

.....
 解 説

種子発芽時に生成する抗菌性物質

鈴木 義勝, 山口 勇

理化学研究所微生物制御研究室

(平成 10 年 5 月 20 日受理)

Antimicrobial Agents (Phytoanticipins) in Gramineae Crops, Produced Specifically during Seedling Stage

Yoshikatsu SUZUKI and Isamu YAMAGUCHI

The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Hirosawa, Wako 351-0106, Japan

はじめに

植物は各種植物病原菌や他の微生物と相互作用をしているが、その中の特定の病原菌により、また特定の器官・生育ステージに高い確率で感染・罹病する。このことは植物は生体防御機構を備えており、それらの発現が器官・生育ステージに特異的であることを示唆しているとも言える。他方、病原菌は植物が備えている種々の静的・動的な生体防御機構に打ち勝って侵入・感染を果たす。このような植物の持つ防御機構の一つに、植物が成長過程で生成・蓄積し、抗菌活性を示す二次代謝産物がある。これらは感染前の植物に存在するプロヒビチン、抗菌不活性前駆体として感染前の植物に存在し、感染により抗菌活性を示す分子に変化するポストインヒビチン、また健全植物には存在しないが感染に呼応して *de novo* で生合成されるファイトアレキシンとに分類される。特に感染によって増加するプロヒビチンをインヒビチンという。VanEtten らは、プロヒビチンとポストインヒビチンを併せたものを“ファイトアンティシピン”(Phytoanticipins)と定義し、ファイトアレキシンと区別することを提唱した¹⁾。ファイトアンティシピンは、植物の特定器官あるいは外皮細胞に高濃度で局在していることと、ファイトアレキシンより病原菌への対応が迅速であるという特徴をもつ。このことからファイトアンティシピンは主に病原菌の侵入抵抗性に、ファイトアレキシンは病原菌侵入後の感染・菌糸伸長抵抗性に関わっているとされている。

従来、このような植物由来の抗菌性物質の研究対象の多くは光合成を行う独立栄養成長時の幼植物ないし成体植物で行われて、従属栄養成長時の植物を対象とする研究は非

常に少ない。独立栄養成長時とは異なる一次代謝系を持つ従属栄養成長時は、その防御機構にも違いが存在するとの考えから、従属栄養成長時の芽生え植物で発現される防御機構に関する研究を開始した。対象植物として選んだイネ科穀物の幼植物の多くはポストインヒビチンであるベンゾオキサジンのグルコース付加体を共通に蓄積している。病原菌感染あるいは昆虫による咬害を受けるとその付加体は抗菌活性・昆虫忌避活性をもつベンゾオキサジンに変化して防御機能を発揮する。ところが、イネ科の穀物植物の中で、イネ、ソルガム、オオムギ、エンバクの4種はこのポストインヒビチンを全く含有せず、したがってベンゾオキサジン付加体に代わるファイトアンティシピンの存在が期待された。

本総説ではイネ科の穀物植物からこれまでに発見されているファイトアンティシピン類について概説後、イネとソルガムの従属栄養成長期にある種子発芽時に生成する抗菌性物質について筆者らが研究してきた成果を中心に述べる。

イネ科の穀物植物に存在するファイトアンティシピン類

これまでに報告されているイネ科穀物植物のファイトアンティシピン類の中で *avenacosides* (1), *hordatine glucosides* (4), *benzoxazinone glucoside* (5) がポストインヒビチンにあたる(図1)。*Avenacosides* はエンバクの幼茎葉、*hordatine glucosides* はオオムギの幼茎、*benzoxazinone glucoside* はトウモロコシとムギ類の幼茎葉に局在する。これらのポストインヒビチン類は感染によって宿主の *glucosidase* が活性化され、その結果、下線で示したグルコースが除去され抗菌活性を示す。エンバクの β -oxidase

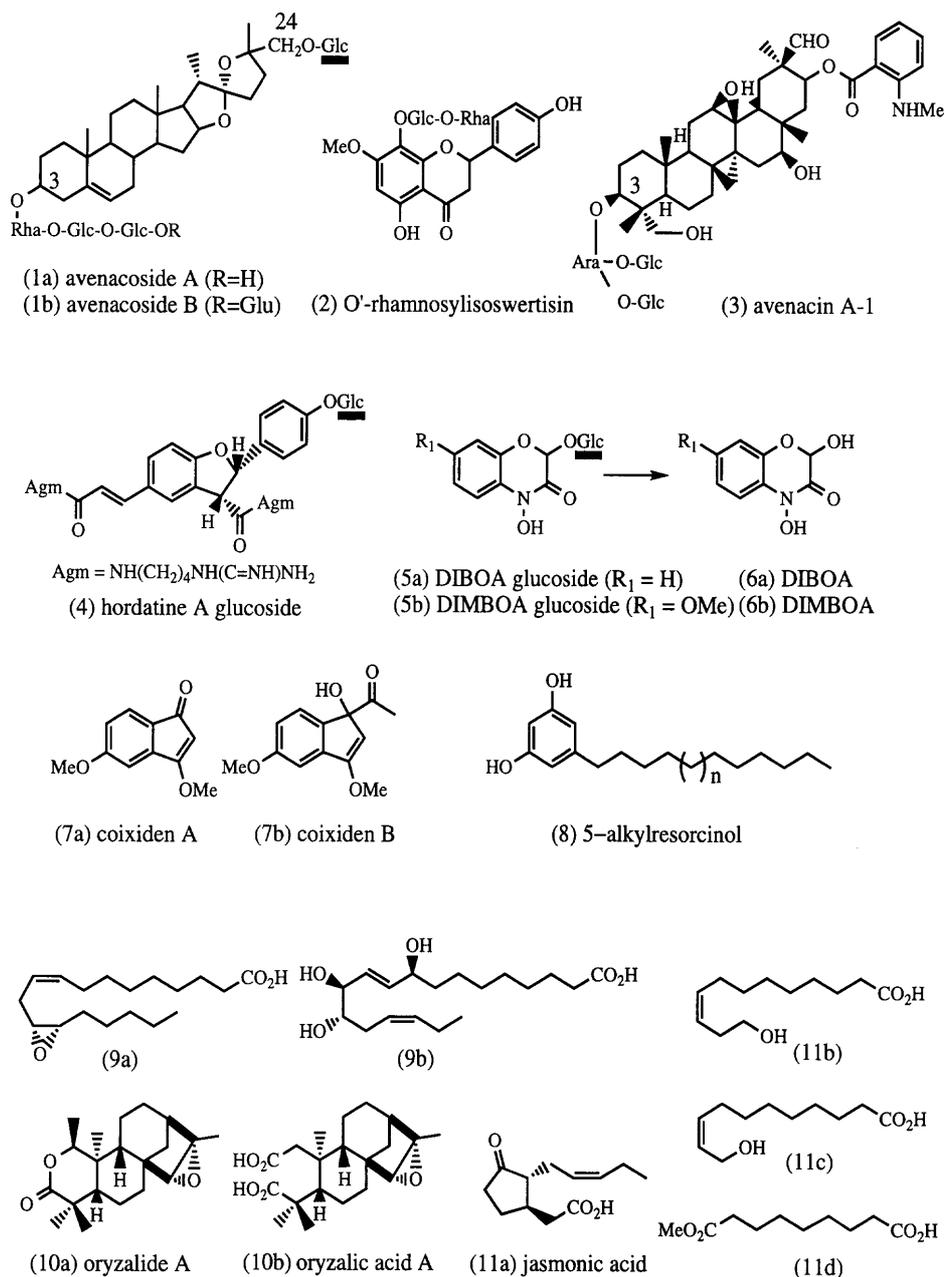


図1 イネ科穀物植物に存在するファイトアンティシピン類

は avenacosides の C-24 位グルコースのみを特異的に分離する²⁾。コムギに感染できないがエンバクに感染できる糸状菌 *Septoria avenae* は avenacosides の C-3 糖鎖を分離して無毒化する³⁾。エンバクには avenacosides 以外に、幼葉に *O*-rhamnosylisowertisin (2), 根に avenacins (3) というプロヒビチンも存在する。コムギにも感染できるエンバクの立枯れ病菌 *Gaeumannomyces graminis* は avenacins の C-3 糖鎖を分離して無毒化する。この分解酵素に変異を起こさせた立枯れ病菌変異株はエンバクには感染できなくなるが, avenacins を持たないコムギには感染できる。糖鎖分解酵素をエンバクに感染できない糸状菌 (*Neurospora crassa*) に導入すると感染できるようになり, 糖鎖分解酵素の有無によってエンバクに対する宿主範囲が決定される⁴⁾。ハト

ムギの幼植物には coixidens (7), ムギ類の種子には 5-alkylresorcinols (8), ジャポニカ系栽培イネの成葉には酸化型脂肪酸類 (9) とオリザライド類 (10)⁵⁾が, 野生型イネ (*Oryza officinalis*) の成葉には酸化開裂型脂肪酸類 (11)⁶⁾が存在する。ソルガムとサトウキビのファイトアンティシピン類は報告されていない。

イネ黄化芽生えに蓄積する抗菌性物質

5-アルキルレゾルシノール (AR) の同定

新鮮重量濃度でイネいもち病菌の胞子発芽を 100%阻害したイネ (cv. RD-25) 黄化芽生えから抗菌性物質 5-アルキルレゾルシノール (AR) が単離された^{7,8)}。AR はアルキル鎖に関する 6 種の同族体混合物 AR_{13:0}-AR_{17:0}であった (図

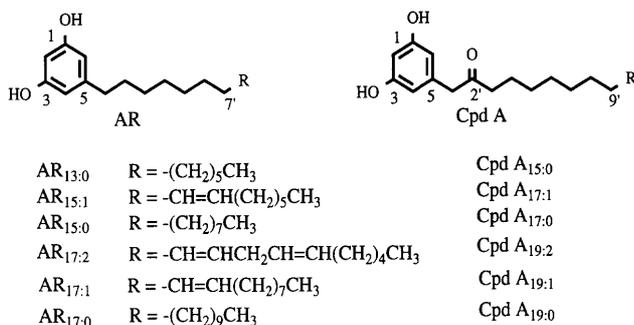


図2 黄化芽生えイネから単離された抗菌性物質 AR とその関連物質 Cpd A

2). アルキル鎖の二重結合の位置はタンデム質量分析計を用いた FAB/MS/MS 法により、一不飽和体は 8'位, 二不飽和体は 8', 11'位と決定した。

イネ AR の蓄積・代謝⁹⁾

AR は種子には全く存在せず, 播種 4 日目以降ほぼ直線的に増加する。ところが, 連続光あるいは明/暗条件下で調製した緑色芽生えの AR 蓄積量は黄化芽生えの 5%程度で, AR の蓄積は黄化体に特異的であった。大部分の AR は根と種子地下部に存在し, 緑色芽生えでも地下部に限ると 34 $\mu\text{g/g fr. wt}$ とかなりの蓄積が見られた (図3)。AR の蓄積が黄化芽生えに特異的であることは黄化芽生えを光に曝すとその含量が短時間で急激に減少することからも明らかである (図4)。緑色芽生えを暗所に移しても AR の蓄積は認められない。AR の蓄積量は生合成と代謝分解活性との差であることを考えると, 明条件下で AR 生合成は抑制され, 他方, AR の代謝活性は飛躍的に促進されることが示唆される。現在, AR の代謝産物の同定には成功していないが, 黄化芽生えと光照射処理後の黄化芽生えで同族体組成比に差が認められないことから AR の代謝分解がレゾルシノール環上で起きることが示唆される。

イネ黄化芽生えにおける AR の蓄積能はインディカ系栽培種, 雑草型と野生型イネに認められ, イネ科イネ属に広く保存されている。ところが, ジャポニカ系栽培種は痕跡程度しか検出されないという興味深いことが示された (図5)。このことは, イネの祖先種からジャポニカとインディカ系栽培種に分岐する段階, あるいはジャポニカ系栽培種が熱帯系と温帯系種に分岐する段階で AR 生合成あるいは AR 代謝に関わる酵素の一部が変異した結果であろう。また, 野生型イネの中で, 栽培イネの祖先種に近縁な野生型種 (W-1192) は, 雑草型イネやインディカ系栽培イネと同じ同族体組成比を示すが, 栽培イネの祖先種からは遠縁な野生型種 (W-0019, W-0002) の同族体組成比とは明らかな違いが見られ, 遠縁野生型イネから近縁野生型イネへの進化の過程で, 同族体組成の変化を伴ったことになる。野生型イネ間の分類に化学的指標として AR 同族体組成比の利用が期待できる。

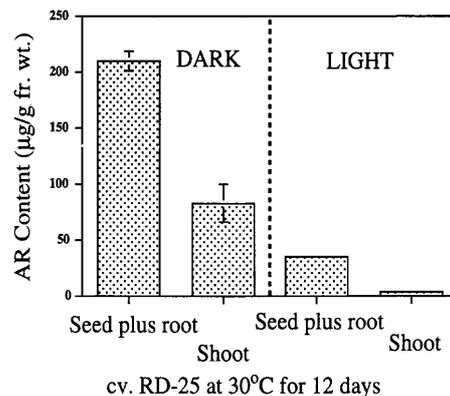


図3 AR の蓄積部位

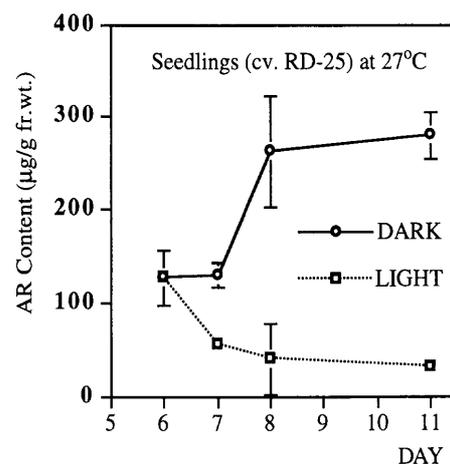


図4 AR 蓄積に対する光条件の影響

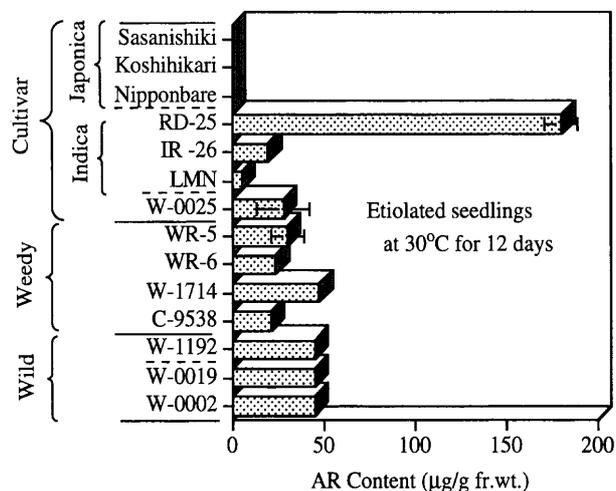


図5 各種イネ植物—栽培種/雑草型/野生型—黄化芽生えの AR 蓄積能

いもち病 (レース: 007) に強い野生型イネでも AR 含量は中程度の抵抗性を示す RD-25 の 1/4 程度かそれ以下の例が見られ, AR 蓄積能といもち病抵抗性とは必ずしも比例せず両者の相関性は認められない。

イネの AR 関連物質¹⁰⁾

AR はイネ科をはじめとする高等植物, 褐藻, 放線菌, バ

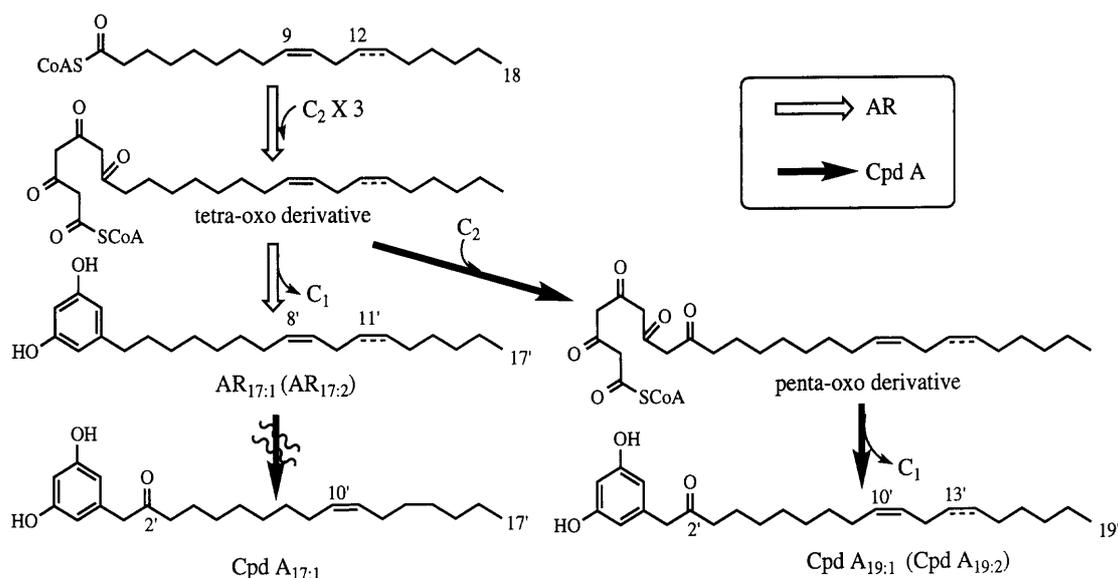


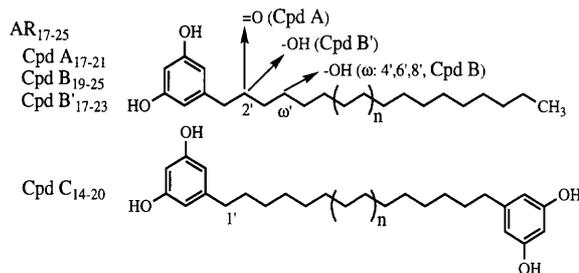
図6 AR と Cpd A の推定生合成経路

クテリア等、多様な生物種に見いだされている。その生合成経路について実験的に証明はなされていないが、テトラオキソ体が前駆体となって環化・脱炭酸反応を経る説¹¹⁾が提唱されている(図6)。バクテリアでは β -hydroxybutyric acidが効率よくARに取り込まれる¹²⁾。イネ黄化芽生えのAR生合成系を用いて高等植物におけるAR生合成経路の解明を目的にAR関連物質の探索を行い、2'-オキソ-アルキルレゾルシノール(Cpd A)を微量単離した¹⁰⁾。ARと同様に、Cpd Aもアルキル鎖に関する6種同族体混合物Cpd A_{13.0}-Cpd A_{19.0}であった(図2)。Cpd Aのアルキル鎖の二重結合位置が一不飽和体で10'位、二不飽和体で10', 13'位であることから、Cpd Aの2'-オキソ基は、AR生成後に酸化反応によって導入されたのではなく、テトラオキソ体にもう1分子の酢酸単位が縮合してペンタオキソ体となり、これがAR推定生合成経路と同様の環化・脱炭酸反応を受けると考えると説明がつく。したがって、イネでも従来から提唱されてきたAR生合成経路が存在することになる。

コムギおよびライムギ種子に存在するARの同定

Gohilらは小麦、ライ麦種子に大量に含まれるARについてGC/MS法によりアルキル鎖の炭素数を分析している¹³⁾。そして、同一鎖長のアルキル鎖に関して、一不飽和体は二重結合位置に関する異性体混合物であることを報告しているが、それらの位置に関しては不明であった。我々は前述のFAB/MS/MS法を用いて二重結合位置を決定した。二不飽和体は、一不飽和体と異なり同一鎖長のアルキル鎖に関して単一成分であった¹⁴⁾。それらの二重結合位置はアルキル基の鎖長に関係なく何れもメチル基側からC/6とC/9位で、イネのARとは異なる(図7)。

飽和アルキル体



不飽和アルキル体 (*モノエン体)

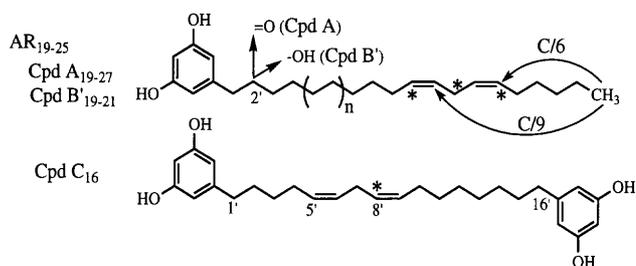


図7 ライムギ種子から単離されたARとその関連物質 Cpd A, B, B', C

ライムギ種子に存在するAR関連物質

ライムギ種子からAR関連物質を探索し、4種の微量成分2'-オキソ体(Cpd A)、 ω' -ハイドロキシ体(Cpd B)、2'-ハイドロキシ体(Cpd B')、ビス体(Cpd C)を何れもアルキル鎖に関する同族体混合物として単離した(図7)。このうち、Cpd AとB'についてアルキル鎖の二重結合位置を決定した。一不飽和体は位置異性体の混合物、二不飽和体は単一成分で、ライムギARの結果と同様であった。二不飽和体の二重結合はライムギARと同様アルキル基の鎖長に関係なく何れもメチル基側からC/6とC/9位に存

在した。この結果は対応するアルキル鎖を有するライムギ AR の二不飽和体の二重結合位置と完全に一致し、二重結合の位置を指標に 2'-オキシ基の導入時期を一義的に決定できなかった。しかし、AR の主成分が AR₁₇から AR₂₁であるのに対し、Cpd A の主成分は Cpd₁₉と Cpd₂₃で、炭素 2 個分のシフトが認められ、このことからアルキル鎖への酸素官能基の導入はイネの場合と同様であると考えている。

ソルガムの黄化芽生えに蓄積する抗菌性物質

3-Pentadecatrienylbenzoquinone (Q-1) の同定

モロコシの黄化芽生えと緑色芽生え抽出物の抗菌活性を比較して、緑色体の約 10 倍もの高い抗菌活性を示した黄化体から抗菌性物質 Q-1 と微量の Q-1 代謝産物 Q-2 を単離した¹⁵⁾。Q-1 は Chang らが同じソルガムの根部から単離した 3-pentadecatrienylbenzoquinone¹⁶⁾と一致した。Q-1 はトウモロコシとソルガム系牧草類の根部に半寄生する植物 *Striga asiatica* の種子発芽促進物質 (hydroquinone) の自動酸化物として報告されている。Q-2 は Q-1 の α -ケトール間で酸化開裂したと考えられるジカルボン酸であった (図 8)。

Q-1 の蓄積・代謝

イネにおける AR の場合と同様に、光の有無による Q-1 蓄積に対する影響を見ると、緑色芽生えの Q-1 蓄積量は黄化体の約 20%強で、Q-1 の蓄積は黄化体に特異的であった。黄化体における Q-1 蓄積量は播種 2 日目以降直線的に増加した。この黄化芽生えを連続光にさらすとその含有量は短時間で急激に低下し、黄化芽生えイネの AR と同様の現象が見られた。この現象を利用して、光照射処理後の黄化芽生えソルガムから代謝産物 Q-3 を単離した。Q-3 は Q-1 の C-2 炭素が酸化によって離脱したラクトール構造であった (図 8)。Q-1 は暗条件で Q-2 へ、明条件で Q-3 へと別々の経路で代謝される。

イネとソルガムの黄化芽生えに蓄積する抗菌性物質の役割

イネとソルガムの黄化芽生えから従属栄養成長期に特異

的に生成する抗菌性物質として AR と Q-1 を同定した。AR のイネいもち病菌に対する孢子発芽阻害活性は 150 $\mu\text{g/ml}$ で 100%, 45 $\mu\text{g/ml}$ で 50%である⁷⁾。オオムギ種子の病原糸状菌 (*Aspergillus niger* と *Penicillium crysogenum*) に対する抵抗性が AR 含有量と相関すること¹⁷⁾、イネ科植物ではないが、マンゴーの未熟果皮に存在する AR がこれに感染する病原糸状菌に対する抵抗性と相関すること¹⁸⁾が報告されている。他方、Q-1 のイネいもち病菌に対する ED₅₀は約 6 ppm と植物由来としては高い抗菌活性を示す。その際、キノンとエノール水酸基がともに存在することが高活性の発現に必須である¹⁵⁾。しかし、現在のところ、病害防御への AR と Q-1 の役割は不明である。AR、Q-1 とともに黄化芽生えでは抗菌作用が機能するに十分な濃度となる。その際、その地上部にも地下部の 50%弱の蓄積が認められ、両物質は従属栄養成長期に特異的な防御機構として機能する可能性が示唆される。一方、その緑色芽生えあるいは光照射処理後の黄化芽生えに認められる AR と Q-1 は低濃度であるが、その大部分は地下部の表皮近傍^{8,16)}に局在していると推測され、緑色芽生えでも発芽初期の地下部の防御機構に関わっている可能性がある。

おわりに

イネとソルガム黄化芽生えに蓄積した AR と Q-1 のように、従属栄養成長期は独立栄養成長期と異なるファイトアンティシピン類の存在が明らかになった。また光によりそのファイトアンティシピンの蓄積・代謝が大きな影響を受けた。このことは二次代謝産物代謝の光による制御という面からも興味深い知見を提供する可能性がある。最近、岩村らはコムギ、トウモロコシ、ライムギ等の幼植物に蓄積されるポストインヒビチンとしてのベンゾキサジン-グルコシド付加体とは別に、これらの従属栄養成長期の芽生えにベンゾキサジンそのものが急速に生成・蓄積し、独立栄養成長期に入るとともに消失すること、またその生成・蓄積・代謝は感染や傷害では影響を受けないということを報告している¹⁹⁾。図 1 で示したプロヒビチンの中にも今後の検討により従属栄養成長期に特異的な防御機構として機能することが明確になる可能性がある。このような従属栄養成長期に特異的な防御機構は、これに関する研究を進展させ、また一般化を図ることによって、植物保護に役立つ新たなターゲットになることが期待される。また、他科植物におけるこのような特異的なファイトアンティシピン類の探索は天然物化学研究の対象としても期待できる。

引用文献

- 1) H. D. VanEtten, J. W. Mansfield, J. A. Bailey & E. E. Farmer: *The Plant Cell* **6**, 1189 (1994)
- 2) H. Nisius: *Planta* **173**, 474 (1988)

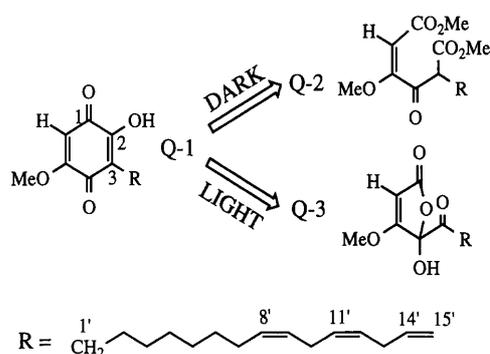


図 8 黄化芽生えソルガムから単離された抗菌性物質 Q-1 とその代謝産物 Q-2、Q-3

- 3) J. P. Wubben, K. R. Price, M. J. Daniels & A. E. Osbourn: *Phytopathology* **86**, 986 (1996)
- 4) P. Bowyer, B. R. Clarke, P. Lunness, M. J. Daniels & A. E. Osbourn: *Science* **267**, 371 (1995)
- 5) M. Watanabe, Y. Sakai, T. Teraoka, H. Abe, Y. Kono, J. Uzawa, K. Kobayashi, Y. Suzuki & A. Sakurai: *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1103 (1990)
- 6) Y. Suzuki, O. Kurita, Y. Kono, H. Hyakutake & A. Sakurai: *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 2049 (1995)
- 7) Y. Suzuki, Y. Esumi, H. Hyakutake, Y. Kono & A. Sakurai: *Phytochemistry* **41**, 1485 (1996)
- 8) M. L. Bouillant, C. Jacoud, I. Zanella, J. Favre-Bovin & R. Bally: *Phytochemistry* **35**, 769 (1994)
- 9) Y. Suzuki, C. Saitoh, H. Hyakutake, Y. Kono & A. Sakurai: *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1786 (1996)
- 10) Y. Suzuki, Y. Esumi, T. Saito, Y. Kishimoto, T. Morita, H. Koshino, J. Uzawa, Y. Kono & A. Sakurai: *Phytochemistry* **47**, 1247 (1998)
- 11) A. J. Birch, R. A. Massy-Westropp & C. J. Moye: *Aust. J. Chem.* **8**, 539 (1955)
- 12) C.-J. Su & H. L. Sadoff: *J. Bacteriol.* **147**, 91 (1981)
- 13) S. Gohil, D. Pettersson, A. C. Salomonsson & P. Aman: *J. Sci. Food Agric.* **45**, 43 (1988)
- 14) Y. Suzuki, Y. Esumi, M. Uramoto, Y. Kono & A. Sakurai: *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 480 (1997)
- 15) Y. Suzuki, Y. Kono, T. Inoue & A. Sakurai: *Phytochemistry* **47**, 997 (1998)
- 16) M. Chang, D. H. Netzly, J. G. Butler & D. G. Lynn: *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7858 (1986)
- 17) S. Garcia, C. Garcia, H. Heinzen & P. Moyna: *Phytochemistry* **44**, 415 (1997)
- 18) M. Cojocar, S. Droby, E. Glotter, A. Goldman, H. E. Gottlieb, B. Jacoby & D. Prusky: *Phytochemistry* **108**, 1093 (1986)
- 19) E. Nakagawa, T. Amano, N. Hirai & H. Iwamura: *Phytochemistry* **38**, 1349 (1995)

略歴

鈴木義勝

生年月日：1945年4月8日

最終学歴：1973年3月名古屋大学農学研究科（農芸化学）
博士課程

趣味：早朝の散歩、プロ野球のテレビ観戦（ドラゴンズを応援）