

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14385

研究課題名(和文)アルドキシムをハブとした含窒素化合物生合成酵素群の機能解析と分子進化の解明

研究課題名(英文)Functional characterization and molecular evolution of aldoxime-derived N-containing compounds biosynthetic enzymes

研究代表者

山口 拓也 (YAMAGUCHI, Takuya)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：00748527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ビワの花香成分である(2-ニトロエチル)ベンゼンの生合成経路を酵素と遺伝子レベルで解明した。本経路では、フェニルアラニンがCYP79D80によってフェニルアセトアルドキシムに、続いてフェニルアセトアルドキシムがCYP94A90によって(2-ニトロエチル)ベンゼンに変換される。本経路から見出したCYP94A90はアルドキシムをニトロ基に変換する新規反応を触媒する酵素であり、植物初のニトロ基合成酵素である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニトロ基(R-NO<sub>2</sub>)は医薬品など、人工の有機化合物には頻繁に含まれるが、天然物に含まれることは非常に少なく、植物・動物・微生物をあわせても200化合物ほどしか見出されていない。そのため、ニトロ基合成酵素は植物から見いだされていなかった。本研究では植物初のニトロ基合成酵素を見出した。本成果は植物の2次代謝産物生合成経路の多様化機構の解明や、酵素を利用したニトロ化合物の生産のための有意義な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Biosynthetic pathway of (2-nitroethyl)benzene, a major flower scent of loquat, was elucidated. Two cytochrome P450s, CYP79D80 and CYP94A90, operate in concert to biosynthesize (2-nitroethyl)benzene from phenylalanine via phenylacetaldoxime. CYP94A90 is the first nitro group forming enzyme from plants.

研究分野：生化学

キーワード：シトクロムP450 ニトロ化合物 ビワ 花香成分

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物が生合成する二次代謝産物は20万種以上にもおよび、植物の生存には必須ではないが外敵に対する化学防御など多様な機能を有している。また、人類にとっては医薬品などの資材となる地球上最大の化合物ライブラリーである。しかし、ニトロ基 (R-NO<sub>2</sub>) は医薬品など、人工の有機化合物には頻りに含まれるが、天然物に含まれることは非常に少なく、植物・動物・微生物をあわせても200化合物ほどしか見出されていない。そのため、ニトロ基合成酵素は微生物からの報告はあるものの、植物からは見出されていなかった。

ビワ(バラ科)の花は、含窒素化合物である青酸配糖体(昆虫食害に対する化学防御物質)を蓄積しており、花香成分として、(2-ニトロエチル)ベンゼンやフェニルアセトニトリルなどを放出す。これらは共通してL-フェニルアラニンからフェニルアセトアルドキシムを介して生合成される。青酸配糖体はバラ科植物に広く分布しており、フェニルアセトニトリルもリンゴなどの一部のバラ科植物に分布しているが、(2-ニトロエチル)ベンゼンはバラ科植物ではビワ以外からは見出されていない。以上のことから、ビワは青酸配糖体の生合成経路を基盤に、フェニルアセトアルドキシムをハブとして、フェニルアセトニトリルと(2-ニトロエチル)ベンゼンの生合成経路を獲得したと推察された。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ビワの(2-ニトロエチル)ベンゼンの生合成経路を酵素と遺伝子レベルで詳細に解明することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) ビワの花で高発現するシトクロム P450 の選抜と cDNA クローニング

ビワの花と葉から total RNA を抽出し、illumina Hiseq 2000 を用いて RNA-seq 解析を行った。edgeR を用いて発現差異解析を行い、続いてビワの花で高発現するシトクロム P450 を選抜した。ビワの花から total RNA を抽出、cDNA を合成し、5' - および、3' -Rapid Amplification of cDNA ends 法により、選抜されたシトクロム P450 をコードする cDNA の配列を決定した。続いてシトクロム P450 をコードする cDNA のタンパク質コード領域をクローニングした。

#### (2) (2-ニトロエチル)ベンゼン生合成に関与するシトクロム P450 の同定

クローニングしたシトクロム P450 を出芽酵母で発現し、フェニルアラニンまたはフェニルアセトアルドキシムを基質とした休止菌体反応を行い、生成物を LC-MS または GC-MS を用いて検出した。出芽酵母はシロイヌナズナ由来シトクロム P450 レダクターゼ遺伝子がゲノムに挿入され、植物 P450 の機能解析にされた WAT11 株を用いた。発現プラスミドは pYeDP60 を用いた。また、アグロインフィルトレーション法によって(2-ニトロエチル)ベンゼン生合成酵素遺伝子をタバコで一過的に発現し、葉から放出される(2-ニトロエチル)ベンゼンを GC-MS を用いて検出・定量した。

#### (3) (2-ニトロエチル)ベンゼン生合成酵素遺伝子の発現解析

ビワの葉と花の各開花ステージにおける(2-ニトロエチル)ベンゼン生合成酵素遺伝子の発現を半定量 PCR により調査した。

#### (4) ビワの花の(2-ニトロエチル)ベンゼン放出量の定量

ビワの各開花ステージにおける(2-ニトロエチル)ベンゼンの放出量を GC-MS を用いて定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) (2-ニトロエチル)ベンゼン生合成酵素遺伝子の同定

RNA-seq 解析から選抜したシトクロム P450 を出芽酵母で発現し、フェニルアラニンまたはフェニルアセトアルドキシムを基質とした休止菌体反応を行った。その結果、CYP79D80 がフェニルアラニンをフェニルアセトアルドキシムに、CYP94A90 がフェニルアセトアルドキシムを(2-ニトロエチル)ベンゼンに変換した。CYP79D80 と CYP94A90 をタバコで一過的に共発現すると、(2-ニトロエチル)ベンゼンの放出が認められた。しかし、CYP94A90 単独では(2-ニトロエチル)ベンゼンの放出は認められなかった。以上のことから CYP94A90 は植物から初めて見いだされた初めてのニトロ基合成酵素であり、アルドキシムをニトロ基に変換する新規反応を触媒する酵素であった。CYP94A はこれまで脂肪酸水酸化酵素として知られており、双子葉植物に広く保存されている。これらもニトロ基合成活性を有していることが示唆される。

#### (2) (2-ニトロエチル)ベンゼン放出と生合成遺伝子発現パターン

CYP79D80 と CYP94A90 の発現は満開の花で認められたが、つぼみ、葉では認められなかった。同様に、(2-ニトロエチル)ベンゼンは満開の花から放出されたが、つぼみからの放出は認められなかった。このように、CYP79D80 と CYP94A90 の発現と、(2-ニトロエチル)ベンゼンの放出に相関が認められた。CYP79D80 と CYP94A90 が(2-ニトロエチル)ベンゼンの生合成遺伝子であることが明確になった。以上のことから、CYP79D80 と CYP94A90 が協調的に発現し、機能することで

フェニルアラニンから(2-ニトロエチル)ベンゼンが生合成されると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口拓也, 桑原保正, 浅野泰久, 春原由香里, 松本宏
2. 発表標題 ピワの(2-ニトロエチル)ベンゼン生合成経路の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口拓也, 桑原保正, 浅野泰久, 春原由香里, 松本宏
2. 発表標題 ピワの(2-ニトロエチル)ベンゼン生合成酵素の同定と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口拓也, 松井祐美, 松本宏, 桑原保正, 浅野泰久
2. 発表標題 ピワの花の含窒素香氣成分の生合成に関するシトクロムP450の探索と性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----