

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05853

研究課題名(和文) 真のトロパン骨格生合成の解明およびスコポラミンの微生物生産

研究課題名(英文) Microbial production of Scopolamine by rerouting tropane alkaloid biosynthesis

研究代表者

鮎 信学 (Funa, Nobutaka)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：70361574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トロパンアルカロイドの生合成経路を大腸菌において再構築することを目的としている。我々は、トロピノンの生合成に關与するIII型ポリケチド合成酵素(III型PKS)、CHSBが3-oxoglutaric acid (3-OG)の合成を触媒することを見いだした。また、3-OGの閉環反応に必須であるP-450酵素の可溶化を大腸菌宿主において成功した。CHSBとP-450の共発現により、大腸菌におけるトロパンアルカロイドの生産に成功した。また、また、スコポラミンの生産のために人工生合成経路を設計し、その鍵経路であるトロパ酸のCoAエステル化を触媒する酵素を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒヨスチアミンは、ベラドンナやヒヨスなどが生産するトロパンアルカロイドであり、副交感神経系の抑制効果があるため、胃腸鎮痛鎮痙薬などとして市販されている。しかしながら、トロピノンの生合成が長らく不明であったため、大腸菌での生産系が確立されておらず、現在でも植物や植物培養細胞からの抽出に頼っている。そのためコストが高く、潜在的な用途が多種あるのにも関わらず利用が限られている。本研究の成功は、ヒヨスチアミンやアトロピン、それらの類縁体の安価大量生産系の構築につながる。本研究で生産した3'-ヒヨスチアミンは、単離例が少なく未知であるが、抗アセチルコリン活性がある。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to reconstruct the biosynthetic pathway of tropane alkaloids in *Escherichia coli*. We found that CHSB, a type III polyketide synthase (type III PKS) involved in the biosynthesis of tropinone, catalyzes the synthesis of 3-oxoglutaric acid (3-OG). We also succeeded in solubilizing the P-450 enzyme, which is essential for the ring-closing reaction of 3-OG, in an *E. coli* host. Co-expression of CHSB and P-450 led to the production of tropane alkaloids in *E. coli*.

We also designed an artificial biosynthetic pathway for the production of Scopolamine. The key reaction of the pathway is the CoA esterification of tropic acid, which was found to be catalyzed by a ligase from *Streptomyces*.

研究分野：天然物化学

キーワード：アルカロイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

hyoscyamine は抗アセチルコリン活性を有するトロパンアルカロイドであり、医薬品として利用されている。しかしながら、その供給は植物からの抽出に依存しており、大腸菌における異種生産など、安価大量生産は実現されていない。大腸菌生産の障壁になっているのは、主に次の2点である。図1中の経路の内、破線経路の littorine synthase は、植物細胞における翻訳後修飾がその活性に必須であるため、大腸菌での機能発現が不可能である。また、植物 P-450 は膜タンパク質であり、AbCYP82M3 や CYP80A1 の大腸菌における機能発現は困難である。最近、酵母を用いた生産例が報告されたが (nature (2020) 585, 614-9) 生産量は $\mu\text{g/L}$  オーダーである。

### 2. 研究の目的

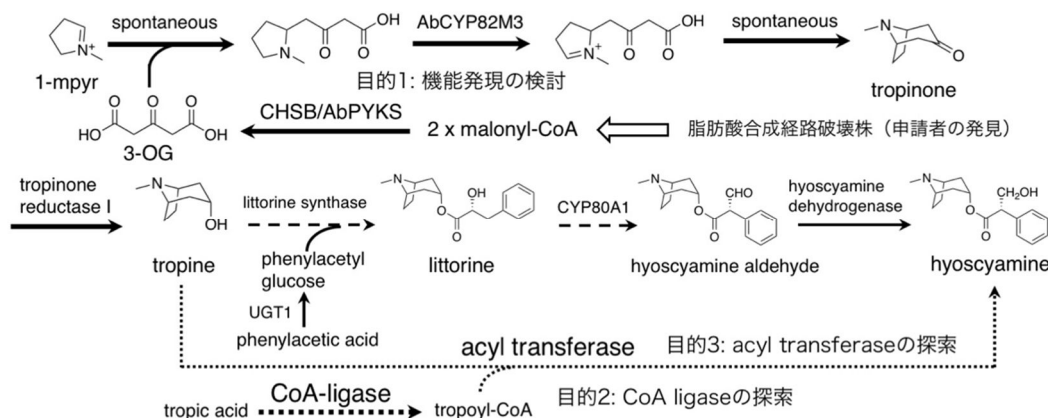


図1 hyoscyamineの生合成経路(実線・破線)および申請者が設計した人工生合成経路(点線)

我々は、上記の障壁を回避し、大腸菌で hyoscyamine を生産するため、図1の点線で示す人工生合成経路を設計した。本経路の実現のため、次の目的1~4を達成する。

AbCYP82M3の大腸菌における機能発現を行う(目的1)

tropic acidをtropoyl-CoAに変換する酵素のスクリーニング(CoA-ligase、目的2)

tropineにtropoyl-CoAを転移する酵素のスクリーニング(acyl transferase、目的3)

最後に図1の太線および点線の経路を大腸菌内で再構築することにより、hyoscyamineの微生物生産を達成する(目的4)

### 3. 研究の方法

AbCYP82M3の可溶化は、N末端の配列を削除すること、また、codon usageを変えることにより実現した。tropic acidをtropoyl-CoAに変換する酵素は、放線菌からスクリーニングした。tropineにtropoyl-CoAを転移する酵素はcocaine synthaseに変異導入することにより作製した。

以上の詳細は再提出の際に、記述する。

### 4. 研究成果

目的1では、AbCYP82M3の大腸菌における可溶発現に成功したので、最大の壁は突破した。

目的2では、tropic acidをtropoyl-CoAに変換する新規酵素を発見し、目的を達成した。

目的3では、psuedotropineにtropoyl-CoAを転移する酵素を創出したことから、一部ではあるが、目的を達成した。

目的4では、目的を達成していないが、psuedotropine、psuedohyoscyamineの微生物生産を理論上、可能にしたことから、大きなブレイクスルーを起こしたと言える。

本成果の詳細は、再提出の際に、記述する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------