

宿主特異的毒素生産菌の感染に関与する植物成分とその病理学的役割

岡 久美子
(2006)

**Plant components involved in infection of pathogens producing
host-specific toxins and their pathological role**

**Kumiko OKA
(2006)**

目次

目次

第1章 序論	1
--------	---

第2章 *Alternaria brassicicola* の感染に関与する植物成分

第1節 宿主特異的毒素 (AB 毒素) 生成を誘導する宿主成分

1. 序論	5
2. 材料および方法	7
3. 結果	15
1) 胞子の感染行動と発芽胞子からの AB 毒素生成	
2) AB 毒素生成を誘導する宿主成分の検出	
3) 宿主植物葉上における胞子発芽時の AB 毒素生成の誘導機構	
4) AB 毒素生成誘導因子の純化	
5) AB 毒素の純化	
4. 考察	45

第2節 胞子発芽に関与する植物成分

1. 序論	48
2. 材料および方法	49
3. 結果	53
1) 植物葉上における O-264 胞子発芽	
2) O-264 胞子発芽に対する植物磨碎液の作用	
3) O-264 胞子発芽を促進する宿主成分の検出と純化	
4) O-264 胞子発芽を阻害するトマト葉成分の検出と純化	
4. 考察	80

第3章 *Alternaria alternata* および *Corynespora cassiicola* の感染における α -トマチンの役割

1. 序論	82
2. 材料および方法	86
3. 結果	91
1) 胞子発芽に対する α -トマチンの作用	
2) 病原菌の α -トマチン解毒能	
3) 病原菌の感染における α -トマチン解毒の役割	
4. 考察	99

第4章 総合考察	102
----------	-----

要約	105
Summary	108
引用文献	111
謝辞	117
論文目録	118

第1章 序論

自然界において、ごく限られた微生物しか病原菌となり得ないのは、植物の持つ多様な防御機構を凌駕できる生化学的戦略を持つことが要求されるからである。その戦略の1つとして、特定の植物病原菌が特定の植物種あるいは植物品種などを選択的に侵害し、病害を引き起こすような明確な宿主特異性を決定する病原菌側の因子として、以前より宿主特異的毒素 (host-specific toxin または、host-selective toxin、以下 HST と略す) の存在が明らかとなっている。HST が介在した宿主特異性の発現機構に関しては、病原菌側から宿主識別のシグナル因子である HST が放出され、それに対して受容せざるを得ない植物のみが病原菌に侵害されるといったモデルが提唱されている (尾谷 1991, 2000)。

1933 年、田中は *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype (ニホンナシ黒斑病菌) の培養濾液には黒斑病感受性のナシ品種 ‘二十世紀’ のみに黒色壊死斑を引き起こす選択毒性物質が存在することを報告し (Tanaka 1933)、これが HST の最初の発見となった。しかしながら、当時、英文で発表されたにも関わらず、国際的に全く反響を呼ばなかった。それから 14 年後、米国において *Cochliobolus victoriae* (エンバク victoria blight 病菌) の生産する宿主に特異性を示す毒素が発見された (Meehen and Murphy 1947)。その後、Pringle と Scheffer (Pringle and Scheffer 1964) は、上述の *C. victoriae* が生産する HV 毒素 (victorin) や *Periconia circinata* (モロコシ milo 病菌) が生産する PC 毒素 (peritoxin) の研究により、HST の概念を提唱した。現在、HST の具備すべき条件としては、(i) 毒素作用が宿主特異的であること、(ii) 病原菌の毒素生産能と病原性が一致すること、(iii) 宿主植物の毒素耐性と抵抗性が一致すること、(iv) 病原菌感染による宿主の生理学的変化が毒素によって再現できること、(v) 病原菌胞子の発芽時に毒素が放出されること (Nishimura and Scheffer 1965)、(vi) 毒素によって宿主細胞の生理・生化学的変化が誘導され病原菌の侵入・定着が起こること (Yoder and Scheffer 1969) を挙げることができる。

このような HST 概念の確立により、HST は単に宿主特異性を示す毒性物質ではなく、その病理学的役割から病原菌の病原性発現に関与する第一次決定因子 (primary determinant)、菌の感染を成功させるための始動因子 (initiation factor) あるいは宿主識別因子 (host recognition factor) などと考えられるようになった (Kohmoto and Otani 1991)。このような HST の概念に適合する毒素を生産する糸状菌は、これまでに *Alternaria* 属菌を中心に約 20 例が報告されている (尾谷および児玉 2004; 尾谷ら 2004)。我々の研究室では、主に *Alternaria* 属菌および *Corynespora* 属菌 (Table 1) において、HST の生合成と宿主識別の分子機構に関する研究を行っている (尾谷 2000)。

Table 1. *Alternaria* spp. and *Corynespora cassiicola* known to produce host-specific toxin

Pathogen		Disease name	Toxin
<i>Alternaria</i> species			
<i>A. alternata</i>	Apple pathotype	Alternaria blotch of apple	AM-toxin
	Japanese pear pathotype	Black spot of Japanese pear	AK-toxin
	Rough lemon pathotype	Brown spot of rough lemon	ACR(L)-toxin
	Strawberry pathotype	Alternaria black spot of strawberry	AF-toxin
	Tangerine pathotype	Brown spot of tangerine	ACT-toxin, ACTG-toxin
	Tobacco pathotype	Brown spot of tobacco	AT-toxin
	Tomato pathotype	Alternaria stem canker of tomato	A(A)L-toxin
	Spotted knapweed pathotype	Black leaf blight of spotted Knapweed	Maculosin
	Sunflower pathotype	Necrotic spots of sunflower	AS-toxin
		Gray leaf spot of <i>Brassica</i>	Destruxin B Homodestruxin B
<i>A. brassicicola</i>		Black leaf spot of <i>Brassica</i>	AB-toxin
<i>A. panax</i>		Alternaria blight of American ginseng	AP-toxin
<i>A. tenuissima</i>		Leaf spot of pigeon pea	ATC-toxin
<i>Corynespora cassiicola</i>		Target leaf spot of tomato	CCT-toxin
		Corynespora leaf spot of cucumber	CCC-toxin

HST を生産する *Alternaria* 属病原菌は、現在までに少なくとも 13 例が報告されており、HST 生産菌の半数以上を占めている。中でも、*A. alternata* の病原菌が最も多く、7 種の病原型 (pathotype) と他の 2 種の病原菌は異なる HST を生産し、それぞれ異なる宿主植物に寄生する (尾谷ら 2004)。なお、*A. alternata* はこれらの病原菌のみで構成されている訳ではなく、植物に対して病原性を持たず、植物に寄生できない腐生菌 (非病原性菌) として存在しているのが殆どである。*A. alternata* の HST の多くは化学構造がすでに明らかにされ、HST 生合成関連遺伝子の解析が進められている。これらの HST は、宿主植物に対し 10^{-9} ~ 10^{-8} M の低濃度で毒性を示すが、その構造は多種多様である (尾谷 1991)。菌側の HST 生合成系の研究が精力的に進められる一方、分子生物学的手法の急速な進歩によって植物側の HST 認識機構の解明も次第に明らかにされつつある (赤松ら 2003)。これまで、*Alternaria* 属菌の生産する HST の初期作用点は宿主植物の細胞膜、ミトコンドリア、葉緑体などにあることが明らかとなっており (尾谷ら 2004)、HST が介在する植物病原菌の宿主識別機構については以下のように考えられている (尾谷 1991, 2000)。(i) 病原菌発芽孢子による HST の放出、(ii) 宿主植物による HST の選択的受容、(iii) 細胞膜機能障害の誘起、(iv) 宿主抵抗反応の発現停止、(v) 病原菌の受容化である。このように HST 生産菌における特異性は、HST 生産菌と HST 受容因子をもった植物の基本的親和性関係によって発現すると考えられている。したがって、HST の宿主識別から病原菌受容化誘導機構を分子レベルで解析することは作物の病害防除戦略の観点からも重要な研究課題である。

植物および病原菌は、一般的に多種の化学構造をした二次代謝産物を生産しており、宿主植物と病原菌間の相互作用においては、主に植物由来の二次代謝産物の多くは感染防御の手段として、また、寄生菌由来のものは植物への攻撃手段として生合成されている (児玉ら 2005)。植物は侵入しようとする微生物に対し、抵抗性反応を誘導して自身を守っている。植物の抵抗性反応機構は多種多様で、現在までにいくつかの抵抗性誘導に関与する物質が同定されている (豊田ら 2004)。一般に植物の抵抗性には植物がもともと備えている抵抗性 (静的抵抗性) と病原菌の攻撃で誘導される抵抗性 (動的抵抗性) の 2 つに大別できる。静的抵抗性に関与する植物成分としてはフェノール、配糖体、サポニン、有機硫黄化合物などの低分子抗菌性物質や、植物の細胞壁と細胞間隙に存在している β -グルカナーゼやエンドキチナーゼ等の高分子物質がある (豊田ら 2004)。また、HST を不活性化する酵素の存在も報告されている (Johal and Briggs 1992)。動的抵抗性に関与する植物成分としてはファイトアレキシン、PR-タンパク質、感染阻害因子等が挙げられる (豊田ら 2004)。一方、病原菌は積極的に植物の抵抗性発現を抑制する何らかの仕組みを備えている。その一つの例が HST であり、その他にもエリシターで誘導された宿主の抵抗性を積極的に阻害 (遅延) する病原菌

の宿主特異的な抵抗性抑制因子（サプレッサー）がある（豊田ら 2004）。現在までに約 15 例の糸状菌からのサプレッサーが報告されており、*Mycosphaerella pinodes*（エンドウ褐紋病菌）とエンドウの系において精力的に研究が展開されている（豊田ら 2004）。また、病原菌は植物への感染時に宿主植物の何らかの成分（シグナル）を認識することによって、感染器官の形態分化とそれに伴う機能的分化を行うことが *Magnaporthe grisea*（イネいもち病菌）や *Colletotrichum lagenarium*（ウリ類炭そ病菌）等で報告されており（久保 2004; 久保および辻 2004）、病原菌の感染において各種の宿主成分が関与することも知られている。

このように病原菌が植物に感染し、発病に至るまでには複雑なメカニズムがあり、そこには病原菌と植物との相互作用が親密に関係している。本論文では、HST 生産菌の感染に関与する植物成分に焦点をあて、植物成分の純化および同定を行うとともに、その病理学的役割を明らかにすることを目的として研究を行った。まず、第2章において HST を生産する *Alternaria* 属菌の中でもその生産において大変ユニークな特性を持っている *A. brassicicola*（アブラナ科植物黒すす病菌）を研究材料として、*A. brassicicola* の HST 生成および孢子発芽に関与する植物成分とそれらの病理学的役割について述べる。また、第3章ではトマト葉に存在する抗菌性物質の α -トマチンに注目し、HST を生産するトマトの病原菌である *A. alternata* および *Corynespora cassicola* の感染における α -トマチンの病理学的役割について述べる。

なお、これらの成果の一部を学会誌などに公表するとともに（Oka et al. 2005a, 2005c）、日本植物病理学会を始めとする各種学会で発表した（岡ら 2002, 2003a, 2003b, 2005a, 2005b, Oka et al. 2005b）。

第2章 *Alternaria brassicicola* の感染に関与する植物成分

第1節 宿主特異的毒素 (AB 毒素) 生成を誘導する宿主成分

1. 序論

Alternaria brassicicola (Schweinitz) Wiltsh.によって引き起こされる各種アブラナ科植物の黒斑病および黒すす病は世界的に発生する重要病害である。日本ではキャベツにおける被害が最も多いが、現在までにキャベツ黒すす病防除に適用できる殺菌剤としては、ポリオキシン AL 水和剤が登録されている。本菌に感染されたキャベツでは、始め灰褐色の小さな斑点が生じ、後に拡大して内部が灰白色、周辺が黒色の不鮮明な円形の病斑となる。病斑上に同心円状に黒色の輪紋が出来るが、後に湿度が高いと黒色ですす状のカビで覆われる。病斑の周囲には、多くの場合かなり幅広い黄色の中毒部が広がる。病原菌は主に下葉から侵害し始め、成熟葉に発病しやすく、結球葉に発生して内部を侵す場合もあり経済的被害が大きい (木曾ら 1988)。また、キャベツの育苗方法であるセル成型育苗において、8~10 月の高温期に本病害の被害が問題となっている (窪田ら 2003)。この被害の原因は種子伝染によると考えられている。

A. brassicicola が生成する植物毒素に関して、Hodgkin and MacDonald (1986) はアブラナ科植物の花粉発芽を抑制する物質の存在を報告したが、本毒素は非特異的であった。しかし、1995 年に Otani et al. (Otani et al. 1998 a, b) によって、HST である AB 毒素が報告された。なお、アブラナ科植物に *A. brassicicola* と類似の病徴を引き起こし、同様の宿主域を有する *A. brassicae* (Berkeley) Sacc. (アブラナ科植物黒斑病菌) では、HST として destruxin B と homodestruxin B が報告されている (Ayer and Pena 1987; Bains and Tewari 1987; Cooke et al. 1997)。

A. brassicicola はこれまで発見されてきた品種間を明確に識別する多くの HST 生成菌とは異なり、アブラナ科植物に広く病原性を示し、また AB 毒素も病原菌と同様の宿主特異性を示す (Otani et al. 1998 a, b)。なお、科または属を識別する HST としては、これまでに *A. brassicae* の destruxin B (Bains and Tewari 1987) やタバコ品種に広く病原性を示す *A. alternata* tobacco pathotype (タバコ赤星病菌) の AT 毒素 (Kodama et al. 1990) が報告されている。

これまで報告された *Alternaria* 属菌の生成する HST はいずれも低分子の二次代謝物である (Kohmoto and Otani 1991; Otani et al. 1998 a, b)。これに対して AB 毒素は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) において約 35 kDa の蛋白質であることが明らかと

なっている (Otani et al. 1998 a, b)。AB 毒素のような蛋白質 HST としては、すでに *Pyrenophora tritici-repentis* (コムギ tan spot 病菌) が生成する Ptr 毒素 (Balance et al. 1989; Tomas et al. 1990; Wolpert et al. 2002) および *A. panax* (アメリカニンジン *Alternaria blight* 病菌) が生成する AP 毒素 (Quayyum et al. 2003) が知られている。なお、AP 毒素は AB 毒素と同じく、35 kDa の蛋白質である。蛋白質毒素は病原性遺伝子の直接的な産物である可能性が高く、従来のような低分子の二次代謝物である毒素の生合成関連遺伝子のクローニングより遥かに容易に目的遺伝子をクローニングできるという利点があり、菌側の分子生物学的研究の進展が期待できる。なお、本研究室において、形質転換体を作出し、AB 毒素関連遺伝子のクローニングおよび解析が進められている。

また、アブラナ科植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) はモデル植物として植物病害抵抗性遺伝子の解析などでしばしば用いられており (島本 1996)、2000 年に全塩基配列が解読された (柴田 2001)。このようなシロイヌナズナの生態型の中には、*A. brassicicola* や AB 毒素に対し感受性を示すものと、抵抗性を示すものが存在することが明らかとなっている (Otani et al. 2001)。また、病原菌や AB 毒素に対するシロイヌナズナの生態型の反応は抵抗性優性の一对立遺伝子であることが示唆されている (Otani et al. 2001)。これらのことより、*A. brassicicola* とシロイヌナズナは植物—病原菌相互反応における宿主特異性発現機構の解析のモデル実験系として期待されている。

一方、これまでの HST はいずれも病原菌を液体培地で培養した培養液中に生成され、また、胞子発芽時には宿主植物以外の基質上でも生成される。しかし、*A. brassicicola* の AB 毒素は各種液体培地中では生成されず、宿主葉上での胞子発芽時にのみ検出されることが報告されている (Otani et al. 1998 b)。このことから *A. brassicicola* の発芽胞子からの AB 毒素生成には、宿主植物が関与していることが示唆されている。しかしながら、その因子についてはこれまで全く明らかとなっていない。なお、HST 生成が宿主植物上でのみ誘導される例は本菌以外今まで全く報告されていない。

本研究においては、*A. brassicicola* の発芽胞子からの AB 毒素生成に関与する宿主因子の探索およびその解析を行った。また、AB 毒素はその化学構造については明らかになっていないため、胞子発芽液からの AB 毒素の純化を試みた。

2 材料および方法

1) 供試植物

A. brassicicola の宿主であるアブラナ科植物 (Cruciferae) としてキャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 品種 初秋、コマツナ (*B. campestris*) 品種 楽天、ハガラシナ (*B. juncea* var. *juncea*)、ナタネ (*B. napus*) 品種 Wester を、非宿主にはナス科植物 (Solanaceae) としてトマト (*Lycopersicon esculentum*) 品種 桃太郎、ウリ科植物 (Cucurbitaceae) としてキュウリ (*Cucumis sativus*) 品種 つばさ、マメ科植物 (Leguminosae) としてエンドウ (*Pisum sativum*) 品種 貴笹、バラ科植物 (Rosaceae) としてニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*) 品種 二十世紀を使用した。ニホンナシを除く全ての植物は、‘花と野菜の土’ と ‘サカタスーパーミックス A’ を 1:1 に混合したものを入れたポット (直径 15 cm) に種子を播いた。ニホンナシは1年生苗木をポット (直径 30 cm) に植えた。各植物は 24~26°C、自然光下の温室で 3~4 週間栽培した。毒素活性検定には各植物の第 2~3 葉の若葉を、また、葉上での孢子発芽液を得るには十分に展開した葉を用いた。

2) 供試菌

A. brassicicola として研究室に保存されている O-264 菌株を使用した。また、アブラナ科植物の非病原菌として研究室保存の *A. alternata* Japanese pear pathotype (ナシ黒斑病菌) O-276 菌株および非病原性 *A. alternata* の O-94 菌株を使用した。これらの菌株は試験管中のジャガイモ煎汁寒天培地 [ジャガイモ 300 g/グルコース 20 g/寒天 15 g/水 1 ℓ、以下 potato dextrose agar (PDA)] 上で 25°C で保存し、適時実験に使用した。

3) 孢子懸濁液の調整

PDA 培地上で保存した O-264 菌株をシャーレ (直径 9 cm) 内の V-8 寒天平板培地 (V-8 ジュース 200 ml/CaCO₃ 3 g/寒天 20 g/水 800 ml) 上に接種し、25°C 暗下で 2~3 週間静置培養した。培地表面に形成された孢子を蒸留水 (DW) 中に筆でかき取って懸濁し、4 重キムワイプ (ワイパー200、十條キンバリー) で濾過して菌糸片を取り除いた後、遠心分離 (800 ×g、5 分、20°C、CF7D2、日立) を行った。上清を取り除いて、沈殿した孢子を DW 中に再懸濁し吸引濾過により濾紙 (Whatman No.50) 上に孢子を集め、孢子を室温中で乾燥させた。濾紙上の孢子は乾燥孢子として -80°C 下で保存し、適時実験に使用した。

O-94 菌株はシャーレ (直径 9 cm) 中の PDA 平板培地上に接種し、25°C 明下で 20 日間静置培養した。その後、O-264 菌株と同様な方法で濾紙上に孢子を集め、乾燥して -80°C 下で

保存し、適時実験に使用した。

O-276 菌株は 100 ml 培養瓶中の PD 液体培地（ジャガイモ 300 g／グルコース 20 g／水 1 l）50 ml に接種し、25℃明下で 2~3 週間静置培養した。形成された菌体マットを水道水でよく洗浄し風乾させた後、プラスチックチャンバー内に移し、25℃暗下で 2~3 日静置した。マット上に形成された胞子を DW に懸濁し、吸引濾過によって濾紙上に胞子を集め、乾燥させて-80℃で保存した。

胞子使用時には、濾紙上の乾燥胞子を筆でかき取って DW に懸濁させ、遠心分離（800 \times g、5 分、20℃）し、得られた沈殿胞子を DW に再懸濁して、Thoma 氏血球計により胞子濃度を調整した。

4) 胞子発芽液（Spore germination fluid: SGF）の調製

各葉上およびプラスチックシャーレ上に O-264 胞子の DW 懸濁液（ 10^6 個/ml）を約 40 μ l ずつ滴下し、湿室プラスチックチャンバー内のスポンジマット上に置き、25℃暗下で 24 時間静置した。光学顕微鏡（LABOPHOT-2、ニコン）で胞子発芽を観察した後、各葉上およびプラスチックシャーレ上の懸濁液を回収し、遠心分離（800 \times g、5 分、20℃）を行った。その上清をミリポアフィルター（SARTORIUS、Minisart、孔径 0.2 μ m）で発芽胞子を除去したものを胞子発芽液（SGF）とした。

5) 毒素生成誘導活性の検定

宿主葉上に O-264 胞子懸濁液を滴下して得た SGF を 100℃温湯中で、15 分間熱処理を行うことにより、SGF 中に存在する毒素を失活させた。SGF または各種検定液に O-264 胞子を 5×10^5 個/ml の濃度になるように懸濁し、プラスチックシャーレ上に約 40 μ l ずつ滴下し、湿室プラスチックチャンバー内のスポンジマット上に置き、25℃暗下で 24 時間静置した。胞子発芽を光学顕微鏡で観察した後、滴下液を回収し遠心分離（800 \times g、5 分、4℃）により発芽胞子を取り除いた。その上清を用いて毒素活性の検定を行った。

6) 毒素活性の検定

宿主および非宿主葉の裏面にピンセットで数カ所傷をつけた有傷部に検定液を 30 μ l ずつ滴下し、湿室プラスチックチャンバー内のスポンジマット上に置き、25℃暗下で静置した。48 時間後に形成される葉上の壊死斑により毒素生成の有無を判定した。生成された毒素の希釈限界値および壊死斑の面積により毒素活性を評価した。

7) 植物成分の調製

(i) 葉熱抽出液の調製

DW 10 ml と各植物葉 1 g をビーカーに入れアルミホイルで蓋をして、オートクレーブ処理 (121°C、15 分) した。処理液を濾紙 (Whatman No.50) で濾過して得られた濾液を葉熱抽出液とした。

(ii) 葉磨砕液の調製

各植物葉 1 g を液体窒素中で、乳棒と乳鉢を用いて磨砕し、5 ml の DW を加えたものを葉磨砕液とした。また、葉磨砕液を遠心分離 (51,400 $\times g$ 、3 分、4°C) し、沈殿と上清画分を得た。

(iii) 葉細胞壁画分の調製

葉細胞壁画分の抽出は English et al. (1971) の方法および Kiba et al. (1995) の方法に従って行った。

English et al.の方法は、適当量の植物葉を液体窒素中で乳棒と乳鉢を用いて磨砕し、磨砕物体積の約 2.5 倍量の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、磨砕機 (POLYTRON、KINEMATICA) を用いてさらに磨砕した。磨砕液を濾紙 (Whatman No. 4) で濾過し、濾紙上の残渣を同様のリン酸緩衝液で 3 回洗浄した。次に DW で残渣を洗浄し、残渣体積の約 2.5 倍量を冷却したクロロホルム：メタノール (1:1、v/v) に懸濁し、磨砕機 (POLYTRON) で磨砕した。磨砕液を吸引濾過し、濾紙 (Whatman No.4) で回収した。以上の操作は全て氷上で行った。回収物にアセトンを加え 3 度洗浄し、アルミホイル上で 1~2 日間乾燥させてアセトンを除去したものを細胞壁画分とした。この画分は密封容器に入れ 4°C で保存し、使用時には DW に懸濁して用いた。

Kiba et al.の方法は、暗下 25°C で約 10 日間生育させた植物 100 g に緩衝液 A (0.25 M スクロース含有 75 mM MOPS-KOH, pH 7.6/5 mM EDTA/5 mM EGTA/2 mM PMSF/4 mM SHAM/10 $\mu g/ml$ BHT) を 200 ml 加え、乳棒と乳鉢で磨砕した。磨砕液を 3 重キムワイプで濾過し、キムワイプ上の残渣にさらに緩衝液 A を 200 ml 加え、磨砕し濾過した。これらの濾液を遠心分離 (800 $\times g$ 、5 分、5°C) して得られた沈殿物に緩衝液 B (0.25 M スクロース含有 5 mM MOPS-KOH, pH 6.5/1 mM EDTA/0.2 mM PMSF/10 mM KCl/1 mM DTT) を体積の 4 倍量加え、磨砕し遠心分離 (800 $\times g$ 、15 分、5°C) した。この操作を 3 度繰り返し、最終的な沈殿物を細胞壁画分とした。なお、これらの操作は 5°C 下で行

った。この画分は緩衝液 B に再懸濁後、-80℃で保存し、使用時には遠心分離（800 ×g、15 分、5℃）により DW で 2~3 度洗浄し、DW に再懸濁して用いた。

8) プラスチックシャーレ上から得た SGF の毒素生成誘導活性検定

O-264 孢子懸濁液（ 10^5 個/ml）をプラスチックシャーレ上に約 40 μ l ずつ滴下し、25℃暗下で 24 時間培養した。懸濁液を回収し、遠心分離（800 ×g、5 分、4℃）によって得た上清（毒素活性なし）を各植物葉およびプラスチックシャーレ上に約 40 μ l ずつ滴下した。25℃暗下で 24 時間培養後に滴下液を回収し、回収液の毒素生成誘導活性の検定を行った。

9) 毒素生成誘導因子の化学的特性

(i) 溶媒抽出

O-264 SGF（1 ml）をロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、アセトン、酢酸エチルおよびメタノールの各溶媒 1 ml を加え攪拌し、遠心分離（800 ×g、5 分、20℃）した。溶解画分と非溶解画分を得、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した後、各画分を 1%メタノールに溶解し、毒素生成誘導活性の検定を行った。

(ii) Sep-pak C₁₈ カートリッジ

熱処理した O-264 SGF（1 ml）を Sep-pak C₁₈（Waters）カラムに注入し、非吸着画分を得た。カラムを DW 3 ml で洗浄し、100%メタノール 1 ml で溶出した液をロータリーエバポレーター で濃縮乾固し、1%メタノール 1 ml に溶解したものを吸着画分とした。各画分において毒素生成誘導活性の検定を行った。

(iii) 限外濾過

熱処理した O-264 SGF を 5 kDa および 10 kDa 分画用のモルカット II（LCC、日本ミリポア）または 3 kDa 分画用のウルトラフリー15（日本ミリポア）を用いて限外濾過を行った。得られた各画分において毒素生成誘導活性の検定を行った。

(iv) 過ヨウ素酸処理

熱処理した O-264 SGF を 1N HCl で pH 4.5 に調製し、各濃度の過ヨウ素酸カリウム溶液を処理し、4℃暗下で 24 時間静置した。反応液から 5 kDa 分画用のモルカット II を用いて過ヨウ素酸カリウムを取り除き、5 kDa 以上の画分を DW に溶解し、毒素生成誘導活性

の検定を行った。

(v) 酵素処理

熱処理した O-264 SGF を 1N HCl または 1N KOH で各 pH に調製し、各濃度の proteinase K (pH 7.5) を処理し、32°C で 7 時間静置した。一方、熱処理した O-264 SGF に 10 units の β -galactosidase (pH 7.3) および β -glucosidase (pH 5.0) を処理し、37°C で 3 時間静置した。また同様に 10 units の α -glucosidase (pH 6.0) および α -mannosidase (pH 4.5) を処理し、25°C で 3 時間静置した。反応液より 10 kDa 分画用のモルカット II で各酵素を取り除き、10 kDa 以下の画分において毒素生成誘導活性の検定を行った。

1 0) 毒素生成誘導因子の純化

(i) ゲル濾過クロマトグラフィー

O-264 SGF 100 ml を凍結乾燥により 10 ml に濃縮し、Sephadex G-25 Coarse カラム (Amersham Biosciences, 1.5×90 cm)、Sephadex G-50 Coarse カラム (Amersham Biosciences, 1.5×60 cm) および Sephadex G-50 Superfine カラム (Amersham Biosciences, 1.5×90 cm) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。DW で溶出し、フラクションコレクター (SF-2120、ADVANTEC) で 5 ml ずつ分取し、得られた画分において毒素生成誘導活性の検定を行った。

(ii) 糖の定量

糖含量はアンスロン法 (阿南 1976) により定量した。200 mg のアンスロンを 100 ml 硫酸 (濃硫酸 95 ml と DW 5 ml) に氷上で溶解し、DW 20 ml を加えたものをアンスロン溶液とした。なお、アンスロン溶液は暗下で保存した。

検定サンプル 0.5 ml に氷上でアンスロン溶液 3 ml を加え攪拌した後、沸騰水中で 10 分間反応させ、620 nm の吸光度を測定した。糖の標準物質として D-グルコースを用いて、検量線を作製した。

(iii) 蛋白質含量の測定

蛋白質含量は Bradford (1976) の方法に従い定量した。Coomassie brilliant blue (CBB) G-250 (SIGMA) 100 mg を 95% エタノール 50 ml に溶解し、85% (w/v) リン酸 100 ml を加え、さらに DW を加えて全量を 1 l にしたものを CBB 溶液とした。CBB 溶液は暗下

に保存し、使用時には濾紙（Whatman No.2）で濾過した。

検定サンプル 40 μ l に DW 3.2 ml と CBB 溶液 0.8 ml を加え攪拌した後、595 nm の吸光度を測定した。蛋白質の標準物質として Albumin bovine（SIGMA）を用いて、検量線を作製した。

(iv) ゲル濾過高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

カラムとして GSM-700H（7.5×250 mm）を用いて、DW により平衡化した後、DW に溶解したサンプルを流速 1 ml/min で溶出し、フラクションコレクターで 1 ml ずつ分取し、得られた画分において毒素生成誘導活性の検定を行った。カラムオーブンは 30℃に設定し、示差屈折率検出器（RID-6A、SIMAZU）により検出した。既知分子量のプルランを用いて検量線を作製し、サンプルの保持時間（Rt）より分子量を求めた。

1 1) 構成糖分析

ゲル濾過 HPLC により得られた活性画分の構成糖を分析するために、本画分を誘導体化した。凍結乾燥により濃縮乾固した活性画分 20 μ g をミニバキュームチューブに入れ、1 M HCl 80 μ l を加え窒素置換した後、100℃、6 時間加水分解した。加水分解したサンプルをエバポレーターで濃縮乾固し、滅菌 DW 500 μ l と水素化ホウ素ナトリウム（NaBH₄）2.5 mg を DW 100 μ l に溶解したものを氷上で加え、4℃で一晩反応させた。その後、酢酸を 1~2 滴加え反応を終了させ、イオン交換樹脂（Dowex 50、H form）1 g をパスツールピペット（5×100 mm）に詰めて作ったミニカラムを用いて、過剰のナトリウムを除去した。溶出液を濃縮乾固し、無水メタノール 3 ml を加え、50℃で 30 秒間反応させ濃縮乾固した。この操作を 2 度繰り返し、最終的に得られた残渣をピリジン 30 μ l と無水酢酸 20 μ l を加え、100℃、20 分間処理し、アセチル化した。

アセチル化サンプルを用いてガスクロマトグラフィー（GC）分析を行った。GC カラムは DB-1（30 m×0.25 mm）を、キャリアーガスには窒素を用い流速 2.8 ml/min で分析を行った。サンプル注入温度を 280℃、検出温度を 280℃にして、カラムオープン温度を始め 160℃で 3 分間、1 分間に 2℃ずつ上昇させ、150℃で 2 分間保持するように設定した。サンプルは水素炎イオン化検出器（FID）により検出した。

また、GC 分析と同様のサンプルを用いてガスクロマトグラフィー/質量分析（GC-MS）を行った。カラムは GC 分析と同様のものを用いて、キャリアーガスにはヘリウムを用い流速 23.8 ml/min で行った。サンプル注入温度を 130℃、カラムオープン温度を始め 130℃で 3 分間、1 分間に 2℃ずつ上昇させ、150℃で 2 分間になるように設定した。MS は JMS-AX505H

型 (JEOLDATUM) を用いて行った。コントロールとして D-マンノース、D-ガラクトースおよび D-グルコースにおいても GC および GC-MS 分析を行った。

1 2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

蛋白質サンプルを Laemmli (1970) の方法に従って SDS-PAGE により分析した。各サンプル 5 μ l に同量の Tris-SDS β ME SEPRASOL™ (第一化学薬品) を加え、60°C で 10 分間熱処理を行った。そのサンプルをグラジエントゲル (マルチゲル 10/20、第一化学薬品) に添加し、40 mA 定電流で約 1 時間泳動した。泳動緩衝液は SDS-トリスグリシン緩衝液 (第一化学薬品) を使用した。分離した蛋白質は銀染色キット (第一化学) で染色し、分子量は分子量マーカー (蛋白質分子量マーカー ‘第一’ III、第一化学) により推定した。

1 3) AB 毒素の純化

(i) 硫酸分画

O-264 孢子懸濁液 (10^6 個/ml) をキャベツ葉に 40 μ l ずつ滴下接種し、湿室プラスチックチャンバー内のスポンジマット上に置き、25°C 暗下で 24 時間静置培養した。回収した SGF に粉末硫酸アンモニウム $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]$ (硫酸) を 40% 飽和になるように徐々に攪拌しながら添加した。完全に溶解後 30 分間放置し、遠心分離 (15,000 $\times g$, 30 分, 4°C) により上清と沈殿物を得た。上清はさらに上記と同様な手順で粉末硫酸の飽和度を高め、それぞれの飽和度において得た沈殿物を DW に溶解した。この溶液を 10 kDa 限外濾過膜により脱塩した後、毒素活性の検定を行った。

(ii) 疎水クロマトグラフィー (HIC)

HIC 吸着体として Butyl-650M (TOYOPEARL) を使用し、カラム (2 \times 3 cm) に洗浄したゲルを充填した後、0.5 M 硫酸・0.5 mM DTT 含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) をカラム体積 2 倍量加え、平衡化した。サンプルとして硫酸沈殿により得た毒素活性画分を添加し、同緩衝液をカラム体積 2 倍量加えた。次に 0.25 M 硫酸・0.5 mM DTT 含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) をカラム体積 2 倍量、0.5 mM DTT 含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) をカラム体積 2 倍量加え溶出した。最後に DW をカラム体積 3 倍量加えて洗浄した。各溶出液を 10 kDa 限外濾過膜により脱塩した後、毒素活性の検定および蛋白質含量の測定を行った。

(iii) ゲル濾過クロマトグラフィー

HIC により得た毒素活性画分を Sephadex G-75 ゲル濾過カラム (Amersham Biosciences, 1.2×65 cm) により分離した。0.5 mM DTT 含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で溶出し、9 ml ずつ画分を分取した。各画分を 10 kDa 限外濾過膜により脱塩した後、毒素活性の検定および蛋白質含量の測定を行った。

(iv) SDS-PAGE

ゲル濾過クロマトグラフィーにより得た各画分を濃縮し、SDS-PAGE 解析を行った。各サンプル 5 μ l に同量の Tris-SDS β ME SEPRASOL™ を加え、60°C で 10 分間熱処理を行った。そのサンプルをグラジエントゲル (マルチゲル 10/20) に添加し、40 mA 定電流で約 1 時間泳動した。泳動緩衝液は SDS-トリスグリシン緩衝液を使用した。分離した蛋白質は CBB 染色液 (0.25% Coomassie brilliant blue R-250、25% メタノール、7.5% 酢酸を DW に加えたもの) により染色し、分子量は分子量マーカー (蛋白分子量マーカー ‘第一’ III) により推定した。

3 結果

1) 胞子の感染行動と発芽胞子からの AB 毒素生成

宿主植物（キャベツ、コマツナおよびナタネ）、非宿主植物（ニホンナシ、エンドウおよびトマト）の葉上およびプラスチックシャーレ上に O-264 の DW 胞子懸濁液（ 5×10^5 個/ml）を滴下接種し、24 時間後の胞子発芽率および毒素生成を調べた。宿主植物葉上では 90%以上の胞子発芽と顕著な毒素生成が認められた（Table 2）。一方、非宿主植物およびプラスチックシャーレ上においては、宿主葉と比較すると胞子発芽率は低く、毒素生成は全く認められなかった（Table 2）。

2) AB 毒素生成を誘導する宿主成分の検出

(1) 植物葉熱抽出液の毒素生成誘導活性

キャベツ、コマツナおよびエンドウ葉をオートクレーブ処理して得た葉熱抽出液に O-264 胞子を懸濁し、毒素生成誘導活性を調べた。その結果（Table 3）、宿主葉熱抽出液において若干の毒素生成誘導活性が認められたが、非宿主葉熱抽出液においては全く認められなかった。

(2) 植物葉磨碎液の毒素生成誘導活性

キャベツ、コマツナおよびエンドウ葉を液体窒素中で磨碎して得た磨碎液を遠心分離し、上清および沈殿画分を得た。各画分に O-264 胞子を懸濁し、毒素生成誘導活性を調べた結果（Table 4）、宿主植物葉磨碎液の沈殿画分においてのみ若干の毒素生成誘導活性が認められたが、他の画分においては全く認められなかった。

(3) 植物細胞壁画分の毒素生成誘導活性

宿主葉磨碎液沈殿画分において若干の毒素生成誘導活性が認められ、また以前の研究（岡 2001）において、宿主葉磨碎液に細胞壁分解酵素を処理して得た上清に毒素生成誘導活性が若干認められたことから、宿主葉細胞壁が毒素生成誘導に関与することが示唆された。そこで、キャベツ、コマツナおよびエンドウ葉から English et al. (1971) の方法と Kiba et al. (1995) の方法を改変して細胞壁画分を抽出し、毒素生成誘導活性を調べた。English et al.の方法で抽出した細胞壁画分においては、宿主葉細胞壁画分において誘導活性が認められた（Table 5）。また、Kiba et al.の方法により抽出した細胞壁画分においては、宿主ではコマツナ葉細胞壁

Table 2. Germination and toxin production of *A. brassicicola* spores on host and non-host leaves ^{a)}

Dropped on:	Rate of SG (%)	Toxicity of SGF ^{b)}
Host		
Cabbage	92 ± 11	++
Komatsuna	95 ± 8	++
Oilseed rape	98 ± 4	++
Non-host		
Japanese pear	41 ± 3	—
Pea	83 ± 9	—
Tomato	70 ± 39	—
Plastic plate	47 ± 14	—

a) Spore suspensions (5×10^5 spores/ml) of O-264 were dropped on various plant leaves and plastic plate. After 24 hr incubation, rate of spore germination (SG) (%) was measured. Spore suspensions were collected and SGFs were obtained. SGFs were dropped on wounded cabbage leaves and toxicity was observed after 48 hr incubation.

b) Toxicity is shown as ++: severe symptom and —: no symptom.

Table 3. Toxin-inducing activity of hot water extracts from host and non-host leaves ^{a)}

Hot water extract from:	Rate of SG (%)	Activity ^{b)}
Cabbage leaves	100	+
Komatsuna leaves	100	+
Pea leaves	100	—

a) For assay of toxin-inducing activity, spore suspensions (5×10^5 spores/ml) of O-264 in host water extracts from leaves were dropped on plastic plates and incubated for 24 hr. After spore germination (SG) was observed under a light microscope, spore suspensions were collected and SGFs were obtained. SGFs were dropped on wounded cabbage leaves, and toxicity was observed after 48 hr incubation.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves (+: slight symptom and —: no symptom).

Table 4. Toxin-inducing activity of homogenates of host and non-host plant leaves ^{a)}

Homogenate of:	Fraction	Rate of SG (%)	Activity ^{b)}
Cabbage leaves	Supernatant	100	—
	Pellet	100	±
Komatsuna leaves	Supernatant	100	—
	Pellet	100	±
Pea leaves	Supernatant	100	—
	Pellet	100	—

a) Homogenates of leaves were centrifuged and supernatant and pellet fractions were obtained. Spore suspensions (5×10^5 spores/ml) of O-264 in fractions were assayed for toxin-inducing activity. In the assay, rate of spore germination (SG) was also measured.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves (±: symptom at wound site and —: no symptom).

Table 5. Toxin-inducing activity of cell wall fractions extracted by according to the protocol of English et al. (1971) from etiolated seedlings of host and non-host plants ^{a)}

Cell wall fraction from:	Exp. 1		Exp. 2	
	Rate of SG (%)	Activity ^{b)}	Rate of SG (%)	Activity ^{b)}
Cabbage	88	—	94	+
Komatsuna	89	+	92	+
Pea	88	—	92	—
Cucumber	93	±	95	—

a) Spore suspensions (5×10^5 spores/ml) of O-264 in cell wall extract from leaves of host and non-host plants were assayed for toxin-inducing activity. In the assay, rate of spore germination (SG) was also measured.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves (+: slight symptom, ±: symptom at wound site and —: no symptom).

画分において若干の誘導活性が見られたが、キャベツ葉細胞壁画分では全く活性がみられなかった (Table 6)。一方、非宿主葉細胞壁画分においては若干の活性がみられたが、一定した活性ではなかった (Table 6)。

(4) 植物葉上の SGF の毒素生成誘導活性

宿主および非宿主植物葉に O-264 の DW 孢子懸濁液を滴下接種し、24 時間培養後に SGF を得た。SGF を熱処理して SGF 中に存在する毒素を失活させた後、毒素生成誘導活性を調べた。その結果 (Table 7)、全ての宿主葉上より得た SGF において著しい毒素生成誘導活性が認められた。一方、非宿主葉においては活性が認められなかった。

3) 宿主植物葉上における孢子発芽時の AB 毒素生成の誘導機構

(1) 植物葉上 SGF の毒素生成誘導活性の経時的変化

キャベツ葉上に O-264 の DW 孢子懸濁液を滴下接種し、一定時間毎に孢子発芽率を測定後に滴下液を回収した。SGF の毒素活性を検定した後、SGF を熱処理し、毒素生成誘導活性を調べた。その結果 (Fig. 1)、O-264 孢子は接種後 3 時間目から発芽し始め、12 時間後には 100%の孢子発芽率となった。また、SGF の毒素生成は接種後 6 時間目以降から認められ、培養時間が経過するに従って増大した。毒素生成誘導活性は孢子が発芽し始める 3 時間目以降から検出され、12 時間目まで増大した。

(2) *A. alternata* SGF の毒素生成誘導活性

キャベツに非病原菌である *A. alternata* O-276 および O-94 の DW 孢子懸濁液をキャベツ葉およびプラスチックシャーレ上に滴下接種し、24 時間培養後に回収した SGF における AB 毒素生成誘導活性を調べた。比較のため、O-264 孢子においても同様の検定を行った。その結果 (Table 8)、*A. alternata* の両菌株から得た SGF においては全く誘導活性を示さなかった。一方、病原菌の O-264 から得た SGF においては顕著な誘導活性を示した。

(3) プラスチックシャーレ上 O-264 SGF で処理した宿主葉からの浸出液の毒素生成誘導活性

以上の結果より、AB 毒素生成誘導因子が宿主葉上の O-264 SGF においてのみ存在していることが示唆された。そこで、本因子が宿主植物由来か、または病原菌孢子由来かについて調べた。プラスチックシャーレ上に O-264 の DW 孢子懸濁液を滴下し、24 時間培養後に回

Table 6. Toxin-inducing activity of cell wall fractions extracted by according to the protocol of Kiba et al. (1995) from etiolated seedling of host and non-host plants ^{a)}

Cell wall fraction from:	Exp.1		Exp.2	
	Rate of SG (%)	Activity ^{b)}	Rate of SG (%)	Activity ^{b)}
Cabbage	94	—	92	—
Komatsuna	85	±	100	±
Pea	64	±	35	—
Cucumber	97	—	27	±

a) Spore suspensions (5×10^5 spores/ml) of O-264 in cell wall fractions from etiolated seedlings of host and non-host plants were assayed for toxin-inducing activity. In the assay, rate of spore germination (SG) was also measured.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves (±: symptom at wound site and —: no symptom).

Table 7. Toxin-inducing activity of spore germination fluids (SGFs) of *A. brassicicola* (O-264) on various plant leaves ^{a)}

Plant family	Plant species	Activity ^{b)}
Cruciferae	<i>Brassica campestris</i> (Komatsuna) cv. Rakuten	++
	<i>B. juncea</i> (leaf mustard)	++
	<i>B. napus</i> (oilseed rape) cv. Wester	++
	<i>B. oleracea</i> (cauliflower) cv. Snow crown	++
	<i>B. oleracea</i> (cabbage) cv. Shoshu	++
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> (cucumber) cv. Tsubasa	—
Rosaceae	<i>Pyrus pyrifolia</i> (Japanese pear) cv. Nijisseiki	—
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato) cv. Momotaro	—

a) Spore suspensions (10^6 spores/ml) in water were placed on leaves. After incubation for 24 hr, SGFs were heated for 15 min at 100°C and assayed for toxin-inducing activity.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. ++: severe symptom, —: no symptom.

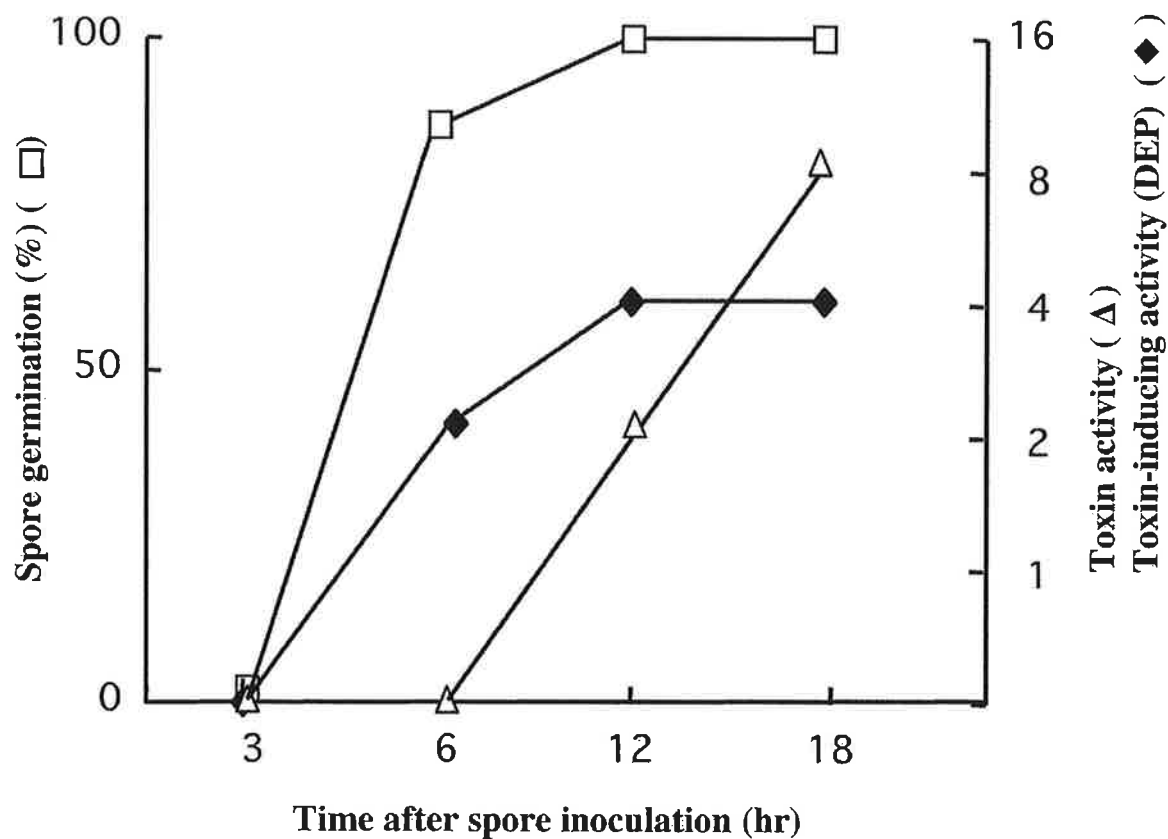


Fig. 1. Time course of toxin-inducing activity in spore germination fluids (SGFs) of *A. brassicicola* (O-264) incubated on cabbage leaves. Spore suspensions (10^6 spores/ml) in water were dropped on cabbage leaves and incubated for 0~18 hr. After spore germination percentages (□) in droplet solutions were determined, SGFs were assayed for toxin activity (Δ) and toxin-inducing activity (◆). Both activities are shown by dilution end point (DEP) of the solution that gave toxicity to cabbage leaves.

Table 8. Toxin-inducing activity of spore germination fluids (SGFs) of *Alternaria* isolates on cabbage leaves and plastic plates ^{a)}

Spore suspension of	Placed on	Activity ^{b)}
<i>A. brassicicola</i> (O-264)	Cabbage	++
	Plastic plate	—
<i>A. alternata</i> Japanese pear pathotype (O-276)	Cabbage	—
	Plastic plate	—
<i>A. alternata</i> saprophyte (O-94)	Cabbage	—
	Plastic plate	—

a) Spore suspensions (10^6 spores/ml) in water were placed on cabbage leaves and plastic plates. After incubation for 24 hr, SGFs were heated for 15 min at 100°C and assayed for toxin-inducing activity.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. ++: severe symptom, —: no symptom.

収した SGF を宿主および非宿主葉上に滴下した。24 時間培養後に滴下液を回収し、AB 毒素生成誘導活性を調べた。その結果 (Table 9)、宿主葉上に滴下した SGF では顕著な誘導活性が認められたが、非宿主葉上に滴下した SGF や宿主および非宿主葉上に滴下した DW では全く活性は認められず、毒素生成誘導因子は宿主植物由来であることを示した。

4) AB 毒素生成誘導因子の純化

以上の結果から、宿主葉上での *A.brassicicola* SGF には AB 毒素生成誘導因子が存在していることが示唆されたので、SGF から本因子の純化を試みた。

(1) 有機溶媒抽出

キャベツ葉から得た O-264 SGF を熱処理し、濃縮乾固した後、各有機溶媒を入れ、溶解画分と非溶解画分を得、各画分における毒素生成誘導活性を調べた。その結果 (Table 10)、活性はアセトンおよび酢酸エチルの非溶解画分とメタノールの両画分においてみられた。

(2) Sep-pak C₁₈ カラムによる抽出

キャベツ葉から得た O-264 SGF を熱処理し、Sep-pak C₁₈ カラムを用いて逆相クロマトグラフィーを行った。カラム非吸着画分および 100%メタノール溶出画分 (吸着画分) において毒素生成誘導活性を調べた結果 (Table 11)、非吸着画分にのみ活性がみられた。

(3) 限外濾過膜による分画

キャベツ葉から得た O-264 SGF を熱処理し、5 kDa および 10 kDa 分画用のモルカット II または 3 kDa 分画用のウルトラフリー15 により分画し、各画分における毒素生成誘導活性を調べた。その結果 (Table 12)、活性は 10 kDa 以下、5 kDa 以上および以下、3 kDa 以上の画分においてみられた。

(4) 過ヨウ素酸および各種酵素処理

誘導因子が蛋白質か糖かを調べるために、キャベツ葉から得た O-264 SGF を熱処理し、500 µg/ml proteinase K または、0.125~1 mM の過ヨウ素酸カリウム (KIO₄) 溶液を処理し、毒素生成誘導活性を調べた。その結果 (Fig. 2)、proteinase K 処理における活性への影響はみられず、1 mM KIO₄ 処理において完全に活性は消失した。以上のことより、本誘導活性には糖が関与することが示唆された。そこで各種糖分解酵素を処理した結果 (Fig. 2)、α-mannosidase 処理により活性は完全に消失した。また、β-glucosidase 処理においても若干活性は低下した

Table 9. Toxin-inducing activity of diffusates from leaves of host and non-host plants treated with spore germination fluids (SGFs) of *A. brassicicola* (O-264) on plastic plates ^{a)}

Treatment	Diffusate from	Activity ^{b)}
SGF	Cabbage	++
	Komatsuna	+
	Oilseed rape	+
	Cucumber	—
	Japanese pear	—
	Tomato	—
DW	Cabbage	—
	Japanese pear	—

a) Spore suspensions (10^5 spores/ml) in water were placed on plastic plates and incubated for 24 hr. SGFs and water on plastic plates were transferred on host and non-host leaves. After 24 hr incubation, the solution droplets containing diffusates from leaves were assayed for toxin-inducing activity.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. ++: severe symptom, +: slight symptom, —: no symptom.

Table 10. Toxin-inducing activity of solvent-soluble and insoluble fractions from SGF ^{a)}

Solvent	Fraction	Activity ^{b)}
Acetone	Soluble	—
	Insoluble	+
Ethyl acetate	Soluble	—
	Insoluble	+
Methanol	Soluble	+
	Insoluble	+

a) SGF of O-264 from cabbage leaves was evaporated and extracted with solvents. Solvent-soluble and insoluble fractions were dissolved in DW and assayed for toxin-inducing activity.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. +: symptom, —: no symptom.

Table 11. Toxin-inducing activity of absorbed and passed fractions in reverse phase column chromatography with Sep-pak C₁₈ cartridge of SGF ^{a)}

Fraction	Activity ^{b)}
Adsorbed fraction (100% MeOH elution)	—
Passed fraction (DW elution)	+
SGF	+

a) SGF of O-264 from cabbage leaves was chromatographed with Sep-pak C₁₈ cartridge. Absorbing fraction was evaporated and dissolved in DW. Absorbed and passed fractions were assayed for toxin-inducing activity.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. +: symptom, —: no symptom.

Table 12. Toxin-inducing activity of low and high molecular weight fractions obtained by ultrafiltration of SGF

Ultrafiltration ^{a)}	Activity ^{b)}
> 10 kDa	—
< 10 kDa	+
> 5 kDa	+
< 5 kDa	+
> 3 kDa	+
< 3 kDa	—
SGF	+

a) SGFs of O-264 from cabbage leaves were filtrated by ultrafiltration across 3 kDa, 5 kDa and 10 kDa membranes. The fractions were assayed for toxin-inducing activity.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. +: symptom, —: no symptom.

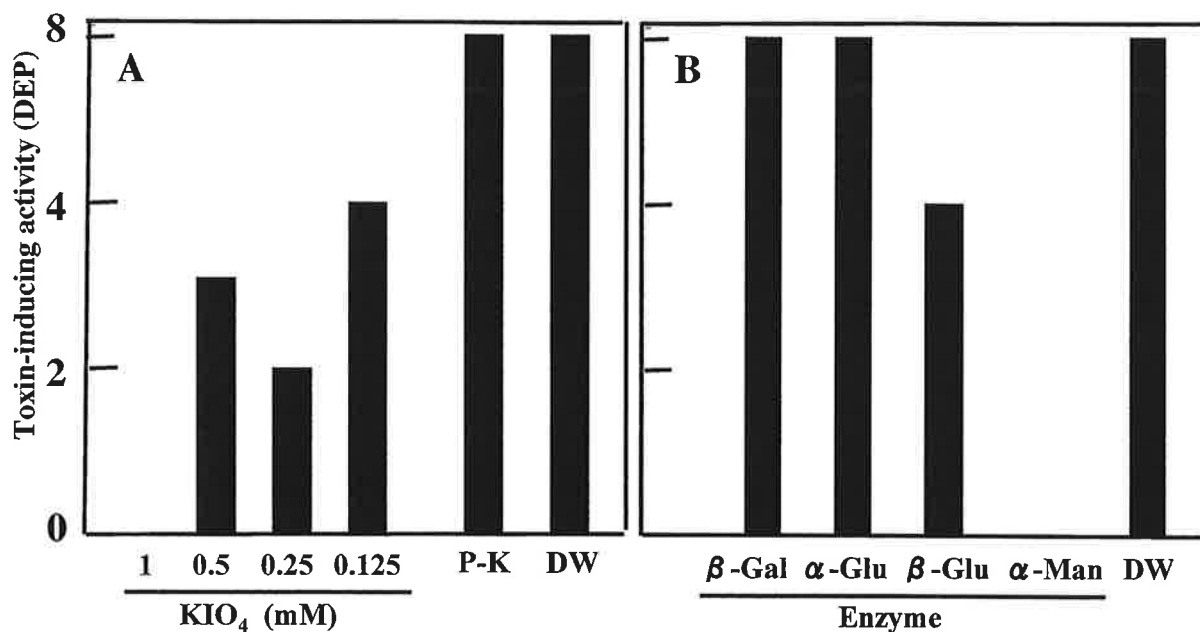


Fig. 2. Effect of chemical treatments on toxin-inducing activity of spore germination fluids (SGFs) of *A. brassicicola* (O-264). (A) SGFs from cabbage leaves were treated with KIO_4 at various concentrations and proteinase K (P-K) at 500 μ g/ml. (B) SGFs from cabbage leaves were treated separately with 10 units each of β -galactosidase (β -Gal), α -glucosidase (α -Glu), β -glucosidase (β -Glu) and α -mannosidase (α -Man). After KIO_4 and enzymes in the reactions were removed by ultrafiltration, toxin-inducing activity in SGF samples was evaluated using bioassay. Activity is shown by dilution end point (DEP) of the solution that gave toxicity to cabbage leaves.

が、それ以外の酵素では全く影響はなかった。

(5) 各種ゲル濾過クロマトグラフィーによる分画

キャベツ葉上から得た SGF (100 ml) を濃縮して 1 ml にし、それぞれ Sephadex G-25 Coarse および G-50 Coarse ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、溶出液を 5 ml ずつ集め、各画分における毒素生成誘導活性を調べた。Sephadex G-25 Coarse ゲル濾過クロマトグラフィーでは、 V_0 およびその付近 (溶出量 30-50 ml) に活性が見られ、多量の糖および蛋白質が検出された (Table 13)。一方、Sephadex G-50 Coarse ゲル濾過クロマトグラフィーでは V_0 より遅れた画分 (溶出量 45-55 ml) に活性が見られ、糖は検出されたが蛋白質は殆ど検出されなかった (Table 14)。以上のことより、Sephadex G-50 Coarse ゲル濾過クロマトグラフィーにより得た活性画分の方が純度が高いと考えられ、この画分をさらに Sephadex G-50 Superfine ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画した。溶出液を 5 ml ずつ集め、各画分における毒素生成誘導活性を調べた結果 (Table 15)、溶出量 130-135 ml の画分において活性が見られた。また、活性画分には少量の糖が含まれており、蛋白質は検出されなかった。G-50 Superfine ゲル濾過クロマトグラフィーにより得た活性画分を濃縮し、ゲル濾過 HPLC により分析した結果 (Fig. 3)、溶出時間 (Rt) 7.75 分に単一のピークが検出された。既知分子量のプルランをスタンダードとした分子量解析により本ピークは約 1.3 kDa であると推定された。本ピークを分取した画分を各濃度に調整し、毒素生成誘導活性を調べた結果 (Table 16)、0.02 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度まで活性を示した。なお、本因子の SGF からの純化手順を Fig. 4 に示した。

(8) GC による構成糖分析

ゲル濾過 HPLC により得た純化誘導因子を加水分解し、アセチル化した後、GC により分析した。スタンダードとして、D-マンノース、D-ガラクトースおよび D-グルコースを同様にアセチル化し、GC により分析した。その結果 (Fig. 5)、マンノースが Rt:19.99 分、ガラクトースが Rt:20.30 分、グルコースが Rt: 20.67 分であった。一方、誘導因子は 3 つの主要なピークが検出され、ピーク I は Rt:19.99 分、ピーク II は Rt:20.30 分、ピーク III は Rt:20.59 分であった (Fig. 5)。さらに、純化誘導因子の加水分解物を GC-MS により解析した結果、予想される単糖のスペクトル (m/z 115、145 および 187) がピーク I および II においては検出されたが、ピーク III には検出されなかった (データなし)。

(9) SDS-PAGE による発現蛋白質解析

ゲル濾過 HPLC により得た純化誘導因子で処理した O-264 胞子懸濁液をプラスチックシ

Table 13. Toxin-inducing activity of fractions by Sephadex G-25 Coarse column chromatography of SGF ^{a)}

Fraction No.	Elution volume (ml)	Activity ^{b)}	Sugar content (ppm)	Protein content (ppm)
1	20-25	—	0.5	8.1
2	25-30	—	2.6	1.5
3 (Vo)	30-35	+	88.4	58.1
4 (Vo)	35-40	+	100.0	105.8
5	40-45	+	61.7	69.7
6	45-50	+	48.3	51.4
7	50-55	—	42.0	44.9
8	55-60	—	40.8	66.8
9	60-65	—	41.3	77.0

a) SGF of O-264 from cabbage leaves was chromatographed on SephadexG-25 Coarse column (1.5×90 cm) and fractions (5 ml) of the elutions were collected. The fractions were assayed for toxin-inducing activity. Protein and sugar contents of the fractions were also determined.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. +: symptom, —: no symptom.

Table 14. Toxin-inducing activity of fractions by Sephadex G-50 Coarse column chromatography of SGF ^{a)}

Fraction No.	Elution volume (ml)	Activity ^{b)}	Sugar content (ppm)	Protein content (ppm)
1	20-25	—	7.1	8.2
2	25-30	—	6.3	1.8
3 (Vo)	30-35	—	24.1	14.7
4 (Vo)	35-40	—	27.6	13.5
5	40-45	—	23.0	16.6
6	45-50	+	17.2	7.3
7	50-55	+	18.5	9.5
8	55-60	—	19.8	5.9
9	60-65	—	29.1	8.2
10	65-70	—	68.8	27.3

a) SGF of O-264 from cabbage leaves was chromatographed on Sephadex G-50 Coarse column (1.5×60 cm) and fractions (5 ml) of the elution were collected. The fractions were assayed for toxin-inducing activity. Protein and sugar contents of the fractions were also determined.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. +: symptom, —: no symptom.

Table 15. Toxin-inducing activity of fractions by Sephadex G-50 Superfine column chromatography of active fraction obtained from Sephadex G-50 Coarse column chromatography ^{a)}

Elution volumn (ml)	Activity ^{b)}	Sugar content (ppm)
70 — 75 (Vo)	—	1.8
75 — 80	—	2.1
80 — 85	—	0.6
85 — 90	—	1.2
90 — 95	—	3.1
95 — 100	—	7.0
100 — 105	—	8.1
105 — 110	—	11.0
110 — 115	—	17.4
115 — 120	—	24.1
120 — 125	—	27.3
125 — 130	—	34.1
130 — 135	+	19.9
135 — 140	—	10.7
140 — 145	—	7.5
145 — 150	—	2.1
150 — 155	—	1.9

a) Active fractions obtained from Sephadex G-50 Coarse column chromatography were combined and chromatographed on Sephadex G-50 Superfine column (1.5×90 cm). The fractions (5 ml) of the elution were collected and assayed for toxin-inducing activity. Sugar contents of fractions were also measured.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. +: symptom, —: no symptom.

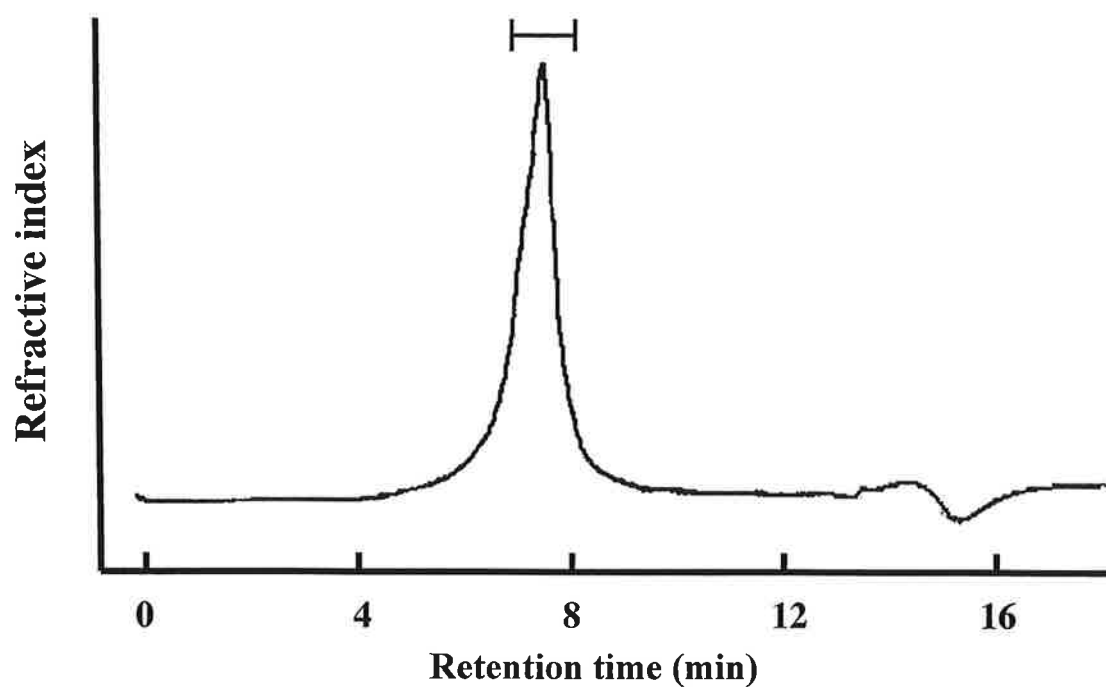


Fig. 3. Gel filtration HPLC of the active fraction obtained by Sephadex G-50 Superfine column chromatography. Column; GSM-700H (7.5×250 mm), solvent; water, flow rate; 1 ml/min, detector; RID-6A.

Table 16. Toxin-inducing activity of active fraction by gel filtration HPLC

Concentration ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}	Activity ^{b)}
20	+
10	+
2	+
1	+
0.2	+
0.1	+
0.02	+
0.01	—
0.002	—

a) Active fraction obtained by gel filtration HPLC was evaporated and weight was measured. The fraction was dissolved in DW at various concentrations, and assayed for toxin-inducing activity.

b) Activity is shown by toxicity to cabbage leaves. +: symptom, —: no symptom.

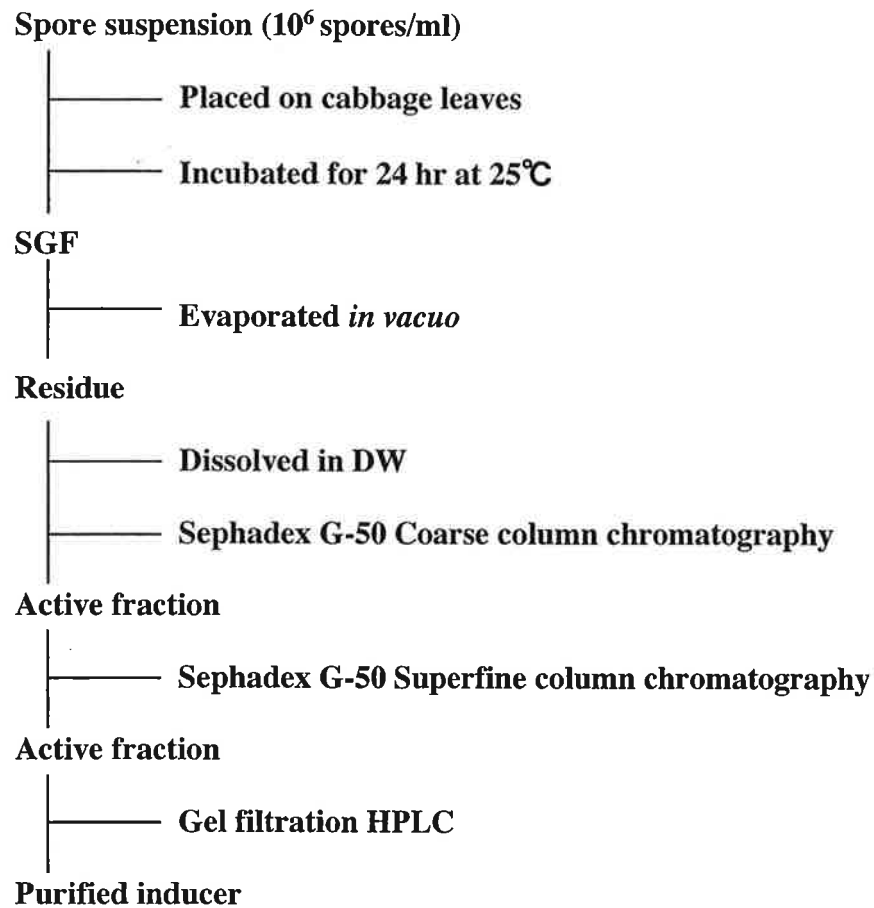


Fig. 4. Scheme for purification of inducer for AB-toxin production from SGF.

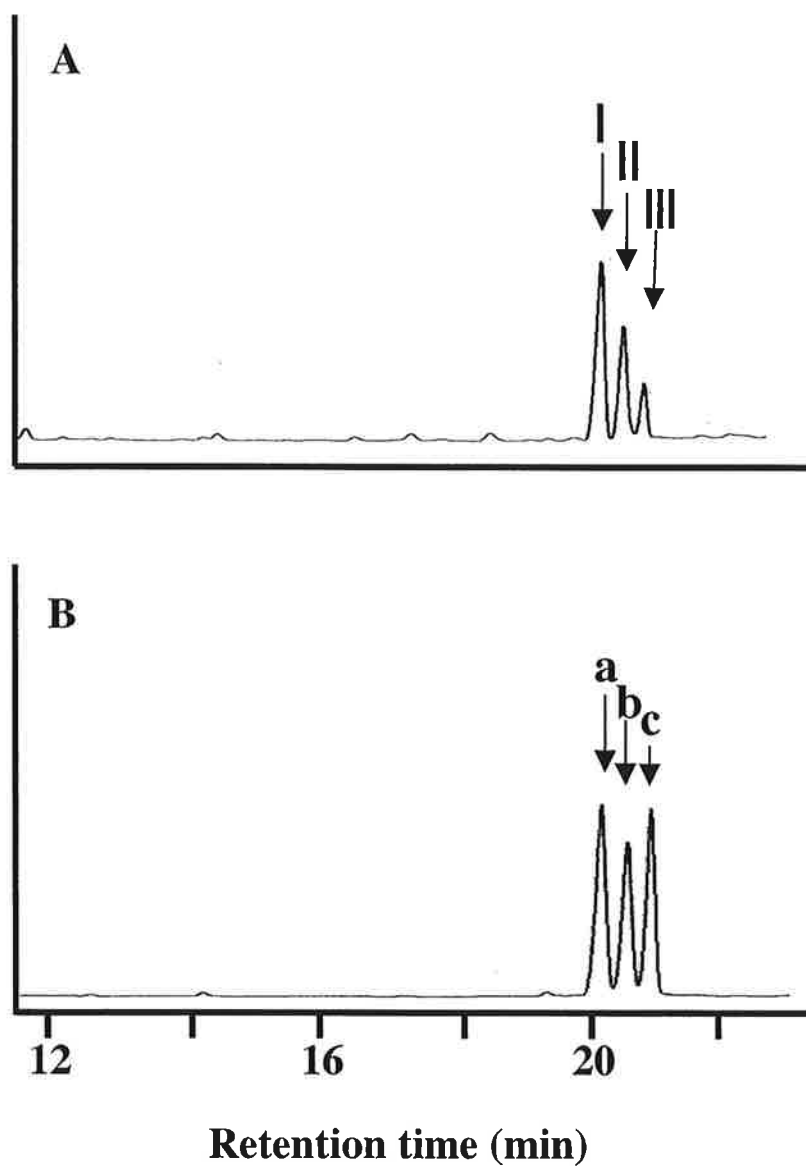


Fig. 5. Gas chromatography (GC) of the active fraction obtained by gel filtration HPLC. (A) GC profile of acetylated derivatives from the hydrolyzed active fraction. I, II and III shown in figure are major peaks. (B) GC profile of acetylated D-mannose (a), D-galactose (b) and D-glucose (c) used as standards. Column, DB-1 (30 m×0.25 mm); carrier gas, N₂; flow rate, 2.8 ml/min; detector, FID.

ヤーレ上に滴下し、24 時間培養後に回収した SGF において SDS-PAGE 解析をおこなった。その結果 (Fig. 6, lane 1)、約 38 kDa に顕著なバンドが観察され、その他にも、いくつか薄いバンドがみられた。一方、コントロールとして、O-264 の DW 胞子懸濁液を同様に培養して得た SGF (Fig. 6, lane 3) や誘導因子のみ (Fig. 6, lane 2) においても SDS-PAGE 解析を行ったが、38 kDa 付近にバンドは観察されなかった。

5) AB 毒素の純化

キャベツ葉上に O-264 の DW 胞子懸濁液を滴下接種し、24 時間培養後に回収して得た SGF 中に存在する宿主特異的 AB 毒素の純化を試みた。

まず、SGF 100 ml に粉末硫安を順次 40%、80%および 100%飽和になるように加え、遠心分離により沈殿物を得た。各沈殿物を DW 4 ml に溶解し脱塩した後、毒素活性を調べた結果 (Table 17)、40~80%の飽和画分において希釈限界値 32 倍まで毒素活性を示した。次に、硫安画分により得た活性画分を疎水性クロマトグラフィーにより分画し、各画分の毒素活性および蛋白質含量を調べた結果 (Table 18)、非吸着画分において希釈限界値 8 倍まで活性がみられ、0.25 M 硫安含有リン酸緩衝液により溶出された画分においても希釈限界値 4 倍まで活性が見られた。なお、両画分において多量の蛋白質が存在した。さらに、疎水性クロマトグラフィーにより得た活性画分 (非吸着画分) を Sephadex G-75 ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し、各画分の毒素活性および蛋白質含量を調べた。その結果 (Table 19)、溶出量 36-63 ml において希釈限界値 8 倍まで活性がみられた。Sephadex G-75 ゲル濾過クロマトグラフィーにより得た画分 (No.1~7) を濃縮し、SDS-PAGE 解析を行った結果 (Fig. 7)、画分 No.1~5 において多くのバンドが検出された。Table 19 において毒素活性の強かった No.3 および No.4 では、約 38 kDa 付近に顕著なバンドが検出された。

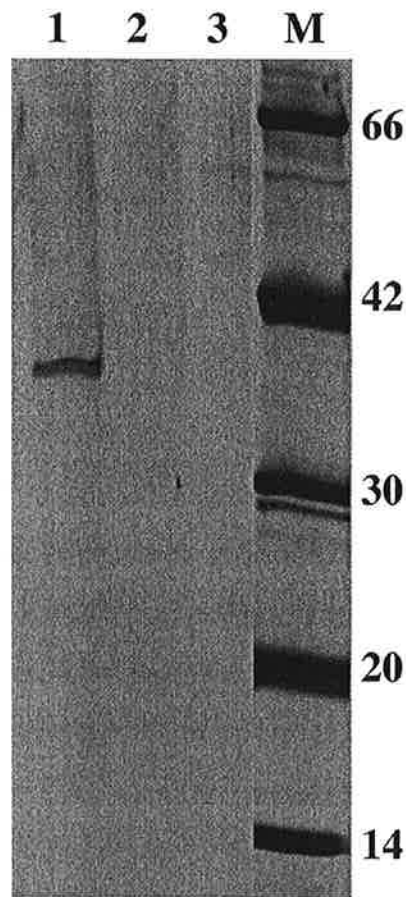


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of spore germination fluids (SGFs) from *A. brassicicola* (O-264) treated with the active fraction on plastic plates. Spore suspension (5×10^5 spores/ml) supplied with the active fraction ($4 \mu\text{g/ml}$) (lane 1), solution containing the active fraction (lane 2) and spore suspension in water (lane 3) were incubated for 24 hr on plastic plates. A 10-fold concentration of the sample was electrophoresed and proteins were detected by silver staining. Molecular weight marker (lane M) is indicated on the right of the gel in kiloDalton.

Table 17. Toxicity of fractions by ammonium sulfate $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ precipitation of SGF of *A. brassicicola* ^{a)}

Fraction	Toxicity ^{b)}					
	Dilution					
	×1	×2	×4	×8	×16	×32
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ conc.						
0-40%	0.0					
40-80%	2.5	1.5	2.0	1.5	1.0	0.5
80-100%	0.0					
DW	0.0					

a) Proteins were precipitated from 100 ml SGF of *A. brassicicola* (O-264) with 0-40%, 40-80% and 80-100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation at 4°C. Proteins were pelleted by centrifugation and dissolved in 4 ml DW. The solutions were serially diluted with DW and assayed for toxicity.

b) Toxicity is shown as 0-3 values. 0: no symptoms, 1: slightly chlorosis, 2: moderate chlorosis, 3: severe chlorosis. Each value is the average of three replications.

Table 18. Toxicity of fractions by hydrophobic interaction chromatography (HIC) ^{a)}

Fraction	Toxicity ^{b)}				Protein conc. (μg/ml)
	Dilution				
	×1	×2	×4	×8	
Passed fraction	2.3	2.0	2.0	2.0	321.6
Adsorbed fraction					
0.25 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0.7	0.3	1.0	0.0	172.6
0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0.0	0.0	NT		83.5
Washing fraction (DW)	0.0	0.0	NT		50.5

a) Toxic fraction by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation as applied to HIC (Butyl-TOYOPEARL, 2 \times 3 cm). The adsorbed fraction was eluted with 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) consisting of 0.25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or only buffer. Finally, the column was loaded with DW. Each fraction was collected and concentrated by ultrafiltration 10 kDa membrane. After protein contents in the fractions were determined, the fractions were serially diluted with DW and assayed for toxicity.

b) Toxicity is shown as 0-3 values. 0: no symptoms, 1: slightly chlorosis, 2: moderate chlorosis, 3: severe chlorosis. NT : not test. Each value is the average of three replications.

Table 19. Toxicity of fractions by Sephadex G-75 column chromatography ^{a)}

Fraction No.	Elution volume (ml)	Toxicity ^{b)}				Protein conc. (µg/ml)
		Dilution				
		×1	×2	×4	×8	
1	27-36 (Vo)	0.0	NT			166.8
2	36-45	1.5	2.0	1.0	1.0	157.8
3	45-54	2.5	2.5	2.0	1.0	126.6
4	54-63	2.3	2.5	1.0	1.0	66.9
5	63-72	0.7	0.0	NT		61.7
6	72-90	0.0	NT			43.7
7	90-120	0.0	NT			10.6

a) The toxic fraction (passed fraction) by HIC was chromatographed on Sephadex G-75 column (1.2×65 cm). The eluted fractions were concentrated by ultrafiltration 10 kDa membrane. After protein contents in the fractions were determined, the fractions were serially diluted with DW and assayed for toxicity.

b) Toxicity is shown as 0-3 values. 0: no symptoms, 1: slightly chlorosis, 2: moderate chlorosis, 3: severe chlorosis. NT : not test. Each value is the average of three replications.

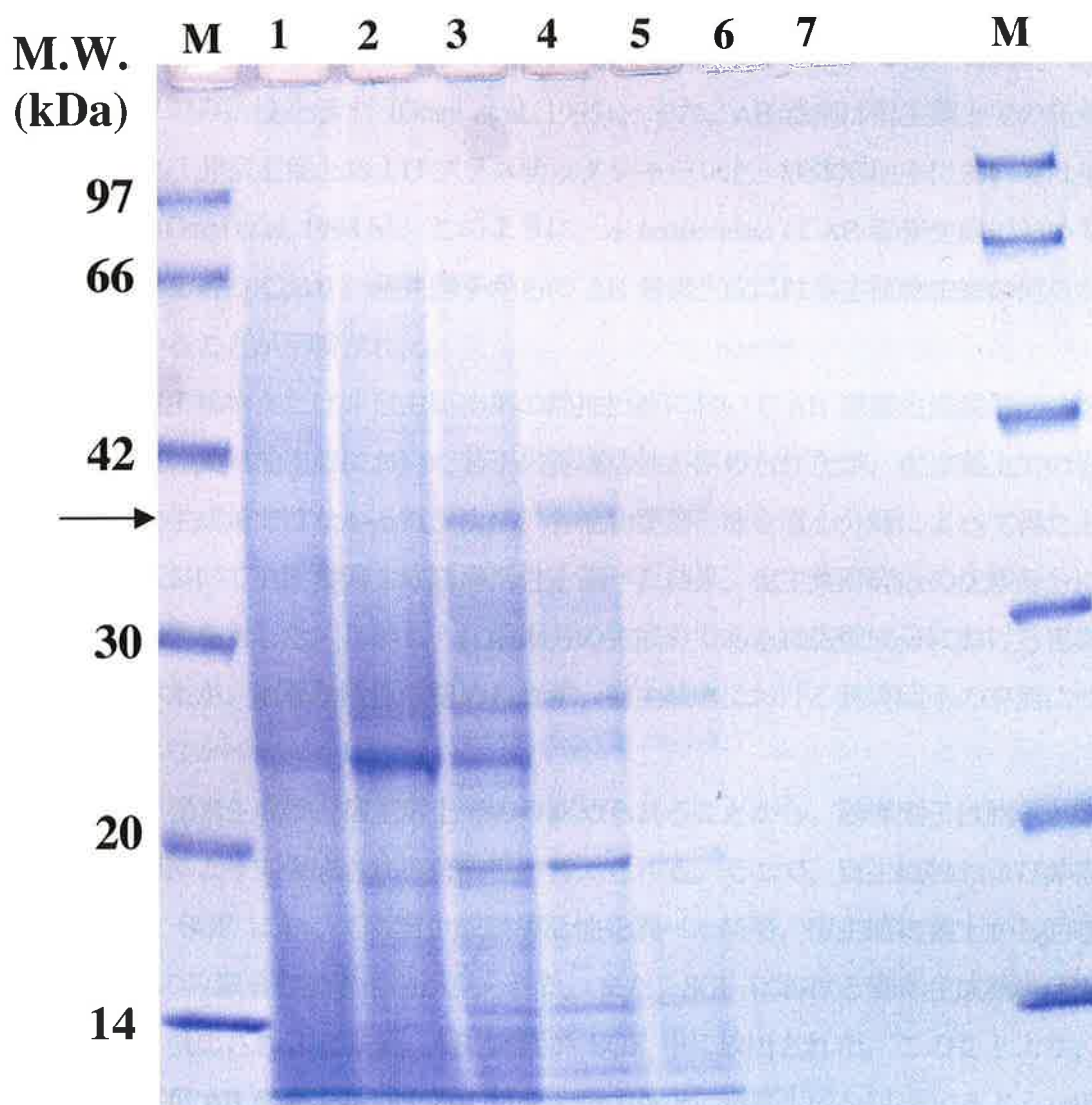


Fig. 7. SDS-PAGE of fractions by Sephadex G-75 column chromatography. Each fraction (200 μ l) was concentrated and electrophoresed. Proteins were detected by CBB staining. Lanes 1~7 show fraction numbers obtained by Sephadex G-75 column chromatography. Lane M is molecular weight markers. Arrow shows 38 kDa protein.

4 考察

Alternaria brassicicola は多数のアブラナ科植物に及ぶ広い範囲の宿主に病原性を示す (Cooke et al. 1997)。 *A. brassicicola* によって生成される蛋白質毒素である宿主特異的 AB 毒素は本菌の宿主にのみ活性を示す (Otani et al. 1995)。 また、AB 毒素は宿主葉上での発芽孢子により生成され、非宿主葉上およびプラスチックシャーレ上、液体培地中においては生成が認められない (Otani et al. 1998 b)。 このように、 *A. brassicicola* は AB 毒素生成において大変ユニークな特性を持っており、発芽孢子からの AB 毒素生成には宿主植物由来の何らかの因子が関与していることが示唆された。

そこでまず、宿主植物または非宿主植物葉の熱抽出液において AB 毒素生成誘導活性を調べた結果、宿主植物葉熱抽出液において若干の誘導活性が認められたが、宿主葉上での毒素生成ほどの顕著な生成量ではなかった。 次に、各植物葉磨砕液を遠心分離によって得た上清および沈殿画分において AB 毒素生成誘導活性を調べた結果、宿主葉磨砕液の沈殿画分において若干の誘導活性を示した。 しかし、沈殿画分の主成分である細胞壁成分における毒素生成誘導活性を調べたが、顕著な活性は認められず、宿主植物における誘導因子の有無については明確にはできなかった。

発芽孢子の AB 毒素生成は、宿主葉上でのみ認められることから、誘導因子は孢子と宿主植物との相互作用によって生成される可能性が考えられる。 そこで、宿主植物および非宿主植物葉上より得た SGF において毒素生成誘導活性を調べた結果、宿主植物葉上から回収した SGF においてのみ顕著な誘導活性が見られた。 また、SGF における毒素生成誘導活性は孢子発芽直後より検出され、その後、AB 毒素が SGF 中に放出された。 このことより、宿主葉上でのみ本菌が AB 毒素を生成するのは、非宿主葉上に毒素生成を阻害するような因子が存在するからではなく、宿主葉からの SGF 中に AB 毒素生成を誘導する何らかの因子が存在するからであると思われた。

そこで、SGF 中の毒素生成誘導因子が宿主由来かどうか調べるために、プラスチックシャーレ上より回収した SGF を宿主および非宿主葉上に滴下し、24 時間後にその滴下液の毒素生成誘導活性を検討した。 その結果、宿主葉上の滴下液のみ顕著な誘導活性が認められ、本因子は宿主由来であり、発芽孢子からの何らかの因子によって宿主葉より遊離してくる物質であることが示唆された。 また、興味深いことに、本因子は *A. brassicicola* の SGF 中のみ遊離され、他の *Alternaria* 属菌の SGF 中には遊離されなかったことより、毒素生成誘導因子の遊離は本病原菌に特異的であることが考えられる。

SGF 中の毒素生成誘導因子は熱に安定な水に可溶な物質であり、その活性は KIO_4 や α -

mannosidase 処理によって完全に消失したが、proteinase K 処理には全く影響されなかった。このことより、本因子は α -マンノースからなる構造が誘導活性に関与する多糖類である可能性が示唆された。SGF から各種クロマトグラフィーによって精製した誘導因子をゲル濾過 HPLC 分析した結果、単一ピークとして検出され、分子量約 1.3 kDa と推定された。本画分は 20 ng/ml の低濃度まで誘導活性を示した。さらに、この純化画分を GC および GC-MS により分析した結果、本因子は D-マンノースおよび D-ガラクトースからなる配糖体であることが示唆され、このことは酵素処理の実験結果とも一致した。プラスチックシャーレ上に本誘導因子を処理して得た SGF を SDS-PAGE によって解析した結果、約 38 kDa のバンドが顕著に検出され、本誘導因子によって発芽胞子から主に AB 毒素が生産されることが示唆された。しかし、以前の報告 (Otani et al. 1998 a) において、AB 毒素の分子量は約 35 kDa と推定されており、今回の結果における分子量の差異がどうして生じたのかは明らかではないが、AB 毒素の構造が SGF からの精製過程において変化した可能性も考えられる。なお、今回の SDS-PAGE 解析において 38 kDa 以外の数個の薄いバンドが検出されたが、これらは *A. brassicicola* 胞子発芽時に宿主葉より毒素生成誘導因子を遊離するための細胞壁分解酵素である可能性があり、今後、検討する必要がある。

一方、AB 毒素の化学構造は明らかになっていないことより、SGF からの毒素の純化を試みた。SGF の硫酸分画により得た活性画分を疎水性クロマトグラフィー、Sephadex G-75 ゲル濾過クロマトグラフィーで順次分画して活性画分を得た。活性画分を SDS-PAGE で分析した結果、約 38 kDa にバンドが検出されたが、その他にも多数のバンドが検出され、不純物が多く含まれており、純化には至らなかった。さらに他の方法を用いて純化を進め、構造解析を行う必要がある。

今回の研究により、*A. brassicicola* の発芽胞子による AB 毒素生成機構に関しては、(i) 発芽胞子による宿主葉からの配糖体である誘導因子の生成、(ii) 宿主由来の配糖体による発芽胞子中の AB 毒素の誘導、(iii) 発芽胞子からの AB 毒素の放出、という一連の図式が想定される。このような病原糸状菌の発芽胞子による HST 生産が宿主との相互作用によって誘導される例は世界で初めてのことである。

最近、Quayyum et al. (2003) は、アメリカニンジンに *Alternaria blight* 病を引き起こす *A. panax* の生産する HST (AP 毒素) は 35 kDa の蛋白質であり、宿主葉上でのみ生産され、非宿主葉上では生産されないことを報告した。このように、宿主植物を介した HST 生産は蛋白質 HST の一つの特徴と考えられる。したがって、*A. panax* の発芽胞子による AP 毒素生成においても、今回の研究と同様な検討を行えば、宿主由来の何らかの因子が HST 生成に関与していることが明らかとなるかもしれない。なお、蛋白質 HST としては、すでにコムギ tan spot

病を引き起こす *Pyrenophora tritici-repentis* によって生成される Ptr Tox A (Balance et al. 1989; Tomas et al. 1990; Tuori et al. 1995) および Ptr ToxB (Strelkov et al. 1999) が明らかとなっている。本 HST は、液体培地中においても植物上と同様に生産されるが、今後、HST の探索を宿主植物上での病原菌の SGF に注目して行えば、新たな蛋白質 HST の発見となるかもしれない。

宿主植物由来の因子を認識して、病原菌の発芽孢子が病原性関連因子を生産する例はクチナーゼにおいて報告されている (Kolattukudy and Gamble 1995)。一般的に、病原糸状菌の孢子は植物葉表面上で発芽する時、微量のクチナーゼを放出し、植物葉細胞壁より少量のクチンモノマーが遊離される。クチンモノマーは病原菌のクチナーゼ遺伝子を活性化して、発芽孢子から大量のクチナーゼが分泌される。*A. brassicicola* においても孢子発芽時にクチナーゼやリパーゼなどの酵素が分泌されていることが知られているので (Berto et al. 1990; Fan and Köller 1998)、発芽孢子によって生成される酵素が宿主葉からの配糖体の遊離を引き起こしているかもしれない。したがって、今後、病原菌が生成する宿主細胞壁または葉表皮ポリマーを分解する酵素を明らかにすることが重要な課題である。

第2節 胞子発芽に関与する植物成分

1 序論

A. brassicicola は高濃度胞子懸濁液 (10^6 個/ml 以上) の場合、宿主葉上では顕著な発芽を示すが、非宿主葉上やプラスチックシャーレ上では殆ど発芽しない (Otani et al. 1998 b and 2001)。また、非宿主葉上の未発芽胞子懸濁液を宿主葉上に滴下すると、胞子は発芽を開始することから非宿主やプラスチックシャーレ上での発芽の低下は、発芽抑制物質の存在によるものではないことが示唆されている (Otani et al. 1998 b)。このように、*A. brassicicola* では、HST 生産のみならず、胞子発芽においても宿主成分が関与していることが示唆されるため、宿主植物における *A. brassicicola* の胞子発芽を促進する因子の探索およびその純化を試みた。

一方、本実験を行っている過程で、*A. brassicicola* は低濃度胞子懸濁液 (10^5 個/ml 以下) の場合、宿主葉上ではもちろん、非宿主葉上やプラスチックシャーレ上においても顕著な発芽を示すが、非宿主植物であるトマト葉磨碎液中では *A. brassicicola* 胞子の発芽が著しく阻害されることを見出した。そこで、トマト葉磨碎液中に存在すると思われる *A. brassicicola* 胞子発芽阻害物質の単離および同定を試みた。

2 材料および方法

1) 供試植物および供試菌

第1節の実験で用いた植物の他に、ナス科植物のピーマン (*Capsicum annuum* L) 品種 京波、およびバラ科植物のリンゴ (*Malus pumila* var. *domestica*) 品種 レッドゴールドを使用した。供試菌には *Alternaria brassicicola* (アブラナ科植物黒すす病菌) の O-264 菌株および *A. alternata* 非病原菌の O-94 菌株を使用した。胞子の調整は第1節と同様の方法で行った。

2) 胞子発芽率の測定

湿室プラスチックチャンバー内のスポンジマット上に置いた宿主、非宿主葉およびプラスチックシャーレ上に、O-264 胞子の DW 懸濁液を 40 μ l ずつ滴下し、25°C暗下で 24 時間静置した。胞子懸濁液滴下部を 0.01%コットンブルー液で染色し、光学顕微鏡下で発芽胞子数を計測し、発芽率を次式により求めた。

$$\text{胞子発芽率 (\%)} = \text{総発芽胞子数} / \text{総胞子数} \times 100$$

3) 植物葉磨碎液の調製

各植物葉 1 g に DW 5 ml を加え、ホモジナイザー (Kinematica) で磨碎したものを植物葉磨碎液とし、遠心分離 (800 \times g、5 分、20°C) して上清および沈殿画分を得た。沈殿画分はさらに遠心分離 (800 \times g、5 分、20°C) によって、3 度洗浄した。

4) 胞子発芽液の調製

各植物上およびプラスチック上に各濃度に調整した O-264 胞子の DW 懸濁液を 40 μ l ずつ滴下し、湿室プラスチックチャンバー内のスポンジマット上に置き、25°C暗下で 24 時間静置した。光学顕微鏡で胞子発芽を観察した後、各葉上およびプラスチック上の懸濁液を回収し、遠心分離 (800 \times g、5 分、20°C) を行った。その上清をミリポアフィルター (孔径 0.2 μ m) で発芽胞子を除去したものを胞子発芽液 (SGF) とした。

5) 胞子発芽促進活性の検定

検定サンプルに高濃度 (10^6 個/ml) になるように O-264 胞子を懸濁し、プラスチックシャーレ上に 40 μ l ずつ滴下し、湿室プラスチックチャンバー内のスポンジマット上に置き、25°C暗下で 24 時間静置した。その後、発芽胞子数を計測し発芽率を求めた。

6) 胞子発芽促進物質の純化

(i) 限外濾過

O-264 SGF を 5 kDa および 10 kDa 分画用のモルカット II (TGC、LCC) を用いて、限外濾過を行った。得られた各画分における胞子発芽促進活性の検定を行った。

(ii) 有機溶媒抽出

O-264 SGF を pH 5.5 に調整し、分液漏斗に入れて同量の酢酸エチルを加えて攪拌した。酢酸エチル抽出画分と非抽出画分に分離し、非抽出画分は再度同量の酢酸エチルを適量加えて攪拌した。抽出画分中の水分を除去するために、無水硫酸ナトリウムを加えて、濾紙 (Whatman No.2) で濾過した。各画分をロータリーエバポレーター (EYELA N-1 型、東京理化工学) により濃縮乾固し、抽出画分は 1%メタノールに、また非抽出画分は DW に溶解し、各画分における胞子発芽促進活性の検定を行った。同様に *n*-ブタノールについても抽出を行い、胞子発芽促進活性の検定を行った。

(iii) Sep-pak C₁₈ カートリッジ

O-264 SGF 1 ml を Sep-pak C₁₈ カラムに注入し、非吸着画分を得た。次に、15%、70% および 100% のアセトニトリルをカラムに加え、各溶出画分を得た。各画分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、非吸着画分は DW に、また溶出画分は 1%メタノールに溶解した各画分における胞子発芽促進活性の検定を行った。

(iv) ゲル濾過クロマトグラフィー

O-264 SGF 100 ml を凍結乾燥機により濃縮乾固し、DW 1 ml に溶解し、ミリポアフィルター (0.2 μm) で濾過した。濾液を Sephadex G-50 Coarse カラム (2×50 cm) でゲル濾過クロマトグラフィーを行った。DW で溶出し、フラクションコレクターで 5 ml ずつ分取し、各画分における胞子発芽促進活性の検定を行った。さらに活性画分を濃縮し、Sep-pak C₁₈ カラムに通して非吸着画分を得た。本画分を濃縮し、DW 1 ml に溶解して、Sephadex G-25 Coarse カラム (2×90 cm) でゲル濾過クロマトグラフィーを行った。DW で溶出し、フラクションコレクターで 5 ml ずつ分取し、各画分における胞子発芽促進活性の検定を行った。

7) 胞子発芽阻害活性の検定

検定サンプルに低濃度 (10^5 個/ml) になるように O-264 胞子を懸濁し、プラスチックシャーレ上に 40 μ l ずつ滴下し、湿室プラスチックチャンバー内のスポンジマット上に置き、25°C 暗下で 24 時間静置した。その後、発芽胞子数を計測し発芽率を求めた。また、コントロールとして DW に O-264 胞子を懸濁し、同様に発芽率を求め、次式により胞子発芽阻害率を算出した。

$$\text{胞子発芽阻害率(\%)} = (1 - \text{検定サンプルにおける発芽率} / \text{コントロールにおける発芽率}) \times 100$$

8) 胞子発芽阻害物質の純化

(i) DIAION HP-20 逆相クロマトグラフィー

トマト葉磨碎液の上清画分を DIAION HP-20 カラム (三菱化学、3×14 cm) に注入し、DW および各濃度のメタノールを順次カラムに加え、溶出画分を得た。各画分をロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、1%メタノール 1 ml に溶解した後、胞子発芽阻害活性の検定を行った。

(ii) Sephadex LH-20 ゲル濾過クロマトグラフィー

HP-20 逆相クロマトグラフィーにより得られた活性画分を Sephadex LH-20 カラム (Amersham Biosciences、1.4×42 cm) に注入し、80%メタノールで溶出した。溶出液をフラクションコレクターで 5 ml ずつ分取した各画分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、1%メタノール 1 ml に溶解した後、胞子発芽阻害活性の検定を行った。

(iii) TLC

LH-20 ゲル濾過クロマトグラフィーにより得られた活性画分をシリカゲル TLC プレート (Merck) 上に展開した。展開溶媒は酢酸/酢酸エチル/メタノール/DW (10:30:20:1、v/v/v/v) を用いて 2 度展開し、風乾した。50%硫酸を噴霧した後、100°C で熱処理することでスポットを検出した。スポットが検出された画分をかき取り、100%メタノールで溶出して遠心分離 (800 \times g、5 分、20°C) によりシリカゲルを取り除き、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。1%メタノール 1 ml に溶解した後、胞子発芽阻害活性の検定を行った。

9) 胞子発芽阻害物質の同定

(i) NMR

純化画分における ^1H -NMR スペクトル解析を、Jeol Lambda 400 NMR spectrometer を用いて行った。

(ii) FAB-MS

純化画分の分子量を、JMS-AX505H 型 (JEOLDATUM) を用いて行った。

3 結果

1) 植物葉上における O-264 胞子発芽

宿主植物葉、非宿主植物葉およびプラスチックシャーレ上に 10^5 個/ml と 10^6 個/ml に調整した O-264 胞子懸濁液を滴下接種し、24 時間培養後に O-264 胞子の発芽率を測定した。その結果 (Table 20)、宿主葉上ではどちらの濃度においても約 90% の高い発芽率を示し、著しい発芽管伸長が見られた。一方、非宿主葉上およびプラスチックシャーレ上においては、低濃度 (10^5 個/ml) では 80% 程度の発芽率を示したが、高濃度 (10^6 個/ml) ではほとんど発芽しなかった。

2) O-264 胞子発芽に対する植物磨碎液の作用

宿主および非宿主植物葉を磨碎し、遠心分離により得た上清および沈殿画分に高濃度 (10^6 個/ml) および低濃度 (10^5 個/ml) になるように O-264 胞子を懸濁し、24 時間培養後の O-264 胞子の発芽率を測定した。その結果 (Table 21)、胞子濃度に関わらず、トマト葉磨碎液の上清以外の全ての画分において高い胞子発芽率を示し、著しい菌糸生育がみられた。なお、トマト葉磨碎液の上清画分中では低胞子濃度でも胞子は全く発芽しなかった。

3) O-264 胞子発芽を促進する宿主成分の検出と純化

(1) 葉浸出液における胞子発芽促進活性

宿主および非宿主葉上に DW を滴下し、24 時間培養後に回収した浸出液における胞子発芽促進活性を調べた。その結果 (Table 22)、両植物葉の浸出液中での胞子発芽率は 10% 以下で活性はみられなかった。

(2) 植物葉上より得た O-264 SGF における胞子発芽促進活性

宿主、非宿主およびプラスチックシャーレ上に 10^5 個/ml と 5×10^5 個/ml に調整した O-264 胞子懸濁液を滴下し、24 時間培養後の SGF における胞子発芽促進活性を調べた。その結果 (Table 23)、両胞子濃度で接種した宿主葉上より得た SGF 中では 70% 以上の高い発芽率を示し、発芽管伸長も著しかった。一方、両胞子濃度で接種した非宿主葉上およびプラスチックシャーレ上より得た SGF 中では、20% 以下の低い発芽率であった。

Table 20. Spore germination (SG) of *A. brassicicola* on various leaves and plastic plates

Dropped on:	Spore concentration (spores/ml) ^{a)}	
	10 ⁵	10 ⁶
	Rate of SG (%)	Rate of SG (%)
Cabbage	95.0 ± 5.3	89.7 ± 12.2
Komatsuna	98.0 ± 1.8	89.0 ± 7.1
Tomato	70.0 ± 11	3.2 ± 4.0
Japanese pear	82.0 ± 1.8	2.4 ± 2.0
Plastic plate	83.0 ± 2.8	5.5 ± 4.0

a) Spore suspensions (10⁵ or 10⁶ spores/ml) of *A. brassicicola* (O-264) were dropped on various leaves and plastic plates. After 24 hr incubation, spore germination was observed under a light microscope.

Table 21. Spore germination (SG) of *A. brassicicola* in homogenates of various plants ^{a)}

Plant	Fraction	Rate of SG (%)	
		10 ⁵	10 ⁶
Cabbage	Supernatant	100 (Hypha extension)	100 (Hypha extension)
	Pellet	100 (Hypha extension)	100 (Hypha extension)
Komatsuna	Supernatant	100 (Hypha extension)	100 (Hypha extension)
	Pellet	100 (Hypha extension)	100 (Hypha extension)
Leaf mustard	Supernatant	100 (Hypha extension)	NT
	Pellet	100 (Hypha extension)	NT
Apple	Supernatant	100 (Hypha extension)	NT
	Pellet	100 (Hypha extension)	NT
Cucumber	Supernatant	100 (Hypha extension)	NT
	Pellet	100 (Hypha extension)	NT
Sweet pepper	Supernatant	100	NT
	Pellet	100	NT
Tomato	Supernatant	0	0
	Pellet	100	100
DW		96 ± 3	1.8 ± 1.3

a) Homogenates of various plants were centrifuged (800 ×g, 5 min) and obtained supernatant and pellet fractions. Spores suspensions (10⁵ or 10⁶ spores/ml) of *A. brassicicola* (O-264) in each fraction were dropped on plastic plates. After incubation for 24 hr, rate of spore germination (SG) was measured. As a control, spores suspensions (10⁵ or 10⁶ spores/ml) of O-264 in DW were dropped on plastic plates.

Table 22. Spore germination (SG) of *A. brassicicola* in diffusates from host and non-host leaves

Diffusate from ;	Rate of SG (%) ^{a)}		
Cabbage leaves	6.0	±	4.6
Japanese leaves	5.8	±	3.8
Plastic plates	1.8	±	1.3

a) DW was dropped on leaves and plastic plates. After incubation for 24 hr, droplets were collected and spore (10^6 spores/ml) of *A. brassicicola* (O-264) suspended in the solutions were dropped on plastic plates. After 24 hr incubation, spore germination was observed under a light microscope.

Table 23. Spore germination-stimulating activity of *A. brassicicola* SGFs incubated on various plant leaves

Plant	Rate of SG (%)			
	Spore concentration (spores/ml) ^{a)}			
	10 ⁵		5×10 ⁵	
Cabbage	88.9	± 6.6	77.0	± 8.7
Komatsuna	75.8	± 16.2	59.0	± 0.0
Cucumber	11.6	± 3.0	2.0	± 1.7
Japanese pear	18.9	± 13.1	3.0	± 3.0
Plastic plate	15.1	± 16.3	3.7	± 4.7

a) Spore suspensions (10⁵ or 5×10⁵ spores/ml) of O-264 were dropped on various leaves and plastic plates. After incubation for 24 hr, SGFs were collected and assayed for spore germination-stimulating activity.

(3) 宿主葉上での O-264 孢子発芽率および孢子発芽促進活性の経時的変化

キャベツ葉上に O-264 孢子懸濁液 (10^6 個/ml) を滴下接種し、一定時間毎に孢子発芽率を測定した後、SGF を回収し、O-264 孢子発芽促進活性を調べた。その結果 (Fig. 8)、O-264 孢子はキャベツ葉上では接種 4 時間後から発芽し始め、12 時間後には発芽率は 40%を超え、24 時間目にはほぼ 100%の発芽率を示した。また、孢子発芽促進活性は O-264 孢子が発芽し始める接種 4 時間目より以前の接種 2 時間目から認められ始め、24 時間目まで緩やかに増加した。

(4) 植物葉上より得た *A. alternata* (O-94) SGF における孢子発芽促進活性

各植物葉上およびプラスチックシャーレ上に 5×10^5 個/ml に調整した非病原性 *A. alternata* O-94 孢子懸濁液を滴下し、24 時間培養後に回収した O-94 SGF における O-264 孢子発芽促進活性を調べた。なお、O-94 孢子は全ての植物葉上およびプラスチックシャーレ上においても 90%以上の高い発芽率を示した。その結果 (Table 24)、アブラナ科植物葉上より得た O-94 SGF 中では 80%以上の高い発芽率を示したが、それ以外の植物葉上およびプラスチックシャーレ上より得た O-94 SGF 中においては 20%以下の低い発芽率であった。

(5) O-264 孢子発芽促進因子の純化

以上の結果より、アブラナ科植物葉上からの *A. brassicicola* および *A. alternaria* SGF 中には O-264 孢子発芽を促進する因子が存在していることが示唆された。そこで、*A. brassicicola* (O-264) SGF からの O-264 孢子発芽促進因子の純化を試みた。

(i) 限外濾過膜による分画

O-264 SGF を 5 kDa および 10 kDa 分画用のモルカット II で分画した各画分における孢子発芽促進活性を調べた。その結果 (Table 25)、10 kDa 以下および 5 kDa 以下の画分において顕著な発芽が認められた。

(ii) 有機溶媒抽出

孢子発芽促進因子は低分子化合物と思われたので、O-264 SGF を pH 5.5 に調整し、酢酸エチルおよび *n*-ブタノールで抽出を行い、抽出および非抽出画分を得た。各画分における孢子発芽促進活性を調べた結果 (Table 26)、両有機溶媒の非抽出画分において発芽が促進された。

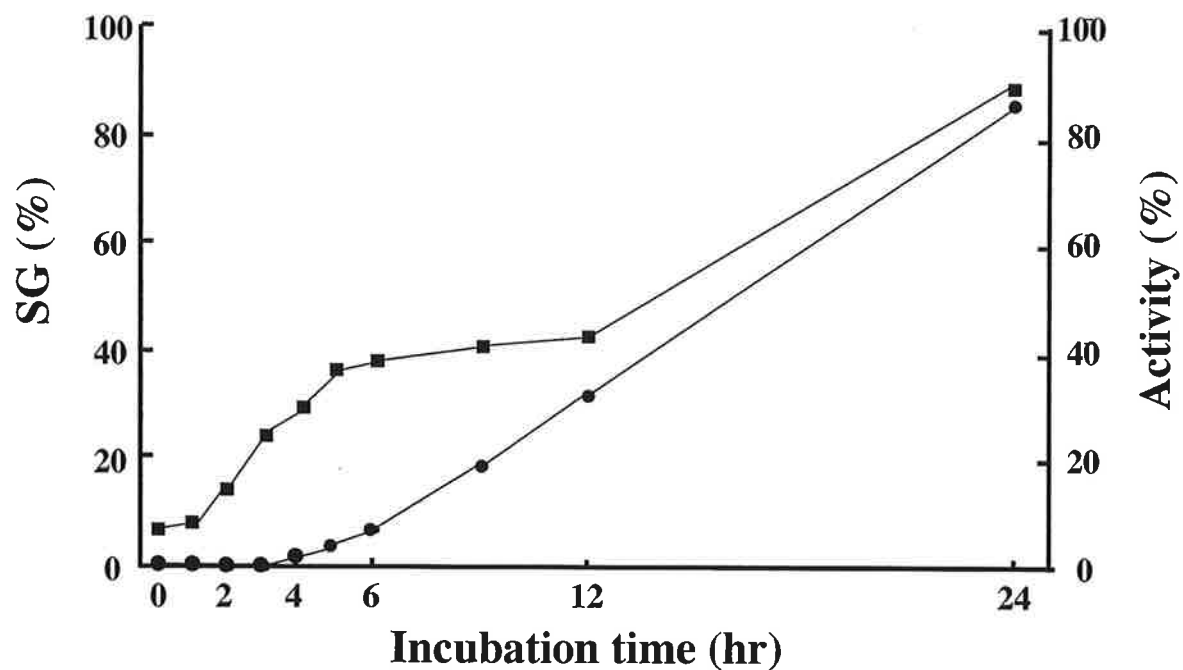


Fig. 8. Time course of spore germination-stimulating activity of *A. brassicicola* SGFs incubated on cabbage leaves. Spore suspensions (10^6 spores/ml) of *A. brassicicola* (O-264) were dropped on cabbage leaves and incubated for various times. After incubation for various times, rate of spore germination (SG) (●) was measured under a light microscope. Then, SGFs were collected and assayed for spore germination-stimulating activity (■).

Table 24. Spore germination-stimulating activity of non-pathogenic *A. alternata* SGFs incubated on various leaves

Plant	Activity (%) ^{a)}
Cabbage	87.0 ± 4.1
Komatsuna	83.0 ± 7.2
Cucumber	16.8 ± 11.0
Japanese pear	14.2 ± 6.9
Plastic plates	16.3 ± 11.4

a) Spore suspensions (5×10^5 spores/ml) of non-pathogenic *A. alternata* (O-94) were dropped on various plant leaves and plastic plates. After incubated for 24 hr, SGFs were collected and assayed for spore germination-stimulating activity.

Table 25. Spore germination-stimulating activity of low and high molecular weight fractions by ultrafiltration of *A. brassicicola* SGF ^{a)}

Fraction	Activity (%)
> 10 kDa	21.8 ± 13.2
< 10 kDa	72.2 ± 18.3
> 5 kDa	37.4 ± 26.8
< 5 kDa	92.8 ± 7.4

a) SGFs of *A. brassicicola* (O-264) were filtered by ultrafiltration across 5 kDa and 10 kDa membranes. Each fraction was assayed for spore germination-stimulating activity.

Table 26. Spore germination-stimulating activity of extracted and unextracted fractions by solvents of *A. brassicicola* SGF^{a)}

Solvent	Fraction	Activity (%)
Ethyl acetate	Extracted	12.7 ± 7.2
	Unextracted	47.7 ± 21.9
<i>n</i> -Butanol	Extracted	5.5 ± 0.0
	Unextracted	48.0 ± 0.0

a) SGF (pH 5.5) of *A. brassicicola* (O-264) from cabbage leaves was extracted with various solvents. Solvent-extracted and unextracted fractions were dissolved in 1% MeOH or DW and assayed for spore germination-stimulating activity.

(iii) Sep-pak C₁₈ カートリッジによる分画

O-264 SGF 1 ml を Sep-pak C₁₈ カラムに通して非吸着画分を得た後、15、70、100%アセトニトリルで順次溶出し、各溶出画分を得た。各画分における孢子発芽促進活性を調べた結果 (Table 27)、非吸着画分において顕著に発芽が促進された。

(iv) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分画

O-264 SGF 100 ml を 1 ml に濃縮し、Sephadex G-50 Coarse カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、溶出液を 5 ml ずつ分画し、各画分における孢子発芽促進活性を調べた。その結果 (Table 28)、溶出量 80-90 ml の画分において発芽が促進された。この画分をさらに Sephadex G-25 Coarse カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、5 ml ずつ分画し、各画分における孢子発芽促進活性を調べた。その結果 (Table 29)、溶出量 110-125 ml の画分において顕著に発芽が促進された。また、溶出量 95-135 ml の画分における糖含量を測定した結果 (Table 29)、発芽促進活性の見られた画分において糖が検出された。Sephadex G-25 Coarse ゲル濾過クロマトグラフィーにより得られた促進活性画分においてゲル濾過 HPLC 解析を行った結果 (Fig. 9)、溶出時間約 8 分に単一のピークが見られた。既知分子量のプルランを標準物質として検量線により、本ピークの分子量を約 600 Da と推定した。

4) O-264 孢子発芽を阻害するトマト葉成分の検出と純化

本研究の過程において、トマト葉磨砕液中では O-264 孢子の発芽が顕著に阻害されることが示され (Table 21)、トマト葉中には何らかの孢子発芽阻害物質が存在することが示唆された。そこで、孢子発芽阻害物質の検出と純化を試みた。

(1) 宿主葉上におけるトマト葉磨砕液上清の孢子発芽阻害活性

O-264 孢子は宿主葉上では孢子濃度に関わらず顕著な発芽を示す (Table 20) ので、孢子発芽阻害活性を持つトマト磨砕液上清に O-264 孢子を懸濁し、キャベツ葉上に滴下した時の孢子発芽阻害活性を調べた。その結果 (Table 30)、宿主植物であるキャベツ葉上でも孢子発芽は完全に阻害された。

(2) O-264 孢子発芽阻害物質の純化

トマト葉磨砕液中から孢子発芽阻害物質の純化を行うために、トマト葉磨砕液を遠心分離し、得られた上清画分を DIAION HP-20 カラム (3×14 cm) を用いて逆相クロマトグラフィー

Table 27. Spore germination-stimulating activity of adsorbed and passed fractions in reverse phase column chromatography with Sep-pak C₁₈ cartridge of *A. brassicicola* SGF ^{a)}

Fraction	Activity (%)
Passed fraction (DW elution)	79.8 ± 9.1
Adsorbed fraction	
15% MeCN elution	41.0 ± 22.0
70% MeCN elution	27.3 ± 9.9
100% MeCN elution	7.3 ± 7.8

a) SGF of *A. brassicicola* (O-264) from cabbage leaves was chromatographed with Sep-pak C₁₈ cartridge. Adsorbed fractions were evaporated and dissolved in 1% MeOH. Each fraction was assayed for spore germination-stimulating activity.

Table 28. Spore germination-stimulating activity of fractions by Sephadex G-50 Coarse column chromatography of *A. brassicicola* SGF ^{a)}

Elution volume (ml)	Activity (%)
40-45 (Vo)	8.3 ± 14.0
45-50	4.6 ± 4.1
50-55	5.5 ± 4.9
55-60	7.6 ± 5.6
60-65	10.1 ± 12.0
65-70	16.3 ± 14.0
70-75	16.9 ± 9.5
75-80	27.9 ± 15.0
80-85	37.2 ± 15.0
85-90	40.0 ± 27.0
90-95	22.8 ± 18.0
95-100	13.3 ± 7.1

a) SGF of *A. brassicicola* (O-264) from cabbage leaves was chromatographed on Sephadex G-50 Coarse column (1.5×60 cm) and fractions (5 ml) of the elution were collected. The fractions were assayed for spore germination-stimulating activity.

Table 29. Spore germination-stimulating activity of fractions by Sephadex G-25 Coarse column chromatography of active fraction obtained from Sephadex G-50 Coarse column chromatography ^{a)}

Elution volume (ml)	Activity (%)	Sugar content (ppm)
75-80 (Vo)	3.0 ± 1.4	—
80-85	1.5 ± 0.7	—
85-90	3.0 ± 2.8	—
90-95	1.5 ± 2.1	—
95-100	1.5 ± 0.7	6.15
100-105	1.5 ± 0.7	13.73
105-110	5.0 ± 2.8	27.46
110-115	48.5 ± 13.4	20.24
115-120	52.0 ± 1.4	18.79
120-125	34.0 ± 7.1	8.49
125-130	2.5 ± 0.7	0.0
130-135	6.0 ± 4.2	0.0
135-140	0.5 ± 0.7	—
140-145	1.0 ± 1.4	—
145-150	0.5 ± 0.7	—
150-155	3.0 ± 4.2	—
155-160	2.0 ± 0	—
160-165	7.0 ± 1.4	—
165-170	0.5 ± 0.7	—
170-175	4.5 ± 2.1	—
175-180	0.0 ± 0	—
180-185	0.5 ± 0.7	—
185-190	0.5 ± 0.7	—
190-195	0.0 ± 0	—
195-200	4.0 ± 1.4	—

a) Active fraction obtained from Sephadex G-50 Coarse column chromatography was chromatographed on Sephadex G-25 Coarse column (1.5×90 cm). The fractions (5 ml) of the elution were collected and assayed for spore germination-stimulating activity. Sugar contents of fractions were also measured.

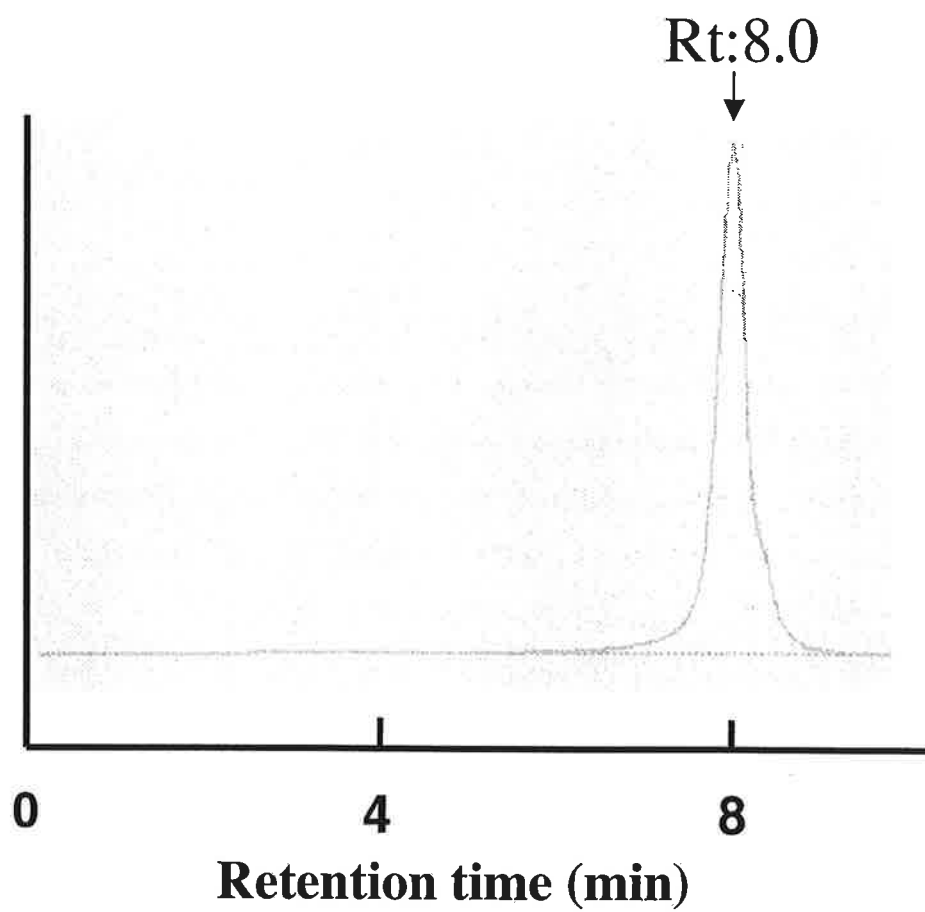


Fig. 9. Gel filtration HPLC of active fraction obtained by Sephadex G-25 Coarse column chromatography. Column: GSM-700H (7.5×250 mm); Solvent: Water; Flow rate: 1 ml/min.

Table 30. Spore germination-inhibiting activity of supernatant obtained by centrifuging homogenate of tomato leaves ^{a)}

Dropped on;	Rate of SG (%)	
	Supernatant	DW
Cabbage	0 (100) ^{b)}	85 ± 15
Tomato	0 (100)	80 ± 13
Plastic plate	0 (100)	97 ± 0

a) Spores of *A. brassicicola* (O-264) were suspended in supernatant obtained by centrifuging homogenate of tomato leaves or DW as a control. Spore suspensions (10^5 spores/ml) were dropped on various plants or plastic plate and assayed for spore germination-inhibiting activity.

b) Number in parentheses shows inhibition rate (%) of spore germination.

ーを行った。0~100%メタノールで順次溶出し、分取した各画分において孢子発芽阻害活性の検定を行った結果 (Table 31)、60~90%メタノール溶出画分において顕著な活性が認められた。次に、この活性画分を濃縮し、Sephadex LH-20 カラム (1.5×50 cm) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。80%メタノールで溶出し、4.6 ml ずつ分画した各画分において孢子発芽阻害活性の検定を行った結果 (Table 32, Fig. 10)、いずれの画分においても阻害活性がみられたが、溶出量 138~152 ml の画分において最も高い活性が認められた。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィーによって得た活性画分を濃縮し、シリカゲル TLC プレート上に展開した。50%硫酸をスプレー処理した結果 (Table 33)、1 個のスポットが検出され、孢子発芽阻害活性の検定を行った結果 (Table 33)、スポットが検出された画分において顕著な活性が認められた。以上のトマト葉磨砕液からの O-264 孢子発芽阻害物質の純化手順を Fig. 11 に示した。

(3) O-264 孢子発芽阻害物質の同定

トマト葉中には α -トマチンという抗菌活性をもった物質が存在していることが報告されている (Morrissey and Osbourn 1999; Schönbeck and Schlösser 1976)。健全なトマト葉組織ではほぼ 1 mM の濃度まで含まれており、この濃度は *in vitro* で多くの病原菌の成長を阻害するのに十分である (Roddick 1974)。トマト葉磨砕液中に存在する O-264 孢子発芽阻害物質は、 α -トマチンではないかと考えられたので、トマト葉磨砕液から純化した活性画分と α -トマチンについて TLC 分析を行った。その結果 (Fig. 12)、 R_f 値 4.0 付近の同じ位置にスポットが検出された。また、各濃度に調整した純化活性画分と α -トマチンの O-264 孢子発芽阻害活性について調べた結果 (Table 34)、両画分とも 0.1 mM の濃度で完全に孢子発芽を阻害した。さらに純化活性画分において FAB-MS 解析を行った結果 (Fig. 13)、 m/z 1057 の位置にピークが見られ、これは α -トマチンの分子 (分子量 1034) に Na が付加したイオンの値であることが考えられる。次に、純化活性画分と α -トマチンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを比較した結果 (Fig. 14)、両スペクトルはほぼ一致した。以上の結果より、O-264 孢子発芽阻害物質は α -トマチンであると同定した。なお、 α -トマチンの化学構造を Fig. 15 に示した。

Table 31. Spore germination-inhibiting activity of fractions by DIAION HP-20 column chromatography of supernatant obtained by centrifuging homogenates of tomato leaves ^{a)}

Elution fraction	Rate of SG (%)	Inhibition (%)
Passed fraction	100 (Hypha extension)	-7.3
Adsorbed fraction		
10% MeOH	98.5 ± 2.1	-5.7
20%	97.5 ± 0.7	-4.6
30%	98.0 ± 5.3	-5.2
40%	98.0 ± 1.5	-5.2
50%	98.0 ± 1.0	-5.2
60%	0.0 ± 0.0	100.0
70%	0.0 ± 0.0	100.0
80%	0.5 ± 0.6	99.5
90%	1.5 ± 0.7	98.4
100%	92.0 ± 2.9	1.3
DW (Control)	93.2 ± 1.9	

a) Supernatant obtained by centrifuging homogenate of tomato leaves was chromatographed on DIAION HP-20 column (3×14 cm). Each elution fraction was evaporated and assayed for spore germination-inhibiting activity.

Table 32. Spore germination-inhibiting activity of fractions by Sephadex LH-20 column chromatography of active fraction obtained from DIAION HP20 column chromatography ^{a)}

Elution volume (ml)	Rate of SG (%)	Inhibition (%)
0-69.0	96.0 ± 0.0	0.0
69.0-73.6	68.5 ± 3.5	28.6
73.6-78.2	83.0 ± 5.7	13.5
78.2-82.8	55.5 ± 7.8	42.2
82.8-87.4	61.0 ± 8.5	36.5
87.4-92.0	70.0 ± 7.1	27.1
92.0-96.6	75.0 ± 0.0	21.9
96.6-101.2	85.5 ± 9.2	10.9
101.2-105.8	70.0 ± 7.1	27.1
105.8-110.4	69.0 ± 7.1	28.1
110.4-115.0	67.0 ± 7.1	30.2
115.0-119.6	52.0 ± 1.4	45.8
119.6-124.2	55.0 ± 1.4	42.7
124.2-128.8	72.0 ± 2.8	25.0
128.8-133.4	60.0 ± 12.7	37.5
133.4-138.0	72.5 ± 4.9	24.5
138.0-142.6	27.0 ± 4.2	71.9
142.6-147.2	33.5 ± 4.9	65.1
147.2-151.8	14.0 ± 2.8	85.4
151.8-156.4	41.0 ± 18.4	57.3
156.4-161.0	43.0 ± 28.3	55.2
DW (Control)	96.0 ± 0.0	

a) Active fractions obtained by DIAION HP-20 column chromatography were chromatographed on Sephadex LH-20 column (1.5×50 cm). The 21 fractions (4.6 ml) of the elution were evaporated and assayed for spore germination-inhibiting activity.

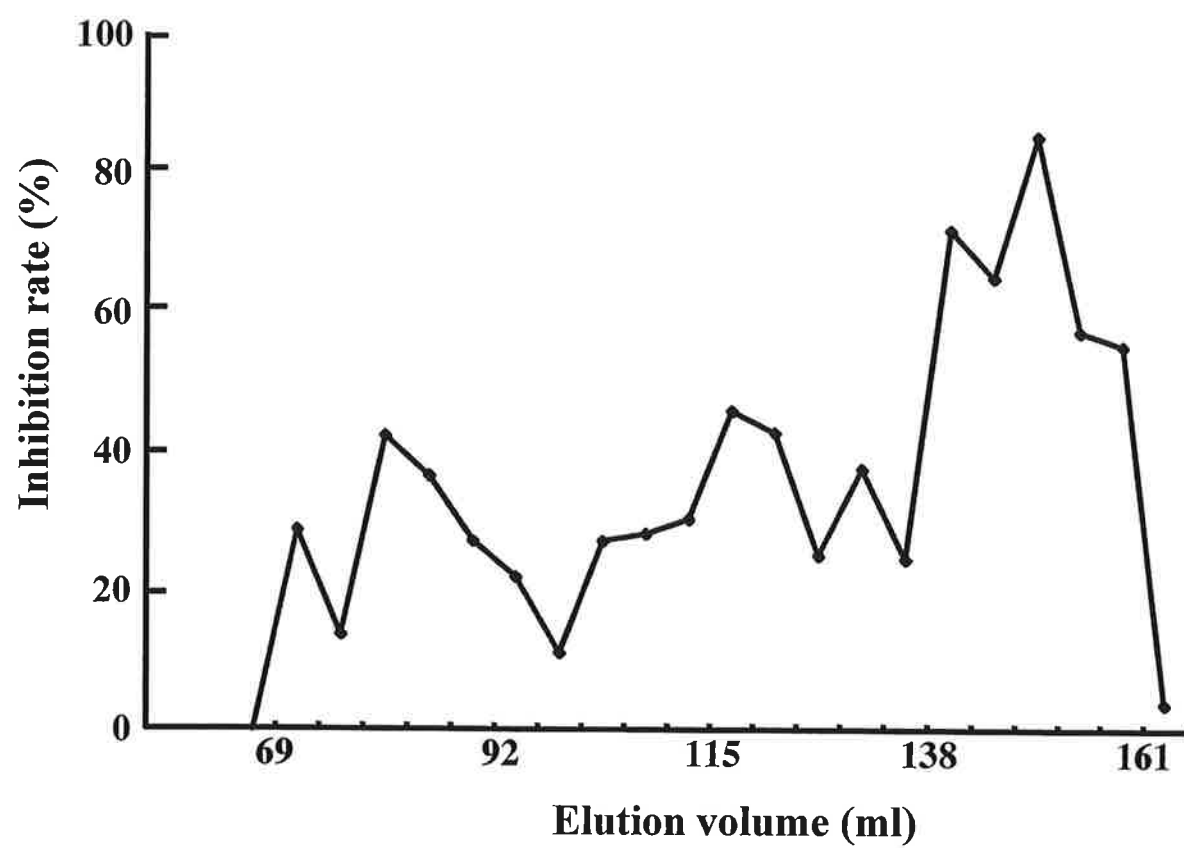


Fig.10. Sephadex LH-20 column chromatography of active fraction obtained from DIAION HP-20 column chromatography.

Table 33. Spore germination-inhibiting activity of fractions by TLC of active fraction obtained by Sephadex LH20 column chromatography ^{a)}

<i>Rf</i> value	Reaction spot ^{b)}	Rate of SG (%)	Inhibition (%)
0.62-1.00	—	95.0 \pm 5.7	-4.4
0.44-0.62	+	3.5 \pm 0.7	96.1
0.00-0.44	—	71.0 \pm 2.8	22.0
Control	—	91.0 \pm 1.4	

a) Active fractions obtained by Sephadex LH-20 column chromatography were loaded on silica gel TLC plates and developed 2 times with a solvent system of ethyl acetate, methanol, acetic acid, and water (30:20:10:1, v/v/v/v). Each fraction of difference *Rf* value was collected and assayed for spore germination-inhibiting activity. Control is fraction of cellulose TLC plates which samples were not loaded on.

b) The plates were sprayed with 50% sulfuric acid and heated at 100°C for 5 min. +: reaction, —: no reaction.

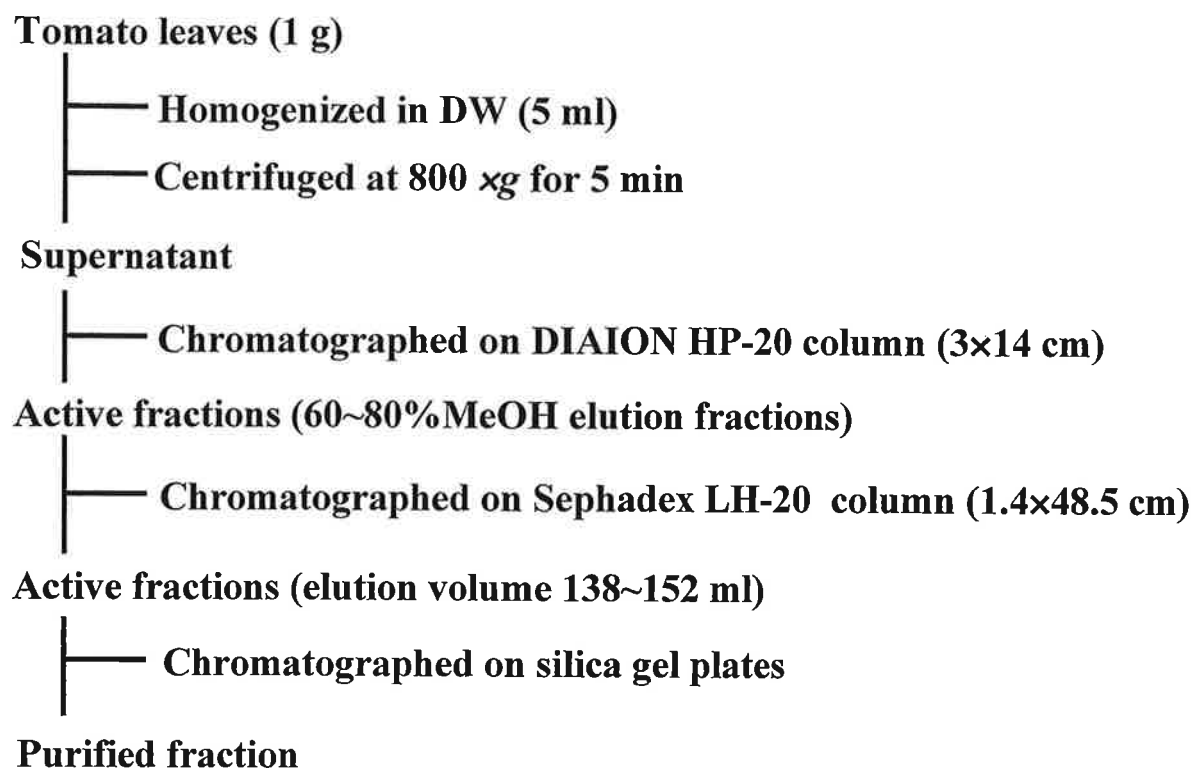


Fig. 11. Purification protocol of a substance for inhibiting spore germination of *A. brassicicola* from tomato leaves.

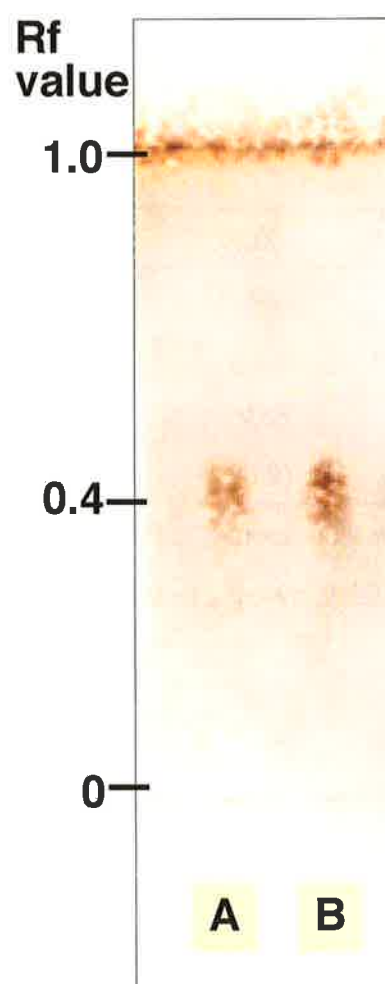


Fig. 12. TLC analysis of active fraction (A) obtained by Sephadex LH-20 column chromatography and α -tomatine (B).

Table 34. Comparison of spore germination-inhibiting activity fraction purified from tomato leaves and α -tomatine

Fraction	Rate of SG (%) ^{a)}			
	Concentration (mM)			
	0	0.001	0.01	0.1
Purified fraction	96.0	98 (-1.8)	96 (-0.3)	0 (100)
α -Tomatine	96.0	92.5 (3.9)	67.3 (30.1)	0 (100)

a) Purified fraction by TLC and α -tomatine at various concentrations were assayed for spore germination-inhibiting activity. Number in parentheses shows inhibition rate (%) of spore germination.

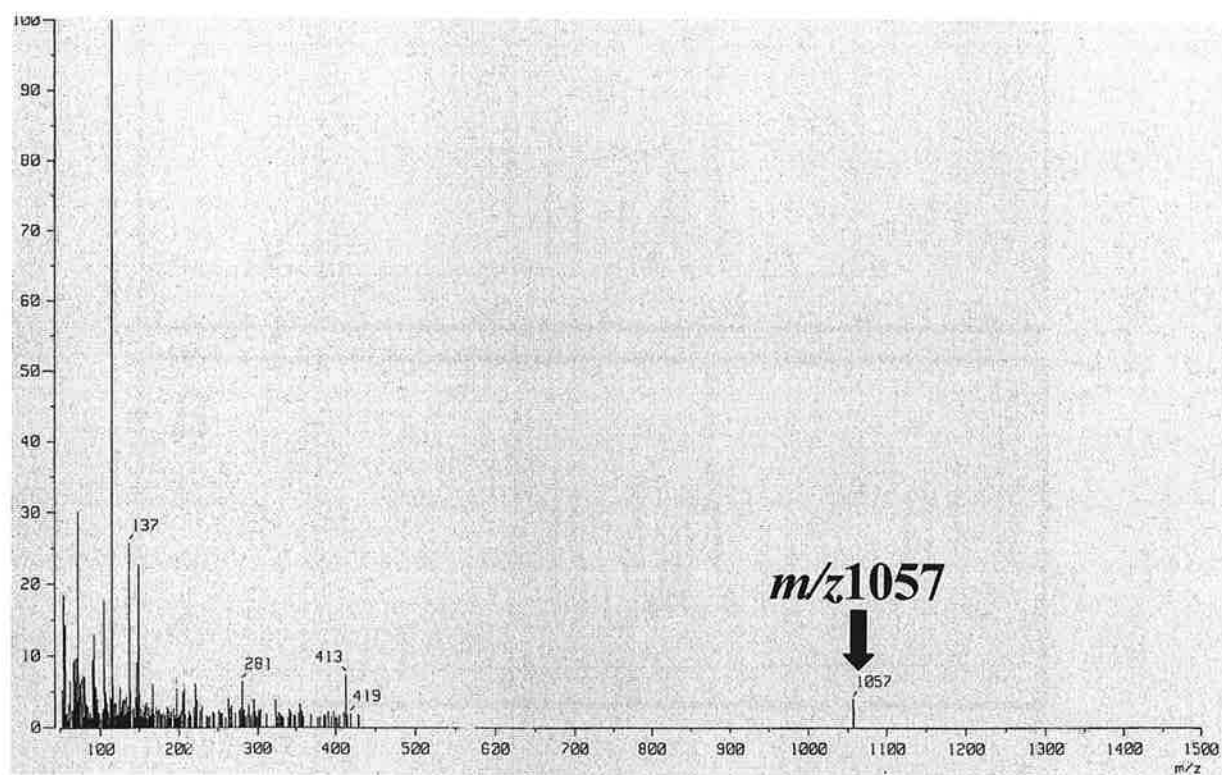


Fig. 13. FAB-MS analysis of purified fraction obtained by TLC.

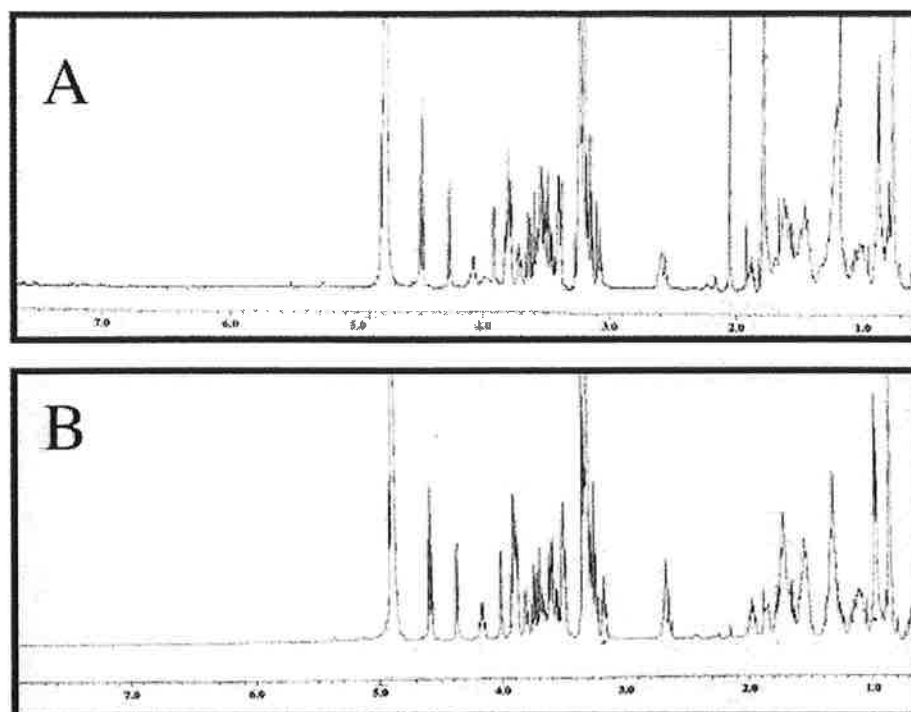


Fig. 14. ^1H -NMR spectrum of purified fraction (A) and α -tomatine (B).

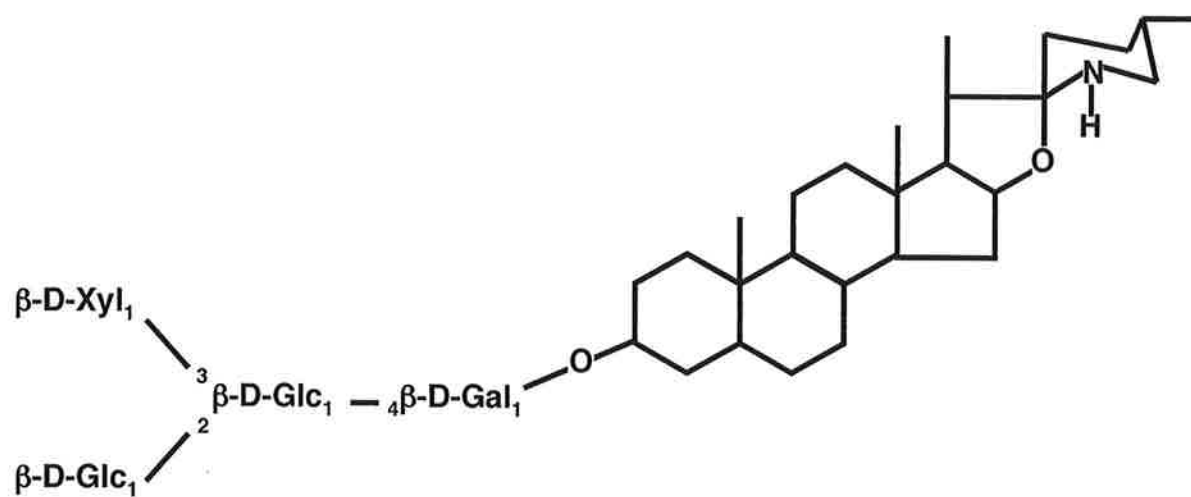


Fig. 15. Chemical structure of α -tomatine ($C_{50}H_{83}NO_{21}$, MW: 1034).

4 考察

A. brassicicola は高濃度懸濁液 (10^6 個/ml) の場合、宿主葉上では顕著な発芽を示すが、非宿主葉上およびプラスチックシャーレ上では殆ど発芽せず、本菌の孢子発芽においても宿主植物の何らかの因子が関与していることが示唆された。そこで、宿主および非宿主葉上より得た滲出液における孢子発芽促進活性を調べたが、活性はみられなかった。また、宿主および非宿主葉の磨砕液より遠心分離によって得た沈殿および上清画分においては、トマト磨砕液上清以外の全ての画分において顕著な孢子発芽がみられ、特異性はみられなかった。以前の報告 (宇野 1998) において、高濃度の *A. brassicicola* の孢子は各種液体培地中では顕著な発芽を示すが、5%のグルコース溶液中では殆ど発芽しないことが示されている。したがって、葉磨砕液中には液体培地と同様に多くの栄養物が含まれており、これらが孢子発芽を促進したと考えられる。非宿主葉上では高濃度の孢子は発芽しないのにも関わらず、宿主葉上では顕著に発芽することより、孢子が宿主葉表面上に存在する場合においてのみ孢子発芽を促進する何らかの因子が出現するように思われる。

そこで、*A. brassicicola* 孢子懸濁液を各植物葉に滴下して得た SGF における孢子発芽促進活性の検定を行った結果、宿主葉上より得た SGF にのみ顕著な活性が見られた。孢子発芽促進活性は宿主葉上に孢子接種 2 時間後には検出され、4 時間後から孢子発芽を開始した。また、非病原性 *A. alternata* (O-94) の孢子懸濁液を各植物葉に滴下して得た SGF においても、*A. brassicicola* と同様、アブラナ科植物葉上より得た SGF にのみ孢子発芽促進活性が見られた。このことより、孢子発芽促進因子は *A. brassicicola* とアブラナ科植物間の相互作用においてのみ特異的に生成されるのではなく、各種病原菌の孢子がアブラナ科植物上に存在する時にアブラナ科植物葉から放出されることが示唆された。

孢子発芽促進因子は熱に安定で、有機溶媒に不溶であり、Sep-pak C₁₈ カラムに吸着されない 5 kDa 以下の物質であった。そこで宿主葉上から得た SGF 中からの孢子発芽促進因子の純化を試みた。各種クロマトグラフィーによって精製した活性画分の糖含量を測定した結果、促進活性と糖含量のピークがほぼ一致し、本促進因子は糖である可能性が考えられた。また、本活性画分をゲル濾過 HPLC 分析した結果、単一のピークとして検出され、約 600 Da の物質であると推定されたが、因子を特定するまでには至らなかった。今後、さらに精製を進め、NMR や FAB-MS によって孢子発芽促進因子を同定していく必要がある。

一方、本実験を行っている過程で、トマト葉磨砕液に *A. brassicicola* 孢子を懸濁すると孢子発芽が顕著に抑制されることが見出され、トマト葉中には何らかの孢子発芽阻害物質が存在するが示唆された。そこで、トマト葉磨砕液からの孢子発芽阻害物質の純化を試みた。

まず、トマト葉磨砕液を遠心分離することにより得た上清画分を用いて DIAION HP-20 逆相クロマトグラフィーを行った。得られた活性画分をさらに Sephadex LH-20 ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し、活性画分を得た。本活性画分をシリカゲル TLC プレート上に展開させ、50%硫酸の呈色反応を行うと 1 つのスポット (R_f 値 0.44-0.62) が検出され、このスポットに孢子発芽阻害活性が認められた。

多くの植物にはサポニンとして知られる低分子の抗菌性化合物が存在し、病原菌の伸展を抑制する。サポニンにはグリコシル化されたトリテルペノイド、ステロイドまたはステロイド系アルカロイドがある。*Lycopersicon* 種における主なサポニンは α -トマチンであり、健全なトマト葉組織は最大 1 mM 程度の濃度を含んでおり、多くの病原菌の成長を阻害していることが報告されている (Morrissey and Osbourn 1999; Roddick 1974; Schönbeck and Schlösser 1976)。今回の実験で得られたトマト葉磨砕液上清に存在する孢子発芽阻害物質は α -トマチンである可能性が考えられたため、TLC によって得た純化画分と α -トマチンを TLC で分析した結果、同じ R_f 値にスポットが検出された。また、 α -トマチンは純化画分と同じ 0.1 mM の濃度で完全に *A. brassicicola* の孢子発芽を阻害した。さらに純化活性画分において FAB-MS 解析を行った結果、 m/z 1057 の位置にピークが見られ、これは α -トマチンの分子 (分子量 1034) に Na が付加したイオンである。純化活性画分と α -トマチンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを比較した結果、両スペクトルはほぼ一致した。以上の結果より、O-264 孢子発芽阻害物質は α -トマチンであると同定した。

今回の実験より、トマト葉中に含まれる α -トマチンにより *A. brassicicola* の孢子発芽が阻害されることが明らかになった。一般的に、トマトの病原菌は α -トマチンに対する解毒機構を持っており、解毒によってトマト葉への感染を成立させる (Osbourne 1996)。しかし、トマトの病原菌ではない *A. brassicicola* は α -トマチンに対して感受性であり、 α -トマチンを解毒する機構を持っていないように思われる。第 3 章において、HST を生成するトマトの病原菌と非病原菌の α -トマチンに対する解毒能力と HST 生産菌の感染における α -トマチンの役割について詳細に研究を行った。

第3章 *Alternaria alternata* および *Corynespora cassiicola* の感染における α -トマチンの役割

1 序論

多くのナス科植物は二次代謝物のサポニンに属する抗菌性化合物を生産することが知られている (Morrissey and Osbourn 1999; Schönbeck and Schlösser 1976)。トマトなどの *Lycopersicon* 種においては、主なサポニンはステロイド系グリコアルカロイドである α -トマチン (Fig. 16) である。健全なトマト葉組織において α -トマチンは *in vitro* で多くの菌の生育を抑制するのに十分な濃度 (最大 1 mM) で存在しており (Roddick 1974)、多数の病原菌による攻撃に対して自身を保護するための抗菌性化合物であると理解されている (Martin-Hernandez et al. 2000; Osbourn 1996)。一般的に、トマト植物の病原菌は *in vitro* において α -トマチンに抵抗性であり (Arneson and Durbin 1967)、その抵抗性機構の殆どは α -トマチンの酵素的解毒である (Osbourn 1996)。 *Alternaria solani* (Schönbeck and Schlösser 1976)、 *Botrytis cinerea* (Quidde et al. 1998)、 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Ito et al. 2002; Lairini et al. 1996 and 1997; Roldán-Arjona et al. 1999)、 *F. solani* (Lairini and Ruiz-Rubio 1998)、 *Septoria lycopersici* (Bouarab et al. 2002; Martin-Hernandez et al. 2000; Sandrock and VanEtten 2001; Woods et al. 2004) および *Verticillium albo-atrum* (Pegg and Woodward 1986) のような多くのトマト病原菌は様々な方法で α -トマチンから糖を加水分解する細胞外酵素 (トマチナーゼ) を生産することが知られている (Fig. 16)。

HST 生成菌の中で、トマトに病原性がある菌はアルターナリア茎枯病を引き起こす *A. alternata* tomato pathotype (*A. alternata* f. sp. *lycopersici*) とトマト褐色輪紋病を引き起こす *Corynespora cassiicola* の2つである。

A. alternata tomato pathotype によって引き起こされるアルターナリア茎枯病は、暗褐色の茎枯れと葉組織の壊死を特徴とする病害である (Gilchrist and Grogan 1975; Grogan et al. 1975)。本菌は 1975 年にカルフォルニアにおいて Earlypak7 など特定のトマト品種のみに茎枯病を引き起こすことが報告され (Grogan et al. 1975)、1981 年に本菌の生産する HST (AAL 毒素) の単離および構造決定が行われた (Bottini et al. 1981)。また、日本では 1970 年代後半に温室栽培品種三重ファーストに本病害の発生が認められ、Kohmoto et al. (1995) はそこから分離された *Alternaria* 属菌の生産する HST (AL 毒素) は、AAL 毒素と同一である可能性を報告した。さらに、本菌は非病原性 *A. alternata* と形態的に区別できないことから、特定の品種に対する病原性を獲得した病原型の一つであるとして、本病原菌名を *A. alternata* tomato

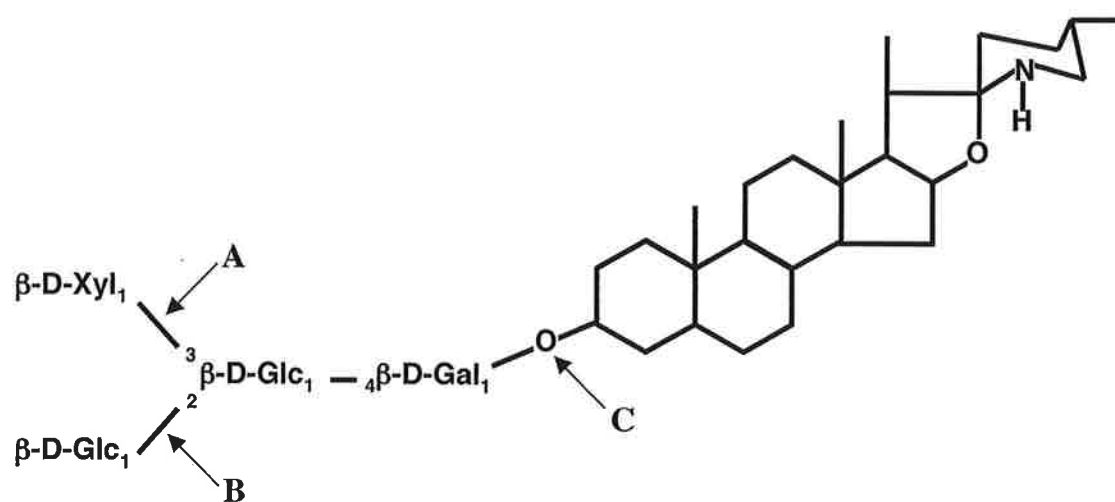


Fig. 16. Chemical structure of α -tomatine and the cleavage sites by fungal enzymes. (A) *Botrytis cinerea*, (B) *Septoria lycopersici*, *Verticillium albo-atrum*, (C) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. solani*, *Alternaria solani*.

pathotype とした (Kohmoto et al. 1982)。AAL 毒素はポリケチドあるいはアミノペントールに分類され、トマト細胞のスフィンゴ脂質生合成系に作用することが明らかになっている (Brandwagt et al. 2000; Wolpert et al. 2002)。最近、Akamatsu et al. (1997) は AAL 毒素生産欠損変異株が感受性トマト品種において病原性を欠損していることを報告し、AAL 毒素が本菌の病原性発現に不可欠であることを明らかにした。

一方、*C. cassiicola* によるトマトの病害は、1936 年に Sierra Leone で初めて発見され、Wei (1950) により target spot 病と命名された。また、1975 年に Onesirosan et al. (1975) は本菌の培養濾液中にトマトのみに毒性を示す HST (CC 毒素) の存在を報告した。日本では 1985 年に岡山県で本菌によるトマトの病害が発生し、1991 年にも同県のトマト生産地において多発した。本病害は、主に葉に発生し、茎・果実にも発生することがある。葉では最初に黄色の小斑点を生じ、次第に黄色のハローに囲まれた径 5 mm 前後の不規則な褐色輪紋状の病斑になり、落葉する。茎では褐色の小斑点を生じ、次第に褐色楕円形の病斑になる。果実では黒色的小斑点を生じ、その後やや凹んだ径 5 mm 前後の黒色円形病斑になる。1992 年に、粕山らは本菌によるトマトの病害を褐色輪紋病菌と命名し、本菌は日本で主要なトマト栽培品種である桃太郎などに強い病原性を示すことを明らかにした (粕山ら 1992)。また、尾谷ら (1995) は日本で発生したトマトより分離した本菌の培養濾液中に CC 毒素が存在することを報告した。

C. cassiicola は様々な植物に病気を引き起こす多犯性菌として知られているが (Ellis 1975; Wei 1950)、寄生性の分化も報告されている (Table 35) (狭間 1993)。トマト褐色輪紋病菌以外にも、キュウリ褐斑病を引き起こす *C. cassiicola* においてキュウリにのみ特異的に毒性を示す HST の存在が報告された (尾谷ら 1998)。そこで、これらの HST を区別するために、トマト褐色輪紋病菌の生産する HST を CCT 毒素、キュウリ褐斑病菌が生産する HST を CCC 毒素と呼称することが提唱された (尾谷ら 1998)。なお、CCT 毒素の化学構造については明らかにされていないが、本毒素は *C. cassiicola* のトマトへの病原性に重要な役割を担っていることが報告されている (Onesirosan et al. 1975; 尾谷ら 1998)。

現在までに、これらの HST を生産するトマト病原菌の α -トマチンに対する感受性およびトマトへの感染における α -トマチンの解毒能については全く報告されていない。本研究においては、*A. alternata* tomato pathotype (トマトアルターナリア茎枯病菌) および *C. cassiicola* (トマト褐色輪紋病菌) における α -トマチン解毒能力について検討し、これらの病原菌の病原性における α -トマチン解毒能力の役割について考察した。

Table 35. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* isolated from various host plants (Hasama 1993)

<i>C. cassiicola</i> isolated from:	Pathogenicity ^{a)}				
	Cucumber	Eggplant	Hydrangea	Perilla	Tomato
Cucumber	+++	—	—	—	±
Eggplant	—	++	—	—	+
Hydrangea	—	±	+	—	±
Perilla	±	±	—	++	±
Tomato	±	+	—	—	+++

a) Plants were sprayed with spore suspensions (10^3 spores/ml) and intensity of symptoms was observed after 7days of inoculation. Pathogenicity is shown as -: no symptom, ±: necrosis at only spotted site, +: necrosis around spotted site, ++: necrosis expanded from spotted site, +++: necrosis over all leaves.

2 材料および方法

1) 供試菌

本実験において使用した各種 *Alternaria* 属菌株および *C. cassicola* 菌株を Table 36 に示した。これらの菌株は試験管中の PDA 上で 25°C で保存した。

2) 供試植物

トマト (*Lycopersicon esculentum*) 品種である桃太郎の種子をポットに入れた土に播き、24~26°C の温室内で約 3~4 週間生育させた。第 2~3 葉の幼葉を実験に使用した。

3) 胞子の調整

A. alternata の IF08984 菌株および O-94 菌株、*A. brassicicola* の O-264 菌株、*A. brassicae* の O-265 菌株をシャーレ上の V-8 ジュース寒天培地 (O-265 菌株の場合はローズベンガル 4 mg/ℓ を添加) に接種し、25°C 暗下で 2~3 週間培養した。培地表面に形成された胞子を DW 中に筆でかき取り、4 重キムワイプで濾過し遠心分離 (800 ×g、5 分、20°C) した。沈殿した胞子を DW に再懸濁し、吸引濾過により濾紙 (Whatman No.50) の上に胞子を集め、乾燥させた。濾紙上の乾燥胞子は -80°C 下で保存し、適時実験に使用した。

A. alternata の O-276 菌株および As-27 菌株は PDB 液体培地 50 ml に接種し、25°C で 3~4 週間培養した。*C. cassicola* の全ての菌株はリチャーズ液体培地 (KNO₃ 10 g/KH₂PO₄ 5 g/MgSO₄ · 7H₂O 2.5 g/FeCl₃ 0.02 g/DW 1 ℓ) 100 ml に接種し、25°C で 3~4 週間培養した。形成された菌体マットを水道水でよく洗浄し風乾した後、プラスチックチャンバー内に移し、25°C 暗下で 2~3 日間静置した。マット上に形成された胞子を DW に懸濁し、吸引濾過によって濾紙上に胞子を集め、乾燥させて -80°C 下で保存した。

胞子使用時には濾紙上の乾燥胞子を筆でかき取って DW に懸濁させ、菌糸片を取り除くために 4 重キムワイプで濾過し遠心分離 (800 ×g、5 分、20°C) した。沈殿した胞子に DW を加え、Thoma 氏血球計により胞子濃度を調整した。

4) α-トマチン処理

トマト葉組織中に含有している α-トマチンの最大濃度は約 1 mM と推定されている (Roddick 1974)。そこで本実験では α-トマチン (東京化成) を 1 mM および 0.1 mM になるように、50 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解し、各菌株の胞子発芽における影響を調べた。α-トマチンは pH 4.0~4.5 の緩衝液においてのみ溶解したが、α-トマチンは pH

Table 36. Isolates of *Alternaria* spp. and *Corynespora cassiicola* used in this study

Pathogen	Isolate	Disease
<i>A. alternata</i>		
apple pathotype	IFO8984	Alternaria blotch of apple
Japanese pear pathotype	O-276	Black spot of Japanese pear
tomato pathotype	AS-27	Alternaria stem canker of tomato
non-pathogen	O-94	
<i>A. brassicae</i>	O-265	Gray leaf spot of cabbage
<i>A. brassicicola</i>	O-264	Alternaria sooty spot of cabbage
<i>C. cassiicola</i>		
from tomato	LC93009	Corynespora target spot of tomato
	LC93020	do.
	Tf882	do.
from cucumber	C95001	Corynespora leaf spot of cucumber
	C95156	do.
	C95251	do.
	Tf584	do.
from perilla	PC90002	Corynespora leaf spot of perilla
	PC95010	do.

6.5~8.0 の条件下において十分な抗菌性を示すことが知られている (Schönbeck and Schlösser 1976)。そこで、 α -トマチンを 0.1 mM (α -トマチンが 1%メタノールに溶解する最大濃度) になるように 1%メタノール (pH 7.0) に溶解し、各菌株の孢子発芽における影響を調べた。

各濃度の α -トマチン溶液に懸濁した孢子懸濁液 (10^5 個/ml) を 40 μ l ずつプラスチックシャーレ上に滴下し、湿室プラスチックチャンバー内のスポンジマット上に置き、25°C暗下で 24 時間静置した。培養後、孢子発芽率を顕微鏡下で測定した。なお、コントロールには 50 mM クエン酸 - リン酸緩衝液 (pH 4.0) および 1%メタノール (pH 7.0) に懸濁した孢子を用いた。

5) TLC

0.1 mM α -トマチン含有 1%メタノール溶液に懸濁した孢子懸濁液 (10^5 個/ml) をプラスチックシャーレ上に滴下し 24 時間培養後に、滴下液を回収し遠心分離 (800 \times g、5 分、20°C) した。さらにその上清をミリポアフィルター (0.45 μ m) に通し、濃縮乾固した。100%メタノール 50 μ l に溶解し、シリカゲル TLC (Merck) 上に展開した。展開溶媒は酢酸エチル/メタノール/酢酸/DW (30:20:10:1、v/v/v/v) を用い、2 度展開した。風乾した後、50%硫酸を噴霧し 100°Cで 5 分間熱処理し、検出されたスポットとスタンダードとして用いた α -トマチンおよびトマチジン (Sigma-Aldrich) の R_f 値を比較した。

6) CCT 毒素の調整

トマトに病原性を示す *C. cassicola* (トマト褐色輪紋病菌) の LC93020 菌株および LC93009 菌株をリチャーズ液体培地 100 ml に接種し、25°Cで 3~4 週間培養した。培養濾液を 4 重キムワイプで濾過して、菌糸片を取り除いた。その濾液を Sep-pak C₁₈ カートリッジに注入し、20、70 および 100%メタノール溶液で溶出し、各画分を濃縮し DW 1 ml に溶解した。各画分における毒素活性を Kohmoto (1992) の方法に従って検定した。70%メタノール溶出画分にトマト葉への毒素活性が認められた (Table 37) ので、実験にはこの画分を部分純化 CCT 毒素として使用した。なお、CCT 毒素の濃度をトマト葉に壊死を引き起こす希釈限界値の 4 倍に調整して用いた。

7) 感染誘導活性の検定

トマトに非病原性である各種 *A. alternata* および *C. cassicola* の孢子を CCT 毒素およびコントロールとして DW に 10^5 個/ml の濃度になるように懸濁した。孢子懸濁液を感染行動の観察においてはトマト葉上に滴下し、また壊死斑形成の観察においてはトマト葉に噴霧接種

Table 37. Isolation of CCT-toxin by Sep-pak C₁₈ cartridge of culture filtrates obtained from *C. cassiicola* pathogenic to tomato

Fraction	Toxicity ^{a)}			
	×1	×2	×4	×8
Passed fraction	—	NT		
Adsorbed fraction				
20%MeOH	—	NT		
70%MeOH	+	+	+	—
100%MeOH	—	NT		
DW	—	NT		

a) The culture filtrates of isolates LC93020 and LC93009 of *C. cassiicola* pathogenic to tomato were applied to a Sep-pak C₁₈ cartridge. The fractions eluted with methanol solutions were evaporated and dissolved in DW. Toxicity of the solutions was determined by a tomato leaf necrosis assay. Toxicity is shown as +: necrosis, —: none, NT: no test.

した。25℃で 24 時間培養後、孢子懸濁液の滴下部を切り取り、葉のクロロフィルを除去するためにエタノールと酢酸の混合液 (3:1、v/v) の入ったシャーレに入れた。葉切片を抱水クロラール (8 g) /グリセロール (1 ml) /DW (2 ml) の混合液に入れて、葉切片が透明になるまで静置した。その後、0.1%アニリンブルー溶液で染色し、孢子の感染行動を光学顕微鏡下で観察した。また、培養 48 時間後に孢子懸濁液を噴霧接種したトマト葉に形成された壊死斑数を数えた。

3 結果

1) 孢子発芽に対する α -トマチンの作用

トマトに病原性および非病原性の *A. alternata* や *C. cassiicola* 胞子を 0.1 および 1 mM α -トマチン含有 50 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 4.0)、または、0.1 mM α -トマチン含有 1% メタノール溶液 (pH 7.0) に懸濁し、孢子発芽に対する α -トマチンの影響を調べた。その結果 (Table 38)、*A. alternata* のトマトアルターナリア茎枯病菌株 (As-27) および非病原菌株 (O-94) の孢子発芽においては、0.1 mM α -トマチンでは影響がみられなかったが、1 mM α -トマチンでは O-94 の孢子発芽が若干抑制された。対照的に、*C. cassiicola* 孢子発芽における α -トマチンの影響はトマト褐色輪紋病菌 (LC93009) とキュウリ褐斑病菌 (C95001) との間において明らかに異なっていた。LC93009 の孢子発芽はどの条件の溶液中においても抑制されることはなく、 α -トマチンの影響がみられなかった。一方、C95001 の孢子発芽は 50 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解した 1 mM α -トマチンで完全に、0.1 mM α -トマチンで 60%の抑制がみられ、また 1%メタノール溶液 (pH 7.0) に溶解した 0.1 mM α -トマチンで完全に抑制された。C95001 孢子発芽における 0.1 mM α -トマチンの抑制効果は 50 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 4.0) よりも 1%メタノール溶液 (pH 7.0) の方が高いことから、0.1 mM α -トマチン含有 1%メタノール溶液 (pH 7.0) を今後の実験に使用した。

次に、様々な *Alternaria* 属および *C. cassiicola* の孢子発芽に対する α -トマチンの影響について調べた。その結果 (Table 39)、*A. alternata* のトマトアルターナリア茎枯病菌、リンゴ斑点落葉病菌、ニホンナシ黒斑病菌、非病原菌および *C. cassiicola* のトマト褐色輪紋病菌においては α -トマチンの影響は全くみられなかった。対照的に、*C. cassiicola* のキュウリ褐斑病菌およびシソ斑点病菌の孢子発芽は 40~80%抑制され、*A. brassicae* および *A. brassicicola* では完全に抑制された。

2) 病原菌の α -トマチン解毒能

A. alternata および *C. cassiicola* 各菌株の胞子を 0.1 mM α -トマチン溶液に懸濁し、プラスチックシャーレ上で 25°C暗下で 24 時間培養した。回収した孢子懸濁液から胞子を取り除いた溶液中に活性のある α -トマチンが存在しているかどうかを、本実験において α -トマチンに対してもっとも感受性である *A. brassicicola* (O-264) 胞子を使用した検定方法によって調べた。検定溶液に O-264 胞子を 10^5 個/ml の濃度になるように懸濁し、プラスチックシャーレ上で 25°C暗下で 24 時間培養後、孢子発芽率を観察した。その結果 (Table 40)、O-264 胞

Table 38. Effect of α -tomatine on spore germination of *A. alternata* and *C. cassiicola* isolates

Isolate	Spore germination (%) ^a				
	α -Tomatine concentration (mM)			α -Tomatine concentration (mM) in	
	in buffer (pH 4.0)			1% methanol (pH 7.0)	
	0	0.1	1	0	0.1
<i>A. alternata</i>					
As-27	98.7 \pm 1.5	99.7 \pm 0.6 (-1.0)	96.7 \pm 0.6 (2.0)	99.3 \pm 1.2	99.7 \pm 0.6 (-0.4)
O-94	88.7 \pm 1.5	92.3 \pm 1.2 (-4.1)	58.7 \pm 7.4 (33.8)	90.7 \pm 3.2	90.7 \pm 1.5 (0)
<i>C. cassiicola</i>					
LC93009	58.3 \pm 4.2	59.3 \pm 8.1 (-1.7)	51.3 \pm 2.5 (12.0)	53.3 \pm 7.5	53.7 \pm 13.2 (-0.8)
C95001	82.3 \pm 3.8	36.7 \pm 3.5 (55.4)	0.0 \pm 0.0 (100.0)	80.0 \pm 6.0	4.0 \pm 3.5 (95.0)

^aSpore suspensions (10^5 spores/ml) in 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 4.0) or in 1% methanol (pH 7.0) containing α -tomatine were dropped on plastic plates. After incubation for 24 hr, percentage of spore germination in drop solutions was determined. Each value is the average of three replications and the standard deviation. Number in parentheses shows inhibition rate (%) of spore germination by α -tomatine.

Table 39. Effect of α -tomatine on spore germination of various isolates of *Alternaria* spp. and *C. cassiicola*

Isolate	Spore germination (%) ^a		Inhibition (%)
	DW	α-Tomatine	
<i>A. alternata</i>			
As-27	98.7±1.2	99.0±1.7	-0.3
IFO8984	99.7±0.6	99.7±0.6	0.0
O-276	97.0±2.0	93.0±6.1	4.1
O-94	95.0±4.4	97.3±3.1	-1.0
<i>A. brassicae</i>			
O-265	62.0±0.0	7.0±6.6	88.7
<i>A. brassicicola</i>			
O-264	45.3±9.7	0.0±0.0	100.0
<i>C. cassiicola</i>			
LC93009	58.5±6.4	60.5±2.1	-1.0
LC93020	55.0±13.7	48.7±10.9	11.5
Tf882	45.0±7.0	44.0±16.0	2.2
C95001	50.3±6.4	17.8±2.6	64.6
C95156	60.0±8.5	12.0±1.4	80.0
C95251	41.5±2.5	12.8±2.2	69.2
PC90002	82.0±2.0	42.0±10.0	48.8
PC95010	82.5±17.5	52.5±13.5	36.4

^a Spore suspensions (10^5 spores/ml) in DW or 0.1 mM α -tomatine (1% methanol) were dropped on plastic plates. After incubation for 24 hr, percentage of spore germination in drop solutions was determined. Each value is the average of three replications and the standard deviation.

Table 40. Detoxification of α -tomatine by germinated spores of *Alternaria* spp. and *C. cassicola* isolates

Isolate	Inhibition (%) ^a
<i>A. alternata</i>	
As-27	14.6
IFO8984	0
O-276	0
O-94	0
<i>A. brassicicola</i>	
O-264	100.0
<i>C. cassicola</i>	
LC93009	0
LC93020	11.7
Tf882	4.5
C95001	100.0
C95156	99.4
Tf584	100.0
PC90002	100.0
PC95010	100.0

^a Spore suspension (10^5 spores/ml) in 0.1 mM α -tomatine (1% methanol) was incubated for 24 hr, and the cell-free solution was assayed for the presence of α -tomatine using *A. brassicicola* (O-264) spores. O-264 spores (10^5 spores/ml) were suspended in the solutions or DW. After incubation for 24 hr, spore germination was observed, and percentage inhibition was calculated.

子発芽は *C. cassiicola* のキュウリ褐斑病菌およびシソ斑点病菌から得た処理液において完全に抑制され、この処理液中に α -トマチンが存在していることが示された。対照的に、全ての *A. alternata* 菌株および *C. cassiicola* のトマト褐色輪紋病菌から得た処理液中では O-264 胞子は通常に発芽し、 α -トマチンは解毒されていることが示された。

A. alternata 各菌および *C. cassiicola* のトマト褐色輪紋病菌による α -トマチンの解毒を確認するために、各菌株の胞子を 0.1 mM α -トマチン溶液中で 24 時間培養し、その処理液中に α -トマチンが存在しているかどうかを、TLC によって調べた。その結果 (Fig. 17)、*A. alternata* 各菌および *C. cassiicola* のトマト褐色輪紋病菌は α -トマチンを極性の低い物質へと分解していたが、*C. cassiicola* のキュウリ褐斑病菌およびシソ斑点病菌では全く分解していなかった。また、分解産物の *Rf* 値は α -トマチンの加水分解産物であるトマチジンの *Rf* 値とは明らかに異なっていた。

3) 病原菌の感染における α -トマチン解毒の役割

HST が介在したトマト病原菌の感染における α -トマチン解毒の役割を解明するために、CCT 毒素の感染誘導作用をトマトに非病原菌の *A. alternata* および *C. cassiicola* 各菌株を用いて調べた。各菌株胞子を CCT 毒素またはコントロールとして DW に懸濁し、トマト品種桃太郎の葉上に接種し、48 時間培養後の胞子の感染行動および葉上の壊死斑形成を観察した (Table 41)。DW に懸濁した非病原菌胞子はいずれもトマト葉上で発芽し、付着器を形成したが、組織内への侵入菌糸形成は観察されず、壊死斑も出現しなかった。一方、CCT 毒素に懸濁した *A. alternata* 各菌の胞子ではトマト葉への侵入および壊死斑形成が観察され感染が誘導されたが、*C. cassiicola* 各菌の胞子ではトマトへの侵入および壊死斑形成は観察されなかった。これらの結果より *A. alternata* および *C. cassiicola* において、 α -トマチン解毒能力がトマト組織への侵入および定着には必須条件であることが示唆された。

さらに、トマト葉への感染時における *C. cassiicola* の α -トマチン解毒能力の重要性について明確にするために、非病原菌である *C. cassiicola* のキュウリ褐斑病菌 (C95001) 胞子を、 α -トマチン解毒能力を有する *A. alternata* 非病原菌 (O-94) の胞子発芽液 (SGF) に懸濁した。SGF 中またはコントロールとして DW に懸濁した C95001 胞子に対する CCT 毒素の感染誘導作用を観察した結果 (Fig. 18)、CCT 毒素によって SGF 中に懸濁した C95001 胞子の感染は誘導されたが、DW に懸濁した胞子においては誘導されなかった。

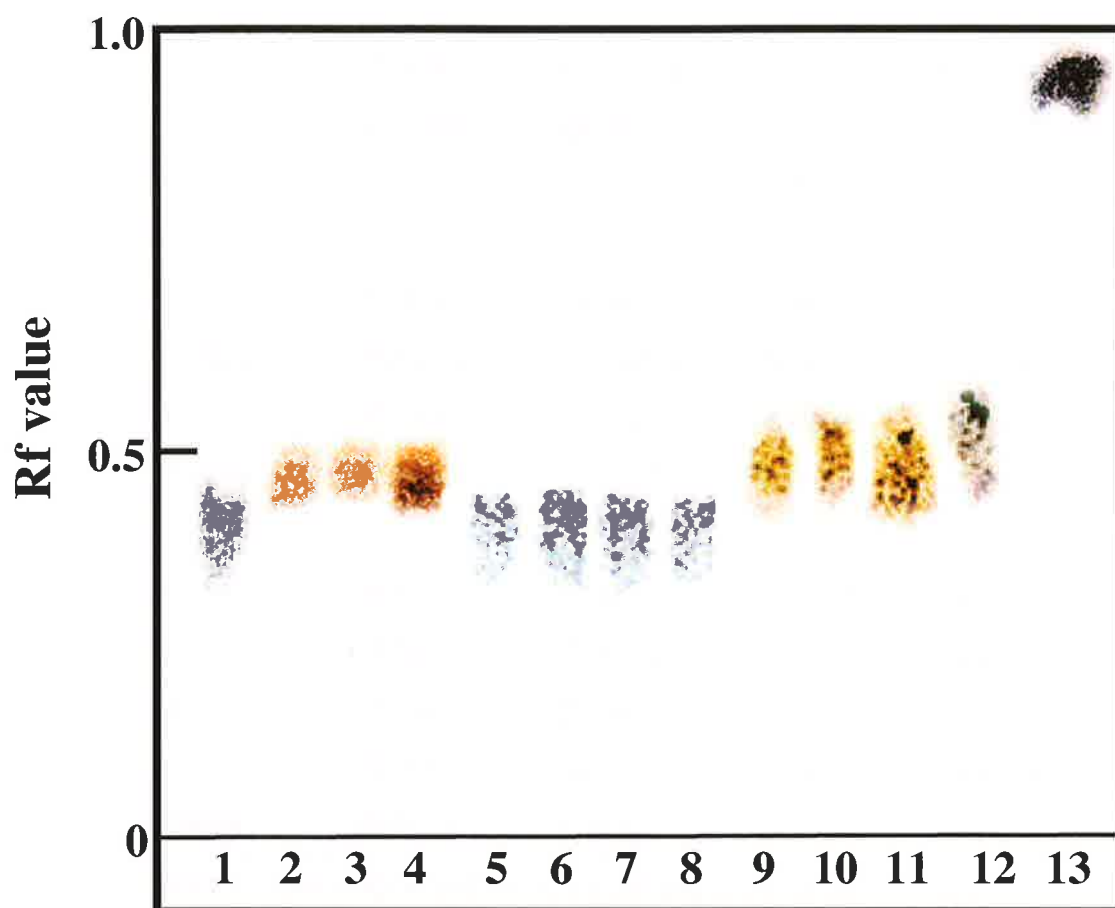


Fig. 17. TLC analysis of α -tomatine-detoxified products by *A. alternata* and *C. cassiicola* isolates. Spore suspensions (10^5 spores/ml) in 0.1 mM α -tomatine (1% methanol) were incubated for 24 hr, and the cell-free solutions were evaporated and dissolved in 100% methanol. The solutions were loaded on TLC plates and developed twice with a solvent system of ethyl acetate, methanol, acetic acid, and water (30:20:10:1, v/v/v/v).

Lanes; 1, α -tomatine; 2, LC93009; 3, LC93020; 4, Tf882; 5, C95001; 6, Tf584; 7, PC90002; 8, PC95010; 9, O-94; 10, O-276; 11, IFO8984; 12, As-27; 13, tomatidine.

Table 41. Effect of CCT-toxin on infection of *A. alternata* and *C. cassiicola* isolates non-pathogenic to tomato

Inoculation		Infection behavior ^a			Necrotic lesion (spots/cm ²) ^b
Isolate	Suspended in:	Spore germination (%)	Appressorium formation (%)	Infection hypha formation (%)	
<i>A. alternata</i>					
IFO8984	DW	97.3±1.5	25.3±7.6	1.7±1.2	6.4±9.1
	CCT-toxin	98.0±1.4	57.0±12.7	47.2±6.8	41.8±16.3
O-94	DW	98.3±2.1	23.0±2.6	0.0±0.0	0.0±0.0
	CCT-toxin	92.7±6.4	52.3±2.5	50.8±3.3	20.8±8.1
<i>C. cassiicola</i>					
LC95020	DW	96.0±4.6	63.8±3.2	67.7±5.5	11.4±5.4
C95001	DW	73.0±7.1	27.0±1.4	9.2±2.1	4.3±2.2
	CCT-toxin	67.0±4.2	27.5±0.7	9.1±2.8	5.9±2.6
PC90002	DW	58.0±4.2	24.7±3.1	2.4±4.1	0.0±0.0
	CCT-toxin	85.0±2.8	13.5±6.4	0.0±0.0	0.0±0.0

^a Spore suspensions (10⁵ spores/ml) in DW or CCT-toxin solution were dropped on tomato leaves and incubated for 48 hr. Infection behavior was observed under a microscope. Each value is the average of three replications and the standard deviation.

^b Spore suspensions (10⁵ spores/ml) in DW or CCT-toxin solution were sprayed on tomato leaves. After incubation for 24 hr, the number of necrotic spots per cm² of leaf was recorded. Each value is the average of three replications and the standard deviation.

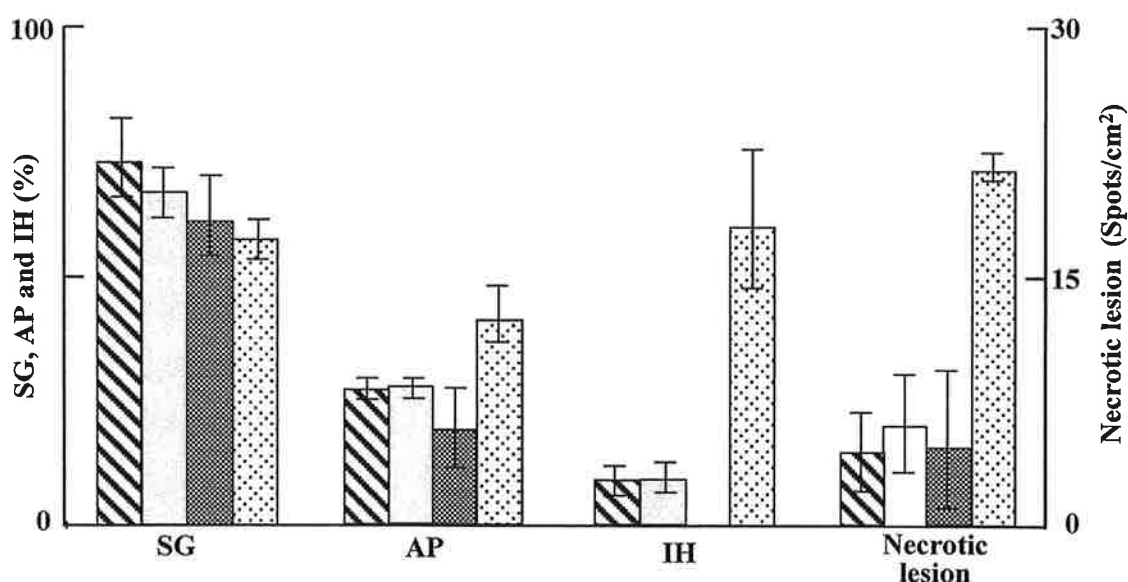


Fig. 18. Effect of CCT-toxin on infection behavior of *C. cassicola* cucumber isolate C95001. Spore suspensions (10^5 spores/ml) of *A. alternata* isolate O-94 was dropped on tomato leaves, and spore germination fluid (SGF) was obtained after incubation for 24 hr. Spores of C95001 were suspended in the SGF containing CCT-toxin at 10^5 spore/ml, and infection-inducing activity of CCT-toxin was evaluated on the basis of infection behaviors of the spores.

▨: spores of C95001 suspended in DW, □: spores of C95001 suspended in CCT-toxin, ▤: spores of C95001 suspended in O-94 SGF, ▩: spores of C95001 suspended in O-94 SGF and CCT-toxin. SG: spore germination, AP: appressorial formation, IH: infection hypha formation.

4 考察

トマトには、低分子抗菌性化合物のサポニンである α -トマチンが存在している (Martin-Hernandez et al. 2000, Osbourn 1996)。それゆえ、トマトの病原菌は α -トマチンの抗菌作用を打破するための能力を持っていないてはならない。本研究において、HST を生産するトマトの病原菌、*A. alternata* tomato pathotype (トマトアルターナリア茎枯病菌) および *C. cassicola* (トマト褐色輪紋病菌) の α -トマチンに対する感受性を調べた。各種 *A. alternata* 菌株ではトマトへの病原性に関係なく全ての菌が、また *C. cassicola* ではトマト褐色輪紋病菌のみが、1 mM の濃度の α -トマチンでもほとんど孢子発芽は抑制されず、0.1 mM の濃度では全く抑制されなかった。対照的に、*A. brassicae*、*A. brassicicola*、*C. cassicola* のキュウリ褐斑病菌およびシンシ斑点病菌の孢子発芽は 0.1 mM α -トマチンでも顕著に抑制された。これらの結果より、*A. alternata* 菌株はトマトへの病原性に関係なく α -トマチンに抵抗性であり、*C. cassicola* 菌株ではトマトの病原菌のみが α -トマチンに抵抗性であることが示唆された。

トマトの病原菌は一般的に、トマトの非病原菌よりも α -トマチンに対し抵抗性である (Arneson and Durbin 1967)、また、トマトの病原菌の α -トマチンに対する抵抗性は α -トマチンの酵素的解毒能力と関連があること (Osborn 1996) が報告されている。本研究において、トマトに病原性および非病原性の *A. alternata* 菌株やトマトに病原性の *C. cassicola* の発芽孢子は α -トマチンを極性の低い物質に分解することによって解毒したが、トマトに非病原性の *C. cassicola* の孢子は解毒できなかった。 α -トマチンの抗菌活性は、病原菌の細胞膜に存在するエルゴステロールと複合体を形成し、細胞膜の凝集、小孔の形成を経て膜流動性や機能を喪失させることによって引き起こされると考えられている (Fenwick et al. 1992)。抗菌活性は α -トマチン構造中の 4 つの糖鎖に依存しており、各病原菌が生産する α -トマチン分解酵素の作用機構は以下のように報告されている (Fig. 16) (Keukens et al. 1995; Osbourn 1996)。(i) *A. solani* (Schönbeck and Schlösser 1976) や *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Lairini et al. 1996) によって報告されたように、 α -トマチンの 4 つの糖 (β -lycotetraose) を取り除き、トマチジンに変換される。(ii) *Septoria lycopersici* (Martin-Hernandez et al. 2000) によって報告されたように、末端の D-グルコースを取り除き、 β 2-トマチンに変換される。(iii) *Botrytis cinerea* (Quidde et al. 1998) によって報告されたように、 β 1,3 末端鎖のキシロースを取り除き、 β 1-トマチンに変換される。*A. alternata* および *C. cassicola* による α -トマチンの解毒機構は α -トマチン分解産物としてトマチジンが検出されなかったことより、(ii) か (iii) であるように思われる。しかしながら、この点に関してはまだ不明確であるので、今後、さらに詳細に調べていくことが必要である。

HST 生産菌において、HST は病原性の第一次決定因子として病原菌の感染成立に重要な役割を担っている (Kohmoto and Otani 1991)。このことは HST で処理された宿主植物には、非病原菌も感染できるようになるという HST の感染誘導作用によって証明することができる (Kohmoto 1992)。そこで、トマト葉上での CCT 毒素の感染誘導作用を調べた結果、本毒素は α -トマチンに抵抗性の *A. alternata* の感染を誘導したが、 α -トマチンに感受性の *C. cassiicola* の感染は誘導しなかった。なお、本実験において、トマトに非病原性 *C. cassiicola* の胞子は α -トマチン解毒能力が欠損しているにも関わらず、トマト葉上で発芽し、付着器を形成したことより、胞子発芽を抑制するのに十分な濃度の α -トマチンはトマト葉からは滲出しておらず、菌の侵入時に影響を与えているものと思われる。また、トマトに非病原性 *C. cassiicola* 胞子を α -トマチン解毒活性を有する非病原性 *A. alternata* の SGF 中に懸濁すると、CCT 毒素は胞子のトマト組織への感染を誘導した。これらの結果より、トマトアルターナリア茎枯病菌およびトマト褐色輪紋病菌はその感染過程において α -トマチンを解毒していること、その解毒能力は HST が介在する病原菌のトマト組織への感染において必須であることが明らかとなった。最近、Ito et al. (2002) は *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* のトマチナーゼ遺伝子欠損変異体は、トマト植物への病原性が低下したことを報告している。しかし、*S. lycopersici* (Martin-Hernandez et al. 2000) や *Colletotrichum coccodes* (Sandrock and VanEtten 2001) におけるトマチナーゼ遺伝子欠損変異体はトマトへの病原性になんら影響を与えないことも報告されている。したがって、*A. alternata* や *C. cassiicola* において、感染時の α -トマチン解毒の役割をより詳細に調べるためにはトマチナーゼ遺伝子のクローニングおよび遺伝子破壊等の研究が必要である。

A. alternata のうちトマトに非病原性のニホンナシ黒斑病菌、リンゴ斑点落葉病菌および非病原性菌の発芽胞子はトマトの病原菌と同様に α -トマチンを解毒した。*F. oxysporum* の分化型においてもトマトに非病原性の分化型は α -トマチンの解毒能力を有していることが報告されている (Lairini et al. 1997)。一方、*C. cassiicola* においてはトマトに病原性があるトマト褐色輪紋病菌のみが α -トマチンの解毒能力を具備しており、トマトに非病原性であるキュウリ褐斑病菌やシソ斑点病菌ではその能力は持っていなかった。同様なことは *A. solani* においても知られており、Schönbeck and Schlösser (1976) は、トマトから分離された *A. solani* はトマト果実に感染できるが、ジャガイモから分離した *A. solani* はトマト果実に感染できず、トマトに非病原性 *A. solani* は α -トマチン解毒能力を有していないことを報告している。それゆえ、トマトの病原菌を含む種においては、 α -トマチンの解毒能力において少なくとも 2 つのタイプが存在する。1 つはトマトへの病原性には関係なく種内の全ての菌が α -トマチン解毒能力をもっているグループであり、もう 1 つはトマトの病原菌のみが α -トマチン解

毒能力をもっているグループである。今回、実験で用いた *A. alternata* および *C. cassicola* は トマトの病原菌における α -トマチン解毒と HST 生産の両能力の獲得機構を解明するための 良いモデルとして役立つかもしれない。

第4章 総合考察

現在、約 8,000 種類にのぼる植物病害のうち、約 80%が糸状菌によって引き起こされていると言われている。人類の生存を支える農業生産に大きな被害を与えてきた糸状菌病から食物を守っていくことは重要な課題である。自然界では、殆どの病原菌は植物の非特異的抵抗性によって感染できないが、特定の病原菌が特定の植物においてのみに寄生することができるのは、病原菌とそれを受容する植物間に基本的親和性関係が成り立っているからである。HST はこの関係の成立に重要な役割をもった病原菌の宿主識別因子として注目されてきた (Nishimura and Kohmoto 1983)。日本で初めて HST が発見されて以来約 70 年が経過したが、今日の分子生物学的解析手法の急速な進展に伴って、ここ数年で驚異的に HST 研究は発展してきた。HST は極めて低濃度で宿主細胞に選択的毒性を誘起するが、その病理学的役割は宿主抵抗反応の始動停止による病原菌受容化の誘導であるとされている (尾谷 1991)。HST が介在する病害における植物と病原菌間での複雑な相互作用を研究することは、病害防除の観点からも好適のモデルとなり、重要であると思われる。そこで本論文では HST 生産菌の感染に関与する植物側の因子を探索し、その病理学的役割について考察した。

第2章においては、アブラナ科植物黒すす病を引き起こす *Alternaria brassicicola* の感染に関与すると思われる植物成分として、*A. brassicicola* における HST の AB 毒素生成を誘導する植物成分を第1節で述べ、*A. brassicicola* 胞子発芽を促進する植物成分および阻害する植物成分を第2節で述べた。*A. brassicicola* の HST である AB 毒素は、これまでの HST が低分子の二次代謝物であるのに対し、約 35 kDa の蛋白質であり、宿主植物に水浸状壊死を誘起する (Otani et al. 1998a, 1998b)。また、AB 毒素生成は各種液体培地中では全く見られず、宿主であるアブラナ科植物の葉上の胞子発芽液中にのみ検出されることより、本菌の HST 生産には宿主植物が関与することが示唆された。そこで AB 毒素生成誘導因子を探索したところ、宿主葉上の胞子発芽液中に顕著な毒素生成誘導活性が示された。本因子は *A. brassicicola* 胞子発芽後すぐに宿主葉から遊離される約 1.3 kDa の配糖体であった (第1節)。病原糸状菌による HST 生産が宿主との相互作用によって誘導される例は初めてのことであり、大変興味深い。

一方、*A. brassicicola* の胞子は、高濃度胞子懸濁液の場合、宿主葉上では発芽するが、非宿主葉上およびプラスチック上では胞子発芽が顕著に抑制される。このことより、宿主葉の何らかの成分が胞子発芽を促進していることが考えられ、本研究の結果 (第2節)、約 600 Da の宿主葉由来の成分が発芽促進に関与していることが示唆された。本因子は *A. brassicicola* 以外の菌によってもアブラナ科植物葉から遊離されるので、アブラナ科植物上に病原菌が存

在することによって、非特異的に滲出されるものと思われる。以上の結果より、*A. brassicicola* におけるアブラナ科植物への感染に関しては、*A. brassicicola* の孢子がアブラナ科植物葉に接触すると、植物葉から約 600 Da の物質が滲出し、孢子発芽が促進される。その後、発芽孢子から放出される何らかの因子が植物葉から約 1.3 kDa の配糖体を遊離し、この配糖体によって発芽孢子から AB 毒素が生産されるという図式が想定される。今回、明らかにした宿主植物成分は HST 生成に関連する因子であり、このメカニズムを明らかにしていくことは病害防除の観点からも重要であろう。

また、上述の実験の過程でトマト葉磨碎液が *A. brassicicola* 孢子の発芽を顕著に阻害することを見出した。トマト葉より孢子発芽阻害物質の単離を行った結果（第 2 節）、本物質はトマトの抗菌性物質として知られている α -トマチンと同定され、*A. brassicicola* には α -トマチンを解毒する能力がないことが明らかとなった。そこで、HST を生産するトマト病原菌における α -トマチンの影響について調べ、その感染過程における病理学意義について第 3 章で述べた。トマトに病原性および非病原性の *A. alternata* および *C. cassiicola* の α -トマチンの感受性を調べた結果、*A. alternata* では病原性に関係なく全ての菌が α -トマチンに抵抗性であり、解毒能力を有していた。一方、*C. cassiicola* ではトマトの病原菌のみが α -トマチンに抵抗性で解毒能力を有しており、トマトの非病原菌では α -トマチンに感受性であった。また、トマト病原菌のトマトアルターナリア茎枯病菌およびトマト褐色輪紋病菌のトマトへの感染における α -トマチン解毒能力の役割に関して検討した結果、これらの病原菌がトマトに病原性を示すためには、HST 生産以外に α -トマチン解毒能力も必須であることが明らかとなった。

植物は病原菌の感染に対して潜在的な抗菌性物質や誘導的な抗菌性物質の生産により自身を保護している。HST は誘導的宿主抵抗反応の始動を停止して病原菌の受容体制化を誘導し、病原菌の感染を成立させると考えられている。今回の研究からトマトに病原性を示す HST 生産菌は、トマトに先在的に存在しているサポニンの α -トマチンを解毒する能力を持っており、HST による宿主抵抗反応の始動停止前に、潜在的な静的抵抗性を打破する能力を有したもののみが植物上で感染初期行動（孢子発芽、付着器および侵入菌糸形成）を開始し、その後、分泌された HST によって誘導的な動的抵抗性が抑制され、菌受容化に至るものと思われる。このように宿主植物側には病原菌の感染に対して潜在的な抵抗性が存在し、一方で病原菌側はそれに打ち勝つ能力を備えていることは他の病原菌でも認められており、普遍的な現象であると考えられる。一方、ウリ類炭疽病菌を用いた宿主植物と病原菌との相互作用における研究では、宿主植物表層のクチクラ成分によって病原菌の感染器官の分化を誘導することが報告されている（久保 2005）。また、イネいもち病菌においては植物表層の

クチン成分と疎水性表面とが付着器形成のシグナル因子であることが示されており（鎌倉 2001）、病原菌が植物成分を利用して感染を成立させることも知られている。このような病原菌と植物成分との関係を利用することによって病害を防除するという考え方がある。従来の動的抵抗性の誘導剤を利用して植物を病原菌から防御するという方法よりも、植物成分を利用するため、植物に全くストレスを与えることのない植物に優しい病害防除戦略となるであろう。

一方、腐性的に生存してきた糸状菌がある特定の植物に適応し、どのように感染能力を獲得してきたのかについて解明することは、植物と病原菌との相互作用の仕組みを考慮した効果的な植物保護戦略となるであろう。特に、HST が介在した病害においては、HST 受容因子を無効にする、あるいは HST 生成を抑制することにより HST 生産菌に対して耐病性を獲得することができると思われる。これまで報告されてきている抵抗性植物は、病原菌の非病原性遺伝子と植物の抵抗性遺伝子の相補的な組合せによって発現された品種特異的抵抗性に関与するものが多く、容易に病原菌の非病原性遺伝子の変異した菌の出現によって植物が再び感受性化する事例がよく知られている。しかし、HST 受容因子や HST 生成誘導因子を無効にして作出した耐病性植物に対して再び病原菌が病原性を発揮するためには新たな感染機能の獲得が必要となるので、この耐病性は比較的安定であると思われる。HST 受容や HST 生成制御のメカニズムは多種多様であるが、こうした情報から新たな病害防御戦略を構築していけると考えられる。

要 約

特定の植物病原菌は特定の植物種あるいは植物品種などを選択的に侵害し、病害を引き起こす。このような明確な宿主特異性を決定する病原菌側の因子として、以前より宿主特異的毒素 (HST) の存在が明らかとなっている。HST 生産菌では病原菌から宿主識別のためのシグナル因子としての HST の放出があり、それを受容せざるを得ない植物のみが病原菌を受け入れ、感染が成立すると考えられている。

このような病原菌の感染の成立には各種の植物成分が関与することが知られている。ある種の病原菌では植物の感染時に宿主成分を認識することにより感染器官の形態分化を行うことや病原性関連因子を放出することなどが報告されている。一方、植物は侵入しようとする病原菌に対して抵抗性を示す多種多様な植物成分を含んでおり、病原菌はこれらの障害を排除する何らかの仕組みを備えていると考えられている。本論文では、HST 生産菌の感染に関与する植物成分の探索および同定を行い、その病理学的役割について検討した。

1. *Alternaria brassicicola* による宿主特異的 AB 毒素生成に関与する宿主成分

Alternaria brassicicola (アブラナ科植物黒すす病菌) によって生成される蛋白質 HST の AB 毒素は宿主葉上での孢子発芽時にのみ検出されることより、発芽孢子からの AB 毒素生成には宿主植物由来の何らかの因子が関与していることが示唆された。そこで、*A. brassicicola* の発芽孢子からの AB 毒素生成に関与する宿主因子の探索およびその解析を行った。

宿主および非宿主葉上より得た孢子発芽液 (SGF) において AB 毒素生成誘導活性を調べた結果、宿主葉上から回収した SGF においてのみ顕著な誘導活性がみられた。また、SGF における毒素生成誘導活性は孢子発芽直後より検出され、その後、AB 毒素が SGF 中に放出された。以上のことより、宿主植物上の SGF 中には毒素生成誘導因子の存在が示唆された。次に、SGF 中の毒素生成誘導因子が宿主由来かどうか調べるために、プラスチックシャーレ上より回収した SGF を宿主および非宿主葉上に滴下し、24 時間後にその滴下液の毒素生成誘導活性を検討した。その結果、宿主葉上の滴下液にのみ顕著な誘導活性が認められ、本因子は宿主由来であることが明らかとなった。

SGF 中の毒素生成誘導因子は熱に安定な水に可溶性物質であり、その活性は KIO_4 や α -マンノシダーゼ処理によって完全に消失することより、本因子は α -マンノースからなる構造が誘導活性に関与する多糖類であることが示唆された。そこで、SGF から各種クロマトグラフィーにより精製した誘導因子をゲル濾過 HPLC で分析した結果、誘導因子は単一ピークとして検出され、その分子量は約 1.3 kDa と推定された。さらに、GC および GC-MS に

よる分析の結果、本因子は D-マンノースおよび D-ガラクトースからなる配糖体であることが示唆された。プラスチックシャーレ上に本誘導因子を処理して得た SGF を SDS-PAGE で解析した結果、約 38 kDa のバンドが顕著に検出され、本誘導因子によって発芽胞子から主に AB 毒素が生成されることが示された。

以上の結果より、*A. brassicicola* の発芽胞子による AB 毒素生成機構に関して、(i) 発芽胞子による宿主葉からの配糖体の遊離、(ii) 宿主由来の配糖体による発芽胞子中の AB 毒素生成の誘導、(iii) 発芽胞子からの AB 毒素の放出、という一連の図式が想定された。

2. *A. brassicicola* 胞子発芽に関与する植物成分

A. brassicicola は高濃度胞子懸濁液 (10^6 個/ml 以上) の場合、宿主葉上では顕著な発芽を示すが、非宿主葉およびプラスチックシャーレ上では殆ど発芽せず、本菌の胞子発芽において宿主植物の何らかの因子が関与していることが示唆された。そこで、*A. brassicicola* 胞子懸濁液を各植物葉に滴下して得た SGF における胞子発芽促進活性の検定を行った結果、宿主葉上より得た SGF にのみ顕著な活性が検出された。胞子発芽促進活性は宿主葉上に胞子接種 2 時間後に検出され、4 時間後から胞子発芽を開始した。また、非病原性 *A. alternata* の胞子懸濁液をアブラナ科植物葉上に滴下して得た SGF においても胞子発芽促進活性がみられたことより、胞子発芽促進因子は各種病原菌の胞子がアブラナ科植物上に存在する時にアブラナ科植物葉から放出されることが示唆された。宿主葉上から得た *A. brassicicola* SGF から各種クロマトグラフィーにより精製した胞子発芽促進活性画分をゲル濾過 HPLC で分析した結果、単一のピークとして検出され、約 600 Da の物質であると推定された。

一方、本実験を行っている過程で、トマト葉磨碎液中に *A. brassicicola* 胞子を懸濁すると胞子発芽が顕著に抑制されることが見出され、トマト葉中に何らかの胞子発芽阻害物質が存在することが示唆された。そこで、トマト葉磨碎液から各種クロマトグラフィーにより胞子発芽阻害物質を精製し、得られた活性画分において TLC 分析を行った結果、50%硫酸の呈色反応により 1 つのスポットが検出され、このスポットに胞子発芽阻害活性が認められた。得られた胞子発芽阻害物質はトマトに存在する抗菌性化合物の α -トマチンである可能性が考えられたため、TLC 純化画分と α -トマチンを TLC で分析した結果、同じ R_f 値にスポットが検出された。さらに、純化画分を FAB-MS および $^1\text{H-NMR}$ で解析した結果より、胞子発芽阻害物質は α -トマチンであると同定した。

3. *A. alternata* および *Corynespora cassiicola* の感染における α -トマチンの役割

トマトには、低分子抗菌性化合物のサポニンである α -トマチンが存在している。そこで、

HST を生産するトマトの病原菌である *A. alternata* tomato pathotype (トマトアルターナリア茎枯病菌) および *C. cassiicola* (トマト褐色輪紋病菌) の α -トマチンに対する感受性を調べ、その病理学的役割について検討した。各種 *Alternaria* 属菌および *C. cassiicola* の孢子発芽に対する α -トマチンの影響を調べた結果、*A. alternata* では病原性に関係なく全ての菌が、*C. cassiicola* ではトマト褐色輪紋病菌のみが α -トマチンに抵抗性を示した。一方、トマトに非病原性の *A. brassicae* および *A. brassicicola*、*C. cassiicola* のキュウリ褐斑病菌およびシンシ斑点病菌では孢子発芽が抑制され、 α -トマチンに感受性であった。また、 α -トマチンに抵抗性である *A. alternata* および *C. cassiicola* の発芽孢子は α -トマチンを極性の低い物質に分解することにより解毒したが、 α -トマチンに感受性の孢子は解毒できなかった。

次に、HST が介在する病原菌のトマトへの感染における α -トマチン解毒の役割を解明するために、トマト褐色輪紋病菌が生成する HST (CCT 毒素) の感染誘発作用をトマトに非病原菌の *A. alternata* および *C. cassiicola* 各菌を用いて調べた。その結果、CCT 毒素は α -トマチンに抵抗性の *A. alternata* のトマトへの感染を誘導したが、 α -トマチンに感受性の *C. cassiicola* の感染は誘導しなかった。一方、トマトに非病原性の *C. cassiicola* 孢子をも α -トマチン解毒活性を有する非病原性 *A. alternata* の SGF 中に懸濁すると、CCT 毒素は *C. cassiicola* 孢子のトマトへの感染を誘導した。以上の結果より、トマトアルターナリア茎枯病菌およびトマト褐色輪紋病菌ではトマトへの感染過程において HST 生成以外に α -トマチン解毒能力が必須であることが明らかとなった。

Summary

Certain fungal pathogens, especially in the genera *Alternaria* are known to produce host-specific toxins (HSTs) as agents of virulence or pathogenicity. HSTs are very useful for the study of the mechanism underlying host specificity in parasitism, being reliable substitutes for the pathogens that produce them. In the mechanism that determines specificity in the disease involving HSTs, it has been suggested that the induction of susceptibility on host plants is established by a HST-specific suppression of the defense responses in host plants.

Plants have evoked different mechanism to protect themselves against a great variety of invasive pathogens. The plant disease resistance can be classified two types. One is the constitutive resistance such as structural barriers or preformed antimicrobial secondary metabolites, and another is the induced resistance such as phytoalexins or PR-proteins etc. However, pathogens use different strategies to counter these plant defenses, including degradation of preformed antimicrobial compounds and the production of molecules that suppress induced resistance. On the other hands, it has reported that pathogens recognize the factors of host plants during the infection and differentiate infection structures or produce functional pathogenicity factors. Thus, various compounds of host are involved in the infection process of the pathogens. The purpose of this study is to detect compounds involved in infection of HST-producing pathogens, and to discuss their pathological role.

1. Host compounds involved in production of host specific AB-toxin by *A. brassicicola*

A. brassicicola, the causal agent of black spot disease of *Brassicae* plants produces a HST (AB-toxin). Although most of HSTs are low-molecular-weight secondary metabolites and are produced in culture media as well as spore germination fluids (SGFs) of the pathogens, AB-toxin is a protein and is released from spores germinating only on host leaves. The results imply that host-related factors for AB-toxin production are involved in spore germination of *A. brassicicola*. Therefore, the experiments were focused on detection of the factors for inducing AB-toxin production in SGFs obtained from host leaves. SGFs of the pathogen had the activating for inducing AB-toxin production within 3 hr after spore germination, and subsequently AB-toxin was released in the SGFs. When spore suspensions in water were incubate on non-host leaves and plastic plates, AB-toxin was not produced. However, diffusates from host leaves treated with SGFs of the pathogen on plastic plates induced AB-toxin production. These results indicated that factors for inducing toxin production are released from host leaves by germinating spores of *A. brassicicola*. The toxin-inducing activity of SGF was heat-stable, and insoluble

in organic solvents. Furthermore, the activity was lost completely by treatment with KIO_4 and α -mannosidase. A toxin-inducing factor was purified from SGF by gel-filtration chromatography. The purified factor was estimated to be about 1.3 kDa and was confirmed to be a glycoside containing mannose and galactose by GC and GC-MS analyses. The activity of the purified factor was detectable at the low concentration of 20 ng/ml. Based on these results, the mechanism of AB-toxin production by germinating spores of *A. brassicicola* is summarized as follows: (i) release of a glycoside from host plants by substance(s) derived from germinating spores, and (ii) release of AB-toxin from germinating spores by recognition of glycoside.

2. Plant compounds involved in spore germination of *A. brassicicola*

When spore suspensions of *A. brassicicola* at high concentrations (10^6 spores/ml) were dropped on plant leaves and plastic plates, spores germinated on host leaves, but not on non-host leaves and plastic plates. This result implies that a host-related factor is involved in spore germination of *A. brassicicola*. Therefore, spore suspensions of *A. brassicicola* were dropped on various leaves and SGFs were collected after incubation for 24 hr and assayed for spore germination-stimulating activity. The activity was detected only in SGF on host leaves. Spore germination-stimulating activity of *A. brassicicola* were detected 2 hr after inoculation, and spores began to germinate 4 hr after inoculation. Spore suspensions of non-pathogenic *A. alternata* were dropped on *Brassica* leaves, and SGF collected after incubation for 24 hr. When the SGF was assayed for spore germination-stimulating activity, the activity was detected. These results suggest that the spore germination-stimulating factors were released from *Brassica* leaves when spores of various pathogens exist on *Brassica* leaves. A spore germination-stimulating factor was purified from SGF of *A. brassicicola* by various chromatographies. The purified factor was estimated at about 600 Da by gel-filtration HPLC.

When spores of *A. brassicicola* were suspended in homogenates of tomato leaves, the spore germination was significantly inhibited. A spore germination-inhibiting compound was purified from homogenates of tomato leaves by various chromatographies. The compound was detected as a spot on TLC plate and had the same R_f value as α -tomatine, an antimicrobial compound in tomato. From the results of FAB-MS and $^1\text{H-NMR}$ analyses, the spore germination-inhibiting compound was characterized as α -tomatine.

3. The role of α -tomatine in infection of *A. alternata* and *C. cassicola*

In tomato plants, α -tomatine, a steroidal glycoalkaloid saponin inhibits fungal growth. Therefore,

tomato pathogens that produce HSTs, *A. alternata* tomato pathotype causing Alternaria stem canker and *Corynespora cassiicola* causing Corynespora target spot, were investigated for sensitivity to α -tomatine. Although spore germination of *A. alternata* pathogenic and non-pathogenic to tomato and of *C. cassiicola* pathogenic to tomato was not affected by 0.1 mM α -tomatine, spore germination of *C. cassiicola* non-pathogenic to tomato was significantly inhibited. This result shows that *A. alternata*, regardless of its pathogenicity, and only the *C. cassiicola* pathogenic to tomato are resistant to α -tomatine. Germinating spores of *A. alternata* and *C. cassiicola* resistant to α -tomatine detoxified α -tomatine by degrading of to a less polar product. After inoculation of tomato leaves, spores of *A. alternata* and *C. cassiicola* non-pathogenic to tomato germinated and formed appressoria, but did not form infection hyphae in host tissues. When a HST (CCT-toxin) produced by *C. cassiicola* pathogenic to tomato was added to non-pathogenic spores, colonization to within leaves was observed in *A. alternata*, but not in *C. cassiicola*. On the other hand, when spores of *C. cassiicola* non-pathogenic to tomato were suspended in spore germination fluid of non-pathogenic *A. alternata* with α -tomatine detoxification activity, the fungus could be induced to colonize leaves in the presence of CCT-toxin. These results indicate that *A. alternata* tomato pathotype and *C. cassiicola* pathogenic to tomato detoxify α -tomatine during infection, and that this detoxification is essential for host colonization by pathogens that produce HSTs.

参考文献

- 赤松 創, 尾谷 浩, 児玉基一朗 (2003) 植物病原糸状菌の病原性制御と宿主の耐病性強化の展望.
植物感染生理談話会論文集 39:111-129
- Akamatsu H, Itoh Y, Kodama M, Otani H, Kohmoto K (1997) AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* 87:967-972
- 阿南功一 (1976) 化学的分析. 基礎生化学実験法 5 化学的測定. 丸善, 東京, p 84
- Ameson PA, Durbin RD (1967) The sensitivity of fungi to α -tomatine. *Phytopathology* 58:536-537
- Ayer WA, Pena-Rodriguez LM (1987) Metabolites produced by *Alternaria brassicae*, the black spot pathogen of Canola. Part 1, the phytotoxic components. *Journal of Natural Products* 50:400-407
- Bains PS, Tewari JP (1987) Purification, chemical characterization and host-specificity of the toxin produced by *Alternaria brassicae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 30:259-271
- Balance GM, Lamari L, Bernier CC (1989) Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35:203-213
- Berto P, Belingheri PCL, Dehorter B (1999) Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiol Letter* 180:183-189
- Bottini AT, Bowen JR, Gilchrist DG (1981) Phytotoxins. II. Characterization of a phytotoxic fraction from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Tetrahedron Letter* 22:2723-2726
- Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn AE (2002) A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418:889-892
- Brandwagt BF, Mesbah LA, Takken FLW, Laurent PL, Kneppers TJA, Hille J, Nijkamp HJJ (2000) A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B₁. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:4961-4966
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Cooke DEL, Jenkins PD, Lewis DM (1997) Production of phytotoxic spore germination liquids by *Alternaria brassicae* and *A. brassicicola* and their effect on species of the family Brassicaceae. *Annals of Applied Biology* 131:413-426
- Ellis MB (1957) Some species of *Corynespora*. *Mycological Papers* 65:1-15
- English PD, Jurale JB, Albersheim P (1971) Host-pathogen interactions. Parameters affecting polysaccharide degrading enzyme secretion by *Colletotrichum lindemuthianum* grown in culture. *Plant Physiology* 47:1-6
- Fan CY, Köller W (1998) Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: differential and sequential expression

- of cutinolytic esterases by *Alternaria brassicicola*. FEMS Microbiological Letter 158:33-38
- Fenwick GR, Price KR, Tsukamoto C, Okubo K (1992) Saponins. In: D'Mello JP, Duffus CM, Duffus JH (eds) Toxic substances in crop plants. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 285-327
- Gilchrist DG, Grogan RG (1975) Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Phytopathology 66:165-177
- Grogan RG, Kimble KA, Misagi I (1975) A stem canker of tomato caused by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Phytopathology 65:880-886
- 狭間 渉 (1993) キュウリ褐斑病の発生生態と防除に関する研究. 大分県農業技術センター特別研究報告 2:1-105
- Hodgkin T, MacDonald MV (1986) The effect of a phytotoxin from *Alternaria brassicicola* on *Brassica oleracea* seed production crop. Annals of Applied Biology 100:61-71
- Ito S, Takahara H, Kawaguchi T, Tanaka S, Kameya-Iwaki M (2002) Post-transcriptional silencing of the tomatinase gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Phytopathology 150:474-48
- Johal GS, Briggs SP (1992) Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. Science 258:985-987
- 鎌倉高志、齋藤憲一郎、寺岡 徹、山口 勇 (2001) いもち病菌の付着器形成・誘導に関わる遺伝子. 植物感染生理談話会論文集 37:129-139
- Keukens EAJ, De Vrije T, Van Den Boom C, De Waard P, Plasman HH, Thiel F, Chupin V, Jongen WMF, De Kruijff B (1995) Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. Biochemical Biophysical Acta 1240:216-228
- Kiba A, Toyoda K, Ichinose Y, Yamada T, Shiraishi T (1995) Specific inhibition of cell wall-bound ATPases by fungal suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. Plant Cell Physiology 36:809-817
- 木曾 皓, 田代定良 (1988) キャベツ黒すす病. 作物病害事典 (岸 国平編). 全国農村教育協会, 東京, p 374
- Kodama M, Suzuki T, Otani H, Kohmoto K, Nishimura S (1990) Purification and bioassay of host-selective AT-toxin from *Alternaria alternata* causing brown spot of tobacco. Annals of Phytopathological Society of Japan 56:628-636
- 児玉基一郎, 山岸大輔, 赤木靖典, 赤松 創, 尾谷 浩 (2005) 植物病原糸状菌における二次代謝産物生合成と病原性; ポリケチドおよび環状ペプチドを例にして. 植物感染生理談話会論文集 41:57-67
- Kohmoto K (1992) Determination of host-selective toxins. In: Linskens HF, Jackson JF (eds) Plant toxin analysis. Springer-Verlag, Berlin, pp 51-73

- Kohmoto K, Otani H (1991) Host recognition by toxigenic plant pathogens. *Experientia* 47:755-764
- Kohmoto K, Otani H, Tsuge T (1995) *Alternaria alternata* pathogens. In: Kohmoto K, Singh US, Singh RP (eds) Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Eukaryotes vol. 2. Pergamon, Oxford, pp 51-63
- Kohmoto K, Verma VS, Nishimura S, Tagami M, Scheffer RP (1982) New outbreak of *Alternaria* stem canker of tomato in Japan and production of host-selective toxins by the causal fungus. *Journal of Faculty Agriculture Tottori University* 17:1-8
- Kolattukudy PE, Gamble D (1995) *Nectria haematococca*. In: Kohmoto K, Singh US, Singh RP (eds) Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Eukaryotes vol. 2. Pergamon, Oxford, pp 83-101
- 久保康之 (2004) 植物病原糸状菌の侵入器官の形態文化と病原性. 植物病の探究 (高松ら編). 「植物病の探究」出版会, 津, pp 82-87
- 久保康之, 辻 元人 (2004) 糸状菌の病原性遺伝子. 新版: 分子レベルからみた植物の耐病性 (島本 功ら監修). 羊土社, 東京, pp 64-73
- 窪田昌春, 我孫子和雄, 西 和文 (2003) キャベツセル成型苗の育苗条件が黒すす病の発生に及ぼす影響. 野菜茶業研究所研究報告 2:1-8
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lairini K, Perez-Espinosa A, Pineda M, Ruiz-Rubio M (1996) Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Applied Environmental Microbiology* 62:1604-1609
- Lairini K, Perez-Espinosa A, Ruiz-Rubio M (1997) Tomatinase induction in formae speciales of *Fusarium oxysporum* non-pathogenic of tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50:37-52
- Lairini K, Ruiz-Rubio M (1998) Detoxification of α -tomatine by *Fusarium solani*. *Mycological Research* 102:1375-1380
- Martin-Hernandez AM, Dufresne M, Hugouvieux V, Melton R, Osbourn AE (2000) Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13:1301-1311
- Meehan F, Murphy HC (1947) Differential phytotoxicity of metabolic by-products of *Helminthosporium victoriae*. *Science* 106:270-271
- Morrissey JP, Osbourn AE (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiological Molecular Biological Review* 63:708-724
- Nishimura S, Kohmoto K (1983) Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual*

- Nishimura S, Scheffer RP (1965) Interactions between *Helminthosporium victoriae* spores and oat tissue. *Phytopathology* 55:629-934
- 粕山新二, 井上浩二, 畑本 求 (1992) 岡山県で発生したトマト褐色輪紋病菌 (新称). 日本植物病理学会報 58:544 (講演要旨)
- 岡久美子 (2001) アブラナ科植物黒すす病菌発芽胞子からの AB 毒素生成を誘導する宿主因子の探索. 鳥取大学農学部学士論文
- 岡久美子, 赤松 創, 児玉基一郎, 尾谷 浩 (2002) *Alternaria brassicicola* 発芽胞子からの AB 毒素生成誘導因子の探索. 日本植物病理学会報 68:159 (講演要旨)
- Oka K, Akamatsu H, Kodama M, Nakajima H, Otani H (2005a) Host-specific AB-toxin production by germinating spores of *Alternaria brassicicola* is induced by a host-derived oligosaccharide. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66:12-19
- Oka K, Kodama M, Otani H (2005b) Involvement of a host-derived glycoside in host-specific AB-toxin production by *Alternaria brassicicola*. In: Second Asian Conference on Plant Pathology, Singapore, pp 67-68 (Abstract)
- Oka K, Okubo A, Kodama M, Otani H (2005c) Detoxification of α -tomatine by tomato pathogens, *Alternaria alternata* tomato pathotype and *Corynespora cassiicola*, and its role in infection. *Journal of General Plant Pathology* (in press)
- 岡久美子, 大久保暁子, 中島廣光, 児玉基一郎, 尾谷 浩 (2005a) トマト葉中に存在する *Alternaria brassicicola* 胞子発芽阻害物質の同定と数種病原菌に対する作用. 日本植物病理学会報 71:56 (講演要旨)
- 岡久美子, 大久保暁子, 中島廣光, 児玉基一郎, 尾谷 浩 (2005b) トマト褐色輪紋病菌による α -トマチンの解毒と感染におけるその役割. 日本植物病理学会報 71:207-208 (講演要旨)
- 岡久美子, 中島廣光, 赤松 創, 児玉基一郎, 尾谷 浩 (2003a) 宿主葉上の *Alternaria brassicicola* 胞子発芽液に存在する AB 毒素生成誘導因子の解析. 日本植物病理学会報 69:245 (講演要旨)
- 岡久美子, 西尾美穂, 川田俊成, 赤松 創, 児玉基一郎, 尾谷 浩 (2003b) 宿主葉上の *Alternaria brassicicola* 胞子発芽液に存在する胞子発芽および AB 毒素生成誘導因子. 日本植物病理学会報 69:52 (講演要旨)
- Onesirosan P, Mabuni CT, Durbin RD, Morin RB, Rich DH, Army DC (1975) Toxin production by *Corynespora cassiicola*. *Physiological of Plant Pathology* 5:289-295
- Osborn AE (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8:1821-1831

- 尾谷 浩 (2000) 植物病原菌の宿主識別と宿主特異的毒素の作用機構に関する研究. 日本植物病理学会報 66:278-280
- 尾谷 浩 (1991) 宿主特異的毒素作用の分子機構. 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 55-65
- 尾谷 浩, 児玉基一郎 (2004) 植物病原糸状菌の宿主特異的毒素; 生合成と宿主識別の分子機構. 植物病の探究 (高松ら編). 「植物病の探究」出版会, 津, pp 68-74
- Otani H, Kohmoto K, Kodama M (1995) *Alternaria* toxins and their effects on host plants. Canadian Journal of Botany 73: 453-458
- Otani H, Kohnobe A, Kodama M, Kohmoto K (1998a) Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. Physiological and Molecular Plant Pathology 52:285-295
- Otani H, Kohnobe A, Kodama M, Kohmoto K (1998b) Involvement of host factors in the production of a protein host-specific toxin by *Alternaria brassicicola*. In: Kohmoto K, Yoder OC (eds) Molecular genetics of host-specific toxin in plant disease. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 63-69
- Otani H, Kohnobe A, Narita M, Shiomi H, Kodama M, Kohmoto K (2001) A new type of host selective toxin, a protein from *Alternaria brassicicola*. In: Keen NT, Mayama S, Leach JE, Tsuyumu S (eds) Delivery and perception of pathogen signals in plants. APS Press, St. Paul, pp68-76
- 尾谷 浩, 中島廣光, 児玉基一郎, 甲元啓介 (1995) 日本で発生したトマト褐色輪紋病菌 (*Corynespora cassiicola*) による宿主特異的毒素 (CC 毒素) の生成. 日本植物病理学会報 61:618 (講演要旨)
- 尾谷 浩, 中島廣光, 児玉基一郎, 甲元啓介 (1998) トマト褐色輪紋病およびキュウリ褐斑病を引き起こす *Corynespora cassiicola* が生成する宿主特異的毒素. 日本植物病理学会報 64:358-359 (講演要旨)
- 尾谷 浩, 田平弘基, 岡久美子, 児玉基一郎 (2004) *Alternaria* 属植物病原菌の宿主特異的毒素と特異性発現の分子機構. 化学と生物 42:230-235
- Pegg GF, Woodward S (1986) Synthesis and metabolism of α -tomatine in tomato isolines in relation to resistance to *Verticillium albo-atrum*. Physiological and Molecular Plant Pathology 28:187-201
- Pringle RB, Sceffer RB (1964) Host-specific toxin. Annual Review of Phytopathology 2:133-156
- Quayyum HA, Gijzen M Traquair JA (2003) Purification of a necrosis-inducing, host-specific protein toxin from spore germination fluid of *Alternaria panax*. Phytopathology 93:323-328
- Quidde T, Osbourn AE, Tudzynski P (1998) Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology 52:151-165
- Roddick JG (1974) The steroidal glycoalkaloid α -tomatine. Phytochemistry 13:9-25
- Roldán-Arjona T, Pérez-Espinosa A, Ruiz-Rubio M (1999) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp.

- lycopersici* defines a new class of saponinases. *Molecular Plant Microbe Interaction* 12:852-861
- Sandrock RW, VanEtten HD (2001) The relevance of tomatinase activity in pathogens of tomato: disruption of the β_2 -tomatinase gene in *Colletotrichum coccodes* and *Septoria lycopersici* and heterologous expression of the *Septoria lycopersici* β_2 -tomatinase in *Nectria haematococca*, a pathogen of tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58:159-171
- Schönbeck F, Schlösser E (1976) Preformed substances as potential protectants. In: Heitefuss R, Williams PH (eds) *Physiol plant pathology*. Springer-Verlag, Berlin, pp 653-678
- 柴田大輔 (2001) ゲノム農学：新しい植物バイオテクノロジーを目指して. 植物感染生理談話会論文集 37:95-103
- 島本 功 (1996) モデル植物としてのイネとシロイヌナズナ. 植物細胞工学シリーズ 4:22-26
- Strelkov SE, Lamari L, Balance GM (1999) Characterization of a host-specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 12:728-732
- Tanaka S (1933) Studies on black spot disease of the Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) *Memories of College of Agriculture, Kyoto Imperial University* 28:1-31
- Tomas A, Feng GH, Reech GR, Bockus WW, Leach JE (1990) Purification of a cultivar-specific toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Molecular Plant Microbe Interaction* 3:221-224
- 豊田和弘, 白石友紀, 一瀬勇規, 山本幹博, 稲垣善茂 (2004) 植物の病原菌に対する受容性と抵抗性. 新版：分子レベルからみた植物の耐病性 (島本功ら監修). 羊土社, 東京, pp 74-81
- Tuori RP, Wolpert TJ, Ciuffetti LM (1995) Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Microb Interaction* 8:41-48
- 宇野朱美 (1998) アブラナ科植物黒すす病菌 (*Alternaria brassicicola*) における宿主特異的 AB 毒素生成の宿主植物による誘導. 鳥取大学農学部学士論文
- Wei CT (1950) Notes on *Corynespora*. *Mycological Papers* 34:1-10
- Wolpert TJ, Dunkle LD, Ciuffetti LM (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annual Review of Phytopathology* 40:251-285
- Woods K, Hamilton CJ, Field RA (2004) Enzymatic liberation of lycotetraose from the *Solanum* glycoalkaloid α -tomatine. *Carbohydrate Research* 339:2325-2328
- Yoder OC, Scheffer RP (1969) Role of toxin in early interactions of *Helminthosporium victoriae* with susceptible and resistant oat tissues. *Phytopathology* 59:1954-1959

謝 辞

本研究を進めるにあたり、懇切丁寧なご指導ならびにご鞭撻を頂き、又、多大なるご支援を頂戴した鳥取大学農学部 尾谷 浩先生に深く感謝の意を表します。また、研究展開の上で有益なご助言を頂いた鳥取大学農学部 児玉基一朗先生、島根大学生物資源科学部 荒瀬 榮先生、山口大学農学部 田中 秀平先生、ワシントン州立大学 赤松 創博士に心から御礼申し上げます。本研究において、AB 毒素生成誘導因子および孢子発芽抑制因子の構造解析の御指導を頂いた鳥取大学農学部 中島 廣光先生、作野 えみ先生、谷 央子博士、AB 毒素精製の御指導を頂いた鳥取大学大学院連合農学研究科 森 信寛先生、菌株と種子を分譲して頂いたタキイ種苗 塩見 寛氏に厚く御礼申し上げます。

最後に本研究を行うにあたり、お力添えを頂いた西尾 美穂氏、大久保暁子氏、並びに終始ご協力を頂いた山岸 大輔氏、江草真由美氏、研究室諸氏にも合わせて御礼申し上げます。

論文目録

学術論文

Oka K, Akamatsu H, Kodama M, Nakajima H, Kawada T, Otani H (2005) Host-specific AB-toxin production by germinating spores of *Alternaria brassicicola* is induced by a host-derived oligosaccharide. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66:12-19. (第2章 第1節に記載)

Oka K, Okubo A, Kodama M, Otani H (2005) Detoxification of α -tomatine by tomato pathogens, *Alternaria alternata* tomato pathotype and *Corynespora cassiicola*, and its role in infection. *Journal of General Plant Pathology* (in press). (第3章に記載)

参考文献

尾谷 浩・田平弘基・岡久美子・児玉基一朗 (2004) *Alternaria* 属植物病原菌の宿主特異的毒素と特異性発現の分子機構. *化学と生物* 42:230-235.