

微生物発酵法による植物アルカロイド生産とその応用



石川県立大学生物資源工学研究所 助教 南 博 道

はじめに

高等植物はアルカロイド、テルペノイド、フラボノイドなどのさまざまな有用二次代謝産物を産生する。多様な二次代謝産物のなかでも、アルカロイドは少量で顕著な生理活性を示すため、市販されている医薬品原料として非常に高い需要がある。植物の産生する約 12,000 種類のアルカロイドの中で、イソキノリンアルカロイド (IQA) と呼ばれるグループは、インドールアルカロイドと並んで最も大きな一群を構成しており、モルヒネやコデインをはじめ、多くの薬理的に有用な化合物を含む (図 1)。一般にアルカロイド種は含窒素複素環をもつ天然高分子で、光学活性を有し化学構造が複雑なために、化学合成による大量生産は困難であり、植物体からの抽出が主な生産法である。しかし、アルカロイドは植物体に乾燥重量の数パーセント程度しか含まれていないものも多く、さらに植物体の生育には数カ月～数年を要するため、大量に供給する方法が検討されている。

1. 微生物におけるイソキノリンアルカロイド生合成システムの構築

植物抽出に替わる生産方法として、筆者らは、植物の IQA 生合成酵素と微生物由来のモノアミン酸化酵素 (MAO) を大腸菌内で組み合わせ、ドーパミンを出発物質とした改変型のレチクリン生合成経路を構築し、ドーパミンからレチクリンが合成できることを明らかにした (図 2(a))。レチクリンは、IQA の中間体であるだけでなく、抗細菌剤、抗マラリア剤、抗がん剤の重要な前駆物質でもある。植物の IQA 生合成においては、チロシンを出発材料とし、norcoclaurine synthase (NCS) によるドーパミンと 4-hydroxyphenylacetaldehyde (4-HPAA) との縮合反応の後、レチクリンが生合成され、さらにさまざまな IQA が生合成される (図 2(b))。筆者らが構築した改変型経路では、簡単な基質であるドーパミンのみを材料とし、その MAO による反応産物である 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (3,4-DHPAA) を NCS 反応の基質とすることで、小胞体局在酵素である CYP80B (水酸化反応) を省略した生合成が可能となった。

培地に基質を添加する *in vivo* での生産では、20 時間で 5

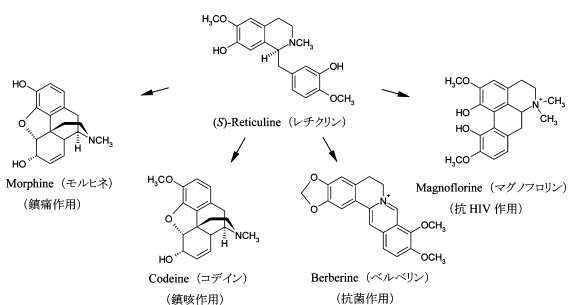
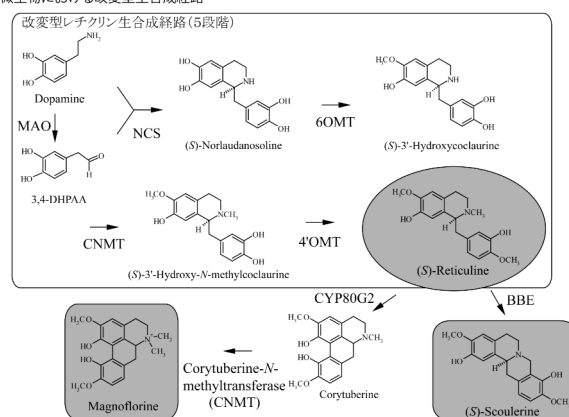


図 1 植物の産生する有用イソキノリンアルカロイド

mM のドーパミンから培地中に 11 mg/L の (R,S)-レチクリンが産生された。NCS は (S) 特異的な反応を行うが、改変された大腸菌中でラセミ体のレチクリンが合成された要因としては、植物では NCS 反応の基質となるドーパミンは液胞内に蓄積され、その反応が酵素的に制御されているのに対し、大腸菌内においては、ドーパミンと 3,4-DHPAA との非酵素的な縮合が起こったものと考えられた。一方、粗酵素液を用いた *in vitro* での合成では、1 時間の反応で 5 mM のドーパミンから 55 mg/L の (S)-レチクリンが産生された。化学合成では不斉合成が生産の課題となることが多いが、*in vitro* での酵素合成法を用いることで、生物活性において極めて重要な光学活性体を短時間に効率よく生産できることが示された。

さらに、CYP80G2 と CNMT 酵素を導入した酵母との共培養系を用いることにより、抗 HIV 作用およびアテローム動脈硬化症の進行抑制効果が期待されるアポルフィン型アルカロイド (マグノフロリン) を、ドーパミンを基質として 72 時間の培養で培地中に 7.2 mg/L 合成することにも成功した (図 2(a))。一方、プロトベルリン型アルカロイド (スコウレリン) を、スコウレリン生合成酵素 (BBE) を導入した酵母との共培養により、48 時間の培養で培地中に 8.3 mg/L 合成することにも成功している (図 2(a))。共培養法の利点は、大腸菌では発現が困難な生合成酵素を酵母で発現させることで、これらの生合成系の発現が容易となること、また共培養する酵母を任意に変えることで、多様な IQA の生産が可能になることがあ

(a) 微生物における改変型生合成経路



(b) 植物のレチクリン生合成経路 (9段階)

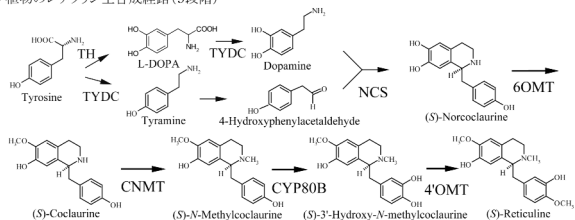


図 2 微生物における改変型生合成経路 (a) と植物のレチクリン生合成経路 (b)

る。

2. 微生物発酵法によるイソキノリンアルカロイド生産

微生物においてもアルカロイド合成が可能であることが示されたが、実用生産には、より安価な基質の利用が不可欠と考えられた。そこで、安価で入手しやすい基質であるグルコースからのレチクリン生産、すなわち微生物発酵法による生産システムの構築を行った。具体的には、i) チロシン生産大腸菌の作製、ii) チロシンからドーパミンまでの人工生合成経路の作製を行い、すでに確立済みであるドーパミンからのアルカロイド生産システムに付加することで、生産システムを構築した (図3)。

大腸菌におけるチロシン生産については、多数の試みがなされている。例えば、大腸菌の芳香族アミノ酸代謝に関わる遺伝子群全般の発現を制御するDNA結合型の転写調節因子 (*tyrR* 遺伝子) を欠損させることで、チロシン生産菌が得られる。さらに、シキミ酸生合成経路において、フィードバック阻害耐性 (*fbr*) の3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase (*fbr*-DAHPS: *aroG^{fbr}*) と mutase/prephenate dehydrogenase (*fbr*-CM/PDH: *tyrA^{fbr}*), および phosphoenolpyruvate (PEP) synthetase (PEPS: *ppsA*) と transketolase (TKT: *tktA*) を大量発現させることで、チロシン生産量が増加する。これらの方法を利用して構築したチロシン高生産大腸菌では、チロシンが培地中に4.17 g/L生産された。

植物の IQA 生合成経路では、チロシンからアミンとアルデヒドが合成され、NCS による縮合反応によりイソキノリン骨格が形成される (図2(b))。この生合成経路において、チロシンからドーパへの反応を触媒するチロシン水酸化酵素 (TH) はテトラヒドロピオプテリンを補酵素として必要とする。しかし、大腸菌にはその生合成酵素が存在しないため、新たにその生合成経路を構築する必要があった。また、アルカロイド生合成経路におけるチロシン・ドーパ脱炭酸酵素 (TYDC) はドーパだけでなく、チロシンに対しても活性を有しており、ドーパからのドーパミン生産だけでなく、チロシンからチラミンへと生合成経路が流れてしまう可能性があった。そこで、チロシン

からドーパミンまでの生合成経路を微生物由来のチロシナーゼ (TYR) とドーパ脱炭酸酵素 (DODC) で構築した (図3)。TYR によりチロシンからドーパが、DODC によりドーパからドーパミンが生合成される。TYR はドーパへの変換を触媒するだけでなく、さらにドーパをドーパキノンへと変換するためドーパ生産には適さないが、DODC を組み合わせることでドーパミンへの変換に成功した。チロシン生産大腸菌に、*Streptomyces castaneoglobisporus* 由来 TYR および *Pseudomonas putida* strain KT2440 由来 DODC を導入することで、ドーパミンが培地中に260 mg/L生産された。

上記のドーパミン生産大腸菌に、ドーパミンからのレチクリン生合成遺伝子 (MAO, NCS, 6OMT, CNMT, 4OMT) を導入することで、微生物発酵法によるレチクリン生産システムを確立した。80時間の培養で、培地中のグルコースから2.2 mg/Lの(S)-レチクリンが生産された (図4)。野生型大腸菌では0.5 mg/Lの生産量であり、チロシンを高生産することにより効率的にレチクリンが生産されることが示された。炭素源としてグリセロールを含む培地を用いて培養した場合には、80時間における(S)-レチクリンの収量は6.2 mg/Lに増大し、これはグルコースを用いた生産量よりも約3倍高かった。さらに、この生産システムに、ドーパからドーパキノンへの酸化活性の低い *Ralstonia solanacearum* 由来 TYR を導入することで、15 g/Lのグリセロールからのレチクリン合成活性を大幅に向上 (46 mg/L) することにも成功している。

ドーパミンからの *in vivo* 生産システムではレチクリンがラセミ体として生産されたのに対し、微生物発酵法によるシステムでは、(S)-レチクリンのみが生産された。また、培養中、中間体としてチロシンが蓄積したが、ドーパおよびドーパミンの蓄積は観察されなかった。ドーパミンが蓄積しないことにより、ドーパミンと3,4-DHPAAとが非酵素的に縮合反応を起こすことなく、NCSの触媒作用により(S)-体特異的なノルラウダノソリンが生成された結果、(S)-レチクリンのみが得られるものと考えられた。微生物発酵法によるレチクリン生産は、光学的に活性な(S)-レチクリンを、植物培養細胞の培養または遺伝子組換え植物による生産 (通常、数カ月から数年程度の期間を要する) よりも速く (2~3日)、生産することが可能である。また、炭素源として用いるグルコースやグリセロールは、ドーパミンなど比較して格段に安価で入手が容易である。微生物発酵法の確立により、(S)-レチクリンの生産が工業的に実用

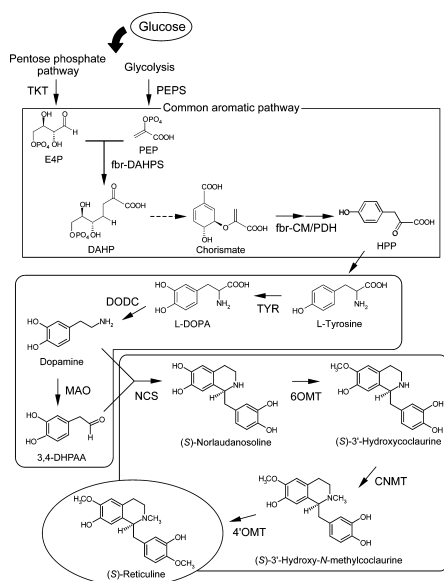


図3 大腸菌におけるグルコースからのレチクリン生合成経路

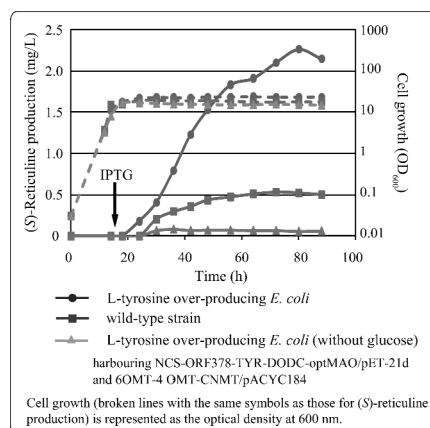


図4 微生物発酵法によるグルコースからのレチクリン生産

可能なものとなったと考えている。

おわりに

芳香族アミノ酸を出発材料として多様な植物二次代謝産物が合成されていることを考えると、今回開発した微生物発酵プラットフォームは、植物アルカロイドのみならず、多様な有用物質生産にも応用可能である。効率化された微生物発酵法による有用物質生産は、新たな生物産業の創出に向けた生物機能利用技術開発の基本的な戦略として重要である。特に、医薬的に重要なアルカロイドの微生物発酵法の確立は、需要の高まる医薬品への安定した供給方法になるだけでなく、創薬研究における新たな展開に貢献できるものと期待される。

本研究は、石川県立大学生物資源工学研究所応用微生物工学研究室において実施したものです。本研究を行う機会を与えていただき、学生時代からご指導ご鞭撻を賜りました熊谷英彦先

生（現 石川県立大学特任教授）に心より御礼申し上げます。また、京都大学において、博士研究員として在籍の機会をいただき、その後も共同研究者としてご指導いただきました京都大学大学院生命科学研究科教授・佐藤文彦先生に深く感謝いたします。学生時代から長年にわたり数々の激励と暖かいご助言を賜りました山本憲二先生（現 石川県立大学教授）、鈴木秀之先生（現 京都工芸繊維大学教授）、玉置尚徳先生（現 鹿児島大学准教授）、片山高嶺先生（現 石川県立大学准教授）に感謝いたします。本研究を遂行するにあたっては、中川 明博士（石川県立大学）をはじめ、多くの共同研究者ならびに研究室のメンバー、卒業生の皆様のご協力によって成り立っています。この場を借りて、深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました山本憲二先生ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。