

報告番号 ※ 甲第 343 号

主論文の要旨

題名 サツマイモにおけるテルペン
生合成の生化学的研究

氏名 井上 博雅

主論文の要旨

報告番号

※甲第1343号

氏名

井上博雅

一個所に固着し生育する植物にとって、他の生物に侵されることから自己を守る防御機構は重要なものと考えられる。この防御機構をなす成分のうち多くは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 (*Ipomoea batatas* Lam. cv) 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抗菌性セスキテルペン類を蓄積することが知られている。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、イボキサマロン (Ip)、イボキサマロール (IpOH)、デヒドロイボキサマロン (DHIp)、 γ -ヒドロキシミオポロン、4-ヒドロキシミオポロン (OHMy)、4-ヒドロキシデヒドロミオポロン (OHDHMy)、ジヒドロ- γ -ヒドロキシミオポロン、ミオポロン、6-ミオポロール、1-ミオポロール及び A₁ と A₂ 成分がある。

上記テルペン類の蓄積は、新鮮な、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* 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または昇汞等の有害化学試薬処理によって引き起こされる。

一般にテルペン生合成にはプレニル中間体 (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。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。IPP は次に植物、微生物に広く見いだされた prenyl transferase 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。一方サツマイモ及びその近縁種に特異的な上記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。したがって他の植物の例からは、この場合の生合成経路を知る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2つの章からなり次の結果が得られた。

第1章 *in vivo* の実験による FPP 以降のテルペン生合成経路

黒斑病菌胞子接種サツマイモ塊根組織に 2-¹⁴C-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の生合成が開始され、以後増加していくことがわかった。またテルペン生合成のごく初期から盛んな時期(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。

接種36時間後の組織に 2-¹⁴C-酢酸を2分間与え後チエイイスし、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各成分を並べたところ OHDHMy (後述) > DH1p > 1p > 1pOH >

B.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。

OHMy とよく似た挙動を示す成分を分離し、構造決定を行ない、OHDHMy と命名した。¹⁴C-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 に活発に転換されることと、HPLC による分画をくり返しても、比放射能が一定であることから知った。また μ にも若干転換されることが、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

1. ファルネソール (FON) 脱水素酵素 (FDH) について

接種2日後の組織磨砕液を用い FON から μ の生合成を試みる過程で、NADP⁺依存性 FDH の活性がみられた。本活性は可溶性画分にみられ、反応生成物の、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、反応生成物がファルネオールであると同定した。

接種2日後の組織の磨砕液から、硫酸分画、DEAE-cellulose クロマトグラフィー、Toyopearl ハーミエーションクロマトグラフィー及び 2,5-ADP Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィーにより本酵素を約 1900 倍に精製した。本酵素標品を polyacrylamide gel 電気泳動後のガイモグラムも調べたところ活性染色のバンドの位置とタンパク質染色の主バンドの位置が一致した。SDS-スラブゲル電気泳動後のタンパク質染色から、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-スラブ電泳の結果にもとづき分子量約 47,000 のサブユニット 2 つからなるとみられた。

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 付近であった。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 SH 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 C₁₅ テルペンール > C₁₀ テルペンール >> C₁₀ 脂肪酸アルコールの順となり、また L-L-FOH に対する K_m 値は 15 μM であり、GOH の場合に比べ非常に低いことを知った。

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。

以上の性質から考えて、本酵素は接種に伴うテルペン生合成でのテルペン間転換の初発反応に関与するものと考えた。さらに本酵素反応を含んだフラン環形成反応の推定を示した。

II. DHIp 還元酵素について

接種 2 日後の組織磨砕液の 100,000 × g 画分 (ミクロソーム画分) に、NADPH に依存し DHIp を Ip と、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。ここに第 1 章の *in vivo* の系

で示した結果を in vitro の系で証明した。また FPP 以降のテルペン生合成についての酸化還元反応のうち、他の生物を通じて初めて無細胞系でも証明された酵素である。

γ -DHP を基準とし ITLC での Rp 画分中のラベルを調べる活性測定により、反応約 1 時間まで (約 1 g 組織新鮮重相当のミクロソームのとき) の間直線的に増加した。また約 1 g 組織新鮮重相当のミクロソーム懸濁液まで (反応を 1 時間とするとき) その活性は直線的に増加した。また本酵素は pH 7.5-8.0 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。

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