

《日本農芸化学会功績賞》

## フラボノイドの生態生物化学に関する研究



北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 教授 田原 哲士

筆者のフラボノイド研究は、1981年9月在外研究員として英国レディング大学植物学科に滞在、J. B. Harborne 教授と J. L. Ingham 博士の指導を得て実施した植物の防御因子としてのイソフラボノイドの構造や機能の研究に端を発する。1988年からはカナダのコンコルディア大学生物学科 Ibrahim 教授とも共同研究を行った。極めて多様な構造と機能を有するフラボノイドは、シキミ酸経路に由来するケイ皮酸の C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> 部分に、マロン酸由来の酢酸ユニット 3 個からの C<sub>6</sub> 部分が C-C 結合して生合成 (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) され、C<sub>3</sub> 部分の 1,3-位にベンゼン環 (C<sub>6</sub>) が結合したものをフラボノイド骨格、1,2-位に結合したものをイソフラボノイド骨格といい、それぞれが多くのクラスに分けられる化合物よりなる。フラボノイドという名称は、これらすべての化合物を含むが、イソフラボノイドと対比した場合は狭義のものを指す。フラボノイドは、生命体が陸上に進出する際に紫外線防御の機能を負ったといわれているが、近年、細胞内の機能や生態系における生物間相互作用に情報物質として、多様な役割を果たしていることが知られてきている。大まかには、フラボノイドが、ステロイドテンプレートにはまることから、その生理活性のかなりの部分がステロイド系生理活性物質のアゴニストあるいはアンタゴニストとしての機能によると考えられている。しかし、それらの多様で特異的な生理作用については、多くの未知な部分が残されている。フラボノイドの新しい生理活性領域の開拓を目指して行った研究成果を以下に要約する。これらの研究により、高等植物の代表的二次代謝産物であるフラボノイドに関する生態生物化学的な新知見と応用展開のための多くの研究素材を得ることができた。

## I. 天然に存在するフラボノイドの構造研究ならびにその応用

植物の構成的あるいは誘導的抗菌物質、関連化合物の構造研究を行い、マメ科植物 *Lupinus albus*, *L. luteus*, *Piscidia erythrina*, *Pueraria mirifica* その他から、(A) フラボノイド骨格炭素と直結した窒素原子を含有する 3 種類のイソフラボン (1~3), (B) 新規クマラノクロマノン骨格を有するイソフラボノイド 4 種類 (4~7), (C) フラボノイドとしては初めての回転異性体 2 組 4 種類のイソフラボン (8, 9; 10, 11), (D) 生成にペルオキシダーゼが関与し、抗菌作用が顕著な新規結合様式のイソフラボン二量体 2 種類 (12, 13) など (図 1), 新規フラボノイド 119 種を単離同定した。また、天然フラボノイドの構造研究で得た質量分析や NMR 分析のデータをもとに、部分構造の決定や置換様式の判定に役立つルールを提案した。その適用により、ウオトリマメ (*P. erythrina*) の piscidone (1968 年) や 6-prenylpiscerythron (1984 年), ライマメのファイトアレキシンの構造に疑義を見だし、再検討の結果、それらの構造を改めた。

## II. プレニル化フラボノイドのカビによる新しい代謝経路の研究

抗菌物質生産能を有しながら、植物が病原菌に感染するのは、植物と病原菌の間に成立している特殊な関係による。その要因の一つは、植物病原菌による宿主抗菌物質の解毒代謝にある。単純フラボノイドの微生物代謝の研究例は多かったが、複合型フラボノイド (基本骨格の C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 上に直接メチル基やイソプレニルユニットが置換した誘導体) では、プレニル化イソフラバノンである kievitone のプレニル側鎖への水付加反応のみが知られていた。イソフラボンはプレニル化により抗菌活性

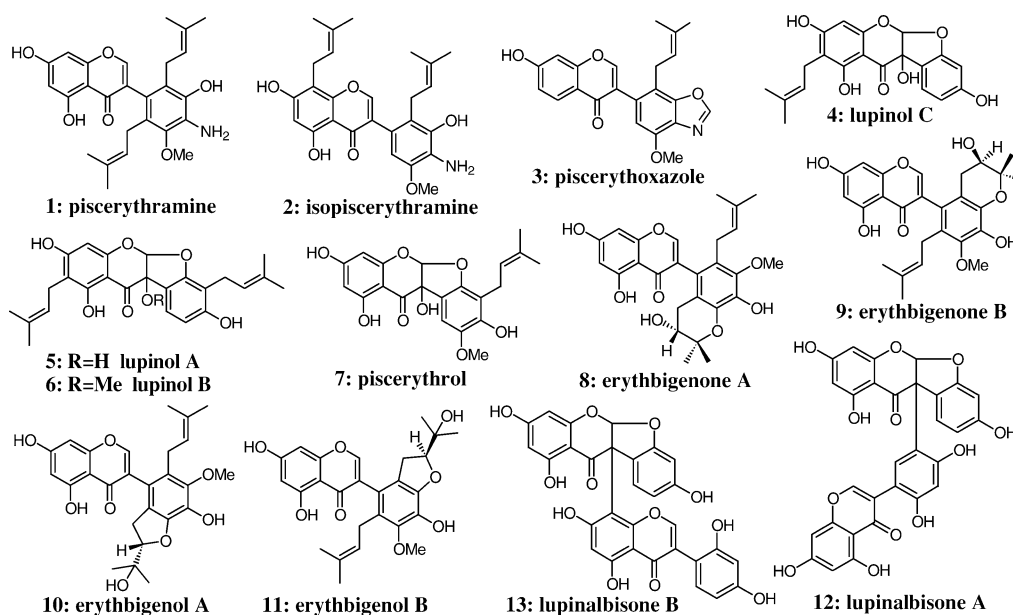


図 1 ルーピン類およびウオトリマメから得られた新規イソフラボノイドの構造

が増大することから、ルーピンの感染前抗菌物質として知られる luteone (5,7,2',4'-tetrahydroxy-6-prenylisoflavone) をモデル化合物に選んだ。代謝能を有する菌株を検索し、多犯性植物病原菌 *Botrytis cinerea* と土壤中の腐生菌 *Aspergillus flavus* を選出して、代謝実験を行い、(1) 植物由来の多種類の基質を用いて、生菌による代謝産物を確認、基質特異性を解明、(2) 化学的に部分修飾した基質を用いて、プレニル側鎖二重結合部のエポキシ化された反応中間体の生成を確認、(3) 本中間体は、不安定で自動的にオルト位水酸基と環状エーテルを作るか、1,2-diol へと加水分解された。 (4) 反応中間体と反応生成物の立体化学を解析し、代謝反応の立体特異性を解明、(5) 無細胞系での反応解析により、エポキシ化反応は空中酸素を利用し、P450 阻害剤には感受性を示さない FAD 依存型、基質誘導性モノオキシゲナーゼ (エポキシ化酵素) によって触媒されること、を明らかにした (図 2)。代謝産物の抗菌活性が大きく低下し、イソフラボンのみならず、フラボン、フラバノン、プテロカルパン骨格上のプレニル側鎖も同様に代謝されたので、植物防御物質中の二重結合エポキシ化を経る、カビの新しい解毒代謝系と位置づけた。

### III. フラボノイド研究の新展開 (有糸分裂阻害型殺菌剤の解毒物質ならびに病原性卵菌類遊走子に対する宿主特異的誘引物質の同定とその作用特性)

化学物質に対する植物の潜在能力の顕在化を目的に生物検定系を工夫、農業用ベンズイミダゾール系殺菌剤のアンチドートを探索した。本剤はチュープリンの重合を妨害し有糸分裂を阻害する。タデ科植物から、アンチドートとしてフラボン (5-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone) その他を単離同定し、構造と活性の関係や耐性菌に対する効果を解析した。単離化合物は、最低増殖阻害濃度より少し高い殺菌剤で菌の細胞分裂が抑制されている状態を、等モル程度で解除するが、殺菌剤とチュープリンの相互作用を拮抗的に妨害はしないことがわかった。

一方、ホウレンソウ根腐れ病の病原菌 *Aphanomyces cochlioides* の遊走子が、宿主の根を定位するための宿主特異的な成分として 5-hydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (CA) を同定した。CA は遊走子の誘引、被嚢化、被嚢胞子の発芽を nM-pM レベルで誘導する。フラボン骨格のアゴニスト部分、光アフィニティー修飾のためのアジド基、高感度検出のためのピオチン側鎖からなるプローブを設計・調製した。遊走子を誘引し CA

と拮抗するこのプローブを用いて、遊走子を処理、細胞膜画分の電気泳動ゲル上で、プローブと結合したタンパク質 (40 および 70 kDa) を、ペルオキシダーゼ・ストレプトアビジンとの複合体として検出することに成功した。また、プローブ処理遊走子を金粒子包摂ストレプトアビジンと反応させ、超薄切片の電顕観察で細胞膜表層に沈着した金粒子を検出した。これらの結果は、遊走子細胞膜上の CA に対する受容体タンパク質の検出を意味しており、生物間相互作用の走化性にかかわるフラボン受容体の構造、機能の特定、走化性にかかわるシグナル伝達機構解明と生活環の展開制御研究への端緒が得られた。CA と同様に G-タンパク質活性化物質 (mastoparan) は遊走子の被嚢化、被嚢胞子の発芽を誘導し、phospholipase C 阻害剤がその連鎖を遮断したので、本受容体は G-タンパク質共役型のものと想定される (図 3)。

遊走子の挙動、形態変化を指標にした生物検定により、(1) イソフラボノイドを含む天然および合成のエストロゲン活性物質は、遊走子に顕著な忌避反応を引き起こす、(2) ニコチンアミドは遊走子の遊泳を停止させ、被嚢化の初期段階を経て再度遊走子を生成する、(3) 植物の防御物質として知られる縮合タンニンやアナカルド酸は、遊走子の細胞膜破壊を誘導することを明らかにした。この種の遊走子の挙動変化や菌糸の形態変化は、宿主植物の根圏微生物でも惹起されることから、植物病原菌の微生物制御資材探索への応用展開も進めている。

以上のフラボノイド研究は、英国レディング大学植物学科、北海道大学農学部農芸化学科農薬化学講座、同大学院農学研究科生態化学研究室、モントリオールのコンコルディア大学生物学科で行われました。初期の課題は、レディング大学 故 Jeffrey B. Harborne 教授、John L. Ingham 博士、コンコルディア大学 Ragai K. Ibrahim 教授の発案ならびに懇篤なるご指導のもとに開始され、引き続き共同研究を実施、研究の展開を図ってきたものであります。その事実をここに記し、深甚なる感謝の意を表明いたします。長期にわたり、本間 守先生、下村得治教授、小幡彌太郎教授、坂村貞雄教授、水谷純也教授、市原耿民教授、葛西隆則教授、吉原照彦教授 (以上北大農) には終始、真情あふれるご指導・ご鞭撻をいただきました。また、研究室を共にした西村弘行博士、川端 潤博士、橋床泰之博士、富士幸治博士、崎浜靖子博士、機器分析室の渡部賢二氏、富士江里博士、電顕室の伊藤利章氏からは温かい激励とご支援をい

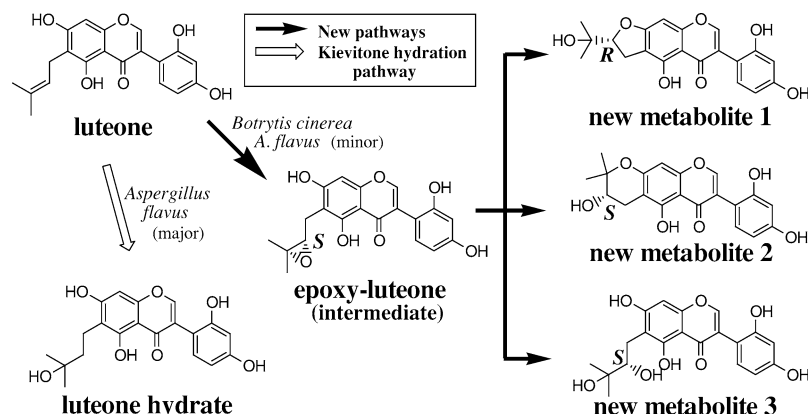


図 2 カビによるプレニル化イソフラボノイドの新しい代謝経路  
エポキシ化は、FAD 依存で P450 阻害剤に非感受性の基質誘導性モノオキシゲナーゼで触媒される。

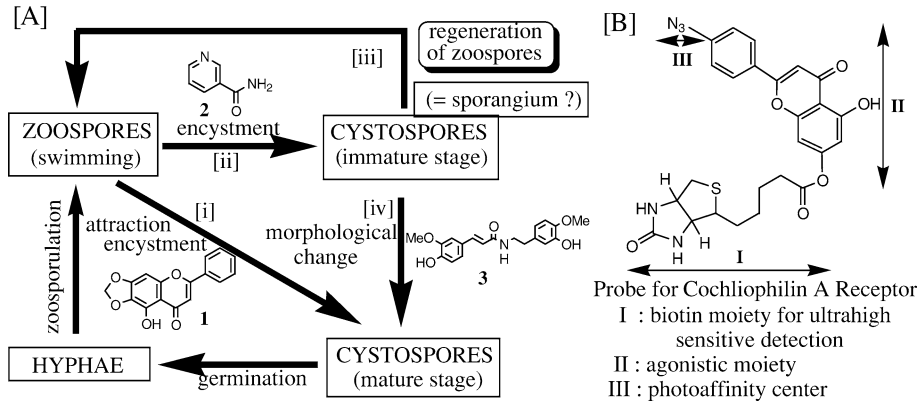


図 3 ホウレンソウ根腐れ病菌の生活環略模式図とその制御因子および遊走子誘引物質レセプター検出用プローブの構造  
 [A]: [i] 遊走子は宿主根の近辺で、宿主特異的成分 cochliophilin A (1) の存在を感知、宿主根へ誘引され→根の表面で被嚢化→菌糸発芽→侵入→増殖→遊走子放出、のサイクルを完結する。この過程は、化合物 1 の存在のみで触発される。菌糸は、耐久体の卵胞子を形成するがその過程は略されている。[ii] 遊走子は nicotinamide (2) によって遊泳を停止し、被嚢化する。[iii] この被嚢胞子の多くは成熟には向かわず、再度遊走子に戻る。[iv] 未成熟な被嚢胞子が生成した際に、宿主成分の一つである化合物 3 が存在すると被嚢胞子は成熟に向かい、菌糸発芽に至る。  
 [B]: Cochliophilin A (1) のアゴニスト活性を有するプローブの構造。このプローブは、化合物 1 の約 1/10 の遊走子誘引活性を有し、1 の誘引活性を拮抗的に抑制する。

ただきました。感謝申し上げます。上記農薬化学講座ならびに生態化学研究室における研究は、お名前を挙げるにはあまりにも多すぎる大学院、学部学生諸君ならびに特別研究員諸氏の情熱と努力にその多くを負っております。ご厚誼をいただいた内外の多くの方々と受賞の栄誉を共に分かち合えることを幸いに存じます。

プロジェクト研究チームへの参加をお誘いいただいた京都大学大学院農学研究科岩村 倣先生、ホウレンソウ根腐れ病菌に関する研究では、分離菌を分譲していただき懇切なご教示をいただいた、北海道医療大学薬学部の横澤菱三先生、生態学的な考え方の基礎をお教えいただいた京都大学生態学研究センターの大串隆之先生に改めて、お礼を申し上げます。