

Title	Identification of oxidosqualene cyclases from Bauhinia forficata and their application on valuable triterpenoids production
Author(s)	Srisawat, Pisanee
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/73549
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Pisaneer SRISAWAT)	
Title	<p>Identification of oxidosqualene cyclases from <i>Bauhinia forficata</i> and their application on valuable triterpenoids production (<i>Bauhinia forficata</i> 由来オキシドスクアレノ環化酵素の機能解析とそれらを用いた有用トリテルペノイド生産に関する研究)</p>
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Triterpenoids are one of the most structurally diverse class of plant specialized metabolites with a variety of biological properties, which are commercially important. However, the low abundance of triterpenoids in nature and its structural complexity limit the commercial applications. Recently, synthetic pathway manipulation in heterologous host become the alternative methods to produce plant-derived metabolites. For this purpose, the identification of the enzymes involved in triterpenoid biosynthesis and the efficient expression platform for the production is required.</p> <p>Cyclization of 2,3-oxidosqualene by enzymes known as oxidosqualene cyclases (OSCs) is the first committing step of triterpenoids biosynthesis to generate the diversity of triterpene scaffolds. In this study, by transcriptome analyses, homology-based cloning, and heterologous expression, an OSC (BfOSC3) with a preponderant α-amyrin-producing activity, which comprised at least 95% of total triterpenols, and also three other functional OSCs (BfOSC1, BfOSC2, and BfOSC4) that produce β-amyrin, germanicol, or cycloartenol were discovered, which are responsible for the diversity of triterpenols in non-model legume <i>Bauhinia forficata</i>. Then, those characterized enzymes were applied for the production of morolic acid and ursolic acid.</p> <p>Morolic acid (a germanicol derivative with carboxyl at C-28) is a low abundant plant-derived triterpenoid, which possesses various pharmacological properties. To developed yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expression platform for efficient morolic acid production, a novel production pathway using combinatorial biosynthesis approach for morolic acid biosynthesis was constructed by co-expressing <i>BfOSC2</i> and <i>CYP716A49</i> from <i>Beta vulgaris</i>. To further improve the transcriptional efficiency of heterologous genes, the cellular galactose regulatory network was reconstructed by introducing chimeric transcriptional activator (fusion of Gal4dbd.ER.VP16) to overdrive the genes expressing under galactose promoter. Yeast truncated <i>HMG1</i>, encoding rate-limiting enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase 1 and sterol-regulating transcription factor <i>upc2-1</i> were also overexpressed to increase the isoprenoids precursors produced by the mevalonate pathway. By using this yeast system, morolic acid production was achieved up to 20.7 ± 1.8 mg/L in batch culture.</p> <p>Moreover, the <i>N. benthamiana</i> expression platform was also constructed to efficiently produce ursolic acid, a potential therapeutic triterpenoid derived from α-amyrin. The mevalonate pathway of <i>N. benthamiana</i> was engineered by co-expressing <i>Arabidopsis thaliana</i> HMGR1 variants and ursolic acid biosynthesis genes to improve the flux to ursolic acid production. A novel production pathway was constructed using combinatorial biosynthesis approach for ursolic acid biosynthesis by co-expressing <i>BfOSC3</i> and <i>CYP716A49</i>. Ursolic acid production was achieved up to 6.5 ± 0.6 mg/L mg/g dw, which was 12 folds higher than without AtHMGR1 co-expression.</p> <p>This study demonstrated the possible strategies to improve the productivity of triterpenoids in heterologous production systems, which may contribute to produce further other plant specialized metabolites that present in extremely low abundance in the natural resources.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Pisanee SRISAWAT)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教 授	村中 俊哉
	副 査	教 授	渡邊 肇
	副 査	教 授	藤山 和仁
	副 査	教 授	福崎 英一郎
	副 査	教 授	内山 進
	副 査	教 授	紀ノ岡 正博
	副 査	教 授	大政 健史
	副 査	教 授	永井 健治

論文審査の結果の要旨

植物は、炭素数 5 を基本骨格とする多種多様のテルペノイドを産生する。なかでも、天然に 2 万種類以上の物質が知られている炭素数 30 のトリテルペノイドは、抗腫瘍、抗ウイルス、抗炎症などさまざまな生理活性を有するものが多い。トリテルペノイドは、直鎖の 2,3-オキシドスクアレンを出発物質として、オキシドスクアレン環化酵素(OSC)による環化反応により多様なトリテルペノールが産生され、続いてシトクローム P450 モノオキシゲナーゼ(CYP)による部位特異的酸化反応などにより多様な分子種として生合成される。そのためこれらの酵素の機能を解明し当該酵素遺伝子を用いることにより、ヘテロガスな生産系によりトリテルペノイドを生物工学的に生産することが可能である。しかしながら OSC のうち、 β -アミリンを合成する β -アミリン合成酵素(bAS)、および、ステロールの基質となるシクロアルテノールを合成するシクロアルテノール合成酵素(CAS)をコードする遺伝子は多数単離されていたが、ゲルマニコールおよび α -アミリンを高効率に生成する OSC をコードする遺伝子は単離されていなかった。

このような背景に基づき学位申請者は、ゲルマニコールおよび α -アミリンを生成する OSC をコードする遺伝子をマメ科植物の *Bauhinia forficata* から単離し、その機能解析を行うとともに、出芽酵母ならびにタバコ植物の一過的発現系を用いた物質生産系を構築し、ゲルマニコールの酸化物であるモロール酸、ならびに、 α -アミリンの酸化物であるウルソール酸の生産研究を行なっている。学位申請者は、マメ科植物におけるトリテルペノイドの多様性を検討している過程で、南米を原産地とする植物 *B. forficata* に α -アミリンおよびゲルマニコールが他のマメ科植物よりも多く蓄積していることを見出している。次に、*B. forficata* の葉から RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを構築し、次世代シーケンシングにより 4000 万リードを得て、45k のコンティグをアセンブリしている。そこから OSC の候補を 4 種類 (BfOSC1~4)マイニングしている。出芽酵母を用いた機能解析、GC-MS 分析により、まず、BfOSC1および、BfOSC4は、それぞれ bAS、ならびに CAS であることを見出している。続いて、同じく出芽酵母を用いた機能解析、GC-MS 分析により、BfOSC2 はゲルマニコール合成酵素(GS)であることを見出している。その変換率は 90%であり、これまで報告のあった GS で最も高いものとなっている。さらに、BfOSC3 では、出芽酵母を用いた機能解析、GC-MS 分析により α -アミリンと推定されるピークが得られているが、さらなる確証を得るために、タバコ植物ニコチアナ・ベンサミアナを用いた一過的遺伝子発現系を用いた実験により BfOSC3 は、 α -アミリン合成酵素(aAS)であることを見出している。その変換率は 95%であり、これまで報告のあった aAS で最も高いものとなっている。

学位申請者はまた、ゲルマニコールの酸化物であり、抗 HSV、抗 HIV、抗炎症などの機能を有するモロール酸を、出芽酵母発現系により生産させる研究を行なっている。その際、上流の代謝経路の活性化、副反応系の誘導剤による遮

断などの酵母発現ベクターの改良を行っている。この発現ベクターにて、GS である BfOSC2、ならびに、トリテルペノイド C-28 位酸化酵素であるビート由来 CYP716A49 の各遺伝子を過剰発現させた出芽酵母を 10 日間培養することにより、21mg/L のモロール酸を生産させている。

学位申請者はまた、 α -アミリンの酸化物であり、抗炎症、抗腫瘍、肝保護などの機能を有するウルソール酸を、ニコチアナ・ベンサミアナを用いた一過的遺伝子発現系により生産させる研究を行なっている。その際、上流の代謝経路における HMG-CoA レダクターゼのリン酸化部位のアミノ酸置換による活性化など発現ベクターの改良を行っている。この発現ベクターにて、aAS である BfOSC2、ならびに、トリテルペノイド C-28 位酸化酵素であるビート由来 CYP716A49 を過剰発現させることにより HMG-CoA レダクターゼ遺伝子がない場合よりも 12 倍高いタイターのウルソール酸を生産させている。

以上のように、本論文は、ゲルマニコールおよび α -アミリンを高効率に生成するゲルマニコール合成酵素遺伝子ならびに、 α -アミリン合成酵素遺伝子を *B. forficata* から単離し機能解析するとともに、出芽酵母ならびにタバコ植物の一過的発現系を用いた物質生産系により、ゲルマニコールの酸化物であるモロール酸、ならびに、 α -アミリンの酸化物であるウルソール酸を生産できることを示し、これらの酵素遺伝子を活用することによる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。