

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18710177

研究課題名 (和文) 作物のアンチエイジングを指向した老化機構に関する研究

研究課題名 (英文) Chemical Studies on Senescence Mechanism aimed anti-aging of Crops

研究代表者

高田 晃 (TAKADA NOBORU)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：10332701

研究成果の概要：ダイズは開花結実後、急激な個体老化を起こす（一回結実性老化）。申請者らは老化物質アブシジン酸の活性を増強させるシナージスト（ジャスモン酸と12-ヒドロキシジャスモン酸）を単離した。ダイズの生長に伴う両シナージストの変動を調べた結果、後者はダイズの老化開始時期に一過的に増加し、前者の量は生育期間を通じて変動しなかった。よって、12-ヒドロキシジャスモン酸がダイズの老化開始のシグナルである可能性が示された。このシナジー効果はダイズ植物体へ散布実験においても確認することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：(1) ダイズ (2) 一回結実性老化 (3) シナージスト (4) ジャスモン酸 (5) アブシジン酸

1. 研究開始当初の背景

ダイズは開花結実後、急激に老化する (Nooden, L. D *et al.* *A Comprehensive Treatise*, 1978, 2, 329)。植物ホルモンがその候補に挙げられているが、活性と内在量を包括的に論じた報告が今までになく、真の老化シグナルは分かっていなかった。我々はダイズ莢に含ま

れる老化活性がダイズの生長に伴ってどのように変動するか調べ、ダイズ莢エキスが緑葉の老化を促進すること、また、それは老化が開始する直前に最大になることを見出した (図 1)。さらに、その活性は内生アブシジン酸 (ABA) 量より最大で 10 倍も強いため、ABA 以外の何らかの因子の関与が示唆

された。我々はダイズ莢エキスの粗精製を進めた結果、ダイズの老化促進物質として ABA を同定するとともに、その老化活性を増強する物質が存在することを明らかにした。

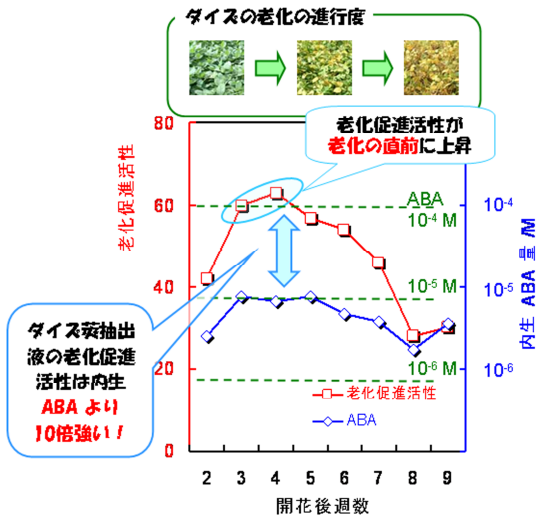


図 1

2. 研究の目的

現在、日本人の3分の2近くの人が生活習慣病を原因とした病気で亡くなっている。このため、生活習慣病予防への意識が高まり、予防効果が報告されているダイズペプチドなどの薬効成分関連商品の売れ行きが好調である。

我々は作物の老化を遅らせること（アンチエイジング）で作物の高付加価値化が可能であると考えた。すなわち作物の薬効成分は光合成によって葉で合成・蓄積されるため、アンチエイジングは薬効成分の高度蓄積に直結すると予想した。

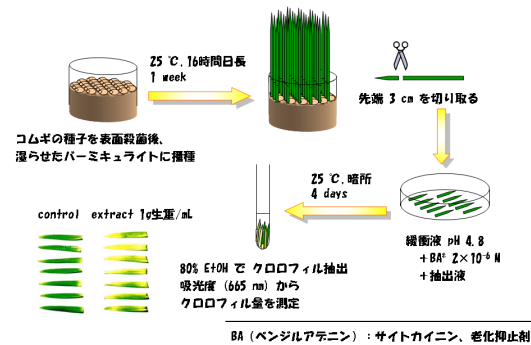
老化の分子機構を調べることでその遅延技術の開発が可能になると考えられる。そこで本研究ではその基礎研究として未解明のダイズシナージストを追求し、一回結実性老化で機能するシグナル物質の特定を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 老化促進活性試験法

老化促進活性の検定には、コムギ第1葉用いたクロロフィル保持試験を使用した（図2）。播種後、1週間生育させたコムギ第1葉の先端3cmを切り取り、検液をしみ込ませたろ紙の上に並べ、暗所にて4日間放置した後、クロロフィルを抽出し、吸光度665nmを測定することでクロロフィル含量を測定した。葉の黄化の程度が大きいものを老化活性有りと判断した。

老化促進活性の検定法 (クロロフィル保持試験)



BA (ベンジルアデニン) : サイトカイニン、老化抑制剤

図 2

(2) シナージストの精製

ダイズ莢 (5.4 kg fresh weight) を 80%EtOH に1週間浸漬した後、ろ過・濃縮し、ダイズ莢エキスを調製した。得られたエキスを分配し、酸性酢酸エチル画分を得た。続いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [toluene:EtOAc (9:1→4:1→3:2→2:3, stepwise elution)] にて分離した後、toluene:EtOAc (4:1、3:2) 溶出画分を Sep-Pak® cartridge [10 g, MeOH:H₂O:AcOH (60:40:0.1)] にて分離した。老化活性を示した画分を HPLC [Nova-Pak HR C18, 25 mmφ× 150 mm, MeOH:H₂O:AcOH (55:45:0.1), 4.0 mL/min flow, detected at 254 nm] にて分画すると、老化促進物質として ABA (7.2 mg) が得られた。また、シナージー活性を示した画分（溶出時間：24～34分）に対

し、HPLC (Inertsil ODS-3, 20 mmφ × 250 mm, MeOH:H₂O:AcOH (60:40:0.1), 5.0 mL/min flow, detected at 210 nm) を4回繰り返すことで (-)-ジャスモン酸 (JA, 0.2 mg) をシナージストとして得た。一方、toluene:EtOAc (4:1, 3:2) 溶出画分を活性炭クロマトグラフィー (30 mmφ × 230 mm)にて分離し、シナージ活性を示した MeOH、EtOAc 溶出画分をゲルろ過クロマトグラフィー (Toyopearl[®] HW-40F, 23 mmφ × 390 mm)にて分画した後、HPLC (Inertsil ODS-3, 20 mmφ × 250 mm, MeOH:H₂O:AcOH (60:40:0.1), 10 mL/min flow, detected at 254 nm)にて精製し、(-)-12-ヒドロキシジャスモン酸 (JAOH, 0.1 mg) を得た。

(3) ダイズへの散布試験

長日条件下1ヶ月育成したダイズ植物体に検液を散布した。散布は1日2回 (9:00AM と 5:00PM) 行い、1株当たり1 mLを散布した。散布中は暗室にて育成させた。散布開始から1週間後、植物体を撮影するとともに葉緑素計にて老化の程度を計測した。

(4) シナージストの定量

開花後4週目から7週目にかけて莢 (1 gFW) を80%EtOHにて抽出した後、分配操作にて酸性酢酸エチル画分を得た。得られた酢酸エチル画分をシリカゲル薄層クロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH=9:1)にて分離した。R_f=0.2-0.45を集め、MeOHにて溶出した。得られた画分はTMSCHN₂にてメチルエステルへ変換した後、GCEIMS測定 [column: Rtx[®]-1 (0.25 mmφ × 30 m; Shimadzu GLC Inc.); splitter ratio: 5:1; temperature: 50°C to 300°C for 25 min; gas flow: 1.69 mL/min]にて有機酸を分析した。アブジジン酸 (ABA)、ジャスモン酸 (JA)、12-ヒドロキシジャスモン酸 (JAOH) の保持時間はそれぞれ23.9、19.1、

22.1 minであった。また、内在量はそのイオンクロマトグラフ[ABA : m/z = 190, JA : m/z = 83, JAOH : m/z = 83]のピーク面積より算出した。

(5) 光学活性JAの調製

市販のジャスモン酸メチルをキラルカラム [Column: Chiralpak AS-H (φ 4.6 mm × 250 mm); Solvent: hexane/ⁱPrOH (95:5); Flow rate: 1.0 mL/min; Detection: 230 nm]により光学分割して調製した。

(6) 光学活性JAOHの調製

JAOHは市販のジャスモン酸メチルを原料に、文献既知 (Matsuura, H., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 2380.)の方法にしたがって合成した。得られたJAOHをキラルカラム [Column: Chiralpak AS-H (φ 10 mm × 250 mm); Solvent: hexane/ⁱPrOH (7:3); Flow rate: 4.0 mL/min; Detection: 230 nm]により光学分割して調製した。

4. 研究成果

(1) シナージストの同定

老化促進活性を指標として、ABAの老化促進活性を増強する物質の精製を行い、2種のシナージストを得た。¹H NMRスペクトル等の解析によりその構造はそれぞれジャスモン酸 (JA)、12-ヒドロキシジャスモン酸 (JAOH) と同定した (図3)。

得られた両シナージストの活性閾値をABA 10 μmol/L存在下にて測定した結果、JAは1 μmol/L以上でABAの老化活性を高める (シナージ活性) ことが分かった。また、JAOHは0.1 μmol/L以上で活性を示すことが分かった。また、両物質とも単独では10 μmol/Lの濃度においても老化活性を示さないことも確認した (図4)。以上の結果、

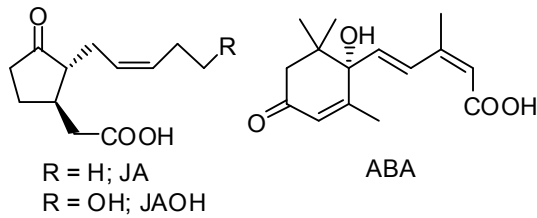


図3

ジャスモン酸類のシナジー効果

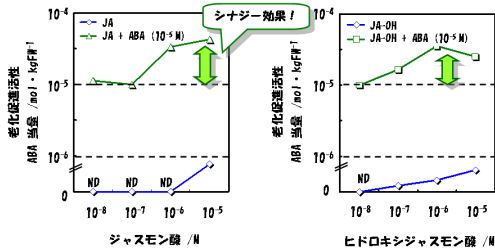


図4

JA ならびに JAOH はそれ自身老化活性を示さないが、ABA の老化活性を高めるシナジストであることが確認できた。

(2) ダイズ葉への散布実験

老化物質ならびにシナジストをダイズ植物体へ散布し、その影響を調べた。老化物質である ABA は 10 μmol/L 溶液の散布によって、弱い老化活性を示したが、シナジストである JA、JAOH 10 μmol/L 散布区では対照区の葉と同様に緑色を維持しており、ともに単独では老化活性を示さないことが分かった。しかし、ABA とともにこれらシナジストを散布すると、ABA 単独の試験区に比べて有意の差で老化活性が高まっている

シナジー活性はダイズ葉にも作用する



[Experimental Method]
Soybean plants, one month old, were sprayed with plant hormone solution at 9:00 AM and 5:00 PM ca. 1 ml/time, 25°C, dark condition

図5

ことが判明した (図5)。よって、JA、JAOH がダイズ葉に対してもシナジー効果を示すことが明らかとなった。

(3) シナジストの定量

GCEIMS を用いてダイズ莢に内在する植物ホルモン量を定量した (図6)。その結果、ダイズの老化が開始する開花後5週目に JAOH の内在量が一過的に増加し、その濃度は 10 μmol/kg であった。なお、この濃度は JAOH がダイズ葉に対してのシナジー効果を発揮する量である。一方、JA の内在量は常に 1 μmol/kg 以下であり、その濃度の変動もほとんど観測できなかった。また、この定量実験によってダイズ莢エキスによる老化活性は内在する ABA 量と JAOH 量によって十分説明可能であることが判明した。以上のことから、2種のシナジストのうち、JAOH がダイズの一回結実性老化の開始シグナルである可能性が示唆された (図7)。

ダイズ莢の発達とシナジスト内在量の変化

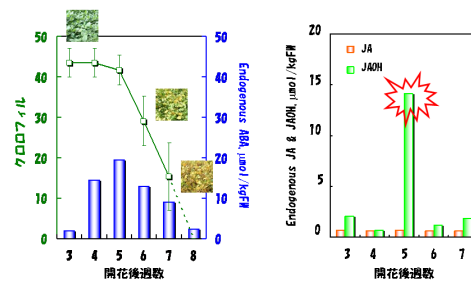


図6

(4) 光学活性シナジストの活性試験

光学活性 JA ならびに JAOH (図9) のシナジー活性を調べた。JA、JAOH とともに天然型鏡像体のみがシナジー活性を示し、非天然型鏡像体は老化活性、シナジー活性のいずれも示さなかった。この結果より、シナジストの受容体の存在が示唆された。

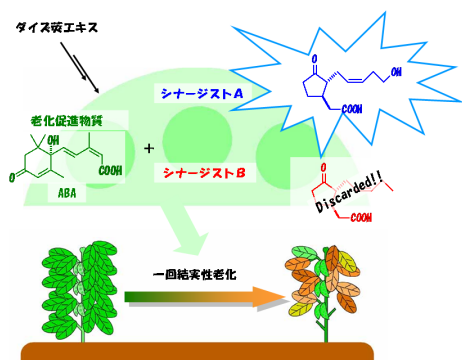


図 7

光学活性 JAOH のシナージ活性 (ABA当量)

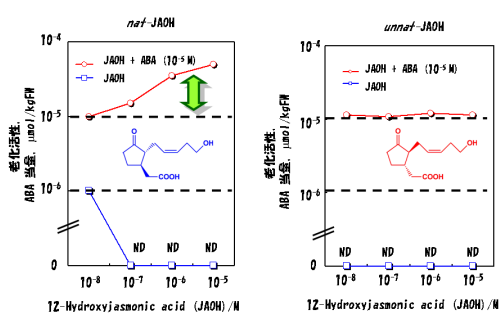


図 8

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)

- ①Murakami, T., Tsushima, T., Takada, N., Tanaka, K., Nihei, K., Miura, T., Hashimoto, M., Four analogues of spiroleptosphol isolated from *Leptosphaeria doliolum*. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 492-495, 2009, 査読有.
- ②Mukrakami, T., Takada, N., Hashimoto, M., Biosynthetic studies of spiroleptosphol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 1122-1125, 2009, 査読有.
- ③Nomiya, M., Murakami, T., Takada, N., Okuno, T., Harada, Y., Hashimoto, M., Syntheses of Lambertellols and Their Stable Analogues; Investigation of the Real Active Species in the Mycoparasitism by Lambertella Species. *J. Org. Chem.*, 73, 5039-5047, 2008, 査読有.
- ④Schuetz, A., Murakami, T., Takada, N., Junker,

J., Hashimoto, M., Griesinger, C., Rdc-enhanced NMR spectroscopy in structure elucidation of natural products/small molecules:

Sucro-neolambertellin as a testcase. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 2032-2034, 2008, 査読有.

⑤Shimura, H., Matsuura, M., Takada, N., Koda, Y., An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* (Orchidaceae). *Phytochemistry*, 68, 1442-1447, 2007, 査読有.

⑥志村華子, 高田 晃, 幸田泰則, ランと菌

の生存を賭けた闘争 レブンアツモリソウの共生発芽実験から見た「共生」の実体. *化学と生物*, 44, 261-264, 2006, 査読無.

スペースの都合上、その他は省略した。

[学会発表] (計 35 件)

- ①Tayone, W. C., Shindo, S., Tanaka, K., Hashimoto, M., Takada, N., Absolute Stereochemistry of Fungal Metabolites. 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡)、2009 年 3 月 27-29 日.
- ②高田晃, 須藤彩, 山下一夫, 山崎賀久, 橋本勝: メチインのイモグサレセンチュウ誘引活性. 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡)、2009 年 3 月 27-29 日.
- ③山崎絵麻, 脇田枝里子, 橋本勝, 幸田泰則, 高田晃: ジャスモン酸を基盤とした抽だい抑制剤開発. 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡)、2009 年 3 月 27-29 日.
- ④阿部美穂子, 松野純子, 橋本勝, 幸田泰則, 高田晃: ダイズさやに含まれる老化促進因子. 植物化学調節学会第 43 回大会 (筑波)、2008 年 10 月 29-30 日.
- ⑤脇田枝里子, 山崎絵麻, 阿部美穂子, 橋本勝, 幸田泰則, 高田晃: ジャスモン酸誘導体の抽だい抑制効果. 植物化学調節学会第 43 回大会 (筑波)、2008 年 10 月 29-30 日.
- ⑥橋本勝, 対馬太郎, 村上貴宣, 田中和明,

高田晃、根平達夫：新規二量体テトラヒドロアントラキノン alterporriol F, G の構造. 日本農芸化学会東北支部第 143 大会 (弘前)、2008 年 10 月 11 日.

⑦工藤慎士、宮西淳介、村上貴宣、高田晃、橋本勝：*Glonium* sp. (Hysteriales, Ascomycota) から単離した光学活性 Sydonic acid. 日本農芸化学会東北支部第 143 大会 (弘前)、2008 年 10 月 11 日.

⑧阿部美穂子、松野純子、橋本勝、幸田泰則、高田晃：ジャスモン酸類の新しい生理活性. 日本農芸化学会東北支部第 143 大会 (弘前)、2008 年 10 月 11 日.

⑨須藤彩、山下一夫、山崎賀久、橋本勝、高田晃：ニンニクに含まれるイモグサレセンチュウ誘引物質に関する研究. 日本農芸化学会東北支部第 143 大会 (弘前)、2008 年 10 月 11 日.

⑩村上貴宣、対馬太郎、高田晃、田中和明、橋本勝：*Spiroleptoshol* の単離と構造決定. 第 50 回天然有機化合物討論会 (福岡)、2008 年 9 月 30 日～10 月 2 日.

⑪Takada, N., Abe, M., Matsuno, S., Hashimoto, M., Koda, Y.: Jasmonates accelerate senescence induced by abscisic acid. IUPAC ICOB-6 & ISCNP-26 (Canada), 2008年 7月13-18日.

⑫村上貴宣、高田晃、C. Griesinger、奥野智旦、橋本勝：*Sucro-neolambertellin* の糖部分の絶対立体化学について. 日本農芸化学会東北支部第 142 回大会 (仙台)、2007 年 11 月 10 日.

⑬田中将之、石戸谷歩、竹本成孝、村上貴宣、橋本勝、高田晃、早狩誠：記憶改善薬を目指した ACE 阻害物質の探索. 日本農芸化学会東北支部第 142 回大会 (仙台)、2007 年 11 月 10 日.

⑭阿部美穂子、松野純子、橋本勝、高田晃、幸田泰則：ジャスモン酸はアブシジン酸の老化促進活性を高める. 植物化学調節学会第 42

回大会 (静岡)、2007 年 10 月 29-30 日.

⑮村上貴宣、野宮正浩、高田晃、奥野智旦、原田幸雄、橋本 勝：リンゴ果実上におけるマイコパラサイト現象解明研究. 第 49 回天然有機化合物討論会 (札幌)、2007 年 9 月 19-21 日.

⑯Takada, N., Matsuno, J., Abe, M., Hashimoto, M., Koda, Y. The Role of Jasmonic Acid in Monocarpic Senescence in Soybean. 19th IPGSA Meeting (Mexico)、2007 年 7 月 21-25 日. スペースの都合上、その他は省略した。

〔図書〕 (計 1 件)

①高田晃：第 1 章第 7 節緩衝液および第 7 章第 1 節生体分子の抽出、細胞生物学実験法、野村港二編、朝倉書店、pp 21-22、100-103、2007.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：ハウレンソウの簡易抽だい耐性判定法
発明者：高田晃、石戸谷歩、幸田泰則、吉田祐子
権利者：国立大学法人弘前大学
種類：特許
番号：特願 2008-181773
出願年月日：平成 20 年 7 月 11 日
国内外の別：国内

名称：イモグサレセンチュウ誘引剤およびイモグサレセンチュウ駆除方法
発明者：高田晃、橋本勝、山下一夫、山崎賀久
権利者：国立大学弘前大学、青森県
種類：特許
番号：特願 2008-273959
出願年月日：平成 20 年 11 月 13 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ：

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/2/biochem/takada/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 晃 (TAKADA NOBORU)
弘前大学、農学生命科学部、准教授
研究者番号：10332701