

報告番号

2
第1831号

主論文の要旨

題名

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

氏名 尾谷 浩

主論文の要旨

報告番号

※²第1831号

氏名

尾谷 浩

ナシ黒斑病は、二十世紀ナシなどの特定の品種のみで激しく発病し、他の品種にはまったく発生しないという宿主特異性の顕著な病害である。本病の特異性発現に関与する菌側の因子として、以前から宿主特異的毒素の存在が知られており、このような毒素は、複雑な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。そこで、ナシ黒斑病における宿主特異性発現機構の解明にあたり、ナシ黒斑病菌 (*Alternaria kikuchiana* TANAKA) の分泌する宿主特異的毒素 (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の検討を行なった。

I 菌の侵入行動と宿主の抵抗反応

黒斑病菌の分生胞子をナシ葉に接種すると、胞子は1時間後には発芽を開始し、4時間目頃より付着器の形成が活発となった。しかし、ここまでの菌の行動には感受性、抵抗性両ナシ品種間での差異はまったく認められなかった。

た。感受性品種では、接種後6~9時間目頃から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。また、18時間目頃からは肉眼的な小病斑が出現した。一方、抵抗性品種では、表皮細胞への菌の侵入は少く、たとえ侵入してもその後の菌の進展は観察できず、菌侵入に対する抑制現象が認められた。

次に、ナシ葉に軽い熱処理(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著しく侵入が増大し、感染が誘発された。また、ナシ葉に予め非病原菌の胞子接種や胞子発芽液処理を行ない、黒斑病菌の胞子を接種すると、感受性品種では黒斑病菌の感染行動は著しく抑制された。なお、黒斑病菌のAK-毒素を除いた胞子発芽液処理でも同様の効果が認められた。

以上の観察結果から、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こと、一方、菌側は病原性には関係なく胞子発芽時に抵抗反応誘導物質を分泌し、この物質により植物側に抵抗反応が発現

すること、さらに、黒斑病菌に対する拮抗反応は、感受性品種には発現しないことなどが示唆される。

Ⅱ 感染成立におけるAK-毒素の役割

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。胞子接種後3時間目には発芽胞子1個からすでに 10^{-6} μg のAK-毒素が分泌され、これは、約100個の宿主細胞に障害を引き起す毒素量に相当する。感受性品種のナシ葉では、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現象が観察された。多量漏出はその後一時停滞し、菌の宿主内侵入後に再び急激な増大を示した。

次に、病原性失活菌の胞子にAK-毒素を加えて接種すると、胞子は黒斑病菌と同様な行動を示し、感受性品種への感染が著しく誘発された。一方、黒斑病菌の胞子発芽時のAK-毒素分泌のみを阻害すると、菌の宿主組織への感染頻度は逆に著しく抑制された。なお、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、二

のよう組織におけるAK-毒素活性の変化はまったく認められなかった。

以上の結果から、黒斑病菌は孢子発芽時にAK-毒素と拮抗反応誘導物質を分泌するが、感受性品種では拮抗反応の発現前に孢子発芽直後のAK-毒素によって宿主細胞に生理障害が誘起され、それが宿主の拮抗反応系の始動を停止し、黒斑病菌受容へと導くものと考えられる。一方、拮抗性品種や非宿主はAK-毒素に不感受性であるために、菌の拮抗反応誘導物質による拮抗反応を発現し、感染は不成功に終るものと推察される。

Ⅲ AK-毒素の生理活性とその作用機構

AK-毒素は感受性品種のナシ葉には0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度まで毒性を発揮したが、拮抗性品種や非宿主には1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度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、黒斑病菌に対する感受性と完全に一致した。

感受性ナシ組織におけるAK-毒素の作用を各種生理学的反応性から調べると、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、花粉発芽の抑制などが観察され、しかもすべての組織、器官がAK-毒素反応性を示した。なお、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、その反応性は組織レベルに比べて遅延低下していることが認められた。

AK-毒素に対する宿主の生理学的諸反応の中で最も早く顕著に観察される現象は、宿主組織からの電解質多量漏出で、AK-毒素を処理した感受性品種では、処理後直ちに急激な電解質の漏出が認められた。また、電解質漏出に対するAK-毒素の作用は、おおよそ温度依存性を示さなかった。なお、AK-毒素以外の黒斑病菌代謝毒物質の中には、急激な電解質漏出を引き起すものや宿主特異性を示すものはおおよそ認められなかった。

AK-毒素による宿主組織からの漏出物質を分析すると、その主成分は K^+ で、 K^+ の漏出は組織をAK-毒素液に浸漬後直ちに急激な増大を示した。また、AK-毒素による無機リン酸やアミノ酸、さらに予め組織内に取り込ませた ^{14}C -ラベル物質などの初期漏出も観察され、毒素処理2時間後からは

還元糖や蛋白などの漏出もみられたが、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などのカチオンの漏出は認められなかった。

一方、AK-毒素による K^+ 多量漏出は、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などのカチオンの添加によってさらに著しく増大した。しかし、 K^+ 漏出の増大現象は、これらカチオンの添加時にのみ認められ、カチオンを除去するとその効果は容易に消失した。さらに、カチオンの添加時には K^+ 漏出との交換反応で添加カチオンの組織内への取り込みが観察された。なお、AK-毒素は宿主のカチオン依存性ATPase活性には何らの効果も示さなかった。

次に、感受性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、電解質多量漏出や壊死斑形成などのAK-毒素作用は著しく抑制された。熱処理の効果は一時的で、熱処理組織は 28°C では12時間以内に元の感受性に回復した。また、AK-毒素処理後に熱処理を行なうと、毒素処理1時間後では熱処理の効果はまったく認められなくなった。なお、浸透圧ショックを与えた感受性ナシ葉でも、電解質漏出に対するAK-毒素作用の著しい低下が観察された。さらに、ナシ組織に各種阻害剤や薬品

処理を行って AK-毒素反応性の変化を調べると、感受性品種では、S-S結合還元剤のジチオスレイトールやメルカプトエタノール処理によって 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、植物ホルモンのアブサイシン酸処理では抑制効果で、インドール-3-酢酸では促進効果がそれぞれ認められた。一方、プロトプラストにプロテアーゼやトリプシンなどの蛋白分解酵素処理を行おうと、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。なお、以上のすべての人為処理による AK-毒素反応性の変化は感受性品種にのみ観察され、抵抗性品種ではどのような処理を行ってもすべて AK-毒素不感受性を示した。

各種人為処理の結果から、感受性品種には何らかの AK-毒素の特異性発現因子の存在が示唆されたので、チン組織における AK-毒素結合物質の存在有無によるその検索を試みた。チン組織より得た高分子分画には AK-毒素との結合が観察されたが、感受性、抵抗性両品種間での差異はまったく認められなかった。

なお、抵抗性品種のナシ組織には AK-毒素を特異的に不活性化するような機構は存在しなかった。

以上の諸結果から、AK-毒素は感受性ナシ品種にのみ顕著な活性を発揮するが、このような宿主特異性発現に関与する植物側の因子は、抵抗性品種側ではなく、感受性品種の側に存在することはすなわち間違いないものと思われる。さらに、この特異性発現には宿主の何らかの蛋白質が関与する可能性が示唆され、恐らく、AK-毒素と宿主原形質膜上の特定部位(蛋白質)との結合が特異性発現の重要な出発点であり、それが膜透過調節機能の失活現象へと導くものと思われる。しかし、たとえ AK-毒素の作用点が判明したとしても、それがどのような機構で宿主の抵抗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ない重要な課題である。