

現在、このタンパク質複合体の解析を進めている。分離がブロードであること、酵素活性に対応する明確なタンパク質バンドを見いだせていないことから、電気泳動法の最適化、分析試料の改良（マイクロソームではなく酵素が局在するゴルジ体を多く含む画分から分析試料を調製する）などを行う。比較的シャープな分離が得られれば、SDS-PAGEにより各構成タンパク質を同定することで、複合体の構成因子を見いだす。この道管分化誘導BY-2細胞のEST解析が進められているため、構成因子の同定が行い

やすい。本研究が達成されれば、キシラン含量がより多い、あるいはより少ない植物体を作成するデザインが可能となり、バイオ燃料としてより適した植物体を選抜できる基盤技術が整う。

なお、本研究は奈良先端科学技術大学院大学の出村拓教授との共同研究で遂行したものである。最後に、本研究を遂行するにあたり、ご援助してくださいました財団法人農芸化学研究奨励会に感謝申し上げます。

## フォスファチジン酸を利用した植物の耐病性向上に関する研究

高知大学教育研究部総合科学系 木場章範

植物-病原体相互作用は過敏反応に代表される植物免疫の誘導機構に焦点が当てられ、世界中で精力的に解析が進められている。特に病原体の感染の認識に関わるレセプターの同定と認識の分子機構、細胞内情報伝達にかかわるタンパク質分子に関しては世界的に注目され、精力的に研究がすすめられている。一方、①植物の病害感受性・受容化機構に関しては未知な部分が多い。申請者は植物の免疫応答発動システムのみならず、植物の罹病性・病害感受性機構の解析を進めてきた。その過程でリン脂質、特にフォスファチジン酸 (PA) 含量の変化が植物免疫応答の調節に関与することを見出した。

これまで、①PAを脱リン酸化しジアシルグリセロールに変換するPAフォスファターゼ (PAP) 遺伝子をノックダウンした植物では、PAの蓄積に伴い耐病性が向上すること。②PAPノックダウンした植物では、PAの蓄積量が増加しているが通常の植物と変わりなく成長し、免疫応答の活性化も起こっていない。しかし病原体の感染を受けると、通常の植物と比較して過剰なPAの蓄積に伴う急激・強力な免疫応答が誘導されるプライミング（病原体に対する反応性を高めるられる状態）が生じる。ことを明らかにしている。

そこで、本研究は植物細胞内でのPA蓄積量の人為的

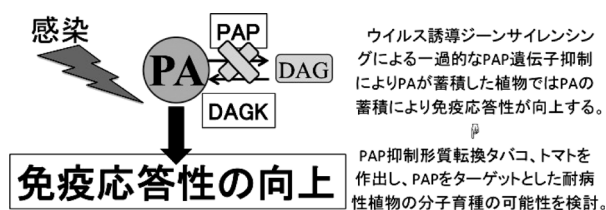
昇による植物の耐病性を向上について検討するために、①PAP抑制形質転換タバコ植物の作出、PAP遺伝子欠損シロイヌナズナ系統の収集と種々の病原体への免疫反応の検討。②プライミング効果を誘導するために必要な感染刺激についての詳細な解析を行う。③PAP抑制植物内で蓄積しているPAの分子種を解析し、プライミング効果を持つPA分子を特定する。ことを目的とした。

### 1. PAの人為的処理による病害防除効果

PAP遺伝子抑制タバコ植物では耐病性の向上が認められるが、PAの蓄積が直接的原因となっているかを確認するために、PAを人為的処理することによる耐病性付与が可能か否かを検討した。PAを処理したタバコ植物では青枯病の発病が著しく抑制されたが、対照として用いたフォスファチジルコリンやジアシルグリセロールの処理では耐病性の付与は認められなかった。さらに、防御関連遺伝子の発現解析の結果からPA処理によって直接的な免疫応答の誘導は生じないことも確認できた。すなわち、PAの人為的処理によってもプライミング状態を引き起こすことができることが明らかとなった。

### 2. PAP遺伝子抑制形質転換植物の作出

カリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーターの下流にヘアピン構造のRNAを発現するようにPAP遺伝子断片を挿入したコンストラクト (RNAiコンストラクト) を、アグロバクテリウムを介して形質転換 *Nicotiana tabacum* (普通タバコ) に導入し、12系統の形質転換体を得た。現在、効率よくPAP遺伝子が抑制された系統の選抜を行っている。また、トマト (品種マイクロトム、マネーメーカー) の形質転換植物を作製・選抜を進めている。今後、PAP遺伝子タバコ植物および対照植物にナス科青枯病菌、タバコ野火病菌、ジャガイモ疫病菌、トマトモザイクウイルス等の病原体を接種し、病原体の増殖、発病程度、防御関連遺伝子の発現を解析する。また、PAP



図

抑制トマトが選抜でき次第、実用作物への適用の可能性を検討する。

### 3. PAP 様遺伝子欠損シロイヌナズナを用いた解析

シロイヌナズナには多数のリン脂質脱リン酸化酵素遺伝子が存在する。そのうち、PAP として機能することが明らかにされている遺伝子の欠損変異体 (*LPPγ*, *LPPε1*, *LPPε2*, *LPPε1ε2*, *pah1*, *pah2*, *pah1pah2*) について、種子の収集が終了した。現在、青枯病細菌およびトマト斑葉病細菌を用いて、耐病性検討を行っている。

### 4. PAP 遺伝子抑制植物におけるプライミングの分子機構の解析

PAP 遺伝子抑制タバコ植物、対照植物に種々の感染刺激を与えた場合の免疫応答の変化を、活性酸素の生産、PR 遺伝子の発現を指標に調べた。キチン等の PAMPs と呼ばれる細胞死を引き起こさない感染刺激を与えた場合、活性酸素の生産、PR 遺伝子発現の上昇は認められなかった。一方、過敏細胞死を誘導する非親和性細菌の感染やエリシチンタンパク質の処理では劇的な活性酸素の生産、PR 遺伝子発現上昇が認められた。

### 5. PAP 遺伝子抑制形質転換植物に蓄積する PA 分子の解析

PAP 遺伝子抑制タバコ植物、対照植物から全脂質画分を抽出し、LC-MS を用いた脂質分析を行った。全 PA 量は 2 倍程度の蓄積が認められるものの、病原体を感染させない状況では、個々の PA 分子や個々のリン脂質含量に劇的な変化が認められないことが明らかとなった。今後は、上記 4 の実験で免疫誘導効果が見られた感染刺激を中心に、種々の免疫付与処理を行った植物を用いた脂質分析を行う予定である。

### まとめと今後の展望

本研究の成果から、PA 蓄積を介した免疫応答のプライミングに対して、強い防御を誘導するためには細胞死を伴うような強い刺激が必要である。すなわち、雑菌や日和見感染性菌との接触では免疫が誘導されないことを示しており、病害防除の実践には極めて有効な手段を与えるものと考えられる。今後は、①プライミングに関わる PA 分子の同定、②実用作物への応用の可能性、③ナス科以外の植物への展開を通して、PA を介したプライミングを利用した耐病性植物の作出や新規の防除剤への応用を検討していく必要がある。

## 複合型テルペンの環化酵素を利用した非天然型化合物の創製

新潟大学大学院自然科学研究科 仲野千秋

テルペン（イソプレノイド）は、炭素数 5 個のイソプレン単位に由来する化合物の総称であり、現在までに 5 万種類以上が報告されている。テルペンには、抗菌活性や抗腫瘍活性などの生理活性を持つものが数多く知られている。テルペンの生合成で中心的役割を果たす酵素は、直鎖状テルペンの環化反応を担うテルペン環化酵素であり、多様な環状骨格の構築を担う。今後、テルペン等の新規化合物を取得し、さらなる構造多様性の拡大を図るには、酵素の触媒機構の改変や基質アナログの活用などによる非天然型化合物の創製が必要となる。

非天然型化合物の創製に向けて、本研究では放線菌 *Actinoplanes* sp. A40644 から単離された抗腫瘍活性、抗 HIV 活性物質 BE-40644 (**1**)<sup>1)</sup> の生合成系に着目した (図 1)。1 のような、テルペンにキノンやポリケタイドなどの非テルペン骨格が融合した複合型テルペンには、抗腫瘍活性、抗菌活性、コレステロール低下作用等の有益な生理活性を示

すものが存在することから、医薬品の有望なターゲットとなっている。1 の生合成は、各 ORF のホモロジー検索から推定された。まず 7 炭糖の *sedo*-heptulose-7-phosphate が環化、脱水、酸化したキノン (2) にファルネシル基 (C<sub>15</sub>) が付加することで 3 が生じる。その後、テルペン環化酵素が 3 の末端二重結合のプロトン付加により環化反応を開始することで 1 を生合成すると考えられている (図 1A)。図 1B の生合成遺伝子クラスターを過剰発現させた放線菌にて 1 の生産が確認されているが<sup>2)</sup>、生合成の最終段階となるテルペン環化酵素は未だ同定されていない。

そこで本研究は、まず、1 の生合成を担う新規テルペン

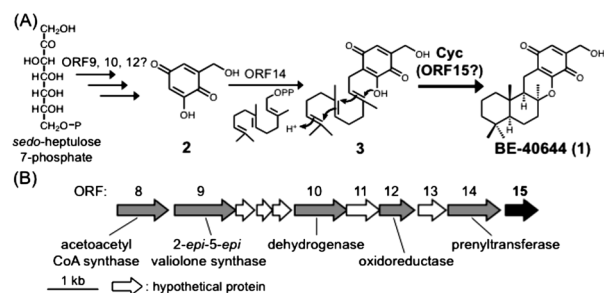


図 1 BE-40644 の生合成経路 (A) および生合成遺伝子クラスター (B)。