

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06627

研究課題名(和文)芳香族プレニル基転移酵素の機能的リデザインを基軸とする生合成工学

研究課題名(英文)Engineered biosynthesis based on functional redesign of aromatic prenyltransferases

研究代表者

田浦 太志(Taura, Futoshi)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：00301341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大麻由来プレニル基転移酵素CsPT4が生理的な基質のオリベトール酸(OLA)およびGPP以外に広範な芳香族基質およびプレニル基質を受容し、新規化合物を含む多数のプレニル化ポリフェノールを生成することを明らかにした。さらに、酵素反応生成物について、ヒト膵がん細胞を用いた抗緊縮活性試験を行った。この結果、本研究で得られた新規なO-プレニル化カルコン誘導体は、既存の抗がん剤候補化合物であるアルクチゲニンと同等の活性を示すことを証明した。また、本研究では抗がん剤候補天然物umbellipreninの生合成に関わるアギ由来新規O-プレニル基転移酵素FaPT1を同定することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プレニル化天然物は注目すべき生物活性を有するが、生合成酵素の機能研究や物質生産への応用研究はいまだ不十分である。本研究では大麻プレニル基転移酵素が植物酵素としては例外的に多様な基質と反応して、ヒト膵がん細胞に顕著な細胞毒性を示す多数のプレニル化ポリフェノールを合成できることを初めて証明した。本成果は酵素を活用した有用天然物の酵素合成に展開可能であり、学術的ならびに社会的意義が大きい。さらに本研究では抗がん天然物umbellipreninの生合成に関わるアギ由来新規O-プレニル基転移酵素FaPT1を同定することにも成功した。本酵素も広範な基質特異性を有しており、有用物質生産への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I demonstrated that the Cannabis prenyltransferase CsPT4 accepts a wide range of aromatic and prenyl substrates other than the physiological substrates olivetolic acid (OLA) and GPP, and produces a number of prenylated polyphenols, including novel compounds. Furthermore, the enzymatic reaction products were examined for their antiausterity activity against human pancreatic cancer cells. The results proved that the novel O-prenylated chalcone derivatives obtained in this study showed activity comparable to that of arctigenin, a well-studied anti-cancer drug candidate compound. The study also succeeded in identifying a novel O-prenyltransferase FaPT1 from *Ferula assa-foetida* involved in the biosynthesis of the anticancer candidate compound umbelliprenin.

研究分野：天然物化学

キーワード：プレニル基転移酵素 生合成 二次代謝 薬用植物

## 1. 研究開始当初の背景

大麻 (*Cannabis sativa*) のプレニル基転移酵素 CsPT4 は、olivetolic acid (OA) に geranyl diphosphate (GPP) 由来のゲラニル基を転移することで、生物活性カンナビノイドの前駆体である cannabigerolic acid (CBGA) を生合成する酵素であり (図 1A)、近年は酵母を宿主とするカンナビノイドの合成生物学にも応用されているが、本酵素の詳細な生化学的性質は解明されていなかった。また、アギ (*Ferula assa-foetida*) など一部のセリ科植物に分布する umbelliprenin は強力な抗がん作用が報告された *O*-ファルネシル化クマリンであり、umbelliferone と farnesyl diphosphate (FPP) を基質として整合せされると考えられるが (図 1B)、植物の *O*-プレニル基転移酵素に関する研究例は限定的で、本反応を触媒する酵素 (FaPT) は同定されていなかった。

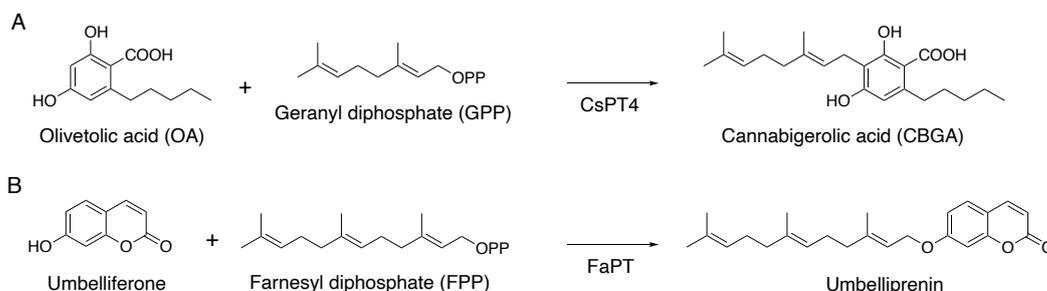


図 1 研究対象とした芳香族プレニル基転移酵素

(A) カンナビノイドの基本骨格を構築する CsPT4 の酵素反応 (B) Umbelliprenin の推定生合成反応

## 2. 研究の目的

本研究では大麻プレニル基転移酵素 CsPT4 の基質特異性などの生化学的性質を詳細に解明し、カンナビノイド関連化合物の酵素合成への応用に向けた可能性を検証することを第一の目的とした。また、カンナビノイドは医薬資源として注目されていることから、本研究で得られた酵素反応生成物については、ヒト膵がん細胞に対する抗緊縮活性を測定し、抗がん剤の候補としての可能性を検証することとした。

また、umbelliprenin を生合成するアギの *O*-プレニル基転移酵素は未解明のため、アギのトランスクリプトーム解析を基盤として、植物界で初めての *O*-ファルネシル基転移酵素である FaPT を同定し、基質特異性などの諸性質について解明することとした。

## 3. 研究の方法

### CsPT4 の異種発現とキャラクタリゼーション

本研究では、異種タンパクの安定的な発現が可能なメチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* を宿主とする組換え CsPT4 の発現系を構築した。すなわち CsPT4 遺伝子を人工合成し、発現ベクター pPICZA に組み込んだ後、エレクトロポレーションで *P. pastoris* に導入した。得られた組換え体をメタノールを含む培地で培養して組換え CsPT4 の発現を誘導し、組換え酵素を含むマイクロソーム画分を調製した。これを粗酵素液として、各種の芳香族基質およびプレニル基質を用いたアッセイを行い、得られた生成物の構造については有機合成した標品との LC-MS の比較により検証した。

### CsPT4 酵素反応生成物の膵がん細胞に対する抗緊縮活性の検討

本項では、上記の酵素反応により得られたカンナビノイド関連化合物について、膵がん細胞 PANC-1 に対する抗緊縮活性を検討した。すなわち、栄養欠乏培地 (nutrient-deprived medium: NDM) および通常培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) で培養した PANC-1 細胞を化合物で処理してそれぞれの条件での 50%致死濃度 (PC<sub>50</sub> および IC<sub>50</sub>) を算出し、PC<sub>50</sub> 値を栄養欠乏状態における選択毒性、すなわち抗緊縮活性の指標とした。

### アギのトランスクリプトーム解析に基づく FaPT1 の同定とキャラクタリゼーション

アギ若葉由来 mRNA について、イルミナ社 TruSeq stranded mRNA により cDNA ライブラリーを作成して、100bp、paired end の条件で次世代シーケンシングを行ない、DRAP ソフトウェアによりアセンブリすることでトランスクリプトームデータを構築した。BLAST 検索によりプレニル基転移酵素の候補配列をセレクトし、分子系統解析から二次代謝酵素 (FaPT1) のクローンを推定した。次いで、FaPT1 の組換え酵素を発現し、各種の芳香族基質およびプレニル基質を用いたアッセイ、および反応速度解析を行うことで、本酵素の基質特異性を解明した。

また、FaPT1 と GFP の融合遺伝子を agroinfiltration で *Nicotiana benthamiana* に導入して一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光観察することで FaPT1 の細胞下局在性を検討した。

#### 4. 研究成果

##### CsPT4 の潜在的触媒活性の解明

始めに OA (**1**) を共基質として dimethylallyl diphosphate (DMAPP, C<sub>5</sub>)、GPP (C<sub>10</sub>)、FPP (C<sub>15</sub>)、geranylgeranyl diphosphate (GGPP, C<sub>20</sub>)、および geranylgeranyl diphosphate (GGPP, C<sub>20</sub>) を用いた酵素反応を行った。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 (図 2)。このうち FPP および GGPP との反応で得られた **1c** および **1d** は新規カンナビノイドであり、それぞれ sesqui-CBGA (**1c**) および diterpeno-CBGA (**1d**) と命名した。また DMAPP との反応産物 **1a** も大麻成分として報告されていない化合物であった。

次に GPP を共基質とし、側鎖の異なるレゾルシノール基質 (**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行った。その結果、CsPT4 は C<sub>3</sub>~C<sub>11</sub> のアルキル側鎖を有する OA 類縁体 (**2-5b**) を基質として、3 位特異的なゲラニル化反応を触媒し、多様な CBGA 類縁体 (**2b-5b**) を合成した (図 2)。また本酵素はビベンジルの 2,4-dihydroxy-6-phenylethylbenzoic acid (DPA, **6**) も受容して、オオケビラゴケなど苔類に特異的なビベンジルカンナビノイドの前駆体である 3-geranyl DPA (**6b**) を合成した。一方、本酵素はカルボキシ基を持たない olivetol (**7**)、側鎖の短い orsellinic acid (**8**)、および基本骨格の異なる芳香族基質 (**9-13**) とは反応しなかった。

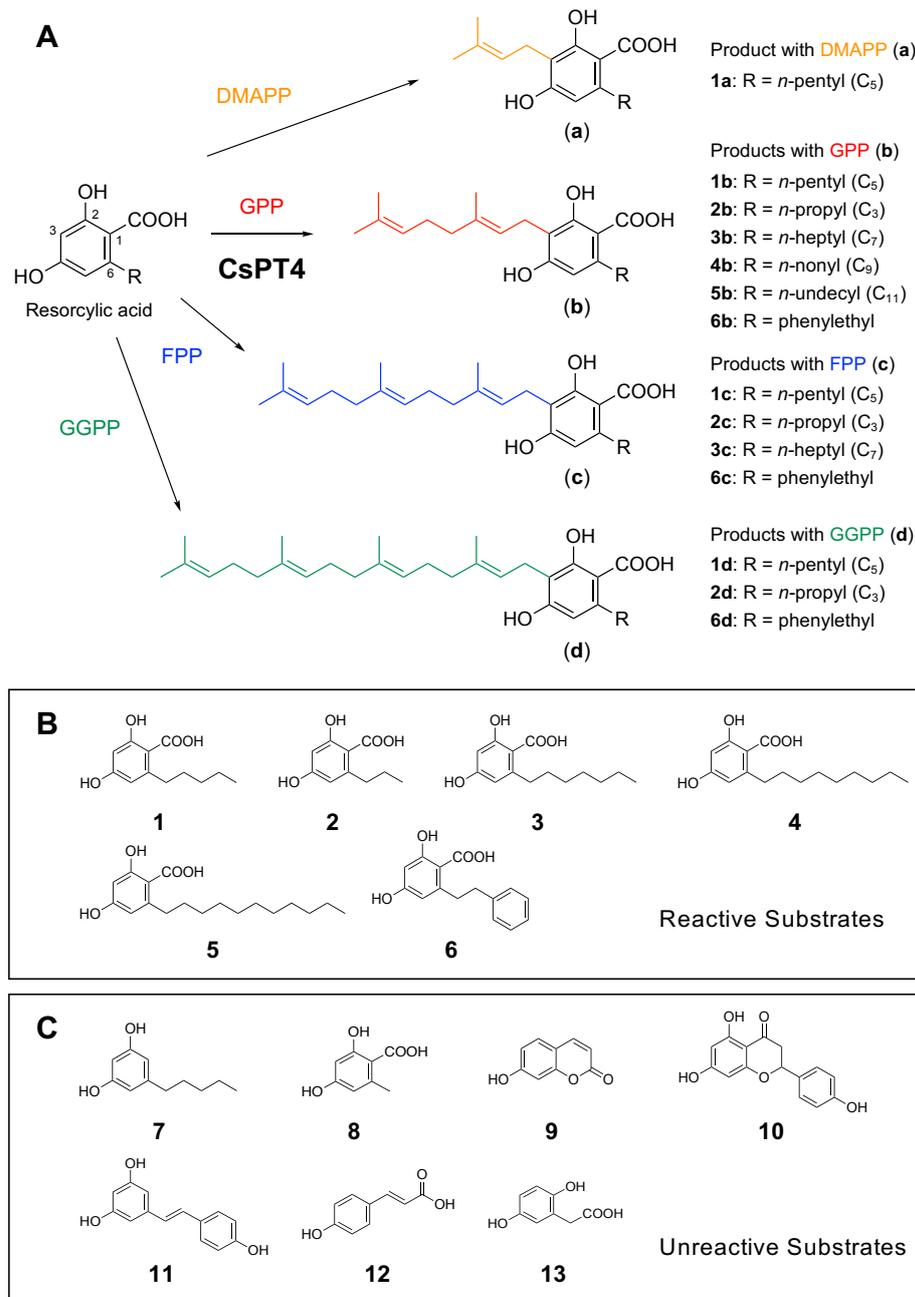


図 2 CsPT4 の基質特異性

(A) 各種の CBGA 類縁体を合成する CsPT4 の酵素反応 (B) CsPT4 と反応した芳香族基質 (C) CsPT4 と反応しなかった芳香族基質

### 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

膵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殊な能力（緊縮活性）を有することが知られている。この性質を阻害し、飢餓状態の細胞に細胞死を誘導する抗緊縮活性は、抗がん剤探索の新しいターゲットとして注目されている。

酵素反応で得られた化合物 (**1a-1d**, **2b-6b**) について、抗緊縮活性を測定した結果、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、OA (**1**) が活性を示さなかったことから、抗緊縮活性はプレニル基依存的で、ファルネシル基を有する **1c** が最も高い活性 ( $PC_{50}$  3.4  $\mu$ M) を示した。

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。カンナビノイド類縁体の活性は、arctigenin ( $PC_{50}$  0.82  $\mu$ M) と比較してやや弱いものであったが、今後構造を最適化することでより活性の高い化合物を得ることが可能と考えられる。

### 基質依存的に変化する CsPT4 のプレニル化様式

CsPT4 の基質特異性についてさらなる知見を得るため、OA (**1**) および DPA (**6**) の異性体で、フロログシノール骨格を有する phlorocaprophenone (PCP, **14**) および 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone (THDC, **15**) を合成し、CsPT4 との反応性を検討した。

GPP を共基質とし、**14** および **15** との酵素反応を行ったところ、予想に反し、CsPT4 は両基質からそれぞれ 2 種の生成物を合成し、LC-MS 分析の結果、生成物はいずれもモノゲラニル化体であることが示唆された。次いで、生成物の LC-MS データを標品と比較した結果、各生成物は C-および O-ゲラニル化体である、3'-C-geranyl-PCP **14a**, 4'-O-geranyl-PCP **14b**, 3'-C-geranyl-THDC **15a**, および 4'-O-geranyl-THDC **15b** であることが明らかとなった (図 3)。このうち O-ゲラニル化体の **14b** および **15b** は新規化合物である。C-および O-プレニル化反応の両者を触媒する唯一の植物 PT として、ミカン科ゲッキツ (*Murraya exotica*) 由来の MePT1 が同定されているが、MePT1 はクマリンのみを厳密に認識する酵素であり、本酵素とは基質特異性が明確に異なっている。また基質の基本骨格の違いに依存して C-/O-プレニル化様式を変化させる植物酵素は CsPT4 が初めての報告である。

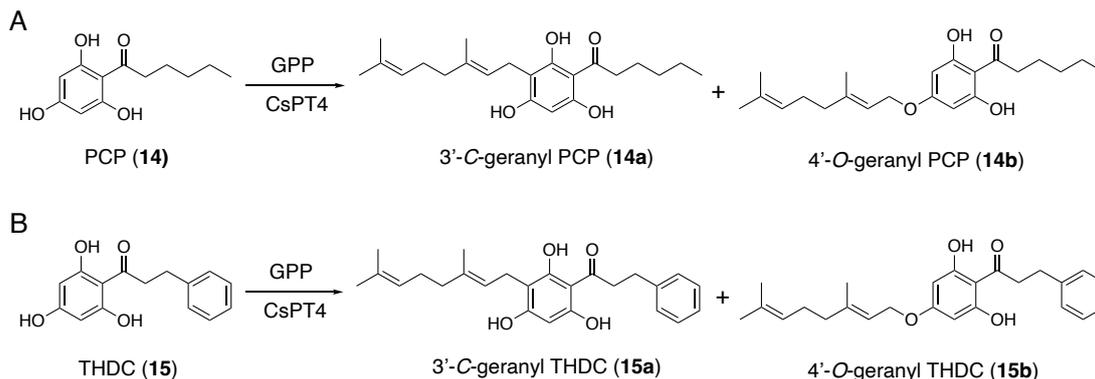


図 3 アシルフロログシノール基質を用いた CsPT4 の酵素反応

(A) PCP を基質とする反応 (B) THDC を基質とする反応

本項で酵素反応生成物として得られた C-および O-プレニル化化合物 (**14a**, **14b**, **15a** および **15b**) に関して PANC-1 細胞に対する抗緊縮活性を検討した。その結果、いずれも抗緊縮活性を有することが確認され、なかでも **15b** は、 $PC_{50}$  値が 0.99  $\mu$ M と顕著な活性を示した。本化合物の  $PC_{50}$  値は前項で試験したカンナビノイド類縁体より数倍低く、ポジティブコントロールの arctigenin に匹敵していた。すなわち、本研究では CsPT4 の酵素反応により抗がん剤の新たなリード化合物として期待できるプレニル化カルコン誘導体 **15b** を見出すことに成功した。

以上のように CsPT4 に関する研究では、植物生化学と創薬化学の両分野において学術的かつ社会的意義を有する新規な知見を得るに至った。

### アギ由来 O-ファルネシル基転移酵素 FaPT1 の同定と機能解析

本研究ではアギ若葉のトランスクリプトームデータを作製し、これを基盤とするホモロジー検索により、FaPT1~3 と称するプレニル基転移酵素コードする 3 つの遺伝子をクローン化した。次いで、FaPT1~3 について既知酵素との分子系統樹解析を行ったところ、FaPT1 はクマリン特異的なプレニル基転移酵素と同一のクレードに属したことから、アギの二次代謝に関与することが推察された。そこで FaPT1 の組換え酵素を発現して活性評価を行った結果、FaPT1 は umbelliferone を芳香族基質とするファルネシル基転移反応により umbelliprenin を生成する活性を有していることが確認された。本酵素は植物界で初めての O-ファルネシル基転移酵素である。

FaPT1 の機能解析より、至適 pH は 8.5~9.5 の弱アルカリ性であり、酵素反応の補因子として 2 価の金属イオン、中でも  $Mg^{2+}$  を要することを確認した。これらは既知の植物由来芳香族 PT の性質と一致している。次いで、各種芳香族基質を用いて基質特異性を検討した結果、umbelliferone

に加えてフラノクマリンの一種である **bergaptol** に対しても活性を示し、FaPT1 がクマリン骨格を有する化合物を認識することが示唆された。また、プレニル基質としては FPP の他に GPP および GGPP について活性を示した。すなわち、FaPT1 は炭素数 10~20 の多様なプレニル基質を受容する酵素であると確認した。次いで、これら反応性を示した基質について、反応速度論解析によって反応性の違いを検討した結果、本酵素は **umbelliprenin** および FPP に対して明確に高い活性および親和性を示した (表 1)。以上から、FaPT1 は多様な基質と反応可能であるが、アギにおいては **umbelliprenin** の生合成酵素として機能していることが示唆された。

表 1 FaPT1 の反応速度パラメーター

Substrate (Co-substrate)	Apparent affinity ( $K_m$ )	Catalytic rate ( $V_{max}$ )	Catalytic efficiency ( $V_{max}/K_m$ )
	$\mu M$	$pmol\ s^{-1}\ mg^{-1}$ microsomal protein	$fmol\ s^{-1}\ mg^{-1}$ microsomal protein $\mu M^{-1}$
<b>Umbelliferone</b> (FPP)	9.69 $\pm$ 4.59	6.68 $\pm$ 1.38	876 $\pm$ 408
<b>Bergaptol</b> (FPP)	57.8 $\pm$ 2.65	0.604 $\pm$ 0.0283	10.4 $\pm$ 0.0498
<b>GPP</b> (Umbelliferone)	155 $\pm$ 23.4	4.47 $\pm$ 0.412	29.3 $\pm$ 4.09
<b>FPP</b> (Umbelliferone)	21.6 $\pm$ 1.19	7.25 $\pm$ 1.76	332 $\pm$ 65.1
<b>GGPP</b> (Umbelliferone)	202 $\pm$ 54.7	0.0642 $\pm$ 0.00704	0.334 $\pm$ 0.0626

既知の植物芳香族 PT の大部分はプラスチドに局在するが、FPP はサイトゾルのメバロン酸経路で生成されることが知られている。そこで、FaPT1 と GFP の融合タンパク質をアグロインフイルトレーションによって *N. benthamiana* で一過的に発現させ、プロトプラストを調製した後に、その細胞下局在性を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。この結果、融合タンパクの緑色蛍光はサイトゾル中で網目状の構造として観察された (図 4)。このような局在パターンは、FaPT1 が主に小胞体膜に局在することを意味している。従って、FaPT1 は小胞体膜においてサイトゾル由来の FPP を基質として **umbelliprenin** を合成していると考えられる。

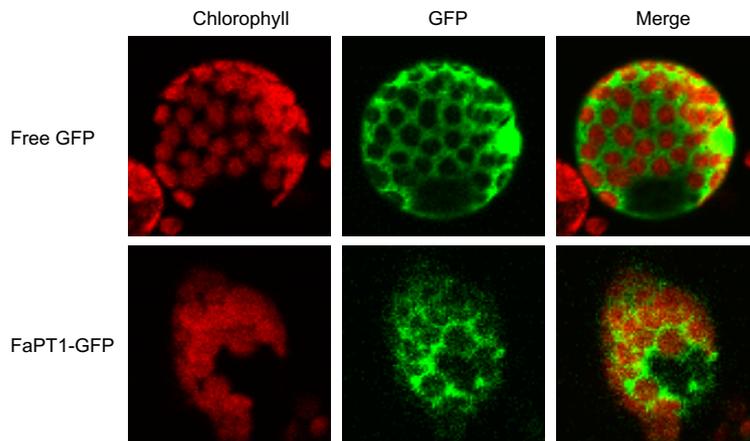


図 4 FaPT1-GFP 融合タンパクの *Nicotiana benthamiana* での細胞下局在性

さらに、アギの各組織における **umbelliprenin** 蓄積量を定量した結果、本化合物は主根および側根に特異的に蓄積していることを確認した。一方、各組織における FaPT1 遺伝子の発現量を RT-PCR により解析したところ、意外なことに FaPT1 は主に葉および葉柄において高発現していた。以上のことから、アギの植物内では、光合成による糖新生の盛んな器官である葉で FaPT1 を発現し、**umbelliprenin** を効率的に生合成した後、これを (おそらくは師管を通じて) 根に転流しているものと推察される。

以上のように本研究では、植物二次代謝に関わる初めての *O*-フェルネシル基転移酵素として、アギ若葉より **umbelliprenin** の生合成酵素 FaPT1 を同定し、その構造機能を解明するとともに、**umbelliprenin** の生合成に関わる植物生理学的な知見を得ることに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Wenger Tibor, Watanabe Kazuhito, Sasaki Yui, Kanazawa Keiko, Shimizu Koichi, Sirikantaramas Supaart, Shoyama Yoshinari, Taura Futoshi, Morimoto Satoshi, Shoyama Yukihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Overview of <i>Cannabis</i> including Kampo Medicine and Therapy for Treatment of Dementia: A Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 713228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.713228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaya Ryosuke, Kodama Takeshi, Lee Yuan-E, Yasuno Yoko, Shinada Tetsuro, Takahashi Hironobu, Ito Takuya, Morita Hiroyuki, Awale Suresh, Taura Futoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Catalytic Potential of <i>Cannabis</i> Prenyltransferase to Expand Cannabinoid Scaffold Diversity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 8601 ~ 8605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.3c03410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Taura Ftoshi, Sirikantaramas Supaart, Sakamoto Seiichi, Tanaka Hiroyuki, Morimoto Satoshi, Shoyama Yukihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Comprehensive review of cannabis including cannabinoid brain function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18103/mra.v11i12.4876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaya Ryosuke, Kodama Takeshi, Maneenet Juthamart, Yasuno Yoko, Nakayama Atsushi, Shinada Tetsuro, Takahashi Hironobu, Ito Takuya, Morita Hiroyuki, Awale Suresh, Taura Futoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Substrate-Dependent Alteration in the <i>C</i> - and <i>O</i> -Prenylation Specificities of <i>Cannabis</i> Prenyltransferase	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 449 ~ 453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b23-00868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西垣菜緒、棚谷綾介、兼目裕充、浅川義範、田浦太志
2. 発表標題 アギ由来0-プレニル基転移酵素に関する研究
3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西垣菜緒、棚谷綾介、兼目裕充、浅川義範、田浦太志
2. 発表標題 アギ由来0-プレニル基転移酵素に関する研究
3. 学会等名 第32回イソプレノイド研究会例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西垣菜緒、棚谷綾介、兼目裕充、浅川義範、田浦太志
2. 発表標題 アギ由来0-プレニル基転移酵素に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryosuke Tanaya, Takeshi Kodama, Takuya Ito, Hiroyuki Morita, Suresh Awale, Futoshi Taura
2. 発表標題 Creation of molecular diversity by CsPT4, an aromatic prenyltransferase from Cannabis sativa
3. 学会等名 Future Drug Discovery Empowered by Chemical Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 棚谷綾介、児玉猛、伊藤卓也、森田洋行、Suresh Awale、田浦 太志
2. 発表標題 大麻プレニル基転移酵素CsPT4による分子多様性の創出
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 棚谷綾介、児玉猛、森田洋行、Suresh Awale、田浦太志
2. 発表標題 大麻プレニル転移酵素CsPT4が合成する非天然型新規カンナビノイドの生物活性
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会(つくば)大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西垣菜緒、棚谷綾介、田浦太志
2. 発表標題 アギ由来0-プレニル基転移酵素に関する研究
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会(つくば)大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 棚谷綾介、児玉猛、森田洋行、Suresh Awale、田浦太志
2. 発表標題 大麻プレニル転移酵素CsPT4が合成する非天然型新規カンナビノイド
3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田浦太志、日江井花菜、棚谷綾介、伊藤卓也、兼目裕充、高橋宏暢、浅川義範
2. 発表標題 オオケピラゴケ由来ビベンジルカンナビノイドの生合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田浦太志、日江井花菜、棚谷綾介、伊藤卓也、兼目裕充、高橋宏暢、浅川義範
2. 発表標題 オオケピラゴケ由来ビベンジルカンナビノイドの生合成研究
3. 学会等名 第67回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	森田 洋行  (Morita Hiroyuki)  (20416663)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授    (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------