

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580105
 研究課題名（和文）植物「立ち聞き」（揮発性化合物感知）分子機構の解析
 -新規植物化学調節物質へ-
 研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of plant eavesdropping (perception of volatile compounds-An approach for a novel plant regulator-
 研究代表者
 松井 健二 (MATSUI KENJI)
 山口大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：90199729

研究成果の概要：

シロイヌナズナ葉を(β)-2-ヘキセナール処理すると、NADPHオキシダーゼ特異的に過酸化水素の蓄積がおり、これが引き金となって細胞膜カルシウムチャンネルが開口し、カルシウムイオンの流入が引き起こされることを明らかとした。その後、還元型グルタチオン量が一過的に減少し、こうした一連の応答が防御遺伝子誘導につながることを示唆された。またメチルビニルケトンなどのα,β-不飽和カルボニル化合物が同様の機構で植物をプライミングすることが示され、新規植物化学調節物質としての可能性を提唱することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	510,000	3,910,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：植物、揮発性化合物、生理活性、化学生態学、立ち聞き、匂い受容

1. 研究開始当初の背景

生態系において植物は様々な揮発性化合物に曝されている。植物が放つ揮発性化合物の組成と量は植物が曝されているストレス状態、例えば病虫害の種類と程度、を反映して動的に変化する。肉食性昆虫は草食性昆虫による食害を受けている植物から放たれる独特の揮発成分組成を嗅ぎ分け、それを頼りに被捕食者を効率良く発見する能力を獲得した。同時に植物はこうした昆虫達との共進化の過程で肉食性昆虫を誘引する揮発性化合物を積極的に放出する能力を獲得し、植食

者による被害を軽減し、自らの生存率を高めている。このように植物は揮発性化合物の組成と量を媒体として生態系に語りかけている（プラントトーク）。もし、植物がその周りの同種、あるいは異種植物から放たれた揮発性化合物を知覚し、その中から情報を抽出できるならまだ無傷な間に病虫害の接近を察知し、予め防御体制を整えておくことが可能となり、その個体の生存率が高まる。生態学的に「立ち聞き」と呼ばれる現象である揮発性化合物を介した植物の「立ち聞き」の実例は生態学的な現象として知られてい

たが、近年、京都大学生態研の高林教授ら、米国農務省の Tumlinson らによって詳細な報告がなされた。ただ、いずれの場合も「立ち聞き」現象そのものの解析であり植物の揮発性化合物受容の分子機構を明らかにしようとした例はこれまでにない。研究代表者らはシロイヌナズナの信号伝達系変異体を用いて初めて受容機構を検討し、報告した。その後、申請者らはシロイヌナズナのグルタチオン合成変異体 *pad2* が揮発性化合物に対する応答能を欠損していることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では植物「立ち聞き」の分子機構全容の解明を目指し、「立ち聞き」への関与が示唆されている C6-化合物 ((*E*)-2-ヘキセナールと(*Z*)-3-ヘキセノール)をターゲットとしてまず、以下の2段階の分子機構を明らかにすることを目的とした。

(1) 受容の段階：受容体、あるいは受容機構の解明

揮発性化合物に特異的な受容体があるのか否かを明らかにするため、(a) 効率的なレポーター系を確立し、揮発性化合物の構造と植物の応答に関する構造活性相関、(b) 結合キネティクスを解析する。

(2) 受容した刺激を細胞内に伝える段階：活性化される信号伝達経路の解明

シロイヌナズナ変異体を用いた検討から揮発性化合物に対する応答反応には *PAD2* 遺伝子が必須であることを明らかとした。*PAD2* 遺伝子はグルタチオン合成律速酵素 (GSH1) をコードしており、グルタチオン依存のレドックス制御が応答を促進していると示唆された。そこで、(a) 揮発性化合物曝露後のレドックス状態の解析、(b) 細胞レドックス状態を制御する活性酸素種生成様式の解析、を行い、揮発性化合物に対する応答と細胞レドックス状態を相関付け、揮発性化合物により活性化される信号伝達経路にグルタチオン依存レドックス制御が関与することを証明する。更に(c) 揮発性化合物受容によりグルタチオン依存レドックス制御に係る因子を探索する。また、(1)で開発したレポーター系を用いて種々の天然揮発性化合物の「立ち聞き」現象誘導活性を評価し、これまで知られていない生物活性を有する植物化学調節物質を同定する。また、野外生態系でのモデル実験系を開発し、候補物質の有効性評価法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 受容の段階：受容体、あるいは受容機構の解明

(a) レポーターアッセイ系の確立と応答の

構造活性相関の確立

。植物の代表的な揮発性化合物である C6-化合物 ((*E*)-2-ヘキセナール、(*Z*)-3-ヘキセノール)で誘導されることが既に明らかなカルコン合成酵素 (*CHS*)、リポキシゲナーゼ 2 (*LOX2*)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ 1 (*GST1*) 遺伝子のプロモーターに β -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子を融合したキメラ遺伝子 (*pCHS::GUS*, *pLOX2::GUS*, *pGST1::GUS*) を作成し、これをレポーターとしてシロイヌナズナに導入する。また、*CHS*, *LOX2*, *GST1* は用いる化合物の構造に依存して異なった応答を示すため、その受容機構がそれぞれに特有である可能性が高い。こうして確立したレポーターアッセイ系を用いて揮発性化合物による防御遺伝子応答のキネティクスを精査し、応答の構造活性相関を明らかにする。その上で(*E*)-2-ヘキセナールと(*Z*)-3-ヘキセノールを基本構造とした類縁体(市販のもの、一部合成する)を用いて構造活性相関を明らかにする。

(2) 受容した刺激を細胞内に伝える段階：活性化される信号伝達経路の解明

(a) 揮発性化合物曝露後のレドックス状態の解析

(小川、松井)

C6-化合物による抵抗性反応誘導は *pad2* 変異体ではほとんど観察されない(図3)。2005年に *PAD2* 遺伝子が同定され、 γ -グルタミルシステイン合成酵素遺伝子 (*GSH1*) であることが明らかとなった (Glazebrook, 私信)。*pad2* 変異体はグルタチオンレベルが低く、細胞内のレドックス状態がコントロールできない。この結果から植物が C6-化合物に曝されると総グルタチオン量、酸化型/還元型グルタチオン比が変化し、これが遺伝子誘導を導くと考えられる。そこで電気化学検出器を装備した HPLC (現有) により総グルタチオン量、酸化型/還元型比を解析し、レポーター活性との相関付けによりグルタチオンによるレドックス制御が関与しているか明らかにする。(b) 細胞レドックス状態を制御する活性酸素種生成様式の解析 (松井)

C6-化合物による応答が確認された *GST1* 遺伝子はその発現が H_2O_2 に支配されていることが知られている。そこで、C6-化合物が活性化する信号伝達経路のひとつは H_2O_2 生成を伴うオキシダティブバーストを介していると考えられる。このことを証明するために、(1)-(a)で確立したシロイヌナズナレポーター系を用い、DAB(3,3'-diaminobenzidine)染色、およびルミノールを用いた化学発光法(ルミノメーターを現有)により H_2O_2 を定量する。 H_2O_2 生成阻害剤の DPI (diphenylene iodonium)、あるいは抗酸化剤添加実験を通して H_2O_2 生成量と防御遺伝子プロモーターの活性化が同じ挙動を示すかを明らかにする。

(c) 揮発性化合物受容から細胞レドックス状態変化にいたる信号伝達経路の解明 (松井、小川)

これまでの検討で明らかになった揮発性化合物処理で誘導される遺伝子のうち、少なくとも GST1 は H_2O_2 、さらにグルタチオン依存細胞レドックス状態変化を介して誘導されたと考えられる。そこで、(1)-(a)で調製した *pGST1::GUS* でシロイヌナズナを形質転換し、更に化学変異剤 EMS (ethylmethanesulfonate) でランダムに変異を導入する。得られた M2 世代の種子に対し揮発性化合物処理を行い、GST1 の応答性を失った変異体を単離する。

(c) 受容体を介さない応答機構の解明

揮発性化合物、特に (*E*)-2-ヘキセナルによる細胞表層タンパク質のカルボニル化などの酸化修飾が応答を担っていると考えられる。カルボニル化タンパク質特異的抗体 (市販) により揮発性化合物処理後のタンパク質カルボニル化の程度と植物体の応答の相関付けを行う。次いで、カルボニル化を指標としてカルボニル化されるタンパク質の単離、同定を試みる。

(d) 新規植物化学調節物質のスクリーニング

(1)-(a)で開発したレポーターアッセイ系を用いて天然揮発性化合物の「立ち聞き」現象誘導活性をスクリーニングし、これまで見出されていなかった新規生物活性を開拓する。

4. 研究成果

まず、植物が揮発性シグナルを受容した際に植物細胞内で遺伝子誘導へ至る信号伝達系の二次メッセンジャーの関与について検討した。揮発成分処理したシロイヌナズナ葉で過酸化水素が生成蓄積することをジアミノベンジジン染色により明らかにした (図1)。この時、過酸化水素の蓄積はNADPHオキシダーゼ特異的阻害剤であるDPIにより効果的に抑制されたため、この蓄積にはNADPHオキシダーゼの活性化が関与していることが明らかとなった。また、アポエクオリン発現シロイヌナズナを用いた検討により (*E*)-2-ヘキセナル処理した葉では細胞内カルシウム濃度の一過的上昇が促進されることが示された (図2)。この上昇は塩化ランタン全処理でほぼ完全に抑制されたので細胞外からのカルシウムチャンネルを介したカルシウムイオンの流入に起因することが明らかとなった。また、NADPHオキシダーゼ阻害剤DPIも細胞内カルシウム濃度上昇を抑制したため、(*E*)-2-ヘキセナル処理ではまず、NADPHオキシダーゼ特異的に過酸化水素の蓄積 (オキダティブバースト) が起こり、これが引き金となって細胞膜カルシウムチャンネルが開口し、カルシウムイオンの流入が引き起こされることが明らかとなった。ただし、いずれの場合もこうした二次メッ

ンジャーの蓄積には比較的高濃度の揮発性化合物処理が必要であり、野外生態系での立ち聞き現象にこうした二次メッセンジャーが関与している可能性についてはより詳細な検討が必要である。一方、揮発性化合物処理したシロイヌナズナ葉でグルタチオン量の変化を検討したところ、大きな変化は認められず、わずかに還元型グルタチオンが一過的に減少することが明らかとなった (図3)。この場合、グルタチオン量は植物組織全体を破碎することによって計測しているが、葉緑体やミトコンドリアなどそれぞれの細胞内小器官での変化が遺伝子発現につながる可能性が示唆されている。今後はこうした細胞内小器官特異的計測が必須である。(*E*)-2-ヘキセナルなどの不飽和カルボニル化合物は生体内でグルタチオンと容易に反応してアダクトを作る。こうしてできたアダクトそのものが遺伝子誘導に寄与している可能性が考えられる。こうしたアダクトはLC-MS/MSで計測するが、極めて煩雑である。そこで、HPLCを用いた簡便なグルタチオンアダクト検出システムを確立した。現在、この検出システムを最適化し、シロイヌナズナ葉を (*E*)-2-ヘキセナルで処理した時のアダクトの生成様式の検討を精力的に進めている。

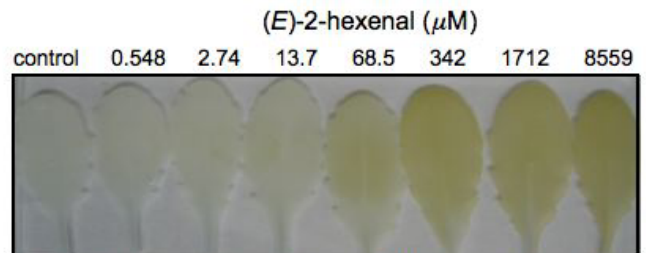


図1 シロイヌナズナ葉の(*E*)-2-ヘキセナル処理後の H_2O_2 生成。 H_2O_2 はジアミノベンジジン染色により検出した。

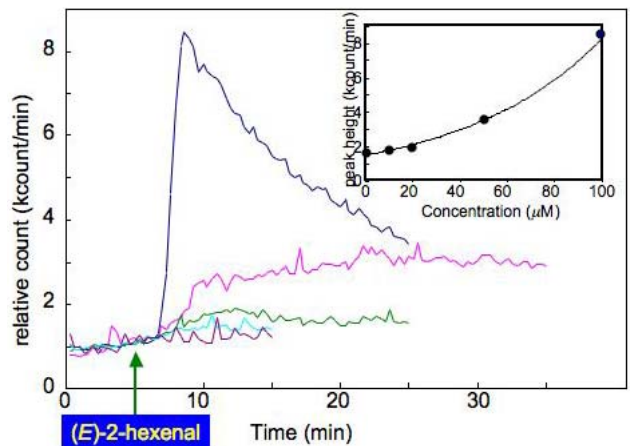


図2 (*E*)-2-ヘキセナル処理による細胞内カルシウムレベルの変化。アポエクオリン発現シロイヌナズナ葉に(*E*)-2-ヘキセナルを曝露し、その後のカルシウム依存発光を測定した。

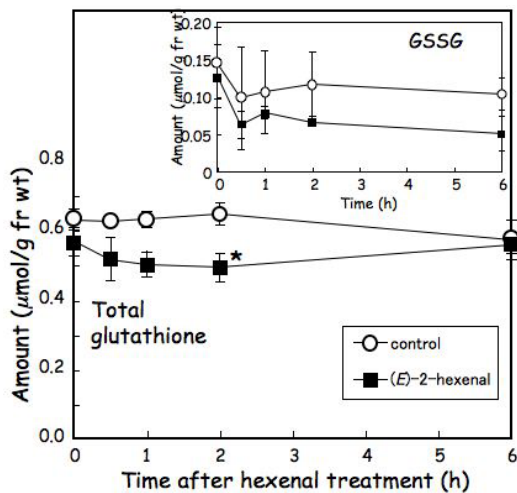


図3 (E)-2-ヘキセナル処理後のシロイヌナズナ葉内グルタチオン量の変化

C6-化合物で誘導されるカルコン合成酵素 (CHS) 等の遺伝子プロモーターに β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を融合したキメラ遺伝子をシロイヌナズナに導入した。このレポーターアッセイ系を用いて揮発性化合物による応答を検討したところ表皮組織でその応答が著しいことが明らかとなった (図4)。このものについて官能基、および炭素数の異なる揮発性化合物曝露を行ったところ、アルデヒド、特に α,β -不飽和カルボニル構造を持っている化合物が高い誘導活性を示すことが明らかとなった。ただ、この実験系は不安定で、植物の生育状態 (湿度、温度、生育度など) によって誘導の程度が大きく変化することが観察された。このことは植物が匂いを受容する際には単に化合物の構造だけでなく、他の未知の内因性因子が関与していることを示唆しており、現在この因子の同定を進めている。



図4 シロイヌナズナ葉でのGLV応答組織の検出
GLVで発現誘導されるカルコン合成酵素のプロモーターの下流にレポーター遺伝子として大腸菌由来の β -グルクロニダーゼを融合し、シロイヌナズナに導入した。この組換え植物をGLVに曝し、24時間後に β -グルクロニダーゼの発現を特異的染色法により検出した。この図はロゼット葉の主脈付近の断面図で、青く染まっているのが β -グルクロニダーゼの発現部位にあたる。ロゼット葉の上側の表皮細胞が全般的に強く染まり、一部はそのすぐ下の柵状葉肉細胞でも染まっているのが認められる。下側の表皮細胞や、海绵状葉肉細胞、あるいは維管束周辺はほとんど染まっておらず、GLVへの応答が限定的に見られることが分かる。

一方、みどりの香り生成能を失ったシロイヌナズナエコタイプ Col-0 に (Z)-3-ヘキセナールを気体で与えると、一部は気孔から、一部は葉組織全体から浸潤して体内に取り込まれ、直ちに (Z)-3-ヘキセナールへと変換されることを明らかとした。一方、みどりの香り生成能を保持したシロイヌナズナエコタイプ No-0 を完全に破碎すると (Z)-3-ヘキセナールが大量に生成され、その一部は酸化されて 4-ヒドロキシ-(E)-2-ヘキセナール

(HHE)へと変換されることを見いだした。このとき、HHEの前駆体として4-ヒドロペルオキシ-(E)-2-ヘキセナールが生成している可能性が示唆されている。HHEは酸化ストレスを受けたほ乳動物細胞で生成され、Keap1系を通じて防御遺伝子誘導を促進することが知られており、植物でもHHEが防御遺伝子誘導物質である可能性が示唆された。(E)-2-ヘキセナールと同様に α,β -不飽和カルボニル構造を持つメチルビニルケトンも同様の防御遺伝子誘導活性を示し、灰色かび病菌への耐性を付与することを認めた。このとき、グルタチオンS-トランスフェラーゼをレポーター遺伝子とすると、その誘導がプライミングされていることが示された。これら α,β -不飽和カルボニル構造をもつ化合物が、新規な植物化学調節物質として有効かもしれない。また、モデル植物としてリマメ、トマトを用い、葉ダニ食害を受けたリマメから放散される揮発性化合物に曝露された無傷リマメがキチナーゼタンパク質を誘導し、葉ダニへの抵抗性を獲得して葉ダニの産卵数を減少させること、ハスモンヨトウ幼虫食害特異的なトマト揮発性化合物が健全トマトのプロテアーゼ活性を高め、ハスモンヨトウ幼虫への抵抗性を高めていることを明らかにした。トマトの系ではプロテアーゼ活性の上昇は実際の食害後にのみ見られるため、プライミングを受けていると考えられた。

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] (計10件)

- ① 松井健二、杉本貢一：みどりの香りを介した生物間相互作用、におい・かおり環境学会誌 (2009)印刷中 (査読無)
- ② Kakumyan, P., Kato, M., Hajika, M., Matsui, K.: Development of a Screening System for the Evaluation of Soybean Volatiles. Biosci. Biotechnol. Biochem., (2009) in press. (査読有)
- ③ Arimura, G, Matsui, K., Takabayashi, J.: Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. Plant Cell Physiol., (2009) 50, 911-923. (査読有)
- ④ Gupta, A., Mukherjee, A., Matsui, K., Roth, J.P.: Evidence for protein radical-mediated nuclear tunneling in fatty acid alpha-oxygenase. J. Am. Chem. Soc., (2008) 130, 11274-11275. (査読有)

- ⑤ Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., Takabayashi, J.: Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in Arabidopsis against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 69: 2127-2132 (2008). (査読有)
- ⑥ Matsui, K., Ishii, M., Sasaki, M., Rabinowitch, HD., Ben-Oliel, G.: Identification of an allele attributable to formation of cucumber-like flavor in wild tomato species (*Solanum pennellii*) that was inactivated during domestication. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 4080-4086 (2007). (査読有)
- ⑦ Koeduka, T., Kajiwara, T., Matsui, K.: Cloning of lipoxygenase genes from cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 54: 315-319 (2007). (査読有)
- ⑧ Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., Takabayashi, J.: Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in Arabidopsis thaliana. *J Gen. Plant Pathol.*, 73: 35-37 (2007). (査読有)
- ⑨ 松井健二：みどりの香り-植物が交わす危険信号-、AROMA RESEARCH, 8: 80-86 (2007). (査読無)
- ⑩ Matsui, K.: Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 274-280 (2006). (査読無)

[学会発表] (計 27 件)
(主な 5 件)

- ① Matsui K., Plant oxylipins formed through P450s and their significance as signaling molecules in plants, 9th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 2008 年 6 月 11 日、ニース、フランス
- ② Matsui K., Are green leaf volatiles involved in warning neighboring cells or plants? Gordon Research Conferences, Floral & Vegetative Volatiles., 2007 年 10 月 7 日、ルディアブレ、スイス
- ③ Matsui K., Molecular aspects of plant induced defense against insects and pathogen, The 23rd International Society of Chemical Ecology Annual Meeting, Jena, Germany, 2007 年 7 月 24 日、イエナ、ドイツ
- ④ Matsui K., Green leaf volatiles: Inter- and intra-plant signal molecules, The 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, Tsukuba, 2007 年 9 月 12 日、つくば
- ⑤ 岸本久太郎, 原志津香, 小澤理香, 高林純示, 松井健二, みどりの香りによる防御応答誘導へのグルタチオンの関与, 第 19 回

植物脂質シンポジウム, 2006 年 11 月 24 日、佐賀

[図書] (計 2 件)

- ① Matsui, K., Sugimoto, K., Kakumyan, P., Khorobrykh, S.A., Mano, J.: Volatile oxylipins and related compounds formed under stress in plants. In *Lipidomics*. (Armstrong, D. ed.) Methods in Molecular Biology, Humana Press Inc. NJ, USA, in press.
- ② 松井健二：種子脂質の分解 種子の科学とバイオテクノロジー (第 3 章 8 項) (原田久也監修 学会出版センター) (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~matsui/>

新聞報道

読売新聞 2007 年 5 月 21 日朝刊

日本種苗新聞 2007 年 7 月 21 日

朝日新聞 2008 年 3 月 3 日朝刊

読売新聞 2009 年 4 月 4 日夕刊

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 健二 (MATSUI KENJI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90199729

(2) 研究分担者

真野 純一 (MANO JUN' ICHI)

山口大学・総合科学実験センター・

准教授

研究者番号：50243100

小川 健一 (OGAWA KEN' ICHI)

岡山県生物科学総合研究所・

細胞工学部門・室長

研究者番号：70344405

(3) 連携研究者 なし