



Title	薬用植物カンゾウにおける UDP-グルコースデヒドロゲナーゼアイソフォームの特性評価
Author(s)	松田, 愛結美
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96028
rights	
Note	

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 （ 松田 愛結美 ）

論文題名

薬用植物カンゾウにおける UDP-グルコースデヒドロゲナーゼアイソフォームの特性評価

論文内容の要旨

カンゾウ（甘草）は古くから漢方薬として用いられてきた薬用植物で、薬理成分としてカンゾウ属で特異的に蓄積される植物特化代謝物のグリチルリチンが知られている。カンゾウの輸入単価は 1996 年から 2022 年の間で約 10 倍に上昇しており、カンゾウおよびグリチルリチンは安定供給が望まれている。カンゾウの品種改良や異種宿主におけるグリチルリチン生合成経路の再構築を行うためには、グリチルリチンの生合成を触媒する酵素をコードしている遺伝子を同定する必要がある。グリチルリチンの生合成酵素遺伝子の多くがすでに同定されているが、グリチルリチンの特徴的な構造であるグルクロン酸部分の糖転移反応において糖供与体となる UDP-グルクロン酸の生合成を触媒する酵素（UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ；UGD）をコードする遺伝子は同定されていなかった。UGD は UDP-グルコースから UDP-グルクロン酸への反応を触媒し、細胞壁の合成においても重要な酵素であることが報告されている。植物では複数分子種の UGD が機能していると推定されているが、組換え UGD のアイソフォームを解析した研究は、細胞壁合成における機能分化に着目したシロイヌナズナの研究のみであった。そこで本研究では、ウラルカンゾウ（*Glycyrrhiza uralensis*）において UGD をコードする遺伝子を同定し、アイソフォームの特性を解析することで、ウラルカンゾウの品種改良やグリチルリチン生合成経路の再構築に資する基礎的な知見の獲得を目的とし、さらなる応用に向けて、UGD アイソフォームの分子進化と特性について考察した。

第 1 章では緒論として、これまでに明らかにされたグリチルリチンの生合成酵素について記載し、UGD の重要性和これまで解析された UGD について述べた。

第 2 章では、ウラルカンゾウの UGD 遺伝子の同定とアイソフォームの機能解析を行った。5 つの推定 UGD 遺伝子（*GuUGD1-5*）のうち 4 つの遺伝子（*GuUGD1-4*）にコードされるタンパク質について酵素活性を有することを示した。また、触媒定数が最も大きく、遺伝子の発現レベルも最も高い *GuUGD2* が、ウラルカンゾウの UGD 機能において特に大きな貢献をしているアイソフォームであると示唆された。

第 3 章では、グリチルリチンやソヤサポニン生合成における *GuUGD* の生理学的な特性の違いを検出できないか試みた。グリチルリチンやソヤサポニン生合成を活性化すると報告されているジャスモン酸メチルと、UGD の転写を活性化すると報告されているアブシジン酸に対する *GuUGD1-4* の転写応答を解析し、グリチルリチンやソヤサポニン生合成酵素遺伝子の転写応答と比較した。その結果、ジャスモン酸メチル処理に応答して UGD の転写が活性化することが初めて確認され、UDP-グルクロン酸の供給量が増加することが示唆された。一方で、グリチルリチンやソヤサポニン生合成酵素遺伝子と類似する転写パターンを示す UGD は確認されなかったことから、グリチルリチンやソヤサポニンの生合成に特化した *GuUGD* アイソフォームは存在せず、*GuUGD* の転写はサポニン生合成酵素遺伝子とは独立した制御機構で調整されており、サポニン生合成においても第 2 章においてウラルカンゾウの UGD 機能において特に大きな貢献をしていると推定された *GuUGD2* が大きく貢献していることが示唆された。

第 4 章では、*GuUGD5* が進化的に活性をもたないアイソフォームであるかを調べるために、植物 UGD の系統樹解析と活性に影響を与えるアミノ酸残基の特定を行った。推定 UGD の系統樹解析の結果から、UGD はマメ科共通祖先において 5 つの分子種に分岐していたことが示唆された。*GuUGD1-5* と同じクレードに属するマメ科植物の推定 UGD が酵素活性を有するかを調べた結果、タルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）の 3 つの UGD も酵素活性を有することが明らかになった。また、系統樹においてクレード V に分類される UGD 分子種は他のアイソフォームより UGD 活性が弱い可能性が示された。アミノ酸配列の比較を通して、UGD 活性に影響を与える可能性のあるアミノ酸残基を推定し、アミノ酸に変異を加えた *GuUGD2* の酵素活性試験を通して、*GuUGD2* の 252 番目のグリシン残基と 254 番目のアスパラギン酸残基が UGD 活性に重要であること、253 番目のトレオニン残基をリシン残基に置換することで酵素活性が高くなることが示された。

第 5 章では、触媒効率がほぼ同じで触媒定数の大きい *GuUGD2* と基質親和性の高い *GuUGD4*、および、さらに触媒効率の高いシロイヌナズナの *AtUGD2* を用いて、遺伝子組み換え出芽酵母において、UGD の生化学的な特性がグリチルリチンの生産量に与える影響を解析した。その結果、触媒定数と基質親和性はどちらも出芽酵母におけるグリチルリチン生産量に影響を与えることが示された。さらに、触媒効率の高い UGD 分子種を用いることで、グリチルリチンのみならず、その前駆体であるグリチルレチン酸の生産も促進されることが示唆された。

以上、本研究によってウラルカンゾウの UGD をコードする遺伝子が 4 分子種同定され、*GuUGD2* が UGD 機能の中心を担っていることが示唆された。また、酵素活性に影響を与えるアミノ酸残基が特定され、触媒効率の高い UGD の利用は酵母発現系を用いたグリチルリチン生産において有利であることが示された。さらに、UGD アイソフォームの生化学的特性と転写パターンはマメ科において保存されている可能性があると示唆された。第 6 章では結論として第 2-5 章で得られた結果について総括するとともに、展望として、塩基編集を用いたウラルカンゾウの品種改良におけるターゲット遺伝子と塩基の決定や、より触媒効率の高い UGD のデザインと酵母発現系における効率的なグリチルリチン生産について記述した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松 田 愛 結 美)			
		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授	村 中 俊 哉
	副 査	教 授	渡 邊 肇
	副 査	教 授	本 田 孝 祐

論文審査の結果の要旨

トリテルペノイドサポニンは、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 (*Glycyrrhiza* 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。グリチルリチンは、もっぱら野生のカンゾウ植物からの抽出に依存してきたが、需給バランスが崩れ、安定供給のための新たな持続的な生産法が求められている。カンゾウの品種改良や異種宿主を用いたグリチルリチンの生合成を行うためには、グリチルリチンの生合成を触媒する酵素をコードしている遺伝子を同定する必要がある。グリチルリチンの生合成を触媒する酵素遺伝子の多くがすでに同定されているが、グリチルリチンの特徴的な構造であるグルクロン酸部分の糖転移反応における糖供与体UDP-グルクロン酸の生合成を触媒する酵素(UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ; UGD) をコードする遺伝子は同定されていなかった。UGDはUDP-グルコースからUDP-グルクロン酸への反応を触媒し、細胞壁の合成においても重要な酵素であることが報告されている。植物では複数分子種のUGDが機能していると推定されているが、組換えUGDのアイソフォームを解析した研究は、細胞壁合成における機能分化に着目したシロイヌナズナの研究のみであった。

このような背景のもと、学位申請者は、ウラルカンゾウにおいてUGDをコードする遺伝子を同定し、植物特化代謝における機能分化を含めたアイソフォームの特徴を解析することで、品種改良や異種宿主を用いたグリチルリチン合成に資する基礎的な知見を得ることを目的として研究を行っている。学位申請者は、まず、すでに機能同定されているシロイヌナズナのUGDをクエリとした相同性検索により、5つのウラルカンゾウUGD候補配列(UGD1～5)を特定している。大腸菌発現系を用いて精製した組換えタンパク質の酵素反応試験を行い、そのうちの4つの候補遺伝子についてはUGDをコードすることを確認している。さらに、遺伝子の発現レベルも最も高いUGD2が、ウラルカンゾウのUGDの機能において特に大きな貢献をしているアイソフォームであると推定している。

学位申請者は、次に、グリチルリチン生合成およびソヤサポニン生合成を活性化することが報告されているジャスモン酸メチルに対するUGDの遺伝子転写応答を解析し、グリチルリチン生合成あるいはソヤサポニン生合成を触媒する酵素をコードする遺伝子の転写応答と比較している。ウラルカンゾウUGD1～4の転写はジャスモン酸メチルによって活性化されるが、グリチルリチンやソヤサポニン生合成酵素遺伝子と類似する転写パターンを示すUGD は見出されていない。したがって、UGD1～4 はジャスモン酸メチルに応答してUDP-グルクロン酸供給量を増加させているものの、UGD1～4にはグリチルリチンやソヤサポニンの生合成に特に大きく貢献するような機能分化は起きていないと考察している。前述の通り、ウラルカンゾウのUGD機能において特に大きな貢献をしていると推定されたUGD2が、サポニン生合成においても大きな貢献をしている可能性が高いと考察している。

学位申請者はさらに、推定UGDの系統樹解析の結果から、ウラルカンゾウのUGD アイソフォームが、マメ科共通祖先において5つの分子種に分かれた可能性が高いことを示している。また、UGDが同定されていなかったマメ科のタルウマゴヤシのUGD 遺伝子を3分子種機能解析した結果、系統樹においてクレードVに分類されるUGD分子種は他のアイソフォームよりUGD活性が弱い可能性を示している。そこで、アミノ酸配列の比較を通して、UGD活性に影響を与える可能性のあるアミノ酸残基を推定している。さらにアミノ酸に変異を加えたUGD の酵素活性試験を通して、ウラルカンゾウのUGD2で252 番目に相当するグリシンと254 番目に相当するアスパラギン酸がUGD活性に重要であること、ならびに、253 番目に相当するトレオニンをリシンに置換することでUGDの反応速度が上がる可能性があることを新たに見出している。さらに、学位申請者は、グリチルリチンの合成を触媒する遺伝子を導入した遺伝子組換え酵母において、ウラルカンゾウUGD2、UGD4、および、シロイヌナズナUGD2 を発現させ、グリチルリチンの合成量にUGDアイソフォームの生化学的な特性の違いが影響を与えるかを調べている

以上のように、本論文では、ウラルカンゾウの UGD をコードする遺伝子が 4 分子種同定され、そのうちの UGD2 が UGD 機能の中心であること、さらに、サポニンの生合成においても中心的な役割を担っていると推定している。これらの知見は、将来的に、例えば塩基編集を用いたウラルカンゾウの品種改良を試みる場合にターゲット遺伝子を決める際の情報となることが期待される。さらに、本論文では、UGD の反応速度を上げる可能性のあるアミノ酸残基も推定している。これにより、酵母発現系を用いたグリチルリチンの生合成において、UGD のアミノ酸置換によるグリチルリチン生産性向上など、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。