

哺乳類由来の毒物代謝遺伝子 CYP1A1 およびバクテリア由来の NADHoxydase 遺伝子に関連する相同性の高い遺伝子 ホモログのジャガイモゲノムでの存在

渡 邊 和 男^{1, 2}、竹 田 靖 彦²、坪 本 真 一²、近 藤 麗 子²、
新 村 洋 一³、大 川 秀 郎⁴、保 坂 和 良⁵、笠 井 和 江^{2, 6}

要 約

異生物の既知遺伝子を使い高等植物での関連遺伝子の存在を調査する目的で、哺乳類由来の毒物代謝遺伝子 Cytochrome P450 monooxygenase (CYP1A1) および *Amphibacillus xylanus* 由来 NADH oxidase 遺伝子をプローブとして RFLP 分析を 2 倍体ジャガイモおよびその近縁種で行った。

ジャガイモゲノム中に CYP1A1 遺伝子とバクテリア NADH oxidase 遺伝子それぞれと相同性の高い DNA ホモログが存在するという新たな発見があった。これは、今まで報告されていないものであり、今後植物からのこれら遺伝子の単離の先駆けとなると考えられる。

Key words : ジャガイモ、CYP1A1, NADH oxydase, サザン分析, DNA ホモログ

緒 言

Cytochrome P450 monooxygenase 遺伝子

Cytochrome P450は、高等動物の肺、肝臓、腎臓、副腎、中枢神経など幅広い臓器に存在し、これらの細胞内のミトコンドリアや、細胞小胞にある。主な作用としては、動物組織のミクロソームにおいて農薬、毒薬、薬剤を含む多くの化学物質を触媒反応によって薬物の薬効や毒性を消失させる。^{1, 2)}

薬物代謝を行うミクロソームには多種類の P450が存在し、分子多様性を示す。動物に薬物投与すると、投与薬物の種類に応じて特定分子種の P450の合成が亢進するため肝ミクロソームなどの P450含量が誘導的に増加する。薬物代謝に関与する P450の基質特異性は異常に広くまた分子種間で重複している。このことと分子多様性は、これらの P450が不特定多数の薬物の処理に対応しなければならないことと、関係すると思われる。^{1, 2)}

現在様々な、起源からの100種類以上の P450の第一構造が主として cDNA のヌクレオチド配列の解析から明らかにされており、それに基づいて P450の分類が行われている。またすべての P450は共通の祖先から進化したと考えられており、進化の系統樹の提案もなされている。^{1, 2, 3)}

これまでの研究では、数多くの植物ゲノムの中に Cytochrome P450遺伝子ホモログの存在が報告されているが、ラットの肝細胞の小胞体由来の P450 monooxygenase CYP1A1 遺伝子のような異物代謝型遺伝子やそのホモログの存在は報告されていない。^{3, 4)}

NADH oxidase 遺伝子

NAD とは、Nicotinamide adenine dinucleotide の略で、生体内反応で水素の交換を仲介する補酵素である。⁵⁾ NAD は、多くの脱水素酵素の補酵素である。脱水素反応は、生体内でありふれた反応なので NAD も広く細胞中に存在する。特に、高等動物の肝臓、筋肉には多く、細胞 1g あたり mg 単位で含まれる。⁶⁾

1. 近畿大学生物理工学研究所

2. 近畿大学生物理工学部生物工学科

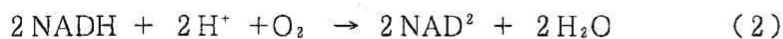
3. 東京農業大学バイオサイエンス学科

4. 神戸大学農学部

5. 神戸大学農学部付属農場

6. 学術振興会

NADH oxidase は、生細胞に普遍的に存在する NADH を、分子状酸素 (O_2) に曝されると、誘導的に合成される。ここで誘導的に合成される NADH oxidase は、2 種類あり (1) 過酸化水素生成型と、(2) 水生成型である。それぞれ、以下の反応を触媒する酵素である。⁶⁾



カタラーゼやペルオキシダーゼをもたない嫌気性菌にとって、過酸化水素は膜の脂肪酸を酸化して、過酸化脂肪を作りだし、タンパク質を酸化し、また DNA を破壊するといった、いわば毒物のはずであり、(1) の過酸化水素生成型 NADH oxidase の機能は不明であった。近年 (1) の過酸化水素生成型 NADH oxidase 遺伝子がサルモネラ菌や大腸菌の酸素ストレス防御酵素アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ (AhpCF) の F 成分と高いホモロジーがあると確認された。⁶⁾ また、(1) の過酸化水素生成型 NADH oxidase 遺伝子は、AhpC 存在下では、ペルオキシダーゼ反応 (過酸化水素を生成せずに、水を生成する) を示した。この反応は、通性嫌気性菌 *Amphibacillus xylanus* 由来の NADH oxidase でも明らかにされている。これらの研究より、(2) 水生成型 NADH oxidase のみならず (1) 過酸化水素生成型 NADH oxidase もまた、菌体内の酸素ストレスから自己防衛する機能を果たしていることが明らかになった。⁶⁾

機能が知られているバクテリア由来の NADH oxidase 遺伝子をプローブとして、ジャガイモゲノムでの DNA ホモログの探索を行うことは興味深いことである。なぜなら、当 NADH oxydase 遺伝子は、高等植物において、oxydative burst 等による環境耐性や耐病性発現と深くかかわりがあると考えられているからである。⁷⁾ 今までの研究で、NADH oxidase 遺伝子が、植物ゲノム中からクローニングされた例はなく、本実験の試みは関連遺伝子の単離の端緒となると考えられる。

材料および方法

植物材料

ジャガイモの *Solanum* 属塊茎形成種の一つである *S. chacoense* (clone; chc525-3, $2n=2x=24$) と、栽培種 2 倍体の *S. phureja* (clone; phu1.22, $2n=2x=24$) を両親とし、これらの F1 雑種 (clone F1-1, $2n=2x=24$) を得た。また、この F1-1 を *S. phureja*-*S. gonyocalyx* complex 由来の 93H100-1 ($2n=2x=24$) と戻し交配させた戻し交雑第一世代系統 94H89-1 ($2n=2x=24$) を用いた。⁸⁾

プローブの由来

i) P450 monooxygenase 遺伝子

ラットの肝細胞の小胞体由来の P450 monooxygenase CYP1A1 遺伝子を CYP1A1 specific primer で PCR 増幅した大きさ 630bp の遺伝子断片をプローブとして用いた。⁹⁾

ii) NADH oxidase 遺伝子

Amphibacillus xylanus 由来の NADH oxidase 遺伝子の大半を含む 1.5kb fragment は pPL-lambda に含まれており、*Hind*III 消化によって取り出すことができる。更に、このベクターは *E. coli* 4830 に導入されている。¹⁰⁾

実験方法

RFLP (Southern) 分析については Hämäläinen et al.¹¹⁾ に準じて行った。制限酵素は、*Eco*RI, *Eco*RV, *Dra*I, および *Hind*III をそれぞれのプローブについて用いた。NADH oxidase 遺伝子については *Hind*III のみで行った。但し、プローブのラベリングおよびプローブシグナルの検出は AlkphosTM (Pharmacia-Amersham) を持ち手行った。ジャガイモゲノムと遺伝子プローブの相同性はハイブリダイゼーション後の Washing stringency を 55-65°C で調整し調査した。

結果および考察

I. ジャガイモゲノムにおける Cytochrome P450 CYP1A1 相同性の DNA ホモログの存在について

供試したすべての系統において幾つかのバンドが用いた4種すべての制限酵素との組み合わせに関し
ての RFLP で得られた (表1、2、3 および 4)。高い stringency (65℃) を用いて、Southern
hybridization を行っても、強い RFLP シグナルが確認された。特に、*EcoRI*, *EcoRV* および *HindIII*
のそれぞれについて、CYP1A1 は制限酵素サイトがないことがわかっており、⁹⁾ これから類推すると供
した植物種では1-2コピーあるいは複数の同一配列およびサイズを持つホモログが存在すると考え
られる。遺伝子特異的プライマーを用いた PCR によっても同様なことが確認できた (Takeda *et al.*
In preparation)。

表1. RFLP (制限酵素; *EcoRI* × プローブ; P450) による多型検出

clone シグナル (kbp)	① phu1.22	② chc525-3	③ F1-1	④ 93H100-1	⑤ 94H89-1
23	Ps	NA	Ps	Ps	Ps
9.4	<i>Ps*</i>	<i>NA*</i>	<i>Ps*</i>	<i>A*</i>	<i>Ps*</i>
6.6	Pw	NA	S	Pw	S
4.2	A	NA	Ps	A	A
4.0	<i>Ps*</i>	<i>NA*</i>	<i>A*</i>	<i>Ps*</i>	<i>Ps*</i>
3.4	A	Pw	Pm	Pm	Pw
3.0	<i>Pm*</i>	<i>A*</i>	<i>Pm*</i>	<i>Pm*</i>	<i>A*</i>
2.8	A	A	A	A	Pw
2.3	Pw	A	Pw	A	Pw
2.0	Pw	Pw	Pm	Pm	Pw

注) シグナルバンド存在 P (Present)

濃 Ps (strong)

中

Pm (medium)

薄

Pw (weak)

シグナルバンド無 A (Absent)

スメア

S (Smear)

判定不可能

NA (No Amplification)

下線* 有効多型のシグナル

S.phureja 側のポリモルフィズム イタリック文字*S.chacoense* のポリモルフィズム 白抜き文字表2. RFLP (制限酵素; *EcoRV* × プローブ; P450) による多型検出

clone シグナル (kbp)	① phu1.22	② chc525-3	③ F1-1	④ 93H100-1	⑤ 94H89-1
23	Ps	Pm	Ps	Ps	Ps
9.4	Ps	Pw	Ps	Ps	Pm
6.6	<i>Pm*</i>	<i>A*</i>	<i>Pw*</i>	<i>Pw*</i>	<i>Pw*</i>
5.0	S	NA	Pm	Pm	Pm

注) 表1 参照

表 3. RFLP (制限酵素; *Hind* III × プローブ名; P450) による多型検出

clone シグナル (kbp)	① phu1.22	② chc525-3	③ F1-1	④ 93H100-1	⑤ 94H89-1
23	S	Ps	Ps	Ps	Ps
16.2	S	Pm	A	A	Pw
9.4	S	A	Pm	Pm	A
8.0	S	Pw	Pm	Pm	Pw
6.6	S	A	Ps	A	A
3.3	A	A	Pm	Pm	A
2.3	A	A	Ps	Ps	A

注) 表 1 参照

表 4. RFLP (制限酵素; *Dra* I × プローブ; P450) による多型検出

clone シグナル kbp	① phu1.22	② chc525-3	③ F1-1	④ 93H100-1	⑤ 94H89-1
23	Ps	NA	Pw	Ps	Pw
16.2	Pm	NA	A	A	A
10.0	Pm	NA	A	Ps	Pw
9.0	Pm	NA	A	Ps	Pw
8.0	A	NA	A	Ps	Pw
7.0	Pm	NA	A	A	A
6.5	A?	NA	Pw	Ps	Pm
5.5	Ps	NA	Pw	A	Pm
5.0	A	A	A	Ps	Pm
4.4	Ps	Pm	Pm	A	A
4.0	<u>Ps*</u>	<u>A*</u>	<u>A*</u>	<u>Ps*</u>	<u>A*</u>
3.5	<u>A*</u>	<u>Pm*</u>	<u>Pm*</u>	<u>A*</u>	<u>Pm*</u>
3.0	<u>Ps*</u>	<u>A*</u>	<u>A*</u>	<u>Ps*</u>	<u>A*</u>
2.7	<u>A*</u>	<u>Pm*</u>	<u>Pm*</u>	<u>A*</u>	<u>Ps*</u>
2.3	Ps	A	A	S	Pw
2.1	A	Pw	Pm	S	S
1.8	Pm	Pm	Pm	A	Pm
1.6	<u>A*</u>	<u>Pw*</u>	<u>Pw*</u>	<u>A*</u>	<u>A*</u>

Cytochrome P450遺伝子群は、高等動物の幅広く臓器に存在し、これらの細胞内のミトコンドリアや、細胞小胞にあることが、証明されている。¹⁾ 高等動物以外にも、酵母、細菌、植物などからも、当遺伝子群の存在は、すでに報告されている。¹⁾ 植物については、ナス、アボガド、ペチュニアの芽から P450 CYP71A 2¹²⁾、また、小麦から P450 CYP51¹³⁾、大豆から P450 CYP93、シロイヌナズナから P450 CYP84,¹⁴⁾ タバコから P450 CYP9A1¹⁵⁾ 等色素、ステロイド等の代謝に関連する特異的な P450遺伝子群がそれぞれのゲノム中に存在していることが、報告されている。しかし、高等植物では CYP1A1 に対応する遺伝子は発見されていない。⁴⁾

一方、ラットの肝細胞の小胞体由来の P450 monooxygenase CYP 1 A 1 遺伝子と相同性の高い RFLP シグナルが高等植物であるジャガイモから、報告されたのは、本実験が最初である。

II. ジャガイモゲノムにおける *Amphibacillus xylophilus* 由来の NADH oxidase 遺伝子相同性の DNA ホモログの存在について

Hind III digest にもとづく Southern 分析を表 5 に示した。Fig. 1 に示すように、高い stringency (65°C) を用いて、Southern hybridization を行っても、強い RFLP シグナルが確認された。なお、供試したすべての系統において 1 - 2 のバンド *Hind* III で得られた。プローブとして用いた NADH oxidase 遺伝子は配列中に *Hind* III サイトがなく、これから類推すると 1 - 2 コピーのホモログが存在する可能性がある。これは、遺伝子特異的プライマーを用いた PCR によっても同様なことが確認できた (Tsubomoto *et al.* In preparation)。

表 5. RFLP (制限酵素 ; *Eco* RI × プローブ ; NADH oxidase) による多型検出

clone シグナル (kbp)	① phu1.22	② chc525-3	③ F1-1	④ 93H100-1	⑤ 94H89-1
23	Ps	Ps	Ps	Ps	Ps
16.2	<u>A*</u>	<u>Pw*</u>	<u>Pw*</u>	<u>Pw*</u>	<u>Pw*</u>
9.4	Pm	Pw	Pm	Pm	Pw
4.4	<u>Ps*</u>	<u>A*</u>	<u>Ps*</u>	<u>Pw*</u>	<u>Pw*</u>
4.0	<u>A*</u>	<u>Pw*</u>	<u>Ps*</u>	<u>A*</u>	<u>A*</u>
3.3	<u>Ps*</u>	<u>A*</u>	<u>A*</u>	<u>Ps*</u>	<u>Pm*</u>

注) 表 1 参照

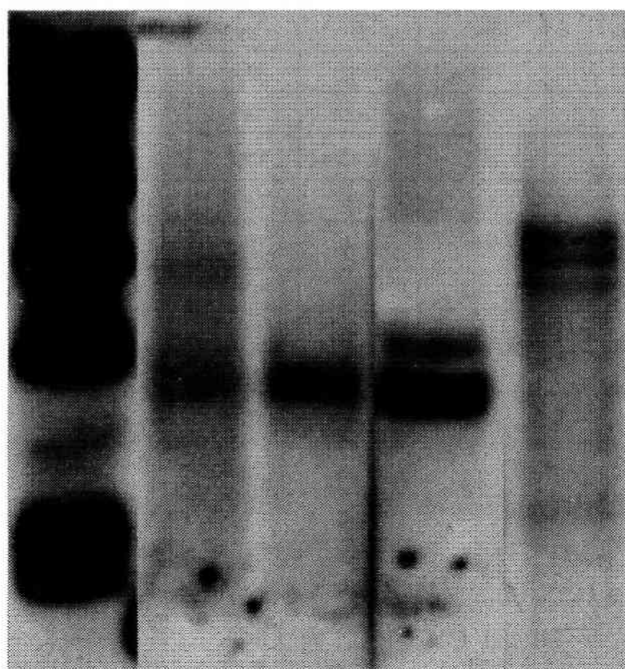


Fig. 1. Signals obtained from Southern hybridization on genomic DNA of tuber-bearing *Solanum* species using a bacterial NADH oxidase gene.

NADH oxidase 遺伝子については高等動物の肝臓、筋肉には多く存在している。⁶⁾ NADH と相補的に機能する AhpC 酵素に関連する遺伝子は、大麦、ほうれん草で同定が報告されている。¹⁶⁾ しかし、NADHoxydase 遺伝子そのものの同定やそのホモログはいまだ報告がなされていない。NADH oxidase 遺伝子と相同性の高い RFLP シグナルの存在が見つかったのは、ジャガイモにおいて、本実験が最初である。

謝 辞

当研究は文部省科学研究助成金（課題番号09760007）および学術振興会未来開拓事業 JSPS-RFTF-96L00603の支援によって行われた。

引用文献

1. 武森重樹, 小南思郎 (1993) チトクロム P-450. 東京大学出版会
2. 島田力, 鎌滝哲也 (1998) 8. 薬物・毒物・癌原物質の代謝に関与するヒトのチトクロム P450. 化学と生物 35 (10) : 659-663
3. Kreuz K, Tommasini R, Martinoia E (1996) Old enzymes for a new job. Plant Physiol. 111 : 349-353
4. Durst F, Benveniste I, Lesot A, Pinot F, Salaun J-P, Werck-Reichhart D (1997) Regulation of cytochrome P450 monooxygenases in plants. BRAIN Seminar Cytochrome P450 and Plant Genetic Engineering, October 30-31, 1997, Tsukuba, Ibaraki, Japan, p 5 - 8.
5. 田宮信雄, 村松正美, 小木達彦, 吉田浩 (1992) 酵素とは、ヴボート生化学, 東京化学同人, 276-287
6. 樋口允子 (1997) 酸素障害防御の立役者-嫌気性菌の NADH オキシダーゼ. 化学と生物. Vol.35 No. 8 : 547-555
7. 山田哲治・島本功・渡辺雄一郎 (1997) 分子レベルからみた植物に耐病性. 秀潤社
8. Hosaka K, Hanneman RE Jr (1994) Random amplified polymorphic DNA markers detected in a segregating hybrid population of *Solanum chacoense* × *S. phureja*. Jpn. J. Genet. 69 : 53-66
9. Inui H, Shiota N, Ishige T, Ohkawa Y, and Ohkawa H (1998) Herbicide metabolism and resistance of transgenic potato plants expressing rat cytochrome P450 1A1. Breed. Sci. 48 : 135-144.
10. Niimura Y, Poole LB, Massey V (1995) *Amphibacillus xylanus* NADH oxidase and *Salmonella typhimurium* alky-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of *S. typhimurium* alky-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component. J. Biol. Chem. 270 : 25645-25652
11. Härmäläinen JH, Sorri VA, Watanabe KN, Gebhardt C, and Valkonen JPT (1998) Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyvirus in potato. Theor. Appl. Genet. 96 : 1036-1043
12. Umamoto N, Kobayashi O, Ishizaki O, Nishizawa O, Toguri T (1993) cDNAs sequences encoding Cytochrome P450 CYP71 family from eggplant seedlings. FEBS Lett. 330 : 169-173
13. Cabellohurtado F, Zimmerlin A, Rahier A, Taton M, Deroose R, Nedelkina S, Batard Y, Durst F, Pallett KE, Werckrethart D (1997) Cloning and functional expression in yeast of a cDNA coding for an obtusifolius 14- α -demethylase (CYP51) in wheat. Biochem. Biophys. Res. Comm. 230 : 381-385

14. Akashi T, Aoki T, Takahashi T, Kameya N, Nakamura I, Ayabe S (1997) Cloning of cytochrome P450 cDNA from cultured glycyrrhiza echinatal cells and their transcriptional activation by elicitor treatment. *Plant Sci.* 126 : 39-47
15. Rose RL, Goh D, Thompson DM, Verma KD, Heckel DG, Roe RM, Hodgson E (1997) Cytochrome P450 (CYP) 9 A 1 in *Heliothis virescens*-the first member of a new CYP family. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27 : 605-615
16. Baier M, Dietz KJ (1996) Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Molec. Biol.* 31 : 553-564
17. Watanabe KN (1994) Molecular genetics. In : Brandshaw JE, Mackay GR (eds.) *Potato Genetics*. CAB, Wallingford, UK, pp213-235

Summary

Presence of gene homologues associated with a mamalian cytochrome P450 monooxygenase (CYP 1 A 1) and a bacterial NADH oxydase in potato genome

Watanabe, K. N.^{1, 2}, Y. Takeda², M. Tsubomoto², R. Kondo²,
Y. Niimura³, H. Ohkawa⁴, K. Hosaka⁵ and K. Kasai^{2, 6}

We attempted to know whether potato and its relatives could have DNA homologues associated with functional genes identified in different organisms in alternative kingdoms. Two known genes were employed for a survey using restriction fragement length polymorphism (RFLP) analysis: a mammalian cytochrome P450 1 A 1 which shows strong xenobiotic metabolism and a NADH oxydase gene from *Amphibacillus xylanus* that exhibits very rapid catalytic activities on superoxide. Genomic DNA samples from haploids from 4 x potatoes (*Solanum tubersoum*, 2 n = 2 x = 24), their relatives (*S. phureja*, 2 n = 2 x = 24; and *S. chacoense*, 2 n = 2 x = 24) and their 2 x hybrids were digested with restriction enzymes *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, and *Dra* I then, the resulting digests were employed for Southern hybridization for RFLP. Even with a high stringency which is usually used for intraspecific genomic hybridization, Southern analysis revealed that a few copies of homologous fragements. While only a few bands were obtained per species, this is an intriguing report on the presence of the gene homologues associated with other organisms.

Key words : potato, CYP 1 A 1, NADH oxydase, Southern hybridization, DNA homologues