

植物病原菌由来ストリゴラクトン様分子の探索

瀬戸 義哉
明治大学 農学部

研究の目的

ストリゴラクトン（以下 SL）は、作物生産において大きな被害をもたらしている根寄生雑草に対する発芽誘導分子として最初に見出された分子である。根寄生雑草は、本分子を感知することで、近傍に寄生する相手となるべき植物が存在することを認識し発芽して寄生を開始する。宿主非存在下では生存できない根寄生雑草が獲得した巧妙な生存戦略とすることが出来る。なぜ、宿主となる植物が、自身の生存にとって不利に働く分子を生産するのかという点は、長い間疑問であったが、2005年には、SLが植物にとって重要な共生菌であるアーバスキュラー菌根菌との共生を誘導するシグナル分子であることが明らかになった。さらに、2008年には、植物地上部の枝分かれを制御する、新たなホルモン分子であることも発見された。すなわち、SLは植物の生長制御においてきわめて重要な役割を担っている分子であり、根寄生雑草はそのような分子を自身の発芽のために悪用している、とすることが出来る。

これまで見出されてきた植物ホルモン分子の多くは、植物の代謝物としてだけではなく、特に植物病原性を有する微生物の代謝物としても見出されてきた。一方で、SLに関しては、これまでそのような報告例がない。根寄生雑草防除の観点においては、作物を植える前の圃場に SL 分子を散布することで、根寄生雑草の種子を強制的に発芽させ、枯死においやるという自殺発芽誘導法が考案されてきているものの、SLの量的な供給が一つの大きなハードルとなり実用化には至っていない。一方、SLと同様の活性を有する分子を生産する微生物を見出すことができれば、その微生物を用いた発酵生産により、自殺発芽誘導剤を量的に生産することが可能になることも期待される。

以上のような背景のもと、本研究では、特に植物病原菌代謝産物から SL 様活性を有する分子を探索することを目的とした。

方法

SLは植物においてカロテノイドを前駆体として生合成される。さらに、カロテノイドに光を照射することで、非酵素的な分解を誘導した際に、根寄生雑草に対する発芽誘導分子が生産されるということも報告されていた（寺本ら、第49回植物化学調節学会）。カロテノイドについては、植物のみならず、種々の微生物の代謝産物としても見出されてきているため、植物病原菌の中でも、カロテノイドを生産することが知られている病原菌に着目し、根寄生植物の一種であるヤセウツボに対する発

芽誘導活性を指標に、SL 様分子生産微生物を探索した。本課題の申請時において、植物病原菌の中でも、比較的代表的な糸状菌 A の培養濾液において、根寄生植物ヤセウツボの発芽誘導活性がみられていた。そこで、糸状菌 A と同属の病原菌をさらに複数種類入手し、同様に培養を行い、培養濾液を用いた活性試験を行い、活性分子が同族の糸状菌により広く生産される可能性を検討した。

続いて、より強い活性を示した一つの菌株に絞り込み、培養条件の検討、活性分子の精製条件などを行った。また、植物における SL 受容体である DWARF14 (D14) は、加水分解酵素ファミリーに属しており、SL を受容するとともに、SL に対する加水分解活性を有することが報告されている。我々が見出した、病原菌由来の根寄生植物発芽誘導分子が SL 様の化学構造を有するか否かを考察するための一つの実験として、SL 受容体である D14 により、活性分子が分解されるか否かを調べる実験を行った。

また、SL 様活性分子を生産する糸状菌においては、SL に対して応答する可能性も考えられるため、SL 合成アナログである GR24 を添加した培地にて生育を行い、SL 応答性を検討した。

結果

① 上記の通り、申請時において、活性を確認できていた糸状菌株と同じ属に属する糸状菌をさらに、7 種類入手し、液体培養を行った後、培養液を酢酸エチルにて抽出した。

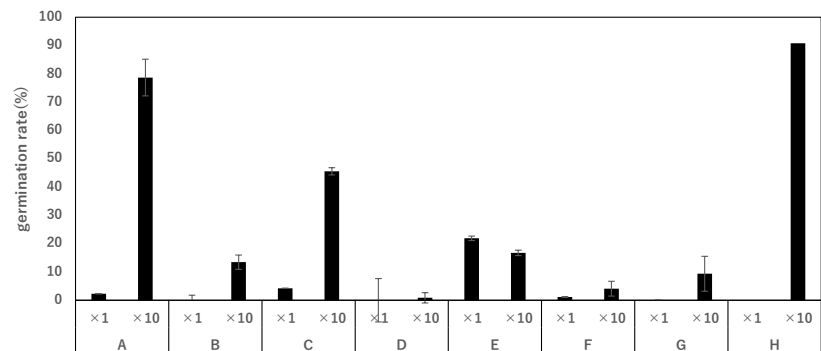


図1; 糸状菌A-Hの培養濾液酢酸エチル抽出物の固相抽出分画後フラクションを用いたヤセウツボ発芽試験結果 (×1、×10は、もともとの培養液と比較した濃度を示す)。

これらの抽出液は、シリカゲル固相抽出カラムを用いて粗精製を行った後に、各フラクションを、根寄生雑草の一種であるヤセウツボ種子に投与した。その結果、試験に供した多くの株において、発芽促進活性を見出すことができた (図 1)。よって、活性分子は、同族の糸状菌に共通の代謝物、もしくは、同様の骨格を有する類縁体分子である可能性が考えられる。

② 上記のスクリーニングにより活性が強かった菌株 A を選抜し、まず種々培養条件の検討を行った。その際、興味深い現象として、活性画分を濃くして与えた際に、発芽促進活性はさほど増加しないものの、発芽後の幼根が短くなるがあった。この結果から、代謝物の中には、発芽促進物質のみならず、発芽を阻害する成分が含まれている可能性が考えられる。こういった点も考慮し、合成培地の一種で

ある、ICI 培地が適していると判断した。続いて、大量培養と活性分子の単離に先立って、種々精製条件の検討も行った。粗抽出物を、シリカゲル順相カラム、ODS 逆相 HPLC カラムでそれぞれ分画し、分画後のフラクションを用いて活性試験を行った。その結果、いずれの場合においても、複数のフラクションにおいて活性がみられたことから、活性分子は複数種存在することが示唆された。

引き続き、上記の通り、SL 受容体を用いた試験を行った。上記のシリカゲル順相カラムによって得られた一つの活性画分をシロイヌナズナにおける受容体である

D14 と予めインキュベートを行った後に、ヤセウツボに対する発芽試験に供した。コントロールとしては、SL 合成アナログである GR24 を用いたが、GR24 の場合には、D14 とのインキュベートにより活性が完全に消失した。一方、糸状菌代謝物の活性フラクションを D14 で処理した後のサンプルにおいては、完全ではないものの、優位に活性が低下した (図 2)。この際、D14 における触媒残基の一つに点変異を導入した変異型タンパク質を用いた場合には、活性が低下しなかったため、活性分子が D14 依存的に分解された可能性が高いと判断した。

- ③ 活性分子を生産することが確認できた病原菌に対し、SL を投与する実験を行った。GR24 を終濃度 1 μM , 10 μM で投与したところ、濃度依存的にコロニーサイズが減少した。さらに、菌糸の生長に異常がみられ、GR24 投与によって、菌糸の生育に異常が見られる様子が観察された。

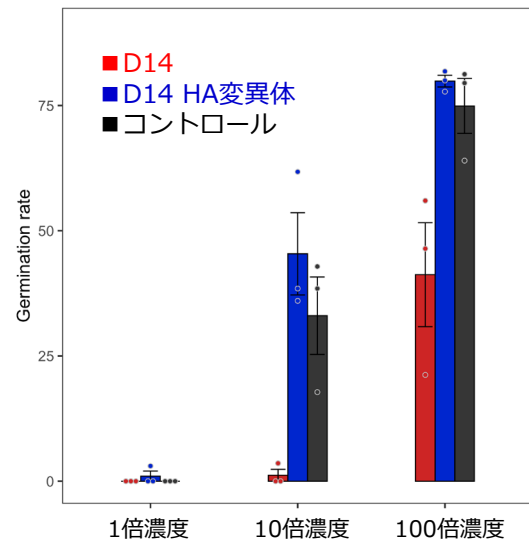


図2: 活性フラクションとD14反応後におけるヤセウツボ発芽試験の結果。

結論

本研究では、植物病原菌から SL 様活性を有する代謝産物を同定することを目的とした。活性分子の単離・同定には至らなかったが、新たに、一つの属に属する複数の病原菌株が活性分子を生産していることを見出した。さらに、活性分子が SL 受容体 D14 によって分解されることが強く示唆された。すなわち、活性分子が SL と類似する化学構造を有する可能性が考えられる。また、活性分子の精製条件の検討もある程度行うことができたため、今後は、大量培養と、活性分子の精製を進め、活性分子の同定を目指したい。本菌株においては、SL に応答する様子も観察されており、見出される活性分子は、もともと本菌株の生長制御に関わる分子である可能性も考えられる。将来的には、本菌株が、SL 様分子を生産する生物学的な意味についても詳細に検討をしていきたい。