

ナシ黒斑病の宿主特異性発現機構
に関する研究、
とくに宿主特異的毒素の役割と
その作用機構について

尾 谷 浩

1979

()

ナシ黒斑病の宿主特異性発現機構
に関する研究、

とくに宿主特異的毒素の役割と
その作用機構について

尾 谷 浩

名古屋大学図書
和 807055

1979

報告番号 2 第 183 / 号

目次

第1章	緒論	1
第2章	菌の侵入行動と宿主の抵抗反 応	6
1	感染過程における菌の行動	6
1)	実験材料および方法	6
2)	実験結果	7
2	熱処理による抵抗反応の誘導停 止	14
1)	実験材料および方法	14
2)	実験結果	14
3	非病原菌接種および胞子発芽液 処理による抵抗反応の誘導	18
1)	実験材料および方法	18
2)	実験結果	19
第3章	感染成立におけるAK-毒素の 役割	27
1	胞子発芽によるAK-毒素の分泌	27
1)	実験材料および方法	28

2)	実験結果	29
2	胞子接種による電解質多量漏出 と AK-毒素の効果	35
1)	実験材料および方法	35
2)	実験結果	36
3	AK-毒素添加および除去による 菌の感染行動の制御	40
1)	実験材料および方法	40
2)	実験結果	41
4	拮抗反応誘導薬における AK-毒 素の効果	43
1)	実験材料および方法	44
2)	実験結果	44
第4章	AK-毒素の宿主特異的生理活 性	48
1	AK-毒素濃度と宿主の反応	48
1)	実験材料および方法	49
2)	実験結果	50
2	十シ品種間の AK-毒素反応性	53
1)	実験材料および方法	53

2)	実験結果	53
3	ナシ組織および心臓の AK-毒素	
	反応性	55
1)	壊死斑の形成	55
i)	実験材料および方法	56
ii)	実験結果	56
2)	電解質の量漏出	56
i)	実験材料および方法	57
ii)	実験結果	57
3)	原形質分離能の失活	57
i)	実験材料および方法	59
ii)	実験結果	59
4)	原形質流動の停止	59
i)	実験材料および方法	62
ii)	実験結果	62
5)	気孔開閉能の失活	62
i)	実験材料および方法	64
ii)	実験結果	64
6)	花粉発芽の抑制	64
i)	実験材料および方法	66

ii)	実験結果	66
4	遊離細胞およびプロトプラスト の AK-毒素反応性	66
i)	実験材料および方法	68
2)	実験結果	69
第5章	AK-毒素の宿主特異的作用機 構	75
1	AK-毒素による電解質多量漏出 現象	75
i)	電解質の初期漏出に対する AK- 毒素の効果	75
i)	実験材料および方法	76
ii)	実験結果	76
2)	電解質多量漏出に対する温度 の影響	78
i)	実験材料および方法	78
ii)	実験結果	79
3)	宿主組織からの電解質多量漏 出量	79
i)	実験材料および方法	81

ii)	実験結果	81
4)	¹⁴ C-ラベル物質の漏出に対するAK-毒素の効果	82
i)	実験材料および方法	82
ii)	実験結果	82
5)	電解質漏出に対するナシ黒斑病菌代謝毒性物質の効果	84
i)	実験材料および方法	86
ii)	実験結果	86
2)	AK-毒素による多量漏出物質の分析	88
i)	実験材料および方法	88
2)	実験結果	89
i)	無機イオンの漏出	89
ii)	有機物質の漏出	96
3)	AK-毒素作用に対するカチオンの効果	99
i)	カチオン添加によるK ⁺ 多量漏出の増大	100
i)	実験材料および方法	100

ii)	実験結果	-----	101
2)	ATPase 活性に対する AK-毒素		
	の 効果	-----	107
i)	実験材料および方法	-----	107
ii)	実験結果	-----	108
4	AK-毒素作用に対する人為処理		
	の 効果	-----	109
1)	熱処理による AK-毒素作用の		
	抑制	-----	109
i)	実験材料および方法	-----	109
ii)	実験結果	-----	111
2)	浸透圧ショック処理による AK-		
	毒素作用の抑制	-----	119
i)	実験材料および方法	-----	119
ii)	実験結果	-----	120
3)	各種阻害剤処理による AK-毒		
	素作用の抑制	-----	120
i)	実験材料および方法	-----	120
ii)	実験結果	-----	122
4)	植物ホルモン処理による AK-		

毒素作用の変化-----	127
i) 実験材料および方法-----	129
ii) 実験結果-----	129
5 AK-毒素の特異性発現因子の検 索-----	134
1) ナシ組織のAK-毒素不活性化能--	135
i) 実験材料および方法-----	135
ii) 実験結果-----	135
2) ナシ組織におけるAK-毒素結 合物質-----	137
i) 実験材料および方法-----	137
ii) 実験結果-----	137
第6章 考察ならびに論議-----	140
1 ナシ黒斑病の感染成立機構にお けるAK-毒素の役割-----	140
2 AK-毒素の生理活性とよの作用 機構-----	145
要約-----	157
引用文献-----	164

第1章 緒論

二十世紀ナシは果実の品質がよく多収性であるため、日本ナシ品種の中では主要品種の王座を占めているが、この品種の最大の欠点は、ナシ黒斑病 (black spot disease of Japanese pear) に極端に弱いことである。本病は、二十世紀までの少数の品種のみに激しく発病し、他の品種にはほとんど発生しないという宿主特異性の顕著な病害で、本病に対する宿主の遺伝学的背景も、感受性が優性で、1対の対立遺伝子によって支配されている¹⁾。

ナシ黒斑病における宿主特異性発現の機構に関しては、田中 (1933)²⁾ は、本病の病原菌であるナシ黒斑病菌 (Alternaria kikuchiana TANAKA) の培養液の中に、二十世紀果実に壊死斑を形成し、抵抗性品種には何らの効果も示さない毒性物質が存在することをみいだし、本病の感受性発現に毒素の関与を示唆した。その後、鳥瀉 (1957)³⁾、毛利 (1962)⁴⁾ は、本毒素を考慮しつつ感染機構についての研究を行なった

が、毒素の病理学的評価は、単に病徴発現に関与する因子であるという点にとどまり、特異性決定機構における役割に関しては、明確にはされなかった。

一方、宿主特異性を発揮する病原菌の代謝毒素が、植物疾病の特異性決定因子として注目され始めたのは、MEEHAN および MURPHY (1947)⁵⁾、LUKE および WHEELER (1955)⁶⁾ などのよるエンバク victoria blight 菌 (Helminthosporium victoriae) の毒素 (HV-毒素または victorin) からで、その後、WHEELER および LUKE (1963)⁷⁾ による病原毒素 (pathotoxin)、さらに PRINGLE および SCHEFFER (1964)⁸⁾ による宿主特異的毒素 (host-specific toxin) の概念が確立されるに至り、一躍脚光を浴び、宿主特異的毒素に関する総説も、これまでに数多く報告されている^{9~25)}。

宿主特異的毒素とは、i) 病原菌に感受性の植物にのみ有毒である、ii) 病原菌の病原性の強弱と毒素生成能とが一致する、iii) 宿主植物

の抵抗性と毒素に対する耐性とが一致する。

iv) 感染によって生じる宿主の生理的あるいは生化学的変調は、毒素処理によっても再現可能であるなどの諸条件を満足するもので、病原菌の病原性の直接的決定因子 (primary determinant of pathogenicity) である。他方、これを満足できない毒素は、たとえ高い生理活性を有しても、病原性の決定にとつては二次的因子 (secondary determinant of pathogenicity) にすぎない。^{8,9)} このような基準で既報の代謝毒素を再検討すると、宿主特異的毒素の発見例は、ナシ黒斑病菌²⁾、エンバク victoria blight 菌⁵⁾ の他、モロコシ milo 病菌 (Periconia circinata)^{26,27)}、トウモロコシ leaf spot 菌 (Helminthosporium carbonum)²⁸⁾、カンキツ brown spot 菌 (Alternaria citri)^{29,30)}、リンゴ斑点落葉病菌 (A. mali)³¹⁾、トウモロコシゴボ葉枯病菌 (H. maydis race T)³²⁾、サトウキビ眼点病菌 (H. sacchari)³³⁾、トウモロコシ yellow leaf blight 菌 (Phyllosticta maydis)^{34,35)}、トマト stem canker 菌 (A. alternata f. sp. lycopersici)³⁶⁾。

トマト target spot 菌 (Corynespora cassicola)³⁷⁾、イチゴ黒斑病菌 (A. alternata strawberry pathotype)³⁸⁾ の合計 2 例となっており、今のところ腐生的病原菌で、しかも顕著な宿主特異性を持つものに限られていいる。しかし、このような毒素の存在は、病原性の本質のみならず、複雑な感染成立の機構を物質的レベルで研究する際に、まさに菌側の好適なモデルを提供する。

以上の観点から、筆者は、イチゴ黒斑病における宿主特異性発現機構の解明にあたり、イチゴ黒斑病菌 (A. kikuchiana) の宿主特異的毒素 (AK-毒素) に焦点をあて、感染成立における役割ならびにその生理活性機構について検討を行なった結果、AK-毒素が本病特異性の決定因子として感染成立に重要な役割を果たしていること、さらにその作用が宿主原形質膜透過機能の変化にあることなどが示唆されたので、その研究成果をここにとりまとめ報告する。なお、これらの研究の一部は、すでに日本植物病理学会との他に報告した^{16,20,25,39-49)}。

本論文の作製に際し、平素から種々ご指導とご助言を賜わり、草稿の綿密なご校閲を賜わりました名古屋大学教授富山宏平博士に衷心より感謝の意を表します。さらに、草稿をご校閲いただき適切なご批判と有益なご助言を賜わりました名古屋大学教授瓜谷郁三博士、名古屋大学教授山本幸男博士、名古屋大学助手道家紀志博士に心から厚くお礼申し上げます。また、本研究遂行にあたり、終始懇篤なご指導とご鞭撻を賜わった鳥取大学教授西村正暘博士、鳥取大学助教授甲元啓介博士、さらに実験に際して熱心な協力を乞った鳥取大学植物病学研究室専攻生諸氏に深く感謝の意を表します。

第2章 菌の侵入行動と宿主の抵抗反応

1 感染過程における菌の行動

トシ黒斑病における宿主特異性が、感染のどの段階で発現するかを把握することは、本病感染機構の解析上重要である。鳥嶋³⁾は、感染過程での菌の行動を観察し、宿主体上での菌の行動には差異は認められなかったが、組織内侵入時に感受性、抵抗性品種間での差異が生ずることを報告している。そこで、既知の報告を再確認するために、トシ葉における菌の行動を光顕下で観察し、特異性発現の時期を調べた。

1) 実験材料および方法

供試菌には、研究室保存菌株のうちから、トシ黒斑病菌として強病原性のNo.15A菌株を、非病原性菌としてNo.15Aの病原性失活菌であるNo.15B菌株と、ポドラより分離した腐生菌 (*A. alternata*) の0-94菌株を使用した。各菌株をRICHARDS液体培地で約20日間28°Cで静置培

養し、その菌体を十分に水洗した後、20°C 湿室内に2~3日放置した。菌体表面に形成した胞子を取り、遠心分離(400g、5分)によつて数回水洗した後、胞子濃度をTOHMA血球計で約 10^6 個/mlに調整し、トシ葉面に噴霧接種した。なお、以後の実験にはすべてこの濃度の胞子懸垂液を、またトシ品種には感受性品種として二十世紀、抵抗性品種として長十郎の各幼葉を使用した。トシ葉を28°C 湿室内に一定時間放置後、トシ葉表面を0.1%コットンブルーで染色し、光顕下でそれぞれ発芽率、発芽管長さおよび付着器形成率を調べた。また、菌の侵入状況の観察には、以下の2つの方法を行なった。i) HOOKERミクロトームでトシ葉の切片を作成し、コットンブルーで染色後検鏡した。ii) コットンブルーで染色したトシ葉を乳酸フェニール液に24時間浸漬し、脱色後に検鏡した。

2) 実験結果

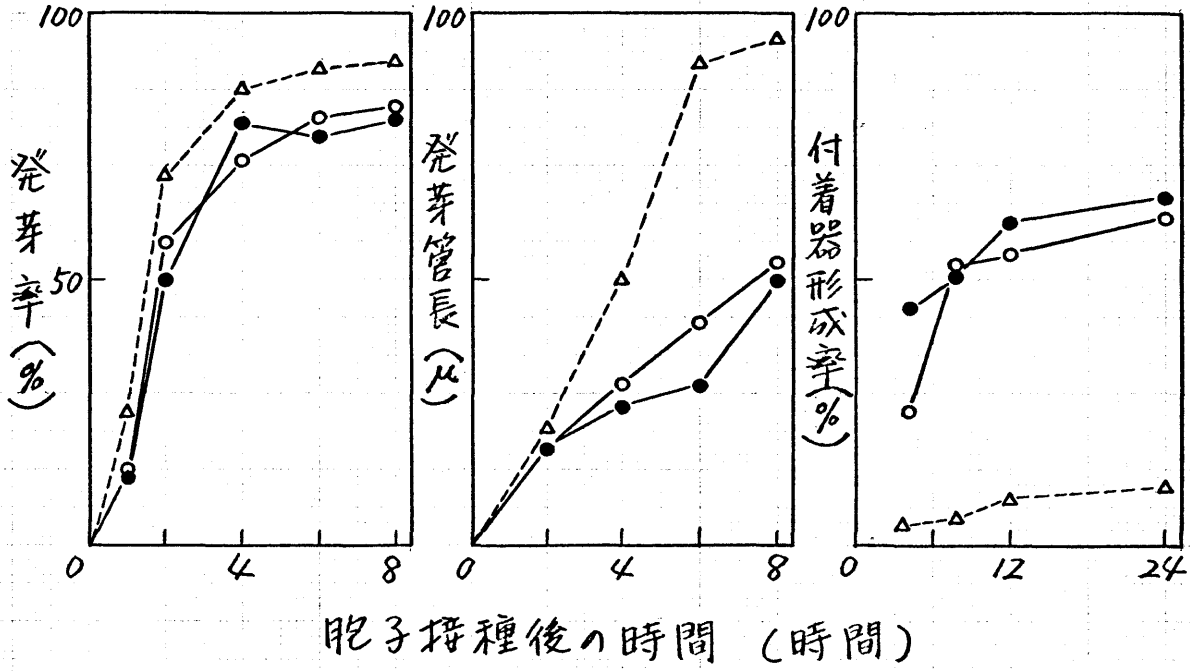
彼試したすべての菌は、トシ葉上で接種1

時間後には容易に発芽を開始し、4時間目頃より付着器の形成が活発となり、 Γ (オ1図)。
 しかし、 Γ オでの菌の行動には、感受性、
 抵抗性両品種間での差異は認められなかった。
 なお、発芽管長は、対照として用いたスライ
 ドガラス上よりもナシ葉上で劣る。これは、
 これは、付着器形成による発芽管伸長の停止
 のためである。また、付着器の形成は、スラ
 イドガラス上ではほとんどみられなかった。

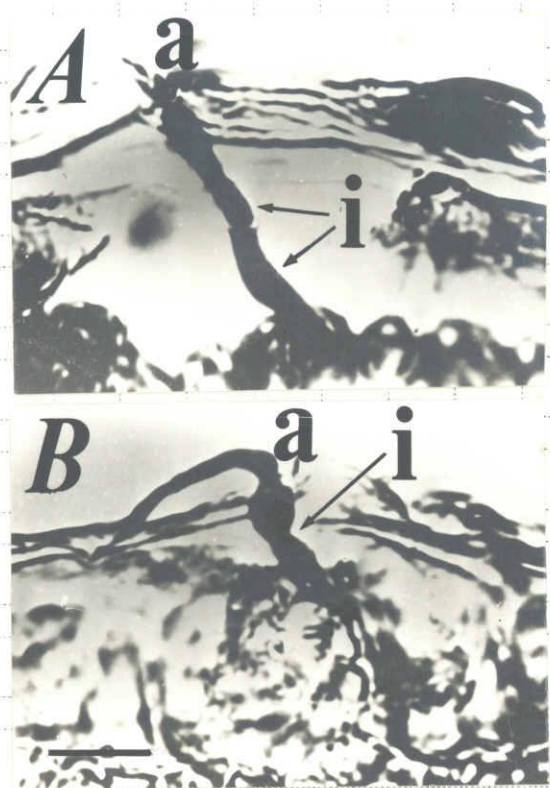
病原性菌株 No.15A を接種した感受性ナシ葉
 では、6~9時間目頃より表皮細胞への菌の
 侵入が観察され、その後葉肉組織へと侵入菌
 糸は進展した (Γ オ2図)。また、18~24時間
 後には肉眼的病斑が出現し始めた (Γ オ3図)。
 一方、抵抗性品種では、6~9時間目頃より
 表皮細胞への侵入が観察されたが、その侵入
 率は感受性品種の場合よりも低かった (Γ オ1
 表)。また、侵入菌糸は侵入した表皮細胞内
 にとどまり、他の細胞への進展は認められず、
 病斑もほとんど出現しなかった (Γ オ2図および

びオ3回)。なお、病原性失活菌や腐生菌と両ナシ葉の系でも、病原性菌接種の抵抗性品種の場合と同様の侵入行動を示したが、病原性失活菌のNo.15B菌株の胞子を接種した感受性品種では、それに病斑の形成が認められた(オ1表)。これは、胞子発芽時にわずかにAK-毒素を分泌していることによると思われるが、この解釈はオ3章で述べる。以上の観察結果は、本病の感染の特異性は、菌の宿主表皮細胞への侵入段階から認められ、既報の結果とよく一致した。

一方、ナシ黒斑病菌は、菌学的には集合種 A. alternata (Fr.) KESSLER の範疇に入る⁵⁰⁾。これらの菌は、病原性に関係なく、すべて共通の宿主非特異的な侵略力を具備しており、タマネギりん茎表皮やセロファン膜上に胞子を置くと、発芽して容易に侵入するのは貫通する⁵⁰⁾。このように強い侵略力を有するにもかかわらず、病原菌と感受性ナシ品種以外の系では、すべて菌侵入の抑制現象がみられ、植物側に



才1回 感受性(—●—)、抵抗性(—○—)タバコ葉およびバースライド
 グラス(---△---)上におけるタバコ黒斑病菌(No.15A)の行動



才2回 感受性(A)および抵抗性(B)
 ナシ葉におけるナシ黒斑病菌(No.15A)
 の侵入行動

a: 付着器 i: 侵入菌糸

(A) 胞子接種12時間後

(B) 胞子接種24時間後

—: 10 μm

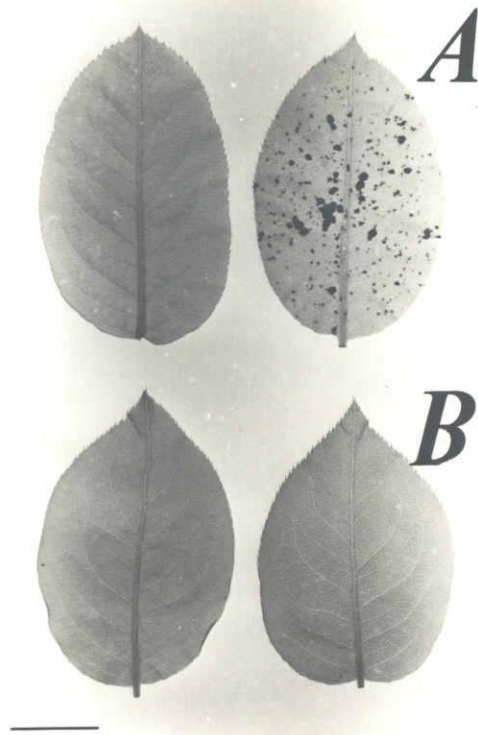


図3 柑橘黒斑病菌(No.15A)および
 腐生菌(0-94)を接種した柑橘葉における
 病斑の形成

(A) No.15A接種 右: 感受性品種
 (24時間後) 左: 抵抗性品種

(B) 0-94接種 右: 感受性品種
 (24時間後) 左: 抵抗性品種

— = 1 cm

表1 表 ナシ葉に対する *Alternaria* 属菌株の侵入行動と病斑形成

ナシ品種	菌株	胞子 発芽率(%) ^{a)}	付着器 形成率(%) ^{a)}	侵入菌糸 形成率(%) ^{a)}	病斑形成 ^{a)}
二十世紀	ナシ黒斑病菌(No.15A)	95.6	46.5	31.4	+
	病原性矢菌(No.15B)	94.2	49.4	9.9	±
	腐生菌(O-94)	96.3	46.3	17.6	—
長十郎	ナシ黒斑病菌(No.15A)	98.4	49.3	12.5	—
	病原性矢菌(No.15B)	98.2	54.2	8.7	—
	腐生菌(O-94)	92.5	44.6	14.2	—

a) 胞子接種24時間後K測定

b) +: 病斑形成 ±: ほとんど病斑形成 —: 病斑形成なし

は菌の侵入行動に対し、何らかの抵抗反応系の存在が示唆される。

2 熱処理による抵抗反応の誘導停止

一般に、植物体を熱処理すると、菌に対する宿主の反応が変化することはいく知られており、その反応は抵抗性から感受性への変換として認められている^{57~58)}。そこで、ナシ葉を熱処理し、菌に対する反応性を調べた。

1) 実験材料および方法

ナシ葉を 50°C の温湯に一定時間浸漬した後、No.15A、No.15BおよびD-94の各菌株の胞子を噴霧接種し、前節と同様の方法により、菌の行動を観察した。なお、実験によつては、ナシ以外にリンゴ(王鈴、紅玉)、イチゴ(盛岡16号、宝交早生)およびイチ(関口朝日、くにひかり)の各幼葉も使用した。

2) 実験結果

ナシ葉に 50°C で10秒以上の温湯処理を行つた場合、病原性の有無に関係なく供試したすべ

この菌は、感受性、抵抗力両品種ともに表皮細胞内への侵入が誘発され、侵入菌糸は葉肉組織へと進展し、病原性菌接種による感受性品種の場合と類似の病斑を形成した(オ2表およびオ3表)。さらに、非宿主のリンゴ、イチゴおよびイチヂクなどでも、すべて熱処理により、感受性への変換が観察された(オ3表)。なお、熱処理の効果は一時的で、熱処理組織を24時間28°C下に置くと、すべて組織は元の抵抗力に回復するのが観察された。

以上の熱処理組織における菌の行動の観察結果から、熱処理による感受性への誘導現象は、植物側の持つ菌侵入に対する抵抗反応系が、軽い熱処理により、始動を停止されたためではないかと考えられる。なお、熱処理組織でのAK-毒素反応性は趣きを異にしており、AK-毒素不感受性化への変換を示すが(オ14表)、この現象についての解釈はオ5章オ4節で述べる。

表2 熱処理トシ葉における *Alternaria* 属菌株の侵入行動

トシ品種	菌株	処理	胞子 発芽率(%) ^{a)}	付着器 形成率(%) ^{a)}	侵入菌糸 形成率(%) ^{a)}
二十世紀	トシ黒斑病菌 (No.15A)	熱処理 ^{b)}	90.57	66.67	53.19
		無処理	93.83	77.63	27.27
	病原性尖汚菌 (No.15B)	熱処理	91.23	67.66	68.72
		無処理	90.00	69.44	5.63
	腐生菌 (0-94)	熱処理	85.71	77.77	45.00
		無処理	87.88	60.34	7.11
長十郎	トシ黒斑病菌 (No.15A)	熱処理	92.47	86.05	74.32
		無処理	92.22	79.52	9.09

a) 胞子接種24時間後に測定

b) 50°C, 20秒の温湯処理

才3表 各種植物の熱処理葉における *Alternaria* 属菌株の
胞子接種による病斑の形成

菌株	無処理			熱処理 ^{a)}		
	二十世紀	長十郎	非宿主 ^{b)}	二十世紀	長十郎	非宿主 ^{b)}
ナシ黒斑病菌 (No. 15A)	+	-	-	+	+	+
病原性失活菌 (No. 15B)	±	-	-	+	+	+
腐生菌 (0-94)	-	-	-	+	+	+

a) 50°C, 20秒の温湯処理

b) リンゴ…王鈴, 紅玉 イチゴ…盛岡16号, 宝交早生
イチ…関口朝日, くはひかり

c) +: 病斑形成, ±: ほとんど病斑形成 -: 病斑形成なし

3 非病原菌接種および胞子発芽液処理による抵抗反応の誘導

菌の侵入行動に対して植物側に何らかの抵抗反応系が存在するとすれば、非病原菌を接種した感受性品種では、この反応系が誘導生成され、その後の病原菌接種による感染反応は抑制されるものと思われる。そこで、宿主における抵抗反応系の存在をさらに明らかにするため、各種非病原菌を接種した感受性マシ葉での病原菌に対する感染反応を調べた。また、これら非病原菌の発芽液での抵抗反応誘導物質の存在有無についてもあわせて検討した。

1) 実験材料および方法

供試菌には、Alternaria 属菌の3菌株 (No.15A、No.15B および O-94) の他に、研究室保存の N-63 (Aspergillus niger)、O-140 (Curvularia sp.)、A-1 (Glomerella cingulata)、O-188 (Cochliobolus miyabeanus) および O-100 (Stemphylium sarcinaeforme) の各菌株を使用した。胞子は、Alternaria 属菌の

菌株は第1節の方法によつて得たものを、他の菌株は、PDA平板に植えて28°Cで約20日間培養後、表面に形成されたものを洗い、これを細胞濃度を 10^6 個/mlに調整した。なお、N-63菌株の細胞は、発芽を促すためにRICHARDS液体培地に懸垂した。各菌株の細胞懸垂液をプラスチック板上に滴下し、28°C湿室下に24時間静置した。発芽液を集め、これをろ過して、40°C下で約50倍に濃縮したものを実験に使用した。なお、No.15A菌株では、細胞発芽液中にAK-毒素が存在しているため、発芽液を活性炭処理して毒素を除去したものを使用した。

細胞懸垂液または発芽液を二十世紀ナシ葉に噴霧接種し、28°C湿室下に置いた。一定時間後にナシ葉表面を水洗し、細胞または発芽液を取り除き、No.15A菌株の細胞を噴霧接種して再び28°C湿室下に置いた。24時間後に菌の行動から病斑数を調べた。

2) 実験結果

感受性ナシ葉に各種の非病原菌を接種し、

24時間後に病原菌を接種して感染反応を調べると、供試したすべての菌の前接種によって、病原菌の侵入菌糸形成は抑制され、病斑数の減少が認められた(才4表)。そこで、非病原菌による感染反応の抑制効果の確立時間をみるために、非病原菌としてD-94菌株の胞子を感受性ナシ葉に接種し、一定時間後に病原菌を接種して出現病斑数を調べた。病斑の抑制現象は、非病原菌接種後4時間目頃より認められ、8時間目で最大となり、その後ほぼ一定となった(才4図)。これらの観察結果より、宿主側には菌侵入に対する抵抗反応系が存在すること、そして、この反応系は菌の接触によって8時間以内誘導生成されることを示唆された。

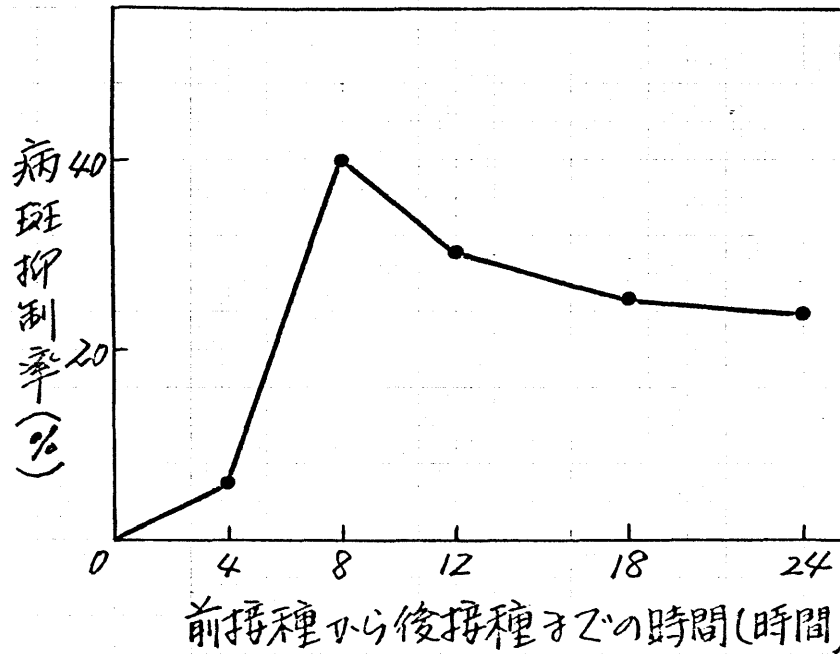
次に、非病原菌接種によって宿主抵抗反応が確立したことから、これらの菌では、胞子発芽時に抵抗反応の誘導物質を放出していることが予想された。そこで、胞子発芽液を感受性ナシ葉に処理し、24時間後に病原菌を接

表4 非病原菌前接種による感受性トシ葉に
けるトシ黒斑病菌(No.15A)による病斑形成の抑制

前接種菌株 ^{a)}	病斑数 ^{b)}
<u>Alternaria kikuchiana</u> , No.15B	55.75
<u>Alternaria alternata</u> , O-94	57.71
<u>Aspergillus niger</u> , N-63	31.70
<u>Curvularia</u> sp., O-140	67.45
<u>Glomerella cingulata</u> , A-1	71.04
<u>Cochliobolus miyabeanus</u> , O-188	54.86
<u>Stemphylium sarcinaeforme</u> , O-100	70.31
水	100.00

a) 各菌株接種24時間後にNo.15Aを接種した。

b) No.15A接種24時間後に病斑数を調べ、
水処理区の病斑数を100として表わした。

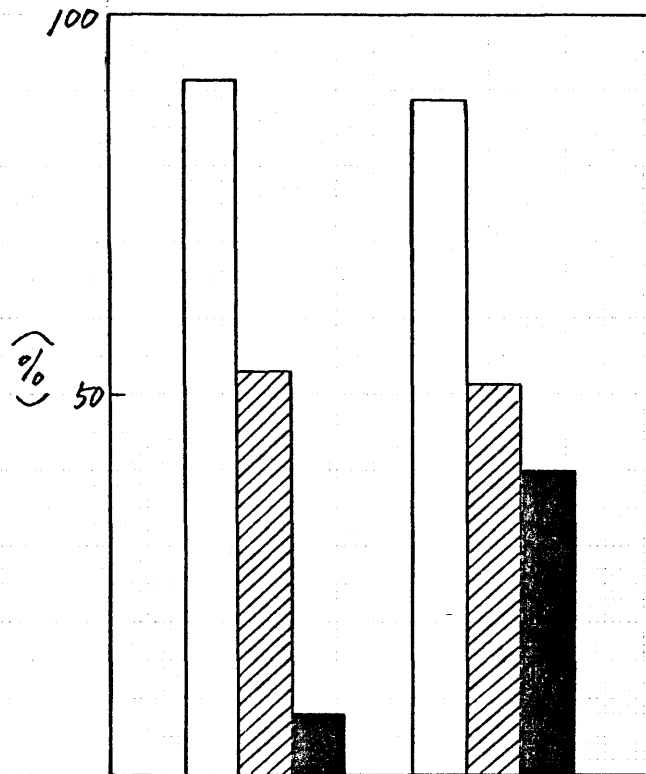


4回 非病原菌(O-94)接種によるシ黒斑病菌
(No.15A)の感染抑制効果の確立時間

$$\text{病斑抑制率} = \frac{\text{水処理} - \text{O-94接種}}{\text{水処理}}$$

種して感染反応を調べた。結果は、供試したすべての発芽液処理によつて病原菌の感染行動の抑制が認められ(オ5図およびオ5表)、これらの発芽液中には拮抗反応誘導物質の存在が示された。また、ナシ黒斑病菌の発芽液処理でも抑制現象がみられ(オ5表)、病原菌自身もその発芽時に拮抗反応誘導物質の分泌が認められた。なお、これらの誘導物質は、胞子発芽時に分泌され、菌の培養液中からは検出することができなかった。また、誘導物質は胞子の発芽やAK-毒素分泌にはほとんど影響せず、さらに光顕下ではナシ細胞に何らの変化も引き起さなかった。

以上の結果から、菌側は、病原性の有無に関係なくその発芽時に拮抗反応誘導物質を分泌し、本物質によつて植物側は拮抗反応系の始動を開始して、何らかの拮抗反応を発現するものと思われる。しかし、ナシ黒斑病菌は、その発芽時に拮抗反応誘導物質を分泌してゐるのにもかかわらず、感受性品種では菌侵入



発芽液処理 水処理

才5回 非病原菌(0-94)の胞子発芽液で
 処理した感受性トシ葉におけるTV黒斑病菌
 (No.15A)の侵入行動




-  : 発芽率
-  : 付着器形成率
-  : 侵入菌糸形成率

表5 孢子発芽液処理した感受性ナシ葉における
ナシ黒斑病菌(No.15A)による病斑形成の抑制

孢子発芽液 ^{a)}	病斑数 ^{b)}
<u>Alternaria kikuchiana</u> , No.15A	66.1
<u>Alternaria alternata</u> , 0-94	52.7
<u>Cochliobolus miyabeanus</u> , 0-188	73.9
<u>Stemphylium sarcinaeforme</u> , 0-100	68.6
水	100.0

a) 孢子発芽液処理24時間後にNo.15Aを接種した。

b) No.15A接種24時間後に病斑数を調べ、水処理
区の病斑数を100として表わした。

抑制などの顕著な抵抗現象は認められない(本章オ1節)。この解釈についてはこちらの章で述べる。

第3章 感染成立におけるAK-毒素の役割

宿主特異的毒素に関するこれまでの研究は、おもにその宿主特異的害作用の機構解明に精力が注かれ、感染場面での毒素の役割については、あまり検討がなされていない。胞子発芽による毒素分泌の重要性が最初に指摘されたのは、エンバク victoria blight 菌の HV-毒素で、NISHIMURA および SCHEFFER⁵⁵⁾ は、胞子は発芽時に検出し得る量の HV-毒素を放出すること、さらに、YODER および SCHEFFER⁵⁶⁾ は、その HV-毒素による宿主細胞のわずかな生理障害が菌の侵入を許し、感染成立に導くことも明らかにした。その後、同様な現象はトウモロコシ leaf spot 菌の HC-毒素⁵⁷⁾ においても観察されている。このような観点から、本章では、胞子発芽直後の AK-毒素に焦点をあて、毒素の感染過程における役割について検討した。

1 胞子発芽による AK-毒素の分泌

宿主特異的毒素がこれと之顯著な生理活性を發揮しても、これが實際の感染場面で菌によつて分泌され、宿主に作用しなければ、感染反応の特異性決定因子としての意味をなさない。そこで、胞子発芽時のAK-毒素分泌量と、宿主細胞に対する毒素活性について調べた。

1) 実験材料および方法

実験には、強病原性菌としてNo.15A、非病原性菌として病原性失活菌のNo.15BおよびNo.11、腐生菌のD-94の各菌株を使用した。各菌株の胞子懸垂液をスライドガラス上に滴下後、28°C湿室下に置き、一定時間毎に発芽液を採集し、3過してAK-毒素活性を調べた。また、休眠胞子中のAK-毒素の存在をみるために、No.15A菌株の胞子約1g(生体重)を乳鉢に入れ、石英砂とともに磨碎した。10mlの水を加えて攪拌し、遠心分離(400g, 10分)によつて上清を得、AK-毒素活性を調べた。AK-毒素活性の検定には、以下の2つの方法を行なった。i) 二十世紀ナシ葉の中央部に針の頭で

傷を付け、その上に検液 25 μ l を滴下した。
 28°C 湿室下に 24 時間置いた後、ナシ葉に形成
 された壊死斑の面積を測定した。ii) 検液を水
 で倍々希釈し、各希釈液を上記 i) と同様の方
 法にす、二十世紀ナシ葉に処理し、24 時間
 後に壊死斑形成の最大希釈限界値を求めた。

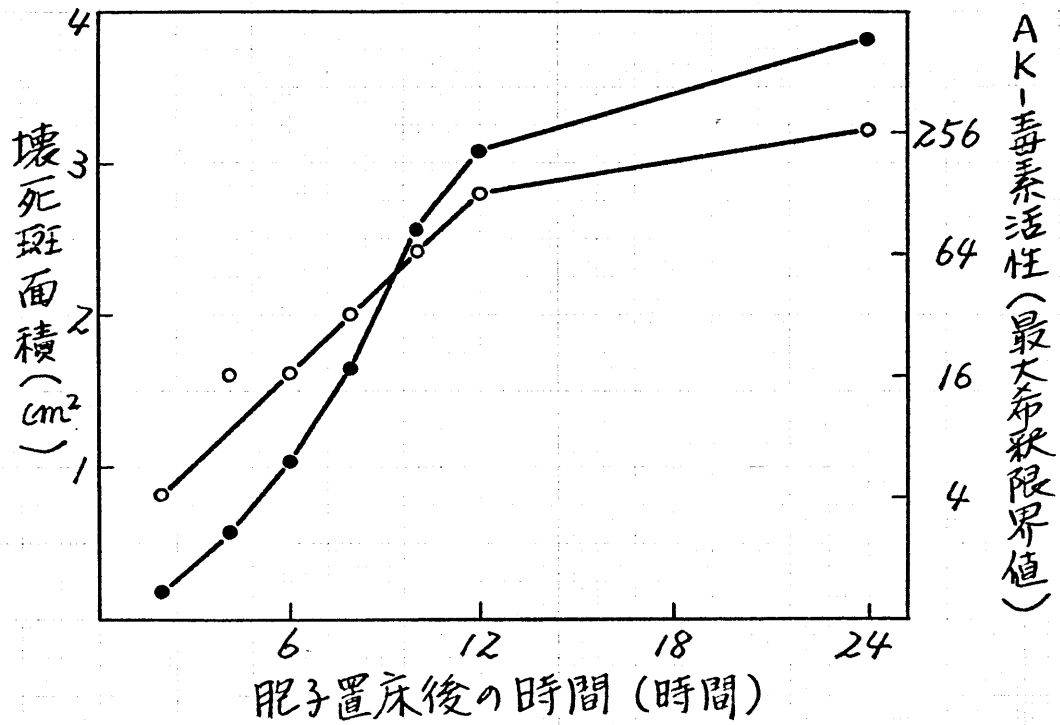
2) 実験結果

病原性菌株の胞子磨砕液中の AK-毒素活性
 を調べた結果、AK-毒素は休眠胞子中に含ま
 られていて検出されなかったが、胞子の発芽とと
 もに徐々に生合成され放出された(図 6)。
 そこで、発芽液によつて形成された壊死斑面
 積から、芽 4 尊芽 1 節の AK-毒素量と壊死斑
 面積との関係を示す図 13 によつて AK-毒素
 濃度を求め、さらに、胞子 1 個の分泌する AK-
 毒素量およびその毒素量による宿主の壊死細
 胞数を以下の試算式によつて算出した。

i) 発芽胞子 1 個当りの AK-毒素量 =

$\frac{\text{発芽液中の AK-毒素濃度} \times \text{滴下量}}{\text{胞子濃度} \times \text{滴下量} \times \text{発芽率}}$

$\frac{\text{発芽液中の AK-毒素濃度} \times \text{滴下量}}{\text{胞子濃度} \times \text{滴下量} \times \text{発芽率}}$



オ6図 スライドガラス上におけるNo.15A 胞子発芽液のAK-毒素活性

- : 壊死斑面積
- : 最大希釈限界値

ii) 発芽胞子 1 個当りの AK-毒素による

壊死細胞数 =

$$\frac{(\text{壊死斑面積} \div 350^{\text{a}}) \times 10^{\text{b}}}{\text{胞子濃度} \times \text{滴下量} \times \text{発芽率}}$$

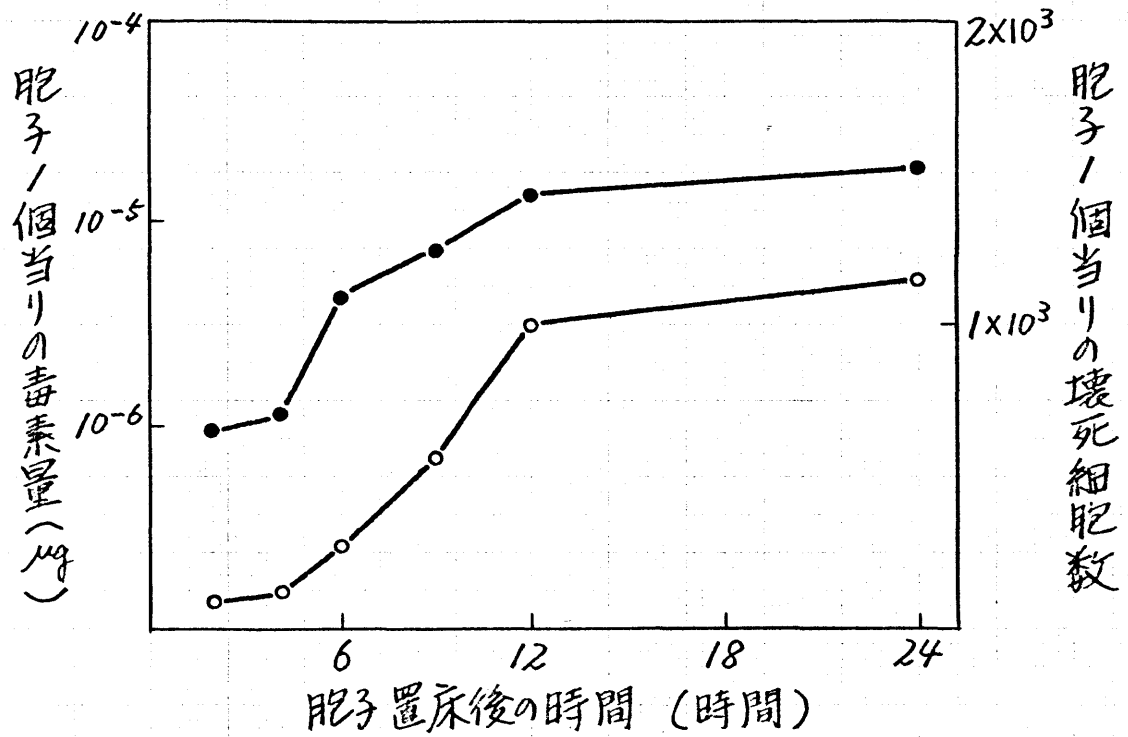
胞子濃度 \times 滴下量 \times 発芽率

a) 宿主細胞 1 個の断面積 (μm^2)

b) ナシ葉横断面の細胞数

発芽胞子からの AK-毒素の分泌は、2 時間目頃より認められ、4 時間目には 1 個の発芽胞子より $1 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ の AK-毒素が分泌され、これは約 100 個の宿主細胞に壊死を形成した (オ7 図)。その後、AK-毒素量は徐々に増大したが、12 時間以後はほぼ一定となった。これは、ガラス板上では発芽管の伸長が停止してしまふためと思われる (オ1 図参照)。なお、病原性失活菌や腐生菌などの発芽液には、おおく AK-毒素活性はみられなかったが、No. 15 B 菌株では、発芽液を濃縮した場合にわづかにその活性が認められた。

次に、胞子接種によつて形成される壊死病斑が、AK-毒素によるものかどうかを検討し



チ7回 胞子1個当りの分泌するAK-毒素量と
宿主細胞に対する毒素活性

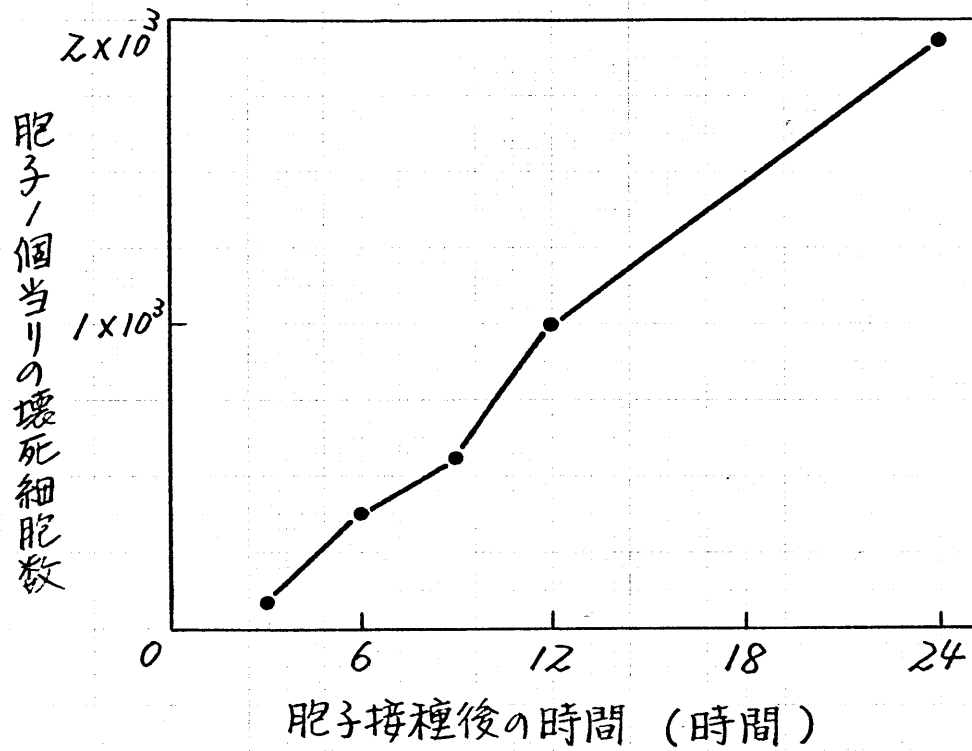
- : AK-毒素量
- : 壊死細胞数

した。二十世紀ナシ葉に No.15 A 菌株の胞子懸垂液を噴霧接種し、28°C 湿室下に置いた。一定時間毎にナシ葉に 0.08% ダイホルタンを噴霧処理し、発芽管の伸長を停止させた。ナシ葉を再び 28°C 湿室下に置き、胞子接種 24 時間後に 1 個の胞子によって形成される壊死病斑の面積を光顕下で測定した。この病斑面積より壊死細胞数を次式によって算出した。

胞子 1 個によって形成される壊死細胞数

$$= \frac{\text{壊死病斑面積}}{350} \times 10$$

結果は、1 個の胞子は接種後 3 時間ですらで約 100 個の宿主細胞に壊死を形成する能力を持つことを示した(オ 8 図)。また、接種後 12 時間目までの結果は、オ 7 図の発芽液による壊死細胞数の結果とよく一致していた。これは、胞子接種による壊死病斑の形成は、発芽胞子からの AK-毒素によることを示している。なお、胞子接種では 12 時間以後も壊死細胞数の増大が認められたので、これは侵入菌糸



オ8回 感受性タバコ葉における胞子1個にお
形成される壊死細胞数

からの AK-毒素によるものと思われる。

2 胞子接種による電解質多量漏出と AK-毒素の効果

エンバ7 victoria blight 病では、感染過程における宿主の生理学的初期変化は、宿主表皮細胞への菌侵入前の感受性組織からの電解質の多量漏出現象であり、これが発芽胞子の HV-毒素に起因することと明らかにしている⁵⁶⁾。ナシ黒斑病においても、胞子は発芽直後に宿主細胞に障害を与え得る十分な量の AK-毒素を分泌していることから、同様な現象が予想される。そこで、胞子接種後のナシ葉からの電解質漏出量を調べ、これが胞子発芽後の AK-毒素の作用かどうかを検討した。

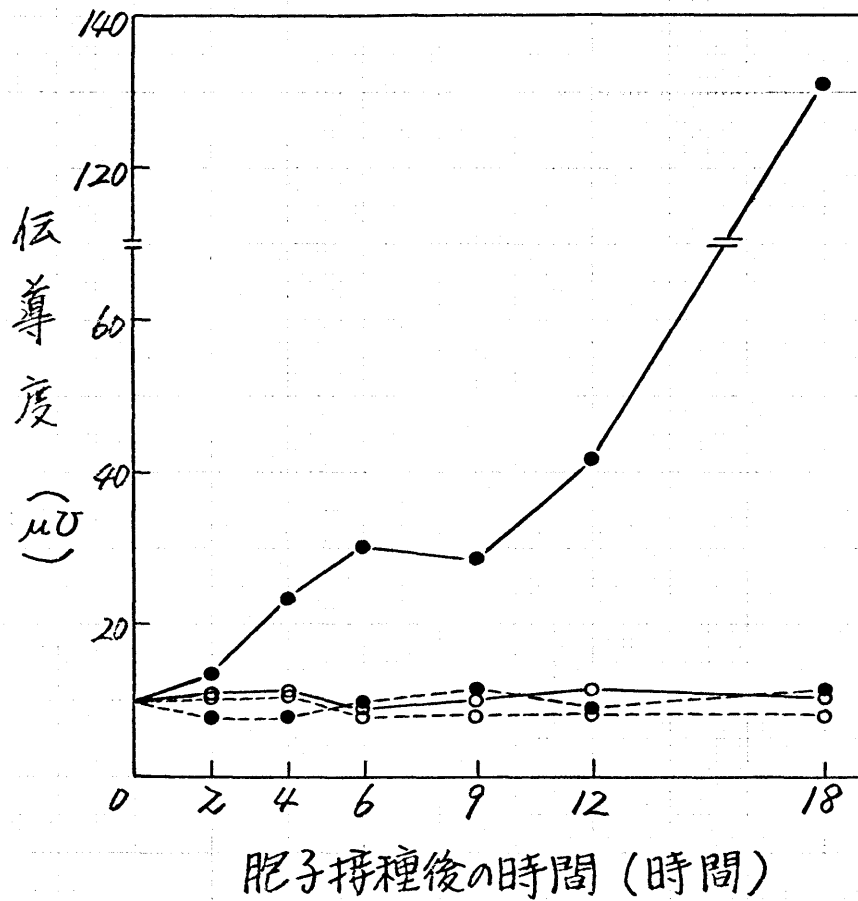
1) 実験材料および方法

ナシ葉に No.15A および No.11 各菌株の胞子懸垂液を噴霧接種し、28°C 湿室下に置いた。一定時間毎にナシ葉から直径 1 cm のディスクを 20 枚打ち抜き、水洗後 10 ml の脱イオン水を入

水に三角フラスコに入れ、 28°C で30分間往復振とう(120回/分)処理した。各処理液中の電解質漏出量は電気伝導度計(M & S製CDC-122型、 $k=1.0$)で測定した。また、電解質漏出に対する発芽胞子からのAK-毒素の効果を見るために、3紙($10 \times 20 \text{ cm}$)にNo.15A菌株の胞子懸垂液(4 ml)を噴霧処理した。一定時間 28°C 下に置床後、3紙に水を加えて発芽液を溶出し、第4章第1節の方法によつてAK-毒素を抽出した。毒素を4 mlの水に溶解し、ティン葉ディスク(直径1 cm)20枚に15分間減圧浸透処理した。ディスクを10 mlの脱イオン水に入れ、上記と同様の方法で電解質漏出量を測定した。

2) 実験結果

病原性菌株の胞子を接種した感受性品種では、胞子接種後2時間目頃から電解質の多量の漏出が認められた(第9図)。この漏出は2段階に分れており、第1段階は接種後2~6時間で、第2段階は9時間以後にみられた。



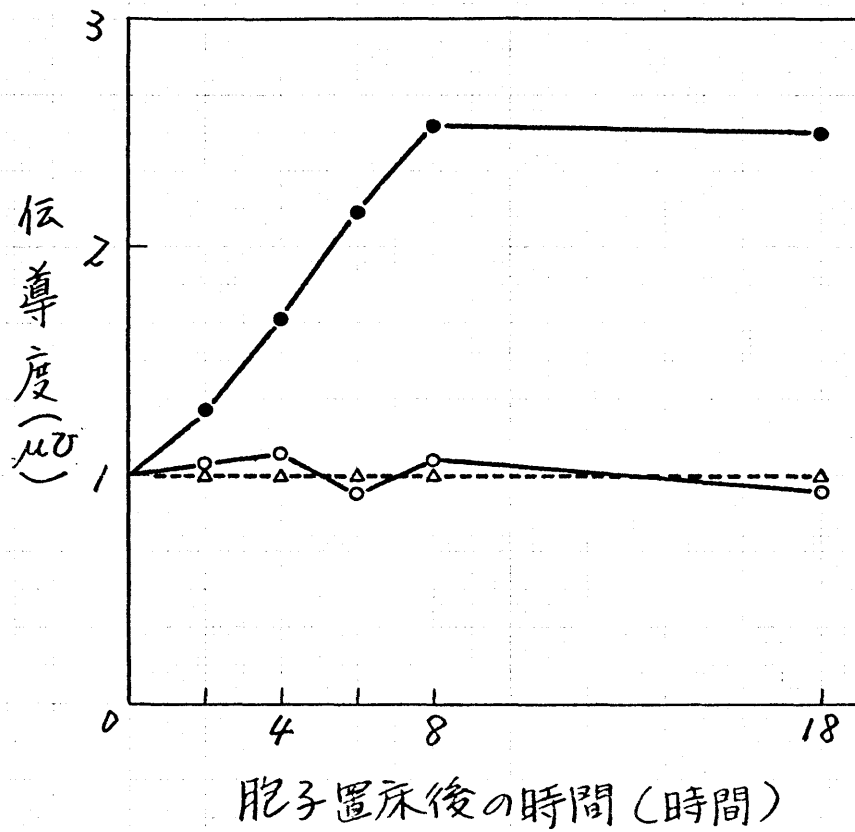
オ 9 図 胞子接種タバコ葉からの電解質の漏出

- 病原性胞子 (No. 15A) 接種感受性タバコ葉
- 病原性胞子 (No. 15A) 接種抵抗性タバコ葉
- 病原性不活性胞子 (No. 11) 接種感受性タバコ葉
- 病原性不活性胞子 (No. 11) 接種抵抗性タバコ葉

なお、病原性菌株接種の抵抗性品種や非病原性菌株を接種した感受性、抵抗性品種では、電解質の多量漏出現象は認められなかった。

一方、胞子置床2時間目の発芽液から抽出したAK-毒素とナシ葉に処理すると、感受性品種のみで電解質の多量漏出を引き起し、その後、発芽管の伸長によるAK-毒素分泌量の増大とともにその漏出も増大した(才10図)。なお、8時間以後、AK-毒素による電解質漏出量はほぼ一定となったが、これは、発芽管伸長の停止によるAK-毒素の生成が停止したためと思われる。

以上の結果から、胞子接種による2時間目からの才1段階の電解質多量漏出は、発芽管から放出されたAK-毒素の効果であり、病原菌の宿主細胞への侵入は6~9時間目頃から観察されることより、9時間以後の才2段階の漏出は、侵入菌糸によるAK-毒素の効果であると考えられる。



ア10回 ナシ葉からの電解質漏出に対する
胞子発芽液より抽出したAK-毒素の効果

- AK-毒素処理 感受性品種
- AK-毒素処理 抵抗性品種
- △-- 水処理 感受性および抵抗性品種

3 AK-毒素添加および除去による菌の感染行動の制御

宿主特異的毒素が感染成立の必須因子であるならば、菌の示す感染行動は、毒素の添加や除去によって制御できるものと思われる。

そこで、感染過程におけるAK-毒素の重要性をさらに検討するため、AK-毒素添加による、あるいは胞子発芽時のAK-毒素分泌阻害による菌の侵入行動を観察した。

1) 実験材料および方法

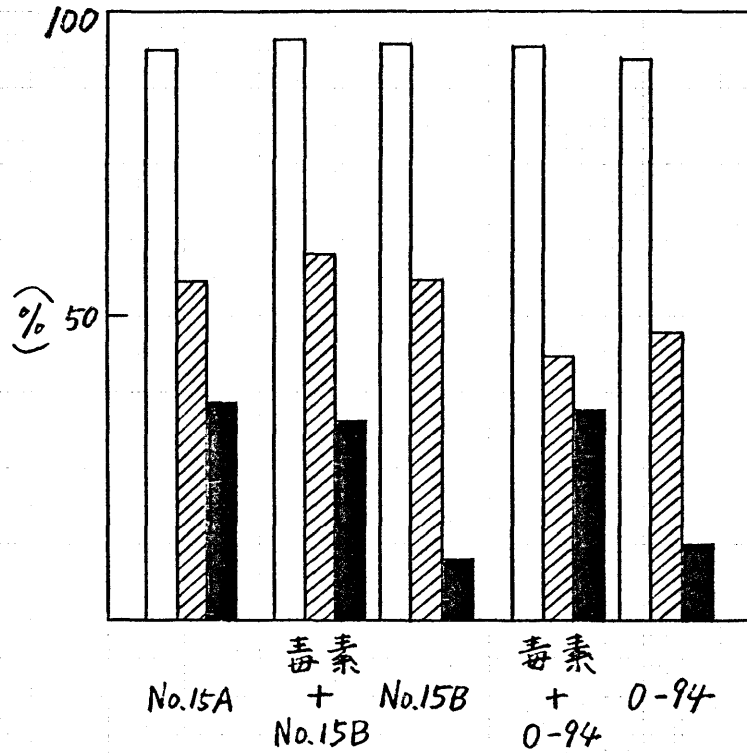
非病原性菌の No.15 B および 0-94 各菌株の胞子を AK-毒素液 (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に懸垂し、トシ葉に噴霧接種後、第二章第一节の方法によってトシ葉における菌の行動を観察した。なお、侵入行動の比較のため、病原性菌の No.15 A 菌株の胞子を接種した。また、AK-毒素の抽出法については第四章第一节で述べる。

一方、トシ黒斑病菌の病原性死活菌の培養液には、胞子の発芽にはほとんど影響せず、

発芽時の AK-毒素分泌のみを阻害する物質の存在が知られてゐる⁵⁸⁾。そこで、病原性菌の No. 15A 菌株の胞子と病原性死活菌の培養液に懸垂し、二十世紀ナシ葉に噴霧接種して菌の行動を上記と同様の方法で観察した。

2) 実験結果

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の AK-毒素とともに接種した非病原性菌の胞子は、病原性菌と同様の行動を示し、対照の非病原性菌のみの場合と比べて、8 時間後にはすでに感受性品種の表皮細胞内への菌の侵入数の増大が観察された(オ11図)。その後侵入菌糸は葉肉組織へと進展し、12 時間目頃より肉眼的な小病斑も出現し始めた。なお、AK-毒素のみの噴霧処理でも12 時間以後から病斑と類似の小斑点が現われた。一方、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の AK-毒素を添加した場合には、24 時間後に菌侵入の増大が認められたが、病斑は出現しなかった。なお、AK-毒素は、抵抗性品種での菌の行動には、大きく影響を与えなかった。このように、非病原菌接種によつ



才11回 感受性ナシ葉における非病原性菌 (No.15B, O-94) の侵入行動に対する AK-毒素 (1 μ g/ml) の効果

発芽率
 付着器形成率 (接種8時間後)
 侵入菌糸形成率

誘導される宿主の抵抗反応は、AK-毒素によつて感受性品種では容易にその発現が停止されることが認められた。

次に、病原性失活菌の培養液とともに病原性菌を接種すると、胞子発芽液中のAK-毒素分泌量は著しく減少し、ナシ組織への菌の侵入は顕著に抑制された。また、病斑の出現もほとんどみられなかった。このように、病原菌でも胞子発芽時のAK-毒素分泌を阻害すると、宿主は容易に抵抗反応を発現することが認められた。

以上の2つの観察結果は、ナシ黒斑病における感染成立の可否は、発芽胞子のAK-毒素によつて決定されることを明確に示している。

4 抵抗反応誘導薬におけるAK-毒素の効果

前節の結果から、AK-毒素は、感受性品種の抵抗反応の発現を停止し、菌の宿主侵入へと導くことが示唆されたが、抵抗反応の確立

したナシ葉では、黒斑病菌の感染が抑制されること(オ2章オ3節)から、このような組織では、AK-毒素作用の低下することも考えられる。そこで、抵抗反応誘導葉におけるAK-毒素の効果調べた。

1) 実験材料および方法

非病原性菌(D-94)の胞子発芽液(50倍濃縮液)または脱イオン水を二十世紀ナシ葉に噴霧処理し、28°C湿室下に24時間放置した。水洗後、ナシ葉からディスク(直径1cm)を5枚打ち取り、AK-毒素液(10 µg/ml)中で20分間減圧浸透処理し、ナシ組織からの電解質漏出を K^+ 量の測定により調べた。なお、AK-毒素の抽出および調整法はオ4章オ1節で、 K^+ 量の測定法はオ5章オ2節で述べる。

2) 実験結果

AK-毒素は、発芽液および水処理した感受性ナシ葉よりともに K^+ の急激な多量漏出を引き起し、その漏出量には両処理間での差異はなかったと認められなかった(オ12図)。した

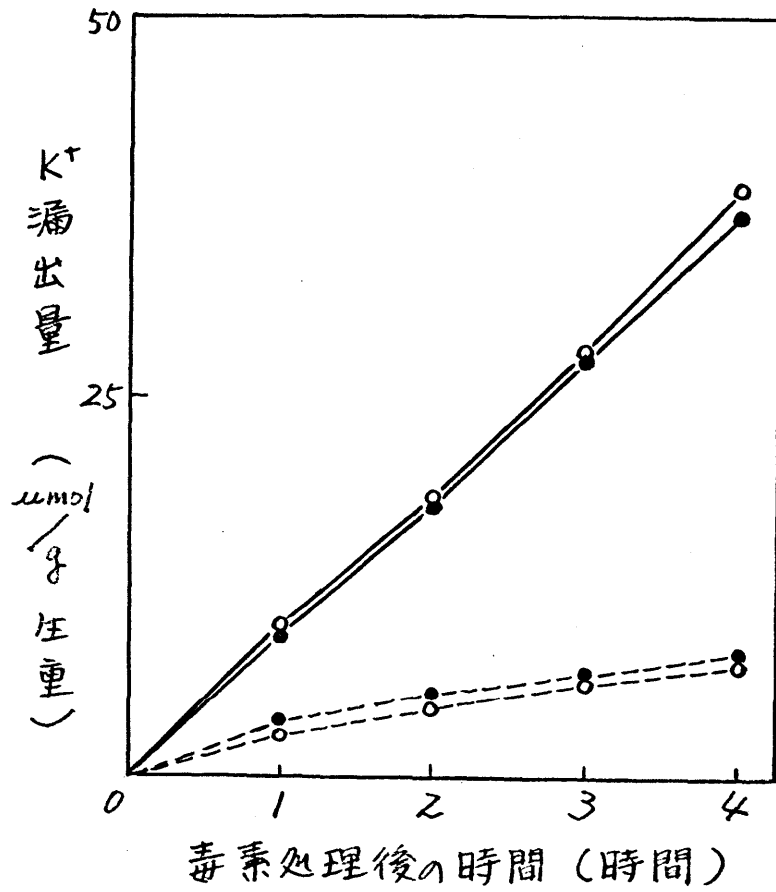


FIG. 12 非病原菌(0-94)の胞子発芽液処理した感受性トシ葉からの K^+ 漏出に対するAK-毒素の効果

- : 発芽液処理 + 毒素
- : 水処理 + 毒素
- - : 発芽液処理 + 水
- - : 水処理 + 水

かつ、AK-毒素は、宿主の抵抗反応の確立した組織にも顕著な活性を示すか、抵抗反応誘導薬では菌の感染抑制が認められることより、確立された抵抗反応そのものには影響を与えないものと思われる。

よって、これより得られた結果から、感染過程におけるAK-毒素の役割を考えると、次のように理解される。ナシ黒斑病菌は、その発芽時にAK-毒素と抵抗反応誘導物質を分泌する。AK-毒素は、接種後2時間目頃より感受性ナシ品種のみに膜透過機能の変化を引き起す。一方、抵抗反応誘導物質によつて、宿主組織では4~8時間後に抵抗反応が確立される。感受性品種では、抵抗反応の発現前にAK-毒素による生理的变化で、何らかの形で抵抗反応の始動を停止し、抵抗反応の発現しない状態で菌は宿主内に侵入し、感染が成立するものと思われる。一方、抵抗性ナシ品種や非宿主では、AK-毒素に不感受性であるために、菌の抵抗反応誘導物質による抵抗

反応の始動によつて、感染は不成功に終るものと思われる。したがつて、感染過程におけるAK-毒素の役割は、宿主における抵抗反応系の始動の停止にあると考へるゝとができる。

第4章 AK-毒素の宿主特異的生理活性

トシ黒斑病菌の培養液中にAK-毒素の存在が田中²⁾によつて示唆されて以後、鳥潟³⁾、広江ら⁵⁹⁾、毛利⁴⁾は、その宿主特異性についての検討を行ない、本菌に対するトシ品種の感受性とAK-毒素反応性とは完全に一致することを認めている。しかし、AK-毒素の宿主に対する生理活性に関する研究は断片的であり、詳しい観察はなされていっていない。そこで、本章では、AK-毒素の宿主特異性を再確認するとともに、AK-毒素に対する宿主の種々生理反応についての検討を行なった。

1 AK-毒素濃度と宿主の反応

AK-毒素がどの程度の濃度で宿主に活性を發揮するのか、また、抵抗性品種にはなかく活性を示すのかどうかを検討するため、各種AK-毒素濃度における感受性、抵抗性トシ葉の反応性を調べた。

1) 実験材料および方法

強病原性の No.15 A 子には No.17 菌株を RICHARDS 液体培地上に 28°C で約 20 日間静置培養し、そのろ液より以下の方法によつて AK-毒素を抽出した。培養ろ液を HCl 酸性下でエチルエーテル (Et_2O) 抽出し、10% NaHCO_3 溶液に転溶後、再び HCl 酸性下で Et_2O 抽出した。これを薄層クロマトグラフィー (ベンゼン : アセトン : *m*-ヘキサン : 酢酸、50 : 20 : 20 : 1, v/v) で分離し、活性部を 10% NaHCO_3 溶液で溶出した。再び HCl 酸性下で Et_2O 抽出後、同様の薄層クロマトグラフィーを数回くり返して AK-毒素を精製した。なお、AK-毒素は Et_2O に溶解し -20°C 下で保存した。実験には、 Et_2O を濃縮乾固し、AK-毒素を秤量後一定量の水に溶解して使用した。AK-毒素の活性は、環死斑面積 (オ3章オ1節参照) および電解質漏出 (オ3章オ2節参照) によつて検定した。なお、電解質の漏出は、ナシ葉ディスク (以下オ4まで直径 1 cm) 10 枚を 10 ml の脱イオン水

に入れ、一定時間往復振とう処理後に測定した。

2) 実験結果

AK-毒素は、感受性品種の二十世紀十シ葉には 0.01 ug/ml の低濃度でも葉脈壊死斑を形成したが、抵抗性品種の長十郎十シ葉には 1000 ug/ml の高濃度でもまったく活性を示さなかった(オ13図およびオ14図)。一方、感受性品種におけるAK-毒素濃度と壊死斑形成との関係を見ると、毒素濃度の上昇とともに徐々に壊死斑面積も増大したが、 $1 \sim 10 \text{ ug/ml}$ の濃度変化で急激な活性の増大がみられ、それ以上の濃度では飽和状態に達した(オ13図)。また、電解質漏出に対するAK-毒素の活性は、壊死斑形成に対する活性と完全に一致した(オ13図)。したがって、感受性品種は極めて低濃度のAK-毒素に反応性を示すが、抵抗性品種は、AK-毒素に対して完全な不感受性であると思われる。

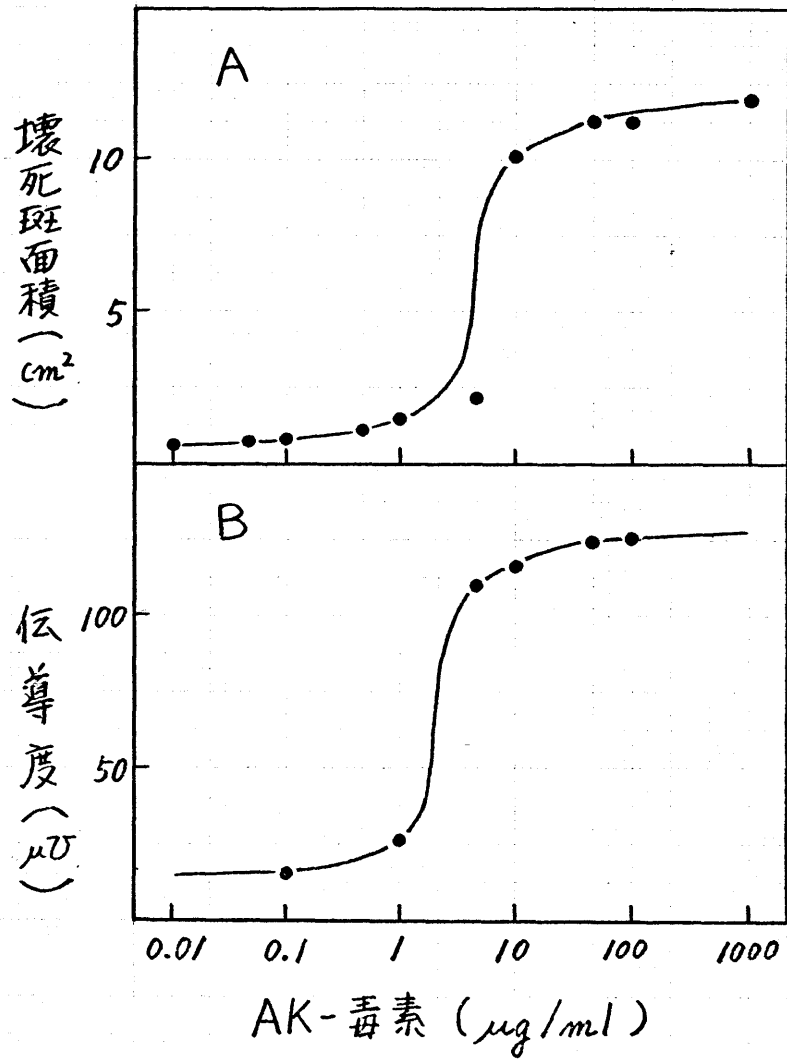
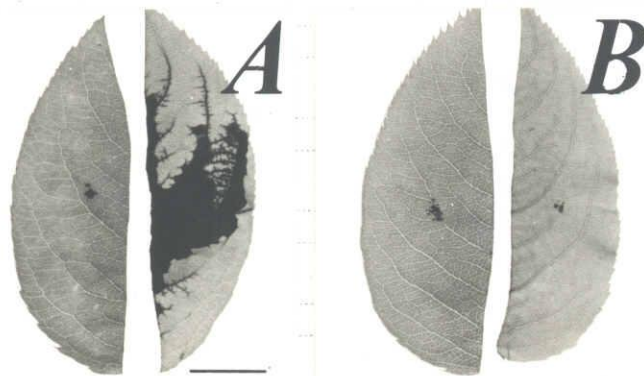


図13 AK-毒素濃度と感受性トシ葉
に対する毒素活性

(A): 壞死斑形成(毒素処理24時間後)

(B): 電解質漏出(毒素処理24時間後)



才14回 AK-毒素による壞死斑の形成

(A) 感受性品種 右: AK-毒素(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
(二十世紀) 左: 水

(B) 抵抗性品種 右: AK-毒素(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
(長十郎) 左: 水

— = 1 cm

乙 ナシ品種間のAK-毒素反応性

前節の結果から、AK-毒素は感受性品種のみで著しい活性を示すことが明らかとなったが、さらにナシ品種の数を増して、黒斑病菌に対する感受性とAK-毒素反応性が一致するかどうか検討した。また、ナシ以外のバラ科植物を中心として非宿主の反応性についてもあわせて調査した。

1) 実験材料および方法

日本ナシ品種および非宿主植物の各幼葉にAK-毒素液(10 µg/ml または 1000 µg/ml)を有傷滴下処理またはNo.15A菌株の胞子懸垂液を噴霧接種し、24時間後にそれぞれ壊死斑と病斑の形成を調べた。

2) 実験結果

供試した日本ナシ品種のうち、胞子接種で病斑形成の認められぬ品種のみはAK-毒素による壊死斑が形成され、宿主の病原菌に対する反応性とAK-毒素反応性とは完全に一致した(表6)。よって、さらにバラ科植物を

表6 十シ黒斑病菌およびAK-毒素
に対する十シ品種間の感受性差異

品種	胞子接種	AK-毒素処理
長十郎	—	—
独乙	+	+
博多青	+	+
君塚早生	+	+
幸水	—	—
明月	+	+
新高	—	—
二十世紀	+	+
二十世紀XP-11-	+	+
晚三吾	—	—
青龍	—	—
新興	—	—
新世紀	—	—
新水	+	+
八雲	—	—

中心に約60種の非宿主を用いてAK-毒素および黒斑病菌に対する反応性を調べたが、供試した植物の中には、これらに反応性を示すものばかりでなく認められなかった。したがって、AK-毒素の活性は黒斑病菌に感受性のナシ品種のみに限定され、本病に対する感受性、抵抗力は、AK-毒素反応性に起因するものと思われる。

3 ナシ組織および器官のAK-毒素反応性
感受性品種のナシ葉では、顕著なAK-毒素反応性を発揮することを確認されたので、さらに、宿主のすべての部位がAK-毒素の標的細胞となりうるかどうかを各種の生理学的反応性から検討した。

1) 壊死斑の形成

AK-毒素による感受性ナシ葉の顕著な反応は、葉脈に沿う壊死斑の形成である。そこで、ナシの各部位におけるAK-毒素反応性を壊死斑の形成に基づいて調べた。

i) 実験材料および方法

ナシの各部位から葉柄、中肋、芽りん片、新梢、果皮、果肉、花柱、花糸、花梗、花弁およびびく片を取り、AK-毒素(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を処理して、24時間後に壊死斑の形成を調べた。なお、芽りん片および花弁はAK-毒素液を有傷滴下処理し、他はすべて毒素液に1時間浸漬処理した。

ii) 実験結果

感受性品種では、供試したすべての組織、器官において黒変壊死の形成が認められ、特に花弁では葉と類似の典型的な脈系に沿って壊死斑を形成した。一方、抵抗性品種の各組織では、AK-毒素に反応性を示すものはないと認められなかった。

2) 電解質多量漏出

ナシ葉に対するAK-毒素の活性は、壊死斑形成の他に、宿主組織からの電解質多量漏出によっても認められる。そこで、各組織、器官におけるAK-毒素反応性を電解質漏出で検

討した。

i) 実験材料および方法

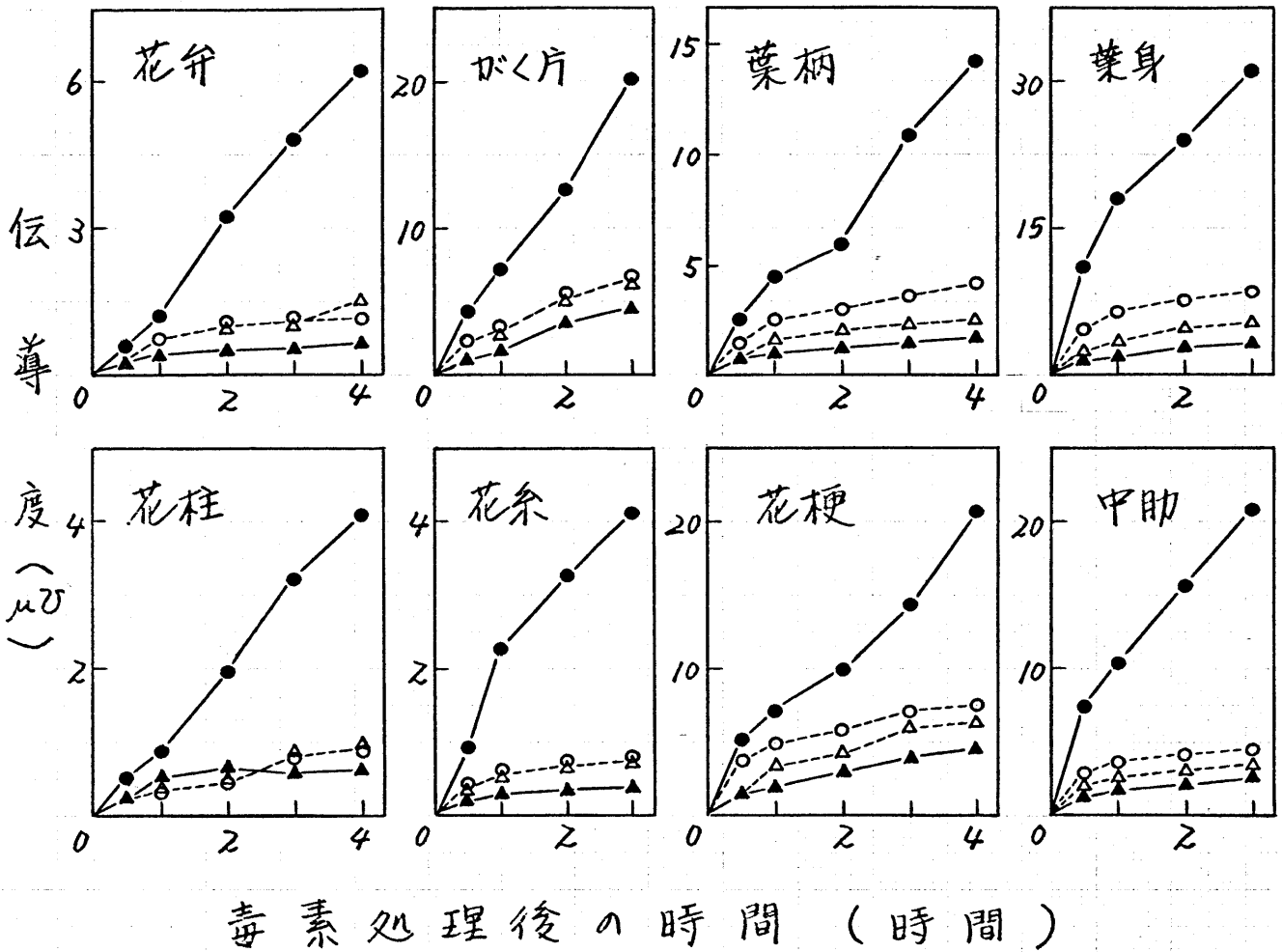
実験には、葉身、葉柄、中肋、花柱、花糸、花梗、花弁およびびく片を使用した。各組織 0.5g (花柱および花糸は 0.05g) を AK-毒素液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 中で 15 分間減圧浸透処理後、20 ml の脱イオン水に入れ、一定時間毎に組織から漏出してくる電解質量を第 3 章第 2 節の方法により測定した。

ii) 実験結果

AK-毒素処理した感受性品種では、すべての組織、器官から処理後直ちに電解質の多量漏出が認められ、AK-毒素に対して顕著な反応性を示した (第 15 図)。なお、抵抗性品種では、AK-毒素による電解質漏出量の変化はほとんど認められなかった。

3) 原形質分離能の失活

HV-毒素⁶⁰⁾では、毒素処理の初期に感受性エンバフ細胞の原形質分離能が失活することが知られている。そこで、原形質分離の顕著な



15図 AK-毒素による各種組織からの電解質の漏出

- : 毒素処理感受性組織
- ▲ : 水処理感受性組織
- : 毒素処理抵抗性組織
- △ : 水処理抵抗性組織

比較的細胞の大きい葉、花弁の表皮細胞および中肋細胞を用いて、原形質分離能に対するAK-毒素の効果調べた。

i) 実験材料および方法

葉および花弁からセロテーブで表皮を剥ぎ取り、また、中肋よりカミソリで切片を作成し、これらを直ちにAK-毒素液(10 μ g/ml)に入れ、25 $^{\circ}$ C以下に静置した。一定時間毎に組織を取り出し、高張液(0.8M KNO₃)に入れ原形質分離細胞を顕微鏡下で観察した。

ii) 実験結果

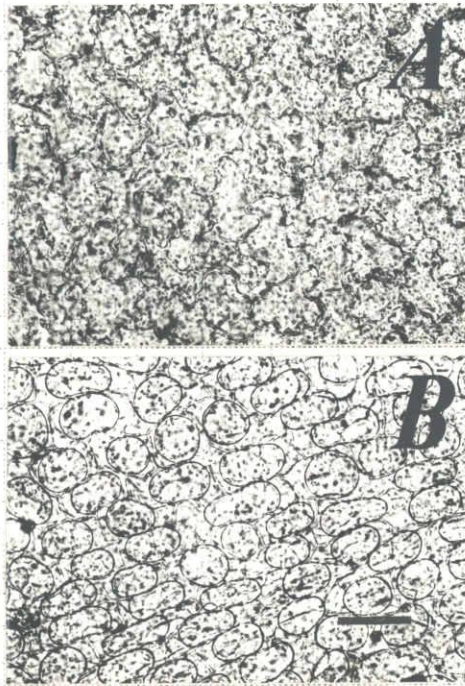
AK-毒素処理後、感受性品種の組織では、すべて10分以内に原形質分離細胞数の低下がみられ、処理後30分にはすべての細胞がその能力を失うことが認められた(オワ表およびオ16回)。一方、抵抗性品種では60分後でもすべての細胞が原形質分離の能力を保持していた。

4) 原形質流動の停止

成熟した果肉細胞や幼葉の毛茸細胞では、

オワ表 原形質分離能に対するAK-毒素の効果

トシ組織	処理	原形質分離能失活細胞の出現時間(分)	
		感受性品種	抵抗性品種
葉表皮細胞	AK-毒素	5	> 60
	水	> 60	> 60
花弁表皮細胞	AK-毒素	10	> 60
	水	> 60	> 60
中肋細胞	AK-毒素	5	> 60
	水	> 60	> 60



才16図 ナシ花弁表皮細胞の原形質
分離能に対するAK-毒素の効果

A: 高張液下の感受性品種
(毒素処理30分後)

B: 高張液下の抵抗性品種
(毒素処理60分後)

—: 30 μ m

顕著な原形質流動が観察される。そこで、原形質流動に対する AK-毒素の効果と、果肉細胞および毛茸細胞を用いて調べた。

i) 実験材料および方法

カミソリで切片を作成した果肉組織とナシ葉表面を筆で軽くこするこにより、得た毛茸を 0.6 M の糖を含む AK-毒素液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に入れ、25°C 下に静置し、一定時間毎に顕微鏡下で原形質流動の速さを測定した。なお、本実験のみ抵抗性品種の果肉には晩三吾を使用した。

ii) 実験結果

果肉細胞では、感受性品種のみ AK-毒素処理後 3 ~ 5 時間で原形質流動の停止が認められた (才 17 図)。一方、毛茸細胞では、AK-毒素処理後 10 分以内に感受性品種の原形質流動は停止したが、抵抗性品種では 60 分後でも顕著な流動を示した。

5) 気孔開閉能の失活

HV-毒素⁶¹⁾ やトウモロコシごま葉枯病菌の HM-

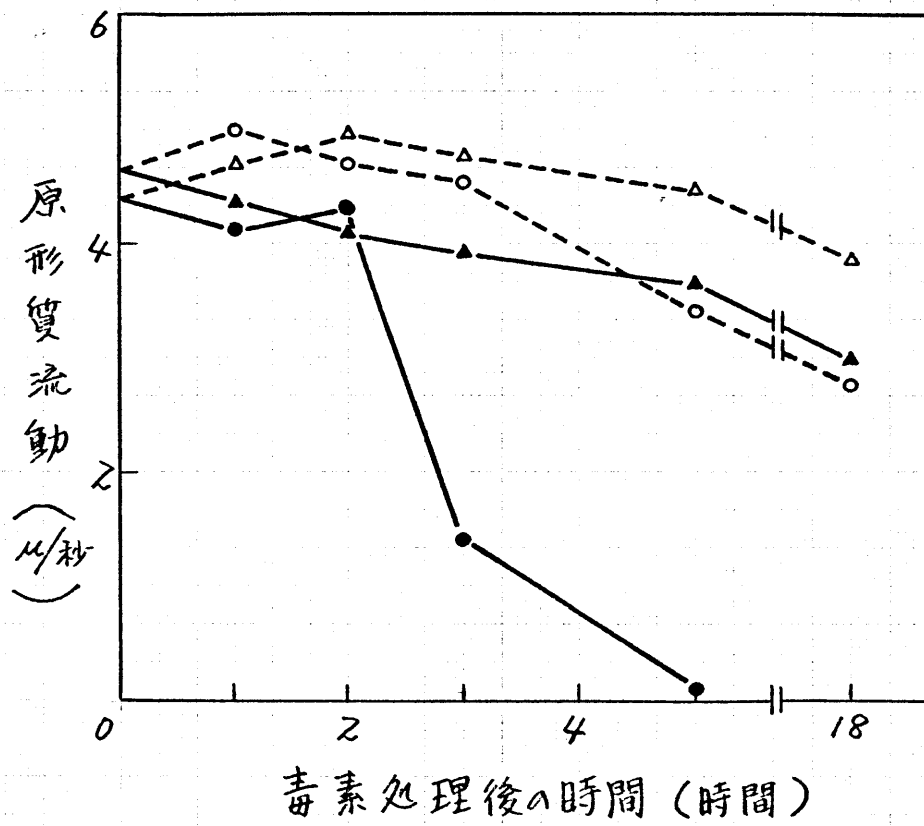


図17 原形質流動に対するAK-毒素の効果

- AK-毒素処理感受性品種
- ▲— 水処理感受性品種
- AK-毒素処理抵抗性品種
- △— 水処理抵抗性品種

ト毒素⁶⁾では、感受性品種の気孔開閉能に顕著な阻害作用を持つことが報告されている。そこで、AK-毒素においても気孔開閉能に効果があるかどうかを検討した。

i) 実験材料および方法

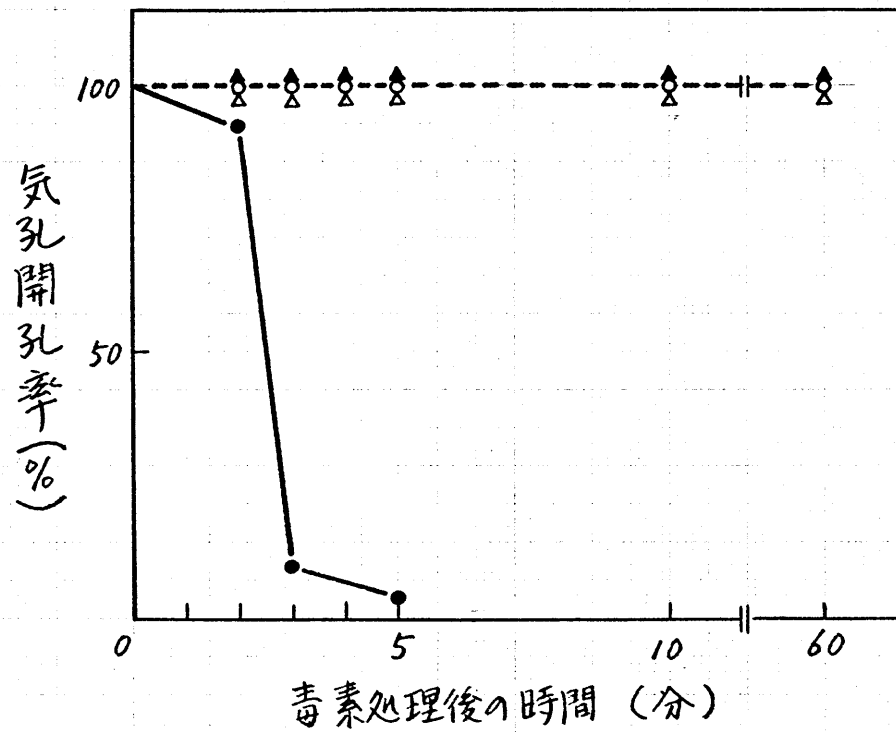
気孔開度の増大しているナシ葉を切り取り、AK-毒素液(10 μ g/ml)を噴霧処理した。25 $^{\circ}$ C下で一定時間毎に気孔の開孔数を顕微鏡下で調べた。

ii) 実験結果

感受性ナシ葉の気孔は、AK-毒素処理5分後にはほぼ完全に閉孔し、開閉能力を消失することを確認された(才18回)。一方、抵抗性品種では、60分後でもAK-毒素による変化はほとんど認められなかった。

6) 花粉発芽の抑制

黒斑病菌に対するナシ品種の反応は、感受性が優性の1対の主遺伝子支配であり、二十世紀の遺伝子型はヘテロである⁷⁾。したがって、理論上、二十世紀の花粉は感受性と抵抗性が



才 18 回 気孔開閉能に対する AK-毒素の効果

- : AK-毒素処理感受性品種
- ▲— : 水処理感受性品種
- : AK-毒素処理抵抗性品種
- △— : 水処理抵抗性品種

1:1に存在し、長十郎ではすべて抵抗性を示すものと思われる。よって、花粉の発芽に対するAK-毒素の効果調べた。

i) 実験材料および方法

AK-毒素(10 μ g/ml)を含む0.1%寒天平面上に花粉を置床し、20 $^{\circ}$ Cで2時間静置後にその発芽率を光顕下で調べた。

ii) 実験結果

花粉の発芽率にはかなりの変動がみられ、3回行った実験では一定の値を示さなかったが、AK-毒素処理した感受性品種では、他の処理区よりも常に低い傾向がみられた(表8表)。

以上の観察結果から、感受性品種では、すべての部位の細胞がAK-毒素反応性を示すことが明らかとなった。また、AK-毒素に対する種々の生理反応の多くは宿主原形質膜の透過機能に関連した現象であると思われる。

4 遊離細胞およびプロトプラストのAK-

表 8 花粉の発芽に対する AK-毒素の効果

ナシ品種	処理	花粉発芽率 (%) ^{a)}		
		実験 I	実験 II	実験 III
感受性品種	AK-毒素	0	0	25
感受性品種	水	51	30	74
抵抗性品種	AK-毒素	28	29	50
抵抗性品種	水	80	90	77

a) AK-毒素処理 2 時間後に観察

毒素反応性

前節で、感受性品種ではすべての部位がAK-毒素の標的細胞となりうることを明らかにした。ナシ組織より遊離細胞、さらにはプロトプラストを得、単細胞系におけるAK-毒素反応性を調べた。

1) 実験材料および方法

ナシ葉の表皮をセロテープで剥ぎ取り、葉肉組織を0.8Mマンニット液または水に入れ、露出した葉肉表面を歯ぶらしで軽くこするとより大量の遊離細胞を得た。遊離細胞の濃度をTOHMA血球計で 10^6 個/mlに調整後、遠心分離(100g、5分)により、数回洗浄した。遊離細胞を0.8Mマンニットまたは水で溶解したAK-毒素液(10 μ g/ml)に懸垂し、25 $^{\circ}$ C下で往復振とう処理した。一定時間毎に懸垂液を取り出し、光顕下で細胞の変化を観察した。また、遊離細胞からの電解質多量漏出をみるために、懸垂液を遠心分離(100g、5分)し、上清の K^+ 量を測定した。なお、 K^+ 量の測定法

に つ い て は 第 5 章 第 2 節 で 述 べ る。

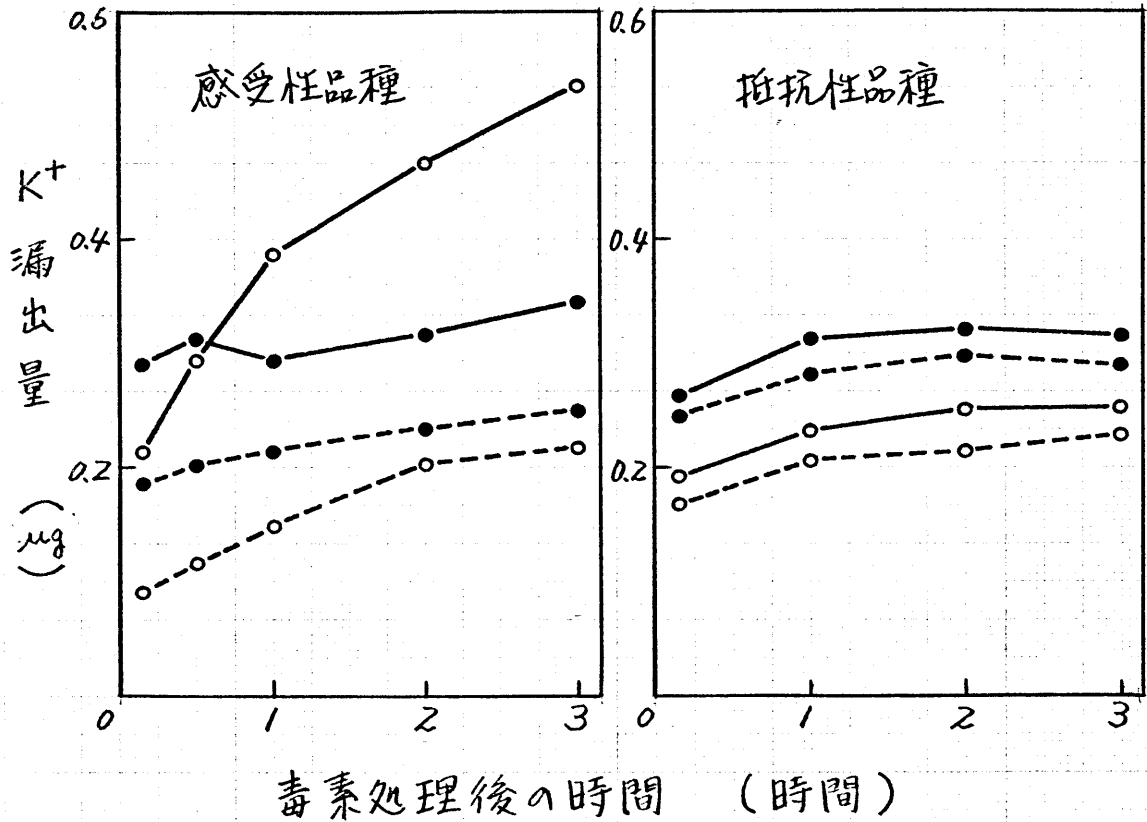
プロトプラストは、セロテーブで表皮を剥離した花卉組織を金井⁶³⁾の方法に準じて約4時間酵素液(1%セルラーゼオノスカ R-10、0.5%マセロチーム R-10、1 mM $MgCl_2$ 、1 mM KH_2PO_4 、0.8 M マンニット、pH 5.8) 処理することによつて得た。プロトプラストを遠心分離(100g、5分)によつて洗液(上記酵素液から酵素を除いたもの、pH 7.0)で数回洗浄した。25 ml のプロトプラスト懸垂液と、洗液に溶解した25 ml の AK-毒素液(20 $\mu g/ml$) をスライドガラス上に滴下混合し、25°C 湿室下に静置した。一定時間毎にスライドガラスを取り出し、光顕下でプロトプラストの変化を観察した。

2) 実験結果

葉肉組織より得た遊離細胞は、小さくて光顕下での観察は困難であり、AK-毒素処理後の細胞の顕著な変化は認めることができなかった。また、細胞の褐変壊死もみられなかった。そこで、電解質漏出によつて AK-毒素反

応性を調べた結果、低張液下の感受性品種の遊離細胞では、AK-毒素処理後直ちに K^+ の多量漏出がみられ、遊離細胞でもその反応性を保持しているのが認められた(才19回)。しかし、高張液下の細胞では、AK-毒素による顕著な多量漏出はみられず、原形質分離下の細胞では、AK-毒素反応性の低下が認められた(才19回)。なお、抵抗性品種の遊離細胞に対するAK-毒素の効果は、すくなく観察された。

次に、葉肉組織よりプロトプラストの分離には成功しなかったが、花弁組織より酵素処理によって大量のプロトプラストが得られた。AK-毒素処理した感受性品種のプロトプラストは、4~6時間目頃より徐々に原形質が一方に凝集し始め、24時間後には原形質膜の消失したものが認められた(才20回)が、その変化は、組織レベルに比べて遅延低下するところが観察された。また、プロトプラストを24時間保存しておくと、さらにAK-毒素反応性



才19回 葉肉遊離細胞からのK⁺漏出に対するAK-毒素の効果

- 高張液下AK-毒素処理
- 高張液下 水処理
- 低張液下AK-毒素処理
- 低張液下 水処理

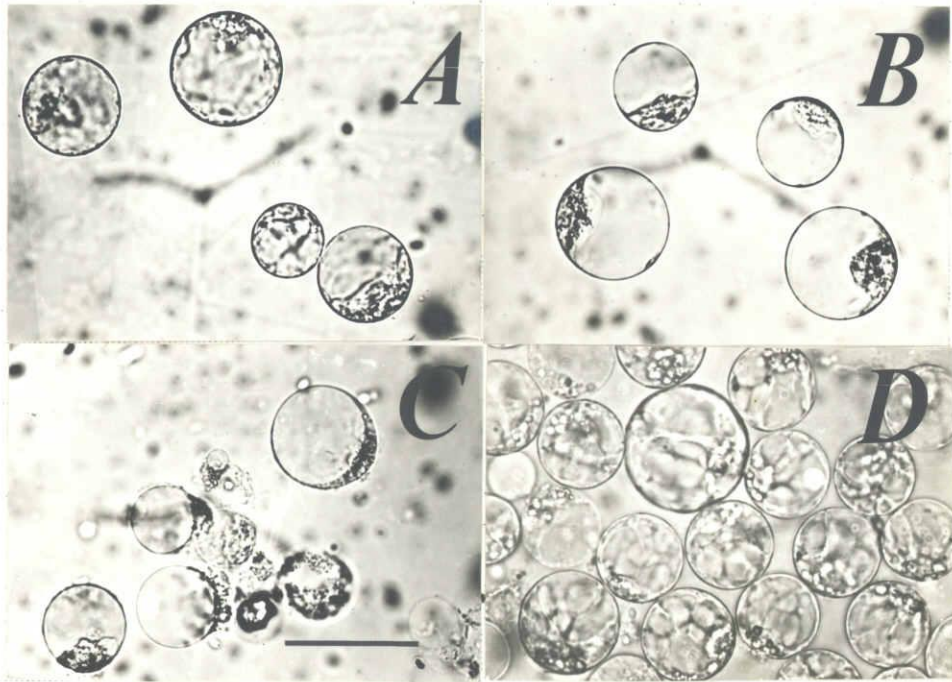


図20 AK-毒素による7°ロトプラストの反応

A: 毒素処理前の感受性品種

B: 毒素処理6時間後の感受性品種

C: 毒素処理24時間後の感受性品種

D: 毒素処理24時間後の抵抗性品種

— = 30 μ m

表9 正常70トプラストに対するAK-毒素の効果

前処理	処理	正常70トプラスト率(%) ^{a)}			
		感受性品種		抵抗性品種	
	AK-毒素	0.2 ^{b)}	0.9 ^{c)}	92.0 ^{b)}	111.2 ^{c)}
	水	82.7	100.0	88.1	100.0
5°C, 24時間保存	AK-毒素	10.2	14.1	79.5	110.0
	水	72.5	100.0	72.3	100.0
25°C, 24時間保存	AK-毒素	27.9	36.9	65.0	94.5
	水	75.5	100.0	68.8	100.0

a) AK-毒素処理24時間後に観察

b) $\frac{\text{正常70トプラスト数}}{\text{全70トプラスト数}} \times 100$

c) $\frac{\text{AK-毒素処理区}}{\text{水処理区}} \times 100$

の低下がみられ、24時間後でも正常なプロトプラストが存在し、原形質膜の消失現象もほとんど認められなかつた(表9)。なお、抵抗性品種では、AK-毒素による変化はみられなかつた。

以上の結果から、感受性品種では単細胞系においてもAK-毒素反応性を保持していることが認められ、原形質分離下の遊離細胞やプロトプラストでは、その反応性が容易に遅延低下したことから、AK-毒素の作用には宿主細胞壁と原形質膜とが関与している可能性が考えられる。しかし、AK-毒素反応性の低下が、原形質分離による原形質膜の状態変化によることも考えられ、さらに、原形質分離による宿主細胞内の電解質が漏出し、AK-毒素による電解質多量漏出が認められなかつたことも十分考えられるので、今後、この点とさらに検討する必要がある。

オ5章 AK-毒素の宿主特異的作用機構

前章のAK-毒素に対する宿主の生理学的諸反応の結果から、AK-毒素の作用点は、宿主原形質膜の透過機能の変化にある可能性が示唆された。そこで、本章ではこの膜透過機能に焦点を当て、各種の生理学的な実験からAK-毒素の宿主特異性発現機構の解明を試みた。

1 AK-毒素による電解質多量漏出現象

AK-毒素の膜透過機能に対する作用の中で、最も顕著に認められる現象は、宿主組織からの電解質の多量漏出である(オ4章オ3節)。そこで、この漏出現象を解析し、膜透過機能の変化がAK-毒素の作用点かどうかを検討した。

1) 電解質の初期漏出に対するAK-毒素の効果

電解質漏出がAK-毒素による宿主の最も早い反応かどうかをみるために、AK-毒素処理

直後の電解質漏出を調べた。

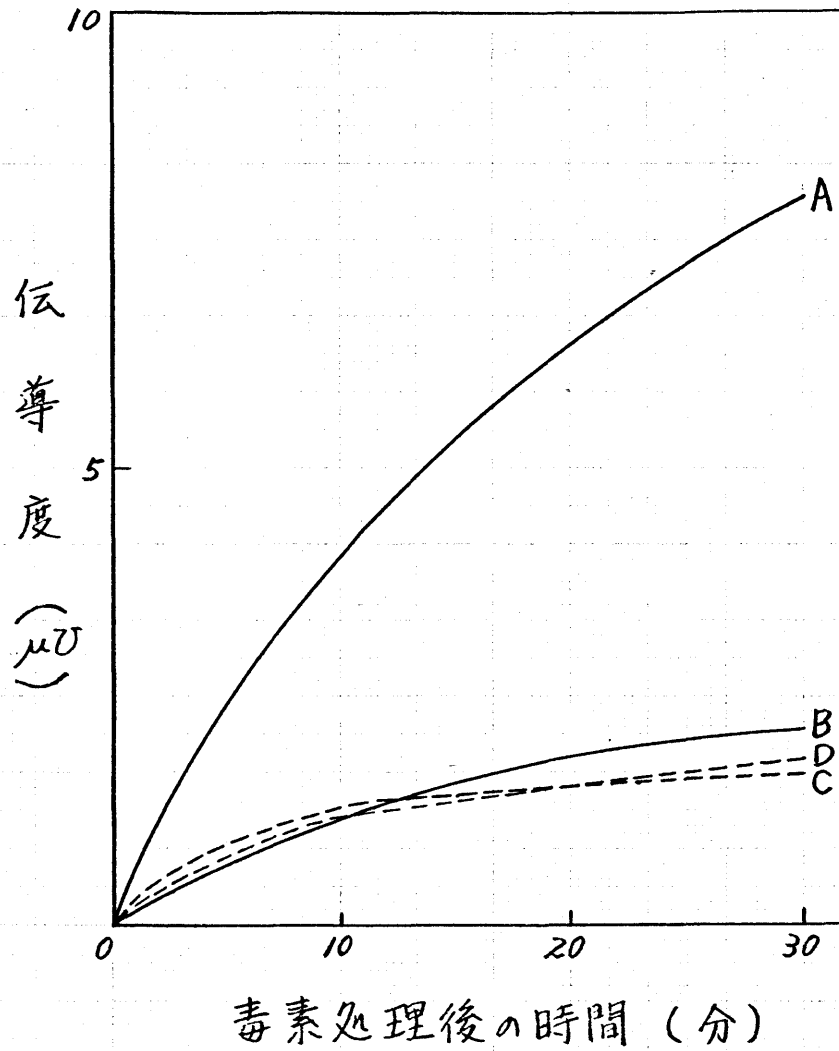
i) 実験材料および方法

ナシ葉ディスク5枚をAK-毒素液(10 $\mu\text{g/ml}$)中で15分間減圧浸透処理後、ディスクを20 mlの脱イオン水を含む三角フラスコ内に入れ、28°Cで往復振とう処理した。フラスコ内には予め電気伝導度計のセルを入れておき、ディスクの挿入と同時に処理液中の伝導度の値を連続的に測定した。

ii) 実験結果

AK-毒素処理した感受性ナシ組織では、処理後直ちに対照の水処理区よりも多くの電解質を漏出したが、抵抗性品種では、AK-毒素処理区と水処理区との差異はそれほど認められなかった(表21回)。

AK-毒素は熱に極めて不安定な物質で、構造決定までに至っていないが、その分子量は350前後と推定されている⁶⁴⁾。したがって、本実験に用いたAK-毒素は $3 \times 10^{-5} \text{M}$ の極めて低濃度であること、また、抵抗性品種では多量



才21回 ナシ葉組織からの初期電解質
漏出に対するAK-毒素の効果

- A: 毒素処理 感受性品種
- B: 水処理 感受性品種
- C: 毒素処理 抵抗性品種
- D: 水処理 抵抗性品種

漏出がみられたいことより、AK-毒素による感受性品種の電解質漏出は、単なる濃度障害による現象とは考えられたい。そこで、AK-毒素の電解質漏出に対する効果を、さらにAK-毒素と同じモル濃度のしん糖を用いて比較した。なお、しん糖による電解質漏出は、AK-毒素処理の場合とすべて同様に行なった。結果は、しん糖を処理したテシ組織では、電解質の多量漏出はほとんど観察されなかつた。したがって、AK-毒素による電解質の多量漏出現象は、感受性品種の膜透過性の変化によるものと考えられる。

2) 電解質多量漏出に対する温度の影響

広江ら²⁴⁾は、壊死斑形成に対するAK-毒素活性の最適温度は 28°C 前後であり、 15°C 以下または 35°C 以上ではほとんど毒性を発揮しないことを報告している。そこで、AK-毒素作用に対する温度の影響を電解質漏出によつて調べた。

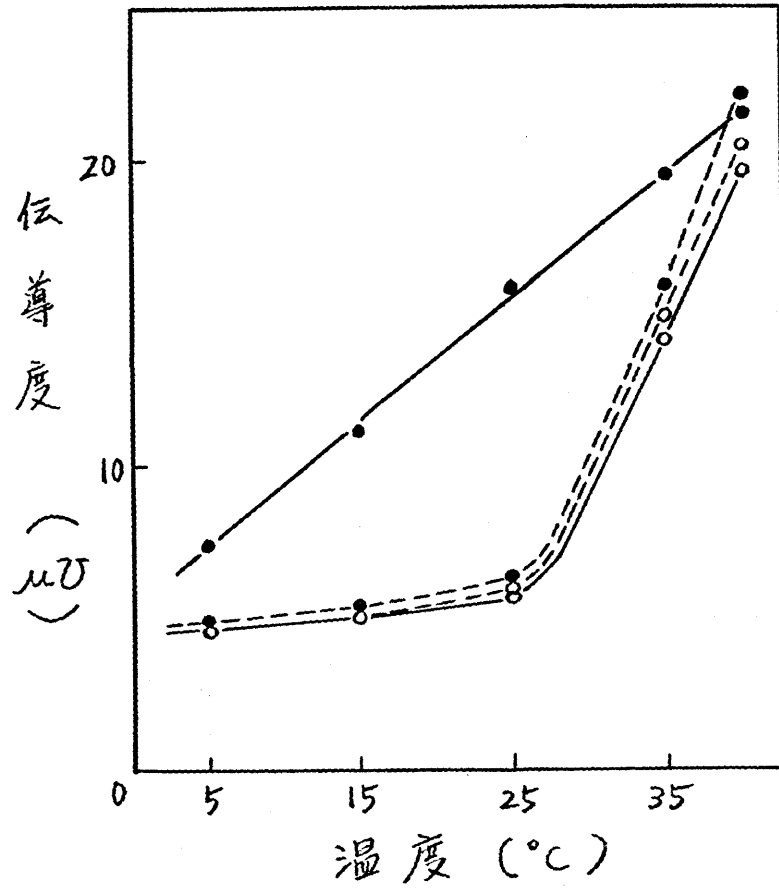
1) 実験材料および方法

前項と同様に AK-毒素 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 処理したナシ葉ディスク 5 枚を 20 ml の脱イオン水中に入れ、5、15、25、35 および 40°C の各温度下で往復振とう処理し、90 分後に処理液中の伝導度の値を測定した。

ii) 実験結果

AK-毒素処理した感受性品種からの電解質漏出は、5°C から温度の上昇とともに直線的に増大し、単純な物理化学的溫度依存性を示した (Fig. 22)。一方、水処理した感受性品種や、毒素処理および水処理した抵抗性品種からの漏出の場合には、25°C まで漏出量はほとんど変化しなかったが、高温になると膜透過機能の失活によって電解質漏出は急激に上昇した (Fig. 22)。したがって、電解質漏出に対する AK-毒素作用は、生物学的な溫度依存性を示すが、AK-毒素は、感受性品種の原形質膜の生物学的膜透過機能を完全に失活させるものと思われる。

3) 宿主組織からの電解質多量漏出量



才22回 AK-毒素によるナシ葉からの
電解質漏出に対する温度の影響

- : AK-毒素処理 感受性品種
- : 水処理 感受性品種
- : AK-毒素処理 抵抗性品種
- : 水処理 抵抗性品種

AK-毒素による電解質異常漏出で、宿主細胞に障害を与えうる量の漏出かどうかをみるために、宿主組織中に存在する電解質当りの漏出量を調べた。

i) 実験材料および方法

AK-毒素処理および電解質漏出の測定法は前項と同様である。宿主組織中の電解質当りの漏出量は、以下の方法によって算出した。AK-毒素処理24時間後の往復振とう処理液をディスクを入れたいすき湯水中に15分間浸漬し、ディスク内に存在する電解質をすべて漏出させた。漏出液中の伝導度の値を測定し、トシ葉組織中に存在する総電解質量とした。AK-毒素処理後一定時間毎に得た伝導度の値を総電解質当りの%として表わし、毒素処理による漏出量とした。

ii) 実験結果

感受性品種では、AK-毒素処理後3時間で約35%を、6時間で約60%を漏出する二つが認められた(才

10表)。一方、抵抗性品種や水処理の対照区では、24時間後でもわずか15%以下の漏出量であった。本実験からも、AK-毒素によつて感受性品種では細胞内電解質の大部分が漏出されることを示した。

4) ^{14}C -ラベル物質の漏出に対するAK-毒素の効果

AK-毒素の作用が膜透過機能の失活にあることをさらに確認するため、人為的にヤシ組織内にラベル物質を取り込ませ、その漏出に対するAK-毒素の効果を調べた。

i) 実験材料および方法

ヤシ葉ディスク10枚をDL-ロイシン- ^{14}C 液(50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)中に入れ、1時間減圧浸透処理した。ディスクを脱イオン水中に30分浸漬した後、10 mlのAK-毒素液(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)中に入れ、28°Cで往復振とう処理した。一定時間毎に処理液1 mlを取り、GMカウンターで処理液の放射活性を測定した。

ii) 実験結果

才10表 AK-毒素によるゲシ葉組織からの
電解質漏出量

組織	処理	毒素処理後の時間(時間)				
		1	3	6	12	24
電解質漏出量(%) ^{a)}						
感受性品種	AK-毒素	13.5	34.0	56.5	78.0	95.0
感受性品種	水	3.1	5.1	8.7	11.0	14.5
抵抗性品種	AK-毒素	2.5	4.3	6.6	9.8	12.2
抵抗性品種	水	2.7	4.8	8.3	10.5	14.0

a)
$$\frac{\text{漏出液中の伝導度}}{\text{熱処理組織液中の伝導度}} \times 100$$

感受性品種では、AK-毒素処理後30分ですでに¹⁴C-ラベル物質の多量漏出が認められ、その後、時間の経過とともにその漏出量も増大した(オ11表)。一方、抵抗性品種や水処理した両ナシ品種では、30分以後、組織からの漏出はさほど観察されなかつた。このように、外部より組織内に取り込まれた物質においてもAK-毒素による初期の多量漏出が認められた。

5) 電解質漏出に対するナシ黒斑病菌代謝毒性物質の効果

ナシ黒斑病菌には、AK-毒素以外に種々の非宿主特異的な代謝毒性物質の存在が知られ、本菌の菌体および培養液よりアルタナリオール⁶⁵⁾、アルタナリオールモノメチルエーテル⁶⁵⁾、テヌアゾン酸⁶⁶⁾、フェニル酢酸⁶⁷⁾およびジオクテルフタレート⁶⁸⁾などが単離されている。なお、ジオクテルフタレートに関しては、菌の代謝物質と考えるよりは、プラスチック製品などの可塑剤としての汚染物質であらうと考えら

表11 AK-毒素によるDL-ロイシン- ^{14}C 処理
 ナシ葉組織からの ^{14}C -化合物の漏出

組織	処理	毒素処理後の時間 (時間)				
		0.5	1	2	3	4
放射活性 ($\text{cpm} \times 10^{-2}$)						
感受性品種	AK-毒素	38.4	43.2	48.4	52.3	59.1
感受性品種	水	28.4	29.1	30.0	28.3	28.1
抵抗性品種	AK-毒素	22.5	23.0	24.3	25.2	24.5
抵抗性品種	水	23.4	22.9	24.0	23.2	23.0

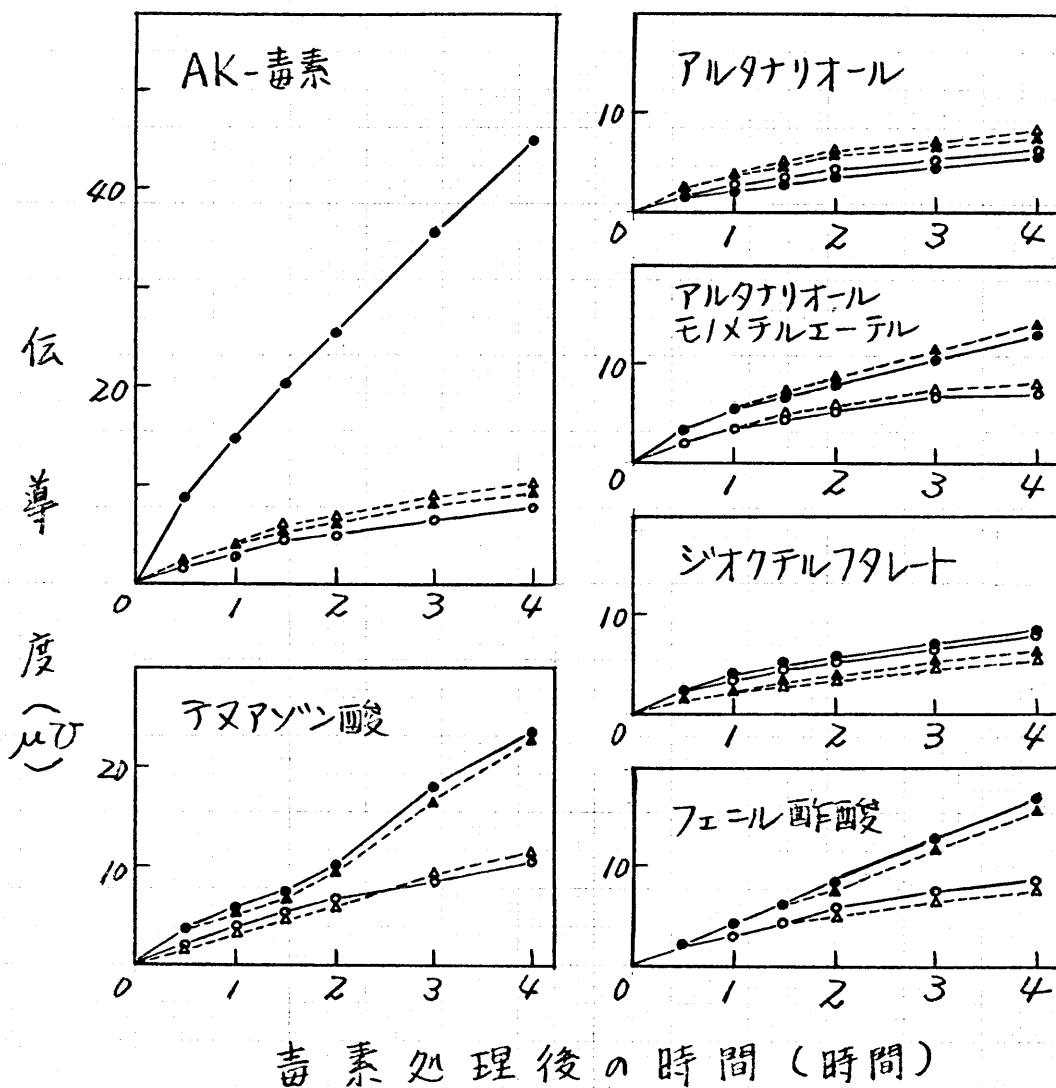
れる^{41,68)}。そこで、これら各種の毒性物質による電解質漏出を調べ、AK-毒素の作用と比較検討した。

i) 実験材料および方法

毒性物質の処理および電解質漏出の測定法はオ1および2項と同様である。また、毒性物質はAK-毒素(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)以外すべて300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度を使用した。

ii) 実験結果

アルタナリオールモノメチルエーテル、テアゾン酸およびフェニル酢酸では、処理後徐々に感受性、抵抗性両トシ組織から電解質の多量漏出を引き起した。AK-毒素による多量漏出とは明らかに異なり、処理直後の顕著な漏出や宿主特異性は示さなかった(オ23図)。なお、アルタナリオールおよびジオクテルフタレートは電解質漏出にはほとんど活性を示さなかった。したがって、AK-毒素による電解質多量漏出現象は、極めて特異的反応であると思われる。



オ23図 ナシ葉組織からの電解質漏出に対するナシ黒斑病菌の代謝毒性物質の効果

- 毒素処理 感受性品種
- 水処理 感受性品種
- ▲— 毒素処理 抵抗性品種
- △— 水処理 抵抗性品種

以上の観察結果は、すべてAK-毒素の宿主特異的作用点が感受性品種の原形質膜の透過機能の失活にある可能性を示唆している。

2 AK-毒素による多量漏出物質の分析

AK-毒素による電解質の多量漏出が、選択的膜透過機能の失活による現象なのか、または、非選択的漏出現象なのかをみるために、AK-毒素処理後の宿主組織からの多量漏出物質を分析した。

1) 実験材料及び方法

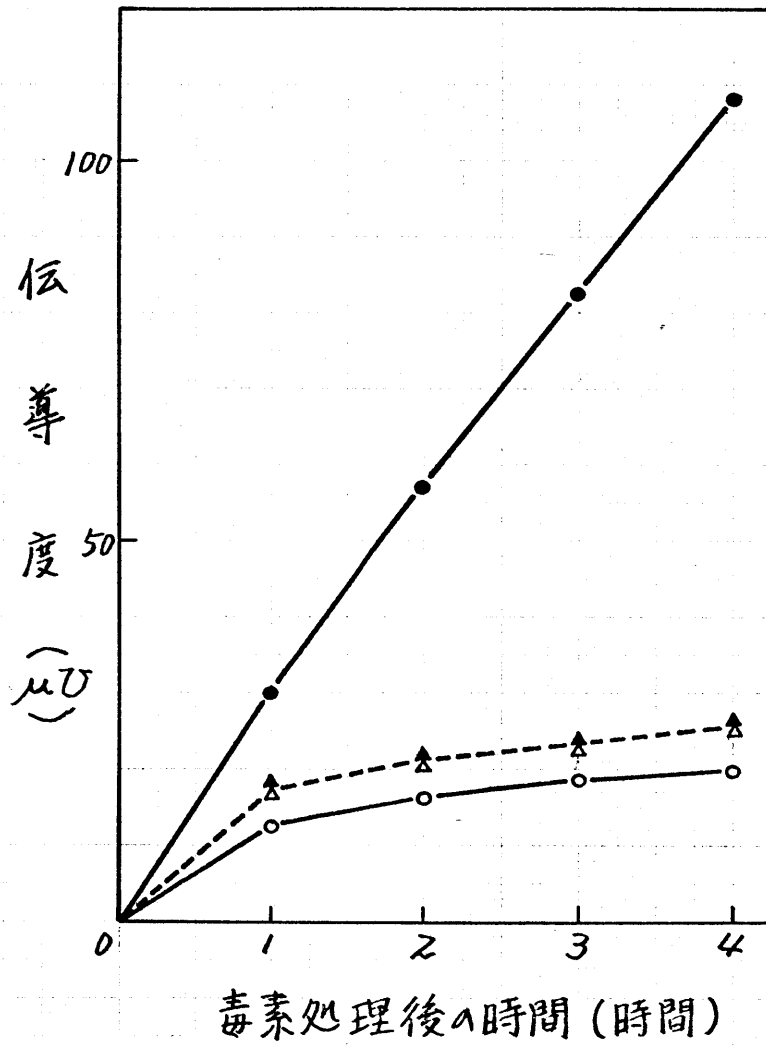
トシ葉ネイス7 20枚をAK-毒素液(10 μ g/ml)中で30分間減圧浸透処理後、20mlの脱イオン水に入れ、27 $^{\circ}$ Cで往復振とう処理した。1時間毎に処理液を取り、新たに20mlの脱イオン水を加えて往復振とう処理をくり返した。各処理液の電解質漏出量を測定後、成分分析を-20 $^{\circ}$ C下で保存した。十分雨量を得るために、上記の操作を40回くり返し、それぞれに対応する処理液を一緒にし、40 $^{\circ}$ C減圧下で約20倍

に濃縮した。濃縮液を2分し、一方はその子溶液中の無機りん酸、還元糖、アミノ酸、蛋白質および280nm吸光物質量を調べた。残り半分は ALLEN⁶⁹⁾の方法によつて60% HClO₄で灰化し、脱イオン水で元の量に調整後、K⁺、Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺および総りん酸量を調べた。りん酸、還元糖、アミノ酸および蛋白質の定量は、それぞれ KH₂PO₄、グルコース、グルタミン酸、牛血清を標準として、中村⁷⁰⁾、SOMOGYI および NELSON⁷¹⁾、YEMM および COCKING⁷²⁾、LOWRY⁷³⁾らの各方法によつて行なつた。280nm吸光物質は、分光光度計(日立製101型)で測定した。また、K⁺および Na⁺は蛍光分光光度計(エコー製IN型)で、Mg²⁺ および Ca²⁺は原子吸光光度計(日立製508型)でそれぞれ測定した。得られた各測定値は、以後すべてナシ組織1g生重当りに換算し、結果は、Ak-毒素処理から1時間毎に得た各処理液子での総漏出量によつて表わした。

2) 実験結果

i) 無機イオンの漏出

異常漏出物質の分析を行なう前に、各処理液の電解質漏出量を調べた。実験は40回行なったが、例外なしにAK-毒素処理した感受性品種のみ著しい電解質の多量漏出が認められ、その漏出は直線的に増大した(才24図)。そこで、各処理液中の無機イオンを分析した結果、感受性品種では、AK-毒素処理によつて K^+ の顕著な多量漏出が認められ、その漏出も直線的で電解質のそれとよく一致した(才25図および才12表)。また、AK-毒素による無機りん酸の多量漏出も認められたが、その漏出は時間とともに徐々に減少した(才25図)。なお、処理液中の総りん酸の漏出量は、無機りん酸のそれとほぼ一致し、組織から漏出するりん酸は、ほとんど無機であることを示した。一方、 Na^+ 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} では、AK-毒素処理による多量漏出は認められず、その漏出は水処理区よりもむしろ減少する傾向を示した(才25図および才12表)。また、抵抗性品種では、AK-毒素による無機イオンの多量漏出



才24図 ナシ葉組織からの電解質漏出
に対するAK-毒素の効果

- : 毒素処理 感受性品種
- : 水処理 感受性品種
- ▲- : 毒素処理 抵抗性品種
- △- : 水処理 抵抗性品種

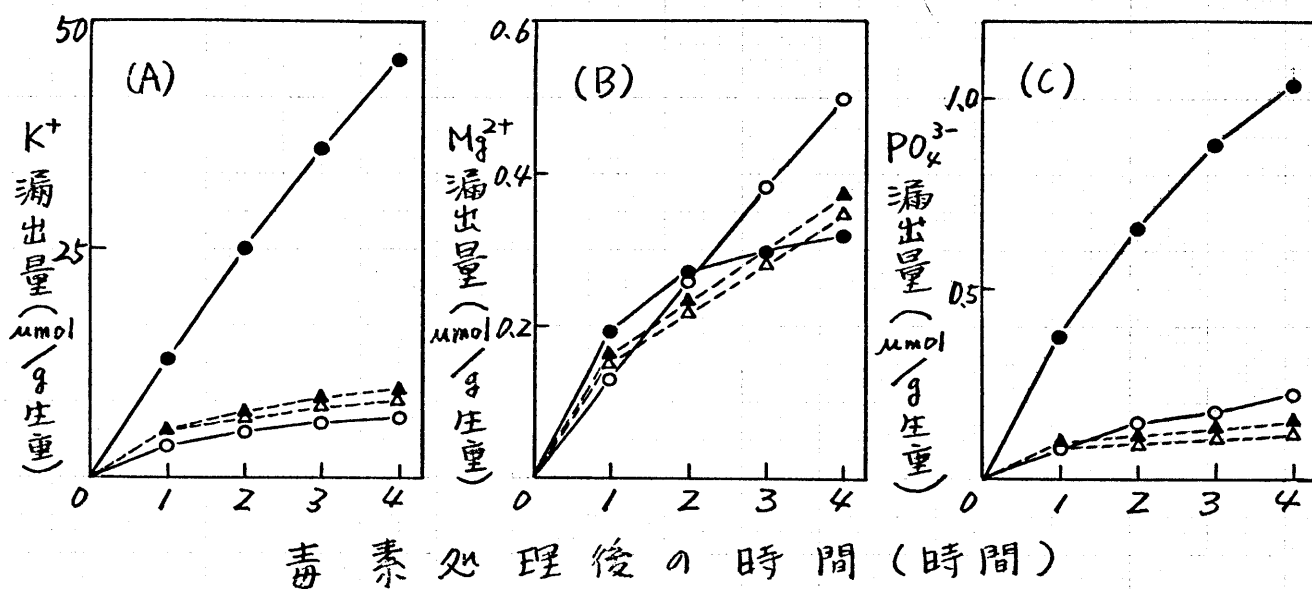


図25 タバコ葉組織からの K^+ (A)、 Mg^{2+} (B)および PO_4^{3-} (C)の漏出に対するAK-毒素の効果

- : 毒素処理 感受性品種
- : 水処理 感受性品種
- ▲---: 毒素処理 抵抗性品種
- △---: 水処理 抵抗性品種

才 12 表 AK-毒素に対するナシ葉組織からのカチオンの漏出

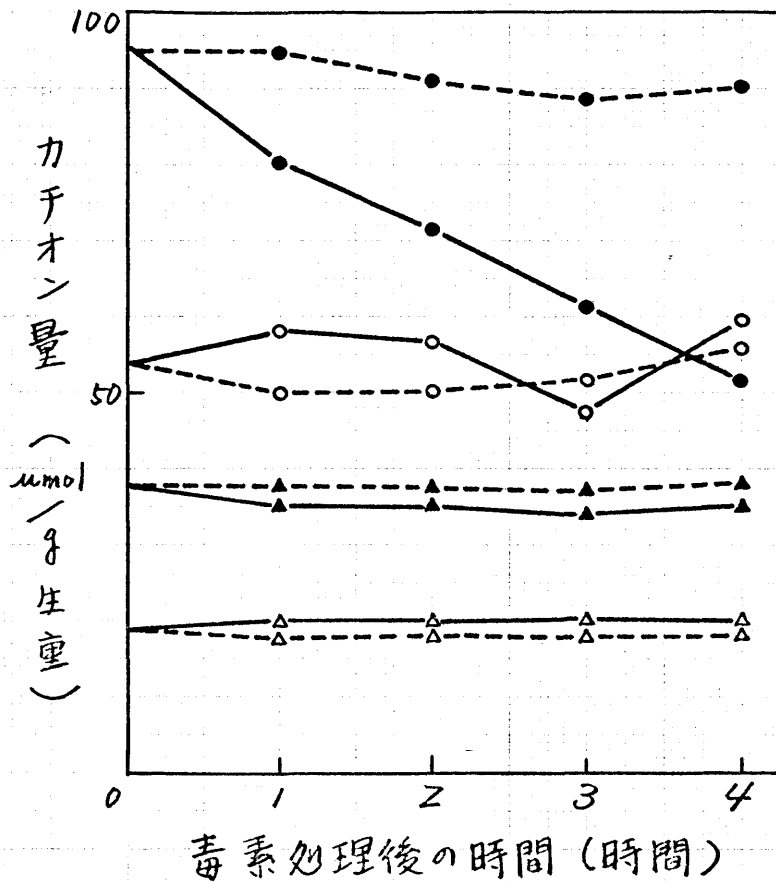
組織	処理	カチオン ($\mu\text{mol/g}$ 生重) ^{a)}			
		K^+	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}
感受性品種	AK-毒素	46.54 ± 0.13	0.31 ± 0.04	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.06
感受性品種	水	7.44 ± 0.83	0.45 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.48 ± 0.04
抵抗性品種	AK-毒素	9.36 ± 0.90	0.36 ± 0.05	0.38 ± 0.01	0.24 ± 0.03
抵抗性品種	水	8.72 ± 0.51	0.34 ± 0.07	0.36 ± 0.02	0.24 ± 0.04

a) AK-毒素処理4時間後の漏出量

はより大きく認められなかった。

次に、ナシ組織中に存在する無機イオン当りの漏出量をみるために、AK-毒素処理後の組織中に残存するイオン量を調べた。AK-毒素処理した感受性品種のティスクを脱イオン水中で往復振とう処理し、一定時間後にティスクを取り出し、1 ml の 60% HClO_4 で灰化後、脱イオン水で希釈して無機イオン量を測定した。AK-毒素処理後、感受性ナシ組織内の K^+ 量は直線的に減少し、4時間後には組織内の総 K^+ 量の約 40% を消失した (オ 26 図)。一方、 Na^+ 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} では、AK-毒素による変化は認められなかった (オ 26 図)。また、リン酸においても、漏出液では多量漏出が観察されたにもかかわらず、組織内残存量の検定からはより大きく減少は認められず、その漏出は極く少量であるものと思われる。

AK-毒素による宿主組織から K^+ の顕著な多量漏出が認められたので、さらに K^+ の初期漏出に対する AK-毒素の効果調べた。感受



才26図 AK-毒素処理後の感受性タンパク質組織に存在するCa²⁺量

K⁺ : ●- 毒素処理 ●- 水処理

Ca²⁺ : ○- 毒素処理 ○- 水処理

Mg²⁺ : ▲- 毒素処理 ▲- 水処理

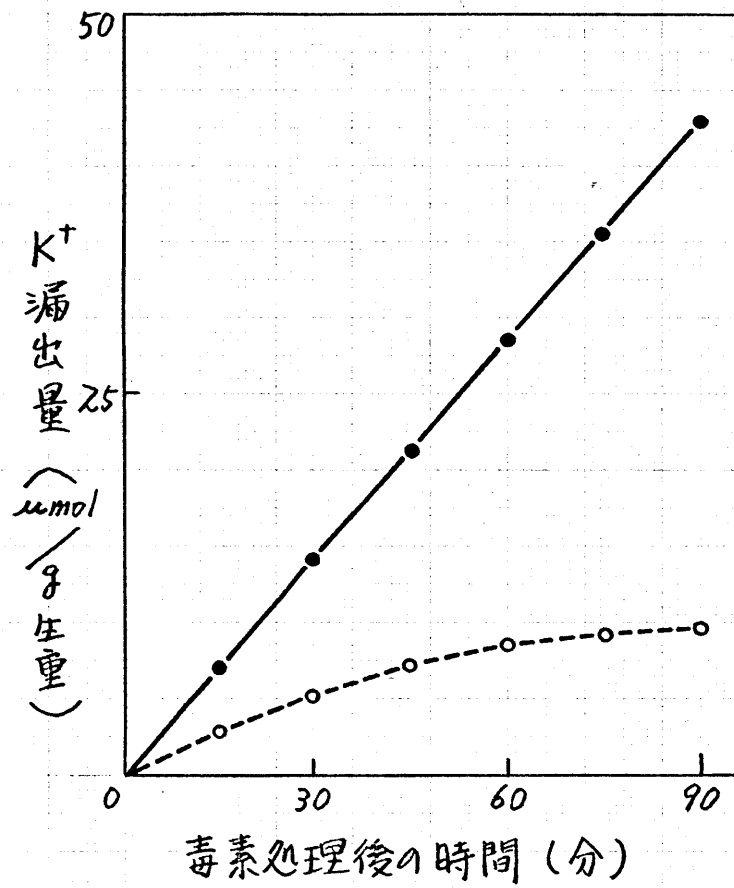
Na⁺ : △- 毒素処理 △- 水処理

性ナシ葉のディスクから表皮をセロテープで剥ぎ取り、葉肉部を10 mlのAK-毒素液(10 μ g/ml)に入れ、27°C下で往復振とう処理した。15分毎にAK-毒素液を入れ換之、各毒素処理液中の K^+ 漏出量を測定した。感受性ナシ組織は、AK-毒素液に浸漬後直ちに直線的な K^+ の多量漏出を生じ(オ27回)、 K^+ 透過性に対するAK-毒素の作用は、極めて速やかであることが示唆された。

ii) 有機物質の漏出

分析したすべての有機物質において、AK-毒素処理した感受性品種では、多量漏出が認められた(オ28回)。アミノ酸では、処理後直線的な漏出を示したが、還元糖、蛋白質および280 nm吸光物質の漏出は、処理後2時間目頃より顕著となり、その後二次関数的な増大を示した。このような物質の漏出は、恐らく膜透過機能失活後の膜破壊による漏出現象であろうと思われる。

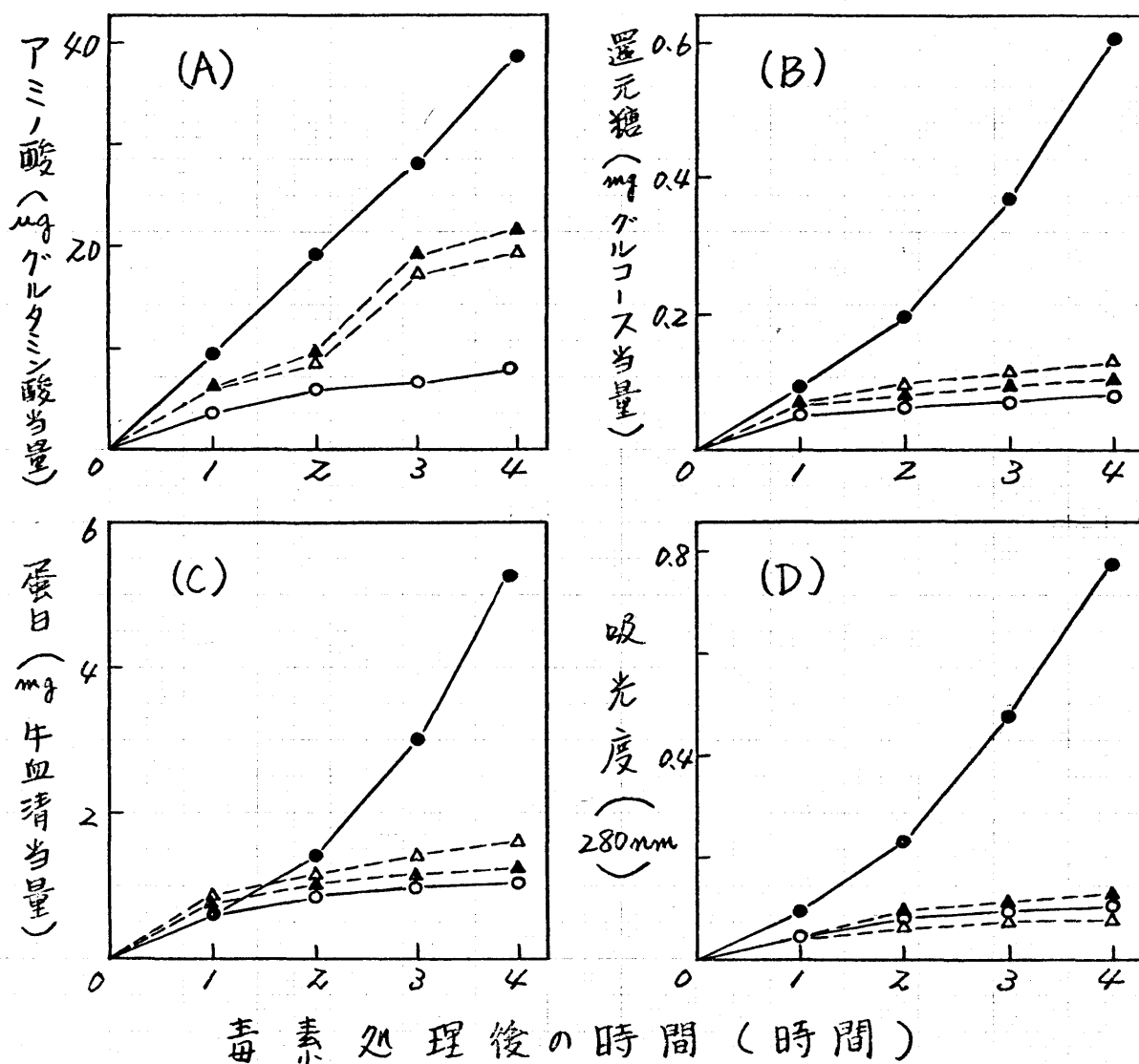
以上のAK-毒素による異常漏出物質の分析



オ 27回 感受性ナシ葉組織からの初期
 K^+ 漏出に対するAK-毒素の効果

—●— : 毒素処理

--○-- : 水処理



才28図 ナシ葉組織からのアミノ酸(A)、還元糖(B)、蛋白(C)および280nm吸光物質(D)の漏出に対するAK-毒素の効果

- 毒素処理 感受性品種
- 水処理 感受性品種
- ▲— 毒素処理 抵抗性品種
- △— 水処理 抵抗性品種

の結果からは、 K^+ 、無機りん酸およびアミノ酸の初期漏出が観察され、特に K^+ の漏出は極めて顕著であることを示した。一方、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などの漏出はそれほど認められず、AK-毒素による漏出物質には特異性がみられた。しかし、植物細胞では、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などのカチオンは原形質膜を透過しにくく、しかも細胞内ではほとんど遊離の状態では存在しないこと、これに対して、 K^+ は細胞内に遊離の状態でも多量に存在し、しかも容易に膜を透過することなどを考えると、AK-毒素による膜透過機能の失活は非選択的であると推察される。

3 AK-毒素作用に対するカチオンの効果
前節の結果から、AK-毒素による細胞内成分の漏出は、非選択的であることが示唆されたが、漏出物質の中でも K^+ はその初期に極めて顕著に漏出が認められる。一方、高等植物の原形質膜には、カチオン依存性ATPaseの存在が知られており、カチオンの存在下で著し

く活性化され、カチオン透過性に重要な役割を果たしていることが観察されている⁷⁴⁾。したがって、AK-毒素による K^+ の漏出には、カチオン依存性ATPaseの関与することも考えられるので、AK-毒素作用に対するカチオンの効果について検討した。

1) カチオン添加による K^+ 多量漏出の増大
AK-毒素処理後のナシ組織に各種カチオンを添加し、 K^+ 多量漏出に対するカチオンの効果を調べた。

1) 実験材料および方法

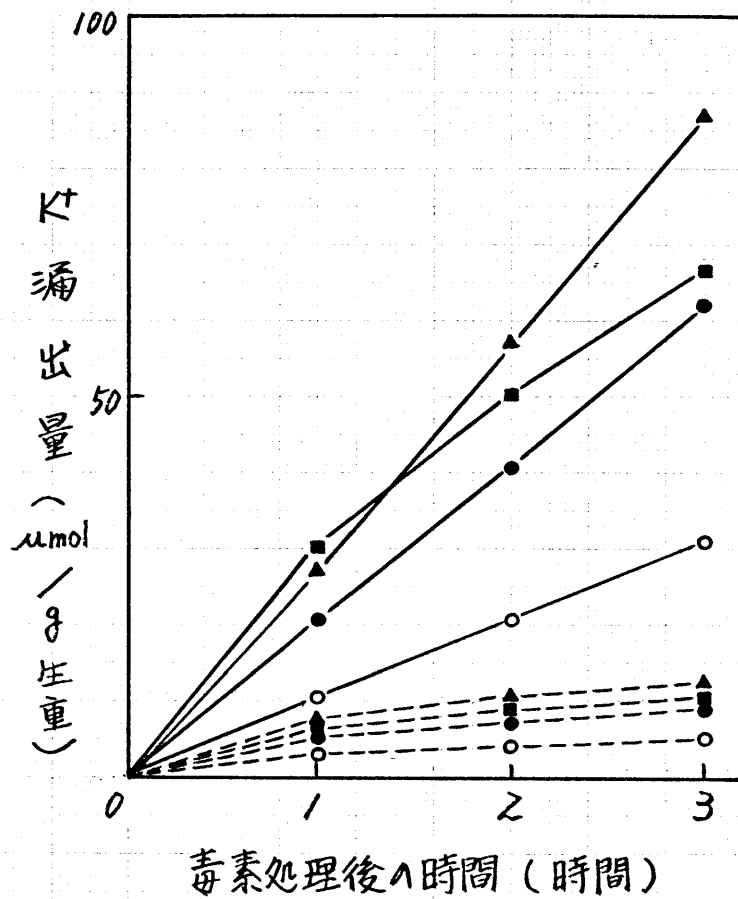
ナシ葉ディスク5枚をAK-毒素液(10 μ g/ml)中で20分間減圧浸透処理後、一定濃度の各種カチオン液10ml中に入れ、27 $^{\circ}$ Cで往復振とう処理した。1時間毎に処理液を入れ換え、各処理液中の K^+ 漏出量を調べた。また、添加カチオンの組織内への取り込み量をみるために、各処理液中の処理カチオン量を測定し、その消失量を求めることにより組織内取り込み量とした。なお、カチオンの測定は、すべて

原子吸光分光光度計（日立製 170-30 型）で行った。また、 K^+ 漏出はすべて AK-毒素処理後の時間での総漏出量によって表わした。

ii) 実験結果

AK-毒素処理後、ヤシ組織をそれぞれ 1mM の NaCl、 $MgCl_2$ および $CaCl_2$ 溶液中に浸漬すると、感受性品種では、AK-毒素による K^+ 多量漏出がさらに著しく増大した（オ 29 図）。特に $MgCl_2$ の効果が顕著に認められ、また、 $CaCl_2$ では時間の経過とともにその効果は徐々に減少した。なお、1mM KCl は K^+ 漏出に対して何らの効果も示さなかった。一方、抵抗性品種における K^+ 漏出には、これら無機物添加の効果はまったく認められなかった。

次に、リチオン濃度と K^+ 漏出促進現象との関係をリチオン処理 3 時間後の K^+ 漏出量によって調べた。NaCl と $MgCl_2$ では 0.1mM から促進効果が認められ、添加濃度の上昇とともにその効果も増大した（オ 30 図）。一方、 $CaCl_2$ も 0.1mM から促進効果を示した。5mM 以上



才29回 AK-毒素に対する感受性が葉組織からの
 のK⁺漏出に対する無機イオンの効果

- : 毒素 + NaCl -●-- : NaCl
- ▲— : 毒素 + MgCl₂ -▲-- : MgCl₂
- : 毒素 + CaCl₂ -■-- : CaCl₂
- : 毒素 -○-- : 水

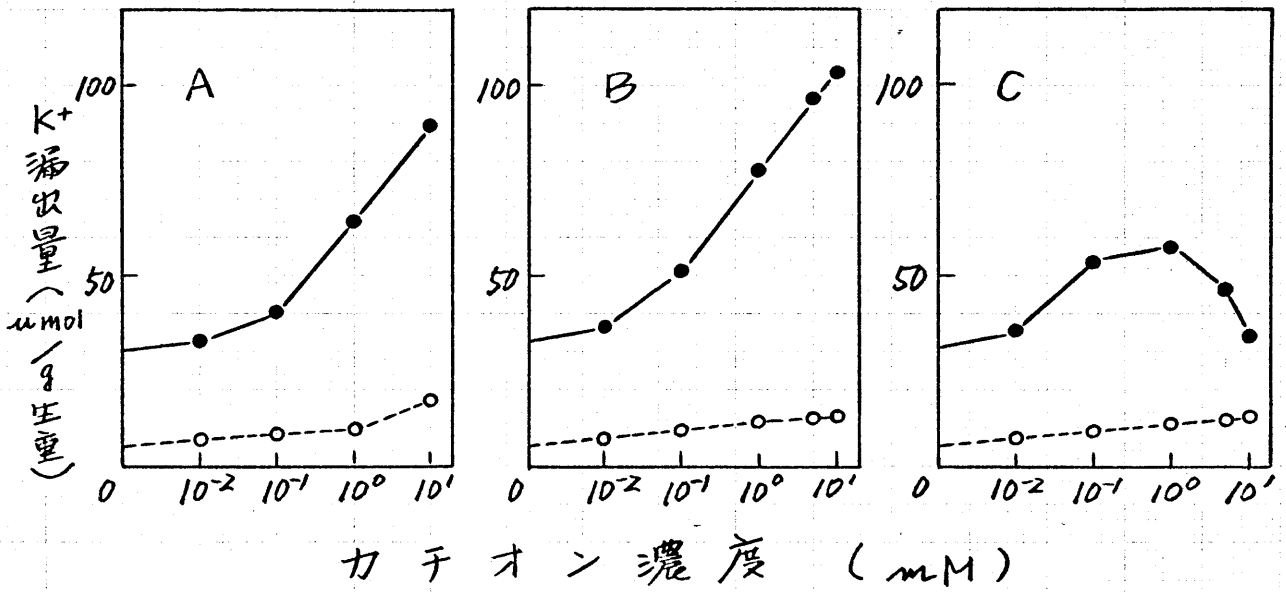


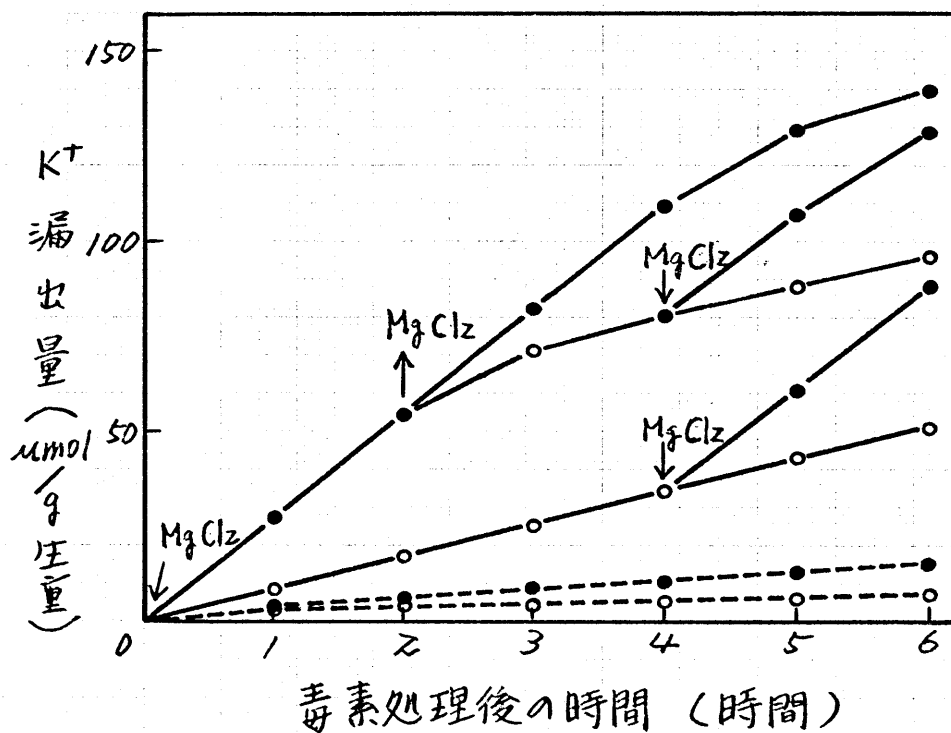
図 30 NaCl(A)、MgCl₂(B)およびCaCl₂(C)の添加濃度とK⁺多量漏出促進効果との関係

- : AK-毒素 + 無機イオン
- : 無機イオン

の濃度では顕著な効果は認められなかった（オ30図）。

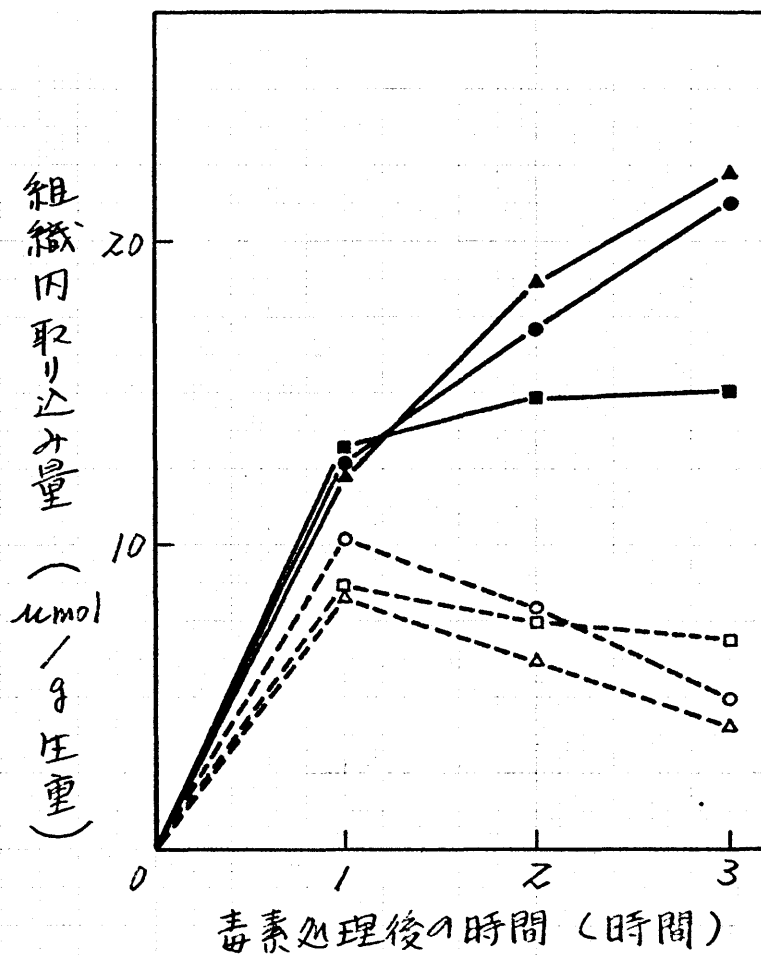
K^+ 漏出に対するカチオン添加の効果が可逆的であるかどうかをみるために、カチオンの添加および除去による K^+ 漏出の変化を調べた。AK-毒素処理した感受性ナシ組織を $MgCl_2$ 液（5 mM）中に浸漬し、2時間後に $MgCl_2$ 液を脱イオン水と入れ換えると、 $MgCl_2$ の効果は急激に減少した（オ31図）。さらに、2時間後に脱イオン水を $MgCl_2$ 液と入れ換えると、 $MgCl_2$ の効果は再び回復した（オ31図）。同様な現象は $NaCl$ や $CaCl_2$ においても観察された。

K^+ 漏出の増大は、カチオンの添加時のみ発揮されることから、添加カチオンとの交換反応で K^+ が漏出することと予想された。そこで、組織へのカチオン取り込みを各処理液の添加カチオンの減少量によって調べた。結果は、AK-毒素を処理した感受性品種では、1時間以内に対照の水処理組織よりも多くのカチオンの取り込みを示した（オ32図）。AK-



ア31図 AK-毒素に対する感受性タバコ組織からの K^+ 漏出に対する $MgCl_2$ (5 mM) の添加および除去の効果

- : 毒素 + $MgCl_2$
- : 毒素
- : $MgCl_2$
- : 水



才32回 AK-毒素処理感受性ナシ組織
によるカチオンの取り込み

- : 毒素+NaCl --○--: NaCl
- ▲—: 毒素+MgCl₂ --△--: MgCl₂
- : 毒素+CaCl₂ --□--: CaCl₂

毒素処理組織では、その後にも Na^+ や Mg^{2+} の取り込みが続いたが、 Ca^{2+} では時間の経過とともに取り込み量は減少した。一方、水処理組織での取り込みは、2時間目以後はすくなく認められなかった。

以上の実験結果から、AK-毒素による K^+ 漏出は無機イオンの添加によるものから増大することを確認されたが、この現象は、カチオンの関与した ATPase レベルでの反応とは明らか異なり、膜透過機能の失活とともに生ずる K^+ の多量漏出という一般的現象に、電氣的バランスを保つための現象であろうと思われる。

2) ATPase 活性に対する AK-毒素の効果

前項で、AK-毒素による K^+ 漏出に ATPase の関与する可能性は認められたので、これをさらに確認するために、ナシ組織のカチオン依存性 ATPase 活性に対する AK-毒素の効果を検討した。

1) 実験材料および方法

ATPase 活性の実験には、ナシ花弁組織を使

用した。組織1gをAK-毒素液(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)中で20分間減圧浸透処理後、27°C湿室下に置いた。1時間後に組織を乳鉢に入れ、5°C下で5mlの50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 6.8)および石英砂とともに磨砕した。磨砕液を4重のカーセードろ過後、遠心分離(10000 g、30分)を行ない、Sephadex G-50カラムを介してろ過し、上清より高分子分画を得た。さらに遠心分離(80000 g、60分)を行ない、沈殿部を上記緩衝液に懸濁して膜分画を得た。カチオン依存性ATPase活性の検定は、3 mM ATP (Na塩)、5 mM MgCl_2 、50 mM KClおよび10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 6.8)を含む反応液1 ml中で行なう。反応は100~200 μg 蛋白質量の検液の添加と同時に開始し、27°Cで60分間処理した。なお、無機リン酸は中村⁷⁰⁾の方法で、蛋白はLOWRY⁷³⁾の方法でそれぞれ定量した。

ii) 実験結果

膜分画のATPase活性は、感受性、抵抗性品種ともに MgCl_2 とKClの添加により促進され

たが、ATPase 活性に対する AK-毒素の効果は、
 すでに大きく認められている（表 1）。さら
 に、各種 ATPase 活性の阻害剤は、AK-毒素作
 用に何らの効果も与えない（本章 4 節）こ
 とからも、AK-毒素による K^+ 多量漏出現象は、
 膜系 ATPase レベルでの現象とは考えられない。

4 AK-毒素作用に対する人為処理の効果
 宿主の AK-毒素反応性に対する人為処理の
 効果とみることは、AK-毒素の作用機構の解
 明に重要な知見を与えるものと思われる。こ
 のような観点から、ナシ組織に各種の人為処
 理を行ない、AK-毒素反応性の変化を調べた。

1) 熱処理による AK-毒素作用の抑制

本章 2 節で、ナシ組織に軽い熱処理を
 行なうと、ナシ黒斑病菌に対する宿主の反応
 は、可変感受性への変換を示すことを観察
 した。そこで、熱処理組織の AK-毒素に対す
 る反応性について検討した。

1) 実験材料および方法

表13 ナシ葉花弁組織の膜分画のATPase活性
に対するカチオンおよびAK-毒素の効果

組織	処理	添加カチオン ^{a)}	ATPase活性 ($\mu\text{mol Pi}/\text{mg 蛋白} \cdot \text{時間}$)
感受性品種	AK-毒素	—	1.08
		$\text{Mg}^{2+} + \text{K}^+$	1.50
	水	—	1.00
		$\text{Mg}^{2+} + \text{K}^+$	1.47
抵抗性品種	AK-毒素	—	1.28
		$\text{Mg}^{2+} + \text{K}^+$	1.86
	水	—	1.49
		$\text{Mg}^{2+} + \text{K}^+$	2.07

a) 3 mM ATP および 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) に
5 mM MgCl_2 および 50 mM KCl を添加

トシ葉を一定時間各温度下で乾熱すれば温湯処理後、熱処理葉から直径1cmのディスクを打ち抜き、AK-毒素(10 μ g/ml)処理した。なお、熱処理葉のAK-毒素反応性は、壞死斑形成(第3章第1節)および電解質漏出(第3章第2節)により調べた。

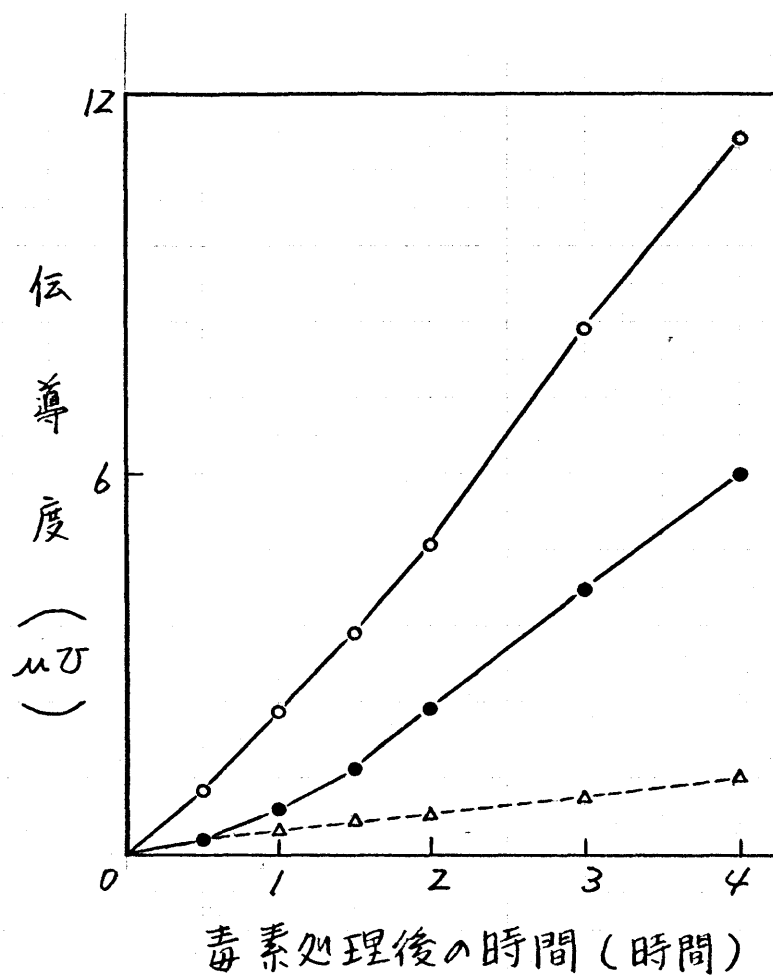
iii) 実験結果

トシ組織を40 $^{\circ}$ Cおよび55 $^{\circ}$ Cで温湯処理すると、感受性品種では、AK-毒素処理12時間後には40 $^{\circ}$ Cで6~8分、55 $^{\circ}$ Cで2~3秒の処理により著しい壞死斑形成の抑制がみられた(第14表)。一方、抵抗性品種では、AK-毒素反応性に対する熱処理の効果は、大きく認められなかった。40 $^{\circ}$ C処理による抑制効果はその後徐々に消失し、24時間後の検定ではほとんど認められなくなった。また、55 $^{\circ}$ C処理の場合も、24時間後には若干の減少を示した。なお、感受性品種では、熱処理によりAK-毒素による電解質多量漏出の抑制も観察された(第33図)。

表14 AK-毒素による壞死斑形成に対する
温湯処理の効果

処理温度	処理時間	壞死斑面積(mm ²) ^{a)}	
		12時間後	24時間後
無処理		47	52
40°C	4分	40	47
	6分	13	51
	8分	7	48
無処理		65	71
55°C	1秒	39	60
	2秒	6	24
	3秒	5	20

a) 直径1cmのナシ葉ディスクに形成された壞死斑



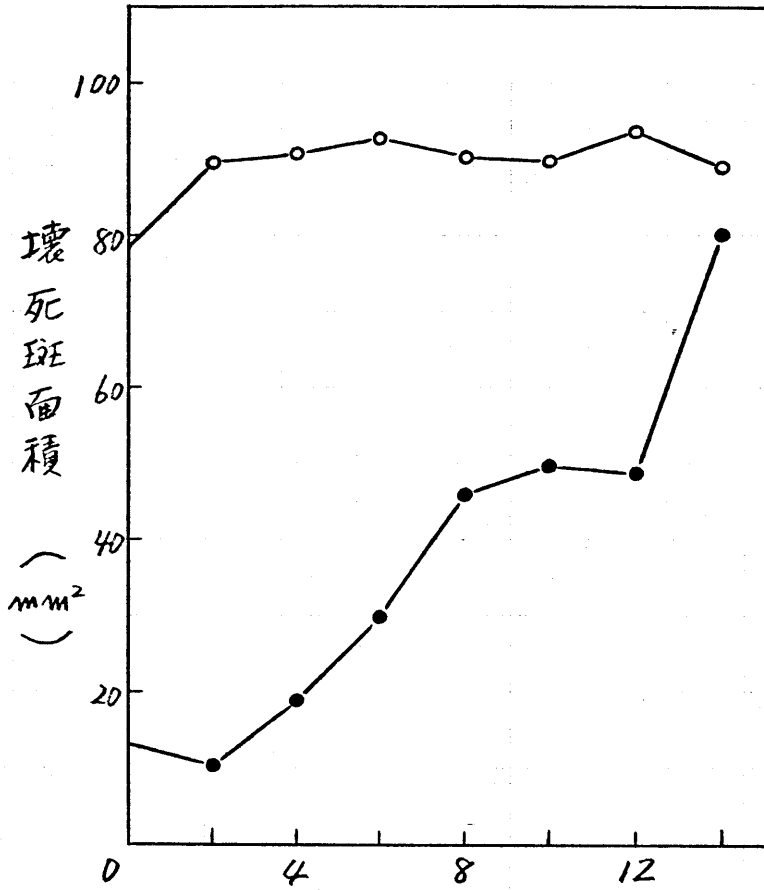
才33回 AK-毒素による感受性ナシ葉組織からの
電解質異常漏出に対する熱処理の効果

- 乾熱処理(35°C, 18時間) + 毒素
- 無処理(28°C, 18時間) + 毒素
- △— 乾熱処理 + 水, 無処理 + 水

熱処理の効果が時間とともに減少する傾向を示したので、 55°C で4秒の温湯処理を行なった熱処理組織を 28°C 下に置き、一定時間後にAK-毒素処理を行なった熱処理効果の持続性を12時間後の壊死斑形成により調べた。感受性品種の壊死斑形成に対する熱処理の抑制効果は、熱処理後の時間の経過とともに徐々に消失し、14時間後のナシ組織は完全に元の感受性に回復した(オ34図)。

次に、AK-毒素作用の抑制に要する熱処理の温度と時間との関係を調べると、熱処理の効果は 33°C から認められ、処理温度の上昇とともに抑制に要する処理時間も短かくなった(オ15表)。また、温湯処理では、乾熱処理の場合よりも短い処理時間で抑制効果が認められ、さらに、壊死斑形成よりも電解質漏出による検定の方が、その効果が早く検出された(オ15表)。

熱処理の効果は、AK-毒素処理後の組織でも発揮されるかどうかをみるために、減圧浸



熱処理から毒素処理までの時間(時間)
 図34 AK-毒素による壊死斑形成に対する
 熱処理の抑制効果の減少

- : 熱処理(55°C, 4秒)+毒素
- : 無処理 + 毒素

表 15 AK-毒素作用抑制に要する
熱処理の温度と時間

処理温度	抑制に要する処理時間	
	壊死斑形成 ^{a)}	電解質異常漏出 ^{b)}
乾熱処理 ^{c)}		
33°C	24時間	14—24時間
35	16	8—24
40	2	0.5—2
45	0.5	0.25—0.5
温湯処理 ^{c)}		
40°C	300秒	240—300秒
45	30	20—30
50	7	3—4
55	2	1
60	1	—

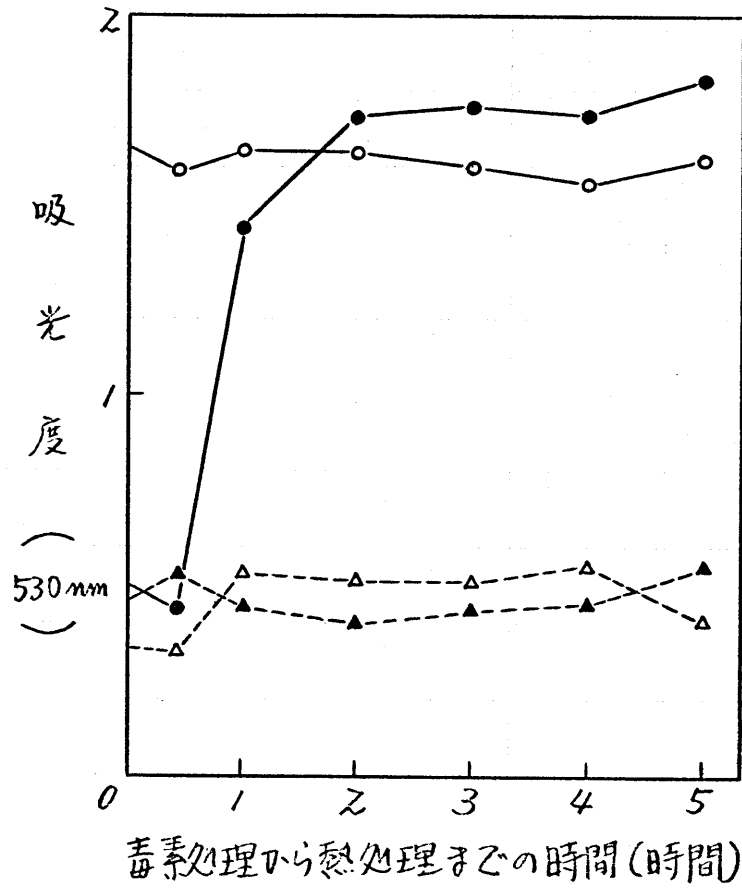
a) 毒素処理12時間後に測定

b) 毒素処理2時間後に測定

c) 熱処理は毒素処理直前に行なう。

透によつて AK-毒素処理した感受性品種のディスクを 28°C 下に置き、一定時間後に 55°C で4秒の温湯処理を行つた。AK-毒素処理の8時間後に組織に現われる黒変の程度を、分光光度計 (530 nm の吸光度) で測定した。AK-毒素処理30分後に熱処理を行つた組織では、壊死斑形成の抑制を示したが、1時間以後の熱処理では、さうなくその効果は認められなく存した (第35図)。したがつて、AK-毒素に対する宿主の反応は、AK-毒素との接触後1時間以内に不可逆的に確立されるものと思われる。

以上の結果から、AK-毒素反応性に対する熱処理の効果は、病原菌に対する効果とは異なり、感受性から不感受性への変換として認められるが、恐らくそれは、感受性品種における AK-毒素作用部位の熱処理による可逆的所変化によるものと考えられる。一方、熱処理組織では、AK-毒素作用部位とは別に、抵抗反応系にも何らかの変化を引き起し、その



才35回 感受性ナシ葉の壊死斑形成に対する AK-毒素処理後の熱処理の効果

- : 毒素 + 熱処理 (55°C, 4秒)
- : 毒素 + 無処理
- ▲---: 熱処理
- △---: 無処理

発現が停止されるために、菌に対してはすべて感受性への変換を示すものと思われる。

2) 浸透圧ショック処理によるAK-毒素作用の抑制

HEPPEL⁷⁵⁾らは、グラム陰性菌に浸透圧ショックを与えると、細胞表面性の透過系因子の遊離による糖およびアミノ酸透過能の減少を認め、その後、高等植物においても浸透圧ショック処理による選択的透過機能の抑制現象が観察されている⁷⁶⁾。そこで、ナシ組織に浸透圧ショック処理を行ないAK-毒素に対する反応性を調べた。

1) 実験材料および方法

ナシ葉ディスクより表皮をセロテープで剥ぎ取り、葉肉部を25°Cの0.8Mマニニットを含む50 mMのリン酸緩衝液(pH 7.0)に入れ、15分後に組織を3°Cのリン酸緩衝液に移し、15分間浸透圧ショックを与えた。この操作を数回くり返したディスクをAK-毒素液(10 µg/ml)に入れ、本章第5節の方法により、一定時間

毎に K^+ 漏出を調べた。

ii) 実験結果

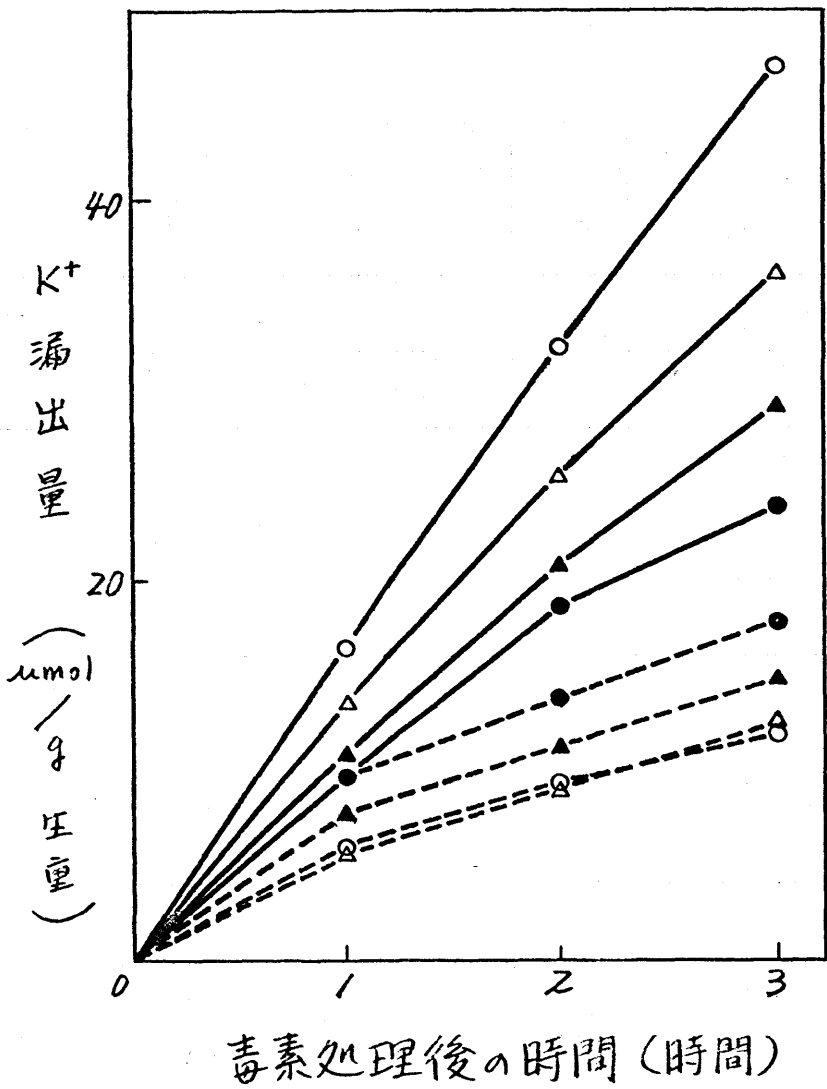
浸透圧ショックを与えた感受性ナシ組織では、AK-毒素による K^+ 多量漏出の抑制が観察され、ショック回数を増すごとにその抑制効果は著しく増大した(才36回)。一方、抵抗性品種ではAK-毒素作用に対する浸透圧ショック処理の効果は才々たく認められなかった。以上の結果からも、AK-毒素の特異性発現の決定因子は感受性品種側に存在すること、さらに、その因子は膜透過機能の失活と密接に関与することから示唆される。

3) 各種阻害剤処理によるAK-毒素作用の抑制

AK-毒素に対する宿主の特異的反応系をさらに検討するために、各種の酵素活性阻害剤や代謝阻害剤をナシ組織に処理し、AK-毒素作用に対する効果を調べた。

i) 実験材料および方法

ナシ葉ディスクを各濃度の阻害剤溶液中で



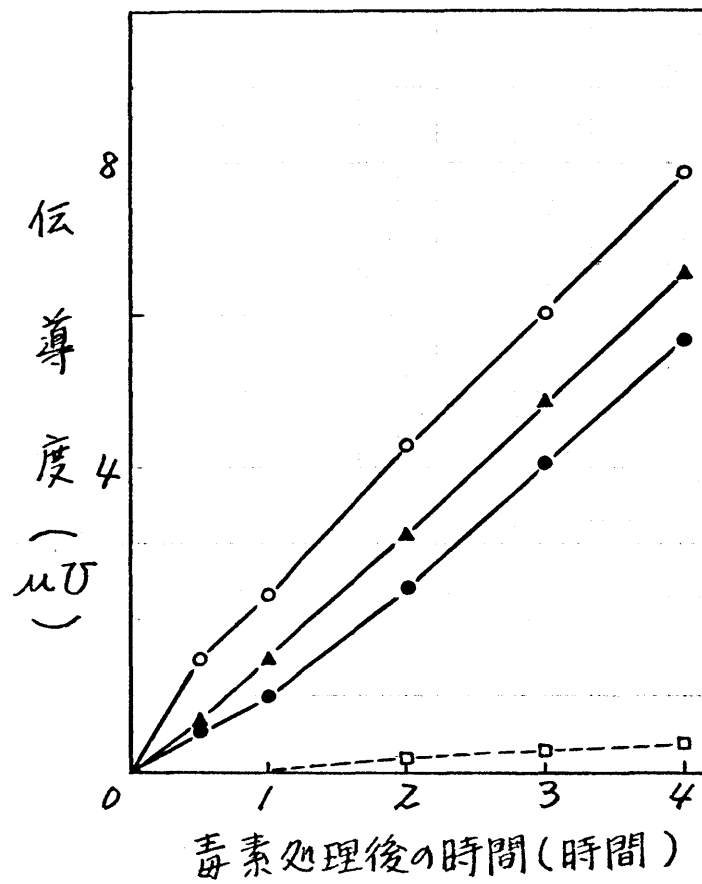
オ 36 回 AK-毒素による感受性トシ葉組織からの K⁺多量漏出に対する浸透圧ショックの効果

- : ショック(8回)+毒素 --○-- : ショック(8回)+水
- ▲— : ショック(4回)+毒素 --△-- : ショック(4回)+水
- △— : ショック(2回)+毒素 --○-- : ショック(2回)+水
- : 無処理+毒素 --○-- : 無処理+水

30分間減圧浸透処理後、同溶液中で往復振とう処理した。2時間後にホイスクをAK-毒素液(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)中に入れ15分間減圧浸透処理し、脱イオン水中に入れて電解質漏出量を測定した。また、酵素処理の実験には、ナシ花卉のプロトプラストを用いた。プロトプラストを0.8 M マンニットに溶解した各酵素液に懸垂し、25°Cで2時間往復振とう処理した。プロトプラストにAK-毒素(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を処理し、24時間後に正常プロトプラスト数を調べた。なお、プロトプラストの調整およびAK-毒素処理の方法は第4章第4節と同様である。

iii) 実験結果

S-S結合還元剤のジチオスレイトール(DTT)およびメルカプトエタノール(ME)は、それぞれ1~5 mMの濃度でAK-毒素による感受性品種からの初期の電解質多量漏出を抑制した(第37図)。AK-毒素処理2時間後には、DTT(1 mM)では約50%、ME(1 mM)では約30%の多量漏出の抑制効果を示したが、その



オ37回 AK-毒素による感受性タンパク組織からの
電解質多量漏出に対するDTTおよびMEの効果

- : DTT + 毒素
- ▲—: ME + 毒素
- : 毒素
- : DTT, ME, 水

後、これら阻害剤の効果は認められなかった。なお、DTTおよびMEはAK-毒素と自己体には何らの作用も示さなかった。また、抵抗性品種における効果も認められなかった。

DTTやMEの効果はS-S結合の還元によって生じるのかどうかをみるために、さらにアルキル化剤のN-エチルマレイミド(NEM)やSH結合酸化剤の5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)の処理を行って、AK-毒素作用の変化を調べた。DTT(1 mM)処理2時間後にNEM(1 mM)を2時間処理しても、DTTの抑制効果が認められたが、DTT処理後に2時間DTNB(1 mM)を処理すると、DTTの効果は完全に消失した(図38)。しかし、DTT処理後にNEMを処理しておくと、DTNB処理を行ってもDTTの効果は保持された(図38)。なお、NEMやDTNBではAK-毒素作用に対する抑制効果はほとんど認められなかった。これらの結果は、DTTやMEによる抑制現象は、S-S結合の還元作用によって発揮

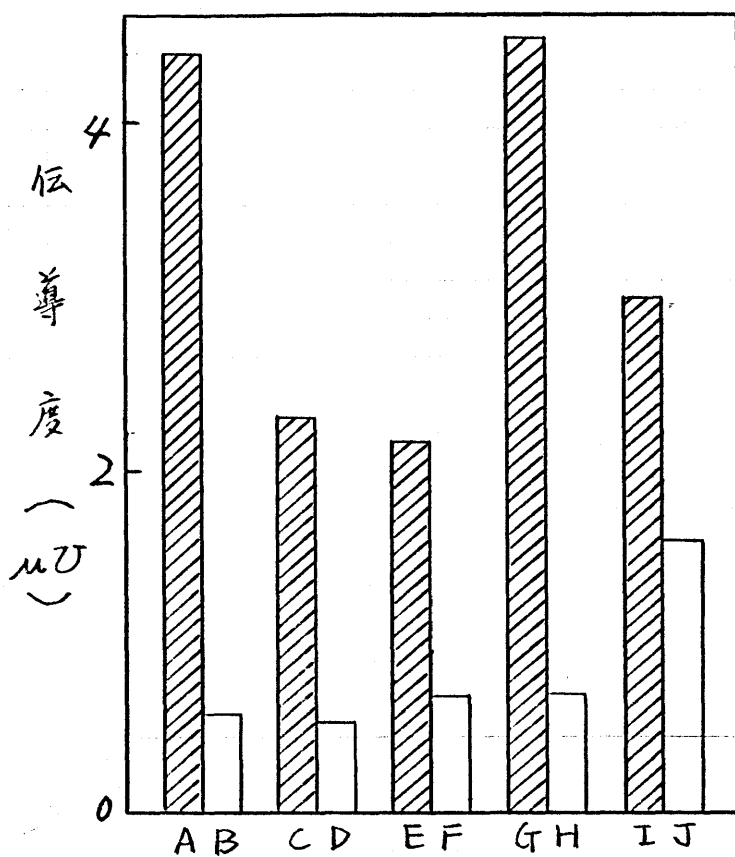


図38 DTTKによる電解質多量漏出の抑制作用に対するDTNBおよびNEMの効果

A = 毒素

B = 水

C = DTT+毒素

D = DTT

E = DTT+NEM+毒素

F = DTT+NEM

G = DTT+DTNB+毒素

H = DTT+DTNB

I = DTT+NEM+DTNB+毒素

J = DTT+NEM+DTNB

されることを示唆している。

実験には、上記阻害剤以外に、 p -クロル安息香酸オニ水銀およびヨード酢酸(SH基修飾剤)、セミカルバジド(CO基修飾剤)、 O -メチルイソ尿素(アミノ基修飾剤)、シクロヘキシミドおよびフラストサイジンS(膜日合成阻害剤)、DNP(脱炭役剤)、オリゴマイシン(エネルギー転移阻害剤)、テトラエチルアンモニウムおよびキニン塩酸塩(K^+ 受輸送阻害剤)、ウアバインおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(ATPase阻害剤)などの効果も調べたが、これらの阻害剤では、AK-毒素作用に対する効果は十分に認められなかった。

次に、AK-毒素作用に対する各種酵素処理の効果と感受性品種のプロトプラストを用いて検討した。第4章第4節の実験で、プロトプラストではAK-毒素反応性の遅延現象が認められるが、その反応性は一応保持しており、AK-毒素処理24時間後には、ほとんど正常プロ

ロトプラストの存在は観察されなく存すること
を示した。しかし、蛋白分解酵素のプロテア
ーゼヤトリフィンと処理したロトプラスト
では、24時間後でも正常プロトプラストの存
在が認められ、AK-毒素反応性の低下を示し
た(才16表)。

以上の結果から、感受性品種におけるAK-
毒素活性の発現機構には、何らかのS-S結合
と関連した蛋白の関与が示唆される。

4) 植物ホルモン処理によるAK-毒素作用 の変化

感受性ナシ葉におけるAK-毒素反応性は、
展葉直後には顕著に認められるが、そのエイ
ジとともに徐々に低下することが観察される⁵⁰⁾。
このような植物組織の成熟過程には、各種植
物ホルモンが密接に関与することが知られて
おり⁷⁷⁾、ナシ葉のAK-毒素反応性に対しても何
らかの影響を与えらるものと思われる。そこで、
ナシ葉組織に植物ホルモン処理を行ない、AK-
毒素反応性の変化を調べた。

表16 感受性ナシ花卉のフロトフラストの
AK-毒素による変化に対する酵素処理の効果

酵素 (0.5 mg/ml)	処理	正常フロトフラスト率 (%) ^{a)}	
β-グルコシダーゼ	AK-毒素	0.2 ^{b)}	0.4 ^{c)}
	水	46.4	100.0
トリプシン	AK-毒素	11.4	18.1
	水	62.9	100.0
プロテアーゼ	AK-毒素	28.6	40.2
	水	71.0	100.0
リパーゼ	AK-毒素	2.1	3.0
	水	70.0	100.0
水	AK-毒素	3.3	4.7
	水	69.7	100.0

a) AK-毒素処理24時間後に観察

b) $\frac{\text{正常フロトフラスト数}}{\text{全フロトフラスト数}} \times 100$

c) $\frac{\text{AK-毒素処理区}}{\text{水処理区}} \times 100$

i) 実験材料および方法

供試した植物ホルモンは、アブサイシン酸、インドール-3-酢酸、エチレン、2,4-ジクロルフェノキシ酢酸、ジベレリン A₃ および 6-ベンジルアデニンである。ナシ葉組織へのホルモン処理の方法は、エチレン以外は前項と同様である。エチレン処理は、ナシ組織を 28°C 下の密閉容器中に入れ、エチレンを注射器で注入することにより行う。AK-毒素 (10 μg/ml) の処理方法も前項と同様であるが、処理組織の AK-毒素反応性は、電解質漏出と壊死斑形成により検定した。

ii) 実験結果

各種植物ホルモンをナシ組織に 2 時間処理すると、アブサイシン酸 (ABA) およびインドール-3-酢酸 (IAA) では、感受性品種における AK-毒素反応性に変化を与えることが認められた (表 17)。ABA は 1 ~ 100 μg/ml の濃度で電解質多量漏出および壊死斑形成の抑制効果を示し、処理濃度の上昇とともにそ

表17 AK-毒素による感受性大豆葉の電解質多量
漏出および環死斑形成に対するABAおよびIAAの効果^{a)}

	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	伝導度 ^{b)} (μS)	環死斑面積 ^{c)} (mm^2)
ABA	0	100.0	100.0
	0.1	100.3	108.1
	1	96.1	79.2
	10	88.5	83.0
	50	80.4	67.4
	100	74.8	65.6
IAA	0	100.0	100.0
	0.01	109.2	98.8
	0.1	116.9	110.8
	1	128.0	124.7
	5	124.9	122.0
	10	117.4	112.4
	50	97.8	100.2

a) ABAおよびIAAを2時間処理後にAK-毒素処理

b) AK-毒素処理2時間後に測定し、植物ホルモン
無処理区の値を100として表わした。

c) AK-毒素処理24時間後に測定し、植物ホルモン
無処理区の値を100として表わした。

の効果も増大した。一方、IAAの場合には、 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の濃度でAK-毒素作用の促進効果が認められただ、それ以上の濃度では、まったく効果を示さなかった。なお、これらの植物ホルモンは、抵抗性品種のAK-毒素反応性に対しては何らの変化も与えなかった。

次に、ABAおよびIAAの各効果と処理時間との関係を調べると、ABAでは処理時間の増大とともにその効果も増大し、 $50 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ のABAを24時間処理すると、AK-毒素作用は約60%抑制された(表18および表19)。

一方、 $1 \mu\text{g/ml}$ のIAAは0.5~3時間の処理で20~30%の促進効果を示したが、4時間以上の処理ではその効果は消失した。

以上の結果から、ABAおよびIAAなどの植物ホルモンも、短時間の処理でAK-毒素反応性に変化を与えることが認められただ、これから植物ホルモンの作用については、今のところ明らかとはならず、詳しい。

表18 AK-毒素による感受性品種からの電解質
多量漏出に対するABAおよびIAA処理時間の効果

ABA (50 $\mu\text{g/ml}$)		IAA (1 $\mu\text{g/ml}$)	
前処理時間 (時間)	伝導度 ^{a)} (μS)	前処理時間 (時間)	伝導度 ^{a)} (μS)
0	97.6	0	92.0
0.5	89.5	0.5	131.9
1	85.8	1	132.6
2	84.4	2	128.0
3	88.6	3	120.3
4	74.1	4	116.6
24	44.3	24	97.1
無処理	100.0	無処理	100.0

a) AK-毒素処理2時間後に測定し、植物ホルモン
無処理区を100として表わした。

表1.9 表 AK-毒素による壞死斑形成に対する
ABA および IAA 24時間処理の効果

前処理	壞死斑面積 (mm^2) ^{a)}
ABA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	62.1
ABA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	45.6
IAA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	102.1
無処理	100.0

a) AK-毒素処理24時間後に測定し、植物ホルモンの無処理区の値を100として表出した。

5 AK-毒素の宿主特異性発現因子の検索
 宿主特異的毒素のその作用機構に関して、
 以前からHV-毒素では2つの仮説が提示され
 ている。一つはROMANKO⁷⁸⁾さらにWHEELER⁷⁹⁾の毒
 素不活化説で、抵抗性品種は毒素を不活化す
 る能力があり、感受性品種はこれを欠くとす
 るものである。もう一つはSCHEFFER および
 RRINGLE⁸⁰⁾による毒素受容体説で、感受性品種
 には毒素受容体が存在し、抵抗性品種ではこ
 れを欠くとする説である。その後、サトウキ
 ビ眼点病菌の宿主特異的毒素(HS-毒素また
 はhelminthosporoside)では、感受性サトウキ
 ビよりHS-毒素結合蛋白が単離されたという報
 告があり^{81,82)}、毒素受容体説が次第に支持されつ
 つある。

前節の結果から、AK-毒素の特異性発現に
 関与する因子は感受性品種側に存在するにと
 が示唆され、AK-毒素においても毒素受容体
 の存在が予想される。そこで、サシ組織にお
 けるAK-毒素結合物質の存在有無を調べた。

また、ナシ組織のAK-毒素不活性化能についてもあわせて検討した。

1) ナシ組織のAK-毒素不活性化能

i) 実験材料および方法

ナシ葉組織1gを乳鉢中で10mlの脱イオン水および石英砂とともに磨砕し、遠心分離(400g、15分)によって上清を得た。上清とAK-毒素液(10 μ g/ml)を等量混合し、一定時間28 $^{\circ}$ C下に静置後、混合液中のAK-毒素活性を最大希釈限界値(第3章第1節)によって調べた。

ii) 実験結果

感受性、抵抗性品種ともに、24時間後でも顕著なAK-毒素活性の低下は認められず、特異的なAK-毒素不活性化能の存在は観察されなかった(第20表)。

よって、ナシ葉組織1gにAK-毒素(10 μ g/ml)を滅菌浸透処理後、一定時間毎に上記と同様にナシ葉を磨砕し、遠心分離上清中のAK-毒素活性を調べたが、本実験からもナシ組織

表20 芥菜組織におけるAK-毒素不活化能

処理時間 ^{a)} (時間)	磨碎液		水
	感受性品種	抵抗性品種	
0	128 ^{b)}	128 ^{b)}	128 ^{b)}
8	64	128	128
24	64	64	64

a) 磨碎液+AK-毒素液を28℃下に静置後の時間

b) 処理液中のAK-毒素活性(最大希釈限界値)

における特異的アセチル化能は認められなかった。

2) ナシ組織におけるAK-毒素結合物質

i) 実験材料および方法

本実験は、HS-毒素の場合⁸⁾とほぼ同様の方法を行なった。ナシ葉組織1gをAK-毒素液(10 μg/ml)中で20分間減圧浸透処理後、28°C湿室下に置いた。2時間後ナシ葉を乳鉢に入れ5°C下で10 mlの50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.2)および石英砂とともに磨砕した。磨砕液を遠心分離(400 g、15分)後、上清をさらに遠心分離(5000 g、30分)し、上清をSephadex G-50のゲルろ過を行なった。3 mlずつ分画した。各分画液をHCl酸性下でEt₂O抽出後、Et₂Oを除去して1 mlの脱イオン水に溶解し、AK-毒素活性を壊死斑面積により検定した。

ii) 実験結果

結果は、感受性、抵抗性品種ともに高分子分画(チューブ番号5~7)にAK-毒素活性が認められ、AK-毒素結合物質の存在を示し

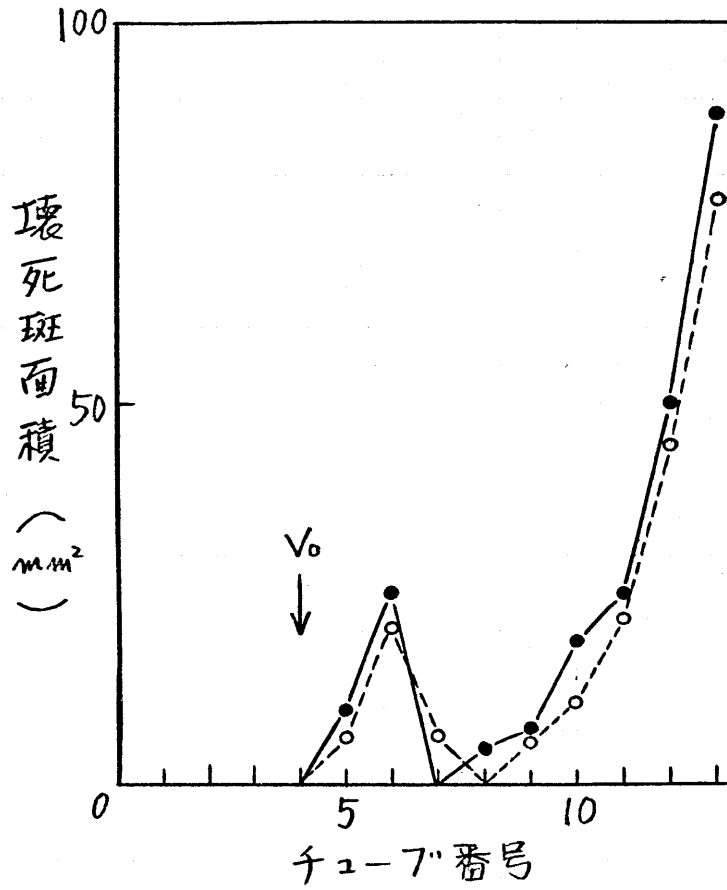


図39 葉組織の高分子分画におけるAK-毒素の結合

- : 感受性品種 + 毒素
- - : 抵抗性品種 + 毒素

たが、両ナシ品種間での差異は十分大きく認められただけでなく(才39図)。

本実験からは、AK-毒素に対する特異的結合物質の存在は認められただけで、非特異的結合物質の混入のため特異的結合物質が検出されただけのこととも考えられ、今後さらに検討が必要である。

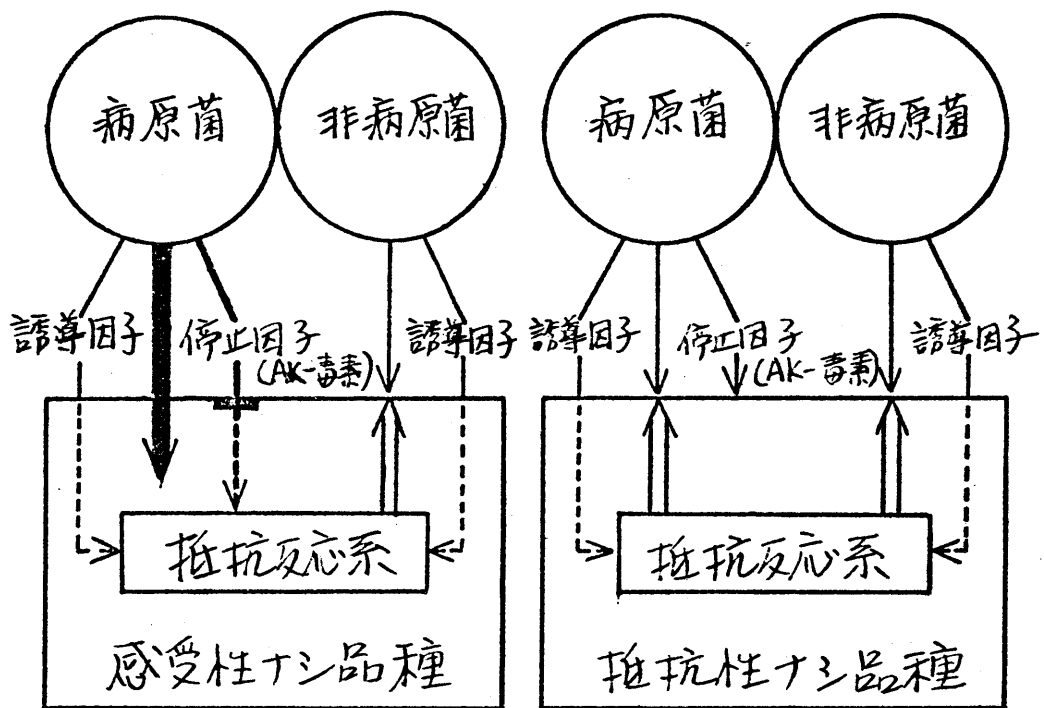
第6章 考察ならびに論議

ナシ黒斑病菌の分泌するAK-毒素は、病原菌の病原性発揮の決定因子であり、感染成立機構を物質レベルで研究する際に菌側の好適なモデルを提供する。したがって、本研究の目的は、ナシ黒斑病における宿主特異的発病機構の解明の一助として、AK-毒素に焦点をあて、本病の感染成立機構における役割ならびにその宿主特異的生理活性機構を明らかにすることである。

1 ナシ黒斑病の感染成立機構におけるAK-毒素の役割

第2章および第3章の実験結果から、ナシ黒斑病の感染成立機構におけるAK-毒素の役割を要約してみると以下のようであることのできる(第40回参照)。

1) 植物は、菌の侵入行動に対する何らかの抵抗反応機構を潜在的に具備している(第



才40図 ナシ黒斑病における感染成立機構

2章オ2節およびオ3節)。

2) 一方、菌側では、病原性の有無に関係なく、すべて胞子発芽時に抵抗反応の誘導因子を放出する(オ2章オ3節)。植物側は、この因子によって異物を認識し、抵抗反応系の始動を開始して抵抗反応を発現する。

3) 病原菌では、胞子発芽時に抵抗反応誘導因子とともにAK-毒素を分泌する(オ3章オ1節)。AK-毒素は感受性ナシ品種にのみ原形質膜の透過機能の変化を引き起し(オ3章オ2節)、それによって何らかの形で抵抗反応系の始動を停止する。抵抗反応系の停止した状態下で菌は組織内に侵入し、感染が成立する(オ3章オ3節およびオ4節)。一方、抵抗性ナシ品種は、AK-毒素に完全な感受性であるため(オ4章オ1節)、病原菌の抵抗反応誘導因子によって抵抗反応が始動し、感染は不成功に終る。

以上のように、ナシ黒斑病における感染成立の可否は、AK-毒素によって決定され、AK-

毒素の役割は、宿主の抵抗反応系の始動停止による菌受容への活性化であると思われる。

感染場面における宿主特異的毒素の役割に
関しては、これまであまり研究がなされてお
らず、わかかきエンバク victoria blight 菌の HV-
毒素^{55,56)} や トウモロコシ leaf spot 菌の HC-毒素⁵⁷⁾
において、感染成立の決定因子としての重要
性が指摘されているにすぎない。両毒素とも
に、感受性品種への感染誘導現象が観察され
ているが、HV-毒素⁵⁶⁾では、病原菌の宿主組織
内侵入に先立って膜透過機能の変化が誘起さ
れるのに対して、HC-毒素⁵⁷⁾では、菌の侵入時
に顕著な生理的变化を示さないことから、毒
素による宿主細胞のわかかき生理障害が菌の
侵入を許し、感染成立に導くものと推察して
いる。ナシ黒斑病では、胞子接種後 2 時間目
頃から電解質多量漏出現象が観察されたが、
その後感染成立まではこの漏出が一時停滞し
(オノ章オ二節)、感染成立に対する AK-毒
素の作用も、急激な宿主細胞の障害を必要と

しなことを考えられる。なお、宿主特異的毒素による菌侵入前の電解質多量漏出現象は、リング斑点落葉病菌のAM-毒素においても観察されている⁸³⁾。

植物側の抵抗反応の直接的因子に関しては、すでにファイトアレキシンの存在が知られており、感染の特異性発現に関与する宿主側の因子であると考えられている^{84~86)}。しかし、ナシ組織においては、ファイトアレキシン生成の検討を試みれば、その存在は認められず、ナシ組織の抵抗反応には、別の因子の存在する可能性も十分考えられる。

一方、菌側の成分が宿主に抵抗反応を誘導生成することは、主にファイトアレキシン誘導物質として多数報告されている^{87~89)}。第二章第3節の実験結果からは、供試したオベマの菌において、胞子発芽液中にナシ組織に抵抗反応を誘導する物質の存在が示唆された。これらの物質が、ファイトアレキシン誘導物質と同様のものか、今後検討が必要である。

さらに、菌側に拮抗反応誘導因子と、その始動の停止因子の両者が存在することは、最近、ジャカイモ疫病菌^{90,91)}やエンドウ褐紋病菌⁹²⁾においても報告されており、後者の停止因子が感染反応の特異性を決定する主要因子であると考えられている。ナシ黒斑病におけるAK-毒素もまたに拮抗反応の始動停止因子の1例であると思われ、植物疾病における特異性発現機構に関しては、基本的な共通性が期待される。

2 AK-毒素の生理活性とその作用機構

宿主特異的毒素の示す顕著な生理活性の機構に関しては、この分野で最優先されてきた問題で、これまでに多数の研究が行われてきている。そこで、第4章および第5章で得られた実験結果から、AK-毒素の生理活性ならびにその作用機構を、他の宿主特異的毒素と比較して以下に考察する。

AK-毒素に対するナシ品種の反応は、顕著

宿主特異性を發揮し、中間的反應性の品種の存在も認められず、抵抗性品種は完全な感受性であるものと思われる(オ4章オ1節およびオ2節)。宿主特異的毒素に対する宿主の二のような反應性は、HV-毒素^{9,93,94)}やモロコシmilco病菌のPC-毒素^{9,12)}でも観察され、これらはずべて感受性が優性の1対の対立遺伝子支配である^{1,8,9)}。

感受性品種におけるAK-毒素反應性には、環死斑形成、電解質多量漏出、原形質分離能の失活、原形質流動の停止、気孔開閉能の失活、さらに花粉発芽の抑制などの現象が認められ、しかも、すべての組織、器官で反應性を示した(オ4章オ3節)。また、PARK⁹⁵⁾は、AK-毒素処理後のナシ組織の電顕観察を行ない、AK-毒素による初期変性像として、感受性品種細胞の原形質膜の陥入やロマンム様構造の出現を観察している。したがって、以上の多くの宿主反應は、宿主原形質膜の透過機能に関連した現象であると思われる。

宿主特異的毒素による宿主組織からの急激な電解質漏出現象は、HV-毒素⁹⁶⁾で最初に観察され、その後、PC-毒素⁹⁷⁾、サトウキビ眼点病菌のHS-毒素⁹⁸⁾、AM-毒素⁹⁹⁾などでも報告されている。また、HV-毒素では、原形質分離能の失活⁶⁰⁾、原形質流動の停止⁶⁰⁾、気孔開閉能の失活⁶¹⁾なども観察されており、これらの毒素は、いずれもその作用が膜透過機能の変化にあると考えられている。一方、トウモロコシヨコエダ病菌のHM-T毒素では、気孔開閉能の失活⁶²⁾、花粉発芽の抑制⁹⁹⁾などが認められているが、顕著な電解質漏出は示さない^{100,101)}。HM-T毒素ではその作用点がまだ明確にはされていないが、ミトコンドリアの膨潤、酸化的りん酸化の阻害、内膜の崩壊などが観察されることより、恐らくミトコンドリアがその作用点であろうと推察されている^{100,102,103)}。また、HC-毒素では、電解質の急激な漏出は示さないが、溶質取り込みの増大^{104,105)}や宿主原形質膜電位の瞬時的変化¹⁰⁶⁾などが認められ、その作用は膜透過機能の

変化にあるが、HV-毒素のような急激な変化とは異なるものと考えられている。

一方、宿主特異的毒素に対する器官感受性の差異については、二例で詳しい観察例はほとんどなく、一般に植物組織では、すべての部位が反応性を示すものと考えられており、AK-毒素においても器官感受性の差異はみられなかった。しかし、AM-毒素では、顕著な器官特異性が見られ、花弁や果肉では反応性を示さないことから、AM-毒素は膜透過機能に変化を引き起すが、その特異性発現には葉緑体の関与が示唆される¹⁰⁷⁾。

AK-毒素に対する宿主の反応は、組織レベルでは顕著に認められるが、原形質分離下の遊離細胞やプロトプラストでは、宿主特異性は保持しているものの、反応性の遅延現象が観察される(オ4章オ4節)、AK-毒素の作用には宿主細胞壁と原形質膜とが関与している可能性を示した。宿主特異的毒素の作用における細胞壁の重要性は、オ2にHV-毒素で報

告され、HANCHEYら¹⁰⁸⁾は、電顕観察よりHV-毒素による細胞の初期変化は細胞壁の障害にあると指摘している。一方、プロトプラストの宿主特異的毒素に対する反応性に関しては、HV-毒素^{60,109)}やHM-毒素¹¹⁰⁾においても観察されており、HV-毒素では、処理後30分以内にプロトプラストの破裂現象を、また、HM-毒素では、18時間以後から徐々にプロトプラストの原形質が変化し始めることを認められている。このように両毒素に対する反応性の違いをEARLEら¹¹⁰⁾は、毒素の作用点の違いに求め、HV-毒素は原形質膜に、HM-毒素はミトコンドリアに作用する点であると推察している。AK-毒素では、組織レベルでのAK-毒素反応性からその作用は宿主原形質膜の透過機能の変化にあると思われるので、AK-毒素に対するプロトプラストの反応性の低下は、宿主細胞壁と関連した現象であることも考えられる。しかし、原形質分離による原形質膜の状態変化やその他の要因も十分考えられるので、今

後さらに検討が必要と思われる。

宿主のAK-毒素反応性の中で最も早く顕著に認められる現象は、電解質の多量漏出である(第5章第1節)。この多量漏出は生物学的な温度依存性を示さず(第5章第1節)、AK-毒素は、感受性品種の原形質膜の生物学的な透過調節機能を完全に消失させるものと思われる。一方、漏出物質の分析の結果は、電解質の主成分は K^+ であり、 K^+ 漏出はAK-毒素処理後最も速やかに増加するのに対して、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などの漏出は示さず認められず(第5章第2節)、AK-毒素による漏出物質には特異性がみられた。受動輸送におけるイオン選択的透過性を説明するものに、イオノフォアが存在が知られており、AK-毒素がイオノフォアとして作用する可能性も考えられる。しかし、AK-毒素によつて、無機りん酸などの初期漏出もみられること(第5章第2節)、さらに、植物細胞では、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などのカチオンは存在量が少く、しかも原

形質膜を透過しにくいことなどを考えると、AK-毒素による電解質漏出は、膜透過機能の失活にともなう非選択的漏出現象であると思われる。なお、PC-毒素⁹⁷⁾やHV-毒素¹⁰⁶⁾においても、両毒素は K^+ の急激な多量漏出を引き起すこと、 Na^+ の漏出には効果が無いことが観察されているが、他の細胞内成分の漏出も認められること^{95,111)}から、この多量漏出は非選択的透過機能障害によるものと推察されている。また、HV-毒素⁸⁰⁾やHS-毒素⁹⁸⁾では、その作用に温度依存性のみられないことも報告されている。さらに、AM-毒素においても K^+ 多量漏出が観察されるが、この場合には、他のカチオンの漏出も認められ、しかもこれらの漏出は時間の経過とともに徐々に増大する¹¹²⁾。恐らく、このような漏出は、原形質膜の破壊による現象であると思われる。

一方、AK-毒素による K^+ 多量漏出は、 $NaCl$ 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ などの添加によってさらに増大することから認められたが、その効果は、無機イ

オン添加時のみ観察されること、添加カチオンは K^+ との交換反応で組織内に取り込まれること、さらに、AK-毒素は、カチオン依存性の ATPase 活性には何らの作用も示さなかったことなどから(オと章オ3節)、この現象は、AK-毒素による膜透過機能の失活にとっても K^+ 漏出という一般的現象に、電氣的バランスを保つためのイオンの交換現象であると考えられる。宿主特異的毒素の作用に対するカチオンの効果は、HV-毒素や AM-毒素でも観察される¹¹³⁾が、HV-毒素では、 Mn^{2+} や Mg^{2+} の添加で電解質漏出の促進が、 Ca^{2+} の添加は抑制を、さらに Na^+ や K^+ では効果のないことが報告される¹¹³⁾。特に、 Ca^{2+} の重要性が指摘され、HV-毒素の作用は、宿主細胞の Ca^{2+} 欠乏障害であるという報告^{108, 113~115)} もあるが、HV-毒素の宿主特異性を説明するまでには至っていない。一方、AM-毒素では、 Ca^{2+} や Mg^{2+} の添加は電解質漏出を促進し、特に Ca^{2+} の効果が顕著であること、また、 Na^+ や K^+ の添加はその作用を抑制するこ

とが観察された¹¹²⁾。これら毒素作用に対するカチオン効果から、膜透過機能の失活機構には明らかに差異のあることが示唆される。

HV-毒素やPC-毒素では、その膜透過機能障害の機構を、宿主の各種阻害剤処理による変化から解析する試みが行われ、HV-毒素では、CO基修飾剤、SH基修飾剤、さらにシクロヘキシミド処理によってその作用が著しく抑制されることを認めている^{111,116)}。また、PC-毒素では、ホスホリパーゼDやシクロヘキシミド処理は著しい抑制効果を示すが、CO基およびSH基修飾剤の効果は認められないことを観察している⁹⁶⁾。このような阻害剤処理の効果から、両毒素に対する宿主特異性発現には、宿主が関与し、その宿主には、合成、分解系が存在するものと考えられている。一方、AK-毒素では、S-S結合還元剤や蛋白分解酵素処理でその作用が抑制されたが、CO基およびSH基修飾剤や蛋白合成阻害剤処理の効果は著しく認められなかった(第5章第4節)。また

に、植物ホルモン処理においてもAK-毒素作用の変化がみられ、ABA処理では抑制効果か、IAA処理では促進効果が観察された(オト章オ4節)。さらに、熱処理や浸透圧ショック処理によるAK-毒素作用の著しい抑制効果も観察された(オト章オ4節)、これからオトの人為処理による結果は、AK-毒素反応性に対して感受性品種のみでその変化が認められ、AK-毒素の特異性発現に関与する植物側の因子は、抵抗性品種ではなく感受性品種側に存在し、その因子は蛋白質である可能性を示唆する。なお、熱処理による宿主特異的毒素作用の抑制現象は、その後、AM-毒素¹⁷⁾、HS-毒素¹⁸⁾およびHV-毒素¹⁹⁾でも観察されたという。

宿主特異的毒素の特異性決定因子に関して、SCHEFFERおよびPRINGLE⁸⁰⁾は、毒素受容体説を提唱し、感受性品種には毒素と特異的に結合する受容体が存在し、その結合が毒素作用の出発点であると考へられたという。その後、STROBEL^{81,82)}は、感受性サトウキビよりHS-毒素結合蛋白質

を単離したと報告している。HS-毒素が膜と結合すると、ATPaseの活性化が生じ膜透過機能の変化を引き起こすこと¹¹⁹⁾、さらに、膜を抵抗性サトウキビ品種やタバコのプロトプラストに処理すると、これらはHS-毒素反応性を示すこと¹²⁰⁾などが報告されている。しかし、この結合膜に関しては、最近疑問視されてきた¹²¹⁾、その信憑性については明らかではない。AK-毒素においてもその作用に特異的膜の関与が示唆されたので、同様の検索を試みたが、特異的結合物質は見い出せなかった(第5章第5節)。さらに、HV-毒素においても、その存在を実証するまでには至っていない²¹⁾。

AK-毒素の作用は、HV-毒素やPC-毒素と多くの類似性を示したが、無機イオン添加の効果、さらに阻害剤処理の結果などからは、幾つかの相違点も認められる。AK-毒素では、その作用が宿主原形質膜にあり、その透過機能が完全に失活することは、ほぼ間違いない。

ものと思われれる。恐らく、感受性品種の原形質膜上の特定部位(蛋白)とAK-毒素との出合いが、宿主特異性発現の重要な出発点であると考えられる。その際、宿主細胞壁と原形質膜との係わり合いも興味を持つられる点である。しかし、その出合いがどのような機構で膜透過機能の失活を引き起すのか、さらに、それがどのような過程を経て宿主の免疫反応系の始動停止へと導くのか、今後解明しなければならぬ重要な課題である。

要 約

本論文は、ナシ黒斑病菌の分泌する宿主特異的毒素（AK-毒素）の感染成立における役割とその作用機構について論じたものである。以下にその概要を述べる。

(1) ナシ黒斑病菌のナシ葉における行動を観察すると、感受性品種では胞子接種後6～9時間目頃より表皮細胞への菌の侵入が認められ、その後葉肉組織へと菌は進展した。また、18時間目頃からは肉眼的小病斑が出現した。一方、抵抗性品種では表皮細胞への菌の侵入は少く、また組織内への進展も観察されず、菌侵入の抑制現象が認められた（第二章第1節）。

(2) ナシ葉に軽い温湯処理（50℃で10秒以上）を行なうと、黒斑病菌は病原性の有無に関係なく、また感受性、抵抗性品種はもとより非宿主にも侵入が誘発され、病斑を形成した（第二章第2節）。

(3) 感受性ナシ葉に予め非病原菌の胞子接

種や発芽液処理を行なうと、その後の黒斑病菌による感染行動は抑制された。また、黒斑病菌の発芽液でも同様の効果で認められた(オ2章オ3節)。

(4) 以上の観察結果から、菌側は病原性の有無に関係なく胞子発芽時に宿主の抵抗反応の誘導物質を分泌すること、一方、植物側では菌の抵抗反応誘導物質により、何らかの抵抗反応系が確立すること、さらに、黒斑病菌に対する抵抗反応は、感受性品種には発現しないことなどが示唆される。

(5) AK-毒素は黒斑病菌の休眠胞子中には検出されなかったが、胞子の発芽とともに徐々に生合成され放出された(オ3章オ1節)。

(6) 感受性トシ葉では、胞子接種後2時間目頃から発芽胞子のAK-毒素による電解質の多量漏出が観察された。多量漏出はその後一時停滞し、菌の侵入後に再び急激な増大を示した(オ3章オ2節)。

(7) 病原性失活菌にAK-毒素を加えて接種

すると、感受性ナシ組織への菌の感染が誘発された。逆に、黒斑病菌の胞子発芽時のAK-毒素分泌を阻害すると、宿主組織への感染頻度は著しく抑制された(オ3章オ3節)。

(8) 非病原菌の胞子発芽液を予め処理した感受性品種では、黒斑病菌の感染が抑制されたが、AK-毒素に対する反応性の低下は認められなかった(オ3章オ4節)。

(9) 以上の結果から、ナシ黒斑病における感染成立の可否は、発芽胞子の分泌するAK-毒素によつて決定され、AK-毒素は感受性品種のみにかかわる生理障害を引き起し、それが宿主の抵抗反応系の始動を停止し、病原菌受容への活性化に導くものと考えられる。

(10) AK-毒素は、感受性品種には $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度まで毒性を発揮したが、抵抗性品種や非宿主には $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ でもまったく活性を示さなかった。また、ナシ品種間におけるAK-毒素反応性は、黒斑病感受性と完全に一致した(オ4章オ1節およびオ2節)。

(11) 感受性トシ組織におけるAK-毒素反応性を調べると、壊死斑の形成、電解質多量漏出、原形質分離能の失活、原形質流動の停止、気孔開閉能の失活、さらに花粉発芽の抑制などが観察され、すべての組織、器官がAK-毒素反応性を示した(オ4章オ3節)。

(12) 原形質分離下の遊離細胞やプロトプラストでも、AK-毒素に対する特異性を保持していたが、その反応性は著しく遅延低下すること認められた(オ4章オ4節)。

(13) AK-毒素による電解質多量漏出は、宿主のAK-毒素反応性の中では最も早く顕著に認められ、その漏出量もAK-毒素処理後急激に増大した。また、電解質漏出に対するAK-毒素作用はまったく温度依存性を示さなかった(オ5章オ1節)。

(14) AK-毒素による多量漏出物質を分析すると、その主成分は K^+ で、 K^+ の漏出はAK-毒素処理後遅やかに、しかも直線的に増大した。また、無機リン酸やアミノ酸においてもAK-

毒素による初期漏出が観察された。なお、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などのカチオンの多量漏出は明らかに認められなかった(第5章第2節)。

(15) AK-毒素による K^+ 多量漏出は、 NaCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 を添加するとさらに著しく増大した。また、 K^+ 漏出の増大現象は、無機イオンの添加時のみ認められ、無機イオンを除去するとその効果は容易に消失した。さらに、無機イオン添加時にはカチオンの組織内取り込みも観察された。なお、AK-毒素は、宿主のカチオン依存性ATPase活性には明らかに効果を示さなかった(第5章第3節)。

(16) ナシ葉に軽い熱処理(例えば 55°C で2秒の温湯処理)を行なうと、感受性品種に対するAK-毒素作用は著しく抑制された。この熱処理の効果は一時的で、 28°C 下では12時間以内に元の感受性に復帰した。また、浸透圧ショックを与えた感受性ナシ葉でも、AK-毒素反応性の低下が認められた(第5章第4節)。

(17) 感受性品種では、S-S結合還元剤処理により、AK-毒素による電解質多量漏出はある程度遅延保護された。また、植物ホルモンのABA処理では抑制効果で、IAA処理では促進効果でそれぞれ認められた。一方、プロトプラストに炭日分解酵素処理を行なうと、感受性品種のプロトプラストのAK-毒素反応性は、さらに著しく低下した(オ5章オ4節)。

(18) ナシ組織では、AK-毒素の特異的不活性化能の存在は認められなかった。一方、ナシ組織におけるAK-毒素結合物質の検索を試みたが、特異的結合物質の存在は見い出せなかった(オ5章オ5節)。

(19) 以上の結果から、AK-毒素は感受性ナシ品種にのみ顕著な活性を發揮するが、宿主における特異性発現に関与する因子は、抵抗性品種側ではなく、感受性品種側に存在すること、この特異性発現には、宿主の何らかの炭日が関与すること、さらに、AK-毒素の作用点は宿主原形質膜にあり、その透過調節機

能を完全に失活させることなどが示唆される。

引用文献

(但し、◎印は著者関係の論文である)

- 1) 小崎 格 (1973). 園芸試験場報告 A12:17-27.
- 2) Tanaka, S (1933). Mem. College Agr. Kyoto Imp. Univ. 28:1-31.
- 3) 鳥飼博高 (1957). 日本梨黒斑病 (Alternaria kikuchiana TANAKA) の罹病様作に関する研究. 名古屋大学農学部園芸学教室. 名古屋. 117p.
- 4) 毛利亮太郎 (1962). 鳥取大学学芸学部研究報告 13:53-119.
- 5) Meehan, F. and Murphy, H.C. (1947). Science 106:270-271.
- 6) Luke, H.H. and Wheeler, H. (1955). Phytopathology 45:453-458.
- 7) Wheeler, H. and Luke, H.H. (1963). Ann. Rev. Microbiology 17:223-242.
- 8) Pringle, R.B. and Scheffer, R.P. (1964). Ann. Rev. Phytopathol. 2:133-156.
- 9) Scheffer, R.P. and Pringle, R.B. (1967). In The Dynamic Role of Molecular Constituents in Plant-

- Parasite Interaction (Mirocha, C.J. et al. eds.). Bruce Pub. Co., St. Paul, Minnesota. pp. 217-236.
- 10) Owens, L.D. (1969). *Science* 165: 18-25.
 - 11) 西村正暘 (1970). 感染の生化学-植物 (平井ら編). 農業技術協会. 東京. pp. 292-313.
 - 12) Scheffer, R.P. and Samaddar, K.R. (1970). *Recent Adv. Phytochem.* 3: 123-142.
 - 13) Luke, H.H. and Gracen, Jr., V.E. (1972). In *Microbial Toxins, Vol. VIII, Fungal Toxins* (Kadis, S. et al. eds.). Academic Press, New York. pp. 139-168.
 - 14) Pringle, R.S. (1972). In *Phytotoxins in Plant Disease* (Wood, R.K.S. et al. eds.). Academic Press, New York. pp. 139-155.
 - 15) Scheffer, R.P. and Yoder, O.C. (1972). In *Phytotoxins in Plant Disease* (Wood, R.K.S. et al. eds.). Academic Press, New York. pp. 251-272.
 - ◎ 16) Nishimura, S., Kohmoto, K. and Otani, H. (1974). *Rev. Pl. Protec. Res.* 7: 21-32.
 - 17) Strobel, G.A. (1974). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 541-566.
 - 18) 西村正暘 (1975). *化学と生物* 13: 304-308.

- 19) 西村正暘(1976). 第12回植物病理化学談話会予稿集: 66-74.
- ◎ 20) Nishimura, S., Kohmoto, K., Otani, H., Fukami, H. and Ueno, T. (1976). In Biochemistry and Cytology of Plant-Parasite Interaction (Tomiyama, K. et al. eds.). Kodansha Ltd, Tokyo. pp. 94-101.
- 21) Scheffer, R.P. (1976). In Biochemistry and Cytology of Plant-Parasite Interaction (Tomiyama, K. et al. eds.). Kodansha Ltd., Tokyo. pp. 112-113.
- 22) Scheffer, R.P. (1976). In Encyclopedia of Plant Pathology, Vol. IV, Physiological Plant Pathology (Heitefuss, R. et al. eds.). Spring-Verlag, Berlin. pp. 247-269.
- 23) Wheeler, H. (1976). In Specificity in Plant Disease (Wood, R.K.S. et al. eds.). Plenum Press, New York. pp. 217-235.
- 24) 西村正暘(1978). 植物病理化学最近の進歩(富山ら編). 植物病理化学最近の進歩刊行会. 名古屋. pp. 139-147.
- ◎ 25) Nishimura, S., Kohmoto, K. and Otani, H. (1979). In Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interactions (Daly, J.M. et al. eds.). Japan Sci. Soc. Press, Tokyo. pp. 133-146.

- 26) Leukel, R.W. (1948). *J. Agr. Res.* 77: 201-222.
- 27) Scheffer, R.P. and Pringle, R.B. (1961). *Nature* 191: 912-913.
- 28) Scheffer, R.P. and Ullstrup, A.J. (1965). *Phytopathology* 55: 1037-1038.
- 29) Pegg, K.G. (1966). *Qd. J. Agric. Anim. Sci.* 23: 15-28.
- 30) Whiteside, J.O. (1976). *Plant Dis. Rep.* 60: 326-329.
- 31) 沢村健三 (1976). *園芸試験場報告* C4: 43-59.
- 32) Smedegard-Petersen, V. and Nelson, R.R. (1969). *Can. J. Bot.* 47: 951-957.
- 33) Steiner, G.W. and Byther, R.S. (1971). *Phytopathology* 61: 691-695.
- 34) Comstock, J.C., Martinson, C.A. and Gengenbach, B.G. (1973). *Phytopathology* 63: 1357-1361.
- 35) Yoder, O.C. (1973). *Phytopathology* 63: 1361-1366.
- 36) Grogan, R.G., Kimble, K.A. and Misaghi, I. (1975). *Phytopathology* 65: 880-886.
- 37) Onesirosan, P., Mabuni, C.T., Durbin, R.D., Morin, R.B., Rich, D.H. and Army, D.C. (1975). *Physiol. Plant Path.* 5: 289-295.
- 38) 西村正暘, 甲元啓介, 菜田雅博, 渡辺康正 (1978). *日植病報* 44:

359 (講要).

- ◎ 39) Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1972). J. Fac. Agric. Tottori Univ. 7: 5-12.
- ◎ 40) 尾谷 浩 (1973). 第9回植物病理化学談話会予稿集: 73-82.
- ◎ 41) Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1973). J. Fac. Agric. Tottori Univ. 8: 14-20.
- ◎ 42) Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1974). Ann. Phytopath. Soc. Japan 40: 59-66.
- ◎ 43) Kasai, T., Otani, H., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1975). J. Fac. Agric. Tottori Univ. 10: 6-14.
- ◎ 44) Otani, H., Nishimura, S., Kohmoto, K., Yano, K. and Seno, T. (1975). Ann. Phytopath. Soc. Japan 41: 467-476.
- ◎ 45) Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1976). J. Fac. Agric. Tottori Univ. 11: 1-6.
- ◎ 46) Morikawa, M., Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1977). J. Fac. Agric. Tottori Univ. 12: 1-7.
- ◎ 47) Otani, H., Morikawa, M., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1977). Ann. Phytopath. Soc. Japan 43: 562-568.
- ◎ 48) Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1978). J. Fac. Agric. Tottori Univ. 13: 11-18.

- ◎ 49) 尾谷 浩 (1979). 第15回植物病理化学談話会予稿集: 105-112.
- ◎ 50) Nishimura, S., Sugihara, M., Kohmoto, K. and Otani, H. (1978).
J. Fac. Tottori Univ. 13: 1-10.
- 51) Salmon, E. S. (1904). Phil. Trans. Roy. Soc. London, B.
197: 107-122.
- 52) Yarwood, C. E. (1956). Phytopathology 46: 523-525.
- 53) Ikegami, H. (1968). Phytopathology 58: 773-775.
- 54) Ouchi, S., Oku, H., Nakabayashi, H. and Oka, H. (1976).
Ann. Phytopath. Soc. Japan 42: 131-137.
- 55) Nishimura, S. and Scheffer, R. P. (1965). Phytopathology
55: 629-634.
- 56) Yoder, O. C. and Scheffer, R. P. (1969). Phytopathology
59: 1954-1959.
- 57) Comstock, J. C. and Scheffer, R. P. (1973). Phytopathology
63: 24-29.
- ◎ 58) 西村正暘, 甲元啓介, 尾谷 浩, 大熊和彦 (1975). 日植病報 41:
262 (講要).
- 59) 広江勇, 西村正暘, 佐藤充治 (1958). 鳥取農学会報 11: 291-299.
- 60) Samaddar, K. R. and Scheffer, R. P. (1968). Plant Physiol.
43: 21-28.

- 61) Turner, N.C. (1972). *Am. J. Botany* 59: 133-136.
- 62) Arntzen, C.J., Haugh, M.F. and Bobick, S. (1973). *Plant Physiol.* 52: 569-574.
- 63) 金井 龍二 (1976). 蛋白質核酸酵素 (別冊2): 57-63.
- 64) 野田 晃弘 (1977). 鳥取大学農学部修士論文 56p.
- 65) 鳥嶋博高, 大川勝徳, 佐々武史, 山田哲也, 大川博徳, 田中博, 青木博夫 (1969). *日植病報* 35: 62-66.
- 66) Kinoshita, T., Renbutsu, Y., Khan, I. D., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1972). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 38: 397-404.
- 67) 村岡尚, 木下忠孝, 西村正暘, 甲元啓介 (1971). *日植病報* 37: 388 (講要).
- ◎ 68) 石井英夫, 多賀浄, 尾谷浩, 甲元啓介, 西村正暘 (1973). *日植病報* 39: 213 (講要).
- 69) Allen, R.J.L. (1940). *Biochem. J.* 34: 858-865.
- 70) 中村道徳 (1950). *日農化誌* 24: 1-4.
- 71) Ashwell, G. (1957). In *Methods in Enzymology*, Vol. III (Colowick, S.P. et al. eds.). Academic Press, New York. pp. 85-86.
- 72) Yemm, E.W. and Cocking, E.C. (1955). *The Analyst*

80: 209 - 213.

- 73) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.
- 74) Leonard, R.T. and Hodges, T.K. (1973). Plant Physiol. 52: 6 - 12.
- 75) Heppel, L.A. (1967). Science 156: 1451 - 1455.
- 76) Amar, L. and Reinhold, L. (1973). Plant Physiol. 51: 620 - 625.
- 77) Van Steveninck, R.F.M. (1975). Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 237 - 258.
- 78) Romanko, R.R. (1959). Phytopathology 49: 32 - 36.
- 79) Wheeler, H. (1969). Phytopathology 59: 1093 - 1097.
- 80) Scheffer, R.P. and Pringle, R.B. (1964). Phytopathology 54: 832 - 835.
- 81) Strobel, G.A. (1973). J. Biol. Chem. 248: 1321 - 1328.
- 82) Strobel, G.A. (1973). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 1413 - 1417.
- 83) Kohmoto, K., Khan, I.D., Renbutsu, Y., Taniguchi, T. and Nishimura, S. (1976). Physiol. Plant Pathol. 8: 141 - 153.

- 84) Müller, K. O. and Börger, H. (1940). Arb. Biol. Reichsanstalt Landw. Fortw. Berlin 23:189-231.
- 85) Cruickshank, I. A. M. (1963). Ann. Rev. Phytopathol. 1: 351-374.
- 86) Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1979). In Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interactions (Daly, J. M. et al. eds.). Japan Sci. Soc. Press, Tokyo. pp. 317-333.
- 87) Cruickshank, I. A. M. and Perrin, D. R. (1968). Life Sci. 7: 449-458.
- 88) Keen, N. T. (1975). Science 187: 74-75.
- 89) Paxton, J. D. (1979). In Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interactions (Daly, J. M. et al. eds.). Japan Sci. Soc. Press, Tokyo. pp. 153-163.
- 90) Doke, N. (1975). Physiol. Plant Pathol. 7: 1-7.
- 91) 道家紀志 (1978). 植物病理化学最近の進歩 (富山ら編). 植物病理化学最近の進歩刊行会. 名古屋. pp. 75-84.
- 92) Shiraishi, T., Oku, H., Yamashita, M. and Ouchi, S. (1978). Ann. Phytopath. Soc. Japan 44: 659-665.
- 93) Scheffer, R. P. and Pringle, R. B. (1963). Phytopathology

53: 465-468.

- 94) Kuo, M. S., Yoder, O. C. and Scheffer, R. P. (1970).
Phytopathology 60: 365-368.
- 95) Park, P., Fukutomi, M., Akai, S. and Nishimura, S.
(1976). Physiol. Plant Pathol. 9: 167-174.
- 96) Wheeler, H. and Black, H. S. (1963). Am. J. Botany 50:
686-693.
- 97) Gardner, J. M., Mansour, I. S. and Scheffer, R. P.
(1972). Physiol. Plant Pathol. 2: 197-206.
- 98) Byther, R. S. and Steiner, G. W. (1975). Plant Physiol.
56: 415-419.
- 99) Laughnan, J. R. and Gabay, S. J. (1973). Crop Sci. 13:
681-684.
- 100) Arntzen, C. J., Koeppe, D. E., Miller, R. J. and Peverly,
J. H. (1973). Physiol. Plant Pathol. 3: 79-89.
- 101) Keck, R. W. and Hodges, T. K. (1973). Phytopathology
63: 226-230.
- 102) Miller, R. J. and Koeppe, D. E. (1971). Science 173:
67-69.
- 103) Gengenback, B. G., Miller, R. J., Koeppe, D. E. and

- Arntzen, C.J. (1973). *Canad. J. Botany* 51: 2119 - 2125.
- 104) Yoder, O.C. and Scheffer, R.P. (1973). *Plant Physiol.* 52: 513 - 517.
- 105) Yoder, O.C. and Scheffer, R.P. (1973). *Plant Physiol.* 52: 518 - 523.
- 106) Gardner, J.M., Scheffer, R.P. and Higinbotham, N. (1974). *Plant Physiol.* 54: 246 - 249.
- 107) 尾谷浩, 西村正暘, 甲元啓介, 前野真一郎 (1979). *日植病報* 45: 108 (講要).
- 108) Hanchey, P., Wheeler, H. and Luke, H.H. (1968). *Am. J. Botany* 55: 53 - 61.
- 109) Rancillac, M., Kaur-Sawhney, R., Staskawicz, B. and Galston, A.W. (1976). *Plant Cell Physiol.* 17: 987 - 995.
- 110) Earle, E.D., Gracen, V.E., Yoder, O.C. and Gemmill, K.R. (1978). *Plant Physiol.* 61: 420 - 424.
- 111) Samaddar, K.R. and Scheffer, R.P. (1971). *Physiol. Plant Pathol.* 1: 319 - 328.
- ◎ 112) 尾谷浩, 小林裕和, 西村正暘, 甲元啓介 (1977). *日植病報*

43: 331 (講要).

- 113) Doupnik, B. (1968). *Phytopathology* 58: 215-218.
- 114) Luke, H.H. and Barnett, R.D. (1974). *Plant Dis. Rep.* 58: 3-6.
- 115) Saftner, R.A., Evans, M.L. and Hollander, P.B. (1976). *Physiol. Plant Pathol.* 8: 21-34.
- 116) Gardner, J.M. and Scheffer, R.P. (1973). *Physiol. Plant Pathol.* 3: 147-157.
- 117) Khan, I.R., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1975). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 41: 408-411.
- 118) Bronson, C.R. and Scheffer, R.P. (1977). *Phytopathology* 67: 1232-1238.
- 119) Strobel, G.A. (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 4232-4236.
- 120) Strobel, G.A. and Hapner, K.D. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 1151-1156.
- 121) Daly, J.M. (1976). In *Specificity in Plant Disease* (Wood, R.K.S. et al. eds.). Plenum Press, New York, pp. 230-235.

報 文 目 録

1. Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1972). Nature of specific susceptibility to Alternaria kikuchiana in Nijisseiki cultivar among Japanese pears (I). J. Fac. Agric. Tottori Univ. 7: 5-12.
2. Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1973). Nature of specific susceptibility to Alternaria kikuchiana in Nijisseiki cultivar among Japanese pears (II). Effect of host-specific toxin on permeability of pear leaves (Supplementary report). J. Fac. Agric. Tottori Univ. 8: 14-20.
3. 尾谷 浩(1973). ナシ黒斑病菌の毒素とその作用点. 日本植物病理学会, 植物病理化学談話会. 「感染と宿主の反応—その解明へのアプローチ—」 pp. 73-82.
4. Otani, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1974). Nature of specific susceptibility to Alternaria kikuchiana in Nijisseiki cultivar among Japanese pears (III). Chemical and thermal protection against effect of host-specific toxin. Ann. Phytopath. Soc. Japan 40: 59-66.
5. Nishimura, S., Kohmoto, K. and Otani, H. (1974). Host-specific toxins as an initiation factor for pathogenicity in Alternaria kikuchiana and A. mali. Rev. Plant Protec. Res. 7: 21-32.