

オピオイド系鎮痛剤の原料である テバインの大腸菌を用いた実用生産系の構築

石川県立大学生物資源工学研究所 中川 明

【略歴】

1999年3月 同志社大学工学部知識工学科卒業
2006年9月 奈良先端科学技術大学院大学博士後期課程修了
2006年10月 協和発酵工業株式会社 NEDO 研究員
2006年12月 博士号(バイオサイエンス)取得
2009年4月 石川県立大学生物資源工学研究所研究員
2017年4月 石川県立大学生物資源工学研究所講師

(S)-レチクリン生産系の構築

モルヒネをはじめとするオピオイド系鎮痛剤は歯科治療から末期ガンまで幅広い痛みの緩和に用いられている。その原料であるテバインは植物からの抽出により生産されるため、化学合成法により生産される他の鎮痛剤に比べ、遥かに高価である。そこで、本研究では安価なオピオイド系鎮痛剤の供給を目的とし、大腸菌を用いたテバイン実用生産系の構築を試みている。テバインはベンジルイソキノリンアルカロイド(BIA)に属する化合物であるが、BIAの殆どは(S)-レチクリンをその中間体としている。よって、我々は最初にグルコースからのレチクリン生産菌を構築した。代替酵素の利用や生合成経路のショートカットにより、天然には存在しない(S)-レチクリン生合成経路を大腸菌内に構築し、グルコースからの(S)-レチクリン生産(60時間、40 mg/L)に成功した。この大腸菌を用いたレチクリン生産性は、植物体での生産よりも遥かに優れており、実用化に向けた基盤技術になり得ると考えている。

テバイン生産系の構築

(S)-レチクリンからテバインを生産する上で2つの障害が考えられた。1つ目は、テバイン生産には(S)-レチクリンをR体に転換する必要があるが、当初、その酵素は同定されていなかったことである。様々な検討の結果、(S)-レチクリンを生産する際に用いられる3つのメチル基転移酵素の内、6OMTを除くと、(S)-レチクリンの生産性は落ちるが、(R)-レチクリンが生成することを見出した。2つ目の障害は大腸菌で発現が難しいとされるP450酵素、サルタリジン合成酵素(SalS)の機能的な発現である。通常大腸菌でP450を発現させる時、N末領域の改変が有効であるが、SalSの場合、N末疎水性領域の削除が有効であることを見出し、機能的なSalSの発現に至った。グルコースからのテバイン生産には全部で13の酵素遺伝子の発現が必要であるが、全てを1菌体に導入することは以下の理由から難しかった。

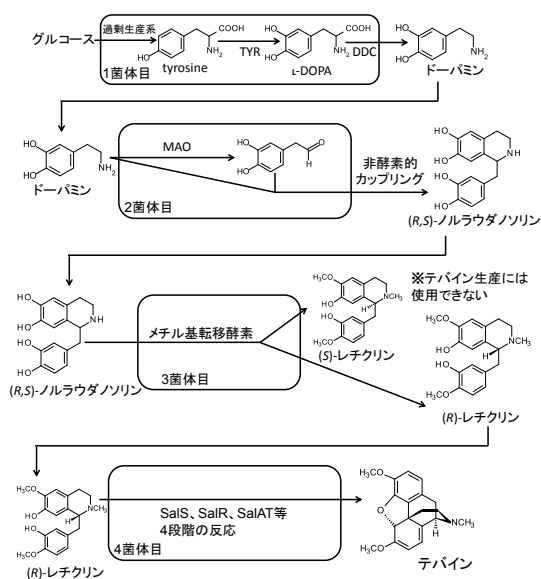


図 4菌体によるテバイン生産系
 ドーパミン生産菌、(R,S)-ノルラウダノソリン生産菌、(R)-レチクリン生産菌、テバイン生産菌の4菌体
 を必要とする。1菌体目のTYRと3菌体目のメチル転移酵素がネックとなっている。

- ① 生合成経路に用いるチロシナーゼ(TYR)が中間体を分解してしまうため、生産段階を分ける必要がある。
- ② (S)-レチクリンからR体のレチクリンを生成するため、メチル基転移酵素の副反応を利用する必要があったが、前駆体である(R,S)-ノルラウダノソリンに含まれるS体濃度が高いとR体生成が阻害されてしまう。
- ③ 5つものプラスミドを必要とするために菌に負担がかかり、思い通りの遺伝子発現が行えない。よって、現時点での大腸菌を用いたテバイン生産は生合成経路を4つに分け、4菌体を段階的に培養することにより、実現している(図)。

テバイン生産系の改善

テバインの実用生産を目指した場合、上記の4菌体系はあまりにもコストが掛かり、現実的ではない。そこで、今後、我々は実用生産を目指し、まずは1菌体でのテバイン生産菌を創製する。チロシナーゼの代替酵素の利用、同定された(S)-レチクリンからR体のレチクリンを生成する酵素STORRの機能的な発現、生合成経路のゲノム挿入などを組み合わせ、100 mg/Lレベルの生産を目標とする。

謝辞

35歳で論文1本という私を研究員として雇うという英断を下した、本研究室のボスである南博道准教授に心より感謝を申し上げます。また、何のコンネクションもない私に直接的にも間接的にも手を差し伸べて下さっている諸先生方には、日頃より様々な視点をご教示頂いております。いつも本当にありがとうございます。

参考文献

- [Nakagawa A](#), Minami H, Kim JS, Koyanagi T, Katayama T, Sato F, Kumagai H. A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. *Nature Communications*, 2011, **2**:326.
- [Nakagawa A](#), Matsuzaki C, Matsumura E, Koyanagi T, Katayama T, Yamamoto K, Sato F, Kumagai H, Minami H. (R,S)-Tetrahydropapaveroline production by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 2014, **4**:6695.
- [Nakagawa A](#), Matsumura E, Koyanagi T, Katayama T, Kawano N, Yoshimatsu K, Yamamoto K, Kumagai H, Sato F, and Minami H. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*, *Nature Communications*, 2016, **7**:10390.