リグニン生合成系制御に関する生理生化学的研究

與語靖洋*

キーワード: リグニン, 植物生長抑制剤 (抑草剤), 高処理選抜系, 生合理的アプローチ, 4-クマロイル CoA リガーゼ

Keywords: lignin, plant growth retardant, High Throughput Screening, biorational approach, 4-coumarate: CoA ligase

大陸性気候の畑作地帯を中心に、土壤侵食による耕作可能面積の減少や砂漠化が急速に進んでいる。その主な要因として、慣行栽培技術による農耕地の裸地化が考えられる。農耕地の土壤侵食対策として、欧米では 30 年以上前から不耕起栽培とともに、リビンゲマルチやカバークロップに代表される草生栽培への取り組みが進められたものの、実用的段階に至っているのは皆無である。石塚 (1984) は加里研究において「除草剤は、殺草作用という極端な効果のみでなく、成長調節機能が強く出されてくる可能性もある」と述べている。即ち、土壤侵食を抑制しつつ、作物-雑草間の選択性を確保するには、雑草管理に対して、除草剤による枯殺から植物生長抑制剤 (抑草剤) による生育抑制への発想転換が必要となる。その後農耕地の外が対象ではあるものの、(財) 日本植物調節剤研究協会では、農薬メーカーと協力して「抑草剤」の実用化に取り組んでいる (竹下 2002)。

1. 研究戦略

リグニンは、細胞壁構成成分のひとつであり、クマリルアルコール等のモノリグノール (リグニンの単量体) が樹状に重合したものであり、イネ科植物では乾物重

で 10~15% 存在する。モノリグノール生合成系の入り口には、芳香族アミノ酸のフェニルアラニンやチロシンが位置しており、アミノ酸生合成系とは密接に関連している。またこの生合成系の出口では、植物の成長制御に少なからず関与しているリグナン、アルカロイド、アントシアニン、スチルベン等が生成される (第 1 図)。

リグニン生合成を選定した理由は、1) 植物にしか存在しない、2) 植物の生育や紫外線・病害耐性に関与している、3) 抑草剤の作用点としては二次代謝系が望ましい、4) 作用点選択性の可能性がある、5) 新規リード化合物が見つかる可能性が高い等である。受賞対象の研究においては、20 数種類あるリグニン生合成系の酵素について、上記項目を点数化して評価した結果、4-クマロイル CoA リガーゼ (4CL, EC6.2.1.12) をターゲット (標的作用点) とした (與語 2000, 2004)。

農薬の新規作用点の探索において、近年、遺伝子工学的手法が主流となっている。しかし、そこで判定できるのは標的酵素の不在 (遺伝子の欠損) が生育に及ぼす影響である。一方、作用点の探索に阻害剤を利用する場合、遺伝子も発現して酵素も存在している健全な植物に対して、標的酵素の阻害が植物の生育に与える影響を判定する (第 2 図) (與語 2003)。本研究の戦略として、化学的手段である抑草剤の開発に直接的に結びつく後者を採用し、現象としての植物の内的・外的反応と組み合わせあわせて、植物代謝系における弱点の解明に取り組んだ (第 3 図)。

2. 研究成果

以下、植物体を用いた試験は、全て水耕栽培で行った。

1) 生物検定

雑草を含む 20 種類の一年生植物に、フェニルプロパノイド代謝系の中でリグニン単量体からアントシアニンやフラボンを合成する途中に位置するナリゲニンおよびカルコンを根部処理したところ、感受性に大きな植物種間差があるものの、何れの植物種に対しても阻害活性を示し、両者の生育阻害程度や茎葉重 / 根重に高

*独立行政法人 農業環境技術研究所 有機化学物質研究領域長

〒305-8604 茨城県つくば市観音台 3-1-3

E-mail: yogo@affrc.go.jp

Yasuhiro Yogo: Biochemical Study on Control of Lignin Biosynthesis.

Organochemicals Division, Director, National Institute for Agro-Environmental Sciences, 3-1-3, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8604 JAPAN

(2010 年 5 月 9 日受付, 2010 年 5 月 10 日受理)

第4図 ナリンゲニンまたはカルコンに対する各種植物の反応の比較
 □アカザ科, ◇アブラナ科, △イネ科, ×ウリ科, ○キク科, +ゴマ科, ■セリ科, ◆ナス科, ▲ナデシコ科, ●マメ科

第5図 ナリンゲニンの根部処理 (1×10^{-4} M) が植物体内の4CL基質含量に与える影響

ン含量が減少した。それらに対して、この生合成系からは遠い位置にある分岐鎖アミノ酸合成を阻害するペンシルフロノメチルでは、4CL基質やリグニン含量の増減はほとんどみられなかった（第2表）。

第四に、カルコン処理後の経時的变化を調べた（Chenら2005）。暗条件で育成したエンドウ幼苗植物に照射したところ、4つの4CLアイソザイムが誘導され、それらの活性は程度に差があるもののカルコンによって全て阻害された。次に、照射開始と同時にトウモロ

第1表 ナリンゲニンの根部処理がイネ体内リグニン含量に与える影響

ナリンゲニン濃度	対無処理区比 (%)	
	茎葉部	根部
無処理	100	100
1×10^{-5} M	97.1	96.5
1×10^{-4} M	89.9	87.6

コシ幼苗植物にカルコンを根部処理すると、まず茎葉中で4CLの基質が増加し、次いでリグニン含量が減少し、最後に茎葉の伸長が阻害された（第6図）。

以上およびその他の研究成果から総合的に判断して、生育中の植物の4CL活性、少なくともモノリグノール生合成系を阻害することによって、植物が生育阻害を受けることが明らかとなり、この生合成系が植物生育抑制剤の新規作用点である可能性が示唆された。

3) 高処理選抜系 (High Throughput Screening, HTS)

HTSとは、高度にシステム化した方法によって、多数の化合物を短期間・省スペースで評価し、新規リード化合物を迅速にスクリーニングすることである。

我々の目指したHTSは作用点（標的酵素）スクリーニングであり、リグニン生合成系の4CLを阻害する植物生長抑制剤のリード化合物の探索が主たる目的である。

第6図 カルコン処理後のトウモロコシのリグニン含量, 4CL 基質, 茎葉長の経時変化
縦軸はリグニン含量と茎葉長は阻害度 4CL 基質は増加量を表す。いずれも無処理区に対する処理区との差を示す。
■: 4CL 基質, □: リグニン含量, ▲: 茎葉長

4CL の活性測定法としては、ヒドロキサム酸法（間接法）と UV 法（直接法）が有効であるが、HTS における酵素活性の検出には、ロボット化に対応でき検

出感度が高い UV 法を採用した。4CL は、植物の茎葉部を Tris-HCl 緩衝液で磨砕・遠心分離後、硫酸分画および透析を行い、その後ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーによりタンパク質を分画することで部分精製した。4CL 活性は主にクマル酸を基質として検出した。

トウモロコシとイネでは、分子量が同じでイオン性が異なる 4CL アイソザイムが存在した。またいずれの酵素精製段階においても、4CL の総体活性はイネの方がトウモロコシよりも高いことが示された（Yun ら 2005）。この 2 草種の間に限らず、ナリンゲニンとカルコンに対する感受性の植物種差は 4CL の総体的活性で説明できた（Yun ら 2009）。また、イネにおけるナリンゲニンとカルコンによる 4CL 活性の阻害様式は不拮抗阻害であった（第 3 表）。

HTS システムのプロトタイプを、形質転換大腸菌を利用して構築した。タバコの 4CL の cDNA（川合氏（東京農工大）提供）を大腸菌発現ベクターに連結させたプラスミドベクターを用いて大腸菌を形質転換した後、培養後 4CL を菌体から回収・精製し、HTS に

第2表 ナリンゲニンおよびアミノ酸生合成阻害剤を処理によるイネ植物体内変化

化合物	4CL 基質	リグニン含量	リグニン構成成分*の減少
ナリンゲニン	著しく増加	減少	シナビルアルコール>コニフェリルアルコール>クマリルアルコール
グリホサート	減少	減少	シリンガ酸を除き全て同程度
ベンスルフロンメチル	僅かに増加	ほぼ変化なし	わずかに変化するのみ

*：リグニンは、リグニン単量体のアルコールが重合して合成されるが、クマリル/コニフェリル/シナビルアルコールに大別できる。シリンガ酸はリグニンを酸加水分解した際にできる物質の一つ。

第3表 トウモロコシおよびイネにおけるカルコン処理と 4CL 活性 (*In vitro*)

植 物	カルコン処理	Km (μM)	Km 比 (%)	Vmax ($\text{pkat mg}^{-1} \text{protein}$)	Vmax 比 (%)
トウモロコシ	有	24.1	100.0	137.0	100.0
	無	11.1	45.9	57.8	42.2
イ ネ	有	35.8	100.0	106.4	100.0
	無	25.9	72.3	62.5	58.8

第4表 Propanil と Swep 処理が 4CL 活性 (*In vitro*) に与える影響

処 理	Km (μM)	Km 比 (%)	Vmax ($\text{pkat mg}^{-1} \text{protein}$)	Vmax 比 (%)
無処理	246.0	100.0	10,000	100.0
Propanil	76.2	31.0	1,667	16.7
Swep	164.5	66.9	5,000	50.0

耐えうる活性を得ることができた (Yun ら 2006)。除草剤を中心に各種低分子有機化合物を供試したところ、Propanil と Swep が 4CL を強く阻害し、その様式はナリンゲニンやカルコン同様不拮抗阻害であった (第 4 表) (Yun ら 2007)。また、大豆培養細胞から精製した 2 つの 4CL 活性ピークの基質特異性は、それぞれ大豆植物に存在する 4CL に類似することも明らかとなった。このことから、植物の培養細胞をスクリーニングに利用できる可能性も示唆された。

本研究における成果を実用段階まで進めるには、まだ数多くの課題が残されている。しかし、本研究によって、モノリグノール生合成系、特に 4CL が抑草剤の作用点となる可能性を示唆しただけでなく、除草剤を含む植物生長制御剤の新規リード化合物探索に、合理的のアプローチ (Biorational approach) の新たな道を拓くことができたと考えている。

ペニシリンを発見した Alexander Fleming は、そのことを偶然によるものとした。John E. Casida は、農薬の発見を Serendipity とした。生体内では 1 万個を超える遺伝子から各種機能タンパク質が作られ、そこから各種代謝系が網の目のように構成され、秩序だって代謝物が生成され、発芽、生長・生殖・老化が繰り返される。それらの機構も、植物ゲノム情報の解析が進むにつれて、今後益々明らかにされることであろう。このような植物生理における基礎科学が、異分野や応用科学との融合によって、農薬開発に結びつくことを心から期待する。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、(独) 農研機構・中央農業研究センターの旧畑雑草研究室の皆様、特に共同研究者である Fan Deng 博士、Min-Soo Yun 博士、Wei-Jun Chen 博士、青木美也子氏、三田 (旧姓：館内) 憲子氏、さらには研究推進にご尽力いただいた日本農薬株式会社にこの場を借りて心より感謝いたします。また、貴重なご助言や試料等を分譲いただいた数多くの方々に感謝します。なお、本研究は農林水産省委託プロジェクト研究 (後年、農研機構運営費交付金プロジェクト) および文部科学省 (日本学術振興会) の研究者養成の助成を受けて実施したことを申し添えます。

引用文献

- Chen, W.-J., M.S. Yun, F. Deng and Y. Yogo 2004. Effects of root-applied naringenin and chalcone on the growth of annual plants. *Weed Biology and Management* 4, 235-238.
- Chen, W.-J., M.S. Yun, F. Deng and Y. Yogo 2005. The rates of maize growth and lignin biosynthesis change after root-applied chalcone. *Weed Biology and Management* 5, 118-122.
- 鄧凡・與語靖洋 1998. ペンスルフロンメチルおよびグリホサートのイネにおけるモノリグノール生合成系への影響と生育阻害. *雑草研究* 43 (別), 208-209.
- 鄧凡・青木美也子・與語靖洋 1999. 数種植物のクマロイル CoA リガーゼの基質特異性とナリンゲニンによる根部成長阻害. *雑草研究* 44 (別), 310-311.
- Deng, F., M. Aoki and Y. Yogo 2004. Effect of naringenin on the growth and lignin biosynthesis of gramineous plants. *Weed Biology and Management* 4, 49-51.
- 石塚皓造 1984. 除草剤雑感 - 肥料とのかかわり合い -. *加里研究* 36, 12-16.
- 竹下孝史 2002. 「抑草剤」の開発 : 2001 年までの要約 - 畦畔雑草に対する抑草剤の開発を中心に -. *植調* 36 (7), pp. 239-259.
- 與語靖洋 2000. 除草剤の新しいターゲット探索の試み. *日本農薬学会誌*, 25, 276-280.
- 與語靖洋 2003. 植物代謝と新規除草剤の創製. 「次世代の農薬開発」. ソフトサイエンス社, 東京, pp. 229-238.
- 與語靖洋 2004. リグニン生合成系を標的とした植物生長抑制剤の探索. *植物の生長調節* 39, 97-105.
- Yun, M.S., W.-J. Chen, F. Deng and Y. Yogo 2005. Differential properties of 4-coumarate : CoA ligase related to growth suppression by chalcone in maize and rice, *Plant Growth Regulation* 46, 169-176.
- Yun, M.S., W.-J. Chen, F. Deng, Y. Yogo, T. Kiyokawa and K. Mametsuka 2006. An in vitro screening assay to discover novel inhibitors of 4-coumarate : CoA ligase, *Pest Management Science* 62, 1065-1071.
- Yun, M.S., W.-J. Chen, F. Deng and Y. Yogo 2007. Propanil and swep inhibit 4-coumarate : CoA ligase activity in vitro, *Pest Management Science* 63, 815-820.
- Yun, M.S., W.-J. Chen, F. Deng and Y. Yogo 2009. Selective growth suppression of five annual plant species by chalcone and naringenin correlates with the total amount of 4-coumarate : CoA ligases *Weed Biology and Management* 9, 27-37.