

学位論文題名

Functions of Theobroxide on
Jasmonic Acid Biosynthesis in Plant

(植物中でのジャスモン酸生合成におけるセオブロキシドの機能)

学位論文内容の要旨

植物病原性糸状菌 *Lasiodiplodia theobromae* の代謝産物であるセオブロキシドはジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) のマイクロチューバー形成やアサガオ (*Pharbitis nil*) の花芽形成を誘導する。ジャガイモやアサガオ葉面にセオブロキシドを噴霧すると、非誘導条件下でも、ジャガイモの塊茎やアサガオの花芽が形成する。また、セオブロキシドはアサガオやホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) の茎伸長を阻害する。本研究は、セオブロキシドのこのような植物の分化誘導や茎伸長への効果が、ジャスモン酸(JA)やジベレリン(GA)生合成の制御によって引き起こされることを明らかにした。また、アサガオ中でセオブロキシドによって誘導され、かつ、JA 合成に関与する酵素を分析し、アレンオキシド合成酵素(AOC)が JA 合成において重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、アサガオ AOC の cDNA をクローン化し、AOC の構造と機能を明らかにするとともに、葉緑体における局在性を証明した。

(1) セオブロキシドによるジャスモン酸およびジベレリン生合成制御によるアサガオとホウレンソウの茎伸長阻害

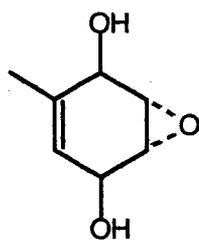
セオブロキシドは、短日あるいは長日両条件下で、短日植物であるアサガオの茎伸長を阻害し、開花を促進する。このような効果は、セオブロキシドによるジャスモン酸 (JA) 生合成の誘導と深く関係する。ジャスモン酸生合成の阻害剤である salicylhydroxamic acid (SHAM) や植物ホルモンであるジベレリン GA₃ の添加は JA の内在レベルを減少させ、結果としてセオブロキシドの茎伸長抑制効果を阻害した。また、セオブロキシドは、短日、長日両条件で GA₁ 生合成を阻害した。これらの結果は、セオブロキシドや光周期で量的に制御される内在性 JA は茎伸長に対し負に働くこと、セオブロキシドはアサガオの JA や GA 生合成を制御することによって茎伸長を制御していることを示唆する。セオブロキシドの茎伸長に対するこのような作用は、長日植物であるホウレンソウでも観察された。

(2) セオブロキシドによって誘導されるアサガオ中での JA 生合成における AOC の役割
生育7日目のアサガオ実生にセオブロキシド溶液を継続的(二日に一度)に噴霧し、短日、長日両条件下で生育させた。セオブロキシド処理開始1週間および2週間後、JA 量を GC-MS で定量分析し、JA 生合成に関与する主要酵素を免疫プロット法で分析した。その結果、短日、

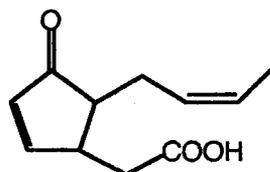
長日の両条件で、セオプロキシド処理によりリポキシゲナーゼ (LOX)、アレンオキシド合成酵素 (AOS) 及び AOC が著量蓄積することが明らかになった。また、セオプロキシドによる AOC タンパク質量の変化を 48 時間観察した結果、AOC の増加は二段階的に起こり、内在性 JA 量と同調的に増減することが明らかになった。最初の AOC 量の増加はセオプロキシド処理後 30 分以内で起こり、二段階目の増加は長日条件では 6 時間後、短日条件では 2 時間後開始した。一方、AOS 及び LOX タンパク質量は AOC タンパク質よりも遅く増加した。このことからセオプロキシドによって誘導される JA の初期生成において AOC が決定的な役割を果たしていることが示唆された。AOC の二段階目の増加は JA による正のフィードバック制御の結果であると推定される。更に、花芽形成誘導物質である KODA 生成に関与する AOS タンパク質もセオプロキシドと短日条件の両者の協奏的な効果により著量蓄積する。このことから、AOS はアサガオの花芽形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

(3)アサガオ AOC 遺伝子の分離と性質および機能

シロイナズナやトマトの AOC 遺伝子にコードされている DNA 配列を有するプライマーを用いて、アサガオ AOC 遺伝子を RACE 法によりクローン化した (コードするタンパク質を *PnAOC* と名付けた; GenBank アクセス番号 DQ314585)。 *PnAOC* をコードした cDNA 領域は 735bp からなり、245 残基のアミノ酸配列をコードしていた。コンピューター解析により、*PnAOC* タンパクは 55 番目と 56 番目のアミノ酸残基間のペプチド結合が切断した後、葉緑体内へ移動すると予想された。 *PnAOC* が AOC タンパク質を含むことを確認するために、葉緑体シグナルペプチドの欠損した断片を大腸菌内で発現させ、21KDa のタンパク質が大腸菌内で新たに生成したことを確認した。このタンパク質を抗トマト AOC ポリクロナール抗体を用いて免疫プロット分析し、AOC タンパク質であることを確認した。アサガオ *PnAOC* のアミノ酸配列は他の植物からの AOC と高い相同性を示した。AOC の葉緑体局在を確認するために、抗 AOC 抗体をプローブとしてアサガオ葉切片を免疫蛍光法により顕微鏡観察した。AOC は葉の維管束鞘の葉緑体内に存在することが確認された。アサガオゲノムでの AOC 遺伝子のコピー数を明らかにするために、*PnAOC* の cDNA 配列をプローブとしてザンプロット分析した。その結果、AOC 遺伝子はゲノム中で多重遺伝子族として存在することが明らかになった。 *PnAOC* の発現パターンを知るために、セオプロキシド処理あるいは JA 処理したアサガオ葉から全 RNA を分離し、*PnAOC* の完全長 cDNA をプローブとしてノザンプロット分析した。その結果、セオプロキシド処理や JA 処理によって、*PnAOC* 発現が誘導されることを証明した。アサガオをセオプロキシド処理すると、30 分以内で *PnAOC* の発現が誘導されることが確認されたが、このことは免疫プロット法で得られた(2)の結果と一致する。



セオプロキシド



ジャスモン酸 JA

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鍋 田 憲 助
副 査 教 授 田 原 哲 士
副 査 助 教 授 阿 部 純
副 査 助 教 授 松 浦 英 幸

学 位 論 文 題 名

Functions of Theobroxide on Jasmonic Acid Biosynthesis in Plant

(植物中でのジャスモン酸生合成におけるセオブロキシドの機能)

植物病原性糸状菌 *Lasiodiplodia theobromae* の代謝産物であるセオブロキシドはジャガイモ(*Solanum tuberosum* L.)のマイクロチューバー形成やアサガオ(*Pharbitis nil*)の花芽形成を誘導し、また、茎伸長を阻害する。本研究では、セオブロキシドのこのような効果が、ジャスモン酸(JA)やジベレリン(GA)生合成の制御によって引き起こされることを明らかにした。更に、アサガオ中でセオブロキシドによって誘導される、JA 合成に関与する酵素を分析し、アレンオキシド合成酵素(AOC)が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、アサガオ AOC の cDNA をクローン化し、AOC の構造と機能を明らかにするとともに、葉緑体における局在を証明した。研究成果は以下のように要約される。

1. セオブロキシドは、短日あるいは長日両条件下で、短日植物であるアサガオの茎伸長を阻害し、開花を促進する。このような効果は、セオブロキシドによるジャスモン酸 (JA) 生合成の誘導と深く関係する。ジャスモン酸生合成の阻害剤である salicylhydroxamic acid (SHAM) や植物ホルモンであるジベレリン GA_3 の添加は JA の内在レベルを減少させ、結果としてセオブロキシドの茎伸長抑制効果を阻害した。また、セオブロキシドは、短日、長日両条件で GA_1 生合成を阻害した。これらの結果は、セオブロキシドや光周期で量的に制御される内在性 JA は茎伸長に対し負に働くこと、セオブロキシドはアサガオの JA や GA 生合成を制御することによって茎伸長を制御していることを示唆する。

2. 生育 7 日目のアサガオ実生にセオブロキシド溶液を継続的に噴霧し、短日、長日両条件下で生育させた。セオブロキシド処理開始 1 週間および 2 週間後、JA 量を GC-MS で定量分析し、JA 生合成に関与する主要酵素を免疫ブロット法で分析した。その結果、短日、長日の両条件で、セオブロキシド処理によりリポキシゲナーゼ (LOX)、アレンオキシド合成酵素 (AOS) 及び AOC が著量蓄積することが明らかになった。また、AOC の増加は二段階的に起こり、内在性 JA 量と同調的に増減することが明らかになった。一方、AOS

及び LOX タンパク質量は AOC タンパク質よりも遅く増加した。このことからセオブロキシドによって誘導される JA の初期生成において AOC が決定的な役割を果たしていることが示唆された。AOC の二段階目の増加は JA による正のフィードバック制御の結果であると推定される。更に、花芽形成誘導物質である KODA 生成に関与する AOS タンパク質もセオプトキシドと短日条件の両者の協奏的な効果により著量蓄積する。このことから、AOS はアサガオの花芽形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

3. シロイナズナやトマトの AOC 遺伝子にコードされている DNA 配列を有するプライマーを用いて、アサガオ AOC 遺伝子を RACE 法によりクローン化した。*PnAOC* をコードした cDNA 領域は 735bp からなり、245 残基のアミノ酸配列をコードしていた。コンピューター解析により、*PnAOC* タンパクは 55 番目と 56 番目のアミノ酸残基間のペプチド結合が切断した後、葉緑体内へ移動すると予想された。*PnAOC* が AOC タンパク質を含むことを確認するために、葉緑体シグナルペプチドの欠損した断片を大腸菌内で発現させ、21KDa のタンパク質が大腸菌内で生成したことを確認した。このタンパク質を抗トマト AOC ポリクロナール抗体を用いて免疫プロット分析し、AOC タンパク質であることを確認した。アサガオ *PnAOC* のアミノ酸配列は他の植物からの AOC と高い相同性を示した。AOC の葉緑体局在を確認するために、抗 AOC 抗体をプローブとしてアサガオ葉切片を免疫蛍光法により顕微鏡観察した。AOC は葉の維管束鞘の葉緑体内に存在することが確認された。アサガオゲノムでの AOC 遺伝子のコピー数を明らかにするために、*PnAOC* の cDNA 配列をプローブとしてサザンプロット分析した。その結果、AOC 遺伝子はゲノム中で多重遺伝子族として存在することが明らかになった。*PnAOC* の発現パターンを知るために、セオブロキシド処理あるいは JA 処理したアサガオ葉から全 RNA を分離し、*PnAOC* の完全長 cDNA をプローブとしてノザンプロット分析した。その結果、セオブロキシド処理や JA 処理によって、*PnAOC* 発現が誘導されることを証明した。

これらの成果は、theobroxide によって活性化される JA 合成をタンパク質及び遺伝子レベルで解明したものであり、今後花芽や塊茎誘導機構解明の一助になると考えられる。よって審査員一同は、Kong Fanjang が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。