

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Roxana Yanira Parada Jaco
審査委員	主査 尾谷 浩 (印) 副査 児玉 基一朗 (印) 副査 荒瀬 榮 (印) 副査 伊藤 真一 (印) 副査 森 信寛 (印)
題目	A New Host-Specific Toxin, a Protein from Germinating Spores of <i>Alternaria brassicae</i> Causing Gray Leaf Spot of Brassica Plants (<i>Brassica</i> 植物黒斑病菌 <i>Alternaria brassicae</i> の発芽胞子が生産する新規の宿主特異的蛋白質毒素)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>特定の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て病気を引き起こす。このような特異性を決定する病原菌の因子として、ある種の病原糸状菌では宿主特異的毒素 (HST) の存在が明らかとなっている。各種 <i>Brassica</i> 植物に黒斑病を引き起こす <i>Alternaria brassicae</i> は、HST として destruxin B を生産することが報告されているが、destruxin B は顕著な宿主特異性を示さないことも指摘されており、HST かどうかについては明確となっていない。本研究は、destruxin B の HST 活性を再検討するとともに、<i>A. brassicae</i> における destruxin B 以外の HST 生産の有無を調べたもので、その内容は以下のように要約される。</p> <p><i>A. brassicae</i> を Fries 液体培地で培養し、培養ろ液より destruxin B を酢酸エチルで抽出した。さらに、HPLC で destruxin B のピークを採取することにより、destruxin B を純化した。純化 destruxin B の毒素活性を調べると、宿主葉には 50~100 µg/ml、非宿主葉には 250~500 µg/ml の濃度まで毒性を示し、顕著な宿主特異性はみられなかった。</p> <p>次に、destruxin B の胞子発芽時の生産量を調べるため、病原菌の胞子懸濁液を発芽基質として宿主葉上、非宿主葉上およびペトリ皿上に静置し、24 および 48 時間後に胞子発芽液 (SGF) を回収した。SGF に存在する destruxin B を HPLC で定量すると、24 時間後、胞子から放出される destruxin B の量はいずれの発芽基質の上でも 0.5~1.0 µg/ml であった。また、非宿主葉上およびペトリ皿上での生産量は 48 時間後でもほとんど増加しなかった。一方、宿主葉上では 48 時間後には顕著な胞子発芽率の増加と発芽管の伸長がみられたが、destruxin B の生産量は 24 時間後の 1.7 倍程度しか増加しなかった。なお、未発芽胞子や発芽胞子中にもほぼ SGF と同じ量の destruxin B が検出された。以上のことから、<i>A. brassicae</i> は未発芽胞子内に存在する destruxin B を発芽時に放出するが、宿主植物に活性を示すのに十分な量には達していないことが明らかとなった。</p>	

さらに、destruxin B が病原菌の感染成立の決定因子であるかどうかを明らかにするため、非病原性 *A. alternata* (O-94) の胞子を用いて destruxin B の感染誘導活性を調べた。その結果、O-94 胞子を宿主葉に十分な活性を示す濃度 (100 µg/ml) の destruxin B に懸濁して宿主葉に接種しても、O-94 の感染は誘導されなかった。一方、宿主葉上から回収した *A. brassicae* の SGF に懸濁した O-94 胞子は、病原菌と同様の行動をとり宿主葉に感染した。そこで、SGF を限外ろ過膜 (10 kDa) により、低分子 (LMW) と高分子 (HMW) の画分に分け、毒素活性と感染誘導活性を調べた。destruxin B を含む LMW 画分は非特異的毒性を示し、O-94 胞子の感染は誘導しなかった。これに対して、destruxin B を含まない HMW 画分は宿主にのみ毒性を発揮し、O-94 胞子の宿主葉への感染を誘導した。以上の結果から、destruxin B は宿主への感染成立には関与せず、非特異的毒素であることが明らかとなった。さらに、*A. brassicae* は宿主葉上の胞子発芽時に宿主特異的活性を示す高分子毒素を生産することが示唆された。

そこで、SGF の HMW 画分より、硫酸分画、各種クロマトグラフィーを順次行って毒素を純化した。純化毒素は、0.5~1.0 µg/ml の低濃度まで宿主葉にクロロシスを伴う水浸状の壊死斑を誘起したが、非宿主葉には 50 µg/ml でも作用せず、顕著な宿主特異性を示した。また、0.5~1.0 µg/ml の毒素は、O-94 胞子の宿主葉への感染を誘導した。本毒素は SDS-PAGE において 27.5 kDa の蛋白質として検出され、pI 値は約 7 であった。さらに、毒素の N 末端より 21 アミノ酸の配列を明らかにし、データベース検索を行った結果、*Fusarium oxysporum* の trypsin precursor (P35049) の配列と 81% の高い相同性を示した。以上の結果から、本毒素は HST の条件を満たしており、*A. brassicae* が胞子発芽時に生産する新規の HST として本毒素を ABR 毒素と命名した。なお、ABR 毒素は宿主葉上の発芽胞子により生産されるが、非宿主葉上やペトリ皿上では検出されないことから、毒素生産には宿主因子が関与する可能性を示した。

以上のように、本研究は、*A. brassicae* が生産する destruxin B は HST ではなく非特異的毒素であること、*A. brassicae* は胞子発芽時に destruxin B 以外に蛋白質 HST (ABR 毒素) を生産し、ABR 毒素が本菌の感染成立に重要な役割を果たしていることを明らかにしたものである。得られた成果は、植物病原菌の感染機構の理解に貢献するばかりでなく、病害防除戦略の確立という応用面からも高く評価することができ、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。