

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		微生物発酵生産プラットフォームを用いた生薬生理活性物質の創製			
研究テーマ (欧文) AZ		The creation of botanical physiologically active substances by microbial fermentative platform			
研究氏 代 表 名 者	カナ CC	姓)ミナミ	名)ヒロミチ	研究期間 B	2017 ~ 2018 年
	漢字 CB	南	博道	報告年度 YR	2018 年
	ローマ字 CZ	Minami	Hiromichi	研究機関名	石川県立大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		石川県立大学生物資源工学研究所・准教授			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>これまでに、イソキノリンアルカロイドの重要な中間体であるレチクリン、および主要なイソキノリンアルカロイドであるアポルフィンアルカロイド(マグノフロリン)に対して、大腸菌 1 菌体による発酵生産システムの構築に成功している。そこで、代謝経路の最適化と培養条件を検討することで生産効率の改善を行った。</p> <p>レチクリン生合成において、3 段階のメチル基転移反応に必要なメチル基供与体の供給が律速であることが明らかとなった。メチル基供与体である SAM は非常に高価なため、培地への添加が難しい。そこで、安価なメチオニンの培地への添加を検討した結果、213 mg/L のレチクリン生産に成功した。</p> <p>さらに、我々が構築したアルカロイド生産システムは生合成酵素の発現にプラスミドを用いており、安定性に問題があった。そこで、より安定かつ高効率なアルカロイド発酵生産のために、アルカロイド生合成経路をゲノム上に構築し、ゲノム挿入型の生産システムを構築した。レチクリンを目的化合物とし、はじめにチロシン高生産大腸菌株を作製した。作製したゲノム挿入型チロシン高生産株では、従来のプラスミド型の生産株と比較しておよそ 5 倍、4.4 g/L (24 mM) のチロシンを生産した。さらに、チロシン水酸化酵素、その補酵素である BH₄ 合成遺伝子(guanosine triphosphate cyclohydrolase I、6-pyruvoyltetrahydropterin synthase、sepiapterin reductase)、BH₄ 再生系に関係する 2 遺伝子(pterin-4α-carbinolamine dehydratase、dihydropteridine reductase)、ドーパ脱炭酸酵素をゲノムに挿入することで、グルコースから 2.3 g/L (15.1 mM) のドーパミンを生産した。</p> <p>マグノフロリン発酵生産における CYP80G2 発現系の検討を行った結果、CYP80G2 の N 末端アミノ酸を欠失させ、<i>Bacillus megaterium</i> 由来の BMR(シトクロム P450 還元酵素)を融合させた CYP80G2 が最も強い活性を持つことが明らかとなった。ゲノム挿入型チロシン高生産大腸菌株に、レチクリン生合成遺伝子群と CYP80G2 発現系を導入することで、グルコースからのコリツベリン(マグノフロリン前駆体)生産に成功した。</p> <p>今後は、ドーパミン以降の生合成遺伝子をゲノムに導入することでレチクリンおよびマグノフロリンの効率的な発酵生産システムを確立する。さらには、テバイン、モルヒネ等のイソキノリンアルカロイドに対しても、我々が確立したゲノム挿入型の生産システムと P450 酵素の発現システムを用いることで、大腸菌 1 菌体による効率的な生産システムを構築する。</p>					
キーワード FA	アルカロイド	生合成工学	大腸菌	レチクリン	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

We have successfully constructed a system for fermentative production by *E. coli* cells for reticuline, which is an important intermediate of isoquinoline alkaloids, and aporphine alkaloid (magnoflorine), which is a major isoquinoline alkaloid. Therefore, we improved the production efficiency by optimizing the biosynthetic pathways and examining the culture conditions.

In reticuline biosynthesis, it became clear that the supply of the methyl donor necessary for the three-step methyl group transfer reaction is rate-limiting. Because the methyl donor SAM is very expensive, it is difficult to add to the medium. Therefore, as a result of examining the addition of inexpensive methionine to the medium, it succeeded in producing 213 mg/L reticuline.

Furthermore, the alkaloid production system we constructed uses plasmids for the expression of biosynthetic enzymes and has problems with stability. Therefore, for more stable and highly efficient alkaloid fermentation production, alkaloid biosynthetic pathway was inserted into the genome, and a genome insertion type production system was constructed. With reticuline as the target compound, an *E. coli* strain with high tyrosine production was constructed first. The genomic insertion type strain produced 4.4 g/L (24 mM) of tyrosine approximately five times as compared with the conventional plasmid type strain. In addition, tyrosine hydroxylase, its coenzyme BH₄ synthetic genes (guanosine triphosphate cyclohydrolase I、6-pyruvoyltetrahydropterin synthase、sepiapterin reductase), two genes related to the BH₄ regeneration system (pterin-4 α -carbinolamine dehydratase, dihydropteridine reductase), DOPA decarboxylase were inserted into the genome in an *E. coli* strain with high tyrosine production. The strain produced 2.3 g/L (15.1 mM) of dopamine from glucose.

As a result of examining CYP80G2 expression system in magnoflorine fermentation production, it was revealed that CYP80G2 in which the N-terminal amino acid was deleted and BMR (cytochrome P450 reductase) from *Bacillus megaterium* was fused had high activity. By introducing the reticuline biosynthetic genes and the CYP80G2 expression system into a tyrosine-producing *E. coli* strain, we succeeded in the production of corytuberine (magnoflorine precursor) from glucose.