



富山県立大学工学部生物工学科 山口拓也

## 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

## はじめに

微生物のアルドキシム-ニトリル経路上から、アクリルアミドの工業生産に利用されているニトリルヒドラーゼなどの重要な有用酵素群が見出されてきた。植物と節足動物であるヤスデも同様にアルドキシムやニトリルの代謝経路を有すると想定されていたが、酵素レベルでの研究は進んでいなかった。そこで、植物および節足動物の広範な非モデル生物を分け隔てなく研究対象として、それら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経路を酵素と遺伝子レベルで詳細に解明し、アルドキシムを介した代謝経路の意義を明らかにするとともに、新規ニトロ基合成酵素など多数の新規酵素を見出した(図1)。さらに微生物、植物およびヤスデ由来酵素を用いる物質生産法の開発を進めてきた。以下に、成果の概要を紹介する。

## 1. 代謝経路の意義と新規酵素の発見

## 1-1. 植物

①ウメ (*Prunus mume*) は、種子に青酸配糖体であるアミグダリンを蓄積している。昆虫食害などの組織破壊によって、アミグダリンは (*R*)-マンデロニトリルに変換され、続いてヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) によって、好気呼吸を阻害する猛毒、シアン化水素が生成する。アミグダリンの生合成酵素は未解明であったが、生合成酵素として2つのシトクロム P450 (P450) と、UDP-グルコシルトランスフェラーゼ (UGT) を見出した。すなわち、CYP79D16 が  $\alpha$ -フェニルアラニンからフェニルアセトアルドキシムに、CYP71AN24 がアルドキシムを (*R*)-マンデロニトリルに変換する<sup>1)</sup>。続いて UGT85A47 がプルナシンを合成する<sup>2)</sup>。このように植物は微生物とは異なりアミノ酸からアルドキシムを合成することを示した。②オオイトドリ (*Fallopia sachalinensis*) は昆虫食害誘導的にフェニルアセトニトリルを生合成し、放出する。フェニルアセトニトリルはウメと同様に  $\alpha$ -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ことを、重水素標識体を用いた

取り込み実験によって明らかにした。さらにフェニルアセトアルドキシムをフェニルアセトニトリルに変換する CYP71AT96 を見出した<sup>3)</sup>。CYP71AT96 は出芽酵母と大腸菌で発現しない問題に直面したが、昆虫培養細胞を用いることで酵素活性の検出に成功した。本酵素がウメ由来 CYP71AN24 と決定的に異なる点は、(*R*)-マンデロニトリルを生成しない点である。③天然物としては極めて珍しいニトロ化合物、(2-ニトロエチル)ベンゼンを花香成分として放出するビワから、出芽酵母発現系とタバコにおける一過性発現系を用いてフェニルアセトアルドキシム合成酵素 CYP79D80 と、アルドキシムからニトロ基を合成する新規反応を触媒する CYP94A90 を見出した<sup>4)</sup>。CYP94A サブファミリーに属する P450 は双子葉植物に広く分布し、脂肪酸  $\omega$  水酸化酵素として知られていた。CYP94A90 も脂肪酸  $\omega$  水酸化活性を示し、さらに他の植物由来 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ことから、多くの植物がニトロ基合成酵素を隠し持っているという予想外の結論に至った。

植物は、微生物とは異なり、 $\alpha$ -フェニルアラニンからフェニルアセトアルドキシムを合成することを明確にした。その後、アルドキシム代謝酵素の多様な反応によってニトリル、ヒドロキシニトリル、ニトロ化合物へと変換されることを示した。いずれも化学防御システムとして機能していると考えられる。

## 1-2. 動物 (ヤスデ)

オビヤスデ目のヤスデは体節の側面にある側庇の内側に貯蔵室と反応室からなる防御腺を有している(図2)。貯蔵室には (*R*)-マンデロニトリルを、反応室には (*R*)-マンデロニトリルをベンズアルデヒドとシアン化水素に分解する HNL を貯蔵している。刺激応答的に (*R*)-マンデロニトリルと HNL を混合し、ベンズアルデヒドとシアン化水素を臭孔から体外へ放出する。このようなシアン化水素発生機構は50年以上前に提唱されていたが、ヤスデ HNL の酵素分子化学的諸性質は未解明であった。ヤスデが酵素資源として着目された例はなく、ゲノム情報もなく、飼育法も確立されていなかった。さらに個体数が少ない種が多く、実験サンプルを安定に確保することが課題であった。そこで、毎秋一部の地域で大発生する外来種のヤンバ

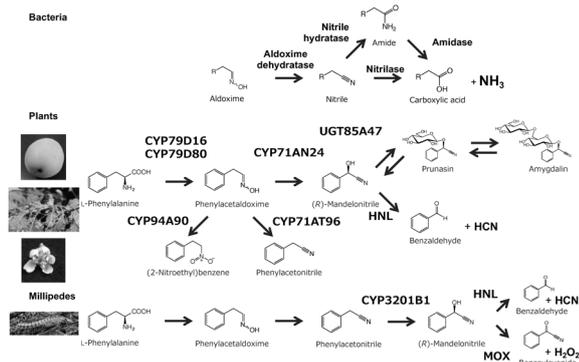


図1. 微生物、植物およびヤスデのアルドキシムを介したニトリルやニトロ化合物の代謝経路

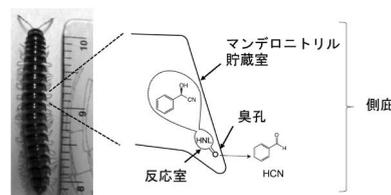


図2. ヤスデのシアン化水素発生機構

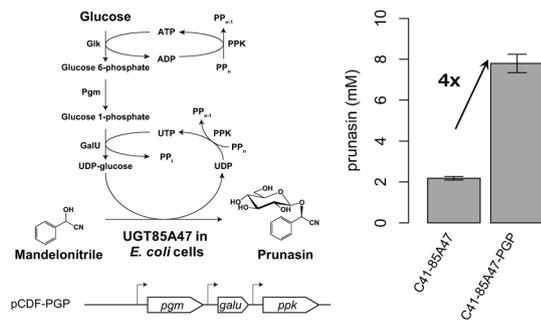


図3. UDP-グルコース供給系とカップリングしたプルナシン生産

ルトサカヤステ (*Chamberlinius hualienensis*) を研究の主材料とした。また、タンバアカヤステ (*Nedyopus tambanus tambanus*) が富山県立大学内で毎春発生することを見出し、HNLを精製することに成功した<sup>5)</sup>。さらに広範囲(富山県、岐阜県、静岡県、熊本県、鹿児島県)に及ぶ野生のヤステの探索を行い、計13種のHNL遺伝子を単離し、機能解析を行った。いずれも既知の植物由来HNLだけでなく、他のタンパク質と相同性が認められない構造をしており、非常に高活性かつ広い温度とpHにおいて安定なHNLがシアン発生性のヤステに保存されていることを明らかにした<sup>5,6)</sup>。また、ヤステ特有の化学防御機構として、マンデロニトリル酸化酵素を利用し、過酸化水素を放出するヤステ独自の経路を見出した<sup>7,8)</sup>。さらに、ヤンバルトサカヤステから50種のP450を獲得、機能解析を行うことで、(R)-マンデロニトリルの生合成最終ステップを触媒するCYP3201B1を見出した<sup>9)</sup>。シアン発生に関わる酵素群は植物とヤステにおいて相同性が全くないことから、ヤステと植物は進化の過程で独自にシアン化水素発生に関わる酵素遺伝子群を獲得し、収斂進化によってシアン化水素発生経路を獲得したと考えられる。

## 2. 動植物由来酵素の利用

### 2.1. プルナシンの合成

ウメの青酸配糖体であるプルナシンは、抗炎症活性などの有用な生理活性が報告されているが、その有効な合成法は開発されていなかった。そこで、ウメ由来UGT85A47は(R)-マンデロニトリル選択的に配糖体化することから、UGT85A47を大腸菌で発現した休止菌体を用いて(R,S)-マンデロニトリルからプルナシンの合成法を初めて開発した。グルコースドナーであるUDP-グルコースを大腸菌内で効率的に供給するために、大腸菌由来UDP-グルコース生合成酵素遺伝子群を過剰発現した。ATPおよびUTP再生系酵素を含めて合計4種類の微生物およびウメ由来の酵素遺伝子を大腸菌において発現させ、プルナシン生産量は約4倍増加し(図3)、2.4 g/L(反応液)まで向上させることに成功した<sup>2)</sup>。このように、植物と微生物由来酵素を組み合わせることで、より優れた物質生産系を構築できることを示した。

### 2.2. ヤステ由来HNLの利用

HNLは生体内ではシアンを発生する役割を担っているが、その逆反応を利用して医薬品などの重要な合成中間体である光学活性ヒドロキシニトリルを合成することができる。これまで植物由来HNLが中心に利用されてきたが、ヤステ由来HNLを用いた光学活性ヒドロキシニトリルの合成法を開発した。ヤステ由来HNLは昆虫培養細胞では発現できるが、一般的な異種

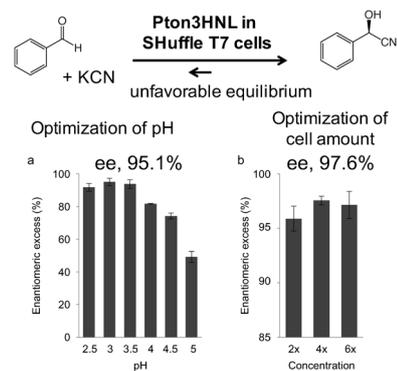


図4. ヤステ由来HNLを利用したマンデロニトリルの不斉合成

発現宿主である大腸菌BL21 (DE3) で発現できない。そこで上記の探索により発見した複数のヤステ由来HNLの大腸菌発現と最適な菌株を検討し、6種のヤステ由来HNLを大腸菌SHuffle T7で発現することに成功した。これらの比活性は2000–3000 U/mgと既知のHNLをはるかに上回る高い比活性と、優れた立体選択性を示した。大腸菌で最も生産量の高いミドリバヤステ (*Parafontaria tonominea*) 由来Pton3HNLを発現した休止菌体を用いて、(R)-マンデロニトリルを鏡像体過剰率 (ee) 97.6%で生産することに成功した(図4)<sup>5)</sup>。

### おわりに

本研究では様々な異種発現法(大腸菌、酵母、昆虫培養細胞、タバコ)や遺伝子組換え技術を駆使し、全て非モデル生物である植物とヤステから10種の新規酵素を見出し、微生物、植物、ヤステ由来酵素を組合せた独自の物質生産法を開発した。これらのことから、有用酵素資源として着目されてこなかった植物やヤステなどの非モデル生物が新規酵素探索のフロンティアかつ、有望な酵素資源とであることを示した。今後もさらなる新規酵素の探索と、酵素の利用法の開発に取り組んでいきたい。

### (引用文献)

- 1) Yamaguchi T et al., *Plant Mol Biol*, Vol. 86, p. 215–223, (2014)
- 2) Yamaguchi T, Asano Y, *Biosci, Biotechnol, Biochem*, Vol. 82, p. 2021–2029 (2018)
- 3) Yamaguchi T et al., *Plant Mol Biol*, Vol. 91, p. 229–239, (2016)
- 4) Yamaguchi T et al., *New Phytol*, Vol. 231, p. 1157–1170, (2021)
- 5) Yamaguchi T et al., *Sci Rep*, Vol. 8, p. 3051, (2018)
- 6) Dadashipour M et al., *PNAS*, Vol. 112, p. 10605–10610, (2015)
- 7) Ishida Y et al., *Sci Rep*, Vol. 6, p. 26998, (2016)
- 8) Kuwahara et al., *Sci Nat*, Vol. 104, p. 19, (2017)
- 9) Yamaguchi T et al., *FEBS Open Bio*, Vol. 7, p. 335–347, (2017)

謝辞 本研究は富山県立大学ERATO浅野酵素活性分子プロジェクト、同大学工学部生物工学科および筑波大学生命環境系で行われたものです。多大なご指導、ご鞭撻を賜り、さらに本奨励賞にご推薦くださいました浅野泰久先生(富山県立大学教授)に衷心より御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたって、日頃より暖かいお言葉と多くのご助言をいただいた桑原保正先生(京都大学名誉教授)、松本宏先生(筑波大学名誉教授)に厚く御礼申し上げます。本研究の発展に多大なるご支援とご指導を賜りました共同研究者の皆様へ感謝申し上げます。また、本研究の遂行を支えていただきました研究室のスタッフ、および共に研究を行った学生の皆様へ感謝いたします。