

オピオイド系鎮痛剤の原料テバインの大腸菌を用いた生産系の構築

研究代表者

中川 明 石川県立大学生物資源工学研究所 講師



1. 研究の背景と達成目標

オピオイド系鎮痛剤は、ケシの抽出物に含まれる成分であり、古代より痛みの緩和に用いられてきた。現代では、歯痛から末期がんまで、しつこくて強い痛みの緩和に処方されており、その需要はこの 10 年で 3 倍にも膨れ上がっていた。オピオイド系鎮痛剤は主にテバインから化学合成により生産されるが、原料のテバインは植物からの抽出に依っているため、化学合成により生産される NSAIDs 系鎮痛剤ロキソプロフェンに比べ、オピオイド系鎮痛剤オキシコドンは 1000 倍近く高価である。鎮痛剤は根治治療薬でないため、罹患者は症状が緩和するまで摂取し続けなければならない、QOL 向上のためにもオピオイド系鎮痛剤の安価な供給系の確立が望まれている。本研究では植物に比べ培養の容易な大腸菌を用いたテバイン生産系を構築し、安価にテバインを実用生産することを目的としていた。大義の達成目標としては、200 mg/L のテバイン生産であり、更にその過程で、多段階反応系を菌に導入する際の遺伝子の並び順やタンパク質過剰発現によるストレス耐性の機構を明らかにできると考えていた。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・テバインを、大腸菌を用いて 1 菌体で 182 mg/L 生産し、現時点で報告のある世界記録である 6.4 μg/L の 30000 倍もの生産量を誇り、世界で最も実用化に近いテバインの微生物生産系である。
- ・遺伝子の導入について、発現干渉が引き起こされることを見出し、シス型、トランス型等複数のメカニズムが複雑に絡んでいることを示唆できた。このような現象はまだ報告されておらず、今後、合成生物学分野で盛んに用いられると考えられる、多数の遺伝子導入系における基礎的なデータとなりうる。
- ・タンパク質過剰発現耐性菌には変異が見出されなかった。昨今報告のある非遺伝学的適応進化と呼ばれる現象である可能性があり、今後の展開によってはインパクトのある結果が得られる可能性がある。

3. 研究成果

MS1: テバイン生合成遺伝子の大腸菌への導入

当初は、テバインを生産に必要な 20 遺伝子を大腸菌のゲノムに挿入することを想定していた。しかし、20 個の遺伝子全てを導入することは叶わなかった。その原因として、導入遺伝子が増えるごとに各遺伝子に共通するプロモーター配列や遺伝子間配列がゲノム上に多数存在してしまうことにより、目的外の相同組み換えが起こってしまうことが考えられた。結果として、(9)-レチクリン合成までの 12 遺伝子をゲノムに導入した株をベースに残りの 8 遺伝子をプラスミドで導入し、テバインを生産する大腸菌を構築した。

MS2: 遺伝子の並び順の最適化

遺伝子の並び順がどのように生産量に影響するかのメカニズムを解明するため、解析のしやすいサルタリジンからテバインを生成する 3 酵素遺伝子(SalR, SalAT, THS1)をモデルとした。解析の結果、SalAT が高発現しやすく、他の 2 つの遺伝子発現を弱める作用があった。この現象は SalAT を別プラスミドから発現させても起こる

ことから、シスだけでなくトランスにも作用することがわかった。一方で(S)-レチクリンから1,2-ジヒドロキシレチクリニウムを生成するDRSは、その上流にある遺伝子発現を阻害するが、下流には影響を及ぼさず、また、トランスでは作用しないことがわかった。このように、複数の遺伝子を導入すると、他の遺伝子発現に干渉し、そのメカニズムは複数存在していることが示唆された。

MS3: タンパク質高発現耐性菌の解析

当研究室で単離されたタンパク質高発現耐性菌のゲノムシーケンスをイルミナで2回、ナノポアで1回解析したが、いずれもゲノムシーケンスに変異は確認されなかった。しかし、本菌株に(S)-レチクリン生産系をゲノムに挿入したところ、親株に比べ2倍の生産を示したことから、本菌株の解析はテバイン生産のみならず物質生産技術全般において非常に重要であることが示唆された。

テバインの1菌体での生産

2020年にカナダの研究チームから酵母を用いてテバインの前駆体である(S)-レチクリンを4.6 g/Lもの大量生産に成功したことが報告された。我々は大腸菌で0.6 g/Lしか生産できておらず、大腸菌を用いる意義の根幹にかかわるために、急速に、(S)-レチクリン生産性向上を試みた。宿主大腸菌の種類を変え、中間代謝産物の3,4-DHPAA分解系を遮断することにより、3.0 g/Lと酵母と同等の生産性を実現した(図1)。この(S)-レチクリン生産菌を用いてテバイン生産を試みたところ、

182 mg/Lのテバインを生産し、概ね、当初の目標値200 mg/L近い生産能を付与できた(図2)。

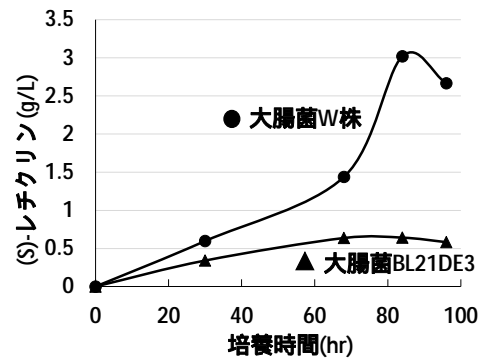


図1 (S)-レチクリン生産系の改良

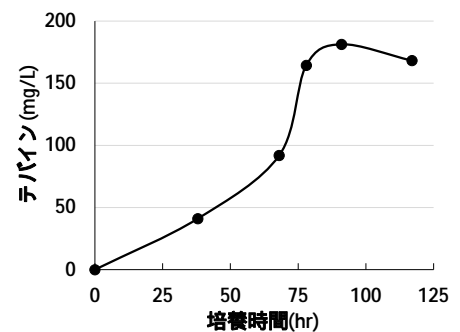


図2 テバインの生産

4. 今後の展開

今回のテバイン生産系は学術的に意義が大きいが、実用化を目指すとなると、まだまだ道のりは長い。特にプラスミドを用いると株が不安定で抗生物質のコストも高く付くため、全遺伝子ゲノム挿入型の菌株を開発する必要があり新たな遺伝子組み換え法の開発が必要である。多数遺伝子導入における問題点を挙げる事ができたことは、テバインのみならず、他の物質生産技術や人工生命における研究分野に重要な知見となりうるため、今後、問題点の発生メカニズムを解明することは非常に重要であると考えられる。タンパク質高発現耐性菌については、発現解析等により、野生株との差異を明らかにし、非遺伝学的適応進化分野にも貢献したいと考えている。更なる研究を重ね、4年以内に実用生産レベル5 g/Lのテバイン生産を実現したい。

5. 発表実績

1. Urui M, Yamada Y, Ikeda Y, Nakagawa A, Sato F, Minami H, Shitan N. "Establishment of a co-culture system using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) for valuable alkaloid production." *Microb Cell Fact.* 2021;20(1):200.
2. Yamada Y, Urui M, Oki H, Inoue K, Matsui H, Ikeda Y, Nakagawa A, Sato F, Minami H, Shitan N. "Transport engineering for improving the production and secretion of valuable alkaloids in *Escherichia coli*." *Metab Eng Commun.* 2021;13:e00184.
3. Nakagawa A, Nakamura S, Matsumura E, Yashima Y, Takao M, Aburatani S, Yaoi K, Katayama T, Minami H. "Selection of the optimal tyrosine hydroxylation enzyme for (S)-reticuline production in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021;105(13):5433-5447.