

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 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780100

研究課題名（和文）植物の防御機構に関するステロイドの骨格部生合成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of steroidal backbone synthesis for plant defensive mechanisms

研究代表者 大山 清 (OHYAMA KIYOSHI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：20391899

研究成果の概要（和文）：トマトの実生を 5 μM の MJ で処理し、トマトステロイド（トマチン）の内生量を調べた。未処理のトマトに比べて、3 日後にはトマチン含量が 4 倍に増加した。一方、トマチン前駆体のコレステロールは 12 時間後に未処理のトマトを比較して 1.5 倍に増加し、24 時間後以降、同程度に回復することがわかった。次に、MJ 添加したトマト実生を用いて $[6\text{-}^{13}\text{C}_3]$ メバロン酸のトレーサー実験を行い、培養 7 日後のトマチンならびにコレステロールの骨格部生合成について調べた。その結果、未処理のトマトではトマチンはシクロアルテノール経路で主に生合成されるのに対し、MJ 処理トマトではラノステロール経路がシクロアルテノール経路と比較して 3% にまで上昇することがわかった。一方、コレステロールは未処理、MJ 処理時共にシクロアルテノール経路で生合成されていることがわかった。これらの結果から、病傷害時にトマトが増産するトマチンは、細胞膜ステロールとして存在するコレステロールを前駆体として生合成されるのではなく、増産されるコレステロールは全てトマチンへと代謝されており、一次代謝物と二次代謝物が切り離されて生合成されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that a part of tomatine, a steroidal alkaloid in tomato, is biosynthesized *via* lanosterol, and tomatine content is increased by enhancing lanosterol pathway with MeJA treatment. In order to investigate the variation of tomatine content by the elicitation with MeJA, tomato seedlings were incubated for 1d, 3d, and 7d in MS medium including 5 μM MeJA. The seedlings were harvested, extracted and subjected to quantitative LC-MS analysis for tomatine. The content of tomatine was 4-fold higher than in the untreated seedlings, while the contents of cholesterol and phytosterol were held constant. In addition, the feeding experiments of $[6\text{-}^{13}\text{C}_3]\text{MVL}$ were performed using tomato seedlings and the backbone synthesis of tomatine was analyzed by ^{13}C -NMR. As a result, the cycloartenol pathway was found to be an exclusive route with little or no lanosterol pathway in a normal growth condition. By 5 μM MeJA treatment the contribution of the lanosterol pathway to tomatine biosynthesis was increased up to ca. 3% of the cycloartenol pathway. However the sterols were biosynthesized by the cycloartenol pathway with little or no lanosterol pathway in the both conditions. From these results, it is suggested that an increase in tomatine biosynthesis occurs independently of phytosterol biosynthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,160,000

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：生合成、ラノステロール、シクロアルテノール、防御応答、トマト、メチルジャスモン酸、メバロン酸

1. 研究開始当初の背景

ステロイド化合物の炭素骨格はオキシドスクアレンの閉環酵素によって構築される。機能同定されていた植物由来の本酵素はシクロアルテノール合成酵素遺伝子 (CAS) のみであり、植物ステロイドは全てシクロアルテノールを経由して生合成されると考えられてきた。しかし 2006 年、シロイヌナズナ、ミヤコグサ、オタネニンジンが、CAS に加えて、動物や酵母からのみ同定されていたラノステロール合成酵素遺伝子 (LAS) を持つことを、申請者らを含め 3 つの研究室が独自に見出した。さらに、シロイヌナズナを用いた $[6-^{13}\text{CD}_3]$ メバロン酸のトレーサー実験により、これまでの報告通りであるシクロアルテノール経路のステロール生合成経路 (シクロ経路) に加えて、ラノステロール経路の経路 (ラノ経路) が存在することを初めて明らかにした。通常の生育条件下、実生においてラノ経路の寄与率は 1%程度であった。シロイヌナズナの CAS (CAS1) はどの器官でもほぼ一定の発現レベルを示したが、シロイヌナズナの LAS (LAS1) は鞘・茎・根で発現を示すものの実生・葉・花序では発現は極わずかであった。また、シロイヌナズナのマイクロアレイのデータから、植物の防御応答に関与するメチルジャスモン酸処理やシュードモナス菌での感染により、CAS1 は発現量に変化が無いのに対し、LAS1 は発現が誘導されることが明らかになっている。これら事実から LAS およびラノステロールの代謝産物が植物の防御機構に関与すると予想されている植物に LAS が存在するとの最初の報告後まもなく、植物の病害や昆虫による食害に対する防御物質であると考えられているステロイド化合物を含むトマトにも LAS が存在することが明らかにされた。トマトに含まれるステロイドアルカロイドであるトマチンを初め、ナス科植物には共通して 6 環性のステロイド化合物を含有することが知られている。その中には食中毒の原因となるジャガイモのソラニンや、動物性ステロイドホルモン類の合成に有用な中間体として利用されているサポゲニンなどが存在する。そのため、これら化合物の生合成制御機構を解明することは、病傷害に対する抵抗性を増強させた植物の育成、医薬品原料として有用なステロイド化合物の生産性向上、食中毒の原因物質含量を低下させた植物の育種といった観点から重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本申請課題ではすでに LAS が単離されているトマトを用いて 2 つのステロイド生合成経路が器官ごとでどのように使い分けられ、ジャスモン酸処理などの外部刺激に対してどのように変化するのか明らかにする (図 1)。また、他のナス科植物についてもジャスモン酸処理によるステロイド化合物の含有量の変化を明らかにし、ナス科に一般的な制御機構であるか検証する。公開されているジャガイモ、ナス、トウガラシ EST ライブラリーに LAS と相同性の高い配列が見出せた場合にはクローニングを行い、その遺伝子の機能同定を目指す。

3. 研究の方法

トマト実生を液体培地で培養し、 $5\mu\text{M}$ の MJ で処理し、トマチンとその前駆体であるコレステロール、その他の植物ステロールの含有量を LCMS や GCMS による分析により明らかにし、タイムコース変化を調べる。含有量に変化があった場合には、トマチンならびにステロールの骨格部生合成経路の変化、すなわち、シクロ経路とラノ経路の寄与率の変化を明らかにするために、トマト実生を用いた $[6-^{13}\text{CD}_3]$ メバロン酸のトレーサー実験を行う。シクロ経路でトマチンやステロールが生合成された場合においては、オキシドスクアレンの 26 位のメチル基からプロトンが 1 個脱離するが、ラノ経路の場合には、そのメチル基は無傷のままである。 $[6-^{13}\text{CD}_3]$ メバロン酸を投与し、ステロイドの 19 位に保持される重水素の数を調べることで、どちらの経路で生合成されたか明らかにできる。保持される重水素の数は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおける同位体シフトを観測することで明らかにできる。重水素による同位体シフトは 1 個の置換あたり 0.3 ppm 程度高磁場側へシフトし、加有成性があることが知られている。標品化合物の 19 位メチル基シグナルに対し、0.6 ppm 高磁場シフトしたシグナル (シクロ経路: 重水素 2 個保持) と 0.9 ppm シフトしたシグナル (ラノ経路: 重水素 3 個保持) の強度比を比べることでそれぞれの経路の寄与率が明らかにできる。

また、他のナス科植物に対しても $5\mu\text{M}$ の MJ で処理した場合のステロイド化合物の含有量変化を明らかにする。使用する植物は EST ライブラリーが公開され、入手用意な、ナス、トウガラシ、ジャガイモを用いて検証する。さらに EST ライブラリーから LAS と相同性

の高く、特徴的なアミノ酸配列を有するデータを抽出し、機能同定を行う。

4. 研究成果

トマト実生を液体培地で培養し、5 μ MのMJで処理後、12時間、1日、3日、7日目にサンプリングし、トマチンならびにステロールの含有量をLCMSとGCMS分析により測定した。12時間後には、MJ処理により、MJ未処理のトマトに比べてトマチン含量が1.5倍に増加し、1日で3倍、3日後には4倍に増加し、7日後にも4倍の含有量であった。トマチン前駆体のコレステロールは、に増加することが明らかになった。また、トマチンの生合成前駆体であるコレステロール含有量は、MJ処理により、12時間後に1.5倍に増加し、その後1日後以降は未処理のコレステロール含量と同程度に回復した。植物ステロールであるカンペステロール、スティグマステロール、シトステロール含量はいずれの時間においても含有量の変化は見出せなかった。これらの結果から、トマチン含量増加させるためにトマチンの生合成前駆体としてのコレステロール生合成経路が強化され、その増加分は全てトマチン生合成に使用されていることが推定された。また植物ステロールは細胞膜の構成成分であり、恒常性を維持するために含有量変化は見出せなかったと考えられる。次にトマチン含有量に変化に対する、トマチンならびにステロールの骨格部生合成経路の変化、すなわち、シクロ経路とラノ経路の寄与率の変化を明らかにするために、トマト実生を用いた[6-¹³CD₃]メバロン酸のトレーサー実験を行った。MJ処理後7日目の実生をサンプリングし、各種クロマトグラフィーにより、トマチン、コレステロール、シトステロールを精製し、¹³C-NMRスペクトルを測定した。0.6 ppm 高磁場シフトしたシグナル（シクロ経路：重水素2個保持）と0.9 ppmシフトしたシグナル（ラノ経路：重水素3個保持）を解析したところ、MJ未処理のトマトにおいては、トマチンは、ほぼシクロ経路で生合成されていることが明らかになった。一方MJ処理した場合には、ラノ経路の寄与がシクロ経路と比較して3%にまで上昇することがわかった。この結果は、トマチン増産のためにシクロ経路を増強させるとともに、それ以上の増加率でラノ経路が増強されたことを意味している。トレーサー実験により得られたコレステロールならびにシトステロールの¹³C-NMRスペクトルを測定したところ、MJ処理によるそれぞれの経路の寄与率に変化はなく、シクロ経路のみで生合成されていることが明らかになった。これらの結果から、病傷害時にトマトが増産するトマチンは、シクロ経路増強、ラノ経路の増強を伴って前駆体であるコレステロール生合成経路が強化され、増強した

分のコレステロールは細胞膜成分としてのステロールとして蓄積することなく、全てトマチン生合成経路に使用されることが示唆された。また、シトステロールについては、細胞膜構成成分として恒常性の維持が必要であり、シクロ経路、ラノ経路どちらの増強分の影響もなく生合成が維持されたと考えられる。以上のように、植物の防御応答に関与するMJで処理することでトマチン含量が増加する際の生合成制御機構の一旦を明らかにすることができた。

トマトの生合成機構が、他のナス科植物でも機能しているか明らかにするために、ナス、トウガラシ、ジャガイモを用いて、MJ処理によるステロイド含量の変化を明らかにすることにした。それぞれの植物の実生を用いて含量変化のタイムコースを調べた。トマトの場合と同様に、5 μ MのMJで処理したところいずれの植物においてもステロイド含量に変化がなく、コレステロールはじめ、植物ステロール含量の変化は見出せなかった。トマトの生合成制御機構がナス科一般的であることを期待したが、MJ処理によってステロイド含量が変化するのにはトマトのみであることが明らかになった。また、ゲノムデータベースで公開されているESTライブラリーからLASと相同性の高い配列を探索した。しかし、CASやその他のオキシドスクアレン環化酵素遺伝子と考えられるEST配列は見出せたものの、LASに特徴的な配列はいずれのデータベースから見出すことは出来なかった。今後データベースが充実していくことでLASと考えられる配列が見出せる可能性もあるが、MJ処理でステロイド含量が増加しなかったという結果と考え合わせ、ナス科にLASが広く存在し、MJ処理によってLASが増強されステロイド含量が増加するという機構が一般的ではなく、トマトに特有の制御機構であると考えている。

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 1件）

〔学会発表〕（計 3件）

①Kiyoshi Ohyama, Satoru Sawai, Masashi Suzuki, Kazuki Saito, Toshiya Muranaka. MeJA elicitation for Solanum plant increases production of steroid and lanosterol pathway while maintaining phytosterol content. Japan-Korea Joint Seminar on Plant Biotechnology for the Next Generation, 2011.12.4, Narita, Japan

②大山 清、澤井 学、鈴木優志、斉藤和季、村中俊哉 メチルジャスモン酸処理によるトマトの

ステロイド生合成に及ぼす影響 第 29 回日本植物細胞分子生物学会、2011.9.8、福岡県福岡市

③ Kiyoshi Ohyama, Satoru Sawai, Masashi Suzuki, Kazuki Saito, Toshiya Muranaka. Elicitation with Methyl Jasmonate for Tomato Plant Increases Production of Tomato Steroid and Lanosterol Pathway. TERPNET2011, 2011.5.24, Kalmar, Sweden

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 清 (OHYAMA KIYOSHI)
東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：20391899

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：