

植物の感染防御機構の生物有機化学的解明

研究代表者：岩村 俣（京都大学大学院農学研究科）

講演要旨

植物は有害微生物および植食性昆虫の攻撃に対して、抗菌活性物質や摂食忌避活性物質をもって備えている。それらは便宜的に大きく構成的防御物質（constitutive or preformed defense substances）と誘導的防御物質（inductive defense substances）に分けられている。しかし、植物の物質的防御機構は、このような従来の概念の枠を越えてきわめて複雑多岐にわたることが近年急速に明らかになりつつある。構成的防御物質にも動的な様相が、誘導的防御物質にも構成的な様態がうかがわれ、しかもそれは器官や生育ステージにより異なり、また環境によっても異なる。本研究では、（1）天然物有機化学ならびに生物有機化学的手法を駆使して、新たな防御機構、防御物質とその動態、すなわち植物の物質的防御機構の多様性を解明し、（2）これらの成果に基づいて応用展望に結びつく研究を酵素化学および分子生物学的手法をも駆使して行うことを目標とした。具体的な対象は穀類植物、果実、野生植物で、これは従来の研究の主流が双子葉植物を中心にモデル研究的に行われてきたのと対照をなす。

穀類植物は人類の生存にとって最も重要な存在である。しかしその防御機構の研究は、双子葉栽培植物にそれに比べて必ずしも十分と云えない。ここではその重要性に鑑み、コムギ、イネ、エンバクを中心に研究を行い、そこでの成果と関連するトウモロコシ、オオムギの防御機構についても研究した。コムギとトウモロコシには誘導的防御物質は見いだされておらず、構成的防御物質の存在しか知られていなかった。しかもその発現動態に関する知見は乏しい。ここでは人類の生存を支えるものとして選択されてきた何かの防御機構の中にも存在するとの観点から研究を行い、育種的应用に結びつく成果を得た。一方、イネは多様な誘導的防御物質で知られる特異な植物であり、コムギ、トウモロコシとは好対照をなす。ここでは、ファイトアレキシンの誘導機構の分子レベルでの解明を行い、新規エリシターの発見や育種的应用に結びつく生合成酵素のクローニングなどに成果を挙げた。エンバクではファイトアレキシンの生合成の最終段階の反応を触媒する酵素を同定した上で、その生合成経路全体を把握することができた。また、他の植物からもエンバクのファイトアレキシンと類似した化学構造をもつストレス誘導性の化合物が見いだされ共通の生体防御機構の存在が示唆された。

果実は植物の生活環の最終段階にあつて、その生殖成長を完成させる最も重要な器官である。ここでは器官特異的な防御機構が機能していると考えられる。そこで熱帯産のバナナ未熟果実を素材として研究を行い、新規ファイトアレキシンを同定するとともに、果実の登熟にともなう感染抵抗性の消失はその生成能の低下によるものであることを見出した。さらに、温帯産果実であるイチゴやネクタリン、キウイフルーツの未熟果実からも新しいファイトアレキシンを同定し、多くの未熟果実が特異的な防御物質を発現していることを初めて明らかにした。

上記のような栽培植物の起源は言うまでもなく野生植物である。栽培植物の理解には野生植物の理解が重要であるにもかかわらず、これまであまり眼が向けられなかった。防御機構の原点は、生態系のなかで他生物と調和して、持続的な生存を図っている野生植物にあると思われる。この野生植物が身に付けてきた防御機構を解き明かし、それを新たな資源にしようとする研究は、学問的に興味深いだけでなく、低投与持続型農業を支える基本理念にも沿うものである。このような観点からキワタ科、ヤナギ科、マメ科の野生植物を選択し、構成的および誘導的抗菌物質の構造と生成様式、分布、動態、機能の解析を行った。また、作物の病原抵抗性を強化するために台木と

して利用される栽培植物近縁の野生種について、栽培植物との病原抵抗性因子の質的および量的差異を解析した。

植物と微生物の関係に対する我々の関心は、それが病原微生物である場合あるいは根粒や菌根のような特殊な構造体を形成する場合に偏りがちである。しかし実際には、葉面や根圏、場合によっては組織のなかで、植物と微生物は極めて豊かな利益共同体を形作っているかに見える。葉面着生菌やエンドファイトが植物の二次代謝産物を代謝して植物を護るのに与っている機構については、本グループの研究者が先駆けてその研究に着手してきたところであり、本プロジェクトにおいても後述するような成果を挙げた。

以上のような内容で構成された本プロジェクト研究は、防御の最前線で繰りひろげられている多様な物質戦術を明らかにするとともに、それを支えている化学的・生化学的原理を解明しようとした。その成果は、新たな植物防疫技術や交配および分子育種による新たな有用品種の開発に貢献することが期待される。

各グループの行った研究の概要は以下の通りである。

岩村グループ（京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻）

(1) コムギおよびトウモロコシにおいて、benzoxazinone グルコシドとそれらに特異的なグルコシダーゼが従属栄養期には特異的に発現していることを見いだした。さらに、このグルコシダーゼおよび benzoxazinone グルコシルトランスフェラーゼを精製単離した。

健全組織ではほとんど見いだされない benzoxazinone 類の一つである hydroxydimetoxylbenzoxazinone (HDMBOA) グルコシド がコムギおよびトウモロコシにおいて誘導発現することを見だし、コムギ、トウモロコシにも誘導防御機構が存在することを示した。

Benzoxazinone 類生合成の最終過程4段階を司る P450 酵素の cDNA クローニングを行い、種々の染色体置換6倍体コムギシステムに対するサザン解析を行った。その結果、これら一連の生合成酵素の遺伝子は第4および第5同祖群染色体に分散座乗しているという全く新規な知見を得た。

オオムギ防御物質 hordatine がオオムギ 2H 染色体添加コムギにおいて発現することを見だし、オオムギの抗菌物質を導入したコムギの耐病性育種に道を開いた。

(2) オオムギの抗菌性化合物 hordatine もその生合成酵素とともに従属栄養期に特異的に発現していることを見だし、酵素の精製単離、性状解析を行った。

(3) エンバクのアレキシン avenanthramide 類の生合成過程の全貌をエリシターによる酵素活性の誘導および想定される前駆物質の取り込み実験によって明らかにした。Avenanthramide 類と類似したヒドロキシ桂皮酸アミド類の関与する生体防御機構が、トウモロコシ、オオムギ、およびアカツメクサに存在することを見だし、その普遍性を示唆した。さらに、このようなヒドロキシ桂皮酸アミド類は細胞壁に取り込まれることによっても植物の生体防御機構に寄与していることが示唆された。

(4) バナナ果実のアレキシンとして、12 種の新規物質を含む合計 24 種のフェニルフェナレン誘導体を単離同定し、その新しい生合成経路を提唱した。フェニルフェナレンの含量増加は追熟によって停止したことから、これが実際の果実でおこっている感染抵抗性減少の主因であることを明らかにした。ネクタリンならびにキウイフルーツ、イチゴの未熟果実からも 3 種の新規物質を含む合計 17 種類のトリテルペン型アレキシンを見出し、トリテルペンが新しいアレキシン化合物群になりうることを示した。

児玉グループ（茨城大学農学部資源生物科学科）

(1) イネのアレキシンのエリシターによる誘導について研究を行い、ジ

ジャスモン酸のアミノ酸複合体、メチオニン、キトオリゴ糖をイネ葉身に処理することにより、ファイトアレキシンを顕著に誘導することを見出した。この研究を行うために LC/MS/MS を用いたファイトアレキシンおよびジャスモン酸類の高感度微量分析法を確立した。

(2) フラボノイド系ファイトアレキシンであるサクラネチンの生合成の最終段階を触媒し、抗菌活性の発現に寄与しているナリンゲニン 7-O-メチルトランスフェラーゼ遺伝子をクローニングした。本遺伝子については新たな病害抵抗性作物の育種への応用を視野に入れて国内および海外特許を出願した。

田原グループ（北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻）

野生植物の化学的防御機構ならびに化学物質を介した植物と微生物の相互作用の解析を目指して研究の展開を図った。

(1) 野生植物の病原抵抗性要因の解析とそれらの作用特性を検討した。キワタ科パキラ、ケシ科植物、バラ科キンミズヒキ、ヤナギ科オノエヤナギ、マメ科植物、耐病性ナス科台木植物の構成的あるいは誘導的抗菌物質の解析を行ない、多数の抗菌性物質を単離・同定した。パキラは、カディネン系抗菌物質を表皮に局在させ、髄では微生物の感染刺激により抗菌物質を誘導生成、ナス科台木は、ナス科植物の感染後抗菌物質として知られるセスキテルペン類を根部で大量に生成し、その一部を根より放出していることを明らかにした。

(2) 植物とその周辺に共存する微生物との相互作用の解析を行なった。アカエゾマツの種子には、ポリケタイド系抗生物質を生産するペニシリウム属カビの胞子が付着していて、種子発芽時にこれらのペニシリウム属カビが化学的あるいは生物的效果を及ぼして、苗立ち枯れ病菌を抑制していることを実験的に証明した。また、葉面着生菌の安息香酸やケイ皮酸脱炭酸反応を介した植物病原糸状菌の抑制機構、チモシーエンドファイトの病原抵抗性亢進への寄与の様式、アブラナ科植物の根圏微生物相の特性を生態化学的視点から解明した。

(3) 病原性卵菌の遊走子を用いた生物検定と卵菌類の病原防除に関する検討を行なった。卵菌の一種である *Aphanomyces cochlioides* は遊走子を形成し、宿主成分に誘引され、非宿主成分には多様な応答を示す。本遊走子の応答を指標に、スベリヒユの遊走子遊泳阻止作用物質を同定した。また、遊走子は内分泌攪乱物質のビスフェノール A や合成エストロジェンのジエチルスチルベストロールを極めて敏感に感知して回避することを発見した。一方、卵菌類によるテンサイ苗立ち枯れ病の微生物防除資材として期待されている *Xanthomonas* sp. の機能発現に関わる抗生物質 *xanthobaccin* 類を単離し、それらの構造を決定した。

(4) 植物病原菌の感染過程および植物の防御に関わる情報伝達の解析を行なった。ハウレンソウ根腐れ病菌の遊走子は、宿主成分に誘引され根の表面に集積、被嚢化、発芽、侵入する。この過程で見られる卵菌類遊走子の遊泳停止・被嚢化は宿主特異的誘引物質に触発され、G-protein activator の mastoparan で促進、phosphokinaseC 阻害剤の neomycin で遮断されたので、G 蛋白質共役型受容体と phospholipase C が関与すると判断された。一方、外的ストレスに応答して、感染防御に関わるイソフラボノイド相に多様な変化をもたらすルーピン類の子葉や胚軸を用いて、代謝変動に対する植物情報物質の効果解析した。