

学位論文題名

Study on biosynthesis of theobroxide
and its related compounds in *Lasiodiplodia theobromae*(Lasiodiplodia theobromae が生産する Theobroxide 及び
関連化合物の生合成研究)

学位論文内容の要旨

熱帯、亜熱帯に広く分布する病原性糸状菌 *Lasiodiplodia theobromae* は貯蔵中の果物や根菜類に感染し、深刻な被害を与える。本菌の主要代謝産物であるセオプロキシド **3** はバレシヨ (*Solanum tuberosum* L.) のマイクロチューバー形成やアサガオ (*Pharbitis nil*) の花芽形成を誘導する。また、セオプロキシドはアサガオやホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) の茎伸長を阻害するなど、農業生産に利用可能な植物ホルモン様の興味ある生理活性を有する。そのほか、本菌はセオプロキシドのカルボニルジオキシ誘導体 **4**、(1*S*, 4*R*, 5*S*, 6*R*)-7,9-dioxa-3-methyl-8-oxobicyclo-[4,3,0]-2-nonene-4,5-diol、lasiodiplodin **2**、4-hydroxylasiodiplodin、5-hydroxylasiodiplodin、メレイン(8-hydroxy-3-methyl-isochroman-1-one)などのポリケチド系代謝産物やジャスモン酸を生産する。

本研究は、主要代謝産物である化合物 **3** および **4** の生合成経路を明らかにし、生合成中間体投与により化合物 **3** の生産性を向上するとともに、*L. theobromae* 培養液中での新たなマイクロチューバー形成誘導物質の探索を目的に行ったものである。

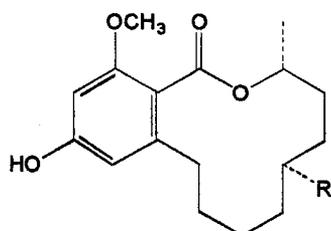
(1) *L. theobromae* の新規代謝産物の精製構造決定¹⁾

本菌の培養液 (ポテト-1%グルコース培地) から新規のマイクロチューバー形成誘導物質 **1** をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離した (3.75mg/L 培養液)。化合物 **1** (HRFIMS: [M]⁺ found *m/z* 308.1630, C₁₇H₂₄O₅, [α]_D²⁰ +12°) の平面構造と相対配置は IR、MS および COSY、HMQC、HMBC を含む NMR 測定により、6-hydroxylasiodiplodin と決定した。絶対構造は **1** をメチル化後、(+)-および(-)-MPTA 誘導体化し、改良 Mosher 法により (3*R*, 6*S*) と決定した。

化合物 **1** のバレシヨのマイクロチューバー形成誘導活性は 10⁻⁶M で認められたが、ジャスモン酸やセオプロキシドよりも活性は低かった。

(2) セオプロキシド **3** 及びそのカルボニルジオキシ誘導体 **4** の生合成²⁾

液体培地に 10mM の重水素及び ¹³C で標識した酢酸 ([1-¹³C]-、[2-¹³C]-、[1,2-¹³C]-、[H₃, 2-¹³C]-) を加え、*L. theobromae* を接種後 7 日間または 14 日間培養した。生成したセオプロキシド **3** と化合物 **4** を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムで精製した後、アセチル化した。



Lasiodiplodin **2**: R=H
(3*R*, 6*S*)-6-hydroxylasiodiplodin **1**: R=OH

化合物3と4のアセチル誘導体を ^{13}C 及び ^2H -NMR 測定し、アセチル基のメチル炭素との相対比から各炭素の

^{13}C の標識率を求めた。その結果、酢酸のカルボニル炭素とメチル炭素が交互に取り込まれ（標識パターン：Fig. 2）、両化合物ともテトラケチド起源であることが示された。さらに、化合物4のカルボニル炭素は酢酸のカルボキシル基炭素由来であること、酢酸のメチル水素は化合物3と4のメチル基とエポキシ炭素のうちの一方のメチン水素に取り込まれること、酢酸のメチル重水素は化合物3及び4のメチル基に取り込まれる前に、培地中の水素とかなり交換することなどが明らかになった。

以上の結果、Fig. 1に示したように、セオプロキシドはテトラケチドから6-メチルサルチル酸5、3-hydroxytoluene 6、2,5-dihydroxytoluene 7、2-methyl-[1,4]-benzoquinone 8、を経て生成する可能性が示された。そこで、推定されるセオプロキシドの前駆体5~8 (10^{-4}M)を *L. theobromae* に投与し、セオプロキシドの生成量を定量したところ、化合物5及び6では生成量が2倍に、化合物7および8の投与では3倍に増加することが判った。メチル基を重水素標識した化合物7aを *L. theobromae* 培養液に加え、化合物3及び4への生物転換を行ったところ、両化合物のメチル基に重水素が取り込まれることから、Fig. 2で示した生合成過程が支持された。また、セオプロキシド生産には化合物7の投与が効果的であることが証明された。

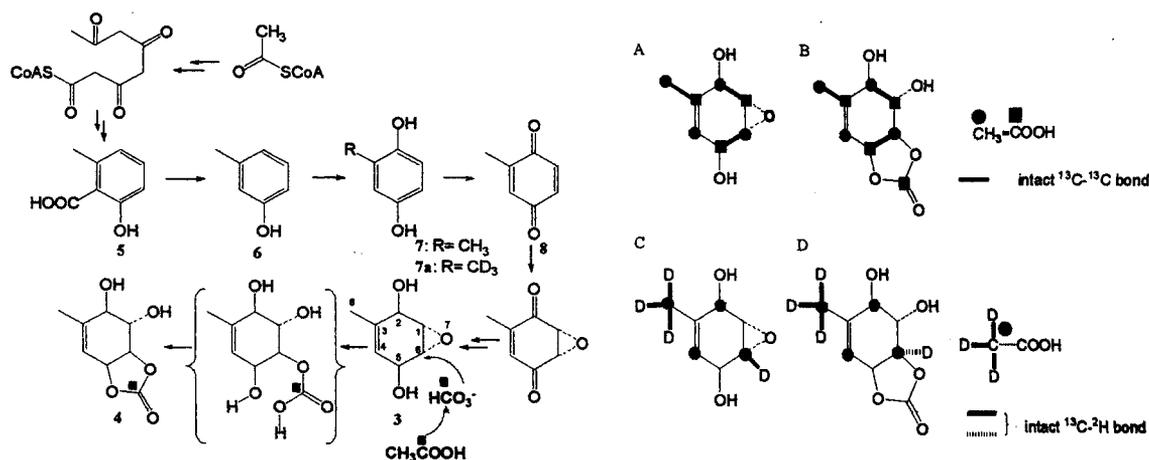


Fig 1. Possible biosynthetic pathway of compounds 3 and 4 Fig 2. Labeling patterns of compounds 3 and 4

- 1) Peng Li, et al., Novel potato micro-tuber inducing compound (3*R*, 6*S*)-6-hydroxylasiodiplodin, from a strain of *Lasiodiplodia theobromae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2005) **69**, 1610-1612.
- 2) Peng Li, et al., Biosynthesis of theobroxide and its related compounds, metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry*, (2007) **68**, 819-823.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鍋 田 憲 助
副 査 教 授 生 方 信
副 査 准教授 松 浦 英 幸
副 査 助 教 高 橋 公 咲

学 位 論 文 題 名

Study on biosynthesis of theobroxide and its related compounds in *Lasiodiplodia theobromae*

(*Lasiodiplodia theobromae* が生産する Theobroxide 及び
関連化合物の生合成研究)

熱帯、亜熱帯に広く分布する病原性糸状菌 *Lasiodiplodia theobromae* は貯蔵中の果物や根菜類に感染し、深刻な被害を与える。本菌の主要代謝産物であるセオブロキシド 3 (Fig. 1) はパレシヨ (*Solanum tuberosum* L.) のマイクロチューバー形成やアサガオ (*Pharbitis nil*) の花芽形成を誘導する。また、セオブロキシドはアサガオやハウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) の茎伸長を阻害するなど、農業生産に利用可能な植物ホルモン様の興味ある生理活性を有する。そのほか、本菌はセオブロキシドのカルボニルジオキシ誘導体{4, (1*S*, 4*R*, 5*S*, 6*R*)-7,9-dioxa-3-methyl-8-oxobicyclo-[4,3,0]-2-nonene-4,5-diol}, lasiodiplodin 2, 4-hydroxylasiodiplodin, 5-hydroxylasiodiplodin, mellein (8-hydroxy-3-methyl-isochroman-1-one) などのポリケチド系代謝産物やジャスモン酸を生産する。

本研究は、主要代謝産物である化合物 3 および 4 の生合成経路を明らかにし、生合成中間体投与により化合物 3 の生産性を向上するとともに、*L. theobromae* 培養液中での新たなマイクロチューバー形成誘導物質の探索を目的に行ったものである。

(1) *L. theobromae* の新規代謝産物の精製と構造決定

本菌の培養液 (ポテト-1%グルコース培地) から新規のマイクロチューバー形成誘導物質 1 をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離した (3.75mg/L 培養液)。化合物 1 (HRFIMS: [M]⁺ found *m/z*:308.1630, C₁₇H₂₄O₅, [α]_D+12°) の平面構造と相対配置を IR, MS および COSY, HMQC, HMBC を含む NMR 測定により、6-hydroxylasiodiplodin と決定した。化合物 1 の絶対構造は化合物 2 への化学転換、並びに、(+)-および(-)-MPTA 誘導体化による改良 Mosher 法により (3*R*, 6*S*) と決定した。化合物 1 のパレシヨのマイクロチューバー形成誘導活性は 10⁻⁴M で認められたが、ジャスモン酸やセオブロキシドよりも活性は低かった。

(2) セオブロキシド及びそのカルボニルジオキシ誘導体の生合成

液体培地に重水素及び ^{13}C で標識した酢酸を加え、*L. theobromae*を接種後7日間または14日間培養した。生成した化合物3と4のアセチル誘導体を ^{13}C 及び $^2\text{H-NMR}$ 測定し、アセチル基のメチル炭素との相対比から各炭素の ^{13}C の標識率を求めた。その結果、酢酸のカルボニル炭素とメチル炭素が交互に取り込まれ、両化合物ともテトラケチド起源であることが示された。さらに、化合物4のカルボニル炭素は酢酸のカルボキシル基炭素由来であること、酢酸のメチル水素は化合物3と4のメチル基とエポキシ炭素のうちの一方のメチン水素に取り込まれること、酢酸のメチル重水素は化合物3及び4のメチル基に取り込まれる前に、培地中の水素とかなり交換することなどが明らかになった。

以上の結果、セオブロキシドはテトラケチドから6-メチルサルチル酸5、3-hydroxy-toluene 6、2,5-dihydroxytoluene 7、2-methyl-[1,4]-benzoquinone 8を経て生成する可能性が示された。そこで、推定されるセオブロキシドの前駆体5~8 (10^{-4}M)を*L. theobromae*に投与し、セオブロキシドの生成量を定量したところ、化合物5及び6の投与では生成量が2倍に、化合物7および8の投与では3倍に増加することが判った。メチル基を重水素標識した化合物7を*L. theobromae*培養液に加え、化合物3及び4への生物転換を行ったところ、両化合物のメチル基に重水素が取り込まれることから、推定した生合成過程が支持された。また、セオブロキシド生産には化合物7の投与が効果的であることが証明された。

本研究は、農業への利用が期待されるセオブロキシドの生合成を明らかにするとともに、その生産性向上を達成したものである。よって審査員一同は、李鵬が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。

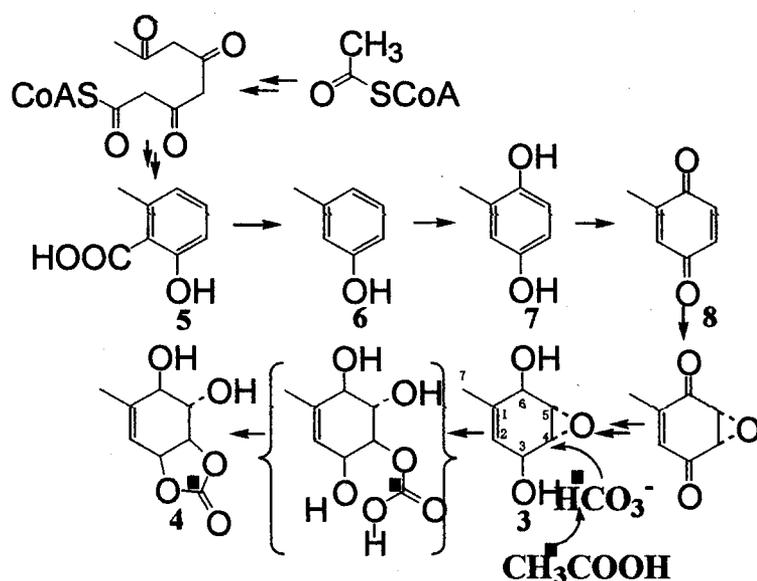


Fig.1. Biosynthetic Pathway of Theobroxide.(3)