

機関番号：13801
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21880021
 研究課題名（和文） 樹木の防御機構におけるイリドイド配糖体の防御分子機構と生合成酵素の機能解析
 研究課題名（英文） Functional characterization of iridoid glycoside and biosynthetic enzymes in plant chemical defense
 研究代表者
 大西 利幸 (OHNISHI TOSHIYUKI)
 静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成拠点・特任助教（テニュアトラック）
 研究者番号：60542165

研究成果の概要（和文）：本研究ではイリドイド化合物の一つであるオレウロペインを化学防御物質前駆体と考え、環境ストレスに対する樹木の化学防御機構の解明を目的として防御活性化酵素の機能解析を行った。その結果、オリーブ実からオレウロペイン糖加水分解酵素（ β -グルコシダーゼ）の精製し、そのペプチド配列から設計したジェネレートプライマーを用いて、オリーブから全長 cDNA 配列の取得に成功した。

研究成果の概要（英文）：Oleuropein, a secoiridoid glycoside, found in several Oleaceae species such as the olive tree and privet tree. The activated iridoid glycoside has adverse effects against herbivores by decreasing the nutritive value of plant protein. Nevertheless the activation pathway has not been clearly proven yet. To investigate the physiological function of iridoid glycoside in chemical defense, we purified a β -GH from olive fruit and characterized the enzymatic activity of an olive β -GH and cloning the cDNA of olive β -GH

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,110,000 | 333,000 | 1,443,000 |
| 2010年度 | 1,010,000 | 303,000 | 1,313,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,120,000 | 636,000 | 2,756,000 |

研究代表者の専門分野：農学

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：植物，酵素，昆虫，農林水産物，生理活性

1. 研究開始当初の背景

昆虫の食害などに対する樹木の防御機構の一つとして化学防御物質を生合成することが知られており、その最終ステップである防御活性化反応を酸化酵素であるシトクロム P450 酵素や糖加水分解酵素 β -グルコシダーゼが触媒することが知られている。樹木、特にモクセイ科植物に含まれるイリドイド配糖体オレウロペインは糖加水分解および酸

化反応により活性化され、グルタルアルデヒド様構造を有するタンパク質変性物質（防御活性化物質）へと変換され、植物中のタンパク質と高分子架橋変性体を形成することが提唱されている（Konno, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9159 (1999)）。しかし、科学的普遍性は十分に証明されていない。最大の理由は、①グルタルアルデヒド様構造を有する防御活性化物質や高分子架

橋変性体の構造解析や化学的な機能解析がなされておらず、②またその生合成経路および酵素が未だ同定されていないためである。樹木におけるオレウロペインの化学防御機構における役割をより一層明確にするには、これらの課題を生物有機化学的、生化学的、分子生物学的の多角的なアプローチを用いて解決することが必須である。

2. 研究の目的

本研究は、「環境ストレスに対する樹木の化学防御機構の解明」というテーマで、環境ストレス（植食性昆虫、病原菌、温度、乾燥など）に対する樹木の化学防御物質の作用機構の理解、またその分子基盤に基づいた生体機能分子を「化学」的視点から究明することを目的とした。具体的には、オリーブに多く含まれるイリドイド配糖体オレウロペインに注目して、①樹木におけるオレウロペインの防御活性化機構を分子レベルで解明すること、②防御活性化物質および高分子架橋変性物質の構造解析をすること、③環境ストレスに対するオレウロペイン内生量変動および防御活性化酵素・遺伝子の発現解析をすることで、環境ストレスに対する樹木の化学的防御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 防御活性化酵素の機能解析

シロイヌナズナやイネなど植物ゲノム情報が容易に入手できるモデル植物の研究領域において、ゲノム情報から酵素機能を解析する手法が主流である。しかし、ゲノム情報が未解読である植物種、特に草本植物に比べゲノムサイズが大きいと予想されている樹木では、高度に重複した遺伝子群が発現しており、クローニングした遺伝子の塩基配列情報や単純な発現解析からだけでは、遺伝子の意味を絞り込みその酵素機能を決定することは困難である。つまり「遺伝子」からの研究アプローチに加え、酵素学的手法が必須である。そこで我々は、イリドイド配糖体オレウロペインの防御活性化機構の鍵酵素である β -グルコシダーゼ (β -GH) をオリーブから直接抽出・精製を行い、その酵素学的機能を詳細に解析した。精製したオレウロペイン活性化酵素 (β -GH) のアミノ酸配列を決定するために、精製タンパク質を Blue Native PAGE に分離し、得られたスポットを断片化して LC-MS/MS により分析して部分アミノ酸配列を同定した。

(2) 次世代シーケンサーを用いたオリーブ EST ライブラリーの構築

樹木に限らず、植物の防御機構の解明とその制御、さらに応用へ展開していくためには、包括的な解析、つまりメタボローム、トランスクリプトーム、プロテオーム解析が極めて重要である。しかし、国家プロジェクト規模に相当するゲノムプロジェクトを立ち上げることは、一研究者には非常に困難である。しかし、近年、次世代シーケンサーの登場により、全塩基配列解析を目指したゲノムプロジェクトにかかる時間や費用は大幅に軽減されたが、研究者個人で取り組むにはまだ経済的負担が大きい。特にゲノムサイズが大きいとされる樹木のゲノムプロジェクトは難しい。そこで我々は次世代シーケンサー「Genome Sequencer FLX System」(Roche Applied Science) を利用して、オリーブアナキゾウムシの加害を受けたオリーブと無加害のオリーブの EST データベースを構築した。

(3) 防御物質前駆体オレウロペインとその生合成中間体の内生量の変動解析

化学防御物質前駆体オレウロペインは、ヒドロキシチロソール構造とセコイリド構造からなり、糖加水分解反応および酸化反応により防御活性化される。防御活性化物質（タンパク質変性物質）において、ヒドロキシチロソール由来のカテコール骨格とセコイリド由来のグルタルアルデヒド構造がタンパク質との架橋形成の鍵構造である。そこで申請者は食害ストレスに対する防御活性化物質前駆体オレウロペインおよびその生合成中間体の定性・定量分析条件を確立した。

4. 研究成果

1: 防御活性化酵素の機能解析

オリーブ葉および実から抽出した粗酵素液を用いて、オレウロペイン糖加水分解反応を行った結果、オリーブ葉に比べて実における比活性が高かったことから、オリーブ実を用いてオレウロペイン糖加水分解酵素 (β -グルコシダーゼ; β -GH) の精製を行った。オリーブ実を凍結破碎した後、アセトン沈殿、硫酸沈殿を行った。30-80%硫酸沈殿で得られた沈殿物をホウ酸バッファー (pH 9) に溶解して、陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (HiTrapQ FF)、疎水クロマトグラフィーカラム (HiTrap phenyl)、ゲル濾過クロマトグラフィーカラム (Superdex200) に供した。オレウロペインを基質、各クロマトグラフィーによって分けられたフラクションを酵素溶液として反応を行い、LC-MS を用いて代謝物を分析することで、酵素活性画分を追跡した。ゲル濾過クロマトグラフィーカラム

(Superdex200) 精製後のフラクションを SDS-PAGE 分析した結果、バンド3本まで精製することに成功した。そこで各バンドの部分アミノ酸配列を解析するために、各バンドをゲルから切り出して、LC-MS/MS 分析を行った。得られたペプチド配列をペプチドシーケンス情報データベース (Masscot) および *de novo* 解析 (PEAKS 5.0) を行った結果、60 kDa 付近のバンドが有するペプチド配列が植物の β -グルコシダーゼと相同性が高いことが分かった。部分アミノ酸配列から設計したジェネレートプライマーを用いて、オリーブから全長 cDNA 配列の取得に成功した。

2: 次世代シーケンサーを用いたオリーブ EST ライブラリーの構築

オリーブの葉や実には多糖類が多いために、汎用的に用いられている植物からの total RNA 抽出方法では cDNA ライブラリー作製に適した高純度 total RNA は抽出できない。そこで、現在報告されている木本植物からの total RNA 抽出法 (2 種類) と市販されている多糖類含有植物用 RNA 抽出 (2 種) を用いて、オリーブ葉および実から total RNA を抽出して、純度検定および収量の解析を行った。本実験に用いた total RNA 抽出方法は塩化セシウム-グアニジン変法、針葉樹由来 RNA に最適化された total RNA 抽出法および RNA easy kit (Qiagen), fruit mate (Takara) を用いた。純度検定にはアジレント社の Bioanalyzer を用いて検定した。純度検定の結果、塩化セシウム-グアニジン変法および RNA easy kit とともに高純度の total RNA を抽出することができた。cDNA ライブラリー作製のためには 1 mg 以上の mRNA が必要であるため、高回収率を示した塩化セシウム-グアニジン法を用いてオリーブ葉および実から cDNA ライブラリー作製の total RNA を抽出した。以上よりオリーブ葉および実から効率的および高純度の total RNA 法を確立することができた。この方法および次世代シーケンサー「Genome Sequencer FLX System」(Roche Applied Science) を利用して、20000 以上の独立したオリーブ EST データベースを構築した。

3: 防御物質前駆体オレウロペインとその合成中間体の内生量の変動解析

3-A: イリドイド化合物の分析条件の確立

静岡大学フィールドセンター内温室で育成しているオリーブ葉を用いて、イリドイド化合物、特にオレウロペインとその類縁体の分析条件の確立を試みた。まず抽出方法は種々の有機溶媒 (メタノール、*n*-ブタノール、酢酸エチル、ヘキサン) による液-液分配法および固相カラム抽出法を検討した。その結果、液-液分配法では一度にグラム単位のオレウ

ロペインが得られるものの、5 段階の抽出と 4 段階の溶媒留去が必要であり、一日で 8 サンプルの処理しかできなかった。しかし、固相カラム抽出法 (Waters Oasis HLB) では、溶媒留去の必要がなく一度に 12 サンプルを 30 分で処理することが可能となった。次に分析機器については LC-MS と GC-MS を比較検討した。GC-MS に供す場合、配糖体であるオレウロペインは誘導体化する必要があるのに対して LC-MS には誘導体化せず供すことができる。しかも LC-MS 分析において 1 インジェクションあたり fmol レベルの検出感度で解析できたので、分析機器は LC-MS を用いることにした。また LC-MS ではオレウロペイン類縁体であるリグステロサイドの検出が可能であった。以上より、オリーブ葉を固相抽出した後に LC-MS に供することでイリドイド化合物をハイスループットかつ高感度に条件を確立することに成功した。

3-B: オレウロペイン内生量の解析

① 静岡大学フィールドセンター屋外で育成しているオリーブ (*Olea europaea* L.) の葉、枝 (辺材、心材)、花、実の各部位を採集して、上記 1-A で確立した分析方法を用いてオレウロペインの定量分析を行った。その結果、オレウロペインは葉において生重量あたり 7-8% 含まれていることが明らかになった。ついで辺材 (枝外側) に多く、花、実、心材におけるオレウロペイン含有量は生重量あたり 0.05%-2% であった。以上より、食害昆虫に被害をうける部位においてオレウロペイン含有量が多いことが明らかになり、環境ストレスとオレウロペイン含有量の関連性を示す知見が得られた。また時期別ではオリーブ葉において 7 月から 12 月にかけて徐々に増加していることが分かった。② 植物の傷害応答ホルモンであるジャスモン酸メチルをオリーブに噴霧して、経時的 (1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 69 hr) にオレウロペイン内生量の分析を 1-A の定量方法に従って行った。その結果、ジャスモン酸メチル処理 24, 48, 69 時間後においてオレウロペイン内生量が無処理植物と比較しておよそ 30% 減少した。以上より、オレウロペインはオリーブの防御機構に関与していること可能性が示唆された。

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 1 件)

① Ohnishi, T., Yokota, T., Mizutani, M., “Insights into the function and evolution of P450s in plant steroid metabolism.” *Phytochemistry*, 査読有, vol. 70 No. 17-18, 2009, pp. 1918-29

〔学会発表〕(計 11 件)

- ①松野聡、渡辺修治、大西利幸
「オリーブ化学防御物質オレウロペインの活性化経路の解明」
日本農芸化学会 2011 年度大会, 京都, 2011 年 3 月 25-28 日
- ②大上将司, 松野聡, 平田拓, 道羅英夫, 渡辺修治, 大西利幸
「イリドイド配糖体糖加水分解酵素の酵素学的研究」
日本農芸化学会 2011 年度大会, 京都, 2011 年 3 月 25-28 日
- ③Ohnishi, T.
"Quest for floral aroma in fresh tea leaves (Camellia sinensis)"
Seminar of the Departmental Meeting series autumn/winter 2010/2011, Denmark, 2010 年 9 月 2 日
- ④大西利幸, 谷田彩、渡辺修治
「茶の香気前駆体である配糖体生合成に関与する糖転移酵素の精製」
日本農芸化学会 2010 年度大会, 東京, 2009 年 3 月 27-30 日
- ⑤松野聡、渡辺修治、大西利幸
「オリーブにおけるオレウロペイン内生量の部位別・時期別変化および傷害応答による変動」
日本農芸化学会 2010 年度大会, 東京, 2009 年 3 月 27-30 日
- ⑥ Ohnishi, T.
"Biochemical characterization of monoterpene UDP-glucosylase in Camellia sinensis" Germany-Japan Joint Symposium and Graduate Students Forum for the Promotion of the DDP, Shizuoka, 2009 年 11 月 25 日
- ⑦ 大西利幸, 松野聡、渡辺修治
「植物の防御機構におけるイリドイド配糖体糖加水分解酵素の探索」
第 44 回植物化学調節学会, 仙台, 2009 年 10 月 29-30 日
- ⑧ 大西利幸
「シトクロム P450 酵素がもたらす植物生理活性物質の多様性—P450 研究の現状と今後の展開」
メタボローム・代謝ネットワーク勉強会, 横浜, 2009 年 7 月 27 日
- ⑨ 大西利幸
「針葉樹の防御機構におけるジテルペン脂肪酸生合成酵素の役割の解明」
日本農芸化学会中部支部第 155 回例会, 静岡, 2009 年 7 月 18 日
- ⑩ Ohnishi, T., Hamberger, B., Hamberger, B., Bohlman, J.
"Biochemical characterization of CYP720B subfamily members involved in diterpene

resin acid biosynthesis in Sitka Spruce" 9th International Meeting: Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Microorganisms and Parasites. 東京, 2009 年 5 月 25-29 日

⑪ Hamberger, B., Ohnishi, T., Hamberger, B., Bohlman, J.
"Gene structure and expression of the cytochrome P450 CYP720B family in Sitka spruce (Picea sitchensis)" 9th International Meeting: Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Microorganisms and Parasites. 東京, 2009 年 5 月 25-29 日

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.grl.shizuoka.ac.jp/~t-oonishi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 利幸 (OHNISHI TOSHIYUKI)
静岡大学
若手グローバル研究リーダー育成拠点
特任助教 (テニュアトラック)
研究者番号 : 60542165

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し