

有用植物二次代謝産物の生合成機構に関する生化学 および分子細胞遺伝学的研究



富山県立大学工学部生物工学科 講師 野村 泰治

はじめに

植物二次代謝産物の生理学的存在意義の1つは、病原菌や害虫に対する防御にあるものと考えられており、実際に抗菌活性や摂食阻害・殺虫活性を示す二次代謝産物が多く知られている。もう1つの重要な意義は、医薬、農薬、香料品、食品等の種々の産業分野での利用が挙げられる。こういった生物・薬理活性を示す有用植物二次代謝産物の生合成機構を解明することは学術上重要であるだけでなく、耐病性育種や、難入手化合物の効率的生産系の開発といった応用を展望する上でも欠かせないものである。筆者はこれまで、食用作物（コムギ）、薬用植物（トコン）、園芸植物（チューリップ）といった非モデル植物における有用植物二次代謝産物を対象として、生化学および分子細胞遺伝学的なアプローチによってその生合成機構の解明に取り組んできた。

1. コムギにおけるベンゾキサジン類の生合成研究

「ベンゾキサジン (Bx) 類」は、コムギ、ライムギ、トウモロコシを含む数種のイネ科植物にみられる耐病性二次代謝産物である。このうち、コムギ（パンコムギ）は A, B, D の3つのサブゲノムからなる6倍体のゲノム（ゲノム式 AABBDD）をもつことを特徴としている。Bx 類の生合成研究はドイツのグループによるトウモロコシでの研究が先行していたが、6倍体のコムギでは2倍体であるトウモロコシにはみられない、倍数性植物特有の二次代謝生合成機構が存在していることが想定された。生化学的な解析の結果、Bx 生合成経路自体はコムギとトウモロコシで共通であったが、コムギ異数体システムを用いた染色体マッピングを行ったところ、コムギでは生合成酵素遺伝子群は A, B, D の各サブゲノムに1セットずつ計3セット存在していることが分かった。そこで、3つのサブゲノムに由来する生合成酵素遺伝子群を全て単離し、遺伝子発現量と酵素触媒能をサブゲノム間で比較する新たな系を確立した。これによって、生合成への寄与率にはサブゲノム間でバイアスがかかっており、特にBゲノムの寄与が顕著であることを明らかにした（図1）。これは、倍数性植物のサブゲノム間の性能差異を遺伝子と酵素の両面から定量的に示した最初の例であり、二次代謝以外の枠組みでも成立する普遍的機構として提示したものである。興味深いことに、トウモロコシでは生合成酵素遺伝子群は染色体上でクラスターを形成しているのに対し、コムギではクラスターの分散が起こっていた。トウモロコシでの発見を端緒として植物二次代謝の生合成酵素遺伝子クラスターの例が相次いで報告され、クラスターの形成は、生合成酵素遺伝子群の共発現を可能にする機構の1つであるとの主張が主流となっているが、クラスターが異なる染色体上に分散しているコムギにおいても Bx 生合成酵素遺伝子群が共発現している事実はその反例であり、植物の二次代謝生合成酵素遺伝子クラスターの存在意義に対して一石を投じる発見である。

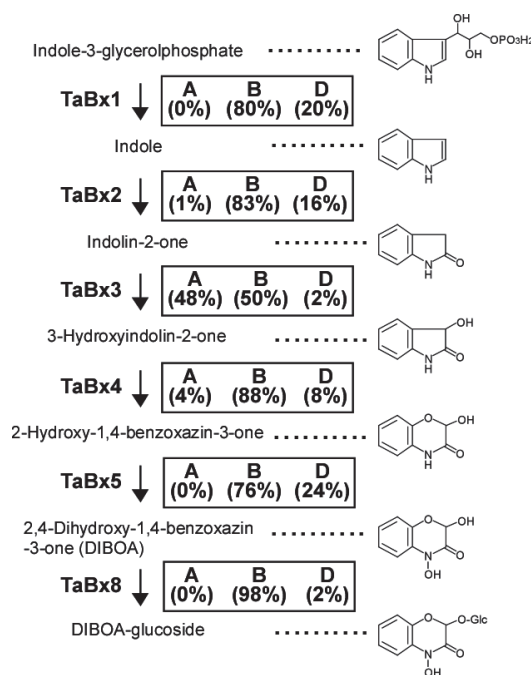


図1 各 Bx 生合成酵素遺伝子 (*TaBx*) につき、A, B, D のサブゲノムに由来する遺伝子（同祖遺伝子）が存在する。生合成への寄与率（カッコ内）は B ゲノムが最も高い。

2. 薬用植物トコンにおけるイペカックアルカロイド類の生合成研究

生薬トコンの根には、テルペノイド-イソキノリン骨格を有する「イペカックアルカロイド類」が含まれており、催吐剤やアメーバ赤痢の特効薬として古くから使われてきたが、その生合成経路は前駆物質やいくつかの中間体の構造を除いて分かっていなかった。イペカックアルカロイド類のうち、主成分である「エメチン」を高生産する *in vitro* 培養根の EST (約 1,000 配列) から、推定生合成反応をつかさどると予想される候補遺伝子を選抜、全長配列を単離し、組換え酵素による詳細な機能解析を行った。その結果、生合成初期の鍵酵素の一つである「Ipecac alkaloid β -glucosidase」をエメチン生合成酵素遺伝子としてはじめて同定した。この過程で、酵素反応生成物の高い反応性による自発的な反応のため、通常の酵素反応では単一の生成物が得られないという問題に直面した。NaBH₃CN 存在下で酵素反応を行うことで、自発的な反応経路上で生じると推定された iminium cation を還元し、単一の生成物に導くことに成功したことがブレイクスルーとなり、その構造解析に基づいて、酵素反応生成物の自発的な反応物のうち、この iminium cation がそれ以降の生合成反応の中間体となることを示した。さらに、2分子のドーパミンに由来するエメチン中のメトキシ基 4 つが、3種の「Ipecac alkaloid *O*-methyltransferase」による段階的な

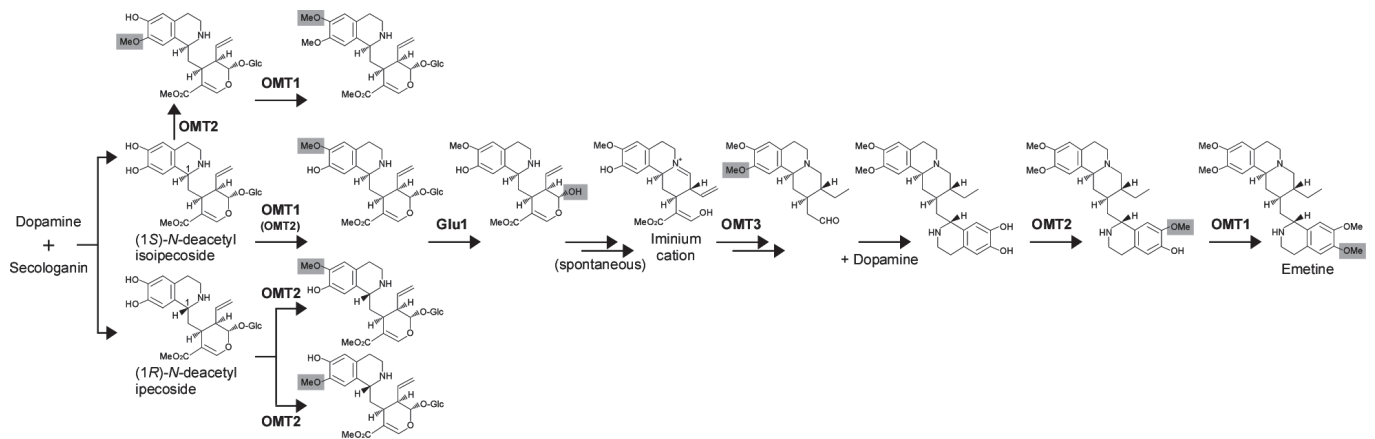


図2 イペカックアルカロイド生合成経路. Glu1は「Ipecac alkaloid β -glucosidase」, OMTは「Ipecac alkaloid *O*-methyltransferase」を表している。

反応によって形成されていることを、詳細な酵素学的解析によって明らかにした。これら計4種の生合成酵素遺伝子の同定によって、これまで未解明であったイペカックアルカロイド生合成経路の全体像を提唱した(図2)。

3. チューリップにおけるチューリップポシド/チューリップパリン類の生合成研究

チューリップの耐病性二次代謝産物として古くから知られているグルコースエステル「チューリップポシド(Pos)類」から、抗菌活性物質本体であるアグリコンのラクトン化体「チューリップパリン(Pa)類」への酵素変換系を解明した。この変換反応を触媒する「Pos変換酵素」の分子実体は全く分かっていなかったが、主要Pos類であるPosAおよびPosBはそれぞれ異なる酵素によって、対応するPaAおよびPaBへと変換されるとの作業仮説に基づき、PosA変換酵素およびPosB変換酵素をチューリップ組織から精製することに成功した。両酵素遺伝子の解析によって、Pos変換酵素は、グルコースエステルであるPos類の加水分解ではなく、分子内エステル転移反応によるラクトン形成を触媒する、これまでに知られていなかった新しいタイプのカルボキシルエステラーゼであることを発見した(図3)。このユニークな酵素の同定は、今では「古典的」とも称される天然酵素の精製に基づいてはじめて達成されたものであり、*in silico*での目的酵素の推測・同定が困難な場合には、酵素精製が今でもなお新規酵素を同定する上で有用であることを示している。さらに、両変換酵素にはそれぞれ複数のアイソザイムが存在しており、組織ごとに異なるアイソザイムが発現しているという分子多様性の存在を酵素、遺伝子の両面から明らかにした。同時に、Pos変換酵素が全組織で構成的に発現していることを見いだすと同時に、本酵素が細胞内のプラスチドに特異的に局在していることを証明した。この発見に基づいて、健常細胞ではPos類とPos変換酵素は、液胞とプラスチドという異なるオルガネラに存在することによって不必要な酵素反応を回避し、感染や摂食による細胞破碎に伴い両者が接触すると、酵素反応によって速やかに活性物質であるPa類を生成するという、チューリップの化学防御機構を新たに提唱した。さらに、本酵素変換系を応用することで、化学合成が困難な光学活性化合物PaBの酵素法に基づく生産プロセスを構築し、かねてより種々の分野で抗菌剤としての利用が期待されてきたPaBの用途開発への端緒を開いた。

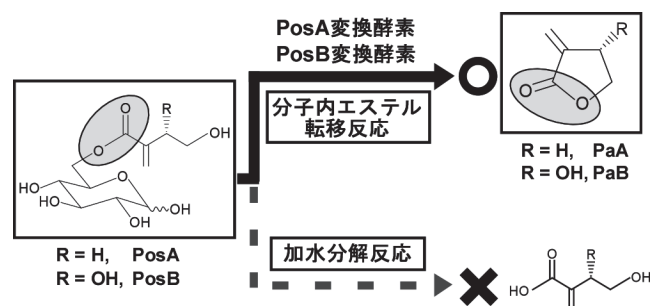


図3 Pos変換酵素はカルボキシルエステラーゼファミリー酵素であるが、分子内エステル転移反応によるラクトン形成のみを触媒する。

謝辞 本研究は京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生物機能制御化学分野、同応用生物科学専攻植物遺伝学分野、米国 Donald Danforth Plant Science Center, Toni M. Kutchan Laboratory, ならびに富山県立大学工学部生物工学科植物機能工学講座において行われたものです。ムギ類の二次代謝研究の機会を与えていただき、ご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学名誉教授・岩村倣先生に衷心より感謝いたします。学生時代およびポスドク時代を通して、ご指導を賜りました京都大学名誉教授・遠藤隆先生(現 龍谷大学教授)に御礼申し上げます。一大学院生であった私に実験の場をご提供いただき、多くのご指導と激励を賜りました神戸大学名誉教授・大川秀郎先生、同教授・今石浩正先生に厚く御礼申し上げます。京都大学在籍時から現在まで、終始ご指導、ご支援いただいている石原亭先生(現 鳥取大学教授)に心より感謝の意を表します。トコンの二次代謝研究の機会を与えていただき、2年半の留学期間中、公私にわたってご指導を賜りました Toni M. Kutchan 博士、故 Meinhart H. Zenk 博士夫妻に厚く御礼申し上げます。チューリップの二次代謝研究の機会を与えていただき、日頃から惜しみないご指導とご協力を賜っている富山県立大学教授・加藤康夫先生に深甚なる感謝の意を表します。現所属への着任以来ご支援いただいている荻田信二郎先生(現 県立広島大学教授)に深く感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長・堀尾文彦先生に厚く御礼申し上げます。