

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 14 年度博士課程進学
氏名 軸丸 裕介
指導教員名 山根 久和

論文題目

高等植物におけるジャスモン酸の機能と情報伝達に関する生物有機化学的研究

(1) 序

病原体の感染を受けた植物では、病原体の細胞表層由来の断片などがエリシターとなって細胞膜表層の受容体と結合し、これにより病原体感染が認識される。そして、これが引き金となって、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の発生、pathogenesis-related protein と総称される抗菌性タンパク質の生産、ファイトアレキシンと総称される低分子の抗菌性二次代謝産物の生合成など、様々な抵抗性反応が誘導される。

我々の研究グループは、イネ液体培養細胞におけるキチンエリシター誘導のファイトアレキシン生産においてジャスモン酸 (JA) がシグナル伝達物質として重要な役割を果たしていることを示した。しかし、その一方で、培養細胞では JA 単独でファイトアレキシンの生産は微弱にしか誘導されず、ジャスモン酸 (JA) とともに機能する、重要な因子の関与が考えられていた。そこで、本研究では、イネの主要ファイトアレキシンであるモミラクトン類、ファイトカサン類、サクラネチン (図) の LC-MS/MS による網羅的解析法を確立するとともに、イネの培養細胞や葉におけるそれらファイトアレキシンの生産誘導に、JA とともに関与する因子を追究した。また、JA 受容体等の JA 結合タンパク質の単離・解析に有用な分子プローブの開発も試みた。

(2) イネのファイトアレキシン生産におけるジャスモン酸と活性酸素種の関与

イネのファイトアレキシンとしては、geranylgeranyl diphosphate から *ent*-copalyl diphosphate (*ent*-CDP)、*syn*-CDP を経由して生合成される、ジテルペン型化合物 (それぞれファイトカサン類、モミラクトン類など) とフラボノイド型化合物 (サクラネチン) が存在する。

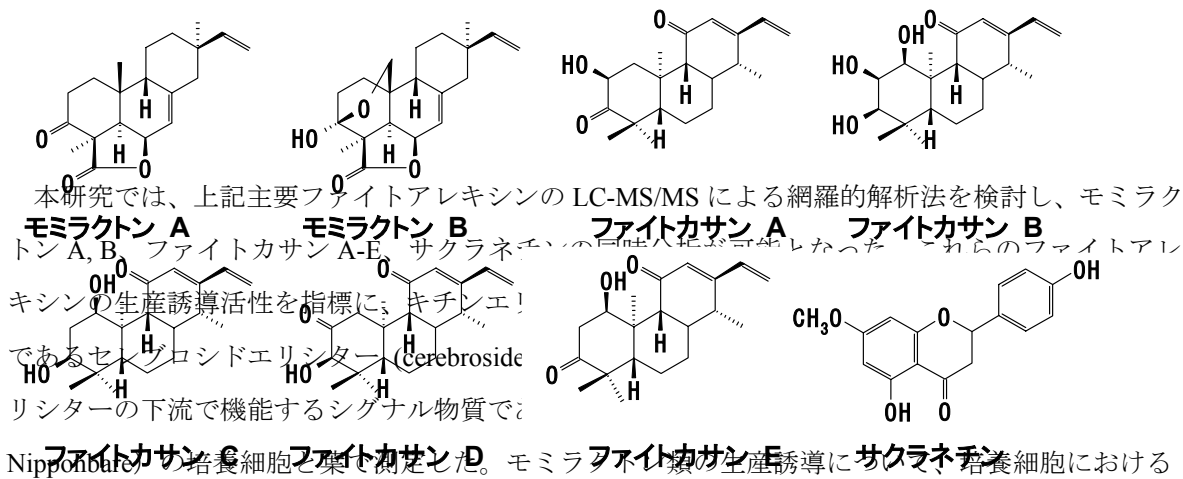


図 1. モミラクトン類、ファイトカサン類、サクラネチンの構造

であり、葉における活性強度は $\text{CuCl}_2 > \text{JA} > \text{セレブロシドエリシター} >> \text{キチンエリシター}$ (葉にはほとんど浸透しないためほぼ不活性) の順であった。また、培養細胞においてはモミラクトン B が、葉ではモミラクトン A が主要成分であることも示された。ファイトカサン類の生産についても、同様の傾向が認められた。サクラネチンは、一般に培養細胞ではいずれのエリシターでも微弱な生産誘導しか認められなかったが、葉では CuCl_2 、JA に対して顕著な生産誘導活性が認められた。

上記のように、JA は葉では強いファイトアレキシシン誘導活性を示したが、培養細胞では微弱な活性しか示さなかった。一方、最近、培養細胞においてキチンエリシターと H_2O_2 を同時投与することによりモミラクトン A の生産が 1.5 倍程度に促進されることが報告された。葉においては、光合成の過程で恒常的に H_2O_2 等の ROS が生産されていると考え、葉に比べて培養細胞で JA のファイトアレキシシン誘導活性が弱かったのは、葉に比べて ROS が少ないことがその一因である可能性が考

えられた。そこで、培養細胞においてファイトアレキシン生産に対する JA と H₂O₂ の相互作用を検討した。H₂O₂ (10 μM) 単独処理ではファイトアレキシン誘導活性は認められなかったが、JA (500 μM) と H₂O₂ (10 μM) を同時処理した場合、モミラクトン類についてはキチンエリシター処理と同等の生産誘導が認められた。このことから、培養細胞におけるモミラクトン類の生産誘導には、JA と活性酸素種の両方が必要であることが示された。また、ファイトカサン類については、微弱な生産誘導しか認められず、モミラクトン類とファイトカサン類では、生産誘導機構に違いがあることも示唆された。

一方、葉においては、H₂O₂ (10 μM) 単独処理で、低いレベルのモミラクトン生産誘導が認められたが、JA (500 μM) と H₂O₂ (10 μM) の同時処理でも相加的な誘導活性がみとめられる程度に過ぎなかった。これは、もともと光照射下の葉ではモミラクトン生産に要求される ROS が必要量に近いレベルで恒常的に供給されており、モミラクトン類の生産レベルは JA に依存しているためかもしれない。ファイトカサン類については、JA、H₂O₂ の同時処理によって、培養細胞の場合と同様に微弱な生産誘導しか認められなかったが、サクラネチンは、CuCl₂ 処理以上の生産誘導が認められた。

(3) ジャスモン酸結合タンパク質の単離・解析に向けた分子プローブの開発

近年、植物ホルモンの受容体遺伝子として、*ETR1* (エチレン受容体)、*BRI1* (ブラシノステロイド受容体)、*CRE1* (サイトカイニン受容体) 等が単離されたことにより、それらのホルモンのシグナル伝達機構に関する研究は飛躍的に進んでいるが、JA については、受容体はもとより結合タンパク質に関する報告は最近に至るまで殆どない。そこで、受容体の単離を目指し、JA 結合タンパク質の単離と解析に有用な分子プローブの開発を行うことにした。JA 結合タンパク質の単離・解析に用いる分子プローブとして、比放射性の高い標識体の調製が容易な JA-アミノ酸複合体、JA 結合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィーによる精製・単離に用いる JA-biotin 複合体、酵母 three-hybrid system による JA 結合タンパク質遺伝子の単離に bait として用いる JA-dexamethasone (JA-dex) 複合体、nonradioactive で JA 結合タンパク質の標識を行う JA-fluoresceine isothiocyanate (JA-FITC) 複合体を合成し、イネ伸長抑制活性検定、ダイズ培養細胞 phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 誘導活性検定、葉におけるモミラクトン A 誘導活性検定の 3 種の検定系を用いてそれらの生理活性検定を行った。

JA-Ala、JA-Val、JA-Leu の 3 種の JA-アミノ酸複合体については、イネ伸長抑制活性検定で天然型の(-)-JA-L-アミノ酸、非天然型の(+)-JA-L-アミノ酸がほぼ同等の生理活性を示したが、ダイズ培養細胞 PAL 誘導活性検定では天然型が非天然型よりも高い生理活性を示した。また、モミラクトン A 誘導活性検定では、天然型のみが活性を示し非天然型が不活性であった。JA-Ile については、イネ

伸長抑制活性検定で天然型の(-)-JA-L-アミノ酸、非天然型の(+)-JA-L-アミノ酸がほぼ同等の生理活性、ダイズ培養細胞 PAL 誘導活性検定では天然型が非天然型よりも高い生理活性を示したが、イネファイトアレキシン誘導活性検定ではいずれの光学異性体も不活性であった。JA-Gly は、イネ伸長抑制活性検定、ダイズ培養細胞 PAL 誘導活性検定で JA に近い高い活性を示した。JA-biotin 複合体、JA-dex 複合体は、イネ伸長抑制活性、PAL 誘導活性で微弱な活性を示したが、JA-FITC 複合体は全ての活性検定系で不活性であった。以上の結果より、JA-FITC 複合体以外の JA 誘導体は JA 様活性を有しており分子プローブとして JA 結合タンパク質の単離・解析に有用であると考えられる。また、合成した各誘導体の活性スペクトルが異なることも示された。

(4) まとめ

本研究によって、イネの主要ファイトアレキシンであるモミラクトン類の生産において、JA と ROS がそれぞれ重要な因子として機能していることが示された。また、サクラネチンについても JA と ROS が相乗的に生産を促進していることが確認された。ファイトカサン類については、JA と ROS の同時処理ではキチンエリシター単独処理ほどの誘導が見られなかったことから、エリシターシグナルにより誘導されるファイトアレキシン類の生産にはそれぞれに特異的な二次シグナルを介した生産誘導機構が存在する可能性が示された。

JA 結合タンパク質の単離・解析に用いる分子プローブの開発を目的として、JA-アミノ酸複合体、JA-biotin 複合体、JA-dex 複合体、JA-FITC 複合体を合成し、3 種の検定系を用いてそれらの生理活性検定を行った。その結果、JA-FITC 複合体以外の JA 誘導体は JA 様の生理活性を有していることが示され、JA 結合タンパク質の単離・解析に有用であることが示唆された。また、合成した誘導体の活性スペクトルが異なることから、それぞれの検定系で複数の異なるタイプの受容体が機能している可能性が示された。