

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14782

研究課題名（和文）昆虫による分子ナノカーボンの直接官能基化に関わる新規タンパク質の探索と機能解明

研究課題名（英文）Exploration and functional analysis of novel proteins involved in the direct functionalization of molecular nanocarbons by insects

研究代表者

宇佐見 享嗣 (Usami, Atsushi)

名古屋大学・高等研究院(WPI)・特任助教

研究者番号：40890447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題により、生体触媒として昆虫であるハスモンヨトウ幼虫を用い、分子ナノカーボンの直接酸化に関与する新規タンパク質の探索と機能を解明することに成功した。直接酸化に関与する酵素タンパク質は異物代謝酵素であるチトクローム P450 の一種である。さらに、さまざまなサイズの分子ナノカーボンをハスモンヨトウ幼虫へ供することで基質特異性を明らかにし、計算科学により結合構造や安定性、反応メカニズムの推定に成功した。今後は、標的タンパク質の分子機能能を詳細に明らかにすることで、新規機能性分子ナノカーボンが創製できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子ナノカーボンは、現在、その特異な性質から工学を始め様々な分野で利用され、生物医学への応用可能性が示され、より複雑な未踏・新奇な分子ナノカーボンの精密設計・合成法が確立している。また、位置選択的に官能基を付与することで新たな物性や機能が見出されているが、適用可能な分子は限定的である。本研究では、昆虫が有する異物代謝能力に着目し実験を進めることで、機能化反応に関与する酵素タンパク質とその機能解明に成功した。本成果は、これまで有機合成的手法や物理的手法による合成・変換が「常識」であった分子ナノカーボン分野に「昆虫を用いた機能分子創製」という新たなオプションを提示する大きな第一歩である。

研究成果の概要（英文）：This project has successfully explored the novel proteins involved in the direct oxidation of molecular nanocarbons and characterized their functions, using the insect, *Spodoptera litura* larva, as a biocatalyst. The protein involved in the direct oxidation is a variant of cytochrome P450, a xenobiotic enzyme. Furthermore, the specificity of the substrates was revealed by feeding molecular nanocarbons of various sizes to the larvae of *S. litura*, and the binding structure, stability, and reaction mechanism were successfully inferred by computational science. It is expected that in the future, novel functional molecular nanocarbons can be created by elucidating the molecular functional capabilities of target proteins in detail.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：生物変換 昆虫 分子ナノカーボン 生体触媒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

分子ナノカーボンとは多環芳香族炭化水素であり、カーボンナノチューブやフラーレンに代表される炭素物質 (ナノカーボン) の部分構造をもつ、ナノメートルサイズの完全に定義された単一分子である。これらは興味深い物性を有した次世代マテリアルであることから、有機合成化学や生物学を始め多様な分野で取り込まれる最も活発な研究領域の一つである。申請者が従事する研究室では、有機合成化学的手法を用いた分子ナノカーボンの精密設計・合成を強みとし、ボトムアップ方式による未踏・新奇な分子ナノカーボンを世に送り出し続けている (Segawa et al. *Acc Chem Res.* 2019, Segawa et al. *Science* 2019, Povie et al. *Science* 2017, Segawa et al. *Nat Rev Mat.* 2016.)。また近年、分子ナノカーボンの構成要素である炭素-水素 (C-H) 結合へ位置選択的に官能基を付与することで新たな物性や機能が見出されている (Lin et al. *Angew Chem, Int Ed.* 2018, Nagase et al. *Beilstein J Org Chem.* 2020, Kubota et al. *J Am Chem Soc.* 2015.)。他方、生物学的手法では、常温・常圧の条件下、微生物細胞や精製酵素を反応場である水溶液に懸濁させた系にて溶解性の分子ナノカーボン部分骨格分子の生物変換反応が検討されている。(Liang et al. *Appl Environ Microbiol.* 2019, Tian et al. *Environ Sci Technol Lett.* 2018.)。しかしながら、いずれの手法においても分子の適用範囲は限られ、依然として位置選択的な直接官能基化が可能な汎用的手法の開発が強く求められている。申請者は、適用可能な分子が限定的である問題点は次の2点に起因すると考えている。

- 1) C-H 結合は一般的な有機合成反応に用いられる官能基と比較して不活性である。
- 2) 分子ナノカーボンは $\pi$ 共役系拡張により分子の剛直性が増し、水はおろか有機溶媒への溶解性も低下する。

申請者は、これまでに香気物質の機能性や生体内動態機構の解明、遺伝子組み換え微生物を用いた気相微生物反応プロセスを構築してきた。これらの経験から、常温・常圧、中性 pH の温和な条件にて反応が進行する生物の中でも特異な生態と代謝機構を持つハスモンヨトウ幼虫に着目した。ハスモンヨトウ幼虫は広食性として知られ、解毒分解酵素であるシトクロム P450 やグルタチオン S-転移酵素の保持数がモデル生物であるカイコより約 1.5 倍多い (Cheng et al. *Nat Ecol Evol.* 2017.)。また、発育後期では多種多様な分子に対して低感受性を示す。これらから、位置選択的な直接官能基化が困難な炭化水素を含む植物二次代謝産物や非天然型の分子に対する水酸化や抱合反応が確立している (Miyazawa et al. *J Agric Food Chem.* 2009, 2010, Takahashi et al. *Nat Prod Res.* 2013, Marumoto et al. *J Mol Catal B Enzym.* 2015, Marumoto et al. *J Oleo Sci.* 2018.)。したがって、ハスモンヨトウ幼虫は分子ナノカーボンを位置選択的に直接官能基化する酵素タンパク質を保持する可能性がある。

以上のことから、本研究では、「ハスモンヨトウ幼虫が有する分子ナノカーボンの位置選択的な直接官能基化に関わる因子は何か」を研究の核心をなす学術的な「問い」として設定し、具体的には以下について検討する。

1. 分子ナノカーボンの直接官能基化に関与する酵素遺伝子を探索・同定する。
2. 同定した酵素遺伝子にコードされるタンパク質の機能を調べる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ハスモンヨトウ幼虫が有する分子ナノカーボンの位置選択的な直接官能基化反応に関わる遺伝子を同定し、同遺伝子にコードされるタンパク質の機能を明らかにすることである。モデル反応には、代表的な分子ナノカーボンである [6]CPP の酸化反応を用いる。数

多くの生物の中でも特異な生態と代謝機構を有するハスモンヨトウ幼虫は、分子ナノカーボンの位置選択的な直接官能基化が可能な酵素タンパク質を有すると期待する。本研究により、機能が明らかになったタンパク質や蓄積する知見は新たなバイオプロセス開発を可能にするだけでなく、アミノ酸長や配列を改変した変異体酵素を創出することで更なる活性向上や基質特異性の拡張が見込まれる。これらのことから、新たな方向性として医薬候補誘導体の探索や生産に有利な触媒の創製が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### 1. [6]CPP の酸化反応に関わる酵素遺伝子の同定

生物変換による水酸化反応には特定のシトクロム P450 が発現誘導される (Wang et al. J Insect Physiol. 2015.)。昆虫の P450 遺伝子は 4グループ (CYP2 clan, CYP3 clan, CYP4 clan, Mitochondrial CYP) に分類され、主に異物代謝には CYP3 及び CYP4 clan に属する遺伝子が関与する (Helvig et al. Proc Natl Acad Sci. 2004)。このことから、[6]CPP の生物変換に伴う酸化反応においても特定の P450 遺伝子の発現量増加が予想される。そのため、[6]CPP を直接混入した人工飼料を摂取した発育後期のハスモンヨトウ幼虫から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行う。コントロールには [6]CPP を含有しない人工飼料を摂取したハスモンヨトウ幼虫の RNA を使用する。CYP3 及び CYP4 clan に属する P450 遺伝子 119 種の発現量を比較し、[6]CPP の水酸化に関与する遺伝子を探索する。候補遺伝子は RNAi 法 (Wang et al. J Insect Physiol. 2015) を発育後期のハスモンヨトウ幼虫へ行い、ノックダウン個体を作製し、[6]CPP の生物変換能の欠失を確認することで同定する。うまくいかない場合は、CYP2 clan や Mitochondrial CYP に属する遺伝子の可能性があるため RNA-seq の結果から再度探索する。この研究過程では、ハスモンヨトウ幼虫における [6]CPP の生体内動態機構を詳細に理解したい。

#### 2. 大腸菌異種タンパク質発現系による機能解析

項目1. にて同定した遺伝子は、[6]CPP の生物変換を実施したハスモンヨトウ幼虫から抽出した RNA を逆転写しクローニング後、大腸菌にて発現、精製する。精製した酵素を生体触媒に [6]CPP の生物変換反応を行い、反応性や誘導体の有無を NMR や MALDI-TOF-MS にて評価する。酵素タンパク質の種類によっては大腸菌での発現が困難な場合がある。活性体として発現しなかった場合は、バキュロウイルスを用いた遺伝子導入昆虫細胞発現系を使用する。機能確認できた酵素タンパク質は基質の適用範囲を評価する。まず、分子ドッキングと分子動力学シミュレーションにより得られた結合ポーズから活性部位周辺に結合された分子の結合分布解析を行い [6]CPP との代謝部位を予測する。得られた知見に基づき、多種多様な分子ナノカーボンの生物変換反応を実施する。使用する分子ナノカーボンは名古屋大学 WPI トランスフォーマティブ生命分子研究所が有する化合物ライブラリー (約 80,000 分子) から用いる。この研究過程では、同定した酵素遺伝子にコードされるタンパク質の機能として、水酸化効率や選択性を明らかにする。これら検討を通じて、分子ナノカーボンを位置選択的に直接官能基化が可能な汎用的手法を構築するための基礎的知見を蓄積する。

### 4. 研究成果

#### 1. [6]CPP の酸化反応に関わる酵素遺伝子の同定

ハスモンヨトウ幼虫の[6]CPP に対する摂食阻害活性を評価し、摂食阻害を示さない最大濃度を見出した。続いて、見出した最大濃度の人工飼料を用いた生物変換を実施し、代謝物から有機溶媒により抽出・精製することで[6]CPP 誘導体の生産効率を算出した。また、生物変換に用い

たハスモンヨトウ幼虫の中腸から RNA を抽出し、RNA-seq を実施し、[6]CPP を与えていない個体と比較して特定の遺伝子群が発現量増加したことを確認した。最も発現増加した遺伝子としては、IgA 産生に関わる遺伝子だった。これは、分子ナノカーボンの中和機能の加速が生体異物または毒素としての認識に起因する可能性があることを示唆している。次いで、代謝に関与する遺伝子群の発現増加を確認し、その中でも異物代謝に関わるチトクローム P450 遺伝子の発現量が顕著であった。確認した異物代謝への関与が示唆される 5 種のチトクローム P450 遺伝子を標的にしたノックダウン個体を RNAi 法により作出した。作出した個体を用いた生物変換を実施し、[6]CPP 誘導体の生産量減少を確認した。これらより、[6]CPP の参加反応に関わる酵素遺伝子の同定に成功した。

## 2. 大腸菌異種タンパク質発現系による機能解析

項目 1. にて同定した遺伝子を、ハスモンヨトウ幼虫から抽出した RNA を逆転写し PCR によりクローニングした。クローニングした DNA を大腸菌へ異種発現させたが、形質転換体は得ることができなかった。これは、同定したチトクローム P450 は膜結合タンパク質であること、コドンが大腸菌に適していなかったためだと考えられる。そのため、まずハスモンヨトウ幼虫を生体触媒に用いて基質適用範囲を評価した。評価基質には、[6]CPP のリングサイズが異なる[5], [7]-[12]CPP を選択した。それぞれの気質を用いて生物変換をした結果、いずれの CPP においても反応が進行せず、サイズ選択的な変換反応であることを明らかにした (図)。続いて、当初の計画通り、分子ドッキングと分子動力学シミュレーションを名古屋大学 WPI トランスフォーマティブ生命分子研究所 柳井毅教授、藤本和宏特任准教授らの協力のもと実施し、結合構造や安定性を推定するとともに量子力学計算により反応メカニズムについても明らかにした。

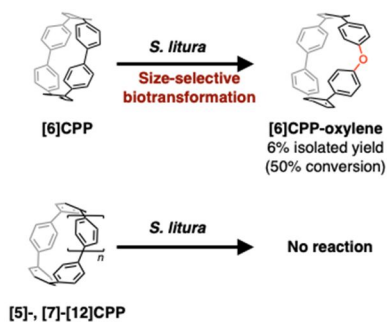


図. CPP のサイズ選択的生物変換反応

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atsushi Usami	4. 巻 22
2. 論文標題 Exploring the Potential Applications of Biocatalysts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Institute for Advanced Research Letter	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野英也・宇佐見享嗣・周戸大季・天池一真・八木亜樹子・伊丹健一郎
2. 発表標題 生物変換による酸素原子含有ナノベルトの合成
3. 学会等名 第32回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤智紀, 河野英也, 宇佐見享嗣, 周戸大季, 八木亜樹子, 伊丹健一郎
2. 発表標題 新奇環状ジアリールエーテルの合成と性質
3. 学会等名 第54回構造有機化学若手の会 夏の学校
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇佐見享嗣
2. 発表標題 有機化学研究室で昆虫を。
3. 学会等名 名大発アカデミックフラッシュ 第25報（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇佐見享嗣
2. 発表標題 農業害虫を益虫に。
3. 学会等名 九州・沖縄昆虫研究会2023年度秋の例会・第100回九州昆虫セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇佐見享嗣
2. 発表標題 有機化学研究室で生物を扱う
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 創立100周年記念大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宇佐見 享嗣、河野 英也、Austen Vic、周戸 大季、加藤 智紀、山田 早人、八木 亜樹子、天池 一真、Phung Quan、藤本 和宏、柳井 毅、伊丹 健一郎
2. 発表標題 ハスモンヨトウ幼虫を生体触媒に用いたナノカーボン材料の機能化
3. 学会等名 日本昆虫学会第84回大会・第68回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------