

セイヨウチャヒキが生産する根寄生植物種子
発芽刺激物質の構造解析と発芽刺激活性における
ストリゴラクトンの構造要求性に関する研究

Studies on structure determination of seed germination stimulants for root
parasitic plants produced by *Avena strigosa* and structural requirements of
strigolactones for germination stimulation

2014. 9

東京農工大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻

金 賢一

目 次

略語表	iii
序 論	1
第1章 根寄生植物種子発芽刺激活性におけるストリゴラクトンの構造要求性	8
1-1 材料および方法	9
1-1-1 根寄生植物種子、試薬	9
1-1-2 根寄生植物種子発芽刺激活性検定法	11
1-2 結果	13
1-2-1 <i>Orobanche minor</i> 種子発芽刺激活性	13
1-2-2 <i>Phelipanche ramosa</i> 種子発芽刺激活性	20
1-3 考察	25
第2章 セイヨウチャヒキが生産する新奇発芽刺激物質の単離と構造解析	27
2-1 材料および方法	28
2-1-1 植物種子、試薬	28
2-1-2 種子発芽検定法	28
2-1-3 セイヨウチャヒキの水耕栽培および根浸出物の回収と抽出	28
2-1-4 粗抽出物のLC-MS/MS分析と <i>O. minor</i> に対する発芽刺激活性	29
2-1-5 発芽刺激物質の単離・精製	29
2-1-6 機器分析	31
2-2 結果	34
2-2-1 新奇発芽刺激物質Aの単離・構造決定	35
2-2-2 新奇発芽刺激物質B (avenaol)の単離・構造決定	40

2-3 考察	48
第3章 総合考察	51
引用文献	56
謝 辞	62

略語

EtOH	ethanol
EtOAc	ethyl acetate
NaOCl	sodium hypochlorite
MeCN	acetonitrile
HPLC	high performance liquid chromatography
ESI	electrospray ionization
MRM	multiple reaction monitoring
LC-MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry
GC/MS	gas chromatography mass spectrometry
EI	electron impact ionization
HR-MS	high-resolution mass spectrum
NMR	nuclear magnetic resonance
COSY	COrrrelated SpectroscopY
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multi Quantum Correlation
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement and Exchange SpectroscopY
CD	circular dichroism
N loss	neutral loss

序 論

寄生植物は、吸器(haustorium)という特殊な器官を介して自身の維管束を宿主植物に結合し、栄養・水分を奪って成長する植物であり、顕花植物約 30 万種のおよそ 1%強の 28 科、4500 種である(Joel et al., 2013)。寄生植物は、光合成機能を有するが、自身の生存に必要なエネルギーの一部しかまかなえない半寄生植物と、葉緑素および光合成機能を欠き、栄養・水分のすべてを宿主植物に依存する全寄生植物に分類される。宿主植物との連結部分により、茎に寄生するものを茎寄生植物、根に寄生するものを根寄生植物と呼ぶ。特に、根寄生植物は世界の農業に大きな被害を与えている。

最も大きな被害を与えている根寄生植物はハマウツボ科(Orobanchaceae)に属する半寄生性のストライガ属(*Striga*)植物（以下、ストライガとする）と、全寄生植物のオロバンキ属(*Orobanche*)およびフェリパンチェ属(*Phelipanche*)植物（以下、オロバンキとする）である。ストライガはソルガム、トウモロコシ、サトウキビ、イネなどのイネ科作物に寄生し、サハラ砂漠以南のアフリカ諸国および中東、アジア諸国の作物生産性を大きく低下させている。特に、アフリカ諸国の被害が著しく、年間損失額は 10 億米ドルに上る。オロバンキ（およびフェリパンチェ）は、トマト、タバコ、キュウリ、ニンジン、ジャガイモおよびマメ科植物などの双子葉作物に寄生する。地中海沿岸地域を中心として世界中に広がっており、地中海沿岸地域と南アジアだけで 1,600 万ヘクタールの農耕地がオロバンキに汚染されている(Parker 2009; 2012)。日本にはオロバンキの一種であるヤセウツボ(*Orobanche minor*)が生息しているが、農業への顕著な被害は報告されていない。

ストライガとオロバンキの生息地域や宿主植物は異なっているが、その生活環は良く似ている(Fig. 1)。微小な(長径 0.2~0.4 mm)種子は通常休眠していて、土壤中で 10 年

以上生存可能である。種子は、暗黒下で温暖湿潤状態(18~30°C)に数日から 2 週間程度保たれると休眠が打破され、宿主植物から分泌される発芽刺激物質に反応するようになる。この休眠覚醒処理を「コンディショニング」と呼ぶ(Joel et al., 1995)。休眠が打破された種子は発芽刺激物質により発芽し、幼根を伸長させて宿主植物に到達する。その後、宿主植物の根に侵入し、吸器を介して維管束と結合する。根寄生植物は吸器を通して宿主植物から栄養・水分を収奪しながら地下で塊根(tubercle)を発達させる。オロバンキでは数ヶ月後、ストライガでは数週間後に、花茎が伸長して地上部に現れ、開花・結実して多数の種子(数万~数十万粒)を生産する(Joel DM, 2000; Yoneyama et al., 2010)。

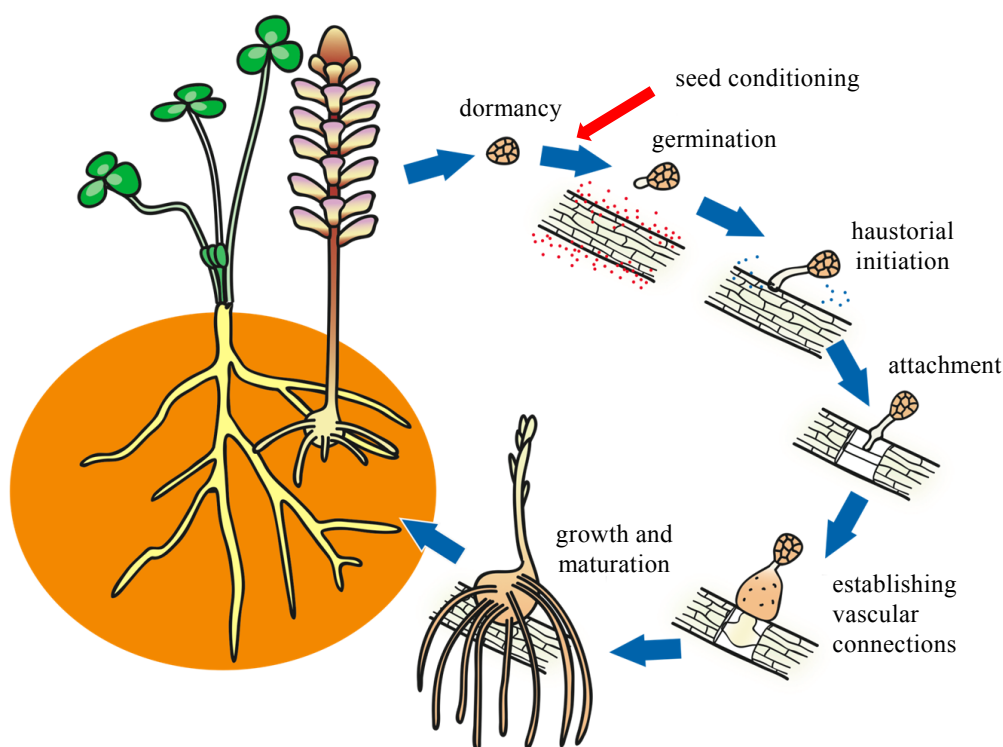


Fig. 1 Life cycle of a root parasitic plant, *Orobanchaceae*

前述の様に根寄生植物の種子は土壤中で 10 年以上生存可能であることから、一旦圃場に侵入を許すと宿主となる植物は長期間に亘って栽培できないことになる。そこで、根寄生植物の被害を軽減するために様々な研究が行われている。具体的には、1) 根寄

生植物耐性作物品種の選抜と育種、2) 除草剤による化学的防除、3) 機械、手取り除草、4) 病原菌や昆虫を利用した生物防除、などが試みられている(Rubiales and Heide-Jørgensen, 2011)。

根寄生植物種子の発芽には、宿主植物の根から分泌される発芽刺激物質が必須であり、一般の植物とは異なり、温度や湿度、酸素などの条件が整ってもそれだけでは発芽しない。植物由来の発芽刺激物質として 3 種類の化合物群が知られている。すなわち、ソルガムが分泌するジヒドロソルゴレオン(dihydrosorgoleone)、ヒマワリが分泌するセスキテルペンラクトン(sesquiterpene lactone)、そしてストリゴラクトン(strigolactone, SL)である(Bouwmeester et al., 2003)。特に SL は最も多くの植物種(宿主および非宿主植物)が生産・分泌している発芽刺激物質である(Yoneyama et al., 2009)。最初の SL である strigol は、*Striga lutea* の発芽刺激物質としてワタの根浸出液から単離された(Cook et al., 1966; 1972)。Strigol (および strigyl acetate)が単離されて以降、ソルガムから sorgolactone、ササゲから alectrol が単離された(Hauck et al., 1992; Müller et al., 1992)。Alectrol は後に orobanchyl acetate であることが分かった(Xie et al., 2008a)。このようにストライガの発芽刺激物質として 4 種類の SL が単離され、それらの SL はオロバンキに対しても強力な発芽刺激活性を示すことは知られていたが、オロバンキの宿主植物が分泌する発芽刺激物質は不明であった。1998 年 Yokota らは、ヤセウツボの宿主であるアカクローバーの根浸出液から発芽刺激物質として orobanchol を単離し (Yokota et al., 1998)、ストライガとオロバンキの両方が SL を発芽刺激物質として利用していることが明らかになった。なお最近、orobanchol の立体構造が改訂された(Ueno et al., 2011)。

その後、タバコから solanacol (Xie et al., 2007)、ソルガムから sorgomol (Xie et al., 2008b)、エンドウから fabacyl acetate (Xie et al., 2009a)、イネから *ent-2'-epi-5-deoxystrigol* (Umehara et al., 2008)、アマから 7-oxoorobanchol (Xie et al., 2009b)、ドクダミから

strigone (Kisugi et al., 2013)が単離された(Fig . 2)。

これまでに単離・構造決定された天然 SL はすべて 3 環性の母核(ABC 環)に、5 員環の D 環がエノールエーテル結合をしている。個々の SL は A 環および B 環の置換様式の違いのみで、C 環から D 環にかけての構造は共通である。これらの SL は 10^{-8} ~ 10^{-14} M の低濃度でストライガおよびオロバンキ種子の発芽を誘導する(Chae et al., 2003; Kim et al., 2010)。根寄生植物の種子発芽刺激活性における SL の構造活性相関の研究から、エノールエーテル結合を介して連結した C-D 環の部分の構造が活性発現に必須であると考えられている(Mangnus and Zwanenburg, 1992)。また、D 環の C-2'位の立体配置と AB 環部分の置換基の種類と置換位置が、高活性に重要であることが示唆されている(Zwanenburg et al., 2009)。

宿主植物が自身を危機に曝すような根寄生植物の発芽刺激物質 SL を生産・分泌する理由は長年にわたり不明であった。その理由は、2005 年、Akiyama らにより、5-deoxystrigol が、アーバスキュラー菌根菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌)の宿主認識に関わる菌糸分岐誘導物質として単離されたことにより明らかになった(Akiyama et al., 2005)。

AM 菌は宿主範囲が非常に広く、80%以上の陸上植物と共生している。宿主植物から光合成産物を得る代わりに、リン酸、窒素などの土壤中の無機栄養を宿主植物に供給する(Smith et al., 2003)。AM 菌の胞子は適当な温度・水分で発芽し、菌糸を伸長させる。菌糸は宿主植物の根の近傍で激しく分岐するが非宿主植物の根の近傍では分岐しないことから、この菌糸分岐は宿主認識メカニズムと考えられていた。また、この菌糸分岐は、宿主植物の根から分泌される菌糸分岐誘導物質(branching factor, BF)によって引き起こされることが示されていた(Giovannetti et al., 1993; 1994)。宿主植物からの BF 分泌量は極微量で、化学的にも不安定であるため、単離・構造解析は困難であった。マメ

科植物であるミヤコグサ(*Lotus japonicas*)の根浸出液から 5-deoxystrigol が BF として単離されたことにより、根から土壤中に放出された SL は寄生と共生の両方の相互作用に関与することが明らかになった(Akiyama et al., 2005)。宿主植物は重要なパートナーである AM 菌を呼び寄せるために共生開始シグナル物質である SL を分泌するが、根寄生植物はその SL を悪用して宿主を検出しているのである(Bouwmeester et al., 2007)。しかし、AM 菌の非宿主植物であるシロイヌナズナやホワイトルーピンなども SL を分泌していることから(Goldwasser et al., 2008; Yoneyama et al., 2008)、SL はそれを生産・分泌する植物自身に対して何らかの重要な機能を持っている可能性が示唆された。その後、SL あるいはその代謝産物が、植物の地上部の枝分かれを抑制する新しいホルモンであることが明らかになった(Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008)。その後の研究から、SL は植物地上部の枝分かれだけではなく、地下部（根系）の形態形成、二次生長（肥大生長）、葉の老化、種子発芽など、植物の生長・分化を、多面的に制御していることが示されている。もちろんこのような植物の生長・分化の制御には他の植物ホルモンとのクロストークが関わっている(Brewer et al., 2013)。

現在までに約 20 種類の SL が単離・構造決定されている。植物は単独の SL ではなく、少なくとも 2 種類以上の SL の混合物を分泌しており、その混合物の組成は、植物種によって、場合によっては同じ植物種でも品種によって、異なっている(Fernández-Aparicio et al., 2011; Xie et al., 2010)。タバコの SL は詳しく研究されているが、タバコは少なくとも 11 種類の SL を分泌している(Xie et al., 2013)。そこで、根寄生植物の種子や AM 菌を始めとする根圏生物（微生物）は、個々の SL ではなく、混合物としての SL を（あるいはその組成の量的・質的な違いを）宿主認識に利用している可能性が想定される。1 種類の SL 単独での発芽刺激活性の比較はこれまでも報告されているが、SL 混合物の活性については全く報告されていない。そこで第 1 章では、天然および合

成 SL を用いて、それぞれ単独および 2 種の SL の混合物の根寄生植物(*Orobanche minor*, *Phelipanche ramosa*)種子に対する発芽刺激活性を検定した。

第 2 章では、双子葉作物に寄生するオロバンキの被害軽減を視野に入れて、アレロパシー作用を持つイネ科飼料作物セイヨウチャヒキ(*Avena strigosa*)が生産・分泌する発芽刺激物質の探索研究を行った。セイヨウチャヒキはオロバンキの種子発芽を誘導するが宿主とはならないので、トラップクロープとして利用できる。さらにアレロパシー作用を示すので、根寄生植物ばかりではなく、他の雑草の防除にも有効であると考えられた。興味深いことに、セイヨウチャヒキの根浸出液抽出物は強力な発芽刺激活性を示したが、LC-MS/MS 分析では既知 SL を分泌していないことが分かった。最終的に 2 種類の新奇発芽刺激物質を単離したが、一方は量的に少なく、¹³C-NMR 測定ができなかったため、構造確定には至らなかった。他方はすべての機器分析データが揃い、構造を決定することができたので *avenaol* と命名した。いずれも SL の構造定義からは外れるので、新しいタイプの発芽刺激物質である(Kim et al., 2014)。

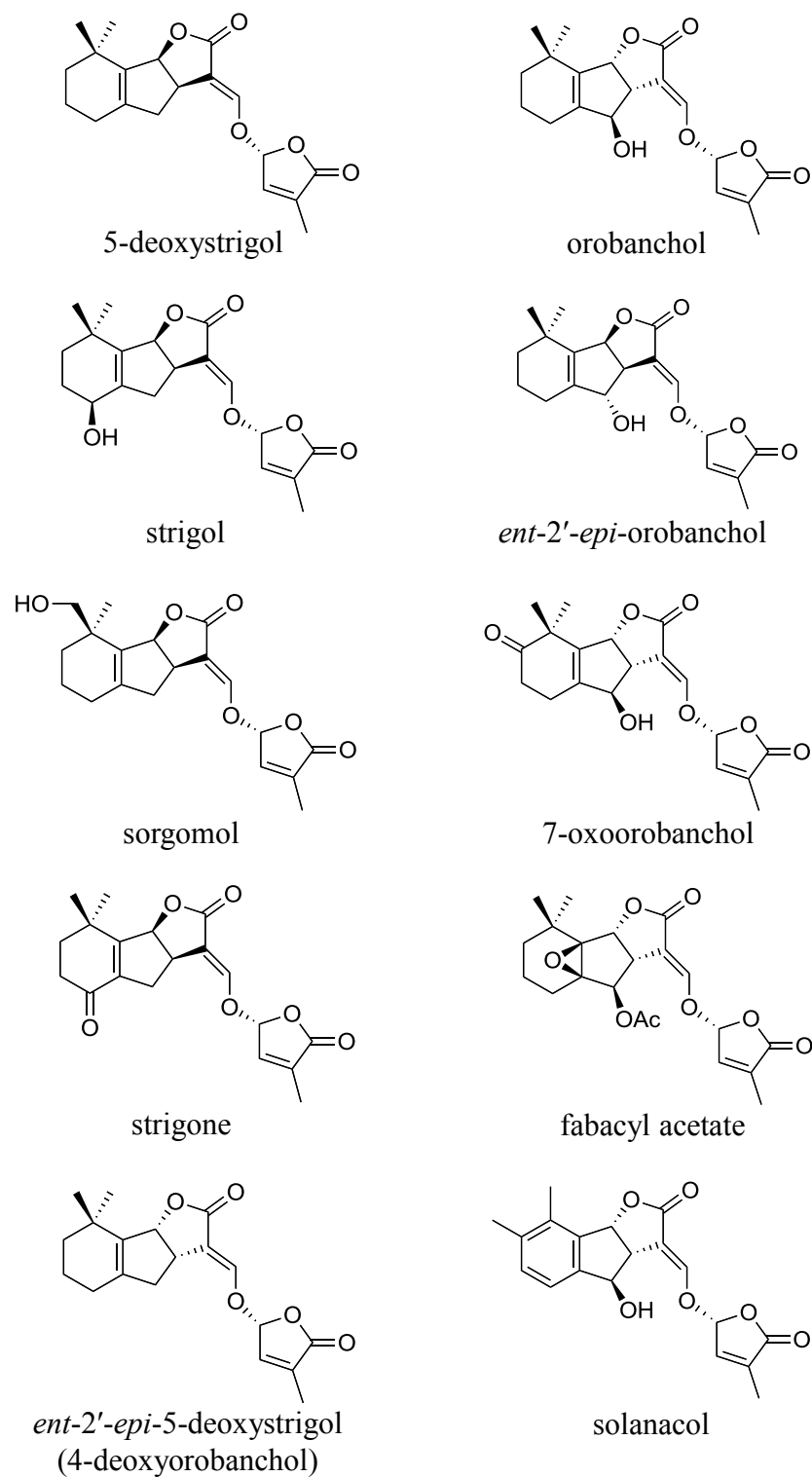
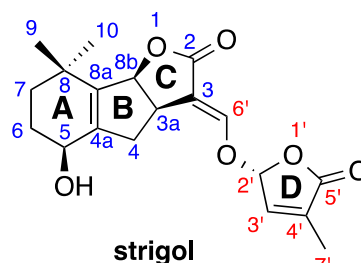


Fig. 2 Natural strigolactones from plants root exudates.

第 1 章 根寄生植物発芽刺激活性におけるストリゴラクトンの構造要求性

根寄生植物種子に対する発芽刺激活性検定法については、Mangnus らによって標準的な検定法が提案されているが(Mangnus et al., 1992)、実際には様々な検定法が用いられている。また、根寄生植物種子は湿潤暗黒条件下に一定期間保つことによって休眠覚醒し、発芽刺激物質に対する感受性を獲得するが（この前培養をコンディショニングと呼ぶ）、休眠覚醒に適した温度、期間は根寄生植物の種によって異なっている(Joel, 2000)。ある特定の化学物質の根寄生植物種子に対する発芽刺激活性は、その他、根寄生植物の種類、種子の由来、処理方法などによっても変動するが、表面殺菌した種子をグラスファイバーろ紙ディスク上に静置して休眠覚醒し、被験溶液を処理するというシャーレ試験では、比較的均一な活性データが得られる(Xie et al., 2010; Kim et al., 2010)。

植物が分泌する代表的な発芽刺激物質であるストリゴラクトン(SL)の化学構造（図は strigol）は、すべて 3 環性の母核(ABC 環)にブテノライドの D 環がエノールエーテルを介して結合している(Xie et al., 2010)。SL の根寄生植物種子



に対する発芽刺激活性発現には、このエノールエーテルを介して結合した CD 環の部分構造が必須であると考えられている(Mangnus and Zwanenburg, 1992)。また、天然および合成 SL の根寄生植物種子の発芽刺激活性における構造活性相関の研究から、発芽刺激活性には、AB 環部分の置換基の種類と位置、および D 環の C-2' の立体配置が重要であることが示唆された(Zwanenburg et al., 2009)。しかし、植物は単一の SL ではなく、少なくとも 2 種類以上の SL 混合物を分泌している (Yoneyama et al., 2009; Xie et al., 2010)。その SL 混合物の組成は植物種によって異なっており、植物の生育ステージや

生育条件によって変動する。そのため、個々の SL の活性ではなく、SL 混合物としての活性が、実際には根寄生植物種子の発芽刺激と宿主認識に深く関連しているものと考えられる。そこで本研究では、天然および合成 SL 単独および 2 種類の SL 混合物を用いて、根寄生植物(*Orobanche minor*; *Phelipanche ramosa*)種子の発芽刺激活性における構造要求性を検討した。

1-1 材料および方法

1-1-1 根寄生植物種子、試薬

Orobanche minor Sm. (ヤセウツボ)の種子は、2008 年 5 月に栃木県宇都宮市の鬼怒川河川敷で、アカクローバーに寄生して成熟したヤセウツボ植物体から採取した。ヤセウツボ植物体を温室で十分乾燥させてから軽くたたいて花序から落下した種子を集めた。夾雑物を取り除いた後、試験用ふるいで大きさの揃った種子を集め、シリカゲルを入れた容器に密封し、室温で保存した。*Phelipanche ramosa* L.の種子は Philippe Delavault 教授(University of Nantes, France)からご供与頂いた。

天然および合成の SL (Fig. 1-1)の由来は以下の通りである。

Solanacol はタバコの根浸出液から単離した (光学活性体)。Solanacyl acetate, 2'-*epi*-solanacol, 2'-*epi*-solanacyl acetate は François-Didier Boyer 博士 (INRA Versailles, France)よりご供与頂いた (すべてラセミ体)。Orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol, *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate は秋山康紀教授 (大阪府立大学) からご供与頂いた (すべて光学活性体)。7-Oxo-orobanchol, 7-oxo-orobanchyl acetate はアマの根浸出液から単離した (光学活性体)。Strigol は森謙治名誉教授 (東京大学) からご供与頂いた光学活性体である。Sorgomol はソルガムの根浸出液から単離した (光学活性体)。*rac*-GR24 はより高活性な立体異性体の対掌体混合物 (ラセミ体) であり、浅見忠男教授 (東京大学)

からご供与頂いた。その他の試薬および有機溶媒はすべて関東化学株式会社と和光純薬株式会社から購入した。

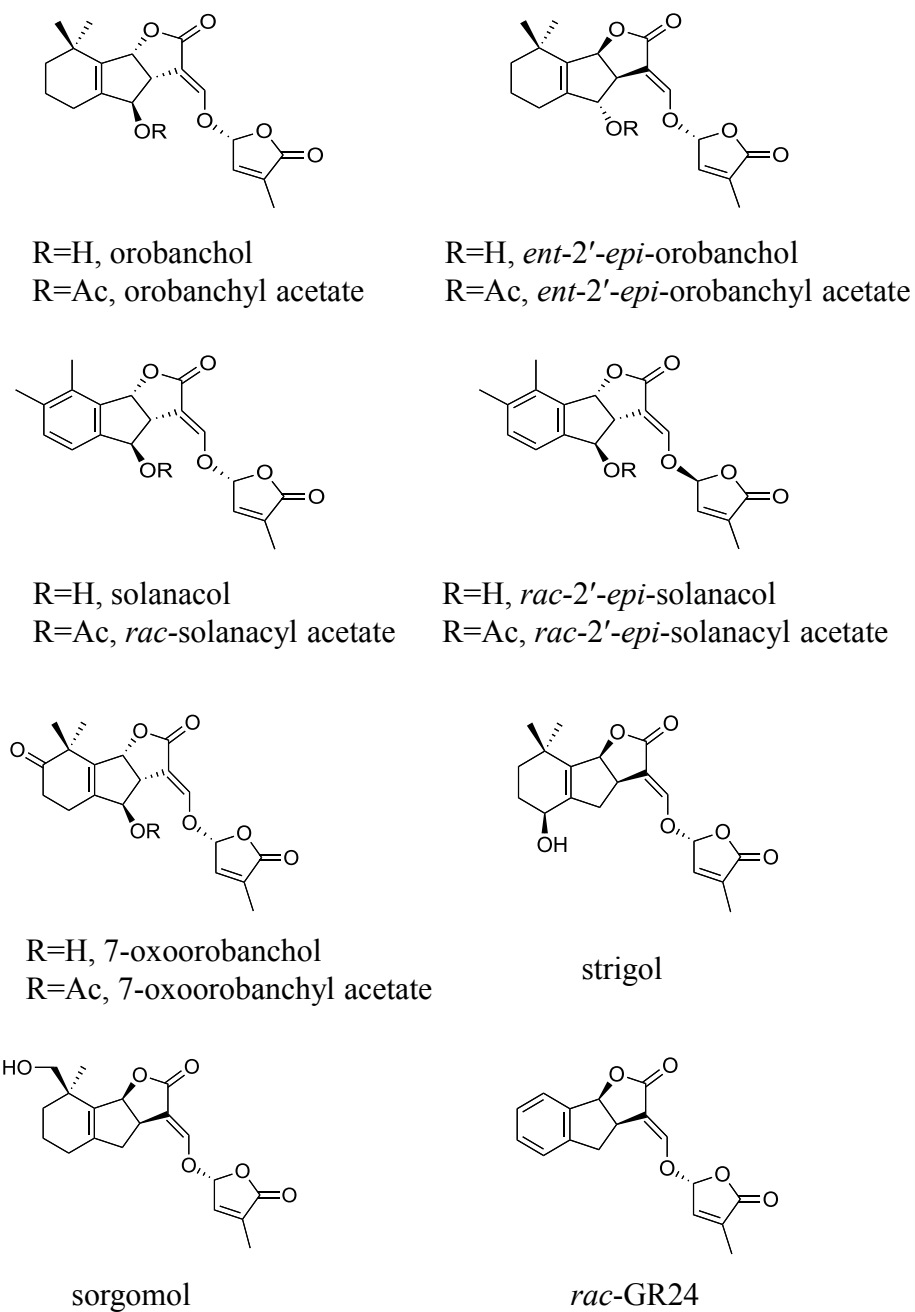


Fig. 1-1 Structures of strigolactones used in the study.

1-1-2 根寄生植物種子発芽刺激活性検定法

種子殺菌

根寄生植物 (*O. minor*, *P. ramosa*) 種子を不織布製 (茶葉用) の袋に入れ超音波洗浄機中で 70% EtOH 100 mL に 3 分間、次いで 0.1% Tween 20、1% NaOCl を含む滅菌 Milli-Q 水 100 mL に 2 分間浸漬し、表面殺菌した。その後、種子を滅菌 Milli-Q 水で十分洗浄し、室温で乾燥した。乾燥後、シリカゲルを入れた容器に入れ、室温で保存した。

前培養 (コンディショニング)

プラスチックシャーレ(φ 90 mm)に 1 枚のろ紙(φ 70 mm, No. 2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)を敷き、2.6 ml の滅菌 Milli-Q 水で湿した。湿されたろ紙の上に、グラスファイバーろ紙製ディスク(φ 5 mm, Whatman GA)を約 80 枚並べ、その上から殺菌した根寄生植物種子を 1 枚のディスクに 50 粒以上播種した。湿度を保つためにシャーレをパラフィルムでシールし、アルミホイルで包んだ後、23°Cの暗黒下で 7 日間前培養を行った。

発芽試験

天然および合成 SL は MeCN に溶解して 10^{-4} M 溶液を調製した。このストック溶液を Milli-Q 水で希釈して、 10^{-7} ~ 10^{-13} M 溶液を作成した。プラスチックシャーレ(φ 50 mm)にろ紙(φ 45 mm, No. 2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)を 1 枚敷き、コンディショニングの完了したヤセウツボ種子を載せたディスク 3 枚を、新しいろ紙の上に置いて少し乾燥させた後、プラスチックシャーレ内のろ紙上に静置し、各 SL 溶液を 0.65 mL 加えた。シャーレをパラフィルムでシールし、アルミホイルで包み、23°C、5 日間暗黒条件下で培養した。発芽率の調査は、実体顕微鏡下で行い、幼根が種皮を破って出てきたものを発芽とした。ポジティブコントロールとして *rac*-GR24 (10^{-7} M)、ネガティブコントロールとして滅菌 Milli-Q 水を用いた。実験は全部の SL 処理を同時に、3 連制で行った。

Orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol, *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate および

solanacol, *rac*-solanacyl acetate, *rac*-2'-*epi*-solanacol, *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate から 2 種類の SL 混合溶液を作製した (Table 1-1)。なお、orobanchol と *ent*-2'-*epi*-orobanchol およびその酢酸エステル体はタバコの根浸出液に含まれているので、自然界に存在しうる組み合わせである。一方、solanacol については、タバコの根浸出液に solanacyl acetate が含まれていることは確認されているものの、2'-エピ体が存在するかどうかは不明である。また、前述したように、エステル体および 2'-エピ体はラセミ混合物である。

Table 1-1 Mixtures of two SLs.

orobanchol + orobanchyl acetate
orobanchol + <i>ent</i> -2'- <i>epi</i> -orobanchol
orobanchol + <i>ent</i> -2'- <i>epi</i> -orobanchyl acetate
orobanchyl acetate + <i>ent</i> -2'- <i>epi</i> -orobanchol
orobanchyl acetate + <i>ent</i> -2'- <i>epi</i> -orobanchyl acetate
<i>ent</i> -2'- <i>epi</i> -orobanchol + <i>ent</i> -2'- <i>epi</i> -orobanchyl acetate
solanacol + <i>rac</i> -solanacyl acetate
solanacol + <i>rac</i> -2'- <i>epi</i> -solanacol
solanacol + <i>rac</i> -2'- <i>epi</i> -solanacyl acetate
<i>rac</i> -solanacyl acetate + <i>rac</i> -2'- <i>epi</i> -solanacol
<i>rac</i> -solanacyl acetate + <i>rac</i> -2'- <i>epi</i> -solanacyl acetate
<i>rac</i> -2'- <i>epi</i> -solanacol + <i>rac</i> -2'- <i>epi</i> -solanacyl acetate

1-2 結果

1-2-1 *Orobanche minor* 種子発芽刺激活性

O. minor は世界中に広く分布しており、多様な植物種に寄生する宿主特異性の低い根寄生植物である。日本国内でもその生息範囲を拡大しており、最近では鴨川河川敷（京都）にも生息が確認されている。*O. minor* の種子は SL に高い感受性を示すが、*Striga* 類に対して発芽を誘導するエチレンや、*P. ramosa* および *P. aegyptiaca* に対して発芽刺激活性を示すイソチオシアン酸エステル類では発芽が誘導されないため、SL の単離・構造解析研究では活性指標植物として良く利用されている。また、根寄生植物の多くが植物防疫法に係わる輸入禁止品で、その取り扱いや管理に十分注意する必要があるが、*O. minor* の種子にはそのような制約はない。そこで本研究ではまず、*O. minor* 種子に対する天然および合成 SL (Fig. 1-1)の発芽刺激活性を検定した。

単独 SL の *O. minor* 発芽刺激活性

Orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol および *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate の *O. minor* 種子に対する発芽刺激活性を Fig. 1-2 に示した。ポジティブコントロールである *rac*-GR24 に比較すると 4 種の SL は強力な発芽刺激活性を示した。低濃度(10^{-11} M) で *ent*-2'-*epi*-orobanchol が若干高い活性を示し、*ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate は最も低活性であった。

Fig. 1-3 では、7-oxoorobanchol および 7-oxoorobanchyl acetate の *O. minor* 種子に対する発芽刺激活性を orobanchol, orobanchyl acetate および *rac*-GR24 の活性と比較して示した。7-Oxoorobanchyl acetate は orobanchol および orobanchyl acetate と同程度の強い活性を示したが、7-oxoorobanchol の発芽刺激活性はこれら 3 種の SL の 1/100 程度であり、*rac*-GR24 と同程度であった。

Fig. 1-4 では、代表的なモノヒドロキシ SL である orobanchol, strigol, sorgomol, solanacol の *O. minor* 種子に対する発芽刺激活性を比較した。Orobanchol, strigol および solanacol は同程度の強力な発芽刺激活性を示した。Sorgomol および *rac*-GR24 の *O. minor* 種子に対する発芽刺激活性は、他の 3 種の SL に比較すると 1/100 程度であった。

Solanacol, *rac*-solanacyl acetate, *rac*-2'-*epi*-solanacol および *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate の *O. minor* 種子に対する発芽刺激活性を Fig. 1-5 に示した。Solanacol, *rac*-solanacyl acetate および *rac*-2'-*epi*-solanacol は同程度の発芽刺激活性を示したが、*rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate は他の 3 種の SL に比較すると 1/1000 程度の低い活性であった。

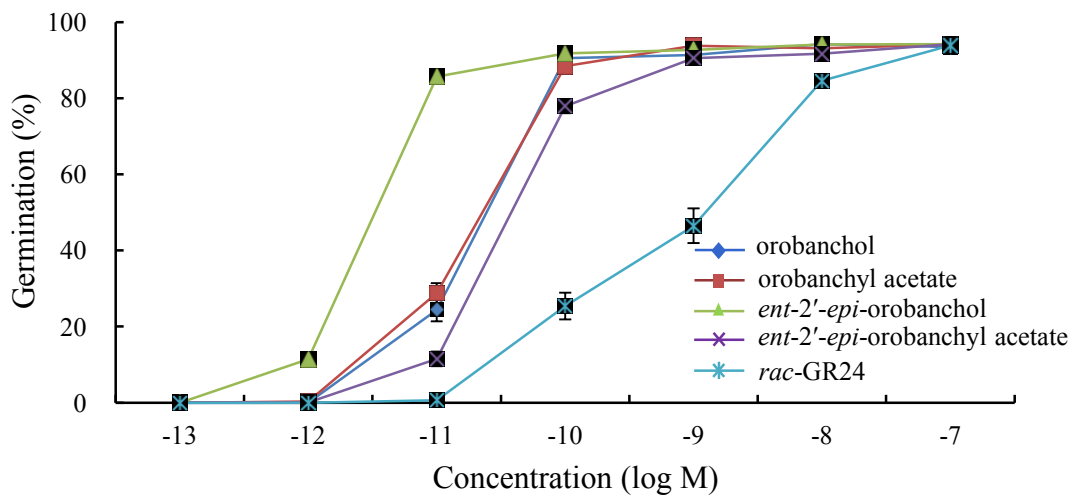


Fig. 1-2 Germination stimulation activity of orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol, *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate and *rac*-GR24 on *O. minor* seed.

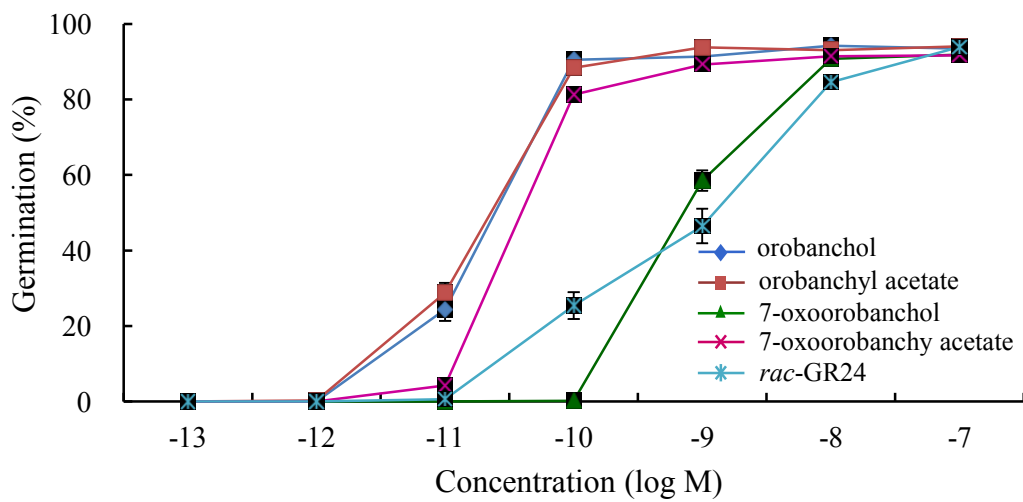


Fig. 1-3 Germination stimulation activity of orobanchol, orobanchyl acetate, 7-oxoorobanchol, 7-oxoorobanchyl acetate and *rac*-GR24 on *O. minor* seed.

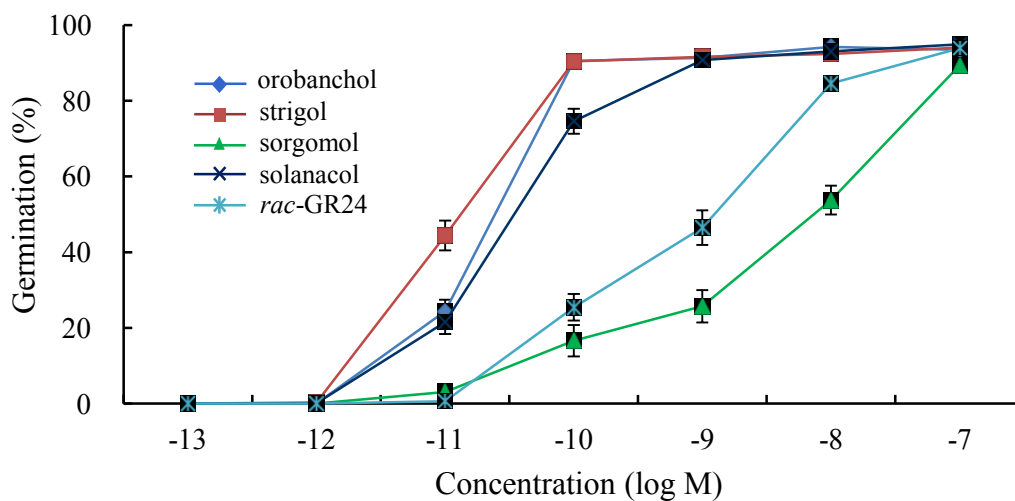


Fig. 1-4 Germination stimulation activity of orobanchol, strigol, sorgomol, solanacol and *rac*-GR24 on *O. minor* seed.

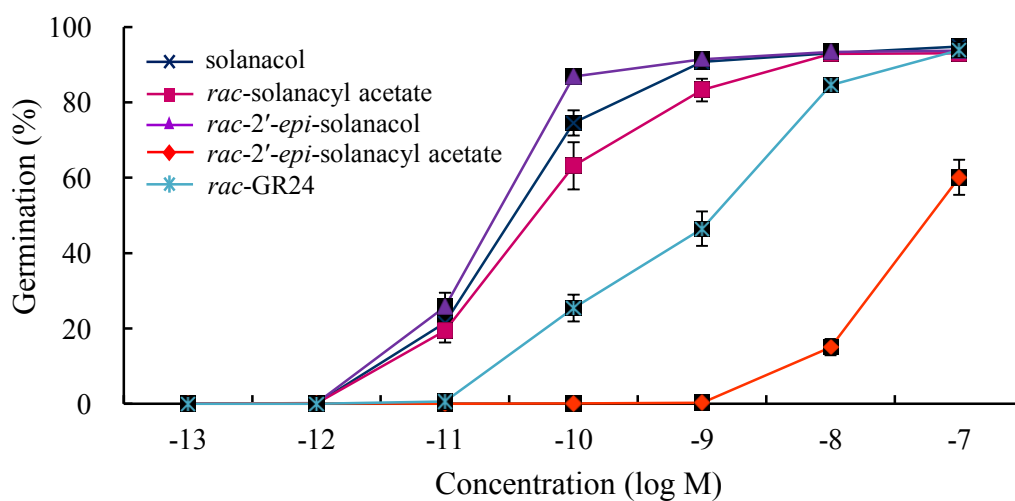


Fig. 1-5 Germination stimulation activity of solanacol, *rac*-solanacyl acetate, *rac*-2'-*epi*-solanacol, *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate and *rac*-GR24 on *O. minor* seed.

2 種類の SL 混合物の *O. minor* 発芽刺激活性

Table 1-1 に示した 2 種類の SL 混合物の *O. minor* 種子に対する発芽刺激活性を検定した。

まず、自然界に存在する組み合わせである orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol, *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate の 2 種類の SL 混合物の *O. minor* 種子に対する発芽刺激活性を Fig. 1-6 に示した (なお、例えば orobanchol + orobanchyl acetate 10^{-11} M では、orobanchol と orobanchyl acetate がそれぞれ 0.5×10^{-11} M 含まれており、結果として SL の濃度は 1×10^{-11} M である)。もともと個々の SL の活性が強いので、すべての SL 混合物が強力な発芽刺激活性を示した。低濃度(10^{-11} M)処理区の発芽率は、単独で処理した時に最も高活性であった *ent*-2'-*epi*-orobanchol を含む混合物が若干高い傾向であった。

Solanacol, *rac*-solanacyl acetate, *rac*-2'-*epi*-solanacol, *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate の 2 種類の SL 混合物に対する *O. minor* 種子の発芽刺激活性を Fig. 1-7 に示した。*rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate は単独で投与した場合には極端に低い活性を示したが、他の 3 種類の SL は同等の活性を示していたので (Fig. 1-5)、2 種類の SL 混合物の活性は個々の SL の活性を反映していた。すなわち、 10^{-8} M と 10^{-9} M で *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate を含む混合物は他の 4 種の混合物に比較すると 1/10 程度の低い活性であった。

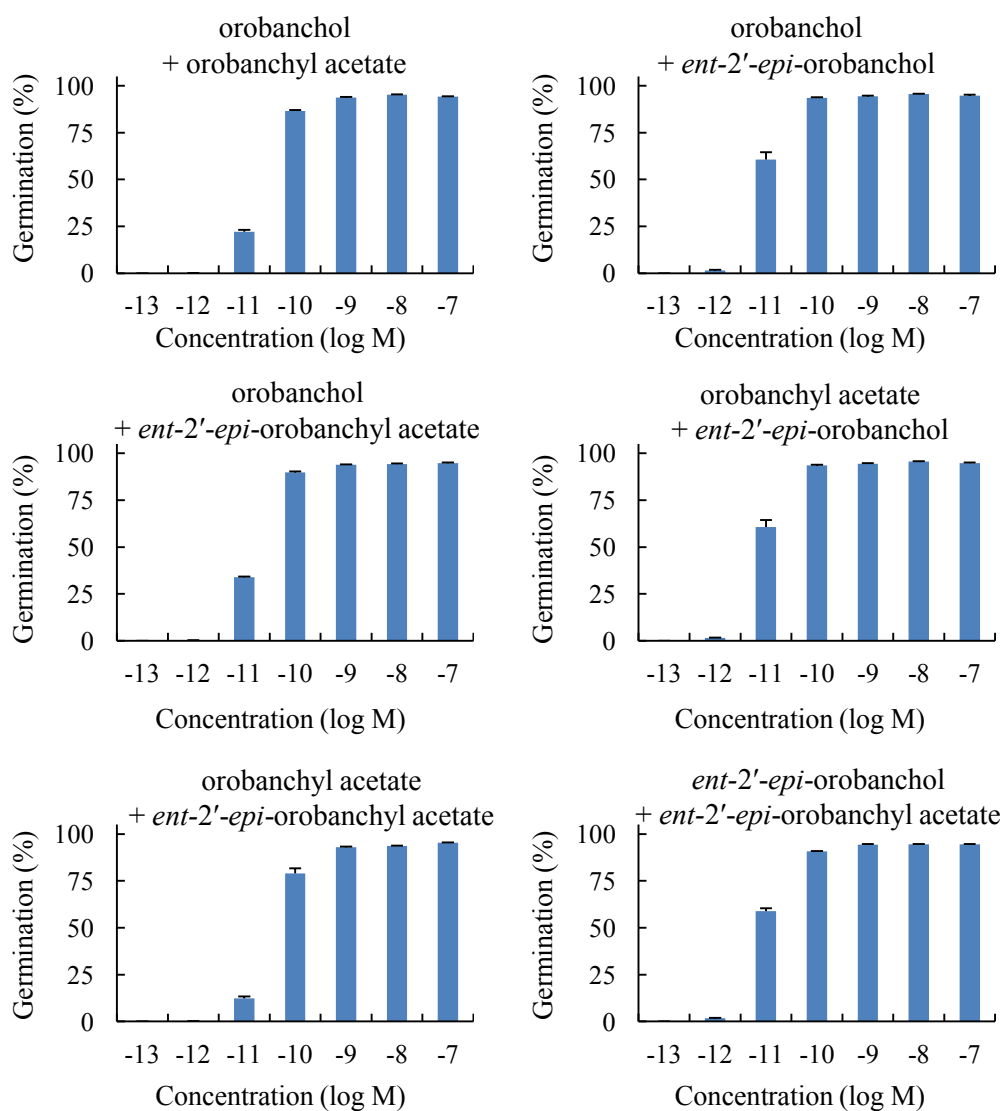


Fig. 1-6 Germination stimulation activity of 2 SL-mixtures (orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol, *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate) on *O. minor* seed.

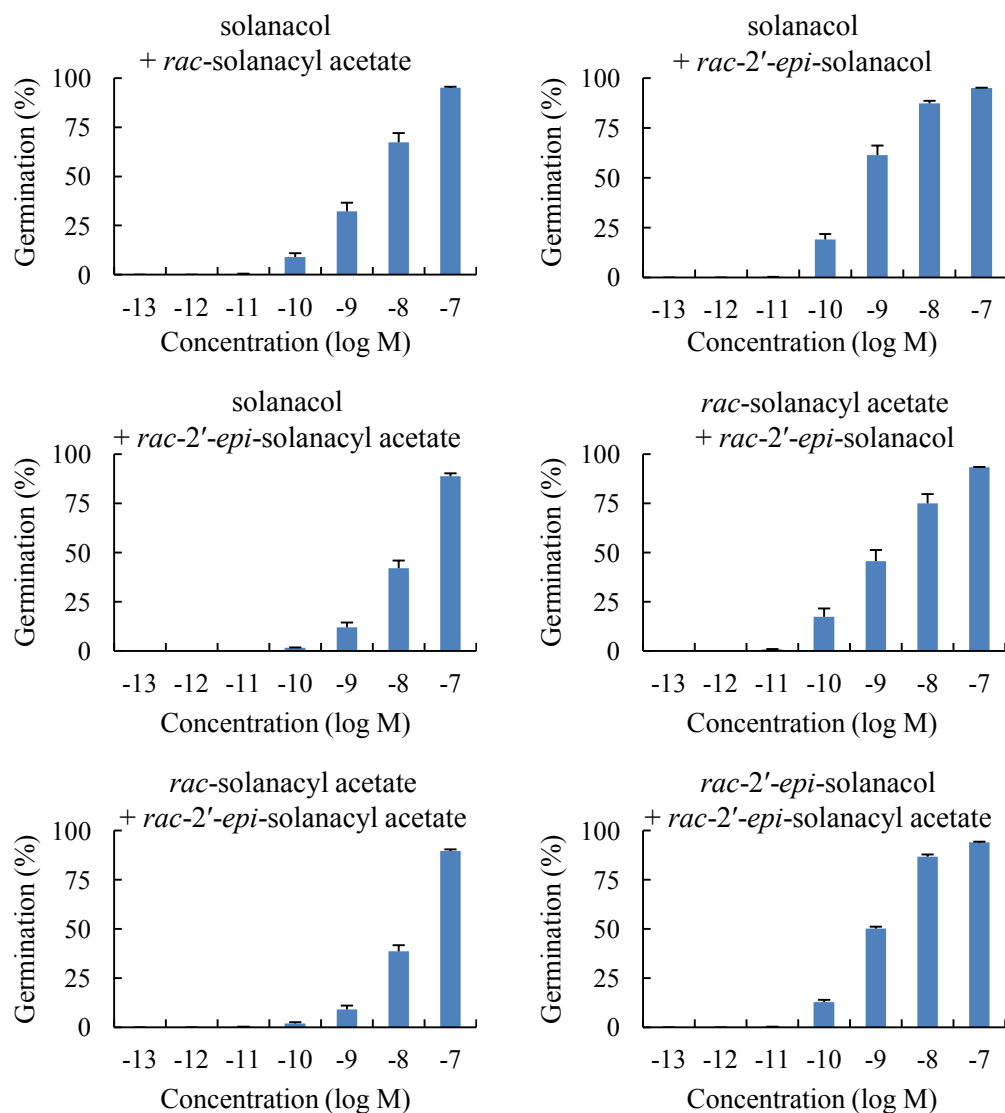


Fig. 1-7 Germination stimulation activity of 2 SL-mixtures (solanacol, *rac*-solanacyl acetate, *rac*-2'-*epi*-solanacol, *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate) on *O. minor* seed.

1-2-2 *Phelipanche ramosa* 種子発芽刺激活性

単独 SL の *P. ramosa* 発芽刺激活性

前項と同様に、天然および合成 SL (Fig. 1-1) の *P. ramosa* 種子に対する発芽刺激活性を検定した。*O. minor* に比較すると *P. ramosa* の発芽率/SL 感受性は低い傾向であった。

Orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol および *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate の *P. ramosa* 種子に対する発芽刺激活性を Fig. 1-8 に示した。*ent*-2'-*epi*-Orobanchol が *P. ramosa* 種子に対して最も高い活性を示し、*O. minor* と同じ結果であった (Fig. 1-2)。Orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate および orobanchol は同程度の活性を示した。一方、ポジティブコントロールである *rac*-GR24 は *ent*-2'-*epi*-orobanchol 以上に強力な発芽刺激活性を示し、*O. minor* と対照的な結果となった。

7-Oxoorobanchol および 7-oxoorobanchyl acetate の *P. ramosa* 種子に対する発芽刺激活性の傾向は *O. minor* と同じであり、7-oxoorobanchyl acetate の方が高活性であった (Fig. 1-3)。

4 種類のモノヒドロキシ SL の *P. ramosa* 種子に対する発芽刺激活性を Fig. 1-10 に示した。4 種類のモノヒドロキシ SL の中で *O. minor* 種子に対する発芽刺激活性が最も低かったのは sorgomol であったが (Fig. 1-4)、sorgomol は *P. ramosa* 種子に対して最も高い活性を示した。一方、strigol の *P. ramosa* 種子に対する発芽刺激活性は最も低く、その活性は *rac*-GR24 と比較すると 1/100 程度であった。

Solanacol, *rac*-solanacyl acetate, *rac*-2'-*epi*-solanacol および *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate の *P. ramosa* 種子に対する発芽刺激活性を Fig. 1-11 に示した。*P. ramosa* 種子に対しては *rac*-2'-*epi*-solanacol が最も高い発芽刺激活性を示した。*rac*-Solanacyl acetate と *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate も同程度の強い発芽刺激活性を示した。最も低い発芽刺激活性を示したのは solanacol であった。これらの発芽刺激活性の傾向も *O. minor* 種子に対する発芽

刺激活性とは明らかに異なっていた。

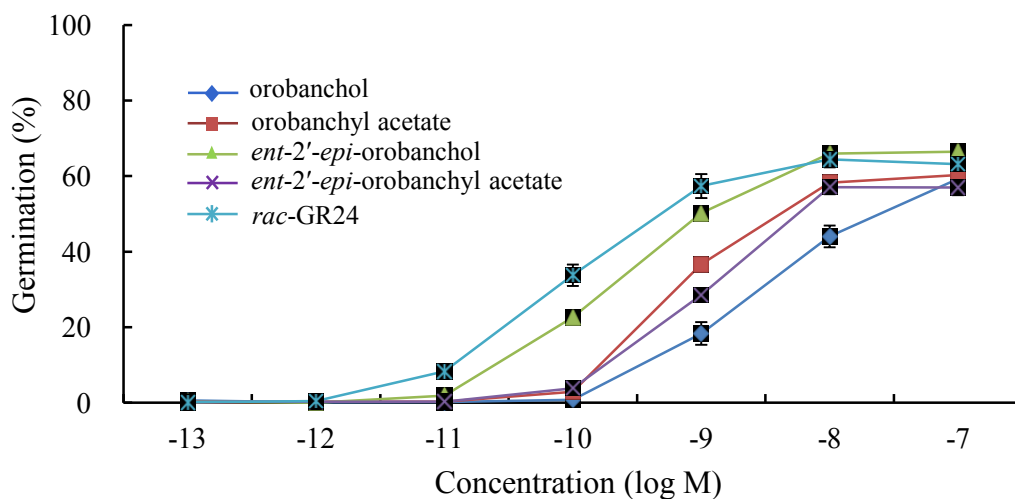


Fig. 1-8 Germination stimulation activity of orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol, *ent*-2'-*epi*-sorobanchyl acetate and *rac*-GR24 on *P. ramosa* seed.

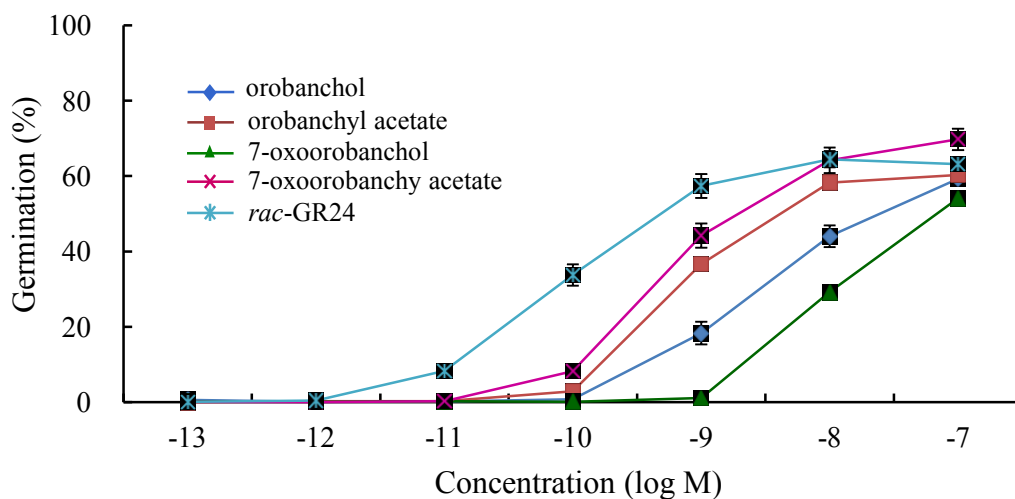


Fig. 1-9 Germination stimulation activity of orobanchol, orobanchyl acetate, 7-oxoorobanchol, 7-oxoorobanchyl acetate and *rac*-GR24 on *P. ramosa* seed.

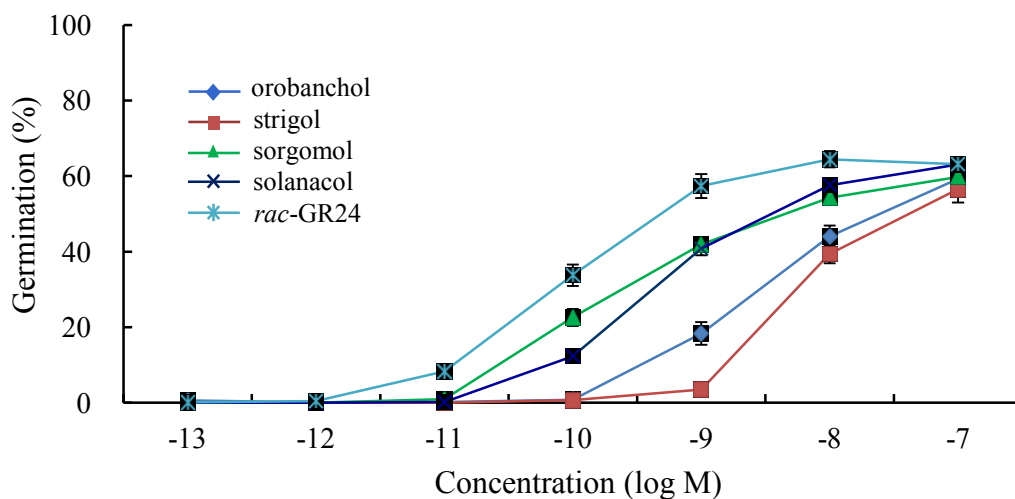


Fig. 1-10 Germination stimulation activity of orobanchol, strigol, sorgomol, solanacol and *rac*-GR 24 on *P. ramosa* seed.

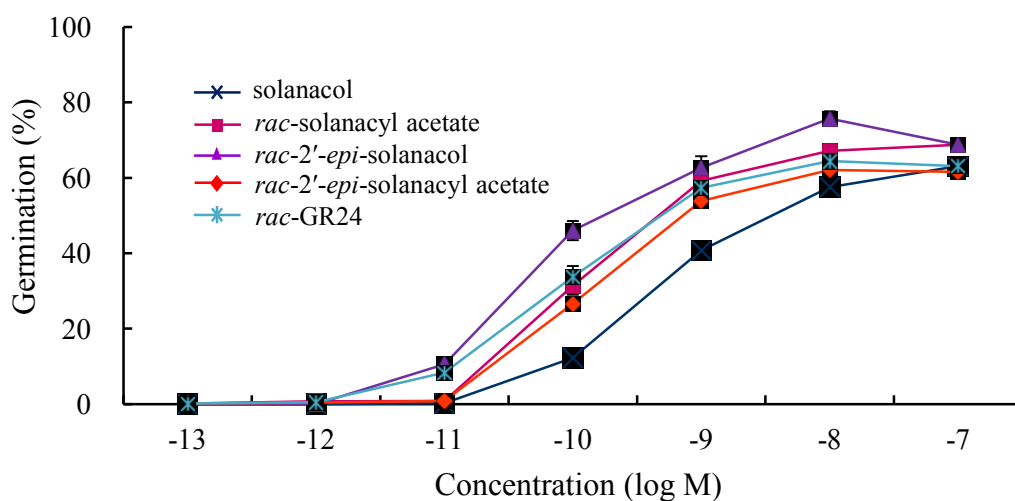


Fig. 1-11 Germination stimulation activity of solanacol, *rac*-solanacyl acetate, *rac*-2'-*epi*-solanacol, *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate and *rac*-GR24 on *P. ramosa* seed.

2 種類の SL 混合物の *P. ramosa* 発芽刺激活性

Table 1-1 に示した 2 種類の SL 混合物の *P. ramosa* 種子に対する発芽刺激活性を Fig. 1-12 と Fig. 1-13 に示した。*O. minor* 種子に対する発芽刺激活性の場合と類似した傾向であり、活性の強弱は、個々の SL の活性に対応していた。ただし、*O. minor* の場合とは異なった傾向として、いくつかの組み合わせで高濃度で発芽率の低下が認められた。

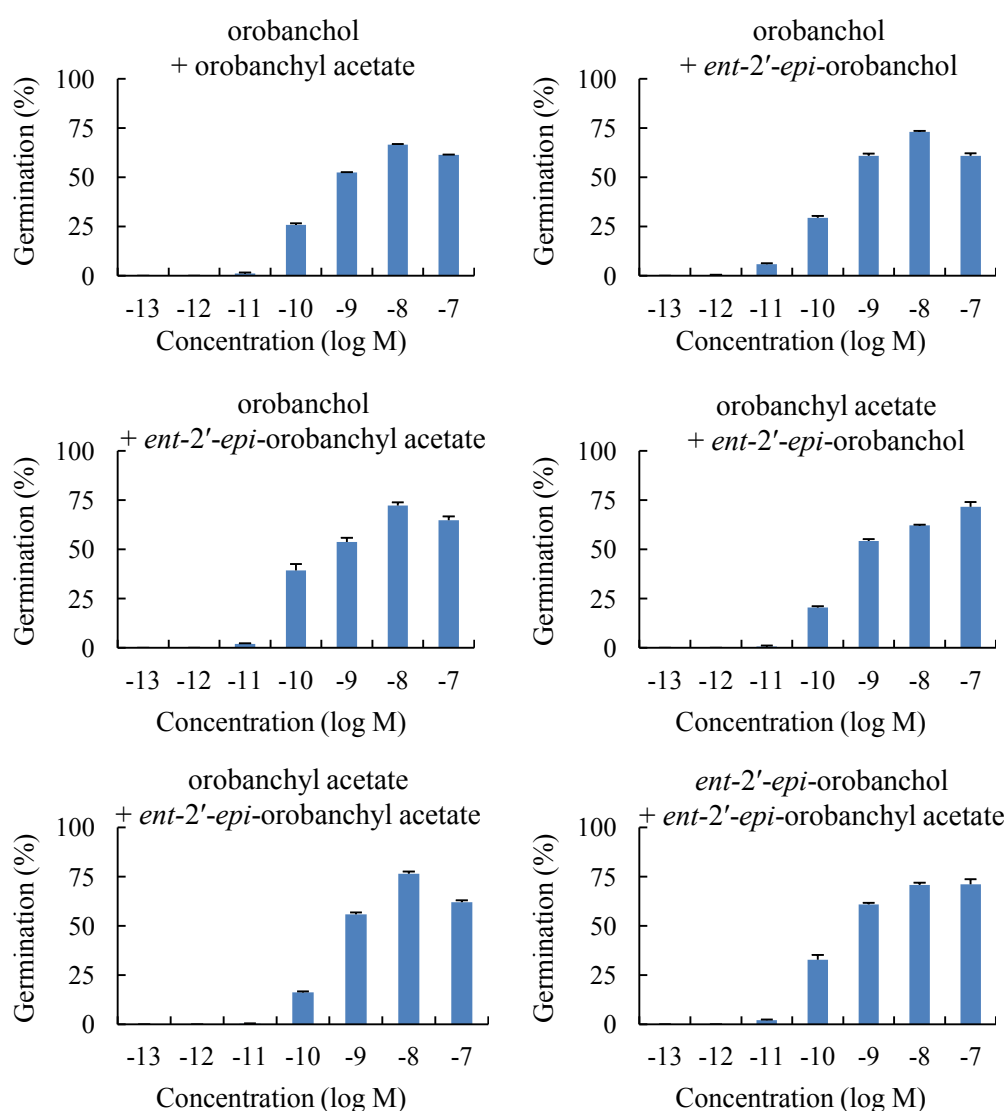


Fig. 1-12 Germination stimulation activity of two SL-mixtures (orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol, *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate) on *P. ramosa* seed.

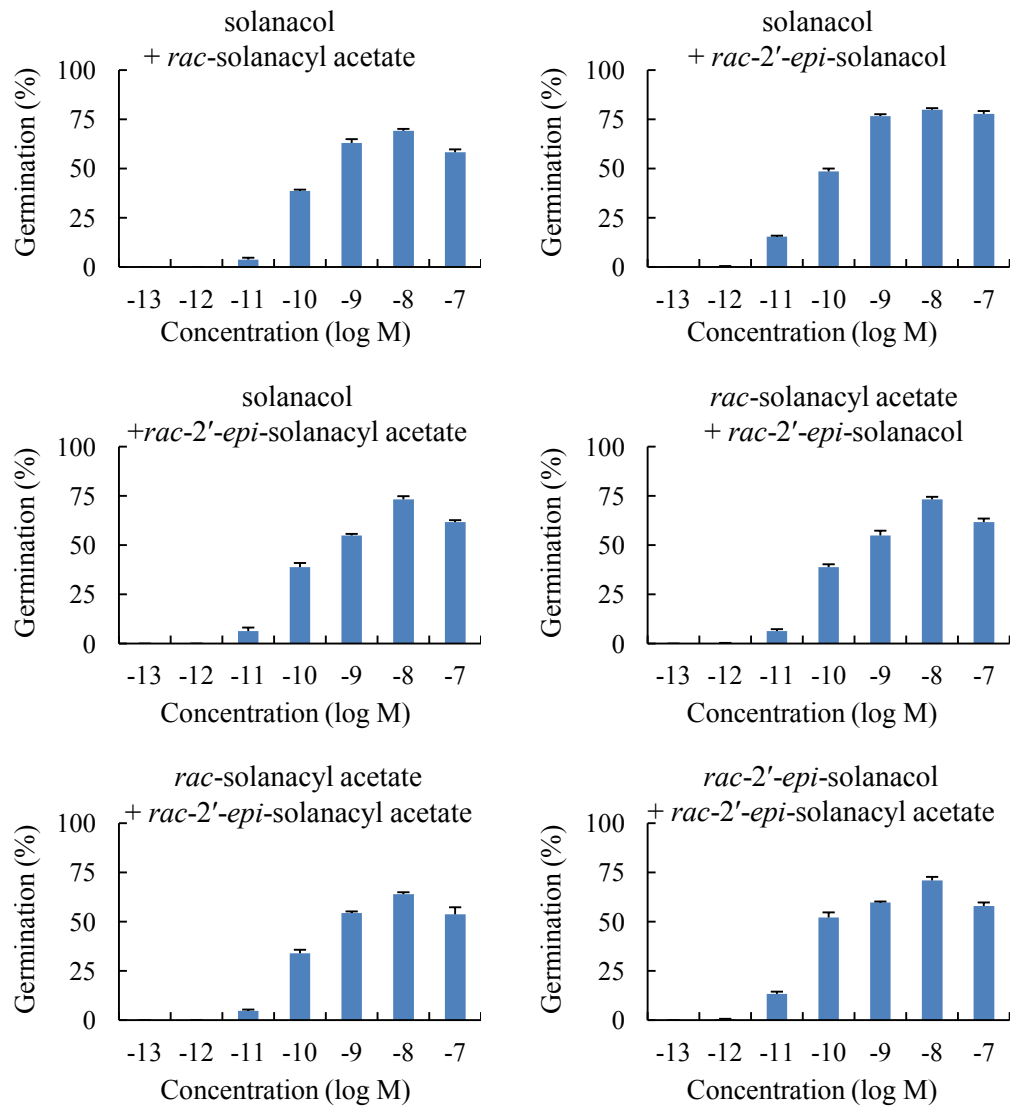


Fig. 1-13 Germination stimulation activity of 2 SL-mixtures (solanacol, *rac*-solanacyl acetate, *rac*-2'-*epi*-solanacol, *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate) on *P. ramosa* seed.

1-3 考察

本章では、天然 SL である orobanchol, orobanchyl acetate, *ent*-2'-*epi*-orobanchol, *ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetate, strigol, solanacol, sorgomol, 7-oxoorobanchol, 7-oxoorobanchyl acetate および合成 SL である *rac*-GR24 を用いて根寄生植物の中では比較的宿主特異性が低く、多種類の植物種に寄生する *O. minor* および *P. ramosa* 種子に対する発芽刺激活性を調査した。また、solanacol については、合成ラセミ体混合物であるが、2'-エピ体と酢酸エステルについても活性を評価した。

単独の SL に対して *O. minor* の方が *P. ramosa* に比較すると若干高い感受性を示した。供試したすべての SL は 100 nM で 2 種類の根寄生植物種子に対して 60%の発芽を誘導したが、SL の活性には最大で 10,000 倍程度の差が認められた。例えば、*O. minor* 種子に対してもっと強い発芽刺激活性を示した *ent*-2'-*epi*-orobanchol では、10 pM で 80%以上の発芽を誘導したのに対して、最も活性の低かった *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate では、100 nM で 60%程度の発芽を誘導したに過ぎなかった。

O. minor と *P. ramosa* では、SL に対する感受性がかなり異なっていることも分かった。例えば、モノヒドロキシ SL の中で最も活性の高かったのは *O. minor* と *P. ramosa* 共に *ent*-2'-*epi*-orobanchol であったが、最も活性の低かったのは *O. minor* では sorgomol であるのに対して、*P. ramosa* では strigol であった。また、前述のように *rac*-2'-*epi*-solanacyl acetate の *O. minor* に対する発芽刺激活性は他の solanacol 誘導体に比較して極端に低かったが、*P. ramosa* に対しては solanacol 誘導体の中では最も高い発芽刺激活性を示した。これらの結果は、SL の AB 環の置換様式を根寄生植物が認識できることを示している。本研究で検討した範囲では、2 種類の SL の混合による相乗効果や拮抗効果は確認できなかったが、植物種によって異なった組み合わせの SL 混合物を分泌していることを考え合わせると、SL 混合物の組成が根寄生植物の宿主認識に関わっている可能性が強く

示唆される。根寄生植物以外の根圏生物も、SL 混合物の組成から植物種を認識しているのかも知れない。

第2章 セイヨウチャヒキが生産する新奇発芽刺激物質の単離と構造解析

ハマウツボ科(Orobanchaceae)の根寄生植物は世界の農業に大きな被害を与えている。特に、ストライガ属 (*Striga* spp.)とオロバンキ属 (*Orobanche* spp.)の根寄生植物の被害が甚大であり、ストライガ属はサハラ砂漠以南のアフリカ諸国を中心に、オロバンキ属は地中海沿岸地域を中心に世界的に広がっている (Parker, 2009; 2012)。根寄生植物の種子は長径 0.2~0.4 mmと微小であるが、土壤中で10年以上生存できるため (Joel et al., 1995)、一旦圃場に侵入すると、宿主となる作物は長期間にわたって栽培できない。

根寄生植物の防除法開発のために様々な研究が行われてきたが (Aly, 2012)、現在、アフリカ諸国 (特にケニア、ウガンダ、タンザニア、エチオピア) で積極的に普及活動が行われているストライガ防除法に ‘Push-Pull’ がある (Cook et al., 2007)。この ‘Push-Pull’ は元々、イネ科作物のトウモロコシやソルガムの害虫であるシンクイムシ (stem borer) の被害を低減させる目的で開発された方法で、イネ科作物の畝間にシンクイムシ忌避物質 (揮発性成分) を放出するマメ科飼料作物 (*Desmodium* spp.) を栽培することでシンクイムシを ‘Push’ し、畑の外周にシンクイムシ誘因効果のあるイネ科飼料作物のネピアグラス (*Pennisetum purpureum*) を栽培することでシンクイムシを ‘Pull’ するというものである。ところが、この ‘Push-Pull’ を取り入れた畑では、ストライガの被害も劇的に軽減された。その理由は、イネ科植物にのみ寄生するストライガの宿主とはならない *Desmodium* がストライガの種子発芽刺激物質を分泌して自殺発芽を誘導する一方で、発芽後の幼根伸長を阻害する物質を同時に分泌しているためと考えられている。そこで、双子葉植物にのみ寄生するオロバンキ属の根寄生植物の防除には、アレロパシー作用を持つイネ科植物 (作物) を利用することで、‘Push-Pull’ に類似した効果が得られるものと期待される。

アレロパシー作用を持つ代表的なイネ科植物としては、ライムギ(*Secale cereal* L.)とセイヨウチャヒキ (*Avena strigosa* Schreb.)が挙げられる(Price et al., 2006; Ratnadass et al., 2012)。ライムギとセイヨウチャヒキを水耕栽培し、根浸出液のヤセウツボ種子に対する発芽刺激活性を比較したところ、セイヨウチャヒキの根浸出液がより強力な発芽刺激活性を示した。そこで本研究では、セイヨウチャヒキが生産する新規発芽刺激物質の単離・構造解析を試みた。

2-1 材料および方法

2-1-1 植物種子、試薬

セイヨウチャヒキ(*Avena strigosa* Schreb.)の種子は雪印種苗より購入した。*Striga hermonthica* 種子はA.G.T. Babiker教授 (Sudan University of Science and Technology, Sudan)からご供与頂いた。その他の根寄生植物種子および試薬類は、第1章で述べたとおりである。

2-1-2 種子発芽検定法

種子発芽検定法は第1章に記載した方法に準じて行った。ただし、*S. hermonthica*種子の前培養と発芽実験の温度は30℃とし、前培養期間は14日間とした (Chae et al., 2004)。

2-1-3 セイヨウチャヒキの水耕栽培および根浸出物の回収と抽出

水耕栽培 新しい発芽刺激物質の探索のため、穴あきプラスチックコンテナ (28.5 × 23.5 × 11 cm, W × L × H)に8 cmの厚さにバーミキュライトを敷き詰め、セイヨウチャヒキ種子500粒を蒔き、水道水を与えて23℃に保ったグロースチャンバー内で栽培した。明期14時間、暗期10時間とした。栽培開始10日後に、草丈10 cmのセイヨウチャヒキを70 Lの水道水を入れた二つのコンテナ (120 × 60 × 20 cm, W × L × H)に移動した。セイ

ヨウチャヒキは約150個の穴が空いたスチロール板に固定し、セイヨウチャヒキの根がちょうど水につかるようにコンテナの上に載せた。水耕栽培は17–22°Cの植物培養室内で水道水を用いて行った。

水耕液に含まれる発芽刺激物質の回収 水耕栽培開始7日後に、ナイロンメッシュ製(ポアサイズ47 μm)のカートリッジに8 gの活性炭(カラムクロマトグラム用、和光純薬)を入れて水中ポンプ(水槽用小型ろ過ポンプ)にセットし、セイヨウチャヒキの根から分泌された浸出物を活性炭に吸着させた。一つのコンテナに二つの水中ポンプをセットした。2~3日毎に活性炭を回収し、水道水を交換した。活性炭(32 g)に吸着された根浸出物をアセトン(1500 mL)で溶出した。アセトンを減圧留去したのち、水性残渣(約150 mL)を等量のEtOAcで3回抽出した。EtOAc溶液を合わせてpH 8.3の0.2 Mリン酸水素2カリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、濃縮し、粗抽出物を得た。粗抽出物は4°C以下で保存した

2-1-4 粗抽出物のLC-MS/MS分析と*O. minor*に対する発芽刺激活性

セイヨウチャヒキが既知のSL(およびその異性体)を生産しているかどうかを調べるために、粗抽出物の1/100を、高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS))を用いて multiple reaction monitoring (MRM)法により直接分析した(分析条件は後述)。また、粗抽出物の1/1000をLC-MS/MSと同じ条件でODS-HPLCにより分画し、各画分の*O. minor*に対する発芽刺激活性を検定した。

2-1-5 発芽刺激物質の単離・精製

シリカゲルカラムクロマトグラフィー 精製の第一段階として、シリカゲルカラムク

ロマトグラフィーを行った。サンプル量 (275 mg)に対して約150倍量 (40 g)のシリカゲル (Merck silica gel 60, 230–400 mesh)を展開開始溶媒 (100% *n*-hexane)で充填してカラム (180 × 25 mm)を作成し、サンプルをセライトに吸着させてカラムの上部に添加した。溶出溶媒は*n*-hexaneとEtOAcの混合液 (各500 mL、カラム容量の12.5倍量) で、EtOAc濃度を0% ~ 100%まで10%ずつステップワイズで上げて11分画を得た。最後にアセトン800 mLで溶出した。アセトン溶出区を含めて各フラクションの*O. minor*種子に対する発芽刺激活性を検定した。

HPLC シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られた活性分画は、逆相HPLCにより精製を行った。まず、分取用 ODS カラム (Mightysil RP-18, 10 × 250 mm, 10 μm)を用いたHPLCで精製した。カラムオープン温度は 30°C、流速は3.0 mL min⁻¹、モニター波長は240 nmに設定した。溶出溶媒はMeCN/H₂Oの混合溶媒を用い、MeCN濃度を40%から100%まで60分間のグラジエント溶出とした。溶出液は1分毎に40分まで分取し、各画分の*O. minor*種子に対する発芽刺激活性を検定した。

分取HPLCで得られた活性画分を、更に分析用ODS (Mightysil RP-18, 4.6 × 250 mm, 5 μm)カラム、またはODS-CN (Develosil CN-5, 4.6 × 250 mm, 5 μm)カラムを用いたHPLCによって精製した。溶出溶媒は30% MeCN/H₂O、カラムオープン温度は30°C、流速1.0 mL min⁻¹、モニター波長は 240 nmに設定した。単一のピークを与える画分をまとめてLC-MS分析およびGC-MS分析によって純度を確認した。精製・単離したサンプルは-18°C以下で保存した。

2-1-6 機器分析

単離・精製、構造解析に使用した分析機器は以下の通りである。

LC-MS/MS

HPLC

HPLC	HITACHI Lachrom Ultra HPLC system
Column	L-column2, CERI, Japan, 50 x 2.1 mm, 2 μ m
Mobile phase	MeOH:H ₂ O, gradient (initially 30:70, 3 min 45:55, 8 min 50:50, 12 min 70:30, 15 min 100:0)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40°C

Mass spectrometry

Mass spectrometry	Quattro LC mass spectrometer, Micromass
Ionization mode	Electrospray ionization (ESI)
Interface temperature	400°C
Source temperature	150°C
Detection	Full scan, Neutral loss, MRM
Collision energy	16 eV

EI-GC/MS JOEL JMS-Q1000GC/K9を使用した。分析条件は以下の通りである (Yokota et al., 1998; Kisugi et al., 2013)。

GC/MS 分析条件

Column	J&W, DB-5 (5 m x 0.25 μ m)
Ionization	EI (70 eV)
Carrier gas	He
Chamber temperature	200°C
Injection temperature	220°C
Separator temperature	260°C
Head pressure	30 kPa
Vacuum	3×10^{-5} Torr
Oven temperature	Initially 130°C 1.5 min, 130°C~270°C 6°C/min, 270°C 5 min

HR-MS HR-MS (High-Resolution Mass Spectrum)分析はAgilent 6520 Q-TOF機器を用いた。

NMR NMR (Nuclear Magnetic Resonance) 分析はJEOL NMN-ECA-500を用いた。溶媒はCDCl₃ (δ_{H} 7.26, δ_{C} 77.00)およびC₆D₆ (δ_{H} 7.16, δ_{C} 128.40)とし、¹H NMR, ¹³C NMR の一次元および¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC, NOESYの二次元NMR解析を行った。

CD-Spectrum CDスペクトルの測定にはJASCO J-720Wを使用した。測定条件は以下に示した。

CD-Spectrum 測定条件

セル長	0.1 mm
溶媒	MeCN
温度	25°C
開始	300 nm
終了	190 nm
分析能	0.1 nm
感度	20 mdeg
レスポンス	0.25 sec
スキャンスピード	20 nm/min
積算回数	10

2-2 結果

セイヨウチャヒキの水耕栽培と根浸出物の回収を約6ヶ月間にわたって行い、計275 mgの粗抽出物を得た。粗抽出物の一部(1/100)を既知SLの検出チャンネル総てを設定してLC-MS/MS分析を行ったが、既知SLおよびその異性体と考えられるピークは検出されなかった。一方、粗抽出物の1/1000をLC-MS/MS分析と同じ条件のODS-HPLCで30秒毎に分取し、各フラクションの根寄生植物*O. minor*種子に対する発芽刺激活性を検定した結果(Fig. 2-1)、発芽刺激活性は保持時間4分から15.5分まで広く分布しており、セイヨウチャヒキは、少なくとも6種類の新奇発芽刺激物質を分泌していると考えられた。

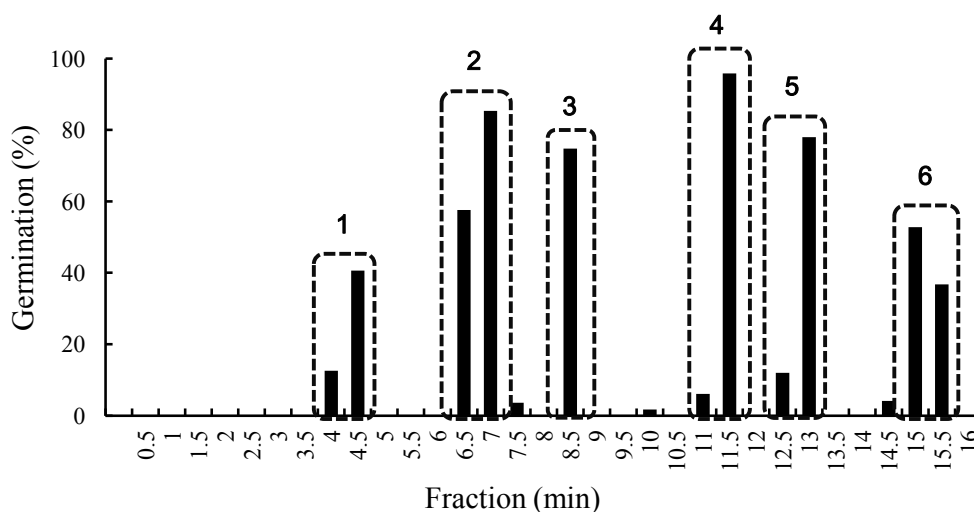


Fig. 2-1 Distribution of *O. minor* seed germination stimulation activity of *Avena strigosa* root exudates after RP-HPLC fractionation.

精製の第一段階として粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0~100%, *n*-hexane-EtOAc)で分画した。得られたフラクションの*O. minor*種子に対する発芽刺激活性をFig. 2-2に示した。なお、100% *n*-hexane 溶出区には活性が認められなかったのを省略した。10% EtOAc溶出区に微弱な発芽刺激活性が、20%から100% EtOAc溶出区お

よびアセトン溶出区に強い発芽刺激活性が認められた。各フラクションの*O. minor*に対する発芽刺激活性の強さと、LC-MS/MS (特にNeutral loss)分析により、比較的少数の発芽刺激物質が含まれていると予想された40%および60% EtOAc溶出区の精製を進めることとした。

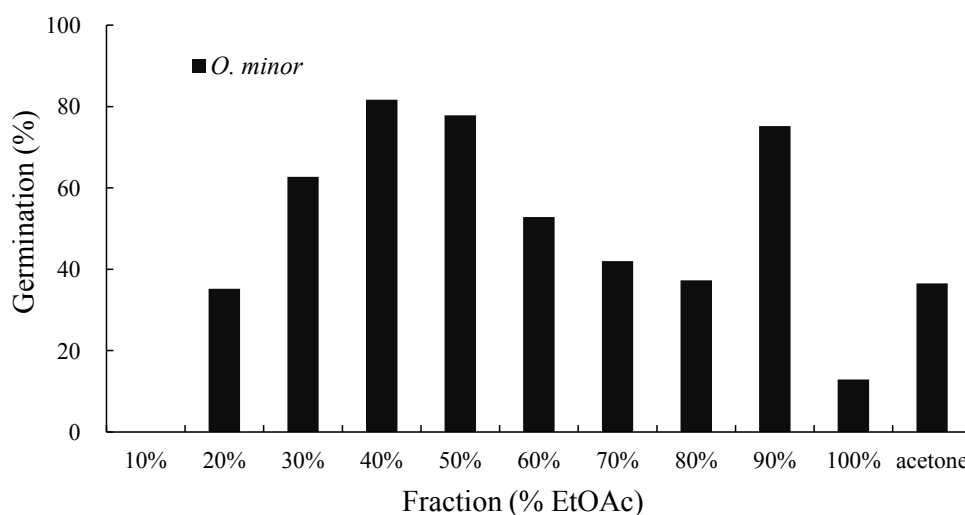


Fig. 2-2 Distribution of *O. minor* seed germination stimulation activity of *Avena strigosa* root exudates after silica gel column chromatography.

2-2-1 新奇発芽刺激物質Aの単離・構造決定

構造未知のSLも、SLに共通な部分構造であるエノールエーテル結合したD環を持っていれば、LC-MS/MSのneutral loss (N loss)法によって検出することができる。そこで、粗抽出物を、D環部分に相当する m/z 97の中性フラグメントの脱離を検出するN loss法によって分析した(Fig. 2-3)。N lossクロマトグラムでは複数のピークが検出されたが、保持時間11.8分に明確なピークが検出された。その親イオンをparent ion scanによって検出した結果 (Fig. 2-3のインサート)、 m/z 383にナトリウム付加イオン $[M + Na]^+$ と考えられる親イオンが得られた。すなわち、この新奇発芽刺激物質Aの分子量は360である。この分子量は後述するように精製した活性画分のGC-MS分析によって確認することが

できた。分子量360のSLとしては、イネが分泌するmethoxy-5-deoxystigol (MeO-5DS)が報告されているが、その構造は確定されていない(Jamil et al., 2011)。

粗抽出物のシリカゲルカラムクロマトグラフィー溶出画分を、 m/z 383 > 286の検出イオンの組み合わせによるMRMで分析した結果、40% EtOAc溶出区に発芽刺激物質Aが含まれていることが分かった。そこで発芽刺激物質Aを含む40%溶出区を濃縮し (44.5 mg)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/EtOAc, 70 : 30) により50画分 (1画分: 10 mL) を得た。各画分のLC-MS/MS分析および発芽活性試験の結果により、画分21-37に発芽刺激物質Aが含まれていたため、合わせて濃縮し (11.7 mg)、分取用カラムを用いたHPLC (Mightysil RP-18, 10 × 250 mm, 10 μm, Kanto Chemicals, 40 – 100% MeCN/H₂O, gradient, 3 mL min⁻¹, over 40 min)で再精製した。発芽刺激活性が確認された保持時間18 minから20 minまでのフラクションを集め (0.9 mg)、ODS-CNカラムを用いたHPLC (Develosil CN-5, 4.6 × 250 mm, 5 μm, Nomura Chemical Co. Ltd., 30% MeCN/H₂O, 0.8 mL min⁻¹)で、保持時間11.13 minに溶出される発芽刺激物質Aを約0.3 mg得た。

単離した発芽刺激物質AのLC-MS/MSおよびGC-MSの分析では、SLに特徴的なD-ring (mw 97) の脱離イオンピークが観測されたほか、メトキシル基と思われるmw 31が脱離した強いフラグメントイオンが観測された。MSで得られたフラグメンテーションから、発芽刺激物質Aは5-deoxystigolを母体に、4, 5, 6, 7, 9または10位にメトキシル基が結合した構造であると推定した。そこで発芽刺激物質Aの化学構造を確定するため、大阪府立大学の秋山康紀教授からご供与頂いた6種類の合成MeO-5DS (Fig. 2-4)と、LC-MS/MSを用いて比較分析した(Fig. 2-5)。LC-MS/MS分析では、ODSカラム(L-Column2 ODS, 2.1 × 50 mm, 2.0 μm; CERI, Japan)を用いて、カラムオーブンの温度は30°C、移動相は60% MeOHと40% H₂Oの混合溶媒、流速0.2 mL min⁻¹に設定し、MSはSelected Reaction Monitoring (SRM)モード (m/z 383 > 286) により比較分析を行った(Fig. 2-5A)。この比較分析の結果

から、発芽刺激物質Aの保持時間は16.5分であり、6種類のMeO-5DSの中で7-MeO-5DSが発芽刺激物質Aと同じ保持時間であった (Fig. 2-5A)。なおこのクロマトグラフでは6-MeO-5DSと7-MeO-5DSの混合物で、最初に溶出されているのが7-MeO-5DSの一方の異性体である。続いてカラムを2.5 μ NAPカラム (2.5 μ NAP, 2.1 \times 50 mm, 2.0 μ m; COSMOSIL, Japan) に替えて、発芽刺激物質Aと7-MeO-5DSを再度比較した。その結果、発芽刺激物質Aの保持時間が21.0 minであるに対して、7-MeO-5DSの保持時間は21.3 minであり、発芽刺激物質Aは7-MeO-5DSではないことが分かった(Fig. 2-5B)。以上の分析結果から、発芽刺激物質AはMeO-5DS異性体ではないと結論された。

単離された発芽刺激物質Aは量が少なかったため、¹H-NMRのデータしか得られなかった(Fig. 2-6)。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.97 (3H, s), 1.04 (3H, s), 1.83 (3H, d, J = 1.2 Hz), 1.96 (3H, t, J = 1.5 Hz), 2.08 (H, d, J = 16.7 Hz), 2.31 (H, d, J = 16.8 Hz), 2.65 (H, d, J = 9.5 Hz), 3.82 (3H, s), 5.25 (H, s), 5.80 (H, dd, J = 15.5, 9.5 Hz), 5.90 (H, brs), 5.94 (H, d, J = 15.6 Hz), 6.07 (H, t, J = 1.4 Hz), 6.73 (H, quin, J = 1.5 Hz)

この¹H-NMRデータを既知SLのデータと比較すると、A環のジェミナルメチルと考えられる δ 0.97 (3H, s)と1.04 (3H, s)のシグナルと、 δ 1.96 (3H, t, J = 1.5Hz, H-7'), 6.07 (H, t, J = 1.4Hz, H-2'), 6.73 (H, quin, J = 1.5Hz, H-3')のシグナルがD環部分に由来すると帰属できるものの、その他のシグナルは、最近報告されたSL生合成中間体のcarlactoneのシグナルと良く似ていることが分かった。すなわち、発芽刺激物質Aはcarlactone型の発芽刺激物質であると考え、その化学構造を methyl 4-dehydro-5-desmethyl-6-hydro-3-oxocaractone-5-carboxylateと推定した(Fig. 2-7)。なお、正式な化学名では5位、9位のメチル基 (それぞれC18とC19) がカルボキシル基に酸化された場合には、5(9)-desmethylcarlactone-5(9)-carboxylic acidと表記すべきであるが、本論文ではcarlactone-5-

carboxylic acidと表記する。また、発芽刺激物質Aは便宜的にmethyl 3-oxocaractone-5-carboxylateと呼ぶ。

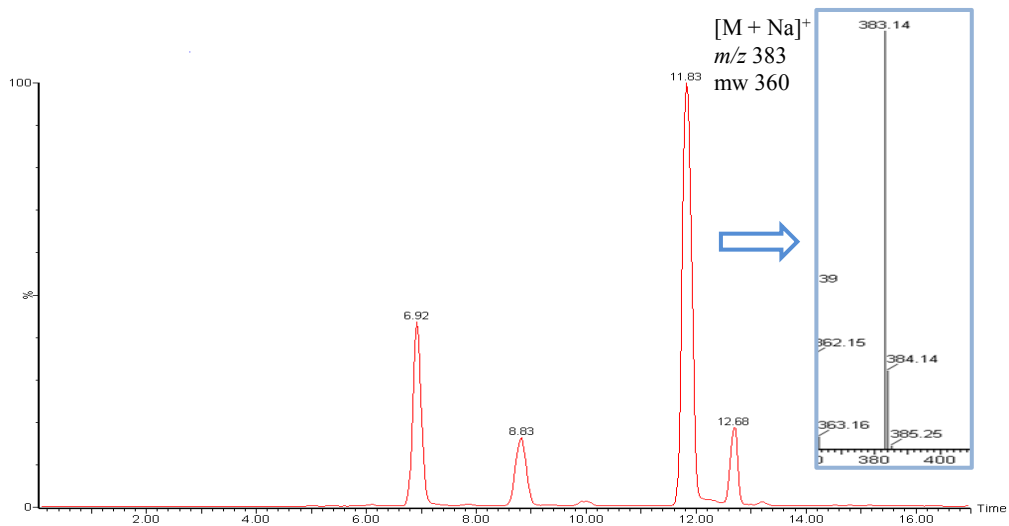


Fig. 2-3 LC-MS/MS neutral loss (N loss) chromatogram of *Avena strigosa* root exudates. Insert: parent ion scan for the peak eluted at 11.8 min.

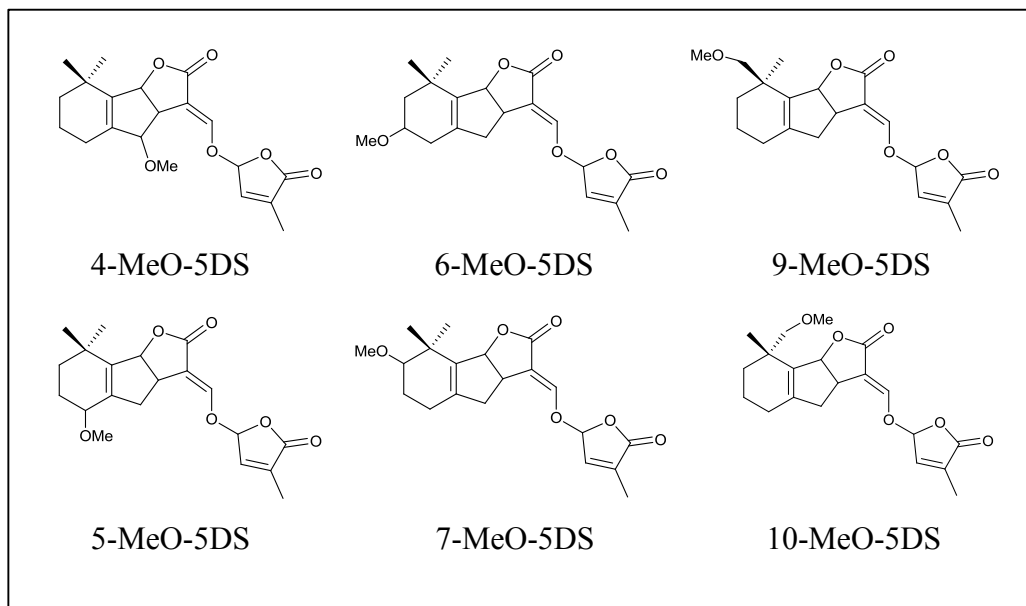


Fig. 2-4 Synthetic methoxy-5-deoxystrigol isomers

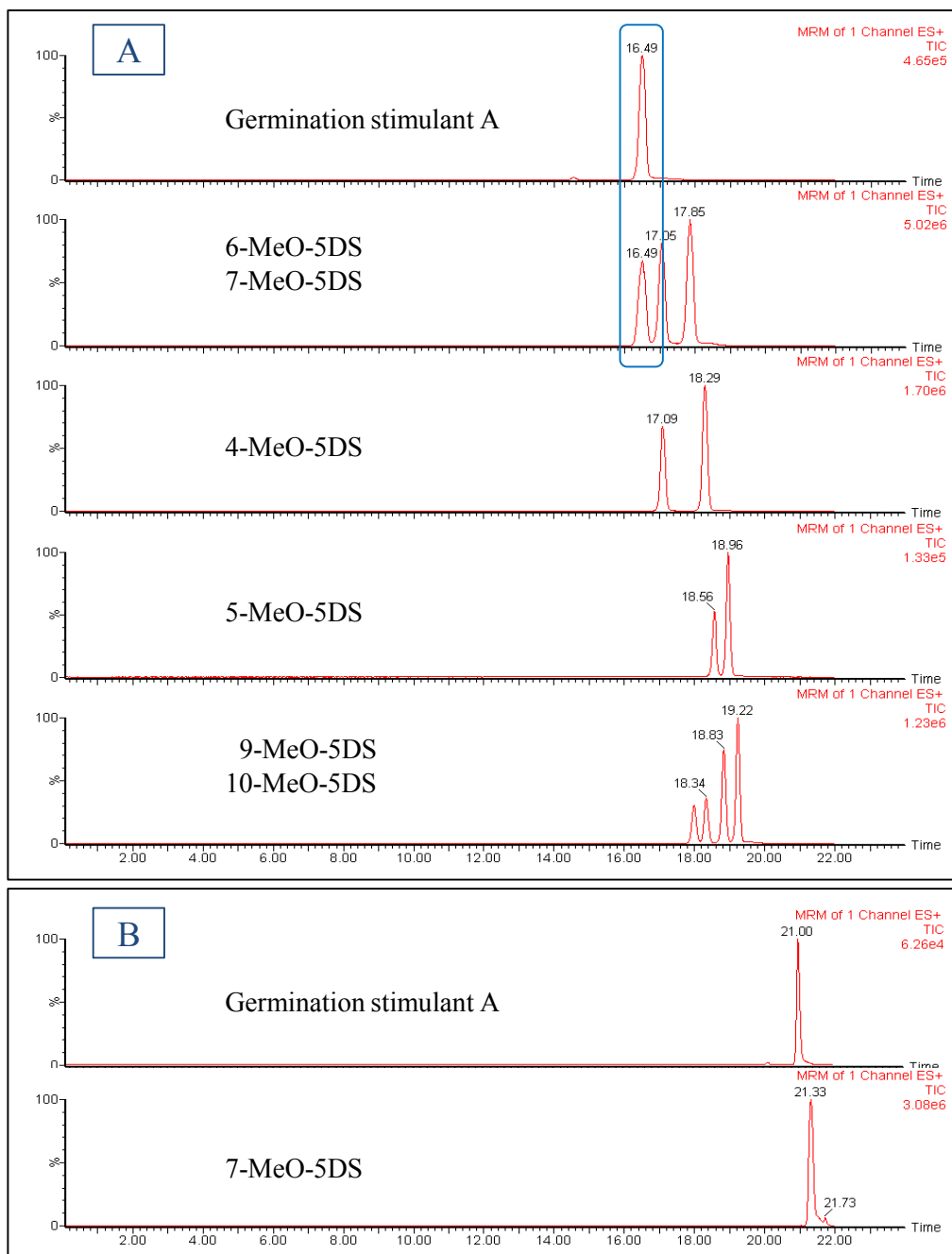


Fig. 2-5 MRM chromatogram of novel germination stimulant A and six synthetic strigolactones

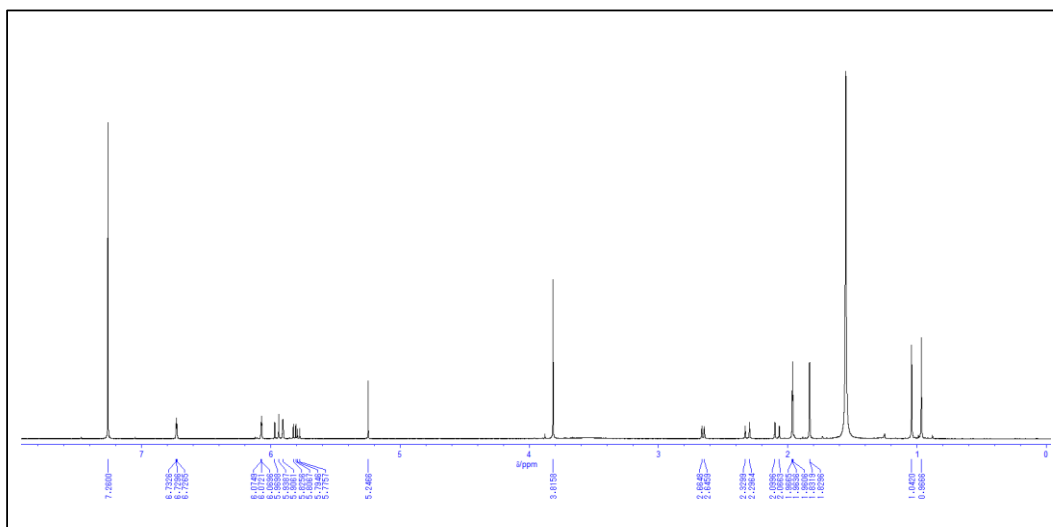


Fig. 2-6 ^1H NMR spectrum of novel germination stimulant A

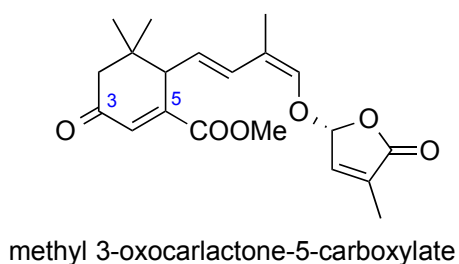


Fig. 2-7 The tentative structure of germination stimulant A

2-2-2 新奇発芽刺激物質B (avenaol)の単離・構造決定

強い発芽刺激活性を示した60% EtOAc溶出区 (20.4 mg)に含まれる発芽刺激物質の単離・構造解析を試みた。最初に分取用カラムを用いたODS-HPLC (Mightysil RP-18, 30% MeCN/H₂O)により精製を行った。保持時間18.4分、23.1分および26.0分に大きなピーク (モニター波長 : 240 nm)が観察された。これらのピークに相当する画分はいずれもO.

*minor*種子に対する発芽刺激活性を示した。最も大きなピークである保持時間23.1分を含む画分を合わせて濃縮し(3.6 mg)、分析用カラムを用いたODS-HPLC (Develosil CN-5, 30% MeCN/H₂O)により精製を行った。保持時間18.3分に単一のピークを与える新奇発芽刺激物質B (0.4 mg)を得た。

単離した発芽刺激物質BのLC-MS (Full scan)分析から、プロトン付加イオン[M + H]⁺ *m/z* 377とナトリウム付加イオン[M + Na]⁺ *m/z* 399が観察された (Fig. 2-8)。すなわち、発芽刺激物質Bの分子量は376と考えられた。GC-EIMS分析でも分子イオン[M]⁺ *m/z* 376が観察された (Fig. 2-9)。HR-ESI-TOF-MS分析ではプロトン付加イオン[M + H]⁺ が *m/z* 377.1589 (calcd. for C₂₀H₂₅O₇, *m/z* 377.1595) に検出され (Fig. 2-10)、発芽刺激物質Bの分子式はC₂₀H₂₄O₇、分子量は376であることが確定した。

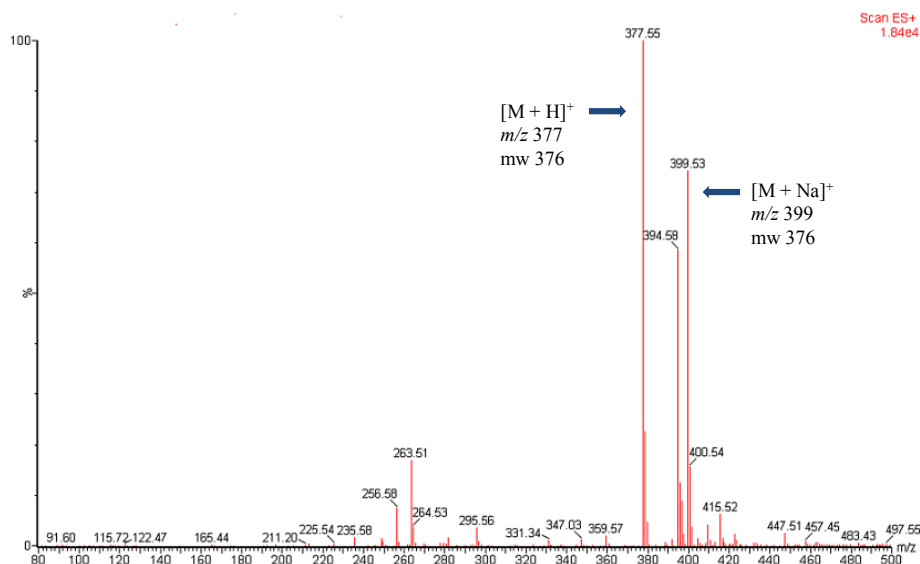


Fig. 2-8 Mass (Full scan) spectrum of germination stimulant B purified from *Avena strigosa* root exudates

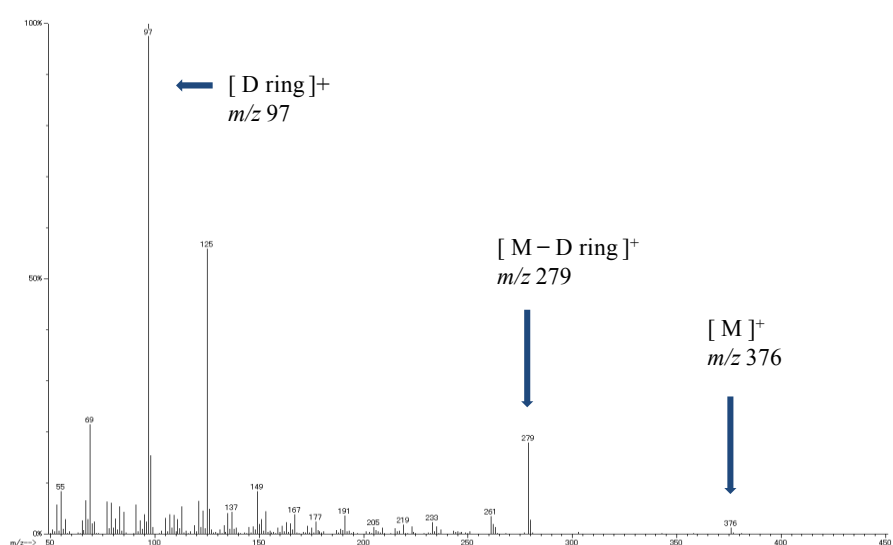


Fig. 2-9 EI mass spectrum of germination stimulant B purified from *Avena strigosa* root exudates

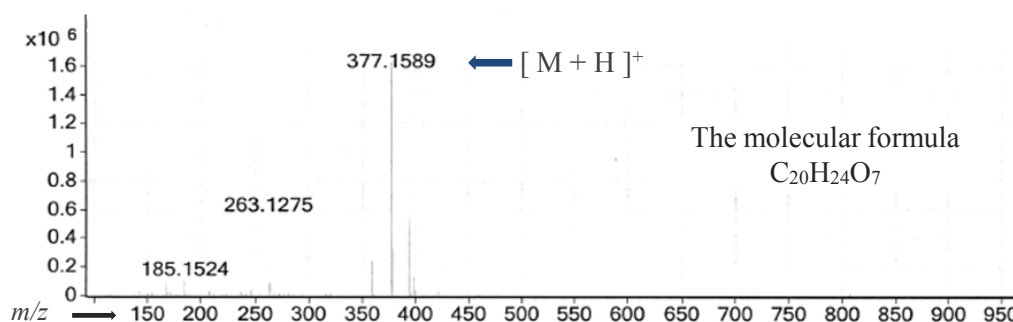


Fig. 2-10 HR-ESI-TOF-MS spectrum of germination stimulant B purified from *Avena strigosa* root exudates

発芽刺激物質Bの ^1H NMR, ^{13}C NMRの一次元NMR解析および ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC, NOESYの二次元NMR解析を行った。その結果をTable 2-1にまとめた。 ^{13}C NMRから、2つの α,β -不飽和エステルカルボニル炭素、2つの3置換オレフィン、2つの sp^3 4級炭素、2つのメチレン（1つは酸素原子と結合している）、5つのメチン（1つは酸素原子と結合している）と4つのメチル基が含まれていることが分かった。 ^1H - ^1H

COSYスペクトルから、C-3 (δ_C 70.4)とC-4 (δ_C 46.8), C-7 (δ_C 40.7)とC-12 (δ_C 71.3)およびC-2' (δ_C 100.8)とC-7' (δ_C 10.7)の結合が確認された。H₃-14, H₃-15とC-4 (δ_C 46.8), C-5 (δ_C 30.1)およびC-6 (δ_C 46.8), H-4とC-2 (δ_C 210.9), C-3 (δ_C 70.4), C-5 (δ_C 30.1)およびC-6 (δ_C 46.8), H₃-13とC-1 (δ_C 34.3), C-2 (δ_C 210.9), C-6 (δ_C 46.8)およびC-7 (δ_C 40.7)のHMBC相関から、C-5 (δ_C 30.1)にジェミナルメチル基、C-1 (δ_C 34.3)にメチル基およびC-2 (δ_C 210.9)にカルボニル炭素を持つシクロヘキサン環(A環)の存在が確認された。C-3 (δ_C 70.4)にはそのケミカルシフトから水酸基が存在すると考えられた。また、H-12bとC-7 (δ_C 40.7)およびC-10 (δ_C 170.4)のHMBC相関から、C-10 (δ_C 170.4)に α,β -不飽和エステルカルボニル炭素を持ち、C-7に結合するもう1つの γ -ラクトン環(C環)の存在が示唆された。さらに、H₃-13とC-1 (δ_C 34.3), C-6 (δ_C 46.8)およびC-7 (δ_C 40.7), H-6とC-13 (δ_C 21.8), H-7とC-13 (δ_C 21.8)のHMBC相関から、シクロプロパン環を有することも明らかとなった。更に、H₃-7'とC-3' (δ_C 139.9), C-4' (δ_C 136.0)およびC-5' (δ_C 170.4), H-6'とC-2' (δ_C 100.8), C-8 (δ_C 33.9), C-9 (δ_C 110.9), C-10 (δ_C 170.4)のHMBC相関から、C-7' (δ_C 40.7)にメチル基を、C-5' (δ_C 170.4)に α,β -不飽和エステルカルボニル炭素を持つエノール- γ -ラクトン構造(D環)が示唆された。すなわち発芽刺激物質Bは、SLに特徴的な構造であるエノールエーテルを介して結合したCD環部分構造を持っていることが明らかとなった。

以上の解析結果から、発芽刺激物質Bの化学構造を[5-((4-(3-hydroxy-1,5,5-trimethyl-2-oxobicyclo[4.1.0]heptan-7-yl)-2-oxodihydrofuran-3(2*H*)-ylidene)methoxy)-3-methylfuran-2(5*H*)-one]と決定し、avenaolと名付けた。なお、H-6, H-7およびH₃-13がシクロプロパン環に対して*cis*配位であること、H-3とH-8のNOE相関から、シクロプロピル基とC-3の水酸基が*trans*配位であることが示唆された。さらにH-8とH-12aのNOE相関から、avenaolの相対的立体配置をFig. 2-11に示したように推定した。また、CDスペクトルでは、232 nmに正の、208 nmに負のコットン効果が観察されたこと(Fig. 2-12)、既知のSLのC-2'位

の立体配置がすべて*R*であることから、avenaolのC-2'位の立体配置も*R*であると考えられた。しかしながら、立体化学を完全に解明するためには、更なる研究が必要である。

Avenaolの*O. minor*, *P. ramosa*および*S. hermonthica*種子に対する発芽刺激活性を調査した(Fig. 2-13)。その結果、avenaolは10 nMで*P. ramosa*種子の約50%を発芽させたが、*O. minor*, *S. hermonthica*種子に対して同程度の発芽率を示すためには1 μ M以上の濃度が必要であった。

Table 2-1 ¹H-, ¹³C-NMR data of germination stimulant B

No.	δ ¹ H (mult., <i>J</i> Hz)	δ ¹³ C	HMQC	¹ H- ¹ H COSY	NOESY	HMBC
1		34.3	C			
2		210.9	C			
3	3.62 (<i>ddd</i> , 7.7, 6.0, 1.9)	70.4	CH	H-4	H-4, H-8, OH	C-5
4	1.60 ^b	46.8	CH ₂	H-3	H-3, H-8, H-14, H-15	C-2, C-3, C-5, C-6, C-14, C-15
5		30.1	C			
6	0.62 (<i>d</i> , 9.0)	46.8	CH	H-15	H-13	C-1, C-13, C-14, C-15
7	0.67 (<i>dd</i> , 9.2, 11.7)	40.7	CH	H-8	H-13	C-13
8	2.68 (<i>m</i>)	33.9	CH	H-7, H-12a	H-3, H-4, H-12a, H-12b	
9		110.9	C			
10		170.4	C			
12a	3.54 (<i>dd</i> , 8.9, 4.3)	71.3	CH ₂	H-8	H-8, H-14, H-12b	
12b	3.79 (<i>t</i> , 8.6)				H-8, H-14, H-12a	C-7, C-10
13	1.01 (<i>s</i>)	21.8	CH ₃		H-6, H-7	C-1, C-2, C-6, C-7
14	0.50 (<i>s</i>)	29.1	CH ₃	H-15	H-4, H-12a, H-12b	C-4 ^a , C-5, C-6 ^b , C-15
15	0.75 (<i>s</i>)	32.2	CH ₃	H-6, H-14	H-4	C-4 ^a , C-5, C-6 ^b , C-14
2'	4.91 (<i>m</i>)	100.8	CH	H-7'	H-6'	C-6'
3'	5.78 (<i>t</i> , 1.6)	139.9	CH	H-7'	H-7'	C-2'
4'		136.0	C			
5'		170.4	C			
6'	7.30 (<i>d</i> , 2.0)	152.4	CH		H-2'	C-8, C-9, C-10, C-2'
7'	1.66 (<i>t</i> , 1.5)	10.7	CH ₃	H-2', H-3'	H-3'	C-3', C-4', C-5'
OH	3.87 (<i>d</i> , 1.9)				H-3	C-4 ^a

^a Overlapping signals^b Obscured signal.

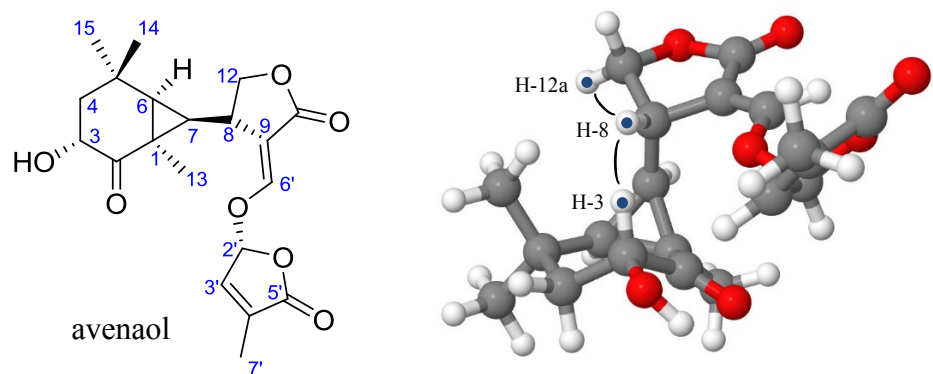


Fig. 2-11 Proposed structure and 3D model of avenaol with key NOEs.

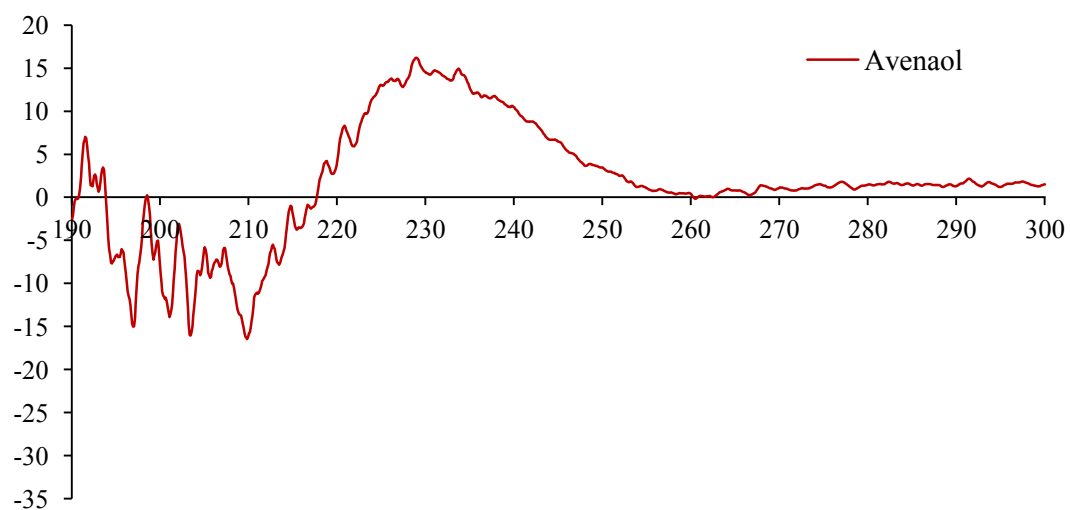


Fig. 2-12 The CD spectrum of avenaol ($c = 0.0020$)

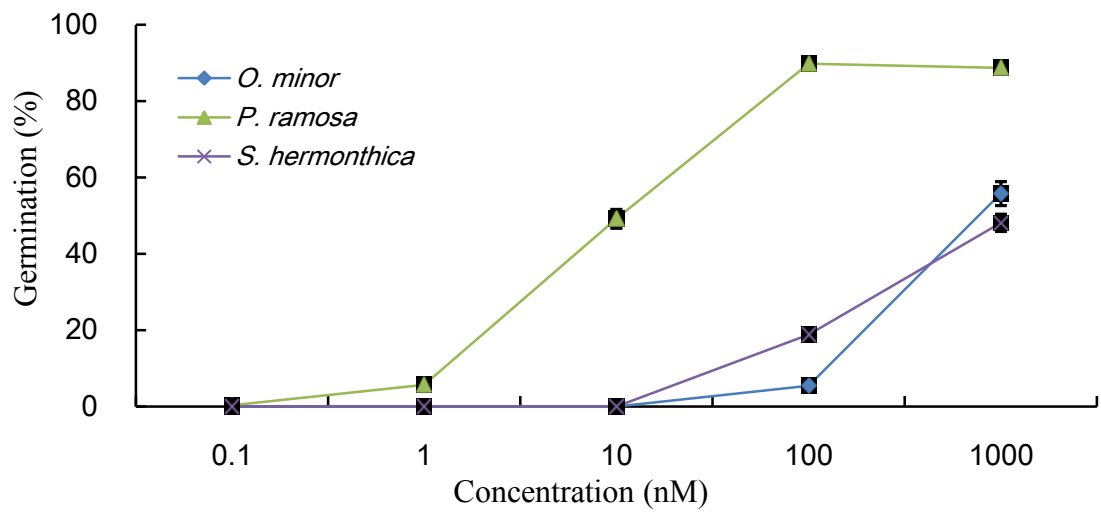


Fig. 2-13 Germination stimulation activity of avenaol on *O. minor*, *P. ramosa* and *S. hermonthica* seeds

2-3 考察

本章では、エンバクの1種であるセイヨウチャヒキが生産する発芽刺激物質の探索および単離・構造解析を行った。セイヨウチャヒキはブラジルやヨーロッパでは、間作植物、緑肥作物として利用されている。セイヨウチャヒキは雑草の生育を抑えるアレロパシー活性があるため、ストライガに対する*Desmodium*のように、根寄生植物オロバンキの被害軽減に効果があると考えられた。そこで、セイヨウチャヒキを水耕栽培し、粗抽出物の*O. minor*に対する発芽刺激活性を調査した。その結果、セイヨウチャヒキは既知のSLを分泌していないが、少なくとも6種類の未知発芽刺激物質を分泌していることが分かった。そこで、粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して得られた11画分について、*O. minor*種子に対する発芽刺激活性検定とLC-MS/MS分析を行い、発芽刺激活性が強く、含まれている発芽刺激物質の種類が少なく、精製が比較的容易であると考えられた40% EtOAc溶出区および60% EtOAc溶出区に含まれる発芽刺激物質の単離・構造解析を行った。

40% EtOAc溶出区からは、MeO-5DS異性体と推定された発芽刺激物質Aが単離された。イネ(NERICA)がMeO-5DS異性体を分泌することは報告されているが (Jamil et al., 2011)、単離・構造解析は行われていない。そこで、合成MeO-5DS異性体とLC-MS/MS分析によって比較した結果、いずれの合成MeO-5DS異性体も発芽刺激物質Aとは異なっていることが分かった。GC-MS分析でも同様の結果が得られた。単離された発芽刺激物質Aの量が少なかったため、¹H-NMRデータしか得られなかったが、既知SLおよびcarlactoneのNMRデータとの比較から、発芽刺激物質Aの構造をmethyl 3-oxocaractone-5-carboxylateと推定した。

60% EtOAc溶出区からは0.4 mgの発芽刺激物質Bが得られ、avenaolと命名した。Avenaolは、SLに典型的なA環、エノールエーテルを介して結合したCD環部分構造を含

むがB環を持たないユニークな構造である。AvenaolのA環はシクロプロパン環と縮合してbicyclo[4.1.0]heptane環を構成しているが、このような特異な構造がどのようにして形成されたのかは興味深い。発芽刺激物質Aもavenaolも、炭素数は20であり、炭素数19のcarlactoneより1炭素多い。この炭素は、発芽刺激物質Aのように、メチルエステルのメチル炭素由来であると考えるのが妥当であろう。すなわち、C18あるいはC19が恐らくP450酵素によってカルボン酸まで酸化された後、メチルエステル化されることによって炭素数が1つ増え、methyl carlactone-5(9)-carboxylateが生成し、その後の修飾変換によって発芽刺激物質Aやavenaolが生成すると考えられる。なお、avenaolでは、エステルメチル基の水酸化後に脱水と環化が同時に進行してC環が形成され、続いてシクロプロパン環が形成されるのであろう。この際、A環の4位に水酸基が存在すると環化が容易に進行すると考えられる。

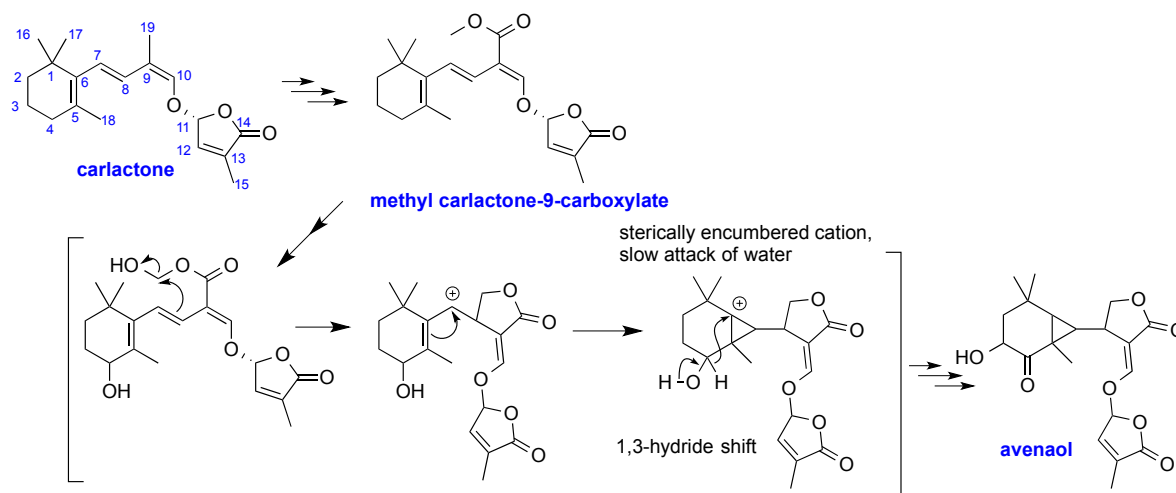


Fig. 2-14 Tentative biosynthetic pathway of avenaol from carlactone

セイヨウチャヒキは既知のSLではない発芽刺激物質を少なくとも6種類分泌しており、その内2種類は、carlactone誘導体であることが分かった。CarlactoneはSL生合成中間体

として植物体内でSLに変換されることが確認されているが(Seto et al., 2014)、本研究で明らかになったように、carlactoneからはavenaolのような別のタイプの代謝物も生合成されることが分かった。残念ながらavenaolを始めとするcarlactone誘導体は化学的に不安定であることが知られているSLよりもさらに不安定であり、単離された量も少なかったことから、根寄生植物の種子発芽刺激活性以外の生理活性は調査できていない。今後、各種生理検定に必要な量を確保すると共に、発芽刺激物質Aについては各種機器分析データをそろえて構造決定を進めることが必要である。

第 3 章 総合考察

最初のSLであるstrigolが根寄生植物*Striga lutea*の発芽刺激物質として単離されて以来 (Cook et al., 1966)、10種類以上のSLが根寄生植物の宿主および非宿主植物の根浸出液から単離され、多くの植物がSLおよびその他の発芽刺激物質を生産・分泌していることが分かった。すべての天然SLは、ABC環の母核にブテノライドのD環がエノールエーテルを介して結合している(Xie et al., 2013)。根寄生植物に対する発芽刺激活性発現には、このC-D環の部分構造が必須であり、さらにAB環の置換様式とC-2'位の立体配置によって発芽刺激活性が大きく影響される (Zwanenburg et al., 2009)。

第1章では、2種類の根寄生植物(*O. minor*, *P. ramosa*)に対する13種のSL単独および2種類のSLの等モル混合物の発芽刺激活性から、SLの構造要求性を検討した。なお、13種のSLの内、GR24を含む4種類はラセミ体混合物である。その結果、*O. minor*に対しては2'-エピ体が若干高い活性を示す傾向であり、特にorobancholと*ent*-2'-*epi*-orobancholで活性の差が顕著であった。Sorgomolと7-oxoorobanchol以外のモノヒドロキシSL (orobanchol, solanacol, strigol)はほぼ同程度の強い発芽刺激活性を示したが、水酸基のアセチル化によって一般に活性が低下し、特に*rac*-2'-*epi*-solanacolでは、アセチル化により活性が1/1000に低下した。逆に7-oxoorobancholでは、対応するアセチルエステルの方が高活性であった。また、合成SLである*rac*-GR24の活性は天然SLに比較すると低く、orobancholの1/100以下であった。一方、*P. ramosa*に対する発芽刺激活性でも、2'-エピ体が若干高い活性を示す傾向であった。なお、2'-エピ体ではアセチル化により活性が低下する傾向であったが、orobanchol, solanacol, 7-oxoorobancholではアセチル化により活性が若干上昇した。*O. minor*の場合とは対照的に、*rac*-GR24は強力な発芽刺激活性を示した。また、*O. minor*では高濃度のSL存在下で発芽率の低下は認められなかったが、*P. ramosa*で

は至適濃度を超えると発芽率が低下する傾向であった。

SLの発芽刺激活性における構造要求性については多くの報告があるが、研究者によって試験方法が微妙に違うので、異なった論文の活性データを直接比較することは困難である。興味深いのは、根寄生植物の種類によって、発芽刺激物質であるSLに対する感受性が異なっていることである。ただし、同じ種類の根寄生植物でも、採取地や宿主植物によって発芽刺激物質に対する感受性が異なるので注意する必要がある。例えばフランス国内には3系統の*P. ramosa*が繁殖しているが、本実験で用いたものはセイヨウアブラナに寄生するpathotype 1である。また、例えば、構造活性研究に良く使用される*S. hermonthica*と*P. ramosa*は、SLだけではなく、それぞれエチレンとイソチオシアン酸エステルによっても発芽が誘導される。最近、Nomuraらは、光学異性体を含む36種のSLについて、構造要求性が厳密な*S. gesnerioides*と、それほど厳密ではない*S. hermonthica*種子に対する発芽刺激活性を比較している。詳細は省略するが、*S. gesnerioides*では α 配位のC環の存在が活性発現に必須であるのに対して、*S. hermonthica*では、2'-位の立体配置が(R)である化合物がより高い活性を示し、C環の立体配置はそれほど重要ではなかった(Nomura et al., 2013)。すなわち、*S. gesnerioides*に対してはorobanchol-type SLsのみが発芽刺激活性を示すのに対して、*S. hermonthica*では、orobanchol-type SLsとstrigol-type SLsの両方が発芽活性を示すものと考えられる。本研究で実験材料とした*O. minor*と*P. ramosa*は、宿主認識がそれほど厳密ではなく、宿主範囲が広い根寄生植物として知られている。Solanacol誘導體ではラセミ体混合物を使用しているが、*S. gesnerioides*のように対掌体が拮抗的作用を示す可能性は低いと考えられる。

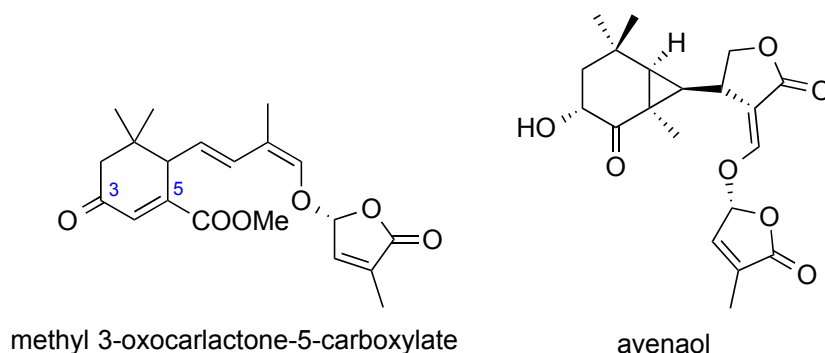
以前、*O. minor*種子の発芽刺激活性におけるSLの構造要求性について報告したが、その報告に記載されているorobancholと2'-*epi*-orobancholは、本論文ではそれぞれ*ent*-2'-*epi*-orobancholとorobancholに対応する（orobancholの構造が改訂されたため）。すなわち、

orobancholの方が*ent-2'-epi-orobanchol*よりも高活性であり、本研究のデータとは逆になっている。その理由は不明であるが、実験条件が同じでも種子の由来／状態によってSL感受性が変動するので、この違いは変動の範囲と考えている。

2種類のSL混合物の発芽刺激活性については十分検討されたとは言えないが、少なくとも*O. minor*と*P. ramosa*について試験した組み合わせの範囲では、2種のSLの混合による相乗的あるいは拮抗的な相互作用は認められなかった。すでに述べたように、植物は少なくとも2種類以上のSLを生産・分泌している(Xie et al., 2010)。例えば、根寄生植物*O. hederiae*は宿主植物であるイングリッシュアイビーの根浸出液でのみ発芽する(Fernández-Aparicio et al., 2011)ので、イングリッシュアイビーは*O. hederiae*の種子発芽だけを特異的に誘導する発芽刺激物質を分泌しているのかも知れない。一方、ヒマワリに寄生する*O. cumana*の種子発芽は、ヒマワリの根浸出液以外に、strigolおよびstrigyl acetateを主要なSLとして含んでいるワタの根浸出液によってもある程度の発芽が誘導されるが、orobanchol等を比較的大量に含むマメ科植物の根浸出液では発芽は全く誘導されない(Fernández-Aparicio et al., 2011)。このことは、*O. cumana*種子の発芽には、宿主植物から分泌されるSLの量よりSLの組み合わせが重要であることを示唆している。なお、ヒマワリが分泌する*O. cumana*の発芽刺激物質としてセスキテルペンラクトンであるdehydrocostuslactoneが同定されているが(Joel et al., 2011)、ヒマワリもSL様発芽刺激物質を分泌していることを確認しているので、*O. cumana*の宿主認識にはSLの関与を無視できないと考えられる。また、イングリッシュアイビーの根浸出液には*O. hederiae*の種子発芽刺激物質が含まれていることを確認したが、根浸出液抽出物をRP-HPLCで分取して*O. hederiae*および*O. minor*に対する発芽刺激活性を検定した結果、それぞれは全く異なった画分に溶出された。

第2章では、セイヨウチャヒキが生産する発芽刺激物質の探索から、新奇発芽刺激物

質avenaolを単離・構造決定した。セイヨウチャヒキは、根浸出液抽出物のRP-HPLC分取画分の*O. minor*に対する発芽刺激活性から、少なくとも6種類の発芽刺激物質を生産していることが分かったが、既知のSLは検出できなかった。発芽刺激活性を指標とした精製を行った結果、2種類の新奇発芽刺激物質を単離することができた。内1種については量が少なく2D NMRデータが取得できなかったため構造決定には至らなかったが、carlactone誘導体と考えられる推定構造(methyl 3-oxocarlactone-5-carboxylate)が得られた。今後、サンプル量を確保して構造を確定する必要がある。



他方の新奇発芽刺激物質はNMRを始めとする各種機器分析データから構造を確定し、avenaolと名付けた。Avenaolはbicyclo[4.1.0]heptanone骨格を有するユニークな構造であり、一般的なSLと比較すると活性発現に必要とされるCD環部分を有するがB環を欠いている。さらに、先のcarlactone誘導体と同様に、一般的なSLより炭素数が1つ多いC₂₀化合物である。Carlactoneの炭素数が19であることから、これらの新奇発芽刺激物質は、carlactoneの5位あるいは9位のメチル基がカルボン酸まで酸化され、さらにメチルエステルとなったmethyl carlactone-5-carboxylateおよびmethyl carlactone-9-carboxylateから生合成されると考えられる。同じようにcarlactoneから派生したと考えられるC₂₀の新奇発芽刺激物質がイネ、トウモロコシ、ヒマワリ、キュウリ、シロイヌナズナ、ポプラなど

からも検出されており、今後、これらのcarlactone関連化合物がSLと同様にAM菌や根粒菌の共生を促進するのか、また、植物ホルモンとしての作用を有するのかについて詳細に検討する必要がある。

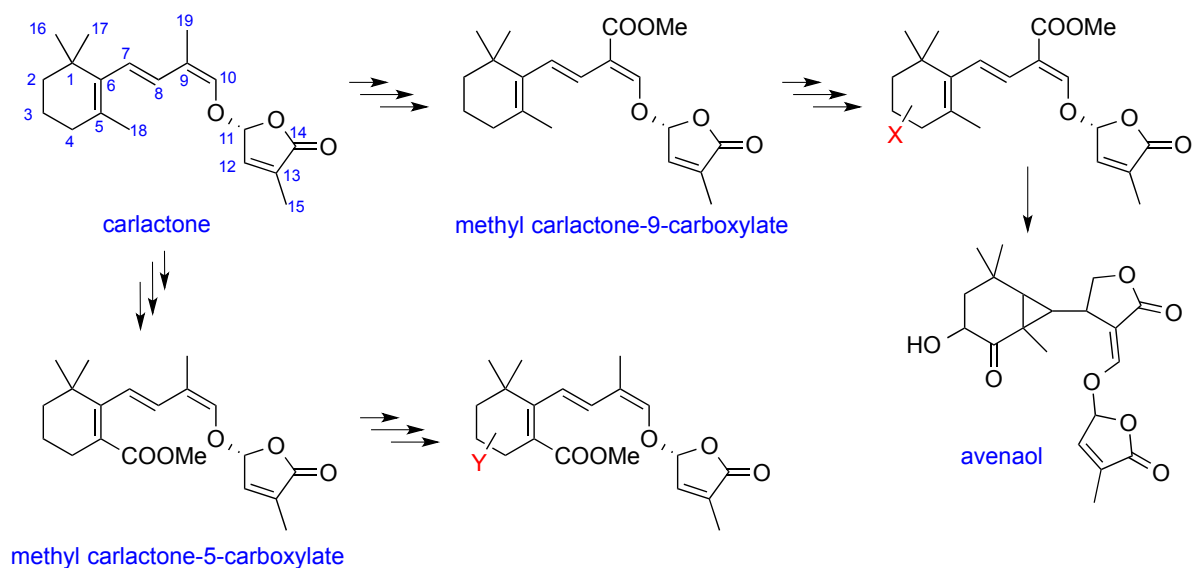


Fig. 3-1 The proposed synthesis pathway of methyl carlactone-5-carboxylate, avenaol and other carlactone derivatives.

引用文献

- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827
- Aly R (2012) Advanced technologies for parasitic weed control. *Weed Sci.* 60: 290-294
- Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH (2003) Secondary metabolite signaling in host-parasitic plant interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 358-364
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Bécard G (2007) Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci.* 12: 224-230
- Brewer PB, Koltai H, Beveridge CA (2013) Diverse role of strigolactones in plant development. *Mol. Plant* 6: 18-28
- Chae SH, Yoneyama K, Takeuchi Y, Joel DM (2004) Fluridone and norflurazon, carotenoid-biosynthesis inhibitors, promote seed conditioning and germination of the holoparasite *Orobancha minor*. *Physiol. Plant.* 120: 328-337
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH (1966) Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154: 1189-1190
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH, Coggon P, Luhan PA, Mcphail AT (1972) Germination stimulants. II. The structure of strigol – A potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.) *J. Am. Chem. Soc.* 94: 6198-6199
- Cook SM, Khan ZR, Pickett JA (2007) The use of ‘push-pull’ strategies in integrated pest management. *Ann. Rev. Entomol.* 52: 375-400

- Fernández-Aparicio M, Yoneyama K, Rubiales D (2011) The role of strigolactones in host specificity of *Orobanche* and *Phelipanche* seed germination. *Seed Sci. Res.* 21: 55-61
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Citernesi AS, Logi C (1993) Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during preinfection stages. *New Phytol.* 125: 587-593
- Giovannetti M, Sbrana C, Logi C (1994) Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 127: 703-709
- Goldwasser Y, Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K (2008) Production of strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobanche aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regul.* 55: 21-28
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189–194
- Hauck C, Müller S, Schildknecht H (1992) A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plant. *J. Plant Physiol.* 139: 474-478
- Jamil M, Rodenburg J, Charnikhova T, Bouwmeester HJ (2011) Pre-attachment *Striga hermonthica* resistance of new rive for Africa (NERICA) cultivars based on low strigolactone production. *New Phytol.* 192: 964-975
- Joel DM (2000) The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite. *Crop Prot.* 19: 753-758
- Joel DM (2013) Functional structure of the mature haustorium. In Joel DM, Gressel J, Musselman LJ. eds. *Parasitic Orobanchaceae*. Springer, Amsterdam, pp. 25-60

- Joel DM, Chaudhuri SK, Plakhine D, Ziadna H, Steffens JC (2011) Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry*. 72: 624-634
- Joel DM, Steffens JC, Matthews DE (1995) Germination of weedy root parasites. In Kigel J, Galili G, eds, *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 567-598
- Kim HI, Kisugi T, Khetkam P, Xie X, Yoneyama K, Uchida K, Yokota T, Nomura T, McErlean CSP, Yoneyama K (2014) Avenaol, a germination stimulant for root parasitic plants from *Avena strigosa*. *Phytochemistry* 103: 85-88
- Kim HI, Xie X, Kim HS, Chun JC, Yoneyama K, Nomura T, Takeuchi Y, Yoneyama K (2010) Structure-activity relationship of naturally occurring strigolactones in *Orobanche minor* seed germination stimulation. *J. Pestic. Sci.* 35: 344-347
- Kisugi T, Xie X, Kim HI, Yoneyama K, Sado A, Akiyama K, Hayashi H, Uchida K, Yokota T, Nomura T, Yoneyama K (2013) Strigone, isolation and identification as a natural strigolactone from *Houttuynia cordata*. *Phytochemistry*. 87: 60-64
- Mangnus EM, Zwanenburg B (1992) Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanche* seeds by strigol and its synthetic analogues. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1066-1070
- Müller S, Hauck C, Schildknecht H (1992) Germination stimulants produced by *Vigna unguiculata* Walp cv Saunders Upright. *J. Plant Growth Regul.* 11: 77-83
- Nomura S, Nakashima H, Mizutani M, Takikawa H, Sugimoto Y (2013) Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of *Striga gesnerioides* seeds. *Plant Cell Rep.* 32: 829–838.

- Parker C (2009) Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Manag. Sci.* 65: 453-459
- Parker C (2012) Parasitic weeds: A world challenge. *Weed Sci.* 60: 269-276
- Price AJ, Wayne RD, Petterson MG (2006) Evaluation of weed control provided by three winter cereals in conservation-tillage soybean. *Renew. Agric. Food Syst.* 21: 159-164
- Ratnadass A, Rernandes P, Avelino J, Habib R (2012) Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agron, Sustain. Dev.* 32: 273-303
- Rubiales D, Heide-Jørgensen HS (2011) Parasitic Plants. *Encyclopedia of Life Sciences.*
doi:10.1002/9780470015902.a0021271
- Seto Y, Sado A, Asami K, Hanada A, Umehara M, Akiyama K, Yamaguchi S (2014) Carlactone is an endogenous biosynthesis precursor for strigolactones. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 1640–1645
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133: 16-20
- Ueno K, Nomura S, Muranaka S, Mizutani M, Takikawa H, Sugimoto Y (2011) *Ent-2'-epi-orobanchol* and its acetate, as germination stimulants for *Striga gesnerioides* seeds isolated from cowpea and red clover. *J. Agric. Food Chem.* 59: 100485-10490
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Kamiya NT, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195-201

- Xie X, Kusumoto D, Takeuchi Y, Yoneyama K, Yamada Y, Yoneyama K (2007) 2'-epi-orobanchol and solanacol, two unique strigolactones, germination stimulants for root parasitic weeds, produced by tobacco. *J Agric. Food Chem.* 55: 8067-8072
- Xie X, Yoneyama K, Harada Y, Fusegi N, Yamada Y, Ito S, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K (2009a) Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 70: 211-215
- Xie X, Yoneyama K, Kisugi T, Uchida K, Ito S, Akiyama K, Hayashi H, Yokota T, Nomura T, Yoneyama K (2013) Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Mol. Plant* 6: 153-163
- Xie X, Yoneyama K, Kurita J, Harada Y, Yamada Y, Takeuchi Y, Yoneyama K (2009b) 7-Oxoorobanchyl acetate and 7-oxoorobanchol as germination stimulants for root parasitic plants from flax (*Linum usitatissimum*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1367-1370
- Xie X, Yoneyama K, Kusumoto D, Yamada Y, Takeuchi Y, Sugimoto Y, Yoneyama K (2008b) Sorgomol, germination stimulant for root parasitic plants, produced by *Sorghum bicolor*. *Tetrahedron Lett* 49: 2066-2068
- Xie X, Yoneyama K, Kusumoto K, Yamada Y, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K (2008a) Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a novel germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry* 69: 427-431
- Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K (2010) The strigolactone story. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 93-117
- Yokota T, Sakai H, Okuno K, Yoneyama K, Takeuchi Y (1998) Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry* 49: 1967-1973

- Yoneyama K, Awad AA, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y (2010) Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiol.* 51: 1195-1103
- Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H, Yoneyama K (2008) Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol.* 179: 484-494
- Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y (2009) Strigolactones: structure and biological activities. *Pest Manag. Sci.* 65: 467-470
- Zwanenburg B, Mwakaboko AS, Reizelman A, Anilkumar G, Sethumadhavan D (2009) Structure and function of natural and synthetic signaling molecules in parasitic weed germination. *Pest Manag. Sci.* 65: 478-491

謝 辞

本論文研究をまとめるに当たり、始終懇切なる御指導および御激励を下さった宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センターの米山弘一教授に心から深く感謝いたします。また、本論文研究に対し、御指導と御助言を下さった宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターの野村崇人准教授、謝肖男助教に感謝いたします。とりわけ、謝肖男助教には研究に関する全面的な御指導に心から感謝します。さらに本研究遂行にあたり、いつも御助言および精神的な御激励を与えて下さった宇都宮大学竹内安智名誉教授に深く感謝の意を表します。本論文の作成に当たり、貴重なアドバイスを与えて下さった東京農工大学の夏目雅裕教授、茨城大学の鈴木義人教授に深く感謝します。研究に関する御指導、研究者としての心がけをご丁寧に教えていただいた米山香織博士、来生貴也博士に心から感謝します。また、論文実験の中、合成SLを御供与頂いた大阪市立大学の秋山康紀教授、機器分析およびデータ処理に御協力下さった帝京大学の横田孝雄教授、内田健一教授、オーストラリアシドニー大学のChristopher S. P. McErlean教授に深く感謝します。

宇都宮大学はバイオサイエンス教育研究センターで論文研究を行う機会を与えて下さり、御指導下さった韓国の全北大学の全載哲名誉教授、李鎮顥教授に深く感謝いたします。留学生活に大きな力となっていたいただいた宇都宮大学の農学部房相佑准教授に心から深く感謝します。また、留学生活にご支援を下さったロータリー米山記念奨学会西那須野クラブの高橋智純先生、関谷直人先生に感謝します。さらに、大学生活の良い思い出を作って下さった宇都宮大学の事務補佐員である川崎順子様、技能補佐員の須永広行様、技術補佐員の高橋明子様および先輩、後輩達に心から感謝します。

最後に、日本での留学生生活を誰よりも支援してくれた韓国の母、兄、姉およびいつも笑顔で迎えてくれる甥子、姪子たちに感謝します。

2014年 6月

金 賢一