

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580126

研究課題名（和文）

植物におけるトリプトファン代謝の機能解明を志向した新規阻害剤の開発と利用

研究課題名（英文）

New inhibitor for the functional analysis of tryptophan metabolism in plants

研究代表者

石原 亨（ISHIHARA ATSUSHI）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80281103

研究成果の概要（和文）：イネは、病原菌の感染を受けるとトリプトファンからセロトニンを合成する。この反応を阻害する物質を投与すると病原菌の感染範囲がより広がったことから、セロトニンはイネの防御反応の中で重要な役割を果たしていることがわかった。一方で、イネごま葉枯病菌はセロトニンを代謝して対応するカルボン酸に解毒することを発見した。このような研究からイネと病原菌が化学物質を利用して攻防を繰り返している様子が浮かび上がってきた。

研究成果の概要（英文）：Rice plants produce serotonin from tryptophan in response to pathogen attack. The treatment of the inhibitor of serotonin synthesis resulted in the enhanced susceptibility, indicating the significance of serotonin production in the defense responses of rice. In addition, we found that the casual agent of rice brown spot, *Bipolaris oryzae*, degraded serotonin to corresponding carboxylic acid. On the bases of these findings, we could illustrate the chemical battle between rice and *B. oryzae*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：天然物化学、阻害剤

1. 研究開始当初の背景

トリプトファンデカルボキシラーゼ（TDC）は、トリプトファンを脱炭酸しトリプタミンの生成を触媒する。これまでの研究から、この酵素は、植物において2つの重要な機能を担っていることが分かってきた。

まず、TDCによるトリプタミンの生成は、防御関連二次代謝産物の生合成に関与することが明らかになってきた。我々は、イネ科

植物を中心に、トリプトファン合成経路に由来する二次代謝産物の探索や構造解析、生合成経路の解明を行ってきた。その中で、イネは、病原菌の感染を受けるとセロトニンを多量に蓄積するという現象を見いだした。病原菌を接種したイネでは、TDCの遺伝子発現や酵素活性が顕著に増加していたことから、セロトニンはトリプトファンからトリプタミンを経て生合成されることが分かった。また、

放射性同位元素で標識したセロトニンが細胞壁に取り込まれたため、セロトニンは酸化重合することによって、細胞壁の強化（物理的防御）に関与していると想定された。さらに、セロトニンの蓄積は、イネだけでなくコムギやオオムギなど他のイネ科植物でも広く観察される感染応答であった。したがって、多くの植物で TDC はセロトニンの蓄積を介して生体防御に重要な役割を担っている可能性が高いと考えられた。

TDC のもう一つの役割は、植物ホルモンであるインドール-3-酢酸 (IAA) の生合成にトリプタミンを供給することである。TDC によって生成したトリプタミンは *N*-ヒドロキシトリプタミンなどを経て IAA へと変換される。トリプトファンからトリプタミンを経て IAA へ至る経路 (トリプタミン経路) は植物の主要な IAA 合成経路の一つであると考えられている。しかし、IAA の生合成については、これ以外にも2つの経路 (インドールアセトアルドキシム経路とインドールピルビン酸経路) があり、個々の経路がどういった制御を受け、どうかかわり合っているのかは全く不明である。そこで、それぞれの経路による IAA 生合成の空間的・時間的制御を解明することが、植物科学における重要な課題となっている。また、これまでの IAA 生合成に関する知見の多くは、モデル植物のシロイヌナズナにおける突然変異体の解析を通して得られてきたものである。しかし、突然変異体の解析だけでは自ずと限界がある。たとえば、重要作物を含む他の植物種ではほとんど研究が行われていないのが現状であった。

2. 研究の目的

TDC によるトリプタミンの生成は、1) 病害応答における二次代謝産物の生合成、および、2) 植物ホルモンである IAA の生合成、の2つの代謝過程にかかわっている。そこで、本研究では、1) に関しては、この経路が関与する抵抗反応の存在意義を証明するため、また、2) についてはトリプタミン経路による IAA 合成の機能と制御を明らかにするために、TDC 阻害剤の開発を行う。特に TDC の自殺基質を標的に化合物をデザイン、合成し、既に同定しているイネの TDC に対する阻害活性を評価する。さらに、得られた TDC 阻害剤を用いて、イネを中心にイネ科植物の病害応答に及ぼす影響を解析する。一方で、シロイヌナズナとイネに TDC 阻害剤を処理し、IAA 関連物質の蓄積量や植物の形態形成にどのように影響するのかを詳細に調べる。以上の実験によって、TDC の関与するトリプトファン代謝の重要性を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

TDC 阻害剤はこれまでに知られていない。我々がイネにおいて見いだした TDC 酵素遺伝子は、ピリドキサル 5'-リン酸を補酵素とする芳香族アミノ酸脱炭酸酵素の一種をコードしていた。このような酵素では、基質となるアミノ酸の α 位にフルオロメチル基を導入した化合物が効果的な自殺基質になる。そこで、TDC の阻害剤として L-トリプトファンの α 位にフルオロメチル基を導入した化合物 (α -フルオロメチルトリプトファン、FMT) を合成した (図 1)。また、D-トリプトファンを出発物質として、非天然型の立体配置をもつ化合物の合成も行った。

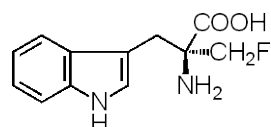


図 1 α -フルオロメチルトリプトファン (FMT)

研究には阻害剤を利用するとともに、トリプトファン代謝に変異を有するイネの *sI* 変異体を活用した。*sI* 変異体とは、疑似病斑変異体の一つでトリプタミンからセロトニンへの反応を触媒する酵素を欠損している。そのため、病原菌を接種してもセロトニンを蓄積できないが、その前駆物質のトリプタミンを高濃度に蓄積する。この変異体の解析によって、イネとイネごま葉枯病菌との相互作用において新たな情報が得られるものと考えられた。

4. 研究成果

(1) 結果

本研究では、TDC 阻害剤を開発し、感染によって誘導されるトリプトファン代謝に及ぼす影響を調べた。TDC の阻害剤として α -フルオロメチルトリプトファン (FMT) を立体特異的に合成した。FMT は実際に TDC の自殺基質として機能した (図 2)。

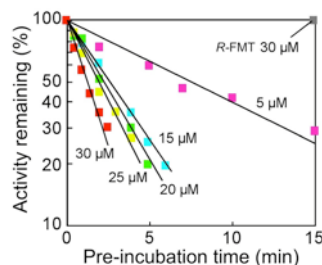


図 2 FMT による TDC 活性の阻害

また、FMT をあらかじめ処理しておいたイネの実生にイネごま葉枯病菌を接種すると、感染によって誘導される、トリプタミンやセ

ロトニンなどの蓄積が顕著に抑制されるとともに、植物がより大きなダメージを受ける傾向が見られた (図3)。したがって、イネにおけるトリプトファン代謝は生体防御において重要な役割を果たしていることがわかった。さらに FMT 処理は病斑における褐色の物質の蓄積を阻害し、そこにトリプタミンを同時に投与すると褐色の物質の蓄積が回復したことから、この物質はセロトニンに由来することが強く推定された。

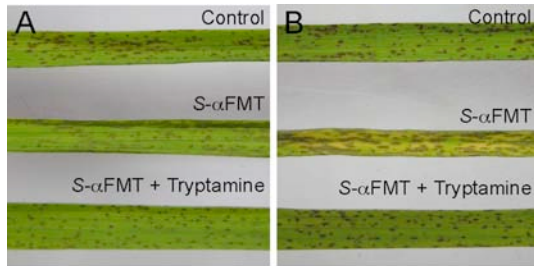


図3 FMT 処理が病斑の形成に及ぼす影響
イネごま葉枯病菌の胞子を接種してから、48 時間後 (A) および 72 時間後 (B) に葉の様子を観察した。FMT を処理するとより大きなダメージを受けるが、同時にトリプタミンを処理しておく、影響が軽減される。

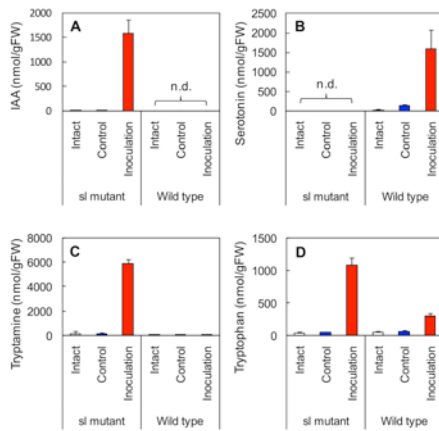


図4 イネごま葉枯病菌を接種したイネにおける IAA (A)、セロトニン (B)、トリプタミン (C)、トリプトファン (D) の蓄積
イネごま葉枯病菌を接種したイネの第3葉を接種72時間後に抽出し、HPLCで分析した。

一方で、トリプタミンからセロトニンへの反応を触媒する酵素を欠損しているため、病原菌が感染してもセロトニンを蓄積できず、前駆物質のトリプタミンを蓄積するイネ *sl* 変異体を用いて、トリプトファン代謝の変化がイネとイネごま葉枯病菌との相互作用に及ぼす影響を調べた。その結果、*sl* 変異体に

イネごま葉枯病菌が感染すると、トリプタミンに加え、高濃度の IAA の蓄積を誘導することを見いだした (図4)。野生型植物では、セロトニンが顕著に蓄積したものの、このような高濃度の IAA の蓄積は認められなかった。

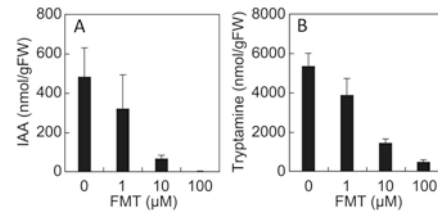


図5 イネごま葉枯病菌を接種した *sl* 変異体の葉における IAA (A) およびトリプタミン (B) の蓄積に及ぼす TDC 阻害剤の効果
培地に FMT 投与してから 12 時間後にイネごま葉枯病菌を接種した。さらに 48 時間後に葉を抽出した。

さらに、この IAA の蓄積は FMT 処理によって阻害された (図5)。したがって、イネごま葉枯病菌を接種した *sl* 変異体に蓄積する IAA はトリプタミンに由来することがわかった。

続いて、IAA の生産者を特定するための実験を行った。IAA の蓄積は、塩化銅などのエリキター処理によって誘導されなかった。また、トリプトファン処理も高濃度の IAA の蓄積をもたらすことはなかった。さらに、イネいもち病菌の接種によってもこのような IAA の蓄積は生じなかった。一方、イネごま葉枯病菌と近縁のイネ科斑点病菌 (*B. sorokiniana*) の接種はイネごま葉枯病菌を接種した場合とほぼ同程度の IAA の蓄積をもたらした。以上の結果から、IAA の蓄積は、全ての病原菌の感染に普遍的な現象ではないことがわかった。このことは、*Bipolaris* 属の病原菌自身がトリプタミンを代謝して IAA を生産をしている可能性を示唆するものである。

そこで、実際に、イネごま葉枯病菌の培養液にトリプタミンを投与し、IAA の蓄積を調べた。結果を図6に示す。イネごま葉枯病菌は、トリプタミンを投与すると高濃度の IAA を生産したことから、*sl* 変異体で見られた IAA の蓄積はイネごま葉枯病菌によるトリプタミンの代謝の結果であることがわかった。

イネごま葉枯病菌は、トリプタミンを代謝して IAA を生産することがわかった。しかし、野生型イネはトリプタミンを高濃度に蓄積することはない。したがって、この代謝経路の本来の役割は IAA の生産のためではない可能性がある。実際に野生型植物において、イネごま葉枯病菌の感染時に蓄積するのはセ

ロトニンである。そこで、イネごま葉枯病菌がセロトニンを代謝できる可能性についても検討を行った。トリプタミンの場合と同様にイネごま葉枯病菌の培養液にセロトニンを投与し、生成してくる5-ヒドロキシインドール-3-酢酸 (5HIAA) を HPLC で定量した。その結果、セロトニンを投与すると培地中から5HIAAが検出されることがわかった(図7)。また、セロトニンの投与によっても、菌糸の生育が抑制された。セロトニンの効果をトリプタミンと比較すると、より低濃度で強く菌糸の生育を抑制する傾向があった。

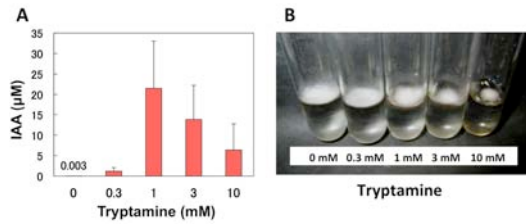


図6 イネごま葉枯病菌によるトリプタミンの IAA への変換 (A) およびトリプタミンが菌糸の生育に及ぼす影響 (B)

イネごま葉枯病菌をトリプタミンを含むリチャーズ培地に接種し、7日後に培地を抽出するとともに菌糸の生育を観察した。

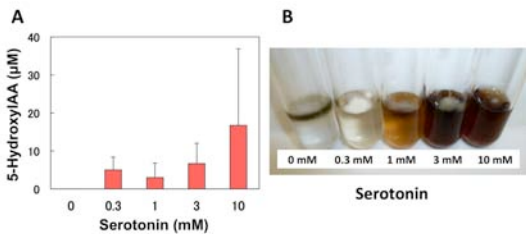


図7 イネごま葉枯病菌によるセロトニンの IAA への変換 (A) およびセロトニンが菌糸の生育に及ぼす影響 (B)

イネごま葉枯病菌をセロトニンを含む培地に接種し、7日後に培地を抽出した。

(2) 考察

植物においてトリプタミンは、トリプトファンデカルボキシラーゼ (TDC) によってトリプトファンから生じる生成する。TDC はピリドキサルリン酸を補酵素とする酵素で、類似の反応を触媒する酵素には、哺乳動物の神経伝達物質、ドーパミンやセロトニンの合成に関与する芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼがある。芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼを特異的に阻害する化合物として、トリプトファンの α 位にフルオロメチル基を有する FMT が開発された。FMT は基質の代わ

りに反応中心のピリドキサルリン酸と結合し、さらにその近傍にあるアミノ酸と共有結合を形成する。そのため、芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼの自殺基質として機能するものと考えられている。本研究では、この化合物がイネの TDC に及ぼす効果について詳細に調べた。その結果、この化合物はイネの TDC の自殺基質として作用し、効果的に TDC を阻害することがわかった。したがって、今後 FMT は植物のトリプタミン代謝を研究する上で効果的なツールとなると考えられる。

イネごま葉枯病菌を接種したイネに FMT を投与すると、セロトニンの合成と褐色の物質の蓄積が顕著に抑制された。我々はすでに、セロトニンを合成出来ない *sI* 変異体において、褐色の物質の蓄積が抑制されることを報告している。これらの事実はいずれも褐色の物質がセロトニンの重合体であることを示すものである。また、FMT を処理することによって植物が病原菌感染によってうけるダメージが大きくなり、トリプタミンの同時投与がそれを軽減するということは、セロトニンの合成と褐色の物質の蓄積がイネの効果的な防御応答の一部であることを証明するものである。

sI 変異体において生じる高濃度の IAA の蓄積は、トリプタミンの蓄積と同時に生じる現象であるため、当初、イネによる IAA 合成の結果と推定した。もし、イネが IAA を合成しているのであれば、イネごま葉枯病菌の接種以外の方法でトリプタミン合成を活性化しても IAA の蓄積が生じる可能性が高いと考えられた。しかし、塩化銅によるエリクター処理やイネいもち病菌の接種は、トリプタミンの蓄積は誘導したが、IAA の蓄積をもたらすことはなかった。また、トリプタミンを直接 *sI* 変異体に投与しても、IAA は蓄積しなかった。このような結果から、イネごま葉枯病菌の感染によって蓄積する高濃度の IAA はイネごま葉枯病菌によって合成されたものである可能性が考えられた。さらに培地へのトリプタミンの投与実験の結果、イネごま葉枯病菌がトリプタミンを IAA に変換する能力をもつことがわかった。イネごま葉枯病菌を接種したイネの葉では、トリプタミンが高濃度に蓄積しており、イネごま葉枯病菌は当然このトリプタミンと接触すると考えられる。したがって、*sI* 変異体における高濃度の IAA の蓄積は、イネごま葉枯病菌によるトリプタミンからの IAA 合成の結果であると結論した。

糸状菌による IAA の生産の報告は少なくない。タケ類てんぐ巣病菌 *Aciculosporium take* はインドール-3-ピルビン酸経路で IAA を生成して、多量に蓄積した IAA がタケにてんぐ巣病の症状を引き起こすことが示唆されている。ハクサイピシウム腐敗病菌 *Pythium ultimum* はトリプタミン経路で IAA

を生産するとの報告がある。本研究ではイネごま葉枯病菌がトリプトタミンから IAA を生成することがわかったが、トリプトタミンからどのような化合物を経て IAA へと変換されるのかは不明である。標識中間体を用いた取り込み実験や、トリプトタミン投与後に増加する化合物の同定などによって、IAA の合成経路を解明することができると思われる。

野生型イネは、*sl* 変異体とは異なり、病原菌の感染時にセロトニンを蓄積する。セロトニンは、ペルオキシダーゼの作用により酸化重合して細胞壁に沈着し、その強化に関わっている。さらに、本研究によって見いだされたように、イネごま葉枯病菌をセロトニンを含む培地で培養すると、菌糸の生育が抑制されることから、病原菌に対する毒性も有する。病原菌は、セロトニンを代謝しその濃度を低下させることによって、より容易に感染することが出来るのかもしれない。我々の研究で、セロトニンの蓄積はイネ科植物に広く分布する防御応答であることがわかってきている。同じくイネ科植物を宿主とするイネ科斑点病菌も IAA を生産したが、これもセロトニンを代謝するためと推定できる。セロトニンを代謝する能力はイネ科植物を宿主とする *Bipolaris* 属の病原菌が進化の早い段階で獲得した基礎的な病原性かもしれない。

本研究によって、イネとイネごま葉枯病菌の間の化学物質を使った攻防の様子が浮かび上がってきた。しかし、病原菌による代謝経路はまだわかっていない。また、このセロトニン代謝能がどのような病原菌に分布しているのかを知る必要もある。さらに、セロトニンは病原菌の孢子発芽にはほとんど影響しないが菌糸の伸長を抑制するようである。その作用メカニズムの解明も興味深い。これらの課題を明らかにすることによって、イネ科植物と病原菌との共進化の過程を描き出すことができるものと思われる。

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 2 件)

- ① A. Ishihara, T. Nakao, Y. Mashimo, M. Murai, N. Ichimaru, C. Tanaka, H. Nakajima, K. Wakasa, H. Miyagawa (2011) Probing the role of tryptophan-derived secondary metabolism in defense responses against *Bipolaris oryzae* infection in rice leaves by a suicide substrate of tryptophan decarboxylase. *Phytochemistry*, 72, 7-3. 査読有り. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.11.001
- ② A. Muroi, A. Ishihara, C. Tanaka, A.

Ishizuka, J. Takabayashi, H. Miyoshi, and T. Nishioka (2009) Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 230, 517-527. 査読有り. DOI: 10.1007/s00425-009-0960-0

[学会発表] (計 9 件)

- ① 深水愛理沙、石原亨、宮川恒、中島廣光、若狭暁、イネ *sl* 変異体に感染したごま葉枯病菌によるインドール-3-酢酸の生産、日本農芸化学会 2011 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都市、京都女子大学
- ② 石原亨、林典子、久米田理恵、深水愛理沙、若狭暁、宮川恒、中島廣光、オオムギにおける病原菌感染によるセロトニンおよびセロトニン類縁化合物の蓄積、日本農薬学会平成第 37 回大会、2012 年 3 月 16 日、岡山市、岡山大学
- ③ 深水愛理沙、石原亨、宮川恒、中島廣光、若狭暁、ごま葉枯病菌が感染したイネ *sl* 変異体におけるインドール-3-酢酸の蓄積、植物化学調節学会第 46 回大会、2011 年 11 月 1, 2 日、宇都宮市、宇都宮大学
- ④ 石原亨、イネ科植物の生体防御におけるトリプトファン代謝の関与、鳥取県病虫害談話会 (招待講演)、2011 年 7 月 15 日、鳥取市、白兔会館
- ⑤ 石原亨、植物の生体防御におけるトリプトファン代謝の役割、日本農芸化学会中四国支部第 4 回農芸化学の未来開拓セミナー (招待講演)、2011 年 5 月 21 日、岡山市、岡山大学
- ⑥ A. Ishihara, T. Nakao, C. Tanaka, H. Nakajima, K. Wakasa, H. Miyagawa, Effects of tryptophan decarboxylase inhibition on defense responses of rice. 12th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, 4th - 8th, July, 2010, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia.
- ⑦ 中尾崇人、石原亨、松田洋子、石原亨、若狭暁、宮川恒、イネ *sl* 変異体におけるインドール-3-酢酸の蓄積、日本農薬学会第 35 回大会、2010 年 5 月 28-30 日、北海道大学、札幌市
- ⑧ 中尾崇人、松田洋子、石原亨、若狭暁、宮川恒、イネ *sl* 変異体におけるインドール-3-酢酸の蓄積、日本農芸化学会 2009 年度大会、2010 年 3 月 27 日~30 日、東京都、東京大学駒場キャンパス
- ⑨ 中尾崇人、石原亨、田中千尋、三芳秀人、若狭暁、宮川恒、トリプトファンデカルボキシラーゼ阻害がイネの抵抗反応に及

ぼす影響、植物化学調節学会第4回大会、
2009年10月29日、30日、仙台市、東
北大学片平キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 亨 (ISHIHARA ATSUSHI)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80281103