

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780181

研究課題名(和文) 樹木の化学防御機構におけるオレウロペインの生物有機化学的研究

研究課題名(英文) Functional characterization of oleuropein in plant defense

研究代表者

大西 利幸 (Ohnishi, Toshiyuki)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60542165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、樹木の化学防御機構を明らかにすることを目的にし、モクセイ科の常緑高木であるオリーブにおいて昆虫傷害および物理的傷害によって生合成が引き起こされるイリドイド-アミノ酸複合体の構造解析およびその生合成機構の解明を試みた。その結果、質量分析装置および核磁気共鳴装置などの分析測定により、イリドイド-アミノ酸複合体が含窒素六員環を有する新規化合物であることを明らかにした。また新規化合物の生合成には糖加水分解酵素が鍵酵素であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Olive trees (*Olea europaea*) biosynthesize a phenolic secoiridoid glycoside, Oleuropein, which is thought as a chemical defense compound against herbivores. To investigate chemical defense system through iridoid compounds in olive, we analyzed iridoid-amino acid compounds biosynthesized by herbivores in olive. We determined the chemical structure of iridoid-amino acid compounds and beta-glucosidase (beta-GH) is an essential trigger for biosynthesis of iridoid-amino acid compounds.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：木質科学

キーワード：オリーブ 化学防御 テルペン

1. 研究開始当初の背景

近年、“Specialized metabolites”と呼ばれるようになった植物の二次代謝産物には数多くの生理活性物質が存在する。植物における二次代謝産物の生理学的機能は長らく未解明であった。しかし、化学生態学的研究や分子生物学的研究の進展に伴い、多くの二次代謝産物は環境ストレス（昆虫食害や病原菌感染など）から身を守るための化学防御物質として化学進化してきたことが徐々に明らかになりつつある。テルペンやアルカロイドなどは植物の防御機構に寄与する化学防御物質として生合成され、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 -グルコシダーゼがしばしば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反応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.*, PNAS, 96, 9159 (1999))。しかし、オレウロペイン-高分子架橋体の形成メカニズムやそこに関わる糖加水分解酵素や酸化酵素は明らかにされていない。これまでに我々は傷害処理時における経時的な内生オレウロペイン量の定量分析、オリーブ由来オレウロペイン特異的糖加水分解酵素の酵素学的機能解析、傷害処理または無傷害オリーブにおけるオレウロペイン糖加水分解酵素遺伝子の発現解析を行い、その結果オレウロペインおよびその糖加水分解酵素がオリーブの防御機構に深く関与していることを明らかにした。

2. 研究の目的

テルペノイド化合物が植物の化学防御機構に関与していると言われて久しい。しかし、苦味配糖体や生薬として知られる環状モノテルペノイドであるイリドイド化合物は古くから研究が進められているが、植物における生合成・存在意義、および生合成に関する分子レベル（酵素、遺伝子、分子間相互作用）に関する知見は未だ不十分である。本研究の目的は、これまでに得られた生物有機化学的および生化学的知見を元に、樹木の化学防御機構を生化学および化学生態学的視点から解明することである。

3. 研究の方法

本研究では、A) 防御活性酵素の抽出・精製および異種発現酵素の作製、B) オレウロペイン糖加水分解物複合体の構造解析、C) イリドイド化合物の成長抑制活性試験を実施した。

4. 研究成果

A) 防御活性酵素の抽出・精製および異種発

現酵素の作製

A-1: 異種細胞発現系を用いた β -グルコシダーゼの発現検討

大腸菌発現系およびバキュロウィルス-昆虫細胞発現系を用いてオリーブ由来 β -グルコシダーゼの異種発現に取り組んだ。原核生物である大腸菌を用いて発現した場合、翻訳後修飾を受けることが困難である。そのため真核生物で翻訳後修飾が施される昆虫細胞発現系も用いた。全長 cDNA (OeGH1) を pET28 ベクター（大腸菌発現用ベクター）および pFastBac1 ベクター（昆虫細胞発現用ベクター）に制限酵素処理により導入した（それぞれ OeGH1-pET28、OeGH1-pFastBac1 と名付けた。）。OeGH1-pET28 を大腸菌コンピテントセル (BL21 (DE3)) に形質転換し、一晚培養後、大量培養を行い、組換え発現酵素を得た。また昆虫細胞発現系については、大腸菌株 DH10Bac に形質転換、組換えバキュロウィルスゲノムである Bacmid を得て、昆虫細胞 Sf9 に感染させた。バキュロウィルス力価増幅後、再度 Sf9 に感染させ、組換え発現酵素を得た。二つの発現系を用いた組換え酵素および基質としてオレウロペインを用いて、酵素活性を行った結果、両組換え酵素ともオレウロペインに対して高い活性を示すことを明らかにした。以後は、操作が簡便かつコスト安の大腸菌発現系を用いることにした。

A-2: β -グルコシダーゼの基質特異性の解析

OeGH1 の基質特異性を明らかにするために、大腸菌発現系を用いて組換え発現酵素を調製し、モノテルペン、イリドイド、セコイリドに属する計 7 種類のテルペン化合物を用いて、相対活性試験を行った。その結果、OeGH1 はオレウロペインに最も高い活性を示すことを明らかにした。また OeGH1 酵素活性に対する構造活性相関を解析した結果、チロソール骨格を有すること、イリドイド骨格にカルボキシ基またはカルボキシメチル基が必要であること、開環したセコイリド骨格が重要であることを明らかにした。

B) オレウロペイン糖加水分解物複合体の構造解析

本課題遂行時に発見した新規アルカロイド化合物の分取、精製および構造解析を行ったオレウロペイン糖加水分解産物とタンパク質がシッフ塩基を形成して高分子架橋体を形成し、昆虫に対する栄養価の低下をもたらすことで植物化学防御機構の一役を担っていると推定されている。しかし、高分子架橋体形成機構について分子レベルでの解明はなされていない。そこで高分子架橋体の形成メカニズムを明らかにするために、まずオレウロペイン糖加水分解産物とアミノ酸を反応させ、その反応代謝物の LC-MS で分析し、HPLC により分取し、NMR および高分解能 MS によりその構造解析を試みた。当初、オレウロペイン糖加水分解産物には二つのアルデヒド基があるため、二分子のアミノ酸と

シップ塩基を形成し結合すると予想した。しかし、LC-MS を用いた分子量解析の結果、オレウロペイン糖加水分解産物に1分子のアミノ酸が結合した化合物が生成されていることが示唆された。そこで、HPLC を用いてオレウロペイン糖加水分解産物-アミノ酸複合体を分取し、その構造決定を $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、二次元 NMR (HMOC、HMBC) により行った。アミノ酸として 20 種類の L-アミノ酸を用いた。その結果、オレウロペイン糖加水分解産物 (OHM) と L-Lys の ϵ -アミノ基が反応した OHM-Lys、OHM と L-Phe の α -アミノ基が反応した OHM-Phe の構造を同定した。両化合物とも含窒素六員環を有する新規化合物であることを明らかにした。次に OHM-Phe または OHM-Lys が実際にオリーブに内生するのかを明らかにするために、オリーブ無加害葉および加害葉を植物試料として、LC-MSMS を用いて解析した。その結果、新規含窒素六員環化合物 OHM-Phe はオリーブに内生することを明らかにした。

C) オレウロペインの成長抑制活性試験
オリーブの食害昆虫に対する防御機構として以下のように推定されている。オリーブが昆虫の食害を受けた場合、オリーブの糖加水分解酵素がオレウロペインを糖加水分解することで、オリーブ植物体内で高分子架橋体が形成される。この高分子可溶体が難消化性タンパク質であるために高分子架橋体は昆虫に吸収されない。つまり昆虫は栄養を摂取することができないために忌避すると考えられている。

しかし、オリーブの糖加水分解酵素がオレウロペインを糖加水分解し植物内で高分子架橋を形成する以外にも、昆虫の消化酵素がオレウロペインを加水分解することで昆虫の消化管内で高分子架橋体が形成することが考えられた。

そこで、植物の糖加水分解酵素と昆虫の糖加水分解酵素のどちらがオレウロペインの活性化において重要な役割を果たすか明らかにするために、カイコのエサにオレウロペインを添加しそのフンを分析することで、カイコがオレウロペインを分解することができるか、また、このときカイコの成長が抑制されるか調べた。

C-1: カイコのエサおよびフン中のオレウロペイン定量解析

カイコの幼虫がオレウロペインを分解することができるか調べるために、カイコのエサに湿重量で 1% となるようオレウロペインを添加し 1 日摂食させた。オレウロペインを添加したエサとカイコのフンを凍結乾燥した。MeOH 抽出を行い HLB カートリッジによる精製後に LC-MS を用いてオレウロペインの定量を行った。その結果、エサに添加したオレウロペイン量とフンに残っていたオレウロペイン量は同量であった。

このことから、カイコはオレウロペインを分

解することができないことが明らかとなった。

C-2: オレウロペインを与えたカイコの成長解析

次にカイコのエサにオレウロペインを添加したオレウロペイン投与区とオレウロペインを添加していないコントロール区を設け、カイコが繭になるまでカイコの体重を測定した。その結果、オレウロペイン投与区では体重が減少した。繭になるまでの日数はコントロール区では 12 日であったのに対し、オレウロペイン投与区では 14 日であった。以上より、オレウロペインがカイコの成長を遅延させる作用を示すことが示されたが、その生理学的要因は今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

池田修也, 松野聡, 大上将司, 渡辺修治, 大西利幸「Oleuropein 糖加水分解産物アミノ酸複合体の構造解析」日本農芸化学会 2013 年度大会, 仙台, 2013 年 3 月 24-28 日

池田修也, 松野聡, 大上将司, 渡辺修治, 大西利幸「オリーブ由来モノテルペン糖加水分解産物の構造解析」第 56 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 鹿児島, 2012 年 10 月 27-29 日

池田修也, 松野聡, 大上将司, 渡辺修治, 大西利幸「オリーブ傷害葉で生じる新規オレウロペイン糖加水分解産物-アミノ酸複合体の構造解析」日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都, 2012 年 3 月 22-26 日

大上将司, 松野聡, 平田拓, 渡辺修治, 道羅英夫, 大西利幸「植物の化学防御機構における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 2012 年度大会, 京都, 2012 年 3 月 22-26 日

池田修也, 松野聡, 大上将司, 渡辺修治, 大西利幸「傷害応答によって生合成されるオレウロペイン糖加水分解産物の構造解析」第 46 回植物化学調節学会, 宇都宮, 2011 年 11 月 1-2 日

大上将司, 松野聡, 平田拓, 渡辺修治, 道羅英夫, 大西利幸「植物の化学防御機構におけるイリドイド配糖体糖加水分解酵素の酵素学的研究」第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会, 福岡, 2011 年 9 月 6-8 日

松野聡, 大上将司, 渡辺修治, 大西利幸「オリーブの化学的防御機構の解明」第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会, 福岡, 2011 年 9 月 6-8 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）:

〔その他〕

<http://www.grl.shizuoka.ac.jp/~t-oonishi/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大西 利幸 (OHNISHI TOSHIUKI)

静岡大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60542165

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し