

エンドウ褐紋病菌が生産するサプレッサーの
作用機構と感染における役割

吉岡博文

1993

名古屋大学図書	
和	1145307

目次	頁
第一章 緒言	1
第二章 分離したエンドウ原形質膜ATPaseにおよぼすエンドウ褐紋病菌	
サプレッサーの影響	11
1. 材料および方法	
1) 供試植物	14
2) 供試菌	14
3) エンドウ褐紋病菌の培養	15
4) サプレッサーおよびエリシターの部分精製	15
5) エリシター、サプレッサーおよび各種阻害剤の処理	18
6) 高速液体クロマトグラフィーによるピサチン定量	20
7) 原形質膜画分の調製	21
8) 原形質膜ATPase活性の定量	24
9) <i>in vitro</i> での原形質膜タンパク質のリン酸化	25
10) 電気泳動とオートラジオグラフィー	26
2. 実験結果	
1) エンドウ褐紋病菌サプレッサーおよびエリシターの	
ピサチン蓄積におよぼす影響	28
2) 原形質膜ATPaseの諸性質	30
3) サプレッサーおよび各種阻害剤のATPase活性におよぼす影響と	
阻害様式	36
4) サプレッサー、ベラパミルおよびオルトバナジン酸による	

原形質膜ATPaseの活性阻害とエリシター誘導によるピサチン蓄積抑制との相関	39
5) <i>in vitro</i> での原形質膜タンパク質のリン酸化および電気泳動	41
3. 考察	46
第三章 エンドウ褐紋病菌サプレッサーおよびATPase阻害剤のピサチン合成系におよぼす影響	52
1. 材料および方法	
1) 供試植物	56
2) エリシターおよびサプレッサーの調製	56
3) ピサチンの定量	56
4) 粗酵素の抽出	57
5) PAL 活性の測定	58
6) 全 RNAの抽出	60
7) ノーザンブロットハイブリダイゼーション	61
8) プローブの作成	63
2. 実験結果	
1) エリシター誘導によるピサチン蓄積の経時的変動におよぼすオルトバナジン酸およびベラパミルの影響	68
2) PAL の活性増大におよぼすオルトバナジン酸の影響	70
3) PAL 活性におよぼすオルトバナジン酸およびベラパミルの直接の影響	70
4) PAL 、CHS および原形質膜ATPase遺伝子発現におよぼすオルトバナジン酸の影響	72

5) エリシター誘導によるピサチン蓄積におよぼすサプレッサー、 オルトバナジン酸およびベラパミルの処理時期の影響	77
3. 考察	79
第四章 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> におけるサプレッサーの	
原形質膜ATPase阻害の特異性について	83
1. 材料および方法	
1) 供試植物	85
2) 供試菌	86
3) 接種源の調製および接種	87
4) エンドウ褐紋病菌のサプレッサーの調製	88
5) 各種植物からの原形質膜の分離	88
6) <i>in vitro</i> における原形質膜ATPase活性の測定	90
7) <i>in vivo</i> における原形質膜ATPase活性の検出	90
2. 実験結果	
1) <i>in vitro</i> におけるサプレッサーの原形質膜ATPaseにおよぼす 阻害の特異性について	92
2) <i>in vivo</i> におけるサプレッサーの原形質膜ATPaseにおよぼす 阻害の特異性について	92
3) サプレッサー処理エンドウ葉におけるATPase活性の経時的変動	99
4) 病原菌接種エンドウ葉におけるATPase活性の経時的変動	99
3. 考察	102

第五章 キチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼ活性におよぼすエリシター、 サブレッサーおよびオルトバナジン酸の影響	106
1. 材料および方法	
1) 供試植物	108
2) エリシターおよびサブレッサーの調製	109
3) エリシター、サブレッサーおよびオルトバナジン酸の処理	109
4) 粗酵素の抽出	110
5) キチナーゼ活性の測定	111
6) β -1, 3-グルカナーゼ活性の測定	113
2. 実験結果	
1) エンドウのキチナーゼ活性の経時的変動におよぼすエリシター、 サブレッサーおよびオルトバナジン酸の影響	114
2) エンドウの β -1, 3-グルカナーゼ活性におよぼすエリシター、 サブレッサーおよびオルトバナジン酸の影響	116
3) エンドキチナーゼ、 β -1, 3-グルカナーゼ活性におよぼす サブレッサーおよびオルトバナジン酸の直接的影響	119
4) 各種供試植物におけるキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの 活性増大におよぼすサブレッサーおよびオルトバナジン酸の影響	119
3. 考察	124
第六章 総合考察	128
引用文献	140
摘要	162

第一章 緒言

病原体による植物病害の 80%以上は糸状菌によって引き起こされる。地上には約10万種の糸状菌が生存していることが知られているが、このうち植物に病気を起こす糸状菌は総計約8000種であり、重要病原菌に限れば 500種以下である。さらに特定の植物種に限定すると、感染し発病させる糸状菌は約10数種である。このように、植物と病原糸状菌との間には厳密な特異的關係が存在する。逆の見方をすると、本来植物は多くの侵入しようとする微生物に対して自身を守る防御機構を備えており、それが特定の微生物により打ち破られるものと考えることができる。

病原菌に対する植物の抵抗性は二つに大別することができる。一つには、機械的な保護組織や潜在的な抗菌性成分の存在などによる防御系で、静的抵抗性といわれる性質である。もう一つは微生物の攻撃を受けた際に発現される動的抵抗性といわれる性質である。後者には、過敏感細胞反応 (Tomiyama 1956)、種々のファイトアレキシン (Dixon 1986) や感染阻害因子 (Yamamoto et al. 1986) の生成・蓄積、細胞壁のリグニン化 (Bowles 1990)、ヒドロキシプロリンに富んだ糖タンパク質の細胞壁での蓄積 (Bradley et al. 1992)、侵入菌の細胞壁を分解するばかりでなく、病原菌由来のエリシターを遊離させるキチナーゼや β -1, 3-グルカナーゼの活性増加 (Mauch et al. 1984, 1988a, 1988b, Schlumbaum et al. 1986)、さらにプロテアーゼインヒビターなどの活性増高 (Ryan 1973) など

が知られている。

ある植物を所定時間熱処理したり、タンパク質合成阻害剤で処理すると動的抵抗反応の発現が抑制され、本来感染できない非病原菌あるいは非親和性菌が感染できるようになる場合が知られている (Ouchi et al. 1975, Nozue et al. 1977, Tani and Yamamoto 1978, Yoshikawa et al. 1978)。したがって、抵抗性の主体は動的抵抗性であると考えられており、微生物の行動やその生産物に反応した植物が物理的あるいは化学的な障壁を構築した結果、微生物の侵入、定着、増殖などの過程のいずれかを抑止するものと推定できる。静的抵抗性のみならず、宿主が発現する動的な抵抗反応を打ち破ることのできる性質を獲得した微生物が植物病原菌であると考えられる。動的抵抗性発現の場合、植物はどのようにして侵略する微生物を認識して抵抗反応を発現するのか、また、病原菌は植物の防御を打ち破るためどのように抵抗性の発現を抑制するのであろうかという命題が浮かび上がってくる。

植物にファイトアレキシンを中心とする動的抵抗反応を誘導する物質が菌体や胞子発芽液中に存在することが知られており、エリシターと呼ばれている (Keen 1975)。この起源や化学的組成は応答する植物の性質によっても異なり、タンパク質 (Nespoulous et al. 1992)、グルカン (Anderson 1980, Doke and Furuichi 1982)、糖タンパク質 (de Wit and Roseboon 1980, Parker et al. 1991)、オリゴ糖 (Darvill and Albersheim 1984, Hadwiger and Beckman 1980)、脂質のアラキドン酸やエイコサペンタエン酸 (Bostock et

al. 1981)などがエリシター機能をもつと報告されている。多くの病原菌は、たとえ親和性株またはレースといえども、自らの宿主に作用するエリシター成分をもっているか生産することが多く、その様な非特異的エリシターに宿主—病原菌の特異性関係を決定づける因子として断定することは困難な場合が多いと思われる。中には、非親和性菌のみが自らの宿主に特異的に作用するエリシターを生産する場合も報告されており (de Wit and Spikman 1982)、エリシターと宿主植物との関係は多様な様相を示している。

ある病原菌から調製されたエリシターは、概してその宿主植物の抵抗性および罹病性品種の両者に同様なファイトアレキシン合成の誘導活性を示すのに対して、感染現場では、親和性レースと非親和性レースの感染に対する抵抗性品種のファイトアレキシン合成を含めた一連の防御反応の発現に顕著な違いがみられる (Cuypers et al. 1988, Bell et al. 1984, 1986)。動的抵抗反応の中で主役を演じていると思われるファイトアレキシンを例にとると、非親和性レースを接種した場合のほうが親和性レースを接種した場合に比べ、その合成の開始と蓄積が速やかに起こる。また、ある植物種に対する病原菌と非病原菌との関係においても、病原菌のレースの違いでみられる現象に類似した現象が多くみられる。

感染した宿主植物に急速な壊死斑を形成させる *Alternaria* 属および *Helminthosporium* 属菌の胞子発芽液から、それぞれの宿主のみに壊死斑を形成させる宿主特異的 (選択的) 毒素と総称される物質が同定されている。これらは感受性宿主の動的抵抗性発現を抑制し、

細胞毒性をもつ病原性決定因子として位置づけられた。その化学的組成は、病原菌の種や病原型などにより異なり、ペプチド (Ueno et al. 1982, Wolpert et al. 1988)、エポキシトリエンカルボン酸 (Nakashima et al. 1982, Otani et al. 1985)、ポリケトール (Kono et al. 1980, Suzuki et al. 1987)、アミノペントール (Bottini et al. 1981)、ジヒドロピロン (Gardner et al. 1985, Kono et al. 1985)、配糖体 (Macko et al. 1983) など、多岐にわたっている。

絶対寄生菌に代表されるように、寄生性が強く殺生性の弱い病原菌の胞子発芽液中には、自らの宿主に急速な壊死斑を形成させる物質は見い出されていない。1970年代になって、病原菌の感受性品種にはエリシター活性を示さず、抵抗性品種のみに作用する宿主特異的なエリシターによって宿主特異性が決定されるとしたレース—品種特異的なエリシター説が発表された (Keen 1975)。その一方で、感受性品種や抵抗性品種に対して、非特異的にエリシター活性を示す物質しか存在しない病原菌においては、それにより誘導される宿主の抵抗反応を抑制する因子の存在が示され、サプレッサーと呼ばれるようになった。Doke (1975) はジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) の遊走子発芽液から、非親和性レースの接種で誘導される過敏感細胞死やファイトアレキシン蓄積を抑制する因子の存在を見い出した。さらにその因子を追求し、病原菌レース—品種間レベルで特異的に抑制する β —グルカンを分離し、それがレース特異的なサプレッサーである可能性を示した (Doke 1983, 1985)。その

後いくつかの病原菌からサプレッサーの存在が示された (Table 1)。

Oke et al. (1977) および Shiraishi et al. (1978) はエンドウ—エンドウ褐紋病菌 (*Mycosphaerella pinodes*) の系を用いて宿主特異性決定因子の解析を行い、本菌柄孢子から、非特異的エリシター (多糖) と、宿主特異的な抵抗反応抑制物質を分離した。後者をサプレッサー (Ser, Gly, Asp を含み、プロテアーゼ処理で失活する糖タンパク質) と称し、孢子発芽時に分泌されることを見出した。エンドウ褐紋病菌のエリシターで処理したエンドウ組織では、処理後 1 ～ 2 時間で侵入糸の形成を阻害する機能をもつ脂溶性の感染阻害因子 (化学構造は未同定) が生産され (Yamamoto et al. 1986)、6 ～ 9 時間頃になるとエンドウのファイトアレキシンであるピサチンの蓄積が確認された。エリシターにサプレッサーを併せて処理すると、これらの物質の蓄積が抑制された (Yamamoto et al. 1986, Yamada et al. 1989)。

部分精製したエンドウ褐紋病菌のサプレッサーで処理したエンドウには、本来感染できない赤クロバー輪紋病菌 (*Stemphylium sarcinaeforme*)、キク花腐病菌 (*Mycosphaerella ligulicola*)、ウリ類蔓枯病菌 (*Mycosphaerella melonis*) やナシ黒斑病菌 (*Alternaria alternata*) など多数の供試菌の感染が成立するようになり、本サプレッサーがエンドウに感染誘導能もつことが示された。さらに、エンドウ褐紋病菌を 12 種のマメ科植物に接種すると、エンドウ以外に赤クロバー、アルファルファ、ナツフジ、キハギ

Table 1. Suppressor from phytopathogenic fungi

Fungus	Nature	Tested plant	Reference
<i>Phytophthora infestans</i>	β -Glucan	Potato	Doke 1975
<i>P. infestans</i>		Tomato	Storti et al. 1988
<i>P. megasperma</i> var. <i>glycinae</i>	Glycoprotein	Soybean	Ziegler & Pontzen 1982
<i>P. capsici</i>	Glucan	Sweet pepper	Sanchez et al. 1992
<i>P. nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i>	Glucan	Tobacco	Sanchez et al. 1992
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	Glycopeptide	Pea	Oku et al. 1977
<i>M. liguricola</i>		Chrysanthemum	Oku et al. 1987
<i>M. melonis</i>		Cucumber	Oku et al. 1987
<i>Ascochyta radiei</i>	Glycoprotein	Chick pea	Kassemann & Barz 1986

などにもわずかに病原性を示すことが判明した。用いた12種のマメ科植物には病原性を示さないナシ黒斑病菌 (*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype)を本菌のサプレッサーと共に接種すると、エンドウ褐紋病菌が病原性を示した5種の植物のみに感染病斑が形成されることが見い出された。これらのことから、本サプレッサーは宿主植物に特異的に作用する病原性因子であると考えられた (Oku et al. 1980, Oku 1980)。

ジャガイモ疫病菌から Doke (1975)が見い出したサプレッサーグルカンと同様に、本サプレッサーは宿主特異的 (選択的) 毒素のように宿主細胞の壊死を誘導するといった顕著な毒性は認められないので、いわゆる毒素の範疇には含まれないものと考えられた (Oku et al. 1980)。

以上のように、エリシターで誘導される植物の防御反応が病原菌のサプレッサーにより宿主特異的に制御されるエンドウ—エンドウ褐紋病菌の系は、宿主—病原菌間で展開される相互作用を分子レベルで解析できる恰好のモデルになりうると考えられる。この系において、宿主決定因子であると思われるサプレッサーの作用点を解明することは、寄生性成立の根本を制御するという新しい視点からの病害防除の技術開発に貢献する基礎研究となり、今日その可能性に期待が寄せられている。

ジャガイモ塊茎組織にジャガイモ疫病菌の非親和性レースを接種すると、宿主原形質膜の透過機能に変化し、電解質の異常漏出に伴う脱分極が起こることが古くから指摘されている (Matsumoto et

al. 1976)。ワタ、タバコおよびダイズの培養細胞においても、*Verticillium dahliae*から分離したエリシターで処理すると、極めて早い細胞外液pHの増加やイオンの流出が観察され、原形質膜の透過性が変化することが示唆されている (Low and Heinsteins 1986)。タバコの培養細胞にエンドウの病原細菌である *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* を接種すると過敏反応の誘導と平行して H^+ / K^+ の交換系の活性化による急激な K^+ の流出がおこることが報告されている (Atkinson et al. 1985)。これらの観察結果は、いずれも病原性を示さない病原菌の攻撃や、エリシター処理により誘導される原形質膜ATPase(H^+ -ATPase)を駆動力した起電性プロトンポンプの障害の結果であると考えられる。ジャガイモ疫病菌の非親和性レースを接種したジャガイモ塊茎組織においては、起電性プロトンポンプの低下は観察されず、拡散ポンプの障害により脱分極が起こる可能性が示唆された (Tomiya et al. 1983)。今日、抵抗反応を示す植物細胞で、原形質膜に存在する H^+ -ATPase が阻害されたり、積極的に作動するとした直接的証拠は示されていない。

原形質膜の H^+ -ATPase は、細胞の恒常性を維持し、細胞機能を発現する基幹的酵素である。エンドウ植物の原形質膜ATPaseにおよぼすエンドウ褐紋病菌のエリシターまたはサプレッサーの影響を調べることは、寄生性の成立・非成立と宿主の代謝変動との関係を解明するのに重要な情報を与えるものと思われる。本研究において、エンドウ褐紋病菌の生産するサプレッサーが宿主植物であるエンドウの原形質膜ATPaseの活性を顕著に抑制することが見いだされた。

本論文は、原形質膜ATPaseの抑制と抵抗反応抑制との間の相関を調べ、サプレッサーの作用機構を解明することを目的として、1) エンドウ原形質膜ATPaseにおよぼすサプレッサーの影響、2) サプレッサーおよび原形質膜ATPase阻害剤のピサチン合成系におよぼす影響、3) *in vitro*および *in vivo*系における原形質膜ATPase活性に対するサプレッサーの阻害特異性、4) キチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性増高におよぼすサプレッサーの影響、などについて研究を行ったものである。

本論文内容の大部分は日本植物病理学会誌および日本植物生理学会誌に発表した (Yoshioka et al. 1990, 1992a, 1992b, Shiraishi et al. 1991b)。

本研究を遂行するにあたって、終始変わらぬ御熱意で御指導、御助言下さった元岡山大学農学部植物病理学研究室、奥八郎教授、同研究室、白石友紀教授および同大学応用遺伝子工学研究室、山田哲治助教授、一瀬勇規助教授に対し、感謝の意を表する。

本論文の作成に当たり、草稿の綿密な御校閲を賜りました名古屋大学農学部植物病理学講座、道家紀志教授、また、有益な助言を下された柘植尚志助教授、川北一人博士に感謝の意を表する。

電子顕微鏡観察を行うにあたり、多大な御援助を頂いた三重大学生物資源学部植物病学研究室、久能均教授および小林一成博士に感謝の意を表する。本研究を遂行するにあたって、貴重なインゲン CHS cDNAを分譲して頂いたカリフォルニア大学ソーク研究所 C. J. Lamb 博士、原形質膜ATPase cDNA 分譲して頂いたカソリック、デ

ロービアン大学の M. Boutry 博士、原形質膜 ATPase 抗体を提供いただいた、元名古屋大学農学部生物化学講座、旭正教授に厚くお礼申し上げます。

また、実験に際し御協力を賜った高砂香料株式会社、川又伸治氏、ならびに岡山大学農学部植物病理学研究室の那須公雄氏、荒木美和女史、豊田和弘氏および同研究室員の諸氏に感謝の意を表する。

本論文の作成に当たり、御協力を賜った名古屋大学農学部植物病理学講座の諸氏に感謝の意を表する。ここに付記してこれらの方々の御厚情と御支援に対して心から御礼を申し上げます。

最後に、終始研究活動を支援してくれた妻、美樹に感謝する。

第二章 分離したエンドウ原形質膜ATPaseにおよぼすエンドウ褐紋病菌サプレッサーの影響

植物—病原菌間にみられる寄生性の特異性は、両者の相互認識から情報伝達といった過程を経て遺伝子の発現によって決定される比重が極めて大きいと考えられる。現在までに得られた知見から多くの場合、寄生性の特異性は宿主の細胞応答の有無または程度の違いとして現れる。特に感染初期過程では防御遺伝子の発現の違いとして現れ、これらは病原菌が生産する抵抗反応誘導因子（エリシター）や抵抗反応抑制因子（サプレッサーおよび宿主特異的毒素）によって制御されることが次第に明らかとなってきた。インゲン炭そ病菌の非親和性レースをその宿主植物組織に接種すると、親和性レースを接種した場合に比べファイトアレキシン生産の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）やカルコン合成酵素（CHS）のmRNAの蓄積が速やかに誘導されることが示された（Bell et al. 1984, 1986）。さらに、Yamada et al. (1989)はエンドウ褐紋病菌エリシターの処理によって両mRNAの蓄積が誘導され、同菌の生産するサプレッサー処理によって抑制されることを報告した。この様に、植物—病原菌間の相互作用は両者の接触にはじまり、エリシターやサプレッサーまたは宿主特異的毒素などの生産と分泌、宿主受容体によるそれらの認識と非認識、情報の発生・増幅・伝達の有無と抑制、細胞応答の有無または特異的展開（一連の抵抗反応の発現あるいは抑止）、という動的関係を経て感染成否が決定され

るという状況が生じるものと考えることができるであろう。

エリシター刺激による植物の防御遺伝子の発現誘導過程においては、宿主細胞の原形質膜へのエリシターの結合が第一に重要であると示唆されている。Yoshikawa et al. (1983) および Schmidt and Ebel (1987)は、ダイズ疫病菌の菌体より可溶性 β -1, 3-グルカンから成るエリシターを分離し、これが原形質膜画分に結合することを示した。エリシターで処理したインゲン懸濁培養細胞では、数分以内に PAL や CHS、さらにキチナーゼなどをコードする一連の防御遺伝子が活性化されることが知られている (Hedrick et al. 1988)。これは、エリシターが植物細胞の原形質膜の受容体で認識され、その後速やかに核での遺伝子発現を促す情報伝達機構が機能することによってエリシター分子の情報が細胞内情報に変換された結果起こるものと推定される。情報伝達については、原形質膜からの Ca^{2+} の遊離やそれに伴う活性酸素生成 (Doke 1983, 1985, Chai and Doke 1987)、cyclic AMP (Kurosaki et al. 1987b)、プロテインキナーゼによる膜タンパクのリン酸化 (Farmer et al. 1989, Dietrich et al. 1990)、原形質膜におけるポリホスホイノシチド代謝 (Kamada and Muto 1991, Kurosaki et al. 1987a, Toyoda et al. 1992b)、原形質膜から遊離した脂肪酸の代謝 (Farmer et al. 1989, Dietrich et al. 1992, Gundlach et al. 1992) などの多岐多様な因子の関与が報告されている。

一方、Doke and Nishimura (1988) はジャガイモ疫病菌の菌体壁成分 (エリシター) でジャガイモ塊茎組織から分離した原形質膜画

分を処理すると、 Ca^{2+} 、ATP およびプロテインキナーゼの存在下で活性酸素が生成されることを見い出した。さらに、親和性レース由来のサプレッサーグルカンが共存すると特異的に活性酸素生成が抑制されることを報告している。この例から考察すると、防御反応発現に至る一連の細胞応答反応はエリシターやサプレッサーの原形質膜における受容が引き金となり、そこから機能する宿主細胞内情報伝達の質的变化によって決定されるものと考えられることができるであろう。

第一章で述べたように、エンドウ—エンドウ褐紋病菌の系においては、エリシター処理によりエンドウ組織に誘導されるピサチン

(ファイトアレキシン) や感染阻害因子の蓄積が本菌サプレッサーの処理によって抑制される。このことは 1) 本サプレッサーがエリシターの作用点を阻害するのか、2) エリシターによって誘起される初期情報伝達系を阻害するのか、あるいは 3) 情報伝達系や、さらには抵抗性発現を支える基礎的な代謝系を阻害するのかという、いくつかの可能性が予想される。いずれにしても、原形質膜に本サプレッサーが受容され、細胞の何らかの生理的作用に影響を与えることが必要であると思われる。

本章では、主に 3) の可能性を探るために、エンドウ上胚軸から水性二相分配法によって分離した原形質膜画分を用い、植物の成長、分化、物質やイオンの能動輸送、膜の電氣的ポテンシャル形成をはじめとして基礎的な代謝を支える原形質膜ATPaseにおよぼすエンドウ褐紋病菌サプレッサーの影響について調べた。

1. 材料および方法

1) 供試植物

エンドウ植物 (*Pisum sativum* L.) の品種ミドリウスイの種子を流水中で一昼夜催芽させた後、バーミキュライトを入れたプラスチック容器に播種した。ハイポネックス溶液を適量与え、20℃で6～10日間生育させた実生の上胚軸を用いた。なお、植物体に光が照射されることにより、抵抗反応を含む様々な代謝変動が報告されているので (Chappell and Hahlbrock 1984)、本研究では幼植物を暗黒条件下で生育した。

2) 供試菌

エンドウ褐紋病菌 (*Mycosphaerella pinodes* (Berkley et Bloxam) stone strain OMP-1) は、子う菌綱 (*Ascomycotina*) 真正子う菌亜綱 (*Euscomycetidae*)、球殻菌目 (*phaeriales*)、ピレノフォラ科 (*Pyrenophoraceae*) に属し、エンドウの葉、茎、莢などに黒褐色の小さい斑点を形成し、やがて輪紋のある病徴を形成する糸状菌である。有性世代では、 $14\sim 18\times 8\ \mu\text{m}$ の子う胞子を、無性世代では、 $9\sim 22\times 3\sim 4.5\ \mu\text{m}$ の柄胞子を、形成する。発育の最適温度は25℃であり、34℃以上あるいは0℃以下では生育できない。供試したエンドウ褐紋病菌は、1978年に岡山県赤磐郡山陽町

下市で採取した罹病キヌサヤエンドウ葉より分離され、横山竜夫博士（醸酵研究所）により同定され、IFO No. OMP-1 として登録されたものである。

3) エンドウ褐紋病菌の培養

継代培養したエンドウ褐紋病菌 (*Mycosphaerella pinodes*, IFO No. OMP-1)の菌糸をV-8ジュース寒天斜面培地（白石 1989a）上に移植し、20℃で6～7日間培養した。培地上に滅菌水を加え、白金耳で柄子殻表面を軽く摩ることにより柄胞子を遊離させ懸濁した。適当な濃度に調整した孢子懸濁液を、ステンレス製バッド（20×35×5 cm）に分注した Czapek 寒天培地（白石 1989a）上に滅菌筆を用いて塗布接種し、20℃、暗黒条件下で7日間培養した。

4) サプレッサーおよびエリクターの部分精製

サプレッサーおよびエリクターは Shiraishi et al. (1978)およびHiramatsu et al. (1986)の方法に準じ、エンドウ褐紋病菌 (*Mycosphaerella pinodes*) の柄胞子発芽液から調製した。培養を開始して7日間経過した後に、Czapek寒天培地上に滅菌水を加え、滅菌筆で柄子殻表面を軽く摩ることにより柄胞子を遊離させ懸濁した。得られた孢子懸濁液を予め滅菌したキムワイプを二重にして濾過し、菌糸断片や残渣を除去した濾過孢子懸濁液を4℃で20分間遠

心分離 ($3,000 \times g$) した。沈澱した胞子を再度滅菌水で懸濁し遠心分離することにより、胞子を洗浄した。このようにして得られた胞子懸濁液を、最終濃度で $1 \sim 2 \times 10^3$ spores/ml になるように調整し、 20°C で24時間振盪培養して胞子を発芽させた。その後、発芽胞子懸濁液を濾過して (東洋濾紙 5 B) 発芽胞子を取り除き、濾液を窒素ガスで加圧して (4 kg/cm^2) 限外濾過し (Millipore poration PTGC 142-05 ;分画分子量10,000)、エリクターを含む高分子画分とサプレッサーを含む低分子画分に分画した。高分子画分は、 4°C の蒸留水に対して透析し (分子量10,000カット)、透析膜内液を 4°C で20分間遠心分離して ($10,000 \times g$)、得られた上清をエリクター画分として用いた。低分子画分は凍結乾燥して適当量の蒸留水に溶解し、ゲル濾過 (Toyopearl HW-40F, Tosoh) により分画した。用いた装置および分画条件は、次の通りである。

[装置および分画条件]

- ・日立D-6000型クロマトグラフデータステーションHPLC
マネージャー
- ・日立クロマトグラフ 635S
- ・カラム樹脂 : 東ソー Toyopearl HW-40F
(分画範囲; $100 \sim 7,000 \text{ Da.}$)
- ・カラムサイズ : $26 \text{ mm i.d.} \times 400 \text{ mm}$
- ・溶出液 : 脱気蒸留水
- ・流量 : 1 ml/min.

- ・ 圧力 : 約 10 ～20 kg/cm²
- ・ 検出波長 : U. V. 210nm～360nm
- ・ 感度 : 2.00
- ・ 分析温度 : 室温

乾燥重量で 0.3g の低分子画分を 1 ml の脱気蒸留水に溶解してゲル濾過した。4 分ごとにサンプルを回収し、エリシター誘導によるピサチン蓄積抑制活性が最も高い画分を減圧乾燥し、その乾燥標品をサプレッサーとして用いた。Shiraishi et al. (1978) はさらにこの画分を薄層クロマトグラフィーによって分離し、ピサチン蓄積抑制活性を有する二つの活性画分を得て、いずれも糖ペプチドであることを報告している。しかしながら、実際の感染現場においてはこれら二つの活性画分とも孢子発芽時に分泌されることが予想される。したがって、これらの物質がそれぞれ単独もしくは協調的に引き起こす生理作用を総合的に調べる目的で、本実験においては二つの活性画分を含む粗画分を用いた。

本菌柄孢子が発芽時に分泌するエリシターは分子量が約 70,000 のマンノースおよびグルコースに富む多糖であることが報告されている (Thanutong et al. 1982)。したがって、エリシター濃度はグルコースを標準標品として糖定量し (Dubois et al. 1956)、最終濃度が 1 mg/ml となるように調整して 500 μ l ずつ分注したものを -20℃ で凍結保存した。一方、サプレッサーは分子量が約 5,000 以下の糖ペプチドであることが示唆されているので (Shiraishi et al.

1978)、牛血清アルブミンを標準標品として Lowry et al. (1951)の方法により定量した。サプレッサーの最終濃度が $200\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調整してエリシターと同様に $500\mu\text{l}$ ずつ分注したものを $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。実験に際しては、エリシターおよびサプレッサーとも必要量を室温で融解して用い、一度融解したものは用いないようにして凍結融解の繰り返しによる活性への影響を避けた。エリシターおよびサプレッサー分離の概要を Fig. 1 に示した。なお、以降に示す両者の濃度はグルコースおよび牛血清アルブミン (BSA) の換算値で示した。

5) エリシター、サプレッサーおよび各種阻害剤の処理

暗所で生育させたエンドウ上胚軸の中腹部分を 1.5cm の長さになるように切断し、さらに縦軸方向にそって二つに切断した。プラスチックバッド中のアルミホイル上にスポットしたエリシター溶液 (最終濃度 $500\mu\text{g}/\text{ml}$) および所定濃度のサプレッサーまたは阻害剤混合液に上胚軸片の切断面が十分に接するようにして、湿室条件下で18時間静置した。また、処理液は一对の上胚軸片あたり $100\mu\text{l}$ とした。

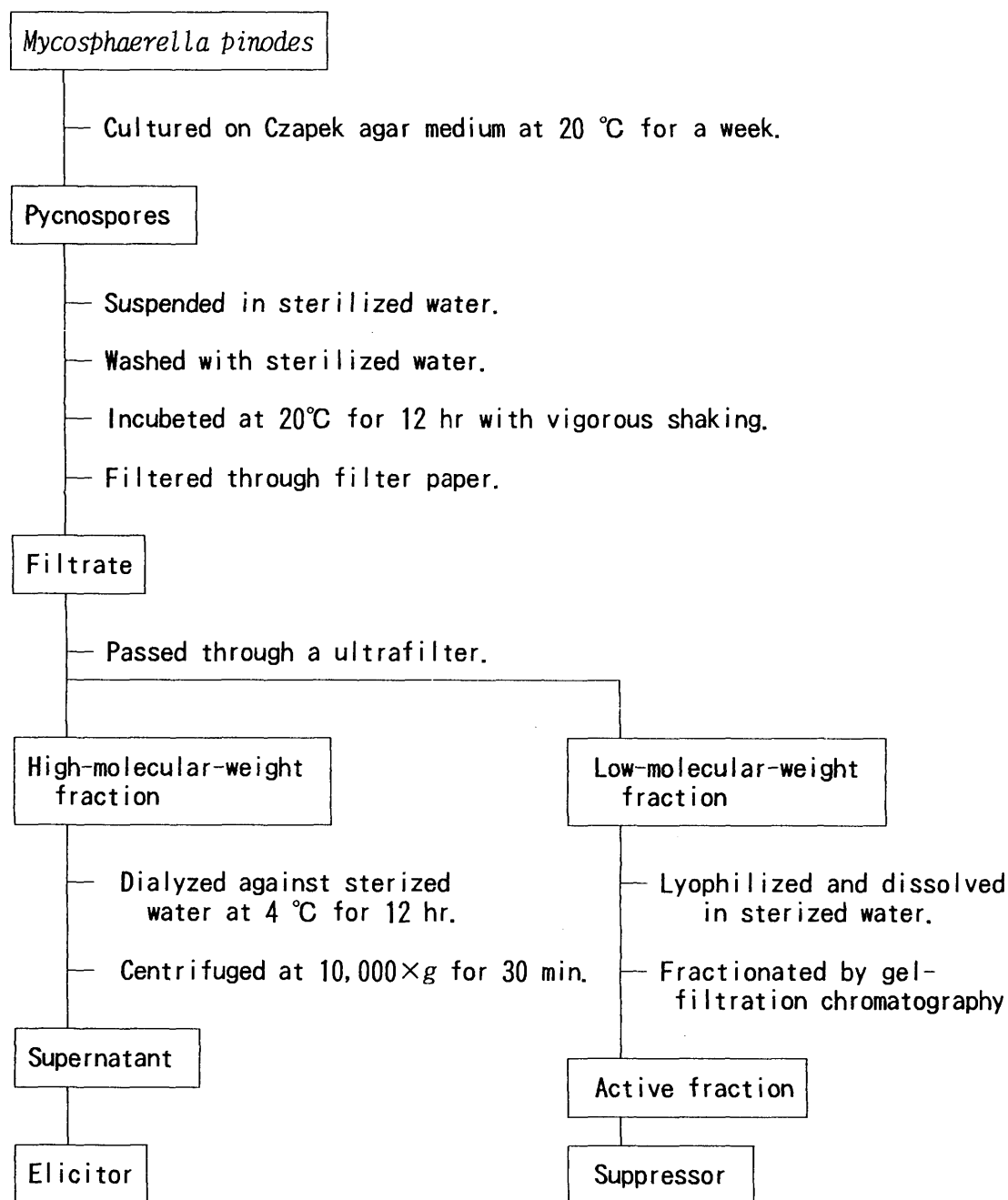


Fig. 1 Preparation scheme of fungal elicitor and suppressor from pycnospore germination fluid of *Mycosphaerella pinodes*.

6) 高速液体クロマトグラフィーによるピサチン定量

ピサチンの抽出および定量は Masuda et al. (1983) の方法に準じて行った。所定時間各処理を施した胚軸片を試験管中の 1 ml、100%エタノールに浸漬して固定し、熱湯水を用いて30分間熱抽出した。組織を取り出し、得られた抽出液を減圧下で濃縮乾固した。乾燥標品に50 μ lの溶出液を加えて溶解し、10 μ lを高速液体クロマトグラフィーによるピサチン定量に用いた。用いた分析装置および分析条件は、以下に示した。

[装置および分画条件]

- ・ 島津高速液体クロマトグラフ LC-3A型

- ・ 島津高速液体クロマトグラフ用紫外線分光光度計検出器

2PD-3A

- ・ 分析カラム : E. Merch Lichrosorb Si-100 (4 Φ × 250 nm)

- ・ 溶出液 : n-ヘキサン : テトラヒドロフラン : 酢酸

= 88 : 12 : 0.5 (V/V)

- ・ 流量 : 2 ml/min.

- ・ 圧力 : 約 80 kg/cm²

- ・ 検出波長 : U.V. 309 nm

- ・ 感度 : 0.02

- ・ 分析温度 : 室温

ピサチンは本条件下で保持時間約 5.8分に溶出される。ピサチンは 286nmと309 nmに極大吸収を持つ化合物である ($OD_{390\text{ nm}}/OD_{286\text{ nm}} = 1.47$)。ピサチン濃度は、予め精製された標品の309 nmにおける吸光度から標準線を算出して決定した ($OD_{390\text{ nm}} 1.0 = 15.2\mu\text{g/ml}$)。

7) 原形質膜画分の調製

エンドウ褐紋病菌サプレッサーの原形質膜ATPase活性におよぼす影響を調べるために、Yoshida et al. (1986)の方法を一部改良して、エンドウ植物から水性二相分配法により原形質膜画分を調製した (Fig. 2)。本章 1. 1) で述べたように暗黒下で生育した黄化エンドウ上胚軸を水道水で洗浄した後、4 °Cの冷蔵庫で約 1 時間冷却した。エンドウ上胚軸 (200g) を乳鉢に入れ、あらかじめ 4 °Cに冷却した 200mlの摩砕緩衝液中 [75mM MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid)/KOH (pH 7.6), 0.25M sucrose, 5 mM disodium ethylenediaminetetraacetate, dihydrate (EDTA), 5 mM glycoethylenediaminetetraacetic acid (EGTA), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 4 mM salicylhydroxamic acid (SHAM), 10 $\mu\text{g/ml}$ butylated hydroxy toluene (BHT), 2.5mM potassium metabisulfate, 0.5% (W/V) bovine serum albumine (BSA) defatted, 1.5% (W/V) Polyclar AT] で十分摩砕した。懸濁液を4層に重ねたガーゼで濾過し、濾液を4 °Cで15分間遠心分離 (12,500 $\times g$) して残渣や核、ミトコンドリアなどを取り除いた。

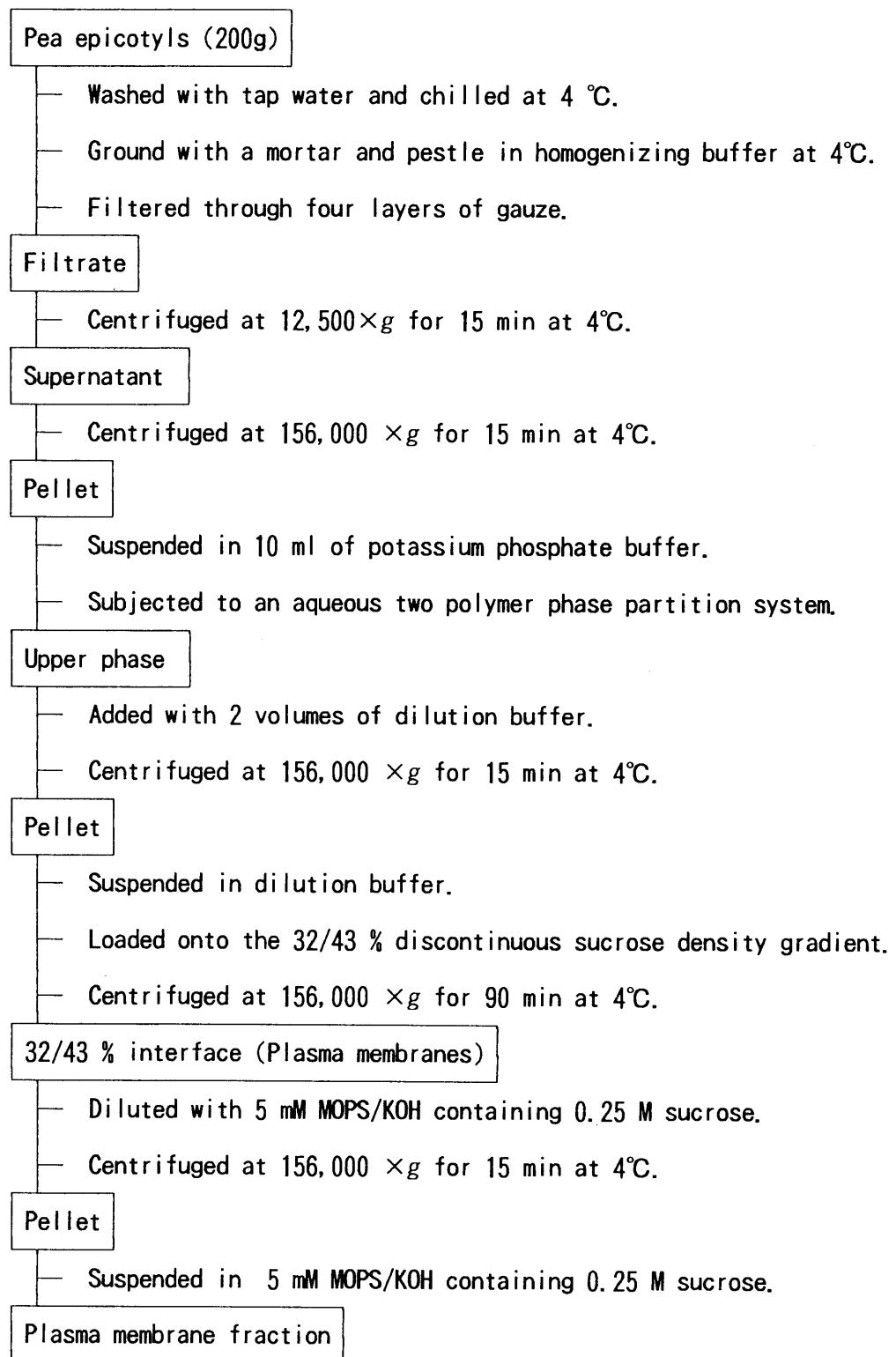


Fig. 2 Preparation scheme of plasma membrane fraction from pea epicotyls.

得られた上清を再度 4 °C で15分間遠心分離 (156,000 $\times g$) して、沈澱物を 10ml のリン酸緩衝液 [10mM potassium phosphate (pH 7.6), 0.25M sucrose, 10mM NaCl] でテフロンホモゲナイザーを用いて懸濁して、ミクロゾーム画分 (原形質膜、トノプラスト膜、小胞体膜およびゴルジ体膜などを含む) を得た。新たな遠心管 2 本に 25ml ずつ二相分配溶液 [10mM potassium phosphate (pH 7.6), 5.6% (W/W) Dextran T500, 5.6% (W/W) polyethyleneglycol (PEG 4000, M.W. 3350), 0.25M sucrose, 10mM NaCl] を分注し、それぞれの遠心管にミクロゾーム画分を 5 ml ずつ加えた。遠心管を横にしてミクロゾーム画分を含む二相分配溶液を30回軽く攪拌した後、0 °C で4分間遠心分離 (1,000 $\times g$) して下層 (トノプラスト膜、小胞体膜およびゴルジ体膜などを含む) と上層 (原形質膜およびトノプラスト膜) とに分け、上層を回収した。このようにして得られた上層に2倍量以上の希釈緩衝液 [75mM MOPS/KOH (pH 7.6), 0.25M sucrose, 10mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2mM PMSF, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 μ g/ml BHT] で希釈して 4 °C で15分間遠心分離 (156,000 $\times g$) して、遠沈物を再度希釈緩衝液で懸濁した。懸濁液を不連続ショ糖密度勾配 [43% (W/W) sucrose, 32% (W/W) sucrose in 75 mM MOPS/KOH (pH 7.6), 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 μ g/ml BHT] に重相して、4 °C で90分間遠心分離 (156,000 $\times g$) した。43% と32% の境界層に見える白いバンドを注射器で回収し、0.25M のショ糖を含む保存用緩衝液 (5 mM MOPS/KOH, pH 7.6) を加え、4 °C で15分間遠心分離 (156,000 \times

g) することにより洗浄して同じ緩衝液で懸濁した画分を原形質膜画分として用いた。なお、原形質膜の量は BSA を標準タンパクとして Lowry et al. (1951) の方法により評価し、凍結融解による膜脂質および膜タンパクの変成を避けるために少量ずつ分注して -80°C で保存した。

8) 原形質膜 ATPase 活性の測定

原形質膜 ATPase 活性の測定は、Perlin and Spanswick (1981) の方法に従って行った。反応液 [30mM Tris(hydroxymethy)

aminomethane/Mes (pH 6.5), 3 mM ATP, 3 mM MgSO_4] の最終量が $25\mu\text{l}$ となるようにして、サプレッサーおよび各種阻害剤をエッペンドルフチューブ内で混合した。原形質膜 $3\mu\text{g}$ (BSA 換算値) を添加することにより反応を開始して、 37°C で 15 分間静置した。その後、エッペンドルフチューブを氷冷することにより反応を停止した。随時調製した 10% アスコルビン酸溶液と、1 N の硫酸液中に 0.42% となるように溶解したモリブデン酸溶液を 1 対 5 となるように混合したものを $50\mu\text{l}$ 酵素反応液に添加して 25°C で 30 分間静置した。波長

820nm における反応液の吸光度を測定して ATPase 活性を求めた。なお、対照区として、20 分間煮沸して変成させた原形質膜を反応液に加えた実験区を設け、ATP の非酵素的な分解や試料の持込みによる無機リン反応を見かけの酵素活性値から差し引いて実際の酵素活性を求めた。また、酵素活性はリン酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4) を

用いてあらかじめ作成した標準曲線より無機リン量を算出して表した。

分離した原形質膜がインサドアウトか、ライトサイドアウトかを検討するために、ATPase抗体で原形質膜を前処理してATPase活性が阻害されるか否かを調べた。原形質膜の安定化のために緩衝液に加えられた0.25Mのサッカロースが抗体を処理する際に希釈されるとATPase活性は顕著に低下する。そこで、原形質膜懸濁液に抗体溶液または必要に応じてTriton X-100を添加し、最終濃度で0.25Mになるようにサッカロースを加えて25℃で30分間前処理し、ATPase活性を調べた。原形質膜ATPase抗体にはリョクトウの67KDa ATPaseに対して調製されたうさぎ抗体を500倍になるように希釈して用いた (Kimura et al. 1988)。

9) *in vitro*での原形質膜タンパク質のリン酸化

*in vitro*での原形質膜タンパク質のリン酸化は Farmer et al. (1989) および Amory et al. (1980)の方法を一部改変して行った。本章1.4)に述べたようにして分離した23 μ gの原形質膜 (BAS換算値)に反応液 [30mM Tris/Mes (pH 6.5)、3 mM MgSO₄]の最終量が40 μ lとなるようにして、50 μ g/mlのサプレッサー (最終濃度) および20 μ g/mlのプロテインキナーゼ阻害剤であるK252a (Felix et al. 1991)をエッペンドルフチューブ内で混合した。 [γ -³²P]ATP (222MBq)を添加することにより反応を開始して、30℃で2分間静

置した。また、リン酸化されたATPaseを未標識の ATPを添加し、チェースする場合は 0℃で30秒間 [γ - 32 P]ATP (222MBq) でリン酸化し、30mMの ATP溶液10 μ lを添加してさらに 1 ないし 2 分間反応させた。その後、あらかじめ氷冷した 10%のトリクロロ酢酸 (TCA)溶液を反応液と等量添加して反応を停止し、氷上で10分間冷却してタンパクを変成させ、15分間 4℃で遠沈した。上清を取り除き、5%の TCA溶液で洗浄した後、非特異的にタンパクへ結合した [γ - 32 P]ATPを取り除くために、30mMの ATPを含む 5% の TCA溶液でさらに洗浄した。

10) 電気泳動とオートラジオグラフィー

遠心分離 (5,000 $\times g$) して得られたタンパクの沈澱をジエチルエーテルで処理して、風乾した後 Laemmli (1970) の方法に従って 20 μ l の試料緩衝液中 [0.025M Tris-HCl (pH 6.8), 0.192M glycine, 0.1% SDS]で試料タンパク質を 5 分間煮沸することにより可溶化した後氷冷し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動は 10mA 定電流で 8 時間、ゲルは 4~20% のアクリルアミド濃度勾配ゲル [第一化学 (株)]、分子量マーカーにはマーカータンパク質の混合物 (レインボーマーカー、Pharmacia 社) を用いた。泳動後、クーマシーブリリアントブルー R250 でゲル中のタンパクを染色して、泳動したタンパク量が各処理区間で等しいことおよび分子量マーカーの位置を常時確認した。ゲル乾燥器でゲルを乾

燥し、X 線フィルムに感光させ、リン酸化したタンパク質の位置を確認した。

2. 実験結果

1) エンドウ褐紋病菌サプレッサーおよびエリシターの ピサチン蓄積におよぼす影響

エンドウ褐紋病菌の孢子発芽液 3 ℓ を限外濾過して得られた低分子画分の乾燥標品は総量で約 2 g であった。この乾燥標品 0.3 g を脱気蒸留水に溶解し、遠心分離した上清をゲル濾過した際の溶出パターンを Fig. 3A に示した。エリシター誘導によるピサチン蓄積を顕著に抑制する画分は、280nm での吸光測定において、カラム保持時間約 95 分から観察される四番目のピークの少し前の部分に存在することが報告されている（金 1991）。さらに、Fig. 3B に示したようにカラム保持時間 15 分後から 4 分間隔で回収した試料を減圧乾固して重量を測定したところ、サプレッサー活性を有すると思われるフラクションナンバー 19 および 20 が最も多く、両画分を合わせると、約 50mg であった。したがって、本菌孢子発芽液 3 ℓ から、約

340mg のサプレッサー画分が得られた。Shiraishi et al. (1978) は、ゲル濾過したサプレッサー画分を薄層クロマトグラフィーでさらに分画したところ、ニンヒドリンで染色される二つの活性画分が存在することを報告している。したがって、本サプレッサーはアミノ酸を含むと思われたので、以後サプレッサー濃度はタンパク換算値で示すこととした。エリシター（最終濃度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）とサプレッサー（最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の混合液でエンドウ上胚軸を処理した場

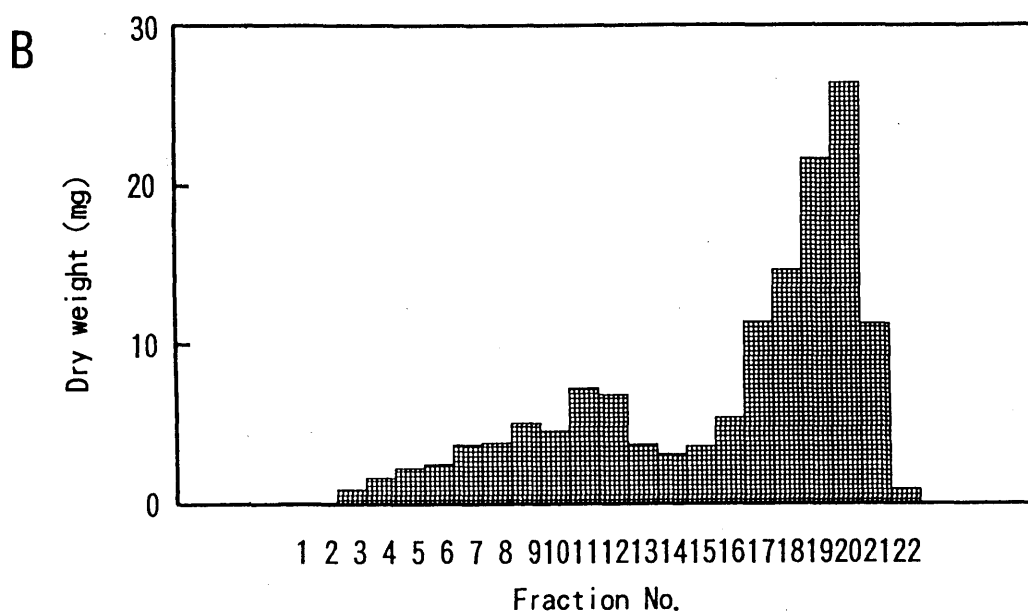
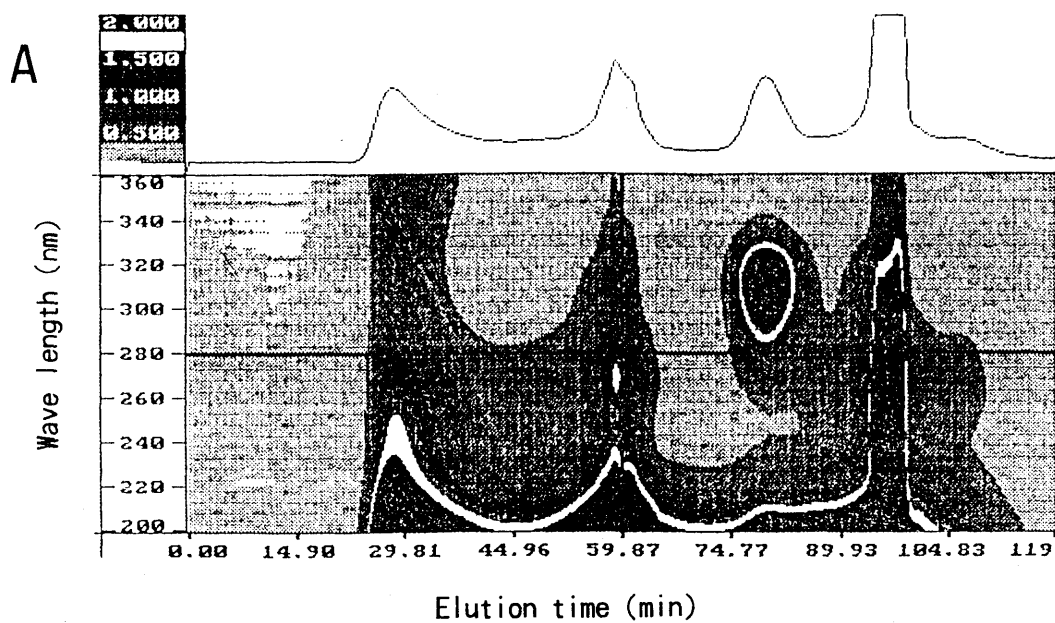


Fig. 3 The elution pattern of low-molecular-weight substances from spore germination fluid from *Mycosphaerella pinodes* by gel chromatography (A) and dry-weight contents of fractionated samples (B).

合、エリシターを単独で処理した場合に比べ顕著にピサチン蓄積を抑制した (Table 2)。本実験結果は、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のサプレッサー濃度でサプレッサー活性を発揮するとした Yamada et al. (1989) の報告と一致したので、本研究を通してこのゲル濾過画分をサプレッサーとして用いた。

2) 原形質膜ATPaseの諸性質

細胞の膜系に存在するATPaseは原形質膜ATPase (P-type ATPase) ミトコンドリアおよびクロロプラストATPase (F_0F_1 -ATPase)さらに液胞膜ATPase (V-type ATPase)に大別することができる (Serrano 1990)。本ATPase活性が原形質膜に由来するものか否かを検討するために、種々の阻害剤で原形質膜を処理し、ATPase活性を調べた。さらに、原形質膜ATPaseの活性を增高させる働きが報告されている Ca^{2+} や K^+ の影響 (Rasi-Caldogno et al. 1987, Rasi-Caldogno et al. 1992, Serrano 1990) についても併せて検討した結果を Table 3 に示した。 Mg^{2+} 非存在下や二価カチオンのキレート剤であるEDTA存在下では、対照区に比べ顕著に活性が低かった。さらに、P-type ATPase によるリン酸の放出を促進することが報告されている K^+ で本酵素を処理すると活性が増加したが、 Ca^{2+} 添加ではこのような増加は認められなかった。一方、P-type ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸で処理すると濃度に依存した活性阻害が観察されたが、V-type ATPase の阻害剤であるショウ酸や、 F_0F_1 -

Table 2. Effect of fungal suppressor on accumulation of pisatin in elicitor-treated pea epicotyls

Treatment (final concentration)	Pisatin accumulated ^a ($\mu\text{g/g}$ fresh weight)	Mean value (% control)
Water	2.0 ± 0.4	11
Elicitor (500 $\mu\text{g/ml}$) ^b	18.9 ± 2.3	(100)
Suppressor (50 $\mu\text{g/ml}$) ^c	2.8 ± 0.7	15
Elicitor ^d + Suppressor ^d	5.3 ± 1.0	28

^aThe amount of pisatin was determined 18 hr after the respective treatment by the method described by Masuda et al. (1983). Each value represents the mean \pm SE in triplicate experiments.

^bThe concentration of fungal suppressor was determined by the method of Lowry et al. (1951) with BSA as the standard.

^cThe concentration of fungal elicitor was determined by the method of Dubois et al. (1956) with glucose as the standard.

^dFinal concentrations of elicitor and of suppressor in mixture were 500 $\mu\text{g/ml}$ glucose equivalents, and 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA equivalents, respectively.

Table 3. Effect of several inhibitors on ATPase activity in pea plasma membranes

Treatment (final concentration)	ATPase activity ^a (μ mol Pi/mg protein/hr)	Mean value (% control)
Control	25.4 \pm 0.6	(100)
-MgSO ₄	2.4 \pm 0.2	9
EDTA (10 mM)	7.8 \pm 0.7	31
KCl (50 mM)	28.0 \pm 0.8	110
CaCl ₂ (0.1 mM)	25.7 \pm 0.5	101
Na ₃ VO ₄ (0.1 mM)	10.3 \pm 0.9	41
(1 mM)	3.8 \pm 0.4	14
NaNO ₃ (50 mM)	27.2 \pm 2.4	107
DCCD (0.1 mM)	21.3 \pm 1.4	84
(1 mM)	13.3 \pm 0.6	52
NaN ₃ (0.1 mM)	22.0 \pm 2.1	87

^aThe assay for ATPase activity was carried out in 30 mM Tris-Mes (pH 6.5) that contained 3 mM MgSO₄ and 3 mM ATP at 37 °C for 15 min by the method described by Perlin and Spanswick (1981). Each value represents the mean \pm SE in triplicate experiments.

ATPase 阻害剤のアジ化ナトリウムで処理してもほとんど活性は阻害されなかった。さらに、膜内に存在するタンパク質の疎水領域に結合し、ATPaseを含む種々の膜系酵素活性を阻害することが知られているDCCD (Serrano 1989) にも感受性であった。以上のように、本酵素活性の Mg^{2+} 要求性、 K^{+} による活性増加や阻害剤に対する感受性より、本画分は原形質膜に富んでいると判断された。

本活性がプロトンATPaseかあるいは種々のヌクレオチドリン酸に対して非特異的な分解作用を示す Ca^{2+} -ATPase (Carnelli et al.

1992)のいずれの活性に由来するかを検討するために、ヌクレオチドリン酸を用いて基質に対する特異性を調べた。その結果、本活性はATP に対して高い活性を示し、CTP, ADP, GTP, UTPの順に活性が認められた。したがって、本活性はプロトンATPase活性を反映しているものと思われた (Table 4)。さらにピロリン酸に対してはほとんど活性が検出されなかったことより、液胞膜に存在する PPase活性も極めて低いことが伺われた (Takeshige et al. 1988, Sarafian and Poole 1989)。

原形質膜ATPaseは活性ドメインを細胞質側に構築されるようにして原形質膜を4回往復するように埋め込まれて存在することが示唆されている (Serrano 1988)。本実験を通して用いた原形質膜がインサイドアウトかライトサイドアウトのいずれかを検討するために、リョクトウの67KDa ATPaseに対する抗体で原形質膜画分を処理してATPase活性におよぼす影響を調べた (Table 5)。この抗体処理ではATPase活性は全く阻害されなかった。しかしながら、抗体と同時に

Table 4. Substrate specificity of ATPase activity in pea plasma membranes

Substrate	ATPase activity ^a (μ mol Pi/mg protein/hr)	Mean value (% control)
ATP (control)	27.0 \pm 0.6	(100)
ADP	6.3 \pm 0.6	23
CTP	11.2 \pm 0.7	41
GTP	4.4 \pm 1.7	16
UTP	2.7 \pm 1.8	10
PPi	1.3 \pm 0.4	5

^aThe assay for ATPase activity was carried out in 30 mM Tris-Mes (pH 6.5) that contained 3 mM MgSO₄, plus substrate at a concentration of 3 mM ATP at 37°C for 15 min by the method described by Perlin and Spanswick (1981). Each value represents the mean \pm SE in triplicate experiments.

Table 5. Effect of antibody against ATPase on the activity in pea plasma membranes

Expt.	Treatment	ATPase activity ^a (μ mol Pi/mg protein/hr)	Mean value (% control)
1	Control	21.4 \pm 0.9	(100)
	Antibody ^b	20.1 \pm 1.2	94
2	Control	20.2 \pm 0.5	(100)
	Triton X-100 ^c	24.7 \pm 0.7	122
	Triton X-100 ^d + Antibody ^d	9.4 \pm 0.5	47

^aThe assay for ATPase activity was carried out in 30 mM Tris-Mes (pH 6.5) that contained 3 mM MgSO₄ and substrate at a concentration of 3 mM ATP at 37 °C for 15 min by the method described by Perlin and Spanswick (1981). Each value represents the mean \pm SE in triplicate experiments.

^bThe antibody against 67 kDa-ATPase in mung bean plasma membranes described by Kimura et al. (1988) was diluted 1/500 in the reaction mixture.

^cThe concentration of detergent was 0.01 % in the reaction mixture.

^dFinal concentrations of detergent and of antibody in mixture were 0.01 % and 1/500 dilution, respectively.

界面活性剤であるTriton X-100で処理した場合、対照区に比べATPase活性が約 50%阻害された。このこととTriton X-100単独処理区では未処理区より活性が増加したことを考え併せると、本実験で用いた原形質膜の大部分はライトサイドアウトであると判断された。

3) サプレッサーおよび各種阻害剤のATPase活性におよぼす影響と阻害様式

原形質膜ATPase活性におよぼすエリシターおよびサプレッサーの影響について調べたところ、原形質膜画分にエリシターを添加してもATPase活性の変動は認められなかったが、サプレッサーは添加濃度に依存して (50～ 150 μ g/ml) 阻害作用を示した (Table 6)。また、エリシターとサプレッサーを混合処理した場合においても原形質膜ATPaseはサプレッサー単独処理区と同程度に阻害された。

Shiraishi et al. (1990) は種々の Ca^{2+} アンタゴニストでエンドウ上胚軸を処理し、その後エリシター処理によるピサチン蓄積に対する阻害効果を調べ、ベラパミルのみが有意に阻害することを報告している。しかしながら、ベラパミルによる阻害は Ca^{2+} アンタゴニストとしての効果によるものか否かは未詳であることを指摘している。そこで、同様の Ca^{2+} アンタゴニストで原形質膜を処理してATPase活性を測定した (Table 7)。EGTA, LaCl_3 および TMB-8で処理すると活性低下は認められなかったが、ベラパミルで処理した場

Table 6. Effect of elicitor or suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on ATPase activity in pea plasma membranes

Treatment (final concentration)	ATPase activity ^a (μ mol Pi/mg protein/hr)	Mean value (% control)
Control	25.4 \pm 0.6	(100)
Suppressor ^b (50 μ g/ml)	17.7 \pm 0.6	70
(150 μ g/ml)	5.2 \pm 0.5	20
Elicitor ^c (500 μ g/ml)	24.4 \pm 1.3	96
Elicitor ^d + Suppressor ^d	17.8 \pm 0.8	70

^aThe assay for ATPase activity was carried out in 30 mM Tris-Mes (pH 6.5) that contained 3 mM MgSO₄ and 3 mM ATP at 37 °C for 15 min by the method described by Perlin and Spanswick(1981). Each value represents the mean \pm SE in triplicate experiments.

^bThe concentration of fungal suppressor was determined by the method of Lowry et al.(1951) with BSA as the standard.

^cThe concentration of fungal elicitor was determined by the method of Dubois et al.(1956) with glucose as the standard.

^dFinal concentrations of elicitor and of suppressor in mixture were 500 μ g/ml glucose equivalents, and 50 μ g/ml BSA equivalents, respectively.

Table 7. Effect of several antagonists of calcium on ATPase activity in pea plasma membranes

Treatment (final concentration)		ATPase activity ^a (μ mol Pi/mg protein/hr)	Mean value (% control)
Control		21.9 \pm 1.3	(100)
La ³⁺	(500 μ M)	20.8 \pm 1.6	95
EGTA	(500 μ M)	21.5 \pm 1.0	98
TMB-8	(500 μ M)	20.3 \pm 1.3	93
Verapamil	(250 μ M)	9.4 \pm 3.4	42

^aThe assay for ATPase activity was carried out in 30 mM Tris-Mes (pH 6.5) that contained 3 mM MgSO₄ and 3 mM ATP at 37 °C for 15 min by the method described by Perlin and Spanswick (1981). Each value represents the mean \pm SE in triplicate experiments.

合のみ顕著な活性の低下が起こることが明らかになった。この Ca^{2+} アンタゴニストのATPaseに対する効果は、Shiraishi et al.

(1990)が行ったエリシター誘導によるピサチン蓄積に対する阻害効果と一致するものであった。

サプレッサーおよびベラパミルの原形質膜ATPase活性阻害様式を、原形質膜ATPaseの阻害剤であるオルトバナジン酸と併せて調べ、阻害様式を比較した。種々の濃度のMg-ATPとベラパミルを原形質膜画分に添加して阻害様式を調べた結果、ベラパミルは K_m 値には影響せず V_{max} 値を低下させ、非拮抗阻害の様相が示された (Fig. 4A)。一方、オルトバナジン酸およびサプレッサーは K_m および V_{max} 双方の値に影響を与え、反拮抗阻害の様相を示した (Fig. 4B と 4C)。

4) サプレッサー、ベラパミルおよびオルトバナジン酸による 原形質膜ATPaseの活性阻害とエリシター誘導による ピサチン蓄積抑制との相関

サプレッサーおよび各種阻害剤による原形質膜ATPase阻害とエリシター処理されたエンドウ上胚軸でのピサチン蓄積抑制との間に相関があるか否かを検討した。各種濃度に調製したベラパミル (50, 100, 150 μM)、オルトバナジン酸 (10, 100, 1000 μM)、サプレッサー (50, 100, 150 $\mu\text{g/ml}$)で原形質膜画分を処理した際のATPase阻害と 500 $\mu\text{g/ml}$ のエリシターと阻害剤を同時処理した際のピサチン

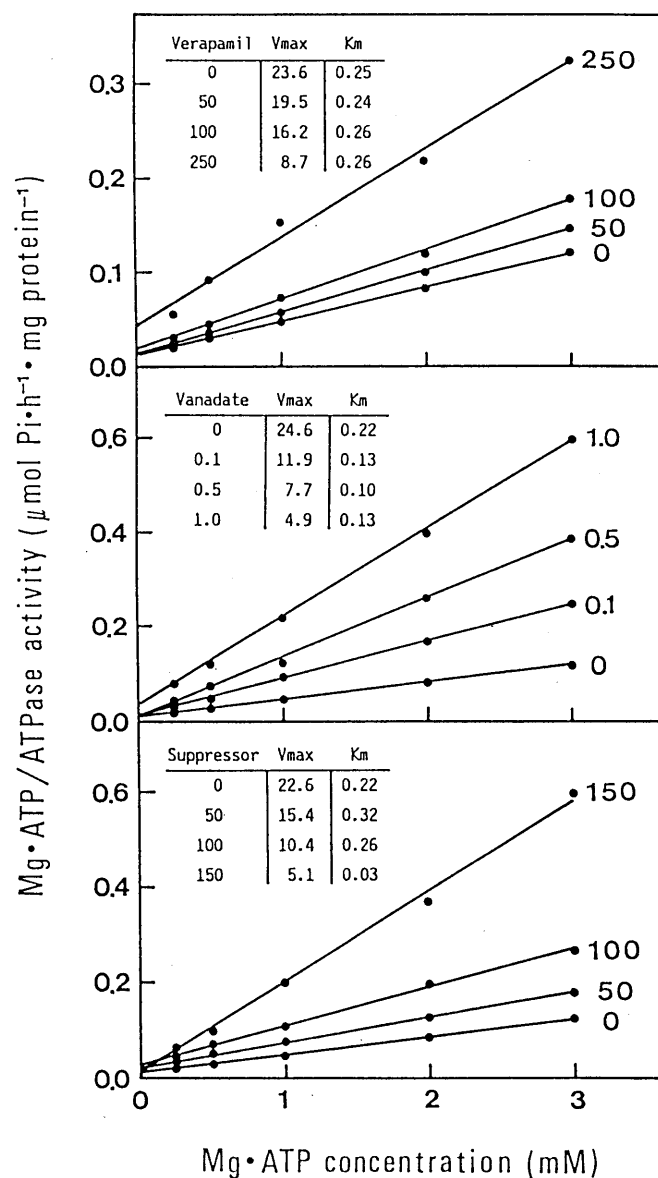


Fig. 4 Hanes-Woolf plot of inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes by verapamil (A), orthovanadate (B) and the fungal suppressor from *Mycosphaerella pinodes* (C). The numbers beside lines show the concentrations of verapamil (μM), orthovanadate (mM) and suppressor ($\mu\text{g/ml}$, BSA equivalents), respectively. The correlation coefficient for each line was more than 0.99 by linear regression analysis. The values of V_{max} and K_{m} are represented by the amount of released inorganic phosphate ($\mu\text{mol/mg protein/hr}$) and the concentration (mM) $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$, respectively. The assay for ATPase activity was carried out with a mixture of $3\mu\text{g}$ (BSA equiv.) of pea plasma membranes, inhibitors or fungal suppressor and $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ in 30 mM Tris-Mes ($\text{pH } 6.5$) at 37°C for 15 min by the method described by Perlín and Spanswick (1981).

蓄積抑制率を比較した (Fig. 5)。その結果、いずれの化合物も処理した濃度に依存してATPase活性とピサチン蓄積ともに抑制した。オルトバナジン酸で処理した場合、*in vitro*におけるATPase活性抑制率と*in vivo*でのピサチン蓄積抑制率がほぼ同程度であった。それに対し、ベラパミルおよびサプレッサーでは、ATPase活性抑制率に比べピサチン蓄積抑制率が高かった。

5) *in vitro*での原形質膜タンパク質のリン酸化および電気泳動

原形質膜ATPaseは基質であるATPを加水分解する過程において、 Mg^{2+} の存在下でATPと複合体を形成し、 γ -位のリン酸によりリン酸化されADPを放出する。その後、リン酸を放出するといった反応様式をとることが報告されている (Fig. 6, Briskin and Leonard 1982)。原形質膜ATPaseのリン酸化におよぼすサプレッサーの影響を調べるために、サプレッサーと $[\gamma-^3P]ATP$ で処理してリン酸化された原形質膜タンパク質を4~20%、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により分析したところ、サプレッサー無処理区に比べ少なくとも三画分 (78kDa, 64kDaおよび42kDa)のタンパク質のリン酸化が阻害された (Fig. 7A)。さらに、ATPaseのリン酸化とプロテインキナーゼによる原形質膜タンパク質のリン酸化と区別するために、プロテインキナーゼの阻害剤であり、顕著にリン酸化を阻害することが報告されている K252a (Grosskopf et al. 1990)を単独で処理し

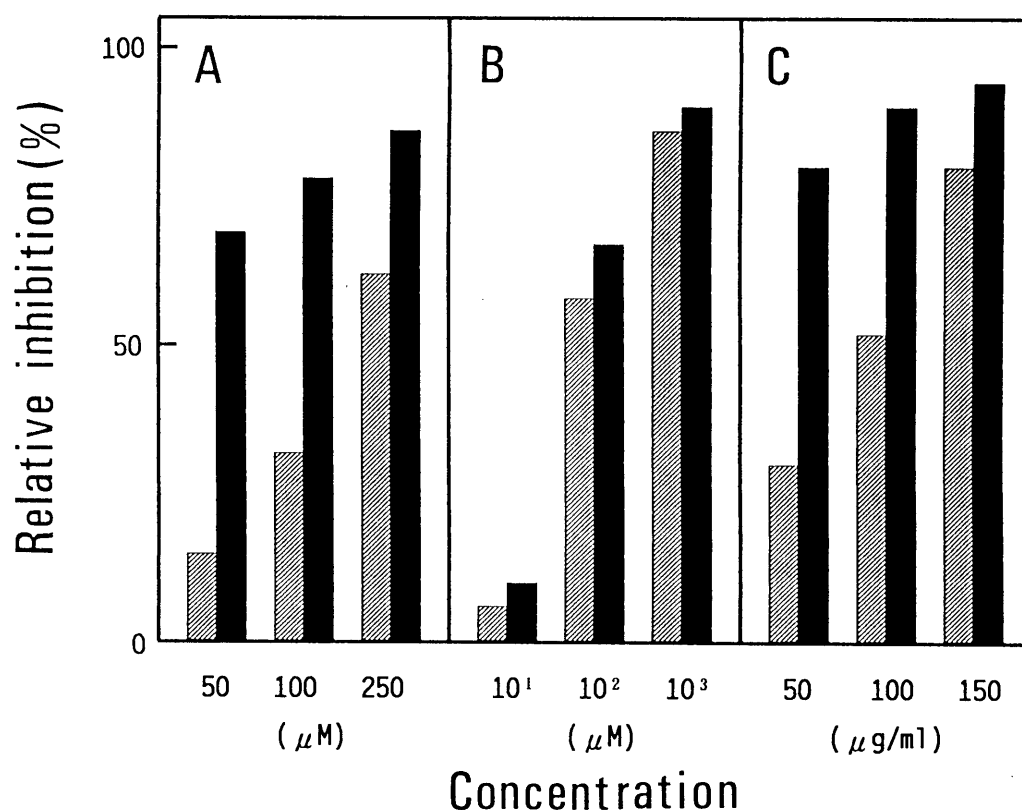


Fig. 5 Comparison of profiles of inhibition between ATPase activity (▨) and accumulation of pisatin (■) with verapamil (A), orthovanadate (B) and the fungal suppressor (C) as inhibitors. The ATPase activity was determined as described in the legend to Figure 1, and accumulation of pisatin was measured 18 hr after the treatment with each agent. The relative inhibition value was calculated as follows: inhibition of ATPase activity (%) = $(1 - \text{Inhibitor}^a \div \text{Control}^a) \times 100$; and inhibition of pisatin accumulation (%) = $[1 - (\text{Inhibitor plus Elicitor}^b - \text{Inhibitor}^b) \div (\text{Elicitor}^b - \text{Water}^b)] \times 100$, respectively. a: The ATPase activity ($\mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$) in the presence or absence of inhibitor. b: The amount of pisatin ($\mu\text{g/g fresh weight}$) in pea epicotyls 18 hr after treatment with inhibitor plus elicitor, with inhibitor, with elicitor and water and water alone, respectively.

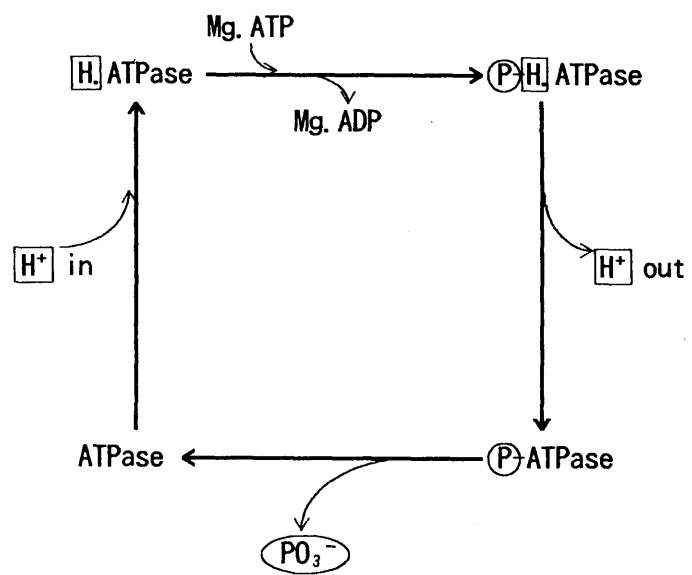


Fig. 6 Model for H⁺-ATPase in the plasma membrane of plant cells.

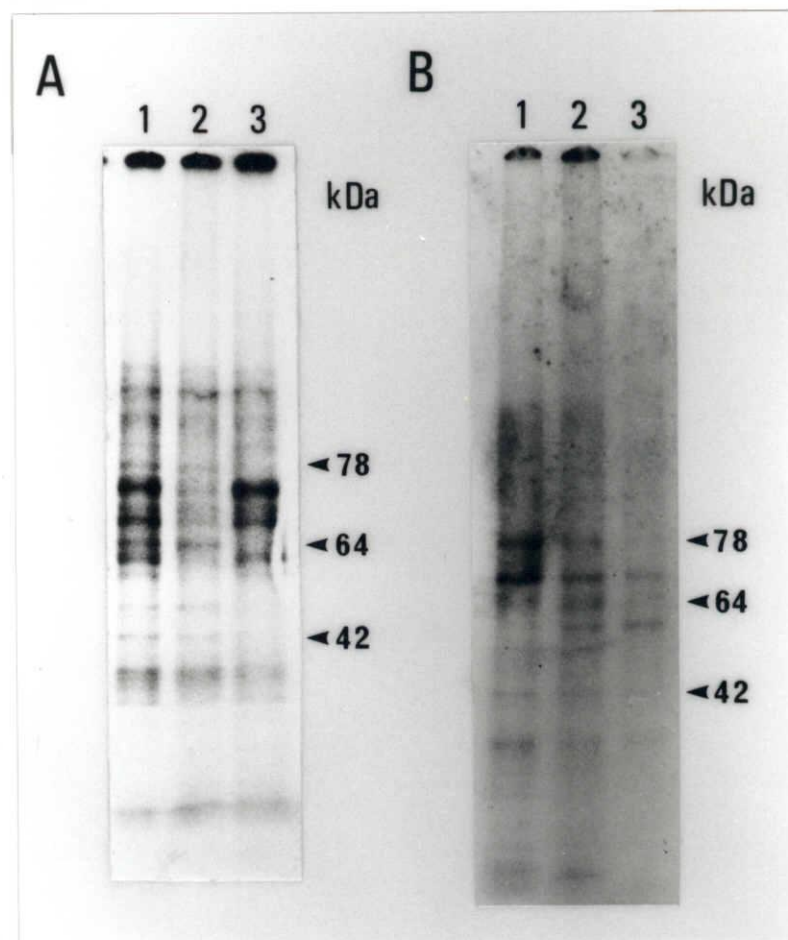


Fig. 7 *In vitro* phosphorylation of pea plasma membrane proteins in response to K252a or fungal suppressor from *Mycosphaerella pinodes* and chase with unlabeled ATP. A; Pea plasma membrane (23 μ g) was phosphorylated with [γ - 32 P]ATP for 2 min at 30°C in the presence or absence of K252a or fungal suppressor. Lanes: 1, control, 2 min phosphorylation; 2, phosphorylated for 2 min in the presence of 20 μ M K252a; 3, phosphorylated for 2 min in the presence of 50 μ g/ml (BSA equivalents) fungal suppressor. B; Lanes: 1, control, 30 sec phosphorylation at 0°C; 2 phosphorylated for 30 sec followed by 1 min chase with 6 mM unlabeled ATP; 3, phosphorylated for 30 sec followed by 2 min chase with 6 mM unlabeled ATP.

たところ、上記のタンパク質はリン酸化された。また、 $[\gamma -$
 $^{32}\text{P}]$ ATPで処理し、0℃で30秒静置した後、放射線未標識のATPを
加えると78kDa, 64kDa, 42kDa のタンパクの放射線活性が弱まった
(Fig. 7B)。

3. 考察

本章では、エンドウ褐紋病菌から分離したサプレッサーが本菌宿主の原形質膜ATPaseの活性を濃度に依存して阻害することを*in*

*vitro*で示した。このサプレッサーは今回の実験に用いた濃度で、いずれもエリシター誘導によるエンドウ組織におけるピサチン生産を抑制し、エンドウに非病原菌の感染を誘導する活性を有する

(Oku et al. 1980, Oku 1980)。ATPase阻害とピサチン蓄積抑制との相関をより明確にするために、P-type ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸をエリシターと混合処理してピサチン蓄積を調べたところ、エリシター単独処理に比べ顕著に減少した。この結果はATPase阻害がピサチン生成の抑制と相関していることを示す。

一方、アズキ (Hattori and Ohta 1985)やピーナッツ (Steffens et al. 1989) の培養細胞に、オルトバナジン酸を処理すると、非生物のエリシターとして作用することが報告されている。しかし、本研究では、エンドウ組織に投与した際には、サプレッサーと同様にピサチン生産を抑制する結果が得られ、オルトバナジン酸の作用様式が培養細胞と分化した細胞とで異なることを示唆していると思われる。この考えは、対数増殖期を過ぎた安定期にあるピーナッツの培養細胞をオルトバナジン酸で処理した場合は、ピーナッツのファイトアレキシンの合成に関与する酵素である PALが活性化しないといった実験報告からも支持されるであろう (Steffens et al. 1989)。

Ca^{2+} のチャンネルブロッカーであり、植物においても原形質膜画分に受容体が存在することが報告されているベラパミルは (Andrejauskas et al. 1985, Harvey et al. 1989)、ピサチン蓄積とATPase活性の双方を抑制した。 Ca^{2+} は、ニンジンやダイズの培養細胞およびジャガイモ組織においてファイトアレキシン生産系のセカンドメッセンジャーとして機能している可能性が示唆されている (Kurosaki et al. 1987b, Stab and Ebel 1987, Chai and Doke 1987)。しかしながら、エンドウ上胚軸においては、 Ca^{2+} のアンタゴニストであるEGTA, LaCl_3 およびTMB-8 で処理してもエリシター誘導によるピサチン蓄積が抑制されないので、ファイトアレキシン生産における情報伝達に関与していない可能性が報告されている (Shiraishi et al. 1990)。さらに、Kendra and Hadwiger (1987) は未成熟なエンドウのさや組織を用いて、ピサチン蓄積におよぼす Ca^{2+} の影響を調べるために6つの Ca^{2+} アンタゴニストを供試したところ、ベラパミルを除くいずれのアンタゴニストも抑制効果を示さなかったとした同様の実験結果を得ている。以上の報告とベラパミルを除くEGTA, LaCl_3 , TMB-8が原形質膜ATPaseの活性を阻害しなかった実験結果を考え併せると、ベラパミルによるピサチン蓄積抑制効果は Ca^{2+} のチャンネルブロッカーとしての機能より、むしろATPase阻害に起因すると考えられるであろう。

原形質膜ATPaseは、基質であるATP を加水分解する過程において Mg^{2+} の存在下でATPと複合体を形成し、 γ -位のリン酸によりリン酸化され（リン酸化中間体形成）ADPを放出する。その後、リン酸

を放出するといった反応様式をとることが報告されている

(Briskin and Leonard 1982)。本研究では、原形質膜ATPaseのリン酸化中間体形成におよぼすサプレッサーの影響を調べるために、原形質膜画分をサプレッサーおよび $[\gamma\text{-}^3\text{2P}]\text{ATP}$ で処理してタンパク質の無細胞系でのリン酸化を試み、SDS 電気泳動で調べた。その結果、78kDa, 64kDa, 42kDa のタンパク質のリン酸化が抑制された。しかし、プロテインキナーゼもATP と複合体を形成し、 γ -位のリン酸を転移させタンパク質をリン酸化するので、P-type ATPase のリン酸化中間体とプロテインキナーゼによるリン酸化とを区別するのは困難である。ATPaseのリン酸化は0℃、15秒間の反応条件下で最大となる。さらに、アルカリ条件下やヒドロキシルアミンの存在下では不安定であることが知られている。このことは、プロテインキナーゼによるリン酸化がセリン、スレオニンまたはタイロシンのヒドロキシル基結合であるのに対してATPaseのリン酸化はアシルリン酸結合でありアスパラギン酸残基のカルボキシル基がリン酸化されていることを裏付けている (Briskin and Leonard 1982)。そこで、プロテインキナーゼによるリン酸化とATPaseの自己リン酸化とを区別するために、プロテインキナーゼの阻害剤であるK252a で原形質膜画分を処理してタンパク質の無細胞系でのリン酸化を試みたところ、78kDa, 64kDaおよび42kDa のタンパク質のリン酸化は抑制されなかった。さらに、 $[\gamma\text{-}^3\text{2P}]\text{ATP}$ で処理し、0℃で30秒静置した後、放射線未標識のATPを加えると78kDa, 64kDaおよび42kDa に相当するバンドの放射線活性が弱まった。すなわち、エンドウ褐紋

病菌サプレッサーは、ATPaseのリン酸化中間体の形成を阻害して活性を阻害することが強く示唆された。

第三章で後述するが、エンドウにおけるATPase遺伝子の発現を調べたところ約 100kDa のタンパク質に相当する 3.6kbと、さらにサイズが小さい 1.6kbのmRNAの存在が確認された。多くの植物細胞で報告されているように、原形質膜に存在する H^+ -ATPase は約 100kDa のタンパク質であるとされている (Briskin and Leonard 1982, Schaller and Sussman 1988, Boutry et al. 1989, Pardo and Serrano 1989, Ewing et al. 1990)。したがって、ハイブリダイズした 3.6kbの RNA種がエンドウの主要なATPase mRNA であると考えられた。さらに膜タンパクは煮沸すると分解されやすいことを考慮すると (Amory et al. 1980)、本実験で確認された78kDa, 64kDaおよび42kDa のタンパク質は電気泳動でサンプルを SDS処理した際に分解された産物である可能性も考えられた。一方、リョクトウ原形質膜より精製されたATPaseには、67kDa および 55kDaのATPaseが存在することが示唆されている (Mito et al. 1988, Kimura et al. 1988)。したがって、ハイブリダイズした 1.6kbのRNA種の存在を考慮すると、エンドウの原形質膜においても 100kDa 以下のATPaseが存在するとした考えは否定できない。

いずれにしても、K252a でリン酸化が阻害されるバンドに対してはサプレッサーは影響をおよぼさなかった。したがって、サプレッサーは原形質膜画分のプロテインキナーゼ活性を直接阻害しないものと考えられた。上記の実験結果は*in vitro*と*in vivo* で得られた

結果であることを考慮する必要があるが、サプレッサーとエリシターの第一作用点が異なることを示すものと考えられた。

Shiraishi et al. (1990) はエリシター誘導によるピサチン蓄積におよぼすプロテインキナーゼの阻害剤であるK252aの影響を調べた。K252aをエリシターの前に処理した場合のみピサチン蓄積が抑制されることを報告している。このことは、本エリシターによる情報伝達の初期過程にプロテインキナーゼが関与している可能性を示した。

種々の濃度の ATP・Mgを用いてサプレッサー、オルトバナジン酸およびベラパミルのATPase阻害様式を調べたところ、これらの化合物は異なった様式で阻害したが、いずれの化合物もピサチン蓄積を阻害した。したがって、阻害様式とは無関係にATPaseの阻害に伴う機能障害がピサチン蓄積抑制を引き起こすものと考えられた。しかしながら、*in vitro*におけるATPase阻害と*in vivo*におけるピサチン蓄積阻害との関連を論ずるには、より緻密なデータの蓄積が必要であると思われる。そこで、種々の濃度の各阻害剤を用いてATPase阻害率とピサチン蓄積阻害率を比較した。その結果、オルトバナジン酸を用いた際には、両者の抑制率がほぼ同程度であったため、オルトバナジン酸によるピサチン蓄積抑制は主にATPase抑制に起因すると考えられた。一方、サプレッサーおよびベラパミルではピサチン蓄積抑制率がより高かった。この理由として、1)これらの物質は*in vitro*で示した阻害濃度より*in vivo*では低い濃度でATPaseを阻害する。または、2)ATPase阻害に加え、ピサチン蓄積に至る過程の

いずれかをも阻害する可能性を考えざるを得ないが現時点では未詳である。

第三章 エンドウ褐紋病菌サプレッサーおよび原形質膜ATPase

阻害剤のピサチン合成系におよぼす影響

フェニルプロパノイド合成経路は植物の二次代謝系の中でも非常に重要な役割を担っており、精力的に研究がなされてきた。リグニン、ズベリン、アントシアニン色素、紫外線吸収物質、クロロゲン酸、クマリンなど植物の防御物質を含めた様々な機能をもつ物質がこの代謝系を経て合成される (Hahlbrock and Scheel 1989)。マメ科植物が生産するファイトアレキシンはフェニルプロパノイド合成系を経由するイソフラボノイド化合物であり、ピサチン、ファゼオリン、マーキアイン、グリセオリン、キービトン、メジカルピンなど多岐に渡っている (Smith and Banks 1986)。一般に、病原菌による感染や種々のエリシター処理により一つの植物種は複数種のファイトアレキシン化合物を生産することが知られており、病原菌やエリシターの種類によって量的比率の変動はあるが、それらが質的に左右されることはない。したがって、生産されるファイトアレキシンの種類は宿主植物の種のレベルによって規定される (Smith and Banks 1986)。エンドウの主要なファイトアレキシンであるピサチンは、フェニルプロパノイド代謝系およびそこから分岐したイソフラボノイド代謝系を経て合成される化合物である

(Cruickshank and Perrin 1960, Smith and Banks 1986)。ピサチンの合成過程において、フェニルアラニンから桂皮酸を触媒する酵素 PAL、また、イソフラボノイド合成経路では CHSがそれぞれピサ

チン合成を調節する鍵酵素として重要な位置を占めている (Fig. 8)。

Lambのグループは、インゲン培養細胞を病原菌由来のエリシターで処理し、その細胞から核を分離して*in vitro*でRNAを合成させ

PALおよび CHS mRNA の存在を調べたところ、処理後 5 分以内の極めて早い段階で両mRNAが合成されることを見いだした (Lowton and Lamb 1987)。さらに彼らはエリシター誘導による PALおよび CHS 活性の増加は、転写レベルで制御されることを指摘した (Cramer

et al. 1985)。エンドウにおいてもピサチンの蓄積に遺伝子発現が関与する可能性については幾つかの傍証があった。それは、シクロヘキシミドなどのタンパク合成阻害剤や mRNA の合成阻害剤であるコーディセピンをエリシター処理後 3 時間までに添加するとピサチンの蓄積がほぼ完全に抑制されたからである (白石 1989b)。

Yamada et al. (1989) はピサチン合成系におよぼすエンドウ褐紋病菌の生産するエリシターとサプレッサーの作用を詳細に調べ、エリシターでエンドウ組織を処理すると、1 時間以内にピサチン合成系の律速酵素である PALおよび CHS mRNA の蓄積増高が認められ、3 時間以内に PAL活性が増加し、さらに 6 ~ 9 時間後になるとピサチンの蓄積が誘導されることを示した。彼らはこれらの時間的背景からピサチン合成における遺伝子の活性化の関与を示唆した。

一方、サプレッサーとの共存下では両mRNAの蓄積が 3 時間、PAL 活性の増高およびピサチン蓄積が 6 時間遅延することから、サプレッサーは植物防御反応に関与する遺伝子の活性化を一時的に抑制

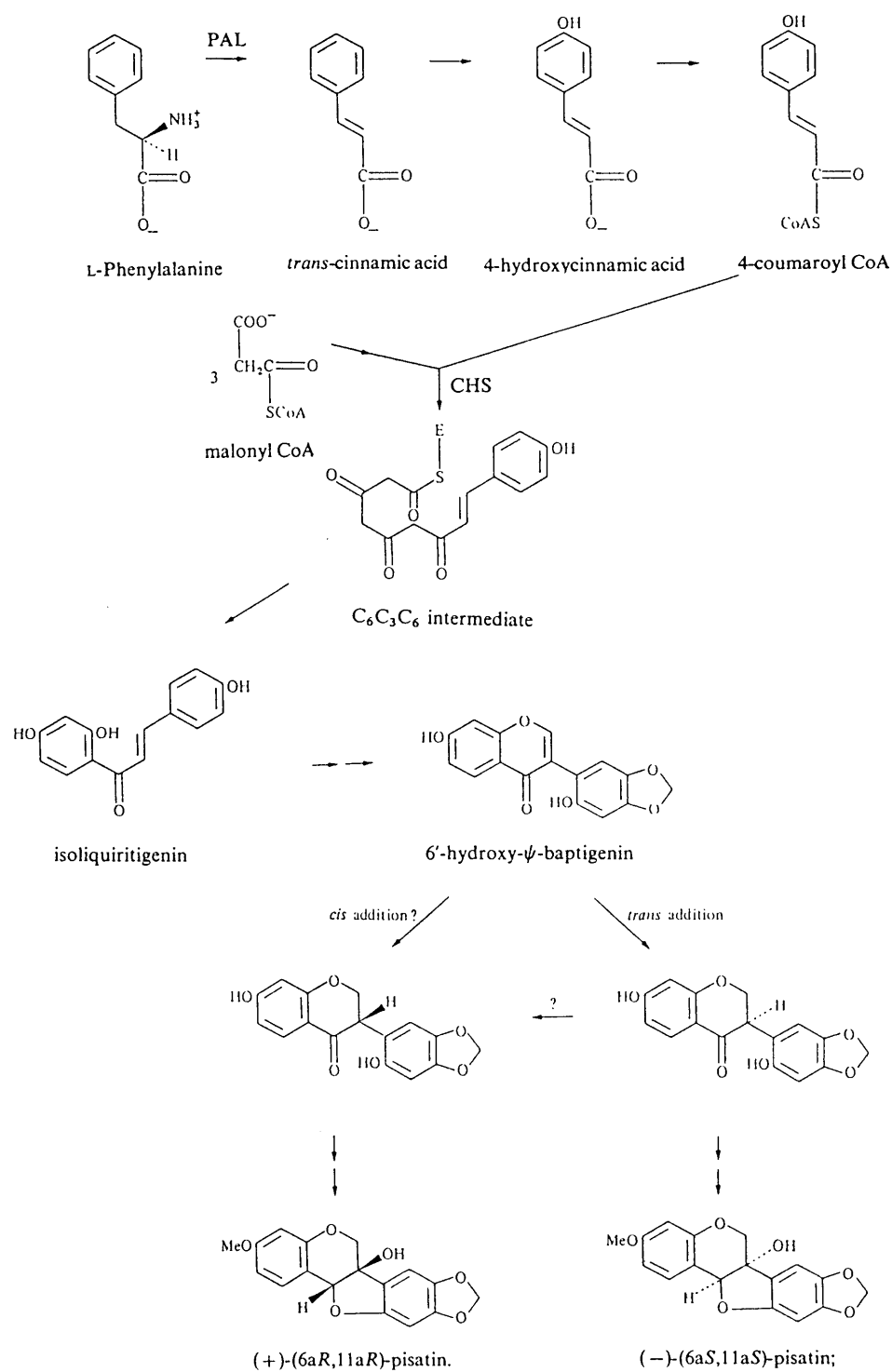


Fig. 8 Biosynthesis of pisatin in pea plant.

することを指摘した。前章において、オルトバナジン酸がサプレッサーと類似した形式で原形質膜 ATPase を阻害し、エリシターで誘起されたピサチン蓄積を抑制することを述べた。本章では上記した背景を踏まえた上で、オルトバナジン酸によるピサチン蓄積抑制効果が、果たしてピサチン合成系に関与する酵素（群）に対する直接的な阻害活性に起因するのか、あるいはこれらの酵素をコードする遺伝子を発現レベルで抑制することに起因するのかを明らかにする目的で、主にピサチン合成系におよぼすオルトバナジン酸の作用について調べた。

1. 材料および方法

1) 供試植物

ピサチン定量、粗酵素抽出および全 RNA の抽出には、第二章 1. 1) と同様に、エンドウ植物 (*Pisum sativum* L.) の品種ミドリウスイの種子を一昼夜水中で催芽させた後、バーミキュライトを入れたプラスチック容器に播種し、 20 ± 2 °C の暗黒下で 6 ~ 10 日間生育させた上胚軸の上部 1.5 cm を供試した。

2) エリシターおよびサプレッサーの調製

エンドウ褐紋病菌のエリシターおよびサプレッサーは、第二章 1. 4) と同様に、Hiramatsu et al. (1986) および Shiraishi et al. (1978) の方法に準じてエンドウ褐紋病菌の孢子発芽液から調製した。なお、以降に示す両者の濃度はそれぞれグルコースおよび牛血清アルブミンの換算値で示した。

3) ピサチンの定量

各種阻害剤のピサチン蓄積におよぼす影響を経時的に調べるために、エンドウ上胚軸をエリシター (最終濃度 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$)、オルトパナジン酸 (最終濃度, 1 mM)、ベラパミル (最終濃度, $100 \mu\text{M}$)

の単独溶液またはエリシターと阻害剤の混合液、対照区として蒸留水で上胚軸片の切断面が十分に接するようにして処理し、所定時間静置した後、Masuda et al.(1983)の方法に準じてピサチンを抽出し、第二章 1. 6) で述べた方法と同様の条件で定量した。さらにエリシター処理後、随時サプレッサー (最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) または阻害剤で処理する際は、所定時間エリシター単独で処理した上胚軸をエリシターと各種阻害剤を含む混合溶液中に移動させて処理し、エリシター単独処理から18時間後にピサチンを定量した。

4) 粗酵素の抽出

エリシター誘導による PAL活性の経時的変動におよぼすオルトバナジン酸の影響、および本酵素活性におよぼす直接的作用を調べる目的で、暗所で生育させたエンドウ上胚軸をエリシター (最終濃度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、オルトバナジン酸 (最終濃度 1 mM)、両者の混合液、および蒸留水で所定時間処理し、Dixon and Fullerの方法 (1978) を一部改変して粗酵素を抽出した。

ピサチン定量の場合と同様に、各処理液でエンドウ上胚軸を処理し、 20 ± 2 °C の湿室暗黒下で静置して、3 時間毎に上胚軸約 400mg をそれぞれ液体窒素で凍結固定した。固定した上胚軸を液体窒素中で摩砕し、20mgのPolyclar AT (Polyscience, Inc.) と 1 ml の抽出緩衝液 [0.1M Tris/HCl, (pH 8.8), 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF] を加えて抽出した。このようにして得た粗抽出液を 4 °C で

10分間遠心分離 ($5,000 \times g$) して残渣を取り除き、その上清を粗酵素液として供試した。各処理区の粗酵素液中のタンパク質含量は、BSAを基準タンパク質として Lowry et al. (1951)の方法により測定した (Fig. 9)。

5) PAL 活性の測定

各処理を施したエンドウ上胚軸から抽出した粗酵素液中の PAL 活性を、Dixon and Fuller (1978)の方法を一部改良して測定した。各粗酵素液の濃度を、 $200 \mu\text{g/ml}$ (BSA換算値) に調整し、粗酵素液 $90 \mu\text{l}$ に PALの基質である ^{14}C -フェニルアラニン (925kBq/ml) を $10 \mu\text{l}$ 添加し、 30°C で 1時間反応させた。その後、それぞれに $500 \mu\text{l}$ のエタノールを加えて反応を停止し、 -20°C で 1時間静置して、 4°C で 10分間遠心分離 ($5,000 \times g$) してタンパクを沈澱させた。このようにして得られた上清の $300 \mu\text{l}$ を遠心濃縮器で減圧乾固し、乾燥標品を桂皮酸の標品をマーカーとして含む (1 mg/ml) エタノール溶液 $50 \mu\text{l}$ で溶解し、シリカゲル薄層クロマトグラフィープレート (Art. 5735, Merk) に吸着させ、ベンゼン : 酢酸 : 蒸留水 = 6 : 7 : 3の混合液の上層を展開溶媒として約 10cm 展開した。展開後、プレートをドライヤーで風乾し、紫外線下で桂皮酸に相当する部分を正確に切り取ってバイアル管に入れ、 $500 \mu\text{l}$ のメタノールと 2 ml のシンチレーションカクテルを加え、液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定した。

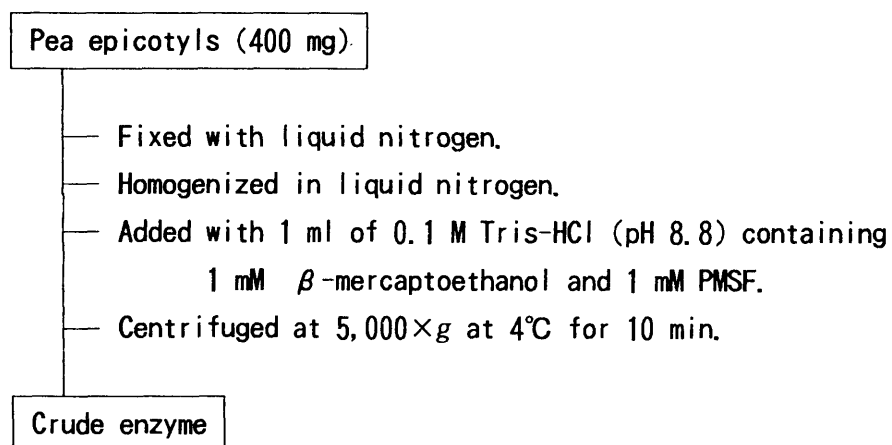


Fig. 9 Preparation of crude enzyme from pea epicotyls.

6) 全RNA の抽出

エリシターで誘導される PAL および CHS 遺伝子の発現におよぼす オルトバナジン酸の影響を調べるために、暗所生育させたエンドウ 上胚軸をエリシターの単独溶液 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、エリシター (最終濃度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と オルトバナジン酸 (最終濃度 1 mM) の混合溶液、オルトバナジン酸の単独溶液 (1 mM)、および蒸留水で所定時間処理し、Chomczynski and Sacchi (1987) の シングルステップ法にしたがって全 RNA を抽出した。

粗酵素抽出の場合と同様に、各処理液で上胚軸を処理し、 20 ± 2 °C の湿室暗黒下で静置して、処理後 6 時間まで 1 時間毎に上胚軸約 1g をそれぞれ液体窒素で凍結固定した。固定した上胚軸を液体窒素中で摩砕し、3 ml のグアニジン緩衝液 [4 M guanidine isothiocyanate, 0.1 M β -mercaptoethanol, 25mM sodium acetate, (pH 7.0), 1.5% (W/V) sodium N-lauroyl sarcosinate] を加え、摩砕液を遠心管に入れた。4 °C で 5 分間遠心分離 (3,000 $\times g$) して残渣を取り除き、上清に 300 μl の 2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)、3 ml の水飽和フェノール、600 μl のクロロホルム : イソアミルアルコール = 49 : 1 を加えてよく攪拌した。10 分間氷冷した後、4 °C で 20 分間遠心分離 (5,000 $\times g$) して上層を回収し、等量のイソプロパノールを加えて -20 °C で 1 時間静置した。その後、4 °C で 20 分間遠心分離 (5,000 $\times g$) して RNA を沈澱させた。300 μl のグアニジン緩衝液で RNA を再度溶解してエッペンドル

フチューブに入れ、等量のイソプロパノールを加えて上記のように RNA を沈澱させた。得られた沈澱を 70%エタノールで懸濁し、4℃で10分間遠心分離 ($5,000 \times g$) することにより RNAを洗淨した。減圧乾固した RNAを 100 μ l のジエチルピロカーボネイト (DEPC) 処理して RNaseを失活させた蒸留水に溶解して RNA溶液を調製した (Fig. 10)。なお、1 g のエンドウ上胚軸から約 200 μ g の RNAを回収することができた。

7) ノーザンブロットハイブリダイゼーション

ノーザンブロットハイブリダイゼーションは、Maniatis et al. (1982) の方法に従って行った。分離した全 RNAを15 μ gずつエッペンドルフチューブに取り、遠心濃縮器で減圧乾固した後、15 μ l の変性溶液 [1-fold MOPS (pH 7.0), (0.02M MOPS, 0.05M sodium acetate), 0.001M EDTA (ethlenediaminetetraacetic acid), 50% (V/V) deionized formamide, 17% (V/V) formaldehyde]で溶解し、65℃で30分間静置して RNAを変性した。その後すぐに5分間静置し、5 μ l のローディング緩衝液 [0.1mg/ml bromophenolblue, 50% (V/V) glycerol] を加え、あらかじめ作製しておいた 1% アガロースゲル [1% agarose, 1-fold MOPS (pH 7.0), 17% (V/V) formaldehyde] 中で RNAを分画した。その後ゲルを 20-fold SSC (3.0M NaCl, 0.3M sodium citrate) で20分間振盪してゲル中のホルムアルデヒドを希釈した後、ゲル中の RNA をナイロンメンブラン

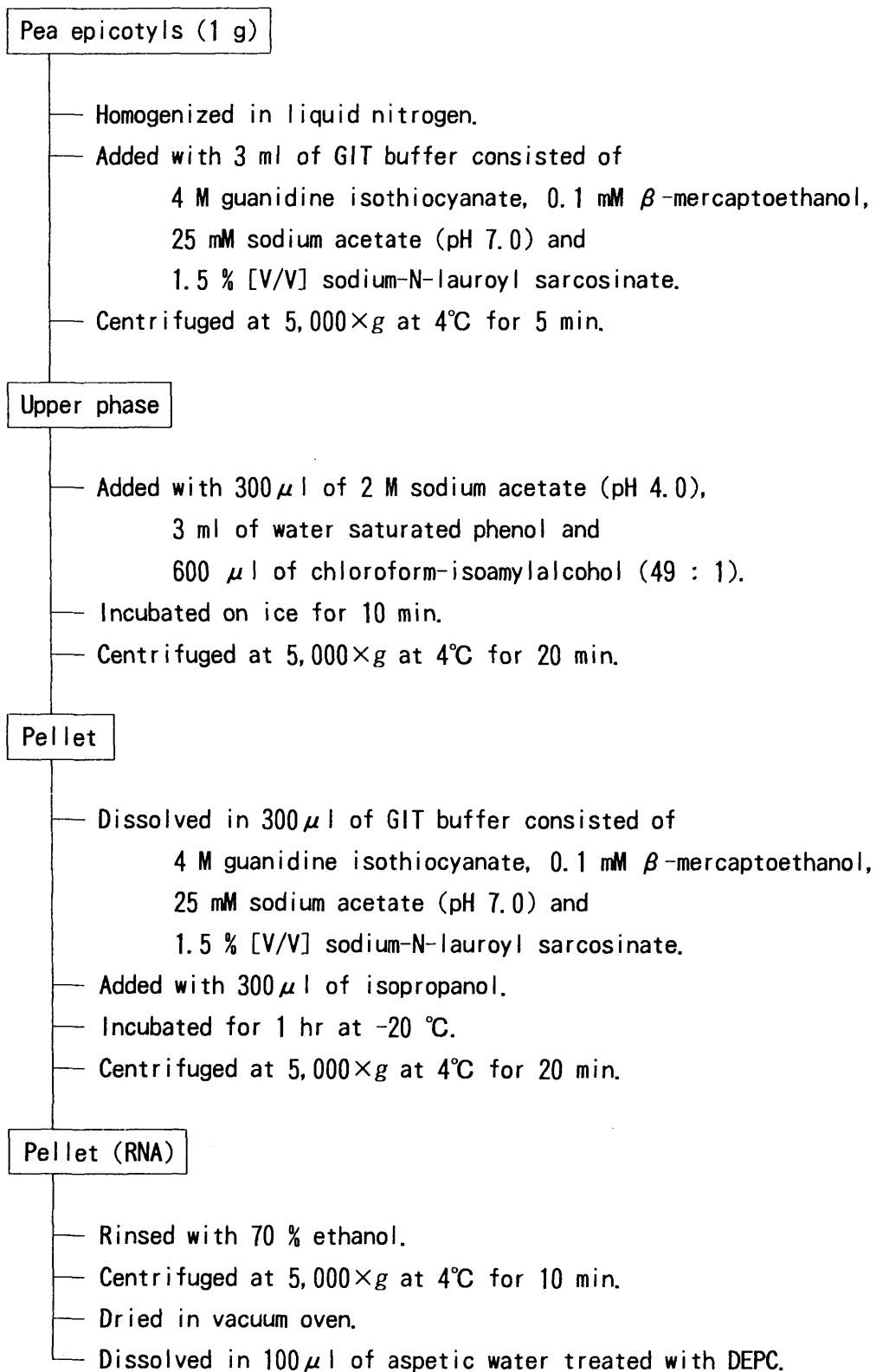


Fig. 10 Isolation of total RNA from pea epicotyls by the single-step method described by Chomczynski and Sacchi (1987).

フィルター (Hybond-N, Amersham) にブロッティングした。フィルターを 6-fold SSC で軽く振盪して洗い、80℃で 2 時間 RNAを加熱固定した。

RNA を固定したフィルターをハイブリダイゼーション緩衝液 [4-fold SSC, 50% (V/V) deionized formamide, 0.02% (W/V) ficol, 0.02% (W/V) BSA, 0.1% (W/V) sodium dodecyl sulfate (SDS) 5 mM EDTA, 0.12mg/ml denatured Herring sperm DNA] を入れたミートパック中で42℃で 2 時間以上振盪してプレハイブリダイゼーションした。その後ミートパック中の緩衝液を捨て、新たにハイブリダイゼーション緩衝液を入れ、 10^8 cpm/ μ g DNA以上の比活性をもつ cDNAプローブを $10^5 \sim 10^6$ cpm/ml になるように加え、42℃で12~24 時間振盪してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターを取り出して、0.1% SDSを含む1-fold SSC中で室温で10分間洗い、続いて 0.5-fold SSC 中 60 °Cで 1 時間、0.1-fold SSC中 60 °Cで 2 時間さらに洗浄した。洗浄後、フィルターをドライヤーで風乾してX線フィルム (X-OMAT, Kodak)に増感紙を用いて -80℃で 2 ~ 3 日間感光させ、プローブがハイブリダイズしたバンドを検出した。

8) プローブの作成

プローブにはエンドウのPAL cDNA、インゲンのCHS cDNAおよびタバコ原形質膜 ATPase cDNAを用い、常法 (Maniatis et al. 1982)

に従ってプラスミドさらにインサートを分離した。PAL, CHSおよび ATPase cDNAをそれぞれ組み込んだプラスミド pKT1 (Kawamata et al. 1992)、pCHS1 (Ryder et al. 1984)、cpma2 (Boutry et al. 1989) は、いずれもアンピシリン耐性遺伝子を選択マーカーとして含んでいるので、プラスミドを保持する大腸菌 (*E. coli* 7118) を、100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天平面培地上 [1% (W/V) bacto-trypton, 0.5% (W/V) bacto-yeast extract, 1% (W/V) sodium chloride, 1% (W/V) agar] で一昼夜 37 $^{\circ}$ C で培養した。それぞれのコロニーを 100 μ g/ml のアンピシリンを含む 5 ml の LB 液体培地に植菌し、37 $^{\circ}$ C で 8 時間前培養して 250ml ずつ LB 液体培地を入れた 500ml の坂口フラスコに植菌して 37 $^{\circ}$ C でさらに一昼夜振盪培養して大腸菌を増殖させた。培養液を 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離 (5,000 $\times g$) することにより集菌し、アルカリ法 (Birmboim and Daly 1979) によってプラスミドを大腸菌から分離した。大腸菌の沈澱を 10 mg/ml の濃度のリゾチームを含む溶液 I [50mM glucose, 25mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.5M EDTA]、10ml で懸濁し、25 $^{\circ}$ C で 5 分間静置した。その後、氷上で 20ml の溶液 II [1% (W/V) SDS, 0.2M NaCl] を添加して 10 分間ガラス棒で攪拌しながらプラスミドを溶出させ、さらに 15ml の溶液 III (3M potassium acetate, 2M glacial acetic acid) を加えて激しく混合して 10 分間以上氷冷した。得られた溶出液を 4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心分離 (5,000 $\times g$) して残渣を取り除き、上清を二重のキムワイプでろ過した。ろ液量を測り、0.6 容のイソプロパノールを加えて室温で 10 分間静置

した後、20℃で20分間遠心分離（5,000 × *g*）してプラスミドを含む沈澱を得た。70% エタノールで沈澱を洗浄した後20℃で20分間遠心分離（5,000 × *g*）して再度沈澱を回収し、減圧乾固し、10mlの TE 緩衝液 [10mM Tris/HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA]で溶解した。等量のトリス飽和フェノール（TE saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1)を加えて攪拌し、4℃で20分間遠心分離（5,000×*g*）して上清を回収し、上記の要領でTE緩衝液で溶解、イソプロパノール沈澱、エタノール洗浄した。このようにして得られた沈澱を 12ml の TE 緩衝液で溶解し、12g の塩化セシウムと0.96mlの臭化エチジウム溶液（10mg/ml)を添加して溶解し、90,000rpm で4時間遠心分離した（TLN-100 ローター、Beckman instruments Inc.）。紫外線下でプラスミドに相当するバンドを注射器で抜き取り、エッペンドルフチューブに移し、等量のブタノール : TE = 5 : 1 を加えて攪拌し、4℃で20分間遠心分離（5,000 × *g*）して上層に溶解される臭化エチジウムを取り除いた。この操作はブタノール層が透明になるまで繰り返し行った。その後、等量のTE緩衝液と二倍量のエタノールを混合して室温で1時間静置し、4℃で20分間遠心分離（5,000 × *g*）して塩化セシウムを取り除き、70% エタノールで沈澱を洗浄して脱塩した。この脱塩操作を2回以上繰り返ししてプラスミドを回収し、減圧乾固して 500 μ l の TE 緩衝液に溶解して -20℃で凍結保存した。

プローブに用いたcDNAは以下の手順でプラスミドより分離した。
pKT 1（10 μ g）は *Eco* RI と *Hind* III で、pCHS 1（10 μ g）および

cpma 2 (10 μ g) は *Eco* RI で 37 °C で10時間消化した後、反応液に1/10量のローディング緩衝液 [0.25% (W/V) bromophenolblue, 0.25% (W/V) xylencyanol, 0.1M EDTA, 50% (V/V) glycerol]を加え 1% アガロースゲル [1% agarose, 0.5 μ g/ml ethidium bromide, 1-fold TBE= 0.089M Tris-borate (pH 8.0), 0.089M glacial acetic acid, 0.002M EDTA] で電気泳動してDNA を分画し、pKT1 では1.6kb、pCHS1 では 1.4kb、cpma 2 では 2.3kbに相当するバンドを紫外線下で切り出し、DNA 回収フィルター (SUPREC-01, タカラ) を用いてゲル中からcDNA画分を回収した。得られた画分中のタンパクを取り除くために等量のトリス飽和フェノールを加えて攪拌し、4 °C で10分間遠心分離 (5,000 $\times g$) して上層を回収した。なお、この操作は境界面にタンパク層が見えなくなるまで繰り返した。さらに、イオン交換カラム (QIAGEN, Promega, Inc.) でcDNAを精製し、等量のイソプロパノールを加えて -20°C で1時間静置し、4 °C で10分間遠心分離 (5,000 $\times g$) してcDNAを沈澱させた。その後、70% エタノールで沈澱を洗浄して、減圧乾固し、少量のTE緩衝液に溶解して -20°C で凍結保存した。

cDNAの放射線標識は、ランダムプライム法 (Feinberg and Vogelstein 1983) を用いたラベリングキット (Boehringer mannheim) と [α - 32 P]dCTP (370MBq/ml, Ameraham) で行った。反応後、ゲルろ過カラム (Sephadex G-50, Pharmacia) で未反応の [α - 32 P]dCTP を取り除き、標識された二本鎖DNA を10分間煮沸して一本鎖に解離させ、プローブに用いた。得られたプローブの比活性

は、 $1 \sim 2 \times 10^9 \text{ cpm} / \mu\text{g}$ DNAであった。

2. 実験結果

1) エリシター誘導によるピサチン蓄積の経時的変動におよぼすオルトバナジン酸およびベラパミルの影響

各種阻害剤のピサチン蓄積におよぼす影響を経時的に調べるために、エンドウ上胚軸をエリシター（最終濃度 $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ ）、オルトバナジン酸（最終濃度 1 mM ）、ベラパミル（最終濃度 $100\text{ }\mu\text{M}$ ）の単独溶液またはエリシターと阻害剤の混合液、対照区として蒸留水で上胚軸を処理し、3時間毎にピサチン蓄積を定量した。その結果、蒸留水処理区、およびベラパミル単独処理区においては、処理後18時間以降で極僅かのピサチン蓄積が確認されるにとどまった（Fig. 11A）。これに対し、エリシター単独処理区では処理後9時間目からピサチン蓄積が確認され、少なくとも24時間後まで急激な蓄積増高が認められた。しかしながら、エリシターにベラパミルを添加して処理した場合には、この蓄積増高が顕著に抑制されたが、その蓄積量は蒸留水処理区およびベラパミル単独処理区と比べると多く、15時間以降その蓄積が徐々に増加した。すなわち、エリシターにより誘導されるピサチン蓄積は、ベラパミルの同時処理により約6時間蓄積が遅れる様相を呈した。一方、オルトバナジン酸を同時処理した場合もベラパミル処理の場合と類似し、エリシター誘導によるピサチン蓄積を約6時間遅らせた（Fig. 11B）。

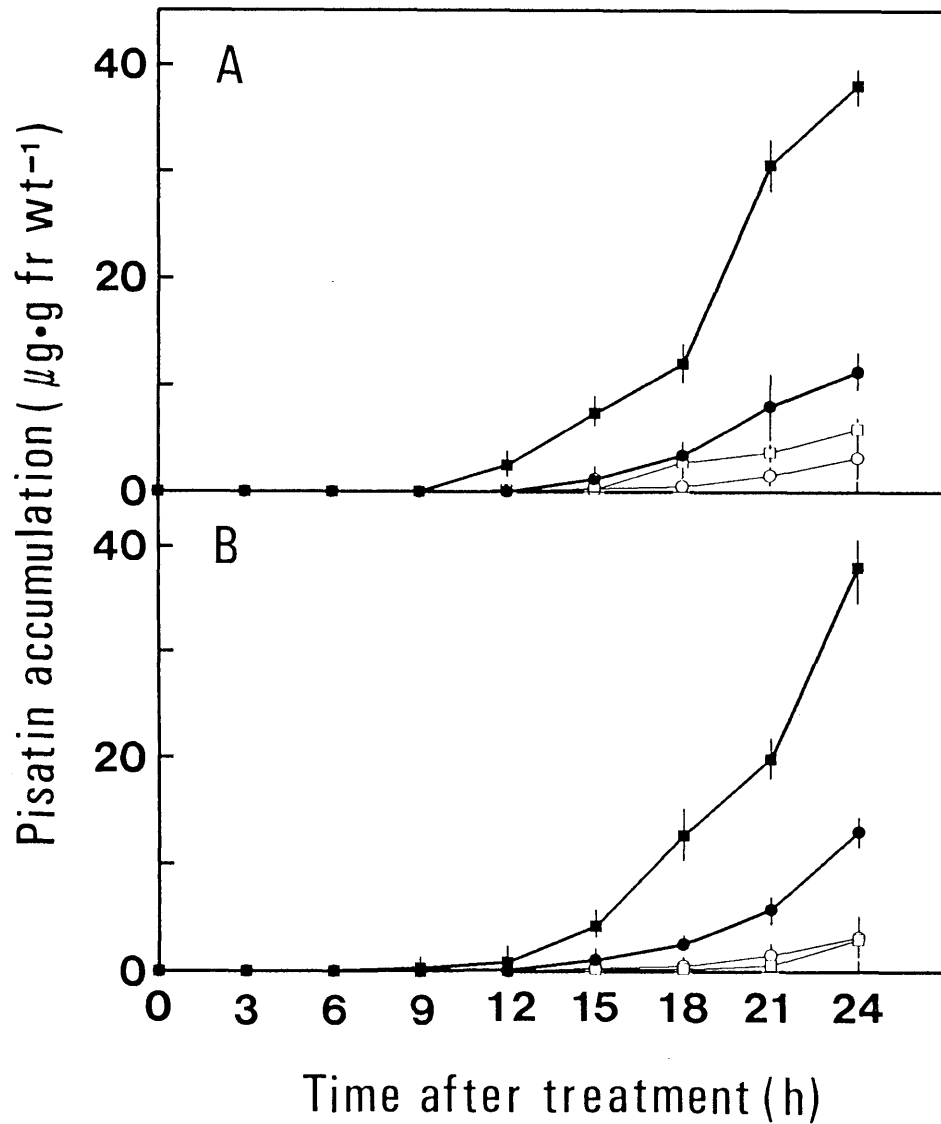


Fig. 11 Time course of accumulation of pisatin in elicitor-treated pea epicotyls in the presence or absence of verapamil (A) or orthovanadate (B). The amount of pisatin ($\mu\text{g/g}$ fresh weight) was determined at intervals of 3 h after the treatment with elicitor alone ($500 \mu\text{g/ml}$, glucose equiv.) (\blacksquare), with elicitor plus $100 \mu\text{M}$ verapamil or 1 mM vanadate (\bullet), with water alone (\circ) and with water plus $100 \mu\text{M}$ verapamil or 1 mM vanadate (\square), respectively, by the method described by Masuda et al. (1983). Each plotted value represents the mean of results of triplicate experiments, and the bar indicates the standard error.

2) PAL の活性増大におよぼすオルトバナジン酸の影響

エリシター誘導による PAL活性の経時的変動におよぼすオルトバナジン酸の作用を調べる目的で、暗所生育させたエンドウ上胚軸をエリシター（最終濃度 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、オルトバナジン酸（最終濃度 1mM ）、両者の混合液、および蒸留水で所定時間処理し、それぞれ処理後 3 時間毎に粗酵素を抽出して PAL 活性を調べた（Fig. 12）。その結果、蒸留水処理区、およびオルトバナジン酸単独処理区においては、処理 3 時間以降で僅かに PAL活性が増加するにとどまった。これに対し、エリシター単独処理区では処理後 3 時間目から PAL活性が増加し始め、9 時間後まで急激な活性増高が認められ、その後減少した。すなわち、一時的な活性変動のパターンを示した。しかしながら、エリシターとオルトバナジン酸の混合処理区では、この蓄積増高が顕著に抑制されたが、蒸留水処理区およびオルトバナジン酸単独処理区での活性に比べると、12 時間以降でその活性が増加する傾向が認められた。これらの PAL活性の動向は、1) で述べたピサチン蓄積の動向と極めて類似しており、それぞれの処理区において PAL活性はピサチン蓄積に先行する形式で変動した。

3) PAL 活性におよぼすオルトバナジン酸およびベラパミルの直接の影響

暗所で生育させたエンドウ上胚軸をエリシター（ $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で処

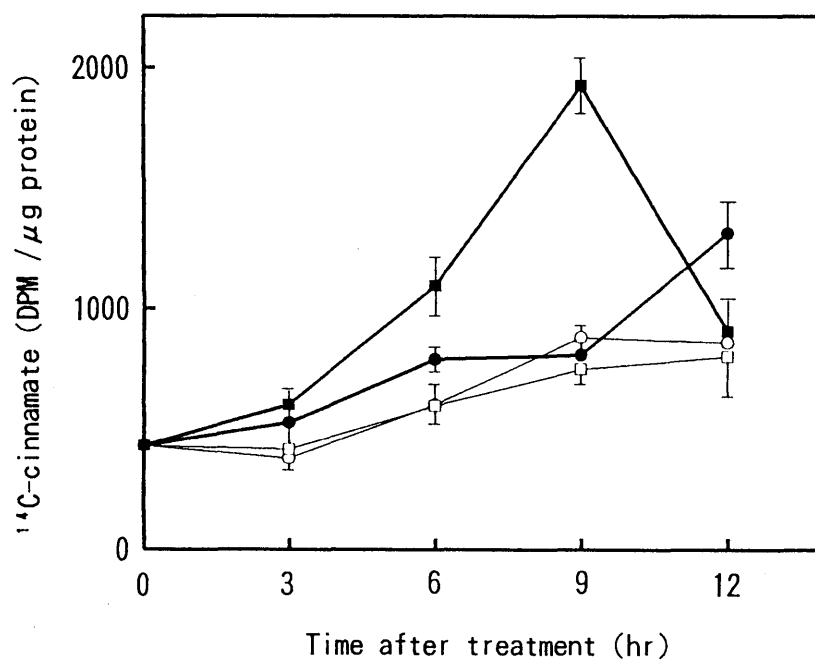


Fig. 12 Time course of activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in elicitor-treated pea epicotyls in the presence or absence of orthovanadate. The activity of PAL was determined at intervals of 3 hr after the treatment with elicitor alone (500 μ g/ml, glucose equiv.) (—■—), with elicitor plus 1 mM orthovanadate (—●—), with water alone (—○—) and with 1 mM orthovanadate alone (—□—), respectively, by the method described by Dixon and Fuller (1978). Each plotted value represents the mean of results of triplicate experiments, and the bar indicates the standard error.

理し、粗酵素を経時的に抽出して PAL活性を測定すると、2) で述べたように処理開始後 9 時間で最も高い値を示した。そこで、この時間での粗酵素液に種々の濃度のオルトバナジン酸およびベラパミルを加え、PAL 活性におよぼすこれらの直接の影響を調べた。オルトバナジン酸を用いた場合、エリシター誘導によるピサチン蓄積および PAL 活性を抑制する 1 mM、0.5mM、0.1mM の濃度では、対照区として設けた蒸留水添加区に比べいずれも PAL活性を阻害しなかった (Table 8)。また、ベラパミルを用いた場合においても、ピサチン蓄積を顕著に抑制する 250 μ M、100 μ M の濃度で PAL活性に対する阻害活性は認められなかった。

4) PAL、CHS および原形質膜 ATPase 遺伝子発現におよぼす オルトバナジン酸の影響

暗所で生育させたエンドウ上胚軸をエリシター (最終濃度 500 μ g/ml)、オルトバナジン酸 (最終濃度 1 mM)、両者の混合液、および蒸留水で処理し、処理後 1 時間毎に全 RNA を抽出して PAL、CHS および原形質膜 ATPase の cDNA をプローブに用いてノーザン解析により mRNA の蓄積動向を調べた (Fig. 13)。本実験で用いたプローブで確認した PAL および CHS mRNA のサイズはそれぞれ約 2.8kb と 1.5kb であった。エンドウより精製された PAL タンパク質のサイズは 81kDa. であることが報告されている (Loschke and Hadwiger 1981)。さらに、Kawamata et al. (1992) はエンドウよりほぼ全長

Table 8. Direct effect of orthovanadate or verapamil on activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

Addition of (final concentration)	PAL activity ^a (DPM/ μ g protein)	Mean value (% control)
Water	1357.7 \pm 68.9	(100)
Orthovanadate (0.1 mM)	1379.6 \pm 34.6	102
(1 mM)	1365.9 \pm 18.6	101
Verapamil (250 μ M)	1353.8 \pm 17.4	100

^aThe activity of PAL was determined by the method of Dixon and Fuller (1978). Each value represents the mean \pm SE in triplicate experiments.

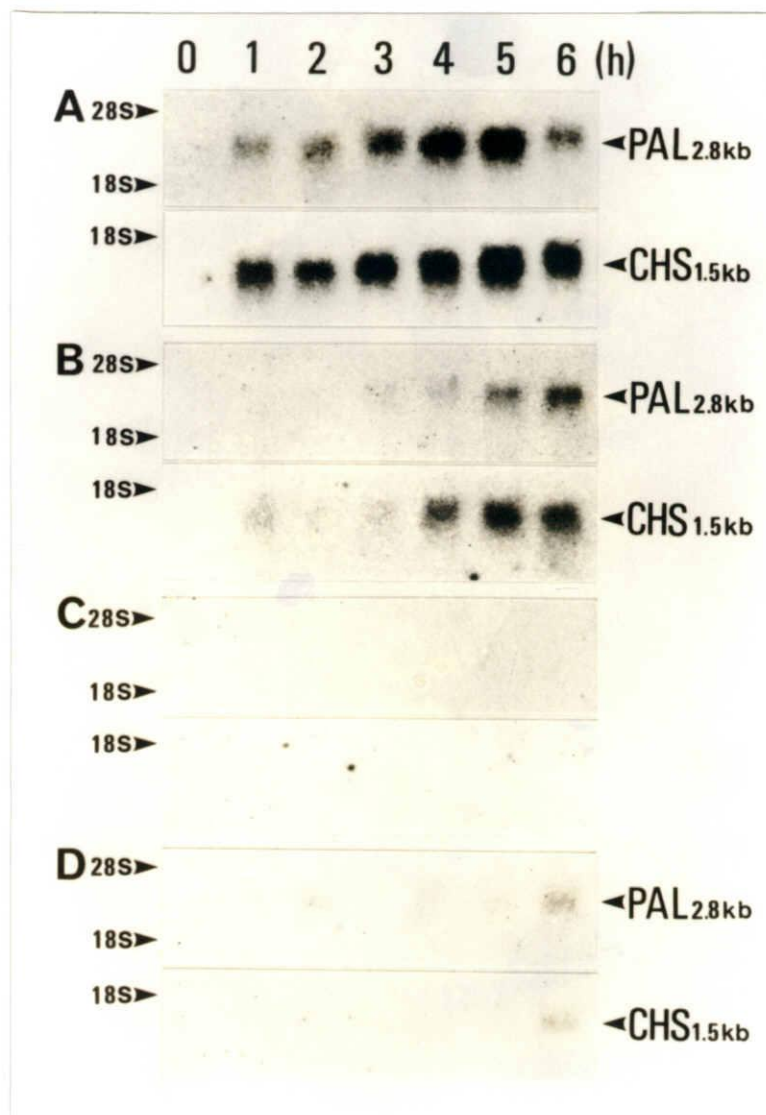


Fig. 13 Accumulation of mRNAs for phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and chalcone synthase (CHS) in elicitor-treated pea epicotyls in the presence or absence of orthovanadate. Fifteen micrograms of total RNA extracted from epicotyl tissues treated with fungal elicitor (A), elicitor plus orthovanadate (B), water plus orthovanadate (C) or water alone (D) were fractionated by electrophoresis, blotted onto a nylon membrane filter, and allowed to be hybridized with a ^{32}P -labeled fragments of pea PAL and bean CHS cDNA as described in the text. Numbers at the top indicated the duration (h) after the treatment. The positions of the putative mRNAs for pea PAL and CHS are indicated with arrows (2.8 kb and 1.5 kb).

のPAL cDNAをクローニングし、そのサイズが 2,367kbであることを示した。したがって、上記の 2.8kbのサイズにハイブリダイズしたバンドはPAL mRNAに相当すると思われる。CHS cDNAについてもエンドウよりほぼ全長がクローニングされており、そのサイズが 1,321kbであることが示されている (Ann 1992)。

蒸留水処理区およびオルトバナジン酸単独処理区においては、処理 6 時間後で僅かに PALおよび CHS cDNA とハイブリダイズするバンドが確認されるにとどまった。これに対し、エリシター単独処理区では処理後 1 時間以内にPAL mRNAが著しく蓄積し、5 時間後まで蓄積増高して 6 時間になると急激に減少した。これと同様に、CHS mRNAも時間を追ってその蓄積が増加し、6 時間後には僅かながら減少する傾向が認められた。しかしながら、エリシターとオルトバナジン酸の混合処理区では、処理 4 時間目以降で両mRNAの著しい蓄積が認められ、その後徐々に蓄積量が増加する傾向にあった。すなわち、オルトバナジン酸の添加が両遺伝子の発現を約 3 時間遅延させることを示していると思われた。一方、内部基準として調べた、原形質膜ATPase mRNA の蓄積動向は、PALおよび CHS mRNA と異なり、すべての処理区において変動はなくほぼ一定であった (Fig. 14)。また、検出されたmRNAは 3.6kbおよび 1.6kbであった。

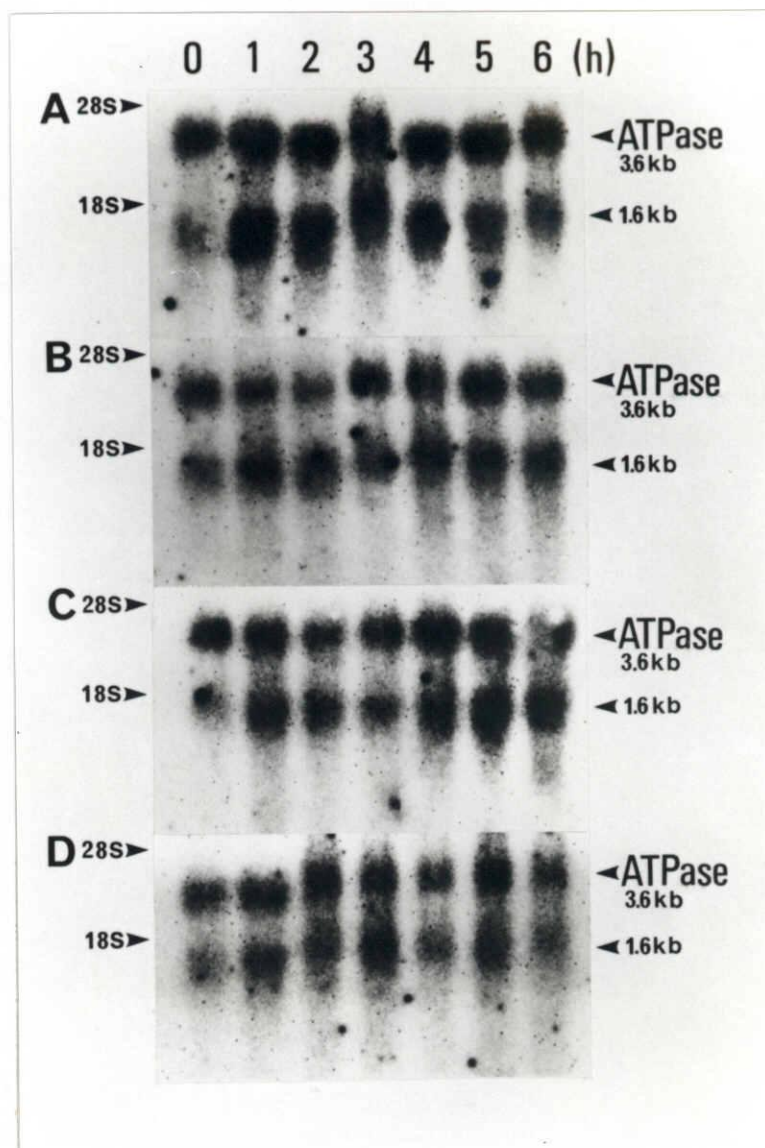


Fig. 14 Accumulation of mRNA for the plasma membrane ATPase in elicitor-treated pea epicotyls in the presence and in the absence of orthovanadate. RNA was blot-hybridized with a ^{32}P -labeled fragments of the cDNA for tobacco ATPase as described in the legend to Fig. 13. The letters and numbers are same as in Fig. 13. The positions of the putative mRNAs for pea ATPase are indicated with arrows (3.6 kb and 1.6 kb).

5) エリシター誘導によるピサチン蓄積におよぼすサプレッサー、オルトバナジン酸およびベラパミルの処理時期の影響

エリシター処理後にサプレッサーおよび各種阻害剤を添加した場合にピサチン蓄積が抑制されるか否かを調べる目的で、エンドウ上胚軸をエリシター単独で処理し(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、処理開始 0、3、6、9 および 12 時間後にエリシター (最終濃度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とサプレッサーまたは阻害剤 (サプレッサー最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、オルトバナジン酸 最終濃度 1 mM、ベラパミル 最終濃度 100 μM) の混合液で上胚軸を再度処理し、処理開始 18 時間後にピサチンの蓄積量を調べた。対照区として、蒸留水処理区とエリシター単独処理区を設けた (Fig. 15)。その結果、PAL および CHS 遺伝子が既に活性化されているエリシター処理後 3 時間にサプレッサーを添加した場合、エリシター単独処理に比べ有意にピサチン蓄積が抑制された。また、この結果はオルトバナジン酸またはベラパミルを添加しても同様であった。さらに PAL 活性が増高しているエリシター処理後、6、9 時間後にこれらの阻害剤を添加した場合においてもピサチン蓄積が抑制される傾向が認められた。この場合、阻害剤を添加する時間に依存してその抑制率は低下したが、ベラパミル添加区では 12 時間後に添加した場合においてもサプレッサーまたはオルトバナジン酸に比べ強い抑制効果をを示した。

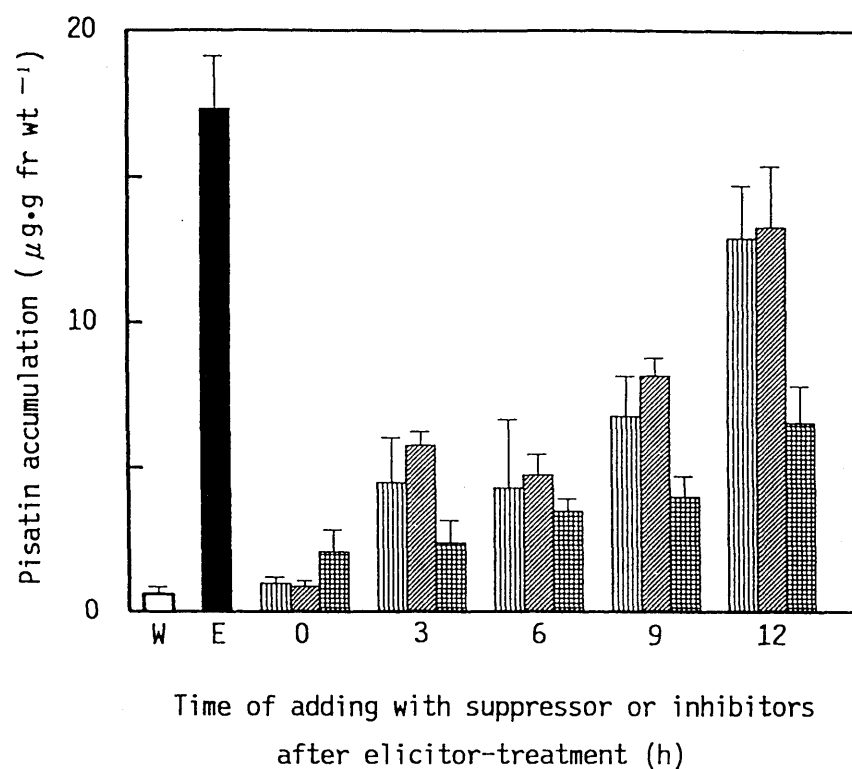


Fig. 15 Effects of the timing of the addition of verapamil, orthovanadate or fungal suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on the accumulation of pisatin in elicitor-treated pea epicotyls. The epicotyls were treated with elicitor alone and then transferred to a solution of elicitor (500 μg/ml, glucose equiv.) plus 100 μM verapamil (▤), of elicitor plus 1 mM vanadate (▨) or of elicitor plus fungal suppressor (50 μg/ml, BSA equiv.) (▧) 0, 3, 6, 9 and 12 hr after the initial treatment with elicitor. Treatments with water (W) (□) and elicitor alone (E) (■) were used as negative and positive controls, respectively. The amount of pisatin (μg/g fresh weight) was determined 18 hr after the initial treatment with elicitor by the method described by Masuda et al. (1983). The height of each bar represents the mean of results of triplicate experiments, and the line on each bar indicates the standard error.

3. 考察

第二章で述べたようにサプレッサーの第一義的な作用点が原形質膜ATPaseであると想定とすると、原形質膜ATPaseの阻害剤もサプレッサーと同様の形式でピサチン蓄積を抑制することが予想できる。そこで、エリシターで誘導されるピサチン蓄積を指標としてオルトバナジン酸およびベラパミルの影響について調べた。エンドウ上胚軸をエリシターと所定濃度に調製したバナジン酸の混合液で処理し、経時的にピサチン生産を調べたところ、エリシター処理区では6～9時間でピサチンの蓄積が検出されるのに対し、オルトバナジン酸またはベラパミルを併せて処理した場合その蓄積は少なくとも6時間遅延することが明らかとなった。以上の結果は、サプレッサーのエリシターで誘導したピサチン蓄積におよぼす効果と酷似しており、原形質膜ATPaseの活性阻害とピサチン蓄積抑制との間には強い相関があることを示すものであろう。さらに、エリシター処理後のPALおよびCHS遺伝子の発現をノーザン解析により経時的に調べた結果、水対照区また、バナジン酸単独処理区では両 mRNA はほとんど検出されなかったが、エリシターで処理すると1時間以内に著しい増加が認められ、エリシターにバナジン酸を添加して処理するとこの転写の増加は2～3時間遅れることが判明した。オルトバナジン酸のPAL および CHS遺伝子の発現におよぼす効果もサプレッサーのそれに対する効果と類似していた。以上の結果は、サプレッサーの第一義的な作用点が原形質膜ATPaseであり、ATPase阻害による膜機能障

害作用と防御遺伝子発現に係わる情報伝達系の一時的な抑制との間には強い相関があることを示唆するものと考えた。すなわち、オルトバナジン酸によるピサチン蓄積の遅延効果は、この合成系に関与する酵素の遺伝子の活性化を転写レベルで遅延することに起因するのであろう。

しかしながら、このようなオルトバナジン酸による防御遺伝子発現の抑制作用は処理細胞の死滅に起因する可能性を無視することは出来ない。最近になって、Yamada et al. (1992)はエンドウのゲノムから、褐紋病菌のエリシターで制御される PALのプロモーター領域をクローニングし、その構造を決定した。Hashimoto et al.

(1992) は、このプロモーター領域を含む DNA断片の下流にレポーター遺伝子としてCAT(chloramphenicol acetyltransferase)を連結したキメラプラスミドを構築し、エンドウのプロトプラストに導入してトランジェントアッセイを行った。その結果、エリシター処理で CAT活性が確認され、その活性化は1 mMのオルトバナジン酸の同時処理で抑制されることを報告した。さらに、彼らはカリフラワーモザイクウイルス由来の構成的発現プロモーターである 35Sプロモーターの下流に CAT遺伝子を連結したキメラプラスミドをエンドウのプロトプラストに導入し、同濃度のオルトバナジン酸で12時間処理してCAT 活性を調べたところ、水処理区と同等の活性を示すことを報告した。これらの報告より、オルトバナジン酸はエンドウ細胞を死滅させることにより防御遺伝子の活性を低下させるものではなく、活性化に至る過程を抑制する効果を有するものと考えられた。

エンドウ褐紋病菌の生産するサプレッサーは、第一章で述べたように菌の接種やエリシター処理による感染阻害因子の生産やピサチン蓄積など、異なる二つの化学的障壁を打破する。ピサチンについては、エリシターとサプレッサーで同時に処理した場合、その蓄積および生合成系に係わる PAL 遺伝子の発現が遅延した。また、エリシター処理により生合成系がすでに活性化した 9 時間後にサプレッサーを処理した場合においても、有意にピサチン蓄積が抑制された。*in vitro*においてはサプレッサーは PAL および挂皮酸 4 ヒドロキシラーゼ活性を阻害することにより、これらの酵素に直接作用することが報告されているが (Hiramatsu et al. 1986)、PAL 活性に対して直接の阻害効果を持たないオルトバナジン酸やベラパミルもサプレッサーと同様に後処理した際でもピサチン蓄積を阻害するので、サプレッサーのピサチン蓄積に対する最も重要な役割は原形質膜 ATPase 阻害であると推察できよう。

これらのことを総合して考えると、サプレッサーをエリシターと同時処理した際にはエリシターの情報伝達が一時的に阻害されることにより一連の防御反応が抑制されると思われるが、後処理した際には時間的な背景から情報伝達以降の過程が抑制されと考えざるを得ない。また、これらの事象はサプレッサーが宿主植物の ATPase を中心とした基本的な代謝系に作用点を持つことを示しているのではないだろうか。この点については今後の研究の進展を待たねばならないが、サプレッサーおよびエリシターの活性を本菌胞子の懸濁後経時的に調べると、前者は懸濁直後から検出されるが後者は 3 時

間後より検出されることが確認されている（白石と山田 1993）。したがって、感染現場においてはサプレッサーがエリシターに先行して作用することが予想された。

第四章 *in vitro*および*in vivo*におけるサプレッサーの原形質膜 ATPase阻害の特異性について

エンドウ褐紋病菌は、子のう菌綱に属し、エンドウの葉、莖、莢などに黒褐色の小さい斑点を生じ、やがて輪紋のある病徴を形成する糸状菌である (Heath and Wood 1969)。本菌柄胞子を葉表面に接種すると、発芽管の先端部に付着器を形成し、宿主原形質を押し込むようにして紡錘形の感染嚢を形成する。この時点では宿主細胞は死に至ることはないが、接種後12時間以降になると感染嚢から侵入菌糸が隣接した表皮細胞を貫通するように伸長して細胞が壊死することが報告されている (Nasir et al. 1992)。以上のように本菌の感染過程には、半寄生菌として知られるウリ類炭そ病菌

(*Colletotrichum lindemuthianum*, O'Connell et al. 1985)と類似し、感染初期においては共生関係を成立させる相が存在することが指摘されている (Nasir et al. 1992)。一方、本菌が病原性を示さない他のマメ科植物に感染を試みた場合や、宿主であるエンドウに感染を試みて失敗した例では、付着器から侵入または感染嚢形成の過程において阻害されることが報告されている (Nasir et al. 1992)。このように、本菌は感染過程の極めて早い段階で感染の成否が決定する。

Nasir のグループは (Nasir et al. 1992, Nasir and Hoppe 1991)は47品種のエンドウにいくつかのエンドウ褐紋病菌の圃場分離株を接種したところ、抵抗性を示すエンドウ品種は見い出せな

かったとしている。別の言い方をすると、本菌は品種レベルでの宿主選択性はなく、種レベルで特異的に病原性を発揮する病原菌であるといえることができる。また、エンドウ褐紋病菌サプレッサーはインゲンやダイズなど本菌の非宿主植物にエリシター処理で誘導されるファイトアレキシン合成を抑制できないだけでなく、逆にエリシターとして作用することが報告されている (Shiraishi et al.

1991b)。すなわち、エンドウ褐紋病菌のサプレッサーはエンドウの防御反応の発現を抑制するが、インゲンやダイズなどの他のマメ科に属する非宿主植物に対しては防御反応の発現を抑制することはない。これらのことから、本サプレッサーの抵抗反応の抑制作用は種特異的であるといえる。

前章では、エンドウ褐紋病菌の生産するサプレッサーが原形質膜ATPaseを*in vitro*で阻害すること、さらに、原形質膜ATPaseの阻害剤であるオルトバナジン酸でエンドウ上胚軸を処理すると本菌の生産するエリシターで誘導されるピサチンの蓄積を抑制することを明らかにした。また、オルトバナジン酸の作用はピサチン合成系の律速酵素である PALおよび CHSの遺伝子発現を一時的に抑制することから、この作用はサプレッサーの作用に極めて類似していた。したがって、サプレッサーによる原形質膜ATPaseの阻害作用が防御反応の発現抑制に重要な役割を果たすと仮定すると、本菌の宿主植物のみにその作用を発揮して寄生関係が生じ、非宿主植物には作用がおよばず防御反応の発現による寄生の不成立という結果になることが予想される。

本章では、エンドウ褐紋病菌のサプレッサーが種特異的にエンドウ原形質膜ATPaseの活性を阻害するか否かを、*in vitro*および*in vivo*の作用系を用い、インゲン、ダイズ、ササゲおよびオオムギの原形質膜ATPaseに対する影響を比較して調べた。さらに、エンドウ褐紋病菌に加えて、同属菌でキクに対してのみ有効に作用するサプレッサーを生産することが報告されている (Oku et al. 1987) キク花腐病菌 (*Mycosphaerella ligulicola*) の胞子を非宿主のエンドウ葉に接種し、本菌が感染現場でエンドウの原形質膜ATPaseを阻害するか否かについても併せて検討した。

1. 材料および方法

1) 供試植物

供試植物には、既述のエンドウ植物の品種ミドリウスイ、インゲン植物の品種ハツミドリ (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Hatsumidori)、ササゲ植物の品種サンジャクササゲ (*Vigna sinensis* Endl. L. cv. Sanjakusasage)、ダイズ植物の品種グリーンホーマー (*Glycine max* Mer. cv. Greenhomer) およびオオムギ植物の品種五畝四石 (*Hordeum vulgare* L. cv. Goseshikoku) を用いた。

原形質膜画分を上記の植物から分離する際には、それぞれの種子

を一昼夜水中で催芽させた後、バーミキュライトを入れたプラスチック容器に播種し、 20 ± 2 °Cの暗黒下で6～10日間生育させた上胚軸または胚軸の上部5～10cmを供試した。なお、オオムギより原形質膜画分を分離する際は、黄化葉を用いた。

電子顕微鏡観察するために上記の植物を供試する際は、種子を一昼夜水中で催芽させた後、バーミキュライトを入れたプラスチック容器に播種し、温光制御室（ $20 \sim 24$ °C、約4000 lux）にて約2週間生育させ、インゲン、ササゲ、ダイズおよびオオムギでは第一葉を供試し、エンドウでは展開した第二葉または第三葉を使用した。

2) 供試菌

エンドウ褐紋病菌は第二章1. 2) で述べたIFO No. OMP-1 を使用し、実験にはV-8 ジュース寒天斜面培地上に 25 °Cの暗黒下で継代培養し、移植6～7日後に形成される柄胞子を使用した。なお、継代培養中に病原性が低下した場合には、エンドウ葉に接種し、形成された顕著な病班より再分離して、V-8 ジュース寒天斜面培地上に移植し、さらに短胞子分離を行って病原性が回復したものを使用した。

キク花腐病菌 (*Mycosphaerella ligulicola* K.F. Baker. strain OML) は、エンドウ褐紋病菌と同属に属し、キクの花弁の基部を褐色に腐敗させ、やがて花を奇形化する糸状菌である。供試したキク花腐病菌は、岡山県農業試験場粕山新二氏より分譲されたものである。

実験には V-8 ジュース寒天斜面培地上に 25℃ の暗黒下で継代培養し、移植 6～7 日後に形成される柄胞子を使用した。なお、継代培養中に病原性が低下した場合には、キクの花弁に接種し、形成された顕著な病斑より再分離して、V-8 ジュース寒天斜面培地上に移植し、さらに短胞子分離を行って病原性が回復したものを使用した。

3) 接種源の調製および接種

継代培養した供試菌を移植して 6～7 日目に形成した胞子を、白金耳で菌体表面を軽く擦ることにより掻き取り、滅菌水を入れたエッペンドルフチューブ中で懸濁した。得られた胞子懸濁液を、二層のガーゼでろ過して混入した培地成分などを取り除いた後、ろ液を、5 分間遠心分離 ($3,000 \times g$) して胞子を沈澱として回収した。この操作を二度繰り返して胞子を洗浄した。胞子懸濁液の胞子濃度は、血球計算器を用いて顕微鏡下で計数し、 $5 \times 10^5 \text{ spores/ml}$ に調整した。

温光制御室で生育させた播種後約二週間のエンドウの上位第二、三葉を切断し、葉の表皮を蒸留水を含ませた脱脂綿で軽く拭いてワックス層を部分的に除いて水を弾かないようにした。湿室条件にしたプラスチック容器内に葉を置き、一葉あたり $10 \mu\text{l}$ ずつの胞子懸濁液を接種した。また、接種する際には、胞子濃度を均一に保つために胞子懸濁液を一回よく攪拌して行った。

4) エンドウ褐紋病菌のサプレッサーの調製

エンドウ褐紋病菌のサプレッサーは、第二章 1. 4) と同様に、Hiramatsu et al. (1986) および Shiraishi et al. (1978)の方法に準じてエンドウ褐紋病菌の孢子発芽液から調製した。なお、以降に示すサプレッサーの濃度は牛血清アルブミン (BSA)の換算値で示した。

5) 各種植物からの原形質膜の分離

原形質膜ATPaseに対する抑制効果におけるサプレッサーの特異性を *in vitro*で調べるために、Yoshida et al. (1986)の方法を一部改良して各植物から水性二相分配法により原形質膜画分を分離した。エンドウ上胚軸およびインゲン、ササゲ、ダイズの胚軸からの分離法の概要は第二章 1. 7) で述べた。オオムギ黄化葉からは次に述べる方法で調製した。

暗黒下で生育した黄化オオムギ葉を水道水で洗浄した後、4 °Cの冷蔵庫で約 1 時間冷却した。オオムギ葉を(100g)を乳鉢に入れ、あらかじめ 4 °Cに冷却した 200mlの摩砕緩衝液中 [75mM MOPS/KOH (pH 7.6), 0.25M sucrose, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 2 mM PMSF, 4 mM SHAM, 10 μ g/ml BHT, 2.5 mM potassium metabisulfate, 0.5% (W/V) BSA (defatted), 1.5% (W/V) Polyclar AT]で十分摩砕した。懸濁液を4 層に重ねたガーゼで濾過し、濾液を 4 °Cで15分間遠心分

離 ($12,500 \times g$) して残渣や核、ミトコンドリアなどを取り除いた。得られた上清を再度 4°C で15分間遠心分離 ($156,000 \times g$) して、沈澱物を 10ml のリン酸緩衝液 [10mM potassium phosphate (pH 7.6), 0.25M sucrose, 10mM NaCl] でテフロンホモゲナイザーを用いて懸濁して、ミクロゾーム画分 (原形質膜、トノプラスト膜、小胞体膜、ゴルジ体膜などを含む) を得た。新たな遠心管2本に25ml ずつ二相分配溶液 [10mM potassium phosphate (pH 7.6), 5.6% (W/W) Dextran T500, 5.6% (W/W) PEG 4000 (M. W. 3350), 0.25M sucrose, 10mM NaCl] を分注し、それぞれの遠心管にミクロゾーム画分を 5 ml ずつ加えた。遠心管を横にしてミクロゾーム画分を含む二相分配溶液を30回軽く攪拌した後、 0°C で4分間遠心分離 ($1,000 \times g$) して下層 (トノプラスト膜、小胞体膜およびゴルジ体膜などを含む) と上層 (原形質膜およびトノプラスト膜を含む) とに分け、上層を回収した。ついで、あらかじめ用意した二相分配溶液の下層 (デキストラン層) と試料を含む上層を再び混合し、上記の要領で二相分配を行い上層を回収した。このようにして得られた上層に2倍量以上の希釈緩衝液 [75mM MOPS/KOH (pH 7.6), 0.25M sucrose, 10mM KCl, 1mM EDTA, 0.2mM PMSF, 1mM dithiothreitol (DTT), $10\mu\text{g/ml}$ BHT] で希釈して 4°C で15分間遠心分離 ($156,000 \times g$) して、遠沈物を 0.25M のショ糖を含む保存用緩衝液 (5 mM MOPS/KOH, pH 7.6) を加え、 4°C で15分間遠心分離 ($156,000 \times g$) することにより洗浄して同じ緩衝液で懸濁した画分を原形質膜画分として用いた。なお、原形質膜の量は BSA を標準

タンパクとして Lowry et al. (1951)の方法により評価し、凍結融解による膜脂質および膜タンパク質の変性を避けるために少量ずつ分注して-80℃で保存した。

6) *in vitro*における原形質膜ATPase活性の測定

各植物から分離した原形質膜画分を用いて、第二章1.8)で述べたように、Perlin and Spanswick (1981)の方法に従いATPase活性を測定した。各原形質膜画分 ($3\ \mu\text{g}$, BSA換算値) は $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ (BSA換算値) の濃度のエンドウ褐紋病菌サプレッサーで処理した。また、原形質膜の純度を評価する目的で、オルトバナジン酸ナトリウム ($1\ \text{mM}$)、アジカナトリウム ($100\ \mu\text{M}$)、ショウ酸ナトリウム ($50\ \text{mM}$) に対する感受性も併せて検討した。

7) *in vivo* における原形質膜ATPase活性の検出

葉組織でのATPase活性は ATPの分解によって生ずる PO_4^- が Pb^{2+} と反応して沈着することで、電子顕微鏡により高電子密度の点として観察することができる。そこで本実験では、Hall et al. (1980) および Moore et al. (1987)の方法を一部改良して活性検出を行った。 $10\ \mu\text{l}$ のオルトバナジン酸溶液 ($1\ \text{mM}$)、サプレッサー ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$) または胞子懸濁液、および対照区として蒸留水で各植物の葉表面を処理した後、 20°C で3、6および9時間静置した。その後、葉組織か

ら各処理を施した部分をあらかじめ切り取り、氷冷した固定液 A [50mM Tris-Mes (pH 7.2), 4% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde] 中に浸漬しながら、縦 5 ~ 10mm、幅 1 mm 以下の葉片になるように切断した。これらの試料は、余分な傷をつけないよう注意深く取り扱い固定液 A の入ったサンプル管に入れ 1 時間浸漬固定した。試料を固定した後、0 °C の洗浄緩衝液で (50mM Tris-Mes, pH 7.2) で、5 回洗浄した。その後、22 °C の反応液 [4mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 2.5mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, 3.5mM ATP, 50mM Tris-Pipes (pH 7.2)] 中に試料を浸漬して 1 時間反応させた。反応後、Tris/Pipes (pH 7.2) で 5 回洗浄した。洗浄した試料を 50、70、90、95、99 および 100% のエタノールシリーズで順次 30 分間浸漬し、プロピレンオキサイドに置換した後 SPURR 樹脂中に包埋し、70 °C で 8 時間重合させた。包埋試料からウルトラミクロトーム (model OmU2, Reichert, Austria) に装着したガラスナイフでゴールドの超薄切片 (ca. 80-90 nm thick) を作成し、フォルムバル膜を張ったシングルスロットの銅グリッド上にのせた。1 % の酢酸ウラニルで 30 分間染色した後、透過型顕微鏡 (JOEL100B) を用いて加速電圧 80kV で観察を行った。なお、未染色の試料は元素分析装置を備えた透過型顕微鏡 (Hitachi H-7100、Horiba Emax-3770) を用いて加速電圧 75kV、プローブ電流 7.2×10^{-10} A で分析した。

2. 実験結果

1) *in vitro*におけるサプレッサーの原形質膜ATPaseにおよぼす阻害の特異性について

各植物から分離した原形質膜画分における、原形質膜の純度を評価する目的で、オルトバナジン酸ナトリウム (1 mM)、アジ化ナトリウム (100 μ M)、ショウ酸ナトリウム (50mM) のATPase活性におよぼす影響を検討した結果、いずれの膜画分のATPase活性も、アジ化ナトリウムおよびショウ酸ナトリウムに非感受性でオルトバナジン酸により強く阻害されたので、いずれの画分も原形質膜に富むと判断された (Table 9)。

一方、エンドウ褐紋病菌の宿主であるエンドウ、非宿主であるインゲン、ササゲ、ダイズおよびオオムギ葉から分離した原形質膜画分をサプレッサーで処理したところ、全ての原形質膜ATPase活性は阻害された (Fig. 16)。

2) *in vivo*におけるサプレッサーの原形質膜ATPaseにおよぼす阻害の特異性について

エンドウの葉組織を蒸留水またはサプレッサーで1時間処理し、ATP とショウ酸鉛を与えて活性染色した後電顕観察したところ、蒸留水処理区では細胞壁に沿って、高電子密度の沈着物が観察された。

Table 9. Effects of ATPase inhibitors on plasma membrane ATPase activities derived from several plants

Treatment (final concentration)	ATPase activity ^a (Relative activity)				
	Pea	Cowpea	Soybean	Kidney bean	Barley
Control	12.0(100)	13.3(100)	7.9(100)	9.3(100)	47.6(100)
NaNO ₃ (50 mM)	14.2(118)	13.5(102)	8.7(110)	10.9(117)	48.5(102)
NaN ₃ (0.1 mM)	12.1(101)	13.2 (99)	6.2 (78)	9.1 (98)	49.3(104)
Na ₃ VO ₄ (1 mM)	2.4 (20)	3.6 (27)	3.2 (41)	1.2 (13)	17.7 (37)

^aThe assay for ATPase activity(μ mol Pi/mg protein/hr) was carried out in 30 mM Tris-Mes (pH 6.5) that contained plasma membrane protein (3 μ g) and 3 mM MgSO₄ and 3 mM ATP at 37 °C for 15 min by the method described by Perlin and Spanswick (1981).

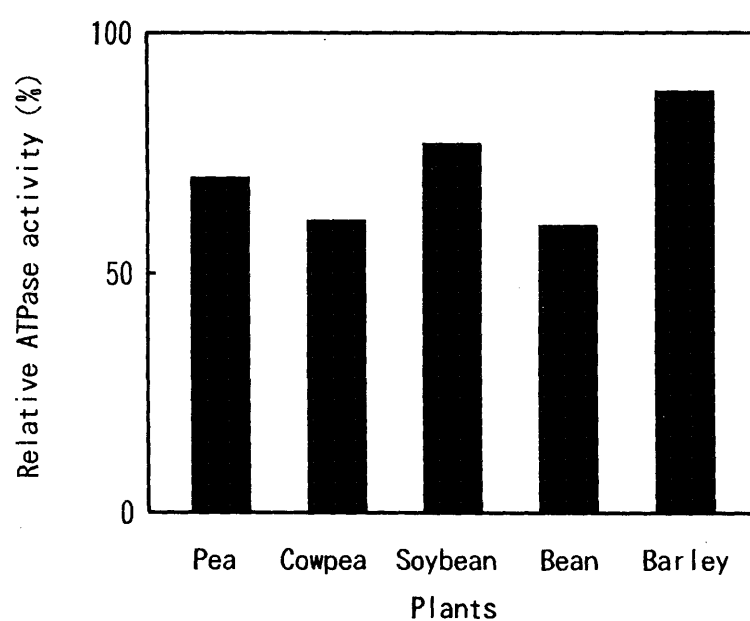


Fig. 16 Effects of suppressor ($50\mu\text{g/ml}$) from *M.pinodes* on ATPase activities in plasma membranes isolated from host or nonhost plant tissues. The ATPase activity was determined by the method of Perlin and Spanswick (1981). The relative ATPase activity (%) was calculated against control activity with each plant described in Table 9.

沈着物に相当する部分をX線分析したところ、Van Steveninck (1979) によって報告されているように 2.23-2.53 KeV (Kilo electron volt) の範囲に鉛の存在を示すピークが認められた (Fig. 17)。しかしながら、Piを示すピークは確認されなかったことより、リン酸との化合物ではなく、鉛自身が析出したものであると思われた。さらに、蒸留水処理に加えサプレッサーで一時間処理したエンドウ葉で電顕観察したところ、前者では原形質膜に沿って、高電子密度物質の沈着が観察されたが、後者では観察されなかった。この像を2.23-2.53 KeV で平面解析を行ったところ、沈着物が観察された部分のみに鉛を示す点が現れ、サプレッサー処理区では僅かに確認されるのみであった (Fig. 18)。エンドウ、ササゲ、インゲン、ダイズおよびオオムギ葉に、オルトバナジン酸処理を1時間施して高電子密度物質の沈着の有無を調べたところ、いずれの植物においても蒸留水処理区で観察された沈着は観察されなかった (Fig. 19)。したがって、この高電子密度物質の沈着は、ATPase活性を反映した鉛であると考えられた。興味深いことに、サプレッサーで処理した、ササゲ、インゲン、ダイズおよびオオムギではATPase活性に依存する鉛の沈着が認められたが、エンドウでは確認されなかった。

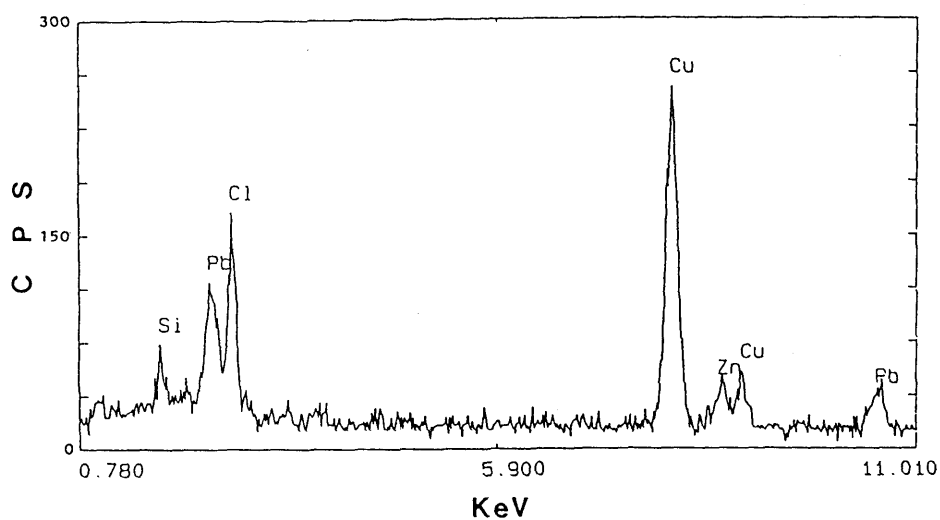


Fig. 17 X-ray microanalysis of the electron-dense granules on plasma membranes in pea cell. Cytochemical detection of plasma membrane ATPase was carried out 1 hr after treatment with water by the method as described in the text. Note that the emission peaks of Si-K α , Pb-M α and -L α , Cl-K α , Cu-K α and -K β and Zn-K α were detected. CPS, count per second; KeV, kilo electron volt.

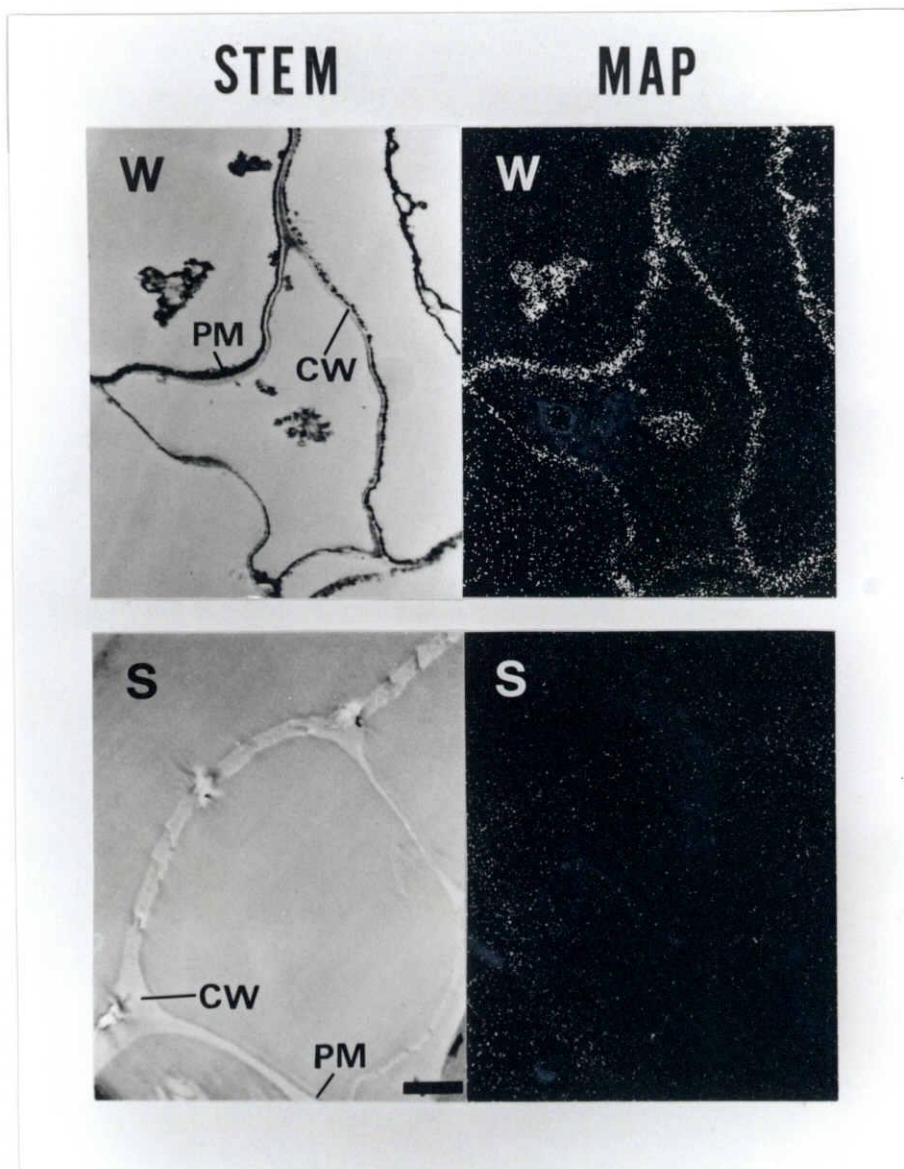


Fig. 18 X-ray mapping (MAP) of the distribution of lead and scanning transmission electron microscopy (STEM) of pea cells after cytochemical staining for ATPase activity. The localization of ATPase activity was performed 1 h after treatment of leaves with water (W) or the suppressor (S), using lead-M α as described in the text. The letters in photographs indicate cell wall (CW) and plasma membrane (PM), and the length of the bar represents 2 μ m. Note that the lead deposits are localized on plasma membranes and fragments of tonoplast in water-treated pea cells but not in the suppressor-treated cells.

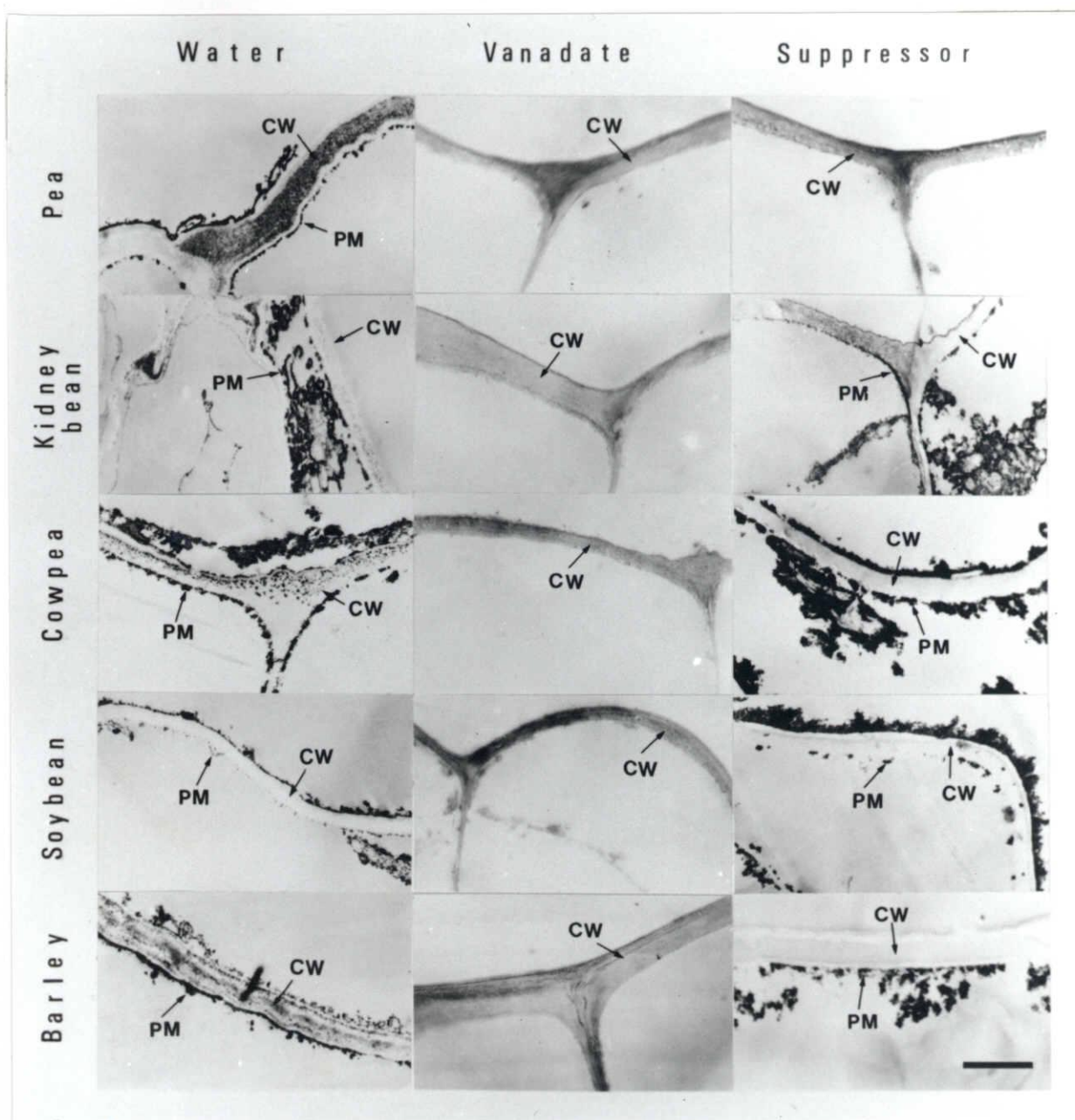


Fig. 19 Effects *in situ* of orthovanadate and suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on plasma membrane ATPase activities in epidermal cells of five plant species. Cytochemical detection of ATPase was carried out 1 h after treatment of respective plant leaves with water, Na_3VO_4 , or the suppressor, as described in the text. The letters and bar in photographs indicate the same organella and scale, respectively, as described in the legend to Fig. 18. Note that orthovanadate inhibited the deposition of lead on plasma membranes in all plant cells, but the suppressor from the fungus blocked the deposition only in pea cells among the five plant species tested.

3) サプレッサー処理エンドウ葉におけるATPase活性の

経時的変動

蒸留水あるいはサプレッサーでエンドウ葉を3、6および9時間処理した後、ATPとショウ酸鉛を与えて活性染色した後電顕観察したところ、蒸留水処理区ではいずれの時間においても原形質膜に沿って高電子密度物質の沈着が観察された。サプレッサー処理区では処理後3および6時間ではこの沈着は観察されなかったが、9時間になると沈着が観察された (Fig. 20)。

4) 病原菌接種エンドウ葉におけるATPase活性の経時的変動

本サプレッサーが感染現場において宿主の原形質膜ATPaseを阻害するか否かを調べる目的で、エンドウ葉にエンドウ褐紋病菌あるいは非病原菌であるキク花腐病菌をそれぞれ接種し、3、6および9時間後にATPと鉛を与えて活性染色した後、電顕観察した。その結果、キク花腐病菌の接種葉では、いずれの時間においても孢子下にATPase活性を示す高電子密度物質の沈着が認められた。しかし、エンドウ褐紋病菌の接種葉では、少なくとも接種後6時間まではその沈着が観察されず、9時間後になると観察された (Fig. 21)。

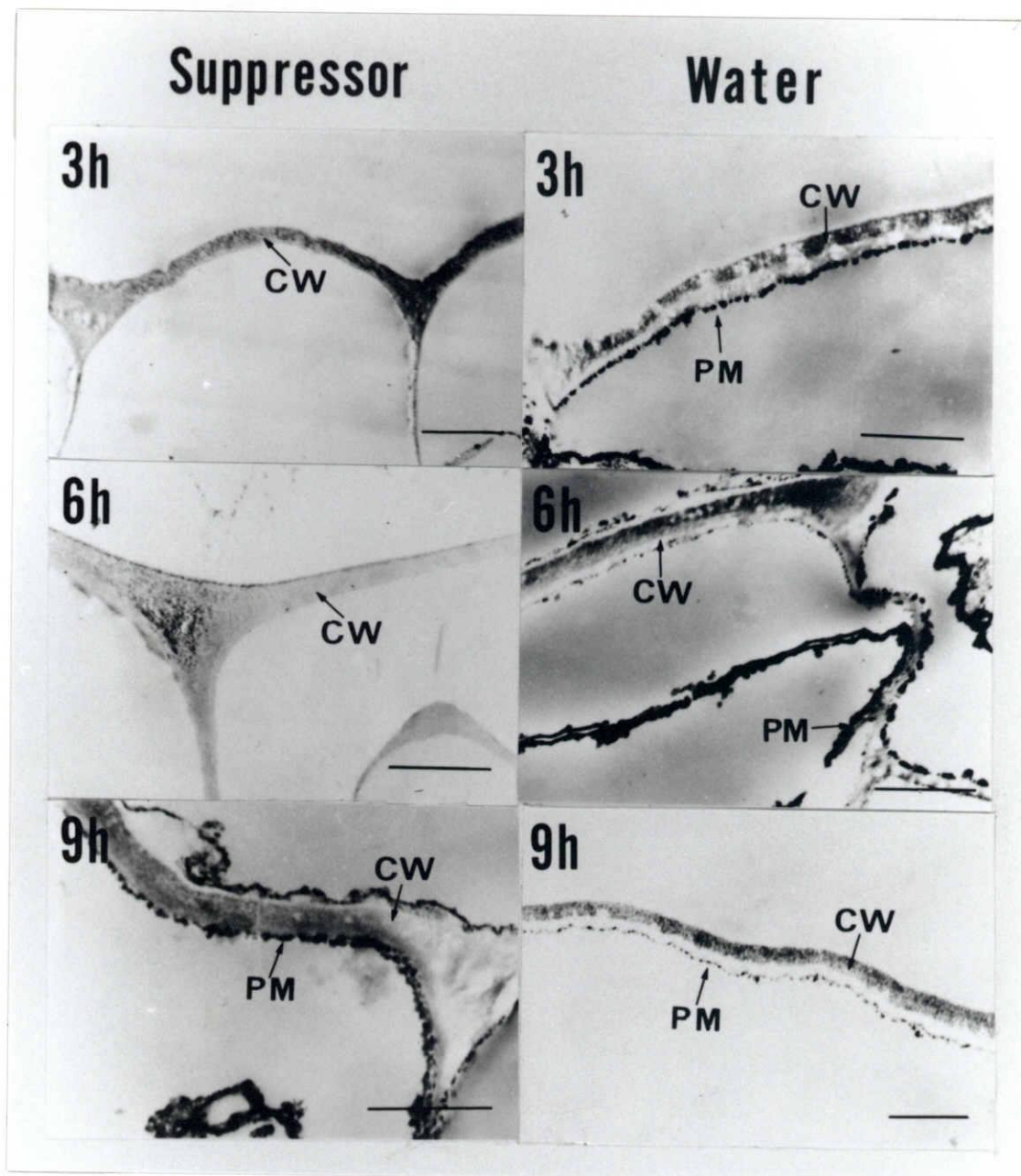


Fig. 20 Changes in ATPase activity in pea cells *in situ* after treatment with water or the suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. The numbers in photographs represent hours after treatment with water or with the suppressor, as described in the text. The bars in photographs represent the same scale as described in the legend to Fig. 18. Note that the ATPase activity in the suppressor-treated cells was markedly inhibited for 6 h, but recovered 9 h after treatment.

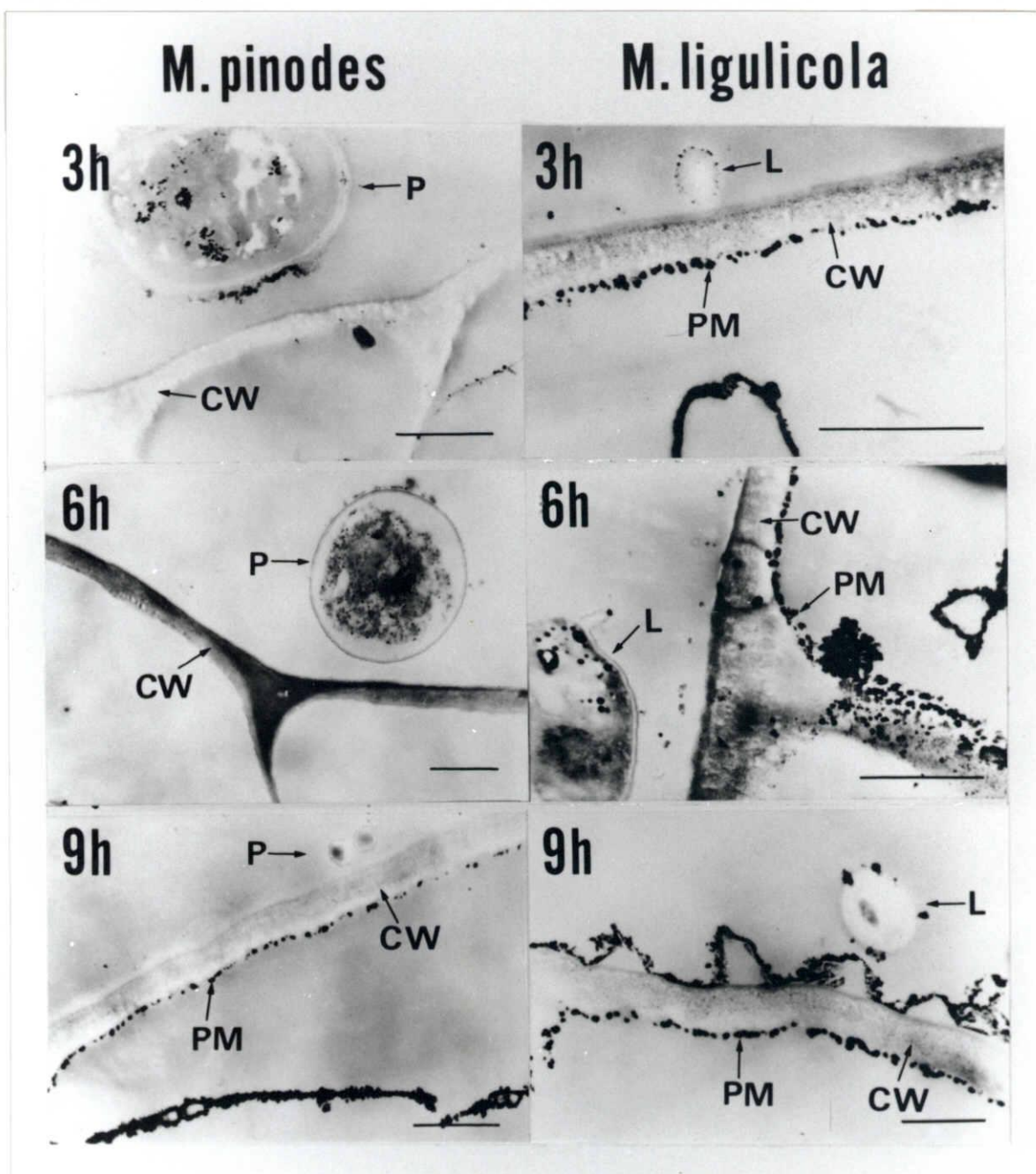


Fig. 21 Changes in ATPase activity in pea cells *in situ* after inoculation with a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes* and a nonpathogen, *M. ligulicola*. The numbers in photographs represent hours after inoculation with *M. pinodes* or *M. ligulicola*. The letters, P, L, CW and PM indicate *M. pinodes*, *M. ligulicola*, cell wall (cuticle layer) and plasma membrane, respectively. The bars represents 2 μm . Note that the ATPase activity in tissues inoculated with *M. pinodes* was severely inhibited for 6 h but recovered 9 h after inoculation, as in the case of the suppressor-treated cells shown in Fig. 20.

3. 考察

エンドウ褐紋病菌の生産するサプレッサーは宿主植物であるエンドウおよび非宿主植物であるササゲ、インゲン、ダイズおよびオオムギから調製した原形質膜画分のATPase活性を非特異的に阻害するが、組織レベルではエンドウのみのATPase活性を種特異的に阻害することが明らかとなった。本サプレッサーの感染誘導作用の特異性を解析するために、上記の5つの植物をサプレッサーで処理して、本来いずれの植物にも病原性を示さないナシ黒斑病菌の毒素生産能失活株を接種したところ、エンドウのみに病斑が形成されることを先に述べた。このように、*in vivo* での本サプレッサーによる原形質膜ATPase阻害とその受容性誘導の作用特異性が一致することから、両者の間には強い相関があるものと考えられた。さらに、エンドウ褐紋病菌およびキク花腐病菌をエンドウ葉に接種した場合、前者においてのみ原形質膜ATPaseが阻害されたことより、サプレッサーは感染現場においても作用し、エンドウ—エンドウ褐紋病菌の間での特異的な相互作用は原形質膜ATPase活性の抑制が鍵となっている可能性を強く示唆するものであると考えた。

Gay らのグループは絶対寄生菌であるエンドウうどんこ病菌 (*Erysiphe pisi*) を用いて同様の実験を試みている。エンドウうどんこ病菌は付着器から栄養吸収器官である吸器を細胞壁と原形質膜の間に形成し、宿主細胞を壊死させることなく寄生する糸状菌である (Manners and Gay 1982)。そこで彼らは、宿主細胞内から吸

器への栄養成分の移行を考えた際に、原形質膜の透過性の変化に共生機構の鍵があるものと考えて原形質膜ATPase活性の変動を感染組織にATP と鉛を与えて電子顕微鏡下で観察した。その結果、吸器周辺の宿主原形質膜のATPase活性が抑制されていることを見出した (Spencer-Phillips and Gay 1981)。エンドウ褐紋病菌も本章の冒頭で述べたように初期感染過程では絶対寄生菌と類似した様相がみられることから、ATPaseの抑制は寄生機構の一端を担う共通の事象であるかもしれない。

本研究では*in vitro*におけるサプレッサーによる非特異的なATPase阻害作用の原因については回答を得るには至らなかったが、同様な現象が*Cochliobolus victoriae*の生産する宿主特異的毒素であるHV毒素で得られている。すなわち、Wolpart and Macko (1989) は感受性および抵抗性のエンバク葉に ^{125}I で標識したHV毒素の誘導体で処理して結合タンパクの有無を調べたところ、感受性品種のみ特異的に結合する100kDaのタンパクを原形質膜画分に見い出し、受容体の存在を示唆した。しかしながら、分離した原形質膜画分を標識したHV毒素の誘導体で処理すると、いずれの植物にも100kDaのタンパクが検出されることから、*in vitro*ではその結合能に特異性はないとした。一方、Akimitsu et al. (1992) はHV毒素に対するポリクローナル抗体を作成し、毒素処理を施して100kDaのタンパクを検出したところ、*in vivo* および*in vitro*のいずれの実験でも感受性および抵抗性品種に結合がみられたとしている。このように異なる結果が報告されているが、サプレッサーで得られた実験結果は前者

の報告と一致しており、*in vivo* および *in vitro*での原形質膜 ATPase阻害における特異性の相違は両者の異なった条件下における受容タンパクのコンフォーメーションの相違に起因するであろうと推定している。

サプレッサーによる原形質膜ATPase阻害を経時的に調べたところ、処理後6時間以降になると活性が回復することが明らかとなり、褐紋病菌胞子を接種した場合も同様にその阻害作用は一時的なものであった。エリシターで誘導されたピサチン蓄積に対するサプレッサーの抑制効果も一時的であったことを考え併せると (Yamada et al. 1989)、サプレッサーの作用は可逆的であると考えることができる。Yoshida et al. (1989) はリョクトウを2日以上低温環境にさらすと液胞膜のATPase機能が低下し、最終的には細胞死に至ることを指摘した。原形質膜ATPaseを阻害するサプレッサー処理を施したエンドウ組織には壊死が誘起されないので、その作用は致死的な作用ではなく、本サプレッサーの作用が失効してゆく何らかの過程があり、原形質膜ATPaseが回復するものと思われる。

原形質膜ATPaseは、プロトン輸送を行う際の自身のリン酸化に伴うコンフォーメーション変化から E_1E_2 -ATPaseともいわれ、プロテアーゼによる分解を受けやすくなる (Serrano 1990)。したがって、細胞あたり 10^6 個存在するATPaseは3～9時間で新しく合成されたATPaseに置換されることが示唆されている (Serrano 1988)。また、塩障害を受けた植物は細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇し恒常性に異常をきたすが、塩耐性植物では Ca^{2+} -ATPaseの発現が誘導され、小胞体内

に輸送されることが示唆された (Perz-Prat et al. 1992)。第三章で述べたようにオルトバナジン酸でエンドウ上胚軸を処理しても、原形質膜ATPase mRNA は一定の蓄積を示したので、ATPaseタンパク質が盛んに合成され機能回復に貢献する可能性を考えることができる。このような現象から、ATPaseの代謝回復はサプレッサー効果の減少の一因と考えられるので、ATPase回復の機構を突き詰めることはエンドウ褐紋病菌に耐性をもつエンドウ植物の育成に一助を与えるものと思われる。

第五章 キチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼ活性におよぼす

エリシター、サプレッサーおよびオルトバナジン酸の影響

エンドウ褐紋病菌の生産するエリシターでエンドウ組織を処理すると防御物質であるファイトアレキシンの蓄積のみならず感染阻害因子の蓄積が誘導され (Yamamoto et al. 1986)、その組織は病原性菌の感染をも許容しない抵抗性の状態となる。しかしながら、本菌の生産するサプレッサーはこれらの動的防御反応の発現を抑制し、エンドウ組織に非病原菌が感染できるようになる受容性を誘導する (Oku et al. 1980)。さらにこの受容性誘導能と、ファイトアレキシン蓄積抑制作用との間には相関のあることが報告されている (Oku et al. 1987, Shiraishi et al. 1991b)。

最近になって、上記の防御物質の他にキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性増高が防御反応に寄与すると考えられている (Abeles et al. 1971, Boller 1985, Schlumbaum et al. 1986, Yoshikawa and Takeuchi 1991)。この考えは次に示す二つの証拠に基づいている。1)種々の植物でキチナーゼや β -1, 3-グルカナーゼの存在が報告されているが、高等植物にはキチナーゼの基質であるキチンが存在せず、 β -1, 3-グルカンについてもカロースなどの限られた部分にしか存在が知られていない。卵菌綱では後者が主要な細胞壁組成となっているが、卵菌綱以外の多くの病原糸状菌の細胞壁は両物質が主な構成成分である (Wessels and Sietsma 1981, Schroder et al. 1992)。2)キチナーゼや β -1, 3-グルカナーゼは

エチレン処理や、病原菌の感染およびエリシター処理で同調して誘導される (Abeles et al. 1971, Mauch et al. 1984, Pegg and Young 1981, Vogeli et al. 1988)。エンドウにおいても Mauchや Hadwiger のグループはこれらの活性増高が侵入菌の細胞壁を分解するばかりでなく、病原菌由来のエリシターを遊離させることを示唆し、注目を集めるようになった (Mauch et al. 1984, 1988a, 1988b, Hadwiger and Beckman 1980)。

本サプレッサーの受容性誘導活性の要因をエンドウの発揮する誘導性抵抗反応の制御といった観点から考えると、ピサチンや感染阻害因子の生合成・蓄積のみではなく、キチナーゼや β -1, 3-グルカナーゼの生産および活性増大を含めた複数の抵抗性要因の生産が抑制されなければ受容性は誘導されないと考えられる。それは、階層的に発現するこれらの防御因子の一つが感染現場において高いレベルで蓄積すれば、病原菌の感染や菌糸伸長は妨げられることは容易に予想されるからである。

本サプレッサーは、感染阻害因子やファイトアレキシンの生産・蓄積を抑制する作用を持つことが既に報告されている (Yamamoto et al. 1986)。これらの背景から考えると、本サプレッサーはエンドウのもつ抵抗反応を総合的に制御して、エンドウ褐紋病菌の感染を成立させるものと推察される。他の制御要因と考えられるキチナーゼや β -1, 3-グルカナーゼの生産に対してもサプレッサーが抑制的に作用するか否かは興味のあるところである。

前章では、サプレッサーの原形質膜ATPase阻害における作用特異

性について検討し、組織レベルではエンドウ植物に対してのみ特異的に阻害することを示した。しかし、オルトバナジン酸は供試したいずれの植物の原形質膜ATPase活性をも阻害することを示した。原形質膜ATPaseの阻害がエリシターで誘導される抵抗反応を総合的に抑制すると仮定すると、サプレッサーやオルトバナジン酸処理はキチナーゼや β -1, 3-グルカナーゼの活性増加も抑制するものと予想される。そこで本章では、エリシターで誘導されるキチナーゼや β -1, 3-グルカナーゼの活性増大におよぼすサプレッサーおよびオルトバナジン酸の影響について調べた。さらに、サプレッサーの作用特異性を調べる目的で、非宿主植物であるインゲンおよびダイズに対する作用についても併せて検討した。

1. 材料および方法

1) 供試植物

供試植物には、既述のエンドウ植物の品種ミドリウスイ、インゲン植物の品種ハツミドリおよびダイズ植物の品種グリーンホーマーを用いた。

粗酵素を上記の植物から分離する際には、それぞれの種子を一昼夜水中で催芽させた後、バーミキュライトを入れたプラスチック容器に播種し、 20 ± 2 °Cの暗黒下で6～10日間生育させた上胚軸また

は胚軸の上部 5 cm を供試した。

2) エリシターおよびサプレッサーの調製

エンドウ褐紋病菌のエリシターおよびサプレッサーは、第二章 1. 4) と同様に、Hiramatsu et al. (1986) および Shiraishi et al. (1978) の方法に準じて孢子発芽液から調製した。なお、エリシター濃度はグルコースを標準標品として糖定量し (Dubois et al. 1956)、サプレッサーは牛血清アルブミンを標準標品として Lowry et al. (1951) の方法により定量した。以降に示す両者の濃度はグルコースおよび牛血清アルブミンの換算値で示した。

3) エリシター、サプレッサーおよびオルトバナジン酸の処理

暗所で生育させた供試植物の上胚軸または胚軸の中腹部分を 5 cm の長さになるように切断し、さらに縦軸方向にそって二つに切断した。プラスチックバッド中のアルミホイル上にスポットしたエリシター溶液 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、エリシター (最終濃度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とサプレッサー (最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の混合溶液、エリシター (最終濃度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とオルトバナジン酸 (最終濃度 1 mM) の混合溶液および蒸留水に上胚軸片の切断面が十分に接するようにして置き、温室条件下で所定の時間処理した。また、処理液は一对の上胚軸片あたり 300 μl とした。

4) 粗酵素の抽出

ピサチンの定量と同様に、各処理液で上胚軸または胚軸を処理し、 20 ± 2 °Cの暗所に湿室状態で静置したのち、処理開始24時間目まで3時間毎にそれぞれ約400mgずつ液体窒素で経時的に凍結固定した。そこから Mauch et al. (1988a, b) と Boller et al. (1983) の方法を参考に一部改良して粗酵素液を抽出した。

固定した上胚軸を、液体窒素を入れた入鉢で摩砕し、摩砕液に20mgのPolyclar AT (Polyscience, Inc.) と1 mlの抽出緩衝液 [0.1M Tris/HCl (pH 7.0), 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF]を加えて再び摩砕し抽出した。抽出液をエッペンドルフチューブに移し、4 °Cで20分間遠心分離 ($5,000 \times g$) して植物残渣を取り除きその上清を回収した。遊離の糖、特に両酵素活性測定妨害となるグルコースおよびN-アセチルグルコサミンを取り除くために、80% 飽和になるようにして硫酸を加えて氷上で2時間静置し、4 °C10分間遠心分離 ($20,000 \times g$) して粗酵素画分を沈澱させた。さらに、30 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) をゆっくり入れて4 °C10分間遠心分離 ($2,0000 \times g$) して洗い、沈澱した粗酵素画分を200 μ lの30mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で溶解し粗酵素液とした。各処理区の粗酵素液は、Lowry et al. (1951) の方法にしたがってタンパク質を定量し、牛血清アルブミン換算値で濃度を測定した。なお、サプレッサーおよびオルトバナジン酸のキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性に対する直接の作用を調べる場合には、

エリクター処理24時間後に抽出した粗酵素を用いた。

5) キチナーゼ活性の測定

各処理を施したエンドウ上胚軸から経時的に抽出した粗酵素液におけるキチナーゼ活性を、Boller et al. (1983)の方法に従って測定した。

各粗酵素の濃度を1 mg/ml (牛血清アルブミン換算値)に調整し、その10 μ lに2 μ lの10 μ M アジ化ナトリウム、基質として15 μ lのキチンコロイド溶液 (20mg/ml)を加え、123 μ lの10 μ M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)で150 μ lに調整し、37℃で2時間反応させた。その後、2分間遠心分離 (3,000 \times g)し、キチンを沈澱させて反応を止め、上清を回収した。なお、キチンコロイド溶液は Berger and Reynolds (1958)の方法にしたがって調製した。

20mgのキチンを乳鉢に量り取り、10～20℃の条件下で100 μ lのアセトンを加えてよく摩砕し、さらに500 μ lの塩酸を加えて摩砕して糊状にした。その後、得られた粘性のある溶液をガラスウールで濾過した。濾液に等量のエタノールを攪拌しながら加え、遠心分離 (3,000 \times g)してキチンを沈澱させ、1 mlの蒸留水に溶解しキチンコロイド溶液とした。

〔1〕 エクソキチナーゼ活性の測定

得られた上清45 μ lに9 μ lの0.8 M ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9.1) を加え、3 分間煮沸した。室温まで徐々に冷却し、270 μ l の DMAB (*p*-Dimethylaminobenzaldehyde) 溶液を加え、37℃で20分間発色させた。再び室温まで冷却し、その5 μ lを95 μ lの蒸留水で希釈し 0. D. _{585 nm} における吸光度を分光光度計で測定し、あらかじめ作成した標準曲線より N-アセチルグルコサミンの濃度を求めた。また、DMAB溶液は、Ressing et al. (1955) の方法に従って調製した。10g の *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドを12.5%の塩化水素を含む氷酢酸に溶かし、使用する前に氷酢酸で10倍希釈して用いた。本溶液は、4℃の冷蔵庫内で一ヵ月間保存可能である。

〔2〕 エンドキチナーゼ活性の測定

得られた上清45 μ lに3 μ lの3% ヘリカーゼ、1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、37℃で2 時間静置した。エンドキチナーゼの活性測定と同様に、10.5 μ lの 0.8M ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9.1) を加え、3 分間煮沸した。その後室温まで徐々に冷却し、315 μ l の DMAB試薬を加え、37℃で20分間発色させた。再び室温まで冷却し、その5 μ lを95 μ lの蒸留水で希釈し 0. D. _{585 nm} における吸光度を分光光度計で測定し、あらかじめ作成した標準曲線より N-アセチルグルコサミンの濃度を求めた。

6) β -1, 3-グルカナーゼ活性の測定

各処理を施した胚軸から経時的に粗酵素液を抽出し、Abeles and Forrence (1970)の方法に従って β -1, 3-グルカナーゼ活性を測定した。各粗酵素の濃度を1 mg/ml(牛血清アルブミン換算値)に調整し、反応液が100 μ lになるようにして3 μ lの10 μ M アジ化ナトリウム溶液、基質として50 μ lの2% ラミナリン溶液、37 μ lの30mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)を加え、50℃で2時間反応させた。それぞれの反応液に300 μ lのジニトロサリチル酸試液(880mlの水に8.8gの3,5-dinitrosalicylic acid および225gのpotassium sodium tartrate \cdot 6H₂Oを溶解した液に300mlの4.5% NaOH 添加したもの)を添加して反応を停止し、5分間煮沸した後25℃まで徐々に冷やしてラミナリンから遊離したグルコースを発色させた。発色液の5 μ lを95 μ lの蒸留水で希釈し、O. D. _{585nm}における吸光度を分光光度計で測定し、グルコースを基準とした標準曲線より濃度を算出して活性を求めた。

2. 実験結果

1) エンドウのキチナーゼ活性の経時的変動におよぼすエリシター、サプレッサーおよびオルトバナジン酸の影響

〔1〕エクソキチナーゼ活性におよぼすサプレッサーおよびオルトバナジン酸の作用

暗所で生育させたエンドウ上胚軸に、エリシター単独処理、エリシターとサプレッサーの混合処理、エリシターとオルトバナジン酸の混合処理、対照区として蒸留水処理を施し、それぞれ処理後3時間毎に24時間まで経時的に粗酵素液を抽出して、エクソキチナーゼの活性を調べた。その結果、24時間を通して、すべての処理区でわずかなエクソキチナーゼ活性が認められるにすぎなかった(Fig. 22)。

〔2〕エンドキチナーゼの活性化におよぼすサプレッサーおよびオルトバナジン酸の作用

暗所で生育させたエンドウ上胚軸に、エリシター単独処理、エリシターとサプレッサーの混合処理、エリシターとオルトバナジン酸の混合処理、対照区として蒸留水処理を施し、それぞれ処理後3時間毎に24時間まで経時的に粗酵素液を抽出して、エンドキチナーゼの

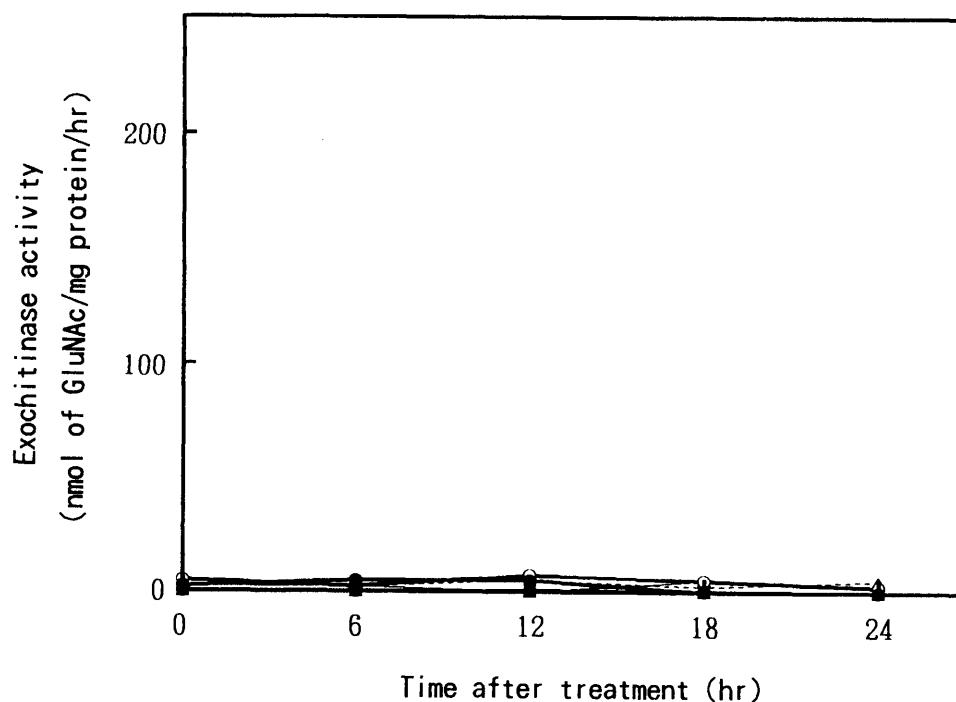


Fig. 22 Time course of activation of exochitinase in elicitor-treated pea epicotyls in the presence or absence of orthovanadate or suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. The activity of exochitinase (nmol of GluNAc/mg protein/hr) was determined at 6-hr intervals after treatment with water alone ($\cdots\Delta\cdots$), elicitor alone (500 μ g/ml, glucose equiv.) ($-\blacktriangle-$), elicitor plus 1 mM orthovanadate ($-\bigcirc-$) and elicitor plus suppressor (50 μ g/ml, BSA equiv.) ($-\bullet-$), respectively, by the method described by Boller et al. (1983). Each plotted value represents the mean of results of triplicate experiments, and the bar indicates the standard error.

活性を調べた。その結果、蒸留水処理区では、エンドキチナーゼの活性は時間の経過とともに高まる傾向が認められた (Fig. 23)。この活性増加は処理する際に行った胚軸の切断による影響と考えられる。エリシター単独処理区では処理開始 3 時間以降から蒸留水処理区に比べて有意なエンドキチナーゼの活性の増加が認められ、24 時間目までその活性は増高した。一方、エリシターの存在下においてもサプレッサーやオルトバナジン酸を添加すると、その活性増大はエリシター単独処理に比べて顕著に抑制された。

2) エンドウの β -1, 3-グルカナーゼ活性の経時的変動におよぼすエリシター、サプレッサーおよびオルトバナジン酸の影響

暗所で生育させたエンドウ上胚軸に、リシター単独処理、エリシターとサプレッサーの混合処理、エリシターとオルトバナジン酸の混合処理、対照区として蒸留水処理を施し、それぞれ処理後 3 時間毎に 24 時間まで経時的に粗酵素液を抽出して、 β -1, 3-グルカナーゼの活性を調べた。その結果、蒸留水処理区では β -1, 3-グルカナーゼの活性は時間の経過とともに高まる傾向が認められた (Fig. 24)。しかしながら、エリシター単独処理区では処理開始 12 時間以降から蒸留水処理区に比べて有意な β -1, 3-グルカナーゼの活性の増加が認められ、少なくとも 24 時間目までその活性は増高した。一方、エリシターとサプレッサーまたはエリシターとオルトバナジン

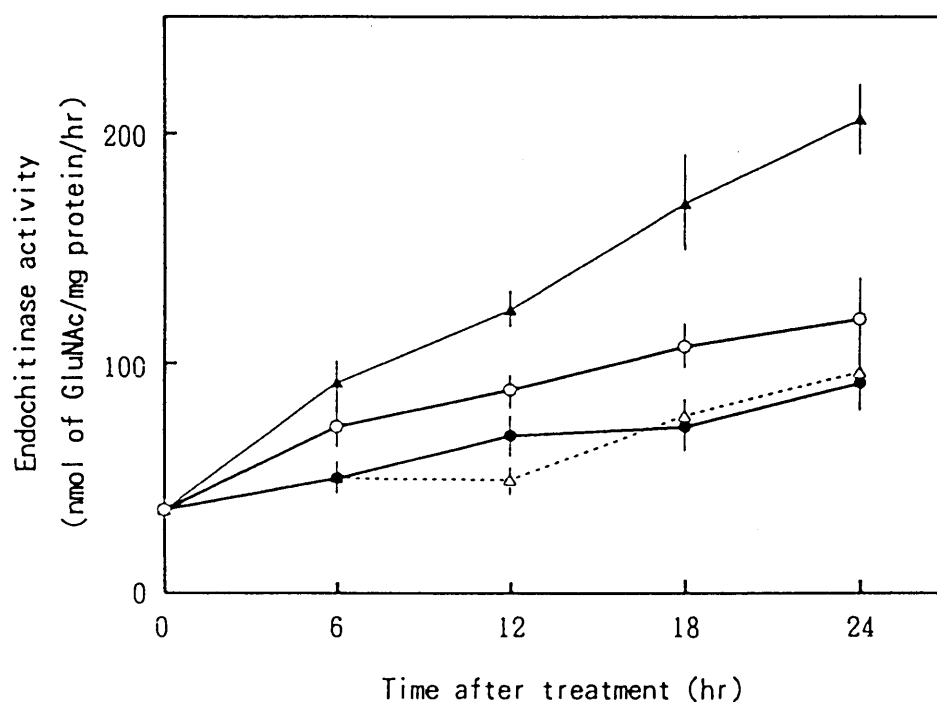


Fig. 23 Time course of activation of endochitinase in elicitor-treated pea epicotyls in the presence or absence of orthovanadate or suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. The activity of endochitinase (nmol of GluNAc/mg protein/hr) was determined at 6-hr intervals after treatment with water alone ($\cdots\Delta\cdots$), elicitor alone (500 μ g/ml, glucose equiv.) ($-\blacktriangle-$), elicitor plus 1 mM orthovanadate ($-\bigcirc-$) and elicitor plus suppressor (50 μ g/ml, BSA equiv.) ($-\bullet-$), respectively, by the method described by Boller et al. (1983). Each plotted value represents the mean of results of triplicate experiments, and the bar indicates the standard error.

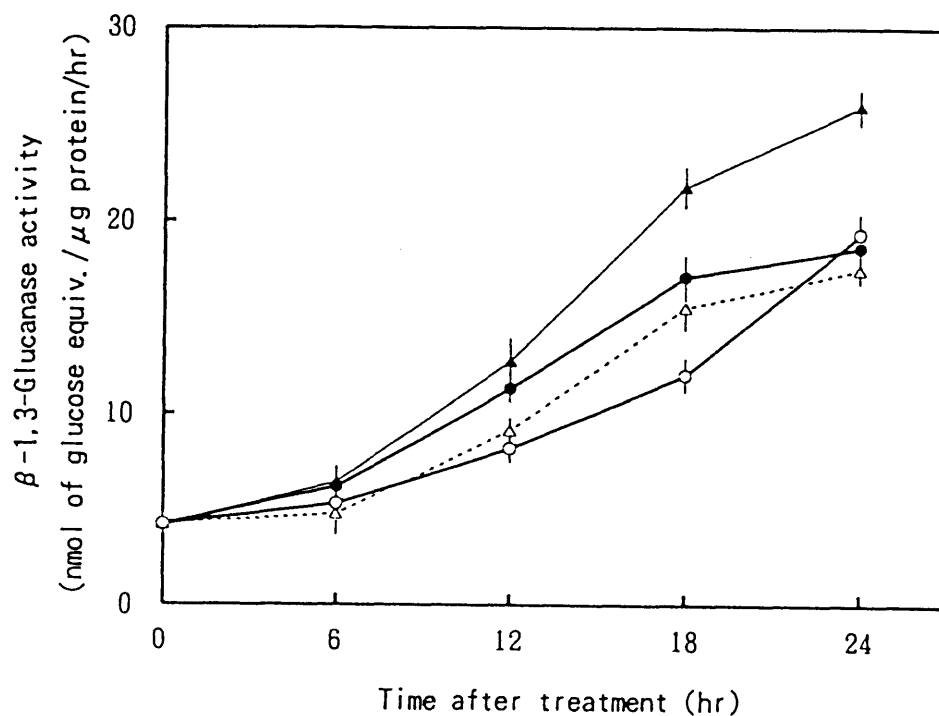


Fig. 24 Time course of activation of β -1,3-glucanase in elicitor-treated pea epicotyls in the presence or absence of orthovanadate or suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. The activity of β -1,3-glucanase (nmol of glucose equiv./ μ g protein / hr) was determined at 6-hr intervals after treatment with the same solution as described in the legend to Fig. 23 by the method described by Abeles and Forrence (1970). The plotted value and bar indicate the same items as described in the legend to Fig. 23.

酸の混合処理区ではその活性は徐々に増加したものの、蒸留水のレベルと同程度であった。

3) エンドキチナーゼ、 β -1, 3-グルカナーゼ活性におよぼす
サプレッサーおよびオルトバナジン酸の直接的影響

2. 2) で述べたように、エリシター単独処理後 24 時間後に抽出した酵素試料でのエンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼ活性が最も高かったので、その粗酵素液に種々の濃度のサプレッサーおよびオルトバナジン酸を混合して反応させ、両酵素に対する直接の作用を調べた。その結果、供試したいずれの濃度においてもサプレッサーおよびオルトバナジン酸による阻害作用は認められなかった (Table 10)。

4) 各種供試植物におけるエンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性増大におよぼすサプレッサーおよびオルトバナジン酸の影響

サプレッサーの作用特異性を調べるために、非宿主植物であるインゲンおよびダイズの胚軸および宿主植物であるエンドウ上胚軸をエリシター単独処理 (500 μ g/ml)、エリシター (最終濃度 500 μ g/ml) とサプレッサー (最終濃度 50 μ g/ml) の混合処理、エリシター (最終濃度 500 μ g/ml) とオルトバナジン酸 (最終濃度 1 mM) の混合

Table 10. Direct effects of the fungal suppressor or orthovanadate on the activities of endochitinase and β -1,3-glucanase

Addition of	Endochitinase activity ^a (nmol of GluNAc/mg protein/hr)	Mean value (% control)	β -1,3-Glucanase activity ^a (nmol of glucose equiv./ μ g protein/hr)	Mean value (% control)
Water	159.6 \pm 22.2	(100)	34.6 \pm 2.4	(100)
Suppressor				
50 μ g/ml ^b	153.2 \pm 14.3	96	34.9 \pm 0.7	101
100 μ g/ml ^b	163.0 \pm 33.5	102	33.9 \pm 1.0	98
150 μ g/ml ^b	169.2 \pm 35.0	106	33.6 \pm 0.8	97
Orthovanadate				
100 μ M ^b	166.4 \pm 18.5	104	32.8 \pm 3.2	95
1 mM ^b	146.6 \pm 21.6	92	35.2 \pm 0.8	102

^a The activities of endochitinase and β -1,3-glucanase were determined by the methods of Boller et al. (1983) and Abeles and Forrence (1970), respectively. Each value represents the mean \pm SE in triplicate experiments. Note that no significant difference was observed among respective treatments ($p < 0.05$).

^b Final concentrations.

処理、対照区としてサプレッサーの単独処理、オルトバナジン酸単独処理および蒸留水処理を施し、それぞれ処理24時間後に粗酵素液を抽出して、エンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性を調べた (Fig. 25 と Fig. 26)。

エンドウでは、サプレッサーおよびオルトバナジン酸単独処理区で、エンドキチナーゼの活性は蒸留水処理区と比べ有意な活性の増加は認められなかった。しかしながら、エリシターとサプレッサーの混合処理区およびオルトバナジン酸の混合処理区ではエリシター単独処理区に比較し、有意に活性が低下した (Fig. 25)。

一方、インゲンおよびダイズを用いた場合、オルトバナジン酸単独処理区での活性は、蒸留水処理区と比べ有意な活性の増加は認められなかったが、サプレッサーの単独処理区では活性が増大するようであった。さらに、エリシターとオルトバナジン酸の混合処理区では、エリシター単独処理区に比較して有意に活性が低下し、サプレッサーとの混合処理区では逆に活性が増大した。これらの処理によるエンドキチナーゼの活性変動におよぼす傾向は、 β -1, 3-グルカナーゼの活性に関してもほぼ同様であった (Fig. 26)。

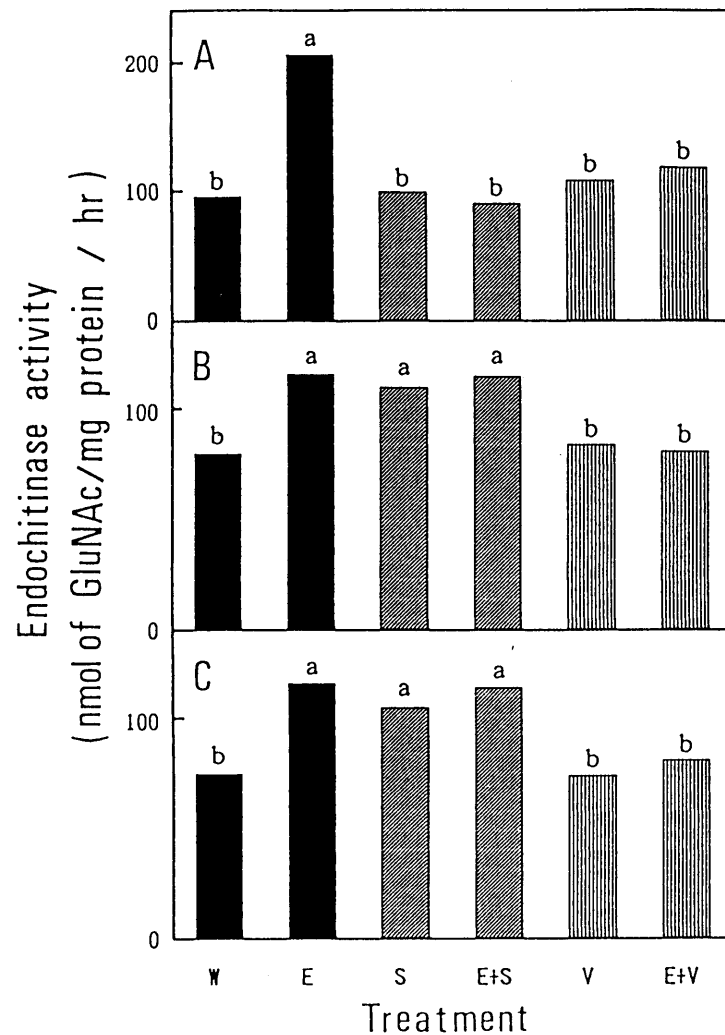


Fig. 25 Effects of orthovanadate or suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on activations of endochitinase in elicitor-treated seedlings of pea (A), soybean(B) or kidney bean (C). The activity of endochitinase (nmol of GluNAc / mg protein / hr) was determined at 24 hr after treatment with water alone (W) (■), orthovanadate alone (V) (▨), fungal suppressor alone (S) (▩), elicitor alone (500 μ g / ml, glucose equiv.) (E)(■), elicitor plus 1 mM orthovanadate (E+V) (▨) and elicitor plus fungal suppressor (50 μ g / ml, BSA equiv.) (E+S) (▩), respectively, by the method described by Boller et al. (1983). Each value represents the mean of results of triplicate experiments and the standard deviations were within 6 % of mean values. Significant difference ($p < 0.05$) was detected among the different letters at the top of each column.

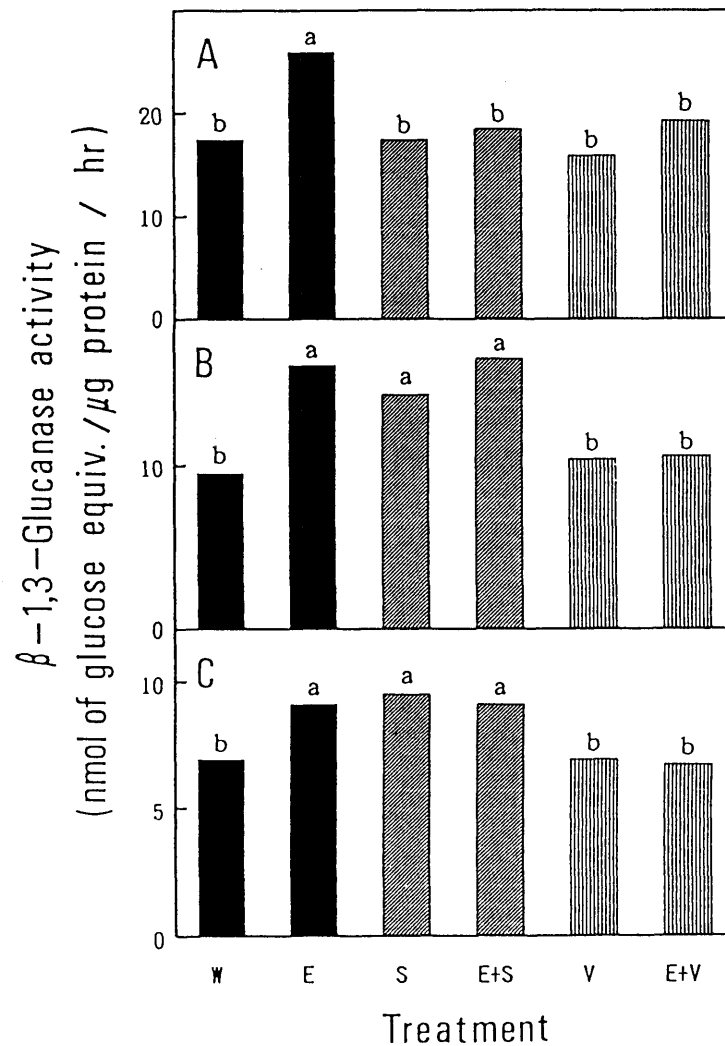


Fig. 26 Effects of orthovanadate or suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on activations of $\beta-1,3\text{-glucanase}$ in elicitor-treated seedlings of pea (A), soybean (B) and kidney bean (C). The activity of $\beta-1,3\text{-glucanase}$ (nmol of glucose equiv. / $\mu\text{g protein / hr}$) was determined at 24 hr after treatment with the same solution as described in the legend to Fig. 25 by the method described by Abeles and Forrence (1970). Each value indicates the same items as described in the legend to Fig. 25 and the standard deviations were within 5 % of mean values. Significant difference ($p < 0.05$) was detected among the different letters at the top of each column.

3. 考察

各処理液でエンドウ上胚軸を処理して経時的にエンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性動向を調べたところ、エンドウ褐紋病菌のサプレッサーまたはオルトバナジン酸はエリシターによって誘導される両酵素の活性増高を顕著に抑制することが判明した。インゲン培養細胞およびジャガイモ組織をエリシターで処理すると両酵素をコードする遺伝子が活性化することから、これらは遺伝子の発現レベルで制御されているものと推定されている

(Hedrick et al. 1988, Schroder et al. 1992)。本実験においても本サプレッサーおよびオルトバナジン酸がそれらの酵素活性を直接阻害する作用は認められなかった。さらに、前述のように本サプレッサーおよびオルトバナジン酸がエリシター処理により誘導される PALの活性増大を遅延させる作用とエンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼにおよぼす作用とが類似していることから、これらの酵素活性の増大抑制はそれらをコードする遺伝子の発現レベルから抑制される結果であると思われる。本研究ではこの点について実証的に明らかにすることはできなかったが、今後の興味ある研究課題であろう。

エンドウ褐紋病菌の宿主であるエンドウと非宿主であるダイズおよびインゲンにサプレッサーまたはオルトバナジン酸を与えてエンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼに対する作用特異性を調べた。その結果、両者はエンドウのエンドキチナーゼおよび β -1,

3-グルカナーゼの活性増大を抑制したが、ダイズおよびインゲンに
対してもオルトバナジン酸は同様に両酵素の活性増大を抑制した。
しかしながら、サプレッサーには抑制作用はみられなかった。さら
に興味深いことに、サプレッサー単独でダイズおよびインゲンを処
理すると、両酵素の活性化が観察された。この結果は、エンドウ褐
紋病菌のサプレッサーは非宿主に対してエリシター様の作用を発揮
するものと思われた。これらのことより、エンドウにおけるエリシ
ター誘導性のエンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性
化におよぼすエンドウ褐紋病菌のサプレッサーの影響は、ファイト
アレキシンの誘導に対する影響と同様であり、エンドウのみに特異
的に作用することが明らかとなった。

第四章で述べたように、*in vivo* においては、エンドウ褐紋病菌
のサプレッサーは宿主のエンドウの原形質膜ATPaseのみを阻害した
が、オルトバナジン酸は供試した非宿主植物に作用した。この
ATPase阻害特異性と本実験結果で得られたエンドキチナーゼおよび
 β -1, 3-グルカナーゼの活性抑制に対する作用特異性を照らし合わ
せて考えると、原形質膜ATPaseに対する抑制作用は後に誘導される
エンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性増大の抑制と
相関するものと考えられた。言い換えると、原形質膜ATPaseの阻害
は植物の抵抗反応の始動を支配すると考えられる情報伝達の過程を
阻害することにより、結果的に誘導されてくるPRタンパクの活性増
加やファイトアレキシン生産などを含めた複数の防御応答反応の発
現を抑制するものと推察できよう。

Mauch et al. (1988b) はエンドウの莢組織より、エンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼを精製し、種々の病原菌に与えて菌糸伸長におよぼす影響を詳細に調べた。彼らの報告によると、単独で酵素を作用させた場合には顕著な抑制効果は観察されないが、混合して用いると *Mycosphaerella pinodes* の菌糸伸長を著しく抑制するとしている。*Colletotrichum lindemuthianum* (Albersheim and Valent 1974) および *C. lagenarium* (Siegrist and Kauss

1990) の場合、それらの酵素が存在する培地で培養を続けると、病原菌が β -1, 3-グルカナーゼおよびエンドキチナーゼに対する抑制因子を生産することが報告されている。これらの報告から考えるとエンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼは殺菌的な作用をおよぼすのではなく、むしろ静菌的に作用して病原菌の伸長を緩慢にすることが第一義的であろう。本菌の感染過程からみると、宿主における β -1, 3-グルカナーゼの活性増大はエリシター処理後約12時間で起こるので、菌が進入して栄養関係を結ぶ感染段階、あるいは二次菌糸を伸長させ蔓延していく段階に、本酵素が抵抗性発現に関与するものと考えられる。したがって、この酵素活性増大の抑制は感染した非病原菌が（エンドウに対する）病斑形成まで感染を進行させる結果になるものと推察できる。またエンドキチナーゼは、エリシター処理6時間という極めて早い時期に誘導され、その誘導は菌の侵入行動が起こる前に起こる抵抗反応であると考えられるので、これが抑制されることは、非病原菌の侵入菌糸形成の誘導に重要な役割をしているものと推察できる。この二つの加水分解酵素の活性

化を抑制するエンドウ褐紋病菌のサプレッサーの作用は、エンドウのもつ抵抗誘導反応を総合的に抑制する結果に導くものであり、このことが、種特異的な受容性誘導活性を起こすものと考えられる。

第六章 総合考察

エンドウ褐紋病菌の生産するエリシターでエンドウ上胚軸を処理すると、速やかに防御遺伝子の発現が誘導され、サプレッサーを同時処理すると抑制される。この現象から、エリシターがエンドウ細胞の原形質膜上に想定される受容体で認識され、これと連動する核での遺伝子発現を促す情報伝達機構が機能することによってエリシター分子の情報が細胞内情報に変換されるシステムが想定される。また、本サプレッサーはエリシター分子による細胞内情報の発生またはその後の過程を抑制することが推定された。本研究は、エンドウ褐紋病菌の生産するエリシターおよびサプレッサーを病原菌由来のシグナル伝達物質として捉えて、両者が第一に受容されるであろう宿主植物の原形質膜に注目し、原形質膜ATPaseにおよぼす影響またはそれに付随する代謝変動を詳細に調べたものである。

エンドウ褐紋病菌の生産するサプレッサーは、エンドウ上胚軸より調製した原形質膜画分のATPase活性を*in vitro*で顕著に抑制した。さらにその阻害様式はP型ATPaseの阻害剤であるオルトバナジン酸と類似した反拮抗阻害であり、ATPaseのリン酸化中間体形成を阻害するものと推定された（第二章）。

オルトバナジン酸はエンドウ上胚軸組織でのエリシター誘導性ピサチン生産をサプレッサーと同様に抑制し、PAL および CHS遺伝子の発現を約3時間遅延させた（第三章）。これらのことより、エンドウ褐紋病菌のサプレッサーの第一義的作用は原形質膜ATPaseの阻

害にあると推定された。

ATP とショウ酸鉛をエンドウ葉組織に与えて、*in vivo* における植物細胞の原形質膜ATPase活性を電子顕微鏡観察により調べた。本サプレッサーは供試した植物の中で、宿主であるエンドウのみを特異的に抑制することが判明した。さらに興味深いことに、エンドウ褐紋病菌のエンドウ組織における感染現場では、接種後 6 時間まで原形質膜ATPase活性は阻害されることが明らかとなった。この結果は、原形質膜ATPaseの阻害が一時的であることを示すものであると考えられた（第四章）。

ピサチン生成・蓄積の他に、誘導性防御反応の一つとして知られているエンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性増加は、サプレッサーおよびオルトバナジン酸により抑制された。サプレッサーは供試したマメ科植物の中でもエンドウのみに作用し、他の供試植物に対しては逆に活性化を誘起した。一方、オルトバナジン酸は供試植物すべてに有効であった（第五章）。以上の結果は、原形質膜ATPase阻害と防御反応の誘導抑制の間に強い相関のあることを示している。また、本研究は、オルトバナジン酸とエンドウ褐紋病菌サプレッサーの生理作用とを比較研究することにより（Table 11）、防御反応の始動に占める原形質膜ATPaseの役割をより明確に位置づけたものである。

病原菌の生産するシグナル因子に対する植物の応答と情報伝達機構に関する研究は、その緒についたばかりの段階である。本研究で得られた個々の傍証を総合すると、植物細胞の原形質膜ATPaseが、

Table 11. Similarity between fungal suppressor from *Mycosphaerella pinodes* and P-type ATPase inhibitor, orthovanadate

Characteristic	Fungal suppressor	Orthovanadate
Accumulation of pisatin	Suppression (delay) ^a	Suppression (delay)
Activation of PAL	Suppression (delay)	Suppression (delay)
Accumulation of mRNAs for PAL and CHS	Suppression (delay) ^a	Suppression (delay)
Activation of endochitinase and β -1,3-glucanase	Suppression	Suppression
P-type ATPase activity	Inhibition	Inhibition
PI and PIP kinases activity	Suppression (delay) ^b	Suppression (delay) ^b
Toxicity to pea cell	Not detected ^c	Not detected ^d
Specificity of action <i>in vivo</i>	Species-specific	Nonspecific

^a Yamada et al. (1989).

^b Toyoda et al. (1992).

^c Oku et al. (1980).

^d Yamada et al. (1992).

外界のシグナルを細胞内情報に変換する機能に関与するといった様相が浮かび上がってきた。

第一章で述べたように、ジャガイモ塊茎組織にジャガイモ疫病菌の非親和性レースを接種すると、宿主原形質膜の透過機能が変化し、電解質の異常漏出に伴う脱分極が起こることが古くから指摘されている (Matsumoto et al. 1976)。Tomiyama et al. (1983)は、この原形質膜の透過機能の変化に注目して膜ポテンシャルを微小電極法で測定した。彼らは、過敏感細胞反応が進行している細胞の K^+ イオンの流出は、ATP をエネルギー源とした起電性ポンプの障害に起因するのではなく、拡散ポンプの障害に関与していることを示唆した。*in vitro*での本実験系においても、エリシター単独でエンドウの原形質膜画分を処理してもATPase活性には影響をおよぼさなかった。このことより、原形質膜ATPaseは植物細胞が抵抗性を発現する上で欠くことのできない基幹的機能を有するものであるが、直接その活性がエリシターの情報伝達の発生に関与するものではないと推定される。

最近になって、Toyoda et al. (1992b) はエンドウ褐紋病菌のエリシターおよびサプレッサーをエンドウ上胚軸より分離した原形質膜に与えてリン脂質代謝系におよぼす影響を調べ、ポリホスホイノチシド代謝系が変動することを報告している。すなわち、エリシター処理は原形質膜に存在するフォスファチジルイノシトール

(PI) や、フォスファチジルイノシトール 1 リン酸 (PIP) をそれぞれリン酸化する酵素であるPIキナーゼやPIP キナーゼの活性を 5 秒

以内に増加させることを報告した。また、これらの活性増加はサプレッサーの共存により、顕著に抑制されることを指摘した。また、エリシターで誘導されるピサチン生成を抑制するオルトバナジン酸および K252a (プロテインキナーゼ阻害剤、Shiraishi et al.

1990)を共存させた場合にも、PIP のリン酸化が顕著に阻害された。さらに、彼らはPIP のリン酸化代謝物であるPIP₂に特異的に結合し、ホスホリパーゼCの活性を阻害するネオマイシン (Gabev et al.

1989)をエリシター処理したエンドウ上胚軸組織に与えると、ピサチン蓄積が阻害されることを報告した。

Miura et al. (1993) は、ジャガイモ膜画分において、O₂⁻生成の活性化を起こすエリシター処理がPIP₂の蓄積を増高させることを見い出した。これらの報告は、エリシター誘導により防御応答に至る情報伝達にポリホスホイノチシド代謝が深く関わることを示していると思われる。本研究におけるエンドウ褐紋病菌サプレッサーのATPase阻害がポリホスホイノチシド代謝系の抑制に連動することは、原形質膜を介しての情報伝達機構の解明に示唆を与えるものであろう。さらに、エンドウ—エンドウ褐紋病菌の系において、エリシターは原形質膜画分のlyso型のホスファチジン酸や PIPも5秒以内に増加させるが、サプレッサーはこれらの生産も抑制することから、ホスホリパーゼCに加えホスホリパーゼAも同調して制御されることが示唆されている (Toyoda et al. 1992b)。

一方、道家 (1991) はジャガイモ塊茎組織にジャガイモ疫病菌の非親和性レースを接種すると、活性酸素生成系の活性化にほぼ同調

してホスホリパーゼA₂の活性が一過的に増大し、この酵素の阻害剤を与えるとファイトアレキシンであるリシチンの合成が阻害されることを報告している。さらに、Farmer and Ryan (1992)はホスホリパーゼA₂の生産物であるリノール酸およびリノレン酸や、その代謝産物のジャスモン酸でトマト組織を処理すると防御反応の一つであるプロテアーゼインヒビターの活性増加が起こることを示した。エンドウにおいても、リノール酸およびリノレン酸やホスホリパーゼCの生産物の一つであるジアシルグリセロールを組織に与えるとピサチンの生産が誘導される（白石と山田 1993）。したがって、これらの分子が防御遺伝子発現のセカンドメッセンジャー的機能を果たしていると推定できる。

Bossのグループはニンジンおよびヒマワリの原形質膜を PIPや PIP₂で処理すると原形質膜ATPaseの活性が上昇することを報告している（Memon et al. 1989, Memon and Boss 1990）。実際にこれらの化合物を添加すると、エンドウの原形質膜ATPase活性も僅かに上昇するので、ポリホスホイノシチド 代謝系で原形質膜ATPase活性が制御される可能性が考えられた（Toyoda et al. 1992a）。しかしながら、前述したようにエンドウにおいては、オルトバナジン酸がPIキナーゼや PIPキナーゼの活性を抑制するので両酵素はクロストークするものであると推定できる。サプレッサーがいずれの酵素に直接影響するかは現時点では未詳であるが、第三章で述べたようにエリシター処理後12時間経過した時点にサプレッサー処理した場合においても、ピサチン蓄積を抑制することを考慮すると、ポリホ

スホイノシチド 代謝系のみに作用するのではなく、原形質膜 ATPaseの阻害に伴う様々な代謝が直接あるいは間接的に変動した結果サプレッサー活性が発揮され、病原体の受容条件が細胞内に形成されるものと推定できよう。Fig. 27 に現段階で想定されるエンドウ褐紋病菌のエリシターおよびサプレッサーが直接あるいは間接的に作用するエンドウの情報伝達経路を示した。

一般に、病原菌はその菌の宿主が生産するファイトアレキシンに対して比較的耐性である場合が多い。Cruickshank and Perrin

(1962) はエンドウの病原菌である褐紋病菌、褐斑病菌、根腐病菌を高濃度のピサチンを含む培地上で培養しても菌そうの発育は約 30%阻害されるにとどまるが、ネギ腐敗病菌、インゲン炭そ病菌などを同様に培養すると、ほぼ完全に発育が阻害されることを報告している。このことは、上記したエンドウの病原菌はピサチンに対しては耐性であり、発育を阻害されないので宿主にたとえピサチンが生成・蓄積されても定着できることを示している。エンドウ根腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *pisi*) では、ピサチンを脱メチル化するピサチンデメチラーゼが誘導され、この無毒化による耐性が示されており、これが本菌の耐性機構に寄与しているものと考えられている (VanEtten et al. 1989)。では、エンドウ褐紋病菌はピサチンに比較的耐性であり、寄生を成立させる過程で一時的にしかピサチン生成を抑制しないサプレッサーの意義をどのように考えたらよいのだろうか。

エンドウうどんこ病菌に、宿主のファイトアレキシンであるピサ

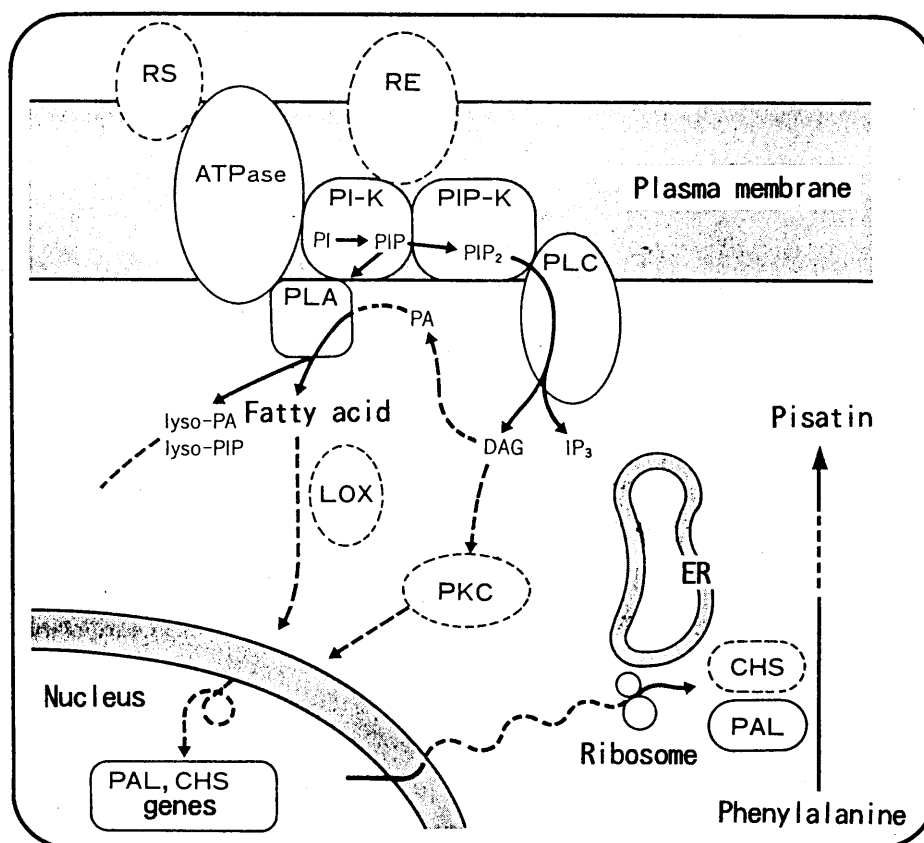


Fig. 27 Model for the mechanism of transmembrane signalling of pea cell treated with elicitor or suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. RS: receptor for suppressor, RE: receptor for elicitor, PI-K: phosphatidylinositol-4-monophosphate kinase, PIP-K: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate kinase, PKC: protein kinase C, PLC: phospholipase C, PLA: phospholipase A, lyso-PA: lysophosphatidic acid, DAG: diacylglycerol, IP₃: inositol-1,4,5-trisphosphate, LOX: lipoxygenase.

チンを $530\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度で与えて発芽率を調べた結果では、阻害率は僅か 50%にすぎないことが示された (Oku et al. 1976)。しかしながら、同菌を接種した宿主植物に菌が侵入を開始する前段階でピサチンを塗布処理すると、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ の低い濃度でも顕著に感染率が低下し、その後に与えた場合にはほとんど感染阻害効果がみられなかったことが報告されている (Oku et al. 1976)。Oku et al.

(1976) は、ピサチンの処理時期と菌の感染行動の様相との関係から、エンドウうどんこ病菌の付着器形成から宿主細胞内に角皮侵入する過程においては、ピサチンは低濃度で感染行動に作用することを指摘した。すなわち、宿主のファイトアレキシンに耐性である病原菌は、感染初期過程で生産されるピサチンの蓄積を抑制すれば、侵入や定着が可能であるということを示唆している。この意味から、エンドウ褐紋病菌は、宿主内に侵入する以前にサプレッサーを生産し、同様に生産されるエリシターに応答してエンドウが発揮する抵抗反応を一時的に回避して侵入および定着を図っているものと考えられる。

他の病原糸状菌がその寄生性を発揮する上で、とくに重要な機能を果たす因子を生産していることが知られている。*Phytophthora* 属菌のサプレッサーによる宿主原形質膜における O_2^- 生産の阻害

(Doke 1983, 1985, Sanchez et al. 1993)、*Helminthosporium maydis* race T が生産する HMT 毒素による原形質膜でのプロトン排出やミトコンドリア機能の阻害 (Bednarski et al. 1977,

Federico et al. 1980, Holden and Zea 1989)、*Alternaria*

alternata Japanese pear pathotypeの生産する AK 毒素による起電性ポンプの障害 (Otani et al. 1989)、Rough lemon pathotypeの生産する ACR毒素によるミトコンドリアの機能障害 (Akimitsu et al. 1989)、Tomato pathotypeの AL 毒素によるフォスファチジルエタノールアミン合成の阻害 (Orolaza et al. 1992)、*Alternaria tenuis* の生産するテントキシンによるクロロプラスト ATPaseの β サブユニットへの特異的結合 (Avni et al. 1992) などが報告されている。これらを概観して考察するならば、病原糸状菌は宿主の膜系に存在する情報伝達系あるいはホメオスタシスやエネルギー生産等に関与する基本的な代謝系を阻害する物質を感染初期過程に生産することにより、病原菌の感染に対して宿主植物が発揮する動的な抵抗反応を抑制して、侵入および定着する巧妙な戦略をたてていると考えることができるであろう。

本研究において、エンドウ褐紋病菌のサプレッサーがエンドウ原形質膜ATPaseを阻害することを見い出したが、その阻害作用がどのような仕組みに起因するかは依然として不明である。近頃、Shiraishi et al. (1992) はエンドウ褐紋病菌の胞子発芽液よりサプレッサーを分離精製してその化学構造を明らかにし、サプレッシン A および B と命名した (Fig. 28)。これら二種のサプレッサーはいずれもムチン型のペプチドグルカンであり、その構造は α -GalNAc-0-Ser-Ser-Gly (Suppressin A) および β -Gal(β 1 \rightarrow 4) α -GalNAc-0-Ser-Ser-Gly-Asp-Glu-Thr (Suppressin B) であった。精製標品を用いて生理活性を調べたところ、サプレッシン A は原形質

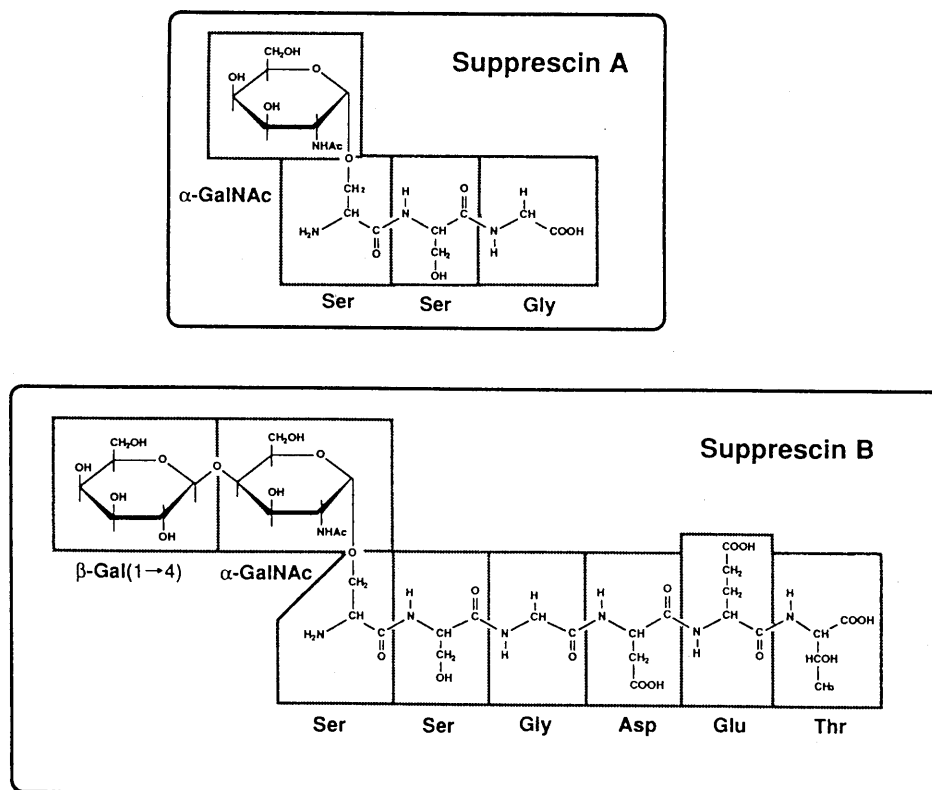


Fig. 28 Structures of two suppressors, Suppresscins A and B, purified from the germination fluid of pycnospores of the pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*.

膜ATPaseに対する阻害効果および感染誘導能は弱いがピサチン生産を抑制する。一方、サプレッシンBは顕著に原形質膜ATPaseを阻害し、ピサチン生産抑制ならびに感染誘導能を有する。興味深いことに、両者を混合してエンドウ組織に与えるとそれぞれを単独で処理した場合より低濃度でピサチン蓄積を阻害し感染誘導能を示すことが報告されている (Shiraishi et al. 1992)。 *Bipolaris zeicola* race 3 の生産する BZR毒素は四つのコンポーネントから成っており、個々は生理作用を示さないが協調的に作用して感染誘導能および毒素作用を発揮することが明らかとなっている (Xiao et al. 1991)。エンドウ褐紋病菌の二種のサプレッサーにおいても同様に、両者による複雑な作用機構が予想される。今後、それぞれのサプレッサー分子に対する宿主の直接的な標的物質を同定し、その機能を解明することが重要な課題となるであろう。

引用文献

- Abele, F. B., Bosshart L. E., Forrence, L. E. and Habig, W. H. (1971)
Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves.
Plant Physiol. 47: 129-134.
- Abele, F. B. and Forrence, L. E. (1970) Temporal and hormonal control of β -
1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 45: 395-400.
- Akimitsu, K., Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1989) Host specific
toxin from the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata* on mitochondria.
Plant Physiol. 89: 925-931.
- Akimitsu, K., Patrick H. L., Walton, J. D. and Hollingsworth, R. (1992) Covalent
binding sites of victorin in oat leaf tissues detected by anti-victorin
polyclonal antibodies. Plant Physiol. 98: 121-126.
- Albersheim, P. and Valent, B. (1974) Host-pathogen interactions VII. Plant
pathogens secrete proteins which inhibit enzymes of the host capable of
attacking the pathogen. Plant Physiol. 53: 684-687.
- Amory, A., Foury, F. and Goffeau, A. (1980) The purified plasma membrane ATPase
of yeast *Schizosaccharomyces probe* forms a phosphorylated intermediate. J.
Biol. Chem. 255: 9353-9357.
- Anderson, A. J. (1980) Studies on the structure and elicitor activity of fungal
glucans. Can. J. Bot. 58: 2343-2348.
- Andrejauskas, E., Hertel, R. and Marme, D. (1985) Specific binding of the
calcium antagonist [3 H] verapamil to membrane fractions from plants. J.
Biol. Chem. 260: 5411-5414.
- Ann, C. (1992) Structure and regulation of the chalcone synthase genes in *Pisum*

- sativum*. Ph. D thesis, Okayama University.
- Atkinson, M. M., Huang, J. S. and Knopp, J. A. (1985) The hypersensitive reaction of tobacco to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Activation of a plasmalemma K^+ / H^+ exchange mechanism. *Plant Physiol.* 79: 843-847.
- Avni, A., Andersin, J. D., Holland, N., Rochaix, J.-D., Gromet-Elhanan, Z. and Edelman, M. (1992) Tentoxin sensitivity of chloroplasts determined by codon 83 of β subunit of proton-ATPase. *Science* 257: 1245-1247.
- Bednarski, M. A., Izawa, S. and Scheffer, R. P. (1977) Reversible effects of toxin from *Helminthosporium maydis* race T on oxidative phosphorylation by mitochondria. *Plant Physiol.* 50: 540-545.
- Bell, J. N., Dixon, R. A., Baily, J. A., Rowell, P. M. and Lamb, C. J. (1984) Differential induction of chalcone synthase mRNA activity at the onset at the phytoalexin accumulation in a compatible and incompatible plant-pathogen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3384-3388.
- Bell, J. N., Ryder, T. B., Wingate, V. P. M., Baily, J. A. and Lamb, C. J. (1986) Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and incompatible plant-pathogen interaction. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1615-1623.
- Berger, L. R. and Reynolds, D. M. (1958) The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Acta* 29: 522-534.
- Birmboim, H. and Daly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Boller, T. (1985) Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens. In Key, J. L., Kosuge, T. eds, *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*, Alan R. Liss, New York, pp. 247-262.

- Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157: 22-31.
- Bostock, R. M., Kuć, J. and Laine, R. A. (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science* 212: 67-69.
- Bottini, A. T., Bowen, J. R. and Gilchrist, D. G. (1981) Phytoalexins. II. Characterization of a phytotoxic fraction from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Tetrahedron Lett.* 22: 2723-2726.
- Boutry, M., Michelet, B. and Goffeau, A. (1989) Molecular cloning of a family of plant genes encoding a protein homologous to plasma membrane H⁺ - translocating ATPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 567-574.
- Bowles, D. J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 873-907.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P. and Lamb, C. J. (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21-30.
- Briskin, D. P. and Leonard, R. T. (1982) Partial characterization of a phosphorylated intermediate associated with the plasma membrane ATPase of corn roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6922-6926.
- Carnelli, A., De Michelis, M. I. and Rasi-Caldogno, F. (1992) Plasma membrane Ca-ATPase of radish seedlings. I. Biochemical characterization using ITP as a substrate. *Plant Physiol.* 98: 1196-1201.
- Chai, H. B. and Doke, N. (1987) Activation of the potential of potato leaf tissue to react hypersensitively to *Phytophthora infestans* by cystospore

- germination fluid and the enhancement of this potential by calcium ions.
 Physiol. Mol. Plant Pathol. 30: 27-37.
- Chappell, J. and Hahlbrock, K. (1984) Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. Nature 311: 76-78.
- Chomczynski, P and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159.
- Cramer, C. L., Ryder, T. B., Bell, J. N. and Lamb, C. J. (1985) Rapid switching of plant gene expression induced by fungal elicitor. Science 227: 1240-1242.
- Cruickshank, I. A. M. and Perrin, D. R. (1960) Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. Nature 187: 799-800
- Cruickshank, I. A. M. and Perrin, D. R. (1962) Studies on phytoalexins VI. Pisatin: The effect of some factors on formation in *Pisum sativum* L., and the significance of pisatin in disease resistance. Austr. J. Biol. Sci. 16: 111-128.
- Cuypers, B., Schmelzer, E. and Hahlbrock, K. (1988) *In situ* localization of rapidly accumulated phenylalanine ammonia-lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. Mol. Plant-Microbe Interact. 1: 157-160.
- Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1984) Phytoalexins and their elicitors; a defense against microbial infection in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 243-275.
- de Wit, P. J. G. M. and Roseboom, P. H. M. (1980) Isolation, partial characterization and specificity of glycoprotein elicitors from culture

- filtrates, mycelium, and cell walls, of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Plant Pathol.* 16: 391-408.
- de Wit, P. J. G. M. and Spikman (1982) Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiol. Plant Pathol.* 21: 1-11.
- Dietrich, A., Mayer, J. E. and Hahlbrock, K. (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 265: 6360-6368.
- Dittrich, H., Kutchan, T. M. and Zenk, M. H. (1992) The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum crispum* cell cultures. *FEBS Lett.* 309: 33-36.
- Dixon, R. A. (1986) The phytoalexin response: elicitation, signalling and the control of host gene expression. *Biol. Rev.* 61: 239-291.
- Dixon, R. A. and Fuller, K. W. (1978) Effects of growth substances on noninduced and *Botrytis cinerea* culture filtrate-induced phaseollin production in *Phaseolus Vulgaris* cell suspension cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 279-288.
- Doke, N. (1975) Prevention of the hypersensitive reaction of potato cells to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* by constituents of the zoospores. *Physiol. Plant Pathol.* 7: 1-7.
- Doke, N. (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 359-369.

- Doke, N. (1985) NADPH-dependent O_2^- generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 27: 311-322.
- 道家紀志 (1991) 過敏感反応と情報伝達. 植物感染生理学最近の進歩. 奥 八郎ら編, 植物感染生理学最近の進歩刊行会, 名古屋, pp. 81-93.
- Doke, N. and Furuichi, K. (1982) Response of protoplasts to hyphal wall components in relationship to resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 21: 23-30.
- Doke, N. and Nishimura, S. (1988) Activation of O_2^- generation reaction in potato plants infected with *Phytophthora infestans*: Its mechanism and significance in induced resistance. 5 th ICCP Abstract Papers. pp. 229.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Ewing, N. N., Wimmers, L. E., Meyer, D. J., Chetelat, R. T. and Bennett, A. B. (1990) Molecular cloning of tomato plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Physiol.* 94: 1874-1881.
- Farmer, E. E., Pearce, G. and Ryan, C. A. (1989) *In vitro* phosphorylation of plant plasma membrane proteins response to the proteinase inhibitor inducing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1539-1542.
- Farmer, E. E. and Ryan, C. A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129-134.
- Federico, R., Scalia, S. and Ballio, A., Cocucci, M., Ballarin-Denti, A. and Marre, E. (1980) Inhibition of fusaric acid-induced electrogenic proton

- extrusion in susceptible maize by *Helminthosporium maydis* race T toxin.
Plant Sci. Lett. 17: 129-134.
- Feinberg, A. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radio-labeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 32: 6-13.
- Felix, G., Grosskopf, D. G., Regenass, M. and Boller, T. (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8831-8834.
- Gabev, E., Kasianowicz, J., Abbott, T. and McLaughlin, S. (1989) Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). Biochem. Biophys. Acta 979: 105-112.
- Gardner, J. M., Kono, Y., Tatum, J. H., Suzuki, Y. and Takeuchi, S. (1985) Plant phytotoxins from *Alternaria citri*: The major toxin specific for roughlemon plants. Phytochemistry 24: 2861-2867.
- Grosskopf, D. G., Felix, G. and Boller, T. (1990) K-252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitors in vivo and their microsomal protein kinase in vitro. FEBS Lett. 275: 177-180.
- Gundlach, H., Muller, M. L. Kutchan, T. M. and Zenk, M. H. (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2389-2393.
- Hadwiger, L. A. and Beckman, J. M. (1980) Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interaction. Plant Physiol. 66: 205-211.
- Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 347-369.

- Hall, J. L., Browning, A. J. and Harvey, D. M. R. (1980) The validity of the lead precipitation technique for the localization of ATPase activity in plants cells. *Protoplasma* 104: 193-200.
- Harvey, H. J., Venis, M. A. and Trewavas, A. J. (1989) Partial purification of a protein from maize (*Zea mays*) coleoptile membranes binding the Ca^{2+} - channel antagonist verapamil. *Biochem. J.* 257: 95-100.
- Hashimoto, T., Yamada, T., Tada, A., Kawamata, S., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Ichinose, Y., Kato, H., Izutsu, S., Shiraishi, T., Oku, H. and Ohtsuki, Y. (1992) Transient expression in electroporated pea protoplasts: Elicitor responsiveness of a phenylalanine ammonia-lyase promoter. *Plant Cell Reports*. 11: 183-187.
- Hattori, T. and Ohta, Y. (1985) Induction of phenylalanine ammonia-lyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate, and elevation of medium pH. *Plant Cell Physiol.* 26: 1101-1110.
- Heath, M. C. and Wood, P. K. S. (1969) Leaf spot induced by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. of Bot.* 33: 657-670.
- Hedrick, S. A., Bell, J. N. and Lamb, C. J. (1988) Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *Plant Physiol.* 86: 182-186.
- Hiramatsu, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., Oku, H. and Ouchi, S. (1986) Regulation of pisatin biosynthesis in pea leaves by elicitor and suppressor produced by *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopath.Soc. Japan.* 52:53-58.
- Holden, M. J. and Sze, H. (1989) Effect of *Helminthosporium maydis* race T toxin on electron transport in susceptible corn mitochondria and prevention of

- toxin actions by dicyclohexylcarbodiimide. *Plant Physiol.* 91: 1296-1302.
- Ito, R., Oba, K. and Uritani, I. (1979) Mechanism for the induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in HgCl₂-treated sweet potato root tissue. *Plant Cell Physiol.* 20: 867-874.
- Kamada, Y. and Muto, S. (1991) Ca²⁺ regulation of phosphatidylinositol turnover in the plasma membrane of tobacco suspension culture cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1093: 72-79.
- Kawamata, S., Yamada, T., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Kato, H., Ichinose, Y., Kato, H., Shiraishi, T. and Oku, H. (1992) Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA from *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* 20: 167-170.
- Keen, N. T. (1975) Specific elicitors of phytoalexin: Determination of race specificity in pathogens? *Science* 187: 187-188.
- Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A. (1987) Calcium and calmodulin may not regulate the disease resistance and pisatin formation responses of *Pisum sativum* to chitosan or *Fusarium solani*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 337-348.
- Kessmann, H. and Barz, W. (1986) Elicitation and suppression of phytoalexin and isoflavone accumulation in cotyledons of *Cicer arietinum* L. as caused by wounding and by polymeric components from fungus *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.* 117: 321-335.
- 金洪模 (1991) エンドウ褐紋病菌サプレッサーの精製および作用機構について. 修士論文. 岡山大学.
- Kimura, T., Maeshima, M. and Asahi, T. (1988) Immunological studies on ATPases in mung bean hypocotyls plasma membrane: proposal of the presence of two molecular species of ATPase. *Plant Cell Physiol.* 29: 883-888.

- Kodama, M., Kaliwara, K., Otani, H. and Kohmoto, K. (1989) A host-recognition factor from *Botrytis* affecting scallion. In Host-Specific Toxins, Recognition and Specificity Factors in Plant Disease. Edited by Kohmoto, K. and Durbin, R. D. Tottori University Press, Tottori. pp. 33-44.
- Kono, Y., Gardner, J. M., Suzuki, Y. and Takeuchi, S. (1985) Plant pathotoxins from *Arternaria citri* : The minor ACRL toxins. *Phytochemistry* 24: 2869-2874.
- Kono, Y., Takeuchi, S., Kwarada, A., Dary, J. M. and Knoche, H. W. (1980) Structure of the host-specific pathotoxin produced by *Helminthosporium maydis* race T. *Tetrahedron Lett.* 21: 1537-1540.
- Kurosaki, F., Tsurusawa, Y. and Nishi, A. (1987a) Breakdown of phosphatidylinositol during the elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Plant Physiol.* 85: 601-604.
- Kurosaki, F., Tsurusawa, Y. and Nishi, A. (1987b) The elicitation of phytoalexins by Ca^{2+} and cyclic AMP in carrot cells. *Phytochemistry*. 26: 1919-1923.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Loschke, D. C. and Hadweiger, L. A. (1981) Effects of light and of *Fusarium solani* on synthesis and activity of phenylalanine ammonia-lyase in pea. *Plant Physiol.* 68: 680-685.
- Low, P. S. and Heinsteins, P. F. (1986) Elicitor stimulation of the defense response in cultured plant cells monitored by fluorescent dyes. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 472-479.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein

- measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Lowton, M. A. and Lamb, C. J. (1987) Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. Mol. Cell. Biol. 7: 335-341.
- Macko, V., Acklin, W., Hildenbrand, C., Weibel, F. and Arigoni, D. (1983) Structure of three isomeric host-specific toxins from *Helminthosporium sacchari*. Experientia 39: 343-347.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) In Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Manners, J. M. and Gay, J. L. (1982) Transport, translocation and metabolism of ^{14}C -photosynthates at the host-parasite interface of *Pisum sativum* and *Erysiphe pisi*. New Phytol. 91: 221-244.
- Masuda, Y., Shiraishi, T., Ouchi, S. and Oku, H. (1983) A rapid and accurate analysis of isoflavonoid phytoalexins by high performance liquid chromatography. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 49: 558-560.
- Matsumoto, N., Tomiyama, K. and Doke, N. (1976) Alteration of membrane permeability of potato-tuber tissue infected by incompatible and compatible race of *Phytophthora infestans* during the initial phase of infection. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 42: 279-286.
- Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T. (1984) Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. Plant Physiol. 76: 607-611.
- Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T. (1988a) Antifungal hydrolases in pea tissue, I. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-glucanases differentially regulated during development and in

- response to fungal infection. *Plant Physiol.* 87: 325-333.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988b) Antifungal hydrolases in pea tissue, II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942.
- Memon, A. R. and Boss, W. F. (1990) Rapid light-induced changes in phosphoinositide kinases and H^+ -ATPase in plasma membrane of sunflower hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 265: 14817-14821.
- Memon, A. R., Chen, Q. and Boss, W. F. (1989) Inositol phospholipids activate plasma membrane ATPase in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 1295-1301.
- Mito, N., Kimura, T. and Asahi, T. (1988) Partial purification and characterization of an ATPase in mung bean hypocotyl plasma membrane: Suggestion for a new type of higher plant plasma membrane ATPase. *Plant Cell Physiol.* 29: 875-882.
- Miura, Y., Yoshioka, H., Kawakita, K. and Doke, N. (1993) Effects of hyphal elicitor of *Phytophthora infestans* on phospholipid metabolisms in an isolated microsomal fraction of potato tissues. Annual Meeting of the Phytopathological Society of Japan. April. pp. 9. (Abstract)
- Moore, R., McClelen, C. E. and Smith, H. S. (1987) Phosphatases. In *Handbook of Plant Cytochemistry*. Edited by Vaughn, K. C. Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 37-64.
- Nakashima, T., Ueno, T. and Fukami, H. (1982) Structure elucidation of AK-toxins, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria kikutiana* Tanaka. *Tetrahedron Lett.* 23: 4469-4472.
- Nasir, M. and Hoppe, H.-H. (1991) Studies on pathotype differentiation within

- Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Bloxam) Vestergren, a component of the *Ascochyta* -disease-complex of peas (*Pisum sativum* L.). Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 98: 616-626.
- Nasir, M., Hoppe, H.-H. and Ebrahim-Nesbat, F. (1992) The development of different pathotype groups of *Mycosphaerella pinodes* in susceptible and partially resistant pea leaves. Plant Pathol. 41: 187-194.
- Nespoulous, C., Huet, J.-C. and Pernollet, J.-C. (1992) Structure-function relationships of α and β elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. Planta 186: 551-557.
- Nozue, M., Tomiyama, K. and Doke, N. (1977) Effect of blasticidin S on development of potential of potato tuber cells to react hypersensitivity to infection by *Phytophthora infestans*. Physiol. Plant Pathol. 10: 181-189.
- O'Connell R. J., Bailey, J. A. and Richmond, D. V. (1985) Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. Physiol. Plant Pathol. 27: 75-98.
- Oku, H. (1980) Determinant for pathogenicity without apparent phytotoxicity in plant diseases. Pro. Japan Acad. 56(Ser.B):367-371.
- Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1976) Effect of preliminary administration of pisatin to pea leaf tissues on the subsequent infection by *Erysiphe pisi* DC. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42: 597-600.
- Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1977) Suppression of induction of phytoalexin, pisatin, by low-molecular-weight substances from spore germination fluid of pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. Naturwissenschaften 64: 643.
- Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1987) Role of specific suppressors in

- pathogenesis of *Mycosphaerella pinodes* . In *Molecular Determinants of Plant Diseases*. Edited by Nishimura, S. et al. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin. pp. 145-156.
- Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S., Ishiura, M. and Matsueda, R. (1980) A new determinant of pathogenicity in plant disease. *Naturwissenschaften* 67: 310.
- Orolaza, N. P., Kawakita, K. and Doke, N. (1992) Inhibitory effect of AL-toxin produced by *Alternaria alternata* tomato pathotype on the biosynthesis of phosphatidylethanolamine in tomato leaves susceptible to the fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 719-725.
- Otani, H., Kohmoto, K., Nishimura, S., Nakashima, T., Ueno, T. and Fukami, H. (1985) Biological activities of AK-toxins I and II, host-specific toxins from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 51: 285-293.
- Otani, H., Tomiyama, K., Okamoto, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1989) Effect of AK-toxin produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype on membrane potential of pear cell. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 466-468.
- Ouchi, S., Oku, H., Nakayabashi, H. and Oka, K. (1975) Some characteristics of the heat-induced susceptibility demonstrated in powdery mildew of barley. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 41: 453-460.
- Pardo, J. M. and Serrano, R. (1989) Structure of plasma membrane H⁺ -ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana* . *J. Biol. Chem.* 264:8557-8562.
- Parker, J. E., Schulte, W., Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1991) An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits

- phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 19-27.
- Pegg, G. F. and Young, G. F. (1981) Changes in glycosidase activity and their relationship to fungal colonization during infection of tomato by *Verticillium albo-atrum*. *Physiol. Plant Pathol.* 19: 371-382.
- Perez-Prat, E., Narasimhan, M. L., Binzel, M. L., Botella, M. A., Chen, Z., Valpuesta, V., Bressan, R. V. and Hasegawa, P. (1992) Induction of putative Ca^{2+} -ATPase mRNA in NaCl-adapted cells. *Plant Pathol.* 100: 1471-1478.
- Perlin, D. S. and Spanswick, R. M. (1981) Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes. *Plant Pathol.* 68: 521-526.
- Rasi-Caldogno, F., Pugliarello, M. C. and De Michelis, M. I. (1987) The Ca^{2+} -transport ATPase of plant plasma membrane catalyzes a $\text{NH}_4^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchange. *Plant Physiol.* 83: 994-1000.
- Rasi-Caldogno, F., Carnelli, A. and De Michelis, M. I. (1992) Plasma membrane Ca-ATPase of radish seedlings. II. Regulation by calmodulin. *Plant Physiol.* 98: 1202-1206.
- Reissing, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *Biochim. Biophys. Acta* 959-966.
- Ryan, C. A. (1973) Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 54: 328-332.
- Ryder, T. B., Cramer, C. J., Bell, J. N., Robbins, M. P., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1984) Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 5724-5728.

- Sanchez, L. M., Doke, N., and Kawakita, K. (1993) Elicitor-induced chemiluminescence in cell suspension cultures of tomato, sweet pepper and tobacco plants and its inhibition by suppressors from *Phytophthora* spp. *Plant Sci.* 88: 141-148.
- Sanchez, L. M., Ohno, Y., Miura, Y., Kawakita, K. and Doke, N. (1992) Host selective suppression by water-soluble glucans from *Phytophthora* spp. of hypersensitive cell death of suspension-cultured cells from some solanaceous plants caused by hyphal wall elicitors of the fungi. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 664-670.
- Sarafian, V. and Poole, R. J. (1989) Purification of an H^+ -translocating inorganic pyrophosphatase from vacuole membranes of red beet. *Plant Physiol.* 91: 34-38.
- Schaller, G. E. and Sussman, M. R. (1988) Isolation and sequence of tryptic peptides from the proton-pumping ATPase of the oat plasma membrane. *Plant Physiol.* 86: 512-516.
- Schlumbaum, A. Mauch, F. Vogeli, U. and Boller, T. (1986) Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324: 365-367.
- Schmidt, W. E. and Ebel, J. (1987) Specific binding of a fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4117-4121.
- Schroder, M., Hahlbrock, K. and Kombrink, E. (1992) Temporal and spatial patterns of 1,3- β -glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Plant J.* 2: 161-172.
- Sequeira, L. (1983) Mechanisms of induced resistance in plants. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 51-79.

- Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 947: 1-28.
- Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.
- Serrano, R. (1990) Plasma membrane ATPase. *In* The Plant Plasma Membrane. Edited by Larsson, C and Moller, I. H. Springer-Verlag, New York. pp. 127-153.
- 白石友紀 (1989a) エンドウ褐紋病菌の抵抗性誘導因子 (エリシター). 植物病理学実験マニュアル. 獅山慈孝監修, pp. 35-36.
- 白石友紀 (1989b) エンドウに於ける病害抵抗性の発現とその制御. 日本植物病理学会植物感染談話会. pp. 95-103. (講要)
- Shiraishi, T., Araki, M., Yoshioka, H., Kobayashi, I., Yamada, T., Ichinose, Y., Kunoh, H. and Oku, H. (1991a) Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes in situ by a suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 32: 1067-1075.
- Shiraishi, T., Hori, N., Yamada, T. and Oku, H. (1990) Suppression of pisatin accumulation by an inhibitor of protein kinase. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 261-264.
- Shiraishi, T., Oku, H., Yamashita, M. and Ouchi, S. (1978) Elicitor and suppressor of pisatin induction in spore germination fluid of pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44: 659-665.
- Shiraishi, T., Satoh, K., Kim, H., Kato, T., Tahara, M., Oku, H., Yamada, T. and Ichinose, Y. (1992) Two, suppressors, suppressins A and B, secreted by a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33: 663-667.
- 白石友紀・山田哲治 (1993) 宿主特異性とサプレッサー. 植物細胞工学. Vol. 5 No.1 pp. 16-22.

- Shiraishi, T., Yamada, T., Oku, H. and Yoshioka, H. (1991b) Suppressor production as a key factor for fungal pathogenesis. *In* Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants. Edited by Patil, S.S. et al. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin. pp. 151-162.
- Siegrist, J. and Kauss, H. (1990) Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 267-275.
- Smith, A. D. and Banks, W. S. (1986) Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. *Phytochemistry* 25: 979-995.
- Spencer-phillips, P. T. N. and Gay, J. L. (1981) Domains of ATPase in plasma membranes and transport through infected plant cells. *New Phytol.* 89: 393-400.
- Stab, M. R. and Ebel, J. (1987) Effect of Ca^{2+} on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 257: 416-423.
- Steffens, M., Ettl, F., Kranz, C. and Kindl, H. (1989) Vanadate mimics effects of fungal cell wall in eliciting gene activation in plant cell cultures. *Planta* 177: 160-168.
- Storti, E., Pelucchini, D., Tegli, S. and Scala, A. (1988) A potential defense mechanism of tomato against the late blight disease is suppressed by germinating sporangia-derived substances from *Phytophthora infestans*. *J. Phytopathol.* 121: 275-282.
- Suzuki, Y., Coleman, L. W., Daly, J. M., Kono, Y., Knoche, H. W. and Tacheuchi, S. (1987) Synthesis and biological activity of mimics of PM-toxins, the host-specific corn pathotoxin produced by *Phyllosticta maydis*. *Phytochemistry* 26: 687-696.
- Takeshige, K., Tazawa, M. and Hager, A. (1988) Characterization of H^+

- translocating adenosine triphosphatase and pyrophosphatase of vacuolar membranes isolated by means of a perfusion technique from *Chara corallina*. Plant Physiol. 86: 1168-1173.
- Tani, T. and Yamamoto, H. (1978) Nucleic acid and protein synthesis in association with the resistance of oat leaves to crown rust. Physiol. Plant Pathol. 19: 371-382.
- Thanutong, P., Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1982) Isolation and partial characterization of an elicitor of pisatin production from spore germination fluid of pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. Sci. Rep. Fac. Agric. Okayama Univ. 59: 1-9.
- Tomiyaama, K. (1956) Cell physiological studies on the resistance of potato plant to *Phytophthora infestans*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 21: 54-62.
- Tomiyaama, K., Okamoto, H. and Katou, K. (1983) Effect of infection by *Phytophthora infestans* on the membrane potential of potato cells. Physiol. Plant Pathol. 22: 233-243.
- Toyoda, K., Hino, I., Kato, T., Shiraishi, T., Ichinose, Y., Yamada, T. and Oku, H. (1992a) Expression of defense responses in pea regulated by two signals from a pathogenic fungus (3) Relationship between ATPase activity and lipid metabolism in isolated pea plasma membranes. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58: 569-570. (Abstract)
- Toyoda, K., Shiraishi, T., Yoshioka, H., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992b) Regulation of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. Plant Cell Physiol. 33: 445-452.
- Ueno, T., Nakashima, T. and Fukami, H. (1982) Chemical basis of host recognition

- by *Alternaria* species. In Plant Infection, The physiological and biochemical basis. Edited by Asada et al. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, pp. 235-251.
- Van Etten, H. D., Matthews, E. E. and Matthews, P.S. (1989) Phytoalexin detoxification. Importance for pathogenicity and practical implications. Ann. Rev. Phytopath. 27: 143-164.
- Van Steveninck, R. F. M. (1979) The verification of cytochemical tests for ATPase activity in plant cells using X-ray microanalysis. Protoplasma 99: 211-220.
- Vögeli, U., Meins, F. and Boller, T. (1988) Co-ordinated regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. Planta 174: 364-372.
- Wessels, J. G. H. and Sietsma, J. H. (1981) Fungal cell walls: a survey. In Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Edited by Tanner, W. and Loewus, F. A. Vol. 13B. Springer-New York, pp. 352-394.
- Wolpert, T. J. and Macko, V. (1989) Specific binding of victorin to a 100-kDa protein from oats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4092-4096.
- Wolpert, T. J., Macko, V., Acklin, W. and Arigoni, D. (1988) Molecular features affecting the biological activity of the host-selective toxins from *Cochliobolus victoriae*. Plant Physiol. 87: 37-41.
- Xiao, J. Z., Tsuge, T., Doke, N., Nakatsuka, S., Tsuda, M. and Nishimura, S. (1991) Race-specific toxins produced by *Bipolaris zeicola*, race 3; Evidence for role as pathogenicity factors for rice and maize plants. Physiol. Mol. Plant Pathol. 38: 67-82.
- Yamada, T., Hashimoto, H., Shiraishi, T. and Oku, H. (1989) Suppression of pisatin, phenylalanine ammonia-lyase mRNA, and chalcone synthase mRNA

- accumulation by a putative pathogenicity factor from the fungus *Mycosphaerella pinodes*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 256-261.
- Yamada, T., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Kato, H., Hashimoto, T., Kawamata, S., chinose, Y., Kato, H., Shiraishi, T. and Oku, H. (1992) Phenylalanine ammonia-lyase genes from *Pisum sativum*: Structure, organ-specific expression and regulation by fungal elicitor and suppressor. *Plant Cell Physiol.* 33: 715-725.
- Yamamoto, Y., Oku, H., Shiraishi, T., Ouchi, S. and Koshizawa, K. (1986) Non-specific induction of pisatin and local resistance in pea leaves by elicitors from *Mycosphaerella pinodes*, *M. melonis* and *M. ligulicola* and effect of suppressor from *M. pinodes*. *J. Phytopathol.* 117: 136-143.
- Yoshida, S., Kawata, T., Uemura, M. and Niki, T. (1986) Properties of plasma membrane isolated from chilling-sensitive etiolated seedlings of *Vigna radiata* L. *Plant Physiol.* 80: 152-160.
- Yoshida, S., Matsuura, C. and Etani, S. (1989) Impairment of tonoplast H⁺ - ATPase as an initial physiological response of cells to chilling in mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek). *Plant Physiol.* 89: 634-642.
- Yoshikawa, M., Keen, N. T. and Wang, M. C. (1983) A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. *Plant Physiol.* 73: 497-506.
- Yoshikawa, M. and Takeuchi, Y. (1991) Molecular aspects of elicitation of host defense reactions. *In* Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants. Edited by Patil, S.S. et al. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin. pp. 165-175.
- Yoshikawa, M., Yamauchi, K. and Masago, H. (1978) *De novo* messenger RNA and

- protein synthesis are required for phytoalexin-mediated disease resistance in soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* 61: 314-317.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Kawamata, S., Nasu, K., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992a) Orthovanadate suppresses accumulation of phenylalanine ammonia-lyase mRNA and chalcone synthase mRNA in pea epicotyls induced by elicitor from *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33: 201-204.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1990) Suppression of pisatin production and ATPase activity in pea plasma membranes by orthovanadate, verapamil and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 31: 1139-1146.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Yamada, T., Nasu, K., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992b) Suppression of the activation of chitinase and β -1,3-glucanase in pea epicotyls by orthovanadate and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 405-410.
- Ziegler, E. and Pontzen, R. (1982) Specific inhibition of glucan-elicited glyceollin accumulation in soybeans by an extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinae*. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 321-331.

摘要

エンドウ褐紋病菌は、胞子発芽過程で宿主のエンドウ組織に抵抗反応を誘導するエリシターとその誘導を抑制するサプレッサーを生産する。エリシターでエンドウ組織を処理すると、速やかにエンドウのファイトアレキシンであるピサチンの合成系（生合成に係わる酵素の遺伝子発現や酵素活性の増大）が誘導される。しかしながら、それはサプレッサーの同時処理により抑制される。この現象は、エリシターがエンドウ細胞に認識され、情報伝達機構が機能し、核で防御遺伝子の発現が誘導されることを示唆している。本サプレッサーは、エリシターによる細胞内での情報発現過程のいずれかで機能し、防御酵素（群）の発現を抑制することによって寄生成立条件を形成するものと推定された。

本研究は、エンドウ褐紋病菌の生産するサプレッサーの宿主選択的作用機構と感染における役割を明らかにすることを目的とし、宿主植物細胞の恒常性維持機能に基本的な役割をもつ原形質膜ATPase (H^{+} -ATPase)に注目して、サプレッサーによる原形質膜ATPaseの活性抑制と宿主防御反応の抑制との相関について調べた。

1. 分離したエンドウ原形質膜ATPaseにおよぼすエンドウ褐紋病菌サプレッサーの影響

エンドウ上胚軸より調製した原形質膜画分を供試し、ATPase活性におよぼすエリシターおよびサプレッサーの影響を調べた。エリシ

ター処理は原形質膜ATPaseの活性に影響をおよぼさなかったが、サプレッサー処理は、その活性を顕著に抑制した。阻害様式はP型ATPaseの阻害剤であるオルトバナジン酸と類似した反拮抗阻害であった。

[γ - ^{32}P]ATPを用いた原形質膜画分でのタンパク質リン酸化系において、サプレッサーは78 kDa, 68 kDaおよび42 kDaのタンパク質のリン酸化を阻害した。これらのタンパク質のリン酸化はプロテインキナーゼの阻害剤であるK252a によって阻害されなかったので、本サプレッサーは原形質膜ATPaseのリン酸化中間体形成を阻害するものと推定された。

2. エンドウ褐紋病菌サプレッサーおよび原形質膜ATPase阻害剤の ピサチン合成系におよぼす影響

原形質膜ATPase活性に阻害作用を示すオルトバナジン酸またはベラパミルを同時処理して、エリシターによるピサチン生産誘導への影響を調べた。いずれの阻害剤もサプレッサーと同様の影響を与え、エリシター誘導によるピサチンの生成・蓄積を約6時間遅延させた。また、オルトバナジン酸はエリシター処理によるピサチン合成の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)の活性増大を約6時間遅延させた。さらに、ノーザン解析によると、オルトバナジン酸は、エリシター誘導によるPAL およびピサチン合成に重要な位置を占めるカルコン合成酵素 (CHS)の遺伝子発現を約3時間遅延させた。これらのことより、エンドウ褐紋病菌サプレッサーの防

御反応抑制作用は、第一義的に原形質膜ATPaseを阻害することにあるものと推定された。

3. サプレッサーの *in vitro* および *in vivo* における原形質膜 ATPase 阻害の特異性について

サプレッサーの原形質膜ATPaseに対する宿主選択的阻害効果を、宿主のエンドウの他、非宿主のインゲン、ダイズおよびオオムギ植物を供試して調べた。それぞれの組織から調製した原形質膜画分の原形質膜ATPase活性は、本サプレッサーによりいずれも阻害作用を受けた。ATP と $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を供試植物葉組織に与えて、*in vivo* における植物細胞の原形質膜ATPase活性を電子顕微鏡観察により調べると、本サプレッサーは供試した植物の中で、宿主であるエンドウの原形質膜ATPase活性のみを抑制する活性を示した。また、エンドウ組織におけるエンドウ褐紋病菌の感染現場では、接種後6時間まで原形質膜ATPase活性が阻害された状況にあることが観察された。これらの結果より、*in vivo* においては、エンドウ褐紋病菌のサプレッサーは宿主細胞の原形質膜ATPaseのみを一時的に阻害することが示された。

4. キチナーゼおよび β -1,3-グルカナーゼ活性におよぼす

エリシター、サプレッサーおよびオルトバナジン酸の影響

エンドウ褐紋病菌のエリシターは、エンドウ上胚軸組織および非宿主のマメ科植物組織に、誘導性防御反応の一つとして知られてい

るエンドキチナーゼおよび β -1, 3-グルカナーゼの活性増加を誘導した。エンドウ組織におけるこの誘導は、サプレッサーおよびオルトバナジン酸により抑制された。しかし、供試した他のマメ科植物においては、両酵素の活性増大はオルトバナジン酸により抑制されたが、サプレッサーではむしろ逆に誘起された。

以上の結果は、サプレッサーおよびオルトバナジン酸による原形質膜ATPase阻害がエリシターによる防御反応の誘導を抑制することを示し、誘導抵抗性発現における原形質膜ATPaseの重要性を示唆している。エンドウ褐紋病菌は、宿主内に侵入する以前にサプレッサーを生産して原形質膜ATPase活性を阻害し、同菌が生産するエリシターに応答して発現するエンドウの抵抗反応を一時的に回避することによって侵入および定着を図っているものと考えられた。

報文目録

- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1990)
Suppression of pisatin production and ATPase activity in pea plasma
membranes by orthovanadate, verapamil and a suppressor from *Mycosphaerella*
pinodes . Plant Cell Physiol. 31: 1139-1146.
- Shiraishi, T., Araki, M., Yoshioka, H., Kobayashi, I., Yamada, T., Ichinose, Y.,
Kunoh, H. and Oku, H. (1991) Inhibition of ATPase activity in pea plasma
membranes in situ by a suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella*
pinodes. Plant Cell Physiol. 32: 1067-1075.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Kawamata, S., Nasu, K., Yamada, T., Ichinose, Y.
and Oku, H. (1992) Orthovanadate suppresses accumulation of phenylalanine
ammonia-lyase mRNA and chalcone synthase mRNA in pea epicotyls induced by
elicitor from *Mycosphaerella pinodes* . Plant Cell Physiol. 33: 201-204.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Yamada, T., Nasu, K., Ichinose, Y. and Oku, H.
(1992) Suppression of the activation of chitinase and β -1,3-glucanase in
pea epicotyls by orthovanadate and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*.
Ann. Phytopath. Soc. Japan 58: 405-410.