

植物の病傷害ストレス抵抗に關与する

情報伝達物質の構造と生成機構

学位論文内容の要旨

植物は様々な環境ストレスに対し適応するために、高度に発達した独自の防御システムを有している。植物ホルモン等の情報伝達物質は植物の成長のみならずストレス応答において関与していることが知られている。また、根圏微生物、内生共生菌なども植物のストレス応答において重要な影響を及ぼしていることが知られている。この様に、植物のストレス応答機構及び他生物の共生等によって付与されるストレス抵抗性を詳細に解明することは非常に重要な課題である。

このような背景の下、本研究第 1 部においては植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) の代謝誘導体であるツベロン酸 (TA)、及びそのグルコシド (TAG) に焦点を当て、これらの化合物の機能解明を目指し研究を行った。更に第 2 部においては内生共生菌の感染により宿主植物チモシーに付与される誘導抵抗性を化合物レベルで明らかにすることを目的に研究を行った。

第 1 部 ツベロン酸グルコシルトランスフェラーゼの精製と機能解析

ジャスモン酸 (JA) は植物の病傷害ストレス応答において情報伝達物質として働く植物ホルモンである¹⁾。植物が病傷害ストレスを受けた際、傷害を受けた部位で一過的に JA が生成され、それに伴いプロテアーゼインヒビターに代表される抵抗性遺伝子の発現が誘導される。さらに JA もしくはその類縁体が傷害部位から非傷害部位に移動し、非傷害部位でも同様の抵抗性反応が誘起される。

一方、ツベロン酸 (TA、12-ヒドロキシジャスモン酸) 及びそのグルコシド (TAG) はバレイショの塊茎形成誘導物質として単離された化合物である²⁾。その後の[2-¹⁴C]JA を用いた実験により、JA は TA 及び TAG に代謝され植物体内を転流することが示された (Fig. 1)³⁾。これらのことから TAG がバレイショの塊茎形成誘導物質として働くのみならず、JA の移動形態として環境情報を植物の他の部位に伝達する働きを担っている可能性が示唆された。前述の傷害部位から非傷害部位へ移動する移動シグナル分子として TA もしくは TAG が有力な候補物質と考えられる。しかし、これらの化合物のバレイショ以外の植物における機能については全く解明されていなかった。そこで、これらの化合物の植物界における機能解明を目的に、TA 及び TAG の様々な植物における分析に加え、TA グルコシルトランスフェラーゼの精製とその機能解析を行った。

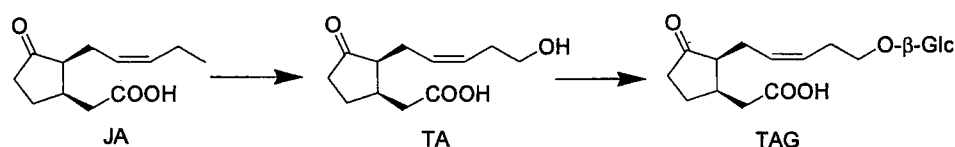


Fig. 1. Metabolism of JA to TA and TAG.

はじめに、TA 及び TAG がバレイショのみならず他の植物にも存在するか否かを検討するために、これらの化合物の様々な植物における定量実験を行った。その結果、分析した 8 種の植物のうち 7 種にこれらの化合物が存在しており、更にはそれらの内生量が傷害ストレスにより増加することが明らかとなった。また $[12-^3\text{H}]$ TA を化学合成し、様々な植物に投与したところ全ての植物において TAG に代謝され、更には他の部位へ転流することが確認された。

多くの植物で TA から TAG への変換が確認されたことから、TA グルコシルトランスフェラーゼの精製を試みた。イネ培養細胞からタンパク質の精製を行い、精製タンパクをサリチル酸 (SA) グルコシルトランスフェラーゼと推定されているタンパク質 (OsSGT, AK064395) と同定した。大腸菌による発現により得られた OsSGT は TA に対して活性を有する一方で SA に対しても非常に高い活性を有していた。OsSGT の mRNA 発現は JA、TA、SA 処理のみならず傷害ストレスにより顕著に誘導された。また、OsSGT のオルソログであると思われるタバコの SA グルコシルトランスフェラーゼ (NtSGT) も TA に対して活性を有するとともに、発現が傷害ストレスにより誘導された。

OsSGT 以外に、TA に対する特異性のより高い酵素が存在するのではないかという仮説のもと、UDP-glucose を糖供与体に用いない TA グルコシルトランスフェラーゼの探索を行った。その結果、octylglucoside を糖供体として用いる新規なタイプのグルコシルトランスフェラーゼを見出し、精製酵素を GH1 の一種 (AK100165) と同定した。

本研究では TA、TAG が様々な植物に存在するとともにこれらの化合物が JA と同様に、傷害応答シグナル伝達において機能している可能性が示唆された。更に、これらの化合物の詳細な機能を解明するために必要となる TA グルコシルトランスフェラーゼを初めて見出すことに成功した。その一つは SA グルコシルトランスフェラーゼであり、もう一つはグルコシダーゼ様の酵素であった。今後、これらの遺伝子の変異体を作成し、その詳細な解析を行うことで TA 及び TAG の機能を知ることが出来ると期待される。

第 2 部 エンドファイト感染によるチモシーの誘導抵抗性に関する化学的研究

牧草チモシーはエンドファイトである *Epichloe typhina* の感染により斑点病菌 *Cladosporium phlei* に対する誘導抵抗性を獲得する。以前の研究により *E. typhina* に感染したチモシーに *C. phlei* の孢子懸濁液を噴霧するとその発芽が阻害されること、更には *E. typhina* の培養濾液中に *C. phlei* 孢子発芽阻害物質が存在することが知られていた。この孢子発芽阻害物質は誘導抵抗性に直接関与していると推測されたが、長い間その同定には至っていなかった。そこで、本化合物の単離・構造決定を第一の目的に研究を行った。

E. typhina 培養濾液 (PD 培地、50 日培養) を *C. phlei* 孢子発芽阻害活性を指標に精製し、孢子発芽阻害物質 epichlicin を単離した。Epichlicin は 8 つのアミノ酸から成る環状ペプチドであり、各種スペクトルデータから絶対構造が判明した (Fig. 2)。Epichlicin は 30 nM という低濃度で *C. phlei* の孢子発芽を完全に阻害した。前述の通り本化合物がチモシーの誘導抵抗性に直接関与している可能性が考えられるため、*E. typhina* に感染したチモシー植物体内に epichlicin が存在するかを含めた更なる検討が必要である。

また、*E. typhina* 培養濾液中に *C. phlei* に対して植物毒素化合物である phleichrome の生産を誘導する化合物が存在することを見出し、活性物質として二種の環状ジペプチド (Pro-Phe, Pro-Leu) を単離・同定した。本現象と誘導抵抗性との関わりは現在のところ不明であるが、これらの環状ジペプチドがグラム陽性細菌においてオートインデューサーとしての働きを担っていることが報告されているが³⁾、本研究においてもこれらの化合物は同様にクオールモン様活性として見出されており非常に興味深いと考えられる。

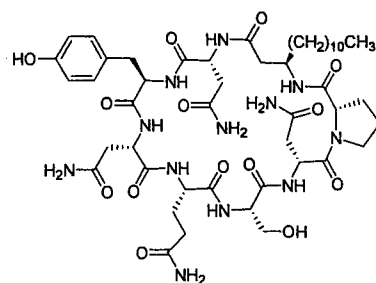


Fig. 2. Structure of epichlicin.

1) Yoshihara T. et al, *Agric. Biol. Chem.*, 10, 2835-2837, 1989. 2) Yoshihara T. et al, *Plant Cell Physiol.*, 37, 586-590, 1996. 3) Holden et al, *Mol. Microbiol.*, 33, 1254-1266, 1999.

学位論文審査の要旨

主査	教授	鍋田	憲助
副査	教授	生方	信
副査	准教授	伊藤	浩之
副査	准教授	松浦	英幸
副査	助教	高橋	公咲

学位論文題名

植物の病傷害ストレス抵抗に関与する 情報伝達物質の構造と生成機構

植物は、様々な環境ストレスに対し適応するために、高度に発達した独自の防御システムを有している。植物ホルモン等の植物自身が生産する情報伝達物質は、植物の成長のみならずストレス応答においても非常に重要な役割を担っている。

本研究第1部においては、植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) の代謝誘導体であるツベロン酸 (TA)、及びそのグルコシド (TAG) に焦点を当て、これらの化合物の機能解明を目指して研究を行った。第2部においては、内生共生菌の感染により宿主植物チモシーに付与される誘導抵抗性を化学的な見地から明らかにすることを目的に研究を行った。

第1部 ツベロン酸グルコシルトランスフェラーゼの精製と機能

ツベロン酸 (TA、12-ヒドロキシジャスモン酸) 及びそのグルコシド (TAG) はバレイショの塊茎形成誘導物質として単離された化合物である。その後の実験により、JA は、TA 及び TAG に代謝され、植物体内を転流することが示された。これらのことから TAG は、JA の移動形態として環境情報を植物の他の部位に伝達する働きを担っている可能性が示唆された。しかし、TA 及び TAG のバレイショ以外の植物における機能については全く解明されていなかった。そこで、これらの化合物の植物界における機能解明を目的に、TA 及び TAG の様々な植物における存在の確認と、TA グルコシルトランスフェラーゼの精製とその機能解明を行った。

その結果、TA および TAG は、ほぼ全ての植物に存在しており、更に、その内生量が傷害ストレスにより増加することが明らかになった。また $[12-^3\text{H}]$ TA を化学合成し、様々な植物に投与したところ、全ての植物において TAG に代謝され、更には、他の部位へ転流することが確認された。次

いで、TA 及び TAG の機能解明のため、TA グルコシルトランスフェラーゼの精製を行った。イネ培養細胞からタンパク質の精製を行い、精製タンパクをサリチル酸 (SA) グルコシルトランスフェラーゼと推定されているタンパク質 (OsSGT, AK064395) と同定した。大腸菌による発現により得られた OsSGT は TA に対して活性を有する一方で、SA に対しても非常に高い活性を有していた。OsSGT の mRNA 発現は JA、TA、SA 処理のみならず傷害ストレスにより顕著に誘導された。また、OsSGT のオルソログであると思われるタバコの SA グルコシルトランスフェラーゼ (NtSGT) も TA に対して活性を有し、また、発現が傷害ストレスにより誘導された。更に、octylglucoside を糖供与体として用いたところ、新規なタイプのグルコシルトランスフェラーゼを見出し、精製酵素を GH1 の一種 (AK100165) と同定した。

第2部 エンドファイト感染によるチモシーの誘導抵抗性に関する化学的研究

牧草チモシーはエンドファイトである *Epichloe typhina* の感染により斑点病菌 *Cladosporium phlei* に対する誘導抵抗性を獲得する。以前の研究により *E. typhina* に感染したチモシーに *C. phlei* の孢子懸濁液を噴霧するとその発芽が阻害されること、更には *E. typhina* の培養濾液中に *C. phlei* 孢子発芽阻害物質が存在することが知られていた。この孢子発芽阻害物質は誘導抵抗性に直接関与していると推測された。そこで、本化合物の単離・構造決定を目的に研究を行った。

E. typhina 培養濾液を、*C. phlei* 孢子発芽阻害活性を指標に精製した結果、孢子発芽阻害物質 epichlicin の単離に成功した。Epichlicin は 8 つのアミノ酸から成る環状ペプチドであり、絶対立体配置を含めた構造が決定された。Epichlicin は 30 nM という低濃度で *C. phlei* の孢子発芽を完全に阻害した。本化合物がチモシーの誘導抵抗性に直接関与している可能性が考えられ、*E. typhina* に感染したチモシー植物体内における epichlicin の存在の有無は興味深い。更に、*E. typhina* 培養濾液中に、*C. phlei* に対して植物毒素活性のある phleichrome の生産を誘導する化合物が存在することを見出し、活性物質として二種の環状ジペプチドを単離・同定した。

これらの研究のうち、TA グルコシルトランスフェラーゼを植物界から初めて見出された成果については、学術論文として、*Phytochemistry* 誌に受理された。また、チモシー植物体内に感染する 2 種の糸状菌間の、生育や二次代謝制御に働く新規ペプチド及び既知ジケトピペラジンの構造決定に関しては、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 誌に 2 報の学術論文として発表した。以上の研究成果によって、審査員一同は、瀬戸義哉が博士（農学）を受けるのに十分な資格を有すると認めた。