

日本農薬学会
農薬科学研究成果報告書
(令和 4 年度研究奨励金交付課題)

研究課題

植物の耐暑性を賦活化する低分子化合物の創製

筆頭研究者氏名 高橋郁夫

所属 東京大学大学院農学生命科学研究科

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

地球規模での気温上昇は農作物に高温障害を引き起こし、生産量や品質の低下を引き起こし生産性に影響を与えている。これを克服すべく育種による手立てが講じられているが、適用困難な作物種は多い。植物に耐暑性を付与できる資材は、多種多様な作物種に適応可能と考えられ、また時間的な制御と強度の調節が可能な点は育種による対策を補うことができる。効果的な耐暑性付与化合物を手に入れることができれば、既存の設備や資材と組み合わせた有効な高温対策が立てられる。

スペルミジンとフェニルプロパノイドの抱合体 (スペルミジン-HCAA) はさまざまな植物から見出されている代謝産物だが、その生理機能は明らかになっていない (図1)。本申請に先立って、申請者はスペルミジン-HCAA の植物における生理機能を調査する過程で、これら化合物の外的な処理が高温

下での植物の生育遅延を緩和
できることに気が付いた。本研究は、この現象の作用機序の解明と、類縁化合物の化学合成による活性向上を目指して実施

されたものである。さらに、イネから同定された新奇のスペルミジンと直鎖脂肪酸の抱合体 (構造未公表) についても同様に検証した。

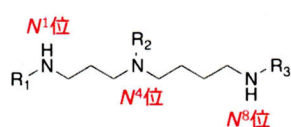
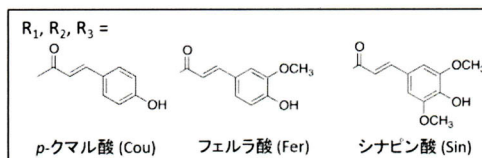


図1 スペルミジン-HCAAの構造



方法

1) スペルミジン-HCAA の化学合成

スペルミジン-HCAA には、アシル化位置の異なる多様な類縁体が存在するが、本申請では3か所存在するスペルミジンのアミノ基のうち1または2か所を同種のフェニルプロパノイドと縮合させた抱合体に限定して調製した。縮合させないアミノ基を *tert*-ブトキシカルボニル基で保護したスペルミジンにアセチル化したフェニルプロパノイドを縮合させたのち、脱保護し、塩酸塩として目的物を得た。

2) スペルミジン-HCAA が植物の高温ストレスに与える影響の評価

3 週齢のキュウリ実生苗 (品種: 鈴成四葉) の葉身全体に 1 mM スペルミジン-HCAA 水溶液を噴霧処理し、24 時間後に高温処理として 40°C で 3 日間生育した。高温処理開始時より経時的に葉身をコル

クボラーでくり抜き、以下の実験に用いた。クロロフィル含量は、*N,N*-ジメチルホルムアミドで抽出したクロロフィルの吸光度から算出した。遺伝子発現解析は、抽出した全 RNA から調製した cDNA を用いた定量 PCR 法を採用した。抗酸化酵素活性は、抽出した粗タンパク質との反応により減少した基質または得られた生成物の量を吸光から決定し、それをもとに算出した。脂質過酸化物質の定量には TBARS 法を採用し、2-チオバルビツール酸と反応したマロンジアルデヒド (MDA) の量として算出した。電解質漏出率は、葉身サンプルを浸漬した蒸留水中の電気伝導率を電気伝導率計で測定し、加熱後のサンプルの電気伝導率における割合として表した。

3) 新奇スペルミジン抱合体の高温ストレスに与える影響の解析

培養土で 12 日間栽培したイネ (品種: 日本晴) の葉身全体に 1 mM スペルミジン抱合体水溶液を噴霧処理し、その 24 時間後に 45°C で 3 日間生育し、これを高温処理とした。高温処理後のイネ葉身における遺伝子発現の解析、脂質過酸化物質の定量、電解質漏出の測定、抗酸化酵素活性測定は 2) と同じ方法で実施した。

成果

1) スペルミジン-HCAA の化学合成

上記の方法により、スペルミジン-HCAA を 13 種類調製した。スペルミジンのアミノ基のいずれか 1 か所に、あるいは *N* 位と *M* 位、*M* 位と *N* 位にシナピン酸が抱合した化合物は、助成期間内に合成を完了することができなかった。したがって、以下の実験はこれらを除いた化合物を用いて実施した。

2) スペルミジン-HCAA が植物の高温ストレスに与える影響の解析

N 位と *N* 位にフェニルプロパノイドを抱合した化合物は、高温処理後のキュウリ実生における生育の抑制と萎れを緩和した。この影響は特にフェルラ酸またはシナピン酸を持つ抱合体 (以下、前者を 1,8-Fer, 後者を 1,8-Sin とする) に強く確認された。先に高濃度の 1,8-Sin の外的処理はシロイヌナズナ実生の生育を抑制することを報告しているが (Takahashi et al. 2022. doi: 10.1093/bbb/zbab223), この実験においては生育に対する負の影響は見られなかった。両化合物の処理は MDA 含量と電解質漏出率の上昇を抑制し、抗酸化酵素活性を高めた。熱ショックタンパク質 (HSP) は生体内タンパク質の機能管理を担っており、植物の耐暑性においても重要な役割を担っていると考えられている。1,8-Fer または 1,8-Sin を処理した実生は、*HSP* 遺伝子の発現を制御する熱ショック転写因子 (*Hsf*) 遺伝子の発現レベルが高まった。以上のことから、スペルミジン-HCAA 抱合体による耐暑性の付与は、酸化ストレスの緩和や熱ショック応答の活性化に依ることが明らかとなった。申請時には、シロイヌナズナ変異体や熱応答レポーター遺伝子導入個体を用いた詳細な解析を計画していたが、助成期間内に完遂できなかった。現在、1) と 2) の内容を取りまとめて Journal of Pesticide Science 誌への投稿を準備している。

10.1093/bbb/zbab223), この実験においては生育に対する負の影響は見られなかった。両化合物の処理は MDA 含量と電解質漏出率の上昇を抑制し、抗酸化酵素活性を高めた。熱ショックタンパク質 (HSP) は生体内タンパク質の機能管理を担っており、植物の耐暑性においても重要な役割を担っていると考えられている。1,8-Fer または 1,8-Sin を処理した実生は、*HSP* 遺伝子の発現を制御する熱ショック転写因子 (*Hsf*) 遺伝子の発現レベルが高まった。以上のことから、スペルミジン-HCAA 抱合体による耐暑性の付与は、酸化ストレスの緩和や熱ショック応答の活性化に依ることが明らかとなった。申請時には、シロイヌナズナ変異体や熱応答レポーター遺伝子導入個体を用いた詳細な解析を計画していたが、助成期間内に完遂できなかった。現在、1) と 2) の内容を取りまとめて Journal of Pesticide Science 誌への投稿を準備している。

3) 新奇スペルミジン抱合体の高温ストレスに与える影響の解析

高温に曝された個体は、地上部重量の減少を伴う生育の遅延とクロロフィル含量の著しい減少が確認されたが、化合物処理個体はこれらの影響が緩和された (図 2A, B)。MDA 含量と電解質漏出率の上昇が抑えられ、抗酸化酵素の比活性の上昇が確認された。また、*Hsf* 遺伝子や *HSP* 遺伝子の発現量の有意な増加が確認されたことから、調査した範囲において、新奇スペルミジン抱合体は高温ストレスの緩和に対してスペルミジン-HCAA と類似した作用機序を持つと考えられる。続いて、より活性の高い化合物の発見を目指して、スペルミジン *N* 位のアミノ基に様々な脂肪酸やカルボン酸を脱水縮合させた類縁体を 5 種類調製した。調製に時間を費やし、助成期間内での生物活性評価には至らなかった。

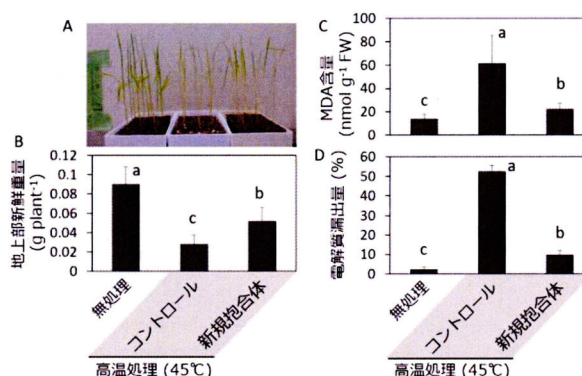


図2 新規スペルミジン抱合体は高温による成長抑制と酸化ストレスを緩和した。エラーバーはSDを示す (n=12)。異なるアルファベットはチューキー検定により処理間で1%の有意差があることを示す。