

サツマイモにおけるテルペン

生合成の生化学的研究

井 上 博 雅

サツマイモにおけるテルペン

生合成の生化学的研究

井上 博雅

名古屋大学図書
和 818257

報告番号	甲第 1343 号
------	-----------

目 次

	頁
序論	
本論	3
第1章 <i>in vivo</i> の実験による FPP 以降 のテルペン生合成経路	11
材料と方法	14
結果	20
考察	37
第2章 <i>in vitro</i> の実験による FPP 以降 のフラノテルペン生合成経路の酵 素的解析	42
材料と方法	44
結果	51
考察	74
文献	81
結語	85
謝辞	90

略号

本論文では、下記の略号を用いる。ただししばしば慣用されるもの（例えば、NADPHなど）は除外してある。

Ip	ipomeamarone (イポキサマロン)
IpOH	ipomeamaronol (イポキサアロール)
DHIp	dehydroipomeamarone (デヒドロイポキサマロン)
OHMy	4-hydroxymyoporone (4-ヒドロキシミオポロン)
OHDHMy	4-hydroxydehydromyoporone (4-ヒドロキシデヒドロミオポロン)
FOH	farnesol (ファルネソール)
c,t-FOH	cis,trans-farnesol (シス,トランス-ファルネソール)
t,t-FOH	trans,trans-farnesol (トランス,トランス-ファルネソール)
GOH	geraniol (ゲラニオール)
FPP	farnesyl pyrophosphate (ファルネシルピロリン酸)
IPP	isopentenyl pyrophosphate (イソペンチニルピロリン酸)
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル コエンザイム A)
FDH	farnesol dehydrogenase (ファルネソール脱水素酵素)
EtOH	ethanol (エタノール)
MeOH	methanol (メタノール)
CHCl ₃	chloroform (クロロホルム)
ICH ₂ CONH ₂	monoiodoacetamide (モノヨドアセトアミド)
K-リン酸	potassium phosphate (リン酸カリウム)
G-6-P	glucose 6-phosphate (グルコース 6-リン酸)
HPLC	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)

序 論

植物は一ヶ所に固着して生育しそのため動物、昆虫さらにカビ、ウイルス等におかされることが多い。しかし無条件に侵入、貪食を許してはいない。動物または昆虫同士にみられる生存競争ほど人目を引きやすいわけではないが、数多くの防衛機構を持っている。たとえば侵入する動物等に対して毒物となるシアン化合物、アルカロイド類等を含育することにより摂食を受けることから自分自身を守っている。また、昆虫に対して有害なピレスロイド、ロテノイド等やさらに昆虫に対する忌避物質、摂食阻害物質等を持つものもある。また微生物等の侵入に対しては、抗菌性物質 (phytoalexin) をつくったり過敏感死することによりそれを防止している。これら防衛機構をになう成分のうち多くは2次代謝産物であり、そのうちテルペン類も含まれる。

サツマイモ塊根組織が、黒斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata* Ell. and Harst.) の侵入を受けると、その

被害部に多量のセスキテルペン類を蓄積し抗
 菌性を示すことが知られている¹⁾。この作用に
 ついてはテルペンの種類により多少の差異は
 あるが、これらの疎水的な性質も菌糸の侵入
 阻止に役立っているといわれている²⁾。サツマ
 イモの phytoalexin として現在までに構造が明ら
 かになったセスキテルペン類には、イポ^o×ア
 マロン (Ip)^{3,4)}、イポ^o×アマロノール (IpOH)^{5,6)}、デヒ
 ドロイポ^o×アマロン (DHIp)⁷⁾、7-ヒドロキシ
 ミオポロン⁸⁾、4-ヒドロキシミオポロン (OHMy)⁹⁾、
 4-ヒドロキシデヒドロミオポロン (OHDHMy)¹⁰⁾、
 ジヒドロ-7-ヒドロキシミオポロン¹¹⁾、ミオポロ
 ン (My)¹²⁾、6-ミオポロール¹²⁾、1-ミオポロール¹²⁾ 及び A₁¹³⁾
 と A₂ 成分がある (図1)。

他に Myoporum^{14,15)} や Anthemideae¹⁶⁻¹⁸⁾ に属する植物か
 ら同様なフラニ環を含むセスキテルペン類が
 見い出され、今までに明らかになったものの
 うちには Ip、DHIp、My、A₁ と A₂ 成分と平面構
 造の同じものがあった。しかし、これら植物
 から分離された ngaione は Ip と同じ構造を持つ

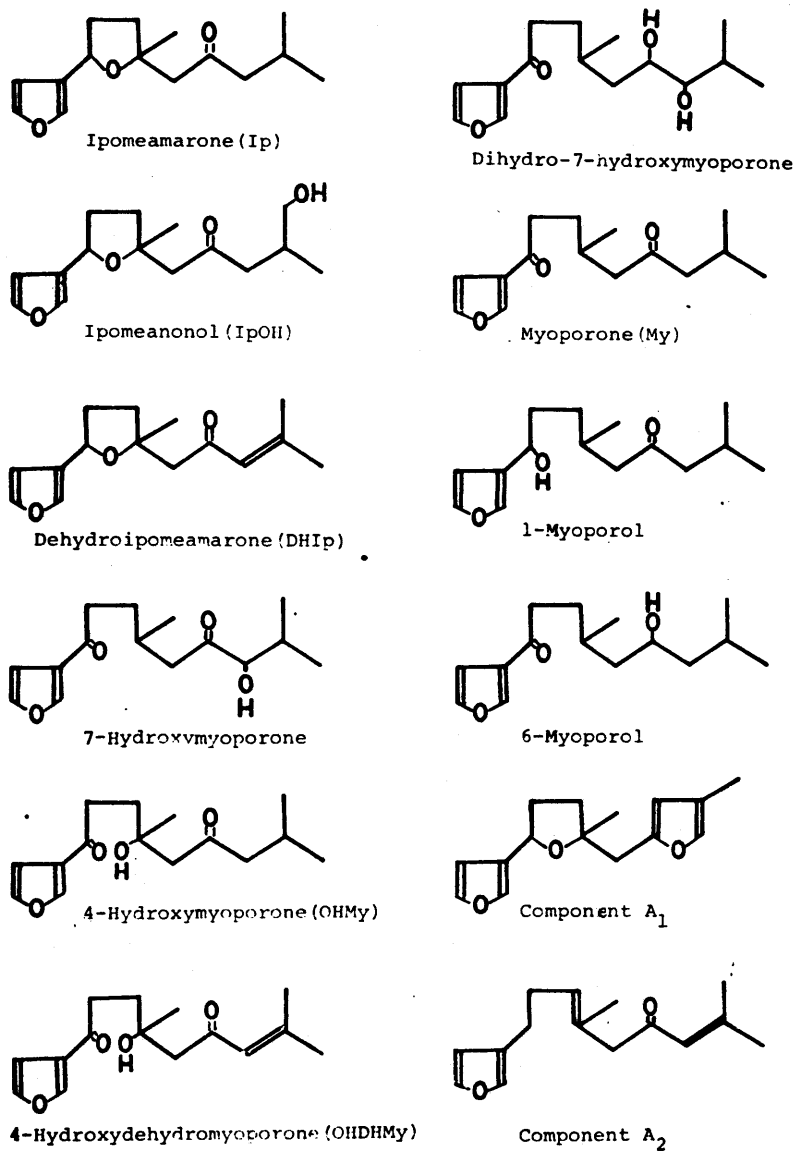


Fig. 1. Furano-terpenes in diseased sweet potato,

が立体構造を異にする enantiomorph であることが示された。¹⁹⁾ 同様に dehydro-ngaione も立体異性体であることが示された。²⁰⁾ さらにサツマイモからの My と *Myoporium* 属からの My は $[\alpha]$ だけを異にし、^{12,14)} これらのことから類推してサツマイモ塊根被害部に含まれる一連のテルペン類も全て他の植物にみられるものと光学的異性体となっていると推定できる。その他の植物においてフラン環を持つセスキテルペン類は少なく、今のところ被害部にみられるこの種のテルペン類はサツマイモ又その近縁種²⁰⁾ に特異的なものといえる。

上記テルペン類の蓄積は、新鮮または切断を受けたサツマイモ塊根組織中には全くあるいはほとんどみられず、*C. fimbriata* の他に *Fusarium solani*²¹⁾ 等のカビの侵入、アリモドキゾウムシ、イモゾウムシ等の昆虫の食害²²⁾ または昇汞等の有害化学試薬処理²³⁾ によってひき起こされる。*C. fimbriata* の感染によりつくられるセスキテルペン類のうちほとんどは、*F. solani*

の感染²¹⁾または昇汞処理²³⁾においても見い出され
 ている。しかし *F. solani* の感染による場合、他
 の2者の場合と異なりイポメアニン、1-イポメ
 アノール、4-イポメアノールと1,4-イポメアジオール
 といったフラン環を含むテルペン(C₉)がつく
 られる²¹⁾。この場合、まずカビの作用によりサ
 ツマイモにテルペン類が蓄積し、次にテルペ
 ン類の1つである OHMy がそのカビ自身により
 代謝されてつくられるという⁹⁾。したがってサ
 ツマイモでの生合成に注目する場合、*F. solani*
 を用いることは不適當であろう。他方 *C. fimbriata*
 接種でも昇汞処理でも、今のところほぼ同種
 類のテルペン類が生成する。しかし図1に見
 られるものの中一方には存在するが、他方には
 ないものもある。一方昇汞処理の場合これら
 テルペン量の蓄積は *C. fimbriata* の場合に比べ約
 1/5程度であったことからしても上記昇汞処理
 の結果は *C. fimbriata* の場合とは多少とも質的に
 異なる合成の機構が存在するのかもしれない
 。ナス科植物の phytoalexin であるリシチン²⁴⁾は、

非感染ジャガイモ組織によってより親水的な物質に転換してゆく。²⁵⁾ サツマイモの場合も同様に、Ipは非感染組織により代謝され、切断後経時的に代謝速度は増し、C. fimbriata接種の場合逆にみかけ上代謝速度は減少する。²⁶⁾ このことからC. fimbriata接種の場合、昇汞処理に比べ、合成・蓄積対分解の比が大きいものとみなされ、テルペン生合成に注目した場合テルペン誘導因子として適していると考えられる。一方で黒斑病菌は切断部位より感染し、テルペンの蓄積は切断表面に続く被害部にみられることから感染に対するサツマイモ塊根組織を調べる場合には一方で切断に対する反応も対照として分析する必要がある。

一般にテルペン生合成はプレニル中間体(ここではファルネシルピロリン酸(FPP))の合成までメバロン酸経路によることが知られている。^{27,28)} 実際接種サツマイモにおいてアセチルCoAからイソペンテニルピロリン酸(IPP)までの関連諸酵素の存在が無細胞系で次々に

明らかになった。²⁹⁻³¹⁾ IPP は次に植物、微生物に
広く見い出された prenyl transferase³²⁾ の作用によ
り FPP まで縮合すると考えられる。またアセ
チル CoA 供給系についても調べられ、この全
容が明らかになりつつある。³³⁾ しかし他方接種
サツマイモではそれに特異的な上記各種テル
ペン類をつくるため、FPP 以降特異的な生合
成経路が形成されるものと考えられる。した
が、³⁴⁾ 其他の植物の例からこの場合の生合成経
路を知るのには直接参考にはならず接種サツ
マイモの系を用いた実験が必要となる。

本論は次の二つの章からなっている。

第 1 章では、接種サツマイモにおけるテル
ペン生合成経路を明らかにする目的で、3 種
類の *in vivo* の取込実験を行なった。そうして
考察に、現在考えられるテルペン生合成推定経
路を示したい。

第 2 章では、フラノテルペン生合成経路を
より明瞭に推定または証明する目的で、2 種
類の酵素について調査した。1 つはファルネ

ソール (FOH) 脱水素酵素についてであり、精製
と性質について述べる。もう一つは DHlp 還元
酵素であり、その諸性質について述べる。

第1章 *in vivo* の実験による FPP 以降のテルペン生合成経路

FPP 以降のフラノテルペンの生合成経路について調べられたものとして、小国らの FOH³⁴⁾ の Ip への転換実験の結果をあげることができる。同様にゲラニオール (GOH) も Ip への転換の可能性を示したことは³⁵⁾、組織中で GOH が一旦ピロリン酸化されたことを示している。たとえば発芽中のマメの磨砕液中でインキュベートするだけでもピロリン酸化された結果がある³⁶⁾。したがって FOH も組織中で^{ピロリン酸化}されると考えられるが、このことが Ip 等への転換に必要なかどうかは明らかではない。また小国らは DHP を単離し³⁷⁾、これが Ip 生合成の最も近い中間体であることを示した。さらに彼らは Ip が IpOH と同じ画分に移行することを示し、Ip から IpOH に転換されることを暗示した³⁸⁾。一方で最近 Burka らは長時間インキュベートした結果である³⁹⁾が、Ip が OHMy に転換されることを示した。

以上のように断片的ではあるが最近になってテルペン間転換反応について明らかにされつつある。

本章ではさらに FPP 以降の生合成経路を知る目的で3種類の *in vivo* の実験を行なった。オ1の実験では胞子接種後経時的に1時間づつ¹⁴C-酢酸を取り込ませ、各時期でのテルペン生合成の速度と生成された成分について調べた。オ2の実験ではテルペン生合成の盛んな黒斑病菌胞子接種36時間後の組織のうちの隣接健全組織を用い、低温条件下での¹⁴C-酢酸によるパルス-チェイス実験を行なった。この中で未知中間体の検出と既知成分の経路上での位置を明らかにしようとした。オ3の実験ではTLCを行なった後のパターンを調べるとOHDMyにごく隣接した(R_f値のより小さい)部分にEhrlich試薬による発色のこく似したスポットのあることをみい出し、これを分離、精製し構造決定を行なったが、この物質は新物質でありOHDHMyと命名し、この成分の組織内変換を調

へることして。

材料と方法

材料

サツマイモ (*Ipomoea batatas* Lam. cv. Norin No.1) 塊根は愛知県苅谷農場で収穫され、実験に供するまで10から14℃で保存された。2-¹⁴C-酢酸は Radiochemical Centre, Amersham から購入された。

OHDHMy の精製

塊根組織 (1.8 kg) を 5-10 mm の厚さに輪切りにし、切断表面に黒斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata* Ell. and Halst.) 胞子懸濁液を接種し、29℃、多湿条件下で3日間インキュベートした。接種組織切片は約2倍の CHCl_3 -MeOH (1:1) 中で磨砕し磨砕液を濾過した。残渣は同じ溶液で2度抽出した。得られた CHCl_3 -MeOH 溶液を合せ、水を加え容積比を CHCl_3 -MeOH-水, 1:1:1 とした。 CHCl_3 層を減圧濃縮し 46.5g の油状物質を得、シリカゲルカラム (350g) にかき 2ℓ の n-ヘキサン-酢酸エチル (8:2) 及び 1ℓ の n-ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で段階的に溶出した。OHDHMy のすぐ後に目

的の成分が溶出されこれを集めた(1.1g)。本成分をn-ヘキサン-酢酸エチル(1:1)によるシリカゲルHF₂₅₄ TLCにより分画し、さらにベンゼン-酢酸エチル(23:2)を用い開放系のTLCで精製し、機器分析に供し構造決定した。精製度は日立ゲル#3040カラムによる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)装置(日立635型)を用いn-ヘキサン-エーテル(3:7)で溶出し調べた。

¹⁴C-OHDHMyの調製

塊根組織から組織切片(厚さ2mm、直径10mm)5コを調製し、これを高湿度下29℃で1日間インキュベートし、0.1%の昇汞溶液を吸収した口紙を敷いたペトリ皿に置いた。この切片の上方の切断面に2-¹⁴C-酢酸溶液(切片当り50 μ l、50 μ Ci、比活性58.2mCi/mmole)を塗布し、29℃で12時間インキュベートした。

インキュベート終了後、切片を氷冷水で洗浄し、CHCl₃-MeOH(1:1, v/v)溶液中で磨砕した。磨砕液をガラスフィルターで濾過し、濾液に与の容量の水を加えた。遠心でCHCl₃層をMeOH-水層から分け、それぞれをCHCl₃画分、MeOH-

H₂O 画分と呼ぶことにした。CHCl₃ 画分を減圧乾燥ののち粗テルペンを得た。

粗テルペンは α -ヘキサン-酢酸エチル (1:1, v/v) を展開溶媒とするシリカゲル TLC に供し、OHDHMy 画分を得た。それを μ Bondapak C-18 カラム (Waters Associates) をとりつけた日立 635 型高速液体クロマトグラフ (HPLC 装置) にかけて 60% MeOH 水溶液で溶出した。それにより得られた OHDHMy は 54.3 μ Ci/mmol の比放射能を示し、くり返し HPLC を行なっても比放射能は変化しなかった。

組織へのラジオアイソトープの供与

ここではラジオアイソトープを用いた3種類の実験を行なった。前2者は 2-¹⁴C-酢酸を取り込ませる実験であり、後の1つは ¹⁴C-OHDHMy を取り込ませる実験である。

才1の実験において、塊根組織を 2cm の厚さに切断し、黒斑病菌胞子懸濁液 (1×10^7 /ml) を塗布し、高湿度下 29℃ で適当な時間インキュベートした。インキュベート後組織から感染部

を含む直径20 mm、厚さ2 mmの薄片4コを調製し、被害部を下にしてペトリ皿中の金属網上に置いた。これら薄片上方の切断表面に2-¹⁴C-酢酸溶液(全容積160 μ l中に酢酸3.8 μ Ci, 1.6 μ mole)を与え、29℃で1時間インキュベートした。

才2の実験において上述のように胞子を接種し、36時間インキュベートした塊根組織から被害部(厚さ0.5 mm)を除き、この新しい切断面を含む隣接健全組織切片(直径20 mm、厚さ2 mm)を得た。切片は水で洗浄し、6.5℃で20分間インキュベートした。7コの切片を2-¹⁴C-酢酸(264 μ Ci, 4.5 μ mole)を含む4 mlの10 mM K-リン酸緩衝液(pH 7.5)を含むペトリ皿中に入れ6.5℃で2分間インキュベートした。その後切片を200 mlの氷冷酢酸カリ緩衝液(50 mM, pH 7.5)中で30秒間3回洗浄した。その後150 mlの酢酸カリ緩衝液(50 mM, pH 7.5)を入れた大きなペトリ皿中の金属網上に切片を置き、厚みの約半分が浸るようにし6.5℃で適当な時間インキュベートした。

オ3の実験において、同様に胞子を接種し、30時間インキュベートした組織から被害部を含む切片(直径10mm、厚さ2mm)を調製した。 ^{14}C -OHDHMyを切片の切断表面に与え、29℃で2時間インキュベートした。

オ1、オ2の実験において、対照として胞子無接種のままインキュベートした切断組織を用いた。

粗テルペンの抽出

全ての実験において粗テルペンは ^{14}C -OHDHMyの調製において述べた方法により抽出した。ただしオ2の実験においてのみ、インキュベーションの後切片を水で洗淨する操作を省いた。

放射能の求め方

0.4%の2,5-diphenyloxazole (PPO) と0.01%の1,4-bis-2(5-phenyloxazole) benzene (POPOP) を加えた、5mlの33%のノニオン(日産油脂(株))を含むトルエン溶液中に試料を入れ、Packard Tri Carb液体シンチレーションスペクトロメーター(3320型)を用い計測した。

フラノテルペンの定量

フラノテルペンを含む標品の一部を取り、EtOH 溶液にして Hyodo らの方法⁴⁰⁾によりフラノテルペンを定量した。

セミカルバゾン誘導体の調製

粗フラノテルペンから TLC で Ip を含む画分を得、非ラベルの Ip を加え Kubota らの方法⁴¹⁾により Ip のセミカルバゾン誘導体を調製した。

結果

酢酸からのフラノテルペン生合成の経時的変化

胞子接種後経時的に組織薄片を調製し、 $2\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸を1時間づつ取り込ませた。図2-aに示したように接種組織の場合において $2\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸から CHCl_3 画分への1時間当りのラベルの取込(取込率)は、最初の間極めて少なかった。しかし3時間後に取込率が約2倍となり、12時間後までほぼ一定であった。この時対照として行った切断組織の場合において、切断12時間後まで同様な取込率の変化を示した。このことは接種組織において、3時間以後12時間までの取込率の増加はその組織が切断傷害を受けている結果と考えられる。

接種組織において、15時間以後 CHCl_3 画分中の取込率は再び増加を始めた。さらに18時間後はフラノテルペンが明瞭に蓄積し始めた。各時期に生合成された成分を比較するため

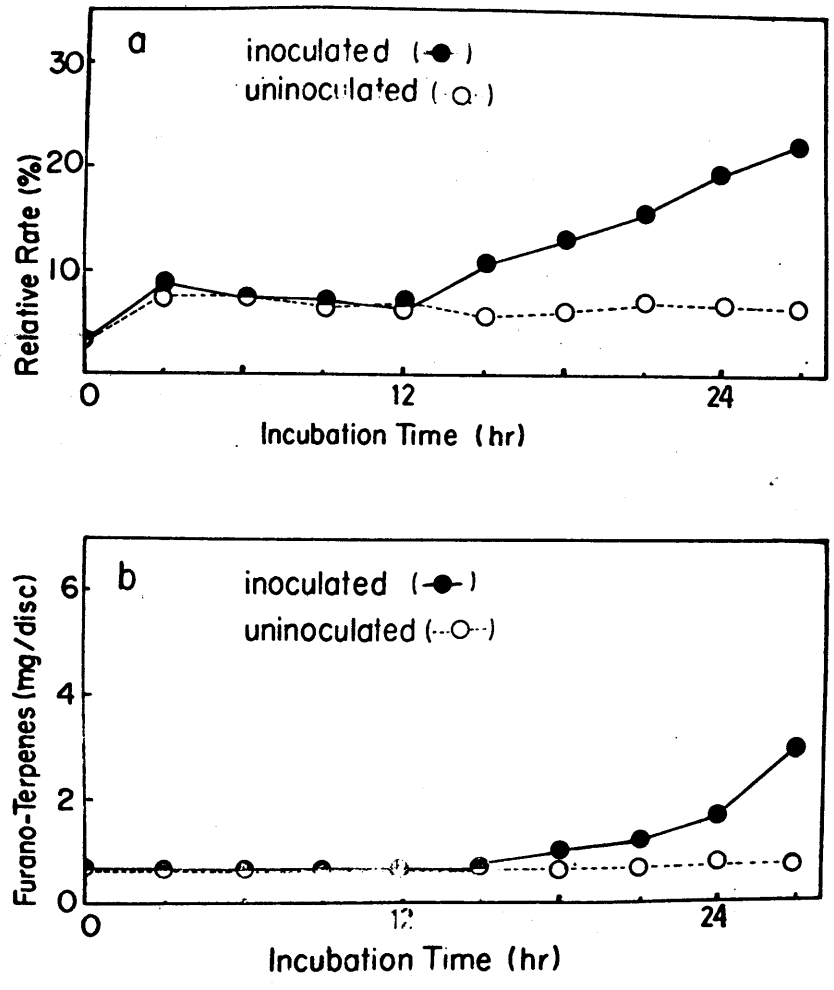


Fig. 2. Changes in relative rates of radioactivities(a) and amounts of furano-terpenes(b) in $CHCl_3$ fractions. Inoculated (diseased, \bullet) and uninoculated (sliced only, \circ) slices (15-20 mm thick) were incubated for various periods as shown in the figure. At the end of each incubation, 4 discs (2x20 mm) were incubated with $2-^{14}C$ -acetate for 1 hr by the procedure described in "Materials and methods." The $CHCl_3$ fraction was prepared from these 4 discs; then the radioactivity was measured(a), and the amount of furano-terpene accumulated in the fraction was assayed(b). The relative rates of the radioactivities are expressed as the percent(%) of the assayed sample to that of the labeled acetate absorbed by the tissue. The radioactivity(dpm) of the latter was calculated by subtracting the dpm of the remaining unabsorbed $2-^{14}C$ -acetate from that of the applied labeled acetate.

に CHCl_3 画分を TLC に供し、ラジオオートグラムを作製した (図 3-a)。3 時間以後調べた最終点 (27 時間) までフラノテルペンに相当しないスポットが認められた。これらのスポットは対照の切断組織の場合と良く一致していることから、切断傷害に反応して生成されたものと考えた。これに反しフラノテルペンに相当するスポットは 18 時間以後出現し、スポットの濃度は増すが、数、位置とも変化が認められなかった。一方で Ehrlich 試薬陽性のスポットは 18 時間後から認められはじめ、数と大きさを増していった。TLC ^{後の発色} 及びラジオオートグラムの結果は、18 時間以後フラノテルペン間の転換酵素系は全てそろっており、TLC 後にみられたフラノテルペンの発色スポットが経時的に出現するのは必ずしも生合成経路の順番にしたがってはいないことを暗示している。

以上の結果から取込率の 2 度目の上昇はフラノテルペン生合成の出現とその速度の増加によるものと結論した。

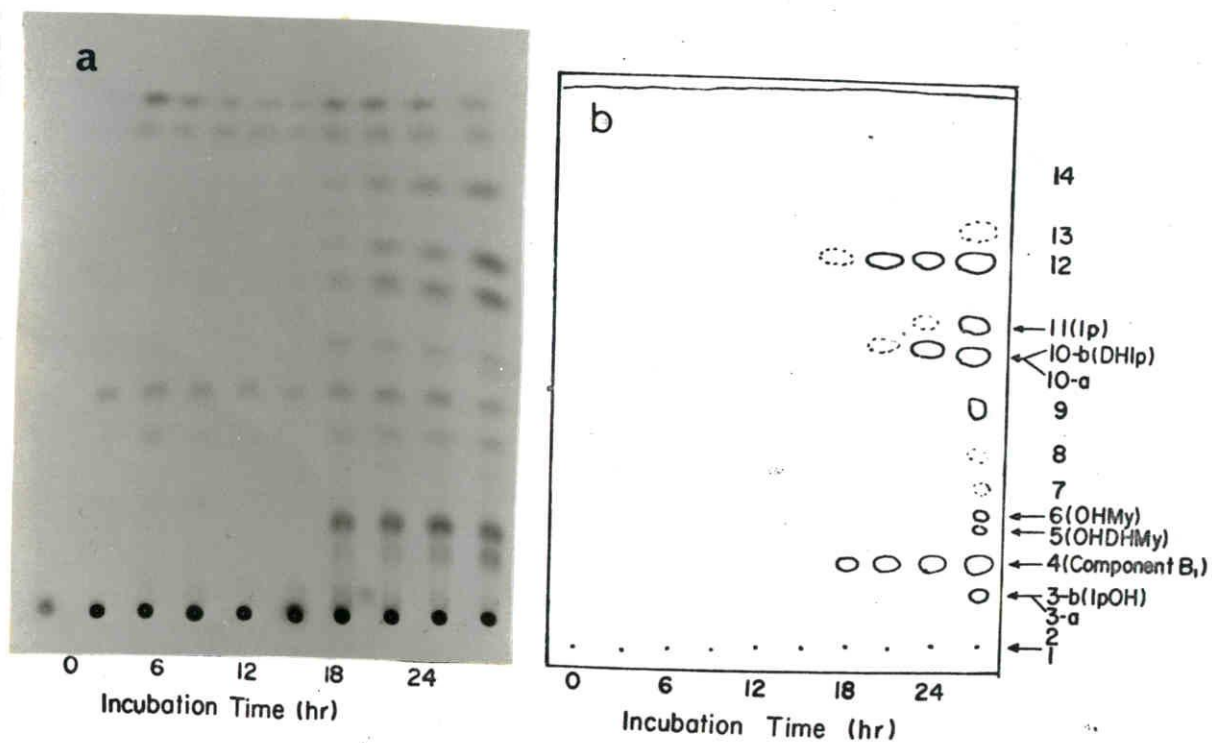


Fig. 3. TLC radioautogram and furano-terpene pattern of the CHCl_3 fractions.

CHCl_3 fractions were prepared by the procedure described in "Materials and methods." The fractions were applied to a TLC plate, which was developed with *n*-hexane-ethyl acetate (8:2, v/v). This plate was subjected to radioautography (a), then sprayed by Ehrlich's reagent (b). The definition of the numbers (1 to 14): see the legend to Fig. 5.

パルス-チェーン実験による生合成経路の推定

接種27時間後において、酢酸からフラノテルペンへの生合成は盛んであり(図2-a)、別の実験で2日後ではさらに増大しており、一方切断組織では1日目までと比べて^{その画分への取込は}わずかに減少していた。そこで接種36時間後では、酢酸から CHCl_3 画分中の諸成分への取込は大部分フラノテルペン生合成によると考え、接種36時間後の組織を用い、パルス-チェーン実験を行なって生合成経路の推定を試みた。

$\text{MeOH-H}_2\text{O}$ 画分中の放射能はチェーン時間にしたがって双曲線的に減少した(図4-a)。一方 CHCl_3 画分中のラベルはチェーン8分まで増大し、後ほぼ一定値となった(図4-b)。これらの変化は、主に細胞中のラベルされた前駆体によりテルペンが生合成される一方、主に細胞間隙中の2-¹⁴C-酢酸が組織外液中に拡散し、非ラベル酢酸と交換したと想像できる。また対照の切断組織では CHCl_3 画分中に放射

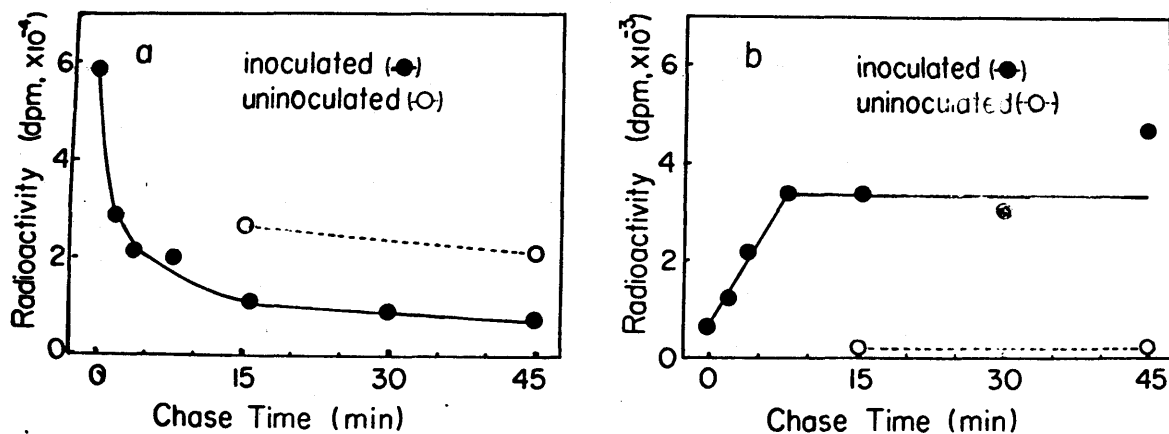


Fig. 4. Radioactivities in the MeOH-H₂O (a) and CHCl₃ (b) fractions. At each incubation time an MeOH-H₂O fraction and CHCl₃ fraction were prepared and assayed for radioactivity by the procedure described in "Materials and methods."

能はほとんど認められず、接種組織で切断の影響による CHCl_3 画分中への取込は、接種の場合に比べ相対的に極めて低いことがわかった。

フラノテルパンを TLC で各成分に分け、各々の放射能の消長を 45 分間中の 7 時期について調べた (図 5)。第 5 画分 (OHDHMy (後述)) ではチエイヌ 2 分後に最大の取込を示しすぐラベルは見られなくなった。第 1、3-a、8、9、10-b (DHIp)、12 (A_1 と A_2 成分)、14 画分においては約 4 分後に最大の取込を示し、急激または徐々にラベルは減少する傾向にあった。以後第 11 (Ip) と 3-b (IpOH) 画分、次に第 4 (B_1 成分) と第 7 画分の順にラベルの最大取込時期が移行した。以上のうち既知成分及び取込の顕著な成分についてのみ生合成経路上の関係を考えると OHDHMy は最初に最大取込がみられたことから、DHIp、Ip、IpOH 及び B_1 成分の前駆体と考えられた。同様に DHIp は Ip さらに IpOH、 B_1 成分へと代謝されると仮定した。

OHMy 類似物の構造決定と接種組織による転換

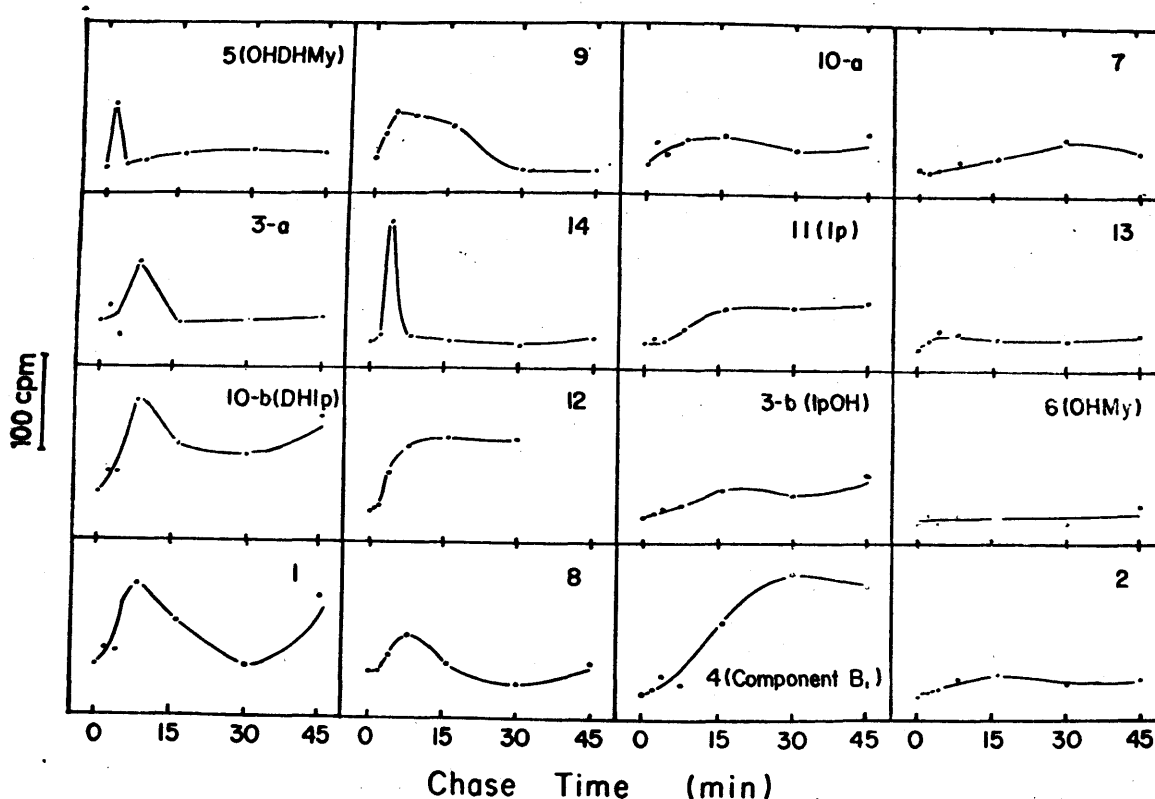


Fig. 5. Changes in the radioactivities of each fraction by TLC.

At an appropriate time, each radioactive CHCl_3 fraction was mixed with the cold standard of furano-terpene, prepared from inoculated and 36 hr-incubated tissue, then applied to a TLC plate (silica gel HF₂₅₄), and developed with *n*-hexane-ethyl acetate (8:2, v/v). Fourteen zones, corresponding to Ehrlich's reagent positive and UV absorbed spots, were individually scraped off and extracted with ethyl acetate. These were called spots 1 to 14 from the lower position. The solutions were concentrated *in vacuo* to oily residues, which then were dissolved in ethyl acetate. Spot 3 and spot 10 were further separated on TLC with *n*-hexane-ethyl acetate (7:3, v/v) and *n*-hexane-ethyl acetate (9:1, v/v), respectively. These were called spot 3-a and 3-b, and spot 10-a and 10-b. The individual spots were named 1, 2, 3-a, 3-b (IpOH), 4 (Component B₁), 5 (OHDHMy), 6 (OHMy), 7, 8, 9, 10-a, 10-b (DHIp), 11 (Ip), 12, 13 and 14; all were assayed for radioactivity. The time course patterns shown in the figure are in the probable order of earliest incorporated to latest incorporated spot.

TLC 後、薄層上で OHMy のすぐ下に Ehrlich 試薬により OHMy と類似してピンク色に発色する成分がみられ、この成分の分離及び構造決定を試みた。材料及び方法に述べた手順によりシリカゲルカラムクロマトグラフィー、TLC 及び開放系の TLC により、接種組織の被害部から抽出した粗テルペンから本成分を精製した。精製標品は、TLC では 1 スポットであり HPLC では 1 ピークを示し、純粋であることを確認した。

本成分は OHMy と似た IR 吸収を示し、フリル基、共役カルボニル基と OH 基を含み、非共役カルボニル基を含まないことが示された (図 6)。 $C_{15}H_{20}O_4$ の組成式は高分解能 MS により決定した。本成分と OHMy のフラグメントイオンは似ており (たとえば $C_9H_{10}O_3$ 、 $C_9H_8O_2$ と $C_7H_8O_2$)、一方で分子イオンをはじめ OHMy に比べ質量が 2 少ないフラグメントイオン (たとえば $C_4H_{17}O_4$ と $C_{14}H_{19}O_4$ 、 $C_{15}H_{18}O_3$ と $C_{15}H_{20}O_3$ 及び $C_8H_{13}O_2$ と $C_8H_{15}O_2$) がみられ (表 1)、図 7 のような開

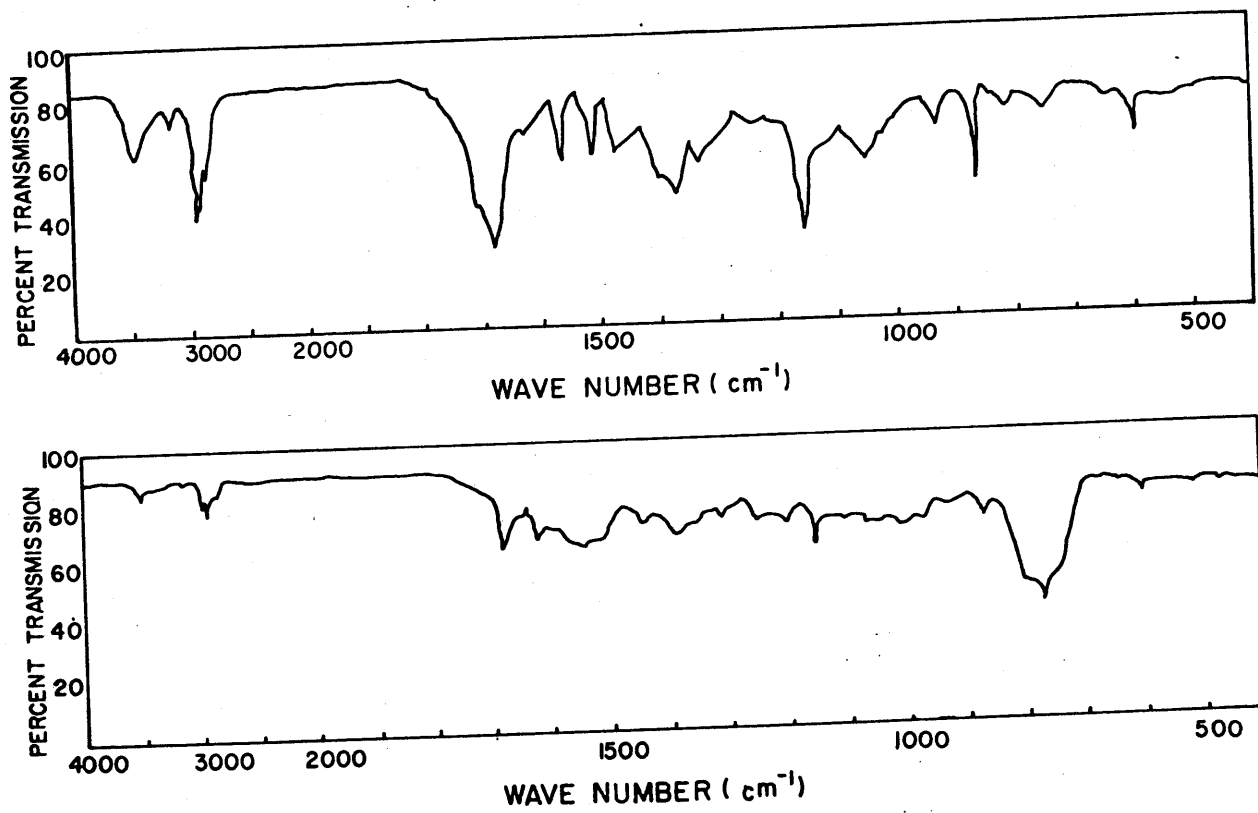


Fig. 6. IR spectra of OHMy and OHDHMy,
upper: OHMy (film)
lower: OHDHMy (CCl₄)

Table 1. M^+ and important fragment ions in the high resolution MS of OHMy and OHDHMy.

m/e	Composition	Rel. intensity	
		OHMy	OHDHMy
266	$C_{15}H_{22}O_4$	14	—
264	$C_{15}H_{20}O_4$	—	4
251	$C_{14}H_{19}O_4$	6	—
249	$C_{14}H_{17}O_4$	—	6
248	$C_{15}H_{20}O_3$	16	—
246	$C_{15}H_{18}O_3$	—	29
209	$C_{11}H_{13}O_4$	3	—
167	$C_9H_{11}O_3$	37	19
148	$C_9H_8O_2$	100	100
143	$C_8H_{15}O_2$	25	—
141	$C_8H_{13}O_2$	—	29
124	$C_7H_8O_2$	9	6
98	$C_6H_{10}O$	—	13
85	C_5H_9O	53	—

Base peak of the low resolution MS at m/e 95 was not shown by high resolution MS. This was perhaps caused by the use of different instruments.

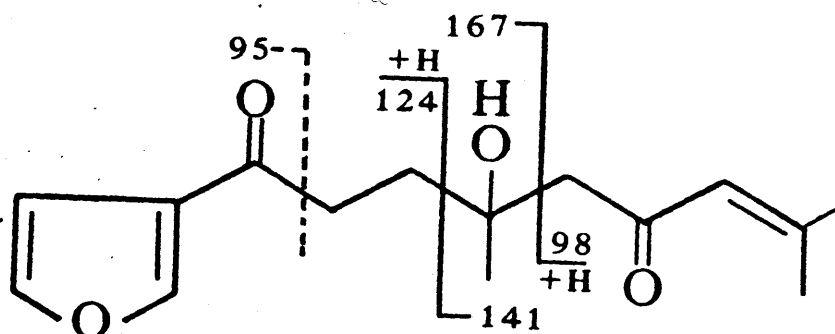
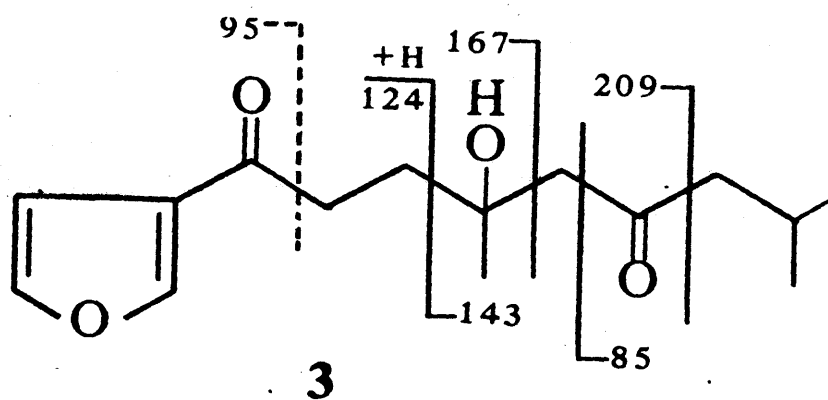


Fig. 7. Related fragments in MS of OHMy and OHDHMy.

—: high resolution MS peaks
 ----: low resolution MS base peaks

裂の様式を考えた。

PMR スペクトルもまた OHMy の場合と似ており、一方で C-12 のメチルプロトンに由来すると考えた $\delta 6.05$ (1H, m) のシグナル及び C-14 と C-15 のジェミ-ジメチル基に由来すると考えた $\delta 1.91$ (3H, d, $J=1.2$ Hz) と $\delta 2.17$ (3H, d, $J=1.0$ Hz) のシグナルが異なっていた (図 8)。これらの PMR スペクトルにおける違いは DHIp と Ip との間における差と一致している。

本成分の UV スペクトルは 243 nm において最大吸収 ($E_m=13,600$) を示し肩もみられた。この値は、243 nm における α, β -不飽和ケトン (DHIp の場合 11,500) と 3-フリルアルカノン (OHMy の場合 2,400) の合計したものと見なせ、本成分の構造中に α, β -不飽和ケトンと 3-フリルアルカノンを含むことを示している。

以上のスペクトルにより得られた結果は、本成分が図 9 に示した構造であることを示している。本成分は新物質であり、4-hydroxy-dehydromyoporone (OHDHMy) と命名した。

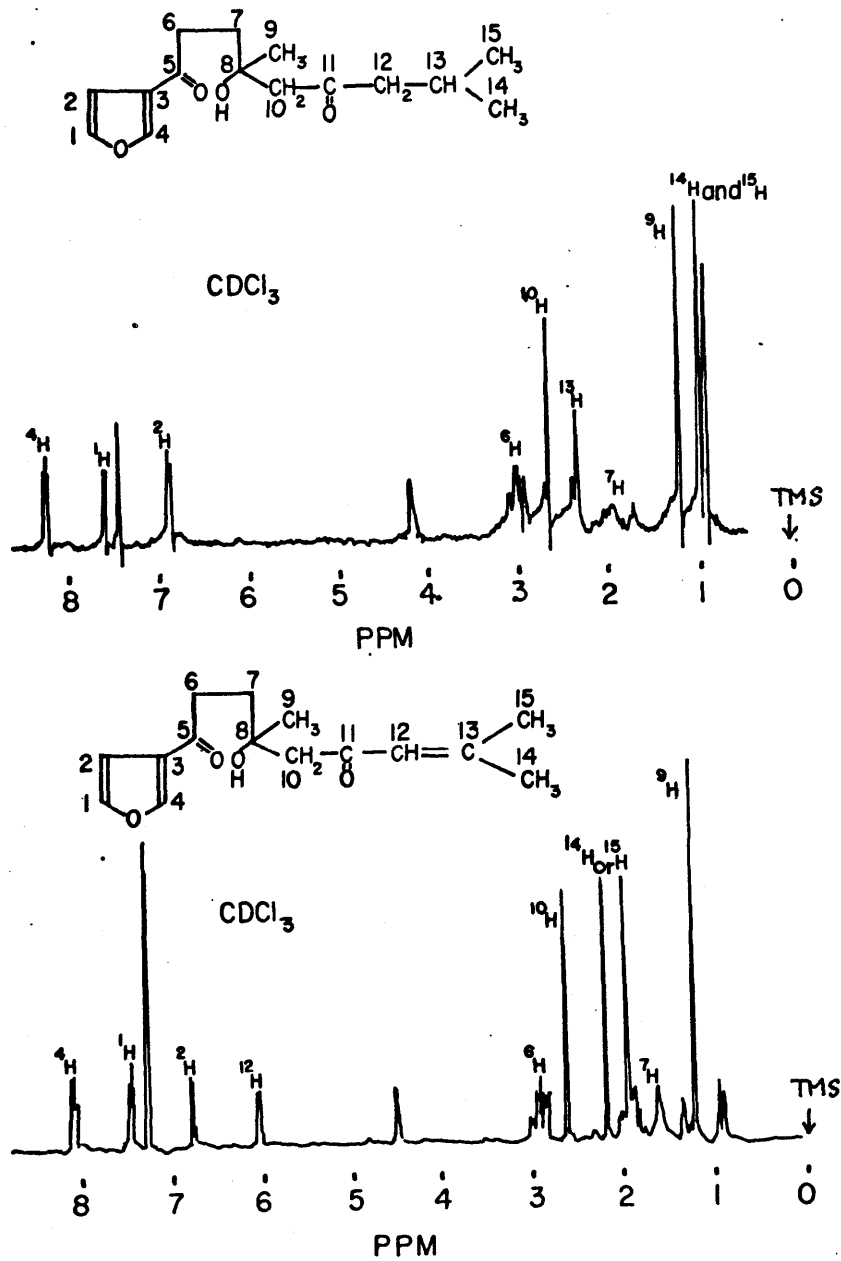


Fig. 8. PMR spectra of OHMy and OHDHMy.
 upper: OHMy
 lower: OHDHMy

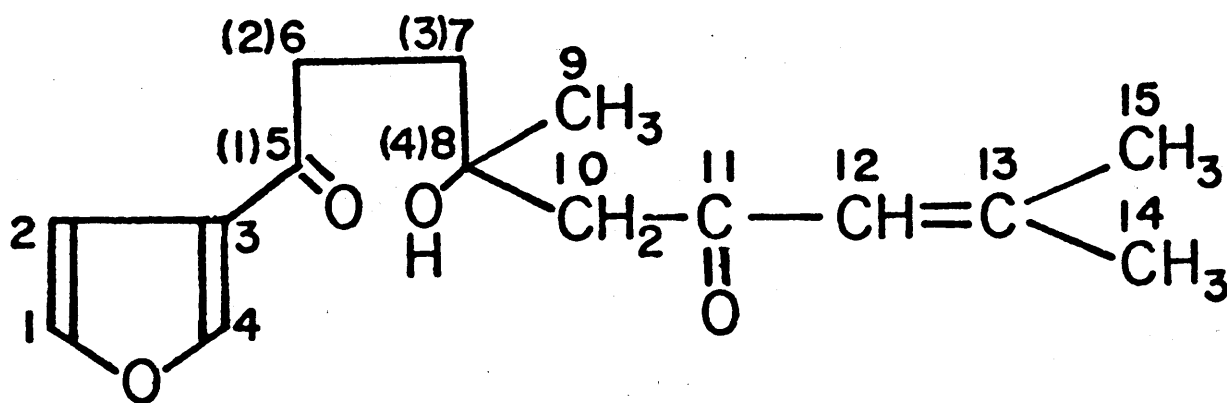


Fig. 9. The formula of OHDHMy.

OHDHMy は DHIp、Ip 等の前駆体であることが図 5 から示唆され、これを確かめる目的で¹⁴C-OHDHMy を接種組織の薄片 (36 時間後) に取り込ませ、この代謝産物を TLC で分離し、放射能の移行を調べた。

この結果、与えた約 20% のラベルが OHMy 画分中にみられ、HPLC による分画をくり返しても比放射能が一定であった。このことから OHMy 画分中のラベルの大部分は OHMy 自身にあると結論した (表 2)。また Ip 画分中には最高約 20% のラベルがみられた。Ip 画分に非ラベル Ip を加え、セミカルバゾン誘導体にし結晶化をくり返した。この結果融点はほぼ一定となったが放射能は最初の結晶化で約 40% が失われ、結晶化にしたがい比放射能が減少したが、放射能は失われなかった。このことから Ip 画分中の少量のラベルは Ip 自身に取り込まれており、残りの大部分のラベルは Ip と混合してその結晶中に取り込まれる成分に存在すると考えた。

Table 2. Incorporation of OHDMY into other terpenes.

TABLE INCORPORATION OF 4-HYDROXYDEHYDROMYOPORONE
INTO OTHER TERPENES

Repetition of treatment	Products				
	Fraction containing OHMy		Semicarbozone of Fraction containing Ip		
	total (dpm)	specific (dpm/ μ g)	total (dpm)	specific (dpm/mg)	Mp ($^{\circ}$ C)
	5020		5280		
1st	2850 ^{a)}	168.9 ^{a)}	600 ^{b)}	10.1 ^{b)}	131.0
2nd	2868	170.0	488	8.1	131.0
3rd	2717	161.1	367	6.4	131.5

a) The fraction containing OHMy was mixed with unlabeled OHMy (13.5 μ g) and chromatographed 3 times by HPLC. Specific radioactivity was calculated as described in the text.

b) The fraction containing Ip was mixed with unlabeled ipomeamarone (60 mg) and derived to the semicarbazone of Ip. After recrystallization 3 times, specific radioactivity was calculated as described in the text.

考察

接種後経時的に酢酸からのフラノテルペン生合成速度の変化を調べる実験により、接種による影響と切断による影響を定量的に区別できた(図2-a,b)。接種による取込率の増加はフラノテルペン生合成速度上昇のためで、切断による増加はImaseki⁴²⁾らの報告から主にリン脂質生合成が盛んになるためと考えられる。

サツマイモ塊根では切断に伴ない呼吸活性が上昇し、これは主としてミトコンドリアの形成によることが知られている⁴³⁾。ミトコンドリアその他細胞顆粒の形成のため膜成分として必要なリン脂質を補うためにもこの生合成が盛んになったと考えられる。専ら新生ミトコンドリアではリン脂質が不足しており、このため切断組織ではシアン耐性吸収が増加しているという説をあげておこう⁴⁴⁾。

接種約18時間後からテルペン生合成速度が上昇したことを(図2-a)酢酸からテルペンま

での酵素系について考えてみる。アセチル CoA 合成酵素³³⁾、次のアセチル CoA から HMG-CoA に到る酵素系²⁹⁾、HMG-CoA 還元酵素³⁰⁾及びメバロン酸から IPP に到る酵素系³¹⁾は、新鮮組織や切断組織に活性が認められるものもあるが、全て接種組織で活性が増加し、中には HMG-CoA 還元酵素のように新鮮及び切断組織にほとんど認められず、接種により初めて出現するものもある⁴⁵⁾。また動物におけるステロイド生合成経路においても HMG-CoA 還元酵素^{46,47)}が律速段階となつていることが知られている。なお接種組織においてまだ prenyl transferase 活性の変動を調べていないが、HMG-CoA 還元酵素^{活性}活性の上昇のパターンからして本酵素もテルペン生合成速度に大きく関与している可能性が強い。

テルペン類の生合成経路について、パルス-チェイス実験及び OHDHMy の取込実験からの推定を試みた。前者の結果から OHDHMy は DHIp、Ip、IpOH 及び B₁ 成分の前駆体であることが示唆され、OHMy⁺ はほんの少ししか取り込まれ

なかった。一方同じ時期の組織を用いた後者の実験では、OHDHMyは主にOHMyに代謝され、おそらくDHIpを經由したと考えられるIpへの代謝は少ししか認められなかった。両者の実験結果の相違は、取込ませる条件が異なるため代謝産物の量比が変わったためかもしれない。異なる条件としてi)被害部の有無による代謝プールの大小、ii)好氣的条件の程度、iii)インキュベーション温度の相違等が考えられる。もう一つの可能性として、前者の実験においてOHDHMy画分中に別の中間体が存在することも考えられるかもしれない。

DHIpはIpの最も近い前駆体であることがすでに推定されており、DHIpへの最大取込時期がIpのそれより早いという1958年の実験結果はこれと一致している。またIpへの最大取込時期がIpOHのそれより早いことは、IpがIpOHの前駆体とみなす先の考えを支持している。最近大羽らによりこの考えは*in vivo*でほぼ証明された。B₁成分への最大取込時期は、Ipまたは

IpOHのそれより遅くみえる。これはB₁成分がDHIp、IpまたはIpOH等から派生していることを示唆している。

以上最近の知見を交えて実験結果を考察した。これらをまとめてフラノテルペン生合成経路を推定した(図10)。しかしここではふれなかつたFOHの関与の可能性(後述)、構造から考え中間体として期待されるA₆成分の経路上の位置などもこの推定経路の基礎に入れている。

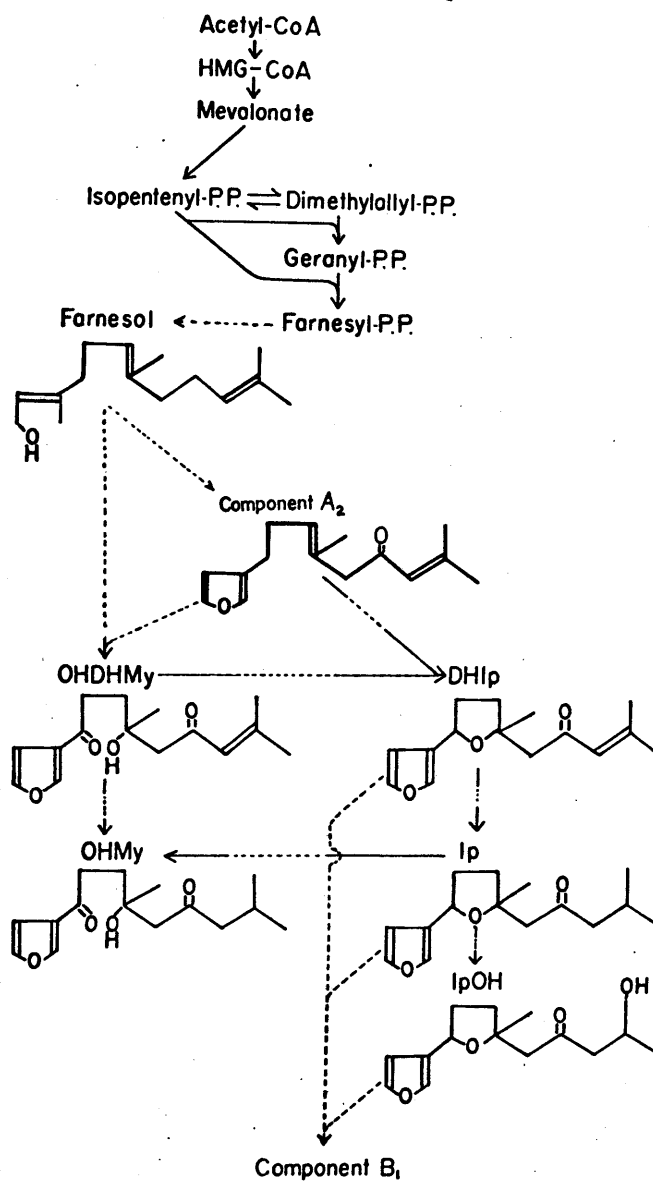


Fig. 10. The hypothetical biosynthetic pathway of furano-terpenes.

—————→: The reaction step previously validated in in vivo and in vitro experiments.

-----→: The reaction step validated by previous and this in vivo experiments.

-----→: The reaction step assumed to take place,

pp: pyrophosphate

第2章 *in vitro* の実験による FPP 以降のフラノテルペン生合成経路の酵素的解析

植物において FPP 以降のセスキテルペン生合成系の酵素、すなわちセスキテルペン間の転換酵素群の *in vitro* の系での報告は今までに^{ほとんど}なされていない。モノテルペンの数種、ジテルペンのジペレリン、トリテルペンの植物ステロール類及びテトラテルペンのカロチン類について酵素的に調べられている。最近比較的よく研究されているモノテルペンを例にその転換反応の分類を試みると一つはピロリン酸の脱離に相前後した閉環反応であり、この結果あらたな C-C 結合が生じ、骨格が形成される。もう一つはこの C-C 結合を変えずに修飾する反応であり、主に酸化、還元反応に分けられる。広義に考えるとメチル化、アセチル化及びグリコシル化等も含まれるかもしれない。

サツマイモの場合、フラノテルペンはいず

れも $C-C$ 結合による閉環反応をしていないと
考えてよく、FPP から加水分解され FOH にな
るものと考えた。この FOH が主に酸化、還元
を中心とし、さらに酸素を介在する閉環反応
を含む一連の反応を受け、Ip に転換すると仮
定した。そこで *in vitro* の系を用い FOH を用い
フラノテルペン生合成を試みたところ、その
過程で FOH 脱水素酵素 (FDH) 活性が認めら
れた。

本章では、まず新たに見い出された FDH の
精製と性質について述べる。また先に *in vivo*
で推定した $DHIp \rightarrow Ip$ の反応及び $OHDHMy \rightarrow OHMy$
の反応を触媒する酵素の諸性質について述べ
る。

材料と方法

材料

サツマイモ塊根は名古屋大学農学部附属農場で収穫され、実験に供するまで¹⁰⁻¹⁴℃で保存した。NaBT₄はRadiochemical Centre, Amersham から購入した。シストランス (c,t-) 体とトランストランス (t,t-) 体からなる FOH は Furuka Corp. (スイス) から購入した。これらの異性体はTLCによりそれぞれ分離した。 また各種モノテルペンアルコールは東京化成(株)から購入した。

³H-FOH の調製

FOH を Attenburrow⁴⁸⁾ らの方法により調製した活性 MnO₂ を用い n-ヘキサン中でファルネサル (FHO) に酸化した。これを抽出しシリカゲル (ワコーゲル B₅F) による TLC (n-ヘキサノン-酢酸エチル、9:1) で分離し、UV 吸収のある画分をかきとり、ここから FHO を抽出した。FHO を今井の方法⁴⁹⁾ により NaBT₄ を用い乾燥 EtOH 中で低温条件下で還元し、³H-FOH を調製した。希塩酸を加えることにより反応を止め、

生じた ^3H -FOH (C-1のHを ^3H で置換)を酢酸エチルで抽出した。TLC (n -ヘキサン-酢酸エチル、8:2)により^{得られた}FOH画分をかきとり、_(C₁₅-体とC₁₇-体の混合物)ここから抽出し ^3H -FOHを得た。

^{14}C -DHIpの調製

第1章の材料と方法、 ^{14}C -OHDHMyの調製で述べた方法で ^{14}C ラベル粗テルペンを得た。TLC (n -ヘキサン-酢酸エチル、8:2)により粗DHIp画分を得、多重展開TLCによりDHIp画分を得た。さらに μ Bondapak C-18カラムによるHPLC (60% MeOH溶液で溶出)に供し ^{14}C -DHIpを精製した。

活性測定及び蛋白質定量

FDH活性は以下の方法により、25℃でNADPHによる340 nmにおける吸収の増加の初速度を測定することにより求めた。標準反応液(0.3 ml)は酵素溶液を含む20 mMのK-リン酸緩衝液(pH 8.0)に最終濃度0.3 mMとなるように5 μ lの ^3H -FOHのアセトン溶液を加え、340 nmの吸収が一定の値となるまで約5分間アレインキューブ

トした。反応は最終濃度 0.5mM となるように NADP^+ 溶液を加えることにより開始した。

DHap 還元酵素は^(活性 / ITLC 紙の R_F 値の)放射活性を測定することにより求めた。 0.5ml の標準反応溶液は以下の組成からなっている：酵素溶液 $50\mu\text{l}$ (蛋白質約 0.6mg を含む) に最終濃度 1mM の NADP^+ 、 20mM のグルコース 6-リン酸 (G-6P)、G-6P 脱水素酵素 0.35U 及び $10\mu\text{l}$ の ^{14}C -DHap (最終濃度 $76\mu\text{M}$ 、 $88,000\text{dpm}$ 、比活性 $0.661\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$) を含む 20mM の K-リン酸緩衝液 (pH 8.0)。

FDH の抽出と精製

[サツマイモ塊根から酵素液の抽出]

約 2cm の厚さに切断した塊根組織に、第 1 章の「材料と方法」に述べた要領で胞子を接種し 2 日間インキュベートした。この後被害部を除き、隣接健全組織 (約 1mm) を用いた。

FDH 脱水素酵素の精製の場合、隣接健全組織 80g に、 0.5M ショ糖、 10mM キルカフトエタール、 10mM EDTA を含む 100mM の K-リン酸緩衝液 (pH 7.5) 160ml 及び 16g の Polyclar AT を加えブレ

ンダ-にて15秒間3回磨砕した。磨砕液をナイロンガーゼでしぼり、300xg、10分間遠心し、上清液を二分し、それぞれ1mMDTTと0.5Mシヨ糖を含む20mMK-リン酸標準緩衝液(pH8.0)で平衡化したSephadex G-25カラム(4x38cm)に通し、低分子物質を除き、同時に酵素溶液の緩衝液を上記の組成とした。素通りの高分子画分を、10000xg、20分間遠心し上清を粗酵素液とした。

[硫酸分画とDEAE-セルロースクロマトグラフィー]

粗酵素液(160ml)に標準緩衝液の飽和硫酸溶液を40%飽和になるまで徐々に加え、攪拌しながら30分間放置した。遠心後上清液に飽和硫酸溶液を加え65%飽和とし沈澱を集めた。この沈澱を標準緩衝液に溶かし、同緩衝液で平衡化したSephadex G-25カラムにより脱塩した。先の画分を標準緩衝液で平衡化したDE-52カラム(3.0x6.0cm)にかけ、標準緩衝液20mlで洗浄し0から0.15MKClの直線的濃度勾配を持つ標準緩衝液300mlで溶出した。活性のある画分を集めて、限外濾過(Amicon PM30)により

ショ糖のかわりに0.2M KClを加えた標準緩衝液を加え、^(4.4mlに濃縮した。)

[Toyopearl HW-60(S)によるゲル濾過]

日立635型HPLC用ポンプを用いToyopearl HW-60(S)カラム(2.7×35.5cm)を、ショ糖のかわりに0.2M KClを加えた標準緩衝液で平衡化した。上の濃縮液をこのカラムにかけ、1ml/min(約5kg/cm²)で溶出した。活性画分を集め、限外濾過により、3回標準緩衝液を加えて濃縮をくり返し、塩濃度を下げ標準緩衝液に近づけた。

[2,5'-ADP Sepharose 4Bによるアフィニティクロマトグラフィー]

先の濃縮液を、標準緩衝液で平衡化した2,5'-ADP Sepharose 4Bカラム(1×3.6cm)にかけ、標準緩衝液5mlで洗浄し、0から3M KClの直線的濃度勾配を持つ標準緩衝液20mlで溶出した。活性のある画分を集め、限外濾過により塩濃度を下げながら1mlに濃縮し、-80℃にて保存した。この濃縮液を精製酵素と呼び、諸性質を調べた。

DH1p還元酵素の抽出

FOH 脱水素酵素の抽出とほぼ同様な方法で抽出し、以下の点を変更した。1% K-isoascorbate をさらに磨砕液中に含ませ、Polyclar AT を磨砕中に加えなかった。また $10,000 \times g$ 遠心を10分間だけとした。さらにこの上清液を $100,000 \times g$ 、60分間遠心し、沈澱を先の標準緩衝液で懸濁させ、粗酵素液とした。

FDH 精製標品の電気泳動の方法

polyacrylamide gel 電気泳動は、試料に等容量の40%ニョ糖を加え、常法により作成した7%の分離ゲル上の濃縮ゲル上におき、低温で行なった。泳動後、ゲルの1つは Coomassie brilliant blue R-250 によりゲル中のタンパク質を染色した。またもう1つのゲルは 0.01% phenazine methosulfate と 0.01% nitroblue tetrazorium を酵素反応液に加え、暗所で反応させ、活性を染色した。

SDS-スラブ電気泳動は、1% mercaptoethanol と1% SDS を加え、 100°C で10分間処理した試料を、常法により作成した10%のSDS平板ゲ

ルにおいておこない、後 Coomassie brilliant blue R250
によりタンパク染色を行った。サブユニットの分子量は cytochrome c (ウシ心臓、12,500)、
ribonuclease (ウシスライ臓、13,700)、citrate synthase
(ブタ心臓、59,000)、 α -amylase (ブタスライ臓、48,700)
及び catalase (ウシ肝臓、69,000) を標準として
求めた。

結果

FDH の精製と性質

反応生成物の同定

無細胞系で 3H-FOH から Ip 等の生合成を試み、反応生成物を TLC で調べたところ、NADP⁺に依存して FHO と同じ画分にラベルがみられた。この反応生成物を同定することから本酵素の存在を明らかにしようとした。反応の基質として *c,t*-FOH を用い、反応生成物を化学合成による *c,t*-FHO と共に、シリカゲル HF₂₅₄ TLC にかけてところ、両者の R_f値は 2 種の展開溶媒系においてともに等しかった。反応生成物は化学合成 *c,t*-FHO と同様に UV の吸収を示すことから共役二重結合を持ち、また 2,4-dinitrophenylhydrazine に対し黄色を呈することからアルデヒド基を持つものと考えた。なお *c,t*-FOH を基質とした場合の反応生成物と化学合成による *c,t*-FHO についても同様の事実がみられた。

FDH の精製と純度

(活性は可溶性画分のみ認められ、こ

FDH の性質を調べることにより接種に伴う
テルペン生成との関係を考察する目的で、^{精製を試み}接
種組織(2日間インキュベート)から約1,000倍
に精製した(表3)。この精製酵素標品の純度
をポリアクリルアミドゲル電気泳動により調
べた(図11)。この結果活性染色による染色バ
ンドに相当する位置に主タンパク染色バンド
がみられた。その他にその近くに2本の弱い
タンパク染色バンドがみられた。さらに SDS-
スラブ電気泳動による純度の検定を行な、た
ところ、分子量47,000の主バンドがみられ、
他に2本の弱いバンドがみられた。以上のこ
とからこの標品は、わずかながら不純物を持
つが、ほぼ単一に近いものとみなした。また
Toyopearl によるゲル透過により分子量を求め
たところ約90,000であり(図12)、分子量47,000
のサブユニット2コからなるものと考えた。
以後この標品を精製酵素と呼びその性質を
調べた。

至適 pH

Table 3. PURIFICATION OF FDH FROM INOCULATED SWEET POTATO TISSUE.

Step	Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Yield (%)	Fold
Sephadex G-25 chromatography and centrifugation	412.80	2.055	0.018	100.0	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 40-65% saturation	111.00	1.284	0.043	62.5	2.3
DE-52 chromatography	7.43	0.556	0.280	27.1	15.0
Toyopearl permiation chromatography	1.52	0.355	1.110	17.3	59.4
2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography	0.06	0.298	18.342	14.5	981.2

POLYACRYLAMIDE GEL ZYMOGRAM OF PURIFIED FDH OF
INOCULATED SWEET POTATO TISSUE

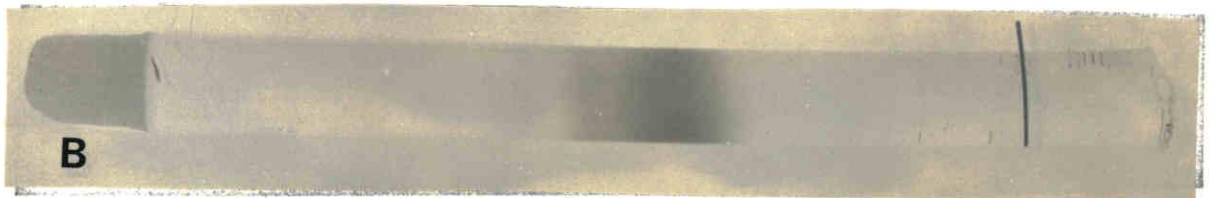
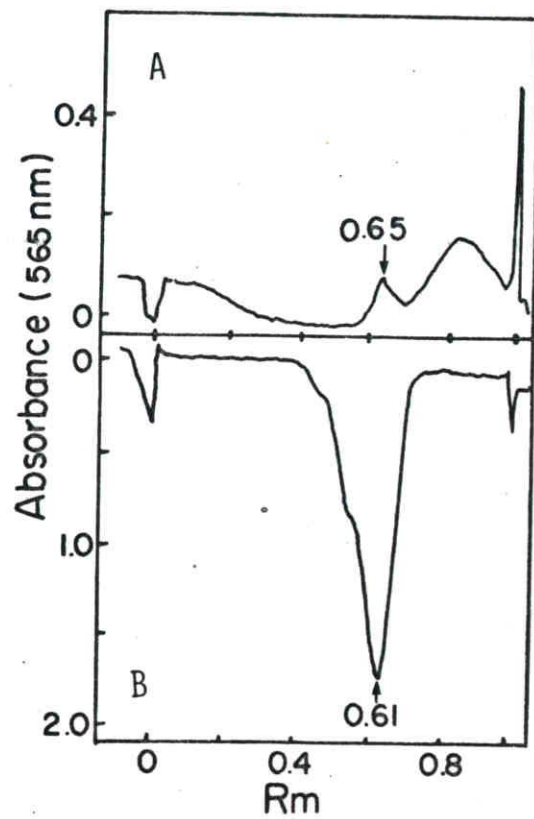
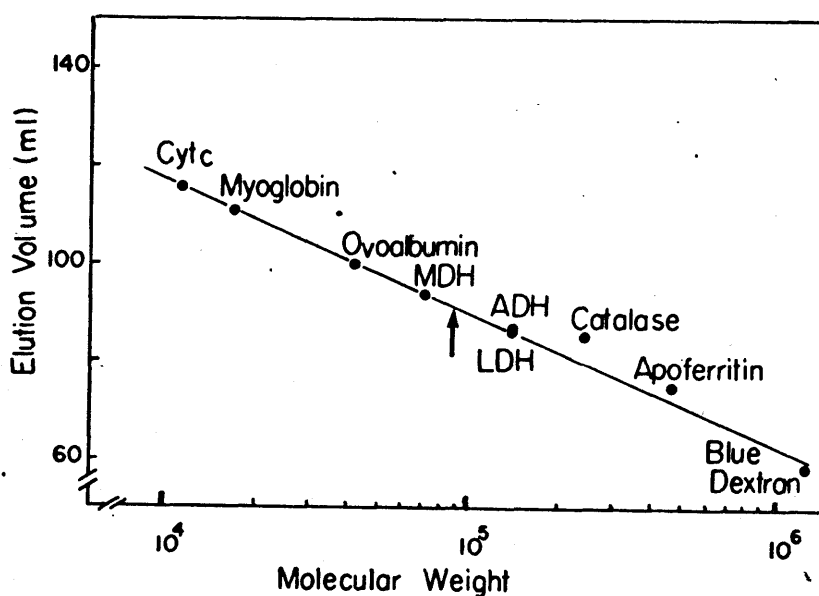


Fig.11. Polyacrylamide gel zymogram of purified FDH of inoculated sweet potato tissue.

A, Activity staining.

B, Protein staining.

DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT OF FDH BY TOYOPEARL
PERMEATION CHROMATOGRAPHY



CYT.c, MDH, ADH AND LDH: CHYTOCHROME C, MALATE DEHYDROGENASE,
ALCOHOL DEHYDROGENASE AND LACTATE DEHYDROGENASE, RESPECTIVELY

Fig. 12. Determination of molecular weight of FDH by Toyopearl permeation chromatography.

Cyt. c, MDH, ADH and LDH: cytochrome c, malate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase, respectively.

K-リン酸 (pH 7.0-8.0)、トリス-HCl (pH 7.5-9.0) 及び $\text{NH}_4\text{OH-HCl}$ (pH 8.5-10.5) の各緩衝液を用い反応の最適 pH を調べた結果 9.5 付近にあった (図 13)。また逆反応 (FOH 生成反応) を K-リン酸 (pH 6.0-8.0) と トリス-HCl (pH 7.5-9.0) の緩衝液を用い調べた結果 7.0-7.5 にあった。また pH を変え安定性を調べたところ 7.0-8.0 で安定であり、それ以上の pH では次第に失活しやすくなった。

活性に影響を及ぼす因子

FDH の触媒能に関する官能基を調べる目的で活性に影響を及ぼす因子を調べた (表 4)。SH 酵素阻害剤として知られている *N*-ethylmaleimide、 $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ 、 Cu^{2+} 及び Zn^{2+} は一般に低濃度 ($50 \mu\text{M}$) で著しい阻害がみられ、活性に SH 基が関与していることが示された。また 2 価カチオンのキレート剤である EDTA でも阻害され、このことは活性に何らかの金属イオンが関与していることを示唆している。

基質特異性と K_m 値

FDH ACTIVITY - PH CURVE

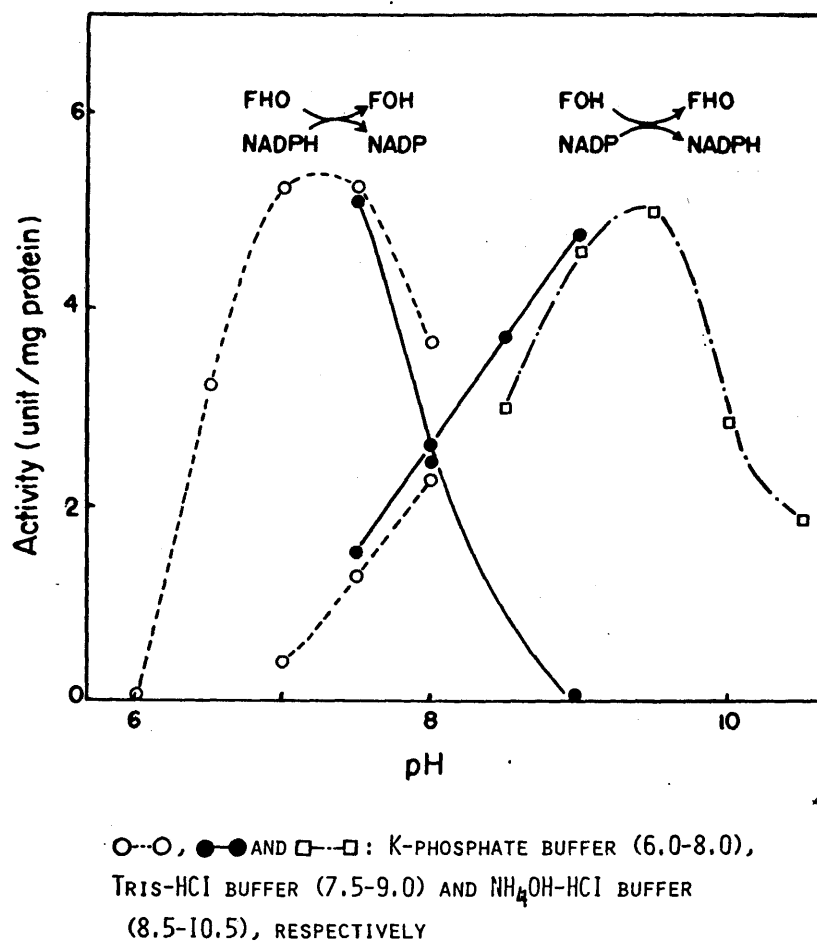


Fig. 13. Effect of the pH of the reaction mixture on FDH activity
 ○---○, ●---● and □---□: potassium phosphate buffer (6.0-8.0),
 Tris-HCl buffer (7.5-9.0) and NH₄OH-HCl buffer (8.5-10.5), respectively

Table 4. Effects of metal ions, sulfhydryl and chelating reagent on FDH activity.

EFFECT OF SOME REAGENTS ON PURIFIED FDH ACTIVITY

REAGENT (M)	ACTIVITY (UNITS)	INHIBITION (%)
N-ETHYMALEIMIDE (0.05)	0.00	100.0
ICH ₂ CONH ₂ (0.05)	0.74	28.6
CuCl ₂ (0.05)	0.00	100.0
ZnCl ₂ (0.05)	0.00	100.0
MgCl ₂ (1.00)	1.02	2.3
EDTA(3.33)	0.53	49.3
H ₂ O	1.04	0.0

DTT WAS CONTAINED IN PURIFIED FDH SAMPLE, BUT THE CONCENTRATION WAS NEGLIGIBLE COMPARED TO THE AMOUNTS OF THE ABOVE REAGENTS

精製酵素を用い各種アルコール類 (0.3 mM) についての基質特異性を調べた。t,t-FDH の場合に最大の活性がみられ、以下 c,t -FDH \gt geraniol \gt citronerol \gt nerol \gg decanol となった (表 5)。これらをまとめると C_{15} テルペンアルコール \gt C_{10} テルペンアルコール \gg C_{10} 脂肪族アルコールとなる。シトランス間の異性体及び二重結合が還元されていいる citronerol の間では本酵素活性はあまり影響がみられないことから基質特異性は比較的広いとみなされた。 $C-15$ と $C-10$ のテルペンアルコールの K_m を比較したところ、t,t-FDH では約 $15 \mu\text{M}$ であるが、一方 geraniol では $729 \mu\text{M}$ とかなり大きく、 $C-15$ テルペンアルコールに親和性が大きいことが示された。また benzylalcohol、glycerol 及び EtOH はいずれも NADP^+ 存在下で本酵素による酸化は受けなかった。また NAD^+ 依存性の各種アルコール脱水素酵素活性は認められなかった。

接種に伴う活性変動

接種後経時的に FDH 活性とテルペン蓄積量

Table 5. Substrate specificity of purified FDH.

SUBSTRATE SPECIFICITY OF PURIFIED FDH

SUBSTRATE (0.3 mM)	ACTIVITY (UNITS)	RELATIVE ACTIVITY (%)	K _M (μ M)
TRANS, TRANS-FARNESOL	1.25	100.0	15.6
CIS, TRANS-FARNESOL	1.04	83.2	—
GERANIOL	0.72	57.6	729.0
NEROL	0.45	36.0	—
CITRONEROL	0.47	37.6	—
DECANOL	0.12	9.8	—
BENZYLALCOHOL	0.00	0.0	—
GLYCEROL	0.00	0.0	—
ETHANOL	0.00	0.0	—

を調べた (図14)。本酵素活性は新鮮組織にも弱いながら認められ、切断2日後の組織では約6倍、接種2日後ではさらに約13倍に増加した。接種することによりさらに活性が増加することは、接種に伴うテルペン生成に何らかの関与をしていることを示唆している。テルペンの蓄積は接種1日後に認められ、切断組織では認められなかった (図14)。

DHlp 還元酵素の性質

反応生成物の同定

RI実験による予備的実験により DHlp から Ip \wedge 及び OHDHMy から OHMy \wedge の両反応を触媒する酵素活性が接種組織磨砕液の 100,000 \times g 沈澱画分に存在すると推定されたので、この反応生成物を同定することにより本酵素の存在を明らかにしようと試みた。DHlp または OHDHMy を基質とし、NADPH 生成系を加え 100,000 \times g 沈澱画分と反応 (2時間、30 $^{\circ}$ C) させ、終了後生成物を TLC さらに HPLC で調べた。TLC におい

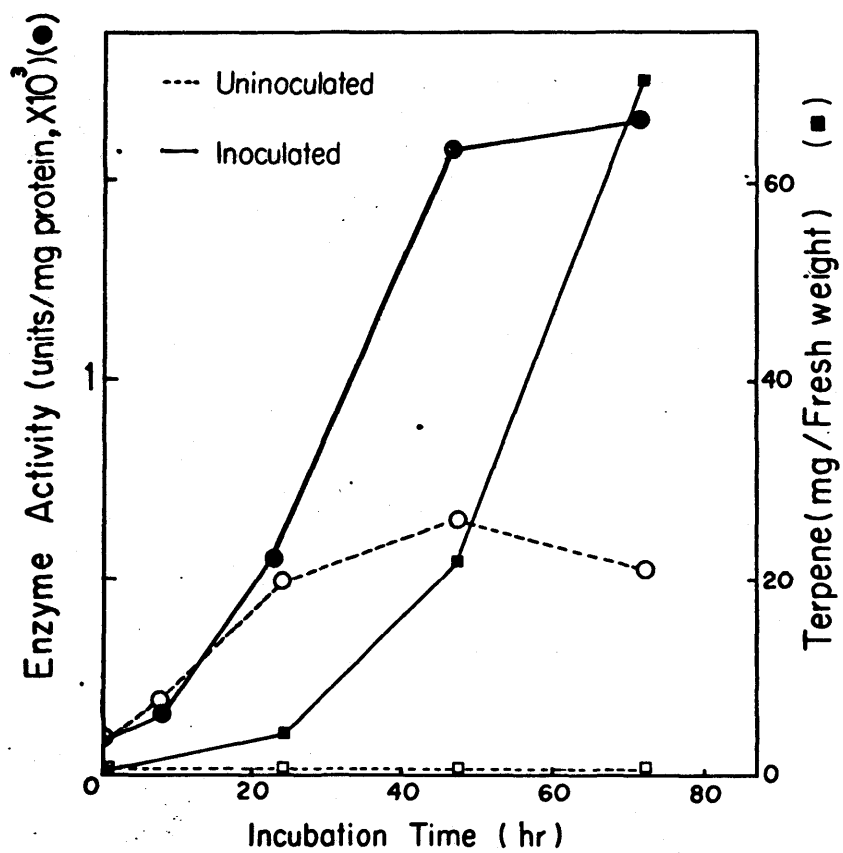
THE COURSE OF CHANGES IN FDH ACTIVITY AND TERPENE
CONTENT DURING INCUBATION

Fig. 14. The course of change in FDH activity and terpene content during incubation.

て DHIp では Ip の位置に、OHDHMy では OHMy の位置にそれぞれ新たな Ehrlich 試薬陽性スポットが見い出された (図 15)。さらに HPLC においてそれぞれ Ip、OHMy のピークが UV 及び示差屈折で検出された (図 16)。以上のことから反応生成物は各々 Ip、OHMy であると同定した。今後本酵素活性を DHIp 還元酵素と呼ぶことにする。

DHIp 還元酵素の酵素標品量、反応時間及び pH との関係

^{14}C -DHIp を用い Ip へのラベルの取込 (1 時間、 30°C) を調べ活性測定を行なった。100,000 \times g 沈澱画分の懸濁液を 100 μl (接種組織 1g に相当) まで増加させても、活性は直線的に増加した (図 17)。また沈澱画分の懸濁液 100 μl のとき、反応時間 1 時間まで反応は直線的に増加した (図 18)。

K-リン酸及びトリス-HCl 緩衝液で至適 pH を測定したところ、7.5 から 8.0 にあった (図 19)。

補酵素要求性

DHIp 還元酵素活性の反応条件の検討の結果、

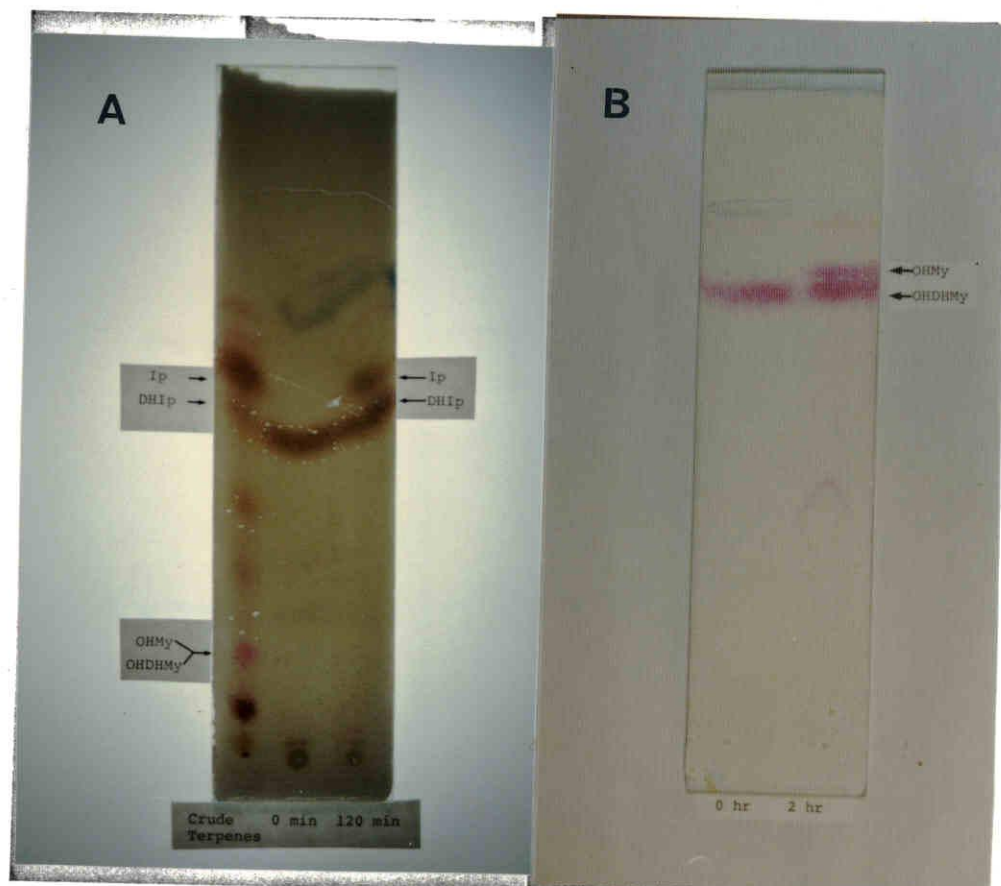


Fig. 15. Ehrlich's reagent positive spots on TLC plate of substrates and products in the enzymatic conversions between sweet potato phytoalexins.

A and B: Conversions of DHIp to Ip and OHDHMy to OHMy, respectively.

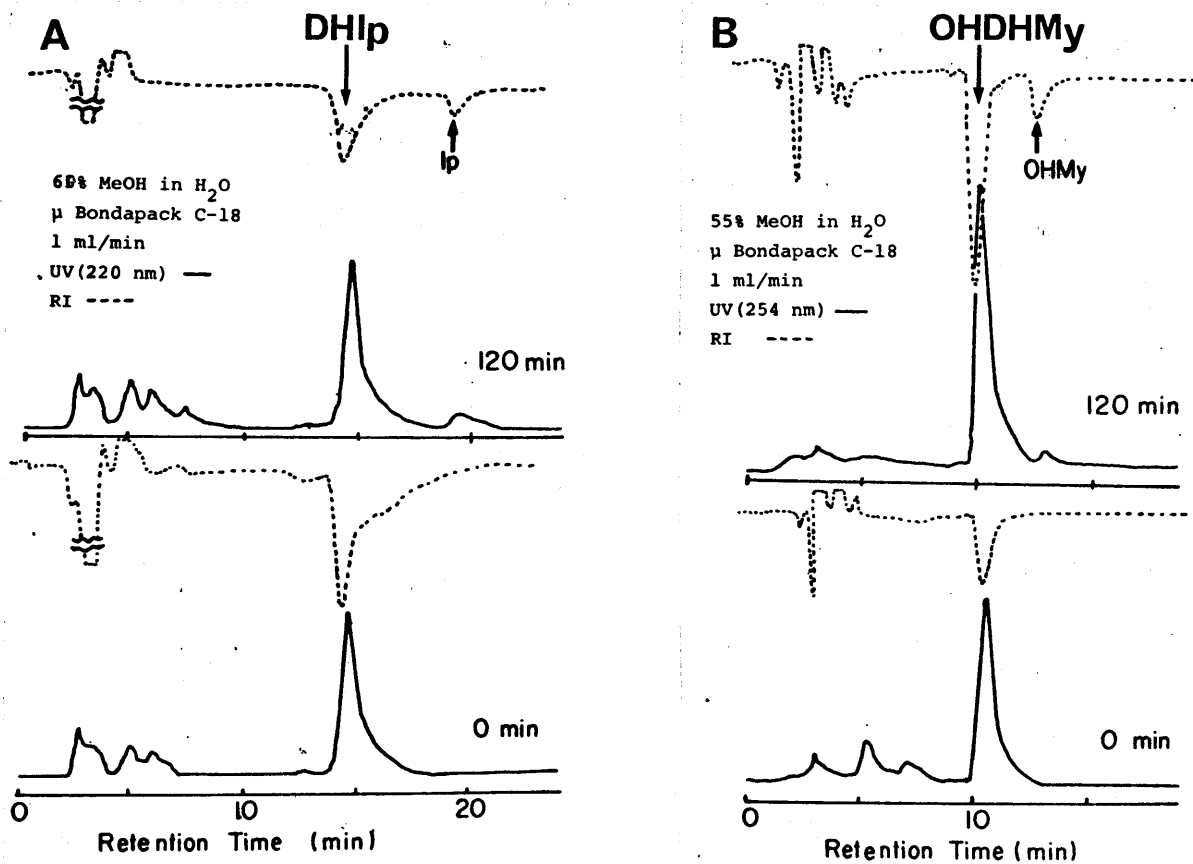


Fig. 16. HPLC elution profiles of substrates and products in the enzymatic conversions between sweet potato phytoalexins.

A and B: Conversions of DHIp to Ip and OHDHMy to OHMy, respectively.

Upper and lower: Elution profiles on 120 min and 0 min incubation time, respectively.

DHIP REDUCTASE CONCENTRATION AND ACTIVITY

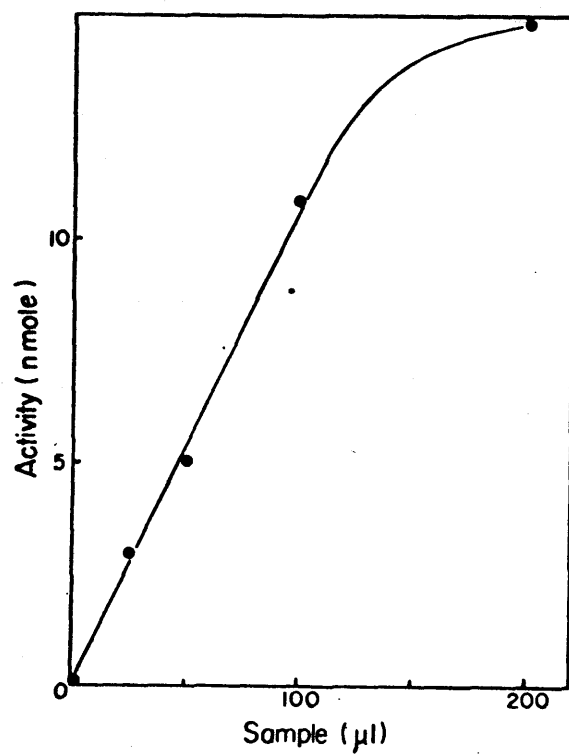


Fig. 17. Effect of DHIP reductase concentration on the activity.

DHIP ACTIVITY AND INCUBATION TIME

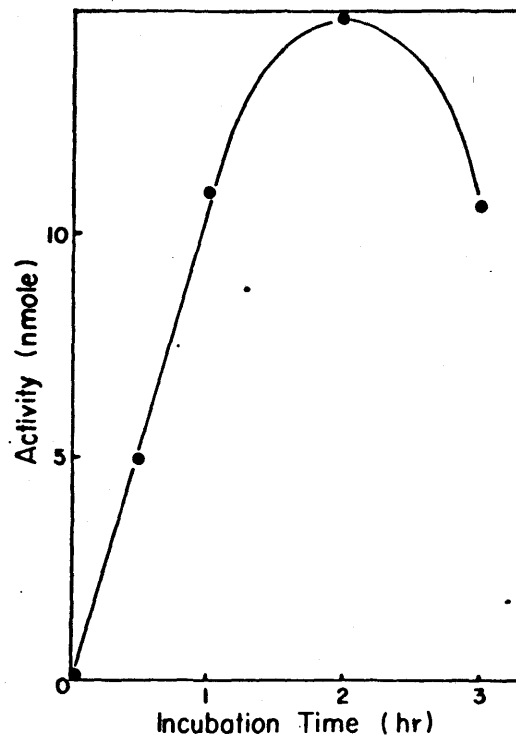


Fig. 18. Effect of incubation time on DHIP reductase activity. Enzyme suspension: 100 μ l (corresponding to 1 g of fresh wt.) of 100,000xg precipitate.

DHIP REDUCTASE ACTIVITY-PH CURVE

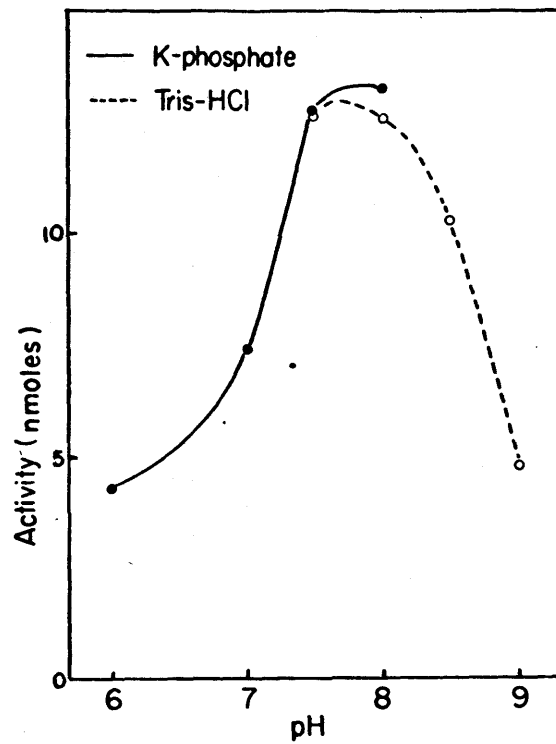


Fig. 19. Effect of the pH of the reaction mixture on DHIP reductase activity.

————: Potassium phosphate buffer
-----: Tris-HCl buffer

NADPH 再生系を加えたときに最も高い活性がみられ、 1mM NADPH の場合にはその約 75% の活性がみられた (表 6)。この差は反応中 NADPH が分解されることや酵素画分が不純なために NADPH が別の系に使われることが原因であると考えられる。また NADH では約 1% の活性しか示さず、 1p 画分に含まれる基質 DHIp の混入のためや、沈澱画分の他の酵素作用による副次的反応の可能性の方が下きい。

DHIp 還元酵素活性に影響を及ぼす因子

Cu^{++} 、 $1\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 及び *N*-ethylmaleimide 等の SH 阻害剤により 80 から 10% 程度の阻害がみられ、活性に SH 基が関与していることが示唆された (表 7)。また Mg^{++} を加えた場合約 13% の活性増加がみられ、EDTA ではほとんど影響しなかった。したがって外から加えた Mg^{++} は活性に必須ではないが多少とも活性化するものと考えられる。

接種に伴う活性増加

新鮮組織、半日後の切断組織及び半日後の接種組織ではほとんど活性は認められなかつ

Table 6. Cofactor requirements for DHIP reductase activity.

COFACTOR REQUIREMENTS FOR DHIP REDUCTASE ACTIVITY

COFACTOR	ACTIVITY (N MOLES)	RELATIVE ACTIVITY (%)
NADPH GENERATING SYSTEM	7.51	100.0
NADPH (1 mM)	5.62	74.8
NADH (1 mM)	0.06	0.9
NADP ⁺ (1 mM)	0.00	0.0
NONE	0.00	0.0

NADPH GENERATING SYSTEM: GLUCOSE-6-PHOSPHATE (20 mM),
NADP⁺ (1 mM) AND GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE
(0.35 UNIT.)

Table 7. Effect of some reagents on DHip reductase activity.

EFFECT OF SOME REAGENTS ON ENZYME ACTIVITY

REAGENTS (mM)	ACTIVITY (N MOLES)	INHIBITION (%)
CuCl ₂	1.20	83.0
IDOACET. AMIDE	6.24	11.9
N-ETHYLMALEIMIDE	5.72	29.0
MgCl ₂	8.01	-13.2
EDTA	6.98	1.2
H ₂ O	7.07	0.0

た(図20)。しかし切断組織の場合その活性は徐々に上昇し2日後に最大となり後減少した。接種組織の場合にはその後著しい活性上昇を示したが、2日後をピークとして後減少した。なおこの場合の活性は切断組織の約2倍以上であった。また活性上昇に伴ってテルペンの蓄積が被害部にみられた(図20)。

細胞内局在性

100,000xg遠心後のミクロソーム画分に最も高い活性がみられ、10,000xg遠心後の沈澱画分にもこの約半の活性がみられた。また100,000xg遠心後の上清液中にも約半の活性が残っており、本酵素が不均一な大きさまたは重さの顆粒中にあることを示唆しているとも考えられる。

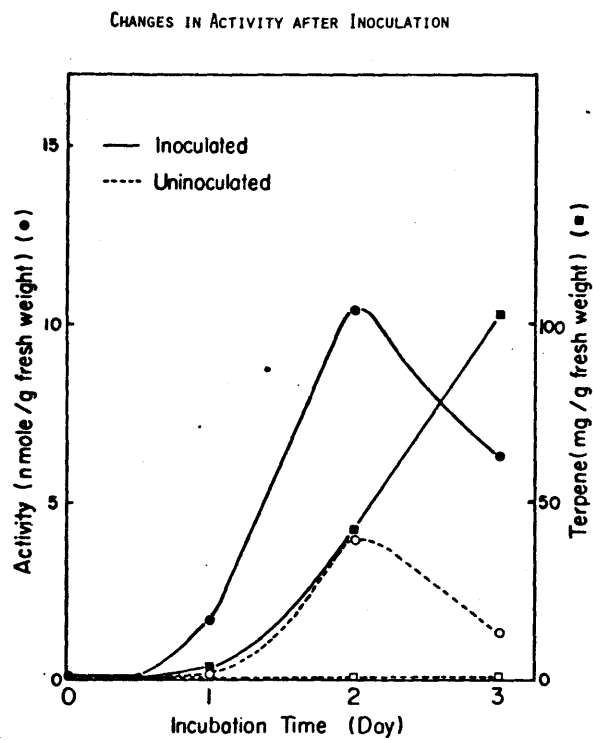


Fig. 20. The course of change in DHIp reductase activity and terpene content during incubation.

考察

FDH について

植物におけるセスキテルペン間転換酵素としては、オレンジでの NADP⁺ 依存性 FDH がただ⁵⁰⁾ 1つ報告されている。しかしこの精製とその性質について全くふれられていない。したがってここに記述された研究はセスキテルペン間転換酵素として精製と性質までふれた初めての報告である。

モノテルペンアルコール脱水素酵素については、geraniol 脱水素酵素がオレンジから分離されており、その部分精製と性質が報告されている⁵¹⁾。この酵素とここに述べた FDH を比べると C₁₀ テルペンアルコールに強い活性を示すことを除いて、補酵素要求性、至適 pH 及び阻害剤の性質が比較的よく似た性質を示している。したがって両酵素間においてその分子構造のどのような差異から基質特異性が生じたかは興味ある点である。モノテルペンアルコール脱

水素酵素としてこれとは別に、環状モノテルペンアルコールの borneol を基質とするものもある。⁵²⁾しかし本酵素は先のモノテルペンアルコール脱水素酵素と性質を大きく異にしている。以上3種のテルペンアルコール脱水素酵素類に共通な点はいずれも比較的基質特異性が広いことである。

サツマイモ FDH は先に示した諸性質よりして、接種組織においてフラノテルペン生成に関与していることを強く示唆している。すなわち、 C_{15} テルペンアルコールに特に親和性が高いことから、セスキテルペン間転換反応系の一酵素であるとみなしてよからう。また接種によつて、切断組織よりもさらに活性の増加がみられたことから、接種によるセスキテルペン生成との深い関連も示された。

本酵素の役割として次の3つの場合を考えている。1つは、フラノテルペン生合成経路の反応のうち FOH 脱水素またはさらに別の反応もになっている。基質特異性が比較的広い

ので複数の類似反応に関与している可能性が強い。次は、 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ の比を一定に保ちフラノテルペン等の生合成を調節している可能性もある。第3は、セスキテルペンアルコール以外の未知のテルペンアルコール類の生合成に関与している。

オ1の場合を仮定してフラノ環の閉環反応を考えてみた(図21)。

DH1p 還元酵素について

生物から初めて見い出された酵素であり、⁵³⁾phytoalexin 生合成酵素として、先のFDHを除きトウゴマの芽ばえのcasbene生合成酵素に次いで2番目のものである。本酵素はゲラニルゲラニルピロリン酸から脱ピロリン酸化としても閉環してcasbeneをつくるのに関与すると考えられている。なおこの反応はジバレリン生合成の中間体のkaurene生合成酵素の副次反応として先に知られていた。⁵⁴⁾さて本酵素については通常芽ばえには活性がみられず、病菌接

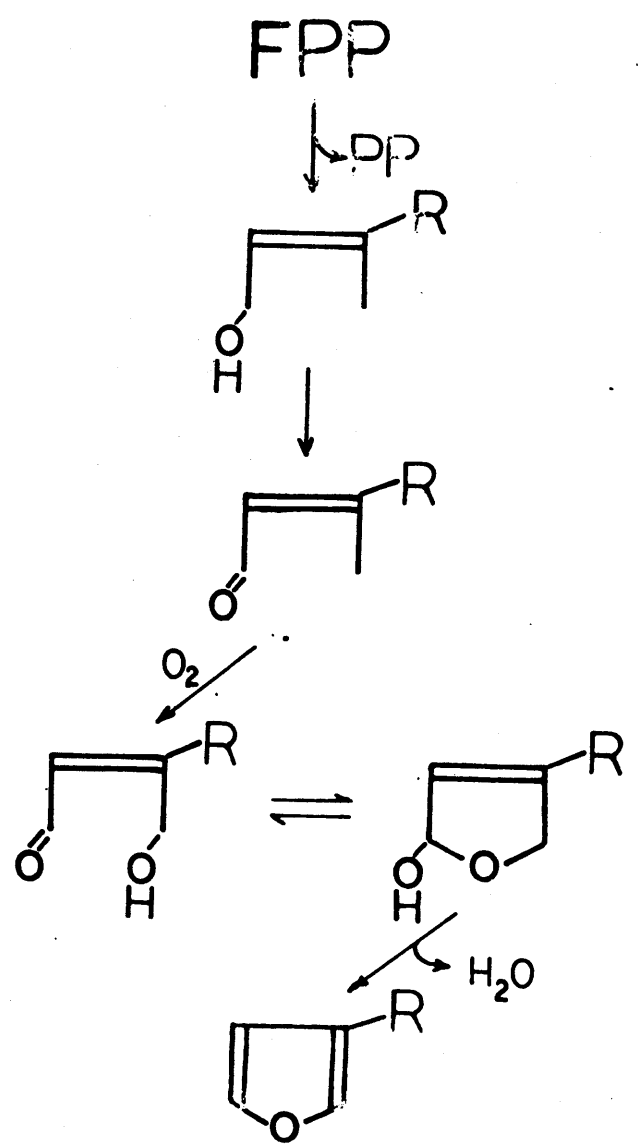


Fig. 21. Hypothetic steps in the formation of the furano-ring of furano-terpenes in diseased sweet potato.

種に伴ない casbene のみをつくる活性が出現する。⁵³⁾ またサツマイモの DHIP 還元酵素のように切断によっても同様に増加するかどうかはわからない。

モノテルペンに働く酵素のうち、DHIP 還元酵素と類似した反応を触媒する酵素がいくつか知られている。それらはバウ花卉の非環状モノテルペン (geraniol, nerol 等) 還元酵素⁵⁵⁾、オレンジ果汁の環状モノテルペン (limonene, p-menthene 等) 還元酵素⁵⁶⁾ 及びゴマ科植物の芽ばえの環状モノテルペン (pulegone, methone 等) 還元酵素⁵⁷⁾ である。DHIP 還元酵素も含めいずれも基質特異性が比較的広いようにみえるが、各々粗酵素液を用いているため、ただ一つの酵素が触媒しているかどうかはわからない。またバウ花卉の酵素反応は不可逆反応であることが示され、この点について共通した性質である可能性が強い。

病菌接種に伴いサツマイモ内に DHIP 還元酵素の活性が増加することは FDH と同様で

あり、これら2種の酵素はフラノテルペン生合成系の酵素であることも支持している。また切断組織において、微量のフラノテルペンが検出されたとの報告⁵⁸⁾と、これらの酵素は切断組織において活性が出現または増加することとは一致している。

以上のことから推定して切断組織では、テルペン間転換酵素系の活性(たとえばFDHやDHIp還元酵素)が増加し、一方で前駆体供給系の律速段階の酵素(たとえばHMG-CoA還元酵素)活性が低くテルペン分解酵素系の活性も増加し、結果としてテルペンの蓄積はほとんどみられな^{25,26)}いと考えた。

$\text{OHDHMy} \rightarrow \text{OHMy}$ の反応を触媒する酵素についてその性質については全くふれな^{25,26)}か、だが、本反応もDHIp還元酵素と同一の酵素により触媒されると考えている。即ち今まで明らかにな^{25,26)}った生合成経路及び構造の明らかにな^{25,26)}ったテルペン類から考え、テルペン間の転換反応には類似した酸化還元反応が多く含まれるように

みえ、これらの反応は比較的特異性の高いテルペン間転換酵素により触媒されると考えた。さて、サツマイモ類のみに特異的なテルペン類を生成することは、FPP以後数多くの特異的反応が存在することを意味している。これら各段階に特異的な個々の酵素により触媒される場合と比べ、先の考えはテルペン生成を支配する遺伝子における突然変異が少なく、すみ進化の立場から考え有利であるようにみえる。さらに先の考えから、^(フラノテルペン) 生合成経路も一部明らかになったようにさらに網状の経路を
していると考えられている。

REFERENCES

1. Uritani, I. and T. Akazawa, Science 121, 216(1955)
2. Kojima, M. and I. Uritani, Plant and Cell Physiol. 8, 97(1976)
3. Hiura, M., Gifu Agr. Coll. Japan Research Bull. 50, 1(1943)
4. Kubota, T. and T. Matsuura, J. Chem. Soc. Japan 74, 101,197, 248,668(1953)
5. Kato, N., H. Imaseki, N. Nakashima and I. Uritani, Tetrahedron Letters 13, 843(1971)
6. Ynag, D. T. C., B. J. Wilson and T. M. Harris, Phytochemistry 10, 1653(1971)
7. Oguni, I. and I. Uritani, Phytochemistry 13, 521(1974)
8. Burka, L. T., R. M. Bowen, B. J. Wilson and T. M. Harris, J. Org. Chem. 39, 3241(1974)
9. Burka, L. T., L. Kuhnert and B. J. Wilson, Tetrahedron Letters 46, 4017(1974)
10. Inoue, H. N. Kato and I. Uritani, Phytochemistry 16, 1063(1977)
11. Burka, L. T., Phytochemistry 17, 317(1978)
12. Burka, L. T. and J. Iles, Phytochemistry 18, 873 (1979)
13. 伊藤 功 名古屋大学農学研究科 修士論文 第682号 (1979)
14. Kubota, T. and T. Matsuura, Chem. and Ind. 20, 491(1957)
15. Hamilton, W. W. , R. J. Park, G. J. Perry and M. D. Sutherland, Aust. J. Chem. 26, 375(1973)
16. Bohlman, F. and C. Zdero, Phytochemistry 17, 1155(1978)
17. Bohlman, F. and C. Zdero, Phytochemistry 17, 1595(1978)
18. Bohlman, F. und R. Nagabhushan, Tetrahedron Letters 11, 1039(1972)
19. Kubota, T. and T. Matsuura, Chem. and Ind. 521(1956)

20. Uritani, I., H. Nomura and T. Teramura, *Agric. Biol. Chem.* 31, 385(1967)
21. Burka, L. T., L. Kuhnert, B. J. Wilson and T. M. Harris, *J. Amer. Chem. Soc.* 99, 2302(1977)
22. Akazawa, T., I. Uritani and H. Kubota, *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 150(1960)
23. Uritani, I., M. Uritani and H. Yamada, *Phytophath.* 50, 30(1960)
24. Tomiyama, K., N. Ishizaka, N. Sato, N. Watsui, M. Takasugi and T. Masamune, *Phytophath.* 58, 115(1968)
25. Horikawa, T., K. Tomiyama and N. Doke, *Phytophath.* 66, 1186(1976)
26. Oba, K., Oga, K. and I. Uritani, *Agric. Biol. Chem.*, in preparation
27. Lynen, F., H. Eggerer, U. Henning and I. Kessel, *Angew. Chem.* 70, 738(1958)
28. Bloch, K., S. Chaykin, A. H. Philips and A. de Waard, *J. Biol. Chem.* 234, 2595(1959)
29. Oshima, K. and I. Uritani, *J. Biochem.* 63, 617(1968)
30. Suzuki, H., K. Oba and I. Uritani, *Agric. Biol. Chem.* 38, 2053(1974)
31. Oshima-Oba, K. and I. Uritani, *Plant and Cell Physiol.* 10, 827(1969)
32. 小倉協三, 蛋白質核酸酵素 14, 219(1969)
33. Takeuchi, A., K. Oba and I. Uritani, *Agric. Biol. Chem.* 41, 1141(1977)
34. Oguni, I. and I. Uritani, *Plant and Cell Physiol.* 12, 507(1971)
35. Oguni, I. and I. Uritani, *Agric. Biol. Chem.* 33, 50(1969)

36. Aller, R. T. and W. R. Nes, *Phytochemistry* 7, 85(1968)
37. Oguni, I. and I. Uritani, *Plant Physiol.* 53, 649(1974)
38. 小国 伊太郎 名古屋大学農学研究科 博士論文 第73号 (1974)
39. Burka, L. T. and L. Kuhnert, *Phytochemistry* 16, 2022(1977)
40. Hyodo, H., I. Uritani and S. Akai, *Phytophath. Z.* 65, 332(1969)
41. Kubota, T., H. Yamaguchi, K. Naya and T. Matsuura, *J. Inst. Polytechn. Osaka City Univ.* 2, 82(1952)
42. Imaseki, H., H. Takei and I. Uritani, *Plant and Cell Physiol.* 5, 119(1964)
43. Asahi, T., in *Biochemistry of wounded plant tissues*, ed. G. Kahl, p391-419, Walter de Gruyter and Co., Berlin. New York(1978)
44. Nakamura, K. and T. Asahi, *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 393(1976)
45. Suzuki, H., K. Oba and I. Uritani, *Physiol. Plant Pathol.* 7, 265(1975)
46. Linn, T. C., *J. Biol. Chem.* 243, 990(1967)
47. Siperstein, M. D. and V. M. Fagen, *J. Biol. Chem.* 241, 602(1966)
48. Attenburrow, J., F. B. Cameron, J. H. Chapman, R. M. Evans, B. A. Hems, A. B. A. Jansen and T. Walker, *J. Chem. Soc.* 1094(1952)
49. 今井 邦夫 名古屋大学農学研究科 博士論文 第102号 (1976)
50. Chayet, L., R. Pont-Lezica, C. George-Nascimento and O. Cori, *Phytochemistry* 12, 95(1973)
51. Potty, V. H., and J. H. Bruemmer, *Phytochemistry* 9, 1003(1970)
52. Croteau, R., C. L. Hooper and M. Felton, *Arch. Biochem. Biophys.* 188, 182(1978)
53. Dueber, M. T., W. Adolf and C. A. West, *Plant Physiol.* 62, 598 (1978)

54. Robinson, D. R. and C. A. West, *Biochemistry* 9, 80(1970)
55. Dunphy, P. J. and C. Allcock, *Phytochemistry* 11, 1887(1972)
56. Potty, V. H. and Bruemmer, *Phytochemistry* 9, 2319(1970)
57. Battaile, J., A. J. Burbott and W. D. Loomis, *Phytochemistry* 7, 1159(1968)
58. 永浜伴紀, 井上啓子, 昇吉継, 藤本 滋生, 蟹江松雄, *日農化* 51, 597(1977)

結 語

第1章 *in vivo* の実験による FPP 以降のテルペン生成経路

1. 黒斑病菌胞子接種サツマイモ塊根組織に $2\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸を経時的に1時間ずつ与え、脂質画分への取り込みを調べた結果によれば、接種15時間後からテルペン生合成が開始され、以後増加していった。

2. テルペン生合成開始のごく初期(18時間前後)から盛んな時期(27時間ごろから始まる)まで、ラベルの取り込まれる成分の数に変化はなかったことから、テルペン生合成開始のごく初期からテルペン間転換酵素の多くはほぼ同時に出現していることが示唆された。

3. 接種36時間後の組織に $2\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸を2分間与え後チエイズし、テルペン成分中のラベルの増減を調べた。経時的にピークが出現する順序をもとにして並べたところ OHDHMy, DHIp,

Ip、IpOH さらに B₁ 成分となり、既存の結果も含め推定生合成経路を提示した。

4. OHMy とよく似た挙動を示す成分を分離し構造決定を行い、OHDHMy と命名した。OHDHMy を接種 36 時間後の組織に与え代謝産物を調べた結果、OHMy に活発に取り込まれることを HPLC による分画をくり返した後に放射能が一定であることから知った。また Ip にも若干取り込まれたことが、セミカルバゾン誘導体にし、再結晶をくり返した結果から推定された。

第 2 章 *in vitro* の実験による FPP 以降のフラノテルペン生合成経路の酵素的解析

I. FDH について

1. 接種 2 日後の組織磨砕液の $100,000 \times g$ 上清液に NADP^+ 依存性 FDH の活性がみられ、2 組の展開溶媒系による TLC 後の R_f 値、UV ランプ下での吸収と 2,4-dinitrophenyl hydrazine による呈色から、反応生成物が FHO であると同定した。

2. 接種 2 日後の組織よりの磨砕液から、

硫酸分画、DEAE-celluloseクロマトグラフィー、Toyopearl パーミエーションクロマトグラフィー及び2,5-ADP Sepharose 4B アフィニティクロマトグラフィーにより本酵素を約1,000倍に精製した。

3. 本酵素標品の polyacrylamide gel 電気泳動後のサイモグラムを調べたところ活性染色のバンドの位置とタンパク染色の主バンドの位置が一致した。SDS-スラブ電気泳動後のタンパク染色からして、微量の不純物を含むがほぼ均一に近いことが示された。さらに Toyopearl パーミエーションクロマトグラフィーの結果から検量線を作成し、分子量を求めたところ約90,000であり、また SDS スラブ電気泳動の結果にもとづき分子量約47,000のサブユニット2コからなるとみなした。

4. 本酵素による FOH から FHO の生成反応の至適 pH は 9.5 付近であり、その逆反応では 7.5 付近にあった。FHO 生成反応によれば、本酵素反応は NADP⁺ のみに依存し、その活性には pH

基が関与しているとみられた。各種の脂質性アルコールを基質として調べたところ基質濃度 0.3 mM のとき、^{その活性は} C_{15} テルペンール $> C_{10}$ テルペンール $\gg C_{10}$ 脂肪族アルコールの順となり、また L-FOH に対する K_m 値は $15 \mu\text{M}$ であり、 G-OH の場合に比べて非常に低いことを知った。

5、本酵素活性は新鮮組織にも弱いながらみられ、組織を切断すると時間とともに活性が上昇し、2日後にほぼ一定となった。接種組織では切断組織に比べさらに2-3倍の増加がみられた。

II、DHIp 還元酵素について

1、接種2日後の組織磨砕液の $100,000 \times g$ 画分 (ミクロソーム画分) に NADPH に依存し DHIp を Ip に、 OHDHMy を OHMy に還元する酵素活性がみられた。各反応生成物は TLC 後の R_f 値及び HPLC による保持時間からそれぞれ Ip または OHMy と同定した。

2、 ^{14}C - DHIp を基質とし Ip 画分へのラベルの取込から活性測定をした場合、反応約1時間

の間直線的に増加した。また約1g (組織新鮮重) 相当のミクロソーム懸濁液量までは、その活性は直線的に増加した。また本酵素はpH7.5-8.0に最適pHをもち、その活性はNADPHのみに依存し、SH試薬により阻害された。

3、本酵素活性は新鮮組織にはみられず、切断後に活性が増加し、2日後に最大となり以後減少した。接種組織では、切断の場合に比ベ約2-3倍の増加がみられた。

謝 辞

本研究をおこなうにあたり、主指導教官として貴重な時間をさき根気強い御指導をされた生物化学研究室の瓜谷郁三教授に感謝の意を表します。FDHの精製及び性質の研究について共同研究者として重要な基礎的実験をされた辻弘子さんに感謝します。また有益な助言と励ましを賜りました、加藤夏樹先生を初め農薬化学研究室内の皆様及び生物化学研究室内の皆様方に厚くお礼申し上げます。

報文目錄

1. H. Inoue, N. Kato and I. Uritani: 4-Hydroxydehydromyoporone from infected Ipomoea batatas Root Tissue, *Phytochemistry* **16**, 1063-1065(1977)
2. H. Inoue and I. Uritani: Biosynthetic Correlation of Various Phytoalexins in Sweet Potato Tissue infected by Ceratocystis fimbriata, *Plant and Cell Physiol.* **20**, 1307-1314(1979)
3. H. Inoue and I. Uritani: Conversion of 4-Hydroxydehydromyoporone to Other Furano-terpenes. in Ceratocystis fimbriata-infected Sweet Potato, *Agric. Biol. Chem.*, **43**(8) in press(1980)
4. H. Inoue and I. Uritani: Furano-sesquiterpene Reductase from Fungal-inoculated Sweet Potato Root Tissue, *Agric. Biol. Chem.*, submitted
5. H. Inoue, H. Tsuji and I. Uritani: Change in Activity and Characterization of Farnesol Dehydrogenase in Sweet Potato after Ceratocystis fimbriata Infection, *Plant Physiol.*, manuscript in preparation
6. H. Inoue and I. Uritani: Enzymatic Conversion of some Phytoalexins in Fungal-inoculated Sweet Potato Root Tissue, *Physiol. Plant Pathol.*, manuscript in preparation