

吗啡的合成生物学研究和工业化生产

范楚珧^{①†}, 刘龙英^{①†}, 沈玥^①, 陈泰^①, 曾筱凡^①, 杨焕明^{①②*}

① 深圳华大基因研究院, 深圳 518083;

② 浙江大学沃森基因组科学研究院, 杭州 310058

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: yanghuanming@genomics.cn

2016-01-12 收稿, 2016-02-17 修回, 2016-02-18 接受, 2016-04-14 网络版发表

国家高技术研究发展计划(2012AA02A708)资助

摘要 吗啡是鸦片中重要的生物碱, 其合成生物学制造及相关工业化生产, 是合成生物学领域继人工合成青蒿素之后最有代表性的实例. 本文从吗啡合成的有关代谢通路的阐明和设计开始, 总结整理吗啡在酵母中的生物合成方法, 介绍这一划时代工作的全过程及合成生物学技术的潜力和前景.

关键词 吗啡, 酵母, 生物合成, 合成生物学, 工业化生产

吗啡是从罂粟未成熟果实的乳汁(阿片)中提取而得, 属于阿片类生物碱. 作为人类应用的最古老的药物之一, 吗啡有强大的选择性镇痛作用, 能明显减轻或消除疼痛, 在临床上多用于缓解严重创伤、战伤、烧伤、晚期癌症等疼痛. 而且直至今日, 仍没有一种天然或合成的镇痛药能够完全代替吗啡.

1 概述

1.1 吗啡的结构及其活性

1805年, 德国药师Sertürner从阿片中成功分离出吗啡晶体; 而直到1925年吗啡正确的化学结构才被化学家Robinson确定; 1952年Gates和Tschudi^[1]完成了吗啡的首次人工全合成.

吗啡具有5个环系稠合而成的复杂结构, 含有部分氢化的菲环, 环上有5个手性碳原子(5R, 6S, 9R, 13S和14R)(图1). 并且科学家们发现, 吗啡类药物的镇痛活性与其立体结构严格相关, 只有左旋体吗啡具有镇痛及其他生理活性. 其分子结构中C₁₃手性中

心的建立一直是化学有机合成中的难点, 虽然几十年来许多化学家对吗啡合成做了大量研究, 但大部分化学合成方法的成本远超过了从天然植物中分离得到产品的成本. 因此, 时至今日, 依旧通过从罂粟中提取吗啡的方式进行生产, 实现吗啡的工业化合成依然是药物化工领域内的重要目标.

1.2 吗啡的临床应用

几千年前, 人类就发现罂粟果有镇痛和迷幻的药效. 苏美尔人早在公元前4000年就把鸦片用作麻醉药. 吗啡可口服, 也可注射. 有强烈的麻醉、镇痛作用, 其镇痛范围广泛, 几乎适用于各种严重疼痛包括晚期癌变的剧痛, 并且镇痛时能保持意识及其他感觉不受影响. 此外还有明显的镇静作用, 能消除疼痛所引起的焦虑、紧张、恐惧等情绪反应, 还能引起某种程度的惬意和欣快感.

吗啡的副作用也是明显的, 它可以导致便秘、头晕、呕吐和抑制呼吸. 在大脑皮层方面, 可造成人注意力、思维和记忆性能的衰退; 吗啡极易成瘾使得长

引用格式: 范楚珧, 刘龙英, 沈玥, 等. 吗啡的合成生物学研究和工业化生产. 科学通报, 2016, 61: 1436–1444

Fan C Y, Liu L Y, Shen Y, et al. Progress of biosynthesis of Morphine and its industrial manufacture (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 1436–1444, doi: 10.1360/N972015-01206

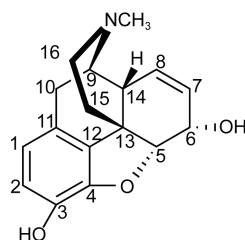


图1 吗啡的结构

Figure 1 The structure of morphine

期吸食者无论从身体上还是心理上都会对吗啡产生严重的依赖性。

1.3 吗啡的生物合成

基因组学的发展和新一代测序技术的应用, 逐步阐明了罂粟中由单糖合成吗啡的完整通路^[2], 为实现微生物由单糖合成吗啡奠定了基础。而合成生物学发展为植物吗啡合成通路在微生物宿主中的重构提供了新的思路 and 工具^[3-6], 进一步使酵母合成吗啡成为现实。

合成生物学的主要目标在于理解生物系统的基础上重新设计构建具有全新功能和特性的生物系统。利用合成生物学的思想和技术, 已经利用微生物实现了从药物到生物燃料等多种产品的生物合成, 包括青蒿素^[7,8]、丁醇^[9-11]、紫杉醇^[12,13]等, 其中最著名的是酵母合成青蒿素, 现已应用于商业生产。本文对已发表的酵母合成吗啡的研究, 尤其是近期发表的研究结果进行了整理总结, 着重介绍了合成生物技术所发挥的重要作用。

2 吗啡合成的有关代谢通路的阐明和设计

吗啡是罂粟的次级代谢产物, 其合成过程复杂, 从葡萄糖的糖酵解开始到酪氨酸的合成, 再由酪氨酸生成苄基异喹啉类物质, 最后到吗啡合成, 包括33步反应, 有30多个酶参与^[14]。对该代谢通路进行模块切分, 可分为以下3个模块: (i) 蔗糖→葡萄糖→*L*-酪氨酸; (ii) *L*-酪氨酸→(S)-牛心果碱; (iii) (S)-牛心果碱→(R)-牛心果碱→吗啡。下面就这3个模块依次介绍吗啡合成的有关代谢通路及合成生物学方法对其的设计改造。

2.1 模块(i): 蔗糖→葡萄糖→*L*-酪氨酸

该模块在吗啡合成的整个过程中属于连接中心代谢反应和特异性的吗啡前体(S)-牛心果碱合成反应

通路, 是最早研究清楚的一个模块。由于大肠杆菌(*Escherichia coli*)基因操作简便成熟的特点, 人们最早想到用大肠杆菌作为构建吗啡合成通路的宿主, 并且早在大约10年前, 科学家们就通过不同的策略对其代谢通路进行改造, 获得了*L*-酪氨酸高产的大肠杆菌菌株^[15,16]。但是, 吗啡生物合成的下游过程, 由(S)-牛心果碱生成苄基异喹啉类生物碱(benzylisoquinoline alkaloids, BIAs)的过程需要细胞色素P450酶(cytochrome P450, CYP450)的参与, 而*E. coli*的原核表达系统很难产生具有生物活性的P450酶。虽然大肠杆菌和酵母共培养的方式可基本上解决这一难题且获得较高的产量, 但是其培养过程较繁琐, 培养条件较难控制。此外大肠杆菌可分泌外毒素, 所以并不是适宜吗啡生物合成的最佳方式。

酵母与大肠杆菌相比, 其真核细胞构造为P450酶的修饰和膜定位提供了更好的条件, 无疑更适合用于生物碱类次级代谢产物的生产, 并且基因组学、转录组学和代谢组学的数据为研究外源导入的酶对整个宿主菌的影响提供了可能, 使人们将完整的吗啡人工生物合成寄希望于酵母上。

由于酿酒酵母自身即可合成和利用*L*-酪氨酸, 所以相对于大肠杆菌, 科学家对该模块在酵母中的改造研究较少。通常情况下, 为避免*L*-酪氨酸产量不足限制下游产物的生产速率和产量, 会选择在酵母培养基中额外添加*L*-酪氨酸, 将其作为合成通路的起始点。DeLoache等人^[17]利用*L*-酪氨酸合成通路中一个对调节反馈不敏感的基因突变体 $ARO4_FBR$ (3-deoxy-D-arabino-2-heptulosonic acid 7-phosphate synthase), 使其在酵母中高度表达, 提高酵母细胞内*L*-酪氨酸的浓度, 从而使下游产物多巴胺产量在原基础上提升了2.2倍。而Trenchard等人^[18]则对酵母中糖酵解等中心代谢至酪氨酸合成的过程进行了大量充分的研究并对其进行修饰改造。他们替换了启动子使 $TKL1$ (transketolase)基因表达上调, 敲除了 $ZWF1$ (glucose-6-phosphate dehydrogenase)基因, 使用对反馈调节不敏感的 $ARO4$ 基因突变体 $ARO4_Q166K$ (DAHP synthase), 增加*L*-酪氨酸的生成, 最终使下游产物去甲乌药碱的浓度达到327 $\mu\text{g/L}$, 为初始产量的60倍。

2.2 模块(ii): *L*-酪氨酸→(S)-牛心果碱

由于(S)-牛心果碱(reticuline)可作为药物前体,

L-酪氨酸→(*S*)-牛心果碱这一过程(图2)非常重要. 其第一部分 *L*-酪氨酸至多巴胺和4-羟苯乙酯(4-hydroxyphenylacetaldehyde, 4-HPAA)支路众多, 过于复杂, 不利于在工程菌中构建用于阿片类生物碱的生产, 所以既往研究大多选择通过直接提高酪氨酸的起始浓度来提高中间产物多巴胺和4-HPAA的浓度, 如上述直接添加 *L*-酪氨酸和Aro4p(DAHP synthase)的过表达^[17]. 然而, 日本科学家在2008年发表的关于在 *E. coli* 中生产苯甲基异喹啉类生物碱的研究^[19]中, 将藤黄微球菌中的单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)导入 *E. coli*, 在MAO的作用下, 多巴胺脱氨转变为4-HPAA, 将多巴胺和4-HPAA偶联起来, 巧妙地简化了通路.

对于 *L*-酪氨酸转化为多巴胺前体 *L*-DOPA(*L*-3,4-dihydroxyphenylalanine)的反应, 植物和动物中均由酪氨酸-3-单氧化酶催化, 需要辅助因子四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH₄)的参与, 而酵母不含有该辅助因子, 使得罂粟中的合成通路无法直接移植入酵母. 另一个常用的含铜离子的酪氨酸酶又因为可以氧化DOPA, 使 *L*-酪氨酸部分生成副产物 *L*-多巴醌, 减少 *L*-DOPA的生成而不适用. 对此, DeLoache 等人^[17]构建了一种酶偶联的生物探测器(biosensor)用于发现在酵母中活性最好的酪氨酸羟化酶, 并确定了一种来自于蜜蜂的细胞色素P450酶, 利用PCR(Agilent Technologies, 美国)对其进行突变得到

了去除氧化性只有羟化性质的酪氨酸羟化酶CYP76AD1(cytochrome P450 DOPA oxidase), 使 *L*-DOPA的产量提高2.8倍; 其与多巴脱羧酶(DOPA decarboxylase, DODC)共表达时使多巴胺浓度上升了7.4倍, 进而使终产物(*S*)-牛心果碱的浓度达到80.6 μg/L. 而同样研究该通路的Trenchard等人^[18]在之后发表的文章中指出虽然CYP76AD1经过突变提高了特异性, 但其仍然具有氧化酶的性质, 会产生副产物, 削弱主生产通路. 因此他们选择了一种哺乳动物源的酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TyrH), 并向酵母中导入其他4种与合成回收BH₄有关的酶来实现TyrH在酵母中的功能性表达. 之后, 他们又通过增加基因拷贝数的方式使TyrH, 4'-甲基转移酶(4'-*O*-methyltransferase, 4'OMT)和去甲乌药碱合酶(norcoclaurine synthase, NCS)这3种酶过量表达, 使 *S*型和 *R*型牛心果碱的总产量达到82 μg/L.

2.3 模块(Ⅲ): (*S*)-牛心果碱→(*R*)-牛心果碱→吗啡

(i) (*S*)-牛心果碱→(*R*)-牛心果碱. 牛心果碱的镜像异构转换是整个吗啡合成通路的关键步骤. Fossati等人^[20]发现参与吗啡前体的合成沙罗泰里啉的酶SAS(salutaridine synthase)和CPR(cytochrome P450 reductase)均具有严格的对映体选择性, 只可利用(*R*)-牛心果碱, 而不消耗(*S*)-牛心果碱. 所以若要

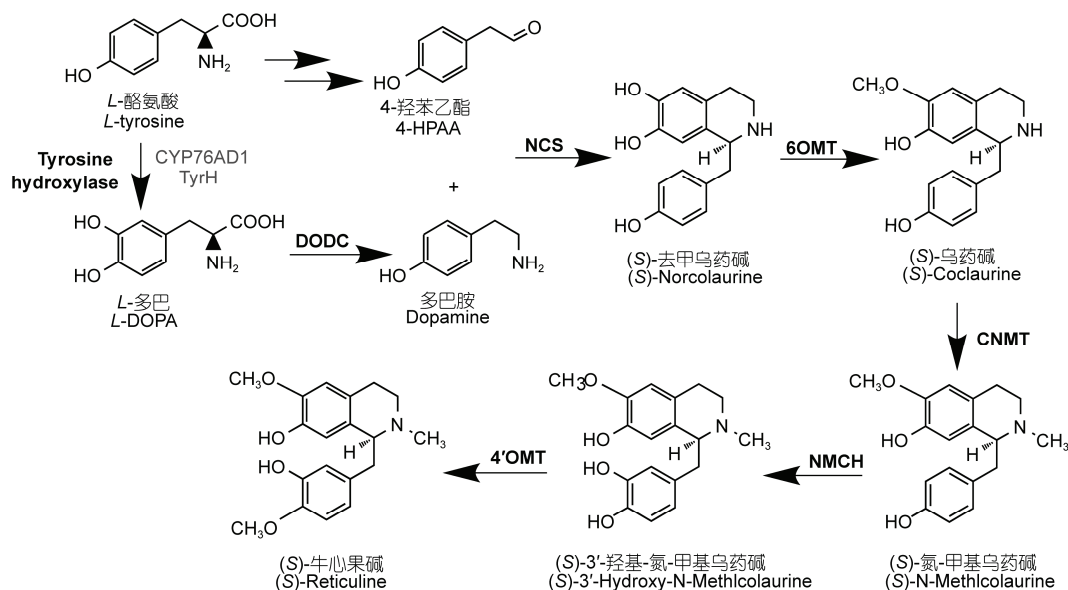


图2 *L*-酪氨酸至(*S*)-牛心果碱的生物合成过程

Figure 2 Biosynthesis of (*S*)-reticuline from *L*-tyrosine

实现最终产物吗啡的合成, 只能通过向培养基中添加(*R*)-牛心果碱或其下游产物。

很早以前, 研究者们就已经确定(*S*)-牛心果碱需先经过1,2-去氢牛心果碱合酶(1,2-dehydroreticuline synthase, DRS)的催化转变为中间产物1,2-去氢牛心果碱, 再经过1,2-去氢牛心果碱还原酶(1,2-dehydroreticulinereductase, DRR)被还原为(*R*)-牛心果碱(图3)^[21]。但这一过程很长一段时间无法进行人工复制, 因为技术水平的限制, 编码DRS和DRR这两个酶的基因一直未能被克隆。

最近这一关键问题被合成生物学方法成功解决。2015年7月, 连续有两篇研究文章发表, 证实了催化该对映体转化反应的是一种细胞色素P450单氧化酶和醛-酮还原酶的融合蛋白, 其中一篇研究的作者Winzer^[22]将该蛋白命名为STORR ((*S*)-to (*R*)-reticuline)。Winzer等人^[22]的研究发表在*Science*上, 他们通过研究编码STORR蛋白的基因的3个突变体及对STORR蛋白做定量质谱确定了其为融合体, 并在酵母中成功表达该基因^[22]。

另一篇研究文章发表在*Nat Chem Biol*, 研究人员通过在酵母中分别表达罂粟STORR蛋白酶的氧化区、还原区以及来自于大红罂粟的同源酶, 分别以(*S*)-牛心果碱、1,2-去氢牛心果碱和(*R*)-牛心果作为底物在不同条件下进行检测, 确定了该酶的性质^[23]。研究中很重要的一点发现是, 1,2-脱氢牛心果碱合酶催化的最适pH和1,2-脱氢牛心果碱还原酶正向催化的最适pH均约为7.8, 而DRR反向催化的最适pH约为8.8。此外, 该文章还对该融合酶的结构和生理性质做了详细分析, 并且对其融合形式的产生提出了假设。研究者认为融合使两种酶之间的间隔大大缩短, 便于物质的高效转化, 从而不需要改变底物 K_m 值和催化效率即可增加产物产量。这对代谢通路改造工作很有启发意义。

(ii) (*R*)-牛心果碱→吗啡。对吗啡合成最后一步的研究相较上一步对映体转化过程反而更早更成熟。Fossati等人^[20]成功在酵母中实现以(*R*)-牛心果碱为底物生产吗啡, 实现了罂粟来源的SalSyn(salutaridine synthase), SalR(salutaridine reductase), SalAT(salutaridinol acetyltransferase)基因在酵母中的功能性表达。同时, 他们发现SalR催化的由沙罗泰里啉(salutaridine)转变为氢化沙罗泰里啉(salutaridinol)为合成过程中的限速步, 并分析其原因可能为: 反应底物在细胞中的运输、SalR表达量少、催化活性较弱。还有相似研究表明, 由蒂巴因(thebaine)合成吗啡的过程中, T6ODM(thebaine 6-*O*-demethylase), COR(codeinone reductase), CODM(codeine-*O*-demethylase)这3种酶的基因拷贝数之比为2:1:3时, 吗啡的产量将会提升^[24]。在2个产物自发转变的步骤中, 环境pH对其影响很大, 如氢化沙罗泰里啉-7-氧-乙酸(salutaridinol-7-*O*-acetate)在pH为8~9时才会自发转变为蒂巴因。此外, 由于CODM, T6ODM和COR这3种酶均存在于酵母细胞质, 是“混合”在一起的, 而此过程副产物的合成也有这3种酶参与, 所以会有较多副产物(新吗啡、可待因酮等)生成, 从而减少目的产物的产量(图4)。

3 酵母中合成阿片类生物碱

3.1 完整通路的构建

至此人们已经研究清楚吗啡生物合成过程中的每一步反应以及参与反应的每一种酶的结构特点和性质, 进而改造或构造了每一步反应的关键酶及体系。但是在酵母中完整重建这条包含有20多种酶的复杂通路, 确保20多种酶全部功能性表达对合成生物学家来说仍是一个不小的挑战。这一挑战在2015年终于被成功克服(图5)。

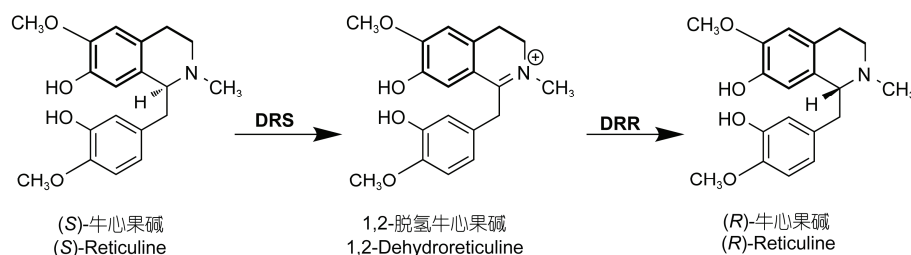


图3 (*S*)-牛心果碱与(*R*)-牛心果碱构型转换

Figure 3 Stereochemical inversion of (*S*)-reticuline to (*R*)-reticuline

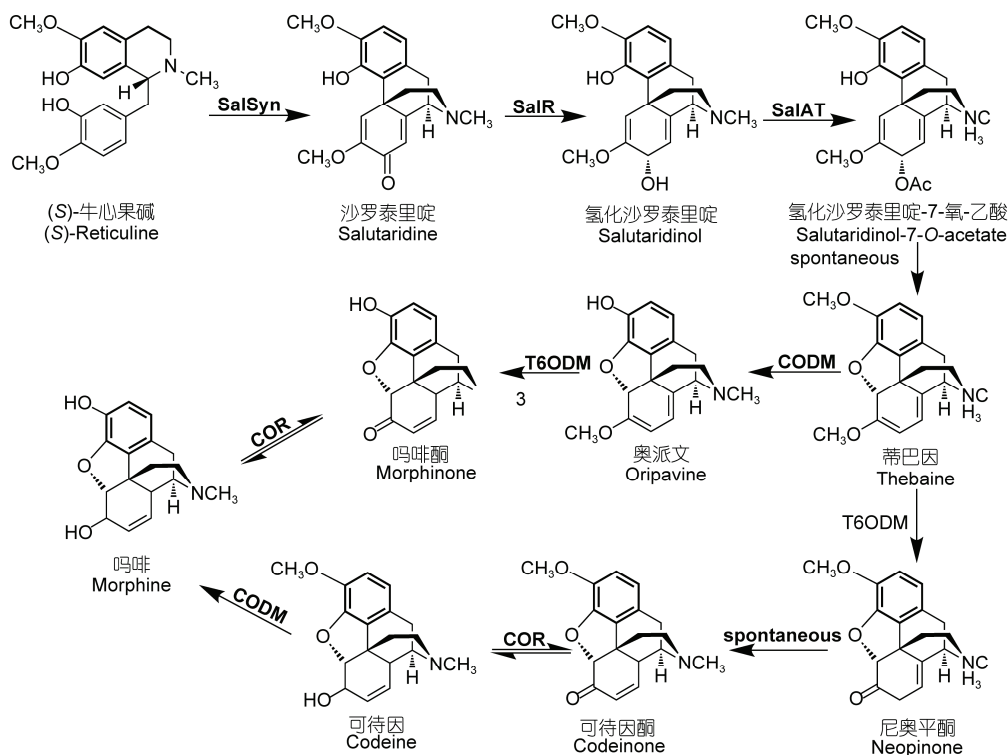


图4 (R)-牛心果碱到吗啡的生物合成过程

Figure 4 Description of the (R)-reticuline to morphine biosynthetic pathway

2015年8月13日, *Science*刊登了美国斯坦福大学 Smolke团队^[25]的最新工作成果. 他们在酵母中构建出阿片类生物碱生物合成的完整通路, 并成功生产蒂巴因和氢可待因, 这是合成生物学应用于微生物中复杂代谢通路改造的里程碑式成果.

Smolke团队^[24]研究酵母生产阿片类生物碱已有近10年的时间, 他们2014年在酵母中实现了由蒂巴因到吗啡的转化, 2015年又发表了利用酵母实现由酪氨酸到(S)-牛心果碱的相关研究^[18]. 这次, 他们在酵母中成功构建了含有21个酶的蒂巴因合成通路以及含有23个酶的氢可待因合成通路, 涉及了24个不同的表达组件, 其中包括21个来自植物、哺乳动物和细菌的外源酶, 2个酵母原有酶的过量表达和1个酵母原有酶的失活. 此外, 他们还分析了沙罗泰里啉合成酶(SalSyn)活性低的原因, 并用来自紫堇碱合成酶的N端 α -螺旋结构代替了原SalSyn的N端结构, 得到具有正确构型的嵌合酶yEcCFS^{1~83}-yPbSalSyn^{92~504}, 使(R)-牛心果碱至沙罗泰里啉的转化率升高6倍. 基于对每一步反应的产量最大化选择, 最终蒂巴因产量为 $6.4 \pm 0.3 \mu\text{g/L}$, 氢可待因产量约为 $0.3 \mu\text{g/L}$.

3.2 酵母合成吗啡存在问题及解决策略

虽然目前合成生物学家们已经基本在酵母中实现了由单糖合成吗啡类生物碱, 但获得的目标产物产量仍然很低, 约为 $6.4 \mu\text{g/L}$, 是目标产量的百万分之一^[25], 还无法取代传统的吗啡生产方式. 这说明现在构建出的吗啡类生物碱生物合成途径仍需不断优化, 使得外源表达与酵母内源代谢相平衡, 使得相关物质流能够更多地流向合成目标产物的通路.

(i) 酶的改造与优化. 有研究表明, 在毛茛科植物中, (R)-牛心果碱并不是唯一的(R)型BIA中间产物, 说明(R)-BIA中间产物的合成可能还存在另外一条还未发现的旁路途径, 即可能存在一种酶在由葡萄糖合成牛心果碱的最初几步就具有(R)选择^[26]. 可以对毛茛科植物的该特点进行研究, 找到生成(R)-牛心果碱的旁路途径, 之后移植于酵母中, 用于吗啡的生物合成优化. 此外, 对于通路中还没有研究透彻或是在酵母中表达活性不高的酶, 可以通过代谢组、转录组、蛋白组、功能基因组等分析, 利用比较基因组的知识发现未知酶, 找到适合在酵母中表达的同源酶或是同工酶, 实现对通路的优化. 同时, 催化

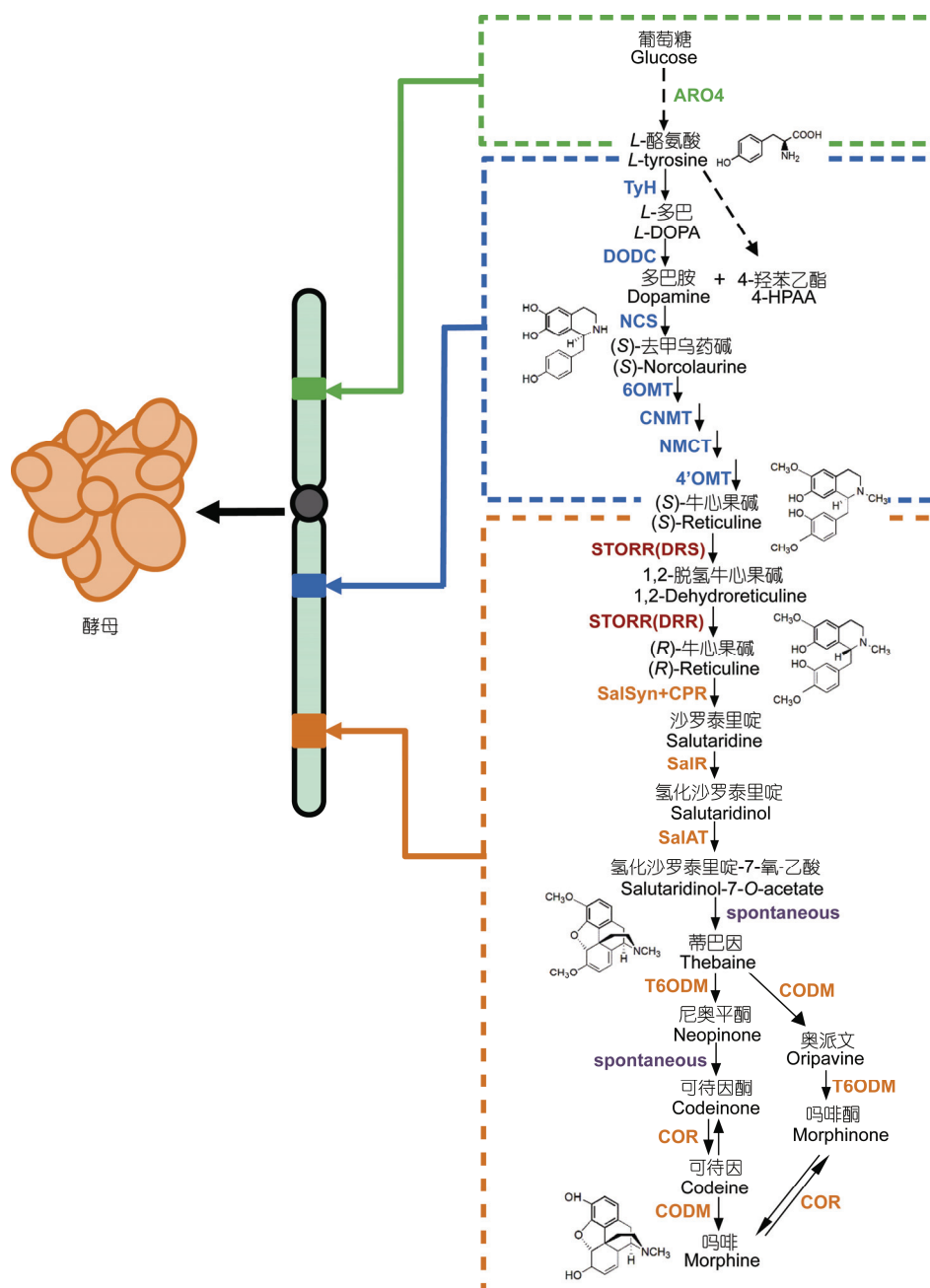


图5 酵母由葡萄糖生产吗啡的合成途径

Figure 5 Morphine biosynthesis pathway starting from glucose in yeast

(S)-牛心果碱转变为(R)-牛心果碱的酶是在自然选择下形成的融合蛋白, 启发研究者可以通过酶工程将两个顺序作用的酶进行融合, 得到人工融合蛋白, 使代谢物可以连续进行催化反应, 从而防止中间产物的流失, 提高转化效率。

(ii) 亚细胞结构及支架蛋白的利用. 实现代谢通路的最优化还应关注合成过程中各个反应与酵母

内部环境的协调. 例如, SalR催化沙罗泰里啉转化为沙罗泰里啉醇的这步反应以及一些中间产物自发转化的发生需要环境提供合适的pH. 为使每一步反应在其最适宜的环境中进行, 可以引入“细胞区室化”(subcellular compartmentalization)的思想, 充分利用酵母细胞中的各种细胞器的不同性质或是构建特定的人工细胞器, 将不同反应部分分配到对应的不

同亚细胞结构中,提高反应速率和转化率.在2013年,Avalos等人^[9]将丁醇合成中的3步反应由酵母细胞质转移至线粒体基质中,使产量增加了2.6倍.

此外,蒂巴因转化到吗啡这一过程中,支路较多,需要CODM, T6ODM, COR这3种酶依次顺序作用,才能实现蒂巴因主要向吗啡转化.对此,可以通过人工构建支架蛋白^[27-29]结构,实现对这3种酶的固定、排序并使它们在数量上达到最优比,从而避免它们“混合”在一起,减少支路副产物对中间产物的分流,提高吗啡的生产率.

4 小结

随着新一代测序技术的发展,人类对于生物生命活动的认知范围和深度都不断扩大.在此基础上,合成生物学也由设计改造单个基因表达元件和模块,发展到系统层面,甚至是全基因组层面的改造和修饰.随之延伸出快速有效的改造技术和构建具有全新功能的生物系统也成为在宿主中的构建外源生物

合成通路的强有力的工具.通路的调控和优化也变得更为科学,由原来的控制单个基因表达的做法,转变为如今系统的、全局的调控方法,使利用微生物进行生物合成附加值高的产品具有更高的发展空间.

目前酵母合成阿片类生物碱的产量很低,还不能够应用于工业化生产.但是随着合成生物学的发展,以及基因编辑新技术的成熟^[30,31],结合系统生物学和计算机模拟,物质代谢流将会被更合理的分配,使宿主细胞的内源代谢与外源物质合成通路达到平衡,并使更多的物质进入目的产物所在的通路,提高终产量.

同时也需要注意到,由于吗啡等阿片类生物碱可用于海洛因等毒品的制造,高效吗啡合成菌株等科学研究成果可能会被不法分子利用,非法制造药品和毒品.“没有远虑,必有近忧”,在此呼吁有关部门尽快出台并完善相关法律法规,规范合成生物学的研究;相关研究人员也应切实重视生命伦理和生物防护问题,真正严肃对待科学研究工作.

参考文献

- Gates M, Tschudi G. The synthesis of morphine. *J Am Chem Soc*, 1956, 78: 1380–1373, doi: 10.1021/ja01588a033
- Hagel J M, Facchini P J. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: A century of discovery and a brave new world. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54: 647–672
- Siddiqui M S, Thodey K, Trenchard I, et al. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12: 144–170
- Guo Y, Dong J, Auxillos J, et al. YeastFab: The design and construction of standard biological parts for metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: e88
- Kavscek M, Strazar M, Curk T, et al. Yeast as a cell factory: Current state and perspectives. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 94
- Yoshikuni Y, Dietrich J A, Nowroozi F F, et al. Redesigning enzymes based on adaptive evolution for optimal function in synthetic metabolic pathways. *Chem Biol*, 2008, 15: 607–618
- Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528–532
- Paddon C J, Keasling J D. Semi-synthetic artemisinin: A model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 355–367
- Avalos J L, Fink G R, Stephanopoulos G, et al. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 335–341
- Steen E J, Chan R, Prasad N, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of *n*-butanol. *Microb Cell Fact*, 2008, 7: 36
- Buijs N A, Siewers V, Nielsen J. Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 480–488
- Aiikumar P K, Xiao W H, Tyo K E, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330: 70–74
- Ye V M, Bhatia S K. Metabolic engineering for the production of clinically important molecules: Omega-3 fatty acids, artemisinin, and taxol. *Biotechnol J*, 2012, 7: 20–33
- Desgagne-Penix I, Khan M F, Schriemer D C, et al. Integration of deep transcriptome and proteome analyses reveals the components of alkaloid metabolism in opium poppy cell cultures. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 252

- 15 Lütke-Eversloh T, Stephanopoulos G. *L*-Tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75: 103–110
- 16 Lütke-Eversloh T, Santos C N, Stephanopoulos G. Perspectives of biotechnological production of *L*-tyrosine and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77: 751–762
- 17 DeLoache W C, Russ Z N, Narcross L, et al. An enzyme-coupled biosensor enables (*S*)-reticuline production in yeast from glucose. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 465–471
- 18 Trenchard I J, Siddiqui M S, Thodey K, et al. *De novo* production of the key branch point benzyloquinoline alkaloid reticuline in yeast. *Metab Eng*, 2015, 31: 74–83
- 19 Minami H, Kim J S, Ikezawa N, et al. Microbial production of plant benzyloquinoline alkaloids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 7393–7398
- 20 Fossati E, Nsrcross L, Ekins A, et al. Synthesis of morphinan alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 2015, 10: e0124459
- 21 Hirata K, Poeaknapo C, Schmidt J, et al. 1,2-Dehydroreticuline synthase, the branch point enzyme opening the morphinan biosynthetic pathway. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1039–1046
- 22 Winzer T, Kern M, King A J, et al. Plant science. Morphinan biosynthesis in opium poppy requires a P450-oxidoreductase fusion protein. *Science*, 2015, 349: 309–312
- 23 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. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 728–732
- 24 Thodey K, Galanie S, Smolke C D. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 837–844
- 25 Galanie S, Thodey K, Trenchard I J, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 2015, 349: 1095–1100
- 26 Kraus P F, Kutchan T M. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbamunine synthase, a C—O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2071–2075
- 27 Lee H, DeLoache W C, Dueber J E, et al. Spatial organization of enzymes for metabolic engineering. *Meta Eng*, 2012, 14: 242–251
- 28 Hosse R J, Rothe A, Power B E. A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition. *Protein Sci*, 2006, 15: 14–27
- 29 Dueber J E, Wu G C, Malmirchegini G R, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 753–759
- 30 Flagfeldt D B, Siewers V, Huang L, et al. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2009, 26: 545–551
- 31 Ronda C, Maury J, Jakociunas T, et al. CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 97

Progress of biosynthesis of Morphine and its industrial manufacture

FAN ChuYao¹, LIU LongYing¹, SHEN Yue¹, CHEN Tai¹, ZENG XiaoFan¹ & YANG HuanMing^{1,2}

¹ BGI-Shenzhen, Shenzhen 518083, China;

² James D. Watson Institute of Genome Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Benzylisoquinoline alkaloids (BIA) are a diverse family of nitrogen-containing plant-specialized secondary metabolites. Morphine is one subclass of BIAs produced in only a few plant species, which is the most abundant analgesic opiate found in the opium poppy. Morphine has been used as a pain reliever for years and has been classified by WHO (World Health Organization) as an essential medicine due to its use in pain management and palliative care. However, the supply of morphine is not adequate to the demand in the world, especially in the developing areas.

The primary source of morphine is the extraction from poppy straw of the opium poppy, but yields are poor because the metabolites accumulate at low levels in plant cells. An alternative way of producing morphine is chemical synthesis, but this way is high-cost and hampered by the complexity and chirality of morphine. As such, the reconstruction of morphine biosynthetic pathways in microorganisms has attracted more and more researchers in recent studies, because microbial systems can improve not only the quantity but also the quality of products. The developments in synthetic biology, combined with continued process in systems biology and metabolic engineering, have enabled the engineering of microorganisms to produce morphine in a manner that was previously unfeasible. And the biosynthesis of morphine is regarded as the most representative example after the successful biosynthesis of artemisinin.

A number of recent reports have successfully reconstituted BIA pathways into *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and combinations thereof in co-culture systems. According to these reports, we clarified the related metabolic pathways and synthesis design of the morphine biosynthesis in microbial systems in this review. We divided the whole morphine biosynthesis pathway into three modules: module (i) is the synthesis of *L*-tyrosine from sugar; module (ii) is the production of (*S*)-reticuline from *L*-tyrosine; and module (iii) is the synthesis of morphine from (*S*)-reticuline including the configuration transformation of (*S*)-reticuline to (*R*)-reticuline. In module (i), more work has been done in *E. coli* than in yeast to achieve high *L*-tyrosine production. However, given the limited ability of bacterial hosts to functionally express endomembrane-localized enzymes, such as plant cytochrome P450s that are prevalent in BIA biosynthesis, no steps downstream of (*S*)-reticuline have been demonstrated in *E. coli*. *S. cerevisiae* is preferred to be the host because of its stable expression of many heterologous enzymes for the extensive BIA biosynthesis pathways, as a result of which, module (ii) and module (iii) have been reconstructed in *S. cerevisiae* for morphine production. And then we displayed the complete biosynthesis of morphine from sugar in yeast based on the study of Smolke's team, who engineered yeast with a medley of plant, bacterial, and rodent genes to turn sugar into the opiate. Finally, we put forward some suggestions to optimize the pathway, including the modification of enzymes and the use of scaffold proteins.

In this review, we not only showed the whole process of the landmark work, but also discussed the potentials and future prospects of synthetic biology for industrial manufacture.

morphine, *Saccharomyces cerevisiae*, biosynthesis, synthetic biology, industrial manufacture

doi: 10.1360/N972015-01206