OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Comparative analysis of legume NADPH-cytochrome P450 reductase classes towards improving heterologous production of triterpenoids in transgenic yeast
Author(s)	Istiandari, Pramest
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/89592
rights	
Note	

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 （ISTIANDARI PRAMESTI）	
Title	Comparative analysis of legume NADPH-cytochrome P450 reductase classes towards improving heterologous production of triterpenoids in transgenic yeast （マメ科植物のNADPHシトクロムP450還元酵素に関する研究）

Abstract of Thesis

Triterpenoids are highly diverse plant specialized metabolites with various pharmacological activities. However, because the accumulation of triterpenoids in plants is very low, there is a need for a new strategy to improve productivity. Yeast provides an ideal alternative host for heterologous triterpenoids production. Legumes produce diverse triterpenoids saponins and provide a good source for triterpenoids biosynthetic genes. Cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) are the most responsible enzymes for the structural diversification of triterpenoids. CYP requires electrons from its redox partner, NADPH-cytochrome P450 reductases (CPRs), to perform catalyzation. Plants have two CPR classes, class I and II, which are reported to be involved in basal/constitutive and inducible metabolic pathway, respectively. By homology modelling, a significant difference of conserved motifs between legume CPR class I and II was observed, which is located near CYP:CPR binding sites. This information suggested that each CPR class might exhibit specific binding conformation with different CYP families. Moreover, gene co-expression analysis of *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, and *Glycyrrhiza uralensis* showed that different CPR classes have different correlation strengths with CYP families. This study revealed the different roles of plant CPR class I and II in triterpenoids biosynthesis. Gene expression and metabolite analysis of *L. japonicus* hairy roots treated with methyl jasmonate (MeJA) showed that *LjCPR1* strongly correlates with *CYP716A51* and *LUS*, while *LjCPR2* showed a strong correlation with *bAS*, *CYP93E1*, and *CYP72A61,* which are involved in soyasaponin biosynthesis. Metabolite analysis of *LORE1* insertion *Ljcpr* mutant plants and *Ljcpr1* knockout hairy root mutants confirmed that *LjCPR2* is crucial for almost all triterpenes biosynthesis, while *LjCPR1* is only necessary specifically for betulinic and ursolic acid production. *LjCPR1* also showed possible physiological role in seed development, while *LjCPR2* might involve in jasmonate-mediated defense response. In addition, co-expressing different legume CPR and CYP in transgenic yeast showed that CYP716A has a better conversion ratio when paired with CPR class I from the same species, while CYP72A has a better conversion ratio when co-expressed with any of the CPR class II. The N-terminal membrane domain might play an essential role in CYP:CPR protein interaction since swapping this domain in MtCPR1 and MtCPR2 significantly compromised CYP716A catalytic activity, but not CYP72A. By screening different CPR classes in engineered yeast, the conversion ratio of CYP88D6 was highest when paired with GuCPR2 to produce 11-oxo β-amyrin as the precursor of glycyrrhizin, a high-value compound. Therefore, screening at least the genes of each CPR class from the same species with the CYP of interest is essential to improve the heterologous triterpenoid production.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ ISTIANDARI PRAMESTI ）	
	（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　本田 孝祐	

論文審査の結果の要旨

植物は医薬品原料、機能性食品等に応用可能な、多種多様なトリテルペノイドを産生する。しかしながら、植物に含有されるトリテルペノイドの量が少ないため、生物工学的手法により生産を向上させるための新たな戦略が必要である。マメ科植物は、多様なトリテルペノイドを含有するため、トリテルペノイド生合成遺伝子源として優れたものである。トリテルペノイドは、酸化修飾酵素であるシトクロームP450モノオキシゲナーゼ（以下CYPと略）により多様性が増す。一方、出芽酵母は、トリテルペノイドの異種生産のための優れた微生物宿主である。そのため、出芽酵母でのトリテルペノイド産生に向け、CYPの分子遺伝学的研究が盛んになされてきた。CYP の触媒活性に不可欠なレドックパートナーとして、NDPH-シトクロームP450レダクターゼ（以下CPRと略）が必要である。植物のCPRは、大きくクラスIとクラスIIに分類される。CPR クラスの違いによりトリテルペノイドを含む植物特化代謝産物の生合成に影響を及ぼす可能性が示唆されつつも、CPRについては、代謝工学の観点からこれまで十分な研究がなされてきなかった。

このような背景のもと、学位申請者は、遺伝子組換え酵母を用いたトリテルペノイドの代謝工学の効率化に向けたマメ科植物のCPRに関する研究を行なっている。まず、植物ゲノムデータベースから、異なる科に属するCPRを抽出し、系統樹と多重配列アライメント解析を行っている。ホモロジーモデリングにより、マメ科CPRクラスIとIIタンパク質構造を解析し、保存されたモチーフの違いを検討している。その結果、CYPと相互作用する部位に近接したマメ科CPRクラスIとIIのタンパク質構造に、有意な違いが観察されていることを見出している。このことから、各 CPR クラスは異なる CYP ファミリーと特異的な結合様式を示す可能性を示唆している。さらに、マメ科植物であるタルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*)、ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)、ならびにウラルカンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis*) の遺伝子共発現解析から、CPR クラスが CYP ファミリーの違いによって異なる相関強度を持つことを明らかにしている。これにより、植物体内における各 CPR クラスの実際の役割を解明することは、トリテルペノイド生合成における CPRとCYP の相互作用を理解する上で重要であることを示唆している。

学位申請者はまた、ミヤコグサ毛状根を材料として、ミヤコグサのCPR(LiCPR) が複数のトリテルペノイド生合成に関わる生合成遺伝子とどのように関わっているかを調べるために、植物ホルモンエリシターとしてジャスモン酸メチル(MeJA)を処理後の毛状根の遺伝子発現および代謝物分析を行なっている。その結果、LjCPR クラス I または II と相関するトリテルペノイド生合成遺伝子群を明らかにしている。LjCPR1、CYP716A51、およびLUS遺伝子は、MeJA処理によって同様に発現が低下し、強い相関があることを認めている。一方、LjCPR2s、CYP93E2、CYP72A61はMeJA処理により発現が上昇し、これらの遺伝子には強い相関があることを推察している。さらに、LjCPR1 と LjCPR2 のトリテルペノイド生合成への関与の違いを確認するために、トラン

スポゾンであるLORE1を 挿入した LjCPRの 変異体および LjCPRの ノックアウト毛状根変異体の代謝物分析を行っている。その結果、LjCPR1 と LjCPR2 はともにベツリン酸とルペオールの生成に重要であり、どちらか一方の CPR クラスを失えば、これらのトリテルペンレベルを回復できないことを明らかにしている。一方，LjCPR2 はトリテルペノイドのうち、β-アミリン，24-OH β-アミリン，ソフォラジオール生産に重要な役割を果たし，その機能は LjCPR1 で相補することができないことを示している。

学位申請者はさらに、これらの情報を利用して、異なるマメ科CPRクラスを異なるCYPと対で共発現させることにより、組換え酵母での異種発現を行っている。その結果、CYP716A は同種の植物のCPR クラスI と組み合わせた場合に、より優れた変換率を示し、CYP72A は CPR クラスII と組み合わせた場合に、より優れた変換率を示すことを見出している。MtCPR1 と MtCPR2 において、 N 末端膜ドメインを交換すると CYP716A 触媒活性は著しく低下するが CYP72A では低下しないことから、この領域がCYPとCPR タンパク質相互作用において重要な役割を果たす可能性を示唆している。組換え酵母で異なるCPRクラスをスクリーニングした結果、ウラルカンゾウのCYP88D6が、同種であるウラルカンゾウCPR２(GuCPR2)をレドックスパートナーとして用いた時に、最も変換率が高く、高付加価値を有するグリチルリチンの前駆体である11-オキソ β-アミリンを生産することを見出している。このことは、異種トリテルペノイド生産を向上させるための CYP 変換率向上には、少なくとも同一種由来の各 CPR クラスの遺伝子と目的とする CYP をスクリーニングすることが不可欠であることを見出している。

以上のように、本論文で、植物 CPR クラス I と II のトリテルペノイド生合成における役割の違いについて、マメ科植物を材料として、植物組織におけるCPRクラスとトリテルペノイド生合成遺伝子の共発現解析、CPRの変異体あるいは遺伝子破壊株による解析などにより重要な生理学的知見を見出している。さらに、組変え酵母におけるトリテルペノイド生産性向上に向け、生物学的応用に重要な代謝工学的知見を見出している。よって本論文は、博士論文として価値あるものと認める。