

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究A

研究期間：2009～2012

課題番号：21248013

研究課題名（和文） イソキノリンアルカロイド生合成系の分子解剖と再構築

研究課題名（英文） Molecular characterization of isoquinoline alkaloid biosynthesis and its reconstitution in plant and microbial cells

研究代表者

佐藤 文彦 (SATO FUMIHIKO)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：10127087

研究成果の概要（和文）：

イソキノリンアルカロイド生合成系の多様性を、(1)生合成酵素と(2)転写因子の両面から分子解剖するとともに、(3)代謝工学による代謝プロファイルの改変、さらには、合成生物学的手法を用いた大腸菌等、異種細胞系での新規有用産物生合成系の開発、また、(4)これらの手法により調製される新規化合物群の生理活性を評価し、植物アルカロイド生合成系の分子細胞生物学と新たな創薬のための開発基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：

Isoquinoline alkaloid biosynthesis was investigated at molecular level to understand their biosynthetic pathways and its regulation. For this purpose, cDNAs of biosynthetic enzymes and transcription factors were isolated and characterized. Genes of biosynthetic enzymes isolated from *C. japonica* cells were successfully used to reconstitute novel alkaloid fermentation platform with some microbial enzyme genes to produce reticuline from glucose in microbial cells. In addition, bioassay system with *Caenorhabditis elegans*, to evaluate lipid-accumulation-reducing activity of isoquinoline alkaloids was successfully applied for the screening of new candidate among isoquinoline alkaloids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	12,500,000	3,750,000	16,250,000
22年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
23年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
24年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
合計	35,700,000	10,710,000	46,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物バイオテクノロジー、薬用植物、代謝工学、合成生物学、イソキノリンアルカロイド、生理活性のスクリーニング

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の二次代謝産物は25万種にも及ぶとされるが、その代謝系の解析は、含量が微量であること、かつ、代謝系が多岐にわたることより、生理活性の高い、あるいは、共通性の高い代謝系において部分的に解明されてきた。植物種特異的な（進化上新しい）二次代謝産物であるアルカロイド代謝においては、伝統的な生合成酵素の精製と遺伝子の単離に基づく研究や、細胞培養による物質生産研究が主流であった。

(2) 我々は、二本鎖（ds）RNAを用いた一過的RNAi法により、イソキノリンアルカロイドであるベルベリン高産生オウレン培養細胞の代謝解析や遺伝子機能同定が効率的に行えることを明らかにするとともに、安定RNAi系を用いることにより効果的に代謝を遮断し、代謝中間体を蓄積させることができること、さらには、代謝切断により新たな代謝経路の誘導が生じ、代謝が極めて可塑的に変動することを明らかにしていた。

(3) 我々は、また、各々のアルカロイド生合成系を対象に、その生合成遺伝子、ならびに発現制御因子の単離同定を精力的に行ってきた。その結果、ベルベリン生合成系のほぼ全ての遺伝子の単離に成功し、これら遺伝子を用いて最終産物を著量蓄積する代謝改変された形質転換細胞を作成するに至った。さらに、アポルフィン型アルカロイドであるマグノフロリン生合成系、ベンゾフェナンスリジン型アルカロイド生合成系においても生合成遺伝子の単離に成功した。また、オウレン細胞から、ベルベリン生合成系を包括的に制御するWRKY遺伝子を初めて単離・同定するとともに、イソキノリンアルカロイド生合成系に特異的と考えられるbHLH遺伝子の単離にも成功した。

(4) さらに、合成生物学的手法により微生物においてアルカロイド生合成系を再構築し、二次代謝を試験管内で解析することを可能にした。

## 2. 研究の目的

以上のように、イソキノリンアルカロイド生合成系は植物二次代謝研究のよいモデルと考えられた。本研究ではイソキノリンアルカロイド生合成系を対象として、これまでの知見をもとに、多様なイソキノリンアルカロイド生合成系を総合的に理解し、活用するために、(1)生合成酵素と(2)転写因子の両面から分子解剖するとともに、(3)代謝工学による代謝プロファイルの改変、さらには、合成生物学的手法を用いた大腸菌等、異種細胞系での新規有用産物生合成系の開発を行うこと、さらには、(4)これらの手法により調製される新規化合物群の生理活性を評価し、新たな創薬のための開発基盤を確立することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

これらの目的のために、以下のような解析を行った。

- I. 多様なイソキノリンアルカロイド生合成系の分子解剖
- II. 包括的転写因子を用いたイソキノリンアルカロイド生合成系の解析
- III. 微生物異種発現系を用いたアルカロイド生合成系の再構成と代謝工学
- IV. イソキノリンアルカロイドの新規生理活性評価

## 4. 研究成果

- I. 多様なイソキノリンアルカロイド生合成系の分子解剖
  - 1) オウレンの生合成酵素 scoulerine

O-methyltransferase 遺伝子を導入したハナビシソウ培養細胞の代謝プロファイル解析から、ベンゾフェナンスリジン型アルカロイド生合成系に関与すると考えられた P450 cDNA の機能解析を組換え酵母を用いて行ない、同 cDNA 産物が protopine 6-hydroxylase 活性、ならびに、corycavine から corynoxine を合成する活性を有することを解明した。

2) エメチン生合成系に関与する O-メチル化酵素遺伝子の機能解析を進め、同産物がエメチン生合成の最終の2段階を触媒することを明らかとした。

3) オウレン tetrahydroberberine oxidase (CjTHBO) 遺伝子を発現したハナビシソウ培養細胞のアルカロイドプロファイル解析から、CjTHBO の発現によって代謝改変が可能であることを明らかにした。

4) 大腸菌で再構築したドーパミンからレチクリンに至るイソキノリンアルカロイドの生合成経路に付加的に遺伝子を追加することにより、新規生合成酵素遺伝子のスクリーニングが可能であることを、マグノフロリン生合成系の CYP80G2 遺伝子をモデルに実証した。

5) また、ハナビシソウのゲノムを部分解読し、既に単離されている生合成遺伝子の転写制御領域を含む、多数の配列情報を取得した。

## II. 包括的転写因子を用いたイソキノリンアルカロイド生合成系の解析

1) オウレンアルカロイド生合成系の包括的な転写制御因子である WRKY ならびに bHLH が実際に生合成酵素遺伝子のプロモーター領域に結合していることを GFP との融合タンパク質の一過的発現系、あるいは、内在の bHLH を介したクロマチンの免疫沈降 (CHIP アッセイ) により実証した。

2) CjbHLH1 の過剰発現の効果を詳細に解析

し、その効果が一過的であること等、CjbHLH1 の転写調節活性が複雑に制御されていることを明らかにした。

3) ハナビシソウ自身の CjbHLH1 ホモログ遺伝子 (EcbHLH1-1, EcbHLH1-2) を単離し、その構造と発現を解析し、それぞれが、組織特異的に発現していること、また、ジャスモン酸応答性を示すことを明らかとした。

4) CjbHLH1, あるいは、CjWRKY1 の活性制御機構を解明することを目的に、CjbHLH1 と GFP の融合タンパク質遺伝子を導入したオウレンプロトプラストから GFP 抗体を用いた免疫沈降を行い、沈降産物の LC-MS/MS 解析、ならびに抗体による解析を行ない、CjbHLH1 はユビキチン化されている可能性が、一方、CjWRKY1 はリン酸化を受けている可能性を示唆した。

## III. 微生物異種発現系を用いたアルカロイド生合成系の再構成と代謝工学

1) ドーパミンを基質にしたイソキノリンアルカロイドの微生物における産生に引き続き、tyrosinase と DOPA decarboxylase の導入により、チロシンからドーパミンまでの生合成経路をもつチロシン生産大腸菌を構築した。その結果、グルコース等から効率的にイソキノリンアルカロイドが微生物発酵できることを明らかとした。

2) 前述のドーパミンからレチクリン生合成系を構成する O-メチル化酵素の反応特性をキメラ酵素を用いて詳細に解析し、キメラ化により新たな反応特性を獲得していることを明らかとした。

3) ドーパミンと様々なアルデヒドとのカップリング反応を触媒する NCS の基質特異性を検討することで、テトラヒドロイソキノリン構造を有する新規化合物の合成を検討した。その結果、芳香族および脂肪族側鎖をもつケ

ト酸をカルボニル供与体とすることを明らかにした。

#### IV. イソキノリンアルカロイドの新規生理活性評価

- 1) 線虫においてベルベリンが脂質蓄積を抑制する分子機構を解析するために、ベルベリン処理した線虫のマイクロアレー、ならびに RT-PCR解析を行い、解毒酵素遺伝子の発現が誘導されていること、また、脂質関連遺伝子の発現に有意な変化があることを明らかにした。
- 2) 線虫の特定の遺伝子発現を抑制することにより、より効果的にベルベリンの生理活性を検出できる条件を見出した。
- 3) ベルベリンの類縁化合物を用いて、線虫における脂質蓄積抑制活性評価を行い、*sanguinarine* にベルベリン以上の強い脂質蓄積抑制効果があることを見出した。
- 4) 一方、ベルベリンよりも抑制活性は低いが、より生存活性への影響が小さい化合物を見出した。
- 5) ハナビシソウ培養細胞抽出液を用いて、*sanguinarine* よりも脂質蓄積活性が高く、かつ、細胞毒性の低い可能性のある化合物を見出した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- 1) Sato, F. and Kumagai, H. Microbial Production of Isoquinoline Alkaloids as Plant Secondary Metabolites Based on Metabolic Engineering Research. Proc. Japan Acad. B. 査読有, 89, 165-182 (2013) doi: 10.2183/pjab.89.165 (総説)
- 2) Sato, F. Characterization of Plant Functions Using Cultured Plant Cells, and Biotechnological Applications. Bioscience, Biotechnology, and

Biochemistry, 査読有, 77, 1-9 (2013). DOI:10.1271/bbb.120759 (総説)

- 3) Matushima Y., Minami, H., Hori, K., Sato, F. Pathway engineering of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in transgenic California poppy cells with ectopic expression of tetrahydroberberine oxidase from *Coptis japonica*. Plant Biotechnology, 査読有, 29, 473-481 (2012). DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.1101a
- 4) Takemura T, Ikezawa N, Iwasa, K., Sato, F., Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells. Phytochemistry, 査読有, in press (2012), doi:10.1016/j.phytochem.2012.02.013
- 5) Nakagawa, A. Minami, H., Kim, J.S., Koyanagi, T., Katayama, T., Sato, F. and Kumagai, H. Bench-top fermentative production of plant benzyloisoquinoline alkaloids using a bacterial platform. Bioengineered Bugs, 査読有, 3, 49-53 (2012). doi:10.4161/bbug.3.1.18446.
- 6) Yamada, Y., Koyama, T., and Sato, F. Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors and Regulation of Alkaloid Biosynthesis. Plant Signaling Behavior, 査読有, 6, 1627-1630 (2011) DOI: 10.4161/psb.6.11.17599
- 7) Yamada, Y., Kokabu, Y., Chaki, K., Yoshimoto, T., Ohgaki, M., Yoshida, S., Kato, N., Koyama, T., and Sato, F. Isoquinoline Alkaloid Biosynthesis is Regulated by a Unique bHLH-type Transcription Factor in *Coptis japonica*. Plant Cell Physiol., 査読有, 52, 1131-1141 (2011) doi:10.1093/pcp/pcr062
- 8) Nakagawa, A., Minami, H., Kim, J.S., Koyanagi, T., Katayama, T., Sato, F. and Kumagai, H. A Bacterial Platform for Fermentative Production of Plant Alkaloids.

Nature Comm., 査読有, 2, (2011) DOI:

10.1038/ncomms1327

9) Takemura T., Ikezawa N., Iwasa K. and Sato F.

Metabolic Diversification of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis through the introduction of a branch pathway in *Eschscholzia californica*. 査読有, Plant Cell Physiol., 51, 949-959 (2010).

doi: 10.1093/pcp/pcq063

10) Morishige, T., Tamakoshi, M., Takemura, T., and Sato, F. Molecular characterization of

*O*-methyltransferases involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. Proc.

Jpn. Acad. Ser. B., 査読有, 86, 757-768 (2010).

doi.org/10.2183/pjab.86.757

11) Cheong, B-E., Takemura, T., Yoshimatsu, K., Sato, F. Molecular cloning of an

*O*-methyltransferase from adventitious roots of *Carapichea ipecacuanha*. Biosci. Biotechnol.

Biochem. 査読有, 75, 107-113 (2011).

doi.org/10.1271/bbb.100605

12) Mizutani M, and Sato F. Unusual P450

reactions in plant secondary metabolism. Arch.

Biochem. Biophys., 査読有, 507, 194-203 (2011).

doi: 10.1016/j.abb.2010.09.026

13) 南 博道, 佐藤文彦, 微生物による高等植物アルカロイドの生産, BIOINDUSTRY, 査読無, 29, 53-59 (2012)

他6編

〔学会発表〕(計45件)

1) 島田友恵, 本村幸也, 山田泰之, 小山知嗣,

佐藤文彦, メチルジャスモン酸によるハナビシソウ*bHLHI*の発現誘導とイソキノリンアルカロイド生合成. 植物生理学会大会(岡山), 2013年03月23日, 岡山大学

2) 松村栄太郎, 中川明, 南博道, 片山高嶺, 山本憲二, 佐藤文彦, 熊谷英彦, 大腸菌における改良型ベンジルイソキノリンアルカロイド生産系を用いたアポルフィンアルカロイド

生産. 2013年度日本農芸化学会, 2013年03月25日東北大学川内北キャンパス(仙台)

3) 西八條正克, 平井義則, 川野茂, 西山章, 南博道, 片山高嶺, 八十原良彦, 佐藤文彦, 熊谷英彦, 酵素的Pictet-Spengler反応によるテトラヒドロイソキノリンアルカロイド類の不斉合成. 2013年度日本農芸化学会2013年03月25日東北大学川内北キャンパス(仙台)

4) 堀健太郎, 竹村知也, 佐藤文彦, sanguinarine生合成経路におけるprotopine 6-hydroxylaseの反応特性. 2013年度日本農芸化学会, 2013年03月27日東北大学川内北キャンパス(仙台)

5) 川崎友梨子, Chow Yit-lai, 佐藤文彦, 線虫(*Caenorhabditis elegans*)を用いたオウレン培養細胞抽出液の生理機能評価. 2012年度日本植物細胞分子生物学会, 2012年08月05日奈良先端科学技術大学院大学(生駒)

6) F. Sato, Microbial platform for systematic investigations of benzyloisoquinoline alkaloid pathway. International Conference of Natural Products Biosynthesis: Enzymology, structural biology, drug discovery and genome mining (招待講演) 2012年06月17日~2012年06月22日 Awaji Shima, Japan

7) F. Sato, Metabolic engineering and microbial production of benzyloisoquinoline alkaloids. GNU Plant Science Symposium 2012 (招待講演) 2012年05月10日~2012年05月11日 Gyeongsang National University, Korea

8) Sato, F. Never-ending attempts to produce plant natural products in vitro; case study for isoquinoline alkaloids. International Symposium on "Future Prospects of Plant Biotechnology" (招待講演) 2011.11.15, 東京大学弥生講堂

9) 佐藤文彦, イソキノリンアルカロイド生合成系に見る代謝工学の可能性と課題, 第48回植物化学シンポジウム(招待講演) 2011.11.25, 大阪大学会館

10) Yit-Lai Chow, Fumihiko Sato,  
*Caenorhabditis elegans* as a screening model for  
biological activities of plant natural chemicals. 4<sup>th</sup>  
East Asia *C.elegans* meeting, July 11-14, 2010,  
National Olympics Memorial Youth Center,  
Tokyo.

11) Sato, F., Ikezawa, N., and Iwasa, K., Novel  
P450s in isoquinoline alkaloid biosynthesis.  
16th International Conference on Cytochrome  
P450 (招待講演), June 21-25, 2009, Nago,  
Okinawa, Japan

12) Sato, F. Production of novel plant  
metabolite-producing cells using RNAi for  
drug-discovery screening. 2009 4th China  
Medical Biotech Forum (招待講演), Aug. 8,  
2009, Dalian, China  
他33件

[図書] (計6件)

1) Chow, Y.L., Sato, F. Metabolic engineering  
and synthetic biology for the production of  
isoquinoline alkaloids. Chandra, S., Lata H.,  
Varma A. (eds) Biotechnology for Medicinal  
Plants: Micropropagation and Improvement.  
Springer, 2013, pp327-343.

2) Matsumura E., Matsuda, M., Sato, F., Minami,  
H. Microbial Production of Plant  
Benzylisoquinoline Alkaloids. K.G. Ramawat,  
J.M. Merillon (eds.), Handbook of Natural  
Products. Springer-Verlag, Berlin, 2013,  
DOI10.1007/978-3-642-22144-6\_1

3) Sato, F., Matsui, K. Chapter 28, "Engineering  
the Biosynthesis of Low Molecular Weight  
Metabolites for Quality Traits," In Plant  
Biotechnology and Agriculture: Prospects for the  
21st Century; Altman, A. and Hasegawa P.M.,  
Eds. Academic Press, Oxford, 2011, pp. 443-462.

4) Minami, H., Ikezawa, N. and Sato, F.,  
Microbial expression of alkaloid biosynthetic  
enzymes for characterization of their properties. In  
"Plant Metabolic Engineering: Methods and  
Protocols" (ed. Fett-Neto, A.G.), Humana Press,  
2010, pp111-120.

doi: 10.1007/978-1-60761-723-5\_8

他2編

[産業財産権]  
○出願状況 (計1件)

名称: 植物ベンジルイソキノリンアルカロイドの  
生産方法  
発明者: 中川 明, 南 博道, 片山高嶺, 熊谷英彦  
権利者: 石川県  
種類: 特許出願  
番号: 2010-212261  
出願年月日: 2010年9月22日  
国内外の別: 国内

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/callus/>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
佐藤文彦 (SATO FUMIHIKO)  
京都大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号: 10127087

(2)研究分担者  
南 博道 (MINAMI HIROMICHI)  
石川県立大学・生物資源環境学部・講師  
研究者番号: 90433200

(3)連携研究者  
岩佐 衣子 (IWASA KINUKO)  
神戸薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 30068340  
(平成21年度)

伊福 健太郎 (IFUKU KENTARO)  
京都大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号: 50359783

士反 伸和 (SHITAN NOBUKAZU)  
神戸薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 20547880  
(平成22-24年度)