

糸状菌におけるアブシシン酸生合成の有機化学的分子解析

(研究課題番号 14360065)

平成 14 年度－平成 15 年度科学研究費補助金 基盤研究 (B) (1)

研究成果報告書

京都大学図書



1040940711

附属図書館

平成 16 年 5 月

研究代表者 平井伸博

(京都大学国際融合創造センター助教授)

は し が き

研究組織

研究代表者 平井伸博 京都大学国際融合創造センター・助教授
研究分担者 川出 洋 東京農工大農学部（現東京農工大学大学院共生科学技術
研究部生命農学部門）・助手

交付決定額（配分額）

（金額単位 千円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成 14 年度	7,100	0	7,100
平成 15 年度	7,800	0	7,800
合 計	14,900	0	14,900

研究発表

(1) 原著論文

1. M. Inomata, N. Hirai, R. Yoshida, and H. Ohigashi, The direct pathway of abscisic acid biosynthesis via inonylideneethane in a fungus, *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, submitted (2004).

(2) 口頭発表

1. 猪俣正広、平井伸博、山本浩敬（日本 NUS）、葭田隆治（富山県大）、大東 肇：アブシシン酸生産糸状菌に存在するカロテノイドの同定. 日本農芸化学会 2002 年度大会（仙台市）2002 年 3 月.
2. 猪俣正広、平井伸博、山本浩敬（日本 NUS）、葭田隆治（富山県大）、大東肇：糸状菌のアブシシン酸生合成経路—新しい直接経路の可能性. 第 37 回植物化学調節学会（札幌市）2002 年 10 月.
3. 猪俣正広、平井伸博、葭田隆治、大東肇：糸状菌のアブシシン酸生合成における直接経路の可能性. 日本農芸化学会 2002 年度大会（藤沢市）2003 年 3 月.
4. 猪俣正広、平井伸博、葭田隆治、大東肇：糸状菌のアブシシン酸生合成経路—イオニリデンエタンを経由する新しい直接経路. 第 38 回植物化学調節学会（名古屋大学）2003 年 10 月.
5. 猪俣正広、平井伸博、葭田隆治、大東肇：糸状菌のアブシシン酸生合成における新しい直接経路. 日本農芸化学会 2004 年度大会（東広島市）2004 年 3 月.

(3) 出版物

な し

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

な し

目 次

	頁
第一部 アブシシン酸生合成経路の解明 (平井 伸博)	
1. 緒 言	1
2. <i>B. cinerea</i> が生産する ABA の $^{18}\text{O}_2$ ならびに H_2^{18}O 標識実験	2
3. <i>B. cinerea</i> が生産する ABA 生合成関連代謝物と ^{13}C 標識体の代謝実験	4
4. <i>C. cruenta</i> における新直接経路の検証	5
5. <i>B. cinerea</i> に関する研究成果の投稿論文	7
第二部 アブシシン酸生合成遺伝子のクローニング (川出 洋)	
1. 緒 言	31
2. 阻害剤添加による ABA 生産菌における ABA 生合成への影響	32
3. <i>B. cinerea</i> ゲノム DNA からの ABA 生合成遺伝子クローニング	38
謝 辞	49

第一部 アブシシン酸生合成経路の解明

平井 伸博

1. 緒 言

アブシシン酸 (ABA, 1) は、セスキテルペノイド系の重要な植物ホルモンである。その代表的な生理作用として、気孔の閉鎖による乾燥耐性や COR (cold-responsive) タンパクの合成促進による低温耐性の誘導、種子の休眠制御などが挙げられる。

ABA は、ジテルペノイド系植物ホルモンのジベレリンと同様、植物だけでなく植物病原糸状菌によっても生合成される。植物の ABA は、非メバロン酸経路由来の isopentenyl diphosphate (IDP) からつくられたカロテノイドがジオキシゲナーゼで酸化開裂されることによって生合成される (図 1)。これに対して糸状菌では、メバロン酸経路由来の IDP から ABA が生合成されることが明らかにされているのみで、IDP 以降は farnesyl diphosphate (FDP) から ionylideneethanol を経て ABA を生合成する直接経路と、カロテノイド経路のいずれを経由するのか不明である。糸状菌の ABA 生合成経路を解明し、植物のものと比較することは糸状菌における ABA の起源を明らかにするだけでなく、その役割について示唆を与えると考えられる。そこで、本研究は糸状菌 *Botrytis cinerea* および *Cercospora cruenta* における IDP 以降の ABA 生合成経路を解明することを目的とした。なお、*B. cinerea* に関する研究の詳細は、「5. *B. cinerea* に関する研究成果の投稿論文」を参照のこと。

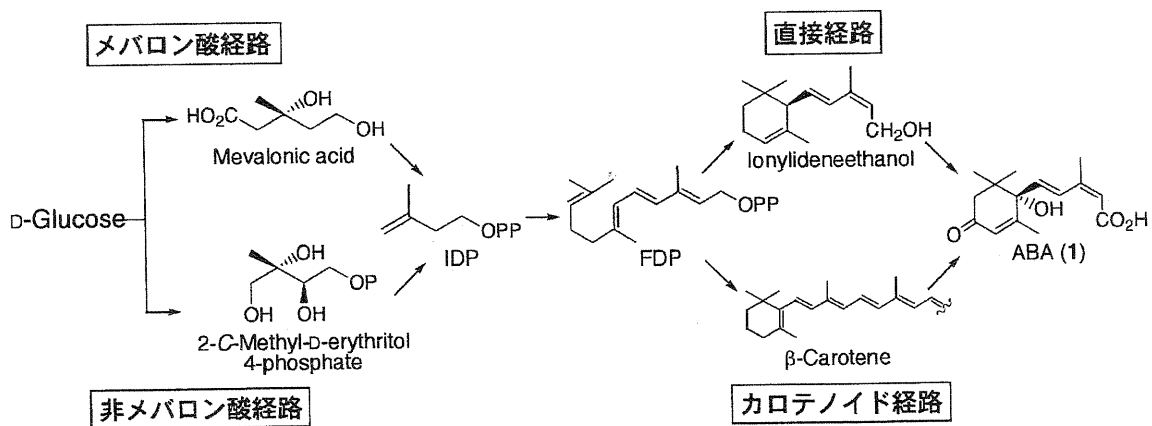


図 1 ABA の生合成経路

2. *B. cinerea* が生産する ABA の $^{18}\text{O}_2$ ならびに H_2^{18}O 標識実験

ABA がカロテノイド経路と直接経路のいずれで生合成されるかを区別するために、 $^{18}\text{O}_2$ による ABA の標識実験を行った。カロテノイド経路では、カロテノイドが分子状酸素を用いるジオキシゲナーゼによって酸化され、生じたアルデヒドは水の酸素を用いてオキシダーゼによりカルボキシル基に酸化される。したがって、ABA の 1 位酸素のひとつが ^{18}O で標識される。これに対して直接経路では、1 位は FDP の酸素を保持したまま、水の酸素を用いてオキシダーゼによりアルデヒド、続いてカルボキシル基へと酸化される。この場合、ABA の 1 位に $^{18}\text{O}_2$ は全く取り込まれない。

$^{18}\text{O}_2$ 雰囲気下で *B. cinerea* を培養し、ABA ならびに本菌の ABA 生合成前駆体の 1',4'-*t*-diol-ABA (2) を単離した。ABA のメチルエステル (ABA-Me) を EI-MS 分析した結果、 $[\text{M}+6]^+$ に相当する分子イオンが m/z 284 に認められ、 ^{18}O が 3 つ取り込まれていることがわかった (図 2)。側鎖に由来するフラグメントイオンが非標識体より 4 mu 大きい m/z 129 に検出されたことから、1 位酸素が 2 つとも ^{18}O で標識されていることが判明した。六員環部のフラグメントイオンは非標識の m/z 162 とともに m/z 164 に認められ、1'位または 4'位のどちらかに 1 つ ^{18}O が取り込まれていることを示した。この取り込み位置を特定するために脱水イオン群を解析したところ、 m/z 266, 264, 262, 260 にそれぞれ $[\text{M}+6-\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{M}+6-\text{H}_2^{18}\text{O}]^+ / [\text{M}+4-\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{M}+4-\text{H}_2^{18}\text{O}]^+ / [\text{M}+2-\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{M}+2-\text{H}_2^{18}\text{O}]^+ / [\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ に相当するイオンが認められた。ABA-Me の脱水イオンは、その約 65% が 1'位水酸基と 4'位または 5'位水素の脱離によって生じることが既にわかっ

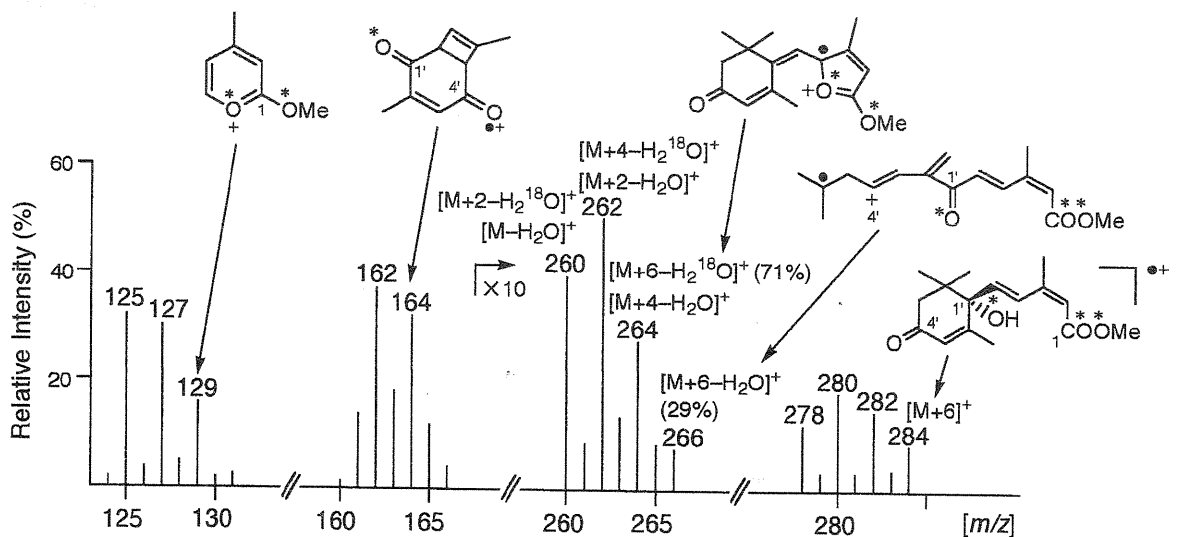


図 2 $^{18}\text{O}_2$ 雰囲気下で培養した *B. cinerea* 由来の ABA-Me の EI マススペクトル
* : ^{18}O , () : $[\text{M}+6-\text{H}_2\text{O}]^+$ と $[\text{M}+6-\text{H}_2^{18}\text{O}]^+$ の相対イオン強度比

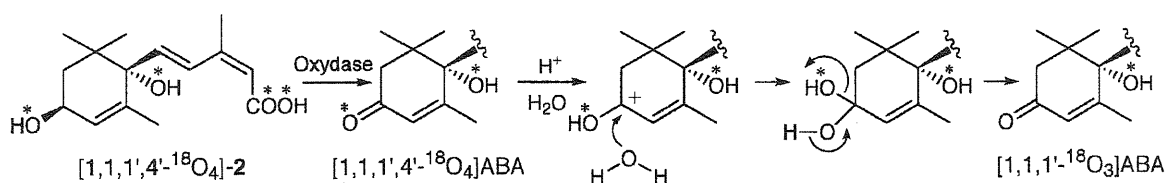


図3 化合物2からABAへの変換と4位¹⁸Oの培地の水由来¹⁶Oとの交換メカニズム
* : ¹⁸O

ている。1'-¹⁸O と 4'-¹⁸O を区別するためには残り 35%の由来を明らかにする必要があった。脱水する可能性のある 4'位酸素をラベルした[4'-¹⁸O]ABA-MeなどをEI-MS分析したところ、残り約 35%の脱水イオンは 4'位カルボニル酸素が 1'位水酸基の水素および 4'位の水素などと脱離することによって生じることが明らかとなった。このようなカルボニル酸素の脱離による脱水イオンの生成は極めて珍しい。1'位水酸基と 4'位カルボニル酸素の脱離は 65:35 の比で起こるため、1'-¹⁸O か 4'-¹⁸O かは[M+6-H₂O]⁺と[M+6-H₂¹⁸O]⁺の脱水イオンの比を調べることによって区別することができる。すなわち 1'-¹⁸O の場合、[M+6]⁺より 1'位水酸基が H₂¹⁸O として脱離するため[M+6-H₂O]⁺と[M+6-H₂¹⁸O]⁺を 35:65 の比で与え、4'-¹⁸O の場合は、[M+6-H₂O]⁺と[M+6-H₂¹⁸O]⁺の比は、逆の 65:35 になる。実際に m/z 266 の[M+6-H₂O]⁺と m/z 264 のイオンから[M+4-H₂O]⁺の寄与を補正した[M+6-H₂¹⁸O]⁺との比は 29:71 であった。この比は 1'位が ¹⁸O で標識されている場合の比に近かったことから、六員環部の ¹⁸O は 1'位に取り込まれていることが判明した。以上の結果から、ABA の 1, 1, 1'位が ¹⁸O で標識されたことが明らかになった。

一方、化合物2はそのメチルエステルのEI-MS分析の結果、ABAの標識結果とは異なり全ての酸素が¹⁸Oで標識されていることがわかった。このことは、先ず全ての酸素が¹⁸O標識された化合物2が生合成され、それがABAに変換された後に4'位酸素が水和体を経て培地の水由来の¹⁶Oと交換したことを示唆している(図3)。この推定は、ABAの4'位酸素が酸性条件で容易に水の酸素と交換すること、培養液のpHが培養中2.7-5.8であったことから支持された。ただし、ABAに取り込まれた¹⁸Oは、¹⁸O₂から呼吸によって生じたH₂¹⁸Oに由来する可能性が考えられた。そこで、H₂¹⁸O培地で培養した同菌から得られたABAと化合物2のメチルエステルをEI-MS分析した結果、何れの酸素も水に由来しないことが確認された。以上の結果より、本菌の生産するABAの全ての酸素は分子状酸素に由来することが明らかとなった。

3. *B. cinerea* が生産する ABA 生合成関連代謝物と ^{13}C 標識体の代謝実験

上記の結果は、直接経路とカロテノイド経路の何れから予想される結果とも異なっていた。そこで、ABA の生合成中間体に関する情報を得るために、フォトダイオードアレイ検出器付 HPLC および GC-MS を用いて *B. cinerea* の菌体抽出物の精査を行った。その結果、極微量のフィトエン (5 ng/g 菌体) 以外にカロテノイドは検出されず、代わりに既知セスキテルペノイドの 2*E*,4*E*,6*E*-allofarnesene (**3**, 1,300 ng/g 菌体) と 2*Z*,4*E*,6*E*-allofarnesene (**4**, 990 ng/g 菌体) ならびに新規セスキテルペノイドの 2*E*,4*E*-ionylideneethane (**5**, 1 ng/g 菌体) と 2*Z*,4*E*- α -ionylideneethane (**6**, 8 ng/g 菌体) の存在を見出した。この結果は、本菌が allofarnesene と ionylideneethane を経る直接経路で ABA を生合成することを示唆した。この新しい直接経路では、FDP の 1 位がいったん還元されて化合物 **3** となり、**6** へと変換された後に、分子状酸素による酸化によって ABA が生合成される。ただし、化合物 **3** から **6** への経路は、**3** の 2 位異性化が起こった後、**4** が環化して **6** を生じる場合と、**3** が環化された後に **5** の 2 位異性化によって **6** を生じる場合の二通りの可能性が考えられた (図 4)。そこで、本菌における新しい直接経路の存在を確かめるとともに、これら二つの経路を区別するため、 ^{13}C 標識した化合物 **3-6** の代謝実験を行った。代謝実験の結果、 ^{13}C -**3**, **4**, **5**, **6** は、それぞれ 0.7, 0.2, 2.6, 17.1% の取り込み率で ABA に変換されることが判った。化合物 **3** の取り込み率が **4** よりも高いことは、**3** の環化が 2 位異性化よりも先に起こることを示唆している。しかし、化合物 **6** の ABA への取り込み率が **5** のそれよりも有意に高いことを考慮すると、環化よりも 2 位異性化が先に起こっている可能性が高い。菌体抽出物中の **5:6** 比は 1:9 であるのに対し、**3:4** 比は 4:3 であることも、**3** の 2 位異性化が先に起こっていることを示唆した。化合物 **3** と **4** の低い取り込み率はこれら化合物の揮発性と不安定性が原因と考えられ、このことも **3** と **4** の取り込み率の僅かな差に影響した可能性が高い。 (\pm) - ^{13}C -**6** を投与した場合に生じた ABA の絶対配置は 99.8% ee で天然型の *S* であり、*(R)*-**6** が選択的に ABA に変換されていた。

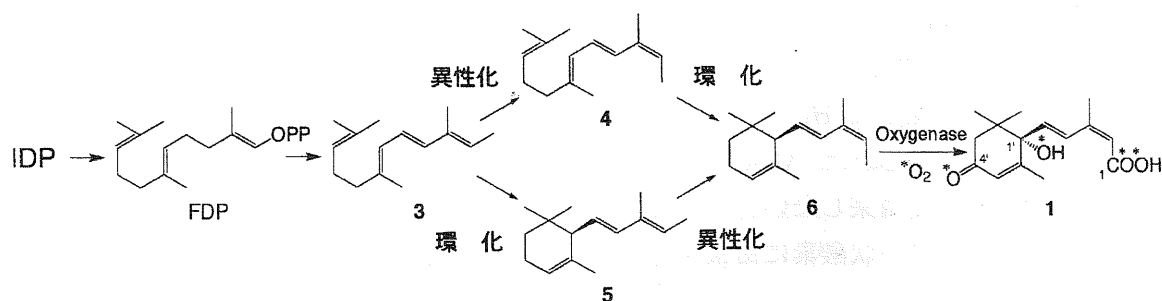


図 4 新しい直接経路における二通りの経路の可能性

* : 分子状酸素由来

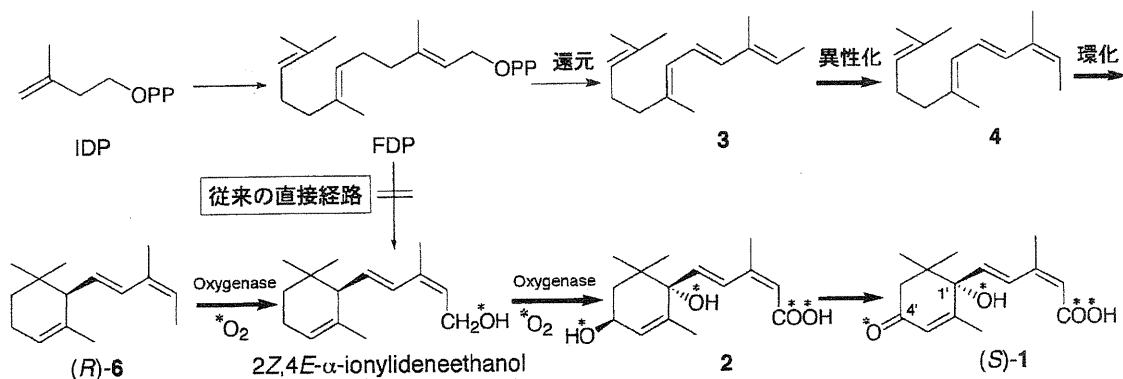


図5 *B. cinerea* の新しい直接経路による ABA の生合成
 太矢印： ^{13}C 標識化合物の代謝実験によって明らかにされた経路，
 *：分子状酸素由来

これらの結果より、本菌は、FDP の 1 位還元と 4, 5 位の不飽和化によって化合物 3 を生じた後、2 位異性化によって 4 を、次いで環化により 6 を生じ、(R)-6 の 1, 1, 1', 4' 位を分子状酸素を用いたモノオキシゲナーゼ反応により酸化して、ABA を生合成することが確実となった (図 5)。

4. *C. cruenta* における新直接経路の検証

ABA 生産糸状菌における新直接経路の普遍性を確認するため、*B. cinerea* とは別属の *C. cruenta* についてもその ABA 生合成経路を調べた。 $^{18}\text{O}_2$ 雰囲気下で *C. cruenta* を培養し、単離した ABA のメチルエステルを EI-MS 分析した結果、ABA の全ての酸素に ^{18}O が取り込まれていることがわかった。本菌の生合成中間体である化合物 7 ならびに 8 の全ての酸素も ^{18}O で標識されていた (図 6)。この結果は、新しい直接経路と一致した。

本菌がカロテノイド経路で ABA を生合成する場合、直前の前駆体は化合物 7 と同じ環構造を有する γ -型 9(9')Z-carotenoid と推定される。しかし、本菌の菌体に存在するカロテノイドは all-E- β -carotene (2,500 ng/g 菌体)、all-E-7,8-dihydro- β -carotene (800 ng/g 菌体)、all-E- β -zeacarotene (80 ng/g 菌体)、all-E-neurosporene (100 ng/g 菌体)、all-E- ζ -carotene (400 ng/g 菌体)、15,15'Z-phytofluene (100 ng/g 菌体)、15,15'Z-phytoene (4,100 ng/g 菌体) であり、 γ -型 9(9')Z-carotenoid を検出することはできなかった。これに対して、セスキテルペノイドは化合物 3 (500 ng/g 菌体) とともに新規化合物の 2E,4E- γ -ionylideneethane (9, 3,300 ng/g 菌体) と 2Z,4E- γ -ionylideneethane (10, 14,400 ng/g 菌体) が存在することを見出した。しかも、2- ^{13}C 標識した化合物 3, 4, 9, 10 は 0.1%、0.2%、0.2%、3.3% の比で

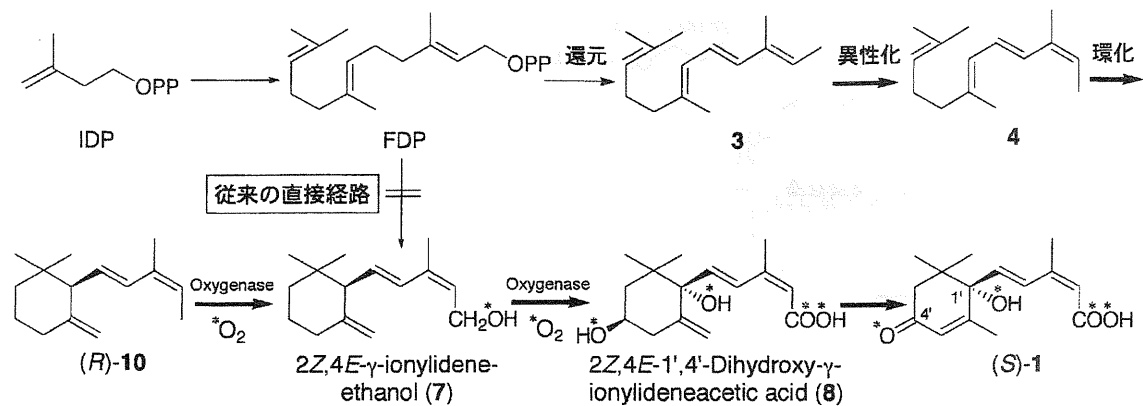


図 6 *C. cruenta* の新しい直接経路による ABA の生合成
 太矢印： ^{13}C 標識化合物の代謝実験によって明らかにされた経路，
 *：分子状酸素由来

ABA に変換された。化合物 3 と 4 の取り込み率がほぼ同程度であるのに対し、10 の取り込み率が 9 よりも有意に高いことから、本菌の直接経路も 3 の 2 位異性化の後、4 の環化が起こると考えられる。(±)-[2- ^{13}C]-10 を投与して生じた ABA の絶対配置は、98.9% ee で天然型の S であり、(R)-10 が選択的に ABA に変換されたことを示した。以上の結果から、本菌の直接経路は FDP → 3 → 4 → (R)-10 → (S)-ABA の順に進行すると推定される (図 6)。本経路は生合成中間体が g-型の六員環構造を有すること以外、*B. cinerea* の直接経路と同じである。したがって、新直接経路は ABA 生産糸状菌に普遍的に存在している可能性が高い。

ABA 生産糸状菌はいずれも植物病原性であることから、感染などの相互作用を通じて ABA 生産能を植物から獲得したと推定されている。しかし、糸状菌の ABA 生合成経路は IDP の前後とも植物と全く異なっている。したがって、糸状菌と植物は ABA 生合成遺伝子を別々に獲得した可能性が高い。ジベレリン生産糸状菌も、その生合成遺伝子は植物のものとは異なっている。糸状菌は、植物ホルモンの生合成能を偶然獲得したと考えられるが、感染などに何らかの有利な点があるため、その生合成遺伝子が維持されていると思われる。実際、ABA は、植物の感染抵抗性を低下させることが示唆されている。ABA 生産糸状菌も、ABA を分泌することによって植物への感染を容易にしているのかもしれない。

5. *B. cinerea* に関する研究成果の投稿論文

投稿先: Phytochemistry

投稿日: 2004年3月11日

Graphical Abstract

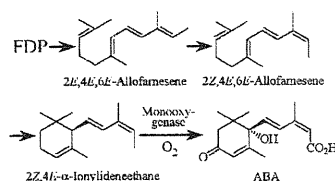
The Biosynthetic Pathway of Abscisic Acid via Ionylideneethane in a Fungus, *Botrytis cinerea*

Masahiro Inomata^a, Nobuhiro Hirai^b, Ryuji Yoshida^c, Hajime Ohigashi^a

^aDivision of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

^bInternational Innovation Center, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan

^cDepartment of Agriculture Technology, Toyama Prefectural University, Toyama 939-0311, Japan



For biosynthesis of abscisic acid in the fungus, we propose the direct pathway via allofarnesene and ionylideneethane based on results of labeling experiments with ¹⁸O₂ and H₂¹⁸O, and feeding experiments with ¹³C-labeled compounds.

The Biosynthetic Pathway of Abscisic Acid via Ionylideneethane in a Fungus, *Botrytis cinerea*

Masahiro Inomata^a, Nobuhiro Hirai^{b*}, Ryuji Yoshida^c, Hajime Ohigashi^a

^aDivision of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

^bInternational Innovation Center, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan

^cDepartment of Agriculture Technology, Toyama Prefectural University, Toyama 939-0311, Japan

* Corresponding author. Tel.: +81-75-753-6282; fax: +81-75-753-6284.

E-mail address: hirai@kais.kyoto-u.ac.jp

Abstract

The biosynthetic pathway of ABA after isopentenyl diphosphate in a fungus, *Botrytis cinerea*, was investigated. ^{18}O -Labeling experiments with $^{18}\text{O}_2$ and H_2^{18}O indicated that all oxygen atoms at C-1, -1, -1' and -4' of ABA were derived from molecular oxygen, and not from water. This finding was inconsistent not only with the carotenoid pathway *via* oxidative cleavage of carotenoid and but also with the classical direct pathway *via* cyclization of farnesyl diphosphate. The fungus produced new C_{15} -compounds, $2E,4E$ - α -ionylideneethane and $2Z,4E$ - α -ionylideneethane, along with $2E,4E,6E$ -allofarnesene and $2Z,4E,6E$ -allofarnesene, but did not produce carotenoids except for a trace of phytoene. These C_{15} -compounds labeled with ^{13}C were converted to ABA by the fungus, and the incorporation ratio of $2Z,4E$ - α -ionylideneethane was higher than that of $2E,4E$ - α -ionylideneethane. From these results, we concluded that farnesyl diphosphate was reduced at C-1, desaturated at C-4, and isomerized at C-2 to form $2Z,4E,6E$ -allofarnesene before being cyclized to $2Z,4E$ - α -ionylideneethane, and then the ionylideneethane was oxidized to ABA with molecular oxygen. This direct pathway *via* ionylideneethane means that the biosynthetic pathway of fungal ABA not only before but also after isopentenyl diphosphate is different from that of plant ABA which is biosynthesized by non-mevalonate and carotenoid pathways.

Keywords: *Botrytis cinerea*; abscisic acid; biosynthesis; allofarnesene; α -ionylideneethane

1. Introduction

A plant hormone, abscisic acid (ABA, 1), regulates various physiological reactions including induction of adaptive responses to water deficiency and low temperature in plants (Leung and Giraudat, 1998). ABA is produced by some phytopathogenic fungi in addition to higher plants, lichens, bryophytes and algae (Hartung and Gimmler, 1994). ABA may control susceptibility of plant tissues to fungal infection (Kettner and Dörffling, 1995), although the physiological role of ABA in fungi is not understood.

Studies on ABA biosynthesis have suggested that the biosynthetic pathway of fungal

ABA is different from that of higher plant ABA (Fig. 1). Higher plants use isopentenyl diphosphate (IDP) derived from the non-mevalonate pathway for biosynthesis of ABA (Hirai et al., 2000a), and the IDP is converted to 9Z-epoxycarotenoid, which is cleaved by dioxygenase to form ABA (Schwartz et al., 2003). In contrast to higher plants, IDP for ABA of fungi, *Botrytis cinerea*, *Cercospora pini-densiflorae* and *C. cruenta*, is biosynthesized by the mevalonate pathway (Hirai et al., 2000a; Yamamoto et al., 2000). Two pathways, the direct and carotenoid pathways, have been proposed for the pathway after IDP in fungi.

In the direct pathway, farnesyl diphosphate (FDP) is hydrolyzed, isomerized, cyclized and desaturated to form ionylideneethanol, and oxidation of ionylideneethanol gives ABA (the classical direct pathway in Fig. 2). This pathway has been suggested based on feeding experiments with C₁₅ compounds in two fungi. *C. rosicola* converted FDP to ABA (Bennett et al., 1984), and *C. rosicola* and *C. cruenta* metabolized 2Z,4E- α -ionylideneethanol (**2**) and 2Z,4E- γ -ionylideneethanol (**3**), respectively, to ABA (Neill et al., 1987; Oritani et al., 1985; Kato et al., 1987). However, putative intermediates between FDP and ionylideneethanol, 4,5-didehydrofarnesol and monocyclofarnesol, were not converted to ABA, and their production by these fungi has not been confirmed (Bennett et al., 1990; Yamamoto and Oritani, 1997; Yamamoto et al., 2001). This is a shortcoming to support the direct pathway.

The carotenoid pathway has been proposed for *C. cruenta*, which produces β -carotene and 2Z,4E- γ -ionylideneacetaldehyde (**4**) along with **3** (Oritani et al., 1985; Yamamoto et al., 2000). This fungus converted **4** to ABA, and incorporated ¹⁸O from ¹⁸O₂ into C-1 of **4** and into C-1, -1' and -4' of ABA (Yamamoto et al., 2000). This result apparently coincides with the biosynthesis of ABA *via* **4** formed by oxidative cleavage of carotenoids. However, 9Z-carotenoids possessing γ -ring that should be precursors for **4** have not been found in this fungus. *C. rosicola* also produces β -carotene (Norman, 1991), but production of carotenoids by other ABA-producing fungi has not been reported. The carotenoid and direct pathway in fungi remain unclear.

The different origin of IDP between higher plants and fungi has suggested that the fungi obtained the genes for ABA biosynthesis independently of higher plants. However, IDP is the ultimate precursor not only for ABA but also other terpenoids. The biosynthesis after IDP seems to be characteristic of ABA, so elucidation of the

biosynthetic pathway after IDP in fungal ABA is important to discuss the origin of genes for ABA biosynthesis. We investigated the biosynthetic pathway between IDP and ABA in *B. cinerea* that produces 1',4'-*t*-diol-ABA (**5**) as the precursor of ABA (Hirai et al., 1986; Kettner and Dörffling, 1995). This paper proposes a direct pathway *via* ionylideneethane based on results from labeling experiments with $^{18}\text{O}_2$ and H_2^{18}O , precise analyses of ABA-related metabolites, and feeding experiments of the labeled metabolites.

2. Result and discussion

2.1. Labeling experiment with $^{18}\text{O}_2$ and H_2^{18}O

An ^{18}O -labeling experiment of ABA with $^{18}\text{O}_2$ may distinguish between the carotenoid and direct pathways. In the direct pathway, oxidation at C-1 of ionylideneethanol by oxidase with oxygen from H_2O will form the carboxyl group of ABA. This means that C-1 of ABA is not labeled with ^{18}O from $^{18}\text{O}_2$ in the direct pathway. If fungal ABA is biosynthesized by the carotenoid pathway as well as plant ABA, a precursor carotenoid would be oxidatively cleaved by dioxygenase with molecular oxygen, and resulting C_{15} -aldehyde could be oxidized at C-1 by oxidase with oxygen from H_2O to form the carboxyl group of ABA (Seo et al., 2000a, 2000b). In this case, one ^{18}O from $^{18}\text{O}_2$ is introduced into C-1 (Creelman and Zeevaart, 1984; Zeevaart et al., 1989). Thus, the number of ^{18}O label at C-1 would be different between the two pathways. ^{18}O -Labeling pattern at C-1' and -4' may also provide information about the pathway.

B. cinerea was cultured under $^{18}\text{O}_2$ for 20 days, and methyl esters of ABA and compound **5** produced by the fungus were analyzed by EIMS. The mass spectrum of the ABA methyl ester gave $[\text{M}+6]^+$, $[\text{M}+4]^+$, $[\text{M}+2]^+$ and $[\text{M}]^+$ ions at m/z 284, 282, 280 and 278, respectively, indicating the incorporation of three ^{18}O atoms at maximum into ABA (Table 1). The fragment ion derived from the side chain that appears at m/z 125 in non-labeled ABA methyl ester was detected at m/z 129, 127 and 125 (Gray et al., 1974). This showed that two oxygen atoms at C-1 at maximum were labeled with ^{18}O . A fragment ion containing 1',4'-oxygen atoms was detected at m/z 164 in addition to m/z 162 corresponding to the ion without ^{18}O (Gray et al., 1974), indicating that either C-1' or -4' was labeled with ^{18}O . The labeled position was determined by analysis of the

dehydrated ion. Dehydrated ions $[M+6-H_2O]^+$, $[M+6-H_2^{18}O]^+/[M+4-H_2O]^+$, $[M+4-H_2^{18}O]^+/[M+2-H_2O]^+$ and $[M+2-H_2^{18}O]^+/[M-H_2O]^+$ were observed at m/z 266, 264, 262 and 260, respectively. More than 60% of the dehydrated ion of ABA methyl ester is formed by elimination of the 1'-hydroxyl group, and 4- or 5-hydrogen (Hirai et al., 2000b). We found by analyzing a mass spectrum of authentic $[4'-^{18}O]$ ABA methyl ester that a residual 32% of the dehydrated ion was formed by elimination of 4'-oxygen and the 4- or 5- hydrogen after migration of 1'-O-hydrogen to 4'-oxygen (Table 1).^{*} This finding means that $[1'-^{18}O]$ ABA and $[4'-^{18}O]$ ABA methyl esters can be distinguished by the ratio of relative intensities of the dehydrated ions $[M+2-H_2O]^+$ and $[M+2-H_2^{18}O]^+$; the former ester should give a ratio of about 32:68, and the latter ester a ratio of about 68:32. The ratio of the relative intensities of the dehydrated ions at m/z 266 and 264 was 29:71 after subtraction of the relative intensity derived from an $[M+4-H_2O]^+$ ion from the relative intensity of the ion at m/z 264. This ratio was close to that of the dehydrated ions $[M+2-H_2O]^+$ and $[M+2-H_2^{18}O]^+$ of $[1'-^{18}O]$ ABA methyl ester, indicating that 1'-oxygen was labeled with ^{18}O , but 4'-oxygen was not. These results revealed that C-1, -1 and -1' of ABA were labeled with ^{18}O from $^{18}O_2$.

The mass spectrum of the methyl ester of **5** showed molecular ions corresponding to $[M+8]^+$, $[M+6]^+$, $[M+4]^+$, $[M+2]^+$ and $[M]^+$, indicating that all four oxygen atoms of **5** at maximum were derived from ^{18}O (Table 2). This result did not coincide with that of ABA. It is possible that the 4'- ^{18}O label of ABA was lost by exchange with ^{16}O from water during culture after $[1,1,1,4'-^{18}O_4]$ ABA had been biosynthesized from $[1,1,1,4'-^{18}O_4]$ -**5**. To examine this possibility, authentic $[4'-^{18}O]$ ABA was incubated in buffer solutions of pH 3.0, 5.0 and 7.0 for 6 days. The result showed that the 4'- ^{18}O content decreased from 84% to 3% and 78% after incubation at pH 3 and 5, respectively, and changed very little after incubation at pH 7. Measurement of pH of the medium during culture showed that the pH decreased from 5.8 to 2.7 during the first 5 days, and then gradually increased to 4.4 until day 20 after inoculation. This fungus began to produce ABA from day 5 after inoculation, and ABA was accumulated in the medium. The acidity of the medium strongly supported the above possibility. Therefore, all oxygen atoms at C-1, -1, -1' and -4' of ABA may be derived from molecular oxygen.

The ^{18}O labels of ABA and compound **5** may be derived from $H_2^{18}O$ that could be produced from $^{18}O_2$ by respiration of the fungus during culture. To avoid this

^{*} The dehydration mechanism involving 4'-oxygen will be reported elsewhere.

possibility, the fungus was cultured in a medium made from H_2^{18}O . The mass spectrum of methyl ester of ABA produced showed an $[\text{M}+2]^+$ ion at m/z 280, dehydrated ions $[\text{M}+2-\text{H}_2\text{O}]^+$ and $[\text{M}+2-\text{H}_2^{18}\text{O}]^+$ at m/z 262 and 260, respectively, with a ratio of 67:33, and a fragment ion containing 1',4'-oxygen at m/z 164, indicating that the ABA was labeled at C-4' with ^{18}O (Table 1). The ^{18}O label at C-4' would be incorporated by non-enzymatic exchange of ^{16}O with ^{18}O from H_2^{18}O of a medium as described above. Compound **5** was not labeled with ^{18}O (Table 2). This result further confirmed that all oxygen atoms at C-1, -1, -1' and -4' of ABA were derived from molecular oxygen, and not from water. The difference of our result from the $^{18}\text{O}_2$ labeling result of *C. cruenta* (Yamamoto et al., 2000) may be explained by the exchange of 1- ^{18}O of **4** with ^{16}O from H_2^{16}O via a hydrate of the aldehyde group due to a slow conversion of **4** to ABA in *C. cruenta*.

The above finding was inconsistent not only with the direct pathway but also with the carotenoid pathway. Labeling of both oxygen atoms at C-1 of ABA with ^{18}O from $^{18}\text{O}_2$ suggested that oxidation at C-1 of a putative C_{15} -aldehyde intermediate was catalyzed not by oxidase with oxygen from H_2O , but by monooxygenase with molecular oxygen. This oxidation mechanism may be applied to the carotenoid pathway. However, we could not exclude a pathway different from the direct and carotenoid pathways. In the bile acid biosynthesis, oxidation of the 27-methyl group of 5β -cholestan- $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -triol to the carboxyl group proceeds by multiple monooxygenation with molecular oxygen (Holmberg-Betsholtz et al., 1993). Carotenoids and C_{15} compounds produced by the fungus were carefully searched for biosynthetic intermediates for ABA that suggest the biosynthetic pathway of ABA.

2.2 Isolation and identification of ABA-related compounds

If the carotenoid pathway is working in *B. cinerea*, the precursor carotenoid could be the 9Z-isomer possessing ϵ -ring. Carotenoids in the extract from the mycelia were analyzed by HPLC with a photodiode array detector at a detection limit of 0.3 ng for all-E- β -carotene. Three compounds having absorption spectra similar to that of phytoene were detected at R_t s 3.8, 4.0, and 9.0 min, and the other carotenoids were not detected. Compounds **6** and **7** detected at R_t s 3.8, and 4.0 min, respectively, were isolated, and their ^1H NMR and mass spectra suggested that **6** and **7** were 2Z,4E,6E- and 2E,4E,6E-allofarnesenes, respectively (Miyaura et al., 1982; Sakai and Hirose, 1969). The

structures of **6** and **7** were confirmed by comparison of their spectral data with those of chemically synthesized *2Z,4E,6E*- and *2E,4E,6E*-allofarnesenes. Compounds **6** and **7** are known to occur in oil of *Perilla frutescens f. viridis* Makino (Sakai and Hirose, 1969) and *Melissa officinalis* L. (Hose et al., 1997), and in virgin olive oil (Lanzon et al., 1994). The compound eluted at R_t 9.0 min was identified as 15,15'*Z*-phytoene. The contents of **6**, **7** and 15,15'*Z*-phytoene were 990, 1,300 and 5 ng/g fresh weight of mycelia, respectively.

The occurrence of **6** and **7** suggested that *B. cinerea* produced ionylideneethane which is a cyclized derivative of allofarnesene. Further analysis of the mycelia extract by GC-MS detected two compounds **8** and **9** that gave molecular ions at m/z 204, coinciding with the molecular weight of ionylideneethane. Compounds **8** and **9** showed $[M-56]^+$ ions at m/z 148, suggesting that **8** and **9** possessed a partial structure of 1,5,5-trimethyl-1-cyclohexene (Biemann, 1962). Compounds **8** and **9** were obtained as a mixture, but the amount was too small to measure a 1H NMR spectrum. We chemically synthesized *2Z,4E*- and *2E,4E*- α -ionylideneethanes, and confirmed by comparison of their R_t s in GC and mass spectra with those of **8** and **9** that **8** and **9** were *2Z,4E*- and *2E,4E*- α -ionylideneethanes, respectively. Compounds **8** and **9** are new compounds, and were contained at 7.7 and 1.1 ng/g fresh weight of mycelia, respectively. β -Ionylideneethane was not detected in the mycelium extract.

Absence of precursor carotenoids and occurrence of the C_{15} compounds, **6**, **7**, **8** and **9**, suggested that another direct pathway *via* allofarnesene and α -ionylideneethane was working in *B. cinerea*. This direct pathway should contain the following reaction steps: reduction at C-1 and desaturation at C-4 of FDP, isomerization at C-2 of **7** or **9**, cyclization of **6** or **7**, and oxidation at C-1, -1, -1' and -4' of **8** with molecular oxygen (Fig. 2). We performed a feeding experiment with $[2-^{13}C]$ -**6**, **7**, **8** and **9** to examine the direct pathway *via* ionylideneethane and to distinguish the two routes for isomerization and cyclization.

2.3 Feeding experiment of $[2-^{13}C]$ -**6**, **7**, **8** and **9**

Compounds $[2-^{13}C]$ -**6**, **7**, **8** and **9** were synthesized, and fed to *B. cinerea*. The incorporation ratios of these compounds into **5**, **6**, **7**, **8**, **9** and ABA were examined using

¹³C NMR or EIMS. The result is summarized in Table 3. All of [2-¹³C]-6, 7, 8 and 9 were converted to ABA and 5, indicating that these compounds were biosynthetic precursors for ABA. The low incorporation of the labeled compounds into 5 was due to the small amount of 5 compared with the amount of ABA. The incorporation ratio (0.7%) of 7 to ABA was higher than that (0.2%) of 6. This result shows the apparent preference of cyclization of 7 to 9 before isomerization of 7 to 6. However, 6 and 7 are extremely unstable in an acidic aqueous solution in addition to volatility, and the medium of the fungus was acidic as described above. Conversion of [2-¹³C]-6 and 7 to their respective isomers may affect the incorporation ratios also. Therefore, the small difference between the low incorporation ratios of 6 and 7 seemed insignificant. The incorporation ratios of 8 and 9 were more significant than those of 6 and 7, and isomerization of 8 and 9 to 9 and 8, respectively, was negligible. The higher incorporation ratio (17.1%) of 8 to ABA than that (2.6%) of 9 to ABA suggested that isomerization of 7 to 6 preceded cyclization of 7 to 9. The content ratio (4:3) of 7 and 6, and that (9:1) of 8 and 9 in the mycelium extract also preferred isomerization before cyclization. At present, it is unknown whether desaturation at C-4 forming 7 occurs before or after reduction at C-1.

Stereospecificity of oxygenase converting 8 to ABA was examined by an HPLC analysis of ABA that incorporated 17.1% of (±)-[2-¹³C]-8. If both enantiomers of [2-¹³C]-8 are converted to ABA, the enantiomeric excess of the ABA should be 96.52%, and if (*S*)-[2-¹³C]-8 is selectively converted to ABA, the enantiomeric excess of ABA should be 93.04%. The result showed that the ABA was a natural (*S*) isomer with 99.77±0.03% ee. This enantiomeric excess indicated that (*R*)-[2-¹³C]-8 was selectively converted to ABA.

In conclusion, the direct pathway *via* ionylideneethane contains the following steps; FDP is dehydrogenated at C-4, 5 and reduced at C-1 to give 7, cyclization of 6 following isomerization at C-2 of 7 gives (*R*)-8, and then (*R*)-8 is converted to (*S*)-ABA *via* 2 and 5 by oxidation at C-1, -1, -1' and -4' by monooxygenase with molecular oxygen (Fig. 2). This direct pathway may occur in other ABA-producing fungi. Some algae which do not produce carotenoid in spite of containing a considerable amount of ABA (Hartung and Gimmler, 1994) might biosynthesize ABA by the direct pathway *via* ionylideneethane. This study revealed that fungal ABA biosynthesis not only before but also after IDP was different from that of higher plants. Fungi probably obtained the genes for ABA biosynthesis independently of higher plants.

3. Experimental

3.1. General experimental procedure

^1H and ^{13}C NMR, NOESY, HMQC and HMBC spectra were measured with a Bruker ARX500 instrument (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C), using TMS as the internal standard. Direct EIMS was carried out with a JEOL JMS-600H mass spectrometer, the temp. of the direct probe being increased from 50°C to 450°C at a rate of 128°C/min. The instrument was operated at a chamber temp. of 250°C, accelerating voltage of 3 kV, ionization voltage of 70 eV, and ionization current of 300 μA in the positive ion mode, the resolution being 1,000 during the measurement. GC-EI mass spectra were recorded on the above mass spectrometer equipped with a Hewlett Packard HP6890 instrument, using a HP-5 column (30 m x 0.32 mm, 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane, film thickness 0.25 μm , Hewlett Packard Co., Wilmington, DE, USA), and 1.0 ml/min of He flow. The parameters of the mass spectrometer were the same as those of direct EIMS. The oven temp. for GC was programmed from 120°C-270°C at a rate of 5°C/min for methyl ester of ABA and **5**, and from 100°C to 190°C at a rate of 3°C/min for **6**, **7**, **8** and **9**. The ^{18}O contents were calculated after correction by natural ^{13}C -, ^2H - and ^{17}O -isotopic abundance. IR spectra were obtained by a Shimadzu FTIR-8100AI spectrometer. UV spectra, Vis spectra and optical rotation were measured with a Shimadzu UV 2200AI and a JASCO DIP-1000 polarimeter, respectively. HPLC was performed with a Hitachi L-7100 pump, Hitachi L-7400 UV detector and Hitachi D-7500 chromato-integrator. For analysis of carotenoids, HPLC was performed with a Waters 600E multisolvent delivery system using a photodiode array detector Waters 991J with a detection range of 200-600 nm. HPLC columns used were a YMC-Pack ODS-AQ 311 column (100 x 6 mm, YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan), a YMC-Pack SIL A-003 column (silica gel, 250 x 4.6 mm, YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan), a YMC Carotenoid column (250 x 4.6 mm, YMC Inc., Wilmington, NC, USA) and a Chiralcel OD column (250 x 4.6 mm, Daicel Chemical Industries Ltd., Niigata, Japan). CC was carried out on Wakogel C-200 (silica gel; particle size, 0.075-0.15 mm; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) or Al_2O_3 90 (Merck, Darmstadt, Germany).

3.2. Material

The phytopathogenic fungus, *Botrytis cinerea* No. 403, was isolated from geranium. (\pm)-ABA was purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. $^{18}\text{O}_2$ (99 atom % ^{18}O) and H_2^{18}O (more than 95 atom % ^{18}O) were purchased from Isotec Inc., Miamisburg, OH, USA. $[1-^{13}\text{C}]$ Bromoethane (99 atom % ^{13}C) was purchased from Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, WI, USA.

3.3. Labeling experiment with $^{18}\text{O}_2$

Culturing under an $^{18}\text{O}_2$ atmosphere was performed according to the method of Yamamoto *et al.* (2000), who reported that more than a 6 molar equivalent of $^{18}\text{O}_2$ to glucose was required for normal fungal growth and ABA production. Fifteen ml of potato dextrose medium containing 0.3 g (1.7 mmol) of D-glucose was added to a 300 ml-sized Erlenmeyer's flask sealed with a stopcock. After inoculation of *B. cinerea*, the flask was immediately evacuated and then replaced with N_2 to purge the air from the flask. This procedure was repeated twice more. The air bag (5.0 l) containing 0.25 l (10 mmol, 23°C) of $^{18}\text{O}_2$ and 1.0 l of N_2 was fitted to the flask, and *B. cinerea* was statically cultured at 23°C in the dark for 20 days. The atmosphere in the air bag was not replenished with $^{18}\text{O}_2$ during the culture.

After filtration of the culture, the filtrate was acidified with 25% H_3PO_4 to pH 3.0, and partitioned three times with 20 ml of EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give yellow oil (6.8 mg). This oil was subjected to silica gel (3 g) CC using mixtures of toluene and EtOAc containing 1.0% HOAc as the eluant. The material (2.9 mg) eluted with 20-30% EtOAc was subjected to preparative HPLC using a YMC-Pack ODS-AQ 311 column (solvent, 0.1% HOAc-45% MeOH-55% H_2O ; flow rate, 1.0 ml/min; detection, 254 nm). Materials eluted at R_t s 7.7 min and 10.9 min were collected and concentrated to give **5** (4.8 μg) and ABA (0.48 mg), respectively. These compounds were separately methylated by ethereal CH_2N_2 to give methyl esters of **5** (4.2 μg) and ABA (0.48 mg). Methyl ester of ABA: EIMS (probe) 70 eV: m/z (rel. int.): 284 $[\text{M}+6]^+$ (0.9), 282 $[\text{M}+4]^+$ (1), 280 $[\text{M}+2]^+$ (2), 278 $[\text{M}]^+$ (1), 266 (0.7), 264 (3), 262 (5), 260 (4), 194 (60), 192 (100), 190 (82), 164 (32), 162 (36), 129 (16), 127 (30), 125 (32). The total ^{18}O content was calculated from the relative intensities of the molecular ions to be 46%. Methyl ester of **5**: EIMS (probe) 70 eV: m/z (rel. int.): 288 $[\text{M}+8]^+$ (0.4), 286 $[\text{M}+6]^+$ (0.8), 284 $[\text{M}+4]^+$ (1), 282

$[M+2]^+$ (1), 280 $[M]^+$ (0.8), 268 (8), 266 (16), 264 (20), 262 (12), 248 (15), 246 (20), 244 (16), 129 (71), 127 (100), 125 (99). The total ^{18}O content was calculated from the relative intensities of the molecular ions to be 42%.

3.4. Preparation of $[4\text{'-}^{18}\text{O}]$ ABA and its incubation in buffer

$[4\text{'-}^{18}\text{O}]$ ABA was prepared according to the method of Gray et al. (1974). One mg of NaOH (0.025 mmol) was dissolved in 100 μl of H_2^{18}O . ABA (6.0 mg, 0.023 mmol) was dissolved in the Na^{18}OH soln. and heated at 85-90°C for 1 h. After cooling, 20 ml of distilled water was added to the soln. The soln. was acidified with 25% H_3PO_4 to pH 3.0 and partitioned three times with 10 ml of EtOAc. The EtOAc layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give yellow oil (5.4 mg). This oil was subjected to silica gel (2.0 g) CC using mixtures of toluene and EtOAc containing 1.0% HOAc as the eluant. A material eluted with 30-40% of EtOAc was collected and concentrated to give $[4\text{'-}^{18}\text{O}]$ ABA (5.0 mg). $[4\text{'-}^{18}\text{O}]$ ABA (0.1 mg) was dissolved in 0.1 ml of MeOH, and ethereal CH_2N_2 was added to the soln. to give a methyl ester of $[4\text{'-}^{18}\text{O}]$ ABA. Methyl ester of $[4\text{'-}^{18}\text{O}]$ ABA: EIMS (probe) 70 eV: m/z (rel. int.): 280 $[M+2]^+$ (2), 278 $[M]^+$ (0.4), 262 (3), 260 (2), 192 (100), 190 (13), 164 (26), 162 (7), 136 (16), 134 (15), 125 (30), 91 (11). The total ^{18}O content was calculated from the relative intensities of the $[M+2]^+$ and $[M]^+$ ions to be 84%. This content was adopted as the $4\text{'-}^{18}\text{O}$ content, since the ^{18}O content 78% calculated from the relative intensity of fragment ions containing $1',4\text{'-}$ oxygen at m/z 164 and 162 was close to the above content.

$[4\text{'-}^{18}\text{O}]$ ABA (0.1 mg) dissolved in 0.1 ml of MeOH was added to 0.3 ml each of a 50 mM buffer soln., NaOAc-HCl for pH 3.0 and 5.0, and $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ for pH 7.0, before being kept at 23°C in the dark for 6 days. After an addition of 5.0 ml of distilled water, the soln. was acidified to pH 3.0 with 25% of H_3PO_4 , and partitioned three times with 2 ml of EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 and filtered. The filtered solns. were concentrated and then dissolved in 0.1 ml of MeOH and ethereal CH_2N_2 to give methyl esters. The methyl ester of ABA incubated at pH 3.0, EIMS (probe) 70 eV: m/z (rel. int.): 278 $[M]^+$ (2), 260 (5), 190 (100), 164 (1), 162 (26), 134 (23), 125 (27), 91 (8). The total ^{18}O content was 3%. The methyl ester of ABA incubated at pH 5.0: EIMS (probe) 70 eV: m/z (rel. int.): 280 $[M+2]^+$ (2), 278 $[M]^+$ (0.5), 262 (3), 260 (3), 192 (100), 190 (29), 164 (23), 162 (10),

136 (14), 134 (16), 125 (35), 91 (10). The total ^{18}O content was 78%. The methyl ester of ABA incubated at pH 7.0: EIMS (probe) 70 eV: m/z (rel. int.): 280 $[\text{M}+2]^+$ (2), 278 $[\text{M}]^+$ (0.3), 262 (3), 260 (2), 192 (100), 190 (18), 164 (24), 162 (8), 136 (15), 134 (14), 125 (30), 91 (10). The total ^{18}O content was 83%.

3.5. Labeling experiment with H_2^{18}O

Difco's potato dextrose broth (0.24 g, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) was dissolved in 10 ml of H_2^{18}O . This medium was sterilized by filtration using a 0.1 μm -pore sized syringe filter (Asahi Technoglass Corp. Tokyo, Japan), and added to a 50 ml-sized sterilized Erlenmeyer's flask. After inoculation of *B. cinerea* in the medium, the fungus was statically cultured at 23°C in the dark for 20 days. The culture was filtered off, and the mycelium was washed with 30 ml of distilled water. The filtrate was acidified with 25% H_3PO_4 to pH 3.0, and immediately partitioned three times with 20 ml of EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give yellow oil (8.0 mg). This oil was subjected to silica gel (3 g) CC using mixtures of toluene and EtOAc containing 1.0% HOAc as the eluant. The colorless oil (3.8 mg) eluted with 30-40% EtOAc was dissolved in 2 ml of MeOH, and then ethereal CH_2N_2 was added to the soln. After leaving it at room temp. for 1 h, the soln. was concentrated to give colorless oil (3.7 mg). This oil was subjected to preparative HPLC using a YMC-Pack SIL A-003 column (solvent, 95% *n*-hexane-5% 2-PrOH; flow rate, 1.0 ml/min; detection, 254 nm). Materials eluted at R_t s 9.6 min and 14.0 min were collected and concentrated to give the methyl esters of ABA (1.4 mg) and 5 (39 μg), respectively. Methyl ester of ABA: GC-EIMS (R_t 15.1 min) 70 eV: m/z (rel. int.): 280 $[\text{M}+2]^+$ (1), 278 $[\text{M}]^+$ (0.3), 262 (3), 260 (2), 192 (100), 190 (22), 164 (29), 162 (10), 136 (19), 134 (19), 125 (35), 91 (15). The total ^{18}O content was calculated from the relative intensities of the molecular ions to be 82%. Methyl ester of 5: GC-EIMS (R_t 13.8 min) 70 eV: m/z (rel. int.): 280 $[\text{M}]^+$ (1), 262 (20), 244 (17), 230 (20), 206 (26), 174 (64), 146 (81), 125 (100), 111 (46), 95 (49).

3.6. Detection of 6, 7 and 15,15'-Z-phytoene by HPLC

B. cinerea was grown on surface culture with 2.0 l of potato-dextrose medium at 23°C in the dark for 8 days. The mycelia (200 g) were harvested by filtration, washed with

distilled water, homogenized in 50 ml of MeOH with sea sand (particle size, 850-1400 μm), and extracted three times with 1.0 l of EtOAc-MeOH (1:1) soln. These extracts were combined, filtered off, and the filtrate was concentrated to give 150 ml of brown aqueous soln. The soln. was partitioned five times with 50 ml of EtOAc, and the combined organic layers were washed with distilled water, dehydrated with Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give black oil (1.2 g). This oil was analyzed by HPLC with a photodiode array detector (200-600 nm): column, YMC Carotenoid column; solvent, 15-85% *t*-butyl methyl ether in MeOH (0-30 min, linear); flow rate, 1.0 ml/min. The contents of 6, 7 and 15, 15'*Z*-phytoene were calculated from the calibration curves between the peak area and amount of authentic samples. As the authentic samples, synthesized 6 and 7, and 15, 15'*Z*-phytoene isolated from *C. cruenta* were used.

3.7. Isolation of 15,15'*Z*-phytoene

B. cinerea was grown on surface culture with 4.0 l of potato-dextrose medium at 23°C in the dark for 8 days. After filtration, the mycelia (460 g) were washed with distilled water, homogenized in 100 ml of MeOH with sea sand and extracted three times with 2.0 l of EtOAc-MeOH (1:1) soln. The extracts were combined, filtered off, and the filtrate was concentrated to give 200 ml of brown aqueous soln. The residue was partitioned five times with 100 ml of EtOAc. The organic layers were combined, washed with 100 ml of 1.0% NaHCO_3 and then distilled water, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give black oil (2.3 g). This oil was subjected to silica gel (50 g) CC using mixtures of *n*-hexane and toluene as the eluant. The fraction (3.5 mg) eluted with 10% toluene was subjected to Al_2O_3 (15 g) CC with mixtures of *n*-hexane and toluene as the eluant. The fraction (1.9 mg) eluted with 5% toluene was purified by preparative HPLC using a YMC Carotenoid column (solvent, 75% MeOH-25% *t*-butyl methyl ether; flow rate, 1.0 ml/min; detection, 254 nm). The fraction eluted at R_t 9.6 min was collected and concentrated to give 15,15'*Z*-phytoene (2.2 μg). For UV, EIMS and ^1H NMR spectral data of 15,15'*Z*-phytoene, see the lit. (Ebenezer and Pattenden, 1993; Britton et al., 1977).

3.8. Detection of 8 and 9 by GC-MS, and isolation of 6, 7 and a mixture of 8 and 9

The culture condition of *B. cinerea* was the same as that described for the isolation of

15,15'-phytoene. The culture (4.0 l in total) was filtered off after 8 days. The mycelia (490 g) were washed with distilled water, homogenized in 100 ml of acetone with sea sand and extracted three times with 1.0 l of acetone. Following filtration of the extract, the filtrate was evaporated to give 400 ml of yellow soln. This soln. was partitioned five times using 100 ml of *n*-hexane, and the organic layers were combined, washed with 100 ml of 1.0% NaHCO₃ and distilled water, dehydrated with Na₂SO₄, filtered and concentrated to give orange oil (0.57 g). This oil was subjected to silica gel (15 g) CC with mixtures of *n*-hexane and toluene as the eluant. The colorless oil (3.4 mg) eluted with 5% toluene was analyzed by GC-EIMS, which was set at the conditions described in the *General experimental procedure*, and compound **8** and **9** were detected at *R*_ts 6.7 and 7.3 min, respectively. Compound **8**. GC-EIMS 70 eV *m/z* (rel. int.): 204 [M]⁺ (29), 148 [M-56]⁺ (100), 133 (86), 119 (21), 105 (18), 91 (23), 77 (10), 55 (12). Compound **9**. GC-EIMS 70 eV *m/z* (rel. int.): 204 [M]⁺ (31), 148 [M-56]⁺ (100), 133 (86), 120 (15), 105 (14), 91 (13), 77 (8). These compounds were not detected in the materials eluted with 10% toluene.

The colorless oil was subjected to Al₂O₃ (15 g) CC using mixtures of *n*-hexane and toluene as the eluant. Materials eluted with 0 and 5% toluene (3.3 mg) were purified by preparative HPLC using a YMC Carotenoid column (solvent, 90% MeOH-10% H₂O; flow rate, 1.0 ml/min; detection, 254 nm). Materials eluted at *R*_ts 10.6, 12.1 and 14.7 min were separately collected, partitioned three times with 10 ml of *n*-hexane, and the combined *n*-hexane layers were concentrated to give a mixture (1.4 μg) of **8** and **9**, **6** (0.3 mg) and **7** (0.4 mg), respectively. 2*E*,4*E*,6*E*-allofarnesene (**7**). Colorless oil; UV: λ_{max} (*n*-hexane) nm: 265 (shoulder), 275, 285; GC-EIMS (*R*_t 12.9 min) 70 eV *m/z* (rel. int.): 204 [M]⁺ (29), 135 (100), 120 (6), 119 (7), 107 (64), 105 (15), 93 (32), 91 (20), 79 (10), 77 (10), 69 (6), 55 (9); GC-HR-EIMS 70 eV: *m/z* 204.1881 (C₁₅H₂₄ requires *m/z* 204.1878); ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.61 (3H, *s*, H-13), 1.68 (3H, *s*, H-12), 1.74 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz, H-1), 1.78 (3H, *s*, H-15), 1.79 (3H, *s*, H-14), 2.09 (4H, *m*, H-8, 9), 5.12 (1H, *m*, H-10), 5.54 (1H, *q*, *J* = 7.0 Hz, H-2), 5.88 (1H, *d*, *J* = 10.7 Hz, H-6), 6.17 (1H, *d*, *J* = 15.3 Hz, H-4), 6.33 (1H, *dd*, *J* = 10.7, 15.3 Hz, H-5). For spectral data of **6**, see Miyaura et al. (1982).

3.9. Synthesis of **6** and **7**

At room temp., 1.0 M THF soln. of potassium *tert*-butoxide (1.2 ml, 1.2 mmol) was

added dropwise to a stirred suspension of ethyl triphenylphosphonium bromide (464 mg, 1.3 mmol) in 10 ml of THF under N₂. After 30 min stirring, *pseudo*-ionone (120 mg, 0.63 mmol) was added to the orange soln. The reactant mixture was stirred for 40 min at room temp. under N₂. To the mixture, 0.5 ml of distilled water was added and the soln. was stirred for 1 h at room temp. After the addition of another 50 ml of distilled water to the mixture, the soln. was partitioned three times with 20 ml of Et₂O. The organic layers were combined, washed with brine and distilled water, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to give yellow oil (592 mg). This oil was purified by AgNO₃-silica gel (1:20, 10 g) CC with mixtures of *n*-hexane and toluene as the eluant. Materials eluted with 20 and 30% toluene were concentrated to give compounds **6** (36 mg, 28% yield) and **7** (41 mg, 32% yield), respectively, as colorless oil. Compound **6**. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.1 (C-1), 16.9 (C-14), 17.7 (C-13), 20.5 (C-15), 25.7 (C-12), 26.7 (C-9), 40.2 (C-8), 124.0 (C-10), 124.2 (C-2), 125.1 (C-5), 125.7 (C-6), 127.5 (C-4), 131.7 (C-11), 133.3 (C-3), 139.0 (C-7). This is the first report of ¹³C NMR spectral data of **6**. Compound **7**. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 12.1 (C-15), 14.0 (C-1), 16.8 (C-14), 17.7 (C-13), 25.7 (C-12), 26.7 (C-9), 40.1 (C-8), 122.5 (C-5), 124.1 (C-10), 125.4 (C-6), 126.1 (C-2), 131.6 (C-11), 135.1 (C-3), 135.5 (C-4), 137.9 (C-7). This is the first report of ¹³C NMR spectral data of **7**. For other spectral data, see **7** isolated from *B. cinerea*.

3.10. Synthesis of **8** and **9**

In the same manner as that described for **6** and **7**, α-ionone (120 mg, 0.63 mmol) was reacted with ethyl triphenylphosphonium bromide (464 mg, 1.3 mmol) and potassium *tert*-butoxide (1.2 ml of 1.0 M THF soln., 1.2 mmol) in 10 ml of THF, and the reaction mixture was treated to give yellow oil (504 mg). This oil was subjected to AgNO₃-silica gel (1:20, 10 g) CC using mixtures of *n*-hexane and toluene as the eluant. Fractions eluted with 0.5% and 1-3% toluene were concentrated to give **8** (53 mg, 41% yield) and **9** (9.9 mg, 7.7% yield), respectively. Compound **8** (2*Z*,4*E*-5-(2',6',6'-trimethyl-2'-cyclohexene-1'-yl)-3-methyl-2,4-pentadiene). Colorless oil; UV: λ_{max} (*n*-hexane) nm (log ε): 239 (4.41); IR: ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3030, 2960, 2915, 2855, 1470, 1455, 1435, 1375, 1365, 965, 820; GC-HR-EIMS 70 eV: *m/z* 204.1875 (C₁₅H₂₄ requires *m/z* 204.1878); ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.82 (3H, *s*, H-9'), 0.91 (3H, *s*, H-8'), 1.19 (1H, *dt*, *J* = 5.0, 13.1 Hz, H-5'), 1.46 (1H, *dt*, *J* = 7.9, 13.1 Hz, H-5'), 1.60 (3H, *d*, *J* = 1.4 Hz, H-7'), 1.73 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz, H-1), 1.79 (3H, *br.s*, H-6), 2.01 (2H, *br.s*, H-4'), 2.18 (1H, *d*, *J* = 9.5 Hz, H-1'), 5.33 (1H, *q*, *J* = 7.0 Hz, H-2), 5.41 (1H, *br.s*, H-3'), 5.45 (1H, *dd*, *J* =

9.5, 15.4 Hz, H-5), 6.41 (1H, *d*, $J = 15.4$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 13.0 (C-1), 20.8 (C-6), 23.0 (C-7'), 23.1 (C-4'), 27.1 (C-8'), 27.6 (C-9'), 31.8 (C-5'), 32.2 (C-6'), 55.1 (C-1'), 120.6 (C-3'), 122.6 (C-2), 128.2 (C-4), 131.1 (C-5), 132.8 (C-3), 134.5 (C-2'). For GC-EIMS, see **8** isolated from *B. cinerea*. Compound **9** (2*E*,4*E*-5-(2',6',6'-trimethyl-2'-cyclohexene-1'-yl)-3-methyl-2,4-pentadiene). Colorless oil; UV: λ_{max} (*n*-hexane) nm (log ϵ): 236 (4.37); IR: ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3030, 2960, 2920, 2855, 1470, 1455, 1435, 1385, 1360, 965, 820; GC-HR-EIMS 70 eV: m/z 204.1874 ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ requires m/z 204.1878); ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.81 (3H, *s*, H-9'), 0.89 (3H, *s*, H-8'), 1.17 (1H, *dt*, $J = 4.9, 13.1$ Hz, H-5'), 1.44 (1H, *dt*, $J = 7.9, 13.1$ Hz, H-5'), 1.60 (3H, *d*, $J = 1.2$ Hz, H-7'), 1.71 (3H, H-1, overlapped with H-6 signal), 1.72 (3H, H-6, overlapped with H-1 signal), 2.00 (2H, *br.s*, H-4'), 2.12 (1H, *d*, $J = 9.5$ Hz, H-1'), 5.33 (1H, *dd*, $J = 9.5, 15.4$ Hz, H-5), 5.38 (1H, *br.s*, H-3'), 5.47 (1H, *q*, $J = 6.6$ Hz, H-2), 6.02 (1H, *d*, $J = 15.4$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 12.2 (C-6), 13.7 (C-1), 23.0 (C-7'), 23.1 (C-4'), 27.0 (C-8'), 27.6 (C-9'), 31.8 (C-5'), 32.3 (C-6'), 54.6 (C-1'), 120.5 (C-3'), 124.6 (C-2), 128.0 (C-5), 134.5 (C-3), 134.8 (C-2'), 136.0 (C-4). For GC-EIMS, see **9** isolated from *B. cinerea*.

3.11. Synthesis of [2- ^{13}C]-3, 6, 7 and 8

Triphenylphosphine (1.8 g, 6.9 mmol) was suspended in [1- ^{13}C]bromoethane (1.0 g, 9.2 mmol) and this suspension was heated at 120°C for 12 h. The resulting colorless solid was washed with benzene and then dissolved in distilled water. The aqueous soln. was evaporated and the remaining colorless solid was dried at 100°C overnight to give [1- ^{13}C]ethyl triphenylphosphonium bromide (2.4 g, 95% yield). In the same manner as that described for synthesis of **6**, **7**, **8** and **9**, α -ionone or *pseudo*-ionone were reacted with [1- ^{13}C]ethyl triphenylphosphonium bromide and potassium *tert*-butoxide in THF to give [2- ^{13}C]-**6**, **7**, **8** and **9**. The ^{13}C contents of these compounds were calculated from the relative intensities of the molecular ions in their mass spectra to be 99%. [2- ^{13}C]-**6**: GC-EIMS (R_t 12.3 min) 70 eV: m/z (rel. int.): 205 [M] $^+$ (30), 136 (100), 120 (7), 108 (51), 94 (24), 80 (6), 69 (8), 55 (5). [2- ^{13}C]-**7**: GC-EIMS (R_t 13.1 min) 70 eV: m/z (rel. int.): 205 [M] $^+$ (30), 136 (100), 120 (7), 108 (51), 94 (24), 80 (6), 69 (7), 55 (5). [2- ^{13}C]-**8**: GC-EIMS (R_t 6.8 min) 70 eV: m/z (rel. int.): 205 [M] $^+$ (21), 149 [$\text{M}-56$] $^+$ (100), 134 (86), 120 (14), 107 (22), 92 (17), 70 (5), 55 (8). [2- ^{13}C]-**9**: GC-EIMS (R_t 7.6 min) 70 eV: m/z (rel. int.): 205 [M] $^+$ (21), 149 [$\text{M}-56$] $^+$ (100), 134 (80), 120 (13), 107 (19), 92 (15), 70 (5), 55 (7).

3.12. Feeding of 2-¹³C labeled 6, 7, 8 and 9 to *B. cinerea*

B. cinerea was statically cultured with four 300 ml-sized flasks, each containing 50 ml of potato-dextrose medium at 23°C in the dark for 8 days. Following decantation of the medium, the mycelia were washed three times with sterile water. Fifty ml of Czapek-Dox medium and 0.5 mg of [2-¹³C]-6 in 50 µl EtOH were added to the mycelia in the flasks, and this culture was incubated at 23°C in the dark for 7 days. The mycelia and medium were separated by filtration. The medium was acidified to pH 3.0 with 25% H₃PO₄, and then partitioned three times with 100 ml of EtOAc. The EtOAc layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to give orange oil (75 mg). This oil was subjected to silica gel CC and the HPLC method in the same manner as that described for the labeling experiment with ¹⁸O₂ to give ABA (6.4 mg) and 5 (0.5 mg). Each compound was methylated and analyzed by ¹H, ¹³C NMR and GC-EIMS. The optical purity of ABA was calculated from peak areas in HPLC with a Daicel Chiralcel OD column (solvent, 80% *n*-hexane-20% 2-PrOH-0.1% HOAc; flow rate, 1.0 ml/min; detection, 254 nm). (+)- and (-)-ABA were eluted at *R*_ts 6.1 and 7.7 min, respectively. The mycelia (49 g) were washed with distilled water, homogenized in 30 ml of MeOH with sea sand, and extracted with 100 ml of an EtOAc-MeOH (1:1) soln. The extract was concentrated and 50 ml of distilled water was added to the residue. This soln. was partitioned with 20 ml of EtOAc three times, and organic layers were combined, washed with distilled water, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The resulted brown oil (75 mg) was subjected to silica gel (5.0 g) CC with a mixture of *n*-hexane and toluene as the eluant. Materials eluted with 0-5% toluene containing compounds 7, 8 and 9 were analyzed by GC-EIMS. The incorporation ratio was calculated using the following equation: Incorporation ratio (% of compound biosynthesized from administrated substrate) = AM/B x 100; A = % of ¹³C abundance of compound - 1.1 (% of natural abundance of ¹³C), M = mol compound isolated, and B = mol substrate fed x 0.99 (% of ¹³C-isotopic abundance of administrated substrate). ¹³C-Isotopic abundance of C-2 of ABA and 5 was evaluated by their ¹³C NMR spectra (Hirai et al., 2000), and those of 6, 7, 8 and 9 were calculated from their EIMS.

Compounds [2-¹³C]-7, 8 and 9 were added to the mycelia in four, eight and three flasks, respectively, and cultured in the same manner as that for [2-¹³C]-6. ABA and compound 5, and compounds 6, 7, 8 and 9 were purified from the media and mycelia, respectively, analyzed by GC-EIMS, and the incorporation ratio was calculated as

described above.

Acknowledgement

The authors thank Dr. Hirotaka Yamamoto of Japan NUS Co., Ltd. for his valuable discussion and advice throughout the research, and Professor Takashi Maoka of Kyoto Pharmaceutical Science University for his suggestions regarding spectral analysis of carotenoids. This work was supported by a grant-in-aid, No. 14360065, from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, and in part by COE for Microbial-Process Development Pioneering Future Production Systems (COE program of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan).

References

- Bennett, R. D., Norman, S. M., Maier, V. P., 1984. Biosynthesis of abscisic acid from farnesol derivatives in *Cercospora rosicola*. *Phytochemistry* 23, 1913-1915.
- Bennett, R. D., Norman, S. M., Maier, V. P., 1990. Intermediate steps in the biosynthesis of abscisic acid from farnesyl pyrophosphate in *Cercospora rosicola*. *Phytochemistry* 29, 3473-3477.
- Biemann, K., 1962. "Mass Spectrometry: Organic Chemical Applications," McGraw-Hill, New York.
- Britton, G., Goodwin, T. W., Harriman, G. E., Lockley, W. J. S., 1977. Carotenoids of the ladybird beetle, *Coccinella septempunctata*. *Insect Biochem.* 7, 337-345.
- Creelman R. A., Zeevaart, J. A. D., 1984. Incorporation of oxygen into abscisic acid and phaseic acid from molecular oxygen. *Plant Physiol.* 75, 166-169.
- Ebenezer, W. J., Pattenden, G., 1993. *cis*-Stereoisomer of β -carotene and its congeners in the alga *Dunaliella bardawil*, and their biogenetic interrelationships. *J. Chem. Soc. Perkin trans. I*, 1869-1873.
- Gray, R. T., Mallaby, R., Ryback, G., Williams, V. P., 1974. Mass spectra of methyl abscisate and isotopically labeled analogues. *J. Chem. Soc., Perkin trans. II*, 919-924.
- Hartung, W., Gimmler, H., 1994. VII. A stress physiological role for abscisic acid (ABA) in lower plants. *Prog. Bot.* 55, 157-173.
- Hirai, N., Okamoto, M., Koshimizu, K., 1986. The 1',4'-*trans*-diol of abscisic acid, a possible precursor of abscisic acid in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 25, 1865-

1868.

- Hirai, N., Yoshida, R., Todoroki, Y., Ohigashi, H., 2000a. Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1448-1458.
- Hirai, N., Okamoto, M., Fujimura, M., Ichiyama, T., Todoroki, Y., Ohigashi, H., Takeda, N., Yoshizumi, H., Tatematsu, A., 2000b. Mechanism of formation of dehydrated ions from abscisic acid and its 1',4'-diol methyl esters in electron impact ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. J.*, 48, 8-22.
- Holmberg-Betsholtz, I., Lund, E., Björkhem, I., Wikvall, K., 1993. Sterol 27-hydroxylase in bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268, 11079-11085.
- Hose, S., Zänglein, A., Berg, T. V. D., Schultze, W., Kubeczka, K.-H., Czygan, F.-C., 1997. Ontogenetic variation of the essential leaf oil of *Melissa officinalis* L. *Pharmazie* 52, 247-253.
- Kato, T., Oritani, T., Yamashita, K., 1987. Metabolism of (2Z,4E)- γ -ionylideneethanol and (2Z,4E)- γ -ionylideneacetic acid in *Cercospora cruenta*. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2695-2699.
- Kettner, J., Dörffling, K., 1995. Biosynthesis and metabolism of abscisic acid in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Planta* 196, 627-634.
- Lanzon, A., Albi, T., Cert, A., Gracian, J., 1994. The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 71, 285-291.
- Leung, J., Giraudat, J., 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 49, 199-222.
- Miyaura, N., Sugimoto, H., Suzuki, A., 1982. Stereospecific synthesis of (2Z,4E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,4,6,10-dodecatetraene [*trans*(C₁₀)-allofarnesene]. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 55, 2221-2223
- Neill, S. J., Horgan, R., Walton, D. C., Mercer, C. A. M., 1987. The metabolism of α -ionylidene compounds by *Cercospora rosicola*. *Phytochemistry* 26, 2515-2519.
- Norman, S. M., 1991. β -Carotene from the abscisic acid producing strain of *Cercospora rosicola*. *Plant Growth Regul.* 10, 103-108.
- Oritani, T., Niitsu, M., Kato, T., Yamashita, K., 1985. Isolation of (2Z,4E)- γ -ionylideneethanol from *Cercospora cruenta*, a fungus producing (+)-abscisic acid. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2819-2822.
- Sakai, T., Hirose, Y., 1969. Farnesenes isolated from the volatile oil of *Perilla frutescens f. viridis* Makino. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 42, 3615.
- Schwartz, S. H., Qin, X., Zeevaart, J. A. D., 2003. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, gene, and enzymes. *Plant Physiol.* 131, 1591-1601.
- Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y., Koshihara, T., 2000a.

- Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. J* 23, 481-488.
- Seo, M., Peeters, A. J. M., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J. A. D., Koornneef, M., Kamiya, Y., Koshiya, T., 2000b. The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12908-12913.
- Yamamoto, H., Oritani, T., 1997. Incorporation of farnesyl pyrophosphate derivatives into abscisic acid and its biosynthetic intermediates in *Cercospora cruenta*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 821-824.
- Yamamoto, H., Inomata, M., Tsuchiya, S., Nakamura, M., Uchiyama, T., Oritani, T., 2000. Early biosynthetic pathway to abscisic acid in *Cercospora cruenta*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2075-2082.
- Yamamoto, H., Inomata, M., Uchiyama, T., Oritani, T., 2001. Identification of 2,3-dihydro- γ -ionylideneethanol in *Cercospora cruenta*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 810-816.
- Zeevaart, J. A. D., Heath, T. G., Gage, D. A., 1989. Evidence for a universal pathway of abscisic acid biosynthesis in higher plants from ^{18}O incorporation patterns. *Plant Physiol.* 91, 1594-1601.

Figure Legends

Fig. 1. Outline of ABA biosynthetic pathway.

Fig. 2. The direct pathway *via* ionylideneethane for ABA biosynthesis in *B. cinerea*. Bold arrows show the pathway confirmed by the feeding experiments. The oxygen atoms with an asterisk are derived from molecular oxygen.

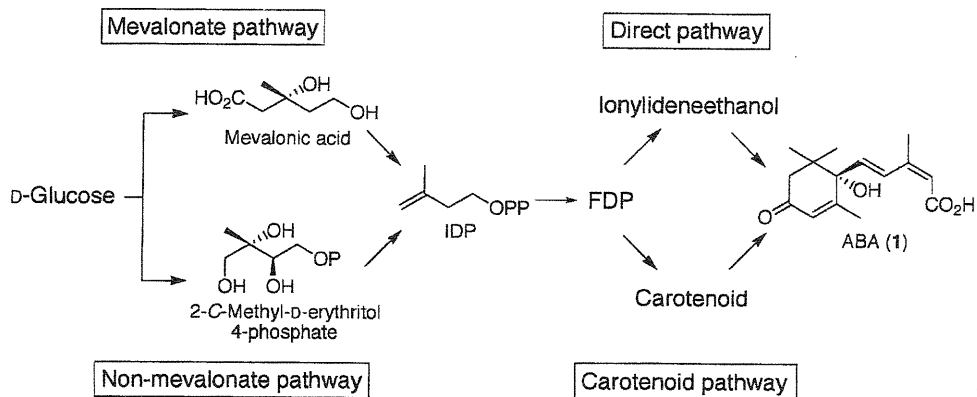


Fig. 1

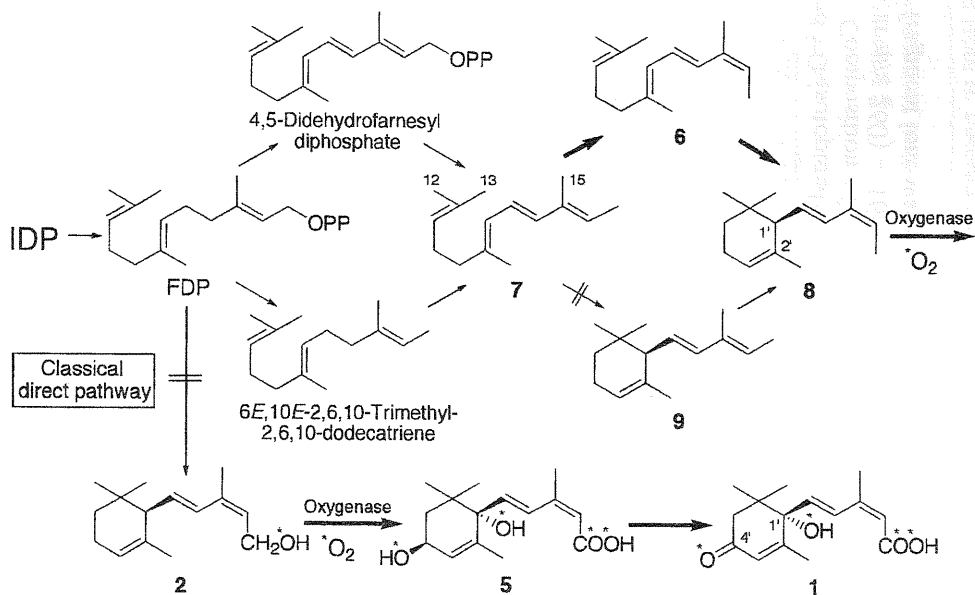
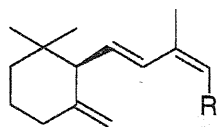


Fig. 2



3: R = CH₂OH

4: R = CHO

Chemical structure

Table 1. Relative intensities^{a)} and compositions^{b)} of molecular and major fragment ions of methyl esters of ABA isolated from *B. cinerea* cultured under ¹⁸O₂ or in H₂¹⁸O.

Methyl ester of non-labeled ABA				Methyl ester of [4 ¹⁻¹⁸ O]ABA				Methyl ester of ABA isolated from <i>B. cinerea</i> cultured under ¹⁸ O ₂				Methyl ester of ABA isolated from <i>B. cinerea</i> cultured in H ₂ ¹⁸ O			
<i>m/z</i>	ion species	rel. int. (%)	comp. (%)	<i>m/z</i>	ion species	rel. int. (%)	comp. (%)	<i>m/z</i>	ion species	rel. int. (%)	comp. (%)	<i>m/z</i>	ion species	rel. int. (%)	comp. (%)
278	[M] ⁺	2.2	100	280	[M+2] ⁺	2.1	84	284	[M+6] ⁺	0.9	17	280	[M+2] ⁺	1.4	82
				278	[M] ⁺	0.4	16	282	[M+4] ⁺	1.4	26	278	[M] ⁺	0.3	18
								280	[M+2] ⁺	1.8	34				
								278	[M] ⁺	1.2	23				
260	[M-H ₂ O] ⁺	4.8	100	262	[M+2-H ₂ O] ⁺	3.2	57 (68) ^{e)}	266	[M+6-H ₂ O] ⁺	0.6	5 (29) ^{e)}	262	[M+2-H ₂ O] ⁺	2.6	55 (67) ^{e)}
				260	[M+2-H ₂ ¹⁸ O] ⁺	2.4	27 (32) ^{e)}	264	[M+6-H ₂ ¹⁸ O] ⁺	2.6	12 (71) ^{e)}	260	[M+2-H ₂ ¹⁸ O] ⁺	2.1	27 (33) ^{e)}
					[M-H ₂ O] ⁺		16		[M+4-H ₂ O] ⁺		10		[M-H ₂ O] ⁺		18
								262	[M+4-H ₂ ¹⁸ O] ⁺	4.9	16				
									[M+2-H ₂ O] ⁺		25				
								260	[M+2-H ₂ ¹⁸ O] ⁺	3.8	9				
									[M-H ₂ O] ⁺		23				
162	[M-116] ⁺ ^{c)}	27.3	100	164	[M+2-116] ⁺	25.4	78	164	[M+6-120] ⁺	30.7	17	164	[M+2-116] ⁺	27.5	73
				162	[M-116] ⁺	7.1	22		[M+4-118] ⁺		29 ^{d)}	162	[M-116] ⁺	10.0	27
									[M+2-116] ⁺						
								162	[M+4-120] ⁺	36.4	31 ^{d)}				
									[M+2-118] ⁺						
									[M-116] ⁺		23				
125	[M-153] ⁺ ^{d)}	26.3	100	125	[M+2-155] ⁺	30.4	84	129	[M+6-155] ⁺	15.3	17	125	[M+2-155] ⁺	34.5	82
					[M-153] ⁺		16		[M+4-153] ⁺		3		[M-153] ⁺		18
								127	[M+4-155] ⁺	30.3	23				
									[M+2-153] ⁺		16				
								125	[M+2-155] ⁺	31.9	18				
									[M-153] ⁺		23				

^{a)} Relative intensities were corrected by natural ¹³C-, ²H- and ¹⁷O-isotopic abundance.

^{b)} Composition of relative intensities of each ion group. Composition of fragment ions [M+2-H₂¹⁸O]⁺ and [M-H₂O]⁺ at *m/z* 260 for [4¹⁻¹⁸O]ABA-Me were calculated as follows; 43% (total percent dehydrated ion at *m/z* 260) - 16% (percent [M]⁺ ion at *m/z* 278) = 27% (percent [M+2-H₂¹⁸O]⁺ ion); percent [M-H₂O]⁺ was identical to that [M]⁺ ion. Composition of other fragment ions was calculated by the same method as that described above.

^{c)} The fragment ion contains oxygen atoms at C-1' and -4'.

^{d)} The fragment ion contains two oxygen atoms at C-1.

^{e)} The values in parentheses show the ratio of compositions of dehydrated ions [M+2-H₂O]⁺ and [M+2-H₂¹⁸O]⁺, or [M+6-H₂O]⁺ and [M+6-H₂¹⁸O]⁺.

^{f)} The sum of compositions of fragment ions [M+4-118]⁺ and [M+2-116]⁺, or [M+4-120]⁺ and [M+2-118]⁺.

Table 2. Relative intensities^{a)} and compositions^{b)} of molecular and major fragment ions of methyl esters of compound **5** isolated from *B. cinerea* cultured under ¹⁸O₂ or in H₂¹⁸O.

	Methyl ester of non-labeled 5			Methyl ester of 5 isolated from <i>B. cinerea</i> cultured under ¹⁸ O ₂			Methyl ester of 5 isolated from <i>B. cinerea</i> cultured in H ₂ ¹⁸ O		
	<i>m/z</i>	rel. int. (%)	comp. (%)	<i>m/z</i>	rel. int. (%)	comp. (%)	<i>m/z</i>	rel. int. (%)	comp. (%)
Molecular ion	280	1.4	100	288	0.3	8	280	1.3	100
				286	0.7	19			
				284	0.9	24			
				282	1.0	27			
				280	0.8	22			
First dehydrated ion	262	27.4	100	268	8.1	15	262	19.9	100
				266	15.7	28			
				264	19.6	35			
				262	12.1	22			
Second dehydrated ion	244	21.7	100	248	14.7	29	244	17.4	100
				246	19.8	39			
				244	15.8	31			
[M-155] ⁺ ion ^{c)}	125	100.0	100	129	69.9	26	125	100.0	100
				127	99.7	37			
				125	98.5	37			

^{a)} Relative intensities were corrected by natural ¹³C-, ²H- and ¹⁷O-isotopic abundance.

^{b)} Composition of relative intensities of each ion group.

^{c)} The fragment ion contains two oxygen atoms at C-1.

Table 3. Incorporation of 2-¹³C labeled **6**, **7**, **8** and **9**

Products	Substrates			
	[2- ¹³ C]- 7	[2- ¹³ C]- 6	[2- ¹³ C]- 9	[2- ¹³ C]- 8
	I. R. ^{a)} (I. A. ^{b)}	I. R. (I. A.)	I. R. (I. A.)	I. R. (I. A.)
7	— ^{c)}	0.5 (82.1)	—	—
6	0.7 (85.3)	—	—	—
9	ND ^{d)}	ND	—	0.6 (100)
8	Trace (1.4)	ND	0.5 (65.1)	—
5	Trace (1.1)	Trace (1.1)	0.1 (1.3)	0.8 (4.4)
ABA	0.7 (1.2)	0.2 (1.2)	2.6 (1.3)	17.1 (4.2)

^{a)} Incorporation ratio (%)

^{b)} ¹³C-Isotopic abundance (%)

^{c)} Not tested

^{d)} Not detected

第二部 アブシシン酸生合成遺伝子のクローニング

川出 洋

1. 緒 言

本分担では、アブシシン酸 (ABA) を生産する糸状菌 *Botrytis cinerea* における ABA 生合成関連遺伝子のクローニングを目指した。最近の研究成果により、糸状菌における二次代謝物の生合成酵素遺伝子群が染色体上でクラスターを形成していることが示されてきた。分担研究者も、糸状菌における植物ホルモン・ジベレリンの生合成酵素遺伝子群が染色体 DNA 上でクラスターを形成していることを突き止めている。そこで、糸状菌由来のジベレリンと同様、ABA 生産菌における ABA 生合成関連遺伝子群もクラスターを形成していると考えた。

目的とする ABA 生合成酵素の遺伝子群を探索するうえで、その遺伝子クラスター内に存在する可能性が高いと考えられる酵素の候補として以下のものを考えた。

- (1) ABA 基本骨格を形成する環化酵素
- (2) ABA 骨格に分子状酸素を導入するモノオキシゲナーゼ

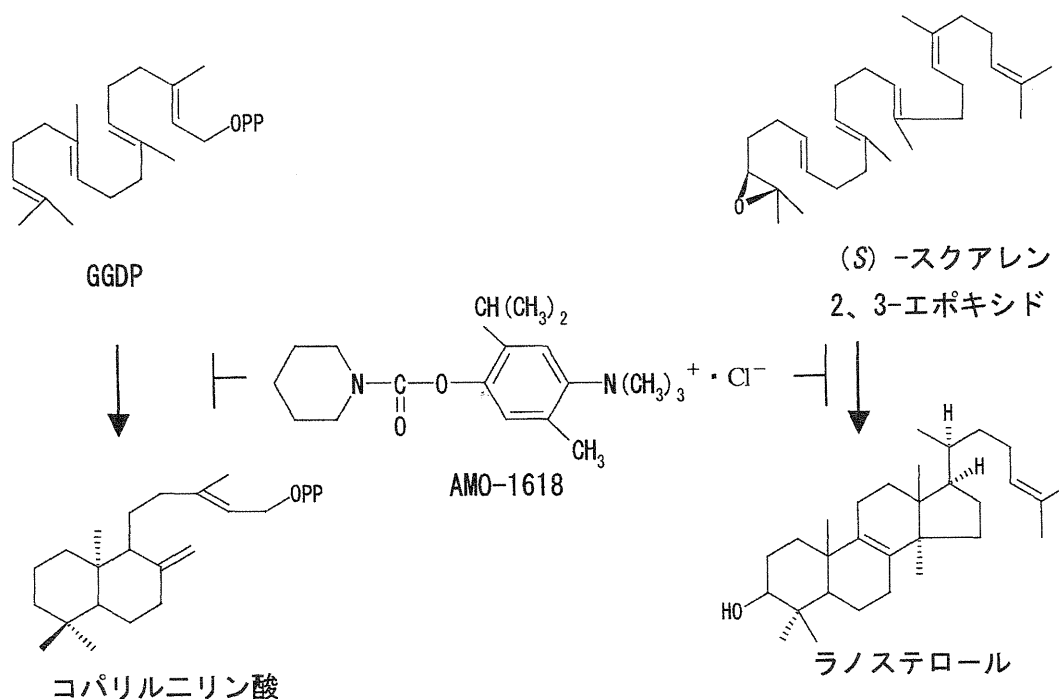
(1) に関しては、ABA 生合成過程における環化反応はプロトン付加型のテルペノイド環化酵素が機能していると考えた。現在までのところ、糸状菌由来のプロトン付加型の環化開始機構を持つ二次代謝系テルペノイド環化酵素のクローニングが行われているのは、ジベレリン生合成における多機能型 *ent*-カウレン合成酵素 (CPS/KS) が知られているのみである (Kawaide *et al.*, 1997, Toyomasu *et al.*, 2000)。CPS/KS は、植物におけるプロトン付加型テルペノイド環化酵素と同様にある種の環化酵素阻害剤に対して特異的に阻害を受ける。これらの環化酵素に共通するアミノ酸保存領域として、機能未知の SAYDTAW モチーフと触媒活性の中心の一部を構成するアスパラギン酸に富む DXDDTA モチーフが存在する。さらに、カロチノイド生合成過程における環化反応 (リコペン環化酵素) を阻害する薬剤・CPTA などが知られている。そこで、ABA 生合成過程で機能する環化酵素も既知のプロトン付加型環化酵素阻害剤で影響を受けるかどうかを調べ、その阻害活性とアミノ酸保存領域との関係から糸状菌 ABA 生合成関連の環化酵素遺伝子クローニングのための情報を得ることにした。

(2) に関しては、研究代表者の平井らの研究により、糸状菌 ABA の酸素原子の由来が分子状酸素による酸化酵素の関与を示していることから、ABA 骨格上の 3 つの官能基 (C1-カルボン酸、C1'-水酸基、C4'-カルボニル基) はテルペノイド生合成に見られる cytochrome P450 系モノオキシゲナーゼ (P450) 類の働きが推測さ

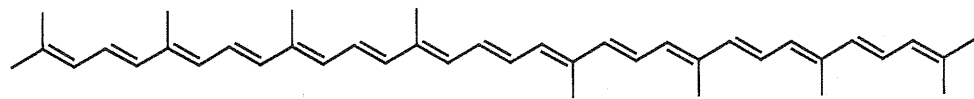
れた。そこで、これまで糸状菌からクローニングされているテルペノイド骨格に酸素添加反応を触媒する P450 のアミノ酸及びDNA配列情報をもとに縮重プライマーを設計し、ゲノムDNAを鋳型にしたPCR法により増幅してくる遺伝子断片を解析することにした。

2. 阻害剤添加によるABA生産菌におけるABA合成への影響

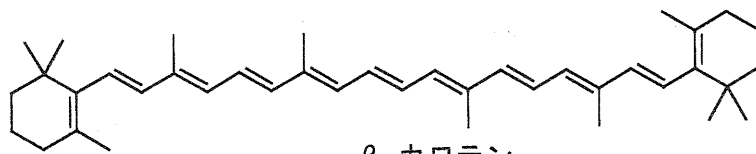
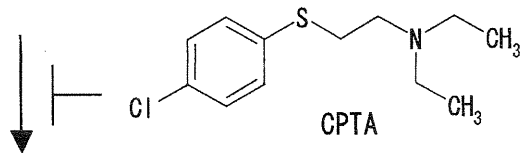
ABA合成において環化反応は必須な反応であり、これまでの研究成果で得られた直鎖状テルペノイド・2E-アロファルネセンから2Z- α -イオニリデンエタンの環化反応に着目した。この環化反応の開始機構はプロトン付加型環化酵素と考えられるので、現在までにこのタイプの環化酵素阻害剤として知られる阻害点・基質特異性の異なる3つの薬剤—AMO-1618、CPTA、FC-907—を添加し、ABA生産菌 *B. cinerea* および *C. cruenta* のABA生産への影響を調べることで、ABA合成経路についての解明の一助を目的とした。AMO-1618は4級アンモニウム塩であり、ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGDP) からコパリルニリン酸への変換だけでなく、(S)-スクアレン-2,3-エポキシドからラノステロールへの変換も阻害する (Barnes M. F. et al., 1969)。CPTAは3級アルキルアミノチオフェノール系化合物であり、リコペンから β -カロテンへの変換を特異的に阻害する (Schnurr G. et al., 1998)。FC-907は4級アンモニウム塩であり、GGDPからコパリルニリン酸への変換を阻害する (Hedden P. et al., 1977)。各薬剤の阻害点を下図に示した。



AMO-1618の阻害点

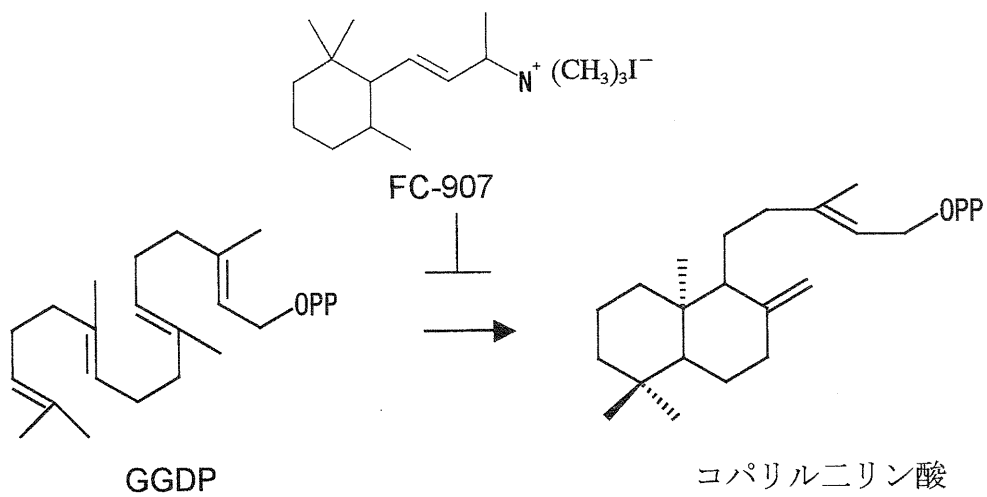


リコペン



β -カロテン

CPTAの阻害点



GGDP

コパリルニリン酸

FC-907の阻害点

また3種の阻害剤のうち入手ができないCPTAについては合成を行った。

2-1 材料と方法

使用菌株

B. cinerea (104 株) は名古屋大学より供与された 20 菌株から ABA 大量生産菌株として、選抜したものをを用いた。*C. cruenta* は研究代表者と同じ株を使用した。

薬剤

AMO-1618 ([2-isopropyl-4-(trimethylammoniochloride)-5-methylphenyl]-1-piperidinecarboxylate) は CALBIOCHEM 社から購入した。

CPTA (*N,N*-diethyl-*N*-[2-(4-chlorophenylthio)ethyl]amine) は、Schuetz らの方法によって合成した (Schuetz *et al.*, 1958)。

FC-907 (*N,N,N*-trimethyl-1-methyl-(2',6',6'-trimethylcyclohex-2-en-1-yl)prop-2-enylammoniumiodide) は理化学研究所植物科学研究センターの神谷勇治博士より供与されたものをを用いた。

CPTA の合成

2 首フラスコ (100mL 容) に NaOH を 2 g 入れ、milliQ 水 8 mL に溶解した。そこへ、*p*-クロロチオフェノールを 2.2 g (0.015 mol) 加え、還流する温度 (130°C) まで上昇させた。還流状態になったら、milliQ 水 10 mL に溶解したジエチルアミノ塩化エチル・HCl を 1 時間かけて滴下した。すべて滴下し終わってから、さらに 3 時間反応を続けた。黄色油状物が上層に現れ、反応液全体は透明になり、反応が終了した後にエーテル 40 mL で 2 回抽出した。エーテル層を 5% NaOH 5mL で 2 回洗浄した後、飽和食塩水 10 mL ずつで洗浄し、水層の pH が中性になるまで行った (5 回)。エーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、エーテル層を減圧濃縮した。得られた油状物質を少量取り、クロロホルムで溶解後、真空デシケーターで乾固した。合成したものは、NMR により構造を確認した。

ABA 生産菌の培養

2 倍 PDA 培地 (PD broth 濃度を 4.8 重量%にした培地) 10 mL をシャーレ (内径 60 mm) にまき、培地が固まらないうちにメタノールで溶かした薬剤を 10 μ L 添加した。その後、固まった各培地上に菌体 (*B. cinerea*, *C. cruenta*) の菌糸懸濁液を 2 mL ずつまき、26°C の暗黒下で培養した。また薬剤のコントロールとしてメタノールを用いた。

ABA の抽出および精製

B. cinerea の菌体と培地を合わせ、アセトン 100 ml を加えて 3 日間室温、暗黒下で浸漬抽出した。その抽出溶液を吸引ろ過、減圧濃縮後、酸性条件下で酢酸エチル (8 mL \times 2) を加えて液々分配した。酢酸エチル層を洗浄・脱水し、減圧濃縮して酢酸エチル可溶中酸性画分を得た。得られた酢酸エチル可溶中酸性画分を VARIAN BOND ELUT C₁₈ (固

相量 200 mg、50% MeOH aq) で精製した。

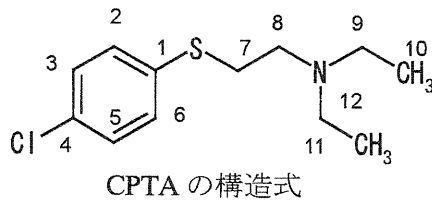
逆相 HPLC による ABA の定量

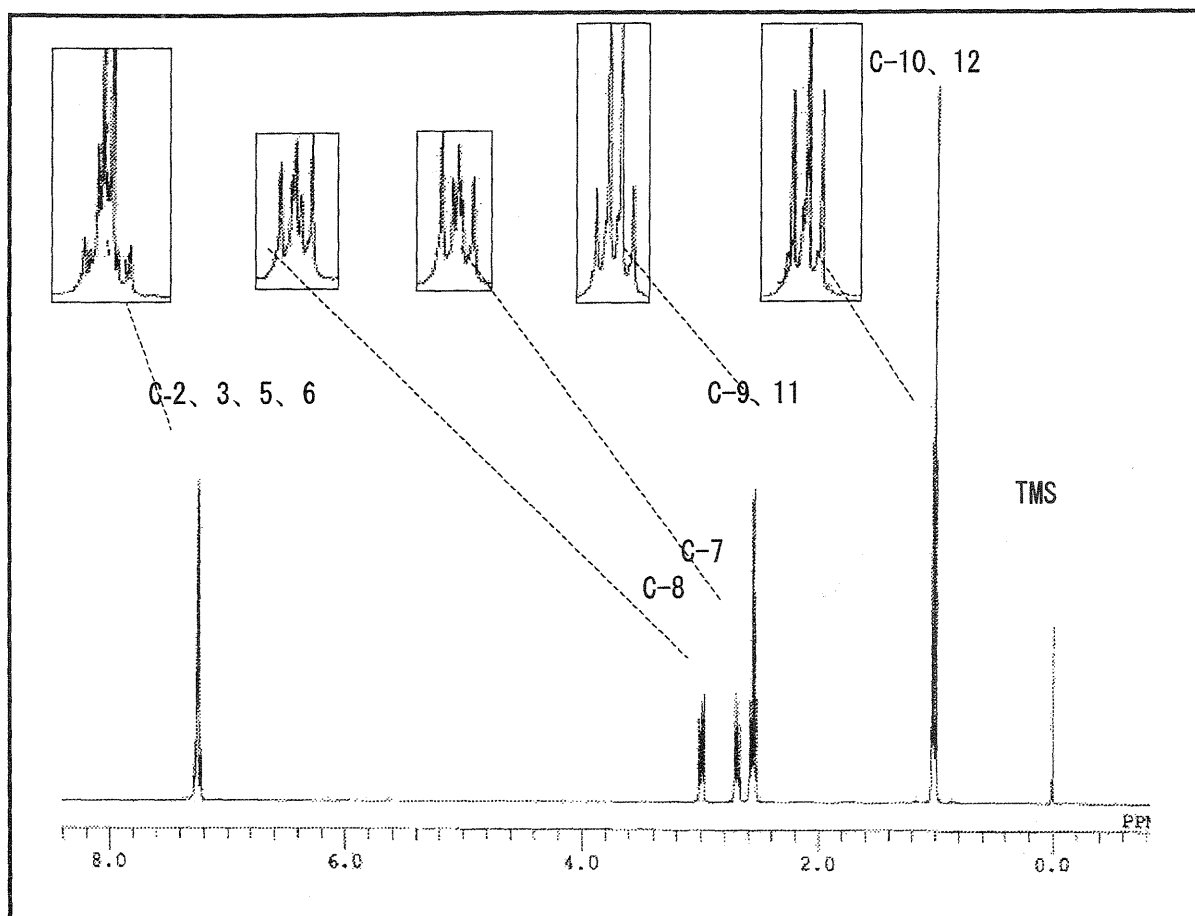
固相抽出により得られた粗精製物を HPLC にかけて、ABA を定量した。カラムに CAPSELL PAK C₁₈ (SHISEIDO、Φ4.6 mm×250 mm) を使用し、検出波長を 254 nm、流速を 1 mL/min とした。移動相は 0.05% 酢酸を含むメタノール溶液を用い、高圧グラディエント法により 20%~80%メタノール溶液までの範囲で溶出した。

2-2 結果および考察

CPTA の NMR 分析

合成した CPTA の一部を重クロロホルム (0.3% TMS 含) に溶解して、¹H-NMR を測定した (400 MHz、積算回数 16 回)。NMR δ_H (CDCl₃) : δ 1.01 (6H, t, 7.1 Hz, C-10 and 12), 2.56 (4H, q, 7.2 Hz, C-9 and 11), 2.69 (2H, t, 7.6 Hz, C-7), 2.99 (2H, t, 7.6 Hz, C-8), 7.25 (4H, d, 13.4 Hz, C-2, 3, 5 and 6) . CPTA の構造式と ¹H-NMR スペクトルを示す。





CPTA の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

ABA生産菌への阻害剤の効果

プロトン付加環化型酵素の阻害点・基質特異性の異なる3種類の薬剤(AMO-1618、CPTA、FC-907)をメタノールに溶解し、終濃度を 10^3 M 、 10^4 M になるように調整した6種類の2倍PDA培地10 mLと、コントロールとしてメタノールを添加した2倍PDA培地10 mLの計7種類の培地を用いて、各ABA生産菌を 26°C 、暗黒下で培養した。コントロールと各薬剤 10^4 M の *B. cinerea* は、培養4日目に培地一面に菌体が生育したが、 10^3 M では菌体が均一に生育せず、生育阻害が見られた。そこで、培養4日目のコントロールと各薬剤 10^4 M の各培養物(菌体と培地)から得られた抽出物中のABA量を逆相HPLCで定量した。

その結果、コントロールと各薬剤処理区とのABA生産量の差は認められなかった。 10^3 M では菌体の生育阻害が見られたことから薬剤の濃度の問題ではなく、*B. cinerea* のABA生合成の環化に関与する酵素は、上記の3つの薬剤では阻害されず、例えばカウレン合成酵素やリコペン環化酵素のようなプロトン付加型環化酵素との構造上の類似性が低いと考えられた。

Table 1 各薬剤 10^{-4} M 処理 4 日間培養した *B. cinerea* の ABA 量

培養条件	ABA 量 (mg/mL)
Control	0.31
AMO-1618 10^{-4} M	0.30
CPTA 10^{-4} M	0.31
FC-907 10^{-4} M	0.29

同様に、*C. cruenta* についても実験を行った。コントロールと各薬剤 10^{-4} M の *C. cruenta* は、培養 6 日目に培地一面に菌体が生育したが、 10^{-3} M では均一に菌体が生育しておらず、生育阻害が見られた。培養 6 日目のコントロールと各薬剤 10^{-4} M の培養物中の ABA 量を調べたところ、コントロールと各薬剤処理区との ABA 生産量の差は、認められなかった。*C. cruenta* も ABA 生合成に関与する酵素は、上記の 3 つの薬剤では阻害されないと示唆された。また、*C. cruenta* は *B. cinerea* と異なり、カロチノイドを経て ABA を合成する可能性が示唆されていたが (Yamamoto *et al.*, 2000)、近年イオニリデンエタンを経由する直接経路で ABA を合成することが提唱されており (Inomata *et al.*, 2003b)、本研究の結果は後者の直接経路を支持するとも考えられる。

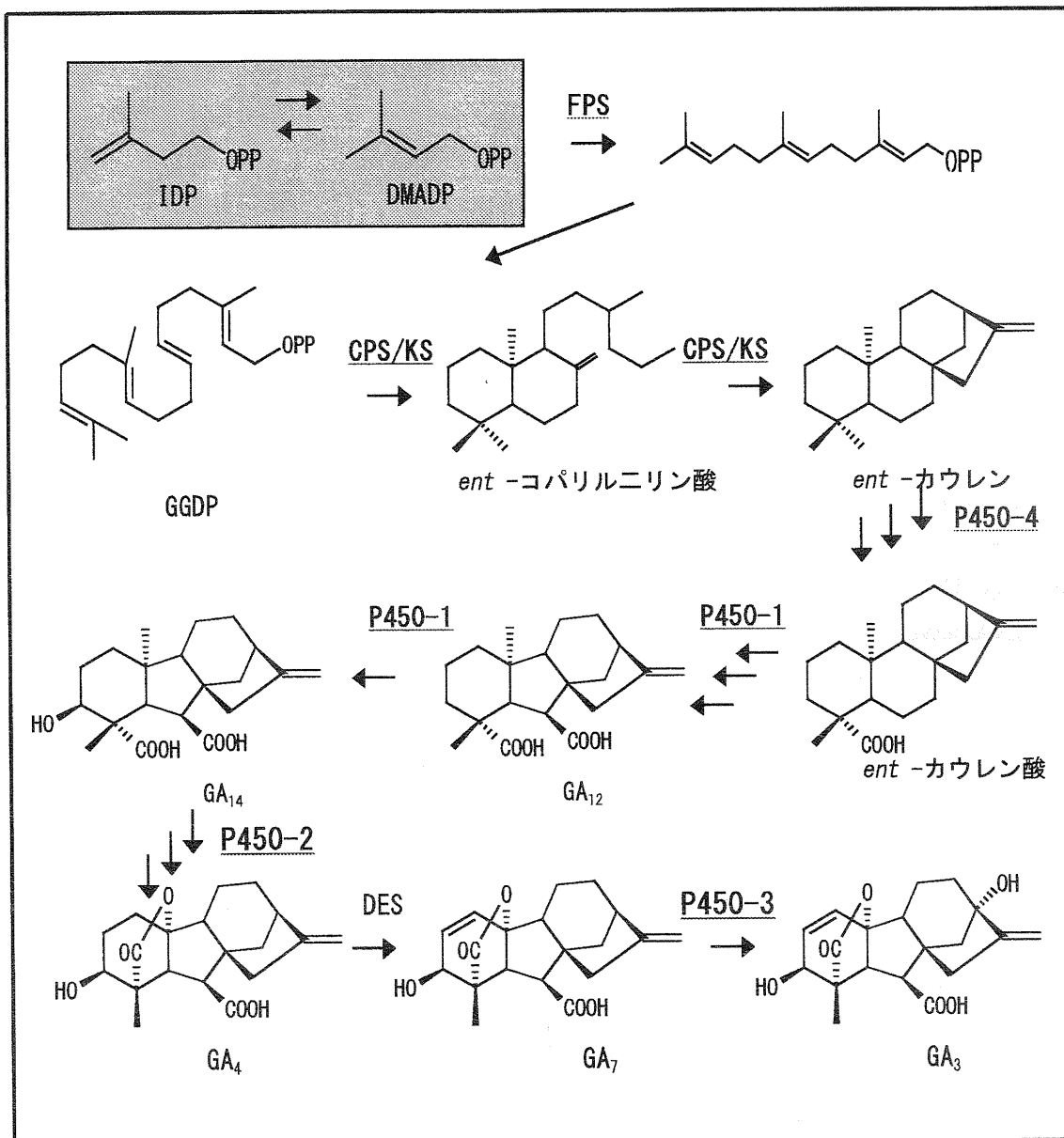
Table 2 各薬剤 10^{-4} M 添加後、6 日間培養した *C. cruenta* の ABA 量

培養条件	ABA 量 (μ g/mL)
Control	0.46
AMO-1618 10^{-4} M	0.44
CPTA 10^{-4} M	0.45
FC-907 10^{-4} M	0.48

3. *B. cinerea* ゲノムDNAからのABA生合成遺伝子クローニング

近年の分子生物学や遺伝子工学の進歩により、植物や微生物の二次代謝物生合成について分子レベルで解析が進められるようになってきた。現在、真核微生物における二次代謝産物の研究として、*Aspergillus* 属菌の生産するポリケタイド系マイコトキシン・アフラトキシンや *Fusarium* 属菌の生産するテルペノイド系マイコトキシン・トリコセセンなどは、その生合成遺伝子群がゲノム DNA 上でクラスター構造をとっていることが証明されている。さらに糸状菌の生産する植物ホルモンも、その生合成遺伝子群がクラスターを形成していることが最近になり明らかにされ、*Gibberella fujikuroi* や植物類似の生合成経路をもつジベレリン生産菌 *Phaeosphaeria* sp. L487 株でもジベレリン生合成酵素遺伝子群のクラスターが明らかにされた (Tudzynski *et al.*, 1998, Kawaide *et al.*, 2000)。ABA を生産する糸状菌類においても、その生合成酵素遺伝子群はクラスター構造をとっていると考えられる。そこで、ABA 生合成酵素の候補となりうるいくつかの代表的な酵素をターゲットとし、ゲノム DNA を鋳型にして homology-based PCR 法から遺伝子断片の取得を試みた。

テルペノイドは鎖長延長酵素、環化酵素、酸素添加酵素、その他の修飾酵素群によって複雑かつ多彩な構造を持つ。環化酵素は、第 2 章の実験によりプロトン付加型の環化酵素阻害剤で阻害を受けなかったことから、既知のテルペノイド環化酵素の構造とは異なる可能性が考えられた。そこで、テルペノイド骨格に酸素添加する P450 系酸化酵素をターゲット遺伝子とし、コントロールとしてファルネシルニリン酸合成酵素 (FPS) および GA 生産菌等で用いた *ent*-カウレン合成酵素 (CPS/KS) を用いた。



P450、FPS、CPS/KS の触媒する反応例

3-1 材料と方法

ゲノム DNA の調製

B. cinerea をポテトデキストロース液体培地で 28°C、8 日間振盪培養し、菌体をろ過して集め、直ちに液体窒素で凍結させた。凍結菌体 1 グラムをサンプリングし、EASY-DNA isolation kit (Invitrogen 社製) のプロトコールにしたがってゲノム DNA を調製した。DNA

濃度として 1.58 mg/mL を得、アガロース電気泳動で高分子量 DNA のチェックを行った。

P450 遺伝子クローニング用プライマー設計

糸状菌由来のテルペノイド骨格への酸素添加反応を触媒するものから選択し、アミノ酸配列のアライメントから縮重プライマーを設計した。

- ・フォワードプライマー (P450Fwd) :

5'-CC(C/T)GAI(C/T)T(C/T)ATCGA(A/G)CC(A/T)CT(G/T)CGTGATGA-3'

- ・リバースプライマー (P450rev) :

5'-TC(A/G)T(A/T)AG(A/C)(C/T)GCAAAGAACCGICCAGGGCA-3'

FPS 遺伝子クローニング用プライマー

真核生物間で高度に保存されているアミノ酸領域から縮重プライマーを設計した。

- ・フォワードプライマー (FPS fwd) :

5'-TT(C/T)(C/T)TIGTIGCIGA(C/T)GA(C/T)ATIATG-3'

(FLVADMM 領域)

- ・リバースプライマー (FPS rev) :

5'-TCIA(A/G)(A/G)TA(A/G)TC(A/G)TC(C/T)TGIAC(C/T)TG(A/G)AA-3'

(FQVQDDYL 領域)

CPS/KS 遺伝子クローニング用プライマーには、次の縮重プライマーを用いた。

- ・フォワードプライマー (CPS/KS fwd) :

5'-ATITA(C/T)GA(C/T)ACIGCITGGGTIGC-3'

(IYDTAWV 領域)

- ・リバースプライマー (CPS/KS rev) :

5'-(A/G)AAIGCCATIGCIGT(A/G)TC(A/G)TC-3'

(DDTAMAF 領域)

PCR 条件

PCR 酵素等は Expand Hi-Fi PCR kit (ロッシュ社製) を用いた。PCR 装置は、GeneAmp 2700 (ABI 社製) を用いた。PCR は 50 μ l の反応溶液とし、200 μ M dNTP、500 μ M primer、DNA 3 μ g、酵素 3.5 U を加えて行った。反応の温度条件は、95°C で3分間加熱した後、95°C (1 min)→50°C (1 min)→72°C (1 min)のサイクルを 35 回繰り返した。反応終了後、増幅された DNA をアガロース電気泳動で確認した。

DNA シークエンス

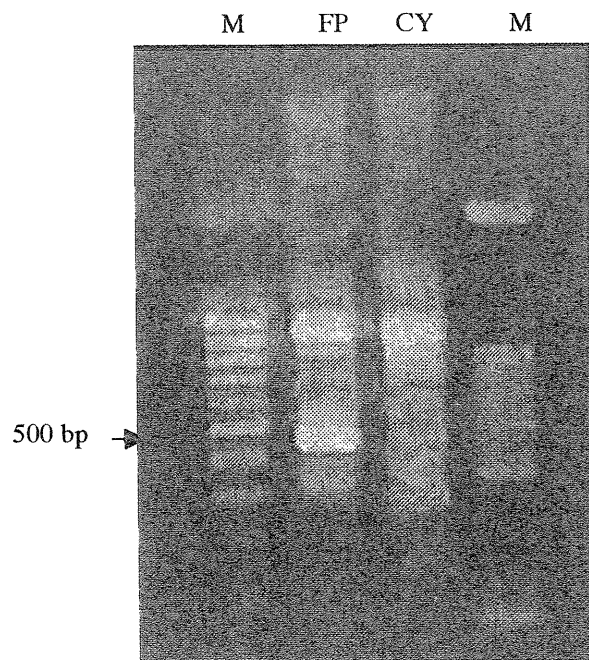
PCR 断片を pCR2.1 クローニングベクター (Invitrogen 社製) にライゲーションし、直ちに大腸菌 JM109 株を形質転換した。PCR により増幅された DNA 断片を含む形質

転換大腸菌 (24 株) をアンピシリン含有の LB 培地 (2 ml) で培養し、それぞれの菌体からプラスミドを調製した (Promega 社製 Wizard plasmid isolation kit)。DNA シークエンスは、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit (アマシャム社製) を用い、M-13-forward および M-13 reverse プライマーを用いてシークエンス用サンプルを調製した。サンプルは、ABI 社製 PRISM 377 Sequencer 装置と 48 cm のゲル板を使用し、10 時間泳動して解析した。

3-2 結果および考察

Homology-based PCR

B. cinerea のゲノム DNA を鋳型として各プライマーを用いて PCR を行った。アニーリング温度 50°C において FPS プライマーでは 450 bp 付近にバンドが得られた。これは、各種真核生物間でプライマー設計した FPS の保存領域の大きさとほぼ一致した。同じ PCR 条件において P450 プライマーを用いた場合には、単一なバンドではなく、いくつかのバンド (380 bp、450 bp、730-950 bp 付近) が増幅された (下図)。しかし、380 bp、730-950 bp 付近のバンドは、非特異的バンドの増幅を減らすためにアニーリング温度を高め設定したところ増幅されなかった (Data not shown)。一方、CPS/KS プライマーを用いたときには、DNA が全く増幅されなかった (Data not



P450 プライマーを用いた PCR により増幅された DNA
M1 : 100 bp ラダーマーカー、M2 : 50 bp ラダーマーカー

shown)。コントロールとして *G. fujikuroi* の DNA を鋳型にしたときには、*ent*-カウレン合成酵素が予想サイズ (850 bp 付近) に増えてきたことから、*B. cinerea* には GGDP を基質とするプロトン付加型のジテルペン環化酵素遺伝子が存在しない可能性が示唆された。すなわち、ABA 生合成における環化反応は、プロトン付加型でも糸状菌型 *ent*-カウレン合成酵素やジテルペン環化酵素とは構造の異なる環化酵素の可能性を示し、この推測は上述の環化酵素阻害剤の実験結果とも一致する。

増幅された DNA のシーケンス解析

PCR によって増幅された DNA 断片を TA クローニングベクター (pCR2.1) に組み込み、プラスミドを調製後、DNA シーケンス解析を行った。FPS 断片 24 コロニーからプラスミドを調製し、Dyeterminator 法により DNA 配列を解析した。

PCR で取得した *B. cinerea* FPS (BcFPS) 遺伝子断片は、441 bp で 148 アミノ酸をコードしていた。この領域にはイントロンを含んでおらず、BLASTP によるホモロジー検索の結果、*G. fujikuroi*、*Neurospora crassa*、*Craviceps sp.*等のデータベースに登録されている FPS と 80%以上の高い相同性があった。8 個の遺伝子断片を調べた結果、すべて同じ配列を持つものであり、今回のスクリーニングからはホモログの存在は確認できなかった。

TTC	TTG	GTG	GCG	GAT	GAT	ATG	ATG	GAC	AGC	AGC	ATC	ACT	CGT	CGT	GGT	CAA	CCT
<u>F</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>M</u>	<u>M</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>
TGT	TGG	TAC	AGA	CAG	CCA	GGT	GTT	GGT	ATG	ATC	GCT	ATC	AAC	GAC	GCT	TTC	CTC
C	W	Y	R	Q	P	G	V	G	M	I	A	I	N	D	A	F	L
CTC	GAA	GCC	GCG	ATC	TAC	TCT	TTA	TTG	AAG	AAA	TAC	TTC	CGC	TCT	CAC	CCT	TCC
L	E	A	A	I	Y	S	L	L	K	K	Y	F	R	S	H	P	S
TAC	CTT	GAT	CTC	ATC	GAA	CTC	TTC	CAC	GAA	GTT	ACA	TAC	CAG	ACA	GAA	CTT	GGT
Y	L	D	L	I	E	L	F	H	E	V	T	Y	Q	T	E	L	G
CAA	TTG	TGC	GAT	TTG	TTG	ACA	GCA	CCA	GAG	GAC	AAG	GTC	GAC	TTG	GAC	AAC	TTT
Q	L	C	D	L	L	T	A	P	E	D	K	V	D	L	D	N	F
TCT	ATG	ACC	AAG	TAT	GAC	TTC	ATT	GTC	ACA	TAC	AAG	ACT	GCT	TAT	TAT	TCC	TTC
S	M	T	K	Y	D	F	I	V	T	Y	K	T	A	Y	Y	S	F
TAC	CTT	CCT	GTC	GCC	CTC	GCA	CTT	CAC	CAC	CAG	AAT	ATC	GCG	ACT	CCA	AAG	AAT
Y	L	P	V	A	L	A	L	H	H	Q	N	I	A	T	P	K	N
CTT	AAG	CAA	GTC	GAA	GAT	ATC	TTG	ATT	CCG	CTT	GGC	CAA	TAT	TTC	CAA	GTC	CAG
L	K	Q	V	E	D	I	L	I	F	L	G	Q	Y	F	Q	V	Q
GAC	GAC	TAC	CTC	3'													
<u>D</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>														

クローニングされた *B. cinerea* 由来 FPS 遺伝子断片 (下線はプライマー領域)

1. >tr:Q8X0Y6 [Q8X0Y6] Farnesyl-pyrophosphate synthetase(FPPsynthetase)
(FPS) [*Neurospora crassa*] Length = 347

Score = 263 bits (672), Expect = 3e-70
Identities = 123/148 (83%), Positives = 139/148 (93%)

```
Query: 1   FLVADDMMDSITRRGQPCWYRQPGVGMIAINDAFLEAAIYSLKKYFRSHPSYLDLIE 60
          FLV+DD+MDSSITRRG+PCWYRQ  GVGM+AINDAF+LE+AIY+LLKKYFRSHP Y+D +E
Sbjct: 91  FLVSDDIMDSSITRRGKPCWYRQEGVGMVAINDAFMLES AIY TLLKKYFRSHPRYVDFLE 150

Query: 61  LFHEVTYQTELGQLCDLLTAPEDKVDLDNFSMTKYDFIVTYKTAYYSFYLPVALALHHQN 120
          LFHEVT+QTE+GQLCDLLTAPEDKVDLDNFSM KY FIV YKTAYYSFYLPVALA++ +
Sbjct: 151 LFHEVTFQTEMGQLCDLLTAPEDKVDLDNFSMDKYTFIVYIYKTAYYSFYLPVALAMYMLD 210

Query: 121 IATPKNLKQVEDILIPLGQYFQVQDDYL 148
          IATP+NLKQ EDILIPLG+YFQVQDDYL
Sbjct: 211 IATPENLKQAEDILIPLGEYFQVQDDYL 238
```

2. >sp:FPPS_GIBFU [Q92235] Farnesyl pyrophosphate synthetase (FPP
synthetase) (FPS) [*Gibberella fujikuroi*] Length = 347

Score = 264 bits (675), Expect = 2e-70
Identities = 124/148 (83%), Positives = 136/148 (91%)

```
Query: 1   FLVADDMMDSITRRGQPCWYRQPGVGMIAINDAFLEAAIYSLKKYFRSHPSYLDLIE 60
          FLV+DD+MDSSITRRGQPCWYRQ  GVGMIAINDAF+LE+AIY+LLKKYFRSHP+Y DLIE
Sbjct: 91  FLVSDDIMDSSITRRGQPCWYRQEGVGMIAINDAFMLES AIY TLLKKYFRSHPAYFDLIE 150

Query: 61  LFHEVTYQTELGQLCDLLTAPEDKVDLDNFSMTKYDFIVTYKTAYYSFYLPVALALHHQN 120
          FHE T+QTELGQLCDLLTAPED V+LDNFS+ KY FIV YKTAYYSFYLPVALALH N
Sbjct: 151 SEHETTFQTELGQLCDLLTAPEDNVNLDNFSLEKYSFIVYIYKTAYYSFYLPVALALHQLN 210

Query: 121 IATPKNLKQVEDILIPLGQYFQVQDDYL 148
          +ATP NLKQ EDILIPLG+YFQ+QDDYL
Sbjct: 211 LATPSNLKQAEDILIPLGEYFQIQDDYL 238
```

3. >pir:S71433 [S71433] farnesyl-pyrophosphate synthetase - ergot fungus (fragment) Length =
212

Score = 250 bits (639), Expect = 2e-66
Identities = 117/148 (79%), Positives = 133/148 (89%)

```
Query: 1   FLVADDMMDSITRRGQPCWYRQPGVGMIAINDAFLEAAIYSLKKYFRSHPSYLDLIE 60
          FLV+DD+MD SITRR +PCW+RQ  GVGMIAINDAFL+E+AIY+LLKKYFRSHP+Y+D++E
Sbjct: 44  FLVSDDIMDGSITRRRKPCWHRQDGVGMIAINDAFLIES AIY ALLKKYFRSHPAYVDMLE 103

Query: 61  LFHEVTYQTELGQLCDLLTAPEDKVDLDNFSMTKYDFIVTYKTAYYSFYLPVALALHHQN 120
          LFHE T+Q ELGQLCDL+T P DKVDL NFSM KY FIV YKTAYYSFYLPVALALH N
Sbjct: 104 LFHEATFQAEELGQLCDLITGPVDKVDLGNFSMDKYRFIVYIYKTAYYSFYLPVALALHQLN 163

Query: 121 IATPKNLKQVEDILIPLGQYFQVQDDYL 148
          +ATP+NLK EDILIPLG+YFQVQDDYL
Sbjct: 164 LATPRNLKVAEDILIPLGEYFQVQDDYL 191
```

4. >tr:Q92218 [Q92218] Farnesylpyrophosphate synthetase [*Claviceps purpurea*] Length = 211

Score = 250 bits (639), Expect = 2e-66
Identities = 117/148 (79%), Positives = 133/148 (89%)

Query: 1 FLVADDDMMSSITRRGQPCWYRQPGVGMIAINDAFLEAAIYSLKKYFRSHPSYLDLIE 60
FLV+DD+MD SITRR +PCW+RQ GVGMIAINDAFL+E+AIY+LLKKYFRSHP+Y+D++E
Sbjct: 44 FLVSDDIMDGSITRRRKPCWHRQDGVGMIAINDAFLIESAIYALLKKYFRSHPAYVDMLE 103

Query: 61 LFHEVTYQTELGQLCDLLTAPEDKVDLDNFSMTKYDFIVTYKTAYYSFYLPVALALHHQN 120
LFHE T+Q ELGQLCDL+T P DKVDL NFSM KY FIV YKTAYYSFYLPVALALH N
Sbjct: 104 LFHEATFQAEELGQLCDLITGPVVDKVDLGNFSMDKYRFIVTYKTAYYSFYLPVALALHQLN 163

Query: 121 IATPKNLKQVEDILIPLGQYFQVQDDYL 148
+ATP+NLK EDILIPLG+YFQVQDDYL
Sbjct: 164 LATPRNLKVAEDILIPLGEYFQVQDDYL 191

5. >tr:Q92334 [Q92334] Farnesylpyrophosphate synthetase [*Sphaceloma manihoticola*] Length = 212

Score = 238 bits (606), Expect = 2e-62
Identities = 112/148 (75%), Positives = 129/148 (87%)

Query: 1 FLVADDDMMSSITRRGQPCWYRQPGVGMIAINDAFLEAAIYSLKKYFRSHPSYLDLIE 60
FLV+DD+MDSS TRRG PCWY P VGM+AINDAF+LE +IY LLKKYFR Y+DLIE
Sbjct: 44 FLVSDDIMDSSKTRRGSPCWYLMQVGMVAINDAFMLETSIYLLKKYFRQSKHYVDLIE 103

Query: 61 LFHEVTYQTELGQLCDLLTAPEDKVDLDNFSMTKYDFIVTYKTAYYSFYLPVALALHHQN 120
LFHEV++QTE+GQ CDLLTAPEDKVDLDNFS+ KY FIV YKTA+YSFYLPVALAL++
Sbjct: 104 LFHEVSFQTEMGQCDLLTAPEDKVDLDNFSLEKYSFIVTYKTAFYSFYLPVALALYCE 163

Query: 121 IATPKNLKQVEDILIPLGQYFQVQDDYL 148
+AT KNLKQ +DILIP+G+YFQVQDDYL
Sbjct: 164 LATEKNLKQAKDILIPMGEYFQVQDDYL 191

6. >sp:FPPS_YEAST [P08524] Farnesyl pyrophosphate synthetase (FPP synthetase) (FPS) [*Saccharomyces cerevisiae*] Length = 352

Score = 228 bits (581), Expect = 1e-59
Identities = 108/148 (72%), Positives = 125/148 (84%)

Query: 1 FLVADDDMMSSITRRGQPCWYRQPGVGMIAINDAFLEAAIYSLKKYFRSHPSYLDLIE 60
FLVADDDMMD SITRRGQPCWY+ P VG IAINDAF+LEAAIY LLK +FR+ Y+D+ E
Sbjct: 96 FLVADDDMMKSIITRRGQPCWYKVEVGEIAINDAFMLEAAIYKLLKSHFRNEKYIIDITE 155

Query: 61 LFHEVTYQTELGQLCDLLTAPEDKVDLDNFSMTKYDFIVTYKTAYYSFYLPVALALHHQN 120
LFHEVT+QTELGQL DL+TAPEDKVDL FS+ K+ FIVT+KTAYYSFYLPVALA++
Sbjct: 156 LFHEVTFQTELGQLMDLITAPEDKVDLSKFSLEKHSFIVTFKTAYYSFYLPVALAMYVAG 215

Query: 121 IATPKNLKQVEDILIPLGQYFQVQDDYL 148
I K+LKQ D+LIPLG+YFQ+QDDYL
Sbjct: 216 ITDEKDLKQARDVLIPLGEYFQIQDDYL 243

B. cinerea P450 遺伝子断片

P450 断片 24 コロニーからプラスミドを調製し、Dyeterminator 法により DNA 配列を解析した。

P450 プライマーを用いたときの PCR 産物の DNA 解析では、43 bp の intron を含む 897 bp の断片 (BcP450-1) と、intron を含まない約 840 bp の断片 (BcP450-2) にチトクローム P450 モノオキシゲナーゼ様アミノ酸配列を持つことを確認した。これまで、データベース上における *B. cinerea* 由来 P450 遺伝子は、eburicol-14 α -demethylase が *Botryotinia fuckeliana* として登録されているが、今回発見した 2 つの BcP450-1 および BcP450-2 は、これとは全く異なる遺伝子であった。特に、BcP450-1 のアミノ酸配列は、BLASTP によるホモロジー検索の結果、テルペノイド骨格への酸素導入反応を触媒する *Phaeosphaeria* sp. L487 株や *G. fujikuroi* 由来の *ent*-カウレン酸化酵素、*Neurospora crassa* 由来の P450 などと高い相同性を持つ断片だった (Table 3)。また BcP450-2 のホモログについては現在解析中である。

平井らの研究によると、*B. cinerea* の ABA 生合成ではイオニリデンエタンを経由して合成される可能性が高く、その過程においてイオニリデンエタン骨格上に 3 ヶ所の酸素導入ステップがあると考えられている (Inomata *et al.*, 2003a)。今回発見できた BcP450-1 は、その 3 ヶ所の酸素導入ステップのうちの 1 つを触媒する可能性が持たれる。これまでの糸状菌二次代謝産物の生合成研究から、ABA 生合成に関与する遺伝子群がゲノム DNA 上でクラスターを形成していると仮定して、BcP450-1 遺伝子の近傍の DNA 配列を解析すると、*B. cinerea* における ABA 生合成酵素遺伝子の全容が解明できるかもしれない。今後は、ゲノム DNA ライブラリの構築と BcP450-1 をプローブにした陽性クローンのスクリーニング、およびプライマー歩行による BcP450-1 遺伝子付近の DNA 解析を行う予定である。

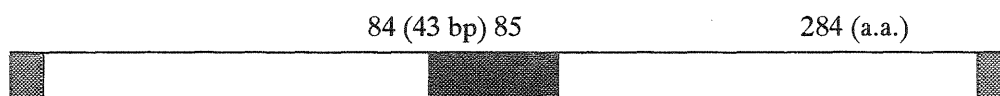


Fig. 17 BcP450-1 の構造

Table 3 BcP450-1 と他の菌由来酵素との相同性

菌	酵 素	Identities	Positives	Gaps
<i>Neurospora crassa</i>	Hypothetical protein	30%	48%	6%
<i>Coriolus versicolor</i>	チトクローム P450	27%	48%	6%
<i>Gibberella fujikuroi</i>	チトクローム P450	27%	44%	9%
<i>Penicillium paxilli</i>	チトクローム P450 モノオキシゲナーゼ	26%	45%	11%
<i>Gibberella fujikuroi</i>	チトクローム P450 モノオキシゲナーゼ	24%	44%	6%

引用・参考文献一覧

Barnes, M. F., Light, E. N., and Lang, A., Action of plant growth retardants on terpenoid biosynthesis. Inhibition of gibberellic acid production in *Fusarium moniliforme* by CCC and AMO-1618[[2-isopropyl-4-(trimethylammoniochloride)-5-methylphenyl]-1-piperidine-carboxylate]; action on sterol biosynthesis. *Planta*, **88**, 172-182 (1969).

Bowen, D. H., MacMillan, J., and Graebe, J. E., Determination of specific radioactivity of carbon-14 labeled compounds by mass spectroscopy. *Phytochemistry*, **11** (7), 2253-2257 (1972).

Hedden, P., Phinney, B. O., and MacMillan, J., Sponsel Valerie M., Metabolism of kaurenoids by *Gibberella fujikuroi* in the presence of the plant growth retardant, *N,N,N*-trimethyl-1-methyl-(2',6',6'-trimethylcyclo-hex-2'-en-1'-yl)prop-2-enylammonium iodide. *Phytochemistry*, **16** (12), 1913-1917 (1977).

Inomata, M., Hirai, N., Yoshida, R., Ohigashi, H., 糸状菌のアブシジン酸生合成における直接経路の可能性. 日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集, 114 (2003a).

Inomata, M., Hirai, N., Yoshida, R., Ohigashi, H., 糸状菌のアブシジン酸生合成経路—イオニリデンエタンを經由する新しい直接経路. 植物化学調節学会第 38 回大会研究発表記録集, **38**, 39 (2003b).

Kawaide, H., Imai, R., Sassa, T., and Kamiya, Y., *ent*-Kaurene synthetase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a

bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis., *J. Biol. Chem.*, **271** (35), 21706-21712 (1997).

Kawaide, H., Toyomasu, T., Sassa, T., Kamiya, Y., Genes encoding gibberellin biosynthetic enzymes and their functions in fungi. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **76** (12), 1195-1198 (2002).

Schuetz, R.D., Baldwin, R. A., The Synthesis and Properties of Some Substituted Phenyl ω -(*N,N*-Dialkylamino)-alkyl Sulfides. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 162-164 (1958).

Schnurr, G., Boger, P., and Sandmann, G., Interaction of 2-(4-Methylphenoxy)triethylamin and Related Compounds with Its Herbicide Target in the Carotenoid. *J. Pestic. Sci.*, **23**, 113-116 (1998).

Toyomasu, T., Kawaide, H., Ishizaki, A., Shinoda, S., Otsuka, M., Mitsuhashi, W., and Sassa, T., Cloning of a Full-length cDNA Encoding *ent*-Kaurene Synthase from *Gibberella fujikuroi*: Functional Analysis of a Bifunctional Diterpene Cyclase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 660-664 (2000).

Tudzynski, B, Holter, K., Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet Biol.*, **25** (3), 157-170 (1998).

Ymamoto, H., Inomata, M., Tsuchiya, S., Nakamura, M., Uchiyama, T., and Oritani, T., Early Biosynthetic Pathway to Abscisic Acid in *Cercospora cruenta*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2075-2082 (2000).

謝 辞

本研究は、京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻生命有機化学分野および東京農工大農学部応用生物科学科生物制御化学研究室において行われたものです。京都大学において本研究に携わり、新しいアブシシン酸生合成経路の発見に多大の貢献をしていただいた猪俣正広氏に心より感謝いたします。

富山県立大学短期大学の葭田隆治先生には、アブシシン酸生産菌 *Botrytis cinerea* を、また日本エヌユーエス（株）の山本浩敬博士には、アブシシン酸生産糸状菌 *Cercospora cruenta* のみならず、研究に関する種々の最新情報をご提供していただきました。名城大学薬学部の武田直仁先生には、質量分析におけるフラグメンテーション解析に関して、また京都薬科大学真岡孝至先生には、カロテノイドのスペクトル測定法に関して、それぞれ貴重なアドバイスをいただきました。理化学研究所植物科学研究センターの神谷勇治グループディレクターには、環化酵素阻害剤（FC-907）をご提供いただきました。これらの方々に心より感謝するとともに、厚くお礼申し上げます。