

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658102

研究課題名(和文) イネ由来新規糖転移酵素の探索とジャスモン酸の不活性化機構の解明

研究課題名(英文) UDP-Glc independent transglucosidase to mediate jasmonic acid degradation in rice

研究代表者

松浦 英幸 (Matsuura, Hideyuki)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20344492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の傷害応答機構、特にジャスモン酸(JA)シグナル伝達機構の不活性化に寄与すると想定される配糖化酵素として、OsBGlu1を同定した。種々のJA類を用いてイネ幼苗の根の伸長阻害試験を行った。この結果、JAが最も伸長阻害を示し、12-hydroxyjasmonic acid および12-hydroxyjasmonoyl L-isoleucine配糖体がほとんど伸長阻害を示さなかった。以上の事から生理活性を示すJAの重要な代謝経路の一つとして、OsBGlu1が介する糖転位反応を証明できたと考える。

研究成果の概要(英文)：In order to uncover controlling system of jasmonate signaling pathway, we attempted to find out UDP-glucose independent transglucosylation enzyme, and OsBGlu1 was picked up to afford 12-glucopyranosyl jasmonic acid and 12-glucopyranosyljasmonoyl L-isoleucine. The biological activities of jasmonic acid, 12-hydroxyjasmonoyl L-isoleucine and 12-glucopyranosyljasmonoyl L-isoleucine were compared, which revealed that jasmonic acid has most effective activity and 12-hydroxyjasmonoyl L-isoleucine has the lowest activity. Thus, our project showed that transglucosylation reaction mediated by OsBGlu1 is important pathway to control the activity of jasmonic acid.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：Jasmonic acid 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

植物は大地に根を張り移動が困難である事から、自己の被る様々な環境要因、ストレスに呼応して生活環を終結させなくてはならない。よって、植物は独自の環境応答機構を有している。この応答機構を司る生理活性物質として植物ホルモンとの呼称される一群の化合物が知られ、多くの研究がなされてきた。我々の研究室では長年、植物ホルモンの一種であるジャスモン酸(JA)について、鋭意研究を行っている。JA類は植物の傷害応答シグナル物質として必須であり、他の興味ある生理活性としてバレイショ塊茎の誘導活性、植物の就眠運動における就眠物質、花粉管伸長促進などが知られている。近年、JA類の生理活性の制御の観点から、配糖体化、P450による酸化などの報告がある。

我々はJA類の配糖体化に関して研究を進め、イネに含まれるOsSGTを12-hydroxyJA(12OHJA)配糖体化酵素として報告した。OsSGTは糖供与体としてUDP-Glcを用い、サリチル酸(SA)に対してより高い糖供与能をしめした。しかしながら、本酵素の探索過程において、SAに対してほとんど配糖体化活性を示さず、12OHJAに特異性の高いUDP-Glc非依存性の配糖体化酵素の存在も明らかとした。現在の所、UDP-Glc非依存性の配糖体化酵素に関しては松葉らの報告[1]があるのみであり、植物ホルモンの配糖体化に関してUDP-Glc非依存性の配糖体化酵素が関与しているとの報告は一切無い。

2. 研究の目的

UDP-Glc非依存性の配糖体化酵素に関する上記の興味ある発見を明らかとすべく我々は、1) イネカルスに含まれるUDP-Glc非依存性の配糖体化酵素の単離、2) イネカルスに含まれる本配糖化酵素の糖供与体の単離精製、構造決定、3) 本配糖化酵素の所性質の究明を目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

実験材料としてイネおよびイネカルスを用いた。入手可能な試薬は市販のものを用いた。重水素ラベル体化合物、配糖体などの化合物は化学合成した。

4. 研究成果

(1) UDP-Glc非依存性配糖体化酵素の発見

酵素溶液として、イネカルスより抽出した粗酵素溶液、糖受容体としてJA水酸化体の一種である12OHJAを用い、種々の市販の糖供与体、Glc-1-phosphate, TDP-Glc, octyl-Glc, UDP-Glcを用いて実験を行った。その結果、octyl-GlcはUDP-Glcよりも12OHJAにより選択的に糖を供与し、SAにほとんど糖を供与しない事が明らかとなった。よって、イネカルス抽出粗酵素溶液に12OHJA選択的な、UDP-Glcを糖供与体としない配糖体化酵素が存在すると明らかになった。

(2) イネ由来のUDP-Glc非依存性配糖体化酵素の同定

イネカルス抽出粗酵素溶液に含まれる、12OHJA選択的配糖体化酵素の同定を試みた。糖供与体としてoctyl-Glc、受容体として12OHJAを用い、種々の精製操作の後、得られたタンパクをトリプシン処理し、MALDI-Tof-MS分析に供し、得られたMS dataを、データベースを用いて解析し、本タンパクはOsBGlu1(AK100165)であると明らかとした。

(3) イネカルスに含まれる糖供与源の同定

イネカルス抽出

粗酵素溶液に含まれる、12OHJA選択的配糖体化酵素がOsBGlu1であると

イネカルス抽出に

含まれる糖供与体の精製単離を試みた。配糖体化酵素に上記で同定したOsBGlu1、糖受容体に12OHJAを用いて実験を進め、図1に示す、3-(4-hydroxyphenyl) prop-2-enyl-β-D-glucopyranoside(1)を単離同定した。

(4) 配糖体化酵素、OsBGlu1に対する糖供与能の活性相関

植物に含まれる配糖体化酵素、糖供与体の情報が得られた事から、種々の類縁配糖体を化学合成し12OHJAに対する糖供与能の活性相関を試みた。その結果、イネに非常に多く蓄積するSAGが最も高い糖供与能を有する事を明らかとできた。12OHJAに対するSAGの糖供与能は化合物1に比べ10倍程度、octyl-Glcに比べ40倍程度の高い効率を示した。植物の傷害応答時にJAシグナル系とサリチル酸(SA)シグナル系は拮抗す

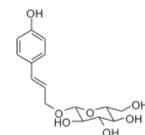


図1.化合物1の化学構造

る事が知られおり、非常に興味深い発見であると考えられた。

(5) 配糖体化酵素、OsBGlu1 に対する糖受容体の特異性

配糖体化酵素として OsBGlu1、糖供与体を SAG として、糖を受け取る化合物(糖受容体)の選択性を明らかにする事を目的に実験を進めた。その結果、quercetin, kaempferol などのフラボノイド化合物、ABA, SA への配糖体化はほとんど示さず、JA 水酸化体への選択的な糖供与活性が明らかとできた。興味深い事に本酵素は 12OHJA と 11OHJA の区別も可能で、12OHJA は 11OHJA に比べ 10 倍程度の糖受容能を示す事が明らかとなった。また、JA 水酸化体のうち、12-hydroxyjasmonoyl isoleucine (12OHJA-Ile) が最も高い糖受容能を示し、ついで 12OHJA が高い受容能を示した。

(6) イネ葉部傷害時の JA 活性の抑制機構

イネ葉部へ傷害を与えた場合、傷害初期に一時的な SA 蓄積量の上昇が観察され、傷害 2 時間後程度の後期より 12OHJA, 12-O-β-D-glucopyranoxyloxyJA (12OGlcJA) の上昇が確認される。また、12-O-β-D-glucopyranoxyloxyJA-Ile (12OGlcJA-Ile) の蓄積は 12OGlcJA に比べ非常に低いものであった。以上の事から、葉部傷害応答時における JA の配糖体化機構を図 2 のように想定した。これを証明すべく、Leaf Disk としたイネ葉に糖の 6 位メチレン水素が重水素ラベル化された SAG を一夜、処理した。その結果、6 位メチレン水素が重水素ラベル化された 12OGlcJA を同定した。よって、生体内で図 2 の JA 代謝機構が存在する事を証明できた。JA はイネ幼苗の根部の伸長阻害を示し、12OGlcJA はほとんど伸長阻害を示さない事から本配糖体化は JA 活性を制御する生体機構に関与していると示唆できた。

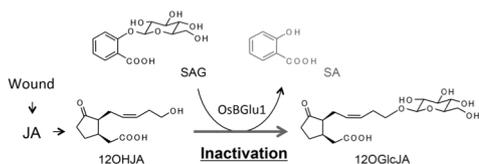


図 2. イネ傷害応答時の OsBGlu1 を介した JA 不活化機構

(7) 結語

我々の研究により、OsBGlu1 を介した新規な

JA 不活化機構を明らかとできた。本酵素は UDP-Glc 非依存性の配糖体化酵素である点に特徴を有し、植物ホルモンの配糖体化に関して、UDP-Glc を用いない配糖体化反応は本研究事例が初めてである。また、拮抗作用を示す植物ホルモン同士が登場する点で非常に興味深い。イネの花芽部分に OsBGlu1 が最も局在し、12OGlcJA に比べ 12OGlcJA-Ile がより花芽部に蓄積する事も明らかとしており、本酵素反応が種実形成に関与している可能性も示唆され非常に興味深く、今後の研究課題である。酵素の単離、評価など生化学的手法と生理活性物質の単離、構造決定、重水素ラベル化合物および構造活性相関に必要な類縁体の合成、微量な生理活性物質の定量などの天然物化学の手法を交えて研究を遂行した点が本研究の特徴である。

[1] Matsuba Y. et al., Plant Cell, **22**, 3374-3389 (2010).

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 1 件)

Naoki Kiatoka, Hiroshi Kawaide, Takuya Matsubara, Kosaku Takahashi, Kensuke Nabeta, and Hideyuki Matsuura, CYP94B3 activity against jasmonic acid amino acid conjugates and the elucidation of 12-O-β-glucopyranosyl-jasmonoyl-L-isoleucine as an additional metabolite, *Phytochemistry*, **99**, 6-13 (2014, 査読あり).

[学会発表] (計 1 件、ポスター賞受賞)

発表者:

竹松知紀¹、瀬戸義哉²、宮澤吉郎¹、和久田真司¹、佐分利亘¹、森 春英¹、高橋公咲¹、松浦英幸¹

(1北大院農、2東北大学生命科学研究科)

傷害時のイネにおけるサリチル酸グルコシドを糖ドナーとするツベロン酸への糖転移反応
第49回植物化学調節学会

2014年10月18日~19日

京都大学 (京都府・京都市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 英幸 (MATSUURA Hideyuki)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号 : 20344492

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :