

課程博士

楠本 大 (くすもと だい)

博士 (農学)

博農 第2649号

平成 15年9月9日

論文題目 ヒノキ師部の防御反応とシグナルによる誘導

## 論文の内容の要旨

森林科学専攻

平成 11 年度博士課程 進学

氏 名：楠本 大

指導教官名：鈴木 和夫

論文題目 ヒノキ師部の防御反応とシグナルによる誘導

樹木は自然環境から様々な生物的・非生物的環境ストレスを常に受けており、これに対して様々な防御反応を行うことで、生存を可能にしている。樹木の樹皮は幹の最も外側を構成しているので、樹皮における防御反応は、その内側にある形成層を保護する上で非常に重要であると考えられる。樹皮の防御反応には、傷害周皮の形成、ファイトアレキシンの蓄積、傷害樹脂道の形成などが挙げられる。しかし、これらの防御反応がどのような機構でストレスを認識し発現に至るかは明らかにされていない。

近年、作物を中心にシグナルと呼ばれる低分子物質が植物の防御反応の発現に関与することが明らかにされた。シグナルはストレスを受けた細胞やその周囲の細胞で生成され、植物内を移動して離れた場所で防御反応を誘導する。現在、シグナルとしての機能を持つ物質が複数発見されているが、その中の一つであるエチレンは、phenylalanine ammonia-lyaseの活性を高め、フェノールやリグニンの合成を促進することが知られている。また、もう一つのシグナルであるジャスモン酸は、プロテイナーゼ・インヒビターズやアントシアニンの蓄積を増加させる。しかし、これらのシグナル物質が樹木の防御反応に与える影響は明らかにされていない。

樹木は永年性であり、その成長段階において示す生理特性は変化する。したがって作物を用いて得た知見をそのまま樹木に当てはめることはできず、樹木を材料として研究を行うことが必要である。本研究の目的は、第一にヒノキの樹皮における防御反応を明らかにし、第二にヒノキ樹皮の防御反応に対してシグナルであるエチレンやジャスモン酸が与える影響を明らかにすることである。

### ヒノキ師部の防御反応

ヒノキの二次師部に傷を付けることによって誘導される防御反応について、化学的および組織化学的に検討した。形態的な変化として、傷付け後 7 日目に壊死部と健全部との間で師部柔細胞が肥大し、その後分裂して、parenchymatic zone (PZ) を形成した。壊死部の細胞壁にはリグニンとスベリンの蓄積が認められ、ligno-suberized impervious tissue (SIT) を形成した。14 日目には形成層の近くで柔細胞がさらに分裂し、カルスを形成した。壊死部と PZ との間には 2~3 層のコルク組織からなる傷害周皮が形成された。また、形成層に近い師部柔細胞には接線方向に並んだ傷害樹脂道が形成された。56 日目にはカルスは 2mm 幅の傷口を閉塞し、傷害周皮のコルク組織は 6~9 層に増加した。この頃には傷害樹脂道の間隙の拡大も停止した。一方、細胞壁のリグニン含有率は、壊死部において傷付け後 14 日目から健全師部よりも増加し始め、28 日目には 7% 程度高くなった。カルスでは 14 日目のリグニン含有率は健全師部よりも 4% 低かったが、28 日目には健全師部と同程度まで増加した。ポリフェノールの蓄積量はカルスや PZ では健全師部よりも 3 倍多く、壊死部では 30~40% 減少した。傷から 1mm 以内の師部柔細胞ではポリフェノールの蓄積量は傷付けによって若干増加したにもかかわらず、ポリフェノール染色に対する染色性は 14 日目以降減少した。このことは、ポリフェノールの化学性が変化したためだと考えられた。エピセリウム細胞では、傷害樹脂道の間隙が拡大している間は液胞内に多量のポリフェノールを含んでいたが、間隙の拡大が停止するとポリフェノールの蓄積がほとんど認められなくなった。樹脂道間隙が拡大する期間は樹脂が生産される期間に一致することから、エピセリウム細胞におけるポリフェノールの蓄積は樹脂の生産と関係があると考えられた。以上のように、傷に対する防御反応は組織レベルで異なっており、それぞれの組織について防御反応の詳細が化学的かつ組織化学的視点から明らかにされた。

### 防御反応を誘導する化学物質

ヒノキ師部に傷を付けたときに生成されるストレスエチレンの生理特性について検討した。ストレスエチレンの生成は、エチレンの前駆物質である 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) の添加によって増加し、ACC 酸化酵素を阻害する  $\text{Co}^{2+}$  の添加によって減少した。また、エチレンとリセプターの結合を阻害する  $\text{Ag}^+$  を添加するとエチレン生成はピークを過ぎても増加し続け、エチレンのフィードバックが阻害されたことが示唆された。これらの結果を総合すると、ヒノキ師部におけるエチレン生成の制御は ACC 合成酵素によって行われていることが推察された。また、経時的には、ストレスエチレンの生成は傷付け後 3 日間ほど続き、ACC やエチレン発生剤のエスレルを与えるとエチレン生成期間はさらに長くなることが明らかにされた。

ヒノキ師部の防御反応に対するエチレンの役割を明らかにするため、無傷のヒノキ師部にエチレン発生剤のエスレルを処理した。その結果、エスレル処理によって傷害樹脂道が形成され、処理の回数や濃度を増加させると傷害樹脂道の形成数や樹脂の生産量は増加した。このことから、エチレンは傷害樹脂道形成を誘導し、樹脂道の数や樹脂の生産を調節していることが明らかにされた。一方、エスレル処理によって師部の壊死、傷害周皮の形成、細胞壁のリグニン化やスベリン化は認められず、これらの防御反応はエチレンによって誘導されないことが示唆された。また、エスレル処理による樹脂道形成についてヒノキ属のヒノキとサワラ、アスナロ属のアスナロとヒノキアスナロの 4 樹種を比較したところ、属内ではエスレル処理に対する反応が類似しているが、属間では異なることが明らかにされた。

次に、エチレンと、シグナル物質の一つであるジャスモン酸について、傷付けによって誘導される防御反応の誘導過程における役割を明らかにするため、ヒノキ師部に傷を付け、その傷口にエチレン発生剤のエスレル、エチレン生成阻害剤の  $\text{Co}^{2+}$ 、さらに、ジャスモン酸のメチル化物のジャスモン酸メチル (MeJa) を処理した。その結果、エスレルおよび MeJa の処理によって壊死部とカルスのリグニン含有率が増加した。リグニン合成の中間産物であるフェルラ酸とリグニン合成酵素の活性を測定すると、エスレル処理では、壁結合性フェルラ酸が増加し、peroxidase (POD) の活性が増加した。このことから、エチレンはフェルラ酸合成と POD 活性を高めることによりリグニン合成を促進している可能性が推察された。一方、MeJa 処理では、壁結合性フェルラ酸は高濃度処理よりも低濃度処理の方が対照に比べて増加したが、phenylalanine ammonia-lyase (PAL) と 4-coumarate:CoA ligase (4CL) の活性は低濃度処理よりも高濃度処理の方が高かった。このことから、フェルラ酸は PAL

の活性化によって増加するが、フェルラ酸をフェルラ酸：CoA エステルに変化させる 4CL の活性化によって低濃度処理よりも高濃度処理で少なくなると考えられた。したがって、ジャスモン酸は PAL と 4CL の活性を高めることによってリグニン合成を促進し、とくに 4CL の活性が強く影響していることが推察された。このようにエチレンもジャスモン酸もリグニンの生合成を促進するが、それぞれ影響を与える酵素活性は異なっていることが明らかにされた。また、エスレルを処理しても MeJa を処理してもリグニンが合成される範囲は変化しなかった。このことからエチレンもジャスモン酸もリグニン合成を誘導しないことが明らかにされた。傷害樹脂道は、エチレンあるいはジャスモン酸を処理した場合、対照よりも傷から遠く離れた場所にまで形成され、エチレン生成を阻害することによって、対照よりも狭い範囲に形成された。このことから、エチレンもジャスモン酸も傷害樹脂道の形成を誘導することが明らかにされた。ポリフェノールの合成に対しては、エチレン処理でもジャスモン酸処理でも影響は認められなかった。

#### エチレンおよびジャスモン酸による防御反応の誘導機構

傷に対する反応としてヒノキは壊死部にリグニンを蓄積する。リグニンの蓄積は組織化学的には傷付け後 1 週間で認められるが、含有率をみてみると 2 週間後から増加し始め、1 カ月後に停止する。また、このリグニン合成はエチレンやジャスモン酸の濃度が高まることによって促進される。一方、傷害樹脂道はエチレンとジャスモン酸によって誘導され、エチレンやジャスモン酸の生成量が多いとそれらはより遠くまで拡散するので、広範囲に傷害樹脂道が形成される。さらに、エチレンは形成される樹脂道の数や樹脂の生産量を調節する。ポリフェノールはカルスと PZ で増加し、壊死部で減少する。傷近くの師部柔細胞ではポリフェノールの化学的変性が認められる。しかし、これらのポリフェノールの変化に対してエチレンもジャスモン酸も影響を与えない。このように本研究から、ヒノキ師部は傷に対して様々な防御反応を行うことが明らかにされ、エチレンおよびジャスモン酸はリグニンの合成に対しては調節因子として働き、傷害樹脂道形成に対しては形成を誘導する誘導因子と形成数や樹脂生産を調節する調節因子としての役割を持つことが明らかにされた。