

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 2 8 年 6 月 2 2 日現在

機関番号：1 2 1 0 2

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012 ~ 2015

課題番号：2 4 6 5 8 1 0 6

研究課題名 (和文) 高等植物におけるファイトアレキシン産生のもう一つの意義

研究課題名 (英文) The cross-talk between phototropic response and phytoalexin production

研究代表者

山田 小須弥 (YAMADA, Kosumi)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：7 0 2 9 2 5 2 1

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要 (和文) : 近年の研究から光屈性はオーキシンの偏差分布だけでなく、特に初期応答では光照射側組織で生成した成長抑制物質の関与の可能性も示唆されてきた。興味深いことにその多くは各植物固有のファイトアレキシンであった。本研究では植物の生体防御機構の一つであるファイトアレキシン産生と光屈性反応が機能的にクロストークしている可能性を明らかにする目的で研究を行った。

光誘導性成長抑制物質 (以下、光屈性制御物質と呼ぶ) の細胞伸長抑制メカニズムの解明、光屈性反応とファイトアレキシン産生との関連性を中心に検討を行い、得られた結果は光屈性刺激の初期応答反応は生体防御応答反応と関連していることを強く支持するものとなった。

研究成果の概要 (英文) : Cholodny-Went theory is a major model describing the positive and negative curvatures in phototropism. The directional growth is caused by an asymmetrical distribution of auxin. In contrast, evidence showing that phototropism is caused by blue light-induced local accumulation of growth inhibitors has also been presented (Bruinsma-Hasegawa theory). To clarify the mechanism of growth inhibition in response to unilateral blue light, the isolation and identification of growth inhibitors has been intensively attempted in several plant species. Interestingly, most of the inhibitors have been known as phytoalexins. Therefore, we hypothesized the possible cross-talk between phototropism and plant defense mechanism. The physiological and biochemical studies have strongly suggested that the phototropic response may be one of the responses against the environmental stresses.

研究分野：植物生理化学

キーワード：光屈性 オーキシン 光屈性制御物質 ファイトアレキシン クロストーク

1. 研究開始当初の背景

(1) 光屈性は植物の運動の一種であり、一方向からの光(光屈性刺激)に対して茎を光の方向に屈曲させる現象である。これは植物全般が具備する環境応答反応として知られているが、その応答メカニズムについては不明な点が多い。光屈性を誘導するトリガーが従来の植物ホルモン・オーキシンの横移動にともなう影側組織の成長促進ではなく、光屈性刺激によって新たに生成するオーキシン活性抑制物質(光屈性制御物質)による光側組織の成長抑制であるという仮説が90年代前半に提唱され、数多くの光屈性制御物質の探索が様々な植物種において行われてきた。双子葉植物としてアブラナ科のダイコンおよびシロイヌナズナ芽生え、単子葉植物としてイネ科のトウモロコシ芽生えなどを実験材料として、光屈性刺激(青色光照射)により内生量が顕著に増加する物質を単離・構造決定したところ、興味深いことにその多くは各植物にメジャーなファイトアレキシン(生体防御物質)であった。

(2) ダイコン芽生えから単離された化合物はミロシナーゼ-グルコシノレート・システムと呼ばれる防御応答機構によって生成するイソチオシアネートの一種、4-MTBI およびその代謝物であるラファヌニンであった。これらの物質は光屈性刺激後すみやかに光側組織で増加すること、さらにこの増加に先立ってミロシナーゼの酵素活性および遺伝子の転写レベルの上昇も確認された。一方、トウモロコシ芽生えからはベンゾキサジノイド化合物の一種、DIMBOA およびその代謝物であるMBOAが単離された。これらの化合物も光屈性刺激後すみやかに光側組織で増加すること、さらにこの増加に先立ってDIMBOAの前駆物質である配糖体のDIMBOA-Glcを加水分解する酵素(DIMBOA-glucosidase)活性や転写レベルの上昇が観察された。これらの結果から、光

屈性反応の初期応答と生体防御反応には何らかの関連性があることが強く示唆されていた。

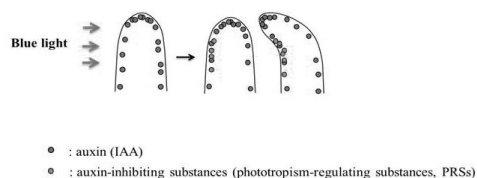


図0 光屈性制御物質によって制御される光屈性メカニズム(モデル)

2. 研究の目的

「ミロシナーゼ-グルコシノレート・システム」は含硫配糖体のグルコシノレートが加水分解酵素・ミロシナーゼによってファイトアレキシン(主な物質としてイソチオシアネートが挙げられる)を生成するアブラナ科植物で主に知られた生体防御機構である。一方、イネ科植物ではベンゾキサジノイド化合物(例えばDIMBOAおよびMBOAなど)を生成する生体防御機構が知られており、この反応には基質となるDIMBOA-Glcおよびその特異的加水分解酵素であるDIMBOA-glucosidaseが関与していることが知られている。本研究はミロシナーゼ-グルコシノレート・システムおよびベンゾキサジノイド化合物の生成機構が光屈性反応における光照射側組織の細胞伸長にどのように関与しているのか、さらに各反応系を介して生成した光屈性制御物質による成長抑制メカニズムと生体防御機構で特徴的に観察される生理現象についての類似性を生理化学的アプローチによって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 植物の培養

トウモロコシ芽生え

トウモロコシ種子(スノーデント118、雪印種苗)は流水中で24時間吸水(暗所)後、湿らせたバーミキュライト上に播種した(室温25℃)。その後24時間赤色光($0.3 \mu\text{mol m}^{-2}$)

s⁻¹)下で培養し、更に暗所で2日間培養した。実験の約24時間前に緑色安全光の下で湿らせたパーミキュライトの入った小型シートリングケースに植え替えを行い、最終的に5日齢の芽生え(幼葉鞘の長さが3.5~4.0 cm)を実験に供した。

ダイコン芽生え

ダイコン(桜島大根、渡辺種苗)種子は室温(暗所)で1時間程度吸水させた後、湿らせたパーミキュライト上に播種した(25)。その後暗所で4日間培養した。実験の約24時間前に緑色安全光の下で湿らせたパーミキュライトの入った小型シートリングケースに植え替えを行い、最終的に4日齢の芽生え(下胚軸の長さが約4.0 cm)を実験に供した。

(2) 光屈性刺激

光屈性実験用の光源として、青色LED光あるいは白色蛍光灯をスリット状の青色アクリル製フィルター(パラグラス、クラレ)で分光して得られた青色光(0.05 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)を用いた。光屈性刺激はスリットが芽生えの先端部とほぼ同じ高さになるように調節して与えた。屈曲角度はカメラで一定時間毎のインターバル撮影により記録し、撮影画像を基に測定した。

(3) 化合物の投与

一定量のラノリンを小型シャーレに量りとり、各濃度に有機溶媒で調製した化合物を加え温めながら混合させた。コントロールとして等量の溶媒だけを混合したラノリンペーストを用意した。緑色安全光下で爪楊枝を用い、ダイコン芽生えの場合はフック直下から2 cmの幅で、トウモロコシ芽生えの場合は幼葉鞘と中胚軸とのジャンクションのより上の2 cmに片側投与した。

(4) H₂O₂の局在部位の可視化

H₂O₂の局在部位の可視化については、過去に報告されているTissue print法を用いた(Schopfer et al., *Plant Physiol.*, 1994)。ニトロセルロース膜(Hybond-C Extra、アマシャム社)は10%デンプン水溶液(w/v)に終濃度が0.5 Mになるようヨウ化カリウムを加えて調製したKI-starch反応液に浸し、ドライヤーで乾燥させた。ヨウ化カリウムの酸化による影響を最小限に抑えるため、ニトロセルロース膜は2時間以内に使用した。これらの操作は緑色安全光下で行った。青色光照射または化合物を投与した芽生えの屈曲部位をそれぞれカミソリで切り出し、切断面を均等な圧力でニトロセルロース膜に約60秒間押しつけた。30分程度ニトロセルロース膜を暗所・室温に放置した後、実体顕微鏡で観察し、画像を記録した。

なお、H₂O₂量は組織を切り出し、バッファーによる抽出後、専用の定量キット(Amplite™ Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit、コスモバイオ)のマニュアルに従って測定を行った。

(5) リグニンの局在部位の可視化

リグニンの局在部位の確認は、フロログルシノール 塩酸による染色法(Pomar et al., *Protoplasma*, 2002)、あるいは蛍光顕微鏡による自家蛍光の直接観察により行った。染色液はフロログルシノールを99.5%エタノールおよび10.1 M 塩酸(25/75, v/v)を用いて終濃度1%フロログルシノール 塩酸液(w/v)になるよう調製した。青色光照射または化合物を投与した芽生えからカミソリを用いて屈曲部位の薄切片を作成し、直ちにフロログルシノール 塩酸染色液に浸し、10分間染色を行った。これらの操作は全て緑色安全光下にて行った。染色後、H₂Oを数滴たらしたスライドガラスに切片を載せ、光学顕微鏡で観察を行い、画像を記録した。

蛍光顕微鏡による観察はスライスした切

片を H₂O を数滴たらしたスライドガラスに載せ、リグニン由来の青色蛍光を観察した。

(6) トウモロコシ芽生えにおけるリグニン生合成関連遺伝子の発現解析

光屈性刺激あるいは各化合物を投与した芽生えより専用キットを用いて RNA 抽出を行った。その後、リグニン生合成系で重要な酵素である PAL、CAD、POX の各酵素をコードする遺伝子の特異的に増幅するプライマーをデザインし、常法に従って RT-PCR を行った。得られた PCR 産物はエチジウムブロマイドによって染色し、専用画像解析装置により、バンドの輝度を定量した。また、18SRNA をローディングコントロールとして用いた。

4. 研究成果

(1) 光屈性刺激にともなう過酸化水素 (H₂O₂) およびリグニンの蓄積

シロイヌナズナよりも植物サイズが大きく、同じアブラナ科のダイコン芽生えを材料にして、光屈性刺激によって誘導される光照射側の成長抑制の原因の一つとして考えられている細胞の一時的な硬直化 (cell-wall stiffness) について詳細な検討を行った。ダイコン芽生えの光屈性を誘導する最適な光エネルギー量 (青色光) を検討し、その光エネルギー条件下で経時的にダイコン芽生えの下胚軸をサンプリングし、過酸化水素 (H₂O₂) 量のカイネティクスを調べた。リグニンの蓄積は顕微鏡観察によって定性的に調べた。

ダイコン芽生えの屈曲角度の経時的变化と光照射側組織における H₂O₂ の蓄積量を比較・定量したところ、屈曲開始時期に先立ち、増加していることが確認された。続いて、光屈性刺激にともない H₂O₂ が光照射側組織で蓄積する様子を観察するため、まず H₂O₂ の蓄積について Tissue-printing 法を用いて検

討した。Tissue-printing 法では光屈性刺激を与えてから 30 分後には光側組織で H₂O₂ 由来のシグナルが観察された。H₂O₂ の蓄積はその後、60 分、90 分後まで観察されたが、120 分後には明瞭なシグナルが確認できなかった。

一方、リグニンの蓄積については胚軸の薄切片を調製し、フロログルシノール-塩酸により染色したプレパラートを顕微鏡下で観察した。リグニンの蓄積にともなうシグナルは光照射側組織の隣り合う細胞同士の接合部位で観察された。特に強いシグナルが皮層部位で確認された。また、自家蛍光の観察でも同様な結果が得られた。これらの結果は光屈性刺激によって cell-wall stiffness が誘導され、その結果光照射側組織の成長抑制が引き起こされるというメカニズムを強く支持するものとなった。

(2) 光屈性制御物質投与による応答 (ダイコン芽生え)

光屈性刺激にともない、光照射側組織において H₂O₂ およびリグニンの蓄積が確認されたことから、次にミロシナーゼ-グルコシノレート・システムによって生成するイソチオシアネートの一種、4-MTBI およびその代謝物であるラファヌサニンをダイコン芽生えの片側にラノリンにまぶして投与し、H₂O₂ およびリグニン蓄積のカイネティクスを調べた。なお、投与量は先行研究で用いられた濃度を基に決定した。その結果、片側投与開始から 30 分後には投与側組織で H₂O₂ 由来のシグナルが観察された。H₂O₂ の蓄積はその後、60 分、90 分後まで観察された。シグナルは光屈性刺激と比較してより強く観察された。一方、リグニンの蓄積についても光屈性刺激の場合と同様の方法で調べたところ、投与側組織でシグナルが観察された。これらの結果は光屈性刺激に応答して光照射側組織で生成した 4-MTBI およびその代謝物であるラフ

アヌサニンが H_2O_2 およびリグニンの蓄積を誘導している可能性を強く示唆している。

(3) 光屈性制御物質投与による応答(トウモロコシ芽生え)

先行研究より、光屈性刺激に応答してトウモロコシ芽生えの光照射側組織における H_2O_2 およびリグニンの内生量が増加することが機器分析により明らかとなっていた。前述のダイコン芽生えの実験で用いた手法により、トウモロコシ芽生えにおける光屈性刺激、ならびにベンゾキサゾリノンの一種・DIMBOA を片側投与した際の幼葉鞘における H_2O_2 およびリグニン蓄積の可視化実験を行った。その結果、ダイコン下胚軸で観察された場合と同様に、光屈性刺激にともない光照射側組織で一過的な H_2O_2 由来のシグナルが観察された(図1参照)。

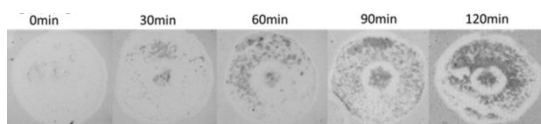


図1 屈性刺激にともなう H_2O_2 の蓄積

また、リグニンの蓄積についても光屈性刺激によって光照射側組織でシグナルが観察された。さらに、リグニン由来のシグナルは DIMBOA 処理を行った場合においても投与側組織で観察された。以上の結果より、光屈性刺激に応答してトウモロコシ芽生えの光照射側組織で生成したベンゾキサジノイド化合物が H_2O_2 およびリグニンの蓄積にともなう cell-wall stiffness を誘導することが示唆された(図2参照)。

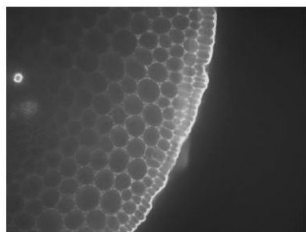


図2 光屈性刺激によるリグニンの蓄積(トウモロコシ:自家蛍光)

(4) リグニン生合成関連遺伝子の発現解析

光屈性刺激あるいは各化合物を投与したトウモロコシ芽生えにおいて、生体防御反応との密接な関係が知られているリグニン関連遺伝子の発現を半定量的 RT-PCR によって調べた。本研究ではリグニン生合成系で特に重要な酵素である PAL、CAD、POX の各酵素をコードする遺伝子に着目した。予想通り、光屈性刺激ならびに化合物を投与した場合の両方で PAL、CAD、POX のいくつかの遺伝子の転写レベルでの上昇が光屈性の初期応答時に確認された。

以上の結果から光屈性刺激が本来のファイトアレキシン生成、すなわち生体防御応答とクロストークしている可能性が強く示唆された。

(5) まとめおよび今後の展望

本研究で得られた知見は、ミロシナーゼ-グルコシノレート・システムに代表されるファイトアレキシン産生をともなう生体防御反応が光屈性反応、特にその初期応答において重要な役割を担っていることを示唆するものであり、光屈性メカニズムを理解する上で非常に興味深い。本研究プロジェクトと並行して双子葉植物のシロイヌナズナを用いた光屈性刺激に応答して内生量の変化する化合物をメタボローム解析により探索中であり、本仮説を分子レベルからも証明する非常に有用な情報が得られるものと期待される。本研究で得られた成果は将来、農作物の増産、農作物への高付加価値の付与、環境低付加型農業の開発などに貢献することが期待される。

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7件)

Takase, R., Hasegawa, T., Yamada, K.,

Hasegawa, K. and Shigemori, H. Sesinoid, a new iridoid glucoside from sesame (*Sesamum indicum*) seedlings. NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS, **9**, 1539-1540, 2014. (有)

Moehninsi, Miura, K., Yamada, K. and Shigemori, H. Raphanusanin-mediated resistance to pathogens is light dependent in radish and *Arabidopsis thaliana*. PLANTA, **240**, 513-524, 2014. (有)

Arai, T., Toda, Y., Kato, K., Miyamoto, K., Hasegawa, T., Yamada, K., Ueda, J., Hasegawa, K., Inoue, T. and Shigemori, H. Artabolide, a novel polar auxin transport inhibitor isolated from *Artemisia absinthium*. TETRAHEDRON, **69**, 7001-7005, 2013. (有)

〔学会発表〕(計 14 件)

繁森英幸、須藤恵美、牧野譲、長谷川剛、山田小須弥、長谷川宏司 トウモロコシ芽生えの重力屈性に関わる生理活性物質の機能解明、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27-30 日、札幌コンベンションセンター、北海道・札幌市
萩原美里、高瀬涼、山田小須弥、繁森英幸、ゴマ(*Sesamum indicum*)芽生えの光屈性メカニズムの解明 新規素材探索研究会第 14 回セミナー、2015 年 6 月 5 日、新横浜フジビューホテル、神奈川県・横浜市

Yamada, K., Nudtanicha C., Jabeen, R., Hasegawa, T., Hasegawa, K. and Shigemori, H. New insights on mechanism of blue-light induced growth suppression in maize shoot. Auxin 2012, December 9-14, 2012 ,

Hawaii, USA

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 小須弥 (YAMADA, Kosumi)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：70292521