

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分  
平成28年3月14日現在

植物アルカロイド生合成系の分子進化の解明と代謝工学  
Characterization of Molecular Evolution of Plant  
Isoquinoline Alkaloid Biosynthesis and its Application to  
Metabolic Engineering



課題番号：26221201

佐藤 文彦 (Sato Fumihiko)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授

研究の概要

本研究では、キンポウゲ科（オウレン）ならびにケシ科（ハナビシソウ）のイソキノリンアルカロイド（IQA）生合成系に関する分子情報解析を基盤として、より広範な植物種のIQA生合成の分子進化を分子細胞生物学的に解明し、代謝工学による多様な新規有用物質生産系を確立するとともに、その安定生産のための遺伝子発現制御系を確立する。

研究分野：農芸化学、応用生物化学

キーワード：代謝工学、合成生物学、有用イソキノリンアルカロイド生産

1. 研究開始当初の背景

植物の二次代謝産物は25万種にも及び、その構造と生理活性の多様性から多くの研究者の関心を集めてきたが、含量が微量、かつ、代謝系が多岐にわたることより、その生合成系の分子生物学的・細胞生物学的解析、ならびに代謝工学的応用は遅れていた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに我々が解明してきたキンポウゲ科（オウレン）ならびにケシ科（ハナビシソウ）のイソキノリンアルカロイド（IQA）生合成系に関する分子情報解析を基盤として、より広範なIQA、特に、進化的、あるいは、生合成経路的に異なるウマノスズクサ科（ウマノスズクサ）やヒガンバナ科（ヒガンバナ）、アカネ科（トコン）、ミカン科（キハダ）におけるIQA生合成の分子進化を分子細胞生物学的に解明し、代謝工学による多様な新規有用物質生産系を確立するとともに、その安定生産のための遺伝子発現制御系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

二次代謝産物のなかでもっとも多様な構造と生理活性を示す植物イソキノリンアルカロイド生合成系の分子進化の解明、代謝工学による代謝再構築、ならびに生理機能評価を行うために、まず、これまでに分子研究が最も進行しているケシ科ハナビシソウのIQA生合成系を対象に、そのゲノム構造とその遺伝子機能を解析し、その生合成ネットワークを解明することを試みた。

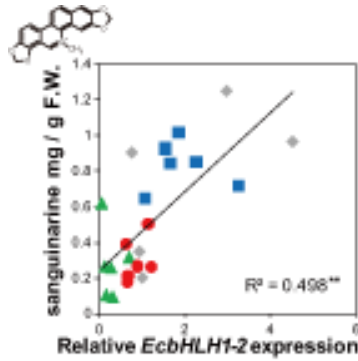
それとともに、異なるIQAを産生するアカネ科のトコン、ヒガンバナ科のIQA生合成系の分子レベルでの解析と代謝工学による改変制御、さらには生理機能評価を行う。また、キンポウゲ科やケシ科とは進化的に遠縁になるウマノスズクサ科やミカン科（キハダ）のIQA生合成系との比較解析により、IQA生合成系の分子進化の統合的理解とその応用基盤を確立することを試みた。

4. これまでの成果

I. 「ゲノム遺伝子配列情報を元にしたIQA生合成酵素ネットワークの解明」

ケシ科ハナビシソウのドラフトゲノム（総塩基数0.42Gb）配列情報を元に、IQA生合成遺伝子クラスターの解析、IQA生合成に関わるP450遺伝子群のシロイヌナズナとの比較を行ない、IQA生合成系のCYP80、CYP82、CYP719ファミリー遺伝子がハナビシソウにおいて特徴的に増幅していること、また、CYP82遺伝子が特定のscaffoldにクラスター形成していることを明らかにした。また、これらの生合成遺伝子をカタログ化し、解析することによりmacarpine生合成と関連する生合成遺伝子を同定した。

一方、転写調節ネットワーク解析を行うために、ハナビシソウから転写因子候補EcbHLH1-1, 1-2を単離し、その機能解析を行ない、EcbHLH1-2がサンギナリン生合成を制御していることを明らかにした。また、ゲノム編集を用いた相同組換え系をオウレンプロトプラスト系において確立した。



EcbHLH1-2 とサンギナリン産生の相関

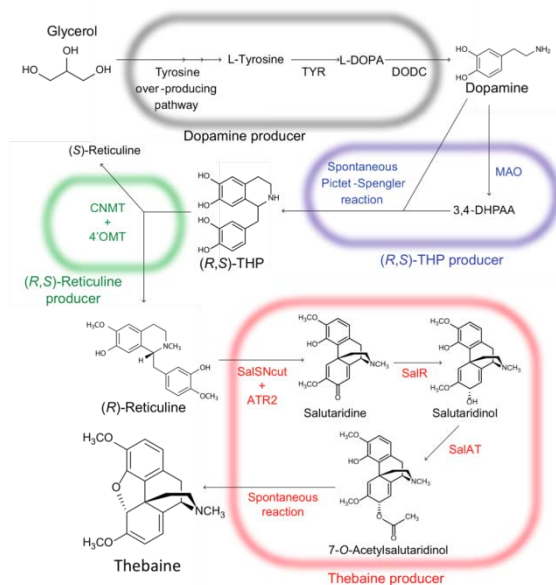
II. 「次世代シーケンサー(NGS)を用いた比較ゲノム解析による多様なアルカロイド生合成系の解析」

トコン培養根、ウマノズクサ培養細胞からの再分化系を確立し、その発現 RNA 解析を行った。

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築」

グリセロールからの(S)-レチクリン生産系を一部改変し、より高効率なレチクリン生産系を確立するとともに、さらに、ケシのモルフィナンアルカロイド生合成酵素遺伝子を用いて、テバイン、ハイドロコドンを生産する大腸菌培養系を構築した。

また、*Pichia* 酵母を用いたレチクリンからスタイロピン生合成の再構築を行い、共培養系は反応に時間がかかるが反応阻害が起こりにくいことを明らかにした。



大腸菌におけるテバイン生産の概略

#### IV. 生理活性評価

線虫において *nhr-8* 遺伝子が IQA アルカロイド、特に、ベルベリンに対する感受性に大きく作用することを明らかにした。また、マウス 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化系において IQA の効果を検証し、ベルベリンを上回る抑制効果を示す新規化合物を新たに見出した。その作用機構を検証した結果、AMPK を介した作用とともに、新奇な作用機構の可能性を示唆する結果を得た。

#### 5. 今後の計画

I. ゲノム遺伝子配列情報を元にした IQA 生合成酵素ネットワークの解明の加速。

II. トコン、ウマノズクサ等における IQA 生合成の比較ゲノム解析、微生物におけるイソキノリン代謝系の解析、ならびに異種発現系による解析の加速。

III. モルフィナンアルカロイド、ならびに、より多様な IQA の微生物生産の検討

IV. 動物細胞を用いた IQA 化合物の生理活性評価の加速、ならびに、多様な IQA を生産する培養細胞/植物体の作成と植物体における IQA 機能評価

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1) Nakagawa A., Matsumura E., Koyanagi T., Katayama T., Kawano N., Yoshimatsu K., Yamamoto K., Kumagai H., Sato F. and Minami H. (2016) Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. *Nature Communications* 7, 10390.

2) Hori, K., Okano, S., Sato F. (2016) Efficient microbial production of stylophine using a *Pichia pastoris* expression system. *Scientific Reports* 6, Article number: 22201.

3) Yamada, Y., Motomura, Y., Sato F. (2015) CjbHLH1 homologs regulate sanguinarine biosynthesis in *Eschscholzia californica* cells. *Plant Cell Physiol.* 56(5): 1019-1030.

4) Chow, Y.-L., Kawasaki, Y., Sato F. (2014) Knockdown of the NHR-8 nuclear receptor enhanced sensitivity to the lipid-reducing activity of alkaloids in *Caenorhabditis elegans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78 (12), 2008-2013.

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/callus/>