

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

2024 年

石川恵里加

目次

| | |
|--|----|
| 序論..... | 5 |
| 1. 同位体標識 Trp を用いた側鎖短縮反応の解析..... | 7 |
| 1-1. 序論..... | 7 |
| 1-2. 結果..... | 8 |
| 1-2-1. グラミン蓄積パターンの調査..... | 8 |
| 1-2-2. ¹³ C や ¹⁵ N 標識 Trp を用いた <i>in vivo</i> トレーサー試験..... | 9 |
| 1-2-3. 生体内でのアミノ基交換の確認..... | 13 |
| 1-3. 考察..... | 13 |
| 1-4. 実験手法..... | 15 |
| 1-4-1. 化学物質..... | 15 |
| 1-4-2. オオムギの栽培..... | 15 |
| 1-4-3. オオムギ代謝物の分析とグラミンへの同位体取り込みの評価..... | 15 |
| 2. グラミン生合成に関与する遺伝子の探索..... | 17 |
| 2-1. 序論..... | 17 |
| 2-2. 結果..... | 17 |
| 2-2-1. RNA-seq 解析によるグラミン生産性に関連する遺伝子の抽出..... | 17 |
| 2-2-2. Trinity_20495 の生化学的機能解析..... | 19 |
| 2-3. 考察..... | 22 |
| 2-4. 実験手法..... | 23 |
| 2-4-1. オオムギの栽培..... | 23 |
| 2-4-2. <i>De novo</i> トランスクリプトームアセンブリと RNA-seq 解析..... | 23 |
| 3. オオムギ新規 CYP の機能解析..... | 26 |
| 3-1. 序論..... | 26 |
| 3-2. 結果..... | 28 |
| 3-2-1. CYP76M57 の系統解析..... | 28 |
| 3-2-2. CYP76M57 の <i>in vitro</i> 酵素活性評価..... | 29 |
| 3-2-3. CYP76M57 による Trp-AMI 変換における Trp の保存部位の確認..... | 32 |
| 3-2-4. 様々なインドール化合物に対する CYP76M57 の活性..... | 34 |
| 3-3. 考察..... | 38 |
| 3-4. 実験手法..... | 39 |
| 3-4-1. 化学物質..... | 39 |
| 3-4-2. <i>P. pastoris</i> および大腸菌を用いた CYP76M57 および HvNMT のクローニングと 発現..... | 39 |
| 3-4-3. ミクロソーム画分を用いた CYP76M57 の <i>in vitro</i> 酵素活性評価..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 4. オオムギ品種間における CYP76M57 の配列とグラミン生産性との関係 | 43 |
| 4-1. 序論 | 43 |
| 4-2. 結果 | 44 |
| 4-2-1. T104 型 CYP76M57 の <i>in vitro</i> 酵素活性評価 | 44 |
| 4-2-2. CYP76M57 の活性に関与するアミノ酸残基の探索 | 46 |
| 4-3. 考察 | 47 |
| 4-4. 実験手法 | 48 |
| 4-4-1. 変異型 CYP76M57 の作製 | 48 |
| 4-4-2. <i>in vitro</i> 酵素活性評価 | 48 |
| 4-4-3. CYP76M57 のホモロジーモデリング | 49 |
| 総括 | 49 |
| 参考文献 | 52 |
| 謝辞 | 58 |
| Summary | 59 |

序論

植物は、生命維持に必須の一次代謝を通じて生合成された前駆体を利用して、二次代謝産物を生合成する。二次代謝産物は、移動の自由を持たない植物にとって、環境適応や他生物との相互作用に関与し、植物の生存戦略に重要な役割を果たす。植物の二次代謝産物は、非常に多様な骨格構造をもち、代表的なものとして、アルカロイド、フェニルプロパノイド、テルペノイド、ポリケチドなどに分類される。これらの多様性は地球上に存在する数十万種以上の植物種に起因する。そのため、近年ではこれらの化合物を「植物特化代謝物 (Specialized Metabolites)」と呼ぶこともある。二次代謝産物の骨格構造構築のための生合成反応は、二次代謝産物の全体構造を特徴づける。骨格形成における最も顕著な反応は、前駆体の構造を劇的に変化させる環化と転位である。これらの反応に加えて、炭素鎖の伸長と短縮も重要である。なぜなら、これらの反応もまた、エステル、アミド、イミンに含まれる C-O 結合や C-N 結合よりも安定な C-C 結合を形成または切断することによって、炭素骨格構造を変化させるからである。このような足場形成によって生成された化合物は、より大きな化合物をさらに構築するための構成要素としての役割を果たすことができる。したがって、コア構造の構築に関与する新規の生合成反応を同定することは、未発見の植物特化代謝経路を解明し、多様性をもたらしたその進化を説明するのに役立つだろう。さらに、植物の二次代謝産物は構造が多様なため、生理活性も多種多様であり、人類はこれらを医薬品や香料、嗜好品などとして利用してきた。植物にとって二次代謝産物は主に、植物の耐病性に寄与していると考えられている。また、植物種によって生産する化合物が異なるので、植物ごとの防御機構も様々である。個々の植物の防御機構を理解することは、新たな農薬の開発や耐病性を付与した作物の開発にもつながる。

世界の主要作物であるオオムギ (*Hordeum vulgare*) は、グラミン、トリティカミド、ヒドロキシケイ皮酸アミド、ホルダチンなどを生産蓄積し、病原菌や害虫から身を守っている。ヒドロキシケイ皮酸アミドやホルダチンは生合成経路が解明されたが (Ube et al., 2023)、グ

ラミンはトリプトファン (Trp) 由来のインドールアルカロイドとして古くから知られており (Bowden & Marion, 1951; O'Donovan & Leete, 1963)、シンプルな構造にもかかわらず、生合成経路の全容が明らかになっていない。グラミンの生理活性は、アブラムシや病原菌の生育阻害効果やシロガラシに対するアレロパシー活性が報告されている (Corcuera, 1984; Sepulveda & Corcuera, 1990; Zuniga & Corcuera, 1986; Overland, 1966)。また、光化学系 II とミトコンドリア複合体 I への作用が示唆されたが (Foguel & Chaloub, 1993; Niemeyer & Roveri, 1984)、グラミンの細胞内標的や作用様式は完全には解明されていない。

グラミンの生合成の過程で、Trp の側鎖が炭素原子 2 個分短縮され (C_2 短縮)、3-アミノメチルインドール (AMI) が生成し、続いて AMI のアミノ基で 2 回連続して *N*-メチル化が起こり、グラミンが得られる (Fig. 1; Mudd, 1961; Gower & Leete, 1963; Leland et al., 1985)。Larsson らは、コーヒー酸に作用するジャスモン酸誘導性 *O*-メチルトランスフェラーゼ (Lee et al., 1997) をコードすると提唱されていた遺伝子 (GenBank U54767) が、AMI の *N*-メチル化を担う *N*-メチルトランスフェラーゼ (HvNMT) をコードしていることを証明した (Larsson et al., 2006)。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詳細なメカニズムや触媒する酵素遺伝子は不明である。先行研究では、グラミンに引き継がれる Trp の炭素原子に着目した研究が行われたが、側鎖短縮反応を触媒する酵素に関する報告がない。側鎖短縮反応の仕組みが解明されることは、植物二次代謝における骨格形成に重要な知見をもたらすと考えられる。そこで、本研究では、有機化学的手法から側鎖短縮反応の詳細な反応様式の解明を目指すとともに、分子生物学的手法から側鎖短縮反応を触媒する新規酵素遺伝子の同定、酵素学的手法から新規酵素の生物学的機能の解明を目指した。

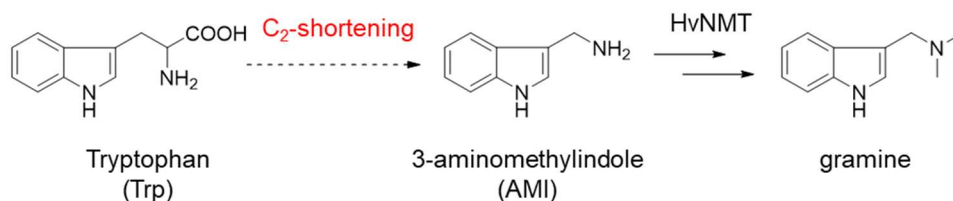


Fig. 1 グラミンの生合成経路

1. 同位体標識 Trp を用いた側鎖短縮反応の解析

1-1. 序論

グラミンの骨格構造は、Trp から AMI のコア骨格である芳香環 (Ar)-メチレン基-アミノ基 (Ar-C₁-NH₂) に至る過程で側鎖の炭素原子 2 個の短縮 (C₂短縮) が生じている (Fig. 1)。先行研究において、放射性同位体 ¹⁴C や ³H を用いたトレーサー試験により、グラミン生合成における Trp のインドール環 2 位の炭素とβ炭素、β水素 (側鎖のメチレン基) が保存されるという報告から (Leete & Marion, 1953; O'Donovan & Leete, 1963)、α炭素が保持されないことは推察できるが、窒素原子に関する報告はまだない。さらに、先行研究の結果から Trp のアミノ基がピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) と結合して Schiff 塩基を形成し、レトロ-マイケル反応により Trp のα炭素を含むグリシン部分が脱離して 3-メチレンインドリウムが生じ、アンモニアの求核攻撃により AMI になる推定経路が提唱されたが (Fig. 1-1A; Wenkert, 1962; O'Donovan & Leete, 1963)、この反応機構を支持する実験的証拠はまだ得られておらず、グラミンのコア骨格構築、すなわち Trp の側鎖短縮に関連する酵素遺伝子、中間体に関する情報は今のところ得られていない。

二次代謝における側鎖短縮反応について知られているものの例として、トウガラシ属植物の *Capsicum chinense* におけるカプサイシン生合成前駆体のバニリルアミン (Ar-C₁-NH₂) は、フェニルアラニン (Ar-C₃) からアミノ基が脱離した桂皮酸から数々の修飾反応を経てフェルロイル CoA (Ar-C₃) となり、ヒドラターゼリアーゼによる C₂短縮によりバニリン (Ar-C₁) となり、アミノ基転移酵素により外部からアミノ基を取り込み生合成されと考えられている (Fig. 1-1B; Weber et al., 2014)。また、アブラナ科植物 *Brassica rapa* におけるブラシニン (Ar-C₁-N-R) の生合成では、アブラナ科特有の化合物であるグルコブラシニン (Ar-C₂-N-R) がミロシナーゼによる加水分解の後にロッセン転位を受け、インドール-3-メチルイソチオシアネート (Ar-C₁-N-R) となることが知られている (Fig. 1-1C; Klein & Sattely, 2017)。このように、既知の側鎖短縮反応は前駆体のアミノ基の脱離や種特異的な化合物の経路を伴

うことから、オオムギにおけるグラミン生合成は、これらと異なる反応を経ると予想される。また、Trpのアミノ基窒素がグラミンに保存される場合、植物二次代謝におけるTrpの新規の代謝経路の提唱が期待される。本研究では安定同位体¹³C, ¹⁵Nで標識したTrpを用いたオオムギでのトレーサー試験により代謝物をLC/MSで分析し、グラミン生合成におけるTrpの保存部位を特定し、Trp-AMI変換の反応様式を考えるヒントを得る。

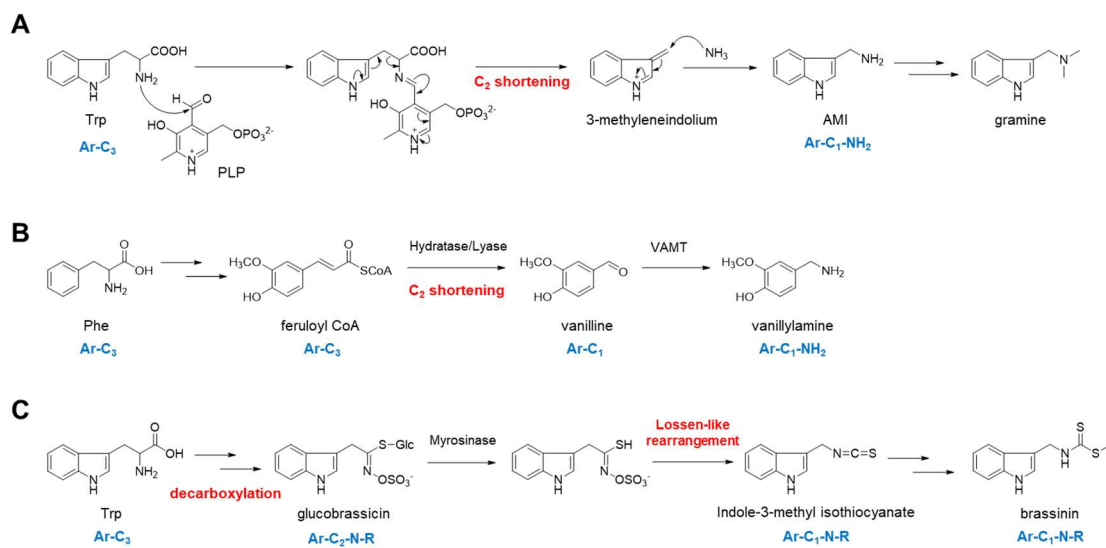


Fig. 1-1 過去に提唱されたグラミンの推定生合成経路と芳香族アミノ酸における側鎖短縮反応とC-N結合形成転位の例

A) Wenkert(1962)と O'Donovan & Leete(1963)により提唱された AMI 生合成経路

B) *Capsicum chinense* におけるバニルルアミン生合成経路

C) *Brassica rapa* におけるブラシニン生合成経路

1-2. 結果

1-2-1. グラミン蓄積パターンの調査

まずトレーサー試験で使用するグラミン生産サンプルを決めるために、様々なオオムギ品種 (11 種) を 4 つの部位 (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。定量的結果、Trp の蓄積は全ての品種とすべての部位で見られたが (≈ 1.63 nmol/mg FW)、グラミンの蓄積は一部の品種の葉身のみで見られ、野生オオム

ギの subsp. *spontaneum* で 3.44 nmol/mg FW、六条オオムギのファイバースノウとシュンライでそれぞれ 3.15 nmol/mg FW と 4.21 nmol/mg FW だった (Fig. 1-2A, B)。AMI の蓄積は、subsp. *spontaneum* とシュンライで見られたが (それぞれ 0.54 nmol/mg FW と 0.14 nmol/mg FW)、ファイバースノウの AMI 濃度は本研究の条件では検出限界以下だった。種子の入手しやすさや発芽率の高さを考慮して、本研究におけるグラミン生産サンプルはファイバースノウを使用する。

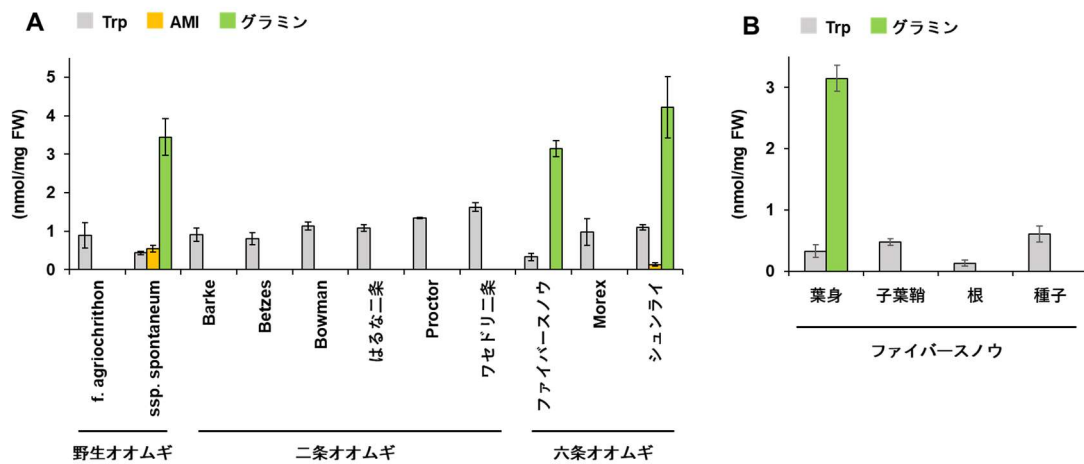


Fig. 1-2 野生オオムギや栽培品種オオムギにおけるインドールアルカロイドの蓄積量

A) 72 時間栽培した様々なオオムギ品種の葉身におけるインドールアルカロイドの蓄積量

B) 72 時間栽培したファイバースノウにおける部位ごとの Trp とグラミンの分布

エラーバーは SD を示す (n=3)。

1-2-2. ^{13}C や ^{15}N 標識 Trp を用いた *in vivo* トレーサー試験

グラミンの生合成において Trp からどの炭素が取り除かれるかを確認するため、インドール 2 位と側鎖の α -および β -位を ^{13}C で標識した Trp をオオムギの苗に与えた。グラミンのマススペクトルには、プロトン化分子 (m/z 175 $[\text{M}+\text{H}]^+$) に加え、3-メチレンインドリウムを表すフラグメントイオン (m/z 130) が存在する。これらのイオンピークを検出することで、Trp から変換されたグラミンへの標識の取り込みを評価した。この研究では、同位体の取り込みは、Trp、グラミン、3-メチレンインドリウムのモノアイソトピックイオン $[\text{M}+\text{H}]^+$

(それぞれ m/z 205、175、130) に対する同位体イオン $[M+1+H]^+$ (それぞれ m/z 206、176、131) の相対強度 (%) に基づいて評価した。Trp、グラミン、3-メチレンインドリウムの +1 Da の同位体イオンの天然存在比 ($[M+1+H]^+/[M+H]^+$) は、それぞれ 12.7、12.1、9.8% と計算された。したがって、標識 Trp 投与サンプルにおいてこれらの値から相対強度が有意に増加した場合は、同位体の取り込みを示す。以下では、例えば +1Da 同位体の相対強度 (%) を +1 値と表記する。

| | Trp +1 (%) | グラミン +1 (%) | グラミンのフラグメント +1 (%) |
|---------------------------------------|---------------|----------------|-----------------------|
| 天然存在比 | 12.7 | 12.1 | 9.8 |
| control | 13.1 ± 1.6 | 12.1 ± 1.1 | 9.7 ± 1.0 |
| [indole-2- ¹³ C]-Trp | 21.7 ± 4.9* | 17.9 ± 2.7* | 14.1 ± 1.9* |
| [α- ¹³ C]-Trp | 23.3 ± 6.7* | 12.2 ± 1.5 | 9.3 ± 0.8 |
| [β- ¹³ C]-Trp | 23.9 ± 6.9* | 17.7 ± 2.4* | 15.0 ± 1.7* |
| [¹⁵ NH ₂]-Trp | 22.2 ± 9.5* | 16.3 ± 3.4* | 10.5 ± 1.5 |

Table 1-1 オオムギ体内における Trp とグラミンの ¹³C および ¹⁵N の取り込み

数値は、モノアイソトピックイオンピークに対する同位体ピークの強度 (%) を表す。グラミン (精密質量: 174.12) は、プロトン化分子 (m/z 175 $[M+H]^+$ および 176 $[M+1+H]^+$) およびフラグメント (m/z 130 および 131) として検出された。値は平均値 ± SD。アスタリスクは、コントロールと有意な差があることを示す ($p < 0.01$; Welch の t 検定または Mann-Whitney U 検定)。

Table 1-1 に示すように、Trp の +1 値は、どの ¹³C 標識 Trp 投与群でも有意に上昇し (1.7 - 1.9 倍)、実験条件下でオオムギに標識 Trp が取り込まれたことが示された。[indole-2-¹³C]-および [β-¹³C]-Trp 群では、グラミンおよびそのフラグメントの +1 値はコントロールに比べて約 5% 増加した。一方、[α-¹³C]-Trp 投与群では、グラミンおよびそのフラグメントの +1 値に有意な変化は見られなかった (それぞれ 12.2 ± 1.5% と 9.3 ± 0.8%)。これらの結果から、Trp のインドール環と β-炭素はグラミンに保存され、α-炭素は Trp-AMI 変換によって除去されることが明らかになった。また、このデータは、AMI の側鎖の唯一の炭素原子が Trp の β-

炭素に由来することから、Trp のカルボキシ基炭素が除去されていることを示唆している。Trp からグラミンに保存される炭素原子の情報は、先行研究 (Leete and Marion, 1953; O'Donovan and Leete, 1963) の結果と一致している。

興味深いことに、[amino-¹⁵N]-Trp 投与群では、グラミンの+1 値が増加し (16.3±3.4%)、フラグメントイオンの+1 値の有意な増加は見られなかった (10.5±1.5%)。フラグメントイオンには側鎖の炭素と窒素の間で開裂が起き、窒素原子は含まれないのでこの結果は妥当であると言え、Trp のアミノ基窒素はグラミンに保存されることが示唆された。個々のサンプルのグラミンの+1 値を Trp の+1 値に対してプロットすると、取り込みがより明確に示された。このプロットは、¹⁵N-グラミンと ¹⁵N-Trp の量の間にも正の相関を示し (Fig. 1-3)、これは、標識 Trp が植物内に多く取り込まれるほど、同位体グラミンが蓄積されることを意味している。

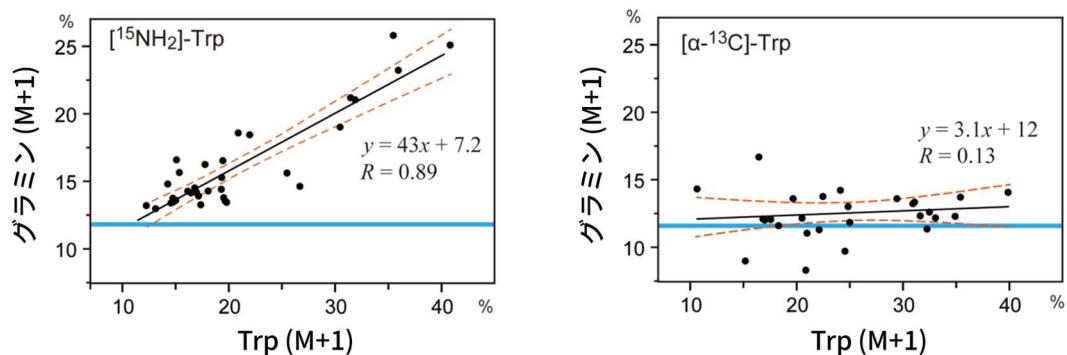


Fig. 1-3 [¹⁵NH₂]-Trp(A)および [α-¹³C]-Trp(B)を投与したオオムギ個体における Trp とグラミンの+1 値の相関

青線は、グラミンの+1 値の天然存在比 (12.1%) を表す。線形回帰と 95%信頼区間をそれぞれ黒とオレンジの線で示す。

もし-NH₂ の窒素がインドール環と一緒に Trp からグラミンに保存されるとすると、インドール環とアミノ基の両方で標識された [¹⁵N₂]-Trp は、M+2 の質量を持つグラミンに代謝されると仮定される。また、グラミンの M+2 である m/z 177 は天然では検出されないことから、より明確にアミノ基窒素の保存が確認できる。予想通り、 [¹⁵N₂]-Trp をオオムギに与え

ると、コントロールでは検出されなかった m/z 177 $[M+2+H]^+$ (+2 値 : $7.7 \pm 3.6\%$) のグラミンが得られた (Table 1-2)。興味深いことに、M+1 同位体に相当するグラミンも $[^{15}N_2]$ -Trp 投与により上昇した。コントロールからの+1 値の変動 ($17.7 - 12.1 = 5.6\%$) は+2 値の変動 (7.7%) より小さく、さらに Trp の+1 値もグラミンと同様に上昇した。

| | Trp | | グラミン | |
|-------------------|-------------|--------------|-------------|------------|
| | +1 (%) | +2 (%) | +1 (%) | +2 (%) |
| ファイバースノウ | | | | |
| control | 13.1 ± 1.6 | n.d. | 12.1 ± 1.1 | n.d. |
| $[^{15}N_2]$ -Trp | 25.5 ± 3.6* | 24.1 ± 8.8* | 17.7 ± 2.5* | 7.7 ± 3.6* |
| Morex | | | | |
| control | 10.7 ± 1.1 | 1.02 ± 0.31 | n.d. | n.d. |
| $[^{15}N_2]$ -Trp | 21.0 ± 4.2 | 20.7 ± 12.7* | n.d. | n.d. |
| ワセドリ二条 | | | | |
| control | 11.9 ± 1.8 | 1.03 ± 0.27 | n.d. | n.d. |
| $[^{15}N_2]$ -Trp | 20.1 ± 1.7* | 18.7 ± 3.2* | n.d. | n.d. |
| コムギ | | | | |
| control | 13.0 ± 0.47 | 1.06 ± 0.43 | n.d. | n.d. |
| $[^{15}N_2]$ -Trp | 27.7 ± 2.2* | 27.4 ± 5.7* | n.d. | n.d. |

Table 1-2 オオムギとコムギの $[^{15}N_2]$ -Trp の取り込み

数値は、モノアイソトピックイオンピーク(トリプトファン m/z 205 $[M+H]^+$; グラミン m/z 175 $[M+H]^+$)に対する同位体イオンピークの強度(%)を表す。ファイバースノウ、Morex、ワセドリ二条はオオムギの品種。値は平均値±SD。+1 および+2 はそれぞれ M+1 および M+2 同位体のデータ。アスタリスクは、コントロールと有意な差があることを示す ($p < 0.01$; Welch の t 検定)。

このことからオオムギの生体内で Trp アミノトランスフェラーゼ (TAT) によるアミノ基交換が起きていたことが疑われる。Trp (M+1) の存在パターンとしては、投与した Trp (M+2) の ^{15}N -アミノ基がはずれて、非標識のアミノ基と交換される場合と、オオムギ体内にもともと存在する非標識の Trp が ^{15}N -アミノ基を取り込んで生じる場合が考えられ、これらの Trp (M+1) が代謝され、M+1 のグラミンが生じたと考えられる (Fig. 1-4)。

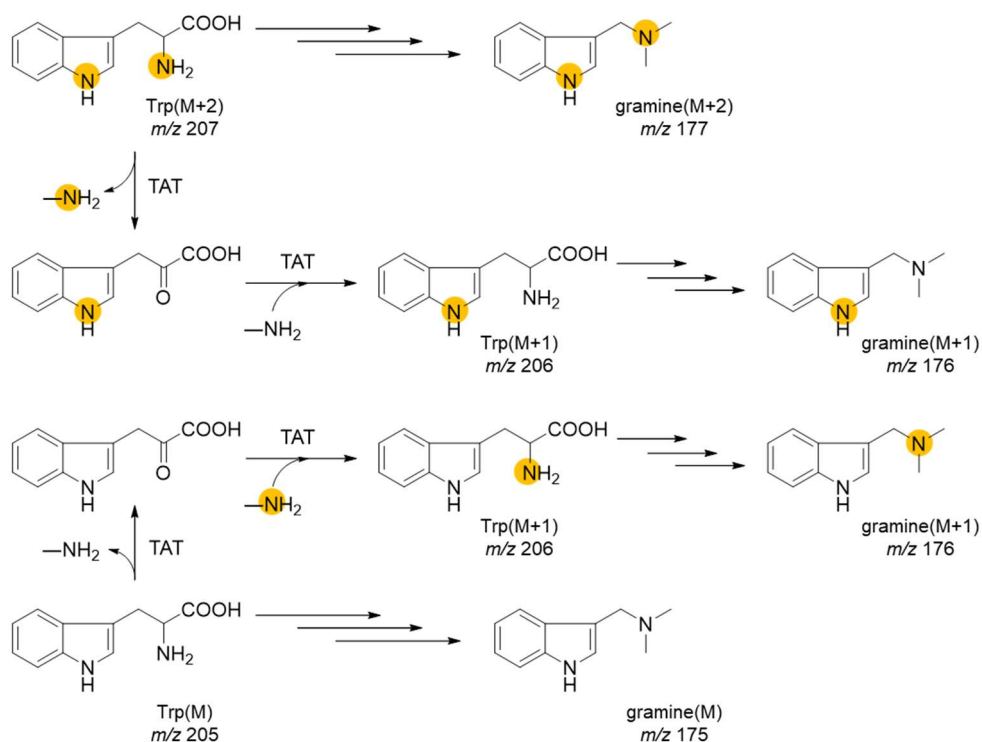


Fig. 1-4 生体内における Trp のアミノ基交換と標識パターン
黄色の丸印は ^{15}N を示す。TAT ; Trp アミノトランスフェラーゼ。

1-2-3. 生体内でのアミノ基交換の確認

観察されたアミノ基交換がグラミンの生産性に関連するかどうかを調べるため、グラミンを生産しないコムギ (cv. チャイニーズスプリング) とオオムギ 2 品種 (Morex とワセドリ二条) を用いて $^{15}\text{N}_2$ -Trp (m/z 207) を与えた。その結果、+1 値を表すイオン (m/z 206) が+2 値に匹敵する強度で検出された (Table 1-2)。

1-3. 考察

本研究で検討した六条オオムギの中で、Morex はグラミンも AMI も検出されなかった (Fig. 1-2A)。Larsson らは、AMI を *N*-メチル化してグラミンを生成する *N*-メチルトランスフェラーゼ (HvNMT) では転写産物レベルでもタンパク質レベルでも検出されなかったと報告した (Larsson et al., 2006)。もし Morex におけるグラミン蓄積の欠如が *N*-メチルトランス

フェラーゼの欠如のみに起因し、Morex が AMI に先行する経路を持つのであれば、Morex は AMI をある程度蓄積することになる。したがって、Morex は AMI 生合成酵素と HvNMT が欠損しているのかもしれない。また、二条オオムギの Barke と Betzes、Proctor は HvNMT が転写産物レベルまたはタンパク質レベルで検出され、AMI とそのモノメチル体である *N*-メチル AMI (MAMI) に対して *N*-メチル化活性を示すことが報告されている (Larsson et al., 2006; Leland et al., 1985)。これらの品種でもグラミンと AMI の蓄積は見られなかったことから、AMI 生合成能を欠損していることが示唆される。

トレーサー試験の結果から、Trp のアミノ基窒素がグラミンに保存されることが示唆されたので、グラミン生合成において AMI の前駆体が存在するとしたら、側鎖に窒素を持たないインドール化合物はその前駆体の候補から除外される (例：インドール-3-ピルビン酸、インドール-3-酢酸)。Breccia らが β - ^{14}C インドール-3-ピルビン酸 と β - ^{14}C インドール-3-アクリル酸を投与したオオムギから ^{14}C グラミンが得られたので、これらの化合物がグラミン生合成の中間体である可能性があるとして報告したが (Breccia & Marion, 1959)、この結果は、本研究で示されたように、 ^{14}C 標識化合物がオオムギ生体内のアミノトランスフェラーゼによるアミノ基交換により β - ^{14}C Trp になった後にグラミンに代謝されたからだと考えられる。オオムギのトリプトファンアミノトランスフェラーゼ(TAT)の単離の報告はまだないが、イネ科における TAT は、イネの OsTAR1 (Kakei et al., 2017)、コムギの TaTAR2 (Shao et al., 2017)、トウモロコシの vt2 (Phillips et al., 2011) などが単離されている。

グラミン生合成において、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 依存的に Trp の α -と β -炭素間の切断が起こり、そのグリシン部分が除去されるという仮説が立てられた (Wenkert, 1962, O'Donovan & Leete, 1963)。しかし、本研究で、Trp のアミノ基窒素がグラミンに保存されることが判明したので、Trp-AMI 変換は、Wenkert らの仮説とは異なる反応ルートを進むことが考えられる。

Trp-AMI 変換の間に中間体があるとしたら、側鎖に $\text{C}_2\text{-N}$ 構造を持つインドール化合物が

候補になると考えられる。しかし、WightmanらはTrpのβ炭素に対応した部位を¹⁴Cで標識したトリプタミンとインドール-3-アセトニトリルを、Brecciaらはインドール-3-アセトアミドを検討したが、これらの候補化合物がオオムギ体内で¹⁴C-グラミンに代謝されなかったと報告した(Wightman et al., 1961; Breccia & Marion, 1959)。これらの報告と本研究の結果から、gramine生合成におけるTrpからAMIへの変換は、Trpが直接AMIになる可能性が考えられ、間のα炭素を除いてβ炭素とアミノ基窒素が保存されることから、分子内転位の可能性が示唆された。

1-4. 実験手法

1-4-1. 化学物質

L-Trpは富士フィルム和光純薬から購入した。[indole-2-¹³C]-、[α-¹³C]-、[amino-¹⁵N]-および[¹⁵N₂]-Trpは、Sigma-Aldrichから購入した。[β-¹³C]-Trpは、Takatoriらの手順を改良して、インドールと*N,N*-ジメチル-[¹³C]-ホルムアミドから有機合成した(Takatori et al., 2008; Christiansen et al., 2009; Gazit et al., 2015)。

1-4-2. オオムギの栽培

オオムギ種子を70% (v/v) エタノールで1分間洗浄し、次亜塩素酸ナトリウム水溶液で15分間滅菌した。その後、種子を滅菌水で洗い、室温で2時間水に浸し、プラントボックス(φ87 mm x 120 mm)内の0.8% (w/v) 寒天培地に播種し、明期12時間、25°Cに設定した人工気象機で72時間生育させた。

トレーサー実験では、1 mMの同位体標識Trpを含む5 mLの水に浸した4層のペーパータオル上にオオムギを播種し、同じ条件下で72時間生育させた。

1-4-3. オオムギ代謝物の分析とグラミンへの同位体取り込みの評価

様々なオオムギ品種の各部位におけるグラミンの蓄積を調べるため、播種72時間後に植物体を葉身、子葉鞘、根、種子に分割した。液体窒素で凍結した各組織を乳鉢と乳棒で粉

末にし、10% (v/w) のメタノールを用いて代謝物を抽出した。抽出液に抽出液と同量の0.2% (v/v) 酢酸を加え、-20°Cで20分間冷蔵した後、15,000 rpm、4°Cで15分間遠心分離した。得られた上清をLC/MS分析に供した。

グラミン、トリプトファン (Trp) およびアミノメチルインドール (AMI) の分析には PDA および QDa 検出器を搭載した ACQUITY UPLC H-Class system (Waters)を用い、カラムは Acquity UPLC BEH C18 カラム (1.7 μ m, 2.1 x 50 mm, Waters)を用いた。流速を 0.6 mL/min、カラム温度を 40°Cに設定し、0.1% (v/v) ギ酸水に対しアセトニトリル濃度を 3-20% (0-2分)、20-50% (2-3分) にしてグラジエント溶出した。MS分析はポジティブイオンモードで行い、検出範囲は m/z 100-300、キャピラリー電圧は 0.3 kV、ソース温度は 120°C、プローブ温度は 600°C、サンプリングコーン電圧は 3.0 V に設定した。グラミン ($C_{11}H_{14}N_2$; 精密質量 174.12) と Trp ($C_{11}H_{12}N_2O_2$; 精密質量 204.09) は、それぞれ m/z 175 [M+H]⁺と 205 [M+H]⁺のポジティブイオンモードで選択イオン記録 (SIR) により定量された。AMI のプロトン化分子 (m/z 147 [M+H]⁺) は検出できなかったため、 m/z 130 のフラグメントイオンを検出することで定量した。 m/z 130 のモニタリングは、グラミンのインドール環とメチレン炭素からなるフラグメントを検出するためにも用いられた。

トレーサー試験における同位体取り込み評価は、Trp についてはモノアイソトピックイオン[M+H]⁺ (m/z 205)と同位体イオン[M+1+H]⁺ (m/z 206)と[M+2+H]⁺ (m/z 207)のイオン強度比 (それぞれ 206/205 と 207/205)を、グラミンについてはモノアイソトピックイオン[M+H]⁺ (m/z 175)と同位体イオン[M+1+H]⁺ (m/z 176)と[M+2+H]⁺ (m/z 177) のイオン強度比 (それぞれ 176/175 と 177/175)を測定した。またグラミンのフラグメントイオン (m/z 130) についてもその同位体イオンである m/z 131 とのイオン強度比 (131/130) を測定した。統計解析は SigmaPlot 14.5 (SYSTAT Software, CA) を用いて行った。

2. グラミン生合成に関与する遺伝子の探索

2-1. 序論

1章でトリプトファン (Trp) からグラミンへ保存される原子が明らかになり、窒素原子が、カルボキシ基と α -炭素が取り除かれた状態で β -炭素に転位することを示した。このような反応は、上述の芳香族アミノ酸の C_2 短縮経路とは全く異なる (Fig. 1-1)。側鎖の C_2 短縮反応については、脱炭酸に続いて α -炭素が除去される段階的な炭素除去が考えられる。PLP 依存性脱炭酸酵素はよく研究されている酵素ファミリーであり、Trp 脱炭酸酵素はトリプトタミンを生成する。しかし、連続するアミノ基を除去することなく炭素を除去する酵素や経路は、現在までに知られていない。そこで、グラミン生産能を指標にしたトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) により、遺伝子を網羅的に比較することで、 C_β -N 結合形成分子内転位を触媒するグラミン生合成候補遺伝子を探索した。

2-2. 結果

2-2-1. RNA-seq 解析によるグラミン生産性に関連する遺伝子の抽出

オオムギの標準ゲノムはグラミン非生產品種の Morex のものであるため、まずファイバースノウ葉身の RNA ライブラリを用いてペアエンド RNA-seq 解析をした。ペアリードデータを用いて、Trinity による転写産物アセンブリ、TransDecoder によるタンパク質コード配列 (CDS) 予測、CD-HIT による冗長配列クラスタリングを行い、unigene と定義される 26,355 の転写産物を含む発現遺伝子カタログを作製した。つづいて、グラミン生合成の候補遺伝子を抽出するために、発現遺伝子カタログをリファレンスとしてシングルリード RNA-seq 解析を行った。第1章で明らかにしたオオムギ品種のグラミン生産性をもとに (Fig. 1-2)、グラミン生産サンプルとして、六条オオムギのファイバースノウの葉身 (FS-L) と野生オオムギの *subsp. spontaneum* の葉身 (SP-L) を用い、グラミン非生産サンプルとして、ファイバースノウの子葉鞘 (FS-C) と、六条オオムギでゲノムが解読されており、アミノメチ

ルインドール (AMI) 生合成遺伝子とオオムギ *N*-メチルトランスフェラーゼ (HvNMT) が欠如している Morex の葉身 (MO-L) を用いた。ファイバースノウの部位間で比較した結果 (FS-L vs FS-C)、FS-L で 1,432 遺伝子が発現上昇した (Fig. 2-1)。また、品種間の比較として、FS-L vs MO-L では 583 遺伝子、SP-L vs MO-L では 380 遺伝子が発現上昇した。すべての比較で発現が共通して上昇した 35 遺伝子をグラミン生合成候補遺伝子として抽出し (Table 2-1)、それらの配列をシロイヌナズナのアミノ酸配列との BLASTP 解析によってアノテーションした (<https://www.arabidopsis.org/>)。抽出された 35 遺伝子のうち、*O*-メチルトランスフェラーゼ遺伝子としてアノテーションされた Trinity_24696 は、AMI へのメチル基転移を担う HvNMT (U54767) と 99%以上の同一性を示した (Larsson et al., 2006)。この結果は、本解析の妥当性が高いことを示している。さらに、ファイバースノウの葉身と子葉鞘で比較したときに (FS-L vs FS-C)、発現倍数が 1034.71 倍と最も高くなった Trinity_20495 はシトクロム P450 (CYP) をコードしていると推定された。CYP は、アミノ酸の脱炭酸や炭素骨格の形成など、極めて多様な反応性、特に植物における二次代謝に関与している (Mizutani & Sato, 2011)。そこで、Trinity_20495 をグラミン生合成候補遺伝子として生化学的機能の解析を進めた。

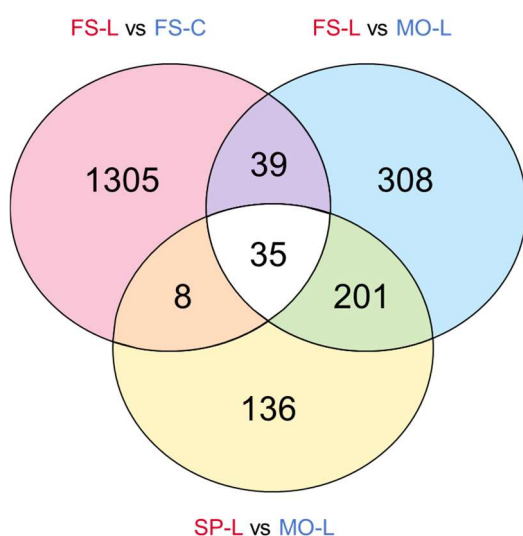


Fig. 2-1 RNA-seq により抽出したグラミン生合成候補遺伝子数のベン図

グラミン生産サンプルで 10 倍以上発現が増加した遺伝子 (DEGs) の数を記載。ファイバースノウの葉身 (FS-L) と subsp. *spontaneum* の葉身 (SP-L) はグラミン生産サンプル、ファイバースノウの子葉鞘 (FS-C) と Morex の葉身 (MO-L) はグラミン非生産サンプル。

2-2-2. Trinity_20495 の生化学的機能解析

GenBank のヌクレオチドコレクション (nt) に対して BLASTN 検索を行った結果、Trinity_20495 の CDS は、一塩基の置換を除いて、生理学的機能が注釈されていないオオムギ品種はるな二条由来の遺伝子 (AK360305) と同一であることが示された。タンパク質配列 (nr) に対する翻訳配列検索 (BLASTX) では、野生オオムギから単離された CYP とアノテーションが付けられた同一配列 (KAI5022397) が検出された。その他に Predicted-CYP76M5 および -CYP76C4 のアノテーションを持つ様々な配列が検出され、Trinity_20495 と約 80% の相同性を示した。また、EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>) の Morex のゲノム配列との BLAST 検索では、相同遺伝子は検出されなかった。

Table 2-1 RNA-seq解析で抽出されたグラミン生産サンプルで発現上昇した候補遺伝子

| Gene ID | ファイバースノウ葉身 vs ファイバースノウ子葉鞘 (Fold Change) | ファイバースノウ葉身 vs Morex葉身 (Fold Change) | spontaneum葉身 vs Morex葉身 (Fold Change) | Top_Hit | e-value | Symbols | Description |
|----------------------------|--|--|--|-------------|----------|--------------|--|
| Trinity_20495 [†] | 1034.7 | 345.5 | 683.0 | AT2G45550.1 | 1.5E-105 | CYP76C4 | cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 4 |
| Trinity_8424 | 847.7 | 24.6 | 44.0 | AT3G55990.1 | 2.4E-176 | ESK1, TBL29 | Plant protein of unknown function (DUF828) |
| Trinity_22494 | 515.1 | 470.9 | 103.9 | AT1G44900.1 | 0 | MCM2, ATMCM2 | minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein |
| Trinity_26114 | 485.2 | 443.5 | 649.9 | | | | |
| Trinity_25670 | 247.9 | 428.7 | 435.6 | AT5G54160.1 | 1.3E-129 | ATOMT1, OMT1 | O-methyltransferase 1 |
| Trinity_24696 [‡] | 235.9 | 1098.9 | 315.9 | AT5G54160.1 | 1.9E-91 | ATOMT1, OMT1 | O-methyltransferase 1 |
| Trinity_9457 | 177.2 | 161.9 | 167.1 | | | | |
| Trinity_22543 | 172.5 | 119.8 | 74.3 | AT5G45470.1 | 4.9E-11 | | Protein of unknown function (DUF594) |
| Trinity_11578 | 161.6 | 39.3 | 15.9 | AT5G45540.1 | 1.8E-21 | | Protein of unknown function (DUF594) |
| Trinity_4872 | 153.8 | 991.1 | 89.0 | AT5G25610.1 | 1.3E-33 | RD22, ATRD22 | BURP domain-containing protein |
| Trinity_24697 | 134.6 | 927.3 | 276.8 | AT5G54160.1 | 1.5E-66 | ATOMT1, OMT1 | O-methyltransferase 1 |
| Trinity_21200 | 127.6 | 116.6 | 420.9 | | | | |
| Trinity_18644 | 119.6 | 109.4 | 96.0 | AT2G33860.1 | 1.2E-119 | ETT, ARF3 | Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-related |
| Trinity_13140 | 106.3 | 97.2 | 112.3 | AT3G12530.1 | 1.3E-94 | PSF2 | PSF2 |
| Trinity_3801 | 96.9 | 88.5 | 120.6 | | | | |
| Trinity_4415 | 75.1 | 18.3 | 15.9 | | | | |
| Trinity_20450 | 70.1 | 15.0 | 20.4 | AT4G29990.1 | 0 | | Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase protein |
| Trinity_15741 | 69.5 | 25.3 | 270.5 | AT1G62420.1 | 1.9E-38 | | Protein of unknown function (DUF506) |
| Trinity_7408 | 68.1 | 62.2 | 288.7 | AT1G73370.2 | 1.8E-151 | SUS6 | sucrose synthase 6 |
| Trinity_8807 | 56.7 | 51.8 | 64.6 | AT5G18980.1 | 1.3E-07 | | ARM repeat superfamily protein |

Table 2-1 continued

| | | | | | | | |
|---------------|------|---------|--------|-------------|----------|--------------------------|---|
| Trinity_10177 | 50.5 | 12.3 | 19.1 | AT5G18980.1 | 7.1E-09 | | ARM repeat superfamily protein |
| Trinity_1133 | 46.3 | 170.2 | 308.8 | AT4G14280.1 | 1.1E-08 | | ARM repeat superfamily protein |
| Trinity_16025 | 46.1 | 26.1 | 29.3 | | | | |
| Trinity_23605 | 34.6 | 131.5 | 429.5 | AT3G15790.1 | 1.2E-30 | MBD11, ATMBD11 | methyl-CPG-binding domain 11 |
| Trinity_700 | 26.1 | 18.5 | 10.8 | AT1G21250.1 | 2.5E-68 | WAK1, PRO25 | cell wall-associated kinase |
| Trinity_1721 | 24.3 | 1969.4 | 1334.5 | AT2G18390.1 | 7.0E-106 | TTN5, HAL, ARL2, ATARLC1 | ADP-ribosylation factor family protein |
| Trinity_3800 | 23.6 | 16.0 | 19.1 | | | | |
| Trinity_15720 | 22.8 | 398.7 | 264.8 | | | | |
| Trinity_11724 | 22.6 | 145.6 | 59.1 | AT3G63460.1 | 5.7E-14 | | transducin family protein / WD-40 repeat family protein |
| Trinity_22708 | 21.8 | 16979.7 | 3954.8 | AT4G38770.1 | 7.4E-07 | PRP4, ATPRP4 | proline-rich protein 4 |
| Trinity_3798 | 16.1 | 26.9 | 21.4 | | | | |
| Trinity_24790 | 12.4 | 80.0 | 81.6 | AT3G16160.1 | 6.2E-09 | | Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing protein |
| Trinity_19811 | 10.6 | 68.4 | 119.6 | AT5G17210.2 | 6.2E-07 | | Protein of unknown function (DUF1218) |
| Trinity_25792 | 10.3 | 22.6 | 12.2 | | | | |
| Trinity_17581 | 10.2 | 79.2 | 88.8 | | | | |

† 本研究で同定されたシトクロム P450。

‡ AMI をメチル化してグラミンを生成する *N*-メチル基転移酵素(HvNMT)。

2-3. 考察

Morex は主要な六条オオムギの品種の一つであり、そのゲノム配列は公開されているが、グラミンを蓄積しない (Fig. 1-2)。さらに、Morex は AMI の最後の 2 つの連続的な *N*-メチル化を触媒する HvNMT を欠き (Larsson et al., 2006)、第 1 章で AMI を蓄積しないことが示されたことから、Morex は Trp-AMI 変換に関与する遺伝子を発現していないことが示唆された。そこで、RNA-seq 解析ではグラミン非生産品種として Morex を用い、Trp-AMI 変換の候補遺伝子を抽出した。Trp-AMI 変換は、脱炭酸と分子内転位の 2 段階反応であると仮定した。 C_{β} - C_{α} - NH_2 から C_{β} - NH -を生成する転位反応には、窒素原子が脱離基と結合していることが必要である。例えば、グルコシノレートは硫酸化アルドキシム構造を持ち、これはチオグルコシド結合の加水分解後に起こる Lossen 転位に必須である (Fig. 1-1)。窒素原子の酸化が AMI 生成のメカニズムの一つであると推定される。さらに、CYP79 ファミリーは、グルコシノレートやシアノグルコシドの生合成において、カルボキシ基の除去と窒素原子の酸化を触媒し、アミノ酸からアルドキシムを生成する。したがって、CYP をコードすると予測された Trinity_20495 を AMI 生合成遺伝子の有力候補とみなした。オオムギはロイシン由来のシアノグルコシドを蓄積し、その生合成前駆体であるメチルブタナールオキシムは CYP79A8 または CYP79A12 によって生合成される (Knoch et al., 2016; Komatsuda et al., 2007)。しかし、CYP79A8 は Trinity_20495 とアミノ酸配列相同性が約 30% であり、遠縁であると考えられる。

BLASTX 検索でヒットした CYP76C4 と CYP76M5 はヒドロキシラーゼ活性もち、テルペノイドの修飾に関与することが報告されているが (Höfer et al., 2013; Wang et al., 2012)、予想する C_{β} - N 結合形成分子内転位を触媒するかは不明である。また、CYP76C サブファミリーはアブラナ科植物に特異的である (Hansen et al., 2021; Höfer et al., 2014)。Trinity_20495 の基質の情報が不明なため、まずはトランスジェニック植物を作製して生理機能を推定することを計画した。

2-4. 実験手法

2-4-1. オオムギの栽培

ファイバースノウと Morex と *subsp. spontaneum* を 1-4-2 と同じ条件で 72 時間栽培した。地上部を葉身と子葉鞘に分割して回収した。

2-4-2. *De novo* トランスクリプトームアセンブリと RNA-seq 解析

ISOSPIN Plant RNA (ニッポンジーン) を用いて、ファイバースノウの葉身から全 RNA を抽出し、バイオアナライザーを用いて RNA の品質を確認した。RNA ライブラリは、TruSeq RNA Prep Kit (Illumina) を用いて、500 ng の全 RNA からメーカーのプロトコールに従って作製した。バイオアナライザーで測定したライブラリの平均長さは 300 bp であった。ライブラリ濃度は qRT-PCR で決定し、10 μ M に調整した。100 bp ペアエンドリード (6,200 万フラグメント) は、Illumina HiSeq 2500 system を用いて作成した。この生リードデータは DNA Data Bank of Japan (DDBJ) から入手可能である (DRA017157)。

生リードを Trimmomatic と FASTX-toolkit でクリーンアップし、アダプター配列、5'末端の 15 塩基配列、同定できなかった塩基 (N) を含むリード、長さ 50 bp 未満のリード、塩基の 80% 未満が Q30 以上のリードを除去した。クリーンアップしたリードからペアリードのみを抽出し、その後の解析に用いた (5,400 万フラグメント)。トランスクリプトームアセンブリは Trinity を用いて行い、CDS 同定はアセンブリされたトランスクリプトームに基づいて TransDecoder で行った。100 アミノ酸未満のトランスクリプトームは TransDecoder オプションで除去した。予測された CDS 配列の冗長性とノイズを減らすため、CD-HIT を用いて類似度が 90% 以上の CDS 配列をクラスタリングし、最終的に 26,355 個の CDS 配列を生成した。本研究では、生成された CDS 配列をファイバースノウ葉身の unigene と定義した。BUSCO により評価した結果、陸上植物に共通に保存されている遺伝子の 92.3% が unigene として含まれていた。unigene の機能推定は、e-value < 1e-5 のシロイヌナズナ全遺伝子のア

ミノ酸配列に対して BLAST プログラムを用いて行った。この解析に使用したコマンドを Table 2-2 に示す。

RNA-seq 解析のために、グラミン生産サンプル (ファイバースノウ葉身、subsp. *spontaneum* 葉身) および非生産サンプル (ファイバースノウ子葉鞘、Morex 葉身) から、ISOSPIN Plant RNA を用いて n=3 で全 RNA を抽出し、バイオアナライザーで品質を確認した。NEBNext Ultra II RNA Library prep kit (New England Biolabs) を用いて、1000 ng の全 RNA から平均長 350 bp の RNA ライブラリを調製した。濃度は qRT-PCR で測定し、10 nM に調整した各ライブラリを等量混合した。NextSeq550 system を用いて 75 bp のシングルリードを得た。本研究で使用した生リードデータは、DDBJ (DRA017157) から入手できる。その後の解析には CLC Genomics Workbench version 22 を用いた。生リードデータをクリーンアップし (quality limit = 0.001、5'-末端ヌクレオチド数 = 14、3'-末端ヌクレオチド数 = 3、リード中の最小ヌクレオチド数 = 36)、unigene にマッピングした (オプションはすべてデフォルト値)。グラミン生合成に関与する発現変動遺伝子の候補は、偽発見率 (FDR) <0.05、fold-change > 10 とした。

Table 2-2 ファイバースノウ葉身の *de novo* トランスクリプトームアセンブリに使用された

プログラムツール

| Content of implementation | Tool | Command |
|--|----------------------|--|
| Remove adapter sequences | Trimmomatic | java -jar 'trimmomatic-0.39.jar' PE -threads 4 -phred33 'R1.fastq' 'R2.fastq' 'paired_R1.fastq' 'unpaired_R1.fastq' 'paired_R2.fastq' 'unpaired_R2.fastq' ILLUMINACLIP:/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-SE.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:50 -trimlog 'log.txt' |
| Remove 15 nucleotide sequences on the 5' | FASTA/Q Trimmer | fastx_trimmer -Q 33 -f 16 -l 100 -i input.fastq -o output.fastq |
| Remove reads containing N and reads less than 50 bp length | FASTA/Q Clipper | fastx_clipper -Q 33 -a N -l 50 -i input.fastq -o output.fastq |
| Remove reads with less than 80% of bases > Q30 | FASTQ Quality Filter | fastq_quality_filter -Q 33 -q 30 -p 80 -i input.fastq -o output.fastq |
| <i>De novo</i> transcriptome assembly | Trinity | Trinity --seqType fq --max_memory 40G --CPU 20 --output ./trinity_out -- left cleaned-up R1.fastq --right cleaned-up R2.fastq |
| CDS identification | TransDecoder | TransDecoder.LongOrfs -m 100 -t input.fasta TransDecoder.Predict -t input.fasta --single_best_only |
| Cluster CDS sequences | CD-HIT | cd-hit-est -i input_cds.fasta -o output_cds.fasta -c 0.90 -M 10000 -T 8 |
| Evaluation of unigenes | BUSCO | busco -i input_AA.fasta -l embryophyta_odb10 -o output -m protein -c 20 |
| Annotation | BLAST | blastp -query input_AA.fasta -db TAIR10_pep_20101214.fasta -evalue 0.0001 -outfmt 5 -num_threads 8 -max_target_seqs 1 -out output_AA.fa.xml |

3. オオムギ新規 CYP の機能解析

3-1. 序論

グラミン生合成候補遺伝子として抽出した Trinity_20495 の CDS を 72 時間生育したファイバースノウの葉身からクローニングし、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に導入し、代謝変動を解析したところ、トランスジェニック *A. thaliana* は新たにグラミン前駆体の 3-アミノメチルインドール (AMI) 生合成能を獲得した (Fig. 3-1A; 金井 修論, 2022)。さらに、AMI を基質として受け入れる *N*-メチルトランスフェラーゼ (HvNMT) の共発現がグラミンの蓄積をもたらすかどうかを調べた結果、Trinity_20495 と HvNMT を共発現させたトランスジェニック *A. thaliana* は、グラミンと *N*-メチル-AMI (MAMI) を蓄積した。これらの結果から、Trinity_20495 は AMI 生合成能をもつ酵素遺伝子であることが示された。しかし、*A. thaliana* はグルコブラシシンなどのアブラナ科植物特有の化合物を蓄積し、これらが AMI の前駆体になる可能性も考えられる。実際に、グルコブラシシンがミロシナーゼによる加水分解を受けて生じるインドール-3-メチルグルコシノレートが AMI に分解される経路が示唆されている (Bednarek et al., 2009)。

アブラナ科特有の化合物を経ずに AMI が生合成されるのか調べるために、単子葉植物であるイネ (*Oryza sativa*) を宿主として、Trinity_20495 の機能をさらに調べた (金井 修論, 2022)。その結果、Trinity_20495 と HvNMT を共発現させたトランスジェニックイネから AMI および MAMI とともにグラミンが明瞭に検出された (Fig. 3-1B)。これらの結果は、Trinity_20495 がコードする CYP が AMI の生合成に重要な役割を果たしているという仮説を強く支持するものであった。

CYP 命名委員会 (David R. Nelson, University of Tennessee Health Science Center) に Trinity_20495 の系統名を問い合わせたところ、Trinity_20495 のタンパク質配列は機能未知の CYP76M57 と同一であることが判明した。以下、本論文では Trinity_20495 を CYP76M57 と命名する。

CYP76M57 が単独で Trp-AMI 変換を触媒しているのか、あるいは他の酵素と協力しているのかは、特殊な代謝経路が複雑なネットワークを構成している可能性があるため、まだ不明であった。そこで、CYP76M57 の直接的な機能を調べるために *Pichia pastoris* で異種発現させた酵素を用いて *in vitro* 活性評価を実施した。CYP76M57 と共に *A. thaliana* の NADPH:CYP 還元酵素(CPR)である ATR1 を *P. pastoris* で発現させた。

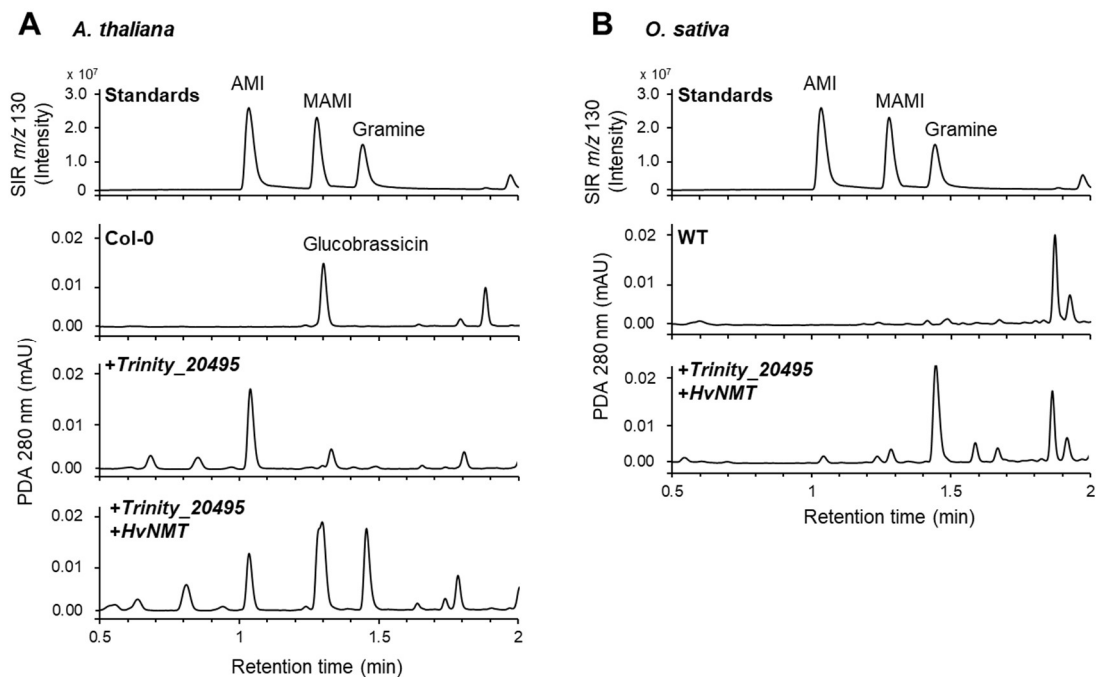


Fig. 3-1 *Arabidopsis thaliana* (A) および *Oryza sativa* (B) における *Trinity_20495* (CYP76M57) および *HvNMT* の過剰発現の影響

標品のクロマトグラムにおける m/z 130 のシングルイオン記録 (SIR) は AMI、MAMI、グラミン由来のフラグメントイオン (3-メチレンインドリウム) を検出できる。RT \approx 1.3 分 (Col-0 および +*Trinity_20495*) に観察される小さなピークは、*A. thaliana* に蓄積したインドールグルコシノレートであるグルコブラッシンに対応する。

3-2. 結果

3-2-1. CYP76M57 の系統解析

オオムギ CYP76M57 (HvCYP76M57) と他の CYP との系統解析の結果、機能未知のコムギ (*Triticum aestivum*) (XM_044558560), タルホコムギ (*Aegilops tauschii*) (XM_020319230), オオムギ (*H. vulgare*) (XM_045099516) 由来の CYP76M5-like タンパク質との密接な関係が示された (Fig. 3-2)。HvCYP76M57 と系統学的に近縁であるイネの CYP76M メンバーは、オリザレキシンや フィトカッサンなどのジテルペノイド系フィトアレキシンの前駆体を水酸化する (Wang et al., 2012; Kitaoka et al., 2021) が、アミノ酸に対する活性の例はない。HvCYP76M57 のアミノ酸配列は、機能が解明されている CYP76M メンバーであるイネ OsCYP76M5-8 と 50-53% の相同性を有している。

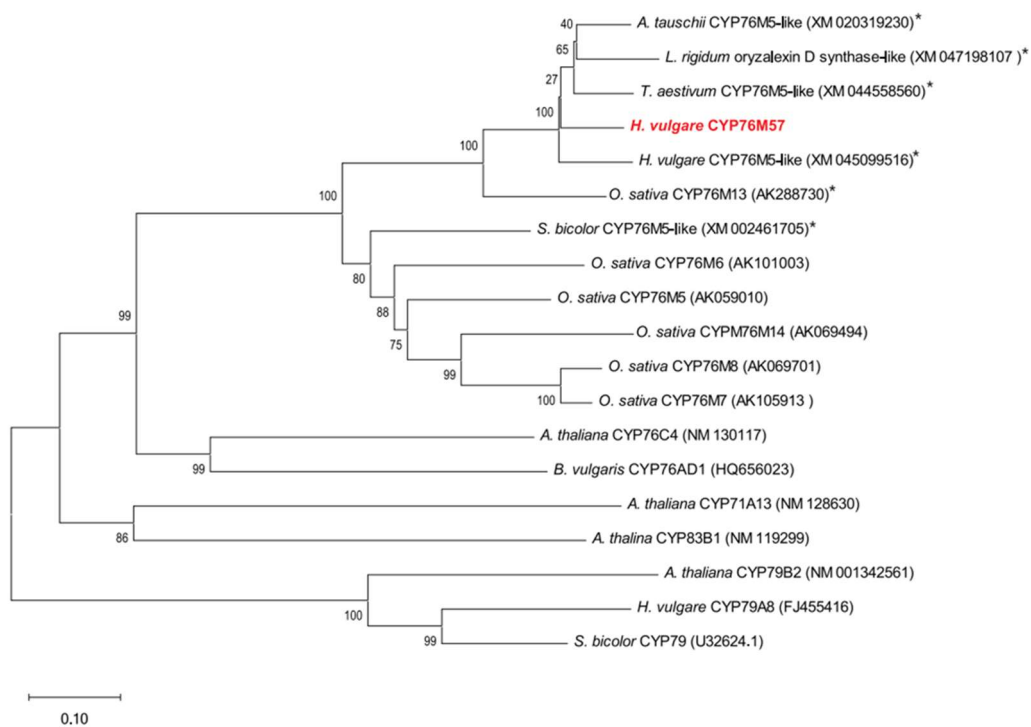


Fig. 3-2 単離した CYP76M57 を含む CYP の系統樹

アミノ酸配列は MAFFT を用いてアラインメントし、MEGA11 の近傍結合法を用いて系統樹を作成した。各ノードにブートストラップ値(試行回数 1000 回)を示す。括弧内に各 CYP のアクセッション番号を示す。活性が未同定の CYP はアスタリスクで示す。

3-2-2. CYP76M57 の *in vitro* 酵素活性評価

CYP76M57 と ATR1 を導入した *P. pastoris* からマイクロソーム画分を回収し、ウェスタンブロットティングで CYP76M57 と ATR1 の発現を確認したところ、CYP76M57 のバンド (59 kDa) は明瞭に検出できたが、ATR1 のバンド (71 kDa) は CYP76M57 ほど明瞭に検出できなかった (Fig. 3-3)。得られたマイクロソーム画分中に *P. pastoris* 由来の CPR が含まれていると考え、活性評価に使用した。まず、グラミン生合成経路の出発物質である L-Trp を基質として CYP76M57 ミクロソームと NADPH を反応させた。その結果、RT \approx 1.0 分に生成物のピークが検出され、標品の AMI と MS スペクトルと UV スペクトルが一致した (Fig. 3-4A, C)。 m/z 130 は、AMI のフラグメントイオン (3-メチレンインドリウム) を示している。シングルイオンレコーディング (SIR) m/z 130 で検出すると、AMI の生成がより明瞭に確認できた。この結果から CYP76M57 は L-Trp を AMI に変換することが明らかになった。さらに、反応液に NADPH が存在しない場合、AMI が生成されないことから、Trp-AMI 変換は CYP の活性によるものであることを支持している。

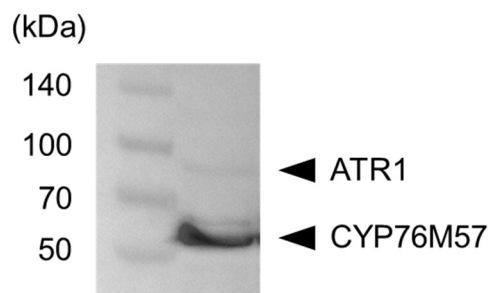


Fig. 3-3 *P. pastoris* で発現させた CYP76M57 のウェスタンブロットティングによる検出

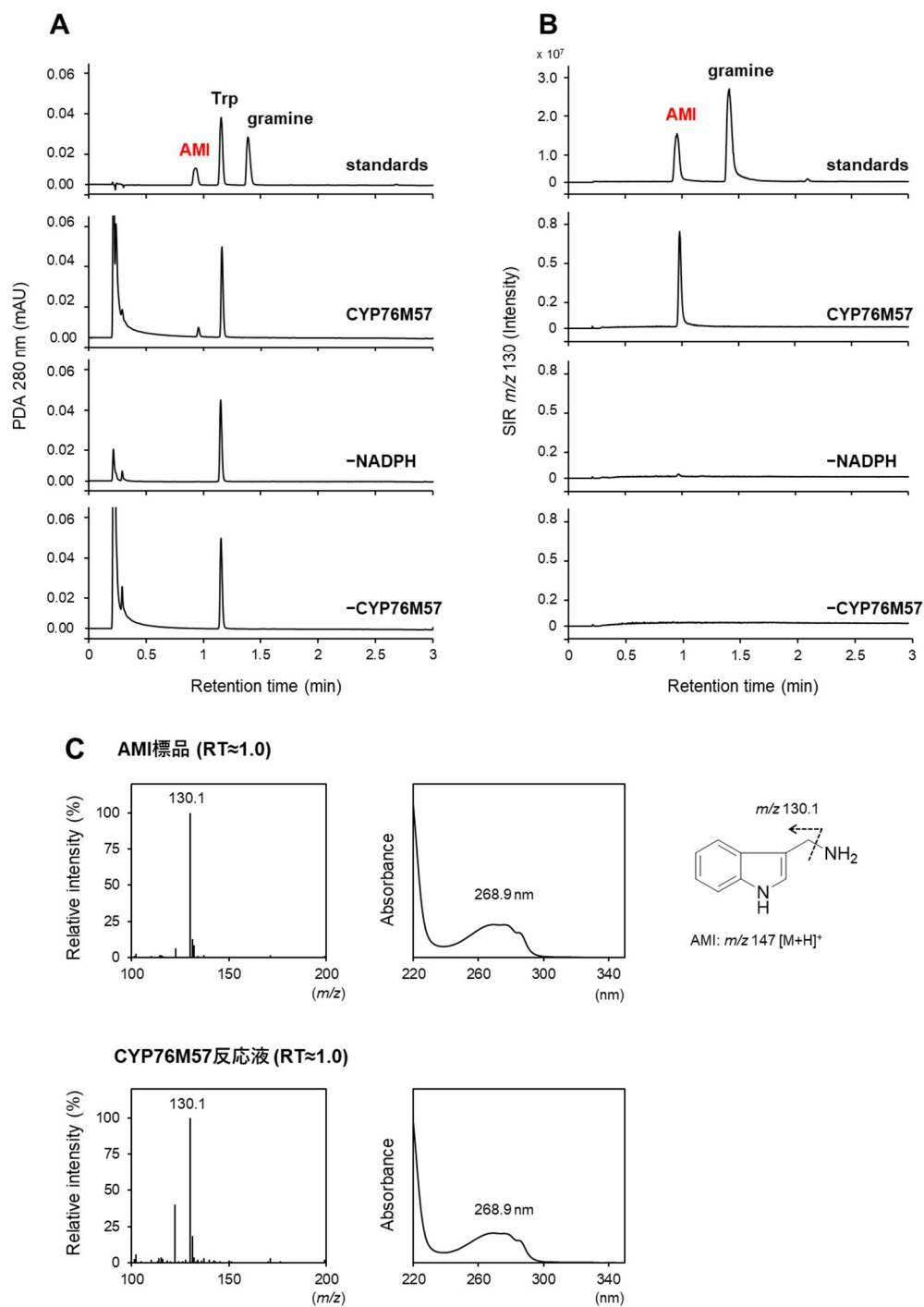


Fig. 3-4 CYP76M57 反応液の LC-MS 解析

- A) PDA 280 nm で検出した反応液のクロマトグラム
- B) Single ion recording (SIR) m/z 130 で検出した反応液のクロマトグラム
- C) AMI 標品と CYP76M57 反応液の RT \approx 1.0 分のピークにおける MS スペクトルと UV スペクトル

つづいて、CYP76M57による Trp-AMI 変換は、一段階の反応なのか、それとも多段階の反応なのか調べる必要がある。第1章の結果より、Trpのアミノ基窒素はグラミンに保存されることから、Trp-AMI変換に中間体が存在するとしたら、芳香環(Ar)-C₂-NH₂構造を持つトリプタミン(TAM)やインドール-3-アセトアミド(IAAmd)が候補として考えられる。TAMはTrpの脱炭酸体として知られており、Trp-AMI変換において、Trpのカルボキシ基は脱離するので、TAMが中間体になる可能性は十分考えられる。さらに脱炭酸を伴う反応を触媒するCYPとして、アルドキシム生合成に関与するCYP79が知られている(Hull et al., 2000)。また、IAAmdはTAMから酸素原子が1つ付加した化合物で、CYPによる酸素原子添加反応は広く知られている。そこで、CYP76M57によるTrp-AMI変換が中間体を經由するか調べるために、TAMとIAAmdを基質として反応させた。その結果、TAMとIAAmdの両方でAMIの生成は見られなかったので(Fig. 3-5)、CYP76M57によるTrp-AMI変換はTrpから直接AMIが生成される反応であることが示された。

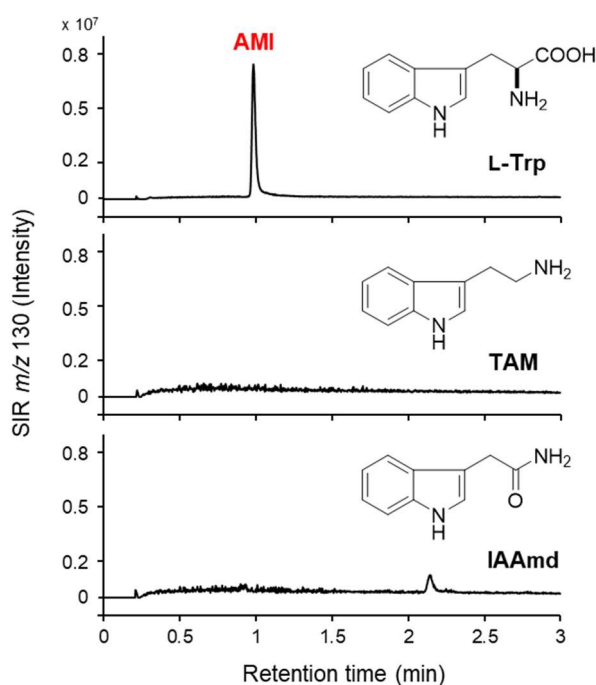


Fig. 3-5 Ar-C₂-NH₂ 構造をもつ化合物に対する CYP76M57 の反応性

生成物はシングルイオンレコーディング (SIR) m/z 130 で検出した。

RT \approx 1.0 分のピークは AMI を示す。

L-Trp…トリプトファン、TAM…トリプタミン、IAAmd…インドール-3-アセトアミド

3-2-3. CYP76M57 による Trp-AMI 変換における Trp の保存部位の確認

第 1 章の *in vivo* トレーサー試験の結果より、グラミンが Trp 側鎖のβ-炭素とアミノ基窒素を受け継いだことが示唆された。Trp-AMI 変換における保存部位を確認するためには、 $[\beta\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Trp}$ (M+1 同位体) や $[\text{}^{15}\text{N}_2]\text{-Trp}$ (M+2 同位体) を基質として *in vitro* で同様の取り込みが観察され、AMI 同位体ピーク ($[\text{M}+1+\text{H}]^+$, $[\text{M}+2+\text{H}]^+$) が増加するかどうかを調べる必要がある。しかし、本研究で採用した MS の分析条件では、AMI のプロトン化分子 (m/z 147; $[\text{M}+\text{H}]^+$) は検出できず、AMI からアミノ基が脱離したフラグメントイオンである 3-メチレンインドリウム (m/z 130) が検出される。そこで、CYP76M57 により生成した AMI の窒素原子が L-Trp から保存されたか調べるためには、プロトン化分子が検出できるグラミンを合成する必要がある。大腸菌 (*Escherichia coli*) で異種発現させた HvNMT とメチル基供与体 (S-アデノシル-L-メチオニン) の存在下で Trp を基質に CYP76M57 の反応を行ったところ、CYP76M57 により Trp から生成した AMI を N-メチル AMI (MAMI) とグラミンに変換することができ、グラミンのプロトン化分子が m/z 175 $[\text{M}+\text{H}]^+$ として検出された (Fig. 3-6)。

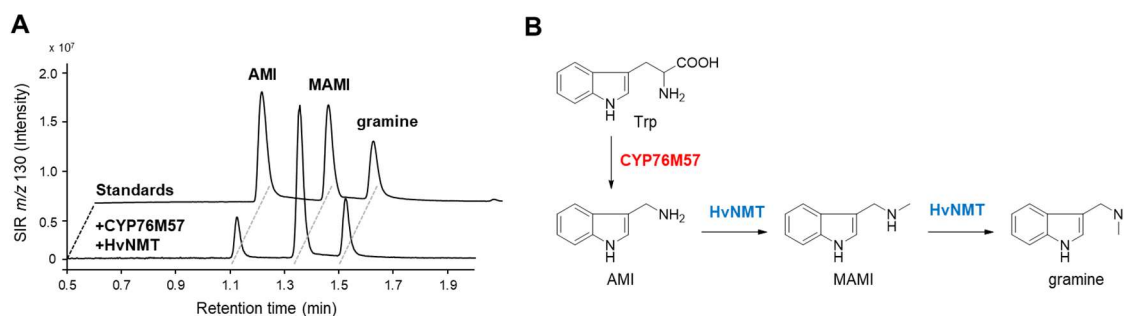


Fig. 3-6 CYP76M57 と HvNMT による Trp に対する反応

A) 反応生成物はシングルイオンレコーディング (SIR) m/z 130 で検出した。CYP76M57 と HvNMT はそれぞれ *Pichia pastoris* と *Escherichia coli* で発現させた。

B) トリプトファンからグラミンの反応経路

つづいて、CYP76M57 と HvNMT による *in vitro* 酵素反応で $[\alpha\text{-}^{13}\text{C}]$ 、 $[\beta\text{-}^{13}\text{C}]$ 、 $[\text{}^{15}\text{N}_2]\text{-Trp}$ からグラミンを合成することで Trp 側鎖のグラミンへの保存部位を確認した。反応液を SIR

m/z 175(プロトン化分子 $[M+H]^+$)、176 (同位体 $[M+1+H]^+$)、177 (同位体 $[M+2+H]^+$)で検出した結果、Fig. 3-7 で示す通り、 $[\alpha\text{-}^{13}\text{C}]$ -Trp 反応液からはグラミンが m/z 175 で明瞭に検出された。この結果は Trp の α 炭素はグラミンに引き継がれないことを示している。非標識 Trp と $[\alpha\text{-}^{13}\text{C}]$ -Trp 反応液における m/z 176 のピークは、天然存在比と同程度の検出であった。 $[\beta\text{-}^{13}\text{C}]$ -Trp と $[\text{N}_2\text{-}^{15}]$ -Trp 反応液からはグラミンがそれぞれ m/z 176 (M+1 同位体) と m/z 177 (M+2 同位体) で検出され、 m/z 175 ではほとんど検出されなかった。これらの結果から、Trp のグラミンへの保存部位は、第 1 章の *in vivo* トレーサー試験の結果と同様に、 β -炭素とアミノ基窒素であることが明らかになった。非標識 Trp と $[\text{N}_2\text{-}^{15}]$ -Trp の 1:1 混合物を基質として用いてグラミンを生成すると、 $[M+H]^+$ (m/z 175)と $[M+2+H]^+$ (m/z 177)は同程度の強度であった (Fig. 3-8)。一方、 $[M+1+H]^+$ (m/z 176)の存在量は、非標識グラミンで検出されたものと同程度の低いレベルに保たれていた。

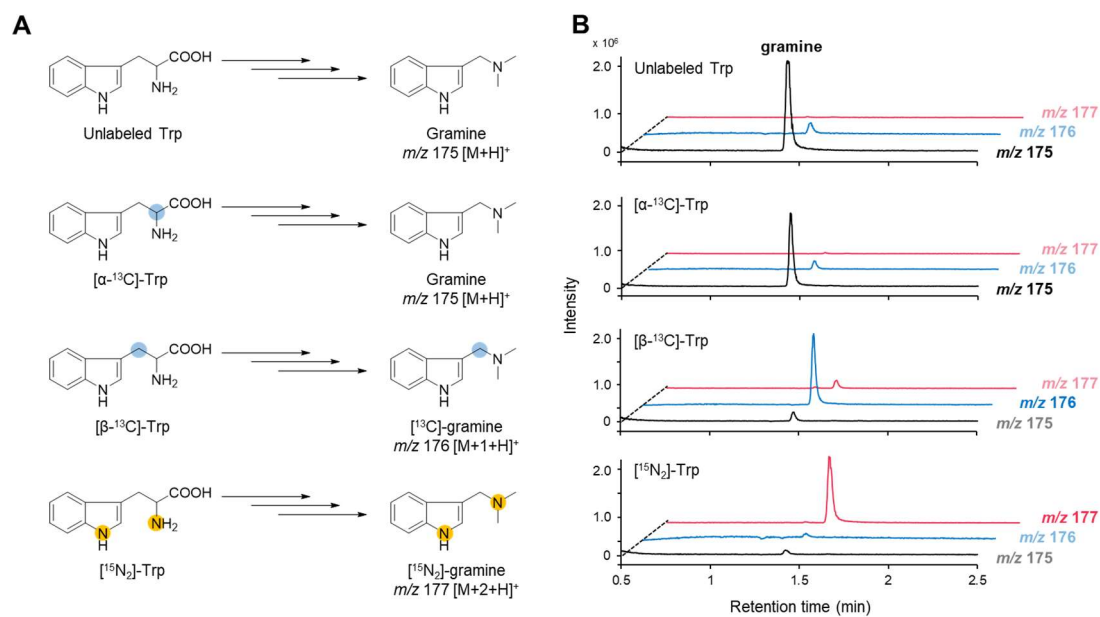


Fig. 3-7 *in vitro* 酵素反応における Trp の ^{13}C 、 ^{15}N のグラミンへの取り込み

- A) Trp-グラミン変換における保存部位。青丸印は ^{13}C 、黄丸印は ^{15}N を表す。
 B) 標識 Trp 反応生成物のクロマトグラム。生成物はシングルイオンレコーディング(SIR) m/z 175, 176 (M+1 同位体), 177 (M+2 同位体) で検出した。RT \approx 1.5 分のピークはグラミンを示す。

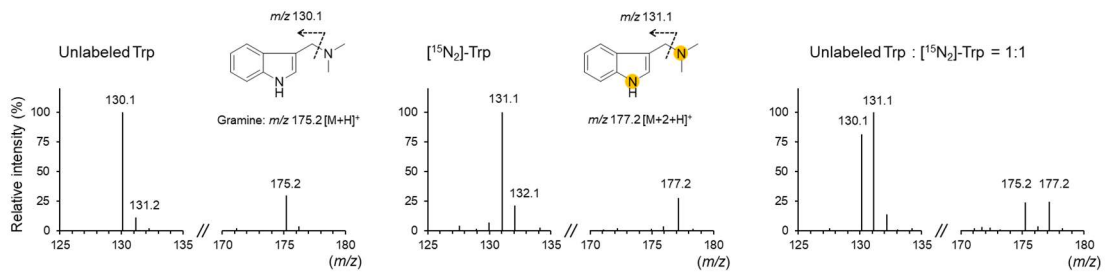


Fig. 3-8 非標識 Trp、 $[^{15}\text{N}_2]$ -Trp、および非標識 Trp と $[^{15}\text{N}_2]$ -Trp の 1:1 混合物を基質とした反応液中のグラミンのマススペクトル

3-2-4. 様々なインドール化合物に対する CYP76M57 の活性

CYP76M57 による Trp-AMI は脱炭酸を伴い $\text{C}_\beta\text{-N}$ 結合を形成する分子内転位であり、このような反応は前例がなく、反応機構の解明が必須である。そこで、反応機構の手がかりをつかむために、L-Trp の鏡像異性体である D-Trp や、L-Trp に置換基を導入した化合物、様々なインドール化合物を基質として CYP76M57 と反応させた。本研究で検討した化合物を Fig. 3-9 に示す。

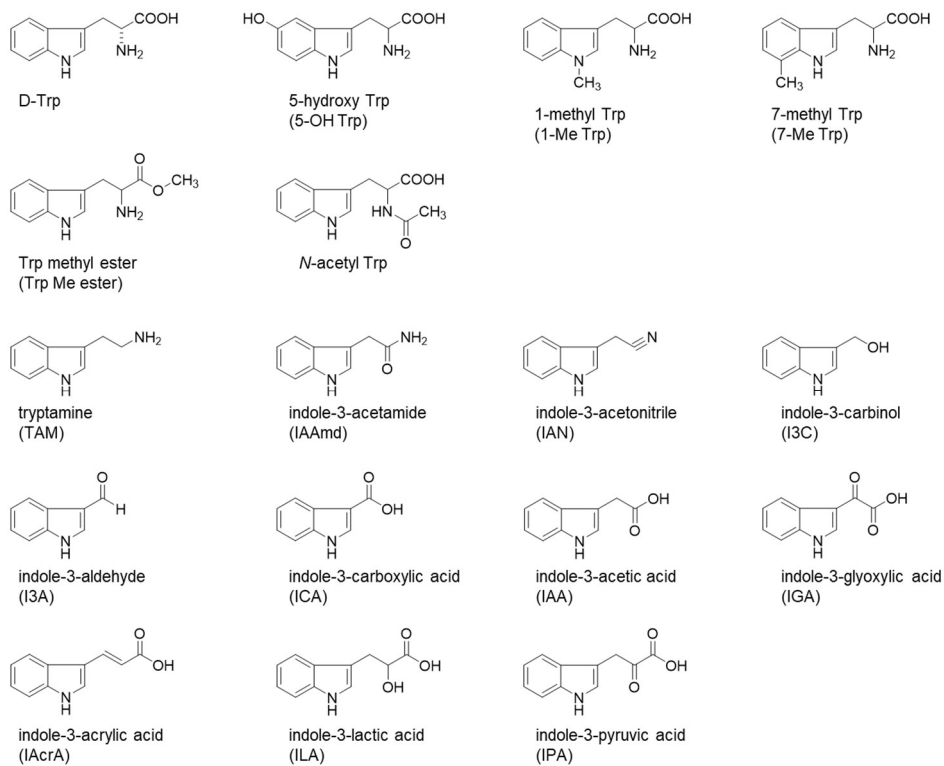


Fig. 3-9 CYP76M57 の基質検討に用いた化合物

括弧内に略称を示す。

Fig. 3-10 で示す通り、D-Trp からは AMI が生成されなかった。この結果から、CYP76M57 は鏡像異性体を認識できることが示された。つづいて、Trp に置換基を導入した化合物では、L-Trp と同様の分子内転位が起こるのか (置換基導入 AMI が生成されるのか) どうか確かめた。5-ヒドロキシ Trp (5-OH Trp) と *N*-アセチル Trp の反応液は基質のピークのみ検出され、生成物が得られなかった。1-メチル Trp (1-Me Trp) と Trp メチルエステルは反応中に Trp に分解したが、基質由来の生成物は検出されなかった (Fig.3-11A)。7-メチル Trp (7-Me Trp) 反応液では、未知の生成物 (m/z 231) が得られたが、CYP76M57 を含まないマイクロソーム画分を用いた反応液でも同様の生成物が得られたので、CYP76M57 特異的な生成物ではないと結論付けた (Fig. 3-11B)。

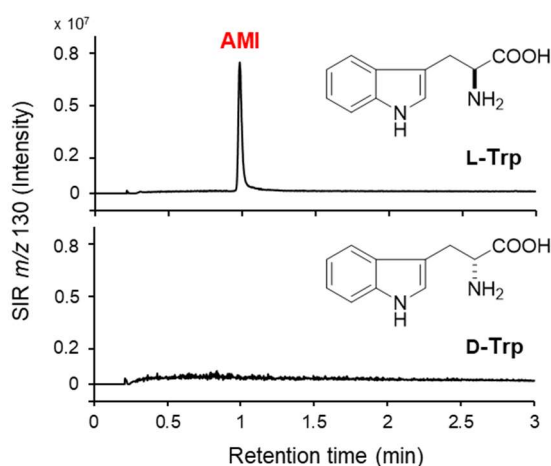


Fig. 3-10 鏡像異性体による CYP76M57 の反応性への影響

上のクロマトグラムは L-Trp を基質にした反応液、下のクロマトグラムは D-Trp を基質にした反応液を示す。反応生成物はシングルイオンレコーディング(SIR) m/z 130 で検出した。RT \approx 1.0 分のピークは AMI を示す。

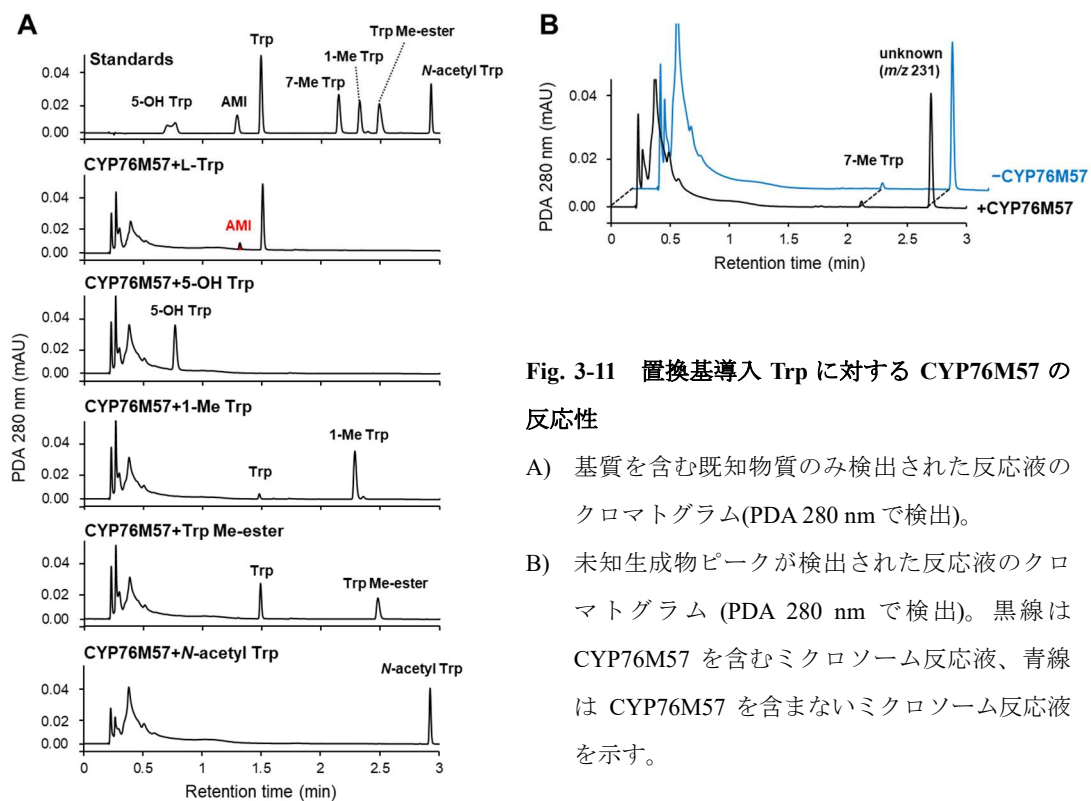


Fig. 3-11 置換基導入 Trp に対する CYP76M57 の反応性

- A) 基質を含む既知物質のみ検出された反応液のクロマトグラム(PDA 280 nm で検出)。
- B) 未知生成物ピークが検出された反応液のクロマトグラム (PDA 280 nm で検出)。黒線は CYP76M57 を含むマイクロソーム反応液、青線は CYP76M57 を含まないマイクロソーム反応液を示す。

インドール化合物については、インドール-3-グリオキシル酸(IGA)、インドール-3-アセトアミド (IAAmd)、インドール-3-カルビノール (I3C)、インドール-3-酢酸 (IAA) 反応液では、基質のピークのみ検出された (Fig. 3-12A)。一方でトリプタミン (TAM)、インドール-3-乳酸 (ILA)、インドール-3-アルデヒド (I3A)、インドール-3-カルボン酸 (ICA)、インドール-3-ピルビン酸 (IPA)、インドール-3-アクリル酸 (IAcrA)、インドール-3-アセトニトリル (IAN) 反応液では、基質以外のピークが検出されたが、CYP76M57 を含まないマイクロソーム画分を用いた反応液でもピークの出現パターンが同様であったため、CYP76M57 特異的な生成物は得られなかった (Fig. 3-12B)。

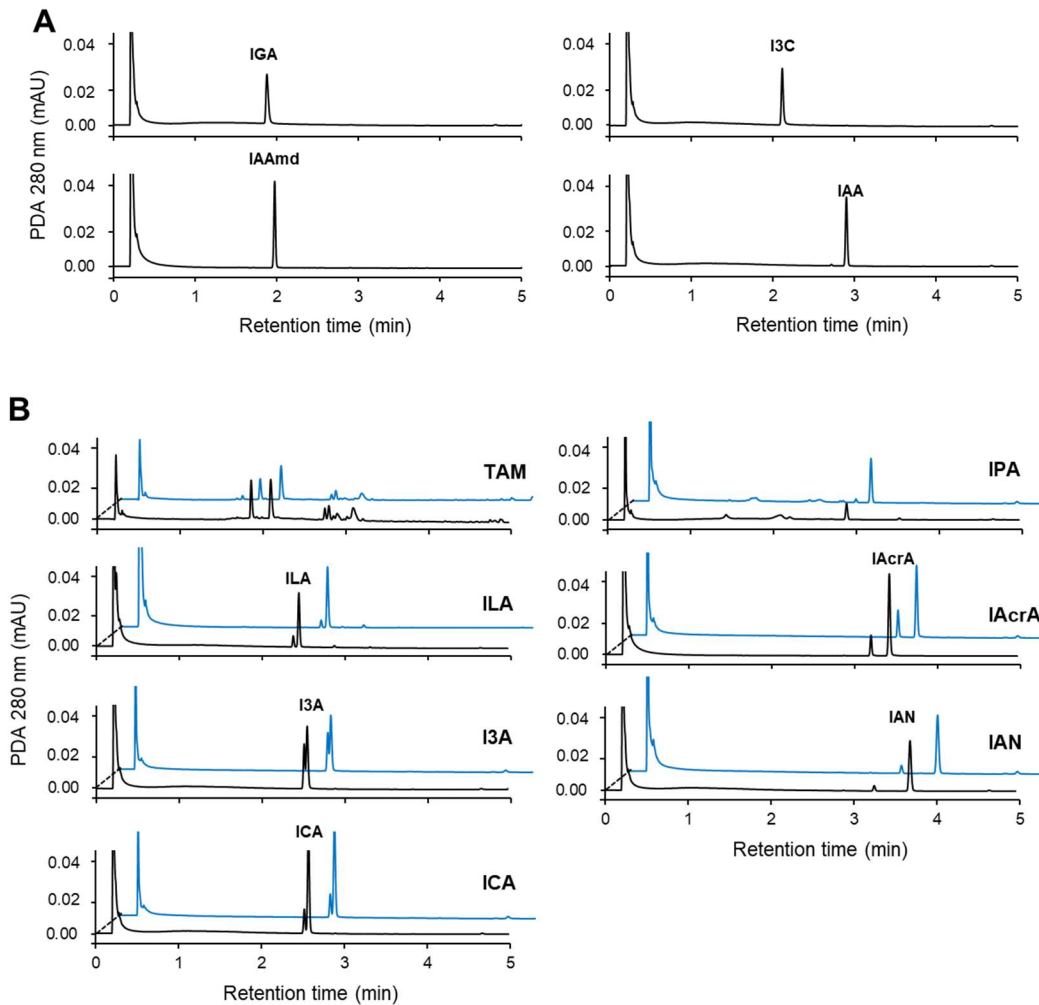


Fig. 3-12 様々なインドール化合物に対する CYP76M57 の反応性

A) 基質のピークのみ検出された反応液のクロマトグラム (PDA 280 nm で検出)

IGA : インドール-3-グリオキシル酸、IAAMD : インドール-3-アセトアミド、I3C : インドール-3-カルビノール、IAA : インドール-3-酢酸

B) 未知生成物ピークが検出された反応液のクロマトグラム (PDA 280 nm で検出)

黒線は CYP76M57 を含むミクロソーム反応液、青線は CYP76M57 を含まないミクロソーム反応液を示す。TAM : トリプタミン、ILA : インドール-3-乳酸、I3A : インドール-3-アルデヒド、ICA : インドール-3-カルボン酸、IPA : インドール-3-ピルビン酸、IAcrA : インドール-3-アクリル酸、IAN : インドール-3-アセトニトリル

3-3. 考察

P. pastoris で異種発現させた CYP76M57 は、NADPH の存在下で Trp から AMI の生成を触媒することが示され、この酵素が Trp に直接作用して AMI を与えることが示された。さらに、Trp のアミノ基窒素が AMI に取り込まれるという第 1 章で示された結果は、 $[^{15}\text{N}_2]$ -Trp を基質として用いることで明確に検証された。しかし、この結果は必ずしもアミノ基の導入が分子内転位によって進行することを示しているわけではない。なぜなら、別の Trp との分子間アミノ基交換も考えられるからである。このメカニズムを推論するために、非標識 Trp と $[^{15}\text{N}_2]$ -Trp の等濃度混合物を基質として用いた。もしアミノ基の分子間交換が起これば、モノアイソトピックイオン (M) と M+2 同位体イオンとともに M+1 同位体イオンをもつグラミンが生成するはずである。M、M+1 同位体、M+2 同位体の存在量はそれぞれ 24.3%、3.8%、24.6%であった。グラミンの M および M+1 同位体の天然存在量が 30.0 および 3.9%であることを考慮すると、M+1 同位体グラミンは、非標識 Trp 中に天然に存在する M+1 同位体 Trp に由来する。このデータから、Trp-AMI 変換の際に Trp のアミノ基とインドール環は互いに解離しなかったことが示された。したがって、Trp のアミノ基 ^{15}N のグラミン (および AMI) への取り込みは、分子間のアミノ基交換ではなく、分子内転位によって進行した。 β -酸化および非 β -酸化 (レトロアルドール) 経路は、芳香族アミノ酸から C_2 を同時に除去する機構として知られている (Marchiosi, et al., 2020)。これらの経路はチオラーゼ (β -酸化) とリアーゼ (レトロアルドール反応) によって触媒され、 α -NH₂ の除去と β -炭素 (ケト基またはヒドロキシ基) の酸化が必要であることから、本研究で述べた AMI 生合成経路は全く異なるメカニズムで起こると考えられる。

CYP76M57 による Trp-AMI 変換は、Trp の側鎖の構造が重要だと仮定して、インドール環に置換基が導入された Trp では、置換基が導入された AMI が生成され、Trp の側鎖のカルボキシ基やアミノ基に置換基が導入された化合物では AMI は生成されないと予想した。Trp メチルエステルや *N*-アセチル Trp では、予想通り、CYP76M57 による反応生成物が得ら

れなかったが、一方でインドール環に置換基が導入された Trp では、予想と異なり、反応生成物が得られなかった。また、L-Trp の鏡像異性体である D-Trp を基質とした場合にも AMI の生成は見られなかった。これらの結果から、CYP76M57 の基質は、インドール環と共に側鎖の立体構造が維持されている必要があると考えられる。

CYP76M57 が触媒する反応は C₂ 除去を伴う C_β-N 結合形成分子内転位であるが、これまでに前例のない反応のため、反応機構の解明が必要である。反応機構の手がかりを得るために、様々なインドール化合物に対する CYP76M57 の反応性を調べ、得られた生成物の構造から法則性を見出そうとした。しかし、本研究で検討した 11 種の化合物では CYP76M57 特異的な反応生成物は検出されず、反応機構を考える手がかりは得られなかった。本研究では CYP76M57 は L-Trp のみを基質として受け入れたことから、CYP76M57 は基質特異性が高いことが考えられる。

3-4. 実験手法

3-4-1. 化学物質

全ての化学物質は、Sigma-Aldrich と 富士フィルム和光純薬、東京化成工業で購入した。

3-4-2. *P. pastoris* および大腸菌を用いた CYP76M57 および HvNMT のクローニングと発現

PCR はすべて PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて行い、発現ベクターの構築はすべて In-Fusion[®] HD Cloning Kit (タカラバイオ) を用いて行った。プライマー配列を Table 3 に示す。Trinity_20495 (CYP76M57) および HvNMT (GenBank U54767) の CDS は、AK360305 および U54767 の CDS の 5'-末端および 3'-末端をそれぞれ標的とするプライマーセットを用いて PCR により増幅した。PCR 鋳型は、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) とオリゴ dT プライマーを用いて、72 時間栽培ファイバースノウ葉身の全 RNA を逆転写することにより調製した。得られた DNA 断片を pBluescript の EcoRV

部位に挿入し、大腸菌 DH5 α の形質転換を行った。配列確認後、得られたプラスミドをさらなるクローニングのための鋳型として使用した。HvNMT を大腸菌で発現させるために、CDS をインバース PCR で直鎖化した pET28a に挿入し、BL21-CodonPlus(DE3)-RP の形質転換を行い、N 末端 His タグタンパク質として発現させた。

形成された単一のコロニーを 150 mL の LB 培地 (34 μ g/mL chloramphenicol、50 μ g/mL kanamycin)に接種し、OD₆₀₀が約0.7になるまで37°Cで振盪培養した。その後、終濃度 1 mM になるようイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加して異種発現を誘導し、20°Cで一晩培養した。細胞を遠心分離 (5000 g、5分、4°C) でペレット化し、5 mL の 50 mM HEPES (pH 7.2) に懸濁した。超音波処理で細胞を破碎した後、15,000 g、15 分間の遠心分離で上清から可溶性タンパク質画分を回収した。組換え His タグタンパク質を TALON Metal Affinity Resin (タカラバイオ)を用いて精製した。可溶性画分は、200 mM NaClを含む 50 mM HEPES (pH7.5) であらかじめ平衡化した樹脂に結合させた。同じバッファーで樹脂を洗浄した後、200 mM イミダゾールを含む同じバッファーで組換え酵素を溶出した。

CYP76M57 を *P. pastoris* で発現させるため、CDS を pPICZA (Thermo Fischer Scientific)の *EcoRI-KpnI* 部位に挿入した。シロイヌナズナ CPR (ATR1; GenBank X66016) の CDS を、あらかじめインバース PCR で線状化して α -因子配列を除去した pPICZ6A に挿入した。構築した発現ベクターを *PmeI* で線状化し、*Pichia* EasyComp Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて *P. pastoris* X-33 のゲノムに組み込んだ。CYP76M57 と ATR1 の共発現のために、CYP76M57 導入 X-33 に ATR1 を導入した。メーカーのプロトコールに従って、異種発現のためにコロニーを選択した。組換え *P. pastoris* の単一コロニーを 2 ml の BMGY 培地に接種し、200 rpm で振盪しながら 30°Cで一晩培養した。3000 g、3 分間の遠心分離で細胞を回収し、500 μ L の BMMY 培地に再懸濁した。250 μ L の菌体懸濁液を 100 mL の BMMY 培地に移し、さらに 200 rpm で振盪しながら 30°Cで 48 時間培養した。培養中、24 時間ごとに最終濃度 0.5%(v/v)のメタノールを培地に添加することで異種発現を誘導した。遠心分

離 (3000 g、5分、4°C) で細胞を回収した後、10 mL の breaking buffer [50 mM リン酸ナトリウム (pH7.4)、1 mM EDTA、5% (v/v) グリセロール] に懸濁した。その後、酸洗浄したガラスビーズ (425-600 μm ; Sigma-Aldrich) で激しく攪拌して細胞を破碎し、遠心分離 (20,000 g、15分、4°C) で可溶性画分を上清として回収した。上清をさらに遠心分離 (104,000 g、65分、4°C) し、ミクロソーム画分を得て、100 μL の breaking buffer に再懸濁した。ウシ血清アルブミン (BSA) を標準として、ブラッドフォード試薬を用いて総タンパク質含量を測定した。

5 μg のタンパク質を含むミクロソーム画分を SDS-PAGE で分離し、EzFastBlot buffer (ATTO) を用いて PVDF メンブレンに転写した。Bullet Blocking One for Western Blotting (ナカライテスク) でブロッキング後、CYP76M57 と ATR1 を Anti-Myc-tag mAb-HRP-Direct (MBL ライフサイエンス) と Amersham ECL Prime Western Blotting Direct Reagent (Cytiva) を用いて検出した。

3-4-3. ミクロソーム画分を用いた CYP76M57 の *in vitro* 酵素活性評価

P. pastoris のミクロソーム画分を用いて CYP76M57 活性を評価した。反応液は総量が 1000 μL になるように 100 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.5) に基質 (終濃度 100 μM) および NADPH (終濃度 500 μM)、200 μg のタンパク質を含むミクロソーム懸濁液を添加して調製し、20°C で 6 時間振盪 (200 rpm) しながらインキュベートした。反応は 98°C で 3 分間加熱して終了した。上清を第 1 章 (1-4-3) と同条件の LC-MS 分析に供した。

in vitro トレーサー試験で Trp からグラミンを合成するために、精製した組み換え HvNMT (終濃度 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と *S*-アデノシル-L-メチオニン (終濃度 1 mM) を前述の組成と条件で反応させた CYP76M57 反応液に添加し、30°C で 20 分間インキュベートした。反応終了と生成物の分析は前述の手順で行った。

| Primer | Direction | Sequence (5' → 3') |
|--|-----------|--|
| <i>For cDNA cloning</i> | | |
| CYP76M57 | Forward | ATGGAGCTGTTCCATGTTTGCAT |
| | Reverse | GAAGCACCGGCAAATGACTTGC |
| HvNMT | Forward | AGCCATGGACAAGATTTTCAGCAC |
| | Reverse | GCTACTTGGTGA ACTCAAGAG |
| <i>For construction of CYP76M57-pPICZA</i> | | |
| CYP76M57_pPICZA | Forward | <u>TCGAAACGAGGAATTATGGAGCTGTTCCATGTTTG</u> |
| | Reverse | <u>CCGCCGCGGCTCGAGGC</u> GATGGCAACAACGGGTA |
| <i>For construction of HvNMT-pET28a</i> | | |
| HvNMT_pET28a | Forward | <u>ACTGGTGGACAGCAAATGGACAAGATTTTCAGCACCT</u> |
| | Reverse | <u>ACGGAGCTCGAATTC</u> CTACTTGGTGA ACTCAAGAG |
| <i>For construction of ATR1-pPIC6A</i> | | |
| ATR1_pPIC6A | Forward | <u>TTATTCGAAACGATGACTTCTGCCTTGTACGC</u> |
| | Reverse | <u>GATGAGTTTTTGTTC</u> CCAAACGTCCCTCAGGTATC |
| <i>For inverse PCR</i> | | |
| pPIC6aA | Forward | GAACAAAACTCATCTCAGAAGAG |
| | Reverse | CATCGTTTTCGAATAATTAGTTGTT |
| pET28a | Forward | GAATTCGAGCTCCGTCGACAA |
| | Reverse | TTGCTGTCCACCAGTCATGCTA |

Table 3 プライマー配列

下線は In-Fusion クローニングのアダプター配列を示す。

4. オオムギ品種間における CYP76M57 の配列とグラミン生産性との関係

4-1. 序論

第 2 章でグラミン生合成候補遺伝子を RNA-seq で抽出したところ、Trinity_20495 (CYP76M57) は、グラミン非生產品種であるはるな二条より単離された遺伝子 AK360305 と一塩基の置換を除いてほぼ同一であった。さらに、なぜグラミンが野生オオムギや栽培品種オオムギの限定された品種にのみ蓄積するのか、その分子基盤は明らかにされていなかった。グラミンを生産するオオムギ品種と生産しないオオムギ品種が存在する理由を明らかにするために、オオムギ品種間の CYP76M57 転写物の分布と塩基・アミノ酸配列を調べた。グラミン非生產品種において、Morex、*f. agriochrithon* は CYP76M57 が欠如しており、Betzes、Bowman、Barke では数百 bp の DNA 断片の挿入によるフレームシフト、Proctor は DNA 断片の挿入と 1 塩基欠損によるフレームシフトが生じることが明らかになった (Fig. 4-1A; 金井 修論, 2022)。さらに、検討した全てのグラミン生產品種 (ファイバースノウ、シュンライ、Maraini、*subsp. spontaneum*) とグラミン非生產品種であるはるな二条とワセドリ二条では約 1500 bp の断片が検出され、492 アミノ酸のタンパク質をコードすることが示された。タンパク質の一次構造をアラインメントした結果、9 か所にアミノ酸置換があることが判明し、これらの置換のうち、104 位の置換はグラミン生産性と相関があり、グラミンを生産するオオムギでは Arg104、グラミンを生産しないオオムギでは Thr104 であった (金井 修論, 2022)。そこで、はるな二条由来とワセドリ二条由来の T104 型 CYP76M57 の機能を *in vitro* で評価し、104 位残基の AMI 生産性および触媒活性への寄与を調べた。つづいて、SWISS-MODEL により CYP76M57 のホモロジーモデリングを構築して 104 位残基の位置を調べると共に、ホモロジーモデリングに基づき活性部位を推定し、その周辺に変異を導入して、活性に影響を及ぼすアミノ酸残基を調べた。

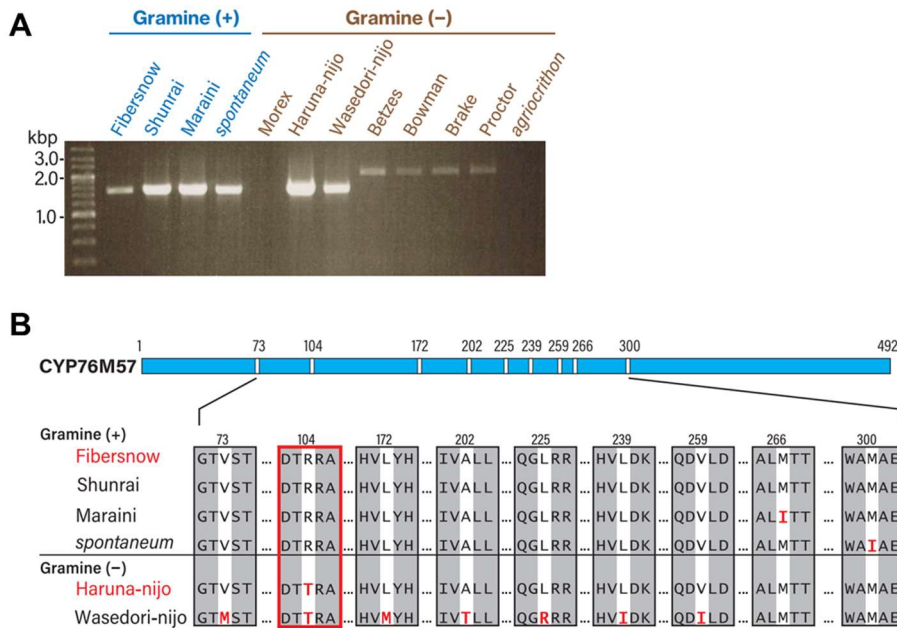


Fig. 4-1 オオムギ品種間における CYP76M57 の配列

- A) 逆転写 PCR で増幅させた CYP76M57。72 時間栽培オオムギ葉身から調製した cDNA を鋳型として PCR を行った。
- B) CYP76M57 配列の変異の概要。変異を含む 9 個の領域をバーの下に示す。赤枠の 104 位の変異はグラミン生産性と相関する。

4-2. 結果

4-2-1. T104 型 CYP76M57 の *in vitro* 酵素活性評価

はるな二条 CYP76M57 はファイバースノウと一アミノ酸しか違いがないが(R104T)、ワセドリ二条 CYP76M57 は、R104T 以外に、6 か所の変異 (V73M、L172M、A202T、L225R、L239I、V259I) をもつ (Fig. 4-1B)。グラミン生産能と相関のある T104 型 CYP76M57 の活性を調べるために、はるな二条由来の CYP76M57 とワセドリ二条由来の CYP76M57 を *P. pastoris* でそれぞれ異種発現させた。得られたマイクロソーム画分を L-Trp と NADPH と共に反応させると、2 つの T104 型 CYP76M57 で AMI の生成が見られなかった (Fig. 4-2)。この結果は、CYP76M57 による Trp -AMI 変換活性には R104 が必須であることを示している。

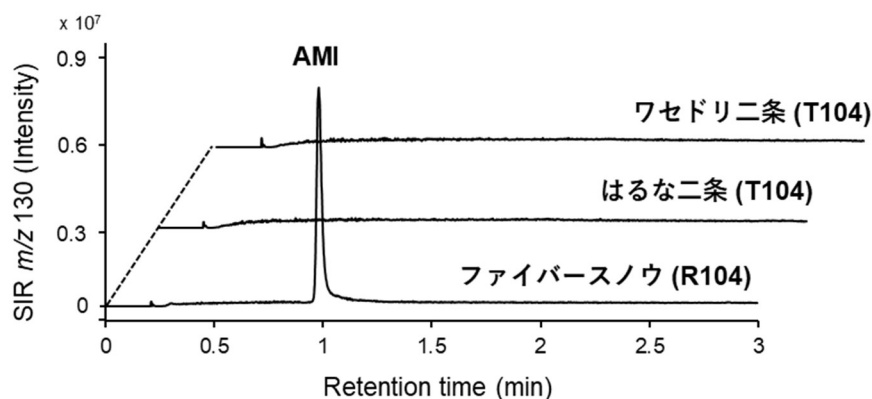


Fig. 4-2. *in vitro* で評価した R104 型および T104 型 CYP76M57 の触媒特性

反応生成物はシングルイオンレコーディング(SIR) m/z 130 で検出した。

RT ≈ 1.0 分のピークは AMI を示す。

SWISS-MODEL により、ソルガム (*Sorghum bicolor*) の CYP73A33 (PDB 6VBY) を鋳型に CYP76M57 のホモロジーモデリングを構築し、R104 が活性にどのように機能しているか調べた。Fig. 4-3 で示す通り、鋳型のリガンドであるヘムと HEPES が位置する空間を基質結合部位と仮定すると、R104 は基質と相互作用しうる位置に存在することが示唆された。

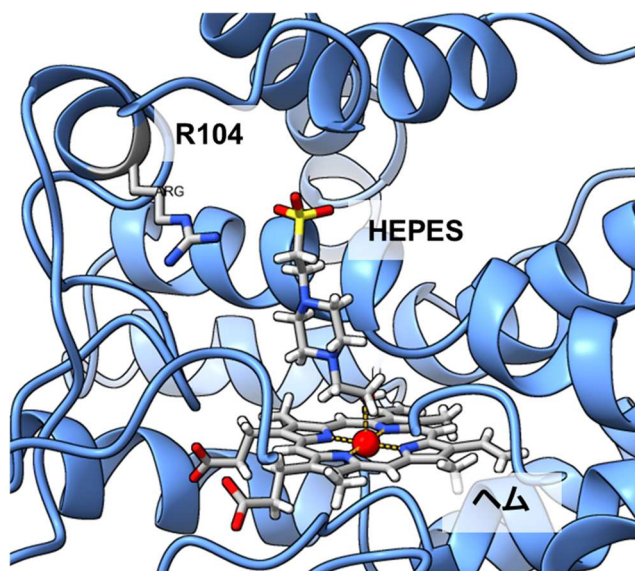


Fig. 4-3 CYP76M57 のホモロジーモデリング

基質結合部位を拡大表示した。ヘムと HEPES と Arg104 の側鎖をスティックで示した。

窒素、酸素、硫黄原子はそれぞれ青、赤、黄色で示した。

4-2-2. CYP76M57の活性に関与するアミノ酸残基の探索

CYP76M57 予測構造の信頼性を確かめると同時に、CYP76M57の触媒残基を特定するために、ヘムと配位結合していると考えられる C430、I-helix の酸素結合部位と考えられる T291、リガンドと 5Å 以内に位置すると予測された W116、N209、D283、L358 は Ala に、A287 は Leu に置換した変異型 CYP76M57 を作製した。ファイバースノウ由来 CYP76M57 と変異型 CYP76M57 の活性を比較することで、触媒残基を探索した。

ウェスタンブロッティングで各種変異型 CYP76M57 と ATR1 の発現を確認したところ、CYP76M57 のバンド (59 kDa) は明瞭に検出できたが、ATR1 のバンド (71 kDa) は検出できなかった (Fig. 4-4)。 *P. pastoris* 由来の CPR がミクロソーム中に含まれていると考え、得られたミクロソーム画分を活性評価に使用し L-Trp、NADPH と反応させた。N209A、T291A は AMI の生成が大幅に減少し、W116A、D283A、A287L、L358A、C430A では AMI の生成が見られなかった (Fig. 4-5)。活性部位周辺に変異を導入することで、AMI の生成が減少もしくは欠如したことから、CYP76M57 のホモロジーモデリングの信頼性の高さが支持された。

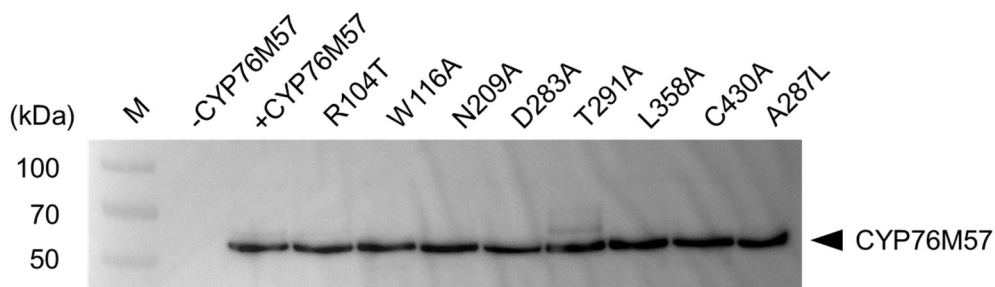


Fig. 4-4 *P. pastoris* に発現させた CYP76M57 と ATR1 のウェスタンブロッティングによる検出

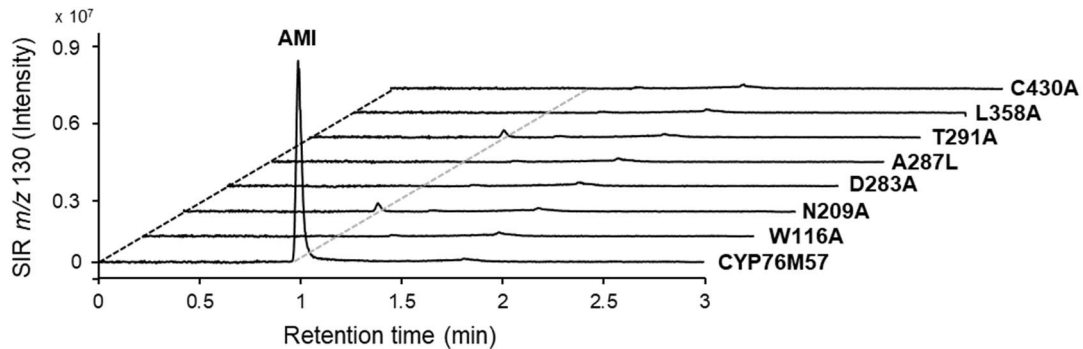


Fig. 4-5 *in vitro* で評価した変異型 CYP76M57 の触媒特性

反応生成物はシングルイオンレコーディング(SIR) m/z 130 で検出した。

RT ≈ 1.0 分のピークは AMI を示す。

4-3. 考察

グラミン生産能に相関のある CYP76M57 の変異 R104T が AMI の生合成能に影響を与えたことから、104 番目の Arg は Trp の側鎖短縮活性に重要であることが示された。一方で、HvNMT にはグラミン生産能に相関のある変異 L130R が存在するが、活性への影響はなかった(金井 修論, 2022)。これらことからオオムギにおけるグラミンの生産能は CYP76M57 に依存していると考えられる。ワセドリ二条由来の CYP76M57 (WaCYP76M57) は 104 番目以外にも複数の変異があり、それらの変異が機能に影響している可能性もあるので WaCYP76M57 の T104R 変異体を作製し、活性が回復するかどうか調べる必要がある。

二条オオムギ品種の Barke、Betzes、Bowman、Proctor は遺伝子に断片が挿入されているため、機能的な CYP76M57 を生成することができないが、104 番目のアミノ酸残基に対応する塩基配列はグラミン生産品種の塩基配列、すなわち Arg をコードする AGG と同一であることが判明した。したがって、R104 型遺伝子の塩基配列は六条オオムギに特異的ではなく、この位置の塩基配列変異は必ずしもグラミン生産性と相関しない。野生のオオムギ *subsp. spontaneum* が機能的な CYP76M57 を持つことを考慮すると、オオムギの祖先は機能

的な酵素をコードする遺伝子を持ち、進化の過程で欠失または変異したと考えられるが、この塩基変異や断片挿入がいつ起こったのかは現在のところ不明である。遺伝子の改変と再配列の進化的側面を解明するには、他のオオムギ品種やグラミンを蓄積する植物種についてさらなる分析が必要である。

Ube らは、Morex が *Fusarium culmorum* の感染に対して、トリプトファン誘導体を有するヒドロキシケイ皮酸アミドであるトリティカミドをファイトアレキシンとして蓄積することを報告した (Ube et al., 2019)。トリティカミド C は、その構造中に AMI を含み、アシルトランスフェラーゼ HvTHT7/8 によってヒドロキシシンナモイル CoA と AMI が縮合し、生合成されると提唱された。さらに、感染により AMI の蓄積も観察された。Morex はゲノム中に *CYP76M57* 遺伝子を持たないため、報告された AMI の蓄積は別の未知の経路によって達成されるはずである。

4-4. 実験手法

4-4-1. 変異型 *CYP76M57* の作製

pBluescript-Fs*CYP76M57* を鋳型に、変異を導入したプライマー (Table 4-1) を用いてインバース PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲルから切り抜いた後、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。Mighty cloning Reagent Set (タカラバイオ) を用いたリン酸化とセルフライゲーションのあと、DH5 α を形質転換し、配列解析によって変異導入を確認した。

3-4-2 の手法と同様に、変異型 *CYP76M57* と *ATR1* を *P. pastoris* X-33 に導入し、タンパク質を発現させ、ウェスタンブロットティングにより、*CYP76M57* と *ATR1* の発現を確認した。

4-4-2. *in vitro* 酵素活性評価

3-4-3 と同様に行った。

4-4-3. CYP76M57 のホモロジーモデリング

SWISS-MODEL を用いてホモロジーモデリングを構築した。テンプレートとしてソルガム (*Sorghum bicolor*) の Cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A33; PDB 6VBY)(相同性 : 28%)を用いた(Zhang et al., 2020)。

| Primer | Direction | Sequence (5' → 3') |
|----------------|-----------|------------------------------|
| CYP76M57_W116A | Forward | GCCCTACCAAGCTCAGACCCATTGTGGA |
| | Reverse | CACCATGGAGCGGTCAGCATGTGAA |
| CYP76M57_N209A | Forward | GCCGTCTCGGACTTCTACCCGTTACTTC |
| | Reverse | GGGCTCGGCGAGAAGTGCCACAATG |
| CYP76M57_D283A | Forward | CCATCCTTGCAGCAGGTACAGAGAC |
| | Reverse | CAACAACATGGCCTTCACGTCCT |
| CYP76M57_A287L | Forward | CTGGGTACAGAGACAACCAAGATCACGG |
| | Reverse | TGCAAGGATGTCAAACAACATGGCC |
| CYP76M57_T291A | Forward | CAACCAAGATCACGGTGGAGTGG |
| | Reverse | CCTCTGTACCTGCTGCAAGGATGTC |
| CYP76M57_L358A | Forward | GCCCCGCACATGGTCGTAGAGGAGGGCG |
| | Reverse | CAGTAGCGGTGCCACGGGGTGTAGC |
| CYP76M57_C430A | Forward | CTCCTGCATTGCCCATGGTGGAGCTC |
| | Reverse | CCAGCCTCCGGCCGGTGCCCA |

Table 4 プライマー配列

総括

本研究では、オオムギ耐病性化合物であるグラミンの生合成における Trp-AMI 間の側鎖短縮反応を解明するために、同位体標識化合物を用いたトレーサー試験による評価、RNA-seq によるグラミン生合成遺伝子の探索、ピキア酵母 (*P. pastoris*) を宿主とした異種発現によ

る AMI 生合成酵素の機能解析を行った。

第 1 章では、まず、様々なオオムギ品種のインドール化合物を定量し、グラミンを生産する品種と部位を特定した。つづいて、Trp-AMI 間の反応様式を理解する手がかりを得るために、 ^{13}C や ^{15}N で標識した Trp を用いた *in vivo* トレーサー試験を実施した。その結果、Trp 側鎖の β -炭素とアミノ基窒素がグラミンに保存され、間の α -炭素は保存されないことが判明し、Trp-AMI 間の側鎖短縮反応は新規の分子内転位であることが示唆された。

第 2 章では、Trp-AMI 間の分子内転位を触媒する酵素遺伝子を探索するために、グラミン生産能を指標に RNA-seq 解析を実施した。グラミン生合成候補遺伝子として選抜した 35 遺伝子の中には既知の *HvNMT* と機能未知のシトクロム P450 (CYP) が含まれていた。

第 3 章では、トランスジェニック植物の代謝変動解析や、異種発現タンパク質を用いた *in vitro* 酵素活性評価により、Trp-AMI 間の側鎖短縮反応を触媒する CYP76M57 を同定し、Trp 側鎖のアミノ基を分子内転位により C_β に結合させ、 C_α 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を示した (Fig. 5)。本研究で明らかとなった新規反応は、植物の二次代謝産物における基本骨格形成に関わる新規の反応系、特に芳香族アミノ酸について新規の代謝経路を提案することになる。さらに、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、今後の CYP に関する酵素学的研究の発展に貢献することが期待できる。また、様々なインドール化合物に対する CYP76M57 の活性を評価することで CYP76M57 の基質特異性について新たな知見を得ることができた。CYP76M57 による分子内転位の反応機構の解明は今後の課題であり、脱離する 2 つの炭素原子がどのような化合物として脱離しているかを解析することで知見を得ていく。

第 4 章では、オオムギ品種間でのグラミン生産性の有無について分子基盤を明らかにした。これまでに行われた CYP76M57 の多型解析の結果、R104T がグラミン生産性と関連のある変異であることが示された。この変異が CYP76M57 の活性に影響を与えるのか調べるために、組換えタンパク質を用いた *in vitro* 酵素活性評価を実施したところ、T104 型

CYP76M57 は AMI 生成能を失うことが明らかになり、R104 は CYP76M57 による Trp の側鎖短縮活性に必須であることが示された。CYP76M57 のホモロジーモデリングから、R104 は基質結合部位に位置することが示唆された。これまでに行われた解析より、グラミン生産能と相関のある HvNMT の変異 K130R は活性に影響がなかったため、オオムギにおけるグラミン生産能は CYP76M57 に依存していることが見出された。

本研究で明らかにした植物二次代謝経路をもとに、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。さらに、酵素反応を利用した有用化合物の効率的な生産や、病害抵抗性作物の開発にもつながるだろう。

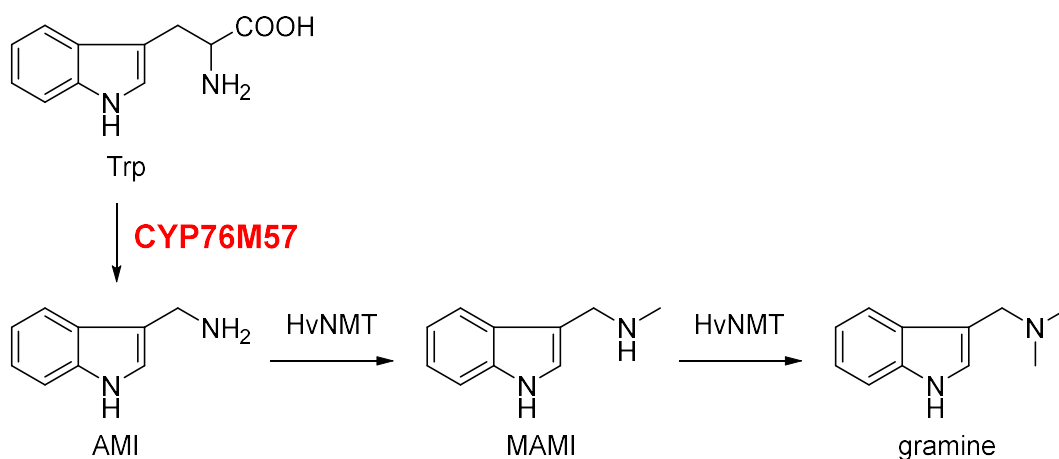


Fig. 5 本研究で示されたオオムギ (*Hordeum vulgare*) におけるグラミン生合成経路

Trp : トリプトファン、AMI : 3-アミノメチルインドール MAMI : *N*-メチル AMI

HvNMT : *N*-メチルトランスフェラーゼ

参考文献

- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M. *et al.* (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, 323(5910), 101-106. <https://doi.org/10.1126/science.1163732>
- Bowden, K., & Marion, L. (1951). THE BIOGENESIS OF ALKALOIDS: IV. THE FORMATION OF GRAMINE FROM TRYPTOPHAN IN BARLEY. *Canadian Journal of Chemistry*, 29(12), 1037-1042. <https://doi.org/10.1139/v51-121>
- Breccia, A., & Marion, L. (1959). THE BIOGENESIS OF ALKALOIDS: XXII. SOME INTERMEDIATE STEPS IN THE TRANSFORMATION OF TRYPTOPHAN TO GRAMINE. *Canadian Journal of Chemistry*, 37(6), 1066-1070. <https://doi.org/10.1139/v59-154>
- Christiansen, M. A., Butler, A. W., Hill, A. R., & Andrus, M. B. (2009). Synthesis of kurasoin B using phase-transfer-catalyzed acylimidazole alkylation. *Synlett*, 2009(04), 653-657. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1087809>
- Corcuera, L. J. (1984). Effects of indole alkaloids from Gramineae on aphids. *Phytochemistry*, 23(3), 539-541. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80376-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80376-3)
- Foguel, D., & Chaloub, R. M. (1993). Effects of the alkaloid gramine on the light-harvesting, energy transfer, and growth of *Anabaena* sp.(PCC 7119). *Plant physiology*, 101(2), 633-639. <https://doi.org/10.1104/pp.101.2.633>
- Gazit, E., Amir, Y., Buzhansky, L., Abel, U., & Frydman-Marom, A. (2015). *U.S. Patent No. 9,096,645*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US9096645B2/en>
- Gower, B. G., & Leete, E. (1963). Biosynthesis of gramine: the immediate precursors of the alkaloid. *Journal of the American Chemical Society*, 85(22), 3683-3685. <https://doi.org/10.1021/ja00905a034>

- Hansen, C. C., Nelson, D. R., Møller, B. L., & Werck-Reichhart, D. (2021). Plant cytochrome P450 plasticity and evolution. *Molecular Plant*, 14(8), 1244-1265. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.06.028>
- Höfer, R., Dong, L., André, F., Ginglinger, J. F., Lugan, R., Gavira, C. *et al.* (2013). Geraniol hydroxylase and hydroxygeraniol oxidase activities of the CYP76 family of cytochrome P450 enzymes and potential for engineering the early steps of the (seco) iridoid pathway. *Metabolic engineering*, 20, 221-232. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.08.001>
- Höfer, R., Boachon, B., Renault, H., Gavira, C., Miesch, L., Iglesias, J. *et al.* (2014). Dual function of the cytochrome P450 CYP76 family from *Arabidopsis thaliana* in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides. *Plant physiology*, 166(3), 1149-1161. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244814>
- Hull, A. K., Vij, R., & Celenza, J. L. (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(5), 2379-2384. <https://doi.org/10.1073/pnas.040569997>
- Kakei, Y., Nakamura, A., Yamamoto, M., Ishida, Y., Yamazaki, C., Sato, A. *et al.* (2017). Biochemical and chemical biology study of rice OsTAR1 revealed that tryptophan aminotransferase is involved in auxin biosynthesis: identification of a potent OsTAR1 inhibitor, pyruvamine2031. *Plant and Cell Physiology*, 58(3), 598-606. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx007>
- Kitaoka, N., Zhang, J., Oyagbenro, R. K., Brown, B., Wu, Y., Yang, B. *et al.* (2021). Interdependent evolution of biosynthetic gene clusters for momilactone production in rice. *The Plant Cell*, 33(2), 290-305. <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa023>
- Klein, A. P., & Sattely, E. S. (2017). Biosynthesis of cabbage phytoalexins from indole glucosinolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(8), 1910-1915. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615625114>

- Knoch, E., Motawie, M. S., Olsen, C. E., Møller, B. L., & Lyngkjær, M. F. (2016). Biosynthesis of the leucine derived α -, β - and γ -hydroxynitrile glucosides in barley (*Hordeum vulgare* L.). *The Plant Journal*, 88(2), 247-256. <https://doi.org/10.1111/tpj.13247>
- Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., He, C., Azhaguvel, P., Kanamori, H., Perovic, D. *et al.* (2007). Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1424-1429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608580104>
- Larsson, K. A., Zetterlund, I., Delp, G., & Jonsson, L. M. (2006). *N*-Methyltransferase involved in gramine biosynthesis in barley: cloning and characterization. *Phytochemistry*, 67(18), 2002-2008. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.036>
- Lee, J. E., Vogt, T., Hause, B., & Löbler, M. (1997). Methyl jasmonate induces an *O*-Methyltransferase in barley. *Plant and cell physiology*, 38(7), 851-862. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029244>
- Leete, E., & Marion, L. (1953). The biogenesis of alkaloids: ix. further investigations on the formation of gramine from tryptophan. *Canadian Journal of Chemistry*, 31(12), 1195-1202. <https://doi.org/10.1139/v53-154>
- Leland, T. J., Grumet, R., & Hanson, A. D. (1985). Biochemical, immunological and genetic characterization of natural gramine-free variants of *Hordeum vulgare* L. *Plant Science*, 42(2), 77-82. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90145-1](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90145-1)
- Marchiosi, R., dos Santos, W. D., Constantin, R. P., de Lima, R. B., Soares, A. R., Finger-Teixeira, A. *et al.* (2020). Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews*, 19, 865-906. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2>
- Mizutani, M., & Sato, F. (2011). Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507(1), 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.026>

- Mudd, S. H. (1961). 3-Aminomethylindole and 3-methylaminomethylindole: new constituents of barley. *Nature*, 189(4763), 489-489. <https://doi.org/10.1038/189489a0>
- Nelson, D. R. (2006). Cytochrome P450 Nomenclature, 2004. *Cytochrome P450 protocols*, 1-10. <https://doi.org/10.1385/1-59259-998-2:1>
- Niemeyer, H. M., & Roveri, O. A. (1984). Effects of gramine on energy metabolism of rat and bovine mitochondria. *Biochemical pharmacology*, 33(19), 2973-2979. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90596-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90596-3)
- O'Donovan, D., & Leete, E. (1963). Biosynthesis of gramine: feeding experiments with tryptophan- β -[H³, C¹⁴]. *Journal of the American Chemical Society*, 85(4), 461-463. <https://doi.org/10.1021/ja00887a021>
- Overland, L. (1966). The role of allelopathic substances in the “smother crop” barley. *American Journal of Botany*, 53(5), 423-432. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1966.tb07355.x>
- Phillips, K. A., Skirpan, A. L., Liu, X., Christensen, A., Slewinski, T. L., Hudson, C. *et al.* (2011). *vanishing tassel2* encodes a grass-specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. *The Plant Cell*, 23(2), 550-566. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075267>
- Sepulveda, B. A., & Corcuera, L. J. (1990). Effect of gramine on the susceptibility of barley leaves to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry*, 29(2), 465-467. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85098-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85098-Z)
- Shao, A., Ma, W., Zhao, X., Hu, M., He, X., Teng, W. *et al.* (2017). The auxin biosynthetic *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED TaTAR2. 1-3A* increases grain yield of wheat. *Plant Physiology*, 174(4), 2274-2288. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00094>
- Takatori, K., Lee, M., & Kajiwara, M. (2008). Asymmetric synthesis of L-[3-¹³C] tryptophan. *Current Radiopharmaceuticals*, 1(2), 122-124. <https://doi.org/10.2174/1874471010801020122>

- Ube, N., Ishihara, A., Yabuta, Y., Taketa, S., Kato, Y., & Nomura, T. (2023). Molecular identification of a laccase that catalyzes the oxidative coupling of a hydroxycinnamic acid amide for hordatine biosynthesis in barley. *The Plant Journal*, 115(4), 1037-1050. <https://doi.org/10.1111/tpj.16278>
- Ube, N., Yabuta, Y., Tohnooka, T., Ueno, K., Taketa, S., & Ishihara, A. (2019). Biosynthesis of phenylamide phytoalexins in pathogen-infected barley. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5541. <https://doi.org/10.3390/ijms20225541>
- Wang, Q., Hillwig, M. L., Okada, K., Yamazaki, K., Wu, Y., Swaminathan, S. *et al.* (2012). Characterization of CYP76M5–8 indicates metabolic plasticity within a plant biosynthetic gene cluster. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), 6159-6168. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305599>
- Weber, N., Ismail, A., Gorwa-Grauslund, M., & Carlquist, M. (2014). Biocatalytic potential of vanillin aminotransferase from *Capsicum chinense*. *BMC biotechnology*, 14, 1-6. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-25>
- Wenkert, E. (1962). Biosynthesis of indole alkaloids. The Aspidosperma and Iboga bases. *Journal of the American Chemical Society*, 84(1), 98-102. <https://doi.org/10.1021/ja00860a023>
- Wightman, F., Chisholm, M. D., & Neish, A. C. (1961). Biosynthesis of tryptophan and gramine in young barley shoots. *Phytochemistry*, 1(1), 30-37. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82808-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82808-3)
- Zhang, B., Lewis, K. M., Abril, A., Davydov, D. R., Vermerris, W., Sattler, S. E., & Kang, C. (2020). Structure and function of the cytochrome P450 monooxygenase cinnamate 4-hydroxylase from *Sorghum bicolor*. *Plant physiology*, 183(3), 957-973. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00406>
- Zúñiga, G. E., & Corcuera, L. J. (1986). Effect of gramine in the resistance of barley seedlings to the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 40(3), 259-262. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1986.tb00509.x>

金井詞音 (2022). オオムギ耐病性化合物グラミンは新規 Cyt.P450 の減炭反応により生合成される. 東京農業大学大学院 修士論文

謝辞

本研究は東京農業大学大学院応用生物科学研究科農芸化学専攻 生物有機化学研究室において、東京農業大学農芸化学科教授 須恵雅之博士のご指導の下に行いました。本研究を行う機会と環境を与えてくださり、終始多大なご指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。また、同位体標識化合物の有機合成の際に多くのご指導とご助言を賜りました東京農業大学農芸化学科教授 松島芳隆博士に心から感謝の気持ちと御礼を申し上げます。本研究の遂行にあたり、RNA-seq 解析にご協力くださいました東京農業大学バイオサイエンス学科助教 篠澤章久博士に深謝いたします。トランスジェニック植物の解析と CYP76M57 クローニングにご協力くださった東京農業大学農芸化学科生物有機化学研究室の卒業生である金井詞音氏、酵素活性評価にご協力くださった東京農業大学農芸化学科生物有機化学研究室の百武真美氏に厚く御礼申し上げます。最後に、生物有機化学研究室の皆様には、本研究を遂行するにあたり多大なご助言、激励をくださいました。ここに感謝の意を表します。

Summary

Plants accumulate a wide variety of secondary metabolites (specialized metabolites) which allow plants to adapt to their environment and interact with other organisms. The diversity of their structure and function is attributed to the metabolic pathways specific to each plant. In particular, the construction of the core structure (scaffold) is an important step that involves key reactions such as cyclization, rearrangement, and elongation or shortening of carbon chains. However, there are metabolic steps whose mechanisms remain unknown.

Some barley cultivars accumulate a simple indole alkaloid, gramine (3-[dimethylaminomethyl]indole). Gramine is toxic to pathogens and herbivorous insects such as aphids, so gramine plays a role as a disease-resistance compound. Gramine is biosynthesized from tryptophan (Trp) via 3-aminomethylindole (AMI) whose amino group is methylated by *N*-methyltransferase (HvNMT). The biosynthesis of AMI, the core structure of gramine, includes the shortening of the side chain of Trp by two carbon atoms (C_2 shortening). However, no information is currently available on the enzyme(s), gene(s), or intermediate(s) related to the side chain shortening of Trp. In this study, we searched for candidate genes for gramine biosynthesis by RNA-seq. The results showed that 35 candidate genes correlated with gramine productivity, including *HvNMT* and an uncharacterized cytochrome P450, *CYP76M57*.

To investigate the function of *CYP76M57*, we conducted *in vitro* enzyme assays using a recombinant protein expressed in *Pichia pastoris*. *CYP76M57* was able to act on L-Trp as a substrate to produce AMI. This reaction produces AMI directly from L-Trp without intermediates such as tryptamine. When gramine was synthesized from ^{13}C and ^{15}N -labeled Trp using recombinant *CYP76M57* and HvNMT, it was shown that the α -carbon and carboxyl group of Trp side chain were removed, while the β -carbon and nitrogen of amino group were inherited by gramine, suggesting that the conversion of Trp to AMI by *CYP76M57* involves intramolecular rearrangement formed C_{β} -N

bond. This reaction catalyzed by CYP is an unprecedented biosynthetic step and represents a new reaction system involved in the construction of the core structures of plant secondary metabolites.

In addition, the reactivity of CYP76M57 with various indole compounds was investigated to reveal the substrate specificity of CYP76M57. As a result, no CYP76M57-specific reaction products were detected from the 15 compounds, suggesting that CYP76M57 has a high substrate specificity. Furthermore, AMI was not produced from D-Trp, indicating that CYP76M57 can recognize enantiomers. Furthermore, it was shown that differences in gramine productivity among barley cultivars were caused by three types of gene variations: lack of *CYP76M57* transcripts, insertion of DNA fragments (a few hundred bp) into the gene, and a single nucleotide mutation that results in the R104T mutation.