

学位論文題名

植物の病傷害応答に関与する β -glucosidase の
酵素機能ならびに生理機能に関する研究

学位論文内容の要旨

糖質加水分解酵素は多様な構造や機能を持つ糖質の代謝に関わる。その主な生理機能の1つとして植物ホルモン配糖体の活性化が挙げられる。幾つかの植物ホルモン(abscisic acid, gibberellin, auxin, cytokinin, brassinosteroid 等)には配糖体が存在し、アグリコンとの相互変換は glucosyl transferase と β -glucosidase が担う。シグナル物質の生合成には数段階の酵素反応を必要とするが、配糖体は安定な非活性体として貯蔵され、必要に応じて β -glucosidase による一段の反応により脱配糖化されて活性体として供給される。また、細胞内における活性化物質の濃度調整も担うと考えられている。しかしながら、植物ホルモン配糖体 β -glucosidase としての機能は未知の部分が多い。

tuberonic acid (TA) およびその配糖体 (tuberonic acid β -glucoside : TAG) は、塊茎形成を誘導する化合物としてバレイショから単離され、病傷害ストレスの防御応答に関与する植物ホルモンの jasmonic acid (JA) から合成されることが知られている。近年、TA はシロイヌナズナやトマトにおいて JA 生合成・代謝関連遺伝子の発現を調節することが報告され、バレイショ以外の植物においても生理機能が示された。加えて、TA は傷害時に傷害葉から非傷害葉に輸送される。これらのことは TA の輸送が防御応答における重要な機能を担うことを示唆している。これまで TA から TAG を生成する酵素は同定されているが、TAG を分解して TA に変換する β -glucosidase については存在すら明らかにされていなかった。本研究では TAG β -glucosidase を同定し、酵素機能および生理機能を解明することを目的とした。

1. TAG β -glucosidase の精製

TAG が TA に加水分解されることを重水素標識の TAG (TAG-*d5*) を用いた代謝実験で明らかにした。すなわち、UPLC-MS/MS により TAG-*d5* 処理した登熟期のイネでは TAG-*d5* と TA-*d5* が検出された。

次に、活性本体である TAG β -glucosidase (OsTAGG) を精製した。TAG 加水分解活性は、CM Sepharose カラムクロマトグラフィーにより低濃度 NaCl に溶出する画分 OsTAGG1 と高濃度 NaCl に溶出する画分 OsTAGG2 に分離された。前者を 5 種類のカラムクロマトグラフィーに供し、精製倍率 4300 倍で OsTAGG1 0.065 mg を得た。また、後者を 6 種類のカラムクロマトグラフィーに供し、精製倍率 2800 倍で OsTAGG2 0.025 mg を得た。

2. TAG β -glucosidase の同定

OsTAGG1 は SDS-PAGE により分離される 42 kDa および 25 kDa の 2 本のポリペプチド鎖からなり、OsTAGG2 は 40 kDa および 26 kDa の 2 本のポリペプチド鎖からなる。N 末端アミノ酸配列解析および peptide mass fingerprinting 解析の結果、OsTAGG1 および OsTAGG2 はそれぞれ Os04g0474900 および Os04g0474800 にコードされるアミノ酸配列と一致した。また、OsTAGG1 および OsTAGG2 はそれぞれ Gly355 および Gly359 の N 末端側で切断されることが明らかになった。

OsTAGG1 および OsTAGG2 のアミノ酸配列は 85% 一致し、glycoside hydrolase family 1 (GH1) に属する β -glucosidase において保存性が高い領域が認められた。また、OsTAGG1 および OsTAGG2 は、GH1 酵素の触媒残基 (一般酸塩基触媒残基および求核触媒残基)、すべての GH1 のメンバーで保存されているグリコンとの結合を担うアミノ酸残基も保存されていた。以上のことから、OsTAGG1 および OsTAGG2 は GH1 に属する酵素群の共通構造を有することを明らかにした。

3. TAG β -glucosidase の酵素機能解析

OsTAGG1 および OsTAGG2 の基質特異性を調べるために、種々の配糖体 (TAG, MeTAG, jasmonyl 1- β -glucoside, salicylic acid glucoside, zeatin glucoside, linamarin, *p*NP β -glucoside, *p*NP β -galactoside, *p*NP β -mannoside, および *p*NP β -cellobioside) に対する活性を測定した。その結果、OsTAGG1 および OsTAGG2 は、*p*NP β -glucoside に対して最も高い活性を示した。天然の配糖体では TAG に対する活性が最も高かった。OsTAGG1 の TAG に対する K_m は 31.7 μ M であり、 V_{max} は 14.7 μ mol/min/mg であった。一方、OsTAGG2 の K_m は 146 μ M であり、 V_{max} は 38.0 μ mol/min/mg であった。このことから、OsTAGG1 の TAG に対する親和性は OsTAGG2 よりも高いことが明らかになった。

OsTAGG1 および OsTAGG2 の細胞内局在性を解析したところ、両酵素は細胞膜に不均一に存在した。また、細胞質において網目状のシグナルも観察されたことから、endoplasmic reticulum にも存在することが判明した。

4. 病傷害応答における JA, TA および TAG の代謝および TAG β -glucosidase の生理機能

TA および TAG の代謝および生理機能に関する知見は少ない。しかし、JA と同様に病傷害応答に関与すると予想され、病傷害ストレスに対する JA, TA および TAG の内生量の変化を解析した。

傷害に対する JA 類の内生量を定量した。傷害後 0.5 時間で JA が検出され、その内生量は傷害後 1 時間で最大となった (3.29 ± 0.66 nmol/g FW)。また、TA および TAG の内生量を調べた。両化合物は JA が減少するにつれて徐々に蓄積し、4 時間後に TA の内生量が最大となった (1.03 ± 0.19 nmol/g FW)。また、TAG は 8 時間後に内生量が最大となった (9.95 ± 0.41 nmol/g FW)。

いもち病菌接種に対する JA 類の内生量を定量した。胞子散布後、JA の内生量は徐々に増加し、72 時間後に最大となった (0.16 ± 0.018 nmol/g FW)。また、TA および TAG の内生量については、TA の内生量が感染によりわずかに上昇し、TAG の内生量は JA とほぼ同様の蓄積パターンを示した。72 時間後に TAG の内生量が最大となった (4.49 ± 0.77 nmol/g FW)。

さらに、病傷害ストレスによる *OsTAGG1* および *OsTAGG2* の転写産物への影響をリアルタイム PCR によって解析した。その結果、傷害時の *OsTAGG1* の発現は傷害前に比べて抑制され、*OsTAGG2* の発現は誘導された。また、いもち病菌が感染することにより、*OsTAGG* および *OsTAGG2* の転写

産物はいずれも徐々に増加することが明らかになった。

いもち病菌の感染により、*OsTAGG1* の発現が誘導されたことから、GUS 染色によるいもち病菌感染によるイネ組織の *OsTAGG1* の発現を解析した。その結果、いもち病菌の感染により、*OsTAGG1* は病斑付近の維管束で誘導されることが明らかになった。導管もしくは篩管で、TA が輸送されることから、*OsTAGG1* は病害時に維管束細胞内で TAG を分解し、TA を木部もしくは師部へと輸送する働きを担うと推定された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	松 井 博 和
副 査	客員教授	今 井 亮 三
副 査	准教授	松 浦 英 幸
副 査	准教授	森 春 英
副 査	助 教	佐分利 亘

学 位 論 文 題 名

植物の病傷害応答に關与する β -glucosidase の 酵素機能ならびに生理機能に関する研究

本論文は、図 44, 表 16, 引用文献 119 を含み、4 章からなる総ページ 112 の和文論文である。別に参考論文 2 編が添えられている。

糖質加水分解酵素は多様な構造や機能を持つ糖質の代謝に関わる。その主な生理機能の 1 つとして植物ホルモン配糖体の活性化が挙げられる。幾つかの植物ホルモン (abscisic acid, gibberellin, auxin, cytokinin, brassinosteroid 等) には配糖体が存在し、アグリコンとの相互変換は glucosyl transferase と β -glucosidase が担う。シグナル物質の生合成には数段階の酵素反応を必要とするが、配糖体は安定な非活性体として貯蔵され、必要に応じて β -glucosidase による一段の反応により脱配糖化されて活性体として供給される。また、細胞内における活性化物質の濃度調整も担うと考えられている。しかしながら、植物ホルモン配糖体 β -glucosidase としての機能は未知の部分が多い。

tuberonic acid (TA) およびその配糖体 (tuberonic acid β -glucoside : TAG) は、塊茎形成を誘導する化合物としてバレイショから単離され、病傷害ストレスの防御応答に關与する植物ホルモンの jasmonic acid (JA) から合成されることが知られている。近年、TA はシロイヌナズナやトマトにおいて JA 生合成・代謝関連遺伝子の発現を調節することが報告され、バレイショ以外の植物においても生理機能が示された。加えて、TA は傷害時に傷害葉から非傷害葉に輸送される。これらのことは TA の輸送が防御応答における重要な機能を担うことを示唆している。これまで TA から TAG を生成する酵素は同定されているが、TAG を分解して TA に変換する β -glucosidase については存在すら明らかにされていなかった。本研究では TAG β -glucosidase を同定し、酵素機能および生理機能を解明することを目的とした。

イネの植物体内において TAG が TA に加水分解されることを重水素標識の TAG (TAG-*d5*) を用いた代謝実験で明らかにした。続いて、活性本体である TAG β -glucosidase (OsTAGG1 および OsTAGG2) を精製した。OsTAGG1 および OsTAGG2 はそれぞれ Os04g0474900 および Os04g0474800 にコードされるアミノ酸配列と一致した。OsTAGG1 は SDS-PAGE により分離される 42 kDa および 25 kDa の 2 本のポリペプチド鎖からなり、OsTAGG2 は 40 kDa および 26 kDa の 2 本のポリペプチド鎖からなることを明らかにした。また、OsTAGG1 および OsTAGG2 はそれぞれ Gly355 および Gly359 の N 末端側で切断されることが示された。

OsTAGG1 および OsTAGG2 のアミノ酸配列は 85%一致し、glycoside hydrolase family 1 (GH1) に属する β -glucosidase において保存性が高い領域が認められた。また、OsTAGG1 および OsTAGG2 は、GH1 酵素の触媒残基 (一般酸塩基触媒残基および求核触媒残基)、すべての GH1 のメンバーで保存されているグリコンとの結合を担うアミノ酸残基も保存されていた。以上のことから、OsTAGG1 および OsTAGG2 は GH1 に属する酵素群の共通構造を有することを明らかにした。

OsTAGG1 および OsTAGG2 の基質特異性を調べるために、種々の配糖体 (TAG, MeTAG, jasmonyl 1- β -glucoside, salicylic acid glucoside, zeatin glucoside, linamarin, pNP β -glucoside, pNP β -galactoside, pNP β -mannoside, および pNP β -cellobioside) に対する活性を測定した。その結果、OsTAGG1 および OsTAGG2 は、pNP β -glucoside に対して最も高い活性を示した。天然の配糖体では TAG に対する活性が最も高かった。また、OsTAGG1 および OsTAGG2 の細胞内局在性を解析したところ、両酵素は細胞膜に不均一に存在した。また、細胞質において網目状のシグナルも観察されたことから、endoplasmic reticulum にも存在することが判明した。これらのことから、OsTAGG1 および OsTAGG2 は細胞内で TAG β -glucosidase として機能すると考えられた。

TA および TAG の代謝および生理機能に関する知見は少ない。しかし、JA と同様に病傷害応答に関与すると予想され、病傷害ストレスに対する JA, TA および TAG の内生量の変化を解析した。その結果、傷害に対して JA だけでなく TA, および TAG が蓄積することが明らかになった。また、いもち病菌に対して JA と共に、TA および TAG が蓄積することが示された。さらに、病傷害ストレスによる OsTAGG1 および OsTAGG2 の転写産物への影響を解析した。その結果、傷害時の OsTAGG1 の発現は傷害前に比べて抑制され、OsTAGG2 の発現は誘導された。また、いもち病菌が感染することにより、OsTAGG1 および OsTAGG2 の転写産物はいずれも徐々に増加することが明らかになった。

いもち病菌の感染により、OsTAGG1 の発現が誘導されたことから、GUS 染色によるいもち病菌感染によるイネ組織の OsTAGG1 の発現を解析した。その結果、いもち病菌の感染により、OsTAGG1 は病斑付近の維管束で誘導されることが明らかになった。導管もしくは篩管で、TA が輸送されることから、OsTAGG1 は病害時に維管束細胞内で TAG を分解し、TA を木部もしくは師部へと輸送する働きを担うと推定された。

本研究によって、OsTAGG1 および OsTAGG2 の酵素機能ならびに生理機能に関する新たな知見が得られた。さらに、OsTAGG1 および OsTAGG2 が TA の輸送に関与する可能性を見出し、イネの防御機構における OsTAGG1 および OsTAGG2 の役割の解明に大きく近づいたと

いえる。

よって審査員一同は、和久田真司が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。