

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15404

研究課題名(和文)ナス科植物に虫害防御応答を選択的に誘導するジャスモン酸類縁体の分子作用機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of action of JA analogue which selectively enhances antiherbivore defense in Solanaceae plants

研究代表者

加治 拓哉 (Kaji, Takuya)

東北大学・理学研究科・助教

研究者番号：80835520

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)：植物ホルモンジャスモン酸は病害虫への防御応答など魅力的な生理応答と同時に、生長阻害をも引き起こす。ナス科植物タバコにおいて生長阻害を生じることなく、虫害耐性やニコチン蓄積を誘導する新規ジャスモン酸誘導体としてジャスモン酸イソロイシンラクトン(JILa)が報告されたが、その生物活性発現機構は未解明であった。本研究では、ナス科モデル植物トマトを用いた作用機構解明研究により、JILaがトマチン生合成を活性化すること、および活性本体が12-ヒドロキシジャスモン酸イソロイシンであり、受容体サブタイプ選択的な結合活性を通して、転写因子選択的なジャスモン酸応答の一部活性化を誘導することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物において外敵への防御応答は様々な方法で制御されている。ジャスモン酸による防御応答については生長と防御のトレードオフを伴うことが知られていた。本研究では、このトレードオフの切り分けを生じるジャスモン酸類縁体に着目し、生物活性が報告されたタバコと同じナス科植物トマトでの作用機構解明に取り組んだ。トマトに着目したのは有用な商品作物であり、生物活性を有する特化代謝物トマチンを生合成すること、またジャスモン酸関連の変異体や遺伝子資源が利用できるためである。得られた知見はジャスモン酸応答の一部活性化に関する新しいメカニズムの一端を示唆するものであり、ジャスモン酸の人為的な活用に有用な知見である。

研究成果の概要(英文)：Plant hormone JA-Ile induces defense response against insects and pathogens, but also induces growth inhibition. Jasmonoyl-L-isoleucine lactone (JILa), which is a synthetic lactone analogue of JA-Ile, was reported to show defense response without causing growth inhibition against tobacco. However, detailed mechanism of action remained elusive. In this study, we conducted bioactivity measurements and in-vitro biochemical mechanistic analysis using tomato, the same Solanaceae model plant as tobacco. Our results suggested that JILa induced tomatine accumulation, and the bioactive form of JILa was suggested as its hydrolytate, 12-OH-JA-Ile. In-vitro assay and gene expression analysis suggested that 12-OH-JA-Ile would selectively activate partial jasmonate signaling through receptor subtype selective binding activity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 植物ホルモン タンパク-タンパク間相互作用

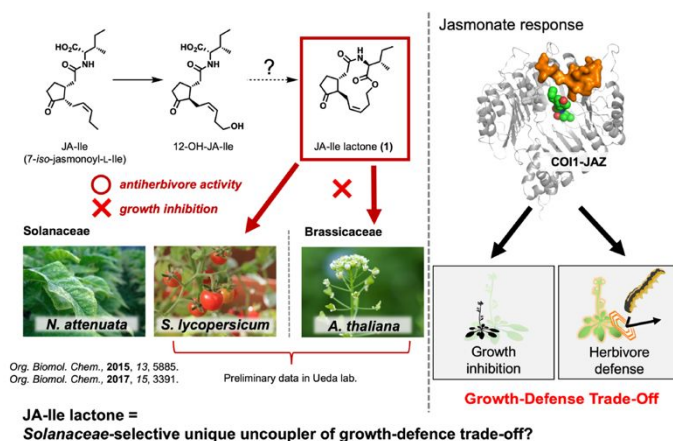
1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンジャスモン酸について生長阻害と防御応答活性化がトレードオフの関係にあることが良く知られている。ジャスモン酸について、遺伝的・機能的に冗長なジャスモン酸受容体系によって生理応答が複雑に制御されていることが近年明らかになりつつある。しかしながら、生長阻害と防御応答の切り分けを実現するような分子作用機構は明らかでなかった。

研究開始当初、海外の研究者がジャスモン酸の合成類縁体 JA-Ile-macrolactone (JILa) が野生種のタバコにおいて生長阻害を引き起こすことなく、虫害への防御応答ならびにニコチンの生合成を活性化することを報告していたが、その詳細な作用機構は未解明だった。ジャスモン酸による防御応答について、生長阻害と切り分けが可能であれば、ジャスモン酸応答を人為的に活用する上で有用であることが期待された。

2. 研究の目的

本研究課題では、ジャスモン酸に見られる生長と防御のトレードオフを解消し、防御応答を選択的に活性化する分子機構に関して新しい知見を得ることを主たる目的として JILa の作用機構解明研究に取り組んだ。とりわけ、ジャスモン酸受容体に依存的な防御応答と生長阻害の切り分けが生じている点について、受容体サブタイプ選択性など、ジャスモン酸応答の一部活性化を生じる機構に重点をおいた解析を行った。



3. 研究の方法

生命現象の解明には種々のモデル生物が使用される。本研究課題では先行研究においてナス科植物タバコでのニコチン蓄積の活性化が見られていたことから、タバコと同じナス科のモデル植物であり、有用な商品作物でかつ、トマチンなど特化代謝物やその生合成経路について盛んに研究されているトマト (*Solanum lycopersicum*) に着目した。とりわけジャスモン酸受容体 COI1 の変異体である *jail* 株など本研究に適した遺伝的リソースのある矮性のミニトマト *Micro-Tom* を用いることとした。生物活性評価としては、化合物投与による地上部重量への影響から生長阻害を評価したほか、葉におけるトマチン蓄積量の定量、遺伝子発現解析を実施した。また、JILa が内在性のリガンドか否かについて、LC-MS/MS を用いた抽出・定量を行った。

研究に用いる JILa を始めとしたジャスモン酸イソロイシン類縁化合物については化学合成し、HPLC 精製したものをを用いた。

また、*in-vitro* でのリガンドとトマトジャスモン酸受容体系との結合活性試験のため、SICOI1 について GST 融合タンパク質として昆虫細胞での発現を行ったほか、トマトに 13 種類存在する SIJAZ について FLAG タグをつけた全長タンパク質の無細胞発現系をそれぞれ構築した。また、JAZ の COI1 との相互作用ドメインである Jas モチーフ配列について、N 末に蛍光色素フルオレセインを結合したペプチドを固相合成法により調整した。

調整した COI1, JAZ, リガンド類を用いた受容体とリガンドの結合活性、結合親和性についてプルダウン法および AlphaScreen 法などで評価を行った。

4. 研究成果

本研究課題に関連して得られた各種実験データは課題終了時点において論文として未投稿であるため、具体的なデータを伏せて概略について記述する。

トマトの葉の抽出物中のジャスモン酸類の定量を外部標準法により行った結果、JILa の内在量は他の代謝物に比べて十分少なく、検出下限以下であったことから、先行研究において特異な生物活性を示した JILa は植物の内在性の新規活性代謝物ではないことが示唆された。具体的にはトマト葉に傷害ストレスをかけると JA 応答の亢進により、JA-Ile → 12-OH-JA-Ile の代謝経路で 12-OH-JA-Ile の含量が増加することが知られる。JA-Ile ラクトンは 12-OH-JA-Ile がラクトン環を形成した分子なので、内因性分子であれば、12-OH-JA-Ile の増加に伴って含量が増加すると予想された。外部標準法により内在量を継続的に定量した結果、JA-Ile ラクトンがトマトの内因性分子ではないことが示唆された。一方で、JA-Ile ラクトンを外部投与した際に、12-OH-JA-Ile の含量が増加することが同様の定量分析により示唆された。

化学合成した JILa を *Micro-Tom* に作用させたところ、対照の mock 処理と地上部重量については有意差がなく、生長阻害を生じないことが示唆された。一方で、JILa で処理したトマトの葉においては、トマトにおいてよく知られる生理活性な特化代謝物の 1 つであるトマチンの蓄積

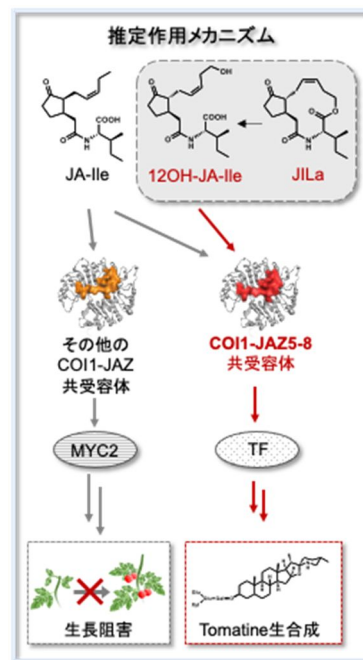
量が増加していることが明らかとなった。また、この JILa によるトマチン蓄積がジャスモン酸受容体の変異体である *jai1-1* 株では生じないことが示唆された。

得られた結果は、JILa がトマトにおいてもジャスモン酸受容体に依存的にトマチン蓄積を活性化する一方で、ジャスモン酸応答における一般的な副作用である生長阻害を生じないことを示唆した。

化合物処理したトマト葉における遺伝子発現解析を RT-qPCR により行ったところ、MeJA を用いた対照実験において活性化の見られたトマトにおける一般的なジャスモン酸マーカー遺伝子 (*JAZs*, *OPR3*, *AOS*, *TD2* など) の活性化が見られた一方で、JILa はこれらの遺伝子の発現を活性化しなかった。興味深い知見として、トマチン生合成遺伝子 (*GAME* 遺伝子) については JILa, MeJA のどちらも活性化したほか、COI1 下流のジャスモン酸関連の転写因子について選択的な活性化を生じていることを示唆する結果が得られた。

得られた実験結果から、受容体サブタイプ選択的なリガンドの結合によるジャスモン酸応答の一部活性化の可能性が強く示唆されたことから、*in-vitro* での各受容体サブタイプとの結合活性・親和性評価を実施したところ、JILa は一切トマトのジャスモン酸受容体に結合しないことが明らかとなった。一方で、JILa の加水分解体である 12-OH-JA-Ile が、受容体サブタイプ選択的な結合活性を示すことを明らかにした。得られた結果は、JILa が植物体内で 12-OH-JA-Ile に変換されることでジャスモン酸応答の一部活性化を引き起こすことを強く示唆する。

現在、論文化に向けて引き続き研究を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jianxin Wang, Haruka Sakurai, Nobuki Kato, Takuya Kaji, Minoru Ueda	4. 巻 11
2. 論文標題 Syntheses of dinor-cis/iso-12-oxo-phytodienoic acid (dn-cis/iso-OPDAs), ancestral jasmonate phytohormones of the bryophyte <i>Marchantia polymorpha</i> L., and their catabolites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 SCIENTIFIC REPORTS	6. 最初と最後の頁 2033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81575-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 齋藤里菜、加治拓哉、安部 洋、山神壮平、高岡洋輔、上田 実
2. 発表標題 ジャスモン酸イソロイシンラク톤のトマトにおける生理活性評価
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rina Saito, Sohei Yamagami, Hiroshi Abe, Takuya Kaji, Yousuke Takaoka, Minoru Ueda
2. 発表標題 JA-Ile-macrolactone, an artificial regulator of plant hormone response
3. 学会等名 Pacifichem2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加治拓哉、齋藤大明、林 謙吾、野本春菜、中山美涼、加藤信樹、高岡洋輔、上田 実
2. 発表標題 植物ホルモン受容体サブタイプ選択的リガンド開発を志向したコロナチンの立体異性体ライブラリー戦略
3. 学会等名 第48回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤里菜、加治拓哉、安部 洋、山神壮平、高岡洋輔、上田 実
2. 発表標題 ジャスモン酸イソロイシンラクトンによる植物アルカロイド生産活性化
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤里菜、加治拓哉、安部 洋、山神壮平、高岡洋輔、上田 実
2. 発表標題 ジャスモン酸イソロイシンラクトンによるアルカロイド生産活性化
3. 学会等名 植物化学調節学会第56回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武藤俊哉、齊藤里菜、加藤信樹、加治拓哉、上田 実
2. 発表標題 12-ヒドロキシ-(3R,7S)-ジャスモン酸イソロイシン異性体のCO11-JAZ受容体親和性
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------