

持続可能な植物由来医薬品供給のための 乳酸菌利用技術の開発

東京電機大学 理工学部 理工学科 生命科学系

高橋 俊介

1. はじめに

近年、ゲノム解析やゲノム編集技術の進展に加え、人工知能（AI）や情報科学をはじめとするデジタル技術との融合が急速に進んでいる。これにより、バイオテクノロジーは医療、環境、エネルギーなどの分野における新たな産業基盤として、世界的に注目を集めている。こうした潮流の中で、「バイオエコノミー社会」の実現に向けた取り組みが各国で加速しており、日本においても、2030 年までに世界最先端のバイオエコノミー社会を構築することが国家戦略として掲げられている。このような背景のもと、『第五次産業革命』とも称されるバイオ産業分野において、日本が国際的な競争力を発揮するためには、バイオテクノロジーとデジタル技術を融合させた革新的な技術開発が不可欠である。とりわけ、近年急速に発展している分野として注目されているのが「合成生物学」である。合成生物学は、ゲノム解析・編集・合成などの技術を基盤とし、生物の代謝機能や遺伝子回路を人工的に設計・構築するものであり、その応用範囲は医療、環境、エネルギーなど多岐にわたる。中でも、植物由来の二次代謝産物であるベンジルイソキノリンアルカロイド (benzylisoquinoline alkaloids: BIA) は、モルヒネ（鎮痛）、ノスカピン（抗がん）、ベルベリン（抗炎症・抗血管新生）など、薬理活性を有する多くの医薬品候補を含んでおり、合成生物学的手法による発酵生産のモデルケースとして高い注目を集めている（1）。

報告者はこれまでに、合成生物学の設計・構築・評価・学習（DBTL）サイクルに機械学習を統合し、BIA 生産に関与する酵素の機能を予測するモデルを開発してきた。その結果、未解明であった代謝の「ミッシングリンク」を担う新規酵素の発見や、酵素活性の改変による代謝経路の最適化に成功し、BIA の前駆体であるレクチリンの高効率生産技術を大腸菌において確立した（2,3）。

本研究では、こうした BIA 生産に関する基盤技術をさらに発展させ、持続可能かつ患者に優しい医薬品供給システムの構築を目指した。特に、従来の経口投与や注射による薬剤投与において課題となる、投与量の過剰、治療効果の持続性の不足、侵襲性の高さなどを解決するために、BIA 医薬品原料を腸内で局所的に生産可能とするプロバイオティクス乳酸菌を活用した新たな技術開発に取り組んだ。

2. これまでの植物由来医薬品原料生産の課題

人類は古来より、植物を薬用資源として活用してきた。現代においても、薬用植物に含まれる多様な二次代謝産物は、薬理活性を有する重要な医薬品原料として広く利用されている。これらの天然化合物の多くは、化学構造が明らかにされており、有機合成によって再現・誘導体化され、新規医薬品として応用されてきた実績がある。一方で、モルヒネ（鎮痛）、ノスカピ

ン（抗がん）、ベルベリン（抗炎症・抗血管新生）などの薬理活性をもつベンジルイソキノリンアルカロイド（benzylisoquinoline alkaloids: BIA）の一部については、分子構造の複雑さから化学合成が困難であり、依然として植物からの抽出に依存しているのが現状である。

このような植物由来化合物の供給には、長期間にわたる栽培、広大な農地の確保、収穫後の乾燥・抽出・精製といった煩雑な工程が必要とされ、生産コストの高さや品質のばらつきといった課題を伴う。また、天候不順や気候変動などの外的要因によって収量が左右されるため、安定供給が難しいという側面もある。加えて、大規模な農業生産および工業的な抽出処理によって生じる環境負荷も無視できない。このような背景から、BIA をはじめとする植物由来医薬品原料を、より安定的かつ持続可能に生産するための代替技術の確立は、長年にわたって医薬・創薬分野における重要課題とされてきた。

3. 医薬品生産プラットフォームとしての乳酸菌の特性と有用性

乳酸菌（Lactic Acid Bacteria: LAB）は、グラム陽性の非孢子形成性細菌であり、発酵食品の製造やヒト腸内の常在菌として広く知られている。グラム陽性菌は、細胞膜の外側に厚いペプチドグリカン層を持ち、グラム陰性菌に見られる外膜を有していない。この構造的特徴により、細胞外分泌経路が単純であり、外来タンパク質の分泌が比較的容易であることが報告されている（4）。また、タンパク質分泌の制御には、リボソームで合成されたタンパク質の N 末端に存在するシグナルペプチドが重要な役割を果たし、細胞内外の局在を決定する（5）。代謝的観点からは、乳酸菌はホモ乳酸発酵およびヘテロ乳酸発酵の 2 種の経路を活用して、乳酸、CO₂、酢酸、エタノールなどの産生を行う。このような代謝的柔軟性により、糖資源の利用効率や環境条件に応じた発酵プロセスの制御が可能となる（6）。さらに、乳酸菌は通性嫌気性あるいは微好気性の性質を有し、食品環境に限らず、動物の消化管、特に小腸から大腸にかけての過酷な環境下でも高い生存性と定着性を示す。胃酸、胆汁、消化酵素といった腸管通過時の障害因子に対しても耐性を持ち、特定の菌株においては、これらへの応答性に関わる遺伝子群が同定されている（7）。加えて、乳酸菌は病原性を持たないことから「GRAS（Generally Recognized As Safe）」に指定されており、経口摂取における高い安全性が保証されている。特に一部の乳酸菌株は、腸内環境を整えるほか、免疫系への作用を通じて健康維持や疾病予防に寄与する「プロバイオティクス」としての機能を有することが知られている（8）。

以上のように、乳酸菌は（1）外来遺伝子の発現・分泌が容易であること、（2）腸内への定着性が高いこと、（3）代謝経路に多様性があること、（4）ヒトに対する安全性が高いこと、という 4 つの特性を兼ね備えており、体内で有用物質を持続的に生産する生体内製剤のプラットフォームとして極めて有望である。

本研究では、これらの特性を活かし、医薬品原料であるベンジルイソキノリンアルカロイド（BIA）の一種を腸内で生産可能なプロバイオティクス乳酸菌株の開発を試みた。従来の外部投与型薬剤とは異なり、腸内で直接有効成分を産生・放出する「体内型ドラッグデリバリーシステム」として応用することで、治療効果の持続性向上、副作用の軽減、ならびに患者 QOL の改善が期待される。

4. 乳酸菌株の遺伝子導入法の最適化

本研究では、乳酸菌に医薬品原料生産能を付与するための基盤技術として、外来遺伝子導入法の最適化に取り組んだ。対象とした菌株は、ゲノム情報が整備されており、遺伝子の安定性にも優れる *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 株（以下、NCIMB 株）である。遺伝子導入には、大腸菌および乳酸菌の双方で複製可能なシャトルベクター pTRKH2（Addgene plasmid #71312）を用いた（9）。導入手法としては、乳酸菌への形質転換に一般的に用いられるエレクトロポレーション法を採用し、その導入効率に関する最適条件の検討を行った。

具体的には、NCIMB 株を嫌気条件下で前培養した後、電気穿孔処理用のコンピテントセルを調製し、ECM399 型パルサー（BTX）を用いてエレクトロポレーションを実施した。印加電圧は 1.0 kV、1.5 kV、2.0 kV の 3 条件で設定し、導入効率を比較検討した。処理後には回復培養（3 時間）を行い、選択マーカーとしてエリスロマイシンを添加した MRS 寒天培地上でコロニー形成を確認した。その結果、印加電圧 1.0 kV、プラスミド DNA 量 2 µg の条件で最も高い形質転換効率を得られた（図 1）。これにより、NCIMB 株に対する安定かつ効率的な遺伝子導入条件を確立し、今後の目的遺伝子の発現系構築および機能評価に向けた技術的基盤を整備することができた。

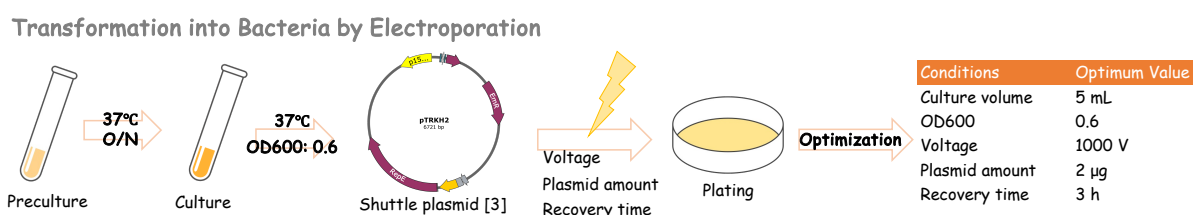


図 1 乳酸菌 NCIMB 株での遺伝子導入法の最適条件の探索の概要図

4. CRISPR-Cas9 による医薬品原料生産特化型乳酸菌プラットフォーム株の開発

医薬品原料を乳酸菌で生産するためには、目的物質の高効率な生産に適したプラットフォーム株の構築が不可欠である。一般的な乳酸菌は、糖資源を主に乳酸へと変換する代謝特性を有しており、外来化合物の生産において糖が乳酸合成に大量に消費されることが、生産効率の低下を招く一因となっている。また、過剰な乳酸の蓄積は培養液の pH を著しく低下させ、菌体の増殖や生存を阻害することが知られている。従来は、アルカリ剤を添加して pH を中和する方法が採られてきたが、乳酸自体が乳酸菌に対して毒性を持つ可能性も報告されており、代謝レベルでの制御による根本的な解決が求められていた。そこで本研究では、乳酸代謝を遺伝子レベルで抑制することにより、糖資源を目的化合物の生産に優先的に利用させると同時に、培地の酸性化を防止することを目的としたプラットフォーム株の開発に取り組んだ。

乳酸生成の主要酵素である L-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhL1) および D-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhD) をそれぞれコードする遺伝子を標的とし、CRISPR-Cas9 システムを用いてゲノム編集を行った。なお、NCIMB 株においては DNA 2 本鎖切断 (Double-Strand Break: DSB) 後の相

同組換え修復（Homology-Directed Repair: HDR）効率が低く、そのままでは細胞死が生じやすいという課題がある。この課題に対し、HDR を支援する目的で、5'→3'エキソヌクレアーゼ酵素 RecE および生成された 1 本鎖 DNA に結合して相同組換えを促進する RecT をコードするプラスミドをあらかじめ導入する戦略を採用した。これにより、NCIMB 株における HDR 活性を補強し、効率的なゲノム編集を実現した。

実験手順としては、まず RecE/RecT 遺伝子を搭載したプラスミドをエレクトロポレーションにより NCIMB 株に導入し、クロラムフェニコールを添加した MRS 培地で選抜を行った。続いて、Cas9、標的ガイド RNA、ならびに相同配列領域を含む CRISPR-Cas9 ベクターを導入し、エリスロマイシンおよびクロラムフェニコールの 2 重選択条件で選抜した（図 2）。得られたコロニーをゲノム PCR により解析した結果、ldhL1 遺伝子の欠損を確認することができた。同様に、ldhD 遺伝子を標的とする CRISPR-Cas9 ベクターを構築し、同一の手法を用いて遺伝子破壊を行った結果、ldhL1 および ldhD の両遺伝子を欠損した 2 重ノックアウト株の取得に成功した（図 2）。

これにより、乳酸生成を抑制した医薬品原料生産に特化した乳酸菌プラットフォーム株の開発が実現し、今後の外来遺伝子導入による目的物質生産に向けた基盤を確立することができた。

5. 乳酸生産能欠損乳酸菌株の好気および嫌気環境下における増殖特性の比較

乳酸産生経路を欠損させた乳酸菌プラットフォーム株の有用性を評価するため、好気環境および嫌気環境下での増殖特性を比較した。その結果、好気条件下では比較的安定した増殖が確認された一方で、嫌気条件下では明確な増殖速度の低下が観察され、寒天培地上のコロニー径も小さくなる傾向が見られた（図 2）。

この現象は、ldhL1 遺伝子（L-乳酸デヒドロゲナーゼ）を欠損させたことによる乳酸発酵の阻害に起因し、結果として NAD⁺再生効率が低下したことが主因であると考えられる。一般に、*Lactobacillus plantarum* は糖を解糖系で代謝し、得られた NADH を L-乳酸デヒドロゲナーゼにより酸化して NAD⁺を再生する。この NAD⁺再生は、嫌気環境下においてエネルギー代謝を維持するうえで不可欠なプロセスである。しかし、本研究で構築した乳酸生産能欠損株では、この再酸化経路が遮断されているため、嫌気条件下において NADH の蓄積と NAD⁺の枯渇により代謝全体が停滞し、結果として細胞の増殖が著しく抑制されたと推察される。一方、好気条件下では酸素を電子受容体とする呼吸的代謝経路が部分的に機能することで、NADH の酸化が代償され、増殖の顕著な阻害は回避されたと考えられる。

これらの結果は、乳酸代謝の改変が環境条件に依存して菌体の増殖動態に大きく影響することを示しており、今後の物質生産プロセス設計において、酸素供給条件の最適化や補助的な電子受容体の添加といった代謝補完戦略の導入が重要であることを示唆している。

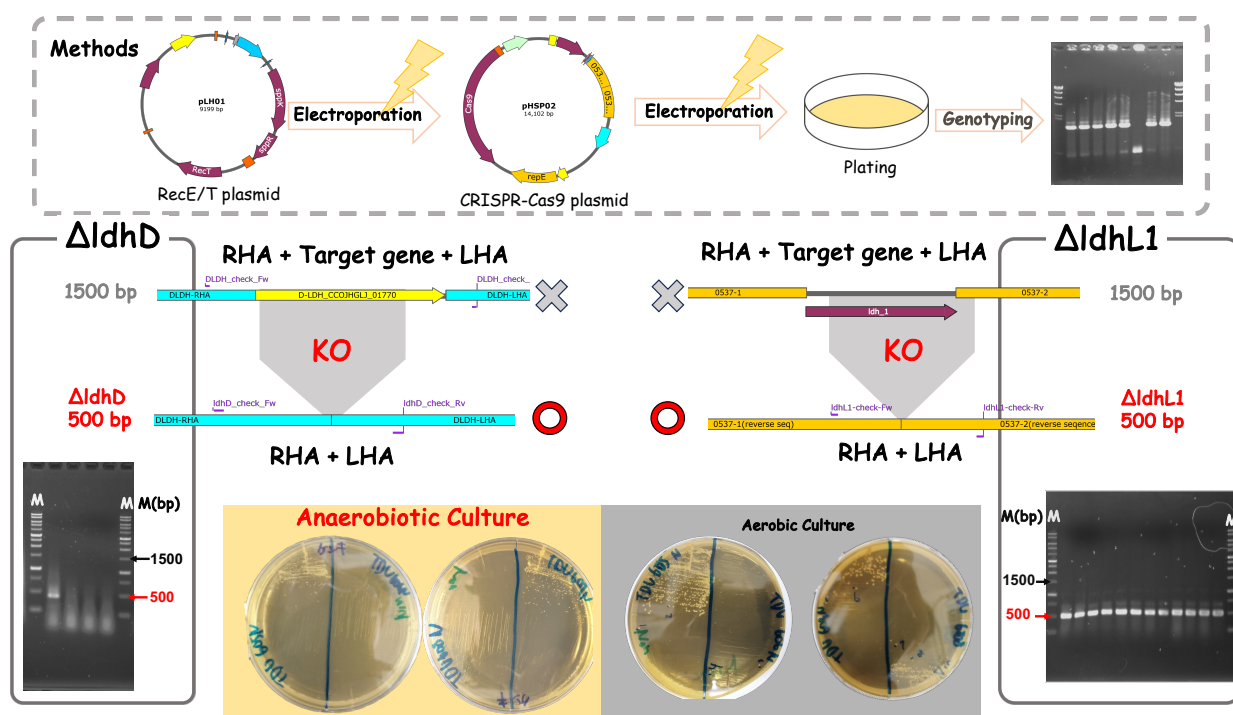


図2 CRISPR-Cas9による乳酸生産能欠損乳酸菌株の開発と増殖特性の比較

6. まとめ

本研究では、乳酸菌を用いた医薬品原料の持続的かつ効率的な生産システムの構築を目指し、外来遺伝子導入法の最適化と、代謝改変による物質生産特化型プラットフォーム株の開発に取り組んだ。まず、*Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 株を対象に、シャトルベクターpTRKH2およびエレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入条件の検討を行い、安定かつ再現性の高い形質転換系を確立した。次に、乳酸菌特有の乳酸発酵によって生じる糖資源の消費と培地の酸性化という課題を解決するため、CRISPR-Cas9 システムを用いて、乳酸生成の主要酵素をコードする *ldhL1* および *ldhD* 遺伝子の欠損株を作出した。なお、NCIMB 株における相同組換え修復 (HDR) の効率が低いという技術的課題に対しては、*RecE* および *RecT* 遺伝子を導入することで HDR 活性を補強し、ゲノム編集の成功率を向上させた。得られた乳酸生産能欠損株は、好気条件下では安定した増殖を維持したが、嫌気条件下では NAD^+ 再生の制約により増殖速度が低下することが明らかとなった。これにより、物質生産に向けた今後の培養設計においては、酸素供給制御や補助的な代謝経路の補完が重要であることが示唆された。

以上の成果を通じて、医薬品原料生産に適した乳酸菌の基盤技術としての有用性と将来性を実証することができた。今後は、本プラットフォーム株に目的遺伝子を導入し、腸内環境下における物質生産および薬効発現の評価を進めることで、プロバイオティクスを応用した新たなドラッグデリバリーシステムの実用化に向けた展開が期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人天野工業技術研究所より格別のご支援を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Li Y, Smolke CD. Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast. *Nat Commun.* 2016 Jul 5;7:12137. doi: 10.1038/ncomms12137
- 2) Vavricka CJ, Yoshida T, Kuriya Y, Takahashi S, Ogawa T, Ono F, Agari K, Kiyota H, Li J, Ishii J, Tsuge K, Minami H, Araki M, Hasunuma T, Kondo A. Mechanism-based tuning of insect 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase for synthetic bioproduction of benzylisoquinoline alkaloids. *Nat Commun.* 2019 May 1;10(1):2015. doi: 10.1038/s41467-019-09610-2.
- 3) Vavricka CJ, Takahashi S, Watanabe N, Takenaka M, Matsuda M, Yoshida T, Suzuki R, Kiyota H, Li J, Minami H, Ishii J, Tsuge K, Araki M, Kondo A, Hasunuma T. Machine learning discovery of missing links that mediate alternative branches to plant alkaloids. *Nat Commun.* 2022 Mar 16;13(1):1405. doi: 10.1038/s41467-022-28883-8.
- 4) Kleerebezem M, Hols P, Bernard E, Rolain T, Zhou M, Siezen RJ, Bron PA. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 Mar;34(2):199-230. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00208.x.
- 5) Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science.* 2016 Jul 1;353(6294):aac4354. doi: 10.1126/science.aac4354.
- 6) Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1983 Sep;49(3):209-24. doi: 10.1007/BF00399499.
- 7) Jensen CG, Vangkilde S, Frokjaer V, Hasselbalch SG. Mindfulness training affects attention--or is it attentional effort? *J Exp Psychol Gen.* 2012 Feb;141(1):106-23. doi: 10.1037/a0024931.
- 8) Mohamadzadeh M, Duong T, Sandwick SJ, Hoover T, Klaenhammer TR. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 17;106(11):4331-6. doi: 10.1073/pnas.0900029106.
- 9) O'Sullivan DJ, Klaenhammer TR. High- and low-copy-number *Lactococcus* shuttle cloning vectors with features for clone screening. *Gene.* 1993 Dec 31;137(2):227-31. doi: 10.1016/0378-1119(93)90011-q.