

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22248012

研究課題名(和文)疫病菌交配ホルモンの化学・生物学的解明と受容体探索

研究課題名(英文)Phytophthora mating hormones: chemical biological studies including their receptors

研究代表者

小鹿 一(OJIKI, Makoto)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50152492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 22,200,000円

研究成果の概要(和文)：疫病菌はPhytophthora属の糸状菌で、ジャガイモやトマトなど重要農作物に甚大な被害をもたらす。疫病菌は異なる交配型を交配ホルモン(A1型の分泌する $\alpha 1$ 、A2型の分泌する $\alpha 2$ )で認識し有性生殖を行うが、その解明は長年の懸案であった。本課題により2つの交配ホルモンの化学構造を解明するとともに、ホルモン活性に重要な構造要素を明らかにした。また、ホルモンの生合成経路、種間の普遍性を明らかにした。さらに、 $\alpha 1$ の受容体探索を目指して $\alpha 1$ 蛍光プローブを調製し、A2交配型選択的に菌糸を染色できることを示した。今後、受容体同定に向けてさらに研究を進展させたい。

研究成果の概要(英文)：Phytophthora is a genus that infects and damages important crops such as potatoes and tomatoes. This phytopathogen sexually reproduces using mating hormones ( $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ ), which are secreted by A1 and A2 mating types, respectively. The identification of the mating hormones had been a long-pending problem. In this project, we determined the chemical structures of these mating hormones, clarified the structure-activity relationship, biosynthetic process, and hormone universality. Furthermore, to identify the hormone receptors, fluorescent probes of  $\alpha 1$  were synthesized and found to selectively stain the A2 mating type, which could furnish  $\alpha 1$  receptor.

研究分野：天然物化学

キーワード：疫病菌 Phytophthora 交配ホルモン 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 疫病菌について

疫病菌は *Phytophthora* 属の糸状菌で、本属を構成する種の多くは農作物に甚大な被害をもたらす。1840 年代に発生した「アイルランドジャガイモ飢饉」では約 100 万人の餓死者を出した。現在でも、ジャガイモ疫病による損害は世界で年間数十億ドルにのぼるといわれており、膨大な量の防除剤が用いられている。疫病菌は異なる交配型 (A1 型と A2 型) が会すると有性生殖を行い有性胞子「卵胞子」を形成するが、この現象には交配ホルモン (A1 型の分泌する 1、A2 型の分泌する 2) が関与する。これは菌における自家不和合性現象とも言える興味深い現象であるが、これらの化学的解明は長年の懸案であった。

### (2) 交配ホルモンについて

研究代表者らは数年前、長年の懸案であった疫病菌交配ホルモンの 1 つ 1 の同定に初めて成功した (*Science*, 2005 年)。約 2 トンの A1 交配型培養液から 1.2 mg の 1 を単離し、鎖状ジテルペン構造 (図 1) を決定し、種間普遍性の可能性も示唆した。さらに、研究分担者による 4 種の異性体の全合成が行われ全絶対立体配置が解明された (*Nat. Chem. Biol.*, 2008 年)。本課題採択直前には、代表者は A2 交配型培養液から 2 の精製に成功し平面構造を決定している。

以上の成果により、代表者らは少なくとも 1 種の疫病菌 (*Phytophthora nicotianae*) の両交配ホルモン 1, 2 を手にしたことになり、「疫病菌有性生殖の分子基盤の全容解明」を目指す本研究課題を推進するための主役が揃ったことになった。すなわち、両ホルモンを利用することで初めて、ホルモンの種間普遍性、構造活性相関、生合成経路、ホルモン受容体の同定を含む本研究課題を推進できるようになった。

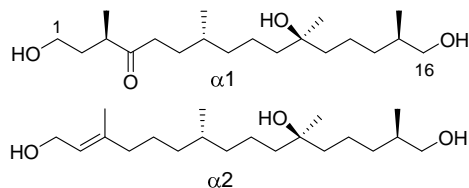


図 1. 疫病菌の交配ホルモン

## 2. 研究の目的

これまでに交配ホルモン 1 の立体構造解明に成功している。そこで本研究課題では、疫病菌有性生殖の分子基盤の全容解明に向けて、有性生殖誘導因子である交配ホルモン 1, 2 の化学基盤を確立するとともに、これをケミカルバイオロジー分野にまで展開することを目的とする。具体的には以下の点を明らかにする。

- (1) 2 の立体構造解析
- (2) ホルモンの生合成経路
- (3) 構造活性相関
- (4) 種間の普遍性
- (5) ホルモン受容体の探索

## 3. 研究の方法

### (1) 2 の立体構造解析

2 には 8 種の立体異性体が可能であるが、まず 1 と共通構造の右端の絶対配置を同じ 15*R* と仮定して 4 種類の立体異性体を合成した (図 2)。(*R*)-citronellol から既知の方法で (*R*)-1 を合成し、5 段階の反応で C15-アルケン (7*R*)-2 を得た。これに対し ADmix- $\alpha$  または ADmix- $\beta$  存在下での酸化を含む 5 段階の反応で (11*R*)-, (11*S*)-三級アルコールを得た。さらに 6 段階の反応を経て (7*S*,11*R*,15*R*)- $\alpha$ 2, (7*S*,11*S*,15*R*)- $\alpha$ 2 を合成した。一方、(*S*)-citronellol から (*S*)-1, (7*S*)-2 を経て同様の手法で (7*R*,11*R*,15*R*)- $\alpha$ 2, (7*R*,11*S*,15*R*)- $\alpha$ 2 を合成した。

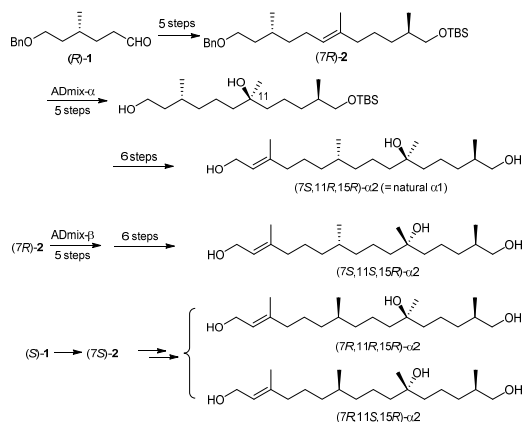
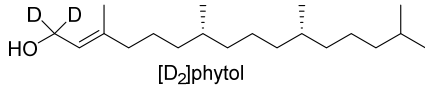


図 2. 交配ホルモン 2 立体異性体の合成

これら異性体のホルモン活性を以下に述べるアッセイ法でテストした。すなわちタバコ疫病菌 *P. nicotianae* の A1 交配型を野菜ジュース寒天培地上で培養後、検体を含む紙をコロニー付近に置く。8 日間培養後紙周囲をくり抜き、形成された卵胞子 (有性胞子) の数を顕微鏡下で計測した。

### (2) ホルモンの生合成経路

「phytol 2 1」という生合成経路仮説を証明するため、phytol から酸化・重水素ヒドリド還元を経て重水素ラベル化 [ $D_2$ ]phytol を合成した。これを *P. nicotianae* A2 交配型の液体培養液に投与し、7 日間振とう培養した。培養液から 2 を精製し、NMR と MS により重水素の取り込みを調べた。さらに、この実験で得られた [ $D_2$ ] 2 を A1 交配型の液体培養液に投与して 7 日間振とう培養し、1 を単離精製して、同様に重水素の取り込みを調べた。



### (3) 構造活性相関

ホルモンの水酸基、ケトン、二重結合を足場に 1 誘導体 **3-11**、2 誘導体 **12-19** の合計 17 の誘導体を合成した (図 3)。エステル **3, 4, 12-15**、ウレタン **5-7, 16-18** は定法により合成し、各位置異性体はクロマトグラフィーにより分離した。アルコール **8** は 1 のヒドリド還元により、**9** は **3** の脱水により調製した。誘導体 **10, 11** は図 3 に示す方法で全合成により調製した。

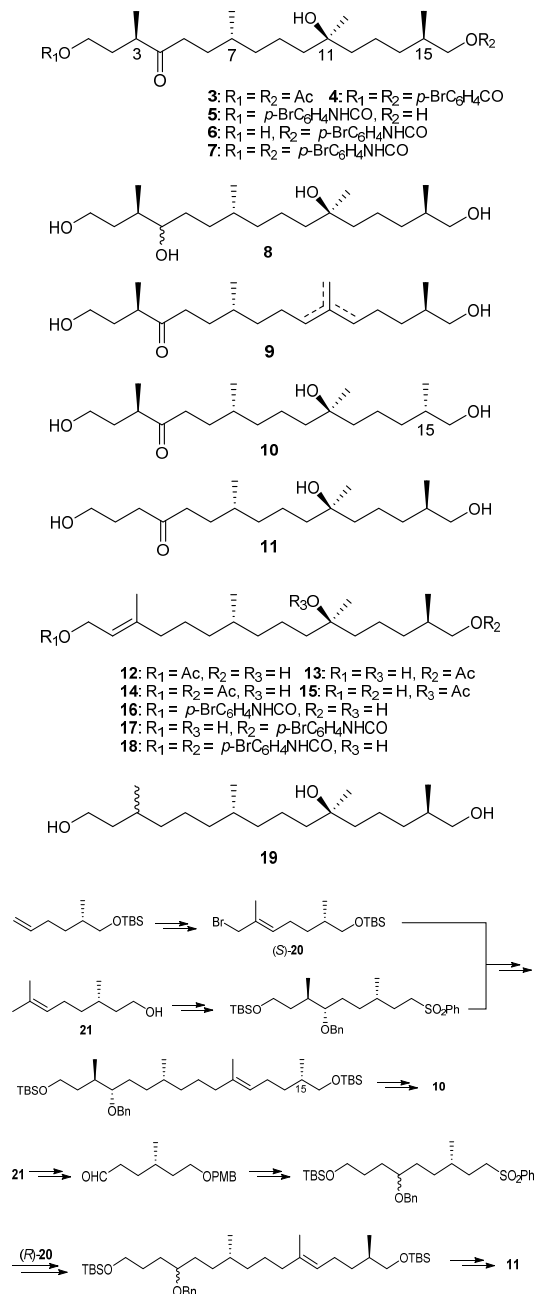


図 3. ホルモン類縁体の合成

### (4) 種間の普遍性

研究室で保有する約 70 株の疫病菌 (米国から輸入または国内保存機関 NBRC から入

手) について、A1, A2 標準株と対峙培養することで交配型を調べた。次いで、各株を V8 野菜ジュース寒天培地上で培養し、ホルモンをディスク法により投与し、ディスク周辺の卵孢子誘導を顕微鏡で観測することでホルモン感受性を調べた。さらに、全ての株について液体培養をして培養上清中のホルモン量 (μg/L) を LC/MS 法により決定しホルモン産生能を調べた。

### (5) ホルモン受容体の探索

1 受容体探索のためのプローブとして 3 種の蛍光プローブ FP-1, FP-2, FP-3 を合成した (図 4)。

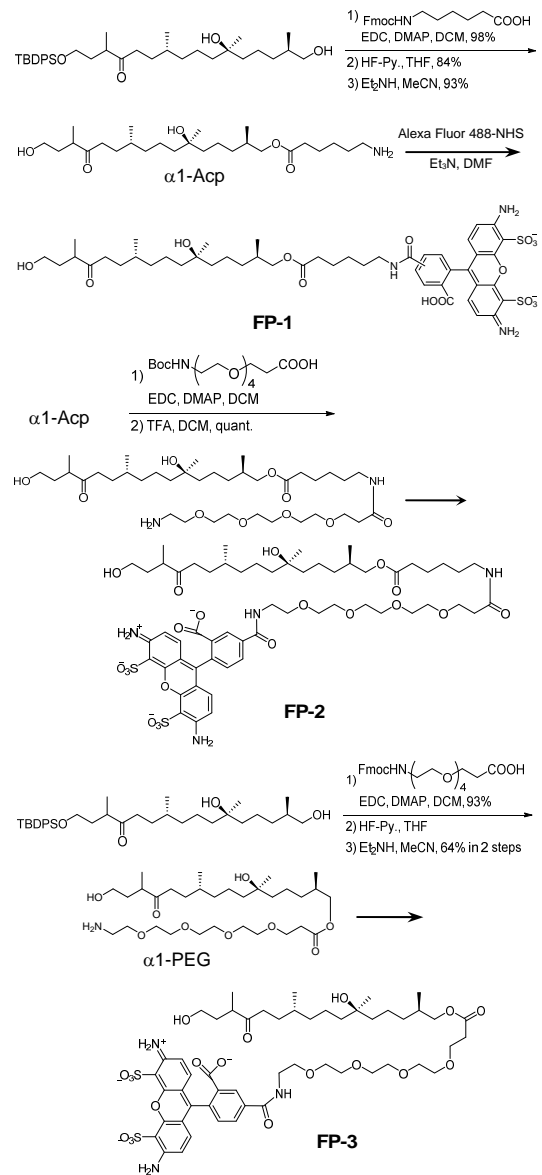


図 4. 1 受容体探索用蛍光プローブの合成

疫病菌 *P. nicotianae* ATCC38606 (A2 交配型) および 38607 (A1 交配型) を V8 野菜ジュース培地中、7 日間、25、80 rpm で振とう培養した後、菌体を精製水で洗浄し、上記の各蛍光プローブ水溶液中でインキュベートした (1 μM, 15、14 h)。競合剤として

天然 1 の添加条件も同時に行った。菌体を水でよく洗浄し、蛍光顕微鏡下、緑色蛍光と明視野で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 2 の立体構造解析

平面構造の決定に成功していた 2 について、絶対立体構造の決定を行った。15R に固定した 2 異性体 4 種を全合成し(図 2)、A1 交配型に対するホルモン活性を調べたところ、7S,11R 異性体のみが天然物と同等の活性を示したことから、2 の絶対立体配置を 7S,11R,15R と決定した(図 5)。

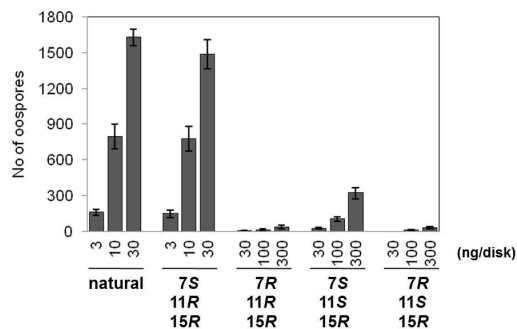


図 5. 合成した 2 異性体のホルモン活性

##### (2) ホルモンの生合成経路

A2 交配型の培養で phytol を添加すると 2 の生産量が大きく上昇する。また、A1 交配型の培養で A2 交配型の菌体を微量添加すると 1 の生産量が上昇する。以上のことからホルモンは、phytol → 2 → 1 の経路で生合成されると考えた。このことは、これらの構造が全て鎖状ジテルペンで同じであること、生成段階が進むにつれて酸化段階が上がることから納得できる。この推定を証明するため、重水素ラベル化した[D<sub>2</sub>]phytol を A2 交配型へ投与し得られる 2 への取り込みを調べた。その結果、A2 交配型は[D<sub>2</sub>]phytol を [D<sub>2</sub>] 2 に変換することが証明された(図 6、取込率 87%)。さらに得られた[D<sub>2</sub>] 2 を A1 交配型に投与したところ [D<sub>2</sub>] 1 に変換された(取込率 66%)。

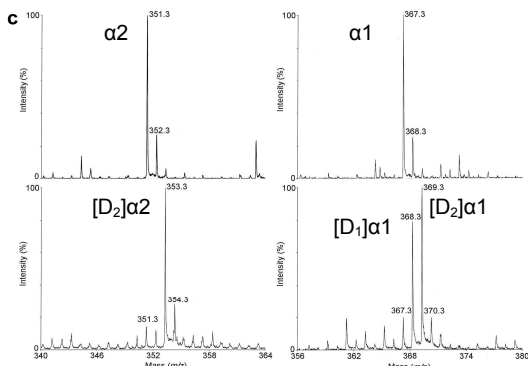


図 6. phytol の ホルモンへの取込み ESI-MS による 1, 2 の解析

以上のことから以下の機構が明らかとなった(図 7)。A2 交配型は(おそらく感染宿主植物由来の) phytol を 2 に変換し、A1 交配型が共存するこの 2 を感知して有性生殖を開始する、同時に A1 交配型は 2 を 1 に変換し、1 は共存する A2 交配型に有性生殖を誘導する。

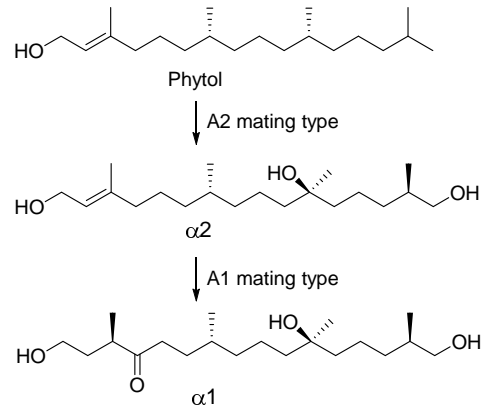


図 7. ホルモンの生合成経路

##### (3) 構造活性相関

合成した ホルモン誘導体(図 3)のホルモン活性を調べた結果(図 8)、活性に重要な構造として以下の傾向が判明した。1 の構造中で、全ての水酸基が重要で特に両端がマスクされると活性が完全に消失する。ただ、1 位のエステル化は活性を保持する。3 位メチル基、4 位ケトン基は重要である。2 では全ての官能基(3つの水酸基および二重結合)が重要である。これらの結果から、2 の誘導体を用いた 2 受容体の探索は困難を伴う可能性が判明した。

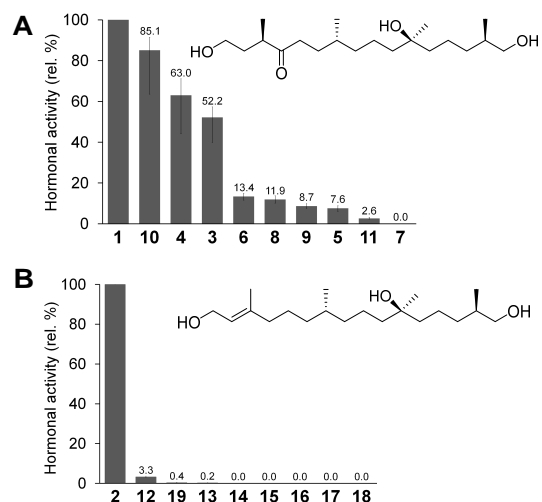


図 8. ホルモン誘導体のホルモン活性 (A) 1 活性、(B) 2 活性

##### (4) 種間の普遍性

保存菌株約 70 株の疫病菌について、ホルモン生産性を液体培養と LC/MS により、ホルモン感受性をホルモンアッセイにより調

べた(図9)。その結果、58%の株でホルモン生産が確認された。また、44%の株が少なくとも一方のホルモンにより有性生殖を開始した。興味深いことに、 $\alpha 2$ のみを生産すると考えられていたA2交配型の多くが両ホルモンを生産していることが判明した。今後、その機構に興味を持たれる。

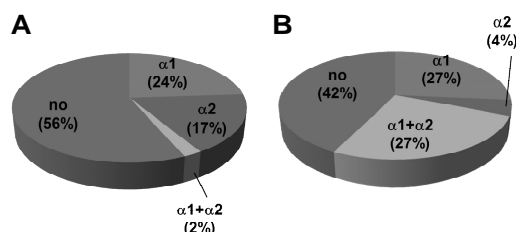


図9. ホルモンの普遍性  
(A) 感受性、(B) 生産性

#### (5) ホルモン受容体の探索

疫病菌の菌体における $\alpha 1$ 受容体の分布を調べるために、「 $\alpha 1$ リンカー 蛍光基」の基本構造をもつ3種の蛍光プローブFP-1~FP3を設計し合成した(図4)。 $\alpha 1$ の構造活性相関から分子の右側の修飾は活性を保持することがわかっていたので、 $\alpha 1$ 分子の右側に、リンカー(脂肪鎖、PEGおよびその組合せ)を介して蛍光基AlexaFluor488を結合した。これらが受容体に結合することで、蛍光顕微鏡下、受容体分布の多い細胞器官の特定が期待できる。

結合実験の前に、これら蛍光標識プローブのホルモン活性を調べた。A2交配型に30~300 ng/diskで投与したところ、 $\alpha 1$ の活性に比べプローブ1は約5%、プローブ2は約1%の弱い活性を示し、プローブ3は活性を示さなかった(図10)。活性が低い理由として、リンカーと蛍光色素が結合したことにより分子構造が大きく変化したため菌体内に透過しにくくなったためと考えられた。

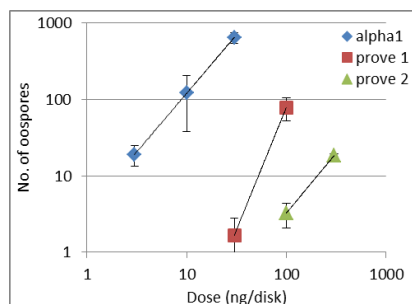


図10.  $\alpha 1$ 受容体探索用蛍光標識プローブのホルモン活性

ホルモン活性は低いものの、生きた菌体の蛍光染色実験を行った(図11)。その結果、FP-1(1  $\mu\text{M}$ )によりA2交配型の菌系がより強く染色され、この染色は $\alpha 1$ (100  $\mu\text{M}$ )の添加により完全に阻害された。一方、FP-2、FP-3にはこのようなA2選択的な染色は見られなかったことから、FP-1が蛍光プローブとして

優れており、その効果はホルモン活性と概ね一致していた。FP-1により染色される細胞器官は断定できなかったが、明視野画像と比較すると細胞壁の均一な染色とは異なり細胞内が不均一に染色されている。今後、プロトプラストに対する染色など、細胞内のどの器官が選択的に染色されるかを詳しく調べる必要がある。

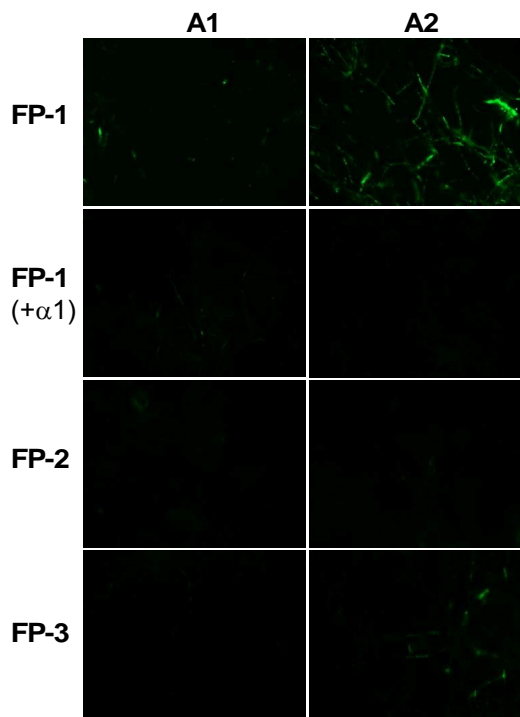


図11.  $\alpha 1$ 蛍光プローブによる疫病菌菌体の染色(露出時間1/8秒)

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計30件)

1) Dong, L.; Zhu, X.; Cui, H.; Ojika, M.; Wang, R.; Liu, H. Establishment of the straightforward electro-transformation system for *Phytophthora infestans* and its comparison with the improved PEG/CaCl<sub>2</sub> transformation, *J. Microbiol. Methods*, **112**, 83-86 (2015). [査読有]

2) Yajima, A. Recent progress in the chemistry and chemical biology of microbial signaling molecules: quorum sensing pheromones and microbial hormones, *Tetrahedron Lett.* **55**, 2773-2780 (2014). [査読有]

3) Molli S. D.; Qi J.; Yajima A.; Shikai K.; Imaoka T.; Nukada T.; Yabuta G.; Ojika M. Structure-activity relationship of  $\alpha$  hormones, the mating factors of phytopathogen *Phytophthora*, *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 681-686 (2012). [査読有]

4) Yajima, A.; Toda, K.; Molli, S. D.; Ojika, M.; Nukada, T. Syntheses of the four stereoisomers of *Phytophthora* mating hormone  $\alpha_2$  and a concise synthesis of mating hormone  $\alpha_1$ , *Tetrahedron*, **67**, 8887-8894 (2011). [査読有]

5) Ojika, M.; Molli, S. D.; Kanazawa, H.; Yajima, A.; Toda, K.; Nukada, T.; Mao, H.; Murata, R.; Asano, T.; Qi, J.; Sakagami, Y. The second *Phytophthora* mating hormone defines interspecies biosynthetic crosstalk, *Nat. Chem. Biol.* **7**, 591-593 (2011). [査読有]

[学会発表](計 74 件)

1) 天廣志保、岩井里佳、小鹿 一、野菜ジュースからの植物疫病菌有性生殖促進物質の探索、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学 (岡山市) 2015.3.28.

2) 小鹿 一、疫病菌の交配ホルモン、第 49 回天然物化学談話会、せとうち児島ホテル (岡山県倉敷市) 2014.7.2.

3) 岩井里佳、GOVINDAM, S. V. S.、小鹿 一、植物疫病菌 *Phytophthora* 無性生殖の阻害物質の探索、日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学 (仙台市) 2013.3.26.

4) 小鹿 一、MOLLI, S. D.、戚 建華、矢島 新、四海圭祐、今岡 忠、額田恭郎、藪田五郎、坂神洋次、疫病菌交配ホルモンの構造活性相関、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都女子大 (京都市) 2012.3.24.

5) 岩井里佳、Sudhakar V. S. Govindam、小鹿 一、野菜ジュースからの植物疫病菌の無性生殖促進物質、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都女子大 (京都市) 2012.3.24.

6) 矢島 新、戸田 皓、MOLLI S. D.、小鹿 一、額田恭郎、疫病菌の繁殖誘導ホルモン $\alpha_2$  の合成と立体化学の決定及び $\alpha_1$  の新規合成、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都女子大 (京都市) 2012.3.24.

7) Ojika, M. *Phytophthora* mating hormones, The 2011 International Symposium on Natural Products Chemistry and Chemical Biology, Hangzhou (China), 2011.11.20.

8) Molli, S. D.; Qi, J.; Yajima, A.; Shikai, K.; Imaoka, T.; Nukada, T.; Yabuta, G.; Asano, T.; Sakagami, Y.; Ojika, M. Structure-activity relationship of  $\alpha$  hormones, the mating factors of phytopathogen *Phytophthora*, 2011 年度日本農芸化学会関西・中部支部合同大会、京都

大 (京都市) 2011.10.2.

9) 小鹿 一、Molli, S. D.、金沢春海、矢島 新、戸田 皓、額田恭郎、毛 海萌、村田 涼、浅野友世、戚 建華、坂神洋次、疫病菌交配ホルモン $\alpha_2$ 、第 53 回天然有機化合物討論会、大阪国際交流センター (大阪市) 2011.9.28.

10) 村田 涼、Molli, S. D.、毛 海萌、浅野友世、小鹿 一、植物疫病菌における交配ホルモンの普遍性、日本農芸化学会 2011 年度大会、京都女子大 (京都市) 2011.3.26.

11) Ojika, M.; Molli, S. D.; Qi, J.; Kanazawa, H.; Mao, H.; Yajima, A.; Sakagami, Y. Alpha hormones: The mating factors of the phytopathogen *Phytophthora*, Pacificchem 2010, Honolulu (USA), 2010.12.17.

12) 小鹿 一、疫病菌の交配ホルモン、第 6 回関西創農薬研究会、三井化学アグロ株式会社農業化学研究所 (滋賀県野洲市)、2010.10.15.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小鹿 一 (名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授)

研究者番号 : 50152492

### (2) 研究分担者

矢島 新 (東京農業大学・応用生物科学部・准教授)

研究者番号 : 30328546

### (3) 連携研究者

坂神 洋次 (名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授) (2012 年 4 月 9 日逝去)

研究者番号 : 80107408