

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2017

課題番号：26221201

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Characterization of molecular evolution of plant isoquinoline alkaloid biosynthesis and its application to metabolic engineering

研究代表者

佐藤 文彦(Sato, Fumihiko)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10127087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 147,500,000円

研究成果の概要(和文)：ケシ科ハナビソウゲノム配列の決定ならびに、発現するRNA配列の解析により、イソキノリンアルカロイド(IQA)生合成酵素ならびに転写因子遺伝子の同定と転写ネットワーク解析を大きく進展させた。また、多様なIQA生合成系について比較ゲノム解析するとともに、ベルベリン分解菌のゲノムを解読し、ベルベリン分解酵素を同定し、IQA生合成・代謝系の分子進化に大きな知見を与えた。

これらの生合成酵素遺伝子等を用いてモルフィナンアルカロイドの微生物生産系等を構築するとともに、その生産性を向上させた。また、マウス3T3-L1細胞を用いて強い脂質蓄積抑制効果をもつ13-methylberberineを見出した。

研究成果の概要(英文)：1) Genes for biosynthetic enzymes, especially novel cytochrome P450 and O-methyltransferases, and transcription factors in isoquinoline alkaloid (IQA) biosynthesis were identified based on the draft genome sequence and transcriptome analysis of *Eschscholzia californica*. 2) Post-transcriptional regulation of WRKY transcription factor in *Coptis japonica* were characterized for the stable metabolite production. 3) Transcriptomes were characterized in several IQA producing plants to isolate IQA biosynthetic enzyme genes. 4) Common origin of methylenedioxy ring degradation and demethylation enzyme was identified in bacteria. 5) For the microbial production of useful IQAs, total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation was established in engineered *Escherichia coli*, beside the efficient microbial production of stylophine using a *Pichia pastoris* expression system. 6) 13-Methylberberine, a berberine analogue with stronger anti-adipogenic effects on mouse 3T3-L1 cells was identified.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：植物アルカロイド生合成系 生合成系の分子進化 代謝工学と代謝再構築 有用二次代謝産物生産 生理機能評価



二次代謝誘導因子であるメチルジャスモン酸処理による遺伝子発現を解析することにより、ERF, bHLH, WRKY 転写因子群が IQA 生合成酵素の発現に先駆けて発現誘導していること、また、ERF, bHLH, WRKY から生合成遺伝子の発現に至る転写カスケードの概要を明らかにした（未発表データ）。

また、WRKY 転写因子によるオウレン IQA 生合成系の発現制御を詳細に解析し、WRKY による IQA 生合成制御において WRKY の Y(チロシン)のリン酸化とタンパク質分解が重要であること、すなわち、転写因子の転写後制御が安定した物質生産（IQA）生産において重要であることを初めて明らかにした（主な発表論文 7、図 3）。また、オウレンの WRKY が他の IQA 産生植物でも有効であることを明らかにした（主な発表論文 6）。

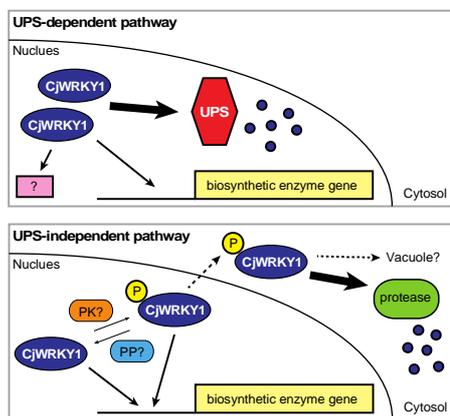


図3 オウレンの IQA 生合成系における WRKY 転写因子の転写後制御の模式図

さらに、転写因子の機能解析を進める手法として、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集をオウレンプロトプラストに適用し、相同 DNA 配列を用いたノックイン系を確立し、GFP による検出を可能にするとともに、蛍光をもとにノックイン細胞を単離し、1細胞解析できることを明らかとした（未発表データ）。

## 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」

多様な植物種における IQA 生合成遺伝子を解析するために、トコン培養根、ウマノスズクサ培養細胞からの再分化系を確立し、それぞれの組織における発現 RNA 解析を行った。また、培養細胞化が不十分であったヒガンバナ、エンゴサクからは、異なる組織から RNA を調製し、その配列解析を行った（未発表データ）。特に、IQA 主要経路を共有すると考えられるウマノスズクサのアリストロキア酸生合成系に注力し、推定されていた IQA 生合成経路の妥当性を含め検討した。その結果、ウマノスズクサの推定 IQA 生合成経路における酵素候補遺伝子をほぼ特定する

とともに、ウマノスズクサの magnoflorine 生合成に関与する CYP80G2 様遺伝子を同定することができた。また、アリストロキア酸の生合成において、重要な 3'位の O-メチル化を行う OMT 活性を組換えタンパク質を用いて検出し、ウマノスズクサ生合成酵素の特異性を明らかにした。（未発表データ）

これらの結果は、困難はあるが、比較ゲノム解析による生合成系解析の有効性をしめすとともに、IQA 生合成系において生合成酵素が極めて多様化し、生合成系進化の重要な起点として機能していることを示唆していた。また、これらの酵素は、多様なアルカロイド類の代謝工学・合成生物学による物質生産のよい材料を提供するものであった。

また、ベルベリンを単一炭素源として生育する細菌を単離し、解析した。単離した菌株における分解経路の解析から、2,3-メチレンジオキシ環の脱メチレン化が鍵反応として重要であることを明らかにした。さらに、同反応に関与する遺伝子 *brdA* をトランスポゾン変異導入実験ならびに相補実験で同定した。興味深いことに、同酵素はテトラヒドロ葉酸(THF)要求性であり、グリシン分解の脱メチル酵素と高い相同性を有するものであったことから、細菌によるメチレンジオキシ環の脱メチレン化や脱メチル化は、原核および真核生物の両方に共通する基本的な代謝を担うグリシンの C1 代謝に由来することが考察された（主な発表論文 4 他、図 4 参照）

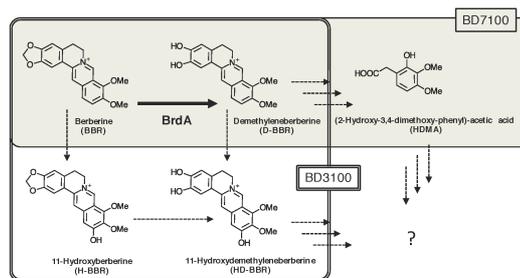


図4 ベルベリン資化性菌におけるベルベリン分解経路

## 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」

これまでの研究において、グリセロールから(S)-レチクリンを生産する大腸菌株が確立されていた。同大腸菌生産系をさらに改変することにより、より高効率なレチクリン生産系を確立した（主な発表論文 12）。また、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ることにより、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（主な発表論文 8 他、図 5 参照）。

この成果は、酵母でのテバイン生産の報告にわずかに遅れをとったが、生産性は 2.3mg/L と酵母での報告の数百倍であった。

その後も、生産性の安定性を向上するため、ゲノムに生合成酵素遺伝子を組み込んだ大腸菌を作成し、そのレチクリンの生産性は、166 mg/L に達している。

また、ヒト硫酸基転移酵素の導入によりレチクリン等の硫酸抱合体の生産が可能になった。抱合体の生理活性評価も合わせて行ない、抱合体化により生理活性の改変が起こることも明らかにした(主な発表論文2)。

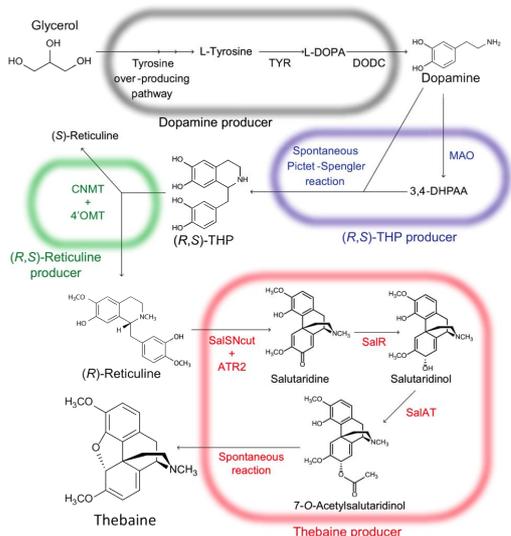


図5 大腸菌を用いたテバイン生産系の確立

重要中間体であるレチクリンの高生産系が開発されたことから、レチクリンからのアルカロイド変換についても開発した。具体的には、*Pichia* 酵母に生合成酵素遺伝子を組み込み、その共培養によるレチクリンからスタイロピン生産系の再構築が可能であること、また、共培養系は反応に時間がかかるが反応阻害を避けられることを明らかにした(主な発表論文9)。

#### IV. 生理活性評価

多様な植物 IQA の有効活用をはかるために、線虫ならびにマウス 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化系における脂質蓄積に対する IQA アルカロイドの効果をベルベリンと比較評価した。その結果、ベルベリン以外にも多くの IQA 分子が脂質蓄積抑制活性をもつことを明らかにした。線虫における評価においては、*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が明らかになった(主な発表論文14)。一方、マウス細胞を用いた検証から、線虫とマウスにおける効果の違いが明らかになり、線虫では、ベルベリンの分解が著しいことが判明した。また、マウス細胞を用いた評価において、ベルベリンを上回る抑制効果を示す新規化合物として、13-メチルベルベリンを見出した。13-メチルベルベリンは、ベルベリン

同様 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した(主な発表論文10他、図6参照)。また、dihydrosanguinarine のグルコース取込み促進効果を明らかにした(主な発表論文5)。

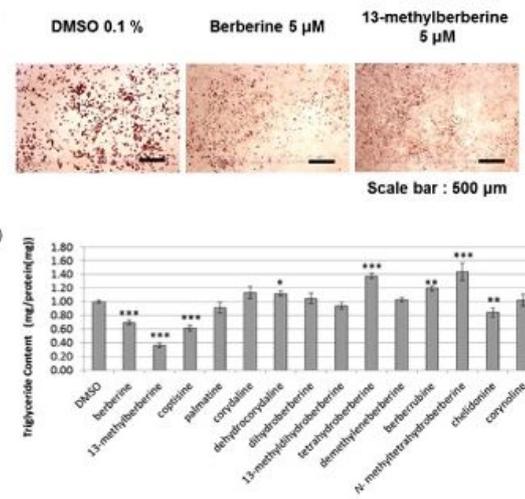


図6 13-メチルベルベリンは、ベルベリンより低濃度で強い脂質蓄積抑制効果を示した

以上のように、植物のみならず、微生物を含めた IQA の生合成、あるいは、代謝系の分子進化の理解に重要な多くの知見を得るとともに、これらの知見を活用した代謝工学、ならびに合成生物学による物質生産系の開発、さらには、生理活性評価に貢献した。

#### 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24件)

- Hori, K., Yamada, Y., Purwanto R., Minakuchi, Y., Toyoda, A., Hirakawa, H., Sato, F. (2018) Mining of the uncharacterized cytochrome P450 genes involved in alkaloid biosynthesis in California poppy using a draft genome sequence. *Plant Cell Physiol.*, 59, 222-233. doi.org/10.1093/pcp/pcx210.
- E. Matsumura, A. Nakagawa, Y. Tomabechei, S. Ikushiro, T. Sakaki, T. Katayama, K. Yamamoto, H. Kumagai, Sato, F., H. Minami (2018) Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. *Scientific Reports*, in press. DOI:10.1038/s41598-018-26306-7
- R. Purwanto, K. Hori, Y. Yamada, and Sato, F. (2017) Unraveling additional O-methylation steps in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in California poppy (*Eschscholzia californica*). *Plant Cell Physiology* 58(9), 1528-1540. DOI:10.1093/pcp/pcx093.
- H. Takeda, K. Ishikawa, H. Yoshida, D.

- Kasai, D. Wakana, M. Fukuda, F. Sato, T. Hosoe (2017) Common origin of methylenedioxy ring degradation and demethylation in bacteria, accepted June 28, 2017 *Scientific Reports* 7, 7422. doi:10.1038/s41598-017-07370-x
- 5) Y.-L. Chow, Y. Iwata and F. Sato (2017) Dihydroanguinarine enhances glucose uptake in mouse 3T3-L1 cells. *ACS omega*, 2(10), 6916-6925. doi: [10.1021/acsomega.7b01134](https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01134)
- 6) Y. Yamada, T. Shimada, Y. Motomura, F. Sato (2017) Modulation of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis by heterologous expression of CjWRKY1 in *Eschscholzia californica* cells. *PLOS ONE*, 12, 10. e0186955. doi: 10.1371/journal.pone.0186953
- 7) Yamada, Y., Sato F. (2016) Tyrosine phosphorylation and protein degradation control the transcriptional activity of WRKY involved in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Scientific Reports*, 6, 31988; doi:10.1038/srep31988.
- 8) 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. DOI: 10.1038/NCOMMS10390
- 9) K. Hori, S. Okano, F. Sato (2016) Efficient microbial production of stylophine using a *Pichia pastoris* expression system. *Scientific Reports* 6, 22201. doi: 10.1038/srep22201
- 10) Y.-L. Chow, Y.-L., M. Sogame, M. and Sato F. (2016) 13-Methylberberine, a berberine analogue with stronger anti-adipogenic effects on mouse 3T3-L1 cells, *Scientific Reports* 6, 38129 DOI: 10.1038/srep38129
- 11) Y. Yamada, T. Yoshimoto, S. Tsushima-Yoshida and F. Sato (2016) Characterization of the promoter region of biosynthetic enzyme genes involved in berberine biosynthesis in *Coptis japonica*. *Frontiers in Plant Science*, section Plant Metabolism and Chemodiversity, 7:1352. doi: 10.3389/fpls.2016.01352
- 12) E. Matsumura, A. Nakagawa, Y. Tomabechi, T. Koyanagi, H. Kumagai, K. Yamamoto, T. Katayama, F. Sato, and H. Minami (2016) Laboratory-scale production of (S)-reticuline, an important intermediate of benzyloisoquinoline alkaloids, using a bacterial-based method. *Biosci. Biotech. Biochem.* 81(2): 396-402. doi:10.1080/09168451.2016.1243985
- 13) Yamada, Y., Motomura, Y., Sato F. (2015) CjbHLH1 homologs regulate sanguinarine biosynthesis in *Eschscholzia californica* cells. *Plant Cell Physiol.* 56(5): 1019-1030. Doi. 10.1093/pcp/pcv027.
- 14) 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. DOI: 10.1080/09168451.2014.940278
- 〔学会発表〕(計 46 件;うち招待講演 11)
- 1) Sato F., Yamada, Y., Hori, K. (2018) Draft genome sequence and genes involved in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in California poppy. IAPB2018 (19-24, August, Dublin, Ireland) 口頭発表
- 2) Sato F. (2017) Synthetic biology goes in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. The 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Metabolism (ICPM 2017) (July 16-20, Dalian, China) 招待講演
- 3) Sato F. (2017) Synthetic biology of plant specialized metabolism using NGS information of non-model medicinal plants. Plant Genomics & Gene editing, Asia Congress (April. 10, Hong Kong) 招待講演
- 4) Sato F. (2017) Microbial production of Opiates and Related Isoquinoline alkaloids. 16<sup>th</sup> Annual PEPTalk, Microbial Production; Optimizing the Production of Microbial-based Expression Systems, Hilton San Diego Bayfront, San Diego, USA (Jan. 13. 2017) 招待講演
- 5) Sato F. (2016) Characterization of plant functions using cultured plant cells, and biotechnological applications. Science Conferences & Events Association on “Plant Cells in Vitro: Theory and Practice” (Feb. 8-9, 2016, Vienna, Austria) 招待講演
- 6) Sato F. (2014) P450s and plant isoquinoline alkaloid biosynthesis. 12<sup>th</sup> International symposium on cytochrome P450: Biodiversity and biotechnology (9. 24-28, 2014, Kyoto, Japan) 招待講演
- 〔図書〕(計 1 件)
- Sato, F. (2014) Plant Secondary Metabolism. In: eLS 2014, John Wiley & Sons Ltd: Chichester DOI: 10.1002/9780470015902.a0001812.pub2
- 〔産業財産権〕
- 取得状況 (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：JP5761723B  
取得年月日：2015年6月  
国内外の別：国内

名称：Method for producing alkaloids  
発明者：佐藤文彦、南 博道  
権利者：国立大学法人京都大学  
種類：United States Patent  
番号：US8993280B2  
取得年月日：2015.3.31  
国内外の別：国際

〔その他〕ホームページ等  
研究室ホームページ：  
<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/callus/>

Eschscholzia Genome Database  
<http://eschscholzia.kazusa.or.jp>

京都大学プレスリリース：ハナビシソウゲノムの解読から見えてきたイソキノリンアルカロイド生合成酵素遺伝子の進化 -  
[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2017/171229\\_2.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/171229_2.html)

京都大学アカデミックデイ 2017 植物は何故薬をつくるのだろうか？(京都大学百周年時計台記念館 2017.09.39)  
[http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2017/fumihiko\\_sato/](http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2017/fumihiko_sato/)

京都大学プレスリリース：植物が有用物質生産を制限する仕組みとは - ベルベリン生合成を制御する転写因子の働きを解明 - (2016.8.25)  
[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2016/160824\\_1.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/160824_1.html)

京都大学プレスリリース：モルフィナンアルカロイド生産のための微生物プラットフォームの確立  
[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2015/160205\\_1.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/160205_1.html)

京都大学アカデミックデイ：ゲノムの中から薬づくりの道具を探す：新規解読ゲノム情報を用いたハナビシソウアルカロイド生合成マシナリーの構築（京都大学百周年時計台記念館 2015.10.4）  
<http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2015/2/>

京都大学アカデミックデイ 植物の薬用成分を効率的に作る（京都大学百周年時計台記念館 2014.9.28）  
<http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2014/07/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤文彦（SATO Fumihiko）  
京都大学・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・准教授  
研究者番号：90433200

細江智夫（HOSOE Tomoo）  
星薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：10287849  
（平成 27—28 年度は連携研究者）

山田泰之（YAMADA Yasuyuki）  
神戸薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：20770879  
（平成 29 年度から研究分担者）

### (3)連携研究者

永尾雅哉（NAGAO Masaya）  
京都大学・生命科学研究科・教授  
研究者番号：10237498

河野徳昭（KAWANO Noriaki）  
（独）医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センター・主任研究員  
研究者番号：70392298

大和 勝幸（YAMATO Katsuyuki）  
近畿大学・生物理工学部・教授  
研究者番号：50293915

西田律夫（NISHIDA Ritsuo）  
京都大学・農学研究科・教授  
研究者番号：30135545  
（平成 26 年度のみ連携研究者）

平川英樹（HIRAKAWA Hideki）  
かずさ DNA 研究所・ゲノム情報解析グループ・グループ長  
研究者番号：80372746  
（平成 27 年度より連携研究者）

### (4)研究協力者

豊田 敦（TOYODA Atsushi）  
国立遺伝学研究所・教授  
研究者番号：10267495