

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

申請代表者	田浦 太志	富山大学学術研究部薬学・和漢系	准教授
所外共同研究者	棚谷 綾介	富山大学大学院医学薬学教育部	博士後期課程 1 年
所外共同研究者	林 望	富山大学大学院医学薬学教育部	博士前期課程 2 年
研究統括者	森田 洋行	富山大学学術研究部薬学・和漢系	教授

■背景・目的

大麻(*Cannabis sativa*)のカンナビノイドはポリケタイドとモノテルペンで構成される特異な二次代謝産物であり、中でも Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) や cannabidiol (CBD) は鎮痛、鎮吐、抗炎症及び抗痙攣など種々の興味深い薬理作用を示すことから、多発性硬化症や小児てんかんなど各種難治性疾患の治療薬として欧米を中心とした約 30 カ国で医薬品応用されている。申請者はカンナビノイドの生合成研究に取り組み、主成分である THCA や CBDA の生合成酵素を同定するなど、本研究領域をリードしてきた (Sirikantaramas and Taura, 2017)。THCA や CBDA はアルキル側鎖として直鎖状のペンチル基(C5)を含むが、側鎖がプロピル基(C3)のカンナビノイドも微量成分として確認されており、ペンチルカンナビノイドとは全く異なる薬理活性を示すことが知られている。例えば THCA の脱炭酸で生じる THC は大麻の幻覚活性成分であるが、側鎖がプロピル基の THCV は幻覚活性を示さない一方、II 型糖尿病患者に顕著な治療効果を示すことから英国 GW pharmaceuticals により phase 2 の臨床試験が実施されている (Welling et al., 2018)。

カンナビノイドの生合成経路は、1) ポリケタイド骨格の形成、2) プレニル基の転移、及び 3) 立体選択的酸化閉環の 3 ステップで構成される (Taura et al., 2019, 図 1)。酵素と基質の関係は一般に「鍵と鍵穴」と言われるほど厳密であるが、近年我々は森田教授との共同研究により、各ステップの酵素が比較的フレキシブルに基質アナログを受容する潜在的触媒活性を有することを確認しつつある。即ち、これら生合成酵素は、新規なカンナビノイド類縁体の酵素合成や微生物生産に応用できる可能性が考えられる。今回我々は、カンナビノイドの基本炭素骨格を構築する大麻プレニル転移酵素 CsPT4 の詳細な機能解析により明らかにした潜在的触媒活性について報告する。

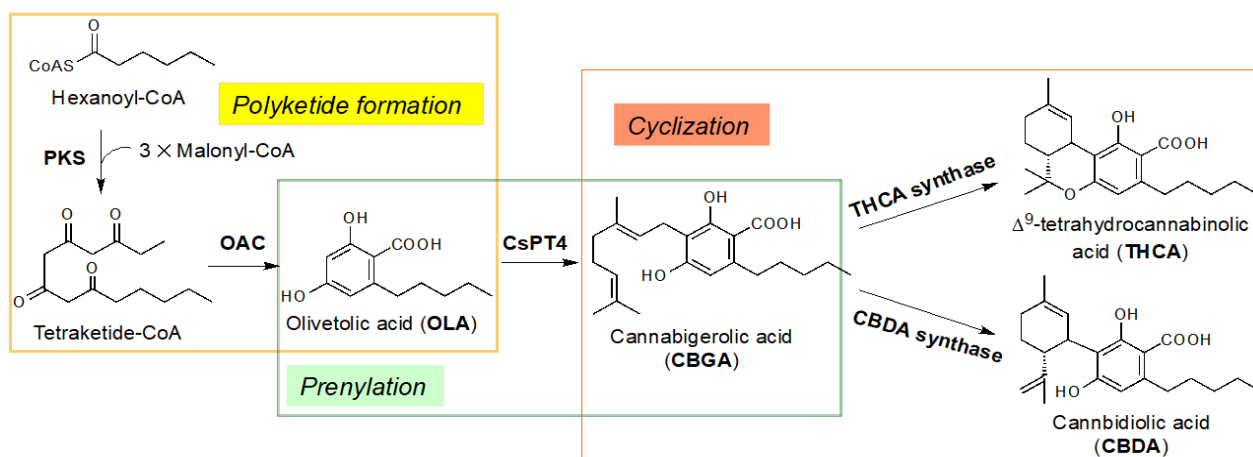


図 1. カンナビノイドの生合成経路

■結果・考察

1. 大麻プレニル転移酵素 CsPT4 の基質特異性

植物二次代謝に関与するプレニル転移酵素としてこれまでにフラボノイドやスチルベノイドなどの各種芳香族を acceptor とする酵素が報告されている (Sasaki et al., 2011, Yang et al., 2016)。また、二次代謝経路のプレニル転移酵素の多くはジメチルアリル二リン酸 (DMAPP) に特異的であるが、我々は複数のプレニル基質と反応する酵素を同定、報告しており、プレニル転移酵素の触媒ポテンシャルには非常に興味もたれる (Saeki et al., 2018)。そこで我々は、メ

チロトロフ酵母 *Pichia pastoris* で発現した CsPT4 の基質特異性を検討した。はじめに芳香族基質として OLA を用い、各種プレニル基質との反応を検討した結果、本酵素は GPP に最も高い活性を示し、CBGA を生成した一方、DMAPP、FPP 及び GGPP も受容し、プレニル鎖長の異なる CBGA 類縁体を合成することを確認した。すなわち、CsPT4 はプレニルドナーの違いに例外的なほどに寛容であると言える。今回生成したセスキテルペン型及びジテルペン型の CBGA は新規化合物であり、それぞれ sesqui-CBGA および diterpeno-CBGA と命名した。また DMAPP との反応により生じた 3-dimethylallyl-OLA は市販天然物ライブラリーの一構成成分として報告されているが、大麻には確認されていない (Crystal et al., 2013)。

次いで、OLA と類似したアルキルレゾルシノール酸誘導体を用いてさらなる基質特異性の検討を行った。すなわち、図2に示す各種芳香族基質およびプレニル基質を用いて酵素反応を行った結果、さらに 10 種の化合物の生成を確認した。中でも、dihydropinosylvin acid に GPP が結合した 3-geranyl dihydropinosylvin acid (GDPA) はオオケビラゴケ (*Radula perrottetii*, Asakawa et al., 2013) に存在するビベンジルカンナビノイドの前駆体であり、非常に興味深い結果が得られた。カンナビノイドは、モノテルペン部の立体構造やフェノール部分の側鎖の違いにより薬理活性に大きな変化が生じることが知られており、このためビベンジルカンナビノイドの前駆体である GDPA の生物活性には興味を持たれるところであるが、本化合物は希少な苔類から得られる微量成分であることから、生物活性試験に関しては検討されていないのが現状である。本酵素の触媒能力を活用することで、GDPA の大量生産および生物活性試験の検討が可能になると考えられる。植物 PT の基質特異性は一般に厳密であり、このように多様な生成物を与える酵素は極めて異例である。

2. 反応速度論解析

CsPT4 は OLA を基質として GPP との反応で CBGA を生成した他、DMAPP、FPP および GGPP からそれぞれプレニル側鎖の異なる CBGA 類縁体を生成することを確認した。そこで、各酵素反応の反応速度論解析を行うことにより、各基質との反応性の違いを明確にすることを試みた。なお、本酵素は膜結合型酵素であり精製することが困難であることから、酵素サンプルとしてはミクロソーム画分を使用し、得られた $V_{\max}$ を酵素活性の指標として用いることとした。

各基質に対して得られた反応速度定数を Hanes-Woolf plot により算出した結果を図3に示している。鎖長の異なるプレニル基質を比較すると、 K_m 値では $DMAPP \gg GPP > FPP > GGPP$ となり、ゆえに本酵素は GGPP に対して最も高い親和性を示すと言える。酵素反応において GPP が最も高い反応性を示したことから、我々は GPP の親和性が最も高くなると考えていたため、本結果は予想外のものであった。一方で、 $V_{\max}$ 値は $GPP \gg FPP > GGPP \gg DMAPP$ となり、GPP が突出して高い値を示した。また、反応効率の指標として算出した $V_{\max} / K_m$ 値の比較では、GPP を用いた反応が他の基質を用いるよりも明確に高い値を示した。したがって、本酵素は GPP を最適なプレニル基質として受容することが明らかとなった。

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

図2. CsPT4 の基質特異性

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

Substrate Structures	K_m μM	$V_{\max}$ $pmol\ sec^{-1}\ mg^{-1}$	$V_{\max} / K_m$ $pmol\ sec^{-1}\ mg^{-1}\ \mu M^{-1}$
DMAPP	1439 $\pm$ 506	7.46 $\pm$ 1.15	0.0055 $\pm$ 0.0013
GPP	64.0 $\pm$ 0.72	1345 $\pm$ 16	21.0 $\pm$ 0.012
FPP	21.4 $\pm$ 0.38	146 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.10
GGPP	6.3 $\pm$ 0.40	31 $\pm$ 1.2	4.9 $\pm$ 0.50

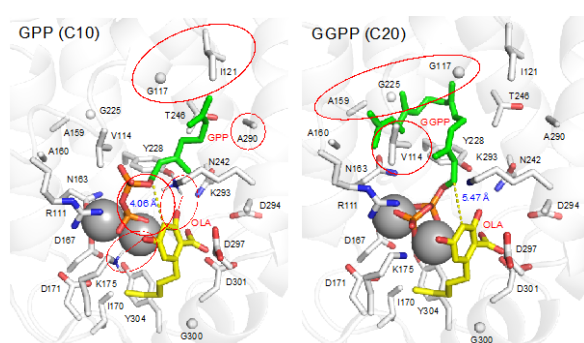
図3. CsPT4 の反応速度定数

3. 分子モデリング解析

CsPT4 の酵素反応における構造基盤を推察するため、結晶構造が報告されたプレニル転移酵素 ApUbiA をテンプレートとして、酵素-基質複合体の分子モデリン

グ解析を行った。分子モデルによると、OLA は 2 つの水酸基が K175 および K293 と水素結合を形成することにより、反応点となる 3 位が活性中心を向く形で固定されていることが分かる。次に、GPP のピロリン酸部分と相互作用する形で活性部位に結合し、さらに、ゲラニル側鎖は G117、I121 および A290 などで構成される疎水性領域に近接している。また、GPP と OLA の反応点の距離は 4.06 Å と適切であり、高い $V_{\max}$ 値を支持する結果となった。次いで、結合エネルギーから見ると、DMAPP との結合が最も不安定で、GGPP が最も安定であるという結果になった。これは、側鎖長が長いほど CsPT4 の反応ポケットに存在する疎水性アミノ酸と相互作用しやすくなり、より安定になるからであると考えられる。しかし GGPP は長い側鎖を折りたたむ形にて結合しており、結果として反応点間の距離が 5.47 Å と遠くなることが示唆された(図 4)。

本モデリングの結果は上記の反応速度論解析と対応しており、両者の実験結果から GPP が最適な基質であると証明された。



Substrate Structures	Docking energy kcal/mol	Distance Å
DMAPP	-1140.55	5.79
GPP	-1546.18	4.06
FPP	-1882.37	5.12
GGPP	-1958.94	5.47

図 4. CsPT4 の

分子モデルおよび各プレニル基質に対する結合パラメーター

4. カンナビノイド合成酵素の基質特異性

CsPT4 は OLA から CBGA の合成を触媒するが、今回生成した CBGA 類縁体がカンナビノイド合成酵素 (THCA synthase) によって代謝を受けるかどうか興味深いところであると考えた。そこで、sesqui-CBGA とタバコ BY-2 細胞で発現した組換え THCA synthase をインビトロで反応させ、生成物を HPLC で分析したところ、コントロールには見られない生成物のピークを確認した。本生成物を LC-ESI-MS で分析した結果、酸化生成物と予想される $m/z = 425$ の分子イオンピークを示すことを確認した。したがって、THCA synthase は少なくとも sesqui-CBGA を酸化する能力を有していると推察される。

さて、従来カンナビノイドの構造活性相関に「プレニル鎖長の違い」という概念は存在せず、このため本研究で得られた CBGA 類縁体に加え、カンナビノイド合成酵素が生成する新規カンナビノイドについても、各種生物活性試験に供して医薬資源としての可能性を検証する計画である。

■結論

本研究では、大麻プレニル転移酵素 CsPT4 の詳細な機能解析を行った。本酵素は GPP に最大の活性を示した一方で、DMAPP、FPP および GGPP も受容し、鎖長の異なる CBGA 類縁体を合成することを確認した。さらに本酵素は広範な芳香族基質を受容して数種の新規化合物およびビベンジルカンナビノイド前駆体を合成可能であることを確認した。本酵素が有する潜在的触媒活性を応用し、また THCA synthase などカンナビノイド合成酵素と組み合わせた反応を行うことで、これまで想像されることのなかったプレニル鎖長の異なる非天然カンナビノイドの生産が可能になると考えられる。

■参考文献

- 1) Sirikantaramas S, Taura F (2017) Cannabinoids: Biosynthesis and biotechnological applications. In S Chandra, H Lata, M ElSohly, eds, *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*. Springer, Cham, Switzerland, pp183–206
- 2) Welling MT, Liu L, Raymond CA, Ansari O and King GJ (2018) Developmental plasticity of the major alkyl cannabinoid chemotypes in a diverse Cannabis genetic resource collection. *Front Plant Sci* 9: 1510

- 3) **Taura F, Tanaya R, Sirikantaramas S** (2019) Recent advances in cannabinoid biochemistry and biotechnology. *Science Asia* **45**: 399–407
- 4) **Sasaki K, Tsurumaru Y, Yamamoto H, Yazaki K** (2011) Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*. *J Biol Chem* **286**: 24125–24134
- 5) **Yang T, Fang L, Rimando AM, Sobolev V, Mockaitis K, Medina-Bolivar F** (2016) A stilbenoid-specific prenyltransferase utilizes dimethylallyl pyrophosphate from the plastidic terpenoid pathway. *Plant Physiol* **171**: 2483–2498
- 6) **Saeki H, Hara R, Takahashi H, Iijima M, Munakata R, Kenmoku H, Fuku K, Sekihara A, Yasuno Y, Shinada T, Ueda T, Nishi T, Sato T, Asakawa Y, Kurosaki F, Yazaki K, Taura F** (2018) An aromatic farnesyltransferase functions in biosynthesis of the anti-HIV meroterpenoid daurichromenic acid. *Plant Physiol* **178**: 535–551
- 7) **Darby CM, Ingólfsson HL, Jiang X, Shen C, Sun M, Zhao N, Burns K, Liu G, Ehrt S, Warren JD, Anderson OS, Brickner SJ, Nathan C** (2013) Whole cell screen for inhibitors of pH homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **8**: e68942
- 8) **Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F** (2013) Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry*. **91**: 52–80
- 9) **Taura F, Iijima M, Yamanaka E, Takahashi H, Kenmoku H, Saeki H, Morimoto S, Asakawa Y, Kurosaki F, Morita H** (2016) A novel class of plant type III polyketide synthase involved in orsellinic acid biosynthesis from *Rhododendron dauricum*. *Front Plant Sci* **7**: 1452