

Cupressus lusitanicaの菌感染に対する防御システムの理解

八木, 惟月
九州大学大学院生物資源環境科学府

藤田, 弘毅
九州大学大学院農学研究院

堤, 祐司
九州大学大学院農学研究院

<https://hdl.handle.net/2324/7430222>

出版情報 : 2026. 日本木材学会
バージョン :
権利関係 :



Cupressus lusitanica の菌感染に対する防御システムの理解

Insights into the Defense Mechanisms of *Cupressus lusitanica* in Response to Fungal Infection

(九大院農) ○八木 惟月、藤田 弘毅、堤 祐司

(Kyushu Univ.) ○Itsuki Yagi, Koki Fujita, Yuji Tsutsumi

【緒言】

菌に侵された感染植物は菌に抗う傍ら、自らに迫ったリスク情報を、テルペン類等の揮発成分放出によって周囲の植物に伝達する。危険信号を受け取った植物は、自身に迫り来る次なる菌攻撃に備えて抵抗力を高める。個体だけでなく種の生存を支える、この防御システムの理解は、植物の生存戦略を解明するうえで非常に重要である。

当研究室では、菌感染に見立て酵母抽出物由来のエリシターで処理した *Cupressus lusitanica* 培養細胞から、10 種類のモノテルペンの放出を確認した^{1,2)}。そのうち γ -terpinene を曝露した培養細胞からは、曝露開始 5 分で terpinolene 放出の有意な増加を確認した。曝露が 24 時間に及ぶと、高い抗菌性で防御機構の中枢を担うと思われる hinokitiol 合成の開始に至った³⁾。また、hinokitiol 生合成は terpinolene を基質とし、数種の間体を経たのちに行われる⁴⁾。しかし、この曝露刺激に対する即応的な terpinolene 放出メカニズムについては、十分に検討されていない。

本研究では、*C. lusitanica* 培養細胞に対するエリシター処理（疑似感染）および、感染植物からの危険信号を模した、 γ -terpinene 曝露処理を行った。本研究では、エリシター処理サンプルおよび 24 時間曝露サンプルにエリシター処理したものを、それぞれ第一感染サンプルおよび第二感染サンプルとする。また、30 分以下の曝露を短時間、それより長い条件を長時間曝露と定義する。第一感染から第二感染に至る過程を 5 つのフェーズに区分し(Fig. 1)、それぞれの二次代謝物定量結果や生化学的挙動を相互に比較した。未処理と短時間曝露サンプルの遺伝子発現量、酵素活性値および生産物量を比較検討することで、terpinolene の即応的放出メカニズムの解明に関する知見を獲得できる。第一感染と第二感染サンプルの相違は γ -terpinene 曝露処理の有無のみなので、hinokitiol 生産量の比較から *C. lusitanica* 生存戦略におけるテルペンを介した危険伝達の役割の重要性が理解できる。また、感染は生存に関わる重篤な危険だが、曝露はあくまで危険の接近を知らせる信号であり、生命の直接の脅威にはならない。そのため長時間曝露と第一感染サンプルの比較により、リスクレベルに応じた植物のテルペン生成制御の違いが観察されることを期待した。これらの検討から、植物の菌感染に対する、防御システムの分子レベルの理解を目指した。

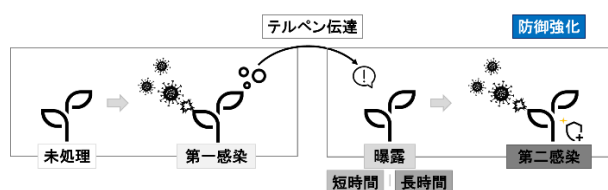


Fig. 1 本研究の疑似感染と防御フェーズの模式図

【実験方法】

培養 2 週目の *C. lusitanica* 細胞およそ 5 g を使用した。酵母抽出物を部分精製したエリシターを滴下した“感染サンプル”およ

びフラスコの蓋裏に張り付けた、 γ -terpinene 含浸ろ紙によって曝露処理した“曝露サンプル”に対して以下の実験を行った。

ヘッドスペース気相分析には SPME 法を採用した。フラスコ内ヘッドスペースに 25°C、5 分間ファイバー（65 μ m, PDMS/DVB, pink, Supelco, USA）を挿入し、GC-MS 分析に供した。

酵素アッセイでは、破碎した細胞に、terpinolene synthase 抽出・反応用バッファーを加え酵素抽出後、上清に基質 GPP および

内部標準として camphor を添加し、30℃、15 分間反応させた。生成した terpinolene は反応液上に重層した pentane によって捕集し、窒素気流下で濃縮したのち GC-MS 分析に供した。

hinokitiol 定量分析では、破碎した細胞から methanol および ethyl acetate によって得た抽出液を乾固したのち、BF₃ 錯体化した。内

【結果および考察】

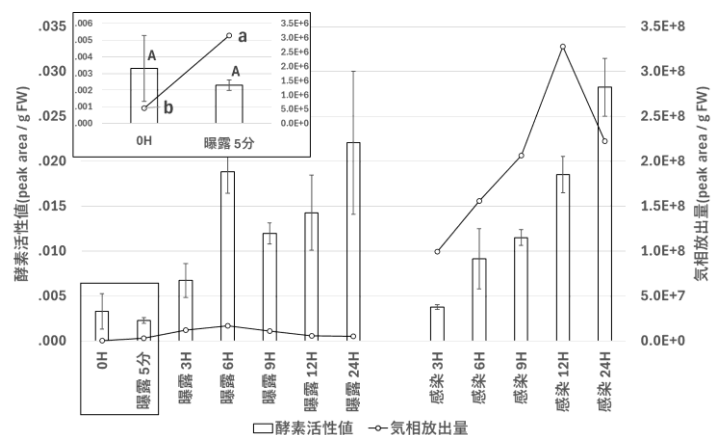


Fig. 2 曝露と第一感染サンプルの terpinolene 放出量 (折れ線グラフ)および terpinolene synthase 酵素活性値 (棒グラフ) 記号の異なりは有意差を示す($P < 0.10$)。

Fig. 2 に terpinolene 気相放出量および terpinolene synthase の酵素活性値を示す。第一感染サンプルの terpinolene 放出量は、長時間曝露サンプルに比べ大きな値を示したが、terpinolene synthase の酵素活性値には、ほぼすべての時間条件において差異は確認されなかった。この違いは、感染時は周囲への危険伝達のためにテルペン放出を、曝露時は二次感染に備えて hinokitiol 中間体生産を強化するため、と予想した。そこで、hinokitiol 定量分析を長時間曝露、第一感染および、第二感染サンプルに対して実施し、前二者の総和と後者を比較した。もし第二感染サンプルにおいて、曝露処理による中間体貯蔵があれば、その後の感染処理によって hinokitiol 生産は増大すると予想されるため、この比較により曝露による中間体蓄積の有無を評価できると考えた。Fig. 3 に hinokitiol 生産量を示す。曝露と第一感染サンプルの hinokitiol 生産量の総和と、二次感染サンプルのそれに有意差は確認されなかった。したがって、hinokitiol 中間体生産が長時間曝露サンプルで増加する、という仮説は否定された。そのため、長時間曝露と第一感染サンプル双方を比較した際に生

部標準の vanillin を含んだ 50% methanol aq を添加し、HPLC 分析に供した。

qPCR では、terpinolene synthase の遺伝子配列から増幅サイズ 99 bp となるプライマーセットを設計した。解析は $\Delta\Delta Ct$ 法で、各 $n = 3$ で相対定量比較を行った。尚、参照遺伝子には tubulin 遺伝子を使用した。

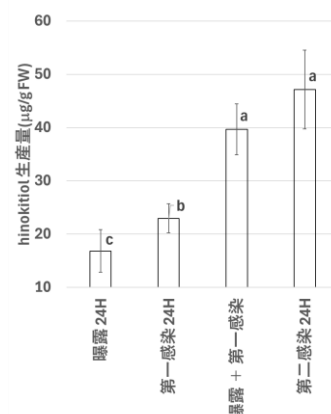


Fig. 3 hinokitiol 生産量 記号の異なりは有意差を示す($P < 0.05$)

じた terpinolene 放出量と酵素活性値の矛盾は、GPP 供給過程に起因する可能性が予想された。短時間曝露条件を含めた、GPP 供給に関連する実験は現在進行中である。

一方、第一感染単体の hinokitiol 生産量と第二感染サンプルのそれを比較すると、後者で有意な増加が確認された。感染処理前のテルペン曝露が hinokitiol 生産を亢進していることから、揮発テルペン伝達によるリスク情報伝達の重要性が示された。

未処理サンプルと短時間(5 分間)曝露サンプルについても terpinolene 放出量は酵素活性値(Fig. 2 左上拡大図)で説明できなかった。そこで、In vivo の酵素量について確認するため、qPCR による terpinolene synthase 遺伝子発現量の相対比較を行ったが、Fold Change に有意差はないことが確認された。つまり細胞内酵素量にも差異がないと考えられる。そのため、terpinolene 放出の即応性も、基質 GPP 供給過程に制御されている可能性が予想された。

【参考文献】

- 1) Matsunaga et al., Nat. Prod. Res. 17, 441-443(2003) 2) Ransika D. A. et al., J. Plant Physiol., 166, 720-728(2009) 3) Fujita et al., J. Chem. Ecol., 42, 814-820(2016) 4) Fujita et al., J. Plant Physiol., 171, 610-614(2013)