

## 論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻

平成 21 年度博士課程 入学

氏名 徐 銀 卿

指導教員名 浅見 忠男

### 論文題目

植物病害抵抗性を制御する物質の探索とその作用に関する研究

作物を病害から守ることは、安定した農業生産力を維持するために重要な手段のひとつである。そのために化学農薬である殺菌剤が大量にかつ広汎に使用され大きな成果を挙げたが、近年の環境保護への意識の高まりや食の安全への志向から、植物が本来持つ抵抗性を効率的に利用することが注目されている。これまでに植物の病害抵抗性を活性化できる化合物であるプラントアクティベーターが実際の病害防除に活用されてきており、それらの化合物をプローブとした研究が進められてきたが、病害抵抗性の作用機構の詳細については今後の研究進展が必要な状況である。今後の課題として、植物の病害抵抗性の発現機構を解明し、その知見を応用することで、農作物の病害抵抗性をより効果的に活性化でき、さらに殺菌剤の使用を削減することで環境に対する負荷を大幅に軽減することが期待されている。

近年になって生理活性を有する低分子化合物を生物学研究に応用し複雑な生物システムを明らかにするケミカルバイオロジーが新しい研究分野として発展している。植物生理現象の研究においても植物ホルモンの生合成やシグナル伝達を阻害する阻害剤を開発し、その化合物を利用し新しい植物ホルモンの機能やシグナル伝達機構を明らかにする研究が行われてきた。植物病害抵抗性機構の解明には変異体解析研究が多大な貢献をしているものの、化合物を利用し

た研究例は少ない。そこで本研究では病害抵抗性機構の解明に向けた試みとしてケミカルバイオロジック的手法を用いることにし、病害抵抗性を制御する新規化合物の探索を行った。

また病害抵抗性の発現機構にはいろいろな植物ホルモンのネットワークが関与していることが最近になって明らかになってきている。このネットワークは自身の生長を制御しつつ外部からの様々なストレスに対応するための植物の生存戦略の一環であり、植物ホルモンシグナルネットワークの詳細な分子機構を解明することにより、様々な外部環境に対して適応しながら病原体に対して抵抗性を示す植物の創出が可能になると期待される。そこで本研究では病害抵抗性機構と環境ストレスに対する応答シグナルのクロストークに関して検討した。

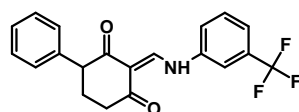
### 植物病害抵抗性の抑制化合物の探索

植物の病害抵抗性には SA を介する免疫機構が重要であることが明らかとなっているものの、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。そこで新たな変異体の探索や原因遺伝子の同定によるシグナル伝達機構の解明につながるような SA シグナル伝達阻害活性を示す化合物を探索することにした。SA シグナル伝達阻害活性を示す化合物を網羅的に調べるため、SA シグナルにより発現が上昇する遺伝子のプロモーター *GUS* 発現系を利用したハイスループットな実験系を構築しスクリーニングを行った。市販の化合物ライブラリーの化合物が含有されている 96 ウェルプレートに *PR1::GUS* シロイヌナズナを播種し、10日目に PR1 プロモーターを活性化する化合物として SA を噴霧処理した。SA 処理3日後に植物体をサンプリングし、*GUS* 染色試験を行い、SA 誘導性 *GUS* 活性上昇に対して阻害効果を示す化合物を候補化合物として選抜した。また化合物の活性強度を定量的に調べるため、real-time PCR を行い候補化合物の処理に伴う遺伝子発現レベルの変化を解析した結果、最終的に7種類の候補化合物に *GUS* 発現を低下させる効果を見出した。その中で最も強い阻害活性を示す化合物を SA シグナル阻害剤候補物質として選抜し、PAMD と名づけ、以下 PAMD を用いてその生理作用に関する研究を進めた。まず選抜した PAMD の SA シグナル阻害活性発現に重要な構造特性を調べるため、入手可能な様々な PAMD の類縁体についてそれらの SA シグナル阻害効果を調べ、構造活性相関について検討した。その結果、PAMD や PAMD 類縁体の阻害活性にはアミノメチリデンシクロヘキサジオン構造と適当な置換基で修飾された芳香環を有することが重要であることが示唆された。

続いて PAMD の植物病害抵抗性に対する阻害活性を確かめるために、アブラナ科野菜類炭

そ病菌である *Colletotrichum higginsianum* を用いて病原菌感染試験を行った。PAMD を処理したシロイヌナズナにおける病原菌の感染程度を観察した結果、PAMD の処理に伴う炭そ病菌に対する感受性の増加が確認された。以上より、PAMD は SA を介するシグナルを負に制御し植物の病害抵抗性を低下させていると考えている。またその作用部位は抵抗性発現のための情報伝達系上で重要な機能を果たしている因子である NPR1 の下流であると予想できる結果を得た。

以上 SA シグナル伝達阻害効果を示すアッセイ系を用いたスクリーニングより SA シグナル誘導阻害剤を見いだすことができた。今後、この化合物を利用するケミカルバイオロジーの手法より植物の病害抵抗性に関する未知の機構の解明が期待される。



PAMD

#### 植物病害抵抗性と環境ストレスの相互作用についての研究

植物の病害抵抗性機構と ABA を介する環境ストレス応答の間には拮抗的な相互作用があることが明らかになっており、それらの相互作用のメカニズムを解明することにより病害抵抗性の作用機構についての新たな知見が得られると考えた。そこで、様々な ABA 合成類縁体を用い SA 誘導性 GUS 活性上昇に対する阻害効果を調べ、病害抵抗性抑制効果と ABA 合成類縁体の構造活性相関について調査した。また ABA 受容体として同定された 14 種類の PYR/PYL ファミリーの中で病害抵抗性制御選択的に関わっている ABA 受容体が存在する可能性があると考え、各 ABA 受容体の過剰発現体を作製した。続いて、それら各受容体過剰発現体における ABA の SA シグナル阻害活性を野生体や過剰発現体間で相互に比較することで、ABA の病害抵抗性阻害活性を選択的に伝達している ABA 受容体の存在について検討した。

##### (1) ABA 合成類縁体による病害抵抗性抑制と構造活性相関

ABA 生物試験として行った気孔閉鎖試験、発芽阻害試験、 $\alpha$ -アミラーゼ誘導阻害試験、そして芽生えの伸長阻害試験の四つの結果に基づき、本研究に用いた 16 種類の ABA 合成類縁体を 3 グループに分け、それぞれの SA 誘導性 GUS 活性を抑制する効果を調べ、構造活性相関について検討した。その結果 ABA 生物試験において見られた構造活性相関と同様の傾向を示すことが明らかとなったが、従来の生物試験で活性が確認されたにもかかわらず、SA 誘導性 GUS 活性の抑制効果が見られなかった

ABA と異なる活性を示す可能性のある ABA 合成類縁体を複数見いだすことができた。その中の 1 つを選び、新たに合成した化合物を用いて再試験を行ったところ、スクリーニング時と異なり ABA と同様の活性を示すとの結果が得られたので、他の化合物についても逐次化学合成を行い SA シグナル抑制効果について詳細に調べる必要があると考えている。

## (2)植物病害抵抗性に関与する ABA 受容体の追究

シロイヌナズナには ABA 受容体である PYR1 と配列の相同性を有する 13 種類のタンパク質 PYL1-13 (PYR-like protein)が存在し、冗長的に機能していることが明らかとなっている。ABA が多様な生理作用を担っていることを考えると、14 種類の ABA 受容体が各々の生理作用を発現するために役割分担し機能を果たしている可能性が予想される。そこで病害抵抗性の阻害作用発現に対して特異的に機能している ABA 受容体が存在している可能性があると考え、それについて追究することにした。まず 10 種類の ABA 受容体 PYLs (PYL1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 13)の過剰発現体を作製し、それら植物体における ABA による SA シグナル伝達阻害効果を調べた結果、PYL1, 2, 6, 7, 8 の 5 種類の形質転換体でより高い阻害活性が見られた。この結果をさらに確認するために受容体選択的アゴニスト、アンタゴニストを利用したケミカルバイオロジー的解析を行うことにした。化合物 AS2 は PYL1, 2, 3 では ABA 受容体のアゴニストとして、また PYL4 から 13 ではアンタゴニストとして活性を示す化合物である。この AS2 を用いて SA 誘導性 GUS 活性阻害試験を行った結果、AS2 処理による GUS 活性の低下が見られた。この事実は PYL1, 2, 3 を介した AS2 の活性発現が SA シグナル抑制効果として現れていることを示している。以上の結果を合わせると、SA を介する病害抵抗性を抑制する ABA の作用に PYL1 と PYL2 が関わっている可能性が示唆された。また 10 種類の ABA 受容体高発現体中 PYL1, 2, 4, 11, 12 が高い塩耐性を示していた。以上の結果をまとめると、塩ストレス耐性と病害抵抗性の誘導阻害活性の両方において PYL1, 2 が機能している可能性が高いと考えることができる。今後本研究の結果をもとに PYLs の多重変異体を用いた SA シグナルの抑制活性やストレス抵抗性について解析を行うことにより、病害抵抗性と相互作用する ABA 受容体が明確になり、複雑な ABA 受容体の機能分担の一端と ABA-SA クロストーク機構を解明することが可能になると予測している。

Seo EK, Nakamura H, Mori M and Asami T. Screening and characterization of a chemical regulator for plant disease resistance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. *In press*.