

日本農芸化学会中部支部
第 155 回例会

講演要旨集

受賞講演・シンポジウム
「植物のケミカルバイオロジー」

日時：平成 21 年 7 月 18 日（土）12:35～

場所：B-nest（ビネスト）静岡市産学交流センター
静岡市葵区御幸町 3-21 ペガサート

日本農芸化学会中部支部
〒464-8601 名古屋市千種区不老町
名古屋大学大学院生命農学研究科内

会場への交通案内

JR 静岡駅から徒歩 5 分, 静岡鉄道新静岡駅から徒歩 1 分
(<http://www.hanjyou.jp/ss/user/sangaku/SangakuAction>)



日本農芸化学会中部支部第 155 回例会 受賞講演・シンポジウム「植物のケミカルバイオロジー」

日時：平成 21 年 7 月 18 日（土） 12:35～

場所：B-nest（ビネスト）静岡市産学交流センター
静岡市葵区御幸町 3-21 ペガサート

プログラム

12:35-12:55 総会

13:00-14:30 受賞講演

13:00-13:30 平成 20 年度日本農芸化学会奨励賞

「放線菌由来ヘテロ環含有抗生物質の生合成に関する分子生物学的研究」
尾仲 宏康（富山県大・工）

13:30-14:00 平成 21 年度日本農芸化学会技術賞

「L-テアニンの工業的生産技術の確立と機能性食品としての研究開発」
ジュネジャ レカ ラジュ, 朱 政治, 大久保 勉, 小関 誠（太陽化学（株））

14:00-14:30 平成 21 年度日本農芸化学会奨励賞

「高等植物における二成分制御系関連分子の体系的解析」
山篠 貴史（名大院・生命農学）

14:45-17:40 シンポジウム「植物のケミカルバイオロジー」

14:45-15:25 「オーキシシン分子プローブの開発（オーキシシンケミストリーの温故知新）」
林 謙一郎（岡山理大・理）

15:25-16:05 「ジベレリン受容体阻害剤の探索」
中嶋 正敏（東大院・農生科）

16:20-17:00 「ストリゴラクトン：植物における共生と寄生そして形態形成を司るテルペノイド」
秋山 康紀（大阪府大院・生環科）

17:00-17:40 「針葉樹の防御機構におけるジテルペン樹脂酸生合成酵素の役割の解明」
大西 利幸（静大創造院・統合バイオサイエンス）

17:50-19:30 懇親会（参加費：無料）

問合せ先

轟 泰司（静岡大学農学部応用生物化学科）

〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836

Tel&Fax: 054-238-4871 E-mail: aytodor@agr.shizuoka.ac.jp

中部支部庶務幹事

浅川 晋（名古屋大学大学院生命農学研究科）

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

Tel: 052-789-5509 E-mail: asakawa@agr.nagoya-u.ac.jp

受賞講演

(受賞講演)

放線菌由来ヘテロ環含有抗生物質の生合成に関する分子生物学的研究

尾仲 宏康 (富山県大・工)

放線菌は主に土壤中に生息し、分解者としての役割を担っているグラム陽性細菌である。また、放線菌は多様な抗生物質を生産する菌群としても知られており、ストレプトマイシンやカナマイシンなど初期の代表的な抗生物質に始まり、近年では MRSA に効くバンコマイシンや免疫抑制剤 FK506 など、さまざまな化合物が放線菌の培養抽出液中から発見されている。放線菌の生産するこれら多様な抗生物質の生合成機構を遺伝子レベルで明らかにし、遺伝子組換えにより新たな抗生物質を創製する「コンビナトリアル生合成」研究は、ゲノム情報解読の急速な進展に伴い、昨今ますます活発に展開されている。

我々は放線菌由来ヘテロ環含有抗生物質のうち、類縁化合物を含めて生合成経路が未だ明らかになっていない化合物、インドロカルバゾール系化合物・スタウロスポリン及びレベッカマイシン、ビスインドール系化合物・ビオラセイン及び直鎖チオペプチド系化合物・ゴードスポリンを研究対象とし、遺伝子工学的、構造生物学的手法を用いてその生合成経路を同定した(図1)。インドロカルバゾール化合物およびビオラセインにはピロール環およびインドール環、ゴードスポリンにはチアゾール環、オキサゾール環構造が存在するが、これらヘテロ環の形成に参与する酵素はいずれも既知のヘテロ環合成酵素群とは異なるユニークなものであった。

本講演ではこのうち、インドロカルバゾール生合成の鍵反応を担っている P450 StaP 及びビオラセイン生合成における分子内インドール転移酵素 VioE の二つの新規酵素の反応機構について紹介する。

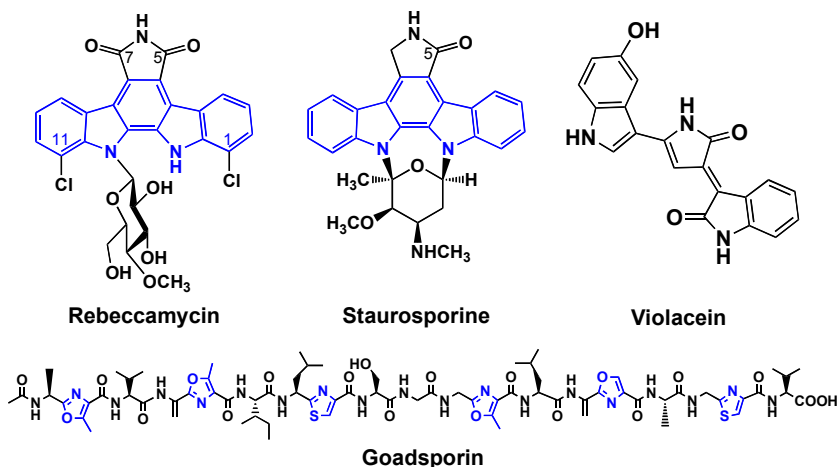


図1 本研究で生合成経路を明らかにした化合物

(1) P450 StaP、インドロカルバゾール環合成酵素の C-C 結合反応機構

インドロカルバゾール骨格の生合成は、放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0274 の生産するスタウロスポリン及び *Lechevarieria aerocolonigenes* ATCC39243 が生産するレベッカマイシンをモデルに解析が進められている。インドロカルバゾール骨格は図2に示したようにトリプトファン2分子から生合成される。まず、Sta0 によるトリプトファンのアミノ基の脱水素化によりインドールピルビン酸イミン体 (IPA イミン) となり、次に巨大ヘム酵素・StaD によりカップリング反応

が進みクロモピロリン酸(CPA)となる。続いて CPA 内の 2 分子のインドール環間が C-C 結合し、更にピロール環に付加しているカルボン酸が脱炭酸、酸化することによって、インドロカルバゾール骨格ができあがる。この際、CPA に C-C 結合、脱炭酸を施す酵素がスタウロスポリン生合成においては P450 StaP である (レベッカマイシン生合成においては RebP)。StaP はアミノ酸配列上から P450 と推定されていたが、本反応は一般的な P450 反応である水酸化反応では説明できない。そこで P450 StaP の反応機構を明らかにするために X 線結晶構造解析を行い、立体構造より、パーオキシダーゼ様の電子引き抜き反応により、CPA がインドールカチオンラジカルとなり、ラジカルカップリングにより C-C 結合が結ばれること、さらには C-C 結合に伴う構造変化により、脱炭酸反応が促されることが明らかとなった。

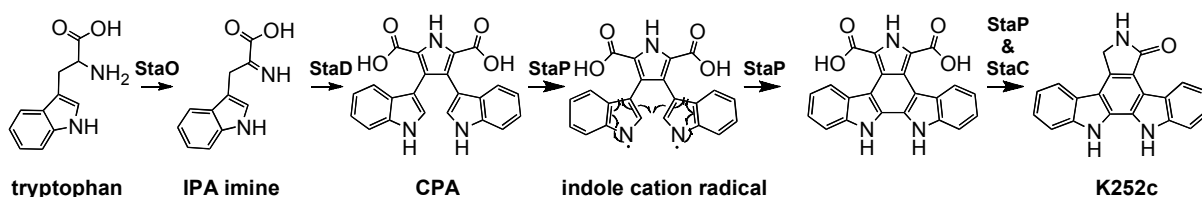


図2 インドロカルバゾール生合成経路

(2) VioE、ビオラセイン生合成における分子内インドール 1,2 転移酵素

Violacein はインドロカルバゾールと同様にトリプトファンを出発物質に生合成され、途中の CPA の手前までの 2 段階の反応はインドロカルバゾールのホモログ酵素 VioA, VioB によって行われており共通性が高い。しかし VioE によりインドール環の分子内転移反応が行われるために、CPA が合成されず、かわりにビスインドール骨格の PVA となる (図3)。インドールのような大きな分子を分子内で転移反応する酵素の例はこれまでなく、しかも VioE は 25 kDa と分子量も小さい酵素である。そこでビオラセインとインドロカルバゾール生合成経路の分岐点を担う VioE の立体構造を解明し、その反応機構を推定した。VioE は野球グローブのような構造を取り、そのまさに球をつかむ部分で基質をとらえていることが明らかとなった。また、VioE は押し型のような役目をすることによって、自然に放っておくと CPA になってしまう反応性の高い基質を別の形に変換させる酵素であることが明らかとなった。

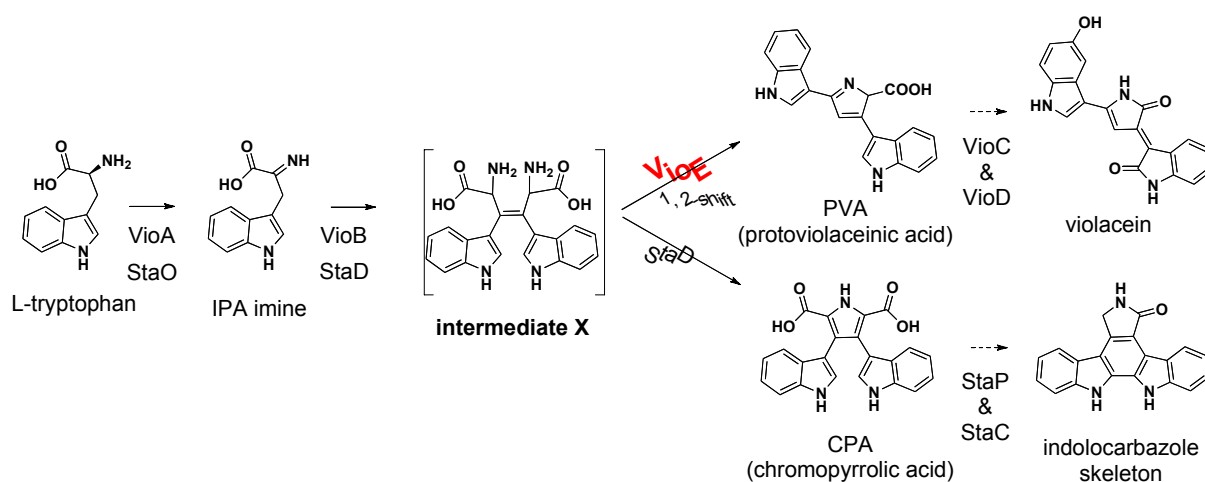


図3 ビオラセイン生合成とインドロカルバゾール生合成経路の類似性

(受賞講演)

L-テアニンの工業的生産技術の確立と機能性食品としての研究開発

小関 誠、大久保 勉、朱 政治、ジュネジャ レカ ラジュ (ニュートリション事業部)

茶樹には特異なアミノ酸として L-テアニン (以後、テアニンと記す) が存在している。テアニンは約 60 年前に発見されたアミノ酸であるが、テアニンの生理効果については 1971 年に木村らがカフェインに対する拮抗作用について初めて報告しているものの、その後 90 年代前半までテアニンに関する研究はほとんどない。我々はテアニンの潜在的な効果と需要についていち早く着目し、生産技術の確立や生理効果の検証に取り組んだ。以下に、(A) 工業スケールでのテアニン生産技術の確立、(B) テアニンの健康機能の科学的解明と安全性、(C) グローバル展開と商品について概説する。

(A) 工業スケールでのテアニン生産技術の確立と研究への寄与 テアニンの製法に関して、茶葉からの分離精製法、化学的合成法、茶細胞による組織培養法などが検討されてきた。しかし、いずれも低収量あるいは煩雑な工程という問題があり、結果的に製造コストは高くならざるを得なかった。我々はこの問題の解決に挑み、*Pseudomonas nitroreducens* 由来グルタミンナーゼを利用、培養系に二価の金属イオンを用いることにより安価に高効率な生産法を確立、1994 年に上市した。工業スケールでは、グルタミンとエチルアミンを基質としてグルタミンナーゼのアミノ基転移反応によりテアニンを生成させ、さらに精製工程を経ることにより高純度の L-テアニンを得ることに成功した。テアニンについては、1940 年代からテアニンに関する植物学のおよび化学的な研究はあるが、生理作用に関しては、木村らが 1970 年代にカフェインとの拮抗作用について発表しているのみで他にほとんどなかった。しかし、候補者らが 1990 年代にテアニンの酵素法による工業的生産を確立してから、緑茶のユニークなアミノ酸として試験管レベルの試験からヒト介入試験まで幅広い研究が飛躍的に増加しこれまで 100 編を超える報告がなされている。

(B) テアニンの健康機能の科学的解明と安全性 テアニンの生理的機能については、動物試験により、脳関門を通過し脳内神経伝達物質の動態に影響を及ぼし、カフェインの興奮作用に対し拮抗的に働き、そして血圧降下作用、記憶学習能力向上作用、体重増加抑制作用やテアニンの生体内の代謝等を明らかにしてきた。現代人を取り巻く社会環境は、身体のみならず、心の健康にも大きな影響を与えている。日常のさまざまな場面で感じるストレスは精神面の乱れの原因となり、うつ症状や睡眠の質などにも強い影響を及ぼしている。ストレスやリラクスの重要な指標となるのは脳の活動であり、脳波を測定記録することでそれらを評価できる。そこで、ヒトにテアニンを服用させ、その後の脳波を測定した結果、顕著に α 波 (リラクスの指標) の発生が認められ、テアニンにはリラクス状態をもたらす効果があることが強く示唆された。また、急性ストレスとして暗算の負荷を与え、テアニンの影響について主観的内省評価や唾液の分泌型免疫グロブリン A (sIgA) 含量及び自律神経活動の指標である心拍数を測定した。その結果、テ

アニンにはストレス緩和効果があることが示唆された。精神的ストレスが睡眠に影響を及ぼすことは良く知られている。テアニンを就寝 1 時間前に服用し、入眠時と起床時の睡眠状態に関して主観的評価とアクチグラフによる睡眠と覚醒の判別状態を測定した。その結果、テアニンは睡眠機能を改善することを示唆しており、ストレス軽減効果を有すると推察された。なお、テアニンには睡眠改善効果があるものの強い催眠効果は認められないため、車の運転や集中力を必要とするような作業においても有効性が示唆されている。テアニンは上記以外にも月経前症候群(PMS)や更年期障害など女性特有の症状に対して改善効果が実証されている。さらに、社会的に問題化している子供の注意欠陥多動性障害(ADHD)に対してはカナダで臨床試験が実施され、ADHD有症者の睡眠を改善する効果が認められた。茶は世界中で飲用されておりその歴史も長い。その成分であるテアニンの安全性については経験的に認識されているが、候補者はテアニンの安全性に関する詳細な試験(細菌による復帰突然変異試験、ラットによる単回投与急性毒性試験、反復投与による亜急性毒性試験)を実施し安全性を確認した。さらにヒトが過剰摂取しても安全であることを科学的に立証した。

(C) グローバル展開とテアニン利用商品テアニンに関する研究は現代の社会的背景や市場ニーズに沿って立案・実施され、その成果は国際学術誌での原著論文と総説 30 編、国際特許を含む特許出願 140 件余に結実した。ストレス軽減に着目したテアニンの機能性研究と開発は、新しいコンセプトの素材を生み出したことで海外でも注目され、数々の国際的な賞を受賞した(「Food Ingredient Europe:FIE」でグランプリ、「健康食品素材展(Nutracon)」でベスト・ニュー・プロダクト賞など)。米国では FDA が認定する GRAS (Generally recognized as safe) 審査において承認が得られ、韓国や台湾においても食品添加物として認可され、一般食品への広範な利用が可能となった。テアニンの最初の採用商品はリラックスをコンセプトとしたガムであり、現在、清涼飲料、製菓、サプリメントなど数多く採用されている。海外ではサプリメントとして 140 社以上の採用実績があり、食品医薬品関連大手企業において茶飲料への検討を始めており新製品への採用・開発がグローバルに進んでいる。

我々は、常にストレスに曝されている現代人の心の健康状況に視点をおき、テアニンにストレスを緩和する機能性を見出し、工業スケールでの生産技術を確立し、世界ナンバーワンかつオンリーワン企業として「サンテアニン®」を商品化することに成功した。

(受賞講演)

高等植物における二成分制御系関連分子の体系的解析

山篠 貴史 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

はじめに

バクテリア細胞の恒常性を支える二成分制御系と総称される環境応答システムは、浸透圧、pH、無機イオン、栄養、酸素状態などの様々な条件に対して特異的な制御系が存在し、多様な環境応答をカバーしていることが知られている。本システムは、環境に応答して活性化されるセンサーヒスチジンキナーゼと遺伝子発現を制御するレスポンスレギュレーターとの二因子間のリン酸リレーを基盤としたシグナル検知・情報伝達・応答的遺伝子発現という広範な細胞機能を包含しているが、リン酸リレーに与るタンパク質のアミノ酸残基がヒスチジンとアスパラギン酸であることから「His-Asp リン酸リレー系」とも称されている。近年、多様な生物のゲノム情報が蓄積してきたことにより、His-Asp リン酸リレー系関連制御分子はバクテリアだけではなく、古細菌、酵母・カビなどの真菌、植物一般に広く認められ、動物を除く真核生物にも普遍的に保存されていることが判明した。そこで、本研究は多細胞生物における環境に適応した器官発生・組織分化を伴う個体統御に関する知見を得るために、モデル高等植物シロイヌナズナを対象に、二成分情報伝達系関連分子による環境応答機構を体系化することを試みた。

1. 高等植物の His-Asp リン酸リレー系の解析

モデル高等植物シロイヌナズナのゲノム情報を精査することにより、シロイヌナズナには11種類のヒスチジンキナーゼ(HK)ホモログ、5種類のリン酸転移メディエーター(HPt)、23種類のレスポンスレギュレーター(RR)が存在することが明らかとなり、それぞれ AHK、AHP、ARR と名付けられ分類された。まず、ヒスチジンキナーゼホモログを解析するにあたり、大腸菌の多段階型 His-Asp リン酸リレー系である RcsC(HK)→YojN(HPt)→RcsB(RR)系に注目し、この情報伝達系の活性化を *cps promoter-lacZ* レポーター遺伝子の発現でモニターすることのできる大腸菌株を確立した。このリン酸リレーアッセイシステムを用いて、RcsC HK 機能をシロイヌナズナの HK ホモログで相補させる実験を行うことにより、シロイヌナズナの HK ホモログの解析を行った。その結果、シロイヌナズナのヒスチジンキナーゼ AHK2/AHK3/AHK4(CRE1)がここ 40 年来探し求められていた植物の成長と分化を制御するサイトカニンホルモンの受容体であることが示唆された。さらに、ラジオアイソトープラベルされたサイトカニンをを用いて AHK4/CRE1 がサイトカニンと直接結合することが示された。また、T-DNA 挿入変異による Type-B ARR の多重欠損変異体を作製し、サイトカニン情報伝達における Type-B ARR の機能に関する遺伝学的な解析を行った。その結果、*arr1-4 arr10-5 arr12-1* 三重欠損変異体はカルスからのシュート分化においてサイトカニン非感受性を示し、主根形成不全、根の維管束分化の異常、茎頂・根端分裂組織領域の減少が観察された。これらの表現型はサイトカニン受容体(AHK)三重欠損変異体(*ahk2/3/4*)に極めて類似していた。以上の結果より、AHK2/3/4(HK)→AHP(HPt)→ARR1/10/12(RR)へのリン酸リレーを基本骨格とするヒスチジンとアスパラギン酸残基間の逐次的リン酸基転移のシステム

がサイトカイニンに応答した遺伝子発現調節における初発の分子機構であることが明らかになった。

2. 植物固有に存在する疑似レスポンスレギュレーター(PRR)ファミリーの解析

シロイヌナズナの His-Asp リン酸リレー系を体系化する過程で、バクテリアには見いだされない制御分子ファミリーが、植物には存在することが明らかとなった。これらのタンパク質の一次構造上の特徴として N 末端側にレシーバードメイン様の配列を C 末端側に特徴的な配列(CCT モチーフ)をもっていることから、疑似レスポンスレギュレーター(PRR)と名付けられた。シロイヌナズナには PRR ファミリーをコードする遺伝子が5つ(*PRR1*, *PRR3*, *PRR5*, *PRR7*, *PRR9*)存在した。*PRR* 遺伝子群の発現を解析したところ、各遺伝子がそれぞれ *PRR9*, *PRR7*, *PRR5*, *PRR3*, *PRR1* の順序で夜明けから夕方にかけて概日リズムを刻んで発現していることが観察された。*PRR* 遺伝子の一つ *PRR1* は長年にわたりシロイヌナズナの時計候補遺伝子として注目されていた *TOC1* と同一であることが判明した。そこで、本研究では *prp9 prp7 prp5 toc1/prp1* 四重変異体を含む多様な組み合わせの *prp* 多重変異体を作製して解析した。その結果、*prp9 prp7 prp5 toc1/prp1* 四重変異体においては、明暗条件下においても概日リズムが消失していることが示された(図4)。このことから、高等植物に見出された疑似レスポンスレギュレーター分子群が、植物の高次機能を統御することで古くから知られている概日リズム機構を支える中心振動体(時計)として機能していることが明らかとなった。

おわりに

植物の特徴は胚発生以後に、環境(栄養環境、物理的環境、生体防御環境等)に応答しながら新たな器官を発生・分化させることにより、個体としての体制構築がなされることである。この環境適応分化型の個体統御機構が、地に根ざし動かずに生きていく植物独自の生存戦略を可能にしていると考えられている。その点で、植物ホルモンは胚発生と後胚発生における分化・生長あるいは環境応答を調節する情報分子として、重要な役割を果たしていることが知られている。一方、外環境と密接な関係もって生長分化を統御していく上で、特に、日周期(1日における光[温度]環境の明暗[寒暖]サイクル)と光周期(1年における日長変化のサイクル)の情報を処理する概日時計システムは、植物成長と密接に関連した生体機能の一つであるといえる。本研究により、バクテリアの環境応答系から進化した二成分制御系関連分子によって、植物の生長と分化を規定するサイトカイニンホルモンの情報伝達機構や日周期と光周期の情報を処理する概日時計システムが構築されており、これらを基盤として植物の環境に適応した可塑的な個体統御が支えられていることが明らかとなってきた。

本研究は名古屋大学大学院生命農学研究科において行われたものです。研究を行う機会を与えていただき、同研究室においてご指導、ご助言を賜りました水野 猛先生に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究は同研究室で植物科学研究を立ち上げ、日々推進してこられた多くの皆様の多大なる努力の賜であり、ご協力いただきましたすべての共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦下さりました日本農芸化学会中部支部長、前島正義先生の細心のお心遣いならびに学会の諸先生のご支援に厚く御礼申し上げます。

シンポジウム
「植物のケミカルバイオロジー」

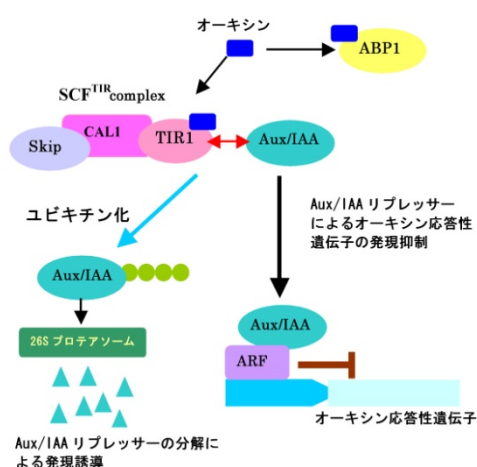
(S-1)

オーキシン分子プローブの開発（オーキシンケミストリーの温故知新）

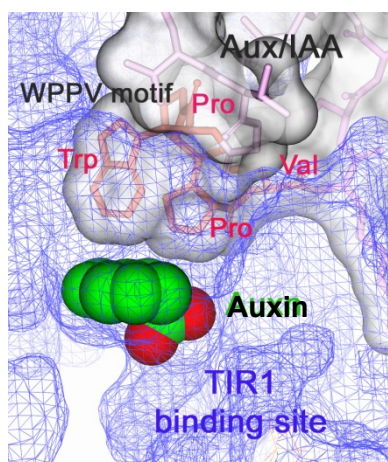
林 謙一郎（岡山理大・理）

植物ホルモンであるオーキシンは、植物の分化、成長のあらゆる面に関与するホルモンである。オーキシンの分子レベルでの作用、特にその信号伝達機構は、シロイヌナズナを用いた分子生物学的手法と変異体解析より、飛躍的に解明されてきた。

F-Box タンパクであるオーキシン受容体 TIR1 は、SCF^{TIR1} ユビキチンリガーゼ複合体を形成しており、オーキシンは、TIR1 受容体に結合することで、転写抑制因子 (Aux/IAA) と TIR1 の相互作用を促進する。その結果、ユビキチン化された Aux/IAA は、プロテアソームにより分解されるため、最終的に転写抑制が解除され、オーキシン応答性遺伝子の発現が誘導される。また、TIR1-オーキシン-Aux/IAA 複合体の結晶構造解析が報告され、TIR1 はマッシュルーム型の立体構造をとり、オーキシンは TIR1 表面の窪みに結合し、さらに、そのオーキシン結合部位を埋めるように Aux/IAA タンパク



が結合する構造が解明された。すなわち、オーキシンは、TIR1 と Aux/IAA タンパクの両者と疎水結合を行うことで、両タンパク間の相互作用を促進する“分子接着剤”として機能すると提唱された。このような分子レベルでのオーキシンの作用機構の知見は、1990年初頭から、シロイヌナズナを用いて、オーキシン応答性遺伝子の同定やオーキシン感受性変異株の原因遺伝子のクローニングから、それに続く逆遺伝学的アプローチや分子生化学的解析などにより、解明されてきた。このように、オーキシンの基本的な情報伝達系は明らかとなったが、その詳細な成長制御機構や

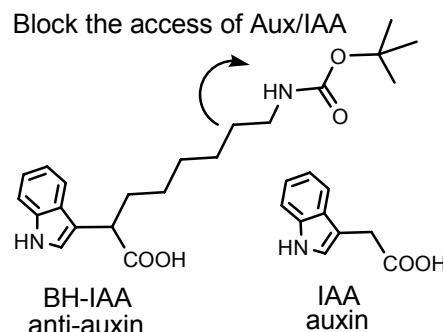
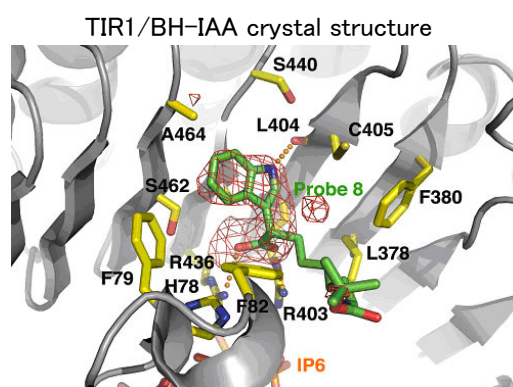


他の植物ホルモンとの協調作用については、不明な点が多い。さらには、それらの分子レベルでの生理作用の解析についてもモデル植物であるシロイヌナズナに限られているのが現状である。また、シロイヌナズナにおいても、オーキシンの受容体には、TIR1 と、そのホモログである AFB1-5 の計 6 種が知られているが、これらの受容体ホモログは互いに機能を相補し、また、その多重遺伝子破壊株では、胚性致死や胚発生異常が観察され、分化の各段階でのこれら受容体の詳細な役割については、解析が困難であるのが現状である。

インドール 3-酢酸 (IAA) やインドール 3-酪酸が内因性のオーキシンとして、認知されているが、比較的簡単な化学構造の化合物がオーキシン活性を示すことから、フェノキシ酢酸系、ピリジン系、ナフタレン系などの合成オーキシン (naphthalene 1-acetic acid や 2,4-dichlorophenoxy acetic acid) が 1950 年代から 1980 年までに盛んに開発された。また、これらのオーキシン誘導体の構造活性相関が検討され、オーキシン活性やアンチオーキシン活性を示す誘導体が報告されている。しかしながら、活性の評価には、古典的なオーキシン活性の評価方法であるアベナの屈性試験や伸長試験で評価されており、特に、アンチオーキシンについては、オーキシン特異的な阻害活性 (アンチオーキシン活性) が必ずしも十分に確認されていなかった。すなわち、オーキシンの研究については、分子レベルではケミストリーが先行し、バイオロジーが追いついてきた感がある。

我々は、最新のオーキシンバイオロジーの知見に基づき、オーキシンのケミストリーを再検討することで、オーキシンの信号伝達や、オーキシン輸送を制御できる分子プローブを探索することができると考えた。そのような分子プローブは、オーキシンの生理作用を解析する上で、非常に有用なツールとなりうる。我々は、各種オーキシン誘導体を合成し、オーキシンレポーターアッセイやオーキシン変異株などを用いて、その生理活性を評価してきたところ、IAA の α 位にアルキル基を導入すると、オーキシン活性が消失し、強いアンチオーキシン活性が観察されることを見出した。その後の詳細な生理活性の検討と、最終的には TIR1 とプローブ (BH-IAA) の複合体の結晶構造解析により、その作用機構を明らかとした。すなわち、IAA と同様に、アンチオーキシン BH-IAA の IAA 部分は TIR1 と結合するが、そのアルキル基が、Aux/IAA の TIR1-オーキシン複合体への結合を阻害することが判明した。これは、分子レベルで作用機構が明らかとなった、はじめてのアンチオーキシンである。

植物のオーキシン反応には、その信号伝達系の制御とともに、重力屈性、光屈性、胚形成などの重要な分化・成長を制御するプロセスとして、オーキシン輸送タンパクによるオーキシンの極性輸送が関与している。このオーキシンの極性輸送の解析には、オーキシン極性輸送阻害剤が大きな役割を果たしてきた。しかしながら、現在、作用機構の明らかとされているオーキシン極性輸送阻害剤は報告されていない。そこで、作用機構が明らかで特異性の高いオーキシン輸送阻害剤もまた、オーキシン生物学の非常に有用なツールとなりうる。今回、新しいオーキシン輸送阻害剤とその作用機構についても紹介する。



(S-2)

ジベレリン受容体阻害剤の探索

中嶋 正敏（東京大学大学院農学生命科学研究科）

はじめに

ジベレリンは発芽過程や茎部の伸長制御を司る植物ホルモンとして広く知られている。それゆえに、ジベレリンからのシグナル伝達が滞ると植物は草丈が低くなり、発芽が遅れると予想される。実際、イネではそのような見通しに従って、非常にシビアな矮性形質を呈するものとして受容体遺伝子に関する最初の変異株が単離されている。他の植物でも、受容体の変異により同様の形質の出現を期待するところであるが、受容体分子が1種のみ存在するイネと異なり、複数種存在する植物では互いの機能的な重複が妨げとなって形質が明瞭に現れないケースが多い。シロイヌナズナも然りで、3種の受容体のうちいずれかの機能に異常が生じても、外見上は正常種と全く区別がつかない。つまり、受容体が複数存在する植物では、受容体からのシグナル伝達過程を遺伝学的・分子生物学的に一斉に制御することが必ずしも容易ではないと解釈できる。本発表では、基礎研究レベルにおける利用のみならず新たな作用点に効く生長調節剤としての応用も視野に入れ、ジベレリン受容体の機能を阻害する薬剤創製に向けた候補化合物のスクリーニングの現状を紹介する。

受容体からのシグナル伝達阻害剤探索系の着想

現在までに蓄積された知見をもとに、植物におけるジベレリンのシグナル伝達過程は以下のように述べる事が可能である。i) 過程の途上には DELLA と呼ばれる因子が含まれ、常にはシグナルが下流に伝わらないようにブレーキ役として機能している。ii) ひとたびジベレリンが存在すると、受容体はジベレリンを捕捉して2分子複合体を形成する。iii) 受容体-ジベレリン複合体は、形成時点において新たに DELLA 因子に対する親和性を生じ、受容体-ジベレリン-DELLA 因子の3分子からなる複合体を形成する。iv) その高次複合体の形成過程において、DELLA 因子はブレーキ役としての機能を失うため、ジベレリンが引き金となる生理作用の発現に向けて下流へのシグナル伝達が進む。

上述のとおり、この制御のかなめはジベレリン依存的に DELLA 因子への親和性が生じる「受容体の性状変化」にある。この変化を追跡するための系として、生育の有無により受容体と DELLA 因子間の相互作用状況をモニターすることが可能な酵母 two-hybrid 系を利用することが可能な状況にあった。そこで、受容体の性状変化の有無を判定するまでに要する時間をより短縮して、

ハイスループット化を図ることができれば、受容体阻害剤探索系への転用が現実的なものになると期待した。

阻害剤探索の実施状況

シロイヌナズナにおいては、3種の受容体に加えて DELLA 因子が5種も存在する。そして、上述した酵母 two-hybrid 系ではその15通りの全組み合わせに、ジベレリン依存的な高次複合体の形成をモニターすることができた。この事は、いずれの組み合わせも阻害剤探索の目的に適用可能であることを意味している。そこで、さらに各組み合わせの性状を吟味してより扱い易い酵母の選抜を目指した。最大の観点は、受容体の持つ「ジベレリンに対する親和性」にあった。すなわち、3種の受容体のうち1種のみ、他に比べて親和性の高さが有意に認められたことから、阻害剤探索時にこの受容体を含む組み合わせの選択によって、より効力の低い(より高濃度の投与を必要とする)化合物までが探索上の視界に入る利点を期待した。また、受容体間でジベレリンの構造要求性を比較したところ互いに類似する傾向が示され、ジベレリン識別様式における類似性を根拠として1種の阻害剤による3分子一斉制御の可能性が十分期待されることも確認した。詳しくは触れないが、DELLA 因子についても諸般の事情を加味して最終的に阻害剤探索用の1つの組み合わせを採用した。

続いて、系のハイスループット化に着手した。生育状況を指標として2分子間の相互作用成立を判定する場合、通常であればセットアップから4-5日を要する。この判定までの期間短縮を狙って、液体培養を基本とするレポーターアッセイ系を整備した。加えて、i)2分子間相互作用の成立が酵母の生育にとって必須となる条件下で被検化合物の添加が生育に影響を与えるもの、かつ、ii)2分子間相互作用の成立が酵母の生育にとって必ずしも必要の無い条件下で被検化合物の添加が生育に影響を与えないもの、を陽性候補選抜の必要条件に据えた。構築した探索系に市販の化合物ライブラリーを供し、再現良く上記2つの必要条件をクリアしたものを当面の陽性候補とした。現在これらを対象として、*in vitro*評価系や植物体への投与試験を重ねている。

(S-3)

ストリゴラクトン：植物における共生と寄生そして形態形成を司るテルペノイド

秋山 康紀（阪府大院・生命環境）

アーバスキュラー菌根共生

“菌根”とは菌類と植物根との共生体であり、菌根を形成する菌類を菌根菌と呼ぶ。アーバスキュラー菌根菌（arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌）は 80%以上もの陸上植物と共生する菌根菌であり、根の皮層細胞内に樹枝状体（arbuscule）と呼ばれる栄養交換器官を形成することからその名が付けられている。この樹枝状体を介して AM 菌は根外に伸ばした菌糸で土壌から吸収したリン酸などのミネラルを宿主植物に与え、自らは宿主から光合成産物である糖を受け取るという相利共生関係を築く。分子系統解析や化石記録から AM 菌の起源は約 4 億 6 千万年前と考えられている。これは陸上植物の起源と同時期であることから、無機栄養素が乏しい陸上で植物が生存していくのに AM 菌が重要な役割を果たしてきたと考えられている。

AM 菌は菌単独ではほとんど生育せず、次世代の胞子も形成しない絶対共生菌である。このため、実験生物としては取り扱いが極めて難しく、AM 菌と植物とがどのようにして互いの存在を認識し、共生確立に至るのか、その分子機構はあまり分かっていない。とりわけ、AM 菌と植物との間で取り交わされる共生シグナルはながらく不明のままであった。我々は天然物化学的手法を用いて AM 共生における共生シグナルの解明を目標に研究を行ってきた。その結果、植物から AM 菌に向かって発せられるシグナル物質の解明に世界に先駆けて成功した。

AM 菌の宿主認識シグナル＝ストリゴラクトン

AM 菌の菌糸は宿主の根の近傍に達すると激しく分岐する。この菌糸分岐は非宿主であるアブラナ科やアカザ科などの植物では見られないことから、AM 菌の宿主認識反応と見なされている。菌糸分岐は根から分泌される脂溶性の低分子化合物により引き起こされることが分かっていた。本物質は branching factor (BF) と呼ばれ、その単離が試みられてきたが、根から極微量しか分泌されず、化学的にも不安定であるため、ながらく単離されなかった。2005 年、我々はマメ科モデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の根分泌物から世界で初めて BF の単離に成功し、これを 5-deoxystrigol と同定した。本物質はストリゴラクトン (strigolactone, SL) と総称される根寄生雑草の種子発芽刺激物質として単離されていた化合物であった。ストライガやオロバンキなどの根寄生雑草は他の植物の根に寄生して養水分を奪う難防除性の強害雑草であり、世界中で農作物に甚大な被害を与えている。寄生を受けてしまうのにもかかわらず、なぜ植物が SL を根から分泌するのか、ながらく謎であった。本成果により、SL は本来、AM 菌に対する共生シグナルとして根から発せられ、根寄生雑草はこれを傍受することにより寄主となる植物の所在を突き止めているということが分かってきた。

ストリゴラクトン=シュート分岐抑制ホルモン

SL は LC-MS/MS においてメチルブテノライド環の脱離に由来する特徴的なフラグメントパターンを示す。これと根寄生雑草種子発芽・AM 菌菌糸分岐アッセイを組み合わせることにより、植物界における SL の分布について精査したところ、SL は調べる限りすべての AM 菌の宿主植物が生産・分泌していることが分かった。しかし、意外なことに AM 菌の非宿主であるアブラナ科のシロイヌナズナやマメ科のルピナス、外生菌根性のアカマツなども微量ながら SL を生産していた。AM 菌と共生しないにもかかわらず、なぜこれらの植物は SL を生産するのか。AM 菌の宿主から非宿主へと進化していった後の単なる“痕跡”なのか、それとも“欠くことのできないもの”なのか。

1990 年代半ば以降にペチュニアやエンドウ、シロイヌナズナ、イネにおいて地上部シュートが過剰に枝分かれする変異体が発見されていた。これらの変異体の一部は、カロテノイド酸化開裂酵素 (carotenoid cleavage dioxygenase, CCD) をコードする遺伝子の変異に原因があることから、カロテノイドに由来するシュート分岐抑制ホルモンの存在が予想されていた。カロテノイド生合成阻害剤やカロテノイド生合成変異体を用いた研究から SL がカロテノイドの酸化開裂により生合成されることが分かっていた。そこで、CCD7 や CCD8 が欠損したイネの枝分かれ過剰変異体について LC-MS/MS に分析したところ、SL をほとんど生産していないことが分かった。さらに、これらの変異体に SL を投与すると、枝分かれが正常に戻ることを見出した。このようにして、1966 年に寄生シグナル、2005 年には共生シグナルとして同定された SL は 2008 年には植物のシュートの分岐を制御する内生ホルモンとして同定されることとなった。

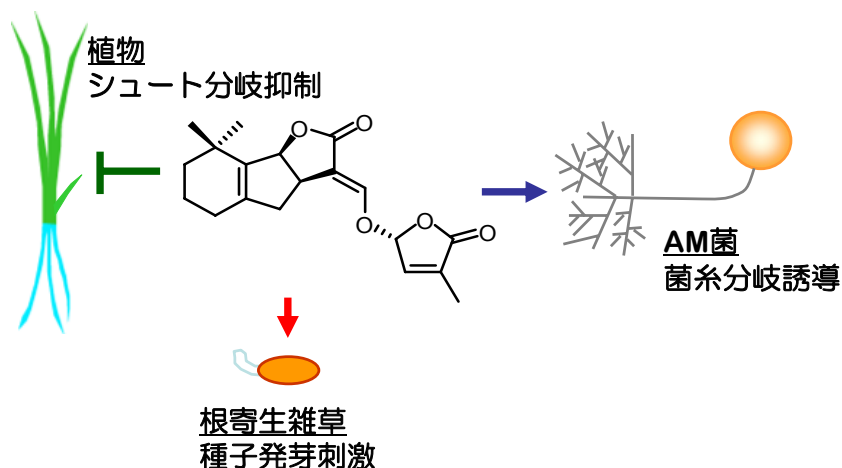


図. AM 菌, 根寄生雑草, 植物に対するストリゴラクトンの生理機能

Akiyama *et al.*, *Nature*, **435**, 824-827 (2005).

Umehara *et al.*, *Nature*, **455**, 195-200 (2008).

(S-4)

針葉樹の防御機構におけるジテルペン樹脂酸合成酵素の役割の解明

大西 利幸（静岡大学創造科学技術大学院）

はじめに

針葉樹は温帯から寒帯の広大な地域に 500 種類以上が生育しており生態学的価値や林業としての工業的価値の高い樹木である。1990 年以降、針葉樹食害昆虫の大発生に伴い、カナダ西部の針葉樹林を形成する Sitka spruce (シトカトウヒ) が大規模な被害を受けている。そこで Treenomix Conifer Forest Health Project (www.treenomix.ca) (University of British Columbia, CANADA) では針葉樹林の環境保全を目的として、針葉樹のゲノム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析により針葉樹の防御機構の解明に取り組んでいる。本プロジェクトにおいて、演者は針葉樹の化学防御物質であるジテルペン樹脂酸の生合成を明らかにする目的で、「化合物」、「酵素」、「遺伝子」の側面から包括的に研究を行ってきた。以下にこれまでに得られた新しい知見を紹介する。

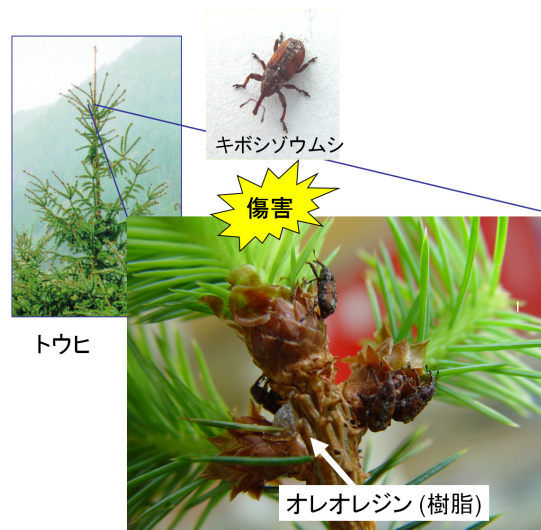


図1.針葉樹に対する昆虫の傷害の様子

針葉樹の化学防御物質であるジテルペン樹脂酸の生合成を明らかにする目的で、「化合物」、「酵素」、「遺伝子」の側面から包括的に研究を行ってきた。以下にこれまでに得られた新しい知見を紹介する。

1. 新規ジテルペン生合成遺伝子の単離・同定

針葉樹は、樹齢が数百年、数千年にも及び様々なストレスから身を守るために複雑な防御機構を備えている。針葉樹が傷害を受けたときに分泌するオレオレジン (モノテルペン、ジテルペン、セスキテルペンから構成される樹脂の総称) には、昆虫や病原菌に対する忌避成分や殺菌成分を有する化合物が多数含まれている (図 1)。特に不揮発性のジテルペン樹脂酸は、針葉樹特有に存在する二次代謝産物であり、その化学構造多様性は 30 種類以上存在する。また樹皮の傷口を防ぐ作用や食害昆虫を樹木内部から追い出す作用が知られており、針葉樹の重要な防御物質であると考えられている。ジテルペン樹脂酸の多くはラブダン型ジテルペン (アビエタン、ピマラン、イソピマラン) 骨格を有するモノカルボン酸である (図 2)。アビエタン骨格の環化形成は、ゲラニルゲラニルピロリン末端の二重結合のプロトン化により生じるカルボニウムイオンがコパリルピロリン酸を形成する第一環化反応とピロリン酸エステルのイオン化による第二環化反応で行われ、三環オレフィンであるアビエタジエンが生合成される。さらにアビエタジエンの C-18 位メチル基が三段階酸化されてジテルペン樹脂酸へと変換される。現在までにテルペン環化酵素 (TPS) のひ

とつであるジテルペンシクエン酸および一原子酸素添加酵素シトクロム P450 酵素 (P450) がジテルペン樹脂酸の生合成に重要な役割を担っていることが報告され、5 種類の TPS、1 種類の P450 の酵素機能が同定されている (Bohlmann and Keeling, 2008)。

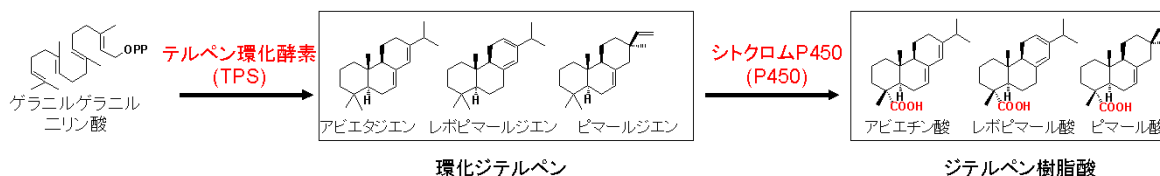


図2. ジテルペン樹脂酸生合成経路

しかし、進化系統樹解析やジテルペン樹脂酸の構造多様性から、その生合成にはまだ多くの TPS や P450 が関与していると考えられる。そこでジテルペン樹脂酸生合成遺伝子の中でほとんど活性が未同定であるシトクロム P450 に注目し、針葉樹の防御機構に関与する新規 P450 遺伝子の探索および機能同定を試みた。まず針葉樹のゲノムデータベース (<http://www.bcgsc.bc.ca/>、<http://www.plantgdb.org/>) の解析、次に P450 遺伝子のクラスター解析、RT-PCR による P450 遺伝子の全長 ORF のクローニングを行った。その結果、30 種類以上の新規 P450 遺伝子を同定することに成功した。また進化系統樹解析の結果、新たにクローニングした P450 遺伝子の多くが針葉樹特有の CYP720B subfamily に存在すること、さらに CYP720B subfamily は 4 つのクラスター (I, II, III, IV) に分類されることを明らかにした。このことは針葉樹特有の二次代謝産物であるジテルペン樹脂酸の生合成に CYP720B subfamily が関与していることを強く示唆するものである。

2. シトクロム P450 酵素 CYP720B4 の酵素学的解析

CYP720B subfamily の各クラスターの遺伝子発現の解析の結果、最もジテルペン樹脂酸生合成に関与している可能性が高いと示唆された CYP720B4 遺伝子の酵素機能を明らかにする目的で、大腸菌および昆虫細胞発現系を用いて CYP720B4 を異種発現させ、その酵素学的解析を行った。酵素活性実験には基質として 24 種類のジテルペン化合物とシトカトウヒ由来 NADPH-P450 還元酵素を用いた。その結果、CYP720B4 はジテルペン樹脂化合物の C-18 位メチル基をヒドロキシ基、アルデヒド基、カルボキシ基へと連続的に三段階酸化すること、24 種類のジテルペン化合物を基質とすることを明らかにした。また CYP720B4 の酵素反応速度論解析の結果、ジテルペン化合物の二重結合の位置と CYP720B4 の基質特異性に相関関係があることを見出した。以上のように CYP720B4 はジテルペン樹脂酸の構造多様性を生み出し、針葉樹の化学防御機構に大きく寄与していることを示した。今後は CYP720B subfamily に属する P450 遺伝子の機能解析を行うことにより、CYP720B subfamily 全体としての針葉樹の化学防御機構への役割を考えたい。