

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892013

研究課題名(和文)フェアリー化合物の生合成を司る新規プリン代謝経路の解明

研究課題名(英文)Chemical studies on novel purine metabolic pathway of fairy chemicals

研究代表者

崔 宰燾 (Choi, Jae-Hoon)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：40731633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：コムラサキシメジから単離されたフェアリー化合物であるAHXとICA、AHXの代謝産物であるAOHについて生物における内生を調べた。種子植物15種、藻類3種、担子菌14種、その他の菌1種にAHXとAOHの内生を確認した。ICAに関してはイネに内生が確認された。植物内でフェアリー化合物の代謝産物を単離成功し、構造を決定した。現在、生合成・代謝酵素の同定を試みている。AHXの作物に対する収量増産効果および静止細胞を用い効率的AOH合成法が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Fairy chemicals that cause fairy ring, 2-azahypoxanthine (AHX) and imidazole-4-carboxamide (ICA), were isolated from *Lepista sordida*. In plant, AHX were existed and metabolized to 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH). We examined the endogenous fairy chemicals in microorganisms. AHX and AOH were detected in plants and fungi. The metabolites of fairy chemicals in the plant were isolated, and then determined the structures. Currently, we are trying to identify the biosynthesis and metabolism enzymes. The yield increased production effect on the crop of AHX. An efficient AOH synthesis using resting cells was studied.

研究分野：農学

キーワード：天然物化学 代謝産物 フェアリー化合物

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、本研究に関する最新の成果を発表し、Nature 誌に紹介された(図1)(業績 No. 3, Mitchinson, A., Nature, 505, 298, 2014)。本研究は、そのさらなる展開である。公園などで芝生が輪状に周囲より色濃く繁茂し、後にその輪の上にキノコが発生する現象があり、「フェアリーリング」と呼ばれている。研究代表者らはフェアリーリング形成菌コムラサキシメジから、妖精の正体(シバ成長制御物質) AHX と ICA そして AHX の植物体内での代謝産物 AOH を発見した。その後、これら3化合物(fairy chemicals、FCs と略称)は調べた全ての植物にも内生していることを証明し、その生合成がプリン代謝における新しい経路によることを明らかにした。

2. 研究の目的

植物成長調節物質 AHX、ICA そして AHX の植物体内での代謝産物 AOH が、あらゆる植物にも内生し、植物中の新しいプリン代謝経路で生合成されることを証明した。本研究では、それらのフェアリー化合物の植物・菌類における内生の有無を確認する。また生合成を司る新しいプリン代謝経路の全容解明のため、フェアリー化合物の生合成・代謝酵素の同定や関連化合物を探索する。

3. 研究の方法

(1) フェアリー化合物の植物・菌類における内生の有無の確認

様々なキノコ(子実体)をエタノール及びアセトンで抽出し、減圧濃縮後、得られる抽出物をオービトラップ型質量分析装置で分析する。直接分析するとこれらの物質の含量が少ないことで検出されない可能性があり、化合物濃度を濃くするために抽出物を ODS Sep-pack で溶出後、HPLC で画分し、部分精製物をオービトラップ型質量分析装置で分析した。

(2) フェアリー化合物の代謝産物の探索

2週間生育させたイネに AHX と AOH を処理し、新たな代謝産物を探索したところ、AHX と AOH の処理区では新たな同じ代謝産物が産生されることが明らかになった。これらの処理区のイネの地上部、根から AHX、AOH とそれら以外の物質が検出された。このことから、AHX 処理のイネの栽培をスケールアップし抽出を行い、その抽出物を各種クロマトグラフィによる精製が進行した。代謝産物を単離・精製し質量分析や NMR で構造解析し構造を決定した。ICA はイネに対する生育抑制活性を示すことで、化合物の濃度と培養条件を検討し、AHX と同様の実験を行って ICA の代謝産物の探索を行った。

(3) 植物における生合成経路

以前研究の結果から植物由来の粗酵素液から AICA から AHX への、AHX から AOH への変換活性を指標とし、変換酵素の精製を

試みた。

4. 研究成果

(1) フェアリー化合物の植物や菌類における普遍的存在の証明

AHX と AOH をオービトラップ型質量分析装置での最適な LC-MS/MS 分析条件を確定し、イネとシロイヌナズナ抽出物から AHX と AOH の検出に成功した。その後、様々な生物種の内生を検討し、種子植物15種、藻類3種、担子菌14種、その他の菌1種に AHX と AOH の内生を確認した(表1-1-1, 表1-1-2)。

表1-1-1 植物における存在の確認

サンプル	AHX	AOH	ICA
イネ科			
米(日本晴れ, コシヒカリ; 可食部)	d	d	-
小麦(農林61号; 可食部)	d	d	-
トウモロコシ(ミルフィーユ, 甘々糖; 可食部)	d	nd	-
日本晴れ(地上部)	d	nd	d
日本晴れ(根)	d	d	d
ペントグラス(地上部, 根)	d	d	-
コウライシバ(地上部)	d	nd	-
コウライシバ(根)	d	d	-
サトイモ科			
サトイモ(可食部)	d	d	-
タスギカズラ科			
アスハラガス(可食部)	d	nd	-
種子植物			
フトモモ科			
ユーカリ(<i>Eucalyptus pellita</i> ; 地上部, 根)	d	nd	-
ユーカリ(<i>Eucalyptus camaldulensis</i> ; 地上部, 根)	d	nd	-
ナス科			
トマト(ハウス様式, 籠夏, Endeavour; 地上部)	d	nd	-
トマト(ハウス様式, 籠夏, Endeavour; 根)	d	d	d
ジャガイモ(ダンシャク, メーカーイン可食部)	d	d	-
双子葉			
ウリ科			
キュウリ(地上部, 根)	d	nd	-
ツバキ科			
ツバキ(地上部)	d	d	-
ツバキ(根)	d	nd	-
コマツナ(地上部)	d	nd	-
コマツナ(根)	d	d	d
アブラナ科			
ダイコン(可食部)	d	nd	-
シロイヌナズナ(地上部)	d	nd	nd
シロイヌナズナ(根)	d	d	-
藻類			
クロレラ(<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Parachlorella beyerinckii</i>)	d	d	-
藍藻(<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803)	d	nd	-
ミドリムシ	d	nd	-

d: detected, nd: not detected, -: not tested

表1-1-2 菌におけるAHX及びAOHの内生

サンプル	AHX	AOH
キノコ		
キシメジ科		
コムラサキシメジ	d	nd
ムラサキシメジ	d	d
オシロイシメジ	d	d
キシメジ	d	nd
ハタケシメジ	d	nd
エノキタケ	d	nd
モエギタケ科		
ヌメリシゲタケモドキ	d	nd
クリタケ	d	nd
シメジ科		
ホンシメジ	d	nd
フウセンタケ科		
ショウゲンジ	d	nd
トンビマイタケ科		
マイタケ	d	nd
ヌメリガサ科		
サクランメジ	d	d
マツバハリタケ科		
コウタケ	d	nd
クロカワ	d	d
その他の菌		
<i>Gibberella fujikuroi</i>	d	nd

すべてのサンプルを1 mg/mLなるように調整し、分析した。d: detected, nd: not detected

特に注目すべきは、世界の三大穀物である、トウモロコシ、コムギ、イネ全ての可食部に AHX と AOH が内生していることである。この ICA に関して、その検出法が確立しつつある。この方法を用いて現在、各種サンプルの内生を検討しており、イネ、トマト、コマツナにその内生が確認された。

(2) フェアリー化合物の代謝産物の探索

イネに AHX, AOH, ICA を取り込ませることによって、生成する代謝産物を精製、構造決定を行った。これらはいずれも新規物質あるいは化学合成品としては知られているが天然からは初めて発見された物質であった(図1)。

(3) 植物における生合成経路

AHX, AOH, ICA はいずれも共通の前駆体 AICA から化学合成される。AHX, AOH, ICA の生合成経路も、この化学合成経路と同じである。

いは極めて類似していると仮定した。何故なら、AICAは生物共通のプリン代謝経路上にあり、その後の代謝は不明であったからである。そこで、中課題2で合成された同位体ラベルACIAのイネとシロイヌナズナへの取り込み実験を行い、その仮説を証明した。このことは本研究によって、植物の新しいプリン代謝経路を発見したことを意味する(図2)。現在、変換酵素の同定を試みている。

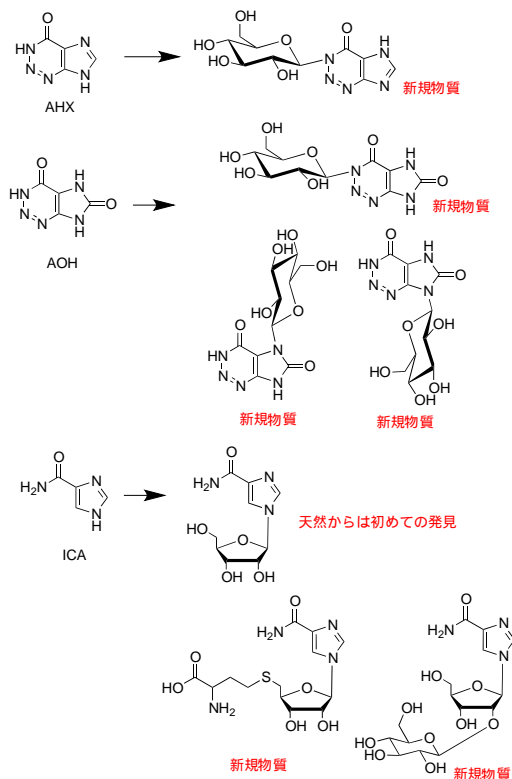


図1. フェアリー化合物の代謝産物

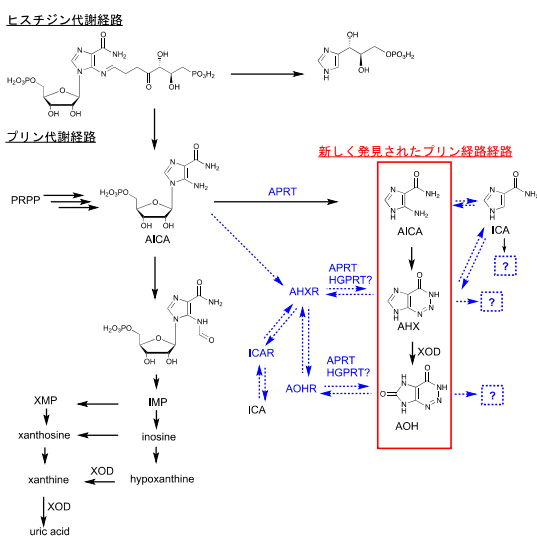


図2 生物に共通なプリン代謝経路と植物中で発見された新経路と新代謝産物 (新経路・代謝産物は赤字四角内、仮説経路・代謝産物は青字点線)

その他、AHXの作物に対する収量増産効果および静止細胞を用いた効率的AOH合成法が明らかになった。

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2件)

Choi, J.-H., Kikuchi, A., Hirai, H., Tokuyama, S., Kawagishi, H., Bioconversion of AHX to AOH by resting cells of *Burkholderia contaminans* CH-1, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 2016, in press.

Asai, T., Choi, J.-H., Ikka, T., Fushimi, K., Abe, N., Tanaka, H., Yamakawa, Y., Kobori, H., Kiriwa, Y., Motohashi, R., Deo, V. P., Asakawa, T., Kan, T., Morita, A. and Kawagishi, H., Effect of 2-azahypoxanthine (AHX) produced by the fairy-ring-forming fungus on the growth and the grain yield of rice, *Jpn. Agric. Res. Quart.*, 査読有, 2015, 49, 45-49.

[学会発表](計13件)

松崎信生、崔宰熏、平井浩文、近藤満、浅川倫宏、稲井誠、菅敏幸、河岸洋和、フェアリー化合物であるICAの代謝に関する化学的研究、日本農芸化学会2016年大会、札幌コンベンションセンター、札幌、2016年3月28日

澤田梓、近藤遼一、崔宰熏、平井浩文、浅川倫宏、稲井誠、菅敏幸、河岸洋和、フェアリー化合物AHXの代謝に関する化学的研究、日本農芸化学会2016年大会、札幌コンベンションセンター、札幌、2016年3月28日

近藤遼一、澤田梓、崔宰熏、平井浩文、浅川倫宏、稲井誠、菅敏幸、河岸洋和、フェアリー化合物AHXとAOHの糖転移酵素の化学的研究、日本農芸化学会2016年大会、札幌コンベンションセンター、札幌、2016年3月28日

杉浦輝、崔宰熏、平井浩文、浅川倫宏、稲井誠、菅敏幸、河岸洋和、イネにおけるフェアリー化合物AOHの生合成経路に関する化学的研究、日本農芸化学会2016年大会、札幌コンベンションセンター、札幌、2016年3月28日

崔宰熏、平井浩文、浅川倫宏、稲井誠、菅敏幸、河岸洋和、フェアリー化合物による新プリン代謝経路に関する化学的研究、日本農芸化学会2016年大会、札幌コンベンションセンター、札幌、2016年3月28日

松崎信生、竹田翔伍、澤田梓、崔宰熏、鈴木智大、平井浩文、近藤満、浅川倫宏、菅敏幸、河岸洋和、フェアリー化合物の代謝産物に関する生物有機化学的研究、第57回天然

有機化合物討論会、神奈川県民ホール、横浜
2015年9月9日

松崎信生、竹田翔伍、澤田梓、崔宰熏、鈴木智大、平井浩文、近藤満、浅川倫宏、菅敏幸、河岸洋和、フェアリー化合物の代謝産物に関する生物有機化学的研究、新規素材探索研究会 第14回セミナー、新横浜フジビューホテル、横浜、2015年6月5日

寺島百合香、圓山和希、崔宰熏、鈴木智大、平井浩文、浅川倫宏、菅敏幸、河岸洋和、コムラサキシメジにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究、日本農芸化学会 2015年大会、岡山大学、岡山、2015年3月27日

伊藤里奈、崔宰熏、鈴木智大、平井浩文、浅川倫宏、菅敏幸、河岸洋和、フェアリーリング惹起物質配糖化酵素の探索、日本農芸化学会 2015年大会、岡山大学、岡山、2015年3月27日

崔宰熏、岩堀倫大、鈴木智大、平井浩文、浅川倫宏、菅敏幸、河岸洋和、イネにおけるフェアリーリング惹起物質の生合成経路に関する化学的研究、日本農芸化学会 2015年大会、岡山大学、岡山、2015年3月27日

松崎信生、崔宰熏、平井浩文、近藤満、浅川倫宏、菅敏幸、鈴木智大、河岸洋和、フェアリーリング惹起物質の代謝産物に関する生物有機化学的研究、日本農芸化学会 2015年大会、岡山大学、岡山、2015年3月27日

澤田梓、崔宰熏、鈴木智大、平井浩文、河岸洋和、フェアリーリング惹起物質の代謝に関する生物有機化学的研究、日本農芸化学会 2015年大会、岡山大学、岡山、2015年3月27日

菊池礼花、崔宰熏、河岸洋和、徳山真治、生体触媒を用いたAOHの合成、日本農芸化学会 2015年大会、岡山大学、岡山、2015年3月27日

〔その他〕

ホームページ等

http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/achievement_choi.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崔 宰熏 (CHOI, Jae-Hoon)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：40731633