

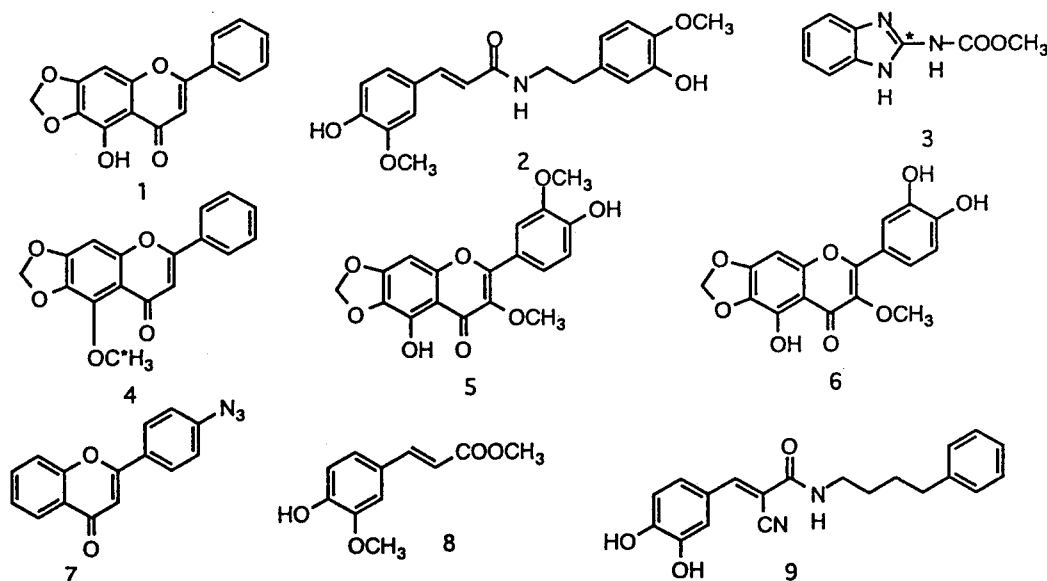
ホウレンソウ根腐病菌 (*Aphanomyces cochlioides*)

遊走子の走化性に関する生態化学的研究

学位論文内容の要旨

本論文は、ホウレンソウ根腐病菌 (*Aphanomyces cochlioides*) の生活環展開および宿主植物との相互関係の生態化学的研究の一環として、遊走子の走化性に注目して進めた研究の成果を取りまとめたものである。その内容は、(a) 宿主特異的遊走子誘引物質である cochliophilin A (1) を用いた遊走子の走化性検定法の検討、(b) ホウレンソウ地上部に含まれる新規遊走子誘引物質の単離・同定、ならびに関連化合物の調製と遊走子誘引試験の実施、(c) 遊走子の走化性に関わる受容体を想定し、調製した cochliophilin A 類似化合物や関連化合物ならびに天然誘引活性物質に対する遊走子の誘引応答の解析、(d) 化合物 1 の構造類似フォトアフィニティーラベル化剤の調製とそれを用いた受容体の化学修飾、よりなり、結果は以下のように要約される。

ホウレンソウ根腐病菌 (*Aphanomyces cochlioides*) は卵菌類に属する植物病原菌で、土壤水中を遊泳する遊走子を生成する。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おり、これまでにホウレンソウ地下部より cochliophilin A (1)、またシロザの根からは *N-trans-feruloyl-4-O-methyldopamine* (2) が宿主特異的な誘引物質として確認されている。植物病原菌の遊走子は化学物質や外的刺激に対して最も感受性が大きく、遊走子の挙動に顕著な効果を与える化合物の探索やその効果の機構を探ることは、難防除土壤病原菌の生物合理的な制御の面でも重要なことである。



(a) 植物の化学成分と植物病原菌遊走子の相互作用の解析に先だって、*A. cochlioides* 遊走子の走化性検定法の検討を行った。以前に藻類配偶子の性フェロモン検定用に開発された液滴法を遊走子誘引試験に応用、定量的な試験法を確立し、cochliophilin A (1) の最低活性濃度を求めた。液滴を遊走子懸濁液へ注入すると、液滴上に誘引される遊走子数は約 90 秒後には安定した。誘引された遊走子数を指標に、遊走子が誘引されるに必要な 1 の最低濃度は、 3.0×10^{-9} M であると結論した。一方、試料を塗布した担体粒子を遊走子懸濁液に加え遊走子の挙動を観察する担体法は、これまでに簡便な定性的検定法としてよく用いられてきたが、量的な検討はなされていなかった。今回、放射性同位元素標識化合物の $[2-^{14}\text{C}]$ -carbendazim (3)、 $[5\text{-O}^{14}\text{CH}_3]$ -5-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone (4)、 $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ -sucrose、 $\text{L-}[^{14}\text{C}(\text{U})]$ -proline および溶媒として酢酸エチル、アセトン、メタノールを用いて、担体に付着する化合物量を測定した。60-80 mesh Chromosorb W AW (担体) 粒子を各試料溶液に浸し、余分の液を濾紙片に吸収させた後風乾した場合、担体に保持された標識化合物の量は、溶媒の種類に関係なく、試料濃度 10^{-8} M から 10^{-3} M の範囲で溶液の濃度に比例し、1 粒子当たり平均試料溶液約 4 nl 分に相当するものであった。溶質の極性が大きく違っても、担体に保持される溶質の量的な違いは、通常の検定濃度の較差からすれば、無視できる程度であった。

(b) ホウレンソウ地上部に含まれる遊走子誘引物質を単離、構造決定し、その配糖体や類似化合物の誘引活性も検討した。地上部に含まれる遊走子誘引物質として新たに、5,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone (5) を単離した。化合物 5 はホウレンソウから配糖体として分離されていたが、遊離状態では得られていなかった。5 は 10^{-5} M [cochliophilin A (1) に比較して 1/100 ~ 1/1000 の活性強度] で遊走子誘引活性を示した。別の配糖体の加水分解産物 3-methoxy-5,3',4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (6) はそれ自身誘引活性は示さないが、1 の 10^{-4} - 10^{-5} 倍濃度あるいは 5 の 10 倍濃度で、それぞれ 1 と 5 の誘引活性を抑制することを見い出した。

(c) *A. cochlioides* 遊走子の走化性に関わる受容体を想定し、骨格の異なる誘引物質の共存下での遊走子の挙動について検討した。Cochliophilin A (1) の飽和溶液中で遊出させた遊走子は、骨格構造を異にする誘引物質である *N-trans*-feruloyl-4-*O*-methyldopamine (2) に正常な誘引応答を示した。さらに、1 類似のフラボンやクロモン類を 10^{-6} M で遊走子懸濁液に共存させても、2 の誘引活性は影響されなかった。一方、顕著な誘引活性を有する 1 の構造類似フラボン類を共存させると 1 の誘引活性は失われたことから、これらの構造類似体が 1 の受容体を飽和させた状態にしていると考えられた。これらの結果から *A. cochlioides* の遊走子には、少なくとも 1 と 2 に対する別々の受容体が存在すると判断された。化合物 8 や 9 は、2 に匹敵する誘引活性を示すが、1 と 2 のいずれの誘引活性も抑制しなかったため、さらに他のタイプの誘引物質に対する受容体が存在する可能性も示唆された。これらの実験には、天然および合成化合物 50 種類を使用して、1 や 2 の誘引活性に対する効果について、比較検討している。

(d) 宿主特異的遊走子誘引化合物である cochliophilin A (1) と類似した部分構造を有するフォトアフィニティー化剤として 4'-azido-flavone (7) を調製し、1 の受容部位に結合させることを試みた。7 そのものは、遊走子誘引活性はそれ程大きくはなく、1 の受容部位に対し弱い相互作用しか示さないと思われたが、7 を含む遊走子懸濁液を UV 照射し

た後では、遊走子の 1 に対する誘引応答の低下が観察された。しかしその影響は 2 の誘引活性には及ばなかった。このことから 1 の受容部位あるいはその近傍に 7 のニトレンが反応して、1 とその受容体の親和性を低下させたものと推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 原 哲 士

副 査 教 授 吉 原 照 彦

副 査 助 教 授 橋 床 泰 之

学 位 論 文 題 名

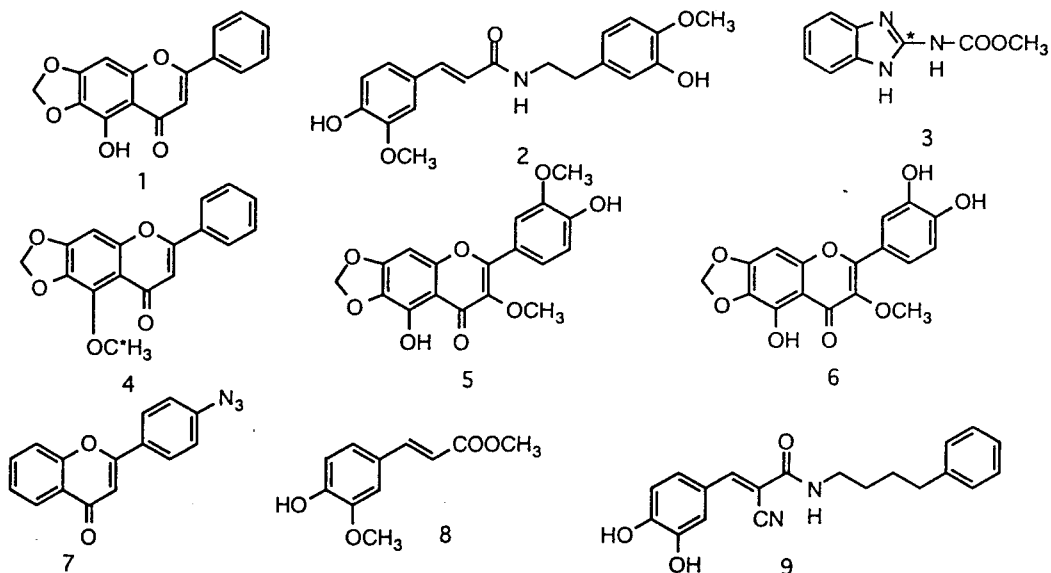
ハウレンソウ根腐病菌 (*Aphanomyces cochlioides*)

遊走子の走化性に関する生態化学的研究

本論文は、和文 140 頁、図 74、表 25、スキーム 5、8 章からなり、ほかに参考論文 2 編が付されている。

ハウレンソウ根腐病菌 (*Aphanomyces cochlioides*) は卵菌類の植物病原菌で、土壤水中を遊泳する遊走子を生成する。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。これまでにハウレンソウ地下部より cochliophilin A (1)、またシロザの根からは *N-trans-feruloyl-4-O-methyldopamine* (2) が宿主特異的な誘引物質として確認されている。

植物と病原微生物の相互作用研究の一環として、*A. cochlioides* の遊走子の化学物質に対する挙動の解析を目的に研究を実施し、以下の結果を得ている。



1) 先ず、*A. cochlioides* 遊走子の走化性検定法の検討を行った。以前に藻類配偶子の性フェロモン検定用に開発された液滴法を遊走子誘引試験に応用、定量的な試験法を確

立し、cochliophilin A (1) の最低活性濃度を求めた。液滴を遊走子懸濁液へ注入すると、液滴上に誘引される遊走子数は約 90 秒後には安定した。誘引された遊走子数を指標に、遊走子が誘引されるに必要な 1 の最低濃度は、 3.0×10^9 M と結論した。一方、試料を塗布した担体粒子を遊走子懸濁液に加え遊走子の挙動を観察する担体法は、簡便な定性的検定法として用いられてきたが、量的な検討はなされていなかった。今回、標識化合物の $[2-^{14}\text{C}]$ -carbendazim (3)、 $[5\text{-O}^{14}\text{CH}_3]$ -5-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone (4)、 $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ -sucrose、 $\text{L-}[^{14}\text{C}(\text{U})]$ -proline および溶媒として酢酸エチル、アセトン、メタノールを用いて、担体に付着する化合物量を測定した。60-80 mesh Chromosorb W AW(担体)粒子を各試料溶液に浸し、余分の液を濾紙片に吸収させた後風乾した場合、担体に保持された標識化合物の量は溶媒の種類に関係なく、試料濃度 10^8 M から 10^3 M の範囲で溶液の濃度に比例し、1 粒平均溶液約 4 nl に相当した。溶質の極性が違って、担体に保持される溶質の量的な違いは、通常の検定濃度の較差からすれば、無視できる程度であった。

2) ホウレンソウ地上部に含まれる遊走子誘引物質を単離、構造決定し、その配糖体や類似化合物の誘引活性も検討した。地上部に含まれる遊走子誘引物質として 5,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone (5) を単離した。化合物 5 はホウレンソウから配糖体として分離されていたが、遊離状態では得られていなかった。5 は 10^5 M [cochliophilin A (1) に比較して 1/100 ~ 1/1000 の活性強度] で遊走子誘引活性を示した。別の配糖体の加水分解産物 3-methoxy-5,3',4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (6) はそれ自身誘引活性は示さないが、1 の 10^4 - 10^5 倍濃度あるいは 5 の 10 倍濃度で、それぞれ 1 と 5 の誘引活性を抑制した。

3) *A. cochlioides* 遊走子の走化性に関わる受容体を想定し、骨格の異なる誘引物質の共存下での遊走子の挙動について検討した。1 の飽和溶液中で遊出させた遊走子は、骨格構造を異にする誘引物質である *N-trans-feruloyl-4-O-methyldopamine* (2) に正常な誘引応答を示した。さらに、1 類似のフラボンやクロモン類を 10^6 M で遊走子懸濁液に共存させても、2 の誘引活性は影響されなかった。一方、顕著な誘引活性を有する 1 の構造類似体を共存させると 1 の誘引活性は失われたことから、1 の構造類似体が 1 の受容体を飽和させた状態にしていると考えられた。これらの結果から *A. cochlioides* の遊走子には、少なくとも 1 と 2 に対する別々の受容体が存在すると判断された。化合物 8 や 9 は、2 に匹敵する誘引活性を示すが、1 と 2 のいずれの誘引活性も抑制しなかった。ので、さらに他のタイプの誘引物質に対する受容体が存在する可能性も示唆された。

4) フォトアフィニティー化合物として 4'-azidoflavone (7) を調製し、1 の受容部位に結合させることを試みた。7 そのものは、遊走子誘引活性はそれ程大きくはなく、1 の受容部位に対し弱い相互作用しか示さないと思われたが、7 を含む遊走子懸濁液を UV 照射した後では、遊走子の 1 に対する誘引応答の低下が観察された。しかしその影響は 2 の誘引活性には及ばなかった。このことから 1 の受容部位あるいはその近傍に 7 のニトレンが反応して、1 とその受容体の親和性を低下させたものと推測された。

以上のように、本研究はホウレンソウ根腐病菌遊走子の生態化学的特性を追究するための生物検定の定量化ならびにホウレンソウ地上部の遊走子誘引物質の単離・同定を行

うとともに、宿主特異的誘引物質及び類似化合物、フォトアフィニティーラベル化剤を用いて遊走子の走化性に関わる受容体の特性を探り、学術的に貴重な知見を得ている。

よって審査員一同は、高山智光が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。