

氏名	石川 恵里加		
学位(専攻分野の名称)	博士(農学)		
学位記番号	甲 第905号		
学位授与の日付	令和6年3月20日		
学位論文題目	オオムギ病害抵抗性化合物グラミンの新規生合成酵素の同定と機能解析		
論文審査委員	主査 教授・博士(農学)	松島 芳隆	
	教 授・博士(農学)	樋口 恭子	
	教 授・博士(農学)	横田 健治	
	教 授・博士(農学)	須 恵 雅 之	

## 論文内容の要旨

### 背景・目的

植物は非常に多様な構造と生物活性を持つ二次代謝産物を生産・蓄積している。人類はこれまでに、植物二次代謝産物を医薬品や農薬、またはそれらの原料などとして利用してきているが、植物自身への機能としては、病害抵抗への寄与があげられる。このような二次代謝化合物の機能(生物活性)の多様性は、化合物構造の多様性、ひいては生合成経路の多様性に由来する。そのため、植物間のゲノム情報比較などを通じて二次代謝の進化を明らかにする研究も行われているが、そこでは二次代謝化合物の基本骨格形成に関わる生合成経路の情報が必要である。しかし、多様な骨格構造が存在するために、どのような反応を経て生合成されるのか未解明な二次代謝産物も残されている。

オオムギ (*Hordeum vulgare*) の中には、トリプトファン(Trp)由来の二次代謝産物であるグラミンを病害抵抗性化合物として蓄積するものがある。グラミンの生合成は、Trp の側鎖から炭素が 2 個減少する反応を経て、グラミンの骨格となる 3-アミノメチルインドール(AMI)が形成され、その後 2 段階の N-メチル化を経てグラミンとなると考えられている。グラミン生合成における N-メチル化を触媒する酵素(HvNMT)は既に同定されているが、グラミンの骨格形成の鍵となる Trp-AMI 間の側鎖短縮反応の機構や触媒する酵素遺伝子は不明である。そこで、本研究では、側鎖短縮反応を触媒する新規酵素遺伝子の同定と新規酵素の機能の解明を目指した。

### 1. オオムギにおけるグラミンの分布

オオムギでは、栽培種によりグラミンの生産性に差異があることが知られている。そのため、まず、研究試料として使用するためのオオムギ品種や部位を決定するために、様々なオオムギ品種(11 種)を 72 時間栽培し、葉身、子葉鞘、根、種子に分けて、Trp とグラミン、

AMI の蓄積量を LC-MS で分析した。Trp は全ての品種の全ての部位で検出された一方で、グラミンは六条オオムギのファイバースノウとシュンライ、野生オオムギ(*H. vulgare* ssp. *spontaneum*) の葉身で検出され(~4.21 nmol/mg FW)、子葉鞘と根、種子では検出されなかった。以降の実験では、種子の入手しやすさや発芽率を考慮してのファイバースノウ葉身をグラミン生産サンプルとして主に利用した。

## 2. 同位体標識 Trp を用いた側鎖短縮反応の解析

Trp からグラミンへの代謝過程で、Trp 中のどの原子が保持されるかを明らかにするために、安定同位体  $^{13}\text{C}$  や  $^{15}\text{N}$  で標識した Trp を用いた *in vivo* トレーサー試験を行った。まず、[indole-2- $^{13}\text{C}$ ]-, [ $\beta$ - $^{13}\text{C}$ ]-, [ $\alpha$ - $^{13}\text{C}$ ]-, [amino- $^{15}\text{N}$ ]-Trp (1 mM)を含む水をペーパータオルに添加し、そこにオオムギ(品種：ファイバースノウ)を播種して 72 時間後に葉身に含まれる代謝物をメタノールで抽出した。抽出液を UPLC-MS で分析することで、各化合物同位体置換体の存在比 (M+1/M) を測定した。

[indole-2- $^{13}\text{C}$ ]-, [ $\beta$ - $^{13}\text{C}$ ]-Trp 投与サンプルのグラミンについては、control の M+1/M (=12.1%)に対して約 18%と有意に上昇した一方で、[ $\alpha$ - $^{13}\text{C}$ ]-Trp では変化が見られなかったことから、Trp のインドール環、 $\beta$ 炭素はグラミンに引き継がれ、 $\alpha$ 炭素は引き継がれないことが明らかとなった。また、[amino- $^{15}\text{N}$ ]-Trp を用いた場合でもグラミンの M+1/M 値は有意に増加し、Trp のアミノ基がそのままグラミンに保持されたことが示唆された。アミノ基窒素原子の取り込みをより明確に確認するために、Trp のインドール環とアミノ基両方の窒素原子を  $^{15}\text{N}$  で標識したものをを用いて同様に実験を行った。その結果、control では存在しない M+2 が新たに検出されたことから、Trp の 2 つの窒素原子がともにグラミンに引き継がれたことが示唆された。

これらの結果から、Trp 側鎖の $\beta$ 炭素とアミノ基窒素がグラミンに保持される一方で、両原子に挟まれている $\alpha$ 炭素は除去されていることが示され、グラミン生合成における側鎖短縮反応は、 $\text{C}_2$  除去を伴い  $\text{C}_\beta$ -N 結合を形成する分子内転位により進行する可能性が示された。

## 3. グラミン生合成に関与する遺伝子の探索

次に、Trp 側鎖短縮に関与する酵素遺伝子を同定するために、グラミン生産能を指標として次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を実施した。まず、グラミン生産能に差がある六条オオムギのファイバースノウ(グラミン生産品種)と Morex(グラミン非生産品種)の葉身の全 RNA から RNA ライブラリーを作製した。Illumina HiSeq 2500 による解析から得られたリードを *de novo* アセンブルすることで、26,355 個の CDS 配列を含む発現遺伝子カタログを作製した。つづいて、グラミン生産サンプルとしてファイバースノウ葉身(FS-L)と野生

オオムギ葉身(SP-L), グラミン非生産サンプルとしてファイバースノウ子葉鞘(FS-C)と Morex 葉身(MO-L)の全 RNA から RNA ライブラリーを作製した。NextSeq550 を用いた 75 bp シングルリードのデータを発現遺伝子カタログにマッピングして, 発現変動遺伝子 (DEG)候補を選抜したところ, グラミン生産群で 10 倍以上多く発現していた DEG 数は, 部位間の比較として FS-L vs FS-C では 1432, 品種間の比較として FS-L vs MO-L では 583, SP-L vs MO-L では 380 だった。これらの 3 つの比較群で共通する DEG 数は 35 であり, その中には既知のグラミン生合成遺伝子である *HvNMT* が含まれていた。また, 35 の DEG リストの最上位にある Trinity\_20495 は, 配列の類似性からシトクロム P450(CYP)をコードすることが推定された。CYP は二次代謝において基質のヒドロキシ化などの酸素原子添加反応だけでなく, 脱炭酸反応や転位反応などの様々な反応を触媒することが知られている。Trinity\_20495 について CYP 命名委員会に系統名を問い合わせたところ, CYP76M57 (機能については報告なし) と同一であることが判明したので, 本研究では本遺伝子を *CYP76M57* とし, その機能を解析することにした。

#### 4. CYP76M57 の機能評価

*CYP76M57* と *HvNMT* をシロイヌナズナおよびイネに導入した形質転換植物を作出し, その代謝物を解析したところ, AMI と *N*-メチル AMI, グラミンの蓄積が新たに検出されたことから, *CYP76M57* が AMI の生合成に重要な役割を果たしているということが示唆された (2022 金井修論)。そこで, *CYP76M57* の機能をより直接的に評価するため, *Pichia pastoris* で異種発現させたタンパク質を用いて酵素活性を調べた。このとき CYP に電子を供給するためのシロイヌナズナ由来 NADPH-CYP 還元酵素 *ATR1* を *CYP76M57* と共発現させた。タンパク質発現誘導後, 得られたマイクロソーム画分を L-Trp を基質として NADPH 存在下で 6 時間反応させたところ, AMI と一致するピークが明瞭に検出された。また, 大腸菌を用いて発現・精製した *HvNMT* を反応液に同時に添加することで, AMI に加えてグラミンの生成も確認することができた。このことから, *CYP76M57* は単独で L-Trp から AMI の反応を触媒することが示され, L-Trp を前駆体として *CYP76M57* と *HvNMT* により AMI を経てグラミンとなるオオムギ内の生合成経路が明らかとなった。

次に, 同位体標識 Trp を基質として *CYP76M57* による反応生成物の解析を行った。この反応生成物の AMI は, LC/MS 解析時にフラグメント化してしまうため, *CYP76M57*+ L-Trp 反応液に *HvNMT* を添加して生成したグラミンを測定することで評価した。Trp の 2 つの窒素原子を  $^{15}\text{N}$  で標識した  $[\text{15N}_2]\text{-Trp}$  を基質として *CYP76M57* と反応させたところ, グラミンが  $m/z$  177  $[\text{M}+2+\text{H}]^+$  として検出された。非標識 Trp と  $[\text{15N}_2]\text{-Trp}$  の 1:1 混合物を基質とした場合,  $m/z$  175  $[\text{M}+\text{H}]^+$  と  $m/z$  177  $[\text{M}+2+\text{H}]^+$  のグラミンが同程度で検出されたのに対し,  $m/z$  176  $[\text{M}+1+\text{H}]^+$  のグラミンは非標識グラミンで観察される天然存在比と同程度

の低いレベルに保たれていた。このことから、Trp が CYP76M57 によって AMI に変換される際には、同一の Trp 分子から直接アミノ基を引き継いでいることが示され、上述したような分子内転位によって反応が進行したことが示された。

CYP76M57 による分子内転位は、これまでに前例のない反応であるため、反応機構の解明は必須である。Trp-AMI 変換の反応機構のヒントを得るために、D-Trp や置換基導入 Trp, インドール化合物 11 種に対する CYP76M57 の反応性を確認した。D-Trp からは AMI の生成が検出できなかったことから、CYP76M57 は光学異性体を識別することができることが明らかになった。置換基導入 Trp やインドール化合物においては、本研究で検討した全ての化合物で CYP76M57 特異的な生成物は見られなかった。以上のことから Trp-AMI 変換の反応機構のヒントは得られなかったが、CYP76M57 は L-Trp に特異性が高い酵素であると推測された。

## 5. オオムギのグラミン生産能に関与する変異の解析

オオムギ品種間でのグラミン生産能の有無と CYP76M57 の関連について検討したところ、①転写産物の欠如、②数百 bp の DNA 断片の挿入、および ③一塩基変異に由来する R104T 変異、の 3 パターンがあることが示された (2022 金井修論)。そこで、T104 型 CYP76M57 の機能を *in vivo* および *in vitro* で評価し、104 番目の残基の触媒活性への寄与を調べた。その結果、T104 型 CYP76M57 は AMI 生産能を失うことが明らかとなり、CYP76M57 による Trp の側鎖短縮活性には R104 が必須であることが示された。

SWISS-MODEL を用いてソルガムの cinnamate4-hydroxylase (C4H; CYP73A) を鋳型に CYP76M57 の立体構造を構築した。鋳型の構造中には、リガンドとしてヘムと溶媒 (HEPES) が結合していたので、両構造を重ね合わせることにより CYP76M57 の基質結合部位を予測した。その結果、CYP76M57 の活性に関与する R104 は基質結合部位に位置すると予測された。

予測立体構造の確からしさを検証するために、基質結合部位周辺に位置すると予測された W116, N209, D283, T291, L358, C430 をアラニンに、A287 をロイシンに各々置換した変異型 CYP76M57 導入株を作製して酵素活性を評価した。その結果、N209A と T291A では微量の AMI が検出されたが、W116A と D283A, L358A, C430A, A287L では検出されなかった。基質結合部位周辺に変異を導入することで AMI 生成が減少/消失したという結果から、予測構造の確からしさが高いと考えられる。

## 総括

本研究では、グラミン生合成において特徴的な生合成ステップである、Trp 側鎖の C<sub>2</sub> 短縮反応の解明を目指した。同位体標識化合物を用いた評価、RNA-seq、形質転換植物の作

出、酵母による異種発現などを通じ、機能未知のシトクロム P450 分子種である CYP76M57 が、Trp 側鎖のアミノ基を分子内転位により C<sub>β</sub>に結合させ、C<sub>α</sub>およびカルボキシ基を除去する新規反応を触媒していることが示した。また、オオムギ品種（および野生種）間でみられるグラミン生産能の差異を、CYP76M57 の配列および機能の面から説明することができた。本研究で明らかとなった新規反応は、植物の二次代謝経路、特に芳香族アミノ酸に由来する代謝経路について新規の経路を提案することになる。他植物における類似遺伝子・酵素に着目した研究を行うことで、いまだ明らかとなっていない二次代謝生合成経路解明の糸口となり、植物二次代謝の多様性解明の一助にもなるかもしれない。また、CYP 酵素群がもちうる新たな触媒活性の可能性も示唆するものであり、今後、より詳細な反応機構の解析等により、酵素反応を利用した有用化合物の効率的な生産にもつながる可能性もある。

## 審査報告概要

本論文は、オオムギ耐病性二次代謝化合物であるグラミンについて、未解明であったその生合成を明らかにすることを目指した。安定同位体標識 Trp を用いたトレーサー試験により、この生合成過程では新規の反応が起こっている可能性を示した。続いて、RNA-seq による生合成候補遺伝子の単離、形質転換植物を用いた単離遺伝子の機能評価、酵母異種発現系を用いた組換えタンパク質による酵素活性評価を通じて、新規 cyt. P450 がグラミン生合成に関わる酵素であることを示した。本酵素による反応の過程では、Trp の側鎖炭素原子のうち、 $\alpha$ -およびカルボキシ基炭素の 2 つが除去され、アミノ基が $\beta$ -炭素に分子内転位することが示された。また、グラミンを生産しないオオムギ栽培品種では、本酵素遺伝子の欠損もしくは変異によりグラミン生産能が失われていることが明らかとなった。本論文で示された酵素反応は、これまでに類似の反応例がない新規性の高いもので、この成果は、極めて多様な植物二次代謝化合物の生合成について、新たな経路の可能性を提示する学術的価値の高いものと判断された。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査委員一同は博士（農学）の学位を授与する価値があると判断した。