

植物アルカロイド発酵生産のための微生物プラットフォーム開発

南 博道 (石川県立大学 生物資源工学研究所)

minami@ishikawa-pu.ac.jp

はじめに

高等植物は、アルカロイド、テルペノイド、フェノール性化合物(フェニルプロパノイド, フラボノイド)等の様々な有用二次代謝産物を産生する。多様な二次代謝産物のなかでも、アルカロイドは少量で顕著な生理活性を示すため、市販されている医薬品原料として非常に高い需要がある。植物の産生する約 12,000 種類のアルカロイドの中で、イソキノリンアルカロイド (IQA) と呼ばれるグループは、インドールアルカロイドと並んで最も大きな一群を構成しており、モルヒネやコデインをはじめ、多くの薬理的に有用な化合物を含む (図1)。一般にアルカロイドは含窒素複素環をもつ天然高分子で、光学活性を有し化学構造が複雑なために、化学合成による大量生産は困難であり、植物体からの抽出が主な生産法である。しかし、植物体に乾燥重量の数パーセント程度しか含まれていないものも多く、植物体の生育には数ヶ月~数年を要するため、大量に供給する方法が検討されている。

1. 微生物におけるイソキノリンアルカロイド生合成システムの構築

植物抽出に替わる生産方法として、我々は、植物の IQA 生合成酵素と微生物由来のモノアミン酸化酵素 (MAO)¹⁾ を大腸菌内で組み合わせ、ドーパミンを出発物質とした改変型の生合成経路を構築し、レチクリンが合成できることを明らかにした(図2a)²⁾。レチクリンはIQAの中間体であるだけでなく、抗細菌剤、抗マラリア剤、抗がん剤の重要な前駆物質でもある。植物の IQA 生合成においては、チロシンを出発物質とし、norcoclaurine synthase (NCS) によるドーパミンと 4-hydroxyphenylacetaldehyde (4-HPAA) との縮合反応の後、レチクリンが生合成される (図2b)。改変型経路では、ドーパミンのみを材料とし、その MAO による反応産物である 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (3,4-DHPAA) を NCS 反応の基質とすることで、CYP80B (水酸化反応) を省略した生合成が可能となった。

培地に基質を添加する *in vivo* での生産では、20 時間で 5 mM のドーパミンから培地中に 11 mg/L の (R,S)-レチクリンが生産された。NCS は S 特異的な反応を行うが³⁾、改変された大腸菌中でラセミ体のレチクリンが合成された要因としては、植物では NCS 反応の基質となるドーパミンは液胞内に蓄積され、その反応が酵素的に制御されているのに対し、大腸菌内においては、ドーパミンと 3,4-DHPAA との非酵素的な縮合が起こったものと考えられた。一方、粗酵素液を用いた *in vitro* での合成では、1 時間の反応で 5 mM のドーパミンから 55 mg/L の (S)-レチクリンが生産された。

さらに、CYP80G2 と CNMT 酵素を導入した酵母との共培養系を用いることにより、抗 HIV 作用およびアテローム動脈硬化症の進行

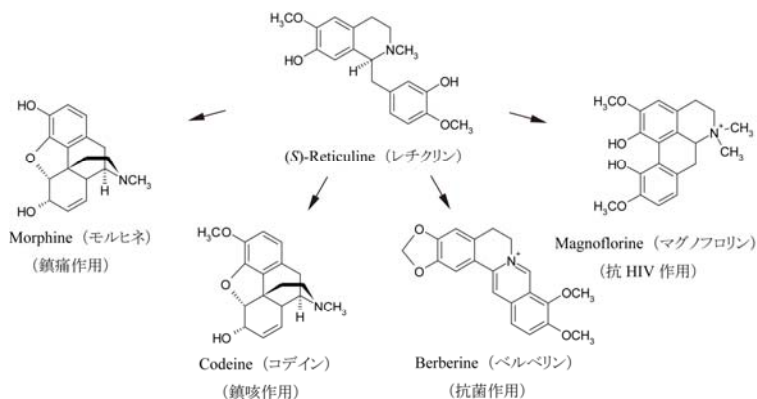


図1 植物の産生する有用イソキノリンアルカロイド

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）を、ドーパミンを基質として72時間の培養で培地中に7.2 mg/L合成することに成功した（図2a）。一方、プロトベルベリン型アルカロイド（スコウレリン）を、スコウレリン合成酵素（BBE）を導入した酵母との共培養により、48時間の培養で培地中に8.3 mg/L合成することにも成功している（図2a）。共培養法の利点は、大腸菌では困難な合成酵素の発現が酵母では容易となり得ること、また共培養する酵母を任意に変えることで、多様なIQAの生産が可能になることがある。

2. 微生物発酵法によるイソキノリンアルカロイド生産

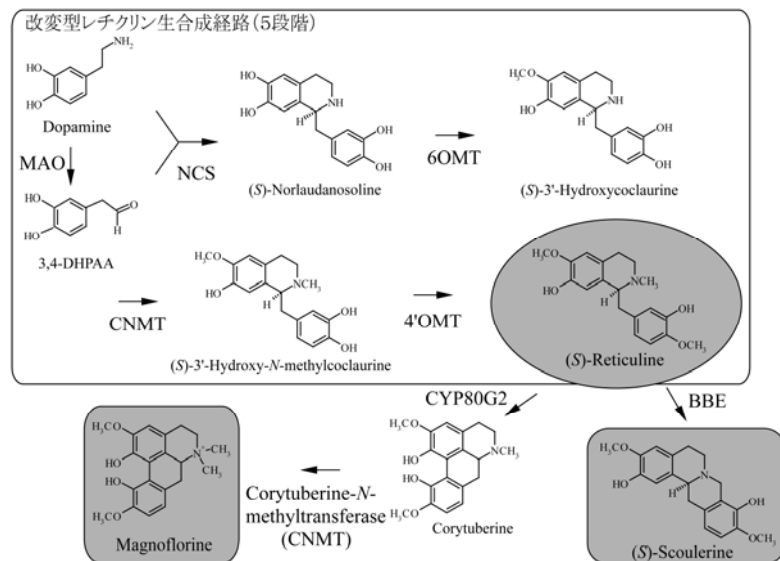
微生物においてもアルカロイド合成が可能であることが示されたが、実用生産にはより安価な基質の利用が不可欠と考えられた。そこで、安価で入手しやすいグルコースからのレチクリン生産、すなわち微生物発酵法による生産システムの構築を行った⁴⁵⁾。具体的には、i) チロシン生産大腸菌の作製、ii) チロシンからドーパミンまでの人工合成経路を構築し、ドーパミンからのアルカロイド生産システムに付加することで、生産システムを確立した（図3）。

大腸菌におけるチロシン生産については、多数の試みがなされている。例えば、大腸菌の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、シキミ酸合成経路において、フィードバック阻害耐性（*fbr*）の3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase（*fbr*-DAHPS: *aroG^{fbr}*）と mutase/prephenate dehydrogenase（*fbr*-CM/PDH: *tyrA^{fbr}*）、および phosphoenolpyruvate synthetase（PEPS: *ppsA*）と transketolase（TKT: *iktA*）を大量発現させることで、チロシン生産量が増加する。これらの方法を利用して構築したチロシン高生産大腸菌では、チロシンが培地中に4.17 g/L生産された。

IQA 合成経路において、チロシンからドーパへの反応を触媒するチロシン水酸化酵素（TH）は、テトラヒドロピオプテリンを補酵素として必要とする。しかし、大腸菌には存在しないため、新たにその合成経路を構築する必要があった。さらに、チロシン・ドーパ脱炭酸酵素（TYDC）はドーパだけでなく、チロシンに対しても活性を有しており、チロシンからチラミンへと合成経路が流れてしまう

可能性があった。また、植物型の合成経路には未同定の部分もあり、その経路を再構成し、効率よ

a) 微生物における改変型合成経路



b) 植物のレチクリン合成経路 (9段階)

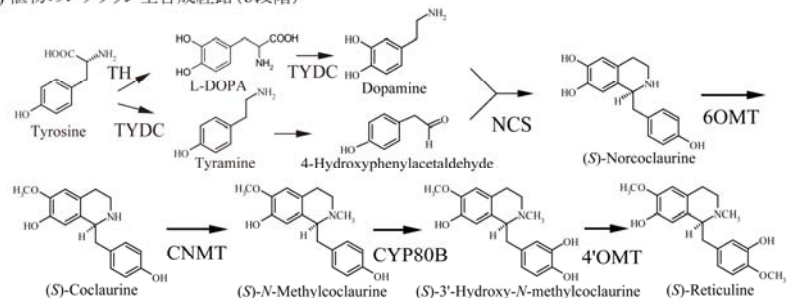


図2 微生物における改変型合成経路 (a) と植物のレチクリン合成経路 (b)

く目的の IQA を生産することは難しいと考えられた。そこで、チロシンからドーパミンまでの生合成経路を、微生物由来のチロシナーゼ (TYR) とドーパ特異的な脱炭酸酵素 (DODC)⁶⁾ で構築した (図 3)。チロシン生産大腸菌に、*Streptomyces castaneoglobisporus* 由来 TYR および *Pseudomonas putida* KT2440 由来 DODC を導入することで、ドーパミンが培地中に 260 mg/L 生産された。

上記のドーパミン生産大腸菌に、ドーパミンからのレチクリン生合成遺伝子 (MAO、NCS、6OMT、CNMT、4'OMT) を導入することで、微生物発酵法によるレチクリン生産システムを確立した。80 時間の培養で、培地中のグルコースから 2.2 mg/L の (S)-レチクリンが生産された (図 4)。野生型大腸菌にレチクリン生合成酵素を導入した場合には 0.5 mg/L の生産量であり、チロシンを高生産することで効率的にレチクリンが生産されることが明らかとなった。また、グルコースを含まない培地ではレチクリンがほとんど生産されないことから、グルコースからの直接発酵によりレチクリンが生産されていることが示された。炭素源としてグリセロールを用いた場合には、(S)-レチクリンの収量は 6.2 mg/L に増大し、これはグルコースを用いた生産量よりも約 3 倍高い結果となった。さらに、この生産システムに、ドーパからドーパキノンの酸化活性の低い *Ralstonia solanacearum* 由来

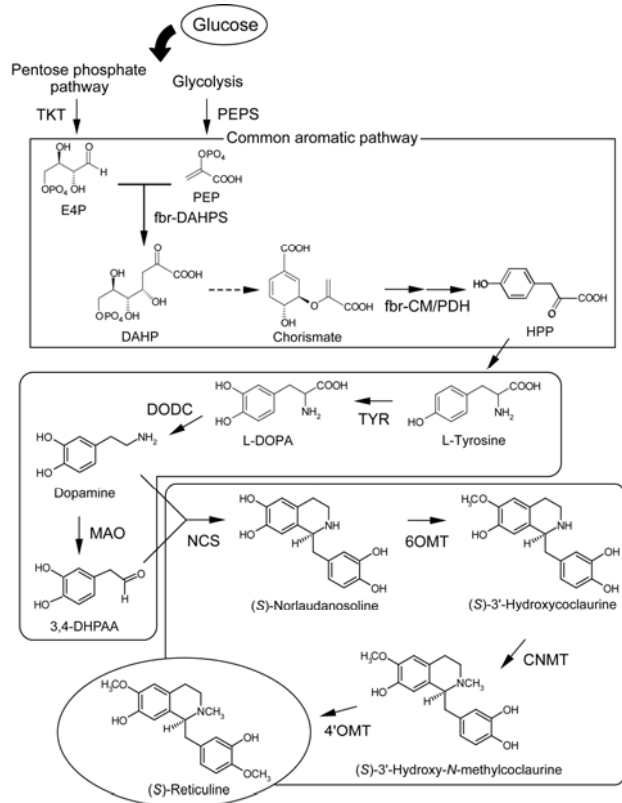


図3 大腸菌におけるグルコースからのレチクリン生合成経路

TYR を導入することで、レチクリン合成活性を大幅に向上 (46 mg/L) することにも成功している。

ドーパミンからの *in vivo* 生産システムではレチクリンがラセミ体として生産されたのに対し、微生物発酵法によるシステムでは、(S)-レチクリンのみが生産された。また、培養中、中間体としてチロシンが蓄積したが、ドーパおよびドーパミンの蓄積は観察されなかった。ドーパミンが蓄積しないことにより、ドーパミンと 3,4-DHPAA とが非酵素的に縮合反応を起こすことなく、NCS の触媒作用により S 体特異的なノルラウダノソリンが生成された結果、(S)-レチクリンのみが得られるものと考えられた。微生物発酵法は、医薬的に極めて重要な光学活性体を、植物培養細胞の培養または遺伝子組換え植物による生産 (通常、数ヶ月から数年程度の期間を要する) よりも速く (2~3 日)、生産することが可能である。また、炭素源として用いるグルコースやグリセロールは安価で入手が容易である。微生物発酵法の確立により、(S)-レチクリンの生産が工業的に実用可能なものになったと考えている。

おわりに

芳香族アミノ酸を出発物質として多様な植物二次代謝産物が合成されていることを考えると、今回開発した微生物発酵プラットフォームは、植物アルカロイドのみならず、多様な有用物質生産にも応用可能である。二次代謝産物の生合成遺伝子には未同定のものが多いが、他生物種からの生合成酵素を利用することで、改変型生合成経路の構築が可能である。また、生合成遺伝子の改変により、新規有用二次代謝産物の生産が可能と考えられる。医薬的に重要なアルカロイドの微生物発酵法の確立は、需要の

高まる医薬品への安定した供給方法になるだけでなく、創薬研究における新たな展開に貢献できるものと期待される。

謝辞

本研究は、石川県立大学生物資源工学研究所応用微生物工学研究室において実施したものです。本研究を行う機会を与えて頂き、ご指導ご鞭撻を賜りました熊谷英彦先生（現 石川県立大学特任教授）に心より御礼申し上げます。また、京都大学において博士研究員として在籍の機会を頂き、その後も共同研究者としてご指導頂きました京都大学大学院生命科学科教授・佐藤文彦先生に心より感謝いたします。本研究の成果は、多くの共同研究者ならびに研究室の皆様のご協力によるものであり、深く感謝いたします。最後に、日本農学進歩賞の受賞にあたっては、日本農芸化学会から推薦を賜りました。太田明徳会長ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

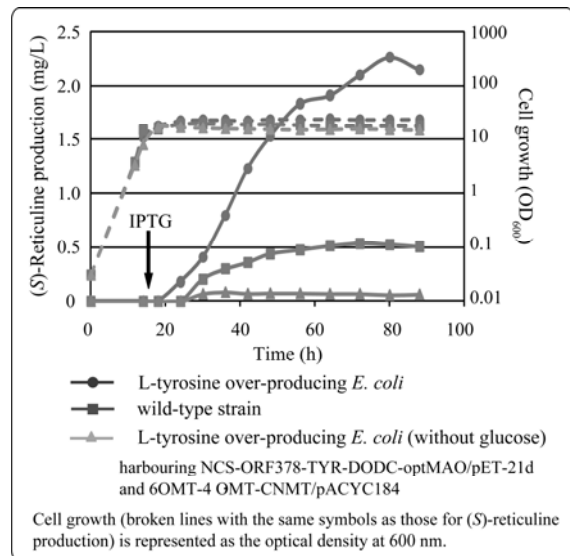


図4 微生物発酵法によるグルコースからのレチクリン生産

引用文献

- 1) Roh J.H., Wouters J., Depiereux E., Yukawa H., Inui M., Minami H., Suzuki H. and Kumagai H. (2000) Purification, cloning, and three-dimensional structure prediction of *Micrococcus luteus* FAD-containing tyramine oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 268: 293-297.
- 2) Minami H., Kim J.S., Ikezawa N., Takemura T., Katayama T., Kumagai H. and Sato F. (2008) Microbial production of plant benzylisoquinoline alkaloids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105: 7393-7398.
- 3) Minami H., Dubouzet E., Iwasa K. and Sato F. (2007) Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. **Journal of Biological Chemistry** 282: 6274-6282.
- 4) Nakagawa A., Minami H., Kim JS., Koyanagi T., Katayama T., Sato F. and Kumagai H. (2011) A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. **Nature Communications** 2: 326.
- 5) Nakagawa A., Minami H., Kim JS., Koyanagi T., Katayama T., Sato F. and Kumagai H. (2012) Bench-top fermentative production of plant benzylisoquinoline alkaloids using a bacterial platform. **Bioengineered Bugs** 3: 49-53.
- 6) Koyanagi T., Nakagawa A., Sakurama H., Yamamoto K., Sakurai N., Takagi T., Minami H., Katayama T. and Kumagai H. (2012) Eukaryotic-type aromatic amino acid decarboxylase from root colonizer *Pseudomonas putida* is highly specific for 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (DOPA), an allelochemical in soil. **Microbiology** in press.

A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids

Hiromichi Minami

(Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University)

minami@ishikawa-pu.ac.jp