

組み換え培養細胞によるテトラヒドロカンナビノールの生産

田浦 太志

(九州大学大学院薬学研究院 創薬科学部門)

研究の目的

大麻の薬理活性の主体をなす成分であるテトラヒドロカンナビノール(THC)は、鎮痛、抗痙攣、免疫抑制及び神経保護等、種々の有用な薬理作用を有し、新鮮なアサ中ではカルボキシル基を有するテトラヒドロカンナビノール酸(THCA)の形で生合成されることが知られている。以前の研究で私は、THCA が新規な酵素である THCA synthase により生合成されることを証明した。THCA synthase は基質カンナビゲロール酸(CBGA)のゲラニル基の立体選択的な環化反応により THCA を合成する酵素である(図 1)。本酵素反応の基質 CBGA は容易に化学合成が可能であり、また THCA は加熱により脱炭酸して THC に変換することから、THCA synthase は THC の新たな生産法の確立に利用できるものと考えられる。本研究で私は THC の生産システムへの道を開くべく、THCA synthase の効率的な異種発現システムの構築を検討した。

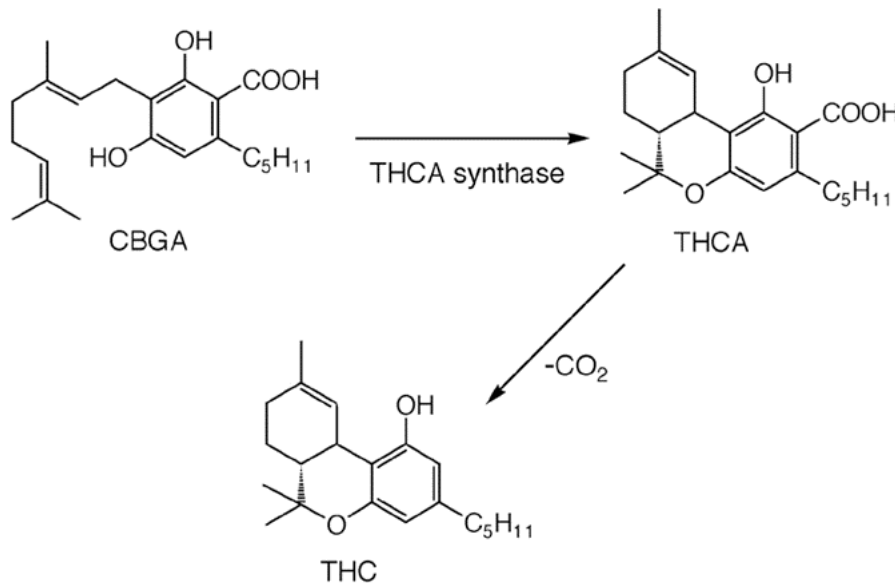


図 1 THC の生成スキーム THCA synthase は CBGA のモノテルペン部の酸化閉環を触媒し THCA を合成する。 THC は THCA から非酵素的脱炭酸により生成する。

方法

1. THCA synthase の酵母での発現

THCA synthase の全コード領域を発現ベクター pPICZ-B (Invitrogen) のアルコールオキシダーゼプロモーターの下流に組み込んだ。次いでこれを *SacI* 処理により直線化し、酵母 *Pichia pastoris* SMD1168 (Invitrogen) に導入した。組み換え体コロニーは zeocin を含む最小培地で選抜した。得

られた THCA synthase を含む *Pichia* は液体 BMGY 培地にて 30 °C で 2 日間前培養した後、遠心により集菌し、組み換え酵素の発現誘導のためメタノールを含む BMMY 培地に再懸濁し、同条件下振盪培養した。細胞抽出液及び培地における THCA synthase 活性は HPLC により測定した。

2. THCA synthase のタバコ毛状根での発現

THCA synthase の cDNA 全長を植物発現ベクターである pBI121 (Clontech) にクローン化した。次いでこれをトリペアレンタルメイティングにより *Agrobacterium rhizogenes* 15834 株に導入した。タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) の茎を *A. rhizogenes* を付着させた針で刺すことにより、菌をタバコ細胞に感染させた。感染部位より生成した毛状根は抗生物質を含む B5 固形培地で培養することにより除菌及び選抜を行った。THCA synthase を発現している組み換え毛状根を 30 ml の液体 B5 培地で 2 週間前培養し、次いで 1 mg の CBGA を培養液に投与し、同条件下培養を続けることにより THCA の生成を検討した。

3. THCA synthase のタバコ BY-2 細胞での発現

THCA synthase 遺伝子を組み込んだ pBI121 ベクターをトリペアレンタルメイティングにより *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株に導入した。次いで得られた *Agrobacterium* の感染によりタバコ BY-2 細胞に THCA synthase 遺伝子を組み込んだ。得られた組み換え体はカナマイシンを含む BY-2 固形培地で選抜した。THCA synthase 発現株について 30 ml の液体 BY-2 培地に懸濁し、25 °C で一週間前培養し、1 mg の CBGA を投与することにより、THCA の生成を検討した。

結果

1. 酵母での発現

酵母はその取り扱いが容易なため異種タンパクの発現に適したホストとされており、先ず酵母の系で THCA synthase の発現を検討した。得られた発現細胞株を培養し、THCA synthase 活性を測定したところ、興味深いことに培地に分泌された活性 (32 picokatal/l) は細胞抽出液の活性 (1.8 picokatal/l) に比べ高く、大部分が分泌されることが判明した。酵素活性を高めるため、培養条件について検討したところ、分泌された組み換えタンパクの安定化に効果があるとされるカザミノ酸およびプロテアーゼインヒビターの添加により、培地中の THCA synthase 活性が 9 倍程度上昇することが明らかとなった。しかしながら、改善された発現レベル (0.30 nanokatal/l) は、大麻から精製された THCA synthase の比活性が 1.9 nanokatal/mg であることを考慮すると、酵素量に換算して 0.2 mg/l 以下のレベルであり、THC の効率的な生産への応用は難しいものと推察された。

2. タバコ毛状根での発現

次に大麻と同じ植物であり、遺伝子組み換えの手法が確立したタバコを宿主とする発現を検討した。本法では THCA synthase 遺伝子とともにバクテリアの root-forming gene がタバコ細胞のゲノムに組み込まれるため、組み換え体は活発に成長する毛状根として得られた(図 2A)。本毛状根は最大で 1.2 picokatal/mg protein 程度の THCA synthase 活性を発現していることが確認された。

次いで得られた毛状根を液体 B5 培地(30 ml)で培養し、1 mg の CBGA を投与することにより THCA の生産を検討した。この結果、THCA の生成量は 2 日後に最大 (82 µg, 変換率 8.2 %) に達した(図 2B)。毛状根は THCA synthase をほとんど分泌しなかったが、およそ半分の THCA が培

地中に検出されたため、タバコ細胞により CBGA が取り込まれ、THCA がリリースされたものと考えられた。この結果はタバコなど大麻以外の植物においても THCA が生産可能であることを初めて示したものである。しかしながら、種々の培養及び反応条件を検討したものの、THCA の生産効率は向上しなかったことから、発現系のさらなる改善が必要なものと考えられた。

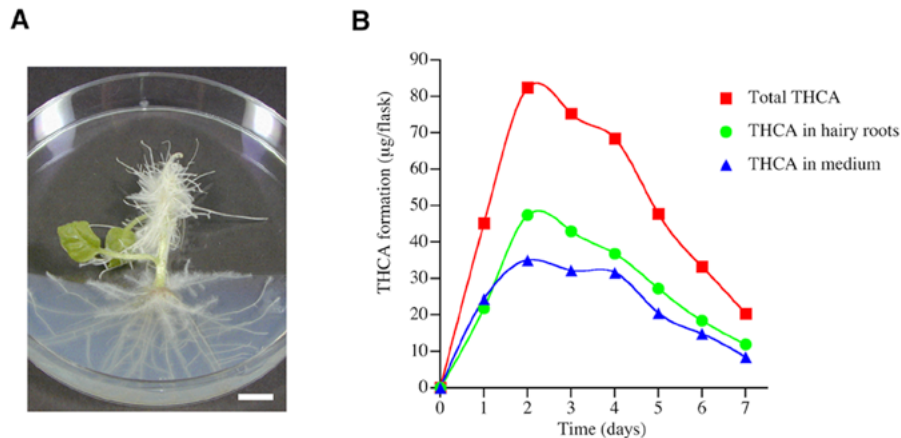


図 2 THCA を生産するタバコ毛状根の作出 A、THCA synthase 遺伝子を有する *Agrobacterium rhizogenes* の感染によるタバコ茎部からの毛状根の誘導 B、THCA synthase を発現する組み換えタバコ毛状根を用いた THCA の生産。毛状根は 30 ml の液体 Gamborg B5 培地中で 2 週間前培養し、これに 1 mg の CBGA を投与した。毛状根及び培地中の THCA の生成量は HPLC により分析した。

3. タバコ BY-2 細胞を用いた THCA の生産

THCA synthase の発現レベルを高めるため、第 3 の宿主としてタバコ BY-2 細胞を選択した。本セルラインは毛状根を含むあらゆる植物細胞、組織培養よりも速やかに増殖し、また遺伝子組み換えの手法も確立されていることから取り扱いが容易であり、かつ高発現が期待されると考えられた。

先ず始めに THCA synthase 遺伝子を BY-2 細胞に組み込み、これを液体 BY-2 培地で培養した。酵素活性を測定した結果、酵母の場合と同様、ほとんどの THCA synthase 活性が培地に分泌されることが判明した。最大の活性を示した細胞株はおよそ 8.7 nanokatal/l の THCA synthase 活性を分泌しており、これは精製したネイティブ酵素の比活性 (1.9 nanokatal/mg protein) を考慮すると、4 mg/l を越える高発現であると推定され、本発現系により発現レベルが非常に向上したことが明らかとなった。

BY-2 組み換え細胞を用いた THCA の生産について、先ず液体培養に直接 CBGA を投与することによる生体変換を検討した。しかしながら、その際の変換率は 8~10 % と予想外に低いものであった。THCA synthase 以外の代謝酵素により CBGA が代謝あるいは分解されている可能性が考えられたため、次に培養フラスコからナイロンフィルターを用いて細胞を除去し、得られた THCA synthase を含む培地に CBGA を加えたところ、最大で 45 % の変換率をもって THCA が生産できることが明らかとなった。さらに組み換え酵素によって得られた THCA を 120 °C の加熱により脱炭酸

させ、シリカゲルカラムにより精製することで THC を得ることに成功した。即ち本研究では THCA synthase を発現する組み換えタバコ BY-2 細胞を用いることで、新たな THC 生産法の確立に成功したと言える。

結論

本研究では酵母、タバコ毛状根及びタバコ BY-2 細胞という3種の異なる宿主を用いて THCA synthase の発現を検討した。酵母及びタバコ毛状根を用いたシステムでは活性を有する組み換え酵素の発現が確認されたものの、その発現量が不十分であったため THC 生産への応用は困難と考えられた。一方、組み換え BY-2 細胞は THCA synthase を大量(> 4 mg/liter)に発現し、CBGA から THCA への変換に応用可能であった。また、生成した THCA は簡単な操作により THC に変換できることから、本研究ではバイオテクノロジーに基づく新たな THC の生産法を確立したと言える。

文献

1. S. Sirikantaramas, S. Morimoto, Y. Shoyama, Y. Ishikawa, Y. Wada, Y. Shoyama and F. Taura "The gene controlling marijuana psychoactivity: Molecular cloning and heterologous expression of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L." *J. Biol. Chem.* **279**, 39767-39774 (2004)
2. S. Sirikantaramas, F. Taura, Y. Tanaka, Y. Ishikawa, S. Morimoto and Y. Shoyama "Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichome" *Plant Cell Physiol.* (2005) in press