総合論文

合成化学と生薬学との接点—天然活性化合物に対するモノクローナル抗体と生合成酵素

正山 征洋*

Point of Contact between Synthetic Chemistry and Pharmacognosy: Monoclonal Antibody against Naturally Occurring Bioactive Compounds and Biosynthetic Enzyme

Yukihiro SHOYAMA*

MAB against THCA was produced by fusing hybridoma with splenocytes immunized with THCA-BSA conjugate and mouse myeloma cell. The cross-reaction of anti-THCA MAB against other marijuana compounds was very wide. This ELISA was applied to the biotransformation experiments of marijuana compounds using plant tissue culture.

Anti-ginsenoside Rb1 MAB cross-reacted with only limited to a few ginsenosides. Newly developed Western blotting used anti-ginsenoside Rb1 MAB surveyed only dammaran saponins. Immunofinity column made it possible to separate ginsenoside Rb1 directly. Compact MAB, scFv against forskolin was prepared from a hybridoma by gene construction, and its expression in *E. coli* was discussed.

Biosynthetic enzymes, THCA-, CBCA- and CBDA-synthase had been purified from the homogenate of fresh *Cannabis* plants, respectively. These characterizations were investigated and compared each other. It became evident that CBCA-synthase catalyzed enantiomeric cyclization of CBGA to CBCA.

Key words: Marijuana compound, Ginseng saponin, Solamargine, Monoclonal antibody, Biosynthetic enzyme, Biotransformation, Western blotting, ELISA

はじめに

合成化学の領域と生薬学の距離は相当に遠いように感じられるが、最終の目的は両分野とも高次機能を有する化合物の創製に終結すると考えられる。また、生薬学の分野では活性成分を単離して構造決定することが多いが、一方、合成化学の領域において構造的に興味深い活性化合物を全合成のターゲットとすることも多いであろう。さらに、医薬品のリードとなった化合物も生薬成分探索からスタートした場合も少なくない。これらの点は両分野が深い連関を持つ部分である。本稿では両分野で共通した領域の研究が行われている抗体や酵素について、

それらを両者の接点として紹介したい。

筆者は大麻に関する研究を30年来テーマの1つとして継続しており、無毒大麻、すなわち最も生理活性の強い tetrahydrocannabinol (THC) (図1) を含有しない品種である cannabidiolic acid (CBDA) 種を育成し¹⁾、また、新規大麻成分の探索やそれらの生合成経路を明らかにしてきた²⁻⁷⁾。大麻成分のうち酸性カンナビノイドは

Fig.1 Structure of THC and THCA.

* 九州大学大学院薬学研究科

()

* Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University ()

Fig.2 Major artificial reactions of cannabinoids.

120–130 °C に直接加熱することにより完全に脱炭酸して中性カンナビノイドへと変換する⁴⁾。また、室温下で保存するうちに徐々に脱炭酸を起こす。一方 CBDA は酸処理すると閉環し、2 重結合が移動した Δ^3 -THCA を与える⁵⁾。また、THCA も酸処理することにより 2 重結合の移動が起こり Δ^3 -THCA を生成する。THCA は酸素の存在下 UV 照射すると脱水素反応が起こって cannabinolic acid (CBNA) となる⁵⁾。一方 cannabichromenic acid (CBCA) は同条件で閉環して cannabicyclic acid (CBLA) を生成する⁴⁾。これらの 2 次変換を図 2 に示す。以上の他にも興味深い変換反応が研究されていることから、大部分の大麻成分が不安定な化合物であることが伺える。最近は大麻成分の生合成酵素の精製を行い、それらの遺伝子クローニングへと移行している。生合成酵素の精製に際し、酵素の活性をアッセイすることは必須であるため、基質と生成物を認識する抗体、特にモノクローナル抗体 (Mab) を作成すれば、アッセイ系は格段にスピードアップすると考え、抗 THCA Mab の

作製からスタートした。

1. 抗 THCA Mab の作製

一般に低分子化合物はそれ自体では免疫原性を持たないため、免疫原性を有する高分子化合物と結合し免疫原性を付与する必要があるため、通常はタンパクを結合する。この場合低分子化合物をハプテンと呼び、タンパクをキャリアーと呼ぶ。一般にハプテンとキャリアータンパクの間に炭素数が数個の架橋剤 (リンカーまたはスペーサーと言う) を入れた方が特異性の高い抗体が得られることが知られている。このような状況を踏まえ免疫原の合成からスタートした。

1.1. 免疫原の合成

THCA をハプテンとし、スペーサーとして β -alanine を、キャリアータンパクとして牛血清アルブミン (BSA) を選び、図 3 に示す反応により、ハプテン-キャリアープロテインが結合したコンジュゲートを合成した⁸⁾。

動物に免疫して思い通りの抗体価を得るためにはキャリアータンパクとのモル数が重要であり、通常キャリアータンパクに対して 8–20 分子のハプテンが適切である。このため MALDI-tof マススペクトルにて分析した。この結果、17 分子のハプテンが結合していることが明らかとなり、次のステップへと進んだ。

Fig.3 Synthesis of hapten-carrier protein.

1.2. マウスへの免疫とハイブリドーマの作成⁹⁾

通常通り、合成したコンジュゲートを BALB/C マウスに免疫し、抗体価が十分上昇したことを確認後、ひ臓を摘出してひ臓細胞を単離した。このものとマウスの骨髓腫由来のミエローマ細胞を細胞融合促進剤であるポリエチレングリコールで処理し¹⁰⁾、融合細胞(ハイブリドーマ)を作成した。

抗 THCA MAb 生産株樹立のため上記ハイブリドーマのスクリーニングとクローニングを行い、10 種の株を選抜した。この内最も活性の高かった 4A4MAb を無血清培地¹¹⁾にてスケールアップして培養し、上清をアフィニティークラムにて精製し MAb を得た。このものを MALDI-tof マススペクトルにて分析したところ、抗体の 1 種である免疫グロブリン G(IgG) の分子量と一致し、その純度も高いことが確認された。

1.3. 抗 THCA MAb の性状

前記の MAb について Weiler らの方法¹²⁾により、各種大麻成分に対する抗原抗体反応の強さ、すなわち交差免疫性(cross-reaction)を求めた。その結果を表 1 に示す。さらに 4A4 以外の MAb についてもその性質を調査した。この結果当初の目的としていた THCA に対する特異性の高い MAb は得られていないことが判明した。

Table 1 Cross-reactions of monoclonal antibody against cannabinoid metabolites.

Compound	Cross-reactivity(%)
Δ^1 -THCA	100
Δ^8 -THCA	55
CBD	523
CBDA	93
CBDA diacetate	0
CBGA	1600
CBGV	391
CBGO	630
CBNA	174
CBLA	100
CBCA	138

本 MAb はほとんどの大麻成分に対してアフィニティーを持つものの、他の植物性フェノール化合物に対しては反応しない特異な性質を持っていることが明らかとなった。このことから判断すると、テルペン部分は認識しておらずフェノール部分のみを認識しており、1 個の水酸基と 1 個のエーテル結合、4 位のアルキル基は必須で、この部分構造がエピトープとなっているものと推察される。

1.4. 大麻成分の変換反応における抗 THCA MAb の応用¹³⁻¹⁵⁾

筆者らは主要な漢方配合生薬の基原植物について広範な育種研究も遂行している。この間に各種の植物細胞・組織培養系も確立した¹⁶⁻²⁰⁾。これらの培養系を用いて大麻成分の biotransformation を検討しているのも、上記で得られた幅広い cross-reaction を有する MAb を用いて代謝物の検索に応用した。すなわち代謝物の判別を行うために HPLC によりすべてのピークを分取し、確立した定量系により各ピークを定量した。そこでまず最初に今回確立した定量系について触れてみよう。

定量系には競合法と非競合法があるが、一般に低分子化合物に対しては競合法を用いることが多い。まずイムノプレートへ抗原として THCA-ヒト血清アルブミン(HSA)コンジュゲートを結合後、タンパク溶液を添加してイムノプレート上へ抗体タンパクが結合しないような処理(ブロッキング)を施す。次に大麻成分を含むサンプルと上記の MAb を同時に添加すると、MAb はイムノプレートへ付けた抗原とフリーの抗原との間で競合的に抗原抗体反応を行う。次に洗浄操作によってイムノプレートに付いている抗原と反応した MAb のみが残るので、酵素標識 2 次抗体を添加、続いて基質を加え発色して吸光度を測定する。本法の測定法ではフリーの抗原が多いほど吸光度の値が小さくなる。このような測定法は競合的 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)と称され生物系の研究において汎用される。

CBDA をカラスビシャク(生薬半夏)のプロトコム(不定形細胞塊)切片¹⁷⁾とインキュベートし、CBDA の代謝物を含む反応粗抽出エキスを HPLC にて分離し、各フラクションに対して上記 MAb を用いた ELISA を行った。前述の通り大麻成分の基本構造を持つ化合物は MAb と反応するので ELISA ポジティブフラクションには CBDA の代謝物が含有されと考えられる。そこでポジティブフラクションをさらに精製して図 4 に示す代謝物を単離構造決定した。同様に biotransformation により得られた大麻成分も併せて図 4 に示す。

2. 特異的 MAb の作成

次に、特異性の高い MAb について述べてみよう。筆者らはこれらの例として阿片アルカロイド²¹⁾、forskolin^{22,23)}、活性配糖体である、サフランの crocin²⁴⁾や人参の ginsenoside Rb1²⁵⁾、甘草の glycyrrhizin²⁶⁾等に対する MAb を作成している。誌面の都合上今回は人参の ginsenoside 類に対する MAb に焦点を絞って紹介する。

Fig. 4 Biotransformation products of various cannabinoids.

2.1. 抗人參サポニン MAb²⁵⁾

人參は漢藥の中で最も重要な生藥に位置される。その活性成分の1つとして ginsenoside Rb1 があげられる。Ginsenoside Rb1 は中枢作用、抗血糖作用、抗腫瘍作用等多くの薬理作用が知られている。また、人參のマーカ成分としても重要である。本化合物に対する MAb 作製は図5に示す方法にてハプテンコンジュゲートを作製後前述同様に免疫し、ハイブリドーマを作成した。抗 ginsenoside Rb1 MAb の cross-reaction を表2に示す。この結果 MAb は極めて特異性の高いことが明らかとなった。

2.2. 抗 ginsenoside Rb1 MAb を用いた新 Western blotting 法の開発²⁷⁾

Western blotting 法はタンパクを電気泳動で分離し

Fig. 5 Preparation of ginsenoside Rb1-carrier protein conjugate.

Table 2 Cross-reactivities of MAb(9G7) against ginsenosides.

Compound	Cross-reactivities (%)
Ginsenoside Rb ₁	100
Ginsenoside Rc	0.024
Ginsenoside Rd	0.020
Ginsenoside Re	<0.005
Ginsenoside Rg ₁	<0.005
Glycyrrhizin	<0.005
Gigitonin	<0.005
Tigogenin	<0.005
Tigonin	<0.005
Gitogenin	<0.005
Digitonin	<0.005
Solamargine	<0.005
Solasonine	<0.005
Cholesterol	<0.005
Ergosterol	<0.005
Ulsolic acid	<0.005
β -Sitosterol	<0.005
Cholic acid	<0.005
Deoxy cholic acid	<0.005

た後、分離ゲルへタンパクを吸着する膜をカバーし電圧をかけて転写する。吸着膜へ特定のタンパクに対する特異的な1次抗体を反応し抗原抗体反応を行う。次に1次抗体に対する酵素標識2次抗体を反応する。最後に酵素に対する基質を加えて発色させ特定のタンパクのバンドを検出する。現在、Western blotting はタンパク等の高分子化合物の研究にとっては必須の手法である。しかし

低分子化合物には適用できない。そこで低分子化合物に対しても応用が可能な方法を開発した。

まず、TLCにて ginsenoside 類を展開する。この TLC 上に polyvinylidene difluoride(PVDF)膜を層積し、TLC 上の化合物を PVDF 膜に移す。しかし低分子化合物はそのままでは膜上に固定化することはできず、buffer 等で洗浄や反応を行う段階で膜から溶失する。このためハプテン-BSA コンジュゲートを作製したと同様に、ginsenoside を転写した膜を NaIO_4 液で処理し ginsenoside の糖部を開環する。アルデヒド体となったところへ BSA 等のタンパクを添加するとシッフベースタイプのコンジュゲートを作り、膜に固定化する。そこで

抗 ginsenoside Rb1 MAb を添加し、ブロッキング後抗マウス BSA MAb で処理後基質を加えて発色する。

図 6A は TLC を H_2SO_4 で発色したスポットで、図 6B は新しく開発した Western blotting である。TLC において人參のエキスでは多くのスポットが発色しているが、Western blotting においては ginsenoside 類のみの発色が認められる。この方法を模式化したのが図 7 である。すなわち糖部は開環しタンパクと結合して膜への固定化に寄与する。一方アグリコンと恐らく糖の一部は MAb と反応するエピトープとして働く。ここで新しく明らかとなったことは、cross-reaction が極めて小さい ginsenoside Rc, Rd 等も発色し、さらに 6 位に糖の結合している cross-reaction は 0 に近い(表 2)ginsenoside Re, Rg1 等もわずかながら発色している。糖の一部をも含むアグリコン部分をエピトープとして認識していた MAb が、 NaIO_4 による糖部の開環により、ルーズに認識するようになったためと推察している。

本手法は筆者らが抗 solamargine MAb を用いて開発したものであるが、図 8 に示すような構造式を持つ solasodine 配糖体のほとんどが発色した²⁸⁾。これらは抗 solamargine MAb が抗 THCA MAb 同様、cross-reaction の広い MAb であったためと認識していたが、ginsenoside 類に対する反応から、糖部の認識がラフになるためにアグリコン部分のみをエピトープとして発色することが判明した。本法の応用として、甘草から抽出される天然のグルクロナイドである glycyrrhizin についても検討した結果²⁹⁾、同様な結果が得られたことから、Western blotting 用

Fig. 6 Western blotting of ginsenosides in various *Panax* samples. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 indicate the standard of chikusetsusaponin IV, white ginseng, red ginseng, fibrous ginseng, *P. notoginseng*, *P. quinquefolium*, and *P. japonicus* (60 μg), respectively. Compounds I, II, III, IV, V, and VI indicate G-Rg1, -Re, -Rd, -Rc, -Rb1, and malonyl G-Rb1,¹⁹⁾ respectively. The arrow near the top of A shows aglycone of ginsenosides.

Fig. 6 Western blotting of ginsenosides in various *Panax* samples.

Fig. 7 Model of Western blotting.

The graph displays the elution profile of a column chromatography experiment. The x-axis represents the 'Fraction number' from 0 to 50, and the y-axis represents relative intensity from 0.0 to 1.4. The profile shows two distinct peaks. The first peak, labeled 'washing', occurs between fractions 0 and 10, with a maximum intensity of approximately 1.2. The second peak, labeled 'elution', occurs between fractions 20 and 30, with a maximum intensity of approximately 0.9. The baseline is relatively flat between the two peaks and after the second peak.

Fraction number	Relative intensity
0	1.20
2	1.22
4	1.20
6	0.95
8	0.48
10	0.22
12	0.15
14	0.18
16	0.15
18	0.12
20	0.12
22	0.55
24	0.90
26	0.88
28	0.32
30	0.15
32	0.10
34	0.10
36	0.10
38	0.10
40	0.08
42	0.08

The reaction scheme illustrates the synthesis of a glycomimetic. It begins with a glucose derivative (a six-membered ring with a wavy line and a Y-shaped group at C1, and hydroxyl groups at C2, C3, and C6). This reacts with NaIO_4 to form a dialdehyde intermediate (a five-membered ring with a wavy line and a Y-shaped group at C1, and aldehyde groups at C2 and C6). This intermediate then reacts with Affi-Gel Hz to form a glycomimetic structure (a five-membered ring with a wavy line and a Y-shaped group at C1, and imine bonds at C2 and C6 linking to the Affi-Gel Hz support).

713

Fig.11 Elution profile of ginsenosides.

は格段にスピードアップしたが、配糖体類の分離はなお時間と熟練を要する部分である。すなわちアグリコン部分を認識できるゲルはないために、現在でも糖の数による極性の差を利用して分離するケースが多い。これに比べアフィニティーカラムは認識部位と特異的に結合するため、一回のカラムで精製が可能である。

このように幅広い cross-reaction を持った MAb の応用面は合成化学の領域にも有用と考えている。すなわち2つ以上のフラグメントを用いてある目的分子を合成する場合、重要な側の構造に対する幅広い cross-reaction を持つ MAb を作成することができれば、反応生成物を単離し構造決定することなく、例えばコンビナトリアル・ケミストリー法で合成した場合など、ELISA にてアッセイしてポジティブフラクションから必要な生成物を迅速に単離することが可能になるであろう。また、Western blotting やアフィニティーカラムは資源の探索や光学分割を可能にするものである。その場合 cross-reaction の広い MAb が必要な場合にはそれにそったハプテン分子のデザインが必要となろう。また、Western blotting を適用する場合は糖に準じた複数の水酸基を持つ部位を付与しておく必要がある。

2.4. 小型化抗体の作成

MAb 産生ハイブリドーマは通常極低温下で保存しているが、時に変異が起り MAb 生産能が低下したり、生産しない株に変異することがある。また、通常は IgG を用いるので、分子量が約 16 万であるため、前述のアフィニティーカラムで低分子化合物である抗原分子を精製する場合、キャパシティーが低い欠点を持っている。こ

Fig.12 Construction of scFV.

れらを解消するために抗原認識部位である VH, VL 鎖をリンカーで結合した小型化抗体を作製することが得策である。この方法はハイブリドーマ細胞から mRNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を合成する。VH, VL 鎖それぞれに相補的なプライマーを用いて PCR により増幅する。リンカープライマーを用いて PCR を行い両断片を連結し小型化抗体である scFV を作製した。その概要を図 12 に示す。この遺伝子を発現ベクターに組み換え大腸菌に組み換えて、大量発現系を構築した。現在大腸菌を培養することにより抗 forskolin scFV が 10 mg/l 生産可能となった。このものの分子量は約 33,000 であるため、アフィニティーカラムのキャパシティーは 5 倍くらいに上昇するものと期待している。

MAb の長所の 1 つとして、ハプテン分子が不純物であっても、それら不純物すべての分子に対するそれぞれの MAb が作製できる可能性を持つことである。光学不活性体を不純物と見るならば、(+), (-) 体それぞれに対する特異的 MAb が作製可能である。これらの特異的 MAb とハプテン分子、または scFV とハプテン分子のモデリングを行うことにより、エピトープ部分の立体化学が明らかとなるであろう。

3. 大麻成分の生合成酵素

3.1. THCA synthase の精製と諸性状³⁰⁾

大麻の主要成分については抗 THCA MAb の項でも触れたが、図 13 に示す 4 種が存在する。これらの生合成についてはトレーサー実験から図 14 に示す経路を提出している⁷⁾。これらの確認のため、また、酵素による新大麻成分の創製等を目指し、生合成酵素の精製をスタート

Fig. 13 Structures of major acidic cannabinoids.

Fig. 14 Biosynthetic pathway of cannabinoids.

Fig. 15 SDS-PAGE of purified THCA synthase. Lane 1: molecular mass standards. Lane 2: purified THCA synthase (1 μ g).

させた。

新鮮アサの若芽の粗酵素に CBGA から THCA に変換する酵素の存在が認められ、THCA synthase と命名した。粗抽出酵素液を 100,000 g で遠心し、可溶性画分に酵素活性が認められたので当画分を表 3 に示すように $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分画後 3 種のカラムにて精製した。図 15 は精製した THCA synthase である。

CBGA から酵素的に生成した THCA の証明は天然から単離した THCA との直接比較により同定した。なお両者の CD を比較した結果同一コトンを示すことから $(-)$ -THCA と決定した²⁾。

酵素反応は pH により反応性が異なることは周知の事実であるが、本酵素についても活性を調査したところ、図 16 に示すように至適 pH は 6 付近であることが判明した。次に各種金属イオンの活性に対する影響を調べた結果が表 4 である。Ag²⁺、Hg²⁺ は当然ながら阻害剤と

Table 3 Purification of THCA synthase from Mexican strain.

Purification step	Total activity (pkat)	Protein (mg)	Specific activity (pkat/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	3635	664	5.47	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2888	47.3	61.1	11	79
70-90 % sat.					
DE-52	1437	1.58	909	166	40
Phenyl Sepharose CL-4B	783	0.487	1608	293	22
Hydroxylapatite	332	0.171	1942	354	9.1

Activity and protein data are means of three replicate assays.

Fig. 16 Effect of pH on THCA synthase activity. Assays were carried out in two different buffer system [100 mM sodium acetate buffer: pH 4.00–5.50, 100 mM sodium phosphate buffer: pH 5.75–8.00]

Table 4 Effects of EDTA and metal ions on THCA synthase activity.

Addition	conc. (mM)	rel. act. (%)
Control	-	100
EDTA	2	99
MgCl ₂	2	104
MnCl ₂	2	103
FeCl ₂	2	102
CaCl ₂	2	103
CoCl ₂	2	102
CuSO ₄	2	105
NiCl ₂	2	104
ZnCl ₂	2	105
AgNO ₃	2	3.0
HgCl ₂	2	3.7

Data are means of three replicate assays and the S.D. was always within 10 %.

なるものの、その他のイオンの影響は認められなかった。また、H₂O₂、KSCN や triazole 等の P-450 インヒビターによる酵素反応の阻害は認められなかった。従って THCA synthase は peroxidase や oxygenase 以外の oxidoreductase に属することが示唆される。さらにラジカル除去剤である 2-methyl-nitroso-propane dimer による酵素活性への影響は認められなかった。この結果 CBGA から THCA への酸化は oxygenation やラジカル生成を伴わない脱水素反応であることが明らかとなった。従って THCA synthase は 1 種の dehydrogenase であることが推察される。

Table 5 Substrate specificity of THCA synthase.

Substrate	K _m (μM)	V _{max} (nkat/mg)
CBGA	134	2.68
CBNRA	254	0.37
CBDA	—	— ^a
CBG	—	— ^a
CBNR	—	— ^a

Assays were carried out with 340 ng of purified enzyme. Data are means of three replicate assays.

^a No activity were detected.

Fig. 17 Biosynthesis of THCA by THCA synthase.

次に THCA synthase の基質特異性を調べた結果が表 5 である。図 17 の構造式から、Z-isomer である CBNRA が CBGA よりもより反応が進むのではないかと予想していたが、結果は逆で CBGA がより高い V_{max} を持つことから CBGA → CBNRA → THCA の経路は否定され、CBGA → THCA の反応がメジャーであることを明らかにした。

3.2. CBCA synthase の精製とその性状³¹⁾

CBCA synthase も THCA synthase³⁰⁾, CBDA synthase³²⁾ 同様に精製を行い、単一バンドまでに精製した。本酵素も前 2 種の酵素と同じような性状であった。

CBCA は旋光度が 0 のためラセミ体と考えられていた。しかし CBGA を CBCA synthase で反応して得られた CBCA が CD のコットン効果を持つことから CBCA は光学活性体であることが明らかとなった。図 18 は両エナンチオマーの CD を示す。このため酵素により生成した CBCA を加熱脱炭酸して得られる CBC を、

Fig. 18 CD spectra of CBC isolated from plant and prepared by optical resolution.

キラル HPLC にて分析した結果、1 : 5 の割合であった。このことから CBCA は CBGA から 1 : 5 のエナンチオ選択的に合成されることが明らかとなった。なお、前出の CBDA synthase および THCA synthase によりそれぞれ合成された CBDA、THCA は 50 : 1 と 15 : 1 のエナンチオマー比であった。このように CBCA の生合成反応は立体特異性が低いことが明らかとなった。

CBCA の酵素反応メカニズムを図 19 に示す。Mechoulan らは (i), (ii) の反応を提出しているが³³⁾、CBGA から直接脱水素反応が起こることが明らかとなり、経路 (i) は否定された。経路 (ii) についても立体特異的に生合成されることから否定され、経路 (iii) を提出するに至った。

以上大麻成分の生合成に関わる 3 種の生合成酵素を精

Fig. 19 Mechanism of CBCA biosynthesis by CBCA synthase.

製した。現在 THCA synthase と CBDA synthase についてクローニングと大腸菌と酵母による発現系を構築し、タンパクの発現を行いその活性を検定しているが、現在までのところ活性発現には至っていない。現在までの段階で明らかとなったことは、CBDA synthase と THCA synthase の全シーケンスを比べると極めて類似している。CBCA synthase についてはまだ着手していないが、今までの性状から恐らく 3 酵素とも極めてホモロジーが高いものと推察される。同一基質である CBGA から構造の異なる化合物を類似した酵素が触媒することは大変興味深いことであり、今後新しい発見があるものと期待している。

大麻成分のレセプターが脳³⁴⁾とマクロファージ³⁵⁾に存在すること、また、内在性リガンドも発見された³⁶⁾。このことは morphine のオピオイドレセプターに匹敵することで、大麻成分の関連化合物が医薬品になる可能性は極めて高いと目されている。現に THC は morphine との併用により鎮痛薬として臨床的に使用されている。このためバインディングアッセイを行いながら合成を行う研究も盛んである。

筆者は前にも述べた通り、THC をほとんど含有しない無毒大麻と称する CBDA 種を育成し、繊維としても耐え得る品種として「とちぎしろ」を種苗登録した¹⁾。

これに反して近年オランダでは THC に富む品種を育成して、今後の需要に備えようとしている。このような育種研究において我々がクローニングした THCA synthase のセンス遺伝子をアサに導入すると CBGA → THCA の経路が活性化され、高含量種の育成が可能と考え研究を遂行している。なお、反対にアンチセンス DNA を導入することにより THCA の合成経路は阻害

され、THCA 含量の低い品種も作出可能と考えている。アサから精製した 3 種の酵素はいずれも高い基質特異性を示すことはすでに触れた。しかし組換え研究が進むにつれ、ピンポイントミューテーションも可能となり、反応性や基質特異性をコントロールすることができるようになる。これは前述の MAbs と同様で、脱水素反応能力は有するが基質特異性はラフにデザインすることにより新しい大麻成分の創成を可能にすると考えている。また、3 種の酵素のシーケンスが類似していることから、脱水素反応に関わるシーケンス部位の特定も可能と考えられる。このことから最少限必要な部

位から構成される人工の酵素作製も夢ではないであろう。こうなると試薬としての利用面も格段に高まるものと推察される。これらも今後検討すべき方向である。

脳内に大麻成分のレセプターが存在することから、morphine 同様脳内にも THC が存在する可能性は否定できない。だとすると上述の THCA synthase に対する MAb を作製し、脳内の酵素の分布や THCA synthase をコードする mRNA や cDNA の発現調査など、また、MAb 添加により脳内における THC の合成阻害から惹起される情動行動の異状など、中枢に関わる多くの情報が見られるものと期待している。

おわりに

以上活性成分に対する各種 MAb の作成とその応用ならびに大麻成分の生合成酵素について述べた。抗体と酵素両者ともに分子を高度に認識するが、抗体はハプテンを都合よくデザインすることによりルーズに認識したり、特異的に認識することが可能である。この点を利用して抗体触媒が進化したものと考えられる。一方生合成酵素は基質特異性が高いものが多い。しかし遺伝子レベルで改変して変異を誘導することにより、かなりのアローアンスを持たせた人工酵素の創成が可能であろう。従って合成化学の領域において、特定の化合物群に対して人工酵素を試薬として利用することも可能と推察される。例えば THCA synthase は図 17 で示したように、geraniol タイプの化合物を一気に、しかも立体特異的に閉環する能力を持っている。もしも基質特異性が低い人工酵素が得られたなら、類似の合成反応を行う場合の試薬としての有用性は大と考えられる。ここに合成化学と生薬学との接点を見いだすことができるであろう。

謝 辞 本研究は本薬学研究科森本聡助教授、田中宏幸、田浦太志両助手をはじめとする教室員の献身的な努力により遂行されたものであり、本稿を終えるにあたり深謝いたします。

(平成 11 年 2 月 16 日受理)

文 献

- 1) Y. Shoyama, In Biological aspects on marihuana, *Cannabis sativa* L. and biotechnological investigation on medicianl plants, H. Okubo, Ed. Tokushu Nosanbutu Kyokai, Tokyo, 1993, pp.141-200
- 2) T. Yamauchi, Y. Shoyama, H. Aramaki, T. Azuma, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1075 (1967)
- 3) Y. Shoyama, T. Fujita, T. Yamauchi, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 1157 (1968)
- 4) Y. Shoyama, R. Oku, T. Yamauchi, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1927 (1972)
- 5) Y. Shoyama, T. Yamauchi, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1327 (1970)
- 6) Y. Shoyama, M. Yagi, I. Nishioka, T. Yamauchi, *Phytochemistry*, **14**, 2189 (1975)
- 7) Y. Shoyama, H. Hirano, I. Nishioka, *Phytochemistry*, **23**, 1909 (1984)
- 8) Y. Goto, Y. Shima, S. Morimoto, Y. Shoyama, H. Murakami, A. Kusai, K. Nojima, *Org. Mass Spectr.*, **29**, 668 (1994)
- 9) H. Tanaka, Y. Goto, Y. Shoyama, *J. Immunossay*, **17**, 321 (1996)
- 10) G. Galfre, C. Milstein, *Methods Enzymol.*, **73**, 3 (1981)
- 11) H. Murakami, H. Masui, G.H. Sato, N. Sueoka, T.P. Chow, T. Kano-Sueoka, *Pro. Natl. acad. Sci. USA*, **79**, 1158 (1982)
- 12) E.W. Weiler, M.H. Zenk, *Phytochemistry*, **15**, 1537 (1976)
- 13) H. Tanaka, S. Morimoto, Y. Shoyama, *J. Nat. Prod.*, **56**, 2068 (1993)
- 14) H. Tanaka, R. Takahashi, S. Morimoto, Y. Shoyama, *Plant Cell Rep.*, **15**, 819 (1996)
- 15) H. Tanaka, R. Takahashi, S. Morimoto, Y. Shoyama, *J. Nat. Prod.*, **60**, 168 (1997)
- 16) Y. Shoyama, I. Nishioka, K. Hatano, In Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants, Y.P.S. Bajaj Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1991, Vol.15, pp.58-72
- 17) Y. Shoyama, I. Nishioka, K. Hatano, In Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation, Y.P.S. Bajaj Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1992, Vol.19, pp.464-480
- 18) Y. Shoyama, Y. Sasaki, I. Nishioka, T. Suzuki, In Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation, Y.P.S. Bajaj Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1992, Vol.18, pp.179-192
- 19) Y. Shoyama, H. Matushita, X.X. Zhu, H. Kishira, In Biotechnology in Agriculture and Forestry, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed, Y.P.S. Bajaj Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1995, Vol.31, pp.343-356
- 20) Y. Shoyama, S. Chen, H. Tanaka, Y. Sasaki, Y. Sashida, In Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants, Y.P.S. Bajaj Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1998, Vol.41, pp.1-13
- 21) Y. Shoyama, T. Fukada, H. Murakami, *Cyto-technology*, **19**, 55 (1996)

- 22) R. Sakata, Y. Shoyama, H. Murakami, *Cytotechnology*, **16**, 101 (1994)
- 23) H. Yanagihara, R. Sakata, Y. Shoyama, H. Murakami, *Planta Medica*, **62**, 169 (1996)
- 24) H. Tanaka, L. Xuan, H. Tanaka, Y. Xu, Y. Shoyama, *Cytotechnology*, **29**, 65 (1999)
- 25) N. Fukuda, H. Tanaka, Y. Shoyama, *Cytotechnology*, **29**, 115 (1999)
- 26) H. Tanaka, Y. Shoyama, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1391 (1998)
- 27) N. Fukuda, H. Tanaka, Y. Shoyama, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 219 (1999)
- 28) H. Tanaka, W. Putalun, C. Tsuzaki, Y. Shoyama, *FEBS Lett.*, **404**, 279 (1997)
- 29) S.J. Shan, H. Tanaka, Y. Shoyama, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 221 (1999)
- 30) F. Taura, S. Morimoto, Y. Shoyama, R. Mechoulam, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9766 (1995)
- 31) S. Morimoto, K. Komatsu, T. Taura, Y. Shoyama, *J. Nat. Prod.*, **60**, 854 (1997)
- 32) F. Taura, S. Morimoto, Y. Shoyama, *J. Biol. Chem.*, **271**, 17411 (1996)
- 33) R. Mechoulam, *Science*, **168**, 1159 (1970)
- 34) W.A. Devane, F.A. Dysarz, M.R. Johnson, L.S. Melvin, A.C. Howlett, *Mol. Pharmacol.*, **34**, 605 (1988)
- 35) A.C. Howlett, M. Bidaut-Russell, W.A. Devane, L.S. Melvin, M.R. Johnson, M. Herkenham, *Trends Neurosci.*, **23**, 420 (1990)
- 36) W.A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam, *Science*, **258**, 1946 (1992)

第 57 巻第 9 号予定

巻 頭 言

天然物合成の楽しさ小笠原國郎

総説および総合論文

特異な構造と顕著な生物活性を有する天然有機化合物の全合成加藤 正
 ポルフィリン多量体合成法の進歩新森 英之ら
 有機銅試薬の共役付加反応における面選択性と反応機構：一般則の提案山本 恵子ら
 パラジウム錯体によるカルボン酸無水物の炭素-酸素結合活性化とその応用長山 和弘ら
 30 員環を越す巨大な環状化合物の合成：古細菌細胞膜の脂質分子を中心として江口 正ら
 単離酵素の特性を活かした不斉還元河合 靖ら

ラ ウ ン ジ

マイクロリアクタは有機合成に役立つのか岡本 秀穂

十 字 路

Cieplak/Modified Cieplak Model山本 恵子
 C-O 結合活性化長山 和弘
 古細菌江口 正
 酵素と補因子河合 靖

新しい合成ほか