

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05405

研究課題名（和文）植物内生シグナル物質としての脂肪酸-アミノ酸縮合体の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of fatty acid-amino acid conjugates as endogenous signal molecules in plants

研究代表者

高橋 公咲（Takahashi, Kosaku）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：30374622

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）：幼虫の唾液分泌物に含まれるエリシターの -リノレン酸-グルタミン縮合体（LA-Gln）は、植物に普遍的に存在していた。LA-Glnは、シロイヌナズナのGH3.15により生成された。LA-Gln処理されたシロイヌナズナは、ジャスモン酸量が増加し、根の伸長が抑制された。また、数種の植物では傷害によりLA-Gln量が増加した。従って、LA-Glnが新たな植物防御機構のシグナル分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幼虫の唾液に含まれる -リノレン酸-グルタミン縮合体（LA-Gln）は、これまで幼虫のみが生産し、植物防御応答を引き起こすエリシターと考えられてきた。しかし、LA-Glnが植物に普遍的に存在することが明らかとなり、LA-Glnが植物内生シグナル分子であることが示唆された。本結果は、既存の概念を覆す非常に重要な結果であり、学術的に大変興味深い。また、本結果は新しい植物防除法開発の一助となりうる。

研究成果の概要（英文）：Fatty acid-amino acid conjugates, elicitors, are found in insect larval saliva, and induce plant defense responses. -Linolenic acid-glutamine conjugate (LA-Gln), a type of fatty acid-amino acid conjugate. This study has revealed LA-Gln is ubiquitously present in plants. This compound is produced by the Arabidopsis thaliana protein GH3.15. Several plant species was revealed to increase endogenous LA-Gln levels in response to wound stress. Additionally, it was shown that LA-Gln inhibited root elongation and increased endogenous jasmonic acid concentration in Arabidopsis thaliana. Therefore, it is suggested that LA-Gln is an endogenous signaling molecule, which is involved in a plant defense system.

研究分野：生物有機化学

キーワード：脂肪酸 - アミノ酸縮合体 GH3.15 生理活性物質 植物 ストレス応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エリシターは化学因子とも呼ばれ、植物の生体防御反応を誘導する化学物質である。これまで様々なエリシターが発見されてきた。それらのエリシターの一つである脂肪酸-アミノ酸縮合体 (fatty acid-amino acid conjugates: FACs) は、植食者である幼虫の唾液分泌物に含まれ、植物の生体防御反応を誘導することが知られている。FACs は鱗翅目昆虫の幼虫の唾液に含まれ、炭素数が 16 個から 18 個の飽和または不飽和脂肪酸とアミノ酸、特にグルタミンやグルタミン酸が縮合した構造を持つ化合物である。FAC は、植物の揮発性成分の生成を促進し、幼虫の天敵を誘引することで植物の防御応答に関与している。しかし、FACs が植物内におけるシグナル伝達などの作用機構の詳細は不明のままである (1)。

植物ホルモンのジャスモン酸の生合成中間体である 12-オキソファイトジエン酸 (OPDA) とイソロイシンの縮合体 (OPDA-Ile) が発見された (2)。当初、OPDA-Ile は、OPDA と Ile が縮合することで生成されると予想された。しかし、研究代表者らは、OPDA-Ile が γ -リノレン酸とイソロイシンの縮合体 (LA-Ile) が環化し OPDA-Ile となることを証明した (3)。そこで、植物中に LA-Ile が存在するのであれば、FACs の一種である γ -リノレン酸-グルタミン縮合体 (LA-Gln) も存在するのではないかと予想し、モデル植物の一つであるシロイヌナズナの抽出物を分析したところ、LA-Gln の存在が確認された。これらの結果から、LA-Gln は植物内生シグナル物質として植物の防御応答に関与していることが予想された。

2. 研究の目的

エリシターは化学因子とも呼ばれ、植物の生体防御反応を誘導する化学物質である。これまで様々なエリシターが発見されてきた。それらのエリシターの一つであり、これまで幼虫の唾液中だけに存在が確認されてきた FACs が、モデル植物のシロイヌナズナも生産しているという結果は、FACs が植物の生体防御機構を誘導する外因性のエリシターではなく、植物内生シグナル伝達物質である可能性を示唆している。本研究は、植物中の FACs の生合成および生理活性発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各植物に含まれる LA-Gln 量の分析

各植物を人工気象器 (24 時間、明期 8 時間、暗期 16 時間の短日条件) 内で 5~8 週間生育させた。地上部約 100 mg を刈取り、液体窒素を加えて冷凍破碎した。破碎された植物体に 10 mL の 80 %エタノール水溶液を添加して 4 時間一晩抽出した。本抽出液に内部標準物質として安定同位体で標識された LA-Gln を添加した。抽出液は綿栓で濾過した後、遠心濃縮した。本濃縮液を固相抽出し、夾雑物を除去した後、得られた溶液を遠心濃縮して分析サンプルとし、LC-MS/MS を用いて LA-Gln の測定を行った。

(2) 傷害処理による各植物の LA-Gln 量の分析

(1) と同様に植物を生育させ、それらの葉をピンセットで挟むことで傷害を与えた。LA-Gln の分析は (1) と同様に行った。

(3) LA-Gln 合成酵素 (GH3.15) の同定および酵素活性の解析

理化学研究所から GH3.15 遺伝子 (At5g13370) の cDNA クローンを購入した。本遺伝子を PCR で増幅させ、定法に従い組換えタンパク質発現用ベクター pET23a に導入した。本ベクターを組換えタンパク質発現用大腸菌 BL21 に形質転換させた。本大腸菌を LB 培地で培養し、IPTG を添加することでタンパク質発現を誘導した。得られた菌体のタンパク質溶液をニッケルアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供し、組換え GH3.15 を精製した。

組換え GH3.15 の反応性を確認するため、 γ -リノレン酸とグルタミンを基質とし、酵素反応液の pH を 7.8、反応温度を 30 °C とし 60 分間の酵素反応を行った。本反応液を LC-MS/MS 分析を行うことで LA-Gln を分析した。

(4) GH3.15 による LA-Gln 合成反応の至適 pH および至適温度

GH3.15 反応液の pH を 6.5 から 9.0 まで変化させ酵素反応を行った。また、GH3.15 反応液の反応温度を 25 °C から 40 °C まで変化させ酵素反応を行った。得られた酵素反応液中の LA-Gln を LC-MS/MS で分析することで、本反応の至適 pH および至適温度を求めた。

(5) GH3.15 反応の基質特異性

20 種類のアミノ酸および 5 種類の代表的な脂肪酸を基質として用いた。GH3.15 により脂肪酸

とアミノ酸の縮合反応で副生成物として生じる AMP の生成量から酵素反応の進行を調べ、GH3.15 の基質特異性を評価した。

(6) LA-Gln がシロイヌナズナの二次代謝産物およびジャスモン酸の生産に与える影響

シロイヌナズナの野生株を土ポット (Jiffy-7) に播種し、人工気象器 (24、明期 8 時間、暗期 16 時間の短日条件) 内で 1 か月生育させた。生育させたシロイヌナズナ野生株に 100 μM の LA-Gln を噴霧した後、植物体を 80%メタノールで抽出した。本抽出液を HPLC に供し、抽出液中の二次代謝産物量を分析した。また、同様の方法で得られたシロイヌナズナ抽出液に含まれるジャスモン酸量は、LC-MS/MS で分析した。⁴⁾

(7) LA-Gln がシロイヌナズナの生育に与える影響

100 μM の LA-Gln を含む 1/2 ムラシゲ-スクーグ寒天培地にシロイヌナズナ野生株を播種し、人工気象器 (24、明期 8 時間、暗期 16 時間の短日条件) 内で生育させ、その根の伸長に与える影響を調べた。

(8) シロイヌナズナの GH3.15 遺伝子欠損株および GH3.15 遺伝子過剰発現株の表現型の観察

ABRC よりシロイヌナズナの GH3.15 遺伝子欠損株 (SALK_108285C) を購入した。GH3.15 遺伝子を pGWB2 ベクターに挿入し、定法に従いシロイヌナズナ GH3.15 遺伝子過剰発現株を作製した。それぞれの GH3.15 遺伝子変異株を土ポットの Jiffy-7 に播種し、人工気象器 (24、明期 8 時間、暗期 16 時間の短日条件) 内で 5 週間生育させ、その表現型を観察した。

4. 研究成果

(1) 植物における LA-Gln の普遍的な存在の証明

研究代表者は、すでにシロイヌナズナにおいて LA-Gln の存在を確認していた (図 1)。他にも、植物の研究によく用いられるトウモロコシ、トマト、ナスおよびダイズ中に含まれる LA-Gln を LC-MS/MS を用いて分析した (表 1)。その結果、いずれの植物からも LA-Gln が検出され、LA-Gln が植物に広く存在する事が明らかとなった。

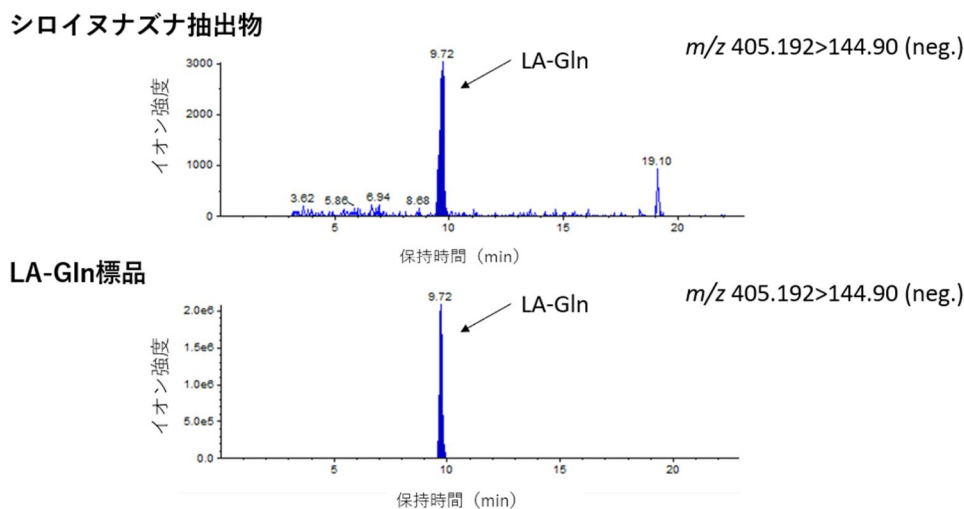


図 1. LC-MS/MS を用いたシロイヌナズナに含まれる LA-Gln の分析.

表 1. 各植物に含まれる LA-Gln の内生量 (n=4) .

植物	内生量 (ng/gFW)
シロイヌナズナ	0.35 ± 0.04
トウモロコシ	758.1 ± 70.8
ナス	0.45 ± 0.03
トマト	253.5 ± 52.9
ダイズ	502.4 ± 97.2

(2) 傷害処理による各植物の LA-Gln 量の分析

LC-MS/MS を用いて、傷害を与えたシロイヌナズナ、ナス、トマトおよびダイズの LA-Gln 量を分析した。ナスとトマトは、傷害処理 1 時間後から有意に LA-Gln 量が増加した。その一方で、ダイズおよびシロイヌナズナでは、LA-Gln 量の有意な増加は認められなかった。従って、傷害

処理による LA-Gln 濃度の増加効果は、植物によって異なることが明らかとなった。

(3) LA-Gln 合成酵素の同定および解析

GH3 タンパク質は、オーキシシンやジャスモン酸などの植物ホルモンとアミノ酸を縮合するタンパク質として知られており、シロイヌナズナには GH3.1 から GH3.19 まで 19 種類の GH3 タンパク質が存在する。シロイヌナズナの GH3.15 は、インドール酪酸とグルタミンの縮合を触媒することが報告されている (5)。そこで、GH3.15 が γ -リノレン酸とグルタミンを縮合し、LA-Gln も生成していることが予想された。定法に従い大腸菌を用いて組換え GH3.15 を生産し、 γ -リノレン酸とグルタミンを基質として縮合反応を行い、反応液中の LA-Gln を LC-MS/MS で分析した (図2)。その結果、GH3.15 の反応液中で LA-Gln が生成していることが明らかとなり、GH3.15 が LA-Gln 縮合酵素であることが明らかとなった。

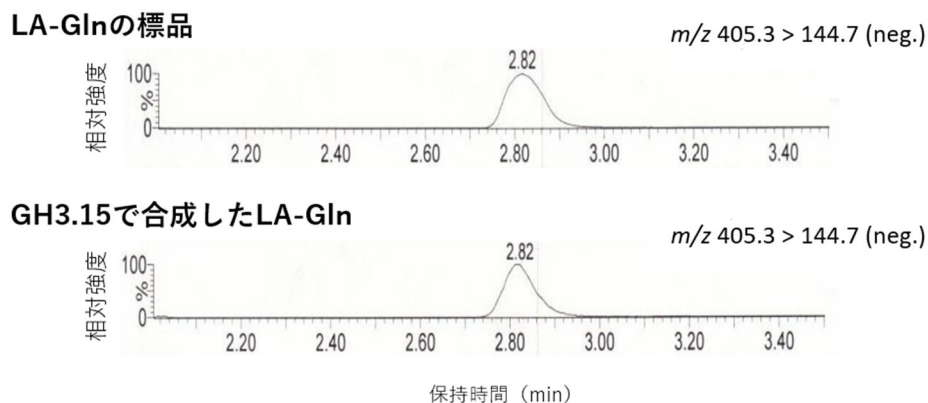


図2. LC-MS/MSによる γ -リノレン酸とグルタミンを基質とした GH3.15 反応生成物の分析。

組換え GH3.15 の LA-Gln 縮合反応温度を 25 から 40 で変化させて酵素反応を行い、本反応の至適温度を求めた。GH3.15 は 25 から 35 にかけて反応性が上昇し極大となり、40 まで上昇させると反応性は 35 より低下した (図3)。これらの結果から、GH3.15 の LA-Gln 縮合反応の至適温度は 35 であることが明らかとなった。同様に GH3.15 縮合反応液の pH を 6.5 から 9.0 まで変化させて酵素反応を行い、本反応の至適 pH を求めた。その結果、GH3.15 反応の至適 pH は 8.5 であることが判明した (図3)。

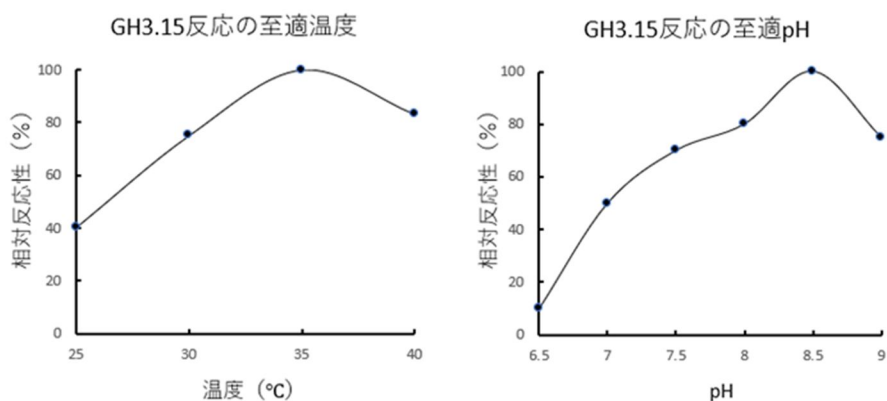


図3. γ -リノレン酸とグルタミンを基質した GH3.15 反応の至適温度と至適 pH。

さらに、GH3.15 のアミノ酸の基質特異性を調べた。GH3.15 反応の副反応物である AMP を HPLC で定量することで反応の進行を解析した。その結果、ヒスチジンに対して最も特異性が高く、グルタミンは 4 番目に高い基質特異性を示した。GH3.15 の脂肪酸の基質特異性を調べた。その結果、 γ -リノレン酸を基質とした反応は、他の 4 脂肪酸を基質とした反応に比べ統計的に有意な差は見られなかった。

LA の濃度を固定し、基質である Gln の濃度を 0.75 ~ 15 mM に変化させて酵素反応を行うことにより本酵素反応の速度論的解析を行った。その結果をもとに Hanes-Woolf プロットによりグラフを作成し、 K_m 、 V_{max} および k_{cat} を算出した結果、それぞれ 0.58 mM、13.33 nmol/min および 17.72 min^{-1} となった。

(4) LA-Gln がシロイヌナズナの二次代謝産物およびジャスモン酸の生産に与える影響

シロイヌナズナの野生株に 100 μM の LA-Gln を噴霧し、その二次代謝産物の生産量に与える変化を調べた。しかし、LA-Gln 処理したシロイヌナズナ抽出物に含まれる二次代謝産物量は、LA-Gln 無処理のシロイヌナズナと比較して顕著な変化は見られなかった。また、同様にシ

ロイヌナズナに含まれるジャスモン酸量の変化を調べた。その結果、100 μ M の LA-Gln 噴霧 1 時間後にジャスモン酸量が一過的に上昇していた。従って、LA-Gln はジャスモン酸量を増加させる効果があることが示された。

(5) LA-Gln がシロイヌナズナの生育に与える影響

シロイヌナズナの野生株を用いて根の伸長阻害活性試験を行った。その結果、100 μ M の LA-Gln は有意に根の伸長を阻害した (図 4)。また、LA-Gln を含む培地で生育させると、プレートを垂直に立てて育てているのにも関わらず、根が斜めに成長するという現象が確認された (図 3)。この結果から、LA-Gln はシロイヌナズナの根の生育を抑制するのみならず、根の重力屈性にも影響することが判明した。

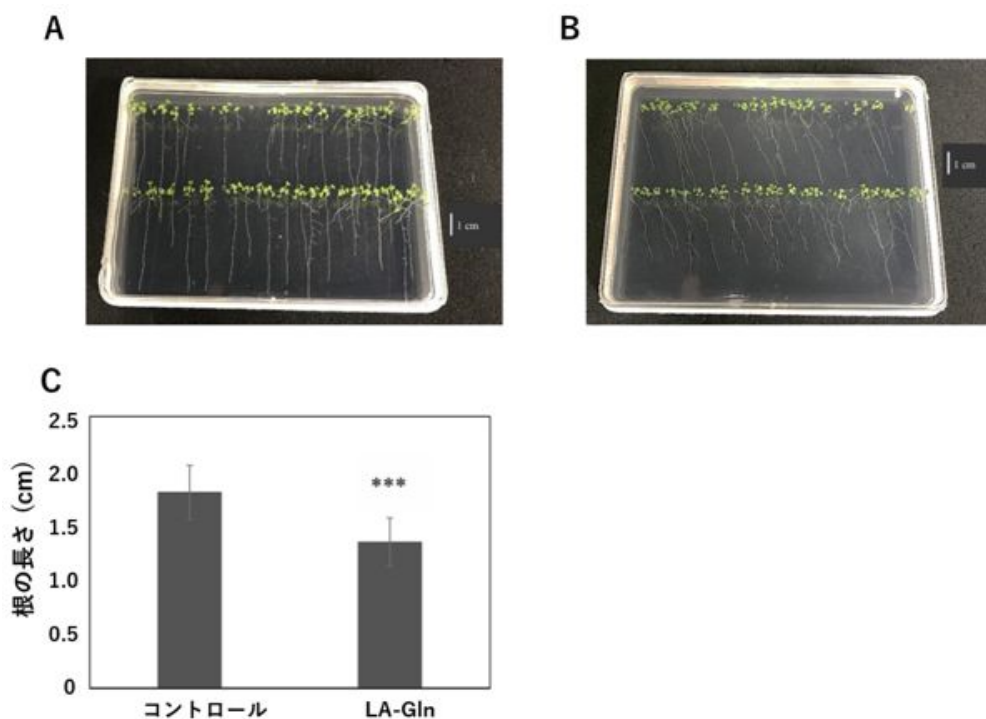


図 4. LA-Gln がシロイヌナズナの根の伸長に与える影響。

A: コントロールのシロイヌナズナの写真; B: LA-Gln 処理したシロイヌナズナの写真; C: コントロールおよび LA-Gln 処理したシロイヌナズナの根の長さ (*** $p < 0.001$, $n=50$).

(6) シロイヌナズナの *GH3.15* 遺伝子変異株の表現型

シロイヌナズナの *GH3.15* 遺伝子欠損株 (SALK_108285C) および *GH3.15* 遺伝子過剰発現株の生育をシロイヌナズナの野生株と比較した。しかし、これらの変異株と野生株の表現型には顕著な違いは観察されなかった。

参考文献

- 1) A. C. Jones et al., *Plant Mol Biol* 109, 427-445 (2022).
- 2) M. D. Arnold et al., *PLoS One* 11, e0162829 (2016).
- 3) A. Uchiyama et al., *Bioorg Med Chem Lett* 8, 1020-1023 (2018).
- 4) P. Pratiwi et al., *Plant Cell Physiol* 58, 789-801 (2017).
- 5) A. M. Sherp et al., *J Biol Chem* 293, 4277-4288 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋公咲、伊藤詩織、謝 肖男、中川博之、北岡直樹、松浦英幸
2. 発表標題 植物の -リノレン酸-グルタミン縮合体の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
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
研究分担者	松浦 英幸 (Matsuura Hideyuki) (20344492)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	

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
---------	---------