

氏 名	おか だ まさ かず 岡 田 雅 和
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1072 号
学位授与の日付	平 成 11 年 5 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	宿主特異的毒素 AK-toxin 標識体の合成とナシ膜画分に対する結合性の評価

論文調査委員 (主 査)
教 授 上 野 民 夫 教 授 岩 村 倅 教 授 古 澤 巖

論 文 内 容 の 要 旨

ナシ黒斑病は、二十世紀ナシ栽培において甚大な被害を与えてきた病害であり、*Alternaria alternata* 日本ナシ病原型によって引き起こされる。本病の発病には病原菌が生産・分泌する宿主特異的毒素 AK-toxin が決定的な役割を果たす。AK-toxin は選択的な植物毒素活性を有し、黒斑病罹病性のナシ品種に対してはごく低濃度で壊死を誘起するのに対し、抵抗性品種には実質的な作用を示さない。これまでの遺伝学および植物生理学的な研究から黒斑病罹病性品種ナシの細胞膜には毒素受容タンパク質が存在し、この受容タンパク質の有無が毒素に対する感受性、さらには黒斑病罹病性を決定するものと考えられてきた。本論文は、AK-toxin の宿主特異的な毒素作用の発現機構を解明するため、その放射性標識体を有機化学的に合成し、得られた標識体の膜画分に対する結合性をもとに受容タンパク質の検出を試みたものである。その主な内容は以下の通りである。

1. AK-toxin のトリチウム標識体を合成するために、目的分子を共役二重結合部分、光学活性な構造部分、 β -メチルフェニルアラニン部分の三つの部分構造に分割し、それぞれを構築してから縮合する効率的かつ立体選択的な AK-toxin I メチルエステルの合成法を確立した。合成においては、不斉炭素の構築には D-フルクトース由来の分枝糖を利用し、共役トリエン部分の構築には Stille 反応を適用して、その幾何配置を制御した。またトリエン部分構築の過程で採用したヘミアセタールの増炭アルキン化反応には、dimethyl 1-diazo-2-oxopropylphosphonate を用いるのが効果的であることを見いだした。これら二つの部分を結合した後、文献既知の方法により不斉合成した β -メチルフェニルアラニンと縮合させ、最終段階のアセチル化反応をトリチウム標識無水酢酸を用いて行うことにより、AK-toxin のトリチウム標識体の合成に成功した。

2. ナシ葉細胞から分画遠心法によりミクロソーム画分を調製し、得られた AK-toxin のトリチウム標識体を用いてリガンド結合アッセイを行うことにより膜画分に対する結合性を評価した。結合アッセイの条件検討を行った結果、膜画分に結合した標識体の放射活性を正確に求めるには、ガラス繊維濾紙に捕捉した膜画分を可溶化剤により溶出させ、過酸化水素水でクロロフィルを脱色する操作が有効であることを見だし、これにもとづいて放射標識 AK-toxin のミクロソーム画分に対する結合を測定した。その結果、全結合と非特異的結合の間に有意な差(特異的結合)が認められ、同画分中に AK-toxin の受容タンパク質が存在することを初めて直接的に確認した。しかし、特異的結合は AK-toxin 感受性品種と非感受性品種いずれのミクロソーム画分に対しても認められた。このことから、毒素受容タンパク質は黒斑病罹病性遺伝子の産物ではなく、AK-toxin に対する感受性はこの受容タンパク質の有無によって決定されるのではないことが判明した。

3. これまで AK-toxin 受容タンパク質は細胞膜に存在すると考えられてきた。このことを検証するために、黒斑病罹病性品種のミクロソーム画分から細胞膜画分を精製し、これに対する AK-toxin の結合性を評価した。細胞膜画分の精製は、dextran-polyethylene glycol 系を用いた水性二相分離法により行い、マーカー酵素の活性から精製度の確認を行った。得られた膜画分についてリガンド結合アッセイを行った結果、全結合と非特異的結合との間に有意な差は見られず、このことより、毒素受容タンパク質は細胞膜に存在せず他の膜画分に存在することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

AK-toxin はナシ黒斑病菌が生産・分泌する宿主特異的毒素で極めて低い濃度で選択的な植物毒素活性を示す。本毒素の作用機構の解明は、病原菌の宿主認識についての理解を深めるとともに、病害防除法の開発に関する有効な手掛かりを与えるはずである。本論文は、AK-toxin の作用機構の解明をめざし、有機化学的手法を用いて初期作用点である受容タンパク質を探索したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. AK-toxin の有機化学的な合成法を確立した。合成にあたっては、特に標識部分の導入を効率よく行う点に配慮した経路を考案し、その計画に従って AK-toxin I メチルエステルを立体選択的に得ることに成功している。さらに本法により、受容タンパク質の検出に用いる AK-toxin のトリチウム標識体の合成を初めて達成した。

2. AK-toxin 受容タンパク質を検出する目的で、ナシ葉細胞から分画遠心法により調製したミクロソーム画分に対して、AK-toxin のトリチウム標識体を用いるリガンド結合アッセイを行った。アッセイにおいて有意な特異的結合を検出することにより、初めて直接的に AK-toxin の受容タンパク質の存在を確認した。また、特異的結合は毒素感受性品種と非感受性品種の両方において認められたことから、毒素受容タンパク質は黒斑病罹病性遺伝子の産物ではなく、毒素感受性はこの受容タンパク質の有無によって決定されるのではないことを明らかにした。

3. これまで AK-toxin 受容タンパク質の存在部位と考えられてきた細胞膜に注目して、水性二相分離法によりミクロソーム画分から細胞膜画分を精製し、リガンド結合アッセイを行った。ミクロソーム画分では認められた特異的結合が、精製細胞膜画分では認められなかったことから、受容タンパク質の存在部位が細胞膜ではない可能性を実験的に示した。

以上のように、本論文は宿主特異的毒素 AK-toxin 放射性標識体の有機化学合成を達成し、これを用いて、毒素受容タンパク質の存在を初めて明らかにした。さらに、受容タンパク質の存在部位および選択的毒素活性の発現機構についての考察も述べられている。本論文で得られた知見は、有機化学、植物病理学ならびに農業科学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、平成 11 年 3 月 18 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。