大麻幻覚成分THCAの生合成研究

九州大学大学院薬学研究院 田浦太志, 正山祥生, 森元 聡

Cannabis sativa produces novel secondary metabolites called cannabinoids. Among them, Δ^1 -tetrahydrocannabinol (THC), the psychoactive component of this plant, has attracted a great deal of attention, because this cannabinoid is shown to exert a variety of therapeutic activities such as the relief of nausea caused by cancer chemotherapy. To reveal the mechanism of THC formation in *Cannabis sativa*, we attempted biosynthetic studies. Consequently, we established that Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid (THCA), the precursor of THC, is derived from cannabigerolic acid and that this reaction is catalyzed by the novel oxidocyclase, THCA synthase. Here, we show the biochemical and structural properties of THCA synthase.

biosynthesis / *Cannabis sativa* / marijuana / structural analysis / Δ^1 -tetrahydrocannabinol / Δ^1 -tetrahydrocannabinolic-acid synthase

1. 大麻とは

大麻 (marijuana) は古くから世界各国で使用されてきた鎮痛・催眠薬であるが、20世紀後半以降、幻覚剤としての濫用が世界各国で大きな社会問題となっており、そのために最も頻繁にその名前を目にする向精神薬となっている。しかしながら、大麻を正確に理解している人は筆者の属している薬学部でも意外に少ない。そこで、最初大麻について簡単に説明する。

大麻は、繊維作物であるアサ (Fig. 1) の葉や未熟果穂を乾燥した生薬であり、アルコール処理して調製したエキ스는大麻樹脂と称される。新聞等では、しばしば大麻は麻薬として扱われているが、本邦では麻薬には指定されておらず、大麻取締法によってその所持や使用が規制されている。大麻は、モルヒネやヘロインのような麻薬とは異なり、精神的・肉体的依存 (耽溺性) はきわめて弱く、世界各国で大麻所持に対する規制の緩和が行われている。日本でも大麻の合法化を主張しているホームページ等がみられるが、非科学的な根拠にもとづいた記述が多く、それらの意見を鵜呑みにするのは非常に危険である。実際大麻には発がん物質や変異原が大量に含まれており、その慢性的な服用により、睾丸萎縮、精子異常、舌がん等が誘発される可能性が指摘されている¹⁾。

しかしながら、1990年代に入ってから大麻の含有成分に医薬品としての有用性が再認識され、特に末期がん患者の quality of life を高める鎮痛薬として注目され

つつある²⁾。通常、末期がん患者の疼痛治療にはモルヒネが使用されているが、強い吐き気や便秘などの副作用が大きな問題となっている。大麻は鎮痛作用を示すが、モルヒネでみられるような副作用はないことから、大麻をもとにした有用な医薬品の開発が期待されている。

2. 大麻に含まれる有効成分

大麻には、カンナビノイドと称される特異な構造の低分子有機化合物が含まれており (Fig. 2a)、これまで約60種のカンナビノイドが発見されている。256000種といわれている既知植物のうち、カンナビノイドを生産できるのはアサのみである。したがって、ToddやAdams等の著名な有機化学者をはじめとする多くの研究者が古くから大麻に関する研究を行ってきた³⁾。

大麻に含まれる成分のなかで、幻覚活性を示すのは、 Δ^1 -テトラヒドロカンナビノール (THC) およびその関連化合物のみである⁴⁾。THCを含むすべてのカンナビノイドは、モノテルペン部とアルキルレゾルシノール (酸) がカップリングした基本骨格を有している。アルキル部は通常ペンチル基であるが、タイやヒマラヤ産の大麻にはプロピル基をもつカンナビノイドがみられる。非常に興味深いことに、シロシピン (マジックマッシュルームの幻覚成分)、ハルミン (キントラノオ科の幻覚植物)、LSD-25 (合成幻覚剤) 等の幻覚剤のほとんどが、分子内にインドールエチルアミン骨格を有するのに対し (Fig. 2b)、THC はまったく異なる構造

Biosynthetic Study on THCA, the Psychoactive Component of Marijuana

Futoshi TAURA, Yoshinari SHOYAMA and Satoshi MORIMOTO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Fig. 1 *Cannabis sativa* L.

を有している。

THCは新鮮なアサ中にはほとんど存在せず、前駆体である Δ^1 -テトラヒドロカンナビノール酸 (THCA) として蓄積される。THCAも幻覚活性を有するが、THCに比べ1/100程度の活性しか示さない。THCAを加熱すると速やかに脱炭酸が起こってTHCに誘導され、強い幻覚活性を示す。したがって、喫煙による大麻の服用は、幻覚効果を強めるのに、まさに合理的な方法といえる。THCは幻覚の他に学習能力の低下、攻撃性の増大などを引き起こすが、種々の有益な薬理作用（眼圧低下作用、鎮痛作用、鎮吐作用、抗鬱作用）を有することが証明されており、THCをもとにした医薬品の開発が世界各国で進められている。このため、今後THCの需要が著しく増大すると予想される。

3. なぜ生合成研究を行うのか

THCのみならず重要な医薬品として汎用されている植物成分は少なくないが、季節や気候によって植物の成長や成分含量が著しく影響されることが、植物性医薬品を製造する際の隘路となっている。このため多くの化学者が植物成分の化学的合成を試みてきた。前述したモルヒネには、いくつもの化学的合成法が報告されている。しかしながら、医薬品として投与されているモルヒネに関しては、すべてケシから採取したものが使用されており、化学的合成法によっては製造されてない。また、THCについても化学的な合成法が確立されているにもかかわらず⁴⁾、英国の製薬会社はTHCを製造するために、アサの栽培を行っている。これは、ケシやアサから抽出分離するほうが、化学的合成法よりも安価に医薬品を生産できるからである。したがって、医薬品を採取する植物については、有効成分の含量を高めた優良品種の開発が非常に重要となっている。このためには、植物が有する有効成分の生産システム（生合成経路）を精密に解析することが必須である。

植物は他の生物に比べ、低分子有機化合物を生産す

(a) Cannabinoids

(b) Hallucinogens

Fig. 2 The structures of cannabinoids and other hallucinogens.

る生合成経路を高度に発達させており、簡単な化合物からきわめて複雑な構造の成分を生産している。たとえば上記のモルヒネやTHCはそれぞれチロシンおよびアセチル CoA（両化合物ともに、究極的には二酸化炭素を出発原料としている）から生合成酵素の触媒によって整然と合成される。したがって、ケシやアサは医薬品製造のための工場と考えられ、生合成酵素は機械（ナノマシン）とみなすことができる。

このナノマシン（生合成酵素）の機能を人為的に調節することができれば、薬用植物の優良品種の開発が非常に容易になる。たとえば、アサの優良品種の開発を行う場合には、THCAの生産は医療の立場からみれば重要であるが、繊維作物として用いる場合には、この幻覚成分は不必要である。THCA 高生産株やTHCA 欠損株は、THCAの生合成メカニズムを明らかにして、生合成酵素を活性化あるいは阻害することにより作出が可能である。筆者の研究室で、有機化学的、生化学

(a) Deduced biosynthetic pathway

(b) Actual biosynthetic pathway

Fig. 3 Biosynthetic pathway of THCA.

的、分子生物学的、構造生物学的手法を用いてTHCAをはじめとする各種カンナビノイドの生合成研究を遂行している。

4. THCAの生合成経路

カンナビノイドの生合成経路に関しては、大麻研究で著名なヘブライ大学のMechoulamが1970年に*Science*誌のレビューでTHCAはカンナビゲロール酸(CBGA)からカンナビジオール酸(CBDA)をへて生合成されるメカニズムを提唱していた(**Fig. 3a**)⁴⁾。筆者らは、THCAの生合成メカニズムを酵素レベルで解明するために、上

記の仮説にもとづき、CBDAからTHCAの異性化反応を触媒する酵素の検出を試みた。しかしながら、詳細に条件検討を行ったにもかかわらず、この反応を触媒する酵素活性を検出することはできなかった。

そこで、前段階の生合成ステップであるCBGAからCBDAの反応を触媒する酵素活性の検出を検討した。メキシコ種アサ(THCAを大量に生産するアサ)から粗酵素溶液を調製し、CBGAを基質としてアッセイを行ったところ、驚くべきことに反応溶液中にはCBDAではなくTHCAの生成が観察された。また、本酵素溶液にCBDAを添加しても、THCAへの変換は認められなかったことから、従来の生合成仮説は誤りであり、THCAはCBGAから直接生合成されることが明らかとなった(**Fig. 3b**)⁵⁾。なお、筆者らは別の生理種(CBDA種)のアサを用いて、CBGAからCBDAの変換反応を触媒する酵素(CBDA合成酵素)の検出にも成功している⁶⁾。

THCAの生成ステップはCBGAのテルペン部を酸化的に閉環する反応である。鎖状モノテルペンを閉環する反応は、特にシソ科植物やミカン科植物で頻繁に起こるとされており、米国のCroteauが本反応を触媒する酵素(モノテルペン閉環酵素)について詳細な研究を行っている⁷⁾。しかしながら、これらの酵素反応はTHCAの生合成反応とは異なり、酸化反応は伴わずに鎖状モノテルペンの閉環反応が進行する(**Fig. 4**)。したがって、THCA合成酵素の構造やその反応メカニズムは、モノテルペン閉環酵素と大きく異なることが予想された。また、植物には、テルペン部が酸化的に閉環して生合成されたと推定される成分が広く分布しているが、それらの生合成反応や生合成酵素に関しても、正確な情報は現在でもきわめて少ない。

5. THCA合成酵素の性質

THCA合成酵素の活性の検出法を確立したことにより、本酵素の精製が可能となった。上記のメキシコ種アサより粗酵素溶液を調製し、各種クロマトグラフィーを用いて分離を試みた結果、SDS-PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)で単一のバンドを示すまでTHCA合成酵素を精製することに成功した。

Fig. 4 Cyclization of geranylpyrophosphate by monoterpene synthase.

Table 1 Effects of pH on THCA synthase reaction

pH	The amount of reaction product (pmol/sec)	
	THCA	CBCA
5.0	2952	95
6.0	2593	331
7.0	192	240
7.5	0	279

精製したサンプルを用いて、THCA 合成酵素の性質を評価することにより、THCA 生成反応のメカニズムの解明を試みた。Mechoulam らは CBGA の閉環反応に酸素の付加を伴うメカニズムを提唱したことから⁴⁾、オキシゲナーゼの関与が推定されたが、オキシゲナーゼ阻害剤によっても THCA の生成は抑制されなかった。また、本酵素反応は過酸化水素を要求しなかった。したがって、THCA 合成酵素はオキシゲナーゼやペルオキシダーゼ以外の酸化酵素と考えられた。さらに、種々の補酵素や金属イオンについても検討したところ、これらは CBGA の酸化閉環反応には必要ないことが判明した。しかしながら、反応系から溶存酸素を除くと THCA の生成が明確に阻害されたことから、THCA 合成酵素は酸化反応に分子状酸素を要求することが明らかとなった。さらに、THCA 合成酵素は CBGA を酸化する際に過酸化水素を生成することから、分子状酸素を還元することが示唆された。

また、THCA 合成酵素は、THCA の他に、カンナビクロメン酸 (CBCA, Fig. 2a) を生成する活性も示した。このように 1 つの酵素が複数の反応生成物を与える現象はモノテルペン閉環酵素でも確認されており、リモネン合成酵素が基質のゲラニルピロリン酸を環化する際に、リモネン (約 94%) の他に少量の α -ピネン、 β -ピネン等を与えることが報告されている (Fig. 4)⁸⁾。興味深いことに、THCA 合成酵素を用いて至適 pH (pH 5.0) 付近で反応を行った場合には、CBCA に比べ 30 倍以上

の THCA を生成したが、pH 7 以上では CBCA への変換が優先され、pH 7.5 以上では THCA の生成活性はほとんど消失した (Table 1)。これらの結果は、THCA 合成酵素による CBGA の閉環様式が反応溶液中の pH に大きく依存することを示している。筆者が知る限りこのような性質を有する植物成分の酸化酵素は、これまで報告されていない。

6. THCA 合成酵素の遺伝子クローニング

THCA 合成酵素は特異な反応を触媒し、その性質も他の酸化酵素と異なっていることが明らかとなったが、上記の生化学的手法のみでは、それ以上の有用な情報を得ることは不可能であった。そこで、本酵素の構造を明確にすることにより、反応メカニズムの解析を試みた。まず、THCA 合成酵素の一次構造を決定するために、PCR を用いて本酵素遺伝子のクローニングを試みた。精製した THCA 合成酵素を直接あるいは部分分解して得られたフラグメントを、アミノ酸シーケンサーで分析することにより、それぞれ N 末端側のアミノ酸配列や内部アミノ酸配列を決定した。次いで、これらの配列をもとに重複プライマーを作成した後、degenerate PCR、3'-, 5'-RACE (3'-, 5'-rapid amplification of cDNA ends) を行った結果、完全領域をコードする cDNA のクローニングに成功した⁹⁾。

THCA 合成酵素遺伝子は 545 個のアミノ酸残基をコードする open reading frame を有しており、推定一次構造中には、上記の部分アミノ酸配列がすべて認められた。次に、クローニングした遺伝子が実際に酵素活性をもつタンパク質をコードしていることを確かめるために、THCA 合成酵素の発現条件を調べた。大腸菌を用いた場合には、不溶性タンパクとして発現し、酵素活性はまったく認められなかったが、タバコ (シュートおよび毛状根, Fig. 5) や昆虫細胞で発現した組換えタンパクは、アサから精製した酵素と同程度の THCA 合成活性を示した。

Fig. 5 Transgenic tobacco expressing THCA synthase.

Fig. 6 Oxidocyclization catalyzed by BBE.

タバコでのTHCA合成酵素の発現に成功したことから、この形質転換植物を用いてTHCAの生産を検討した。タバコは基質となるCBGAを生産していないので、本カンナビノイドを添加してタバコを培養した結果、THCAの生成を確認した。CBGAはTHCAと異なり、不斉炭素有さずに化学的な合成も容易な化合物である。しかも、タバコの試験管培養はアサの栽培に比べ管理も容易であることから、THCA合成酵素発現植物は、アサに代わるTHCの製造原料となり得ると思われる。

7. THCA合成酵素の一次構造

THCA合成酵素遺伝子をクローニングしたので、塩基配列から推定したアミノ酸配列の特徴を詳細に解析した。モチーフ検索を行った結果、フラビン結合部位を示唆する配列以外に特徴的なモチーフは認められなかった。さらに他のタンパク質とのホモロジーを調べた結果、THCA合成酵素は機能の解明されているタンパクとして2種の酵素、すなわち6-ヒドロキシ-D-ニコチンオキシダーゼおよびベルベリンブリッジ酵素(BBE)とそれぞれ約25%および40%のホモロジーを示すことが判明した。前者はバクテリアから遺伝子クローニングされた酵素であるが、後者をコードする遺伝子はケシからクローニングされている。きわめて興味深いことに、このBBEはケシに含まれるベンジルイソキノリンアルカロイドを酸化的に閉環し、プロトベルベリン型アルカロイドの生合成を触媒するオキシダーゼであ

る(Fig. 6)¹⁰。また、BBEはフラボプロテインであることや、溶存酸素を要求し、基質の酸化に伴って過酸化水素を生成することなど、THCA合成酵素と反応メカニズムがきわめて類似している。しかしながら、基質であるベンジルイソキノリン骨格はカンナビノイドとは構造はまったく異なっていることから、両酵素の活性部位の構造に興味もたれた。

THCA合成酵素がフラビン有していることを確かめるために、組換え酵素の吸収および蛍光スペクトルを測定したところ、ともにフラビンに特徴的なスペクトルを与えた。THCA合成酵素をSDS-PAGEで泳動しても、蛍光は消失しないことから、フラビンは酵素に共有結合していると思われる。なお、結合しているフラビンはFADであることを確認している。

8. THCA合成酵素の活性部位

THCA合成酵素におけるFADの機能の解析を行った。THCA合成酵素にみられるArg¹¹⁰-Ser-Gly-Gly-His¹¹⁴はいわゆるフラビン結合モチーフで、このなかのHis残基にFADが共有結合していると考えられる。そこで、His¹¹⁴をAlaに置換した変異酵素(H114A)を調製し、その性質を調べた結果、H114AにはFADの存在が認められず、酵素活性は完全に失われていた(Fig. 7)。したがって、FADはTHCA合成酵素活性に必須と考えられる。以上の検討から、CBGAの酸化閉環反応はFig. 8に示すメカニズムにしたがって進行すると結論した。

Fig. 7 Changes in THCA synthase activity by site-directed mutagenesis.

Fig. 8 Possible mechanism of oxidocyclization of CBGA by THCA synthase.

また、フラビン結合モチーフ中の Arg¹¹⁰ は FAD の His¹¹⁴ への結合に関与することが報告されている。そこで、変異体 R114A を調製したところ、本変異体は野生株と同様の FAD 結合量を示しているにもかかわらず、活性は野生株と比べて 10% と大きく低下した (Fig. 7)。また、この近傍には Arg¹⁰⁸ 残基も存在しているが、その変異体 R108A も FAD 結合量は野生株と同程度であるにもかかわらず、顕著な活性低下 (野生株の 13%) を示した。これらの結果は、両 Arg 残基が FAD の結合には関与せずに、活性そのものに大きくかかわっていることを示している。さらに活性に関与するその他のアミノ酸を同定するために、BBE と一次構造の比較を行ったが、BBE の活性部位についても詳細な検討は報告されていないことから、有用な情報を得るにはいたらなかった。

THCA 合成酵素反応に関して興味をもたれるのは、環化反応を制御している活性部位の構造である。筆者のグループでは CBGA から CBDA の生合成を触媒する酵素 (CBDA 合成酵素) の遺伝子クローニングに成功しており (未発表)、その推定一次構造は THCA 合成酵素と 80% 以上のホモロジーを示すことを確認している。このことは、酵素中のわずかな構造の違いが、異なった環化反応を誘導することを示唆しているため、活性部位の構造を原子レベルまで解明することは非常に重要と考えられる。

9. THCA 合成酵素の結晶化

THCA 合成酵素のように幻覚物質の生合成に関与する酵素の立体構造を解明した研究は、皆無である。また、THCA 合成酵素とホモロジーを示す酵素の立体構造についても、まったく報告されていない。前述した THCA 合成酵素の興味深い性質を考慮すると、本酵素は新規

な構造を有する可能性が示唆される。しかしながら、生化学的および分子生物学的手法のみでは、活性部位の構造を正確に証明することは不可能と判断されたので、THCA 合成酵素の X 線結晶構造解析を検討した。

筆者らは、大腸菌、酵母、植物、昆虫細胞を用いて発現を試みており、大腸菌以外の発現系で THCA 合成酵素の活性を確認している。このうち昆虫細胞を用いた系で THCA 合成酵素を最も多量に発現したので、この発現酵素を用いて種々の条件を検討した結果、THCA 合成酵素の単結晶を得ることに成功した。

得られた結晶は微小 (<0.1 mm 角) であったが、SPring-8 の BL41XU ビームラインを用いて測定を行ったところ、2.7 Å の分解能を示す反射を得ることに成功した。位相の決定については、昆虫細胞での発現タンパクを用いているために、セレンメチオニンの導入が困難であるので、重原子同型置換の至適条件を検討している段階である。

10. おわりに

筆者の大麻に関する研究の究極的な目的は、アサが生産するカンナビノイドの量を人為的にコントロールすることである。近年では、遺伝子操作により、目的の植物成分を大量に誘導することやその生産を完全に抑制することも可能となっている。しかしながら、たとえ目的の形質転換植物の開発に成功したとしても、それらに抵抗感をもつ人は非常に多く、圃場で栽培することに対して社会的なコンセンサスを得ることは、今後も困難であろう。

特にアサの場合には、THCA の大量生産株 (医薬製造原料) と THCA 欠損株 (繊維原料) の相反する形質の植物の作出が求められているが、遺伝子操作によって目的の形質をもつアサの作出に成功したとしても、非

常に交雑しやすいために、形質転換植物を圃場で栽培することは困難である。このような問題を考慮すると、優良品種の開発を行うには遺伝子改変以外の方法が望ましいと考えられる。

そのひとつの方法として、有効成分の生合成酵素の活性に影響を与える化合物を開発することが考えられるが、このためには、酵素の構造を正確に解明することが必須である。また、内在性の低分子有機化合物によって制御されている植物の形質(たとえば花の色等)も数多く知られており、それらの量を制御することにより、さまざまな優良品種が作出できると考えられる。このような観点からも、生合成酵素の立体構造の解明がますます重要になると思われる。

謝 辞

本研究を遂行する際に、数々の協力を賜った九州大学大学院薬学研究院教授正山征洋博士に感謝する。THCA 合成酵素の結晶化およびX線測定の際に有益なご助言、指導を頂いた日本原子力研究所・中性子利用センター主任研究員黒木良太博士、副主任研究員玉田太郎博士および九州大学生体防御医学研究所教授神田

大輔博士、助教授前仲勝実博士に深謝する。なお、本研究でのX線測定は、SPRING-8(高輝度光科学研究センター)のサポートのもとに行った(利用研究課題: 2004A0827-RL1-np, 2004B0132-NL1-np)。

文 献

- 1) 山本郁男 (2001) 大麻の文化と科学, pp. 209-238, 廣川書店, 東京.
- 2) Guzman, M. (2003) *Nature Rev. Cancer* **3**, 745-755.
- 3) Mechoulam, R. (2000) *Curr. Pharm. Res.* **6**, 1313-1322.
- 4) Mechoulam, R. (1970) *Science* **168**, 1159-1166.
- 5) Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y. and Mechoulam, R. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9766-9767.
- 6) Taura, F., Morimoto, S. and Shoyama, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 17411-17416.
- 7) Croteau, R. (1987) *Chem. Rev.* **87**, 929-954.
- 8) Colby, S. M., Alonso, W. R., Katahira, E. J., MacGarvey D. J. and Croteau, R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23016-23024.
- 9) Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., Shoyama, Y. and Taura, F. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 39767-39774.
- 10) Kutchan, T. M. and Ditttrich, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **279**, 24475-24481.

森元 聡

田浦太志（たうら ふとし）

九州大学大学院薬学研究院助手

1994年九州大学薬学部卒業。96年九州大学大学院薬学研究科修士課程修了。97年九州大学薬学部助手。99年薬学博士。

研究内容：大麻をはじめとする各種薬用植物の生合成研究

連絡先：〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1

正山祥生（しょうやま よしなり）

九州大学大学院薬学府博士後期課程学生

2000年福岡大学薬学部卒業。02年九州大学大学院薬学研究科修士課程修了。

研究内容：大麻成分の生合成酵素の構造生物学的研究

連絡先：〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1

森元 聡（もりもと さとし）

九州大学大学院薬学研究院助教授

1981年九州大学薬学部卒業。87年九州大学大学院薬学研究科博士後期課程修了（薬学博士）。93年九州大学薬学部助教授。

研究内容：有機化学，生化学，分子生物学手法を使って，植物成分の生合成機構や植物の生体防御の誘導機構に関する研究を進めている。最近では構造生物学の知識・技術の習得にも取り組んでいる。

趣 味：写真機の蒐集

連絡先：〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1

E-mail: morimoto@phar.kyushu-u.ac.jp