

日本学士院賞 受賞者 佐藤文彦



専攻学科目 植物細胞分子生物学

生年 昭和二八年 二月
略歴 昭和五〇年 三月
同 五二年 三月
同 五六年 一月

同 五六年 一月 農学博士

平成 二年 一月 京都大学農学部助教授

同 七年 六月 京都大学農学部教授

同 九年 四月 京都大学大学院農学研究科教授

同 一一年 四月 京都大学大学院生命科学研究科教授（現在に至る）

農学博士佐藤文彦氏及び農学博士熊谷英彦氏の「代謝工学的研究に基づく植物二次代謝産物イソキノリンアルカロイドの微生物による生産」(共同研究) に対する授賞審査要旨

植物は、強い生理機能をもつ多様な二次代謝産物を産生する。一方、微生物は、旺盛な増殖・代謝能により、多くの一次代謝産物及び抗生物質等の生産に利用されている。佐藤文彦氏は、植物の二次代謝産物であるイソキノリンアルカロイドの生合成系の分子基盤を解析してその全貌解明に貢献するとともに、同生合成系改変の技術的基盤を確立した。一方、熊谷英彦氏は、微生物のアミノ酸とアミンの代謝に関わる未解明の酵素群の触媒機構と生合成調節機構を解析し、有用アミノ酸類の新たな生産法を開発した。さらに、両氏は、これらの研究成果を基に、共同して、微生物の旺盛な代謝機能を利用する植物イソキノリンアルカロイドの効率的生産システムの構築に成功した。以下に、その研究業績を略述する。

A. 植物培養細胞におけるイソキノリンアルカロイド生合成系の解明と代謝工学的手法による改変

植物のイソキノリンアルカロイド生合成系の諸酵素は活性が低く、その分子的基礎の解明は長い間進展しなかった。佐藤氏は、イソキノリンアルカロイド高産生のオウレン培養細胞を用い、ベルベリン生合成経路の全九段階中の七段階、及び、その派生経路の五段階、計一二段階に関わる酵素と遺伝子を単離同定し、イソキノリンアルカロイド生合成系の全貌解明に大きく貢献した。次いで、ハナビシソウの培養細胞を用い、この種固有のベンゾフェナンスリジン経路の分子的基盤を解明するとともに、効率的形質転換系を開発し、オウレンのスコウレリンO-メチル化酵素遺伝子を導入し、ベルベリンを始めとするプロトベルベリン経路の多様なイソキノリンアルカロイドの生産能の付与に成功した。また、遺伝子発現を増進または抑制する代謝工学的手法を用いてイソキノリンアルカロイド生合成系の改変を行い、植物二次代謝経路の高い可塑性を明示した。

B. 微生物における芳香族アミノ酸及びアミンの代謝に関する研究
植物イソキノリンアルカロイドの前駆物質には、芳香族アミノ酸のチロシンとL-ドーパ、芳香族アミンのチラミンとドーパミンが

含まれる。従って、これらの代謝研究は、微生物によるイソキノリンアルカロイド生合成系の構築に不可欠である。熊谷氏は、微生物を用いて、芳香族アミノ酸からアミンを生成するアミノ酸脱炭酸酵素とそれを分解するアミン酸化酵素の触媒能と反応機構を解明し、アミン酸化酵素を、活性中心に銅とFADをもつものに二大別する新分類法を提唱した。また、ミクロコッカスアミン酸化酵素のドーパミン分解反応においてイソキノリン環化合物の生成を発見し、イソキノリンアルカロイドの微生物生産の可能性を示した。さらに、熊谷氏は、エルビニア属細菌のLドーパ産生酵素の生合成調節機構を解明し、その転写調節因子の変異遺伝子を得、Lドーパの高生産株の分子育種に成功した。これらの研究において、熊谷氏が発見したLドーパ特異的脱炭酸酵素及びチラミン酸化酵素の遺伝子は、微生物によるイソキノリンアルカロイド生産のプラットフォーム構築に重要な役割を果たすこととなった。

C. 微生物における植物イソキノリンアルカロイド生合成系の構築

佐藤、熊谷両氏は、緊密な連携の下、植物イソキノリンアルカロイドの微生物による生産系を世界で初めて構築した。すなわち、グルコースからチロシンを過剰生産するように大腸菌を改変した「普遍的生合成モジュール」、大腸菌にストレプトマイセス、シュード

モナス及びミクロコッカスの遺伝子を導入してドーパミン生産を最適化した「テトラハイメイド生合成モジュール」、並びに、大腸菌にオウレンの四遺伝子を導入してイソキノリンアルカロイド生合成の鍵物質レチクリンの効率的生産を計る「基礎的生合成モジュール」を作成した。そして、これら三モジュールを同一大腸菌に導入し、グルコースからレチクリンを効率的に生産する統合的微生物プラットフォームの構築に成功している。さらに、レチクリンから多様なイソキノリンアルカロイドを生合成するため、その目的に適ったオウレン遺伝子を酵母に導入した「アドホック生合成モジュール」を作成し、この酵母と「基礎的生合成モジュール」を組み込んだ大腸菌の混合培養によって、マグノフロリン等のイソキノリンアルカロイドの生産に成功している。

このように、両氏の研究業績は、イソキノリンアルカロイドを当面の対象としながら、植物と微生物の代謝系の融合を通して、微生物による植物二次代謝産物の効率的・安定的生産に新たな道を拓いたものであり、合成生物学及び代謝工学の発展に寄与するところが大きい。これら一連の研究業績は、数多くの国際会議での招待講演や国際的学術誌における発表を通し、国際的に高く評価されている。なお、佐藤氏は、日本植物化学調節学会賞、日本植物細胞分子

生物学会学術賞、日本農芸化学会賞等を、熊谷氏は、毎日学術奨励賞、日本ビタミン学会賞、日本農芸化学会賞等を受賞している。

佐藤文彦氏 主要な著書及び論文目録

A 著書・総説

1. **Sato, F.** (2003) Secondary metabolites and biotechnology in plants. In "Agrobiotechnology and Plant Tissue Culture" (eds. Bhojwani, S. S. and Soh, W.-Y.), Science Pub, Inc., Enfield (NH), USA, pp. 97–104.
 2. **Sato, F.**, Inai, K., and Hashimoto, T. (2007) Metabolic engineering in alkaloid biosynthesis: case studies in tyrosine- and putrescine-derived alkaloids. In "Applications of Plant Metabolic Engineering" (eds. Verpoore, R., Alfermann, A. W., and Johnson, T. S.), Springer, New York, pp. 145–173.
 3. **Sato, F.** and Yamada, Y. (2008) Engineering formation of medicinal compounds in cell cultures. In "Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology" (eds. Bohnert, H. J., Nguyen, H., and Lewis, N. G.), Elsevier Ltd., Amsterdam, Vol. 1, pp. 311–345.
 4. Minami, H., Ikezawa, N., and **Sato, F.** (2010) Microbial expression of alkaloid biosynthetic enzymes for characterization of their properties. In "Plant Secondary Metabolism Engineering: Methods in Molecular Biology 643" (ed. Fett-Neo, A. G.), Humana Press Inc., New York, pp. 111–120.
 5. Takemura, T., Chow, Y.-L., Todokoro, T., Okamoto, T., and **Sato, F.** (2010) Over-expression of rate-limiting enzymes to improve alkaloid productivity. In "Plant Secondary Metabolism Engineering: Methods in Molecular Biology 643" (ed. Fett-Neo, A. G.), Humana Press Inc., New York, pp. 33–45.
- 目録
1. **Sato, F.** and Yamada, Y. (1984) High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. **Phytochem.** 23, 281–285.
 2. Takeshita, N., Fujiwara, H., Minura, H., Fichen, J. H., Yamada, Y., and **Sato, F.** (1995) Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-L-methionine: scoulerine-9-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. **Plant Cell Physiol.** 36, 29–36.
 3. Morishige, T., Tsujita, T., Yamada, Y., and **Sato, F.** (2000) Molecular characterization of the S-adenosyl-L-methionine : 3'-hydroxy-N-methyl-coclaurine 4'-O-methyltransferase in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. **J. Biol. Chem.** 275, 23398–23405.
 4. **Sato, F.**, Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K., Choi, K.-B., Morishige, T., Fujimoto, H., and Yamada, Y. (2001) Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98, 367–372.
 5. Choi, K.-B., Morishige, T., Shitan, N., Yazaki, K., and **Sato, F.** (2002) Molecular cloning and characterization of coclaurine N-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. **J. Biol. Chem.** 277, 830–835.
 6. Ikezawa, N., Tanaka, M., Nagayoshi, M., Shinkyo, R., Sakaki, T., Inouye, K., and **Sato, F.** (2003) Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylendioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. **J. Biol. Chem.** 278, 38557–38565.
 7. Dubouzet, J. G., Morishige, T., Fujii, N., An, C.-I., Fukusaki, E., Itoku, K., and **Sato, F.** (2005) Transient RNA silencing of scoulerine 9-O-methyltransferase expression by double stranded RNA in *Coptis japonica* protoplasts. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 69, 63–70.
 8. Fujii, N., Inui, T., Iwasa, K., Morishige, T., and **Sato, F.** (2007) Knockdown of berberine bridge enzyme by RNAi accumulates (S)-reticuline and activates a silent pathway in cultured California poppy cells. **Transgenic Res.** 16, 363–375.
 9. Inui, T., Tamura, K., Fujii, N., Morishige, T., and **Sato, F.** (2007) Overexpres-

- sion of *Coptis japonica* norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase overcomes the rate-limiting step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in cultured *Eschscholzia californica*. **Plant Cell Physiol.** 48, 252–262.
10. Minami, H., Dubouzet, E., Iwasa, K., and Sato, F. (2007) Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. **J. Biol. Chem.** 282, 6274–6282.
 11. Ikezawa, N., Iwasa, K., and Sato, F. (2007) Molecular cloning and characterization of methylendioxy bridge-forming enzymes involved in stylopine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. **FEBS J.** 274, 1019–1035.
 12. Minami, H., Kim, J.-S., Ikezawa, N., Takemura, T., Katayama, T., Kumagai, H., and Sato, F. (2008) Microbial production of plant benzylisoquinoline alkaloids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105, 7393–7398.
 13. Ikezawa, N., Iwasa, K., and Sato, F. (2008) Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C-C phenol coupling of (S)-reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells. **J. Biol. Chem.** 283, 8810–8821.
 14. Ikezawa, N., Iwasa, K., and Sato, F. (2009) CYP719A subfamily of cytochrome P450 oxygenases and isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*. **Plant Cell Rep.** 28, 123–133.
 15. Takenura, T., Ikezawa, N., Iwasa, K., and Sato, F. (2010) Metabolic diversification of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis through the introduction of a branch pathway in *Eschscholzia californica*. **Plant Cell Physiol.** 51, 949–959.
- 熊谷英彦氏 生薬学専攻及心臓文庫**
- A 専攻・書籍**
1. Yamada, H. and Kumagai, H. (1975) Synthesis of L-tyrosine-related amino acids by β -tyrosinase. In “**Advances in Applied Microbiology**” (ed. Perlman, D.), Academic Press Inc., New York, Vol. 19, pp. 249–288.
 2. Kumagai, H. and Yamada, H. (1985) Bacterial and fungal amine oxidases. In “**Structure and Function of Amine Oxidases**” (ed. Mondovi, B.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 37–43.
 3. Kumagai, H. (2000) Microbial production of amino acids in Japan. In “**Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**” (ed. Scheper, Th.), Springer-Verlag, Berlin, Vol. 69, pp. 72–85.
- B 論文**
1. Kumagai, H., Matsui, H., Ogata, K., Yamada, H., and Fukami, H. (1968) Oxidation of dopamine by crystalline tyramine oxidase from *Sarcina lutea*. **Memoirs Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.** 29, 69–71.
 2. Kumagai, H., Yamada, H., Matsui, H., Ohkishi, H., and Ogata, K. (1970) Tyrosine phenol lyase I. Purification, crystallization and properties. **J. Biol. Chem.** 245, 1767–1772.
 3. Kumagai, H., Yamada, H., Suzuki, H., and Ogura, Y. (1971) Action mechanism of tyramine oxidase from *Sarcina lutea*. **J. Biochem.** 69, 137–144.
 4. Kumagai, H., Uchida, H., and Yamada, H. (1979) Reaction of fungal amine oxidase with β -bromoethylamine. **J. Biol. Chem.** 254, 10913–10919.
 5. Nakazawa, H., Kumagai, H., and Yamada, H. (1981) Aromatic L-amino acid decarboxylase from *Micrococcus peritremus*. Purification, crystallization and properties. **Agric. Biol. Chem.** 45, 2543–2552.
 6. Yamashita, M., Azakami, H., Yokoro, N., Roh, J.-H., Suzuki, H., Kumagai, H., and Murooka, Y. (1996) *mazB*, a gene that encodes a positive regulator of the monoamine oxidase gene (*maoA*) in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 178, 2941–2947.
 7. Katayama, T., Suzuki, H., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (1999) Transcriptional regulation of tyrosine phenol-lyase gene mediated through TyrR and cAMP receptor protein. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 63, 1823–1827.
 8. Roh, J.-H., Wouters, J., Depleieux, 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. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 268, 293–297.
9. Koyanagi, T., Katayama, T., Suzuki, H., Onishi, A., Yokozeki, K., and **Kunagai, H.** (2009) Hyperproduction of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-dopa) using *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 73, 1221–1223.
 10. Nakagawa, A., Minami, H., Kim, J. S., Koyanagi, T., Katayama, T., **Sato, F.**, and **Kunagai, H.** (2011) A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. **Nature Communications** 2, Article number: 326, doi:10.1038/ncomms1327.