「生体防御のメカニズム」
平成７年度採択研究代表者

岩村　俶

（京都大学大学院農学研究科　教授）

「植物の感染防御機構の生物有機化学的解明」

１．研究実施の概要

⑴　Dimethoxybenzoxazinoneがコムギにおいて誘導発現することの発見、benzoxazinone類生合成に与るコムギゲノムおよび染色体の特定、トウモロコシ従属栄養期に発現するbenzoxazinone glucosyltransferaseの単離精製、特性および内部配列の解析、オオムギ防御物質hordatineのコムギにおける発現。

⑵　エンバクのファイトアレキシンavenanthramide類の生合成過程のエリシターによる酵素活性の誘導を指標にした解析、およびアカツメグサにおけるヒドロキシ桂皮酸アミド類のジャスモン酸による誘導の解析を行った。

⑶　バナナ未熟果実より４つの新規フェニルフェナレノン型ファイトアレキシンを同定した。バナナのフェニルフェナレノンはcinnamic acid２分子とmalonic acid１分子から生合成されることを明らかにした。またアブシジン酸の受容体探索のため、デキサメタソンとのヘテロダイマーを合成した。

⑷　イネのファイトアレキシンの誘導機構および生合成経路の解析を行った。

⑸　生物検定を指標に、植物病原菌遊走子の誘引物質や野生植物の抗菌物質の構造・生成様式を追究した。

⑹　植物着生菌や植物内生菌、根圏微生物と宿主植物の相互作用を病原抵抗性昂進の面から検討した。

２．研究実施内容

⑴　コムギおよびトウモロコシの従属栄養期における特異的防御機構

ａ）Benzoxazinone類を防御物質として持つトウモロコシおよびムギ類にはいわゆる誘導性物質（phytoalexins）は知られていなかったが、dimethoxybenzo-xazinone がエリシター処理により特異的に誘導されること、ならびにその発現メカニズムを明らかにした。

ｂ）種々の染色体置換系統コムギを用いてにおいてbenzoxazinione類の発現に関わる遺伝子が複数のＢゲノム染色体上に存在すること、その発現を複数のＤ染色体上にある遺伝子が抑制していることを明らかにした。

ｃ）トウモロコシ従属栄養期特異的benzoxazinone glucosyltransferase（２種）を精

製単離し、部分的内部配列を解析し、それが報告されている植物タンパク質のそれとは相同しないことを知った。

d）オオムギ染色体のコムギへの添加系統を用いて、オオムギの強力な抗菌物質hordatineがオオムギ２H染色体上にあること、そしてそれがコムギ添加系統で有効に発現する事を明らかにした。これにより染色体工学的手法が新規耐病性育種に有効であることを示した。

⑵　誘導発現するヒドロキシ桂皮酸アミド類の機能

a）エンバク、トウモロコシ、およびオオムギにおけるストレスによるアミド化合物の誘導について解析した。エンバクではavenanthramide類がそのファイトアレキシンとして同定されているが、その生合成酵素活性、特に、アントラニル酸生合成系について、エリシターによる誘導を指標に解析した。また、標識したavenanthramide類が細胞壁に顕著に取り込まれることが見い出された。トウモロコシでは、傷害ストレスによるヒドロキシ桂皮酸アミドの誘導について解析し、アミド化合物およびその生合成酵素が傷害によって誘導されることが明らかになった。さらに、オオムギではジャスモン酸およびアブシジン酸によってアミド化合物が誘導されることを発見し、その構造をp-coumaroylagmatineおよびp-coumaroylhydorxyagmatineと同定した。

b）レッドクローバーにおいてジャスモン酸が新たな二次代謝成分を誘導することを見いだし、その構造を解析した。その結果、これらの物質はcaffeoyol DOPA（クローバミド）などのヒドロキシ桂皮酸のアミド化合物であることを明らかにした。

⑶　未熟果実のファイトアレキシンと動的感染防御機構

バナナ未熟果実より４つの新規フェニルフェナレノン型ファイトアレキシン、1,2-trans-2,3-cis-2,3-dihydro-1,2,3-trihydroxy-4-（4'-hydroxyphenyl）phenalene ⑴、2-hydroxy-4-（3',4'-dihydroxyphenyl）phenalen-1-one ⑵、2-（4'-hydroxyphenyl）-8-formyl-1-naphthalic acid ⑶、7-（4'-hydroxyphenyl）-8-formyl-1-naphthalic acid ⑷を単離同定した。１は生合成中間体と考えられていた化合物であり、今回はじめてその天然存在を確認した。13Cでラベルしたcinnamic acidとmalonic acidの投与実験の結果、cinnamic acid２分子とmalonic acid１分子がフェニルフェナレノンに取り込まれた。このことは、バナナ（Musaceae科）のフェニルフェナレノン生合成はHaemodoraceae科植物とほとんど同じであることを示している。

アブシジン酸は植物に感染抵抗性を誘導する場合が知られている。そのシグナル伝達に関わる受容体の同定は、抵抗性発現メカニズムを理解する上で重要である。酵母three-hybrid法によってアブシジン酸の受容体をクローニングするために、第一段階としてアブシジン酸とデキサメタソンからなるヘテロダイマーを合成し

た。

⑷　イネのファイトアレキシンの動的発現機構

エチレンは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蓄積を誘導するが、テルペノイド系のモミラクトン A の蓄積はほとんど誘導しないことを明らかにした。イネの培養細胞においては顕著なエリシター活性を示すキチンオリゴ糖がイネ葉身に処理をした場合にはほとんどファイトアレキシンを誘導せず、培養細胞ではエリシター活性を示さないキトサンオリゴ糖が葉身においては強いエリシター活性を示すことを明らかにした。

ジベレリン生合成の阻害剤として知られるシトクロムP450酸化酵素阻害剤のパクロブトラゾールを処理することによって、紫外線照射や塩化銅ストレスによるモミラクトン A の誘導が阻害されることを確認した。また、生合成が阻害されことにより、モミラクトン類やオリザレキシン類の前駆体と考えられるジテルペン類が蓄積することをGC/MS分析によって明らかにした。

⑸　野生植物の化学的防御機構

野生植物の防御物質探索のため、バラ科キンミズヒキ（*Agrimonia pirosa*）の構成的抗菌物質を検討し、フロログルシノールオリゴマー構造を有する活性本体の部分構造を明らかにした。また、老化ルーピンの根に含まれ2'-hydroxygenistein を基質としてペルオキシダーゼを作用させた反応生成物中にも生成する抗菌成分を探索し、新しいタイプのイソフラボン二量体２種を単離、構造解析した。 抗菌活性は単量体の100-1000 倍であった。

ホウレンソウ根腐れ病菌（Aphanomyces cochlioides）の遊走子の宿主特異的成分に対する走化性を解析し、フォトアフィニティーラベル化を試みるとともに、アミド系とフラボノイド系誘引物質に対する特異的レセプターの存在を証明した。

栽培ナス用台木植物の主たる抗菌物質ルビミンを出発材料にして関連化合物を調製し、新規化合物の推定構造確認とそれらの抗菌スペクトルを完成させた。

⑹　化学物質を介した栽培植物および近縁野生植物と微生物の相互作用

ハマナスの葉から、4- ヒドロキシ安息香酸型カルボン酸類を単純フェノール類へ脱炭酸する葉面着生細菌、Phyllobacterium sp.を分離し、生成物の抗菌活性が増大することを見い出した。ルーピン（*Lupinus albus*）子葉をジャスモン酸やサリチル酸処理に対する応答反応として、組織中のイソフラボンレベルの上昇、特異的プレニル化を定量的に解析した。

アブラナ科コショウソウ根内由来の*Fusarium* 属糸状菌は、ミロシナーゼ活性を有し、カラシ油成分に耐性を示した。また、この菌の接種により病原菌*Pythium ultimum*によるコショウソウの発病率が低下した。イヌビエ根圏定着菌として分

離された糸状菌はアルファルファやオランダガラシの苗立枯れ病菌*Pythium rostratum*と同定されたが、イネ科のイネやヒエには病原性を示さなかった。

エンドファイト感染による抵抗性発現にはファイトアレキシンや解毒代謝能に関する低分子化合物が関与せず、干渉型ではなく消費型の競合による可能性が考えられる。

３．主な研究成果の発表（論文発表）

○Oikawa, A., Ebisui, K., Sue, M., Ishihara, A. and Iwamura, H. Purification and characterization of a β-glucosidase specific for 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) glucoside in maize. Z. Naturforsch, 54c, 181-185 (1999)

○Ishihara, A., Ohtsu, Y. and Iwamura, H. Induction of biosynthetic enzymes for avenanthramides in elicitor-treated oat leaves. Planta, 208, 512-518 (1999)

○Tanabe, J., Sue, M., Ishihara, A. and Iwamura, H. Occurrence and characterization of 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one and indole hydroxylases in juvenile wheat. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63, 1614-1617 (1999)

○Nomura, T., Sue, M., Horikoshi, R., Tebayashi, S., Ishihara, A., Endo, T. R. and Iwamura, H. Occurrence of hordatines, the barley antifungal compounds, in a wheat-barley chromosome addition line. Genes & Genetic Systems, 74, 99-103 (1999)

○Matsukawa, T., Isobe, T., Ishihara, A. and Iwamura, H. Occurrence of avenanthramides and hydroxycinnamoyl-coA: hydroxyanthranilate *N*-hydroxycinnamoyltransferase activity in oat seeds. Z. Naturforsh, 55c, 30-36 (2000)

○Sue, M., Ishihara, A. and Iwamura, H. Purificaiton and characterizaiton of a hydroxamic acid glucoside β-glucosidase from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Planta, 210, 432-438 (2000)

○Sue, M., Ishihara, A. and Iwamura, H. Purification and characterization of a β-glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. Plant Sci., 155 , 67-74. (2000)

○Nakazato, Y., Tamogami, S., Kawai, S., Hasegawa, M. and Kodama, O. Methionine-indeuced phytoalexin production in rice leaves. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 577-583 (2000)

○Shibatani, M., Hashidoko, Y. and Tahara, S. A major fungitoxin from *Pachira aquatica* and its accumulation in outer bark. J. Chem. Ecol., 25, 347-353 (1999)

○Ma, W. G., Fukushi, Y., Ducrey, B., Hostettmann, K. and Tahara, S. Phenolic glycosides from *Eriosema tuberosum*. Phytochemistry, 51, 1087-1093 (1999)

○Hashidoko, Y., Nakayama, T., Homma, Y. and Tahara, S. Structure elucidation of xanthobaccin A, a new antibiotic produced from *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88. Tetrahedron Letters, 40, 2957-2960 (1999)

○Yamaji, K., Fukushi, Y., Hashidoko, Y., Yoshida, T. and Tahara, S. Characterization of antifungal metabolites produced by Penicillium species isolated from seeds of *Picea glehnii*. J. Chem. Ecol., 25, 1643-1653 (1999)

○Ma, W. G., Fukushi, Y. and Tahara, S. Fungitoxic alkaloids from Hokkaido *Corydalis species*. Fitoterapia, 70, 258-265 (1999)

○Ma, W. G., Mizutani, M., Malterud, K. E., Lu, S. L., Ducrey, B. and Tahara, S. Saponins from the roots of *Panax notoginsen*. Phytochemistry, 52, 1133-1139 (1999)

○Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J. and Tahara, S. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. Appl. Environ. Microbiol., 65, 4334-4339 (1999)

○Greulich, F., Horio, E., Shimanuki, T., and Yoshihara, T. Field results confirm natural plant protection by an endophytic fungus *Epichloe* typhina against the pathogenic fungus *Cladosporium phlei* on timothy leaves. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 65, 454-459 (1999)

○Shibatani, M., Hashidoko, Y. and Tahara, S. Accumulation of isohemigossypolone and its related compounds in the inner bark and heartwood of diseased *Pachira aquatica*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63, 1777-1780 (1999)

○Sakasai, M., Fukui, H., Yamane, H., Kyaw, A. N. and Tahara, S. A new class of biflavonoids: 2'-hydroxygenistein dimers from the roots of white lupin. Z. Naturforsch., 55c, 165-174 (2000)

○Hashidoko, Y., Endoh, K., Kudo, T. and Tahara, S. (+)-4-Epi- α-bisabolol as a major sesquiterpene constituent in the leaves of two *Rose rugosa* hybrids, Martin Frobisher and Vanguard. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 907-910 (2000)

○Farooq, A. and Tahara, S. Fungal metabolism of flavonoids and related phytoalexins. Current Topics in Phytochemistry, 2, 1-33 (1999).

○Yoshihara, T. Chemistry of endophytic mycotoxins. Mycotoxins, Supplement '99, 126-130 (1999).