

植物の防御反応を利用した水耕栽培薬用植物の機能性強化に関する研究

申請代表者 田中 謙 立命館大学薬学部 教授
所内共同研究者 渡辺志朗 病態制御研究部門栄養代謝学分野 准教授

■背景・目的

我が国で漢方方剤の製造原料として使用される生薬の約 90%は、主として中国などの海外からの輸入に依存している。しかしながら、近年の中国の経済成長を背景とする中国国内需要の増加や世界的健康志向の高まりによる欧米諸国での需要が増加に対して、環境変化や乱獲に伴う野生資源の枯渇により資源の減少が進んでおり、我が国が今後も安定して品質の高い生薬資源を確保することができるか危惧されている。一方、我が国での生薬生産量は、農業従事者の高齢化の進展、生薬価格の低迷の影響により依然として改善されていない。こうした状況を改善することを目的として、現在、農林水産省・厚生労働省は、共同で薬用植物の産地形成を進め「医福食農連携」事業として進めており、全国で水耕栽培を利用した薬用植物の栽培実験が展開されている。

生薬の有効成分とされる二次代謝物の多くは、本来ストレスに対する耐性や防御のために生産されているものと考えられる。従って、水耕栽培などの低ストレス環境で栽培すると植物体の成長は見込めるものの、二次代謝物の蓄積については必ずしも良好でない。これまでに、富山県で水耕栽培されたエゴマと路地植えのエゴマの成分比較を行った結果、水耕栽培では rosmarinic acid、flavonoid 類及び oleanolic acid などのトリテルペンの含有量が極めて低いことを明らかにした（図 1、2）。

研究代表者らはこれまでに、セリ科植物の主要な害虫であるキアゲハ幼虫の吐き戻し液から見出した脂肪酸誘導体のエリシターが、セリ科薬用植物のポウフウの培養植物で、防御に関する二次代謝物を誘導することを明らかにした。本研究では、このエリシターを無菌発芽させたエゴマ植物体に接種して、揮発性成分量の変動について研究し、水耕栽培による高機能性薬用植物栽培の実用化に資する知見を集積する。

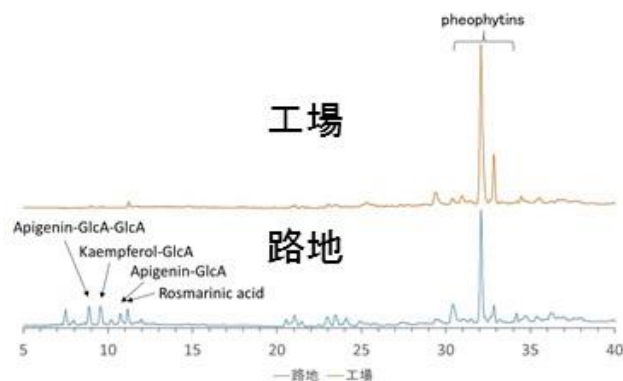


図 1 水耕栽培と路地栽培のエゴマメタノールエキスの LC-MS TIC

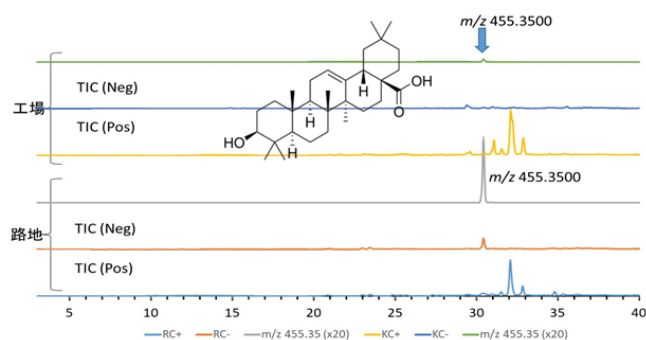


図 2 水耕栽培と路地栽培のエゴマクロロホルムエキスの GC-MS TIC

■方法

(1) 無菌培養エゴマの調製

エゴマの種を 70%エタノールで 1 分間混和後、0.1%PPM を含む滅菌液で 16 時間処理を行った。これらの種子を 0.5 %スクロース、0.8%寒天、1%PPM を含む寒天培地に播種し、25℃、明条件下で発芽させた。発芽した個体の種皮を除去し、3%スクロース、0.8%寒天、1%PPM、MS 培地を pH5.8 に調整した寒天培地に移し替え、25℃、明条件下で培養した。約 2 週間後、3%スクロース、0.8%寒天、MS 培地を pH5.8 に調整した寒天培地に移し替え、さらに 2 週間植物体を目的の大きさに成長させ実験に使用した。

(2) 揮発性成分量の分析

一週間に二回、エゴマの葉 3 枚にハサミで切りつけ、エリシター 10 %溶液 20 μ l を塗布した。これを 8 週間

様式 1-5

種目 (一般研究 I)

にわたって行い、植物体の抽出を行った(n=3)。植物体を液体窒素凍結下粉碎後、水-メタノール-クロロホルムを用いて抽出し、クロロホルム層を GC-MS で分析した。

GC-MS 条件 装置 : 島津 QP 2010GC-MS, カラム : DB-5MS (30 m×0.25 mm 膜厚 0.25 μm), 注入口温度 270℃, カラム温度 : 40℃ (3 分間保持) → 300℃ (10℃/min で昇温), キャリアーガス : He 1 mL/min. EI モード ; イオン化電流 : 60μA, イオン化電圧 : 70eV.

(3) エリシターに対する応答の解析

エゴマの葉 3 枚をはさみで切りつけ、そこに水または 10%エリシター溶液を 20 μl ずつ塗布した。その後、SPME を用いて 25℃、30 分で捕集した揮発成分を GC/MS で測定した。この分析を 1 時間毎に塗布 5 時間後まで行った。同様の実験を三日間連続して行い、葉から放出される成分を分析した。

GC-MS 条件は上記と同じ。

■結果・考察

エゴマ培養植物に対し、他種の薬用植物で二次代謝物の誘導効果のある脂肪酸誘導体のエリシターを長期間接種し、エゴマの主要な揮発性成分量の変化を SPME GC-MS で解析したクロマトグラムを図 3 に示す。さらに、エゴマ特有の香り成分である perillaketone 及び植物の防御に関与することが知られている caryophyllene について、エリシター接種の有無による含有量を測定した結果を図 4、5 に示す。

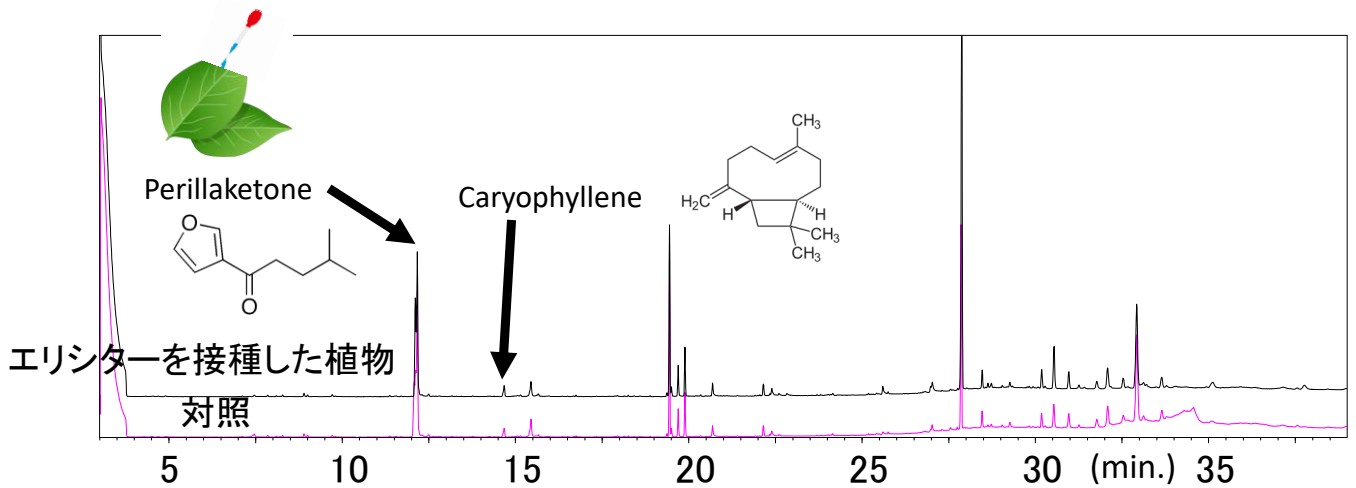


図 3 エリシターを長期間接種したエゴマの主要な揮発性成分量の変化を SPME GC-MS で解析したクロマトグラム

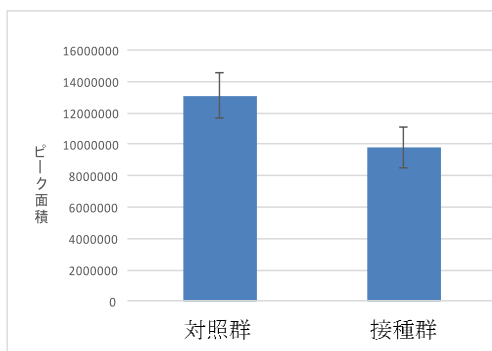


図 4 エリシターを長期間接種したエゴマの perillaketone 量変化

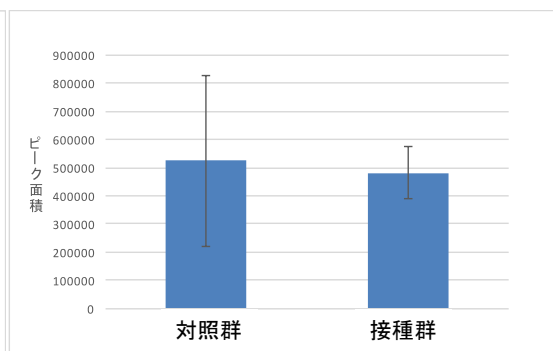


図 5 エリシターを長期間接種したエゴマの caryophyllene 量の変化

他種の薬用植物で二次代謝物の誘導効果のある脂肪酸誘導体のエリシターを長期間接種し、エゴマの主要な揮発性成分である perillaketone 及び caryophyllene については、期待される代謝物量の増加は認められなかった。

植物は生態系からのストレスに耐えるためタンパク質の合成などを行い、防御機構を発動させる。そのためには、植物ホルモンがシグナル伝達物質として重要な役割を果たす。環境の変動 (乾燥・低温・高塩濃度など)

様式 1-5

種目 (一般研究 I)

に対してはアブシジン酸が、病原菌抵抗性にはサリチル酸が、虫の食害などに対してはジャスモン酸が初期段階で関与することが知られている。さらに、ジャスモン酸が、植物防御に関与する二次代謝物生合成を誘導することも報告されている[1]。

ジャスモン酸は、食害等による細胞の構造的破壊から生じるリノレン酸が、13-リポキシゲナーゼによって生成されるリノレン酸 13-ヒドロペルオキシドから生成されるが、この過程で、リノレン酸 13-ヒドロペルオキシドは一部 12-オキソ-9-ドデセン酸を経て3-ヘキセナールなどのオキシリピン類に変換され、近隣の植物に対し外敵の接近を知らせるシグナルとして放出される。今回実験に使用したエリシターが、ジャスモン酸シグナル経路による植物の二次代謝誘導に関与していることをメタボローム解析により裏付けるためには、葉からオキシリピン類が放出されるか否か明らかにする必要がある。そこで、エリシター接種後、葉から放出されるオキシリピン類を SPME-GC-MS 法によりを分析した。その結果を図6に示す。

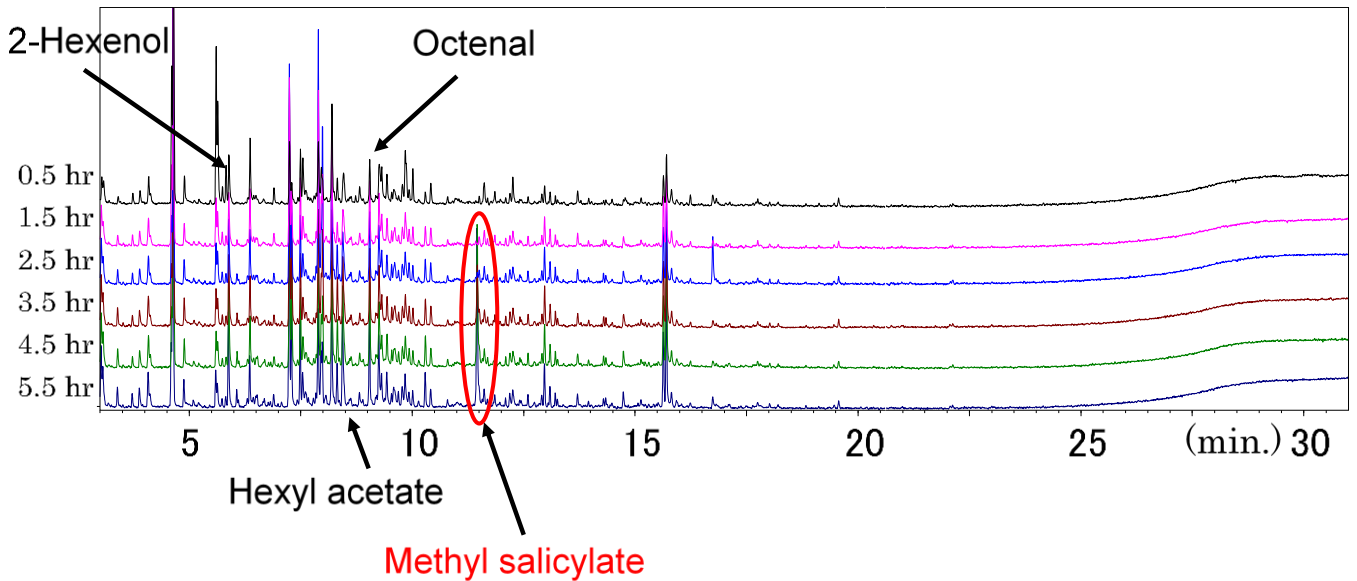


図6 エリシターを投与したエゴマ葉からの揮発成分の経時変化

エリシター投与後、ジャスモン酸シグナル経路活性化の指標となるオキシリピン類は検出されず、投与後 1.5 時間以降で病原菌などの感染防御に関与するサリチル酸メチルの放出が確認された。Heil らの報告によれば、植物体内でサリチル酸類は、ジャスモン酸の生合成及びジャスモン酸で誘導される二次代謝物生合成を抑制し、全身獲得抵抗性を誘導する引き金となる[2]。

この結果から、今回実験で使用したエリシターでエゴマに対して有用な二次代謝物生合成を誘導できなかった要因として、サリチル酸シグナル系が関与するジャスモン酸シグナル系の抑制が考えられた。

一方で、今回使用したエリシターで病原抵抗性を誘導できることが示唆されたが、サリチル酸類による全身獲得抵抗性の誘導後に見られる抵抗性は広い範囲の病原体に有効であり、現在、このような全身獲得抵抗性の誘導による病気に強い農作物の栽培を目的として、プロベナゾールなど 4 種の「プラントディフェンスアクティベーター」が農薬登録されている。今回の実験で使用したエリシターを新たなプラントディフェンスアクティベーターとして応用することも可能であると考えられた。

■結論

エゴマ培養植物に対し、他種の薬用植物で二次代謝物の誘導効果のある脂肪酸誘導体のエリシターを長期間接種し、エゴマの主要な揮発性成分量の変化を解析したが、期待される代謝物量の増加は認められなかった。その原因を明らかにするため、エリシター接種後、葉から放出されるシグナル伝達物質を分析した。その結果、虫害などの防御に関与するオキシリピン類及びジャスモン酸類の放出は検出されず、病原菌などの感染防御に関与するサリチル酸メチルの放出が確認された。

サリチル酸類は、ジャスモン酸の生合成に対して拮抗的に働くことから、二次代謝産物に変化がなかったと考えられる。一方で、今回使用したエリシターで病原抵抗性を誘導できることから、病気に強い植物の栽培へ応用することが可能であると考えられた。

■文献

- [1] 松井健二, & 有村源一郎. (2003). 情報化学物質として機能する植物揮発性成分の合成と制御 (特集 植物が放つ揮発性物質を介した動植物の相互作用—その生態機能と誘導のメカニズム). 蛋白質核酸酵素, 48(13), 1793-1800.
- [2] Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of botany*, 89(5), 503-512.