

「生体防御のメカニズム」

平成7年度採択研究代表者

岩村 俣

(京都大学農学研究科 教授)

## 「植物の感染防御機構の生物有機化学的解明」

### 1. 研究実施の概要

- (1) コムギおよびトウモロコシの従属栄養期における benzoxazinone 類合成酵素の発現動態、特性等を明らかにするとともにゲノム解析を試みた。
- (2) エンバクのアレキシン avenanthramide 類の生合成過程をエリシターによる酵素活性の誘導を指標に解析した。
- (3) バナナおよびイチゴ未熟果実のアレキシン生合成経路を調べた。
- (4) イネのアレキシンの誘導機構の解析および合成酵素のクローニングを行った。
- (5) 生物検定を指標に、野生植物の構成的および誘導的抗菌物質の構造解析ならびに生成様式を追究した。
- (6) 植物着生菌や根圏微生物による宿主植物の防御、植物内生菌の宿主の病原抵抗性向上の機構を検討した。

### 2. 研究実施内容

- (1) コムギおよびトウモロコシの従属栄養期における特異的防御機構
  - ① 幼時期特異的 benzoxazinone glucosidase をコムギ glucosidase としては初めて明らかにし、その N 末端アミノ酸配列が報告されている植物タンパク質とは全く異なることを知った。また、特異的 glucosyltransferase と N-hydroxylases の存在も明らかにし、部分精製によりその性状解析を行った。
  - ② コムギにおいて benzoxazinone 類の発現には B ゲノムが関与、D ゲノムがその発現抑制に働いていることが明らかにされた。
  - ③ 精製単離によりトウモロコシ独立栄養期においても特異的 glucosidase が外敵に備えて存在していることが示された。Glucosyltransferase (2 種) については内部配列の一部の解析を終えた。
  - ④ オオムギの防御物質 hordatins が染色体操作コムギで発現していることを見いだした。

## (2) エンバクのファイトアレキシン avenanthramide 類の発現機構

エンバクのファイトアレキシン avenanthramide 類の生合成の最終段階、アントラニル酸類とヒドロキシ桂皮酸類の CoA エステルの縮合を触媒する酵素の精製を試みた。その結果、エリシター誘導されるこの酵素には基質特異性が異なった少なくとも 2 種のアイソザイムがあることが見いだされた。また、フェニルアラニンからヒドロキシ桂皮酸 CoA エステルに至る生合成酵素もエリシターによって誘導されることが明らかになった。このことから、avenanthramide 類の生合成酵素活性は協調的に制御されていることが示唆された。

## (3) 未熟果実のファイトアレキシンと動的感染防御機構

バナナ未熟果実のファイトアレキシン 2-(4'-hydroxyphenyl)naphthalic anhydride の生合成に、前駆体 hydroxyanigorufone に選択的な脱炭酸酵素が関与していることが示唆された。Phenylalanine ammonialyase が傷害処理で誘導されたことから、本酵素が前駆体であるフェニルプロパノイドを供給していることが判った。イチゴ未熟果実のトリテルペン型ファイトアレキシンは、構成的配糖体が加水分解されて生じるのではなく、de novo 合成によって作られることが示唆された。

## (4) イネのファイトアレキシンの動的発現機構

主要なファイトアレキシンであるサクラネチンとモミラクトン A, およびエリシター活性を示すジャスモン酸の LC/MS/MS による高感度検出法を確立した。従来イネファイトアレキシンの誘導はジャスモン酸を介して起こるとされていたが、メチオニンがジャスモン酸の増加なしにファイトアレキシンを誘導することを見出した。サクラネチンの生合成最終段階の酵素 ナリングニン 7-O-メチルトランスフェラーゼ 遺伝子のクローニングを行い、全塩基配列を決定した。

## (5) 野生植物の化学的防御機構

- ① 野生植物の防御物質探索の過程で、ウコギ科三七人参よりサポニン 14 種、マメ科タデハギよりフロログルシノールのアシル化配糖体 2 種を得た。
- ② 傷害を受けたルーピンで、イソフラボンが重合して防御機能を発現する可能性を追究した。2'-hydroxygenistein を基質に、ペルオキシダーゼで新生した 2 種の二量体の構造解析を行った。抗菌活性は基質の 100-1000 倍と見積られた。
- ③ キワタ科パキラの感染組織から分離した *Pseudomonas* sp. が、抗菌物質を含まない心髄部で isohemigossypolone 型抗菌物質を誘導生成することを実証した。
- ④ ナス用の耐病性台木エチオピアナスの根分泌物の主成分は栽培品種と同じくソラベチボン、ルビミンであった。土壌病原菌 *Fusarium oxysporum* は生育

を阻害されたが、*Verticillium dahliae*は促進され、興味ある現象を示した。

(6) 化学物質を介した栽培植物および近縁野生植物と微生物の相互作用

- ① 宿主と着生非病原性細菌の相互作用解析のため、クロロゲン酸を多く含む植物に広く着生する*Klebsiella oxytoca*のケイ皮酸脱炭酸酵素の性質と誘導機構を解明した。
- ② テンサイ苗立枯病拮抗細菌がテンサイ根圏で生産している大環状ラクタム系抗生物質の単離、構造解析に成功した。
- ③ アブラナ科植物の根圏に優占的な*Rhizopus*と*Fusarium*の、アブラナ科植物の防御物質であるカラシ油に対する感受性を詳細に検討した。
- ④ エンドファイトの検出法を開発した。エンドファイト感染個体の病原抵抗性昂進に関与する成分を探索するため、非感染個体成分と比較検討を進めている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Ebisui, K., Ishihara, A., Hirai, N. and Iwamura, H., Occurrence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) and a  $\beta$ -glucosidase specific for its glucoside in maize seedlings. *Z. Naturforsch.*, 53c (9/10), 793-798 (1998).
- Oikawa, A., Ebisui, K., Sue, M., Ishihara, A. and Iwamura, H., Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase specific for 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) glucoside in maize. *Z. Naturforsch.*, 54c (3/4), 181-185 (1999).
- Ishihara, A., Miyagawa, H., Matsukawa, T., Ueno, T., Mayama, S. and Iwamura, H., Induction of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyl transferase activity by oligo-N-acetylchitoooligosaccharides in oats. *Phytochemistry*, 47 (6), 969-974 (1998).
- Ishihara, A., Ohtsu, Y. and Iwamura, H., Biosynthesis of oat avenanthramide phytoalexins. *Phytochemistry*, 50, 237-242 (1998).
- Ishihara, A., Ohtsu, Y. and Iwamura, H., Induction of biosynthetic enzymes for avenanthramides in elicitor-treated oat leaves. *Planta*, 208, 512-518 (1999).
- Tanabe, J., Sue, M., Ishihara, A., Iwamura, H., Occurrence and characterization of 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one and indole hydroxylase in juvenile wheat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 1614-1617 (1999).
- Nomura, T., Sue, M., Horikoshi, R., Tebayashi, S., Ishihara, A., Iwamura,

