

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05861

研究課題名(和文)植物の新規ニトロ基合成酵素の分布と基質認識に関する構造の解明

研究課題名(英文) Distribution of novel nitro group-forming enzymes in plants and structures involved in substrate recognition

研究代表者

山口 拓也 (Takuya, Yamaguchi)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：00748527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物は多種多様な植物特化代謝物を生合成するが、ニトロ基を含む化合物は極めて少ない。我々が植物(ビワ)から見出した新規ニトロ基合成酵素CYP94Aは植物に広く分布し、脂肪酸水酸化活性も示すことが示唆された。そこで本研究では、様々な植物由来CYP94Aの機能解析を行った。これによって、ニトロ基合成反応を触媒する“promiscuous”な脂肪酸水酸化酵素CYP94Aが双子葉植物に広く保存されていること、CYP94Aはアルドキシムよりも脂肪酸に対して高い親和性を示すことを明らかにした。よって、アルドキシムが高濃度で蓄積する特殊な条件において、CYP94Aはニトロ基合成反応を触媒すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少な天然物の生合成酵素は、進化の過程で特定の反応を触媒するように最適化され、特定の種だけが有している場合が多い。しかし、本研究では植物に広く存在している酵素が特定の条件で本来の機能とは異なる酵素活性を発揮し、極めて珍しい化合物の生合成に関わることを示唆した。植物特化代謝物の多様化機構の新たな側面を提示した点で学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Plants biosynthesize numerous numbers of plant specialized metabolites, but few contain nitro groups. We have discovered a novel nitro group forming enzyme CYP94A90 from loquat. CYP94A family members are widely distributed in dicot plants and some of them have been characterized as fatty acid hydroxylases. In this study we evaluated fatty acid hydroxylase activity and nitro group-forming activity of CYP94A from loquat and other plants. Our results demonstrated that CYP94As are “promiscuous” fatty acid hydroxylase, catalyzing the formation of nitro groups from aldoximes, and are widely distributed in dicot plants. In addition, CYP94A exhibited a higher affinity for fatty acids than aldoxime. Thus, CYP94A was thought to catalyze nitro group synthesis reactions under special conditions in which aldoxime accumulates at high concentrations.

研究分野：生化学

キーワード：ビワ ニトロ基合成酵素 シトクロムP450 脂肪酸水酸化酵素 CYP94A 植物特化代謝物

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-NO₂) は医薬品など、人工の有機化合物には頻りに含まれるが、ニトロ基を有する天然物は非常に少なく、植物・動物・微生物を併せても、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) の花は主要な香気成分としてニトロ化合物である (2-ニトロエチル)ベンゼンを放出する。本化合物は抗真菌作用があることから病原菌に対する化学防御物質と考えられる。応募者はビワの(2-ニトロエチル)ベンゼン生合成経路を酵素と遺伝子レベルで研究した結果、2 つの新規シトクロム P450 を見出した。すなわち、CYP79D80 が L-フェニルアラニン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)ベンゼンに変換する (図 1)。既知の CYP79 はアミノ酸をアルドキシムに変換することが知られており、CYP79D80 の反応と一致していた。一方、CYP94A は植物のクチクラの構成成分であるクチンの生合成に関与する脂肪酸 ω 水酸化酵素として知られていた。また、ニトロ化合物の報告例の無い植物も CYP94A90 と相同性の高い (最大で 96%) CYP94A を有しており、ほとんどの双子葉植物に保存されている。よって、ビワの CYP94A90 だけがニトロ基合成反応を獲得したというよりは、CYP94A90 以外の CYP94A も脂肪酸 ω 水酸化活性に加えて、ニトロ基合成活性を隠し持っていると考えた。しかし、CYP94A90 以外のニトロ基合成活性は検討されておらず、CYP94A の基質認識に関与する構造も明らかにされていない。

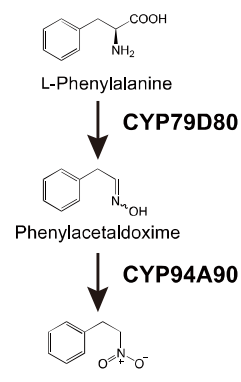


図 1. ビワの(2-ニトロエチル)ベンゼン生合成経路.

2. 研究の目的

本研究の目的は、双子葉植物に広く保存されている脂肪酸 ω 水酸化酵素 (CYP94A) がニトロ基合成反応も有しているかを明らかにし、さらに、CYP94A の基質認識に関する構造を解明することである。

3. 研究の方法

(1) CYP94A90 の脂肪酸 ω 水酸化活性の検出

ビワ由来 CYP94A90 が脂肪酸 ω 水酸化活性を有しているか明らかにするため、植物由来シトクロム P450 の発現に最適化された出芽酵母 WAT11 株 (シトクロム P450 のレドックスパートナーであるシトクロム P450 レダクターゼをコードする遺伝子が染色体上に導入されている)において CYP94A90 を発現した。組換え酵母を破碎後、シトクロム P450 が局在するミクロソーム画分を調製した。ミクロソームと炭素数 10~18 の飽和脂肪酸を NADPH の存在下で反応し、反応生成物を超高速液体クロマトグラフィー質量分析計またはガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて検出した。

(2) 様々な植物由来 CYP94A のクローニングとニトロ基合成活性の検出

タバコ (ナス科) ヤハズエンドウ (マメ科) ウメ (バラ科) から CYP94A をクローニングした。各 CYP94A は上述の方法によって酵母で発現し、ミクロソームを調製した。ミクロソームとフェニルアセトアルドキシムを NADPH の存在下で反応し、反応生成物はガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて検出した。

(3) 大腸菌におけるウメ由来 CYP94A の大量生産と、基質親和性

予備検討の結果、ウメ由来 CYP94A の大腸菌における発現が良好であった。そこでウメ由来 CYP94A をヒスタグ融合タンパク質として大腸菌で発現し、ニックルアフィニティークロマトグラフィーにより粗精製した。粗精製酵素とフェニルアセトアルドキシムまたは脂肪酸の基質結合スペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1) CYP94A90 の脂肪酸 ω 水酸化活性

CYP94A90 と炭素数 10~18 の飽和脂肪酸を NADPH の存在下で反応し、反応生成物をメチルエステル化、さらに TMS 誘導体化し、ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて検出した。その結果、CYP94A90 は C12、C14、C16 の脂肪酸の ω 位を水酸化することが明らかになった (図 2)。なお、CYP94A90 はミリスチン酸に対して最も高い比活性を示した。以上のことから、CYP94A90 はニトロ基合成反応だけでなく、脂肪酸 ω 水酸化反応を触媒する promiscuous な酵素

であることが明らかになった。

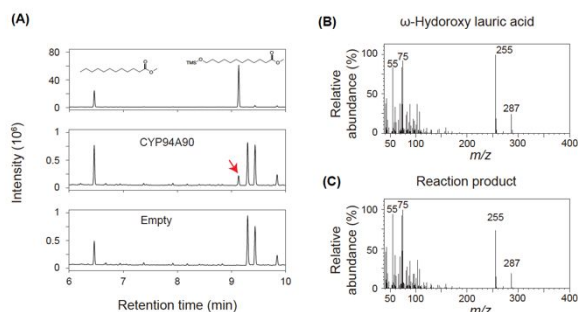


図 2. ビワ由来 CYP94A90 による脂肪酸水酸化反応. (A) GC-MS による反応生成物の検出。生成物を赤の矢印で示した。(B) ω ヒドロキシラウリン酸のマススペクトル。(C) 反応生成物のマススペクトル。

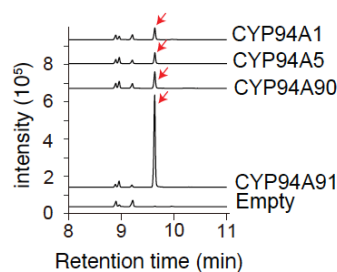


図 3. 様々な植物由来 CYP94A によるニトロ基合成反応. CYP94A とフェニルアセトアルドキシムを反応し、GC-MS を用いて反応生成物を検出した。反応生成物を赤の矢印で示した。

(2) 様々な植物由来 CYP94A のクローニングとニトロ基合成活性の検出

続いて、タバコ由来 CYP94A5、ヤハズエンドウ由来 CYP94A1、ウメ由来 CYP94A91 がニトロ基合成反応を触媒するか調査した。その結果、いずれの CYP94A もフェニルアセトアルドキシムから(2-ニトロエチル)ベンゼンを合成した (図 3)。よってビワ由来 CYP94A90 だけでなく、多くの双子葉植物由来 CYP94A がニトロ基合成反応を触媒することが示唆された。

(3) 大腸菌におけるウメ由来 CYP94A の大量生産と、機能解析

CYP94A のニトロ基合成反応と脂肪酸水酸化活性を比較するために、CYP94A の異種発現系を検討した。その結果、ウメ由来 CYP94A91 が大腸菌において良好に生産できることを明らかにした。そこでウメ由来 CYP94A91 をモデル酵素として機能解析を行った。ウメ由来 CYP94A をヒスタグ融合タンパク質として大腸菌で生産し、精製した。脂肪酸(ミリスチン酸)とフェニルアセトアルドキシムの基質結合差スペクトルを測定した結果、ミリスチン酸は Type I、フェニルアセトアルドキシムは Type II のスペクトル変化を示した。すなわち、アルドキシムの窒素原子がヘム鉄に配位することが示唆された。また、基質濃度を変化し、結合親和性を評価したところ、ミリスチン酸に対する (spectral dissociation constants) K_s は $40 \mu\text{M}$ 、フェニルアセトアルドキシムに対しては 4.6 mM と推定された。このようにウメ由来 CYP94A91 のミリスチン酸とフェニルアセトアルドキシムに対する結合親和性は大きく異なることが明らかになった。

以上のことから、ニトロ基合成反応を触媒する“promiscuous”な脂肪酸 ω 水酸化酵素 CYP94A が双子葉植物に広く保存されていることを明らかにした。また、ウメ由来 CYP94A91 の基質親和性を評価したところ、脂肪酸に対する高い親和性を示した。よって、ビワの花のようにアルドキシムが高濃度で蓄積する特殊な条件において、CYP94A はニトロ化合物の生合成に関与すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yamaguchi Takuya, Nomura Takuya, Asano Yasuhisa	4. 巻 257
2. 論文標題 Identification and characterization of cytochrome P450 CYP77A59 of loquat (<i>Rhaphiolepis bibas</i>) responsible for biosynthesis of phenylacetonitrile, a floral nitrile compound	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-023-04151-x	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamaguchi Takuya, Matsui Yumi, Kitaoka Naoki, Kuwahara Yasumasa, Asano Yasuhisa, Matsuura Hideyuki, Sunohara Yukari, Matsumoto Hiroshi	4. 巻 3
2. 論文標題 A promiscuous fatty acid hydroxylase CYP94A90 is likely involved in biosynthesis of a floral nitro compound in loquat (<i>Eriobotrya japonica</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1157-1170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17441	査読の有無 有
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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口拓也
2. 発表標題 動植物のアルドキシムを介したニトリルやニトロ化合物の代謝に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村拓矢, 山口拓也, 浅野泰久
2. 発表標題 ビワの花におけるフェニルアセトニトリル生合成に関わるCYP77Aの同定と性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村拓矢, 山口拓也, 浅野泰久
2. 発表標題 ピワの花香成分フェニルアセトニトリルの生合成に関わるCYP77Aの同定と性状解析
3. 学会等名 令和4年度内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口拓也, 浅野泰久
2. 発表標題 ピワの花香成分(2-ニトロエチル)ベンゼンの生合成に関わるCYP94A90の同定と性状解析
3. 学会等名 令和4年度内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口拓也
2. 発表標題 ピワのニトロ化合物生合成に関わるpromiscuousな脂肪酸水酸化酵素CYP94A90の発見
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第194回 例会 (招待講演)
4. 発表年 2022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
---------	---------