

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580113

研究課題名（和文）植物の動的防御機構に関する生物有機化学的研究

研究課題名（英文）Bio-organic chemical study on dynamic defense mechanisms of plants

研究代表者

長谷川 守文 (HASEGAWA Morifumi)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：80311588

研究成果の概要（和文）：植物が病原菌の感染時に新たに生合成する抗菌活性物質であるフィトアレキシン（PA）について、イネを材料として研究を行った。その結果、従来は知られていなかった新たな PA としてジテルペン化合物である *ent*-10-oxodepressin を発見した。また、既知の PA の関連化合物として新規化合物を一つ発見した。さらに、イネの重要病原菌であるいもち病菌による PA の分解・解毒経路についての研究も行った。

研究成果の概要（英文）：This study focused on rice phytoalexins (PA). *ent*-10-Oxodepressin was found as a novel diterpenoid PA. A novel compound was also found as a known PA-related compound. Moreover, the detoxification pathway of PA in rice blast fungus was investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物制御化学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

キーワード：フィトアレキシン，イネ，テルペノイド，フラボノイド，いもち病

### 1. 研究開始当初の背景

イネのフィトアレキシンは研究開始時点までに 15 の化合物が報告されており、そのうち 14 種類はジテルペン骨格を持つ化合物、1 種類はフラバノン骨格を持つ化合物であった。このように多様な化学構造を持つフィトアレキシンを生産する例はイネ以外には全く知られていない。また、イネはゲノム配列が解読された生物であり、これらフィトアレキシンの生合成に関与する遺伝子の解析が比較的進めやすいと考えられる。これらのことからイネのフィトアレキシンは高等植物

の二次代謝産物生合成の一つのモデル系として近年非常に注目される存在となっている。

イネフィトアレキシンの生合成については、4 種類のジテルペン炭化水素骨格の作り分けが行われる環化酵素に最も注目して研究が行われており、山形大学の豊増、東京大学の山根、アイオワ州立大学の Peters の 3 グループによって、すべてのジテルペン炭化水素生合成に関与する酵素遺伝子が同定されている。一方、生合成経路の環化反応以外の部分については不明の部分も多く、生合成

中間体も一部が同定されているのみであった。

植物病原菌がフィトアレキシンを解毒・代謝する能力を持っていることが主に双子葉植物の研究において明らかにされてきているが、イネフィトアレキシンのイネ病原菌による解毒についての知見は少なかった。研究代表者らは、いもち病菌によってサクラネチン（抗菌活性を持つフィトアレキシン）がゲンクワニン（抗菌活性をほとんど持たない）に変換されることを明らかにしている。さらに、いもち病菌がモミラクトン A を代謝分解していることも明らかにしたが、代謝産物は特定されていなかった。

## 2. 研究の目的

### (1) 紫外線照射イネ葉片からのストレス誘導性化合物の単離・構造決定

フィトアレキシンは病原菌の感染時以外にも重金属溶液処理や紫外線照射などの非生物的ストレスによって蓄積が誘導されることが知られている。イネのフィトアレキシンも紫外線照射によって多量に蓄積させることができるため、紫外線照射イネ葉片を材料として、今まで知られていない化合物を同定することを目指した。ここで同定された化合物の中には新規のフィトアレキシンやフィトアレキシンの生合成前駆体、代謝産物などが含まれることが予想された。

### (2) イネいもち病菌によるイネフィトアレキシンの代謝産物の同定

代謝産物の同定を行うためには、比較的多量のフィトアレキシンを必要とするので、イネ穀殻から多量に得られるモミラクトン類および市販のナリングニンから容易に化学合成できるサクラネチンについて研究に取り組むこととした。モミラクトン A については、すでにいもち病菌によって解毒されることは分かっていたが、解毒代謝産物は同定されていなかったため、その同定を目的とした。同様にモミラクトン B についても解毒代謝産物の同定を目指した。サクラネチンについては、すでに解毒代謝産物として同定されているゲンクワニンは生成量が非常に少なく、他の代謝経路が存在する可能性が示唆されていたので、ゲンクワニン以外の代謝産物の同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 紫外線照射イネ葉片からのストレス誘導性化合物の単離・構造決定

ファイトロンで約 2 ヶ月生育させたイネ葉を切り取り、水で湿らせたティッシュペーパーを敷いたプラスチック箱に並べ、紫外線殺菌灯を用いて 20 cm の距離から 20 分間紫外線照射を行った。紫外線照射後のイネ葉は

高湿度を保った状態で、26°C、連続光下で 2 日間または 3 日間インキュベートした。

インキュベートしたイネ葉を 70% メタノールで抽出し、メタノールを減圧留去後に酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチル相を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離した。得られた画分を GC/MS かまたは LC/MS によって分析し、既知のフィトアレキシンやフィトアレキシン生合成前駆体とは異なる化合物を探索した。未知の化合物が含まれる画分について、さらに分取 TLC および HPLC によって精製を行った。

精製された化合物について、NMR, MS, IR などのデータを用いて構造解析を行った。イネいもち病菌に対する抗菌活性といもち病菌接種によって蓄積が誘導されるかどうかを調べ、フィトアレキシンとしての機能を有するかを確認した。

### (2) イネいもち病菌によるイネフィトアレキシンの代謝産物の同定

イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 培養液中にフィトアレキシン (モミラクトン A, B, サクラネチン) を添加して 27°C で培養を行い、培養液および菌体をまとめて 80% メタノール抽出し、添加したフィトアレキシンの減少を LC/MS/MS または GC/MS によって測定した。フィトアレキシンの減少が確認された後、減少に伴い増加してくる物質を LC/MS または GC/MS 分析によって探索した。

代謝産物候補として有力な化合物について、構造解析に必要な量を得るためにスケールアップした培養を行った。培養液及び菌体を 70% メタノール抽出し、メタノールを減圧留去後、酢酸エチル抽出した。酢酸エチル相を濃縮後、分取 TLC および HPLC によって代謝産物候補化合物を単離した。単離された化合物について、NMR, MS, IR などのデータを用いて構造解析を行った。

モミラクトン A の代謝産物候補として同定された化合物 (3,6-dioxo-19-nor-9β-pimara-7,15-diene, **1**) は、モミラクトン A を原料として、アルカリ脱炭酸および Dess-Martin 酸化によって合成した。合成した化合物 **1** を用いて、イネいもち病菌孢子発芽阻害活性測定を行った。また、**1** の LC/MS/MS を用いた定量法を確立し、いもち病菌培養でのモミラクトン A 添加後の **1** の蓄積の経時変化を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) イネの新奇フィトアレキシン *ent*-10-oxodepressin (**2**) の同定

紫外線照射イネ葉抽出物のシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製画分を GC/MS 分析に供したところ、従来知られているフィトアレキシンやフィトアレキシン生合成中間

体とは異なる保持時間とマススペクトルを示す物質が検出され、その分子イオンは  $m/z$  300 と推定された。また、この物質は紫外線照射をしていないイネ葉中では検出されなかった。紫外線照射イネ葉 (400 g) から GC/MS 分析による保持時間とマススペクトルを指標にして、この物質を各種クロマトグラフィーによって精製し、2.1 mg の無色油状物質 (2) を得た。

精製した物質を高分解能質量分析 (EI) に供したところ、分子式は  $C_{20}H_{28}O_2$  であると推定された。各種 NMR や IR スペクトルにより、平面構造を決定したところ、casbane 骨格を持つジテルペン化合物であることが明らかとなった。平面構造をもとに文献を調査した結果、NMR スペクトルが完全に一致する化合物 10-oxodepressin (3) がすでに報告されていることが判明した。化合物 3 は軟質サンゴ *Sinularia depressa* より単離された化合物 10-hydroxydepressin の Dess-Martin 酸化によって得られた物質である。化合物 2 の比旋光度を測定した結果、正の値 (+124.2) を示したが、3 の比旋光度の文献値は負の値 (-76) だったことから、2 は 3 のエナンチオマーである *ent*-10-oxodepressin (図 1) であることが明らかとなった。化合物 2 は本研究によって初めて発見された化合物である。

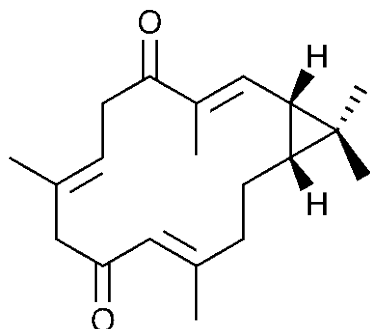


図 1 *ent*-10-Oxodepressin (2) の化学構造

化合物 2 のイネいもち病菌に対する抗菌活性を測定したところ、胞子発芽阻害試験における 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) が 30 ppm (100  $\mu$ M)、胞子発芽管伸長阻害試験における  $IC_{50}$  が 10 ppm (33  $\mu$ M) であった。胞子発芽阻害試験の結果を従来知られているフィトアレキシンと比較すると、モミラクトン A ( $IC_{50}$  540  $\mu$ M) よりは抗菌活性が強く、サクラネチン ( $IC_{50}$  52  $\mu$ M) よりは抗菌活性が弱かった。

化合物 2 の LC/MS/MS を用いた定量法を確立し、紫外線照射イネ葉およびいもち病菌接種イネ葉における蓄積量を測定した。紫外線照射後 72 時間における 2 の蓄積量は 41.7  $\mu$ g/g FW、いもち病菌接種後 72 時間の蓄積量は 2.48  $\mu$ g/g FW であった。化合物 2 は紫外線照射だけでなく、いもち病菌接種によっても蓄積が誘導されること、ならびにいもち病

菌に対する抗菌活性を示すことが確認されたので、2 はイネの新奇フィトアレキシンであることが明らかとなった。

従来知られていたイネのジテルペン系フィトアレキシン 14 種類はすべてゲラニルゲラニルニリン酸が二段階の環化反応を受けて生成する labdane 関連炭化水素を前駆体として生合成されるものであった。しかし、2 はこれらとは異なり、ゲラニルゲラニルニリン酸から一段階の環化反応によって生成する casbane 型炭化水素が前駆体であると推定される。イネは多様なフィトアレキシンを生合成する能力を有していることが知られている数少ない植物であるが、本研究成果によってフィトアレキシンのさらなる構造多様性が明らかとなった。

Casbane 骨格を持つジテルペン化合物の起源は比較的限定されており、本研究以前に知られていたものはすべてトウダイグサ科植物か *Sinularia* 属軟質サンゴから得られたものであった。本研究成果はイネが casbane 型ジテルペンを生合成するという化学分類学的にも大変興味深いものである。

(2) ファイトカサン類縁体  $1\alpha$ ,  $2\alpha$ -dihydroxy-*ent*-12, 15-cassadiene-3, 11-dione (4) の同定

紫外線照射イネ葉抽出液を LC/MS 分析 (ESI) に供し、従来知られている化合物とは保持時間及びマススペクトルが異なる物質を探索したところ、 $[M+H]^+$  と推定される  $m/z$  333 のイオンを示す物質が検出された。この物質は紫外線照射をしていないイネ葉では検出されなかった。紫外線照射イネ葉 (400 g) から LC/MS 分析を指標に各種クロマトグラフィーによってこの物質を精製し、1.9 mg の化合物 4 を得た。化合物 4 の構造を高分解能質量分析、各種 NMR および IR スペクトルにより決定したところ、すでにイネフィトアレキシンとして知られているファイトカサン類の類縁体  $1\alpha$ ,  $2\alpha$ -dihydroxy-*ent*-12, 15-cassadiene-3, 11-dione (図 2) であった。化合物 4 は本研究で初めて発見された化合物である。

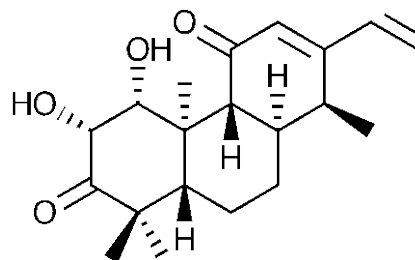


図 2  $1\alpha$ ,  $2\alpha$ -Dihydroxy-*ent*-12, 15-cassadiene-3, 11-dione (4) の化学構造

化合物 4 の LC/MS/MS を用いた定量法を確立し、いもち病菌接種イネ葉における蓄積量を測定したところ、接種後 72 時間で 43.9  $\mu\text{g/g}$  FW の蓄積が確認された。しかし、4 のイネいもち病菌に対する抗菌活性を孢子発芽阻害試験および孢子発芽管伸長阻害試験によって測定したところ、4 は全く抗菌活性を示さないことが明らかとなった。したがって、4 はフィトアレキシンではなくファイトカサン類の活性のない代謝産物であると推定される。化合物 4 は、その構造からファイトカサン A, B, C, E のいずれかが酸化されて生合成されたものと考えられる。

### (3) モミラクトン類のイネいもち病菌による代謝産物の同定

モミラクトン A をいもち病菌培養培地に添加して培養し、培養後の培地成分の変化を GC/MS で分析することによって、モミラクトン A 代謝産物候補化合物を探索した。探索の結果、複数の候補化合物が検出されたが、最も強度が大きく検出された化合物をいもち病菌による主要なモミラクトン A 代謝産物の一つであると推定した。この化合物は GC/MS 分析の結果、分子イオンが  $m/z$  286 であると推定された。モミラクトン A を添加して培養したいもち病菌培養培地から、逆相 HPLC を用いてその化合物を単離し、各種 NMR スペクトル解析を行った結果、この化合物 (1) を 3,6-dioxo-19-nor-9 $\beta$ -pimara-7,15-diene (図 3) であると同定した。モミラクトン A を水酸化カリウムによって脱炭酸した後、Dess-Martin 酸化することで 1 を化学合成した。合成した 1 と、モミラクトン A を添加したいもち病菌培養培地から単離した 1 は、機器分析データによって同一の化合物であることを確認した。また、いもち病菌培養培地にモミラクトン A を添加し培養したときのモミラクトン A の減少と 1 の蓄積を LC/MS/MS で定量した。終濃度 0.3 mM で添加したモミラクトン A は培養時間とともに減少し、それに伴い 1 が蓄積し、培養 4 時間で蓄積の極大を示した後、培養 8 時間時では顕著に減少した。化合物 1 の最大の蓄積量は、最初に添加したモミラクトン A の約 4 分の 1 の濃度を示した。これは、1 がモミラクトン A の主要な代謝産物であることを示唆している。化合物 1 のいもち病菌孢子発芽阻害活性の  $\text{IC}_{50}$  は 500  $\mu\text{M}$  であり、モミラクトン A ( $\text{IC}_{50}$  540  $\mu\text{M}$ ) と同程度の抗菌活性を示した。モミラクトン A を添加したいもち病菌培養培地上清の抗菌活性は添加後 4 時間ではあまり低下しないが、8 時間では有意に低下することがすでに示されている。以上の結果から、1 はモミラクトン A の解毒代謝の中間体であり、解毒にはさらなる代謝が必要であると考えられる。

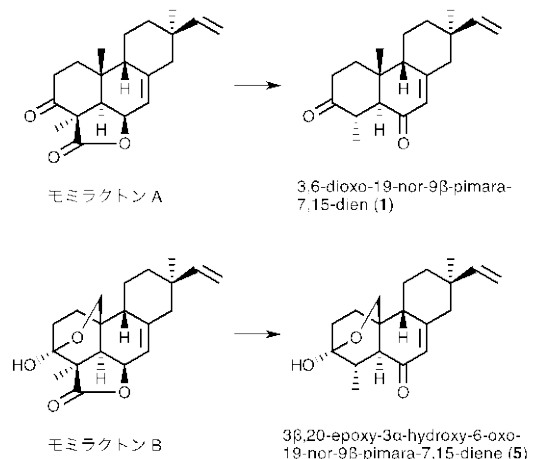


図 3 イネいもち病菌によるモミラクトン類の代謝

モミラクトン B についても、モミラクトン A と同様の反応で代謝されたと考えられる 3 $\beta$ ,20-epoxy-3 $\alpha$ -hydroxy-6-oxo-19-nor-9 $\beta$ -pimara-7,15-diene (図 3, 5) を同定した。

化合物 1 については、モミラクトン A から化学合成することによって比較的多量に得ることが可能であり、1 を添加したいもち病菌培養液から、1 がさらに変換を受けた化合物を同定することが次の課題である。LC/MS 分析によって分子量 320 と推定される化合物を有力な 1 の代謝産物候補として見いだしており、その精製方法も確立した。現在、この化合物の構造解析を行っているところである。

### (4) サクラネチンのイネいもち病菌による代謝産物の探索

サクラネチンを添加したいもち病菌培養培地からゲンクワニン以外の代謝産物としてナリンゲニン(図 4) を LC/MS/MS 分析によって同定した。ナリンゲニンはイネにおいてはサクラネチンの生合成前駆体であり、サクラネチンに比べて抗菌活性が低いことが知られている化合物である。しかし、ナリンゲニンの蓄積量は添加したサクラネチンの量の 1/100 以下であるため、他に主要な代謝産物が存在しているものと推定された。

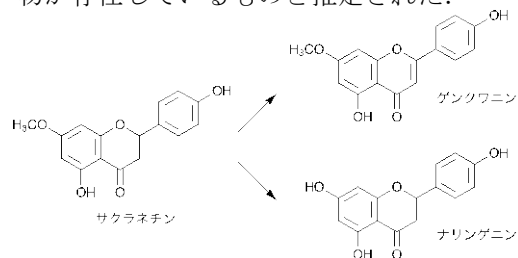


図 4 イネいもち病菌によるサクラネチンの代謝

より主要な代謝産物の候補として、LC/MS 分析によって分子量 302 と推定される化合物を見いだした。しかし、この化合物は不安定であり、精製の途中で分解してしまうことが明らかとなった。現在、分解を抑えた精製方法を検討し、化合物の単離を目指している。

#### 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 2 件)

①Inoue, Y., Sakai, M., Yao, Q., Tanimoto, Y., Toshima, H., and Hasegawa, M., Identification of a novel casbane-type diterpene phytoalexin, *ent*-10-oxodepressin, from rice leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**(4), 760-765 (2013). DOI: 10.1271/bbb.120891 査読有

②Imai, T., Ohashi, Y., Mitsuhashi, I., Seo, S., Toshima, H., and Hasegawa, M., Identification of a degradation intermediate of the momilactone A rice phytoalexin by the rice blast fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**(2), 414-416 (2012). DOI: 10.1271/bbb.110756 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①井上靖乃, 阪井美紀, 姚群, 谷本洋輔, 戸嶋浩明, 長谷川守文『紫外線照射イネ葉からの新奇ジテルペン化合物 *ent*-10-oxodepressin の単離』植物化学調節学会第 46 回大会, 2011. 11. 2, 宇都宮大学

②今井卓也, 戸嶋浩明, 長谷川守文『イネフイトアレキシン モミラクトン B のいもち病菌による代謝産物の同定』植物化学調節学会第 46 回大会, 2011. 11. 2, 宇都宮大学

③井上靖乃, 阪井美紀, 姚群, 谷本洋輔, 戸嶋浩明, 長谷川守文『紫外線照射イネ葉からの新奇ジテルペン化合物の単離』日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011. 3. 27, 京都女子大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

長谷川 守文 (HASEGAWA Morifumi)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号: 80311588