

報告番号 ※ 甲第 849 号

主論文の要旨

主論文題目

BIOSYNTHESIS OF TERPENOID IN DISEASED
SWEET POTATO

(罹病サツマイモにおけるテルペン合成)

氏名 小國 伊太郎

主論文の要旨

報告番号 ※甲第 849 号 氏名 小國伊太郎

一般に植物組織が病原菌の侵入を受けると、宿主と寄生者が相互作用を営む被害部（病原菌侵入部位）に、異常代謝産物が生成蓄積し、しかも、多くの場合、その異常代謝産物は抗菌作用を持ち、菌の侵入を抑制するものとみなされている（これらの抗菌性物質は phytoalexin と呼ばれている）。これらの異常代謝産物の生成機構およびその調節機構の解明は、病理化学の面で重要であるばかりでなく、生物の代謝調節のメカニズムを考える上で重要であると思われる。サツマイモが黒斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata*) に感染すると、健全時には存在しなかった異常代謝物であるテルペノイド類（その代表的なものは ipomeamarone; Ip と略す）が、その被害部に生成蓄積する。これらのテルペノイドは、他のテルペノイド含有植物にくらべて、非常に早く、かつ著量につくられるので、罹病サツマイモ組織は、テルペノイド生成を調べる上で非常によい材料であると思われる。

テルペノイド生合成機構は、次の如く大別できる。

- ① 初発物質である acetyl CoA (AcCoA と略す) のテルペノイド合成部位への供給の問題。
- ② AcCoA から isopentenylpyrophosphate (IPP と略す) の

生成反応。

① IPP から prenylpyrophosphate の生成の縮合反応。

② 後半の閉環反応。

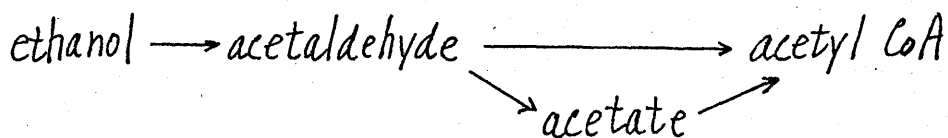
このうち①および②の問題については多くの研究の結果、動物、植物、微生物において大差なく、共通の経路を経ることが明らかになっている。②の AcCoA の供給の問題については、ラットを以て非反刍動物の脂肪酸合成で ATP: citrate oxaloacetate lyase (EC 4.1.3.8; ACL と略す) の経路が AcCoA の供給に重要な役割を持つことが Lowenstein らによって明らかにされている。しかしながら、植物、微生物においてはほとんど調べられていないのが現状である。罹病サツマイモのテルペノイド合成においても、AcCoA の供給の問題は糖質代謝と脂質合成との相互間の調節の機構を理解する上で重要であると思われる。②の後半の閉環反応については、mevalonate 以降の化合物を用いた研究は、二、三の例をのぞいてはほとんどなされておらず、テルペノイド合成機構の後半の閉環機構は、Ruzicka らのイソフレン則に基づく推論の域を脱していないのが現状である。本研究では上記の①、②の問題に中心を置いて、罹病サツマイモ組織に生成蓄積する Ip の合成機構と、その調節機構を *in vivo* の系を用いて検討した。

(I) AcCoAの供給の問題については、すでに述べたように、非反刍動物においては、citrate経由のACL関与の系が重要な役割を持つことが明らかになっている。そこで先ず、^四罹病サツマイモ組織においても、このACL経路がテトラノイド合成のためのAcCoAの供給に関与しているか否かを調べるために、罹病サツマイモ組織に、citrate-1,5-¹⁴C, pyruvate-3-¹⁴C および acetate-2-¹⁴C を投与し、その¹⁴CのIpへの取込みに対する(-)-hydroxycitrateの影響を検討した。その結果、0.025Mの(-)-hydroxycitrateで罹病組織を前処理すると、citrate-1,5-¹⁴Cの¹⁴Cのlipid fraction および Ipへの取込量は、それぞれ81%, 92%阻害された。また、citrate-1,5-¹⁴Cのかわりにpyruvate-3-¹⁴Cを投与した場合には、阻害率はそれぞれ32%, 33%であった。しかしながら、acetate-2-¹⁴Cを用いた場合には、その¹⁴Cのlipid fraction および Ipへの取込みに対する(-)-hydroxycitrateの影響は見られなかった。これらの結果は、罹病サツマイモにおけるACLの経路は、そのテトラノイド合成に必要なAcCoAの供給に、あまり関与していないことを示唆している。このことは、次のTCAサイクルの阻害剤であるmonofluoroacetate (aconitaseの阻害剤; Facと略す)を用いる阻害実験によっても示唆される。すなわち、罹病サツマイモ組織をFacで前処理したあと、pyruvate-3-¹⁴C

を与え、その¹⁴C a lipid fraction および Ip への取込みに
 対して Fac の影響を調べた。その結果、Fac 処理を可
 すると無処理の場合と比べ、pyruvate-3-¹⁴C からの¹⁴C は
 Ip へ数倍多く取込まれるが、しかし Ip の合成量は Fac
 処理によって影響されなかった。一方、glucose-U-¹⁴C か
 らの¹⁴C a Ip への取込量は Fac 処理で、いさぎよく減少
 した。もし、罹病サツマイモ組織において、ACL が AcCoA
 の供給に重要な役割を持つならば、Fac 処理で pyruvate
 -3-¹⁴C が Ip へ数倍多く取込まれる条件下 (citrate が蓄
 積する条件) で、Ip の合成量は増加すると考えられるが、
 Fac 処理によって Ip の合成量には変化は見られなかった。
 このことは、L-)-hydroxycitrate を用いた実験の結果を支持
 している。これらのことより、Fac 処理をした場合、pyruvate-
 3-¹⁴C の¹⁴C が Ip へ数倍多く取込まれる現象は、次のよう
 に説明される。すなわち、Fac 処理を可すると細胞内に
 citrate が蓄積し、その結果、解糖系の抑制がおこり、
 pyruvate の pool size が小さくなり、そのため、細胞内の
 pyruvate の比活性が高くなり、pyruvate から Ip へ¹⁴C が多
 く移行したものと推定される。

次に、AcCoA の供給に対して ACL 以外の別の可能性
 が調べられた。罹病サツマイモ組織における、AcCoA
 synthetase の活性は、短期間に急速に合成されるため

ノイド合成量を十分に説明できないことが今までの予備実験から考えられたし、また、サツマイモを含む植物界には、pyruvate decarboxylase (2-oxoacid carboxyl-lyase; EC 4.1.1.1) が広く分布していることが知られているので、植物組織においては、cytosolで pyruvate から AcCoA が合成される可能性が考えられる。更にまた、二、三のバクテリアにおいては、ethanol から直接 AcCoA が生成することが報告されているので、この可能性を調べるために、ethanol-2-¹⁴C の ¹⁴C の lipid fraction および Ip への取込みを検討した。その結果、ethanol-2-¹⁴C を与えた後、2時間では Ip に与えた ethanol-2-¹⁴C の約 4% が取込まれた。このように ethanol-2-¹⁴C が非常に効率よく Ip に取込まれるので、その取込みを acetate-2-¹⁴C の場合と比較したところ、ethanol-2-¹⁴C は、acetate-2-¹⁴C よりも約 2倍早い速度で Ip に取込まれることが判明した。そして罹病サツマイモ組織では、alcohol dehydrogenase の強力な阻害剤である pyrazole を前処理すると ethanol-2-¹⁴C の Ip への取込みは著しく減少した。このことは、罹病サツマイモ組織に、



この経路が作動しており、このようにして生じた AcCoA が Ip に取込まれたものと考えられる。 acetate-¹⁴C, citrate-¹⁴C

の¹⁴Cが lipid fraction および Ip にある程度取込まれる
 ことや、上の結果から考へて、罹病サツマイモにおけるテルペ
 ノイド合成に必要な AcCoA は、たゞ一つの経路によって
 供給されるのではなく、本文 (Fig. 31) に示されている
 複数の経路によって供給されると推定できる。このこ
 とは、罹病サツマイモにおける急速なテルペノイドの合成速度
 (感染後 2~3 日で fresh weight あたり 数% のテルペノ
 イドが合成される) を考へると、妥当なものと思われる。

(II) 後半の閉環機構を調べるとには 三つの方法が考
 えられる。

(i) farnesol のような ラベル化合物のテルペノイドへの取
 込みを試みる方法。

(ii) テルペノイド生合成の後半の中間体を同定する方法。

(iii) テルペノイド間の変換を試みる方法。

先づ最初に今までの実験の結果、geraniol, farnesol,
 および nerolidol が acetate-¹⁴C から Ip への¹⁴C の取込み
 において trapping 効果、希釈効果 および 阻害効果を示すことが明
 らかになっているので、これらの terpenol が Ip 生合成に関与
 するといふ直接的な証拠を得るために、これらの terpenol
 のラベル化合物を予へ、その¹⁴C が、Ip に取込まれることを
 証明する必要がある。そこで farnesol-2-¹⁴C の合成を試
 みた (acetate-¹⁴C, mevalonate-¹⁴C は市販されているが

farnesol-¹⁴C は市販されていないので、すなわち変法 Wittig 反応を応用して、従来の Reformatskii 反応を用いる化学合成法や、生合成法よりも、簡単に比活性の高い farnesol-2-¹⁴C を合成した。このように合成した farnesol-2-¹⁴C を罹病サツマイモ組織に与え、その¹⁴C の Ip への取込みおよび Ip の生成量を経時的に調べる。その結果、farnesol-2-¹⁴C を与えた後 3 時間で、Ip に与えた farnesol-2-¹⁴C の約 3% が取込まれ、この¹⁴C の取込みは時間の経過と共に増加し、21 時間で 6% 以上の高率で取込まれた (Ip の結晶誘導体である Ip semicarbazone を作り、その再結晶を繰り返しても比活性は低下しなかった)。Ip への取込みを、更に確認するために、lipid fraction を TLC で分離した後、radioautogram にかけたと、Ip a band 以外にも多くの band が認められたが、Ip a band の density は高く、また、Ip の radioautogram のホターンは、Ehrlich 試薬による発色ホターンともよく一致した。一方、この取込みと Ip a 生成量から、Ip a 比放射能を求め、この値を farnesol-2-¹⁴C の比放射能と比較して dilution factor を求めると、38 であった (同様に acetate-2-¹⁴C を用いた場合、dilution factor を求めると約 560 であった)。このように farnesol-2-¹⁴C を与えた場合、dilution factor が acetate の場合よりも小さいと、更に farnesol-2-¹⁴C を罹病サツマイモ組織に与えた

場合、 C_{14} が methanol-water fraction にほとんど取込まれないことから、farnesol- $2\text{-}^{14}\text{C}$ が直接 Ip に (farnesol が acetate などに分解されたのちに Ip に取込まれるのではないかと) 取込まれることを示している。これらの結果は、farnesol をもその誘導体が Ip の前駆体であることを示している。

次に、罹病サツマイモの lipid fraction を silica gel の TLC にかけると、十数種類の Ehrlich 試薬陽性の TLC スポットが分離し、その中に Ip と TLC 上によく似た挙動を示す成分 ipomeamarone' (Ip' と略す) が存在することが知られている。さらに、Ip' が Ip よりも経時的に早く生合成されることがわかったので、Ip' の構造を明らかにすると共に、Ip 生合成との関連について検討した。その際、最近キク科植物より分離された dehydro-ngaione ($[\alpha]_D - 8.8^\circ$) を比較標品として用いた。その結果、Ip' は油状で、 $[\alpha]_D + 14.7^\circ$ (in ethanol) を示し、その構造は、IR スペクトルで Ip と似ており、新たに、 $\alpha\beta$ -不飽和ケトン ($1683, 1625 \text{ cm}^{-1}$) の存在が認められ、更に、UV スペクトル (EtOH) $\lambda_{\text{max}} 239 \text{ nm}, 211 \text{ nm}, \epsilon \approx 12,000$) で $-\text{C}=\text{C}-\text{CO}-$ の存在がわかった。Ip' の NMR スペクトル ($\text{CDCl}_3, 100 \text{ MHz}$) は Ip のそれによく似ているが、Ip の isopropyl 基の methyl の signal とはちがって、そのかわりに $\delta 1.81, 2.09$ にそれぞれ 3H の broad singlet および Ip' には新たに、 $\delta 6.11$ に 1H

a broad singlet の signal が認められた。さらに、Mass
 スペクトルで $m/e: 248$ を示した。以上のスペクトルデータか
 ら、Ip' は Ip の C₁₂, C₁₃ 位に二重結合を有する構造
 と考え、Ip' を dehydro-ipomeamarone (Dehydro-Ip と
 略す) と命名した。更に、Dehydro-Ip が Ip に生合成的に
 効率よく変換すると、Dehydro-Ip と dehydro-ngaione
 の optical rotation の関係、および Ip と ngaione との立体構
 造が antipode であることから、Dehydro-Ip と dehydro-ngaione
 は antipode であると断定した。

次に、Dehydro-Ip が Ip 生成にどのような影響を及ぼすか
 を検討した。先づ、acetate-2-¹⁴C の ¹⁴C が Ip へ
 取込みにおよぼす Dehydro-Ip の影響を調べた。その
 結果、罹病サツマイモ組織に、予め Dehydro-Ip を与え
 た場合、無添加の時に比べて acetate-2-¹⁴C が Ip へ
 の ¹⁴C の取込みは著しく減少した。組織に与えた
 Dehydro-Ip を TLC で re-isolate するとその中に放射能
 がみられた。また ¹⁴C でラベルした Dehydro-Ip を罹病
 サツマイモ組織に投与した場合、6 時間で Ip に与えた
 Dehydro-Ip の約 20% が取込まれた。更に、Dehydro-Ip
 が Ip 生成を多少阻害することもわかった。これらの結果は、
 Dehydro-Ip が Ip 生成の前段階の前駆体であることを示し
 ている。このことは farnesol から furan ring および hydro-

furan ring が形成されたので、Ip 生合成の最終段階で還元反応がおこることを示している。

次に、 ^{14}C でラベルされている Ip を用いて、Ip が他のテルペノイドに変換されるかどうかを調べられた。その結果、Ip は少なくとも二つの成分に変換された。この成分の一つが、TLC 上で ipomeamaroneol (Ip-OH と略す) とよく似た挙動を示した。このことは、Ip-OH が Ip から生成される可能性を示し、Dehydro-Ip, Ip および Ip-OH との間、の生合成上の相互関係は次の順序であることを示唆している。

