

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380073

研究課題名 (和文) 疫病菌 *Phytophthora* の性ホルモンに関する基礎研究研究課題名 (英文) Studies on the mating hormones of the plant pathogen *Phytophthora*

研究代表者

小鹿 一 (OJIKI MAKOTO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：50152492

研究成果の概要：疫病菌 (*Phytophthora* 属糸状菌) はジャガイモなどの重要農作物に感染し農業生産に被害をもたらす。この菌の興味深い特徴は、性ホルモン ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$) を使って有性生殖をおこなう点だが、ホルモンの化学基盤は確立されていない。本課題では、 $\alpha 2$ の分離・精製・構造解析に成功するとともに、以前発見した $\alpha 1$ の構造活性相関を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

キーワード：疫病菌、生理活性、微生物、有性生殖、ホルモン

1. 研究開始当初の背景

重要農作物に感染し甚大な被害をもたらす植物疫病菌 (*Phytophthora* 属の糸状菌) は有性生殖をおこない、その際、化学物質 α ホルモンを用いている。 α ホルモンは 80 年ほど前に有性生殖に関与する何らかの化学物質として存在が予想され、1978 年、Ko らにより実験的に立証されたものの、純粋分離と化学的同定はなされていなかった。我々は

2005 年、A1 交配型が分泌し A2 型の有性生殖を誘導するホルモン $\alpha 1$ の化学構造を世界で初めて決定した (図 1)。一方、A2 型が分泌し A1 型の有性生殖を誘導する $\alpha 2$ ホルモンは、本課題開始時点で構造決定されていなかった。両ホルモンの同定は、疫病菌の制御に何らかの貢献をするものと期待できる重要な課題である。

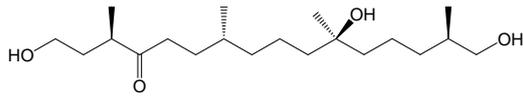


図1 ホルモン $\alpha 1$ の構造

2. 研究の目的

- (1) 第1に、疫病菌 *Phytophthora nicotianae* の A2 交配型の大量培養により、未知の性ホルモン $\alpha 2$ を単離し化学構造を解明する。
- (2) 第2に、 $\alpha 1$ の誘導體を調製して、A2 交配型に対する性ホルモン活性を測定することにより、分子のどの部分が活性に重要なかを解明し、将来の作用機構解析の基盤を確立する。

3. 研究の方法

- (1) ホルモン活性の評価は次のように行った。有性生殖は有性胞子である卵胞子(図2)を誘導するので、卵胞子数をホルモン活性の目安とする。まず、野菜ジュース寒天培地中央に疫病菌の A1 (または A2) 交配型の菌糸片を設置し、25°C 4 日間培養する。形成されたコロニー上にホルモンサンプルを含むペーパーディスクを設置し、25°C 3 日間培養し、ディスク周辺に形成された卵胞子の数を顕微鏡下で計数する。



図2 卵胞子の写真

- (2) ホルモン $\alpha 2$ の生産菌 *P. nicotianae* (A2 交配型) の培養は次のように行った。V8 野菜ジュース培地に、寒天培地で前培養した菌体片 (1 cm²/50 ml) を加え、27°C、80 rpm で振とう培養した。条件検討では、野菜ジュ

ースの割合、pH、培養期間、添加物の有無を変えてホルモン活性を調べた。大量培養では、3 リットルの三角フラスコ中、1.6 リットルの野菜ジュース培地 (20%) に A2 交配型菌体と 1 ppm のフィトールを入れ、27°C、80 rpm で 5 日間振とう培養した。

- (3) ホルモン $\alpha 2$ の分離・精製は次のように行った。菌体をろ別してろ液を ODS カラムクロマトグラフィーにより大まかに分離した。ホルモン活性検定で活性の見られた 85% MeOH 画分を HPLC (MeOH-H₂O 系) により精製した。1 分ごとに分取し各画分のホルモン活性を検定し、活性の見られた画分をさらに HPLC (MeCN-H₂O 系) で精製し $\alpha 2$ を得た。

- (4) ホルモン $\alpha 2$ の構造解析は NMR (¹H, ¹³C, 及び 2 次元データ) を中心に行った。

- (5) ホルモン $\alpha 1$ の構造活性相関では、合成品 (東京農業大学矢島博士より提供) を用いて化学変換を行うか、純粋に合成した類縁体を用いてホルモン活性を検定した。

4. 研究成果

- (1) $\alpha 2$ ホルモンの抽出方法・生産条件

A2 株の液体培地を ODS 担体に吸着させ、段階溶出を行うことによって $\alpha 2$ 活性をもつ粗抽出サンプルを得ることができた。この方法により安価で効率の良い A2 株培養液の大量抽出が可能となった。続いて $\alpha 2$ 生産性を高める培養条件を検討した。培地組成 (野菜ジュース濃度および pH 変更) や培養日数の変更によって一定の生産性の改善が見られた。さらに、 $\alpha 1$ に類似の化合物であることが推定されたので、 $\alpha 1$ の前駆体と思われる phytol を添加したところ (1 ppm)、 $\alpha 2$ の生産性は飛躍的に高められた。また、 $\alpha 2$ の化学的安定性を検討したところ、蒸気滅菌の条件では失活しないが、アセチル化により失活

したことから、比較的安定で、活性に重要な水酸基の存在が示唆された。

(2) $\alpha 2$ の大量生産と構造解析

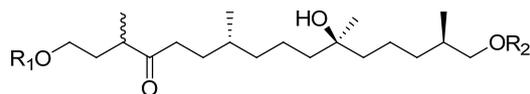
1.6 リットルの 20%野菜ジュース培地に A2 交配型菌体と 1 mg/L のフィトールを加え、27°C、80 rpm で 5 日間振とう培養した。合計 83 L の株培養液から上記の方法で精製し、0.9 mg の $\alpha 2$ を得た。NMR 解析の結果、 $\alpha 2$ の化学構造を決定することに成功した（未発表につき構造は非公開）。 $\alpha 2$ は、新規鎖状ジテルペン化合物であり、8 位の炭素を境に 1 位側が phytol、16 位側が α ホルモンと同じ構造をとっていた。今後、他種の疫病菌に対するホルモン活性の普遍性と構造活性相関を検討する予定である。

(3) $\alpha 1$ ホルモンの立体化学

まず、両側の水酸基を (R)-MTPA および (S)-MTPA エステルとし、NMR 化学シフトの差から、C-3 の立体化学を R/S=3/2、C-15 のそれを R と決定した。本課題の研究期間中、矢島ら（東京農業大学）らは可能な 4 種の立体異性体を合成し、ホルモン活性を調べることにより、残る立体化学を 7R,11R と決定し、全立体化学の解明が終了した。

(4) $\alpha 1$ の構造活性相関

天然の $\alpha 1$ および合成 $\alpha 1$ から以下に示す 10 誘導体を合成した（図 3、3-demethyl 体と (15S) 体は矢島らによる完全合成）。ジエステル（アセテートやベンゾエート）は $\alpha 1$ に匹敵する活性を示したが、ジカルバメートは示さなかったことから、エステルはホルモンの被曝を受けた A2 交配型により $\alpha 1$ に生物分解され活性を示すと推定される。左側の水酸基のみカルバメートでマスクされた誘導体、ケトンの還元体、およびデメチル体で活性が低下したことから分子の左側のケトアルコール構造がホルモン活性に重要と考えられた。また、11 位の水酸基も重要である。



$R_1 = R_2 = \text{Ac}$: diacetate

$R_1 = R_2 = \text{p-BrC}_6\text{H}_4\text{CO}$: dibenzoate

$R_1 = \text{p-BrC}_6\text{H}_4\text{NHCO}$, $R_2 = \text{H}$: 1-O-carbamate

$R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{p-BrC}_6\text{H}_4\text{NHCO}$: 16-O-carbamate

$R_1 = R_2 = \text{p-BrC}_6\text{H}_4\text{NHCO}$: dicarbamate

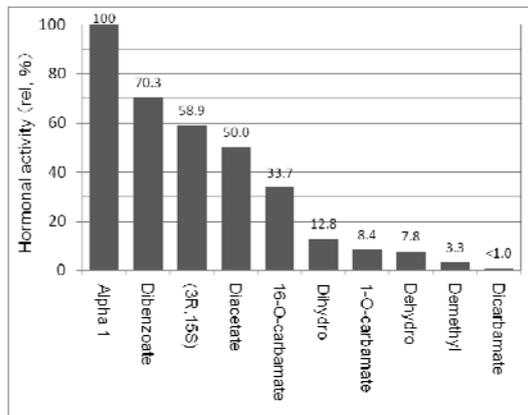
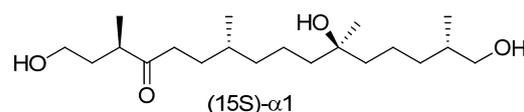
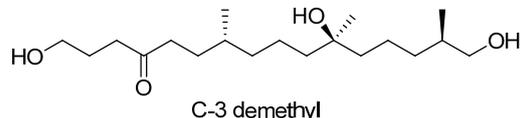
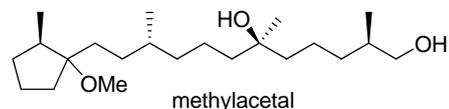
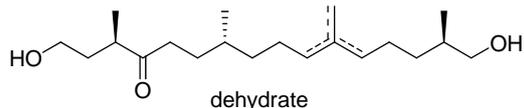
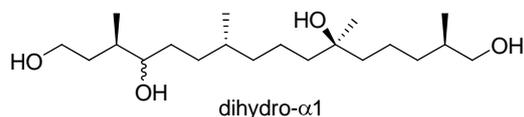


図 3 $\alpha 1$ 誘導体と相対的ホルモン活性

(5) 今後の課題

- ① 今回の課題で、 α ホルモンの種間を超えた共通性について検討を行う計画であったが、期間内に達成できなかった。少なくとも国内で 70 株以上の *Phytophthora* が入手できるので、これらを用いた検定が必要である。
- ② 次に、 $\alpha 2$ ホルモンの全合成による構造の

確認や絶対立体配置の決定、構造活性相関研究等があげられる。 $\alpha 1$ ホルモンの全合成は2008年に達成されたが、この過程で5, 11位については(5*R*, 11*R*)のみが活性を示す絶対立体配置であることが確認されている。したがって、 $\alpha 2$ ホルモンも同様に、限定された配置が重要である可能性が高い。また $\alpha 2$ ホルモンは、高熱およびアセチル化によって活性を失うことから、構造中の3つの水酸基のうちいずれか、もしくは全てが活性に必須であると推定される。構造活性相関の研究からは、 α ホルモンの活性部位が解明され、さらにアンタゴニストが開発されれば交配による変異を予防する新農薬に応用されることが期待される。

③また、phytolと $\alpha 2$ 生産の関連性を解明することも重要な課題にあげられる。本研究においては、phytolの存在下でのA2株の培養により $\alpha 2$ 生産性が顕著に高まることから、phytolが $\alpha 2$ の生合成前駆体になっている可能性が高い。そこで安定同位体ラベルされたphytolを用いて $\alpha 2$ ホルモン生産経路への取り込みを確認することが求められる。さらに、 $\alpha 2$ より酸化段階の進んだ $\alpha 1$ は、 $\alpha 2$ から生合成される可能性があるため、上記の実験で得られるであろう同位体標識 $\alpha 2$ のA1交配型への投与実験も興味深い。

④さらに、性ホルモンの作用機序の解明、特にホルモン受容体の同定は、純粋な学術的興味だけでなく、疫病菌防除の観点からも重要な課題である。

本研究課題で疫病菌の性ホルモンの化学的同定が対($\alpha 1$ と $\alpha 2$)で完了したことは、農業生産の分野における疫病菌の制御、監視の観点から意義深い。本研究を礎に、植物疫病菌に関する様々な研究が発展することを期待したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Makoto Ojika, Jianhua Qi, Yuko Kito and Youji Sakagami, Stereochemical Analysis of $\alpha 1$, a Mating Hormone of the Phytopathogen *Phytophthora*, *Tetrahedron: Asym.* 18, 1763–1765 (2007)、査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 四海圭祐、今岡 忠、浅野友世、戚 建華、Shylaja D. MOLLI、金沢晴海、小鹿 一、矢島 新、額田恭郎、藪田五郎：疫病菌 *Phytophthora* 繁殖誘導ホルモン $\alpha 1$ の構造活性相関. 日本農芸化学会 2009 度大会 (福岡) 2009. 3. 29.
- ② 金沢春海、浅野友世、小鹿 一：植物疫病菌 *Phytophthora* の交配ホルモン $\alpha 2$ の探索. 日本農芸化学会 2008 度大会 (名古屋) 2008. 3. 27.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小鹿 一 (OJIKA MAKOTO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：5 0 1 5 2 4 9 2