OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular basis of product specificity of legume cytochrome P450 involved in high-value triterpenoid biosynthesis
Author(s)	Zaenal Fanani, Much
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82259
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

Form 3

Abstract of Thesis

Name（MUCHAMMAD ZAENAL FANANI）	
Title	Molecular basis of product specificity of legume cytochrome P450 involved in high-value triterpenoid biosynthesis (高価値トリテルペノイド生合成に関与するマメ科植物シトクロムP450の生成物特異性の分子基盤)

Abstract of Thesis

The genus *Glycyrrhiza* produces a high-value triterpenoid saponin called as glycyrrhizin with characteristic a ketone group at C-11 and a carboxyl group at C-30. Of 22 accepted species in the genus *Glycyrrhiza*, only three species, *G. uralensis*, *G. glabra*, and *G. inflata*, known as glycyrrhizin-producing species, in contrast, other species produce triterpenoid saponins that have diene structure in place of a ketone group at C-11 and a carboxyl group at C-29. Two CYPs enzymes, CYP88D6 and CYP72A154, are key player in glycyrrhizin biosynthesis, catalyzing the oxidation at position C-11 and C-30, respectively. Thus, why glycyrrhizin produced in particular *Glycyrrhiza* species is poorly understood. The objective of this study was to elucidate the molecular basis of product specificity of CYPs involved in high-value triterpenoid biosynthesis by characterizing the oxidation activities of CYPs homolog and identifying essential residues involved in product specificity.

In Chapter 2, the molecular basis for product specificity of C-11 oxidases was characterized. *In vivo* enzyme assay of CYP88D6 homologs from glycyrrhizin-producing and non-glycyrrhizin-producing *Glycyrrhiza* plants showed that the oxidation function of CYP88D6 homologs especially ability to catalyze the second oxidation step at the C-11 influences glycyrrhizin productivity of *Glycyrrhiza* species, thus clarifying the differences between glycyrrhizin-producing and non-glycyrrhizin-producing species. Moreover, mutation analyses of the CYP88D6 homolog indicate that M221 and F300 residues are essential for 11-oxo-β-amyrin biosynthesis. Moreover, protein modeling analysis suggested that these hydrophobic bulky amino acid residues may involve in hydrophobic interaction with 11α-hydroxy-β-amyrin as substrate for second oxidation step.

In Chapter 3, the molecular basis for product regioselectivity of C-30 oxidases was characterized. *In vivo* enzyme assay of CYP72A154 homologs from non-glycyrrhizin-producing *M. truncatula* showing that CYP72A63 is an enzyme with high C-30 product regioselectivity, while other homologs have completely different product regioselectivity. By performing sequence comparison and homology modeling of the three-dimensional structure in combination with segment swapping, Leu149 and Leu398 were identified as essential residues for C-30 product regioselectivity. Moreover, functional characterization of CYP72A154 variants from both glycyrrhizin-producing and non-glycyrrhizin-producing *Glycyrrhiza* species indicates that residue #398 differentiated the product regioselectivity of CYP72A154 variants between glycyrrhizin-producing and non-glycyrrhizin-producing species. Protein modeling analysis suggested that Leu149 and Leu398 may be involved for positioning of the substrate in the most favorable orientation for enzyme catalysis at C-30 position through hydrophobic interaction.

This study provides direct evidence that the oxidation activities of CYPs homolog influence glycyrrhizin production ability in non-glycyrrhizin-producing, revealing the key molecular basis of glycyrrhizin production in particular *Glycyrrhiza* species. The results presented in this study could be used in several ways. One possibility is a synthetic biological approach to engineer CYP88D15 could enable the production of pharmacologically active saponins with diene structures, such as saikosaponins, whose biosynthetic pathways have yet to be fully characterized. Another possible application is the synthethic biology combining with protein engineering to direct the product specificity of CYPs toward desired target product more efficiently.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　MUCHAMMAD ZAENAL FANANI　）		
	(職)		氏　名
論文審査担当者	主 査	教 授	村中 俊哉
	副 査	教 授	本田 孝祐
	副 査	教 授	栗栖 源嗣
	副 査	教 授	福﨑 英一郎
	副 査	教 授	渡邉 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	藤山 和仁
	副 査	教 授	永井 健治

論文審査の結果の要旨

マメ科カンゾウ属植物のカンゾウはその地下部にショ糖の数百倍の天然甘味成分グリチルリチンを蓄積することが知られている。グリチルリチンには、甘味以外に、抗炎症作用などの薬理活性を有することから、それを蓄積するカンゾウの地下部を乾燥したものは生薬「甘草」として漢方など洋の東西を問わず古くから薬として用いられている。カンゾウ属の中で、G. uralensis（ウラルカンゾウ）、G. glabra（スペインカンゾウ）、G. inflata（新疆カンゾウ）の 3 種はグリチルリチンを比較的多く蓄積している一方、カンゾウ属植物には G. pallidiflora（イヌカンゾウ）をはじめグリチルリチンを蓄積しない種が多数存在する。グリチルリチンは、トリテルペノイドサポニンに分類される植物特化代謝産物の一つである。トリテルペノイドサポニンは、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（CYPs と略)による部位特異的酸化により、サポニンの前駆体であるアグリコンが生成される。グリチルリチンの生合成においては、OSC としてβ-アミリン合成酵素が、CYP としてトリテルペノイド骨格の C-11 位酸化酵素である CYP88D6、ならびに、C-30 位酸化酵素である CYP72A154 により、グリチルリチンの前駆体アグリコンである、グリチルレチン酸が生合成されることがわかっている。しかしながら、これら CYP の生成物位置特異性の分子機構については知られていなかった。

このような背景のもと、学位申請者はまず、C-11 位酸化酵素の生成物特異性の分子基盤について解析している。グリチルリチンを産生する G. uralensis 由来の CYP88D6 は、C-11 位を、アルコール、ケトンの 2 段階酸化により、11α-ヒドロキシ-β-アミリンを介して 11-オキソ-β-アミリンを生成することが知られている。学位申請者は、C-11 位酸化酵素の生成物特異性の分子基盤を明らかにするために、酵母発現系を用いて、グリチルリチン産生種および非グリチルリチン産生種の CYP88D6 ホモログの酸化機能を解析している。その結果、非グリチルリチン産生種由来の CYP88D6 ホモログでは、β-アミリンのアリル化水酸化を触媒して 11α-ヒドロキシ-β-アミリンを産生し、非酵素的または酵母内因性酵素による脱水反応により、ジエン化合物を産生することを明らかにし、グリチルリチン産生／非産生が、C-11 位酸化酵素による酸化段階の違いにあると考察している。学位申請者さらに、11-オキソ-β-アミリン生成物特異性に関与するアミノ酸残基を同定するために、グリチルリチン産生種と非グリチルリチン産生種の CYP88D6 ホモログのアミノ酸配列比較を行ってる。、酵母発現系で、CYP88D6 ホモログの変異解析の結果、11-オキソ-β-アミリンを生成するための C-11 位での第二階目の酸化には CYP88D6 の Met221 残基と Phe300 残基が必要であることを明らかにし、その分子機構について考察している。

次に申請者は、C-30 位酸化酵素の生成物特異性の分子基盤について解析している。グリチルリチンを産生する G.

uralensis 由来の CYP72A154 は、C-30 位での酸化を触媒する多機能酸化酵素であり、副産物として C-30 位以外の立体異性体を産生する。一方、グリチルリチンを生成しないマメ科モデル植物の Medicago truncatula（タルウマゴヤシ）は複数の CYP72A154 ホモログを有しており、そのうち、CYP72A63 は C-30 位でのみ優れた位置選択的酸化反応を示すことが知られている。そこで、学位申請者は、C-30 酸化酵素の位置選択性の分子基盤を明らかにするために、M. truncatula 由来の CYP72A154 ホモログの位置選択的酸化活性を評価している。酵母発現系での解析の結果、CYP72A63 は高い C-30 生成物位置選択性を有する酵素であるのに対し、CYP72A62v2 など他のホモログでは全く異なる生成物位置選択性を示すことを明らかにしている。学位申請者はまた、基質認識部位と推定されるアミノ酸配列を比較し、タンパク質のモデル化を行った結果、CYP72A63 の Leu149 と Leu398 が、C-30 位の位置選択性の鍵となるアミノ酸残基であることを明らかにし、その分子機構について考察している。

以上のように本論文は、高付加価値のトリテルペノイドであるグリチルリチンの生合成に関わるマメ科 CYP の C -11 位酸化酵素、および、C-30 位酸化酵素の生成物特異性の分子基盤について、酵母発現型を用いた比較機能解析を行い、それぞれの CYP における生成物特異性に必要とされるアミノ酸残基を同定している。このような生成物特異性に関わるアミノ酸置換を利用した、酵母における高付加価値トリテルペノイドの生産性向上に資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。