

ジャガイモの疫病抵抗性に
おける過敏反応の始動機
構に関する研究

古市 尚高

ジャガイモの疫病抵抗性に
おける過敏反応の始動機
構に関する研究

名古屋大学図書
和 869766

古市 尚高

1982

報告番号	甲 第 1477 号
------	------------

目 次

第 I 章 緒 言 ----- 1

第 II 章 感染をたけ切断傷害による
宿主組織の過敏反応性の
誘導

1. 序 論 ----- 6

2. 材料と方法 ----- 7

(1) 供試植物 ----- 7

(2) ジャガイモ疫病菌の保存培養 --- 8

(3) 接種源の調製と接種 ----- 12

(4) グラストサイジンズの植物体
への処理 ----- 13

(5) 過敏細胞死の顕微鏡観察 --- 14

(6) ジャガイモ疫病菌の宿主細胞
への貫入と細胞内菌糸長の測
定 ----- 15

(7) グラストサイジンズ処理によ

る蛋白質合成の阻害	-----	16
3. 実験結果	-----	19
(1). 切断による塊茎細胞の過敏感 反応性の獲得	-----	19
(2). 塊茎切断面細胞の過敏感反応 性におよぼすガラスサイズ の影響	-----	23
(3). 過敏感反応性におよぼす切断 傷害の影響	-----	26
(4). 葉柄表皮組織におけるガラス サイズによる過敏感細 胞死の抑制	-----	30
(5). ガラスサイズの影響が イモ疫病菌に対する影響	-----	36
(6). 宿主組織の蛋白質合成に対す るガラスサイズの影響	---	45
4. 考察	-----	47

第Ⅲ章 ジャガイモ疫病菌表面と結合
する宿主蛋白質性成分の探索

1. 序 論 ----- 54

2. 材 料 と 方 法 ----- 57

(1). ジャガイモ疫病菌菌体をリガ
ンドとしたアフィニティー
クロマトグラフィ ----- 57

(2). ジャガイモ・レクチンの抽出 ----- 61

(3). SDS - ポリアクリルアミドゲ
ル電気泳動 ----- 63

(4). 赤血球凝集活性の測定 ----- 65

(5). 抗レクチン - 抗血清の作製と
免疫学的手法 ----- 66

3. 実 験 結 果 ----- 70

(1). ジャガイモ疫病菌菌体を特異
的リガンドとしたアフィニ
ティークロマトグラフィ ----- 70

(2). ジャガイモ・レクチンの抽出
と純化 ----- 77

(3). ジャガイモ・レクチンおよび
疫病菌菌体結合性蛋白質の免
疫学的検討 ----- 89

4. 考 察 ----- 107

第 IV 章 宿主 - 病原菌の相互作用に
おけるレクチンの役割

1. 序 論 ----- 111

2. 材 料 と 方 法 ----- 114

(1). ジャガイモ疫病菌発芽被のう
胞子の調製 ----- 114

(2). レクチンによる発芽被のう胞
子の凝集 ----- 115

(3). ジャガイモ疫病菌菌体壁成分
の抽出 ----- 116

(4). FITC-レクチンと発芽胞子お
よび菌体壁成分の相互作用 ----- 120

(5). 供試植物 ----- 122

(6). ジャガイモプロトプラストの
調製 ----- 123

(7). ジャガイモプロトプラストの
反応と顕微鏡観察 ----- 124

(8)	ジャガイモプロトプラストへの各種糖類の処理	125
(9)	ウサギ赤血球の分離と固定	126
(10)	ジャガイモ細胞膜分画の抽出	128
(11)	ジャガイモ細胞膜分画と発芽被のう胞子の混合	130
(12)	電子顕微鏡用試料と切片	130
3	実験結果	131
(1)	レクチンによる発芽被のう胞子の凝集	131
(2)	蛍光化レクチンと疫病菌の相互作用	138
(3)	蛍光化レクチンと菌体壁成分の相互作用	143
(4)	ジャガイモ塊茎組織の過敏反応性とジャガイモプロトプラストの菌体壁成分に対する反応	143
(5)	ハプロテンによる菌体壁成分に対するプロトプラストの反応	

の 阻 止 ----- 147

(6) . ジャガイモプロトプラスト表

面へのウサギ赤血球の結合 --- 151

(7) . ジャガイモ・レクチンによる

ジャガイモ細胞膜分画と発芽

胞子表面との結合 ----- 151

4 . 考 察 ----- 163

第 五 章 ま と め ----- 168

引 用 文 献 ----- 176

報 文 目 録 . 報 文 .

第 I 章

緒 言

植物感染生理学の分野では、植物病原菌の病原性の発現機構^{2, 3, 6, 8, 42-44, 105, 106, 121, 122, 133-135)}と、植物の病害抵抗性の発現機構^{1, 9, 37, 49, 50-53, 65, 73, 83-86, 127, 136-139, 147-159)}が最も重要な課題であることは論をまたない。これらの問題に対して、これまで多くの研究がなされてきている。

植物病原菌の病原性の発現機構については、十数種の糸状菌より、宿主細胞の抵抗性反応を抑制し、その病原菌の感染を促進する物質が見い出されている。その物質は、宿主となる高等植物のみにも有効に働くことから、宿主特異的毒素と呼ばれている。

高等植物の病害抵抗性の発現機構について

は、名古屋大学植物病理学教室において、畠山らによる、ジャガイモとジャガイモ疫病菌の系を用いた、宿主過敏反応の発現機構に関する研究の成果をあげることもできる。

高等植物は、侵入する病原菌に対し壊死反応により応答し、病原菌の侵入を阻止する。この現象を過敏反応と呼ぶ。この反応は、病原菌と植物の関係が、非親和性の組合せにおいて、普遍的に観察される。したがって、過敏反応は、異物排除機構を担う抵抗性現象として、高等植物に特徴的な細胞反応と考えることができる。

過敏反応が起こるための、最初の「異物識別」の機構についての理解は、今日まできわめて不明である。この「識別機構」を明らかにするためには、感染初期の侵入菌と宿主細胞との接触段階の様相を明らかにしなければならない。

これまでの一連の研究結果⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁹⁾から、宿主と病原菌が感染のごく初期において接触する、そ

の時点で、感染が成立するか否かという、特異性が決定されるものと考えられた。そして、その接触の段階において、すでに宿主の過敏感細胞死の引き金となる現象が存在し、一連のその後の過敏感反応の結果へと導き、抵抗性が成立することか示唆されて来た。

本研究は、上記のジャガイモとジャガイモ疫病菌の系を用い、過敏感反応への引き金となる、疫病菌と宿主細胞の相互識別機構を物質的に明らかにすることを、第一の目的として行なった。この研究過程において、宿主-病原菌の非親和性、あるいは、親和性関係が物質的にどのように制御されているのかという問題に対しても、新たな知見が期待され、また、新たな防除技術の確立のための、基礎的知見を集積するということが、応用面における発展として考えられる。

これまでに、宿主植物の過敏感反応を誘導する病原菌成分の存在も報告されている^{17, 25, 27, 28, 68, 71, 86, 91, 92, 101, 126, 136)}。また動物細胞におい

ても、物質間の接触、あるいは、相互作用が細胞内への情報の伝達を司り、発現現象および、組織分化の誘導において重要な役割をはたしていることが示されている^{67, 115-120, 173}。

筆者は、病原菌-宿主植物間の相互作用を、広く細胞-細胞の情報伝達として捉え、宿主過敏細胞死を指標現象とし、生理、生化学的研究を進めて来た。

本研究は、筆者が、名古屋大学大学院農学研究科博士課程において、昭和52年4月より昭和57年3月までの間、名古屋大学農学部植物病理学教室前教授畠山宏平博士の指導のもとに行なったものである。

研究指導はもとより、本論文の作製に当り、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。名古屋大学農学部植物病理学教室前教授畠山宏平博士、ならびに同教室道家紀志博士に衷心より感謝の意を表

す。また、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った名古屋大学農学部植物病理学教室教授西村正暘博士はじめ当教室の教官諸氏、ならびに同大学農学部生物化学教室教授仙谷郁三博士に厚くお礼申し上げます。

また、実験に際しご協力を賜わった山形大学理学部発生理学教室及川胤昭博士、ならびに当教室の諸氏に厚くお礼申し上げます。さらに、実験材料を提供していただいた、農林水産省北海道農業試験場作物第一部畑作第二研究室西部幸男氏および研究室員の諸氏に深く感謝の意を表す。フラストサイジンSを提供いただいた、科研化学工業株式会社高木伸夫博士に厚くお礼申しあげます。

第 II 章

感染または切断傷害による宿主 組織の過敏感反応性の誘導

1. 序論

ジャガイモの塊茎あるいは葉柄の切断直後の柔組織は、非親和性疫病菌の感染に対し、直ちに過敏感反応を示さず(109, 110, 153, 158, 159)。しかし、切断後5時間以上経過すると速やかに、過敏感反応を起すことが知られて(109, 110, 153, 159)。この現象は、ジャガイモの切断組織の加齢(aging)過程における代謝変動が、過敏感反応性に影響を及ぼしていることを示唆している。

一方、葉柄表皮組織では、非親和性疫病菌が感染した場合に、速やかに過敏感反応を起すことが知られている。一見、高度の過敏感

反応性を有してゐるかに見える。無傷の表皮組織には、本来反応性が備わつてゐるのであろうか。

本章では、上記の塊茎切断後の過敏反応性の獲得過程を、更に詳細に検討した。また無傷の葉柄組織における過敏反応性の有無についても検討を行なつた。

その結果、無傷の表皮組織では、本来過敏反応性は有しておらず、疫病菌の感染によつて初めて、誘導されるものであることが明らかになった。

2. 材料と方法

(1). 供試植物

ジャガイモ疫病に對する抵抗力遺伝子 R_2 をもつ、強度抵抗力品種リシリ (*Solanum tuberosum* X *Solanum demissum*) の塊茎切断組織と葉柄表

皮組織を用いた。塊茎は、収穫後4℃に貯蔵した。

組織を水洗し、0.1%アニソホルミン溶液に、10分間浸漬し、表面殺菌した後水洗した。塊茎の柔組織よりコルクホーラー、およびミクロトームで、スライス(直径18mm×厚さ3mm)を作製した。スライスは流水で洗浄した後、蒸留水でリンスし、濾紙(東洋濾紙No. 2)を敷いたペトリ皿、またはガラスチップの箱に入れ、湿潤条件下で18℃に静置した。

(2) ジャガイモ疫病菌の保存培養

ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans* (Mont) De Bary) のレース1^{レース0} およびレース1.2を接種源として供試した。ジャガ品種リニリは、レース0の感染に対して強度の抵抗性をもつ。レース1、レース1.2に対しては、罹病性である。本供試菌は、北海道農業試験場作物第

I部畑作第二研究室の圃場で分離され、その後名古屋大学農学部植物病理学教室にて継代培養されたものであった。

疫病菌の菌そうを採取し、10 ml の CaCl_2 水溶液 ($2 \times 10^{-4} M$) 中にけん濁し、4℃で3-4時間、あるいは、10℃で2時間静置し、遊走子のうを間接発芽させ、遊走子を得た。トーマ血球メーターを用いて、遊走子濃度を $1 \times 10^4 / \text{ml}$ に調整した。

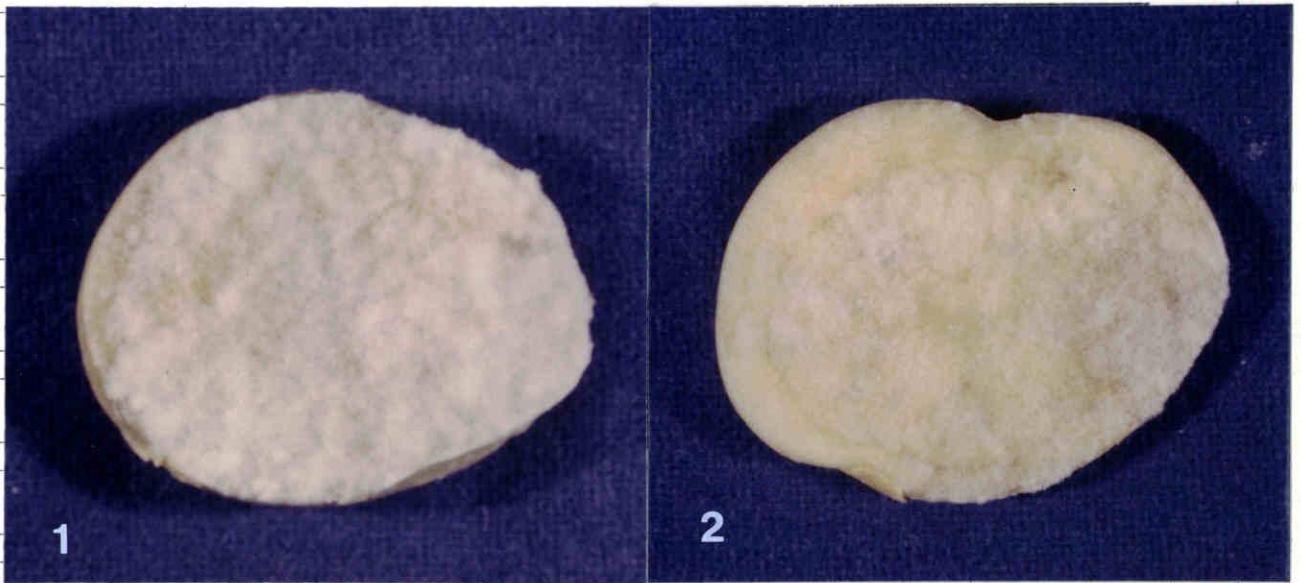
遊走子のうの採取は、次のように行った。ジャガイモ品種男しせく (*Solanum tuberosum* L.) の塊茎表面を滅菌し、厚さ 1.0 cm のスライスを作製し、水洗した。そのスライスをプラスチック箱中の金網上に並べ、上述の遊走子けん濁液を、スライス表面上に脱脂綿で塗布し、4-6日間18℃で培養した (Plate I)。スライス表面に生育した菌そうから、遊走子のうを採取した。

Plate. I.

Light micrograph showing tuber tissues (cultivar Irish
Cobbler, r-gene) infected with Phytophthora infestans.

1) race 1 (compatible).

2) race 0 (compatible).



(2) 接種源の調製と接種

上述の保存培養の菌そうをピンセットでかき取り、 4°C の CaCl_2 水溶液($2 \times 10^{-4}\text{M}$)中にけん濁した。けん濁液を金網メッシュで濾過し、菌そうを取り除いてから、さらに濾紙(東洋濾紙、No. 2)で濾過し、濾紙上の遊走子のうを冷却蒸留水(4°C)で洗浄し、雑菌を含まない遊走子のうを得た。得られた濾紙上の遊走子のうを 10ml の CaCl_2 水溶液($2 \times 10^{-4}\text{M}$)中にけん濁し、その溶液中に5-12時間、 4°C に放置し、間接発芽させた。その後、低速遠心分離(600rpm 、2分間)を行ない、遊走子液中の未発芽の遊走子のうや、胞子のう柄などを取り除いた。トーマ血球メーターにて、遊走子濃度を計数し、所定の濃度($1.0 - 3.0 \times 10^6$ 個/ ml)に調整した。この遊走子けん濁液を、接種源とした。マイクロピペットを用い、塊莖スライス表面に、 50ml の遊走子けん濁液を均一に塗布し接種した。スライスは、接種後70ラッシュ箱に

入れ、 18°C に静置した。

(4) グラストサイジンSの植物体への処理

塊茎スライスへのグラストサイジンS (BcS) 処理の場合、ペトリ皿 (直径14 cm) に脱脂綿を敷き、5 ppm の BcS 溶液を45 ml 入れ、脱脂綿上に塊茎スライスを乗せ、室温で15分処理した。また、対照区としては、蒸留水で同様な処理をした。処理後、スライスには蒸留水で洗浄し表面の水分を濾紙でふき取り、BcS 処理面に疫病菌を接種した。

また、ジャガイモ葉柄の場合には、BcS を30 ml 入れ、ペトリ皿の中央に置いた3×8 cm の脱脂綿に、葉柄の切り口面をさした。BcS 処理後、葉柄は蒸留水で洗浄し、濾紙で水分をふき取り、実験に供試した。

(5) 過敏感細胞死の顕微鏡観察

塊莖スライスの接種面より、約3細胞を含む厚さの切片 (3×3 mm) を作製し、ニュートラルレッド (2×10^{-4} M) を含む、0.8 M ショ糖液に5分間浸漬した後、光学顕微鏡で接種した表面細胞の観察を行なった。宿主細胞の過敏感細胞死の判別は、接種組織表面の菌糸侵入した細胞についてのみ行なった。生死判別の基準は次のようにした。

- (1) . ニュートラルレッドで液胞が染色される。
- (2) . ショ糖液により、原形質分離が起こる。
- (3) . 原形質流動がみられない。

以上の3点のうち、(1)、(2)を満たせば死細胞とし、(3)については、判断の参考のために用いた。

細胞死率は、ジャガイモの被感染細胞数に対する、死細胞数の割合として求めた。

宿主の細胞死率 (%)

$$= \frac{\text{死細胞数}}{\text{宿主被感染細胞数}} \times 100$$

実験結果は、一実験の観察で約70-100個の感染細胞を観察し、2-3回の実験を繰り返して、その平均値で表わした。

(6). ジャカイモ疫病菌の宿主細胞への貫入と細胞内菌糸長の測定

疫病菌接種後、発芽被のう胞子が、付着器形成を行ない、被感染宿主細胞内に侵入菌糸の見られるものを貫入とした。その貫入率は次の式による。

$$\text{貫入率} (\%) = \frac{\text{貫入発芽被のう胞子数}}{\text{付着器を形成した全発芽被のう胞子数}} \times 100$$

疫病菌の被感染宿主細胞における菌糸伸長の測定は、Kitazawa et al. (74) の方法に準じて行なった。接種後、時間を追って、スライス

より作製した切片を F A A 固定液 (エチルア
ルコール : ホルマリン : 氷酢酸 = 1 : 1 : 1)
に浸漬、固定した後、接眼マイクrometer
を用い光学顕微鏡下におい菌糸長を測定し
た。

一実験区の観察では、約 100 個の発芽後
の胞子、あるいは細胞内菌糸を観察し、2-
3 回以上実験を繰り返し、結果はその平均値
で表わした。

(7). フラストサイジン S 処理による蛋 白質合成の阻害

リシリ塊茎より、5 x 5 x 5 cm の組織ブ
ロックを作製し、0.1 % アンチホルミンに 10
分間浸漬した後、滅菌蒸留水で洗浄した。以
下の操作はすべて無菌的に行なった。上記ブ
ロックから、コルクホーラーで直径 16 mm の
円柱組織をくり抜き、マイクロトームで直径 16
mm、厚さ 1 mm のスライスを作製した。こ

木のスライスは、 BcS 処理を行なうまでの間、ペトリ皿に入れ、 $18^{\circ}C$ の暗黒条件下に放置した。切断 1、4、7、16 時間後、スライスを 5 ppm の BcS 溶液中に 15 分間浸漬処理した。対照区は、滅菌水で処理した。 BcS 処理後、滅菌蒸留水でよく洗浄した。その後、再びペトリ皿に入れ、 $18^{\circ}C$ 暗黒下に静置し、切断 16.5 時間めにおのおののスライスを、各区 5 枚ずつ同時に、 $2\mu Ci/ml$ の濃度の L -ロイニニ-4, 5- 3H (430 Ci/mg) 溶液中に室温で 1 時間浸漬した。その後と直ちに、スライスを $4^{\circ}C$ の蒸留水で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、 $-30^{\circ}C$ で凍結した。

凍結スライスは、組織重の 4 倍量の 8 mM β -メルカプトエタノール、 1 mM EDTA を含む 0.01 M リン酸緩衝液 ($pH\ 7.7$) とともに磨碎した。磨碎液を $2700 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清部と沈澱部に分けた。上清部の 1 ml を取り、組織へ吸収された 3H -ロイニニの測定試料とし、下記の方法で放射能を測

定した。また、 ^{35}S -メチオニンの蛋白質への取り込み測定は、下記の方法で行なった。上清部 2 ml に、最終濃度が 7.5 % になるよう過塩素酸 (PCA) を加え、10 分間静置した。そのあと 10000 $\times g$ で遠心分離を行なり、酸不溶性分画を沈澱させた。得られたペレットを 7.5 % PCA で再び洗、その後、1 N の水酸化ナトリウム 1 ml に溶解した。以上の操作は、4 $^{\circ}\text{C}$ の低温下で行な、た。次に、その溶解液 0.5 ml を取り、1 N の塩酸で中和した後、放射能測定試料とした。

15 ml のパイアルに、おのおのの試料液 0.5 ml を取り、シンチレーター (PPO 4 g, POPOP 0.2 g, トルエン 1 l, トリトン-X-100 500 ml) 10 ml を加えた。放射能活性はアロカ液体シンチレーションカウンター (モデル LSC - 653) を用いて測定した。蛋白質含量は Lowry et al. ¹⁰⁰⁾ の方法により定量した。

また、ジャガイモ葉柄における蛋白質合成

阻害の実験は、以下のように行なった。

葉柄を、本章の2. (4)で述べたと同様にし
て、BcS 溶液で1時間処理し、その後、葉
柄の切口より2 mm までの部位は、カミソリ
刃で切り取り、最初の切口より5 mm 以内の
顕微鏡観察を行なう部位の、蛋白質合成阻
害度を検討した。この全長3 mm の葉柄切片
を作製し、 $2 \mu\text{Ci/ml}$ の L-ロイシン-4,5-
 ^3H 液 10 ml に入れ、1時間浸漬した。この
あと滅菌蒸留水でよく洗浄し、 -30°C で凍結
した。あとの磨砕処理、放射能活性の測定、
蛋白質含量の測定は、塊茎組織の場合と同様
にして行なう。

3. 実験結果

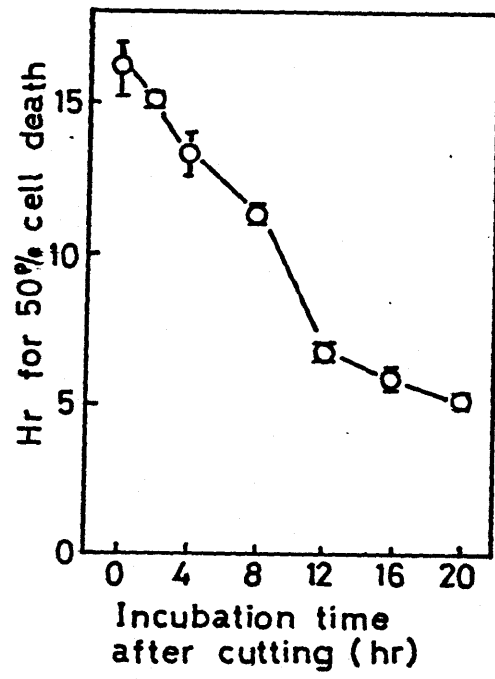
(1). 切断による塊茎細胞の過敏感 反応性の獲得

ジャガイモ塊茎を切断後、0、2、4、8、12、16、あるいは20時間加齢させたスライスに、非親和性疫病菌レース0を接種し、顕微鏡下で被感染細胞の生死を判別し、50%の細胞が過敏死に到るまでの時間を比較観察した (Fig. 1)。

塊茎切断直後に、非親和性菌を接種した場合、感染を受けた宿主細胞の50%が死ぬまでに約17時間を要した。切断4時間後に接種した場合には、約13時間を要した。切断後、加齢に伴って、接種するまでの時間分さらに経過すると、次第に50%細胞死に要する時間は短縮され、16-20時間加齢したスライスでは、接種後約6時間で50%の細胞死が起こった。

以上の結果は、塊茎切断直後には過敏反応性が低いから、あるいはほとんど見られず、加齢と共に徐々にその反応性が高まり、切断後16時間までに、最高のレベルに達することを示した。また、別の実験で、切断24時

Fig. 1. Relationship between time after cutting of potato disks until inoculation and time from inoculation until hypersensitive death of 50% of infected surface cells of the disks. The disks (Rishiri) were inoculated with the incompatible race of Phytophthora infestans at intervals after cutting. Each value represents the average of three separate experimentats. The range from mean is indicated with bars.



間後でも、反応性は高まった状態で維持さ
まわっていることも示された。

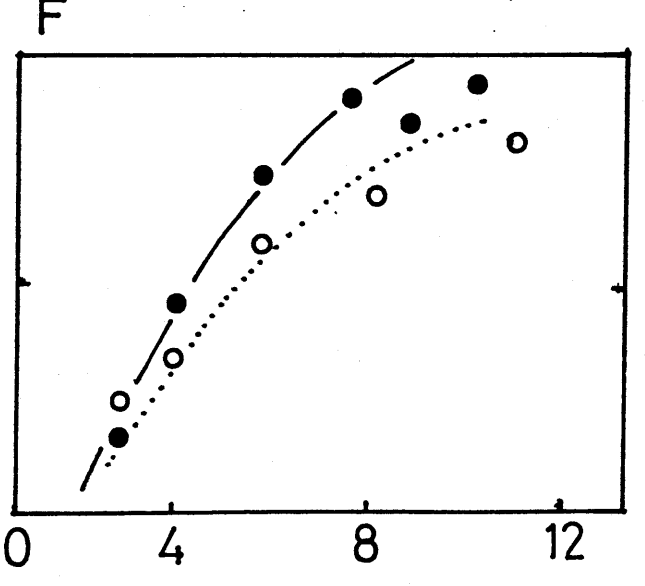
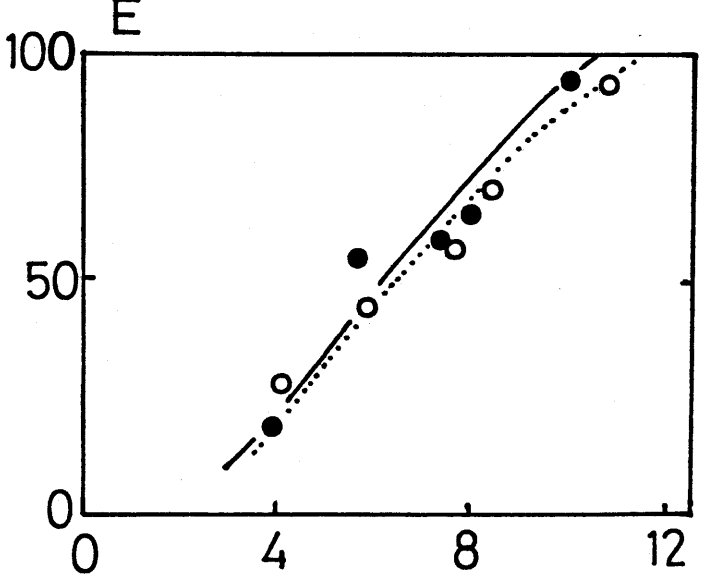
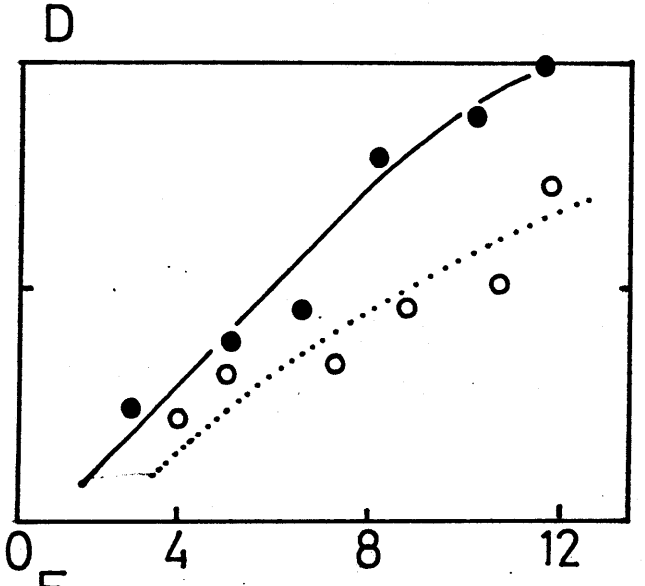
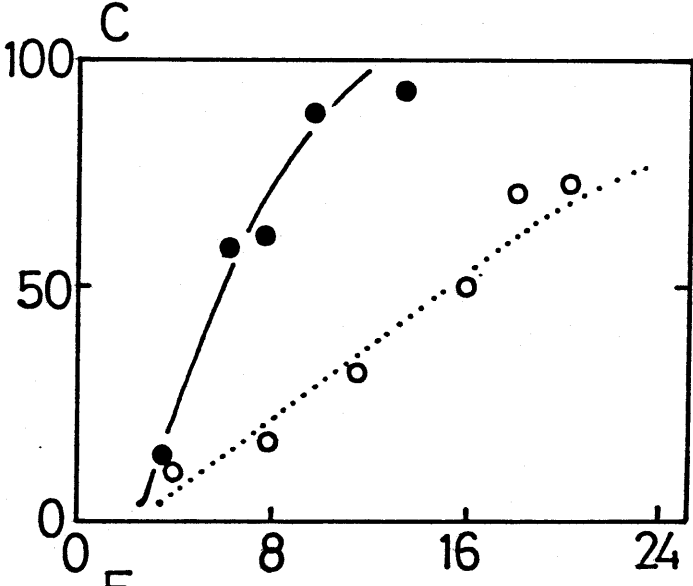
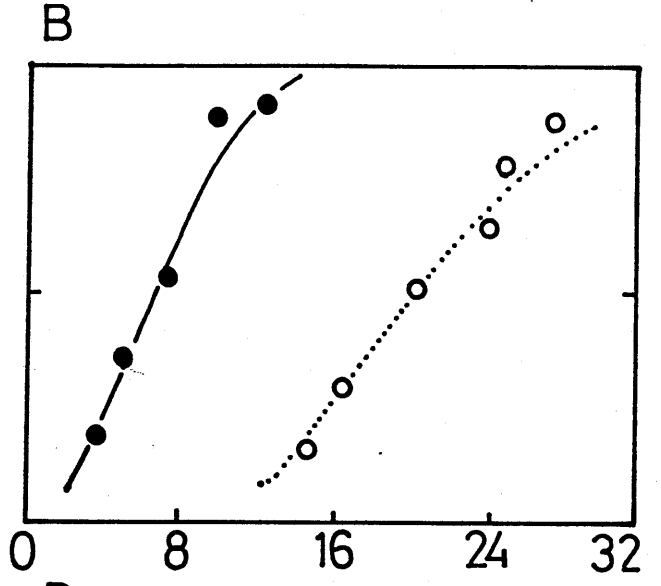
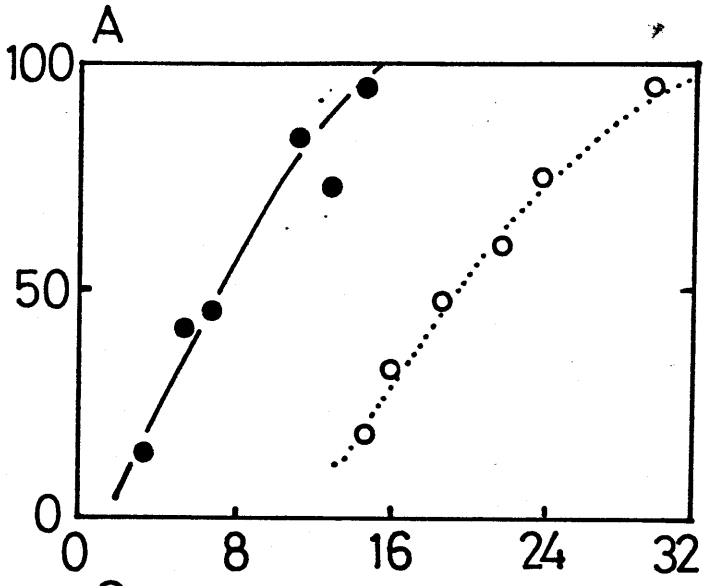
(2) 塊茎切断面細胞の過敏感反応性 におよぼすブラストサイジンS の影響

切断後種々の時間をかけて BcS 処理したス
ライスにおいて、感染を受けた細胞の 50% の
ものが死に到る時間を比較検討した。すなわ
ち、切断後蛋白質合成阻害剤処理時点までに
獲得された過敏感反応性か、固定・維持さ
まわっているかを検討した。

切断直後、およそ 4 時間後に BcS を処理し
たスライスにおいて、その 50% 細胞死が起こ
るまでに要する時間は、約 22 時間である。た
ら (Fig. 2, A, B)。切断 8 時間以後に BcS を処
理したスライスでは、次第に過敏感反応性か
高まり、50% 細胞死に到る時間は短縮した。
切断 16 時間後では、BcS 無処理のスライスと

Fig. 2. Effect of blasticidin S (BcS) on time length for hypersensitive cell death of potato cells infected with an incompatible race of Phytophthora infestans. The tuber disks were treated with BcS, 5 ppm, or water for 15 min at 0 hr(A), 4 hr (B), 8 hr(C), 12 hr (D), 16 hr(E), and 20hr(F) after cutting, and inoculated with the fungus 16.5 hr after cutting.

Treated with (●) water, (o) BcS.



Time after inoculation (h)

同様 菌接種後約6時間で50%の細胞死が起
こった (Fig. 2. E)。

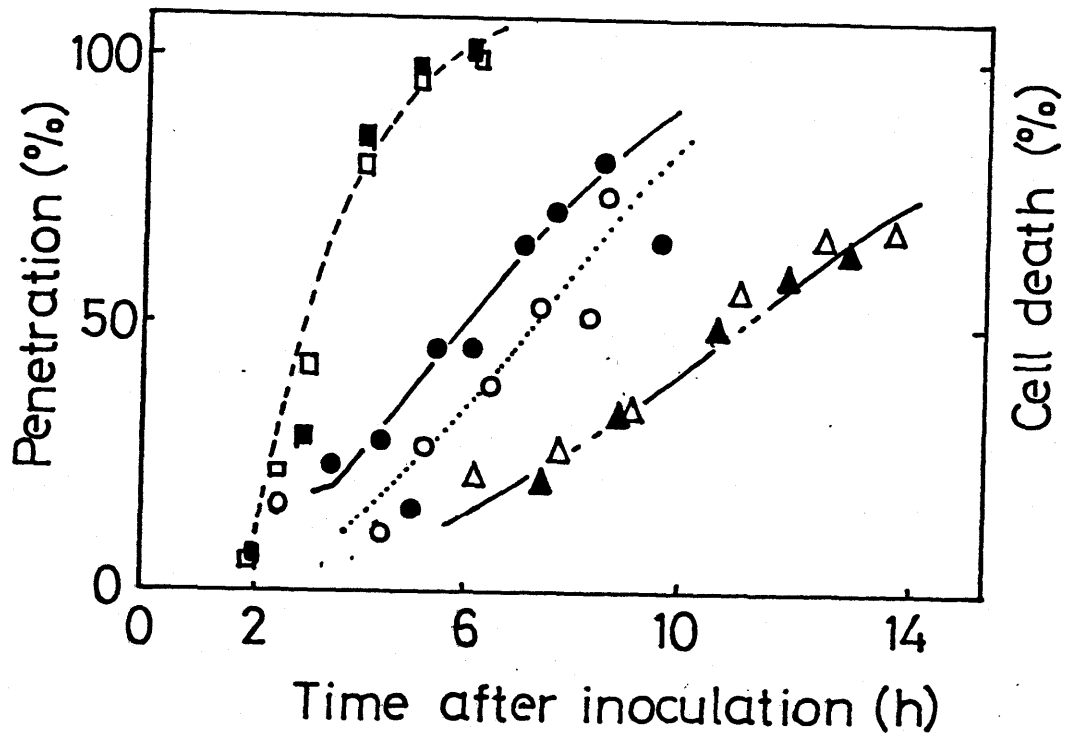
以上の結果は、切断後加齢の過程で処理し
た BcS は、処理時点以後の反応性の増大を抑
制し、処理時点の反応性のレベルに固定し、
その過敏感反応性を維持したことを示す。
さらに、反応性が最高に存在状態 (切断16
時間以内以降) では、BcS は過敏感反応性に影
響を与えないことを示す。

(3) 過敏感反応性におよぼす切断傷害 の影響

切断直後の塊茎組織は、疫病菌感染に対す
る、過敏感反応性が著しく低いことを、前節
で明らかにした。本節では、そのことは、物
理的傷害により、本来保持されていた反応性
が消失した結果なのか、それとも、無傷の状
態では、反応性が存在しないのかどうかにつ
いて検討した。

Fig. 3. Comparison of time length of penetration and hypersensitive death of the infected cells of the aged cut surface tissue and those of their neighboring tissues. The surface tissue 0 mm (non-removed as a control), 0.2-0.3 mm, 1 mm or 5 mm in thickness were removed from the tuber disks, and then the freshly cut surfaces were inoculated with an incompatible race of Phytophthora infestans. Each value represents the average of three separate experiments.

(●) Cell death; control, (o) Cell death; 0.2-0.3 mm removed, (▲) Cell death; 1 mm removed, (△) Cell death; 5 mm removed, (■) Penetration; control, (□) Penetration; 5 mm removed.



塊茎切断後、15時間加齢し、高度の過敏感反応性を獲得した塊茎スライスの、表面から0.2 - 0.3 mm、1 mm、あるいは5 mmの厚さで再切断を行なう。切断後、新たに表われたそれぞれの新鮮切断面に、非親和性疫病菌を接種し、被感染宿主細胞の過敏感細胞死に要する時間を測定した (Fig. 3)。

スライス表面より、0.2 - 0.3 mmの組織 (表層より細胞数にして、2 - 3細胞めにあたる) を切除したものでは、切断後15時間加齢した表層組織と、ほぼ同じように速やかに過敏感死を起した。すなわち、接種後5 - 6時間で50%細胞死が起こった。また、表層より1 mmと5 mmの組織を切除した切断面組織では、50%細胞死に11時間を要した。塊茎切断直後の切断面と比較して5 - 6時間、細胞死が速く起こった。だが、15時間加齢した切断面組織に比べると著しく遅れた。

これらの結果は、加齢により、たゞ高まったジャガイモ組織の過敏感反応性は、再切

断による傷害を受けても、加齢してよりなり切断面の反応性の程度にまで下がることはなりことを示す。加齢した組織では、表面の組織が最も反応性が高く、表面から内部へ（1 mm および 5 mm の内部組織）向かうにつれて反応性は低下したことを示す（Fig. 3）。

なお、切断後15時間加齢した組織表面と、再切断により表われた切断面とにおいて、疫病菌の貫入に要する時間には、有意な差はなかった（Fig. 3）。

(4) 葉柄表皮組織におけるフラスト

サイジンSによる過敏細胞死

の抑制

葉が未展開のジャガイモ葉柄を基より切り取り、直ちにその切り口を BcS (5 ppm) で1時間浸漬処理し、その後、切り口に近（約2-4 mm の間）無傷表面に、非親和性菌レーズ0を接種した。

対照区（水処理）の葉柄表皮細胞では、感染後8時間、ほとんども全ての感染を受けた宿主細胞が細胞死を起こした。しかし、BcSを処理したものである。接種後10時間の時点でもきわめて低い細胞死率であった（Fig. 4）。

葉柄を茎より切り取り、BcS処理したあと、菌貫入までの4時間の間に、切り取りの影響により過敏反応性が高まる可能性も考えられる。そこで、次の検討を行なった。葉柄を切り取り、4時間置いたあと、1時間のBcS処理を行なって、レース0を接種した。この実験より得られた過敏細胞死率の測定結果（Fig. 5）は、葉柄切り取り直後にBcS処理を行なって得た結果と同様であった。

さらに、葉柄表皮細胞に、親和性菌レース1,2が感染した場合の細胞反応について、上述のレース0感染の場合と同様にして調べた。この結果、レース1,2の宿主細胞への貫入はレース0の場合と、ほとんど同じように起きた（Fig. 6）。しかし、感染を受けた宿主細胞

Fig. 4. Effect of blasticidin S (BcS) treatment on time from inoculation until hypersensitive cell death of infected potato petiole cells. Cutends of petioles were treated with BcS, 5 ppm, or water for 1 hr immediately after excision, and the intact surfaces of the petioles were inoculated with the incompatible race of Phytophthora infestans.

(●) Cell death; control, (o) Cell death; BcS.

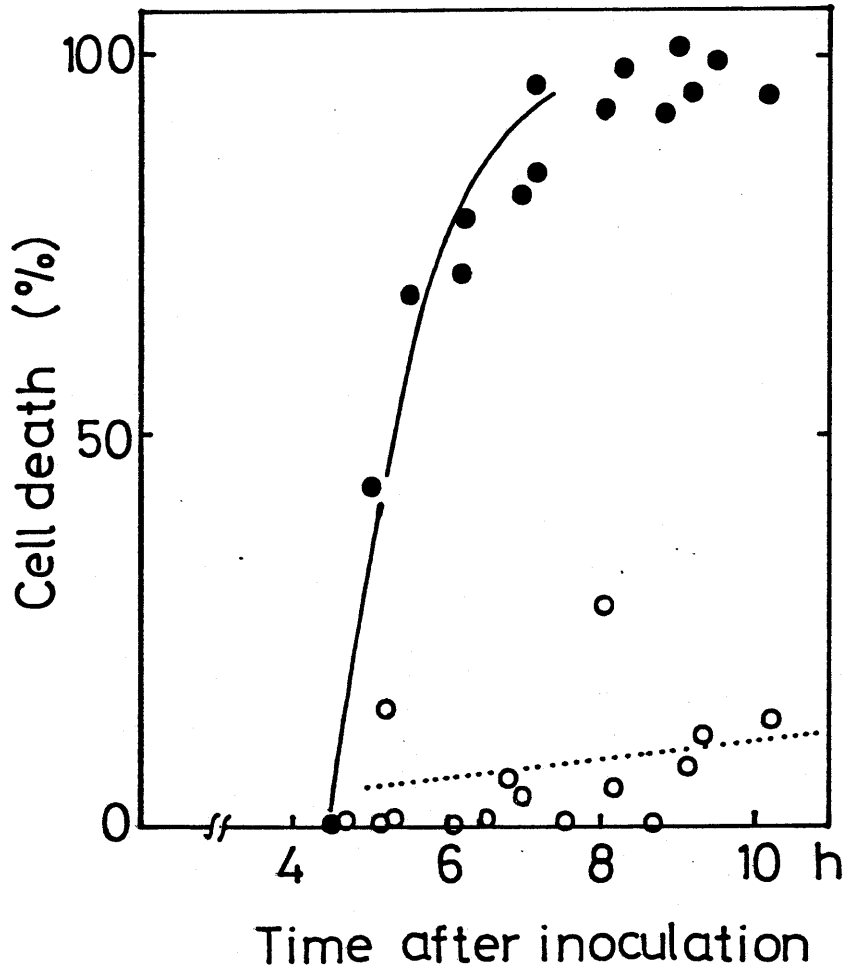
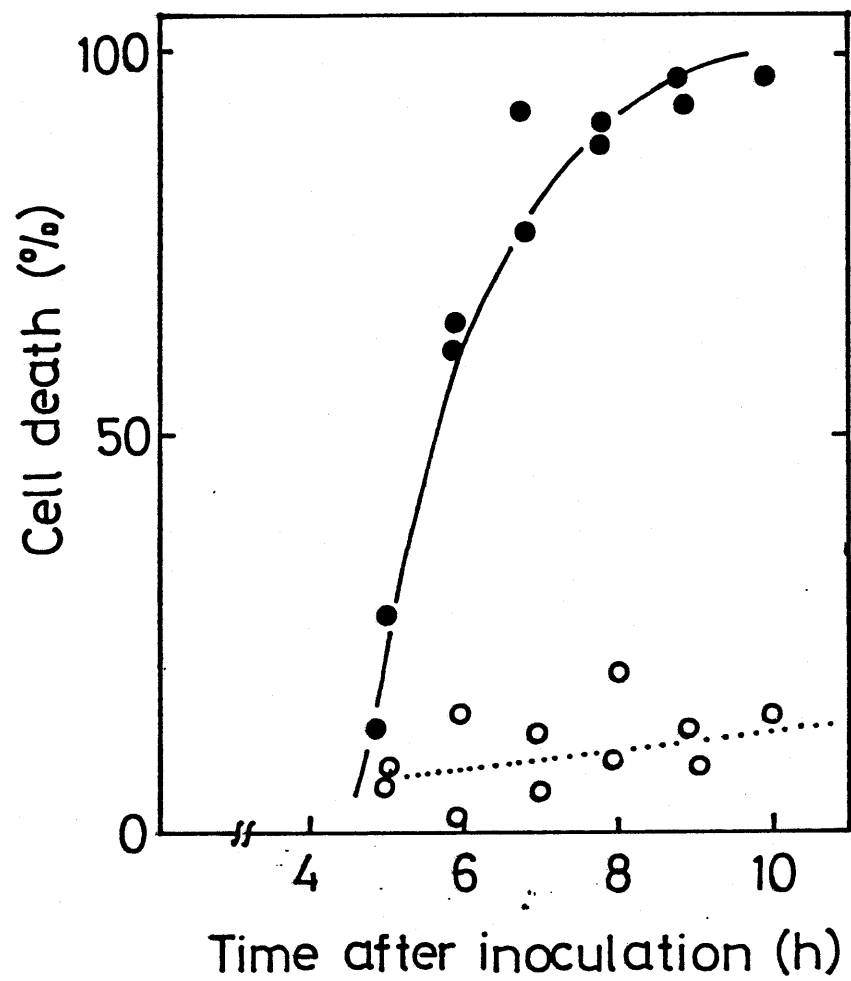


Fig. 5. Effect of blasticidin S (BcS) treatment on time length from inoculation until hypersensitive cell death of infected potato petiole cells. Cutends of petiole were treated with BcS, 5 ppm, for 1 hr beginning 4 hr after excision, and the intact epidermis of petioles were inoculated with the incompatible race of Phytophthora infestans.

(●) Cell death ; control, (o) Cell death; BcS.



胞、細胞死は、レスロの場合に比較して、約4時間遅く起こり、感染後14時間でほぼ100%の細胞死が起こった (Fig. 7)。レスロ2感染によっても引き起こされた。宿主の細胞死も、葉柄切り取りの直後に BcS を処理しておくこと著しく阻害された (Fig. 7)。

(5) フラストサイジンスのジャカイ

モ疫病菌に対する影響

BcS を1時間処理した葉柄表皮組織における、疫病菌の貫入率および宿主細胞内の菌糸長を測定した。また、塊茎組織においても、BcS を処理したときの菌の宿主細胞内菌糸長を測定した。

葉柄表皮組織における疫病菌の貫入率には、BcS 処理による影響はみられなかった (Fig. 8)。また、葉柄および塊茎組織における宿主細胞内での菌糸生育量にも BcS の影響は認められなかった (Table 1. 2)。

Fig. 6. Time length from inoculation to penetration. Epidermal cells of young unfolding leafstalks of cultivar Rishiri (R_1) were inoculated with race 0 or race 1,2 of Phytophthora infestans.

(■) race 0, (□) race 1,2.

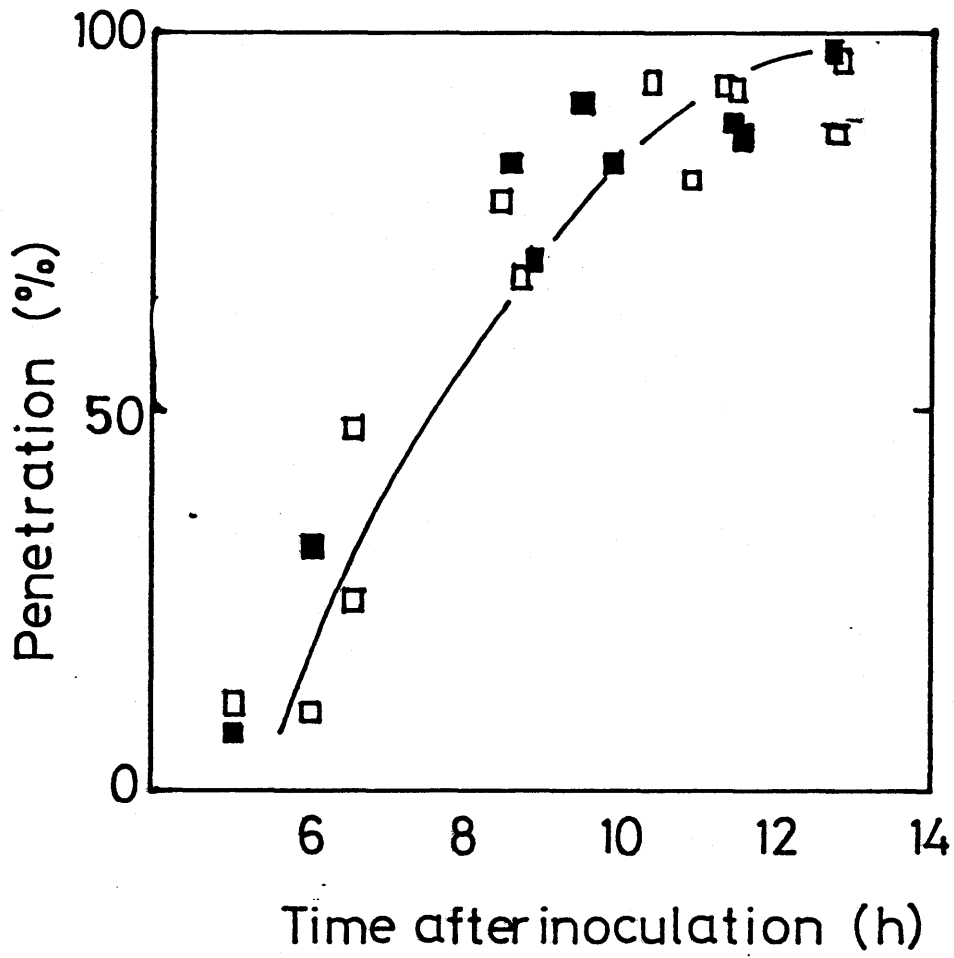


Fig. 7. Time length from inoculation until hypersensitive cell death. Epidermal cells of young unfolding leafstalks of potato cultivar Rishiri (R_1) were inoculated with race 0 or race 1,2 of Phytophthora infestans. Treatment of blasticidin S (BcS) was done for 1 hr immediately after excision of the leafstalks, and then inoculated with race 1,2.

(●) Cell death; race 0, (o) Cell death; race 1,2.

(Δ) Cell death; race 1,2 with BcS treatment.

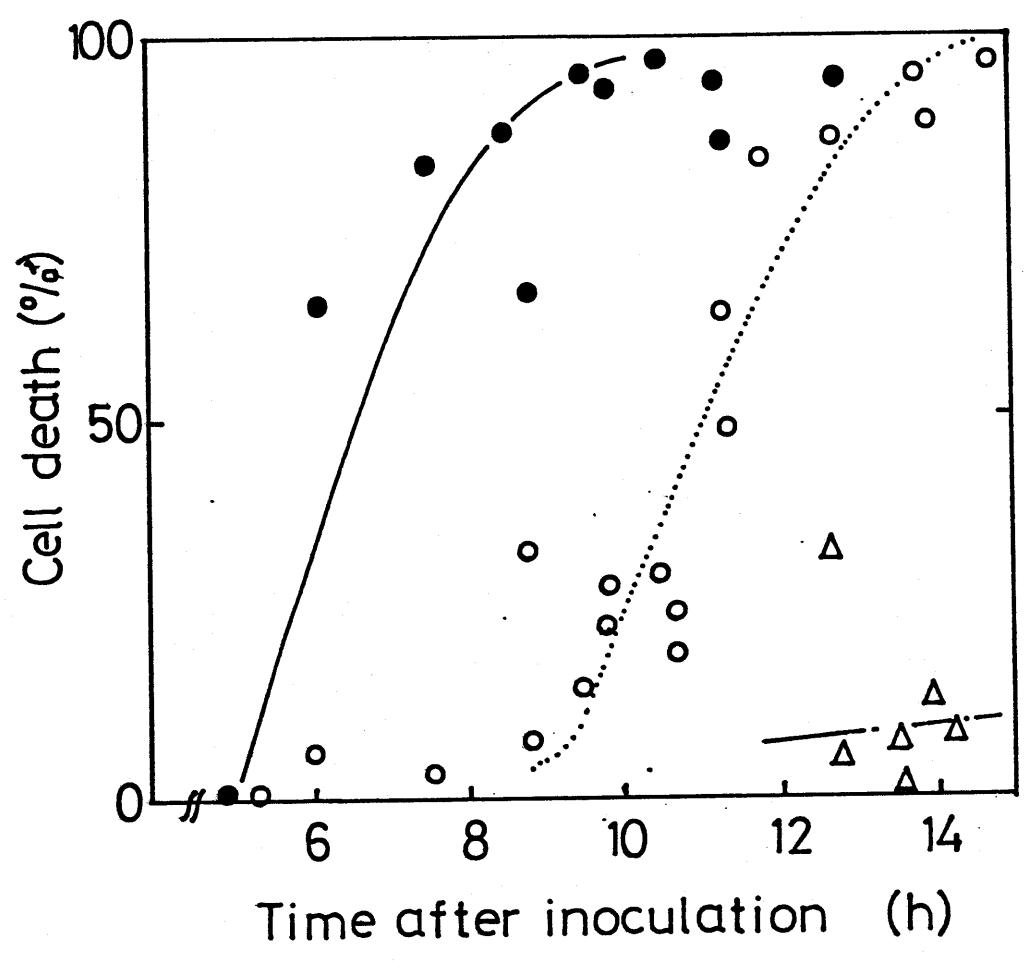


Fig. 8. Effect of BcS treatment on penetration of Phytophthora infestans into potato petiole cells. Cutends of petioles were treated with BcS, 5 ppm, or water for 1 hr immediately after excision, and intact surfaces of the petioles were inoculated with an incompatible race of the fungus.

(■) Penetration; control, (□) Penetration; BcS.

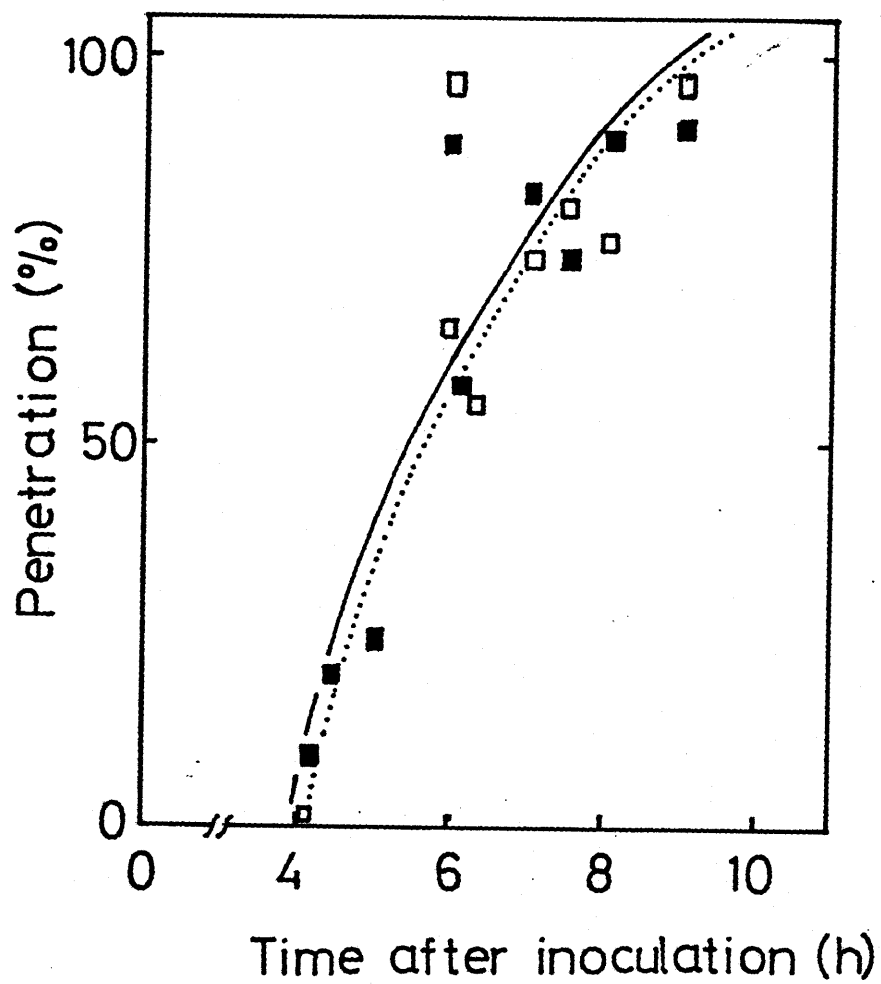


Table 1.
Effect of blasticidin S on the length of
intracellular hyphae of the incompatible
race of Phytophthora infestans in potato
cells ^{a)}

Treatment	Length of intracellular hyphae hr after inoculation	
	4.5 hr (μm)	8.5 hr (μm)
Water	20.2 ^b \pm 5.7	35.6 ^b \pm 12.8
BcS	18.1 ^b \pm 5.9	25.9 ^b \pm 10.1

a) Treated with BcS (5 ppm) 16 hr after cutting, and inoculated with race 0. Controls were treated with water.

b) Mean of measurements from about 100 cells per tuber disks,

\pm ; the standard deviation of the mean.

Table 2,
 Effect of blasticidin S on the length of
 intracellular hyphae of the incompatible race
 of Phytophthora infestans in epidermal cells
 of potato petiole^{a)}

Treatment	Length of intracellular hyphae	
	hr after inoculation	
	9 hr (μm)	10 hr (μm)
Water	12.4 ^b \pm 3.6	11.5 ^b \pm 2.5
BcS	12.6 ^b \pm 2.3	12.4 ^b \pm 2.9

a) Treated with BcS (5ppm) or water for 1 hr immediately after excision, and inoculated with the fungus.

b) Means of measurements from about 100 cells per leaf petioles with the standard deviation of the mean.

(6) 宿主組織の蛋白質合成に対する
 フラストサイジンの影響

塊茎および葉柄組織で、蛋白質合成阻害剤である BcS' 処理によつてどの程度の蛋白質合成阻害が起こつてゐるのかも調べた。蛋白質合成阻害率は、BcS' を処理した各組織に L-ロイシン-4,5- 3 H を取り込ませ、その磨砕液中の 2000 \times g の上清部に含まれる放射能に対する、その溶液中の酸不溶性分画に含まれる放射能の割合を求めて調べた。

塊茎の場合には、塊茎切断直後、および 4、7、16 時間後に、BcS' を 15 分間処理し、その直後または 16.5 時間後に、それを用いて L-ロイシン-4,5- 3 H を投与した。酸不溶性分画への L-ロイシン-4,5- 3 H の取り込みは、切断後 4、7 および 16 時間めの BcS' 処理区では、約 90% 抑制されてゐた。また、切断から数時間以内の BcS' 処理区では、約 50% の抑制がみられた (Table 3.)。

Table 3.

Effect of treatment of potato disks with blasticidin S on the incorporation of radioactivity from ^3H -leucine into the acid-insoluble fraction ^{a)}

Time from cutting to BcS treatment	Treatment with BcS or water	Time from cutting to ^3H -leucine treatment	Radioactivity		Incorporation into acid in- soluble fraction dpm/mg protein	Inhibition of protein synthesis (%)
			$\frac{\text{dpm}}{\text{g fr wt}}$ ($\times 10^{-3}$)	$\frac{\text{dpm}}{\text{mg protein}}$ ($\times 10^{-3}$)		
hr		hr				
1	Water Bcs	Immediately after BcS treatment	387	105	3.7	56.1
			337	89	1.4	
1	Water BcS	16.5	3435	1108	709.2	48.1
		16.5	742	309	102.7	
4	Water Bcs	16.5	4147	1159	105.2	92.7
		16.5	679	174	1.2	
7	Water Bcs	16.5	4888	1040	113.0	92.2
		16.5	960	267	2.2	
16	Water Bcs	16.5	2198 ^{b)}	564 ^{b)}	30.2	88.8
		16.5	2032	399	2.4	

a) The experiments were repeated twice.

b) The disks were administered with ^3H -leucine just after treatment with water.

葉柄組織の場合には、葉柄を植物体より切り取り、直後に BcS 処理を 1 時間行ない、その直後、あるいは、12 時間後に、L-ロイシン-4,5-³H を投与し、上記の場合と同様にして、蛋白質合成の阻害率を見ら。葉柄組織の場合も、塊茎組織の場合と同様、BcS 処理区では、90% 以上の蛋白質合成阻害が見られた (Table 4)。

4. 考 察

ジャガイモ塊茎の切断直後の組織では、非親和性疫病菌感染に対し、速やかな細胞死が起これず過敏反応性が低いとみなされた。

しかし、切断塊茎組織が加齢すると、それと共に徐々に、過敏反応性が高まり、速やかな細胞死が起さるようになる (Fig. 1)。

この場合、切断直後の組織で過敏反応性

Table 4.

Effect of treatment of potato petioles with blasticidin S on the incorporation of radioactivity from ^3H -leucine into the acid-insoluble fraction ^{a)}

Time from excision to BcS treatment	Treatment with BcS or water	Time from BcS treatment to ^3H -leucine treatment	Radioactivity			Inhibition ^{b)} of protein synthesis (%)
			Total uptake	Incorporation into acid-insoluble fraction		
hr		hr	dpm g fr wt ($\times 10^{-3}$)	dpm mg protein ($\times 10^{-3}$) (A)	dpm/mg protein ($\times 10^{-3}$) (B)	(%)
1	Water	1	1164	264.6	81.8	91.6
	BcS		791	208.2	5.5	
1	Water	12	3853	1630.0	509.7	97.9
	BcS		1495	510.2	3.4	

a) The experiments were repeated twice.

b) Percentage of inhibition effect was calculated by using following equation;

$$\frac{(B/A) \text{ water} - (B/A) \text{ BcS}}{(B/A) \text{ water}} \times 100$$

が低いことから、切断による反応性の消失も考へられる。しかし、加齢によりすでにその反応性が高ま、組織では、表層を 0.2 - 0.3 mm の厚さで再切断して得た、再切断面においても、速やかな細胞死が起きた (Fig. 3)。したがって、再切断の傷害を受けても高い過敏反応性を保持してゐること分示された。また、塊茎切断後、加齢の過程で起こる過敏反応性の増大は、切断傷害をうけた組織表面の細胞、あるいは、その隣接数細胞に限られていた (Fig. 3)。すなわち、切断表層面から離れた組織深部まで、反応性が高まることはなかった。

これらの結果から、無傷のジャガイモ塊茎組織の、非親和性菌に対する過敏反応性が極めて低いのは、本来無傷の組織には過敏反応性が存在しないためであると推察した。さらに、切断傷害後の加齢の過程で、反応性が獲得されること分示された。

蛋白質合成阻害剤であるアラストサイジン

S⁵⁶) (BcS) を用いた実験によつて、塊莖切断後の如齡の過程で BcS を処理すれば、処理以後の過敏感反応性の増大が抑制されることを示された (Fig. 2)。このことは、BcS 処理により、塊莖の切断から BcS 処理時点までに獲得された反応性のレベルが、固定・維持されてゐることを示す。さらに、反応性が高まらぬ組織の場合には (切断 15 時間後以降)、BcS は、もはや過敏感死を抑制しないことを示された。したがつて、BcS 処理によつて、宿主細胞の過敏感反応性の有無を判断できることとなる。

そこで、葉柄表皮組織における、過敏感反応性の有無を、BcS 処理法によつて検討した。

BcS 処理を行なう、表皮組織では、疫病菌レース 0 の感染に対する過敏感死が強く抑制された (Fig. 4. 5)。また、レース 1. 2 の感染に対する細胞死も、BcS 処理によつて強く抑制された (Fig. 7)。

これらの結果は、無傷の葉柄表皮組織も、

塊茎組織と同様、本来過敏感反応性を有して
いることを示す。BCS無処理の、無傷表皮
組織で、速やかな細胞死が起きたことは、疫
病菌の感染それ自体によつて、過敏感反応性
が高められたためであると推察した。

いま、塊茎あるいは葉柄表皮組織の、過敏
感反応性の低い状態を、「状態Ⅰ」(state I)、
反応性の高まった状態を、「状態Ⅱ」(state II)
とすると、上記の結果から、次のように結論
される(Fig. 9)。

1. 無傷のジャガイモ組織は、「状態Ⅰ」
であり、
2. それは、切断傷害によつて次第に、「
状態Ⅱ」に移行する。また、感染それ自
体によつても、この移行が起こる。「状
態Ⅱ」にある細胞に、非親和性疫病菌が
感染すると、速やかに細胞死を起こす。
3. 「状態Ⅰ」から、「状態Ⅱ」への移行
には、de novoの蛋白質合成が必要である。

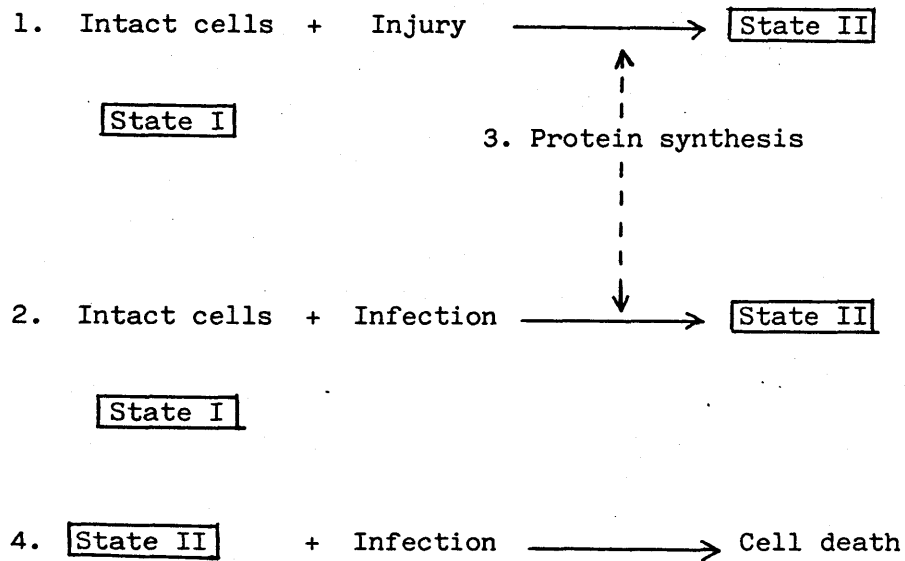


Fig. 9. Transition of host cell condition from inactive (state I) to active state (state II) for the hypersensitive cell death with protein synthesis.

本章で述べたジャガイモ細胞の過敏反応性の活性化は、切断傷害による生理的变化と密接に関連してゐる。ジャガイモセ、サツマイモなどの貯蔵組織において、切断傷害の生理学的な影響は、いわゆる障害呼吸 (wound respiration) の増加を誘導することから知られてゐる^{10, 63-66, 162)}。この場合、組織を1-3 mmの厚さのスライスにし、25°-30°Cに置くと、呼吸は、切断後3-6時間のラグを伴なひ、24時間までに新鮮組織の2倍程度まで増加することから知られてゐる^{63, 64, 162)}。これだけ増加した呼吸は、数日間維持され、蛋白質含量も、切断24時間後までにおよそ10-30%の増加を示すと知られる¹⁶²⁾。この傷害により増加する蛋白質成分の中に、植物の抵抗性に必要な要因と云ふものがある¹⁵⁾と考へられた^{65, 155)}。

第三章

疫病菌菌糸表面と結合する宿主 蛋白質性成分の探索

1. 序論

ジャガイモ組織が、非親和性ジャガイモ疫病菌の感染・侵入を受けるときに起こる、速やかな細胞死（過敏細胞死）は、組織の切断傷害あるいは菌の感染過程の何らかの刺激によって、新たに活性化され、獲得された過敏反応性に基づいて起ることを前章で明らかにした。

これまで、植物病原菌の宿主細胞への侵入様相とそれに対する宿主細胞の反応の特異性分、光学顕微鏡および顕微映画観察によつて、詳細に観察されて起る^{74, 75, 109-113, 147-154}。

ジャガイモ疫病菌の観察記録によれば、そ

の非親和性菌が宿主細胞壁を貫入し、原形質膜に接触する直前直後から、その場を中心にして宿主細胞の原形質が集積し始め、やがて原形質流動の停止が起こる。次いで、原形質膜の透過性に異常が起こり、やがてその宿主細胞は死に到る。他方、親和性菌が感染した場合には、被感染宿主細胞は、過敏感死を起さず、非親和性菌感染にみられた前記の細胞反応がみられな。これらの観察結果は、貫入菌系の表面物質、あるいは、菌系伸長時の放出物質と宿主原形質膜上の物質との相互作用が、過敏感細胞死のための生理的反応過程に係わっている可能性を示唆している。また非親和性・親和性関係の成立決定の上で、重要な反応の場であることを提起している。

非親和性菌感染の極く初期には、宿主原形質膜の物質吸収および漏出の異常が認められたり、膜電位の変化が起るなど、侵入菌系に対して宿主原形質膜機能の変化が起る事が明らかになっており^{107, 108, 158, 159)}、侵入菌の

何らかの物質と宿主原形質膜の物質間の反応が、過敏感死の誘導機構に関与してゐることをさらに裏づけてゐる。

病原菌と宿主植物の関係は、いわゆる cell to cell の相互作用の関係であり、動物^{115-119, 173)}や植物²⁾の受精現象や、動物の免疫反応^{67, 70, 140)}における自己-非自己の認識反応にみられるような、蛋白質と多糖質、あるいは糖と糖などの分子間の反応を基礎に成り立ってゐることを推察される。

Nozue et al.¹²¹⁾ は、ジャカイモと疫病菌の系で、侵入菌系表面が、宿主原形質膜と接着することを、光学顕微鏡および電子顕微鏡観察により報告した。また、その接着が特定の糖により阻害され、阻害が起ると過敏感死が抑制されることを示した¹¹²⁾。これらの実験事實は、侵入菌系表面の物質と、宿主原形質膜上の物質との結合反応が具体的に存在し、その結合反応が過敏感死の反応機構に係わってゐることを示唆してゐる。

本章では、ジャガイモ疫病菌菌系表面物質と宿主細胞膜上の物質との相互作用を物質的に明らかにするため、疫病菌菌系表面物質と結合する宿主の蛋白質性成分の探索を行なった。また、ジャガイモの抵抗性品種と罹病性品種を用いて、そのような成分の品種間差異を検討した。

2. 材料と方法

- (1) ジャガイモ疫病菌菌体をリガン
ドとしたアフィニティークロ
マトグラフィー

前章で述べたようにして得たジャガイモ疫病菌のレーズ0とレーズ1の、液体培養菌体(5g)を5%グルタールアルデヒド(20 ml)で一晩固定し(4°C)、50 mM Tris-HCl 緩衝

液で洗淨した後、凍結乾燥した。この菌体 (500 mg) を乳鉢中で磨碎し、Oikawaの方法¹¹⁴⁾により、アフィニティークロマトグラフィー用のリガンドとして、40 ml の7.5% ホリアクリルアミドゲル中に包埋した (Plate II)。

ジャガイモ塊茎の可溶性蛋白質成分は、次の方法で抽出した。皮をむいた塊茎 (100g) の細片を、4℃に冷却した5倍量の緩衝化食塩水 (PBS; 10 mM リン酸緩衝液, pH 7.2, と0.9% 塩化ナトリウム) と共に、ブレンダーで磨碎した。その磨碎汁液を4重のカーゼで濾過し、硫酸を加え75%飽和とし、室温で2.5時間攪拌した。この溶液を20000×gで10分間遠心分離し、沈澱を得た。塩析による沈澱物を10 ml のPBSに溶解し、PBSに対して一晩透析した。非透析性成分を凍結乾燥し、-30℃に貯蔵した。

ジャガイモ塊茎の、塩析によって得られた100 mgの粗蛋白質成分を100 ml のPBSに溶かし、その溶液を20000×g、15分間、遠心分離

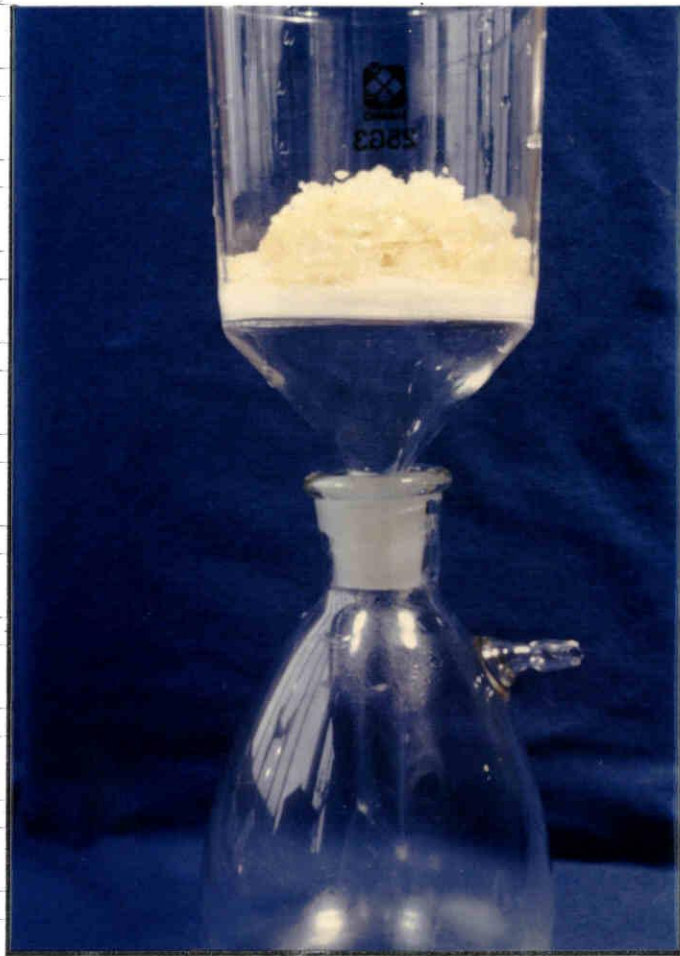


Plate II.

し、その上清を得た。この上清を、1 l のフラスコ中で、500 mg の疫病菌菌体磨砕成分を含むアフィニティー・リガンドと混合し、23°C で 2 時間振とう (60 回/分) した。次いでゲルを、洗浄液の O.D.₂₈₀ が 0.000 以下となるまで PBS で繰り返し返し洗浄した。このあと、ゲルを 100 ml の 0.1 M 酢酸とともに、23°C で 1.5 時間振とう (60 回/分) し、ゲルから菌体結合性のジャガイモ蛋白質成分を溶出した。

溶出後直ちに、1 N 水酸化ナトリウムにて溶出液の pH を 7.0 に調整し、溶液の O.D.₂₈₀ を測定した。このあと、塩を取り除くために溶出液を蒸留水に対して透析を行なった。この場合、外液を数度取り変え、4°C で 3 日間行なった。非透析分画を凍結乾燥し、得られたジャガイモ成分は、収量を測定したあと、-30°C に保存した。

(2) ジャガイモ・レクチンの抽出

ジャガイモ・レクチンは、*Sequeira & Graham* (199) の方法を用いて、塊茎組織より抽出した。実験には、男しやく(ト-遺伝子、*Solanum tuberosum* L.) およびリシリ(R₁-遺伝子、*Solanum tuberosum* × *S. demissum*) の2品種を供試した。レクチン含量は、収穫直後の塊茎と、貯蔵期間の長いものとは、大きな差異があり、含量の多い前者を主に用いた。

皮をむいた塊茎組織(1500g)を、おろし金でおろし、之の塩酸・エタノール混液(1.25N 塩酸 : 100% エタノール = 1 : 3)へ直接投入した。この混液中で、2日間4℃で保持したあと、10000 × g で10分間遠心分離した。この上清部を、セライトパウダーで濾過した。この濾液に3倍量の4℃の冷アセトンを加え、1時間静置し、生じた不溶物質を12000 × g、10分間の遠心分離により回収し、0.1 M 酢酸緩衝液、pH 3.6、を供試塊茎10g

トッき 1 ml の割合で加え溶解した。これを粗レクチン溶液とした。粗レクチン溶液を、セロハン透析キューブ (排除限界分子量: 8000) に入れ、上記の 0.1 M 酢酸緩衝液に対して、2 日間透析した。この粗レクチン溶液を、0.1 M 酢酸緩衝液で平衡化した SE-セルロースカラム (1.6 x 13 cm) に通し、0 から 0.5 M の塩化ナトリウムの連続濃度勾配によって溶出を行なった。

その後、赤血球凝集活性を指標として、レクチン活性をもつ分画を集め、0.1 M 酢酸緩衝液に対して透析した。このあとレクチン分画を、8 M 尿素存在下で限外濾過 (PM-30, アミコン) に分けた。得られた高分子分画を 0.1 M 酢酸緩衝液 (含 0.1 M 塩化ナトリウム) に対して、3 日間以上透析を行なった。その後、4 °C に保存した。この溶液を純化レクチンとして供試した。

(3) SDS - ホリ ア ク リ ル ア ミ ド ゲ ル

電 気 泳 動

平板ゲル電気泳動は、Laemmli⁸⁵⁾の手法に執った。まず、試料を1%、 β -メルカプトエタノール、1% SDS、40% グリセロールを含む0.0625 M Tris-HCl緩衝液(pH 6.8)に溶かし、36°Cで3時間、あるいは、60°Cで2時間処理した。泳動ゲルには、厚さ2 mm、縦130 mm、横180 mmの、10% ホリ ア ク リ ル ア ミ ド ゲ ルの平板を用い、泳動の指標色素としてブロムフェノールブルーを使った。10 mAの定電流で16時間泳動した。泳動後ゲルを、クマシーブルー染色液(0.25% クマシーブルーリアントブルー-R250 ; エタノール : 酢酸 : 水 = 9 : 2 : 9)中に、3時間漬り、蛋白性成分を染色した。このあとゲルを脱色液(酢酸 : エタノール : 水 = 15 : 10 : 175)中に漬り、蛋白成分が存在しな部分のゲルが透明になるまで脱色を行なった。

ディスクゲル電気泳動法は、Weber & Osborn (169) の方法を用いた。泳動ゲルには、0.2% の SDS を含む 0.01 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて作製した 7.5% ポリアクリルアミドゲル (直径 6 mm, 長さ 100 mm) を用いた。泳動用試料は、1% SDS と 1% メルカプトエタノールを含む、0.01 M リン酸緩衝液に、蛋白質濃度が 0.2 - 0.6 mg/ml になるように溶解し、100 °C で 2 分間処理した。25 μ l の試料をゲルにのせ、ゲル当り 8 mA の電流で約 4 時間泳動させた。その後、泳動ゲルをガラス管から取り出し平板ゲルの場合と同様の手順で染色した。

PAS 染色は、Zacharius⁽¹⁷⁵⁾ の方法に従って次のように行なった。電気泳動後ゲルを 12.5% トリクロロ酢酸液中に室温で 1 時間処理し、蒸留水でよく洗浄した後、3% の酢酸を含む 1% 過ヨウ素酸 (HOIO_3) 中で 2 時間静置した。次いでゲルを、蒸留水に浸し、スターラーで攪拌しながら 1 晩置いた。このゲルをシ

ツフ試薬に暗中で1時間漬けた後、0.5%ヒ
ロ亜硫酸ナトリウム溶液に移し、攪拌した。
この間、20分おきに3回その溶液を取り変之
た。さらにケルの背後の色素を除去し、
その後蒸留水で脱色を行なう。

(4) 赤血球凝集活性の測定

赤血球凝集活性は、トリプシン処理を行な
ったウサギ赤血球を用いて検定した。白色ニ
ュージランドウサギより新鮮血を採り、分取
した赤血球を1%トリプシン(Difco)で37℃
1時間処理した後、PBSで洗浄した。その後
赤血球をPBSに稀釈し、1%(v/v)の濃度
に調整し、検定に用いた。赤血球凝集活性の
測定は、Mishkind et al.¹⁰⁴⁾の方法に準じて行
なう。

検定試料をPBSにより順次2分の1希釈し
て得たサンプル液を、マイクロタイタープレ

一トに 10 ml ずつ注入し、おのおのに 100 ml の 1% 赤血球液を加え、1 時間室温で静置した。

赤血球凝集反応の有無を肉眼で観察し、凝集活性を示す最大希釈値の逆数をカ価とした。

(5) 抗レクチン-抗血清の作製と免疫学的手法

リシリ、および、男しやくの凍結乾燥した純化レクチンを 2 mg/ml の濃度に PBS に溶かし、等量の完全アジュバンド (ヤトロン) とエマルジョンになるまでよく混合し、混合液を白色ニューージーランドウサギ (雄) の後肢の指掌に 8ヶ所と、後肢大腿部皮下に 2ヶ所、各 0.2 ml ずつ注射した。3 週間後、2 度目の抗原注射を最初と同じ手順で行なう。採血は、第 2 回注射後 15 日目に心臓貫刺法により行なう。採血した新鮮血液を室温に 1 時

向静置したのを、 38°C に2時間、次いで 4°C で1晩置き、凝血させた。そのあと、凝固した血球成分を遠心分離により取り除き、血清を得た。

免疫グロブリン分画は、次のように抽出した。得られた血清に、等量の80%飽和の硫酸を加え、室温で塩析を行なった。得られた沈澱部を、 $20000 \times g$ で10分間遠心分離し、その沈澱部を、40%飽和の硫酸溶液にけん濁し、遠心分離する操作を2回繰り返した。この沈澱部を最初用いた血清量と等量のPBSに溶解した。この溶液を、まず、蒸留水に対して 4°C で4日間、外液を取り変え、透析し、最後にPBSに対して透析した。この溶液を2mlのサンプルキャップに分注し、 -30°C に保存した。この場合、0.02%の窒化ナトリウムを加えた。非免疫血清からも、同様の手順で、グロブリン分画の抽出を行なった。

二重拡散法による抗原抗体反応を行なう場合には、PBSに溶かした1%精製寒天ゲルを

0.01 % 窒化ナトリウムを含む) を用いた。直径 9 cm のペトリ皿に、寒天を 20 ml 流し込み、固化したあと、直径 3 mm のホーラーで中心に 1 個の穴をくり抜き、その周囲に、5 mm の間隔をとり、正六角形の頂点に 6 個の穴を作った。中心の穴には、25 μ l の抗レクチン-抗血清を注入し、その周囲の穴には、男しゃく・レクチン、リシリ・レクチン、PBS、および非免疫血清を、それぞれ 25 μ l ずつ注入した。そして、30 $^{\circ}$ C に 3 日間静置したのを、抗原抗体反応の沈澱バンドの有無を観察した。

免疫電気泳動は、Sakurabayashi¹³¹⁾ の方法に拠って行なった。まず、26 x 76 mm のスライドガラスを、100 % エタノール、次に、100 % エタノール：エチルエーテル (1 : 1) 混合液で順次洗浄した。PBS に溶かした 0.5 % の寒天 (ベリニガー、精製寒天) 溶液、2.5 ml をスライドガラス上に均一に流し込み、厚さ 1 mm の平板ゲルを作製した。その平板

ゲルの中心に、幅 2 mm、長さ 40 mm の溝を切り、溝の中心部の左右に、溝から 5 mm の距離をおき直径 3 mm の抗原注入用の穴を打ちぬき、スポイトで穴の中のゲルを取り除いた。そして、各穴に 4 μ l の抗原液を注入し、スライドガラス上のゲル、幅 10 mm 当り、1 mA の電流を 1.5 時間流した。この場合、

0.025 M のベロナール緩衝液 (pH 8.0) を通電用溶液として用いた。通電後、ピンセットで、切り込み溝を入れてあり、中央の抗体注入用溝内のゲルを取り除き、その中に 40 μ l の抗レクチン-抗血清を注入し、4 $^{\circ}$ C にて 24 時間静置した後、抗原抗体反応を観察した。

3. 実験結果

(1) ジャガイモ疫病菌菌体を特異的
リガンドとしたアフィニティ
ークロマトグラフィー

塊茎より得られた 75 % 飽和の硫酸塩析分
画の凍結乾燥標品を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH
3.6) に溶かし (100 mg / 100 ml), SE-セルロ
ースカラムクロマトグラフィーを行なうた (Fig. B. 14.)。リシリより抽出した試料は、
溶出塩濃度が 0.4 M の位置に 280 nm の吸
光度をもつ物質の主要なピークが得られた。
男しゃくより抽出した試料は、280 nm の吸
光度をもつピークは、0.2 M の塩濃度で溶
出されていた。それぞれの品種の試料の主ピ
ークの O.D. 280 は、リシリの場合 0.70 で、男
しゃくの場合が 0.62 であつた。

塊茎より抽出した硫酸塩析分画を、菌体成
分によるリガンドと混合した後、得られた

上清部の、SE-セルロースカラ、4クロマトグラフィーを行ない、 280 nm の吸光度をもつ物質の溶出パターンを調べた。リシリ塊茎からの硫酸塩析分画と、疫病菌レーズ1の菌体成分リガンドケルとを混合し、反応のあと得られた上清部のカラ4クロマトグラフィーでは、溶出液の O.D._{280} のピークは、 0.39 M の塩濃度で溶出され、その値は 0.3 であった。レーズ1のアフィニティーリガンドと反応させた前に比べピークの O.D._{280} の値は、 0.4 低下した。この 280 nm の吸光度を示す物質の減少した部分は、菌体リガンドに結合したものと推察された。

上記と同様にして、レーズ0の菌体成分リガンドと反応させた後の、上清部のSE-セルロースカラ4クロマトグラフィーを行なった場合、 280 nm の吸光度をもつ主要ピークの値は、 0.15 となり、菌体リガンドとの反応前より、その吸光度の値で 0.55 低下した。

また、男しやく塊茎の硫酸塩析分画におり

Fig. 13. Comparison of the elution pattern through SE-cellulose column between samples of the tuber homogenate (cultivar Rishiri) and the supernatant which have been obtained after affinity absorption with the specific ligand from race 0 of Phytophthora infestans. The tuber homogenate was dissolved in 0.1 M acetate buffer, pH 3.6 (100 mg/ 100 ml). The supernatant was used after dialyzing against the acetate buffer.

The SE-cellulose was packed into a column (13 x 1.6 cm) equilibrated with the acetate buffer and fractions were collected (6.0 ml), during elution with sodium chloride gradient (---).

a) Tuber homogenates.

b) The supernatant of affinity chromatography.

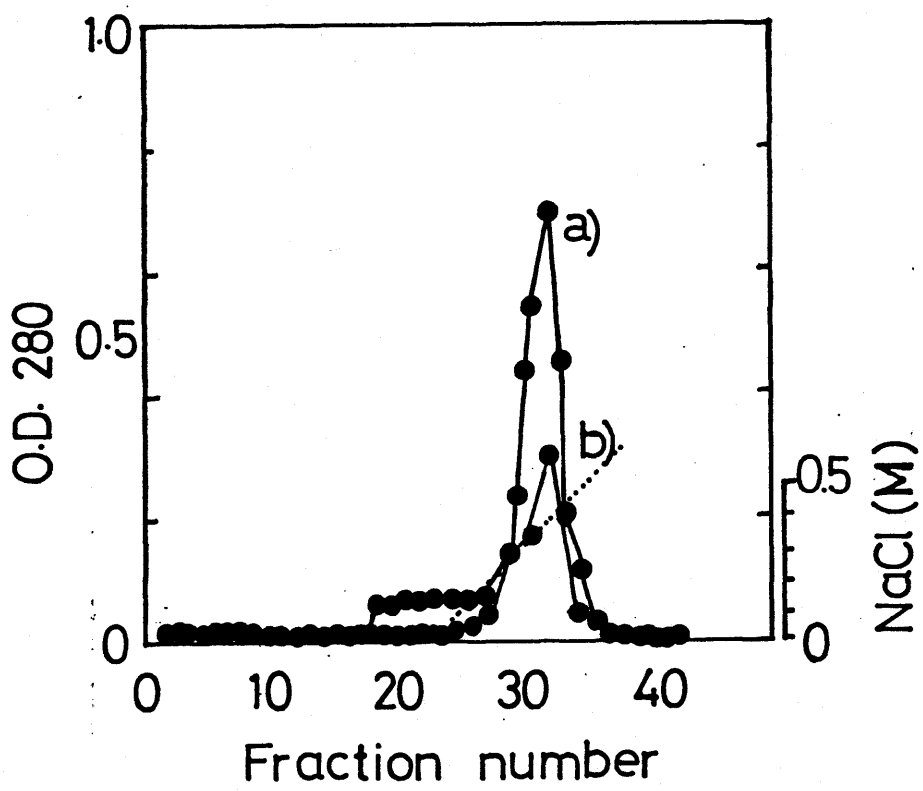
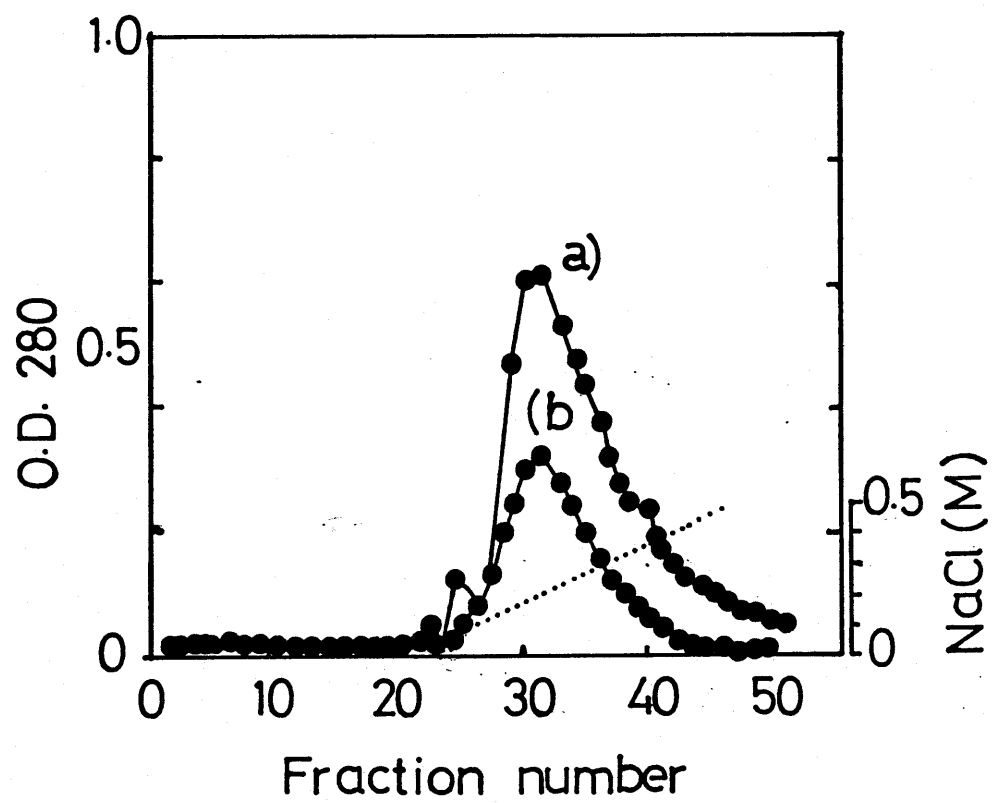


Fig. 14. Comparison of the elution pattern through SE-cellulose column between samples of the tuber homogenates (cultivar Irish Cobbler) and the supernatant which have been obtained after affinity absorption with the specific ligand from race 0 of Phytophthora infestans. The experimental details were the same as those of Fig.

a) tuber homogenates

b) the supernatant of affinity chromatography.



ても、リシリの場合と同様に、菌体成分アフィニイターリガンドへの吸着の有無を調べた。この場合、レース1およびレース0のどさの菌体成分リガンドを硫酸塩析分画と反応させても、反応後の上清部のSE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なうと、280 nmの吸光度で測定したピークは、0.2 Mの塩濃度で溶出され、ピークの値は0.3であった。アフィニイターリガンドへの吸着以前の試料より、ピークのO.D. 280は、0.32低下した(Fig. 14.)。

次に、菌体成分アフィニイターリガンドに吸着してゐる宿主成分を100 mlの0.1 Mの酢酸で溶出した。リシリ由来の硫酸塩析分画を、レース1の菌体成分リガンドでアフィニイタークロマトグラフィーを行なう場合も、レース0の菌体成分リガンドを用いた場合も、この酢酸溶出液のO.D. 280値は、有意な差が認められなかった。

男しやく由来の硫酸塩析分画を供試した場

合においても、リシリの場合と同様に、両レ
ースの菌体成分リガントから、等量の結合性
成分が溶出された。

(2) ジャガイモ・レクチンの抽出と 純化

材料と方法に述べたようにして得た、冷ア
セトン処理に由る沈澱物を、150 ml の 0.1
M 酢酸緩衝液に溶出し、この溶液の SE-セ
ルロースカラムクロマトグラフィ-を行なっ
た。

リシリより抽出したアセトン不溶性分画の
SE-セルロースカラムによる溶出パターン
を Fig. 15. に示す。収穫後1ヶ月以内の塊茎
を用いた場合、溶出塩濃度が、0.12 M と 0.17
M で又つのピークが見られた。それぞれのピ
ークの O.D. 280 値は、0.8 と 1.4 であった。分
画 36 番では、1 : 32768 の赤血球凝集力価を

示し、カ価を $O.D._{280}$ 値で除した相対的カ価 (R_p) は、23700 であつた。分画 30 番では、 $R_p = 400$ 、分画 33 番では $R_p = 1300$ 、分画 43 番では $R_p = 1800$ であつた。しかし、収穫後 6 ヶ月間 $4^\circ C$ で貯蔵されてゐた塊茎から、同様の手順で抽出したアセトン不溶性成分の SE - セルロースカラムクロマトグラフィーを行なうと、そのピークは、塩濃度が $0.12 M$ で溶出されており、 $O.D._{280}$ 値も 0.1 と低下してゐた。

男しゃく塊茎より得られたアセトン不溶性成分の SE - セルロースカラムクロマトグラムは、Fig. 16. に示す。収穫直後の塊茎を用いた場合には、男しゃく塊茎の場合も、 $0.18 M$ の塩濃度でピークが溶出され、その $O.D._{280}$ 値は、 1.3 であつた。Marinichovich⁽¹⁰²⁾ は、

Solanum tuberosum より得られたアセトン不溶性分画の、SE - セルロースカラムクロマトグラフィーを行ない、そのピークの $O.D._{280}$ 値は 1.1 であり、ピークの方画の R_p を

Fig. 15. Comparison of the elution pattern of tuber homogenate from cultivar Rishiri (R_1) through SE-cellulose column. The tubers were used for the experiments within a month after harvest (a) or 6 months after harvest (b). The SE-cellulose was packed into a column (13 x 1.6) equilibrated with 0.1 M acetate buffer, pH 3.6, and fractions were collected (6.1 ml), during elution with a sodium chloride gradient (---).

●, Absorbance at 280 nm.

Rp, Hemagglutination titre/ O.-D. $_{280}$.

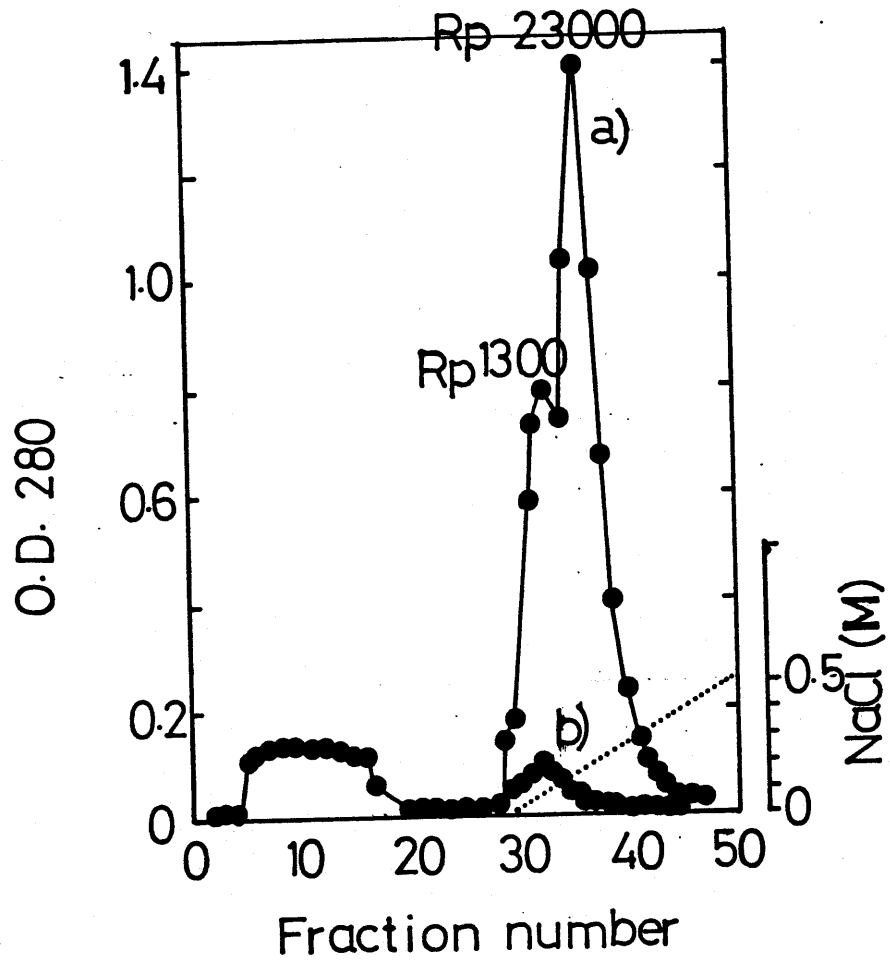
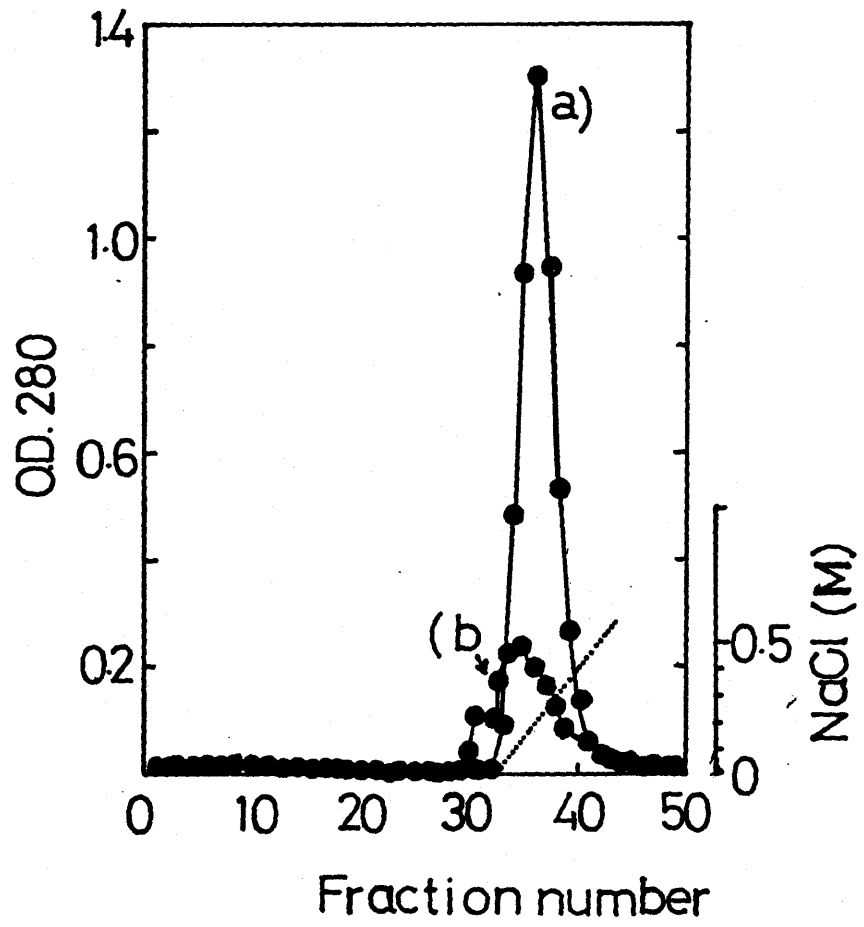


Fig. 16. Comparison of the elution pattern of tuber homogenate from cultivar Irish Cobbler (r) through SE-cellulose column. The tubers were used for the experiments within a month after harvest (a) or 6 months after harvest (b). The experimental details were stated in Fig. 15.

●, Absorbance at 280 nm.



10000 と報告してゐる。男しやく塊茎においても、6ヶ月貯蔵した塊茎のアセトン不溶性分画のSE-セルロースカラムクロマトグラフィ-を行なうと、そのピークは、0.12 Mの塩濃度で溶出され、O.D.₂₈₀の値は0.26であつた (Fig. 16.)。

次に、両品種の収穫直後の塊茎を用いたSE-セルロースカラムクロマトグラフィ-において、O.D.₂₈₀の値で最大値を示す分画の、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、その蛋白質成分の数を調べた。

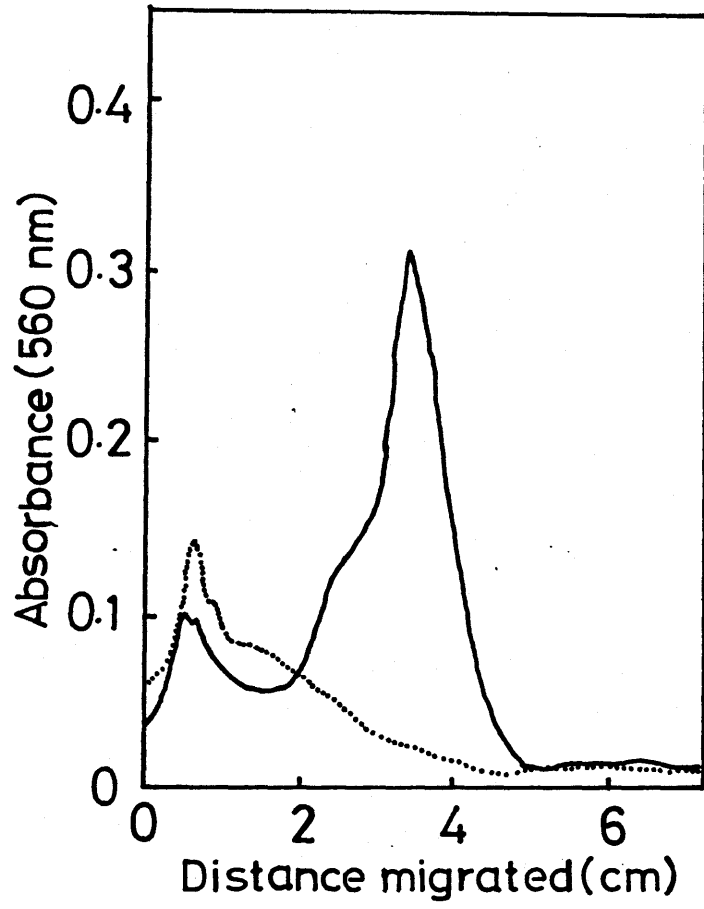
リニリより得られた、セルロースカラムクロマトグラフィ-におけるO.D.₂₈₀値の最大ピークに含まれてゐる蛋白質成分は、数本のバンドを形成した (Fig. 17.)。男しやく塊茎由来のそのピーク分画の場合にも、数種の蛋白質成分が検出された (Fig. 17.)。両品種の各バンドの中で1成分のバンドだけ、その相対的移動度が一致した。

SE-セルロースカラムクロマトグラフィ-

Fig. 17. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the crude lectin samples of potato tuber obtained after precipitation with acetone. The gels contain 30 μ g of the samples which have been incubated in the buffer of Weber and Osborn¹⁶⁹⁾ containing 1% SDS and 1% β -mercaptoethanol at 100 C for 2 min. Electrophoresis time was approximately 4 hr at 8 mamp/gel.

—, potato cultivar Irish Cobbler (r).

--, potato cultivar Rishiri (R₁).



一によつて溶出された分画のうち、赤血球凝集力価の高い分画を集め、8M尿素存在下でPM-30メンブレンによる限外濾過を行ない、その内液を回収した。得られた高分子分画を透析し、尿素を取り除いたあと、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、存在するレクチンの純度を検討した。この高分子分画中には、リシリ由来のものも、男しゃく由来のものも、主成分として等しい分子量をもつ蛋白質一成分が認められた (Fig. 18.)。

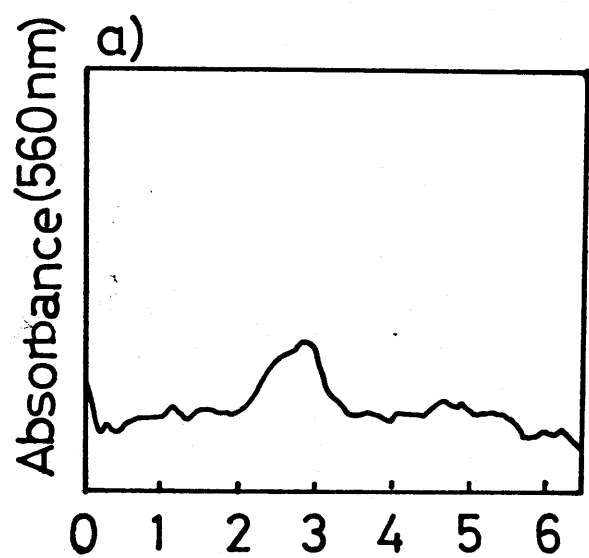
次に、この分子が糖蛋白質であるのかどうか、次のように検討した。

二本の同一試料の、電気泳動後のディスクゲルを、一方はクマジーブリリアントブルーで染色し、他方はPAS染色を行ない、それぞれのバンドのゲル上の位置が、一致するかどうか調べた。この結果、リシリ由来の純化成分も、男しゃく由来の純化成分も、それぞれのバンドの形成位置が、ゲル上で一致した (Fig. 18.)。したがって、それぞれの純化成

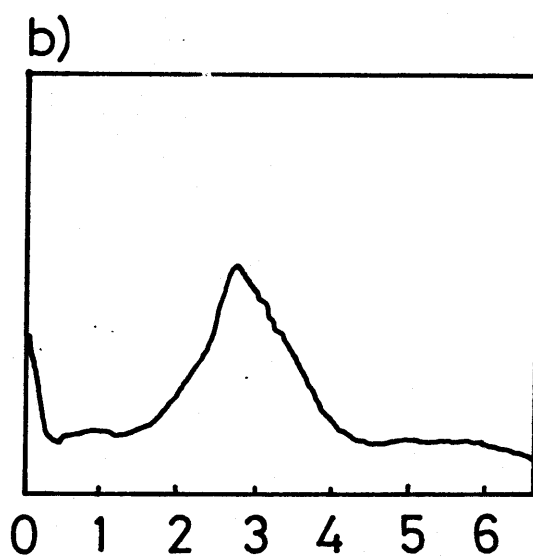
Fig. 18. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified potato lectin from cultivar Rishiri (R_1). The gel contains 40 μ g purified lectin which have been incubated in the buffer of Weber and Osborn⁽¹⁶⁹⁾ 2 min at 100 C. Electrophoresis time was approximately 4 hr at 8 mamp/gel. The densities of protein bands on the stained gel were determined by a densitometer (Jois).

(a) bands stained with coomassie brilliant blue.

(b) bands stained with PAS.



Distance moved (cm)



分の糖蛋白質であることを判明した。

次に、この限外濾過によって得られた濾過器内液中の純化成分に、赤血球凝集活性が存在するかどうかを検討した。これら又品種から抽出された、純化された糖蛋白質成分は、赤血球凝集活性をもち、レクチンであると判明した (Plate III. IV.)。

(3) ジャガイモ・レクチンおよび疫病菌菌体結合性蛋白質の免疫学的検討

塊茎よりジャガイモ・レクチンを抽出し、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンを調べた場合には、抵抗性品種および罹病性品種間で差がなかった (本章, 3, (2))。

次に、抗原性の違いがあるかどうかを検討した。両品種ジャガイモ・レクチンを抗原とした抗血清を作製し、二重拡散法による抗

原一抗体のバンド形成を比較観察した。

この結果、リシリ・レクチンと、男しやく・レクチンは、スパーを形成せずにそれぞれ抗血清と沈降バンドを形成した。これらの沈降バンドは、兩種レクチンで等しい位置で形成され、一本のバンドとして表われた (Plate V)。

これらの結果から、リシリ・レクチンと男しやく・レクチンの抗原性等しいことが示唆された。

さらに、免疫電気泳動により、二品種レクチンの抗原数の比較を行なった。この二種のジャガイモ・レクチンは、スライドのゲル上で電気泳動を行なったあと、抗血清と反応させると、陰極側に二本の沈降バンドを形成した (Plate VI)。これらの、抗血清との反応のバンドの形状は、兩種レクチンで差位が認められず、抗原数も同数であることが判明した。

次に、本章、又、(1)に述べたようにして得

Plate. III.

Rabbit red blood cells after incubation for 1 hr with 10 μ g of potato lectin of cultivar Rishiri per milliliter, 1), or distilled water, 2). (x 450).

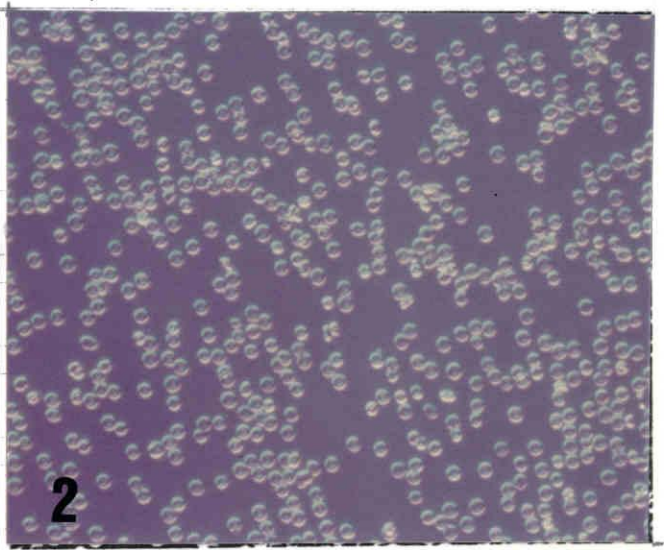
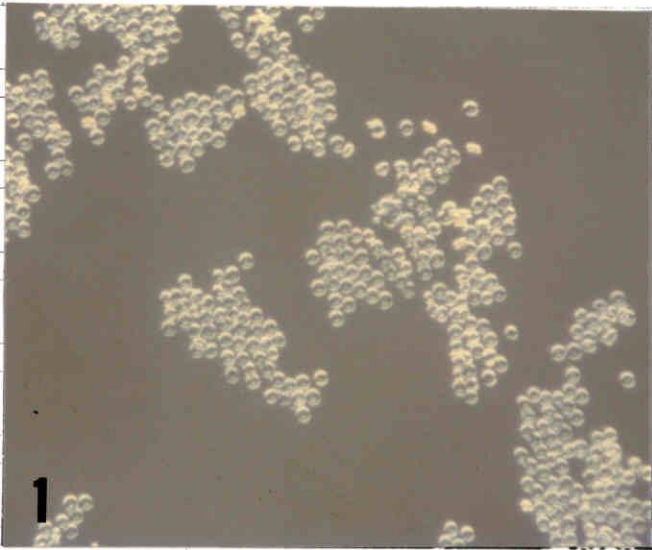
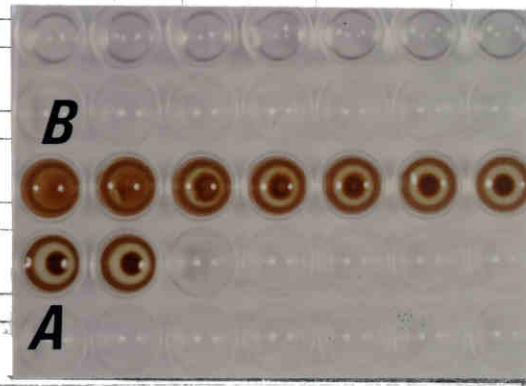


Plate. **IV**.

Agglutination assay using rabbit red blood cells. Control wells showed the precipitation of the cells in the center of the well(A). In contrast, lectin caused agglutination of the cells without precipitation (B).



た疫病菌菌体表面に結合する塊茎由来の蛋白質成分とジャガイモ・レクチンの、電気泳動的、および、免疫学的性質について比較を行なつた。

アフィニティークロマトグラフィーによつて得られた菌体結合性塊茎成分と、2品種のジャガイモ・レクチンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンを見た場合、リシリ・レクチンと、男しゃく・レクチンは、それぞれ1本のバンドを示した (Plate VIII)。

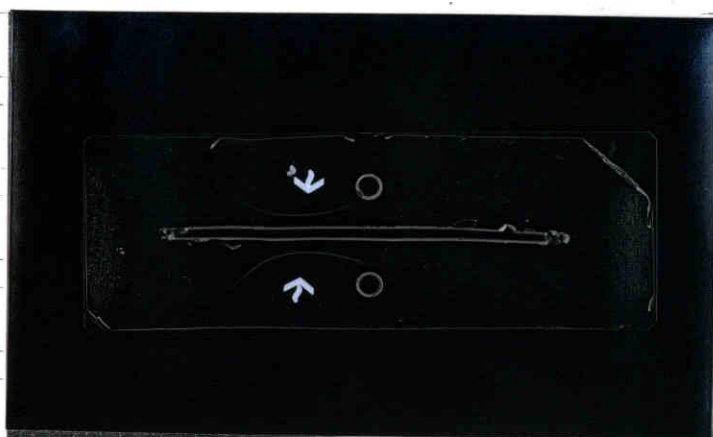
リシリより抽出した塩析成分から、レース0およびレース1の菌体成分リガンドによる、アフィニティークロマトグラフィーによつて抽出された成分も、おのおの1本のバンドを形成することから示された。さらに、男しゃく由来の塩析成分から、レース0およびレース1の菌体成分を用いたアフィニティークロマトグラフィーによつて抽出した成分も、同じく、おのおの1本のバンドを形成した。また、分子量測定のために、マーカ-蛋白質

Plate V.

Serological reaction of potato lectins from cultivars
Rishiri (1) and Irish Cobbler (2) with antiserum to
the Irish Cobbler-lectin (center well).



Plate VI Immunelectrophoresis of purified potato lectin of cultivars Rishiri (R1) and Irish Cobbler (r). The purified lectins (4 μ l) were added to each well. After electrophoresis (as discribed in the text), immune IgG fraction against cv. Irish Cobbler-lectin was added to the center through and allowed to diffuse for 48 hr at 4 C. Note that the same diffuse precipitin band (arrow) form in each side.



として、次の蛋白質を泳動した。高分子のものから順番に、その分子量を示すと、ホスホリラーゼ b: 94000, アルブミン: 67000, オホアルブミン: 43000, カルホニック・アンヒドラーゼ: 30000, トリプシンインヒビター: 20100, α -ラクトアルブミン: 14400 であった。これらのマーカー蛋白質を標準にして求めた、疫病菌菌体結合性蛋白質とジャガイモ・レクチンの分子量は、約 20000 と算出された (Fig. 19)。

次に、二重拡散法によつて、ジャガイモ・レクチン抗血清と、菌体結合性蛋白質の免疫学的反応を観察した。その結果、菌体結合性蛋白質は、リシリおよび男しゃく由来のものでも、レクチン抗血清と反応し、沈降線を形成した (Plate VIII)。

Plate VII.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of hyphal wall surface binding proteins (HWBP) isolated from potato tuber homogenates by affinity chromatography.

Gel 1; HWBP from cultivar Rishiri by using the affinity absorbent of race 0.

Gel 2; HWBP from cultivar Rishiri by using the affinity absorbent of race 1.

Gel 3; HWBP from cultivar Irish Cobbler by using the affinity absorbent of race 1.

Gel 4; HWBP from cultivar Irish Cobbler by using the affinity absorbent of race 0.

Gel 5; Irish Cobbler-lectin.

Gel 6; Rishiri-lectin.

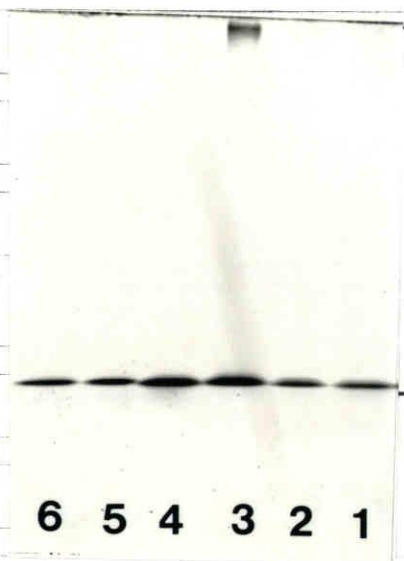


Fig. 19. Estimation of molecular weight of the hyphal wall surface binding protein of potato tuber. Semilog plot of molecular weight against distance of migration relative to bromphenol blue is indicated.

1; phosphorylase b (94000), 2; albumin (67000), 3; ovalbumin (43000)
4; carbonic anhydrase (30000), 5; trypsin inhibitor (20100),
6; hyphal wall surface binding protein, 7; α -lactalbumin (14400).

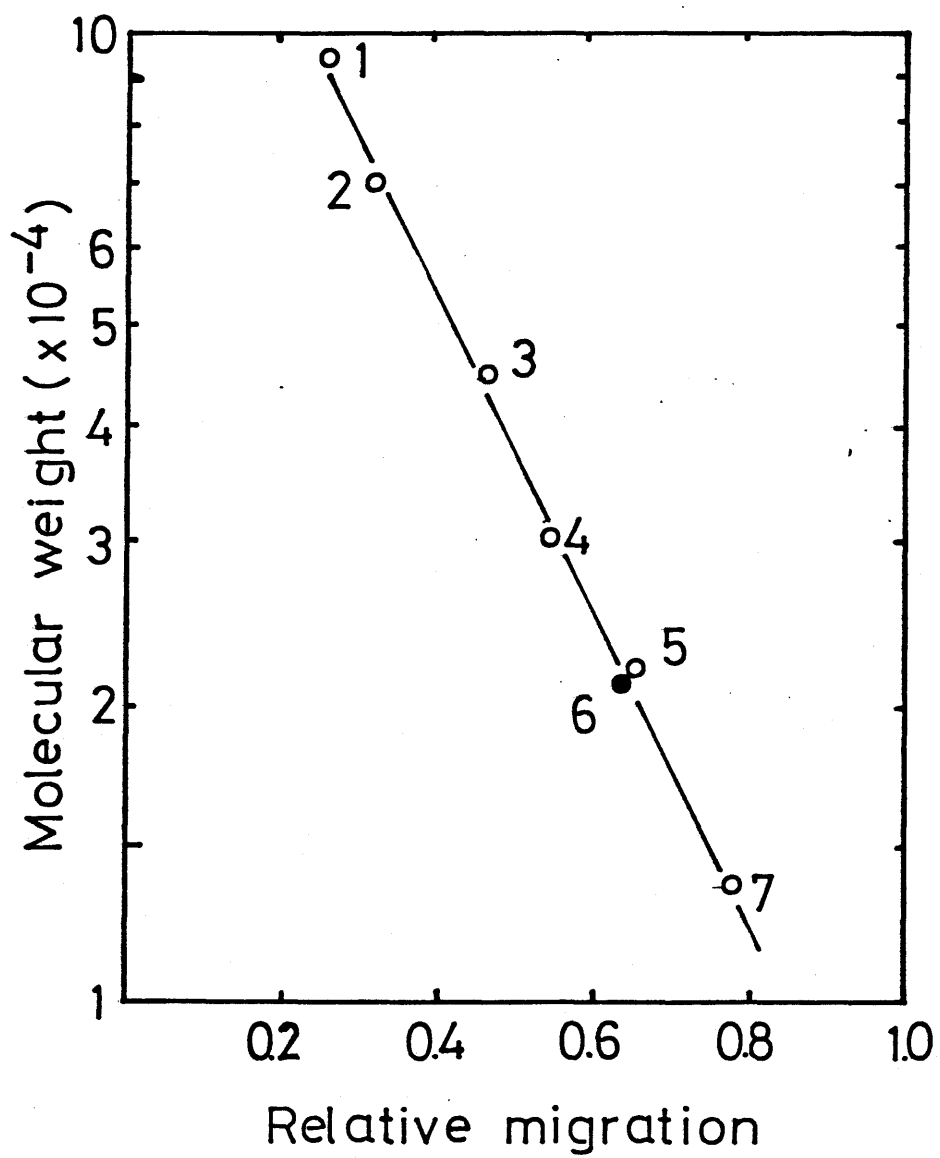


Plate VIII.

A) Serological reaction of hyphal wall surface binding protein (HWBP) with antiserum to Rishiri-lectin (center well).

1) HWBP isolated from cultivar Irish Cobbler by using the absorbent of race 1 (compatible).

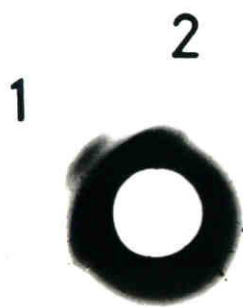
2) Non immune sera.

B) Serological reaction of HWBP with antiserum to Rishiri-lectin (center well).

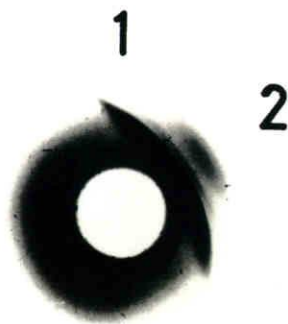
1) Non immune sera.

2) HWBP isolated from cultivar Rishiri by using the absorbent of race 0 (incompatible).

A



B



4. 考察

ジャガイモ疫病では、感染初期に、非親和性菌、親和性菌ともに、それらの侵入菌系が宿主細胞膜に結合した様相が観察されて¹¹⁾いる。そこで、本章では、疫病菌菌系と結合する成分を、塊茎組織から抽出を試みた。また、そのような成分の、抵抗性品種および罹病性品種間における異同を検討した。

これまでの研究報告は、疫病菌感染初期の最も早い時期に、すでに親和性あるいは非親和性の識別が存在している可能性を示唆しており、上記の宿主と病原菌の結合反応の分子的機構を明らかにすることから、過敏反応の機構解明のために必要不可欠であると考へられる。

そのため、本章では疫病菌の培養菌体をそのままゲルタールアルデヒドで固定し、それをアフィニティークロマトグラフィー用のリガンドとして用い、塊茎細胞より菌体結合

性蛋白質成分を抽出した。

その結果、緩衝化食塩可溶性の硫酸塩析分画から、抵抗性品種、罹病性品種とともに、

SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動において等しい分子量を示す成分が、一成分だけ抽出された (Plate VIII)。さらに、この菌体結合性成分と、ジャガイモ・レクチン抗血清との二重拡散法による結果から、ジャガイモ・レクチンが菌体結合性蛋白質の主成分であることが判明した (Plate VIII)。

また、抵抗性品種、罹病性品種より抽出されたそれぞれのレクチンの間で、抗原活性および抗原数には差異がないうことが、二重拡散法 (Plate V)、および免疫電気泳動 (Plate VI) によって確認された。

非親和性あるいは親和性の宿主と病原菌との組み合わせから等しく宿主成分が、菌体結合性成分として抽出されたことは、in vivo における宿主細胞膜と疫病菌との結合が、非親和性、親和性の両方の組み合わせにおいて、

ともに起こることを¹⁸⁹⁾と一致する。

近年、植物レクチンが、宿主-寄生菌の感染成立の特異性を決定して見らるる例が、細菌と植物の系で多数報告されて^{29-32, 49, 136-139)}いる。例之は、Dazzo & Hubbell³⁰⁾

は、根粒菌である Rhizobium trifolii の中で、病原性の系統は根粒を形成できな^ら系統の菌よりも、クローバーの根の抽出物によって強く凝集されると報告した。彼らは、さらに、R. trifolii とクローバーの根の両方の表面に、共通抗原が存在することを確認し、根の多価の結合基をもつレクチンによって、菌と根の表面を架橋せしめ感染が成立するとした。

Sequeira & Graham¹³⁹⁾ は、グラム陰性菌である Pseudomonas solanacearum を 89 系統用い、その中でジャガイモに非病原性の 34 系統は、ジャガイモ・レクチンによって凝集され、病原性の 55 系統はレクチンによっても凝集せしめらるると報告した。

糸状菌病害においては、Fusarium 菌の分生

胞子也、Ceratocystis 菌の分生胞子が異なる、右ハ
フラン特異性をもつ各種レクチンによつて凝
集すること外知られてゐる^{77, 79-82)}。

しかし左から、高等植物の病害抵抗性にお
けるレクチンの生理学的な役割については、
これまで全く不明であると言へる。本章にお
ける、病原菌結合性蛋白質：ジャガイモ・レ
クチンの抵抗性反応における役割については
次章で検討する。

第四章

宿主-病原菌の相互作用に おけるレクチンの役割

1. 序論

ジャガイモ疫病菌感染初期現象の光学顕微鏡観察によつて、非親和性菌および親和性菌の糞入菌糸と宿主細胞膜とが結合してゐることを明らかにされてゐる¹¹¹⁾。この結合は、また、ジャガイモ・レクチンのハポランであるキトビオースによつて阻害され、同時にキトビオースは、非親和性菌感染により誘起される速やかな細胞死を抑制することから観察されてゐる¹¹²⁾。そして、キトビオースは、親和性菌の感染に対する宿主細胞の反応には影響しなかつた。

これらのことから、宿主細胞と病原菌表面

の感染初期の結合反応は、非親和性菌感染の場合に過敏細胞死が起こるための必要条件であると推察される。

筆者は、この結合反応の機作を説明することが、宿主細胞の非親和性菌認識反応を理解する上で重要であると考之た。そこで、前章で、その結合反応に関与すると推定される疫病菌菌体結合性蛋白質を、塊茎より抽出した。その結果、その成分がジャガイモ・レクチンであると同定した。

最近、多くの生物学的な認識現象において、多糖類外、蛋白質や核酸と同様に、その情報も担っておりることが知られてきた^{89, 140, 141}。特に、多糖類と蛋白質の特異的な相互作用が注目されてきた^{2, 89, 115-119}。

このような糖分子と特異的に作用する蛋白質あるいは糖蛋白質は、現在多数報告されておき^{4, 5, 20, 29-32, 45, 46, 95, 98, 102, 103}。その様な物質のうち赤血球凝集活性をもつものは、レクチン (lectin) あるいはフィトヘム

アケルチニン (phytohemagglutinin) と呼ばれて
 いる (89, 95, 98, 140, 141)。レクチン分子の最も特
 徴的な性質は、細胞表面の複合糖質を介して
 細胞表面に結合することである (141)。レクチ
 ンは一般的に、その分子内に特異的な糖質に
 対する多価の結合基を有しており、赤血球は
 かりでなく多くの種類の細胞を凝集すること
 が知られており、また、レクチンによる赤血
 球 (67, 95, 98, 141)、細菌 (29-32, 45, 49, 106-139)、植物
 プロトプラスト (95) およびリンパ球 (67, 168) 左
 心の凝集は、単糖セオリゴ糖によつて拮抗的
 に、かつ、効果的に阻害されること知られて
 いる。このようなハフテン効果は、レクチ
 ンによる特異的な凝集あるいは結合反応と、
 非特異的な反応とを区別するのに有効である。
 本章では、宿主のジャガイモ・レクチンと
 疫病菌菌糸表面、あるいは、菌体壁成分との
 相互反応、そして、菌体壁成分と宿主プロト
 プラストの相互反応におけるハフテン効果の
 有無、さらに、抵抗性および罹病性品種間の

レクチンの性質を検討し、宿主-寄生菌の相互作用におけるレクチンの役割について検討した。

2. 材料と方法

(1) 発芽被のう胞子の調製

ジャガイモ疫病菌被のう胞子の整一的な発芽は、Doke & Tomiyama³⁸⁾に準じた。塊茎スライス上に培養した菌体より、遊走子のうをとり、 $2 \times 10^{-4} M$ $CaCl_2$ 溶液中で間接発芽させ、遊走子を得、上記 $CaCl_2$ 溶液で 1.0×10^6 個/ml の遊走子濃度に調整し、110回/分、 $23^\circ C$ で1.5時間振とうした。この方法では、約80-100%の遊走子が被のう化し、発芽した。発芽管長は、30-50 μm であつた。発芽胞子を、冷水で洗淨す、遠心分離による沈澱法を

3 回行ない、実験に供試した。

(2) レクチンによる発芽細胞の凝集 の凝集

発芽細胞溶液 1.25 ml を 15 ml のバイアルに入れ、その中に、0.2 ml の各種濃度のジャガイモ・レクチンを加えた。対照区に、0.2 ml の蒸留水を加えた。18°C のもとでバイアルを 110 回/分で 15 分間振とうした。このあと 0.4 ml の反応液をゴマゴメセペットで取り、スライドガラスへのせ、発芽細胞の凝集度を光学顕微鏡下で観察した。

ハフテン効果は、次のようにして検定した。発芽細胞の濁液 1.35 ml と、0.2 ml の各種濃度のハフテン溶液、あるいは対照として蒸留水をバイアル中で混合し、0.15 ml のレクチン溶液を加えた。そして、バイアルを 110 回/分で、15 分間振とうした。

凝集度は、0から4までの5段階で、相対値で示した (plate IX)。すなわち、0; 凝集なし。1; 最低度の凝集、発芽胞子が1個ずつの遊離したものも多数ある。2; 小さな数個の発芽胞子塊が見られる。3; 発芽胞子塊が多数みられるが、対に左、右もの凝集してはいないものも若干存在する。4; ほとんど全ての発芽胞子が大きな凝集塊を形成する。

観察は、各バイアルごとに数回行われ、実験は、4回以上繰り返した。

(2) ジャガイモ疫病菌菌体壁成分の抽出

ジャガイモ疫病菌のレーソのおよびレーソ1より菌体壁成分を抽出した。

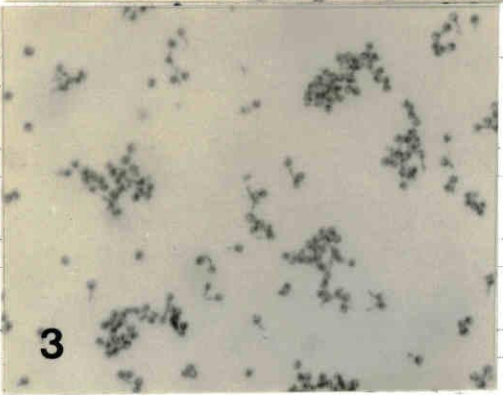
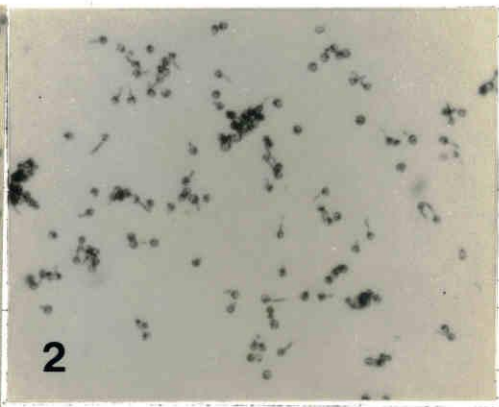
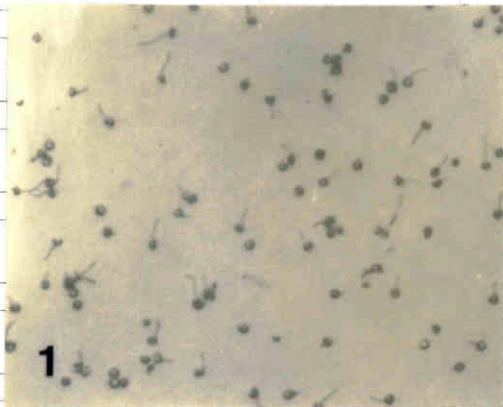
ライ麦寒天培地上に形成されたコロニーを接種源とし、200 ml のフラスコ中で25 ml のライ麦液体培地にて10-13日間、18°Cで静

Plate IX.

The agglutination of germinated cystospores of Phytophthora infestans obtained after incubation with potato lectin.

Agglutination was estimated according to the degree divided into 5 classes ranging from 0 to 4. The ranges of 0, 2 and 3 were indicated for respective picture. x 150.

1. agglutination 0. 2. agglutination 2. 3. agglutination 3.



置培養した²²⁾。液体培地には、サッカロース (20g/l)、イーストエキス (2g/l)、50gのライムギ種子からの抽出物/l を含んでゐる。このようにして得られた菌体から、Lisker & Kucí⁹⁹⁾, Kucí et al.⁸⁶⁾ の方法に従って菌体壁成分を抽出した。

培養菌体を蒸留水で洗淨し、ブフポートで吸引脱水した。このとき新鮮重を計り、-30°Cに貯蔵した。凍結菌体を0.05 M 酢酸緩衝液 (5 ml/g fr wt.)、pH 4.5、とともに磨碎し、4°C以下で20分間超音波処理した後、この溶液を20000 × g、30分間の遠心分離にかけた。ペレットを再度酢酸緩衝液で溶出し、遠心分離をくり返した。このペレットを、0.1 M ホウ酸緩衝液、pH 8.8、に溶かし (5 ml/g fr wt.)、120°Cで5分間、高温処理した。冷却後20000 × g、30分、遠心分離にかけ、上清を別に取り、ペレットを再びホウ酸緩衝液に溶かし、前記と同じ操作をくり返し、再び上清を得た。1回めと、2回めの上清部を合

あせて、蒸留水に対して24時間透析した。非透析分画を分液漏斗中で次のように処理した。

等量のジエチル・エーテルを加えて振とうし、エーテル層中のゲル化した分画を得た後、残った水層に再び等量のエーテルを加えて抽出した。2回分のエーテル層を合わせ、少量の蒸留水を加えて分ろし、減圧下でエーテルを除去した。できたミロツプを凍結乾燥した。この乾燥粉末を、疫病菌菌体壁成分として実験に供試した。

(4) FITC-レクチンと発芽胞子および菌体壁成分の相互作用

レクチンを、The & Feltkamp¹⁴⁶⁾の方法に準じて蛍光色素 (fluorescein isothiocyanate : FITC) でラベルした。

0.15 M Na_2HPO_4 , pH 9.0, に FITC を 1 mg/l

ml の濃度で溶かし標準溶液を作製した。この溶液 1 ml に 50 mg のレクチンを混合し、室温で攪拌した。この間、0.1 M Na_3PO_4 にて pH を 9.5 に保った。1 時間後、FITC-レクチン混合液を、PBS で平衡化した Bio gel P6 のゲルクロマトグラフィーを行ない、FITC 結合レクチンと未反応の FITC を分離した。FITC-レクチンは、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、これを原液とした。

菌体壁成分は、次のように 7.5% ポリアクリルアミドゲルの中に包埋した。100 mg の菌体壁成分を 10 ml の 4% ゲルタールアルデヒド溶液に加え、4 °C に 1 晩置き固定した。これを遠心分離し、ペレットを 50 mM Tris-HCl 緩衝液で洗浄した。この操作を 3 回くり返した。

固定した菌体壁成分 (50 mg) を 7.5% ポリアクリルアミドゲル (20 ml) に溶解し、ゲルを固めた。そのゲルを、200 ml の 50 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.2、とともに 2 グレン

グーに入れ、小さな破片と存すまで、10秒間の攪拌をくり返した。

このゲル小片と FITC-レクチンとの反応は次のように行なう。FITC-レクチンは、あとのバックグラウンドの除去が容易なように原液を PBS にて $1/20$ 、あるいは $1/50$ に希釈して用いた。等量の FITC-レクチンとゲル小片を時計皿上で混合し、アルミホイルで包み暗黒下、室温で1時間静置した。このあと、PBS にて1-2回洗浄し、蛍光顕微鏡観察を行なった。発芽胞子も同様の手順で FITC-レクチンと反応させ、観察した。

(5) 供試植物

異なる抵抗性遺伝子を有する Solanum tuberosum と S. demissum との種間雑種を12品種と、r 遺伝子をもつ S. tuberosum の1品種を供試した。それぞれを、同一圃場で栽培

し、収穫後4℃に貯蔵した。供試品種名と、
 それぞれの疫病抵抗性遺伝子を次に記す。リ
 シリ (R₁)、エキジロ (R₁)、96-56 (R₁)、
 1512-C (16) (R₂)、シマケイ 518 (R₃)、ホ
 ッカイ 59 (R₃)、パントランドエース (R₃)、
 シマケイ 520 (R₃)、シレトコ (R₁R₂)、ホ
 ッカイ 53 (R₁R₃)、ホッカイ 43 (R₁R₃)、ホ
 ッカイ 34 (R₄)、男しゃく (r)。

(6) ジャガイモプロトプラストの 調製

直径16 mm、厚さ1 mmの塊茎スライスを
 1 mm幅で切片にした。2gの切片を100 ml
 のフラスコに入れ、0.6 M マニトール (1 mM
 MgCl₂、1 mM CaCl₂、1 mM KH₂PO₄を含む)
 pH 5.5 の溶液でテンポン粒を洗い流した。
 そのあと15 mlの酵素液 [4% セルラーゼ;
 Onozuka R-10, 0.5% マセロザイム; Ono-

znka R-10, 0.6M マニトール, 1 mM $MgCl_2$,
1 mM $CaCl_2$, 1 mM KH_2PO_4 , 0.01% β -XIL
カゴトエタノール (v/v)]. pH 5.5 を加之
24°C で 3.5 時間振とうした (40回/分)。その
後、溶液をナイロンメッシュ (0.2 x 0.2 mm)
で濾過した。濾液を 100 ml ビーカー中で 2 分
間静置し、下部 10 ml を残し、上部液を吸引
除去した。下部液に 0.05 M Tris-HCl 緩衝液を
含む 0.6 M マニトール液を 90 ml 加之、2 分間
静置し上部 90 ml を再び吸引除去した。この操
作を 3 回くり返し、塊茎ゴロトフラス
トを得た。

このようにして得たゴロトフラストの濃度
は、1000 - 2000 個/ml であった。各反応系に
は、約 1000 個/ml の濃度にして用いた。

(7) ジャガイモゴロトフラストの反応
と顕微鏡観察

0.2 ml のプロトプラスト溶液と 0.2 ml の菌体壁成分あるいは糖溶液を 10 ml の試験管中で静かに混合し、20 °C で静置した。一定時間後、スライドガラス上に溶液を全量取り、光学顕微鏡下で観察し、形態異常化あるいは細胞質偏在反応したプロトプラスト（以下反応と呼ぶ）と反応していないものを数えた。このプロトプラストの反応過程を plate XI に示した。反応型のうち原形質の凝集のみ観察されたものを反応型 I、原形質が凝集し、膜が突出していったものを反応型 II とした。反応型 I と II を合わせて反応率を計算した。反応率は次式による。

$$\text{反応率} = \left(\frac{\text{実験区の反応プロトプラスト数}}{\text{実験区的全プロトプラスト数}} - \frac{\text{対照区の反応プロトプラスト数}}{\text{対照区的全プロトプラスト数}} \right) \times 100$$

(8) ジャガイモプロトプラストへの

各種糖類の処理

用いた糖類とその由来は、Table 5. に示した。各種糖類を $0.6 M$ マニトール [$0.05 M$ Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) , $1 mM MgCl_2$, $1 mM CaCl_2$, $1 mM KH_2PO_4$ を含む] に溶かし、 $70^\circ C$ トローストリン濁液に等量を加えた。手で緩やかに攪拌し、 $20^\circ C$ に静置した。

(9) ウサギ赤血球の分離と固定

ニュージーランド白ウサギより、赤血球を分離した。採血した血液を $2000 rpm$ で10分間遠心し、沈澱部を得て、それに PBS を加え、ピペッティングを行ない洗淨した。これを遠心し再び PBS で洗淨した。このあと、PBS にて4%赤血球溶液 (v/v) に調整し、 $1/10$ 容の1%トリフィン溶液 (Difco) を加え、 $36^\circ C$ で1時間攪拌した。トリフィン処理赤血球を、

Table 5.

List of carbohydrate units used and their sources

D-mannitol	Wako Pure Chemical Industries
α -methyl-D-glucoside	Wako Pure Chemical Industries
α -methyl-D-mannoside	Sigma Chemical Corporation
N-acetyl-D-glucosamine	Sigma Chemical Corporation
N,N'-diacetyl-D-chitobiose	Sigma Chemical Corporation
N,N',N''-triacetyl-D- chitotriose	Calbiochem-Behring Corporation

PBS で再び洗淨し、10% 赤血球液に調整した後、最終濃度が1%に作るようにゲルゴールアルデヒドを加え、4°Cで一晩保持した。その後、一度遠心し(2000 rpm)、10分、沈澱部をPBSで洗淨した。この赤血球を0.01% NaN_3 を含むPBSにけん濁し、4% (v/v) に調整し、4°Cに貯蔵した。

(10) ジャガイモ細胞膜分画の抽出

細胞膜分画は、品種リシリ (R₁) より、Sze & Hodges¹⁴⁵⁾ と Leonard et al^{93, 94)} の方法に準じて抽出した。全ての操作は、0-4°C下で行なった。

塊茎スライス(厚さ1 mm、直径18 mm) 30 gを18時間加齢させ、120 mlの磨碎液(25 mM Tris-MES 緩衝液、pH 7.4、0.7 M ショ糖、1 mM EDTA、8 mM β -メルカプトエタノールを含む)を加え、ブレンダーに於

けた。塵砕液を4枚のガーゼで濾過し、その汁液を3400 x g、5分間遠心した。この上清を11000 x g、15分間遠心し、その上清をさらに80000 x gで30分間遠心した。

80000 x gの遠心による沈澱物を塵砕緩衝液にけし濁し、再び80000 x gで遠心分離した。その後、2 mlの2 mM Tris - MES 緩衝液 (pH 7.4)、1 mM $MgCl_2$ を含む16% ショ糖液にけし濁した。この溶液全量を、26 ml のチューブ中に2 mM Tris - MES 緩衝液 (pH 7.0) を溶媒として形成した20、34、45% (w/w) の不連続のショ糖濃度勾配溶液に重層し、日立水平口一ター (RDS - 25) を用い、24000 rpm で3分間遠心した。34 - 45% ショ糖の界面に存在する層をパスツールピペットで抽出し、この分画を細胞膜分画とした。

この分画1 ml に15 ml の2 mM Tris - MES 緩衝液 (pH 7.0) を加之、80000 x gで30分間遠心分離した。得られた沈澱を4 ml の10 mM Tris - MES 緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、

実験に供試した。

(11) ジャガイモ細胞膜分画と発芽被
のう胞子の混合

0.5 ml の細胞膜分画 (10 mM Tris - MES
緩衝液、pH 7.0) と 0.5 ml のジャガイモ・レ
ウキニ溶液 (最終濃度 29 μ g 蛋白質当量/ml)
ありは、0.5 ml の蒸留水を 10 ml 試験管
中で混合した。15分間室温で静置したあと、

0.2 ml の発芽被のう胞子けん濁液 (2×10^6
個/ml) を加之、20°C で 20分間振とうしたあ
と、1000 rpm の遠心分離を行ない、上清を棄
て、沈澱部を電子顕微鏡観察試料とした。

(12) 電子顕微鏡用試料と切片

Spurr¹⁴²⁾ の方法に準じ次のように行なう。

た。試料を2% グルタールアルデヒド (0.05 M. リン酸緩衝液, pH 7.8) に2時間, 2°C にて浸漬し, 蒸留水で5回洗浄した。次に上記リン酸緩衝液にて調製した2% OsO₄ に浸漬し, 二重固定を行なった。固定試料を順次濃度を高めたエタノールに移し, 脱水したあと, 低粘性のエポキシ樹脂に包埋し, 50-60°C で7時間重合させた。この後, Porter-Bloom ウルトラマイクロトーム MT-1を用い, ガラスナイフで切片を作製した。切片をウラン酢酸およびウラン酸鉛にて二重染色し, 日立Hu-12A電子顕微鏡を用い観察した。

3. 実験結果

- (1) レクチンによる発芽後の胞子の凝集

ジャガイモ品種リシリ (R_1) と男しやく (P) の2品種より抽出した、ジャガイモ・レクチンと、タナタマ・レクチン (Concanavalin A; 以下 Con A と略す) を用いて、発芽胞子の凝集実験を行なった。

この結果、リシリ・レクチンに対してレースロおよびレース1,2の発芽胞子は共に、同程度の凝集を示した (Table 6)。レクチン濃度から $9 \mu\text{g}$ 蛋白質相当量/ml 以上では、両レースは共に凝集度3および4であった。このリシリ・レクチンによる発芽胞子の凝集は、ジャガイモ・レクチンの特異的ハプタン、キトビオース (最終濃度 4.8 mM) によつて、両レース共に等しく阻害された (Table 7)。

また、男しやく・レクチンによつても、両レースの発芽胞子は同程度の凝集を示した (Table 8)。

Con A によつても、レース0、レース1,2の発芽胞子は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度から共に凝集し、 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度では、発芽胞子の破

Table 6.

Agglutination of germinated cystospores of race 0 and race 1,2, Phytophthora infestans, by potato lectin ^{a)}

Concentration of Rishiri lectin (μ g protein/ml)	Relative agglutination of <u>P.</u> <u>infestans</u> ^{b)}	
	race 0	race 1,2
0	0	0
1.1	1	1
2.2	1	1
4.5	1	1
9.0	3	3
18.0	4 c)	4 c)
36.0	4 c)	4 c)
72.0	4 c)	4 c)

a) Agglutination experiments were carried out at 23 °C for 17 min in the standard mixture, which was 1.25 ml, containing 0.2 ml of Rishiri lectin.

b) Relative agglutination is defined in Materials and Methods.

c) Spores were damaged by Rishiri lectin.

Table 7.

Effect of N,N'-diacetyl-chitobiose on agglutination of germinated cystospores of race 0 and race 1,2 of Phytophthora infestans by potato lectin

Addition	Relative agglutination of <u>P. infestans</u>	
	race 0	race 1,2
Rishiri lectin	4	4
Rishiri lectin + N,N'-diacetyl-chitobiose	3	3

- a) The standard mixture was 1.35 ml , consisting 0.2 ml water or chitobiose solution (final, 4,8 mM), 0.15 ml Rishiri lectin (18 μ g protein/ml).

Table 8.

Agglutination of germinated cystospores of race 0 and race 1,2 of Phytophthora infestans by Irish Cobbler-lectin^{a)}

Concentration of Irish Cobbler lectin (μg protein/ml)	Relative agglutination of <u>Phytophthora infestans</u> ^{b)}	
	race 0	race 1,2
0	1	1
3	2	2
8	2	2
16	3	3
66	3	3

a) Agglutination experiments were carried out at 23 C for 15 min in the mixture (1.2 ml) containing 0.2 ml of Irish Cobbler-lectin.

b) Relative agglutination is defined in Materials and Methods.

Table 9.

Agglutination of germinated cystospores of race 0 and race 1,2 of Phytophthora infestans by Concanavarin A ^{a)}

Concentration of concanavarin A (μ g/ml)	Relative agglutination of <u>P. infestans</u>	
	race 0	race 1,2
0	1	1
2	2	2
4	3	3
8	3	3
16	lysis ^{b)}	lysis ^{b)}
32	lysis ^{b)}	lysis ^{b)}

a) The standard mixture was 1.25 ml, consisting 0.25 ml concanavarin A.

b) Germinated cystospores were strongly agglutinated, but caused lysis by concanavarin A.

Table 10.
Effect of α -methyl-mannoside and α -methyl-glucoside on the agglutination of germinated cystospores of Phytophthora infestans by concanavarin A^{a)}

Addition	Relative agglutination of	
	race 0	race 1,2
Concanavarin A	4	3
Con A + α -methyl-mannoside	2	1
Con A + α -methyl-glucoside	3	3

a) All incubation suspension contained concanavarin A ($4 \mu\text{g/ml}$) in a final volume of 1.25 ml. Either α -methyl-mannoside ($130 \mu\text{g}$) or α -methyl-glucoside ($130 \mu\text{g}$) was added to the vial prior to the addition of concanavarin A.

壞を引き起こした (Table 9)。この Con A による凝集は、Con A の N プロテンドと認められた 141) α -メチル-D-マニノサイドあるいは α -メチル-D-グルコサイドによって阻害された (Table 10)。この場合、前者の方が後者より強い阻害効果を示した。

(2) 蛍光化レクチンと疫病菌の相互作用

疫病菌の菌糸表面におけるレクチン受容体の存在およびその量的差異を、蛍光色素 (FITC) でラベルした各種レクチンを用いて検討した。

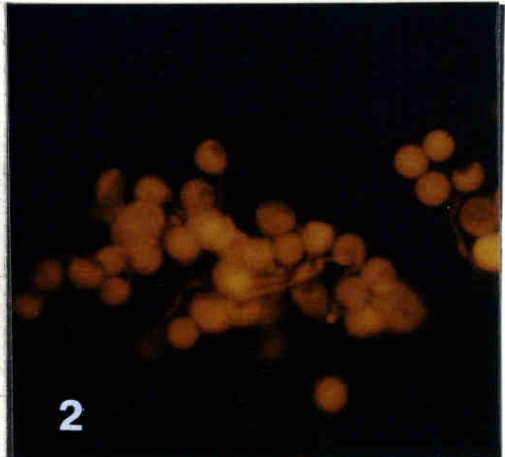
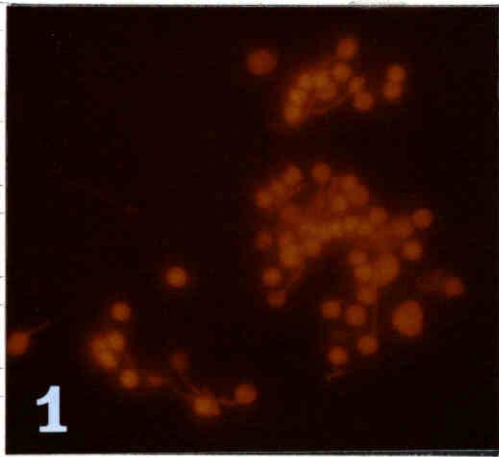
FITC-リシリ・レクチン、および、FITC-男しせく・レクチンと混合したレーズのあられはレーズ1之の発芽胞子表面に蛍光が観察された (Plate Ⅴ)。この場合、発芽管表面と、胞子表面とともに、同程度の蛍光が見られた。

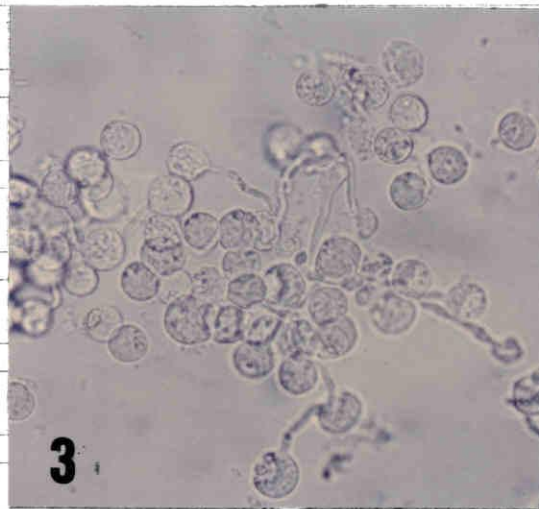
Plate, X.

1) Fluorescence of germinated cystospores of Phytophthora
infestans after staining with fluorescein potato-lectin. X 150.

2) Fluorescence of germinated cystospores of the fungus
after staining with fluorescein wheat germ-lectin. X 200.

3) Light micrograph showing germinated cystospores of
the fungus as a control. X 250.





た。

また、液体培養の菌系（レーズのおよびレーズ1.2）表面も FITC-ジャガイモ・レクチンと反応し、蛍光が観察された。

以上の結果から、レーズのおよびレーズ1.2の発芽管表面、被りの孢子表面、そして菌系表面に、ジャガイモ・レクチンが結合することが判明した。

さらに、FITC-レクチンの菌体表面への結合は、25 mM キトビオースによって阻害され、蛍光度が減少した。

次に、FITC-小麦胚芽レクチンと混合したレーズのおよび、レーズ1.2の発芽孢子は、ジャガイモ・レクチンの場合と同様に、発芽管と孢子表面に蛍光を示した（Plate Ⅴ）。
蛍光の強度には、レーズ間で差が見られなかった。また、この FITC-レクチンを培養菌系と混合しても、その菌系表面に蛍光が観察された。

(3) 蛍光化レクチンと菌体壁成分の
相互作用

FITC-リシリ・レクチンあるいは、FITC-
男しゃく・レクチンと混合した、レース0か
よびレース1.2の菌体壁成分は、いずれの組
み合わせの場合でも蛍光が観察され、FITC-
ジャガイモ・レクチンの菌体壁成分への結合
がみられた。

この兩種FITC-ジャガイモ・レクチンの結
合は、混合液中にありかじめ、50 mMのキ
トビオースを加えておくことにより、阻害さ
れた。

(4) ジャガイモ塊茎組織の過敏感反
応性とジャガイモプロトプラス
トの菌体壁成分に対する反応性

本節では、プロトプラストの菌体壁成分に

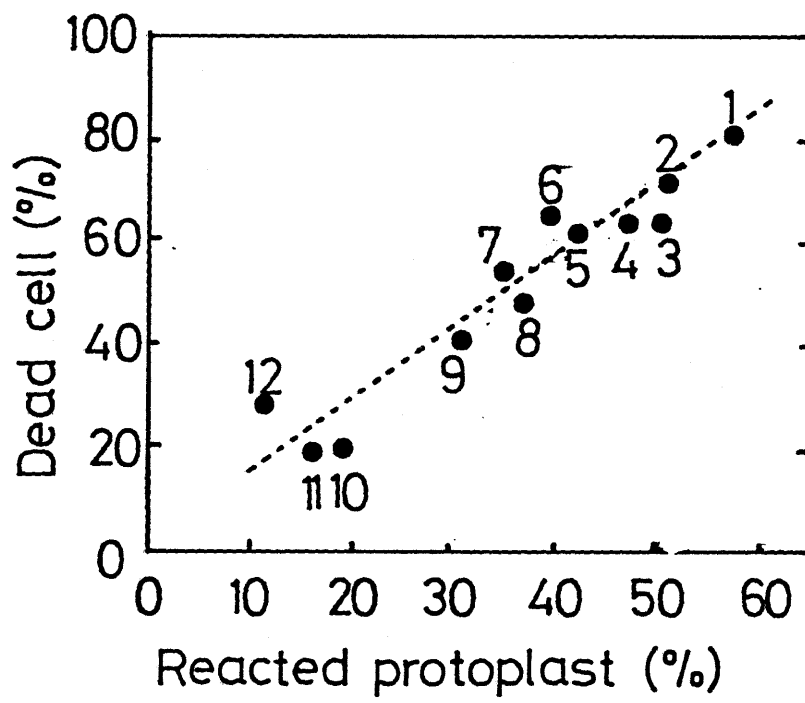
対する反応⁴⁰⁾が、感染を受けた場合の過敏
感反応性と関連があるかどうかを検討した。

12品種の塊茎より調製したプロトプラスト
を、最終濃度が $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の菌体壁成分と混合
し、30分間 23°C で反応させた。

プロトプラストの反応率は、品種によ、て
ずかり、 $10 - 60\%$ という範囲にあった (Fig.
20)。そして、抵抗性の強度が高い品種ほど、
高い反応率を示した。

他方、加齢塊茎組織における各品種の、非
親和性菌感染による、接種6-7時間後の過
敏感細胞死率について調べた。各品種は、そ
れぞれ異なる、細胞死率を示し、 $20 - 80\%$
の範囲にあった。各品種における菌体壁成分
に対するプロトプラストの反応率と、被感染
細胞の過敏感死率との間には、強い相関関係
がみられた ($r = 0.942$)。すなわち、過敏感
死率の高い品種は、プロトプラストの反応性
においても反応率が高い傾向を示した。

Fig. 20. Correlation between rate of dead cells in the first infected cells of aged potato tuber disks inoculated by an incompatible race of Phytophthora infestans and reaction rate of potato tuber protoplasts to hyphal wall components of the fungus (500 µg/ml). 1; Rishiri (R1), 2; Hokkai-53 (R1R3), 3; Shimakei-518 (R3), 4; Hokkai-59 (R3), 5; Yukijiro (R1), 6; Shimakei-520 (R3), 7; Hokkai-34 (R4), 8; Hokkai-43 (R1R3), 9; Pentland Ace (R3), 10; Shiretoko (R1R2), 11; 1512-C(16) (R2), 12; 96-56 (R1).



(5) ハプトニンによる菌体壁成分に対する
フロトプラストの反応の阻
止

本節では、少糖類によつてフロトプラストの反応が抑制されるかどうかを検討した。

ジャカイモ・レクチンのハプトニンであるキトビオースは、50、40、および20 mMで、菌体壁成分によるフロトプラストの反応(Plate VI)を、それぞれ49、38、そして22%阻害した。50 mMのトリキトトリオースも同様に、43%の阻害効果を示した。50 mMのアセキルグルコサミンは、37%の阻害効果を示した。

また、Con Aのハプトニンである α -メキルグルコサイド、 α -メキルマンノサイドは、それぞれ50 mMの濃度で加えた場合、20%と17%の阻害効果を示した。少糖類による阻害効果は、 χ^2 検定により統計学的に有意の差が認められた(Table 6)。

Plate. XI.

1) Protoplasts prepared from potato cultivar Rishiri (R1-gene). They were suspended in 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.6 M mannitol, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ and 1mM KH₂PO₄ (pH 7.4). x 400.

2) Protoplasts reacted with hyphal wall components (250 µg/ml, final concentration) showing reaction type I. Protoplasmic aggregate began to form and resided at a single site of the protoplast. x 400.

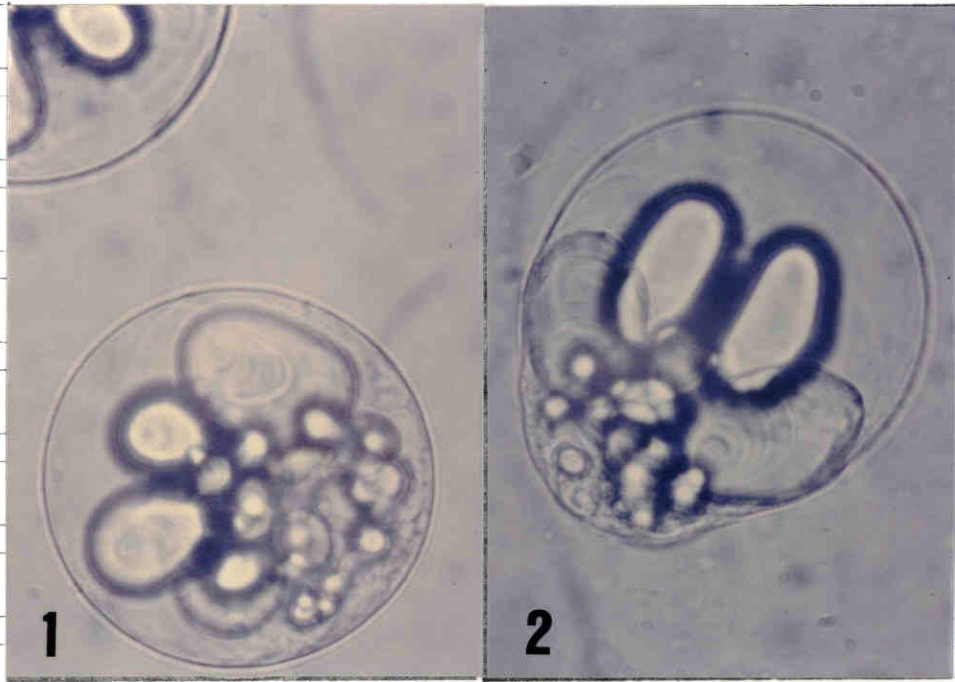


Table 6.

Effect of carbohydrate units on a specific reaction
of potato protoplasts caused by hyphal wall component
of Phytophthora infestans^{a)}

Substance added to the protoplasts solution		% inhibition of protoplast reaction
N-acetyl-D-glucosamine	50 mM	36.8 B ^{b)}
N-acetyl-D-chitobiose	50 mM	48.6 C
	40 mM	38.0 B
	20 mM	22.0 A
N-acetyl-D-chitotriose	50 mM	43.0 D
N-acetyl-D-galactosamine	50 mM	2.7 E
α -methyl-D-glucose	50 mM	20.5 A
α -methyl-D-mannose	50 mM	17.1 A
D-mannose	50 mM	20.1 A

a) 0.2 ml of potato protoplast solution were added with 0.2 ml sugar solution in incubation medium and stand for 15 min at room temperature. Then, 0.4 ml of hyphal wall component solution (final, 250 μ g/ml) of P. infestans were added. After 30 min incubation, microscopic observation was conducted.

b) The same letters following the percentage indicate no significant differences between treatments at the 0.05 level of probability.

(6) ジャガイモポロトプラスト表面
へのウサギ赤血球の結合

ジャガイモ3品種、リシリ (R_1)、ユキジロ (R_1)、男しゃく (r) のポロトプラスト表面に赤血球結合分子、レクチンが露出してゐるかどうかを検討した。

ガルタールアルデヒド固定した赤血球をポロトプラストに混合すると、3品種のいずれのポロトプラスト表面にも赤血球が散在し、結合してゐる様子が観察された (Plate XII)。

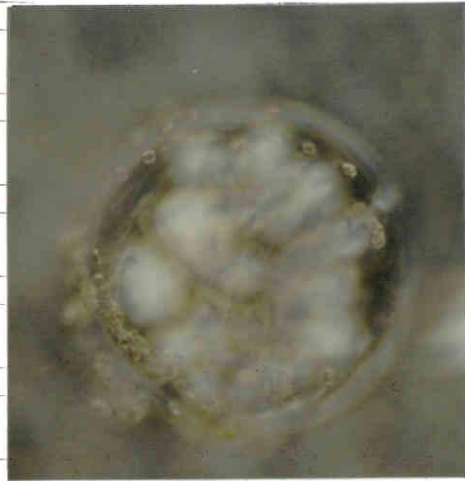
さらに、ポロトプラスト溶液中に 50 mM のキトビオースを予め加えておき、赤血球を加えた場合、上述のようなポロトプラスト膜表面への赤血球の結合は起こらなかった。

(7) ジャガイモ・レクチンによるジャ
ガイモ細胞膜分画と発芽胞子
表面との結合

Plate XII.

Light micrograph showing the binding of fixed rabbit red blood cells to the surface of potato protoplast.

—; 10 μ m.



疫病菌レーズ0. あさりなレーズ1.2の発芽胞子をジャガイモ品種リシリ(R₁)から抽出した細胞膜分画と混合した場合の電子顕微鏡観察を行なった。その結果、その細胞膜小胞は、発芽胞子とは結合してゐなかつた。しかし、リシリ・レクチン(最終濃度29 μ g 蛋白質当量/ml)をこの混合液に加えた場合に、細胞膜小胞が両レーズの疫病菌発芽管および胞子表面に結合してゐる様相が観察された(Plate XIII. 1.)。また、男しやく・レクチンを混合液に加えた場合にも、リシリ・レクチンと同様に、細胞膜小胞が両レーズの発芽管および胞子表面に結合した(Plate XIII. 2.)。

ジャガイモ・レクチン添加によつて起こる、ジャガイモ細胞膜と疫病菌発芽菌糸表面との結合は、ジャガイモ・レクチンの特異的ハフテン、キトビオース(最終濃度4.8 mM)を加へることによつて完全に阻害された(Plate XIII. 3.)。

Plate XIII. 1.

Electron micrograph showing the binding of plasma membrane vesicles of potato cultivar Rishiri to surface cell wall of Phytophthora infestans. Rishiri-lectin was added to the reaction mixture (final concentration 29 $\mu\text{g/ml}$) x 25000.

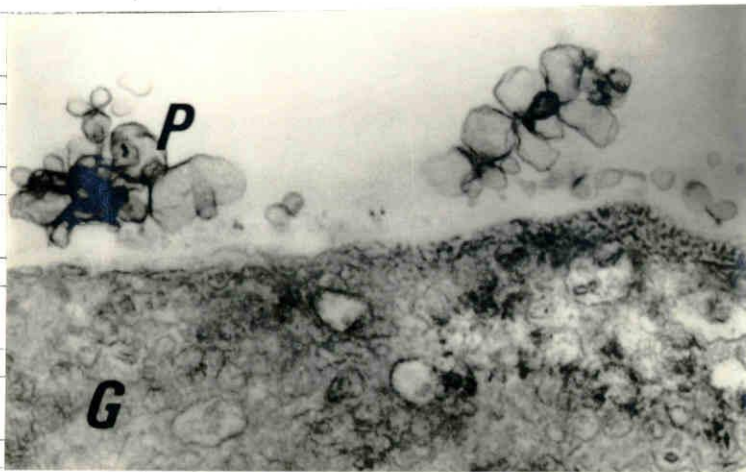


Plate XIII. 2.

Electron micrograph showing the binding of plasma membrane vesicles of potato cultivar Rishiri to the surface cell wall of Phytophthora infestans. Irish Cobbler-lectin was added to the reaction mixture (final concentration 30 $\mu\text{g/ml}$).

PM; potato plasma membrane vesicles

CW; fungal cell wall

x 62500.

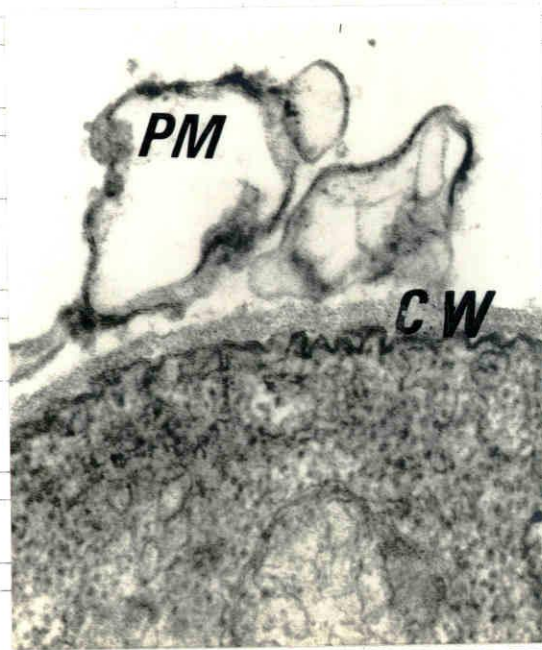


Plate XIII. 3.

Electron micrograph showing no binding of plasma membrane vesicles to the fungal surface cell wall of Phytophthora infestans . N-acetylchitobiose was added in the reaction mixture (final 4.8 mM).

x 12500.

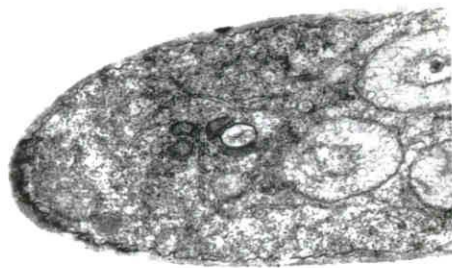
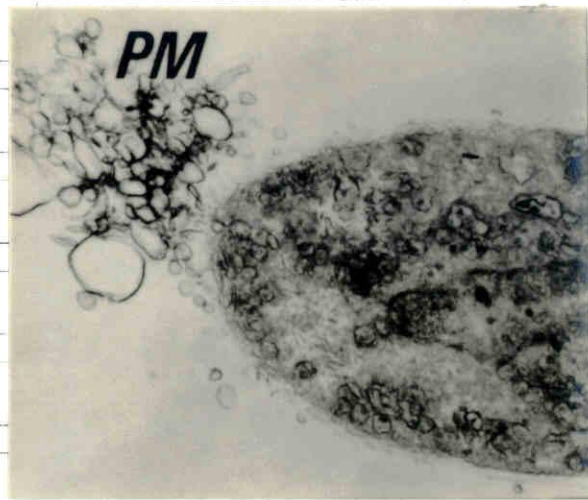


Plate XIII. 4.

Electron micrograph showing the binding of plasma membrane vesicles of potato cultivar Rishiri to the surface cell wall of race 0 of Phytophthora infestans Rishiri-lectin was added to the reaction mixture.

Note that the aggregates of the membrane vesicles was also observed. The final concentration of the lectin was 29 $\mu\text{g/ml}$.

PM; Rishiri plasma membrane vesicles
x 12500.



抽出細胞膜小胞は、それ自体では凝集を示さないが、ジャガイモ・レクチンを溶液中に加えただけの場合には、細胞膜小胞の凝集が観察された (Plate XIII. 4.)。

4. 考察

これまでの研究において、ジャガイモ疫病菌の宿主細胞内への貫入初期に、菌糸が宿主細胞膜と固く結合することから光学および電子顕微鏡観察により明らかたことについて¹¹⁾。

この宿主と病原菌の結合において、ジャガイモ・レクチンが重要な役割をはたすことを本実験結果は、強く示唆した。

供試ジャガイモ品種は、抵抗性遺伝子の有無に係りなく、同じ免疫抗原性をもったジャガイモ・レクチンを有し、それぞれのレクチンは、レース0ありはレース1,2の発芽

胞子を共に強く凝集した (Table 6, 8)。この結果は、FITC-ジャガイモ・レクチンによつて、レース0あるいはレース1, 2の発芽胞子ならびに菌糸表面に、同程度の螢光が観察されたことによつても確認された。

さらに、FITC-小麦胚芽レクチンも、両レースの菌糸を同程度に染色し、Con A は、両レースを同程度に凝集した。また、過敏反応誘導活性をもつ菌体壁成分は、レース0のものも、レース1のものも、FITC-ジャガイモ・レクチンと結合し同程度の螢光が見られた (3, (4))。

したが、つ、これらのことより、疫病菌菌糸細胞壁表面に、ジャガイモ・レクチンと相互作用をする糖構造が存在し、レース0、レース1, 2の間で差が有りものと考へられる。また、菌体壁成分、レクチンに対する結合基は、菌糸表面に露出してゐるものと推察される。

Matsunoto & Osawa (1953) および Allen et al. 等

5) は、Solanum tuberosum レウケニンが、キチンオリゴマー中の、アセチルグルコサミンと相互作用するとした。彼らによれば、小麦胚芽レウケニンも、上記のオリゴ糖と相互作用するとされてゐる。本結果からも、ジャガイモ、レウケニンに対する菌糸の受容部位として、アセチルグルコサミンの糖残基、あるいは関連糖残基の存在が考えられる。

ジャガイモ組織より調製したプロトプラストは、疫病菌菌体壁成分に対して細胞質凝集と偏寄反応を示すことが知りれてゐる^(40, 41)。12品種より調製したプロトプラストの菌体壁成分に対する反応は、各品種の過敏感反応性と強い相関を示した (Fig. 20)。また、プロトプラストの上記反応は、分単位の短時間で起こることから、何らかの認識機構がその細胞表面にあるものと推察される。

本研究では、まず菌体壁成分に対するプロトプラストの反応が、糖の添加によつて拮抗的な阻害を受けようかを調べた (Table. 6)。

その結果、キトビオースの添加濃度が高まるにつれて阻害効果も高まり、最高約50%の阻害効果が観察された。その他のアセチルグルコサミンのオリゴ糖の添加によってもプロトプラストの反応は、約40%阻害された (Table 6.)。

これらの結果と、前述の菌体壁成分と FITC-ジャガイモ・レクチンとの相互作用の結果から、疫病菌菌体壁成分がプロトプラスト表面のジャガイモ・レクチンと結合し、その結果、細胞偏寄反応を引き起こすものと推察される。

Bowles & Kauss¹⁹⁾ は、緑豆 (mung bean) の胚軸より、細胞膜、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体の各分画を超遠心分離により分画・抽出し、各分画にそれぞれレクチン活性のあることを認めただが、それぞれ分画の上清部にもレクチン活性が存在したと報告した。また、レクチン活性は、各分画を超音波処理することによって一層強くなることが認めら

れた。これらのことは、各分画の膜の表面および内部にレクチンが存在することを示唆する。

本章においても、ウサギ赤血球外了品種のジャガイモプロトプラスト表面に結合し、キトビオース添加によつて、その結合を阻害を受けることが示された(3, 16)。

上記の諸結果より、ジャガイモ細胞の過敏感死の始動機構として、筆者は、疫病菌の貫入菌糸がジャガイモ細胞膜上のジャガイモ・レクチンと結合することか、必須の要因であると考へる。

第五章

まとめ

本研究は、ジャガイモ疫病における、宿主細胞の過敏反応性の誘導機構について検討した。さらに、宿主と病原菌の非親和性関係の相互識別の機構に焦点をあて検討を行なった。

ジャガイモ疫病では、宿主の抵抗性の強度と、感染から過敏死に到るまでに要する時間の関係が、各種の品種および各組織を用いて比較研究されている。抵抗性の強い品種あるいは組織ほど、過敏死に要する時間の短くなること知られている^{156, 159)}。したがって、宿主植物の抵抗性の強弱は、感染細胞の過敏死に到るまでの時間によって実験的に知ることが出来る。

しかし、抵抗性品種でも、切断直後の塊茎組織では過敏反応性を有さず、切断後の加

齡によつてその反応性が高まる¹⁵⁸⁾。本研究でも、この過敏感反応性は、塊茎切断後徐々に高まり、切断後約15時間で最高のレベルに達した(第二章、3. (1))。

この原因として、無傷の組織では過敏感反応性は高いが、切断傷害により一時的に消失する可能性も考へられる。しかし、第二章、3. (3)で明らかにしたように、高い反応性をもつた加齢切断組織を再び切断しても、その反応性の低下あるいは消失という事実々、観察されなかった。この結果、無傷組織には本来過敏感反応性が備わつていようものと結論した。

また、第二章、3. (2)では、塊茎組織の加齢の各段階で、蛋白質合成阻害剤を処理すると、一定時間加齢した後、処理時点における組織の過敏感反応性の程度に固定され、その後、反応性の高まりを抑制することも明らかた。このことは、蛋白質合成阻害剤の処理によつて、組織の動的な過敏感反応性

の程度を実験的に知ることができていることを示している。

無傷のジャガイモ葉柄表皮組織は、感染により速やかな過敏細胞死を起こすことから、一見、高度の反応性をもっているかに見える。上記の仮説をもとに、この葉柄表皮組織の過敏反応性について検討した。

その結果、葉柄表皮組織でも、非親和性菌接種前にこの阻害剤を処理すると細胞死は、強く抑制された(第II章 3. (4))。このことは、葉柄組織も塊茎組織と同様に、本来無傷では過敏反応性を有してはならないことを示唆している。したがって、本来反応性を備えていない表皮組織で、非親和性菌の感染を受けた場合に、速やかな細胞死が起こるのは、感染それ自体によって、過敏反応性が誘導されるためであると推察された。

次に、宿主細胞の異物識別の結果として起こさる、細胞死の始動機構について検討を進めた。

これまでに、宿主-病原菌の相互作用の抵抗性の発現機構について、物質レベルでの解析の試みが多数なされて来た (18, 20, 25, 27, 34-44, 49-51, 68-71, 78-82, 96, 97, 99, 123, 136-139, 154-159, 164, 165)。宿主組織の壊死や、ファイトアレキシンの集積を引き起こす。病原菌由来の物質が知られて来了。それは、ポリペプチド²⁷⁾、 β -グルカニン^{6, 86, 99)}、糖蛋白質^{71, 91, 92)}であった。

ジャガイモ疫病において、過敏性細胞死における糖類の影響が調べられて来了。¹¹²⁾ また、疫病菌貫入菌糸とジャガイモ細胞膜の相互作用が観察されて来了¹¹³⁾。

本研究では、過敏性死の始動機構の解明の基礎として、菌体表面の糖質と結合する宿主成分の探索を行なった。すなわち、固定した菌体成分を吸着体としたアフィニティークロマトグラフィにより、塊茎磨砕液中より結合性蛋白質成分を抽出した。また、その同定を行なった (第四章)。

SDS - 電気泳動による分析の結果、抵抗性
あるいは罹病性品種由来の菌体結合性蛋白質
は、それぞれ一本のバンドのみを示し、従来
報告されてゐるジャガイモ・レクチンと等し
い分子量をもつことを確認した(第四章、3.
(3))。また、塊茎由来のこの菌体結合性蛋白
質成分と、純化レクチン-抗血清との固の二
重拡散法による実験の結果、この宿主蛋白質
成分はレクチンであると同定された(第四章
3. (3))。

さらに、D-キトビオースが阻害糖である
(4, 5, 103, 141) ジャガイモ・レクチンの過敏感
細胞死における役割について検討を進めた。

疫病菌の菌糸表面に、ジャガイモ・レクチ
ンに対するレセプターが存在することは、螢
光色素(FITC) でラベルしたレクチンが、
その表面と結合することによって証明された
(第四章、3. (2))。疫病菌レース0とレー
ス1-2の菌糸表面に、レクチンに対する結合
基が同程度存在することから、凝集実験により

明らかにされた(第四章, 3, (1))。

ジャガイモ・プロトプラストは、疫病菌の菌体壁成分に対して細胞質偏寄反応を起すことが知られてゐる。^{40, 41)} 本研究では、菌体壁成分とジャガイモ・プロトプラストの系を、宿主細胞の異物識別機構を研究するためのモデル系として捉え、プロトプラスト表面と菌体壁成分との相互作用を、ハフテン効果により解析した(第四章, 3, (5))。

その結果、ジャガイモ・レクチンのハフテンであるD-キトビオース処理によつて、このプロトプラストの反応が阻害された。さらに、N-アセチルグルコサミン、トリキトトリオースによつても強く阻害された。また、プロトプラストの膜表面へのウサギ赤血球の結合によつて、プロトプラスト表面におけるレクチンの存在が明らかにされた(第四章, 3, (6))。

リシリより抽出した細胞膜小胞は、そのみでは、疫病菌発芽管表面には結合せず、V

ワチンの添加によ、て初めて、菌系細胞壁に結合することか観察された。(第IV章. 3.

(7)) この結合は、男しやく・レクタンによっても同様に引き起こされ、非親和性菌および親和性菌の菌系表面で差位はなかつた。

このうりのことは、感染の場における、非特異的な疫病菌と宿主細胞膜の結合の結果と一致した。

以上の実験結果から、ジャガイモ・レクタンか、疫病菌と宿主細胞膜の結合を媒介しており、この結合反応か宿主細胞の過敏感細胞死の始動を引き起こす第一義的な要因であると考えられた。

植物の病害において、病原菌外、たん感染を成立した組織では、そのあと非病原菌か侵入しても過敏感反応か起こるなりことが報告されてる^{154, 123, 161, 166})。このことは、病原菌かたんろかの過敏感反応抑制成分をもつことを示唆する。ジャガイモ疫病では、最近 Doke et al.^{34, 35}、Doke & Tomiyama⁴¹⁾

が、病原菌レースより抽出した水溶性ゲルファンが、過敏反応抑制効果をもつことを報告した。

本研究における、過敏反応誘導あるいは始動の機構と、上記病原菌成分との関連は、今後の重要な課題である。

引用文献

1. Aist, J. R. (1976). In: Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 4. Ed. by R. Heitefuss and P. H. Williams. Springer-Verlag. pp. 197-216.
2. Albersheim, P. & A. J. Anderson-Prouty. (1975). Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 31-52.
3. Albersheim, P. & A. J. Anderson. (1971). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68, 1815-1819.
4. Allen, A. K. & A. Neuberger. (1973). Biochem. J. 135, 307-314.
5. Allen, A. K., A. Neuberger. & N. Sharon. (1973). Biochem. J. 131, 155-162.
6. Ayers, A. R., B. Valent, J. Ebel & P. Albersheim. (1976). Plant Physiol. 57, 766-774.
7. Bartnicki-Garcia, S. (1966). J. Gen. Microbiol. 42, 57-69.
8. Bateman, D. F. & H. G. Basham, H. G. (1976). In; Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 4. Ed. by R. Heitefuss and P. H. Williams. Springer-Verlag. pp. 316-345.
9. Bell, A. A. & R. D. Stipanovic. (1978). Mycopathologia 65, 91-106.
10. Benveniste, P. (1978). In; Biochemistry of Wounded Plant Tissues. Ed. by G. Kahl. Walter de Gruyter & Co. pp. 103-122.

11. Bhagwat, A. A. & J, Thomas. (1980). J. Gen. Microbiol. 117, 119-125.
12. Bhuvanewari, T. V. & W. D. Bauer. (1978). Plant Physiol. 62, 71-74.
13. Bhuvanewari, T. V., S. G. Peuppke & W. D. Bauer. (1977). Plant Physiol. 60, 486-491.
14. Bohlool, B. B. & E. L. Schmidt. (1974). Science 185, 269-271.
15. Bowles, D. J. & H. Kauss. (1975). Pl. Sci. Lett. 4, 411-418.
16. Brücher, O., M. Wecksler, A. Levy, A. Palozzo. & W. G. Jaffe. (1969). Phytochemistry 8, 1739-1743.
17. Brugger, B. B. & N. T. Keen. (1979). Physiol. Plant Pathol. 15, 43-51.
18. Bostock, R. M., J. A. Kuc. & R. A. Laine. (1981). Science 212, 67-69.
19. Bowles, D. J. & H. Kauss. (1975). Plant Sci. Lett. 4, 411-418.
20. Callow, J. A. (1974). In; Advances in Botanical Research. Ed. by R. D. Preston. & H. W. Woolhouse. Vol. 4, 1-49.
21. Calvert, H. E., M. Lalone, T. W. Bhuvanewari & W. D. Bauer. (1978). Can. J. Microbiol. 24, 785-793.
22. Caten, C. E. & J. L. Jinks. (1968). Can. J. Bot. 46, 329-348.
23. Charudattan, R. & J. E. DeVay. (1981). Physiol. Plant Pathol. 18, 289-295.

24. Chen, A. T. & D. A. Phillips. (1976). *Physiol. Plantarum* 38, 83-88.
25. Cline, K., M. Wade & P. Albersheim. (1978). *Plant Physiol.* 62, 918-921.
26. Cook, G. M. W. & R. W. Stoddart. (1973). *Surface Carbohydrates of the Eukaryotic Cell*. Academic Press. Inc. pp. 1-310.
27. Cruickshank, I. A. M. (1980). In; *Plant Disease Vol. V*. Ed. by J. G. Horsfall & E. B. Cowling. Academic Press Inc. pp. 247-264.
28. Daly, J. M. (1976). In; *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 4. Ed. by R. Heitefuss and P. H. Williams. Springer-Verlag. pp. 27-47.
29. Dazzo, F. B. & W. J. Brill. (1979). *J. Bacteriol.* 137, 1362-1373.
30. Dazzo, F. B. & D. M. Hubbell. (1975). *Pl. Soil* 43, 713-717.
31. Dazzo, F. B., C. A. Napoli. & D. H. Hubbell. (1976). *App. Envi. Microbiol.* 32, 166-171.
32. Dazzo, F. B., W. E. Yanke. & W. J. Brill. (1978). *Biochem. Biophys. Acta.* 539, 276-286.
33. DeVay, J. E. & H. E. Adler. (1976). *Ann. Rev. Microbiol.* 30, 147-168.
34. Doke, N., N. A. Garas & J. Kuc (1979). *Physiol. Plant Pathol.* 15, 127-140.
35. Doke, N., N. A. Garas & J. Kuc. (1980). *Phytopathology* 70, 35-39.

36. Doke, N., S. Sakai & K. Tomiyama. (1979). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 45, 386-393.
37. Doke, N., K. Tomiyama, N. Nishimura & H. S. Lee. (1975). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 41, 425-433.
38. Doke, N. & K. Tomiyama. (1977). *Phytopath. Z.* 90, 236-242.
39. Doke, N. & K. Tomiyama. (1978). *Physiol. Plant Pathol.* 12, 133-139.
40. Doke, N. & K. Tomiyama. (1980). *Physiol. Plant Pathol.* 16, 169-176.
41. Doke, N. & K. Tomiyama. (1980). *Physiol. Plant Pathol.* 16, 177-186.
42. English, P. D. & P. Albersheim. (1969). *Plant Physiol.* 44, 217-224.
43. English, P. D., J. B. Jurale. & P. Albersheim. (1971). *Plant Physiol.* 47, 1-6.
44. English, P. D., A. Maglothin, K. Keegstra. & P. Albersheim. (1972). *Plant Physiol.* 49, 293-297.
45. Fett, W. & L. Sequeira. (1980). *Plant Physiol.* 66, 847-852.
46. Fett, W. & L. Sequeira. (1980). *Plant Physiol.* 66, 853-858.
47. Garas, N. A., N. Doke. & J. Kuc. (1979). *Physiol. Plant Pathol.* 15, 117-126.
48. Garas, N. A. & J. Kuc. (1981). *Physiol. Plant Pathol.* 18, 227-237.
49. Goodman, R. N. (1978). *Mycopathologia* 65, 107-113.

50. Hadwiger, L. A. & J. M. Beckman. (1980). *Plant Physiol.* 66, 205-211.
51. Hadwiger, L. A., J. M. Beckman. & M. J. Adams. (1981). *Plant Physiol.* 67, 170-175.
52. Heath, M. C. (1974). *Physiol. Plant Pathol.* 4, 403-414.
53. Heath, M.C. (1980). *Ann. Rev. Phytopathol.* 18, 211-236.
54. Hebert, G. A., P. L. Pelham. & B. Pittman. (1973). *Appl. Microbiol.* 25, 26-36.
55. Holliday, M. J, N. T. Keen. & M. Long. (1981). *Physiol. Plant Pathol.* 18, 279-287.
56. Huang, K. T., T. Misato. & H. Asuyama. (1964). *J. Antibio.* 17, 65-70.
57. Hughes, C. (1976). In; *Specificity in Plant Diseases.* Ed. by R. K. S. Wood. & A. Graniti. Plenum Press. pp. 77-99.
58. Ito, R., K. Oba. & I. Uritani. (1979). *Plant Cell Physiol.* 20, 867-874.
59. Ishiguri, Y., K. Tomiyama, N. Doke, A. Murai, N. Katsui, F. Yagihashi. & T. Masamune. (1978). *Phytopathology* 68, 720-725.
60. Jetten, A. M. & M. E. R. Jetten. (1975). *Biochem. Biophys. Acta.* 387, 12-22.
61. Jones, D. R. & B. J. Deverall. (1978). *Physiol. Plant Pathol.* 12, 311-319.
62. Jones, T. M., A. J. Anderson. & P. Albersheim. (1972). *Physiol. Plant Pathol.* 2, 153-166.
63. Kahl, G. (1973). *Bot. Rev.* 39, 274-299.

64. Kahl, G. (1974). Bot. Rev. 40, 263-314.
65. Kahl, G. (1976). Physiol. Vég. 14, 725-738.
66. Kahl, G. (1977). Z. Naturforsch. 32 c, 229-235.
67. 川上正也 (1978), 免疫応答, 講談社サイエンスライヴ
pp. 1-192
68. Keen, T. N. & B. Bruegger. (1977). In: Host Plant Resistance to Pests. ACS Symposium Series, No.62. pp. 1-26.
69. Keen, N. T., T. Ersek, M. Long, B. Bruegger. & M. Holliday. (1981). Physiol. Plant Pathol. 18, 325-337.
70. Keen, T. N. & R. Horsch. (1972). Phytopathology 62, 439-442.
71. Keen, T. N. & M. Legrand. (1980). Physiol. Plant Pathol. 17, 175-192.
72. Kenfield, D. S. & G. A. Strobel. (1981). Plant Physiol. 67, 1174-1180.
73. Kiraly, Z. (1980). In: Plant Diseases V. Ed. by J. G. Horsfall & E. B. Cowling. Academic Press. pp. 201-219.
74. Kitazawa, K., H. Inagaki. & K. Tomiyama. (1973). Phytopathol. Z. 76, 80-86.
75. Kitazawa, K. & K. Tomiyama. (1969). Phytopathol. Z. 66, 317-324.
76. 清沢 茂久 (1980). 農業および園芸 55, 1074-1078.
77. Kleinschuster, S. J. & R. Baker. (1974). Phytopathology 64, 394-399.
78. Kojima, M., A. Takeuchi. & I. Uritani. (1979). In: Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interactions. Ed. by J. M. Daly & I. Uritani. Japan Scientific Societies Press. Tokyo. pp. 335-349.

79. Kojima, M. & I. Uritani. (1974). *Plant Cell Physiol.* 15, 733-737.
80. Kojima, M. & I. Uritani. (1978). *Plant Cell Physiol.* 19, 71-81.
81. Kojima, M. & I. Uritani. (1978). *Plant Cell Physiol.* 19, 1099-1101.
82. Kojima, M. & I. Uritani. (1978). *Plant Physiol.* 62, 751-753.
83. Kuć, J. (1972). *Ann. Rev. Phytopathol.* 10, 207-232.
84. Kuć, J. (1975). In: *Specificity in Plant Disease*. Ed. by R. K. S. Wood. & A. Graniti. Plenum Press. New York. pp. 253-271.
85. Kuć, J. (1976). In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 4. Ed. by R. Heitefuss. & P. H. Williams, Springer-Verlag, pp. 632-646.
86. Kuć, J., W. W. Currier, J. Elliston. & J. McIntyre. (1976). In: *Biochemistry and Cytology of Plant-Parasite Interaction*. Ed. by K. Tomiyama, J. Daly, I. Uritani, H. Oku. & S. Ouchi. Kodansha Ltd, Tokyo. pp. 168-180.
87. Kurants, M. J. & R. M. Zacharius. (1981). *Physiol. Plant Pathol.* 18, 67-77.
88. Laemmler, L. K. (1970). *Nature* 227, 680- 685.
89. Lamport, D. T. A. (1980). In: *The Biochemistry of Plants*. Vol. 3. Academic Press. pp. 501-541.
90. Lance, E. M., P. B. Medawar. & E. Simpton. (1977). In : *An Introduction to Immunology*. A. P. Watt. & Son Ltd., London. pp. 1-125.
91. Lee, S. C. & C. A. West. (1981). *Plant Physiol.* 67, 633-639.

92. Lee, S. C. & C. A. West. (1981). *Plant Physiol.* 67, 640-645.
93. Leonard, R. T. & T. K. Hodges. (1973). *Plant Physiol.* 52, 6-12.
94. Leonard, R. T. & W. J. VanDerWoude. (1976). *Plant Physiol.* 57, 105-114.
95. Liener, I. E. (1976). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 291-319.
96. Lippincott, B. B., M. H. Whatley & J. A. Lippincott. (1977). *Plant Physiol.* 59, 388-390.
97. Lippincott, J. A. & B. B. Lippincott. (1976). In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 4. Ed. by R. Heitefuss & P. H. Williams. Springer-Verlag. pp. 356-381.
98. Lis, H. & N. Sharon. (1973). *Ann. Rev. Biochem.* 42, 541-574.
99. Lisker, N. & J. Kuć. (1977). *Phytopathology* 67. 1356-1359.
100. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr. & R. J. Randall. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
101. Marcan, H., M. C. Jarvis. & J. Friend. (1979). *Physiol. Plant Pathol.* 14, 1-9.
102. Marinchovich, V. A. (1964). *J. Immunol.* 93, 732-741.
103. Matsumoto, I & Osawa. (1971). *Vox Sang.* 21, 548-559.
104. Mishkind, M., Keegstra, K. & Palevitz, B. A. (1980). *Plant Physiol.* 66, 950-955.
105. Nishimura, S., K. Kohmoto. & H. Otani. (1979). In: *Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interactions*. Ed. by J. M. Daly & I. Uritani. Japan Scientific Societies Press. Tokyo., pp. 133-146.

106. Nishimura, S., K. Kohmoto. H. Otani, H. Fukami. & T. Ueno. (1976).
In: Biochemistry and Cytology of Plant Parasite Interaction. Ed.
by K. Tomiyama, J. M. Daly, I. Uritani, H. Oku & S. Ouchi. Kodansha
Ltd, Tokyo. pp. 94-101.

107. Nishimura, N. & K. Tomiyama. (1978). Ann. Phytopath. Soc. Japan
44, 159-166.

108. Nishimura, N., K. Tomiyama. & N. Doke. (1981). Ann. Phytopath. Soc.
Japan 47, 308-312.

109. Nozue, M. K. Tomiyama. & N. Doke. (1977). Physiol. Plant Pathol.
10, 181-189.

110. Nozue, M., K. Tomiyama. & N. Doke. (1978). Phytopathology 68, 873-
876.

111. Nozue, M., K. Tomiyama. & N. Doke. (1979). Physiol. Plant Pathol.
15, 111-115.

112. Nozue, M., K. Tomiyama. & N. Doke. (1980). Physiol. Plant Pathol.
17, 221-227.

113. Nozue, M., K. Tomiyama. & N. Doke. (1981). Ann. Phytopath. Soc.
Japan 47, 189-193.

114. Oikawa, T. (Personal Communication).

115. Oikawa, T. (1979). Zool. Magazine 88, 84.

116. Oikawa, T., G. L. Nicolson. & R. Yanagimachi. (1974). Exp. Cell
Res. 83, 239-246.

117. Oikawa, T., G. L. Nicolson. & R. Yanagimachi. (1975). J. Reprod.
Fert. 43, 133-136.

118. Oikawa. T., R. Yanagimachi. & G. L. Nicolson. (1973). Nature 241, 256-259.
119. Oikawa, T., R. Yanagimachi. & G. L. Nicolson (1975). J. Reprod. Fert, 43, 137-140.
120. 大沢利明・森良一編 (1976) レクチャー, 講談社サイエンティク
PP. 39-73.
121. 尾谷 浩 (1973) 第9回植物病理化学談話会予稿集
pp. 73-82.
122. 尾谷浩(1979)第15回植物病理化学談話会予稿集 pp. 105-112.
123. Ouchi, S., C. Hibino, H. Oku, M. Fujiwara & H. Nakabayashi. (1979).
In: Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interactions.
Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp. 49-65.
124. Ouchi, S., H. Oku, C. Hibino. & I. Akiyama. (1974). Phytopathol.
Z. 79, 142-154.
125. Palmerley, R. A. & J. A. Callow. (1978). Physiol. Plant Pathol.
12, 241-248.
126. Peters, B. M., D. H. Cribbs. & S. A. Stelzig. (1978). Science
201m 364-365.
127. Pueppke, S. G. (1978). Mycopathologia 65, 115-119.
128. Pueppke, S. G. (1979). Plant Physiol. 64, 575-580.
129. Pueppke, S. G. & W. D. Bauer. (1978). Plant Physiol. 61, 779-784.
130. Sakai, S., K. Tomiyama. & N. Doke. (1981). Ann. Phytopath. Soc.
Japan 47, 255-257.
131. Sakurabayashi, (1971). 医化学実験法講座 1A, 中山書店.

132. Sato, N., K. Tomiyama, N. Katsui. & T. Masamune. (1968). Ann. Phytopath. Soc. Japan 34, 140-142.
133. Scheffer, R. P. (1976). In: Biochemistry and Cytology of Plant-Parasite Interaction. Ed. by K. Tomiyama, J. M. Daly, I. Uritani, H. Oku, & S. Ouchi. Kodansha Ltd, Tokyo. pp. 112-123.
134. Scheffer, R. P. (1976). In: Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 4. Ed. by R. Heitefuss & P. H. Williams. Springer-Verlag. pp. 247-265.
135. Scheffer, R. P. & R. B. Pringle. (1964). Phytopathology 54, 832-835.
136. Sequeira, L. (1976). In: Specificity in Plant Diseases. Ed. by R. K. S. Wood, F. R. S. & A. Graniti. Plenum Press, New York. pp. 289-310.
137. Sequeira, L. (1978). Ann. Rev. Phytopathol. 16, 453-481.
138. Sequeira, L. (1980). In: Plant Disease V. Ed. by J. G. Horsfall. & E. B. Cowling. Academic Press, New York. pp. 179-196.
139. Sequeira, L. & T. L. Graham. (1977). Physiol. Plant Pathol. 11, 43-54.
140. Sharon, N. (1975). Complex Carbohydrates. Addison-Wesley Pub. Co. Inc. pp. 1-282.
141. Sharon, N. & H. Lis. (1972). Science 177, 949-959.
142. Spurr, A. R. (1969). J. Ultra. Res. 26, 31-43.
143. Stacey, G., A. S. Paa. & W. J. Brill. (1980). Plant Physiol. 66, 609-614.

144. Stekoll, M. & C. A. West. (1978). *Plant Physiol.* 61, 38-45.
145. Sze, H. & T. K. Hodges. (1976). *Plant Physiol.* 58, 304-308.
146. The, T. H. & T. E. W. Feltkamp. (1970). *Immunology* 18, 875-881.
147. Tomiyama, K. (1954). *Res. Bull. Hokkaido Nat. Agr. Exp. Sta.* 67, 28-38.
148. Tomiyama, K. (1955). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 19, 149-154.
149. Tomiyama, K. (1956). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 20, 165-169.
150. Tomiyama, K. (1956). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 21, 54-62.
151. Tomiyama, K. (1960). *Phytopathol. Z.* 39, 134-148.
152. Tomiyama, K. (1963). *Ann. Rev. Phytopathol.* 1, 295-324.
153. Tomiyama, K. (1967). *Phytopathol. Z.* 58, 367-378.
154. Tomiyama, K. (1971). In; *Morphological and Biochemical Events in Plant-Parasite Interaction.* Ed. by S. Akai. & S. Ouchi. The Phytopathological Society of Japan, Tokyo. pp. 387-401.
155. 富山宏平 (1978). *生物の制御機構*, 化学同人
pp 31-45
156. 富山宏平 (1979). *植物感染機作, 病理化学談話会予編集*
pp. 147-157.
157. Tomiyama, K., N. Doke. & H. S. Lee. (1976). In; *Biochemistry and Cytology of Plant-Parasite Interaction.* Ed. by K. Tomiyama, J. M. Daly, I. Uritani, H. Oku. & S. Ouchi. Kodansha Ltd., Tokyo, pp. 136-142.

158. 富山宏平, 道家紀志, 李好植, 西村範夫, 野末雅之 (1976)
第12回 植物病理化学談話会予稿集 pp. 43-50
159. Tomiyama, K., N. Doke, M. Nozue. & Y. Ishiguri. (1979). In;
Recognition and Specificity in Plant-Parasite Interactions. Ed.
by J. M. Daly. & I. Uritani. Japan Scientific Societies Press,
Tokyo. pp. 69-84.
160. Toyoshima, S., T. Osawa. & A. Tomomura. (1970). Biochem.
Biophys. Acta. 221, 514-521.
161. Tsuchiya, K. & K. Hirata. (1973). Ann. Phytopath. Soc. Japan
39, 396-403.
162. Uritani, I. (1971). Ann. Rev. Phytopathol. 9, 211-234.
163. Uritani, I. (1976). In; Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 4.
Ed. by R. Heitefuss. & P. H. Williams. Springer-Verlag, pp. 509-
521.
164. Uritani, I. & M. Kojima. (1979). In; Recognition and Specificity
in Plant Host-Parasite Interactions. Japan Scientific Societies
Press, Tokyo. pp. 181-191.
165. Uritani, I., K. Oba, M. Kojima, W. K. Kim, I. Oguni. & H. Suzuki.
(1976). In; Biochemistry and Cytology of Plant-Parasite Inter-
actions. Kodansha Ltd., Tokyo. pp. 239-252.
166. Varns, J. L. & J. Kuć. (1971). Phytopathology 61, 178-181.

167. Varns, J. L., J. Kuć. & E. B. Williams. (1971). *Phytopathology* 61, 174-177.
168. Weir, D. M. (1977). *Immunology*. Longman Group Limited., London. pp. 1-215.
169. Weber, K. & M. Osborn. (1968). *J. Biol. Chem.* 244, 4466-4412.
170. Weiss, M. J. & S. E. Luria. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 2483-2487.
171. Wheeler, H. E. (1976). In; *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. 4. Ed. by R. Heitefuss. & P. H. Williams. Springer-Verlag, pp. 413-426.
172. Woodward, J. R., P. J. Keane. & B. A. Stone. (1980). In; *Fungal Polysaccharides*. Ed. by P. A. Sandford. & K. Matsuda. ACS symposium series 126. pp. 113-142.
173. 柳町隆造, 及川胤昭 (1979) 性, 代謝臨時増刊号 16, 337-342
174. Yoder, O. C. (1980). *Ann. Rev. Phytopathol.* 18, 103-129.
175. Zacharius, R. M., T. E. Zell, J. H. Morrison, J. J. Woodlock. (1969). *Anal. Biochem.* 30, 148-152.

報文目録

1. Furuichi, N., Tomiyama, K., Doke, N. and Nozue, M. (1979).
Inhibition of further development of hypersensitive reactivity to Phytophthora infestans by blasticidin S in cut tissue of potato tuber at various stages of aging process. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 45: 215-220.
2. Furuichi, N., Tomiyama, K. and Doke, N. (1979). Hypersensitive reactivity in potato: Transition from inactive to active state induced by infection with an incompatible race of Phytophthora infestans. *Phytopathology* 69: 734-736.
3. Furuichi, N., Tomiyama, K. and Doke, N. (1980). The role of potato lectin in the binding of germ tubes of Phytophthora infestans to potato cell membrane. *Physiological Plant Pathology* 16: 249-256.
4. Furuichi, N., Tomiyama, K. and Doke, N. (1980). Induction of hypersensitive reactivity of juvenile potato cell to compatible race of Phytophthora infestans by its infection per se. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 46: 247-249.
5. 古市尚高・道家紀志 (1981). ジャガイモ疫病における感染の機構をめぐって, *ホテトサイエンス* 1: 17-26
6. Doke, N. and Furuichi, N. (1982). Response of protoplasts to hyphal wall components in relationship to resistance of potato to Phytophthora infestans. *Physiological Plant Pathology*. (in press).