植物生理活性短鎖アルデヒド生合成系の生理・生化学的研究†

(2000 年度農芸化学奨励賞受賞)

松 井 健 二

(山口大学農学部)

Key words: short chain aldehydes; phytooxylipin; lipoxygenase; fatty acid hydroperoxide lyase; cytochrome P450

はじめに

植物に特有の香り成分である炭素数 6 (C6) のアルデヒド類はよく“みどりの香り”と称される。これはわれわれが日頃裏山や庭の草木から感じとっているなじみ深い香り成分であり、特に植物の葉を指の間でもみつぶすとその香気を強く感じることができる。この香りの本体の化学的同定は 20 世紀初頭にまでさかのぼり、これらの有機化学、生合成化学に関しては、宇治茶の香り成分の研究を出発点とする、武居、畑中らの永年にわたる努力により解明されてきた(歴史的背景は畑中の総説⁽¹⁾に詳しい)。C6 アルデヒド類はダイズの加工食品ではいわゆる“戻り臭”といわれる、オフフレーバーであり、その除去が試みられてきた⁽²⁾。一方、トマト、ピーマンなどの野菜類ではフレッシュ感を想起させる重要なフレーバー成分である。特にトマト果実では香气成分の存在量と閾値から算出された全体のフレーバーへの寄与率では (Z)-3-hexenal が最も高い値を示し⁽³⁾、トマトらしいフレーバーの主要因子であることがわかる。一方、キュウリ、スイカなどのウリ科植物の多くは C6 アルデヒド類とは大きく異なったキュウリ様の香气特性を有する炭素数 9 (C9) のアルデヒドを生成する。これら短鎖アルデヒド類は原料となる脂肪酸の構造、あるいは生成後のアルコール脱水素酵素によるアルコール体への還元、エステラーゼによるエステル化、または二重結合の異性化によってさまざまな類縁体へと変換される。これら化合物群の

構造-活性(フレーバー特性) 相関の解析により微妙な構造の違いでもフレーバー特性に大きな違いをもたらすことが明らかになっている^(4,5)。くしくも初めて明らかになった哺乳動物嗅細胞の匂い受容体のリガンドはオクタナールであった⁽⁶⁾。われわれはこうした短鎖アルデヒド類にフレッシュさを感じ、その結果として心理的な影響を受けるが、これはわれわれの嗅覚器官にこれらアルデヒド類特異的なレセプターが存在し、その信号が脳皮質のフレッシュ感を想起させる部位に投射されるためであろう。人類が地球上に誕生したときにはすでに地上はみどりの香りに包まれていたはずであり、植物との共進化の過程でこれら短鎖アルデヒドに対するレセプターが作り上げられたのも不思議でない。しかし、植物はわれわれにフレッシュ感を与えるためにこうした生合成系をもっているのではなく、植物組織内で何らかの生理的役割を果たしているはずである。ほとんどすべての植物にこの生合成系が見いだされることから、この生合成系が植物に普遍的で重要な役割を担っていることが予想されるが、その点に着目した研究はまだ少なく、多くは未知のままである。また、この植物特有の生合成経路に関与する酵素群の実体、生合成の制御機構に関しても多くの課題が残されている。筆者らは短鎖アルデヒド生合成系の生理的役割解明を目的として、その生合成経路をつぶさに解析し続けてきた。本稿では筆者らのグループで行われてきた研究を中心に、植物短鎖アルデヒド生合成系研究の進展について述べる。

A. 植物オキシリピン生合成系の多様性

短鎖アルデヒド類は図 1 に示したように膜脂質から切り出されたりノレン酸などの不飽和脂肪酸からリボキシゲナーゼ (LOX)、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ (HPL) の作用により生成される。LOX はその特異性によりリノレン酸 9-ヒドロペルオキシド

† Physiological and Biochemical Studies on Short Chain Aldehyde Biosynthetic Pathway in Plants
Kenji MATSUI (Department of Biological Chemistry,
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University)

図1 植物におけるフィトオキシリピン経路

膨大なフィトオキシリピン系のうち、本文で主に取り上げられた部分のみを示している。本図ではリノレン酸から出発しているが、リノール酸からも同様の経路があり、*n*-hexenalなどの対応する位置に二重結合がない生成物ができる。また、AOSもDESも9-HPOを基質にするものが知られている。

(HPO), 13-HPO のどちらか (場合によっては両方) を生成するが、それぞれの HPO に特異的な HPL が存在し、前者からは C9 アルデヒドが、後者からは C6 アルデヒドが生成する。また、出発物質がリノール酸の場合、不飽和の一つ少ない短鎖アルデヒドが生成されることになる⁽⁷⁾。一方、リノレン酸 HPO はアレノオキシド合成酵素 (AOS) の基質ともなり、アレノオキシドへ変換され、さらに環化、還元、炭素鎖短縮を経てジャスモン酸へと導かれる。ジャスモン酸は当初老化促進物質として同定されていたが、その後植物組織が害虫による食害を受けた際のプロテアーゼインヒター生成制御物質であることがわかり、広く植物の病

傷害応答の際のシグナル物質として機能していることが明らかとなった⁽⁹⁾。また花芽では葯からの花粉の飛散に必須でもある⁽¹⁰⁾。ジビニルエーテル脂肪酸もまた、同様の過酸化脂肪酸からジビニルエーテル合成酵素 (DES) により生成される⁽¹¹⁾。ジビニルエーテル脂肪酸はバレイショで胴枯れ病感染時に合成、蓄積され、胴枯れ病菌の生育を阻害する⁽¹²⁾。この図に示したもの以外にもペルオキシゲナーゼは過酸化脂肪酸とオレイン酸からヒドロキシ脂肪酸 (植物表面のクチン層形成原料) を生成し⁽¹³⁾、また、 α 酸化酵素 (タバコ葉でタンパク性エリシター、HrpN により誘導される) は脂肪酸の α 位に酸素添加し、 α ヒドロペルオキシ脂肪

酸を生成するなど^(14,15), 生物学的ストレスに対する応答系から生殖の場合まで多岐にわたる生理活性を有する化合物群が脂肪酸から合成される。これら代謝経路はさらにさまざまな酵素によって分岐し, その様子は化学構造の点からもまた生理機能の点からも動物細胞のアラキドン酸カスケード系に匹敵する多様性を有しており, フィトオキシリピン経路と称されている^(8,9)。海藻にもフィトオキシリピン経路が存在し, その多様性は高等植物のそれよりさらに高い。また, その生成物の中には特異な生理活性を有するものも見られ, 医薬品, または研究試薬としての応用が期待されている⁽¹⁶⁾。菌類ではマツタケオール (1-octen-3-ol) に代表される2級アルコールがLOX-HPL経路で生成することが知られているが⁽¹⁷⁾, その反応特異性は高等植物のものとはかなり異なっているようである。

B. 植物短鎖アルデヒドの生理的役割

それでは, 短鎖アルデヒド類を生成するLOX-HPL経路はこのフィトオキシリピン系の中でどのような生理的役割を担っているのだろうか。無傷のシロイヌナズナ葉には新鮮重当たり 0.1 μmol 程度の (Z)-3-hexenal が検出されるが, この葉を乳鉢で磨砕すると hexenal は急速に合成され, 30 秒後には 10 倍となり, 5 分後には新鮮重当たり 2.5 μmol にまで達する (図 2B 参照, 松井ら, 未発表)。傷害に伴うこうした急激な生成が生理的役割解明の鍵となっているに違いない。自然界でこうした傷害が起こる場面としてはまず, 害虫による食害が考えられる。

トウモロコシにヨトウムシの幼虫で食害を与えたとき, その植物体から LOX-HPL 系およびテルペン系の揮発成分が放散される^(18,19)。ここで放散された揮発成分はこの幼虫の天敵である寄生蜂を誘引し, 結果としてトウモロコシの食害が軽減される⁽²⁰⁾。このとき, テルペン系化合物の生成が食害数時間後から見られるのに対し, C6 アルデヒド誘導体の一つ, hexenyl acetate の生成は食害後直ちに見られ, この両生合成系は明らかに異なった制御支配下にあることがわかる。こうした hexenyl acetate の生成は直接食害を受けていない葉でも顕著に見られ, LOX-HPL 経路が傷害を受けた部位から放出された何らかのシグナル因子によって誘導される, つまり, システミックな応答をすることが示されている。先に述べたように短鎖アルデヒド類は植物組織の破砕に伴い急速に生成される。

これは無傷植物細胞内でもともと細胞内小器官に分画されていた基質と酵素が破砕によって出会う結果, その生合成が開始するためと考えられている。しかし, こうしたシステミックな誘導の際には食害を受けていない細胞は無傷であり, 基質と酵素が混じるような細胞内構造の崩壊が進むことは考えにくい。少なくともこうした場合ではあらかじめ潜在的であった酵素が活性化され, それによって短鎖アルデヒド生成系が始動したと考えるのが妥当であろう。同様の現象はトウモロコシだけでなく, ワタでも実証されている⁽²¹⁾。また, ここで放出される hexenyl acetate は人為的な傷害処理よりも, 幼虫の食害でより顕著に生成されるため, 幼虫の唾液に含まれる化合物がエリシターとなって LOX-HPL 生成系を誘導していることが示唆されている。一方, 野外で生育しているトマトにジャスモン酸をスプレーすることで害虫に対する抵抗性が増すことが確認されている⁽²²⁾。ジャスモン酸処理でアルデヒド生成量が増えることはタバコ, キュウリ, シロイヌナズナで確認されており⁽²³⁾, これは, 後述するようにジャスモン酸による LOX, HPL 遺伝子の活性化の結果である。こうして生成された hexenal, (E)-2-hexenal は実際に *Manduca sexta* 幼虫に対して忌避作用を示す⁽²⁴⁾。一方で, クローバーと redlegged earth mite の組合せの場合, わずか 10 ppm の (E)-2-hexenal で redlegged earth mite の顕著な誘引が認められる⁽²⁵⁾。ある種の昆虫 (soldier bug) は確かにこれら C6 アルデヒド類に対する鋭敏な嗅覚を有していること⁽²⁶⁾ から, 共進化の過程で短鎖アルデヒド類が植物-昆虫間の化学生態学的相互作用の確立に組み込まれてきたことは明らかである。ただし, 誘引なのか, 忌避なのかは組合せによって多様である。

一方, アルデヒド, 特に α,β -不飽和アルデヒドはアミノ基との反応性が高く, 多くの生体物質に付加するため, 本質的にある程度の毒性を有している。そのため, 種々の植物病原菌に対する生育阻害効果, あるいは致死効果もよく調べられている。事実, LOX-HPL 系で生成される C6, C9 アルデヒドはすべて *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* の増殖に阻害的である⁽²⁷⁾。特に (E)-2-hexenal は気相 1 L 当たり 0.23 μmol で *Botrytis cinerea* の生育を完全に抑える。ダイズはマメ類の中でも *Aspergillus flavus* に感染しにくい。これはダイズ種子に感染を開始した *Aspergillus*

flavus が栄養分を取り込む際に分泌するリパーゼがダイズの LOX-HPL 経路に基質を供給し、その結果生成した短鎖アルデヒド類により *Aspergillus flavus* の生育が停止するためである⁽²⁸⁾。また、短鎖アルデヒド類、特に α, β -不飽和アルデヒドである (*E*)-2-hexenal は 360 μM で *Pseudomonas* を溶菌し、さらに低濃度でも生育を阻害する⁽²⁹⁾。 *Pseudomonas* の非親和性株をインゲンマメに接種すると抵抗性反応の一つとして感染した部位を積極的に壊死させ、それ以上の感染を防ぐ、いわゆる過敏反応が起こる。過敏反応によるこうした壊死斑の形成は接種後 18 時間程度で観察され始めるが、(*E*)-2-hexenal などの C6 アルデヒド類はその 2 時間ほど前から生成、放出され、その後再び基底レベルにまで減少する⁽²⁹⁾。この場合は、過敏細胞死により細胞構造が破壊されるにつれ、乳鉢で植物組織を破碎した場合と同様の急激なアルデヒド生成が起こるものと考えられる。前述したようにシロイヌナズナの場合、細胞破碎により新鮮重当たり 2.5 μmol の hexenal が生成する。単純に計算すると、細胞内濃度は約 2.5 mM 程度にも達することになる。アルデヒドの揮発性を考慮に入れなくてはならないが、感染細胞で特異的、局所的にこうした高濃度のアルデヒドが生成すると、十分な溶菌活性を示すことになる。つまり、短鎖アルデヒドの生理的役割の一つとしてこうした病原菌に対する防御が挙げられる。植物細胞が何らかの刺激によって破壊されたとき、直ちに LOX-HPL 経路を作動し、短鎖アルデヒドを大量に生成する。このような瞬時の応答系はイソチオシアン酸類のほかに例を見ない。ほとんどすべての植物はこうした最前線での防御を行うため、LOX-HPL 経路を潜在的な状態で常に準備しており、細胞死によって不要となった細胞膜を利用してできる限りの抵抗をしているのかもしれない。また、傷害を受けた場合はその傷口からの菌の侵入を防いでいるのだろう。ただし、短鎖アルデヒド類には多くのフィトアレキシンのような特異性はなく、その簡単な構造、またその化学反応性から予想すると、不特定で幅広い抗菌剤として機能していると考えべきである。

では、HPL 生成物のもう片方の化合物、12-oxo-(*Z*)-9-dodecenoic acid (ODA) は一体どのような機能を有しているのだろうか。理論上、生成した短鎖アルデヒドと同量の ODA が生成しているはずである。しか

し、大量に C6 アルデヒドを生成した植物組織からでも ODA はごくわずかにしか単離することができない (Fukushige & Hildebrand, 私信)。少なくとも一部の ODA は二重結合がシフトし、そのオキシ基が酸化されたジカルボン酸へと変換されている。実は、この化合物はこれまでにトラウマチン酸と呼ばれていたもので、当初癒傷ホルモンとして同定されていたものである。破碎細胞での短鎖アルデヒドの生成様式から予想できるようにこの化合物は傷害を与えることで増加し、また、キュウリ下胚軸の肥大、インゲンマメの莢の肥大をひき起こすことが報告されている⁽³⁰⁾。興味深いことにキノコ類でも ODA の類縁体の 10-oxo-8-(*E*)-decenoic acid が子実体の柄の部分の伸長を促進することが知られている⁽³¹⁾。しかし、こうした効果についてはその後ほとんど追試されていない。ただ、ODA が破碎された細胞で短鎖アルデヒド類と同様の高濃度にまで生成されることを考えると、この化合物そのもの、あるいはその代謝産物が何か未知の重要な生理的役割を担っていることが期待され、こうした成長促進効果を含め、ODA の生理的意義を再度検証する必要がある。

さて、神経システムをもたない植物にとって、自らの細胞の一部が外敵の侵入を受け、破壊されたときに、このように瞬時に生成される短鎖アルデヒド類は自らが傷つけられたことを知る術として利用されていても不思議ではない。実際、ワタでは hexenal によってセスキテルペン系のフィトアレキシンの合成が誘導される⁽³²⁾。つまり、傷害に伴い生成したアルデヒドによってフィトアレキシンの合成に与る酵素群が誘導されることが示唆された。最近になって、シロイヌナズナで LOX-HPL 経路で生成された短鎖アルデヒドがカルコン合成酵素やジヒドロフラボノール還元酵素などのフェニルプロパノイド生合成系の遺伝子や、LOX, AOS などのオキシリピン系遺伝子などを誘導することが報告された⁽³³⁾。このことは短鎖アルデヒドが傷害シグナルとしても機能していることを示す。同様に傷害シグナルとして知られているオキシリピンとしてジャスモン酸があるが、シロイヌナズナのジャスモン酸非感受性変異体を用いた実験から短鎖アルデヒドのシグナル伝達系はジャスモン酸のシグナル伝達系と異なることが示唆されている⁽³³⁾。このように傷口で生成された短鎖アルデヒドは傷害を受けたことを知覚

図2 短鎖アルデヒド生成系における時間軸の異なる二つの応答系

A. 無傷の植物体ではアルデヒド生成量は極めて低い。一部の葉が昆虫による食害などで傷害を受けたとき、数秒から数分の間に急激にアルデヒドが生成される。このアルデヒド生成はその生成部位でさまざまな生物学的ストレスに対する障壁として機能する。同時に傷害シグナルが生成され、HPL がシステミックに誘導され、傷害を直接受けていない葉でもアルデヒド生成が促進される。B. シロイヌナズナ葉を乳鉢で破碎したときのアルデヒド生成。C. シロイヌナズナの下位葉を傷つけたときに、直接傷つけた葉 (local)、同じ植物体の傷つけていない葉 (systemic) での HPL 転写物量の推移。

するシグナル物質としても機能している。

シロイヌナズナの一部の葉をピンセットで軽く傷つけ、しばらく放置しておくと、傷害を与えた葉だけでなく、直接傷害を与えなかった他の葉でも HPL 遺伝子が誘導され、HPL mRNA 量が一過的に上昇する^(34, 35)。このとき、無傷のシロイヌナズナをジャスモン酸の蒸気で処理しても同様に HPL 遺伝子の誘導が観察される⁽³⁵⁾。確かに、シロイヌナズナ HPL 遺伝子のプロモーター領域にはジャスモン酸応答性の G-box や TGACG-Box などのシス因子が見いだされ、ここにジャスモン酸を介した信号伝達系で活性化された転写因子が結合するのであろう。このジャスモン酸誘導は葉をあらかじめオカダ酸で処理することで抑制され、一方、スタウロsporin で処理しておくことで増強される⁽³⁶⁾。ことから、ある制御タンパク質の可逆的なリン酸化が関与していることが示唆されている。前述した害虫による食害でのシステミックな誘導もおそらくジャスモン酸を介したシグナル伝達系に依存しているのであろう。植物細胞破碎に伴う短鎖アルデヒドの

生成は数分以内に完了し、局所的にしかも瞬時に防御化合物を蓄積することができる。一方、こうした HPL 遺伝子の誘導は 1~数時間を要するが、誘導の起こった葉では明らかにより多くの短鎖アルデヒドを作ることができる。つまり、HPL は局所的、瞬時的な応答をすることができると同時に、少し時間をかけて全身的、持続的な応答もできるというように、時間軸、空間軸の異なった 2 種の応答を担っているということができる (図 2)。

C. 脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼの構造と機能

HPL は過酸化脂肪酸のヒドロペルオキシ基の付け根の炭素と、その隣の炭素との間の単結合を切断するというユニークな反応を触媒する。今のところ、こうした反応を触媒する酵素は HPL 以外に知られていない。では、一体どのような反応機構なのであろうか。筆者らはこの疑問に対する回答を得るために HPL を単離し、その構造を決定することから始めた。

植物組織での HPL 量は極めて低く、膜タンパク質

であることもその精製を困難にしていたが、筆者らはチャ葉から初めて精製することに成功した⁽³⁷⁾。その後、ピーマン果実から比較的大量に精製することにも成功し⁽³⁸⁾、精製酵素の性質をかなり明らかにすることができた。いずれの場合もサブユニットサイズ 55 kDa 程度の膜タンパク質で、13-HPO に高い特異性を示し、位置異性体の 9-HPO をほとんど基質としなかった。また、基質の 1-hydroperoxy-(*E*, *Z*)-2, 4-pentadiene 構造に極めて特異性が高く、共役二重結合を (*E*, *E*) に異性化したものは基質とならなかった。さらに、リノール酸 13-HPO に対してよりも、リノレン酸 13-HPO に対して 10 倍以上の高い活性を示した。ノルジヒドログアイアレチン酸や α -トコフェロールなどの脂溶性抗酸化剤は効果的な可逆的阻害剤であり、また、サリチル酸が非可逆的阻害剤であった⁽³⁹⁾。興味深いことに、HPL 反応はまだ未反応の基質が十分量残っているときに停止する⁽⁴⁰⁾。これは HPL が自殺基質様の不活性化をきたしたためである。このことは HPL がその反応途中に反応性の高い中間体を生成していることを示唆する。

精製したピーマン果実 HPL 溶液は赤褐色を示し、ヘムタンパク質であることが予想された。そのヘム分子種はヘム b (プロトヘム IX) であり、サブユニット当たり 1 mol 当量含まれていた⁽⁴¹⁾。HPL の分光学的特徴はシトクローム P450 に酷似していたが、ジチオナイトで還元した酵素の CO 処理で 450 nm に吸収極大をもつアダクトは形成されず、P450 であるとの決定的な証拠は得られなかった。そこで、精製酵素から得られた部分アミノ酸配列をもとにピーマン果実 HPL cDNA を単離し、その配列を決定した⁽⁴²⁾。ホモロジー検索の結果、特にその C-末端領域で P450 遺伝子群と高い相同性を示し、その中にはヘム結合部位と考えられるシステイン残基が保存されていた。こうした配列上の特徴から HPL は P450 酵素に関する国際命名委員会により P450 スーパー遺伝子族の新規サブファミリーの一員として CYP74B と名づけられた。P450 酵素は一般的に分子状酸素と通常 NAD(P)H シトクローム P450 還元酵素から供給される還元力を必要とし、分子状酸素の一方の酸素原子を基質に添加する一原子酸化酵素である⁽⁴³⁾。しかし、HPL は分子状酸素も還元力の供給も必要としない。HPL の触媒する反応、また、CO に対する低いアフィニティーから考

えると、分子状酸素の代わりに基質のヒドロペルオキシ基を活性化し、ヘムの酸化、還元を独立して完結できる酵素と言える。通常の P450 酵素でも特定の反応条件ではペルオキシドを基質とし、コファクターの供給なしに反応を完結することができる (ペルオキシドシャントと呼ばれている⁽⁴³⁾)。HPL は P450 のシャント経路に特化したペルオキシド特異的 P450 酵素と言えるかもしれない。こうした反応性を示す P450 酵素は他に余り例がないが、高等植物では AOS がペルオキシド特異的 P450 の酵素的特徴を示し⁽⁴⁴⁾、しかも、AOS と HPL のアミノ酸配列の相同性は 40~50% と高いので、両者は共通の祖先型から進化してきた酵素と考えられる。動物細胞では、プロスタサイクリン合成酵素、トロンボキサン合成酵素が同様にペルオキシド特異的 P450 である⁽⁴⁵⁾ が、HPL はこれらとはわずかに 10~15% 程度の相同性しかもたない。

では、HPL は一体どのような反応機構で過酸化脂肪酸の開裂を触媒するのだろうか。脂肪酸ヒドロペルオキシドを非プロトン性溶媒下で BF₃ のようなルイス酸と反応させると、HPL 生成物である hexanal と ODA が生成する⁽⁴⁶⁾。この反応ではヒドロペルオキシ基の付け根側の酸素原子は ODA に保持され、hexanal には水由来の酸素が導入される。チャ葉 HPL と ¹⁸O でラベルしたヒドロペルオキシドを反応させると、予想どおり ODA にだけラベルが保持されていることが GC-MS により明らかにされた⁽⁴⁷⁾。このことから、HPL 反応機構はルイス酸触媒による分解と同様反応途上でオキソニウムイオン (R-O⁺) が生成され、このものからの図 3 に示す反応によりエポキシアリルカルボカチオン中間体の生成を経て、最終的に炭素鎖切断が起こるものと考えられる⁽⁴⁸⁾。HPL と構造的に類似性の高い AOS では、基質類縁体を用いた反応生成物の解析から、やはりエポキシアリルカルボカチオン中間体の生成が示唆されている⁽⁴⁹⁾。パレイシヨ塊茎などに見られるジビニルエーテル脂肪酸も同様にエポキシアリルカルボカチオン中間体を経て生成されるとすると合理的に説明できる。非常に多様なフィトオキシリピンを生成する海藻においても同様な中間体を経た反応機構が提唱されている⁽⁵⁰⁾。残念ながら、HPL の反応機構に関して、エポキシアリルカルボカチオン中間体を直接証明することには成功していないが、HPL と AOS の特にヘム結合領域での高い類似

図3 CYP74 ファミリーの反応機構

HPL (CYP74B), AOS (CYP74A), および DES などの CYP74 ファミリーに属するペルオキシド特異的シトクローム P450 酵素は基質のヒドロペルオキシ基の活性化を同じ反応機構で行い、共通の中間体であるエポキシアリルカルボカチオンを生成する。この中間体のその後の反応は各酵素によって違った様式で制御され、それぞれ特定の生成物に導く。なお、ヒドロペルオキシ基の活性化がホモリシスであればアルコキシルラジカルが生成するが(図中括弧内に表記)、これらの酵素が反応中にこのラジカルを経るのかどうかはいまだ不明である。

性、またサリチル酸による非可逆的失活などの性質上の類似性を考え合わせると、ヒドロペルオキシ基の活性化機構は HPL と AOS, そしておそらくは DES で共通であり、活性化によって生成されたエポキシアリルカルボカチオン中間体のその後の反応が、それぞれの酵素によって異なった様式で制御されていると考えられる。

これまで得られてきた HPL はすべて 13-HPO 特異的なものであったが、筆者らはキュウリ下胚軸から RT-PCR により初めて 9-HPO を良い基質とする HPL を得た⁽⁵¹⁾。しかし、この場合、基質特異性は比較的低く、13-HPO も 9-HPO の半分程度の活性を示す。この性質はキュウリ果実から生成されたものと酷似していた⁽⁶²⁾。面白いことにキュウリ下胚軸 HPL はその配列が他の 13-HPO 特異的 HPL よりむしろ AOS

に相同性が高かった。そこで、¹⁴C でラベルした 13- および 9-HPO を基質にしてその生成物を解析したが、キュウリ下胚軸 HPL から AOS 生成物は検出できなかった。逆にオオムギ AOS の生成物には HPL 生成物は検出できなかった。このことは HPL と AOS が反応の初期段階を共有し、同じ中間体を生成するにもかかわらず、その中間体の運命がわずかなアミノ酸の置換により厳密に制御されていることを改めて示唆する。こうした知見を活用した点変異導入、ドメイン交換などでこの反応特異性の分子論的解析が可能となる。最近、P450 cam が進化分子工学的手法によってペルオキシドシャント経路に特化した P450 に変換された⁽⁵³⁾。P450 酵素が極めて多様で、多くの化合物を酸化できるため、遺伝子治療から有用化合物の合成にまで幅広い応用が期待されているが、コファクターを必要としないペルオキシドシャントは反応系を簡素化でき、P450 を応用する際には極めて有利である。

HPL がどのような過程で、ペルオキシドシャントに特化した P450 となったのか、その分子論的基盤を明らかにすることで“スーパー P450”をデザインすることができるかもしれない。

D. 脂肪酸ヒドロペルオキシド供給系

HPL は無論、代謝酵素系の一員であり、それ単独で全体の代謝の流れを制御することは難しい。HPL 生成物である短鎖アルデヒドの生成量が厳密に制御されているのならば、HPL に基質を供給する経路も厳密に制御されているはずである。

HPL に基質を供給する脂肪酸酸素添加酵素、リポキシゲナーゼ (LOX) は植物界に広く存在し、一つの植物に数種類以上のアイソザイムが存在する⁽⁵⁴⁾。それぞれのアイソザイムをコードする遺伝子は独立して制御されており、各々が独自の生理的役割を担っていると考えられている。このアイソザイムの中で、どれが HPL に基質を供給しているのかははっきりしている例はいまだにない。筆者らもキュウリ実生を用いて HPL に基質を供給している LOX を検索した。キュウリ実生には少なくとも 5 種のアイソザイムが同定できた。その中で、発芽初期の子葉に特異的に発現しているアイソザイム (cotLOX) は中性脂質のアシル基に対する反応性が高く⁽⁵⁵⁾、その生育に伴う遺伝子発現制御機構の解析などから貯蔵脂質の分解に関連したアイソザイムであることがわかった⁽⁵⁶⁾。一方、根に特異的

な LOX (rootLOX) はリン脂質に対する反応性が高く⁽⁵⁷⁾, この場合もその発現様式からキュウリ根の発芽初期の急速な成長に伴う膜構造の変化に関与しているようで, HPL へ基質を供給しているという証拠は得られていない. 一方, トマト果実特異的 LOX をアンチセンス抑制したケースが報告されているが⁽⁵⁸⁾, この場合でも予想されるような C6 アルデヒド生成量の減少はなかった. フィトオキシリピン経路で HPL と AOS は基質を共有しているように見えるが, 実際はそれぞれの経路に専属の LOX が存在していると考えられるべきであろう. こうした LOX の役割分担を明らかにするためにはノックアウト株を用いるなど, 分子遺伝学的なアプローチが必須である.

通常, 無傷で健康な植物組織内の遊離脂肪酸量は高くないので, 短鎖アルデヒド類は何らかの刺激に応じて脂質の加水分解が進行し, それによって生成された遊離脂肪酸が基質となって生成されていくと考えられる. つまり, 短鎖アルデヒド生成の律速段階を脂質加水分解酵素が担っているという, 動物細胞のアラキドン酸カスケード系におけるフォスホリパーゼ A2 と同様の役割が考えられる. これまでにこのステップを触媒すると考えられる脂質加水分解酵素活性がインゲンマメなどに見いだされ, このものがリン脂質, ガラクト糖脂質, 中性脂質のどれをも加水分解する非特異的酵素であることが報告されている^(59, 60). しかし, これもまた LOX-HPL 経路へ基質を供給しているとの証拠はない. 遺伝子工学的に不飽和度を变化させたシロイヌナズナを用いた解析により葉緑体のガラクト糖脂質が C6 アルデヒド生成の主要な出発物質であることが示された⁽⁶¹⁾. 多くの植物葉ではリノレン酸から生成される (Z)-3-hexenal が主要な短鎖アルデヒドであることを考慮すると, ガラクト糖脂質は葉緑体チラコイド膜に局在し, リノレン酸に豊富であり, 基質の供給源として極めて合理的である. そこで, シロイヌナズナ葉を乳鉢で破碎し, 積極的に (Z)-3-hexenal を生成させたときの各脂質における脂肪酸組成を定量的に解析した. その結果, ガラクト糖脂質, 特にモノガラクトシルジアシルグリセロールのリノレン酸が優先的に減少していることを見いだした (松井ら, 未発表). この減少は葉を嫌気条件下で破碎し, LOX による酸素添加を抑えた場合でも見られたが, その際には遊離脂肪酸の蓄積が見られた. このことは葉緑体チラコイ

ド膜のガラクト糖脂質が LOX-HPL 系へのリノレン酸の供給源であり, 植物細胞の破碎に伴い, ガラクト糖脂質特異的な加水分解酵素が作用し始めることを示している. タバコ葉の過敏反応時にリポキシゲナーゼにより生成される過酸化脂肪酸が蓄積する. このとき, 葉の不飽和脂肪酸の 50% までもが消費されるが, それはもっぱら葉緑体脂質から加水分解されたものであった⁽⁶²⁾. また, ジャスモン酸の生成が葉緑体型 LOX のアンチセンス抑制で抑えられることから, 葉緑体, なかでもチラコイド膜が多くのフィトオキシリピン生成原料をまかなっているようだ⁽⁶³⁾. 最近, カナダの Thompson らのグループが老化に関連すると思われる脂質加水分解酵素を単離, クローニングした⁽⁶⁴⁾. この遺伝子のシロイヌナズナにおけるホモログをアンチセンス抑制した時野生種よりひとまわり大きく, しかも老化の遅い表現形を示した (Thompson ら, 私信). この遺伝子がコードする加水分解酵素が LOX-HPL 系に基質を供給しているか否かはまだ明らかではないが, このステップがフィトオキシリピン生成量の制御を担っていることが考えられ, さらなる研究が待たれる.

おわりに

古くて新しい“みどりの香り”は今, 生理的役割の一端が見え始めたことにより多くの研究者の注目を浴びつつある. 今後, その生理的役割をより確固とするために遺伝学的な解析を含めた精緻な研究が必要である. こうした成果をもとに植物が本来もつ生物学的ストレスに対する抵抗性を有効に利用する方が考案されよう. 実際, これら C6 アルデヒドが *Botrytis cinerea* の増殖を防ぐことから, ポストハーベスト農薬としての用途が期待されている⁽⁶⁵⁾. これらのアルデヒド類は揮発性が高く, 残留農薬の問題が回避される. また, C6, C9 アルデヒドは香料素材として利用価値の高いものであり, LOX-HPL 経路を用いてその生産を図る試みもなされている⁽⁶⁶⁾. また, もう一つの HPL 生成物, ODA は二官能性化合物であり, これをポリマーの原料として利用する試みも始まっている. さらに, HPL を含めたペルオキシド特異的 P450 の反応の分子機構を明らかにすることで, 汎用性の高い“スーパー P450 酵素”創出のための論理的基盤を得ることができる. 今, “みどりの香り”の研究は新たな転機を迎えており, さらにその裾野を広げていくことが

期待されている。

本研究は山口大学農学部生物資源科学科農産製造学研究室において行われたもので、本研究の機会を与えていただき、永年ご指導ご鞭撻をいただきました山口大学名誉教授 畑中顯和先生（現東亜大学教授）、山口大学教授 梶原忠彦先生に心から御礼申し上げます。また、本研究の多くは研究室のスタッフ、多くの卒業生や在籍生との共同作業であり、心から感謝いたします。また、京都大学名誉教授 浅田浩二先生（現福山大学教授）には永年にわたり研究のフィロソフィーをご教授いただき、激励いただきました。ここに深く感謝いたします。本奨励賞に推薦いただきました西日本支部長 石黒正恒先生、ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

- (1) 畑中顯和: 農化, **67**, 1391-1398 (1993).
- (2) 羽鹿牧太, 須田郁夫, 酒井真次, 高橋将一: 研究ジャーナル, **20**, 23-30 (1997).
- (3) R. G. Buttery, R. Teranishi, R. A. Flath, and L. C. Ling: in "Flavor Chemistry," ed. by R. Teranishi, R. G. Buttery, and F. Shahidi, ACS Symposium Series 388, American Chemical Society, Washington, 1989, pp. 213-222.
- (4) A. Hatanaka, T. Kajiwarra, H. Horino, and K. Inokuchi: *Z. Naturforsch.*, **47c**, 98-104 (1992).
- (5) Y. Sakoda, K. Matsui, T. Kajiwarra, and A. Hatanaka: *Z. Naturforsch.*, **50c**, 757-765 (1995).
- (6) H. Zhao, L. Ivic, J. M. Otaki, M. Hashimoto, K. Mikoshiba, and S. Firestein: *Science*, **279**, 237-242 (1998).
- (7) K. Matsui: *Belgian J. Bot.*, **131**, 50-62 (1998).
- (8) R. A. Creelman and J. E. Mullet: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 355-381 (1997).
- (9) E. Blee: *Prog. Lipid Res.*, **37**, 33-72 (1998).
- (10) D. X. Xie, B. F. Feys, S. James, M. Nieto-Rostro, and J. G. Turner: *Science*, **280**, 1091-1094 (1998).
- (11) M. Hamberg: *Lipids*, **33**, 1061-1071 (1998).
- (12) H. Weber, A. Chetelat, D. Caldelari, and E. E. Farmer: *Plant Cell*, **11**, 485-494 (1999).
- (13) E. Blee and F. Schuber: *Plant J.*, **4**, 113-123.
- (14) A. Sanz, J. I. Moreno, and C. Castresana: *Plant Cell*, **10**, 1523-1537.
- (15) M. Hamberg, A. Sanz, and C. Castresana: *J. Biol. Chem.*, **274**, 24503-24513 (1999).
- (16) W. H. Gerwick, P. J. Proteau, D. G. Nagle, M. L. Wise, Z. D. Jiang, M. W. Bernart, and M. Hamberg: *Hydrobiologia*, **260/261**, 653-665 (1993).
- (17) M. Wurzenberger and W. Grosch: *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 1083-1091 (1992).
- (18) T. C. J. Turlings, J. H. Tumlinson, and W. J. Lewis: *Science*, **250**, 1251-1253 (1990).
- (19) T. C. J. Turlings and J. H. Tumlinson: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 8399-8402 (1992).
- (20) J. Takabayashi and M. Dicke: *Trends Plant Sci.*, **1**, 109-113 (1996).
- (21) U. S. R. Rose, A. Manukian, R. R. Heath, and J. H. Tumlinson: *Plant Physiol.*, **111**, 487-495 (1996).
- (22) J. S. Thaler: *Nature*, **399**, 686-688 (1999).
- (23) S. A. Avdiushko, K. P. C. Croft, G. C. Brown, D. M. Jackson, T. R. Hamilton-Kemp, and D. F. Hildebrand: *Plant Physiol.*, **109**, 1227-1230 (1995).
- (24) S. A. Avdiushko, G. C. Brown, D. L. Dahlman, and D. F. Hildebrand: *Physiol. Chem. Ecol.*, **26**, 642-654 (1997).
- (25) Y. Jiang, T. J. Ridsdill-Smith, and E. L. Ghisalberti: *J. Chem. Ecol.*, **23**, 163-174 (1997).
- (26) J. Sant'Ana and J. C. Dickens: *J. Chem. Ecol.*, **24**, 965-984 (1998).
- (27) T. R. Hamilton-Kemp, C. T. McCracken, Jr., J. H. Loughrin, R. A. Andersen, and D. F. Hildebrand: *J. Chem. Ecol.*, **18**, 1083-1091 (1992).
- (28) D. C. Doehliert, D. T. Wicklow, and H. W. Gardner: *Phytopathology*, **83**, 1473-1477 (1993).
- (29) K. P. C. Croft, F. Juttner, and A. J. Slusarenko: *Plant Physiol.*, **101**, 13-24 (1993).
- (30) D. C. Zimmerman and C. A. Coudron: *Plant Physiol.*, **63**, 536-541 (1979).
- (31) J. Mau, R. B. Beelman, and G. R. Ziegler: *Phytochemistry*, **31**, 4059-4064 (1992).
- (32) H. J. Zeringue, Jr.: *Phytochemistry*, **31**, 2305-2308 (1992).
- (33) N. J. Bate and S. J. Rothstein: *Plant J.*, **16**, 561-569 (1998).
- (34) N. J. Bate, S. Sivasankar, C. Moxon, J. M. C. Riley, J. E. Thompson, and S. J. Rothstein: *Plant Physiol.*, **117**, 1393-1400 (1998).
- (35) K. Matsui, J. Wilkinson, B. Hiatt, V. Knauf, and T. Kajiwarra: *Plant Cell Physiol.*, **40**, 477-481 (1999).
- (36) E. Rojo, E. Titarenko, J. Leon, S. Berger, G. Vancanneyt, and J. J. Sanchez-Serrano: *Plant J.*, **13**, 153-165 (1998).
- (37) K. Matsui, H. Toyota, T. Kajiwarra, T. Kakuno, and A. Hatanaka: *Phytochemistry*, **30**, 2109-2113 (1991).
- (38) Y. Shibata, K. Matsui, T. Kajiwarra, and A. Hatanaka: *Plant Cell Physiol.*, **36**, 147-156 (1995).
- (39) K. Matsui, C. Miyahara, J. Wilkinson, B. Hiatt, V. Knauf, and T. Kajiwarra: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1189-1196 (2000).
- (40) K. Matsui, T. Kajiwarra, and A. Hatanaka: *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 175-178 (1992).
- (41) Y. Shibata, K. Matsui, T. Kajiwarra, and A. Hatanaka: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 438-443 (1995).

- (42) K. Matsui, M. Shibutani, T. Hase, and T. Kajiwara: *FEBS Lett.*, **394**, 21–24 (1996).
- (43) T. D. Porter and M. J. Coon: *J. Biol. Chem.*, **266**, 13469–13472 (1991).
- (44) W. C. Song, C. D. Funk, and A. R. Brash: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 8519–8523 (1993).
- (45) M. Hecker, and V. Ullrich: *J. Biol. Chem.*, **264**, 141–150 (1989).
- (46) H. W. Gardner and R. D. Plattner, *Lipids*, **19**, 294–299 (1984).
- (47) A. Hatanaka, T. Kajiwara, J. Sekiya, and H. Toyota: *Z. Naturforsch.*, **41c**, 359–362 (1986).
- (48) L. Crombie, D. O. Morgan, and E. H. Smith: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1991**, 567–575.
- (49) W. C. Song, S. W. Baertschi, W. E. Boeglin, T. M. Harris, and A. R. Brash: *J. Biol. Chem.*, **268**, 6293–6298 (1993).
- (50) W. H. Gerwick: *Lipids*, **31**, 1215–1231 (1996).
- (51) K. Matsui, C. Ujita, J. Wilkinson, B. Hiatt, V. Knauf, and T. Kajiwara: *FEBS Lett.*, **481**, 183–188 (2000).
- (52) A. R. Hornostaj and D. S. Robinson: *Food Chemistry*, **66**, 173–180 (1999).
- (53) H. Joo, Z. Lin, and F. H. Arnold: *Nature*, **399**, 670–673 (1999).
- (54) J. N. Siedow: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**, 145–188 (1991).
- (55) K. Matsui and T. Kajiwara: *Lipids*, **30**, 733–738 (1995).
- (56) K. Matsui, K. Hijiya, Y. Tabuchi, and T. Kajiwara: *Plant Physiol.*, **119**, 1279–1287 (1999).
- (57) K. Matsui, M. Nishioka, M. Ikeyoshi, Y. Matsu-mura, T. Mori, and T. Kajiwara: *Biochim. Biophys. Acta*, **1390**, 8–20 (1998).
- (58) A. Griffiths, S. Prestage, R. Linforth, Z. Jianliang, A. Taylor, and D. Grieson: *Postharvest Biol. Tech.*, **17**, 163–173 (1999).
- (59) T. Galliard: *Eur. J. Biochem.*, **21**, 90–98 (1971).
- (60) H. Matsuda, G. Tanaka, K. Morita, and O. Hirayama: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 563–570 (1979).
- (61) H. Zhuang, T. R. Hamilton-Kemp, R. A. Andersen, and D. F. Hildebrand: *Plant Physiol.*, **111**, 805–812 (1996).
- (62) C. Rusterucci, J. Montillet, J. Agnel, C. Battesti, B. Alonso, A. Knoll, J. Bessoule, P. Etienne, L. Suty, J. Blein, and C. Triantaphylides: *J. Biol. Chem.*, **274**, 36446–36455 (1999).
- (63) E. Bell, R. A. Creelman, and J. Mullet: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 8675–8679 (1995).
- (64) Y. Hong, T. W. Wang, K. A. Hudak, F. Schade, C. D. Froese, and J. E. Thompson: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 8717–8722 (2000).
- (65) D. D. Archbold, T. R. Hamilton-Kemp, M. M. Barth, and B. E. Langlois: *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 4031–4037 (1997).
- (66) B. J. Cass, F. Schade, C. W. Robinson, J. E. Thompson, and R. L. Legge: *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 372–377 (2000).