

微生物异源合成植物异喹啉生物碱的新进展*

马雅婷¹ 刘珍宁¹ 刘 雪¹ 於洪建² 赵广荣^{1**}

(1 天津大学化工学院 教育部合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300350)

(2 天津益倍生物科技集团 天津 300450)

摘要 植物异喹啉生物碱(plant isoquinoline alkaloids, PIAs) 包括吗啡、可待因、加兰他敏及小蘖碱等药用活性产物和其他天然活性产物。从植物中提取异喹啉生物碱,受制于低含量、种植季节及提取方法。人们开始研究利用微生物异源合成和改造天然异喹啉生物碱,从而获得低成本的药用活性物质。异喹啉生物碱合成途径长,反应复杂,为实现微生物异源合成带来了诸多挑战。随着合成途径和酶的解析和鉴定,合成生物学技术为在微生物中合成异喹啉生物碱提供了可能。综述了 PIAs 合成途径解析的最新进展,以及微生物异源合成 PIAs 的代谢工程策略,讨论了目前存在的问题和未来的发展趋势。

关键词 植物异喹啉生物碱 微生物合成 合成生物学 代谢工程 天然药物

中图分类号 Q946. 88

植物异喹啉生物碱(plant isoquinoline alkaloids, PIAs) 具有结构和活性多样性,是天然产物领域研究的热点之一。根据前体骨架结构不同,PIAs 分为石蒜科生物碱(Amaryllidaceae alkaloids)、吐根生物碱(ipecac alkaloids)、苄基异喹啉生物碱(benzyloisoquinoline alkaloids)。石蒜科生物碱包括乙酰胆碱酯酶抑制剂加兰他敏^[1]、抗肿瘤活性的石蒜碱^[2]、具有细胞毒效应的血凝集素^[3]等,吐根生物碱包括催吐、抗虫活性的吐根素和吐根酚碱等^[4],苄基异喹啉生物碱中包括临床镇痛药吗啡和可待因、抗菌活性的小蘖碱和血根碱^[5]、止咳药诺斯卡品等^[6]。

目前药用 PIAs 的获取方式是植物提取,但存在 PIAs 含量低、提取废物污染环境、成本高等问题^[7]。随着合成生物学和新一代测序技术发展,PIAs 合成途径解析及其微生物异源合成为解决药源提供了新的方案,并取得了突破性进展^[8-9]。本文综述了 PIAs 合成途径解析的最新发现、微生物异源合成的工程策略,并对存在的问题和未来发展进行了讨论。

1 PIAs 合成途径解析

1.1 PIAs 的生源

PIAs 的生源是酪氨酸,由酪氨酸衍生物与另一醛类分子聚合形成前体骨架结构,再修饰生成 PIAs(图 1)。酪氨酸经过脱羧酶催化生成酪胺,再经过酪氨酸酶或酪氨酸羟化酶催化生成多巴胺。由酪胺和 3,4-二羟基苯甲醛聚合生成石蒜科生物碱的前体骨架为降孤挺花啉,由多巴胺和开联番木鳖苷聚合生成吐根生物碱的前体骨架为 *N*-deacetyloisopicoside,由多巴胺和 4-羟基苯乙醛聚合生成苄基异喹啉生物碱的前体骨架为 (S)-去甲乌药碱。

石蒜科生物碱合成途径中,从酪胺到共同前体 4'-氧甲基降孤挺花啉的两个酶已经从水仙(*Narcissus pseudonarcissus* L.) 中被鉴定出来,即降孤挺花啉合成酶^[10]和生成 4'-氧甲基降孤挺花啉的儿茶酚-O-甲基转移酶^[11]。4'-氧甲基降孤挺花啉发生酚-酚偶联继而生成各种不同石蒜科生物碱。目前,一个能催化对-对位(para-para') 偶联的 P450 酶 CYP96T1^[12]和血凝集素途径中的 noroxomaritidine 还原酶^[13]被分别鉴定出来,而其他酶仍未被鉴定。

吐根生物碱合成途径中, *N*-deacetyloisopicoside 骨

收稿日期: 2019-03-23 修回日期: 2019-05-13

* 国家自然科学基金(31870077) 资助项目

**通讯作者, 电子信箱: grzhao@tju.edu.cn

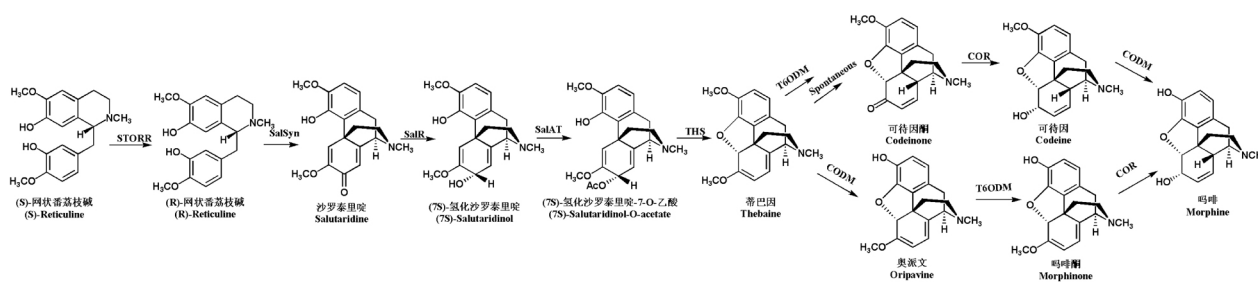


图4 吗啡的合成途径

Fig. 4 Biosynthetic pathway of morphine

STORR: (S) - to (R) -reticuline epimerase; SalSyn: Salutaridine synthase; SalR: Salutaridine reductase; SalAT: Salutaridinol 7-O-acetyltransferase; THS: Thebaine synthase; T6ODM: Thebaine 6-O-demethylase; COR: Codeinone reductase; CODM: Codeine 6-O-demethylase

2 微生物异源合成 PIAs 代谢工程策略

2.1 异源合成途径重构

具有天然药物活性的 PIAs 合成途径长, 关键酶复杂^[24], 如吗啡的全合成途径包含 20 多种酶, 诺斯卡品的合成途径涉及 30 多个酶, 在微生物中异源合成面临诸多挑战。通常采用分段模块化构建, 然后集成、打通整个途径, 从而实现在工程菌株中重构完整的生物碱合成途径。

在酵母中全合成诺斯卡品的研究中, 分别重构了两个重要中间产物 (S)-网状番荔枝碱^[25] 和 (S)-四氢小蘖碱^[26] 的合成模块, 并研究从 (S)-四氢小蘖碱到诺斯卡品的高效转化^[20], 最后集成三个模块, 在 2018 年实现了从头合成诺斯卡品, 整个途径包含了来自植物、动物和细菌的 25 个外源基因及 6 个酵母基因^[9]。在吗啡途径构建中, 在关键步骤 (S)-网状番荔枝碱转化为 R 构型的酶未鉴定的情况下, 分别研究 (S)-网状番荔枝碱的从头合成途径^[25, 27-28] 以及 (R)-网状番荔枝碱到吗啡生物碱^[29-30] 的高效转化。随着异构酶的发现和解析, 实现了在酵母和大肠杆菌中从头合成蒂巴因和氢可待因^[8, 31]。分步验证、逐步组装天然产物途径的策略能将途径新发现与元件解析和代谢工程紧密联系, 加快研究进程, 也用于单萜吲哚生物碱的微生物合成^[32-33]。除了诺斯卡品和蒂巴因外, 运用同样策略, 小蘖碱、血根碱、木兰花碱等也在微生物中成功合成 (表 1)。

在微生物中构建异源合成途径时, 另一种有效的策略是不按照天然途径, 而是选择可替代合成途径, 以此减少复杂酶的使用。在天然植物中, 多巴胺与 4-HPAA 经 NCS 催化聚合生成去甲乌药碱, 再经过三步甲基化和一步 P450 酶催化的羟化反应生成 (S)-网状

番荔枝碱。NCS 也能催化多巴胺与 3,4-二羟基苯乙醛 (3,4-DHPAA) 聚合, 生成全去甲劳丹碱后, 再经过三步甲基化反应即可生成 (S)-网状番荔枝碱^[36]。这样将羟化步骤前置, 可减少了一个细胞色素 P450 酶的使用。在酵母中表达鸦片罂粟的三个甲基转移酶 6OMT、4'OMT 和 CNMT, 添加非天然前体 (R,S)-全去甲劳丹碱, 实现了酵母中首次合成网状番荔枝碱^[37]。使用藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus* M.) 的单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 催化多巴胺合成 3,4-DHPAA, 表达日本黄连 (*Coptis japonica* Makino) 的聚合酶 NCS 和鸦片罂粟的三个甲基转移酶 6OMT、CNMT 及 4'OMT, 加入多巴胺, 在大肠杆菌中合成了 (S)-网状番荔枝碱 (图 5)^[34]。而在选用天然途径的工程菌株中, 即从去甲乌药碱出发生产网状番荔枝碱, 不仅需要再引入 P450 酶 CYP80B1 (NMCH), 还需要引入 NADPH 还原酶 CPR 促进氧化还原反应, 加重了细胞代谢负担^[25]。

2.2 酶的合理选择

在异源微生物系统构建 PIAs 合成途径中, 对于高效自发反应, 可以减少酶的使用, 如四氢小蘖碱到小蘖碱^[26] 以及二氢血根碱到血根碱的自发高效转化^[35]。而有的生物碱合成过程虽然可以自发反应, 但是在酶存在情况下转化率显著提高。在蒂巴因微生物异源合成时, 通过控制发酵在碱性条件下使最后一步自发重排, 合成了蒂巴因^[29]。但是表达蒂巴因合成酶 THS 使产量提高了 24 倍, 同时中间副产物的积累显著减少^[23]。

在生物碱合成途径中, 有的反应步骤可以由不同类型的酶实现, 需要针对酶的催化特性和副作用进行选择。在 (S)-网状番荔枝碱合成途径中, 酪氨酸到多巴的羟化反应可以由酪氨酸酶 TYR 与酪氨酸羟化酶

表 1 微生物异源合成苄基异喹啉生物碱

Table 1 Synthesis of benzyloquinoline alkaloids in microbial hosts

产物	功能元件(来源物种)	前体	异源宿主菌参考文献
(S)-网状番荔枝碱	PTPS, SepR, PCD, QDHPR, TyrH(褐家鼠), DODC(恶臭假单胞菌), NCS(日本黄连), 6OMT, CNMT, 4'-OMT, CPR(鸦片罂粟), CYP80B1(加州罂粟)	葡萄糖	酿酒酵母 [25]
四氢小檗碱	CAS(日本黄连), MT1, BBE(鸦片罂粟), ATR1(拟南芥)	(S)-网状番荔枝碱	酿酒酵母 [26]
诺斯卡品	MT1, TNMT, CYP82Y1, CYP82X2, AT1, CYP82X1, CXE1, SDR1, MT2, MT3(鸦片罂粟), CAS(日本黄连), ATR1(拟南芥)	(S)-四氢小檗碱	酿酒酵母 [20]
诺斯卡品	6OMT, CNMT, 4'-OMT, CPR, BBE, MT1, TNMT, CYP82Y1, CYP82X2, AT1, CYP82X1, CXE1, SDR1, MT2, MT3(鸦片罂粟), DODC(恶臭假单胞菌), NMCH(加州罂粟), CAS(日本黄连), SepR, PTPS, QDHPR, PCD, DHFR, TyrH(褐家鼠)	葡萄糖	酿酒酵母 [9]
(S)-网状番荔枝碱	MAO(藤黄微球菌), DODC(恶臭假单胞菌), TYR(青枯雷尔氏菌), NCS, 6OMT, CNMT, 4OMT(日本黄连)	甘油	大肠杆菌 [27]
(S)-网状番荔枝碱	DODC(恶臭假单胞菌), CYP76AD1(甜菜), NCS, 6OMT, CNMT, 4OMT, NMCH(鸦片罂粟)	葡萄糖	酿酒酵母 [28]
蒂巴因	SAS, CPR, SAR, SAT(鸦片罂粟)	(R)-网状番荔枝碱	酿酒酵母 [29]
吗啡	T6ODM, COR, CODM(鸦片罂粟)	蒂巴因	酿酒酵母 [30]
蒂巴因	PTPS, SepR, PCD, QDHPR, TyrH, DHFR(褐家鼠), DODC(恶臭假单胞菌), NCS(日本黄连), 6OMT, CNMT, 4'-OMT, CPR, SalAT(鸦片罂粟), NMCH(加州罂粟), SalR, DRS-DRR(大红罂粟), CFS-SalSyn: CFS(加州罂粟), SalSyn(大红罂粟)	葡萄糖	酿酒酵母 [8]
蒂巴因	TYR(青枯雷尔氏菌), DODC(恶臭假单胞菌), MAO(藤黄微球菌), CNMT, 4'-OMT(日本黄连), SalScut, SalR, SalAT(鸦片罂粟), ATR2(拟南芥)	葡萄糖甘油	大肠杆菌 [31]
木兰花碱	MAO(藤黄微球菌), NCS, 6OMT, CNMT, 4'-OMT, CYP80G2(日本黄连)	多巴胺	大肠杆菌 酿酒酵母 [34]
血根碱	ATR1(拟南芥), CFS, STS, P6H(加州罂粟), 6OMT, OMT, CNMT, BBE, TNMT, MSH(鸦片罂粟)	(R,S)-去甲劳丹碱	酿酒酵母 [35]
小檗碱	CAS(日本黄连), MT1, BBE(鸦片罂粟), ATR1(拟南芥), STOX(金花小檗)	(S)-网状番荔枝碱	酿酒酵母 [26]

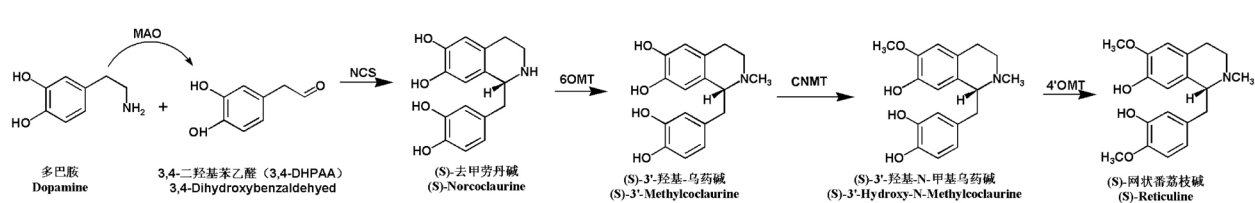


图 5 微生物中(S)-网状番荔枝碱的合成途径重构

Fig.5 Reconstruction of (S)-reticuline biosynthetic pathway in microbes

TH 实现。TH 催化需要辅因子四氢生物蝶呤 BH₄ 参与,但大肠杆菌与酵母中均无天然 BH₄,需要表达至少包括三个外源基因的辅因子合成途径。选用了不需要 BH₄ 辅因子的酪氨酸酶 ScTYR 实现大肠杆菌中从头合成(S)-网状番荔枝碱,产量为 6.24mg/L。在选用了氧化活性较低的酪氨酸酶 RsTYR 后,产量提高了 7 倍,达到 46mg/L^[27]。选择来自黑腹果蝇 (*Drosophila*

melanogaster Meigen) 的酪氨酸氢化酶 dTH2 催化该步反应,引入 BH₄ 合成模块,大肠杆菌从头合成 (S)-网状番荔枝碱产量达到 163.5mg/L^[38]。

2.3 关键酶改造

蛋白质工程是优化酶功能、提高酶活性的有效方式,采用优化酶二级结构的策略能有效提高酶的表达和功能,同时提高酶的转化效率。通过蛋白质印迹分

析,发现蒂巴因合成途径中沙罗泰里啉合成酶 SalSyn 被 N-糖基化,降低了催化效率。用酵母中高效催化的 P450 酶的 N 端序列替换原 SalSyn 的相应位置,定向改造后的 SalSyn 使沙罗泰里啉的转化率提高了 6 倍^[8]。在大肠杆菌中,只有 N 端截短 SalSyn 才能实现了酶的功能^[31]。采用了同样的改造策略,对金罂粟碱合酶 SPS 的 N 端跨膜结构域进行改造,增加在酵母中的表达,对小檗碱桥酶 BBE 的 N 端截短,有效实现了酶的功能表达^[40]。

在微生物合成 PIAs 中,由于酶底物的宽泛性,在细胞质中的反应途径通常呈网状而非设计的线性途径。为了使反应按预定步骤进行,减少副产物的产生,对酶的区域化表达和定向改造是一种有效的策略^[41]。在蒂巴因到吗啡的合成途径中,由于蒂巴因在 T6ODM 催化后去甲基生成尼奥平酮,需要经过一步自发重排生成可待因酮后继续反应生成吗啡,而尼奥平酮也会被下游酶 COR 与 CODM 催化,从而生成尼奥平以及副产物新吗啡。在 COR 的 C 端加入内质网途径标签,将 COR 酶锚定在酵母的内质网表达,与前一步在细胞质中表达的关键酶 T6ODM 隔离,从而使尼奥平合成后有充足的时间进行自发反应,生成可待因酮后再被下游酶 COR 催化,减少了副产物新吗啡,提高了吗啡产量^[30]。

通过易错 PCR 突变对酶进行定向进化,提高酶的催化效率。通过对三个甲基转移酶 6OMT、4'OMT 和 CNMT 进行突变和组合,在酵母中合成网状番荔枝碱的产量从 5mg/L 提高至 150mg/L^[37]。对关键酶 RnTyrH 进行突变,减弱了底物和产物对其的抑制作用,最优突变体 TyrH^{WR}使酵母从头合成(S)-网状番荔枝碱产量提高了 9 倍^[25]。

在酵母细胞合成(S)-网状番荔枝碱中,利用多巴转化为甜菜黄素的酶设计了酶联生物传感器,通过易错 PCR 构建酪氨酸羟化酶的突变体库并进行特异性筛选,最优酶使得多巴胺的产量提高了 7.4 倍,为从头合成(S)-网状番荔枝碱奠定了基础^[28]。对大肠杆菌内源的羟化酶 HpaBC 进行大量突变和高通量筛选^[39],获得了能在大肠杆菌中特异性合成多巴胺的酶突变体,为未来关键酶的改造提供了思路。

2.4 模块化优化

模块化代谢工程能简化复杂的代谢系统,根据途径关键节点或途径关键酶进行代谢网络划分,协调各个模块之间的表达和相互配合,从而实现异源高效生产天然活性产物,平衡代谢通量^[42]。微生物合成 PIAs

研究中,在实现途径所有酶功能表达后,将所有相关基因进行模块化管理,从而实现微生物异源合成复杂异喹啉生物碱,并进行代谢调控。

血根碱合成途径有 10 个基因,分成网状番荔枝碱模块、金黄紫堇碱模块和二氢血根碱模块,对三个模块分别进行设计和优化,全部整合在酵母基因组上。对限速酶 BBE 在高拷贝质粒上表达后,实现了在酵母中从去甲劳丹碱到血根碱的合成^[40]。

在从头合成诺斯卡品中,将(S)-网状番荔枝碱到诺斯卡品途径的 12 个关键基因分为 3 个模块整合至高产(S)-网状番荔枝碱的底盘菌株。5 个植物 P450 酶需要辅因子 NADPH 进行电子转移,过表达酵母中再生 NADPH 的基因 *Ald6p* 和 *Tyr1p* 能有效增加辅因子提供从而增加全局代谢通量,将两个基因与途径中限速酶 CYP82X2 和 S9OMT 组成辅助模块后,产量进一步提高了 3 倍^[9]。

以关键中间产物为节点,并考虑辅因子循环代谢和限速步骤,在酵母中构建并整合酪氨酸模块、BH4 供应模块、全去甲劳丹碱模块和(S)-网状番荔枝碱模块,实现了从头合成了(S)-网状番荔枝碱^[8]。长途径的产物合成中,产量受限于限速步骤通量,在分析中间产物与代谢流基础上,对前四个模块中的三个限速酶再次进行过表达,(S)-网状番荔枝碱产量提高了 4 倍。继续整合蒂巴因模块或氢可待因模块后,实现了在酵母中从头合成蒂巴因和氢可待因^[8]。采用 4 个大肠杆菌中分别表达了多巴胺模块、全去甲劳丹碱模块、网状番荔枝碱模块、蒂巴因模块或氢可待因模块,前一个菌的产物是后一个菌的底物,通过分步发酵实现了大肠杆菌中从头合成蒂巴因和氢可待因^[31]。

2.5 优化培养基和碳源

除了遗传水平改造提高代谢通量外,培养基的成分,特别是碳源对 PIAs 的异源合成有显著影响。糖酵解途径和戊糖磷酸途径可以提供较多的乙酰辅酶前体和辅因子 NADPH,选择葡萄糖作为碳源发酵合成蒂巴因^[31]。由于甘油代谢能增加前体途径莽草酸和 L-酪氨酸的代谢通量,将碳源由葡萄糖换成甘油后,在大肠杆菌中从头合成网状番荔枝碱产量提高了 3 倍^[27]。Li 等^[9]对培养基和碳源的种类及浓度进行优化,使用 2% 葡萄糖和 10% 甘油时,酵母从头合成诺斯卡品的产量最高,比优化前提高了 300 倍。

3 结论与展望

PIAs 是一类非常重要的天然活性产物,诺斯卡品、

吗啡等苜基异喹啉生物碱的合成途径被完全解析,而吐根碱和石蒜类生物碱的合成途径中仅部分酶和基因被鉴定。天然活性 PIAs 合成途径的完全解析是未来的研究方向。微生物中天然产物生物合成基因成簇存在,然而植物天然产物合成基因很少成簇,即使成簇,如 BIA 基因簇,也是相对分散在染色体的一定区域内,因此植物天然产物合成途径发现和鉴定相对较难。随着植物基因组和转录组测序等系统生物学技术的发展,天然产物化学分离鉴定中间产物及其结构、合成生物学挖掘基因和鉴定酶的功能,二者相结合,有望解析出其他 PIAs 的生物合成途径。

微生物异源合成 PIAs 已经取得了重要进展,在大肠杆菌和酵母中从头合成蒂巴因、诺斯卡品等产物。但目标产物的产量仍然很低,在技术层面远远达不到工业生产要求,需要在以下几方面进一步优化和提高。(1) 挖掘合成途径新元件和新酶。PIAs 合成的酶存在底物宽泛性,在异源微生物合成中,反应效率低,而且产生多种副产物。采用合成生物学和系统生物学新方法和新技术,从不同物种中挖掘 PIAs 合成的新功能元件和高活性酶,是攻克异源合成反应的效率的关键。(2) 构建合成途径的后修饰系统。PIAs 骨架合成后,需要不同类型的后修饰酶,包括 P450 氧化酶及其还原酶、甲基转移酶、乙酰转移酶等,这些酶的催化过程需要 NADPH、甲基和乙酰基供体等。在高效合成骨架的前提下,改造底盘细胞,强化后修饰系统的设计和构建,充分供给甲基、乙酰基和氧化还原平衡,开发功能化的 PIAs 专一底盘细胞。(3) 采用多元模块系统代谢工程进行综合调控。PIAs 合成途径长,代谢分支节点较多,主路通量往往较低,制约了产量。从时空表达角度,合理设计和控制整个代谢过程,协调中间产物、目标产物合成和细胞生长,从而实现长途径的 PIAs 的异源高效合成。(4) 组合生物合成非天然 PIAs。在天然 PIAs 合成途径中,增加新反应或添加前体,合成新产物。表达人源的硫转移酶,合成了非天然的 O-硫酸化的(S)-网状番荔枝碱^[38]。添加或饲喂 17 种酪氨酸衍生物前体,合成了非天然 PIAs^[9]。通过组合合成生物学技术改造 PIAs 合成途径,从而应用于新药研发。

参考文献

- [1] Desgagne-Penix I, Hotchandani T. Heterocyclic amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and pharmacological applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2017, 17(4): 418-427.
- [2] He M M, Qu C R, Gao O D, et al. Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances*, 2015, 5(21): 16562-16574.
- [3] Li L, Dai H J, Ye M, et al. Lycorine induces cell-cycle arrest in the G0G1 phase in K562 cells via HDAC inhibition. *Cancer Cell International*, 2012, 12(1): 49-49.
- [4] Foreman K E, Jesse J N, Kuo P C, et al. Emetine dihydrochloride: a novel therapy for bladder cancer. *Journal of Urology*, 2014, 191(2): 502-509.
- [5] Bessi I, Bazzicalupi C, Richter C, et al. Spectroscopic, molecular modeling, and NMR-spectroscopic investigation of the binding mode of the natural alkaloids berberine and sanguinarine to human telomeric G-Quadruplex DNA. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(6): 1109-1119.
- [6] Santoshi S, Naik P K. Molecular insight of isotypes specific β -tubulin interaction of tubulin heterodimer with noscapinoids. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2014, 28(7): 751-763.
- [7] Dittbrenner A, Mock H P, Borner A, et al. Variability of alkaloid content in *Papaver somniferum* L. *Journal of Applied Botany and Food Quality-Angewandte Botanik*, 2009, 82(2): 103-107.
- [8] Galanie S, Thodey K, Trenchard I J, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 2015, 349(6252): 1095-1100.
- [9] Li Y, Li S, Thodey K, et al. Complete biosynthesis of noscapine and halogenated alkaloids in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(17): 3922-3911.
- [10] Singh A, Massicotte M A, Garand A, et al. Cloning and characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 338.
- [11] Kilgore M B, Augustin M M, Starks C M, et al. Cloning and characterization of a norbelladine 4'-O-methyltransferase involved in the biosynthesis of the Alzheimer's drug galanthamine in *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus*. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103223.
- [12] Kilgore M B, Augustin M M, May G D, et al. CYP96T1 of *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus* catalyzes formation of the para-para' C-C phenol couple in the amaryllidaceae alkaloids. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 225.
- [13] Kilgore M B, Holland C K, Jez J M, et al. Identification of a noroxomaritidine reductase with amaryllidaceae alkaloid biosynthesis related activities. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(32): 16740-16752.
- [14] Nomura T, Quesada A L, Kutchan T M. The new-D-glucosidase in terpenoid-isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Psychotria ipecacuanha*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(50): 34650-34659.

- [15] Nomura T, Kutchan T M. Three new *O*-methyltransferases are sufficient for all *O*-methylation reactions of ipecac alkaloid biosynthesis in root culture of *Psychotria ipecacuanha*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(7): 7722-7738.
- [16] Cheong B E, Takemura T, Yoshimatsu K, et al. Molecular cloning of an *O*-methyltransferase from adventitious roots of *Carapichea ipecacuanha*. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 2011, 75(1): 107-113.
- [17] Guo L, Winzer T, Yang X F, et al. The *Opium poppy* genome and morphinan production. *Science*, 2018, 362(6412): 343-347.
- [18] Winzer T, Gazda V, He Z, et al. A *Papaver somniferum* 10-gene cluster for synthesis of the anticancer alkaloid noscapine. *Science*, 2012, 336(6089): 1704-1708.
- [19] Dang T T, Chen X, Facchini P J. Acetylation serves as a protective group in noscapine biosynthesis in *Opium poppy*. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(2): 104-106.
- [20] Li Y, Smolke C D. Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast. *Nature Communications*, 2016, 7: 12137.
- [21] Winzer T, Kern M, King A J, et al. Morphinan biosynthesis in *Opium poppy* requires a P450-oxidoreductase fusion protein. *Science*, 2015, 349(6245): 309-312.
- [22] Farrow S C, Hagel J M, Beaudoin G A W, et al. Stereochemical inversion of (S)-reticuline by a cytochrome P450 fusion in *Opium poppy*. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(9): 728-732.
- [23] Chen X, Hagel J M, Chang L, et al. A pathogenesis-related 10 protein catalyzes the final step in thebaine biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(7): 738-743.
- [24] 刘金凤, 黄鹏, 卿志星, 等. 苧基异喹啉类生物碱生物合成与代谢工程研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(8): 2194-2200.
- Liu J F, Huang P, Qing Z X, et al. Advances in the biosynthesis and metabolic engineering research of benzyloquinoline alkaloids. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(8): 2194-2200.
- [25] Trenchard I J, Siddiqui M S, Thodey K, et al. *De novo* production of the key branch point benzyloquinoline alkaloid reticuline in yeast. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 74-83.
- [26] Galanie S, Smolke C D. Optimization of yeast-based production of medicinal protoberberine alkaloids. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 144.
- [27] Nakagawa A, Minami H, Kim J S, et al. A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. *Nature Communications*, 2011, 2(2): 8.
- [28] DeLoache W C, Russ Z N, Narcross L, et al. An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(7): 465-471.
- [29] Fossati E, Narcross L, Ekins A, et al. Synthesis of morphinan alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 2015, 10(4): 15.
- [30] Thodey K, Galanie S, Smolke C D. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(10): 837-844.
- [31] Nakagawa A, Matsumura E, Koyanagi T, et al. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 2016, 7: 10390.
- [32] Brown S, Clastre M, Courdavault V, et al. *De novo* production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(11): 3205-3210.
- [33] Caputi L, Franke J, Farrow S C, et al. Missing enzymes in the biosynthesis of the anticancer drug vinblastine in *Madagascar periwinkle*. *Science*, 2018, 360(6394): 1235-1238.
- [34] Minami H, Kim J S, Ikezawa N, et al. Microbial production of plant benzyloquinoline alkaloids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(21): 7393-7398.
- [35] Trenchard I J, Smolke C D. Engineering strategies for the fermentative production of plant alkaloids in yeast. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 96-104.
- [36] Minami H, Dubouzet E, Iwasa K, et al. Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(9): 6274-6282.
- [37] Hawkins K M, Smolke C D. Production of benzyloquinoline alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4(9): 564-573.
- [38] Matsumura E, Nakagawa A, Tomabechi Y, et al. Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 7980.
- [39] Chen W, Yao J, Meng J, et al. Promiscuous enzymatic activity-aided multiple-pathway network design for metabolic flux rearrangement in hydroxytyrosol biosynthesis. *Nature Communications*, 2019, 10: 12.
- [40] Fossati E, Ekins A, Narcross L, et al. Reconstitution of a 10-gene pathway for synthesis of the plant alkaloid dihydrosanguinarine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Communications*, 2014, 5: 3283.
- [41] Lee H, Deloache W C, Dueber J E. Spatial organization of enzymes for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(3): 242-251.
- [42] Biggs B W, Paepe B D, Santos C N S, et al. Multivariate modular metabolic engineering for pathway and strain optimization. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, 29(1): 156-162.

Advances in Production of Plant Isoquinoline Alkaloids in Heterologous Microbes

MA Ya-ting¹ LIU Zhen-ning¹ LIU Xue¹ YU Hong-jian² ZHAO Guang-rong¹

(¹ School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Frontier Science Center for Synthetic
Biology and Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Tianjin 300350, China)

(² Ubasio Biotech Co., Ltd., Tianjin 300450, China)

Abstract Plant isoquinoline alkaloids (PIAs) include morphine, codeine, galantamine, berberine and other pharmaceutically active products. Currently, most high-value PIAs are extracted from plants, which is limited by low concentration in nature, seasonal production and extraction methods. Microbial biosynthesis provides an alternative way to gain PIAs at low cost, however, the long and complex biosynthesis pathways of PIAs bring it many challenges. With the development of synthetic biology and biotechnology, many progresses are made in the pathway elucidations and enzyme identifications, which make it possible to achieve the biosynthesis of PIAs in heterologous microbes. Recent advances in the PIAs pathway elucidations and metabolic engineering in heterologous microbes are reviewed, and current challenges as well as future perspectives are discussed.

Key words Plant isoquinoline alkaloids Microbial synthesis Synthetic biology Metabolic engineering
Natural drug