

総 説

大 麻 研 究

正 山 征 洋

(長崎国際大学 薬学部 薬学科)

要 旨

マリファナはアサから生産され、世界各国地域により色々な名称で呼ばれる。マリファナは特異のカンナビノイドと称するアルキールフェノールを含有する。それらの中で最も強い幻覚活性を持つのが THC である。THCA 生合成酵素を新鮮なアサから精製・単離し、その性状を明らかにした。THCA 生合成酵素は CBGA から環を形成して THCA を生成する過程を触媒する。また、THCA 生合成酵素はいかなる補酵素も要求しないので内在性の FAD 等の補酵素を持つことが予想される。そこで THCA 生合成酵素をクローニングし、昆虫細胞系で大量発現し結晶化に成功した。X-線結晶解析により全構造を明らかにした。これにより FAD がヒスチジン、システインと結合しポケット付近に位置すること、チロシンが環形成に必須であることを明らかにした。THCA 生合成酵素はアサの腺毛で生合成されそこで大麻成分を生合成することが明らかとなった。

キーワード

大麻、カンナビノイド、THCA 生合成酵素、X線構造解析

はじめに

20世紀に入り大麻は世界各国で薬用として、また幻覚剤として用いられるようになってきたが、その毒性のために1925年以来ジュネーブの国際阿片条約により規制された。わが国では1947年以降大麻取締法が施行された。大麻は1951年まで日本薬局方に鎮痛、鎮静薬として収載されてきたが、それ以後は大麻禍が社会問題となってきたために、医薬品としては認められず、大麻取締法で厳しく規制されるに至っている。麻薬と大麻は法律的にも全く別物である。何れも乱用薬物として扱われているが、その他に乱用薬物の範疇に入るものとして、覚せい剤、アヘン、コカ、LSD、シンナー等が有る。従ってこれら薬物に関する法律も、覚醒剤取締法(アンフェタミン等)、アヘン法(ケシ栽培、ケシから、アヘン等)、麻薬及び抗精神薬取締法(モルヒネ、コカイン、LSD等)、大麻取締法(アサ栽培、大麻製品、大麻成分 THC等)、毒物及び劇物取締法(トルエン等有機溶媒)等個々

の法律が定められ運用されている。世界の乱用薬物の事犯数を比べてみると、大麻が圧倒的に多く、年間1億6千万人が使用していると推定されている。一方、覚せい剤はその5分の一程度である。日本の場合は逆で、覚せい剤事犯に関わった者は年間約1万7千人で、大麻は2千人以下となっている。このことは戦後の乱用薬物を取り巻く環境の違いによるものと考えられる。

大麻の基原植物はアサである。アサは学名を *Cannabis sativa* L. と称し、アサ科(Cannabaceae)に属する雌雄異種の一年生草本である。アサは栽培される最も古い繊維作物の一つで、ロシアでは既に紀元前4000年頃栽培されていたと言われている。日本における栽培も古く、各地に麻植、託麻、麻生など麻がつく地名が多いことから窺える。わが国ではいわゆる三草四木(三草:アサ、紅花、藍/四木:桑、うるし、茶、こうぞ)として古くから人々の生活に利用されてきた。繊維は耐久性、通風性、耐水性に

優れているので衣服をはじめ、漁網、ロープなど、また、おがらはお盆の仏事に用いられている。一方、果実は七味トウガラシやスナックとして食用とする他、油脂原料でもある。また、漢方では大麻仁、麻子仁と称し漢方薬に配合されるので最近日本薬局方にも収載された。特殊な例としては、ミャンマーで若葉をお野菜として、また、スリランカでは肉を柔らかくするために新鮮な大麻葉を用いると言われる。

アサの未熟花穂や葉を乾燥又は各種の加工を施したものを大麻と称する。特にインド産が有名で、麻醉性、幻覚性等が高いということからインド大麻と呼ばれ、植物学的に *Cannabis sativa* L. var. *indica* Lam. と区別し、また科名もクワ科に属していたが、現在では前述の通り一属一種となっている。また世界各地により名称が千差万別であり、Haschisch、Bengh、Antabamik、Muraba、Marihuana 等と呼ばれている。以上からアサは生きた植物を示す標準和名で、大麻はその加工品、即ち生薬という修治を施した物ということになる。

古くから大麻が儀式やまじない、また、医療に用いられていたことは数多くの史実で明らかとなっている。中国では3世紀頃大麻を処方した「麻沸散」が作られ全身麻酔を行い外科手術が行われている。大麻を幻覚剤として用いたのは小アジアからインドにわたる地域で、イスラム教文化とともに、北アフリカを経て南ヨーロッパに伝播したと考えられている。スキタイ民族は他民族を攻撃する前にテントの中で大麻をいぶしたと言われている。また、11世紀イランにハシシーンと呼ばれるイスラム教の一派があり、彼らはすべての敵を暗殺したことで知られており、暗殺に出かける前にはハシシュを飲んだと言われている。

アサには特異な構造を持つカンナビノイド (CN) と呼ばれる一連の成分が70種以上単離構造決定されている。これらの内麻酔性、幻覚性を持つのがテトラヒドロカンナビノール (THC) である。近年脳とマクロファージから

THC に対する2種のレセプター、CB1¹⁾、CB2²⁾ が発見され、また2種の内在性リガンドであるアナンダミド³⁾ と2-アラキドニルグルセライド⁴⁾ が見出され、カンナビノイドが有力な医薬素材と考えられるようになってきている。

1 無毒大麻の育種研究

Fig. 1 に新鮮なアサに含有する主CNを示した。また、外形は同じでも、CNが全く異なる品種があり、これらを生理品種と称する。これらの内麻酔性、幻覚性を持つのがTHCである。THCのカルボン酸タイプの存在が予想されていたが単離されていなかった。このものの単離構造決定にはじめて成功したのが1967年である⁵⁾。アサの研究を始めた当時は大麻禍が激増期だったので厚生省、栃木県との共同研究で活性を持たないアサの育種からスタートし、8年間を要してTHCAをほとんど含まずcannabidiolic acid (CBDA)を主CNとするCBDA種(無毒大麻)を育成し、さらに繊維としても使用に耐える品種「とちぎしろ」として品種登録するに至った。本品種は日本全国の栽培農家に在来種に替えて栽培することが義務づけられるに至った。

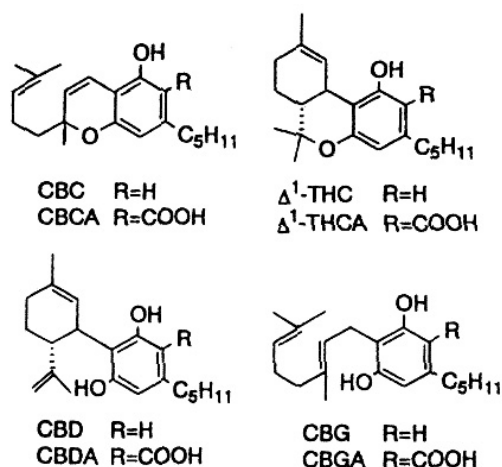


Fig. 1 Major cannabinoids in fresh *Cannabis* plant

2 CNの生合成酵素に関する研究

1970～1980年代はトレーサーを用いた植物成分の生合成研究が全盛期を迎えた時代だったので、大麻成分についても研究を行って大麻成分が酢酸・マロン酸経路とメバロン酸経路から生合成されることを明らかにした^{6,7)}。

そこでCN高含有品種の作出やアサの2生理品種の成因解明を目的として、3種のCN生合成酵素、THCAsynthase⁸⁾、CBDAsynthase⁹⁾、カンナビクロメン酸(CBCA)synthase^{10,11)}を精製した。これらの内一番最初に精製したTHCAsynthaseに付いて概説する。

先にも述べたがアサには2種の生理種がありCNの質的量的変動が大で、また成育期によってもCNの変動が極めて大きいことを明らかにしているので、酵素の精製にも適した材料を吟味する必要がある。THCAsynthaseに関しては当然ながらTHCAをメジャーとして含有するTHCA種であるメキシコ種を選んだ。また幼若葉と成熟葉では前者の活性が4倍近く高いことからメキシコ種の3週齢葉を材料としphosphate buffer (pH 7.0)で抽出した。粗酵素液を遠心後Table 1に示す精製ステップによりSDS-PAGEにおいてTHCAsynthaseをワンバンドまで精製することに成功した。

本酵素の性質について検討した。pH 6前後で最も活性が高いことが判明した。次に各種金属イオンの要求性を調べたところ、いかなる金属イオンも活性に影響しないことが明らかとなった。またNAD、NADP、FAD、FMN等補

酵素類もなんら活性には影響しなかった。THCAsynthaseはoxydoreductaseと考えられるので以下の検討を行ったが、H₂O₂や分子状の酸素を要求せず、P-450インヒビターによる酵素阻害も認められなかった。さらにラジカル除去剤も活性に影響しなかった。以上の結果から本酵素はdehydrogenaseであると推察される。しかし前述のごとくNAD、NADP、FAD、FMN等の補酵素を要求しないことから通常のdehydrogenaseとは大きく異なっていることが推察された。

同様にCBDAsynthaseとCBCAsynthaseをCBDA種の幼若葉から抽出精製した。これら両酵素の内前者はTHCAsynthaseと性質が極めて類似していることが判明した。一方CBCAsynthaseは類似の性質を持っているが分子量は約倍で、2量体酵素であることが明らかとなった。ただしCBCAsynthaseについては興味ある反応を触媒することが分かったのでこの点について触れる。

著者らは新鮮なアサからCBCAを単離し構造決定を行ったが、CBCAに施光度がないことからラセミ体と考えていた¹²⁾。ところがCBGAをCBCAsynthaseにより反応して得られたCBCAと、化学合成により得られたCBCAを比較したところCDスペクトルが異なっていることが明らかとなった。Fig. 2 Aは化学合成して得られたCBCAを脱炭酸により得たカンナビクロメン(CBC)をキラルHPLCで分析した結果で、ほぼ等価の2つの

Table 1 THCAsynthase activity under purification step

Purification step	Total activity (pkat)	Protein (mg)	Specific activity (pkat/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	3,635	664	5.47	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 70-90% sat.	2,888	47.3	61.1	11	79
DE-52	1,437	1.58	909	166	40
Phenyl Sepharose CL-4B	783	0.487	1,608	293	22
Hydroxylapatite	332	0.171	1,942	354	9.1

Data are based on the extraction of rapidly expanding Cannabis leaves. Assays were carried out under the standard conditions using HPLC analysis.

pKat indicates picokatal.

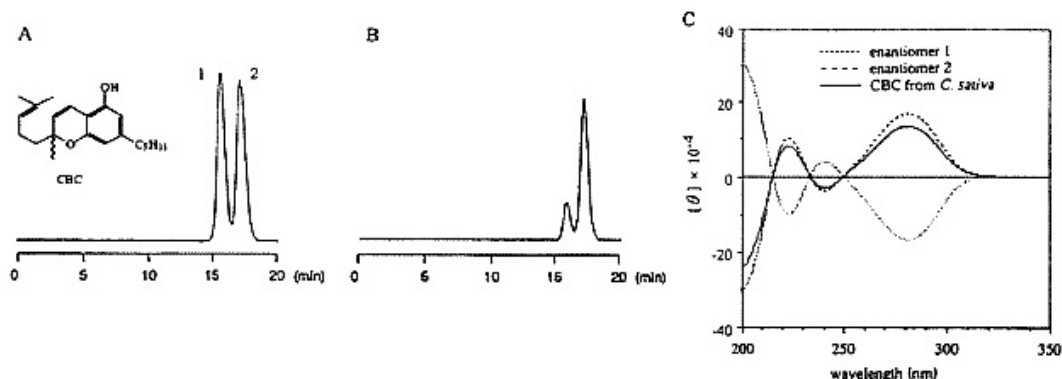


Fig. 2 Epimers of CBC separated by chiral column and CD spectrum

ピークが見られる。一方 Fig. 2 B は CBGA から CBCAsynthase により得られた CBCA を脱炭酸した CBC で、エナンチオマーが約 5:1 の割合で混在している。そこでそれぞれのエナンチオマーを分取し CD スペクトルを測定した。この結果アサから単離した CBC の CD スペクトルは酵素反応で得られたスペクトルと一致した。以上の結果から CBCA は CBGA から CBCAsynthase により 5:1 のエナンチオ選択的に生合成されることが明らかになった¹¹⁾。酵素は大変特異性が高いのが普通であるが、CBCAsynthase は特異性が低い酵素で基質を変えても触媒出来ることがわかった。目下クローニング中なので、ポイントミュウテーションにより活性部位のアミノ酸を変換し、触媒能を調節する酵素のデザインを具現化するに相応しいモデル酵素と考えている。

3 生合成酵素遺伝子のクローニングとその発現¹³⁾

CN の生合成は以下の 3 種の酵素が関与する。(1) olivetolic acid を形成するための polyketosynthase、(2) olivetolic acid と geraniol pyrophosphate を結合する olivetol-geraniol transferase、(3) CBGA の閉環反応を触媒する前述の 3 酵素である。

CN のアルキル部位は通常 pentyl 基であるが、アジア地区には propyl 基も多く、metlyl

基の存在も報告されている。このことから polyketosynthase のクローニングを行っており、3 個の遺伝子、pk-1 から 3 を単離し、その内 pk-1 を昆虫細胞に組み込み発現系を構築し、その酵素タンパクの性状を明らかにすると共に、活性を調査した。その結果 hexylCoA をスターターとして添加した場合、olivetol が生成されるが、olivetolic acid 生成能が低いことが判明したので現在も検討中である。

3 種の大麻成分生合成酵素を精製しその性状に付いて述べた。その中で研究が先行している THCA synthase のクローニングに付いて概説する。

既に N 末端アミノ酸配列を報告しているが、更に詳細な情報を得るために精製酵素を BrCN および V8 プロテアーゼにより部分分解を行い内部構造フラグメントを得た。これらを基に重複プライマーを用いて PCR により増幅し、アガロース電気泳動にて約 350bp のバンドを確認した。本増幅産物を M13 ベクターにクローニング後、シーケンシングした結果部分分解産物の配列を保持することが明らかとなり、THCA synthase 遺伝子の部分構造を示していると結論した。

まず最初に先の 350bp 増幅産物のアンチセンスプライマーと N 末端アミノ酸配列によるセンスプライマーを用いて PCR を行い、約 1Kbp の cDNA フラグメントをクローニングし

た。一方 350bp 増幅産物のセンスプライマーと adapter primer を用いた 3'RACE により 3' 末端をクローニングした。同様に 1kbp の cDNA フラグメントをもとにアンチセンスプライマーと oligo (dT) 17adapter primer を用いて 5'RACE により 5'末端をクローニングした。最終的に両 RACE 産物を基にしたプライマーを合成して PCR を行い全長をクローニングした (Fig. 3)。

得られた cDNA は Fig. 3 に示す通り 545 個のアミノ酸をコードする 1635bp で、分子量の理論値は 59KD と算出された。先に述べた通りアサから精製した THCA synthase の分子量は 75KD であるので両者の差異は大きい。この点に関しては 6 個所に N-glycosylation site を保持していることからプロセッシングが必要なことが窺える。

なお、CBDA synthase についても同様にクローニングと昆虫細胞による大量発現系を構築し、酵素タンパクを単離した¹⁴⁾。THCA syn-

thase とホモロジーが 85% で極めて性質が類似することが明らかとなったことから、今後 CBDA synthase を改変して THCA と CBDA 両者を同時に生合成出来る新しい酵素の設計等が課題となると考えている。なお、CBDA synthase に付いては紙面の関係上割愛する。詳細については引用文献¹⁴⁾を参照されたい。

4 THCA synthase の大量発現と X 線構造解析

次に昆虫細胞による発現系を構築した。組換え THCA synthase 遺伝子は、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System を用いて発現用ウイルスを調製し、Sf9 を宿主細胞として分泌発現を行った。THCA synthase の cDNA を鋳型として PCR 法により、THCA synthase 遺伝子をコードする領域を増幅し、制限酵素 BamH I 及び Sac I によって切断後、バキュロウイルスへのトランスファーベクター pFastBac 1 にクローニングした。クローニン

THCA synthase	1	MNCSAFSEWF	VCKIIFPELS	FHIQISIANP	RENFLKCFSP	HIPNNVANPK	LVYTQHDQLY	60
CBDA synthase	1	MKCSFSEWF	VCKIIFPEFS	FNIQTSIANP	RENFLKCFSP	YIPNNATNLK	LVYTQNNPLY	60
						*		
THCA synthase	61	MSILNSTION	LRFISDTPPK	PLVIVTPSNP	SHIQATILCS	KKVGLQIRTR	SGGHDAEGMS	120
CBDA synthase	61	MSVLNSTIHN	LRFTSDTPPK	PLVIVTPSHV	SHIQGTILCS	KKVGLQIRTR	SGGHDSSEMS	120
		*						
THCA synthase	121	YISQVPEVVV	DLRNMHSIKI	DVHSQTAWVE	AGATLGEVYY	WINEKNNLS	FPGSYCPTVG	180
CBDA synthase	121	YISQVPEVIV	DLRNMRSIKI	DVHSQTAWVE	AGATLGEVYY	WVNEKNNLS	LAAGYCPTVC	180
						*		
THCA synthase	181	VGGHESGGGY	GALMRNYGLA	ADNIIDAHLV	NVDGKVLDRK	SMGEDLFWAL	RGGGGENFGI	240
CBDA synthase	181	AGGHEGGGGY	GPLMRNYGLA	ADNIIDAHLV	NVHGKVLDRK	SMGEDLFWAL	RGGGAESFGI	240
THCA synthase	241	IAAWKIKLVA	VESKSTIFSV	KKNMEIHGLV	KLFNKWQNTA	YKYDKDLVLM	THFITRKNITD	300
CBDA synthase	241	IVAWKIRLVA	VE-KSTMFESV	KKIMEIHELVA	KLVNKWQNTA	YKYDKDLLLM	THFITRKNITD	299
							*	
THCA synthase	301	NHGKNTTIVH	GYFSSIFHGG	VDSLVDLMNK	SFPELGIKKT	DCKEFSWIDT	TIFYSGVVNE	360
CBDA synthase	300	NQGNKTAIIV	TYFSSVFLGG	VDSLVDLMNK	SFPELGIKKT	DCRQLSWIDT	TIFYSGVVNY	359
		*		*				
THCA synthase	361	NTANFKKEIL	LDRSAGKATA	FSIKLDYVKK	PIPETAMVKI	LEKLYEEDVGG	AGMYVLYPYG	420
CBDA synthase	360	DTDNENKEIL	LDRSAGQNGA	EKIKLDYVKK	PIPEVVFVQI	LEKLYEEDIG	AGMYALYPYG	419
THCA synthase	421	GIMDEISESA	IPFPFRAGIM	YELWYASWE	KQEDNEKHIN	WVRSVYNETT	PYVSNQNPRLA	480
CBDA synthase	420	GIMDEISESA	IPFPFRAGIL	YELWYICSWE	KQEDNEKHIN	WIRNIYNEMT	PYVSKNPRLA	479
THCA synthase	481	YLNYRDLDDG	KTNHASPNNY	TQARIWGEKY	FGKNFNRLVK	VKTQVDPNNE	FRNEQSIPLP	540
CBDA synthase	480	YLNYRDLDDG	INDPKNPNNY	TQARIWGEKY	FGKNFDRLVK	VKTQVDPNNE	FRNEQSIPLP	539
			*					
THCA synthase	541	PPHHH	545					
CBDA synthase	540	PRRRH	544					

Fig. 3 Sequencing of THCA synthase
 Allow and bar indicates signal peptide cleavage site and fravin-binding site consensus sequence, respectively.
 Asterisks show potential glycosylation sites.

グ後、塩基配列の確認を行い、大腸菌 DH10Bac に形質転換することで組換えバクミドを作成した。ここで得られた組換えバクミドを Sf9 細胞に形質移入することで組換え THCA synthase バキウウイルスの作製を行った。

培養上清 1 L から約 2 mg の精製 THCA synthase を得ることに成功し、得られた THCA synthase は SDS-PAGE 上で単一なバンドとして確認できた。得られた THCA synthase の波長スペクトルを測定すると、360nm 及び 440nm 付近に FAD に特徴的な吸収極大を示した。また、精製 THCA synthase 溶液を濃縮したところ、FAD 由来の黄色を呈していたことから、THCA synthase が補酵素として FAD を含んでいることを確認した。

精製した THCA synthase を用いて、結晶化スクリーニングをおこなった。結晶の析出を経時的に顕微鏡下で観察した結果、微結晶もしくは沈殿が確認され、そのうちクエン酸ナトリウム塩を含む条件において単結晶を得た。単結晶が確認された条件を中心に結晶化条件の最適化を行った。この結果 0.1mm 程度の結晶を得ることができた (Fig. 4)⁵⁾。

結晶解析には分子置換法を用いた。最初に分子置換法を適用するための検索モデルを検討した。タンパク質立体構造データベースを対象として、各種プログラムを用いて THCA synthase の一次構造から、立体構造の特徴が類似

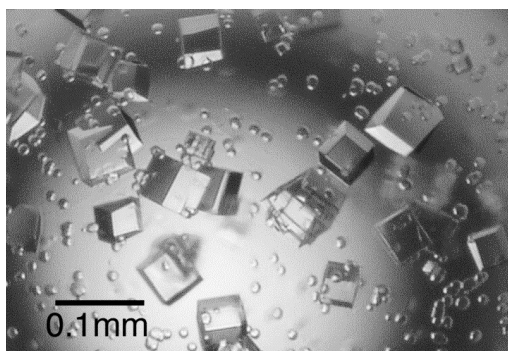


Fig. 4 Crystallines of THCA synthase

するタンパク質を検索した結果、glucosyltransferase (GOOX) が THCA synthase と相同性を持つことが判明した。本モデルを用いて電子密度図を作製した結果、GOOX の FAD に相当する部位に電子密度を確認し構造を決定した。最終的に THCA synthase は Fig. 5 に示す構造と決定した。

THCA synthase は、FAD の結合ポケットを境界にして大きく二つのドメインに分けられる。これらの二つのサブドメインに FAD のアデニル酸部分が挟まれて存在する形をとっている。

THCA synthase は FAD が内在する酵素タンパクであるので、FAD と結合しているアミノ酸の決定も重要である。このためヒスチジンとシステインをそれぞれポイント muta ションすることにより完全に活性が消失するので、2つの結合アミノ酸を決定した (Fig. 6)。ポケット内のチロシンは基質である CBGA の OH 基から H を引き抜く塩基として作用する重要な役目を担っている。そこで本チロシンをフェニルアラニンに変換することで活性が消

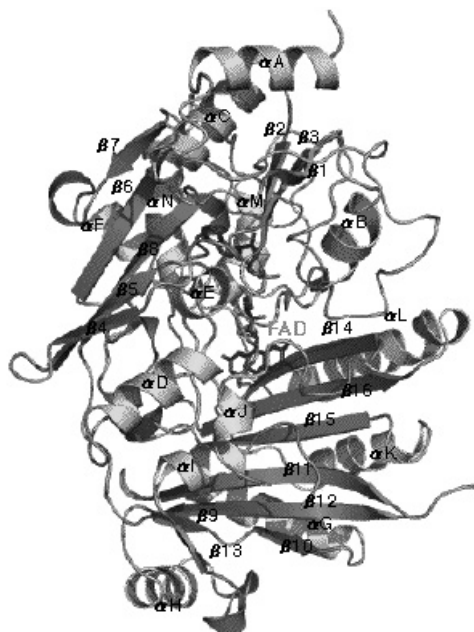


Fig. 5 Structure of THCA synthase

失することから、本チロシンが必須であることが明らかとなった。この反応に関連して、FADによりCBGAの3位の炭素に結合するHの脱離が起こりTHCAの合成を触媒する。

以上THCAsynthaseの構造解析から生合成メカニズムを解明することが出来た。現在までに植物2次代謝産物に関する膨大な生合成酵素がクローニングされ酵素タンパクが発現されているが、最終的な反応メカニズムを直接的に証明した例は少ない。

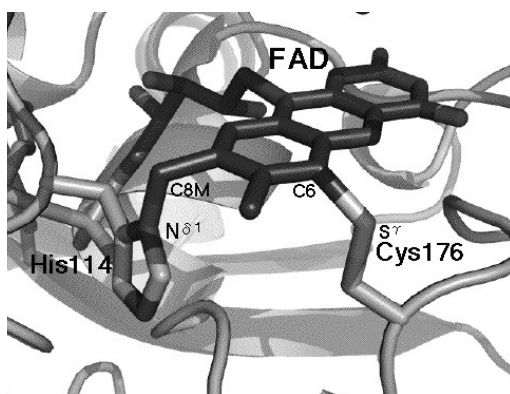


Fig. 6 FAD combining position in THCAsynthase

5 THCAsynthaseの発現部位¹⁶⁾

THCAsynthaseの分布を明らかにするために、緑色蛍光タンパク(GFP)とTHCAsynthaseを結合した形のハイブリッド遺伝子をタバコに導入してその発現を検討した結果、Fig. 7のDに見られるように腺毛部分に蓄積することが明らかとなった。CN類が植物細胞や昆虫細胞のアポトーシスを引き起こすことが明らかとなったことから¹⁷⁾、THCAsynthaseは腺毛の分泌細胞から分泌され、貯蔵部位でCBGAからCNを生合成して貯蔵し、外敵に対する生体防御の役割を担っていると考えている。

6 昆虫細胞以外でのTHCAsynthaseの発現

THCAsynthaseのcDNAを*Agrobacterium*を介してタバコ細胞へ導入し、CBGAとインキュベートすることによりCBGAはTHCAに変換した(Fig. 8)。このことからCNを大麻以外の植物で合成することに成功した世界で最初の例となった^{18,19)}。

同様に酵母での発現にも成功したが²⁰⁾、本稿では紙面の関係上割愛した。引用文献²⁰⁾に詳

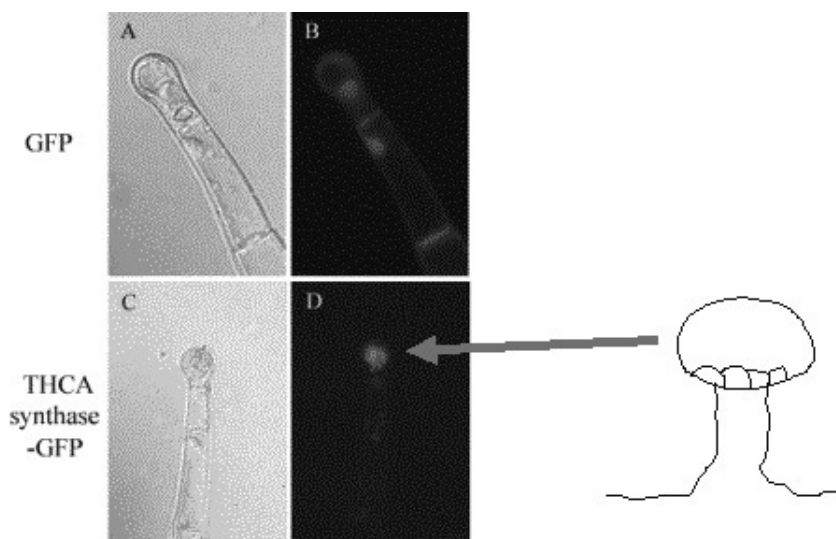


Fig. 7 Expression of THCAsynthase-GFP hybrid protein in tobacco hair

細を報告した。

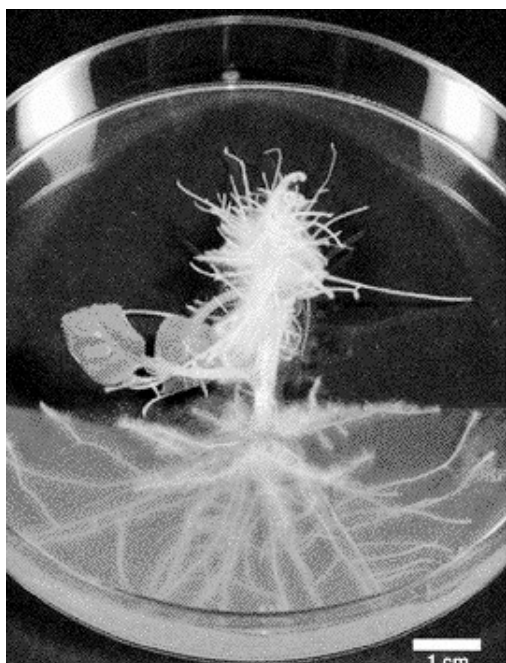


Fig. 8 Regeneration of tobacco hairy root inducing THCA synthase
THCA synthase was transferred to the plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* and induced to the tobacco leaf segment by infection resulting in hairy root. CBGA solution was fed to the regenerated tobacco plant to produce THCA detected by HPLC.

おわりに

本稿では大麻成分の生合成酵素遺伝子について概説した。Fig. 9 に THCA の生合成反応を示す。全反応メカニズムが解明された数少ない例である。

近年大麻の不法使用は年々増加の途を辿っており、他の薬物と同様深刻な社会問題となっている。また、不法栽培があとをたない状況である。しかし一方では大麻成分を直接医薬品とする試みや、大麻成分をモデルとして医薬品を造り出そうとする研究が急増していることも事実である。何故なのだろうか。大麻成分のレセプターが脳とマクロファージで発見されたことおよび内在性リガンドが単離されたことから、アンタゴニスト等の研究が急速に進んできた。また、大麻成分の中で特に活性の高い、THC 関連化合物の合成研究が幅広く行われている。臨床面から見ると、カリフォルニアでは医師の処方箋に基づき、大麻の主薬理活性成分である THC とモルヒネを、ガン患者の鎮痛を目的に投与するケースがあるとの報告がなされている。また、年少者の制吐を目的に THC を用いるケースもある。ごく最近、前述のリガンドの関連化合物が海馬における長期増強 (LTP) を起こすことが報じられており記憶学習ともリンクしていることが容易に予測され

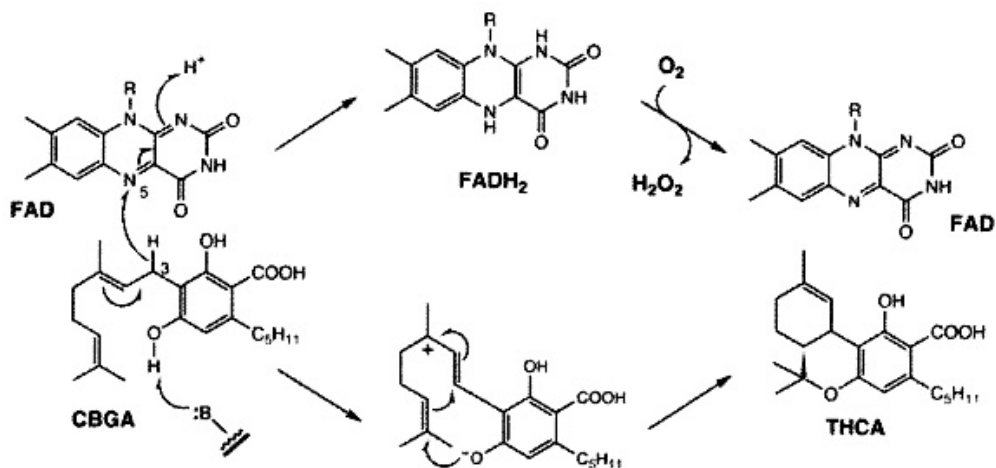


Fig. 9 Proposed reaction mechanism of THCA

る。

一方では大麻の害として麻薬等の「入門薬」と考えられている。これはアルコールより強いといわれる。また、反復使用で精神疾患・精神不安定となり、この症状をカンナビスサイコーシスと呼んでいる。さらにアルコール、喫煙等でフラッシュバック現象を起こすことも知られている。短期記憶の低下現象や無動機症候群(怠け者)等の副作用が付きまとうことから、扱い難い薬物ではあるが、末期がん患者に対する鎮痛作用や多発性硬化症に対する治療等の特性を生かした医薬品創出が望まれている。新しい医薬品としての魅力は十分に持っている化合物なので、ケシとアヘン・モルヒネとの関係同様、医薬品として認めるべく、法の改正も必要かと考える。

謝 辞

本研究は九州大学大学院薬学研究院で行われたもので、森元聡教授、田浦太志助教に感謝します。本研究の一部は学術振興会アジアコアプログラム の助成によった。併せて感謝します。

引用文献

- 1) Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., Bonner, T. I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-564.
- 2) Munro, S., Thomas, K. L. and Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature*, 365, 61-65.
- 3) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffing G, Gibson D, Etinger A, Mandelbaum A, Mechoulam R. (1992), Isolation and Structure of a Brain constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor, *Science*, 258, 1946.
- 4) Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215, 89-97.
- 5) Yamauchi, T., Shoyama, Y., Aramaki, H., Azuma, T., Nishioka, I. (1967) Tetrahydrocannabinolic acid, a genuine substance of tetrahydrocannabinol. *Chem. Pharm. Bull.* 15, 1075-1076.
- 6) Shoyama Y., Yagi M., Nishioka I., Yamauchi, T. (1975) Biosynthesis of cannabinoid acids, *Phytochemistry*, 14, 2189-2192.
- 7) Shoyama Y., Hirano H., Nishioka I. (1984) Biosynthesis of propyl cannabinoid acid and its biosynthetic relationship with pentyl and methyl cannabinoid acids, *Phytochemistry*, 21, 1909-1912.
- 8) Taura F., Morimoto S., Shoyama Y., Mechoulam R. (1995) First direct evidence for the mechanism of 1-tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9766-9767.
- 9) Taura F., Morimoto S., Shoyama Y. (1996) Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from *Cannabis sativa* L. Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid. *J. Biol. Chem.* 271, 17411-17416.
- 10) Morimoto S., Komatsu K., Taura F., Shoyama Y. (1998) Purification and characterization of cannabichromenic acid synthase from *Cannabis sativa*, *Phytochemistry*, 49, 1525-1529.
- 11) Morimoto S., Komatsu K., Taura F., Shoyama Y. (1997) Enzymological evidence for cannabichromenic acid biosynthesis, *J. Nat. Prod.*, 60, 854-857.
- 12) Shoyama Y., Fujita T., Yamauchi T., Nishioka I. (1968) Cannabichromenic acid, a genuine substance of cannabichromene, *Chem. Pharm. Bull.*, 16, 1157-1158.
- 13) Sirikantaramas S., Morimoto S., Shoyama Y., Ishikawa Y., Wada Y., Shoyama Y., Taura, F. (2004) The gene controlling marijuana psychoactivity. Molecular cloning and heterologous expression of D1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L., *J. Biol. Chem.* 279, 39767-39774.

- 14) Taura F., Sirikantaramas S., Shoyama Y., Yoshikai K., Shoyama Y., Morimoto S. (2007) Cannabidiolic acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*, *FEBS Lett.*, 581, 2929–2934.
- 15) Shoyama Y., Takeuchi A., Taura F., Tamada T., Adachi M., Kuroki R., Shoyama Y., Morimoto S. (2005) Crystallization of D1-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase from *Cannabis sativa*. *Acta Cryst. F* 61, 799–801.
- 16) Sirikantaramas S., Taura, F., Tanaka Y., Ishikawa Y., Morimoto S., Shoyama Y. (2005) Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes, *Plant Cell Physiol.*, 46, 1578–1582.
- 17) Morimoto S., Tanaka Y., Sasaki K., Tanaka H., Fukamizu T., Shoyama Y., Shoyama Y., Taura F. (2007) Identification and characterization of cannabinoids that induce cell death through mitochondrial permeability transition in *Cannabis* leaf cells, *J. Biol. Chem.*, 282, 20739–20751.
- 18) Sirikantaramas S., Taura F., Morimoto S., Shoyama Y. (2007) Recent advances in *Cannabis sativa* research : Biosynthetic studies and its potential in biotechnology, *Current Pharmaceutical Biotech.*, 8, 237–243.
- 19) Taura F., Sirikantaramas S., Shoyama Y., Shoyama Y., Morimoto S. (2007) Phytocannabinoids in *Cannabis sativa* : Recent studies on biosynthetic enzymes, *Chem. Biodiversity*, 4, 1649–1663.
- 20) Taura F., Dono E., Sirikantaramas S., Yoshimura K., Shoyama Y., Morimoto S. (2007) Production of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic *Pichia pastoris*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 361, 675–680.