

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780084
 研究課題名 (和文) EST 解析を基盤とするカンナビノイド生合成遺伝子のクローニングと応用
 研究課題名 (英文) Cloning and application of cannabinoid biosynthetic genes based on EST analysis
 研究代表者 田浦 太志 (TAURA FUTOSHI)
 九州大学・大学院薬学研究院・助教
 研究者番号：00301341

研究成果の概要 (和文)：本研究では EST 解析及び RE-PCR により大麻成分カンナビノイドのフェノール部分を合成するポリケチド合成酵素、**olivetol synthase** の遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現した組み換え酵素のキャラクタリゼーションを行うことにより本酵素の構造及び機能を詳細に解明した。さらにカンナビノイドの基本炭素骨格を形成するプレニル転位酵素の遺伝子クローニングを検討した結果、2種の候補遺伝子を得、これら酵素が大麻と近縁の植物ホップで二次代謝産物の生合成を触媒するプレニル転位酵素と 50%以上のアミノ酸が一致することを確認した。

研究成果の概要 (英文)：In this study, I cloned a gene encoding olivetol synthase, the polyketide synthase that synthesizes the phenolic moiety of cannabinoids in *Cannabis sativa*, by means of EST analysis and RE-PCR, and then characterized the bacterially expressed recombinant olivetol synthase to clarify the structural and functional properties in detail. In addition, I attempted to obtain a gene for the prenyltransferase that synthesizes the carbon skeleton of cannabinoids, resulting in cloning of two candidate genes for the prenyltransferase. Interestingly, I confirmed that these putative prenyltransferases show more than 50% identity with the prenyltransferase involved in secondary metabolism in hop, a close relative of *C. sativa*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産科学・生物有機化学

キーワード：生合成

1. 研究開始当初の背景

大麻 (*Cannabis sativa*) はカンナ

ビノイドと称される特異な二次代謝産物含有することが知られている。

中でも **tetrahydrocannabinol (THC)** は鎮痛、抗炎症及び抗痙攣など種々の有用な薬理活性を有することから、アメリカ、カナダ及びオランダ等では医薬品として認可されており、本化合物に対する需要は増々高まっている。

一方私は **THC** の前駆体である **tetrahydrocannabinolic acid (THCA)** の合成酵素 (**THCA synthase**) の **cDNA** クローニングに成功し、本酵素の構造、機能について報告した (*J. Biol. Chem.* **279**, 39767-39774, 2004)。さらに近年、組み換え酵母で **THCA synthase** を分泌発現し、この培養上清に合成前駆体の **cannabigerolic acid (CBCA)** を投与することにより立体選択的な **THCA** の合成に成功した (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 675-680, 2007)。**THCA** は穏和な加熱により定量的に **THC** に変換するため、このような酵素合成は新たな **THC** 生産システムに向けた基盤として期待されるが、反応基質の **CBCA** を安価かつ大量に合成することは困難であり、生産システムをより効率的、実用的にするには **CBCA** の生合成に関わる酵素遺伝子をすべてクローン化し、これらと **THCA synthase** をセットとして発現することが必要と考えるに至った。

CBCA に至る生合成メカニズムに関しては、私及び欧州の複数グループによる研究から以下の推定経路が受け入れられている。即ち、細胞質においてポリケタイド合成酵素の反応により **olivetolic acid** が生成し、これがプラスチドに移行した後、プレニル転位酵素の触媒によりゲラニル基とカップリングすることで **CBCA** が合成されるというスキームである。

ポリケタイド合成酵素及びプレニル転位酵素に関しては、発現量が低く、酵素の精製をベースとする古典的な手法により遺伝子をクローニングすることは非常に困難と推察された。そこで本研究では **RT-PCR** 及び **EST (Expressed Sequence Tag)** 解析をベースとする遺伝子のクローニングを企画した。

2. 研究の目的

本研究では、**RT-PCR** 及び **EST** 解析を基盤としてカンナビノイドの基本骨格形成を触媒する酵素、即ちポリケタイド合成酵素及びプレニル転位酵素をコードする遺伝子を世界で初めてクローニングし、その構造機能を詳細に解明することを目的とした。またクローン化した各酵素遺伝子を **THCA synthase** とセットとして酵母などで大量発現させて **THCA** を生物生産し、これを基盤として新たな **THC** 生産システムを実現する事についても当初の研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) **RT-PCR** による候補遺伝子のクローニング

カンナビノイドを活発に生産する若葉より **mRNA** を抽出し、逆転写により鋳型 **cDNA** を調製した。次いで既知の植物ポリケタイド合成酵素及びプレニル転位酵素の保存配列を基に設計したプライマーを用いて **PCR** を行い、ポリケタイド合成酵素及びプレニル転位酵素の候補遺伝子の部分断片を各々得た。更に、各々の遺伝子について **5' RACE** 及び **3' RACE** を行うことで、全塩基配列を明らかにした。

(2) **EST** 解析による遺伝子クローニングの検討

若葉由来の **mRNA** から常法に従い完全長 **cDNA** を合成してプラスミドに組み込み、これを大腸菌コンピテントセルに導入することで **cDNA** ライブラリーを作製した。得られたライブラリーよりランダムにプラスミドを調製した後、組み込まれた遺伝子の **5'** 末端より部分的に配列を決定した。得られた配列について、ポリケタイド合成酵素及びプレニル転位酵素に期待されるモチーフの検索や同源性検索など種々の配列解析を行い、候補クローンが得られているか検討した。

(3) ポリケタイド合成酵素の大腸菌での発現及び機能解析

(1) で得られたポリケタイド合成酵素遺伝子を発現ベクター **pET24a** にサブクローニングし、大腸菌 **BL21(DE3)** を宿主として組み換え酵素を発現し、金属キレートカラムにより精製した。得られた組み換え酵素について各種 **acyl CoA** を基質とするアッセイを行い、生成物を **HPLC** 分析することにより酵素機能を検討した。

(4) プレニル転位酵素の酵母での発現

(1) で得られたプレニル転位酵素遺伝子を発現ベクター **pPICZa** にサブクローニングし、メチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* を宿主として組み換え酵素の発現システムを確立した。

4. 研究成果

(1) ポリケタイド合成酵素のクローニングと構造機能解析

各種植物ポリケタイド合成酵素に保存されたアミノ酸配列を基にプライマーを合成し、**RT-PCR** により **GPKS** と仮称する一種のポリケタイド合成酵素の **cDNA** をクローニングした。**GPKS** の推定アミノ酸配列は既知の植物ポリケタイド合成酵素と高いホモロジーを示し、また植物に普遍的に存在する **chalcone synthase** とも **65%** 程度のアミノ酸が一致したが、活性部位近傍のアミノ酸に数種の変化が観察されたことから、本酵素は **chalcone synthase** より進化した新規酵素である可能性が示唆された。

次に **GsPKS** 遺伝子を **pET24a** にクローニングし、大腸菌を宿主として組み換え酵素を発現後、**Hs-bindresin** カラムで電気泳動上単一に精製した。得られた組み換え酵素について **olivetolic acid** の生合成基質と推察される **hexanoyl-CoA** 及び **malonyl-CoA** を基質としてアッセイを行い、生成物を **HPLC** で分析したところ、**olivetolic acid** とは異なる三種のピークが確認された。

各生成物は微量であったことから、ラージスケールの反応を行うことで各生成物を単離し、**NMR** により構造決定した。この結果、**GsPKS** は、**derailment product** と推察される **triketide pyrone** とともに、テトラケタイド中間体のラクトン化により **tetraketide pyrone** を、また脱炭酸を伴う **aldol** 縮合により **olivetolic acid** の脱炭酸体である **olivetol** を合成することが判明した。

次に酵素反応の速度論的解析を行ったところ、**GsPKS** は **hexanoyl-CoA** から **olivetol** 及び **tetraketide pyrone** を、各々 **3.46 min⁻¹** 及び **1.06 min⁻¹** の *k_{cat}* 値をもって合成することが明らかとなった。本酵素が比較的高い **olivetol** 合成活性を示したことから、以下、本酵素を **olivetol synthase (OLS)** と称することとした。**Olivetol** のような **alkylresorcinol** を合成する植物 **PKS** は本例が初めてである。なお **OLS** と同様な閉環反応を触媒する植物 **PKS** としては *p-coumaroyl-CoA* を開始基質として **resveratrol** を合成する **stilbene synthase** が知られているが、**stilbene synthase** は **hexanoyl-CoA** を基質とした際には **pyrone** 化合物のみを合成することが報告されている。

また、各種 **CoA** エステルを用いて基質特異性について検討したところ、本酵素は **hexanoyl-CoA** 以外に、数種の脂肪族化合物の **CoA** エステル、即ち **butyryl-CoA**、**isovaleryl-CoA** 及び **octanoyl-CoA** を開始基質として反応を触媒することが明らかとなったが、**butyryl-CoA** から低い反応効率 (*k_{cat}*: **0.25 min⁻¹**) で **resorcinol** を合成した以外は **triketide pyrone** のみを合成した。また、**benzoyl-CoA** 及び *p-coumaroyl-CoA* など芳香族 **CoA** を基質としないことが確認され、以上から、本酵素が開始基質として **C4** ~ **C8** の脂肪鎖を有する **CoA** エステルのみを受け入れること、及び **hexanoyl-CoA** に最も高い活性を示すことが明らかとなった。植物ポリケタイド合成酵素は一般に幅広い基質特異性を示すことが知られているが、**OLS** は活性部位に生じた変異により **hexanoyl-CoA** を基質として選択するよう進化したものと推察された。

OLS の大麻における発現を抗 **OLS** ポリクローナル抗体を用いた **western blotting** で分

析した結果、カンナビノイドを活発に生産する花部及び若葉由来のサンプルで強いバンドが観察された。また大麻より粗酵素を調製しアッセイを行った結果、花部及び若葉に **olivetol** 合成活性が確認されたことから、**OLS** はこれら組織で発現していることが明らかとなった。

以上のように **OLS** は **olivetolic acid** を合成しなかったものの、**hexanoyl-CoA** に特異的であり、**aldol** 縮合を触媒することに加え、カンナビノイドを生産する植物組織で発現している点から、大麻では **olivetolic acid** 生合成に関与しているものと推察された。

(2) プレニル転位酵素のクローニングと構造解析

近年の研究から、微生物や植物などに分布する所謂 **ubi A** ファミリーに属するプレニル転位酵素が、植物二次代謝成分の生合成に関与する例が報告されていることから、**ubi A** ファミリーに保存された配列を基にプライマーを合成し、重複 **PCR** を行う事で、大麻に **GsPT1** 及び **GsPT2** と仮称する2種のプレニル転位酵素が発現している事を確認した。そこで各々 **5' RACE** 及び **3' RACE** を行うことにより、全長の **cDNA** をクローニングし、配列を明らかにした。

GsPT1 は **404** アミノ酸、**GsPT2** は **384** アミノ酸から成り、**PSORT** プログラムによる解析からいずれもプラスチドへの **transit peptide** を有することが示唆された。また、これらのアミノ酸配列はいずれも、プレニル転位酵素に特徴的なモチーフである **NQxxDxxxD** を含むことが確認された。さらにホモロジー解析の結果、これらのアミノ酸配列は **flavonoid prenyl transferase** など二次代謝系の酵素を含む各種の植物プレニル転位酵素と高いホモロジーを示し、興味深いことに大麻と近縁の植物ホップで二次代謝産物 **bitter acid** の生合成を触媒するプレニル転位酵素と **50%** 以上のアミノ酸が一致する高いホモロジーを示した。これらの配列的特徴から、**GsPT1** 及び **2**、あるいはそのいずれかは大麻においてカンナビノイドの生合成に関与するものと推察した。そこでこれらについて、酵素機能を解明するため、各々の遺伝子を発現ベクターに組み込んだ後、メチロトロフ酵母に導入して発現系を構築した。組み換え酵素の活性については現在検討中であり、今後カンナビノイド生合成経路のプレニル転位酵素を同定できるものと考えている。

これら操作と並行して、大麻 **cDNA** ライブラリーのランダムシーケンスを行い、決定した配列 (**EST**) についてポリケタイド合成酵素およびプレニル転位酵素の予想される構造的特徴と比較したが、本検討により両酵素をコードすると推察されるクローンは得

られなかった。同様な結果は Marks らにより報告されており (*J. Exp. Bot.* 60, 3715-3726, 2009)、カンナビノイド生合成酵素は発現量の少ない遺伝子にコードされるものと考えられた。

以上のように本研究ではカンナビノイド生合成経路のポリケチド合成酵素及びプレニル転位酵素遺伝子について各種検討を行い、候補遺伝子を得ることが出来た。本成果はカンナビノイドの新たな生物生産システムを確立する上で重要なステップであると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① C Taguchi, F. Taura, T. Tanada, Y. Shoyana, Y. Shoyana, H Tanaka, R Kuroki, S Mrimoto, Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of polyketide synthase-1 (PKS-1) from *Cannabis sativa.*, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 査読有, 64, 2008, 217-220

② F. Taura, Molecular characterization of the biosynthetic enzyme for the biotechnological production of tetrahydrocannabinol, the active constituent of marijuana, *Drug Discoveries and Therapeutics*, 査読無, 2, Supplement, 2008, 59-59

③ F. Taura, S. Tanaka, C Taguchi, T. Fukamizu, H Tanaka, Y. Shoyana, and S. Mrimoto Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway, *FEBS Letters*, 査読有, 583, 2009, 2061-2066

④ F. Taura, Studies on tetrahydrocannabinolic acid synthase that produces the acidic precursor of tetrahydrocannabinol, the pharmacologically active cannabinoid in marijuana, *Drug Discoveries and Therapeutics*, 査読有, 3, 2009, 83-87

[学会発表] (計 2 件)

① 田浦太志、大麻成分の生合成酵素に関する研究、日本薬学会第 129 年会、平成 21 年 3 月 27 日、京都市

② F. Taura, Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway, *Asian Symposium for Pharmaceutical Sciences in JSPS Asian Core Program in Fukuoka*, 平成 21 年 11 月 6 日、福岡市

[図書] (計 1 件)

① F. Taura, S. Sirikantaranas, Y. Shoyana, Y. Shoyana and S. Mrimoto, *Phytocannabinoids in Cannabis sativa: Recent studies on biosynthetic enzymes in* D.M. Lambert (Ed.), *Cannabinoid in Nature and Medicine*, Springer Verlag, 2009, 51-65

[その他]

ホームページ等

<http://seigyophar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田浦 太志 (TAURA FUJOSH)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：00301341