慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	近縁種が織りなす寄生関係のケミカルエコロジー多様性の化学的解明
Sub Title	Chemical studies on diversity of chemical ecology in closely-related parasitic systems
Author	犀川, 陽子(Saikawa, Yoko)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	寄生菌P2は、互いに近縁の真菌C1とC2を侵食する際に、C1には誘引され、C2には阻害される。この誘引と阻害に関わる物質を探索した結果、C1の抽出物からP2に対する誘引活性を示す新規の芳香族化合物を単離、構造決定した。一方、タマバエがブナの葉の組織を異常発達させてできる虫えいに注目し、その桃色虫えいに含まれる主要赤色色素の化学構造を決定した。また、この赤色色素は、葉に比べて虫えい中に3倍程度多く存在することを明らかにした。さらに、赤色色素を異常生産させる物質を探索する評価系を確立し、虫えい抽出物に若葉を赤変する活性を見出した。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2010～2012 課題番号：22603009 研究分野：ケミカルバイオロジー 科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22603009seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２５年　３月３１日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010～2012
課題番号：２２６０３００９
研究課題名（和文）　近縁種が織りなす寄生関係のケミカルエコロジー多様性の化学的解明
研究課題名（英文）　Chemical studies on diversity of chemical ecology in closely-related parasitic systems

研究代表者
犀川　陽子（Saikawa Yoko）
慶應義塾大学・理工学部・専任講師
研究者番号：20348824

研究成果の概要（和文）：寄生菌P2は、互いに近縁の真菌C1とC2を侵食する際に、C1には誘引され、C2には阻害される。この誘引と阻害に関わる物質を探索した結果、C1の抽出物からP2に対する誘引活性を示す新規の芳香族化合物を単離、構造決定した。一方、タマバエがブナの葉の組織を異常発達させてできる虫えいに注目し､その桃色虫えいに含まれる主要赤色色素の化学構造を決定した。また、この赤色色素は、葉に比べて虫えい中に3倍程度多く存在することを明らかにした。さらに、赤色色素を異常生産させる物質を探索する評価系を確立し、虫えい抽出物に若葉を赤変する活性を見出した。

研究成果の概要（英文）：A parasite P2 is attracted by mycete C1 whereas P2 is inhibited by C2, closely related to mycete C1. As a result of a research for the attractant and the inhibitor from C1 and C2, a new attractant having an aromatic skeleton was isolated from C1. On the other hand, chemical studies of a pink, berry-like gall formed by gall midge laying egg into beechen leaves were investigated. The red pigment in the pink gall was identified and its content was three times higher than that in beechen leaves. Furthermore, an assay to evaluate erythrochromia activity was developed to reveal that the extract of the gall abnormally induced pigment production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	1,600,000	480,000	2,080,000
２０１１年度	1,000,000	300,000	1,300,000
２０１２年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ケミカルバイオロジー
科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー
キーワード：ケミカルエコロジー　国際情報交換　微生物　有機化学　生体分子　菌類　近縁種　進化

１．研究開始当初の背景

(1) 菌類間の誘引、阻害関係発現に関わる低分子化学シグナルの特定と共進化機構の解明:

2008 年 9 月から 1 年間の留学先であった Jon Clardy 博士(ハーバード医学大学院)の指導の下、Nicole Gerardo 博士(エモリー大学)との共同研究として、遺伝的に非常に近い 2 種の菌が寄生菌に対して一方は誘引し、他方は阻害するという現象の化学的な解明を開始した。帰国後、Gerardo 博士に菌を提供していただき、本研究費を得てクリーンベンチとシ

ェーカーを購入し、研究を再開した。

(2) タマバエ近縁種の違いによる虫えい形態多様性の現象解明:
　虫えいは虫が植物に卵を産みつけることによって植物自体の形態が変化する現象である。同じブナの葉に対してタマバエ科の近縁種が虫えいを形成させると、その形態は非常にバリエーションに富んだものとなるという多様性に注目してその多様性の原因を追究するべく研究を開始した。

２．研究の目的

(1) 菌類間の誘引、阻害関係発現に関わる低分子化学シグナルの特定と共進化機構の解明:
　菌と菌との間で起こる種特異的な誘引、阻害にまつわる多様性に注目し、菌が生産する特定の菌に対する誘引物質、阻害物質を調べることで、ケミカルエコロジーのシステムにより特異的に選ばれた種だけが共生、寄生関係を獲得する本質的な仕組みを解明することを目的とした。

(2) タマバエ近縁種の違いによる虫えい形態多様性の現象解明:
　タマバエがブナの葉に組織の異常発達を起こして形成させる虫えいの多様性に注目し、虫えいの形成メカニズムに迫ると共に、近縁のタマバエが形成させる多様な形状の虫えいの形成条件や化学成分を比較することでどのように多様性が現れているのかを化学的に追及することを目的とした。

３．研究の方法

(1) 菌類間の誘引、阻害関係発現に関わる低分子化学シグナルの特定と共進化機構の解明:
　ある菌 C1 はその寄生菌 P2 を誘引し、P2 に侵食されるが、P2 の近縁種である P1 は C1 に阻害を受ける(図 1)。一方、C1 の近縁種である C2 は P1 を誘引し、P2 を阻害するという C1 との逆転現象が見られる。
　図 1 に示した共培養においては、P1、P2 いずれにおいても共同実験者が報告した通りの誘引、阻害現象が見られたが、P1 は成長が遅いため、その現象を評価するのは困難であった。そこで、本研究では 2 種の寄生菌(P1, P2)のうち、成長の速い P2 に注目し、P2 が誘引または阻害される状態の観察によって活性を評価した。C1 および C2 をそれぞれ液体培養したのち、有機溶媒で抽出し、濃縮して抽出物を得た。寒天培地の一箇所に寄生菌 P2 を植菌し、同じ培地上、一定の距離に C1、C2 の抽出物や分離画分を 8 mg/mL の濃度で DMSO に溶解させたものを添加して、P2 の様子を観察し、誘引、阻害の評価をした。活性の見られた抽出物や画分についてさらに分離を行い、誘引物質、阻害物質の探索を行った。

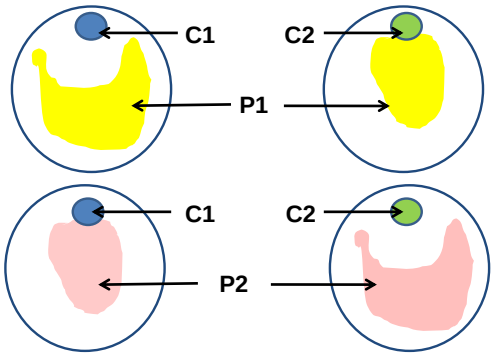

　図 1　菌類の共培養における誘引、阻害現象の概略図

(2) タマバエ近縁種の違いによる虫えい形態多様性の現象解明:
　虫えいの半分近くはタマバエによるものであり、その形態は様々である。これらの虫えいはタマバエの親や幼虫の分泌物や物理刺激によって植物組織の変化から生じると考えられているが、虫えいの形成メカニズムも多様性を生み出す化学物質の存在の有無も定かではない。そこで、数種の虫えいの観察から始め、それぞれの虫えいのユニークな色と形状がどのような植物組織の変化から生じているのかを調べることにした。

① 虫えいの観察
　特徴的な鮮やかな桃色とボール型のユニークな形の虫えいであるブナハアカゲタマフシ(図 2)と、同じブナながら全く形態の異なるブナハマルタマフシに注目し、まず、宿主であるブナの葉のどの組織に対してどのような形態変化が起きるのかを観察した。ブナハアカゲタマフシはブナの若葉が開く頃に急速に成長したのち脱落することが知られており、本研究期間の間に 5～6 月に集中して観察を行い、形成時期と期間や脱落までのスパンを含めた詳細なフィールドワークを行った。また、脱落個体の顕微鏡観察により組織を観察した。一方、ブナハマルタマフシはわずかしか観察できなかったため、タマバエの形成させるブナの葉の虫えいの別種としてブナハベリタマフシ、ブナハツノフシ、ブナハマゲタマフシを観察し、ブナの葉の形成箇所や形成時期、内部の様子を観察した。

図 2 ブナハアカゲタマフシ(左)とブナハベリタマフシ(右)

② ブナハアカゲタマフシ由来赤色色素の単離と同定

虫えいの化学成分として、まずブナハアカゲタマフシの特徴的な桃色に注目し、相当する赤色色素の同定を試みた。ブナハアカゲタマフシを酸性メタノールで抽出したのち、色素を HP-20 に吸着させて精製し、ODS クロマトグラフィーを経て赤色色素を単離した。また、別途同様の方法にてブナの若葉から赤色色素であるアントシアニンを分離し、虫えい由来赤色色素と比較した。

③ ブナハアカゲタマフシの赤色色素過剰生産に関わる化学物質の探索

②の結果(4 の項目に後述)を受けて、ブナハアカゲタマフシに特徴的な赤色色素の過剰生産に関わる化学物質が幼虫もしくは虫えい内に存在すると推測して、鍵化学物質の探索をおこなった。この際、赤色物質がアントシアニン類であることに注目し、アントシアニン生合成経路はブナに限らず植物全体でほぼ同じであることを利用して、容易に栽培可能なシロイヌナズナに抽出物を添加し、赤変活性があるかを評価することにした。既知の方法に基づき、シロイヌナズナの葉や根や培地に試料を適下し、最も活性の判断しやすい方法へと改良した。また、この評価系確立の際、ポジティブコントロールとして、コロナチンのラセミ体を化学合成して用いた(図 3)。

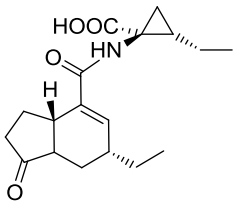

図 3　コロナチン(アントシアニン生合成を促進する植物毒)の構造

合成コロナチンを添加すると、シロイヌナズナの葉と葉柄部分が赤変し、アントシアニン生合成が促進されていることを評価することができた。この評価系を用いてブナハアカゲタマフシおよびブナハベリタマフシの抽出物の活性を調べた。

４．研究成果

(1) 菌類間の誘引、阻害関係発現に関わる低分子化学シグナルの特定と共進化機構の解明:

① C1 由来の P2 誘引物質の単離

まず、P2 に対して誘引現象を示す C1 の誘引物質を探索した。

C1 の抽出物の溶液を、P2 を植菌した培地に添加したところ、C1 を P2 と共培養した時に比べて程度は弱いものの、誘引現象が観察された。その後の検討により、抽出物試料の添加を 12 時間毎に行うことにより、C1 と P2 を共培養した時と同程度の誘引現象が見られ、試料中に含まれる誘引物質が不安定であるか、揮発性である可能性が示唆された。そこで、P2 と培地上で接触しないガラスカップに試料を入れて P2 培養条件下に置いたところ、図 4 のように C1 抽出物に向かって P2 が誘引される様子が観察された。

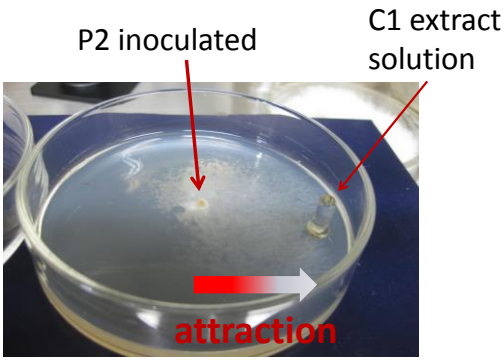

図 4　C1 抽出物の P2 誘引現象

このことから C1 抽出物に含まれる誘引物質は揮発性物質であるとの確証を得て、抽出物からシリカゲルクロマトグラフィーおよび ODS クロマトグラフィーにより精製を行い、新規の芳香族アルデヒドを単離、構造決定した。芳香環置換基の配置については各種 NMR スペクトル測定により決定したほか、市販の試薬から化学合成を行うことによりその構造を確認した。この誘引物質は 0.1 mg/mL 以下の低濃度では誘引現象を引き起こすが、0.5 mg/mL 以上の濃度では培地上の高濃度領域で P2 に対する阻害現象も見られた。

② C2 由来活性物質の探索

①の結果を受け、C1,および C2,の P1 および P2 に対する誘引、阻害現象が同じ物質の濃度の制御によって司られているのではないかと推測し、C2 抽出物から同じ化合物を探索した。すなわち C2 抽出物を上述と同じくクロマトグラフィーにて分離し、分離画分の ^{1}H

NMR スペクトルを測定した。しかし、推測通りであれば C1 由来誘引物質が大量に含まれているはずの画分にも全く誘引物質に相当するシグナルは検出されず、C2 抽出物には C1 と同じ活性物質は含まれていないことがわかった。この分離の際に得られた画分について P2 に対する阻害活性を調べたところ、C1 由来誘引物質とは異なる画分に弱い活性が見られた。以上の結果より、C2 は C1 の持つ活性物質とは異なる活性物質を生産し、P2 を阻害することがわかった。

(2) タマバエ近縁種の違いによる虫えい形態多様性の現象解明:

① 虫えいの観察

ブナハアカゲタマフシの形成期間を観察したところ、直径 1 mm 未満の小さな虫えいが葉の表側に形成されたのち、数日間で急速に 7 mm 程度にまで成長し、さらに数日経つと脱落することがわかった。小さな虫えいを枝ごと切り離すと、枝を水に差しても成長は止まり、虫えい成長はブナからの栄養補給が常に行われる必要があると考えられた。また、脱落後の葉は小さな跡を残すのみで葉自体の侵食はしないことを確認した。顕微鏡観察により、幼虫室が葉の組織と類似し、幼虫室から外側に向かって中空の突起が成長し、これが特徴的な桃色やボール型に相当していた。この突起には赤色色素が多く含まれるように見える他、葉のクロロフィルは相対的に少ないようであった。ブナハマルタマフシ、ブナハマゲタマフシも同様に葉の表側に形成されるが比較的葉と同様の硬組織に覆われており、形成時期も開葉時期を過ぎた緑の葉に見受けられた。また、ブナハベリタマフシは秋口にかけても見られ、葉の縁にのみ形成されており、顕微鏡観察においてカプセル型の二重構造の中に幼虫室が見られた。ブナハマゲフシはブナハアカゲタマフシと同じ時期に観察されるが葉脈に沿った部分に形成され、組織はつやがあり硬かった。これらの色と形状の多様性は形成場所と形成時期に大きく左右されているように見受けられ、本質的な組織異常のメカニズムは実は似通っていることを示していると解釈している。

② ブナハアカゲタマフシ由来赤色色素の単離と同定

前述した方法にてブナハアカゲタマフシより赤色色素を単離した。別途単離したブナの若葉由来の赤色色素の各種スペクトルとの比較により虫えい由来の赤色色素はブナの色素と同じアントシアニンであるシアニジン―ガラクトース配糖体であることがわかった。しかし、ブナの色素については配糖様式は特定されていなかったので今回詳細な ^{1}H NMR スペクトル解析を行い、赤色色素がシアニジン-*O*-β ガラクトシドであることを決定した(図 5)。

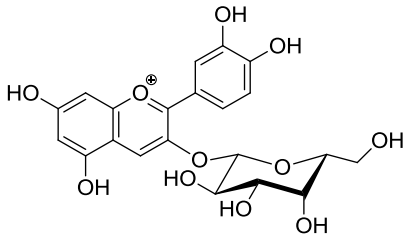

図 5　シアニジン-*O*-β ガラクトシドの構造

また、虫えいとブナの葉に含まれるこの赤色色素を定量したところ、虫えい中にはブナの葉の 3 倍以上の赤色色素が含まれていることがわかった。

③ ブナハアカゲタマフシの赤色色素過剰生産に関わる化学物質の探索

②の結果を受けて、ブナハアカゲタマフシの形成時にアントシアニンの異常生産が起こっていることを利用し、アントシアニン生合成を促進する物質を探索することにした。上述した評価系によりアントシアニン生合成が促進されればシロイヌナズナの赤変活性が見られることがわかったため、ブナハアカゲタマフシの抽出物を添加して観察したところ、コントロールに比べて有意に赤変が起こっていることがわかった(図 6)

図 6　赤変活性試験：コントロール(左)とブナハアカゲタマフシ抽出物の添加(右)

この赤変したシロイヌナズナの葉を集めて色素を抽出し、虫えい由来の赤色色素と比べたところ、別のアントシアニン色素であることがわかった。このことから、虫えい抽出物に含まれるシアニジン-*O*-β ガラクトシドがシロイヌナズナに浸透したのではなく、抽出物に含まれる特定の物質がシロイヌナズナのアントシアニン生合成を促進していることがわかった。この結果を受けて、ブナハベリタマフシの抽出物についても同様の方法にて赤変活性を調べたところ、ブナハアカゲタマフシと同様の活性があることがわかった。

以上、２種の研究テーマにより、共進化のモ

デルケースとなる寄生関係の多様性を探る研究を行った。本研究結果の範囲では多様性を説明する直接的なデータには至っていないが、菌類間の誘引、阻害現象の追及においては多様性の鍵となる化学物質も近縁種により異なる可能性を見つけた。また、虫えいの多様性については観察と化学成分の調査により、化学物質の多様性よりも虫えい形成時期や形成箇所の違いにより多様性が生じるストーリーが見えつつある。本研究期間にて確立した評価系や鍵化学物質の探索方法を利用してさらに研究対象のバリエーションを増やし、共進化とその多様性を化学的に説明できる手がかりを集める予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計０件）

〔学会発表〕（計１件）
「ブナハアカゲタマフシ形成に関する化学的研究」
栗栖泰之介、井上大樹、犀川陽子、中田雅也
新規素材探索研究会第 11 回セミナー(2012 年 6 月 8 日　新横浜フジビューホテル)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.applc.keio.ac.jp/~msynktxa/iinde/index.html(研究室 HP)

http://www.st.keio.ac.jp/kyurizukai/04_zadankai/(理工学部広報誌)

６．研究組織

(1)研究代表者
犀川　陽子（Saikawa, Yoko）

研究者番号：20348824

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし