

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07470

研究課題名(和文) 樹木防御反応の誘導・調節に対する細胞間シグナル物質の機能解明

研究課題名(英文) Inducing and mediating mechanisms of intercellular signal compounds to defense responses in woody plants

研究代表者

楠本 大 (Kusumoto, Dai)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・講師

研究者番号：80540608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物に傷がつくと活性酸素種やジャスモン酸、エチレンが発生し、防御反応を誘導することが知られている。しかし、植物の二次代謝産物の合成に与える影響はほとんど明らかにされていない。そこで、ヒノキ二次師部のリグニン合成に与える影響を調査した。傷つけ後のジャスモン酸処理はリグニン化の発現位置に影響を与えなかったが、リグニンの生合成速度を促進した。リグニン化の発現位置は細胞壁の変色と密接な関係があり、細胞壁の変色は活性酸素種の発生による可能性が示唆された。以上のことから、ヒノキ二次師部のリグニン化は、活性酸素種とジャスモン酸という異なる特性を持つ2つのシグナルによって誘導・調節されていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：When plants are wounded, they produce reactive oxygen species (ROS), jasmonic acid and ethylene as inducers of defense responses. However, their effects on secondary metabolites have been little known. We investigated the effects of those signals on lignification and lignin synthesis in the secondary phloem of *Chamaecyparis obtusa* in this study. Exogenous treatments of jasmonate did not affect the location of lignification induced by wounds but promoted the lignin synthesis. The location of lignification was related with cell wall discoloration. It was suggested that the wall discoloration was caused by the generation of ROS. These results show that lignification in the phloem of *C. obtusa* is regulated by the two signals, ROS and jasmonate, which have different characteristics for defense induction.

研究分野：森林科学

キーワード：ジャスモン酸 リグニン 活性酸素種 防御反応 二次師部 木本植物

### 1. 研究開始当初の背景

近年、植物の防御反応を誘導する内生シグナルの存在が明らかとなり、モデル植物を中心にその機能が解明されてきている。一方、樹木の二次木部(材)や二次師部(内樹皮)は木本特有の組織構造をしており、防御機構も草本とは異なるため、既存の知識だけでは樹木の病虫害抵抗性や生存戦略を理解するには不十分である。また、内生シグナルが樹木で起こる防御反応に与える影響、とりわけ二次代謝産物に与える影響は未解明のままになっている。

二次木部における防御機構は、CODITモデルや反応帯モデルとして古くから知られており、柔細胞におけるフェノール性物質の蓄積、仮道管や木繊維におけるフェノール性物質や油脂の蓄積、道管でのチロースの形成などが、感染部の周囲を連続的に取り囲むことによって菌の拡大を封じ込める。二次師部でも同様に、感染部の周囲で傷害周皮や傷害樹脂道の形成、細胞壁のリグニン-スベリン化、フェノール類の蓄積などが生じる。こうした防御組織は、一旦完成してしまえば非常に強固で持続的な障壁として感染部の拡大を阻害するが、障壁として機能するまでの時間は、最初の防御反応が検出されるまでに7~14日、防御物質の増加が完了するまでに30日ほどとかなり長い時間がかかることが知られている。

樹木の生存戦略を考える場合、こうした二次代謝産物に基づく防御反応の誘導・調節機構を理解することが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、代表的なシグナル物質であるジャスモン酸やサリチル酸、エチレン、活性酸素種を対象とし、二次木部や二次師部の防御反応における各シグナル物質の機能を生化学・組織化学的手法により明らかにすることにより、シグナル伝達から抵抗性獲得までの一連の生理プロセスを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ①ヒノキ師部の防御反応に対するジャスモン酸の影響

実験は東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林田無演習林のヒノキ成木36個体(平均直径約27.5cm、平均樹高約15.0m)を用いて行った。師部に長さ10cmの傷を3カ所付け、傷口にスポイトで0、0.1、2.0mMのジャスモン酸メチル溶液を処理した。処理後7、14、28日目に傷口を含む周囲の師部を採取し、直ちに冷凍保存した。

細胞壁のリグニン濃度を測定するため、サンプリングした師部の一部から変色部を切り出し、60℃で乾燥させたのち、粉碎した。粉碎したサンプルを80%メタノール3回、80%エタノール、蒸留水3回、クロロホルム+メタノール(1:1)、ブチルメチルエーテ

ルで洗浄し、可溶性成分を取り除いた。残った細胞壁中のリグニン量を、チオグリコール酸リグニン法を用いて定量した。

別の部位の変色部と健全部から可溶性物質を80%メタノールで抽出し、フォリン-チオカルト法を用いてフェノール性物質の定量を行った。

細胞壁のリグニン化や傷害周皮の形成を組織化学的に観察するため、クリオスタットを用いて10μm厚の切片を作成し、フロログルシン塩酸法によりリグニンの染色を行った。切片を光学顕微鏡を用いて写真撮影し、リグニン化や傷害周皮が形成された傷口からの深さを計測した。

#### ②細胞壁の変色に対する活性酸素種の影響

師部における細胞壁の変色は、リグニン化や傷害周皮形成が起こる位置決定に重要な役割を果たしている。この変色が活性酸素種による酸化に起因しているか検討した。

ヒノキ師部に傷を付け、15分、30分、1時間、2時間、5時間後に傷を含む樹皮を採取した。樹皮は直ちにTMB-ペルオキシダーゼ溶液で染色し、顕微鏡観察を行った。

また、二次師部の一部に傷をつけた切り枝を0.03%過酸化水素水または蒸留水に浸漬させ、減圧下で各液を浸透させた。その後、変色の範囲が変化するか顕微鏡観察した。

野外にあるヒノキ苗木に対して、ヒノキ師部に傷を付け、0.03%過酸化水素水または蒸留水を24時間、傷口に接触させた。2週間後、傷口を含む師部を採取し、変色の範囲およびリグニン化、傷害周皮の形成位置を顕微鏡下で観察した。

#### ③傷によって生成されるジャスモン酸およびエチレンの定量分析

ジャスモン酸の分析は、2×2cm程度の師部片を用いて行った。切り出した師部片をプラスチックバッグに入れて、30℃で保温し、6時間おきに3片からジャスモン酸を80%メタノールで抽出した。固相抽出カートリッジで抽出液を精製したのち、ジャスモン酸の量をLC-MS/MSで分析した。

エチレンの分析は、1×1cmの師部片を用いて行った。切り出した師部片をガラスバイアルに入れ、シリコン栓で蓋をした。4時間おきにヘッドスペースガスを採取し、ガスクロマトグラフィーでエチレン量を分析した。

### 4. 研究成果

#### ①ヒノキ師部の防御反応に対するジャスモン酸の影響

ヒノキ師部に傷を付けると、変色部の細胞壁がリグニン化を起こした。変色部のリグニン濃度の経時変化を測定すると、コントロールでは、7日目でもまだ0日目とほとんど変わらず微増程度であったが、14日には最終濃度の半分程度まで増加し、28日目には0日目と比べて10%増加した(図-1)。一方、ジャ

スモン酸を処理すると、7日目、14日目ともにコントロールと比べて有意にリグニン濃度が高まったが、28日目ではコントロールと有意な差はなくなった。

顕微鏡観察では、ジャスモン酸を処理しても、変色の深さやリグニン化の位置、傷害周皮形成の速度や位置に違いがみられなかった。また、総フェノール量に関しても処理間の差は認められなかった。

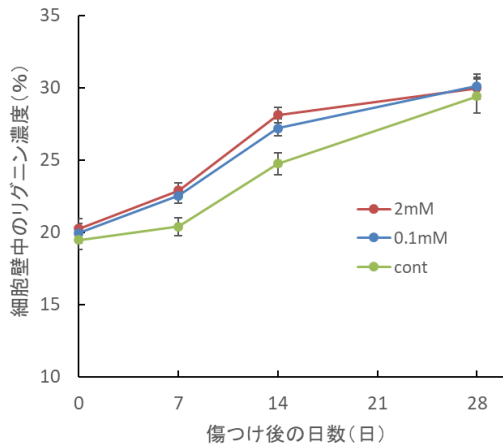


図-1. 傷つけによって起こる変色部のリグニン化に対するジャスモン酸メチルの促進効果

以上のことから、ジャスモン酸はリグニン化に関する生合成を促進することで、病傷害を受けて1カ月以内の抵抗性を高めていると考えられた。一方で、リグニン化が起こるのは変色部に限られており、ジャスモン酸を処理しても変色の範囲は変わらないことから、ジャスモン酸はリグニン化を直接的に誘導するシグナル物質ではないと考えられた。

## ②細胞壁の変色に対する活性酸素種の影響

師部細胞壁の変色は傷つけ後15分程度ですでに開始していた。この師部をTMB-ペルオキシダーゼ溶液で染色すると、変色部の細胞壁が一部青く染まったことから、変色部に過酸化水素が発生していたことが推察された。変色は時間経過とともに徐々に濃くなっていったが、その間、TMB-ペルオキシダーゼ溶液によっても青く染まったことから、継続して過酸化水素が発生していたと考えられた。

次に、0.03%過酸化水素水を二次師部に減圧浸透させると、蒸留水に比べて、傷口からより深くまで細胞壁の変色が起こっていた。このことから、変色を引き起こす原因として過酸化水素が関与していることが示唆された。

ヒノキ苗木に対して二次師部に傷をつけ、そこに0.03%過酸化水素水を処理した場合、わずかではあるが、変色の範囲はコントロールよりも広がった(図-2)。リグニン化はいずれの処理でも変色部の健全部寄りでは起

り、傷害周皮も変色部と健全部の境界で起こっていた。つまり、リグニン化と傷害周皮の発生位置は過酸化水素処理によって傷口から離れた位置に移行しており、このことから、活性酸素種シグナルの発生がリグニン化と傷害周皮の形成誘導に強く関係していることが示唆された。

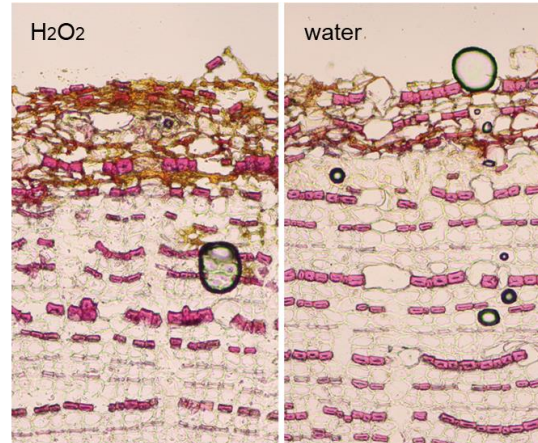


図-2. 過酸化水素処理による変色範囲の拡大とリグニン化発現位置の変化

## ③傷によって生成されるジャスモン酸およびエチレンの定量分析

ジャスモン酸の含有量は傷つけ後直ちに増加し始め、6時間後にピークに達し、12時間後には傷つけ前の濃度まで減少した(図-3)。12時間以降、ジャスモン酸が増えることはなかった。ピーク時のジャスモン酸含有量は約40pmolであった。

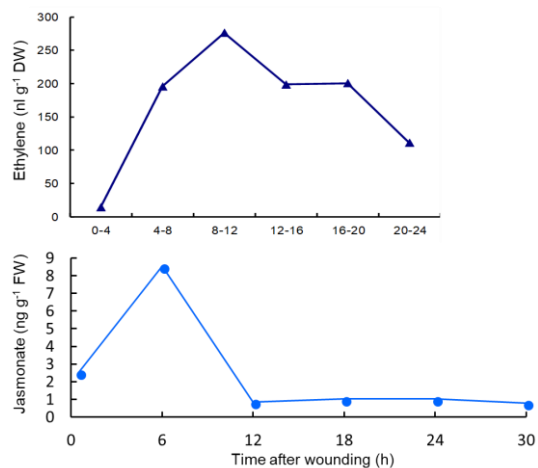


図-3. 傷に対するヒノキ二次師部のエチレン(上)およびジャスモン酸(下)生成量の経時変化

エチレンは、4時間目まではほとんど発生していなかったが、4時間目以降に急増し、およそ12時間後あたりでピークに達した(図-3)。その後、徐々に発生量が減少したが、48時間後でも傷つけ前よりも多くのエチレンを生成していた。ピーク時のエチレン生成量は10nmol以上あり、ジャスモン酸よりもはるかに多量のエチレンが発生するこ

とがわかった。

#### ④仮定されるリグニン化の発生機序

以上の結果をもとに、ヒノキ二次師部におけるリグニン化の発生機序を考察する。

傷や微生物感染等のストレスを受けた場合、数十分ほどで傷付近の柔細胞で酸化バーストが起こる。酸化バーストで増加したスーパーオキシドや過酸化水素はアポプラストを移動し、細胞壁中のフェノール性物質を酸化することで細胞壁の変色を発生させる。また、それと同時に、シグナルとして作用し、柔細胞にリグニン合成遺伝子の発現を誘導すると考えられる。そのため、細胞壁が変色する範囲でリグニン化も起こるものと推察される。

一方、ジャスモン酸は傷に直ちに反応し、6時間程度でピークに達する。ジャスモン酸は一般に全身的シグナルとみなされおり、比較的離れた部位まで移動する。針葉樹では傷などがなくてもジャスモン酸処理により傷害樹脂道の形成が誘導されるが (Martin et al. 2002, Hudgins and Franceschi 2004)、その際、細胞壁の変色やリグニン化が起こるといった報告はなく、ジャスモン酸はリグニン化の誘導シグナルではないと考えられる。一方、ジャスモン酸生成量の増加はリグニン合成を促進し、素早く細胞壁の堅さを高めることに寄与している。このことは微生物などの強いストレスによってジャスモン酸が多く生成されることにより、感染を防ぐために素早くリグニン化を完了させるといった機能が考えられる。

#### <引用文献>

- ① Hudgins JW, Franceschi VR. Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiol.*, 135, 2004, 2134-2149.
- ② Martine D, Tholl D, Gershenzon J, Bohlmann J. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.*, 129, 2002, 1003-1008.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (0件)

[学会発表] (計2件)

- ① 楠本 大, ヒノキ師部の傷害樹脂道形成と傷害エチレンの特性. 第129回日本森林学会大会, 2018年.

- ② 楠本 大, シグナル物質によるヒノキ師部防御反応の制御. 第128回日本森林学会大会, 鹿児島大学, 2017年.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

楠本 大 (Dai Kusumoto)

東京大学・農学生命科学研究科・講師

研究者番号: 80540608

##### (2) 研究分担者

謝 肖男 (Xiaonan Xie)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号: 30610323