

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580165

研究課題名(和文)植物自己防除機構におけるジャスモン酸シグナルの活性化に関する研究

研究課題名(英文)Studies on jasmonic acid signalling for plants defense induction

研究代表者

田母神 繁(Tamogami, Shigeru)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70315589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモンは害虫の食害ストレスに対応するシグナル物質として機能する。特に食害葉ではジャスモン酸(JA)関連代謝物が機能し、不活性なJAがアミノ酸のイソロイシンと結合して活性体のJA-Ileに活性化される。植物の葉が食害されると遠隔葉で抵抗性が誘導される現象があり、メチルジャスモン酸(MeJA)は有力な移行性シグナル物質の候補である。モデル実験植物(ヒナタイノコスチ)の下部から投与したMeJAの上葉への移行と代謝を解析し、MeJAは移行先で活性体のJA-Ileに変換されることを示した。さらに、MeJA水溶液に重水を加えることで、誘導されるテルペンがde-novo代謝物であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Plant hormones function as signalling compounds which defend against environmental stresses or herbivore damage. Especially, jasmonic acid (JA) and its related metabolites work in the herbivore damaged leaves. Recent studies have shown that JA its self is inactive, but its isoleucine conjugate (JA-Ile) is active. It has been known that herbivore damage can activate plants defense at distant tissues, and signalling compounds may control the whole-plant defense induction. Highly mobile MeJA can be a candidate as the whole-plant defensive signalling molecule. In this study, transportation of MeJA and its activation into JA-Ile in the distant tissues (upper leaves) were investigated using an experimental mode plant *Achyranthes bidentata* (Ox knee). Exogenously applied MeJA was transported into upper distant leaves and activated into JA-Ile. Induced defensive terpene metabolites in the distant leaves were shown to be de-novo metabolites.

研究分野：有機化学

キーワード：植物ホルモン ジャスモン酸 メチルジャスモン酸 ジャスモノイルイソロイシン 防御反応 揮発性
化合物 テルペン 食害

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンは、植物の生長や分化の制御に加え、環境変化や害虫の食害などのストレスに対応するシグナル物質としても機能している。この応答には、ジャスモン酸(JA)、サリチル酸、エチレンなどが関与する。特に食害葉では JA やその代謝物であるジャスモノイルイソロイシン(JA-Ile)が主に機能している。JA 機能発現に関する最近の研究から、JA 自体は不活性であり、アミノ酸のイソロイシンと結合して活性体の JA-Ile となることが明らかにされている。JA それ自体が不活性であるという研究結果は驚きであるが、JA-Ile が高い活性を示すことは以前から知られ、シグナル伝達における JA から JA-Ile への活性化は巧妙で興味深い制御機構であると考えられている。

一方、植物の下位の葉が食害されると上位の葉で抵抗性が誘導されるシグナル伝達現象があり、何らかのシグナル物質が植物体全身に移行し、防御反応が誘導されると考えられる。シグナル物質の本体は未解明であるが、高い移行性と膜透過性をもつメチルジャスモン酸(MeJA、JAのメチルエステル)が有力な候補化合物の一つである。

2. 研究の目的

植物は食害を受けたという情報を食害葉から離れた葉に伝達する仕組みを持つ。遠隔の葉では様々な二次代謝産物の生産が誘導され全身的な防御が開始される。そこで、食害葉で生成した MeJA が植物体内を移行し、移行先の組織で活性体の JA-Ile に変換され、それが防御反応を誘導すると考えた。

本研究では、MeJA の移行、代謝、活性化、遠隔葉での防御反応の誘導を分子レベルで解析し、植物の全身的な防御反応発現メカニズムを明らかにすることを計画した。すなわち、植物個体内での MeJA の移行性、移行先での JA-Ile への活性化、移行先で防御反応の発現、の諸過程を化学分析によって明らかにする。

3. 研究の方法

この研究には、我々のモデル植物(ヒナタイノコズチ)と JA 類の LC-MS/MS 分析を応用し、下部位から投与した MeJA の上葉への移行と代謝を解析した。ヒナタイノコズチは MeJA を効率よく吸収・代謝し、かつ多様な防御物質を生成する。重水素標識 MeJA (d_2 -MeJA) を投与した後、移行先の遠隔部位で重水素標識 JA-Ile(d_2 -JA-Ile) を検出する実験を行った。次に、移行先で防御反応が誘導されていることを明らかにする目的で、上葉で防御反応が活性化される指標である植物揮発性化合物の放出を GC-MS で確認した。これらの化合物は害虫の天敵を誘引する活

性を有し、非食害時には生合成されないため、防御反応の活性化を示す指標となる。さらに、上葉での揮発性有機化合物の生成が de-novo 合成であることを確認する実験も行った。

4. 研究成果

以前から、傷害を受けた植物が MeJA を放出し、それを受容した近隣植物が防御機構を活性化させる現象が知られていたが、MeJA 受容植物体内で MeJA がどのように機能するのかは不明であった。我々のグループはこの領域で研究を続け、受け取られた MeJA は JA へ加水分解され、次いでイソロイシンと結合して JA-Ile に活性化されることを解明している [Tamogami et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 376, 723-727(2008)]。また、生じた外生の JA-Ile が内生の JA や JA-Ile の生合成を誘導するポジティブフィードバックが働くことも示している。今回の研究によって、上記の植物間で見出した MeJA 解析研究の知見が、植物個体内でも起きる可能性を示すことができた。すなわち、MeJA は不活性体で植物体内を移行し、移動先で活性体に変換されて機能する可能性を示した。代表的な研究成果を図 1~3 に示す。

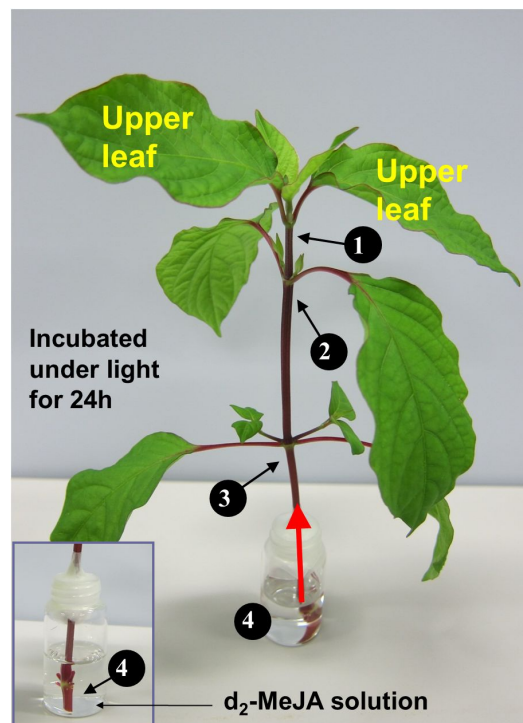


図 1. MeJA の上位葉移行と JA-Ile への活性化。
で示される下位に投与された MeJA は、の葉柄を隔てた上位葉 (Upper leaves) に移行し、そこで活性体となり活性を発現する。

ヒナタイノコズチ茎葉部を重水素標識された MeJA を含む水溶液に浸し、3 箇所葉柄を隔てた上位葉への移行性を調べた(図 1)。その結果、上位葉に活性化された重水素 JA-Ile が存在することを確認した。興味ある

ことに、上位葉で内生の JA-Ile が増加することも明らかとなった(図2)。すなわち、図1に示されるように d_2 MeJA は下部部から上葉へ移行し、移行先で活性体の d_2 JA-Ile に代謝されることが確認された。その移行先で内生の活性体である JA-Ile も誘導されることも明らかとなった。

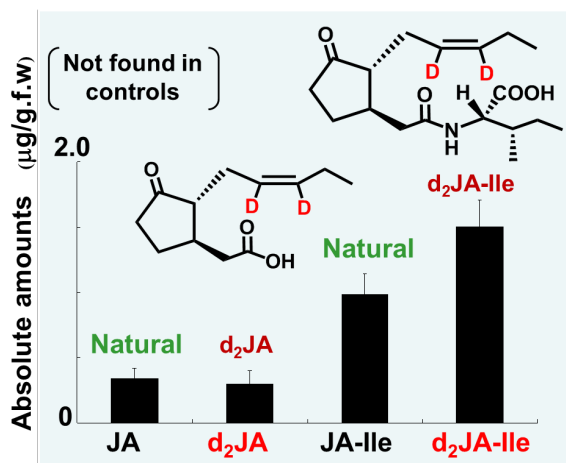


図2. 下位葉に MeJA 処理してから 24 時間後に上位葉に存在する JA・JA-Ile 量。 d_2 -JA および d_2 -JA-Ile は外生の代謝物を、JA および JA-Ile は内生の代謝物であることを示す。

これらの結果から、外生の MeJA は、ヒナタイノコズチ体内で活性化されるだけでなく、新たな内生の JA と JA-Ile を誘導することが確認された。これは、植物個体内でシグナルの再誘導がかかっていることを示す有用な知見である。

誘導される揮発性化合物は生合成経路が互いに異なる多くの化合物から構成されている。また、化合物によっては放出されるタイミングが異なる化合物があることから、外生の d_2 JA-Ile によって誘導されるものと、その後生じる内生の JA-Ile によって誘導されるものという二つのグループに区別することができる可能性がある。

さらに、上位葉から放出される揮発性テルペンが de-novo 合成であることを確認するための実験を行った。図1の水溶液に重水(D_2O)を加えることで、誘導される新生テルペンが重水素を含む代謝物であることを見出した(図3)。この結果は、放出が誘導された揮発性化合物は、貯蔵されていたのではなく、MeJA の処理後に誘導されたことが明らかとなった。

この方法を利用すれば、新規に誘導される二次代謝物の de-novo 合成を網羅的に解析することができる。この手法は他の MeJA 誘導性二次代謝物の探索実験への応用が期待される。以上の実験結果から、MeJA は不活性体で植物体内を移行し、移動先で活性体に変換されて機能し得ることが実験的に確かめられた。また、そのとき誘導される応答反応は de-novo 合成であることも確認された。

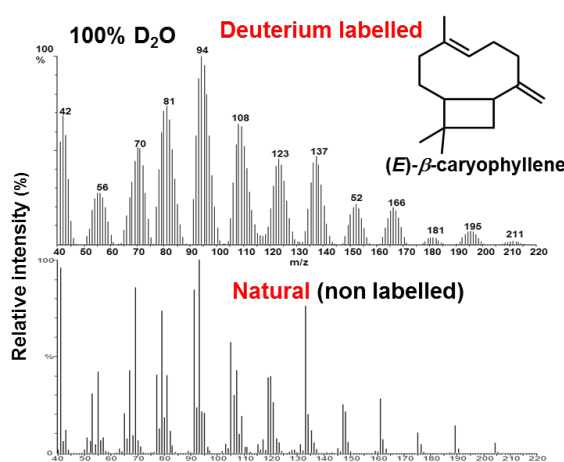


図3. 活性化された上位葉から放出された揮発性代謝物カリオフィレンのマススペクトル。(上) D_2O 処理によって重水素化された同位体を含むことから de-novo 合成であることが分かった。(下) 同位体を含まないマススペクトル。

一方、この重水によって標識されるテルペン化合物間で標識化される程度を比較したところ、カリオフィレンやファルネセンなどの普遍的なテルペンに比べ、4,8-ジメチル-1,3,7-ノナトリエン(DMNT)と呼ばれるホモテルペンの重水素標識化割合が低いことがわかった。この結果から、放出された DMNT の一部は、あらかじめ植物体内に貯蔵されていた前駆体のネロリドールから生合成されているのではないかと推測している。

以上の実験結果をまとめると、MeJA は植物個体間でのシグナル物質としての機能に加え、植物体内でもその機能を果たし得ることを分析化学的手法によって示すことができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Tamogami, S. et al., Methyl jasmonate is transported to distal leaves via vascular process metabolizing itself into JA-Ile and triggering VOCs emission as defensive metabolites. *Plant signaling & behavior*, 7(11),1378-1381,2012.<http://DOI:10.4161/p.sb.21762>

Tamogami, S. et al., Deuterium labeling for investigating de novo synthesis of terpene volatiles in *Achyranthes bidentata*, *Biotechnology Letters*, 35 (8), 1247-1252, 2013.<http://DOI10.1007/s10529-013-1201-y>

Tamogami, S. et al., Methyl jasmonate elicits the production of methyl (E)-2-hexenoate from (Z)-2-hexenol via (Z)-2-hexenal in *Achyranthes bidentata* plant. *FEBS Letters*,589(3),390-395,2015.<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.12.025>

〔学会発表〕(計6件)

田母神繁, 野下浩二, 阿部 誠、植物シグナル質メチジャスモン酸の移行・代謝・防御反応の誘導、日本農芸化学会東北支部 第147回大会、2012, 10. 6, 弘前。

田母神繁, 野下浩二, 阿部 誠, G・アグラワール, ランディーブ・ラクワール、植物シグナル質メチジャスモン酸の機能解析、日本農薬学会第38回大会2013, 3. 14~16, 筑波。

田母神繁, 野下浩二, 阿部誠、メチルジャスモン酸により放出されるヒナタイノコズチ C6 の揮発性有機化合物の同定、日本農芸化学会東北支部 第148回大会、2013, 10. 26 岩手。

田母神繁, 野下浩二, 阿部誠、メチルジャスモン酸により放出されるヒナタイノコズチ C6 化合物の構造と生合成、日本農薬学会第39回大会2014, 3. 13~15日, 京都。

清水 理未, 野下 浩二, 阿部 誠, 田母神繁、ヒナタイノコズチ葉による(E)-2-ヘキセナール揮発性代謝産物の同定、平成26年度日本農芸化学会北海道支部・東北支部 合同支部大会、2014, 9. 22、札幌。

田母神繁, 野下浩二, 阿部誠, G・アグラワール, ランディーブ・ラクワール、ヒナタイノコズチ葉における methyl (E)-2-hexenoate の生合成経路、日本農薬学会第40回大会、2015, 3.18~20, 町田(玉川大学)。

〔図書〕(計1件)

Cho, K., Han, O., Tamogami, S., Shibato, J., Kubo, A., Agrawal, G. and Rakwal, R. Quantification of Jasmonic and salicylic acids in rice seedling leaves, *Methods in Molecular Biology*, 956, 185-200, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者(単独)

田母神 繁(TAMOGAMI Shigeru)
秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 70315589