

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670046

研究課題名(和文)糸状菌を宿主とする植物アルカロイド生物合成システム

研究課題名(英文)Plant alkaloid production system using fungi as host organism

研究代表者

藤井 勲(Fujii, Isao)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：70181302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：二次代謝産物生産性の高い糸状菌を宿主とした有用植物アルカロイド生物合成システムの構築を目指した。宿主とする麹菌により供給されるチロシンからノルラウダノソリン生成までに必要な生合成酵素遺伝子4種の発現プラスミドを構築し、麹菌に導入した。形質転換体を、順次、誘導培養とその生産物の解析を進めた。特にmonoamine oxidaseとnorcoclaurine synthaseの共発現株にdopamineを投与し、ベンジルイソキノリン骨格をもつ化合物の生成を検討したが、期待した生成物を確認できなかった。そこで、アルカロイドを生産するヒガンバナ科植物より内生糸状菌を分離し、解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：To utilize high productivity of secondary metabolites of fungi, construction of benzyl isoquinoline alkaloids biosynthesis system in *Aspergillus oryzae* was attempted. Expression plasmids of tyrosinase, monoamine oxidase, tyrosine decarboxylase, and norcoclaurine synthase genes were constructed. These plasmids were introduced into the host fungus *A. oryzae* by transformation. Analysis of induction culture products of transformants did not give any detectable benzyl isoquinoline alkaloids. Thus the direction of study was changed to isolate endophyte fungi producing alkaloids from alkaloid producing plants. So far some endophyte fungi were obtained from Amaryllidaceae plants.

研究分野：天然物化学

キーワード：アルカロイド

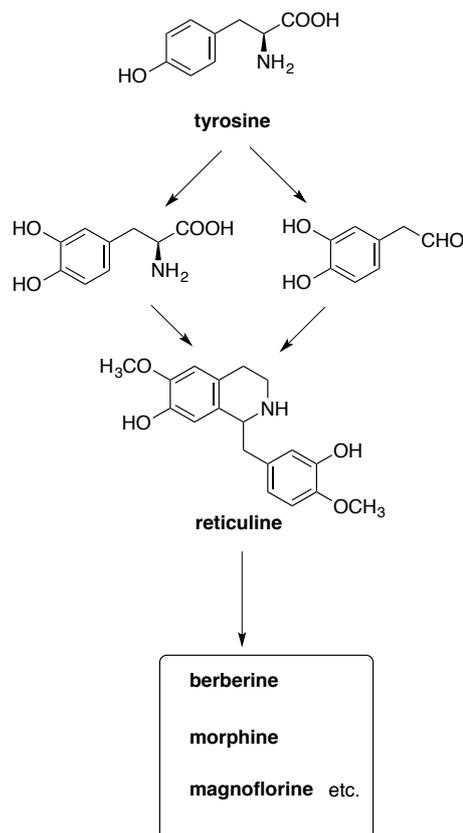
1. 研究開始当初の背景

植物アルカロイドは多様な構造と生理活性から医薬資源、原料として重要な化合物群であり、例えば、ケシのアルカロイドであるモルヒネは緩和ケアにおいて欠かすことのできない重要な医薬である。しかし、その供給はケシの栽培に頼らざるをえず、非合法栽培による麻薬の生産など、世界的にも未だ大きな問題となっている。また、一般に植物の栽培ではアルカロイドの生産性は低い。そこで、微生物を宿主としてこれに生合成遺伝子を導入して生産系を構築しようとする試みが、合成生物学 (synthetic biology)、あるいは代謝工学 (metabolic engineering) として注目されている。しかしながら、大腸菌や酵母などを宿主とした場合、基質供給の問題や複数の遺伝子の発現制御など、克服すべき点が多い。

一方、糸状菌は、二次代謝産物の生産性が高く、アルカロイドの生産も多く報告されており、植物アルカロイド異種生産のホストとして有用な生物と考えられる。また、糸状菌のゲノム解析から二次代謝産物生合成遺伝子がクラスターを構成しており、特定の制御因子のもとでクラスター全体の発現が活性化することなどが明らかにされてきている。申請者はこれまで糸状菌のポリケタイド生合成系を中心として異種糸状菌での発現、機能解析を行ってきたが、これを植物の有用アルカロイド生物合成へと展開することが可能であると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

有用性の高い植物アルカロイドであるモ



ルヒネの生産、生物合成系の構築を最終目標とするが、本研究においては、その前駆体であり、他のベンジルイソキノリン系アルカロイドの共通の前駆体であるレチクリンを糸状菌宿主において高生産できる生物合成系の構築を具体的な目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、糸状菌を宿主として、レチクリンをターゲットとした植物アルカロイド生物合成システムの構築を目指す。【1】宿主糸状菌の選択、【2】レチクリン生合成遺伝子の調製、【3】レチクリン生合成遺伝子の発現、【4】レチクリン生合成遺伝子の共発現によるアルカロイド生産と同定、へと進め、本システムの有用性を実証し、モルヒネ生物合成への足掛かりとすることとした。

【1】宿主糸状菌の選択

これまでの申請者の研究成果に基づき (J. Antibiot., 10, 63, 207-218, 2010 など)、宿主糸状菌として麹カビ *Aspergillus oryzae* をまず検討する。既に本菌の形質転換法は確立されており、また、二次代謝産物生産のバックグラウンドもほとんどなく、安全性も確認されている。

【2】レチクリン生合成遺伝子の調製

レチクリンの最初の前駆体であるチロシンは宿主により十分に供給可能であると考え、チロシンからレチクリンへの変換に必要な遺伝子を南らによる大腸菌での生産 (Nature Commun., 2, 326-333, 2011) を参考に入手する。しかし、異種生物の遺伝子は糸状菌内でコドン使用頻度の違いなどより mRNA が不安定化され、発現されない例が多く知られており、本研究においては、できるだけ糸状菌に至適化された cDNA を合成して用いる。

【3】レチクリン生合成遺伝子の発現

【1】で選択した *A. oryzae* 菌株に、【2】で調製したレチクリン生合成の各 cDNA を順次、導入していく。研究代表者がこれまで糸状菌ポリケタイド合成酵素の発現・機能解析に用いてきて α -アミラーゼ プロモーターを利用する。

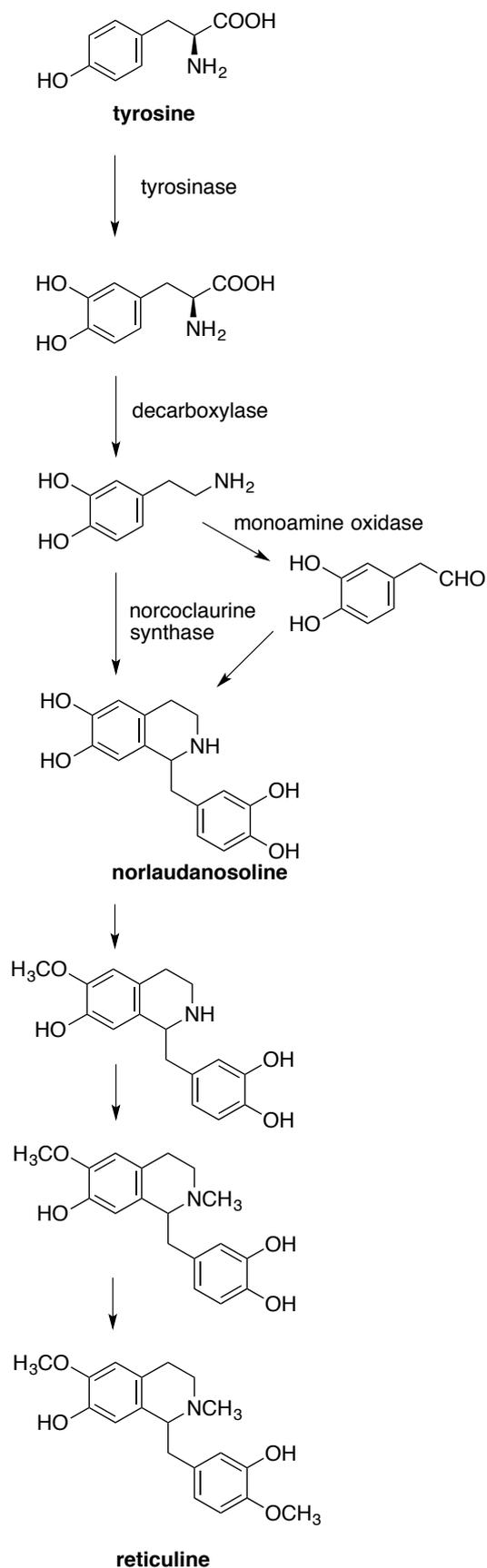
【4】レチクリン生合成遺伝子の共発現によるアルカロイド生産と同定

人工生合成遺伝子を導入した *A. oryzae* 遺伝子組換え体を培養する。培養は、前培養後、デンプンを含む誘導培地に移し、 α -アミラーゼ プロモーターにより各遺伝子を発現させる。宿主により供給されたチロシンが、発現させた各生合成酵素により変換されるかどうかを HPLC や LC-MS により追跡する。

4. 研究成果

二次代謝産物生産性の高い糸状菌を宿主とした有用植物アルカロイド生物合成システムの構築を目指し、種々のベンジルイソキノリン系アルカロイド生合成の共通前駆体であるレチクリンを第一のターゲットとし

て、研究を進めた。宿主とする麹菌 *A. oryzae* により供給されるチロシンから、最初のベンジルイソキノリン骨格化合物であるノルラウダノソリン生成までに必要な生合成酵素遺伝子として tyrosinase 遺伝子、monoamine oxidase 遺伝子、tyrosine decarboxylase 遺

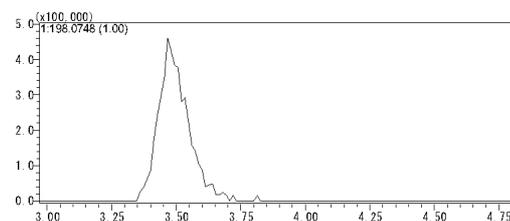
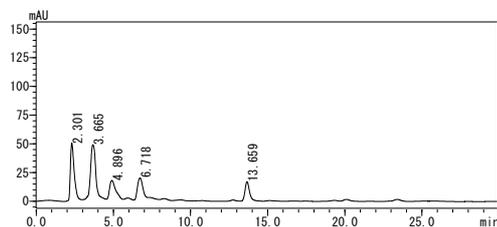


伝子、norcoclaurine synthase 遺伝子を考え、*A. oryzae* の tyrosinase 遺伝子と monoamine oxidase 遺伝子、ケン由来 tyrosine decarboxylase 遺伝子、オウレン由来 norcoclaurine synthase 遺伝子を選択した。植物由来の遺伝子については、麹菌にコドン至適化した遺伝子を合成した。各遺伝子を栄養要求性マーカーの異なる4つのベクタープラスミドに誘導発現用プロモーターである α -アミラーゼプロモーターの下流に導入し、各発現プラスミドを構築した。各酵素の機能と反応スキームを示す。

次いで、宿主として用いる4重栄養要求性 *A. oryzae* NSAR1 株に発現プラスミドを生合成反応順に組合せて形質転換を行った。プロトプラスト-PEG 法による形質転換によって得られた *A. oryzae* NSAR1 形質転換株について、ゲノム DNA を鋳型にした PCR により導入遺伝子のゲノムへの組込を確認した。

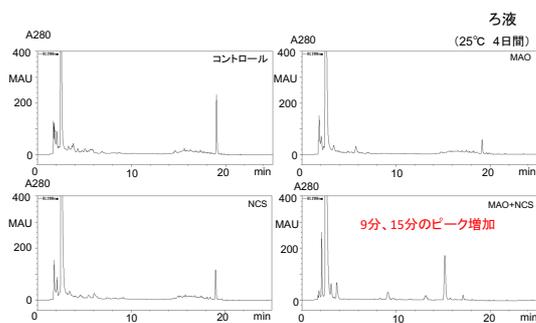
得られた *A. oryzae* 形質転換体の誘導発現培養を行い、導入遺伝子の発現により生産が期待される化合物の分析を行った。まず、tyrosinase 遺伝子の導入株について、LC-MS で分析したが、L-DOPA、dopamine は確認できなかった。次いで、tyrosinase 遺伝子と tyrosine decarboxylase の共発現株を分析したところ、L-DOPA の生産を確認し、tyrosinase 遺伝子が *A. oryzae* において機能的に発現することを確認できた。

LC-MS 分析



ただし、dopamine の生産は認められず、解析した株での tyrosine decarboxylase の機能的発現は確認することができなかった。

そこで、monoamine oxidase 遺伝子と norcoclaurine synthase 遺伝子の共発現株に基質である dopamine を誘導培地中に投与し、その変換体を HPLC で検出することを試みた。基質のドパミンは誘導培養開始時に 5 mM 添加し、ドパミンの酸化防止のために sodium ascorbate (ビタミン C) を 1 mM 添加した。その結果、新規生成物のピークが2つ認められた。



保持時間 15 min のメインピークについて構造解析を行った。LC-ESI-MS で分析したところ、その分子式は $C_{10}H_{13}NO_3$ であることが示唆された。そこで分子式とドパミンの構造から、ドパミンがアセチル化された場合と、ノルラウダノソリンが生成後、さらに代謝を受けて結合が切断される可能性が考えられた。なおノルラウダノソリンと思われる分子量の化合物はマスキングクロマトグラムからは確認できなかった。また、保持時間 9 min のピークについては、芳香環を持たない別の化合物へ代謝された可能性がその不飽和度から考えられたため、これ以上の解析は行わなかった。

メインピークの予想される構造のうち、合成が可能な N-アセチルドパミンを調製し、比較したところ、本化合物は N-アセチルドパミンと同定され、ベンジルイソキノリン骨格をもつ化合物の生成は確認されなかった。

一方、*Aspergillus niger* にドパミンを添加することでノルラウダノソリンが合成されることが報告されている。これは、*A. niger* の培養時にブチルアミンを添加してモノアミン酸化酵素をあらかじめ誘導しておき、培地を交換後、ドパミンを添加することによりドパミンを酸化し、残りのドーパミンと非酵素的な Pictet-Spengler 反応より (±) ノルラウダノソリンを生成させる方法であるが、本研究の宿主として、*A. niger* を用いることも考え、その追試を行ったが、ノルラウダノソリンの生成は確認できなかった。

以上のように糸状菌を宿主として植物のベンジルイソキノリンアルカロイド生合成の初期遺伝子を共発現させることにより、鍵化合物であるノルラウダノソリン、レチクリンの生物合成系の構築を目的として研究を進めたが、一部の遺伝子の機能的発現は確認できたものの、ノルラウダノソリンの生成を検出することはできなかった。その原因の一つは、合成した植物由来遺伝子のコドン最適化が不十分でうまく機能しなかった可能性が考えられる。

そこで、植物の遺伝子を糸状菌に導入するのではなく、植物に内生し、植物と同じアルカロイドを生産している糸状菌を単離してその遺伝子の解析から植物アルカロイドの生合成系を解明し、生物合成系の構築を目指すことに方針を転換した。現在のところ、アルツハイマー病の治療薬であるガラントミンなどのヒガンバナアルカロイドを生産す

るヒガンバナ科植物より内生糸状菌の分離と生産化合物の解析を進めている。ヒガンバナアルカロイドの生合成機構や生合成遺伝子は明らかにされておらず、その解明も視野に入れている。

現在、酵母を宿主としてモルヒネの生物合成系構築の報告はあるが、その一つの問題点は実用レベルまで生産性を向上できるかである。糸状菌の高い物質生産性を考えると、本研究で目指した方向性は重要であり、本研究で当初の目的は達成できなかったものの、今後さらに検討を続けていくべき課題であると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

浅野 孝、長井規至、橋元 誠、藤井 勲：
糸状菌を宿主とする植物アルカロイド生物合成システムの開発、日本薬学会東北支部会、2015年9月26日、矢巾町、岩手県

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://inpc.iwate-med.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 勲 (FUJII, Isao)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号：70181302

(2) 研究分担者

浅野 孝 (ASANO, Takashi)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：10552888

橋元 誠 (HASHIMOTO, Makoto)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：80552893