

· 综述 ·

# 博落回中苄基异喹啉类生物碱生物合成 与代谢工程研究概况<sup>△</sup>

刘金凤<sup>1</sup>, 黄鹏<sup>1</sup>, 唐昭山<sup>2</sup>, 曾建国<sup>1\*</sup>

(1. 湖南农业大学 兽用中药资源与中兽药创制国家地方联合工程研究中心, 湖南 长沙 410128;

2. 湖南美可达生物资源股份有限公司, 湖南 长沙 410005)

[摘要] 植物生长产生多种多样的次生代谢产物, 其中许多还有非常重要的药用价值。但是植物中具有药用价值的次生代谢产物含量较低, 而利用微生物代谢工程技术可以为次生代谢产物提供新的药源途径。本文对植物次生代谢产物特别是博落回属植物中苄基异喹啉类生物碱的生物合成以及国内外研究中利用微生物代谢工程技术在酵母中异源表达生产苄基异喹啉类生物碱的研究进展进行综述, 同时结合博落回研究进展对未来博落回资源的综合利用进行展望。

[关键词] 苄基异喹啉类生物碱; 博落回; 生物合成; 微生物代谢工程

## Overviews in Biosynthesis of *Macleaya cordata* Secondary Metabolites and Metabolic Engineering

LIU Jinfeng<sup>1</sup>, HUANG Peng<sup>1</sup>, TANG Zhaoshan<sup>2</sup>, ZENG Jianguo<sup>1\*</sup>

(1. National and Local Union Engineering Research Center for the Veterinary Herbal Medicine Resources and Initiative,

Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Micollta Bioresource Inc, Changsha 410005, China)

[Abstract] Plant growth produces a wide variety of secondary metabolites, many of which have very important medicinal value. However, the content of secondary metabolites with significant medicinal value are low in plants, while the use of microbial metabolic engineering technology can provide a new source of secondary metabolites pathway. In this paper, we reviewed the biosynthesis of plant secondary metabolites, especially the benzyloisoquinoline alkaloids of *Macleaya spp.*, as well as the research progress of heterologous expression and production of benzyloisoquinoline alkaloids in yeast using microbial metabolic engineering technology in China and abroad. At the same time, a prospect of the comprehensive utilization of *Macleaya spp.* resources in the further future is discussed.

[Keywords] Benzyloisoquinoline alkaloid; *Macleaya cordata*(Willd.) R. Br.; biosynthesis; microbial metabolic engineering

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.10.029

## 1 植物次生代谢产物

植物在次生代谢(Secondary metabolism)过程中通常以一个特定的方式合成、运输和储存多种不同类型的次生代谢产物(Secondary metabolites), 这些次生代谢产物不参与植物的初级代谢或能量代谢, 是植物生长非必需的小分子有机化合物。在植物的生物进化过程中, 它们可以作为一种保护自己的内生

物质用于防御病虫害以及细菌、真菌、病毒等的侵袭<sup>[1-4]</sup>。

根据已经被鉴定出的次生代谢产物结构, 可以将其分为含氮和不含氮两种类型。在含氮的次生代谢产物中, 生物碱结构类型超过了20 000种<sup>[5]</sup>。已经被分离鉴定和具有重要药用价值的次生代谢产物包括具有抗肿瘤作用的长春花碱、紫杉醇、喜树碱等, 具有镇痛镇咳作用的罂粟碱、可待因、吗啡等,

<sup>△</sup> [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31200615); 湖南省科技重点计划(2016SK3002)

\* [通信作者] 曾建国, 教授, 研究方向: 中药资源与综合利用研究; Tel: (0731) 84673824, E-mail: zengjianguo@hunau.edu.cn



因在酵母中的共表达,并生成高药用价值的血根碱。Hawkins等<sup>[27]</sup>通过基因重组,在酵母中合成了BIAs生物合成通路中的重要中间体(*S*)-reticuline。D. Smolke团队<sup>[28]</sup>通过构建不同物种的细胞色素P450和还原酶基因的重组酵母,并进行培养条件优化,提高了BIAs在酵母中生产的产量,同时还对原小檗碱生物碱在酵母中的合成进行了优化<sup>[29]</sup>。2015年,SCIENCE报道了Galanie等在酵母中实现了吗啡的全合成<sup>[30]</sup>,这也是首次实现吗啡在酵母中的全合成,该研究为今后实现其他BIAs的全合成奠定了坚实的基础。

#### 4 博落回属植物中BIAs生物合成进展

博落回属植物包括博落回和小果博落回,其中含有的血根碱、白屈菜红碱等BIAs具有良好的抑菌、抗炎作用,在欧洲已成为饲用抗生素的良好替代品<sup>[25]</sup>。从2006年1月开始欧盟全面禁止在饲料中添加任何抗生素,导致血根碱的需求逐年增加。目前血根碱的主要来源是从博落回植株中提取,而博落回作为一种野生资源,这种获取方式导致其野生资源的存储量逐年减少。由于还未实现大规模的人工种植,导致了目前只能通过获取野生资源来提取血根碱。又由于苜基异喹啉类生物碱分子结构的复杂性,通过化学合成血根碱的成本很高,也不利于产品开发<sup>[31]</sup>。虽然利用植物细胞培养生产次生代谢产物在一定程度上能缓解药用植物资源的紧缺,但是由于次生代谢物的细胞内自毒性高,使得许多组培材料中的次生代谢产物不积累或者含量很低,再加上生产成本较高等因素限制了组培技术的利用。因此,找到一种可替代和可持续高效生产BIAs的方法是当务之急。虽然国际上已有一些科研团队正在进行产BIAs的工程菌构建工作,但是由于罂粟和花菱草等植物的生物信息数据有限以及从这些植物中克隆的功能酶转化效率不高等因素影响了工程菌的产出效率。

本课题组在前期基于博落回中生物碱质谱裂解规律建立了一套新的方法,鉴定了博落回中异喹啉类生物碱,并为博落回中生物碱的合成规律预测奠定了研究基础<sup>[32]</sup>。在研究博落回的生物碱合成规律研究中,我们通过对博落回中不同组织部位的生物碱组织化学定位发现,根中生物碱出现在中柱鞘外的薄壁细胞和导管周围;茎和叶柄中的生物碱主

要出现在维管束周围,偶尔也出现在茎的髓细胞中。总体上,茎中的生物碱积累量少于根。利用激光显微切割,结合超高效液相色谱串联四级杆/飞行时间质谱仪(UPLC-MS/MS)技术测定了博落回根中6种生物碱(血根碱、原阿片碱、别隐品碱、白屈菜红碱、二氢白屈菜红碱和二氢血根碱),发现其主要分布在木栓层和木质部维管束,并推测博落回中的生物碱合成部位是根部<sup>[33-34]</sup>。2012年通过对博落回和小果博落回转录组进行高通量测序<sup>[25]</sup>,通过10个在不同时间、不同组织器官和不同种样本的转录组、蛋白质组和代谢数据对博落回属植物的生物碱生源合成的可能机理进行探索。博落回转录组数据组装和聚类之后,两个种分别得到了69 367和78 255条unigenes。序列分析说明,大约2/3的unigenes与公共数据库中的序列是相似的。因此,在分析中对于控制生物碱代谢通路中酶的关键基因的表达进行了多层次比较和分析。同时,还通过对转录组数据注释找到了血根碱合成通路中所有功能基因的同源基因,并对参与血根碱合成的重要功能基因TYDC、STOX和去甲乌药碱合成酶基因NCS等进行了生物信息预测与克隆<sup>[35-37]</sup>。为了进一步解析博落回血根碱与白屈菜碱合成规律和相关基因的克隆,本团队在转录组测序基础上对博落回进行了全基因组测序(de novo)、组装及注释,并结合同位素示踪和转录组代谢组进行大数据分析,克隆了参与血根碱合成的14个基因,并进行了酵母异源表达验证,目前正在进行后期的个性化生物信息分析和文章撰写,并将于2017年公布基因组数据。目前博落回作为罂粟科首个完成全基因组测序的物种,其生物信息数据可以对参与BIAs合成的功能基因进行更细致的研究,也有望找到转化效率更高且更有利于构建工程菌的功能基因。

#### 5 展望

随着博落回植物全基因组和转录数据的公布,以及功能基因的不断深入研究,以及相关功能基因的不断深入研究,综合利用微生物系统的快速繁殖、培养简单和成本低等优点,将基因工程技术和微生物系统有机结合起来,把植物中合成BIAs的功能基因重组到酵母中生产目的BIAs,在未来一定可以为BIAs的生产提供新的药源途径。

## 参考文献

- [1] Wink M. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism[J]. Annual Plant Reviews, 2010, 40(3):484-485.
- [2] Wink M. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology[J]. Functional Plant Biology, 2010, 28(2):149-156.
- [3] Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective[J]. Phytochemistry, 2003, 64(1):3-19.
- [4] Wink M. Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and its Evolution [J]. Natural Product Communications, 2008, 3(8):1205-1216.
- [5] Schäfer H, Wink M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis [J]. Biotechnology Journal, 2009, 4(12):1684-1703.
- [6] Wink, Michael. Medicinal plants of the world[M]. Timber Press, 2004, 4(3):1-623.
- [7] Wink M, Wyk B E V. Mind-Altering and Poisonous Plants of the World[M]. Timber Press, 2008.
- [8] Wink M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine[J]. Current Drug Metabolism, 2009, 9(10):996-1009.
- [9] Ajikumar P K, Tyo K, Carlsen S, et al. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms [J]. Mol Pharm, 2008, 5(2):167-190.
- [10] Facchini P J, De L V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants [J]. Plant Journal, 2008, 54(4):763-784.
- [11] Zenk M H, Juenger M. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds[J]. ChemInform, 2008, 68(17):2757-2772.
- [12] Sato F, Inai K, Hashimoto T. Metabolic Engineering in Alkaloid Biosynthesis: Case Studies in Tyrosine- and Putrescine-Derived Alkaloids[M]. Berlin: Springer Netherlands, 2007.
- [13] Ziegler J, Facchini P J. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking[J]. Plant Biology, 2008, 59(59):735-769.
- [14] Liscombe D K, Facchini P J. Molecular cloning and characterization of tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase, an enzyme involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(20):14741-14751.
- [15] Sato F, Inui T, Takemura T. Metabolic engineering in isoquinoline alkaloid biosynthesis[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2007, 8(4):211-218.
- [16] Ilari A, Franceschini S, Bonamore A, et al. Structural basis of enzymatic (S)-norcoclaurine biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(2):897-904.
- [17] Kang S, Kang K, Lee K, et al. Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice [J]. Planta, 2007, 227(1):263-272.
- [18] Samanani N, Park S U, Facchini P J. Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis [J]. Plant Cell, 2005, 17(3):915-926.
- [19] Lehmann T, Pollmann S. Gene expression and characterization of a stress-induced tyrosine decarboxylase from Arabidopsis thaliana [J]. FEBS Letters, 2009, 583(12):1895-1900.
- [20] Samanani N, Liscombe D K, Facchini P J. Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis [J]. Plant Journal, 2004, 40(2):302-313.
- [21] Minami H, Dubouzet E, Iwasa K, et al. Functional Analysis of Norcoclaurine Synthase in Coptis japonica [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(9):6274-6282.
- [22] Facchini P J, Park S U. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy [J]. Phytochemistry, 2003, 64(1):177-186.
- [23] Ikezawa N, Tanaka M, Nagayoshi M, et al. Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured Coptis japonica cells [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(40):38557-38565.
- [24] Dang T T, Onoyovwi A, Farrow S C, et al. Biochemical genomics for gene discovery in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy and related species [J]. Methods in Enzymology, 2012, 515:231-266.
- [25] Zeng J, Liu Y, Liu W, et al. Correction: Integration of Transcriptome, Proteome and Metabolism Data Reveals the Alkaloids Biosynthesis in Macleaya cordata and Macleaya microcarpa [J]. Journal of Plant Science, 2012, 8(suppl1):2159-2163.
- [26] Fossati E, Ekins A, Narcross L, et al. Reconstitution of a 10-gene pathway for synthesis of the plant alkaloid dihydrosanguinarine in Saccharomyces cerevisiae [J]. Nat Commun, 2014, 5:3283.

- [27] Hawkins K M, Smolke C D. Production of benzyloisoquinoline alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(9):564-573.
- [28] Trenchard I J, Smolke C D. Engineering strategies for the fermentative production of plant alkaloids in yeast [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30:96-104.
- [29] Galanie S, Smolke C D. Optimization of yeast-based production of medicinal protoberberine alkaloids [J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1):44.
- [30] Galanie S, Thodey K, Trenchard I J, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast [J]. *Science*, 2015, 349(6252):1095-1100.
- [31] Pj. F. ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications [J]. *Plant Biology*, 2001, 52(52):29-66.
- [32] 卿志星, 程辟, 曾建国. 博落回中生物碱质谱裂解规律研究进展[J]. *中草药*, 2013, 44(20):2929-2939.
- [33] 左姿, 郑亚杰, 梁之桃, 等. 博落回根中生物碱的组织化学定位研究[J]. *中草药*, 2016(10):1785-1790.
- [34] Zuo Z, Zheng Y, Liang Z, et al. Tissue-specific metabolite profiling of benzyloisoquinoline alkaloids in the root of *Macleaya cordata* by combining laser-microdissection with ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2017, 31(5):397-410.
- [35] 刘金凤, 黄鹏, 柳亦松, 等. 博落回 Mc TYDC 基因的克隆与实时定量表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2017(2):501-506.
- [36] 黄鹏, 刘金凤, 卿志星, 等. 博落回中四氢小檗碱氧化酶 Mc STOX 基因的克隆及表达分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2017(6):2458-2463.
- [37] 黄鹏, 刘金凤, 卿志星, 等. 博落回去甲乌药碱合成酶基因的克隆及表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2017(2):454-459.

(收稿日期 2017-02-20)

(上接第 1494 页)

- [35] 吕小波, 黄春球, 武正才, 等. 白及多糖对胃溃疡大鼠防治作用的实验研究 [J]. *云南中医学院学报*, 2012, 35(1):30-32.
- [36] Ke Y C, Zhao C J. Effects of *Bletilla striata* Polysaccharides on Ulcerative Colitis [J]. *China Pharmacy*, 2011, 22:2132-2134.
- [37] Huang Y, Sun Q H, Hu X J. Effects of *Bletilla striata* polysaccharides on animal gastriculcer [J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2009, 18:612-613.
- [38] Takagi S, Yamaki M, Inoue K. Antimicrobial agents from *Bletilla striata* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(4):1011-1015.
- [39] 马世宏, 金玲, 王守香, 等. 中药白及在牙膏中的应用研究 [J]. *中国野生植物资源*, 2009, 28(3):32-36.
- [40] Zheng C S, Feng G, Zhou R, et al. New use of *Bletilla striata* as embolizing agent in the intervention treatment of hepatic carcinoma [J]. *China J Oncol*, 1996, 18:305-307.
- [41] Wu Z B, Ruan Y B. Electron-microscopic observations of effect during the induction of hepatocellular carcinoma in rats [J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 1978(2):121-122.
- [42] Qiu H M, Zhang Y, Zhou Q Z, et al. Regulatory Effect of *Bletilla striata* Polysaccharide on Immune Function of Mice [J]. *China J Biologicals*, 2011, 24:676-678.
- [43] Sun R S, Chen X H, Cheng T M, et al. Some factors of *Bletilla striata* in wound healing [J]. *Chinese Journal Clinical Rehabilitation*, 2003, 7(29):3927-3929.
- [44] 雷震, 常明泉, 陈黎, 等. 白及的临床应用研究进展 [J]. *中国药师*, 2013, 16(8):1240-1242.
- [45] 孙达峰, 史劲松, 张卫明, 等. 白及多糖研究进展 [J]. *食品科学*, 2009(30):296-298.
- [46] 张寒, 郝保华, 徐花荣, 等. 白及多糖的提取工艺的研究 [J]. *陕西中医*, 2007(28):223-225.
- [47] 王军, 王春宏, 任晓玲, 等. 白及胶的临床运用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2004, 24(9):556-557.

(收稿日期 2017-02-20)