

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	植物由来12-オキソ-フィトジエン酸の植物ならびに動物細胞における機能に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	中野希
Author(English)	Nozomi Taki-Nakano
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10294号, 授与年月日:2016年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:太田 啓之,久堀 徹,駒田 雅之,中戸川 仁,増田 真二,下嶋 美恵
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10294号, Conferred date:2016/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 28 年度博士論文

植物由来 12-オキソ-フィトジエン酸の

植物ならびに動物細胞における

機能に関する研究

東京工業大学

大学院生命理工学研究科

生体システム専攻

中野 希

指導教員 太田啓之 教授

略語一覧

12-OH-JA	12-ヒドロキシジャスモン酸
15d-PGJ ₂	15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J ₂
6-OHDA	6-hydroxydopamine
AOC	allene oxide cyclase
AOS	allene oxide synthase
APP	amyloid precursor protein
A β	amyloid- β
BAFF	B-cell activating factor
CK2	casein kinase 2
COI1	coronatine insensitive 1
COX	cyclooxygenase
CSF	cerebrospinal fluid
DGR	double glycine domain
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GCLC	glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GCLM	glutamate-cysteine ligase modifier subunit
HO-1	heme oxygenase-1
IAR3	IAA-amino acid conjugate hydrolase IAR3
IKK	I κ B-kinase
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6
ILL6	IAA-amino acid conjugate hydrolase ILR-like 6
iNOS	inducible NO synthase

I κ B α	inhibitory subunit of NF- κ B α
JA	ジャスモン酸
JA-Ile	ジャスモノイルイソロイシン
JMT	JA methyl transferase
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
LDH	lactate dehydrogenase
LPS	lipopolysaccharide
LT β	lymphotoxin β
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MeJA	ジャスモン酸メチル
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridium ions
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NC	ネガティブコントロール
Neh	Nrf2-ECH homology domain
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NO	nitric oxide
NQO1	NADPH quinone oxidoreductase 1
Nrf2	nuclear factor erythroid2 related factor 2
OPC4:0	3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-butyric acid
OPC6:0	3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-hexanoic acid
OPC8:0	3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-octadecanoic acid
OPDA	12-オキシ-フィトジエン酸
OPR3	OPDA reductase 3

ORG	OPDA 特異的応答遺伝子
PG	プロスタグランジン
SOCS	suppressor of cytokine signaling
SOCS-1	suppressor of cytokine signaling-1
SOD1	superoxide dismutase 1
TBS	tris buffered saline
TNF- α	tumor necrosis factor- α
Ub	ユビキチン

第 1 章 序論	1
1.1 植物におけるジャスモン酸類	1
1.2 哺乳類におけるジャスモン酸類	7
1.3 哺乳類におけるプロスタグランジン	8
1.4 抗酸化ストレス応答に関わる Nrf2/kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) システム.....	11
1.5 炎症に関わる NF- κ B 経路	19
1.6 炎症に関わる mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路	22
1.7 神経変性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病) における酸化ストレスと炎症 ..	25
1.8 本研究の目的	31
第 2 章 植物シロイヌナズナにおける 12-オキソ-フィトジェン酸によるジャスモン酸非依存の遺伝子群発現制御	32
2.1 序.....	32
2.2 実験材料と方法.....	34
2.2.1 植物に対する化合物処理と傷害処理	34
2.2.2 RNA 抽出	34
2.2.3 DNA マイクロアレイ	35
2.2.4 マイクロアレイデータ解析	35
2.2.5 ORG、JRG ならびに WRG の抽出.....	35
2.2.6 ノザンブロット	36
2.3 結果.....	37
2.3.1 OPDA 応答遺伝子群	37
2.3.2 ノザンブロットによる ORG の遺伝子発現解析	39

2.3.3	ORG 群の機能的分類	42
2.3.4	傷害応答における ORG の機能	50
2.3.5	COI1 非依存的経路を介した ORG の発現制御	53
2.3.6	OPC8:0 と OPC6:0 による ORG 発現誘導	55
2.4	考察	57
2.4.1	OPDA による JA/MeJA とは異なる独自の遺伝子発現制御	57
2.4.2	傷害応答における OPDA の機能	58
第 3 章 ヒト神経細胞における酸化ストレス誘発細胞障害に対する 12-オキソ-フィトジエン酸		
の保護作用		63
3.1	序	63
3.2	実験材料と方法	65
3.2.1	試薬	65
3.2.2	細胞培養	66
3.2.3	細胞障害性測定	66
3.2.4	活性酸素測定	66
3.2.5	ミトコンドリア膜電位測定	67
3.2.6	イムノブロッティング	67
3.2.7	定量 PCR	68
3.2.8	細胞内グルタチオン量測定	69
3.2.9	ARE レポーターアッセイ	69
3.2.10	siRNA による Nrf2 ノックダウン	69
3.2.11	ユビキチン化アッセイ	70
3.2.12	統計解析	72

3.3 結果.....	73
3.3.1 H ₂ O ₂ 誘発細胞障害の OPDA による抑制	73
3.3.2 H ₂ O ₂ 誘発ミトコンドリア膜電位低下に対する OPDA の保護作用.....	75
3.3.3 H ₂ O ₂ 誘発活性酸素産生に対する OPDA の抑制効果	77
3.3.4 Nrf2 シグナル経路の OPDA による活性化	79
3.3.5 OPDA による抗酸化酵素群の発現誘導	82
3.3.6 Nrf2 シグナル経路を介した OPDA の細胞保護効果.....	86
3.3.7 Nrf2 ユビキチン化の OPDA による抑制	89
3.3.8 OPDA 構造類縁化合物の ARE レポーター活性と細胞保護作用	93
3.4 考察.....	95
 第4章 マウスミクログリア細胞における lipopolysaccharide 誘発炎症に対する 12-オキソ-フ イトジエン酸の保護作用.....	101
4.1 序.....	101
4.2 実験材料と方法.....	103
4.2.1 試薬	103
4.2.2 細胞培養	103
4.2.3 イムノブロッティング	104
4.2.4 定量 PCR.....	105
4.2.5 サイトカインならびに NO の測定.....	105
4.2.6 siRNA による Nrf2 のノックダウン.....	105
4.2.7 統計解析	106
4.3 結果.....	107
4.3.1 OPDA による LPS 誘発炎症性サイトカイン産生の抑制	107

4.3.2	OPDA による LPS 誘発 NO 産生の抑制	110
4.3.3	OPDA の抗炎症作用メカニズム解析—NF- κ B シグナル経路の抑制	112
4.3.4	OPDA の抗炎症作用メカニズム解析—p38 リン酸化の抑制	114
4.3.5	OPDA の抗炎症作用メカニズム解析—SOCS-1 発現誘導	116
4.3.6	OPDA の抗炎症作用メカニズム解析—Nrf2 シグナル経路の寄与	118
4.3.7	15d-PGJ ₂ による LPS 誘導性炎症反応の抑制	121
4.4	考察	123
第 5 章 結語		128
参考文献		134
報文目録		166
謝辞		167

第 1 章 序論

1.1 植物におけるジャスモン酸類

植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) に関する研究は、そのメチルエステル体であるジャスモン酸メチル (MeJA) がジャスミンの香りの主要な成分として 1962 年に発見されたことが始まりである[1]。その後、1980 年代に JA が病傷害応答に関与することが示唆され、JA やその類縁体 (図 1-1 に示すもので、本研究ではこれらをジャスモン酸類と呼ぶ) の研究が盛んとなった。1990 年代半ば以降からは、ジャスモン酸類の生合成遺伝子の同定やジャスモン酸類生合成・非感受性変異体の解析が進み、ジャスモン酸類が多様な生理活性作用を持つことが示された[2]。2000 年代後半以降に、JA の受容体が明らかとなり、JA の情報伝達機構に関する研究も進んだ[3]。

現在考えられているジャスモン酸類の生合成ならびに代謝経路を図 1-1 に示した[3]。ジャスモン類の生合成は、通常、葉緑体等のプラスチド膜のガラクト脂質から、プラスチドに局在するリパーゼにより α -リノレン酸が切り出されることにより開始する[4]。リパーゼにより切り出された α -リノレン酸は、13-lipoxygenase により 13-ヒドロペルオキシリノレン酸へと変換される[5]。13-ヒドロペルオキシリノレン酸は 13-allene oxide synthase (AOS) によりアレノオキシドへと変換される。13-lipoxygenase と AOS はプラスチドに局在すると考えられている[3]。

AOS によって生成したアレノオキシドは非酵素的に α -ケトールや γ -ケトールとなるが、酵素的には allene oxide cyclase (AOC) の環化反応により、12-オキソ-フィトジエン酸 (OPDA) へと変換される[3]。AOC はシロイヌナズナやトマトではプラスチドに局在することが報告されている。OPDA は α -リノレン酸から合成されるが、ヘキサデカトリエン酸を出発物質として同様の経路を経て dinor-OPDA が産生されることも知られており、この dinor-OPDA も後で示す β 酸化経路に提供され、ジャスモン酸類合成の前駆体になる[2]。

OPDA はプラスチドからペルオキシソームへ輸送され、OPDA reductase 3 (OPR3) により OPDA の 5 員環の二重結合が還元され、3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-octadecanoic acid (OPC8:0) となる[3]。OPR3 は、ペルオキシソームに局在することが示されている。OPC8:0 は、OPC 8:0 CoA ligase 1 によってアシル基に CoA が付加され、ペルオキシソームにおける β 酸化経路で、アシル-CoA オキシダーゼ、4 頭酵素、ケトアシル-CoA チオラーゼによって炭素数が 2 個ずつ減少し、3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-hexanoic acid (OPC6:0)、3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-butyric acid (OPC4:0)、JA へと変換される。先に示した dinor-OPDA の場合、OPC6:0 に変換された後に 2 回の β 酸化を受けて JA へと変換される[2]。

JA はさらに代謝されてアミノ酸縮合体となる。JA amino acid synthetase をコードする JAR1 により JA とイソロイシンの縮合体であるジャスモノイルイソロイシン (JA-Ile) が生合成されることが知られており、JAR1 は細胞質に局在する[2]。JA のメチル化は、細胞質に存在すると考えられている JA methyl transferase (JMT) によって行われ、JA からジャスモン酸メチル (MeJA) が生じる[2]。JA-Ile は、IAA-amino acid conjugate hydrolase ILR-like 6 (ILL6) ならびに IAA-amino acid conjugate hydrolase IAR3 (IAR3) により、12-ヒドロキシジャスモン酸 (12-OH-JA) へと変換される[2]。このようにしてジャスモン酸類は生合成されるが (図 1-1)、これらは植物内で多様な生理作用を発揮することが知られている。

ジャスモン酸類の植物における生理機能に関する報告はこれまでに多数なされてきた。その中でも植物が傷害や病害を受けた際の防御応答に、ジャスモン酸類が関与することがよく知られている[3]。植物が傷害、病害といったストレスに晒されると、JA の生合成が誘導され、JA 受容体を介した情報伝達が行われ、JA 応答遺伝子群の発現制御を介して防御応答が生じると考えられている[2]。

例えば、傷害応答に関しては下記の報告がある。トマトの葉に傷をつけたり、JA 処理を行ったりすると局所的、広域的に JA 合成が誘導され、JA 応答遺伝子であるプロテアーゼイ

ンヒビターの遺伝子ならびにタンパク質の発現が誘導される[2]。プロテアーゼインヒビターは害虫の消化酵素の働きを阻害し、害虫の成長を妨げるため、結果的に植物を害虫から防御することにつながる。ジャスモン酸類の生合成に関わる因子の変異体や情報伝達に関わる因子の変異体では、このような防御応答が起こらず、食虫害の被害を受けることが知られている[2]。病害応答に関しては、病原体感染と同様な応答を引き起こすエリシターを処理すると、JA が蓄積し、JA 応答遺伝子の発現を介してアルカロイドといった病害抵抗性因子の蓄積が起こることが報告されている[2]。JA は病害抵抗性物質の産生を誘導することで、病原体に対する抵抗性を示すと考えられている。

ジャスモン酸類はこのようにストレスに対する防御応答に関わっている他、老化の促進、花の形成等に関与することが知られている[3]。

更に、ジャスモン酸類の中で、OPDA ならびに 12-OH-JA に関しては特徴的な活性として下記のことが報告されている。

Bryonia dioica の蔓の巻きつき時に OPDA の内在的な量が一時的に増加し、蔓の巻きつきに対する活性はジャスモン酸より OPDA の方が強いことが報告されている[6]。また、病害応答時に、OPDA がジャスモン酸とは異なる遺伝子発現制御を担い、防御応答に関与していることが示唆されているが、詳細はよく分かっていない[7]。12-OH-JA は、ジャガイモにおける塊茎形成を誘導することが知られている。12-OH-JA はグルコシド体で塊茎形成部位まで輸送され、その後糖部分が切断され 12-OH-JA となる可能性が報告されている[2]。

JA の受容と情報伝達機構は、シロイヌナズナにおける JA への感受性が低下した変異体の解析から明らかにされてきた。*coronatine insensitive 1 (coi1)* 変異体は JA に対して非感受性で、JA による遺伝子発現応答がほとんど起こらなくなり、JA 生合成変異体と同様に雄性不稔の表現型を示す。*coi1* 変異体の解析から *COI1* は SCF 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成因子である F-box タンパク質をコードし、JA 情報伝達の特異的な抑制因子である JAZ タンパク質と共に JA 情報伝達に重要な役割を果たすことが明らかにされている[8]。

jai3 変異体では JA に対する感受性が低下しており、その原因遺伝子は、ZIM ドメインと Jas ドメインを持つ JAZ タンパク質ファミリーの 1 つの JAZ3 であると報告されている[9]。種々のストレス刺激により生体内の JA-Ile 濃度が上昇すると、JAZ タンパク質は、Jas ドメインを介して JA-Ile 依存的に COI1 と結合し、COI1-JAZ 複合体を形成する。JAZ タンパク質は、SCF-COI1 複合体によりユビキチン化され、26S プロテアソームによって分解される。この時、JAZ と結合していた転写因子が JAZ と解離し、JA 応答遺伝子の発現が制御されるようになる[9] (図 1-2)。OPDA や JA、MeJA は COI1-JAZ 複合体形成を引き起こさないことから、現在では JA-Ile が受容体に結合する活性型 JA であると考えられている[2]。

このように植物におけるジャスモン酸類に関しては、その生合成経路、生理活性作用、情報伝達に関して多くの研究がなされてきた。しかしながらその研究の大部分は JA や MeJA、JA-Ile に関するものであり、その生合成中間体である OPDA に関しては研究の歴史が浅い。そのため OPDA の生理作用の詳細は不明であり、ジャスモン酸類全体の理解を深めるうえで OPDA の機能の解明は重要であると考えられる。

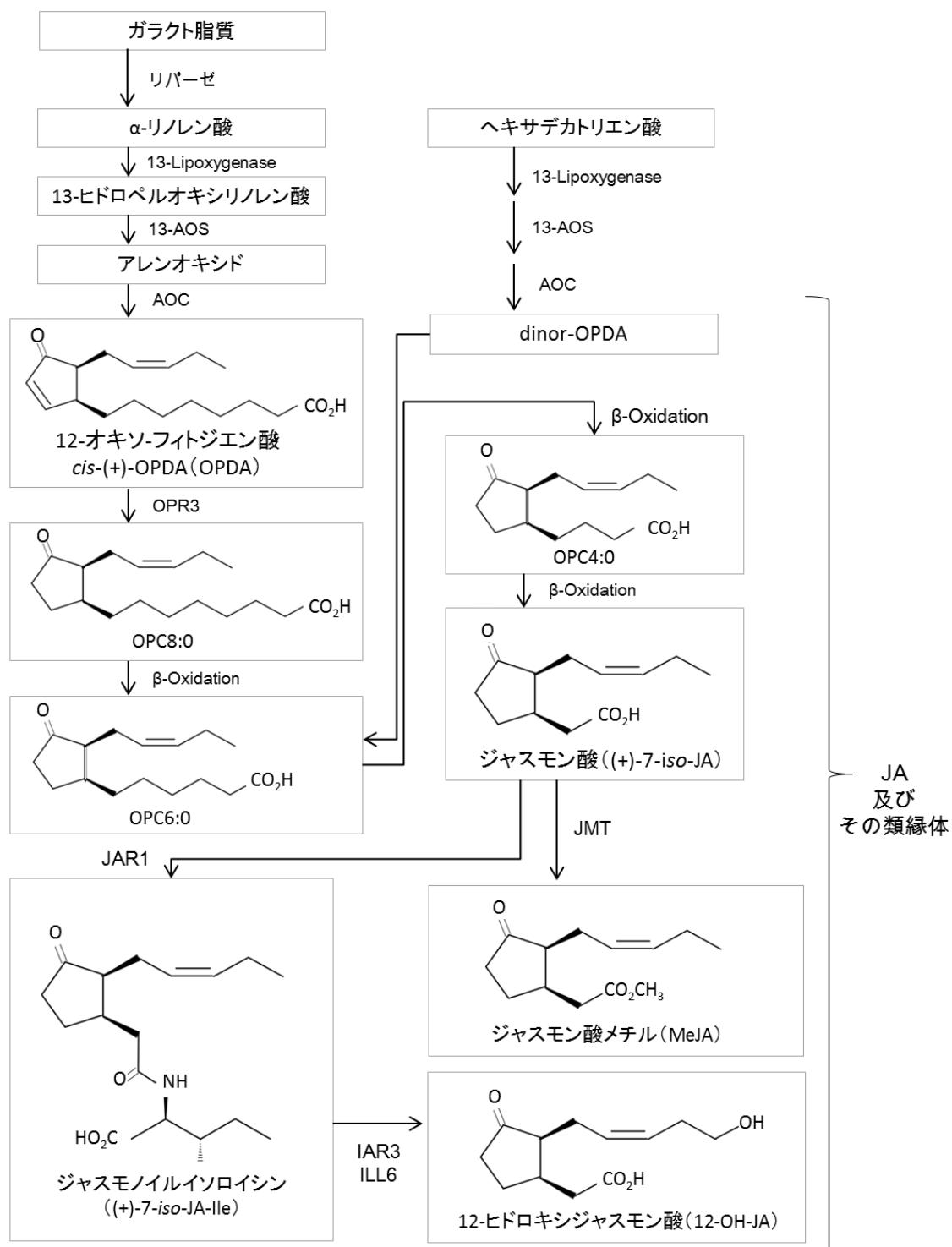


図 1-1. ジャスモン酸類の生合成・代謝経路

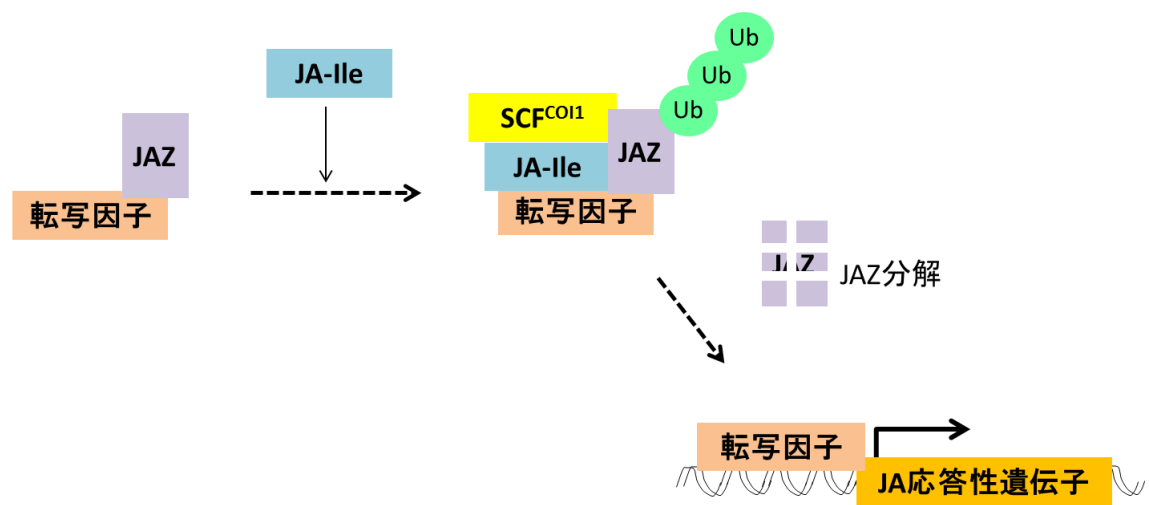


図 1-2. ジャスモン酸情報伝達の模式図

1.2 哺乳類におけるジャスモン酸類

ジャスモン酸類は植物内で生合成されるが、哺乳類の体内で生合成されるという報告はない。しかしながら、ヒトを始め哺乳類が食材として植物を摂取することから、哺乳類に対するジャスモン酸やジャスモン酸メチル、あるいは化学合成によって得られたそれらの誘導体の生理作用に関しては 2000 年代からいくつかの研究がなされている[10]。

哺乳類におけるジャスモン酸類の生理作用に関して最も研究がなされている分野は抗癌作用である[11-13]。2002 年に、JA と MeJA が、正常なヒトリンパ球に対しては変化を与えず、かつ、リンパ芽球性白血病のリンパ球に対しては細胞死を引き起こす抗癌作用があるとの報告がなされた[14]。この報告を初めとして、ジャスモン酸類は肺癌、前立腺癌、乳癌といった癌細胞に対して抗癌作用を持つことが分かってきた[15]。ジャスモン酸類に認められる抗癌作用メカニズムに関しては、ミトコンドリアへ障害を与えることにより引き起こされる細胞死や、アポトーシス促進性タンパク質と活性酸素発生を誘導することによる細胞死が関与しているのではないかと考えられている[16-18]。

ジャスモン酸類の抗炎症作用に関しても報告がなされており、MeJA から人工的に合成された非天然のジャスモン酸誘導体である methyl 4,5-didehydrojasmonate が、マウスのマクロファージ細胞において lipopolysaccharide (LPS) により惹起された nitric oxide (NO)、interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) といった炎症性メディエーターの産生を抑制することが報告されている[19]。ジャスモン酸類に関しては、抗癌作用や抗炎症作用の他に、抗うつ作用や鎮痛作用に関しても報告がなされている[20, 21]。

このように哺乳類におけるジャスモン酸類の研究はいくつかなされているものの、植物における膨大な報告と比べ極めて少なく、様々な面からの解析が期待されている。

1.3 哺乳類におけるプロスタグランジン

哺乳類ではジャスモン酸類が生合成されるとの報告はないが、ジャスモン酸類と構造がよく似た生理活性物質であるプロスタグランジン (PG) が生合成される[22]。プロスタグランジンとしてはプロスタグランジン D₂ (PGD₂)、プロスタグランジン E₂ (PGE₂)、プロスタグランジン F_{2a} (PGF_{2a})、プロスタグランジン I₂ (PGI₂)、プロスタグランジン J₂ (PGJ₂) 等が知られている[23]。プロスタグランジンの生合成は、細胞膜のリン脂質からホスホリパーゼ A2 によりアラキドン酸が切り出され、アラキドン酸から cyclooxygenase (COX) によりプロスタグランジン H₂ (PGH₂) が生じることから始まる (図 1-3) [23]。COX には COX-1、COX-2 の 2 つのアイソフォームが存在する[23]。COX-1 は恒常的に全身に発現しているのに対し、COX-2 は定常状態では主に脳と腎臓に発現している。COX-1 は刺激等でその発現が誘導されることはないが、COX-2 は炎症時に発現が誘導され、炎症性疾患と強く関連していることが知られている[23]。PGH₂ からは、PGD 合成酵素、PGE 合成酵素、PGF 合成酵素、PGI 合成酵素により、それぞれ PGD₂、PGE₂、PGF_{2a}、PGI₂ が生じる[23]。さらに PGD₂ から非酵素的反応により、PGJ₂ ならびに 15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ (15d-PGJ₂) が生じる[24]。PGD₂、PGE₂、PGF_{2a}、PGI₂ は、GPCR と呼ばれる G タンパク質共役型受容体である PGD 受容体、PGE 受容体、PGF 受容体、PGI 受容体にそれぞれ結合し、その下流の情報伝達を介して生理活性作用を示す[25]。15d-PGJ₂ は核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor γ のリガンドであることが報告されている[24]。

プロスタグランジンは多様な生理活性作用を持っており、急性炎症、疼痛、発熱、喘息、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ、神経変性疾患、肺の線維化、炎症性腸炎、胸腺やリンパ球の発達等に関わることが報告されている[25-35]。

15d-PGJ₂ はジャスモン酸類の中でも特に OPDA とよく似た構造を持っている (図 1-1、1-3)。15d-PGJ₂ に関しては、peroxisome proliferator-activated receptor γ のリガンドであることが報告されて以降研究が進み、種々の生理作用を持つことが明らかとなってきた。例えば、

15d-PGJ₂による転写因子の nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) (1.4 節に記載) の活性化を介した、酸化ストレス刺激誘発の細胞死に対する抑制作用に関しては複数の報告がなされている[24, 36, 37]。また、nuclear factor-kappa B (NF-κB) シグナル経路 (1.5 節に記載) の阻害作用などを介した抗炎症作用に関しても報告がなされている[38-41]。

OPDA は 15d-PGJ₂ とよく似た構造を持つことから、OPDA が哺乳類細胞に対し 15d-PGJ₂ のような生理作用を示す可能性も考えられる。

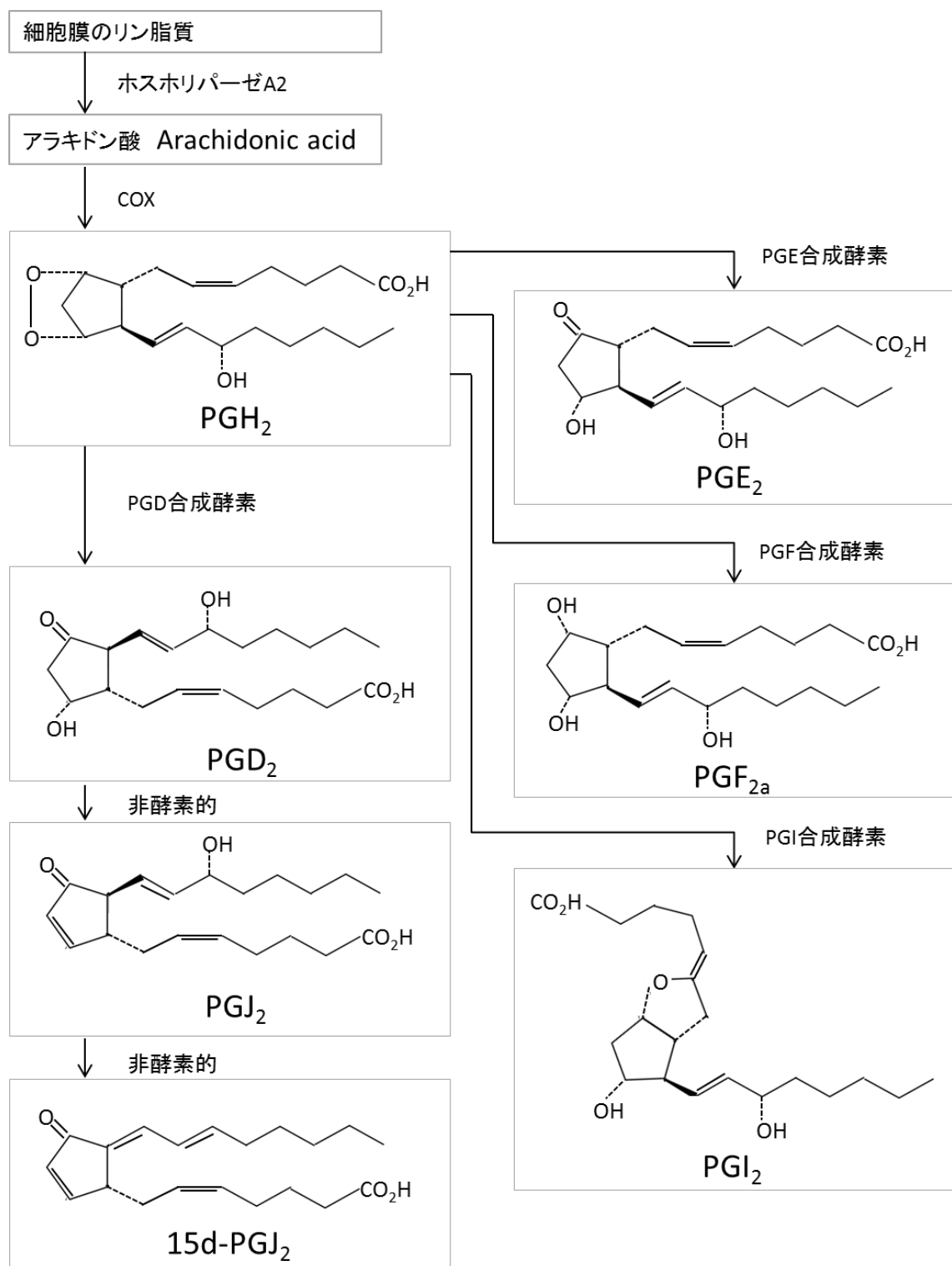


図 1-3. プロスタグランジンの生合成経路

1.4 抗酸化ストレス応答に関わる Nrf2/kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) システム

1.3 節に述べたように、15d-PGJ₂ が持つ抗酸化ストレス作用のメカニズムの1つとして Nrf2 の活性化が知られている。Nrf2/Keap1 システムは、細胞の種類を問わず普遍的に存在し、抗酸化ストレス応答を担う遺伝子群の制御に中心的な役割を果たしている[42]。Nrf2 は bZIP 構造を持つ転写因子であり、定常状態では細胞質に存在しユビキチンリガーゼのアダプター分子である Keap1 によりユビキチン化を受け分解されている。一方、酸化ストレス等の刺激下では、Nrf2 は Keap1 による制御から外れて核に蓄積し、antioxidant responsive element : ARE 配列 (コア配列 : RGTGACNNNGC、R は A/G、N は A/G/C/T) に結合し[43]、ARE 配列をプロモーター領域に持つ遺伝子群 (Nrf2 標的遺伝子群) の発現を誘導することで、抗酸化ストレス応答を引き起こす[44] (図 1-4)。Nrf2 標的遺伝子としては heme oxygenase-1 (HO-1)、glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)、NADPH quinone oxidoreductase (NQO1)、glutathione reductase、glutathione peroxidase、thioredoxin などが知られており、いずれも解毒代謝や活性酸素除去に関わっている (図 1-5) [42, 45-49]。Nrf2 ノックアウトマウスはこれらの遺伝子を活性化することができないために抗酸化ストレス応答を誘導できず、様々な酸化ストレス疾患に対し重篤な症状を示すことが報告されている[42]。以上のことから Nrf2 は生体防御機構を担う点で重要な転写因子であると考えられる。

細胞内の Nrf2 制御には Keap1 が重要な役割を担うことが報告されている。Nrf2 と Keap1 の結合様式については以下のことが知られている。Nrf2 には種間で保存された領域 Nrf2-ECH homology domain (Neh) 1-6 が存在する (図 1-6)。このうち Keap1 との結合に必須とされるのは、N 末端の Neh2 である。Neh1 はロイシンジッパー領域を持ち、DNA 結合ならびに Nrf2 の核への移行に重要な領域であり、Neh4 および Neh5 は転写活性化ドメインとして機能する領域であることが知られている[42]。Keap1 は N 末端に BTB ドメインを、C

末端に double glycine domain (DGR) ドメインを持つタンパク質であり、DGR ドメインが Neh2 との相互作用に重要であることが示されている (図 1-6) [44]。一方 BTB ドメインは、Keap1 の 2 量体形成に関与しており、Keap1 は 2 量体で Nrf2 と相互作用しているとの報告がなされている[50] (図 1-4、1-6)。さらに X 線結晶構造解析や核磁気共鳴解析などから、Neh2 内の酸性アミノ酸に富んだ DLG モチーフおよび ETGE モチーフが Keap1 との相互作用に関わっていること、Neh2 は Keap1 の DGR ドメインによって形成される 6 面体の β プロペラ構造ポケット内部に相互作用し、特に Keap1 の 380、415、483 番目の塩基性アミノ酸であるアルギニンに相互作用していることが報告されている (図 1-4、1-6) [44]。結合強度に関しては、ETGE モチーフと Keap1 の結合の方が DLG モチーフと Keap1 の結合より強いことが分かっている[44]。現在は Nrf2 と Keap1 の結合様式に関して、Keap1 の 2 量体のポケットそれぞれに Nrf2 の ETGE モチーフ、DLG モチーフの 2 つの結合モチーフが相互作用し、2 分子の Keap1 に対して 1 分子の Nrf2 が結合するという two site recognition モデルが提唱されている (図 1-6) [44]。

Keap1 は定常状態では Cullin3 ユビキチンリガーゼ複合体における基質認識のアダプター分子として働き、Nrf2 をプロテアソーム依存的に分解する[51] (図 1-4)。この際に Neh2 ドメインの DLG モチーフと ETGE モチーフの間に連続して存在するリジンがユビキチン化される。具体的には Nrf2 のアミノ酸 44、50、52、53、56、64、68 番目に位置するリジンと考えられている[52]。酸化ストレスや求電子性化合物は Keap1 の立体構造を変化させ、Keap1 と Nrf2 との相互作用を減弱させることで Keap1 による Nrf2 のユビキチン化分解制御を抑制し、Nrf2 の活性化 (新規に合成された Nrf2 の核内蓄積→Nrf2 標的遺伝子群誘導→抗酸化ストレス応答) を引き起こすことが知られている[42, 45, 53-56] (図 1-4)。これまでに、Nrf2 を活性化する求電子性化合物として、*tert*-butyl hydroquinone、sulforaphane、dexamethasone mesylate、15d-PGJ₂、4-hydroxy nonenal 等が知られており、それらは Keap1 の BTB と DGR ドメインの間に位置する IVR 領域に含まれるシステインに結合し、Keap1 の構造を変化さ

せると考えられている（表 1-1）[57]。

Nrf2 が活性化すると、Nrf2 標的遺伝子の発現が上昇し、抗酸化作用や解毒作用が誘導される。Nrf2 標的遺伝子である glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) と glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) はグルタチオン合成の律速酵素である γ -glutamylcysteine synthetase を構成する。GCLC は約 600 アミノ酸から、GCLM は 300 アミノ酸から成っている。活性中心は GCLC に存在するが、活性の発現には GCLM の存在が不可欠であると考えられている[58]。GCLC、GCLM の発現が上昇すると生体内のグルタチオン合成が誘導される。グルタチオンは分子量 307 のトリペプチドから成り、細胞普遍的に mM オーダーの濃度で存在する[59]。細胞内に存在するグルタチオンの主な役割は、細胞内のレドックス状態を適切に保つために、グルタチオンペルオキシダーゼと協調して H_2O_2 を H_2O に変換させることと、タンパク質のチオール基が酸化されるのを保護し機能維持に働くこと、と考えられている[59, 60]。これらの反応が起こる過程でグルタチオンは酸化型のグルタチオンへと変換される。酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンへ戻す反応を担う酵素が glutathione reductase である[59]。Glutathione peroxidase と glutathione reductase も Nrf2 標的遺伝子であることが報告されている[42]。グルタチオンの低下は、神経変性疾患であるアルツハイマー病（1.7 節に記載）やパーキンソン病（1.7 節に記載）の増悪化に関わる可能性が報告されている[61]。

HO-1 も Nrf2 標的遺伝子として広く知られている。HO-1 は heme を biliverdin、一酸化炭素 (CO)、鉄に分解する酵素である[62, 63]。heme は大量に存在すると細胞に対して酸化ストレスを引き起こすため、HO-1 がそれを防御していると考えられている。biliverdin は biliverdin reductase により bilirubin に還元される。biliverdin と bilirubin は、高い抗酸化能を示し細胞を酸化ストレスから保護する作用を持つことや、抗炎症作用を持つことが知られている[63]。また、CO も抗炎症作用に関わることを報告されている[62]。HO-1 は脳において、神経変性疾患の発症や進展を防いでいることが報告されている[64, 65]。

Nrf2 標的遺伝子としては他に、キノンの解毒化を引き起こし、細胞内の nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) 濃度を上昇させることにより抗酸化ストレス応答に関わる NQO1[66, 67]、活性酸素の除去に関わる catalase や superoxide dismutase (SOD)、peroxiredoxin、異物代謝に関わる glutathione transferase、細胞内レドックス制御タンパク質である thioredoxin 等が知られている[42]。そのため Nrf2 を活性化することは、網羅的な抗酸化応答を引き起こし、細胞を酸化ストレスから保護する極めて重要な生体防御につながると考えられる。

酸化ストレスが病因の 1 つとされる神経変性疾患と Nrf2 との関連性については多数の報告がなされている。[68]。Nrf2 ノックアウトマウスに対して神経変性疾患モデルを作製すると、神経細胞死の増加といった症状が認められる。例えば、パーキンソン病 (1.7 節に記載) に関しては、Nrf2 ノックアウトマウスに対し、パーキンソン病モデルとして 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) や 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を投与すると、野生型に比べて酸化ストレスが増強し、神経細胞死が増加することが報告されている[69]。一方で、Nrf2 の活性化が酸化ストレスによる神経細胞障害を保護するとの報告が多数なされている[70-77]。このような知見から Nrf2 の活性化は神経変性疾患の病態を抑制する可能性が示唆されている。

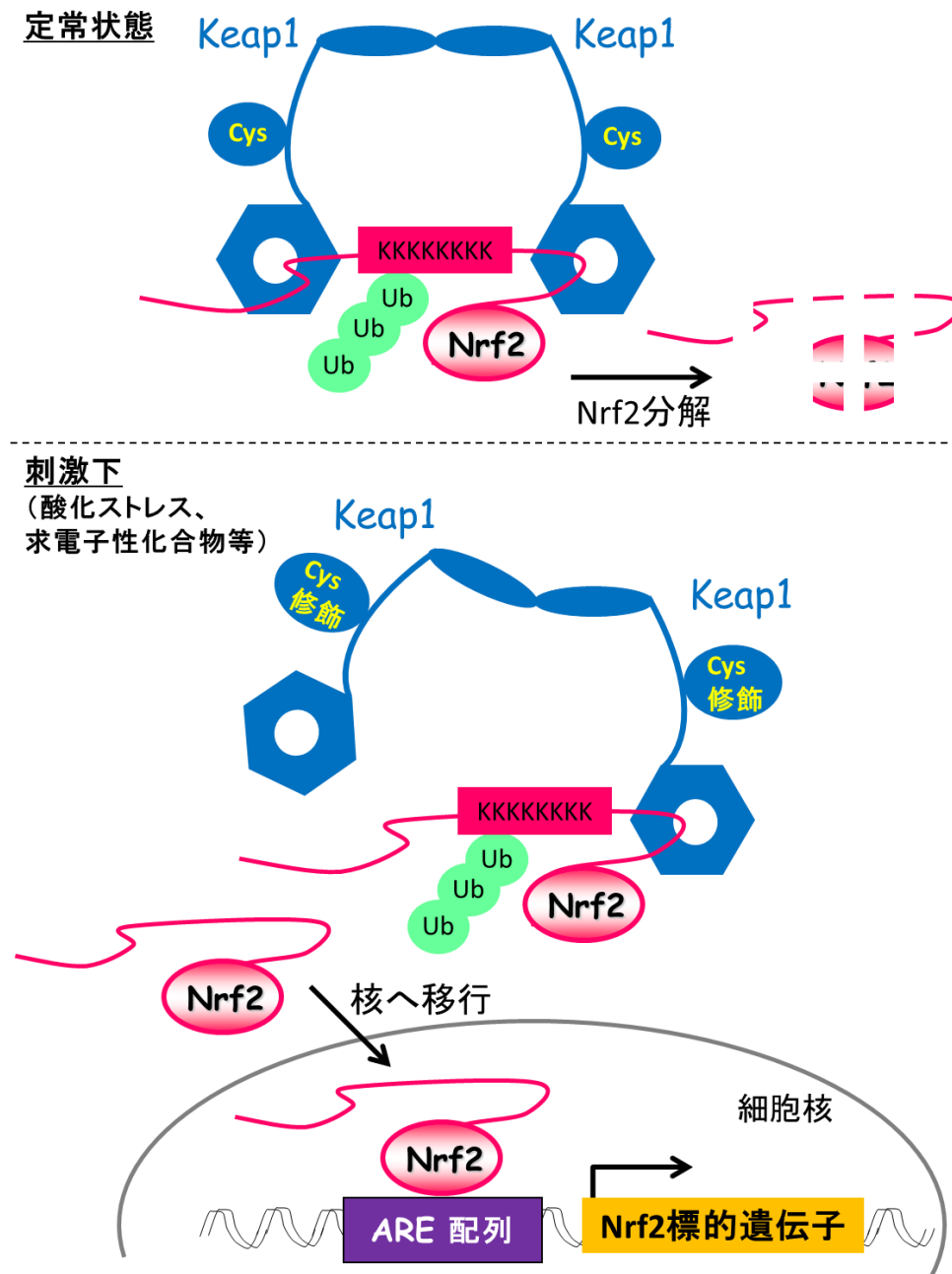


図 1-4. Keap1 による Nrf2 の制御

定常状態において、Nrf2 は Keap1 によりユビキチン化を受け分解される。刺激下では、Keap1 の Cys が修飾を受けて Keap1 の構造が変化し、Nrf2 は Keap1 の制御から外れて核へ移行し、ARE 配列に結合して Nrf2 標的遺伝子の発現を誘導する。

Tong らの論文[78]の図 5 を元に作成した。

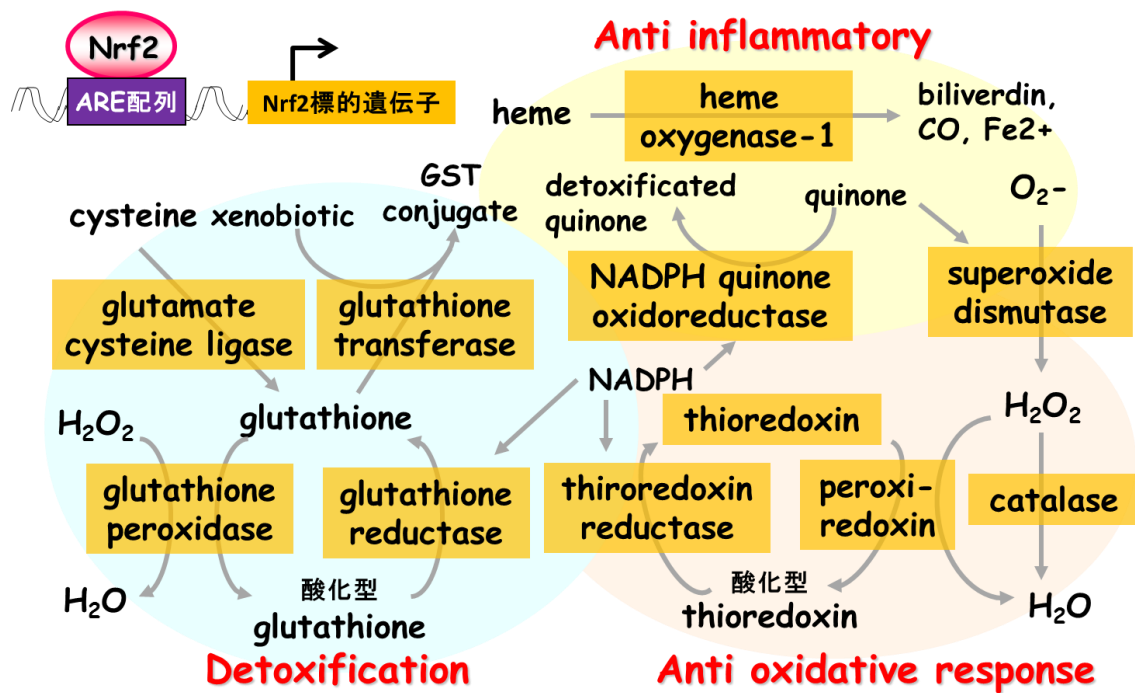


図 1-5. Nrf2 標的遺伝子群

四角で囲んだ遺伝子群は Nrf2 により発現が誘導されることが報告されており、Nrf2 が活性化することで、抗酸化応答、解毒作用、抗炎症作用が引き起こされる。

鈴木らの総説[79]の図 2 を元に作成した。

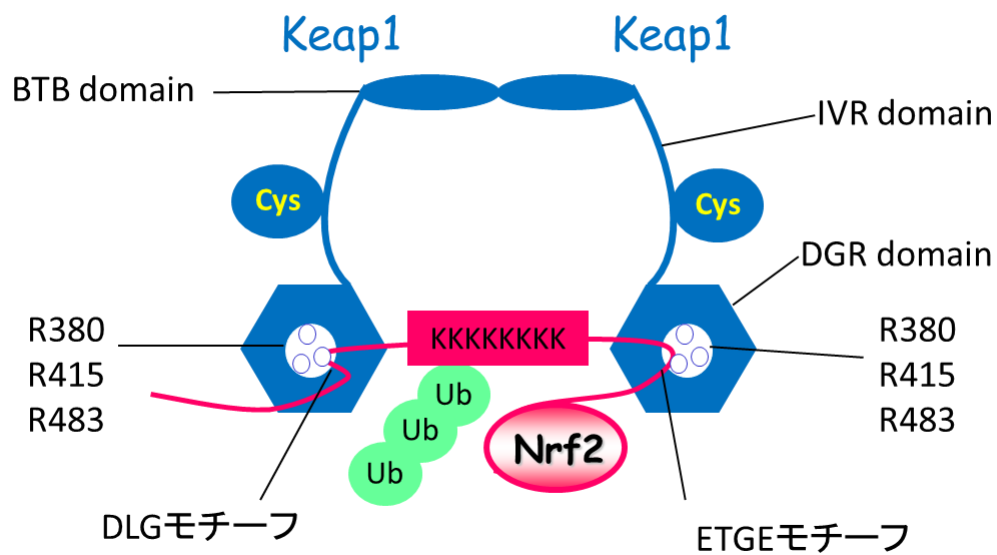
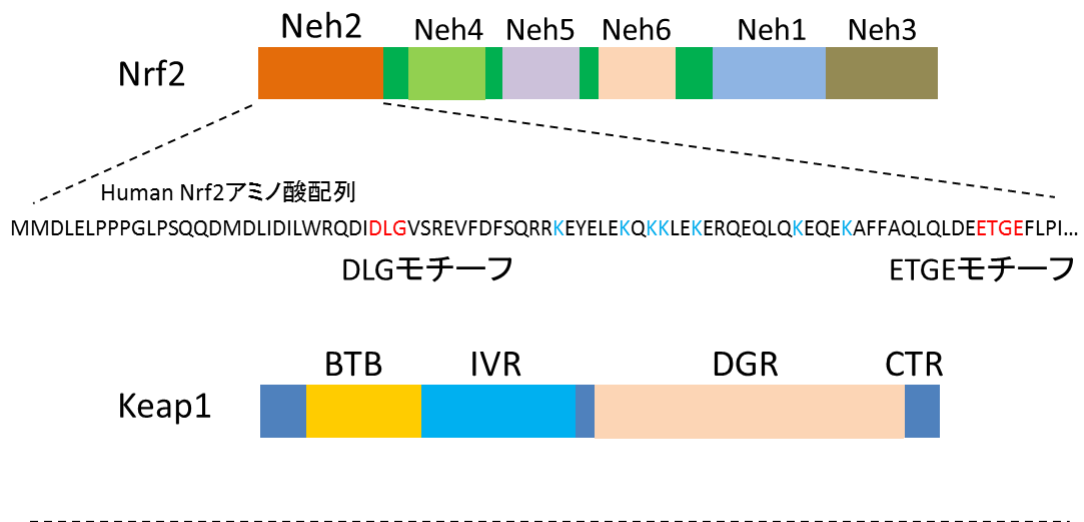


図 1-6. Nrf2 と Keap1 の構造、両者の結合様式 (two site recognition モデル)

Nrf2 と Keap1 内の各ドメインの位置を示す。Neh2 ドメインの配列には DLG モチーフ（上図赤字）と ETGE モチーフ（上図赤字）が含まれ、その間の領域にユビキチン化される連続リジン（上図青字）が存在する。Nrf2 の ETGE モチーフと DLG モチーフが、Keap1 の DGR ドメイン内の R380、R415、R483 と相互作用することで、両者が結合する。

鈴木らの総説[79]の図 3 を元に作成した。

表 1-1. Keap1 のシステインを修飾する化合物とその修飾位置

Class	修飾するKeap1の システインの位置	化合物
Class I	151	<i>tert</i> -butyl hydroquinone、 sulforaphane、 dexamethasone mesylate
Class II	288	15d-PGJ ₂
Class III	151/273/288	4-hydroxy nonenal、As ²⁺
Class IV	上記以外	Cd ²⁺ 、Zn ²⁺ 、H ₂ O ₂

1.5 炎症に関わる NF- κ B 経路

1.3 節で述べたように、15d-PGJ₂ の抗炎症作用のメカニズムの 1 つとして、NF- κ B シグナルの抑制が報告されている。また一般的に、NF- κ B シグナルの活性化は炎症の惹起に中心的な役割を果たすことが知られている。

NF- κ B は哺乳類に存在する 5 種類のタンパク質のホモまたはヘテロ二量体の転写因子の総称であり、最も有名なものは p65 と p50 のヘテロ二量体である[80]。NF- κ B は炎症反応を広く引き起こし、極めて重要な役割を持つことが知られている。NF- κ B は定常状態では細胞質に存在するが、何らかの刺激で活性化されると核へ移行し、NF- κ B 標的遺伝子の発現を制御する[80]。

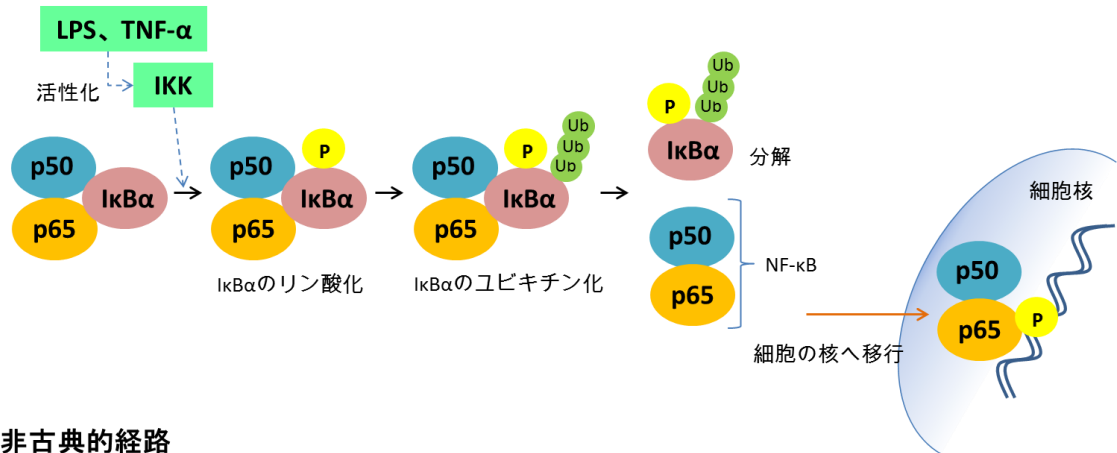
NF- κ B の活性化経路の代表的なものとして、古典的経路、非古典的経路、非典型経路の 3 種類が知られている (図 1-7) [80]。古典的経路では、LPS や TNF- α 等が I κ B-kinase (IKK) を活性化し、IKK が inhibitory subunit of NF- κ B α (I κ B α) をリン酸化することで I κ B α のユビキチン化を引き起こし、I κ B α はプロテアソーム依存的に分解される[80, 81]。その結果、p65 と p50 のヘテロダイマーから成る NF- κ B が活性化され核へ移行することが知られている。さらに p65 のリン酸化がなされるが、これは転写活性を上昇させると考えられている[80]。非古典的経路では、lymphotoxin β (LT β)、B-cell activating factor (BAFF)、CD40 等が IKK を活性化し、IKK が p100 の N 末端ならびに C 末端に存在するセリンをリン酸化し、p100 がユビキチン化を受けて分解され、p52 と RelB のヘテロダイマーから成る NF- κ B が活性化され、細胞質から核へ移行することが知られている[80]。非典型経路では、UV 等による DNA 損傷が casein kinase 2 (CK2) を活性化し、I κ B α の C 末端領域にあるセリンをリン酸化することで I κ B α のユビキチン化分解を促進し、p65 と p50 のヘテロダイマーから成る NF- κ B が活性化され核へ移行することが知られている[80]。

活性化され核へ移行した NF- κ B は、 κ B コンセンサス配列 (GGGRNYYYCC、R は A/G、Y は C/T、N は A/G/C/T) に結合し、 κ B コンセンサス配列をプロモーター領域にもつ NF- κ B

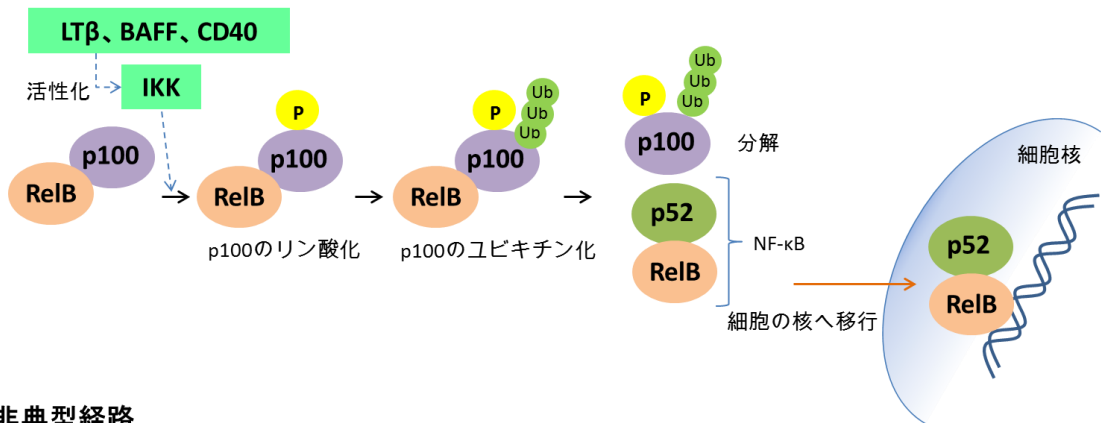
標的遺伝子群の発現を誘導する[82]。NF- κ B 標的遺伝子群としては、COX2、inducible NO synthase (iNOS) といった酵素の他、IL-1、IL-8、IL-6、TNF- α といったサイトカイン、ケモカインが知られており、炎症応答や免疫応答に関わる遺伝子群が多数含まれる[83, 84]。神経変性疾患のアルツハイマー病やパーキンソン病、筋委縮性側索硬化症、脳梗塞、ハンチントン病といった疾患では、恒常的に NF- κ B 経路が活性化しており、強い炎症反応が引き起こされることで病態の進展に寄与していると考えられている[81, 85-90]。例えばアルツハイマー病 (1.7 節に記載) においては、患者の脳内の神経原線維やプラーク周辺等で NF- κ B の活性化が認められている[81, 91, 92]。またアルツハイマー病のモデル動物である、amyloid- β (A β) の前駆体を発現させた Tg2576 トランスジェニックマウスにおいては、脳内における NF- κ B の活性化が報告されており、A β の沈着に関与していると考えられている[81, 93]。脳内では、NF- κ B は神経細胞において発現が認められる他、免疫応答を担うミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトといったグリア細胞 (図 1-10) に発現が認められ、特にグリア細胞における NF- κ B の活性化が炎症を引き起こし、病態に関連している可能性が報告されている[81]。

このように NF- κ B の活性化は、神経変性疾患をはじめとした疾患の発症や進展に関わっていると考えられる。

古典的経路



非古典的経路



非典型経路

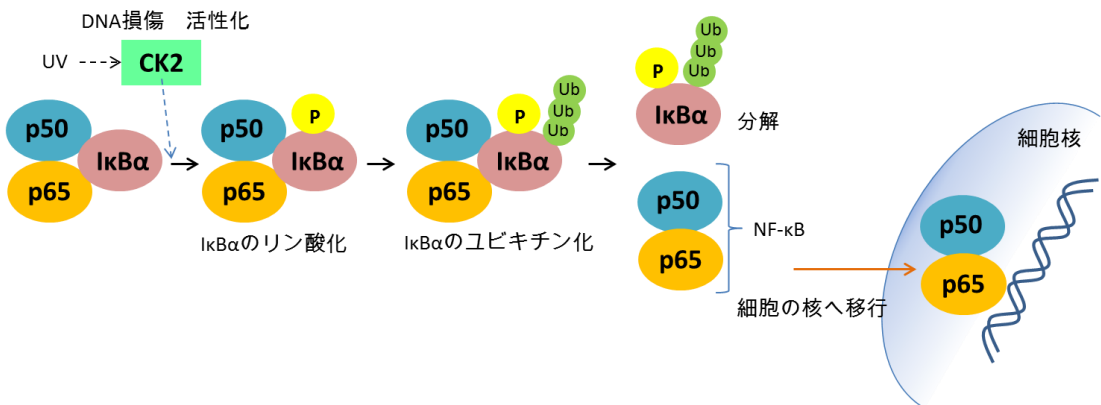


図 1-7. NF- κ B シグナル伝達の活性化経路

1.6 炎症に関わる mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路

NF- κ B に加え、MAPK 経路も炎症反応に関与する重要なシグナル伝達経路であることが知られている。MAPK はセリンスレオニンプロテインキナーゼで、炎症、細胞死、増殖、分化といった様々な生理現象の制御に関わっていることが知られている[94-96]。哺乳類における MAPK には、c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)、p38、extracellular signal-regulated kinase (ERK) が含まれ、それぞれにいくつかのアイソフォームが存在する[94]。MAPK シグナル伝達経路は、3 つのキナーゼから構成される。最上流に MAP3K が、次に MAP2K が、最下流に MAPK が位置し、MAP3K は MAP2K をリン酸化し、リン酸化された MAP2K は MAPK をリン酸化する (図 1-8)。リン酸化された MAPK は c-Jun や c-Myc といった転写因子等をリン酸化し、種々のシグナルが流れる[94]。JNK と p38 シグナル伝達経路は、酸化ストレス、遺伝毒性ストレス、浸透圧ストレスといった細胞ストレスの他に、LPS や TNF- α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインによって活性化される[95]。JNK 経路では、MAP2K として MKK4 と MKK7 が、MAP3K として ASK1 と TAK1、MEKK1、MLK3 が知られている[97]。p38 経路では、MAP2K として MKK3 と MKK6 が、MAP3K として ASK1 と TAK1、MEKK1、MLK3 が知られている[98]。ERK シグナル伝達経路は、増殖因子等により活性化され、MAP2K としては MEK1 と MEK2 が、MAP3K としては Raf が知られており、Raf は Ras により活性化される[94]。

MAPK シグナル伝達経路の活性化は、炎症や細胞障害を惹起することが報告されており[99, 100]、神経変性疾患の発症や進展において重要な役割を担っていると考えられている[94, 101-103]。アルツハイマー病 (1.7 に記載) では、患者で蓄積が認められる A β が p38 を活性化し、タウのリン酸化を引き起こすことで病態に関与することが報告されている[94, 104]。また、アルツハイマー病モデルマウスへ p38 の活性化を抑制する抗体を投与すると、アルツハイマー病の症状の 1 つである認知症状の改善が認められる[105]。パーキンソン病においても、MAPK の活性化が病態に寄与しているとの報告がなされている。パーキンソ

ン病の細胞モデルとして、MPTP や 6-OHDA を細胞へ処理すると、ERK、JNK、p38 のリン酸化が引き起こされ、ミトコンドリア機能障害や神経細胞障害が引き起こされることが報告されている[94, 106]。

これらの知見から MAPK シグナル伝達の活性化は神経変性疾患の病態の進展に関与していると考えられる。

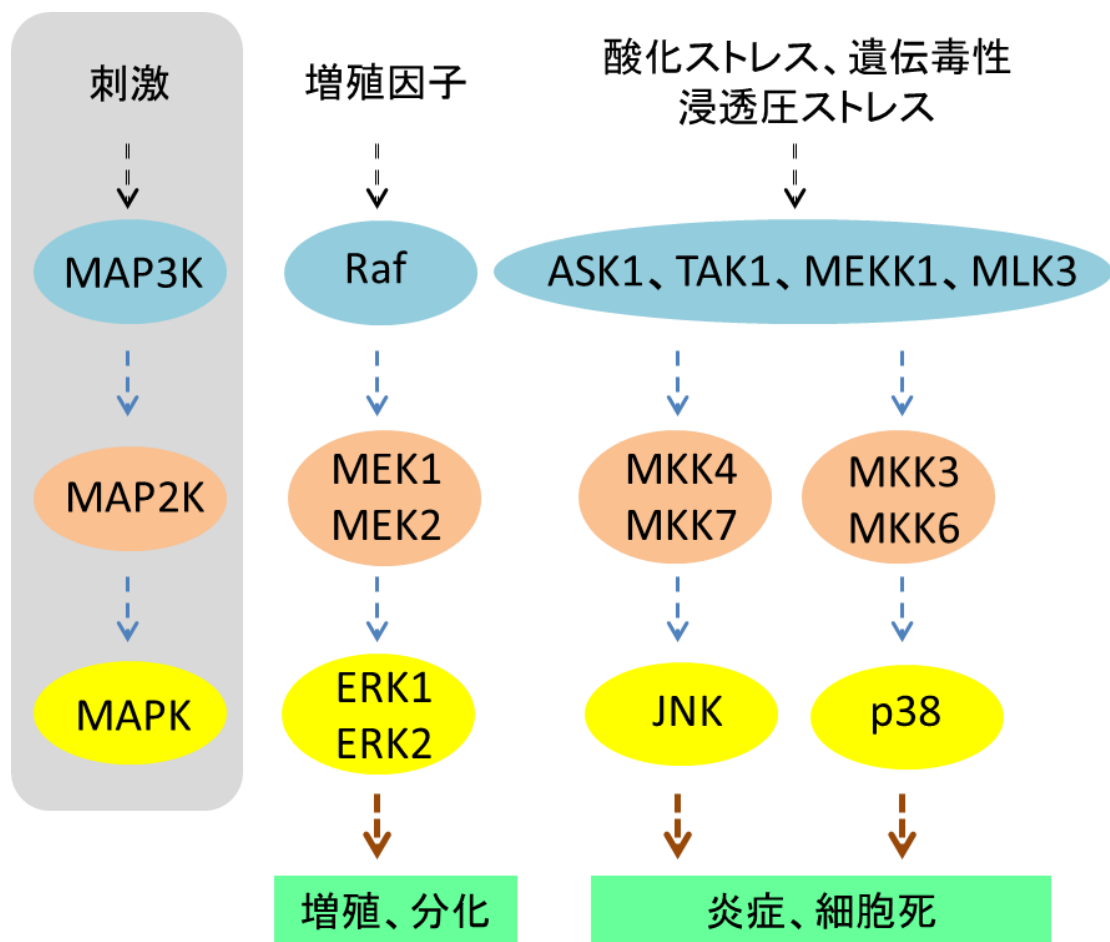


図 1-8. MAPK シグナル伝達経路

1.7 神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病）における酸化ストレスと炎症

1.4 節、1.5 節、1.6 節で述べたように、Nrf2 シグナル伝達経路は抗酸化ストレス応答に、NF- κ B や MAPK シグナル伝達経路は炎症反応に重要な役割を担い、これらのシグナル伝達経路は神経変性疾患に密接に関わっていると考えられる。神経変性疾患として代表的なアルツハイマー病、パーキンソン病においては、病態で生じている酸化ストレスと炎症に関して下記のことが知られている（図 1-9）。

アルツハイマー病は 1907 年に Alois Alzheimer 氏によって報告され、記憶と認知機能障害を特徴とした認知症を引き起こす神経変性疾患である[107]。加齢が 1 つの危険因子とされており、60-64 歳に 1-2%、85 歳以上では 30%のリスクがあるとの報告もある[108]。また、全体の約 2%は家族性アルツハイマーであり遺伝的に発症することが知られている。アルツハイマー病では、amyloid- β (A β) の細胞外沈着により老人斑や拡散斑といったプラーク形成が認められる。また、凝集したリン酸化タウタンパク質から成る神経原線維変化と呼ばれる繊維状の凝集体が認められる[108]。アルツハイマー病に特徴的なこれら 2 つの組織学的変化は、記憶や言語、認知機能などを司る脳の海馬や大脳皮質に認められ、アルツハイマー病の診断にも用いられる[109]。アルツハイマー病に寄与する A β は、amyloid precursor protein (APP) から β セクレターゼと γ セクレターゼによりそれぞれ産生される、40 アミノ酸から成る A β 40 と 42 アミノ酸から成る A β 42 であると考えられている[107]。アルツハイマー病ではシナプス崩壊をはじめとする神経細胞の障害と、ミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞（図 1-10）の活性化による炎症が、病態の進行に関わっていると考えられている[107]（図 1-9）。

脳や脊髄など神経系の細胞は、神経細胞とグリア細胞によって構成されている[110]（図 1-10）。神経細胞は、核を含む細胞体と神経細胞から情報を受け取る樹状突起、情報を受け渡す軸索から成る。グリア細胞は、脳内の免疫や炎症反応を担うミクログリアと、軸索を取り巻き、ミエリン髓を形成して跳躍伝導を生み出すオリゴデンドロサイト、神経細胞を

支持し周囲の環境を恒常的に保つアストロサイトから成る[110]。

アルツハイマー病における炎症は、 $A\beta$ や死んだ神経細胞由来の因子によるミクログリアの過剰な活性化によって生じると考えられている[107, 111]。活性化したミクログリアは神経障害性因子や炎症性因子を放出し、これがアルツハイマー病における神経細胞機能障害と神経細胞死を引き起こす (図 1-9)。神経障害性因子や炎症性因子としては、 $COX2$ により産生される PGE_2 、 $iNOS$ により産生される NO 、炎症性サイトカインやケモカインである $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-8$ 、 $TGF-\beta$ 、 $MIP-1\alpha$ 等があげられる。アルツハイマー病の患者や動物モデルの脳において、これらの因子の増加が報告されている[107]。

炎症に加えて酸化ストレスもアルツハイマー病における神経細胞障害に強く関連していると考えられている[107, 112]。アルツハイマー病の患者や動物モデルの脳、特に海馬や皮質においては、酸化ストレスマーカーとして知られている 3-nitrotyrosine、thiobarbituric acid、acrolein、4-hydroxy-nonenal、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の上昇が認められる[113]。酸化ストレスは $A\beta$ が原因で生じると考えられている。 $A\beta$ がミトコンドリアに作用しミトコンドリアから発生する活性酸素や、 $A\beta$ が $iNOS$ を活性化させ発生する NO 等が酸化ストレスの原因になっていると考えられている[107, 114]。これらの酸化ストレスが、神経細胞への障害を引き起こし、神経細胞死へとつながる (図 1-9)。

このように炎症と酸化ストレスはアルツハイマー病に深く関与しているが、神経細胞とミクログリアが相互作用することが、病態の増悪化を引き起こしていると考えられている[115]。 $A\beta$ 等の刺激により活性化したミクログリアは神経障害性因子である炎症性サイトカインやケモカイン、酸化ストレスを引き起こす NO や活性酸素を発生させ、神経細胞へ障害を与え神経細胞死を引き起こす。一方、死んだ神経細胞や障害を受けた神経細胞から生じる液性因子はミクログリアをさらに活性化させるという終わりのない増悪化サイクルが存在すると考えられている (図 1-9) [107]。従って、ミクログリアの炎症と神経細胞の酸化ストレスを抑制することは、アルツハイマー病の発症や進展を抑制するための 1 つの重要な

鍵と考えられる。同様のことは他の神経変性疾患でも示唆されている。

パーキンソン病は震え、筋硬直、動作緩徐（動作開始と進行の遅れ）の症状を特徴とする神経変性疾患である[116]。発症平均年齢は 55 歳で、70 歳を超えると発症リスクは 5 倍になると言われており、遺伝性の家族性パーキンソン病は全体の約 5%とされている。パーキンソン病では、脳内の黒質緻密部のドーパミン作動性神経細胞の脱落が生じており、結果として脳内の線条体におけるドーパミンの低下が認められる[117]。

ドーパミン作動性神経細胞の脱落の原因にはいくつかの説があるが、1 つにミトコンドリアの機能障害による酸化ストレスが知られている[116]。ミトコンドリアに毒性を示す 1-methyl-4-phenylpyridium ions (MPP⁺) や MPTP を服用した場合、パーキンソン病様の症状を示すことが報告されている[116]。ミトコンドリアの機能障害は酸化ストレスを発生させることが知られており、酸化ストレスがパーキンソン病に関与すると考えられる。実際にパーキンソン病患者の脳内の黒質において、酸化ストレスマーカーである 4-hydroxy-nonenal、8-hydroxyguanosine の蓄積が報告されている他、抗酸化ストレス作用を持つ還元型グルタチオンの量が減少していることが報告されている[118, 119]。パーキンソン病における酸化ストレスの発生要因はミトコンドリアのみならず、ドーパミン由来の酸化ストレスも関与していることが知られている。細胞内でドーパミンが酸化されると、酸化ストレスの原因となるドーパミンキノンと H₂O₂ が発生する[116, 120, 121]。このような酸化ストレスがドーパミン作動性神経細胞へ障害を与えると考えられている（図 1-9）。

パーキンソン病では、酸化ストレスに加えてミクログリアにおける炎症も強く関与している。パーキンソン病患者の CSF や脳内の線条体では、活性化したミクログリアの増加や炎症性サイトカインの増加が認められている[116]。パーキンソン病を引き起こす MPTP を服用した患者の死後脳では、ミクログリアの活性化と黒質におけるドーパミン作動性神経細胞の脱落が報告されている[122]。パーキンソン病モデル動物である MPTP や 6-OHDA を投与した動物においては、ミクログリアの活性化と神経細胞障害が認められている[116]。

また、LPS 投与で活性化させたミクログリアによるドーパミン作動性神経細胞に対する障害も報告されている[123]。これらの知見から、活性化したミクログリアから放出される NO や IL-1 β 、TNF- α が神経細胞へ障害を与えることでパーキンソン病につながると考えられている（図 1-9）。

このようにパーキンソン病においても酸化ストレスと炎症が強く関わっているが、上述したアルツハイマー病と同様に、神経細胞とミクログリアが相互作用することによる増悪化サイクルが存在すると考えられている。MPTP やドーパミンキノンから生じる酸化ストレスは神経細胞に障害を与え、障害を受けた神経細胞から産生される液性因子や死んだ神経細胞は、ミクログリアを活性化させる（図 1-9）。活性化したミクログリアは炎症性サイトカインや活性酸素等を放出し、神経細胞へ障害を与え、これがさらなるミクログリアの活性化を生む（図 1-9）[116]。そのため、ミクログリアの炎症と神経細胞の酸化ストレスを抑制することは、パーキンソン病の発症や進展を抑制できる可能性がある。アルツハイマー病やパーキンソン病以外にも多発性硬化症や筋萎縮性側索硬化症といった神経変性疾患においても同様のストラテジーが成り立つと考えられており[124-126]、酸化ストレスならびに炎症を抑制する分子が神経変性疾患に有効である可能性が考えられている。

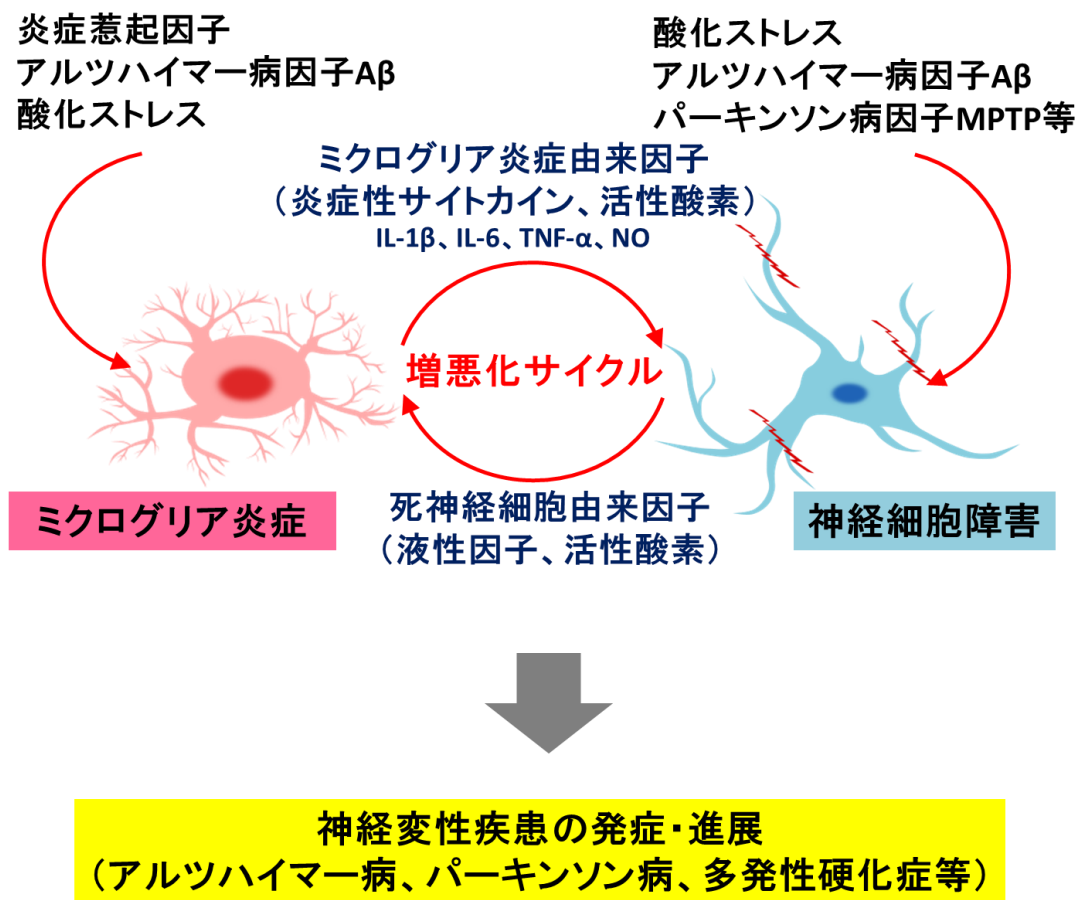


図 1-9. 神経変性疾患を引き起こす酸化ストレスと炎症、
ミクログリアと神経細胞の相互作用

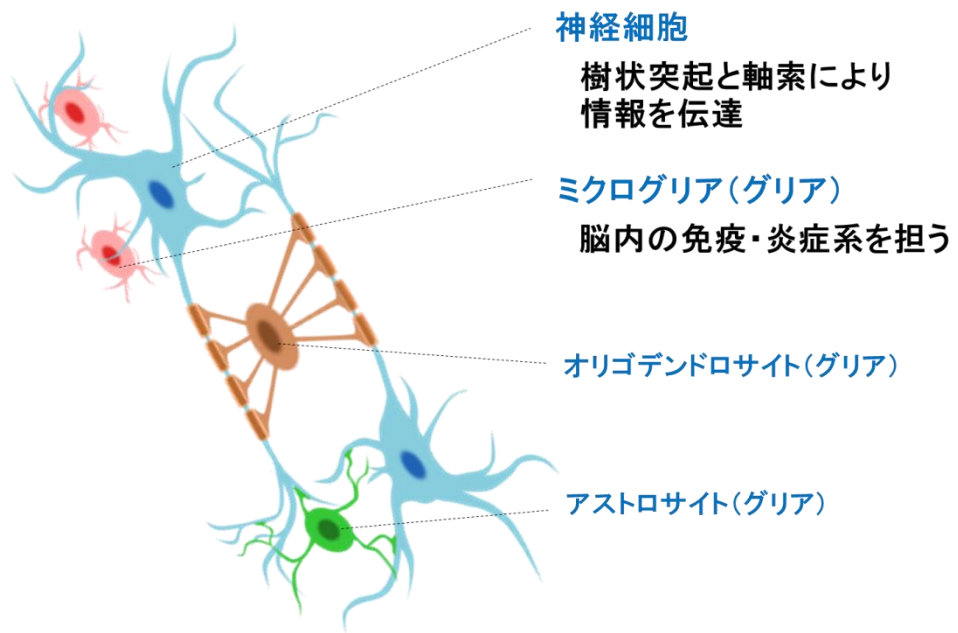


図 1-10. 脳を構成する神経細胞とグリア細胞

1.8 本研究の目的

本研究においては、初めに植物において、ジャスモン酸類の中で生理機能がほとんど明らかにされていなかった OPDA に着目し、OPDA による遺伝子発現制御の詳細を明らかにするための研究を行った。DNA マイクロアレイを用いて、OPDA による発現制御遺伝子群と JA や MeJA による発現制御遺伝子群に違いがあるかを比較し、OPDA 特異的応答遺伝子群を同定した。次に OPDA 特異的応答遺伝子群と植物の傷害応答との関わりについて研究を行った。これらの内容を第 2 章に述べる。また、植物におけるジャスモン酸類の生理機能に関する研究が多数なされているのに対し、哺乳類における報告は少なく、特に OPDA に関する報告はほとんどなされていなかった。しかしながら、OPDA に構造の似ている 15d-PGJ₂ が哺乳類において、酸化ストレス応答を担う Nrf2 シグナルや炎症反応を担う NF-κB シグナル、MAPK シグナルに作用する等、多様な生理作用を持つことから、OPDA などのジャスモン酸類が哺乳類に対して何らかの生理作用を持つ可能性が考えられた。そこで、神経変性疾患に密接に関わる酸化ストレスと炎症に着目し、ジャスモン酸類がこれらに対して作用を持つのかを明らかにするために研究を行った。第 3 章において、神経細胞における酸化ストレスに対するジャスモン酸類の生理作用に関して行った研究について述べ、第 4 章において、ミクログリアにおける炎症に対するジャスモン酸類の生理作用に関して行った研究について述べる。

第 2 章 植物シロイヌナズナにおける 12-オキシ-フィトジエン酸によるジャスモン酸非依存の遺伝子群発現制御

2.1 序

ジャスモン酸(JA)やジャスモン酸メチル(MeJA)は、 α -リノレン酸から過酸化、環化、 β 酸化を経て合成され(図 1-1)、植物の傷害応答や病害応答、葯の開裂、老化の促進など多様な生理現象に関与することが知られている[3, 7, 127-133]。JA によりこれらの生理現象が引き起こされる際には、COI1 を介したシグナル情報伝達経路が使われると考えられている[8, 134]。

2001 年に Stintzi らのグループは、JA や MeJA の生合成前駆体である 12-オキシ-フィトジエン酸(OPDA)(図 1-1)も生理活性作用を持つ分子であることを報告した[7, 129]。彼らは、JA の生合成酵素の 1 つである OPDA reductase 3(OPR3)の変異体(OPDA は生合成できるが JA や MeJA は生合成できない変異体)を用いて下記を報告した。*opr3* 変異体は葯の開裂が起こらず雄性不稔の表現型を示すが、外から JA を添加すると雄性不稔は回復した[129]。一方、OPDA を外から添加しても雄性不稔のままであった[129]。このことから、葯の開裂に関して、JA が生理活性を持つのに対し、OPDA は生理活性を持たないことが明らかとなった。*opr3* 変異体は JA を合成できないため病害応答を引き起こすことができず、病害に対して感受性が高まると考えられた。しかしながら彼らが病害虫の 1 種である *Bradysia impatiens* を感染させたところ、野生型と同様の抵抗性を示し、OPDA が病害応答を引き起こす生理活性物質として作用していることが示唆された[7]。さらに 150 個の遺伝子が含まれるミニアレイを用いて、OPDA が傷害応答遺伝子群の発現を制御するかどうかを調べたところ、OPDA は傷害時に COI1 依存的かつ JA によって誘導される遺伝子群の発現を誘導していたが、傷害時に COI1 非依存的に誘導され、かつ JA には誘導されない幾つかの遺伝子群の発現も誘導することが明らかとなった[7]。このことから、OPDA が JA とは異なる独自の遺伝子発現制御を担っている可能性が示唆されたが、

OPDA による遺伝子発現制御の詳細は明らかにされていない。そこで OPDA の生理機能の解明を目的とし、OPDA によって制御される遺伝子群に焦点をあて、研究を進めた。

本研究において、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析からシロイヌナズナにおいて、JA や MeJA には発現の制御を受けず、OPDA にのみ制御を受ける遺伝子群（OPDA 特異的応答遺伝子群）を同定した。OPDA 特異的応答遺伝子群の多くは傷害処理時に発現が変動しており、ジャスモン酸類の生合成や情報伝達に関わる遺伝子の変異体を用いた解析から、OPDA は JA/MeJA とは異なる情報伝達経路を用いて OPDA 特異的応答遺伝子の発現を引き起こすことで、傷害応答をはじめとする生理現象に JA/MeJA とは異なるシグナルとして関与することが示唆された。

2.2 実験材料と方法

2.2.1 植物に対する化合物処理と傷害処理

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*; Col Ws, *aos*, *opr3*, ならびに *coronatine insensitive 1* (*coi1-16*)) は 1% スクロースを含む Murashige / Skoog 液体培地を用い、22°C で連続光の下、巡回培養法により培養した。*coi1-16* 変異体は John Turner 博士 (East Anglia 大学) より譲渡された。10 日間培養したシロイヌナズナに対し、30 μ M の OPDA、JA、MeJA、3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-octadecanoic acid (OPC8:0)、3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-hexanoic acid (OPC6:0)、リノレン酸 ならびに acrolein を処理した。OPDA、OPC8:0 ならびに OPC6:0 は小林雄一博士 (東京工業大学) より譲渡された。JA、MeJA、リノレン酸、ならびに acrolein は Sigma-Aldrich より購入した。シロイヌナズナに上記化合物処理を行い、0 (未処理)、15、30、60、180 および 360 分後に回収した。傷害処理においては、シロイヌナズナ (Col、Ws、*aos*、*opr3* 変異体) は、0.8% アガロースを含む Murashige / Skoog 培地を用い、22°C で連続光の下で培養した。*aos* 変異体は Joon-Hyun Park 博士 (Arizona 大学) と Kenneth A. Feldmann 博士 (Arizona 大学) より譲渡された。*opr3* 変異体は John Browse 博士 (Washington State 大学) より譲渡された。21 日間培養した後、全てのロゼット葉に対してピンセットにて傷害処理を行い、0 (未処理)、15、30、60、180 および 360 分後に回収した。

2.2.2 RNA 抽出

化合物を処理したシロイヌナズナからのノザンブロット用の RNA 抽出は phenol/sodium dodecyl sulfate 法に準じて行った[135]。マイクロアレイ用の RNA 抽出は RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて行った。傷害処理を行ったシロイヌナズナからのノザンブロット用ならびにマイクロアレイ用の RNA 抽出は RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて行った。

2.2.3 DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイは Arabidopsis 2 oligo microarray (Agilent Technologies) と Agilent Linear Amplification/Labeling kit (Agilent Technologies) を用いて行い、実験は duplicate で行った。DNA マイクロアレイに用いた RNA の品質は RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies) にて確認した。500 ng の RNA に対して T7 promoter プライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型に、cyanine 3-dCTP (化合物もしくは傷害処理サンプル) もしくは cyanine 5-dCTP (未処理サンプル) を含む dNTP mix 存在下で、T7 RNA Polymerase を用いて 40°C で 2 時間反応させることにより、標識された cRNA を得た。cRNA を RNeasy mini kit (Qiagen) にて精製後、ハイブリダイゼーション液、Orientation marker (Deposition Control SP300; Operon Technologies)、ならびに Cot-1 DNA (Invitrogen) と混和し、マイクロアレイガラスと 60°C で 17 時間ハイブリダイズさせた。マイクロアレイガラスは洗浄後、Agilent microarray Scanner (Agilent Technologies) にてスキャンし、データを取得した。

2.2.4 マイクロアレイデータ解析

アレイスポットのシグナル強度を Agilent Feature Extraction software で計算し、さらにシグナルのノーマライズ処理を行い、各処理における各々の遺伝子の発現量を数値化した。その後化合物処理や傷害処理によって発現量が何倍変化したかを示す normalized fold expression (NRE) を算出した。マイクロアレイには 21,500 個の遺伝子が含まれていたが、フラグを示した遺伝子を除き、最終的に 20,095 遺伝子が解析対象となった。

2.2.5 ORG、JRG ならびに WRG の抽出

マイクロアレイデータをもとに、OPDA 特異的応答遺伝子 (ORG)、JA かつ MeJA 応答

遺伝子 (JRG)、傷害応答遺伝子 (WRG) の抽出を行った (Taki ら[136])。簡単に述べると、初めに OPDA、JA、MeJA、傷害処理の各処理時間における NRE の最大値 (maxNRE) ならびに NRE の最小値 (minNRE) を求めた。誘導型 ORG は、OPDA 処理時の maxNRE が 3 以上、かつ、JA ならびに MeJA 処理時の maxNRE が 2 以下の遺伝子群とした。抑制型 ORG は、OPDA 処理時の minNRE が 0.33 以下、かつ、JA ならびに MeJA 処理時の minNRE が 0.5 以上の遺伝子群とした。JRG は、JA ならびに MeJA 処理時の maxNRE が 3 以上、または、minNRE が 0.33 以下の遺伝子群とした。WRG は、傷害処理時の maxNRE が 3 以上、または、minNRE が 0.33 以下の遺伝子群とした。

2.2.6 ノザンブロット

5 µg の RNA を 1.2% agarose/formaldehyde ゲルへ電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写した。ノザンブロット用のプローブは AV544343 (*AtERF5* に対応)、AV521889 (*ZAT10* に対応)、AV546998 (*FAD-OXR* に対応)、AV537643 (*GST6* に対応)、AV544278 (*TCH4* に対応) ならびに AV532124 (*AtVSP2* に対応) (アクセッション番号に関しては[137]に記載) 由来のプラスミド DNA、または、下記プライマーセットを用いた。5'-gtgttggtgtattgtagattgtgttg-3' と 5'-gtcttctctattgtcatatcactgtttcg-3' のプライマーセット (*DREB2A* に対応)、5'-cttaggtattgcagaccgtatgagc-3' と 5'-gtttttatccgagtttgaagaggct-3' のプライマーセット (*ACTIN8* に対応)。プローブは [α -³²P]dCTP にて標識後、[138]に記載の方法に準じて RNA が転写されたナイロンメンブレンとハイブリダイゼーションさせた。シグナルは Image Quant (version 5.1; Molecular Dynamics) を用いて検出した。データは 2 回または 3 回実施したうちの代表的な 1 回分を示した。

2.3 結果

2.3.1 OPDA 応答遺伝子群

シロイヌナズナにおいて、OPDA、JA ならびに MeJA が遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に調べるために、21,500 個の遺伝子を含むマイクロアレイを用いて解析を行った。OPDA、JA ならびに MeJA 処理を行った 30 分後ならびに 180 分後のサンプルに対して、マイクロアレイ解析を行い、方法 2.2.4 節に記載したように、未処理に対して遺伝子発現量が何倍変化したかという **normalized fold expression (NRE)** を算出した。各処理の 30 分後ならびに 180 分後の NRE を用いて、スキャッタープロットにより遺伝子発現プロファイルの比較を行った (図 2-1)。JA と MeJA の処理を比較すると、30 分における相関係数が 0.64、180 分における相関係数が 0.85 であり、高い相関が認められ、JA と MeJA はよく似た遺伝子発現制御を担っていることが示唆された (図 2-1C、F)。一方、OPDA と JA の処理を比較すると、30 分における相関係数が 0.48、180 分における相関係数が 0.77 であり (図 2-1A、D)、また、OPDA と MeJA の処理を比較すると、30 分における相関係数が 0.47、180 分における相関係数が 0.76 であり (図 2-1B、E)、その相関関係は JA と MeJA の処理の相関係数より低かった。その理由は、図 2-1A、B、D、E に示すように、縦軸沿いにプロットされた OPDA にのみ特異的に誘導される遺伝子群 (赤いプロット) ならびに OPDA にのみ特異的に抑制される遺伝子群 (緑のプロット) が存在するためであることが分かった。これら赤ならびに緑のプロットの遺伝子群を OPDA 特異的応答遺伝子 (ORG) として同定した。ORG のクライテリアに関しての方法は 2.2.5 節に記載した通りである。以上の検討より、OPDA と JA/MeJA とは異なる遺伝子発現制御を担うことが示された。

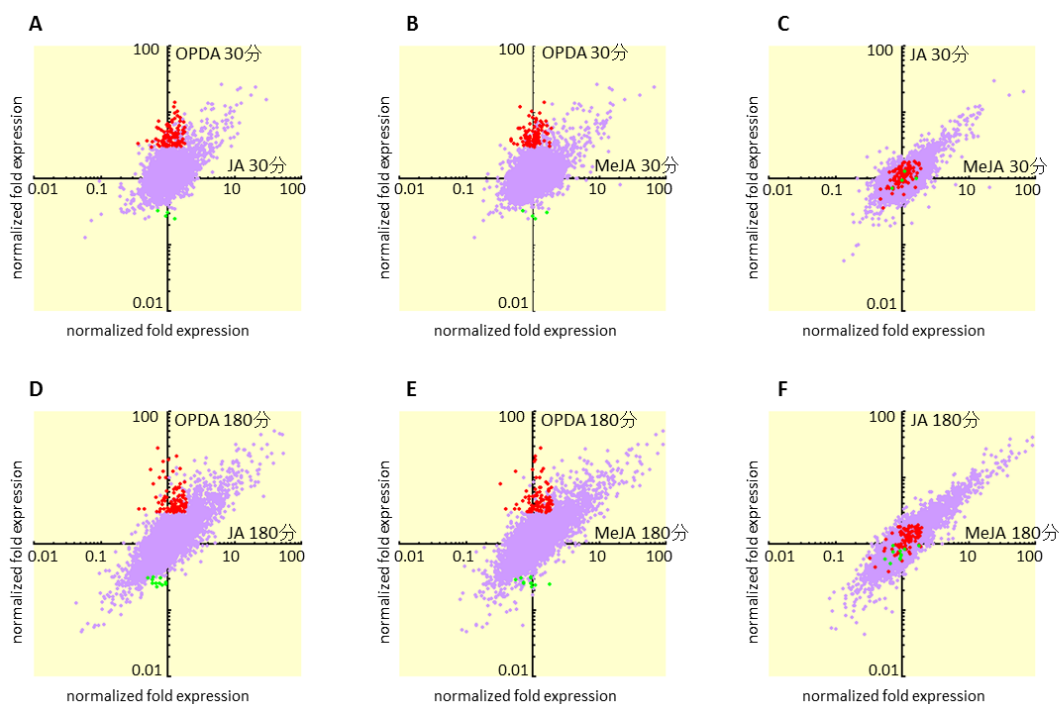


図 2-1. OPDA、JA、MeJA 応答遺伝子群の相関図

(A) OPDA 処理と JA 処理 30 分における遺伝子発現プロファイルの相関図

(B) OPDA 処理と MeJA 処理 30 分における遺伝子発現プロファイルの相関図

(C) JA 処理と MeJA 処理 30 分における遺伝子発現プロファイルの相関図

(D) OPDA 処理と JA 処理 180 分における遺伝子発現プロファイルの相関図

(E) OPDA 処理と MeJA 処理 180 分における遺伝子発現プロファイルの相関図

(F) JA 処理と MeJA 処理 180 分における遺伝子発現プロファイルの相関図

赤いスポットは、OPDA 処理により遺伝子発現が 3 倍以上誘導され、かつ、JA と MeJA 処理による遺伝子発現誘導が 2 倍以下の遺伝子を示す。緑のスポットは、OPDA 処理により遺伝子発現が 0.33 倍以下に抑制され、かつ、JA と MeJA 処理による遺伝子発現抑制が 0.5 倍以上の遺伝子を示す。

2.3.2 ノザンブロットによる ORG の遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析の結果より得られた ORG 群は、誘導型 (OPDA による発現誘導が 3 倍以上かつ JA/MeJA による発現誘導が 2 倍以下) が 157 遺伝子であり、抑制型 (OPDA による発現抑制が 0.33 倍以下かつ JA/MeJA による発現抑制が 0.5 倍以上) が 15 遺伝子であった。

ORG が OPDA にのみ応答し、JA/MeJA には応答しないことを確かめるために、ノザンブロットによる発現解析を行った。ORG の中から代表的なものとして *ZAT10* (At1g27730)、*AtERF5* (At5g47230)、*DREB2A* (At5g05410)、*GST6* (At2g47730)、*FAD-OXR* (FAD-linked oxidoreductase ; At4g20860) を選んだ。図 2-2A に示すように、これらの遺伝子は OPDA 処理によってのみ誘導され、JA ならびに MeJA 処理による変化は認められなかった。マイクロアレイでは方法 2.2.5 節に示したように、JA かつ MeJA 処理により 3 倍以上発現が誘導または抑制された遺伝子群を JRG 群として同定した。JRG 群の代表的な遺伝子として報告されている *AtVSP2* (At5g24770) [139] に関してもノザンブロットによる発現解析を行ったところ、ORG 群とは異なり OPDA、JA、MeJA 全ての処理により発現の誘導が認められた (図 2-2A)。*ZAT10*、*AtERF5*、*DREB2A* は種々の abiotic ストレス応答に関わる転写因子であることが知られている [140-143]。また、*GST6* と *FAD-OXR* に関してもストレス応答の際に発現が誘導されることが報告されている [144, 145]。ORG の発現プロファイルを比較すると、*ZAT10* や *AtERF5* といった転写因子では OPDA 処理により 30 分以内に発現が誘導されるのに対し、*GST6* や *FAD-OXR* では 180 分といった比較的遅い時間帯で誘導されることが分かった (図 2-2A)。

ORG が JA/MeJA には応答せず、OPDA に特異的に応答する遺伝子であることをさらに検証するために、OPDA から JA を生合成する際に必要な酵素である *OPR3* が欠損した変異体 [7, 129]、すなわち JA ならびに MeJA が生合成されない *opr3* 変異体を用いて解析を行った。野生型ならびに *opr3* 変異体に対して、OPDA、JA、MeJA 処理を行い、ORG の

ZAT10 ならびに *FAD-OXR* の発現をノザンブロットにて解析したところ、野生型と *opr3* 変異体において OPDA 処理による発現誘導に差は認められなかった (図 2-2B)。 *AtERF5*、 *DREB2A*、 *GST6* に対するノザンブロット解析でも同様の結果を示した。これらの結果は OPDA が JA/MeJA とは異なり、独自の遺伝子発現制御を担っていることを示唆している。一方、野生型で認められた OPDA 処理による *AtVSP2* の誘導は、*opr3* 変異体では消失した (図 2-2B)。このことより、*AtVSP2* が JA/MeJA に特異的に応答すること、ならびに外から添加した OPDA は 180 分以内に OPDA から JA に変換されることが示唆された。

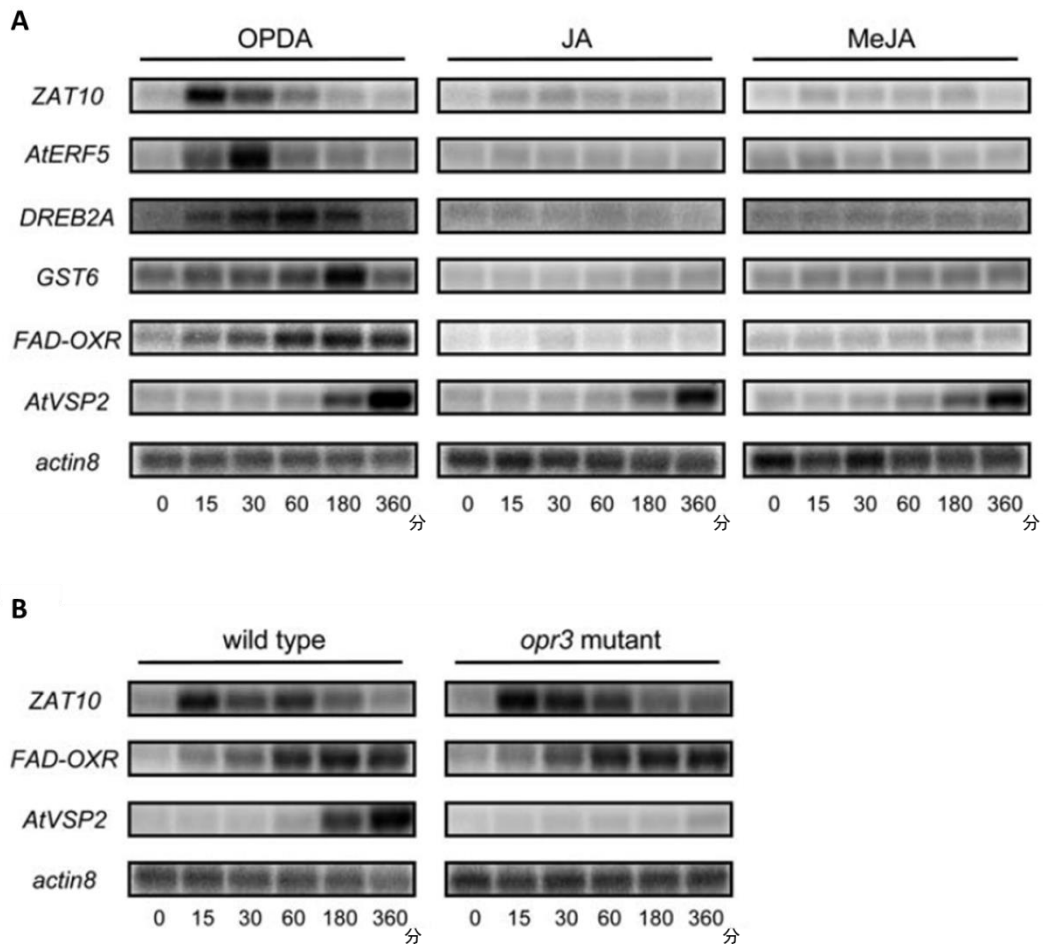


図 2-2. 野生型と *opr3* 変異体における ORG のノザンブロットによる発現解析

(A) 10 日間培養した植物体に対し、それぞれ 30 μ M の OPDA、JA、MeJA を処理し、15、30、60、180、360 分後の各遺伝子の発現量をノザンブロットで解析した。*Actin8* はローディングコントロールとして用いた。

(B) 10 日間培養した野生型と *opr3* 変異体に対し、30 μ M の OPDA を処理し、15、30、60、180、360 分後の各遺伝子の発現量をノザンブロットで解析した。*Actin8* はローディングコントロールとして用いた。

2.3.3 ORG 群の機能的分類

172 個の ORG 群に関して機能を調べたところ、約 70%にあたる 123 個については、Arabidopsis Information Resource を用いて遺伝子機能の annotation 付けが可能であった。残りの 49 個に関しては、hypothetical、expressed または putative であった。遺伝子機能の annotation を参考に、誘導型 ORG 群を 6 つのグループへ、抑制型 ORG 群を 3 つのグループへ分けた (表 2-1、2-2)。誘導型 ORG 群の 1 つめのグループには、kinase やカルシウム依存的シグナル因子、calmodulin といったシグナル伝達に関与する遺伝子が含まれていた。このグループに含まれる遺伝子は OPDA による誘導が 30 分以内に生じ、その誘導が一過的であるという特徴を持っていた。誘導型 ORG 群の 2 つめのグループには、*AP2/EREB*[146]、*WRKY*[147]、*MYB*[148]といった転写因子や zinc-finger タイプ[149]の DNA 結合タンパク質が含まれた。このグループの発現プロファイルも OPDA による誘導が早期で一過的であるという特徴を持っていた。グループ 1 とグループ 2 に含まれる遺伝子は 40 個で ORG 群全体の 26%であった。誘導型 ORG 群のグループ 3 には、ストレス応答に関わる種々タンパク質が含まれていた。例えば、酸化ストレス環境下で発現が誘導される *AtGPX6*[150]や、環境の変化に応じて植物の形態形成調節に関わる *TCH4*[151]、多種の heat shock protein である。グループ 3 の遺伝子発現プロファイルはグループ 1、2 と異なり、OPDA により誘導される時間が 30 分より遅い 180 分であるものが多かった。グループ 4、5、6 にはそれぞれ、二次代謝、植物ホルモン、金属やイオンの輸送に関わる遺伝子が含まれていた。

今回の検討では、JA かつ MeJA 処理により 3 倍以上誘導または抑制された遺伝子を JRG 群として同定している。JRG 群は 449 個であり、誘導型が 371 個、抑制型が 78 個であった (詳細は Taki ら[136]の supplemental data に記載)。JRG 群の遺伝子機能に関して調べたところ、アスコルビン酸やグルタチオン代謝、ジャスモン酸生合成、インドールグルコシノレート生合成に関わる遺伝子が多く認められ、これらは JA と MeJA によって発現制

御を受けることがすでに報告されており、今回の結果と一致していた[138, 152-154]。

表 2-1. 誘導型 ORG 群のリスト

Annotation	Gene Name	Normalized Fold Expression							
		OPDA		JA		MeJA		Wounding	
		30分	180分	30分	180分	30分	180分	30分	180分
Group 1: Signaling Component									
Phosphatase									
Protein phosphatase 2C (PP2C), putative	At3g27140	3.0	1.5	1.4	1.3	0.9	0.5	1.6	0.4
Protein kinase									
Protein kinase family (OXI)	At3g25250	12.1	3.1	1.3	1.8	0.6	0.9	10.0	1.1
Protein kinase family	At4g25390	1.9	3.5	1.0	1.5	1.1	1.8	2.2	2.2
Protein kinase family (MAPKKK18)	At1g05100	3.7	3.0	1.1	1.1	1.0	1.6	5.7	2.6
Protein kinase, putative	At2g05940	4.2	1.6	1.2	1.5	1.3	1.2	1.5	0.7
Receptor-related protein kinase like	At5g25930	9.6	7.1	1.3	1.4	1.3	1.3	7.4	0.9
Calcium-binding protein									
Calcium-binding EF-hand family protein	At4g27280	3.5	0.8	0.6	0.3	0.7	0.4	0.4	0.4
Calcium-binding EF-hand family protein	At5g39670	6.0	2.8	1.1	0.8	1.4	0.8	1.5	1.1
Calcium-binding protein, putative (PBPI)	At5g54490	3.7	0.7	0.5	0.5	0.5	0.4	1.0	0.4
Calcium-transporting ATPase, putative	At3g63380	1.2	3.4	0.7	1.1	1.1	1.0	2.4	8.1
Calmodulin-binding protein	At5g26920	4.4	0.9	1.0	0.6	0.8	0.7	1.1	0.3
Calmodulin-related protein, putative	At3g01830	8.1	0.9	1.3	0.6	1.1	0.7	12.2	1.0
Calmodulin-related protein, putative	At5g42380	5.5	5.0	1.1	0.7	1.2	0.8	6.3	1.3
Other signaling component									
F-box protein family	At1g61340	4.4	0.9	1.0	0.6	1.1	0.7	6.9	1.2
Transcription factor inhibitor 1 & B like	At5g45110	3.4	1.4	1.4	1.0	1.1	0.9	2.2	0.7
Response regulator 2 (ATRR2)	At3g48100	3.7	0.6	1.5	0.7	1.5	0.9	1.0	0.3
SigA-binding protein (SIB1)	At3g56710	7.5	1.5	1.2	0.7	1.1	0.6	1.2	0.7
Group 2: Transcription Factor									
AP2-EREB-type transcription factor									
AP2 domain transcription factor TINY, putative	At1g22810	13.9	1.5	1.3	1.2	1.5	1.1	58.8	5.2
AP2 domain transcription factor, putative	At1g19210	6.1	1.2	1.0	1.0	1.1	1.2	1.3	0.3
C-repeat/DRE-binding protein, putative	At5g52020	2.1	6.3	1.4	1.0	0.9	0.8	1.9	1.0
DRE-binding protein (DREB2A)	At5g05410	7.3	4.4	0.7	0.9	1.6	1.9	7.9	2.8
Ethylene responsive element binding factor 5 (AtERF5)	At5g47230	4.3	0.9	0.9	0.5	0.9	0.5	0.3	0.3
Transcription factor TINY, putative	At1g33760	3.6	0.6	0.9	0.7	1.0	0.5	0.6	0.1
WRKY-type transcription factor									
WRKY family transcription factor (WRKY30)	At5g24110	5.8	1.0	0.7	0.5	0.7	0.5	9.7	0.3

次頁へ続く

次頁へ続く

表2-1. (前頁から続く)

Annotation	Gene Name	Normalized Fold Expression							
		OPDA		JA		MeJA		Wounding	
		30分	180分	30分	180分	30分	180分	30分	180分
WRKY family transcription factor (<i>WRKY46</i>)	At2g46400	3.7	0.7	1.0	0.6	1.1	0.8	1.3	0.5
WRKY family transcription factor (<i>WRKY53</i>)	At4g23810	3.1	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	2.0	0.4
MYB-type transcription factor									
Myb family transcription factor (<i>MYB15</i>)	At3g23250	5.1	1.5	1.8	1.5	1.5	1.2	34.6	4.5
Transcription factor (<i>MYB4</i>)	At4g38620	5.6	0.9	0.7	1.1	0.7	0.8	1.0	0.9
Zinc-finger-type transcription factor									
C2H2-type zinc-finger protein family	At2g28710	2.6	4.5	0.7	0.8	0.7	0.7	0.3	0.7
C2H2-type zinc-finger protein related	At2g37430	10.2	1.1	1.4	1.5	1.0	1.0	4.5	0.7
C2H2-type zinc-finger protein related (<i>FZF</i>)	At2g24500	1.2	3.1	0.9	1.1	0.9	1.4	2.0	4.7
CONSTANS B-box zinc-finger family protein	At2g47890	2.2	3.1	1.0	1.0	0.9	0.9	1.3	1.5
CONSTANS B-box zinc-finger family protein	At3g21150	3.3	1.0	0.9	0.7	0.8	1.2	1.4	0.5
RING-H2 zinc-finger protein related	At5g27420	3.4	0.5	0.4	0.3	0.5	0.3	1.3	0.2
Salt-tolerance zinc-finger protein (<i>ZAT10</i>)	At1g27730	7.0	1.7	1.2	0.7	1.3	0.7	1.6	0.7
Zinc-finger protein (<i>PMZ</i>)	At3g28210	3.7	17.4	0.7	0.8	0.9	1.0	14.5	23.6
Zinc-finger protein Zat12 (<i>RHL41</i>)	At5g59820	6.4	3.5	1.0	1.2	1.4	1.8	1.9	1.1
Zinc-finger-related protein	At3g46080	5.1	1.7	0.9	0.7	0.8	1.0	2.9	1.7
Other-type transcription factor									
bHLH protein family	At2g28160	4.0	3.7	1.7	1.5	1.0	1.4	1.5	1.1
Transcription factor GT-3a	At5g01380	1.8	4.0	1.0	1.2	0.9	0.6	15.7	12.3
Group 3: Stress Response									
Pathogenesis related									
Disease resistance protein (TIR class), putative	At2g20145	3.2	1.5	1.3	0.9	1.0	0.9	1.6	2.0
Disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	At1g66090	5.3	0.9	0.8	0.6	0.9	0.7	2.4	0.5
Disease resistance protein family (<i>LRR</i>)	At3g05360	1.0	3.3	0.9	1.3	1.0	1.1	1.7	3.9
Seven transmembrane MLO protein family (<i>MLO6</i>)	At1g61560	3.1	3.9	1.6	1.8	1.8	1.4	11.0	0.7
Gly-rich protein	At3g04640	4.1	3.4	1.2	0.9	1.1	0.9	1.0	0.7
Stress-related protein related	At1g67360	3.1	2.0	1.1	0.8	1.1	0.9	3.6	1.6
Thaumatococcus family	At4g36010	2.3	4.5	1.6	1.6	1.2	1.8	14.1	3.9
Cell wall modification									
BON1-associated protein 1 (<i>BAP1</i>)	At3g61190	3.3	2.5	1.4	1.8	0.8	0.9	1.8	0.8
Cellulose synthase family (<i>ATCSLE1</i>)	At1g55850	1.6	3.1	1.0	1.7	0.8	1.8	1.1	1.1
Glucosyltransferase related	At2g15480	4.4	6.7	0.9	1.2	1.1	1.7	7.2	4.9
Glycosyltransferase family	At1g73880	0.9	3.6	0.9	1.8	0.8	1.3	0.9	1.0

次頁へ続く

表2-1. (前頁から続く)

Annotation	Gene Name	Normalized Fold Expression							
		OPDA		JA		MeJA		Wounding	
		30分	180分	30分	180分	30分	180分	30分	180分
UDP-glycosyltransferase family	At1g07260	1.2	3.2	0.8	1.1	1.0	1.1	0.5	0.4
Cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD) family	At1g09500	1.5	7.2	0.6	1.3	0.5	1.3	0.5	1.8
Xyloglucan endotransglycosylase (<i>TCH4</i>)	At5g57560	3.5	0.4	0.8	0.3	0.8	0.4	0.9	0.5
Heat-shock response									
17.6-kD heat-shock protein (AA 1-156)	At1g53540	6.3	13.5	1.5	1.5	1.3	1.4	20.6	32.3
Class I heat-shock protein(<i>HSP 17.4</i>)	At3g46230	3.3	12.4	1.3	1.2	0.8	1.3	3.5	13.8
Class II heat-shock protein	At5g12020	3.7	12.5	0.8	0.8	0.9	0.5	2.0	10.0
Endomembrane-localized small heat-shock protein	At4g10250	5.9	5.4	1.8	1.6	1.1	1.2	1.0	4.9
Heat-shock protein 17.6A (<i>AT-HSP17.6A</i>)	At5g12030	4.4	13.2	1.0	0.6	0.8	1.0	2.7	15.1
Heat-shock protein family	At1g52560	8.7	28.1	1.4	0.7	0.9	1.3	1.6	18.2
Heat-shock protein family	At5g37670	4.6	3.0	1.3	0.8	0.8	0.9	2.6	6.0
Heat-shock protein family (<i>HSP18.2</i>)	At5g59720	2.4	4.7	1.3	1.8	1.1	0.9	1.7	12.1
Heat-shock protein hsp70b	At1g16030	4.1	10.0	1.3	0.8	1.2	1.3	5.5	10.5
Heat-shock protein hsp70t-2	At2g32120	3.5	3.9	1.6	0.8	1.2	1.2	5.3	10.6
Heat-shock protein, putative	At1g59860	5.4	4.8	1.4	0.9	1.3	1.3	20.2	8.8
Heat-shock protein, putative	At2g20560	4.1	7.2	1.1	1.5	0.8	1.9	7.5	5.9
Mitochondrion-localized small heat-shock protein	At4g25200	5.2	2.2	1.1	0.6	1.0	1.8	1.6	7.3
Small heat-shock protein related	At2g19310	2.3	3.0	0.9	1.2	0.8	1.6	1.3	1.2
Small heat-shock protein, chloroplast precursor (<i>HSP21</i>)	At4g27670	5.3	3.0	1.7	1.5	1.2	1.4	1.6	14.7
Oxidative burst stress response									
Glutathione peroxidase, putative (<i>AtGPX6</i>)	At4g11600	1.5	3.2	0.8	1.1	1.0	1.4	3.0	4.5
Glutathione S-conjugate ABC transporter (<i>AtMRP1</i>)	At1g30400	1.1	3.8	0.8	1.2	0.9	1.2	1.1	1.7
Glutathione transferase, putative (<i>GST21</i>)	At2g29470	1.5	4.2	1.0	1.6	1.2	1.1	1.0	0.7
Glutathione transferase, putative (<i>GST6</i>)	At2g47730	1.7	5.1	0.8	1.0	1.0	1.8	2.3	3.4
Iron superoxide dismutase (<i>FSD1</i>)	At4g25100	3.1	2.5	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.6
Group 4: Secondary Metabolism									
FAD-linked oxidoreductase family	At1g30700	1.6	7.9	0.4	0.6	0.3	0.3	4.0	3.7
FAD-linked oxidoreductase family	At4g20860	3.7	6.6	1.1	1.4	1.1	1.1	6.0	2.3
FAD-linked oxidoreductase family	At5g44360	2.5	4.5	1.1	1.4	1.0	0.7	1.0	1.1

次頁へ続く

表2-1. (前頁から続く)

Annotation	Gene Name	Normalized Fold Expression							
		OPDA		JA		MeJA		Wounding	
		30分	180分	30分	180分	30分	180分	30分	180分
Cytochrome P450, putative (<i>CYP72A15</i>)	At3g14690	1.8	4.0	1.0	1.3	1.1	1.7	1.4	3.8
Cytochrome P450, putative (<i>CYP707A3</i>)	At5g45340	3.2	0.3	0.5	0.3	1.0	0.9	0.5	0.2
Group 5: Hormonal Response									
Auxin									
Auxin-induced protein family	At3g09870	4.5	0.7	1.0	0.8	1.1	0.9	0.6	0.4
Auxin-induced protein family	At5g35735	4.1	3.4	1.0	1.0	0.9	1.0	6.0	1.8
JA									
12-Oxo-phytodienoate reductase (<i>OPR2</i>)	At1g76690	2.7	6.2	1.1	1.7	1.2	1.8	3.1	6.7
Absciscic acid									
ABA-responsive protein related	At5g13200	2.8	3.2	1.6	1.1	1.6	1.3	8.6	4.1
Group 6: Transporter									
ABC transporter family protein	At1g15520	1.7	18.7	0.9	1.0	0.9	1.1	3.0	16.1
Ammonium transporter, putative (<i>ATAMT1;2</i>)	At1g64780	1.6	4.2	1.5	1.9	1.3	1.3	1.6	1.2
High-affinity sulfate transporter related (<i>SEL1</i>)	At1g78000	0.7	10.1	0.9	0.9	1.2	1.1	0.4	1.2
Mitochondrial carrier protein family	At2g22500	4.7	1.1	1.4	1.0	1.3	0.8	4.1	0.8
Mitochondrial carrier protein family	At4g24570	3.9	0.4	0.7	0.3	0.5	0.3	1.1	0.4
Nucleoporin 98-related protein	At1g59660	4.7	0.9	1.7	0.7	1.6	1.0	0.8	0.5
Zinc transporter, putative (<i>MTPa2</i>)	At3g58810	1.2	3.6	0.8	1.4	1.0	1.2	2.3	2.7
Others									
60S ribosomal protein L10 (<i>RPL10C</i>)	At1g66580	1.2	3.8	1.0	1.3	0.9	1.6	3.5	10.2
AAA-type ATPase family	At3g50930	6.3	1.2	1.1	0.8	1.7	1.1	1.3	0.7
Carbonic anhydrase related	At2g28210	3.2	4.2	1.2	0.7	1.0	0.9	1.7	2.3
DnaJ protein family	At3g08970	4.0	5.0	0.9	1.7	1.1	1.6	2.4	4.3
Glycosyl hydrolase family 1	At2g44460	0.9	6.1	1.3	1.7	0.9	1.3	1.3	1.6
Glycosyl hydrolase family 1, β -glucosidase (<i>DIN2</i>)	At3g60140	1.2	3.1	1.5	1.3	1.0	1.3	0.2	0.3
Heavy-metal-associated domain-containing protein	At5g52760	3.2	0.8	1.0	0.5	1.0	0.7	1.5	0.8
Hydrolase, α/β fold family	At4g24160	4.2	4.1	1.2	1.3	1.1	1.8	6.1	3.2
Lemir (miraculin) related	At1g17860	1.8	3.4	1.3	1.5	1.1	0.9	6.3	2.7
Lys decarboxylase-related protein	At5g06300	1.3	5.3	0.8	1.7	0.8	1.1	1.0	1.4
Nitrilase 4 (sp P46011) (<i>NIT4</i>)	At5g22300	1.2	3.9	1.1	1.7	1.0	1.9	1.2	1.8
Phospholipid/glycerol acyltransferase family	At4g01950	3.2	0.7	0.7	0.7	0.6	0.5	1.9	0.6
Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family	At3g44190	3.6	4.3	1.1	1.1	1.0	1.2	12.7	3.2
Transferase family	At5g07870	7.0	4.7	1.7	1.6	1.1	1.5	2.0	1.8

次頁へ続く

表2-1. (前頁から続く)

Annotation	Gene Name	Normalized Fold Expression							
		OPDA		JA		MeJA		Wounding	
		30分	180分	30分	180分	30分	180分	30分	180分
Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family	At5g22140	6.6	20.9	1.0	1.4	0.9	1.1	6.9	24.2
Aldo/keto reductase family	At1g60730	1.1	4.6	0.9	1.4	0.9	1.8	1.8	4.1
Aldo/keto reductase family	At1g60750	1.4	5.8	0.9	1.2	1.4	1.2	2.9	2.1
Ubiquinol-cytochrome-c reductase-related protein	At5g25450	2.5	5.3	1.2	1.5	0.8	1.3	5.4	8.9
Expressed and putative proteins are 49									

表 2-2. 抑制型 ORG 群のリスト

Annotation	Gene Name	Normalized Fold Expression							
		OPDA		JA		MeJA		Wounding	
		30分	180分	30分	180分	30分	180分	30分	180分
Group 1: Signaling Component									
Protein kinases									
Ser/Thr kinase-like protein	At4g23190	0.9	0.3	1.1	0.9	1.1	0.7	2.0	0.2
Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family	At1g64460	0.6	0.3	0.5	0.5	0.8	0.7	0.5	0.9
Group 2: Transcription Factor									
AP2-EREB-type TF									
C-repeat/DRE binding factor 1 (<i>CBF1</i>) (<i>DREB1B</i>)	At4g25490	0.3	0.6	0.7	0.6	0.7	0.8	0.5	0.3
Group 3: Stress Response									
Oxidative burst stress response									
Copper/zinc superoxide dismutase (<i>CSD2</i>)	At2g28190	0.2	0.4	1.3	1.6	1.1	1.0	0.6	0.7
Copper/zinc superoxide dismutase, putative	At1g12520	0.3	0.4	0.9	1.1	1.0	0.9	0.3	0.7
Peroxidase, putative	At1g34510	0.4	0.2	0.8	0.9	1.3	1.8	1.0	1.0
Peroxidase, putative	At5g22410	0.4	0.2	0.7	0.8	1.3	1.1	1.8	1.0
Peroxidase, putative	At1g05240	0.5	0.3	0.7	0.6	0.7	0.6	0.9	1.2
Cell wall modification									
Expansin, putative	At1g62980	0.4	0.3	0.7	0.6	1.0	1.0	0.5	0.7
Xyloglucan endotransglycosylase, putative	At4g28850	0.4	0.3	0.7	0.6	1.2	0.9	0.6	0.6
Others									
Plasma membrane H ⁺ -ATPase like	At3g60330	0.7	0.3	1.0	0.8	1.0	0.9	1.1	1.0
Pro-rich protein	At3g62680	0.5	0.3	0.6	0.7	1.0	1.0	1.1	1.0
Ribosomal protein L13 homolog	At3g48130	0.3	1.0	1.0	0.5	1.6	0.7	1.0	1.0
Glycosyl hydrolase family 9	At1g48930	0.5	0.2	0.7	0.7	0.9	1.0	0.7	0.4
Invertase/pectin methylesterase inhibitor family	At5g62340	0.8	0.3	0.7	0.8	1.0	0.7	1.0	0.7

2.3.4 傷害応答における ORG の機能

OPDA の詳細な役割は不明であるが、JA の生合成前駆体であることから、同様な生理現象に寄与している可能性が考えられる。JA や MeJA は傷害応答に重要な役割を果たすことが報告されている[155]。そこで、傷害応答における OPDA の役割を解明するために、シロイヌナズナへ傷害を与えた際の遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、ORG 群の 45%と JRG 群の 46%が傷害処理においても発現変動を受けることが分かった（表 2-1、2-2）。これは OPDA も傷害応答に関わるシグナル伝達分子であることを示唆している。

そこで植物が傷害を受けた際に、OPDA による ORG 群の誘導が必要かどうかを検証するために、傷害処理を行った *opr3* 変異体と *aos* 変異体を用いて、ORG 群の発現解析を行った。*opr3* 変異体では OPDA は生合成されるが、JA ならびに MeJA は生合成されない[129]。一方、*aos* 変異体では OPDA、JA、MeJA いずれも生合成されない[156]。野生型、*aos* 変異体、*opr3* 変異体に対して傷害処理を行い、ノザンブロットにて ORG の *ZAT10*、*FAD-OXR*、*AtERF5* の発現解析を行った。その結果、*aos* 変異体では野生型と比較し、傷害処理後の *ZAT10*、*FAD-OXR*、*AtERF5* の発現誘導が抑制されていた（図 2-3A）。一方、*opr3* 変異体では傷害処理により野生型と同様のレベルでこれらの遺伝子の発現誘導が認められた（図 2-3B）。また、JRG である *AtVSP2* に関してはいずれの変異体においても発現が消失していた。以上の結果から、OPDA は傷害応答時に *ZAT10*、*FAD-OXR*、*AtERF5* の発現誘導を引き起こし、シグナル伝達分子として機能することが示唆された。

図 2-3A で認められるように、*aos* 変異体では OPDA が生合成されていないにもかかわらず、傷害応答時に *ZAT10*、*FAD-OXR*、*AtERF5* の発現が弱いながらも誘導されていた。OPDA 以外にも種々のオキシリピンが遺伝子発現制御を担うシグナル伝達因子として機能することが報告されている。それらオキシリピンの多くはリノレン酸由来であることから、*aos* 変異体で認められた *ZAT10*、*FAD-OXR*、*AtERF5* の発現誘導にもリノレン酸由来のオキシリ

ピンが関わっているのではないかと考えた。そこで野生型と *aos* 変異体に対してリノレン酸を処理し、*ZAT10* ならびに *AtVSP2* の発現解析を行った。その結果、*aos* 変異体では野生型に比べ *ZAT10* の発現量が減少しており、*AtVSP2* の発現は完全に消失していた (図 2-3C)。このことより、リノレン酸由来のオキシリピンが傷害処理時の ORG の発現誘導に関わっていることが示唆された。

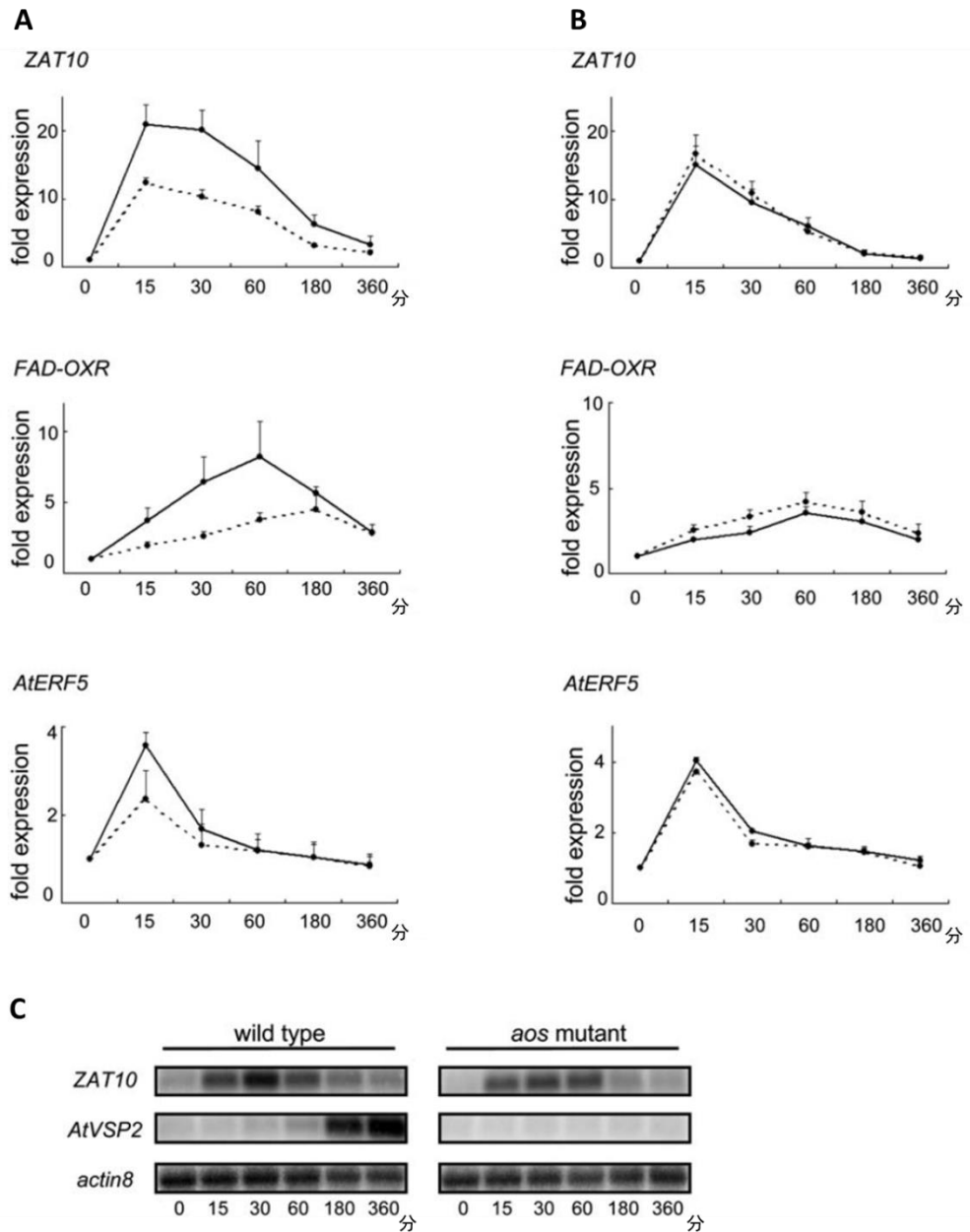


図 2-3. 野生型とジャスモン酸合成変異体における傷害時の ORG の発現解析

(A) 野生型 (実線) と *aos* 変異体 (点線)、(B) 野生型 (実線) と *opr3* 変異体 (点線) に傷害処理を行い、15、30、60、180、360 分後の各遺伝子の発現量をノザンプロットにより解析し、未処理に対する発現変動倍率 (fold expression) を求めた。グラフは 4 回分のデータの平均値と標準誤差を示す。(C) 10 日間培養した植物体に対し、10 μ M のリノレン酸を処理し、15、30、60、180、360 分後の各遺伝子の発現量をノザンプロットで解析した。

2.3.5 COI1 非依存的経路を介した ORG の発現制御

COI1 は JA ならびに MeJA のシグナル伝達に必須であることが報告されている[133]。OPDA の構造は JA と類似しているため、OPDA も COI1 を介してシグナル伝達を引き起こしている可能性が考えられる。そこで、*coi1-16*変異体[157]を用いて、OPDA による ORG の発現制御に COI1 を介しているかを検討した。野生型と *coi1-16* 変異体に対して OPDA または JA を処理し、ノザンブロットにより ORG である *ZAT10*、*FAD-OXR*、*AtERF5*、*DREB2A*、*GST6*、*TCH4* の発現量を解析した。その結果、OPDA 処理によるこれら ORG の発現誘導は *coi1-16* 変異体においても認められた (図 2-4)。一方、JRG である *AtVSP2* に関しては、*coi1-16* 変異体において OPDA ならびに JA 処理による発現誘導が消失していた (図 2-4)。これらの結果は OPDA による ORG の制御が COI1 非依存的に引き起こされていることを示唆している。

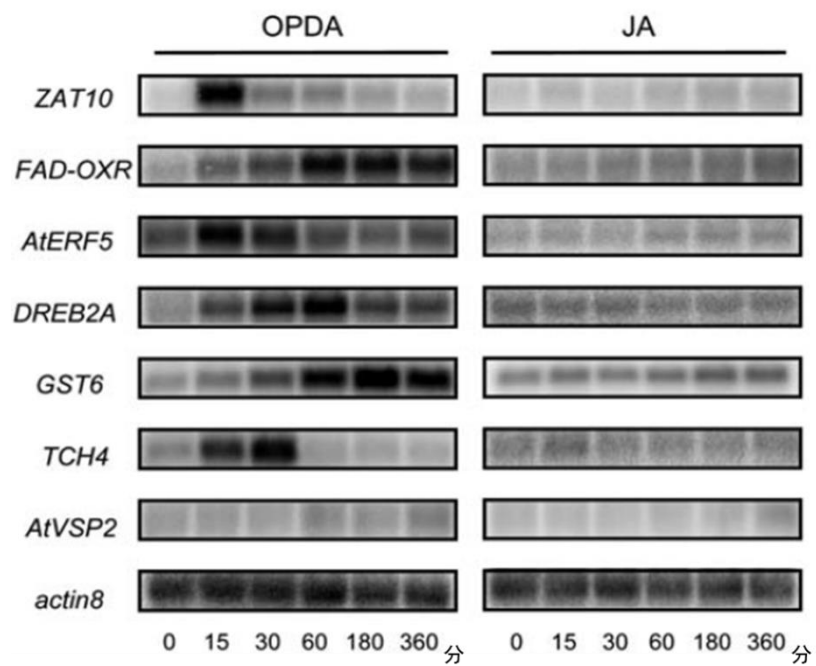


図 2-4. *coi1-16*変異体における ORG のノザンブロットによる発現解析

10 日間培養した野生型と *coi1-16*変異体に対し、30 μ M の OPDA または JA を処理し、15、30、60、180、360 分後の各遺伝子の発現量をノザンブロットで解析した。*Actin8* はローディングコントロールとして用いた。

2.3.6 OPC8:0 と OPC6:0 による ORG 発現誘導

OPDA は JA の生合成前駆体であり、 β 酸化を受けて JA となるため、OPDA と JA の構造的骨格はよく似ている。しかしながら、今回のこれまでの結果では、OPDA は JA に非依存的なシグナル分子として機能することが分かってきた。これは OPDA の JA とは異なる何らかの構造的違いを植物が受容している可能性を示唆している。図 1-1 に示すように、OPDA と JA の間には 2 つの構造的違いが存在する。1 つ目として OPDA は α 、 β -不飽和カルボニル構造をシクロペンテノン環に持つことが上げられる。この α 、 β -不飽和カルボニルを持つ種々の化合物は植物で遺伝子発現を引き起こすことが報告されており [158]、acrolein もその 1 つである (図 2-5A)。そこで ORG の発現が acrolein により制御されているかどうかを検討した。その結果、図 2-5B に示すように、acrolein は ORG の発現を誘導することが分かった。OPDA と JA の構造的違いの 2 つ目として、カルボキシル基を持つ炭素鎖の長さの違いが上げられる。OPDA は JA と比較し、長い炭素鎖を持っている。そこでこの長さの違いが、JA とは異なる OPDA 独自の発現誘導に関わっているのかを検討するために、OPDA から JA が生合成される際の間体である 3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-octadecanoic acid (OPC8:0) ならびに 3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-hexanoic acid (OPC6:0) を用いて検討を行った。OPC8:0 と OPC6:0 をそれぞれシロイヌナズナへ処理し、ORG の発現解析を行ったところ、どちらの化合物を処理した場合でも ORG の発現誘導が認められた (図 2-5C)。この結果より、JA とは異なる OPDA 独自の遺伝子発現制御には、 α 、 β 不飽和カルボニル構造のみならず、JA と異なる炭素鎖の長さの違いといった 2 つの構造的違いが関与していることが示唆された。

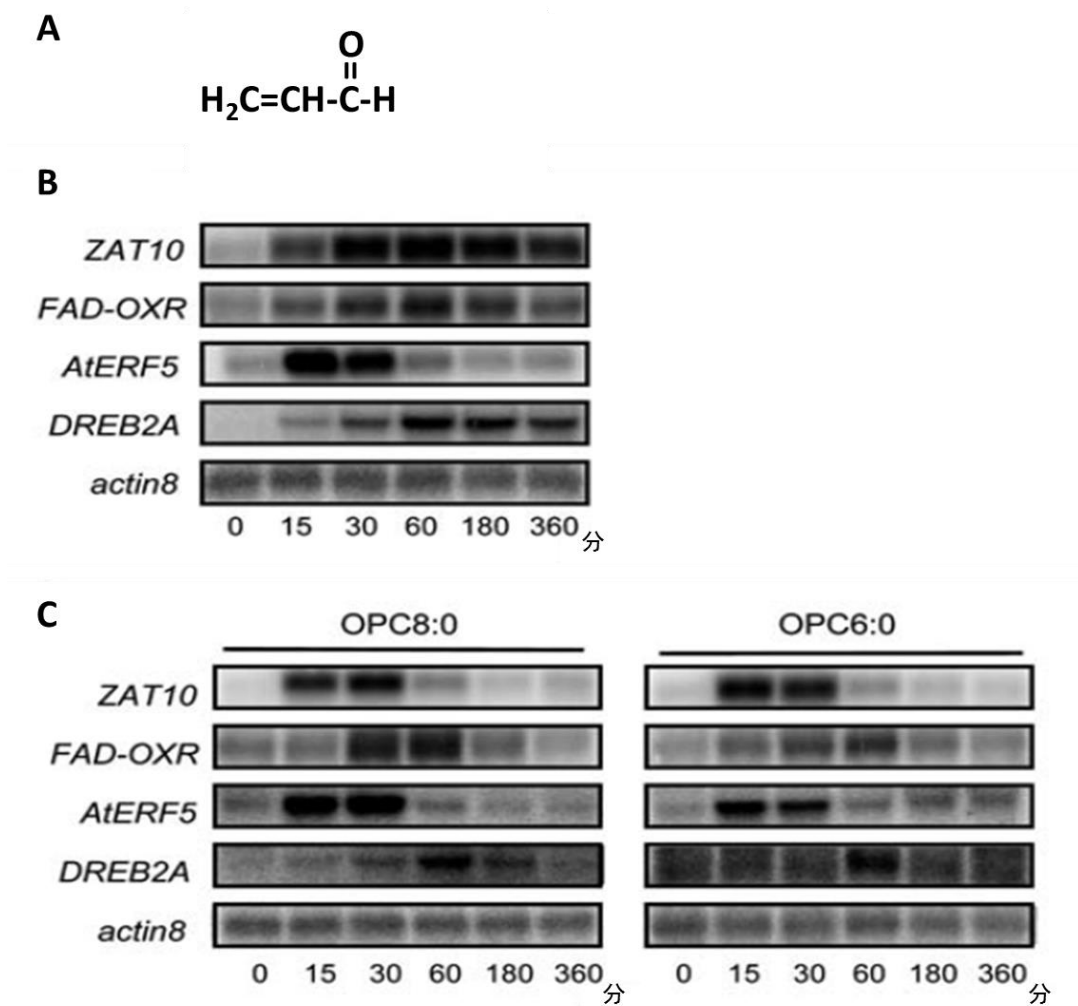


図 2-5. OPDA の構造類似体を用いた ORG の発現解析

(A) Acrolein の構造

(B) 10 日間培養した植物体に対し、30 μM の acrolein を処理し、15、30、60、180、360 分後の各遺伝子の発現量をノザンブロットで解析した。*Actin8* はローディングコントロールとして用いた。

(C) 10 日間培養した植物体に対し、30 μM の OPC8:0 または OPC6:0 を処理し、15、30、60、180、360 分後の各遺伝子の発現量をノザンブロットで解析した。*Actin8* はローディングコントロールとして用いた。

2.4 考察

2.4.1 OPDA による JA/MeJA とは異なる独自の遺伝子発現制御

JA や MeJA は、植物が傷害や虫害、感染といった種々の環境ストレスから防御する際に機能する重要な生理活性物質である[131, 155]。このようなストレス環境下では、JA や MeJA により発現が制御される遺伝子群が存在することが報告されている[159, 160]。JA の生合成前駆体である OPDA も、遺伝子の発現制御を担うことが知られているが[7]、その詳細については不明であった。

本研究においては、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析手法により、OPDA、JA、MeJA 処理により発現が変動した遺伝子群を同定し、その中からさらに JA や MeJA 処理では発現が変動せず OPDA 処理にのみ応答した遺伝子群として ORG 群の同定を行った。また JA ならびに MeJA 処理により発現が変動した遺伝子群として JRG 群を同定した。ORG 群と JRG 群は明らかに異なる特徴を有しており、ORG 群ではシグナル伝達因子や転写因子が多く含まれるのに対し、JRG 群には JA やアスコルビン酸、グルタチオン、インドールグルコシノレートといった物質の代謝に関わる酵素群が多く含まれていた[138, 152-154]。COI1 は JA/MeJA を介したシグナル伝達に必須の因子であることが広く知られている[133, 161]。図 2-4 に示すように、JRG の発現は COI1 依存的な経路を介していたが、ORG の発現は COI1 非依存的経路を介しており、OPDA のシグナル伝達経路は JA/MeJA とは異なることが明らかとなった。

以上の結果は、OPDA と JA/MeJA が異なるシグナル伝達分子として機能していることを示唆している。そこには OPDA が JA/MeJA とは異なる構造的特徴として持ち合わせる α 、 β -不飽和カルボニル構造の有無と炭素鎖の長さの違いが関わっている可能性が考えられる。 α 、 β -不飽和カルボニル構造を持つ acrolein には ORG の発現を誘導する活性が認められた。哺乳類では膜脂質由来の脂肪酸であるプロスタグランジンがシグナル伝達分子として機能することが知られている。プロスタグランジンの中で OPDA に構造が類似しているものと

して 15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ (15d-PGJ₂) が上げられる。15d-PGJ₂ は OPDA と同様に α 、 β -不飽和カルボニル構造を持ち、タンパク質やグルタチオン、システインのチオール基と Michael 付加反応を起こす生理活性物質である[162]。従って OPDA の α 、 β -不飽和カルボニル構造が Michael 付加反応を起こし、何らかのタンパク質修飾を介したシグナルが流れることにより OPDA による特異的な遺伝子発現制御がなされている可能性が考えられる。また、今回の研究から OPC8:0 と OPC6:0 が ORG 群の遺伝子発現を誘導することが初めて明らかとなった (図 2-5C)。これは JA と異なる炭素鎖の長さも OPDA 特異的な遺伝子発現制御に関わる重要な要素である可能性を示唆している。OPDA と JA の局在性の違いが OPDA と JA の発現制御の違いに関わっている可能性も考えられる。OPDA は葉緑体で生合成されることが[127, 128, 163]、エステル結合したプラスチド特異的なガラクト脂質から切り出され産生されることが報告されている[164]。OPDA はペルオキシソームで OPR3 による反応と β 酸化を受け、JA に変換される[129, 165]。そのため、OPDA と JA が最終的に産生される細胞内局在は異なっている。またトマトの花では OPDA と JA が異なる組織分布を示すことが報告されている[166]。従って OPDA と JA の生合成される場所や蓄積する場所が異なることも、両者が異なるシグナル伝達を引き起こすことに関係があるのかもしれない。

2.4.2. 傷害応答における OPDA の機能

JA や MeJA は防御応答に必須であり、特に傷害応答に重要な役割を果たしていることが知られている[155]。これまでに植物が葉に傷害を受けると JA が蓄積することが多数報告されており[131, 132, 167, 168]、これが傷害により引き起こされる遺伝子発現を制御するシグナルになっている可能性があると考えられている[169]。実際に今回の検討では、JRG 群の約半数が傷害時に発現が変動していることが分かった。結果で述べたように、ORG 群の約半数もまた傷害時に発現が変動していた。傷害を受けた葉に OPDA が蓄積するとの報

告もある[132]。従って OPDA も JA と同様に傷害応答時に何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。傷害時の ORG 群の発現は、*aos* 変異体では野生型に比べ 50%程度にまで抑制されていたが、*opr3* 変異体では野生型との差は認められなかった (図 2-3A、B)。この結果は OPDA が JA とは異なるメカニズムで傷害応答時のシグナル伝達分子として機能していることを示唆している。

aos 変異体に対する傷害処理において、ORG の発現量は減少するものの、半分程度は残っていた (図 2-3A、B)。植物においてはリノレン酸由来の種々オキシリピンが蓄積することが報告されており[170]、これらが残存した ORG の発現に関与している可能性が考えられる。図 2-3C に示したように、*aos* 変異体にリノレン酸を処理すると ORG の発現誘導が認められ、これは AOS による反応を介さないリノレン酸由来のオキシリピンが関与したためと考えられる。このようなオキシリピンとしては、JA 生合成の OPDA 前駆体である 13-ヒドロペルオキシリノレン酸や、傷害応答時に蓄積するとの報告がある hydroperoxide lyase や lipoxygenase 由来のオキシリピン、非酵素的に生じる phytoprostane 等が考えられる[171-174]。Phytoprostane は OPDA と構造的に似ており[175]、植物において遺伝子発現を制御することが報告されているが、その活性は OPDA より弱いと考えられている[176]。

今回の検討では 74 個の ORG 群の発現が傷害時に誘導されていた。これらの ORG 群にはシグナル伝達因子や転写因子が多く含まれており、OPDA が傷害応答時に上流のシグナル伝達因子として機能していることを示唆している。傷害時には酸化ストレスを引き起こす活性酸素が蓄積することが報告されており[177]、乾燥や低温、塩といった環境ストレス下においても酸化ストレスが生じることが報告されている[178-180]。今回同定された ORG 群の多くは酸化ストレスによる制御を受けるとの報告がなされている。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達は酸化ストレスによって活性化されるが[181-185]、ORG 群の中には MAPK シグナル伝達に関与する *OXI1* (At3g25250)、protein kinase

family (At4g25390)、*MAPKKK18* (At1g05100)、protein phosphatase 2C (At3g27140) が含まれていた。特に *OXII* はシロイヌナズナにおける酸化ストレス時のシグナル伝達に不可欠であることが知られている[186]。酸化ストレスはシロイヌナズナにおいてカルシウムシグナル経路を誘導することが報告されている[187, 188]。誘導型 ORG 群には calcium-binding EF-hand family protein (At4g27280、At5g39670)、a putative calcium-binding protein (At5g54490)、a calmodulinbinding protein (At5g26920)、a putative calmodulinrelated protein (At3g01830、At5g42380) といった多くのカルシウムシグナル伝達に関わる遺伝子が含まれていた。これらのシグナル伝達に関わる ORG 群の発現プロファイルは早期で一過的であり、OPDA が植物の酸化ストレス早期応答時に重要なシグナル分子として機能している可能性が考えられる。さらに ORG 群として同定された転写因子として *ZAT10* (At1g27730)、*AtERF5* (At5g47230)、*DREB2A* (At5g05410)、*MYB4* (At4g38620)、*ZAT12* (At5g59820) があるが、これらは低温や傷害、乾燥、塩ストレスといった酸化ストレスが発生するような環境下において発現が誘導されることが報告されている[140-143, 189, 190]。OPDA 処理によるこれら転写因子の発現誘導は 30 分以内に起きていた。以上のことは、傷害といった酸化ストレス下に植物が置かれた際に、OPDA が上流のシグナルとして機能し、早期の遺伝子発現変動を介した酸化ストレス応答に関わっていることを示唆している。

本研究において、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から JA や MeJA には発現の制御を受けず、OPDA にのみ制御を受ける ORG 群が存在することが明らかとなった。また ORG 群の多くは傷害処理時に発現が変動しており、OPDA を生合成できない変異体に傷害処理を行うと ORG の発現が抑制されることから、OPDA が傷害応答時に機能することが示唆された。また、OPDA は JA/MeJA とは異なる COI1 非依存的な情報伝達経路を用いて ORG の発現を引き起こしていた。以上のことから、OPDA は傷害応答をはじめとする生理現象に JA/MeJA とは異なる独自のシグナルとして機能することが示唆された (図 2-6)。

OPDA の生理的な機能はまだ不明な部分も多いが、今後 OPDA シグナルや OPDA 量に変化が生じるような変異体を活用することで、植物におけるオキシリピンシグナルの詳細が明らかにされていくことが期待される。

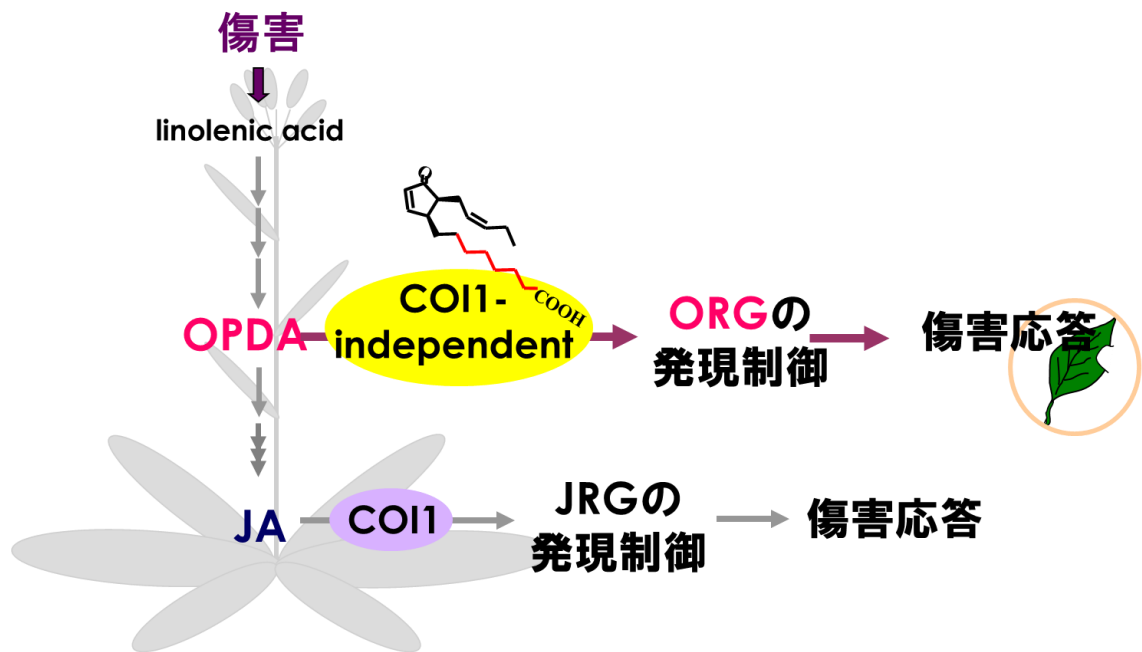


図 2-6. OPDA による ORG の遺伝子発現制御とシグナル情報伝達

第 3 章 ヒト神経細胞における酸化ストレス誘発細胞障害に対する 12-オキシ-フィトジェン酸の保護作用

3.1 序

ジャスモン酸類は、アラキドン酸から産生されるオキシリピンで、植物内では傷害応答、病虫害応答、葯の開裂といった多様な生理作用を持つことが報告されている[3]。第 2 章において、ジャスモン酸類の 1 つである 12-オキシ-フィトジェン酸(OPDA)が、植物における傷害等の酸化ストレスに対して防御応答を引き起こすための生理活性物質として機能している可能性について述べた。ジャスモン酸類は高等植物で生合成され、トマトやリンゴといった食品にも含まれていることが報告されているが[191-193]、一方で、ジャスモン酸類が哺乳類で生合成されるという報告はない。ジャスモン酸類の構造は哺乳類で生合成されるプロスタグランジンとよく似ており[22]、プロスタグランジンが哺乳類において、炎症や発熱といった多様な生理作用を引き起こすことから[26-28]、ジャスモン酸類が哺乳類においても何らかの生理的作用を持つ可能性が考えられる。動物細胞におけるジャスモン酸類の作用に関しては、ジャスモン酸 (JA) やジャスモン酸メチル (MeJA) の抗癌作用に関してはいくつかの研究がなされているものの[11-13]、その他に関してはほとんど報告がない。特に OPDA の動物細胞に対する作用に関しては、全くと言ってよいほど報告されていない。そこで本研究では、哺乳類におけるジャスモン酸類の酸化ストレスに対する作用を検討することとした。

動物細胞において酸化ストレスに対する感受性の高い組織の 1 つに神経細胞があり[194]、酸化ストレスによる神経細胞の障害がアルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患に関与していると考えられている[107, 116, 124]。動物細胞では、酸化ストレスに対抗するための、酸化ストレス応答システムとして nuclear factor erythroid2 related factor 2 (Nrf2) / kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) システムが存在する (図 1-4、1-5)。Nrf2 は転写因子で、通常は Keap1 によりユビキチン化され不活性化しているが[42]、何らか

の刺激で活性化すると Nrf2 が制御する抗酸化遺伝子群の発現を網羅的に誘導し[42, 45]、グルタチオンの蓄積や heme oxygenase-1 (HO-1)、NADPH quinone oxidoreductase (NQO1) の発現誘導といった抗酸化ストレス応答を引き起こすことが知られている[46-49]。そのため、Nrf2 の活性化は酸化ストレスによる神経細胞障害を保護することが報告されている[70-74]。

本研究において、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に対して、ジャスモン酸類を処理した後、酸化ストレスとして H_2O_2 刺激を行い、細胞生存率を測定したところ、OPDA を処理した細胞でのみ H_2O_2 刺激による細胞死が抑制された。また、OPDA は H_2O_2 刺激によるミトコンドリア膜電位の低下ならびに活性酸素の産生を抑制し、酸化ストレスに対して保護的な作用を示した。OPDA の保護作用メカニズムを解明するために、Nrf2 との関わりを検討したところ、OPDA 処理により Nrf2 の核蓄積が認められ、Nrf2 標的遺伝子群の誘導が認められた。以上のことより OPDA は動物細胞において Nrf2 経路を活性化することにより、酸化ストレスに対する保護作用を示すことが示唆された。

3.2 実験材料と方法

3.2.1 試薬

Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (1:1 (v/v)、DMEM/F-12)、5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H2DCFDA)、Lipofectamine 2000、Lipofectamine RNAiMAX、Opti-MEM I Reduced Serum Medium、pcDNA3.1 MycHis B ベクター、pcDNA3.1(+)ベクター、pcDNA3.1-Hygro ベクターは Life Technologies から購入した。Fetal bovine serum は Cell Culture Bioscience から購入した。cis-OPDA、(±)-JA、(±)-MeJA、dinor-OPDA、15d-PGJ₂ は Cayman Chemical から購入した。(−)-JA-Ile、(±)-12-OH-JA、3-oxo-2-(2'-pentenyl)cyclopentane-1-butyric acid (OPC4:0) は OlchemIm Ltd から購入した。H₂O₂、LDH Cytotoxic Test は Wako Pure Chemicals から購入した。GSH-Glo Glutathione Assay、pGL4.15 ベクター は Promega から購入した。抗 Nrf2 抗体、抗 GCLM 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗 lamin 抗体は Cell Signaling から購入した。抗 HO-1 抗体は Biomol から購入した。抗 GCLC 抗体、抗 β-actin 抗体、抗 NQO1 抗体、抗 glutathione reductase 抗体は Abcam から購入した。Horseradish peroxidase 標識二次抗体、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent は GE Healthcare から購入した。NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent、Micro BCA Protein Assay kit は Pierce から購入した。Mitochondria-selective dye JC-1 は Immunochemistry Technologies から購入した。Protease inhibitor cocktail、CMV14 ベクター、EZ view red anti FLAG M2 affinity gel は Sigma から購入した。RNeasy Mini kit、All Stars Negative Control siRNA は Qiagen から購入した。ReverTra Ace、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal、Can Get Signal Solution、KOD-Plus-Mutagenesis Kit は TOYOBO から購入した。Sample Buffer Solution with Reducing Reagent は Nacalai から購入した。Anti-HA-peroxidase high affinity (3F10) rat monoclonal antibody は Roche から購入した。

3.2.2 細胞培養

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞は DS Pharma Biomedical から購入した。細胞は 10% fetal bovine serum を含む DMEM/F-12 培地を用い、5% CO₂、37°C の下で培養した。HEK293 細胞は JCRB から購入し、細胞は 10% fetal bovine serum を含む DMEM 培地を用い、5% CO₂、37°C の下で培養した。SH-SY5Y 細胞を 8×10^3 cells/ 100 μ L/ウェルの細胞数で 96 ウェルプレートに播種し（実験に応じて、24 ウェルプレート、12 ウェルプレート、6 ウェルプレートへのスケールアップを実施し）、ジャスモン酸類を種々の濃度、時間で処理した。コントロールの細胞はジャスモン酸類を含まないエタノール溶媒のみを含む培地（エタノール終濃度 0.9%）で処理を行った。細胞に酸化ストレス処理を行う際には、ジャスモン酸類で細胞を 24 時間処理した後、ジャスモン酸類を含まない培地に置換し、200 μ M の H₂O₂ で種々の時間処理した。

3.2.3 細胞障害性測定

細胞が障害を受け、アポトーシスやネクローシスといった細胞死が生じると、細胞内から培地へ lactate dehydrogenase (LDH) が漏出する。そこで、細胞障害性測定は、培地中の LDH 活性を LDH Cytotoxic Test で測定することにより行った。細胞障害性 100%となるポジティブコントロールは、細胞を 2% (v/v) triton X-100 で溶解させ調製した。

3.2.4 活性酸素測定

活性酸素は CM-H2DCFDA プローブを用いて測定した。SH-SY5Y 細胞を遮光下で、10 μ M の CM-H2DCFDA と 37°C で 30 分間反応させ、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、フローサイトメーターで FL1 チャネル（488 nm excitation; 525 nm emission）の蛍光を測定した。

3.2.5 ミトコンドリア膜電位測定

ミトコンドリア膜電位は JC-1 試薬を用いて測定した。JC-1 はミトコンドリアに蓄積する脂溶性のカチオンで、ミトコンドリア膜電位依存的に赤色から緑色へと変化する試薬である。正常な細胞では、高いミトコンドリア膜電位が維持され、JC-1 は FL2 チャネル (488 nm excitation; 590 nm emission) で認識される赤色の蛍光複合体を形成する。一方細胞が障害を受け、ミトコンドリア膜電位が低下すると、JC-1 は FL1 チャネル (488 nm excitation; 525 nm emission) で認識される緑色の蛍光単量体を形成する[195]。SH-SY5Y 細胞を JC-1 で 15 分間染色した後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、フローサイトメーターで FL1 チャネルならびに FL2 チャネルで蛍光を測定した。FL1 (X 軸) と FL2 (Y 軸) の値をプロットした図を作成し、領域 1、2 に含まれる細胞数の割合を算出した。

3.2.6 イムノブロットティング

細胞からの核タンパク質の抽出は 1% protease inhibitor cocktail を含む NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent を用いて行った。細胞からの全タンパク質の抽出は 1% protease inhibitor cocktail を含む RIPA buffer を用いて行った。タンパク質濃度は Micro BCA Protein Assay kit を用いて測定した。3.5-5 μ g のタンパク質を Sample Buffer Solution with Reducing Reagent と混ぜ 95°C で 10 分間反応させた後、ポリアクリルアミドゲルの電気泳動に供し、polyvinylidene difluoride メンブレンに転写した。メンブレンを PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal を用いて室温で 1 時間反応させることによりブロッキングした後、1 次抗体と 4°C で一昼夜反応させた。1 次抗体は、Nrf2、lamin、GCLM、GCLC、HO-1、NQO1、glutathione reductase、 β -actin に対する抗体を用いた。1 次抗体と反応させたメンブレンを 0.1% (v/v) tween-20 を含む tris buffered saline (TBS) で洗浄し、horseradish peroxidase 標識 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。Anti-HA-peroxidase high affinity (3F10) rat monoclonal antibody を用いる場合の反応は、室温で 1 時間とした。抗体は全て Can Get Signal Solution

を用いて希釈した。Peroxidase 標識抗体と反応させたメンブレンに対して ECL PrimeWestern Blotting Detection Reagent を添加し、得られた発光シグナルを Image Quant LAS 3000 CCD camera system (Fujifilm) を用いて検出した。イムノブロットは 2 または 3 回実施したうちの代表的な 1 回分のデータを示した。

3.2.7 定量 PCR

細胞からの RNA の抽出は RNeasy Mini kit を用いて行い、DNase 処理過程を含むプロトコルで実施した。RNA を鋳型として、ランダムヘキサマープライマーを用いて、ReverTra Ace reverse transcriptase による逆転写反応を行い、cDNA を調製した。定量 PCR 反応は約 500 ng の cDNA をテンプレートとして、7500HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。各々の遺伝子を測定するために用いたプライマーならびに蛍光標識プローブ (5' - 3') は下記の通りである。データは GAPDH の発現量でノーマライズさせることにより算出した。

Nrf2 プライマー : Nrf2 forward (fwd)、TACTCCCAGGTTGCCCACA ; Nrf2 reverse (rev)、CATCTACAAACGGGAATGTCTGC ; Nrf2 プローブ (FAM-TAMRA) 、TCAGATGCTTTGTACTTTGATGACTGCATGC。

HO-1 プライマー : HO-1 fwd 、 CTTCTTCACCTTCCCCAACATT ; HO-1 rev 、GCAGTCTTGGCCTCTTCTATCAC; HO-1 プローブ、AGATGACTCCCGCAGTCAGGCA。

NQO1 プライマー : NQO1 fwd 、 CCTGGAAGGATGGAAGAAACG ; NQO1 rev 、AGAATCCTGCCTGGAAGTTTAGG ; NQO1 probe 、ACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCC。

GCLC プライマー : GCLC fwd、TCTCTAATAAAGAGATGAGCAACATGC ; GCLC rev、TTGACGATAGATAAAGAGATCTACGAA ; GCLC プローブ 、CAGGAGATGATCAATGCCTTCCTGCAAC。

GCLM プライマー : GCLM fwd、 GTTCAGTCCTTGGAGTTGCACA ; GCLM rev、
CCCAGTAAGGCTGTAAATGCTC; GCLM プローブ、 GCTGGATTCTGTGATCATTGCTTCACC。
Glutathione reductase プライマー : glutathione reductase fwd、
AGTGATCCCAAGCCCACAATAG ; glutathionereductase rev、
CCATCGCTGGTTATTCCTAAGC ; glutathione reductase プローブ、
AAAAAGTACACCGCCCCACACATCCT。

3.2.8 細胞内グルタチオン量測定

細胞内のグルタチオン量は GSH-Glo Glutathione Assay を用いて測定し、Micro BCA Protein Assay kit により求めた細胞の総タンパク質量でノーマライズさせることにより算出した。

3.2.9 ARE レポーターアッセイ

Hygromycin 耐性遺伝子を持つ pGL4.15 ベクターのルシフェラーゼ配列上流のマルチクローニングサイトに thymidine kinase minimal promoter と ARE (TTTCTGCTGCGTCATGTTTG) 配列を 3 個連結させたものを組み込み、pGL4-3 × ARE レポータープラスミドを構築した。SH-SY5Y 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて pGL4-3 × ARE レポータープラスミドを導入し、75 µg/mL hygromycin による選抜後、限界希釈法によってクローン化し、ARE レポーター安定発現細胞を得た。レポーター活性を測定する際には、Bright-Glo Luciferase Assay System を用いた。

3.2.10 siRNA による Nrf2 ノックダウン

SH-SY5Y 細胞において Nrf2 をノックダウンするために、Nrf2 siRNA (5'-CCCATTGATGTTTCTGATCTA-3') を用い、コントロールとしては All Stars Negative Control siRNA を用いた。96 ウェルプレートの 1 ウェルあたり、20 µL の Opti-MEM I Reduced

Serum Medium、0.2 μ L の Lipofectamine RNAiMAX、3 pmol の siRNA、細胞 8×10^3 cells (100 μ L に懸濁) を混ぜて播種し、各アッセイへ用いた。

3.2.11 ユビキチン化アッセイ

ユビキチン (Ub) の N 末に HA タグを付加させた配列を 8 個タンデムにつなげた配列である (HA-Ub)₈ を pcDNA3.1 MycHis B ベクターへ組込み、HA-Ub 発現プラスミドである pcDNA3.1-MHB-(HA-Ub)₈ の構築を行った。(HA-Ub)₈ の配列を下記に示す。

```
ATGGCCAGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTTCTCGTGGTATGCAGATCTT
CGTGAAGACTCTGACTGGTAAGACCATCACCTCGAGGTTGAGCCCAGTGACACCATCG
AGAATGTCAAGGCAAAGATCCAAGATAAGGAAGGCATCCCTCCTGACCAGCAGAGGCTG
ATCTTTGCTGGAAAACAGCTGGAAGATGGGCGCACCCCTGTCTGACTACAACATCCAGAA
AGAGTCCACCCTGCACCTGGTGCTCCGTCTCAGAGGTGGGATGGCCAGTTACCCTTATGA
TGTGCCGGATTATGCCTCCCTTTCTCGTGGTATGCAGATCTTCGTGAAGACTCTGACTGGT
AAGACCATCACCTCGAGGTTGAGCCCAGTGACACCATCGAGAATGTCAAGGCAAAGAT
CCAAGATAAGGAAGGCATCCCTCCTGACCAGCAGAGGCTGATCTTTGCTGGAAAACAGC
TGGAAGATGGGCGCACCCCTGTCTGACTACAACATCCAGAAAGAGTCCACCCTGCACCTG
GTGCTCCGTCTCAGAGGTGGGATGGCCAGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCC
TTTCTCGTGGTATGCAGATCTTCGTGAAGACTCTGACTGGTAAGACCATCACCTCGAGG
TTGAGCCCAGTGACACCATCGAGAATGTCAAGGCAAAGATCCAAGATAAGGAAGGCATC
CCTCCTGACCAGCAGAGGCTGATCTTTGCTGGAAAACAGCTGGAAGATGGGCGCACCCCT
GTCTGACTACAACATCCAGAAAGAGTCCACCCTGCACCTGGTGCTCCGTCTCAGAGGTG
GGATGGCCAGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTTCTCGTGGTATGCAGAT
CTTCGTGAAGACTCTGACTGGTAAGACCATCACCTCGAGGTTGAGCCCAGTGACACCA
TCGAGAATGTCAAGGCAAAGATCCAAGATAAGGAAGGCATCCCTCCTGACCAGCAGAGG
```

CTGATCTTTGCTGGAAAACAGCTGGAAGATGGGCGCACCCCTGTCTGACTACAACATCCA
GAAAGAGTCCACCCTGCACCTGGTGCTCCGTCTCAGAGGTGGGATGGCCAGTTACCCTT
ATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTTCTCGTGGTATGCAGATCTTCGTGAAGACTCTGAC
TGGTAAGACCATCACCCCTCGAGGTTGAGCCCAGTGACACCATCGAGAATGTCAAGGCAA
AGATCCAAGATAAGGAAGGCATCCCTCCTGACCAGCAGAGGCTGATCTTTGCTGGAAAA
CAGCTGGAAGATGGGCGCACCCCTGTCTGACTACAACATCCAGAAAGAGTCCACCCTGCA
CCTGGTGCTCCGTCTCAGAGGTGGGATGGCCAGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCC
TCCCTTTCTCGTGGTATGCAGATCTTCGTGAAGACTCTGACTGGTAAGACCATCACCCCTC
GAGGTTGAGCCCAGTGACACCATCGAGAATGTCAAGGCAAAGATCCAAGATAAGGAAG
GCATCCCTCCTGACCAGCAGAGGCTGATCTTTGCTGGAAAACAGCTGGAAGATGGGCGC
ACCCTGTCTGACTACAACATCCAGAAAGAGTCCACCCTGCACCTGGTGCTCCGTCTCAG
AGGTGGGATGGCCAGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTTCTCGTGGTATG
CAGATCTTCGTGAAGACTCTGACTGGTAAGACCATCACCCCTCGAGGTTGAGCCCAGTGA
CACCATCGAGAATGTCAAGGCAAAGATCCAAGATAAGGAAGGCATCCCTCCTGACCAGC
AGAGGCTGATCTTTGCTGGAAAACAGCTGGAAGATGGGCGCACCCCTGTCTGACTACAAC
ATCCAGAAAGAGTCCACCCTGCACCTGGTGCTCCGTCTCAGAGGTGGGATGGCCAGTTA
CCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTTCTCGTGGTATGCAGATCTTCGTGAAGACT
CTGACTGGTAAGACCATCACCCCTCGAGGTTGAGCCCAGTGACACCATCGAGAATGTCAA
GGCAAAGATCCAAGATAAGGAAGGCATCCCTCCTGACCAGCAGAGGCTGATCTTTGCTG
GAAAACAGCTGGAAGATGGGCGCACCCCTGTCTGACTACAACATCCAGAAAGAGTCCACC
CTGCACCTGGTGCTCCGTCTCAGAGGTGGGTGA。

ヒト Nrf2 の Neh2 ドメイン発現プラスミドとして、CMV14 ベクターにヒト Nrf2 (アクセ
ッション番号 : NM_006164) のコーディング領域 1 番目から 113 番目までのアミノ酸を組
込んだ CMV14-Neh2 プラスミドを構築した。CMV14 に組込むことにより、Neh2 の C 末端

側に Flag タグが付加して発現するようになる。CMV14-Neh2 に対し、KOD-Plus-Mutagenesis Kit を用いることにより、Neh2 内でユビキチン化を受けるとの報告がなされているリジン残基 7 箇所（アミノ酸の 44、50、52、53、56、64、68 番目の位置）をアルギニンに置換し、CMV14-Neh2 (K7R) の構築を行った。ヒト Keap1 の発現プラスミドとして、pcDNA3.1(+) へヒト Keap1（アクセッション番号：NM_203500）のコーディング領域を組込んだ pcDNA3.1-Keap1 プラスミドを構築した。HEK293 細胞に、CMV14-Neh2 または CMV14-Neh2(K7R)、pcDNA3.1-Keap1、pcDNA3.1-MycHis-(HA-Ub)₈ を導入した。導入試薬としては lipofectamine LTX を用いた。プラスミド導入 48 時間後に、OPDA を 8 時間処理し、細胞溶解液 (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、120 mM NaCl、5 mM EDTA、10% glycerol、1% tritonX-100、1% protease inhibitor) にて細胞を溶解し、細胞溶解液を調製した。細胞溶解液に Sample Buffer Solution with Reducing Reagent を加え、95°C で 10 分処理したものを total lysate サンプルとしてイムノブロットに供した。細胞溶解液に対して EZ view red anti FLAG M2 affinity gel を添加し、4°C で一昼夜反応させて Flag タグに対する免疫沈降を行い、洗浄液 (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、100 mM NaCl、10% glycerol、1% tritonX-100、0.1% NP-40) にて洗浄後、Sample Buffer Solution with Reducing Reagent を加え、95°C で 10 分間処理し溶出させたものを免疫沈降サンプルとしてイムノブロットに供した。

3.2.12 統計解析

対照群と被検物質処理群 1 濃度の 2 群間比較には Student の t 検定を、対照群と 2 濃度以上の被検物質処理群の比較は Williams の多重比較検定を用いて統計解析を行った。統計解析ソフト Pharmaco Analyst を使用し、*p* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判断した。

3.3 結果

3.3.1 H₂O₂ 誘発細胞障害の OPDA による抑制

初めに、SH-SY5Y 細胞における H₂O₂ 誘発細胞障害に対して、ジャスモン酸類である OPDA、JA、MeJA、ジャスモノイルイソロイシン (JA-Ile)、12-ヒドロキシジャスモン酸 (12-OH-JA) の作用を見た。SH-SY5Y 細胞に対して、OPDA、JA、MeJA、JA-Ile、12-OH-JA を 24 時間処理した後、H₂O₂ を 24 時間処理し、細胞障害性として LDH 活性を測定した。その結果、H₂O₂ により上昇した LDH 活性は OPDA を前処理した場合のみ、抑制されることが分かった (図 3-1A)。一方、他のジャスモン酸類による変化は認められなかった (図 3-1A)。また OPDA による H₂O₂ 誘発の細胞障害に対する抑制効果は濃度依存的であった (図 3-1B)。これらの結果は、ジャスモン酸類の中で、OPDA のみが酸化ストレスに対する保護作用を示す特性を持つことを示している。

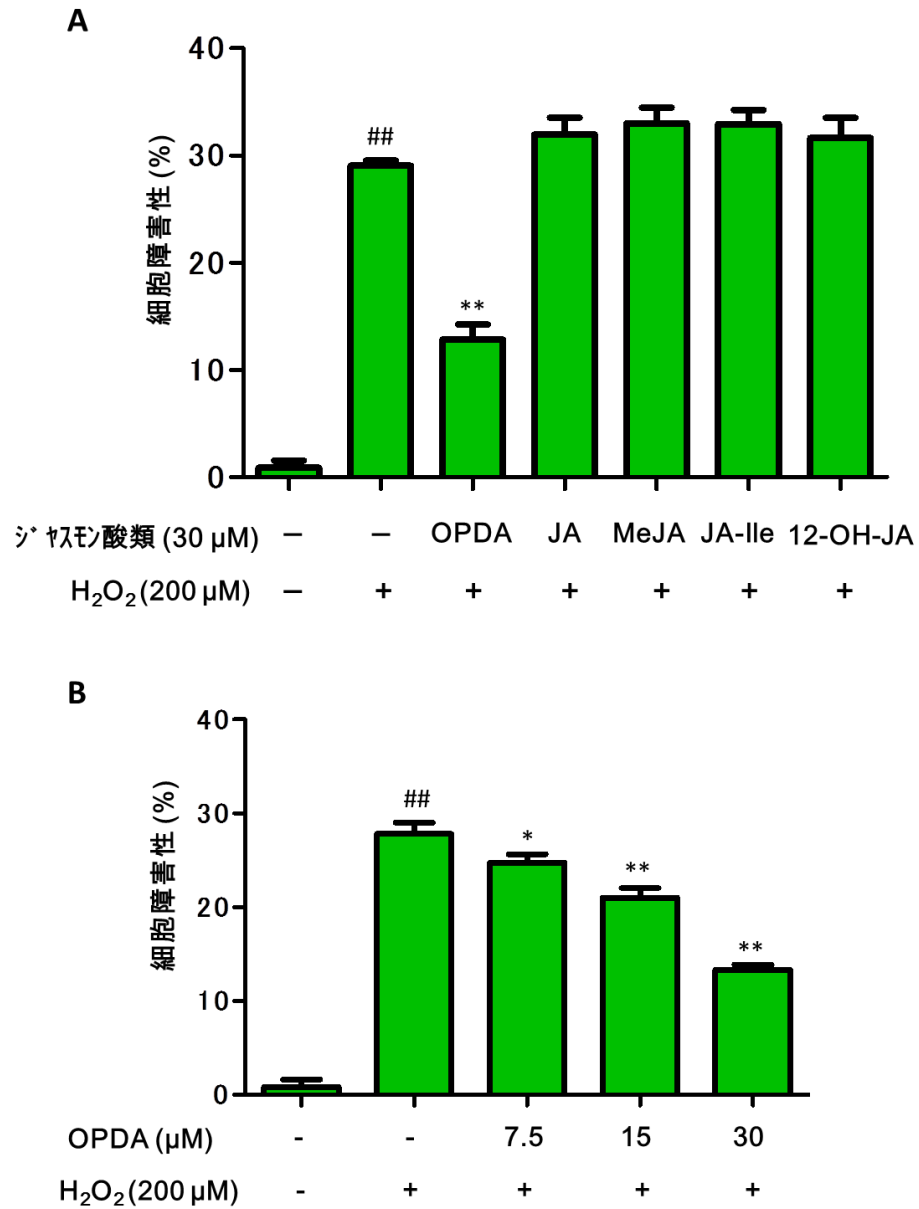


図 3-1. H_2O_2 誘発細胞障害の OPDA による抑制

SH-SY5Y 細胞を (A) 30 μ M の OPDA、JA、MeJA、JA-Ile、12-OH-JA、(B) 7.5、15、30 μ M の OPDA により 24 時間処理し、培地交換後に 200 μ M の H_2O_2 で 24 時間処理し、LDH 活性により細胞障害性を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (## $p < 0.01$ 対コントロール、* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 対 H_2O_2 処理)。

3.3.2 H₂O₂ 誘発ミトコンドリア膜電位低下に対する OPDA の保護作用

酸化ストレスとミトコンドリアは密接な関わりを持つことが知られているため、ミトコンドリアの機能に H₂O₂ と OPDA がどのような影響を与えるかを調べることにした。細胞が障害を受けるとミトコンドリア膜電位の低下がおこることが知られている。そこで、ミトコンドリア膜電位を測定する JC-1 試薬を用いて、H₂O₂ 誘発細胞障害時のミトコンドリア膜電位とそれに対する OPDA の作用を見ることとした。JC-1 は正常で膜電位が高く保たれている細胞においては赤蛍光を発するが、障害を受け膜電位が低下した細胞においては緑蛍光を発する。SH-SY5Y 細胞に対して、OPDA を 24 時間処理した後 H₂O₂ を 24 時間処理し、JC-1 試薬で染色し、膜電位を測定した。その結果、コントロールの細胞では高い膜電位を持つ細胞が 94%であるのに対し、H₂O₂ を処理した細胞では高い膜電位を持つ細胞が 32%にまで減少しており、逆に H₂O₂ を処理することにより低い膜電位を持つ細胞が 4%から 68%にまで増加していた（図 3-2、A1、C1、A2、C2 領域、）。OPDA 単独処理においては、コントロールと比較し膜電位に変化は認められなかった（図 3-2、B1、B2 領域）。OPDA を処理した後に H₂O₂ を処理した細胞では、H₂O₂ のみを処理した場合と比べて膜電位の低い細胞の数は著しく減少し、膜電位の高い細胞の数が増加していた（図 3-2、D1、D2 領域）。以上のことより、OPDA は H₂O₂ によるミトコンドリア膜電位の低下から保護する作用を持つことが示された。

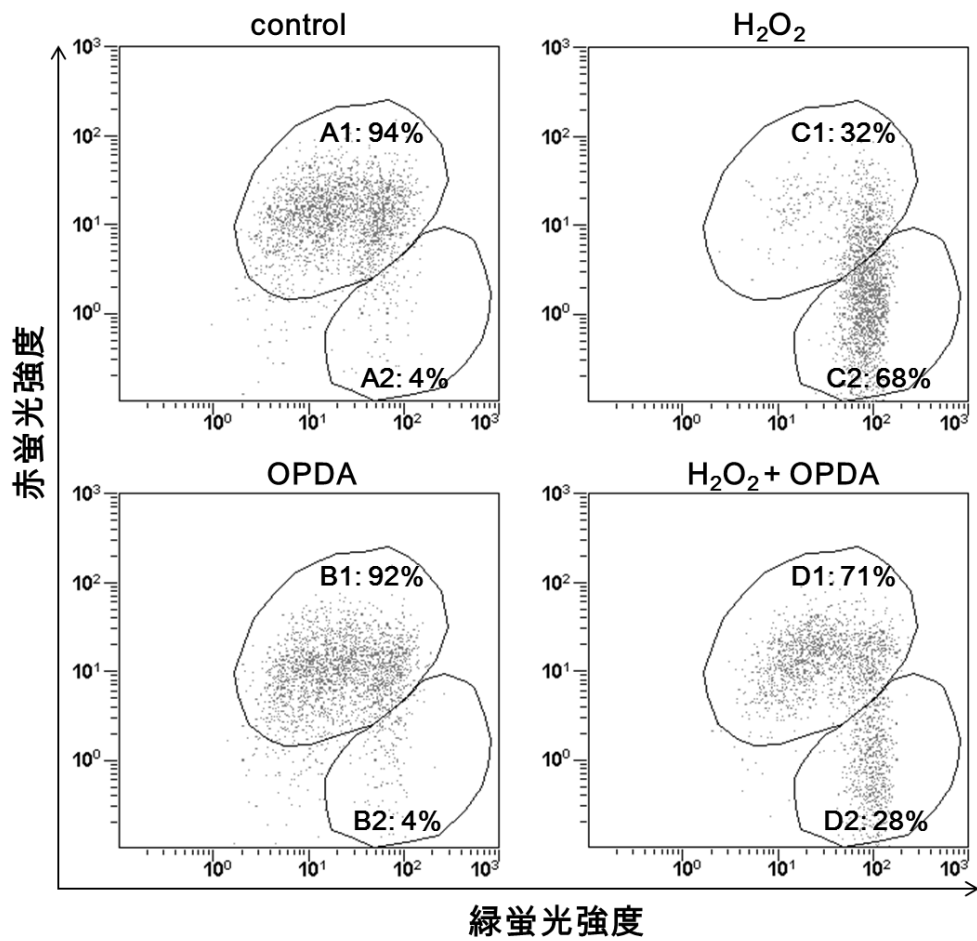


図 3-2. H₂O₂ 誘発ミトコンドリア膜電位低下に対する OPDA の保護作用

SH-SY5Y 細胞において、30 μ M の OPDA を 24 時間処理し、培地交換後に 200 μ M の H₂O₂ で 24 時間処理し、JC-1 試薬にて染色を行った。その後 JC-1 で染色した細胞が発する蛍光を解析し、ミトコンドリア膜電位を測定した。ドットプロットは X 軸を緑蛍光の強度、Y 軸を赤蛍光の強度とした時の細胞の分布を示している。

3.3.3 H₂O₂ 誘発活性酸素産生に対する OPDA の抑制効果

OPDA が H₂O₂ 誘発細胞死を抑制する際に、細胞内の活性酸素量にどのような変化が生じているのかを調べた。SH-SY5Y 細胞に OPDA を 24 時間処理し、H₂O₂ を 2 時間処理した後、細胞内活性酸素を CM-H2DCFDA で染色し、活性酸素量を測定した。その結果、H₂O₂ を処理した場合は、細胞内活性酸素の増加が認められたが、OPDA を 24 時間前処理した場合は、細胞内活性酸素の増加が抑制されることが分かった（図 3-3）。以上のことより、OPDA の前処理は細胞内の抗酸化ストレス応答を誘導している可能性が示唆された。

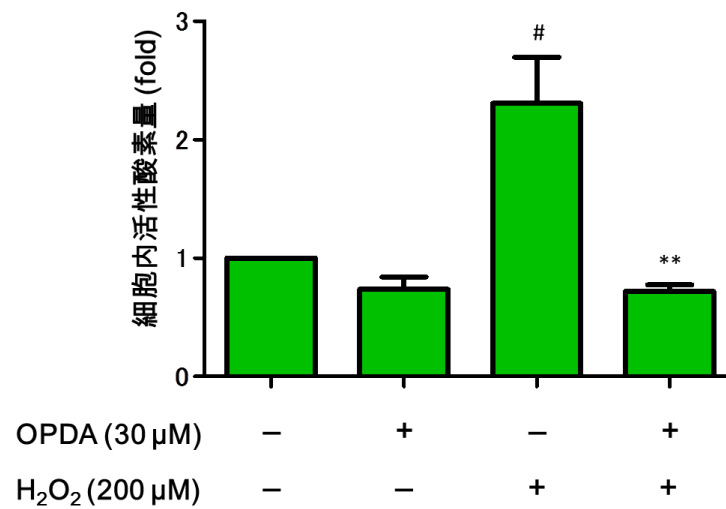


図 3-3. H₂O₂ 誘発活性酸素産生に対する OPDA の抑制効果

SH-SY5Y 細胞において、30 μM の OPDA を 24 時間処理し、培地交換後に 200 μM の H₂O₂ で 2 時間処理し、活性酸素量を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた未処理の細胞に対する変化率の平均値±標準誤差で示した (^{##} $p < 0.01$ 対コントロール、^{*} $p < 0.05$; ^{**} $p < 0.01$ 対 H₂O₂ 処理)。

3.3.4 Nrf2 シグナル経路の OPDA による活性化

Nrf2 シグナル経路が活性化されると、プロモーター領域に ARE 配列を持つ遺伝子群の発現が誘導され、抗酸化ストレス応答が引き起こすことが知られている[42]。そこで、OPDA が Nrf2 シグナル経路を活性化させることにより、細胞を酸化ストレスから保護したかどうかを調べることにした。初めに ARE レポーターアッセイによりジャスモン酸類が Nrf2 シグナル経路を活性化するかどうかを検討した。Nrf2 が結合する ARE 配列をルシフェラーゼの上流に組込んだ発現ベクターを SH-SY5Y 細胞へ安定発現させ、OPDA、JA、MeJA、JA-Ile、12-OH-JA を 24 時間処理し、ルシフェラーゼの発光量を測定した。その結果、JA、MeJA、JA-Ile、12-OH-JA 処理ではシグナルの上昇は認められなかったが、OPDA を処理した場合のみ ARE レポーターシグナルが上昇し、Nrf2 が活性化していることが分かった (図 3-4A)。次に OPDA が Nrf2 の核蓄積を引き起こしているかどうかを見るために、OPDA を 1、2、3、6 時間処理した細胞の核タンパク質を抽出し、抗 Nrf2 抗体を用いたイムノブロットングを実施した。その結果、OPDA 処理後 1 時間という早い時間帯から Nrf2 が核に蓄積していることが分かった (図 3-4B)。これらの結果は OPDA が Nrf2 シグナル経路を迅速に活性化させていることを示唆している。

活性酸素や求電子化合物は Nrf2 の負の制御因子である Keap1 のシステイン残基を修飾し Keap1 の構造を変化させることにより、Nrf2 シグナルを活性化させることが報告されている[42, 45, 53, 54]。そこで OPDA が Nrf2 を活性化させるメカニズムに活性酸素が関与しているかどうかを調べるために、OPDA 処理後の細胞内活性酸素量を測定した。その結果、OPDA は処理後 1~3 時間の間に一過的に活性酸素量を増大させることが分かった (図 3-4C)。従って Nrf2 シグナル伝達経路の活性化に活性酸素が寄与している可能性が考えられた。

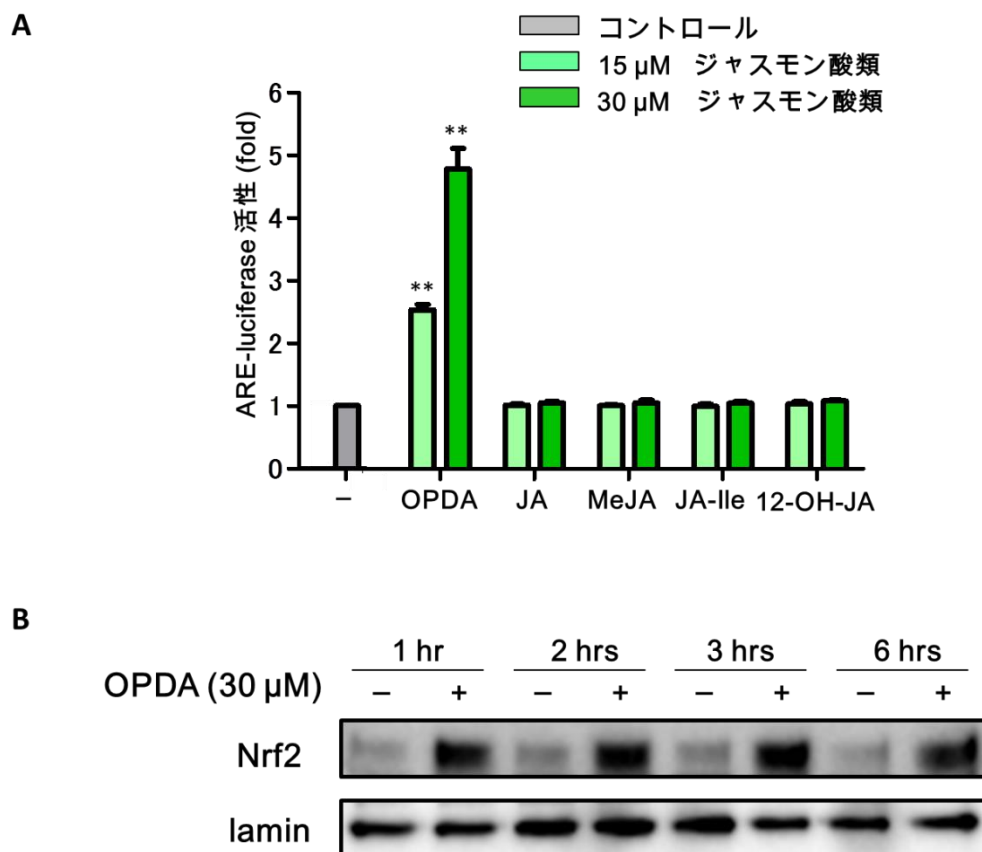


図 3-4. Nrf2 シグナル経路の OPDA による活性化

(A) SH-SY5Y 細胞を親株とした ARE レポーター細胞に対して、15 もしくは 30 μ M の OPDA、JA、MeJA、JA-Ile、12-OH-JA を 24 時間処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた未処理の細胞に対する変化率の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (** $p < 0.01$ 対コントロール)。

(B) SH-SY5Y 細胞に対して 30 μ M の OPDA を 1、2、3、6 時間処理し、核における Nrf2 タンパク質の発現量をイムノブロッティングにて解析した。Lamin はローディングコントロールとして用いた。

C

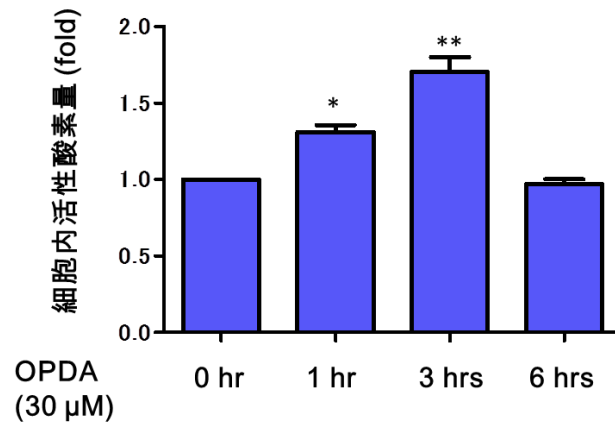


図 3-4. (C) SH-SY5Y 細胞に対して 30 μ M の OPDA を 1、3、6 時間処理し、活性酸素量を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた未処理の細胞に対する変化率の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 対コントロール)。

3.3.5 OPDA による抗酸化酵素群の発現誘導

Nrf2 シグナル経路の活性化は細胞内の抗酸化応答に重要な遺伝子群の発現を誘導することが知られている[42]。これらの遺伝子群の 1 つにグルタチオン合成酵素である GCL がある。GCL はモジュレートサブユニットの GCLM と触媒サブユニットの GCLC から成る。SH-SY5Y 細胞において OPDA を処理した際に GCLM と GCLC の発現レベルに変化があるのかどうかを調べたところ、GCLM に関しては、mRNA とタンパク質のいずれの発現量も上昇していた (図 3-5A、B)。一方 GCLC に関しては mRNA の発現量の上昇が認められた (図 3-5A)。OPDA が GCLM の mRNA ならびにタンパク質の発現量を増加させたため、細胞内のグルタチオン量に変化があるかどうかを見たところ、OPDA 処理 24 時間後に濃度依存的なグルタチオンの蓄積が認められた (図 3-5C)。グルタチオン合成酵素に加えて、他の抗酸化や解毒化に関わる酵素群である HO-1 や NQO1、glutathione reductase の発現解析を行った。その結果、いずれの遺伝子においても OPDA を処理することで mRNA ならびにタンパク質の発現量が増加することが分かった (図 3-5D、E)。以上の結果より OPDA は Nrf2 シグナル伝達経路を活性化させ、抗酸化応答を引き起こしていることが示唆された。

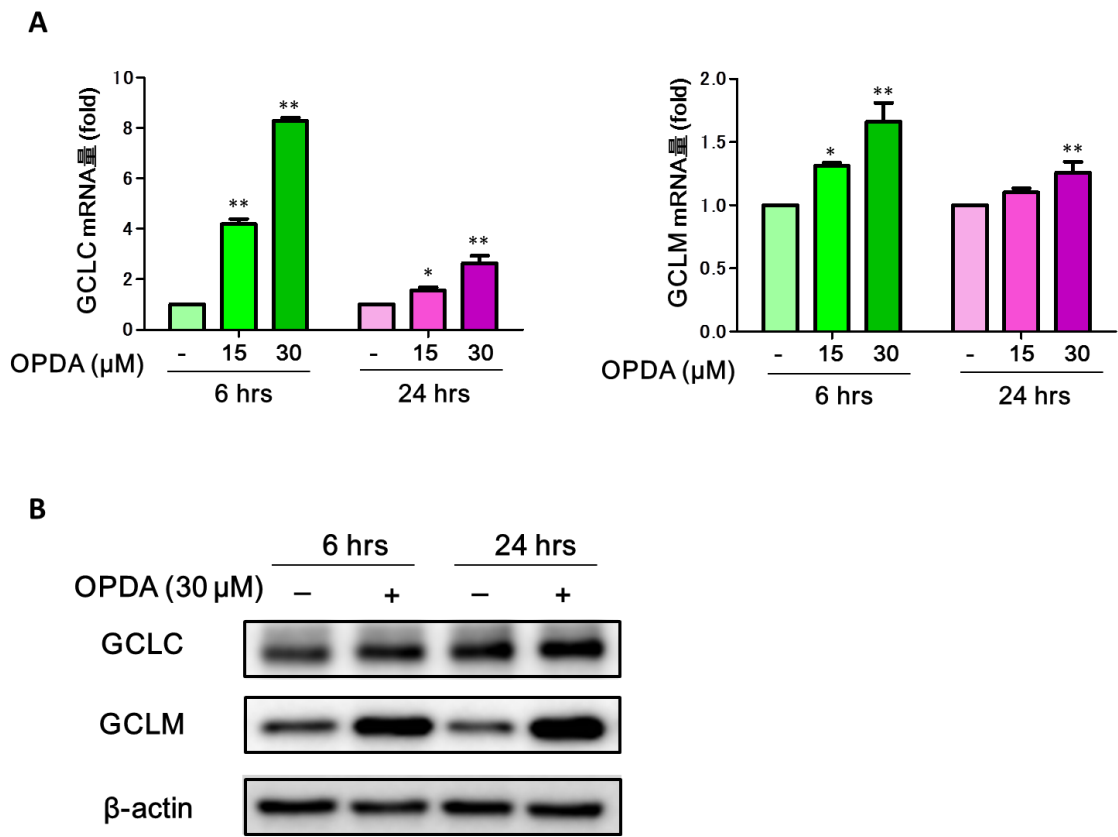


図 3-5. OPDA による抗酸化酵素の発現誘導

(A) SH-SY5Y 細胞に対し、15、30 μM の OPDA を 6 または 24 時間処理し、定量 PCR により GCLM と GCLC の mRNA 発現量を解析した。3 回の独立した実験から得られた未処理の細胞に対する変化率の平均値±標準誤差で示した (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 対コントロール)。

(B) SH-SY5Y 細胞に対し、15、30 μM の OPDA を 6 または 24 時間処理し、イムノブロッティングにて細胞全体における GCLM と GCLC のタンパク質発現量を解析した。β-actin はローディングコントロールとして用いた。

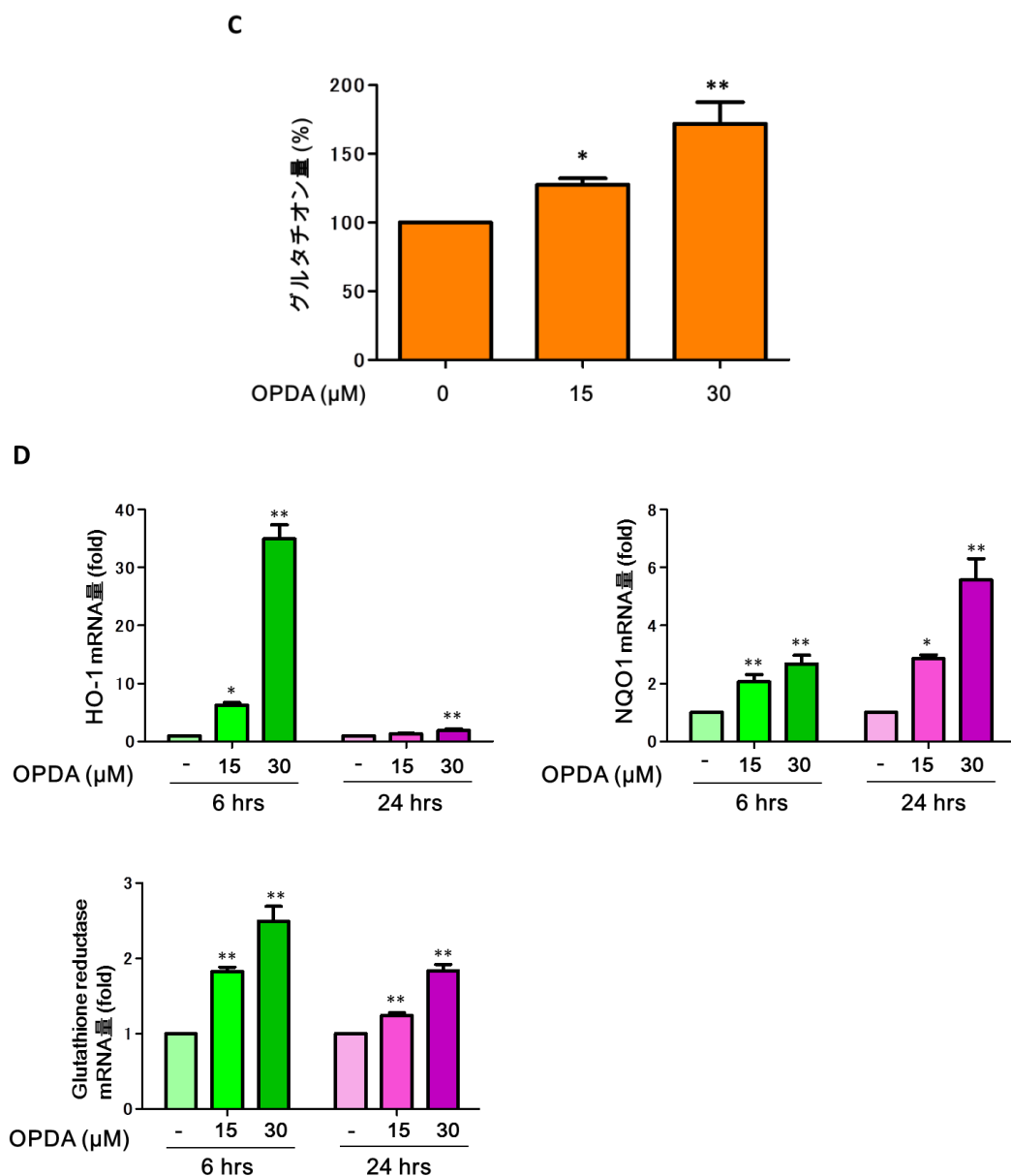


図 3-5. (C) SH-SY5Y 細胞に対し、15、30 μM の OPDA を 24 時間処理し、総グルタチオン量を測定した。3 回の独立した実験から得られた未処理の細胞に対する変化率の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 対コントロール)。

(D) SH-SY5Y 細胞に対し、15、30 μM の OPDA を 6 または 24 時間処理し、定量 PCR により HO-1、NQO1、glutathione reductase の mRNA 発現量を解析した。3 回の独立した実験から得られた未処理の細胞に対する変化率の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 対コントロール)。

E

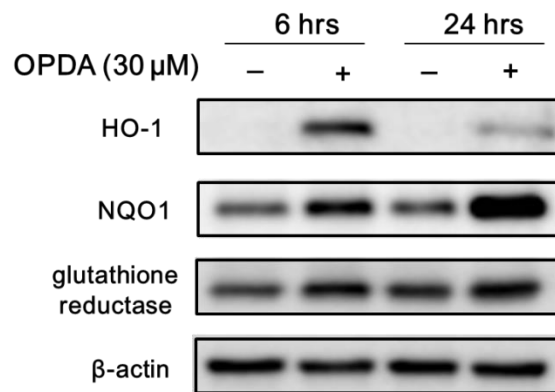


図 3-5. (E) SH-SY5Y 細胞に対し、15、30 μ M の OPDA を 6 または 24 時間処理し、イムノブロットイングにて細胞全体における HO-1、NQO1、glutathione reductase のタンパク質発現量を解析した。 β -actin はローディングコントロールとして用いた。

3.3.6 Nrf2 シグナル経路を介した OPDA の細胞保護効果

OPDA による H_2O_2 誘発細胞障害の抑制に Nrf2 がどの程度寄与しているかを検証するために、SH-SY5Y 細胞へ Nrf2 の siRNA を導入し、Nrf2 や Nrf2 標的遺伝子群の発現、 H_2O_2 誘発細胞障害へ与える影響を調べた。Nrf2 の siRNA 導入は OPDA による Nrf2 の核蓄積を抑制し、OPDA による GCLM、HO-1、NQO1、glutathione reductase の発現誘導も抑制した（図 3-6A、B）。この時の H_2O_2 誘発細胞障害を調べたところ、OPDA による H_2O_2 誘発細胞傷害抑制は Nrf2 を siRNA でノックダウンすることにより阻害されることが分かった（図 3-6C）。以上の結果は Nrf2 の活性化による Nrf2 下流の抗酸化遺伝子群の発現誘導が、OPDA の酸化ストレスに対する保護作用に関与していることを示している。一方、siRNA による Nrf2 の核蓄積の抑制に比べ、 H_2O_2 誘発細胞障害抑制の阻害が弱いことから Nrf2 以外の経路の存在も示唆される。

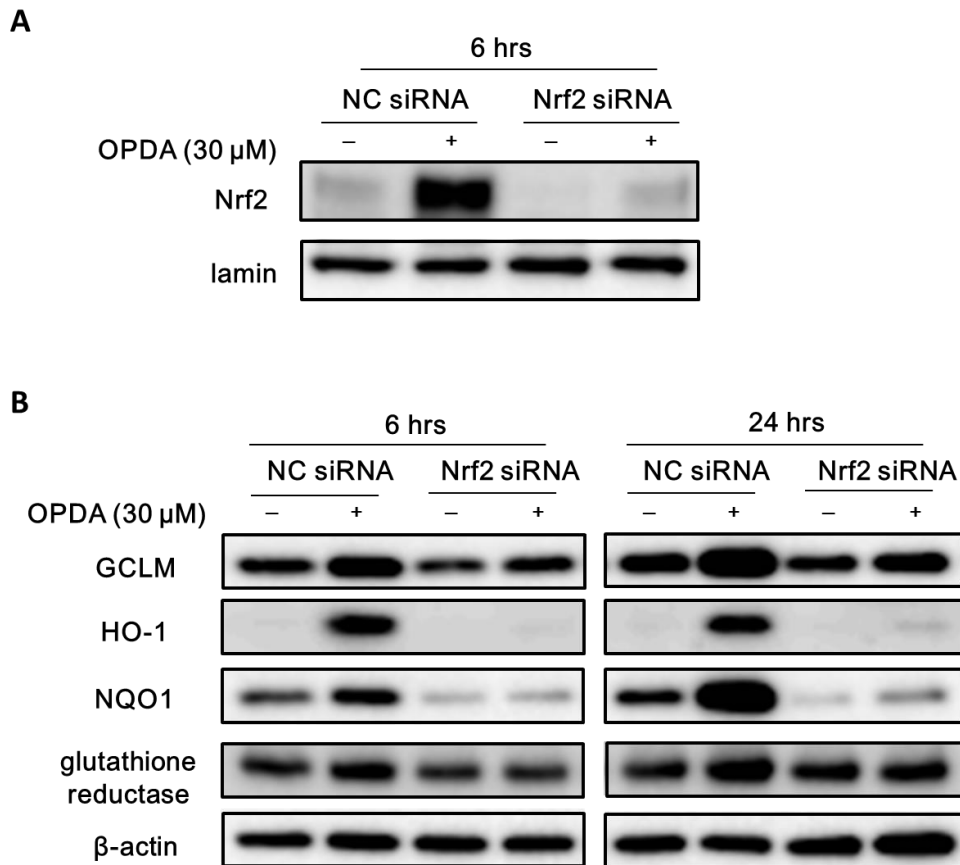


図 3-6. Nrf2 を介した OPDA の細胞保護作用

(A) SH-SY5Y 細胞へネガティブコントロール (NC) または Nrf2 の siRNA を導入し、24 時間後に OPDA を 6 時間処理した。核における Nrf2 タンパク質の発現量をイムノブロッティングにて解析した。Lamin はローディングコントロールとして用いた。

(B) SH-SY5Y 細胞へ NC または Nrf2 の siRNA を導入し、24 時間後に OPDA を 6 または 24 時間処理した。イムノブロッティングにて細胞全体における GCLM、HO-1、NQO1、glutathione reductase のタンパク質発現量を解析した。 β -actin はローディングコントロールとして用いた。

C

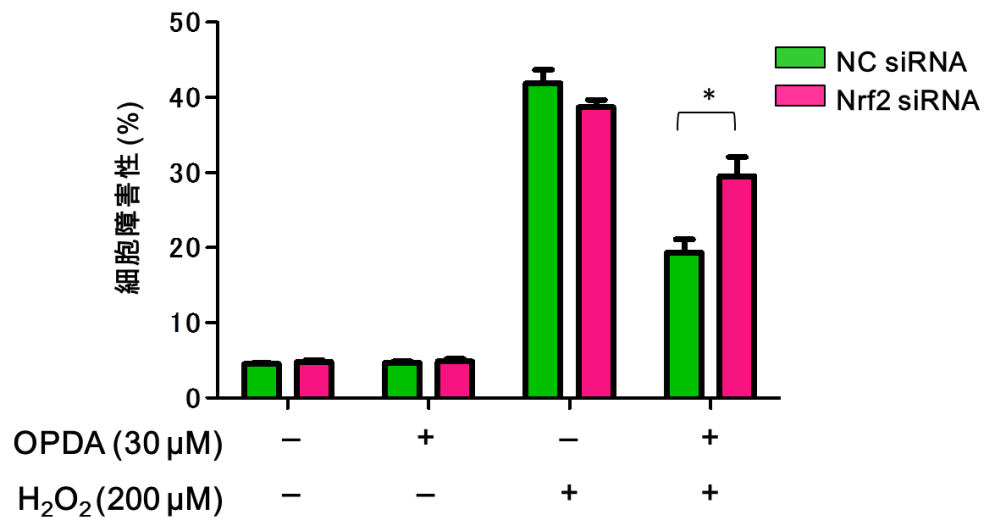


図 3-6. (C) SH-SY5Y 細胞へネガティブコントロール (NC) または Nrf2 の siRNA を導入し、24 時間後に OPDA を 24 時間処理した。培地交換後に 200 μM の H₂O₂ で 24 時間処理し、LDH 活性により細胞障害性を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±標準誤差で示した (* $p < 0.05$ 対コントロール)。

3.3.7 Nrf2 ユビキチン化の OPDA による抑制

Nrf2 は定常状態ではユビキチンリガーゼのアダプター分子である Keap1 によりユビキチン化を受け分解されているが (図 3-7A)、Keap1 による制御から外れるとユビキチン化が抑制され、核内へ移行し Nrf2 シグナルを活性化させることが分かっている。そこで OPDA 処理により Nrf2 のユビキチン化状態に変化があるのかを調べた。初めに HEK293 細胞に Neh2-Flag (Neh2 は Nrf2 の N 末端領域でユビキチン化を受けることが報告されている領域)、Keap1 および HA-Ub 発現プラスミドをそれぞれ図 3-7B に示すような組み合わせで導入し、Flag タグに対する免疫沈降を行った。得られた免疫沈降サンプルを用いて、イムノブロットを行い抗 HA 抗体により検出した (図 3-7B)。Neh2-Flag、Keap1 および HA-Ub の 3 種を発現させたサンプルでは、ラダー状のバンドが認められ (矢印)、Neh2 がユビキチン化されていることが示唆された。ラダーバンドが、Neh2 のユビキチン化によるものであるかを検証するために、Neh2 内のユビキチン化サイトと報告されている[52]リジン 7 箇所をアルギニンに置換させた Neh2-Flag (K7R) 発現プラスミドを用いて同様の検討を行った。その結果、ラダーバンド (矢印) は野生型導入サンプルでのみ認められた (図 3-7C)。従って、Neh2-Flag、Keap1、HA-Ub を発現させた際に認められるラダーバンドは Neh2 のユビキチン化を検出していることが分かった。次に、Neh2 のユビキチン化が OPDA 処理により変化するかについて検討した。HEK293 細胞に、Neh2-Flag、Keap1、HA-Ub を発現させ、30 μ M の OPDA を 8 時間処理し、Flag タグに対する免疫沈降を行った。得られた免疫沈降サンプルを用いて、イムノブロットを行い抗 HA 抗体により検出した (図 3-7D)。その結果、OPDA 処理サンプルではラダーバンドが減少しており Neh2 のユビキチン化が減少していることが示唆された。以上の検討から、OPDA は Neh2 のユビキチン化を抑制し、Nrf2 シグナル経路を活性化させていることが示唆された。

A

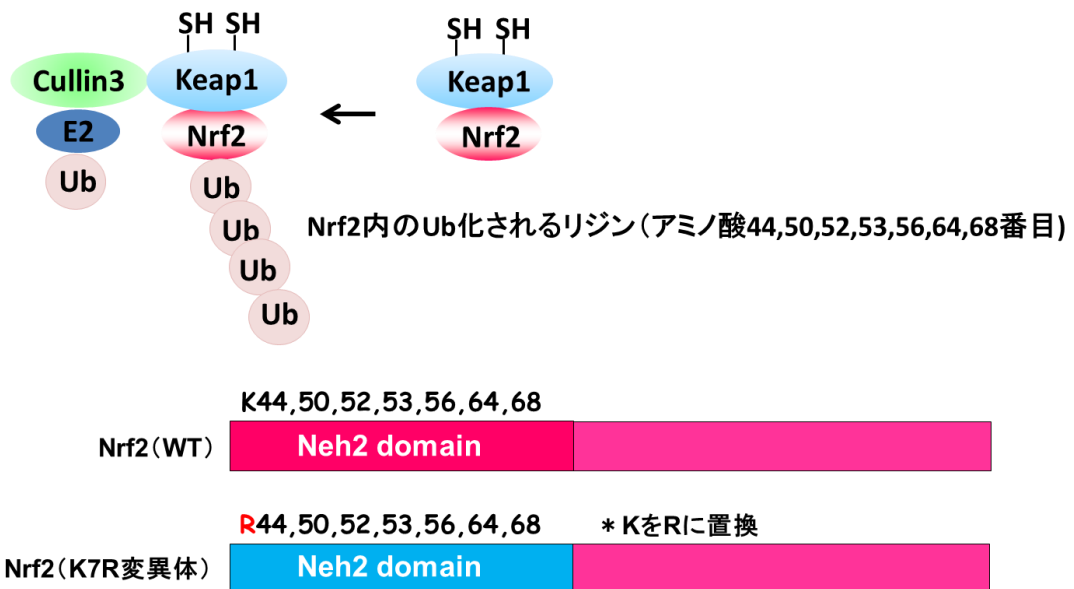


図 3-7. Neh2 ユビキチン化の OPDA による抑制

(A) Nrf2 のユビキチン化機構を示す。Nrf2 はユビキチンリガーゼのアダプターである Keap1 によりユビキチン化を受け、分解される。Nrf2 の N 末端領域の Neh2 domain 内に位置するアミノ酸の 44、50、52、53、56、64、68 番目のリジン残基がユビキチン化を受ける。これから 7 ヲ所のリジン残基をアルギニン置換した変異体を K7R 変異体と名付けた。

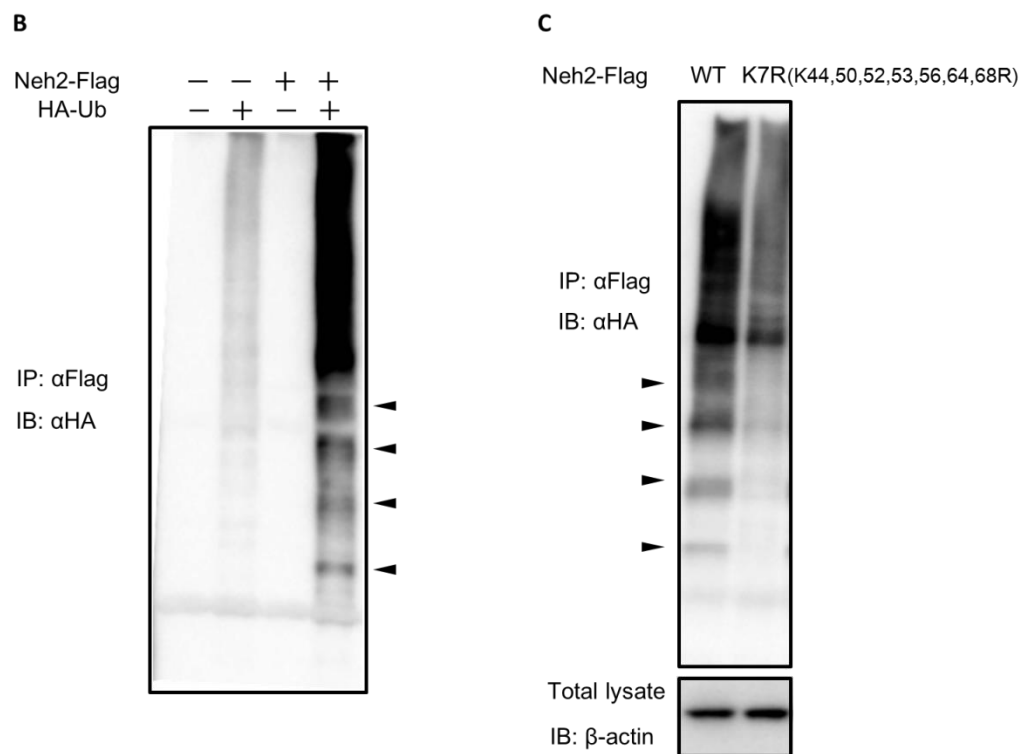


図 3-7. (B) HEK293 細胞へ Neh2-Flag、Keap1、HA-Ub 発現プラスミドを導入し、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行い、抗 HA 抗体でイムノブロッティングを行った際の結果を示す。

(C) HEK293 細胞へ Neh2-Flag (WT ならびに K7R 変異体)、Keap1、HA-Ub 発現プラスミドを導入し、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行い、抗 HA 抗体でイムノブロッティングを行った際の結果を示す。免疫沈降に用いた総タンパク質量のコントロールとして total lysate における β-actin の発現量を示す。

D

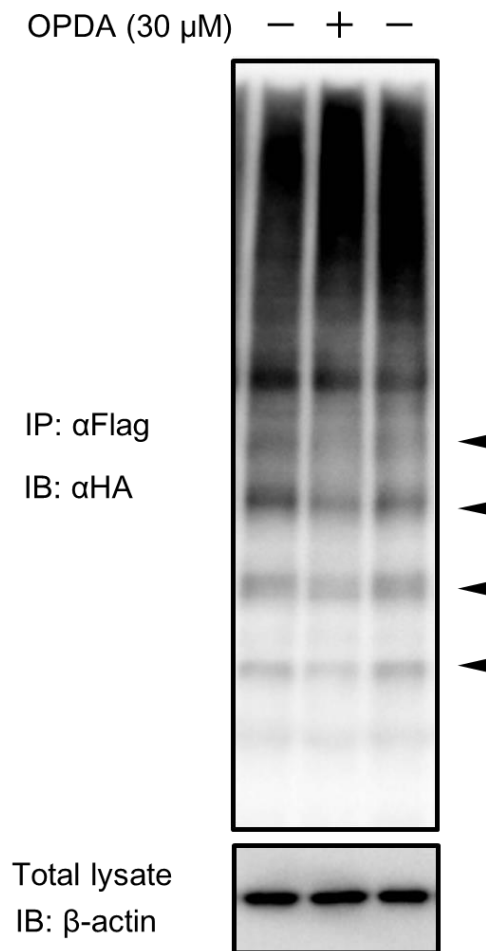


図 3-7. (D) HEK293 細胞へ NEB2-Flag、Keap1、HA-Ub 発現プラスミドを導入し、30 μM の OPDA を 8 時間処理し、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行い、抗 HA 抗体でイムノブロッティングを行った際の結果を示す。免疫沈降に用いた総タンパク質量のコントロールとして total lysate における β-actin の発現量を示す。

3.3.8 OPDA 構造類似化合物の ARE レポーター活性と細胞保護作用

OPDA と構造が類似している化合物として、 α 、 β -不飽和カルボニル構造を持つ *dinor*-OPDA (図 1-1) や 15-デオキシ- Δ 12,14-プロスタグランジン J₂ (15d-PGJ₂) (図 1-3)、 α 、 β -不飽和カルボニル構造を持たない OPC4:0 (図 1-1) があげられる。*dinor*-OPDA と OPC4:0 は植物で生合成され、15d-PGJ₂ は哺乳類で生合成されるオキシリピンである。これらの化合物が Nrf2 シグナルや H₂O₂ 誘発細胞障害に対してどのように作用するのかを調べた。ARE レポーターアッセイにおいて、*dinor*-OPDA、OPC4:0、15d-PGJ₂ を 24 時間処理したところ、*dinor*-OPDA ならびに 15d-PGJ₂ を処理した細胞では ARE レポーター活性の上昇が認められ、Nrf2 シグナル伝達経路を活性化していることが示唆された (図 3-8A、E)。一方で、OPC4:0 を処理した細胞では ARE レポーター活性に変化は認められなかった (図 3-8C)。*dinor*-OPDA、OPC4:0、15d-PGJ₂ を 24 時間処理した後、H₂O₂ を処理して細胞障害性を調べたところ、ARE レポーター活性が上昇した *dinor*-OPDA ならびに 15d-PGJ₂ を処理した細胞では H₂O₂ による細胞障害の抑制が認められたが、OPC4:0 を処理した細胞では細胞障害に変化は認められなかった (図 3-8B、D、F)。以上のことより、 α 、 β -不飽和カルボニル構造を持つ OPDA 構造類似化合物は、OPDA と同様に Nrf2 を活性化し、酸化ストレスに対する細胞障害に対して保護作用を示すことが示唆された。

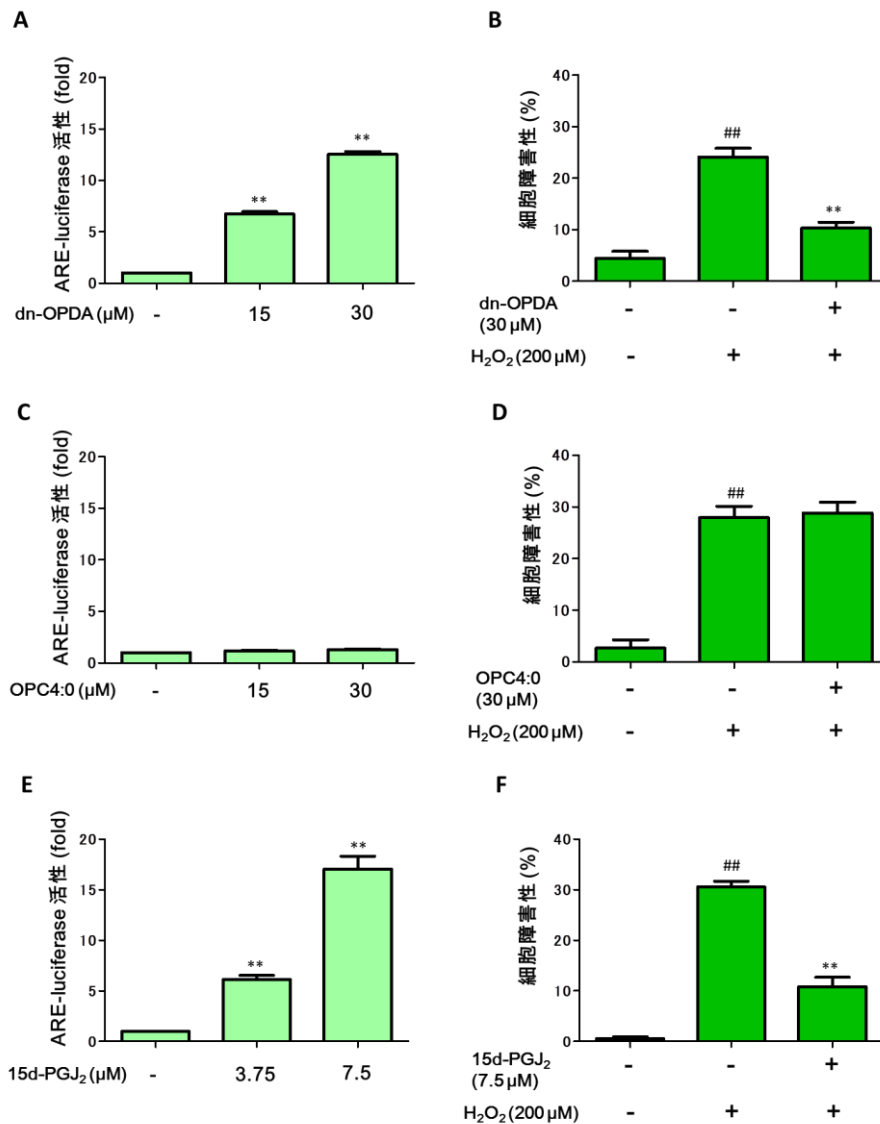


図 3-8. OPDA 構造類縁化合物の ARE レポーター活性と細胞保護作用

(A、C、E) SH-SY5Y 細胞を親株とした ARE レポーター細胞に対して、(A) dinor-OPDA、(C) OPC4:0、(E) 15d-PGJ₂ を 24 時間処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた未処理の細胞に対する変化率の平均値±標準誤差で示した (** $p < 0.01$ 対コントロール)。(B、D、F) SH-SY5Y 細胞に対し (B) dinor-OPDA、(D) OPC4:0、(F) 15d-PGJ₂ を 24 時間処理し、培地交換後に 200 μM の H₂O₂ で 24 時間処理し、LDH 活性により細胞障害性を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±標準誤差で示した (## $p < 0.01$ 対コントロール、* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 対 H₂O₂ 処理)。

3.4 考察

今回の検討から植物由来オキシリピンである OPDA は SH-SY5Y 細胞において Nrf2 シグナル経路を活性化させることにより、抗酸化ストレス作用ならびに細胞保護作用を示すことが明らかとなった。検討したジャスモン酸類の中で、OPDA と dinor-OPDA のみがこのような Nrf2 シグナル経路の活性化ならびに細胞保護作用を示した。これまでの報告では、化合物処理や刺激により Nrf2 の活性化が生じる際には、化合物の求電子的効果や活性酸素により Keap1 のシステインが翻訳後修飾を受け、その結果として Keap1 の構造変化が起こり、Keap1 による Nrf2 のユビキチン化分解制御が抑制され、Nrf2 の活性化につながっていると報告が多い[45, 55]。求電子的構造を持ち、哺乳類で生合成される 15d-PGJ₂、緑茶等に含まれるポリフェノールである epigallocatechin-3-gallate、ブロッコリーの新芽等に豊富に含まれる sulforaphane は、Keap1 のシステインに直接結合し、Keap1 による Nrf2 の分解制御を抑制することで Nrf2 経路を活性化し、酸化ストレスに対して保護作用を示すことが報告されている[196-198]。活性酸素に関しては、H₂O₂ 処理による活性酸素の産生が Keap1 のシステインに作用し Keap1 の構造を変化させることで Keap1 による Nrf2 の分解制御を抑制し、Nrf2 シグナル伝達経路の活性化を引き起こしているとの報告がなされている[56]。OPDA は構造的に α 、 β -不飽和カルボニル構造による求電子的効果を持つ化合物であり、また図 3-4C に示したような一過的な活性酸素の産生を引き起こすことから、OPDA の求電子的効果ならびに一過的に増大した活性酸素の両者が Keap1 のシステインに対する翻訳後修飾に関与し、Nrf2 シグナルの活性化を引き起こしている可能性が考えられる。但し、図 3-4B、C で示したように、Nrf2 の活性化は OPDA による活性酸素の一過的な産生が終了した後も継続して生じていることから、OPDA の α 、 β -不飽和カルボニル構造による求電子的効果が、Keap1 の翻訳後修飾に伴う Nrf2 の活性化により強く関与している可能性も考えられる。実際に α 、 β -不飽和カルボニル構造を持たない JA や MeJA といったジャスモン酸類では Nrf2 の活性化は認められず、一方で α 、 β -不飽和カルボニル構造を持つ dinor-OPDA や 15d-PGJ₂ では Nrf2

の活性化ならびに H_2O_2 誘発細胞障害に対する保護作用が認められた。OPDA による Nrf2 活性化の正確なメカニズムに関して不明な部分はあるが、図 3-6C に示したように SH-SY5Y 神経細胞における OPDA による Nrf2 の活性化が酸化ストレスからの細胞保護作用へ寄与していることが明らかとなった。

Nrf2 の活性化による神経細胞の保護に関しては、*in vivo* においても複数の報告がなされている[75-77]。パーキンソン病モデル動物である、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を投与したマウスにおいて、Nrf2 を活性化させる化合物である triterpenoids を投与すると神経細胞障害を抑制するとの報告がある[75]。また、脳梗塞モデルである MCAO モデルマウスにおいて、Nrf2 活性化化合物の epicatechin を投与すると梗塞体積の減少が認められることが知られている[77]。Nrf2 活性化化合物の neurite outgrowth-promoting prostaglandin も、MCAO モデルマウスにおいて、梗塞体積の減少ならびに神経細胞への保護を示すことが報告されている[71]。このように *in vivo* においても Nrf2 の活性化は、神経変性疾患をはじめとした病態に関連する酸化ストレスから神経細胞を保護すると考えられる。

図 3-5 に示したように、OPDA は抗酸化酵素の HO-1、NQO1、glutathione reductase の発現を誘導し、細胞内の抗酸化物質であるグルタチオン量の蓄積を引き起こした。グルタチオンは哺乳類細胞において最も豊富に存在する非タンパク質性のチオールであり、細胞内のレドックス状態を適切に保つために還元剤として機能している[60]。アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患ではグルタチオン量の低下が認められる[61]。また、パーキンソン病の患者においては、病気の進行度合いが進むほどグルタチオン量が低下することや、グルタチオン投与の臨床試験で症状が改善したことが報告されている[61]。従ってグルタチオンは神経変性疾患からの保護に重要であると考えられる[199]。還元型のグルタチオンは glutathione peroxidase を介して、 H_2O_2 を還元し H_2O へと変換させ、活性酸素を除去する[60]。この反応により還元型のグルタチオンはジスルヒド結合により 2 分子が結合した酸化型グルタチオンとなる。酸化型グルタチオンは glutathione reductase により還元型グ

グルタチオンへと還元される[59, 60]。従って glutathione reductase はグルタチオンによる細胞内レドックス状態の恒常性の制御に重要な役割を担っていると考えられる。HO-1 も抗酸化ストレス応答に重要であることが知られている。HO-1 は毒性を持つ heme を CO、鉄、biliverdin へと変換させることにより、酸化ストレスに対して保護的に機能する酵素である[63]。biliverdin は biliverdin reductase により bilirubin へと変換されるが、bilirubin は抗酸化作用を持つ抗酸化物質であることが知られている[63]。HO-1 の活性や発現を上昇させる化合物を脳内へ投与したマウスや、アデノウイルスを介して脳内へ HO-1 を強制発現させたマウスでは、パーキンソン病といった神経変性疾患モデルや脳梗塞モデル動物における細胞障害に対して保護作用を示すことが報告されている[200, 201]。NQO1 はキノンの還元を担う酵素で、キノンによる活性酸素の発生を防ぐ抗酸化タンパク質である[66]。また、NQO1 は還元型 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) を酸化型 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) に変換させるため、細胞内の NAD⁺量を増加させ、NADH オキシダーゼ由来のフリーラジカル産生やミトコンドリア障害を介した酸化ストレスから細胞を保護している[67]。このような性質を持つため、NQO1 は、神経細胞におけるパーキンソン病関連因子の酸化ストレスによる細胞死からの保護を担うなど、神経変性疾患に対して保護的に作用することが報告されている[202, 203]。

今回の検討では、OPDA を 24 時間前処理することで、H₂O₂ 誘発の細胞障害に対して保護作用を示したが、前処理 6 時間では保護作用が認められなかった。このことから、OPDA を長時間処理することにより抗酸化タンパク質の蓄積が十分に起こることが、保護作用を発揮するには必要であると考えられる。実際にグルタチオンの蓄積は OPDA の処理時間が 6 時間の時には認められず、24 時間が必要であった。今回の検討より、OPDA はヒト神経細胞において、Nrf2 を活性させることにより、抗酸化応答に関わる Nrf2 標的遺伝子の発現を上昇させ、抗酸化応答を引き起こすことが示された。Nrf2 の標的である抗酸化応答に関わる遺伝子群はパーキンソン病やアルツハイマー病といった神経変性疾患に対して保護的に

機能することから、OPDA もこれらの疾患に対して有効である可能性が考えられる。

OPDA は Nrf2 を介した抗酸化応答を引き起こすことが分かったが、これが図 3-3 で示した H_2O_2 による活性酸素産生の抑制に寄与している可能性が考えられる。細胞内の活性酸素はミトコンドリア膜電位の低下を引き起こし、神経変性疾患で認められるミトコンドリア機能障害へつながると考えられている[204-206]。実際に N-acetyl cysteine といった抗酸化物質は、酸化ストレスによるミトコンドリア膜電位の低下を抑制することが報告されている[207]。今回の検討から OPDA は H_2O_2 誘発のミトコンドリア膜電位の低下を抑制することが分かったが（図 3-2）、これは OPDA が H_2O_2 による活性酸素産生を抑制したからかもしれない。加えて OPDA によるミトコンドリア機能に対する保護作用が OPDA による H_2O_2 誘発細胞障害の抑制に繋がっている可能性も考えられる。

第 2 章で述べたように、植物シロイヌナズナの傷害応答において、OPDA は JA や MeJA とは独立したシグナル伝達物質として機能することが分かった。今回の検討から、哺乳類細胞においてジャスモン酸類の中で OPDA のみが Nrf2 の活性化による細胞保護作用を示すことが分かった。OPDA が神経細胞以外でも同様の作用を示すかどうかは検討が必要であるが、OPDA が植物と同様に動物細胞においても独自の機能を持つことが示されたことは興味深い。これまでに赤ブドウに含まれる resveratrol、ローズマリーに含まれる carnosic acid、グレープフルーツに含まれる naringenin、ブロッコリーに含まれる sulforaphane といった種々の植物由来の天然物が SH-SY5Y や PC12 細胞といった神経系の細胞において Nrf2 を誘導させることにより、 H_2O_2 や 6-hydroxydopamine といった酸化ストレスによる神経細胞障害に対して保護作用を示すことが報告されており[208-213]、これらの天然物が神経変性疾患において予防や治療効果をもたらすかどうかは議論されている[214]。OPDA はシロイヌナズナ、トマト、豆といった食品として用いられる高等植物に広く存在することが分かっている[7, 191, 215, 216]。OPDA の体内での吸収や代謝、血液脳関門に対する透過性等に関する検討は必要であるが、OPDA を含む天然由来の食品を摂取することは、神経変性疾患をはじめとす

る酸化ストレス関連疾患に対して予防や治療効果をもたらす可能性がある。これまでにジャスモン酸類の中でJAやMeJAに関してはすでに抗癌剤としての開発が期待されている[12, 13, 217]。将来的にはJAやMeJAに加えてOPDAも植物由来のオキシリピンとして、健康食品や薬としての応用が期待できる可能性がある。

本研究より、神経細胞においてOPDAはNrf2シグナル経路を活性化し、グルタチオンの蓄積や、抗酸化酵素であるHO-1やNQO1の発現を誘導することにより、酸化ストレス刺激による細胞障害を抑制することが明らかとなった。OPDAは酸化ストレスに対する保護作用を持つことにより、神経変性疾患の発症や進展を抑制する可能性が考えられる（図 3-9）。

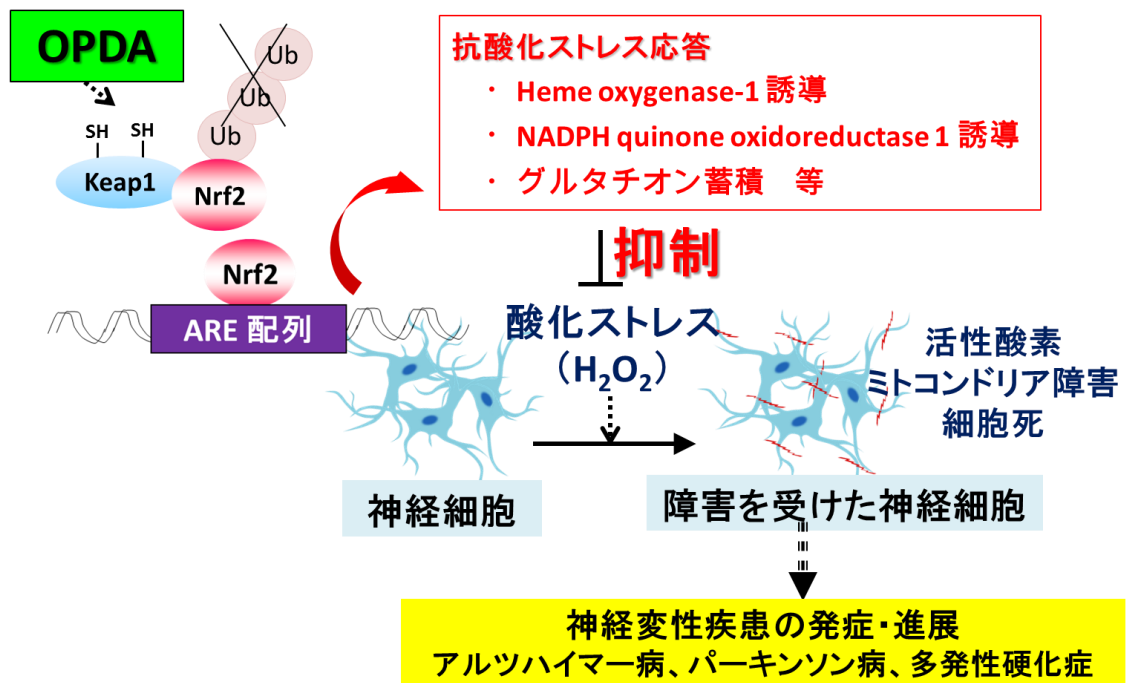


図 3-9. 神経細胞における OPDA の酸化ストレスに対する保護作用

第4章 マウスミクログリア細胞における lipopolysaccharide 誘発炎症に対する 12-オキソ-フィトジェン酸の保護作用

4.1 序

ジャスモン酸類の植物における生理活性作用に関する報告は多数存在するのに対し、動物細胞における生理活性作用に関しての報告はほとんどない。第3章では、ジャスモン酸類の 12-オキソ-フィトジェン酸 (OPDA) が神経細胞において酸化ストレスに対して保護的に作用する生理活性を持つことを述べた。酸化ストレスによる細胞障害は疾患と密接に関連しており、神経細胞に対する酸化ストレスはアルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患に関与するとの報告がなされている[112]。神経変性疾患においては、酸化ストレスに加え、炎症が疾患の発症や進展につながるもう 1 つの鍵と考えられている[107, 116, 124] (図 1-9)。神経変性疾患における炎症は、脳内の免疫や炎症を制御するミクログリア細胞の過剰な活性化により引き起こされると考えられている[116, 124] (図 1-10)。ミクログリアを lipopolysaccharide (LPS) 等の刺激で活性化させると、炎症反応として炎症性サイトカインや神経障害性因子である interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、nitric oxide (NO) 等の産生が生じるが、これらはアルツハイマー病やパーキンソン病の患者やモデル動物の脳において増加が認められている[116, 124]。これらの報告より、ミクログリアの活性化によって引き起こされる炎症を抑制することは、神経変性疾患の抑制に寄与する可能性が考えられる。

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) は炎症反応において種々の遺伝子発現を制御する重要な転写因子である[80] (図 1-7)。NF- κ B は通常は細胞質に存在し、inhibitory subunit of NF- κ B α (I κ B α) によって負の制御を受けているが、何らかの刺激により I κ B α の制御から外れると核へ移行し、NF- κ B 標的遺伝子群の発現を誘導する。NF- κ B 標的遺伝子群には IL-1 β 、IL-6、TNF- α の他、NO を産生させる inducible NO synthase (iNOS) 等が含まれる[80, 84]。

LPS 刺激等による mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル経路の活性化も炎症

反応の惹起に強く関与しており、炎症性サイトカインや神経障害性因子の産生を引き起こすことが報告されている[99, 100] (図 1-8)。代表的な MAPK として ERK、JNK、p38 が知られているが、その中でも p38 の活性化は、下流に位置する転写因子を介してサイトカイン mRNA の誘導を引き起こしたり[218]、サイトカイン mRNA の安定化を引き起こしたりすることで[219]、炎症反応に密接に関与していることが報告されている。

Suppressor of cytokine signaling (SOCS) ファミリーは炎症性サイトカインの産生やそのシグナル経路を負に制御する内在性因子であることが知られており、過剰な炎症状態を正常な状態に戻す役割があると考えられている[220, 221]。

第 3 章で述べた転写因子 nuclear factor erythroid2 related factor 2 (Nrf2) は、Nrf2 標的遺伝子の発現を誘導することで抗酸化ストレス応答の他に抗炎症反応にも関与することが報告されている[222]。

ジャスモン酸類の中で OPDA が特異的に Nrf2 の活性化を引き起こすことを第 3 章で述べた。また、ジャスモン酸類は動物のプロスタグランジンと構造が類似しており、プロスタグランジンの 1 つである 15-デオキシ- Δ 12,14-プロスタグランジン J₂ (15d-PGJ₂) に関しては抗炎症作用を持つとの報告がなされている[41]。そこで、ジャスモン酸類、特に OPDA がミクログリア細胞において抗炎症作用を持つかどうかを検討することとした。

本研究において、マウスミクログリア MG5 細胞に対してジャスモン酸類を処理し、LPS 誘導性の炎症サイトカインや神経障害性因子の産生に対する作用を見たところ、OPDA のみこれらの産生を抑制することが分かった。また、OPDA は LPS 誘導性の NF- κ B 活性化の抑制、p38 リン酸化の抑制を引き起こし、SOCS-1 発現誘導を引き起こすことが分かった。以上のことより OPDA はミクログリア細胞において NF- κ B、p38、SOCS-1 といった因子に複合的に作用することで抗炎症作用を持つことが示唆された。

4.2 実験材料と方法

4.2.1 試薬

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) と Lipofectamine RNAiMAX は Life Technologies から購入した。Fetal bovine serum は Cell Culture Bioscience から購入した。cis-OPDA、(±)-JA、(±)-MeJA、15d-PGJ₂ は Cayman Chemical から購入した。(±)-JA-Ile、(±)-12-OH-JA は OlchemIm Ltd から購入した。抗 Nrf2 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗 HO-1 抗体は Biomol から購入した。抗 lamin 抗体、抗 phospho p65 抗体、抗 p65 抗体、抗 IκBα 抗体、抗 phospho JNK 抗体、抗 JNK 抗体、抗 phospho p38、抗 p38 抗体は Cell Signaling から購入した。Horseradish peroxidase 標識二次抗体、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent は GE Healthcare から購入した。NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent、Micro BCA Protein Assay kit は Pierce から購入した。Chemi-Lumi One Super は Nacalai から購入した。LPS、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail は Sigma から購入した。All Stars Negative Control siRNA は Qiagen から購入した。Maxwell 16 RNA purification kit は Promega から購入した。ReverTra Ace、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal、Can Get Signal Solution は TOYOBO から購入した。Nitric oxide assay kit、Mouse IL-6 Quantikine ELISA kit、Mouse TNF-α Quantikine ELISA kit、Mouse IL-1β Quantikine ELISA kit は R&D systems から購入した。

4.2.2 細胞培養

マウスミクログリア MG5 細胞ならびにマウスアストロサイト A1 細胞は JCRB から購入した。A1 細胞は 10% fetal bovine serum を含む DMEM を用いて 5% CO₂、37°C の下で培養した。MG5 細胞は 10% fetal bovine serum を含む DMEM と A1 細胞の培養上清を 1 : 1 で混ぜた培地を用いて 5% CO₂、37°C の下で培養した。MG5 細胞は 2.5×10^4 cells/ 100 μL/ウェルを 96 ウェルプレートに播種し（実験に応じて、24 ウェルプレート、12 ウェルプレート、

6 ウェルプレートへのスケールアップを実施し)、ジャスモン酸類を種々の濃度、時間で処理した。コントロールの細胞はジャスモン酸類を含まないエタノール溶媒のみを含む培地（終濃度 0.9%）で処理を行った。細胞に LPS 処理を行う際には、ジャスモン酸類で細胞を 24 時間処理した後、ジャスモン酸類を含まない培地に置換し、1 $\mu\text{g/mL}$ の LPS で種々の時間処理した。

4.2.3 イムノブロットティング

細胞からの核タンパク質の抽出は 1% protease inhibitor cocktail を含む NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent を用いて行った。細胞からの全タンパク質の抽出は 1% protease inhibitor cocktail ならびに 1% phosphatase inhibitor cocktail を含む RIPA buffer を用いて行った。タンパク質濃度は Micro BCA Protein Assay kit を用いて測定した。3.5-5 μg のタンパク質を Sample Buffer Solution with Reducing Reagent と混ぜ 95°C で 10 分反応させた後、ポリアクリルアミドゲルの電気泳動に供し、polyvinylidene difluoride メンブレンに転写した。メンブレンを PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal を用いて室温で 1 時間反応させることによりブロッキングした後、1 次抗体と 4°C で一昼夜反応させた。1 次抗体は、Nrf2、lamin、HO-1、phospho p65、p65、I κ B α 、phospho JNK、JNK、phospho p38、p38、 β -actin に対する抗体を用いた。1 次抗体と反応させたメンブレンを 0.1% (v/v) tween-20 を含む tris buffered saline (TBS) で洗浄し、horseradish peroxidase 標識 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。抗体は全て Can Get Signal Solution を用いて希釈した。Peroxidase 標識抗体と反応させたメンブレンに対して ECL PrimeWestern Blotting Detection Reagent を添加し、得られた発光シグナルを Image Quant LAS 3000 CCD camera system (Fujifilm) を用いて検出した。イムノブロットは 2 または 3 回実施したうちの代表的な 1 回分のデータを示した。

4.2.4 定量 PCR

細胞からの RNA の抽出は Maxwell 16 RNA purification kit を用いて行い、DNase 処理過程を含むプロトコルで実施した。RNA を鋳型として、ランダムヘキサマープライマーを用いて、ReverTra Ace reverse transcriptase による逆転写反応を行い、cDNA を調製した。定量 PCR 反応は約 500 ng の cDNA をテンプレートとして、7500HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。IL-6、TNF- α 、iNOS、SOCS-1 遺伝子の測定には Taqman Gene Expression Assays kits である IL-6 (Mm00446190)、TNF- α (Mm00443260)、IL-1 β (Mm00434228)、iNOS (Mm00440502)、SOCS-1 (Mm00782550) を用いた。GAPDH の遺伝子を測定するために用いたプライマーならびに蛍光標識プローブ (5'-3') は下記の通りである。GAPDH プライマー : GAPDH forward、CAAATTCAACGGCACAGTCAAG ; GAPDH reverse、CCTCACCCCATTTGATGTTAGTG ; GAPDH プローブ (FAM-TAMRA)、CCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGAC。データは GAPDH の発現量でノーマライズさせることにより算出した。

4.2.5 サイトカインならびに NO の測定

MG5 細胞を 1.25×10^5 cells/ 500 μ L/ウェルの細胞数で 24 ウェルプレートに播種し、OPDA を 24 時間処理した。培地を交換した後 1 μ g/mL の LPS で 24 時間処理し、培養上清をサイトカイン (IL-6、TNF- α 、IL-1 β) ならびに NO の測定に用いた。サイトカインの測定には Mouse IL-6 Quantikine ELISA kit、Mouse TNF- α Quantikine ELISA kit、Mouse IL-1 β Quantikine ELISA kit を用いた。NO の測定は、NO の安定した代謝産物である nitrite を Nitric oxide assay kit を用いて検出することにより行った。

4.2.6 siRNA による Nrf2 のノックダウン

MG5 細胞において Nrf2 をノックダウンするために、Nrf2 siRNA (5'-

AACTCTCAAGTTAATTTCTTA -3') を用い、コントロールとしては All Stars Negative Control siRNA を用いた。24 ウェルプレート の 1 ウェルあたり、100 μL の Opti-MEM I Reduced Serum Medium、1.25 μL の Lipofectamine RNAiMAX、10 pmol の siRNA、細胞 6×10^4 cells (500 μL に懸濁) を混ぜて播種し、各アッセイへ用いた。

4.2.7 統計解析

対照群と被検物質処理群 1 濃度の 2 群間比較には Student の t 検定を、対照群と 2 濃度以上の被検物質処理群の比較は Williams の多重比較検定を用いて統計解析を行った。統計解析ソフト Pharmaco Analyst を使用し、 p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判断した。

4.3 結果

4.3.1 OPDA による LPS 誘発炎症性サイトカイン産生の抑制

MG5 細胞に対して、ジャスモン酸類の OPDA、ジャスモン酸 (JA)、ジャスモン酸メチル (MeJA)、ジャスモノイルイソロイシン (JA-Ile)、12-ヒドロキシジャスモン酸 (12-OH-JA) を 30 μ M で 24 時間処理した後 LPS で 3 時間処理し、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、TNF- α の mRNA 量を測定した。LPS 処理により IL-1 β 、IL-6、TNF- α の mRNA 発現量は顕著に誘導されたが、OPDA を前処理することにより抑制されることが分かった (図 4-1)。一方、他のジャスモン酸類による変化は認められなかった (図 4-1)。これらの結果は、MG5 細胞においてジャスモン酸類の中で OPDA のみが LPS 誘導性の炎症反応に対して保護する独自の機能を持つことを示唆している。次に、IL-1 β 、IL-6、TNF- α のタンパク質分泌量に対する OPDA の作用を検討した。MG5 細胞に対して OPDA を 24 時間処理した後 LPS で 24 時間処理し、培地中に分泌された IL-1 β 、IL-6、TNF- α のタンパク質量を測定した (図 4-2)。LPS 処理により IL-1 β 、IL-6、TNF- α の分泌量は顕著に増加したが、OPDA を前処理することにより濃度依存的な抑制が認められた (図 4-2)。以上のことから OPDA はミクログリアにおいて、LPS 誘導性の IL-1 β 、IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。

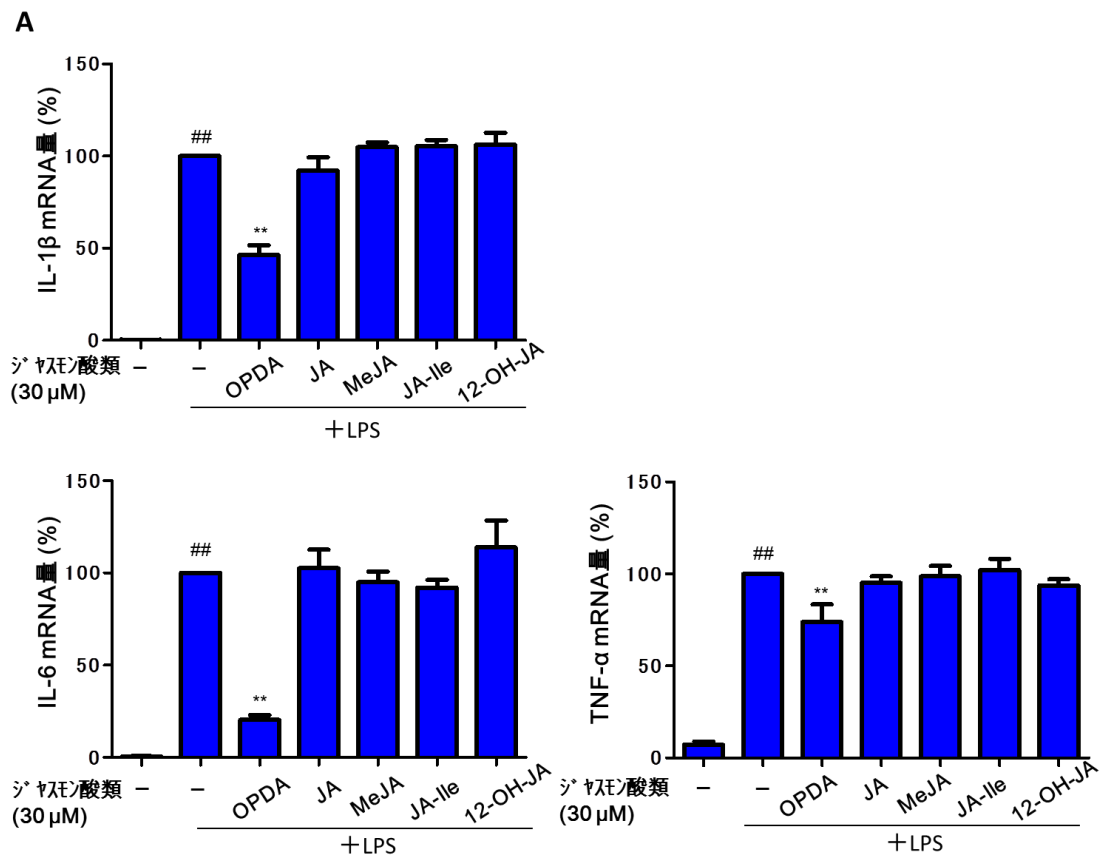


図 4-1. LPS 誘発炎症性サイトカイン mRNA 発現に対する OPDA の抑制作用

MG5 細胞を 30 μ M の OPDA、JA、MeJA、JA-Ile、12-OH-JA、により 24 時間処理し、培地交換後に 1 μ g/mL の LPS で 3 時間処理し、IL-1 β (A)、IL-6 (B)、TNF- α (C) の mRNA 量を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ 標準誤差で示した(# $p < 0.01$ 対コントロール、* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 対 LPS 処理)。

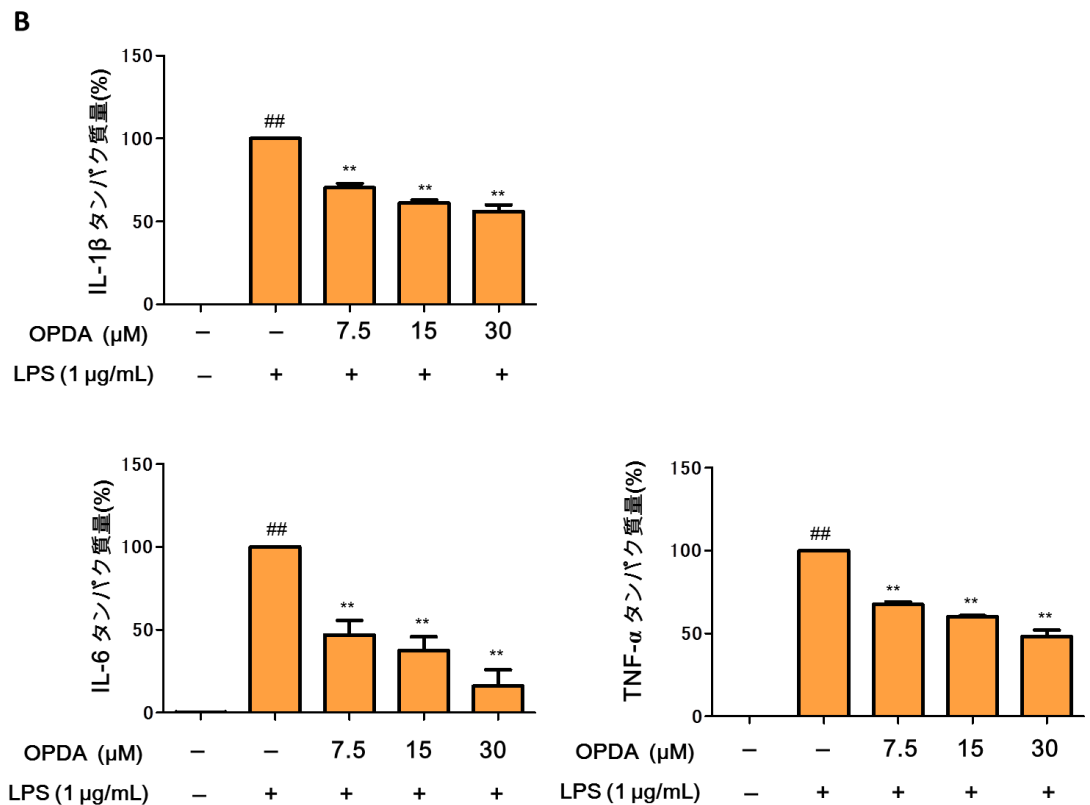


図 4-2. LPS 誘発炎症性サイトカインタンパク質分泌に対する OPDA の抑制作用

MG5 細胞を 7.5、15、30 μ M の OPDA により 24 時間処理し、培地交換後に 1 μ g/mL の LPS で 24 時間処理し、培地中に分泌された IL-1 β (A)、IL-6 (A)、TNF- α (B) タンパク質の量を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ 標準誤差で示した(^{##} $p < 0.01$ 対コントロール、^{**} $p < 0.01$ 対 LPS 処理)。

4.3.2 OPDA による LPS 誘発 NO 産生の抑制

活性化したミクログリアから産生される神経障害性因子の 1 つに NO が上げられる。図 4-1 と 4-2 に示したように OPDA が LPS 誘発炎症性サイトカイン産生に対して抑制作用を示したため、NO に対しても作用を示すかどうかを検討した。

MG5 細胞に対して、ジャスモン酸類の OPDA、JA、MeJA、JA-Ile、12-OH-JA を 30 μ M で 24 時間処理した後 LPS で 3 時間処理し、NO の産生酵素である iNOS の mRNA 量を測定した。LPS 処理により iNOS の mRNA 発現量は顕著に誘導されたが、OPDA を前処理することにより抑制されることが分かった (図 4-3A)。次に NO の産生量に対する OPDA の作用を検討した。MG5 細胞に対して OPDA を 24 時間処理した後 LPS で 24 時間処理し、培地中に分泌された NO 量を測定した (図 4-3B)。LPS 処理により NO の産生量は顕著に増加したが、OPDA を前処理することにより濃度依存的な抑制が認められた (図 4-3B)。以上のことから OPDA はミクログリアにおいて、LPS 誘導性の神経障害性因子である NO の産生を抑制することが明らかとなった。

図 4-1、4-2 ならび 4-3 より、OPDA はミクログリアにおいて、LPS 誘導性の IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO といった炎症性サイトカインならびに神経障害性因子の産生を抑制し、抗炎症作用を持つことが明らかとなった。

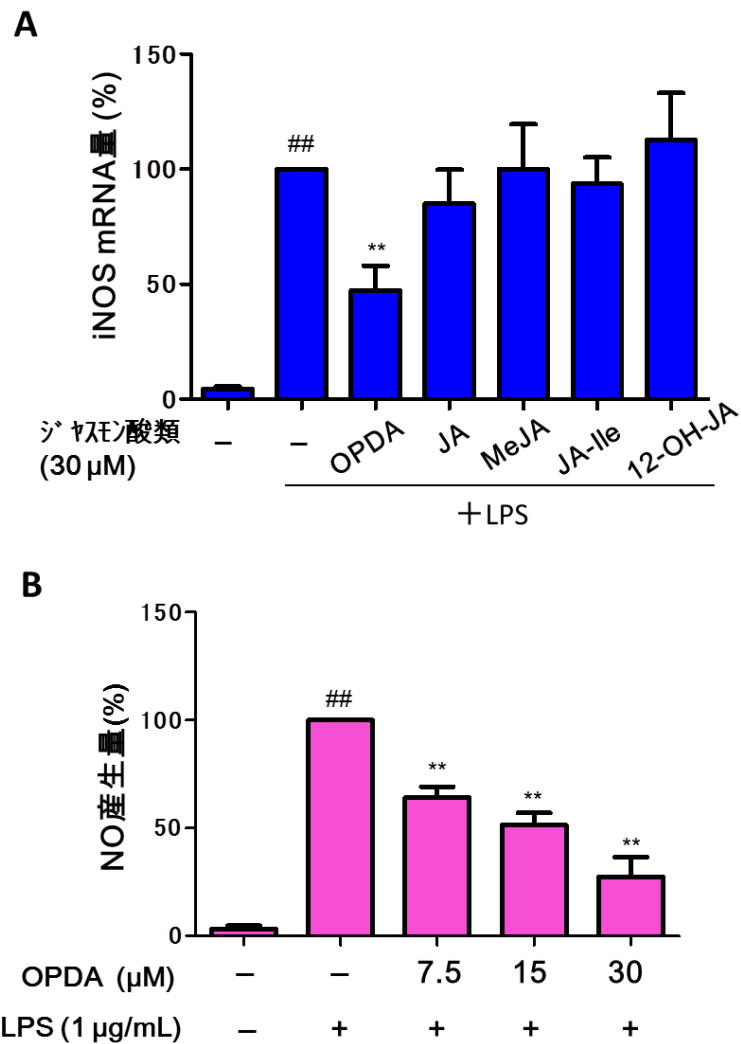


図 4-3. LPS 誘発 iNOS mRNA 発現ならびに NO 産生に対する OPDA の抑制作用

(A) MG5 細胞を 30 μM の OPDA、JA、MeJA、JA-Ile、12-OH-JA、により 24 時間処理し、培地交換後に 1 μg/mL の LPS で 3 時間処理し、iNOS の mRNA 量を測定した。

(B) MG5 細胞を 7.5、15、30 μM の OPDA により 24 時間処理し、培地交換後に 1 μg/mL の LPS で 24 時間処理し、培地中に分泌された NO の産生量を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±標準誤差で示した (## $p < 0.01$ 対コントロール、** $p < 0.01$ 対 LPS 処理)。

4.3.3 OPDA の抗炎症作用メカニズム解析—NF- κ B シグナル経路の抑制

上述したように OPDA は MG5 細胞において抗炎症作用を持つことが明らかとなった。そこで次に、OPDA の抗炎症作用のメカニズムについて解析を行うこととした。

初めに NF- κ B 経路に着目した。NF- κ B は、p65 と p50 のヘテロダイマーから成る転写因子であり、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS といった炎症性因子ならびに神経障害性因子の発現誘導を担う炎症反応において重要な転写因子であることが知られている（図 4-4A）。OPDA は LPS による IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS の mRNA 誘導を抑制したため、OPDA が NF- κ B シグナル経路に関与しているかどうかを調べた。NF- κ B シグナルの活性化に重要な過程は NF- κ B の負の制御因子である I κ B α の分解である（図 4-4A）。そこで MG5 細胞に OPDA を 24 時間処理し、LPS で 30 分刺激した際の I κ B α のタンパク質発現量を解析した。図 4-4B に示すように、I κ B α は LPS 刺激 30 分後に顕著に減少したが、その減少は OPDA 処理により阻害されることが分かった。p65 のリン酸化も NF- κ B の転写活性の上昇に関わっていると報告がなされており、NF- κ B シグナルの活性化において重要である（図 4-4A）。p65 のリン酸化状態をイムノブロッティングで解析したところ、LPS 刺激により生じた p65 のリン酸化が OPDA により抑制された（図 4-4B）。これらのことより、OPDA は LPS によって活性化された NF- κ B シグナルを抑制することが分かった。以上のことから、OPDA による LPS 誘導性 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS の発現上昇の抑制に、OPDA による NF- κ B シグナル経路の抑制が関わっていることが示唆された。

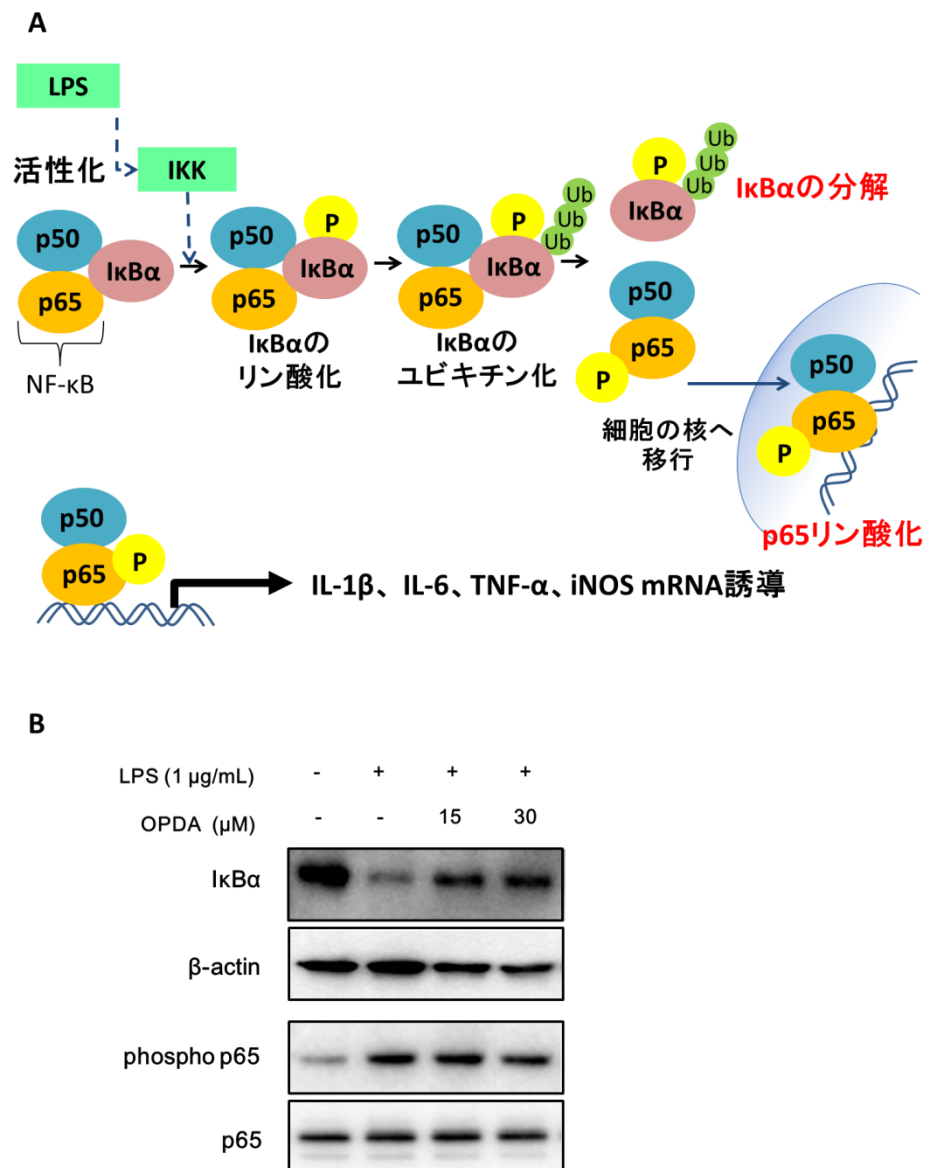


図 4-4. OPDA による NF-κB シグナル経路抑制

(A) LPS による NF-κB 経路活性化メカニズム

(B) MG5 細胞を 15、30 μM の OPDA により 24 時間処理し、培地交換後に 1 μg/mL の LPS で 30 分処理し、IκBα とリン酸化 p65 のタンパク質発現量を解析した。β-actin ならびに p65 はローディングコントロールとして用いた。

4.3.4 OPDA の抗炎症作用メカニズム解析—p38 リン酸化の抑制

これまでに免疫細胞における LPS 刺激誘発性の炎症反応に、ERK、JNK、p38 といった MAPK シグナルの活性化が関与することが報告されており、OPDA の抗炎症作用メカニズムとして、NF- κ B シグナル経路に加えて MAPK シグナルも寄与している可能性が考えられる。MG5 細胞を OPDA で 24 時間処理し、LPS 刺激 30 分後の c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)、p38 のリン酸化の状態を解析した。その結果、LPS 刺激により JNK ならびに p38 のリン酸化が生じることが分かった (図 4-5)。OPDA を処理することにより JNK ならびに p38 のリン酸化状態に変化があるかを検討したところ、p38 のリン酸化は OPDA 処理により抑制されることが分かった (図 4-5)。一方、JNK のリン酸化に関して変化は認められなかった (図 4-5)。以上のことから、OPDA による抗炎症作用に p38 リン酸化に対する抑制作用が関与している可能性が示唆された。

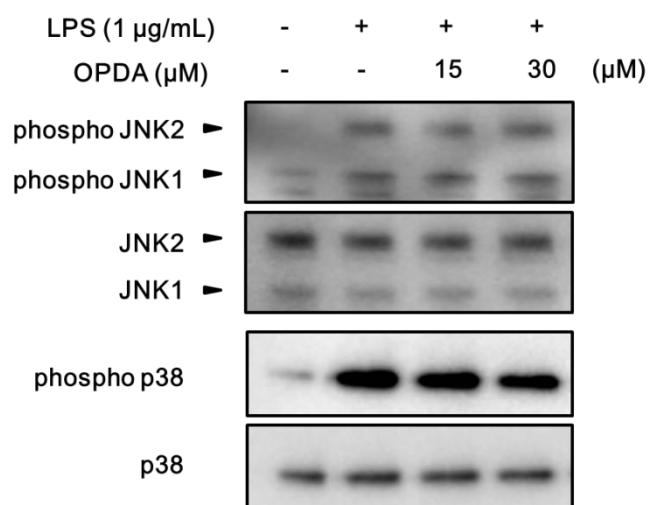


図 4-5. OPDA による p38 リン酸化抑制

MG5 細胞を 15、30 μM の OPDA により 24 時間処理し、培地交換後に 1 $\mu\text{g/mL}$ の LPS で 30 分処理し、リン酸化 JNK ならびにリン酸化 p38 のタンパク質発現量を解析した。JNK ならびに p38 はローディングコントロールとして用いた。

4.3.5 OPDA の抗炎症作用メカニズム解析—SOCS-1 発現誘導

SOCS ファミリーは炎症性サイトカイン分泌を負に制御する重要な制御因子であることが知られており、その中でも SOCS-1 はマクロファージにおいて LPS 刺激後の IL-6 ならびに TNF- α の産生を抑制することが報告されている[221]。そこで OPDA が SOCS-1 の発現量に変化を与えるかどうかを検討した。MG5 細胞へ OPDA を 24 時間処理した際の SOCS-1 の mRNA 発現量を解析したところ、SOCS-1 mRNA の誘導が認められた (図 4-6)。よって、OPDA による SOCS-1 の発現誘導が、LPS 刺激後のサイトカイン産生の抑制に関与している可能性が考えられる。

以上のことから、MG5 細胞における OPDA の抗炎症作用には、NF- κ B シグナル経路の抑制、p38 リン酸化の抑制、SOCS-1 発現誘導が関わっていることが示唆された。

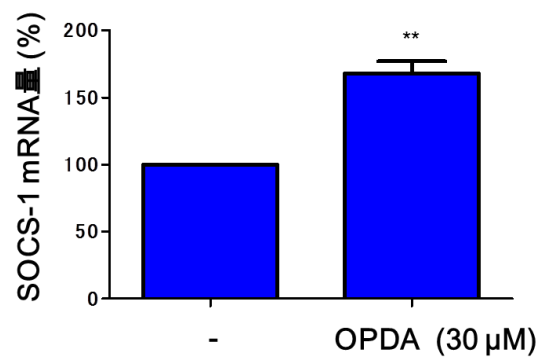


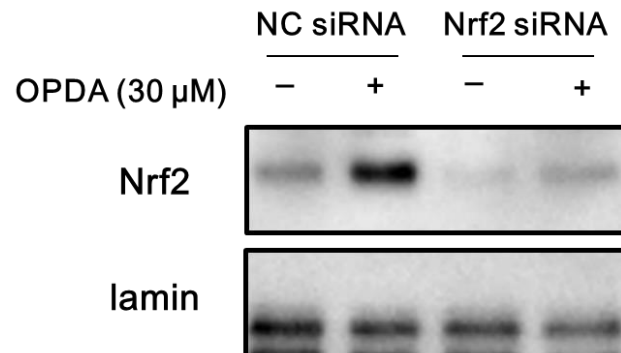
図 4-6. OPDA による SOCS-1 発現誘導

MG5 細胞を 30 μM の OPDA で 24 時間処理し、SOCS-1 の mRNA 量を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±標準誤差で示した (** $p < 0.01$ 対コントロール)。

4.3.6 OPDA の抗炎症作用メカニズム解析—Nrf2 シグナル経路の寄与

Nrf2 シグナルの活性化が細胞内の抗炎症作用に関わっていることが報告されていることから、OPDA の抗炎症作用に Nrf2 シグナルが関与しているのかについて検討した。初めに、MG5 細胞において OPDA を処理することにより Nrf2 シグナルが活性化するかどうかを調べた。ネガティブコントロールの siRNA を導入した MG5 細胞へ OPDA を 6 時間処理した際に、核における Nrf2 タンパク質の発現量を見たところ、発現量の増加が認められた (図 4-7A)。また、OPDA を 24 時間処理した際の細胞全体における Nrf2 標的遺伝子の heme oxygenase-1 (HO-1) のタンパク質の発現量を見たところ上昇が認められた (図 4-7B)。以上のことから、OPDA が MG5 細胞において Nrf2 の核蓄積を引き起こし、Nrf2 シグナルを活性化することが分かった。Nrf2 シグナルの活性化が OPDA の抗炎症作用に関与しているかどうかを調べるために、Nrf2 の siRNA 導入実験を行った。MG5 細胞へ Nrf2 の siRNA を導入した際に、OPDA による Nrf2 の核蓄積ならびに HO-1 発現誘導が抑制されていることを確認した (図 4-7A、B)。その後、LPS 刺激を行った際の IL-6、TNF- α 、iNOS 発現量を解析した。その結果、Nrf2 をノックダウンした細胞においても、LPS 刺激による IL-6、TNF- α 、iNOS の発現誘導に対する OPDA の抑制作用が認められた (図 4-7C)。以上のことから、OPDA の抗炎症作用メカニズムにおける Nrf2 シグナル活性化の寄与度は少ないことが示唆された。

A



B

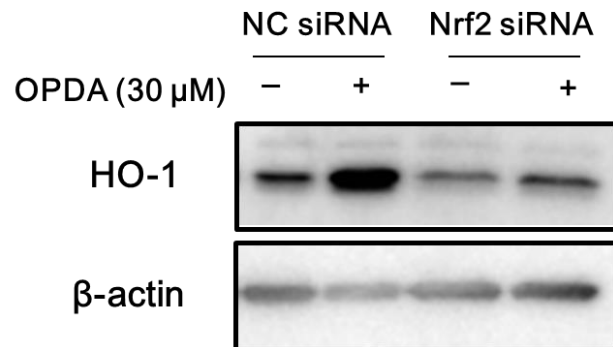


図 4-7. Nrf2 をノックダウンした際の OPDA の抗炎症作用

(A) MG5 細胞へネガティブコントロール (NC) または Nrf2 の siRNA を導入し、48 時間後に 30 μ M の OPDA で 6 時間処理し、核における Nrf2 タンパク質の発現量を解析した。Lamin はローディングコントロールとして用いた。

(B) MG5 細胞へ NC または Nrf2 の siRNA を導入し、48 時間後に 30 μ M の OPDA で 24 時間処理し、細胞における HO-1 タンパク質の発現量を解析した。 β -actin はローディングコントロールとして用いた。

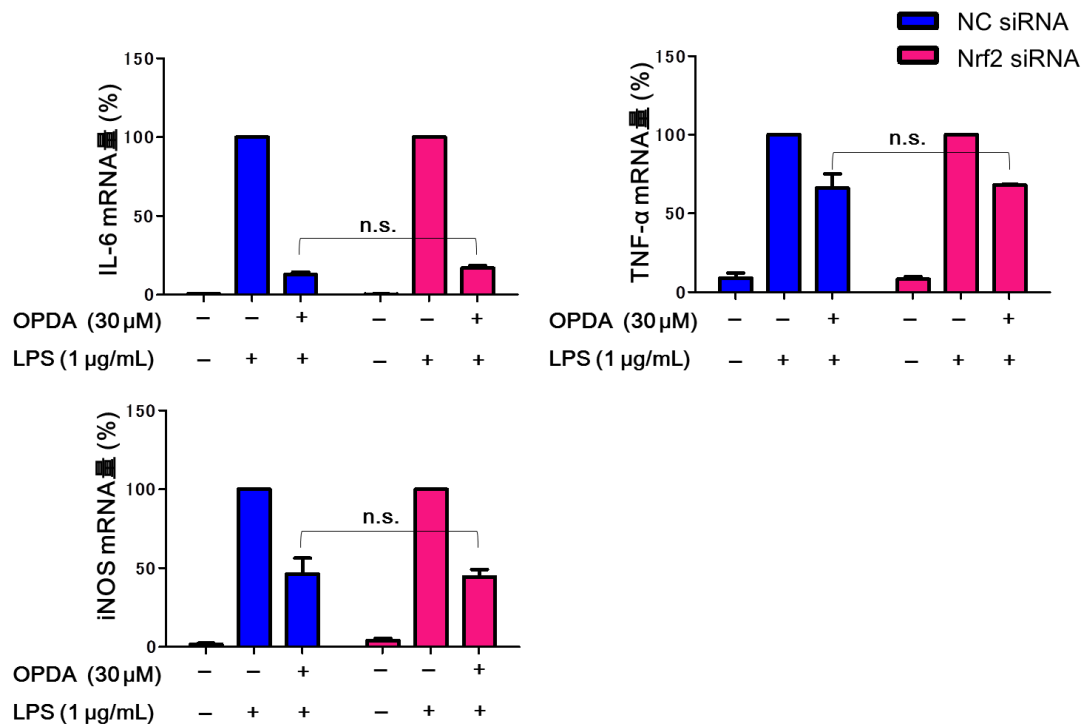


図 4-7. (C) MG5 細胞へ NC または Nrf2 の siRNA を導入し、48 時間後に 30 μM の OPDA で 24 時間処理し、培地交換後に 1 μg/mL の LPS で 3 時間処理し、IL-6、TNF-α、iNOS mRNA 量を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±標準誤差で示した (n.s. は有意差なしを示す)。

4.3.7 15d-PGJ₂によるLPS誘導性炎症反応の抑制

OPDA と構造的に類似している哺乳類のプロスタグランジンである 15d-PGJ₂には抗炎症作用があることが知られているものの、MG5 細胞における報告はこれまでになされていない。そこで MG5 細胞における 15d-PGJ₂の作用を調べた。15d-PGJ₂を 24 時間処理した後 LPS で 3 時間処理し、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、TNF- α の mRNA 量ならびに NO の産生酵素である iNOS の mRNA 量を測定した。LPS 処理により誘導された IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS の発現量は 15d-PGJ₂を前処理することにより濃度依存的に抑制された(図 4-8)。従って 15d-PGJ₂も OPDA と同様に MG5 細胞において抗炎症作用を持つことが分かった。

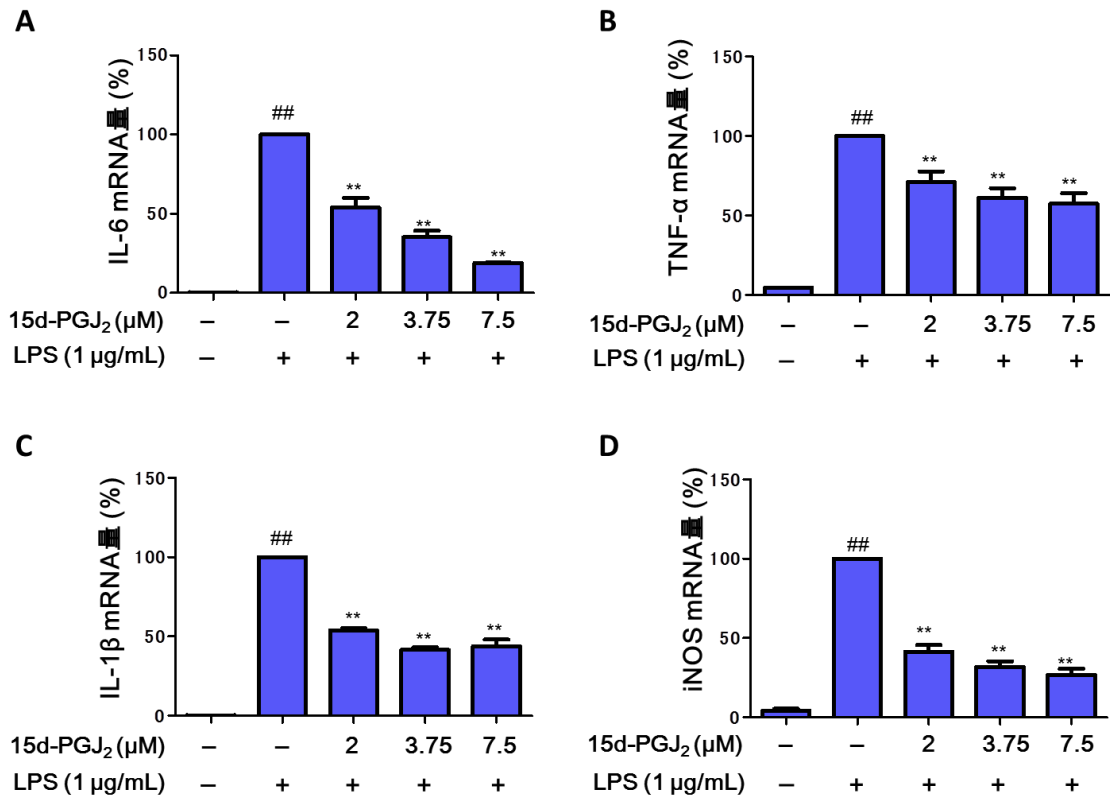


図 4-8. 15d-PGJ₂ による LPS 誘導性炎症反応の抑制

MG5 細胞を 2、3.75、7.5 μM の 15d-PGJ₂ により 24 時間処理し、培地交換後に 1 μg/mL の LPS で 3 時間処理し、IL-1β (A)、IL-6 (B)、TNF-α (C)、iNOS (D) mRNA 量を測定した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±標準誤差で示した (## $p < 0.01$ 対コントロール、* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 対 LPS 処理)。

4.4 考察

脳内炎症は酸化ストレスと同様に、アルツハイマー病、パーキンソン病といった神経変性疾患における重要な因子である[124]。これらの神経変性疾患においては、ミクログリアが活性化し、活性化したミクログリアから種々の炎症性ならびに神経障害性因子が放出され、神経障害に関与することが示されている[124, 223]。従って、脳内炎症に関わる疾患に関しては、ミクログリアにおける炎症性ならびに神経障害性因子の産生を阻害することが治療に役立つと考えられる。

IL-1 β 、IL-6、TNF- α は活性化したミクログリアから放出され、脳内炎症におけるサイトカインシグナルの引き金になっていることが報告されている[224]。今回の検討において、OPDA は LPS により活性化したミクログリア MG5 細胞から産生されるこれらの炎症性サイトカインを抑制することが分かった。また、脳内において、NO はミクログリアにおける iNOS の発現上昇により産生され、酸化ストレスとして神経細胞に対して障害を与えることが報告されている[225]。OPDA は LPS により活性化したミクログリアにおいて、iNOS の発現を抑制し、NO の産生を抑制することが示された。今回の検討から OPDA は活性化したミクログリアにおける炎症性サイトカインならびに NO の産生を抑制することが明らかとなった。そこで、次に OPDA による抗炎症作用のメカニズムに関して調べた。

初めに NF- κ B シグナルとの関連性を調べた。NF- κ B シグナルの活性化過程においては、I κ B-kinase (IKK) による I κ B α のリン酸化が生じ、これが I κ B α の分解を引き起こす。そして I κ B α による負の制御から外れた p65 と p50 のヘテロダイマーから成る転写因子 NF- κ B が核内へ移行し、IL-1 β 、IL-6、TNF α 、iNOS といった遺伝子群の転写が誘導される[80, 84]。今回の検討から OPDA は LPS 刺激による NF- κ B シグナルの活性化を抑制することが分かった。OPDA の構造は哺乳類のプロスタグランジンである 15d-PGJ₂ と類似している (図 1-1、1-2)。OPDA と 15d-PGJ₂ はいずれも求電子性の炭素を持つシクロペンテノン構造を有しており、15d-PGJ₂ に関しては Michael 付加反応によって細胞内タンパク質のシステインに共有

結合するとの報告がなされている[226]。15d-PGJ₂は IKK ならびに NF-κB の DNA 結合ドメインのシステインに結合することで、NF-κB シグナルを抑制することが報告されている[226]。今回の検討において、15d-PGJ₂は LPS 刺激により誘導された NF-κB 依存の IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS といった遺伝子の発現を抑制した（図 4-8）。OPDA は 15d-PGJ₂と同様の求電子性のシクロペンテノン構造を持つことから、OPDA も 15-PGJ₂と同様の機構で NF-κB シグナルを抑制している可能性が考えられる。このことは求電子性を持たない他のジャスモン酸類が NF-κB 依存の遺伝子発現に変化を与えなかったこととも一致する。また、MeJA のアナログである非天然性の methyl 4,5-didehydrojasmonate は、OPDA や 15d-PGJ₂と同様のシクロペンテノン構造を持ち、LPS により活性化したマクロファージから産生される NO や、IL-6 と TNF-α といった炎症性サイトカインの分泌を抑制することが報告されている[227]。以上のことから、OPDA の求電子性のシクロペンテノン構造が抗炎症作用に重要であると考えられる。

OPDA は LPS による p38 の活性化（リン酸化）を抑制した。MAPK の活性化は脳における炎症性因子の産生を制御する重要な機能を担っていることが分かっており[99]、MAPK の中でも p38 は特に脳内炎症との関連性が高いとの報告がある[228, 229]。p38 のノックアウトマウス由来のミクログリアでは LPS 誘導性の炎症が抑制されることが報告されている[228]。また、神経変性疾患モデルマウスにおいて、p38 の阻害剤が脳における炎症サイトカインの産生を抑制し、神経障害に対して保護することが示されている[229]。OPDA が p38 の活性化を阻害するメカニズムは不明であるが、p38 の活性化を抑制することが MG5 細胞における OPDA の抗炎症作用に関わっていると考えられる。

OPDA は SOCS-1 の遺伝子発現を誘導した。SOCS-1 のノックアウトマウス由来のマクロファージでは LPS 刺激を行った際の IL-6 ならびに TNF-α の産生量が野生型に比べて増大し、LPS に対する感受性が高いことが報告されている[221]。また、SOCS-1 を過剰発現させたマクロファージでは、JAK-STAT 経路を阻害することにより LPS 刺激による IL-6 の産生が抑

制されることが知られている[230]。従って、OPDA による SOCS-1 の誘導は抗炎症作用に関与している可能性が考えられる。

今回の検討では、MG5 ミクログリア細胞において 15d-PGJ₂ が、OPDA と同様に LPS 刺激により誘導される IL-1 β 、IL-6、TNF α 、iNOS といった遺伝子の発現を抑制する作用を持つことが示された。これまでに 15d-PGJ₂ は活性化したラットミクログリア細胞からの炎症性因子やサイトカインの産生を抑制することが報告されている[41]。また、15d-PGJ₂ はミクログリア細胞において、p38 活性化の抑制と SOCS-1 の発現誘導を引き起こすことが報告されている[231, 232]。さらに、15d-PGJ₂ は脳梗塞や多発性硬化症、脊髄損傷といった神経変性疾患モデル動物において、ミクログリアの炎症を抑制することにより症状を改善することが知られており、神経変性疾患を抑制する可能性が示唆されている[233, 234]。OPDA と 15d-PGJ₂ は、構造的な面かつミクログリア細胞系において認められる抗炎症作用が似ていることから、OPDA も神経変性疾患に有効である可能性が考えられる。

今回の研究において、OPDA がミクログリア MG5 細胞において、LPS 誘導性 NF- κ B、p38 シグナル経路の活性化の抑制と SOCS-1 発現誘導により抗炎症作用を示すことが初めて明らかとなった（図 4-4、4-5、4-6）。第 3 章で述べたように、OPDA は Nrf2 シグナルを活性化することにより抗酸化ストレス応答を誘導し、神経細胞において酸化ストレスによる細胞障害から保護する作用を持つ。神経変性疾患においてはミクログリアと神経細胞間に次のような相互作用が生じることが知られている。活性化したミクログリアから放出され、酸化ストレスの原因となる NO 等の活性酸素や、炎症性因子である TNF- α といった炎症性サイトカインは、神経細胞に障害を引き起こす。障害を受けた神経細胞から放出される因子はさらなるミクログリアの活性化を引き起こし、神経細胞にさらに障害を与える。このようにしてミクログリアと神経細胞において炎症と酸化ストレスの増悪化サイクルが生じ、神経変性疾患の発症や進展につながると考えられている[107, 116, 124]（図 1-9）。従って抗酸化作用と抗炎症作用を併せ持つ OPDA は神経変性疾患のような酸化ストレスと炎症が関

わる疾患に対して、有効な化合物であることが期待できる（図 4-9）。

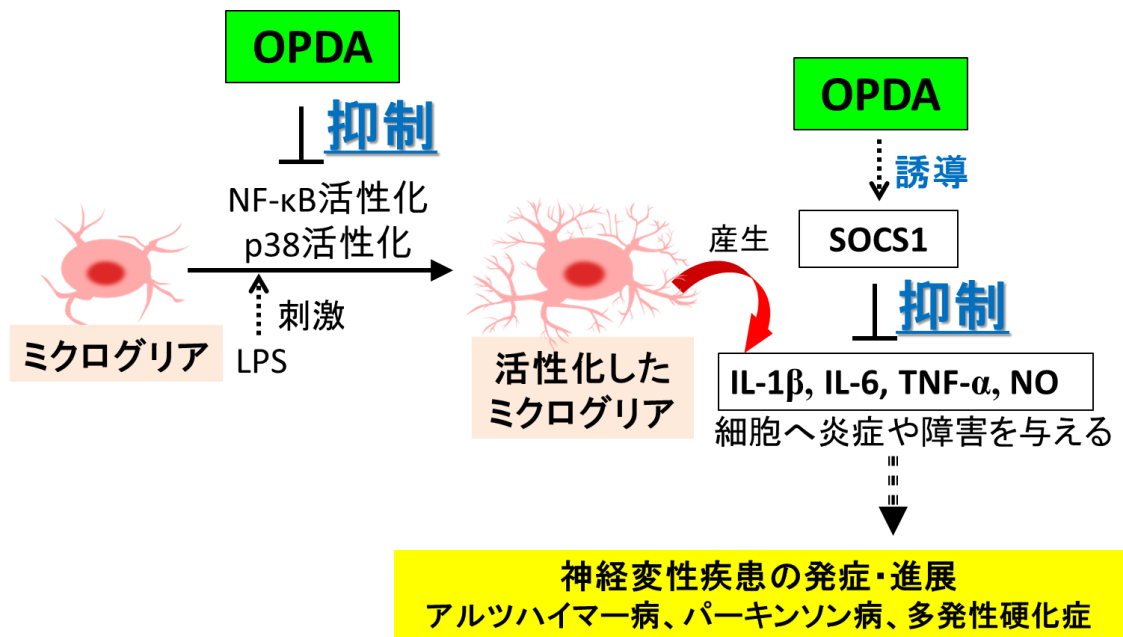


図 4-9. ミクログリアにおける OPDA による抗炎症作用

第5章 結語

植物で生合成されるジャスモン酸類は多様な生理活性作用を持つ植物ホルモンであることが知られてきたが、その研究は主にジャスモン酸 (JA)、ジャスモン酸メチル (MeJA)、ジャスモノイルイソロイシン (JA-Ile) に関してなされてきた。そのため 12-オキソ-フィトジェン酸 (OPDA) に関しては、植物においても詳細な生理機能の解明はなされておらず、さらに動物細胞に対する生理作用を見た報告はこれまでにほとんど存在しなかった。

本研究では植物ならびに動物細胞に対する OPDA の生理機能の解析を行った。第2章の植物における機能解析では、初めにマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から JA や MeJA には応答せず、OPDA にのみ応答する OPDA 特異的応答遺伝子群 (ORG 群) を同定した。ORG 群の多くは傷害処理時に早期に発現が誘導されており、OPDA を生合成できない *aos* 変異体では発現の誘導が抑制されることから、OPDA が傷害応答時に上流のシグナル伝達因子として機能していることが示唆された。また、OPDA は JA とは異なる COI1 非依存的な情報伝達経路を用いて、ORG の発現を引き起こしていた。以上のことから OPDA は植物において傷害応答をはじめとする生理現象に、JA とは異なる独自のシグナルとして機能することが示唆された。

その後、他の研究グループからも OPDA が JA とは異なる独自の生理活性作用を持つことを支持する様々な報告がなされている。Dave らは、OPDA が種子の発芽の抑制に関与していることを報告しており、ジャスモン酸類生合成変異体を用いて、OPDA が JA や JA-Ile より発芽抑制活性を強く持ち、その作用は COI1 非依存的であることを示している[235]。Mueller らは、OPDA が転写因子 TGA によって制御される遺伝子群の発現を制御していることを報告した[236]。Mueller らはマイクロアレイを用いて、OPDA と植物内に酸化ストレス等で非酵素的に合成されるプロスタグランジン様の *phytoprostane* により発現が制御される遺伝子群を同定し、それらの多くが JA による制御は受けないことと、転写因子 TGA の機能を失った *tga2-5-6* 変異体では OPDA と *phytoprostane* による発現制御が抑制されることを

示している[236]。Park らは、OPDA が葉緑体内で cyclophilin 20-3 タンパク質に JA の約 100 倍の強さで結合し、システイン合成酵素複合体を形成させ、システイン並びにグルタチオンの合成を誘導することで細胞内のレドックス恒常性の維持に寄与していることを報告した[237]。Ohkama-Ohtsu らは、OPDA が glutathione transferase 6 によりグルタチオンと結合し、液胞内で代謝される経路が存在することを明らかにし、OPDA の生体内の量を調節している可能性を示唆した[238]。上記のいずれの報告においても OPDA と JA の活性の違いが何に由来するのかについて詳細な検討はしていないが、Dave らは、OPDA と JA の生合成される細胞内の部位や組織の違いが影響している可能性を考察しており、また Ohkama-Ohtsu らは OPDA が α 、 β -不飽和カルボニル構造を持つことゆえの活性である可能性を述べている。

このようにジャスモン酸類の中で生合成前駆体として位置づけられてきた OPDA が独自の機能を有していることは興味深い。今後、OPDA のシグナル伝達の変異体の解析等が進むことにより OPDA の受容体やさらなる OPDA の生理機能の解明が進むことが期待できる。

OPDA の動物細胞に対する作用に関する報告はこれまでにほとんどなされておらず、OPDA の抗酸化ならびに抗炎症作用に関しては本研究が初めの報告である。第 3 章に述べたように、OPDA は神経細胞において nuclear factor erythroid2 related factor 2 (Nrf2) 経路を活性化し、グルタチオンの蓄積や、抗酸化酵素である heme oxygenase-1 (HO-1) や NADPH quinone oxidoreductase (NQO1) の発現誘導といった抗酸化ストレス応答を引き起こすことにより、酸化ストレス刺激に対するミトコンドリア障害や細胞障害から保護する作用を持つことが分かった。また、第 4 章に述べたように、OPDA はミクログリア細胞においては、lipopolysaccharide (LPS) 誘発性の炎症に対し、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) シグナル経路の抑制、p38 シグナル経路の抑制、suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) 発現誘導を引き起こし、炎症性サイトカインである interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) や神経障害性因子である nitric oxide (NO) の産生を抑制し、抗炎症作用を示すことが明らかとなった。

動物細胞において、酸化ストレスと炎症は種々の疾患の発症や進展につながると考えられている。特に神経変性疾患においては、神経細胞とミクログリアにおける酸化ストレスと炎症がそれぞれ作用しあうことで、神経細胞の障害とミクログリアにおける炎症が増悪化し、疾患の発症や進展に関与していることが知られている[124] (図 1-9)。従って、抗酸化ストレス作用ならびに抗炎症作用を併せ持つ OPDA は神経変性疾患に有効である可能性が考えられる (図 5-1)。

2013 年に Biogen Idec 社の BG-12 (商品名 Tecfidera) は、神経変性疾患の多発性硬化症に対する承認をアメリカ食品医薬品局 (FDA) から受け、米国にて上市された[239]。BG-12 は抗酸化ストレスと抗炎症作用を併せ持つ神経を保護する薬剤で、その薬効メカニズムに Nrf2 活性化作用と NF- κ B シグナル経路に対する抑制作用が含まれることが分かっている[240]。また BG-12 は α 、 β -不飽和カルボニル構造を持っており、これが Nrf2 の活性化と NF- κ B 経路抑制作用を生み出しているのではないかと考えられている。SH-SY5Y 細胞において BG-12 を評価した論文では、4 μ M の BG-12 を 8 時間処理すると、Nrf2 活性化により HO-1、NQO1、glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)、glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) の mRNA が誘導されるが、その誘導の度合いは未処理に対して 1.5 倍から 3 倍程度であり[241]、第 3 章で報告した OPDA の誘導活性と比べると大きくは変わらない。また、ミクログリア BV2 細胞において BG-12 の抗炎症作用を評価した論文では、LPS 刺激により炎症を誘発した際の NO の産生量に関して、20 μ M の BG-12 が NO 産生量を約 50% に抑制することが報告されており[242]、第 4 章で報告した OPDA の活性とほぼ同等である。従って OPDA は上市されている BG-12 とよく似た生理活性作用を持ち合わせており、ヒトに対する有用性が示唆される。

BG-12 が人工的に合成される薬剤であるのに対し、OPDA は高等植物に広く存在する天然物であることが魅力とも考えられる。それは OPDA が、我々が普段食べる野菜等にも含まれており、健康食品としての応用につながる可能性が考えられるためである。食品の OPDA

の含有量に関する詳細な報告は非常に少ないが、トマトの果実とシロイヌナズナの葉に関する報告によると、OPDA はグラム当たり数 nmol 含まれている[7, 191]。これは単純に水溶液の濃度に換算すると数 μM となり、OPDA の体内での吸収や代謝安定性等に依存するが、OPDA を含む食品を摂取した際に Nrf2 活性化や NF- κ B 抑制作用が発揮される可能性が考えられる。今後、種々の野菜や果実における OPDA の含有量の測定から、より多くの OPDA を含む食品が見出されることが期待される。また、OPDA は傷害時に蓄積量が増加することが報告されていることから[7]、栽培上の条件を工夫することで、OPDA の含有量を増やす可能性も考えられる。

近年、健康食品として広く知られるようになったブロッコリーのスプラウトは sulforaphane を成分として持つ。Sulforaphane は、OPDA 同様に、Nrf2 活性化による抗酸化作用と NF- κ B 抑制による抗炎症作用を併せ持つ[243, 244]。Sulforaphane は α 、 β -不飽和カルボニル構造は持たないが、イソチオシアネート基を有しており、これが求電子作用を持つことが、上記の生理活性を引き起こしていると考えられている[245]。Sulforaphane は皮膚がんを適応疾患とした第一相臨床試験が実施されており、また自閉症を適応疾患とした前臨床試験も実施中である。従って健康食品という位置づけのみならず、医療の現場にも介入して来る可能性がある。

OPDA も sulforaphane と同様に機能性食品として有用である可能性があるが、そのためには、種々の野菜や果実で OPDA の含有量を網羅的に探索する研究が必要であると思われる。また、今後 OPDA の体内における吸収や組織分布、代謝安定性、毒性試験、各種疾患動物モデルにおける評価などを行うことで、医薬品への応用の道も開かれていく可能性が考えられる。ジャスモン酸類の毒性試験においては、MeJA をマウス腹腔内へ投与した場合、投与量が 100 から 500 mg/Kg の範囲においては、急性毒性を示したり死亡に至ったりする個体は出現せず、また、MeJA の誘導体である methyl dihydrojasmonate に関しては、ラット経口投与における LD₅₀（半数致死量）は>5g/Kg であるとの報告がなされている[21]。従って

ジャスモン酸類の毒性は今のところ懸念はされていない。また体内の組織移行性に関しては、MeJA の抗うつ作用を研究した報告において、マウスへの腹腔内投与でも中枢組織への作用を示すことから[20]、一般的に低分子の通過が困難とされる血液脳関門を通過して脳内へ移行している可能性が示唆されている。今後 OPDA に関してもこのような研究を通してその特性が明らかにされていくことが期待される。

本研究においては、ジャスモン酸類の OPDA に注目し、植物ならびに動物細胞における機能解析を行った。しかしジャスモン酸類に関しては、植物においても動物細胞においても未だに生理作用やシグナル伝達に関しては明らかにされていない部分も多く、今後も発展が続く分野であると思われる。

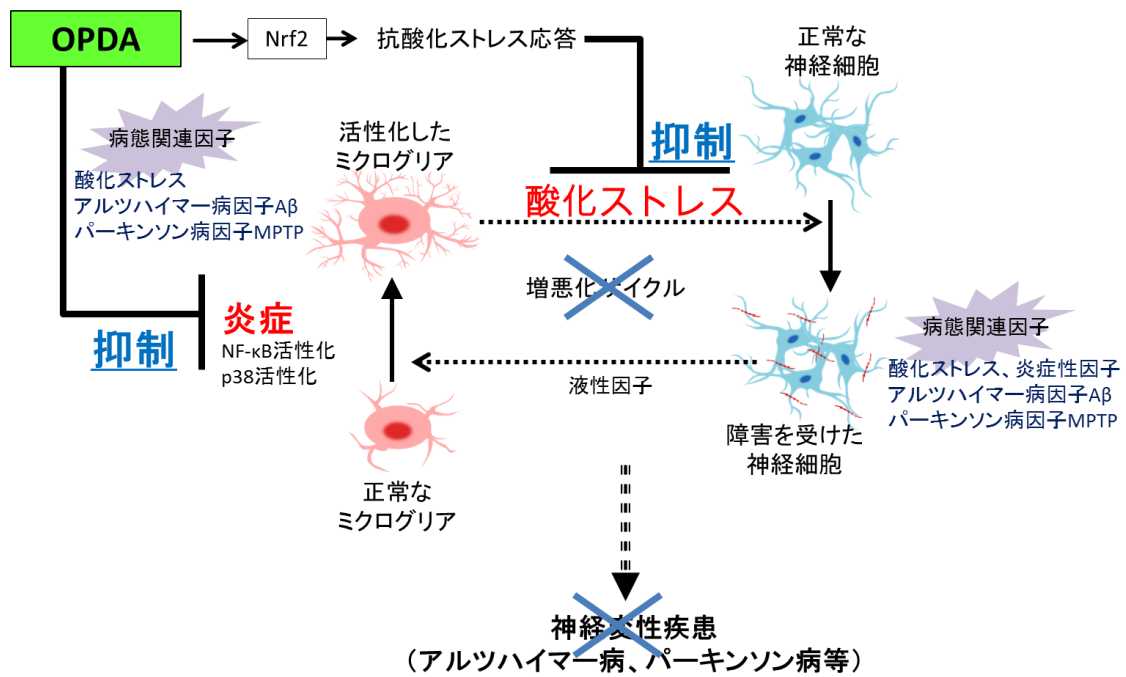


図 5-1. OPDA の抗酸化ならび抗炎症作用により期待される神経変性疾患の抑制機構

参考文献

- [1] E. Demole, E. Lederer, D. Mercier, Isolation and determination of methyl jasmonate structure, forming characteristic fragrant jasmine essence, *Helvetica Chimica Acta*, 45 (1962) 675-685.
- [2] 関本 (佐々木) 結子, 太田啓之, 新しい植物ホルモンの科学、第3版、8章ジャスモン酸, (in press).
- [3] C. Wasternack, B. Hause, Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*, *Annals of botany*, 111 (2013) 1021-1058.
- [4] S. Ishiguro, A. Kawai-Oda, J. Ueda, I. Nishida, K. Okada, The DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*, *The Plant cell*, 13 (2001) 2191-2209.
- [5] G. Bannenberg, M. Martinez, M. Hamberg, C. Castresana, Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*, *Lipids*, 44 (2009) 85-95.
- [6] S. Bleichert, C. Bockelmann, M. Füßlein, T.v. Schrader, B. Stelmach, U. Niesel, E.W. Weiler, Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril-coiling response of *Bryonia dioica* Jacq., *Planta*, 207 (1999) 470-479.
- [7] A. Stintzi, H. Weber, P. Reymond, J. Browse, E.E. Farmer, Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001) 12837-12842.
- [8] D.X. Xie, B.F. Feys, S. James, M. Nieto-Rostro, J.G. Turner, COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility, *Science (New York, N.Y.)*, 280 (1998)

1091-1094.

[9] A. Chini, S. Fonseca, G. Fernandez, B. Adie, J.M. Chico, O. Lorenzo, G. Garcia-Casado, I. Lopez-Vidriero, F.M. Lozano, M.R. Ponce, J.L. Micol, R. Solano, The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling, *Nature*, 448 (2007) 666-671.

[10] A. Ghasemi Pirbalouti, S.E. Sajjadi, K. Parang, A review (research and patents) on jasmonic acid and its derivatives, *Archiv der Pharmazie*, 347 (2014) 229-239.

[11] S. Cohen, E. Flescher, Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug, *Phytochemistry*, 70 (2009) 1600-1609.

[12] I.M. Cesari, E. Carvalho, M. Figueiredo Rodrigues, S. Mendonca Bdos, N.D. Amoedo, F.D. Rumjanek, Methyl jasmonate: putative mechanisms of action on cancer cells cycle, metabolism, and apoptosis, *International journal of cell biology*, 2014 (2014) 572097.

[13] Z. Raviv, S. Cohen, D. Reischer-Pelech, The anti-cancer activities of jasmonates, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 71 (2013) 275-285.

[14] O. Fingrut, E. Flescher, Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells, *Leukemia*, 16 (2002) 608-616.

[15] E. Flescher, Jasmonates in cancer therapy, *Cancer letters*, 245 (2007) 1-10.

[16] J.H. Kim, S.Y. Lee, S.Y. Oh, S.I. Han, H.G. Park, M.A. Yoo, H.S. Kang, Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells, *Oncology reports*, 12 (2004) 1233-1238.

[17] D. Ezekwudo, R. Shashidharamurthy, D. Devineni, E. Bozeman, R. Palaniappan, P. Selvaraj, Inhibition of expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and induction of cell death in radioresistant human prostate adenocarcinoma cell line (PC-3) by methyl jasmonate, *Cancer letters*, 270 (2008) 277-285.

[18] N. Goldin, L. Arzoin, A. Heyfets, A. Israelson, Z. Zaslavsky, T. Bravman, V. Bronner, A.

Notcovich, V. Shoshan-Barmatz, E. Flescher, Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase, *Oncogene*, 27 (2008) 4636-4643.

[19] H.J. Lee, K. Maeng, H.T. Dang, G.J. Kang, C. Ryou, J.H. Jung, H.K. Kang, J.T. Prchal, E.S. Yoo, D. Yoon, Anti-inflammatory effect of methyl dehydrojasmonate (J2) is mediated by the NF-kappaB pathway, *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 89 (2011) 83-90.

[20] S. Umukoro, A.O. Akinyinka, A.C. Aladeokin, Antidepressant activity of methyl jasmonate, a plant stress hormone in mice, *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 98 (2011) 8-11.

[21] S. Umukoro, A.S. Olugbemide, Antinociceptive effects of methyl jasmonate in experimental animals, *Journal of natural medicines*, 65 (2011) 466-470.

[22] K. Kazan, J.M. Manners, Jasmonate signaling: toward an integrated view, *Plant physiology*, 146 (2008) 1459-1468.

[23] R.N. Dubois, S.B. Abramson, L. Crofford, R.A. Gupta, L.S. Simon, L.B. Van De Putte, P.E. Lipsky, Cyclooxygenase in biology and disease, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12 (1998) 1063-1073.

[24] R.E. Haskew-Layton, J.B. Payappilly, H. Xu, S.A. Bennett, R.R. Ratan, 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) protects neurons from oxidative death via an Nrf2 astrocyte-specific mechanism independent of PPARgamma, *Journal of neurochemistry*, 124 (2013) 536-547.

[25] T. Matsuoka, S. Narumiya, Prostaglandin receptor signaling in disease, *TheScientificWorldJournal*, 7 (2007) 1329-1347.

[26] E. Ricciotti, G.A. FitzGerald, Prostaglandins and inflammation, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31 (2011) 986-1000.

[27] Y.J. Surh, H.K. Na, J.M. Park, H.N. Lee, W. Kim, I.S. Yoon, D.D. Kim,

15-Deoxy-Delta(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J(2), an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling, *Biochemical pharmacology*, 82 (2011) 1335-1351.

[28] S. Narumiya, Physiology and pathophysiology of prostanoid receptors, *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 83 (2007) 296-319.

[29] I.V. Lima, L.F. Bastos, M. Limborco-Filho, B.L. Fiebich, A.C. de Oliveira, Role of prostaglandins in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases, *Mediators of inflammation*, 2012 (2012) 946813.

[30] T.J. Montine, K.R. Sidell, B.C. Crews, W.R. Markesbery, L.J. Marnett, L.J. Roberts, 2nd, J.D. Morrow, Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD, *Neurology*, 53 (1999) 1495-1498.

[31] U.A. Chaudhry, H. Zhuang, B.J. Crain, S. Dore, Elevated microsomal prostaglandin-E synthase-1 in Alzheimer's disease, *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 4 (2008) 6-13.

[32] A.M. Pooler, A.A. Arjona, R.K. Lee, R.J. Wurtman, Prostaglandin E2 regulates amyloid precursor protein expression via the EP2 receptor in cultured rat microglia, *Neuroscience letters*, 362 (2004) 127-130.

[33] M.B. Mattammal, R. Strong, V.M. Lakshmi, H.D. Chung, A.H. Stephenson, Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine: implication for Parkinson's disease, *Journal of neurochemistry*, 64 (1995) 1645-1654.

[34] E. Carrasco, D. Casper, P. Werner, PGE(2) receptor EP1 renders dopaminergic neurons selectively vulnerable to low-level oxidative stress and direct PGE(2) neurotoxicity, *Journal of neuroscience research*, 85 (2007) 3109-3117.

[35] J. Jin, F.S. Shie, J. Liu, Y. Wang, J. Davis, A.M. Schantz, K.S. Montine, T.J. Montine, J.

Zhang, Prostaglandin E2 receptor subtype 2 (EP2) regulates microglial activation and associated neurotoxicity induced by aggregated alpha-synuclein, *Journal of neuroinflammation*, 4 (2007) 2.

[36] Y. Saito, K. Nishio, Y. Numakawa, Y. Ogawa, Y. Yoshida, N. Noguchi, E. Niki, Protective effects of 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J2 against glutamate-induced cell death in primary cortical neuron cultures: induction of adaptive response and enhancement of cell tolerance primarily through up-regulation of cellular glutathione, *Journal of neurochemistry*, 102 (2007) 1625-1634.

[37] E.S. Kang, J.S. Hwang, S.A. Ham, M.H. Park, G.H. Kim, K.S. Paek, T. Yoo, W.J. Lee, K.R. Kang, J.H. Lee, Y.J. Choi, H.G. Seo, 15-Deoxy-Delta^(12,14)-prostaglandin J2 prevents oxidative injury by upregulating the expression of aldose reductase in vascular smooth muscle cells, *Free radical research*, 48 (2014) 218-229.

[38] T.H. Lin, C.H. Tang, K. Wu, Y.C. Fong, R.S. Yang, W.M. Fu, 15-deoxy-Delta^(12,14)-prostaglandin-J2 and ciglitazone inhibit TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase 13 production via the antagonism of NF-kappaB activation in human synovial fibroblasts, *Journal of cellular physiology*, 226 (2011) 3242-3250.

[39] T.S. Lee, H.L. Tsai, L.Y. Chau, Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J2, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 19325-19330.

[40] D. Liu, Z. Geng, W. Zhu, H. Wang, Y. Chen, J. Liang, 15-deoxy-Delta^{(1)(2),(1)(4)}-prostaglandin J(2) ameliorates endotoxin-induced acute lung injury in rats, *Chinese medical journal*, 127 (2014) 815-820.

[41] P.D. Drew, J.A. Chavis, The cyclopentone prostaglandin 15-deoxy-Delta^(12,14) prostaglandin J2 represses nitric oxide, TNF-alpha, and IL-12 production by microglial cells,

Journal of neuroimmunology, 115 (2001) 28-35.

[42] K. Itoh, J. Mimura, M. Yamamoto, Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview, *Antioxidants & redox signaling*, 13 (2010) 1665-1678.

[43] Y. Hirotsu, F. Katsuoka, R. Funayama, T. Nagashima, Y. Nishida, K. Nakayama, J.D. Engel, M. Yamamoto, Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks, *Nucleic acids research*, 40 (2012) 10228-10239.

[44] K.I. Tong, Y. Katoh, H. Kusunoki, K. Itoh, T. Tanaka, M. Yamamoto, Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model, *Molecular and cellular biology*, 26 (2006) 2887-2900.

[45] M. Kobayashi, M. Yamamoto, Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation, *Antioxidants & redox signaling*, 7 (2005) 385-394.

[46] H. Zhang, A. Shih, A. Rinna, H.J. Forman, Resveratrol and 4-hydroxynonenal act in concert to increase glutamate cysteine ligase expression and glutathione in human bronchial epithelial cells, *Archives of biochemistry and biophysics*, 481 (2009) 110-115.

[47] E.M. Sikorski, T. Hock, N. Hill-Kapturczak, A. Agarwal, The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury, *American journal of physiology. Renal physiology*, 286 (2004) F425-441.

[48] A.K. Jaiswal, Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases, *Free radical biology & medicine*, 29 (2000) 254-262.

[49] C.J. Harvey, R.K. Thimmulappa, A. Singh, D.J. Blake, G. Ling, N. Wakabayashi, J. Fujii, A. Myers, S. Biswal, Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress, *Free radical biology & medicine*, 46 (2009) 443-453.

[50] L.M. Zipper, R.T. Mulcahy, The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to

sequester Nrf2 in cytoplasm, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 36544-36552.

[51] A. Kobayashi, M.I. Kang, H. Okawa, M. Ohtsuji, Y. Zenke, T. Chiba, K. Igarashi, M. Yamamoto, Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2, *Molecular and cellular biology*, 24 (2004) 7130-7139.

[52] D.D. Zhang, S.C. Lo, J.V. Cross, D.J. Templeton, M. Hannink, Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex, *Molecular and cellular biology*, 24 (2004) 10941-10953.

[53] Y. Luo, A.L. Eggler, D. Liu, G. Liu, A.D. Mesecar, R.B. van Breemen, Sites of alkylation of human Keap1 by natural chemoprevention agents, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18 (2007) 2226-2232.

[54] T. Suzuki, H. Motohashi, M. Yamamoto, Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway, *Trends in pharmacological sciences*, 34 (2013) 340-346.

[55] S. Ichihara, Y. Yamada, F. Liu, T. Murohara, K. Itoh, M. Yamamoto, G. Ichihara, Ablation of the transcription factor Nrf2 promotes ischemia-induced neovascularization by enhancing the inflammatory response, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30 (2010) 1553-1561.

[56] S. Fourquet, R. Guerois, D. Biard, M.B. Toledano, Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation, *The Journal of biological chemistry*, 285 (2010) 8463-8471.

[57] R. Saito, T. Suzuki, K. Hiramoto, S. Asami, E. Naganuma, H. Suda, T. Iso, H. Yamamoto, M. Morita, L. Baird, Y. Furusawa, T. Negishi, M. Ichinose, M. Yamamoto, Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response, *Molecular and cellular biology*, 36 (2015) 271-284.

- [58] S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Molecular aspects of medicine*, 30 (2009) 42-59.
- [59] M. Deponte, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochimica et biophysica acta*, 1830 (2013) 3217-3266.
- [60] D.M. Townsend, K.D. Tew, H. Tapiero, The importance of glutathione in human disease, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 57 (2003) 145-155.
- [61] F. Gu, V. Chauhan, A. Chauhan, Glutathione redox imbalance in brain disorders, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 18 (2015) 89-95.
- [62] D.D. Haines, I. Lekli, P. Teissier, I. Bak, A. Tosaki, Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders, *Acta physiologica (Oxford, England)*, 204 (2012) 487-501.
- [63] H.O. Pae, E.C. Kim, H.T. Chung, Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites, *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 42 (2008) 197-203.
- [64] H. Hyun, Y.W. Won, K.M. Kim, J. Lee, M. Lee, Y.H. Kim, Therapeutic effects of a reducible poly (oligo-D-arginine) carrier with the heme oxygenase-1 gene in the treatment of hypoxic-ischemic brain injury, *Biomaterials*, 31 (2010) 9128-9134.
- [65] J. Ilzecka, Z. Stelmasiak, Serum bilirubin concentration in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Clinical neurology and neurosurgery*, 105 (2003) 237-240.
- [66] D. Ross, Quinone reductases multitasking in the metabolic world, *Drug metabolism reviews*, 36 (2004) 639-654.
- [67] H.J. Kim, G.S. Oh, A. Shen, S.B. Lee, S.K. Choe, K.B. Kwon, S. Lee, K.S. Seo, T.H. Kwak, R. Park, H.S. So, Augmentation of NAD(+) by NQO1 attenuates cisplatin-mediated hearing impairment, *Cell death & disease*, 5 (2014) e1292.

- [68] D.A. Johnson, J.A. Johnson, Nrf2—a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases, *Free radical biology & medicine*, 88 (2015) 253-267.
- [69] R.J. Jakel, J.A. Townsend, A.D. Kraft, J.A. Johnson, Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine, *Brain research*, 1144 (2007) 192-201.
- [70] T. Satoh, K. Kosaka, K. Itoh, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Y. Shimojo, C. Kitajima, J. Cui, J. Kamins, S. Okamoto, M. Izumi, T. Shirasawa, S.A. Lipton, Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1, *Journal of neurochemistry*, 104 (2008) 1116-1131.
- [71] T. Satoh, S.I. Okamoto, J. Cui, Y. Watanabe, K. Furuta, M. Suzuki, K. Tohyama, S.A. Lipton, Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006) 768-773.
- [72] A. Cuadrado, P. Moreno-Murciano, J. Pedraza-Chaverri, The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's disease, *Expert opinion on therapeutic targets*, 13 (2009) 319-329.
- [73] M. Zhang, C. An, Y. Gao, R.K. Leak, J. Chen, F. Zhang, Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection, *Progress in neurobiology*, 100 (2013) 30-47.
- [74] H. Kumar, S. Koppula, I.S. Kim, S.V. More, B.W. Kim, D.K. Choi, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling in Parkinson disease: a promising multi therapeutic target against oxidative stress, neuroinflammation and cell death, *CNS & neurological disorders drug targets*, 11 (2012) 1015-1029.
- [75] N.A. Kaidery, R. Banerjee, L. Yang, N.A. Smirnova, D.M. Hushpulan, K.T. Liby, C.R.

- Williams, M. Yamamoto, T.W. Kensler, R.R. Ratan, M.B. Sporn, M.F. Beal, I.G. Gazaryan, B. Thomas, Targeting Nrf2-mediated gene transcription by extremely potent synthetic triterpenoids attenuate dopaminergic neurotoxicity in the MPTP mouse model of Parkinson's disease, *Antioxidants & redox signaling*, 18 (2013) 139-157.
- [76] M.J. Calkins, D.A. Johnson, J.A. Townsend, M.R. Vargas, J.A. Dowell, T.P. Williamson, A.D. Kraft, J.M. Lee, J. Li, J.A. Johnson, The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease, *Antioxidants & redox signaling*, 11 (2009) 497-508.
- [77] C.C. Leonardo, M. Agrawal, N. Singh, J.R. Moore, S. Biswal, S. Dore, Oral administration of the flavanol (-)-epicatechin bolsters endogenous protection against focal ischemia through the Nrf2 cytoprotective pathway, *The European journal of neuroscience*, 38 (2013) 3659-3668.
- [78] K.I. Tong, B. Padmanabhan, A. Kobayashi, C. Shang, Y. Hirotsu, S. Yokoyama, M. Yamamoto, Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response, *Molecular and cellular biology*, 27 (2007) 7511-7521.
- [79] 鈴木隆史, 山本雅之, Keap1-Nrf2 システムによるレドックスシグナル応答メカニズム, *実験医学*, 24 (2006) 1737-1743.
- [80] P. Viatour, M.P. Merville, V. Bours, A. Chariot, Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation, *Trends in biochemical sciences*, 30 (2005) 43-52.
- [81] S. Camandola, M.P. Mattson, NF- κ B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases, *Expert opinion on therapeutic targets*, 11 (2007) 123-132.
- [82] F. Wan, M.J. Leonardo, Specification of DNA binding activity of NF- κ B proteins, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1 (2009) a000067.
- [83] R.H. Shih, C.Y. Wang, C.M. Yang, NF- κ B Signaling Pathways in Neurological

Inflammation: A Mini Review, *Frontiers in molecular neuroscience*, 8 (2015) 77.

[84] K.S. Ahn, B.B. Aggarwal, Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056 (2005) 218-233.

[85] Y. Yamamoto, R.B. Gaynor, Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer, *The Journal of clinical investigation*, 107 (2001) 135-142.

[86] M. Grilli, M. Ribola, A. Alberici, A. Valerio, M. Memo, P. Spano, Identification and characterization of a kappa B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene, *The Journal of biological chemistry*, 270 (1995) 26774-26777.

[87] M. Nakai, Z.H. Qin, J.F. Chen, Y. Wang, T.N. Chase, Kainic acid-induced apoptosis in rat striatum is associated with nuclear factor-kappaB activation, *Journal of neurochemistry*, 74 (2000) 647-658.

[88] J.A. Clemens, D.T. Stephenson, E.B. Smalstig, E.P. Dixon, S.P. Little, Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 28 (1997) 1073-1080; discussion 1080-1071.

[89] A. Schneider, A. Martin-Villalba, F. Weih, J. Vogel, T. Wirth, M. Schwaninger, NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia, *Nature medicine*, 5 (1999) 554-559.

[90] A. Nurmi, P.J. Lindsberg, M. Koistinaho, W. Zhang, E. Juettler, M.L. Karjalainen-Lindsberg, F. Weih, N. Frank, M. Schwaninger, J. Koistinaho, Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 35 (2004) 987-991.

[91] K. Terai, A. Matsuo, P.L. McGeer, Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease, *Brain research*, 735

(1996) 159-168.

[92] I. Ferrer, E. Marti, E. Lopez, A. Tortosa, NF- κ B immunoreactivity is observed in association with beta A4 diffuse plaques in patients with Alzheimer's disease, *Neuropathology and applied neurobiology*, 24 (1998) 271-277.

[93] S. Sung, H. Yang, K. Uryu, E.B. Lee, L. Zhao, D. Shineman, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, D. Pratico, Modulation of nuclear factor- κ B activity by indomethacin influences A beta levels but not A beta precursor protein metabolism in a model of Alzheimer's disease, *The American journal of pathology*, 165 (2004) 2197-2206.

[94] E.K. Kim, E.J. Choi, Compromised MAPK signaling in human diseases: an update, *Archives of toxicology*, 89 (2015) 867-882.

[95] J.S. Arthur, S.C. Ley, Mitogen-activated protein kinases in innate immunity, *Nature reviews. Immunology*, 13 (2013) 679-692.

[96] W. Peti, R. Page, Molecular basis of MAP kinase regulation, *Protein science : a publication of the Protein Society*, 22 (2013) 1698-1710.

[97] R.J. Davis, Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell*, 103 (2000) 239-252.

[98] K. Takeda, I. Naguro, H. Nishitoh, A. Matsuzawa, H. Ichijo, Apoptosis signaling kinases: from stress response to health outcomes, *Antioxidants & redox signaling*, 15 (2011) 719-761.

[99] B. Kaminska, MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits, *Biochimica et biophysica acta*, 1754 (2005) 253-262.

[100] B. Kaminska, A. Gozdz, M. Zawadzka, A. Ellert-Miklaszewska, M. Lipko, MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target,

Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007), 292 (2009) 1902-1913.

[101] P. Veglianesi, D. Lo Coco, M. Bao Cutrona, R. Magnoni, D. Pennacchini, B. Pozzi, G. Gowing, J.P. Julien, M. Tortarolo, C. Bendotti, Activation of the p38MAPK cascade is associated with upregulation of TNF alpha receptors in the spinal motor neurons of mouse models of familial ALS, *Molecular and cellular neurosciences*, 31 (2006) 218-231.

[102] G.A. Morfini, D.A. Bosco, H. Brown, R. Gatto, A. Kaminska, Y. Song, L. Molla, L. Baker, M.N. Marangoni, S. Berth, E. Tavassoli, C. Bagnato, A. Tiwari, L.J. Hayward, G.F. Pigino, D.M. Watterson, C.F. Huang, G. Banker, R.H. Brown, Jr., S.T. Brady, Inhibition of fast axonal transport by pathogenic SOD1 involves activation of p38 MAP kinase, *PloS one*, 8 (2013) e65235.

[103] Y.R.L.B. Tovar, R. Tapia, VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK, *Journal of neurochemistry*, 115 (2010) 1090-1101.

[104] E. Giraldo, A. Lloret, T. Fuchsberger, J. Vina, Abeta and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: protective role of vitamin E, *Redox biology*, 2 (2014) 873-877.

[105] M. Kitazawa, D. Cheng, M.R. Tsukamoto, M.A. Koike, P.D. Wes, V. Vasilevko, D.H. Cribbs, F.M. LaFerla, Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187 (2011) 6539-6549.

[106] J.C. Tobon-Velasco, J.H. Limon-Pacheco, M. Orozco-Ibarra, M. Macias-Silva, G. Vazquez-Victorio, E. Cuevas, S.F. Ali, A. Cuadrado, J. Pedraza-Chaverri, A. Santamaria, 6-OHDA-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction are mediated by early modulation of intracellular signals and interaction of Nrf2 and NF-kappaB factors,

Toxicology, 304 (2013) 109-119.

[107] P. Agostinho, R.A. Cunha, C. Oliveira, Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Current pharmaceutical design*, 16 (2010) 2766-2778.

[108] K. Blennow, M.J. de Leon, H. Zetterberg, Alzheimer's disease, *Lancet* (London, England), 368 (2006) 387-403.

[109] S.W. Scheff, D.A. Price, Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus, *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 9 (2006) 101-115.

[110] R.D. Fields, B. Stevens-Graham, New insights into neuron-glia communication, *Science* (New York, N.Y.), 298 (2002) 556-562.

[111] P. Eikelenboom, E. van Exel, J.J. Hoozemans, R. Veerhuis, A.J. Rozemuller, W.A. van Gool, Neuroinflammation - an early event in both the history and pathogenesis of Alzheimer's disease, *Neuro-degenerative diseases*, 7 (2010) 38-41.

[112] J. Navarro-Yepes, L. Zavala-Flores, A. Anandhan, F. Wang, M. Skotak, N. Chandra, M. Li, A. Pappa, D. Martinez-Fong, L.M. Del Razo, B. Quintanilla-Vega, R. Franco, Antioxidant gene therapy against neuronal cell death, *Pharmacology & therapeutics*, 142 (2014) 206-230.

[113] J.A. Sonnen, J.C. Breitner, M.A. Lovell, W.R. Markesbery, J.F. Quinn, T.J. Montine, Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models, *Free radical biology & medicine*, 45 (2008) 219-230.

[114] P.H. Reddy, M.F. Beal, Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease, *Trends in molecular medicine*, 14 (2008) 45-53.

[115] U.K. Hanisch, H. Kettenmann, Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain, *Nature neuroscience*, 10 (2007) 1387-1394.

- [116] A. Hald, J. Lotharius, Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link?, *Experimental neurology*, 193 (2005) 279-290.
- [117] R. Deumens, A. Blokland, J. Prickaerts, Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway, *Experimental neurology*, 175 (2002) 303-317.
- [118] A. Yoritaka, N. Hattori, K. Uchida, M. Tanaka, E.R. Stadtman, Y. Mizuno, Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (1996) 2696-2701.
- [119] R.K. Pearce, A. Owen, S. Daniel, P. Jenner, C.D. Marsden, Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease, *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996), 104 (1997) 661-677.
- [120] M. Gesi, A. Santinami, R. Ruffoli, G. Conti, F. Fornai, Novel aspects of dopamine oxidative metabolism (confounding outcomes take place of certainties), *Pharmacology & toxicology*, 89 (2001) 217-224.
- [121] D. Sulzer, L. Zecca, Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review, *Neurotoxicity research*, 1 (2000) 181-195.
- [122] J.W. Langston, L.S. Forno, J. Tetrad, A.G. Reeves, J.A. Kaplan, D. Karluk, Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure, *Annals of neurology*, 46 (1999) 598-605.
- [123] A.J. Herrera, A. Castano, J.L. Venero, J. Cano, A. Machado, The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system, *Neurobiology of disease*, 7 (2000) 429-447.

- [124] M.L. Block, L. Zecca, J.S. Hong, Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms, *Nature reviews. Neuroscience*, 8 (2007) 57-69.
- [125] K. Hensley, M. Mhatre, S. Mou, Q.N. Pye, C. Stewart, M. West, K.S. Williamson, On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *Antioxidants & redox signaling*, 8 (2006) 2075-2087.
- [126] G.G. Ortiz, F.P. Pacheco-Moises, O.K. Bitzer-Quintero, A.C. Ramirez-Anguiano, L.J. Flores-Alvarado, V. Ramirez-Ramirez, M.A. Macias-Islas, E.D. Torres-Sanchez, Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach, *Clinical & developmental immunology*, 2013 (2013) 708659.
- [127] E. Bell, R.A. Creelman, J.E. Mullet, A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (1995) 8675-8679.
- [128] D. Laudert, U. Pfannschmidt, F. Lottspeich, H. Hollander-Czytko, E.W. Weiler, Cloning, molecular and functional characterization of Arabidopsis thaliana allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates, *Plant molecular biology*, 31 (1996) 323-335.
- [129] A. Stintzi, J. Browse, The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2000) 10625-10630.
- [130] M. McConn, J. Browse, The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant, *The Plant cell*, 8 (1996) 403-416.
- [131] R.A. Creelman, J.E. Mullet, BIOSYNTHESIS AND ACTION OF JASMONATES IN

PLANTS, Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 48 (1997) 355-381.

[132] P. Reymond, H. Weber, M. Damond, E.E. Farmer, Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis, The Plant cell, 12 (2000) 707-720.

[133] B. Feys, C.E. Benedetti, C.N. Penfold, J.G. Turner, Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen, The Plant cell, 6 (1994) 751-759.

[134] J.C. del Pozo, M. Estelle, F-box proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation, Plant molecular biology, 44 (2000) 123-128.

[135] J.M. Chirgwin, A.E. Przybyla, R.J. MacDonald, W.J. Rutter, Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, Biochemistry, 18 (1979) 5294-5299.

[136] N. Taki, Y. Sasaki-Sekimoto, T. Obayashi, A. Kikuta, K. Kobayashi, T. Ainai, K. Yagi, N. Sakurai, H. Suzuki, T. Masuda, K. Takamiya, D. Shibata, Y. Kobayashi, H. Ohta, 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis, Plant physiology, 139 (2005) 1268-1283.

[137] E. Asamizu, Y. Nakamura, S. Sato, S. Tabata, A large scale analysis of cDNA in Arabidopsis thaliana: generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries, DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes, 7 (2000) 175-180.

[138] Y. Sasaki, E. Asamizu, D. Shibata, Y. Nakamura, T. Kaneko, K. Awai, M. Amagai, C. Kuwata, T. Tsugane, T. Masuda, H. Shimada, K. Takamiya, H. Ohta, S. Tabata, Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways,

DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes, 8 (2001) 153-161.

[139] S. Berger, E. Bell, A. Sadka, J.E. Mullet, *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate, *Plant molecular biology*, 27 (1995) 933-942.

[140] Q. Liu, M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*, *The Plant cell*, 10 (1998) 1391-1406.

[141] S.Y. Fujimoto, M. Ohta, A. Usui, H. Shinshi, M. Ohme-Takagi, *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression, *The Plant cell*, 12 (2000) 393-404.

[142] M. Ohta, K. Matsui, K. Hiratsu, H. Shinshi, M. Ohme-Takagi, Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression, *The Plant cell*, 13 (2001) 1959-1968.

[143] H. Lee, Y. Guo, M. Ohta, L. Xiong, B. Stevenson, J.K. Zhu, LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase, *The EMBO journal*, 21 (2002) 2692-2702.

[144] H. Dittrich, T.M. Kutchan, Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (1991) 9969-9973.

- [145] W. Chen, G. Chao, K.B. Singh, The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 10 (1996) 955-966.
- [146] N. Gutterson, T.L. Reuber, Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors, *Current opinion in plant biology*, 7 (2004) 465-471.
- [147] T. Eulgem, P.J. Rushton, S. Robatzek, I.E. Somssich, The WRKY superfamily of plant transcription factors, *Trends in plant science*, 5 (2000) 199-206.
- [148] R. Stracke, M. Werber, B. Weisshaar, The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana, *Current opinion in plant biology*, 4 (2001) 447-456.
- [149] B.W. Tague, H.M. Goodman, Characterization of a family of Arabidopsis zinc finger protein cDNAs, *Plant molecular biology*, 28 (1995) 267-279.
- [150] M.A. Rodriguez Milla, A. Maurer, A. Rodriguez Huete, J.P. Gustafson, Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 36 (2003) 602-615.
- [151] W. Xu, M.M. Purugganan, D.H. Polisensky, D.M. Antosiewicz, S.C. Fry, J. Braam, Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase, *The Plant cell*, 7 (1995) 1555-1567.
- [152] G. Brader, E. Tas, E.T. Palva, Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in Arabidopsis by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*, *Plant physiology*, 126 (2001) 849-860.
- [153] J.G. Turner, C. Ellis, A. Devoto, The jasmonate signal pathway, *The Plant cell*, 14 Suppl (2002) S153-164.
- [154] Y. Sasaki-Sekimoto, N. Taki, T. Obayashi, M. Aono, F. Matsumoto, N. Sakurai, H.

Suzuki, M.Y. Hirai, M. Noji, K. Saito, T. Masuda, K. Takamiya, D. Shibata, H. Ohta, Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in Arabidopsis, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 44 (2005) 653-668.

[155] P. Reymond, E.E. Farmer, Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression, *Current opinion in plant biology*, 1 (1998) 404-411.

[156] J.H. Park, R. Halitschke, H.B. Kim, I.T. Baldwin, K.A. Feldmann, R. Feyereisen, A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 31 (2002) 1-12.

[157] C. Ellis, J.G. Turner, A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in Arabidopsis thaliana seeds and young seedlings, *Planta*, 215 (2002) 549-556.

[158] E. Almeras, S. Stolz, S. Vollenweider, P. Reymond, L. Mene-Saffrane, E.E. Farmer, Reactive electrophile species activate defense gene expression in Arabidopsis, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 34 (2003) 205-216.

[159] E.E. Farmer, C.A. Ryan, Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors, *The Plant cell*, 4 (1992) 129-134.

[160] P. Reymond, N. Bodenhausen, R.M. Van Poecke, V. Krishnamurthy, M. Dicke, E.E. Farmer, A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore, *The Plant cell*, 16 (2004) 3132-3147.

[161] C.E. Benedetti, D. Xie, J.G. Turner, *Coil*-dependent expression of an Arabidopsis vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate, *Plant physiology*, 109 (1995) 567-572.

- [162] J. Atsmon, B.J. Sweetman, S.W. Baertschi, T.M. Harris, L.J. Roberts, 2nd, Formation of thiol conjugates of 9-deoxy-delta 9,delta 12(E)-prostaglandin D2 and delta 12(E)-prostaglandin D2, *Biochemistry*, 29 (1990) 3760-3765.
- [163] I. Stenzel, B. Hause, O. Miersch, T. Kurz, H. Maucher, H. Weichert, J. Ziegler, I. Feussner, C. Wasternack, Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*, *Plant molecular biology*, 51 (2003) 895-911.
- [164] B.A. Stelmach, A. Muller, P. Hennig, S. Gebhardt, M. Schubert-Zsilavecz, E.W. Weiler, A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl Diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 12832-12838.
- [165] J. Strassner, F. Schaller, U.B. Frick, G.A. Howe, E.W. Weiler, N. Amrhein, P. Macheroux, A. Schaller, Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 32 (2002) 585-601.
- [166] B. Hause, I. Stenzel, O. Miersch, H. Maucher, R. Kramell, J. Ziegler, C. Wasternack, Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 24 (2000) 113-126.
- [167] H. Pena-Cortes, J. Fisahn, L. Willmitzer, Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (1995) 4106-4113.
- [168] S. Parchmann, H. Gundlach, M.J. Mueller, Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures, *Plant physiology*, 115 (1997) 1057-1064.

- [169] J. Leon, E. Rojo, J.J. Sanchez-Serrano, Wound signalling in plants, *Journal of experimental botany*, 52 (2001) 1-9.
- [170] G.A. Howe, A.L. Schilmiller, Oxylin metabolism in response to stress, *Current opinion in plant biology*, 5 (2002) 230-236.
- [171] K. Croft, F. Juttner, A.J. Slusarenko, Volatile Products of the Lipxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, *Plant physiology*, 101 (1993) 13-24.
- [172] S. Vollenweider, H. Weber, S. Stolz, A. Chetelat, E.E. Farmer, Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 24 (2000) 467-476.
- [173] G. Vancanneyt, C. Sanz, T. Farmaki, M. Paneque, F. Ortego, P. Castanera, J.J. Sanchez-Serrano, Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001) 8139-8144.
- [174] I. Feussner, C. Wasternack, The lipxygenase pathway, *Annual review of plant biology*, 53 (2002) 275-297.
- [175] M. Krischke, C. Loeffler, M.J. Mueller, Biosynthesis of 14,15-dehydro-12-oxo-phytodienoic acid and related cyclopentenones via the phytoprostane D(1) pathway, *Phytochemistry*, 62 (2003) 351-358.
- [176] M. Iqbal, P. Evans, A. Lledo, X. Verdaguer, M.A. Pericas, A. Riera, C. Loeffler, A.K. Sinha, M.J. Mueller, Total synthesis and biological activity of 13,14-dehydro-12-oxo-phytodienoic acids (deoxy-J1-phytoprostanes), *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 6 (2005) 276-280.

- [177] M. Orozco-Cardenas, C.A. Ryan, Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (1999) 6553-6557.
- [178] Y.H. Cheong, H.S. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu, S. Luan, Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*, *Plant physiology*, 129 (2002) 661-677.
- [179] S. Fowler, M.F. Thomashow, *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway, *The Plant cell*, 14 (2002) 1675-1690.
- [180] L. Xiong, K.S. Schumaker, J.K. Zhu, Cell signaling during cold, drought, and salt stress, *The Plant cell*, 14 Suppl (2002) S165-183.
- [181] A.J. Waskiewicz, J.A. Cooper, Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast, *Current opinion in cell biology*, 7 (1995) 798-805.
- [182] C. Jonak, S. Kiegerl, W. Ligterink, P.J. Barker, N.S. Huskisson, H. Hirt, Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (1996) 11274-11279.
- [183] L. Bogle, W. Ligterink, I. Meskiene, P.J. Barker, E. Heberle-Bors, N.S. Huskisson, H. Hirt, Wounding Induces the Rapid and Transient Activation of a Specific MAP Kinase Pathway, *The Plant cell*, 9 (1997) 75-83.
- [184] I. Meskiene, L. Bogle, W. Glaser, J. Balog, M. Brandstotter, K. Zwerger, G. Ammerer, H. Hirt, MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants, *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 95 (1998) 1938-1943.

[185] E. Baudouin, I. Meskiene, H. Hirt, Short communication: unsaturated fatty acids inhibit MP2C, a protein phosphatase 2C involved in the wound-induced MAP kinase pathway regulation, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 20 (1999) 343-348.

[186] M.C. Rentel, D. Lecourieux, F. Ouaked, S.L. Usher, L. Petersen, H. Okamoto, H. Knight, S.C. Peck, C.S. Grierson, H. Hirt, M.R. Knight, OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis, *Nature*, 427 (2004) 858-861.

[187] T. Yang, B.W. Poovaiah, Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants, *Trends in plant science*, 8 (2003) 505-512.

[188] M.C. Rentel, M.R. Knight, Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis, *Plant physiology*, 135 (2004) 1471-1479.

[189] C. Vannini, F. Locatelli, M. Bracale, E. Magnani, M. Marsoni, M. Osnato, M. Mattana, E. Baldoni, I. Coraggio, Overexpression of the rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of Arabidopsis thaliana plants, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 37 (2004) 115-127.

[190] S. Davletova, L. Rizhsky, H. Liang, Z. Shengqiang, D.J. Oliver, J. Coutu, V. Shulaev, K. Schlauch, R. Mittler, Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis, *The Plant cell*, 17 (2005) 268-281.

[191] S. Goetz, A. Hellwege, I. Stenzel, C. Kutter, V. Hauptmann, S. Forner, B. McCaig, G. Hause, O. Miersch, C. Wasternack, B. Hause, Role of cis-12-oxo-phytodienoic acid in tomato embryo development, *Plant physiology*, 158 (2012) 1715-1727.

[192] S. Kondo, A. Tomiyama, Changes of Endogenous Jasmonic Acid and Methyl Jasmonate in Apples and Sweet Cherries during Fruit Development, *J. Amer. Hort. Sci.*, 125 (2000) 282-287.

- [193] Y. Seto, S. Hamada, H. Matsuura, M. Matsushige, C. Satou, K. Takahashi, C. Masuta, H. Ito, H. Matsui, K. Nabeta, Purification and cDNA cloning of a wound inducible glucosyltransferase active toward 12-hydroxy jasmonic acid, *Phytochemistry*, 70 (2009) 370-379.
- [194] B. Uttara, A.V. Singh, P. Zamboni, R.T. Mahajan, Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options, *Current neuropharmacology*, 7 (2009) 65-74.
- [195] S. Salvioli, A. Ardizzoni, C. Franceschi, A. Cossarizza, JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis, *FEBS letters*, 411 (1997) 77-82.
- [196] E. Kansanen, A.M. Kivela, A.L. Levonen, Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, *Free radical biology & medicine*, 47 (2009) 1310-1317.
- [197] H.K. Na, Y.J. Surh, Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46 (2008) 1271-1278.
- [198] Y.J. Lee, S.H. Lee, Sulforaphane induces antioxidative and antiproliferative responses by generating reactive oxygen species in human bronchial epithelial BEAS-2B cells, *Journal of Korean medical science*, 26 (2011) 1474-1482.
- [199] M. Smeyne, R.J. Smeyne, Glutathione metabolism and Parkinson's disease, *Free radical biology & medicine*, 62 (2013) 13-25.
- [200] A. Jazwa, A. Cuadrado, Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and

neuroinflammation in neurodegenerative diseases, *Current drug targets*, 11 (2010) 1517-1531.

[201] X.D. Chao, Y.H. Ma, P. Luo, L. Cao, W.B. Lau, B.C. Zhao, F. Han, W. Liu, W.D. Ning, N. Su, L. Zhang, J. Zhu, Z. Fei, Y. Qu, Up-regulation of heme oxygenase-1 attenuates brain damage after cerebral ischemia via simultaneous inhibition of superoxide production and preservation of NO bioavailability, *Experimental neurology*, 239 (2013) 163-169.

[202] J.H. Lim, K.M. Kim, S.W. Kim, O. Hwang, H.J. Choi, Bromocriptine activates NQO1 via Nrf2-PI3K/Akt signaling: novel cytoprotective mechanism against oxidative damage, *Pharmacological research*, 57 (2008) 325-331.

[203] A.T. Dinkova-Kostova, P. Talalay, NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector, *Archives of biochemistry and biophysics*, 501 (2010) 116-123.

[204] M.T. Lin, M.F. Beal, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature*, 443 (2006) 787-795.

[205] A. Federico, E. Cardaioli, P. Da Pozzo, P. Formichi, G.N. Gallus, E. Radi, Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration, *Journal of the neurological sciences*, 322 (2012) 254-262.

[206] W. Wang, F. Sun, Y. An, H. Ai, L. Zhang, W. Huang, L. Li, Morroniside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity, *European journal of pharmacology*, 613 (2009) 19-23.

[207] A. Tanel, D.A. Averill-Bates, Inhibition of acrolein-induced apoptosis by the antioxidant N-acetylcysteine, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 321 (2007) 73-83.

[208] H. Lou, X. Jing, D. Ren, X. Wei, X. Zhang, Eriodictyol protects against

H₂O₂-induced neuron-like PC12 cell death through activation of Nrf2/ARE signaling pathway, *Neurochemistry international*, 61 (2012) 251-257.

[209] C.Y. Chen, J.H. Jang, M.H. Li, Y.J. Surh, Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 331 (2005) 993-1000.

[210] J.H. Chen, H.P. Ou, C.Y. Lin, F.J. Lin, C.R. Wu, S.W. Chang, C.W. Tsai, Carnosic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced cell death in SH-SY5Y cells via mediation of glutathione synthesis, *Chemical research in toxicology*, 25 (2012) 1893-1901.

[211] H. Lou, X. Jing, X. Wei, H. Shi, D. Ren, X. Zhang, Naringenin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway, *Neuropharmacology*, 79 (2014) 380-388.

[212] Y.P. Hwang, H.G. Jeong, The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress, *FEBS letters*, 582 (2008) 2655-2662.

[213] C. Deng, R. Tao, S.Z. Yu, H. Jin, Sulforaphane protects against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by increasing expression of heme oxygenase-1 in a PI3K/Akt-dependent manner, *Molecular medicine reports*, 5 (2012) 847-851.

[214] N.A. Kelsey, H.M. Wilkins, D.A. Linseman, Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15 (2010) 7792-7814.

[215] R. Shivaji, A. Camas, A. Ankala, J. Engelberth, J.H. Tumlinson, W.P. Williams, J.R. Wilkinson, D.S. Luthe, Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize, *Journal of chemical ecology*, 36 (2010) 179-191.

[216] M.E. Costanzo, A. Andrade, M. del Carmen Tordable, F. Cassan, G. Abdala, Production

and function of jasmonates in nodulated roots of soybean plants inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*, *Archives of microbiology*, 194 (2012) 837-845.

[217] C. Wasternack, Action of jasmonates in plant stress responses and development--applied aspects, *Biotechnology advances*, 32 (2014) 31-39.

[218] T. Zarubin, J. Han, Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway, *Cell research*, 15 (2005) 11-18.

[219] R.O. Bak, J.G. Mikkelsen, Regulation of cytokines by small RNAs during skin inflammation, *Journal of biomedical science*, 17 (2010) 53.

[220] W.S. Alexander, Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system, *Nature reviews. Immunology*, 2 (2002) 410-416.

[221] N. Sachithanandan, K.L. Graham, S. Galic, J.E. Honeyman, S.L. Fynch, K.A. Hewitt, G.R. Steinberg, T.W. Kay, Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance, *Diabetes*, 60 (2011) 2023-2031.

[222] N.G. Innamorato, A.I. Rojo, A.J. Garcia-Yague, M. Yamamoto, M.L. de Ceballos, A. Cuadrado, The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181 (2008) 680-689.

[223] S.V. More, H. Kumar, I.S. Kim, S.Y. Song, D.K. Choi, Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Mediators of inflammation*, 2013 (2013) 952375.

[224] J.M. Rubio-Perez, J.M. Morillas-Ruiz, A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines, *TheScientificWorldJournal*, 2012 (2012) 756357.

[225] C.C. Chao, S. Hu, T.W. Molitor, E.G. Shaskan, P.K. Peterson, Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism, *Journal of immunology*

(Baltimore, Md. : 1950), 149 (1992) 2736-2741.

[226] D.S. Straus, G. Pascual, M. Li, J.S. Welch, M. Ricote, C.H. Hsiang, L.L. Sengchanthalangsy, G. Ghosh, C.K. Glass, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2000) 4844-4849.

[227] H.T. Dang, H.J. Lee, E.S. Yoo, J. Hong, B. Bao, J.S. Choi, J.H. Jung, New jasmonate analogues as potential anti-inflammatory agents, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16 (2008) 10228-10235.

[228] A.D. Bachstetter, B. Xing, L. de Almeida, E.R. Dimayuga, D.M. Watterson, L.J. Van Eldik, Microglial p38alpha MAPK is a key regulator of proinflammatory cytokine up-regulation induced by toll-like receptor (TLR) ligands or beta-amyloid (Abeta), *Journal of neuroinflammation*, 8 (2011) 79.

[229] L. Munoz, H. Ralay Ranaivo, S.M. Roy, W. Hu, J.M. Craft, L.K. McNamara, L.W. Chico, L.J. Van Eldik, D.M. Watterson, A novel p38 alpha MAPK inhibitor suppresses brain proinflammatory cytokine up-regulation and attenuates synaptic dysfunction and behavioral deficits in an Alzheimer's disease mouse model, *Journal of neuroinflammation*, 4 (2007) 21.

[230] A. Kimura, T. Naka, T. Muta, O. Takeuchi, S. Akira, I. Kawase, T. Kishimoto, Suppressor of cytokine signaling-1 selectively inhibits LPS-induced IL-6 production by regulating JAK-STAT, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 17089-17094.

[231] Q. Si, M.L. Zhao, A.C. Morgan, C.F. Brosnan, S.C. Lee, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits IFN-inducible protein 10/CXC chemokine ligand 10 expression in human microglia: mechanisms and implications, *Journal of*

immunology (Baltimore, Md. : 1950), 173 (2004) 3504-3513.

[232] E.J. Park, S.Y. Park, E.H. Joe, I. Jou, 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 14747-14752.

[233] L. Huang, G. Li, X. Feng, L. Wang, 15d-PGJ2 Reduced Microglia Activation and Alleviated Neurological Deficit of Ischemic Reperfusion in Diabetic Rat Model, *BioMed research international*, 2015 (2015) 864509.

[234] B.J. Kerr, E.I. Girolami, N. Ghasemlou, S.Y. Jeong, S. David, The protective effects of 15-deoxy-delta-(12,14)-prostaglandin J2 in spinal cord injury, *Glia*, 56 (2008) 436-448.

[235] A. Dave, M.L. Hernandez, Z. He, V.M. Andriotis, F.E. Vaistij, T.R. Larson, I.A. Graham, 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in *Arabidopsis*, *The Plant cell*, 23 (2011) 583-599.

[236] S. Mueller, B. Hilbert, K. Dueckershoff, T. Roitsch, M. Krischke, M.J. Mueller, S. Berger, General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*, *The Plant cell*, 20 (2008) 768-785.

[237] S.W. Park, W. Li, A. Viehhauser, B. He, S. Kim, A.K. Nilsson, M.X. Andersson, J.D. Kittle, M.M. Ambavaram, S. Luan, A.R. Esker, D. Tholl, D. Cimini, M. Ellerstrom, G. Coaker, T.K. Mitchell, A. Pereira, K.J. Dietz, C.B. Lawrence, Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (2013) 9559-9564.

[238] N. Ohkama-Ohtsu, Y. Sasaki-Sekimoto, A. Oikawa, Y. Jikumaru, S. Shinoda, E. Inoue, Y. Kamide, T. Yokoyama, M.Y. Hirai, K. Shirasu, Y. Kamiya, D.J. Oliver, K. Saito, 12-oxo-phytodienoic acid-glutathione conjugate is transported into the vacuole in

Arabidopsis, *Plant & cell physiology*, 52 (2011) 205-209.

[239] R.J. Fox, M. Kita, S.L. Cohan, L.J. Henson, J. Zambrano, R.H. Scannevin, J. O'Gorman, M. Novas, K.T. Dawson, J.T. Phillips, BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety, *Current medical research and opinion*, 30 (2014) 251-262.

[240] J.T. Phillips, R.J. Fox, BG-12 in multiple sclerosis, *Seminars in neurology*, 33 (2013) 56-65.

[241] X. Jing, H. Shi, C. Zhang, M. Ren, M. Han, X. Wei, X. Zhang, H. Lou, Dimethyl fumarate attenuates 6-OHDA-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and in animal model of Parkinson's disease by enhancing Nrf2 activity, *Neuroscience*, 286 (2015) 131-140.

[242] R. Foresti, S.K. Bains, T.S. Pitchumony, L.E. de Castro Bras, F. Drago, J.L. Dubois-Rande, C. Bucolo, R. Motterlini, Small molecule activators of the Nrf2-HO-1 antioxidant axis modulate heme metabolism and inflammation in BV2 microglia cells, *Pharmacological research*, 76 (2013) 132-148.

[243] L.O. Brandenburg, M. Kipp, R. Lucius, T. Pufe, C.J. Wruck, Sulforaphane suppresses LPS-induced inflammation in primary rat microglia, *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 59 (2010) 443-450.

[244] C. Lee, G.H. Park, S.R. Lee, J.H. Jang, Attenuation of beta-amyloid-induced oxidative cell death by sulforaphane via activation of NF-E2-related factor 2, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013 (2013) 313510.

[245] C.E. Guerrero-Beltran, M. Calderon-Oliver, J. Pedraza-Chaverri, Y.I. Chirino, Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances, *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 64 (2012) 503-508.

報文目録

Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Ainai T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, Ohta H. 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. Plant Physiol. 139 (3), 1268-83 (2005)

Taki-Nakano N, Ohzeki H, Kotera J, Ohta H. Cytoprotective effects of 12-oxo phytodienoic acid, a plant-derived oxylipin jasmonate, on oxidative stress-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Biochim. Biophys. Acta. 1840 (12), 3413-22 (2014)

Taki-Nakano N, Kotera J, Ohta H. 12-oxo-phytodienoic acid, a plant-derived oxylipin, attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in microglia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 13;473 (4), 1288-94 (2016)

< 参考論文 >

Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Hirai MY, Noji M, Saito K, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Ohta H. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in Arabidopsis. Plant J. 44 (4), 653-68 (2005)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究全般にわたる多大なご支援とご指導を賜りました指導教員の太田啓之教授に心より厚く御礼申し上げます。学部4年生の時から長きにわたり、研究の進め方、学会発表、論文執筆にいたるまで終始貴重な助言を賜りましたことに深く感謝しております。いつもあたたかく励まして下さり、多くのディスカッションをして頂いたおかげで、研究に対する情熱を高く持ち続けることができました。OPDA、OPC8:0、OPC6:0 を合成し提供して下さった、東京工業大学の小林雄一教授ならびに研究室の皆様に心より感謝いたします。opr3 変異体の種子を提供して下さった Washington State 大学の John Browse 博士、aos 変異体の種子を提供して下さった Arizona 大学の Kenneth A. Feldmann 博士ならびに Joon-Hyun Park 博士、coi1-16 変異体の種子を提供して下さった East Anglia 大学の John G. Turner 博士に深く感謝いたします。社会人博士課程の私を快く受け入れて下さった太田・下嶋研究室に関係する皆様に御礼申し上げます。最後に研究生生活を暖かく見守り、支えてくれた家族に深く感謝いたします。