

# 非モデル動植物由来新規アルドキシムおよびニトリル 合成・代謝酵素の探索と高度利用

富山県立大学 工学部 生物工学科 山口 拓也

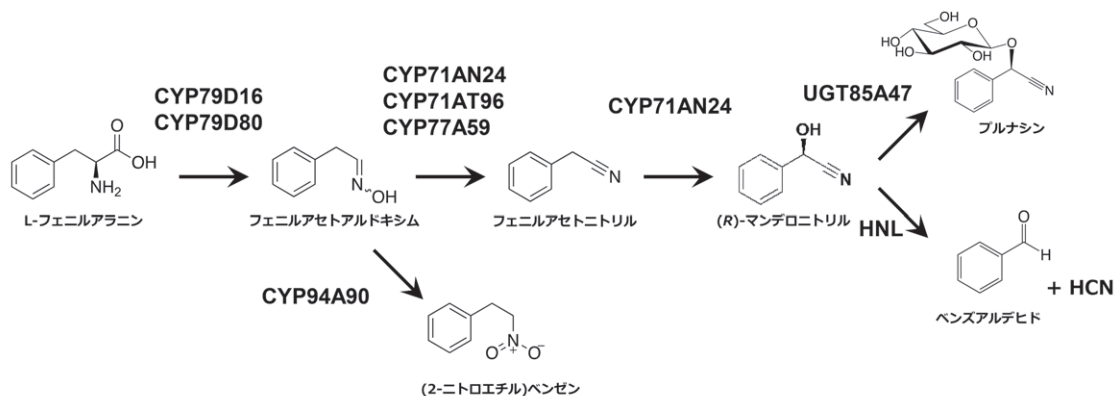
## はじめに

酵素は少量で触媒作用を示し、温和な条件で反応するため、環境調和型の有用物質生産プロセスの構築を可能にする触媒である。しかし、各反応に適した酵素を用意する必要があるため、常に優れた性質を有する新規酵素の探索が行われている。従来、産業用酵素は微生物およびそのゲノム情報が主たる探索領域であった。しかし、地球上の全生物種数1,400万種のうち、15%に相当する22万種が植物界、78%に相当する1,100万種が動物界に属し、両界で地球上の全生物種数の93%を占めている。このことから、植物や動物も有用酵素資源と考えられるが、これらから酵素が広く探索されたことはなく、微生物酵素との比較も行われていなかった。

ニトリル化合物は医薬品などのビルディングブロックとして利用される産業上重要な化合物であるが、従来、その生産には高温、高压条件や劇物が使用されてきた。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合成・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。以上のことから、酵素の探索領域拡張を目的とし、非モデル植物および節足動物のアルドキシムを介したニトリルやニトロ化合物の合成・代謝経路から新規酵素の探索、機能解析および利用法の開発を行った。

## 植物における代謝経路

化学防御システムに関わるニトリルやニトロ化合物の生合成酵素をウメやオオイタドリなどの複数の植物から見出した(図1)<sup>1</sup>。例えば、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、フェニルアセトアルドキシム合成酵素CYP79D80と、植物初のニトロ基合成酵素であるCYP94A90を見出した。CYP94A90は植物に広く分布し、脂肪酸 $\omega$ 水酸化酵素として知られていた。CYP94A90も脂肪酸 $\omega$ 水酸化活性を示すこと、さらに他の植物由来CYP94Aもニトロ基合成反応を触媒することを明らかにし、ニトロ基合成酵素は植物に広く分布していることを示した<sup>2</sup>。これらをアルドキシム合成酵素と組合せることでアミノ酸からニトロ化合物の発酵生産が可能になると考えられる。



## ヤスデにおける代謝経路

節足動物であるヤスデは、(R)-マンデロニトリルをシアン化水素前駆体として蓄積しており、刺激応答的に(R)-マンデロニトリルとヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)を混合することで、シアン化水素を体外へ放出する(図2)。このようなシアン化水素発生機構が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り、ヤスデが酵素資源として着目された例はなかった。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ルトサカヤスデを研究の主材料とした。また、タンバアカヤスデが富山県立大学内で毎春発生することを見出し、これらのヤスデ(数kg)からHNLを精製することに成功した<sup>3,4</sup>。さらに広範囲に及び野生のヤスデの探索を行い、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新規一次構造を有し、非常に高活性なHNLがシアン発生性のヤスデに保存されていた。また、ヤスデにおけるシアン源である(R)-マンデロニトリル生合成酵素

群も見出し<sup>5</sup>、ヤスデと植物は進化の過程で独自にシアノ化水素発生に関わる酵素遺伝子群を獲得したと考えられた。

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シアノヒドリン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、ヤスデ由来HNLを用いた光学活性シアノヒドリンの合成法を開発した。ヤスデ由来HNLを一般的な異種発現宿主である大腸菌BL21 (DE3)において発現できない問題に直面したが、ヤスデ由来HNLの発現に最適な大腸菌株を検討し、6種のヤスデ由来HNLを発現することに成功した。これらの比活性は2000～3000U/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デ由来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97.6%で生産することに成功した<sup>4</sup>。

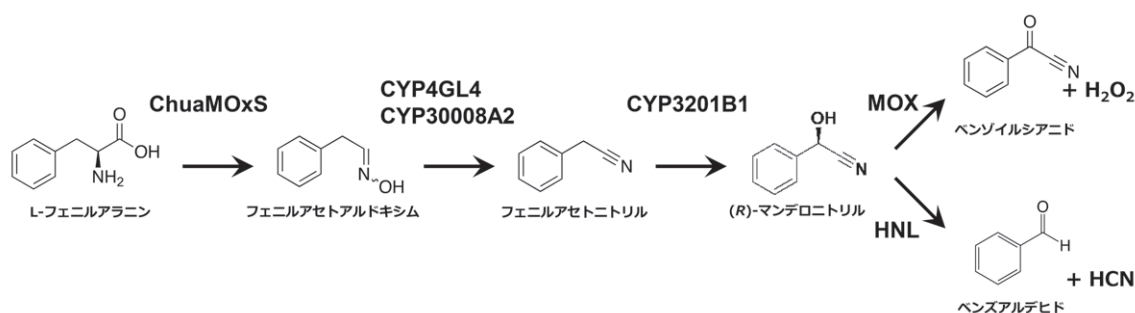


図2. ヤスデのアルドキシム-ニトリル経路

## 今後の展望

非モデル動植物由来の酵素は優れた機能を持っていますが、異種発現宿主における難生産性によって応用的な利用が難しいことがあり、産業用酵素資源としては敬遠されることが多い。申請者らが見出したヤスデHNLについても、異種発現宿主における難生産性の解決が課題として残されている。近年安価になったゲノム解析技術によって遺伝子情報を拡充し、非モデル動植物由来酵素であっても、あたかも微生物由来酵素と同様なレベルで祖先型酵素設計法などの情報学的手法を駆使することで難生産性を打破できることを示し、非モデル動植物を新たな産業用酵素の探索対象とする潮流を生み出していきたい。

## 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。多大なご指導を賜りました浅野泰久名誉教授(富山県立大学)、桑原保正名誉教授(京都大学)、松本宏名誉教授(筑波大学)および加藤康夫教授(富山県立大学)に厚く御礼申し上げます。また、共同研究者や学生の皆様に深く感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Yamaguchi, Biosci. Biotechnol. Biochem., **88**, 138-146 (2024).
2. Yamaguchi et al., New Phytol., **231**, 1157-1170 (2021).
3. Dadashpour et al., PNAS., **112**, 10605-10610 (2015).
4. Yamaguchi et al., Sci. Rep., **8**, 1-10 (2018).
5. Yamaguchi and Asano, bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2025.03.24.645106> (2025).

## 略歴

- 2012年 3月 北海道大学大学院 農学院生物資源科学専攻 博士後期課程 修了
- 2012年 4月 富山県立大学 ERATO浅野酵素活性分子プロジェクト 博士研究員
- 2015年 9月 富山県立大学 ERATO浅野酵素活性分子プロジェクト グループリーダー
- 2016年11月 筑波大学 生命環境系 助教
- 2021年 4月 富山県立大学 工学部 生物工学科 助教(現在に至る)

# Exploration and utilization of aldoxime- and nitrile-producing enzymes from nonmodel plants and animals

Takuya Yamaguchi, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University

## Introduction

Nitriles are a broad group of industrially produced chemicals. Nitriles are used in fine chemicals, pharmaceuticals, as well as solvents and are starting materials for producing carboxylic acids, amides, and other compounds. Nitriles are chemically synthesized using highly toxic compounds and severe reaction conditions. However, the enzymes discovered from microbial “aldoxime-nitrile” pathway are industrially used to catalyze reactions under mild conditions and do not require the use of toxic compounds. For example, nitrile hydratase, which produces amides from nitriles, is industrially used for producing acrylamide. Some plants and animals synthesize or metabolize aldoximes and nitriles; however, these enzymes have not been thoroughly characterized. Thus, plants and animals presumably contain aldoxime- and nitrile-metabolizing enzymes that have yet to be identified. These enzymes may have characteristics distinct from those of microbial enzymes and may catalyze industrially useful reactions. We searched for and characterized novel enzymes from nonmodel plants and animals (millipedes) to expand the field of enzyme exploration. We also used these enzymes to produce nitrile.

## The pathways in plants

We identified aldoxime-, nitrile-, and nitro-compound-producing enzymes in Japanese apricot, giant knotweed, and loquat (Fig. 1)<sup>1</sup>. The loquat flowers emit aldoxime, nitrile, and nitro-compound. We identified two cytochrome P450s, CYP79D80 and CYP94A90, that catalyze the formation of aldoxime from amino acid and nitro group from aldoxime, respectively<sup>2</sup>. CYP94A90 also catalyzes the  $\omega$ -hydroxylation of saturated fatty acids. These enzymes may contribute to the enzymatic production of nitro compounds from amino acids.

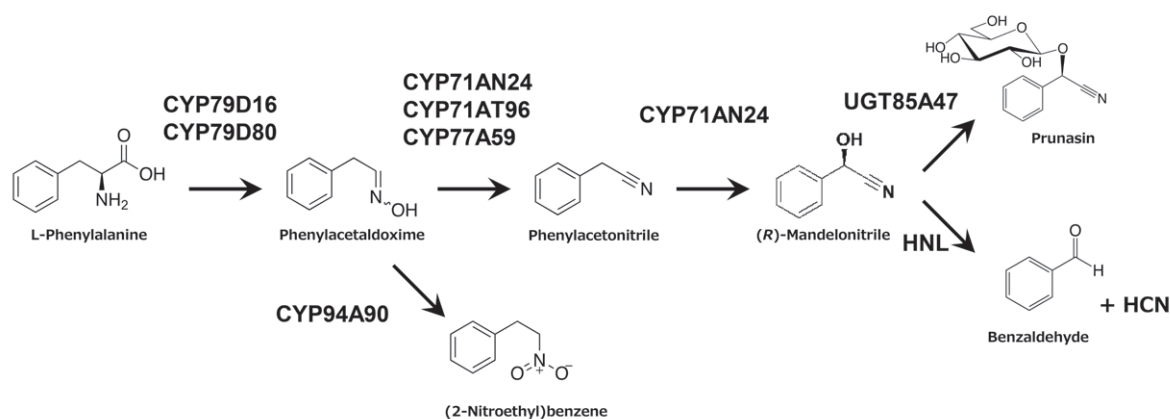


Fig. 1. Plant “aldoxime-nitrile” pathway.

## The pathway in millipedes

Millipedes accumulate (R)-mandelonitrile (MAN) in their defensive glands and emit hydrogen cyanide (HCN). Thus, cyanogenic millipedes are thought to contain nitrile-metabolizing enzymes that are phylogenetically different from those in plants. However, no enzymes have yet been characterized in millipedes. We successfully isolated hydroxynitrile lyase (HNL) from *Chamberlinius hualienensis* and *Nedyopus tambanus*<sup>3,4</sup>. We also cloned 13 HNL genes from various millipede species and identified the (R)-MAN biosynthetic enzymes<sup>5</sup>. Millipedes and plants have independently evolved cyanogenesis-related enzymes as these millipede cyanogenesis-related enzymes share no identity with the plant enzymes.

HNL liberates HCN and benzaldehyde from (R)-MAN in millipedes. HNL also catalyzes the reverse reaction, the asymmetric synthesis of chiral cyanohydrin, which is a building block in the synthesis of pharmaceuticals. Although plant-derived HNL have mainly been used, we developed a method for synthesizing optically active cyanohydrins using

millipede HNLs. The millipede HNLs could not be expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), a common heterologous expression host; as such, we investigated suitable *E. coli* strains for expressing millipede HNLs, and we successfully expressing six species of HNLs. The specific activity of these six HNLs was 2000–3000 U/mg, much higher than that of known HNLs, which also exhibited high stereoselectivity. *E. coli* cells expressing HNL produced (R)-MAN in an enantiomeric excess of 97.6%.

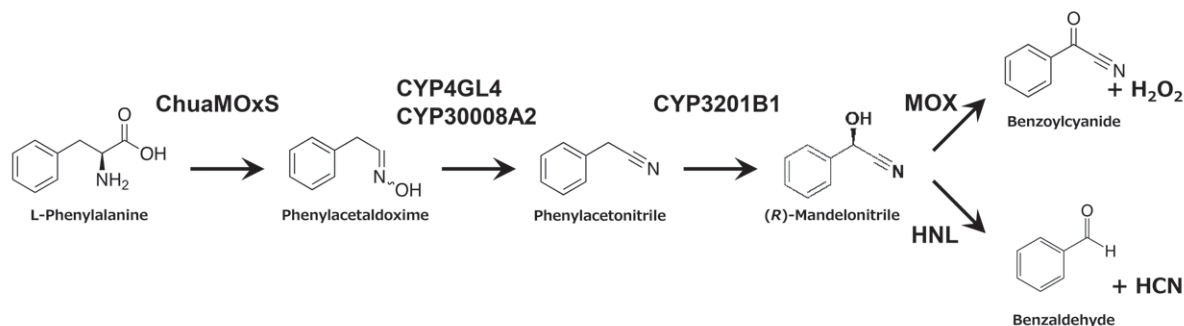


Fig. 2. Millipede "aldoxime-nitrile" pathway

## Future direction

Enzymes from nonmodel plants and animals are often difficult to produce in heterologous expression hosts such as *E. coli*. The genomic information available for plants and animals is insufficient compared with that for microorganisms; however, genome sequencing is becoming less expensive. Therefore, we would like to expand the arthropod genome information and apply bioinformatics methods, such as ancestral sequence reconstruction, to plant- and millipede-derived enzymes to increase production levels in *E. coli*.

## Acknowledgement

These studies were performed at Toyama Prefectural University and University of Tsukuba. I would like to express my special thanks to Professors Yasuhisa Asano (Toyama Prefectural University), Yasumasa Kuwahara (Kyoto University), and Hiroshi Matsumoto (University of Tsukuba), and Yasuo Kato (Toyama Prefectural University). Finally, I would like to thank all laboratory members and collaborators for their support.

## References

1. Yamaguchi, Biosci. Biotechnol. Biochem., **88**, 138-146 (2024).
2. Yamaguchi et al., New Phytol., **231**, 1157-1170 (2021).
3. Dadashpour et al., PNAS., **112**, 10605-10610 (2015).
4. Yamaguchi et al., Sci. Rep., **8**, 1-10 (2018).
5. Yamaguchi and Asano, bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2025.03.24.645106> (2025).

## Brief Biography

2012	Ph. D., Hokkaido University
2012–2015	Postdoc, ERATO Asano Active Enzyme Project, Toyama Prefectural University
2015–2016	Group leader, ERATO Asano Active Enzyme Project, Toyama Prefectural University
2016–2021	Assistant Professor, University of Tsukuba
2021–present	Assistant Professor, Toyama Prefectural University