

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580149

研究課題名(和文) コウモリカズラ培養根におけるストリゴール生合成の解明

研究課題名(英文) Elucidation of strigol biosynthesis in *Menispermum dauricum*

研究代表者

水谷 正治 (Mizutani, Masaharu)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60303898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：5-deoxystrigol (5DS) の重水素標識体を合成し、UPLC-ESI-MSによるSL分析系を確立した。strigol (SG) を高生産するコウモリカズラ培養根による5DS標識体の代謝変換実験を行った結果、標識5DSはSGに取り込まれなかったことから、SGは5DSを経由せずに生合成されることが示唆された。一方、SL合成アナログであるGR24を投与した結果、7-OH-GR24への変換を確認した。つぎに、sorgomolを高生産するソルガムを用いて5DSの代謝実験を行った結果、sorgomolは5DSの9位水酸化により生合成されることが明らかとなり、P450による水酸化が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Deuterium-labeled 5-deoxystrigol was synthesized, and the analytical method for strigolactones by UPLC-ESI-MS was established. When the root-cultures of *Menispermum dauricum*, which are a high producer of strigol, were fed with deuterium-labeled 5-deoxystrigol, the conversion of 5-deoxystrigol to strigol was not detected. This suggests that strigol is not biosynthesized via 5-deoxystrigol in *Menispermum dauricum*. On the other hand, GR24, a synthetic strigolactone analog, was metabolized to 7-OH-GR24 by the root cultures. Next, deuterium-labeled 5-deoxystrigol was administered to hydroponics of a high sorgomol-producing sorghum cultivar, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, and conversion to sorgomol was investigated. 5-deoxystrigol was metabolized to sorgomol and the conversion was inhibited by a P450 inhibitor. These results suggest that sorgomol is biosynthesized from 5-deoxystrigol via a P450-dependent C-9 hydroxylation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：ストリゴラクトン コウモリカズラ ストリゴール GR24 ソルガム ソルゴモール P450

1. 研究開始当初の背景

ストリゴラクトン (以下、SL) は三環性のラクトンとメチルフラノンがエノールエーテル結合しているユニークな構造を有した化合物群であり、根寄生植物 (オロバンキやストライガ) の種子発芽を刺激する物質として宿主作物 (イネ科やマメ科作物) の根滲出液から単離同定された。また、SL はアーバスキュラー菌根菌が宿主植物を認識して菌糸の分岐を誘導する物質として宿主植物の根滲出液から単離同定された。さらに、植物の枝分かれを抑制する新奇な植物ホルモンが SL であることが近年明らかにされた。このように、SL は植物にとって非常に重要な生物活性物質であるが、生合成、情報伝達など不明な点が非常に多い。特に、SL の生合成には以下に示す 2 つの大きな謎がある。

(謎 1) 植物の根滲出液から主に見つかる SL が植物種によって異なるという謎。

構造の共通性や修飾箇所から、5-デオキシストリゴール (以下、5DS) を出発物質とし、環部の酸化やアセチル化などが起こり、様々な SL 類縁体 (ストリゴールやソルゴモールなど) に変換されると予想されるが、未だ証明されていない。SL の構造多様化は植物種にユニークな反応なのか、その代謝変換は SL の活性化あるいは不活性化なのか?

(謎 2) 生合成中間体/生合成経路が全く同定されていないという謎。

SL 生合成変異体の解析から、原因遺伝子としてカロテノイド開裂酵素遺伝子 2 種 (CCD7 と CC8) が、また、酸化反応に関わると推定される鉄含有タンパク質 D27 やシトクロム P450 である MAX1/CYP711 がそれぞれ単離同定された。つまり、SL はカロテノイドを前駆体として酸化的修飾により生合成されると推定される。しかし、CCD の *in vitro* 酵素活性から推定されるカロテノイド中間体や ABC 環からなる中間体を投与しても変異体の表現型は回復せず、また変異体の化学分析からも想定中間体は検出されないことから、SL がどのような経路で生合成されているのか、全く不明である。

2. 研究の目的

SL 研究に関する上記のような状況を打破するためには、SL 生合成を正面から生物有機化学的に解析する必要がある。コウモリカズラ培養根は (+)-ストリゴール (以下、SG) を高生産することから、ストリゴラクトン類の生合成研究には最適な植物材料である。

本研究では、コウモリカズラ培養根における SG 生合成を解明することを目的とする。

- (1) 5DS から SG への変換過程を解明する。
- (2) カロテノイド前駆体から SG までの生合成経路、中間体、生合成酵素を解明する。

3. 研究の方法

(1) SL 関連化合物の合成と分析系の確立。

① SL 生合成の共通の生合成前駆体と推定さ

れる 5SD の重水素標識化合物を合成した。② 合成 SL である GR24 の代謝酸化物である水酸化 GR24 を合成した。③ SL 類を精密に分析定量するための LC-MS 分析系を構築した。

(2) コウモリカズラ培養根による GR24 の代謝変換の解析: コウモリカズラ培養根に GR24 を投与し、24 時間後に培養根および培地中の GR24 代謝物を LC-MS により分析した。

(3) コウモリカズラ培養根による 5DS の代謝変換の解析 (図 1): コウモリカズラ培養根に同位体標識 5DS を投与し、24 時間後に培養根および培地中の SG を LC-MS により分析し SG の同位体存在比を天然型 SG と比較した。

(4) ソルガムによるソルゴモール生合成の解析 (図 1): ①②ソルガムへの同位体標識 5DS 投与実験によりソルゴモールへの取り込みを解析した。③酸化酵素阻害剤処理による 5DS 水酸化活性への影響を検討した。④ソルガムからマイクロソームを調製し 5DS 水酸化活性を検討した

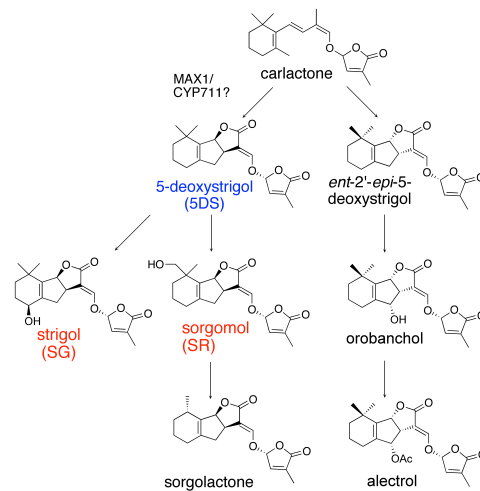


図1 ストリゴラクトン類の推定生合成経路
ストリゴール、コウモリカズラ培養根が生産するSL;
ソルゴモール、ソルガムが生産する内生SL

4. 研究成果

(1) SL 関連化合物の合成と分析系の確立。

①重水素標識 5DS の合成: 5DS の 6' 位を安定同位体である重水素で置換した 4 種の立体異性体を合成し分取精製した (図 2)。

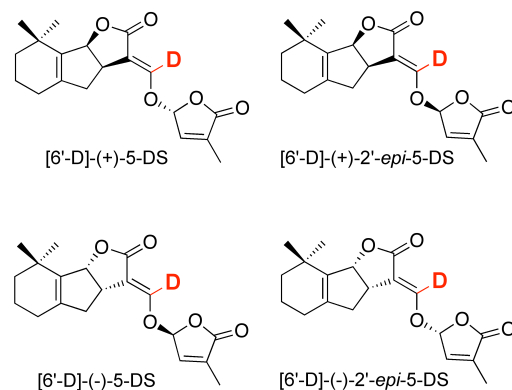


図2 重水素標識5DSの4種の立体異性体

②水酸化 GR24 の合成：合成 SL アナログである GR24 の酸化代謝物の構造を評価するため、A 環および B 環に水酸基を有する 4-OH-GR24, 5-OH-GR24, 6-OH-GR24, 7-OH-GR24, 8-OH-GR24 の 5 種の水酸化 GR24 の標準品を合成した。

③UPLC-MS-MS (UltraPerformance LC、CQUITY® TQD) (WATERS) を用いた SL 類の精密分析系を確立した。

(2) コウモリカズラ培養根による GR24 の代謝変換の解析。

継代後 60 日の培養根に GR24 を投与し培養液中の代謝物を LC-MS 分析した結果、 m/z 299 である GR24 が水酸化されると推定される m/z 315 の化合物へと変換された。次に GR24 の 4 種の立体異性体 [(+)-GR24, (+)-2'-*epi*-GR24, (-)-GR24, (-)-2'-*epi*-GR24] を投与した結果、内生 SL である SG と同じ立体である (+)-GR24 のみが代謝された。A 環および B 環に水酸基を有する 5 種の水酸化 GR24 の合成標品と培養根による代謝産物を比較解析した結果、代謝物は 7-OH-GR であると同定した。これらの結果からコウモリカズラ培養根は (+)-GR24 の立体構造を選択的に認識し、その 7 位を水酸化することが分かった (図 3)。

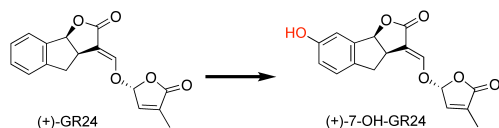


図3 コウモリカズラ培養根によるGR24の7位水酸化物への代謝

(3) コウモリカズラ培養根による 5DS の代謝変換の解析。

(+)-GR24 の場合と同様に、5DS も水酸化を受け SG へ変換されるのではないかと期待された。そこで、安定同位体標識した 5DS をコウモリカズラ培養根に投与し SG への変換が起こるかどうかを検討した。標識 5DS は ^1H の 1 つを ^2H に置き換えた化学構造であり (図 2)、投与した標識 5DS が代謝変換して得られる SG は内生 SG に比べ分子量が 1 大きくなるため、SG の同位体比を LC-MS でモニターすることにより代謝変換を評価した。標識 5DS 投与 24 時間後の培地中の SL を分析した結果、SG 生産は認められたが、parent scan を用いて SG の m/z 97 の親イオンの同位体比をモニターしたところ、標識 5DS を投与したコウモリカズラ培養根において検出された SG の同位体比は天然 SG と比較して変化は見られず、投与した標識 5DS の SG への変換は確認できなかった (図 4)。このことより SG の 5 位の水酸基は SL 骨格が形成する 5DS 以前に導入されることが示唆された。

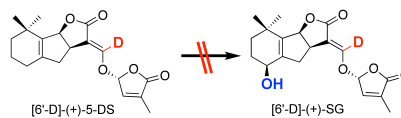


図4 コウモリカズラ培養根は重水素標識5DSをSGへ代謝変換しない。

(4) ソルガムによるソルゴモール生合成の解析。

①ソルガムによる 5DS の代謝変換の解析。
ソルガムの根滲出液からはソルゴモール (sorgomol : 以下 SR と省略) が単離同定されている。そこで、5DS を前駆体として SR が生成されることを検証するため、高生産ソルガム品種に対して 5DS の代謝実験を行った。
[6'-D]5DS 立体異性体 4 種 (図 2) をそれぞれソルガムの水耕液に投与し、24 時間代謝させた。水耕液から SL を抽出・精製し、LC-MS 分析に供した。コントロール (未投与) では、SR と少量の 5DS が検出された。[6'-D]-(+)-5DS を投与すると SR のピークがコントロールと比較して顕著に増加した。この増加は 1 マスユニット大きい SR を検出する m/z 365>318 の MRM チャンネルにおいて検出されたシグナルによるものであったことから、投与した [6'-D]-(+)-5DS が酸化され、SR が生成したことが分かった。[6'-D]-(+)-5DS および [6'-D]-(+)-2'-*epi*-5DS は水酸化物へ代謝変換されなかった。一方、[6'-D]-(+)-2'-*epi*-5DS は内生に存在しない 2'-*epi*-sorgomol へ変換された。

②フルリドン存在下での [6'-D]5DS の代謝実験。

フィトエン不飽和化酵素を阻害することによりカロテノイド生合成を阻害するフルリドンをソルガムに処理すると発芽刺激物質の生産が減少し、SL はカロテノイドから生成されることが示されている。そこで、フルリドンによりカロテノイド生合成を抑制させた条件下で代謝実験を行った。1 μM フルリドン処理を 3 日間行い、SL 生合成を抑制させた後、24 時間フルリドン存在下で 4 種の [6'-D]5DS 立体異性体を代謝させた。その結果、内生 SR 及び 5DS 生合成は抑えられ、上記①と同様の結果を、より明確に得ることができた。以上の結果から、ソルガムでは 5DS が水酸化されることにより SR が生成されることが明らかとなった (図 5)。

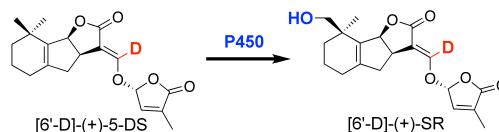


図5 ソルガムのソルゴモール(SR)は5DSから生合成され、P450が水酸化反応を触媒する。

③酸化酵素阻害剤存在下での [6'-D]5DS の代謝実験。

5DSからSRへの水酸化を担う酵素についての知見を得るため、シトクロム P450 阻害剤と 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (20GD) 阻害剤の処理を行い、代謝変換に与える影響を検証した。P450 とはヘムタンパク質で、酸素分子から一原子の酸素を基質に挿入するモノオキシゲナーゼである。また、20GD とは 2-オキシグルタル酸 (20G) と Fe²⁺ を補因子として利用し 2 個の酸素原子を基質と 20G にそれぞれ 1 個ずつ挿入するジオキシゲナーゼである。②の条件下で、終濃度が 1 μM、10 μM、100 μM となるように阻害剤を培地に添加した。その結果、SR への変換は P450 阻害剤であるウニコナゾールによって濃度依存的に阻害されたが、20GD 阻害剤であるプロヘキサジオンは代謝変換に影響を及ぼさなかった。この結果から、5DS から SR への水酸化を担う酵素はシトクロム P450 であることが示唆された (図 5)。

④ミクロソーム画分による 5DS の変換

これまでの実験で、[6'-D]5DS の代謝実験により in planta において 5DS が sorgomol へと変換されることを実証し、この水酸化に関与する酵素が P450 と考えられる知見を得た。P450 はミクロソーム画分に局在する膜結合型酵素であり NADPH-P450 還元酵素によって NADPH の電子が伝達され、酸素を活性化し水酸化反応を触媒する。そこで、ソルガムの根よりミクロソーム画分を調製し、無細胞抽出液において 5DS の水酸化が確認できるかを検証した。その結果、ミクロソーム画分において 5DS から SR への変換活性を検出した。次に、P450 反応を阻害することが知られている cytochrome C および一酸化炭素 CO を共存させたところ、変換活性は顕著に減少した。以上の結果から、5DS から SR への水酸化を担う酵素はシトクロム P450 であることが強く示唆された (図 5)。

以上の結果から、コウモリカズラ培養根において生合成されるストリゴールは、予想に反して、5DS の 5 位水酸化により生成しないことが明らかとなった。すなわち、ストリゴールはより早い中間体 (例えば carlactone) の段階で A 環 5 位の水酸化が起こることが考えられる。

一方、ソルガムが生産するソルゴモールは 5DS の水酸化により生合成されることが明らかとなった。さらに、その水酸化酵素はシトクロム P450 であることが強く示唆された。

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 4 件)

①Noriko Motonami, Kotomi Ueno, Hitomi Nakashima, Saki Nomura, Masaharu Mizutani, Hirosato Takikawa, Yukihiro Sugimoto, The

bioconversion of 5-deoxystrigol to sorgomol by the sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Phytochemistry*, 査読有, 93, 41-48, 2013, doi:10.1016/j.phytochem.2013.02.017.

②Saki Nomura, Hitomi Nakashima, Masaharu Mizutani, Hirosato Takikawa, Yukihiro Sugimoto, Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of *Striga gesnerioides* seeds. *Plant Cell Reports*, 査読有, 32, 829-838, 2013, doi:10.1007/s00299-013-1429-y.

③ Kotomi Ueno, Saki Nomura, Satoru Muranaka, Masaharu Mizutani, Hirosato Takikawa, and Yukihiro Sugimoto, Ent-2'-epi-Orobanchol and Its Acetate, As Germination Stimulants for *Striga gesnerioides* Seeds Isolated from Cowpea and Red Clover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有, 59, 10485-10490, 2011, DOI: 10.1021/jf2024193

④ Kotomi Ueno, Mami Fujiwara, Saki Nomura, Masaharu Mizutani, Mitsuru Sasaki, Hirosato Takikawa, and Yukihiro Sugimoto, Structural Requirements of Strigolactones for Germination Induction of *Striga gesnerioides* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有, 59, 9226-9231, 2011, DOI: 10.1021/jf202418a

[学会発表] (計 13 件)

①上野琴巳、本並宣子、中寫瞳、水谷正治、滝川浩郷、杉本幸裕、ソルガムにおける 5-deoxystrigol から sorgomol への変換反応、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28-30 日、明治大学生田キャンパス

②井上共生、藤岡聖、水谷正治、杉本幸裕、*S. gesnerioides* D14-like 遺伝子の探索とストライゴラクトン加水分解活性の評価、第 48 回植物化学調節学会、2013 年 10 月 31 日、新潟大学

③上野琴巳、本並宣子、中寫瞳、水谷正治、滝川浩郷、杉本幸裕、植物における 5-デオキシストリゴールからモノヒドロキシストリゴラクトンへの変換反応、第 48 回植物化学調節学会、2013 年 10 月 31 日新潟大学

④桑原一真、上野琴巳、三沢典彦、水谷正治、杉本幸裕、β-カロテン生産菌を用いたストライゴラクトン生合成中間体カルラクトン酵素合成の試み、第 48 回植物化学調節学会、2013 年 10 月 31 日、新潟大学

⑤梅田修平、上野琴巳、水谷正治、杉本幸裕、ヒマワリが分泌する根寄生雑草発芽刺激物質の解析、第 48 回植物化学調節学会、2013 年 10 月 31 日、新潟大学

⑥N. Motonami, H. Nakashima, K. Ueno, M. Mizutani, H. Takikawa, Y. Sugimoto, Oxidation of 5-deoxystrigol in sorghum,

Sorghum bicolor (L.) Moench. 10th International Congress on Plant Molecular Biology, 2012年10月24日、Jeju, Korea,
⑦本並宣子、中畠瞳、上野琴巳、水谷正治、滝川浩郷、杉本幸裕、ソルガムによる5-deoxystigol から sorgomol への変換、植物化学調節学会第47回大会、2012年10月28日、山形大学
⑧上野琴巳、中畠瞳、野村早紀、水谷正治、滝川浩郷、杉本幸裕、様々な植物における5-deoxystigol の酸化的代謝、植物化学調節学会第47回大会、2012年10月28日、山形大学
⑨本並宣子、中畠瞳、上野琴巳、滝川浩郷、水谷正治、杉本幸裕、ソルガムにおける5-deoxystigol の酸化的代謝の解析、日本農芸化学会2012年度京都大会、2012年3月24日、京都女子大学
⑩中畠瞳、平垣内雅規、本並宣子、上野琴巳、水谷正治、滝川浩郷、杉本幸裕、合成ストライゴラクトン GR24 の植物による代謝と生成物の同定、日本農芸化学会2012年度京都大会、2012年3月24日、京都女子大学
⑪上野琴巳、水谷正治、滝川浩郷、杉本幸裕、LC-MS/MS による新奇ストリゴラクトン探索法の確立、日本農芸化学会2012年度京都大会、2012年3月24日、京都女子大学
⑫本並宣子、中畠瞳、上野琴巳、滝川浩郷、水谷正治、杉本幸裕、ソルガムにおける5-deoxystigol の酸化的代謝、植物化学調節学会第46回大会、2011年11月2日、宇都宮大学
⑬中畠瞳、平垣内雅規、本並宣子、上野琴巳、滝川浩郷、水谷正治、杉本幸裕、水酸化GR24の合成と構造解析、植物化学調節学会第46回大会、2011年11月2日、宇都宮大学
⑭平垣内雅規、本並宣子、上野琴巳、中畠瞳、滝川浩郷、水谷正治、杉本幸裕、植物によるGR24変換反応の解析、植物化学調節学会第46回大会、2011年11月2日、宇都宮大学

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

なし

○取得状況(計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 正治 (MIZUTANI, Masaharu)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：60303898

(3) 連携研究者

杉本 幸裕 (SUGIMOTO, Yukihiro)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：10243411

(3) 連携研究者

上野 琴巳 (UENO, Kotomi)
神戸大学・大学院農学研究科・学術推進研究員
研究者番号：40582028