

学 位 論 文 題 名

Ecochemical Interactions between Plants and Zoospores  
of the Phytopathogenic Oomycete *Aphanomyces cochlioides*

(植物病原性卵菌 *Aphanomyces cochlioides* の遊走子と  
植物の生態化学的相互作用)

学位論文内容の要旨

卵菌類の*Phytophthora*属、*Pythium*属、*Aphanomyces*属菌には、植物、陸上動物、魚類などに甚大な被害を与える病原菌が含まれる。植物病原性の卵菌は、遺伝的に多様性を有し、化学薬剤による制御も容易ではない。*Aphanomyces cochlioides*は、サトウダイコンやハウレンソウその他のアカザ科やヒユ科の植物に被害をもたらす。*A. cochlioides*の遊走子は、走化性によって宿主植物に到達し、根の組織に侵入する前に形態変化(被嚢化、発芽、付着器形成)を示す。卵菌類の宿主認識や宿主、非宿主植物との生態化学的相互作用に関する知見は極めて乏しい。本研究では、*A. cochlioides*の遊走子と宿主及び非宿主植物との植物二次代謝産物を介した相互作用の実態解明を目的に、8つの独立した、しかし関連性のある実験を実施し、以下に示した新知見を得た。

1) 遊走子の形態と宿主植物との相互作用の様式

遊走子の形態特性及びハウレンソウ根への感染過程を光学ならびに電子顕微鏡で可視化した。腎臓型卵形をした遊走子は、腹面の溝から出た2本のそれぞれは特徴のある毛状体で飾られた不均等な鞭毛を持つ。遊走子は根に接近すると遊泳を停止し、前方の鞭毛を自分の体に巻き付け、後方の鞭毛で、宿主の表面に接触し遊走子本体を徐々に宿主表面に引き寄せて、腹面の溝の部分が宿主表面側に来るように正確に付着し、粘着性物質を分泌して自身を固定する様子が観察された。この事実は、*A. cochlioides*の遊走子が宿主の表面にうまく付着するために、後方鞭毛を使っていることを示唆している。接着した遊走子は、鞭毛を失い球状となり、急激に、回りを滑らかな面で覆われた大型の被嚢体となり、時間の経過とともに表面に皺の寄った小型の被嚢胞子に変化した。それらはやがて、接着した側の決まった部位から発芽管を出し、付着器を形成して根の組織に侵入した。これらの過程は、50 - 60 minで進行した。

2) 宿主特異的誘引物質cochliophilin A (1)による遊走子の形態分化の誘導

被検物質を塗布した珪藻土粒子を遊走子懸濁液に加えてその効果を検定する担体法を、遊走子の分化に対するcochliophilin A (1)の効果がみられるように工夫し、1が遊走子を誘引する最低濃度を $3/10^{10}$  M程度(担体に塗布する溶液の濃度で、担体1個にはその4 nlが付着している)、被嚢化濃度は $1/10^8$  -  $1/10^6$  Mと決定した。被嚢化胞子は、担体の表面に付着し、30 - 35 minで発芽した。発芽管は1を含む担体に対し走化性を示した。希薄な濃度で誘引され、根の表面近くの高い濃度で被嚢化、胞子発芽を起こすことは感染生理からしても極めて合理的である。走査電顕での観察により、1によって誘導される遊走子の分化は、ハウレンソウの根の表面でのものと同じであることが確認された。宿主特異的誘引物質1が、ハウレンソウ根圏で見られる程度の濃度で、ホウ

レンソウの根と同様に遊走子の誘引、被嚢化、発芽を誘導することの観察は、1 が真に機能を負った宿主特異的誘引物質であり、遊走子が宿主の根に定位、付着し、被嚢化、発芽する過程に、必須の役割を果たしていることを示している。

### 3) 卵菌類遊走子のG-タンパク質共役型情報伝達系について

Mastoparanは、スズメバチの毒液に由来する陽イオン性の両親媒性ペプチドで14個のアミノ酸からなり、広く動物のヘテロトリメリックなGTP-結合性制御タンパク質(G-protein)を活性化させる。このmastoparanは、遊走子の分化を誘導し、その作用がphospholipase Cの阻害剤やカルシウム二価イオンの転流を制御する物質で抑制された。上記ペプチドの合成アナログで、6位のleucineがlysineで置換され脂質膜部で両親媒性を示すヘリックス構造をとれないMas17は、遊走子に対する作用性は全くなかった。結果を合わせて考えると、遊走子は宿主のシグナルをG-タンパク共役型のレセプターで受容し、その刺激がリン酸化イノシトール類- $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングカスケードを経て、走化性や分化の応答へと転化されていることが示唆された。

### 4) 非宿主植物は卵菌類遊走子を防ぐための防御物質(化学兵器)を備えている

非感受性の植物は病原菌に対する防御物質を含むとの仮説を立て、約200種の非宿主植物抽出物につき担体法によるスクリーニング試験を行った。約半数で、遊走子の運動性や生存に影響が見られた。そのうち3種の植物、忌避作用を示すマメ科*Dalbergia odorifera*、遊走子の遊泳停止と細胞溶解作用を示すウルシ科*Lannea coromandelica*、遊走子を誘引して遊泳を停止させるヒユ科*Amaranthus gangeticus*について、活性物質(担体法による評価)の同定を試みた。

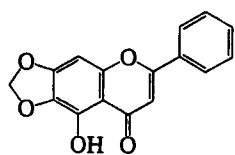
(A) *D. odorifera*から、(±)-medicarpin (2; 100 ppm 溶液で忌避活性)、(-)-claussequinone (3; 150 ppm で興奮作用)及びformononetin (4; 50 ppm で誘引と興奮作用)を単離同定した。これら3種の混合物(1:1:1)は50 ppm で忌避活性を示した。

(B) *L. coromandelica*の活性本体は、MALDI-TOF-MSの手法を用いて、活性本体がアングラー型ポリフラボノイド(縮合)タンニンであることを明らかにした。市販の工業用縮合タンニン2種(ミモザおよびケブラコタンニン)も、遊走子の遊泳を停止させその後細胞を溶解させた。

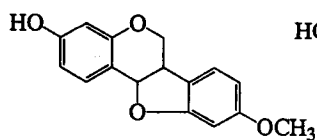
(C) *A. gangeticus*の遊走子誘引と遊泳停止作用は、*N-trans-feruloyl-4-O-methyldopamine* (5)とnicotinamide (6)の共存によると判明した。化合物5は遊走子を誘引するが阻害的作用は示さず、化合物6は、急激に遊泳を停止させ被嚢化させた。しかし化合物6で誘起される被嚢体は発芽はせず、再度遊走子を与えた。化合物5と6が共存すると被嚢体を形成、成熟した被嚢胞子を経て30 - 35 min後に、cochliophilin A (1)存在下と同様に発芽した。*A. gangeticus*の根を遊走子懸濁液に入れると、遊走子は根端部で遊泳を停止し被嚢して、3時間ぐらい後に遊走子を再生した。この事実は、*A. gangeticus*の根端からnicotinamide (6)が滲出していることを示唆している。

(D) 哺乳動物のエストロジェン17 $\beta$ -estradiol (7)やestrone (8)が、卵菌の遊走子に顕著な忌避活性を示すことを発見した。高活性発現には、A環の芳香環化、ステロイド構造のC-3位に遊離の水酸基が必須で、遊走子忌避活性とエストロジェン活性の間には、正の相関があった。

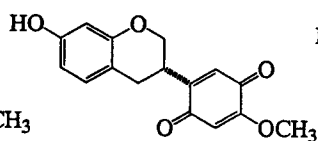
以上、本研究により植物病原性卵菌*A. cochlioides*の遊走子の構造や機能、遊走子と宿主あるいは非宿主植物との生態化学的相互作用に関して、大変興味深い多くの新知見が得られた。病原性卵菌の生理生態を制御するcochliophilin A (1)やnicotinamide (6)のアゴニストやアンタゴニスト、非宿主植物から単離された二次代謝産物などを用いて卵菌の生活環展開の機構を解明することは、病原性卵菌類を制御する新たな方法への手掛りを与えてくれるものと期待される。



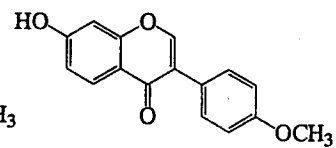
**1:** cochliophilin A



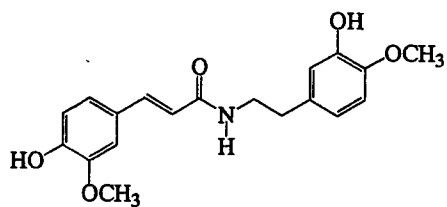
**2:** (±)-medicarpin



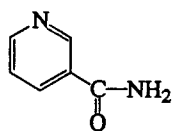
**3:** (-)-claussequinone



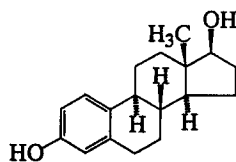
**4:** formononetin



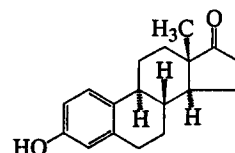
**5:** *N*-trans-feruloyl-4-*O*-methyldopamine



**6:** nicotinamide



**7:** 17β-estradiol



**8:** estrone

# 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  
副 査 講 師 福 士 幸 治

## 学 位 論 文 題 名

### Ecochemical Interactions between Plants and Zoospores of the Phytopathogenic Oomycete *Aphanomyces cochlioides*

(植物病原性卵菌 *Aphanomyces cochlioides* の遊走子と  
植物の生態化学的相互作用)

本論文は、英文272頁、図類43、表18、13章からなり、参考論文9編がある。

*Phytophthora* 属、*Pythium* 属、*Aphanomyces* 属菌などの植物病原性卵菌は、遺伝的に多様性を有し、化学薬剤による制御も容易ではない。*Aphanomyces cochlioides* は、サトウダイコンやハウレンソウその他のアカザ科やヒユ科の植物に被害をもたらす。*A. cochlioides* の遊走子は、走化性によって宿主植物に到達し、根の組織に侵入する前に形態変化(被嚢化、発芽、付着器形成)を示す。卵菌類の宿主認識や宿主、非宿主植物との生態化学的相互作用に関する知見が乏しいため本研究では、*A. cochlioides* の遊走子と宿主及び非宿主植物との植物二次代謝産物を介した相互作用の実態解明を目的に研究を展開し、以下に示した新知見を得ている。

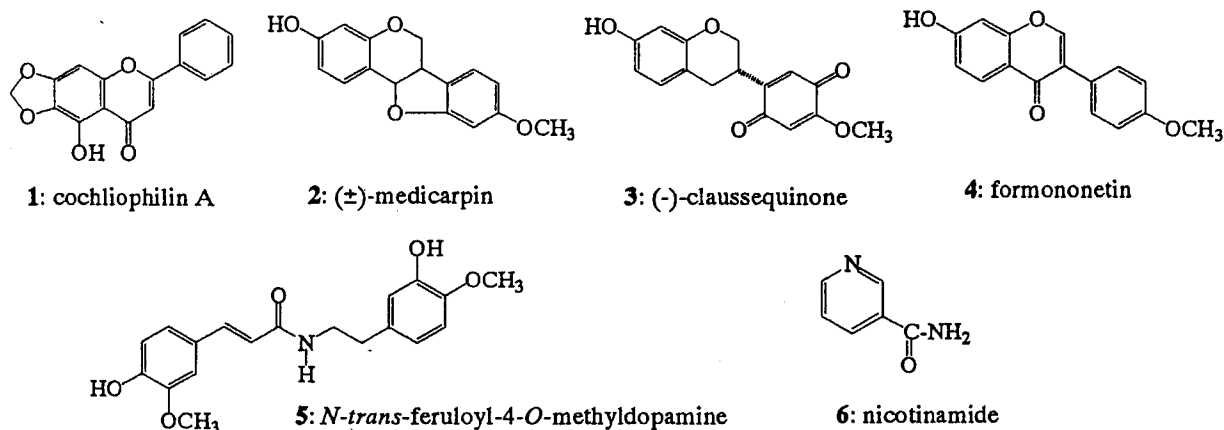
#### 1) 遊走子の形態と宿主植物との相互作用の様式について

遊走子の形態特性及びハウレンソウ根への感染過程を光学ならびに電子顕微鏡で可視化した。鞭毛を含めた遊走子の微細構造を経時的に観察し、*A. cochlioides* の遊走子が宿主表面にうまく付着するのに、後方鞭毛を使っていることを初めて指摘した。遊走子は、鞭毛を失い球状に変化、急激に、回りを滑らかな面で覆われた大型の被嚢体となり、徐々に表面に皺の寄った小型の被嚢胞子に成熟、やがて接着した側の決まった部位から発芽管を出し、付着器を形成して根の組織に侵入した。これらの過程は、50 - 60 min で進行した。

#### 2) 宿主特異的誘引物質 cochliophilin A (1) による遊走子の形態分化の誘導について

被検物質を塗布した珪藻土粒子を遊走子懸濁液に加えてその効果を検定する担体法を、遊走子の分化に対する cochliophilin A (1) の効果が見られるように工夫し、1 が遊走子を誘引す

る最低濃度を  $3/10^{10}$  M 程度(担体に塗布する溶液の濃度で、担体 1 個にはその 4 n1 が付着している)、被嚢化濃度は  $1/10^8$  -  $1/10^6$  M と決定した。被嚢化胞子は、担体の表面に付着し、30 - 35 min で発芽した。発芽管は 1 を含む担体に対し走化性を示した。その他の結果も併せて、1 が真に機能を負った宿主特異的誘引物質であり、遊走子が宿主の根に定位、付着し、被嚢化、発芽する過程に、必須の役割を果たしていることを示した。



### 3) 卵菌類遊走子の G-蛋白質共役型情報伝達系について

スズメバチの毒液に由来し、GTP-結合性制御蛋白質を活性化させる mastoparan が、遊走子の分化を誘導し、その作用が phospholipase C の阻害剤やカルシウムイオンの転流を制御する物質で抑制されることを明らかにした。この事実は、遊走子が宿主のシグナルを G-蛋白質共役型のレセプターで受容し、その刺激がリン酸化イノシトール類- $\text{Ca}^{2+}$  シグナル伝達系を経て、走化性や分化の応答へと転化されることを示唆している。

### 4) 非宿主植物が備えている卵菌類遊走子を防ぐための防御物質(化学兵器)について

非感受性の植物は病原菌に対する防御物質を含むとの仮説を立て、約 200 種の非宿主植物抽出物につき担体法によるスクリーニング試験を行った。約半数で、遊走子の運動性や生存に影響が見られた。(A)忌避作用を示すマメ科 *Dalbergia odorifera* から、(±)-medicarpin (2; 100 ppm 溶液で忌避活性)、(-)-claussequinone (3) 及び formononetin (4) を単離同定、(B)遊走子の遊泳停止と細胞溶解作用を示すウルシ科 *Lannea coromandelica* の活性本体は、MALDI-TOF-MS の手法により、アンギュラー型ポリフラボノイド型(縮合)タンニンであること、(C) *Amaranthus gangeticus* 成分の遊走子誘引と遊泳停止作用は、誘引物質である N-trans-feruloyl-4-O-methyldopamine (5) と被嚢化を誘導する nicotinamide (6) の共存によること、(D) 天然エストロゲンおよび合成エストロゲンアナログ、植物エストロゲン、ビスフェノールなどのエストロゲン作用を示す生体異物を遊走子が極めて敏感に忌避すること、などを見いだした。

以上、本研究により植物病原性卵菌 *A. cochlioides* の遊走子の構造や機能、遊走子と宿主あるいは非宿主植物との生態化学的相互作用に関して、大変興味深い多くの新知見が得られた。病原性卵菌の生理生態を制御する cochliophilin A (1) や nicotinamide (6) のアゴニストやアンタゴニスト、非宿主植物から単離された二次代謝産物などを用いて卵菌の生活環展開の

機構を解明することは、病原性卵菌類を制御する新たな方法への手掛りを与えてくれるものと期待される。

よって、審査員一同は、Md. Tofazzal Islam が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。