

学 位 論 文 題 名

Studies on the Endogenous Elicitor from Potato

(ジャガイモ由来内因性エリシターに関する研究)

学位論文内容の要旨

植物は病原菌の侵入から生体を防御するために様々な抵抗反応を有する。このうち、フィトアレキシンの生成・蓄積は、重要な動的防御反応である。フィトアレキシンは、健全な組織には含まれず、エリシターと呼ばれる分子によりその生産が誘導される。エリシターは、病原菌由来の外因性エリシターと植物自身に由来する内因性エリシターの二種類に分類できるが、内因性エリシターの分子レベルでの研究は少ない。本研究では、植物のフィトアレキシン生成機構の分子レベルでの解明を目指し、ジャガイモの内因性エリシターの単離ならびに構造研究を行った。

既に、我々の研究室において、ジャガイモが疫病菌由来のエリシターであるアラキドン酸を接種することで過酸化水素が発生し、それに伴ってフィトアレキシンを生成すること、更に無傷のジャガイモへの過酸化水素接種によって内因性エリシターが生成することを見い出している。そこで、このようにして得られた内因性エリシターの精製を、ジャガイモのフィトアレキシンであるリシチンの蓄積量を指標にして行った。得られた粗抽出物を、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行うことで、分子量9200の酸性多糖として単離することに成功した。この物質は、 $25\sim 75\mu\text{g}/3\text{ml}$ でリシチンを蓄積することができるが、高濃度においては活性を示さないという興味深い現象が観察された。

次に、内因性エリシターの構造解析を行うために、糖組成分析を行った。エリシターを酸加水分解（0.1M TFA、120 °C、1時間）後、ピリジルアミノ化し、ODSカラムにて分析した。その結果、中性糖としてラムノース、アラビノース、ガラクトースを含むことを見出した。また、ウロン酸を還元した後、同様の操作により分析したところ、酸性糖としてガラクトン酸が含まれることを明らかにした (Table 1)。

Table 1. Glycosyl-composition in the endogenous elicitor.

galactose : arabinose : rhamnose : galacturonic acid			
2	3	4	7

次に、0.1M TFA、80 °Cにて部分酸分解を行った。電気泳動においては、2時間以内でエリシターのバンドが消え、また、¹H-NMRから、12時間で分解反応が収束していた。そこで、12時間および1時間での加水分解物について検討を行った。まず、12時間後の分解物をゲルろ過により分画したところ、中性糖は単糖として得られた。また、オリゴ糖の構造は、¹H-NMRより α -1, 4-オリゴガラクトン

ン酸断片と推定された。その重合度は、高pH陰イオン交換クロマトグラフィーにより、3～6の混合物で、主成分がペンタガラクトツロニドであることが明らかになった (Fig. 1)。

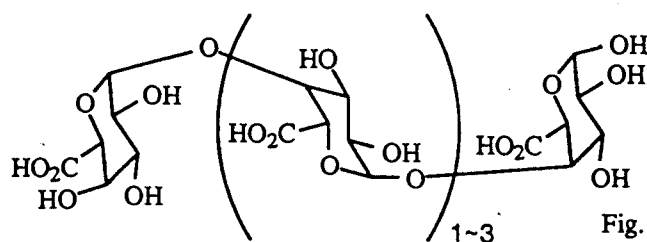


Fig. 1. Structure of the oligogalacturonides obtained by mild acid hydrolysis of the elicitor.

1時間後の加水分解物については、まずゲルろ過により3つの画分に分けた (Table 2)。糖分析および¹H-NMRから、アラビノースが単糖として遊離していた (Fraction 1)。また、ラムノースとガラクトースまたはアラビノースから成るオリゴ糖が得られた (Fr. 2)。分子量が2000以上の画分については、陰イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーにより更に精製し、3つの成分を得た。1つは、5個のウロン酸を含む画分 (Fr. 3)、2つ目は、1～2個のガラクトツロン酸を含み、ラムノース、アラビノース、ガラクトースを1:1:1の比で含む分子量1000～3000の酸性糖 (Fr. 4)、3つ目は1～2個のガラクトツロン酸を含み、ラムノース、アラビノース、ガラクトースを2:1:2の比で含む分子量が約1000の酸性多糖 (Fr. 5) であった。

Table 2. Fractions obtained by the acid hydrolysis of the elicitor at 80 °C for 1 h.

Fractions	Neutral Sugars	Amount of galacturonic acid	MW
1	A	0	
2	A and R, or G and R	0	500~1200
3		5	
4	G, A, and R (1 : 1 : 1)	1~2	1000~3000
5	G, A, and R (2 : 1 : 2)	1	~1000

G, Galactose; A, Arabinose; R, Rhamnose.

さて、エリシター中にペンタガラクトツロニドが含まれていることは既に述べた。一方、オリゴガラクトツロニドは、Ca²⁺を介して、高次構造を形成することが知られている。そこで、内因性エリシター中のCa²⁺を原子吸光により定量したところ4等量のCa²⁺を含んでいた。次に、pHを1～2に調整した後、Ca²⁺をキレート樹脂により除去し、ゲルろ過を行うと、分子量5800の位置に溶出し、またCa²⁺を4等量加えると分子量9800の位置に戻った。更にウロン酸が還元された化合物の分子量は5800を示した。この過程を¹H-NMRにより追跡すると、酸性化とCa²⁺除去によるシグナルの変化が観測された。以上のことより、内因性エリシターは、ガラクトツロン酸によりCa²⁺を配位し、高次構造を形成していることが示唆された。

これらの知見を基に、内因性エリシターのモデル構造を推定した。この構造は、これまでに知られている内因性エリシターとは異なる構造を有していることが明らかになった。また、Ca²⁺が高次構造形成に関与することを初めて明らかにすることができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 村 井 章 夫

副 査 教 授 吉 川 正 明

副 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 荒 木 義 雄 (大学院地球環境科学研究科)

副 査 助 教 授 中 村 英 士

学 位 論 文 題 名

Studies on the Endogenous Elicitor from Potato

(ジャガイモ由来内因性エリシターに関する研究)

植物は病原菌の侵入から生体を防御するために様々な抵抗反応を有する。このうち、フィトアレキシンの生成蓄積は重要な動的防御反応である。フィトアレキシンは健全な植物組織には含まれず、エリシターと呼ばれる分子によりその生産が誘導新生される。エリシターは、病原菌由来の外因性エリシターと植物組織自身に由来する内因性エリシターの二種類に分類できるが、内因性エリシターの分子レベルでの研究は少ないのが現状である。まして植物の自己誘導型内因性エリシターの研究は未開拓の分野で、今後の発展が待たれている状況にある。

本論文は、このような現況にある内因性エリシターについて、ジャガイモを用いて単離ならびに構造を研究することを目的として展開されたものである。すでに我々の研究室において、ジャガイモに疫病菌由来のアラキドン酸を接種すると過酸化水素が発生し、それに伴ってフィトアレキシンを生成すること、さらに健全ジャガイモ組織に過酸化水素を接種すると内因性エリシターが生成蓄積することを見い出している。申請者はこの内因性エリシターの精製を行い、分子量9200の酸性多糖物質として単離することに成功した。これは植物の自己誘導型内因性エリシターの単離として世界で最初の成功例である。次いで申請者はこの物質の構造解析を行い、中性糖としてラムノース、アラビノース、ガラクトースを、また酸性糖としてガラクトツロン酸が含まれることを明らかにした。さらに部分酸加水分解によって、このガラクトツロン酸は重合度が3～6の混合物であり、主成分の重合度が5であることを明らかにした。さらに内因性エリシター中に4等量のCa²⁺を含むことを見い出し、NMRスペクトルの検討により、このエリシターがガラクトツロン酸によってCa²⁺を配位し、高次構造をとっていることを明らかにした。またCa²⁺-freeのエリシターまたは還元されたエリシターの分子量が5800であることを見い出した。これらの知

見をもとに部分酸加水分解による結果と合わせて内因性エリシターの推定構造を提出した。このように申請者は、内因性エリシターについて分子レベルでの新知見を初めて提供したものであり、近年、その概念の輪郭ができつつある天然超分子化学に対し貢献するところ大なるものがある。

よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認めた。