

Title	植物の防御応答に対する緑葉揮発成分のプライミング効果誘導機構に関する研究
Author(s)	平尾, 壽啓
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60068
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【27】

氏 名	平 尾 壽 啓
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学 位 記 番 号	第 2 5 9 7 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	植物の防御応答に対する緑葉揮発成分のプライミング効果誘導機構に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 平 田 收 正 (副査) 教 授 那 須 正 夫 教 授 高 木 達 也 教 授 堤 康 央

植物は昆虫などから食害を受けると直ちに緑葉揮発成分 (Green leaf volatiles, GLVs) を放散する。GLVs は葉緑体膜より遊離される α -リノレン酸やリノール酸といった C18 脂肪酸より酸化分解を経て産生される C6, C9 の揮発性化合物の総称である。また、 α -リノレン酸を前駆体とする化合物としてジャスモン酸 (JA) が知られており、JA とその揮発性誘導体であるメチルジャスモン酸 (MeJA) は、植物のストレス応答、特に防御応答に対して重要な役割を果たす生理活性物質である。具体的には、JA や MeJA は、抗菌性タンパク質の合成などを強力に誘導することが知られており、直接的に食害の拡大を抑制するための防御に利用されている。

GLVs も JA や MeJA と同様に植物の防御応答に利用されるが、その機能は、それらとは異なり、防御応答を予め準備する「プライミング効果」の誘導であることが示唆されている。予め GLVs を処理した植物では、食害を受けた場合、プライミング効果によって GLVs 未処理の植物に比べより強い防御応答が観察される。GLVs の単独処理では、防御応答が確認されないため、食害を受けた植物から放散される GLVs は、周囲の植物が食害の危険を予め察知し、食害を受けた場合に、より強い防御応答を迅速に誘導するために用いられていると推察されている。GLVs によるプライミング効果は、JA のシグナル伝達経路に作用するものと予想されるが、この作用機構はほとんど解明されていない。GLVs はその化学特性として揮発性が高く、GLVs の基本骨格である (Z)-3-hexenal, *n*-hexanal から様々な化学修飾を受けるため、種々の化合物によって構成されている。

申請者らは、GLVs によるプライミング効果を詳細に検証するため、簡便な新規閉鎖型アッセイ系を構築した。プライミング効果は、MeJA によって誘導される二次代謝産物であり、昆虫の忌避物質として知られるアントシアニンを測定することで評価し、GLVs によるプライミング効果と MeJA 応答の関係性を検証した。構築したアッセイ系では、前処理として行う GLVs 添加と、その後に防御応答を誘導するために行う MeJA の処理を合わせて二回行うことが特徴となる。試験に供する GLVs として、代謝経路が明らかにされている九種類の化合物を選定し、それらのプライミング効果を検証した。まず、MeJA 処理のコントロールとして使用した MeOH 処理では、GLVs の処理の有無にかかわらず、植物内で合成されるアントシアニン量に違いが見られず、GLVs の単独処理ではアントシアニン合成が誘導されないことが示された。MeJA 処理区では、*n*-hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenyl acetate, (Z)-3-hexenyl acetate で前処理した場合に、その後の MeJA 処理によって誘導されるアントシアニン量が、GLVs で前処理を行わなかった MeOH-MeJA 処理区と比べ、有意に増加した。以上より、これらの GLVs が MeJA 応答に対するプライミング効果を有する化合物であることを示した。一方、試験に供した GLVs の中で、*n*-hexanol, (E)-2-hexenol, (Z)-3-hexenol, *n*-hexyl acetate による前処理では、アントシアニン量が MeOH-MeJA 処理区と同程度であり、プライミング効果が観察されなかった。これらの結果から、GLVs の構造に着目すると、アルデヒド基を有する GLVs である、*n*-hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenal はプライミング効果を示したが、水酸基を有する GLVs である、*n*-hexanol, (E)-2-hexenol, (Z)-3-hexenol ではプライミング効果が認められないという結果を得た。

さらに、GLVs には C9 化合物の存在も確認されており、今回 C6 GLVs においてプライミング効果を示した *n*-hexanal, (E)-2-hexenal の構造に着目し、それらの構造に類似する *n*-nonanal, (E)-2-nonenal を選定し、プライミング効果の検証を行った。

その結果、試験に供した C9 の GLVs の中で、アルデヒド基を有する (E)-2-nonenal, *n*-nonanal の前処理によって、MeOH-MeJA 処理区よりも有意なアントシアニン量の増加がみられ、C6 化合物と同様にプライミング効果が確認された。一方、水酸基を有する *n*-nonanol や (E)-2-nonenol の前処理では、プライミング効果は認められなかった。これらの結果より、MeJA 応答に対してプライミング効果を誘導する GLVs は、アルデヒド基を有する化合物であることが明らかとなり、水酸基を有する GLVs は MeJA によるアントシアニン合成を促進しないという興味深い知見を得た。また、試験に供した GLVs の中で、最も高いプライミング効果を発揮する物質は、(E)-2-hexenal であった。以上、申請者らは、(E)-2-hexenal がシロイヌナズナにおいてアントシアニン蓄積を誘導する MeJA の感受性を増強することを初めて見出した。

本研究において示された (E)-2-hexenal によるプライミング効果の分子メカニズムを理解するために、申請者らは、アントシアニン生合成系と JA シグナル伝達経路に関わる酵素遺伝子の発現量解析を試みた。アントシアニン生合成経路に関わる遺伝子発現量解析の結果、(E)-2-hexenal-MeJA 処理区において、MeOH-MeJA 処理区よりも有意な発現量の増加が見られた遺伝子は、*PAL*, *CHS*, *F3'H*, *DFR*, *LDOX*, *UF3GT* そして、転写因子の *PAP1* であり、アントシアニン合成を促進させるプライミング効果は、遺伝子の転写レベルでも確認された。特に、アントシアニンの生合成に関与する転写因子である *PAP1* は MeJA 処理後早い段階にてその転写量が著しく上昇しているため、アントシアニン合成経路の後半部分の反応を触媒する酵素の *DFR*, *LDOX*, *UF3GT* の遺伝子発現量を強く活性化することが示唆された。(E)-2-hexenal 処理によるアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現量の促進は、*PAP1* 転写因子の発現量上昇によるものであると推察される。次に、アントシアニンの生合成を制御している JA シグナル伝達経路に関わる鍵遺伝子の発現量について調べた。その結果、MeOH-MeJA 処理区の発現量と比較して、(E)-2-hexenal-MeJA 処理区において有意な発現量の上昇を示した遺伝子は、JA シグナル伝達経路において中心的な役割を担う *COII* と二次代謝経路の活性化に関わる転写因子 *MYC2* であった。アントシアニン生合成遺伝子の発現量解析の結果と合わせれば、(E)-2-hexenal のプライミング効果によって、MeJA 応答時の転写因子の転写レベルが大きく上昇させられることによって、下流の二次代謝経路の活性化が強力に促進させることが示唆された。

以上、本研究では、アルデヒド基を有する GLVs が MeJA 応答性のアントシアニン蓄積におけるプライミング物質であることを明らかにした。また、プライミング効果によって、*PAP1* や *MYC2* などの転写因子の遺伝子発現量が大きく増加させられることにより、アントシアニンを含めた二次代謝経路の活性化が起こっていると考えられた。これらの知見は、植物の有用二次代謝生産に適用することで、新たな栽培技術の開発に貢献できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

博士論文「植物の防御応答に対する緑葉揮発成分のプライミング効果に関する研究」では、植物の防御応答反応として知られるメチルジャスモン酸 (MeJA) によって誘導される二次代謝物質生合成促進作用における緑葉揮発成分 (GLVs) のプライミング効果について、以下のような知見を得た。

1. シロイヌナズナを材料として、MeJAによって誘導されるアントシアニン生合成促進作用に対する種々のGLVsによる前処理の影響について検討し、アルデヒド基を有するGLVsがブライミング効果を有することを明らかにした。また、試験した物質の中では、特に (*l*)-hexenalの活性が強いことが示された。
2. 上記の (*l*)-hexenalが有するブライミング効果は、数種のハーブ植物やスプラウトにおいても同様に認められることが示され、普遍的な現象であることが確認された。
3. (*l*)-hexenalで前処理した際のアントシアニン生合成系の酵素遺伝子の発現を調べたところ、複数の遺伝子の発現が有意に促進されることが明らかとなった。さらに、PAP1やMYC2などの転写因子の遺伝子発現も促進されることが示された。(*l*)-hexenalはこれらの遺伝子の発現を促進することによって、アントシアニン生合成を促進すると考えられる。

これらの研究成果は、植物における環境ストレス応答機構における新たな知見として非常に重要であり、学術的にも高いレベルにある。また、二次代謝物質については、薬用植物における臨床的に重要な成分など、付加価値の高い物質が多く存在することから、本成果は、こういった物質の新たな生産促進方法の開発にも非常に有用な情報を提供するものである。本成果の一部は、原著論文としてすでに英文学術雑誌に発表されている。

以上の研究内容の審査により、本論文は学術的な観点および今後の発展的な応用が期待できるという観点から、非常に優れた研究であることを確認し、大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程の博士論文に値するものと判断するに至った。