

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580248

研究課題名(和文) 樹木特有の新規環拡大反応であるトロポロン生合成機構の解明と応用

研究課題名(英文) Revealing the mechanism of ring expansion reaction to tropolon formation uniquely found in woody plant.

研究代表者

藤田 弘毅 (Fujita, Koki)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90264100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：重水素ラベルのテルピノレンを合成し、*C. lusitanica*培養細胞に投与し、ヒノキチオールへの取り込みをGCMSで測定した。重水素ラベルはヒノキチオール内で検出され、テルピノレンが最初のオレフィンモノテルペン代謝中間体であることが分かった。重水素ラベルのテルピノレンあるいは天然同位体のテルピノレンを培養細胞系に投与した系、それぞれをGCMSで分析し、重水素ラベルの存在から未知の中間体(4以降の物質)を探索したが説明がつかないものであった。よって、文献調査などの結果も含めて再検討した結果、最終段階の反応がP450ではなく、ジオキシゲナーゼである可能性が考えられた。

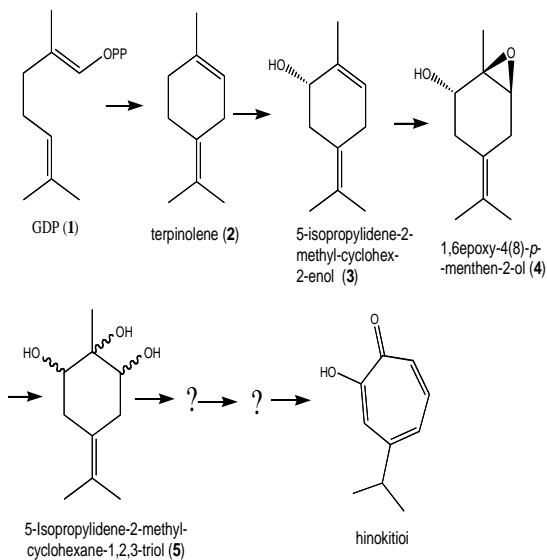
研究成果の概要(英文)：Feeding experiment with deuterized terpinolene into *Cupressus lusitanica* cultured cell revealed that terpinolene is the first olefin monoterpene intermediate to biosynthesize beta-thujaplicin. This pathway was the first report that tropolon ring was formed from terpenoid. Searching other intermediates by comparing GCMS analysis of extractives from normal and deuterized terpinolene fed to the cell did not give the good candidate of the intermediates. Therefore, we should consider another pathway driven by dioxygenase.

研究分野：樹木生化学

 キーワード：ヒノキチオール トロポロン環 テルピノレン GCMS P450 ジオキシゲナーゼ テルペン *Cupressus lusitanica*

1. 研究開始当初の背景

ヒノキチオールは一部のヒノキ科植物の心材成分であり、その強力な広い抗菌スペクトルから、材の高耐久性に寄与していることが知られている。ヒノキチオールは共役七員環化合物(トロポロン類)であり、これは非ベンゼン系共役化合物と分類される。非ベンゼン系共役化合物は、特別な化学的性質を持つことから一学問領域を形成するほどの広がりがあり、抗菌性以外にも液晶材料など様々な機能性材料として期待されるものである。申請者はメキシコイトスギ(*Cupressus lusitanica*)培養細胞を用いてそのヒノキチオールの生合成経路の検討を行ってきた。そして、各種ラベル化基質投与実験を組み合わせることで、樹木内においては、過去に細菌や糸状菌で解明されたトロポロン類の合成経路とは明らかに違う経路でヒノキチオールが生成することを示した<sup>2)</sup>。細胞内テルペノイドの同定<sup>3)</sup>と、投与実験の結果からは、過去に示された経路と違うことだけでなく、Fig.1の経路を予想することができた。既に、terpinolene(2)がこの反応の出発物質であることを証明する実験は進行中であり、エポキシド(4)までの粗酵素反応の詳細は学会発表済みである<sup>4)</sup>。基質(2)から(4)に至る反応に参与するシトクロームP450のクローニングおよび異種発現は現在検討中である。



- 1) A fresh look at tropolonoids. R. Bentley, Nat prod rep, 25, 118-138, 2008  
 2) Biosynthetic pathway of  $\square$ -thujaplicin in the *Cupressus lusitanica* cell culture. K. Fujita et al., J plant physiol, 156(4),

462-467, 2000

3) Monoterpenes produced by *Cupressus lusitanica* cultured cells including a novel monoterpene (1S, 2S, 6S)-(+)-1,6-epoxy-4(8)-p-menthen-2-ol. Y. Matsunaga et al., Natural Product Research, 17 (6): 441-443, 2003

4) 例えば、原田貴子ら、*Cupressus lusitanica* 培養細胞におけるモノテルペンの酸化的代謝(4),第61回日本木材学会大会(京都), 2011

2. 研究の目的

未知の植物独自のトロポロン環生成機構が存在することは間違いなく、その新規性・有用性が期待されるので、ヒノキチオールの産業的生産や、独特の酵素化学機構の解明のために、その経路を明らかにしなければならない。

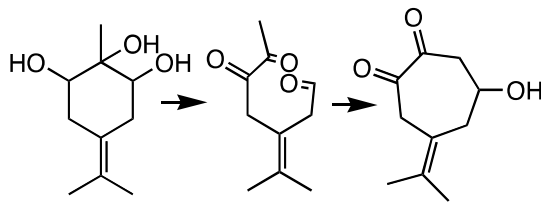


Fig. 2 可能性のある環拡大反応

最低限必要な情報は、1. 七員環(ヒノキチオール)生成直前の基質は何であるか?そして、2. その基質を変換させることができる(粗)酵素反応条件はどのようなものか?である。トリオール(5)のジオール構造が参加解裂して開環し、メチル基を取り込んで七員環を生成すると予想している(Fig. 2)。上記二点が明らかになれば、基質の構造と反応条件からどのような有機化学的な反応機構が機能しているのか、またどのような種類の酵素が働いているかを想定することができる。

ここで取り上げられるヒノキ科樹木内での七員環化合物生成経路は、他の生物におけるトロポロン類生成の機構と全く異なることが、申請者らの過去の研究で明らかになった<sup>1) 2)</sup>。類似の反応が存在しないことから、当申請の研究によって、全く新しい環拡大反応系が提示されることが期待される。また、トロポロン類には特別な機能性を持つものが多いことから、新しい反応系の提示によって新規の機能性化合物製造の市場が開拓されると思われる。さらに、この反応の生合成に参与する遺伝子の取得が成されれば、その遺伝子の導入によって物理特性と防腐特性を兼ね備えたスーパーウッドの育種にもつながると考えられる。

3. 研究の方法

a. ラベル化テルピノレン投与実験(オレフィンモノテルペン中間体の解明)

重水素ラベルのテルピノレンを合成し、*C. lusitanica* 培養細胞に投与し、ラベル原子のヒノキチオールへの移行を観察することで、予想経路の確認を取る。

b. エポキサイド(4)の粗酵素反応

エポキサイド(4)はトリオール(5)へと変換されると予想している。可能性のある酵素は P450 もしくは epoxi-hydrolase と考えられるので、主にこの二種のアッセイ条件でエポキサイド(4)の粗酵素反応を行い、生成物を GC / MS もしくは LC / MS にて分析する。

c. 環解裂中間代謝物の精査

ヒノキチオール生産条件下での細胞抽出物を GC / MS もしくは LC / MS で分析を行う。この細胞培養系はエリシター添加などのヒノキチオール生産条件下でないと各種中間体も作らないので、非ヒノキチオール生産条件下での抽出物の分析結果と比較し、代謝中間体と思われる物質を探索する。エポキサイド(4)、トリオール(5)から酸化的に精製すると予想される分子の分子量から目的物質を探索していく。

#### 4. 研究成果

重水素ラベルのテルピノレンを合成し、*C. lusitanica* 培養細胞に投与し、ヒノキチオールへの取り込みを GCMS で測定した。重水素ラベルはヒノキチオール内で検出され、テルピノレンが最初のオレフィンモノテルペン代謝中間体であることが分かった。これにより、ヒノキチオールがテルペン由来のトロポロンであることが証明された。

エポキサイド(4)の粗酵素反応を試みたが生成物を検出できなかった。細胞内にはトリオール(5)が存在することは示されたので、酵素取得条件・反応条件の改善により発見可能で有ると思われる。

重水素ラベルのテルピノレンあるいは天然同位体のテルピノレンを培養細胞系に投与した系、それぞれを GCMS で分析し、重水素ラベルの存在から未知の中間体((4)以降の物質)を探索した。質量分析では構造を特定できない物質がいくつか検出されたが、Fig. 1 に記されている物質では説明がつかないものであった。よって、文献調査などの結果も含めて再検討した結果、最終段階の反応が P450 ではなく、ジオキシゲナーゼである可能性が考えられた。

#### 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 3件)

Takako Harada, Koki Fujita, Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi, Stereo-selective

oxidations of terpinolene by cytochrome P450 monooxygenases in the microsomal fraction of *Cupressus lusitanica* cultured cells, *JOURNAL OF WOOD SCIENCE*, 査読有り、60, 6, 446-452, 2014

Koki Fujita, Yasufumi Bunyu, Ken-ichi Kuroda, Tatsuya Ashitani, Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi, A novel synthetic pathway for tropolone ring formation via the olefin monoterpene intermediate terpinolene in cultured *Cupressus lusitanica* cells, *Journal of Plant Physiology*, 査読有り、171, 8, 610-614, 2014

Takako Harada, Eriko Harada, Ryoko Sakamoto, Tatsuya Ashitani, Koki Fujita, Ken'ichi Kuroda, Regio- and Substrate-specific Oxidative Metabolism of Terpinolene by Cytochrome P450 Monooxygenases in *Cupressus lusitanica* Cultured Cells, *American journal of plant sciences*, 査読有り、3, 268-275, 2012.

[学会発表](計 3件)

藤村隼人, 藤田弘毅, 堤祐司, d6-ラベル化テルピノレン投与による *Cupressus lusitanica* でのヒノキチオール生合成中間体の探索、第21回木材学会九州支部大会(熊本)2014

豊丹生泰史, 藤田弘毅, 黒田健一, 芦谷竜矢, 堤祐司, テルピノレンはヒノキチオール生合成中間体である、第63回日本木材学会大会(盛岡), 2013.

TAKAKO HARADA, KOKI FUJITA AND YUJI TSUTSUMI, The relationship between the time courses of the -thujaplicin production and of the activities of terpinolene oxygenases in *Cupressus lusitanica* cultured cells, 28th International Society of Chemical Ecology(Vilnius, Lithuania), 2012

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001620/research.html#21407338793554225991>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 弘毅 (Fujita, Koki)

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 (TSUTSUMI Yuji)

九州大学大学院・農学研究院・教授

研究者番号：30236921

### (3) 連携研究者

一瀬 博文 (ICHINOSE Hirofumi)

九州大学大学院・農学研究院・准教授

研究者番号：00432948