

大麻文化科学考¹⁻²⁰⁾ (その19)

渡辺和人^{*,**}, 木村敏行^{*}, 山折大^{*},
竹田修三^{**}, 宇佐見則行^{***}, 山本郁男^{***}

A Study on the Culture and Sciences of the Cannabis and Marihuana XIX¹⁻²⁰⁾

Kazuhito Watanabe^{*,**}, Toshiyuki Kimura^{*}, Satoshi Yamaori^{*},
Shuso Takeda^{**}, Noriyuki Usami^{***}, Ikuo Yamamoto^{***}

Received October 31, 2008

Abstract

This review summarizes the recent advances in the biosynthetic enzymes of cannabinoids. Recently, the enzymes (tetrahydrocannabinolic acid synthase, cannabidiolic acid synthase, cannabichromenic acid synthase etc.) involved in cannabinoid biosynthesis were purified, and the biosynthetic pathways of major cannabinoids were established by Shoyama and co-workers. So, we introduce here their proposal new pathways.

第19章 カンナビノイド生合成経路—再考

第1節 はじめに

先に1997年大麻文化科学考(その8)⁸⁾及び2001年大麻の文化と科学¹⁵⁾において、主要カンナビノイドのカンナビジオール(CBD)及びテトラヒドロカンナビノール(THC)は、酢酸-マロン酸経路により生成するオリベトール酸とメバロン酸経路により生成するゲラニルピロリン酸を原料として、カンナビゲロール酸(CBGA)→カンナビジオール酸(CBDA)→テトラヒドロカンナビノール酸(THCA)の順序で生合成されることを記述した。これはMechoulamとGaoni²¹⁾, 正山²²⁾らの大麻草での生合成及び化学的変換反応に関する研究から

* 薬学部
Faculty of Pharmaceutical Sciences

** 学術フロンティア
Organization for Frontier Research

*** 九州保健福祉大学薬学部
School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare

提唱された経路である (Fig.1)。

しかしながら, 近年, 分子生物学及び植物酵素化学の進歩により, これらカンナビノイドの生合成に関与する酵素群のタンパク質及び遺伝子レベルでの解明が進んだ。その結果, 先の生合成経路については, 一部修正する必要が判明した。本章では, カンナビノイド生合成に関与する酵素群の最近の知見を纏め, 生合成経路について再考を行った。

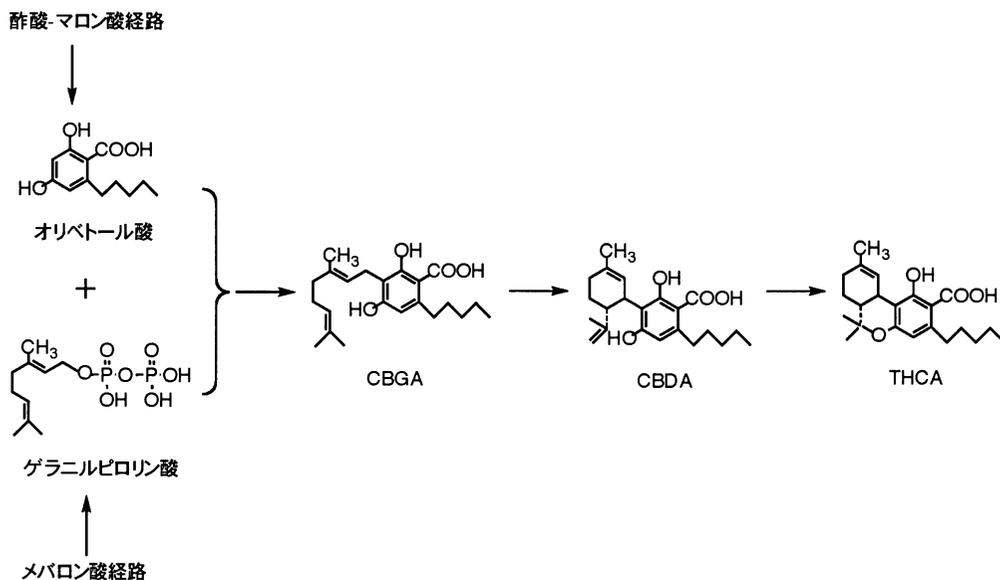


Fig.1 先に提唱されたカンナビノイドの生合成経路^{21,22)}

第2節 オリベトール酸の生合成

オリベトール酸はポリケタイドの一種であり, 酢酸-マロン酸経路により生合成されることは, 大麻文化科学考 (その8)⁸⁾にも記述した。しかし, 当時, 大麻草中におけるオリベトール酸の生合成に関与する酵素の詳細は明確でなかった。ポリケタイド類の生合成に関与する酵素としては, ポリケタイド合成酵素 (polyketide synthase, PKS) が知られているが, 最近, Taguchiら²³⁾は大麻草からポリケタイド合成酵素 (PKS-1) のクローニングに成功した。しかしながら, 本酵素はマロニルCoAとヘキサノイルCoAから直接にはオリベトール酸の合成は行わず, 異性体であるヘキサノイルトリ酢酸ラクトン (hexanoyltriacetic acid lactone, HTAL) を生成した (Fig.2)。同様な反応を触媒する酵素としては, *p*-クマロイルトリ酢酸ラクトン (*p*-coumaroyltriacetic acid lactone, CTAL) 合成酵素が知られている。この酵素の反応生成物であるCTALはスチルベンカルボン酸の前駆物質と考えられている²⁴⁾。従って, HTALはオリベトール酸の前駆物質であると推定される。PKS-1は大麻草中において, オリベトール酸の生合成に関与する酵素として見い出された最初の例である。

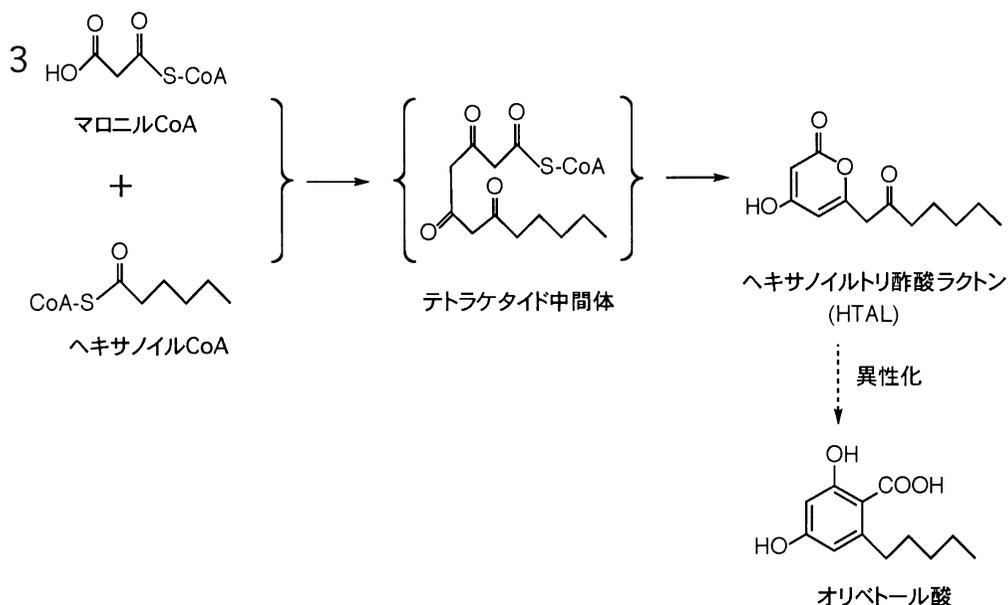
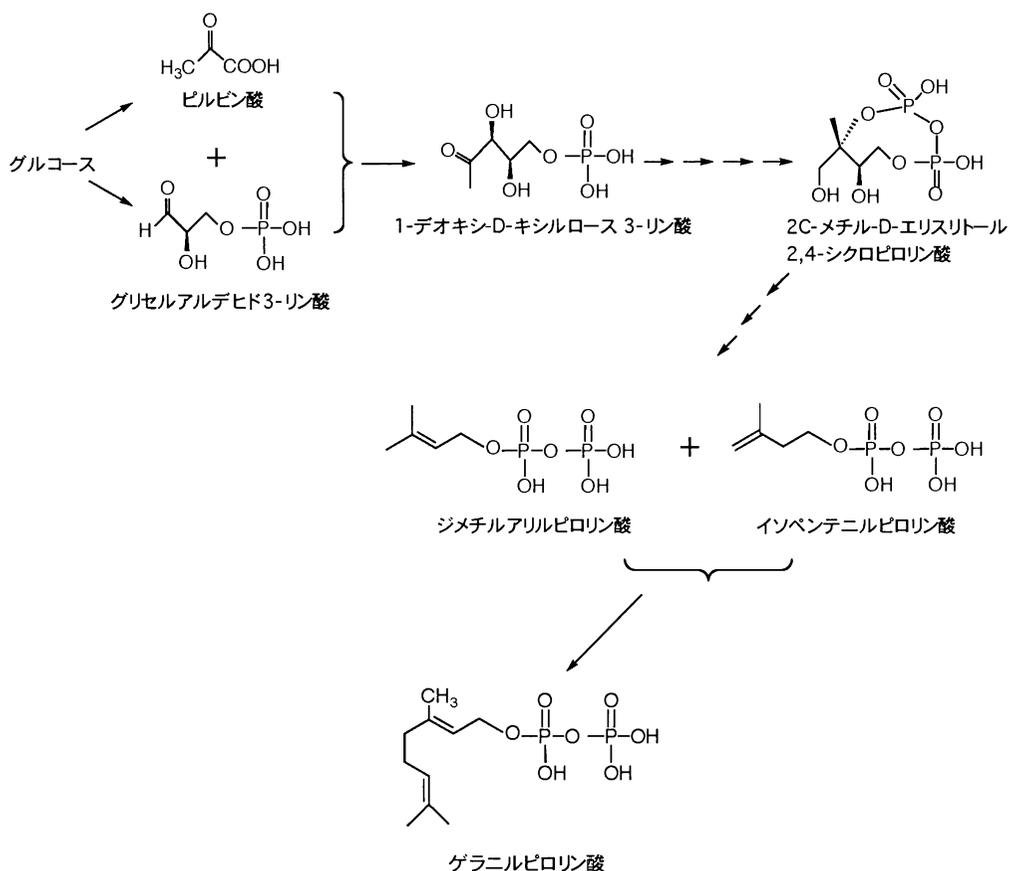


Fig.2 大麻草中におけるオリベトール酸の生合成経路²³⁾

第3節 テルペン部分の生合成

これまで各種テルペン生合成の前駆物質であるイソペンテニルピロリン酸及びジメチルアリルピロリン酸は、メバロン酸経路で生合成されると信じられてきた。カンナビノイドのテルペン部分に相当するゲラニルピロリン酸もメバロン酸経路で合成されることを大麻文化科学考(その8)⁸⁾に記述している。ところが、最近、多くの植物テルペノイドの生合成経路として、メバロン酸経路とは異なるデオキシキシルロースリン酸経路の存在が明らかとなった²⁵⁻²⁷⁾。植物中では、メバロン酸経路に関与する酵素は細胞質に存在するのに対し、デオキシキシルロースリン酸経路の酵素はplastid(液胞)に存在する^{28,29)}。従って、カンナビノイドのテルペン部分についても本経路による生合成の可能性が考えられた。Fellermeierら³⁰⁾は安定同位体の¹³Cで標識したグルコースを大麻草幼若葉に添加して培養し、生合成されたカンナビノイドのテルペン骨格中の炭素原子の大部分に¹³Cの取り込みを確認している。このことは、カンナビノイドのテルペン骨格は、主にデオキシキシルロースリン酸経路により生合成されることを示すものである。Fig.3にデオキシキシルロースリン酸経路によるグルコースからゲラニルピロリン酸までの生合成経路を示す。

Fig.3 カンナビノイドのテルペン部分の生合成²⁵⁻²⁷⁾

第4節 THCAの生合成

大麻草は一属一種の植物であるが、多くの生理的亜種が存在し、特にTHCAを主カンナビノイドとするTHCA種及びCBDAを主カンナビノイドとするCBDA種に大別される。両生理種の大麻草中には、それぞれのカンナビノイドの生合成に関与する特有の酵素が存在することが容易に想像された。しかしながら、その酵素の詳細は永らく不明のままであった。Taura³¹⁾は、成長過程にあり生合成酵素を多く含むと考えられる幼若大麻草よりTHCA合成酵素の精製を試み、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 上で単一の75kDaのフラビンタンパク質を得た。精製酵素はCBGAを基質としてTHCAを生成する触媒活性を示した (Fig.4)。しかし、本酵素は活性発現に特に補酵素は必要とせず、 Mg^{2+} 等2価のカチオンの要求性も認められなかった。また、CBGAのZ-異性体であるカンナビネロール酸 (CBNRA) も基質としたが、活性は低いものであった。この他、本酵素はCBDAをTHCAに変換する活性を示さず、カルボン酸が脱炭酸したカンナビゲロール (CBG) も基質

としなかった。これらの結果から、先にMechoulam³²⁾により提唱されたTHCAの前駆体はCBDAであるという生合成経路は疑問視された。Sirikantaramasら³³⁾は、THCA合成酵素のcDNAクローニングを行い、酵素遺伝子を緑色蛍光タンパク質遺伝子と融合し大麻草の培養組織に導入し分布を検討した。その結果、THCA合成酵素は小胞体に発現し、大麻草の腺毛部分に蓄積することが示された³⁴⁾。これはTHCAの合成が主に大麻草中の腺毛部分で行われることを示すものである。

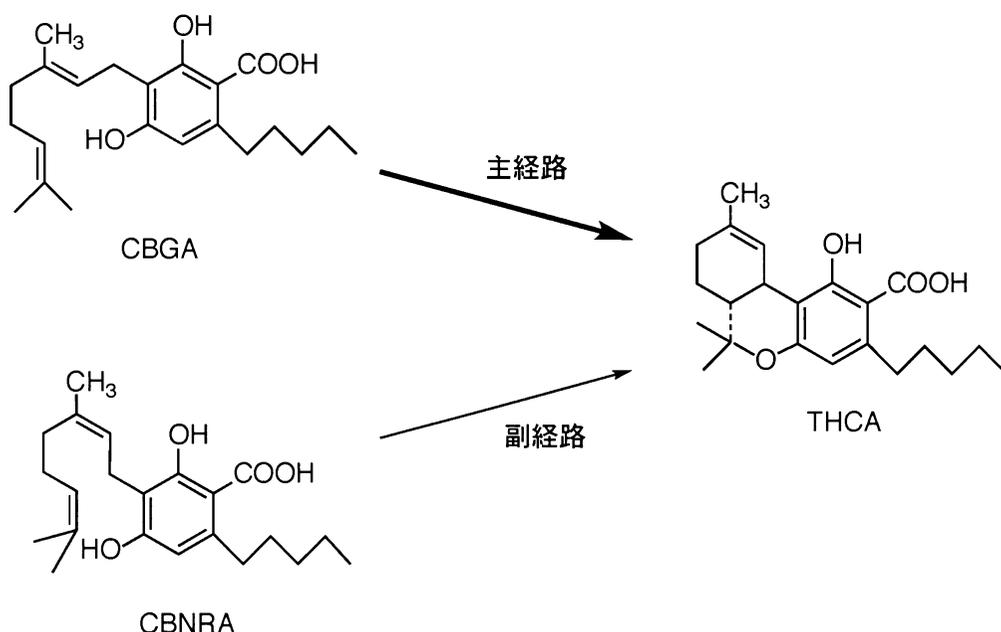
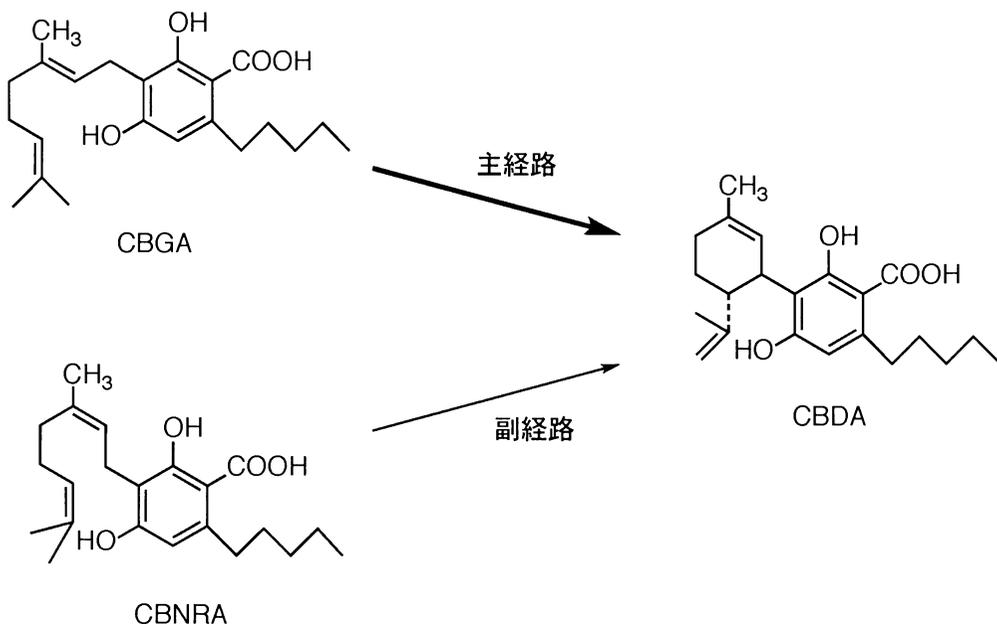


Fig.4 THCA合成酵素によるTHCAの生合成^{31,33)}

第5節 CBDAの生合成

CBDAは、我が国において、主に繊維を採取するために栽培されているCBDA種の大麻草に含まれる主要カンナビノイドである。1996年Tauraら³⁵⁾はCBDA種大麻草より、各種クロマトグラフィーを駆使し、74kDaのタンパク質を精製した。本酵素は、CBGAを基質としてCBDAを生成するCBDA合成酵素であることが明らかになった。CBDA合成酵素は、THCA合成酵素と同様にフラビンタンパク質であり、特に補酵素は必要とせず、2価金属カチオンの要求性も認められなかった。また、CBGA以外にもCBNRAを基質とするが、CBNRAに対する触媒能は低かった。この他、CBGAからCBDAを生成するが、THCA生成能はないことも明らかとなった。従って、CBDAはTHCAの前駆体にはなり得ないことが示された。Tauraら³⁶⁾は、CBDA合成酵素の遺伝子クローニングを行い、THCA合成酵素との構造類似性を明らかにした。Fig.6にTHCA合成酵素とCBDA合成酵素のアミノ酸配列を比較して示す^{33,36)}。

Fig.5 CBDA合成酵素によるCBDAの生合成^{35,36)}

THCA synthase 1	MNCSAFSFWF	VCKIIFFFLS	FHIQISIANP	RENFLKCFSK	HIPNNVANPK	LVYTQHDQLY	60
CBDA synthase 1	MKCSTFSFWF	VCKIIFFFFS	FNIQTSIANP	RENFLKCFSQ	YIPNNATNLK	LVYTQNNPLY	60
THCA synthase 61	MSILNSTIQN	LRFISDTPPK	PLVIVTPSNN	SHIQATILCS	KKVGLQIRTR	SGGHDAEGMS	120
CBDA synthase 61	MSVLNSTIHN	LRFISDTPPK	PLVIVTPSHV	SHIQQTILCS	KKVGLQIRTR	SGGHDSSEMS	120
THCA synthase 121	YISQVPFVVV	DLRNMHSIKI	DVHSQTAWVE	AGATLGEVYY	WINEKNENLS	FPGGYCPTVG	180
CBDA synthase 121	YISQVPFVIV	DLRNMRSIKI	DVHSQTAWVE	AGATLGEVYY	WVNEKNENLS	LAAGYCPTVC	180
THCA synthase 181	VGGHFGGGGY	GALMRNYGLA	ADNIIDAHLV	NVDGKVLDRK	SMGEDLFWAI	RGGGGENFGI	240
CBDA synthase 181	AGGHFGGGGY	GPLMRNYGLA	ADNIIDAHLV	NVHGKVLDRK	SMGEDLFWAL	RGGGAESFGI	240
THCA synthase 241	IAAWKIKLVA	VPSKSTIFS	KKNMEIHGLV	KLFNKWONIA	YKIDKDLVLM	THFITKNITD	300
CBDA synthase 241	IVAWKIRLVA	VP-KSTMFSV	KKIMEIHEL	KLWNKWONIA	YKIDKDLVLM	THFITRNITD	299
THCA synthase 301	NHGKNTTVH	GYFSSIFHGG	VDSLVDLMNK	SFPELGIKKT	DCKEFSWIDT	TIFYSGVVNF	360
CBDA synthase 300	NQGKNTAIH	TYFSSVFLGG	VDSLVDLMNK	SFPELGIKKT	DCRQLSWIDT	IIFYSGVVNY	359
THCA synthase 361	NTANFKKEIL	LDRSACKKTA	FSIKLDYVKK	PIPETAMVKI	LEKLYEEDVG	AGMYVLYPYG	420
CBDA synthase 360	DTDNFNKEIL	LDRSAGQNGA	FKIKLDYVKK	PIPESVFVQI	LEKLYEEDIG	AGMYALYPYG	419
THCA synthase 421	GIMEEISESA	IPFPHGAGIM	YELWYTASWE	KQEDNEKHIN	WVRSVYNFTT	PYVSQNPRLA	480
CBDA synthase 420	GIMDEISESA	IPFPHGAGIL	YELWYICSWE	KQEDNEKHLN	WIRNIYNFMT	PYVSKNPRLA	479
THCA synthase 481	YLNRYDLDIG	KTNHASPNNY	TQARIWGEKY	FGKNFNRLVK	VRTKVDPNNF	FRNEQSIPPL	540
CBDA synthase 480	YLNRYDLDIG	INDPKNPNNY	TQARIWGEKY	FGKNFDRLVK	VRTLVDPNNF	FRNEQSIPPL	539
THCA synthase 541	PPHHH	546					
CBDA synthase 540	PRRRH	545					

Fig.6 THCA合成酵素とCBDA合成酵素のアミノ酸配列の比較^{33,36)}

網かけの部分はアミノ酸が異なることを示す。

第6節 カンナビクロメン酸 (CBCA) の生合成

CBCAは薬物型のTHCA種及び繊維型のCBDA種いずれの大麻草にも含まれるカンナビノイドである。Mechoulamら²¹⁾によって、CBCAはCBGAから生成することが示唆されていた。Morimotoら^{37,38)}は、CBDA種の幼若大麻草よりCBDA合成酵素を精製し、その性質を明らかにした。精製酵素はCBGAを基質としてCBCAを合成した (Fig.7)。しかし、THCA合成酵素及びCBDA合成酵素と比較して、本酵素は立体特異性が低く、ピラン環に結合したメチル基の配位が異なる2種のCBCA異性体を5:1の割合で生成した。CBCA合成酵素のその他の酵素化学的性質は、THCA合成酵素及びCBDA合成酵素と類似していた。

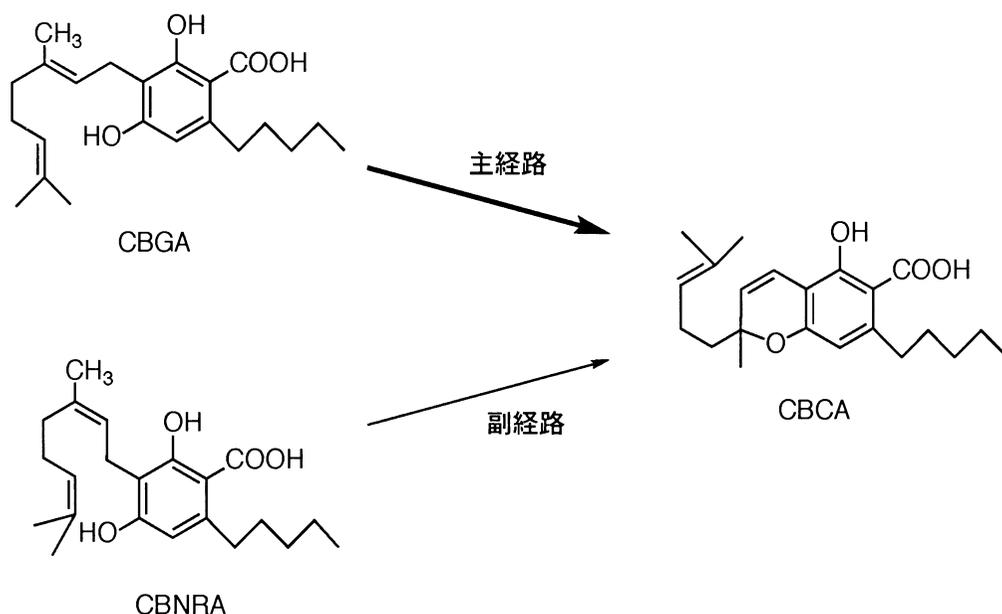


Fig.7 CBCA合成酵素によるCBCAの生合成^{37,38)}

第7節 CBGAの生合成

これまで示したように、THCA、CBDA及びCBCAは、いずれもCBGAを共通の前駆体としてそれぞれ特有の合成酵素により生合成される。従って、カンナビノイド生合成においてCBGAは重要な中間体といえる。CBGAの生合成は、オリベトール酸とゲラニルピロリン酸を原料として行われる。FellermeierとZenk³⁹⁾は、これらを原料としてCBGAを合成する新規なゲラニル転移酵素を幼若大麻草葉中に見い出した。本酵素の活性発現には、THCA合成酵素、CBDA合成酵素及びCBCA合成酵素とは異なりMg²⁺が必要であった。本ゲラニル転移酵素は、これまで報告されている多くの芳香族ゲラニル転移酵素が膜結合型酵素であるに対し、細胞質に存在する可溶性酵素であった。また、本酵素はゲラニルピロリン酸と共にネリルピロリン酸

も基質とし、オリベトール酸と共に反応させるとCBNRAを合成した。従って、CBGA及びCBNRAは共通の酵素により生合成されることが明らかとなった (Fig.8)。しかし、本酵素の触媒能はCBGA>>CBNRAであることから、大麻草中ではCBGAの生合成が優先されるものと考えられた。これは実際の大麻草中では主にCBGAが生合成される事実と一致している。

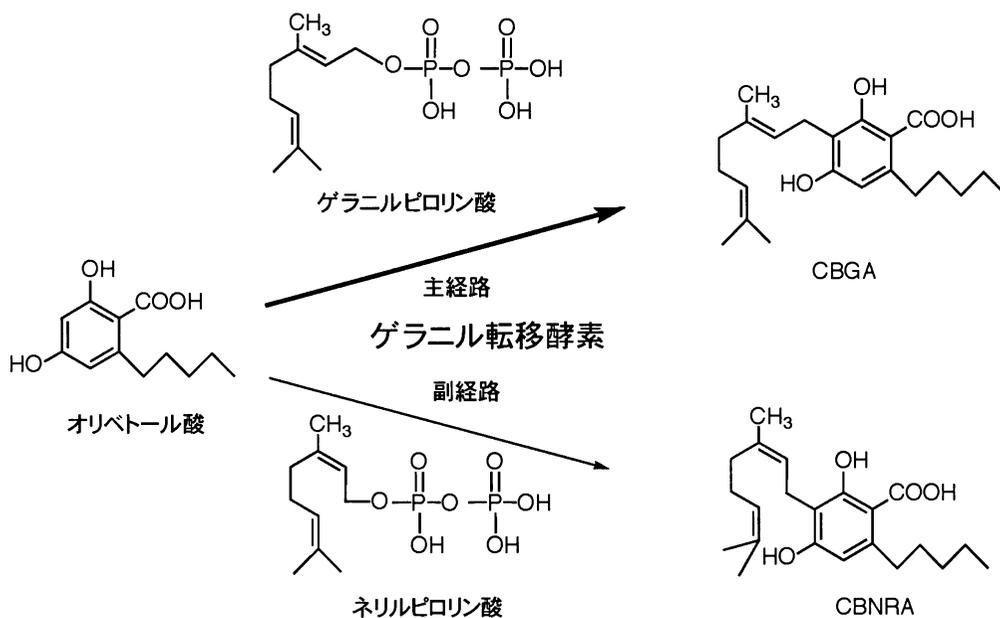


Fig.8 ゲラニル転移酵素によるCBGAの生合成³⁹⁾

第8節 おわりに

大麻草におけるカンナビノイドの生合成経路については、永らく生合成に関与する酵素の明確なデータがなく、仮説や推定の域を出なかった。近年、カンナビノイド生合成に関わる酵素が次々に精製あるいは遺伝子クローニングされ、その全容が明らかにされつつある。その結果、Mechoulam²¹⁾及び正山²²⁾によって提唱されていた生合成経路 (Fig.1)の一部に修正すべき点が明らかとなった。Fig.9に最近の正山らの報告を基にした主要カンナビノイドの生合成経路についてまとめた。主要カンナビノイドは、いずれもCBGAを共通の前駆物質として、対応する合成酵素により生合成されることが明確となった。また、カンナビノイドの大麻草中における生理的意義については不明であったが、この点についても、最近、Morimotoら⁴⁰⁾はCBDA及びTHCAが植物細胞に対してネクロシス型の細胞死を誘発することを明らかにした。このことは、これらカンナビノイドが外的侵襲からの防御因子として機能することを示唆している。

カンナビノイドの生理機能や生合成に関与する酵素の詳細が解明されれば、多彩な生物活性を有するカンナビノイドの有効利用にも道が開かれるものであり、この分野における今後の進

謝 辞

本研究は吉村英敏九州大学名誉教授, 成松鎮雄現岡山大学薬学部教授, 松永民秀現信州大学医学部准教授兼附属病院薬剤部副部長の他, 教室大学院修了生などの協力のもとに遂行され, 現在も続行中のものである。ここに深謝します。また, 本稿を纏めるに当たり, 御助言をいただいた正山征洋九州大学名誉教授(現長崎国際大学薬学部教授)に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その1)」大麻の文化, 北陸大学紀要, 14, 1-15 (1990).
- 2) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その2)」続大麻の文化, 北陸大学紀要, 15, 1-20 (1991).
- 3) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その3)」大麻と法律, 北陸大学紀要, 16, 1-20 (1992).
- 4) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その4)」漢方薬として的大麻, 北陸大学紀要, 17, 1-15 (1993).
- 5) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その5)」日本薬局方と大麻, 北陸大学紀要, 18, 1-13 (1994).
- 6) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その6)」大麻の植物学, 北陸大学紀要, 19, 1-11 (1995).
- 7) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その7)」大麻の栽培, 育種, 北陸大学紀要, 20, 9-25 (1996).
- 8) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その8)」大麻の成分, 北陸大学紀要, 21, 1-20 (1997).
- 9) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その9)」大麻の鑑定と分析, 北陸大学紀要, 22, 1-16 (1998).
- 10) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その10)」カンナビノイドの立体化学と合成, 北陸大学紀要, 23, 1-12 (1999).
- 11) 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その11)」大麻主成分の毒性及び薬理作用, 北陸大学紀要, 24, 1-23 (2000).
- 12) 渡辺和人, 木村敏行, 舟橋達也, 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その12)」大麻(マリファナ)の作用とカンナビノイド受容体, 北陸大学紀要, 25, 15-26 (2001).
- 13) 渡辺和人, 木村敏行, 舟橋達也, 山折 大, 宇佐見則行, 松永民秀, 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その13)」大麻主成分カンナビジオールの毒性発現機構, 北陸大学紀要, 26, 7-15 (2002).
- 14) 渡辺和人, 木村敏行, 舟橋達也, 山折 大, 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その14)」大麻主成分THCの活性代謝物, 北陸大学紀要, 27, 1-11 (2003).
- 15) 山本郁男, 大麻の文化と科学, 廣川書店, (2001).
- 16) 山本郁男, 井本真澄, 岩井勝正, 「大麻文化科学考 (補遺)」日向の大麻, 九州保健福祉大学紀要, 5, 241-245 (2004).
- 17) 渡辺和人, 木村敏行, 舟橋達也, 山折 大, 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その15)」大麻からの創薬-治療薬への応用, 北陸大学紀要, 28, 17-32 (2004).
- 18) 渡辺和人, 木村敏行, 舟橋達也, 山折 大, 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その16)」大麻と事件-最近の動向-, 北陸大学紀要, 29, 13-21 (2005).
- 19) 渡辺和人, 木村敏行, 舟橋達也, 山折 大, 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その17)」乱用薬物防止教育, 北陸大学紀要, 30, 13-22 (2006).
- 20) 渡辺和人, 木村敏行, 山折 大, 竹田修三, 宇佐見則行, 山本郁男, 「大麻文化科学考 (その18)」ヒトにおける大麻主成分カンナビノイドの代謝, 北陸大学紀要, 31, 1-11 (2007).
- 21) R. Mechoulam and Y. Gaoni, Tetrahedron, 21, 1223-1229 (1965).
- 22) 正山征洋, 大麻に関する生薬学的研究, 九州大学博士論文 (1974).
- 23) C. Taguchi, F. Taura, T. Tamada, Y. Shoyama, Y. Shoyama, H. Tanaka, R. Kuroki and S. Morimoto, Acta Cryst. F, 64, 217-220 (2008).
- 24) M.B. Austin, M.E. Bowman, J.L. Ferrer, J. Schroder and J.P. Noel, Chem. Biol., 11, 1179-1194 (2004).
- 25) W. Eisenreich, M. Schwartz, A. Cartayrade, D. Arigoni, M.H. Zenk and A. Bacher, Chem. Biol., 5, R221-R233 (1998).
- 26) M. Rohmer, Nat. Prod. Report, 16, 565-574 (1999).
- 27) S. Herz, J. Wungsintaweekul, S.A. Schuhr, S. Hecht, H. Luttgen, S. Sanger, M. Fellermeier, W. Eisenreich, M.H. Zenk, A. Bacher and F. Rohdich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 2486-2490 (2000).
- 28) D. Arigoni, S. Sanger, C. Latzel, W. Eisenreich, A. Bacher and M.H. Zenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 10600-10605 (1997).
- 29) J. Schwender, J. Zeidler, R. Groner, C. Muller, M. Focke, S. Braun, F.W. Lichtenthaler and H.K. Lichtenthaler, FEBS Lett., 414, 129-134 (1997).

- 30) M. Fellermeier, W. Eisenreich, A. Bacher and M.H. Zenk, *Eur. J. Biochem.*, 268, 1596-1604 (2001).
- 31) F. Taura, S. Morimoto, Y. Shoyama and R. Mechoulam, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 9766-9767 (1995).
- 32) R. Mechoulam, *Science*, 168, 1159-1166 (1970).
- 33) S. Sirikantaramas, S. Morimoto, Y. Shoyama, Y. Ishikawa, Y. Wada, Y. Shoyama and F. Taura, *J. Biol. Chem.*, 279, 39767-39774 (2004).
- 34) S. Sirikantaramas, F. Taura, Y. Tanaka, Y. Ishikawa, S. Morimoto and Y. Shoyama, *Plant Cell Physiol.*, 46, 369-378 (2005).
- 35) F. Taura, S. Morimoto and Y. Shoyama, *J. Biol. Chem.*, 271, 17411-17416 (1996).
- 36) F. Taura, S. Sirikantaramas, Y. Shoyama, K. Yoshikai, Y. Shoyama and S. Morimoto, *FEBS Lett.*, 581, 2929-2934 (2007).
- 37) S. Morimoto, K. Komatsu, F. Taura and Y. Shoyama, *J. Nat. Prod.*, 60, 854-857 (1997).
- 38) S. Morimoto, K. Komatsu, F. Taura and Y. Shoyama, *Phytochemistry*, 49, 1525-1529 (1998).
- 39) M. Fellermeier and M.H. Zenk, *FEBS Lett.*, 427, 283-285 (1998).
- 40) S. Morimoto, Y. Tanaka, K. Sasaki, H. Tanaka, T. Fukamizu, Y. Shoyama, Y. Shoyama and F. Taura, *J. Biol. Chem.*, 282, 20739-20751 (2007).