

## イネとタイヌビエ由来除草剤代謝酵素遺伝子 CYP81A の大腸菌発現系の構築

松村 康平 (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

除草剤の多くは作物には影響を与えず、雑草だけを枯死させる選択性を有している。この選択性を発現する要因の1つとしてシトクロム P450 (P450) による解毒代謝がある。P450 は一原子酸素添加酵素であり、活性部位にヘム鉄を有する。還元状態で一酸化酸素 (CO) と結合し、450 nm の吸収極大を示す。植物ゲノムには数百の P450 遺伝子がコードされており、イネは 412 もの P450 遺伝子を有している。これらの多くは 2 次代謝産物や植物ホルモンの生合成に関与することが知られていたが、近年、イネ科植物では CYP81A サブファミリーが除草剤の解毒代謝に関与することが明らかになってきた。イネでは CYP81A6 が作用機序の異なる複数の除草剤の解毒代謝に関与し (1)、例えば、スルホニルウレア系除草剤であるベンスルフロンメチル (BSM) は CYP81A6 によって O-脱メチル体へと急速に解毒代謝されるため (図)、イネは BSM に対する耐性が強い。一方、タイヌビエなどのイネ科感受性雑草では P450 による除草剤代謝活性がイネよりも低いため枯死に至る。

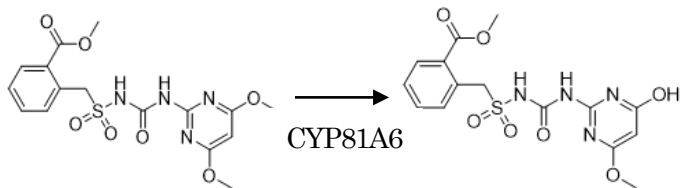


図. CYP81A6 による BSM の代謝 (左: BSM, 右: O-脱メチル体)

しかし除草剤に依存した雑草防除の結果、除草剤抵抗性雑草の出現が世界的に問題になっている。これらの中には、除草剤解毒能を向上し、抵抗性を獲得したものがある。アメリカ・カリフォルニア州において発見されたタイヌビエ個体群は BSM を含む複数の除草剤に対する抵抗性を持つ。この個体群では CYP81A12、CYP81A21 遺伝子が感受性個体群と比較して高発現しており、両 CYP81A が BSM を含む複数の除草剤に対する抵抗性に寄与している (2)。

CYP81A6 と CYP81A12、CYP81A21 の機能及びその相違を明らかにすることが出来ればより選択性の高い除草剤の開発に繋がる可能性がある。しかし、研究室の先行研究で異種発現宿主として出芽酵母を用いたところ CYP81A の生産量は低く、これらの酵素の機能解析は困難であった。そのため、出芽酵母よりも CYP81A 生産量の高い発現系の構築が CYP81A の機能解析を行う上で必要であった。P450 の異種発現宿主として出芽酵母よりも大腸菌の方が高い発現量が期待できることから、本研究では比較機能解析に向けたイネと除草剤抵抗性タイヌビエ由来 CYP81A の大腸菌発現系の構築を目的とした。

## 方法

## CYP81A 変異体の作製と大腸菌における発現の評価

CYP81A の N 末端ベーシックリージョンをインバース PCR によって CYP2C11、CYP5139D7v1、CYP5348N1、CYP94A91 の

N 末端ベーシックリージョンと置換した。作製した N 末端置換体及び以前研究室で作製された CYP2C3 と CYP71A12 置換体の発現プラスミド (3) を用いて大腸菌 C41(DE3)、C43(DE3)、BL21(DE3)、及び KRX を形質転換した。各形質転換体をオートインダクション培地で 26°C、24 時間培養後、L-アラビノース、BSM を添加し、さらに 30°C、24 時間培養した。培地中の BSM 残存量を高速液体クロマトグラフィーによって定量することで CYP81A の N 末端置換体の発現を評価した。

## 結果と考察

まず、N 末端ベーシックリージョン置換の影響を調査した。発現宿主として C41(DE3) を用いた。その結果、いずれの CYP81A においても、CYP5348N1 置換体以外では BSM の消費量が増加し、CYP2C3 置換体の BSM 消費量が最大であった。次に各 CYP81A の CYP2C3 置換体を複数の大腸菌株で発現し、BSM 代謝能を比較した。その結果、本研究で用いた大腸菌 4 株において、BSM 消費量は同程度であったが、C41(DE3) を発現宿主として用いた時の BSM 消費量が最大であった。また、経時的に BSM 消費量を定量した結果、BSM 添加後 24 時間後に BSM 消費量が最大となり、それ以降は大幅な変化は認められなかった。

以上より、CYP81A6、CYP81A12、CYP81A21 の大腸菌における発現では、CYP2C3 の N 末端ベーシックリージョンに置換し、発現宿主は大腸菌 C41(DE3)、30°C、24 時間の培養が有効だと考えられた。今後、各 CYP81A を発現させた大腸菌から膜画分を回収し、至適温度や至適 pH、カイネティックパラメータ、他の除草剤への基質特異性といった機能解析を行う。また、上記の大腸菌発現系を検討する過程で、BSM 代謝産物として O-脱メチル体に加えて、BSM に水酸基が導入された水酸化体が検出された。今後この新規代謝産物を精製し、NMR を用いて構造決定をする予定である。

## 参考文献

- (1) Pan G, Zhang XY, Liu KD, Zhang JW, Wu XZ, Zhu J, Tu J. (2006). Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene *CYP81A6* that confers resistance to two different classes of herbicides. *Plant Mol Biol* 61: 933-943.
- (2) Iwakami S, Endo M, Saika H, Okuno J, Nakamura N, Yokoyama M et al. (2014). Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Physiology*, 165 (2) 618-629.
- (3) Nina GD, Takuya Y, Kanade F, Tohru T, Iwakami S. (2020). Functional characterization of cytochrome P450 CYP81A subfamily to disclose pattern of cross-resistance in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Mol Biol*. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00954-3>