植物病原菌の毒素の化学†

(昭和62年度農芸化学奨励賞受賞)

菅 原 二三男

(理化学研究所)

植物病原菌を用いた天然生理活性物質の研究は、きわめて興味深いものがあるが、その展開の方向は次のように大別される。一つは、病原菌が要因となる植物病の発生機構を、それらが生産する毒素や病徴発現物質を探索して単離、構造決定したうえで解明することであり、他は、毒素の植物に対する活性を利用して、植物生長制御の新しい手段を見出すことである。植物病原菌が生産する植物毒素の構造研究が幅広く行われ、多くの知見が得られているが、その多くは栽培植物を宿主とするものであった^(1,2)。それらに比較して、雑草を宿主とする植物病原菌の研究例は非常に少ない⁽³⁾。本研究では、上記の目的を達成するために、菌株の収集、培養、および抽出を行うとともに、生理活性物質の構造研究を合成化学、機器分析、さらには、植物病理学的手法を用いて行った。以下順を追って、研究結果を中心に紹介したい。

I. 栽培植物を宿主とする植物病原菌が生産する毒素

1. リンコスボロシド

リンコスボロシド(rhynchosporoside)は、大麦の病原菌 *Rhynchosporium secalis* によって生産される植物毒素であり、その構造は1のように推定されていた⁽⁴⁾。すなわち、複数のグルコースが β -1,4結合をし、還元末端が3-デオキシグリセロールと1位または2位で α -結合しているものであった。しかしながら、立体化学および糖残基の結合数など不明な点があった。そこで、これらの問題を解決するために、12種の類縁化合物を立体選択的かつ位置選択的に合成した^(5,6)。まず、キラルなエポキシドをアグリコンとするグリコシド4および5を合成し、これらを還元的に開環、続いて保護基を除去するこ

とにより、アグリコンがR体の2とS体の3を得た。

一方、セロトリオシド類の合成にあたっては、キラルな3-デオキシグリセロール8,9,10,11をL-乳酸より立体選択的かつ位置選択的に得た。おのおののアルコールと、グルコース誘導体12または13と立体選択的にグリコシル化した後、4位のアセチル基を除去して糖受容体とした。糖供与体(14)とのグリコシル化、そして保護基を除去することによって、セロトリオシド15,16,17,18を得た^(7,8)。さらに、8,9,10,11を糖受容体として、マルトース誘導体も得た。合成によって得られたリンコスボロシド類縁体と、天然物を¹H-NMRにより比較したが、一義的に一致するものはなかった。しかしながら、TLC上での挙動および生理試験での比較から、アグリコンの立体構造はR配位であり、またセロビオース(6)およびセロトリオース(15)であると結論した。その後、Nicolaouらによって合成された4糖類と5糖類の生理試験によっても上記のことが確認された⁽⁹⁾。

2. ヘルミントスポロシド

ヘルミントスポロシド(helminthosporoside)または、HS-トキシンと呼ばれる植物毒素は、サトウキビの病原菌 *Helminthosporium sacchari* によって生産される宿主特異的毒素であり⁽¹⁰⁾、その構造は19のように決定された^(11,12)。この糖鎖の部分は、ジガラフラノースより成る珍しいものであるため、構造の確認および全合成を目的として、位置および立体を制御しつつ、糖鎖部分を合成した。5位に水酸基を有する20をガラクトースより10段階で得、21とグリコシル化した後に、保護基を除去することによって19に導いた。そのNMR(¹Hと¹³C)は天然物と良い一致をした⁽¹³⁾。

3. ジンニオール

ヒマワリの病原菌 *Phoma macdonaldii* は、感受性品種に対してとくに強い病原性を示す。ヒマワリの水抽出物を加えた液体培地で培養した後、濾液を抽出して活性

† Chemical Studies on Phytotoxic Metabolites from Plant Pathogens.

Fumio SUGAWARA (Rikagaku Kenkyusho, Hirosawa, Wako 351-01)

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 4

Fig. 3

22

23

24: $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = R_4 = O$ 25: $R_1 = R_2 = O, R_3 = R_4 = O$

Fig. 5

28

Fig. 7

成分を得た。各種クロマトグラフィーにより単離、精製した物質は、 10^{-3} M 濃度で病斑を形成したが、その程度は感受性品種と耐性品種の間で差が認められた。各種機器分析により、この毒素を既に *Alternaria* 属から得られているジニオール (zinniol) (22) と同定した⁽¹⁴⁾。ジニオールは、感染宿主植物から得られた例がないため、液体培地中のみに存在するとされていたが、*P. mac-*

26

27

29

Fig. 6

donaldii の場合は宿主植物上で生産している事実を GC-MS と HPLC によって証明した⁽¹⁵⁾。

II. 雑草を宿主とする植物病原菌が生産する毒素

1. トリプトフォル

Drechslera nodulosum は、重要雑草のメヒシバを宿主とし、多くの病徴を発現する。その液体培地から、 10^{-4} M 濃度で宿主に病斑を形成する一方、他の雑草には 10^{-3} M 濃度以上を要する活性物質を得た。その構造を、機器分析およびクロマトグラフィーによりトリプトフォル (tryptophol) (23) と同定した。*D. nodulosum* に感染した宿主植物中にトリプトフォルが存在することが確認されたため、病徴発現に直接的に関与しているものと考えられる⁽¹⁶⁾。

2. ジヒドロピレノフォリン

Drechslera avenae は、野生および栽培のカラスミギを宿主とし、暗赤色の病斑を形成する。培養中の活性成分の構造は、16 員環ラクトンを有するジヒドロピレノフォリン (dihydropyrenophorin) (24) と推定された。そこで、酸化反応により既知物質であるピレノフォリン (pyrenophorin) (25) に導くことによって、絶対配置を含めて構造を決定した^(17,18)。ジヒドロピレノフォリンは、雑草や栽培植物に対して、 10^{-3} ~ 10^{-4} M 濃度で病斑を示したが、宿主ではないセイバンモロコシに対しては、 10^{-8} M 濃度で選択的に活性を示した⁽¹⁹⁾。

3. エクセロヒロロン

Exserohilum holmii は、タツノツメガヤを宿主とする病原菌で、その培養液から主成分として、モノセリン

(monocerin) (26) を得たことを、NMR (^1H , ^{13}C) と MS によって同定した⁽²⁰⁾。一方活性成分は、 10^{-4} ~ 10^{-5} M 濃度で非選択的に強い雑草性を示した。エクセロヒロロン (exserohilone) (27) は、点対称の構造を有するために NMR では半分のシグナルしか観測されなかった。そこで、*p*-プロモベンゾアート体に導き、結晶化することにより X 線結晶解析によって構造を決定した (28)。さらに、NMR と MS の比較から水素付加体 29 の構造を明らかにした⁽²¹⁾。

4. ビボラロキシン

ギョウギンバを宿主とする病原菌 *Bipolaris cynodontis* の培養液から単離された活性成分ビボラロキシン (bipolaroxin) (30) は、ギョウギンバに対して 10^{-5} M 濃度で赤色の病斑を形成するが、他の約 40 種の試験植物に

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 10

表 1 文献(4)値と合成化合物との $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) による比較

化 合 物	H-1 c	H-1 b	H-1 a	CH_3
6		4.521 (7.81)	4.936 (3.91)	1.181 (2.35)
7		4.523 (7.81)	4.939 (3.90)	1.202 (6.35)
15	4.517 (7.81)	4.545 (8.30)	4.935 (3.42)	1.180 (6.35)
16	4.517 (7.81)	4.546 (8.30)	4.938 (3.42)	1.202 (6.84)
17	4.516 (7.81)	4.546 (8.06)	5.063 (3.91)	1.166 (6.35)
18	4.517 (7.81)	4.547 (7.81)	5.097 (3.91)	1.234 (6.35)
文献(4)		4.68 (7.0)	5.37 (2.5)	1.28 (7.35)

表 2 *D. maydis* race T および race O と *D. sorghicola* によるオフィオボリン類の生産量 (単位: 乾燥菌体重量あたりの μmol)

Ophiobolin	<i>D. maydis</i>		<i>D. sorghicola</i>
	race T	race O	
I (37)	0.3	0.7	0.5
25-OH-I (40)	0.3	0.06	3.1
6-epi-anhyd-A (41)	trace	trace	not detected
6-epi-A (42)	1.3	1.5	1.7
A (38)	8.0	8.4	5.2
C (39)	1.4	1.7	not detected

対しては 10^{-2} ~ 10^{-4} M 濃度を必要とした。NMR による構造の推定、とくにオレフィンプロトンの解析が困難であったが、X線結晶解析によって、図 (31) のような極度に酸化されたエレモフィラン化合物であることを明らかにした。同時に、32 のような還元体も得られた⁽²²⁾。

5. ベタソール

Helminthosporium gigantea は、ギョウギンバやシバムギを宿主とする病原菌で、その培養液から数種の活性物質が得られた。既知物質のフェノネン (phenenone) (33)⁽²³⁾、ベタソール (petasol) (34)⁽²⁴⁾、フェゼオリノン (phaseolinone) (35)⁽²⁵⁾ 等を、機器分析やX線結晶解析 (36) によって同定した。これらのうちで、ベタソールはサイトカイニンと類似のクロロフィル保持能と発根形成能を 10^{-5} M 濃度で示した。詳細については現在検討中である^(26,27)。

III. 複数の植物病原菌が生産する毒素

1. 6-エピオフィオボリン A

ギョウギンバを宿主とする病原菌 *Drechslera sorghicola* の培養液中の活性成分を検討したところ、新物質の I (37) や既知物質の A (38) 他数種のオフィオボリン (ophiobolin) 類を得た。これらの構造を NMR, MS および X線結晶構造解析 (43) によって決定した。一方、トウモ

表 3 *D. maydis* と *D. sorghicola* から得られたオフィオボリン類による、トウモロコシ W64A と B37 (N または T サイトプラズム) の炭酸ガス固定能の阻害 (50% 阻害濃度を mmol で示した。)

Compound	Nuclear background W64A		Nuclear background B37	
	T	N	T	N
6-epi-A (42)	0.8	70	21	115
6-epi-anhyd-A (41)	10	55	52	65
I (37)	13	23	137	105
25-OH-I (40)	100	262	325	325
A (38)	62	95	75	80
C (39)	175	157	187	225

ロコシの病原菌である *D. maydis* (= *Helminthosporium maydis*) もまた同様のオフィオボリン類を生産していることが明らかとなった。これは、完全世代が同じ *Cochliobolus heterostrophus* であることに起因すると考えられる。従前より、*D. maydis* は宿主特異的の毒素を生産する菌種として知られていた。その毒素の構造と生理活性には多大の関心が持たれていたが、HMT-トキシン以外には、オフィオボリン A の存在が知られていたが、構造的、活性的根拠が希薄であった⁽²⁸⁾。そこで *D. maydis* のうち、とくに強い病原性を示す菌株 race T と弱い病原性を示す race O によるオフィオボリン類の生産を、化学的に比較検討するとともに (表 2)、宿主の感受性品種 (T corn) と耐性品種 (N corn) に対する活性試験を行った。その結果、6-エピオフィオボリン A は、race T と race O の両菌株によって生産される一方、T corn には 0.8 mM 濃度で、N corn には 70 mM で葉片の炭酸ガス固定能を 50% 阻害したことから、*D. maydis* の病原性的一端を説明すると思われる (表 3)⁽²⁹⁾。ほぼ時期を同じくして、ミネソタ大学の Gray らは、全く同じ結論を得ている⁽³⁰⁾。遺伝的に関連するイネのゴマ葉枯れ病菌 *D. oryzae* の培養液中の活性物質を単離・精製したところ、

Fig. 11

Fig. 12

上記のオフィオボリン類の他に新規オフィオボリンが得られた。その化学的、生理的詳細については検討中である⁽³¹⁾。

本研究を遂行するにあたり、その機会を与您ご指導、ご鞭撻を賜りました、理化学研究所中山治彦主任研究員、高橋信孝主任研究員、小川智也主任研究員、葛原弘美主任研究員、ならびにモンタナ州立大学 Gary Strobel 教授、コーネル大学 Jon Clardy 教授に深く感謝いたします。また多くのご教授とご助言をいただきました、東北大学山下恭平教授始め農薬化学研究室の皆様、ならびに理化学研究所薬剤作用研究室、細胞機能解析研究室、植物生活環境制御研究室の皆様にご感謝するとともに、理化学研究所鶴沢洵博士、江角保明氏、千々松民子女史に厚くお礼申し上げます。最後に、多大のご援助をいただきましたブリストルマイヤーズ研究所株式会社菅原孝子博士に深く感謝いたします。

- (1) G. A. Strobel : *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 309 (1982).
- (2) A. Stoessel : "Toxins in Plant Diseases," ed. by R. D. Darbin, Academic Press, New York, 1981, p. 140.
- (3) G. A. Strobel, F. Sugawara and J. Clardy : "Allelochemicals ; Role in Agriculture and Forestry," ed. by G. R. Waller, アメリカ化学会シンポジウムシリーズ # 330, 1987, p. 516.
- (4) P. Auriol, G. A. Strobel, J. P. Beltrane and G. R. Gray : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 4339 (1978).
- (5) F. Sugawara, H. Nakayama and T. Ogawa : *Carbohydr. Res.*, **108**, C 5 (1982).
- (6) F. Sugawara, G. A. Strobel, H. Nakayama and T. Ogawa : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2251 (1986).
- (7) F. Sugawara, H. Nakayama and T. Ogawa : *Carbohydr. Res.*, **123**, C 25 (1983).
- (8) F. Sugawara, H. Nakayama, G. A. Strobel and T. Ogawa : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2261 (1986).
- (9) K. C. Nicolaou, J. L. Randall and G. T. Fast : *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5556 (1985).
- (10) G. W. Steiner and G. A. Strobel : *J. Biol. Chem.*, **246**, 4350 (1971).
- (11) R. C. Bieer, B. P. Mundy and G. A. Strobel : *Experientia*, **38**, 1312 (1982).
- (12) V. Macko, C. Acklin, C. Hildenbrand, F. Weibel and A. Agrigoni : *Experientia*, **39**, 343 (1983).
- (13) F. Sugawara, H. Nakayama and T. Ogawa : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1557 (1986).
- (14) D. J. Robeson and G. A. Strobel : *Phytochemistry*, **23**, 1597 (1984).
- (15) F. Sugawara and G. A. Strobel : *Plant Sci.*, **43**, 19 (1986).
- (16) F. Sugawara and G. A. Strobel : *Phytochemistry*, **26**, 1349 (1987).
- (17) S. Nozoe, K. Hirai, K. Tsuda, M. Ishibashi, M. Shirakawa and J. F. Grove : *Tetrahedron Lett.*, 4675 (1965).
- (18) Z. Kis, P. Furgerand and H. P. Sigg : *Experientia*, **25**, 123 (1969).
- (19) F. Sugawara and G. A. Strobel : *Plant Sci.*, **43**, 1 (1986).
- (20) F. E. Scott, T. T. Simpson, L. A. Trimble and J. E. Vederas : *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1984**, 756.
- (21) K. Sugawara, F. Sugawara, G. A. Strobel, Y. Fu, H. Cun-Heng and J. Clardy : *J. Org. Chem.*, **50**, 5631 (1985).
- (22) F. Sugawara, G. A. Strobel, L. E. Fisher, G. D. Van Duyne and J. Clardy : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 8291 (1985).
- (23) C. Riche, C. Pascard-Billy, M. Devys, A. Gaudemer and M. Barbeau : *Tetrahedron Lett.*, 2765 (1974).
- (24) Y. Trilly, J. Klooterman, G. Sigg and J. J. Kettenes Van den Bosh : *Phytochemistry*, **22**, 2082 (1983).
- (25) T. K. Dhar, K. A. I. Siddiqui and E. Ali : *Tetrahedron Lett.*, **23**, 5459 (1982).
- (26) D. Kenfield, F. Sugawara, G. Bunkers, Y. Wu, G. Strobel, Y. Fu and J. Clardy : アメリカ植物病理学会要旨集, アイダホ, 6月 (1987).
- (27) G. A. Strobel, F. Sugawara, D. Kenfield and J. Clardy : アメリカ化学会要旨集, ニューオリンズ, 9月 (1987).
- (28) J. M. Daly : "Toxins in Plant Diseases," ed. by R. D. Durbin, Academic Press, New York, 1981, p. 340.
- (29) F. Sugawara, G. Strobel, R. N. Strange, J. N. Siedow, G. D. Van Duyne and J. Clardy : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 308 (1987).
- (30) M. W. Canales and G. R. Gray : *Phytochemistry*, 印刷中.
- (31) F. Sugawara : 未発表.