植物香気成分の生合成酵素の機能進化と反応制御機構に関する研究

山口大学大学院創成科学研究科　肥　塚　崇　男

はじめに

現存の生物種は進化上極めてわずかな成功例であり，植物はさまざまな外的環境に適応するため巧妙な仕組みを発達させてきた．その一つが情報化学物質や自己防衛物質として機能する「香気成分」を生産する能力である．しかし，植物がいつ頃から，どのようにして多様な香気成分を生成するようになったのかを明らかにした事例は少ない．筆者は，ほぼすべての種子植物が生産する「脂肪族香気成分」ならびに構造多様性の高い「芳香族香気成分」を研究対象として，化学構造を規定する生合成酵素の機能解析に取組み，脂肪族，芳香族香気成分の生合成酵素の機能進化と反応制御機構の全容解明を目指して研究を進めた．以下に各研究成果の概略を記す．

1.　脂肪酸に由来する香気成分の生合成研究

膜脂質から酸化的に代謝されて生成される脂肪族化合物は，動物細胞では炎症や免疫を制御し，植物では生体防御応答や生育制御を駆動する脂質メディエーターとして知られている．その中でも，炭素数6の短鎖アルデヒドや15～17の長鎖アルデヒドは，それぞれ「みどりの香り」や「磯の香り」と呼ばれ，植物界に広く分布している．短鎖アルデヒドは，脂肪酸がリポキシゲナーゼ（LOX）で酸素添加され，脂肪酸ヒドロペルオキシドとなり，このヒドロペルオキシドがシトクロム P450（CYP74）ファミリーに属する脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ（HPL）により開裂することで生合成される（図1）．このような生合成系を植物が進化の過程でいつ獲得したのか定かではなかった．筆者は，in silico によるゲノム解析ならびに酵素活性に基づく生化学的解析から，LOX がラン藻を含めた藻類にも存在することを世界で初めて証明した．一方，車軸藻類のクレブソルミディウムや苔類のゼニゴケで HPL ホモログが見つかるものの，短鎖アルデヒド生成活性はなく，その HPL ホモログは植物ホルモンのジャスモン酸前駆体生成能を示すことを明らかにした．蘚類ヒメツリガネゴケでの HPL 活性の報告と合わせると，生物進化の過程で植物は最初にジャスモン酸を生成する能力を獲得し，陸上進出した後，蘚類以降に，植食性昆虫などへの適応として，短鎖アルデヒドを作り出すために CYP74 ファミリーの酵素機能，代謝系を進化させたことが考えられた（図2）．他方，イネから単離した長鎖アルデヒド生成に関わる α-ジオキシゲナーゼ（DOX）が，ジャスモン酸を介したストレス応答で誘導されること，DOX の構造が哺乳動物のプロスタグランジン H 合成酵素（PGHS）と類似するものの，脂肪酸への酸素添加の位置特異性やペルオキシダーゼ活性に違いが見られるなど独自の触媒機構を持つことを世界で初めて明らかにした．これら一連の研究は，植物が進化の過程でどのように香気成分生合成能力を獲得したかを分子レベルで実証したものであり，植物香気成分研究に先駆的な研究動向をもたらした．

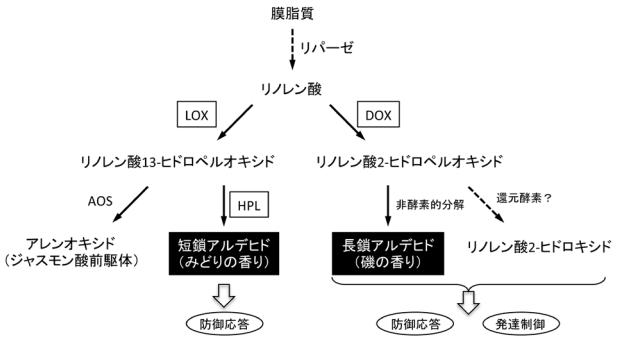

図1　脂肪酸に由来する香気成分の生合成経路

2.　芳香族香気成分の生合成研究

芳香族香気成分として知られる揮発性フェニルプロパノイド類は，ベンゼン環（C6）に直鎖状プロペン（C3）が結合した C6–C3 を基本骨格とし，C3側鎖の立体構造，ベンゼン環（C6）構造に多様性が見られる（図3）．これら揮発性フェニルプロパノイド類を含む香辛植物は，シルクロードにより東西貿易が盛んになった時代から，防腐剤や香辛料として使われてきたが，その生合成経路はいくつかの中間体の構造を除いて未解明であった．そこで，筆者は以下の二点から生合成研究を進めてきた．

第一に，香気成分が器官特異的に生合成，蓄積されるという特徴に着目し，バジルのトライコームおよびペチュニア花弁から EST データベースを構築し，揮発性フェニルプロパノイド類のアリル型，イソ型骨格の形成を制御するオイゲノール/イソオイゲノール合成酵素（EGS/IGS）を単離することに成功した．さらに，基質類縁体を用いた X 線結晶構造解析による構造生物学的アプローチから酵素活性中心を明らかにし，キノンメ

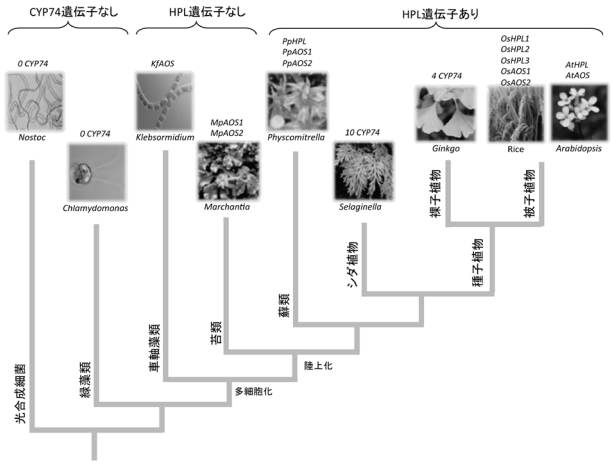

図2　CYP74 ファミリーと植物進化
CYP74 ファミリーは脂肪酸ヒドロペルオキシドを基質とする一連の HPL やアレンオキシド合成酵素（AOS）から成る．

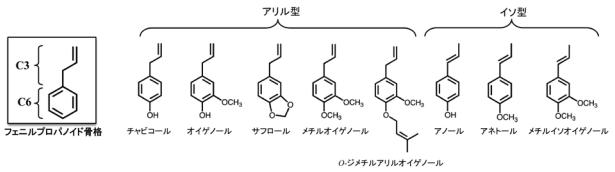

図3 揮発性フェニルプロパノイド類の化学構造多様性

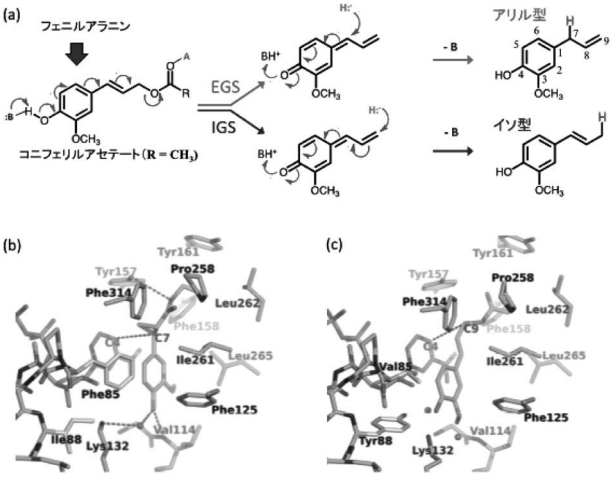

図4 揮発性フェニルプロパノイド生合成酵素EGS/IGSの推定反応機構
a: NADPH依存型還元酵素であるEGS/IGSによるキノンメチド中間体を介した反応機構．b: バジル由来EGSの結晶構造．c: 活性中心に位置する2つのアミノ酸残基（Phe85, Tyr88）に部位特異的変異を入れたバジル由来EGSの結晶構造．

チド中間体を介する反応機構を実証した（図4）．この発見を皮切りに，さまざまな植物種から本酵素遺伝子を同定し，わずか数アミノ酸残基によって活性中心における基質のポジショニングが変わり，生成物特異性が決定されることを明らかにした．さらに，イソオイゲノールが生成されない香気成分変種のペチュニア野生種では，IGSに変異が入り不活性であることを証明した．この結果は，自然界において1つの生合成遺伝子の変異が香気成分の多様性に影響を与えることを分子レベルで示した世界で初めての例であり，環境適応の結果生じた二次代謝産物のナチュラルバリエーションを理解するのに大きな影響を与えた．また，ラズベリーやビワから芳香族香気成分の側鎖構造の多様性に関わる還元酵素やメチル化酵素についても解析し，受粉媒介者の誘引に重要な香気成分が果実や花芽の成熟に伴い増加し，生合成遺伝子の発現レベルで緻密に調整されていることを明らかにした．

第二に，ベンゼン環官能基の修飾反応を触媒する酵素の解析を行った．一般的に芳香族香気成分のフェノール性水酸基がメチル化されると，揮発性が増すだけでなく鋭い刺激的な香りからフレッシュなハーブ臭へ変化することが知られている．筆者は配列情報をもとにしたトランスクリプトーム解析から，芳香族香気成分の生成に関わる*O*-メチル化酵素をクラーキアやアニスなどから単離し，それぞれの*O*-メチル化酵素が基質の側鎖構造の違いを識別することを明らかにした．このような異なる基質特異性をもつ*O*-メチル化酵素が，それぞれの植物種ごとに存在し，器官特異的に発現することで各植物種における独自の香気特性に寄与していることが考えられた．一方で，ベンゼン環の化学修飾は香気特性だけでなく，抗菌活性や防虫活性にも貢献しており，フェノール性水酸基のプレニル化が生理活性に重要であることを初めて示した．筆者はこれらプレニル化反応の研究を発展させ，複数の非揮発性芳香族化合物のプレニル化酵素の単離，解析も行った．さらに，現在までに同定した生合成酵素遺伝子を利用し，香料や医薬品原料として有用なプレニル化フラボノイドやオイゲノールを作り出す組換え植物の作出にも成功した．

おわりに

本研究から，植物の適応進化の一つである香気成分の多様性を制御する分子機構について，多くの基礎的知見が得られた．香気成分は，植物–動物–微生物相互作用を司るシグナル物質としての生態学的機能を果たしているほか，ヒトに対してリラックス効果を与えるなど医療分野や食品フレーバーとしての利用などにも関連することから，その生合成研究に基づいた物質生産系の構築にも期待が高まっている．今後は植物のもつ代謝力を最大限に活用した物質生産を目指し，香気成分の研究を進めることで，基礎から応用につながる農芸化学研究の発展に貢献していきたい．

謝　辞　本研究は山口大学大学院農学研究科，鳥取大学大学院連合農学研究科，米国University of Michigan, Eran Pichersky Laboratory，京都大学生存圏研究所，京都大学化学研究所，ならびに山口大学大学院創成科学研究科で行われたものです．本研究を行う機会を与えてくださり，学生時代から現在に至るまで，日頃より温かいご指導ご鞭撻を賜りました山口大学教授・松井健二先生に衷心より感謝いたします．また学生時代において温かいご指導，多くの有意義なご助言を賜りました梶原忠彦先生（山口大学名誉教授），赤壁善彦先生（山口大学教授）に深謝いたします．芳香族香気成分の生合成研究の機会を与えていただき，4年の留学期間中，公私にわたって惜しみないご指導を賜りましたEran Pichersky教授に厚く御礼申し上げます．また，ポスドク時代よりご指導いただいております矢崎一史先生（京都大学教授）に深く感謝いたします．本研究を発展させるにあたって常に温かいご支援をいただきました故・平竹潤先生（京都大学教授），渡辺文太先生（京都大学助教）に厚く御礼申し上げます．さらに，本研究を遂行する上でご協力いただきましたすべての共同研究者の皆様に心より感謝いたします．また本研究は，これまでに共に研究を行ってきた研究室のメンバーのご協力によって成り立っており，この場を借りて深く感謝申し上げます．最後になりましたが，本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会中四国支部長の大西浩平先生ならびにご支援賜りました日本農芸化学会中四国支部幹事の稲垣賢二先生に厚く御礼申し上げます．