

生体防御と過酸化脂質¹⁾

山 本 弘 幸

(香川大学農学部)

Active Defense Reactions and Lipid Peroxidation in Plants. by Hiroyuki YAMAMOTO

(Faculty of Agriculture Kagawa University, Miki-cho, Kagawa 761-07)

は じ め に

病害抵抗性に関わる内容について谷(1983)は「植物病害における抗菌抵抗性」を、また浅田(1988)は「生体防御システム」をそれぞれ報告している。本稿は抗菌抵抗性の範疇に入るものであるが、谷(1983)の報告の後、とくに注目されてきた第5番目のグループともいえる物質群を中心にして述べる。すなわち、従来は生体に害作用を示す代謝分解産物であると理解されていた過酸化脂質が、抗菌性物質として重要な役割を担う物質であると考えられはじめた背景と、それに関する著者らの最近の結果を加えて紹介したい。また、過酸化脂質の代謝産物が最近情報伝達の物質として脚光されはじめているので、このことについても多少触れてみたい。

1. 抗菌性物質

過酸化脂質に抗菌性のあることがはじめて報告されたのはイネふくゆきの健全葉から抽出された5種類のエポキシ不飽和脂肪酸である(KATO *et al.*, 1983)。その後複数のイネ品種のいもち病感染葉からヒドロキシおよびポリヒドロキシ不飽和脂肪酸が検出され、そのうち10種類が抗菌性物質として確認された(KATO *et al.*, 1984)。これらの物質はいずれも炭素数が18で、リノール酸あるいはリノレン酸の誘導体である。そのなかでヒドロキシ(アリルアルコール)は α -リノレン酸にリボキシゲナーゼ(LOX)が作用し、ヒドロペルオキシドとなり、さらに代謝されて抗菌性物質になったと推定されている。

LOXは不飽和脂肪酸にO₂を添加する酵素であるが、植物の生体膜は主にリノール酸およびリノレン酸が含まれており、これらが基質になると考えられる。LOXは炭素数18の不飽和脂肪酸には9または13位にO₂を添加して9-, 13-ヒドロペルオキシドとするが、その比率は反応時のpHやアイソザイムの種類によって異なる(SIEDOW, 1991)。なお、LOXは不飽和脂肪酸の1, 4-ペンタジエンだけを認識して単にO₂を1個添加するだけではなく、多くの機能を有する酵素であることも最近の研究によって明らかにされており(GARDNER, 1991)、今後ますます詳細な検討が要求される。

ジャガイモやダイズのLOXは昔からその性質が詳しく調べられているが、この酵素を植物病理学的観点から研究され始めたのはごく最近からである。OCAMPO *et al.*, (1986)はコムギに不親和性の黒さび菌あるいは非病原菌のエンバク冠さび菌を接種すると気孔侵入以後LOXの活性が増高すると報じた。著者ら(YAMAMOTO and TANI, 1986; TANAKA *et al.*, 1992)もエンバク-冠さび菌の系で同様の傾向を確認している。すなわち、エンバクの勝冠1号に不親和性の冠さび菌レース226を接種すると、気孔侵入以降にLOXの活性が増高する。活性の増高には*de novo*合成されたアイソザイムと、感染にともなって活性化されたアイソザイムの両方が関与している。不親和性菌接種後のLOXの活性増

1) 本研究の一部は文部省科学研究費補助金によった。

高は勝冠 1 号だけでなく、レース 226 に抵抗性を示す *Pc* 系の品種でも普遍的にみられる現象である。

イネいもち病についても LOX 活性の増高が抵抗性の組合せで認められ、抵抗性と関連性が高いと考えられている。とくに最近では抵抗性発現に関与する LOX の遺伝子が単離され、構造解析も進んでいる (柴田, 1992)。このようにいもち病では抗菌性物質の単離・同定と平行して関連酵素系の研究も着実に進んでおり、化学的防御反応の場における過酸化脂質の重要性が明らかとなっている (KATO *et al.*, 1983, 1984; NAMAI *et al.*, 1990; OHTA *et al.*, 1990, 1991; 柴田, 1992; SHIMURA *et al.*, 1983)。

ただし、過酸化脂質が病徴発現物質としての機能を有したり (NAMAI *et al.*, 1991)、ファイトアレキシンのエリシターとしての役割を担うとする報告もある (LI *et al.*, 1991)。

このほかにもトマトに非病原性の *Pseudomonas* 菌を接種すると、特異的に LOX の活性が増高して抵抗性発現に関与するとされている (KOCH, 1991)。また、ジャガイモ塊茎切片にエリシターのアラキドン酸を処理すると、LOX の活性が処理後 1 時間より増高し始めるとともに、ファイトアレキシンのリシンチンの蓄積に先だってヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 (HPETE) あるいはヒドロキシエイコサテトラエン酸 (HETE) が蓄積されてくる (YAMAMOTO *et al.*, 1991)。これらの物質は低濃度で疫病菌の遊走子の発芽を強く阻害する (BOSTOCK *et al.*, 1988)。

次に著者らのエンパクと冠さび菌の系について述べる。エンパクの抵抗性発現にはファイトアレキシンのアベナルミンが関与すると報告されている (TANI and MAYAMA, 1982; MAYAMA, 1983)。この物質はフェニルプロパノイド系の化合物であり、LOX の代謝系とは異なっている。先に述べたとおり、LOX の活性変化が抵抗性と相関することから、冠さび菌感染エンパク葉の脂質系抗菌性物質の検索を行った (TANAKA *et al.*, 1992)。その結果、エーテルで抽出した中性画分および酸性画分がそれぞれ冠さび菌夏胞子の発芽を阻害した。HPLC によって両画分から物質の単離を試みたところ、中性画分から 1 種 (A)、酸性画分から 2 種 (B および C) の抗菌性物質が得られた。各物質を TLC で展開し、純度および抗菌スポットの位置を調べると、物質 A、B および C の Rf 値はそれぞれ 0.50, 0.31, 0.37 となり、いずれも単一のスポットとして確認された (第 1 表)。さらに試薬類による定性反応を行った結果、A はローダミン 6 G および水に対して陽性を示し、B および C はアニスアルデヒドおよびバニリンで陽性となり、いずれも単一スポットであった。A、B および C の冠さび菌夏胞子の発芽に対する ED₅₀ 値は 7 ~ 21 $\mu\text{g}/\text{ろ紙片}$ (20 mm^2) であり、抗菌活性はきわめて強いことがわかった (第 2 表)。A、B および C は親和性レースの接種

葉からは極微量しか検出されなかった。また、*Pc* 系品種に不親和性レースあるいは親和性レースを接種すると、3 物質の生成は勝冠 1 号の場合と同一の傾向を示した。

さらに、核酸あるいはタンパク合成阻害剤を与え抵抗反応を阻害したり、逆に高温処理を行って抵抗反応を誘導させると、生成量は処理区ごとに 3 物質で多少の変化はみられるものの常に抵抗反応を発現する組合せの場合にのみ多量に生成された。

以上のようにエンパク冠さび病においても脂質系の抗菌性物質が

第 1 表 抗菌性物質 A、B および C の特性

(TANAKA *et al.*, 1992)

	物 質		
	A	B	C
HPLC 溶出時間 (分) (1)	13.6	—	—
(2)	—	10.0	15.0
TLC (Rf 値)	0.50	0.31	0.37
UV 吸収波長 (nm)	205, 230	220, 320	210, 345
	285, 325	340	
性状	黄 色	淡黄色	淡黄色
	油 状	針状結晶	針状結晶
含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 生重※)	4.5	50.0	20.0

(1) Asahipak-ODP50 カラム (2) Finepak SIL C₁₈T-5 カラム

※不親和性レース 226 接種 48 時間後の勝冠 1 号初生葉

第2表 抗菌性物質A, BおよびCの抗菌活性※
(TANAKA *et al.*, 1992)

物 質	ED ₅₀ (μg / ろ紙片)	
	発芽率	発芽管の伸長
A	6.6	8.0
B	15.6	20.6
C	6.5	12.5

※物質A, BおよびCを添加したろ紙片(20mm²)に冠さび菌の夏孢子を塗布し, 0.8%アガロースブロック上にのせて20℃, 6時間放置した。

老化促進などの作用が報告されるようになった(上田, 1991)。最近では塊基形成誘導および遺伝子の活性化に基づくタンパク質の誘導などの機能があることもわかってきた(RYAN, 1990, 吉原, 1990)。とくに1990年代になってからは情報伝達の役割を担う物質として注目されるようになった(FARMER and RYAN, 1990, 1992; GUNDLACH, 1992, STASWICK, 1992)。JAはリノレン酸がLOX, ヒドロペルオキシドヒドロラーゼ, アレンオキシドシクララーゼ, 12-オキソ-フィトジェノン酸リダクターゼなどの酵素の作用を受けながら代謝され, 最終的には3回のβ酸化の後生成されるシクロペンタノイド脂肪酸の代表的な物質である。JAは植物ホルモンのアブジン酸と構造(ケト酸), 分子量, 溶解性および生理作用などが類似している。シクロペンタノイド脂肪酸は5員環を有するが, クルビン酸以外の物質はケトン基があり, 構造的にプロスタグランジンと類似している。

シクロペンタノイド脂肪酸による情報伝達作用は極めて低濃度でもみられ, 数nM~数十μMの範囲にある。一方, 成長抑制などの作用は数百μM~数十mMの範囲にあり, 比較的高濃度で効果を示す場合が多い。

植物の防御システムの一つにプロティナーゼインヒビター(PI)の生成がある(RYAN, 1990)。PIの誘導とJAの関連についてすぐれた研究がRYAN一派によって行われている。同氏らの最近の報告によると(FARMER and RYAN, 1990, 1992), トマト, タバコおよびアルファルファのPIは, 植物が傷害または刺激によって生体膜よりリノレン酸が遊離された後, LOXなどの作用を受けてMe-JAができ, PI遺伝子を活性化して誘導されると推定されている(第1図)。ただし, 最終産物のJAでなくてもその前駆物質もPIの誘導に有効な場合もあるようである。

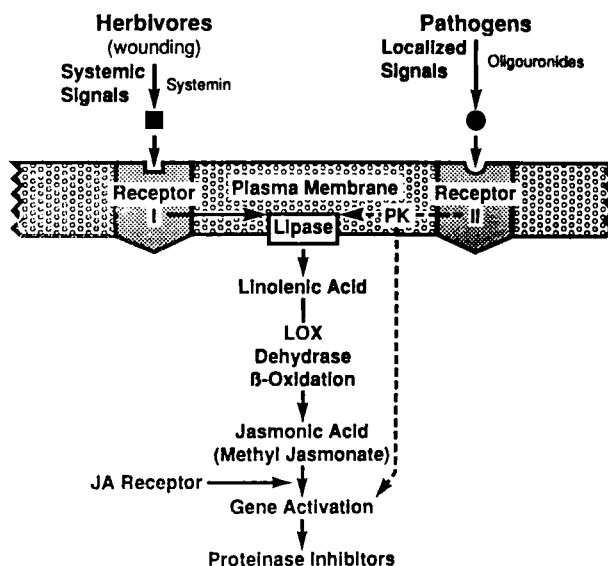
JA類による遺伝子の活性化は多数の植物で認められており, 低濃度で十分生理活性を示す物質として注目されている(上田, 1991)。

抵抗性発現に関与すると推定される(TANAKA *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1991)。

2. 情報伝達作用

動物組織ではアラキドン酸がシクロオキシゲナーゼやLOXの作用を受けると, その後次々と代謝されてプロスタグランジン, ロイコトリエン, リボキシンなどになる。これらの物質は極微量で極めて多様な生理作用を有している。

植物において過酸化脂質の代謝産物が多様な生理作用を示す物質の一つにジャスモン酸(JA)がある。JAは香料として1960年代より利用されてきたが, 1980年代に入り, 植物成長抑制, 植物



第1図 情報伝達のモデル

(FARMER and RYAN, 1992の提案を引用)

お わ り に

以上過酸化脂質に関する最近の状況を簡単に紹介したが、この分野の研究は緒についたばかりであり、今後多方面からの検討が必要である。

最後に関連の文献を列記するので参照されたい (ANDERSON, 1989; GARDNER, 1991; RYAN, 1990; 柴田, 1992; SIEDOW, 1991; STASWICK, 1992; 上田, 1991; 山本・谷, 1991; 吉原, 1990)。

引 用 文 献

- ANDERSON, J. M. (1989): Membrane-derived fatty acids as precursors to second messengers. (In: BOSS, W. F. and MORRE, D. J., eds.), Second Messengers in Plant Growth and Development. Alan R. Liss, Inc., New York, 181 ~ 212.
- 浅田泰次 (1988): 生体防御システムー植物の病気はなぜ自然治癒するのであろうか?ー. 四国植防, 23: 1 ~ 4.
- BOSTOCK, R. M., B. A. STERMER and K. E. BRETSCHNEIDER, (1988): Eicosapolyenoic acid regulation of the hypersensitive response in potato. 5th International Congress of Plant Pathology, 230.
- FARMER, E. E. and C. A. RYAN (1990): Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 7713 ~ 7716.
- FARMER, E. E. and C. A. RYAN (1992): Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. Plant Cell, 4: 129 ~ 134.
- GARDNER, H. W. (1991): Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. Biochim. Biophys. Acta, 1084: 221 ~ 239.
- GUNDLACH, H., M. J. MÜLLER, T. M. KUTCHAN and M. H. ZENK (1992): Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2389 ~ 2393.
- KATO, T., Y. YAMAGUCHI, T. UYEHARA, T. YOKOYAMA, T. NAMAI and S. YAMANAKA (1983): Self defensive substances in rice plant against rice blast disease. Tetrahedron Lett., 24: 4715 ~ 4718.
- KATO, T., Y. YAMAGUCHI, T. HIRANO, T. YOKOYAMA, T. UYEHARA, T. NAMAI, S. YAMANAKA and N. HARADA (1984): Unsaturated hydroxy fatty acids, the self defensive substances in rice plant against rice blast disease. Chem. Lett., 1984: 409 ~ 412.
- KOCH, E., B. M. MEIER, H. -G. EIBEN and A. SLUSARENKO (1991): A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic *Pseudomonads*. Plant Physiol., 99: 571 ~ 576.
- LI, W. X., O. KODAMA and T. AKATSUKA (1991): Role of oxygenated fatty acids in rice phytoalexin production. Agric. Biol. Chem., 55: 1041 ~ 1047.
- MAYAMA, S. (1983): The role of avenalumin in the resistance of oats to crown rust. Mem. Fac. Agr. Kagawa Univ., 42: 1 ~ 64.
- NAMAI, T., T. KATO, Y. YAMAGUCHI and J. TOGASHI (1990): Time-course alteration of lipoxygenase activity in blast-infected rice leaves. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 56: 26 ~ 32.

- NAMAI, T., T. KATO, Y. YAMAGUCHI and J. TOGASHI (1991) : Cytotoxicity and anti-blast activity of hydroperoxide of linolenic acid produced by *in vitro* enzyme reaction using blast-infected rice leaves. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 57 : 339 ~ 344.
- OCAMPO, C. A., B. MOERSCHBACHER and H. J. GRAMBOW (1986) : Increased lipoxygenase activity is involved in the hypersensitive response of wheat leaf cells infected with avirulent rust fungi or treated with fungal elicitor. *Z. Naturforsch.*, 41C : 559 ~ 563.
- OHTA, H., K. SHIDA, Y. -L. PENG, I. FURUSAWA, J. SHISHIYAMA, S. AIBARA and Y. MORITA (1990) : The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. *Plant Cell Physiol.*, 31 : 1117 ~ 1122.
- OHTA, H., K. SHIDA, Y. -L. PENG, I. FURUSAWA, J. SHISHIYAMA, S. AIBARA and Y. MORITA (1991) : A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Physiol.*, 97 : 94 ~ 98.
- RYAN, C. A. (1990) : Protease inhibitors in plants : Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28 : 425 ~ 449.
- 柴田大輔 (1992) : 植物病害抵抗性発現に関わるリポキシゲナーゼ遺伝子. 植物感染生理談話会要旨, 85 ~ 94.
- SHIMURA, M., S. MASE, M. IWATA, A. SUZUKI, T. WATANABE, Y. SEKIZAWA, T. SAKI, K. FURIHATA, H. SETO and N. OTAKE (1983) : Anti-conidial germination factors induced in the presence of Probenazole in infected host leaves. III. Structural elucidation of substances A and C. *Agric. Biol. Chem.*, 47 : 1983 ~ 1989.
- SIEDOW, J. N. (1991) : Plant lipoxygenase : Structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42 : 145 ~ 188.
- STASWICK, P. E. (1992) : Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol.*, 99 : 804 ~ 807.
- TANAKA, A., H. YAMAMOTO, M. MAEYA, Y. MARUYAMA and T. TANI (1992) : Purification and characterization of a lipoxygenase isozyme from oat leaves inoculated with incompatible race of *Puccinia coronata avenae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, (in press).
- TANAKA, A., H. YAMAMOTO and T. TANI (1992) : Purification of antifungal lipids produced in oat leaves infected with incompatible race of *Puccinia coronata avenae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, (submitted).
- 谷 利一 (1983) : 植物病害における抗菌抵抗性. 四国植防, 18 : 1 ~ 8.
- TANI, T. and S. MAYAMA (1982) : Evaluation of phytoalexin and preformed antifungal substances in relation to fungal infection. (In : ASADA, Y. *et al.*, eds.), *Plant Infection*. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 301 ~ 314.
- 上田純一 (1991) : ジャスモン酸類. 植物の化学調節, 26 : 173 ~ 189.
- YAMAMOTO, H., A. TANAKA, T. TANI and R. M. BOSTOCK (1991) : The role of lipoxygenase in the expression of disease resistance of host plants. (In : PATIL, S. S. *et al.*, eds.), *Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants*. Springer-Verlag, New York, 249.
- YAMAMOTO, H. and T. TANI (1986) : Possible involvement of lipoxygenase in the mechanism of resistance of oats to *Puccinia coronata avenae*. *J. Phytopath.*, 116 : 329 ~ 337.
- 山本弘幸・谷 利一 (1991) : 宿主生体防御と過酸化脂質. (奥 八郎ら編), 植物感染生理学最近の

進歩，植物感染生理学最近の進歩刊行会，名古屋， 115 ～ 124.

吉原照彦 (1990) : ジャスモン酸類の化学と活性．植物細胞工学， 2 : 523 ～ 531.