

学 位 論 文 要 旨

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

氏名 Name: 岡 久美子

題目 Title: 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

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

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胞子発芽時にのみ検出されることより、発芽胞子からの 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。

宿主および非宿主葉上より得た胞子発芽液 (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胞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  $\text{KIO}_4$  や  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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、トマト葉磨砕液中に *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、トマト葉磨砕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 $\alpha$ -トマチンである可能性が考えられたため、TLC 純化画分と $\alpha$ -トマチンを TLC で分析した結果、同じ *Rf* 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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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* の胞子発芽に対する $\alpha$ -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 $\alpha$ -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ソ斑点病菌では胞子発芽が抑制され、 $\alpha$ -トマチンに感受性であった。また、 $\alpha$ -トマチンに抵抗性である *A. alternata* および *C. cassiicola* の発芽胞子は $\alpha$ -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、 $\alpha$ -トマチンに感受性の胞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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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* 胞子を $\alpha$ -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* 胞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 $\alpha$ -トマチン解毒能力が必須であることが明らかとなった。