

# 生物的エリシター・キトサンで処理したエンドウにおける $\beta$ -グルコシダーゼの活性化と二次代謝産物誘導

小林昭雄・秋山康紀・牛嶋珠乃・神崎 浩<sup>a)</sup>・河津一儀

(生物資源開発学講座)

Received June 15, 1992

## Activation of $\beta$ -Glucosidase and Accumulation of Secondary Metabolites in Pea Seedlings Treated with a Biotic-elicitor Chitosan

Akio KOBAYASHI, Kohki AKIYAMA, Tamano USHIJIMA,  
Hiroshi KANZAKI<sup>a)</sup> and Kazuyoshi KAWAZU

(Department of Bioresources Chemistry)

The activity of  $\beta$ -glucosidase in pea epicotyls 72 hours after a biotic-elicitor chitosan treatment was about 60-fold higher than in the epicotyls of intact plants. Two kaempferol- $\beta$ -glucosides, a quercetin- $\beta$ -glucoside and a pea phytoalexin pisatin were isolated and characterized from  $\text{CuCl}_2$ -treated seedlings. Pisatin reached maximum levels 72 hours after the chitosan treatment. The kaempferol glucosides accumulated to maximum levels 24 hours after elicitation and disappeared in 48 hours to 72 hours. Twenty-four hours after elicitation, the quercetin glucoside increased to a peak concentration with levels not significantly different from the controls after 86 hours. Since kaempferol and quercetin are not precursors for pisatin biosynthesis, these three glucosides might be utilized for reinforcement of the cell wall.

### 結 言

植物の病原抵抗性において、ファイトアレキシンなどの抗菌性二次代謝産物の誘導・蓄積は病原菌の侵入阻止に大きな役割を果たしている。これら抗菌性化合物は病原菌の侵入時に、生合成酵素をコードしている遺伝子が活性化され、多数の中間体を経て *de novo* 合成される。エリシターはこのような病原抵抗性発現に関与する生理学的・生化学的応答を誘導する物質である。エリシターによるファイトアレキシンの生合成系発現をモデル系として、二次代謝系の遺伝子発現機構に関する研究が数多くなされてきた。

マメ科植物のファイトアレキシンの多くはフェニルアラニンを出発化合物とするフラボノイド系化合物である。植物界には莫大な数のフラボノイドが存在する。その中には糖とグリコシル結合した配糖体として液胞に貯蔵されているものも多い。フラボノイド配糖体の生理学的役割についてはほとんど明らかになっていないが、単に最終生産物として蓄積しているのではなく、アグリコン部分が病原抵抗性において利用されることが示唆されている。自然界に存在するフラボノイド配糖体の大半は  $\beta$ -グルコシドであるので、アグリコン部分の遊離

a) 岡山大学大学院 自然科学研究科 生物資源科学専攻 (Division of Bioresources Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University)

は  $\beta$ -グルコシダーゼによってなされている。しかし、病原抵抗性発現に伴う  $\beta$ -グルコシダーゼの活性の変動についてはほとんど研究例がない。本研究において、我々は植物材料としてエンドウを、エリシターとしてグルコサミンが  $\beta$ -1, 4 結合したキトサンを用い、 $\beta$ -グルコシダーゼの活性化とファイトアレキシンであるピサチンの誘導との相関について精査するとともに、 $\beta$ -グルコシダーゼの作用を受けるフラボノイド配糖体の単離・構造決定を試みたので報告する。

## 材 料 と 方 法

### 1. 無菌条件下でのエンドウの生育

タカヤマシード株式会社より購入したウスイ実喰エンドウ種子を70%エタノールで5分、5%過酸化水素で30分表面滅菌した後、滅菌蒸留水で3回水洗した。この種子を  $\phi 25 \times 200$ mm の試験管中、0.1%塩化マグネシウム(w/v)を含む0.2%ジェランガム固形培地上で暗黒下25°Cで発芽・生育させた。

### 2. キトサンオリゴ糖の調製

25gのキトサンを250mlの4N塩酸に懸濁した。これを湯浴中80°Cで24時間加水分解した。非分解物を遠心分離により除去し、得られた上清を減圧下、濃縮乾固を繰り返すことにより塩酸を除いた。水に再溶解し、活性炭カラムに通して脱色した後、凍結乾燥し、キトサンオリゴ糖混合物を得た。シリカゲル TLC 分析 [MERCK 社 DC-Alfolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 溶媒系 *n*-ブタノール-メタノール-28%水酸化アンモニウム (2 : 3 : 2)] で標品と比較した結果、1~9糖までのキトサンオリゴ糖が確認できた。

### 3. エリシター・アッセイ

任意の濃度に調製したキトサンオリゴ糖混合物水溶液あるいはキトサン懸濁液を  $\phi 18$ mm試験管に1ml入れ、アルミホイルで二重に覆い、120°C、10分間オートクレーブで滅菌した。1.の項で述べた条件で生育させたエンドウ上胚軸からクリーンベンチ内で無菌的に約5mmの長さで植物片を切り出し、試験管に入れ、垂直回転培養器で暗黒下25°Cで24~72時間培養した。対照区には同様に滅菌処理した蒸留水を用いた。

### 4. $\beta$ -グルコシダーゼ・アッセイ

$\beta$ -グルコシダーゼ活性測定は4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-グルコシドを基質として、 $\beta$ -グルコシダーゼにより遊離する4-メチルウンベリフェロンを定量することにより行った。4-メチルウンベリフェロンはアルカリ条件下で蛍光を発するため、高感度分析が可能である。

新鮮重約100mgのエンドウ上胚軸切片を遠心チューブに入れ、10mM EDTA $\cdot$ 2Na, 0.1% Tween 60, 10mM  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む50mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) を400 $\mu$ l 加え、氷冷しつつガラス棒で磨砕・遠心分離し、得られた上清を粗酵素液とした。粗酵素液200 $\mu$ l を4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-グルコシド水溶液800 $\mu$ l の入ったエッペンドルフ・チューブに加え、酵素反応を開始した。反応は37°Cで行い、0, 10, 20, 30分後に100 $\mu$ l 分取し、2.9mlの0.2M 炭酸ナトリウムの入った試験管に注入し反応を停止した。これを JASCO 社 FP-777 Spectrofluorometer を用いて励起波長365nm, 蛍光波長455nm で蛍光強度を測定し、生成した4-メチルウンベリフェロンを定量した。1分間に1 $\mu$ molの4-メチルウンベリフェロンを生成する酵素量を1ユニットとした。タンパク質濃度は BIO-RAD 社 プロテインアッセイを用い、ウシ血清アルブミンをスタンダードとして測定した。

### 5. 二次代謝産物の HPLC 分析

キトサンオリゴ糖混合物で処理したエンドウ上胚軸 (新鮮重約30mg) を5mlのメタノールの入った試験管に入れ、試験管を超音波洗浄器に浸漬して10分間抽出した。エンドウ上胚軸

を試験管から取り出し、抽出液を減圧下、濃縮乾固した。抽出物を500 $\mu$ lのメタノールに溶解し、このうち50 $\mu$ lを分析に供した。HPLC装置はHITACHI L-6200/6210 Intelligent Pump, L-4000 UV Detector, AS-2000 Autosampler, D-2500 Chromato-Integratorを用いた。分析用カラムはGLサイエンス社 Inertsil ODS (カラム・サイズ;  $\phi$ 4.6 $\times$ 250mm, ポアサイズ; 5 $\mu$ m)を用い、ガードカラムとしてMERCK社 LiChrorep RP-18をミニガードカラム( $\phi$ 4 $\times$ 10mm)に充填したものを装着した。溶出はメタノール/水(1%酢酸)系で3/7から9/1への35分間のリニア・グラディエントで行った。流速は0.8ml/minとし、検出波長はUV285nmとした。

#### 6. 塩化第二銅処理したエンドウ実生からのフラボノイド配糖体の精製・単離

エンドウ実生の塩化第二銅処理はSweigardとVanEttenらの方法に若干の修正を加えて行った<sup>1),2)</sup>。塩化第二銅処理したエンドウ実生をメタノールに48時間浸漬した後、メタノールを減圧留去した。得られた水溶液を酢酸エチルで分画し、低極性化合物を水溶液から除去した後、*n*-ブタノールで分画した。得られた*n*-ブタノール抽出物2.08gをWakogel C-200シリカゲルカラムクロマトグラフィーで酢酸エチル-アセトン系でステップ・ワイズ溶出した後、メタノールで溶出することにより精製した。次に、メタノール溶出画分をYMC・GEL ODS-AQ 120-S50カラムクロマトグラフィーで水-メタノール系でグラディエント溶出することにより精製した。40%メタノール溶出区分をさらにWakogel LC・PH-10Hカラムクロマトグラフィーにより水-メタノール系でグラディエント溶出し、結果の3.の項で述べる*t*R19, 20, 22分に相当する化合物がそれぞれ0.82, 4.02, 2.39mg得られた。これらをUV, <sup>1</sup>H-NMR分析に供し、以下のようなデータを得た。

*t*R19分

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm : 205, 265

(MeOH+NaOH) : 208, 273, 328

NMR  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 3.4~4.2 (sugar protons), 5.56 (1 H, d,  $J=7.30\text{Hz}$ ), 6.24 (1 H, d,  $J=2.00\text{Hz}$ ), 6.43 (1 H, d,  $J=2.00\text{Hz}$ ), 6.95 (2 H, d,  $J=8.90\text{Hz}$ ), 8.07 (2 H, d,  $J=8.90\text{Hz}$ )

*t*R20分

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm : 208, 268, 317

(MeOH+NaOH) : 208, 273, 375

NMR  $\delta_{\text{H}}$  (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 3.6~4.2 (sugar protons), 4.4~5.4 (sugar OH-protons), 5.73 (1 H, d,  $J=7.33\text{Hz}$ ), 6.17 (1 H, d,  $J=2.17\text{Hz}$ ), 6.36 (1 H, d,  $J=2.17\text{Hz}$ ), 6.39 (1 H, d,  $J=16.00\text{Hz}$ ), 6.72 (2 H, d,  $J=8.70\text{Hz}$ ), 6.85 (1 H, dd,  $J=8.30\text{Hz}$ ), 7.51 (2 H, d,  $J=8.70\text{Hz}$ ), 7.54 (1 H, d,  $J=16.00\text{Hz}$ ), 7.56 (1 H, dd,  $J=2.41, 8.30\text{Hz}$ ), 7.56 (1 H, dd,  $J=2.41\text{Hz}$ )

*t*R22分

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm : 205, 266, 315

(MeOH+NaOH) : 208, 273, 370

NMR  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 3.6~4.2 (sugar protons), 4.4~5.4 (sugar OH-protons), 5.70 (1 H, d,  $J=7.49\text{Hz}$ ), 6.17 (1 H, d,  $J=2.06\text{Hz}$ ), 6.38 (1 H, d,  $J=15.90\text{Hz}$ ), 6.39 (1 H, d,  $J=2.06\text{Hz}$ ), 6.71 (2 H, d,  $J=8.69\text{Hz}$ ), 6.88 (2 H, d,  $J=8.84\text{Hz}$ ), 7.50 (2 H, d,  $J=8.69\text{Hz}$ ), 7.53 (1 H, d,  $J=15.90\text{Hz}$ ), 8.02 (2 H, d,  $J=8.84\text{Hz}$ )

## 結 果

### 1. キトサン処理したエンドウ上胚軸における $\beta$ -グルコシダーゼ活性のタイム・コース

播種後22日目のエンドウ上胚軸を 4 mg/mlのキトサン懸濁液で処理し, 0, 24, 48, 72, 86 時間後に  $\beta$ -グルコシダーゼ活性を調べた (Fig. 1). キトサン処理区における  $\beta$ -グルコシダーゼ活性は48時間目から72時間目にかけて著しく上昇し, 72時間目から86時間目にはプラトーに達した. この時点での酵素活性は対照区の約22倍であった. 一方, 対照区では72, 86時間目に切り出し直後の上胚軸の約1.5から2.7倍の酵素活性を示したが, その活性はキトサン処理したものに比べると非常に弱かった.

### 2. キトサンオリゴ糖濃度と $\beta$ -グルコシダーゼ活性とのドーズ・レスポンス

播種後14日目のエンドウ上胚軸を32, 63, 125, 250, 500 $\mu$ g/mlの濃度のキトサンオリゴ糖で処理し, 72時間後に  $\beta$ -グルコシダーゼ活性を測定した (Fig. 2). エンドウ上胚軸は250 $\mu$ g/mlの濃度のキトサンオリゴ糖で処理したときに最も高い酵素活性を示し, 500 $\mu$ g/mlでは活性は250 $\mu$ g/mlの約0.7倍と逆に低下した. 125, 63, 32 $\mu$ g/mlのキトサン濃度で処理した上胚軸は500 $\mu$ g/mlより弱い酵素活性しか示さず, 250 $\mu$ g/mlの約0.2から0.3倍であった.

### 3. キトサン処理したエンドウ上胚軸におけるファイトアレキシン・ピサチンとその他のフラボノイド成分の蓄積量のタイム・コース

1. の項において得たエンドウ上胚軸中に含まれるフラボノイド成分を HPLC により分析した (Fig. 3). *tR*32分であるピサチンは切り出し直後の上胚軸には全く存在しないが, キトサン処理によって24時間目から72時間目にかけて著しく増加し, 86時間目には48時間目と同じ蓄積量まで減少した. 対照区においても同様の増加パターンでピサチンが蓄積するが, 蓄積量はキトサン処理したものに比べてはるかに少なかった. *tR*19, 20, 22分に相当する化合物はすべて切り出し直後の上胚軸に存在するが, その蓄積量はピサチンとは全く異なる経時的変動を示した. *tR*19分の化合物はキトサン処理後24時間目に約3倍に増加し, その後急速に減少し, 72時間目には消失した. 対照区においても同様の蓄積パターンで増減するが, インキュベート48時間目ですでに消失している. *tR*20分の化合物もキトサン処理後24時間目

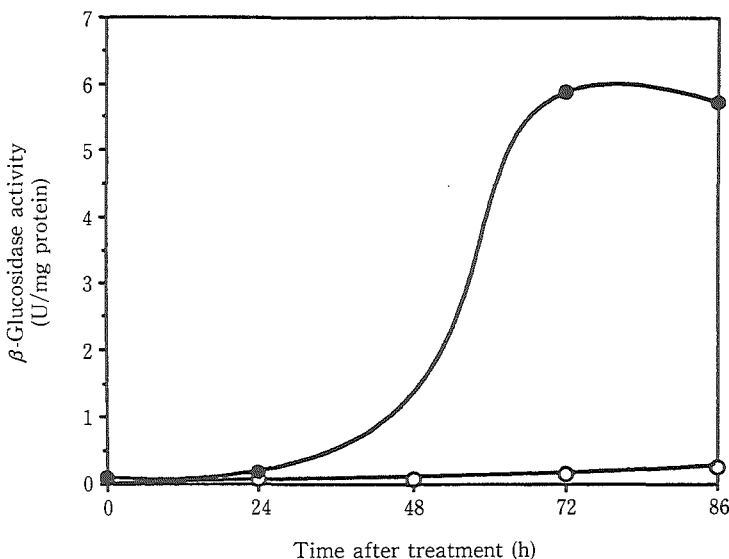


Fig. 1 Time course of  $\beta$ -glucosidase activity.  
—●— +chitosan, —○— control.

に約4倍に増加し, 48時間目には切り出し直後と同量まで減少し, 72時間目に再び増加し, 86時間目には切り出し直後, 48時間目と同量に減少するという複雑な蓄積パターンを示した. 対照区においても24時間目に約2倍に増加するが, その後徐々に減少し, 86時間目には切り出し直後と同量にまで減少している. *tR*22分の化合物はピサチンや *tR*19, 20分の化合物に比べて蓄積量が相対的に少ないが, *tR*19分の化合物

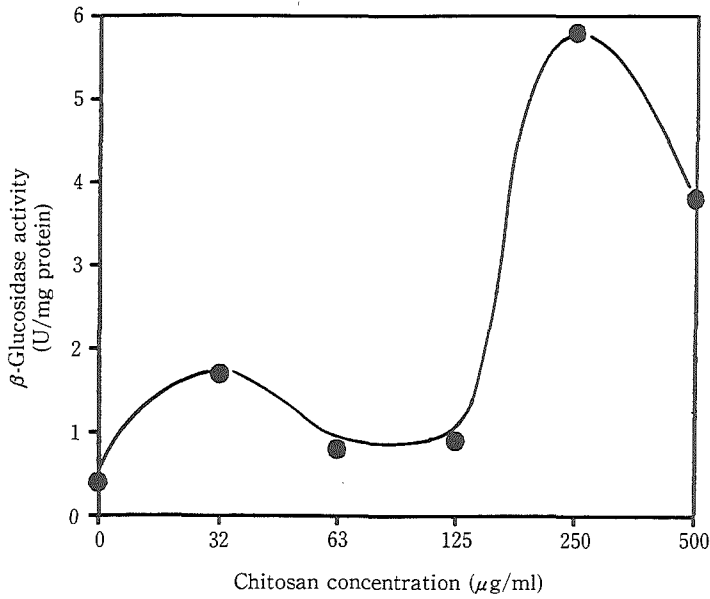


Fig. 2 Dose-response curve for activation of  $\beta$ -glucosidase.

とほぼ同じ蓄積パターンを示した。しかし、対照区においてインキュベート48時間目に、キトサン処理後24時間目に匹敵する蓄積量を示した点が他の化合物とは異なる。

4. *tR*19, 20, 22分に相当する化合物の同定 (Fig. 4)

*tR*19分に相当する化合物の UV スペクトルは 205, 265nm に極大吸収があり、水酸化ナトリウムで塩基性になると、極大吸収が208, 273, 328nm に吸収強度の増加を伴って深色移動した。これは 4'位と7位の水酸基がフ

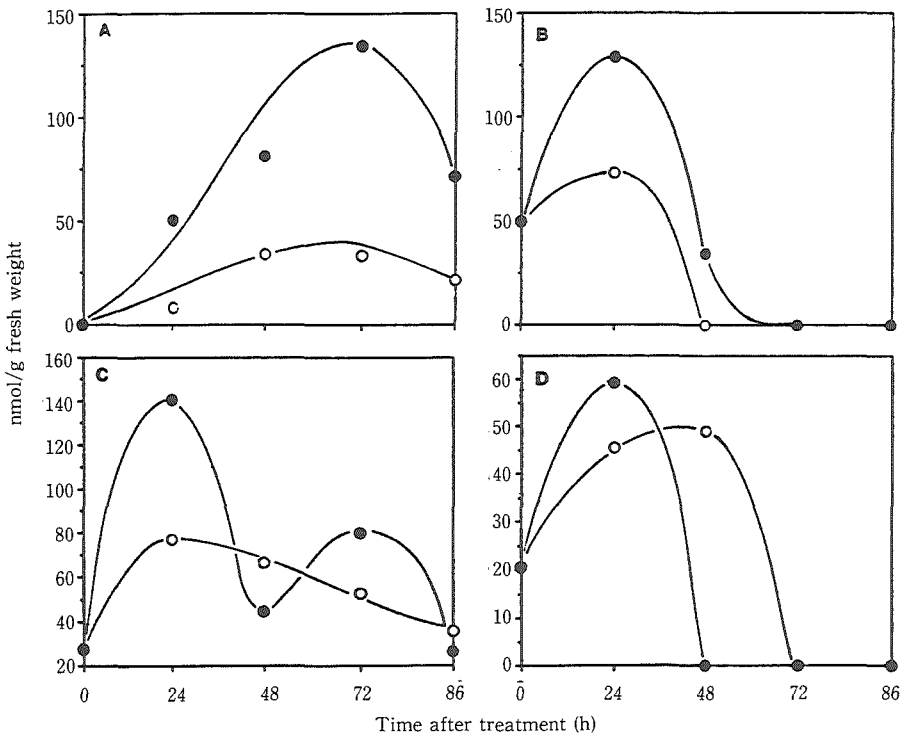


Fig. 3 Accumulation of pisatin (A), kaempferol-3- $\beta$ -glucosyldisaccharide (B), quercetin-3-*p*-coumaroyl- $\beta$ -glucosyldisaccharide (C), and kaempferol-3-*p*-coumaroyl- $\beta$ -glucosyldisaccharide (D) in pea epicotyls. —●— +chitosan, —○— control.

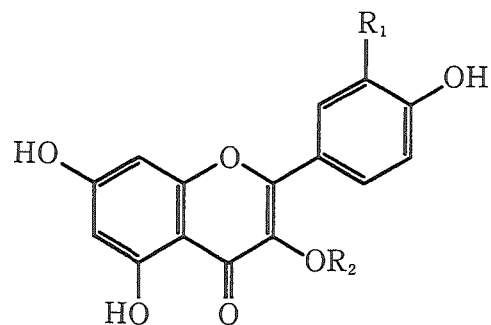
リーで3位の水酸基が置換したフラボノール骨格に特徴的である。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいて芳香族領域における  $J=8.90\text{Hz}$  で  $A_2B_2$ 系カップリングした  $\delta 6.95$ と  $\delta 8.07\text{Hz}$  のピークと  $J=2.00\text{Hz}$  でカップリングした  $\delta 6.24$ と  $\delta 6.43$ はそれぞれフラボノールの B 環の 3', 5'位, 2', 6'位と A 環の 6 位, 8 位に帰属できた。また,  $\delta 3.4\sim 4.2$ に 3糖の存在を示すピークと  $\delta 5.56$ に  $J=7.30\text{Hz}$  でカップリングしたピークが観測されたことから, フラボノールの3位の水酸基に  $\beta$ 結合したグルコースとそれにグリコシル結合した2糖の存在が示唆された。以上の解析から本化合物は kaempferol-3- $\beta$ -glucosyldisaccharide であると推測された。

$tR_{20}$ 分に相当する化合物の UV スペクトルから本化合物がフラボノール骨格を有することが示唆された。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおける芳香族領域の  $J=8.70\text{Hz}$  で  $A_2B_2$ 系カップリングした  $\delta 6.72$ と  $\delta 7.51$ のピークと  $J=16.00\text{Hz}$  でカップリングした  $\delta 6.39$ と  $\delta 7.54$ のピークから *p*-coumaroyl 基の存在が示唆された。また,  $J=2.17\text{Hz}$  でカップリングした  $\delta 6.17$ と  $\delta 6.36$ のピークと  $J=2.41, 8.30\text{Hz}$  で ABX 系カップリングした  $\delta 6.85, \delta 7.56, \delta 7.56$ のピークはそれぞれ A 環の 6 位, 8 位と B 環の 3'位, 2'位, 6'位に帰属できた。 $\delta 3.6\sim 4.2, \delta 4.4\sim 5.4$ のピークから 3糖が存在し,  $\delta 5.73$ の  $J=7.33\text{Hz}$  でカップリングしたピークから3位の水酸基にグルコースが  $\beta$ 結合していることがわかった。以上の解析から本化合物は quercetin-3-*p*-coumaroyl- $\beta$ -glucosyldisaccharide と推測された。

$tR_{22}$ 分に相当する化合物は UV スペクトルから  $tR_{20}$ 分に相当する化合物とほぼ同じクロモフォアを有することが示唆された。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいて芳香族領域に  $J=8.69\text{Hz}$  で  $A_2B_2$ 系カップリングした  $\delta 6.71$ と  $\delta 7.50$ のピークと  $J=15.90\text{Hz}$  でカップリングした  $\delta 6.38$ と  $\delta 7.53$ のピークから *p*-coumaroyl 基の存在がわかる。 $J=8.84\text{Hz}$  で  $A_2B_2$ 系カップリングした  $\delta 6.88$ と  $\delta 8.02$ のピークと  $J=2.06\text{Hz}$  でカップリングした  $\delta 6.17$ と  $\delta 6.39$ のピークはそれぞれ B 環の 3', 5'位, 2', 6'位と A 環の 6 位, 8 位に帰属できた。また,  $\delta 3.6\sim 4.2, \delta 4.4\sim 5.4$ のピークから 3糖の存在が示唆され,  $J=7.49\text{Hz}$  でカップリングした  $\delta 5.70$ のピークから3位の水酸基にグルコースが  $\beta$ 結合していることがわかった。以上の解析から, 本化合物は kaempferol-3-*p*-coumaroyl- $\beta$ -glucosyldisaccharide と推測された。

## 考 察

マメ科植物におけるフラボノイド配糖体の生理学的役割には不明な点が多い。これまでの研究で明らかとなっている配糖体の病原抵抗性に果たす役割の1つにポスト・インヒビチンがある。健全な植物体ではポスト・インヒビチンは不活性な配糖体として液胞に貯蔵されているが, 病原菌の侵入やエリシター処理により活性化されたグリコシダーゼの酵素作用を受け, 抗菌活性を有するアグリコンを遊離する。アルファルファにおける medicarpin-3-*O*-glucoside-6''-*O*-malonate やアカツメクサにおける trifolirhizin のようにファイトアレキシンそのものが, 配糖体として貯蔵されている例もある<sup>3),4)</sup>。ヒヨコマメの培養細胞系や



$tR_{19}$ min:Kaempferol-3- $\beta$ -glucosyldisaccharide  
( $R_1=H, R_2=\beta$ -glucosyldisaccharide)  
 $tR_{20}$ min:quercetin-3-*p*-coumaroyl- $\beta$ -glucosyldisaccharide  
( $R_1=OH, R_2=p$ -coumaroyl- $\beta$ -glucosyldisaccharide)  
 $tR_{22}$ min:Kaempferol-3-*p*-coumaroyl- $\beta$ -glucosyldisaccharide  
( $R_1=H, R_2=p$ -coumaroyl- $\beta$ -glucosyldisaccharide)

Fig. 4 Flavonol glucosides isolated from *Pisum sativum*.

ダイズの子葉において、液胞に蓄積されているファイトアレキシン生合成中間体の配糖体マロン酸エステルが、ファイトアレキシン生合成のためのプールとして機能している可能性が示唆されている<sup>5),6)</sup>。イーストエキス・エリシターで処理したクズの培養細胞においては、イソフラボノイド配糖体マロン酸エステルがリグニンのように細胞壁の強化に使われる可能性があることが報告されている<sup>7)</sup>。

フラボノイド配糖体からのアグリコンの遊離は加水分解酵素であるグリコシダーゼによってなされる。これまで数多くの植物でグリコシダーゼ活性が検出されているが、エリシター処理に伴う活性の変動についてはほとんど調べられていない。フラボノイド配糖体のほとんどは $\beta$ -グルコシドとして存在する。そこで本研究では、キトサンで処理したエンドウ上胚軸における $\beta$ -グルコシダーゼの活性化とそれに伴うフラボノイド配糖体の消長について精査し、病原抵抗性におけるフラボノイド配糖体の役割に関する知見を得ようとした。

エンドウ上胚軸を生物的エリシターであるキトサンで処理すると、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性が顕著に増加し、処理後72時間目にはプラトーに達することがわかった。キトサン処理区に比べて非常に弱いものの、対照区においても72、86時間目に切り出し直後の約1.5から2.7倍の酵素活性が見られた。これは傷害ストレスによるものと推測される。また、1~9糖を含む可溶性のキトサンオリゴ糖でエンドウ上胚軸を処理したところ、250 $\mu$ g/mlの濃度で最も強い $\beta$ -グルコシダーゼ活性を示すことがわかった。一連の実験において、播種後12日目までの若いエンドウ上胚軸をキトサン処理しても $\beta$ -グルコシダーゼは活性化されなかった。

同様にキトサン処理によるピサチン蓄積量の経時的変動について調査したところ、キトサン処理によりピサチンは顕著に誘導・蓄積され、その蓄積量の変動パターンは $\beta$ -グルコシダーゼ活性のそれとパラレルな関係にあった。このことから $\beta$ -グルコシダーゼがピサチンと共に、病原抵抗性においてなんらかの役割を果たしていることが示唆された。

一方、ピサチンの増加とは反対に、キトサン処理によって、減少・消失する3つの高極性化合物が見られた。TLC分析の結果、これらの化合物はフラボノイド配糖体であった。そこでこれらフラボノイド配糖体を塩化第二銅処理したエンドウ実生のメタノール抽出物からクロマトグラフィーにより精製・単離した。得られた量が微量であったため、完全な構造決定には至らなかったが、これら3つの化合物はフラボノールである kaempferol あるいは quercetin の3位の水酸基にグルコースが $\beta$ 結合し、これにさらに2糖が結合した配糖体で、このうち2つの化合物は糖鎖部分に *p*-coumaroyl 基を有していた。これまでエンドウではフラボノール配糖体として kaempferol-3-triglucoside, kaempferol-3-*p*-coumaroyltriglucoside, quercetin-3-*p*-coumaroyltriglucoside が単離・構造決定されている<sup>8)</sup>。kaempferol, quercetin は共にピサチンの生合成中間体ではないため、ピサチンの誘導・蓄積には利用できない。また、メタノリシスによって得られたアグリコン、すなわち kaempferol, quercetin は共に *Bacillus subtilis*, *Aspergillus candidaus* に対して250 $\mu$ g/mlで抗菌活性を示さなかった。

エンドウ上胚軸のフラボノイド成分を HPLC 分析すると、植物年齢の若い上胚軸にはフラボノール配糖体はほとんど存在せず、12日目以降から徐々に見いだされるようになった。 $\beta$ -グルコシダーゼも12日目まではキトサン処理によって活性化されず、それ以降のものでないと活性化されなかった。これは $\beta$ -グルコシダーゼの誘導とフラボノール配糖体の生成に密接な関係があることを示唆している。単離したフラボノール配糖体は *p*-coumaroyl 基を有するため、これらの配糖体はピサチンとリグニン生合成の共通の前駆体である *p*-coumaric acid の供給源として機能するのかもしれない。しかし、ピサチンは7~8日目の比較的若い上胚軸においてもキトサン処理により誘導されたため、ピサチンの生合成系にはリンクしていないと思われる。フラボノール配糖体が完全に消失するキトサン処理72時間後にはピサチン以

外に顕著に増加する成分が見られる。これらを HPLC 分取し、UV スペクトルを測定したところ、それらはすべて kaempferol や quercetin のそれとは異なった特徴を示した。キトサンで処理しなくても72時間目には、処理区と同様に2つの kaempferol 配糖体は消失し、微弱ながら  $\beta$ -グルコシダーゼ活性も検出された。

以上の考察から、エンドウにおいてフラボノール配糖体のアグリコン部分は細胞壁強化に使用されており、フラボノール配糖体はそのプールとして機能している可能性が示唆される。キトサン非処理区における  $\beta$ -グルコシダーゼの活性化と kaempferol 配糖体の消失は、上胚軸の切断面を修復するのに本化合物が使用されるためであろう。キトサン処理により病原抵抗性を発現させた上胚軸での  $\beta$ -グルコシダーゼ活性は非処理区の約22倍である。これは  $\beta$ -グルコシダーゼの活性化が病原抵抗性における細胞壁の強化と正の相関性を持つことを示唆している。今後、フラボノール配糖体が生合成的にどのように変換され、細胞壁強化に寄与するのかを精査し、病原菌に対する物理的防御における役割を証明していく予定である。

### 摘 要

生物的エリシター・キトサンで処理したエンドウ上胚軸における  $\beta$ -グルコシダーゼの活性は、72時間後には処理前の約60倍に達した。塩化第二銅処理したエンドウ実生から2つの kaempferol- $\beta$ -glucoside, quercetin- $\beta$ -glucoside, およびエンドウのファイトアレキシンであるピサチンを精製・単離した。ピサチンはキトサン処理72時間後に最大に達した。kaempferol 配糖体はキトサン処理24時間後に最大に達し、48時間から72時間の間に消失した。quercetin 配糖体はキトサン処理24時間後に最大に達し、86時間後にはコントロールと同じレベルまで減少した。kaempferol と quercetin はピサチン生合成系における前駆体ではないので、これらは細胞壁の強化に利用されていると考えられる。

### 謝 辞

本研究は、平成元年度から3年度までの3年間にわたる岡山大学学内特定研究「生物生産のための細胞選抜と細胞育種」を分担して行ったものである。また、500-MHz  $^1\text{H-NMR}$  測定に際しては岡山大学 SC-NMR 室を利用させていただいた。ともに記して感謝の意を表する。

### 文 献

- 1) Kobayashi, A., Akiyama, K., and Kawazu, K.: A Pterocarpan, (+)-2-Hydroxypisatin from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* (in press)
- 2) Sweigard, J. and VanEtten, H.D.: Reduction in Pisatin Sensitivity of *Aphanomyces euteiches* by Polar Lipid Extracts. *Phytopathology*, **77**, 771-775 (1987)
- 3) Kessmann, H., Edwards, R., Geno, P. W., and Dixon, R.A.: Stress Responses in *Africa* (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, **94**, 227-232 (1990)
- 4) Ingham, J.L.: Phytoalexins and Other Natural Products as Factors in Plant Disease Resistance. *The Botanical Review*, **38**, 343-424 (1972)
- 5) Daniel, S., Hinderer, W., and Barz, W.: Elicitor-induced Changes of Enzyme Activities Related to Isoflavone and Pterocarpan Accumulation in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cell Suspension Cultures. *Z. Naturforsch.*, **43c**, 536-544 (1988)
- 6) Graham, T.L. and Graham, M.Y.: Glyceollin Elicitors Induce Major but Distinctly Different Shifts in Isoflavonoid Metabolism in Proximal and Distal Soybean Cell Populations. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **4**, 60-68 (1991)
- 7) 海老塚豊: ファイトアレキシン・エリシターによる植物二次代謝の活性化. 組織培養**17**(14), 541-546(1991)
- 8) Furuya, M., Galston, A.W., and Stowe, B.B.: Isolation from Peas of Co-factors and Inhibition of Indole-3-acetic Acid Oxidase, *Nature*, **193**, 456-457 (1962)