

学位論文題名

ジャスモン酸応答制御機構に関する生物有機化学的研究

学位論文内容の要旨

緒論

植物ホルモンの一つである jasmonic acid (JA) は、塊茎形成などの形態形成、老化などの生活環境制御、虫害や病害に対する防御応答に寄与するシグナル伝達物質である。JA 応答はその生合成、活性化、受容、植物内外への移動、及び不活性化など様々な機構によって巧妙に制御されている。本博士論文においてはそれらの機構を解明すると共に、JA 応答を標的とし、JA 類似の生物活性を示す低分子化合物に関する研究を行った。

第1部 植物ホルモン(+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine 不活性化機構の解明

数多くの JA 類縁体が発見されているが、多くの JA 応答において重要な役割を果たすのは、イソロイシンとの結合体である 7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile) であるとされている。JA の主要な代謝経路の一つとして 12 位の水酸化が知られており、それぞれ JA と JA-Ile が水酸化された 12-hydroxyJA (ツベロン酸, TA) 及び 12-hydroxyJA-Ile の植物体内における存在が確認されている。TA がさらに硫酸エステル化、配糖体化された化合物の存在も確認されており、これら化合物の JA 類の不活性化経路としての働きが示唆されている。また、それらの知見に加えて TA やその類縁体が JA-Ile 応答遺伝子の発現を抑制し、JA シグナル伝達を負に制御するという報告もある。植物ホルモンの活性は生合成と不活性化のバランスによって巧妙に制御されている。JA 以外の植物ホルモンの不活性化に関する研究は数多く行われており、その阻害剤について研究されるなど、応用研究まで幅広く行われている。本研究を開始した当初、JA-Ile の生合成に関する研究の報告は数多く存在したが、その不活性化に関しては研究例に乏しく、12-hydroxyJA-Ile 及びさらに酸化された化合物 12-carboxylJA-Ile がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の植物体内において存在が確認されているのみであった。これらの背景より、JA-Ile の主要な不活性化機構の解明を目指し、その代謝物及び、代謝酵素の解明を目標に研究を開始した。

まず、12-hydroxyJA-Ile 及び、その ^{13}C 標識化合物を化学合成により調製した。それらの化合物を標品として用い、ピンセットによる傷害処理後のシロイヌナズナの葉部における 12-hydroxyJA-Ile の内生量変化を経時的に UPLC-MS/MS により測定した。その結果、傷害処理後における 12-hydroxyJA-Ile の蓄積が確認され、植物において不活性化体として働いていることが示唆された。

JA-Ile の 12 位の水酸化が主要な代謝経路であると示唆されたことから、その水酸基導入に寄与する酵素の探索を行った。結果として、JA-Ile 12 位水酸化酵素として機能するシロイヌナズナの CYP94B3 の同定に成功した。CYP94B3 をクローニングし、本遺伝子と P450 が機能するのに必要な P450 還元酵素を形質導入したピキア酵母 (*Pichia pastoris*) を作製した。作製した形質転換酵母に基質となる JA-Ile を取り込ませたところ、CYP94B3 を導入した株でのみ 12-hydroxyJA-Ile が生成した。また傷害処理後の CYP94B3 の T-DNA 挿入発現抑制株 *cyp94b3* 変異株では野生株と比較して、基質である JA-Ile が多く蓄積する一方、生成物である 12-hydroxyJA-Ile の蓄積量が少ないことが明らかとなった。

続いて、JA-Ile 以外の基質に対する CYP94B3 の酵素活性を調べた。その結果、本酵素は JA を水酸化する活性は有しない一方で、バリンやフェニルアラニンとの結合体である JA-Val、JA-Phe を水酸化する活性を有した。12-HydroxyJA-Val、12-hydroxyJA-Phe の植物体内における内生量を定量したところ、12-hydroxyJA-Ile と同様に傷害処理後誘導され、*cyp94b3* 変異株において基質となる JA-Val、JA-Phe の蓄積量は増加し、その水酸化物の蓄積量は減少した。これらの結果から、12-hydroxyJA-Ile と同様に 12-hydroxyJA-Phe、12-hydroxyJA-Val も傷害処理後 CYP94B3 によって生合成されることが明らかとなった。

JA-Ile はシロイヌナズナの根の伸長を抑制し根を蛇行させる活性を有することが知られてい

る。変異株 *cyp94b3* と野生株を JA-Ile 存在下で育成したところ、変異株 *cyp94b3* でより強く JA-Ile の効果が観察された。これは変異株 *cyp94b3* においては JA-Ile を不活性化することができず、より多くの JA-Ile が植物体内に蓄積したためと考えられる。12 位の水酸化が JA 類の不活性化として働くことを指し示すために、JA-Ile、JA-Val、JA-Phe 及び、それぞれの 12 位が水酸化された化合物の生物活性を、シロイヌナズナ根伸長阻害試験を用いて評価した。その結果、JA-Val、JA-Phe が JA-Ile 様の作用を示すこと、すべての化合物において生物活性が 12 位の水酸化により低下する結果が得られた。以上の結果より 12 位の水酸化が JA アミノ酸結合体の不活性化に寄与している事が示された。

前述のシロイヌナズナ根伸長阻害試験において、JA-Ile と比べると弱いものの 12-hydroxyJA-Ile も生物活性を示した。このことは、12-hydroxyJA-Ile がさらに代謝されるといふ「二段階の不活性化」の必要性を指し示すものであった。そこで TA の代謝を参考にして、12-hydroxyJA-Ile の水酸基がさらに酸化されカルボン酸となった 12-carboxylJA-Ile、配糖化された 12-β-D-glucopyranosyloxyJA-Ile、及び硫酸基となった 12-sulfoJA-Ile へと代謝されることによって更に不活性化されると予想し、それら化合物を有機合成し、傷害処理後の植物体内における蓄積量の変化を UPLC-MS/MS で分析した。その結果、それら化合物は傷害処理後に植物体内で顕著に蓄積した。しかしながら、12-β-D-glucopyranosyloxyJA-Ile、12-carboxylJA-Ile、12-sulfoJA-Ile の蓄積量が 12-hydroxyJA-Ile と比べ少なかったことから、これら化合物への更なる代謝が完全なる不活性化に寄与しているのではなく 12-hydroxyJA-Ile が液胞へと蓄積し封じ込められ不活性化されると考察した。

第 2 部 蛍光標識ジャスモン酸の合成及びその有用性の検討

第 1 部の研究結果より、12-hydroxyJA-Ile が液胞へと移動し封じ込められることにより JA-Ile の完全なる不活性化が為されていることが示唆された。このような植物体内における移動を可視化するため蛍光標識化された MeJA 及び JA-Ile の合成を行った。合成した化合物が植物体内における移動を可視化するのに使用できるか検討するために、蛍光標識 MeJA を含む培地で育成したシロイヌナズナの根を観察した。その結果根の先端部及び維管束において蛍光が観察される結果が得られ、本化合物の有用性を明らかにした。また蛍光標識 JA-Ile の合成中間体である 7-hydroxyJA-Ile をシロイヌナズナ根伸長阻害試験に供したところ、本化合物が JA に対して阻害作用を有することが明らかとなった。

第 3 部 ジャスモン酸生合成誘導物質 theobroxide 類縁体に関する研究

Theobroxide は糸状菌 *Lasiodiplodia theobromae* によって生合成される低分子化合物であり、JA 生合成酵素遺伝子の発現を誘導することが知られている。*L. theobromae* 培養液中から theobroxide 類縁体の単離構造決定を行い、新規化合物である 4,5-dihydroxy-3-methylcyclohex-2-enone を得た。本化合物の生物活性をタバコ (*Nicotiana tabacum*) に対する生長阻害活性を用いて評価したところ theobroxide よりも強い活性を示した。

総括

本博士論文では、JA 応答を制御する調節機構解明並びに、JA 応答を標的とした生物活性を示す低分子化合物を用いて、JA 応答を制御する事を目標とし研究を遂行した。その結果、JA-Ile の濃度調節に寄与する JA-Ile 12 位水酸化酵素 CYP94B3 の発見に成功した。また、JA の植物体内における移動研究に活用可能な蛍光標識 JA 類の合成を行った。更には、JA 生合成の誘導が予想される新規 theobroxide 類縁体を単離し構造決定を行った。JA 類は病害応答や老化等に関わるシグナル分子であり、JA 応答の人為的制御は、植物の病害抵抗性の増強や生育段階のコントロールを可能にする。農業分野における応用を目指した分野での更なる研究の発展が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	松 浦 英 幸
副 査	教 授	生 方 信
副 査	教 授	橋 床 泰 之
副 査	教 授	増 田 税
副 査	助 教	高 橋 公 咲

学 位 論 文 題 名

ジャスモン酸応答制御機構に関する生物有機化学的研究

本論文は 132 頁，図 34，表 2，合成 Scheme 17，3 部からなり，参考論文 6 編が付されている。

植物は様々な環境要因，ストレスに対して独自の応答機構を有している。植物は細胞壊死を伴う傷害を被った場合、植物ホルモンの一種であるジャスモン酸 (JA) 類を主要なシグナル伝達物質として用い、対峙している。近年の研究により、シグナル伝達物質の本体は JA にイソロイシンがアミド結合体したジャスモノイルイソロイシン (JA-Ile) であると結論づけられているが、その不活性化機構、作用部位の視覚化やケミカルプローブの研究については知見が少なく、新たなアプローチが必要な分野である。本論文では JA-Ile の不活性化機構の解明、作用部位の視覚化および他のケミカルプローブについて研究を行ったものである。

【1】ジャスモノイルイソロイシンの不活性化機構の解明

申請者がこの研究に携わる以前は JA-Ile の不活性化経路は不明であった。これを打開すべく、P450 酸化酵素による JA 不活性化機構を想定し、研究に着手した。まず、最初に酸化不全の有望な変異株をデータベース、既報より絞り込んだ (40 株)。候補のシロイヌナズナ T-DNA 挿入発現抑制株のスクリーニングを行い、有望なシロイヌナズナ変異株、*cyp94b3* 変異株を発見した。引き続き、*CYP94B3* をクローニングし、P450 還元酵素を形質導入したピキア酵母 (*Pichia pastoris*) に導入した。作製した形質転換酵母に基質となる JA-Ile を取り込ませたところ、*CYP94B3* を導入した株でのみ 12-OH-JA-Ile が生成した。また、興味深いことに JA を水酸化する活性は有しないが、バリンやフェニルアラニンとの結合体である JA-Val、JA-Phe を水酸化する活性を示した。この結果から、JA-Val、JA-Phe の植物内での存在および生物活性が予想された。12-OH-JA-Val、12-OH-JA-Phe の植物体内における内生量を定量したところ、予想通り 12-OH-JA-Ile と同様に傷害処理後誘導され、*cyp94b3* 変異株において基質となる JA-Val、JA-Phe の蓄積量の増加と水酸化物の減少がみられた。このことにより、12-OH-JA-Ile と同様に 12-OH-JA-Phe、12-OH-JA-Val も傷害処理後 CYP94B3 によって生合成されることが明らかとなった。

JA-Val、JA-Phe は JA-Ile とほぼ同様の生理活性をしめすことから、CYP94B3 によるこれらの化合物の 12 位の水酸化が JA シグナリング機構の重要な一つの経路である事が明らかと成った。しかしながら、12-OH-JA-Ile、12-OH-JA-Phe、12-OH-JA-Val は弱いながらも、JA-Ile 活性を有し、更なる不活性化機構が必要である。候補として、液泡に排出可能な化合物、12-OGlc-JA-Ile、12-OH-JA-Ile、12-COOH-JA-Ile、を想定し合成した。引き続き、傷害応答時に於ける蓄積量の経時変化を解析し植物に於ける存在を明らかとするとともに、その蓄積パターンを解析した。この結果、傷害応答後、これら予想した化合物が蓄積する事を明らかとしたが、12-OH-JA-Ile が最も高含量である事が明らかと成った。この結果より、傷害応答後、12-OH-JA-Ile がダイレクトに老廃物の蓄積器官である液泡に送り込まれているのではないかと推察している。

【2】ジャスモン酸類の作用部位の視覚化に関する研究

生理活性物質の作用部位の視覚化に関して、市販の MeJA を出発原料として methyl 7-(*N*-fluorescein-4'-isothio-cyanatoglycylglycylglycylaminomethyl)-7-*epi*-jasmonate を化学合成した。合成した蛍光ラベル JA を含む培地にシロイヌナズナを播種し、根の伸長阻害、蛍光の発色の様子を観察した。JA-Ile は強くシロイヌナズナ根の伸長阻害を示すが、今回合成した化合物に関しても弱いながらも根の伸長阻害が観察された。次に根部にに関して、蛍光顕微鏡を用いて観察した。450-490nm の光を用いて励起し、放出される 520nm の蛍光を観察した所、根の維管束、および根毛先端部が強く蛍光色が観察された。よって、今回合成した蛍光ラベル JA が JA 類の作用部位の視覚化に利用できる事を証明した。

【3】JA 活性を有するケミカルプローブの探索研究

JA 様活性を有する化合物を探索する事は、生合成研究や作用部位の探索研究に有用である。また、大量生産が可能であれば実際の農業への応用が期待される。本論文では糸状菌、*Lasioidiplodia theobromae* の培養ろ液を生理活性物質の単離源として、タバコ成長阻害活性を有する 4,5-dihydroxy-3-methyl-cyclohex-2-enone の単離に成功した。また、立体配置が固定された 7-hydroxymethyl JA を合成し、JA が有するバレイショ細胞肥大活性のアンタゴニストとしての作用を明らかとした。これらの知見を応用し、JA 類の作用部位の同定や実際の農業への応用が期待される所である。

以上本研究では主として有機化学的手法を用いて、ジャスモン酸応答制御機構に関する研究を行い、数々の知見を与えた。以上の研究成果より、審査員一同は、北岡直樹氏が博士（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。