

植物の防御応答に関わる天然有機化合物の生合成機構と生理作用の解明



北海道大学大学院農学研究院 北岡直樹

はじめに

植物は天然有機化合物を巧みに利用し、病原菌や植食動物に対抗している。病原菌に感染した際や植食動物の攻撃を受けた際、防御応答を司るジャスモン酸 (JA) やサリチル酸に代表されるシグナル伝達物質の生合成が植物体内で誘導される。これらシグナル伝達物質は、様々な防御応答関連遺伝子の発現を誘導する。植物が病原菌の感染を受けたときに生合成する抗菌活性を有する二次代謝産物は、ファイトアレキシンと呼ばれる。私はこれまで、防御応答に関わる天然有機化合物であるジャスモン酸類とイネのジテルペノイド型ファイトアレキシンの生合成機構と生理作用の解明、さらには、植物細胞を用いた有機化合物の高生産系構築を目指し、研究を進めてきた。以下に詳細を記載する。

1. ジャスモン酸類の活性調節機構に関する研究

ジャスモン酸類は、防御応答や形態形成を制御する植物ホルモンである。ジャスモン酸類には種々の類縁体が報告されているが、多くの JA 応答において重要な役割を果たす真の活性本体はイソロイシン結合型であるジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) であると考えられている。私が研究をスタートさせた当時、JA-Ile の生合成に関わるほとんどの酵素群は明らかとされていたが、その代謝経路については未解明の部分が多く存在していた。私は 12 位のヒドロキシ化に焦点を当て研究を進めた。JA の 12 位にヒドロキシ基を有する 12-ヒドロキシ JA (12-OH-JA, 別名ツベロン酸) は、馬鈴薯の塊茎形成誘導物質として単離構造決定され、その後、植物に普遍的に存在していることが明らかとなった化合物である。私は、JA-Ile についても 12 位がヒドロキシ化された 12-ヒドロキシ JA-Ile (12-OH-JA-Ile) が主要な代謝産物として存在すると予想し、研究を開始した。有機合成した 12-OH-JA-Ile を標準物質として植物を分析したところ、シロイヌナズナ、トマト、およびタバコにおいて 12-OH-JA-Ile が存在しており、傷害処理後に、その生合成が誘導されることを明らかとした。さらに、シロイヌナズナの根の伸長阻害試験を用いて、生物活性を評価したところ、12-OH-JA-Ile の生物活性は JA-Ile よりも弱く、JA-Ile の 12 位ヒドロキシ化は JA-Ile の活性調節機構として機能していることが示唆された。続いて、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (CYP) の一種である CYP94B3 の機能欠損株における内生量分析と組換えタンパク質の酵素活性試験より、同酵素が JA-Ile から 12-OH-JA-Ile への反応を触媒する主要な酵素であることを、明らかとした (図1経路A)。さらに、私は 12-OH-JA-Ile が配糖化され、より不活性化化合物となると予想し、研究を進めた。その結果、12-OH-JA-Ile の配糖体が傷害処理後に蓄積すること、および、その生物活性が 12-OH-JA-Ile と比較して低下

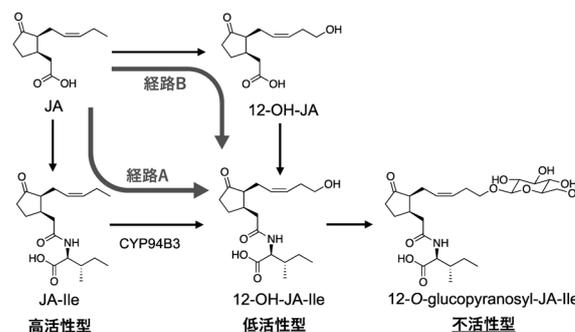


図1. ジャスモン酸の活性調節に関わる代謝経路

していることを明らかとした。前述の通り、12-OH-JA-Ile は JA-Ile よりも弱いものの JA 類としての生物活性を有しており、傷害処理後のシロイヌナズナや花芽で 12-OH-JA-Ile は JA-Ile よりも多く蓄積している。12-OH-JA の重水素標識体をシロイヌナズナに取り込ませたところ、12-OH-JA-Ile の蓄積が確認され、12-OH-JA を経由して 12-OH-JA-Ile を生合成する経路 (図1経路B) をシロイヌナズナが有していることを明らかにした。また、12-OH-JA から 12-OH-JA-Ile への反応を触媒する酵素の同定にも成功している。本研究結果より、植物が 12-OH-JA-Ile を単なる不活性化経路の中間体としてのみならず、高活性型である JA-Ile と低活性型である 12-OH-JA-Ile を巧妙に使い分けしていると予想している。

2. イネの抗菌物質に関する研究

イネは多様なジテルペノイド型ファイトアレキシンを生合成するが、その化学構造の多様性は、炭素骨格を構築するテルペン合成酵素による環化反応と、それに引き続く、CYP や短鎖型脱水素酵素/還元酵素 (SDR) などの酵素による修飾反応に起因する。私が研究を始めた当初、イネのジテルペン環化酵素は同定されていた一方で、酸化修飾機構については不明な部分が多く存在していた。私は生合成に関わる遺伝子群を大腸菌で再構築した系を、候補遺伝子のスクリーニング、生合成中間体の化学構造の決定、および酵素活性試験を行う際の基質の供給に用い、Oryzalexin 類と Momilactone A の生合成経路の解明に成功した (図2)。

まず、テルペノイド生合成における酸化修飾反応を触媒すると考えられる CYP の大腸菌を用いた異種発現系の最適化を行った。最適化した発現系を用い、CYP71Z6 が *ent-isokaurene* の 2 位と 3 位のヒドロキシ化を触媒する一方、CYP71Z7 が *ent-cassadiene* の 2 位メチレンのカルボニル基への酸化と 3 位のヒドロキシ化の計 3 段階の酸化反応を触媒することを明らかにした (図2)。

Oryzalexin 類は *ent-sandaracopimaradiene* が酸化修飾を受け

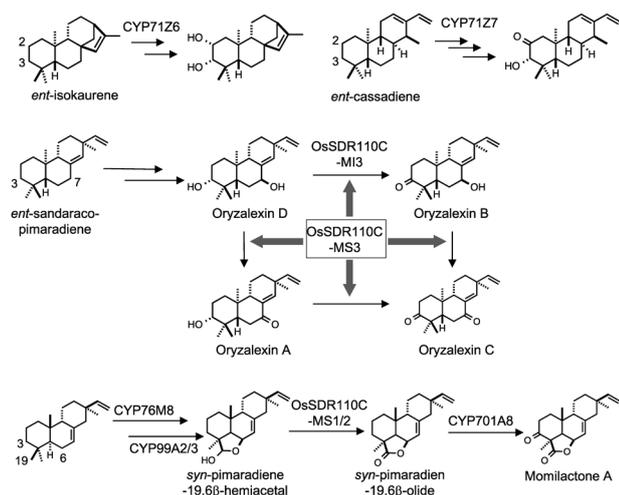


図2. 同定したCYP71Z6とCYP71Z7の酵素活性およびOryzalexin類とMomilactone Aの予想合成経路

生合成される。これまでの研究結果により、3位と7位のヒドロキシ基がそれぞれCYP701A8とCYP76M8により導入され、Oryzalexin Dが生成することが明らかとなっていた。Oryzalexin Dの3位と7位のヒドロキシ基はカルボニル基へとさらに酸化されることにより、Oryzalexin A, B, Cへと変換される。そこで、ヒドロキシ基からカルボニル基への酸化反応を触媒し、Momilactone A合成酵素が属するSDRに着目し、キチンエリシターによって遺伝子発現が誘導されるSDRを候補として酵素活性の評価を行った。その結果、Momilactone A合成酵素と同じクレードに存在するOsSDR110C-MS3がOryzalexin Dを基質としてOryzalexin A, B, Cの混生成物を与える一方で、Momilactone A合成酵素とは異なるクレードに属するOsSDR110C-MI3がOryzalexin Dの3位ヒドロキシ基の酸化反応を触媒しOryzalexin Bを与えることを明らかにした(図2)。

Momilactone Aは、*syn-pimaradiene*が酸化修飾されることにより生合成されるジテルペノイドである。私が研究を始めた当初、CYP76M8とCYP701A8が*syn-pimaradiene*のそれぞれ6位と3位のヒドロキシ化を触媒し、CYP99A2及びCYP99A3が19位のメチル基をカルボキシル基まで酸化することが明らかとなっていたが、酸化反応の順番やラクトン環がどのように形成するかは不明であった。そこで、*syn-pimaradiene*生合成遺伝子群と共に、候補となる複数のCYPを導入した大腸菌を用いて生成物の解析を行った。その結果、CYP76M8とCYP99A2/3を導入した大腸菌において、*syn-pimaradiene-19,6β-hemiacetal*が生成することを明らかとした。さらに、*syn-pimaradiene-19,6β-hemiacetal*を基質としてCYPやSDRの酵素活性試験を行った。その結果、*syn-pimaradiene-19,6β-hemiacetal*がOsSDR110C-MS1/2により酸化され*syn-pimaradiene-19,6β-olide*が生成し、さらに*syn-pimaradiene-19,6β-olide*はCYP701A8によってMomilactone Aへと酸化されることを明らかにした(図2)。

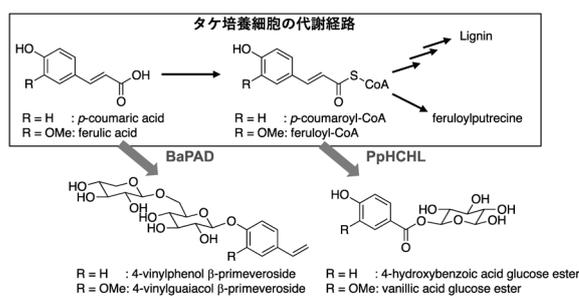


図3. 高機能物質を生産するタケ培養細胞の作出

3. 植物細胞を用いた有機化合物の高生産系の構築

フェニルプロパノイド経路由来の化合物を高蓄積するタケ培養細胞に着目し、同細胞を工業利用可能な物質の高生産系とすることを旨とし研究を行なった。初めに、feruloyl-CoAもしくは*p-coumaroyl-CoA*を基質とし、それぞれ、vanillinと4-hydroxybenzaldehydeへの変換を触媒する酵素遺伝子である*Pseudomonas putida* KT2440由来の*hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase (PpHCHL)*を導入した組換えタケ培養細胞を作製した。同組換え培養細胞において、抗菌剤としての利用される4-hydroxybenzoic acidおよびvanillic acidの配糖体の蓄積を新たに確認した(図3)。特に、4-hydroxybenzoic acid glucose esterの蓄積量は培地1Lあたり1.7gに達し、極めて高効率の生産系を達成した。同様の手法で*Bacillus amyloliquefacience*由来の*phenolic acid decarboxylase (BaPAD)*を導入した組換えタケ培養細胞を作製し、ポリマー原料として利用される4-vinylphenolと4-vinylguaiacolの配糖体の生産に成功した(図3)。おわりに

このように、天然物化学を基盤とし、植物生理学、生化学的手法を用い、植物の防御応答に関わる天然有機化合物の生合成機構と生理作用の解明を目指し研究を進めてきた。今後も、植物が生きるための知恵として生合成している天然有機化合物の生理的機能を解明し、さらに、それらを農業生産などへ展開する糸口となる研究を遂行していきたい。

謝辞 本研究は、北海道大学大学院農学研究院生物有機化学研究室、アイオワ州立大学、および、富山県立大学工学部植物機能工学講座にて行われたものです。研究の機会をいただき、多大なご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学農学研究院松浦英幸先生、鍋田憲助先生、高橋公咲先生(現 東京農業大学)、アイオワ州立大学 Reuben J. Peters先生、富山県立大学加藤康夫先生、野村泰治先生に衷心より感謝申し上げます。東北大学生命科学研究科在籍時に、ご指導を賜りました山口信次郎先生(現 京都大学)、増口潔先生(現 京都大学)、瀬戸義哉先生(現 明治大学)に感謝申し上げます。また、本研究の成果は多くの共同研究により達成されたものであり、多大なるご支援とご指導を賜りました共同研究者の皆様へ感謝申し上げます。共に研究を行ってきた生物有機化学研究室および植物機能工学講座のメンバーに感謝いたします。最後に、本賞にご推薦くださいました日本農芸化学会北海道支部長の園山慶先生(北海道大学)に厚く御礼申し上げます。