

氏 名	いし 石 原 亨
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2336 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Involvement of hydroxycinnamic acid amides in defense mechanisms in oats and maize (エンバクおよびトウモロコシにおけるヒドロキシ桂皮酸アミノの関与する 生体防御機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 岩 村 俣 教 授 上 野 民 夫 教 授 桑 原 保 正

論 文 内 容 の 要 旨

植物においてヒドロキシ桂皮酸類は多くの場合エステルや配糖体の形で存在している。また、ヒドロキシ桂皮酸と種々の生体アミンとのアミド化合物も存在が知られている。ヒドロキシアントラニル酸とヒドロキシ桂皮酸類とのアミド化合物である avenanthramide 類はイネ科植物であるエンバク (*Avena sativa*) のファイトアレキシンとして見いだされた。

Avenanthramide 類はエンバクとエンバク冠さび病菌 (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*) との相互作用において、エンバクの品種と冠さび病菌のレースとの間の親和性・不親和性の決定に重要な役割を果たしていると考えられている。このファイトアレキシンの誘導は病原菌の感染のみならず、菌類の細胞壁構成成分であるキチンの分解物 *N*-アセチルキトオリゴ糖や重金属イオンなどのエリシターを処理することによっても再現される。エンバクでは、ファイトアレキシンあるいはエリシターについて多くの研究が行われてきたが、エリシターの認識からファイトアレキシンの生産、蓄積に至る植物細胞内の過程はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究ではエンバクのファイトアレキシン avenanthramide 類の誘導機構をその生合成を中心に解析した。また、エンバクと同じイネ科植物であるトウモロコシ (*Zea mays*) ではヒドロキシ桂皮酸類と tyramine あるいは tryptamine とのアミド化合物が種子から単離されている。イネ科植物におけるヒドロキシ桂皮酸の関与する生体防御機構の普遍性を明らかにすることを目的として、傷害ストレスを与えたトウモロコシ第一葉を用いてアミド化合物およびその生合成酵素の動態について研究を行った。本論文の主な内容は以下の通りである。

1. カルシウムイオノフォア A23187 が avenanthramide 類を誘導し、また、カルシウムチャネル阻害剤がエリシターによる avenanthramide 類の誘導を阻害したことから、カルシウムイオンが情報伝達過程に関与していることが示唆された。
2. Avenanthramide 類の生合成の最終段階を触媒する酵素 hydroxy-cinnamoyl-CoA: hydroxyanthranilate *N*-hydroxycinnamoyltransferase (HHT) 活性の測定法を確立した。さらにこの方法を用いて、*N*-アセチルキトオリゴ糖をエリシターとして処理したエンバクの第一葉中の酵素活性を測定したところ、この酵素活性が顕著に誘導されていることを見いだした。
3. *Helminthosporium victoriae* の生産する宿主特異的毒素 Hv-toxin C をエリシターとして処理し、HHT 活性の変動を測定した。その結果、Hv-toxin C も *N*-アセチルキトオリゴ糖と同様に HHT 活性を誘導することが見いだされた。
4. Avenanthramide 類がエリシター処理によって *de novo* 合成されることを明らかにし、その生合成経路を大筋で把握するために想定される前駆物質の取り込み実験を行った。[ring-UL-¹⁴C] Anthranilic acid, [2, 3, 4, 5, 6-²H] L-phenylalanine, [1, 2-¹³C] *p*-coumaric acid は全ての avenanthramide 類に取り込まれた。この結果から、avenanthramide 類はエリシター処理によって *de novo* 合成され、その生合成にはフェニルプロパノイド代謝経路が関与していることが明らかされた。
5. フェニルプロパノイド代謝経路上の酵素、phenylalanine ammonialyase, cinnamate 4-hydroxylase, および 4-coumarate: CoA ligase の活性はいずれも avenanthramide 類の蓄積に先立って増大することが見いだされた。したがって、フェニルプロパノイド代謝系上の酵素活性は協調的に制御されていることが示唆された。

6. トウモロコシにおいて種々のストレスが二次代謝産物に与える影響について解析したところ *N-p-coumaroyltyramine* および *N-feruloyltyramine* が傷害処理によって誘導されることを見いだした。これらの化合物の蓄積には *avenanthramide* 類の場合と同様にヒドロキシ桂皮酸類の CoA エステルとアミンの縮合を触媒する酵素活性が関与するものと考え *hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase* 活性の測定を行った。その結果、この酵素活性も傷害処理によって顕著に誘導されることを見いだされた。

論文審査の結果の要旨

イネ科植物は農業上重要な地位を占めるが、その化学的生体防御機構についての研究は比較的少ない。その中で、エンバクではファイトアレキシン *avenanthramide* 類が単離、構造決定されており、その誘導機構を明らかにすることはイネ科植物全体の生体防御機構の理解につながるものと考えられる。本論文はエンバクにおけるエリシターの認識からファイトアレキシンの蓄積に至る過程を情報伝達と生合成の両面から解析したものである。さらに、類似したストレス応答が同じイネ科植物であるトウモロコシにも存在することを見いだしている。評価される点は以下の通りである。

1. カルシウムイオノフォア A23187が *avenanthramide* 類を誘導すること、およびカルシウムチャネルの阻害剤がエリシターによる *avenanthramide* 類の誘導を阻害することを見いだした。このことから、エリシターからファイトアレキシン誘導に至る情報伝達過程に細胞内カルシウムイオン濃度の増大が関与していることが示唆された。

2. *Avenanthramide* 類の生合成の最終段階を触媒する酵素 *hydroxycinnamoyl-CoA: hydroxyanthranilate N-hydroxycinnamoyltransferase* 活性が、*N*-アセチルキトオリゴ糖や Hv-toxin C などのエリシターにより顕著に誘導されることを明らかにした。

3. 安定同位元素および放射性同位元素によって標識された前駆物質の取り込み実験を行い、*avenanthramide* 類の生合成にはフェニルプロパノイド代謝経路が関与していることを明確にした。さらに、フェニルプロパノイド代謝経路上の酵素活性はいずれも *avenanthramide* 類の蓄積に先立って増大することを見だし、*avenanthramide* 類の生合成酵素活性は協調的に制御されていることを示唆した。

4. トウモロコシにおいて *N-p-coumaroyltyramine* および *N-feruloyl-tyramine* が傷害処理によって誘導されることを見いだした。さらにその生合成に関与する *hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine N-hydroxycinnamoyl-transferase* 活性も傷害処理により誘導されることを明らかにした。

以上のように本論文は、イネ科植物、特にエンバクにおけるファイトアレキシンの生成機構を精査したものである。加えて、トウモロコシにおいても類似した防御機構の存在を明らかにしており、ヒドロキシ桂皮酸アミド類の関与する生体防御機構のイネ科植物における普遍性が示唆されている。したがって、生物有機化学、植物生理学、および天然物化学の発展に寄与するところが多い。

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12年9月25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。