

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04485

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を駆使した植物トリテルペノイド生合成遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of triterpenoid biosynthetic genes in plant by using genome editing

研究代表者

村中 俊哉 (Muranaka, Toshiya)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：60342862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生理活性物質が存在することが知られている植物トリテルペノイドの生合成には、シトクロームP450モノオキシゲナーゼ(CYP)の複数のサブファミリーが関わる。本研究では、酵母発現系を用いたヘテロガスな系によりCYPの酵素機能を解析するとともに、植物内におけるCYPの本来機能の評価のために、ゲノム編集された植物組織を作出した。その結果、酵母発現系で複数のCYPの機能を明らかにするとともに、シロイヌナズナ、トマト、薬用植物カンゾウなどで、CYP遺伝子破壊植物/植物組織を作成し、CYP遺伝子の *in planta*での機能検証をすることができた。

研究成果の概要(英文)：Plants produce a wide variety of secondary (specialized) metabolites to survive under biotic and abiotic stress. Among them, terpenoids are those of the most structurally varied class of plant specialized metabolites and perform multiple important biological roles. Cytochrome P450s (CYPs) have a central role to enhance the diversity of the triterpenoids, C-30 terpenoids. In this study, we analyzed the function of various CYPs in triterpenoid biosynthesis using yeast heterologous expression system. Furthermore, we created gene knockout plant/plant tissues to confirm *in planta* function of those CYPs including Arabidopsis, tomato and licorice.

研究分野：植物代謝生化学

キーワード：ゲノム編集 植物組織培養 テルペノイド 代謝制御 植物特化代謝物 合成生物学 P450

#### 1. 研究開始当初の背景

植物は多種多様なトリテルペノイドを生合成する。トリテルペノイドは、直鎖の2,3-オキシドスクアレンから、種々のオキシドスクアレン環化酵素(OSC)による基本骨格形成、シトクローム P450 モノオキシゲナーゼ(CYP)などによる部位特異的酸化修飾、UDP-糖転移酵素(UGT)による配糖化などにより多様性が増す。このような多数のトリテルペノイドの生理学的意義は、ごく一部しか解明されていない。一方、トリテルペノイドは医薬、機能性食品などに利用されるものが多いことから物質生産を目指した応用研究が展開されている。研究代表者は、植物における動物・酵母型OSCを経由するステロイド生合成経路の存在証明(Suzuki et al. PCP 2006, Ohya et al. PNAS 2009)、レアプラント・カンゾウの有用トリテルペノイド(グリチルリチン)の酸化位置特異的 CYP (Seki et al. PNAS 2008, Plant Cell 2011)ならびに UGT (關ら、特願 2013-078847) の酵素機能解明、マメ科植物における特異的 CYP の機能解明とコンビナトリアル生合成(Fukushima et al. PCP 2011, 2013)など、トリテルペノイド生合成研究で世界をリードしてきた。

これら代謝酵素遺伝子、特にトリテルペノイドの生合成に関わる CYP の機能について、サブファミリーを絞って詳細に検討することは重要である。さらに、近年急速に発展してきたゲノム編集技術を駆使、代謝酵素の植物本来での機能を知ることは、植物生理学、代謝工学の両面で重要であるが、遺伝子破壊(Knock out)ができる植物がごく一部のモデル植物に限られている、倍数性植物における遺伝子破壊、あるいは、たとえモデル植物であっても冗長性のある遺伝子破壊は実質困難である、ことなどが課題としてあった。

#### 2. 研究の目的

多くの生理活性物質が存在することが知られている植物トリテルペノイドの生合成には、CYPの複数のサブファミリーが関わる。本研究では、酵母発現系を用いたヘテロガスな系により、その酵素機能を解析するとともに、これら代謝酵素遺伝子の植物内における本来の機能評価を行うために、近年急速に発展してきたゲノム編集技術を用いる。これにより、目的とする酵素遺伝子の欠失、置換などを植物体内で行い、植物における当該酵素ならびに当該酵素が係わるトリテルペノイドの機能を明らかにし、植物代謝生化学研究の新たな基盤形成に資することを目的とする。

#### 3. 研究の方法

(1) トリテルペノイド生合成に関わる CYP につき、シロイヌナズナ、トマト、カンゾウ等から cDNA を抽出し、出芽酵母発現系を用いたヘテロガスな系(Fukushima et al. PCP 2011,

2013)により、その酵素機能を解析する。

(2) ゲノム編集ツールとして、TALEN ならびに CRISPR/Cas9 システムを用い、トリテルペノイド生合成に関わる CYP の遺伝子破壊用ベクターを構築し、シロイヌナズナ、トマト、カンゾウにアグロバクテリウム法により導入する。得られた形質転換植物あるいは植物組織において、ゲノム編集が起こったかどうかを Heteroduplex mobile assay (HMA)によりスクリーニングし、その後候補のクローンからゲノム DNA を抽出しシーケンシングを行う。

#### 4. 研究成果

(1) これまでに CYP716A サブファミリーが、 $\beta$ -アミリンなどの 28 位の酸化活性を有することを、酵母を用いた機能解析により見いだしている(Fukushima et al. PCP 2011)。本遺伝子サブファミリーは、双子葉植物に広く見られることから、双子葉植物に共通な生理機能を有する可能性が推察された。シロイヌナズナには、2 種の CYP716A ファミリー(CYP716A1, A2)がある。酵母を用いた機能解析により、両分子種に 28 位水酸化活性があることに加え、CYP716A2 では、22 水酸化酵素活性もあることを見出した。CYP716A2 により生成される 22 -ヒドロキシ $\beta$ -アミリンは、炎症シグナルの鍵酵素である 5-リポキゲナーゼ阻害活性を有することが示され、抗炎症薬への応用が期待される。22 -ヒドロキシ $\beta$ -アミリンはパタゴニアに生息するキク科植物からの報告されている。今後名古屋議定書により外来植物へのアクセスが難しくなると考えられるが、抗炎症薬への応用が期待される 22 -ヒドロキシ $\beta$ -アミリンを生産させることが可能となる。

(2) シロイヌナズナ CYP716A サブファミリー CYP716A1 ならびに CYP716A2 の両遺伝子を破壊した植物について、その表現型を解析した。通常の栽培条件では表現型には異常は見られなかった。さまざまなストレス条件化で表現型が変わることが期待される。

(3) CYP716A サブファミリーは、 $\beta$ -アミリンなどの 28 位酸化活性を有することを、酵母発現系を用いた機能解析により見出している。より高活性の CYP716A サブファミリー分子種を取得すべく、3 種類のオキシドスクアレン環化酵素 OSC(aAS, bAS, LUS)、および 6 分子種の CYP716A 酵素をそれぞれ組み合わせ酵母内で発現させ、生産された C28 位酸化トリテルペノイドの量を比較した。その結果、CYP716A48(オリーブ由来)、CYP716A49(シュガービート由来)は上述の 3 種の骨格全てに対して、最初に発見された CYP716A12(タルウマゴヤシ由来)より高い酸化活性を示した。

(4) トマトでは、6 分子種の CYP716 ファミリー酵素遺伝子が存在する。これらの6 種の遺伝子について酵母を用いた機能解析を行った結果、CYP716A44, CYP716A46 は、他の CYP716A サブファミリーの多くと同様 28 位の酸化活性を示したが、CYP716E26 については、これまでに報告のない 6 位の水酸化活性を有していることを酵母発現系により見出した(Yasumoto et al. 2017)。さらに、CYP716A44 は、根で高発現していたことから、CYP716A4 を標的とする CRISPR/Cas9 発現ベクターを作成し アグロバクテリウム・リゾゲネスを介した形質転換を行った。その結果、CYP716A4 遺伝子が欠失した毛状根を作成することができた。この毛状根について予備的にトリテルペノイド分析を行ったところ、非形質転換毛状根で検出された 28 位酸化物であるベツリンならびにベツリン酸が検出されないことがわかった(図 1)。

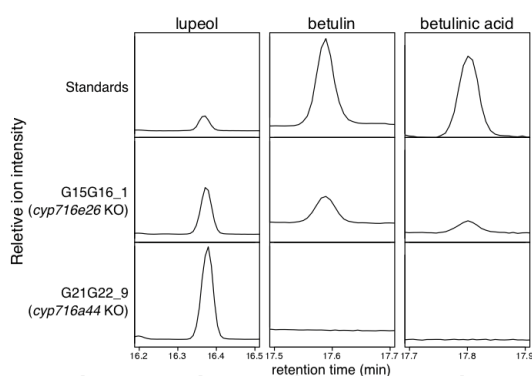


図 1. CRISPR/Cas9 によるトマト CYP716E26 および CYP716A44 遺伝子破壊 (CYP716A44 遺伝子破壊株 (下) では、ベツリンおよびベツリン酸が検出されなかった)

すなわち、酵母を用いた機能解析の結果を、植物組織においても検証することができた。これまで CYP716A サブファミリーの CYP の多くは、トリテルペノイドの 28 位水酸化ならびに酸化に関わると報告されていたが、(1)の通り、シロイヌナズナ由来の CYP716A2 が、トリテルペノイドの 28 位酸化のみならず 22 位の水酸化に関わることを見出したことに加えトマト CYP716E26 が、これまでに報告のない 6 位の水酸化活性を有していることを見出すことができた意義は大きい。さらに、酵母で 28 位酸化活性を示したトマト CYP716A44 について、CYP716A44 破壊毛状根を作成し、トリテルペノイド解析を行った結果、28 位酸化トリテルペノイドが検出されず、in planta での本酵素遺伝子の機能検証をすることができた。

(5) これまで単離した CYP72A154、ならびに CYP93E3 に加え、28 位の酸化酵素遺伝子 CYP716A179 を酵母発現系により機能同定した。CYP72A154, CYP93E3 については、これらの遺伝子を標的とする CRISPR/Cas9 発現ベクターを作成し アグロバクテリウム・リゾ

ゲネスを介した形質転換を行った。その結果、Single guide RNA を発現した CRISPR/Cas9 においては、いずれの遺伝子をターゲットとした場合においても、ゲノム編集された毛状根を取得することができなかった。それに対し、Multiple guide RNA を発現した CRISPR/Cas9 においては CYP72A154 および CYP93E3 を標的とし、1 塩基から数百塩基、さらには 1,600 塩基以上の欠失を導入することができた(図 2)。これまでにカンゾウのゲノム編集の報告はなく、本研究が初の報告となる。



図 2. CRISPR/Cas9 によるカンゾウ CYP93E3 遺伝子破壊の例

#### < 引用文献 >

Fukushima EO, Seki H, Sawai S, Suzuki M, Ohyama K, Saito K and Muranaka T (2013) Combinatorial biosynthesis of legume natural and rare triterpenoids in engineered yeast. *Plant Cell Physiol.* 54: 740-749.

Fukushima EO, Seki H, Ohyama K, Ono E, Umemoto N, Mizutani M, Saito K, Muranaka T (2011) CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 52: 2050-2061.

Ohyama K, Suzuki M, Kikuchi J, Saito K and Muranaka T (2009) Dual biosynthetic pathway to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 106: 725-730.

Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K and Muranaka T (2008) Licorice  $\beta$ -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 105: 14204-14209.

Seki H, Sawai S, Ohyama K, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Fukushima EO, Akashi T, Aoki T, Saito K and Muranaka T (2011) Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *Plant Cell* 23: 4112-4123.

Suzuki M, Xiang T, Ohyama K, Seki H, Saito K, Muranaka T, Hayashi H, Katsube Y, Kushiro T, Shibuya M and Ebizuka Y (2006)

Lanosterol synthase in dicotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 47: 565-571.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Robertlee J, Kobayashi K, Tang J, Suzuki M, Muranaka T (2018) Evidence that the *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 1 is phosphorylated at Ser577 in planta. *Plant Biotechnol.* 査読有り, 35, 1-7. DOI:

10.5511/plantbiotechnology.17.1208a  
Seki H, Tamura K, Muranaka T (2017) Plant-derived isoprenoid sweeteners: recent progress in biosynthetic gene discovery and perspectives on microbial production. *Bios. Biotechnol. Biochem.* 査読有り, DOI:

10.1080/09168451.2017.1387514  
Yano R, Takagi K, Tochigi S, Fujisawa Y, Nomura Y, Tsuchinaga H, Takahashi Y, Takada Y, Kaga A, Anai T, Tsukamoto C, Seki H, Muranaka T, Ishimoto M (2018) Isolation and characterization of the soybean *Sg-3* gene that is involved in genetic variation in sugar chain composition at the C-3 position in soyasaponin. *Plant Cell Physiol.* 査読有り, 59: 797-810.

Robertlee J, Kobayashi K, Suzuki M and Muranaka T (2017) AKIN10, a representative *Arabidopsis* SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1), phosphorylates and downregulates plant HMG-CoA reductase. *FEBS Letters.* 査読有り, 591: 1159-1166.  
doi:10.1002/1873-3468.12618

Kobayashi K, Kobayashi K, Yamaguchi H, Miyagi Y, Takagi K, Fushihara K, Seki H, Suzuki M, Nagata N and Muranaka T (2017) Platform for “chemical metabolic switching” to increase sesquiterpene contents in plants. *Plant Biotechnology* 査読有り, 34: 65-69. DOI:

10.5511/plantbiotechnology.17.0114a  
Yasumoto S, Seki H, Shimizu Y, Fukushima EO, Muranaka T (2017) Functional characterization of CYP716 family P450 enzymes in triterpenoid biosynthesis in tomato. *Frontiers in Plant Science* 査読有り, 8: article 21. doi:

10.3389/fpls.2017.00021  
Tamura K, Seki H, Suzuki H, Kojoma M, Saito K and Muranaka T (2017) CYP716A179 functions as a triterpene C-28 oxidase in tissue-cultured stolons of *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Cell Rep.* 査読有り, 36: 437-445. doi: 10.1007/s00299-016-2092-x.

Vo NNQ, Fukushima EO and Muranaka T (2017) Structure and hemolytic activity

relationship of triterpenoid saponins and sapogenins. *J Nat. Med.* 査読有り, 71: 50-58  
10.1007/s11418-016-1026-9

Mochida K, Sakurai T, Seki H, Yoshida T, Takahagi K, Sawai S, Uchiyama H, Muranaka T and Saito K (2017) Draft genome assembly and annotation of *Glycyrrhiza uralensis*, a medicinal legume. *Plant J.* 査読有り, 89: 181-194. doi: 10.1111/tpj.13385.

Yasumoto S, Fukushima EO, Seki H, and Muranaka T (2016) Novel triterpene oxidizing activity of *Arabidopsis thaliana* CYP716A subfamily enzymes. *FEBS Lett.* 査読有り, 590: 533-540

11 安本周平、村中俊哉 (2016) 農作物でのゲノム編集. *実験医学* 査読なし 34: 3410-3415.

〔学会発表〕(計 28 件)

Muranaka T (2017) Redesign of terpenoid biosynthetic pathway in plant by genome editing. TERPNET2017 (招待講演) (国際学会) 中国・大連

村中俊哉 (2017) 植物におけるゲノム編集技術とスマートアグリに向けて. 諏訪東京理科大学公開シンポジウム (招待講演) 長野県・茅野市

Muranaka T (2017) Redesign of biosynthetic pathway in plant by genome editing for human health and food supply. JSPS-AvH Alumni Joint Conference (招待講演) (国際学会) エジプト・カイロ

村中俊哉 (2017) 植物のゲノム編集について共に学ぶ. 第 3 回デザイン思考勉強会 (招待講演) 大阪府・大阪市

Muranaka T (2017) Redesign of terpenoid biosynthetic pathway in plant by genome editing toward human health. MU-OU 15th Anniversary symposium (招待講演) (国際学会) タイ・バンコク

Muranaka T (2017) Introduction: "Smart cell industry" a new trend in bioeconomy. 第 69 回日本生物工学会大会 (招待講演) 東京都・新宿区

Suzuki H, Fukushima EO, Seki H, Muranaka T (2017) Effect of LjCYP93E disruption on triterpenoid content in *Lotus japonicus* plants, The 13th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids. TERPNET 2017 (国際学会) 中国・大連

Suzuki H, Fukushima EO, Seki H, Muranaka T (2017) Effect of biosynthetic gene disruption on triterpenoid content in *Lotus japonicus*. 第35回日本植物細胞分子生物学会年会, 埼玉県・さいたま市

村中俊哉 (2017) ゲノム編集の原理と農芸化学・育種分野への可能性. 日本農芸化学会2017年度大会 (招待講演) 京都府・京都市  
村中俊哉, 關光, 福島エリオデット

(2017) ゲノム編集による植物テルペノイド生合成のリデザイン. 日本薬学会第137年会 (招待講演) 宮城県・仙台市

11 Muranaka T (2016) Engineering of plant triterpenoid biosynthesis with genome editing. 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology (招待講演) (国際学会) カナダ・バンクーバー

12 Yasumoto S, Seki H, Fukushima E0, Muranaka T (2016) Characterization of CYP716A subfamily genes in *Arabidopsis thaliana*. 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology (国際学会) カナダ・バンクーバー

13 村中俊哉, 中園幹生 (2016) 植物トリテルペノイドの生理機構解明に向けて. 日本植物学会第80回大会 (招待講演) 沖縄県・宜野湾市

14 村中俊哉 (2016) ゲノム編集技術を用いたナス科作物の代謝改変ならびに育種素材開発に向けて. 日本植物学会第80回大会 (招待講演) 沖縄県・宜野湾市

15 Yasumoto S, Seki H, Fukushima E0, Muranaka T (2016) Generation of *cyp716a1 cyp716a2* double knockout *Arabidopsis thaliana* plants by TALEN technology. Plant Genome Stability and Change, 神奈川・葉山市

16 關光, 福島エリオデット, 村中俊哉 (2016) テルペノイドの代謝多様性と遺伝子ディスカバリー. 第68回日本生物工学会大会 (招待講演) 富山県・富山市

17 田村啓太, (8名), 村中俊哉 (2016) 薬用植物カンゾウのトリテルペノイド生合成制御に関わる転写因子の探索. 第34回日本植物細胞分子生物学会 (上田) 大会, 長野県・上田市

18 福島エリオデット, 鈴木隼人, 梅基直行, 關光, 村中俊哉 (2016) 高等植物由来 CYP716Aサブファミリー酵素の酸化活性比較. 第34回日本植物細胞分子生物学会 (上田) 大会, 長野県・上田市

19 Robertlee J, Kobayashi K, Suzuki M, Muranaka T (2016) The *Arabidopsis* SnRk1 (AKIN10) phosphorylates and down regulates AtHMGR1 activity. 第29回植物脂質シンポジウム, 大阪府・豊中市

20 安本周平, 關光, 清水裕子, 福島エリオデット, 村中俊哉 (2016) トマトのトリテルペノイド生合成に関する CYP716 family P450 酵素の解析. 第29回植物脂質シンポジウム, 大阪府・豊中市

21 村中俊哉 (2016) ゲノム編集技術を用いた植物育種の現状と展望. 日本農芸化学会関西支部 第497回講演会 (招待講演) 兵庫県・神戸市

22 Muranaka T (2016) Terpenoid biosynthesis: Chemical diversity and their

application to metabolic Engineering. KAIST-OU Symposium (招待講演) 韓国・大田広域市

23 村中俊哉 (2016) 新植物育種技術としてのゲノム編集. 第39回日本分子生物学会 (招待講演) 神奈川県・横浜市

24 村中俊哉 (2016) 高度機能分化した植物組織培養による有用サポニン生産技術開発. 日本農芸化学会2016年度札幌大会 (招待講演) 北海道・札幌市

25 安本周平, 福島エリオデット, 關光, 村中俊哉. (2016) シロイヌナズナCYP716Aサブファミリー酵素遺伝子の機能解析. 日本農芸化学会2016年度札幌大会, 北海道・札幌市

26 Muranaka T (2015) Triterpenoid biosynthesis: Diversity and their application to metabolic engineering. TERPNET 2015 (招待講演) (国際学会) カナダ・バンクーバー

27 Muranaka T (2015) Production of plants triterpenoids in both transgenic plants and yeast culture system. 2nd SBJ Symposium (招待講演) (国際学会) 大阪府・吹田市

28 安本周平, 澤井学, 若林孝俊, 關光, 刑部祐里子, 刑部敬史, 村中俊哉 (2015) 毛状根培養を用いたゲノム編集のための人工ヌクレアーゼ評価系の構築. 第67回日本生物工学会大会, 鹿児島・鹿児島市

〔図書〕(計2件)

安本周平, 關光, 村中俊哉 (2015) エヌ・ティー・エス, 進化するゲノム編集技術, 第3章 第2節 人工ヌクレアーゼを用いた植物代謝工学, 235-241

安本周平, 關光, 刑部祐里子, 刑部敬史, 村中俊哉 (2015) 羊土社, 実験医学別冊 論文だけではわからないゲノム編集成功の秘訣 Q&A, 第部 第11章 植物でのゲノム編集, 228-243

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)  
名称: 22 位がヒドロキシ基である五環系トリテルペン化合物の製造方法  
発明者: 村中俊哉, 關光, 福島エリオデット, 安本周平  
権利者: 大阪大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-016511  
出願年月日: 2016年01月29日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/pl/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村中 俊哉 (MURANAKA, Toshiya)

大阪大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：60342862

(2)研究分担者  
福島 エリオデット (FUKUSHIMA, Ery Odette)  
大阪大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：40724448

(3)連携研究者  
関 光 (SEKI, Hikaru)  
大阪大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：30392004

(4)研究協力者  
安本周平 (YASUMOTO, Shuhei)  
鈴木隼人 (SUZUKI, Hayato)  
田村啓太 (TAMURA, Keita)  
ジェクソン ロベルトリー (ROBERTLEE,  
Jekson)