

《農芸化学奨励賞》

高等植物と糸状菌におけるジテルペン生合成・環化酵素遺伝子に関する研究



山形大学農学部生物資源学科 助教授 豊 増 知 伸

テルペンとは、炭素数 5 個のイソプレンを構成単位とする一群の天然有機化合物の総称で、その特徴の一つは多様な環状炭素骨格構造にある。これらの一見複雑な環状テルペン群は、以下のように単純な機構で生合成される：まず、プレニルトランスフェラーゼによりイソプレン単位 isopentenyl diphosphate とその異性体である dimethylallyl diphosphate が head-to-tail で連結されることで固有の炭素数のプレニル 2 リン酸が合成され（鎖長の決定）、その直鎖状の前駆物質はテルペン環化酵素により環化され（基本炭素骨格の決定）、さらに酸化酵素、糖転位酵素などにより各種化学修飾を受けて（生理活性の付与）生合成される。ジテルペンは、炭素数 20 個のゲラニルゲラニル二リン酸 (GGDP) より生合成され、ジベレリン（植物ホルモン、植調剤）、タキソール（制がん剤）、アフィジコリン（細胞周期調節剤）、フシコクシン（植物ホルモン様活性）、コチレニン（動物細胞分化誘導活性）のように農薬・医薬・生化学試薬などに応用展開された重要な生理活性物質を多く含む。植物と糸状菌は多様なジテルペン類を生合成することが知られており、それらからジテルペン生合成酵素遺伝子を取得し、有用な遺伝子資源として利活用することは、学術的基礎研究ばかりではなく、新規生理機能物質創製などの応用展開研究の基盤となると期待される。本研究では、植物と糸状菌の多様なジテルペンの生合成酵素、特に環化酵素に関して先駆的な研究を展開し、多くの重要な新知見を得た。以下にその主な成果を記す。

1. イネのジテルペン系フィトアレキシン生合成酵素遺伝子

フィトアレキシンとは植物が病原菌に感染したときに植物側で合成・蓄積される低分子の抗菌性化合物であり、紫外線 (UV) 処理などによる物理的傷害やある種の化学物質（エリシター）によってもその生産は誘導される。フィトアレキシン生産は動物の免疫に似たものであり、植物の病害抵抗において重要な役割を演じると考えられている。イネ (*Oryza sativa* L.) からはこれまでに 15 種類の化合物がフィトアレキシンとして単離・構造決定されており、フラバン型のサクラネチンを除く 14 種類はジテルペンである。それら 14 種類のジテルペン系フィトアレキシンは、基本骨格の構造により 4 系統に分類される：カサジェン型（フィトカサン A-E）、サンダラコピマラジェン型（オリザレキシン A-F）、ステマレン型（オリザレキシン S）、ピマラジェン型（モミラクトン A, B）。これらは、GGDP が第一段階の環化反応（GGDP の末端オレフィンへのプロトン付加により反応開始：B 型環化）により *ent*-copalyl diphosphate (*ent*-CDP) あるいはそのジアステレオマー *syn*-CDP へと変換され、さらに第二段階の環化反応（ピロリン酸アニオンの脱離により反応開始：A 型環化）によりそれぞれの基本骨格となる環状炭化水素が生成し、それらが酸化反応などにより修飾されることで生合成される。筆者が本研究を開始した頃はイネのフィトアレキシン生合成遺伝子は 1 種もクローニングされていない

だったので、基本炭素骨格形成に関与する環化酵素に着目し、cDNA クローニングを試みた。植物ホルモンの一つジベレリンも同様の機構で生合成されるので、その生合成遺伝子の情報を利用して、目的環化酵素遺伝子 6 種（2 種の B 型、4 種の A 型）をすべてクローニングすることに成功した：*OsCPS2/OsCyc2*, *OsCPS4/OsCyc1*, *OsKS4*, *OsKS7/OsDTC1*, *OsKS8/OsDTC2*, *OsKS10* はそれぞれ *ent*-CDP 合成酵素、*syn*-CDP 合成酵素、9βH-pimara-7,15-diene 合成酵素（モミラクトン A, B）、*ent*-cassa-12,15-diene 合成酵素（フィトカサン A-E）、*ste mar*-13-ene 合成酵素（オリザレキシン S）、*ent*-sandaracopimaradiene 合成酵素（オリザレキシン A-F）をコードした（図 1）。これらの遺伝子の発現量は UV 処理やキチンエリシター処理により著しく増加した。イネのゲノムには、これらのパラログが複数存在し、フィトアレキシン生合成に関与するもの以外では、偽遺伝子を除いて B 型で 1 種 (*OsCPS1*)、A 型で 3 種 (*OsKS1*, *OsKS5*, *OsKS6*) みられた。*OsCPS1* と *OsKS1* はジベレリン生合成に関与し、それぞれ *ent*-CDP 合成酵素、*ent*-kaur-16-ene 合成酵素をコードした。*OsKS5* と *OsKS6* は、それぞれ *ent*-pimara-8(14),15-diene 合成酵素、*ent*-kaur-15-ene 合成酵素をコードした。これらのパラログの遺伝子発現量は UV 処理やキチンエリシター処理により増加しなかった。以上の結果、イネにおいてはジベレリンとジテルペン系フィトアレキシンの生合成遺伝子には機能重複がないことが示された。

また、*ent*-CDP 合成の段階は、ジベレリンとオリザレキシン A-F、フィトカサン A-E の生合成で共有するが、それぞれに専用の遺伝子が存在する可能性も強く示された：*OsCPS1* がジベレリン生合成、*OsCPS2/OsCyc2* がフィトアレキシン生合成に関与する。さらに、フィトカサン類の生合成に関与する *OsCPS2/OsCyc2* と *OsKS7* は 2 番染色体上の極めて近い位置に座乗し、モミラクトン類の生合成に関与する *OsCPS4/OsCyc1* と *OsKS4* も同様に 4 番染色体上で近い位置に座乗することが明らかになった。それぞれの周辺には UV 処理やキチンエリシター処理により発現量が増加する P450 遺伝子が複数座乗し、炭素骨格の酸化に P450 が関与する可能性を考え合わせると、フィトカサン類とモミラクトン類の生合成遺伝子はそれぞれ染色体 DNA 上でクラスターをなすことが示唆された。これは、高等植物にも細菌や糸状菌と同様に二次代謝テルペノイド生合成遺伝子クラスターが存在するという初めての知見である。現在、この可能性を実証することを試みている。

2. 糸状菌のジテルペン環化酵素遺伝子

本研究では、糸状菌イネ馬鹿苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*) からの 2 機能 *ent*-kaur-16-ene 合成酵素遺伝子 (*GfCPS/KS*) の取得とその利用について研究を展開し、その中間体 *ent*-CDP のジアステレオマーである *syn*-CDP を生合成中間体とするアフ

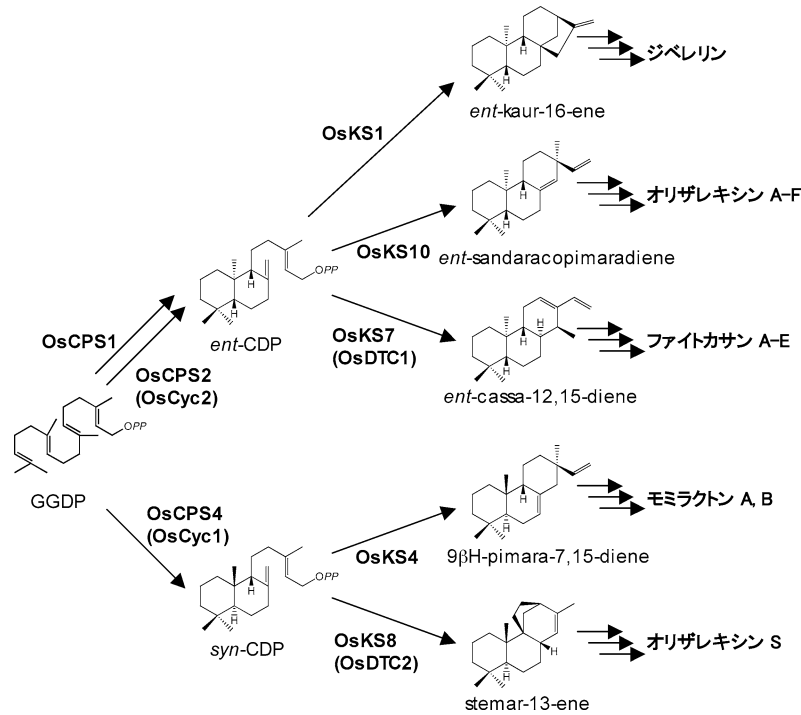


図 1

イジコリンについて、その生合成に関与する環化酵素遺伝子を生産菌 (*Phoma betae*) より cDNA クローニングすることに成功した (*PbACS*)。本酵素も GfCPS/KS と同様に GGDP より *syn*-CDP を経て一気に aphidicolan-16 β -ol を合成する 2 機能酵素であった。*PbACS* 周辺のゲノム DNA 塩基配列を決定したところ、P450 遺伝子が 2 種、トランスポーター遺伝子、転写因子遺伝子がみられた。この結果は、アフィジコリンの生合成遺伝子はジベルリンと同様にゲノム DNA 上でクラスターをなすことを示唆するものであり、このことより糸状菌においても一般的にジテルペン生合成遺伝子はクラスターをなすと考えられた。そこでこの知見を利用して、筆者らは最近、*Phomopsis amygdali* が生産するジテルペン配糖体フシコクシンについてその生合成に関与する環化酵素遺伝子のクローニングと機能解析に成功した (*PaFS*)。この酵素は、N 末端側にテルペン環化酵素ドメイン、C 末端側には鎖長を決定する GGDP 合成酵素ドメインを有するキメラな酵素で、極めて新奇なテルペン生合成酵素であった (図 2)。本キメラ酵素は、生体一般に存在するイソプレ単位を利用して GGDP を経てフシコクシン生合成中間体 fusicocca-2,10(14)-diene を効率よく生産するもので、さらに本酵素遺伝子のホモログは他の糸状菌のデータベース上にも多くみられ、糸状菌特有の高機能酵素ファミリーの一種と考えられた。

本研究は、山形大学農学部名誉教授・佐々武史先生とともに立案し、山形大学農学部において行われたものです。ご指導ご鞭撻いただいた佐々武史先生には厚く御礼申し上げます。また、イネのフィトアレキシン生合成遺伝子について共同研究を行っております東京大学生物生産工学研究センター教授・山根久和先生には卒論生時代より温かいご指導ご激励をいただき、

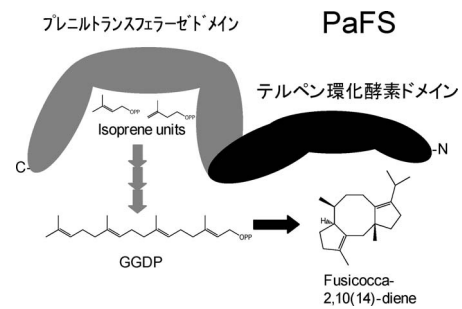


図 2

厚く感謝いたします。ジベルリン生合成に関与する環化酵素の研究を先駆的に行われていた理研 PSC 生長制御研究グループディレクター・神谷勇治先生にはポストドク時代よりご助言ご激励をいただき、深く感謝いたします。さらに、山形大学農学部教授・三橋 渉先生、北海道大学大学院理学院教授・及川英秋先生、茨城大学農学部助教授・戸嶋浩明先生、富山県立大学工学部助教授・大利 徹先生、大阪大学産業科学研究所教授・加藤修雄先生、名古屋大学生物機能開発利用研究センター教授・松岡 信先生、理研 PSC 促進制御研究チームリーダー・山口信次郎博士、東京農工大学大学院助手・川出 洋先生、東京大学大学生物生産工学研究センター助手・岡田憲典先生をはじめとしました多くの共同研究者の方々には厚く感謝いたします。また、卒論生時代よりご指導ご激励をいただいております東京大学農学部名誉教授・高橋信孝先生、東京大学農学部名誉教授・室伏 旭先生 (現・秋田県立大学教授) をはじめとしました多くの先生、先輩・後輩、友人、山形大学の学生の方々には深く感謝いたします。最後になりましたが、本賞にご推薦いただきました日本農芸化学会東北支部長・宮澤陽夫先生 (東北大学大学院教授) に厚く御礼申し上げます。