



Title	High-yield production of bioactive triterpenoids in heterologous hosts through protein engineering of plant-derived cytochrome P450 monooxygenase CYP716A subfamily enzyme
Author(s)	Romsuk, Jutapat
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/91798">https://doi.org/10.18910/91798</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## Abstract of Thesis

Name ( ROMSUK JUTAPAT )	
Title	High-yield production of bioactive triterpenoids in heterologous hosts through protein engineering of plant-derived cytochrome P450 monooxygenase CYP716A subfamily enzyme (異種生産ホストにおける生理活性トリテルペノイド高生産に向けたCYP716Aサブファミリー酵素のタンパク質工学)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Triterpenoids constitute a group of specialized plant metabolites with wide structural diversity and high therapeutic value for human health. Cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) are a family of enzymes important for generating the structural diversity of triterpenoids by catalyzing the site-specific oxidization of the triterpene backbone. The CYP716 enzyme family has been isolated from various plant families as triterpenoid oxidases. However, their experimental crystal structures are unavailable, and the detailed catalytic mechanism remains elusive. Therefore, this research aims to improve bioactive triterpenoid production in the heterologous host through protein engineering of CYP716A subfamily enzyme.</p> <p>To achieve this purpose, firstly, I selected CYP716A12, isolated from a model legume plant <i>M. truncatula</i> with a plenty of genomic data available, as the first of CYP716A subfamily enzymes that have been functionally characterized. I performed homology modeling, structural alignment, <i>in silico</i> site-directed mutagenesis, and molecular docking analysis to search and screen key amino acid residues relevant to the catalytic activity and substrate specificity of the CYP716A subfamily enzyme in triterpenoid biosynthesis. An <i>in vivo</i> functional analysis using engineered yeast that endogenously produced plant-derived triterpenes was performed to elucidate the results. The product profile of CYP716A12 got modified when the amino acids in the signature region and the substrate recognition sites (SRSs) were substituted. In the results, I identified amino acid residues that controlled the substrate contraction of the enzyme (D292) and engineered the enzyme to improve its catalytic activity and substrate specificity (D122, I212, and Q358) for triterpenoid biosynthesis. In addition, I generated the mutants of <i>Arabidopsis thaliana</i> CYP716A1 (S356) and CYP716A2 (M206, F210) by changing the properties of key residues in substrate recognition sites (SRSs) to improve the catalytic activity at C-28 on the different triterpene backbones. Finally, I used the benefits of identified mutant CYP716A12 combined with the Tsukuba system, one of the most efficient agroinfiltration-based transient protein expression systems, to evaluate the applicability of the Tsukuba system for triterpenoid production in <i>N. benthamiana</i> through pathway reconstruction.</p> <p>This research has the potential to help in the production of the desired triterpenoids in engineered yeast by increasing the catalytic activity and substrate specificity of plant CYP716A subfamily enzymes. In addition, this research provides an alternative transient expression platform for high titer of valuable triterpenoid productions through heterologous expression in <i>N. benthamiana</i> contributed to synthesizing and accessing previously inaccessible triterpenoid or the other natural products and its analogs, as well as the possibility of revitalizing drug discovery pipelines.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( ROMSUK JUTAPAT )			
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	栗栖 源嗣	

## 論文審査の結果の要旨

植物特化代謝物の化合物群の一つであるトリテルペノイドは、構造の多様性に富み、医薬品原料、機能性食品などに利用されてものがある。しかしながら、一般に、トリテルペノイドの植物体内での生産量は少なく、化学合成が困難である。そのため、酵母や栽培しやすい植物などの異種宿主を用いた合成生物学的手法により、トリテルペノイドの生合成経路を再構築することが検討されている。シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (CYP) は、トリテルペン骨格の部位特異的酸化反応を触媒することにより、トリテルペノイドの構造多様性を生み出すのに重要な酵素ファミリーである。このうち、CYP716A サブファミリー酵素は、さまざまな植物種からトリテルペノイド酸化酵素として同定されているが、それらの結晶構造は得られておらず、詳細な触媒機構は不明なままであった。

このような背景のもと、学位申請者は、CYP716A サブファミリー酵素のタンパク質工学的的手法により、異種宿主における生理活性トリテルペノイドの生産性を向上させることを目的として研究をおこなっている。まず、CYP716A サブファミリーの酵素として初めて機能解析されたタルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*) の CYP716A12 を選定して、バイオインフォマティクスと *in vivo* 機能解析の結果を統合した酵素工学的的手法をおこなっている。すなわち、CYP716A サブファミリーのトリテルペノイドの部位特異的酸化反応における触媒効率と基質特異性を決定する鍵となるアミノ酸残基を明らかにするため、*M. truncatula* CYP716A12 について、バイオインフォマティクスと酵母を用いた *in vivo* 機能解析を行うことにより、シグネチャー領域と基質認識部位 (SRS) のアミノ酸残基を置換することにより、トリテルペノイド生成物の相対的な量が変化することを明らかにしている。

次に、学位申請者は、*A. thaliana* から単離された CYP716A1 と CYP716A2 が、異なるトリテルペン骨格に対して C-28 での触媒活性に違いがあることに着目し、トリテルペン骨格に対する C-28 の触媒活性を向上させた CYP716A2 の変異体を設計することを目的として研究を行っている。すなわち、CYP716A2 の触媒活性と基質特異性に必要なリガンド結合部位の主要アミノ酸残基をバイオインフォマティクスアプローチにより検討している。続いて、酵母を用いた変異体候補タンパク質の *in vivo* 機能解析を行った結果、リガンド結合部位の主要アミノ酸残基を置換した場合に、異なる生成物プロファイルを見出している。さらに、CYP716A12 変異体の解析結果をもとに、異なるトリテルペン骨格に対する C-28 の触媒活性を向上させた CYP716A2 の変異体を作成している。

学位申請者はまた、ベンサミアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*) を用いた一過的遺伝子発現法において、異種トリテルペノイド生産への本システムの適用性を評価している。*N. benthamiana* の葉を用いて、触媒活性を向上させた変異型 CYP716A12 (D122Q) を他のトリテルペノイド生合成酵素と共発現させている。ジェミ

ニウイルスの複製装置とダブルターミネーターを持つベクターpBYR2HSを使用した「つくばシステム」を用いることにより、オレオノール酸収量が、従来のバイナリーベクターを用いた場合に比べて 13.1 倍に増加することを示している。さらに、変異型シロイヌナズナ HMGR1 触媒ドメインの共発現、異種 CYP に電子を伝達する NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (CPR) の追加、アグロフィルトレーション後の葉の壊死を防ぐためのアスコルビン酸の適用などにより、 $\beta$ -アミリンに加え、オレオノール酸、マスリン酸などの酸化型トリテルペノイドのいずれもにおいて、これまでに報告されている *N. benthamiana* 葉での異種トリテルペノイド生産における収量と比較して、大幅に向上させることに成功している。

以上のように、本論文では、植物 CYP716A サブファミリー酵素の触媒活性と基質特異性について、バイオインフォマティクスと、酵母ならびに植物の一過的遺伝子発現系を用いて検証することにより、目的とするトリテルペノイドの生産量を向上させる手法を示している。本論文での成果を活用した生物工学的手法により、これまでに天然物からの単離が困難であったトリテルペノイドやその類縁体を生産することの可能となることが示された。よって本論文は、博士論文として価値あるものと認める。