

令和元年6月13日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04951

研究課題名(和文) アクチノリザル共生シグナル物質である環状ジアリールヘプタノイドの生合成と作用機作

研究課題名(英文) Biosynthesis and their mechanism of cyclic diarylheptanoids acting as signal compounds for actinorhizal symbiosis

研究代表者

河合 真吾 (Kawai, Shingo)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：70192549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：アクチノリザル樹木は、環状ジアリールヘプタノイド(CDHs)を特異的に生合成し、放線菌フランキアとの共生シグナル物質として利用し、フランキアから窒素源を獲得する。本研究では、オオバヤシャブシのCDHの生合成に関わる酵素遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。まず縮合酵素に関しては、1種のポリケチドシンターゼ候補遺伝子を特定したものの、発現酵素は二段階の縮合を触媒できなかった。そこで、中間体であるジケチドCoAの類縁体を合成し基質としたが反応は進行しなかった。一方、p-クマル酸二重結合還元酵素については、2つの候補遺伝子を特定し、異種タンパク質発現したが、この酵素は基質側鎖を還元できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とした環状ジアリールヘプタノイドは、窒素固定能を有する放線菌フランキアと根粒共生し、成長の早いアクチノリザル樹木に特異的に存在し、シグナル物質として機能する。したがって、この化合物の生合成機構と共生機構の解明は、森林の窒素循環に大きく関わり、二酸化炭素削減により地球温暖化を防止し地球を再生するための、樹木の光合成および生長に極めて大きい影響を与える窒素源の獲得に結びつく。また、健全な森林維持はもとより木質系バイオマスの持続的・循環的利用や、早生樹の作出など木質バイオマスの増産に結びつく極めて重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：The actinorhizal tree specifically biosynthesizes cyclic diarylheptanoids (CDHs) and utilizes them as symbiotic signaling agents with actinomycete Frankia to acquire a nitrogen source from Frankia. In this study, transcriptome analysis of enzyme genes involved in the biosynthesis of *Alnus sioboldiana* CDH was performed. As for the condensation enzyme, one polyketide synthase candidate gene was identified, but the expressed enzyme failed to catalyze the two-step condensation. Then, an intermediate of diketide CoA analogue was synthesized and used as a substrate, but the reaction did not proceed. On the other hand, for p-coumarate double bond reductase, two candidate genes were identified and heterologous proteins were expressed, but this enzyme could not reduce the substrate side chain.

研究分野：森林生物化学

キーワード：環状ジアリールヘプタノイド フランキア アクチノリザル共生 生合成酵素遺伝子 ポリケチド合成酵素 二重結合還元酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19(共通)

1. 研究開始当初の背景

カバノキ科オオバヤシャブシ (*Alnus sieboldiana*) などのアクチノリザル樹木は土壌放線菌で窒素固定能を有するフランキアと根粒共生する。このアクチノリザル共生によって、これら樹木は窒素源を確保でき、やせ地にいち早く侵入・生長できる。アクチノリザル共生のメカニズムに関して、化学生物学的見地からの詳細な研究は殆どない。研究代表者らは、オオバヤシャブシ抽出物の本共生系への影響を検討し、フランキア共存下での根部抽出物添加がオオバヤシャブシ実生の生長を促進すること(図 1, c)を明らかにした。さらに、環状ジアリールヘプタノイド (Cyclic diarylheptanoid, CDH) が、これらアクチノリザル樹木に限定的に分布していることから、オオバヤシャブシ抽出成分より単離した3種のCDH(Chibaら, *J. Wood Chem. Technol.*, **33**, 44, 2013)が、この生長促進に関与している可能性を検討したところ、CDHの添加による根粒形成ならびに生長促進(図 1, d)が確認され、更に根部抽出成分中に CDH が存在することを確認した。これら結果は、CDHの分泌が、フランキアの根粒形成や実生の生長に影響を与えることが推定された。

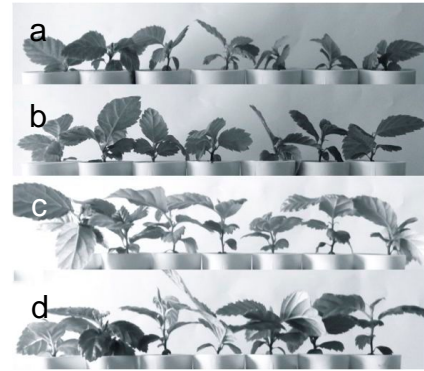


図1 実生成長に及ぼす抽出成分の影響

- a: コントロール (-フランキア)
- b: +フランキア
- c: +フランキア + 根部抽出物
- d: +フランキア + ジアリールヘプタノイド

2. 研究の目的

本研究では、CDHの生合成経路について検討する目的で、次世代シーケンス解析等を用いた酵素遺伝子を特定するとともに、その反応を解析することを目的とした。図2にCDHの推定生合成機構を示した。本生合成の主な反応は、ヒドロキシケイ皮酸類側鎖二重結合の還元(反応1)とCoAエステル化(反応2)、対応するCoAエステル2分子とマロニルCoAによるジアリールヘプタノイド骨格の形成(反応3-1,3-2)、芳香環同士の酸化的なカップリング(反応4)の4つの反応である。いずれの酵素反応もCDH生合成の鍵となる酵素で、未解明なものであり、シグナル物質による共生機作を解明するため重要で、解明しなければならない課題である。特に環化反応が、共生に必須なのかどうかはまだ明らかではないが、カバノキ科の中でも根粒共生を行わないシラカンバなどのカバノキ属のジアリールヘプタノイドが直鎖型構造であることは興味深い。

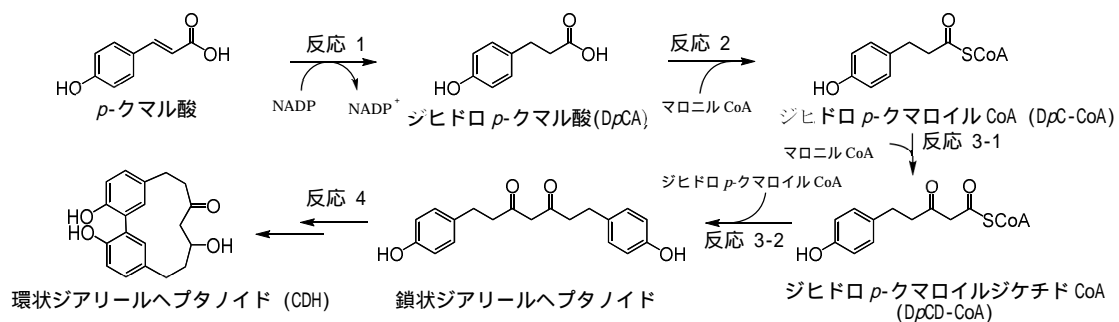


図2 環状ジアリールヘプタノイドの推定生合成機構

3. 研究の方法

a. ジアリールヘプタノイド骨格への縮合酵素遺伝子の特定とその反応機構

本酵素は植物型ポリケチドシンターゼスーパーファミリー (PKS-) に属するとされておりジアリールヘプタノイド骨格形成の鍵となる酵素である。オオバヤシャブシ遺伝子のトランスクリプトーム解析によって決定したPKS- 遺伝子(AsPKS-1)を異種タンパク質発現するとともに特性解明を行った。また、Hi-seqを用いた次世代シーケンス解析を行い、PKS-の検索を行った。

一方、本反応の中間体と予想されるジヒドロ-p-クマロイルジケチド CoA(DpCD-CoA)の類縁体で酵素基質になりうるN-アセチルシステアミンのチオエステル(SNAC)体DpDC-SNACを有機合成によって調製し、酵素反応を行った。

b. p-ヒドロキシ桂皮酸誘導体の側鎖二重結合の還元酵素遺伝子の特定

本反応は、ヤマモモへのフィーディング実験(Kawaiら, *J. Wood Sci.*, **56**, 148, 2010)によって、CHSによる縮合に先立って側鎖の還元が起こることが証明されている。そこで、本還元酵素遺伝子を、オオバヤシャブシの次世代シーケンスデータを元に検索し、得られた全長遺伝子配列の異種タンパク質発現を行った。またNADPH存在下でのp-クマル酸に対する酵素反応を行った。

c. ジアリールヘプタノイドの2つの芳香環の炭素-炭素縮合反応機構の解析

本反応は、ラジカルを経由するカップリング反応が推測されるが、リグニンのようなフェノールオキシダーゼによる単純なラジカルカップリングなのか、アルカロイドで証明されたような P450 型の酸化的カップリングなのかは植物化学的にも関心が高く、まず直鎖型のジアリールヘプタノイドを有機化学的に合成し、市販のペルオキシダーゼ/過酸化水素で、位置選択的にラジカルカップリングが進行するかどうか確認した。

4. 研究成果

a. ジアリールヘプタノイド骨格への縮合酵素遺伝子の特定とその反応機構

トランスクリプトーム解析によって、PKS に保存されている触媒 3 残基等の配列を保持しているオオバヤシャブシ PKS 遺伝子を取得した。これを大腸菌発現系で異種タンパク質発現し、オオバヤシャブシ PKS と予想する酵素 AsPKS -1 を単離した。この AsPKS -1 を用いて DpC-CoA とマロニル-CoA の縮合反応を試み、HPLC により分析したところ、目的とするジアリールヘプタノイド骨格は形成されず、DpC-CoA とマロニル-CoA 2 分子が縮合したポリケチドピロンのみを生成することが明らかとなった。本縮合反応は 2 段階で進行することが予想され、本酵素が 2 段階目の反応を触媒する可能性も考えられた。そこで、ジヒドロ-*p*-クマル酸を出発物質とし、6 工程を経て、目的の中間体で有機合成が極めて困難である DpCDC-CoA の類縁体である DpDC-SNAC を総収率 22% で有機合成した。さらに、DpDC-SNAC と DpC-CoA を基質として AsPKS -1 による縮合反応を試みたが、目的物であるジアリールヘプタノイドを得るには至らなかった。

一方、前回のシーケンス解析ではオオバヤシャブシから 3 種の PKS しか取得できなかったため、別種の PKS を検索するため、最新の機器である HiSeq を用いて 100 倍の感度で詳細なトランスクリプトーム解析を試みた。しかしながら、すでにクローン化が終了した 3 種の遺伝子以外には PKS 遺伝子の存在は認められなかった。

b. *p*-ヒドロキシ桂皮酸誘導体の側鎖二重結合の還元酵素遺伝子の特定

今回得られた HiSeq のシーケンスデータから、*p*-ヒドロキシ桂皮酸誘導体の側鎖二重結合の還元酵素と予想される 2 種の候補遺伝子が検出できた。これら遺伝子は常法に従って全長遺伝子のクローニングと異種タンパク質発現を行った。しかしながら、取得した酵素は、NADPH 存在下で *p*-クマル酸の側鎖を還元できず、反応条件の再検討、あるいは、クマル酸の CoA エステル化の後に還元反応が起きるなどの可能性が考えられた。今後、CoA リガーゼ遺伝子の単離・発現と反応解析も含め検討する必要があると考察した。

c. ジアリールヘプタノイドの2つの芳香環の炭素-炭素縮合反応機構の解析

芳香環同士の分子内カップリング反応については、有機合成した鎖状ジアリールヘプタノイドを、過酸化水素存在下で、市販のペルオキシダーゼによるラジカルカップリング反応の可能性を試みた。しかしながら、環化生成物は得られず、単純なカップリング反応ではないことが予想された。別の可能性として、アルカロイドなどで提案されている P450 型の酸化酵素による位置選択的な酸化カップリングが考えられたため、今回得られたシーケンスデータから P450 型と予想される遺伝子断片の検索を行った。その結果、多数の P450 型遺伝子候補が検出できたため、今後アルカロイドでの酸化酵素などを鋳型にマイニングが必要であると結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Takashi Yamanaka, Hiroaki Okabe, Shingo Kawai, Growth and nodulation in *Alnus sieboldiana* in response to Frankia inoculation and nitrogen treatments, *Tree* (2016) 30, 539-544, 査読有, DOI 10.1007/s00468-015-1246-8

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 林大地、米田夕子、河合真吾、オオバヤシャブシと放線菌フランキアの共生に関する菌体からの根毛変形因子の検索 (II)、第 69 回日本木材学会大会、2019 年 3 月 (函館市)
2. 見小田裕一、竹本幸之介、米田夕子、河合真吾、オオバヤシャブシと放線菌フランキアの共生に関する抽出成分の検索 (V)、第 69 回日本木材学会大会、2019 年 3 月 (函館市)
3. 神田佳一郎、藤本瑛代、米田夕子、河合真吾、天然型ラッカーゼメディエーターとして単離された *p*-ヒドロキシ安息香酸の役割、第 69 回日本木材学会大会、2019 年 3 月 (函館市)
4. Shingo Kawai, Akiho Sakurada, Daichi Hayashi, Takahiro Kaneko, Yuko Yoneda, Takashi Yamanaka, Cyclic diarylheptanoids act as signal compounds involved in symbiosis of nitrogen-fixing actinomycetes *Frankia* and *Alnus sieboldiana*, Mariano Marcos State University-Shizuoka University MOU Signing & Seminar-Workshop, 2018 年 11 月, Mariano Marcos State University, Batac, Philippines
5. 林大地、米田夕子、河合真吾、オオバヤシャブシと放線菌フランキアの共生に関する菌体からの根毛変形因子の検索、第 68 回日本木材学会大会、2018 年 3 月 (京都市)
6. 櫻田明穂、桑原遼太郎、米田夕子、河合真吾、山中高史、オオバヤシャブシと放線菌フランキアの共生に関する抽出成分の検索 (III)、第 67 回日本木材学会大会 2017 年 3 月 (福岡市)

7. 望月祥統、松永幸、米田夕子、河合真吾、西田友昭、腐朽木材からの天然型ラッカーゼメディエーターの検索，第67回日本木材学会大会，2017年3月（福岡市）
8. Shingo Kawai, Akiho Sakurada, Takahiro Kaneko, Yuko Yoneda, Takashi Yamanaka, Cyclic Diarylheptanoids act as signal compounds involved in nitrogen-fixing actinomycetes *Frankia* and *Alnus sieboldiana*, The 3rd International Workshop 2016 - Recent microbiological Research for food, energy and health-, 2016年11月, Kasesart University, Bangkok, Thailand

〔図書〕（計1件）

1. 河合真吾、植物細胞壁実験法（第7章 細胞壁の生合成と分解 7.3 リグニン生合成と生分解 7.3.1 リグニン生分解），弘前大学出版，pp. 348-355，2016年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/f/mokubake/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：米田夕子

ローマ字氏名：YONEDA Yuko

所属研究機関名：静岡大学

部局名：農学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90638595

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。