



Title	Functional analysis of glucuronosyltransferases involved in triterpenoid saponin biosynthesis
Author(s)	Chung, Soo Yeon
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82197
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、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

論文内容の要旨

氏 名 (Chung Soo Yeon)	
論文題名	Functional analysis of glucuronosyltransferases involved in triterpenoid saponin biosynthesis (トリテルペノイドサポニン生合成経路におけるグルクロン酸糖転移酵素の機能解析)
論文内容の要旨 Triterpenoid saponins are a group of specialized plant metabolites renowned for their immense structural diversity and bioactivities. Glycyrrhizin found in licorice (<i>Glycyrrhiza</i> spp.) is widely used as drugs, food additives and cosmetics for its various pharmacological activities and sweetness. The biosynthetic pathway of glycyrrhizin and other triterpenoid saponins has been studied extensively to establish a heterologous production system to overcome their insufficient supply. The biosynthetic pathway of triterpenoid saponins is divided into three major steps starting from the common precursor, 2,3-oxidosqualene: cyclization by oxidosqualene synthases (OSCs), site-specific oxidation by cytochrome P450 monooxygenases (P450s) and glycosylation by UDP-dependent glycosyltransferases (UGTs). UGTs, belonging to the family 1 of glycosyltransferase (GT) superfamily, are known to catalyze glycosylation of diverse plant specialized metabolites including triterpenoids. To date, almost all enzymes involved in biosynthesis of glycyrrhizin and soyasaponins have been identified except for the UGT that catalyzes the transfer of the conserved glucuronosyl moiety at the C-3 position of the aglycones (non-sugar component). Thus, this study aimed to produce glycyrrhizin <i>de novo</i> in yeast by identifying the last missing enzyme. Chapter 1 included general introduction on classification of plant specialized metabolites and triterpenoid saponins, and on characterized plant UGTs to date. Chapter 2, the main chapter, focused on the discovery and functional analysis of cellulose synthase-derived glycosyltransferases (CSyGTs). Gene co-expression analysis of three Fabaceae species (<i>Glycyrrhiza uralensis</i>, <i>Glycine max</i> and <i>Lotus japonicus</i>) revealed the involvement of CSyGTs in triterpenoid saponin biosynthesis. Although CSyGT belongs to family 2 GT, which is known to catalyze plant cell wall biosynthesis, subsequent characterization of the enzymes <i>in vivo</i> using <i>Saccharomyces cerevisiae</i> confirmed that CSyGTs catalyze the glucuronosylation of various oleanane-type triterpenoid aglycones at the C-3 position. Moreover, CSyGT mutants of <i>L. japonicus</i> did not accumulate soyasaponin, but the ectopic expression of ER-localized CSyGTs in a <i>L. japonicus</i> mutant background via agroinfiltration successfully complemented soyasaponin biosynthesis. Finally, glycyrrhizin was successfully produced <i>de novo</i> in yeast, accomplishing the long-cherished goal. Chapters 3 and 4 focused on further characterization of CSyGTs to gain insights into functional distinction between CSyGT and UGTs in triterpenoid saponin biosynthesis. Chapter 3 investigated whether glucuronosyltransferase activity against triterpenoids are unique among UGTs by characterizing 4 homologs of UGT73P12 from <i>G. max</i> and <i>Vigna angularis</i>. Chapter 4 explored on structural role of CSyGT since plant P450s and their redox partners, cytochrome P450 reductases, are reported to anchor to the ER membrane. However, protein-protein interaction assay performed using split-ubiquitin system exhibited that CSyGTs directly interact with β-amyrin synthase, an OSC, but not with any of P450s. The result implies that other factors may be required for binding of P450s to form a complete triterpenoid saponin metabolon. The discovery of CSyGT has completed the elucidation of biosynthetic pathway of glycyrrhizin and soyasaponins. CSyGTs serve as a direct evidence that biosynthetic enzymes of specialized metabolites are recruited from the central metabolism, and investigation on metabolon formation not only provides insights into regulatory mechanism of the pathway but also aids in designing a tailored yeast strain for an improved yield.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Chung Soo Yeon)			
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	福崎 英一郎
	副 査	教 授	渡邊 肇
	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 トリテルペノイドサポニンとは、多様な構造と生理活性で知られる植物特化代謝産物である。マメ科カンゾウ (<i>Glycyrrhiza</i> spp.) に含まれるグリチルリチンは、抗炎症作用、抗潰瘍作用、肝保護作用などのさまざまな薬理作用や、甘味を持つことから、医薬品、食品添加物、化粧品などとして広く利用されている。しかしながら、グリチルリチンをはじめとする多くのトリテルペノイドサポニンでは、その構造が複雑であるため、化学合成ではコストがかかり、その生産量は限られていることが多い。そこで、トリテルペノイドサポニンの生合成酵素遺伝子を利用した酵母などを利用した生産系の確立が望まれている。トリテルペノイドサポニンの生合成経路は、共通の前駆体である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 (OSCsと略) による環化、シトクロームP450モノオキシゲナーゼ (P450sあるいはCYPsと略) による部位特異的酸化、UDP依存性糖転移酵素 (UGTと略) による配糖化の3つの主要なプロセスから成る。UGTは、糖転移酵素 (GTと略) スーパーファミリーのファミリー1に属し、多様な植物特化代謝物の配糖化を触媒している。これまでに、トリテルペノイドサポニン生合成に関与するUGTは数多く報告されているが、植物ゲノムあたりのUGTの数が膨大であること、また、基質選択性とUGTの一次配列の相関性が低いことから、標的UGTの同定は困難であった。さらに、これまでに、グリチルリチンの生合成に関わるP450およびUGTのほぼ全てがすでに明らかにされたのににもかかわらず、配糖化反応の第一段階である3位水酸基へのグルクロン酸転移反応を触媒する酵素は未解明のままとなっていた。 このような背景のもと、学位申請者は、まず、いずれもマメ科植物である、ウラルカンゾウ、ダイズ、タルウマゴヤシの遺伝子共発現解析により、トリテルペノイドサポニン生合成にCSyGTsが関与していることを見出している。CSyGTは、これまでの研究では、植物の細胞壁生合成を触媒するセルロース合成酵素に類似した酵素とされてきており、その機能は不明であった。学位申請者は、酵母を用いた特性評価により、CSyGTがUDP-グルクロン酸を、各種オレナン型トリテルペノイドアグリコンのC-3位に転移する酵素であることを見出している。さらに、ソヤサポニンを蓄積しないタルウマゴヤシのCSyGT変異体に、CSyGTを導入することにより、ソヤサポニンの蓄積が起こることを見出している。学位申請者は、さらに、CSyGTを含め、合計7種の植物由来酵素遺伝子を酵母に導入することにより、出芽酵母でグリチルリチンが生産されることを見出している。 学位申請者は、さらに、これまでに、単離されたグリチルレチンモノグルクロニドにUDP-グルクロン酸を転移する酵素であるカンゾウ由来UGT73P12と、ダイズ、アズキ由来の4種の類似UGT酵素について、UDP-グルクロン酸転移活性の有無について酵母発現系を用いて調べている。その結果、UGTのグルクロン酸転移酵素活性が、収束進化を経て互いに独立して出現したことを見出している。 学位申請者は、また、酵母を用いたタンパク質相互作用分析系を用いることにより、CSyGTがトリテルペノイドサポニンの細胞内メタボロン形成の中核となるかどうかを検討するため、グリチルリチン生合成に関わる他の生合			

成酵素とCSyGTの細胞内における相互作用を解析した。それにより、CSyGTはOSCである β -アミリン合成酵素と直接相互作用するが、P450sとは相互作用しないことを見出している。

以上のように、本論文は、各種オレナン型トリテルペノイドアグリコンのC-3位へのグルクロン酸の転移を触媒する酵素が、これまでに知られていたUGTとは全く異なる酵素群の一つであるCSyGTであるという、大きな発見によりグリチルリチンならびにダイズソヤサポニンの生合成経路の解明を完了している。また、特化代謝産物の生合成酵素であるCSyGTが、セルロース合成に関わる中央代謝からリクルートされていることを示し、また、メタボロン形成に関する研究は、オレナン型トリテルペノイドの生合成経路の制御機構を解明するだけでなく、収量向上のためにより複雑な酵母株の設計にも役立つことを示しており、これ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。