

報告番号 乙^{*}第 4446号

主論文の要旨

題名

エンドウ褶紋病菌が生産するサフロリッサーの
作用機構と感染における役割

氏名 吉岡 博文



主論文の要旨

報告番号	※ 第	号	氏名	吉岡博文
<p>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。</p> <p>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。</p> <p>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</p> <p>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。</p>				

[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。