



Title	ゲノム編集技術を利用したカンゾウ毛状根培養によるグリチルリチン生産
Author(s)	千代, 直樹
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/98645
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

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 (千代直樹)	
論文題名	ゲノム編集技術を利用したカンゾウ毛状根培養によるグリチルリチン生産
論文内容の要旨	
<p>グリチルリチンは、薬用植物カンゾウの根やストロンなどに含まれるトリテルペノイドサポニンの一種で、抗炎症作用や臓器保護効果などの薬理作用を有し、医薬品や化粧品として利用されている。また、独特の甘みを持ち甘味料や香料としても世界中で使用される。現在、グリチルリチンの供給は野生カンゾウに依存しているが、収穫には3-4年と長い年月を要する上に、近年の需要増にともない乱獲が生じ、野生植物の枯渇が危ぶまれている。このような背景の中、本研究では、グリチルリチンの持続的な供給手段の確立を目指し、カンゾウ毛状根を用いたグリチルリチン生産の可能性を検討した。</p> <p>カンゾウ毛状根のグリチルリチン含有量は極めて低く、毛状根をグリチルリチン生産に適用するには課題があつた。カンゾウ毛状根のトリテルペノイド生合成経路には、グリチルリチンのほか、ソヤサポニンやベツリン酸、オレアノール酸の生合成経路も含まれる。本研究では、グリチルリチン生合成と競合するトリテルペノイド生合成をゲノム編集により遮断し、グリチルリチンを産生するカンゾウ毛状根を作出できるか試みた。①ソヤサポニン経路を遮断した<i>CYP93E3 CYP72A566</i>二重ノックアウト毛状根 (double-KO)、②ソヤサポニン経路に加えてオレアノール酸およびベツリン酸経路についても遮断した<i>CYP93E3 CYP72A566 CYP716A179 LUS1</i>四重ノックアウト毛状根 (quadruple-KO)、をそれぞれ作出了したところ、ゲノム編集を施していない毛状根からはグリチルリチンが検出されなかつたのに対して、2種類のノックアウト毛状根からはグリチルリチンが検出され、毛状根でグリチルリチンを生産できることが示された。</p> <p>上述した2種類のノックアウト毛状根の代謝物を解析したところ、いずれからも11-デオキソ-グリチルリチン (11d-GL) が副産物として検出された。この結果より、グリチルリチンの生合成において11位炭素の酸化反応が律速となっており、11位の酸化を受けずに配糖化された産物である11d-GLが蓄積していることが示唆された。11位の酸化を促進することがグリチルリチンの生産量向上に必須と考えられたため、本章では11位酸化酵素遺伝子 <i>CYP88D6</i> の過剰発現と、<i>CYP93E3 CYP72A566</i> 二重ノックアウトを組合せた毛状根 (double-KO/<i>CYP88D6</i>-OX) を作出了。その結果、double-KO/<i>CYP88D6</i>-OXのグリチルリチン含有量はdouble-KOと比べて、3倍以上増加した。<i>CYP88D6</i> の過剰発現を単独で導入した毛状根のグリチルリチン含有量は、double-KOよりも低かったため、ソヤサポニン生合成経路の遮断とグリチルリチン生合成酵素遺伝子 (<i>CYP88D6</i>) の過剰発現の相乗効果によりグリチルリチン生産が向上したことが分かった。</p> <p>本研究では、ゲノム編集を利用して毛状根のトリテルペノイド代謝を改変することにより、グリチルリチンを产生する毛状根を作出できた。作出了した毛状根のグリチルリチン含有量 (最大で1.4 mg/g DW) は、野生カンゾウ (20-80 mg/g DW) より低いが、毛状根の生産期間 (1か月) は野生カンゾウ (3-4年) と比べて短い。このため、毛状根の単位期間当たりのグリチルリチン生産量は、野生カンゾウと同等レベルであるといえる。また、ゲノム編集により不純物を低減させた毛状根を作出できるため、グリチルリチンの精製を簡便化できる点も毛状根を用いた生産方法の利点である。このような利点から、毛状根培養は持続的なグリチルリチン供給手段の一つとして有望であると考えられる。本研究で実施したような遺伝子工学的に代謝を改変した毛状根を用いた物質生産手法は、グリチルリチンに限らず様々な植物根由来の有用物質にも適用できると考えられる。今後、毛状根を用いた物質生産が社会に普及することを期待する。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (千代直樹)	
	(職) 氏名
	主査 教授 村中俊哉
	副査 教授 福崎英一郎
	副査 教授 藤山和仁
論文審査担当者	

論文審査の結果の要旨

グリチルリチンは、薬用植物カンゾウの根やストロンなどに含まれるトリテルペノイドサポニンの一種で、抗炎症作用や臓器保護効果などの薬理作用を有し、医薬品や化粧品として利用されている。また、独特の甘みを持ち甘味料や香料としても世界中で使用される。現在、グリチルリチンの供給は野生カンゾウに依存しているが、収穫には3-4年と長い年月を要する上に、近年の需要増にともない乱獲が生じ、野生植物の枯渇が危ぶまれている。このような植物が作り出す有用物質を持続的に生産する方法として、毛状根と呼ばれる植物の根組織を培養する方法が知られている。たとえば、チョウセンニンジンでは、チョウセンニンジンの毛状根培養により、ニンジンサポニンを生産する手法が開発されている。ところが、カンゾウ毛状根のグリチルリチン含有量は極めて低く、毛状根をグリチルリチン生産に適用するには大きな課題があった。

このような背景のもと、学位申請者は、グリチルリチンの持続的な供給手段を確立することを目指し、ゲノム編集技術を適用した、カンゾウ毛状根を用いたグリチルリチン生産を目的とした研究を行っている。カンゾウ毛状根のトリテルペノイド生合成経路には、グリチルリチンのほか、ソヤサポニンやベツリン酸、オレアノール酸の生合成経路も含まれる。学位申請者は、まず、グリチルリチン生合成と競合するトリテルペノイド生合成をゲノム編集により遮断し、グリチルリチンを産生するカンゾウ毛状根を作出できるか試みている。一つ目に、ソヤサポニン経路を遮断した *CYP93E3* *CYP72A566* 二重ノックアウト毛状根 (double-KO) を、二つ目にはソヤサポニン経路に加えてオレアノール酸およびベツリン酸経路についても遮断した *CYP93E3* *CYP72A566* *CYP716A179* *LUS1* 四重ノックアウト毛状根 (quadruple-KO)、をそれぞれ作出している。その結果、ゲノム編集を施していない毛状根からはグリチルリチンが検出されなかったのに対して、2種類のノックアウト毛状根からはグリチルリチンが検出され、毛状根でグリチルリチンを生産できることを示している。

学位申請者は、次に、上述した2種類のノックアウト毛状根の代謝物を解析することにより、いずれからも11-デオキソーグリチルリチン (11d-GL) が副産物として検出している。この結果より、グリチルリチンの生合成において11位炭素の酸化反応が律速となっており、11位の酸化を受けずに配糖化された産物である11d-GLが蓄積していることを示している。

学位申請者は、さらに、11位の酸化を促進することがグリチルリチンの生産量向上に必須と考え、11位酸化酵素遺伝子 *CYP88D6* の過剰発現と、*CYP93E3* *CYP72A566* 二重ノックアウトを組合せた毛状根 (double-KO/*CYP88D6*-OX) を作出している。その結果、double-KO/*CYP88D6*-OXのグリチルリチン含有量はdouble-KOと比べて、3倍以上増加することを見出している。*CYP88D6*の過剰発現を単独で導入した毛状根のグリチルリチン含有量は、double-KOよりも低いため、ソヤサポニン生合成経路の遮断とグリチルリチン生合成酵素遺伝子 (*CYP88D6*) の過剰発現の相乗効果によりグリチル

リチン生産が向上すると考察している。

以上のように本論文では、ゲノム編集を利用して毛状根のトリテルペノイド代謝を改変することにより、グリチルリチンを産生する毛状根を作出している。本論文でのゲノム編集毛状根のグリチルリチン含有量（最大で 1.4 mg/g DW）は、野生カンゾウ（20-80 mg/g DW）より低いが、毛状根の生産期間（1か月）は野生カンゾウ（3-4 年）と比べて短い。このため、毛状根の単位期間当りのグリチルリチン生産量は、野生カンゾウと同等レベルであると考察している。また、ゲノム編集により不純物を低減させた毛状根を作出できるため、グリチルリチンの精製を簡便化できる点も毛状根を用いた生産方法の利点であり、毛状根培養は持続的なグリチルリチン供給手段の一つとして有望であること、さらに、本論文で実施したような遺伝子工学的に代謝を改変した毛状根を用いた物質生産手法は、グリチルリチンに限らずさまざまな植物根由来の有用物質にも適用できることを指摘しており、生物工学的な重要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。