

**日本農薬学会**  
**農薬科学研究成果報告書**  
(平成 29 年度研究奨励金交付課題)

研究課題

アミン類を介したイネの傷害応答の解明

筆頭研究者氏名      網干 貴子

所属                      山形大学農学部

共同研究者名 (所属)

研究成果 (目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

**【目的】**

植物は、病原菌の感染や植食性昆虫の食害などのストレスを受けると、そのストレスに対する抵抗性が誘導される。イネでは病原菌に感染すると、フラボノイド (サクラネチン) と多様なジテルペン (モミラクトン、オリザレキシン、ファイトカサン) が増加することが知られている。これらの化合物はいもち病菌などに対して抗菌活性を示すことから、ファイトアレキシンとされている。植食性昆虫の食害に対しては、*p*-coumaroylputrescine と feruolylputrescine が増加する。トビイロウンカにこれらの化合物を吸汁させるとその致死率が増加することから、トビイロウンカに対する防御物質である可能性がある。また、植食性昆虫に対する防御物質として oryzacystatin などのプロテアーゼインヒビターが報告されているが、その他の化合物の植食性昆虫に対する影響は判然としない。

申請者等は、ジャスモン酸によりイネ葉で蓄積が誘導される化合物としてイソペンチルアミンを同定した。本化合物のイネからの報告はこれまでにない。イソペンチルアミンは、通常はイネ葉からほとんど検出されないが、ジャスモン酸噴霧から 24 時間後には葉における蓄積量が約 12  $\mu\text{g/gFW}$  となる。植物では生理活性作用を持つポリアミンとして、プトレシン、スペルミジン、スペルミンが知られているが、イソペンチルアミンはモノアミンであり、ポリアミンとは異なる機能をもつと期待される。そこで本研究では、イネ体内におけるイソペンチルアミンの誘導や生合成についてより詳細に調べることにした。

**【方法】**

イネ幼苗 (日本晴) に様々な処理を行い、一定時間後に葉に含まれるイソペンチルアミン量を LC/MS で測定した。葉は 50%メタノール水溶液中でビーズ破砕機により破砕し、破砕液を遠心分離した。上清を一部とり、ホウ素緩衝液 (pH 8.8) 中で 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamate を加えて 55°C、10 分間反応させた。反応液を遠心分離し、上清を逆相カラムで分離後、ESI-positive 法でイオン化した。

また、イネ葉におけるイソペンチルアミンの前駆物質を調べるため、安定同位体標識されたアミノ酸をイネに注射し、その後ジャスモン酸を噴霧して、安定同位体標識されたイソペンチルアミンが検出されるか調べた。

### 【結果および考察】

#### 昆虫食害による変動

イネ幼苗をアワオトウ幼虫 *Mythimna separata* に一晚自由に食害させ、LC/MS で分析すると、食害された葉のイソペンチルアミンが約 2  $\mu\text{g/gFW}$  に増加した。また、ツマグロヨコバイ *Nephotettix cincticeps* をイネ幼苗と同じ容器に 6 日間入れ、吸汁させた後にイソペンチルアミンを分析すると、蓄積量が増加していた。咀嚼性昆虫だけでなく、吸汁性昆虫の食害によっても本化合物の蓄積量が増加することが明らかになった。

#### 物理的障害による変動

イネ幼苗の葉にハサミで切込みを入れ、24 時間後に傷害葉を分析すると、イソペンチルアミンが増加した。切込みを入れた同じ個体の非傷害葉ではイソペンチルアミンの有意な増加は確認されず、本化合物の誘導は全身応答ではなく、傷害部付近における局所的な反応であることが判明した。

#### 植物ホルモン処理の影響

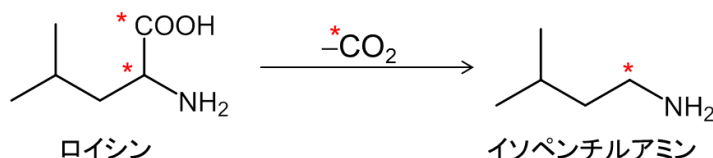
イネ幼苗にジャスモン酸を噴霧し、3 時間おきにイネ葉に含まれるイソペンチルアミン量を測定した。噴霧して 3、6 時間後はほとんど増加しないが、9、12 時間後から増加が確認され、15 時間後以降に大きく増加した。本化合物はジャスモン酸処理から増加までに半日程度を要することが明らかとなった。また、ジャスモン酸以外の植物ホルモンの影響を調べるために、アブシジン酸、インドール酢酸、サリチル酸の 1 mM 水溶液をイネ幼苗に噴霧し、24 時間後のイソペンチルアミンを定量した。いずれにおいても、イソペンチルアミンの増加は確認されなかった。ジャスモン酸は傷害時に増加する植物ホルモンであることから、イネ葉では傷害によりジャスモン酸の増加を経て、イソペンチルアミンが増加すると考えられた。

#### イソペンチルアミンの前駆物質

イソペンチルアミンは、その構造からロイシンの脱炭酸により生じると予想される。イネにジャスモン酸噴霧を行ってから 12 時間後のロイシンの量を、水噴霧したものと比較したが、有意な変化は観察されなかった。しかしながら、[1, 2- $^{13}\text{C}$ ]ロイシンをイネ幼苗に注射し、その後ジャスモン酸を噴霧し、葉のイソペンチルアミンを分析した。イソペンチルアミンは誘導体化処理により  $m/z$  258  $[\text{M}+\text{H}]^+$  で検出されるが、[1, 2- $^{13}\text{C}$ ]ロイシンを注射したイネでは  $m/z$  258 に対する  $m/z$  259 のイオンの相対強度が増加した。1 位の炭素は脱炭酸により脱離し、アミノ基に隣接した炭素のみ  $^{13}\text{C}$  で標識されたイソペンチルアミンが生じたと考えられる。したがって、ロイシンはイソペンチルアミンの前駆体であると判明した。

#### ナチュラルバリエーション

様々なイネの品種を用いて、イソペンチルアミンの蓄積の有無を調べた。日本晴の他にも万作、亀治、雄町などのジャポニカと Jaguary、Tupa729 などのトロピカルジャポニカではジャスモン酸処理による蓄積が生じた。しかしながら、インディカでは、ジャスモン酸処理をしてもイソペンチルアミンが検出されない Kasalath、Shoni、Tupa121-3 と蓄積する Jena 035、Keiboba、Hong Chuh Zai があつた。これらのうち、イソペンチルアミンを蓄積する日本晴と検出されない Kasalath の染色体断片置換系統などを用いて、イソペンチルアミンの生合成に関与する遺伝子を探索中である。



イソペンチルアミン生合成経路