

学 位 論 文 題 名

ホウレンソウ根腐病菌 (*Aphanomyces cochlioides*)

の生態に関する化学的研究

学位論文内容の要旨

北海道におけるホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) の主要な土壌病害のひとつに根腐病がある。これは卵菌綱に属する糸状菌の *Aphanomyces cochlioides* によるものである。この菌はホウレンソウ、シロザ (*Chenopodium album* L.), テンサイ (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera*) などのアカザ科植物を主たる宿主としており、宿主の生育ステージ全般にわたり感染する。また、本菌はその生活環において、水中での運動性を有する遊走子を形成し、これが宿主への直接の感染源となる。その感染過程において、遊走子は宿主植物から滲出されている成分に対して誘引性を示すことが知られている。しかしながら、本菌を含め植物病原糸状菌の遊走子の誘引物質を明らかにした研究例はきわめて少ない。本研究は、主としてホウレンソウを実験材料に用い、遊走子の誘引活性物質を明らかにすることを目的とし、得られた結果は次の通りである。

1. 遊走子誘引活性に対する生物検定法（担体法）の確立

誘引物質の分離に先立ち、生物検定法を確立した。すなわち、ガスクロマトグラフィーの担体である Chromosorb W AW を被検体溶液に浸し、これを風乾後、遊走子懸濁液中に投下し、この担体近傍への遊走子集合の有無を観察する方法である。その際、基準となる集合の度合を決めておき、その活性を与える被検体溶液の最低濃度を被検体の活性の強さ（比活性）とした。この検定法は、疎水性化合物の混合物に対しても、従来用いられていたキャピラリー法に比較し、再現性が高い。担体法が植物病原菌の誘引試験に用いられたのは本研究が初めてである。

2. 植物体地下部抽出物からの遊走子誘引物質の分離

生鮮重22.9kgの収穫期のホウレンソウ地下部のメタノール抽出物をエーテル／水により分配したところ、エーテル可溶部に誘引活性が見られたが、水可溶性画分には活性は見られなかった。この活性画分を先に確立した生物検定法を用いて誘引活性を指標に分画したところ、活性本体を結晶として14.7mg単離に成功した。各種機器分析および化学合成によりその構造を決定し、

cochliophilin A (1, CA) と命名した。すべての分離操作を通して、活性画分重量の減少に伴い比活性が上昇していたので、抽出物が示す活性の本体は CA であると結論した。また、きわめて低濃度 ($10^{-9} \sim 10^{-10}$ mol/l) の CA 溶液で処理した担体に対しても、*A. cochlioides* の遊走子は顕著な誘引現象を示したが、他の *Aphanomyces* spp. に対しては CA が高濃度であっても誘引活性を示さなかった。これは CA が特異的に *A. cochlioides* のみを誘引していることを示すものである。

次に、アカザ科のシロザについても、その地下部抽出物から遊走子誘引活性物質の検索を行ったところ、活性成分として CA が分離された。シロザにおいても CA が抽出物の示す誘引活性の本体であった。CA はテンサイにも含まれていることが知られており、アカザ科植物の広い範囲にわたって含まれる成分と考えられる。3 例とはいえ CA の植物界での分布範囲と、*A. cochlioides* 宿主範囲との間に相関があることは、*A. cochlioides* の宿主特異性を説明する一助となるものである。さらにシロザからは CA とは構造的にまったく異なる誘引活性化合物、*N-trans*-feruloyl-4-*O*-methyldopamine (2) も分離された。化合物 (2) は 10^{-8} mol/l で活性を示した。一方、2 の類縁体であり、ホウレンソウおよびテンサイに含まれていることが知られている *N-trans*-feruloyl-3-*O*-methyldopamine (3) は、2 の 1/3000 程度の活性しか示さなかった。これは、遊走子が活性化合物中の特異的な構造を感知していることを示している。

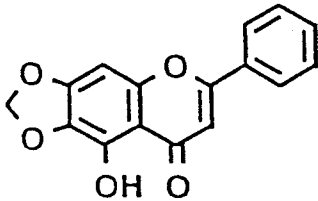
3. ホウレンソウ地下部滲出物中に含まれる遊走子誘引活性物質について

¹H-NMR 測定の応用により、微量の CA を検出・定量する方法を確立した。この方法により、水耕栽培およびヴァット栽培したホウレンソウの滲出物中に CA が存在することを見だし、CA がホウレンソウより滲出されていることを確認した。さらに、その定量を行ったところ、1 個体・1 日当たり 20–30 ng の CA が滲出されていることが分かった。根圏内での蓄積も考慮すると、この滲出量は遊走子の誘引には十分な量と考えられた。一方、根滲出物中に含まれる誘引活性物質の分離を行った。活性成分の検索を生物検定を指標に行ったところ、活性成分は滲出物の水溶性画分には存在せず、エーテル可溶性画分に見いだされた。水耕培養によりこの疎水性画分を大量に得、活性画分の分画を行った。その結果、この活性本体は CA であることが明らかとなった。

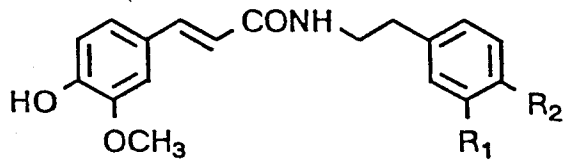
以上述べたように、*A. cochlioides* 遊走子が示すホウレンソウ根への誘引現象は、根から滲出される CA が示す誘引活性によるものと結論した。宿主植物の成体を試料として、植物病原菌遊走子の誘引物質を明らかにしたのは、本研究が初めてである。また、アカザ科植物に対する

誘引現象にも、CA が重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究により、*A. cochlioides* の宿主植物への誘引現象は CA を中心とした化合物を媒介とした生物間相互作用であることが明らかになったが、この事実は化学生態学的にも興味をもたれるところであり、また本菌の感染機構および宿主特異性の解明に対しても、有益な知見を与えるものと考えられる。



1



2: $R_1=OH, R_2=OCH_3$
 3: $R_1=OCH_3, R_2=OH$

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	水 谷 純 也
副 査	教 授	市 原 耿 民
副 査	助教授	田 原 哲 士
副 査	助教授	川 端 潤

本論文は和文で記され、図47、スキーム19、表61、引用文献74を含み、総頁数156からなり、内容は緒論、実験材料および方法、実験結果および考察、総合考察、ならびに要約の5章に分けられ、英文の概要が付してある。ほかに参考論文2編が提出されている。

北海道におけるホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) の主要な土壤病害のひとつに根腐病がある。この病原菌は卵菌綱に属する糸状菌の1種 *Aphanomyces cochlioides* によるもので、本菌はその生活環において水中での運動性を有する遊走子を形成し、この遊走子は宿主植物から滲出する化学物質に誘引されることが知られている。そこで著者は、主としてホウレンソウを実験材料に用い、遊走子の誘引活性物質を明らかにする目的で本研究に着手した。得られた成果は

次の通りである。

先ず、誘引活性物質探索の指標となる生物検定法を確立した。ガスクロマトグラフィーの担体である Chromosorb W AW を被検体溶液に浸し、これを風乾後、遊走子懸濁液中に投下し、この担体近傍への遊走子集合の有無を観察する。その際、基準となる集合の度合を決めておき、その活性を与える被検体溶液の最低濃度を被検体の活性の強さとする検定法である。この方法は、従来用いられていたキャピラリー法に比べてはるかに再現性のよいことが分かった。

次に、収穫期のハウレンソウ地下部22.9kg（生鮮重）から、先に確立した検定法を指標に溶媒抽出・分配・各種クロマトグラフィーを駆使して、遂に活性本体14.7mgの単離に成功した。各種機器分析および化学合成により、その構造を 5-hydroxy-6,7-methylenedioxyflavone と決定し、cochliophilin A（1, CA）と命名した。きわめて低濃度（ 10^{-9} - 10^{-10} mol/l）の CA 溶液で処理した担体に対しても、*A. cochlioides* の遊走子は顕著な誘引作用を示したが、他の *Aphanomyces* spp. は高濃度であっても誘引されず、CA が特異的に *A. cochlioides* のみを誘引することを見いだした。

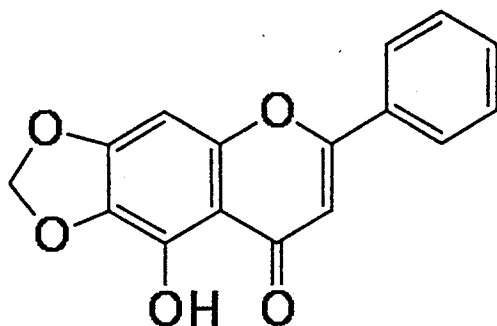
一方、同じアカザ科（Chenopodiaceae）のシロザ（*Chenopodium album* L.）地下部からも、遊走子誘引物質として CA と新規化合物 *N-trans*-feruloyl-4-*O*-methyldopamine（2）を単離同定した。化合物 2 は活性が弱く、 10^{-8} mol/l で活性を示した。CA はアカザ科のテンサイにも含まれていることが知られており、アカザ科植物の広い範囲にわたって含まれる成分と考えられ、*A. cochlioides* の宿主範囲と相関があることを見いだしたことは、この病原菌の宿主特異性を説明する一助になると思われる。また、2 の類似体であり、ハウレンソウおよびテンサイに含まれていることが知られている *N-trans*-feruloyl-3-*O*-methyldopamine（3）は、2 の 1/3000 程度の活性しか示さないところから、遊走子が誘引活性物質のきわめて特異的な構造を識別していると考察した。

ではハウレンソウの根から本当に CA が滲出しているのであろうか。それを調べるために、著者は先ず CA の微量定量法を確立した。種々検討した結果、¹H-NMR 測定法の応用により CA の分析が可能であることを確かめ、この方法により水耕栽培およびヴァット栽培したハウレンソウの滲出物中に CA が存在することを見いだした。さらにその定量を行ったところ、1 個体・1 日当たり 20-30 ng の CA が滲出していることが分かった。根圏内での蓄積も考慮するとこの滲出量は遊走子の誘引には十分な量と考えた。著者は、さらに生物検定を指標に根滲出物に含まれる誘引物質の分離を行い、その活性が水溶性画分ではなく、エーテル可溶性画分に見いだされたところから、水耕培養によりこの疎水性画分を大量に得、活性画分の分画を行った。そ

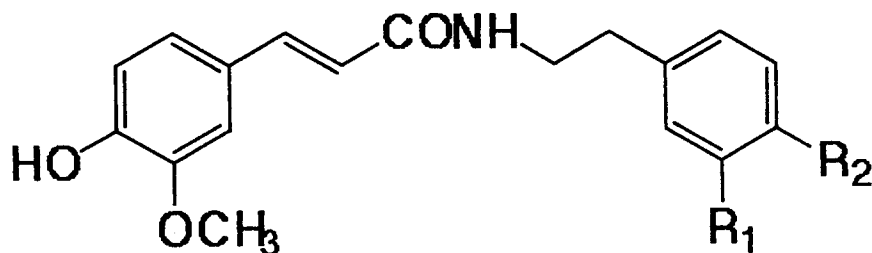
の結果、活性本体が CA であることを明らかにした。

以上のように、著者は *A. cochlioides* 遊走子が示すハウレンソウ根への誘引現象は、根から滲出される CA の誘引活性によるものであると結論した。宿主植物の成体を試料として、植物病原菌遊走子の誘引物質を明らかにしたのは、本研究が初めてと思われる。また、*A. cochlioides* 遊走子が広くアカザ科植物に誘引されるのも、CA によることを示唆した。これは植物-微生物間相互作用に植物の二次代謝産物である CA（フラボンの 1 種）が重要な役割を果たしていることを示したもので、生態化学の分野に貴重な新知見を提出するばかりでなく、将来の生合理的作物病害防除を考えるうえでも示唆に富み、今後の展開が期待される。

よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者堀尾 剛は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。



1



2: $R_1=OH$, $R_2=OCH_3$

3: $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$