

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780122

研究課題名(和文)植物二次代謝産物クマリン類縁体の関与する生体防御機構

研究課題名(英文)Coumarins, the secondary metabolites, have a role in the stress resistance in plants

研究代表者

清水 文一 (SHIMIZU, Bun-ichi)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：50324695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物の産生するクマリン類縁体の生理機能について解析した。またその生合成の場を可視化することで、病原菌等の侵入に伴って植物体内でその生合成酵素が局所的に発現誘導されることを見いだした。

一方、これらの物質は落葉や根から周辺土壌の微生物によって分解された。これらの分解中間物質に生理活性は見られなかったが、クマリン分解微生物は食害昆虫腸管内など局所的に検出された。これは、クマリン類縁体が植物体周辺環境に何らかの影響を与えているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the role of coumarins in plants. Visualization of the key enzyme of coumarin biosynthesis showed spacial detail of its biosynthesis. After infectious stimulation by fungus or elicitors, local induction of coumarin biosynthesis was found around the area of infection. Coumarin degradation in the rhizosphere of Prunus sp. was detected, where coumarin-degrading microbes were isolated. The coumarin degrading microbes were isolated from soil only around Prunus tree. This result indicates the interaction between the plant and the microbe by coumarin.

Coumarin degradation pathway by these microbes were determined. The intermediates of degradation showed no activity to other microbes and plants.

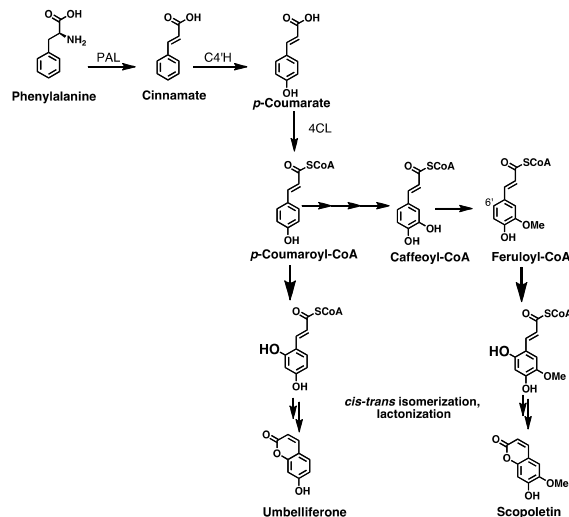
研究分野：農芸化学

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：二次代謝産物 生理活性 クマリン 分解微生物

1. 研究開始当初の背景

クマリン化合物は広く植物界に見られる化合物であるが、その生理機能は明らかではない。研究代表者はその生合成鍵酵素遺伝子を解明し、その生合成経路をシロイヌナズナおよびサツマイモで明らかにした。その鍵酵素は2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼに属し、桂皮酸類の CoA チオエステルを基質としてオルト位に水酸基を導入する反応を触媒した。



2. 研究の目的

クマリン化合物の生合成鍵酵素およびそれをコードする遺伝子に関する知見を利用して、クマリン化合物の植物における生理機能の解明を目的にした。

3. 研究の方法

(1)シロイヌナズナにおいてクマリン化合物の生合成の場を可視化することにより、ストレス受容時にどのように生合成が誘導されるのかを調べた。微生物感染刺激や物理刺激にตอบสนองして GFP ラベル化した鍵酵素の発現を追跡した。

(2)クマリン化合物の病原微生物等による分解の追跡を行った。またサクラ根圏からクマリン分解菌の単離を進めた。

(3)ソライロアサガオにおけるクマリン化合物生合成遺伝子のクローニングおよびこの酵素遺伝子の過剰発現体の作出を進めた。

4. 研究成果

(1)シロイヌナズナにおいては微生物感染にตอบสนองしてクマリン生合成鍵酵素の発現およびその酵素レベルが感染した領域で上昇するのが観察された。また、根では根毛および表皮、皮相組織でその生合成が進んでいることが観察できた。

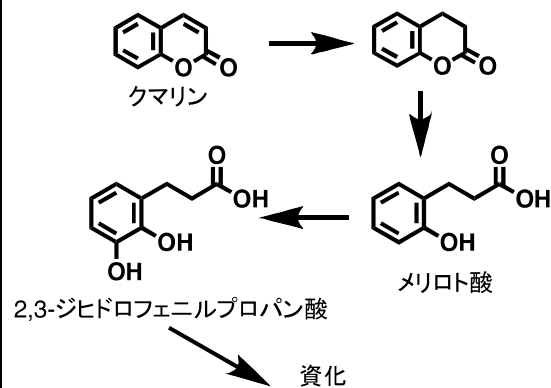
(2)サツマイモつる割れ病菌にはサツマイモの産生するクマリン化合物のウンベリフェロンやスコポレチンに対しての分解活性が

検出できなかった。

一方、サクラ根圏および食害昆虫腸管より高いクマリン分解能を示すバクテリア *Pseudomonas* sp. (STDX-1) を単離した。すなわち、炭素源をクマリンのみとした平板最少培地を用いて、サクラ周辺環境から微生物のスクリーニングを行った。その結果、サクラ葉上で採取したアメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) 幼虫の糞および腸内容物より、明所、好気条件下で、25℃ で 72 時間培養の後、コロニーを形成する微生物 STDX-1 を単離した。

STDX-1 の細胞形態は桿菌、グラム陰性であり、コロニー色調は白色であった。STDX-1 の 16S rRNA 部分配列を比較したところ *Pseudomonas taiwanensis* の配列と 99.8% の相同性を示した。

STDX-1 は、グルコースおよびマンノースを炭素源とすることができたが、スクロースでは生育しなかった。また、フェノールおよびカテコールを炭素源として生育した。0.2% (w/v) クマリンを含む液体培地で、明所、好気条件下、25℃ で、STDX-1 を振盪培養し HPLC を用いてクマリンの代謝を追跡した。その結果、時間の経過とともに添加したクマリンの含量が減少する一方で、培養前には見られなかった成分を確認した。これらの成分を分取用 HPLC を用いて単離・精製をしたのち、¹H-, ¹³C-NMR による構造解析および質量分析を行った。その結果、代謝物の 1 つを melilotic acid (2-hydroxyphenylpropionic acid) と同定した。



Pseudomonas sp. STDX-1によるクマリンの分解代謝反応経路

本菌での代謝をさらに HPLC にて追跡したところ、melilotic acid の次の代謝物と考えられるピークを確認した。この代謝物を LC-HRMS を用いて質量分析したところ $m/z = 181.0533[M-H]^-$ で、組成式は $C_9H_{10}O_4$ と考えられた。これは、melilotic acid に酸素原子が 1 つ導入されたものと予想された。酸素が導入された部位を確認するため、代謝物の単離・精製を行い ¹H-, ¹³C-NMR を用いて代謝物の構造決定を行った。その結果、この代謝中間体は、2,3-dihydrophenylpropionic acid であると同定した。

また、1、5、10 mM のクマリンを含むそれぞれの培地を用いて、サクラの葉、樹皮および土壌からさらにクマリンを炭素源として生育できる微生物を単離した。これら微生物を 16S rRNA 部分塩基配列比較によって同定を行った。その結果、*Pseudomonas* sp. に加えて *Klebsiella* sp. を単離・同定した。

また STDX-1 ゲノムには植物の二次代謝産物の分解代謝に関わるオベロン様の配列があることを見いだした。

また分解代謝中間体の単離同定を行ったが、これらの中には抗菌性や植物に対する生理活性が見られなかった。

これまでに微生物によるクマリンの分解に関する研究はいくつか例があるが、いずれもクマリンの異物とし、異物代謝能を追跡したもののみである。クマリンを資化できる微生物として単離した例は今回がはじめてであった。

サクラ葉食害昆虫（アメリカシロヒトリ）腸管から本菌が単離されたこと、およびクマリンを始めとする植物二次代謝産物を分解するための配列を本菌が有していたことは注目し得る。すなわち、クマリン化合物を仲介した昆虫、微生物、そして植物という相互関係が存在する可能性がある。

(3) サツマイモの *AtF6 H1* ホモログ配列を参考にプライマーを設計し、ソライロアサガオの total RNA を鋳型として部分配列を取得した後、RACE 法にて 3', 5' 末端の配列を調べ、3 種類の全長 ORF を取得した。AtF6 H1 との amino acid 配列での相同性は 58% だった。さらに取得した配列を大腸菌を用いて組換え酵素として発現させ、酵素活性を測定した。その結果、feruloyl-CoA および *p*-coumaroyl-CoA を基質とできるものと、feruloyl-CoA のみ基質としてオルト位に水酸基を導入するものの 2 種類の配列をソライロアサガオは有していることが分かった (It1-1 と It1-2)。

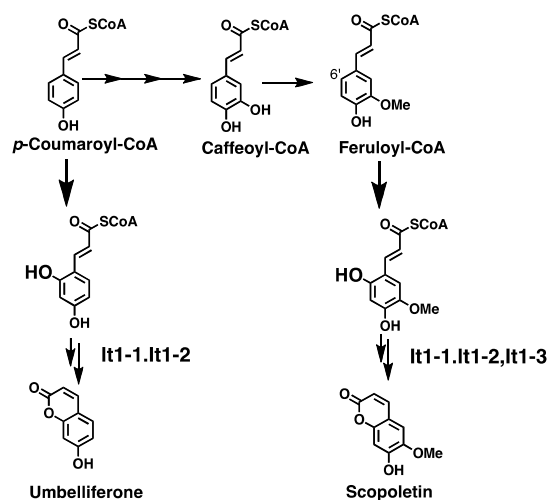
得られた配列を大腸菌を用いて組換え酵素として発現させ酵素活性を測定した。いずれも *p*-coumaroyl-CoA および feruloyl-CoA に対するオルト位水酸化反応を触媒した。また発現している 20GD 配列の解析を進め、It1-1 や It1-2 とは異なる It1-3 配列を取得した。その酵素活性は It1-1 および It1-2 とは異なり *p*-coumaroyl-CoA に対しては活性を示さない一方で feruloyl-CoA に対して触媒活性を示した。

このソライロアサガオのオルト位水酸化酵素遺伝子および、サツマイモのオルト位水酸化酵素遺伝子に着目し、そのゲノム上での遺伝子の構造について解析した。取得した 20DG 遺伝子の cDNA 配列をもとにゲノム配列のクローニングを行ったところ、It1-1 および It1-2 遺伝子はそれぞれ 89 および 95 bp のイントロンをもつ一方、It1-3 はイントロンを持たない遺伝子であった。

イントロンのサイズや挿入位置はシロイヌナズナ、サツマイモ、ソライロアサガオでほぼ類似していた。このことはクマリン化合物の生合成の進化を考える上で重要である。祖先的植物で獲得された本鍵酵素があると想定できる。ただし It1-3 のみイントロンを持たないことから何らかの形で転写物が再度ゲノム DNA に導入されたのかもしれない。

植物界には桂皮酸骨格のオルト位に水酸基を持つ化合物が存在している。進化的に植物をさかのぼりながら、クマリン化合物生合成鍵酵素の存在の有無を調べることで、クマリン化合物生合成の進化を知ることができると考えられる。

これら取得した配列をソライロアサガオ培養細胞にて 35S CaMV プロモータ制御下で過剰発現させた。



ソライロアサガオにおけるクマリン生合成経路とオルト位水酸化酵素

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0件)

[学会発表](計4件)

1. 田村 駿、島崎 真実、今井 政裕、米山 恵介、岡田 貴博、清水 文一 サクラ周辺環境より単離された *Pseudomonas* sp. のクマリンの代謝 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014/3/29 (明治大学・川崎市)

2. 田村 駿、須永 祐輔、清水 文一 サクラ周辺のクマリン分解微生物の単離・同定とクマリン分解代謝の追跡 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013/3/26 (東北大学・仙台市)

3. 田辺 綾野、清水 文一 クマリン生合成に関わるソライロアサガオの桂皮酸オルト位水酸化酵素遺伝子の機能解析とゲノム配列の解析 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013/3/26 (東北大学・仙台市)

4. 田辺 綾野、清水 文一 ソライロアサガオのクマリン生合成に関わるオルト位水酸化酵素遺伝子のクローニングと機能解析 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012/3/23(京都女子大学・京都市)

〔その他〕

ホームページ等

URL: <http://www2.toyo.ac.jp/~bsimz>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

清水 文一 (Bun-ichi SHIMIZU)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：50324695