

氏名（本籍）	すけ がわ さとる 助 川 聖（茨城県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第1029号
学位授与の日付	2019年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ミント香気成分を介した植物の防御応答機構 の解明と応用利用のための基盤研究

論文審査委員（主査）教授 西山 千春
准教授 有村源一郎 教授 島田 浩章
教授 堀戸 重臣 教授 松永 幸大

論文内容の要旨

第一章：序論

植物が産生、放出する揮発性化合物（香り）は花粉媒介者や害虫種の天敵の誘引などに資する情報化学物質である。一方で、害虫に食害された植物から放出される香りに曝された周囲の未被害植物はこの香りを立ち聞きすることで害虫の脅威を察し、前もって自身の防御力を高めることができる。近年、香りを介した植物間コミュニケーションに注目が集まり、様々な植物種間での実証がなされてきたが、これらは食害や傷害ストレスに曝された植物と周囲の同種・異種植物との生態系コミュニケーションに限られたものであった。

本研究では、恒常的に香りを放出する植物の香り成分にも植物の防御応答を誘導できる能力があると考え、アロマ植物の代表であるミントとダイズ（第二章）およびコマツナ（第三章）の間で生じる植物間コミュニケーション（植物のかおりの立ち聞き現象）について検証した。第二章では、香りに曝されたダイズ葉における防御応答の活性化には、ヒストン修飾によるエピジェネティクスが関わる分子機構を提示した。

第四章では、ミントの香気主成分であるメントールの OH 基に脂肪酸やアミノ酸を化学修飾することで、より安定性や生理活性の高い新規化合物を開発する萌芽研究を試みた。メントール修飾化合物を用いて、植物の防御応答誘導活性ならびに哺乳類の抗炎症性作用といった農業の生産システムと健康サプリメントとしての活用技術を構築するための基盤研究を実施した。

以下、それぞれの研究内容について紹介する。

第二章 ミント香気成分を受容したダイズの防御応答の誘導メカニズムの解明

害虫に食害された植物は、害虫の天敵を誘引するために香気成分（匂い・香り）を大気中に放出する。近くの健全な植物はこれらの香りを「立ち聞き」することで、害虫に食害される前に防御能力を高めることができる。本研究では、多岐にわたる生物間相互作用活性をもつミントの香りをモデルケースとし、植物間コミュニケーションを介した立ち聞き植物における防御応答の記憶制御メカニズムの解明を試みた。

ミントは変種が多く、種によって香り組成が異なるため、香り組成の異なる10種のミントの近傍で生育したダイズの防御遺伝子発現解析を行い、最も有用なミント品種を選抜した。その結果キャンディーミントの近傍で生育したダイズでは、トリプシンインヒビター（*TI*）および *pathogenesis-related 1*（*PR1*）の防御遺伝子の発現量が上昇した。キャンディーミントの近傍で生育したダイズにおけるハスモンヨトウ幼虫の成長量やナミハダニの産卵数、ダイズさび病菌の感染などが有意に抑制された。さらにキャンディーミントの香り主成分7化合物を植物に曝した結果、1,8-cineole、menthone、menthol が受容植物葉における防御遺伝子の発現を誘導することが見出された。これらの防御活性の活性化は、ミントの香りに曝してから数日間維持されたが、これらは防御遺伝子のプロモーター領域周辺のクロマチン構造のアセチル化制御によるものであった。さらに、野外圃場でキャンディーミントの近傍でダイズを生育した場合、害虫による被害率が有意に低下した。また、前もってミントの香りを受容させたダイズを野外圃場で生育した場合でも同様に被害率が低下した。これらの結果から、ミント香気成分には害虫忌避性に加え、周囲の植物の防御力を向上させる植物間コミュニケーション様活性があることが示唆された。

第三章 ミント香気成分を活用したアブラナ科野菜の害虫防除技術の確立

ミント香気成分を受容したコマツナの栽培法の確立を目指した基盤研究を実施した。コマツナの防御応答を誘導する能力をもつ有用ミント種の選抜を行った結果、ペパーミントの近傍で生育したコマツナでは防御遺伝子発現の上昇ならびに害虫抵抗性の獲得が認められた。ペパーミントの主要香気成分をコマツナに曝したところ、ダイズと同様に 1,8-cineole、menthone、menthol といった化合物が防御遺伝子発現を誘導した。これらのペパーミントの効果をオープン系温室内で評価した結果、害虫による被害は減少した。同様に、室内でミントの香りを受容させた植物を温室内で栽培した場合でも被害率は低下した。これらの効果は、コマツナの潜在的防御能力の活性化と、コマツナの主要害虫であるコナガの産卵忌避作用によるものであることも明らかにされた。これらの結果から、ミント香気成分と農薬処理を同時に行うハイブリッド農法を試みた結果、ミントの近傍で生育したコマツナでは、農薬の濃度を約半分まで低減することに成功した。これらの結果から、ミント香気成分を用いた減農薬栽培技術の基盤を構築できた。

第四章 メントール側鎖修飾化合物の開発

メントールはペパーミントに含まれる揮発性テルペンアルコールであり、第二、三章において、メントールを受容した植物では防御遺伝子の活性化と受容植物上での害虫の成長抑

制が確認された。しかしメントールは揮発性が高く不安定な化合物であるため、メントールの構造変化により、受容植物内での防御活性の持続性等を改善できる可能性が考えられる。そこで本研究では、メントールの OH 基に脂肪酸やアミノ酸を付加し、揮発性の低下ならびに生理活性の向上を試みた。メントールの OH 基に酢酸、酪酸などの脂肪酸を付加した化合物溶液をダイズ葉に噴霧し、*TI* および *PRI* 防御遺伝子の発現解析を行った結果、メントールと同様の誘導性を示した。一方、グリシン、バリンなどのアミノ酸を付加した化合物を同様にダイズ葉に処理した結果、バリンを付加した化合物（メントール-Val）を処理したダイズ葉において防御遺伝子の発現量がメントールと比較して有意に上昇した。さらに、メントール-Val を処理したダイズ葉におけるハスモンヨトウによる食害量とナミハダニの産卵数も有意に低減したことから、当該化合物は有用な防御活性化剤であることが示唆された。

一方で、メントールには抗炎症、抗腫瘍などの薬理作用があることが知られている。そこで本研究では、LPS 刺激により人工的に炎症反応を誘発させたマウスマクロファージ様細胞株（raw264.7）におけるメントールおよびメントール-Val の抗炎症効果を検証した。その結果、メントール-Val を処理した細胞ではメントールを処理した細胞よりも、*TNF- α* 、*IL-1 β* などの炎症性サイトカインの発現を低下させる効果があることが認められた。本成果は、当該修飾化合物の医薬品、健康サプリメントとしての有用性を示唆する。

総括

植物の香りを介した植物間コミュニケーションの詳細な分子機構の理解と応用利用に向けた挑戦は長く停滞状況にあった。本研究では、それらの課題を解決した成果に位置づけられる。メントール修飾化合物の開発研究は、未だ初期段階であると言えるが、基盤研究における成果を蓄積させることで、化合物の農業利用や医薬品への応用を目指す。

論文審査の結果の要旨

第一章：序論

植物が生産、放出する揮発性化合物（香り）は花粉媒介者や害虫種の天敵の誘引などに資する情報化学物質である。一方で、害虫に食害された植物から放出される香りに曝された周囲の未被害植物はこの香りを立ち聞きすることで害虫の脅威を察し、前もって自身の防御力を高めることができる。近年、香りを介した植物間コミュニケーションに注目が集まり、様々な植物種間での実証がなされてきたが、これらは食害や傷害ストレスに曝された植物と周囲の同種・異種植物との生態系コミュニケーションに限られたものであった。

本研究では、恒常的に香りを放出する植物の香り成分にも植物の防御応答を誘導できる能力があると考え、アロマ植物の代表であるミントとダイズ（第二章）およびコマツナ（第三章）の間で生じる植物間コミュニケーション（植物のかおりの立ち聞き現象）

について検証した。第二章では、香りに曝されたダイズ葉における防御応答の活性化には、ヒストン修飾によるエピジェネティクスが関わる分子機構を提示した。

第五章では、ミントの香気主成分であるメントールの OH 基に脂肪酸やアミノ酸を化学修飾することで、より安定性や生理活性の高い新規化合物を開発する萌芽研究を試みた。メントール修飾化合物を用いて、植物の防御応答誘導活性ならびに哺乳類の抗炎症性作用といった農業の生産システムと健康サプリメントとしての活用技術を構築するための基盤研究を実施した。

以下、それぞれの研究内容について紹介する。

第二章 ミント香気成分を受容したダイズの防御応答の誘導メカニズムの解明

害虫に食害された植物は、害虫の天敵を誘引するために香気成分（匂い・香り）を大気中に放出する。近くの健全な植物はこれらの香りを「立ち聞き」することで、害虫に食害される前に防御能力を高めることができる。本研究では、多岐にわたる生物間相互作用活性をもつミントの香りをモデルケースとし、植物間コミュニケーションを介した立ち聞き植物における防御応答の記憶制御メカニズムの解明を試みた。

ミントは変種が多く、種によって香り組成が異なるため、香り組成の異なる 10 種のミントの近傍で生育したダイズの防御遺伝子発現解析を行い、最も有用なミント品種を選抜した。その結果キャンディーミントの近傍で生育したダイズでは、*trypsin inhibitor* (TI) および *pathogenesis-related 1* (PRI) の防御遺伝子の発現量が上昇した。キャンディーミントの近傍で生育したダイズにおけるハスモンヨトウ幼虫の成長量やナミハダニの産卵数、ダイズさび病菌の感染などが有意に抑制された。さらにキャンディーミントの香り主成分 7 化合物を植物に曝した結果、1,8-シネオール、メントン、メントールが受容植物葉における防御遺伝子の発現を誘導することが見出された。これらの防御活性の活性化は、ミントの香りに曝してから数日間維持されたが、これらは防御遺伝子のプロモーター領域周辺のクロマチン構造のアセチル化制御によるものであった。さらに、野外圃場でキャンディーミントの近傍でダイズを生育した場合、害虫による被害率が有意に低下した。また、前もってミントの香りを受容させたダイズを野外圃場で生育した場合でも同様に被害率が低下した。これらの結果から、ミント香気成分には害虫忌避性に加え、周囲の植物の防御力を向上させる植物間コミュニケーション様活性があることが示唆された。

第三章 ミント香気成分を活用したアブラナ科野菜の害虫防除技術の確立

ミント香気成分を受容したコマツナの栽培法の確立を目指した基盤研究を実施した。コマツナの防御応答を誘導する能力をもつ有用ミント種の選抜を行った結果、ペパーミントの近傍で生育したコマツナでは防御遺伝子発現の上昇ならびに害虫抵抗性の獲得が認められた。ペパーミントの主要香気成分をコマツナに曝したところ、ダイズと同様に 1,8-シネオール、メントン、メントールといった化合物が防御遺伝子発現を誘導した。こ

これらのペパーミントの効果をオープン系温室内で評価した結果、害虫による被害は減少した。同様に、室内でミントの香りを受容させた植物を温室内で栽培した場合でも被害率は低下した。これらの効果は、コマツナの潜在的防御能力の活性化と、コマツナの主要害虫であるコナガの産卵忌避作用によるものであることも明らかにされた。これらの結果から、ミント香気成分と農薬処理を同時に行うハイブリッド農法を試みた結果、ミントの近傍で生育したコマツナでは、農薬の濃度を約半分に低減することに成功した。これらの結果から、ミント香気成分を用いた実用的な減農薬栽培技術の基盤を構築できた。

第四章 メントール側鎖修飾化合物の合成と生理活性の解明

メントールはペパーミントに含まれる揮発性テルペンアルコールであり、第二、三章において、メントールを受容した植物では防御遺伝子の活性化と受容植物上での害虫の成長抑制が確認された。しかしメントールは揮発性が高く不安定な化合物であるため、メントールの構造変化により、受容植物内での防御活性の持続性等を改善できる可能性が考えられる。そこで本研究では、メントールの OH 基に脂肪酸やアミノ酸を付加し、揮発性の低下ならびに生理活性の向上を試みた。メントールの OH 基に酢酸、酪酸などの脂肪酸を付加した化合物溶液をダイズ葉に噴霧し、*TI* および *PRI* 防御遺伝子の発現解析を行った結果、メントールと同様の誘導性を示した。一方、グリシン、バリンなどのアミノ酸を付加した化合物を同様にダイズ葉に処理した結果、バリンを付加した化合物（メントール-Val）を処理したダイズ葉において防御遺伝子の発現量がメントールと比較して有意に上昇した。さらに、メントール-Val を処理したダイズ葉におけるハスモンヨトウによる食害量とナミハダニの産卵数も有意に低減したことから、当該化合物は有用な防御活性化剤であることが示唆された。

一方で、メントールには抗炎症、抗腫瘍などの薬理作用があることが知られている。そこで本研究では、Lipopolysaccharide (LPS) 刺激により人工的に炎症反応を誘発させたマウスマクロファージ様細胞株 (raw264.7) におけるメントールおよびメントール-Val の抗炎症効果を検証した。その結果、メントール-Val を処理した細胞ではメントールを処理した細胞よりも、*TNF- α* 、*IL-1 β* などの炎症性サイトカインの発現を低下させる効果があることが認められた。本成果は、当該修飾化合物の医薬品、健康サプリメントとしての有用性を示唆する。

総括

植物の香りを介した植物間コミュニケーションの詳細な分子機構の理解と応用利用に向けた挑戦は長く停滞状況にあった。本研究では、それらの課題を解決した成果に位置づけられる。メントール修飾化合物の開発基盤研究は、未だ初期段階であるが、様々な思考の基盤研究を維持することで、今後化合物の農業利用や医薬品への応用を目指す。本論文が博士（工学）の学位論文として十分に価値のあるものと認められる。