

合成生物学による植物アルカロイド発酵生産と創薬展開

南 博道

石川県立大学 生物資源工学研究所

研究の目的

植物の産生するアルカロイド等の二次代謝産物は、薬理機能が多種多様で身の回りで幅広く利用されており、主に植物体からの抽出によって生産されている。含有量の低さから詳細は明らかにはなっておらず、単体での利用は難しいものが多い。特定のアルカロイドを効率的に生産することが出来れば、これまでは含有量の低さや夾雑物によって明らかになっていない新たな生理活性を見出すことが可能であり、創薬研究の有効な手段となりうる。

本研究では、高価な基質の添加を必要としない微生物発酵法によるアルカロイド実用生産システムの構築と希少な生薬有効成分の効率的な利用方法の開発を目的とする。特に医薬品原料として重要なモルフィナンアルカロイド（テバイン）の微生物発酵法による実用生産を行う。また、生薬有効成分であるマグノフロリンやサンギナリンを始めとした特定の希少アルカロイドを多量に生産し、新たな生理活性を見出すことで創薬の新たな展開を試みる。さらには任意の生合成遺伝子を組み合わせで導入（コンビナトリアル生合成）し、ユニット型の生産システムを構築することで、新規生理活性物質を短期間、安価に生産するための実用生産システムを確立する。

方法

これまでに植物体に微量にしか含まれないレチクリン（イソキノリンアルカロイド中間体）を、安価なグルコースから 165.9 mg/L 生産することに成功している¹⁾。しかし、構築した生産システムは生合成酵素の発現にプラスミドを用いており、安定性に問題があった。そこで、より安定な生産システム構築のために、アルカロイド生合成経路を大腸菌ゲノム上に構築した。レチクリンまでの生合成遺伝子(12種類)を各々T7プロモーターと共に順次、ゲノムに挿入し、グルコースからのゲノム挿入型のレチクリン生産株を構築した。ジャーファーマンターを用いた培養条件の最適化を行うことで、g/L オーダーの生産量の実用生産システムを確立した。

次に、医薬品原料として重要なモルフィナンアルカロイドやマグノフロリン等の希少アルカロイドの生産を検討した。レチクリンからの各アルカロイドに対する生合成酵素については、プラスミドを用いた大腸菌での発現に成功しており、その利用に問題はない。ただし、ゲノム上での生合成経路の構築が難しい場合は、プラスミドを用いた生合成経路を構築した。

結果

レチクリンまでの生合成遺伝子（12種類）を各々T7プロモーターと共に順次、大腸菌ゲノムに挿入し、グルコースからのレチクリン生合成経路を構築した（図1）。ジャーファーメンターを用いた培養の結果、3g/Lのレチクリン生産に成功した。

次に、レチクリンからテバインまでの生合成遺伝子8種類を、構築したレチクリン高生産大腸菌ゲノムに挿入し、グルコースからのテバイン生合成経路を構築した（図1）。しかしながら、テバインの生産は確認できなかった。そこで、3つのプラスミドに生合成遺伝子8種類を分割して組み込み、レチクリン高生産大腸菌に導入することでテバイン生産株を構築した結果、40.6mg/Lのテバインが生産された。

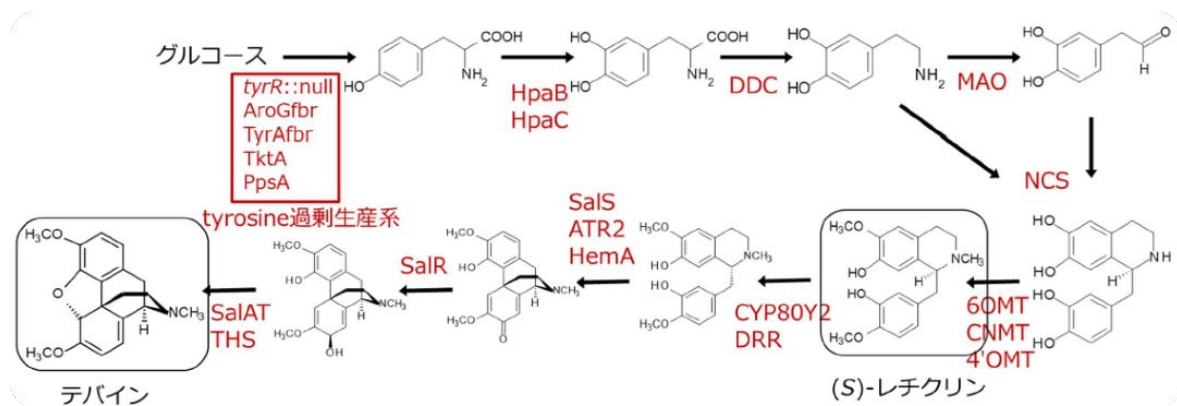


図1 大腸菌におけるテバイン生合成経路の構築

さらに、本研究はレチクリン生産株をプラットフォームとして、様々なイソキノリンアルカロイドを生産することを目的としている（図2）。そこで、レチクリン生産株にマグノフロリン生合成遺伝子2種類を導入することで、グルコースからのマグノフロリン生合成経路を構築した。培養条件を検討した結果、10mg/Lのマグノフロリン生産に成功した。

結論

大腸菌を用いて、イソキノリンアルカロイド（レチクリン、テバイン、マグノフロリン）の微生物発酵生産に成功した。本生産システムは20段階の外来遺伝子を導入したモデルケースであり、独自性と優位性を持ったデータの取得や開発精度の向上が可能となる。レチクリンに関しては3g/Lの生産に成功しており、他の化合物も生産効率を改善させることで、これまでは難しかった様々な二次代謝産物の微生物発酵法による実用生産が幅広く展開されるものと考えられる。

文献

- 1) Matsumura E. *et al.* (2018) Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. *Scientific Reports* 8: Article number 7980.

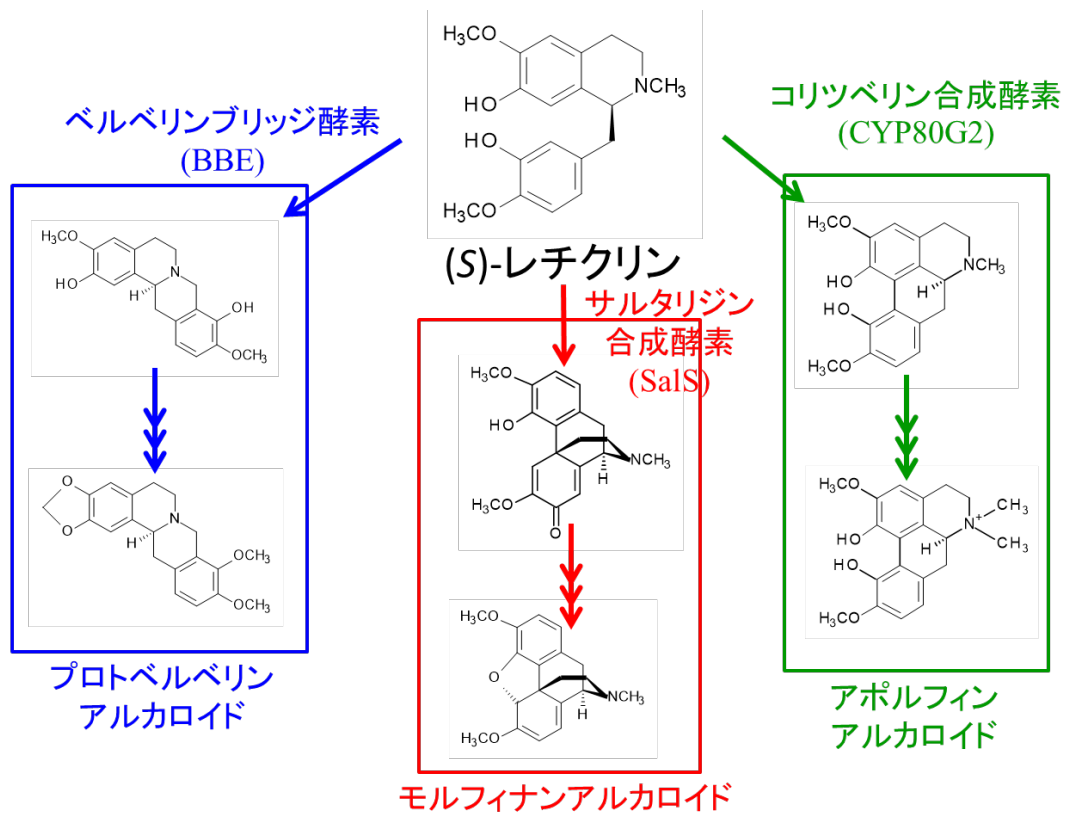


図 2 イソキノリンアルカロイドの主要な 3 グループ