

## 論文の内容の要旨

農学国際専攻

平成 12 年度博士課程 進学

平野 啓

指導教官: 山川 隆

### 論文題目 バラドンナ培養根によるサリチル酸のメチル化に関する研究

Salicylic acid (SA) は植物界に広く存在する低分子量 (MW: 138.12) のフェノール化合物で、植物においては開花の誘導、ethylene 等のホルモンの生合成阻害から systemic acquired resistance のような植物特有の防御機構におけるシグナル因子としての機能等、極めて多岐に渡る生理学的・生化学的な機能を持つ。その一方で他の hydroxybenzoic acid 類と同様に毒性が高いことでも知られ、過剰な SA が植物細胞に作用した場合には、これを種々の配糖体に変換して水溶性を高めると共に反応性を低下させ、毒性の低い形態に変換して貯蔵する働きが高等植物一般には備わっている。植物細胞内に見られる SA の派生物には配糖体以外にもエステルやアミノ酸との結合体等いくつかの種類があるが、これらは無毒化された貯蔵形態であると言うよりは寧ろ自身が生理活性を持つ機能性分子であり、配糖体と比べて量的にも圧倒的に少ないものである。

こうした中で、ナス科の薬用植物として知られる *Atropa belladonna* の毛状根を高濃度 (0.2 mM) の SA を含む培地で生育させると、培地中にも組織中にも配糖体が見られない一方で、培地中から SA のメチルエステルである methyl salicylate (MSA) とさらにフェノール性水酸基もメチルエーテル化した methyl-*O*-methoxybenzoate (MMB) が検出されることが当研究グループにおいて確認された。培地中の MSA と MMB は、添加された SA が *A. belladonna* 毛状根によって変換されたものと考えられ、Fig. 1 のような変換経路を辿ったものと推定される。

SA 添加に対するこの応答様式は配糖体の形成が全く見られない点でも興味深い。植物において SA から派生物として MMB が検出された例はこれまでに無く、生理活性の高い SA およびその派生物の代謝経路としてもユニークな例であると言える。

そこで本研究ではこの SA に対する応答反応を、応答様式そのものを詳細に分析する視点と、応答を構成する酵素とその司る反応を分析する分子生物学的な視点の二面から追ひ、以てこの応答反応の機構・意義を解明する上での基礎的知見を得ることを目的とした。

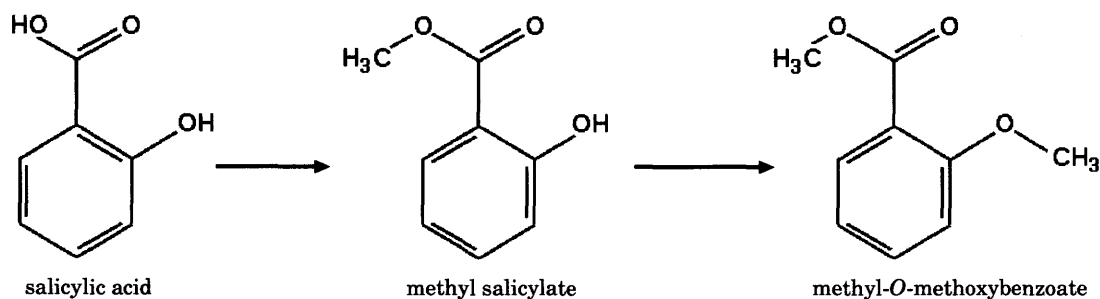


Figure 1: *A. belladonna* による salicylic acid の推定変換経路

まず前者の視点に基づく分析として、培地中の SA の初期濃度とメチル化応答の様式との関係について検討したところ、最低でも 0.1 mM の SA を含む培地で培養しない限り SA のメチル化は見られなかった。従って本応答を見るためにはかなり SA 濃度の高い環境が必要であるが、一方で 2.0 mM を超える濃度の SA で処理した場合には毛状根の枯死が始まってしまい、この間の濃度でのみメチル化された SA の漏出を確認することができた。

また、これまでの知見は全て毛状根におけるものであるが、*A. belladonna* の不定根についても SA への応答を見たところ、毛状根と同様に培地に投与された SA をメチル化し得ることが確認された。毛状根とは植物が *Agrobacterium rhizogenes* による感染を受けた際に植物自身の染色体 DNA 上に *Agrobacterium* 由来の Ri plasmid に含まれる T-DNA を挿入された結果、腫瘍化や毛状根化を始めとした様々な代謝・形態上の異常を発現した状態を指すものであるため、この特異な応答様式も毛状根化したことに起因する可能性が否定し得なかった。しかし、不定根においても毛状根と同様の結果を得られたことから、そもそもこの応答様式は *A. belladonna* に備わっている性質であると言える。

さらに、*A. belladonna* 毛状根によるメチル化の基質特異性を調べるために SA と構造の類似した化合物 12 種類についてその変換の有無を確認したところ、SA 以外では Table 1 に見られる 3 つの化合物 (MSA, acetyl salicylic acid, salicyl alcohol) についてのみそのメチル化が認められた。その一方で、*m*-hydroxybenzoic acid や *p*-hydroxybenzoic acid といった SA の異性体や、類似した構造を持つ benzoic acid のような化合物に対してもメチル化は見られなかった。

また、MSA および MMB の変換を試みた場合に、培地中から SA を検出することができた。このことから *A. belladonna* では SA から MSA, MMB への変換が起きる一方で、SA への逆変換が起きている可能性も示唆される。*Nicotiana tabacum* においては、SA はその配糖体である salicylic acid 2-*O*- $\beta$ -D-glucoside (SAG) との間で相互変換を起こすことが知られているが、配糖体を持たない *A. belladonna* においてはメチル化  $\rightleftharpoons$  脱メチル化がその役割を担っている可能性も考えられ、SA の代謝系における新たな知見に繋がるものとして興味深い。

一方、本応答に関与する酵素群の解明に対するアプローチとして、まず SA  $\rightarrow$  MSA を触媒する salicylic acid methyltransferase (SAMT) と、MSA  $\rightarrow$  MMB を触媒する methyl salicylate methyltransferase (MSAMT) の活性測定法を確立することから始めた。この結果、SA 0.4mM を投与した培地で 3 日間培養した *A. belladonna* 毛状根から、SAMT 活性と MSAMT 活性を同時に持つ crude cell extract を抽出することに成功した。

Crude cell extract によるメチル化反応の基質特異性は、Table 1 に示したように、基本的には毛状根を用

Table 1: 毛状根, crude cell extract, MSAMT 活性画分によるメチル化反応の基質特異性

Substrate	Culture	Crude cell extract	MSAMT fraction
SA	MSA, MMB	MSA, MMB	not detected
MSA	SA, MMB	MMB	MMB
acetyl salicylic acid	MSA, MMB	MSA, MMB	not detected
salicyl alcohol	2-methoxy benzylalcohol	2-methoxy benzylalcohol	2-methoxy benzylalcohol

いて変換させた場合と同様であった。ただし、得られた crude cell extract では MSA, MMB → SA の逆変換は再現できなかった。基質特異性に関する知見から鑑みて、本応答反応に直接関与している酵素群は、恐らくこの crude cell extract に含まれているものと考えられた。

この内の SAMT 活性については、既に当研究グループにおいて SAMT 活性を持つ酵素をコードした遺伝子 *AbSAMT1* が単離されており、恐らくはこの *AbSAMT1* が SAMT 活性の部分についてのみ関与しているものと考えている。しかし *AbSAMT1* には MSAMT 活性が無いことも分かっており、従ってこれとは別に MSAMT 活性を持つ *O*-methyltransferase (OMT) が存在するはずであると考えられた。

そこで、crude cell extract から MSAMT 活性のみを持つ画分の分離を試みた。crude cell extract を用いた酵素活性測定法を構築する上で、MSAMT が methyltransferase 反応に用いるメチル基の供与体として *S*-adenosyl-L-methionine を利用し得ることが確認されていたことから、adenosine-agarose を用いた affinity chromatography によって MSAMT 活性のみを持つ画分の分離を試みたところ、これに成功した。SDS-PAGE にて分析したところ、この画分からは主要なバンド 1 つと微少な 2 つのバンドが検出された。それぞれのバンドについて densitometry を定量し、その値と MSAMT の total activity との関係を前後の chromatography 画分との間で比較した結果、最も主要なバンド (約 38kDa) において最も高い相関関係 (相関係数=0.996) が認められ、これが MSAMT に当たる可能性が高いと考えられた。

Table 1 に示した MSAMT の基質特異性からは、この酵素のサポートする反応がフェノール性水酸基のメチルエーテル化のみであることを読みとることができる。また SA を変換できなかったことから、未修飾のカルボキシル基は MSAMT と基質の結合活性を著しく減少させるものと考えられる。これらのことは同時に、SA → MSA → MMB の順にのみメチル化が進むことを示唆している。さらに、MSA をメチル化して MMB とする OMT はまだ報告が無く、この MSAMT は新規の methyltransferase である可能性が高い。以上から、本 MSAMT は機能的にも酵素の分類学的にも興味深い存在であると思われる。

次に、ここまでで得られた SAMT や MSAMT に対するアプローチ法を利用して、*A. belladonna* 毛状根において SAMT や MSAMT が実際にどのような挙動を示しているのか検討した。先に述べた *AbSAMT1* は、mRNA レベルにおいて通常は発現していないが、*A. belladonna* 毛状根に SA を作用させると発現が誘導されることが分かっている。さらに、*A. belladonna* 毛状根を SA を含む培地で前培養した場合、通常の培地で前培養したものに比べて培地中に MMB が漏出される時間が早くなることも確認された。これらを考え併せると、本応答反応を担う機構は恒常的に発現しているのではなく、SA による誘導といった何らかのトリガによって誘導されるものであると考えられた。

そこで培地に SA を添加した後の SAMT および MSAMT 活性の経時的な変化を追ってみたところ、Fig. 2 に見られるように、SAMT に関してはその発現が完全に SA に依存していることが示された。一方 MSAMT

に関しては、SA 非投入時においても投入時と比べてそれほど変わらない活性を示した。従って、SAMT は確かに SA によって誘導される酵素であったが、MSAMT は恒常的に発現しているものと考えられる。

最後に、SAMT の発現を促す SA 以外のトリガについて検討するために、*A. belladonna* 毛状根にいくつかのストレスまたはエリシター処理をかけ、これらが SAMT および MSAMT 活性に及ぼす影響を見た。ストレスおよびエリシターとしては、 $H_2O_2$  stress, NaCl による osmotic stress,  $Cd^{2+}$  および  $Cu^{2+}$  による金属イオンストレス, エリシターとして yeast extract, 生理活性物質として jasmonic acid および MSA を試みた。しかし、唯一 MSA を適用した場合にのみ SAMT の誘導が確認され、その他の処理を施した場合には SAMT の誘導も見られず、また MSAMT の活性についても大きな変化は見られなかった。

本研究で示された *A. belladonna* における SA に対する応答は、配糖化が見られない点だけでなく、これを MMB までジメチル化する点においてもこれまでに報告のない極めてユニークなものである。その意義についてはなお不明であるが、恐らくこの応答の鍵となる SAMT を誘導し得た因子が SA や MSA といった SA の派生物に限られていることを考えると、*N. tabacum* における SA  $\Rightarrow$  SAG のように SA およびその派生物の代謝機構としての役割をメインに担っているものとも考えられる。この仮定に立つならば、MSA のフェノール性水酸基をさらにブロックし、より反応性が抑えられているものと考えられる MMB にまで変換することは、生存戦略としてより合理的なものであると言える。

ただし MSAMT に関しては、これが常時発現しているものであることを考えると、SA の代謝以外の役割も持つ汎用的な酵素であるとも考えられる。MSAMT は MSA をさらにメチル化する、他の植物 OMT には見られない性質を持つ酵素だが、その全容を見るためには、類似した酵素の検索を始めとする多角的なアプローチが必要となるだろう。SAMT と並んで本応答の鍵となる因子であると共に、植物の OMT を考える上でも非常に興味深い酵素であることから、さらに検討を重ねる必要がある。

また、MSA は植物において様々な機能を担っているが、果たして MMB も同様に何らかの生理的機能を持っているのか、興味深いところである。これまでにそのような報告は無かったが、植物における MMB の研究そのものが殆んど見られなかったものであるため、今後の進展に期待するものである。

本研究によって、このユニークな応答に関する基礎的な知見を得るという目的はある程度達成できたものとする。今後は、本応答を構成するそれぞれの因子に関する知見を深めると共に、なぜ *A. belladonna* でこのような機構が進化したのか、その他の生物で同様の機構を持つものは無いのか、といった点についても検討を進めることが望まれる。

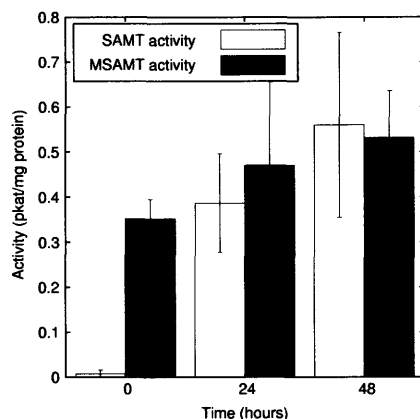


Figure 2: SA 投与後の SAMT, MSAMT activity の経時的変化