



Title	Identification of enzyme genes for triterpenoid biosynthesis and their transcriptional regulation in Glycyrrhiza uralensis and Platycodon grandiflorus
Author(s)	田村, 啓太
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69531
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (田 村 啓 太)

論文題名

Identification of enzyme genes for triterpenoid biosynthesis and their transcriptional regulation in *Glycyrrhiza uralensis* and *Platycodon grandiflorus*
(薬用植物カンゾウおよびキキョウにおけるトリテルペノイド生合成酵素遺伝子の同定とその転写制御に関する研究)

論文内容の要旨

植物が合成する多様な化学成分（特化代謝産物）には有用な生理活性を有するものが多く知られており、こうした有効成分を含む植物は薬用植物として人々の健康維持に役立てられてきた。なかでもトリテルペノイドと称される化合物群は、植物界全体で14,000種類以上が知られている多様性に富んだ化合物群であり、その構造多様化にはシトクロムP450酸化酵素（P450）による酸化反応が重要な役割を担っている。トリテルペノイド生合成に関与するP450はマメ科植物において研究が進んでいる一方で、ほかの科に属する植物においては理解が乏しい。また多くの場合、特化代謝産物は植物内において組織特異的にあるいは外部刺激に応答して合成され、こうした生合成は、転写因子を介した酵素遺伝子の発現制御によって達成されていると一般的に考えられている。フラボノイドやアルカロイドといった化合物群では転写制御機構の研究が進んでいるが、トリテルペノイドに関してはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、トリテルペノイド生合成とその制御に関わる分子メカニズムを明らかにするために、マメ科植物であるカンゾウ（*Glycyrrhiza uralensis*）およびキキョウ科植物であるキキョウ（*Platycodon grandiflorus*）の2種の重要な薬用植物を研究対象として、P450酵素遺伝子およびそれらの発現を制御する転写因子の同定を目標とした。

第1章では緒論として、植物の特化代謝産物研究の歴史的背景、またトリテルペノイドの一般的な生合成メカニズムおよび転写因子を介した特化代謝産物の生合成制御についてこれまで明らかになっている知見を述べ、2種の薬用植物を対象としてP450および転写因子の探索研究を行うことを着想するのに至った経緯を記述した。

第2章では、カンゾウのトリテルペノイド生合成に関わるP450の探索を行った。これまでに、カンゾウの根やストロンに蓄積するグリチルリチンの生合成に関わるP450は同定されていたが、ソヤサポニン、ベツリン酸、オレアノール酸といった培養組織で多く蓄積するトリテルペノイドの生合成に関わるP450は完全には明らかになっていなかった。本著者は、カンゾウ培養ストロンのRNAシークエンシング解析から候補P450の探索を行い、植物トリテルペン生産酵母を用いた*in vivo*機能評価系によって、ベツリン酸およびオレアノール酸の生合成に関与する新規CYP716Aサブファミリー酵素遺伝子および、ソヤサポニン生合成に関与する新規CYP72Aサブファミリー酵素遺伝子を同定した。また根および培養ストロンにおける各トリテルペノイドの蓄積量およびトリテルペノイド生合成酵素遺伝子の発現量を比較することで、各生合成酵素遺伝子の発現量の違いがトリテルペノイド蓄積量に大きく影響していることを示した。

第3章では、キキョウのトリテルペノイド生合成に関わるP450の探索を行った。キキョウは根にプラチコジンDをはじめとする多様なトリテルペノイドを蓄積するが、その生合成酵素遺伝子は未同定であった。そこで主要な生理活性成分プラチコジンDの非糖部分であるプラチコジゲニンについて、その炭素骨格である β -アミリンからプラチコジゲニンへの変換反応に関わるP450の同定を目指した。キキョウの根、葉、花弁の各サンプルについてRNAシークエンシング解析を行い、根で特異的に高く発現している3種のCYP716ファミリー酵素遺伝子および3種のCYP72Aサブファミリー酵素遺伝子を候補P450遺伝子として単離した。第2章と同様の手法を用いて酵素活性試験を行った結果、2種のCYP716Aサブファミリー酵素がそれぞれ β -アミリンのC-28位とC-16 β 位に対する酸化反応を触媒することが示された。

第4章では、第2章の結果よりカンゾウの組織特異的なトリテルペノイドの蓄積に、生合成酵素遺伝子の発現制御が大きく関与している可能性が示唆されたことから、その発現制御のメカニズムを解明するために、カンゾウの各トリテルペノイド生合成経路を制御する転写因子の探索を行った。その結果、bHLH型の転写因子の一種が、カンゾウのソヤサポニン生合成を正に制御する転写因子であることを、レポーターアッセイおよび本転写因子を過剰発現する形質転換毛状根における生合成酵素遺伝子の発現解析ならびに代謝物分析を通じて明らかにした。

以上、本著者はマメ科植物のカンゾウと非マメ科植物のキキョウという2種の重要な薬用植物についてトリテルペノイド生合成の分子メカニズムを明らかにするとともに、類似構造を持つトリテルペノイドが進化的に離れた植物間では異なるファミリーに属するP450によって合成される可能性を指摘した。第5章では結論として第2章から第4章までを総括するとともに、本研究で同定した生合成酵素遺伝子および転写因子の生物工学的応用の可能性について記述した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (田 村 啓 太)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教 授	村中 俊哉
	副 査	教 授	藤山 和仁
	副 査	教 授	渡邊 肇
	副 査	教 授	福崎 英一郎
	副 査	教 授	紀ノ岡 正博
	副 査	教 授	大政 健史
	副 査	教 授	仁平 卓也
	副 査	教 授	永井 健治

論文審査の結果の要旨

植物は、特価代謝物と呼ばれる多種多様な代謝産物を生合成する。これら特価代謝物には有用な生理活性を有するものが多く知られており、こうした成分を含む植物は薬用植物として人々の健康維持に役立てられてきた。なかでも炭素数 30 を基本骨格とするトリテルペノイドと呼ばれる化合物群は、植物界全体で 14,000 種類以上が知られている多様性に富んでおり、その構造多様化にはシトクロム P450 酸化酵素 (P450) による酸化反応が重要な役割を担っている。トリテルペノイド生合成に関与する P450 はマメ科植物において研究が進んでいる一方で、ほかの科に属する植物においては理解が乏しい。また多くの場合、特化代謝産物は植物内において組織特異的にあるいは外部刺激に応答して合成され、こうした生合成は、転写因子を介した酵素遺伝子の発現制御によって達成されていると一般的に考えられている。フラボノイドやアルカロイドといった化合物群では転写制御機構の研究が進んでいるが、トリテルペノイドに関してはほとんど明らかにされていない。

このような背景に基づき学位申請者は、トリテルペノイド生合成とその制御に関わる分子メカニズムを明らかにするために、マメ科植物であるカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) およびキキョウ科植物であるキキョウ (*Platycodon grandiflorus*) の 2 種の重要な薬用植物を研究対象として、P450 酵素遺伝子およびそれらの発現を制御する転写因子の同定を目標として研究を行なっている。学位申請者はまず、カンゾウのトリテルペノイド生合成に関わる P450 の探索を行っている。これまでに、カンゾウの根やストロンに蓄積するグリチルリチンの生合成に関わる P450 は同定されていたが、ソヤサポニン、ベツリン酸、オレアノール酸といった培養組織で多く蓄積するトリテルペノイドの生合成に関わる P450 は完全には明らかになっていなかった。そのため、カンゾウ培養ストロンの RNA シークエンシング解析から候補 P450 の探索を行い、植物トリテルペン生産酵母を用いた *in vivo* 機能評価系によって、ベツリン酸およびオレアノール酸の生合成に関与する新規 CYP716A サブファミリー酵素遺伝子および、ソヤサポニン生合成に関与する新規 CYP72A サブファミリー酵素遺伝子を同定している。また根および培養ストロンにおける各トリテルペノイドの蓄積量およびトリテルペノイド生合成酵素遺伝子の発現量を比較することで、各生合成酵素遺伝子の発現量の違いがトリテルペノイド蓄積量に大きく影響していることを示している。さらにまた、薬用植物として重要なキキョウのトリテルペノイド生合成に関わる P450 の探索を行っている。キキョウは根にプラチコジン D をはじめとする多様なトリテルペノイドを蓄積するが、その生合成酵素遺伝子は未同定であった。そこで、キキョウの根、葉、花卉の各サンプルについて RNA シークエンシング解析を行い、根で特異的に高く発現している 3 種の CYP716 ファミリー酵素遺伝子および 3 種の CYP72A サブファミリー酵素遺伝子を候補 P450 遺伝子として単離している。第 2 章と同様の手法を用いて酵素活性試験を行った結果、2 種の CYP716A サブファミリー酵素がそれぞれ B-アミリンの C-28 位と C-16B 位に対する酸化反応を触媒することが示されている。

学位申請者はまた、上述の通り、カンゾウの組織特異的なトリテルペノイドの蓄積に、生合成酵素遺伝子の発現制御が大きく関与している可能性を示唆することから、その発現制御のメカニズムを解明するために、カンゾウの各トリテルペノイド生合成経路を制御する転写因子の探索を行っている。それにより、bHLH 型の転写因子の一種が、カンゾウのソヤサポニン生合成を正に制御する転写因子であることを、レポーターアッセイおよび本転写因子を過剰発現する形質転換毛状根における生合成酵素遺伝子の発現解析ならびに代謝物分析を通じて明らかにしている。

以上のように、本論文は、マメ科植物のカンゾウと非マメ科植物のキキョウという 2 種の重要な薬用植物についてトリテルペノイド生合成の分子メカニズムを明らかにするとともに、類似構造を持つトリテルペノイドが進化的に離れた植物間では異なるファミリーに属する P450 によって合成される可能性を指摘している。さらに、本研究で同定した生合成酵素遺伝子および転写因子の生物工学的応用の可能性についても述べている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。