

大腸菌を利用した医薬中間体テトラヒドロパパベリンとその派生物であるメチル化ノルラウダノソリン発酵生産系の構築

中川 明

石川県立大学 生物資源工学研究所

研究の目的

ベンジルイソキノリンアルカロイド(BIA)は、モルヒネ(鎮痛剤)、ベルベリン(止瀉薬)、マグノフロリン(抗ガン剤)といった医薬品をはじめとする化合物群を含んでおり、強い生理活性を有している。BIAはその複雑な骨格やキラリティの問題から化学合成が難しく多量には得にくい。昨今、微生物を利用した BIA 生産系の構築が盛んに研究されている。

世界保健機構必須医薬品モデル・リストに挙げられている鎮痙剤アトラクリウムは、比較的高価であり、安価なアトラクリウム生産系の構築が望まれている。アトラクリウムの原料となるテトラヒドロパパベリン(THPP、図 1)は、BIA の 1 つであるが、我々は、THPP の微生物発酵法を用いた生産系構築を目的とする研究を遂行した。更に、THPP の生産過程において得られる派生物(メチル化ノルラウダノソリン)は新規なものも多く、様々な医薬品原料になりうる構造を持っている。そこで、メチル化ノルラウダノソリンのコレクション作製も同時に目指す。

本研究は、安価なアトラクリウムの供給に貢献するだけでなく、BIA を用いた創薬研究にも大きく貢献できる可能性がある。

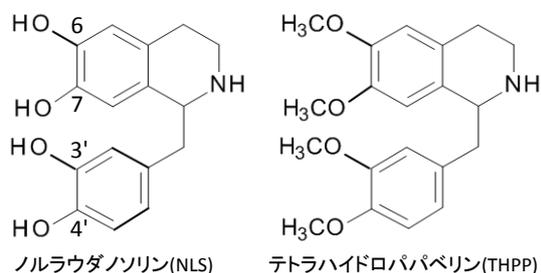


図1 ノルラウダノソリンとテトラヒドロパパベリン

方法

我々は既にグルコースからの BIA 生産に成功しており、その発酵法を本研究にも適用する。THPP はノルラウダノソリン(NLS)の 4 つの水酸基をすべてメチル化することによって得られる(図 1)。4 つの水酸基、6 位、7 位、3'位、4'位をメチル化する酵素はそれぞれ黄連由来のコクラウリン 6-O メチル基転移酵素(6OMT)、ハナビシソウ由来のレチクリン 7-O-メチル基転移酵素(7OMT)、ヒト由来のカテコール O メチル基転移酵素(COMT)、黄連由来の 3'-ヒドロキシ-N-メチルコクラウリンメチル基転移酵素(4'OMT)が触媒する。

各酵素の大腸菌での発現確認後、細胞破砕液を用いた in vitro での活性特性を調べ、メチル化 NLS 合成能を検証した。また、THPP 生成に対する最適な酵素の反応順を検証した。更に、菌体を分け、段階的に培養することによりメチル基転移酵素の反応順を

制御し、THPP 生産を試みた。

結果

1. 各メチル化転移酵素の反応性と生成物

4つのメチル基転移酵素の組み合わせは全部で15通り存在する。また、NLSの水酸基は4つあるため、生成しうるメチル化NLSは15種類存在する。NLSに対し15通りの組み合わせで酵素を反応させ、その生成物を解析した。その結果、想定しうる15種類のメチル化NLSの内、12種のメチル化NLSの生成が確認された(表1)。3'位、4'位の2つのみの水酸基がメチル化された3',4'-OジメチルNLSはいずれの反応産物からも検出されなかった。また、6,3',4'-OトリメチルNLSと7,3',4'-OトリメチルNLSについては、分離条件が見つからなかった。しかし、ピークは確認されるため、どちらかあるいは両方生成されていると考えられる。THPPについては驚いたことに6OMTを用いなくても生成されることがわかった。

更に細かく調べた所、4'OMTに6OMT活性があることがわかった。ただ、生成量は6OMTを用いた方が多いことから、THPP生産には6OMTを利用することを想定した。尚、4'OMTの6OMT活性は、コクラウリン*N*-メチル基転移酵素とともに(*R,S*)-NLSを反応させると(*R*)-レチクリンを生成する¹⁾。これは本研究と直接関係ないが、(*R*)-レチクリンの生成は非常に困難であるため、(*R*)-レチクリン由来の物質生産に利用しうる性質である。

表1 NLSに対するメチル基転移酵素の組み合わせによる反応性

	メチル基転移酵素の組み合わせ															
	6	4'	C	7	6+	6+	6+	4'+	4'+	C+	6+	6+	6+	4'+	4'+	C+
6	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7			○					○	○							○
3'			○					○	○							○
4'		○							○							○
67					○	○		○		○	○	○	○			○
63'			○		○	○		○	○	○	○	○	○			○
64'		○	○		○	○		○	○	○	○	○	○			○
73'			○					○	○							○
74'			○					○	○							○
3'4'																
673'					○	○		○	○		○	○	○			○
674'					○	○		○	○	○	○	○	○			○
63'4'																
73'4'								○			○					○
673'4'																○

2. in vitro での THPP 生成と酵素反応順

4つの酵素を用いれば、THPPを生成することが判明したが、非常に微量にしか作られない。メチル基転移酵素の基質特異性は他の水酸基のメチル化の有無によって変化することが知られている。よって、酵素の反応順が重要であると考えられた。そこで、in vitroにおいて、各酵素発現株の細胞破碎液を用いて、全24通りの反応順を試した所、COMTを一番初めに反応させると良好な生産性が確認された(図2A)。更にCOMT以外の3酵素に関して、順番はさほど関係ないことがわかった(図2B)。よって、THPPはNLS生産菌にCOMTを導入した株及び4'OMT-6OMT-7OMT3酵素発現株の2菌体を用いて段階的に培養すれば生産できることが示唆された。

3. THPPの発酵生産

NLS生産系にCOMTを導入した株を作製し、グルコースからのメチル化NLS生産

を試みた所、メチル化 NLS が検出された。この培養液を 4'OMT-6OMT-7OMT3 酵素発現株の培養液と混ぜ、THPP 生産を試みた所、THPP は検出されなかった。2 種以上のトリメチル NLS が検出されたことから、途中までの生合成経路は構築できていると考えられる。

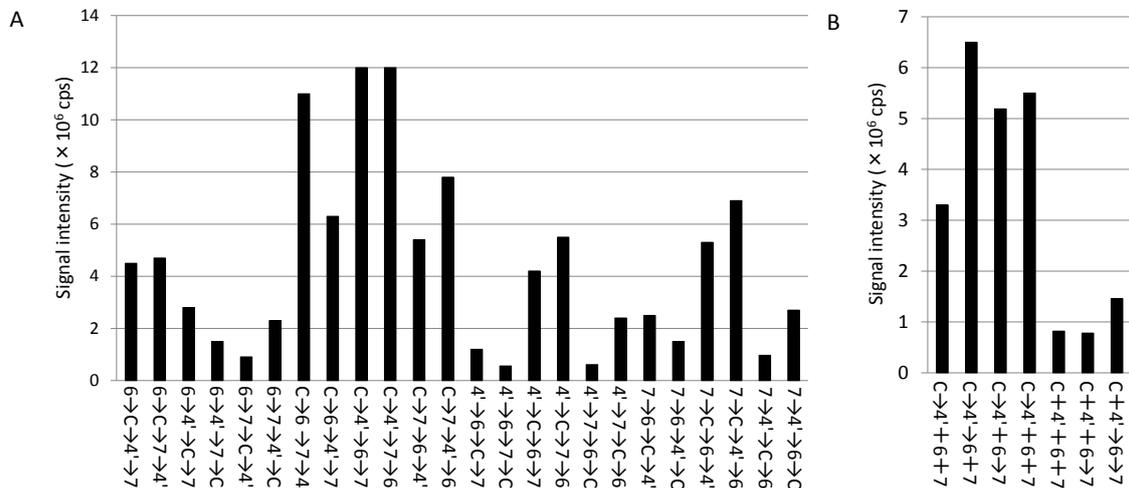


図2 酵素反応順を変えた時のin vitroでのTHPP生成
A. 4段階で各酵素を反応させた。B. C→4'→7→6の順番に関して、まとめられるステップを探索した。→は段階的、+は同時に加えている

結論

今回、THPPの生成には酵素の反応順が重要であることがわかった。今後、どの酵素のどの性質が反応順の重要性を規定しているかを精製基質、精製酵素を用いて明らかにしたい。in vitroではTHPPの生成に成功したが、in vivoでは生産できなかった。1菌体目の反応では、COMTがNLSの基質であるドーパミンに反応してしまい、NLS生産能が落ちていることが予想される。また、2段階目の反応においても、ジメチルNLSが大量に余っており、4'OMT、6OMT、7OMTのいずれかまたはすべての反応性が弱い。各酵素の性状解析等を詳細に行い、系の改良につなげる。

文献

- 1) Nakagawa A, Matsumura E, Koyanagi T, Katayama T, Kawano N, Yoshimatsu K, Yamamoto K, Kumagai H, Sato F, and Minami H (2016) Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli* *Nat Commun* 7:10390