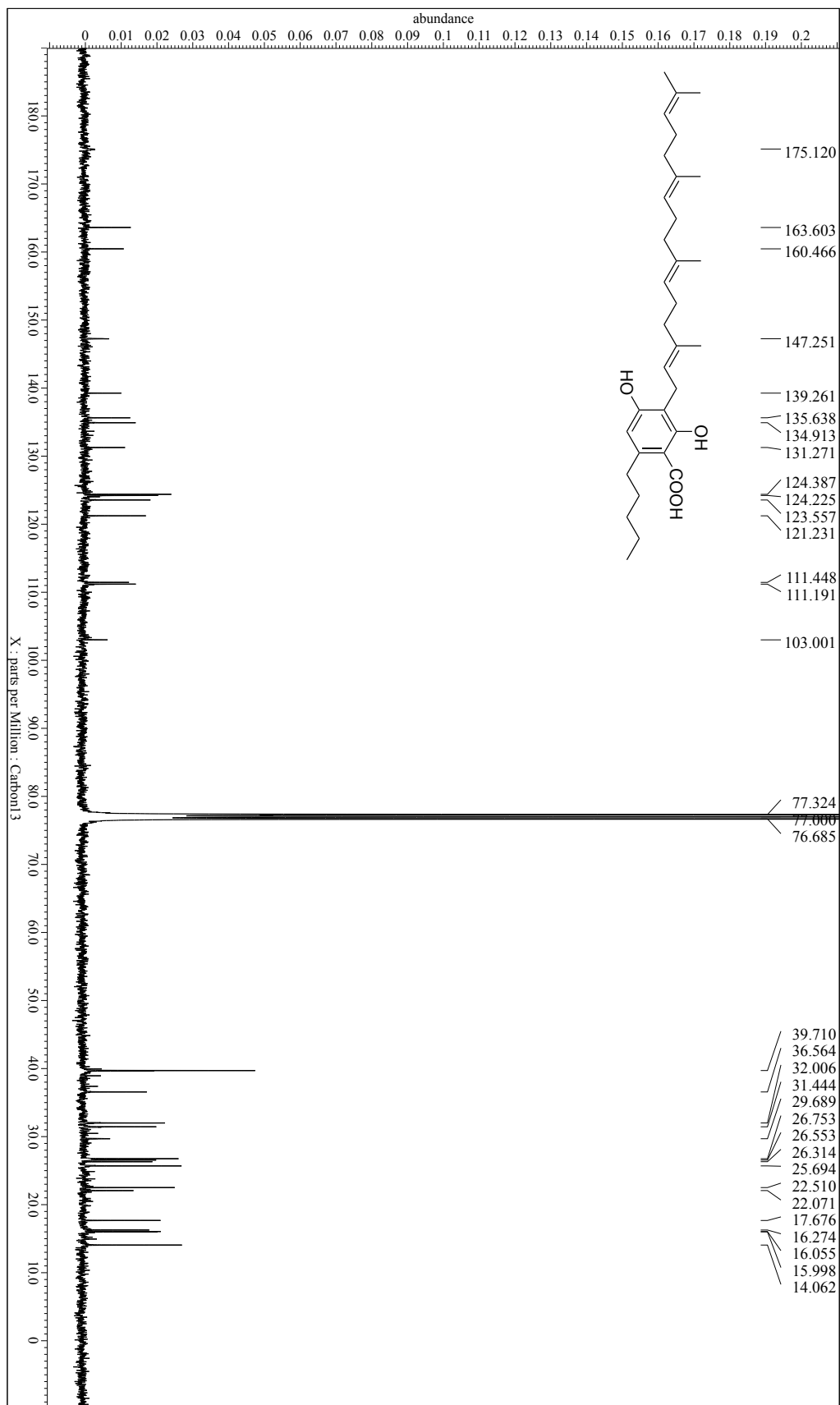
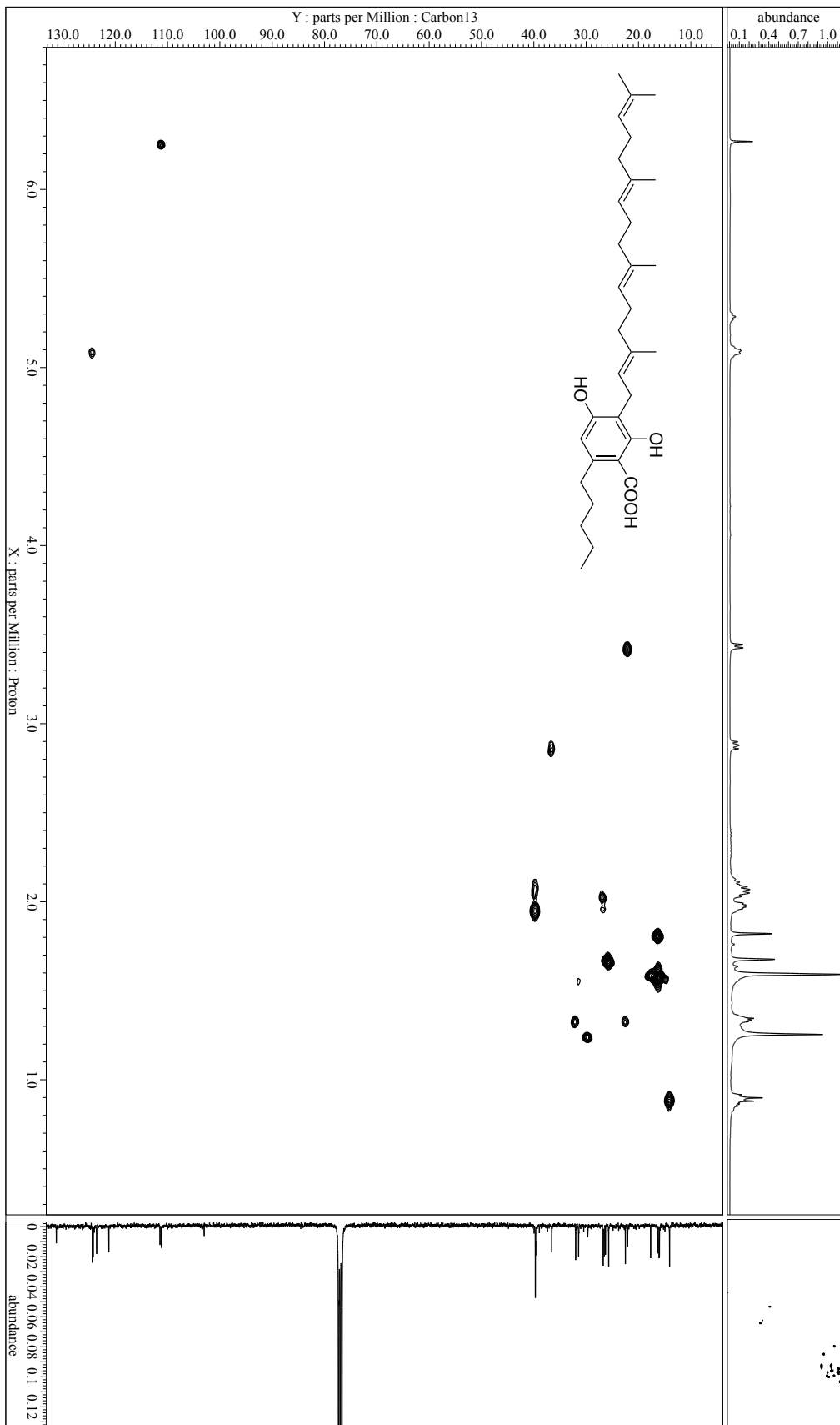


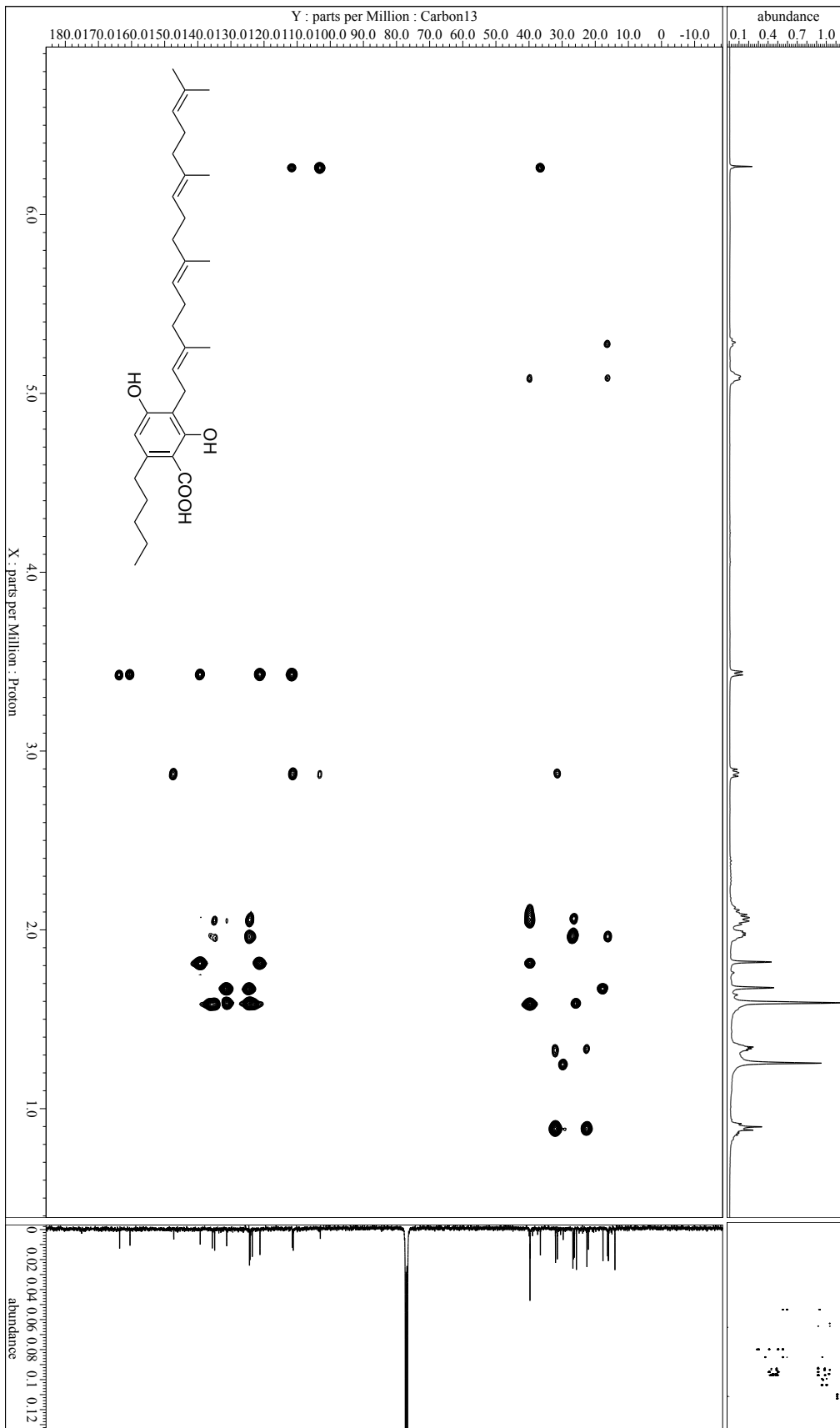
図 S7. 1d の ^1H NMR (400 MHz) スペクトル (CDCl_3).



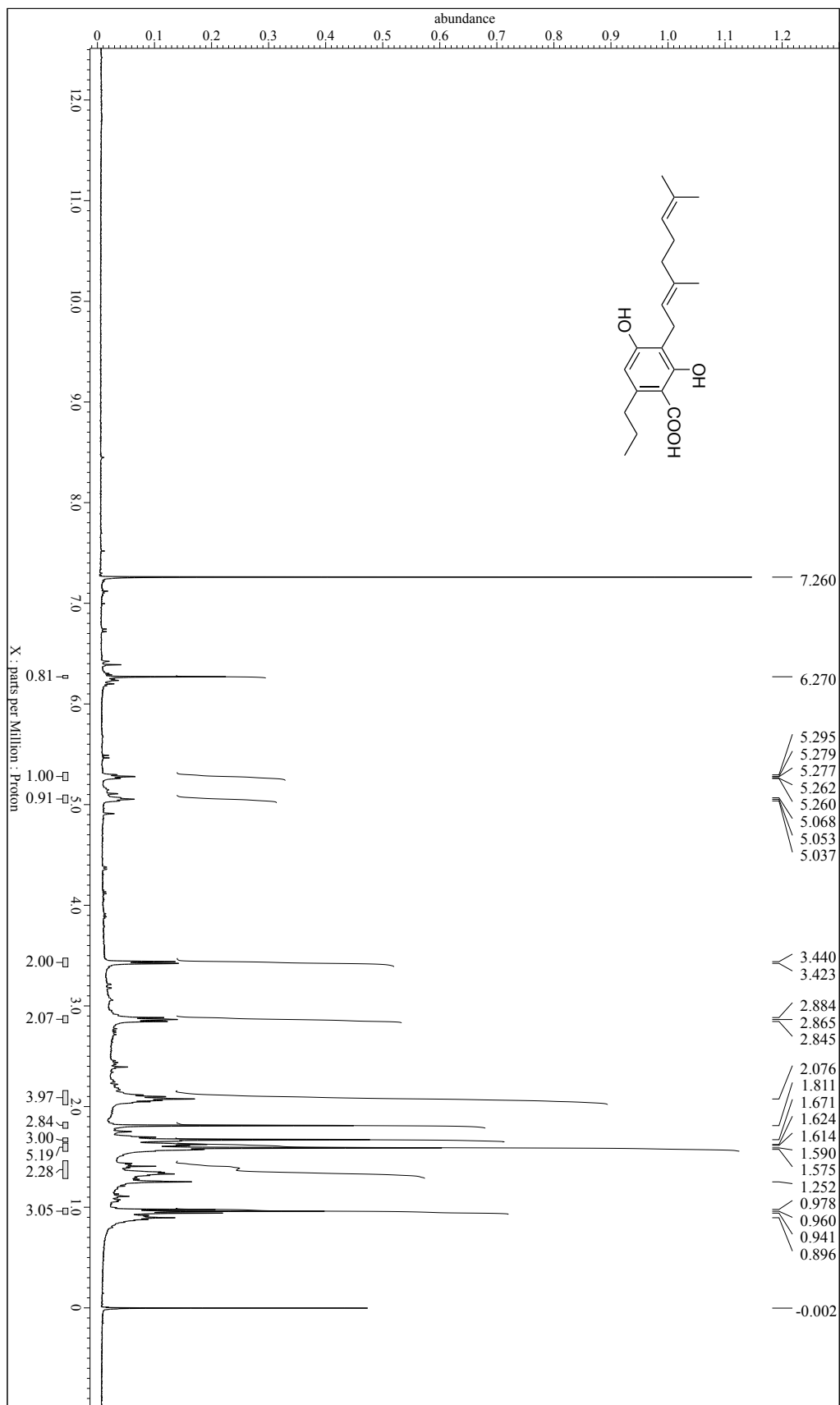
☒ S8.1d の ^{13}C NMR (100 MHz) スペクトル (CDCl_3).



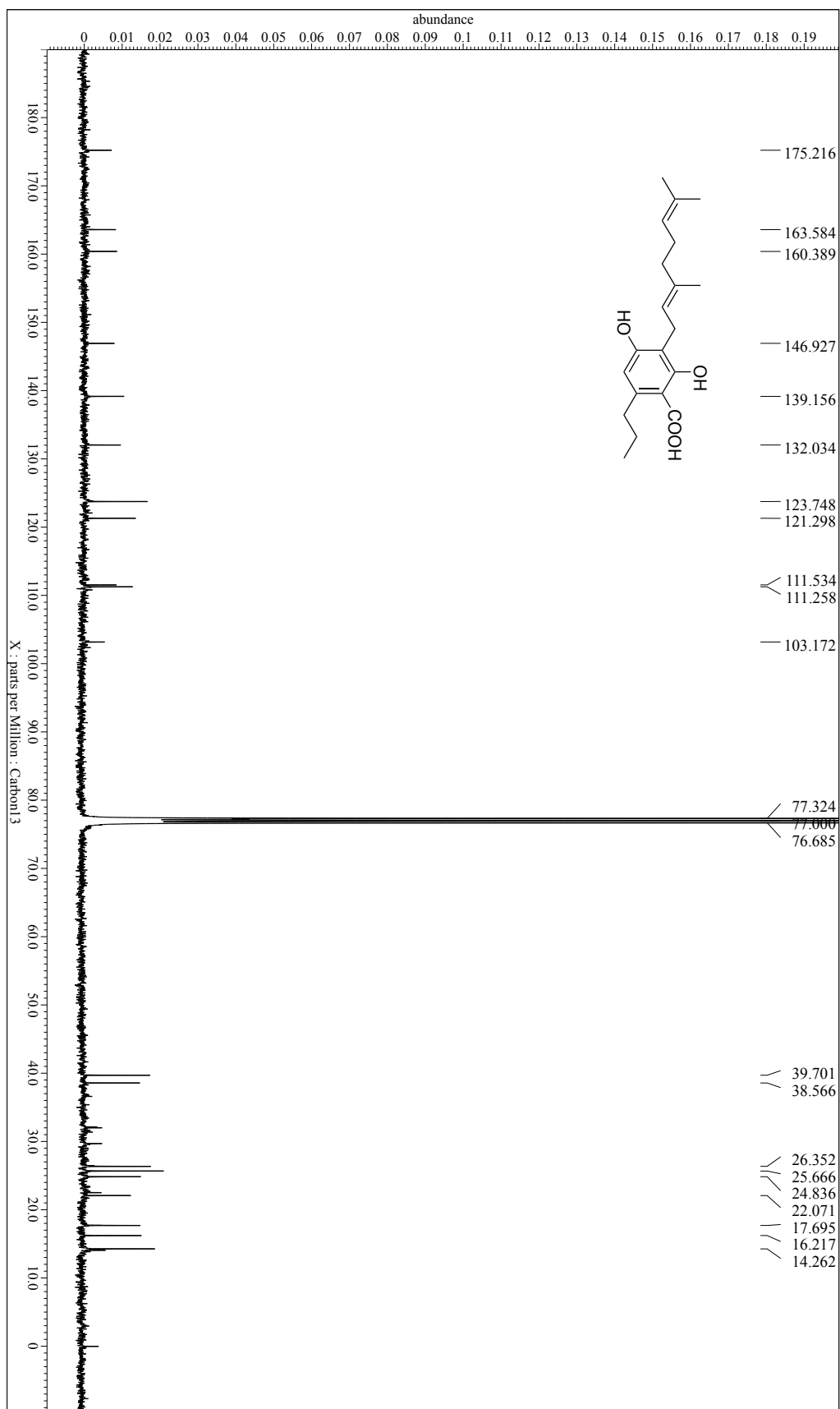
☒ S9.1d の HMQC スペクトル (CDCl₃).



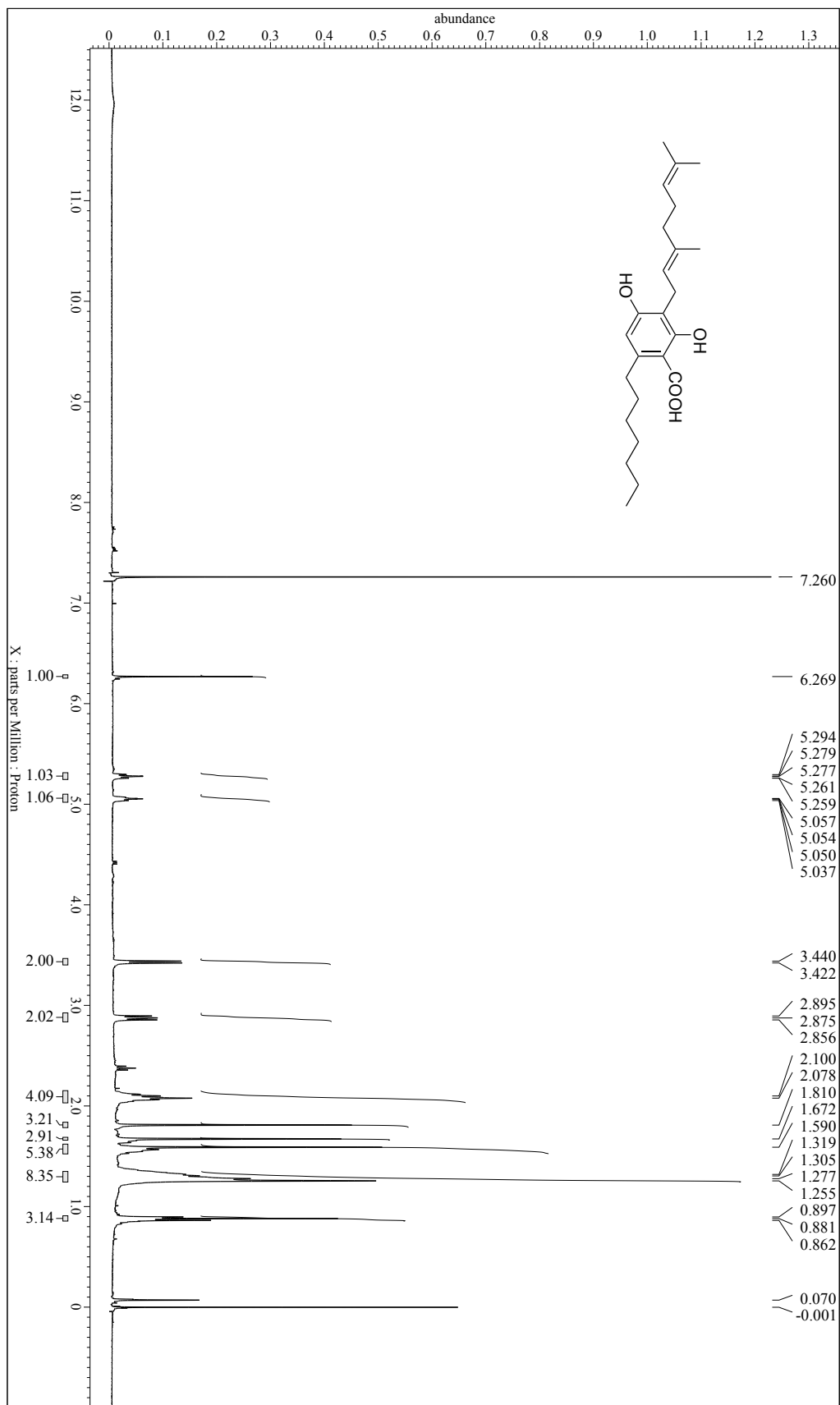
☒ S10. 1d の HMBC スペクトル (CDCl₃).



☒ S11. **2b** の ^1H NMR (400 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S12. 2b の ^{13}C NMR (100 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S13. **3b** の ^1H NMR (500 MHz) スペクトル (CDCl_3).

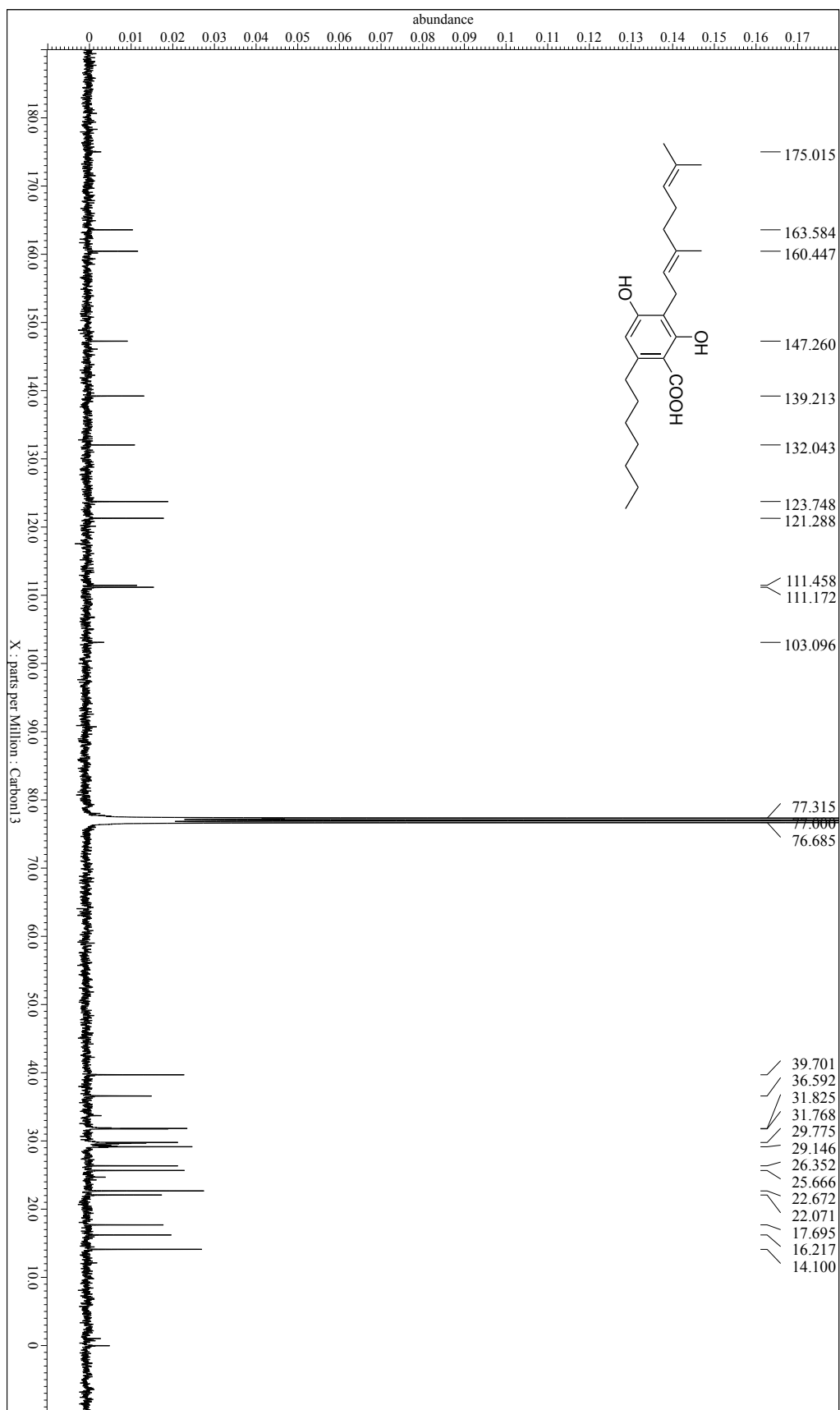
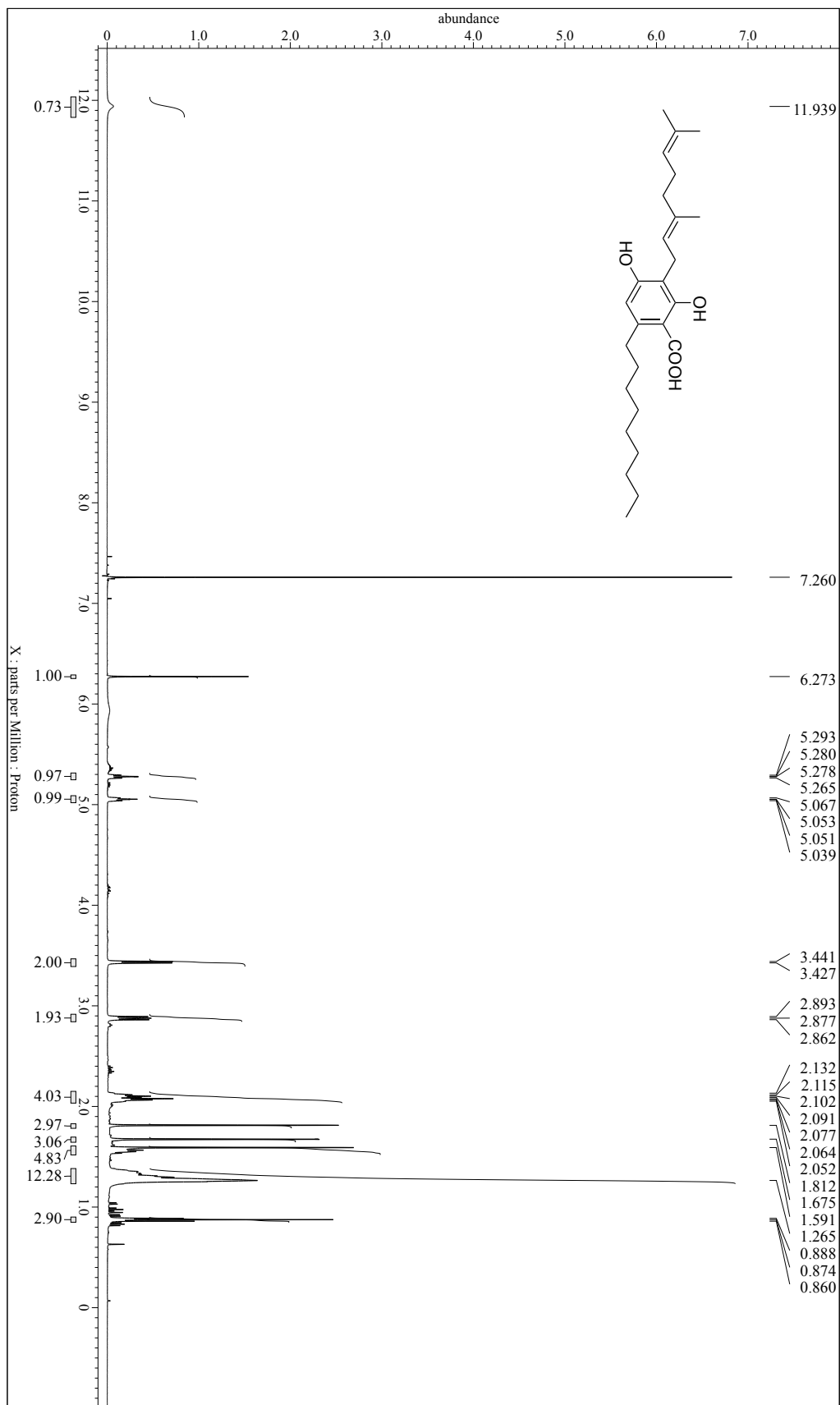
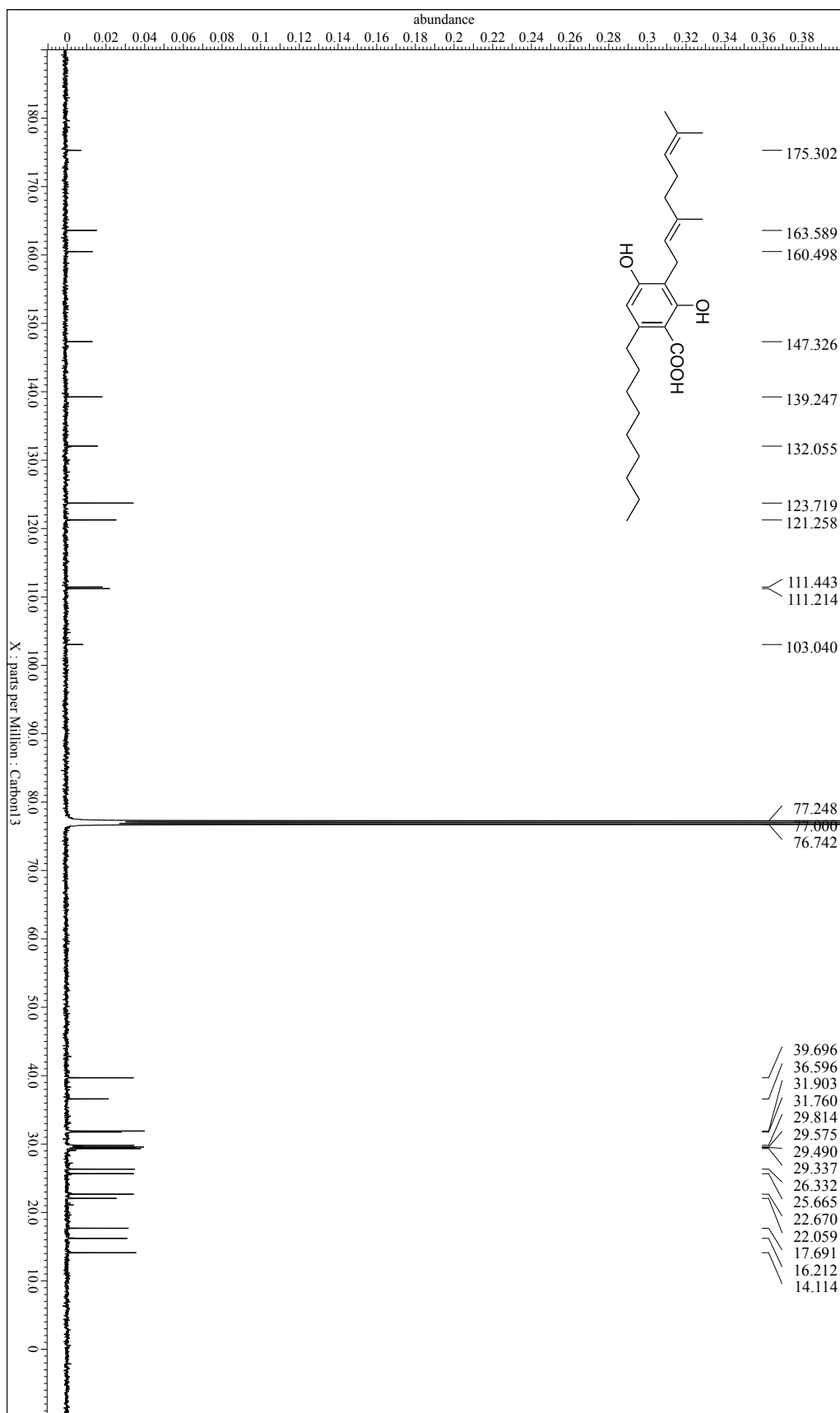


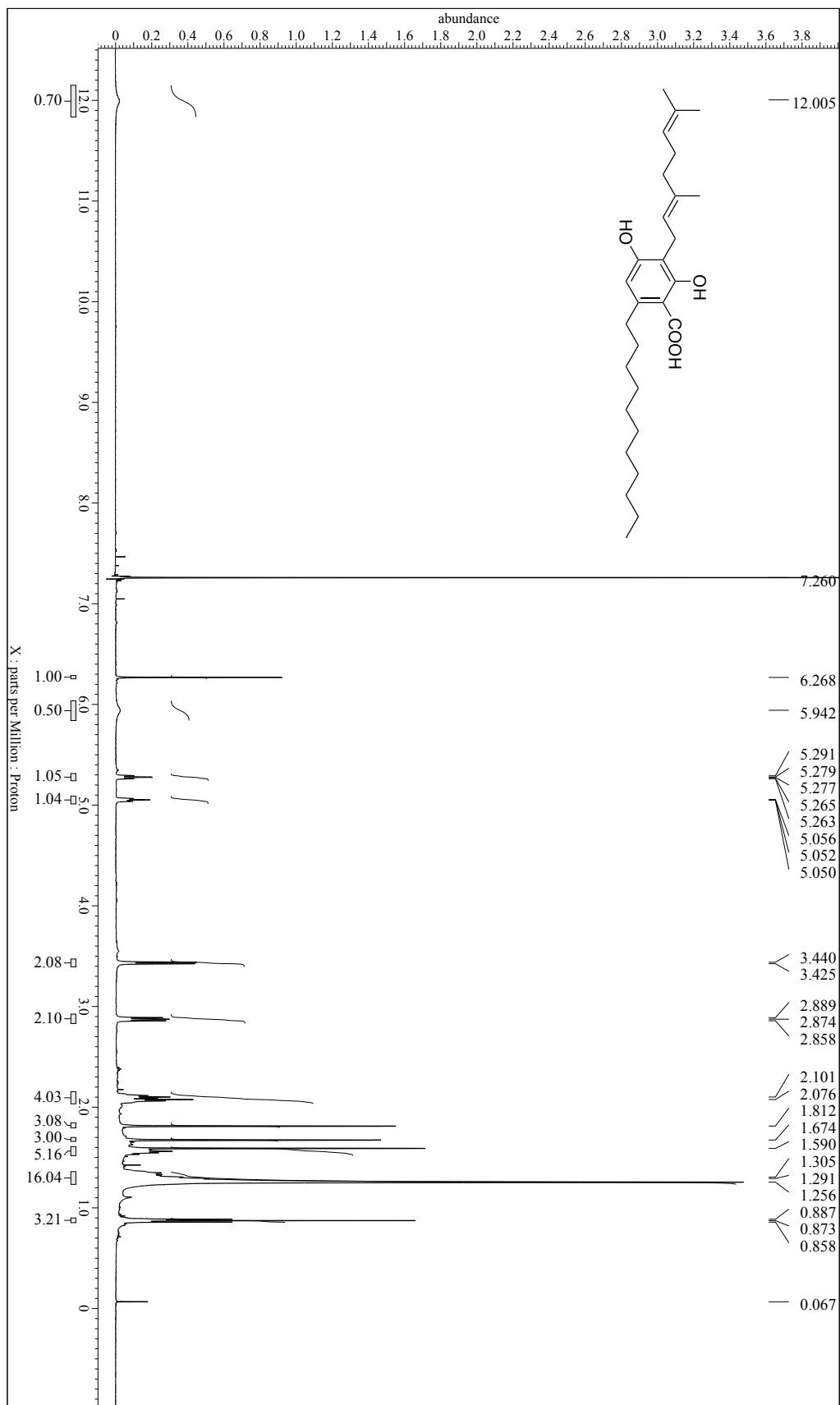
図 S14. **3b** の ^{13}C NMR (125 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S15. 4b の ^1H NMR (500 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S16. 4b の ^{13}C NMR (125 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S17. 5b の ^1H NMR (500 MHz) スペクトル (CDCl_3).

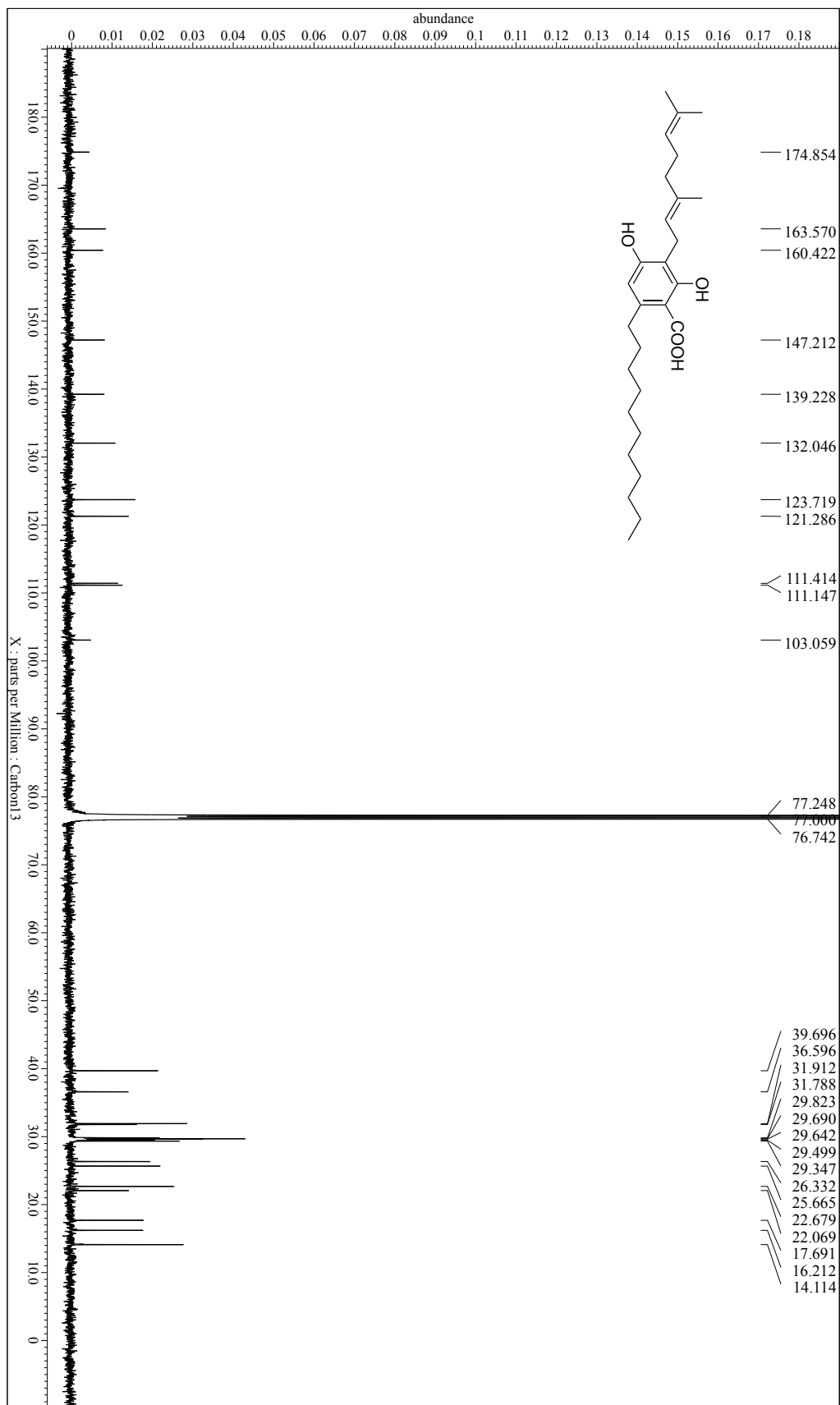


図 S18.5b の ^{13}C NMR (125 MHz) スペクトル (CDCl_3).

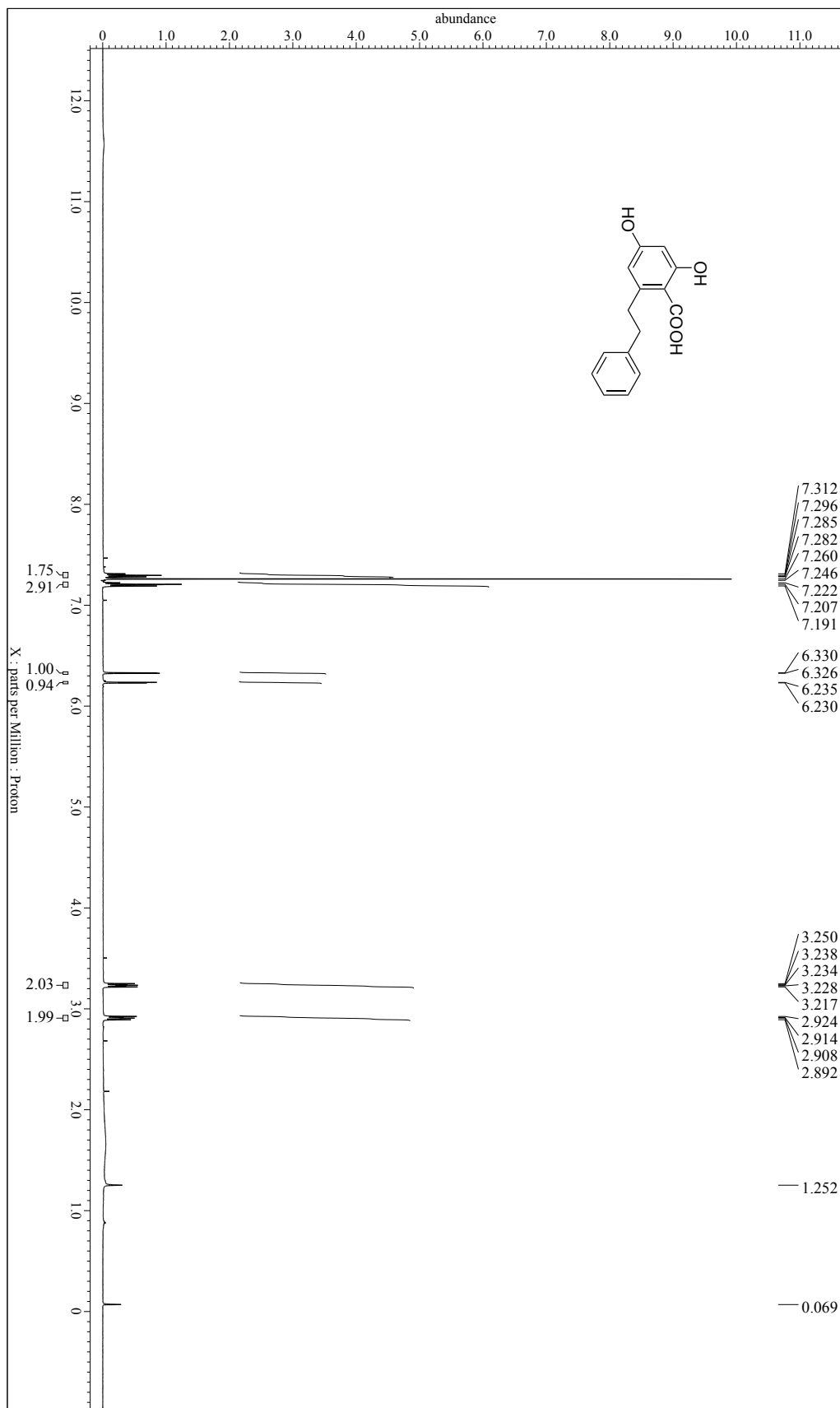
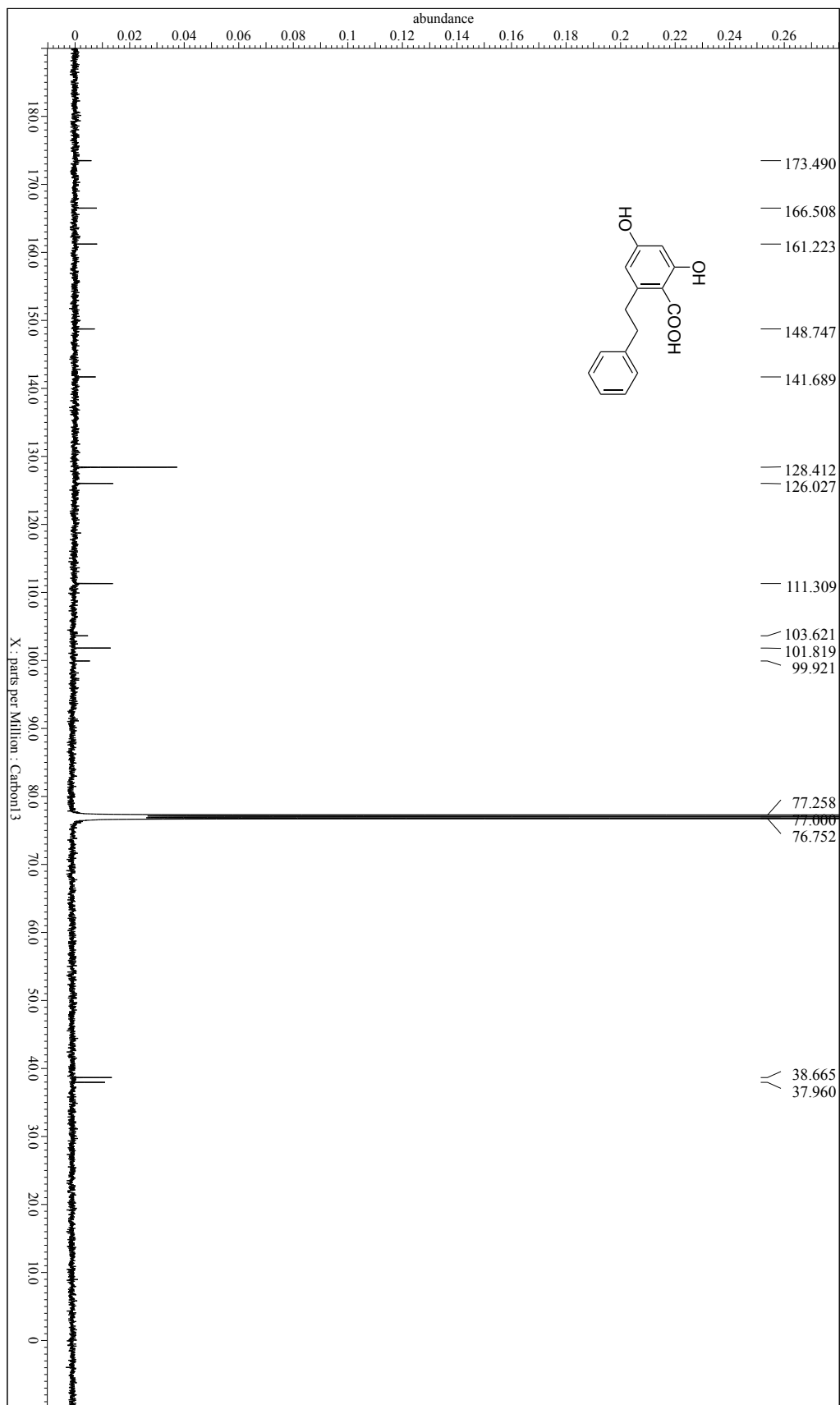
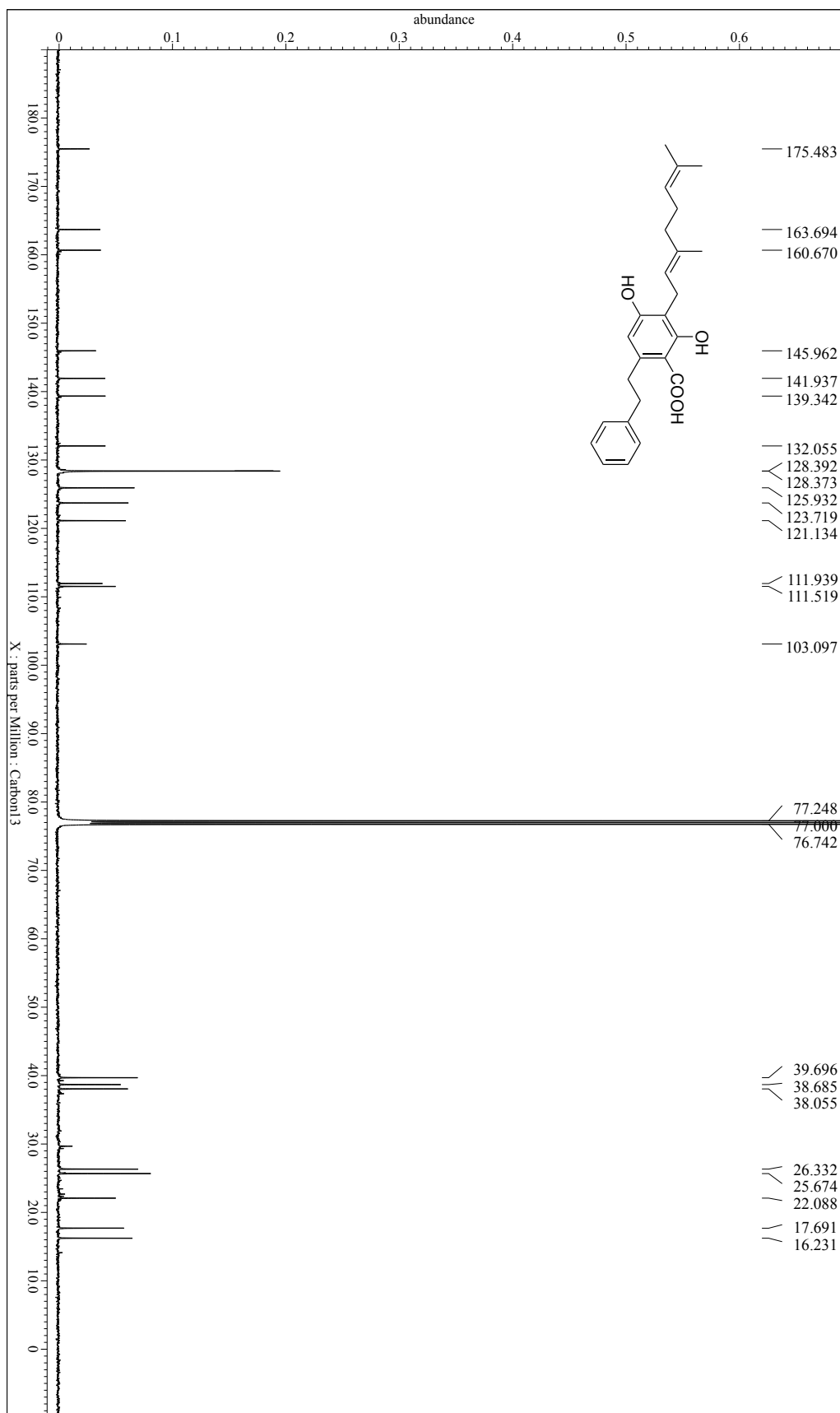


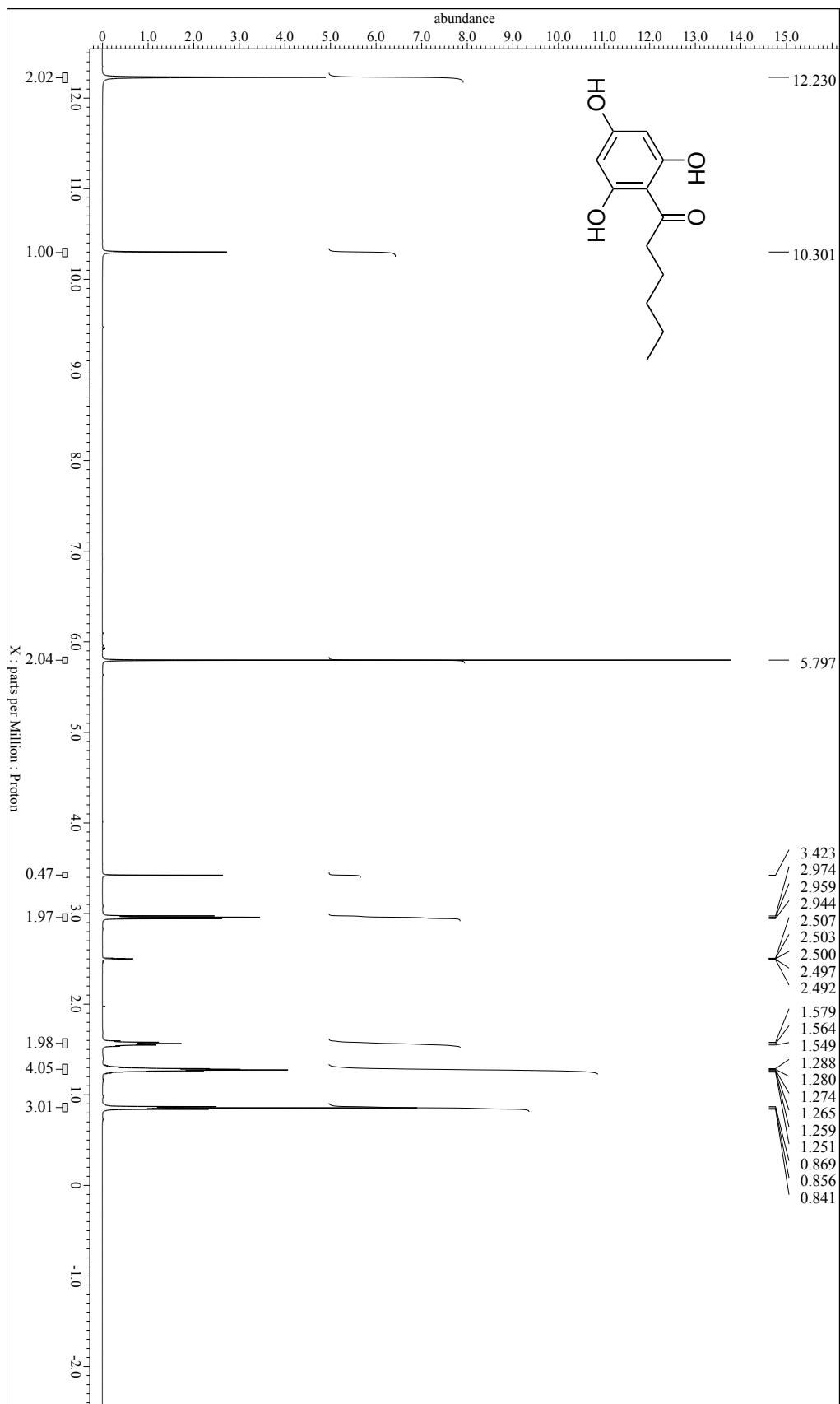
図 S19. 6 の ^1H NMR (500 MHz) スペクトル (CDCl_3).



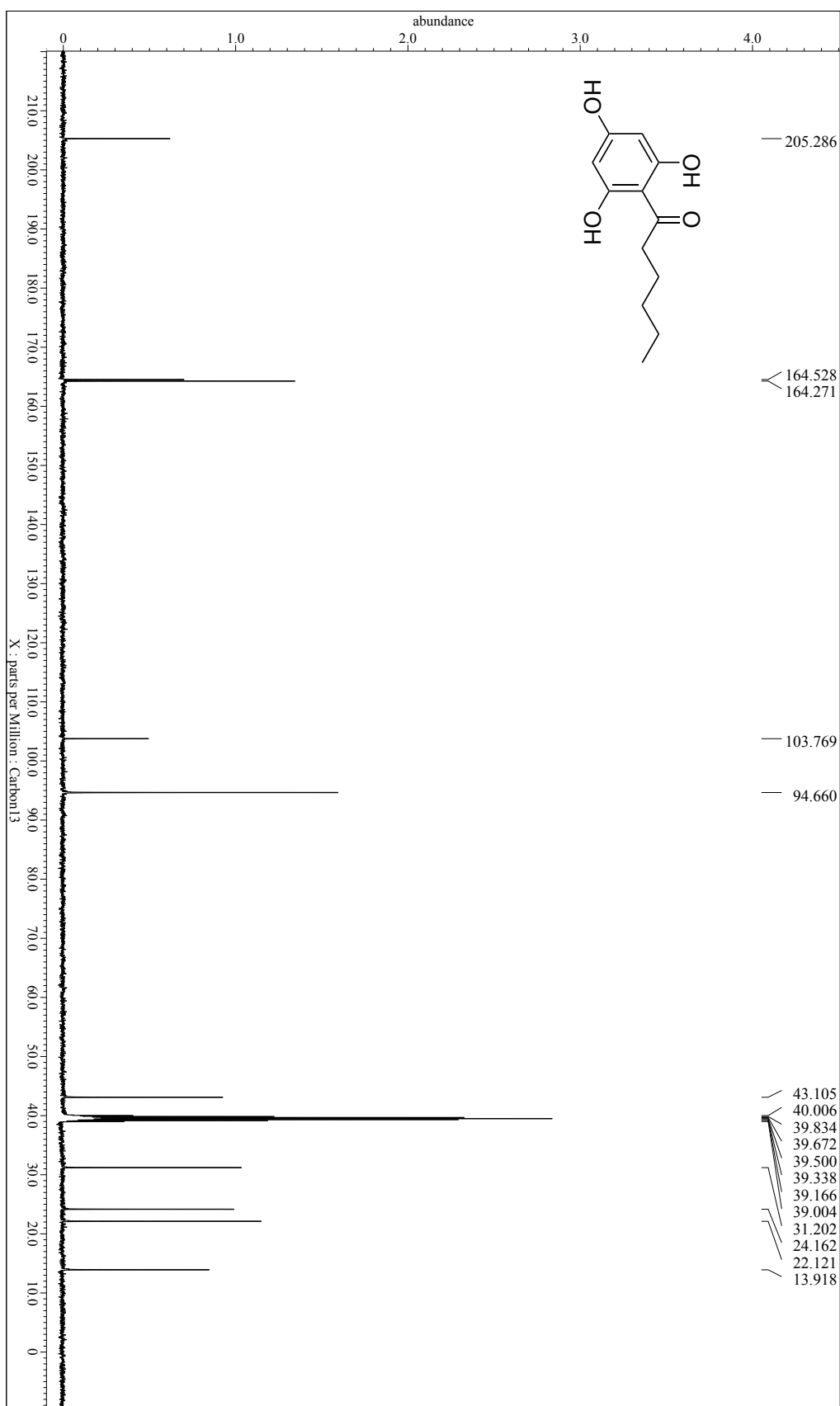
☒ S20. 6 の ^{13}C NMR (125 MHz) スペクトル (CDCl_3).



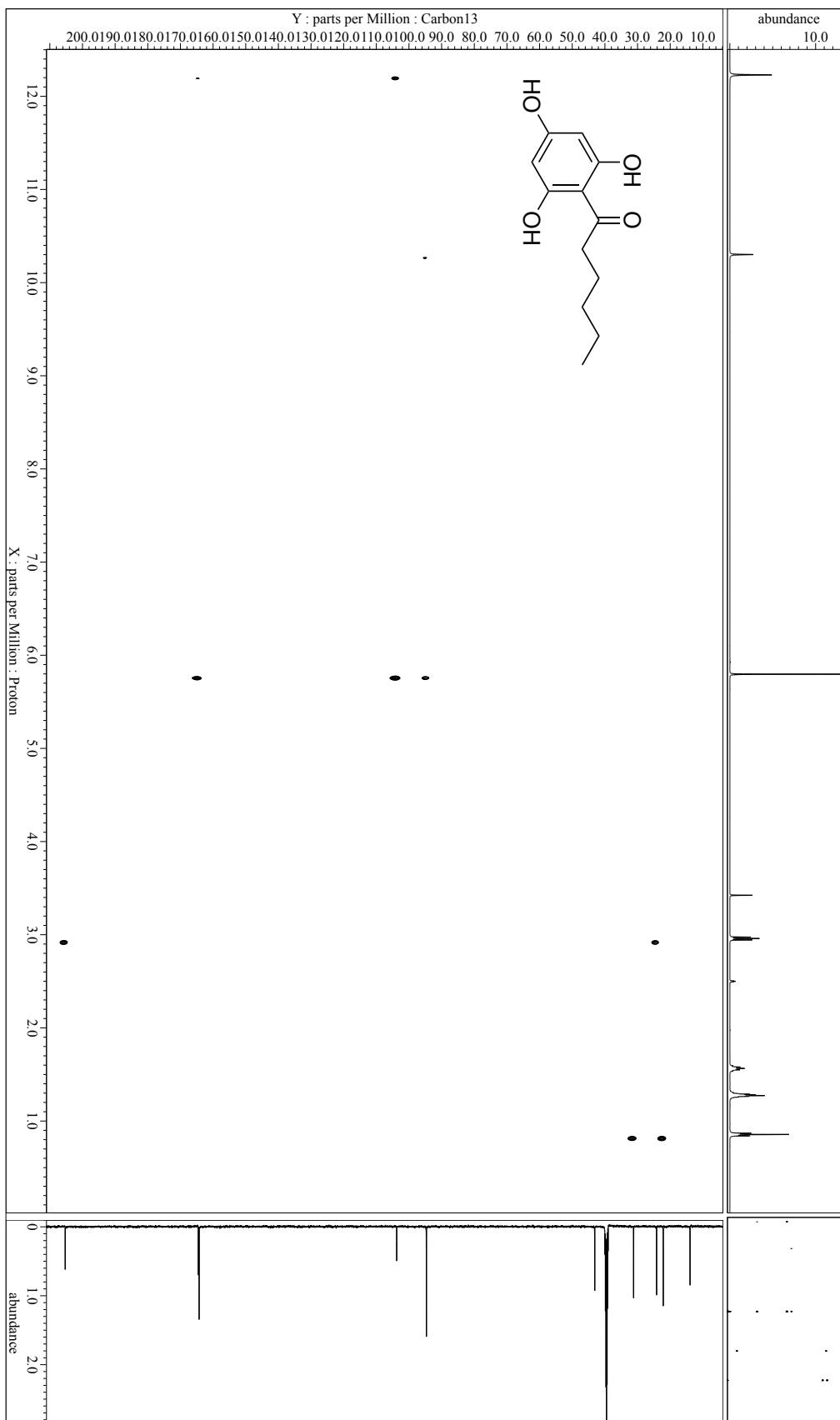
☒ S22. 6b の ^{13}C NMR (125 MHz) スペクトル (CDCl_3).



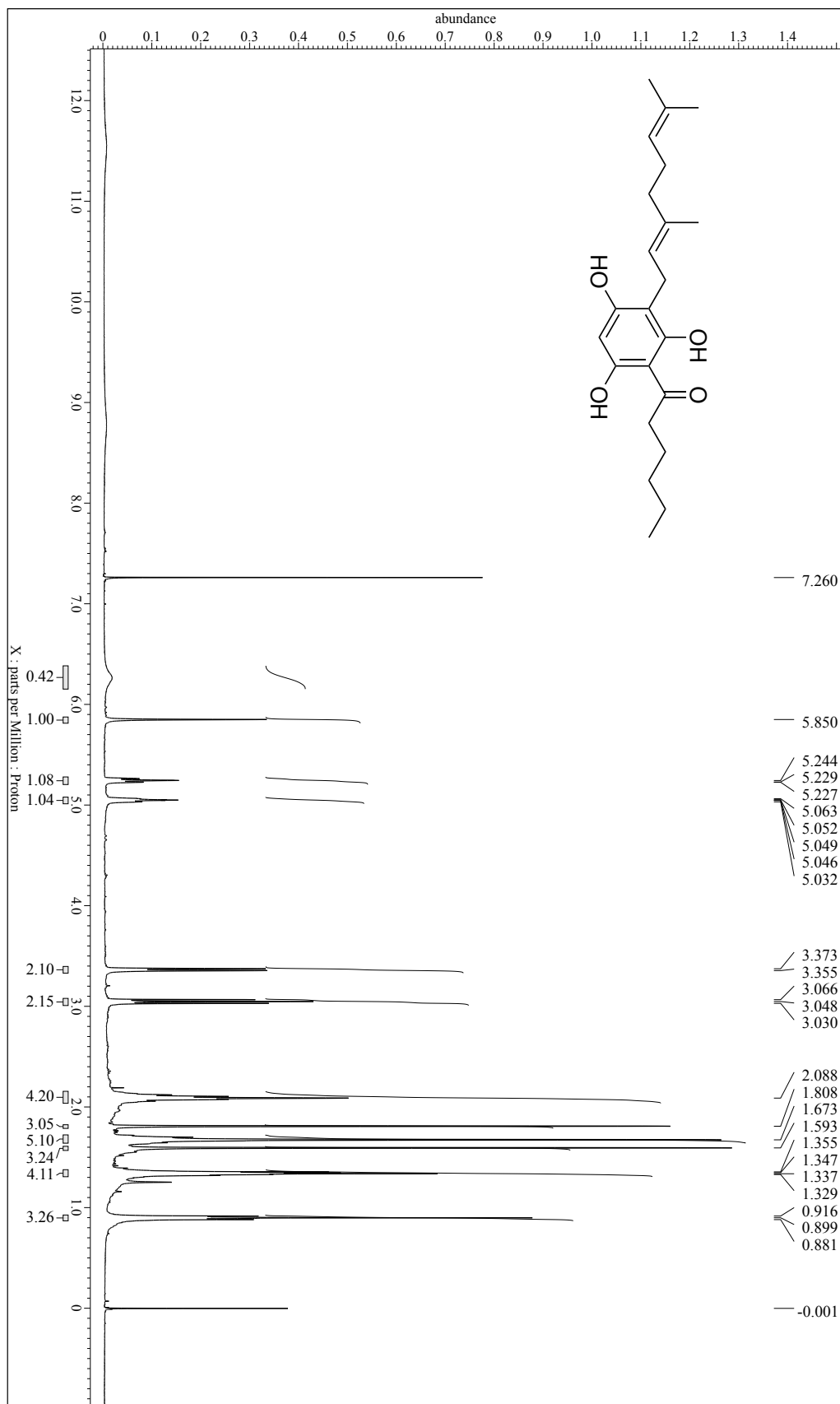
☒ S23.14 の ^1H NMR (500 MHz) スペクトル (DMSO- d_6).



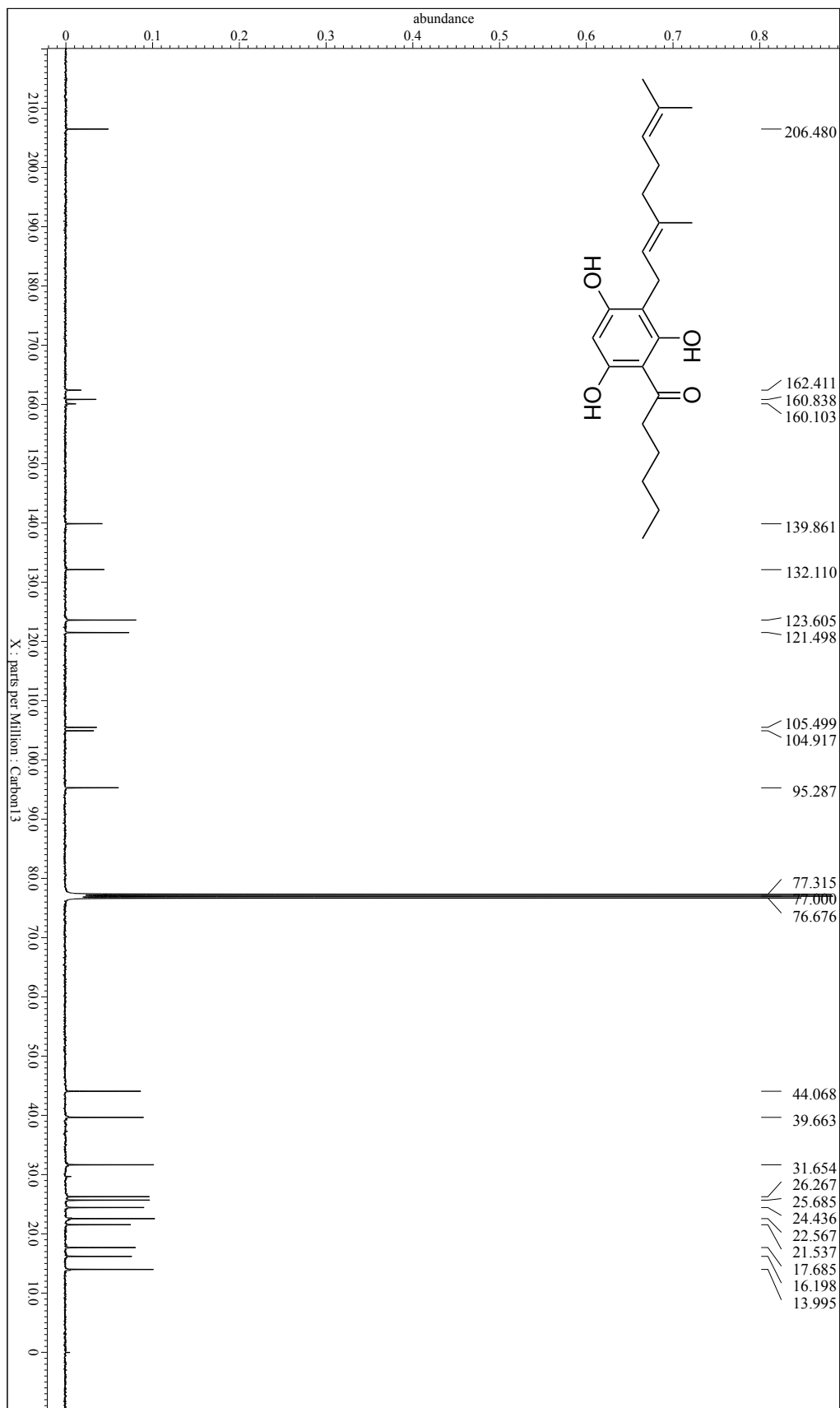
☒ S24.14 の ^{13}C NMR (125 MHz) スペクトル (DMSO- d_6).



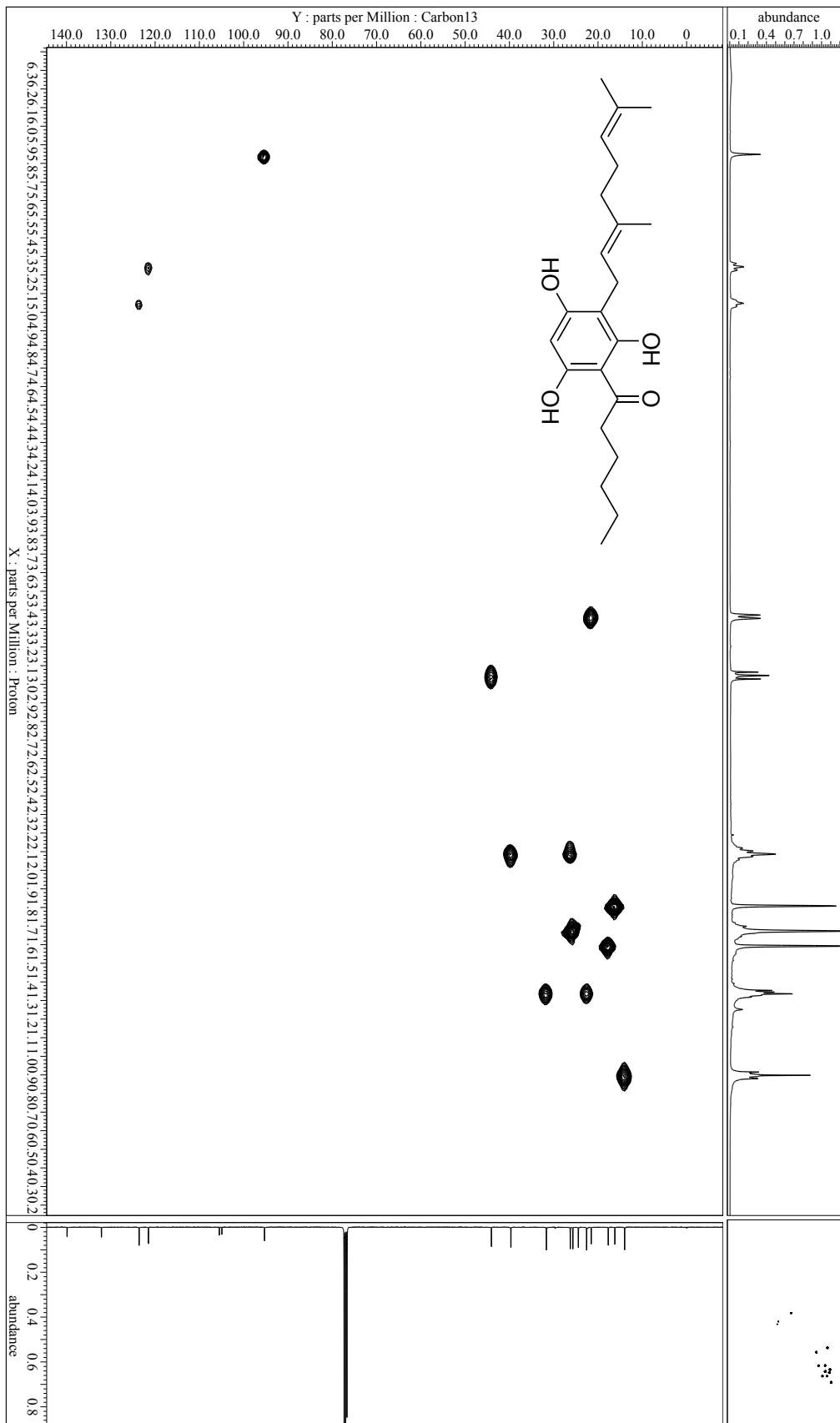
☒ S26. 14 の HMBC スペクトル (DMSO- d_6).



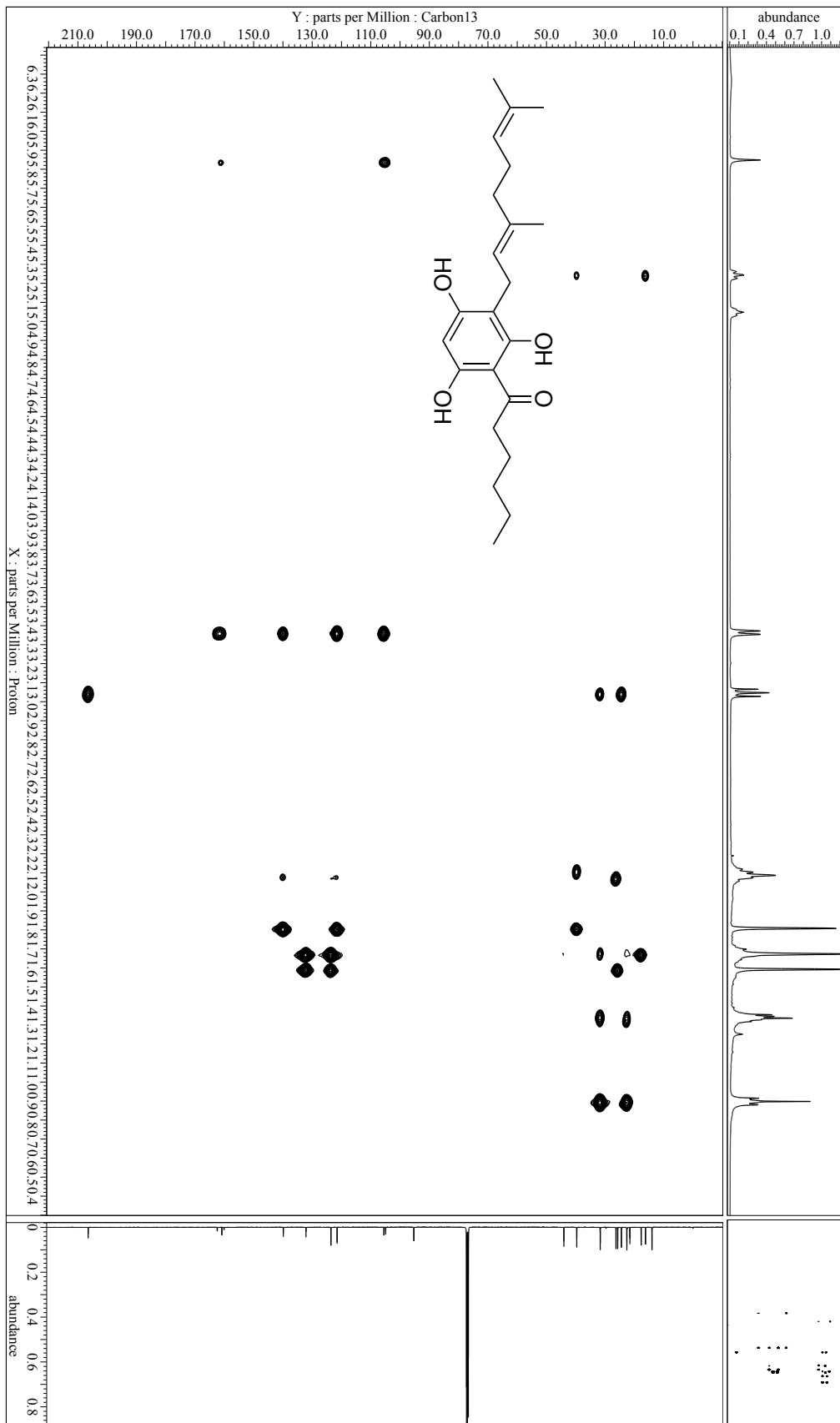
☒ S27. 14e の ^1H NMR (400 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S28. 14e の ^{13}C NMR (100 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S29. 14e の HMQC スペクトル (CDCl₃).



☒ S30. 14e の HMBC スペクトル (CDCl₃).

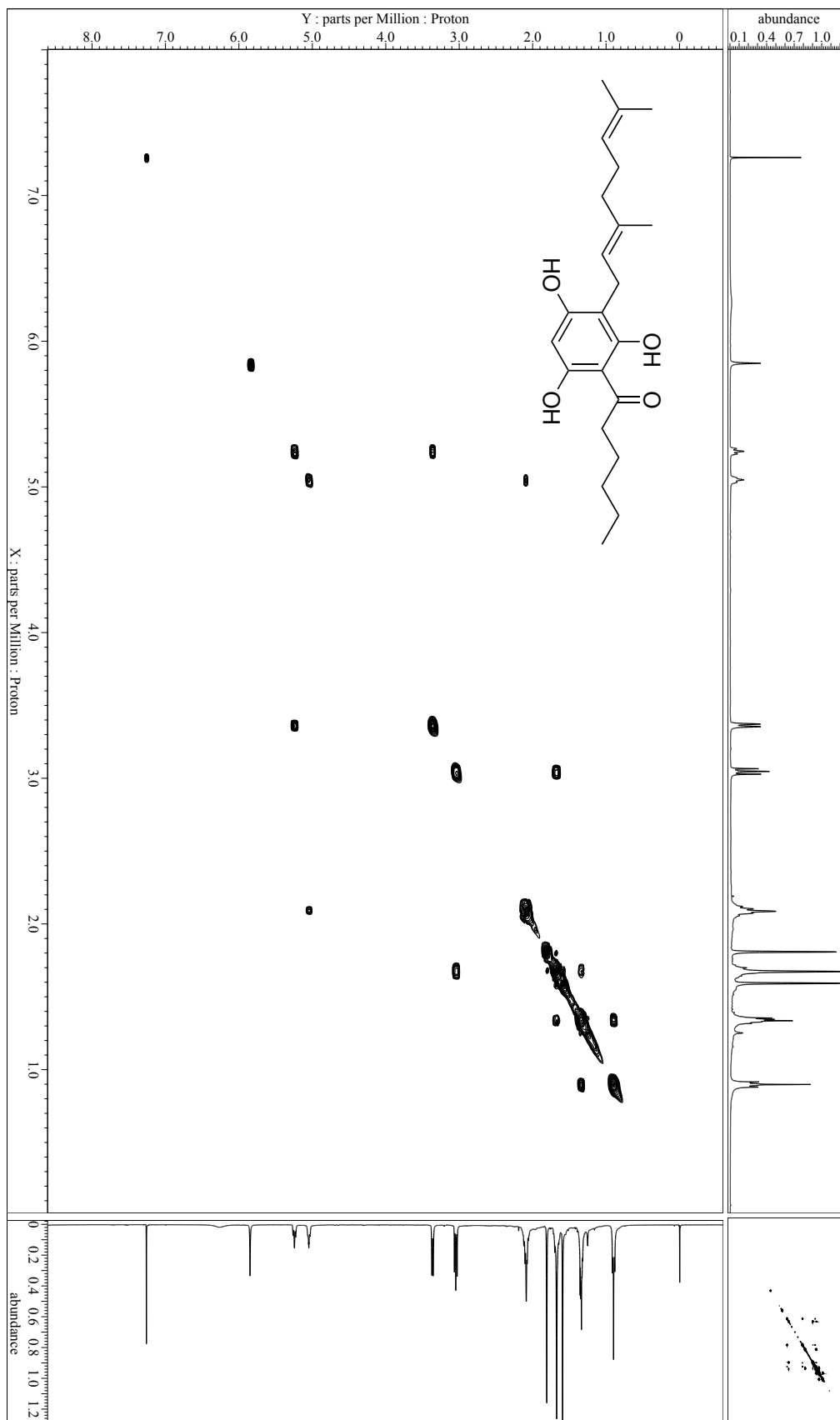


図 S31. 14e の ^1H - ^1H COSY スペクトル (CDCl_3).

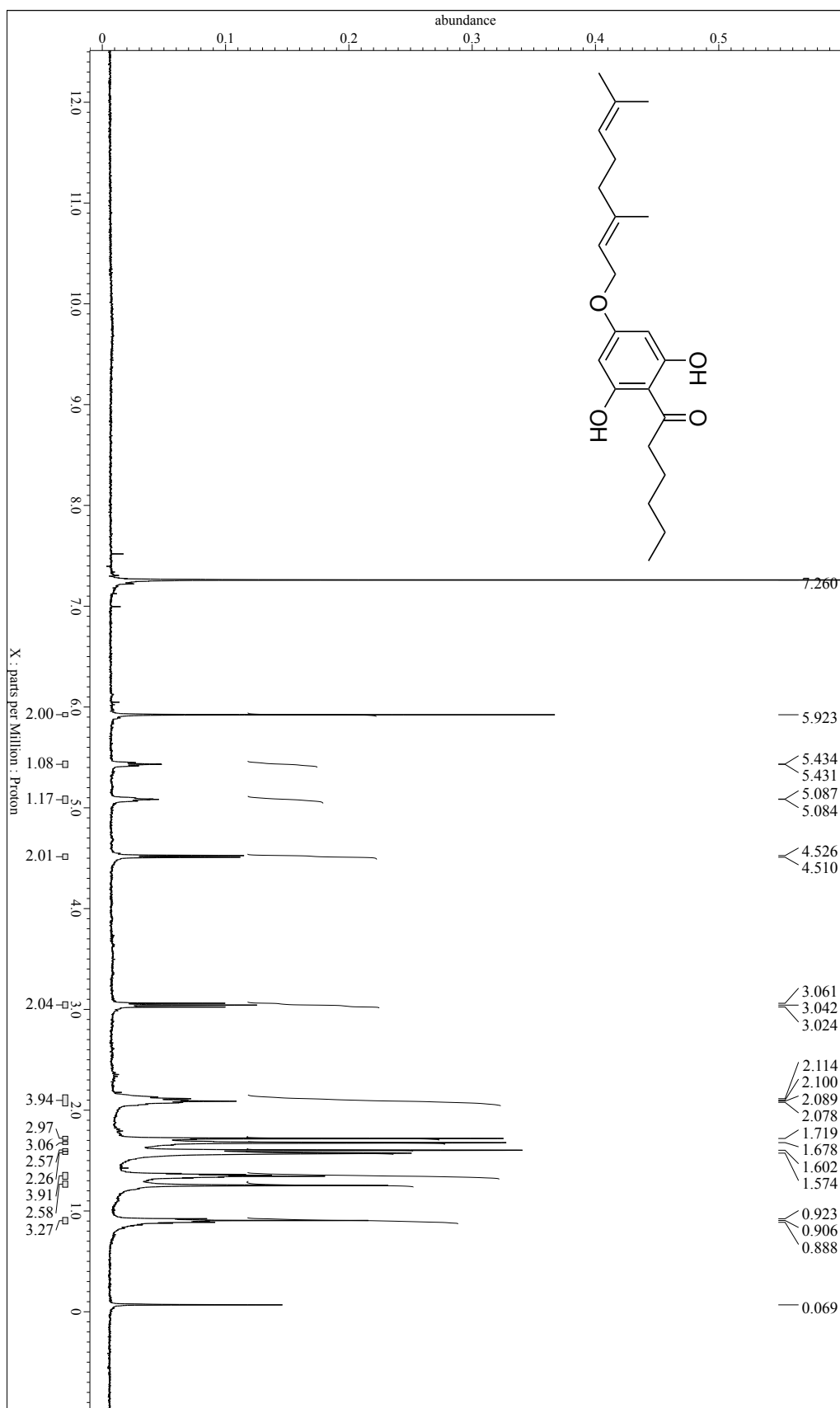
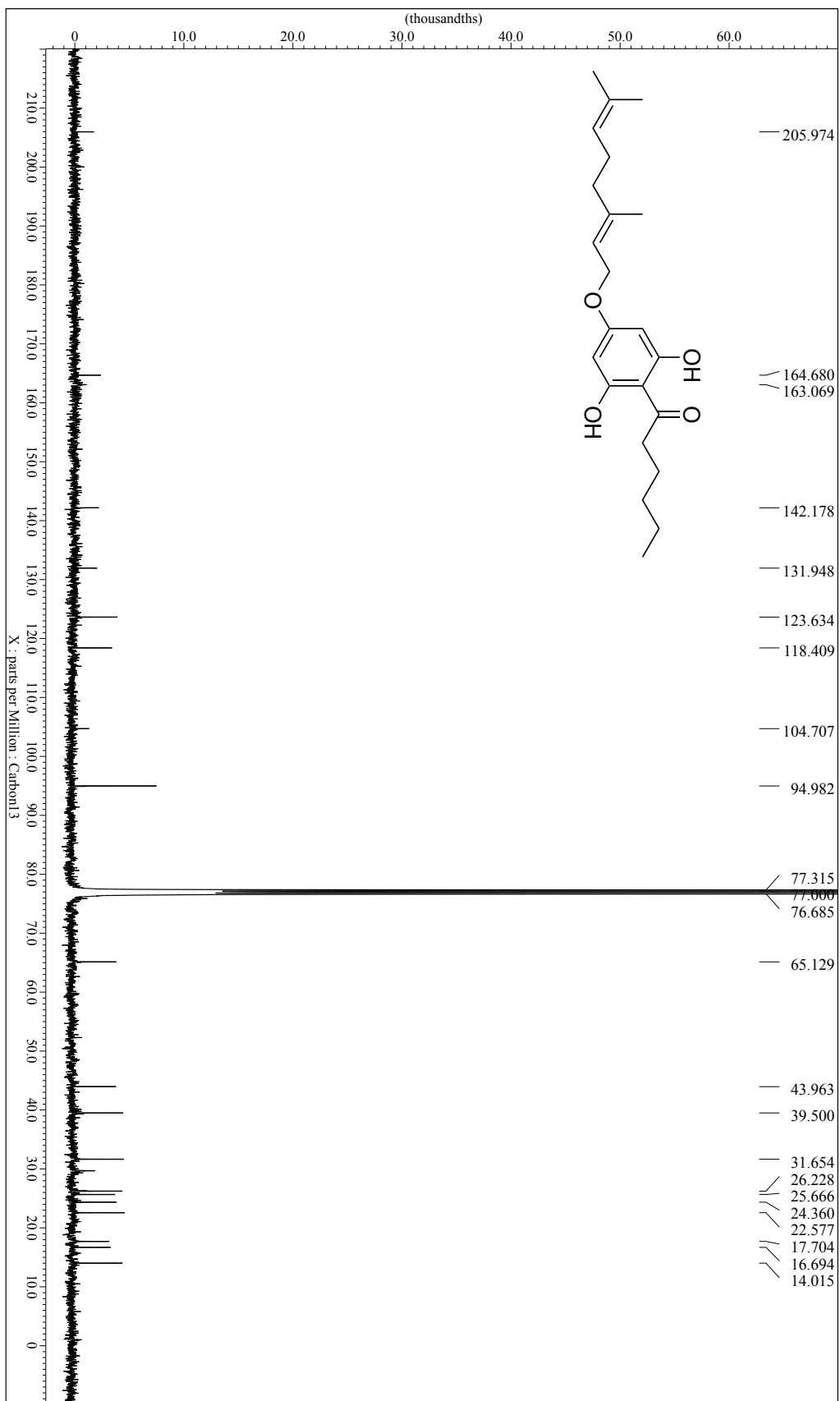


図 S32. 14f の ^1H NMR (400 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S33. 14f の ^{13}C NMR (100 MHz) スペクトル (CDCl_3).

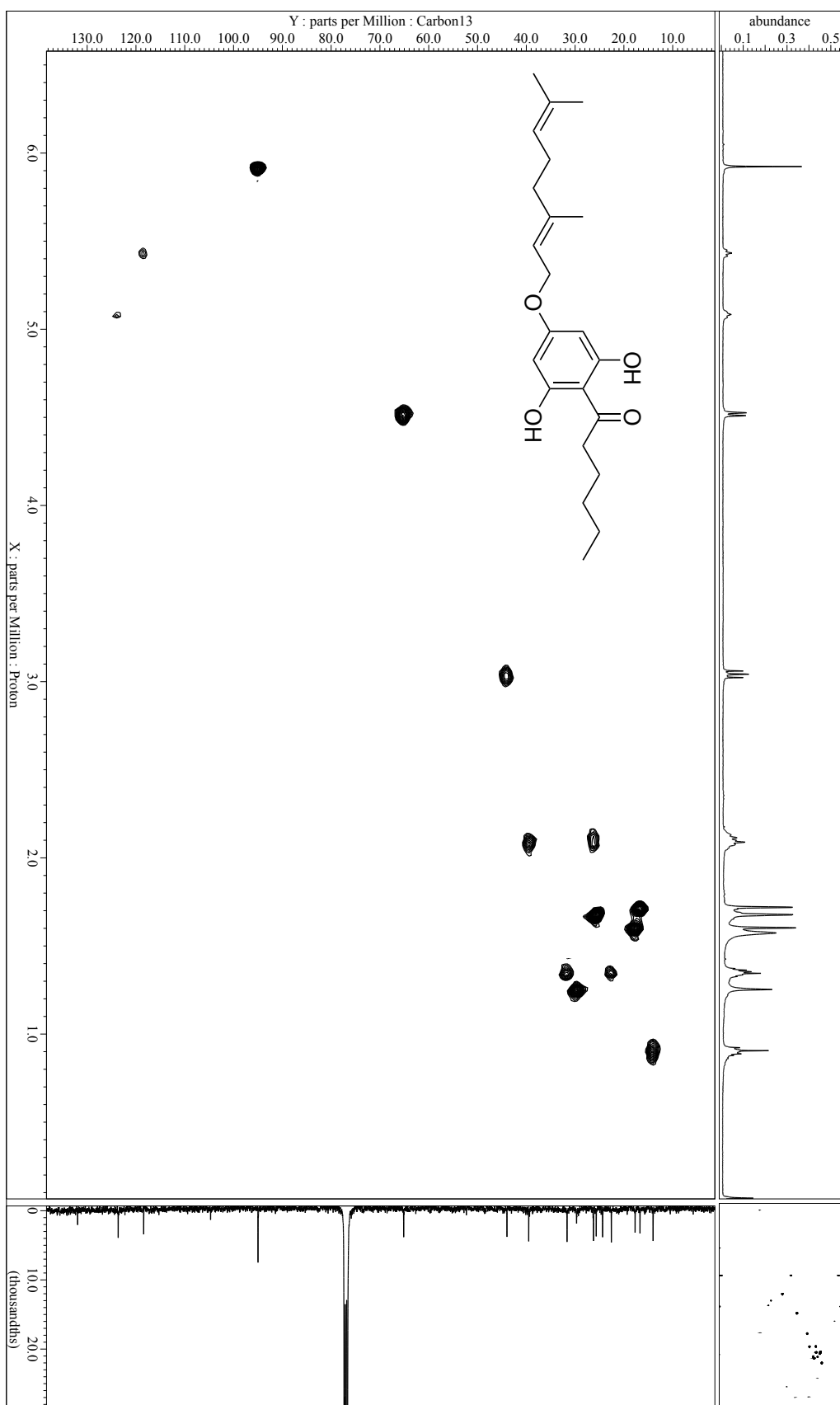


図 S34. 14f の HMQC スペクトル (CDCl₃).

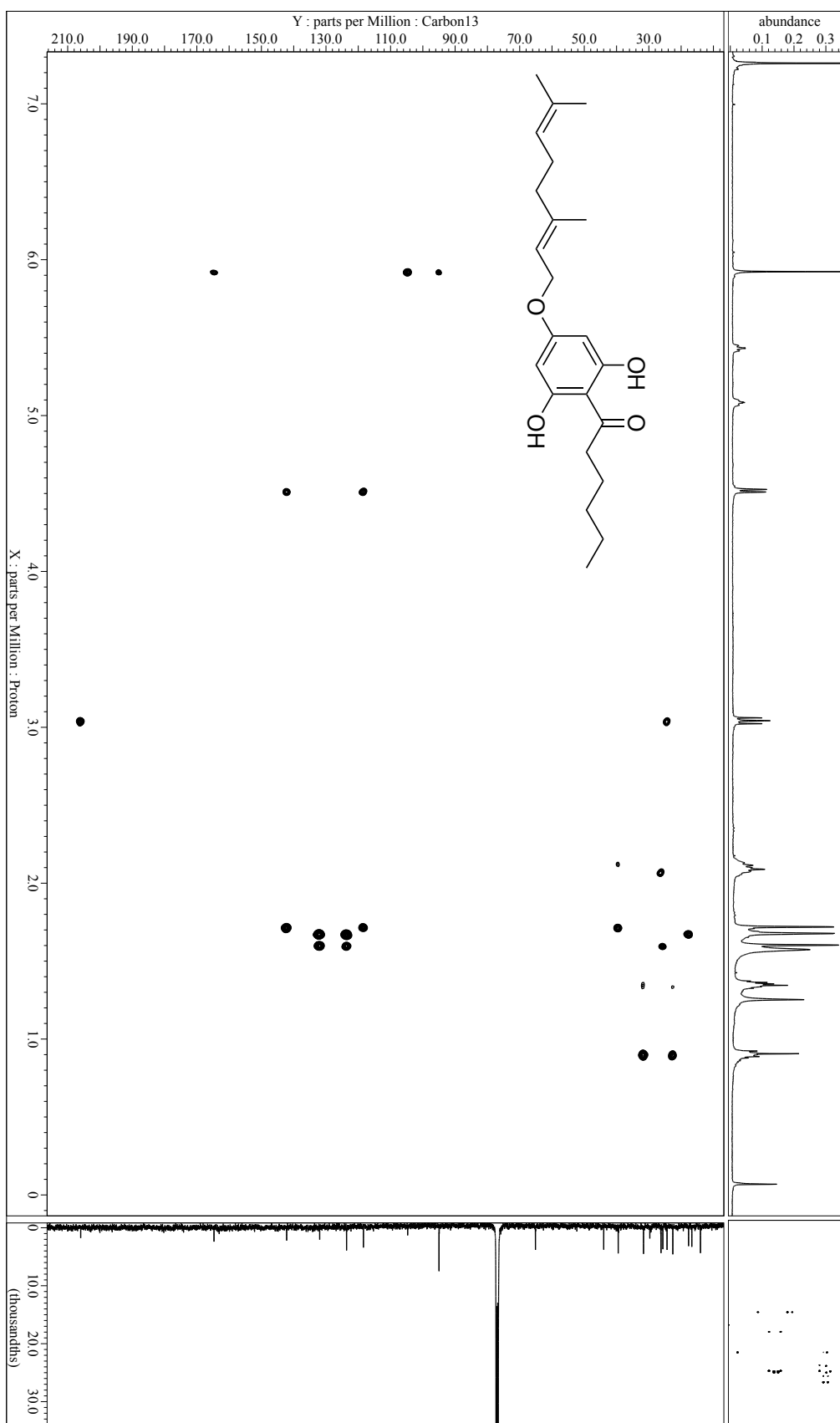
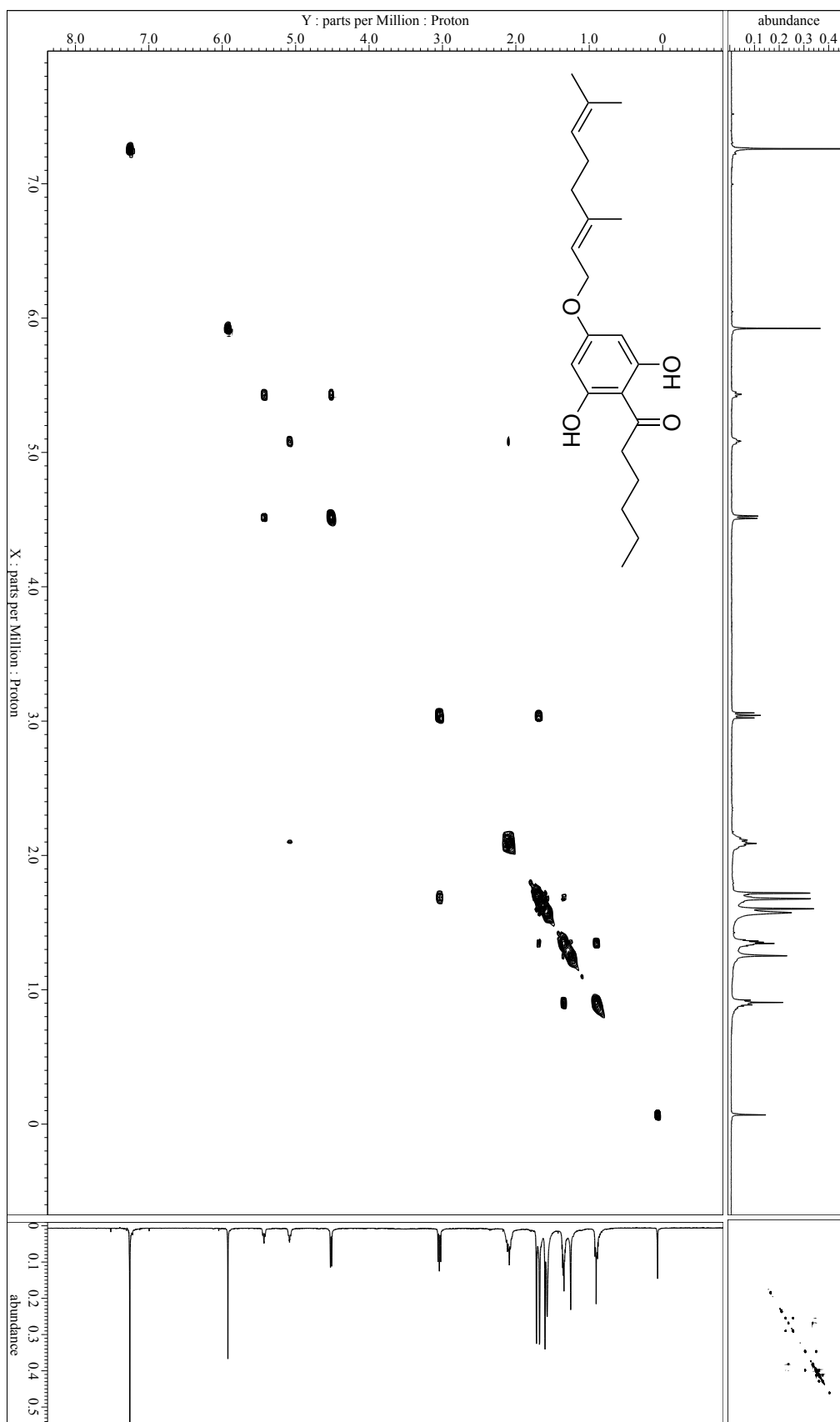
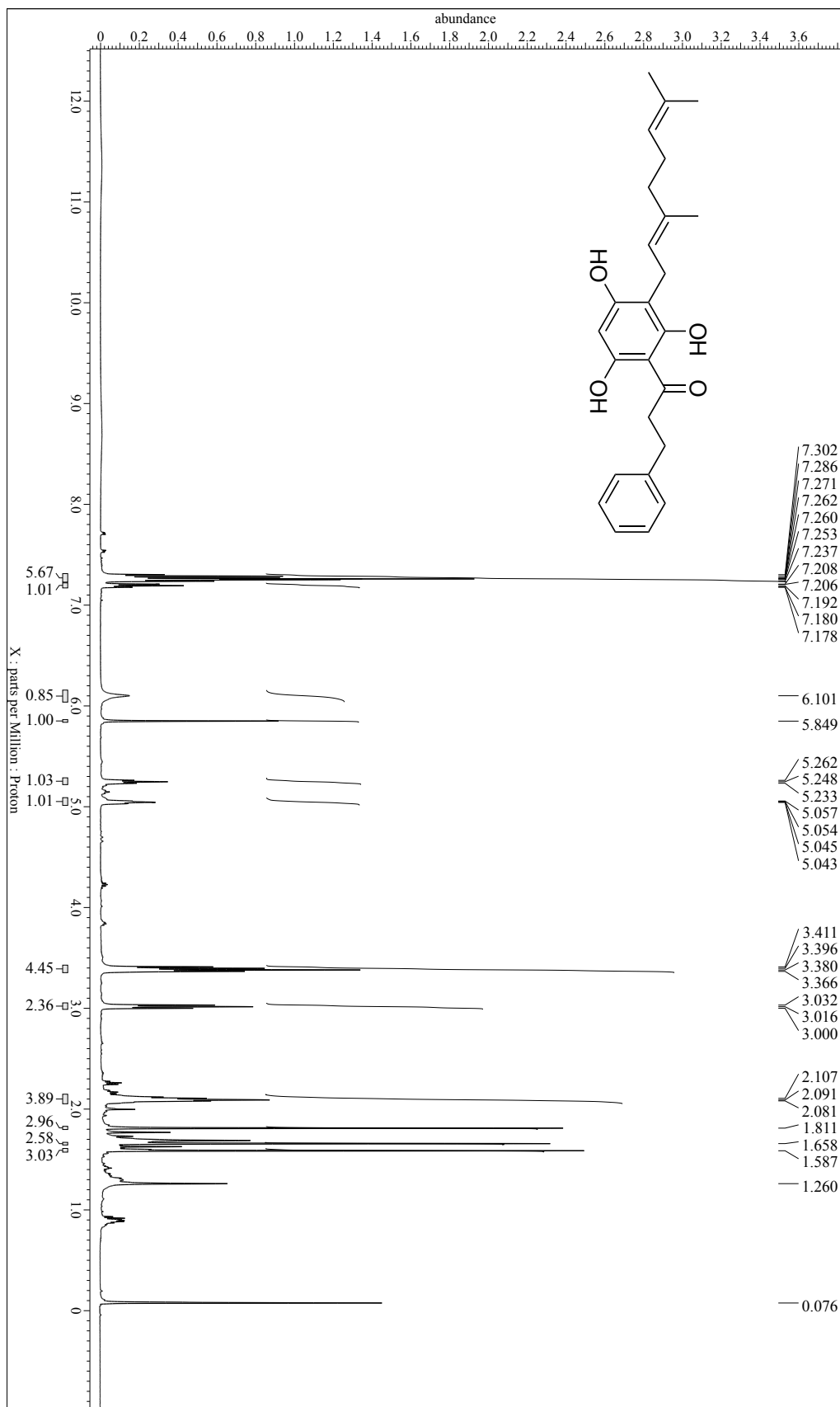


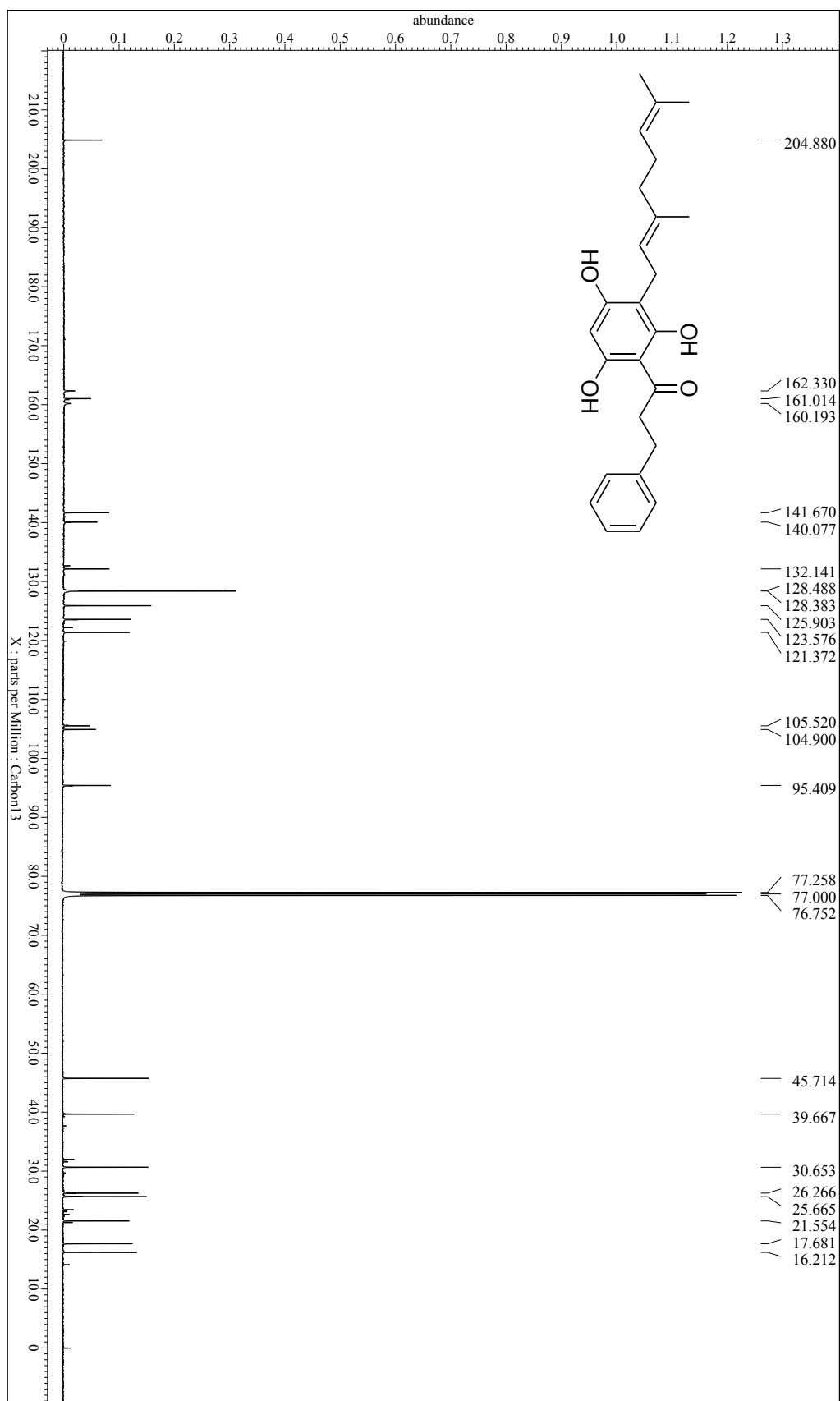
図 S35. 14f の HMBC スペクトル (CDCl₃).



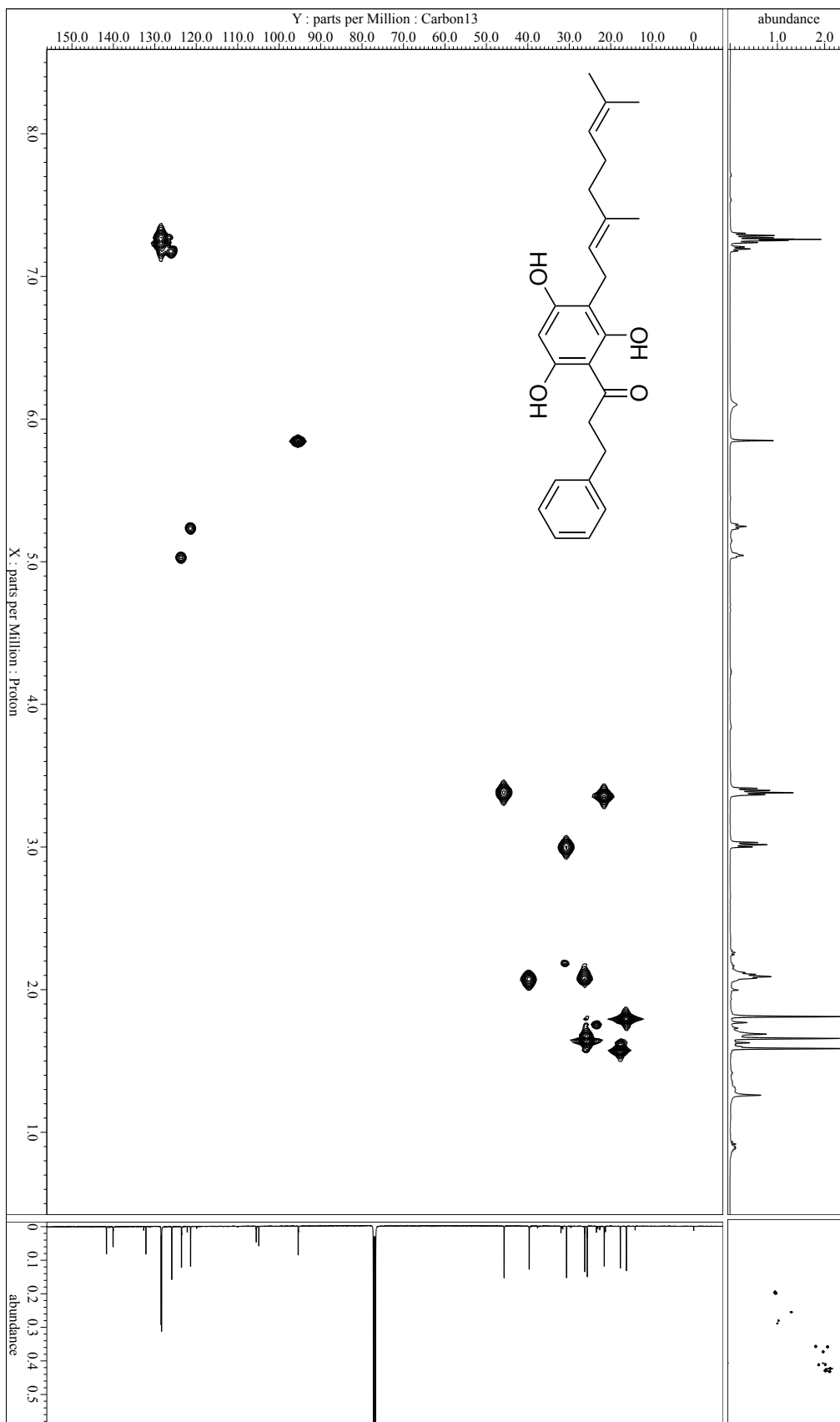
☒ S36. 14f の ^1H - ^1H COSY スペクトル (CDCl_3).



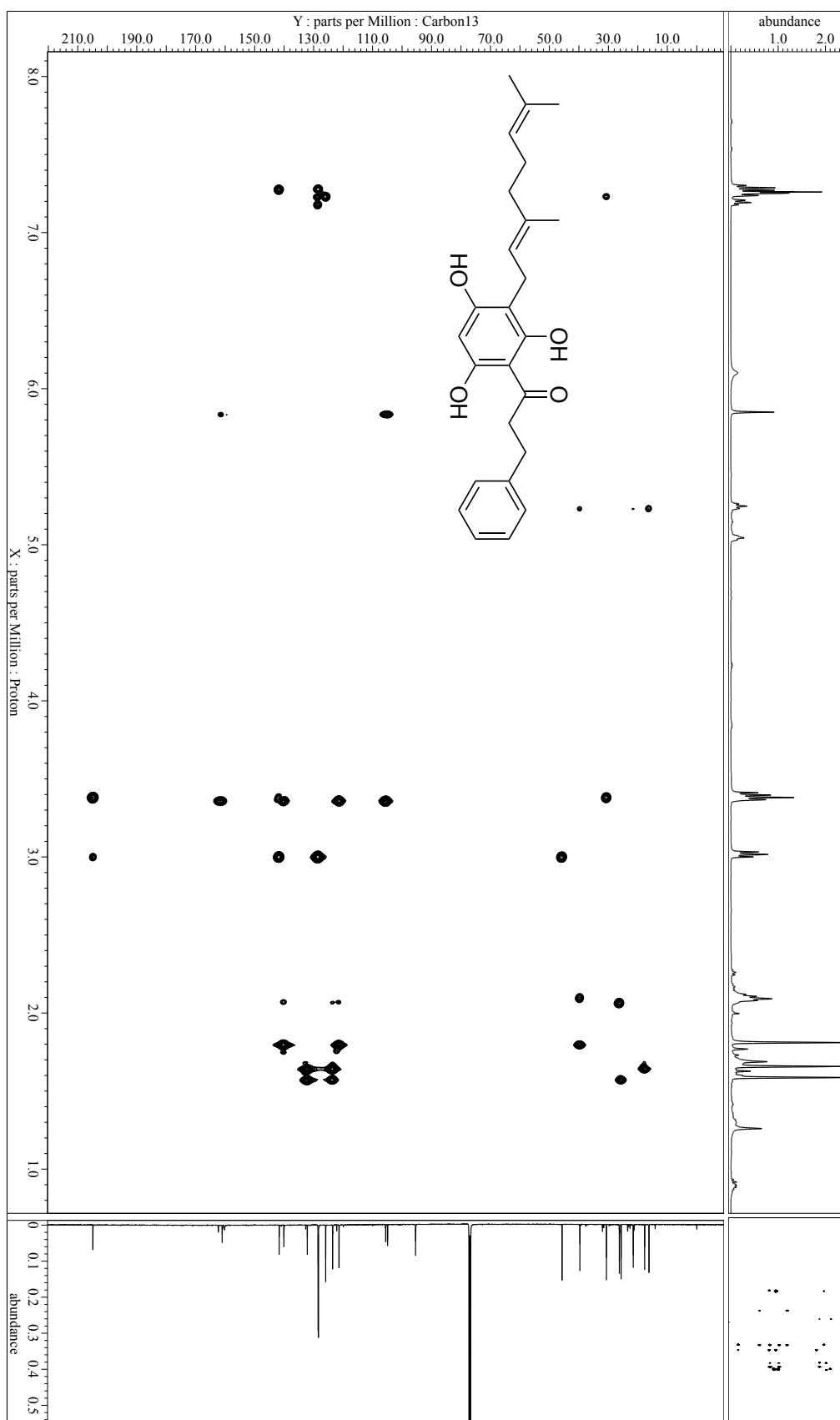
☒ S37. 15e の ^1H NMR (500 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S38. 15e の ^{13}C NMR (125 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S39. 15e の HMQC スペクトル (CDCl₃).



☒ S40. 15e の HMBC スペクトル (CDCl₃).

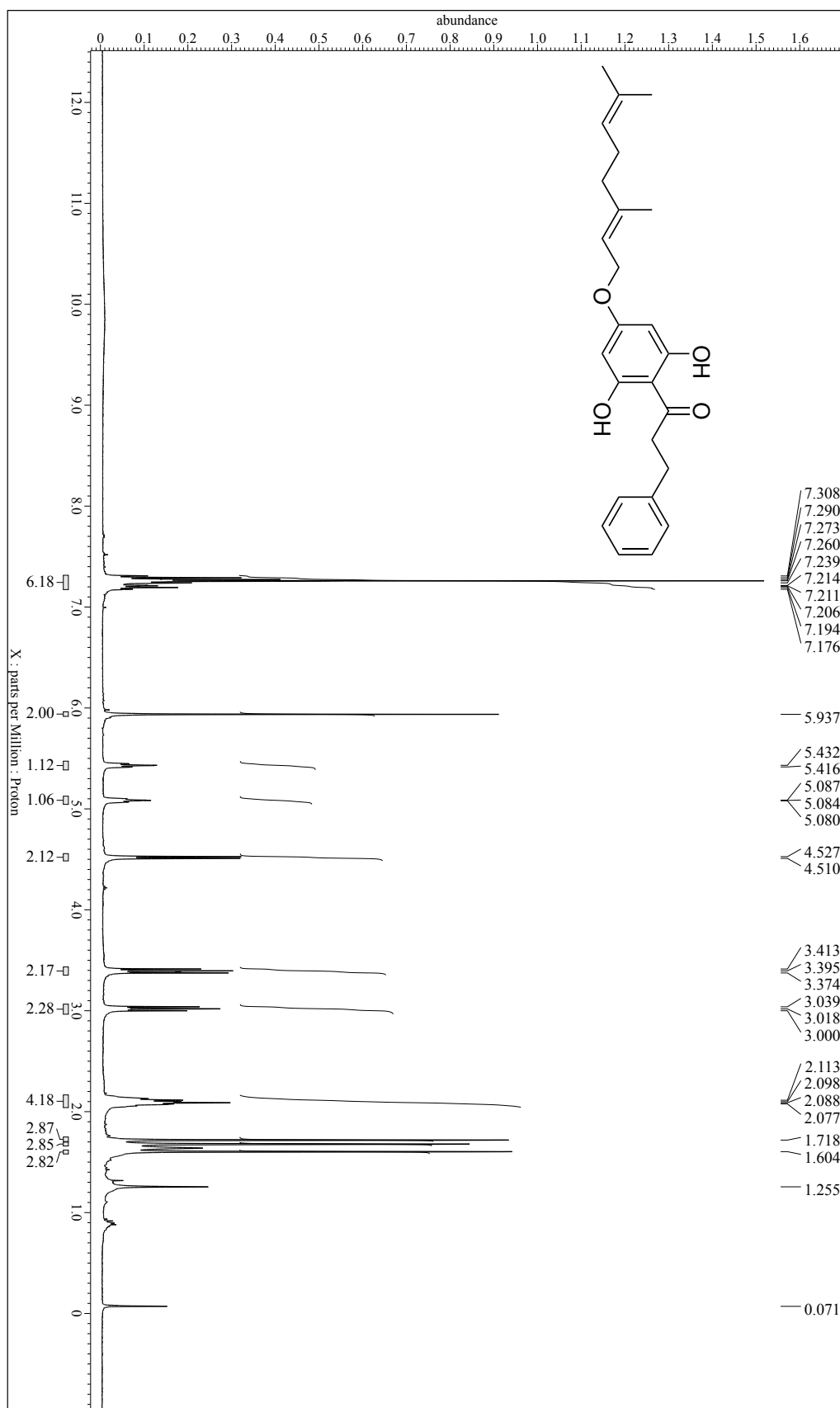
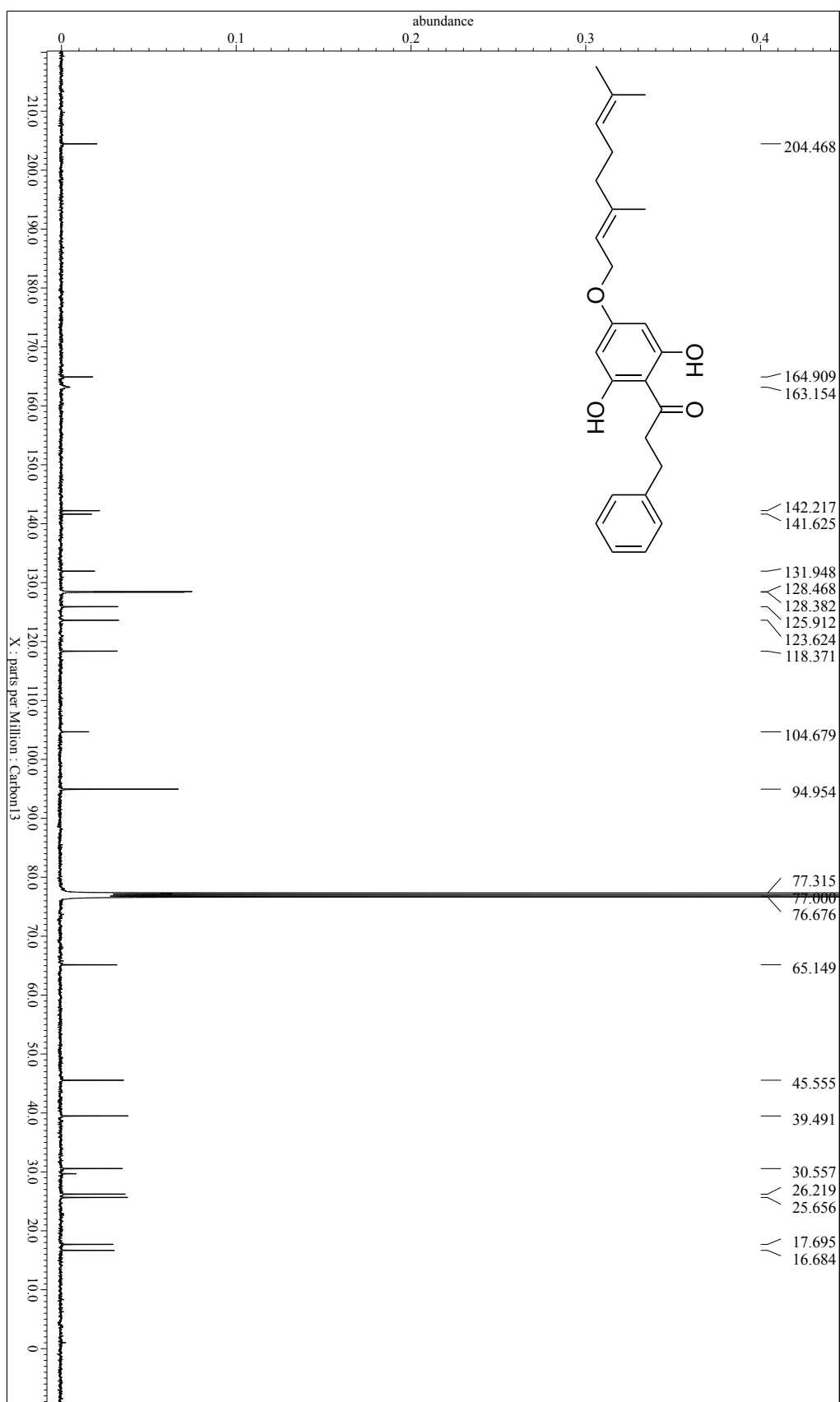


図 S41. 15f の ^1H NMR (400 MHz) スペクトル (CDCl_3).



☒ S42. 15f の ^{13}C NMR (100 MHz) スペクトル (CDCl_3).

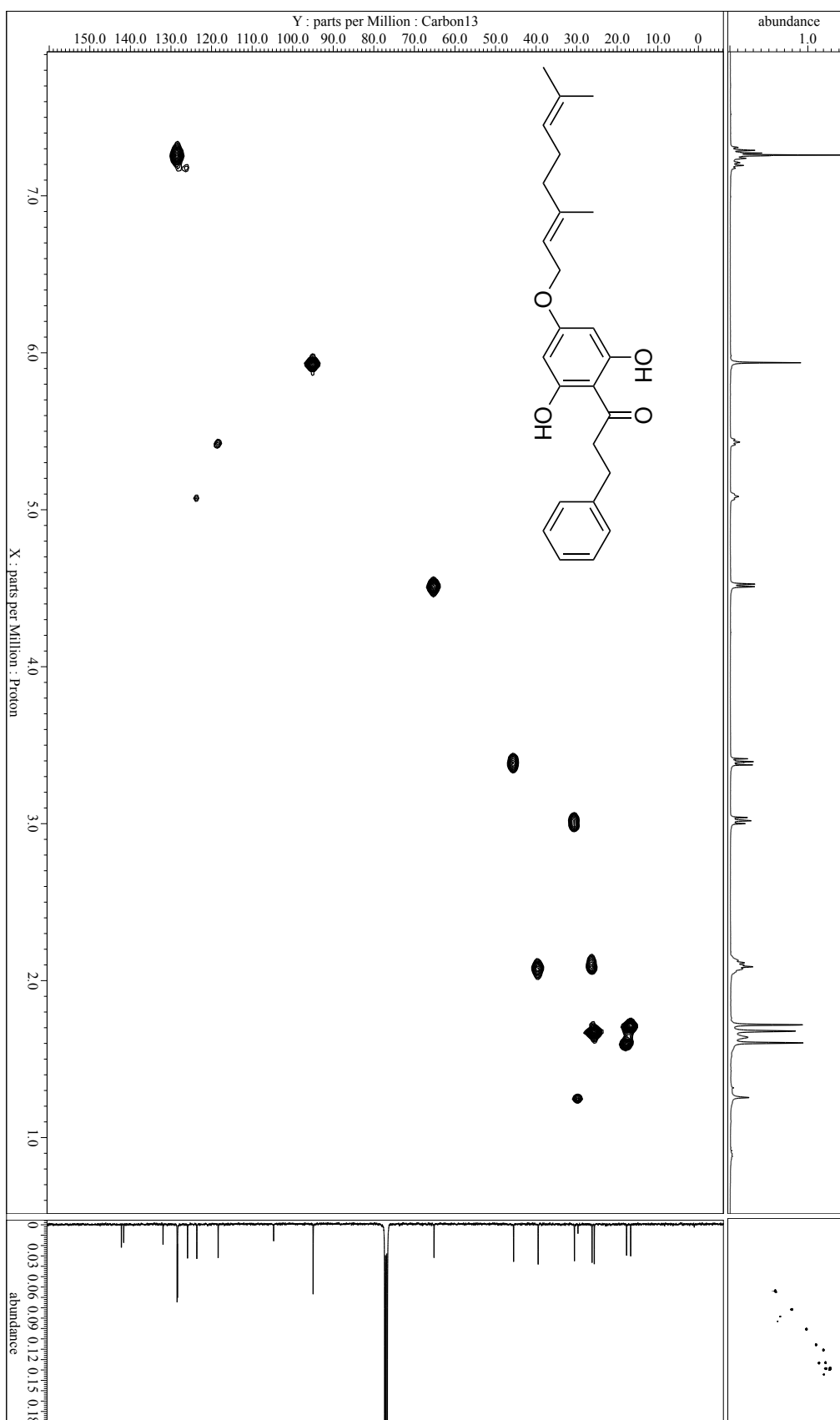


図 S43. 15f の HMQC スペクトル (CDCl₃).

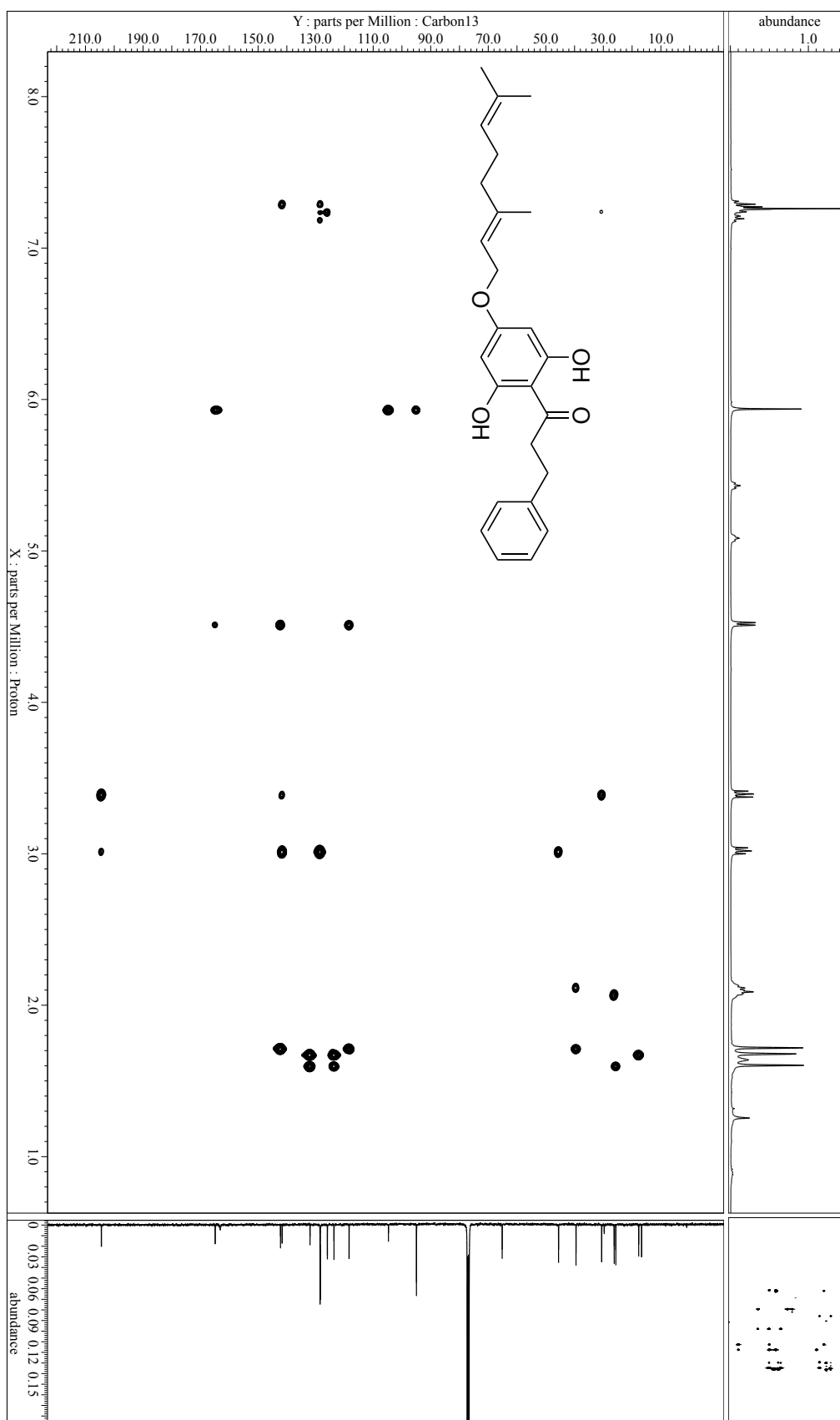


図 S44. 15f の HMBC スペクトル (CDCl₃).