

学 位 論 文 題 名

Structures and Biosynthesis of Cruciferous Phytoalexins

(アブラナ科植物ファイトアレキシンの構造と生合成)

学位論文内容の要旨

植物が微生物に接触した際、植物自身により新たに産生される抗菌性化合物ファイトアレキシンは、病害抵抗機構を説明する物質として植物病理学の立場から重要視されている。当研究室では、罹病ハクサイよりアブラナ科植物として最初のファイトアレキシン brassinin(1), methoxybrassinin(2), cyclobrassinin(5)を単離し、その構造を報告している。これらは2個の硫黄原子を含むインドール化合物であり、全く新しいタイプのファイトアレキシンである(図1)。一方、アブラナ科植物には、正常成分としてグルコシノレートと称される一連の含硫配糖体が多数含まれており、酵素加水分解により isothiocyanates を主成分とするカラシ油を与えることが知られている。これらグルコシノレートのうち、インドール環をもつ glucobrassicin(15)は、その構造的特徴からインドールファイトアレキシンとの関連が注目されている。申請者はアブラナ科植物ファイトアレキシンの全体像を理解するために新規ファイトアレキシンを探索し、さらにファイトアレキシンの相互関係およびインドールグルコシノレートとの関連を明らかにするために、以下の実験を行った。

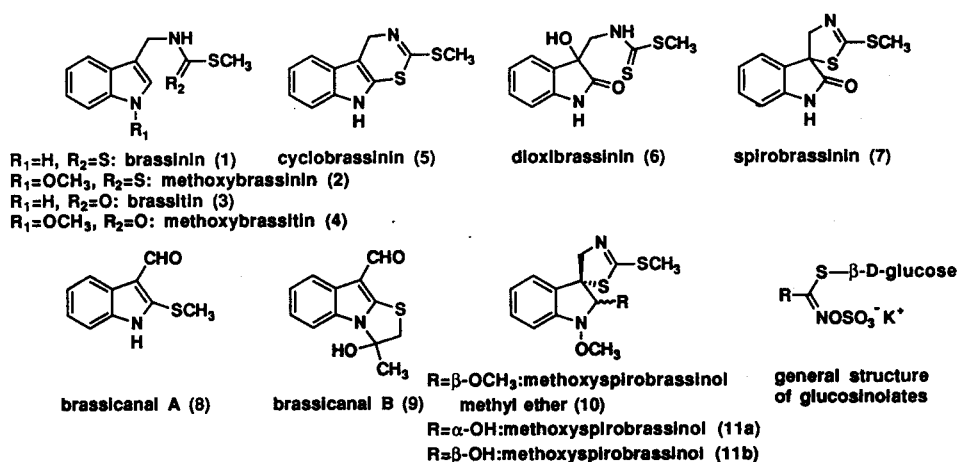


図1 アブラナ科植物ファイトアレキシンとグルコシノレートの構造

ハクサイ、ダイコンのファイトアレキシンの単離・構造決定

レタス腐敗病菌 *Pseudomonas cladorii* を接種したハクサイのアセトン抽出物から、前述の3種のインドールファイトアレキシン(1, 2, 5)と共に3種の新規インドールファイトアレキシンを単離した。NMRを中心とした各種スペクトルから各々、その構造を4, 8, 9と決定した(図1)。この内、methoxybrassitin(4)は先に単離された主ファイトアレキシン methoxybrassinin(2)の側鎖の構造が dithiocarbamate から thiocarbamate に代わったものであり、brassicanal A(8) 及び B(9) は共に硫黄原子を1個有するファイトアレキシンであった。また、brassicanal B(9) は非プロトン性の溶媒中で、水素結合により分子会合することが動的NMRの実験により判明した。

同様な方法により属の異なるダイコンから、既に単離された4種のインドールファイトアレキシン (1, 2, 4, 8) と共に4種の新規インドール系ファイトアレキシン (3, 7, 10, 11a, b) を得た (図1)。Spirobrassinin (7) はオキシインドール型の最初のファイトアレキシンであり、その構造上の特徴から brassinin (1) より生合成されることが推定された。Methoxyspirobrassinol (11a, b) は単離不可能な平衡混合物であり、その methyl ether 体10と共に、後に述べるジオール生合成中間体を支持する構造を有していた。

ファイトアレキシンおよびグルコシノレートの経時変化

アブラナ科植物のファイトアレキシンの生成と代謝の過程を経時的に追跡するため、高速液体クロマトグラフィーによる分析条件を詳細に検討した。その結果、C₁₈ カラムとアセトニトリル・メタノール・水の複雑な濃度勾配法を組み合わせ、温度を厳密に制御することにより、13種のインドール系ファイトアレキシンと3種の関連インドール化合物の再現性よい分析が可能になった。この分析法を用い、紫外線を照射したカブのスライスについてファイトアレキシンの経時変化を追跡した結果、brassinin (1) が最初に生成した後、cyclobrassinin (5)、spirobrassinin (7) が次第に増加することが判明した。また、同一のサンプルについてグルコシノレートの分析を行ったところ、紫外線非照射および紫外線照射カブスライスのどちらにおいても、脂肪族系のグルコシノレートの減少に伴いインドール系グルコシノレート、特に glucobrassicin (15) が急増することが明かとなった。

アブラナ科植物ファイトアレキシンの生合成

次に、先の経時変化及び構造上の特徴から推定される主ファイトアレキシンの生合成的関連を明らかにするため、重水素で標識した brassinin (1)、cyclobrassinin (5) 及び dioxibrassinin (6) の取り込み実験を試みた。その結果、cyclobrassinin (5) 及び spirobrassinin (7) はそれぞれ独立に brassinin (1) より生合成されることが判明した (図2)。また、そのインドール環は L-tryptophan 由来であることが、重水素標識した L-tryptophan の取り込み実験から明かとなった。次いで、2位を ¹³C で標識した DL-tryptophan の取り込み実験を行ったところ、この炭素原子は転位反応により spirobrassinin (7) のイミノ炭素に取り込まれることが判明した。このことは、これらインドール系ファイトアレキシンがグルコシノレートと同様な生合成経路により合成されることを強く示唆している (図2)。

中間体として想定される indol-3-ylmethyl isothiocyanate (16) は不安定なため未だ天然から単離された報告はない。そこで、2つの方法により、中間体としての存在を検討した。まず、メタンチオール存在下にカブを粉砕したところ、生成する indol-3-ylmethyl isothiocyanate (16) が brassinin (1) として捕捉された。次に、isothiocyanate 中間体のモデル化合物として、比較的安定な benzyl isothiocyanate を選び、メタンチオール非存在下に取り込み実験を行ったところ、対応する “ファイトアレキシン” PhCH₂NH-CS-SCH₃ を単離することができた。

想定中間体16にメチルチオ基が付加すれば、形式的に brassinin (1) が生成する。このメチルチオ基が methionine より直接導入されることが以下の実験より明かとなった。即ち、L-[³⁵S]methionine と L-[methyl-³H₃]methionine の混合溶液を取り込ませた結果、単離された brassinin (1) と spirobrassinin (7) 中の ³⁵S/³H の割合は、取り込み前と比較して顕著な差はみられなかった (図2)。また、もう一つの硫黄原子は L-cysteine 由来であることが、L-[³⁵S]cysteine の取り込み実験から判明した。

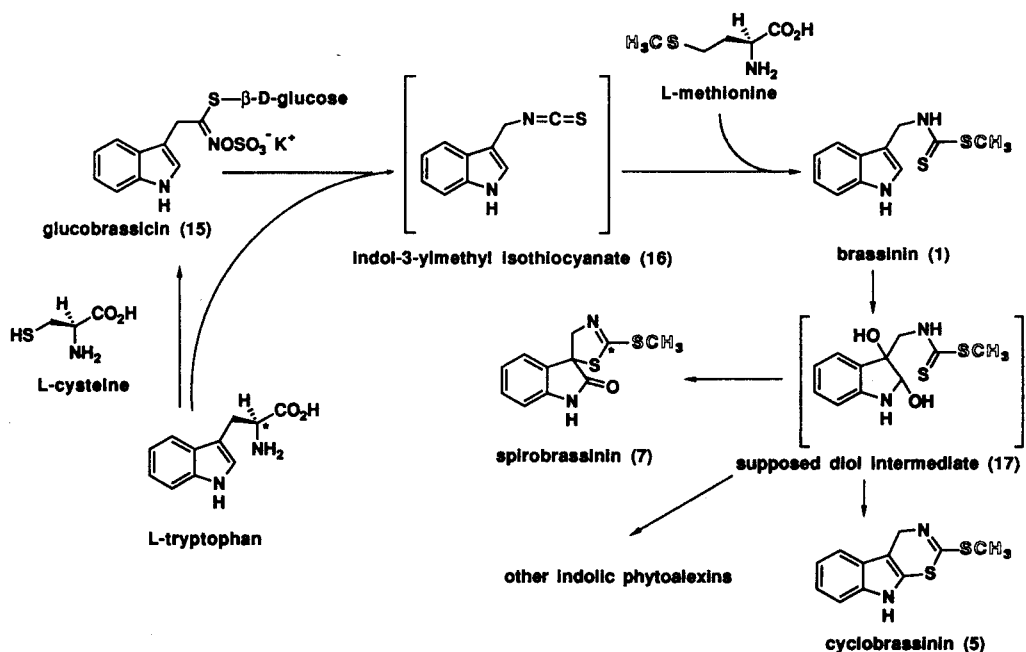


図2 アブラナ科植物ファイトアレキシンの生合成経路

最後に、これらインドール系ファイトアレキシンの多様性を説明するために、brassinin(1)からその他のインドール系ファイトアレキシンの生合成共通中間体を想定し、モデル化合物の取り込み実験により中間体の構造の情報を得ることとした。2位をメチル基でブロックした2-methylbrassinin(12)を合成し、紫外線を照射したカブに投与したところ、側鎖の転位した化合物14を得た。化合物14はピナコール転位より生成したものと考えられ、これよりジオール中間体13（或いはその等価体）の存在が推定された（図3）。天然体の場合、相当するジオール中間体17（或いはその等価体）により brassinin(1) から cyclobassinin(5)、spirobrassinin(7)等の生合成を合理的に説明できる（図2）。また、ダイコンより単離された10, 11の構造からもその存在が支持される。以上、L-tryptophanからアブラナ科植物のファイトアレキシンの経路は図2の様にまとめられる。

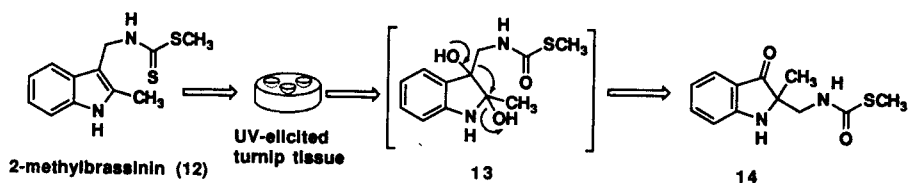


図3 2-Methylbrassinin(12)の取り込み実験

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 杉 光 雄
副 査 教 授 村 井 章 夫
副 査 教 授 白 濱 晴 久
副 査 教 授 平 尾 健 一

学 位 論 文 題 名

Structures and Biosynthesis of Cruciferous Phytoalexins

(アブラナ科植物ファイトアレキシンの構造と生合成)

植物が微生物に接触した際に、植物自身がファイトアレキシンと総称される抗菌性物質を産生・蓄積する現象は植物の動的病害抵抗性の観点から重要視されている。アブラナ科には多くの重要作物が含まれるが、1986年に当研究室よりブラシニンが報告されるまで、この科のファイトアレキシンは全く知られていなかった。本研究は、アブラナ科植物ファイトアレキシンの全体像を理解する目的で新規ファイトアレキシンを単離、構造決定するとともに、生合成経路を明らかにしたものである。その主要内容および新知見を以下に要約する。

新規アブラナ科植物ファイトアレキシンの単離と構造決定 *Pseudomonas cichorii* を接種したハクサイの抽出物について抗菌性物質を注意深く探索し、新たに3種の新規インドール系含硫ファイトアレキシンを単離し構造を決定した。また、*P. cichorii* を接種したダイコンから4種の新規含硫ファイトアレキシンを単離し構造を明らかにした。これらファイトアレキシンのうち spirobrassinin はオキシインドール構造を有する点で、brassicinal A および brassicanal B は硫黄原子を1個含む点で、methoxyspirobrassinol は生合成経路を示唆する構造を有する点で特に注目される。申請者は、これまでに共同研究者とともにキャベツおよびカブから7種の新規ファイトアレキシンを単離しており(参考論文)、これらの結果を総合して、アブラナ科植物のファイトアレキシンがいずれも1ないし2個の硫黄原子を含むインドール系化合物であり、アブラナ科植物が他の科とは構造的に全く異なるタイプのファイトアレキシンを産生することを明らかにした。

アブラナ科植物ファイトアレキシンおよびカラシ油配糖体の経時変化 アブラナ科植物ファイトアレキシンの生成と代謝の過程を経時的に追跡するため、種々の条件下で高速液体クロマトグラフィーによる分析を検討し、複雑な溶媒系の採用と厳密な温度制御によって再現性の良い分析法を確立した。次に、紫外線照射したカブスライスの成分を経時的に分析し、産生する各ファイトアレキシンの経時的増減をもとに生合成経路を推定した。さらに、同一試料についてカラシ油配糖体 (glucosinolates) の経時変化を追跡し、インドール系カラシ油配糖体がインドール系ファイトアレキシンと並行して増加することを確認した。このことは両者の生合成経路の関連性を強く示唆するとともに、病害抵抗性における両者の関連性をも示唆する重要な知見である。

アブラナ科植物ファイトアレキシンの生合成 紫外線照射により活性化したカブ貯蔵根組織を利用する生合成実験法を考案し、本法を用いて重水素標識した基本ファイトアレキシンの取り込み実験を行い、brassinin から cyclobrassinin および spirobrassinin がそれぞれ独立に生合成されることを証明した。次いで、同位体標識したトリプトファンの取り込み実験を行い brassinin のインドール環が L-トリプトファン由来であること、トリプトファンの 2 位の炭素原子が brassinin のチオカルボニル炭素に転位反応を伴って取り込まれることを証明した。カラシ油配糖体が酵素加水分解されると転位反応を伴ってイソチオシアナートを与えることは良く知られている。申請者はインドール系カラシ油配糖体に対応するイソチオシアナートが不安定ながら存在可能であることを見出だし、さらにモデル化合物の投与によって brassinin タイプの生成物が得られたことから、インドール系イソチオシアナートがファイトアレキシンの生合成において重要な中間体であることを示した。二重標識メチオニンの投与実験において、メチオニンのメチルチオ基がユニットとして brassinin へ導入されたことは、1 個の硫黄原子の起源を明らかにするとともにイソチオシアナートが生合成の鍵中間体であることを強く支持する。また、申請者はモデル化合物の取り込み実験の結果から、アブラナ科植物における一連のファイトアレキシンの相互関係が共通中間体を想定することにより合理的に説明されることを示し、これらの結果をもとに L-トリプトファンから多様なアブラナ科植物ファイトアレキシンへ至る生合成経路を提唱している。

以上、本論文はアブラナ科植物ファイトアレキシンに関する先駆的な重要知見を多数含むものであり、高く評価される。よって、審査員一同は、別に行った最終試験の結果と併せ、申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。