

氏 名	まつ だ ふみ お生 松 田 史 生
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1245 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	エリシター処理によるジャガイモのフェノール性アミド化合物の誘導機構

論文調査委員 (主査) 教授 池田篤治 教授 坂田完三 教授 桑原保正

### 論 文 内 容 の 要 旨

エリシターは植物に病害抵抗反応を誘導させる活性物質の総称である。エリシターを認識した植物は、細胞内シグナル伝達経路を経て、防御関連二次代謝産物の蓄積をはじめとする種々の防御反応を展開する。しかし、そのメカニズムは複雑で、未だ不明な点が多い。そこで、この病害抵抗反応の誘導機構を解明するために、次のようなより単純なモデル系に着目した。ラミナリン由来の $\beta$ -1,3-グルコオリゴ糖をジャガイモ (*Solanum tuberosum*) 塊茎組織に処理すると、フェノール性アミド化合物、*p*-クマロイルオクトパミン (*p*-CO) が顕著に蓄積する。類似の現象がジャガイモ疫病菌を接種しても起きることから、本現象は病害抵抗反応の一部であると推測されている。*p*-CO に抗菌活性は認められていないが、遊離状態で生合成された後に、塊茎組織の細胞壁に結合・沈着することで病原菌の侵入を防ぐ物理的防壁として機能すると考えられている。この系で用いるエリシターは褐藻類に由来し、病原菌由来のエリシターで問題となるタンパク質性エリシターなどの混入を考慮せずに、植物に及ぼす影響を解析することが可能である。また、*p*-CO は単純な化合物であり、その生合成経路も比較的単純であると推測される。以上の特性から、病害抵抗反応に関与する二次代謝産物の生合成系の活性化および、その誘導機構を解析するモデル系として、本系の詳細な解析を行い、以下のような知見を得た。

1. 光学活性な *p*-CO を合成し、キラルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー上での挙動を比較して、従来不明であったジャガイモ由来の天然 *p*-CO の絶対配置を *S* と決定した。
2. 安定同位体標識化合物を用いたトレーサー実験により、*p*-CO の生合成前駆体がフェニルアラニンとチロシンであることを証明し、*p*-CO 生合成経路を推定した。ついで、関与が予想されたフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)、4-ヒドロキシ桂皮酸 CoA リガーゼ (4CL)、チラミンヒドロキシシナモイルトランスフェラーゼ (THT)、チロシンデカルボキシラーゼ (TyrDC) の活性を測定した。その結果、いずれの酵素活性もエリシター処理により 2~5 倍程度上昇する事実を認めた。しかし、無処理のコントロール区においてもサンプル作成時の傷害に起因すると思われる活性の上昇が PAL, 4CL, THT で見られ、その活性の制御はこれまで懸濁培養細胞などで知られていたものとは大きく異なることが判明した。
3. エリシター処理による *p*-CO 生合成誘導に種々のシグナル伝達阻害剤が及ぼす影響を検討した。活性酸素分子種消去剤、NADPH オキシダーゼ阻害剤が顕著な阻害活性を示した。そこでジャガイモ塊茎組織に生成する過酸化水素を定量したところ、エリシター処理の数分後から始まる多量の活性酸素分子種の生成を認めた。このことからエリシターの認識から *p*-CO の誘導にいたるシグナル伝達経路への活性酸素分子種の関与を推測した。
4. *p*-CO は *p*-クマロイル部分とオクトパミン部分から構成され、これらは生合成の最終段階で縮合する。オクトパミンは植物成分として比較的珍しい化合物であり、植物におけるその生合成経路は知られていなかった。そこで、放射性ラベルしたチロシンを用いてトレーサー実験を行い、植物でもほ乳類と同様にチラミンを経由する経路で生合成されることを確認した。ついでエリシター処理がチラミンとオクトパミンのジャガイモ塊茎組織中含量に及ぼす影響を検討した。エリシター

処理によりチラミンの顕著な一時的蓄積が起きることを見出した。一方、*p*-クマロイル部分は植物に普遍的に存在するフェニルプロパノイド経路に由来する。ジャガイモ塊茎組織に多量に存在するフェニルプロパノイド経路由来化合物、クロロゲン酸、カフェオイルプトレシン、フェルロイルプトレシンの各含量を測定した。その結果、エリシター処理によりこれら化合物の含量が減少したことから、エリシター処理したジャガイモ塊茎組織では、*p*-COの生合成を優先的に行っていると結論した。

### 論文審査の結果の要旨

植物は病原菌の分泌するオリゴ糖などエリシターと総称される因子を認識し、防御関連二次代謝産物の蓄積を含めた種々の病害抵抗反応を展開することが知られている。しかし、エリシター処理がそれら二次代謝産物の生合成系に及ぼす影響や、その誘導に関わるシグナル伝達系の詳細は明らかにされていない。本論文では、エリシター $\beta$ -1,3-グルコオリゴ糖の処理によるジャガイモ塊茎組織での二次代謝産物、*p*-クマロイルオクトパミンの顕著な蓄積現象に着目し、その生合成系の活性化および活性化誘導に関わるシグナル伝達系について生物有機化学的な見地から検討を行ったものである。その評価すべき点は以下に示すとおりである。

1. ジャガイモ塊茎組織に蓄積する、*p*-クマロイルオクトパミンの絶対配置を*S*と決定した。
2. 同位体ラベル化合物の取り込み実験を行い、*p*-クマロイルオクトパミンの生合成経路を推定した。
3. *p*-クマロイルオクトパミン生合成に関与する、4種の酵素、フェニルアラニンアンモニアラーゼ (PAL), 4-ヒドロキシ桂皮酸 CoA リガーゼ (4CL), チラミンヒドロキシシナモイルトランスフェラーゼ (THT), チロシンデカルボキシラーゼ (TyrDC) の活性を測定し、エリシター処理が及ぼす影響を検討した。その結果、エリシター処理により、いずれの酵素も最大2~5倍程度まで一時的に活性化することを示した。また、PAL, 4CL, THTは無処理区でも試料作成時の傷害に起因する活性化が起きるのに対し、TyrDCはエリシター処理時に特異的に活性化することを見出した。
4. 阻害剤を用いた実験を行い、エリシター $\beta$ -1,3-グルコオリゴ糖の受容から*p*-クマロイルオクトパミン生合成に至るシグナル伝達経路への活性酸素分子種の関与を証明した。
5. *p*-クマロイルオクトパミンの生合成中間体であるチラミンおよびオクトパミンについて、エリシター処理によるそれらの組織中含量の変化を調べた。エリシター処理はチラミンの一時的な蓄積を誘導した。
6. *p*-クマロイルオクトパミンとヒドロキシ桂皮酸部分構造を共有する3種の化合物、クロロゲン酸、カフェオイルプトレシン、フェルロイルプトレシンはジャガイモ塊茎組織に多量に存在する。エリシター処理によりこれらの塊茎組織中の含量は減少したことから、優先的な*p*-COの生合成が起きると結論した。

以上のように、本論文はエリシターオリゴ糖処理が引き起こす植物の二次代謝の変動とその誘導に関わるシグナル伝達経路を精査したものであり、植物生理学、植物病理学、天然物化学、生物有機化学、植物防疫学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年 2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。