

モルヒネの発酵生産

佐藤 康治

植物はさまざまな二次代謝物を産生する。それらの中には、香料、染料、医薬品、サプリメントなどの原料として利用され、我々の生活に欠かせない化合物が多数ある。二次代謝物は植物から抽出・精製されるが、天候や病害の影響、蓄積量の低さなどの理由により、安定かつ安価な供給が困難な化合物もある。たとえば、ヨモギ属植物であるクソニンジンより抽出されるアルテミシニン¹⁾は抗マラリア薬原料として利用されているが、高価であり、患者全員が十分な治療を受けられる環境にはなかった。しかし近年、合成生物学的手法を駆使することでこの状況が打開された。Keaslingらは遺伝子組換えが容易な大腸菌や酵母にその生合成経路を再構築し、アルテミシニンの前駆物質であるアルテミシニン酸の効率的な発酵生産に成功した¹⁾。これは有機合成的にアルテミシニンへと容易に変換される。これを皮切りとし、現在は植物が産生する有用二次代謝物の発酵生産法の研究開発が進められている。

次なるターゲットの一つとして、ケシから得られる鎮痛剤モルヒネがあげられる。近年、Fossatiらは酵母を用いてモルヒネ生合成経路の中間体レチクリンからモルヒネを合成することに成功した²⁾。これは効率的なレチクリン供給経路を構築できれば、モルヒネの発酵生産が実現されることを意味する。レチクリンはチロシンを出発として9ステップにて生合成されるが、酵母を宿主としたジヒドロキシフェニルアラニン（ドパ）合成法がこれまでに報告されておらず、その構築が課題であった。

ドパ合成酵素としては、動物における脳内情報伝達物質ドパミンの生合成に関与するチロシン水酸化酵素および褐色色素メラニンの合成に関与するチロシナーゼが知

られている。チロシン水酸化酵素は補酵素としてテトラヒドロbioプテリンを要求するが、酵母は産生しない。そこでTrenchardらはチロシン水酸化酵素遺伝子に加え、動物由来テトラヒドロbioプテリン生合成および再生関連遺伝子を組み込むことでドパ合成に成功した³⁾。さらにメチル基転移酵素やシトクロムP450を導入しレチクリン生産にも成功した。

チロシナーゼは酸素分子の原子一つをチロシンの水酸化に使用しドパを生成（図1、反応①）、もう一方をドパの酸化に使用する（反応②）ため、ドパキノンが最終生成物となる。これらの反応は独立していることから、DeLoacheらはチロシナーゼの触媒する反応②の速度を低下させた変異酵素を取得し、ドパ合成する系を考案した⁴⁾。変異酵素のスクリーニングのため、テンサイが産生する赤色色素ベタニジン生合成経路に着目し、それを酵母に再構築した（図1、ドパからシトクロムP450によりシクロドパ（反応③）、またドパ酸化酵素によりベトラミン酸（反応④）が生成される。それらは自発的に縮合してベタニジン（赤色、反応⑤）となる）。この組換え酵母をドパ含有培地で培養した場合、培養液は予想通り赤色を呈した。一方、ドパ不含培地では黄色を呈した。解析の結果、この色素はベトラミン酸とアミノ酸が縮合したベタキササンチン（図1、反応⑥）と判明した。この結果はテンサイ由来シトクロムP450が内在性チロシンからドパを生成したことを示し、筆者らはチロシン水酸化化活性を偶然発見したのである。したがって、シトクロムP450は反応①と③の異なる二つの反応を触媒することがわかった。

また、この結果は反応③より④が優先的に進行した場合、黄色を呈することを示している。そこで筆者らはこの色の変化を指標として、先に述べたチロシナーゼおよびシトクロムP450のドパ酸化活性（反応②③）を低下させた変異酵素の取得を試みた。そして進化工学的手法を用い、シトクロムP450から高いチロシン水酸化化活性のみをもつ酵素の開発に成功した。さらに本酵素を用いレチクリン生産も確認した。

以上のように、モルヒネ生合成経路すべてが再構築された。モルヒネが発酵生産される日も近い。

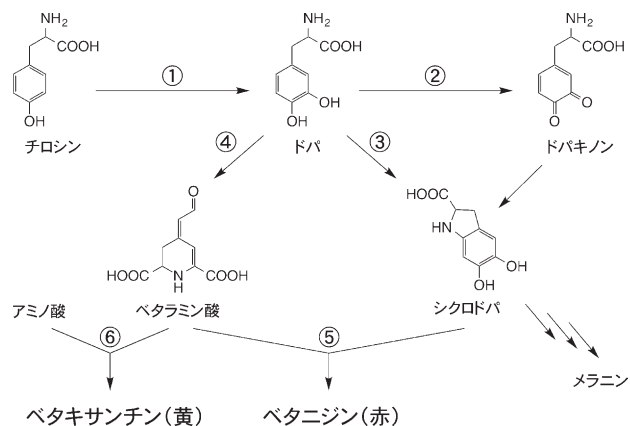


図1. チロシンからの色素形成反応

- 1) Paddon, C. J. and Keasling, J. D.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 355 (2014).
- 2) Fossati, E. et al.: *PLoS ONE*, **10**, e0124459 (2015).
- 3) Trenchard, I. J. et al.: *Metab. Eng.*, **31**, 74 (2015).
- 4) DeLoache, W. C. et al.: *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 465 (2015).