

フェアリー化合物による新プリン代謝経路の解明と受容体の探索

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2020-04-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 崔, 宰熏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/00027298

令和元年6月19日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06192

研究課題名(和文)フェアリー化合物による新プリン代謝経路の解明と受容体の探索

研究課題名(英文)Studies on biosynthesis of fairy chemicals on a novel purine metabolic pathway

研究代表者

崔宰燾(CHOI, JAEHOON)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：40731633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：AHXとその植物内代謝産物であるAOHが、温度や塩などの非生物学的ストレスに対する耐性を植物に付与すること、植物に内生して新規プリン代謝経路で生合成されること、および既知植物ホルモンとは全く異なる挙動を示すことを明らかにした。以上の知見から、AHX、ICA、AOH(フェアリー化合物)は新しい植物ホルモンである可能性が高いと考え、これらの化合物の生合成、代謝を明らかにした。フェアリー化合物を処理したイネから代謝産物を抽出し、HPLCで分析したところ、多数の代謝産物が検出された。化合物を単離成功し、構造決定を行った。生合成・代謝経路の解明の研究を継続し、FCsの生合成酵素を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らにより、フェアリーリングの正体はAHX、AOHとICAであることが世界で初めて明らかになった。さらに重要なことは、それらの化合物は既知の植物ホルモンとは全く違う挙動を示し、新しい作用機構による活性であることや、植物に内生していることから新しい植物ホルモンの可能性がある。そこに生合成や代謝経路が明らかになれば、新しい植物ホルモンとして位置づけられるであろう。さらに、植物生長剤としての実用化研究も内外の大手化学会社によって始まっており、これらの基礎研究は、実用化のためにも有意義な情報を与える。

研究成果の概要(英文)：Fairy ring is a phenomenon in which the turf becomes darker than its surroundings. We discovered the plant growth regulators AHX and ICA from the *Lepista sordida* that causes fairy rings, and AHX and its in-plant metabolite AOH. It has been revealed that it is endogenously produced in plants and is biosynthesized by the novel purine metabolic pathway. Based on the above findings, we believe that AHX, ICA, and AOH (Fairy compounds) are likely to be new plant hormones. When the compound was extracted from the rice treated with the compound and analyzed by HPLC, it was revealed that a large number of metabolites were produced. Those compounds were isolated successfully and structural determination was performed. We continued research on elucidation of biosynthetic and metabolic pathways and identified biosynthetic enzymes of FCs.

研究分野：天然物化学

キーワード：フェアリーリング フェアリー化合物 生合成 代謝 植物成長

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、本研究に関する最新の成果を発表し、Nature 誌に紹介された (Mitchinson, A., Nature, 505, 298, 2014)。本研究は、そのさらなる展開である。芝が大きな曲線を描いて、周りに比較して色濃く繁茂するフェアリーリングという現象が知られている。そのフェアリーリングを惹起するコムラサキシメジ培養液から、シバ成長促進物質 2-azahypoxanthine (AHX) とその関連物質 imidazole-4-carboxamide (ICA) の単離、同定に成功した。両化合物が天然から見出されたのは初めてであり、AHX の植物への活性はほとんど知られていなかった。また、ICA は AHX と異なりシバに対しては生長抑制活性を示し、文献上では生物活性の報告はない。これらの化合物は属する科に関わらず調べた全ての植物の成長を制御した。さらに、イネ cDNA マイクロアレイと RT-PCR 解析によって、これらの化合物の添加によって既知のホルモンの遺伝子発現はほとんど影響されず、また既知のホルモンの作用とも全く異なった挙動を示し、AHX はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、Bowman-Birk type proteinase inhibitor (BBI)、アクアポリンの 1 種 TIP2;1 等の遺伝子の発現を大きく促進したことが判明した。GST は温度や塩に対するストレスを軽減することが知られ、BBI は病原菌への抵抗性を付与、塩ストレスからの保護に関わっている。そこでこれらのストレス下でイネを AHX 処理したところ、生育が大幅に回復した。また、TIP2;1 は $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ の吸収に関わっており、実際に AHX 処理によってアンモニア態窒素及び全窒素のイネへの吸収が大幅に促進された。さらに、AHX と ICA はポット試験や圃場実験においてコメとコムギ収量を大幅に増加させた。また、イネを AHX で処理し生育させた苗の抽出物から AHX の代謝産物が得られ、X 線結晶構造解析により 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

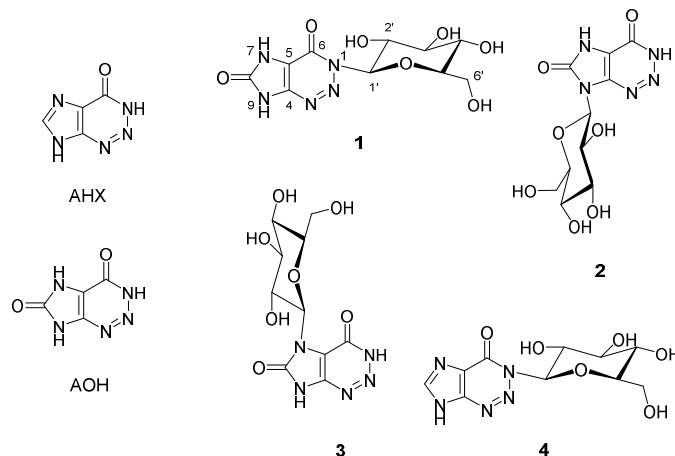
フェアリーリング (fairy rings、妖精の輪) は、芝が輪状に周囲より色濃く繁茂し、枯れた後にキノコが発生する現象である。研究代表者らは、フェアリーリングを引き起こすコムラサキシメジから植物生長調節物質 AHX および ICA を発見し、AHX とその植物内代謝産物である AOH が温度や塩などの非生物的ストレスに対する耐性を植物に付与すること、植物に内生して新規プリン代謝経路で生合成されること、および既知植物ホルモンとは全く異なる挙動を示すことを明らかにした。以上の知見から、AHX、ICA、AOH は新しい植物ホルモンである可能性が高いと考え、これを証明するために、本研究では、これらの化合物の生合成・代謝・受容機構の全容を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ベントグラスを用いた植物成長調節活性を指標にコムラサキシメジから新たな植物成長調節物質を探索した。
- (2) 植物中で AHX と AOH のさらなる代謝産物があるかを HPLC によって調べた。
- (3) コムラサキシメジ菌糸体培養液に AICAR を添加し、取り込み実験を行い、経時的にサンプリングし、AHX の定量を分析した。
また、菌糸体抽出液を用い、酵素活性の有無を調べた。その遺伝子を探索するために、次世代シーケンサーを用いコムラサキシメジのゲノム解析を行なった。
- (4) AOH を合成するための唯一の方法は現在のところキサンチンオキシダーゼによる酵素的変換である。AOH を合成するためのより良い方法を探している間に、偶然にも AHX の水溶液が微生物によって汚染されていることに気づき、溶液の HPLC 分析は溶液中の AHX が AOH に変換されたことを示した。したがって、AOH を生成した空中浮遊微生物の単離を試みた。また、AHX の代謝に関わる遺伝子を同定するため、ゲノム解析を行なった。*L. sordida* フェアリーリング形成に関与する他の遺伝子を同定を試みた。このフェアリーリング現象は、植物と菌類との化学コミュニケーション (化学シグナルのやりとり) によって生じている可能性があることから、シバが発生し、担子菌の成長に影響を及ぼす物質を探索した。
- (5) FCs の生合成経路を明らかにするため、プリン代謝で重要な中間体である AICAR あるいは AICA を用い、取り込み実験などを行った。
また、ダブルラベル体の FCs を合成し、それらを用いイネ、シロイヌナズナにおける FCs の内生量を調べた。
- (6) これまでの結果を踏まえ、FCs が新しい植物ホルモンである可能性が示唆された。このような興味深い生理活性分子でありながら、AHX が植物内で働く仕組みは明らかにされていない。そこで AHX の受容体同定と AHX の作用機序解明を目指し、様々な AHX 誘導体を合成し、構造活性相関を調べることにした。

4. 研究成果

- (1) コムラサキシメジの培養液から新たに植物成長調節物質 4 つを単離成功した。すべての化合物はシバに対する根の伸長阻害活性を示した。
- (2) AHX 処理イネ中に更なる AHX 代謝産物が HPLC により、代謝産物 1 から 4 が検出され、各種クロマトグラフィーに供し、それらの化合物を単離成功した。化合物 1~4 の構造は、分光分析および合成によって AHX と AOH のグルコシド体で決定された。



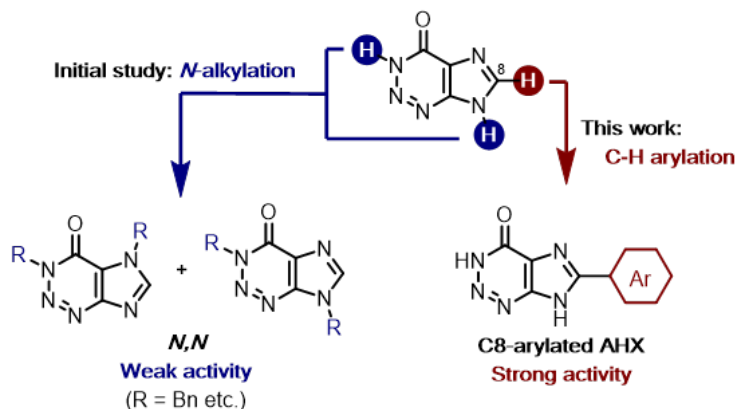
化合物 1~4 はイネに対して有意な活性を示さず、AHX と AOH をグルコシドに変換することによって植物成長調節活性を調節することが明らかになった。

(3) AHX の構造は、AHX が 5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチド (AICAR) に由来すると仮定することを可能にした。そこで、AICAR を *L.sordida* に与えた摂餌実験を行った。AICAR の消費と AHX の蓄積は摂餌後に観察された。菌糸体抽出物はアデニン / 5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (APRT) の酵素活性を有していた。*L. sordida* の APRT 遺伝子は相同性モデリングにおいてその構造的特徴を明らかにし、給餌後に転写増強を示した。これらの結果は、AHX が AICAR から合成され、AHX 合成が AICAR によって転写的に制御されたことを裏付けており、これは *L. sordida* における新規プリン代謝経路の存在を示している。

また、コムラサキシメジのゲノム情報を提供するために、新しいウェブデータベース F-RINGS (<http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/f-rings/>) を構築し、植物成長調節因子およびフェアリーリング形成に関与する 29 の候補酵素コード遺伝子の代謝経路を予測した。

(4) 栄養培地から単離した CH-1 株は AHX を AOH に変換し、*Burkholderia contaminans* として同定された。菌株の静止細胞による AOH の定量的生産が達成された。10.6 mmol AHX を AOH に変換できた。この工程の収率は 91% であった。この菌株の高品質ドラフトゲノム配列を解析し AHX の代謝に関与するいくつかの遺伝子を含む 8065 のタンパク質コード配列が含まれた。担子菌の成長に影響を及ぼす物質を探索したところ、ペントグラス (*Agrostis stolonifera*) から菌糸体成長調節物質の単離・精製に成功した。この化合物を NMR と質量分析に供し、2-acetyl-3,5-dimethoxyphenol と同定した。この化合物は担子菌であるコムラサキシメジ、エノキタケ、ウシグソヒトヨタケの菌糸体伸長に対して抑制活性を示した。

(5) ダブルラベル体を用いたイネの取り込み実験により、AICA から AHX、ICA が産生されることが明らかになった。この結果は化学合成経路と同様な経路が植物中にも存在することを示している。現在、その酵素を同定するために研究している。



(6) 上の図のように、窒素原子上には求核置換反応を用いて、アルキル基を導入した誘導体を合成した。残る変換可能な部位である C8 位にアリール基を導入した誘導体を合成し、植物成長促進活性を評価したところ、窒素上へ置換基を導入した誘導体は活性の大幅な低下が見られた。一方、C8 位にアリール基を導入した誘導体は、AHX よりも強い成長促進作用を示した。現在、合成した誘導体の AHX のアンタゴニスト活性も確認した。

〔雑誌論文〕(計 10 件)

全て査読有

Takano, T., Yamamoto, N., Suzuki, T., Dohra, H., Choi, J.-H., Terashima, Y., Yokoyama, K., Kawagishi, H., and Yano, K., Genome sequence analysis of the fairy ring-forming fungus *Lepista sordida* and gene candidates for interaction with plants. **Sci. Rep.**, 9, 5888 (2019).

DOI: 10.1038/s41598-019-42231-9

Kitano, H., Choi, J.-H., Ueda, A., Ito, H., Hagihara, S., Kan, T., Kawagishi, H., and Itami, K., Discovery of plant growth stimulants by C-H arylation of 2-azahypoxanthine, **Org. Lett.**, 20 (18), 5684-5687 (2018).

DOI: 10.1021/acs.orglett.8b02407

Ouchi, H., Asakawa, T., Ikeuchi, K., Inai, M., Choi, J.-H., Kawagishi, H., and Kan, T., Synthesis of double-¹³C-labeled imidazole derivatives, **Tetrahedron Lett.**, 59(39), 3516-3518 (2018).

DOI: 10.1016/j.tetlet.2018.07.048

Choi, J.-H., Biologically functional molecules from mushroom-forming fungi, **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 82, 372-382 (2018)

DOI: 10.1080/09168451.2018.1431519

Choi, J.-H., Wu, J., Sawada, A., Takemura, H., Yogosawa, K., Hirai, H., Kondo, M., Sugimoto, K., Asakawa, T., Inai, M., Kan, T., and Kawagishi, H., N-Glucosides of fairy chemicals, 2-azahypoxanthine and 2-aza-8-oxohypoxanthine, in rice, **Org. Lett.**, 20, 312-314 (2018).

DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03736

崔宰熏, 呉静, 伏見圭司, 平井浩文, 河岸洋和, シバ *Agrostis stolonifera* 由来のコムラサキシメジ菌糸体に対する生育抑制物質, **日本きのこ学会誌**, 25(4), 141-144 (2018)

Choi, J.-H., Moriuchi, R., Sugiura, H., Kawagishi, H., and Dohra, H. High-quality draft genome sequence of *Burkholderia contaminans* CH-1, a gram-negative bacterium that metabolizes 2-azahypoxanthine, a plant growth-regulating compound, **Genome Announc.**, 5(41), e01148-17, (2017)

DOI: 10.1128/genomeA.01148-17

Ito, A., Choi, J.-H., Wu, J., Tanaka, H., Hirai, H., and Kawagishi, H., Plant growth inhibitors from the culture broth of fairy ring-forming fungus *Lepista sordida*, **Mycoscience**, 58, 387-390 (2017).

DOI: 10.1016/j.myc.2017.05.001

Suzuki, T., Yamamoto, N., Choi, J.-H., Takano, T., Sasaki, Y., Terashima, Y., Ito, A., Dohra, H., Hirai, H., Nakamura, Y., Yano, K., and Kawagishi, H., The biosynthetic pathway of 2-azahypoxanthine in fairy-ring forming fungus., **Sci. Rep.**, 6, 39087 (2016).

DOI: 10.1038/srep39087

Choi, J.-H., Kikuchi, A., Pumkhaeo, P., Hirai, H., Tokuyama, S., and Kawagishi, H., Bioconversion of AHX to AOH by resting cells of *Burkholderia contaminans* CH-1, **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 80, 2045-2050 (2016).

DOI: 10.1080/09168451.2016.1189314

〔学会発表〕(計 11 件)

崔宰熏, 北野 浩之, 上田 彩果, 伊藤 英人, 萩原 伸也, 徳山 真治, 平井 浩文, 菅 敏幸, 伊丹 健一郎, 河岸 洋和, 2-azahypoxanthine 誘導体の植物成長調節活性に関する化学的研究, 2019 年度日本農芸化学会日本農芸化学会, 2019 年

崔宰熏, きのこと植物のクロストークに関する化学的研究, 第 22 回日本きのこ学会, 2018 年

崔宰熏, 近藤 遼一, 平井 浩文, 浅川 倫宏, 稲井 誠, 菅 敏幸, 河岸 洋和, イネにおけるフェアリー化合物 2-azahypoxanthine (AHX) 及び 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) の配糖化に關与する糖転移酵素に関する化学的研究, 2018 年度日本農芸化学会, 2018 年

竹村 太秀, 崔宰熏, 伊藤 彰将, 近藤 遼一, 與五澤 薫, 伏見 圭司, 道羅 英夫, 成川 礼, 松崎 信生, 平井 浩文, 浅川 倫宏, 稲井 誠, 菅 敏幸, 河岸 洋和, 植物におけるフェアリー化合物の生合成経路に関する研究, 第 59 回天然有機化合物討論会, 2017 年

崔宰熏, 伊藤 彰将, 田中 秀和, 呉 静, 平井 浩文, 河岸 洋和, フェアリーリングにおけるシバとコムラサキシメジの共存に関する化学的研究, 第 21 回日本きのこ学会, 2017 年

崔宰熏, 菌類が産生する機能性物質に関する研究, 第 179 例会日本農芸化学会中部支部, 2017 年

竹村 太秀, 崔宰熏, 平井 浩文, 浅川 倫宏, 稲井 誠, 菅 敏幸, 河岸 洋和, 高感度検出方法を用いたイネにおけるフェアリー化合物の定量化, 第 16 回新規素材探索研究会, 2017 年

崔宰熏, 伏見 圭司, 成川 礼, 平井 浩文, 浅川 倫宏, 稲井 誠, 菅 敏幸, 河岸 洋和, イ

ネにおけるフェアリー化合物の新プリン代謝経路上での生合成に関する研究、2017年度日本農芸化学会、2017年

崔 宰熏、菌類が産生する機能性物質に関する研究、2017年度日本農芸化学会、2017年
伊藤 彰将、崔 宰熏、平井 浩文、河岸 洋和、コムラサキシメジ (*Lepista sordida*) 菌系体におけるフェアリー化合物の生合成経路に関する研究、第15回新規素材探索研究会、2016年
伊藤 彰将、寺島 百合香、崔 宰熏、鈴木 智大、笹浪 知宏、道羅 英夫、平井 浩文、浅川 倫宏、稲井 誠、菅 敏幸、河岸 洋和、コムラサキシメジ (*Lepista sordida*) 菌系体におけるフェアリー化合物の生合成経路に関する研究、第58回天然有機化合物討論会、2016年

〔産業財産権〕

取得状況（計1件）

名称：2 - アザ - 8 オキソヒポキサンチンの製造方法

発明者：徳山真治、崔宰熏、河岸洋和

権利者：国立大学法人静岡大学

種類：特許

番号：特許第6494738号

取得年：2019年3月15日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

生物化学研究室のHP

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。