

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850054

研究課題名(和文) 微生物プラットフォームを用いた植物アルカロイド生産ユニットの開発

研究課題名(英文) The development of plant alkaloid production system by using bacterial platform.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：レチクリン生産システムに対して、糖転移酵素および硫酸転移酵素を用いることで、レチクリン等のアルカロイドの側鎖修飾を行った。

具体的には、human由来の硫酸基転移酵素(SULT1E1)をレチクリン生産株に導入した菌株において、グルコースを原料として3'位に硫酸基が付加したReticuline 0-sulfateを生産できた(222 mg/L)。また、ラットおよびマウス由来のグルクロン酸転移酵素(UGT2B1)がレチクリンの水酸基にグルクロン酸を付加することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：We examined the side-chain modification of reticuline by introducing glycosyltransferases or sulfotransferases into reticuline-producing system.

In the reticuline-producing strain containing sulfotransferase (SULT1E1) from human, reticuline 3'-O-sulfate was produced from glucose at a yield of 222 mg/L. Furthermore, we showed that UDP-glucuronosyltransferases (UGT2B1) from rat and mouse catalyze the addition of a glucuronic acid moiety to reticuline.

研究分野：農学

キーワード：植物アルカロイド 発酵 バイオテクノロジー 応用微生物 酵素反応

1. 研究開始当初の背景

植物の産生するアルカロイド等の二次代謝産物は医薬的に重要であり、これまでに遺伝子組み換え植物体や培養細胞を用いた大量生産が試みられてきた。しかしながら、個々の成功例はあるものの、普遍的な大量生産の方法は確立されていない。そのため、合成生物学的手法を用いた、微生物による有用物質生産に注目が集まっている。これまでは微生物の産生する物質、例えば、放線菌におけるポリケチド等の研究が盛んに行われてきたが、近年、植物の二次代謝産物においても、テルペノイドやフラボノイドに関して、数多くの成功例が報告されている。しかしながら、モルヒネ等のイソキノリンアルカロイドに関しては、我々が発表するまで、その成功例はなかった。

我々は、世界で初めて、微生物における植物イソキノリンアルカロイド生産システムを構築し、論文発表 (Minami, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 7393-7398) および特許出願を行っている。微生物酵素と植物の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を、大腸菌において生産した。さらに、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 作用や抗腫瘍作用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。我々の研究に追隨して、スタンフォード大学の smolke らの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, K.M. & Smolke, C.D. 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、重要なものとなっている。しかし、いずれも微生物での生産に高価な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かった。発酵法を用いて、安価な材料からアルカロイドを生産することができれば、生産コストの大幅な削減が可能である。そこで我々は、チロシン生産大腸菌を作製し、チロシンからレチクリンまでの生合成経路をその大腸菌に導入することで、簡単な炭素源 (グルコースやグリセロール) からの微生物発酵法によるアルカロイド生産システムを新たに構築した (Nakagawa, A. et al. Nat. Commun. 2, 326)。ドーパミンからの生産システムに比べて生産量が高く、46.0 mg/L のレチクリンを培地中に生産した。微生物発酵法による生産システムの基幹部分は、我々によって既に構築されている。また、医薬的に重要なアルカロイド系麻薬 (モルヒネ、コデイン) の微生物による生産を最終目的としており、それに先立ち、モルヒネの中間産物であるテバインの生産を行っている。レチクリンからのテバイン生合成遺伝子 (salutaridine synthase, salutaridine reductase

) の単離をケシ cDNA から行い、各遺伝子の大腸菌での発現株を作製することで、その生合成経路を既に構築している。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。現在、これらの発現株を用いて、大腸菌によるテバイン生産を検討している。すなわち、微生物による植物アルカロイド生産の基礎研究は十分に行われており、本提案課題によって、これらの研究を実用化に向けてさらに発展させることができれば、世界をリードすることが可能である。

2. 研究の目的

本提案は、我々が構築した微生物発酵法による植物アルカロイド生産システムを利用した新規生合成遺伝子の網羅的な単離と、単離した遺伝子を組み合わせ (コンビナトリアル生合成) 生産システムに導入することで、様々な新規化合物を生産することを目的としている。すなわち、我々のシステムを用いて、特別な基質を添加することなくアルカロイド生合成遺伝子の網羅的なスクリーニングを行う。また、複数の生合成酵素を様々な組み合わせで用いるユニット型の生産システムを構築することで、化学合成法のように任意の新規生理活性物質を生産することを目的としている。

3. 研究の方法

薬用植物等、様々な生物種から cDNA ライブラリーを構築し、我々が確立した生産システムを用いて生合成遺伝子のスクリーニングを行う。cDNA を導入したアルカロイド産生大腸菌における反応産物を LC-MS/MS を用いて解析することで、網羅的なスクリーニングが可能である。アルカロイド産生大腸菌は、導入する遺伝子の組み合わせにより様々なアルカロイド生産が可能である。そこで、得られた様々な生合成遺伝子を組み合わせることで、含有量が少なく植物体からの抽出利用の難しい化合物や、植物では産生されない新規化合物の生産を行う。さらに、生産した化合物の生理活性を、実験動物や培養細胞を用いたスクリーニングによって明らかにすることで、創薬に向けた化合物ライブラリーを構築する。具体的な方法は以下の通りである。

・微生物生産システムを用いた新規生合成遺伝子のスクリーニング

アルカロイドを生産する薬用植物以外にも、様々な生物種の cDNA ライブラリーを作製し、我々の生産システムに導入することで、その生産物を LC-MS/MS を用いて解析し、新規生合成遺伝子の単離を行う。他の二次代謝

産物（テルペノイドやフェノール性化合物）を産生する植物や放線菌からの cDNA ライブラリーを用いることで、アルカロイドと他の二次代謝産物を基質にするような生合成遺伝子の単離が可能になる。また、ほ乳類の各臓器由来のライブラリーを用いることで、薬物（アルカロイド）代謝に関係する生合成遺伝子の効率的なスクリーニングが可能である。さらに、Pseudomonas 属の微生物は、アルカロイドを産生しないにも係わらず、モルヒネを分解することが知られている（Bruce NC et al. Arch Microbiol. 154:465）。このようなアルカロイド分解性の微生物からのライブラリーを用いることで、植物由来の生合成遺伝子とは異なった分解系の新規遺伝子の単離が期待できる。

・微生物発酵法による新規化合物および生薬有効成分生産のためのユニット構築

単離した新規生合成遺伝子を用いて人工的に生合成経路を構築し、新規化合物生産を行う。また、生合成経路の明らかでない既知の生薬成分（アルカロイド）に関しても、上記のような新規生合成酵素もしくは機能改変型酵素を代替酵素として用いることで、人工的に改変型生合成経路を構築し、その生産を検討する。すなわち、単離した生合成遺伝子を様々な組み合わせで用いることで、ユニット型の生産システムを構築し、多種多様な化合物生産を行う。無関係な複数の生合成遺伝子を組み合わせることで任意の生合成経路を構築できることは、既に確認済みである（minami H et al. PNAS 105:7393, Nakagawa A et al. Nat Commun 2:326）。そのため、本研究の特色であるユニット型の生産システムの構築に問題はない。

得られたアルカロイド化合物および新規化合物に関しては、研究協力者との共同研究以外にも、医薬系研究機関との共同研究もしくは化合物提供により、幅広い生理活性評価を行う。

4. 研究成果

本提案は、我々が構築した微生物発酵法による植物アルカロイド生産システムを利用した新規生合成遺伝子の網羅的な単離と、単離した遺伝子を組み合わせることで（コンビナトリアル生合成）生産システムを導入することで、様々な新規化合物を生産することを目的としている。そこで、レチクリン生産システムに対して、糖転移酵素および硫酸転移酵素を用いることで、レチクリン等のアルカロイドの側鎖修飾を行った。側鎖修飾により、安定性の増加や新規生理活性を有することが報告されている。

具体的には、ヒト、マウス、ラット由来の UDP-glucuronide transferase (UGT) 発現酵母株、Arabidopsis thaliana 由来の UDP-glucose transferase (UGT72E2、UGT84A2) 発現大腸菌株、および Rauvolfia serpentina 由来 arbutin synthase (RsAS)

発現大腸菌株に対して、レチクリンを培地中に添加することで反応させた。その結果、マウス由来 UGT (2b1)、ラット由来 UGT (2B1) において、レチクリン配糖体合成に成功した。

また、ヒト由来硫酸転移酵素 (SULT1A1、1A3、1B1、1E1、2A1) 発現酵母株に対して、レチクリンを培地中に添加することで反応させた。その結果、SULT1A1、1A3、1E1 において硫酸抱合体の合成に成功した。SULT1E1 をレチクリン生産株に導入した菌株において、グルコースを原料として 3' 位に硫酸基が付加した Reticuline O-sulfate を生産できた (222 mg/L) (図 1)。

さらに、Catharanthus roseus 由来の aromatic amino acid decarboxylase (CrTDC) の変異型酵素 (Y348F) を用いて、norcochlorine synthase (NCS)、L-DOPA decarboxylase (DDC) と共発現する菌株を L-DOPA および L-Trp を含む培地で培養したところ、インドール環を有する新規ベンズルイソキノリンアルカロイドが生産された (10 mg/L)。これらの結果より、アルカロイド生成とは無関係な酵素を用いた新規アルカロイド生産が可能であることが明らかとなった。

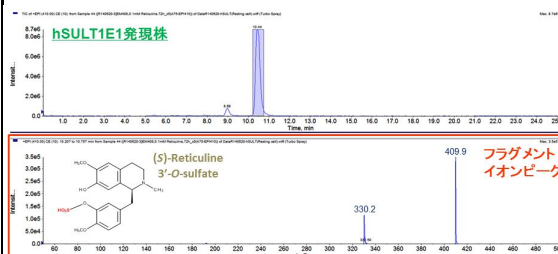


図1 グルコースからの Reticuline O-sulfate 生産

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)

(*R,S*)-Tetrahydropapaveroline production by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. Nakagawa A., Matsuzaki C., Matsumura E., Koyanagi T., Katayama T., Yamamoto K., Sato F., Kumagai H. and Minami H. *Scientific Reports* 査読有 4, 6695 (2014).

Fermentative production of plant benzylisoquinoline alkaloids in microbes. Minami H. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 査読有 77, 1617-1622 (2013).

〔学会発表〕(計 7件)

南博道. 2014. 微生物発酵法による植物アルカロイド生産と創薬展開. 第26回微生物シンポジウム(東京).

南博道. 2014. 微生物発酵法による植物アルカロイド生産. 第32回バイオ技

術シーズ公開会（大阪）.
南博道． 2015． 微生物発酵法による植物アルカロイド生産と生薬生理活性物質の創製． 日本農芸化学会 2015 年度大会（岡山）.
中川明． 2015． 大腸菌を利用した医薬中間体候補化合物であるメチル化ノルラウダノソリンコレクションの作製． 日本農芸化学会 2015 年度大会（岡山）.
松村栄太郎． 2014． チロシンヒドロキシラーゼを用いたベンジルイソキノリンアルカロイドの微生物生産． 日本農芸化学会 2014 年度大会（東京）.
中川明． 2014． モルヒネの生成中間体であるサルタリジンの微生物生産． 日本農芸化学会 2014 年度大会（東京）.
南博道． 2014． 微生物発酵法による植物アルカロイド生産と応用． 日本農芸化学会 2014 年度大会（東京）.

研究者番号：

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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・准教授
研究者番号：90433200

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()