

## ビワの花の含窒素香気成分生合成に関与する CYP79 について

松井 祐美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

### 【背景・目的】

植物の生殖器官である花の香気成分は、花粉媒介昆虫の誘引と、植食性昆虫や病原体に対する化学防御に関与している。花の香気成分はベンゼノイド、テルペノイド、脂肪酸誘導体から構成されることが多いが、ビワ (*Eriobotrya japonica*) の花は特徴的な成分として、含窒素化合物であるフェニルアセトアルドキシム、(2-ニトロ)エチルベンゼンおよびフェニルアセトニトリルを放出する。これらの化合物は L-フェニルアラニンから生合成される。すなわち、L-フェニルアラニンがフェニルアセトアルドキシムに変換され、フェニルアセトアルドキシムが (2-ニトロ)エチルベンゼンまたはフェニルアセトニトリルへと変換される (図 1)。

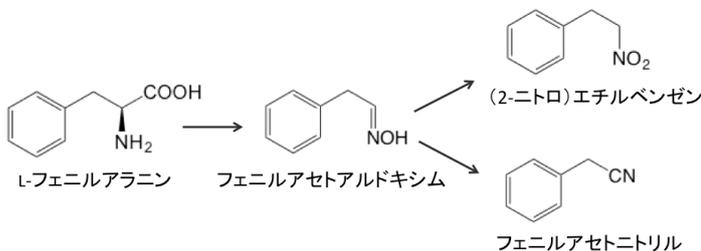


図 1. ビワの含窒素化合物の生合成経路

また、フェニルアセトアルドキシムはウメ (*Prunus mume*) の青酸配糖体生合成経路の中間体であり、シトクロム P450 (CYP79D16) が L-フェニルアラニンをフェニルアセトアルドキシムに変換することから (1)、ビワの含窒素香気成分生合成の初発反応にも CYP79 が関与すると推察された。

本研究の先行研究で、ビワの花と葉の RNA-seq 解析から花で高発現する遺伝子群が選抜された。そこで本研究では、ビワのアルドキシムを介した含窒素化合物の生合成経路を酵素と遺伝子レベルで解明することを目的とし、ビワの花で高発現する遺伝子群から CYP79 をコードする遺伝子を見出し、クローニングした。さらに、出芽酵母で発現し、酵素活性の検出を行った。

### 【材料・方法】

#### ・材料

ビワ *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.

#### ・方法

##### 1. ビワの花由来 CYP79 のクローニング

ビワの花から CYP79 をコードする cDNA をクローニングするため、CYP79D16 と同一性を有する配列を RNA-seq データから検索した。得られた配列から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて PCR で部分配列を増幅し、ダイレクトシーケンス法で部分配列を決定した。EjapCYP79 のコード配列を、PCR により増幅し、ギブソンアッセムブリーによって pYeDP60 ベクターの *KpnI-EcoRI* 部位につなぎ込み、pYeDP-EjapCYP79

を得た。その後、EjapCYP79 の全長を決定し、既知の CYP79 との系統樹を作成した。

##### 2. 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) における CYP79 の発現と酵素活性の検出

pYeDP-EjapCYP79 を用いて出芽酵母 WAT11 株を形質転換し、EjapCYP79 とシトクロム P450 のレドックスパートナーであるシトクロム P450 レダクターゼの共発現系を構築した。形質転換体からマイクロソーム画分を抽出し、L-フェニルアラニンを基質とした酵素反応を行い、フェニルアセトアルドキシムを高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いて検出した。

##### 3. 開花ステージにおけるフェニルアセトアルドキシムの定量

ビワの花を 4 つのステージ (つぼみ、咲きかけ、満開、枯れ) に分類し、各ステージからフェニルアセトアルドキシムを、メタノールを用いて抽出した。メタノール抽出物のフェニルアセトアルドキシム含有量を LC-MS/MS を用いて測定した。

### 【結果・考察】

本研究によって見出した EjapCYP79 は、ウメ由来 CYP79D16 と 79% の同一性を有していた。シトクロム P450 は一次構造の同一性によって分類されており、55% 以上の同一性を有していれば同じサブファミリー分類される。よって、EjapCYP79 は CYP79D に分類されると考えられた。形質転換酵母から調製したマイクロソームと L-フェニルアラニンを反応させた結果、フェニルアセトアルドキシムが検出された。しかし、酵母における発現量が低かったため、EjapCYP79 の酵素化学的諸性質 (至適 pH、至適温度、酵素・基質親和性等) の解明には至らなかった。

ビワの花に含まれるフェニルアセトアルドキシムは 4 つのステージのうち咲きかけと満開のときのみ検出された。このことから、ビワでは花が咲いている時期にのみ含窒素香気成分を放出していると考えられる。今後、各開花ステージにおける EjapCYP79 の発現変動も調査することで EjapCYP79 がビワの花の含窒素香気成分の生合成に関与する酵素であることを明確にできると考えられた。

### 【参考文献】

(1) Yamaguchi et al., *Plant Mol. Biol.*, **86**, 215-223(2014).