

機関番号：23303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780080

研究課題名（和文） チロシン生産菌による植物アルカロイド発酵生産

研究課題名（英文） Fermentative production of plant alkaloids in L-tyrosine producing *Escherichia coli*.

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）：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転写調節因子（*tyrR*）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 と chorismate mutase/prephenate dehydrogenase、さらに Phosphoenolpyruvate synthetase と transketolase 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、*Ralstonia solanacearum* 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。本生産システムを用いることで、効率的な植物アルカロイドの生産が可能になった。

研究成果の概要（英文）：We generated an *E. coli* strain that over-produces L-tyrosine by two steps of genetic engineering. An *E. coli* strain has disrupted the *tyrR* gene, the product of which represses the expression of genes involved in aromatic amino acid biosynthesis. In addition, the feedback-inhibition-resistant (fbr) 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, fbr-chorismate mutase/prephenate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate synthetase, and transketolase are over-expressed in an *E. coli* strain disrupted the *tyrR* gene. We establish an *E. coli* fermentation system that yields plant alkaloids from simple carbon sources, introducing tyrosinase from *Ralstonia solanacearum*, DOPA decarboxylase from *Pseudomonas putida*, and reticuline biosynthetic enzymes from dopamine in the L-tyrosine over-producing *E. coli* strain. The fermentation platform described here offers opportunities for low-cost production of many diverse alkaloids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：植物アルカロイド、レチクリン、発酵生産

1. 研究開始当初の背景

植物は、アルカロイド等の様々な二次代謝

産物を産生する。アルカロイドの中でも、モルヒネやテバイン等に代表されるイソキノリンアルカロイドは、生理機能、薬理機能が多種多様で医薬品として幅広く利用されている。しかしながら、その生産の多くは植物からの抽出によるものであり、収量と品質の均一性にはまだ多くの問題がある。植物におけるアルカロイドの大量生産においては、RNAi 法を用いた遺伝子組み換え植物体や培養細胞を対象として研究が行われているが、個体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ノン還元酵素の働きを止めることで、イソキノリンアルカロイド中間体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。一方、微生物での有用物質生産においては、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、医薬の分野においても関心が高まっている。しかしながら、植物のアルカロイド、特にイソキノリンアルカロイドに関しては重要な生理活性を有するにも関わらず、微生物を用いたアミノ酸からの大量生産についての研究は行われていない。

これまでに我々は、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（Minami H., et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 7393-7398）。我々のグループは、微生物におけるイソキノリンアルカロイド生産に世界で初めて成功しており、研究を牽引する立場にいる。これに追随して、他研究グループも酵母におけるイソキノリンアルカロイド生産を行っており（Hawkins KM., et al. (2008) *Nat. Chem. Biol.* 4: 564-573）、微生物におけるイソキノリンアルカロイド生産は、重要性を高めている。しかしながら、いずれも微生物でのアルカロイド生産に基質の添加を必要としており、発酵法によるアルカロイド

生産は行われていない。他研究グループの生産法ではイソキノリン骨格を基質としているのに対し、我々はドーパミンを基質とした生産に成功している。そこで、我々の生産システムをさらに発展させることを目的として、チロシン生産菌による植物アルカロイド発酵生産を行うに至った。

## 2. 研究の目的

医薬的に重要なアルカロイド系麻薬（モルヒネやコデイン）は、植物の産生するイソキノリンアルカロイドであり、チロシンから生合成される。これまでに、我々は、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、本研究では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、イソキノリンアルカロイド生産システムと組み合わせることで、効率的なアルカロイド生産を行う。すなわち、ドーパミン添加を必要としない、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の構築を目的とする。

## 3. 研究の方法

基質の添加を必要としない大腸菌でのイソキノリンアルカロイド生産システムの構築を目的として、（1）チロシン生産大腸菌の作製、（2）チロシンからドーパミンまでの生合成経路の再構成によるドーパミン生産、（3）ドーパミン生産大腸菌へのアルカロイド生産システムの導入、を行う。

### （1）チロシン生産大腸菌の作製

これまでに大腸菌でのチロシン生産は、多数の方法によって行われている（Ikeda, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2006) 69: 615-626. Lütke-Eversloh, T., et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2007) 75: 103-110. Lütke-Eversloh, T., et al. *Metab. Eng.* (2008) 10: 69-77.）。具体的には、大腸菌において i) 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）を欠損させることで、チロシン生産菌が得られる。さらに、

ii) 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase をコードする *aroG* 遺伝子と chorismate mutase/prephenate dehydrogenase をコードする *tyrA* 遺伝子を大量発現させることで、チロシン生産量がさらに増加することも明らかとなっている。これらの方法を利用することで、チロシン生産大腸菌の構築を行う。イソキノリンアルカロイド生合成の詳細は未だ明らかになっていないため、チロシン生産量とアルカロイド生産量が比例するとは限らない。そのため、単純にチロシン生産量の多い菌を作製する

のではなく、i) および ii) を組み合わせた様々な生産量の大腸菌を作製する。

(2) チロシン生産大腸菌へのチロシン水酸化酵素およびドーパ脱炭酸酵素の導入

大腸菌でのドーパミン生産を目的として、チロシンからドーパミンまでの生合成経路を再構成するために、これらの生合成酵素である、チロシン水酸化酵素とドーパ脱炭酸酵素のクローニングおよび大腸菌での発現ベクターを作製する。そして、両酵素発現ベクターを(1)で作製したチロシン生産大腸菌に導入することで、大腸菌でのドーパミン生産を行う。チロシン水酸化酵素およびドーパ脱炭酸酵素は、既に様々な生物種からクローニングされており、複数の遺伝子が利用可能である。さらに、当研究室でも微生物から2種類のドーパ脱炭酸酵素の単離に成功しており、本研究に利用可能である。チロシン生産大腸菌作製と同様に、効率的な発酵法によるイソキノリンアルカロイド生産に向けて、様々なドーパミン生産量の大腸菌株を作製しておく。

(3) ドーパミン生産大腸菌への植物アルカロイド生産システムの導入

作製したドーパミン生産大腸菌に対して、既に確立しているアルカロイド生産システムを導入する。具体的には、ドーパミンからレチクリンまでの生合成酵素(MAO, NCS, 6OMT, CNMT, 4' OMT)の発現ベクターをドーパミン生産大腸菌に導入する。まずは、既存のレチクリン生合成遺伝子発現ベクターを導入して、レチクリン生産を行う。チロシン生産量と比べて優位なレチクリン生産量が得られない場合は、ドーパミン生合成酵素(チロシン水酸化酵素、ドーパ脱炭酸酵素)とレチクリン生合成酵素の発現ベクターの構築を再検討する。

(4) 発酵法によるイソキノリンアルカロイド生産条件検討

作製したチロシン生産大腸菌におけるイソキノリンアルカロイド生産システムの条件検討を行う。具体的には、培地組成や培養条件、界面活性剤等の添加剤利用を検討する。発酵法によるイソキノリンアルカロイド生産が非効率な場合、ドーパミンよりも効率の良い基質の利用を検討する。そして、バイオリアクターでの生産条件検討や、固定化酵素を用いた生産システムの構築を行い、発酵法によるイソキノリンアルカロイドの生産基盤を確立する。

#### 4. 研究成果

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-phosph

hate 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1)。本生産システムは、15 g/L のグリセロールから、最大で 6 mg/L のレチクリンを培地中に生産した。本生産システムを用いることで、効率的な植物アルカロイドの生産が可能になった。

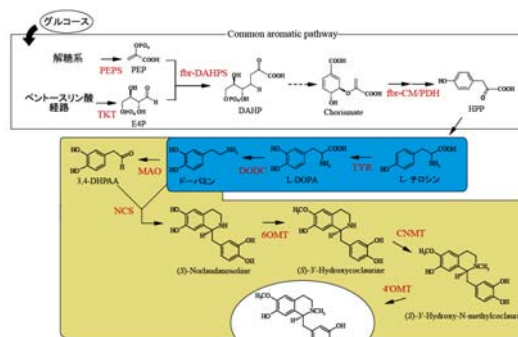


図1 フィードバックレギュレーション (fb) を解除したチロシン生産プラットフォーム、ドーパミン生合成プラットフォームの構築による効率的レチクリン生産プラットフォームの確立。

生合成経路における律速段階を明らかにするため、生成物の解析を行った。LC-MS/MS解析の結果、最終産物である reticuline だけでなく、dopaquinone の蓄積が見られた。Tyrosinase は L-tyrosine から L-DOPA への変換を触媒するだけでなく、さらに L-DOPA を dopaquinone へと変換する。そこで、L-DOPA から dopaquinone への酸化活性の低い *Ralstonia solanacearum* 由来 tyrosinase を生産システムに用いることにした。その結果、15 g/L のグリセロールから、46 mg/L の reticuline 生産に成功した(図2)。本生産システムを用いることで、植物アルカロイドの実用生産が可能になると考えられる。

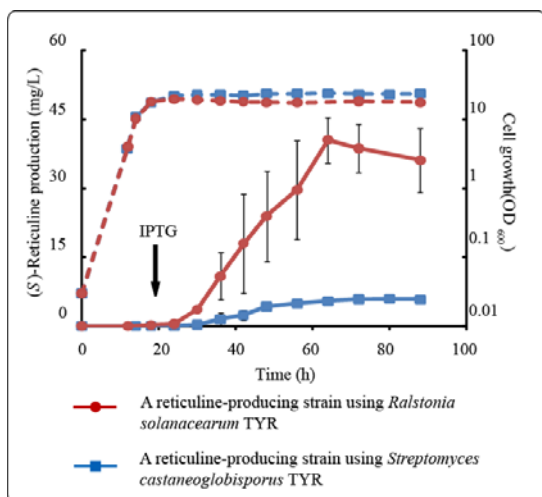


図2 グリセロールからのレチクリン生産

## 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7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)

[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

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: