

機関番号：23303

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200036

研究課題名（和文） 微生物におけるイソキノリンアルカロイド生合成工学

研究課題名（英文） Biosynthetic engineering of isoquinoline alkaloids in microbes

研究代表者

南 博道 (MINAMI HIROMICHI)

石川県立大学・生物資源環境学部・助教

研究者番号：90433200

研究成果の概要（和文）：我々が構築した微生物によるアルカロイド生産システムにおいて、生産性の向上を目的に、生合成経路の改善、およびP450酵素の大腸菌発現システムを確立した。これにより、大腸菌での効率的なアルカロイド生産が可能となった。さらに、医薬的に重要なアルカロイド系麻薬の生産を目的に、その生合成遺伝子の単離をケシ cDNA から行い、大腸菌での発現株を構築した。生合成経路をレチクリン生産大腸菌に導入し、テバインの生産を行った。LC-MS 解析の結果、中間体の生産は確認できたが、テバインは検出されなかった。現在、生産条件を検討中である。

研究成果の概要（英文）：To improve the productivity of alkaloids in our microbial system, we modified the biosynthetic pathway and established the cytochrome P450 expression system in *E. coli* cells. These results enable the production of large amounts of alkaloids in *E. coli* cells. For the production of pharmaceutical important alkaloid narcotic, the biosynthetic genes were isolated from opium poppy, and were expressed in *E. coli* cells. We generated an *E. coli* strain that produce thebaine, introducing thebaine biosynthetic genes from reticuline in the reticuline producing *E. coli* cells. LC-MS analysis showed that the intermediates accumulated in the culture, but thebain was not detected. We have examined the production condition of thebaine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2009年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2010年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
年度			
年度			
総計	26,600,000	7,980,000	34,580,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：イソキノリンアルカロイド、レチクリン、マグノフロリン

1. 研究開始当初の背景

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、利用されてきたにすぎない。すなわち、花色に係る（進化上古い）フラボノイドの代謝研究は、モデル植物であるシロイヌナズナ等を用いた T-DNA 挿入変異株等が活用され、そ

の生合成系の解明、さらには代謝調節機構の研究が進んでいるが、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。植物培養細胞によるアルカロイドの大量生産が試みられているが、細胞ごとの生産量のばらつき、培養時間の長さ(数週間~数ヶ月)、他のアルカロイドの混入による精製の煩雑さなどから、実用化には至っていない。植物における二次代謝産物の生合成経路は多岐および多段階に渡っており、さらにはその生合成遺伝子の転写、発現は高度に制御されている。そのため、植物における特定物質の効率的な生産は容易ではない。ケシにおいてコデイン還元酵素の働きを止めることで、レチクリンが蓄積するという報告(Allen R. S., et al. (2004) *Nature Biotechnology*, 22: 1559-1566)があるが、そのメカニズムは解明されておらず、実用段階には至っていない。抗マラリア薬、artemisinin の前駆体 artemisinic acid を酵母で生産させるという報告(Ro D-K., et al. (2006) *Nature* 440: 940-943)があり、微生物での有用物質生産は医薬の分野においても関心が高まっているが、これまでに微生物と植物の酵素を組み合わせさせてイソキノリンアルカロイドをアミノ酸から生合成させるという報告はない。これまでに研究代表者らは、微生物のモノアミン酸化酵素(MAO)とイソキノリンアルカロイド生合成酵素を組み合わせ、ドーパミンから抗細菌剤、抗マラリア剤、抗がん剤の重要な前駆物質であるレチクリンの大量生産を大腸菌発現系にて成功している。さらには、P450 オキシダーゼ酵素を導入した酵母を共培養することで、抗 HIV 作用およびアテローム動脈硬化症の進行抑制効果が期待されるアポルフィン型アルカロイド、マグノフロリンの生産にも成功している(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 7393-7398 (2008)、および特許出願済み)。研究代表者らのグループは、微生物におけるイソキノリンアルカロイド生産を世界で初めて成功しており、研究を牽引する立場にいる。

2. 研究の目的

植物のもつ極めて多様な二次代謝産物、特に、その生理活性が顕著であるアルカロイドに焦点を絞り、代謝工学ならびに合成生物学的手法により、新規有用生理活性物質生産の基盤的技術開発を行なう。具体的には、これまでに生合成系遺伝子の機能解析が進行しているイソキノリンアルカロイド生合成系を対象に、単離した生合成遺伝子を用いてアルカロイド生合成系の微生物における人工的再構築を行なう。さらに、植物のアルカロ

イド生合成経路に微生物の酵素を組み合わせることでその代謝経路を改変し、微生物発現系で新規な二次代謝生合成経路を構築することで、高効率な植物アルカロイド生産を行うだけでなく、植物で産生されない新規な生理活性を有した化合物を合成し、創薬への展開の基礎を固める。

3. 研究の方法

モルヒネ合成系を含む多様な新規化合物生産法の基盤を開発する。ほぼ全てのベルベリン生合成系遺伝子が単離できたことより、合成生物学的手法によってアルカロイド生合成系の人工的再構築を微生物発現系において行ない、生体内における機能複合体の再構築と人工的代謝産物生産の分子基盤について解析する。

(1) これまでに、抗細菌剤、抗マラリア剤、抗がん剤の重要な前駆物質であるレチクリンの生合成経路の再構成を大腸菌発現系にて既に確立している。さらにこのレチクリン生合成経路を基盤として、複数の生合成経路を組み合わせることで多様なイソキノリンアルカロイドの生合成を既に確立した。マグノフロリンおよびスコウレリンが生合成可能であり、医薬的に重要なマグノフロリンの効率的な生産を行う。本システムでは、多様なイソキノリンアルカロイド生合成のために大腸菌と酵母との共発現系を用いているが、より効率的なマグノフロリン生産のために、大腸菌のみによる生産を行う。そのために P450 酵素の大腸菌における発現システムを構築する。

(2) さらに、アルカロイド系麻薬であるモルヒネ、コデインの微生物での生産を最終目的とする。それに先立ちアルカロイド系麻薬であるテバインの生産を行う。ケシ cDNA から、salutaridine synthase、salutaridine reductase、salutaridinol

7-O-acetyltransferase の単離を行い、大腸菌での発現系を構築する。これらの遺伝子配列は既に明らかになっているので、単離に問題はない。3 遺伝子を用いることで、レチクリンからアルカロイド系麻薬であるテバインの合成が可能である。

(3) これまでに、ドーパミンを基質にした微生物発現系でのイソキノリンアルカロイド生産に成功している。そこで、チロシンからドーパミンまでの生合成経路をチロシン生産大腸菌内で再構成し、構築済みの生産システムと組み合わせることで、ドーパミン添加を必要としない、微生物発酵法による効率的なアルカロイド生産を行う。

4. 研究成果

(1) 既に酵母において構築していた P450 酵素(CYP80G2)の発現システムを大腸菌で

も構築した。CYP80G2 の N 末端に大腸菌 *ompA* 遺伝子のシグナル配列を付加し、*Bacillus megaterium* 由来 P450 還元酵素との融合体を作製することで、より効率的な大腸菌発現株を作製した。この発現株を用いることで、ノルラウダノソリンから 5-7% の変換効率でコリツペリンを生産することが出来た (図 1)。これにより、大腸菌での効率的なマグノフロリン生産が可能となった。また、既に構築しているレチクリン生産システムにおいても、生産性の改善を目的に、培養条件等を検討した。これまでの研究で、ドーパミンの利用効率の低さが生産性の律速であることが明らかになっている。そこで、初発の MAO とノルコクラウリン合成酵素 (NCS) の反応における最適な酵素比率を決定した。精製酵素を用いた解析により、MAO と NCS が重量比で 1 : 8 の時に最も効率良く反応することが明らかとなった。

(2) 医薬的に重要なアルカロイド系麻薬、

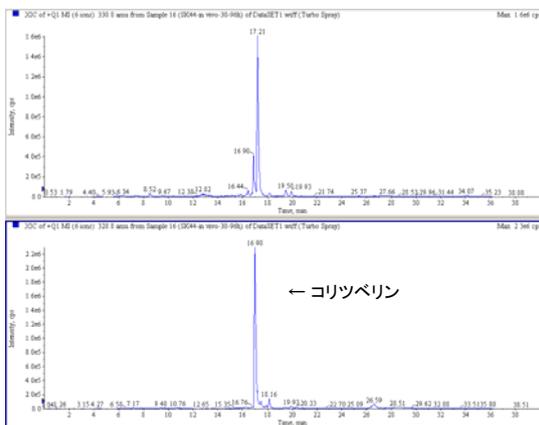


図1 CYP80G2発現大腸菌株によるコリツペリン生産

テバインの生産を目的に、その生合成遺伝子 (salutaridine synthase、salutaridine reductase、salutaridinol 7-O-acetyltransferase) の単離をケシ cDNA から行い、さらに各遺伝子の大腸菌での発現株を構築した。モルヒネとコデインの中間の鎮痛作用を持ち、副作用が少なく、鎮痛、鎮静、鎮咳薬として用いられているオキシコドンは、テバインから化学的に誘導される。そのため、テバイン合成はモルヒネ、コデイン合成のための中間産物というだけでなく、化学合成による医薬品生産の重要な出発物質となる。テバイン生合成経路をレチクリン生産大腸菌に導入し、テバインの生産を行った。LC-MS 解析の結果、サルタリジンの生産は確認できたが、テバインは検出されなかった。現在、サルタリジン以降の生産条件を検討中である。

さらに、大腸菌によるモルヒネ、コデインの生産を目的に、テバインからモルヒネまで

の生合成酵素 (thebaine 6-O-demethylase、codeine O-demethylase、codeinone reductase) の単離と大腸菌発現株の構築を行った。

(3) 大腸菌において、芳香族アミノ酸代謝にかかわる遺伝子群全般の発現を制御する DNA 結合型の転写調節因子 (tyrR 遺伝子) を欠損させた。そして、フィードバック阻害耐性

3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (*aroG* gene) と chorismate mutase/prephenate dehydrogenase (*tyrA* gene)、さらに Phosphoenolpyruvate synthetase (*ppsA* gene) と transketolase (*tktA* gene) を過剰発現させることで、チロシン生産菌を作製した。このチロシン生産菌に、*Streptomyces castaneoglobisporus* 由来 tyrosinase と *Pseudomonas putida* 由来 DOPA decarboxylase、およびドーパミンからのレチクリン生合成酵素を導入することで、微生物発酵法によるイソキノリンアルカロイド生産システムを構築した (図 2, 3)。

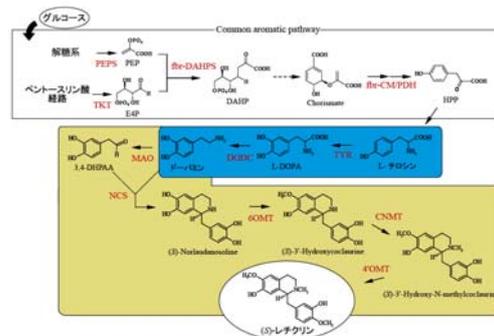


図2 フィードバックレギュレーション (fb) を解除したチロシン生産プラットフォーム、ドーパミン生合成プラットフォームの構築による効率的レチクリン生産プラットフォームの確立。

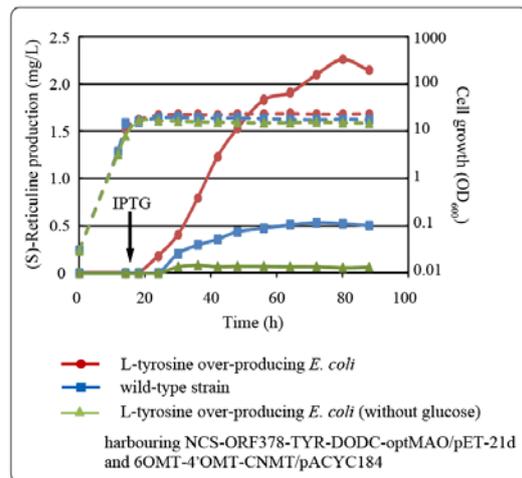


図3 微生物発酵法によるグルコースからのレチクリン生産

さらに、レチクリン生合成経路における律速段階を明らかにするため、メタボローム解析を行った。その結果、tyrosinase による L-tyrosine から L-DOPA への変換が律速で

あることが明らかとなった。そこで、L-DOPA 生産に適した tyrosinase のスクリーニングを行い、*Ralstonia solanacearum* 由来 tyrosinase を用いることで、レチクリン生産量を 6 mg/L から 46 mg/L へと増加させることが出来た。これらの結果より、アルカロイド生合成系の微生物における人工的再構築の有効性が示された。

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 2 件)

- ① Akira Nakagawa, Hiromichi Minami, Ju-Sung Kim, Takashi Koyanagi, Takane Katayama, Fumihiko Sato & Hidehiko Kumagai, A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. *Nature Communications*, 査読有, 2, 2011, 326.
- ② 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、化学と生物、査読無、47、2009、528-530

[学会発表] (計 9 件)

- ① 松島 康高、イソキノリンアルカロイド生合成酵素 THBO の機能解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、大会中止により要旨集のみ 2011 年 3 月 26 日発行、京都女子大学 (京都府)
- ② 中川 明、大腸菌を用いたベンジルイソキノリンアルカロイド直接発酵系の構築、日本農芸化学会 2011 年度大会、大会中止により要旨集のみ 2011 年 3 月 26 日発行、京都女子大学 (京都府)
- ③ 南 博道、微生物発酵法によるイソキノリンアルカロイド生合成工学、第 47 回植物化学シンポジウム、2010 年 11 月 8 日、静岡県立大学 (静岡県)
- ④ 中川 明、大腸菌を用いたベンジルイソキノリンアルカロイド生合成系の構築、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学 (東京都)
- ⑤ 小柳 喬、バクテリア由来芳香族アミノ酸脱炭酸酵素の機能解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京大学 (東京都)
- ⑥ 南 博道、微生物における植物イソキノリンアルカロイド生合成工学、第 82 回日本生化学会大会シンポジウム、2009 年 10 月 21 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑦ 南 博道、植物イソキノリンアルカロイドの微生物生産システムの構築、第 27 回日本植物細胞分子生物学会、2009 年 7 月 31 日、日本大学 (神奈川県)

- ⑧ 佐藤 文彦、ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成系の合成生物学、日本薬学会、2009 年 3 月 26 日、国立京都国際会館 (京都府)
- ⑨ 南 博道、微生物による植物イソキノリンアルカロイド生産、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 26 日、福岡国際会議場 (福岡県)

[図書] (計 1 件)

- ① Hiromichi Minami, Nobuhiro Ikezawa, and Fumihiko Sato, Humana Press, Plant Secondary Metabolism Engineering: Methods and Applications. 2010, p. 111-120.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 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
番号: 特願 2010-212261
出願年月日: 2010 年 9 月 22 日
国内外の別: 国内

名称: 芳香族アミンの製造方法
発明者: 小柳 喬、南 博道、片山 高嶺、熊谷 英彦
権利者: 味の素株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2009-295296
出願年月日: 2009 年 12 月 25 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

片山 高嶺 (KATAYAMA TAKANE)
石川県立大学・生物資源環境学部・准教授
研究者番号: 70346104

(3) 連携研究者

佐藤 文彦 (SATO FUMIHIKO)
京都大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号: 10127087