



Elucidation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in Solanum species.

Akiyama, Ryota

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2020-03-25

(Date of Publication)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7797号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007797>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏名 秋山 遼太

専攻・講座 生命機能科学専攻・応用生命化学講座

論文題目

Elucidation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in *Solanum* species

(ナス属植物におけるステロイドグリコアルカロイド生合成の解明)

指導教員 水谷 正治

ステロイドグリコアルカロイド (SGA) は、窒素原子を含むステロイドを基本骨格とする代謝産物であり、主にナス科やユリ科植物に含まれ、特にナス属作物であるジャガイモ (*Solanum tuberosum*)、トマト (*Solanum lycopersicum*)、ナス (*Solanum melongena*) に含まれる毒性化合物としてよく知られている。SGA は様々な生物に幅広く毒性を示すため、防御物質であると考えられている。最も有名な例として、ジャガイモの緑化した塊茎表皮や芽に α -ソラニン等の SGA が高濃度で蓄積している。これらは不快な苦味の原因となるだけでなく、多量に摂取により食中毒を引き起こす。このように、SGA は我々にとって身近な植物二次代謝産物であり、我々の生活と密接な関わりを持っていると言える。

序章では、SGA の構造と生合成に関するこれまでの知見について詳しく論じた。SGA は2つの構造単位で構成されており、窒素原子を含む C₂₇ ステロイドからなるアグリコン部分と C-3 位の水酸基に結合した糖鎖の2つの部分からなる。ナス属植物が生産する大部分の SGA のアグリコンは構造によってスピロソラン型とソラニダン型の2つに大別される。スピロソラン骨格とソラニダン骨格の構造的な違いは E 環、F 環と呼ばれる環構造によって生じる。水酸化、C5 位の酸化還元などのマイナーな構造変化と糖鎖部分の組み合わせにより、SGA の膨大な構造多様性が生み出され、これらの多様な構造はそれぞれの SGA の特徴的な生物活性を生み出していると考えられる。ジャガイモはソラニダン型 SGA を生産しており、ソラニダン型のソラニジンをアグリコンとする α -ソラニンと α -チャコニンは栽培種ジャガイモの総 SGA の 90% を占める。一方、トマトにはスピロソラン型 SGA である α -トマチンとデヒドロトマチンが葉や未熟果実における主要な SGA として蓄積している。また、トマトやジャガイモに比べて研究は進んでいないが、ナスはスピロソラン型 SGA である α -ソラソニンと α -ソラマルジンを主な SGA として蓄積する。SGA はコレステロールを前駆物質として生合成され、アグリコンの形成と配糖化の2つの段階からなる。コレステロールの水酸化、アミノ基転移、E,F 環の閉環を経てそれぞれのアグリコンが形成され、続く配糖化により多様な SGA が生合成されると推定されている。トマトとジャガイモにおいて SGA の生合成研究は多くなされており、近年、3つのシトクローム P450 (CYP) と1つの2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (DOX) とアミノ基転移酵素が同定された。これらの酵素機能はトマトとジャガイモにおいて共通であるため、スピロソラン型 SGA とソラニダン型 SGA で共通な生合成酵素であることが明らかにされた。さらに、配糖化に関わる UDP 依存性糖転移酵素もトマトとジャガイモから複数同定されている。しかしながら、SGA アグリコンの構造多様性を生み出すような E,F 環形成や C5 位の酸化還元に関わる生合成遺伝子は全く不明であった。

第1章では、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を利用して、毛状根形質転換により既知の SGA 生合成遺伝子のノックアウトを行った。ジャガイモに含まれる α -ソラニン、 α -チャコニンなどの SGA は多量に摂取することにより食中毒を引き起こすため、SGA の低減はジャガイモ育種における最重要課題の一つである。しかし、一般的に栽培されているジャ

(氏名：秋山 遼太 NO. 2)

ガイモは4倍体かつ栄養繁殖生であるため、自然変異およびその集積によるSGA低減個体の取得が非常に困難である。CRISPR/Cas9は任意の配列を狙って破壊・変異導入が可能なゲノム編集技術として、様々な生物に対して利用されつつある。本章では、SGA完全欠損を目的として、既知のSGA生合遺伝子*St16DOX*をCRISPR/Cas9を用いて毛状根形質転換系によるノックアウトを行った。作出した形質転換毛状根のうち複数の系統でSGAが全く検出されなかった。以上より、ゲノム編集技術を用いる育種はSGAを全く生産しないジャガイモを作出する分子育種につながると期待される。さらに、毛状根形質転換系は通常の植物体形質転換に比べ短期間で形質転換体を獲得可能であり、形質転換効率も非常に高い。CRISPR/Cas9と毛状根形質転換を組み合わせることで、迅速な候補遺伝子のin vivo機能解析が可能となり、さらなる新規SGA生合成遺伝子の探索への利用が期待される。

第2章では、トマトにおける α -トマチン生合成に関わる生合成遺伝子の同定および機能解析を行った。トマトは主要なSGAとして α -トマチンとデヒドロトマチンを葉や未熟果実に蓄積する。 α -トマチンとデヒドロトマチンのアグリコンはそれぞれトマチジンとデヒドロトマチジンであり、その構造的な違いはC5-6位の二重結合の有無である。トマチジンは単結合型、デヒドロトマチジンは二重結合型であり、トマチジンはデヒドロトマチジンを前駆物質として、3位水酸基の脱水素、異性化、5 α 位還元と3位ケトンの還元の4つのステップで生合成される。近年、酸化還元酵素であるS138HSD1が上記4反応のうち5 α 位還元以外の3つのステップを触媒することが明らかとなった。本章ではデヒドロトマチジンからトマチジンへの変換に関わる5 α 位還元酵素遺伝子の同定を目的とした。これまでに、植物ホルモンであるブラシノステロイド生合成におけるステロイド5 α 還元酵素遺伝子としてシロイヌナズナから*AtDET2*が単離同定されていた。そこでトマトから*AtDET2*に高い相同性を示す2つのホモログ遺伝子*SIS5aR1*と*SIS5aR2*を選抜した。遺伝子発現解析の結果、*SIS5aR2*は既知のSGA生合成遺伝子と同様の発現挙動を示したが、*SIS5aR1*の発現挙動は類似しなかった。次に、組換え酵素を用いた機能解析では、*SIS5aR1*と*SIS5aR2*ともに推定生合成中間体に対してステロイド5 α 位還元活性を示した。さらに、CRISPR/Cas9によってそれぞれの遺伝子破壊毛状根を作成した結果、*SIS5aR1*ノックアウト毛状根では α -トマチン量に変化が無いのに対して、*SIS5aR2*ノックアウト毛状根では α -トマチン量が大幅に低下し、相当する量のデヒドロトマチンが蓄積していた。以上より、*SIS5aR1*と*SIS5aR2*は同様の酵素機能を持つが、*SIS5aR2*が α -トマチン生合成に関わるステロイド5 α 位還元酵素遺伝子であることを明らかにした。ステロイド5 α 位還元反応は植物ホルモンであるブラシノステロイド生合成に関わる植物に普遍的な反応である。トマトはステロイド5 α 位還元酵素遺伝子を*SIS5aR1*と*SIS5aR2*の2つを有するがシロイヌナズナは*AtDET2*の1つのみである。*SIS5aR1*は*SIS5aR2*と比べて*AtDET2*に対して高い相同性を示すため、トマトにおいて*S5aR*遺伝子の重複が起こり、SGA生合成に特化した*SIS5aR2*が生じた一方で、*SIS5aR1*はハウスキーピングなブラシノステロイド生合成を担っていると推測される。

(氏名：秋山 遼太 NO. 3)

第3章では、ジャガイモのSGA生合成における α -ソラニン生合成機構の解明を試みた。一般的な栽培品種ジャガイモはソラニダン型SGAを主に生産している。一方で、トマトにはスピロソラン型SGAである α -トマチン等が蓄積している。ソラニダン型SGAとスピロソラン型SGAはある段階まで共通の生合成経路を辿った後に、それぞれに分岐した経路で生合成されると推定されているが、実際の分岐経路および生合成遺伝子ともに全く不明であった。そこで、本章ではジャガイモを材料にソラニダン骨格の形成機構の解明を目的とした。これまでに、50種類以上の多様なSGAが栽培品種や野生種ジャガイモから報告されている。その中にはスピロソラン型SGAを主に含む種が存在する。このことから、これまでに提唱されてきた分岐した経路とは異なり、ソラニダン型SGAはスピロソラン型化合物を前駆物質として生合成されるのではないかと考えた。この仮説を実証するために、前述の*St16DOX*を破壊したSGA欠損ジャガイモ毛状根への様々なスピロソラン型化合物の投与実験を行った。その結果、スピロソラン型化合物からソラニダン型SGAへの変換が確認された。さらに、その変換はDOX阻害剤であるプロヘキサジオンにより濃度依存的に阻害された。次にジャガイモのトランスクリプトームからSGAを多量に蓄積する萌芽で高い発現量を示す*StDOX130*をスピロソラン型からソラニダン型への変換を担う候補遺伝子として選抜した。RNAiにより作成した*StDOX130*ノックダウンジャガイモでは内生ソラニダン型SGAが大きく減少し、スピロソラン型SGAが蓄積していた。組換え酵素を用いた機能解析およびNMRによる酵素反応産物の構造決定により、*StDOX130*はスピロソラン型化合物のE環を酸化的に開環する活性を触媒することを見出した。以上の結果から、ジャガイモにおいてソラニダン型SGAはスピロソラン型化合物から生合成されること、さらに、*StDOX130*がその変換の初発反応を担う鍵酵素であることを明らかにした。また、*StDOX130*は染色体上で7つのDOX遺伝子とクラスターを形成している。このクラスターに含まれるDOX遺伝子は幾つかの偽遺伝子を含むが、いずれの遺伝子も*StDOX130*に高い相同性を示す。さらに、ソラニダン型SGAを生産しないトマトにも*StDOX130*に高い相同性を示す遺伝子が1つだけ存在し、本遺伝子の組換え酵素は*StDOX130*と同様の活性を示した。しかしながら、トマトでこの遺伝子は全く発現していない。つまり、ジャガイモの種分化と栽培化の過程で祖先DOX遺伝子が多重化し高発現型の*StDOX130*を獲得することでソラニダン型SGAを生産するようになったと推察される。

以上のように、第2章、第3章を通じて、ナス属植物におけるSGAの構造多様性を生み出す酵素遺伝子を解明した。これらの発見は、植物における二次代謝産物生産系の進化発展について重要な知見を与えるとともに、第1章で示したようなゲノム編集技術を利用した分子育種や代謝改変による有用物質生産への応用も期待される。

氏名	秋山 遼太		
論文 題目	Elucidation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in <i>Solanum</i> species (ナス属植物におけるステロイドグリコアルカロイド生合成の解明)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	准教授	水谷 正治
	副 査	教授	杉本 幸裕
	副 査	教授	宇野 知秀
	副 査		
			印
			印
要 旨			
<p>ステロイドグリコアルカロイド (SGA) は、窒素原子を含むステロイドを基本骨格とする代謝産物であり、特にナス属作物であるジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>)、トマト (<i>Solanum lycopersicum</i>)、ナス (<i>Solanum melongena</i>) に含まれる毒性化合物としてよく知られている。SGA は様々な生物に幅広く毒性を示すため、防御物質であると考えられている。ジャガイモの緑化した塊茎表皮や萌芽には α-ソラニン等の SGA が高濃度で蓄積しており、これらは不快な苦味の原因となるだけでなく、多量な摂取により食中毒を引き起こす。このように、SGA は身近な植物二次代謝産物であるが、その生合成については不明な点が多い。学位申請者である秋山遼太氏は、第 1 章ではゲノム編集技術による SGA を全く含まないジャガイモの分子育種、第 2 章ではトマトにおける α-トマチン生合成に関わる生合成遺伝子の同定、第 3 章ではジャガイモの α-ソラニンのソラニダン骨格形成機構についてそれぞれ論じ、さらに、これらの結果について総合的に考察している。</p> <p>序章では、SGA の構造と生合成に関するこれまでの知見について詳しく論じている。SGA は 2 つの構造単位で構成されており、窒素原子を含む C_{27} ステロイドからなるアグリコン部分と C-3 位水酸基に結合した糖鎖の 2 つの部分からなる。ナス属植物が生産する大部分の SGA のアグリコンは構造によってスピロソラン型とソラニダン型の 2 つに大別される。スピロソラン骨格とソラニダン骨格の構造的な違いは E 環、F 環と呼ばれる環構造によって生じる。さらに、水酸化、C5 位の酸化還元などのマイナーな構造変化と糖鎖部分の組み合わせにより、SGA の膨大な構造多様性が生み出され、これらの多様な構造はそれぞれの SGA の特徴的な生物活性を生み出していると考えられる。ジャガイモはソラニダン型 SGA を生産しており、ソラニダン型のソラニジンをアグリコンとする α-ソラニンと α-チャコニンが栽培種ジャガイモの総 SGA の 90% を占める。一方、トマトにはスピロソラン型 SGA である α-トマチンとデヒドロトマチンが葉や未熟果実における主要な SGA として蓄積している。また、トマトやジャガイモに比べて研究は進んでいないが、ナスはスピロソラン型 SGA である α-ソラニンと α-ソラマルジンを主な SGA として蓄積する。SGA はコレステロールを前駆物質として生合成され、アグリコンの形成と配糖化の 2 つの段階からなる。コレステロールの水酸化、アミノ基転移、E,F 環の開環を経てそれぞれのアグリコンが形成され、続く配糖化により多様な SGA が生合成されると推定されている。トマトとジャガイモにおいて SGA の生合成研究は多くなされており、近年、3 つのシトクローム P450 (CYP) と 1 つの 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (DOX) とアミノ基転移酵素が同定された。これらの酵素機能はトマトとジャガイモにおいて共通であり、スピロソラン型 SGA とソラニダン型 SGA で共通な生合成酵素であることが明らかにされた。さらに、配糖化に関わる UDP 依存性糖転移酵素もトマトとジャガイモから複数同定されている。しかしながら、SGA のアグリコンの構造多様性を生み出すような E,F 環形成や C5 位の酸化還元に関わる生合成遺伝子は全く不明であった。</p> <p>第 1 章では、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を利用して、毛状根形質転換により既知の SGA 生合成遺伝子のノックアウトを行った。ジャガイモに含まれる α-ソラニン、α-チャコニンなどの SGA は多量に摂取することにより食中毒を引き起こすため、SGA の低減はジャガイモ育種における最重要課題の一つである。しかし、一般的に栽培されているジャガイモは 4 倍体かつ栄養繁殖性であるため、自然変異およびその集積による SGA 低減個体の取得が非常に困難である。CRISPR/Cas9 は任意の配列を狙って破壊・変異導入が可能なゲノム編集技術として、様々な生物に対して利用されつつある。本章では、SGA 完全欠損を目的として、既知の SG 生合成遺伝子 <i>St16DOX</i> を CRISPR/Cas9 を用いて毛状根形質転換系によるノックアウトを行った。作出した形質転換毛状根のうち複数の系統で SGA が全く検出されなかった。</p>			

氏名	秋山 遼太		
論文 題目	以上より、ゲノム編集技術を用いる分子育種は SGA を全く生産しないジャガイモを作出する新たな育種法につながるかと期待される。さらに、毛状根形質転換系は通常の植物体形質転換に比べ短期間で形質転換体を獲得可能であり、形質転換効率も非常に高い。CRISPR/Cas9 と毛状根形質転換を組み合わせることで、候補遺伝子の迅速な <i>in vivo</i> 機能解析が可能となり、第 2 章での新規 SGA 生合成遺伝子の探索のために利用した。		
審査 委員	<p>第 2 章では、トマトにおける α-トマチン生合成に関わる生合成遺伝子の同定および機能解析を行った。トマトは主要な SGA として α-トマチンとデヒドロトマチンを葉や未熟果実に蓄積する。α-トマチンとデヒドロトマチンのアグリコンはそれぞれトマチジンとデヒドロトマチジンであり、その構造的な違いは C5-6 位の二重結合の有無である。トマチジンは単結合型、デヒドロトマチジンは二重結合型であり、トマチジンはデヒドロトマチジンを前駆物質として、3 位水酸基の脱水素、異性化、5a 位還元と 3 位ケトンの還元との 4 つの反応ステップで生合成される。近年、酸化還元酵素である <i>S13BHS1</i> が上記 4 反応のうち 5a 位還元以外の 3 つのステップを触媒することが明らかとなった。本章ではデヒドロトマチジンからトマチジンへの変換に関わる 5a 位還元酵素遺伝子の同定を目的とした。これまでに、植物ホルモンであるブラシノステロイド生合成におけるステロイド 5a 位還元酵素遺伝子としてシロヌズナから <i>AtDET2</i> が単離同定されていた。そこでトマトから <i>AtDET2</i> に高い相同性を示す 2 つのホモログ遺伝子 <i>S15aR1</i> と <i>S15aR2</i> を選抜した。遺伝子発現解析の結果、<i>S15aR2</i> は既知 SGA 生合成遺伝子と同様の発現挙動を示したが、<i>S15aR1</i> の発現挙動は類似しなかった。次に、組換え酵素を用いた機能解析では、<i>S15aR1</i> と <i>S15aR2</i> ともに推定生合成中間体に対してステロイド 5a 位還元活性を示した。さらに、CRISPR/Cas9 によってそれぞれの遺伝子破壊毛状根を作成した結果、<i>S15aR1</i> ノックアウト毛状根では α-トマチン量に変化が無いのに対して、<i>S15aR2</i> ノックアウト毛状根では α-トマチン量が大幅に低下し、相当する量のデヒドロトマチンが蓄積していた。以上より、<i>S15aR1</i> と <i>S15aR2</i> は同様の酵素機能を持つが、<i>S15aR2</i> が α-トマチン生合成に関わるステロイド 5a 位還元酵素遺伝子であることを明らかにした。ステロイド 5a 位還元反応はブラシノステロイド生合成に関わるため植物に普遍的な反応であり、シロヌズナなど多くの植物種では 5a 位還元酵素遺伝子は 1 遺伝子のみである。一方、トマトゲノムには <i>S15aR1</i> と <i>S15aR2</i> の 2 つの遺伝子が存在しており、トマトにおいて <i>S15aR</i> 遺伝子の重複が起こり、SGA 生合成に特化した <i>S15aR2</i> が生じた一方で、<i>S15aR1</i> はハウススキーングなブラシノステロイド生合成を担っていると推測された。</p> <p>第 3 章では、ジャガイモの SGA 生合成における α-ソラニン生合成機構の解明を行った。一般的な栽培品種ジャガイモはソラニダン型 SGA を主に生産している。一方、トマトにはスピロソラン型 SGA である α-トマチン等が蓄積している。ソラニダン型 SGA とスピロソラン型 SGA はある段階まで共通の生合成経路を辿った後に、それぞれに分岐した経路で生合成されると推定されているが、分岐経路および生合成遺伝子にも全く不明であった。そこで、本章ではジャガイモを材料にソラニダン骨格の形成機構の解明を目的とした。これまでに、50 種類以上の多様な SGA が栽培品種や野生種ジャガイモから報告されている。その中にはスピロソラン型 SGA を主に含む種が存在する。このことから、これまでに提唱されてきた分岐経路とは異なり、ソラニダン型 SGA はスピロソラン型化合物を前駆物質として生合成されるのではないかと考えた。この仮説を実証するために、前述の <i>St16DOX</i> を遺伝子破壊した SGA 欠損ジャガイモ毛状根への様々なスピロソラン型化合物の投与実験を行った。その結果、スピロソラン型化合物からソラニダン型 SGA への変換が確認された。さらに、その変換は DOX 阻害剤であるプロヘキサジオンにより濃度依存的に阻害された。次に、スピロソラン型からソラニダン型への変換を担う候補遺伝子として、ジャガイモのトランスクリプトーム解析により SGA を多量に蓄積する萌芽で高い発現量を示す <i>StDOX130</i> を選抜した。RNAi により作成した <i>StDOX130</i> 発現抑制ジャガイモでは内生ソラニダン型 SGA が大きく減少し、相当量のスピロソラン型 SGA が蓄積していた。組換え酵素を用いた機能解析および NMR による酵素反応産物の構造決定により、<i>StDOX130</i> はスピロソラン型化合物の E 環を酸化的に開環する活性を触媒することを見出した。以上の結果から、ジャガイモにおいてソラニダン型 SGA はスピロソラン型化合物から生合成されること、さらに、<i>StDOX130</i> がその酵素変換の初発反応を担う鍵遺伝子であることを明らかにした。また、<i>StDOX130</i> は染色体上で 7 つの DOX 遺伝子とクラスターを形成している。このクラスターに含まれる DOX 遺伝子は幾つかの偽遺伝子を含むが、いずれの遺伝子も <i>StDOX130</i> に高い相同性を示す。さらに、ソラニダン型 SGA を生産しないトマトにも <i>StDOX130</i> に高い相同性を示す遺伝子が 1 つだけ存在し、本遺伝子の組換え酵素は <i>StDOX130</i> と同様の活性を示した。しかしながら、トマトでこの遺伝子は全く発現していない。つまり、ジャガイモの種分化と栽培化の過程で祖先型 DOX 遺伝子が多重化し高発現型の <i>StDOX130</i> を獲得することでジャガイモ栽培品種ではソラニダン型 SGA を高生産するようになったと推察された。</p> <p>本研究は、ゲノム編集技術を利用した分子育種は作物育種の有用な手法であることを実証し、さらに、ナス属植物における SGA の構造多様性を生み出す酵素遺伝子を解明し、植物における二次代謝産物の生合成系の進化多様化について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。</p> <p>よって、学位申請者の秋山遼太は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。</p>		