



Title	Functional analysis of artemisinin biosynthetic enzyme homologs from non-artemisinin-producing <i>Artemisia</i> plants
Author(s)	Muangphrom, Ppaskorn
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59620">https://hdl.handle.net/11094/59620</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## Abstract of Thesis

Name (MUANGPHROM PASKORN)	
Title	Functional analysis of artemisinin biosynthetic enzyme homologs from non-artemisinin-producing <i>Artemisia</i> plants (アルテミシニン非産生ヨモギ属植物におけるアルテミシニン生合成酵素ホモログの機能解析)
<p><b>Abstract of Thesis</b></p> <p><b>Chapter 1 General introduction</b></p> <p>Malaria has been one of the main cause of illness and death in human for over a century. Owing to the urgent need of an effective antimalarial drug, artemisinin, the most effective antimalarial compound isolated from <i>Artemisia annua</i> plant, has been discovered, and artemisinin-based combination therapies has become the first-line treatment for malaria since 2006. Artemisinin biosynthetic pathway starts from a cyclization of farnesyl pyrophosphate (FPP) to amorpha-4,11-diene catalyzed by amorpha-4,11-diene synthase (ADS). Amorpha-4,11-diene is then oxidized to artemisinic alcohol, artemisinic aldehyde and artemisinic acid, respectively, by amorpha-4,11-diene 12-monoxygenase (CYP71AV1). The next step of artemisinin biosynthesis is the reduction of artemisinic aldehyde into dihydroartemisinic aldehyde by artemisinic aldehyde <math>\Delta</math>11(13) reductase (DBR2). Then aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) oxidizes dihydroartemisinic aldehyde into dihydroartemisinic acid which is converted non-enzymatically into artemisinin.</p> <p>Among over 400 <i>Artemisia</i> species distributed worldwide, artemisinin is produced only in <i>A. annua</i>. We hypothesized that the acquisition of specific enzymes involved in artemisinin biosynthesis may confer this ability on <i>A. annua</i>. In order to proof this, previous work in our laboratory analyzed the expression and enzymatic function of <i>CYP71AV1</i> homologs in non-artemisinin-producing <i>A. absinthium</i> and <i>A. afra</i>. We found that the isolated homologous enzymes showed similar function to that of <i>A. annua</i> <i>CYP71AV1</i>. These results indicated that <i>CYP71AV1</i> is not a key enzyme controlling artemisinin-producing ability. Therefore, this study aims to investigate the possible existence, the expression, and the enzymatic function of the remaining homologous genes (<i>ADS</i> and <i>DBR2</i> homologs) in non-artemisinin-producing <i>Artemisia</i> species and to verify their artemisinin-producing ability <i>in planta</i>.</p> <p><b>Chapter 2 Functional analysis of ADS homologs from non-artemisinin-producing <i>Artemisia</i> plants</b></p> <p>Chemodiversity of sesquiterpenoids is controlled by a unique function of sesquiterpene synthases. In artemisinin biosynthesis, ADS is a sesquiterpene synthase catalyzing the first cyclization step of FPP to amorpha-4,11-diene. Therefore, this chapter focused on the examination of the possible existence of <i>ADS</i> homologs in non-artemisinin-producing <i>Artemisia</i> species. Among 13 <i>Artemisia</i> species analyzed in this study, <i>ADS</i> homologs were detected only in <i>A. absinthium</i>, <i>A. kurramensis</i> and <i>A. maritima</i>. Unlike <i>A. annua</i> <i>ADS</i>, all of these <i>ADS</i> homologs exhibited novel and unique functions on the cyclization of FPP to rare natural sesquiterpenoids: koidzumiol, (+)-<math>\alpha</math>-bisabolol and 4-amorphen-11-ol. Although further studies may be required to confirm the presence and enzymatic functions of <i>ADS</i> homologs in other <i>Artemisia</i> species, these findings suggested that non-artemisinin-producing <i>Artemisia</i> plants do not have the ability to cyclize FPP to amorpha-4,11-diene.</p> <p><b>Chapter 3 Functional analysis of DBR2 homolog from <i>Artemisia absinthium</i></b></p> <p>DBR2 is a key enzyme involved in the following reduction step and causes a switch in artemisinin biosynthesis to the production of artemisinin via dihydro-analogues. Therefore, the expression and enzymatic function of <i>DBR2</i> homologs were analyzed. <i>A. absinthium</i> and <i>A. afra</i> were selected in this study as both are highly cultivated in malaria-endemic countries, and their crude extracts exhibit antimalarial activity. The results showed that <i>DBR2</i> homolog was expressed only in <i>A. absinthium</i> (<i>abDBR2</i>). <i>In vitro</i> enzymatic assay of <i>abDBR2</i> revealed comparable activity to <i>A. annua</i> DBR2. This finding indicates that non-artemisinin-producing <i>Artemisia</i> species, at least <i>A. absinthium</i>, has the ability to catalyze the reduction step in artemisinin</p>	

biosynthetic pathway.

#### **Chapter 4 *In planta* substrate feeding of artemisinin intermediates**

The presence of *ADS*, *CYP71AV1* and *DBR2* homologs in *A. absinthium* has been confirmed. Among these, only *ADS* homolog exhibits different activity from *ADS*, whereas *CYP71AV1* and *DBR2* homologs have similar functions to their counterparts in *A. annua*. To verify the activities of both homologous enzymes *in planta* and the artemisinin-producing ability of *A. absinthium*, each specific artemisinin intermediate was administered to the leaves of this plant, and the conversion of administered compounds to other intermediates in artemisinin biosynthetic pathway was focused. The conversion of amorpha-4,11-diene to the following products until dihydroartemisinic acid was then detected. This finding indicates that *A. absinthium* can partially catalyze artemisinin biosynthesis *in planta*, despite unable to produce artemisinin.

#### **Chapter 5 General discussions and conclusion**

To investigate a key factor controlling artemisinin-producing ability, this study examined several genes highly homologous to artemisinin biosynthetic genes in non-artemisinin-producing *Artemisia* plants. *CYP71AV1* and *DBR2* homologs in non-artemisinin-producing *Artemisia* plants exhibit similar functions to their counterparts in *A. annua*. However, *ADS* homolog was not detected in most of non-artemisinin-producing *Artemisia* species, whereas the present ones exhibit novel enzymatic functions different from that of *A. annua* *ADS*. These findings indicate that the exceptional artemisinin-producing ability in *A. annua* may be attributed by the acquisition of *ADS*. This study also showed that *A. absinthium* has a partial artemisinin-producing ability *in planta*. This provides an insight into the generation of artemisinin-producing *A. absinthium* which may be more appropriate for its use as an alternative source of the effective antimalarial compound owing to its abundance in malaria-endemic countries in the future.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 ( Paskorn Muangphrom )		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査	教授 村中 俊哉
	副査	教授 福崎 英一郎
	副査	教授 仁平 卓也
	副査	教授 渡邊 肇
	副査	教授 紀ノ岡 正博
	副査	教授 大政 健史
	副査	教授 藤山 和仁
	副査	教授 永井 健治

## 論文審査の結果の要旨

マラリアは、マラリア原虫をもった蚊に刺されることにより感染する、世界中の熱帯・亜熱帯地域で流行している重篤な疾病である。抗マラリア薬として現在最も注目されているものが、ヨモギ属植物である *Artemisia annua* (和名: クソニンジン) が产生するアルテミシニンである。アルテミシニンは、炭素数 15 の骨格を基盤とするセスキテルペノイドである。アルテミシニンが、なぜヨモギ属の *A. annua* 1種でのみ产生されるのかこれまで知られていなかった。学位申請者の論文対象研究以前に、アルテミシニンの生合成研究がなされ、セスキテルペノイドの共通前駆体であるファルネシル二リン酸(FPP)から、アモルファ-4,11-ジエン合成酵素(ADS)、アモルファ-4,11-ジエン酸化酵素(CYP71AV1)、アルテミシニックアルデヒドレダクターゼ(DBR2)などによる酵素反応を経てジヒドロアルテミシン酸が生成され、その後非酵素的反応によりアルテミシニンが合成される経路が提唱してきた。さらに、アルテミシニン非产生ヨモギ属植物において CYP71AV1 ホモログ遺伝子が存在し、酵母による機能解析の結果、*A. annua* の CYP71AV1 と同様にアモルファ-4,11-ジエン酸化酵素として機能することが知られていた。

本論文で学位申請者は、ヨモギ属の *A. annua* 1種でのみアルテミシニンが作られる原因として、アルテミシニン生合成の酵素遺伝子 ADS もしくは DBR2 が *A. annua* でのみ機能すると仮説を立て研究をすすめている。その結果、アルテミシニン非产生ヨモギ属植物においても ADS ホモログ、DBR2 ホモログが存在するが、ADS ホモログはアモルファ-4,11-ジエン合成酵素として機能しないが、DBR2 ホモログはアルテミシニックアルデヒドレダクターゼとして機能しうることを示し、ADS がアルテミシニン生合成における鍵因子であることを明らかにしている。

第一章では緒論として、アルテミシニン生合成研究ならびに、酵母におけるアルテミシニン酸生産研究を示し、本研究を着想するに至った経緯を記述している。

第二章では、アルテミシニン非产生ヨモギ属植物 13 種から ADS ホモログ遺伝子の単離を試みている。その結果、*A. absinthium*, *A. kurramensis*, *A. maritima* の 3 種に ADS ホモログ遺伝子が存在することを見出し、酵母発現系による解析を行っている。その結果、それぞれの ADS ホモログ遺伝子を導入した酵母でアモルファ-4,11-ジエンが产生されず、代わりに、希少なセスキテルペノイドであるコイズミオール、(+)- $\alpha$ -ビザボロール、ならびに、4-アモルファン-11-オールを产生することを見出している。今後さらに多くの ADS ホモログのアモルファ-4,11-ジエン合成酵素としての機能を調べる必要があるが、アルテミシニン非产生ヨモギ属植物には、アモルファ-4,11-ジエン生合成能がないことが示唆されている。

第三章では、2 種のアルテミシニン非产生ヨモギ属植物 *A. absinthium* と *A. afra* から DBR2 ホモログ遺伝子の単

離、ならびに酵母による機能解析を行っている。その結果、*A. absinthium* から DBR2 ホモログ遺伝子が単離され、*A. absinthium* の DBR2 ホモログは、DBR2 と同様に、アルテミシニックアルデヒドレダクターゼとして機能することを示している。

第四章では、アルテミシニン非産生ヨモギ属植物 *A. absinthium*において、ADS, CYP71AV1, DBR2 のホモログ遺伝子が存在し、ADS ホモログ以外の、CYP71AV1 ホモログ、DBR2 ホモログは、それぞれ CYP71AV1, DBR2 としての酵素機能を有していることが酵母を用いた系により明らかとなっていることから、*A. absinthium* 植物において、アルテミシニン生合成中間体の代謝能を有しているかどうかを検討している。種々のアルテミシニン生合成中間体を合成し、*A. absinthium* 植物の葉に処理した結果、アモルファ-4,11-ジエンからジヒドロアルテミシニン酸への変換系が存在することを示している。

第五章では結論として第二章から第四章までを総括するとともに、アルテミシニン非産生ヨモギ属植物へのアルテミシニン生産能付与の代謝工学の可能性について記述されている。

以上のように、本論文から、アルテミシニン生合成における鍵因子が見出されたこと、ならびに ADS ホモログを酵母で発現させることにより希少なセスキテルペノイドが産生できるという重要な知見が得られている。さらに、本論文では、アルテミシニン非産生ヨモギ属植物である *A. absinthium* 植物に ADS 遺伝子を導入することにより新たなアルテミシニン生産のリソースを提供できる可能性が示されており、この知見は、有用セスキテルペノイドの代謝工学に貢献すると期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。