

Title	酵母とマメ科モデル植物ミヤコグサにおけるC28位酸化トリテルペノイドの生産性向上に資する酵素と転写制御因子の同定
Author(s)	鈴木, 隼人
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82195
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (鈴木 隼人)

論文題名

酵母とマメ科モデル植物ミヤコグサにおけるC28位酸化トリテルペノイドの生産性向上に資する酵素と転写制御因子の同定

論文内容の要旨

動植物や微生物に普遍的に存在し、生存に必須である糖、アミノ酸、脂肪酸などの代謝物は一次代謝産物と呼ばれる。一方で、微生物や植物の生産する生存に必須でない多種多様な化合物群は二次代謝産物、あるいは特化代謝産物と総称される。トリテルペノイドは植物特化代謝産物の大きな一群であり、多様な構造と生理活性を有する。炭素数30の直鎖状の基質2,3-オキシドスクアレンはオキシドスクアレン環化酵素 (OSC) により環化され、 β -アミリン、 α -アミリン、ルペオールといった代表的なトリテルペノイド骨格が生成される。シトクロムP450酸化酵素 (P450) はトリテルペノイド骨格の部位特異的酸化反応を触媒し多様な酸化トリテルペノイドを生成する。P450スーパーファミリー酵素のうちCYP716Aサブファミリー酵素は β -アミリン、 α -アミリン、ルペオールすべてを基質として受け入れ、C28位への三段階の酸化修飾を触媒することでオレアノール酸、ウルソール酸、ベツリン酸を生合成する。これらC28位酸化トリテルペノイドは三大機能性トリテルペノイドとも呼ばれ医薬品や食品機能性成分の原料として期待されている。特にベツリン酸は抗ガン剤の原料化合物として注目されている化合物である。C28位酸化トリテルペノイドは広範な植物種に存在するものの植物体での含量が低いため、代謝工学的な手法を用いて酵母や植物組織を用いて代替生産する研究が盛んに行われている。酵母を用いた生産にはより生産性の高いCYP716A酵素の探索が必要であるが、CYP716A酵素の結晶構造は解かれておらず、タンパク質工学的アプローチは難しい。また、植物はその培養条件や組織により大きくトリテルペノイドの蓄積量を変動させるため、植物を用いた生産の効率化にはその生合成制御機構の理解が必要である。近年、マメ科タルウマゴヤシとカンゾウ、ウコギ科サンシチニンジンなどからトリテルペノイド生合成を制御する転写制御因子が同定されており、過剰発現や発現抑制によりトリテルペノイドの生産量を操作することができると報告されている。本研究では、酵母と植物を用いたC28位酸化トリテルペノイド生産の効率化に有用な代謝工学ツールを獲得することを目的とした。

第1章ではトリテルペノイドの生合成と生合成制御に関するこれまでの知見をまとめ、本研究においてCYP716A酵素と転写制御因子に着目した経緯を述べた。

第2章ではC28位酸化トリテルペノイドの鍵酵素であるCYP716Aを系統的に離れた植物種から単離し、酵母での生産に適した遺伝子を探した。結果として世界で初めて機能同定されたCYP716A12と比べて2.5-5.8倍の最終産物収量を達成するCYP716A酵素を新たに同定した。また、酵母においてベツリン酸の生産量がオレアノール酸の20分の1であることを定量的に示した。

第3章と第4章では3種のC28位酸化トリテルペノイドのうち酵母での生産量が特に少なかったベツリン酸のマメ科植物での生産に注目した。第3章ではミヤコグサのトリテルペノイド組成とその生合成経路を明らかにした。加えて水耕栽培という特殊な栽培条件で栽培することで胚軸から根にかけて形成が誘導される二次通気組織に乾燥重量あたり12%のベツリン酸が蓄積することを発見した。組織ごとにベツリン酸生合成酵素遺伝子群の転写産物量を比較した結果、生合成遺伝子群の発現量とベツリン酸の蓄積量が正に相関することが確認された。

第4章では水耕栽培ミヤコグサのRNA-sequencing解析を実施し、ベツリン酸生合成を活性化できる可能性のある転写制御因子の候補を絞り込んだ。それらのうち、既知のトリテルペノイド生合成制御因子との系統関係から2つのbHLH型転写因子に着目し、それぞれ単独でミヤコグサの形質転換毛状根において過剰発現させることで機能解析を行った。いずれのbHLH型転写因子も毛状根におけるベツリン酸蓄積量を4倍以上に増高させたことからこれらが代謝工学ツールとして有効なことが示された。

以上、本著者は酵母と植物でのC28位酸化トリテルペノイド生産を効率化する代謝工学ツールとしてCYP716A酵素とbHLH型転写因子を単離・同定した。第5章では本研究を総括するとともに、本研究で同定された酵素と転写因子の活用とC28位酸化トリテルペノイドの更なる増産について今後の展望を記述した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (鈴木 隼人)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	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 内山 進
	副 査	教 授 紀ノ岡 正博
	副 査	教 授 大政 健史
	副 査	教 授 本田 孝祐
	副 査	教 授 栗栖 源嗣
副 査	教 授 永井 健治	
論文審査の結果の要旨		
<p>植物は、炭素数5の複数のイソプレヌユニットから構成される「テルペノイド」と総称される一群の化合物（特化代謝産物）を産生する。このうち6分子のイソプレヌユニットを基本骨格とする「トリテルペノイド」は、植物特化代謝産物の大きな一群であり、多様な構造と生理活性を有する。トリテルペノイドは、直鎖状の基質 2,3-オキシドスクアレンが、オキシドスクアレン環化酵素により環化され β-アミリン、α-アミリン、ルペオールなどの代表的なトリテルペノイド骨格（トリテルペノール）が生成される。トリテルペノールは、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450s または CYPs と略) により部位特異的な酸化修飾を受け、多様な酸化トリテルペノイドが生成される。P450 のうち、CYP716A サブファミリーは、主としてトリテルペノイドの 28 位の炭素を酸化する。β-アミリン、α-アミリン、ルペオールからは、それぞれ、オレアノール酸、ウルソール酸、ベツリン酸が生合成される。これら C28 位酸化トリテルペノイドは三大機能性トリテルペノイドとも呼ばれ、医薬品や食品機能性成分の原料として期待されている。特にベツリン酸は、抗ガン剤の原料化合物として注目されている。しかしながら、植物におけるトリテルペノイド含量は、植物体全体として、高いものとは言えず、新たな生産法に関する研究が求められていた。</p> <p>このような背景に基づき学位申請者は、まず、これまでに報告された CYP716A サブファミリー酵素を系統分類し、系統的に離れた複数の植物種から計 6 種類単離し、出芽酵母を用いた生産に適した遺伝子の探索を行っている。その結果、最初に単離されたマメ科モデル植物タルウマゴヤシ由来の CYP716A12 と比べて、2.5~5.8 倍の C28 位酸化トリテルペノイドを産生させるヒユ科ビート由来の CYP716A49 酵素を新たに同定している。また、CYP716A49 を用いた場合でも、出芽酵母においてベツリン酸の生産量はオレアノール酸の 20 分の 1 と低いことを確認している。</p> <p>学位申請者は、また、C28 位酸化トリテルペノイドのうち酵母での生産量が特に少なかったベツリン酸の植物での生産について検討している。マメ科モデル植物ミヤコグサの詳細なトリテルペノイド組成は不明であったものの、ゲノムにベツリン酸生合成酵素遺伝子群が見出され、またベツリン酸生合成の中間体であるルペオールが、根から、微量検出されることから、ミヤコグサ植物体においてルペオールの大半が、ベツリン酸に代謝され蓄積すると予想して研究を進めている。まず、ミヤコグサのトリテルペノイド組成とその生合成経路を、明らかにしている。ついで、学位申請者は、土を使わず栄養溶液のみで栽培する水耕栽培という方法でミヤコグサを栽培することで、胚軸から根にかけて形成が誘導される二次通気組織に乾燥重量あたり 12%のベツリン酸が蓄積することを見出している。さらに、栽培条件と組織ごとにベツリン酸生合成酵素遺伝子群の転写産物量の比較を行い、生合成遺伝子群の発現量とベツリン酸の蓄積量が正に相関することを確認している。</p>		

学位申請者、また、土壌栽培または水耕栽培したミヤコグサの RNA-シーケンス解析を行い、ベツリン酸合成の活性化に関わる転写制御因子の候補について検索し、2つの bHLH 型転写因子である bHLH32 と bHLH50 を絞り込んでいく。つづいて、ミヤコグサの形質転換毛状根において bHLH32 または bHLH50 を単独で過剰発現させることにより機能解析を行っている。その結果、いずれの bHLH 型転写因子も毛状根におけるベツリン酸蓄積量が 4 倍以上に増加されたことから、これらが代謝工学ツールとして有効なことであるとされている。

以上のように、本論文は、植物由来の新たな CYP716A 酵素と bHLH 型転写因子を単離・同定し、出芽酵母、ならびに、ミヤコグサ毛状根を用いた C28 位酸化トリテルペノイドの増産に利用可能なことを示している。また、本研究と、そのほかの代謝工学的研究を組み合わせることによる、酵母または植物を用いた C28 位酸化トリテルペノイドの高生産に関す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。