

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580191

研究課題名（和文） 樹木抽出成分のコントロールに向けたテルペノイド生合成関連遺伝子・酵素の解析

研究課題名（英文） Analysis of terpenoid biosynthesis-related enzyme and gene for control of wood extractives

研究代表者

藤田 弘毅 (Koki Fujita)

九州大学大学院農学研究院 助教

研究者番号：90264100

研究成果の概要（和文）：

Cupressus lusitanica 培養細胞におけるテルペノイドの合成を制御し、有用な物質や改変樹種をえるために必要な遺伝子や酵素の詳細を調べた。mRNA 発現パターンの違いから、テルペノイドを生産する MEP 経路の出発物質に深く関わる物である事から、この遺伝子の改変によって、テルペン生産能をコントロールできる可能性が示された。細胞由来粗酵素液での反応についても直接検討した。細胞中のテルピノレンは粗酵素反応で水酸化、エポキシ化された。この反応は基質特異性と生産物のレギオ・立体特異性が極めて高いという興味深い結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

In order to understand the system and control method for terpenoid metabolism in *Cupressu lusitanica* cultured cell as a model of woody plant cell, mRNA and enzyme assay were performed. Membrane array method to analyze mRNA activation showed 22 clones were probably for attacking fungi and 1 clone, enolase, would be involved in the supply of isoprenoid precursor with MEP pathway.

Crude P450 enzymes obtained from *C. lusitanica* cell would be involved in terpene oxidation were also characterized. Major stream of terpene oxidation was initiated from terpinolene and have typical oxidation steps, hydroxylation and epoxidation. Interestingly, these reactions were very strictly stereoselective(e.e=ca.100%).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2000000	600000	2600000
2008 年度	800000	240000	1040000
2009 年度	700000	210000	910000
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：バイオマス、発現制御、二次代謝、テルペン、植物、ヒノキチオール、P450

1. 研究開始当初の背景

抽出成分は樹木それぞれの種において特徴的な種類と組成を持っている。種による材質(物性)の違いとともに、抽出成分の組成はそれぞれの木材に特徴を与える要因の一つとなっている。一部においては抽出成分が物性に与える影響についても検討されているが、樹木抽出成分の一般的な役割は多くの場合、その抗菌性・抗蟻性・殺虫性など、樹木が外部から攻撃されたときに保護する機能である。基本的には死んだ組織である心材には特に防御成分が必要であり、心材化と抽出成分生成の関係は樹木生化学として興味を持たれるところである。

樹木の抽出成分研究においては、それぞれの種に含まれる成分の構造・組成など植物天然物化学としての知見の蓄積は既に膨大に存在している。しかしながら、抽出成分の生合成に関する研究は日が浅く、天然物化学と比しては十分とはいえない。また、酵素や遺伝子の視点から見た場合、代謝中間体は存在量が少なかったり、不安定な物質である可能性が高いが、過去の分析設備では微量であったり不安定で短命な物質は検出できなかった可能性もある。今までの成分研究から代謝を予測・検討することは必ずしも正しい結果を示すとは限らない。

今までの木材の利用では、材に固有に含まれる成分とその性質から「適材適所」との言葉通り用途に合わせて樹種を選び用いられてきた。物理的性質が適切であっても、腐りやすいか否か、変色しやすいか否かなどでさらに適正を検討されなければならない、そしてその根拠として上述の旧来の天然物化学研究からよく知られている抽出成分の性質で説明されてきた。

しかし、将来においてさらに効率的な材の生産/利用を考えるならば、生育/物性/成分すべての条件を満たす木材に対する要求が生まれてくると思われる。すなわち、成長が早く物性に優れた樹木の開発はもちろんのこと、適切に抽出成分を含む樹木(木材)の開発も必要な課題である。

2. 研究の目的

抽出成分の中で、ヒノキチオールは従来より抗菌性の高い有用な成分として知られ、商業的利用が進められてきた。しかし、その存在は一部のヒノキ科植物に限られ、生産性に問題があった。申請者らのグループは、そのヒノキチオールがメキシコイトスギ (*Cupressus lusitanica*) 培養細胞において生産されることを示し、培養細胞が研究対象として優れて便利なことから、本培養系におけるヒノキチオール生合成に関する研究を行ってきた。その結果、ヒノキチオールがゲラニルニリン酸 (GPP) を中間体とするモノテルペンの一種であること、また、このGPP供給は非メバロン酸経路によるものであることを示し、ヒノキチオールの特異な7員環構造は環状モノテルペンではよく知られているlimonene型の炭素骨格を持つ中間体を経ていることを予想した。さらに、この細胞中のテルペンシンターゼ類の活性測定をしたところ、テルピノレンシンターゼが活性のほとんどを占めたにも関わらず、細胞の生産するテルペン類の構造と含量は、テルピノレン量が少なく、またテルピノレンが Cytochrome P450 oxidoreductase 類によって酸化されたと考えられる構造を持つテルペン類が多く見られた。他の動植物に於いても炭化水素モノテルペンが Cytochrome P450 型酵素によって修飾を受ける報告は既にいくつか見られる。これらのことから、この細胞においてはGPPからテルピノレン、そして各種酸化型モノテルペンの順で変換していることが強く示唆され、ヒノキチオールに於いてもその可能性が高いことを示してきた。言い換えれば、細胞内のテルペノイド代謝は、極めて多種多様な酵素・遺伝子が複雑に絡み合ったマトリクスであり(次ページScheme 1)、ヒノキチオールのような最終代謝物の生合成を理解するためには、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームのような網羅的手法を適用する必要があると考えた。

遺伝子改変を人工的に導入する例（例えば、Mahmoud et al, PHYTOCHEM, 65, 547-554 (2004)）では、多くの場合想定通りの成分変化を示すことは少ない。一部分の酵素・遺伝子だけでなく、入り口から出口（出発物質から最終生成物）までの統合的な解析結果無くしては、一個体の抽出成分を安定的に改変することは難しいと思われる。

多様性に富むテルペノイドについて、*C. lusitanica* 培養細胞をモデルに、テルペン生産に関与する遺伝子・酵素を網羅的に明らかにする。特にその抗菌性など有用成分として知られるヒノキチオール生産機構の解明につなげる。

これらの知見から、樹木抽出成分のコントロールについて提言する。

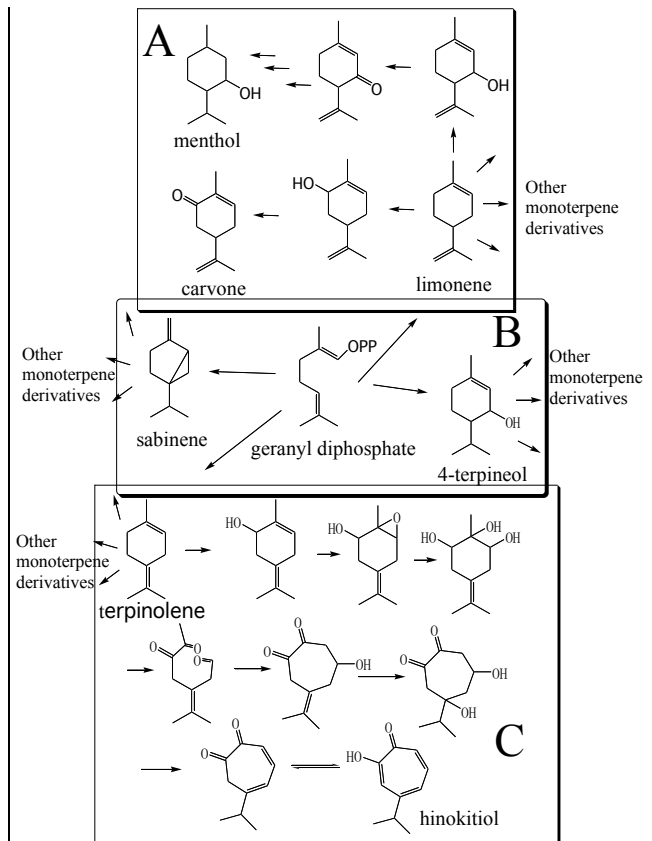
3. 研究の方法

テルペノイドは、既知のメバロン酸経路またはMEP経路を通してゲラニルニリン酸／ファルネシルニリン酸／ゲラニルゲラニルニリン酸などの中間代謝物となり、これらがいわゆるテルペンシターゼによって炭化水素型のテルペンへ変換される。このステップを超えると、カロテンや植物ホルモンなど他のイソプレノイドには変換されない。その後、基本的な骨格を持った炭化水素テルペンは、P450を主とする各種酵素によって多種多様な最終生成物へと代謝されていく (Scheme 1)。

申請者らが持つ*C. lusitanica*培養細胞は特定の培養条件でのみテルペン（ヒノキチオール）を生産することから、テルペン生産時のmRNAから非生産時のmRNAを差し引くことにより、直接にヒノキチオール生産関連遺伝子を検出することが可能である。

研究試料は*Cupressu lusitanica*培養細胞を用いる。この細胞は、特定の培養条件でのみテルペン（ヒノキチオール）を生産することから、P450遺伝子に特徴的な配列を持ち且つこの培養条件でのみ観察されるmRNAを今回のターゲット候補として選抜し、これより得られる酵素とテルペン代謝の関連を証明する。その後、他の遺伝子データベースと比較し、配列の特徴と実際の機能の関連づけを試みる。

cDNAライブラリーの調製のため、培養0, 1, 2, 3日目のmRNAをそれぞれ採取し、これらの混合物からライブラリーを作成する。最終産物であるヒノキチオールの蓄積は3日目までに終わるので、0~3日の試料でエリシターにより発現量が変化するmR



Scheme 1 主なテルペン代謝概略

NAがすべて検出可能になる。ライブラリーをin vivo excisionによりプラスミドとし、それを含むシングルコロニーとして96穴ウェルプレートでそれぞれのクローンを培養する。培養液をプレートとしてPCRでインサート部分を増幅し、アンプリコンをメンブランにプロットする。改めて各培養日数のmRNAを³²Pとともに逆転写し、それぞれをプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、エリシテーションにより放射活性が増加するスポットに相当するクローンを以降のターゲットとする。このプラスミドのインサート部分を一部分シーケンスし、データベースに対してBLAST検索を行う。該当すると思われるクローンを選抜し、これについてはインサート全長の配列決定を行う。アレイで検出したときの消長のプロファイルを根拠に、解析するクローンの優先順位を決定する。5'末が欠けている場合は5' RACE法を行い、欠けている部分を補充する。

また、ヒノキチオール生合成条件下にある細胞を用い、そのテルペン生成の消長を網羅的に解析する。細胞中、培地中の分析は過去に行っているため、今回は特に直接気相に発散されるテルペノイドについても検

討する。同時に、ミクロソーム画分を粗酵素溶液として、粗酵素反応によって、予想されるヒノキチオール代謝経路であるテルピノレンを出発物質とする一連の反応のキャラクタリゼーションを行う。

4. 研究成果

(1) *Cupressus lusitanica* 培養細胞において、ヒノキチオール生産条件酵母抽出物添加改変 B 5 培地で培養した細胞と、コントロールとして刺激を加えなかった細胞の mRNA 発現パターンの違いを、メンブランアレイ法を用いて解析した。複数日の mRNA を混合し、それをサンプル側のプローブとした。その結果、発現量の著しく増加したクローンが 46 クローン確認でき、さらに機能推定できたものが 35 クローンあった。機能推定できたもののうち、菌を攻撃する役割を持つグルカナナーゼ、ソーマチン、キチナーゼに相同性を持つものが 22 クローンあった。また、オキシダーゼに相同性を持つものが 3 クローン、エノラーゼに相同性を持つものが 1 クローンあった。その他、役割が不明のものが 9 クローンあった。エノラーゼは MEP 経路の出発物質である GAP やピルビン酸の生合成に深く関わる物であることから、MEP 経路関連遺伝子・酵素の改変によって、テルペン生産能を改変できる可能性が示された。テルペンシンターゼに関して情報が得られなかったが、発現量の変化が小さい物は解析の対象にしていなかったため、そのグループに含まれたのかもしれない。あるいは、エリシター添加からテルペン生産迄の時間が短いことから、転写後の制御によって迅速に生産モードに変化する可能性も考えられる。

(2) オキシダーゼに関するクローンは、モノテルペンの酸化により最終生成物へ向かう代謝を行っていると考えられる。主に P 4 5 0 とされるこれらに関しては、細胞由来粗酵素液での反応について検討した。細胞中に産するテルピノレンは粗酵素反応で水酸化、エポキシ化された (Fig. 1)。この反応は基質特異性と生産物のレギオ・立体特異性が極めて高いという興味深い結果が得られた。これらの酵素は生成物の制御を厳しく求められる製薬等ファインケミカル生産への応用が期待できる。

(3) また、*Cupressus lusitanica* 培養細胞でのテルペノイド代謝の詳細を明らかにすることも行った。この目的のために、細胞内あるいは培地中のテルペノイドのみならず、大気中へ気散するテルペノイドも

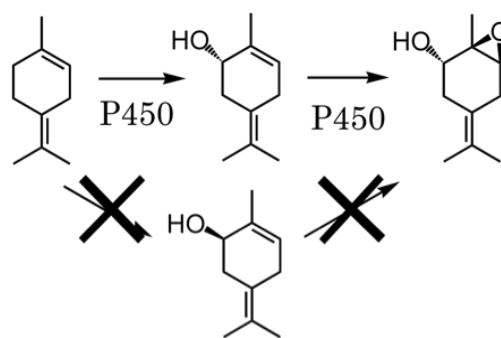


Fig. 1 ミクロソーム画分を使ったテルピノレンの酸化

特定の立体配置のみ受け付け、特定の立体配置の生成物のみ生成する

含めて定性・定量的分析を行った。この時、空気中のテルペノイドは SPME+GCMS (もしくは GCFID) で行った。空気中に揮発するテルペノイドは通常培養条件では存在せず、酵母抽出物エリシターの添加によって初めてヒノキチオール等と共に生産がみられた (fig. 2)。また、培養系内に機械的刺激を与える実験を行ったところ、機械刺激のみではテルペノイドは大気中へ放出されるもののみ検出され、ヒノキチオールへ続くと思われる代謝系は働いていないことがわかった。エリシターは樹木に菌が侵入した場合を、機械的刺激は樹木に傷がつくなどの場合をミミックしていると

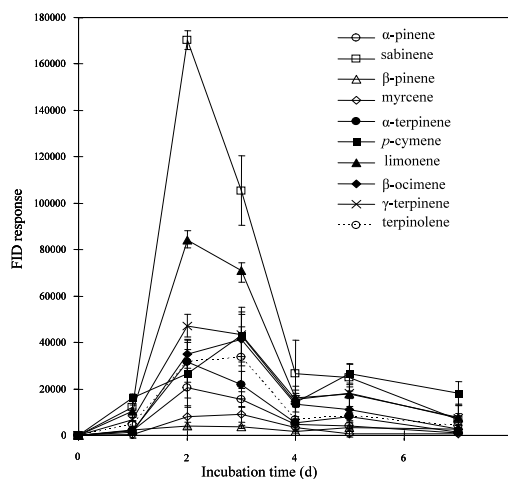


Fig. 2 エリシター添加細胞による気相中へのテルペンの発散

これらの成分は細胞中では検出されず、特定の生理学的意味を持って生成・発散されていると思われる。

考える。菌の侵入には効果的なファイトアレキシン（すなわちヒノキチオールなど）を生産し撃退する必要があるが、傷が付くだけの場合、まだ菌の侵入は検出していないが外部からの将来の侵入が予想される状況である。この将来の侵入を防ぐために揮発性の物質で防御していることが考えられる。あるいはシグナル伝達物質として周囲の組織などに警戒を促す作用がある揮発性テルペノイドを生産していると解釈もできる。つまり、この細胞系においては、天然の樹木における防御反応をよってこの細胞系がテルペノイドの代謝を検討する上で重要なモデル系になることが示された。

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7件)

1. Ransika De Alwis, Koki Fujita, Tatsuya Ashitani, Ken'ichi Kuroda, Volatile and non-volatile monoterpenes produced by elicitor-stimulated *Cupressus lusitanica* cultured cells, *Journal of Plant Physiology*, 166, 720-728, 2009. (査読有り)
2. Ransika De Alwis, Koki Fujita, Tatsuya Ashitani, Ken'ichi Kuroda, Induced monoterpene and lignin production in mechanically stressed and fungal elicited cultured *Cupressus lusitanica* cells, *Plant Biotechnol Rep*, 3, 57-65, 2009. (査読有り)
3. Zhao J, Fujita K, Sakai K, Reactive oxygen species, nitric oxide, and their interactions play different roles in *Cupressus lusitanica* cell death and phytoalexin biosynthesis, *NEW PHYTOLOGIST*, 175 (2): 215-229 2007. (査読有り)

[学会発表] (計17件)

1. 八木 達也、Ransika De Alwis、藤田弘毅、黒田健一、*Cupressus lusitanica* 培養細胞におけるモノテルペンのシグナル効果, 第60回日本木材学会大会 (宮崎), 2010.
2. 原田貴子、藤田弘毅、黒田健一、芦谷竜矢、*Cupressus lusitanica* 培養細胞におけるモノテルペンの酸化的代謝の立体制

御 (3), 第60回日本木材学会大会 (宮崎), 2010.

3. 原田 貴子, 藤田弘毅, 黒田健一, *Cupressus lusitanica* 細胞内におけるモノテルペンの酸化的代謝の立体制御 (2), 日本木材学会第16回九州支部大会 (沖縄), 2009.

4. Takako Harada, Ryoko Sakamoto, Eriko Harada, Koki Fujita, Stereoselective oxidations of terpinolene in *Cupressus lusitanica* culture cells, *Terpnet* 2009.

5. 原田 貴子、坂本 怜子、藤田弘毅、黒田健一, *Cupressus lusitanica* 細胞内におけるモノテルペンの酸化的代謝の立体制御, 第59回日本木材学会大会 (松本), 2009.

6. De Alwis Ransika, Fujita Koki, Kuroda Ken-ichi, Ashitani Tatsuya, activity of emitted monoterpenes from stressed *Cupressus lusitanica* cells, 第59回日本木材学会大会 (松本), 2009.

7. 田中 奏, 藤田弘毅, 黒田健一, 堤祐司, 近藤隆一郎, レーザーマイクロダイセクションによる木化段階別リグニン生合成遺伝子の転写解析と化学分析, 第59回日本木材学会大会 (松本), 2009.

8. Ransika De Alwis, 藤田弘毅, 黒田健一, 芦谷竜也, Induced isoprenoid biosynthesis in response to mechanical stress in cultured *Cupressus lusitanica* cells, 第58回日本木材学会大会 (つくば), 2008.

9. 田中 奏, 藤田弘毅, 黒田健一, 堤祐司, 近藤隆一郎, レーザーマイクロダイセクションによる微量組織でのリグニン生合成遺伝子転写解析およびリグニン分析, 第58回日本木材学会大会 (つくば), 2008

10. Ransika de Alwis, 藤田弘毅、芦谷竜矢、黒田健一, Monoterpene emission from *Cupressus lusitanica* cell culture with fungal elicitor, 第14回日本木材学会九州支部大会 (久留米), 2007.

11. 中西健介, 藤田弘毅, 須原弘登, 黒田健一, *Cupressus lusitanica* テルペンシンターゼ cDNAのクローニングIV, 第57回日本木材学会大会 (広島), 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 弘毅 (Koki Fujita)

九州大学大学院農学研究院 助教

研究者番号: 90264100

(2)研究分担者

堤 祐司 (Yuji Tsutsumi)
九州大学大学院農学研究院 准教授
研究者番号：30236921

黒田 健一 (Ken' ichi Kuroda)
九州大学大学院農学研究院 教授
研究者番号：80015908

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：