

氏 名 たなや りょうすけ
棚谷 綾介

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 457 号

学位授与年月日 令和 6 年 3 月 22 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 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)

論文審査委員

(主査) 教授 庄司 翼
(副査) 教授 水口 峰之
(副査) 教授 森田 洋行 (指導教員)

論 文 要 旨

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

博士後期課程・薬科学専攻

棚谷 綾介

大麻 (*Cannabis sativa* L.) はカンナビノイドと称される二次代謝産物を生産する。中でも Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) は大麻の幻覚成分である一方、鎮痛、鎮吐および抗炎症作用など種々有用な薬理活性を示すことが知られている。また、THC とは環構造が異なる異性体の cannabidiol (CBD) は、近年米国で難治性小児てんかんの治療薬として臨床応用されている。さらに、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 に関し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。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。

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すべて同定されている (図 1)。このうちプレニル基転移酵素 (PT) である CsPT4 は、olivetolic acid **1** (OA) と geranyl diphosphate (GPP) の縮合反応により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 cannabigerolic acid **1b** (CBGA) を生合成する酵素である。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レゾルシノール酸をも基質として用いることができれば、カンナビノイドの構造多様性を大きく拡大できる。しかし従来、CsPT4 の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を行った。その結果、CsPT4 が多様な基質と反応して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 (第一章)、得られた酵素反応生成物がヒトすい臓がん細胞に顕著な毒性を示すことを明らかにした (第二章)。また、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 (第三章)。

第一章 CsPT4 の基質特異性の解明¹⁾

CsPT4 の生化学的解析にあたり、培養が簡便かつ異種タンパク質の安定的発現が可能なメチロトロフ酵母 (*Pichia pastoris*) を宿主とした組換え CsPT4 発現系を作製し、抽出したミクロソーム画分を粗酵素として以降の実験に使用した。本章では、CsPT4 の基質特異性を明らかとするため、各種のプレニル基質および芳香族基質を用いた酵素反応を実施した。はじめに、**1** を共基質とし、鎖長の異なる 5 種のプレニル基質、dimethylallyl diphosphate (DMAPP)、GPP、farnesyl diphosphate (FPP)、geranylgeranyl diphosphate (GGPP)、および geranylfarnesyl diphosphate (GFPP) に対する反応性を検討した (図 2)。その結果、CsPT4 は GFPP を除く 4 種のプレニル基質を認識し、鎖長の異なる CBGA 類縁体 (**1a**–**1d**) を合成した。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。

次に、芳香族基質に対する特異性について検討した (図 2)。GPP を共基質とし、レゾル

シノール誘導体 (2-8) およびその他の芳香族基質 (9-13) を用いて酵素反応を実施した。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合成した。興味深いことに、本酵素はビベンジル骨格を有する 2,4-dihydroxy-6-phenylethylbenzoic acid **6** (DPA) をも受容して、perrottetinene の前駆体である 3-geranyl-DPA **6b** を合成した。本結果は、CsPT4 が perrottetinene など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を示唆している。さらに CsPT4 は、divarinic acid **2**、2,4-dihydroxy-6-heptylbenzoic acid **3**、および **6** を芳香族基質とした反応において、GPP 以外のプレニル基質を受容し、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。

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、本研究により CsPT4 がプレニルおよび芳香族基質に対して例外的に広範な基質認識能力を有していることが証明できた。また、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。

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¹⁾

カンナビノイドには多様な生物活性が報告され、近年は THC および CBD の抗がん作用にも注目が集まっている。一方、**1b** など微量成分として存在するカンナビノイドの生物活性に関する研究は限定的である。そこで本章では、カンナビノイド類縁体のヒトすい臓がん細胞 (PANC-1) に対する生物活性試験を実施した。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、PANC-1 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) を有することが知られている。CsPT4 の酵素反応により得られたカンナビノイド類縁体が PANC-1 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。

強力な抗緊縮活性を有し、すい臓がんに対する臨床試験が実施されている arctigenin をポジティブコントロールとして、**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結果、ほとんどのカンナビノイド類縁体が栄養欠乏条件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、新規カンナビノイドである **1c** が最も高い活性 PC₅₀ 3.4 μM (NDM 培地中での 50% 致死濃度) を示し、その一方でプレニル鎖長が短い 3-dimethylallyl-OA **1a** の活性は弱く、さらにプレニル基を持たない **1** は全く活性を示さなかった (表 1)。

以上のことから、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。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証明したのは本研究が初めてである。本研究で得ら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ものの、構造最適化により活性を向上したカンナビノイドが得られることが期待される。

第三章 基質依存的に変化する CsPT4 のプレニル化様式²⁾

第一章では CsPT4 のレゾルシノール酸誘導体に対する広範な基質特異性を明らかとしたが、本酵素の基質特異性をより深く理解するためにはレゾルシノール酸と構造が類似する

基質に対する反応性を精査する必要があると考えた。本章では本酵素の基質である **1** および **6** 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、CsPT4 との反応性を検討した (図 3A)。

GPP を共基質とした酵素反応を行った結果、意外なことに CsPT4 は **14** および **15** の両基質から 2 種の生成物を合成し、有機合成した標品と LC-MS データを比較した結果、それぞれが 3'-C-および 4'-O-ゲラニル化化合物 (**14e**, **14f**, **15e**, および **15f**) であることが判明した (図 3B, 3C)。これら化合物は、従来報告されていない新規化合物である。一方で CsPT4 は **16** とは反応しなかった。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。

次に、第二章と同様に **14**、**15**、およびそれぞれ 2 種のゲラニル化体について PANC-1 細胞に対する抗緊縮活性を調査した。その結果、プレニル化の有無に関わらずいずれの化合物も一定の活性を有し、中でも 4'-O-geranyl-THDC **15f** が最も強力な抗緊縮活性 (PC₅₀ 0.99 μM) を示した (表 1)。本化合物の活性は、第二章で試験したカンナビノイド類縁体より数倍高く、arctigenin に匹敵するものであった。

以上のように、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驚くべき活性を有していることが明らかとなった。植物二次代謝経路の PT はほとんどが C-PT で、O-PT は数例が報告されているのみであり、CsPT4 のように基質の骨格に依存してプレニル化様式を変化させる酵素は初めてである。また酵素反応生成物のうち、**15f** が強力な抗緊縮活性を有することを見出した。今後、CsPT4 の構造解析が進展することにより、これら化合物を効率的に生産できるよう本酵素をリデザインすることが可能になると考えられる。

総括

本研究により、大麻プレニル基転移酵素 CsPT4 が非常に広範な基質を認識できるだけでなく、基質構造に応じてプレニル化様式を変化させる特異な触媒能力を持つことを明らかとした。本酵素は多様なプレニル化化合物の微生物生産等に应用可能と考えられる。また、CsPT4 の酵素反応により得られたプレニル化化合物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証明した。**15f** をはじめとする本酵素の反応生成物が、すい臓がん治療薬の有益なシーズになることが期待される。

参考文献：

- 1) [Tanaya R](#), Kodama T, Lee YE, 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.*, **25**, 8601–8605 (2023).
- 2) [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.*, **47**, 449–453 (2024).

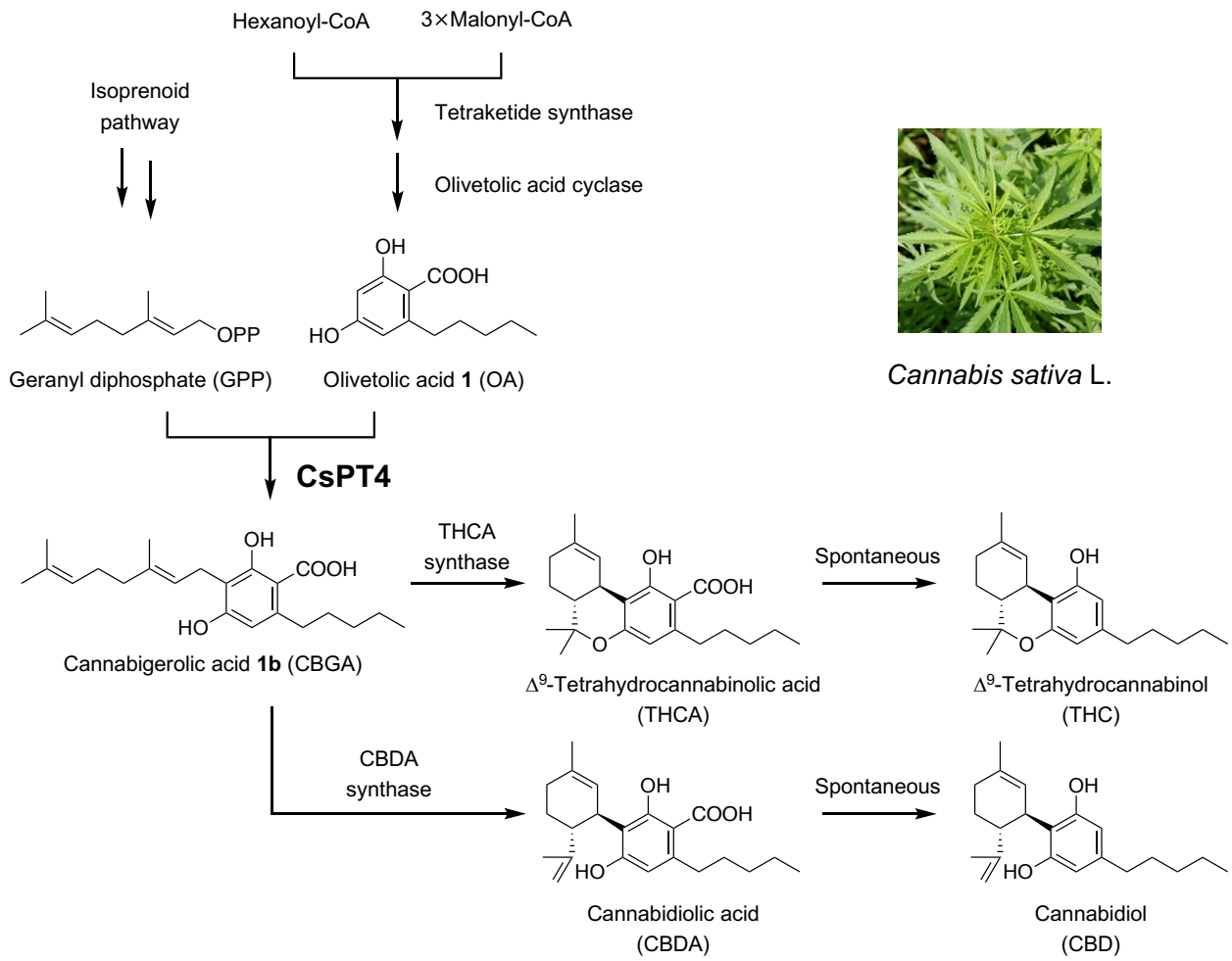


図 1. 大麻における主要カンナビノイドの生合成経路.

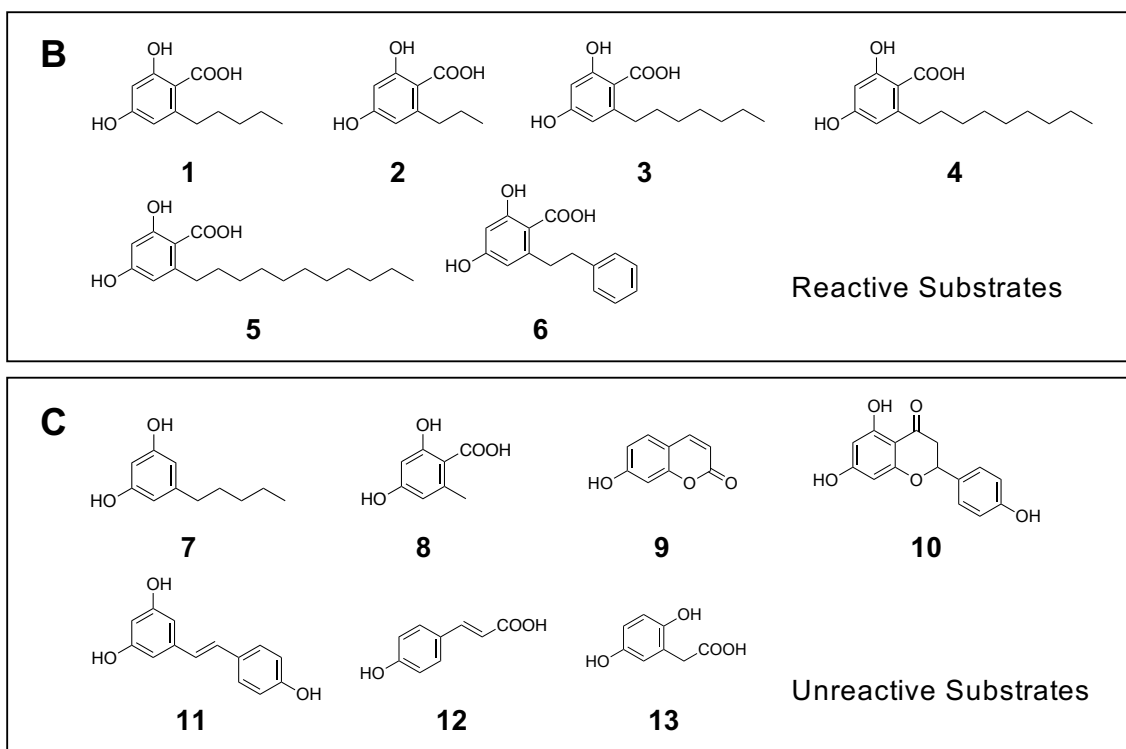
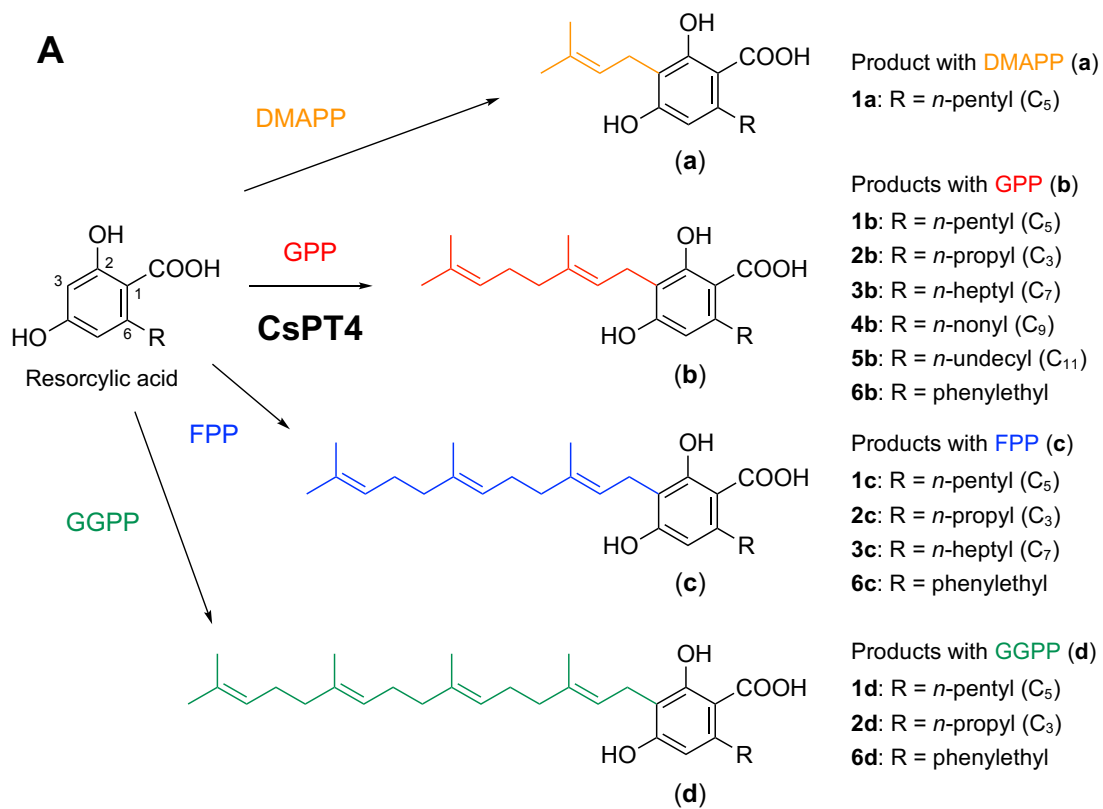


図 2. CsPT4 の基質特異性.

(A) プレニル化レゾルシノールの合成を触媒する CsPT4 の反応. (B) および (C) CsPT4 に反応性を示した、あるいは示さなかった芳香族基質. 1: olivetolic acid, 2: divarinic acid, 3: 2,4-dihydroxy-6-heptylbenzoic acid, 4: 2,4-dihydroxy-6-nonylbenzoic acid, 5: 2,4-dihydroxy-6-undecylbenzoic acid, 6: 2,4-dihydroxy-6-phenylethylbenzoic acid, 7: olivetol, 8: orsellinic acid, 9: umbelliferone, 10: naringenin, 11: resveratrol, 12: *p*-coumaric acid, 13: homogentisic acid.

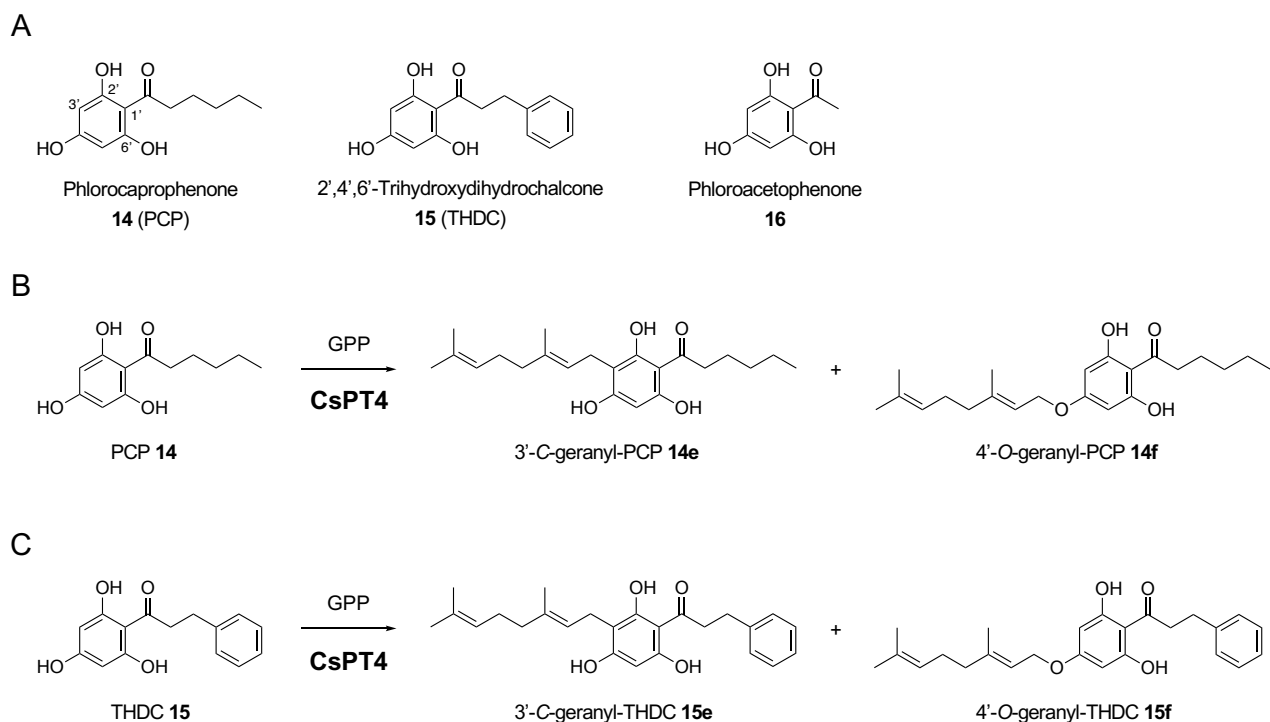


図 3. フロログルシノール誘導体に対する反応性.

(A) 第三章で使用したフロログルシノール誘導体の構造. (B) PCP および GPP を基質とした CsPT4 の反応. (C) THDC および GPP を基質とした CsPT4 の反応. CsPT4 は C-および O-プレニル化反応を触媒する.

Compound	PC ₅₀ [μM] (NDM)	IC ₅₀ [μM] (DMEM)	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	14	4.4	> 100
1a	32	100	3b	5.4	> 100	15	14	> 100
1b	5.0	93	4b	4.5	> 100	14e	2.4	51
1c	3.4	90	5b	4.1	> 100	14f	2.7	94
1d	4.0	81	6b	3.6	> 100	15e	4.8	29
Arctigenin ^a	0.82	100				15f	0.99	93

表 1. ヒトすい臓がん細胞 (PANC-1) に対するカンナビノイドおよびアシルフロログルシノール類縁体の抗緊縮活性.

PC₅₀: 栄養欠乏培地 (NDM) 中での 50% 致死濃度, IC₅₀: 栄養豊富培地 (DMEM) 中での 50% 致死濃度. ^aポジティブコントロール.

学位論文審査の要旨

【学位申請者氏名】 棚谷 綾介

【学位論文題目】

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)

【学位論文審査委員】	職名	氏名
(主査)	教授	庄司 翼
(副査)	教授	水口 峰之
(副査)	教授	森田 洋行

【判定】 合格

【審査の要旨 (2 ページ以内)】

Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (THC) は大麻(*Cannabis sativa*)が生産する Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール酸 (THCA) の1位カルボン酸脱炭酸産物である。THCは、鎮痛、鎮吐、抗炎症作用などの薬理活性を有するが、強い幻覚作用のため、医薬品として用いられない。一方、THCの環構造異性体であり、ゲラニル化中間体であるカンナビゲール酸 (CBGA) からTHCAとは異なる閉環を経て得られるカンナビジオールは、難治性小児てんかん治療薬として使用されている。また、苔類オオケビラゴケ(*Radula perrotetii*)が生産するTHCの(6aS)-3位ビベンジル誘導体ペロツテチネンは、幻覚作用が減少する一方で顕著な抗炎症活性を示す。さらに、THCAの生合成前駆体CBGAの脱炭酸産物であるカンナビゲール (CBG) は幻覚作用を示さずにTHCと類似の薬理活性を示すことから、THCに変わる新たな医薬品シードとして注目されている。THCやCBGとはプレニル基やアルキル基が異なる構造アナログ体のさらなる創出は医薬品として有望な新たなカンビノイドの創出に繋がる。

学位申請者は生合成工学的にTHCやCBGのアナログ生産を可能にすることを指向し、THCの生合成においてオリベトール酸 (OA) からCBGAへの変換を担うプレニル基転移酵素(PT)であるCsPT4のプレニル基質と芳香族基質に対する特異性を検討することで、本酵素が多様なプレニル基やアルキル側鎖を有するCBGAアナログのみならず、プレニル化カルコン等の酵素生産にも利用可能な例のないPTであること、及びCsPT4を用いて新規に生産できたCBGAアナログやプレニル化カルコン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明らかにした。本研究の骨子と審査結果は、下記に示す。

1. CsPT4 の基質特異性の解明

CsPT4は葉緑体へのトランジット配列を有する8回膜貫通型タンパク質であり、高純度に精製したCsPT4を用いて酵素学的性質を検討するのは難しい。学位申請者は、植物由来PTの発現系と酵素反応生成物の解析を参考に、培養が簡便かつ異種タンパク質の安定的発現が可能なメチロトロフ酵母 (*Pichia pastoris*) を宿主とした組換えCsPT4 (N末端トランジット配列除外) 発現系を構築した。抽出したミクロソーム画分をCsPT4の粗酵素として、これにジメチルアリルニリン酸 (DMAPP, C₅) , ゲラニルニリン酸 (GPP, C₁₀) , ファルネシルニリン酸 (FPP, C₁₅) , ゲ

ラニルゲラニルニリン酸 (GGPP, C₂₀) , または, ゲラニルファルネシルニリン酸 (GFPP, C₂₅) をOAとともに基質として作用させることで, CsPT4がGFPP以外の4種のプレニル基質からプレニル鎖長の異なるCBGAアナログを生産できることを明らかにした。さらに, GPPと6位アルキル側鎖の異なる6種類のOAのアナログ体やオリベトール, 及びその他の5種類の芳香族基質をCsPT4に作用させることで, CsPT4がC₃, C₇, C₉, C₁₁の直鎖状アルキル側鎖を有するOAアナログから, それぞれゲラニル化CBGAアナログを単一生成物として生産できること, 及び, ビベンジル骨格を有するOAアナログからペロツテチネン前駆体を生産できることを示した。また, CsPT4が多様なアルキル側鎖を有するOAアナログからファルネシル化CBGAアナログやゲラニルゲラニル化CBGAアナログを生産できる可能性を示した。以上から, CsPT4がプレニル基質と芳香族基質の両基質に対して広範な基質認識能力を有する希なPTであることを示した。

2. 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

THCやCBDの抗がん作用が近年報告され, カンナビノイドの抗がん活性が注目されている。学位申請者は, CBGAと新規に得られたCBGAのジメチルアリル化アナログやゲラニル化アナログ (上記) のヒトすい臓がん細胞PANC-1に対する細胞毒性試験を実施し, すい臓がんに対する臨床試験が実施されているポジティブコントロールとしたアルクチゲニンよりも活性は弱いものの, 供試した全ての化合物が抗緊縮活性を有することを示した。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した例はこれまでになかったことから, 本知見はカンナビノイド骨格を有する新たなすい臓がん治療薬の開発に展望を与える。

3. 基質依存的に変化するCsPT4のプレニル化様式

植物由来 PT の中には, フロログルシノールやカルコンへのプレニル基転移を触媒するものがある。学位申請者は, フロログルシノール骨格を有するフロロカプロフェノン (PCP), カルコン骨格を有する2',4',6'-トリヒドロキシジヒドロカルコン (THDC), 及びフロロアセトフェノン (PAP) に対するCsPT4の反応性を検討した。GPPを共基質として反応すると, CsPT4は, PAPを基質として用いることはできなかったものの, PCPから3'位の炭素原子がゲラニル化された化合物を, THDCから4'位水酸基の酸素原子 (4'O位) がゲラニル化された化合物を生成した。さらに, PCP, THDC, 及び, これらのゲラニル化体はPANC-1細胞に対する抗緊縮活性を示した (THDCから得られた4'O位ゲラニル化体がアルクチゲニンと同等の抗緊縮活性を持つ)。CsPT4が基質の骨格に依存してプレニル化様式を変化させ, プレニル化フロログルシノールやカルコンの合成にも利用可能であることを証明し, CsPT4のプレニル化化合物生産における応用可能性を示した。

以上のように, 棚谷綾介氏は, CsPT4がプレニル基質と芳香族基質に対して広範な基質認識能力を有する極めて希な酵素であること, 及び, CBGAやその8種類のアナログ, さらにはPCPとTHDC, 及び, それらの4種類のプレニル化体が, すい臓がん細胞に対して抗緊縮活性を有することを明らかにした。ここで得たCsPT4の酵素学的知見は, THCやCBGのアナログ及びプレニル化フロログルシノールやカルコンの合成生物学的な創出に繋がる。また, ここで報告した各化合物の抗緊縮活性はすい臓がん治療薬の開発に新たな展望を与えたと言える。

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

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

- 1) [Tanaya R, Kodama T, Lee YE, 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.*, **25**, 8601–8605 \(2023\).](#)
- 2) [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.*, **47**, 449–453 \(2024\).](#)