

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19780086

研究課題名 (和文) シアナミドの生合成前駆体および代謝物の解明

研究課題名 (英文) Biosynthetic precursors and metabolites of cyanamide

研究代表者

加茂 綱嗣 (KAMO TSUNASHI)

独立行政法人農業環境技術研究所・生物多様性研究領域・主任研究員

研究者番号：60345759

研究成果の概要 (和文)：

マメ科牧草のナヨクサフジに天然のシアナミドが含まれることが 2001 年に見出された。本研究では、安定同位体標識を利用した取り込み実験から、シアナミド分子中の炭素原子は解糖系においてピルビン酸よりも上流に位置する炭水化物から派生する経路を経て、シアナミドに取り込まれることが強く示唆された。また、シアナミドは主に地上部下方の葉で生合成された後に、上方の部位に輸送されている可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

It was found in 2001 that natural cyanamide was contained in a leguminous plant, *Vicia villosa* subsp. *varia*. In the present study, it was suggested that the carbon atom of cyanamide is derived from any of the carbohydrates that are present upstream of pyruvate in the metabolic pathway. Also, cyanamide could be transferred from the lower leaves to the upper ones, based on the experiment using stable isotopes.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学／生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生合成

## 1. 研究開始当初の背景

シアナミド ( $\text{NH}_2\text{CN}$ ) は、今から約 100 年前に石灰窒素として合成方法が開発された最古の化学肥料である。シアナミドは土壌消毒・殺菌・殺虫・除草などさまざまな効果があり、その分解物は窒素肥料として機能する。

2001 年、申請者はマメ科牧草のナヨクサフジがシアナミドを含むことを明らかにした。それまでこの化合物が天然物として見出された報告は一切なく、天然シアナミドの最初の発見となった。申請者はこの研究の開始までに以下の成果を挙げていた。まず、安定同位

体標識した硝酸イオンやアンモニウムイオンの $^{15}\text{N}$ 標識がシアナミドに取り込まれることを確認し、シアナミドが天然物であることを証明した。次に、GC-MSを利用した同位体希釈法によるシアナミドの定量方法を確立した。最後に、シアナミドはナヨクサフジ以外の植物にも含まれているかどうか調べた。101種の雑草を対象にした分析では、その他に同じソラマメ属のクサフジに含まれていた。これらのシアナミド含量は数百~数千 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重であった。しかし、他の数種のソラマメ属雑草からはシアナミドは検出されなかった( $<1\mu\text{g/g}$ 新鮮重)。これをさらに発展させ、全部で553種の高等植物を対象にシアナミド含量を測定した。その結果、ナヨクサフジとクサフジの他に、ハリエンジュ属のニセアカシアもシアナミドを含むことが明らかとなった。それ以外の種からはシアナミドが見出されなかったため、植物界におけるその分布は極めて限定的であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

(1) これまで、シアナミド分子に含まれる窒素の由来についてある程度の知見を得てきたため、本研究においては、シアナミドの炭素の由来を中心に調べた。予備実験によってグルコースが取り込まれることが判っているが、それ以外にも前駆体となり得る化合物を用いて炭素原子の標識の取り込みを観測した。

(2) 標識体の取り込み実験に適した部位を選定するため、また、シアナミドの生理的役割を考察するため、生合成部位を具体的に明らかにすることを試みた。地上部をいくつかの部分に分割し、それぞれにおけるシアナミド濃度、生合成、および移動の有無について検討することとした。

(3) これまでに調べた553種の高等植物の中で、ナヨクサフジ、クサフジ、ニセアカシアの3種のみが、すでに報告したGCMSを用いた分析方法において定量限界値である $1\mu\text{g/g}$ 新鮮重以上のシアナミドを含んでいた。この定量限界値は植物中の微量成分を測定するには高いことから、他の植物にも微量のシアナミドが含まれる可能性は検討できない。そこで、定量限界値をおよそ3桁向上させることを目指した。シロイヌナズナ等において微量のシアナミドが検出されれば、生合成前駆体や代謝物を研究する目的に適した材料となるため、その可能性の検討に用いることを目的とした。

なお、これらの研究は、将来的に産業面の応用につながることを期待される。シアナミドを含むことが明らかにされたマメ科植物を、圃場の被覆や鋤き込みに使用することで、農薬や化学肥料の使用量を極力抑えた雑草

防衛および作物栽培が可能になるであろう。これはシアナミドの存在が明らかにされる前から、米国などで用いられている。さらなる研究によって化学的な裏付けが可能になれば、シアナミドを含む植物のより効果的な利用方法の開発に役立つであろう。また、普及に際して、効果の程度に対する疑問や、予想できないリスクへの不安感も解消される。適当な方法でこれらの植物を利用することは、現代社会において強く要求されている「環境への負荷が低い農業」に直結する。

## 3. 研究の方法

(1)  $[^{13}\text{C}_6]$ グルコース、 $^{13}\text{CO}_2$ 、または $[2, 3-^{13}\text{C}_2]$ ピルビン酸ナトリウムを含む水耕液を与えてナヨクサフジ植物体地上部を24時間培養した。培養後、シアナミドをGC-MSで分析するとともに、 $[2, 3-^{13}\text{C}_2]$ ピルビン酸ナトリウムを用いた実験では、メタノール抽出液を分画して得た酸性画分を減圧濃縮し、TMS化した。GC-MSを用いてコハク酸、フマル酸、およびシアナミドの各TMS化物の分析を行い、 $^{13}\text{C}$ の取り込みを調べた。

(2) 植物体地上部を上方から葉を等しく2枚ずつ含むように3つの部位(上部・中部・下部)に分け、各部位に含まれるシアナミドを定量した。また、各部位を $^{15}\text{N}$ 標識した窒素源を含む水耕液で5日間培養した。さらに、0.1%のTween 20を含む $[^{15}\text{N}_2]$ シアナミド水溶液を地上部下部の2枚の葉に塗布し、24-48時間培養した後に、中部および上部への $[^{15}\text{N}_2]$ シアナミドの移動を調べた。

(3) 従来、2g新鮮重の植物体粗抽出液に $20\mu\text{g}$ の $[^{15}\text{N}_2]$ シアナミドを内部標準物質(IS)として添加し、シリカゲルカートリッジカラムにて精製したサンプルをGCMSにて分析する方法を用いていた。このとき、ISに対する天然物の $[\text{M}]^+$ イオンピーク面積が10%となる量が定量限界値であった( $1\mu\text{g/g}$ 新鮮重)。今回、従来の1/100である200ngのIS添加による分析を可能にするため、いくつかの改良を試みた。

## 4. 研究成果

(1)  $[^{13}\text{C}_6]$ グルコースおよび $^{13}\text{CO}_2$ 由来の $^{13}\text{C}$ がシアナミドに取り込まれるのに対し、 $[2, 3-^{13}\text{C}_2]$ ピルビン酸由来の $^{13}\text{C}$ の取り込みは見られないことを確認した。また、 $[2, 3-^{13}\text{C}_2]$ ピルビン酸由来の $^{13}\text{C}$ は、シアナミドへ取り込まれないのとは対照的に、クエン酸回路上の有機酸であるコハク酸やフマル酸へ顕著に取り込まれたことから、植物体内では正常に代謝されていることが確認された。これらのことから、シアナミド分子中の炭素原子は、解糖系においてピルビン酸よりも上流に位置する炭水化物から派生する経路を経てシアナミドに取り込まれていることが強く示

唆された。

(2) 上方の部位ほど高濃度のシアナミドが含まれていた。それとは対照的に、 $^{15}\text{N}$ の取り込み率は下方の部位ほど高い値を示した。下部の葉に $^{15}\text{N}_2$ シアナミド水溶液を塗布すると、培養時間の経過とともに中部および上部の標識体存在率が有意に増加した。これらの結果から、シアナミドは主に地上部下方の葉で生合成された後に、上方に輸送されている可能性が示された。

(3) IS を添加した粗抽出物水溶液を ODS カラムカートリッジにて精製し、その水溶出区に含まれるシアナミドを酢酸エチルに転溶させることで、共存する夾雑物を減少させた。また、感度を向上させるため、装置を Shimadzu QP5000 から QP5050 に変更した。さらに、 $^{15}\text{N}_2$ シアナミドと比較して試薬中に含まれる非標識体の存在比が 1/10 程度である $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}_2$ 体に IS を変更し、微量の天然シアナミドのイオンピーク面積が 5%となる量を定量限界値とした。これらの改良により、5 ng/g 新鮮重の定量限界値を達成した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 加茂綱嗣、笠原良平、阿部俊、廣田満、菅野真実、山谷紘子、平舘俊太郎、藤井義晴. Carbon sources of natural cyanamide in *Vicia villosa* subsp. *varia*. Natural Product Research, 2010, 印刷中. 査読有り.
- ② 加茂綱嗣、加藤健司、阿部俊、廣田満、山谷紘子、平舘俊太郎、藤井義晴. Biosynthetic origin of the nitrogen atom in cyanamide in *Vicia villosa* subsp. *varia*. Soil Science and Plant Nutrition, 55, 235-242, 2009. 査読有り.
- ③ 加茂綱嗣、遠藤舞、佐藤雅恵、笠原良平、山谷紘子、平舘俊太郎、藤井義晴、平井伸博、廣田満. Limited distribution of natural cyanamide in higher plants: Occurrence in *Vicia villosa* subsp. *varia*, *V. cracca*, and *Robinia pseudo-acacia*. Phytochemistry, 69, 1166-1172, 2008. 査読有り.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 加茂綱嗣、遠藤舞、廣田満、山谷紘子、平舘俊太郎、藤井義晴. Cyanamide contents of black locust *Robinia pseudoacacia* and insect species feeding on its leaves. First

International Conference of Asian Allelopathy Society, 2009 年 12 月 20 日、広州市 (中国) .

- ② 加茂綱嗣. 天然シアナミドの発見とその分布に関する研究 (学会奨励賞受賞講演). 植物化学調節学会第 44 回大会、2009 年 10 月 29 日、東北大学.
- ③ 加茂綱嗣. Cyanamide Contained in Several Fabaceae Plants. MARCO Symposium 2009, 2009 年 10 月 7 日、つくば市.
- ④ 藤井義晴、大瀬健嗣、古林章弘、森田沙綾香、加茂綱嗣、平舘俊太郎. 根圏土壤法による植物の根から放出される物質によるアレロパシー活性の検定—植物栽培土壌を用いた検定とプラントボックス法との関係、日本土壤肥料学会 2009 年大会、2009 年 9 月 15 日、京都大学.
- ⑤ 藤井義晴、菅野真実、Anna Golisz、加茂綱嗣、平舘俊太郎. ライフサイクルアセスメント法による閉鎖生態系におけるアレロパシー活性の検定. 2009 生態工学会年次大会、2009 年 6 月 18 日、筑波大学.
- ⑥ 藤井義晴、大瀬健嗣、加茂綱嗣、平舘俊太郎、渡部泰希、駒井史訓. 根圏土壤法によるアレロパシー活性の検定とアスパラガスの活性. 2009 生態工学会年次大会、2009 年 6 月 18 日、筑波大学.
- ⑦ 藤井義晴、平舘俊太郎、加茂綱嗣、Anna Golisz、菅野真実. 植物の一生に及ぼすアレロパシー活性を検定するライフサイクルアセスメント (LCA 法) の開発と DNA マイクロアレイによる影響の解析、植物化学調節学会第 43 回大会、2008 年 10 月 30 日、つくば市.
- ⑧ 阿部俊、加茂綱嗣、廣田満、平舘俊太郎、山谷紘子、藤井義晴. シアナミド生合成における窒素原子および炭素原子の由来. 植物化学調節学会第 43 回大会、2008 年 10 月 30 日、つくば市.
- ⑨ 加茂綱嗣、平舘俊太郎、藤井義晴. Cyanamide as a Natural Product. 5<sup>th</sup> World Congress on Allelopathy. 2008 年 9 月 24 日、サラトガスプリング (アメリカ合衆国) .
- ⑩ 藤井義晴、Anna Golisz、菅野真実、加茂綱嗣、平舘俊太郎. ヘアリーベッチとハリエンジュに含まれるシアナミドが植物に及ぼす影響—成長への影響と DNA マイクロアレイによる遺伝子発現への影響調査、日本土壤肥料学会 2008 年大会、2008 年 9 月 9 日、名古屋市立大学.
- ⑪ 藤井義晴、加茂綱嗣、平舘俊太郎. Cyanamide in hairy vetch, tufted vetch, and black locust. American Chemical Society 236<sup>th</sup> National Meeting and

Exposition、2008年8月17日、フィラデルフィア（アメリカ合衆国）。

- ⑫ 笠原良平、加茂綱嗣、廣田満、平舘俊太郎、山谷紘子、藤井義晴. ヘアリーベッチにおけるシアナミドの生合成部位. 植物化学調節学会第42回大会、2007年10月30日、静岡市.
- ⑬ 遠藤舞、加茂綱嗣、山谷紘子、平舘俊太郎、藤井義晴、廣田満. ニセアカシアに含まれるシアナミド. 日本農芸化学会2007年度関西・中部支部合同大会、2007年9月22日、中部大学.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加茂 綱嗣 (KAMO TSUNASHI)

独立行政法人農業環境技術研究所・生物多様性研究領域・主任研究員

研究者番号：60345759