

博士論文

宿主特異性決定における植物細胞壁の役割
～エンドウ・エンドウ褐紋病菌を用いた解析～

平成9年3月
木場章範

岡山大学大学院
自然科学研究科

博士論文

宿主特異性決定における植物細胞壁の役割
～エンドウ・エンドウ褐紋病菌を用いた解析～

平成9年3月
木場章範

岡山大学大学院
自然科学研究科

本論文中で用いた主な略語

A

AcOH, acetic acid
AMP, adenosine 5'-monophosphate
AP, alkaline phosphatase
ATP, adenosine 5'-triphosphate
ATPase, adenosine 5,-triphosphatase
ATP-BP, adenosine 5'-triphosphate-binding protein

B

BHT, butylated hydroxytoluene
BSA, bovine serum albumin

C

CHS, chalcone synthase
CTP, citidine 5'-triphosphate

D

DMSO, dimethylsulfoxide
DP, degree of polymerization
DPI, diphenyleiodonium
DTT, dithiothreitol

E

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA, ethylene glycol bis(β -aminoethyl-ether-*N, N, N, N*,-tetraacetic acid
EMS, ethyl methan sulfonate
EtOH, ethylalcohol

F

FSBA, 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl adenosine

G

GTP, guanosine 5'-triphosphate

H

HPLC, high performance liquid chromatography
HRP, horseradish peroxidase
HRGP, hydroxyproline-rich glycoprotein

I

IAA, indole acetic acid

M

MES, 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid
MOPS, 3-(*N*-morpholino)-propanesulfonic acid
MtOH, methylalcohol

N

NAD, nicotinamide-adenine dinucleotide, oxidized form
NADH, nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form
NADPH, nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form
NBT, nitroblue tetrazolium
NTP, nucleoside 5'-triphosphate
NTPase, nucleoside 5'-triphosphatase

P

PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis
PAL, phenylalanine ammonia-lyase
PBS, phosphate buffer saline
PEG, polyethyleneglycol
Pi, orthophosphate
PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride
p-CA, *para*-coumaric acid
*p*NPP, *para*-nitrophenyl phosphate
*p*NPPase, *para*-nitrophenyl phosphatase
POX, peroxidase
PPase, pyrophosphatase
PPi, pyrophosphate
PRGP, proline-rich glycoprotein
PVP, polyvinylpyrrolidone

R

RuBP, ribrose-bisphosphate

S

SDS, sodium dodecyl sulfate
SHAM, salicylhydroxamic acid
SOD, superoxide dismutase

T

Tiron, 4, 5-dihydroxy-1, 3-benzene-
disulfonic acid
TBS, tris buffer saline
TPBS, phosphate buffer saline-tween 20
TTBS, tris buffer saline-tween 20
Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane

U

UDP, uridine 5'-bisphosphate
UTP, uridine 5'-triphosphate

V

v/v, volume / volume

W

w/v, weight / volume

目次

序論.....	1
第1章 本研究に共通する実験材料および方法.....	5
第1節 実験材料.....	5
第1項 供試植物.....	5
第2項 供試菌.....	5
第2節 褐紋病菌エリシター、サプレッサーの調製.....	6
第1項 胞子発芽液の調製.....	6
第2項 エンドウ褐紋病菌エリシターの調製.....	6
第3項 エンドウ褐紋病菌サプレッサー調製.....	7
第3節 原形質膜、細胞壁画分の調製.....	8
第1項 細胞壁画分の調製.....	8
(1) 緩衝液の調製.....	8
(2) 細胞壁画分の調製.....	8
第2項 細胞壁中のタンパク質の可溶化方法.....	8
第3項 原形質膜画分の調製.....	9
第4節 細胞壁画分の純度検定.....	10
第1項 各オルガネラのマーカー酵素活性の測定方法.....	10
(1) 原形質膜のマーカー酵素活性.....	10
(2) ミトコンドリアのマーカー酵素活性.....	11
(3) 液胞のマーカー酵素活性.....	12
(4) 小包体のマーカー酵素活性.....	13
(5) 葉緑体のマーカー酵素活性.....	14
(6) ゴルジ体のマーカー酵素活性.....	14
(7) 核膜のマーカー酵素活性.....	15
第2項 結果.....	16
第2章 細胞壁 ATPase の諸性質および褐紋病菌エリシター、 サプレッサーの影響.....	23

第1節	ATPase 活性の測定.....	2 3
第2節	細胞壁 ATPase の諸性質.....	2 3
第1項	基質特異性とサプレッサーの効果.....	2 4
第2項	薬剤感受性.....	2 4
第3項	pH 依存性.....	2 5
第4項	2価イオン要求性.....	2 6
第3節	細胞壁画分の ATPase に対するエリシター、サプレッサーの影響... 2 7	
第1項	可溶化細胞壁 ATPase に対するエリシター、 サプレッサーの影響.....	2 7
第2項	細胞壁 ATPase に対するエリシター、サプレッサーの影響.....	2 7
第4節	まとめ.....	2 8
第3章	細胞壁 ATPase の精製.....	3 8
第1節	精製.....	3 8
第1項	硫酸塩析.....	3 8
第2項	ATP アガロースアフィニティーカラム.....	3 8
第3項	陰イオン交換カラムクロマトグラフィー.....	3 9
第4項	結果.....	3 9
第2節	部分精製細胞壁 ATPase の諸性質.....	4 0
第1項	褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響.....	4 0
第3節	部分精製細胞壁 ATPase の構造解析.....	4 0
第1項	Native-PAGE 解析および活性染色.....	4 0
第2項	免疫沈降.....	4 3
第3項	SDS-PAGE 解析およびウエスタンブロットティング解析.....	4 4
第4節	まとめ.....	4 6
第4章	植物組織表層におけるスーパーオキシドアニオンの生成.....	5 7
第1節	植物組織表層におけるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の測定方法.....	5 7
第2節	植物表層における O_2^- の生成.....	5 7

第1項	エンドウ褐紋病菌エリシターによる O_2^- 生成誘導.....	57
第2項	O_2^- に対する褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響.....	58
第3項	O_2^- 生成活性に対する活性酸素生成酵素の阻害剤の影響.....	59
第4項	O_2^- 生成活性に対するオルトバナジン酸、 ネオマイシンの影響.....	60
第5項	病原菌、非病原菌接種による O_2^- 生成誘導.....	61
第3節	まとめ.....	62
第5章	分離細胞壁画分における O_2^- 生成と酸化・還元酵素.....	73
第1節	細胞壁におけるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の生成.....	73
第1項	細胞壁画分における O_2^- の生成.....	73
第2項	O_2^- に対する活性酸素生成酵素の阻害剤の影響.....	74
第3項	O_2^- 生成に対するオルトバナジン酸、ネオマイシンの影響.....	75
第4項	O_2^- に対する褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響.....	76
第2節	パーオキシダーゼ.....	77
第1項	パーオキシダーゼ活性.....	77
第2項	パーオキシダーゼ活性に対するエリシター、 サプレッサーの影響.....	78
第3節	細胞壁可溶化画分における過酸化水素の生成.....	79
第1項	過酸化水素の生成.....	79
第2項	過酸化水素の生成に対するエリシター、サプレッサーの影響.....	80
第4節	アスコルビン酸オキシダーゼ.....	81
第1項	アスコルビン酸オキシダーゼ活性.....	81
第2項	アスコルビン酸オキシダーゼ活性に対するエリシター、 サプレッサーの影響.....	81
第5節	リンゴ酸脱水素酵素.....	82
第1項	リンゴ酸脱水素酵素活性.....	82
第2項	リンゴ酸脱水素酵素活性に対するエリシター、 サプレッサーの影響.....	83
第6節	ウエスタンブロットイング解析.....	84

第7節	まとめ	85
第6章	抵抗反応における細胞壁の役割	
	～細胞壁－原形質膜間の情報伝達；インテグリンの関与～	106
第1節	RGDペプチドのエンドウの動的抵抗反応に対する影響	106
第1項	RGDペプチドのピサチン蓄積に対する影響	106
第2項	エンドウ原形質膜、細胞壁ATPaseに対する RGDペプチドの影響	108
第2節	細胞壁－原形質膜相互作用に関わるタンパク質	109
第1項	ヴァイトロネクチン受容体様タンパク質	109
第2項	原形質膜と相互作用する細胞壁のタンパク質	110
第3項	細胞壁－原形質膜相互作用に対するRGDペプチドの影響	112
第4項	アクチン結合タンパク質	112
第3節	まとめ	114
第7章	合成モデルエリシターのエンドウの防御応答、 および細胞壁機能に対する影響	125
第1節	合成モデルエリシターの生理活性	125
第1項	ピサチン蓄積に対する影響	125
第2項	エンドウ褐紋病菌の形態形成に対する影響	126
第3項	無傷エンドウ葉における局部抵抗性に対する影響	126
第4項	無傷エンドウ葉におけるスーパーオキシドアニオン生成誘導	127
第5項	細胞壁ATPaseに対する影響	128
第2節	まとめ	129
第8章	総合考察	141
参考文献		154
摘要		170
謝辞		173

序論

動物、高等植物をはじめとする高度に分化した組織を持つ生物から、細菌や単細胞生物に至るまで、厳密に自己と非自己を識別をする能力を備えており、常に非自己(異物)の侵入を拒否(排除)することによって種を維持しているものと考えられる。アブラナ科、ナス科植物でよく知られている自家不和合性や、植物と病原菌間の相互作用における宿主特異性という現象は植物における自己・非自己の識別の典型的な例として挙げられる。これらの識別機構の解明は、生命の本質を理解する上でも、また応用的な側面からも非常に重要な課題であろう。

植物は病原菌の攻撃に対して自らを守る様々な防御機構を備えている。植物の防御機構の1つは「静的抵抗性」と呼ばれており、構成的に存在する細胞壁やクチクラ層の厚さ、硬さ等の物理的な障壁、あるいは構成的に存在する抗菌性物質(プロヒビチン)等の化学的障壁が挙げられる。一方、病原菌の攻撃をはじめとする外界からのストレスに応答して発現される過敏細胞死(Doke 1983a,b, Levine et al. 1994)、ファイトアレキシシンの蓄積(Epperlein et al. 1986, Kuc 1972, Yoshikawa et al. 1981)、Pathogenesis related (PR) タンパク質の蓄積(Mauch et al. 1989, Farmer et al. 1992)、細胞壁のリグニン化(Vance et al. 1980)、細胞壁構造タンパク質であるヒドロキシプロリン、あるいはプロリンに富んだ糖タンパク質の細胞壁への架橋(Apostol et al. 1989, Bradley et al. 1992, Brisson et al. 1994)等の「動的抵抗性」が存在する。植物に熱処理や代謝阻害剤を投与することによって動的な抵抗反応を抑制すると通常感染できない非病原菌の感染さえ成立することから、動的抵抗性が植物の抵抗性の主体であると考えられる(Ouchi et al. 1974, 1975)。

上記の植物の防御応答は植物細胞表層における異物(病原菌)の認識が引き金となるものと考えられる。病原菌が植物の防御応答を誘導する物質(エリシター)を生産することはよく知られており、菌体成分であるグルカン、キチン、キトサン、ペプチド、糖ペプチド、あるいは脂質等がエリシター活性を持つと報告されている(Darvill and Albersheim 1984, Ebel and Cosio 1994)。また、遺伝子対遺伝子説の関係が成立するレースー品種間の相互作用においては、病原菌の持つ非病原性(力)遺伝子の産物であるタンパク質やペプチド、あるいは非病原性(力)遺伝子の産物によって生成される品種特異的エリシターが宿主特異性決定の重要な因子であると考えられており、多数の品種特異的エリシターが単離されている(Vanden Ackervenken et al. 1993, De Wit and Spikman 1982, Hahn et al. 1993, Keen et al. 1996, Yoshikawa et al. 1993)。しかしながら、病原菌は植物への感染の過程で複数のエリシターを生産することが知られており、その中には植物の種や品種に関係なく防御応答を誘導するエリシター(非特異的エリシター)も含まれる。このようなエリシターの一部は感染の場(病原菌の胞子発芽液中)にも分泌されることが報告されている。このことは病原菌は非特異的エリシターで宿主となりえる植物に誘導される防御応答を抑制、あるいは遅延することなくしては感染に成功し

ないことを強く示唆している。実際、病原菌の生産する病原性因子として *Alternaria alternata*、*Cochliobolus* 属菌の生産する宿主特異的毒素（秋光 1995, Kohmoto and Otani 1991, Otani et al. 1996）、あるいは *Mycosphaerella* 属菌や *Phytophthora* 属菌が生産するサプレッサーが単離され（Doke 1975, Oku et al. 1977, 1987, Shiraishi et al. 1992, 1994, Yoshioka et al. 1995）、その作用機構が次第に明らかにされてきた。

Heath (1981) は植物と病原菌の共進化の過程において、病原菌は宿主に対して基礎的親和性 (Basic compatibility) を確立し、非宿主抵抗性 (Non-host resistance) を乗り越える必要があると示している。また、植物はこのような病原菌の変化に対応して病原菌の侵略を阻止する能力、品種抵抗性を獲得する (cultivar resistance)。このような過程を経て植物と病原菌の特異性が多岐に渡って分化してきたものと考えられる。一方、長年の間植物のこのような性質や遺伝資源を利用して、垂直抵抗性遺伝子の導入という方法で抵抗性品種の作出がなされてきた。しかしながら、単一の抵抗性遺伝子を導入する方法で得られた抵抗性品種については、数年の間にその品種を侵すレースが出現し、決定的な防除法であるとは言い難い。このように新たなレースが容易に出現する現象については以下のように考えられている。一般的に垂直抵抗性に関わる遺伝子は病原菌 (非病原性 (力) 遺伝子産物) の認識に関わる因子 (例えば受容体) をコードしているものと考えられるが、病原菌は植物に認識される因子 (非病原性 (力) 遺伝子産物) を生産しない (遺伝子欠損や変異を起こす) という比較的単純な変化 (進化) によって容易に異物認識を乗り越えることが出来るからであると説明されている (Briggs and Johal 1994)。一方、宿主特異的毒素やサプレッサー等の病原性に関わる因子によって成立する親和性を無効にする形質を獲得することによって得られた抵抗性は抵抗性遺伝子の導入で作出された抵抗性とは異なり、この性質を乗り越えて (overcome)、病原菌が再度この植物を侵す際には、新たに親和性に関わる因子を獲得する必要があるものと予想できる。しかし、容易にこのような形質の獲得 (進化) は起こるとは考えにくく、比較的永続的な抵抗性を付与することが可能であると想像されている (Briggs and Johal 1994, 児玉 1996)。従って、病原菌の生産する病原性因子の作用や性質を理解することによって、新たな防除法の確立が期待できるであろう。

エンドウ褐紋病菌は宿主エンドウへの感染の過程で柄胞子発芽液中に高分子糖ペプチドであるエリシター、および低分子糖ペプチドであるサプレッサーを生産することが判っている (Matsubara and Kuroda 1987, Oku et al. 1977, Shiraishi et al. 1978, Thanutong et al. 1982)。エリシター処理された有傷エンドウ組織にはファイトアレキシンであるピサチンの蓄積 (Shiraishi et al. 1978)、PR-タンパク質である β -1,3 グルカナーゼ、キチナーゼの活性化 (Yoshioka et al. 1992b)、あるいはピサチン生合成経路の律速酵素である PAL や CHS 遺伝子の発現が誘導される (Yamada et al. 1989)。また、無傷エンドウ組織をエリシターで処理した場合、ピサチンの蓄積は誘導されないが、未同定の感染阻害因子の生成が認められる (Yamamoto et al. 1986)。一方、本菌の生産するサプレッサーは上記の防御応答を抑制 (遅延) する。褐紋病菌サプレッサーの作用は厳密な種特

異性を示し、宿主エンドウの防御応答のみを抑制するとともに、エンドウ組織に本来感染できない非病原菌の感染も成立させる (Oku et al. 1980, Shiraishi et al. 1991b, 1994, Yoshioka et al. 1992a)。しかし、本サプレッサーは本菌の非宿主に対しては防御応答を抑制するような効果はなく、逆にエリシターとして作用することも明らかとなった (Shiraishi et al. 1991b)。このようなことから、サプレッサーは本菌の病原性因子であるとともに、宿主特異性決定因子であると考えられている。

近年、サプレッサーの作用点が宿主エンドウ細胞の ATPase や原形質膜に存在する情報伝達系であるポリホスホイノシチド代謝系にあることが明らかとなった (Shiraishi et al. 1991a, 1992, 1994, Toyoda et al. 1992, 1993, Yoshioka et al. 1990)。実際、エンドウ、インゲン、ササゲ、ダイズ、オオムギの葉をサプレッサーで処理すると、宿主エンドウの ATPase のみが阻害されること (Shiraishi et al. 1991a)、さらには P 型 ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸がサプレッサーと同様にエンドウ組織の防御応答を抑制することが明らかとなった (Yoshioka et al. 1990)。また、原形質膜 ATPase とクロストークしているポリホスホイノシチド代謝系の酵素である ホスホリパーゼ C の阻害剤であるネオマイシンはエンドウ組織の防御応答を抑制するとともに、本来感染できない非病原菌の感染も成立させることが明らかとなってきた (Toyoda et al. 1992, 1993)。

それでは植物による病原菌 (シグナル分子) 認識の場はどこであろうか? 一般的に植物と病原菌の相互作用は植物による病原菌の認識から始まり、病原菌シグナルの受容の場は植物の原形質膜上に存在するもと考えられてきた。*Phytophthora megasperma* の生産するオリゴペプチドエリシター (Nurnberger et al. 1994)、糸状菌の細胞壁構成成分であるキトサン (Shibuya et al. 1996)、*Phytophthora megasperma* の細胞壁から調製した β -グルカンエリシター (Cheong et al. 1993, Yoshikawa 1983, Yoshikawa and Sugimoto 1993)、あるいは *Cladosporium fulvum* の AVR9 ペプチドエリシター (Kooman-Gersmann et al. 1996) の結合タンパク質は植物の原形質膜に存在すると報告されている。また、*Fusicoccum amygdali* の生産するの毒素であるフシコクシン (Korthout et al. 1994, Oecking and Weiler 1991)、あるいは *Alternaria alternata* の生産する宿主特異的毒素である AF 毒素 (Namiki et al. 1986)、AK 毒素 (Otani et al. 1989) 等の病原性に関わる分子の作用点も植物の原形質膜にあると報告されている。しかしながら、無傷エンドウ葉に滴下されたエリシターは、原形質膜や細胞内に移行しないにも関わらず認識され、防御応答を誘導することや (高見 1992, Yamamoto et al. 1986)、分離された植物の原形質膜は褐紋病菌のエリシターやサプレッサーに対して応答性を持つものの、褐紋病菌の非宿主であるインゲン、ササゲ、ダイズ、オオムギから調製した原形質膜画分の ATPase 活性もエンドウの原形質膜 ATPase 同様にサプレッサーによって阻害され、組織で見られた特異性は分離原形質膜では認められないことが明らかとなった (Shiraishi 1991a)。これらの結果は宿主特異性決定には植物細胞壁が重要な役割を担っていることを強く示唆している。高等植物の例ではないが、真核生物である酵母の生産するキラートキシンの結合部位は酵母細胞壁にあり、毒素の受容や感受性の決定は細胞壁が担っていることが

報告されている (Schmitt and Radler 1988)。このような背景から、本論文では植物の病原菌認識、特に宿主特異性決定における植物細胞壁の役割、および植物細胞壁の防御応答への関与、さらに細胞壁から原形質膜へ至る情報伝達の存在について、エンドウとその病原菌である褐紋病菌の生産するエリシター、サブレッサーを用いて解析した。

本論文で報告された結果は、植物細胞壁と宿主特異性決定の関連性を示唆しており、植物細胞壁が病原菌の侵入を阻害するだけでなく、宿主特異性決定にも関与していることを示している。また、植物細胞壁が植物の防御応答を誘発するだけでなく、病原菌の侵入を阻害する役割も果たしていることが示唆された。

エリシター産生菌	エンドウイモトイシ (<i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Medicago</i>)
サブレッサー産生菌	エンドウイモトイシ (<i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Medicago</i>)
エリシター産生菌	エンドウイモトイシ (<i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Medicago</i>)
サブレッサー産生菌	エンドウイモトイシ (<i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Medicago</i>)

結果と考察

(1) エリシター産生菌の認識と宿主特異性決定 (*Medicago sativa* plants infected by *Medicago sativa* plants)

本研究では、植物細胞壁の認識と宿主特異性決定の関連性を解析するために、植物細胞壁を認識するエリシターとサブレッサーを用いて、植物細胞壁の認識と宿主特異性決定の関連性を解析した。エリシターとサブレッサーは、植物細胞壁を認識するだけでなく、宿主特異性決定にも関与していることが示唆された。エリシターとサブレッサーは、植物細胞壁を認識するだけでなく、宿主特異性決定にも関与していることが示唆された。エリシターとサブレッサーは、植物細胞壁を認識するだけでなく、宿主特異性決定にも関与していることが示唆された。

(2) エリシター産生菌の認識と宿主特異性決定 (*Medicago sativa* plants infected by *Medicago sativa* plants)

本研究では、植物細胞壁の認識と宿主特異性決定の関連性を解析するために、植物細胞壁を認識するエリシターとサブレッサーを用いて、植物細胞壁の認識と宿主特異性決定の関連性を解析した。エリシターとサブレッサーは、植物細胞壁を認識するだけでなく、宿主特異性決定にも関与していることが示唆された。

(3) エリシター産生菌の認識と宿主特異性決定 (*Medicago sativa* plants infected by *Medicago sativa* plants)

本研究では、植物細胞壁の認識と宿主特異性決定の関連性を解析するために、植物細胞壁を認識するエリシターとサブレッサーを用いて、植物細胞壁の認識と宿主特異性決定の関連性を解析した。エリシターとサブレッサーは、植物細胞壁を認識するだけでなく、宿主特異性決定にも関与していることが示唆された。エリシターとサブレッサーは、植物細胞壁を認識するだけでなく、宿主特異性決定にも関与していることが示唆された。

第1章 本研究に共通する実験材料および方法

第1節 実験材料

第1項 供試植物

下記の市販種子を流水中で一晚吸水、催芽させ、バーミキュライトを敷き詰めたプラスチック容器に播種した。葉組織を用いる場合は温光制御室内で、 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、2~4週間生育させた植物の第2、3葉を用いた。また、黄化胚軸を用いる場合は、暗所で $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ で10~14日生育させた実生苗を用いた。

エンドウ品種	ミドリウスイ (<i>Pisum sativum</i> L. cv. Midoriusui)
ササゲ品種	サンジャクササゲ (<i>Vigna sinensis</i> Endl. cv. Sanjakusasage)
ダイズ品種	グリーンホーム (<i>Glycine max</i> L. cv. Greenhomer)
インゲン品種	セレモニー (<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Seremony)

第2項 供試菌

(1) エンドウ褐紋病菌 強病原性系統 (*Mycosphaerella pinodes* (Berkley et Bloxam) Versterger, strain OMP-1)

実験に用いた褐紋病菌は1978年岡山県赤磐郡山陽町下市で採集した罹病キヌサヤエンドウ葉より分離し、横山竜夫博士(発酵研究所)により同定され、OMP-1 (IFO-30342, ATCC-42741)として登録されたものである。本菌は子囊菌の一種で有性世代では子嚢胞子($14\sim 18\times 8\mu\text{m}$)、無性世代では褐色の柄子殻の中に分生胞子である柄胞子($9\sim 22\times 3\sim 45\mu\text{m}$)を形成する。エンドウの葉、茎などに黒褐色の斑点を形成し、やがて輪紋のある病徴を示す。 0°C 以下、 34°C 以上では生育できない。供試したエンドウ褐紋病菌は当研究室において $21\sim 23^{\circ}\text{C}$ でV-8ジュース寒天斜面培地上で経代培養しているものを使用した。なお、継代培養中に病原性が低下した場合には、本菌をエンドウ葉に接種して形成された病斑より再分離し、病原性を回復させたものを用いた。以下、特に記さない限り、エンドウ褐紋病菌は系統OMP-1のことを示している。

(2) エンドウ褐紋病菌 弱病原性系統 (*Mycosphaerella pinodes*, strain OMP-av)

本菌はエンドウ褐紋病菌OMP-1を継代培養中、病原性が低下したものである。本系統も当研究室において $21\sim 23^{\circ}\text{C}$ でV-8ジュース寒天斜面培地上で経代培養して用いた。

(3) ウリ類炭そ病菌 (*Colletotrichum lagenarium* Pass. Ellis et Halsted, strain 104 T) 実験に用いた炭そ病菌は、三重大学資源生物学部、久能均教授より分譲されたものである。本菌は不完全菌に属する菌であり、無性世代の分生胞子($14\sim 20\times 5\sim 6\mu\text{m}$)を形成する。葉や果実に発生し、はじめ黄白色の円い病斑を生じ、のち灰色~褐色の同心輪紋のある病斑を生じ、その上に鮭肉色の粘質物(分生胞子)を生じる。発育適温は $22\sim 24^{\circ}\text{C}$ である。供試したウリ類炭そ病菌は当研究室において $21\sim 23^{\circ}\text{C}$ でV-8ジュース寒天斜面培地上で経代培養しているものを使用した。

第2節 褐紋病菌エリシター、サプレッサーの調製

第1項 胞子発芽液の調製

継代培養したエンドウ褐紋病菌 (*Mycosphaerella pinodes*, IFO No. OMP-1) の菌糸を V-8 ジュース寒天培地上に移植し、 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で 6~7 日間培養した。培地上に滅菌水を加え、白金耳で柄子殻表面を軽くこすることによって柄胞子を懸濁した。懸濁した胞子をステンレス製 (20×35×5cm) バットに分注した Czapek 寒天培地上にガラス棒を用いて塗布移植し、 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で培養した。6~7 日間培養後、ガラス棒で柄子殻表面を軽くこすることによって柄胞子を懸濁した。得られた柄胞子懸濁液をキムワイプで濾過し、菌糸断片等を除去した濾過胞子懸濁液を坂口フラスコに移し、18~20時間室温にて振とう培養し、発芽させた。その後、柄胞子発芽液を 3000 rpm、20 分間の遠心分離、およびろ紙 (東洋ろ紙 5B) で濾過し菌体および柄胞子を取り除いて柄胞子発芽液を得た。得た柄胞子発芽液を Millipore filter (分画分子量 10,000 Millipore corporationTM PTGC 142-05) を用いて限外濾過を行って、高分子画分、および低分子画分を得た。なお、高分子画分には植物の動的抵抗反応を誘導するエリシターを含み、低分子画分にはエンドウの抵抗反応を種特異的に抑制するサプレッサーを含んでいる (Shiraishi et al. 1978)。

第2項 エンドウ褐紋病菌エリシターの調製

エリシターは Yoshioka et al. (1990) の方法に準じて調製した。エンドウ褐紋病菌の柄胞子発芽液を限外濾過して得られた高分子画分を蒸留水に対して 4°C で 24 時間透析 (Wako seamless tube 分画分子量 10,000) することによって残存している低分子画分および塩類の除去を行い、透析膜内液を 4°C で 20 分間遠心分離 ($10,000 \times g$) した (Fig. 1-1)。本菌柄胞子が発芽時に分泌するエリシターはグルコース、マンノースを含む分子量 70,000~140,000 の高分子糖タンパク質である (Matsubara and Kuroda 1987, Thanutong et al. 1982)。従って、得られた上清はグルコースを標品としたフェノール硫酸法 (Dubois et al. 1956) によって定量し、 $1,000 \mu\text{g} / \text{ml}$ (グルコース換算量) に調整した後、 -20°C で保存した。

フェノール硫酸法

- (1) サンプルと 5 % (v/v) フェノールを 1 : 1 の比率で混ぜる (ex. 1ml)
- (2) 10 分間静置後、サンプルの 5 倍量の濃硫酸を入れる (ex. 5 ml)
- (3) 10 分間静置後、よく攪拌し 20~30 分静置
- (4) 吸光度 (OD 490 nm) を測定
- (5) 換算式に代入して濃度を計算する

糖濃度の換算式

$$Y=1.9973 + 0.076753 X$$

X : 吸光度 (OD 490 nm × 1000)

Y : 糖濃度 (μg / ml)

第3項 エンドウ褐紋病菌サプレッサーの調製

サプレッサーは Yoshioka et al. (1990) の方法に準じて調製した。エンドウ褐紋病菌の柄孢子発芽液のうち、限外濾過で得た低分子画分を凍結乾燥後、少量の脱イオン水に融解し、遠心分離 (10,000×g) し、得られた上清部を下記の (1) の条件でゲル濾過クロマトグラフィーによって分画した。エンドウのファイトアレキシンであるピサチンの蓄積を指標に顕著なピサチン蓄積抑制活性を示す画分を回収した (Fig. 1-1, 2)。凍結乾燥後、少量の脱イオン水に融解し、遠心分離で不溶物を取り除いた。本菌の生産するサプレッサーは分子量 5,000 以下の糖ペプチドであるので 下記 (2) の Lowry et al. (1951) の方法により牛血清アルブミンを標準物質としてタンパク質量を定量し、1,000 μg / ml (BSA 換算量) に調整した後、-20℃で保存した。なお、本サプレッサー画分中の二成分については以下のように化学構造が決定されている (Shiraishi et al. 1992)。

(1) サプレッサーの分画条件

- ・ポンプ : Chemco LOW-PREP PUMP
- ・ディテクター : ADVANTEC UV-750 UVICON
- ・カラム樹脂 : 東ソー Toyopearl HW - 40F (分画範囲 : 100 - 7,000 Da)
- ・カラムサイズ : 52 mm × 450 mm
- ・溶出液 : 脱気蒸留水
- ・流速 : 1 ml / min
- ・検出波長 : U. V. 280 nm
- ・分画温度 : 室温

(2) Lowry 法

反応液 : 2 % (w/v) Na₂CO₃ : 1 % 酒石酸カリウム : 0.5 % (w/v) CuSO₄ = 50 : 1 : 1

- (1) 反応液 100 μl に対してサンプルを 10 μl 加え、室温で 10 分間静置
- (2) フェノール試薬 10 μl を加え室温で 30 分静置
- (3) 吸光度 (OD 500nm) を測定
- (4) 換算式に代入し、濃度を計算する

タンパク質量換算式

$$Y = -343.69 + 2151.0 X$$

X：吸光度 (OD 500 nm)

Y：タンパク質量 ($\mu\text{g/ml}$)

Supprescin A； α -GalNAc-O-Ser-Ser-Gly

Supprescin B； β -Gal ($\beta 1 \rightarrow 4$) α -GalNAc-O-Ser-Ser-Gly-Asp-Glu-Thr

第3節 原形質膜、細胞壁画分の調製

第1項 細胞壁画分の調製

本章の第1節、第1項で述べた方法で生育させたエンドウ、インゲン、ササゲ、ダイズの黄化胚軸から Hayashi and Ohsumi (1994) の方法を改変し、細胞壁画分の調製を行った (Fig. 1-3)。以下に操作の詳細について述べる。

(1) 緩衝液の調製

細胞壁画分の調製にあたって、まず以下に示すような緩衝液を調製した。

・ 磨砕バッファー	・ 洗浄バッファー
75 mM MOPS-KOH (pH 7.6)	5 mM MOPS-KOH (pH 7.6)
0.25 M Sucrose (Wako)	0.25 M Sucrose
5 mM EDTA (Wako)	1 mM EDTA
5 mM EGTA (Wako)	0.25 PMSF
2 mM PMSF (Wako)	10 mM KCl
4 mM SHAM (Sigma)	

(2) 細胞壁画分の調製

播種後 10~14 日のエンドウ、インゲン、ササゲ、ダイズの黄化胚軸を地上部より回収し、秤量の後、水道水で洗浄した。回収した黄化胚軸を 0 ~ 4°C に冷却した磨砕バッファー中でホモゲナイザー (Polytron model K; Kinematica AG, Swizerland) を用いて磨砕し、3 重に曳いたガーゼで繊維部分と液体部分を分離した。ガーゼに残った繊維部分を同様の磨砕バッファー中で乳鉢で再度細かくすり潰し、800×g で 20 分間、遠心分離した。沈殿部についてさらに同様の操作を 2 度繰り返し、得られた沈殿部を洗浄バッファー中に懸濁、磨砕後、遠心分離 (800×g) し洗浄を行った。この操作についても 2 度繰り返し、得られた沈殿部を細胞壁画分とした。なお、最終的に得られる上清部についてはタンパク質はほとんど含まれていない。なお、一連の操作は 0 ~ 4°C で行った。

第2項 細胞壁中のタンパク質の可溶化方法

細胞壁中のタンパク質の可溶化は NaCl を用いて行った。細胞壁画分に終濃度 0.5 M

の NaCl を添加し、氷上で 30 分静置し、遠心分離 (10,000×g) 後に上清部を得た。上清におけるタンパク質量、および ATPase 活性を測定したところ 90 % 以上の ATPase 活性が可溶化された。一方、タンパク質については 0.1 N NaOH を添加後、煮沸することによって得た細胞壁画分中の総タンパク質と比較すると回収率は 10 % 程度であった。可溶化したタンパク質については分画分子量 10,000 の限外ろ過フィルター (Millipore, モルカット L, UFPI, LGC) を使い、10 倍量の 30 mM Tris-MES (pH 6.5) で洗浄することによって脱塩し、同フィルターで濃縮を行い、細胞壁可溶化画分とした (Fig. 1-3)。細胞壁可溶化画分は凍結融解によるタンパク質の変性等を防ぐため、100 μ l ずつに分注し、-20°C で保存した。細胞壁可溶化画分のタンパク質量は Bradford et al. (1976) の方法に準じた。市販のタンパク質量定量試薬 Coomassie protein assay reagent (Pierce No. 23200) を用いて、BSA を標品として作成した下記の検量線を用いて求めた。

Bradford 法検量直線

$$Y = -51.584 + 0.76637X$$

X: 吸光度 (OD 595 nm×1,000)

Y: タンパク質量 (μ g/ml)

第3項 原形質膜画分の調製

(1) 緩衝液の調製

原形質膜画分の調製に先立って以下のバッファーを調整した。

<u>・磨碎バッファー</u>	<u>・水性二相分配バッファー</u>
75 mM MOPS-KOH (pH 7.6)	10 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.6)
0.25 M Sucrose (Wako)	6.2% (w/v) Dextran T 500 (Pharmacia)
5 mM EDTA (Wako)	6.2% (w/v) PEG (M. W. 3350; Wako)
5 mM EGTA (Wako)	0.25 M Sucrose
2 mM PMSF (Wako)	10 mM NaCl
4 mM SHAM (Sigma)	
10 μ g/ml BHT (Sigma)	
2.5 mM Potassium metabisulfate (Wako)	
0.5% (w/v) BSA (Nakarai)	
1.5% (w/v) PVP (Sigma)	

<p>・ <u>希釈バッファー</u></p> <p>5 mM MOPS-KOH (pH 7.6)</p> <p>0.25 M Sucrose</p> <p>1 mM EDTA</p> <p>0.2 mM PMSF</p> <p>10 mM KCl</p> <p>1 mM DTT (Nakarai)</p>	<p>・ <u>懸濁バッファー</u></p> <p>10 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.6)</p> <p>0.25 M Sucrose</p> <p>10 mM NaCl</p> <p>・ <u>保存バッファー</u></p> <p>5 mM MOPS-KOH (pH 7.6)</p> <p>0.25 M Sucrose</p>
--	--

(2) 原形質膜画分の調製

原形質膜画分の調製は Yoshida et al. (1986) の方法を一部改良して行った。暗所で生育させた 10 日齢のエンドウ上胚軸を水道水で洗浄し、4℃で約 1 時間冷却した。上胚軸をあらかじめ冷却した磨砕バッファー中で乳鉢を用いてよく磨砕し、磨砕液を 3 重に重ねたガーゼでろ過した。得られたろ液を 12,500×g、4℃で 15 分間遠心分離することによって残さ、細胞核、ミトコンドリアを除去後、上清部を再度超遠心分離 (100,600×g) し、沈殿部を懸濁バッファーで懸濁した (ミクロソーム画分)。5 倍量の水性二相分配バッファーにミクロソーム画分を添加後、遠心チューブを約 30 回横転させて攪拌した後、遠心分離 (1000×g) し、原形質膜の存在する上層部を回収した。得た上層部を 2 倍量以上の希釈バッファーで希釈後、再度遠心分離 (100,600×g) を行った。沈殿部は少量の保存バッファーに懸濁し、原形質膜画分とした (Fig. 1-4)。調製した原形質膜画分は、凍結融解によるタンパク質、膜脂質の変性等を防ぐため、100 μ l に分注し、-80℃で保存した。原形質膜画分のタンパク質量は細胞壁可溶性タンパク質同様、Bradford et al. (1976) の方法で定量し、BSA を標品として作成した検量直線を用いて換算した (本章、第 3 節参照)。

第 4 節 細胞壁画分の純度検定

一般的に細胞から調製したオルガネラの純度検定については、各オルガネラのマーカー酵素活性を調べられている。そこで、細胞壁画分中の他のオルガネラの混入について、Table 1-1 に示したマーカー酵素のうち主要な 11 種類の酵素活性指標に調べた。

第 1 項 各オルガネラの示標酵素活性の測定方法

(1) 原形質膜のマーカー酵素活性測定

(1-1) グルカンシンターゼ II (β - 1, 3 Glucansynthase)

グルカンシンターゼ II 活性の測定は Kauss et al. (1983) の方法に準じて行った。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
200 mM Cellobiose (Wako)	5.0	ddH ₂ O	20 mM
32 % Glycerol (Nakarai)	50.0	ddH ₂ O	16%
100 mM MgCl ₂ (Wako)	5.0	ddH ₂ O	10 mM
140 mM CaCl ₂ (Wako)	5.0	ddH ₂ O	14 mM
40 mM EDTA (Wako)	5.0	ddH ₂ O	4 mM
2 % Digitonin (Wako)	5.0	ddH ₂ O	0.2%
200 μ M ¹⁴ C-UDP-glucose (Amersham)	5.0	ddH ₂ O	20 μ M
Solubilized cell wall fraction (20 mg / ml)	10.0	50 mM Tris-HCl (pH 7.0)	100 μ g
250 mM Tris-HCl (pH 7.0)	10.0	ddH ₂ O	50 mM
Total	100.0	—	—
洗浄液：30 % Ethanol in 0.5 M Ammonium acetate (pH 3.6)			

エッペンドルフチューブに基質 (¹⁴C-UDP-Glucose) を除く反応液を予め混合しておき、¹⁴C-UDP-Glucose をチューブの上蓋の裏面に付着させて、軽く遠心して混合することによって酵素反応を開始し、25°Cで 30 分間静置した。その後反応液をろ紙 (3 MM Paper; Whatman) に滴下し、風乾後、洗浄液で洗浄し (1 h × 2 回) ろ紙上に残る放射標識された β - 1, 3 グルカン量を液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定することによって定量した。実験の際にはポジティブコントロールとして原形質膜画分を用いた。なお、酵素活性の評価に酵素を添加しない区を設け、非特異的にろ紙に吸着する ¹⁴C-UDP-グルコースによる放射活性の値を差し引いて酵素活性とした。

(2) ミトコンドリアのマーカー酵素活性測定

(2-1) シトクローム c オキシダーゼ (Cytochrome c oxidase)

シトクローム c オキシダーゼ活性は Hodges and Leonard (1974) の方法に準じて行った。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
50 mM Cytochrome c (Sigma)	5.0	ddH ₂ O	5 mM
Solubilized cell wall fraction (2000 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 7.5)	10 μ g
30 mM Tris-MES (pH 7.5)	40.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

還元型シトクローム c はアスコルビン酸ナトリウムを用いて強制的に還元することによって調製し、過剰量のアスコルビン酸ナトリウムは分画分子量 10,000 カット (Wako seamless tube) で透析をすることによって除いた。酵素活性測定は予め混合した反応液

を分光光度計のセル内に加えておき、酵素液をピペットマンを用いて添加することによって開始し、経時的に 10 秒おきに 2 分間 OD 550 nm における吸光度を測定した。酵素活性の評価は単位時間当たりの吸光度の変化 (ΔOD 550 nm) を求め、モル吸光係数 $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて以下の式に代入して計算した。

<p>(1) モル吸光係数の算出</p> $\epsilon = (1 / C \cdot l) \log_{10} (I_0 / I)$ <p>ϵ : モル吸光係数</p> <p>C : 試料濃度 (mol / l)</p> <p>l : キュベットの厚さ (cm)</p> <p>I_0 : 入射光強度</p> <p>I : セル通過後の光強度</p>	<p>(2) 酵素活性の算出</p> $\Delta C = \Delta A / \epsilon \cdot d$ <p>ΔC : 物質の濃度変化 (M, mM, μ M)</p> <p>ΔA : 吸光度の変化 (ΔOD)</p> <p>d : 光路長 (1 cm)</p> <p>ϵ : モル吸光係数</p>
---	---

(2-2) フマラーゼ (Fumarase)

フマラーゼ活性は Massey (1953) の方法に準じて行った。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
170 μ M Sodium fumarate (Wako)	5.0	ddH ₂ O	5 mM
Solubilized cell wall fraction (2000 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 7.5)	10 μ g
30 mM Tris-MES (pH 7.5)	40.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

酵素活性測定は予め混合した反応液を分光光度計のセル内に加えておき、酵素液をピペットマンを用いて添加することによって開始し、10 秒おきに 2 分間 OD 300 nm における吸光度を測定した。

(3) 液胞のマーカー酵素活性測定

(3-1) 酸性フォスファターゼ (Acid phosphatase)

(3-2) アルカリ性フォスファターゼ (Alkaline phosphatase)

酸性、およびアルカリ性フォスファターゼ活性の測定は Hodges and Leonard (1974) の方法に準じて pNPP を基質として用いた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM pNPP (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
30 mM MgSO ₄	2.5	ddH ₂ O	3 mM
Solubilized cell wall fraction (200 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 5.5, 9.5)	1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 5.5, 9.5)	15.0	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

酵素活性は無機リン酸の放出量を Perlin and Spanswick (1981) の方法に準じて測定することによって評価した。酸性、アルカリ性フォスファターゼともエッペンドルフチューブに予め混合した反応液を加えておき、酵素液を上蓋の裏面に付着させ、軽く遠心し添加することによって反応を開始し、25°Cで 20 分間インキュベートした。その後、各チューブを氷冷することによって反応を停止させ、随時調製した 0.42 % モリブデン酸アンモニウムと 10 % アスコルビン酸を 5:1 に混合した発色液 50 μ l を添加し、25°Cで 30 分間インキュベートし、OD 820 nm における吸光度を測定し、下記の無機リン酸換算式に代入して求めた。なお、酵素活性の評価は pNPP の非酵素的分解によって生じる無機リン酸量を差し引いて実際の酵素活性とした。

無機リン酸換算式

$$Y = -14.949 + 161.67 X$$

X: 吸光度 (OD 820 nm) Y: 無機リン酸量 (nmol)

(4) 小包体のマーカー酵素活性測定

(4-1) NADH チトクローム c レダクターゼ (NADH Cytochrome c reductase)

(4-2) NADPH チトクローム c レダクターゼ (NADPH Cytochrome c reductase)

NAD(P)H チトクローム c レダクターゼ活性の測定は Hodges and Leonard (1974) の方法に準じて測定した。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM NAD(P)H	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
5 mM Cytochrome c	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
Solubilized cell wall fraction (2000 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 7.5)	100 μ g
30 mM Tris-MES (pH 7.5)	35.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

酵素活性測定は NAD(P)H を除く反応液を予め分光光度計のセル内に加えておき、酵素液をピペットマンを用いて添加することによって開始し、経時的に 10 秒おきに 2 分

間 OD 550 nm の吸光度を測定した。酵素活性の評価は単位時間当たりの吸光度の変化 ($\Delta OD 550 \text{ nm}$) を求め、モル吸光係数 $18.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて算出した。

(5) 葉緑体のマーカー酵素活性測定

(5-1) リブローズ・ビスリン酸・カルボキシラーゼ (RuBP carboxylase)

リブローズ-ビスリン酸-カルボキシラーゼ活性の測定法は、一般的にラジオアイソトープを用いて、あるいは分光光度計を用いて吸光度を測定することによって行われる。本実験では比較的簡便である Racker (1976) の方法に準じて、吸光度の変化として測定した。

	Vol. (μl)	Solvent	Final conc.
1.5 mM NADH	5.0	ddH ₂ O	0.15 mM
200 mM Glutathione	5.0	ddH ₂ O	20 mM
10 mM KHCO ₃	5.0	ddH ₂ O	1 mM
5% Glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase	5.0	ddH ₂ O	0.5%
0.25% 3-P-glycerate kinase	5.0	ddH ₂ O	0.025%
0.05% α -glycerophosphate dehydrogenase-triose-P-isomerase	5.0	ddH ₂ O	0.005%
50 mM Ribulose biphosphate	5.0	ddH ₂ O	5 mM
80 mM ATP	2.5	ddH ₂ O	4 mM
100 mM MgCl ₂	5.0	ddH ₂ O	10 mM
Solubilized cell wall fraction (50 mg/ml)	5.0	1 M Tris-HCl (pH 7.8)	100 μg
1 M Tris-HCl (pH 7.8)	2.5	—	50 mM
Total	50.0	—	—

酵素活性測定は予め混合した反応液を分光光度計のセル内に加えておき、酵素液をピペットマンを用いて添加することによって開始し、1分おきに10分間 OD 340 nm における吸光度の減少を測定した。本法の原理は NADH の酸化を測定することによって酵素活性を間接的に RuBP カルボキシラーゼ活性を測定するものである。RuBP 1 分子がカルボキシル化されることによって4分子の NADH が酸化されることとなる。酵素活性の算出は単位時間当たりの吸光度の変化 ($\Delta OD 340 \text{ nm}$) を求め、モル吸光係数 $6.22 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて行った。

(6) ゴルジ体のマーカー酵素活性測定

(6-1) グルカンシンターゼ I (β -1, 4 Glucansynthase)

グルカンシンターゼ I 活性の測定はグルカンシンターゼ II 活性と同様に、Kauss et al. (1983) の方法に準じて UDP-Glucose を基質に行った。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
200 mM Cellobiose	5.0	ddH ₂ O	20 mM
32 % Glycerol	50.0	ddH ₂ O	16%
100 mM MgCl ₂	5.0	ddH ₂ O	10 mM
40 mM EDTA	5.0	ddH ₂ O	4 mM
1 % Digitonin	10.0	ddH ₂ O	0.2%
200 μ M ¹⁴ C-UDP-glucose	5.0	ddH ₂ O	20 μ M
Solubilized cell wall fraction (10 mg / ml)	10.0	50 mM Tris-HCl (pH 7.0)	100 μ g
250 mM Tris-HCl (pH 7.0)	10.0	—	50 mM
Total	100.0	—	—
洗浄液 : 30 % Ethanol in 0.5 M Ammonium acetate (pH 3.6)			

エッペンドルフチューブに基質 (¹⁴C-UDP-Glucose) を除く反応液を予め混合しておき、基質を添加することによって酵素反応を開始し、25℃で 30 分間インキュベートした。その後反応液をろ紙 (Whatmen 3 MM Paper) に滴下し、風乾後、洗浄液で洗浄し(1 h × 2 回) ろ紙上に残る放射標識された β - 1, 4 グルカン量を液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定することによって定量した。なお、酵素活性の評価に酵素を添加しない区を設け、非特異的にろ紙に吸着する UDP-グルコースによる放射活性を差し引くことによって求めた。

(7) 核膜のマーカー酵素活性測定

グルコース-6-リン酸フォスファターゼ、5'-ヌクレオチダーゼ活性の測定は Hodges and Leonard (1974) の方法に準じて、グルコース-6-リン酸、および 5',-AMP をそれぞれ基質として測定した。

(7-1) グルコース-6-リン酸フォスファターゼ (Glucose-6-phosphatase)

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM Glucose-6-phosphate	5.0	ddH ₂ O	3 mM
30 mM MgSO ₄	5.0	ddH ₂ O	3 mM
Solubilized cell wall fraction (200 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	5.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

(7-2) 5'-ヌクレオチダーゼ (5'-Nucleotidase)

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM 5'-AMP	5	dd H ₂ O	3 mM
30 mM MgSO ₄	5	ddH ₂ O	3 mM
Solubilized cell wall fraction (200 μ g/ml)	5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	5	ddH ₂ O	—
Total	50	—	—

酵素活性は酸性、アルカリ性フォスファターゼと同様に Perlin and Spanswick (1981)の方法に準じて測定することによって評価した。グルコース-6-リン酸フォスファターゼ、5'-ヌクレオチダーゼともエッペンドルフチューブに予め混合した反応液を加えておき、酵素液を上蓋の裏面に付着させ、軽く遠心し添加することによって反応を開始し、25°Cで 20 分間インキュベートした。その後、各チューブを氷冷することによって反応を停止させ、随時調製した 0.42 % モリブデン酸アンモニウムと 10 % アスコルビン酸を 5 : 1 に混合した発色液 50 μ l を添加し、25°Cで 30 分間インキュベートし、OD 820 nm における吸光度を測定し、無機リン酸換算式に代入して求めた。なお、酵素活性の評価は細胞壁可溶化画分を添加しない区を設け、グルコース-6-リン酸、5'-AMP の非酵素的分解によって生じる無機リン酸量を差し引いて実際の酵素活性とした。

第2項 結果

Table 1-1 に示したようにエンドウ、ササゲの細胞壁から NaCl で可溶化した画分中には今回行った 11 種類のマーカー酵素活性のうち、大部分の酵素活性が検出されなかった。実験を行った酵素のうち液胞膜のマーカー酵素と報告されている酸性フォスファターゼ活性が弱いながら認められた。この結果は若干の液胞膜の混入を示す可能性が考えられる。しかしながら、細胞壁中には酸性フォスファターゼが存在するとの報告もある (Ricard 1981)。このことから、本実験で検出された酸性フォスファターゼ活性は液胞膜由来であるのか、あるいは細胞壁由来の活性であるのかは明らかではないが、いずれにせよ活性自体はさほど強くないことから、液胞膜の混入はほとんどないものと判断した。一方、原形質膜のマーカー酵素のグルカンシンターゼ II 活性についてはササゲ由来の画分では検出されなかったが、エンドウ由来の画分で認められた。しかしながら、対照区として実験を行ったエンドウ、ササゲの原形質膜画分を用いた実験結果では、各々の植物由来の原形質膜画分のグルカンシンターゼ II 活性は 15.16、および 18.95 mM (mg protein)⁻¹ h⁻¹ であるのに対し、エンドウ細胞壁可溶化画分のグルカンシンターゼ II 活性は 0.4 mM (mg protein)⁻¹ h⁻¹ と極端に低いものであった。この結果からエンドウ細胞壁画分には若干の原形質膜の混入は認められるものの、細胞壁可溶化タンパク質中の 3 % 以下であり、無視できる程度の混入であると考えられる。

以上のように調製した細胞壁可溶化画分は 11 種のマーカー酵素活性を指標とした純度検定から純度は高いと考えられるので、以下の実験に供試することとした。

Mycosphaerella pinodes

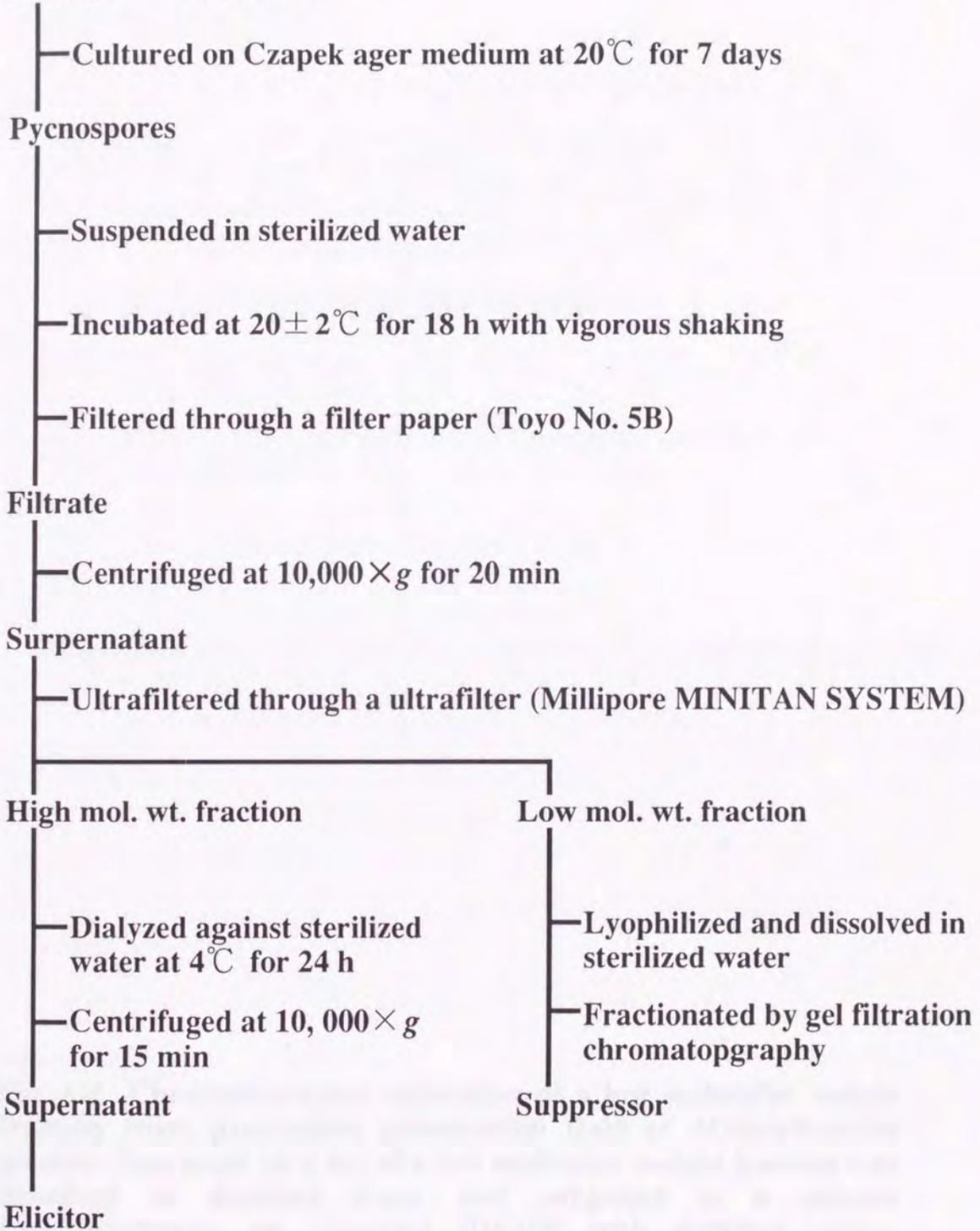


Fig. 1-1 Preparation of elicitor and suppressor from *Mycosphaerella pinodes*.

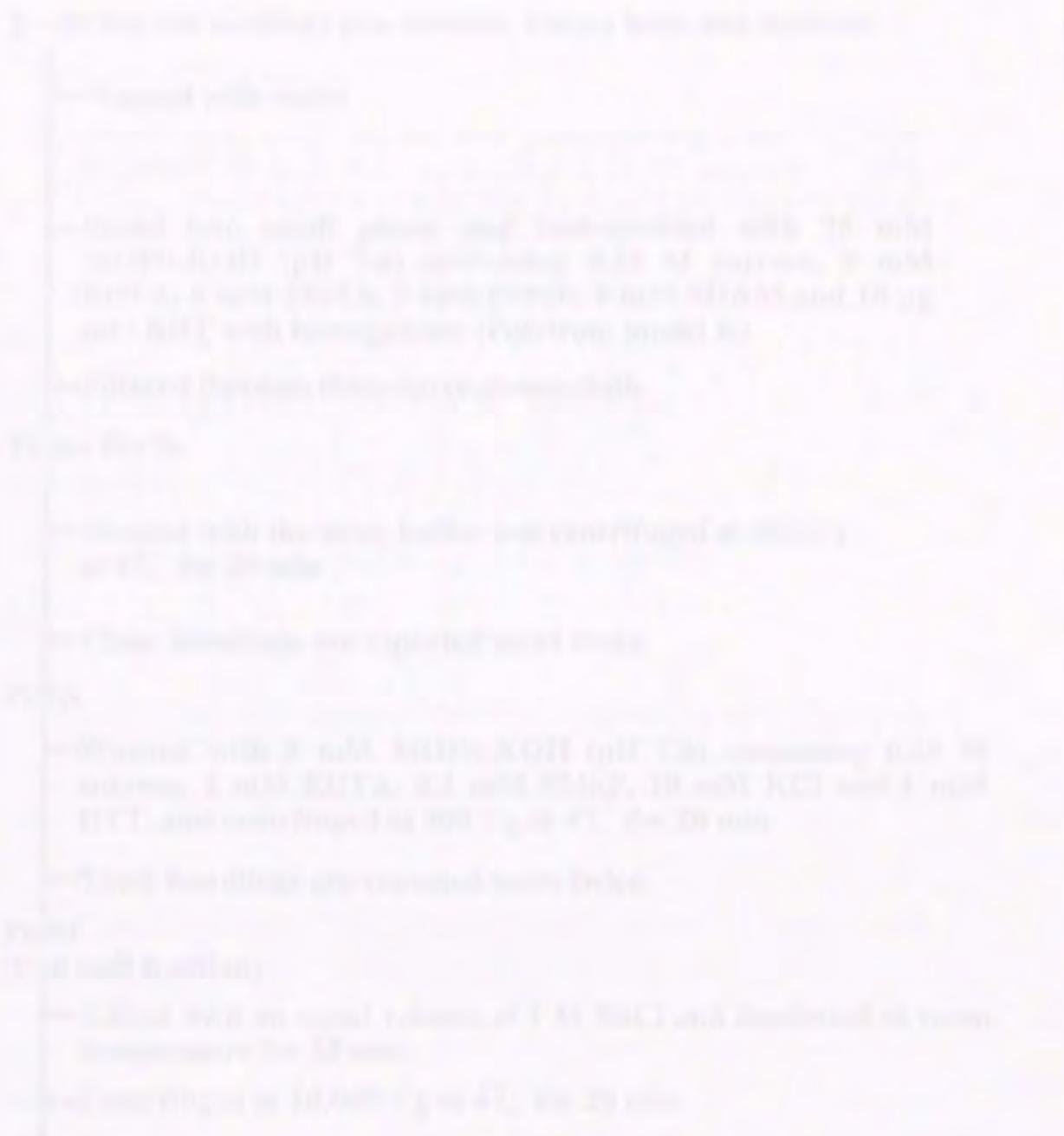


Fig. 1-2 Chromatographic separation of a low molecular weight fraction from pycnospore germination fluid of *Mycosphaerella pinodes*. One gram (dry wt) of a low molecular weight fraction was dissolved in distilled water and subjected to a column chromatography on Toyoperl HW40F with distilled water. Fractions that possess highest suppressor-activities (shadow in figure) were collected and used as a partially purified suppressor throughout experiments.

8 ~ 10 day-old seedlings pea, cowpea, kidney bean and soybean.

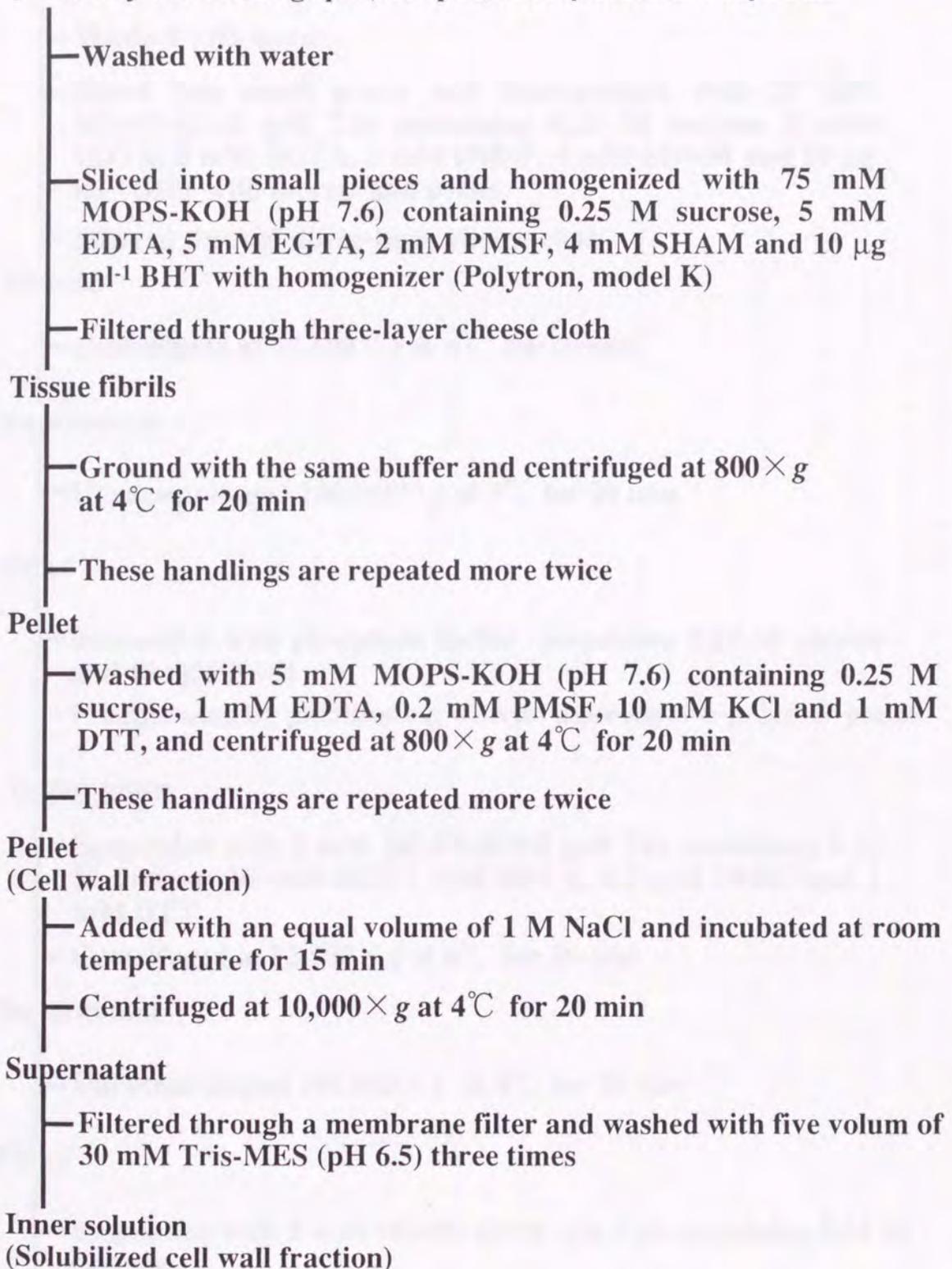


Fig. 1-3 Preparation of cell wall fraction from etiolated seedling of pea, cowpea, kidney bean and soybean, and solubilization of cell wall protein from cell wall fractions.

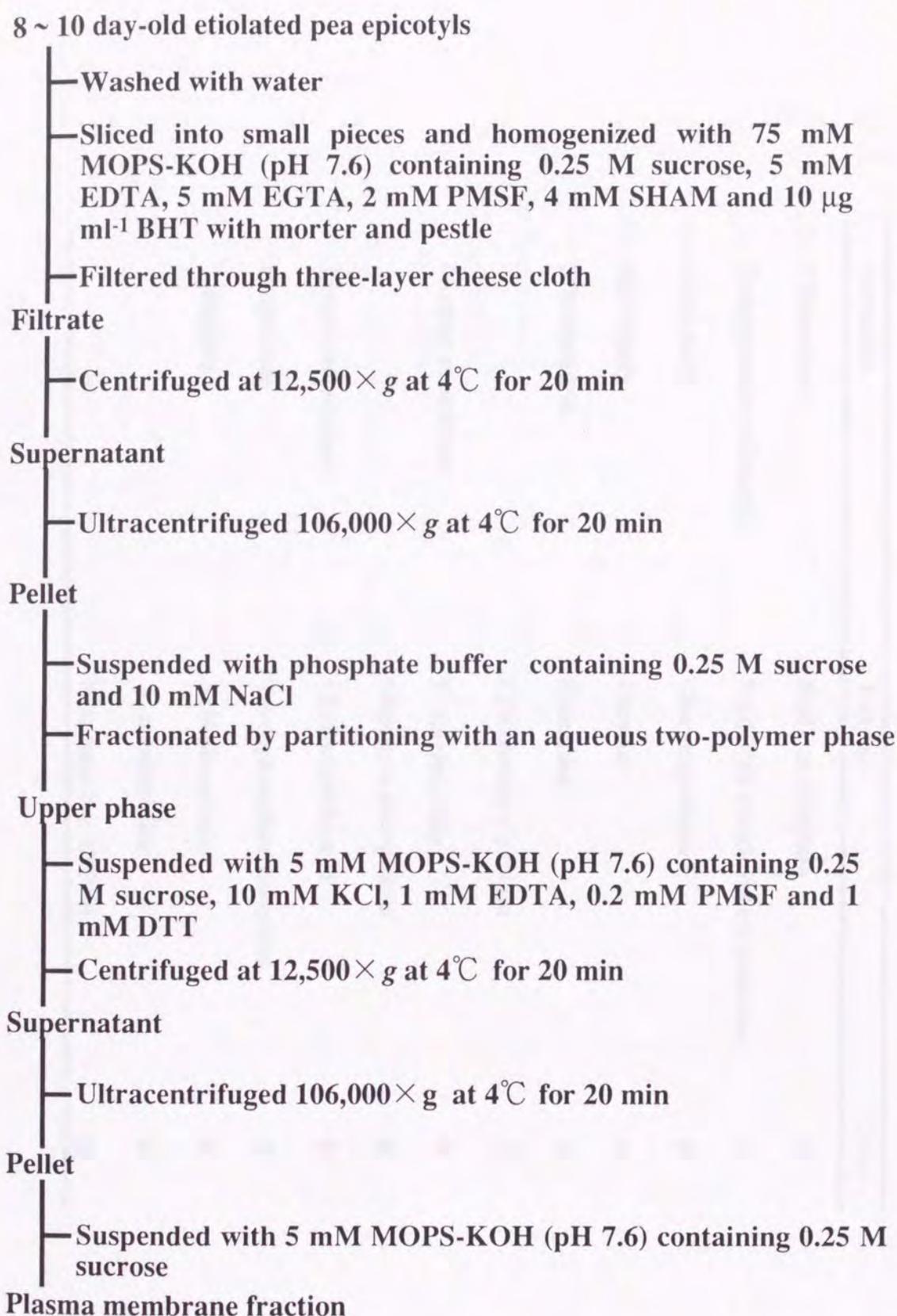


Fig. 1-4 Preparation of plasma membrane fraction from etiolated epicotyls of pea.

Table 1-1 Marker enzymes of plant organelle

Organelle	Enzyme	Class
Chloroplast	RuBP carboxylase	A
Endoplasmic reticulum	NAD(P)H cytochrome c reductase	A
Golgi body	Glucan synthase I	B
Microbody	Catalase	A
Mitochondria	Fumarase	A
	Cytochrome c oxidase	A
Nuclear membrane	5'-nucleotidase	B
	Glucose-6-phosphatase	B
Plasma membrane	Glucan synthase II	B
Proplastide	Triosephosphate isomelase	B
Tonoplast	Acid phosphatase	B
	α -mannosidase	B
	NO ₃ -sensitive ATPase	B

Table 1-2 Activities of several marker enzymes in the fraction solubilized from cell walls of pea and cowpea

Enzyme	Pea	Cowpea
	Specific activity [mmol / mg protein / h]	Specific activity [mmol / mg protein / h]
Acid phosphatase ^a	0.008 ± 0.001	0.005 ± 0.002
Alkaline phosphatase ^a	ND ^e	ND
Cytochrome c oxidase ^a	ND	ND
Fumarase ^b	ND	ND
Glucan synthase I ^c	ND	ND
Glucan synthase II ^c	0.40 ± 0.15	ND
Glucose-6-phosphatase ^a	ND	ND
NADH cytochrome c reductase ^a	ND	ND
NADPH cytochrome c reductase ^a	ND	ND
5-Nucleotidase ^a	ND	ND
RuBP carboxylase ^d	ND	ND

^aThe activities of these marker enzymes were determined by the method of Hodges and Leonald (1974).

^bFumarase activity was determined by the method of Massey et al. (1953).

^cActivities of glucan synthase I and II were determined by the method of Kauss et al. (1983).

^dRuBP carboxylase activity was determined by the method of Racker (1953).

^e The activity was not detected in the fractions solubilized from cell wall with 0.5 M NaCl.

第2章 細胞壁 ATPase の諸性質及びエリシター、サプレッサーの影響

序論で述べたように、エンドウ褐紋病菌が生産する宿主特異性的サプレッサーは、宿主エンドウ組織の ATPase 活性を阻害することが判っている (Shiraishi et al. 1991a, 1992, 1994, Yoshioka et al. 1990)。一方、P 型 ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸をエンドウ組織に与えた場合には、サプレッサー同様にエンドウの防御応答を抑制した (Yoshioka et al. 1990, 1992a, 1992b)。このような結果から、サプレッサーの作用点は ATPase であり、褐紋病菌は宿主の ATPase を阻害することによって基本的な代謝系を攪乱し、防御応答を遅延させ、その結果感染を成立させているものと考えられる。実際、エンドウ、インゲン、ダイズ、ササゲ、オオムギ組織をサプレッサーで処理すると、宿主エンドウ細胞の ATPase 活性だけが阻害され、いくつかの防御応答と同様にサプレッサーの種特異的な作用が認められた。しかしながら、これら 5 種の植物から調製した原形質膜画分中の ATPase 活性はいずれもサプレッサーによって阻害され、組織で見られた特異性は見い出せなかった (Shiraishi et al. 1991a)。以上の結果からサプレッサーに対する特異的応答 (宿主特異性決定) に植物細胞壁が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

植物細胞壁には 酸性フォスファターゼ、ATPase をはじめとするある種のフォスファターゼが存在することが報告されている (Kivilaan et al. 1961, Ricard et al. 1981)。しかしながら、細胞壁の ATPase や酸性フォスファターゼの役割、特に植物と病原菌間の相互作用における役割については明らかにされていない。そこで本章では、エンドウ、ササゲの黄化胚軸より細胞壁画分を調製し、細胞壁画分の ATPase 活性有無、および本 ATPase 活性に対するエリシター、サプレッサーの影響について調べた。

第1節 ATPase 活性の測定

ATPase 活性は無機リン酸の放出量を Perlin and Spanswick (1981) の方法に準じて測定した。エッペンドルフチューブ内に反応液を加えておき、上蓋の裏面に細胞壁画分、あるいは細胞壁可溶化画分を付着させておき、軽く遠心することによって添加し、反応を開始した。25℃で 20 分間インキュベート後、随時調製した 0.42 % モリブデン酸アンモニウムと 10 % アスコルビン酸を 5 : 1 に混合した発色液を 50 μ l 添加し、25℃で 30 分間インキュベートし、OD 820 nm における吸光度を測定し、反応液中の無機リン酸の濃度を定量した。酵素活性の評価は細胞壁可溶化画分、サプレッサーおよび ATP のみの区を設け、ATP の非酵素的分解および酵素、阻害剤等に含まれる無機リン酸の量を差し引いた値を換算式 (第2章、参照) に代入して求めた。

第2節 細胞壁 ATPase の諸性質

第1項 基質特異性とサプレッサーの効果

(1) 方法

細胞壁 ATPase の基質特異性について細胞壁可溶化画分を用いて、ATP 以外に CTP、GTP、UTP、pNPP、PPi を基質として用いて調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM ATP, CTP, GTP, UTP (Sigma), pNPP, PPi (Wako)	2.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
30 mM MgSO ₄ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
1000 μ g/ml Suppressor	2.5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
Solubilized cell wall fraction (20 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	12.5	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

(2) 結果

Fig. 2-1 に示したようにエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分における pNPP、および PPi 分解活性は非常に弱いものであった。しかしながら、エンドウ、ササゲ量植物由来の細胞壁可溶化画分とも ATP の他に CTP、GTP、UTP の加水分解活性を示し、基質特異性の順位はエンドウでは $UTP \geq CTP > GTP > ATP \gg PPi > pNPP$ 、ササゲでは $UTP \geq GTP > CTP \geq ATP \gg PPi > pNPP$ であった (Fig. 2-1)。エンドウ原形質膜画分の ATPase は ATP 以外の基質をほとんど分解せず、基質特異性の順位は $ATP \gg CTP > ADP > GTP = UTP$ であり、PPi はほとんど分解しない (Yoshioka et al. 1990 and unpublished data)。このような結果から、細胞壁画分 ATPase は基質特異性で原形質膜 ATPase とは大きく異なることが明らかとなった。

次に、これら様々な基質分解活性に対するサプレッサーの効果について調べた。エンドウではすべての基質を用いた場合においてサプレッサーによって有意に基質分解活性が阻害された。一方、ササゲでは CTP、GTP、UTP、pNPP、PPi を基質に用いた場合にはエンドウと同様にサプレッサーによって活性が阻害された。しかしながら、ATP を基質に用いた場合には活性は阻害されず、むしろ逆に活性化した (Fig. 2-1)。以上の結果から褐紋病菌サプレッサーは細胞壁画分中の ATPase 活性に対して種特異的に作用することが明らかとなった。

第2項 薬剤感受性

(1) 方法

細胞壁 ATPase の薬剤感受性について可溶化画分を用いて調べた。阻害剤については P 型 ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸、V 型 ATPase の阻害剤である硝酸ナトリウム、F 型 ATPase の阻害剤であるアザイド、酸性フォスファターゼの阻害剤であるモリブデン酸ナトリウム、およびフォスホリパーゼ C (PLC) の阻害剤であるネオマイシンを用いた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM ATP (Sigma)	2.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
30 mM MgSO ₄ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
10 mM Na ₃ VO ₄ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	1 mM
500 mM NaNO ₃ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	50 mM
10 mM NaN ₃ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	1 mM
10 mM Na ₂ MoO ₄ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	1 mM
1 mM Neomycin (Sigma)	2.5	ddH ₂ O	1 mM
Solubilized cell wall fraction (20 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	15.0	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

(2) 結果

両植物由来の細胞壁 ATPase ともオルトバナジン酸処理で顕著に ATPase 活性が阻害されたが、硝酸ナトリウム、アザイド、ネオマイシンによって全く影響を受けなかった。また、エンドウ由来の細胞壁 ATPase はモリブデン酸ナトリウムによっても全く影響を受けなかったが、ササゲ由来の細胞壁 ATPase は若干阻害された (Fig. 2-2)。Serrano (1989) の報告によれば、高等植物の ATPase は 1) 主に原形質膜に存在しリン酸中間体を形成し、オルトバナジン酸で阻害される P 型 ATPase、2) ミトコンドリア、葉緑体に局在し、ATP 合成活性を有し、アザイドによって阻害される F₀ F₁-ATPase、3) 液胞膜や輸送膜に存在し、硝酸イオンで阻害される V 型 ATPase に大別される。以上の阻害剤に対する感受性の結果から、細胞壁 ATPase は P 型の ATPase の範疇に入るものと考えられる。また、ササゲ由来の画分には酸性フォスファターゼが若干含まれていることが判った。この酸性フォスファターゼ活性については液胞膜のフォスファターゼの混入の可能性が考えられた。しかしながら、細胞壁画分の ATPase が液胞膜 ATPase の阻害剤である硝酸イオンによって阻害されなかったことから、本活性も液胞膜ではなく、むしろ細胞壁固有の酸性フォスファターゼと考えられる。また、フォスフォリパーゼ C の阻害剤であるネオマイシンは原形質膜 ATPase を阻害するが (豊田 1994)、細胞壁 ATPase に対してまったく影響を与えなかった (Fig. 2-2)。このことから、薬剤 (ネオマイシン) に対する感受性において細胞壁 ATPase と原形質膜 ATPase は異なることが判った。

第3項 pH 依存性

(1) 方法

細胞壁 ATPase の pH による活性の変化および至適 pH について調べた。実験は 30 mM Tris-MES (pH 5.0-10.0) を用いて pH 0.5 刻みに変化させた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM ATP (Sigma)	2.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
30 mM MgSO ₄ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
Solubilized cell wall fraction (20 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 5.0 - 10.0)	12.5	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

(2) 結果

エンドウ、ササゲ両植物細胞壁由来の ATPase とも広い pH 範囲で活性を示した。至適 pH はエンドウ細胞壁 ATPase は pH 6.0 および pH 8.0、ササゲ細胞壁 ATPase では pH 6.5 および pH 9.0 であった (Fig. 2-3)。以上の結果から、1) エンドウ、およびササゲの細胞壁画分中には複数の ATPase が存在する可能性があること、また、2) エンドウとササゲの細胞壁 ATPase は至適 pH が異なることが明らかとなった。原形質膜 ATPase の至適 pH は 6.0~7.5 付近に存在し、至適 pH をはずれると活性が顕著に低下することが判っており、この点においても原形質膜 ATPase と細胞壁 ATPase は性質が異なっている。

第4項 2価イオン要求性

(1) 方法

細胞壁 ATPase の2価イオン要求性について、マンガンイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオンを用いて調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM ATP (Sigma)	2.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
30 mM MgSO ₄ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
30 mM CaCl ₂ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
30 mM MnCl ₂ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
30 mM ZnCl ₂ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
Solubilized cell wall fraction (20 μ g/ml)	5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	12.5	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

(2) 結果

Fig. 2-4 に示したように、エンドウとササゲの細胞壁 ATPase とも Ca²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺ のいずれの2価イオンを添加した場合においても、2価イオン非存在下での活性と比較して有意に活性が上昇し、2価イオン非存在下での活性はマグネシウムイオン存在下で

の活性と比較して、エンドウでは約 40 %、ササゲでは約 20 % 低下した。2 価イオンの優先順位はエンドウでは $Mn^{2+} \geq Mg^{2+} \geq Ca^{2+}$ 、ササゲでは $Ca^{2+} \geq Mn^{2+} \geq Mg^{2+}$ であった。一方、亜鉛イオンについては逆に ATPase 活性を低下させ、ササゲの画分において顕著であった。以上の結果から、エンドウとササゲの細胞壁 ATPase はイオン要求性が異なることが明らかとなった。一方、エンドウ原形質膜 ATPase は 2 価イオン非存在下での活性はマグネシウムイオン存在下の活性と比較して著しく (90 % 以上) 低下することが判っており、2 価イオンに対する依存性は原形質膜 ATPase より細胞壁 ATPase がはるかに低いといえる。

第 3 節 細胞壁画分の ATPase 活性に対するエリシター、サプレッサーの影響

第 1 項 可溶化細胞壁 ATPase に対するエンドウ褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響

(1) 方法

本節、第 1 項で示したように褐紋病菌サプレッサーは細胞壁可溶化画分の ATPase 活性に対して種特異的な阻害効果を示すことが明らかとなった。そこで次に本 ATPase に対するエリシター、サプレッサーの効果について調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM ATP (Sigma)	2.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
30 mM MgSO ₄ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
1000 μ g/ml Elicitor	2.5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
1000 μ g/ml Suppressor	2.5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
Solubilized cell wall fraction (20 μ g / ml)	5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	12.5	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

(2) 結果

エンドウ、ササゲ両植物由来の細胞壁可溶化画分の ATPase 活性は褐紋病菌由来のエリシターで処理すると有意に活性が上昇した。一方、サプレッサーは第 1 項の結果と同様にエンドウ由来の細胞壁 ATPase 活性を有意に阻害したが、ササゲ由来の細胞壁 ATPase は有意に逆に活性化した。また、エリシターとサプレッサーの混合処理では、エリシターで活性化されるエンドウ細胞壁 ATPase 活性はほぼサプレッサー単独処理レベルまで抑制されたが、ササゲ細胞壁 ATPase はむしろ相加的に活性化された (Fig. 2-5)。以上の結果から、褐紋病菌由来のエリシターは細胞壁 ATPase を非特異的に活性化し、一方、サプレッサーは種特異的に制御することが明らかとなった。

第 2 項 細胞壁 ATPase に対するエンドウ褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響

(1) 方法

本節、第1項および第5項の結果を踏まえて、次にエンドウ、ササゲ、インゲン、ダイズの黄化胚軸より調製した細胞壁画分を用いて ATPase 活性がこれら菌シグナルによって制御されるか否かについて調べた。なお、細胞壁画分中のタンパク質については、細胞壁画分を 0.1 N NaOH で煮沸することによってタンパク質を可溶化し、Bradford (1976) の方法によって定量した。なお、乾重 1 mg の細胞壁当たりのタンパク質量は約 10 μ g である。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM ATP (Sigma)	2.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
30 mM MgSO ₄ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
1000 μ g/ml Elicitor	2.5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
1000 μ g/ml Suppressor	2.5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
Cell wall fraction (20 μ g/ml)	5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	12.5	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

(2) 結果

すべての植物由来の細胞壁 ATPase は褐紋病菌のエリシターで非特異的に活性化した。一方、褐紋病菌サプレッサーはエンドウ由来の細胞壁 ATPase のみを阻害し、褐紋病菌の非宿主植物であるササゲ、インゲン、ダイズの細胞壁 ATPase を阻害せず、逆に活性化した (Fig. 2-6)。以上の結果から、可溶化していない細胞壁中の ATPase もこれら菌シグナルで制御されること、特に、サプレッサーは細胞壁中の ATPase 活性に対しても種特異的に作用することが判った。

第4節 まとめ

本章の実験からマメ科植物の細胞壁画分中には Kivilaan et al. (1961) の報告と同様にある種のフォスファターゼが存在することが判った。本酵素の基質は ATP のみならず、CTP、GTP、UTP、pNPP あるいはピロリン酸等であり、特に CTP や UTP の分解活性が高かった (Fig. 2-1)。一方、これらの加水分解活性に対するエンドウ褐紋病菌サプレッサーの影響を調べたところ、エンドウ由来の細胞壁画分に対しては、いずれの基質を用いた場合にも活性を阻害した。しかしながら、ササゲ由来の細胞壁画分に対しては CTP、GTP、UTP、pNPP、あるいは PPi を基質にした場合はエンドウ同様にサプレッサーによって阻害されたが、ATPase 活性に対しては阻害することはなく、むしろ逆に活性化することが判った (Fig. 2-1)。即ち、褐紋病菌のサプレッサーは宿主エンドウ細胞壁画分の ATPase 活性に対してはサプレッサーとして作用するが、非宿主のササゲ細胞壁画分の ATPase 活性に対してはエリシターとして作用することが明らかとなった。

このことから細胞壁中のフォスファターゼ活性のうち ATPase 活性がエンドウ褐紋病菌 サプレッサーに対して特異的に応答することが明らかとなった。一方、細胞壁中の ATPase 活性のサプレッサーに対するこの特異的な応答性については、1) サプレッサーに対して種特異的に応答する ATPase 分子が存在し、他のフォスファターゼ分子の活性は非特異的に阻害される、2) 1つのフォスファターゼ分子が ATP を基質にした場合のみサプレッサーに対し特異的に応答できるという2つのメカニズムが推定できる。

次に、細胞壁 ATPase の諸性質について調べた。3種の ATPase の阻害剤に対しては オルトバナジン酸によってのみ顕著に阻害され、P 型 ATPase に属するものと推察された。しかしながら、原形質膜 ATPase はネオマイシンによって濃度依存的に阻害されるのに対し、細胞壁 ATPase はまったく影響を受けなかった (Fig. 2-2)。このような点から細胞壁 ATPase は原形質膜 ATPase とは異なる性質を持つ、つまり PIP₂ 等の脂質環境や PLC に影響されないものと考えられる。さらに、至適 pH、基質特異性、2価イオン要求性等の諸性質についても、原形質膜 ATPase とは性質が大きく異なることが明らかとなった (Fig. 2-1, 3, 4)。

エンドウ褐紋病菌のエリシターはエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分の ATPase 活性を非特異的に活性化した。一方、サプレッサーは宿主エンドウ細胞壁可溶化画分の ATPase は阻害したが、非宿主ササゲ由来の細胞壁可溶化画分 ATPase 活性は阻害せず、逆に活性化した (Fig. 2-5)。また、エリシターはエンドウ、ササゲ、インゲン、ダイズの植物由来の細胞壁画分中の ATPase を非特異的に活性化し、本菌由来のサプレッサーは宿主エンドウの細胞壁 ATPase のみを阻害したが、非宿主であるササゲ、インゲン、ダイズ由来の細胞壁 ATPase は阻害せず、逆に活性化し、エリシターとして作用した (Fig. 2-6)。以上の結果は、細胞壁 (ATPase) は菌シグナルに厳密に応答し、特に、サプレッサーに対する応答から細胞壁が宿主特異性決定に極めて重要であることが示唆された。エンドウ褐紋病菌のサプレッサーはピサチン蓄積、PR-タンパク質の活性化をはじめとする宿主エンドウ組織の防御応答を種特異的に阻害し、さらにはエンドウ組織にのみ受容性を誘導し、非病原菌の感染も成立させるが非宿主植物に対しては逆に防御応答を誘導することが判っている (Oku et al. 1980, Shiraishi et al. 1991b)。さらに、宿主エンドウ細胞の ATPase 活性のみを阻害し、非宿主であるインゲン、ササゲ、ダイズ、オオムギ細胞の ATPase 活性は阻害しない (Shiraishi et al. 1991a)。分離細胞壁における ATPase 活性 (in vitro) に対する病原菌シグナルの影響を調べた本実験の結果は、これらサプレッサーが組織 (in vivo) において示す種特異的な作用を反映している。

細胞壁に ATPase、酸性フォスファターゼをはじめとするある種のフォスファターゼが存在することは以前から報告されてきた (Kivilaan et al. 1961, Ricard 1981)。細胞外、あるいは細胞壁中のフォスファターゼの役割については、リン酸飢餓状態において土中の有機リン酸を植物が利用できる無機リン酸に分解するという、生理学的な研究はなされているものの (Duff et al. 1994, Tadano et al. 1993)、植物と病原菌の相互作用という点からの研究はなされていなかった。本章の実験から細胞壁画分中には ATPase をはじ

めとするある種のフォスファターゼ活性が存在し、諸性質が原形質膜 ATPase と大きく異なること (Table 2-1)、本 ATPase 活性は病原菌シグナルに応答性を示し、特にサブレッサーに対して種特異的に応答することが判った。以上の結果から、細胞壁 ATPase は病原菌認識、宿主特異性決定に重要な役割を持つことも、さらにはエリシター、サブレッサーの受容体が本 ATPase の近傍に存在するか、あるいは ATPase 自身がこれら菌シグナルの受容体である可能性が考えられる。



Fig. 2-1. Effects of the suppressor from *Mycoplasma plasma* on the activities of ATPase, GTPase and pNTPase in the fractions solubilized from the cell walls of gas and serum. The assays for respective phosphatase activities were carried out at 25°C for 20 min in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) with 2 mM MgCl₂ in the absence (water control) [□] or presence (■) of the suppressor at the concentration of 100 µg/ml. Respective substrates were used at a concentration of 3 mM. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

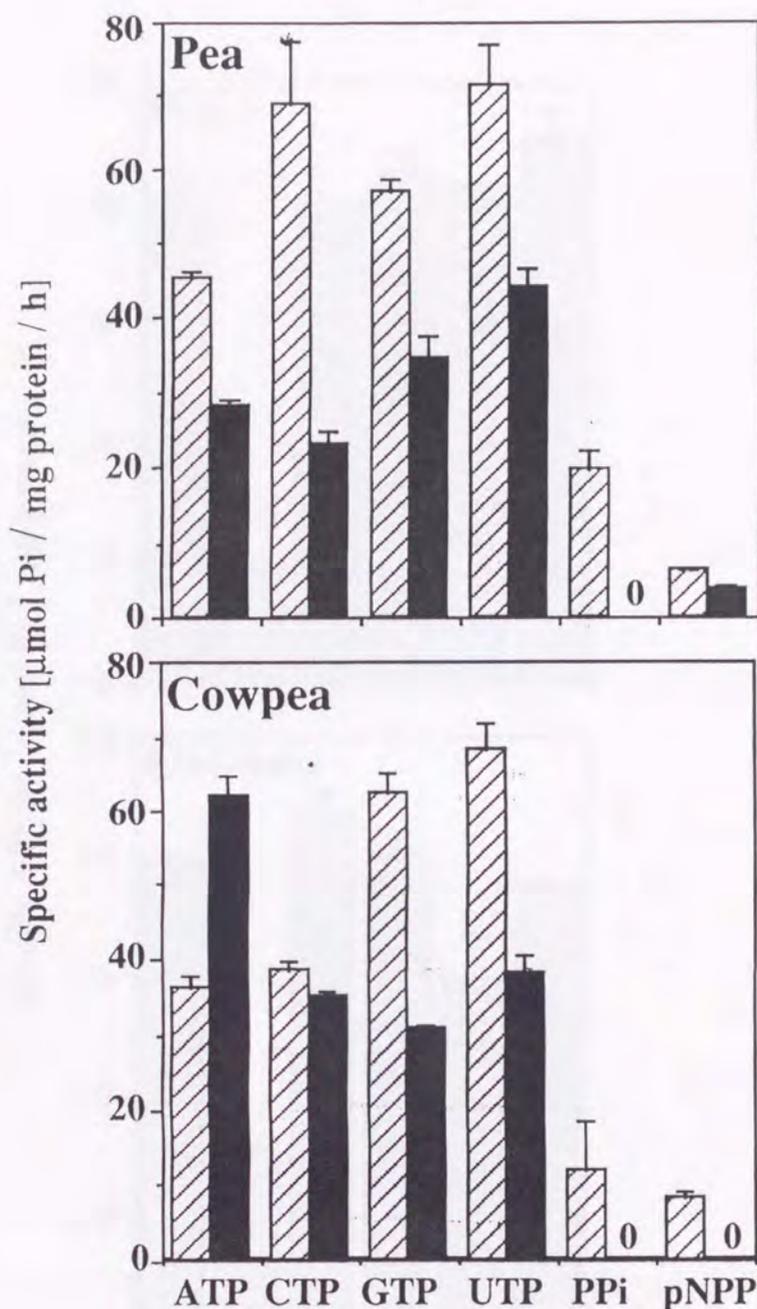


Fig. 2-1. Effects of the suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on the activities of NTPases, PPases and pNPPases in the fractions solubilized from the cell walls of pea and cowpea. The assays for respective phosphatase activities were carried out at 25°C for 20 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) with 3 mM MgSO₄ in the absence (water control; ▨) or presence (■) of the suppressor at the concentration of 100 μg / ml. Respective substrates were used at a concentration of 3 mM. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

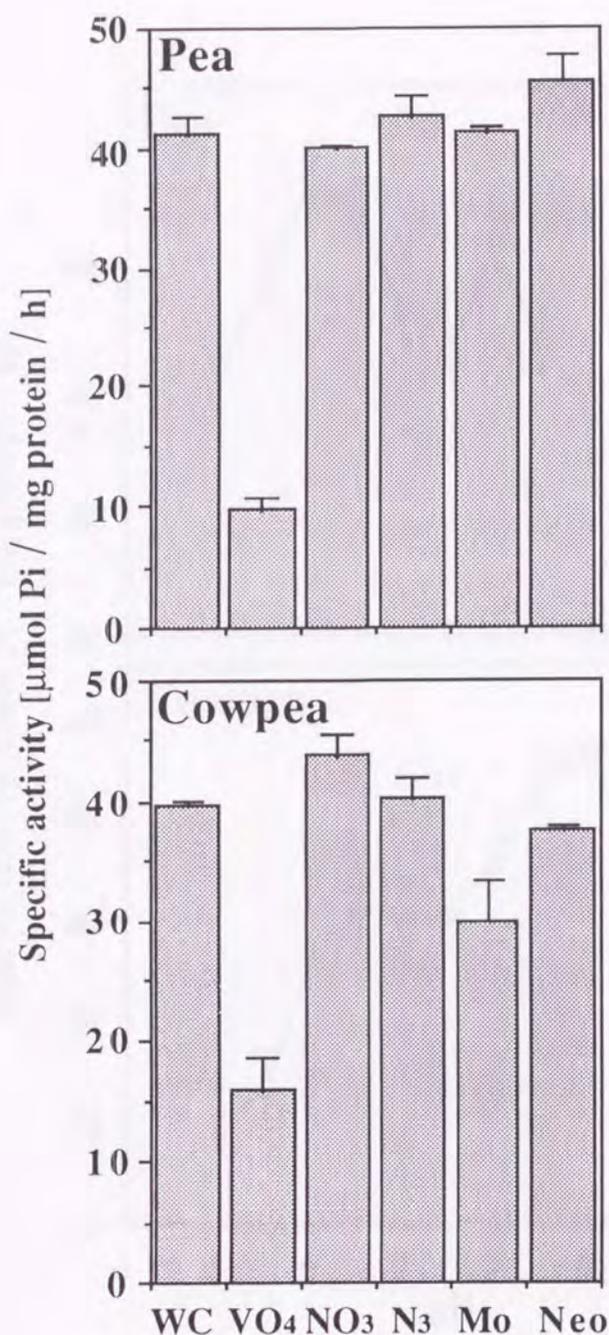


Fig. 2-2. Effects of several inhibitors on ATPase activities in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay for ATPase activity was carried out at 25°C for 20 min with 3 mM Mg-ATP in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) in the absence (water control; WC) or presence of 1 mM Na₃VO₄ (VO₄), 50 mM NaNO₃ (NO₃), 1 mM NaN₃ (N₃), 1 mM Na₂MoO₄ (Mo) or 1 mM neomycin(Neo). Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

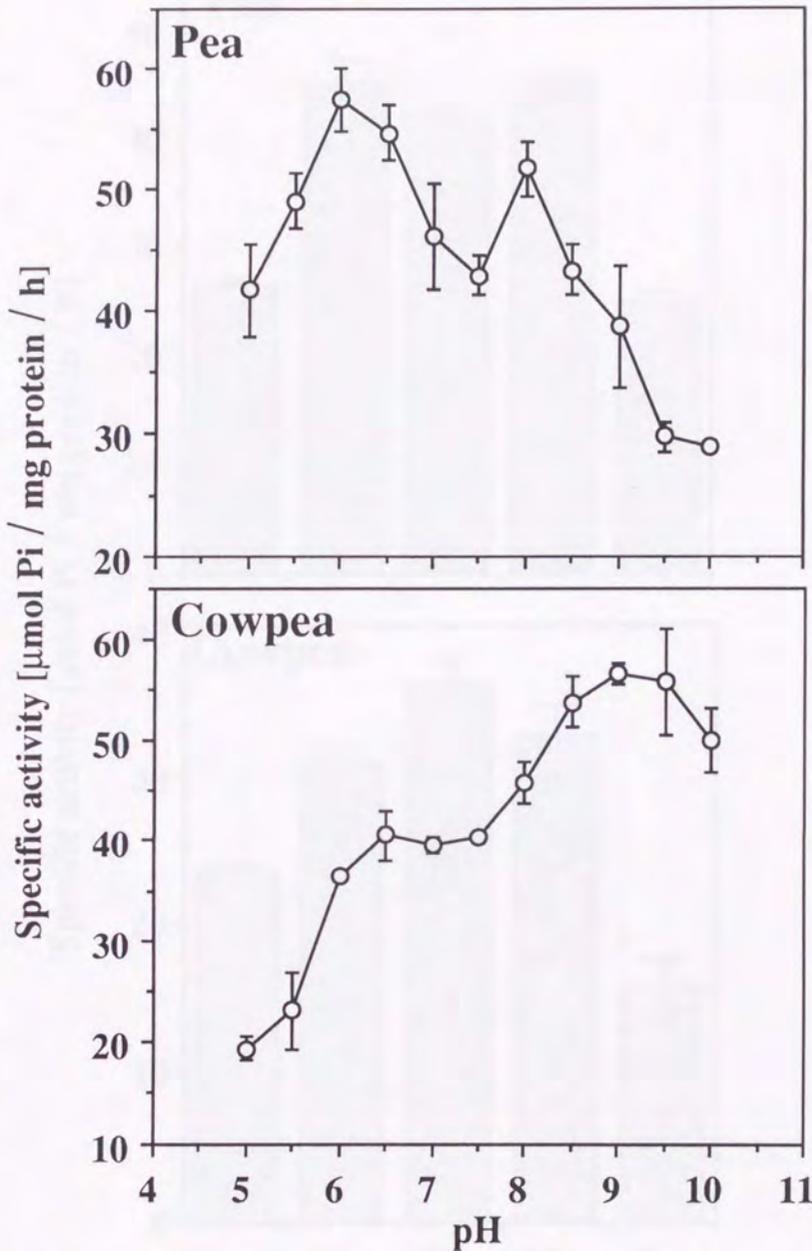


Fig. 2-3. Effects of pH on the ATPase activity in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay for ATPase activity was carried out at 25°C for 20 min with 3 mM Mg-ATP in 30 mM Tris-MES (pH 5.0-10.0) by the method described in the text. The open circles and bars indicate means and SD, respectively, from triplicate experiments.

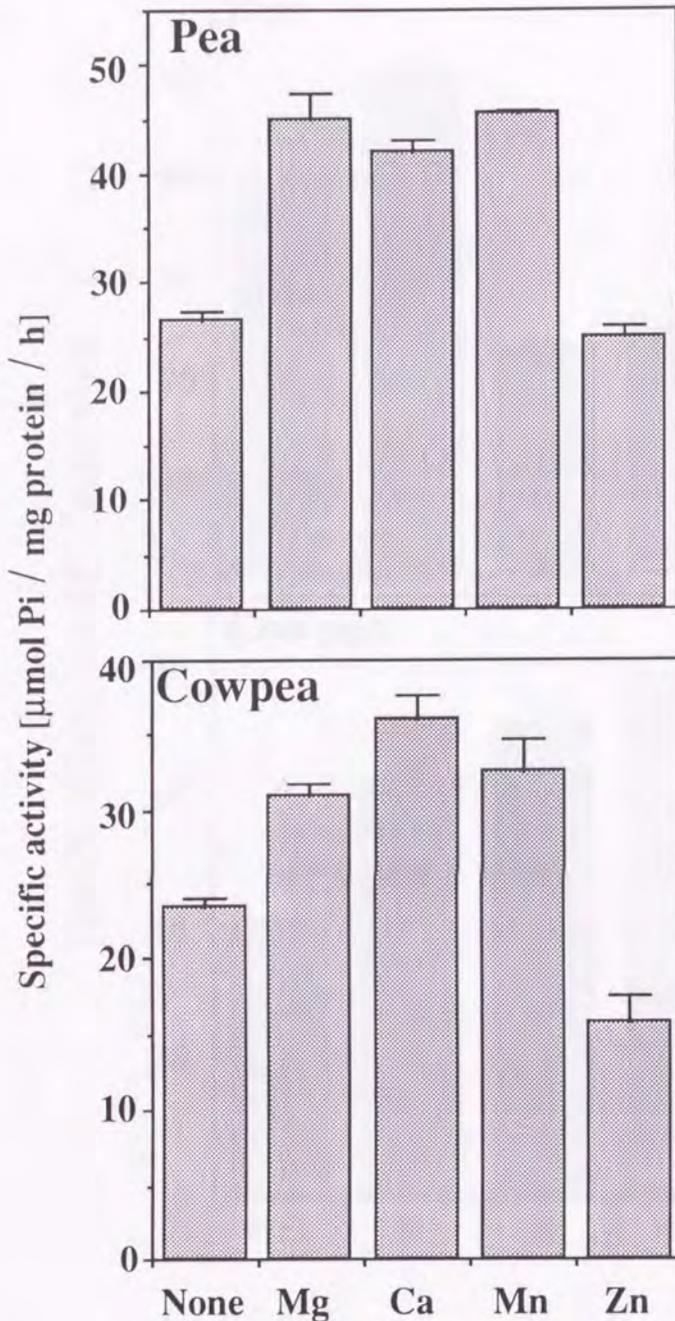


Fig. 2-4. Effects of several divalent cations on ATPase activities in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay for ATPase activity was carried out at 25°C for 20 min with 3 mM ATP in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) in the absence (water control; None) or presence of 3 mM MgSO₄ (Mg), 3 mM CaCl₂ (Ca), 3 mM MnCl₂ (Mn) or 3 mM ZnCl₂ (Zn). Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

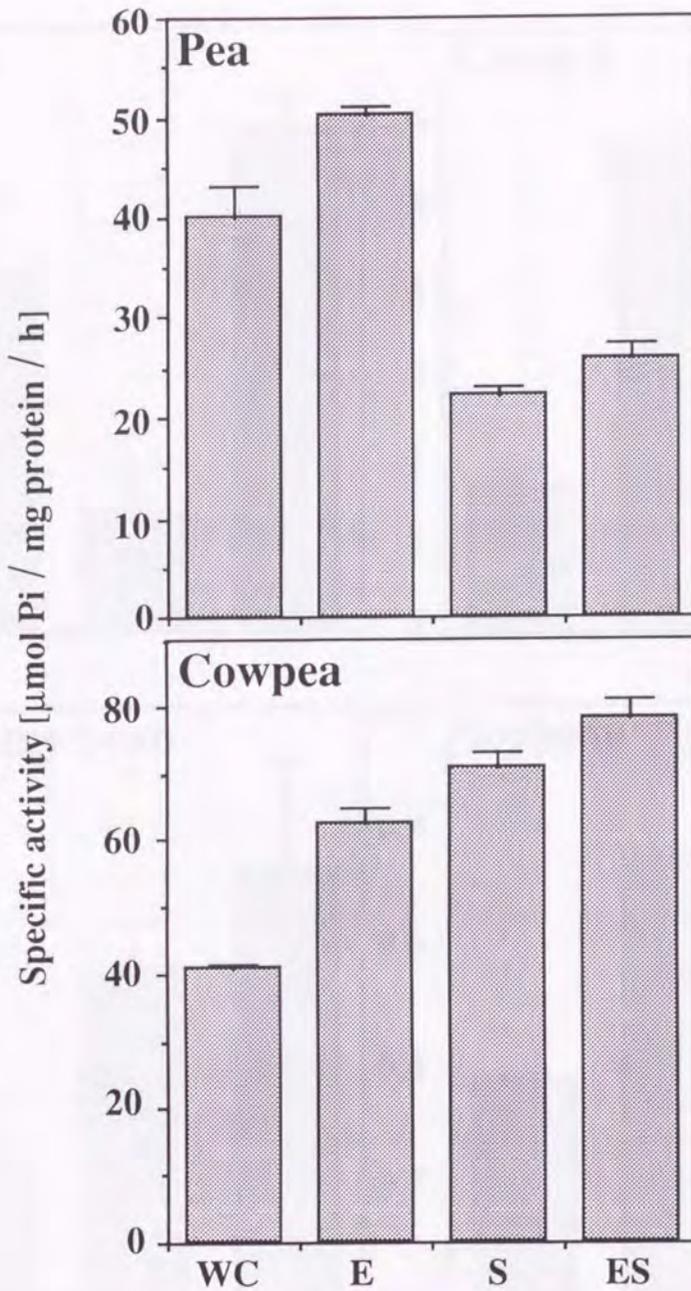


Fig. 2-5. Effects of the suppressor and elicitor from *Mycosphaerella pinodes* on the ATPases activities in the fractions solubilized from the cell walls of pea and cowpea. The assay for ATPase activity was carried out at 25°C for 20 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) that contained 3 mM Mg-ATP in the absence (water control; WC) or presence of 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ elicitor alone (E), 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ suppressor alone (S) or a mixture of the suppressor and elicitor (ES). Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

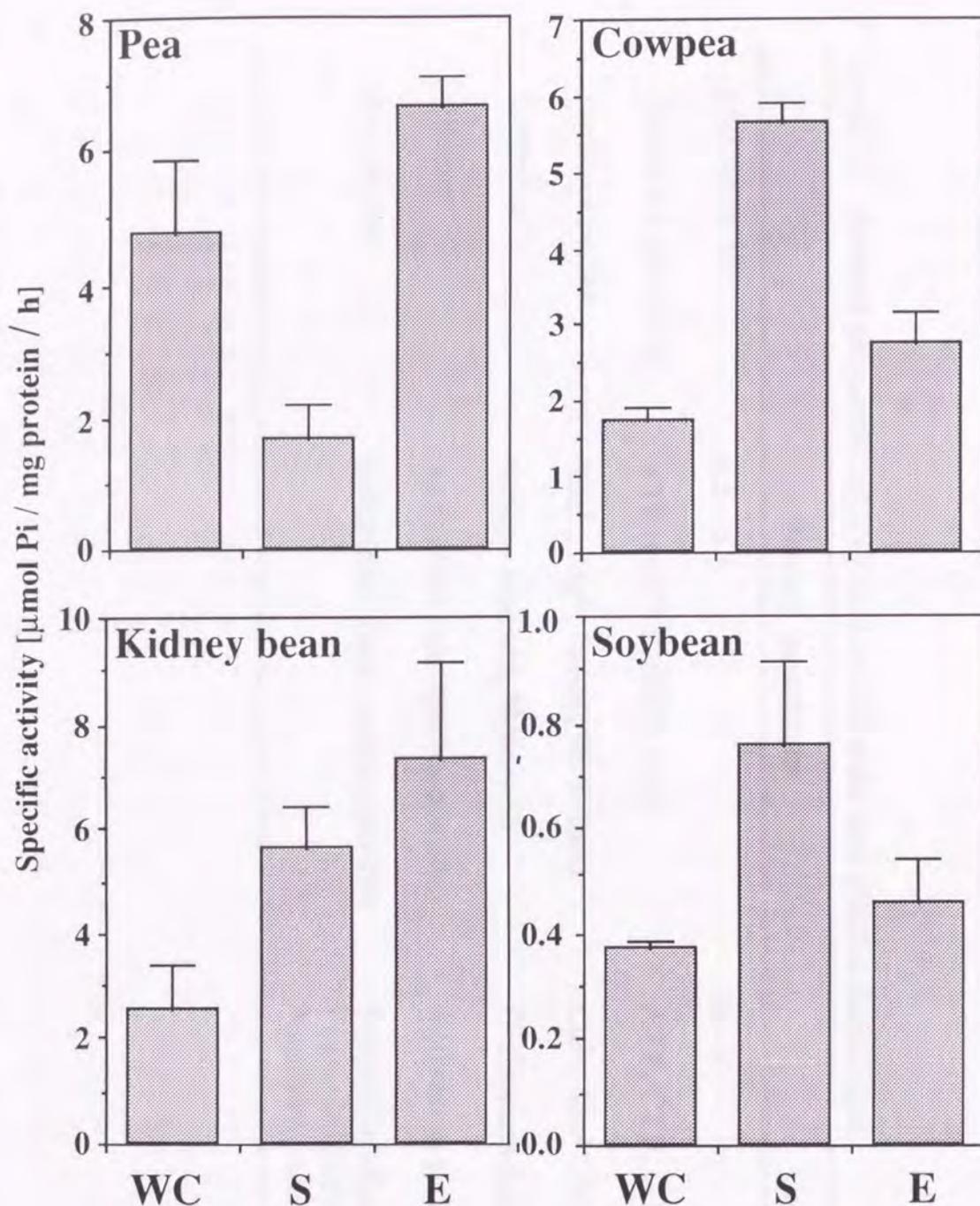


Fig. 2-6. Effects of the suppressor and elicitor from *Mycosphaerella pinodes* on ATPase activities in cell wall fractions from pea, cowpea, kidney bean and soybean. The ATPase assay was carried out at 25°C for 20 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) that contained 3 mM Mg-ATP in the absence (water control; WC) or presence of 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ elicitor alone (E) or 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ suppressor alone (S). The protein content of cell wall fractions from pea, cowpea, kidney bean and soybean were 4.0, 14.6, 15.0 and 12.3 $\mu\text{g (g dry wt)}^{-1}$, respectively. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

Table 2-1 Several properties of ATPases in cell walls and plasma membrane

	Plasma membrane	Cell wall
Optimum pH	6.5 - 6.7	5 - 9
Substrate specificity	ATP >> CTP, GTP, UTP	ATP, CTP, GTP, UTP, PPI, pNPP
Divalent cation	Mn ²⁺ , Mg ²⁺ (none; 90 % loss)	Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ (none; 20-40 % loss)
Inhibitor	Orthovanadate, Neomycin	Orthovanadate
Elicitor	Activation (not species-specific)	Activation (not species-specific)
Suppressor	Inhibition (not species-specific)	Inhibition (Species-specific) Pea; inhibition Non-host; activation

第3章 細胞壁 ATPase の精製

第2章において、エンドウ褐紋病菌エリシターは細胞壁 ATPase を非特異的に活性化し、本菌由来のサプレッサーは細胞壁 ATPase に対して種特異的に作用することを明らかにした。本結果は細胞壁 ATPase は病原菌認識、宿主特異性決定に深く関与すること、さらにはエリシター、サプレッサーの受容体が本 ATPase の近傍に存在するか、あるいは ATPase 自身がこれら菌シグナルの受容体である可能性を示唆する。このことは病原菌シグナルに対する応答性を持つ細胞壁 ATPase を精製することによって、菌シグナルの受容体や病原菌認識後の防御応答発現に関わるエフェクター分子が複合体、即ち装置として単離、精製できるものと考えられる。このような観点から本章では細胞壁 ATPase の精製を試みた。

第1節 精製

細胞壁 ATPase の精製は、播種後2週間目のエンドウ、ササゲの黄化胚軸より調製した細胞壁画分より 0.5 M NaCl を用いて可溶化した画分を用いて行った（第1章、第3節）。

第1項 硫酸塩析

細胞壁可溶化画分の濃縮、および精製の第一段階として、硫酸塩析を行った。終濃度 0.5 M NaCl を用いて可溶化した細胞壁可溶化画分に、60 % 飽和になるように固形の硫酸を添加し、緩やかに攪拌して硫酸を溶解し、4°Cで1時間静置した。10,000×g で遠心分離し、得られた上清にさらに 80 % 飽和になるように硫酸を添加し、緩やかに攪拌し、溶解を確認して4°Cで1時間静置した。その後、10,000×g で遠心分離し、沈殿部を 30 mM Tris-HCl (pH 7.6) に懸濁し、限外ろ過フィルター (Millipore モルカットL, UFP, LGC) を用いて脱塩後、遠心限外ろ過チューブ (Funakoshi; Centricell 20) で濃縮し、硫酸 60 - 80 % 飽和画分を得た。

第2項 ATP アガロースアフィニティーカラム

Serrano et al. (1989) の報告によると、原形質膜 ATPase (H^+ -ATPase) は分子中に ATP 結合ドメイン、フォスファターゼドメイン、キナーゼドメイン、およびトランスダクションドメインの4つの部位から構成されている。細胞壁 ATPase の詳細は不明であるが、少なくとも ATP 結合ドメインとフォスファターゼドメインは存在するものと推察される。そこで、ATP アガロースアフィニティーカラムの有効性を調べた。オープンカラムに予め充填した約 10 ml の ATP アガロースカラム樹脂を、カラム樹脂の約 10 倍量の 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) で十分洗浄、平衡化し、硫酸 60 - 80 % 飽和画分を供した。約 5 - 10 倍量の 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) で非吸着タンパク質を洗浄後、0.5 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) で ATP 結合タンパク質を溶出した (Fig. 3-1)。得られたタ

ンパク質は遠心限外ろ過チューブ (Funakoshi; Cenrticel 20) で脱塩および濃縮し、ATP 結合タンパク質とした。

ATP アガロースアフィニティーカラム分画条件

カラム : ATP アガロースカラム (Sigma)
ポンプ : Pharmacia LKB Gradient pump 2249
溶媒 A : 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)
溶媒 B : 1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)
流速 : 1.0 ml / min
検出波長 : UV 280 nm

第3項 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

100 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した Mono Q カラムに ATP 結合タンパク質を供し、約 5 - 10 倍量の 100 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で非吸着タンパク質を洗浄後、NaCl 100 mM - 250 mM、40 min のリニアグラディエントでサンプルの溶出を行い、1分おきに分取した (Fig. 3-2)。

陰イオン交換カラム Mono Q 分画条件

カラム : Mono Q HR 5/5 (Pharmacia)
ポンプ : Pharmacia LKB Gradient pump 2249
溶媒 A : 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
溶媒 B : 1 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
流速 : 1.0 ml / min
検出波長 : UV 280 nm
溶出 : NaCl 100 mM - 250 mM 間の 40 分間のリニアグラディエント

第4項 結果

硫酸 60 - 80 % 飽和画分を ATP アガロースカラムに供し、十分非吸着画分を 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) で洗浄後、0.5 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) で溶出したところ、約 30 分後に顕著なピークが認められた (Fig. 3-1)。この画分を回収し、ATP 結合タンパク質とした。ATP 結合タンパク質をさらに陰イオン交換カラムである Mono Q に供した。100 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で非吸着画分を洗浄後、NaCl 100mM ~ 250 mM の間で 40 分間リニアグラディエントでタンパク質の溶出を行ったところ、OD 280 nm における吸収から 38 - 39 分付近、および 42 - 43 分付近に 2 つのピークが認められた (Fig. 3-2)。Mono Q で得られた画分の ATPase 活性を測定したところ、

OD 280 nm の吸収が認められた 2 つのピークに対応する部分に ATPase 活性が認められた。従って、38 - 39 分付近に溶出される画分を F1、42 - 43 分付近に溶出される画分を F2 として以下の実験に供した。なお、各精製段階におけるタンパク質の回収率および ATPase 活性の比活性については Table 3-1 にまとめたが、最終的に分画前のタンパク質の F1 で約 1 %、F2 で約 2 % のタンパク質が回収でき、比活性は F1、F2 でそれぞれ約 477、533 倍に上昇した。

第 2 節 部分精製細胞壁 ATPase の諸性質

第 1 項 褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響

(1) 方法

第 2 節に述べた方法で得た、部分精製細胞壁 ATPase が菌シグナルに対して応答性を持つか否かについて調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM ATP	2.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
30 mM MgSO ₄	2.5	ddH ₂ O	3 mM
1000 μ g/ml Elicitor	2.5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
1000 μ g/ml Suppressor	2.5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
Partially purified cell wall fraction (2 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	10 ng
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	12.5	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

(2) 結果

Mono Q で得られた 2 つの画分はいずれも 100 ppm のエリシター処理で ATPase 活性が上昇した。また、100 ppm サプレッサー処理では有意に活性が阻害された (Fig. 3-3)。即ち、本精製方法で得られた部分精製細胞壁 ATPase は菌シグナルに感応性を持つことが明らかとなった。以上の結果は、細胞壁 ATPase と両病原菌シグナルの受容体が非常に密接な関係にあることを示しており、本画分中にはエリシター、およびサプレッサーの受容体が含まれているものと考えられる。

第 3 節 部分精製細胞壁 ATPase の構造解析

第 1 項 Native-PAGE 解析および活性染色

本精製方法で得られた部分精製細胞壁 ATPase の精製度について Native-PAGE 解析を行った。また、得られたタンパク質バンドの ATPase およびパーオキシダーゼ活性を調べた。

(1) 電気泳動

市販のポリアクリルアミドグラディエントゲル (5 - 20 % ; ATTO NPG-520) を泳動

バッファー中で 10 mA で 30 分間予備泳動後、Native PAGE 用サンプルバッファーに懸濁した部分精製細胞壁 ATPase を添加した。10 mA で 15 分程度泳動し、サンプルがゲルに入ったことを確認し、30 mA に電流を上昇させ、定電流で約 90 分間泳動した。サンプルバッファーに含まれている色素（プロモフェノールブルー）がゲルの先端に達したことを確認し、泳動を終了させた。電気泳動終了後、タンパク質染色用、および活性染色用のゲルにカッターナイフで切りわけ、タンパク質染色用ゲルは固定液に、活性染色用ゲルは 30 mM Tris-MES (pH 6.5) に浸漬した。

電気泳動条件

泳動バッファー	: 25 mM Tris - 192 mM Glycine (pH 8.3)
サンプルバッファー	: 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.5), 15 % (v/v) Glycerol (Nakarai), 0.001 % (w/v) BPB (Sigma)
ポリアクリルアミドゲル	: 5 - 20 % グラディエントゲル (ATTO NPG-520)
分子量マーカー	: タンパク質分子量マーカー「第一」・I
固定液	: 20 % (v/v) MtOH (Wako), 40 % (v/v) AcOH (Wako), 40 % H ₂ O

(2) 銀染色

タンパク質染色用のゲルを固定液に 30 分以上浸漬し、十分タンパク質をゲル内に固定した後、市販の銀染色試薬（銀染色・第一；第一化薬）を用いてタンパク質を染色した。なお、分子量の測定については Chrambach (1980) の方法に準じて行った。

(3) ATPase 活性染色

ATPase 活性染色は Tuan and Knowles (1984) の方法を一部改変して行った。30 mM Tris-MES (pH 6.5) に浸漬し、バッファーの平衡化を行った後、ATPase 活性染色用反応液に浸漬し、25℃で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、脱イオン水でゲル表面に付着した鉛イオンを十分洗浄後、0.25 % (w/v) Na₂S で発色させた。ATPase 活性を示すバンドは茶色のバンドとして検出される。本法の原理は ATPase によって ATP が分解された結果生じる無機リン酸を反応系に加えておいた鉛イオンと反応させ、ゲル内にリン酸鉛を沈着させる。ゲル内に沈着したリン酸鉛にさらに硫黄イオンを反応させることによって最終的に硫化鉛に変換し、茶色のバンドとして検出するものである。

	Vol. (ml)	Solvent	Final conc.
300 mM ATP	0.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
1 M MgSO ₄	0.5	ddH ₂ O	10 mM
0.12 % (v/v) Pb(CH ₃ COO) ₂ (Wako)	0.5	ddH ₂ O	0.0012 %
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3.5	ddH ₂ O	—
Total	5.0	—	—

(4) パーオキシダーゼ活性染色

パーオキシダーゼ活性染色は Jimenez et al. (1995) の方法を一部改変して行った。30 mM Tris-MES (pH 6.5) に浸漬し、バッファの平衡化を行った後、パーオキシダーゼ活性染色用反応液に浸漬し、25 °C で 1 時間インキュベートした。パーオキシダーゼ活性を示すバンドはオレンジ色あるいは茶色のバンドとして検出される。

	Vol. (ml)	Solvent	Final conc.
2.5 % (v/v) <i>O</i> -dianisidine (Sigma)	0.5	100 % EtOH	0.25 %
10 mM H ₂ O ₂ (Wako)	0.5	ddH ₂ O	1 mM
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	4.0	ddH ₂ O	—
Total	5.0	—	—

(5) 結果

Native-PAGE 後、銀染色を行ったところ、Mono Q で得られた 2 つの画分 (F1、F2) とも推定分子量 91.7 kDa の最もメジャーなバンドが検出され、それ以外にも F1 では 116.3、65.8 kDa に F2 では 116.3、79.5、72.3、65.8 kDa にバンドが認められた。また、ATPase、パーオキシダーゼ活性染色をしたところ、銀染色同様に推定分子量 91.7 kDa に最も強い ATPase 活性を示すバンドが認められ、それ以外にも F1 では 116.3、65.8 kDa、F2 では 116.3、79.5、72.3 kDa にバンドが認められた。一方、パーオキシダーゼ活性染色では ATPase 同様に推定分子量 91.7 kDa に最も強い活性を示すバンドが認められ、それ以外にも F1 では 116.3、65.8 kDa、F2 では 116.3、79.5、72.3 kDa にバンドが認められた (Fig. 3-4)。以上の結果から、部分精製細胞壁画分にはメジャーなバンド 1 つとマイナーなバンドが複数含まれており、完全に精製するには至らなかった。しかしながら、興味深いことに活性染色の結果、ATPase とパーオキシダーゼが同一の移動度のバンドとして検出された。このことから細胞壁中で ATPase とパーオキシダーゼが複合体で存在している可能性が考えられた。また、Mono Q で得られた 2 つの画分とも Native-PAGE の結果、同一の移動度にメジャーなバンド (91.7 kDa) が認められた点については ATPase のアイソザイムであるか、あるいは複合体を形成しているタンパク質の分子種が異なる可能性等が考えられる。

第2項 免疫沈降

細胞壁可溶化画分を硫酸塩析、ATP-アガロースカラム、陰イオン交換カラム Mono Q を用いて部分精製 ATPase 中には ATPase 活性、およびパーオキシダーゼ活性が存在し、活性染色の結果、ATPase とパーオキシダーゼが同一の移動度のバンドとして検出された。この結果から、細胞壁中で ATPase とパーオキシダーゼが複合体で存在している可能性が考えられた。そこで本項では ATPase とパーオキシダーゼが複合体として存在する可能性を明らかにするため、抗-西洋ワサビのパーオキシダーゼ抗体を用いて免疫沈降を行い、ATPase が共沈してくるか否かを調べた。

(1) 方法

免疫沈降は Suzuki and Shinshi (1995) の方法に準じて行った。エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分に抗-西洋ワサビのパーオキシダーゼ抗体を加え、緩やかに攪拌しながら 4℃で 6 時間インキュベートし、その後、プロテイン A を結合させたセファロースカラム樹脂を添加し、緩やかに攪拌しながら 4℃で 12 時間インキュベートした。その後、カラム樹脂を沈降させ上清を除去し、10 倍量の免疫沈降バッファーで 5 回洗浄した。さらに 10 倍量の 30 mM Tris-MES (pH 6.5) でバッファーの平衡化を行い、最終的にカラム樹脂と等量の 30 mM Tris-MES (pH 6.5) を加え、ATPase 活性測定に供した。なお、対照区として抗-西洋ワサビのパーオキシダーゼ抗体を加えない区を設け、カラム樹脂に非特異的に吸着する ATPase 活性を測定した。

使用抗体およびバッファー

Anti-peroxidase : HRP ポリクローナル抗体 (Rabbit; Sigma)

免疫沈降バッファー : 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100 (Wako), 0.5 % (v/v) Nonidet P-40 (Nakarai), 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)

カラム樹脂 : プロテイン A セファロース (Bio Rad)

(2) 結果

対照実験として行った抗体を添加しない区ではエンドウ、ササゲとも ATPase 活性は全く認められなかった。一方、抗体を添加した区では、活性の強さはエンドウ、ササゲで異なるものの ATPase 活性が認められ、処理した抗体の濃度に依存して ATPase 活性も上昇した (Fig. 3-5)。以上の結果は、細胞壁 ATPase とパーオキシダーゼが細胞壁可溶化画分中 (細胞壁中) で複合体として存在していることを示しているものと考えられる。

第3項 SDS-PAGE 解析およびウエスタンブロットリング解析

本精製方法で得られた部分精製細胞壁 ATPase について SDS-PAGE 解析を行った。また、第2項の実験で活性が認められた ATPase、パーオキシダーゼについてウエスタンブロットリングを行い、タンパク質の同定を試みた。

(1) 電気泳動

市販のポリアクリルアミドグラデIENTゲル (5 - 20 % ; ATTO NPG-520) を SDS-PAGE 用泳動バッファー中で 10 mA で 30 分間予備泳動した。SDS-PAGE 用サンプルバッファーに部分精製細胞壁 ATPase を懸濁し、3 分間煮沸し、タンパク質を変性させた後、電気泳動に供した。10 mA で 15 分程度泳動し、サンプルがゲルに入ったことを確認し、30 mA に電流を上昇させ、約 90 分間泳動した。サンプルバッファーに含まれている色素 (プロモフェノールブルー) がゲルの先端に達したときに泳動を終了させた。電気泳動終了後、タンパク質染色用、およびウエスタンブロットリング用のゲルにカッターナイフで切りわけ、タンパク質染色用ゲルは固定液に、ウエスタンブロットリングゲルは転写バッファーに浸漬し、タンパク質の固定、およびバッファーの平衡化を行った。

電気泳動条件

泳動バッファー	: 25 mM Tris - 192 mM Glycine (pH 8.3), 0.1 % SDS
サンプルバッファー	: 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.5), 15 % (v/v)Glycorol, 0.001 % (w/v) BPB, 0.1 % (w/v) SDS (Wako), 1 % (v/v) 2-mercaptoethanol (Wako)
ポリアクリルアミドゲル	: 5 - 20 % グラデIENTゲル (ATTO NPG-520)
分子量マーカー	: Reinbow coloured protein molecular weight marker (Amersham)
固定液	: 20 % (v/v) MtOH, 40 % (v/v) AcOH, 40 % H ₂ O

(2) 銀染色

タンパク質染色用ゲルを固定液に 30 分以上浸漬し、十分タンパク質をゲル内に固定した後、市販の銀染色試薬 (銀染色・第一 ; 第一化薬) を用いてタンパク質を染色した。

(3) エレクトロブロットリング

ゲルを転写バッファーに浸漬し、バッファーの平衡化を行った。その後、予め 100 % メタノールに浸漬した PVDF 膜上にゲルを置き、上下に 6 枚ずつの転写バッファーに浸したろ紙で挟み、転写装置にセットした。その後、室温で 170 mA、90 分間のエレクトロブロットリングを行った。

転写条件

転写装置	: ATTO セミドライ転写装置
転写用電源	: ATTO CROSS POWER
転写膜	: PVDF 膜 (Bio-Rad)
ろ紙	: Whatman 3MM
転写バッファー	: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10 % (v/v) methanol, 0.1 % (w/v) SDS (pH 8.3)
電流	: 170 mA
転写時間	: 90 分

(4) PVDF 膜上での ATPase、パーオキシダーゼの検出

転写終了後、PVDF 膜を TBS に 10 分間浸漬後、ブロッキング溶液で 1 時間振とうした。その後、1 % ゼラチンを含む TTBS に希釈した 1 次抗体である ATPase 抗体 (×3,000)、HRP 抗体 (×100) で 2 時間振とうした。1 次抗体の処理後、PVDF 膜を TTBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄後、TTBS に希釈したアルカリフォスファターゼ標識した 2 次抗体 (Protein G - AP ; UBI) 溶液で 1 時間振とうした。1 次抗体の処理後、PVDF 膜を TTBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄後、アルカリフォスファターゼ発色基質を含む TBS 中でインキュベートし発色させた。

バッファーおよび抗体等

TBS	: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl
TTBS	: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.05 % Tween 20
ブロッキング溶液	: TTBS, 3 % ゼラチン (Bio Rad)
Anti-ATPase	: リョク豆 ATPase のポリクローナル抗体 (Rabbit; Kimura et al. 1988)
Anti-Peroxidase	: 西洋ワサビ Peroxidase のポリクローナル抗体 (Rabbit; Sigma)
2 次抗体	: アルカリフォスファターゼ標識 Anti-rabbit IgG (UBI)
AP 基質	: 4-nitroblue tetrazolium chloride (Wako) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Wako)

(5) ATP 結合タンパク質の検出

細胞壁 ATPase の同定を目的とし 5-*p*-fluorosulfonylbenzoyl adenosine (FSBA; ATP-Binding Protein Detection Kit ; BOEHRINGER MANNHEIM) を用いて ATP 結合タンパク

質の検出を試みた。本方法の基本的な原理は ATP のアナログである FSBA を ATP 結合タンパク質に結合させ、そのタンパク質を SDS-PAGE、PVDF 膜にエレクトロブロットティング後、Anti-FSBA 抗体を用いて検出するものである。

部分精製細胞壁 ATPase に 1 mM FSBA を加え、30°C で 20 分間インキュベートし、ATP 結合タンパク質を FSBA でラベルした。ラベル化した部分精製細胞壁 ATPase に SDS PAGE 用サンプルバッファーを添加し、3 分間煮沸後、SDS PAGE に供した。SDS PAGE 後、PVDF 膜にエレクトロブロットティングした後、ウエスタンブロットティングの方法に準じて Anti-FSBA 抗体 (×3,000) を用いて検出した。

試薬および抗体

5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl adenosine (FSBA ; BOEHRINGER MANNHEIM)

Anti-FSBA 抗体 (Rabbit ; BOEHRINGER MANNHEIM)

アルカリフォスファターゼ標識 Anti-rabbit IgG 抗体 (UBI)

(6) 結果

SDS-PAGE 後銀染色した結果、Mono Q で得られた 2 つの画分 (F1、F2) とともに 89.7、76.1、61.2、54.9、51.9、46.6、41.8、31.8、26.9、20.5 kDa に少なくとも 10 本のバンドが確認できた (Fig. 3-6, 7, 8)。その中で最もメジャーなバンドの推定分子量は 61.2 kDa であった。抗-西洋ワサビのパーオキシダーゼ抗体を用いたウエスタンブロットティングでは最もメジャーな 61.2 kDa に相当するバンドに強いシグナルが認められ、それ以外にも 46.6、31.8、26.9 kDa にマイナーなバンドが検出できた (Fig. 3-5)。以上の結果から部分精製細胞壁 ATPase 中には複数のパーオキシダーゼ分子を含んでいることが明らかとなった。また、タンパク質量の関係から部分精製画分中のパーオキシダーゼ活性は主に、61.2 kDa のタンパク質によって担われているものと推察される。次に抗-緑豆の ATPase 抗体を用いて ATPase 分子の特定を試みたところ、推定分子量 54.9 kDa に単一のバンドとして検出された (Fig. 3-7)。また、同様に ATPase 分子の同定を目的とし、FSBA、および抗-FSBA 抗体を用いて ATP 結合タンパク質の検出を行った結果、ATPase 抗体同様に推定分子量 54.9 kDa に単一のバンドとして検出された (Fig. 3-8)。このように ATPase 抗体と相互作用するタンパク質と ATP 結合タンパク質が同様の移動度のバンドとして検出されたことから細胞壁 ATPase の本体は 54.9 kDa のタンパク質であろうと考えられる。

第5節 まとめ

細胞壁可溶化画分を硫酸塩析、ATP-アガロースカラム、陰イオン交換カラム Mono Q を用いて部分精製 ATPase を 2 画分得た (Fig. 3-1, 2)。これら 2 画分に対するエンドウ褐紋病菌 由来のエリシター、サプレッサーの影響について調べたところ、エリシタ

ーによって活性化され、サプレッサーによって有意に阻害された。この結果から本部分精製画分は菌シグナルに対する応答性を持つこと、つまり、エリシター、サプレッサー、の受容体を含む画分である可能性が示唆された (Fig. 3-3)。部分精製 ATPase を 2 画分について Native-PAGE を行い、精製度について調べたところ複数のバンドが銀染色によって検出され、完全に単一のバンドにまで精製されていなかった (Fig. 3-4)。しかしながら、活性染色の結果、ATPase とパーオキシダーゼが同一の移動度のバンドとして検出され (Fig. 3-4)、さらに、抗-西洋ワサビのパーオキシダーゼ抗体を用いた免疫沈降の実験から ATPase が共沈してくることが明らかとなった (Fig. 3-5)。以上の結果から、細胞壁中で、ATPase とパーオキシダーゼが複合体として存在し、相互に活性の制御がなされている可能性が考えられる。また、ウエスタンブロッティングの結果、活性が認められたパーオキシダーゼは複数の分子種の存在が認められ、その中で最もメジャーなものの推定分子量は 61.2 kDa であった (Fig. 3-6)。一方、ATPase に関しては抗-緑豆 ATPase を用いたウエスタンブロッティング、および FSBA-抗 FSBA 抗体を用いた ATP 結合タンパク質の実験から 54.9 kDa のタンパク質が単一のバンドとして認められた (Fig. 3-7, 8)。今後、これらのタンパク質、特に ATPase については構造解析を行い、どのようなタンパク質であるか、相同性を持つタンパク質の検索を行うこと、あるいはエリシター、サプレッサーの結合タンパク質 (受容体) の同定等の実験を行う必要がある。

エリシターの細胞壁中の受容体による認識後、どのような抵抗反応が誘導されるのか、あるいは抵抗反応誘導するためのどのようなシグナルが生成されるのかについては、まったくブラックボックスの中にあった。本実験の結果から、細胞壁 ATPase はパーオキシダーゼと複合体を形成しており、相互に活性の制御がなされている可能性が伺えた。細胞壁に極在するパーオキシダーゼはリグニン化 (Vance et al. 1980)、ヒドロプロリン、プロリンに富む糖タンパク質の細胞壁繊維への架橋反応等を触媒し (Apostol et al. 1989, Bradley et al. 1992, Brisson et al. 1994)、病原菌に対する物理的な障壁を形成する過程に重要な役割を持つことが数多く報告されている。また、パーオキシダーゼは NAD(P)H、IAA を電子供与体としてスーパーオキシドアニオン、過酸化水素を生成する (Bolwell et al. 1995, Bolwell 1996, Halliwell 1978, Pedreno et al. 1995)。細胞壁 ATPase とパーオキシダーゼが複合体として機能しているならば、パーオキシダーゼが病原菌あるいはそのシグナル認識後のエフェクター分子として機能していることが考えられる。即ち、エリシター等の菌シグナル受容後の抵抗反応、あるいは抵抗反応誘導の第二次シグナルの生成にパーオキシダーゼが関与している可能性が考えられる。

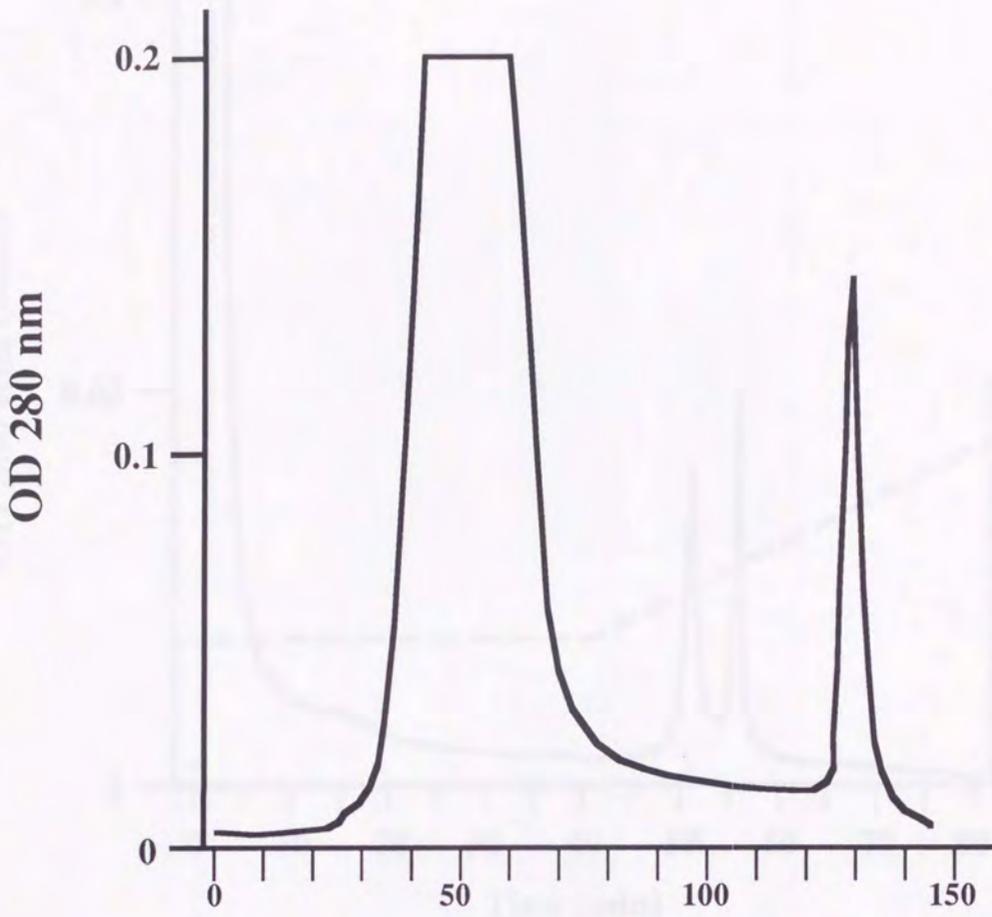


Fig. 3-1 Separation by ATP-agarose column chromatography of the solubilized cell wall protein. The protein precipitated with ammonium sulfate (60-80% saturation) was applied to an ATP-conjugated agarose column. The ATP-binding proteins were eluted with 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) containing 500 mM NaCl.

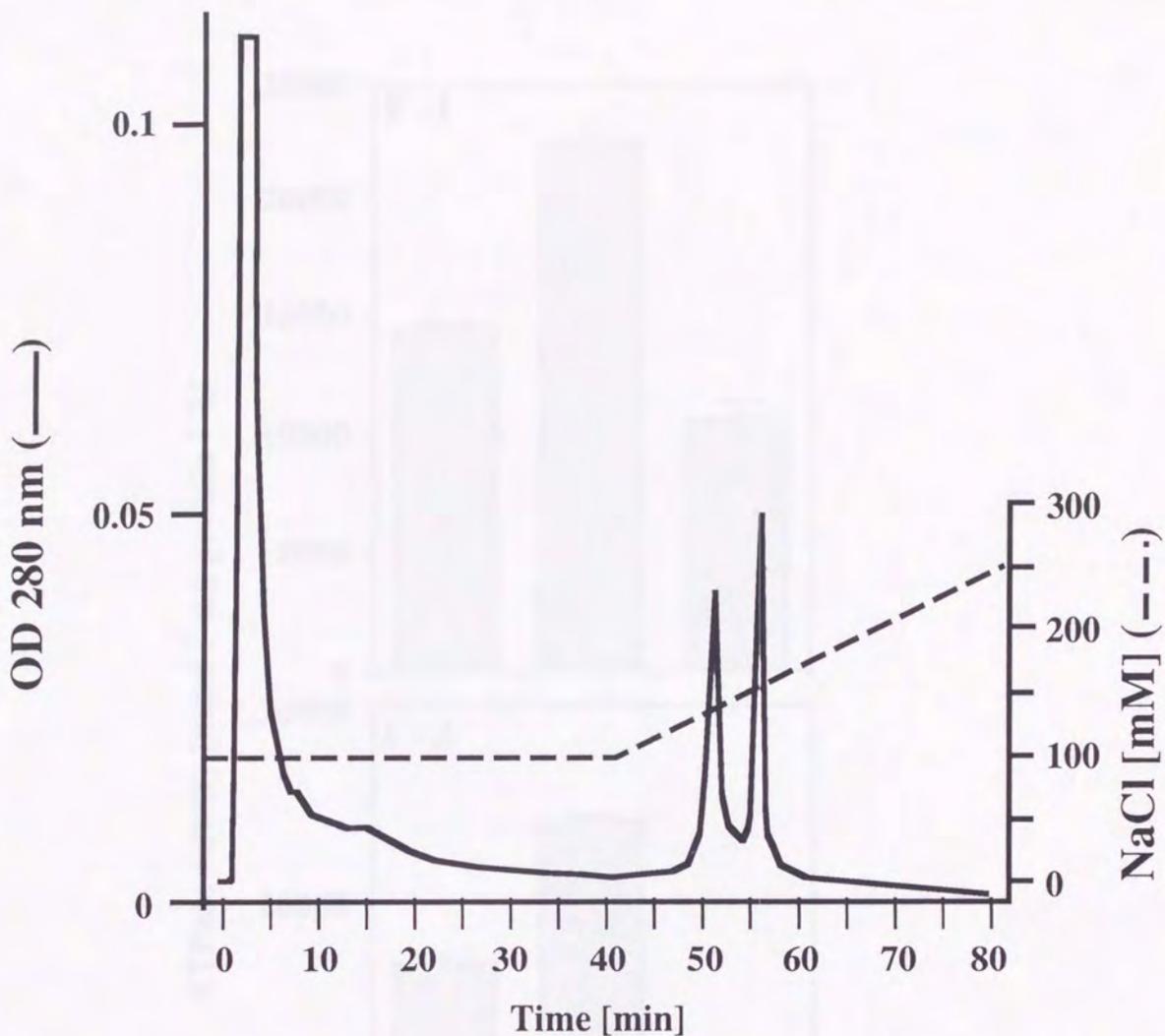


Fig. 3-2 Elution profile of ATP-binding proteins by column chromatography with an anion exchange column (Mono Q HR 5/5). Bound proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 100 mM to 250 mM.

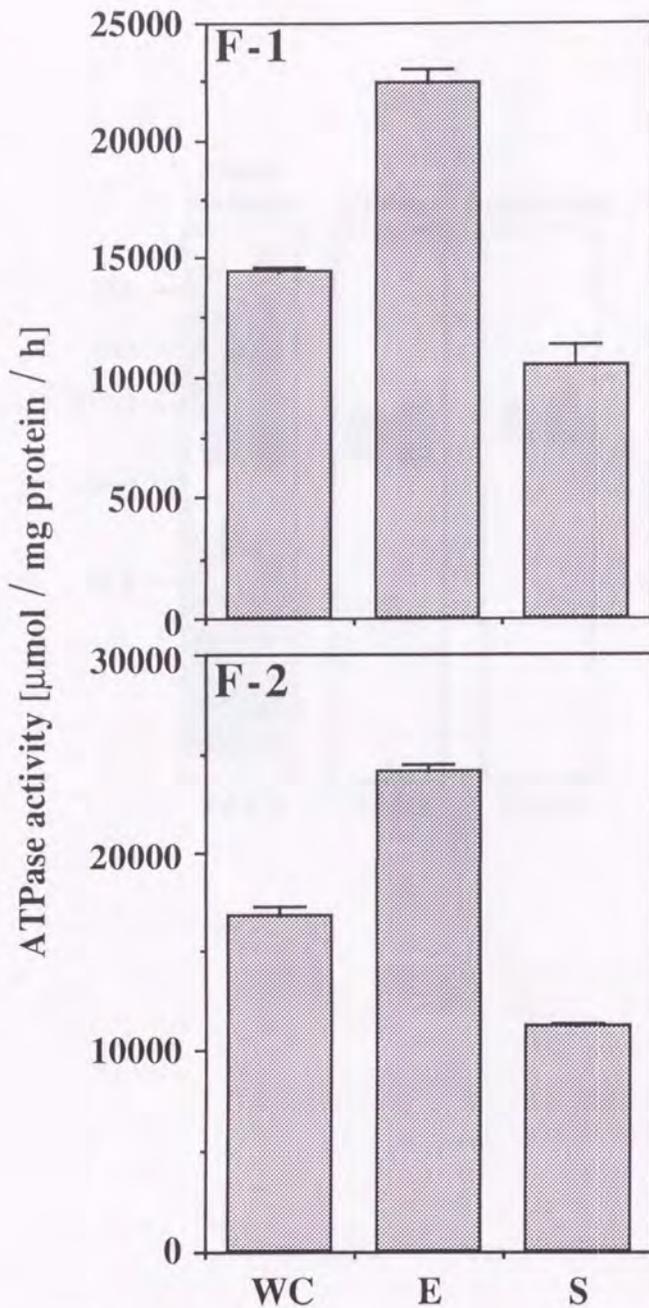


Fig. 3-3. Effects of the elicitor and suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on the activities of pea cell wall-bound ATPases partially-purified by an ion-exchange column chromatography. The assay for ATPase activity was carried out at 25°C for 20 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) that contained 3 mM Mg-ATP in the absence (water control; WC) or presence of 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ elicitor alone (E), 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ suppressor alone (S). Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

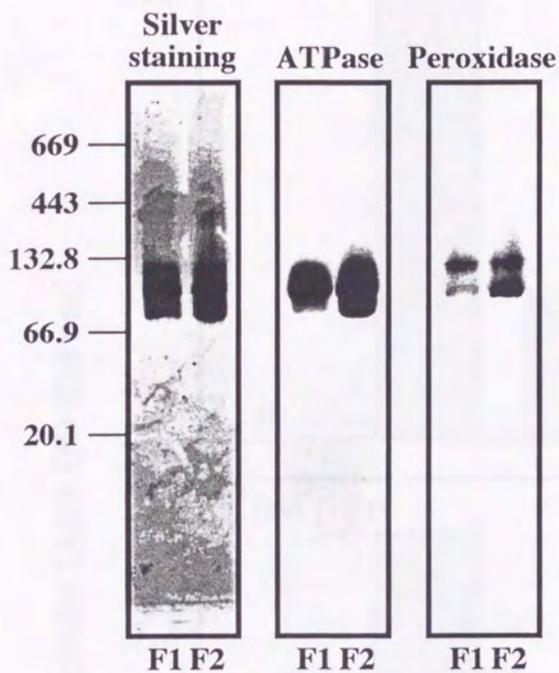


Fig. 3-4. Active-staining of ATPase and peroxidase of partially purified cell wall-bound ATPases Native-PAGE. One microgram of each enzyme fraction (F1 and F2) was separated by Native-PAGE and then was subject to silver-staining or active staining of ATPase and peroxidase.

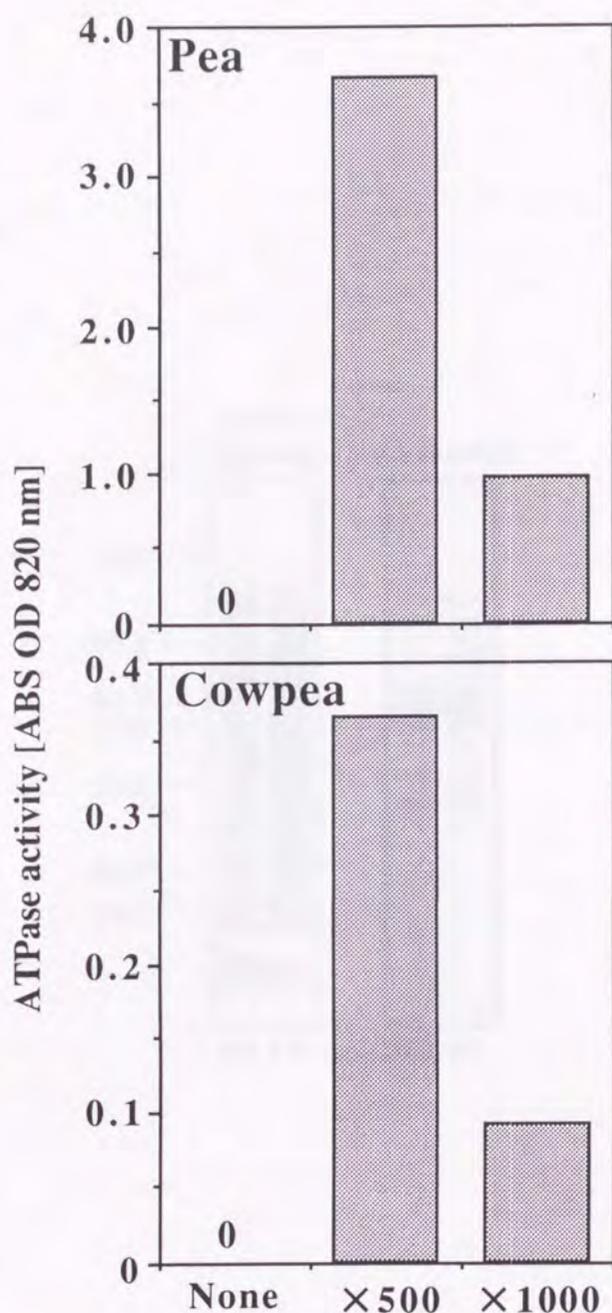


Fig. 3-5 Activity of ATPase in the fractions immuno-precipitated with anti-HRP antibody. Ten micrograms of solubilized cell wall fractions were incubated in the absence (None) or presence of a rabbit antiserum raised against horseradish peroxidase (1/500, $\times 500$, 1/1000, $\times 1000$), and then precipitated with protein A-conjugated agarose beads. The assay for ATPase activity was carried out at 25°C for 20 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) with 3 mM MgSO₄ and 3 mM ATP.

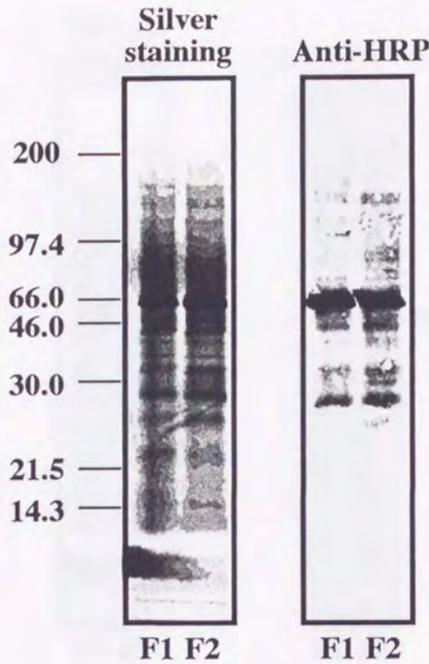


Fig. 3-6 Western blot analysis of peroxidase in partially purified cell wall-bound ATPases. One microgram of each enzyme fraction (F1 and F2) was separated by a SDS-PAGE and then was subject to silver-staining, or electrophoretically transferred to PVDF membranes. The bolts were subjected to an immunoblot analysis with a rabbit antiserum raised against a horseradish peroxidase (Anti-HRP).

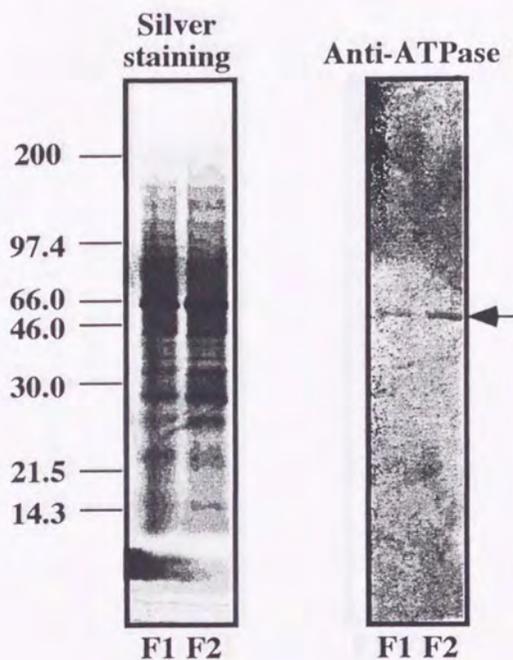


Fig. 3-7 Western blot analysis of peroxidase in partially purified cell wall-bound ATPases. One microgram of each enzyme fraction (F1 and F2) was separated by a SDS-PAGE and then was subject to silver-staining, or electrophoretically transferred to PVDF membranes. The bolts were subjected to an immunoblot analysis with a rabbit antiserum raised against a plasma membrane ATPase from mung bean (Anti-ATPase).

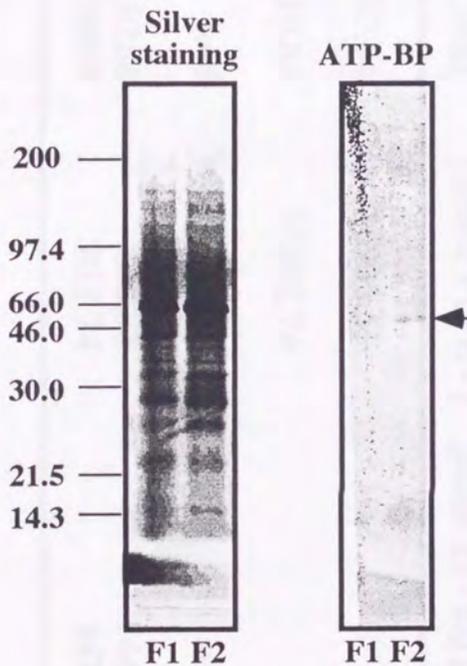


Fig. 3-8 Detection of ATP-binding protein in partially purified cell wall-bound ATPases. One microgram of each enzyme fraction (F1 and F2) was incubated with FSBA and then was separated by a SDS-PAGE. The proteins separated by SDS-PAGE was subject to silver-staining, or electrophoretically transferred to PVDF membranes. The bolts were subjected to an immunoblot analysis with a rabbit antiserum raised against a FSBA (Anti-FSBA).

Table 3-1. Purification of cell wall-bound ATPase from pea seedlings

	Total protein [mg]	Total activity [mmol Pi • h ⁻¹]	Specific activity [μmol Pi • mg protein ⁻¹ • min ⁻¹]	Recovery (%)	Purification [-fold]
NaCl-soluble	557.94	16905.59	30.3	100	1.0
60-80 % (NH ₄) ₂ SO ₄	210.85	12482.74	59.2	73	2.0
ATP-agarose	1.48	1611.50	1088.0	5	36.0
Mono Q F1	0.0258	373.31	14469.4	0.8	477.5
F2	0.0484	811.74	16759.8	1.6	553.1

第4章 植物組織表層におけるスーパーオキシドアニオンの生成

植物の無傷組織に処理されたエンドウ褐紋病菌のエリシターは細胞内、あるいは原形質膜には到達せず、クチクラ、細胞壁上に留まっている。しかしながら、植物は速やかに応答し、感染阻害因子の生成とそれに伴って局部的に抵抗化することが現在までに明らかとなっている。即ち、植物は細胞壁上のエリシターも認識することを示しており、エリシターの認識過程に細胞壁が重要な役割を持つことが推察される。このように植物組織表層における抵抗反応と細胞壁は密接な関係にあると考えられるが、感染阻害因子の生成とそれに伴う局部的な抵抗化以外、植物の表層における防御応答については解析されていない。近年、植物と病原菌の相互作用の過程の極めて初期の段階で活性酸素の生成が誘導されることが数多く報告されている。そこで、植物の表層における防御応答の1つとしてこのようなスーパーオキシドアニオンの生成が起こるか否かについて調べることにした。

第1節 植物組織表層におけるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 生成の測定方法

スーパーオキシドアニオンの定量方法には化学発光法、チトクローム c 還元法、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元法等の方法が一般的に用いられている。今回は比較的簡便で、ジャガイモ塊茎 (Doke 1983a, b) やイネ葉 (Sekizawa et al. 1987) における O_2^- 生成をはじめとする、植物組織における O_2^- の検出や定量に比較的よく用いられている NBT 還元法を用いることとした。本方法の原理は O_2^- によって NBT が還元され生じるブルーホルマザンを OD 560 nm の吸光度を測定することによって定量するものである。

NBT と褐紋病菌由来のエリシター、サプレッサー、各種阻害剤、あるいは菌の孢子懸濁液を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) 50 μ l をワックスを拭きとった播種後2週間目の無傷エンドウ、ササゲ葉に滴下し、一定時間のインキュベート後、処理液を回収し OD 560 nm における吸光度を測定した (Fig. 4-1)。また、ブルーホルマザン生成量の換算は Nathern et al. (1969) の方法に準じて既知の NBT をアスコルビン酸ナトリウムを用いて強制的に還元し、検量直線を作成し求めた。

ブルーホルマザン検量線

$$Y = 0.34379 + 0.055641X$$

Y: ブルーホルマザン (μ g/ml)

X: 吸光度 (OD 560 nm \times 1000)

第2節 植物表層における O_2^- の生成

第1項 エンドウ褐紋病菌エリシターによる O_2^- の生成誘導

エンドウ褐紋病菌由来のエリシターのブルーホルマザン生成に対する影響について経

時的に調べた。

(1) 方法

エリシター、あるいは対照区として脱イオン水を含む NBT 反応液 50 μ l を無傷エンドウ、ササゲ葉に滴下し、5 分おきに 20 分間処理液を回収し、ブルーホルマザンの生成を経時的に測定した。なお、エンドウ、ササゲ葉におけるブルーホルマザンの生成量は、エリシターや光による NBT の還元の影響を除くため、葉に処理しない反応液自体の吸光度を差し引き、さらに処理液下の組織重 1 g 当たりの生成量として求めた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
25 μ g/ml NBT (Wako)	5	ddH ₂ O	2.5 μ g/ml
1000 μ g/ml Elicitor	5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
50 mM Tris-MES (pH 7.6)	40	ddH ₂ O	—
Total	50	—	—

(2) 結果

褐紋病菌エリシターを処理した無傷エンドウ、ササゲ葉においてブルーホルマザン生成が 5 分以内に水対照区と比較して有意に増加し、ブルーホルマザン生成は処理後 15 分ではほぼ最高値に達した。一方、水対照区においても若干のブルーホルマザン生成の上昇は認められたものの、エリシター処理と比較して非常にわずかであった (Fig. 4-2)。以上の結果から、褐紋病菌エリシターは無傷葉に非特異的に O_2^- 生成を誘導すること、さらには O_2^- 生成はエリシター認識後速やかにおこる初期防御応答との関連が示唆された。

第2項 O_2^- 生成に対する褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響

第1項の結果より褐紋病菌エリシター処理後5分以内にブルーホルマザンがエンドウ、ササゲの無傷葉に誘導されることが明らかとなった。そこで次にエリシターによって生成が誘導されるブルーホルマザンの生成が O_2^- に依存したのか否か、さらにはエリシターで誘導されるブルーホルマザンの生成に対する褐紋病菌サプレッサーの影響について調べた。

(1) 方法

第1項の結果よりエリシター処理後5分以内にブルーホルマザン生成が増高することが判ったので、以下の実験は5分間のブルーホルマザン生成量を測定した。褐紋病菌エリシター単独、サプレッサー単独、エリシターとサプレッサーの混合、およびこれらの各々の反応液にスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) を加えたもの、あるいは対照区として脱イオン水を含む NBT 反応液 50 μ l を無傷エンドウ、ササゲ葉に滴下し、5 分後に処理液を回収し、ブルーホルマザンの生成を測定した。なお、エンドウ、ササ

ゲ葉によるブルーホルマザンの生成量の評価は、エリシター、サプレッサー、SOD による NBT の還元への直接的な影響を除くため、葉に処理しない反応液における吸光度を差し引き、さらに処理液下の組織重 1 g 当たりの生成量として求めた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc
25 μ g/ml NBT	5	ddH ₂ O	2.5 μ g/ml
1000 μ g/ml Elicitor	5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
1000 μ g/ml Suppressor	5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
3000 units SOD (Sigma)	5	ddH ₂ O	300 units
50 mM Tris-MES (pH 7.6)	35	ddH ₂ O	—
Total	50	—	—

(2) 結果

Fig 4-3 に示したようにエンドウ、ササゲ葉において褐紋病菌エリシター処理で水処理と比較して顕著にブルーホルマザンの生成が増加した。一方、サプレッサーは単独処理ではエンドウ葉に対してまったく影響を与えなかったが、エリシターとの混合処理ではエリシターで誘導されるブルーホルマザンの生成を水処理レベルにまで抑制した。一方、ササゲ葉においてはサプレッサー単独処理でブルーホルマザンの生成を上昇させ、エリシターとの混合処理ではエリシター単独処理で誘導されるブルーホルマザンの生成をむしろ相加的に上昇させる傾向が伺えた。また、SOD は水処理におけるブルーホルマザンの生成に対してほとんど影響を与えなかったが、エリシターやサプレッサー（ササゲの場合）で上昇するブルーホルマザンの生成はほぼ完全に阻害した。以上の結果から、これら菌シグナル処理によって上昇するブルーホルマザンの生成は O_2^- に依存したものであることが判った。褐紋病菌のエリシターは O_2^- 生成を非特異的に誘導すること、一方、本菌のサプレッサーは宿主エンドウの O_2^- のみを特異的に抑制し、非宿主に対しては O_2^- 生成を逆に誘導すること、即ちエリシターとして作用することが明らかとなった。

第3項 O_2^- 生成に対する活性酸素生成酵素の阻害剤の影響

第1、2項の実験からエンドウ、ササゲ葉は病原菌シグナルを認識し、速やかに O_2^- を生成することが明らかとなった。そこで次に、どのような酵素が本 O_2^- 生成に関与しているかについて、膜系 NADPH oxidase の阻害剤であるイミダゾール、キナクリン、ペルオキシダーゼ阻害剤である SHAM を用いて O_2^- 生成に対する影響を調べた。

(1) 方法

エリシター単独、イミダゾール、ネオマイシン、キナクリン、SHAM、とエリシターの混合、あるいは対照区として脱イオン水を含む NBT 反応液 50 μ l を無傷エンドウ、ササゲ葉に滴下し、5分後に処理液を回収し、ブルーホルマザンの生成を測定した。

なお、エンドウ、ササゲ葉によるブルーホルマザンの生成量の評価は、阻害剤による NBT の還元に対する直接的な影響を除くため、葉に処理しない反応液におけるブルーホルマザンの生成量を差し引き、さらに処理液下の組織重 1 g 当たりの生成量として行った。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc
25 μ g / ml NBT	5	ddH ₂ O	2.5 μ g / ml
1000 μ g / ml Elicitor	5	ddH ₂ O	100 μ g / ml
100 mM Imidazole (Ishizu)	5	ddH ₂ O	10 mM
5 mM Quinacrine (Sigma)	5	ddH ₂ O	0.5 mM
5 mM SHAM (Sigma)	5	10 % EtOH	0.5 mM
50 mM Tris-MES (pH 7.6)	5	ddH ₂ O	—
Total	5	—	—

(2) 結果

褐紋病菌エリシター処理無傷エンドウ、ササゲ葉では水対照区と比較してブルーホルマザン生成の有意な上昇が認められた。膜系 NADPH oxidase の阻害剤であるイミダゾールはエリシターによるブルーホルマザン生成の上昇を若干抑制する傾向が伺えたが、もう一方の膜系 NADPH oxidase の阻害剤であるキナクリンは本ブルーホルマザン生成の上昇にまったく影響をしなかった。一方、ペルオキシダーゼ阻害剤である SHAM はエリシターによるブルーホルマザン生成の上昇を顕著に阻害し、ほぼ水処理レベルまで抑制した。これらの阻害剤の影響はエンドウ、ササゲに共通したものであった (Table 4-1)。イミダゾールは b 型のチトクロームに作用することによって (Iizuka et al. 1987)、また、キナクリンはフラビンタンパク質に作用することによって (Cross and Jones 1991) NADPH oxidase を阻害すると報告されている。このように作用の異なる 2 種類の NADPH oxidase 阻害剤を用いても、無傷エンドウ、ササゲ葉表層における O₂⁻ 生成は顕著に阻害されることがなかった。以上の結果より、無傷エンドウ、ササゲ葉表層における O₂⁻ 生成には、膜系 NADPH oxidase の関与は完全には否定できないものの、主にはパーオキシダーゼが関与しているものと推察される。

第4項 O₂⁻ 生成に対するオルトバナジン酸、ネオマイシンの影響

P 型 ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸、フォスフォリパーゼ C の阻害剤であるネオマイシンで有傷のエンドウ組織を処理すると、エリシターで誘導されるピサチンの蓄積や、PR タンパク質である β -1, 3 グルカナーゼ、キチナーゼの活性化をはじめとするエンドウの防御応答が抑制されること (Toyoda et al. 1992, 1993, Yoshioka et al. 1990, 1992b)、さらにはネオマイシンで処理されたエンドウ葉には本来感染できない非病原菌のキク花腐病 (*Mycosphaerella ligulicola*) の感染が成立することが明らかとなって

いる (Toyoda et al. 1993)。そこでオルトバナジン酸、ネオマイシンの O_2^- 生成に対する影響について調べた。

(1) 方法

エリシター単独、ネオマイシン、オルトバナジン酸とエリシターの混合、あるいは対照区として脱イオン水を含む NBT 反応液 $50 \mu\text{l}$ を無傷エンドウ、ササゲ葉に滴下し、5分後に処理液を回収し、ブルーホルマザンの生成を測定した。なお、エンドウ、ササゲ葉によるブルーホルマザンの生成量の評価は、ネオマイシン、オルトバナジン酸による NBT の還元に対する直接的な影響を除くため、葉に処理しない反応液における吸光度を差し引き、さらに処理液下の組織重 1g 当たりの生成量として求めた。

	Vol. (μl)	Solvent	Final conc
$25 \mu\text{g/ml}$ NBT	5	ddH ₂ O	$2.5 \mu\text{g/ml}$
$1000 \mu\text{g/ml}$ Elicitor	5	ddH ₂ O	$100 \mu\text{g/ml}$
10mM Na ₃ VO ₄	5	ddH ₂ O	1mM
10mM Neomycin	5	ddH ₂ O	1mM
50mM Tris-MES (pH 7.6)	35	ddH ₂ O	—
Total	50	—	—

(2) 結果

オルトバナジン酸はエリシター処理によって無傷エンドウ、ササゲ葉に誘導されるブルーホルマザン生成の上昇をほぼ水レベルにまで抑制した。一方、ネオマイシンは約 20 % 程度ブルーホルマザン生成の上昇を抑制したが、オルトバナジン酸処理程の効果は認められなかった (Table 4-2)。以上の結果から、無傷エンドウ、ササゲ葉表層における O_2^- 生成にフォスホリパーゼ C や PIP₂ を含むポリフォスホイノシチド代謝系によって制御を受ける O_2^- 生成系が一部関与している可能性がある。一方、オルトバナジン酸によってブルーホルマザン生成が顕著に抑制された点については ATPase と O_2^- 生成系に密接な関連のあることを示している。しかしながら、Serra et al. (1990) はバナジン酸はペルオキシダーゼを直接阻害すると報告しており、本 O_2^- 生成にペルオキシダーゼが関与しているすれば (第 3 項)、オルトバナジン酸が本 O_2^- 生成に関わるペルオキシダーゼを直接阻害したという考えも成り立つであろう。

第 5 項 病原菌、非病原菌接種による O_2^- 生成の誘導

本章、第 2、3 項の結果より、無傷エンドウ、ササゲ葉の表層におかれたエリシター (あるいはサプレッサー) は認識され、速やかに O_2^- を生成を誘導することが明らかとなった。そこで、本項では実際の菌の感染の場合において O_2^- 生成が誘導されるか否かについて、病原菌、非病原菌を接種し、ブルーホルマザンの生成が誘導されるか否かに

ついて実験を行った。

(1) 方法

エンドウ褐紋病菌強病原性系統 (OMP-1)、エンドウ褐紋病菌弱病原性系統 (OMP-av)、ウリ類炭そ病菌 (104T) の孢子懸濁液、あるいは対照区として脱イオン水を含む NBT 反応液 50 μ l を無傷エンドウ、ササゲ葉に滴下し、10、20、40、60 分後の各時間に処理液を回収し、経時的なブルーホルマザンの生成を測定した。なお、実験に際しては病原菌自体が生成する O_2^- 等によって NBT が還元される可能性があるため、病原菌と反応液との混合液の吸光度差し引き、さらに処理液下の組織重 1 g 当たりの生成量としてエンドウ、ササゲ葉のブルーホルマザンの生成量とした。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc
25 μ g / ml NBT	5	ddH ₂ O	2.5 μ g / ml
5 $\times 10^5$ spore / ml <i>Mycosphaerellapinodes</i> OMP-1	5	ddH ₂ O	100 μ g / ml
5 $\times 10^5$ spore / ml <i>Mycosphaerellapinodes</i> OMP-av	5	ddH ₂ O	1 mM
5 $\times 10^5$ spore / ml <i>Colletotrichumlagenarium</i> 104T	5	ddH ₂ O	1 mM
50 mM Tris-MES (pH 7.6)	35	ddH ₂ O	—
Total	50	—	—

(2) 結果

無傷エンドウ葉に非病原菌であるウリ類炭そ病菌 (*C. lag*) やエンドウ褐紋病菌弱病原性系統 (OMP-av) を接種した場合、接種後 10 分以内にブルーホルマザンの生成が水対照区と比較して有意に上昇し、1 時間後にはほぼ最高値に達した。一方、病原菌であるエンドウ褐紋病菌接種では、ブルーホルマザンの生成は全く増加せず、むしろ逆に水対照区以下に抑制する傾向が伺えた。一方、ササゲ葉の場合、これらすべての菌 (非病原菌) を接種した場合にブルーホルマザン生成の有意な上昇が認められた (Fig. 4-4)。以上の結果から、エンドウ、ササゲ葉に非病原菌を接種した場合にはエリシター処理と同様に O_2^- が速やかに生成されることが明らかとなった。即ち、植物は病原菌と接触後の極めて早い段階で、病原菌あるいはシグナル分子をすでに認識しているものと考えられる。一方、エンドウ褐紋病菌 OMP-1 は非宿主ササゲの O_2^- 生成を誘導したが、宿主エンドウの O_2^- 生成の上昇は誘導しなかった。このことは、褐紋病菌 OMP-1 は宿主の O_2^- 生成を特異的に回避する機構を備えていることが示された。

第3節 まとめ

酸素は生体にとって必須なものである。その一方で可視光線、紫外線、放射線等の環境的要因や光合成や酸化的リン酸化といった生体内の代謝生じる活性酸素種は、生体に

種々の障害を引き起こすことが知られている。これがいわゆる”酸素中毒”であり、動物では炎症、発癌、放射能障害等に深い関わりがあることが判っている（大柳 1981）。従って、種々の生体反応で生じる活性酸素種を消去する能力が個体や生物種の維持にも大きく関わっており、現在生存している生物種はいずれも活性酸素を消去するシステムを備えていることが判っている。しかしながら、活性酸素種は上記のように、生物に対して悪い影響を与えているだけではない。動物細胞では白血球や貧食細胞等が細菌などの異物を認識して、排除する場合に活性酸素、特に O_2^- を生産して積極的に生体防御に利用している。

近年、植物と病原菌の相互作用の過程の極めて初期段階で O_2^- 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ 等の活性酸素種が生成される”Oxidative burst”という現象が数多く報告されている。ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) の非親和性レースを接種したジャガイモ塊茎には速やかに O_2^- が誘導される (Doke 1983a, b)。また、ダイズの培養細胞を エリシターで処理すると急激な H_2O_2 の生成が誘導される (Apostol et al. 1989, Legendre et al. 1993, Levine et al. 1994)。これらの例以外にも、イネ、トマト、ピーマン、タバコ、ダイズ、インゲン、キュウリ、パセリ等、数多くの植物種と病原菌の相互作用で報告されており、植物の普遍的な防御応答の1つであると考えられる (Table 4-3)。

エンドウ、ササゲの無傷葉を褐紋病菌由来のエリシターで処理すると5分以内に O_2^- の生成が認められた (Fig. 4-2, 3)。エンドウ葉における O_2^- 生成は本菌由来のサプレッサーで顕著に抑制されたが、本菌の非宿主であるササゲの O_2^- 生成は抑制せず、サプレッサーは単独でも O_2^- 生成を誘導した (Fig. 4-3)。このことは、1) エンドウ、ササゲ葉上の病原菌シグナルは速やかに認識され、植物は応答すること、2) サプレッサーは他の防御応答と同様に O_2^- 生成を種特異的に抑制することを示している。

非病原菌接種エンドウ、ササゲ葉でも速やかな O_2^- 生成が認められるが、褐紋病菌強病原性系統接種エンドウの O_2^- 生成は増高しなかった (Fig. 4-4)。この結果は、実際の感染の場合においても O_2^- が生成されることを示しており、褐紋病菌はサプレッサーを生産することによって、宿主エンドウの O_2^- 生成を回避していると推察される。従来モデル実験系として広く用いられている培養細胞はすでにストレスがかかった状態であると考えられ、健全な植物では認められない代謝変動（嫌氣的代謝の活性化等）が起こっていることが想像できる。また、リーフディスク等を用いた場合、切断障害による代謝変動は避けられない。つまり、これらの材料は、本来の病原菌との相互作用がおこる場とは程遠いものと考えられる。一方、本実験ではワックスを除去しただけのエンドウ、ササゲ葉を用いており、病原菌の攻撃に対して正常に応答する。従って本実験は、実際の植物-病原菌の相互作用をかなり忠実に再現しているのではないかと考えられる。

オキシデーティブーストによって生成される活性酸素の病害抵抗性における役割についてはさまざまな報告がある (Table 4-3)。ジャガイモ塊茎スライスに非親和性ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) を接種、あるいは疫病菌の細胞壁エリシター (HWC) を処理すると O_2^- の生成が誘導され、それに伴って過敏細胞死、ファイト

アレキシンであるリシチンの生成が誘導される。この系に O_2^- の消去剤である SOD、あるいは Tiron を与えておくと、これらの抵抗反応は誘導されなくなることが報告されている (Doke 1983a)。即ち、 O_2^- は過敏感細胞死、あるいはファイトアレキシン蓄積誘導の第二次シグナルとして働いていると考えられている。また、非生物のエリシターとして知られている硝酸銀や塩化水銀で処理されたダイズの組織にはファイトアレキシンであるグリセオリンの蓄積が誘導されるが、 $OH\cdot$ の消去剤である安息香酸、マンニトールやメチオンで処理するとグリセオリンの蓄積が抑制された (Epperlein et al. 1986)。つまり、活性酸素種の中で反応性に富む $OH\cdot$ もファイトアレキシン蓄積のシグナルとして作用していると考えられている。また、Oxidative burstによって生成される H_2O_2 においてもファイトアレキシン蓄積 (Montillet and Degousee 1991) や防御応答関連タンパク質の蓄積による局所的な抵抗化のための第二次シグナルとして (Levine et al. 1993) 重要な役割を持つと報告されている。また、 H_2O_2 はリグニン化 (Vance et al. 1980)、あるいは細胞壁タンパク質の架橋反応 (Apostol et al. 1989, Bradley et al. 1992, Brisson et al. 1994) の基質として物理的な障壁の形成にも関しているとの報告がある。さらに、 H_2O_2 は局所的な抵抗性にとどまらず、サリチル酸を介した全身獲得抵抗性の誘導にも関しているとの報告もある (Chen et al. 1993, Kauss and Jeblick 1995)。実際、全身獲得抵抗性のシグナル物質と考えられているサリチル酸結合タンパク質が精製され、カタラーゼと高い相同性を示すタンパク質であることが示され、さらにサリチル酸は *in vitro* においてカタラーゼ活性を阻害すると報告されている (Chen et al. 1993)。 H_2O_2 の全身獲得抵抗性誘導のメカニズムは、全身的に増加したサリチル酸はターゲット分子であるカタラーゼに結合しカタラーゼ活性を阻害し、細胞内の H_2O_2 量を上昇させることによると考えられている。植物組織における H_2O_2 量の病害抵抗性における重要性についてはさらに詳細な研究がなされている。カタラーゼのアンチセンス cDNA を導入したトランジェニックタバコ植物ではカタラーゼ活性の低下に伴って PR タンパク質の蓄積が誘導されることや (高橋 1996)、 H_2O_2 を生産する *Aspergillus* 属菌由来のグルコースオキシダーゼ遺伝子を導入したトランジェニックタバコ植物では H_2O_2 の過剰生産が起こり、糸状菌に対する抵抗性が付与されると報告されている (Wu et al. 1995)。本項実験で明らかとなったエンドウやササゲの表層組織でおこる O_2^- の生成と抵抗性との関連については、特にエンドウの病害抵抗性における活性酸素種の役割が次第に明らかになりつつある。有傷エンドウ組織をエリシターで処理した場合、ファイトアレキシンであるピサチンの蓄積が誘導される。ピサチン蓄積と活性酸素種の関係について、 O_2^- の消去剤であるアスコルビン酸、SOD、ラジカルの消去剤であるタイロン、 $OH\cdot$ の消去剤であるマンニトール、メチオンおよびトリプトファン、過酸化水素の消去剤であるカタラーゼを用いて調べたところ、いずれの薬剤もエリシターで誘導されるピサチン蓄積を有意に抑制せず、外部から過酸化水素を与えた場合でもピサチン蓄積は誘導されなかった (藤井 1997)。しかしながら、無傷エンドウ組織をエリシターで処理した場合に誘導される局所的な抵抗化 (感染阻害因子の生成) は、タイロン、SOD、カタラ

ーゼ、マンニトールの共存下で著しく阻害された（稲田 1997）。さらには、無傷エンドウ葉にキサンチン-キサンチンオキシダーゼを処理し、人為的に O_2^- / H_2O_2 を与えると、エリシター処理同様に局所的な抵抗性が誘導され、本抵抗化も SOD、タイロン、カタラーゼ、マンニトールが共存することによって著しく阻害された。このような結果から考えると、植物組織表層で生成される活性酸素種はピサチン蓄積には関与しておらず、むしろ感染阻害因子の生成に伴う局所的な抵抗化に重要な役割を担うものと推察される。



FIG. 4-1. Differentiation of *M. unguis* colonies on pea and mung bean surfaces.

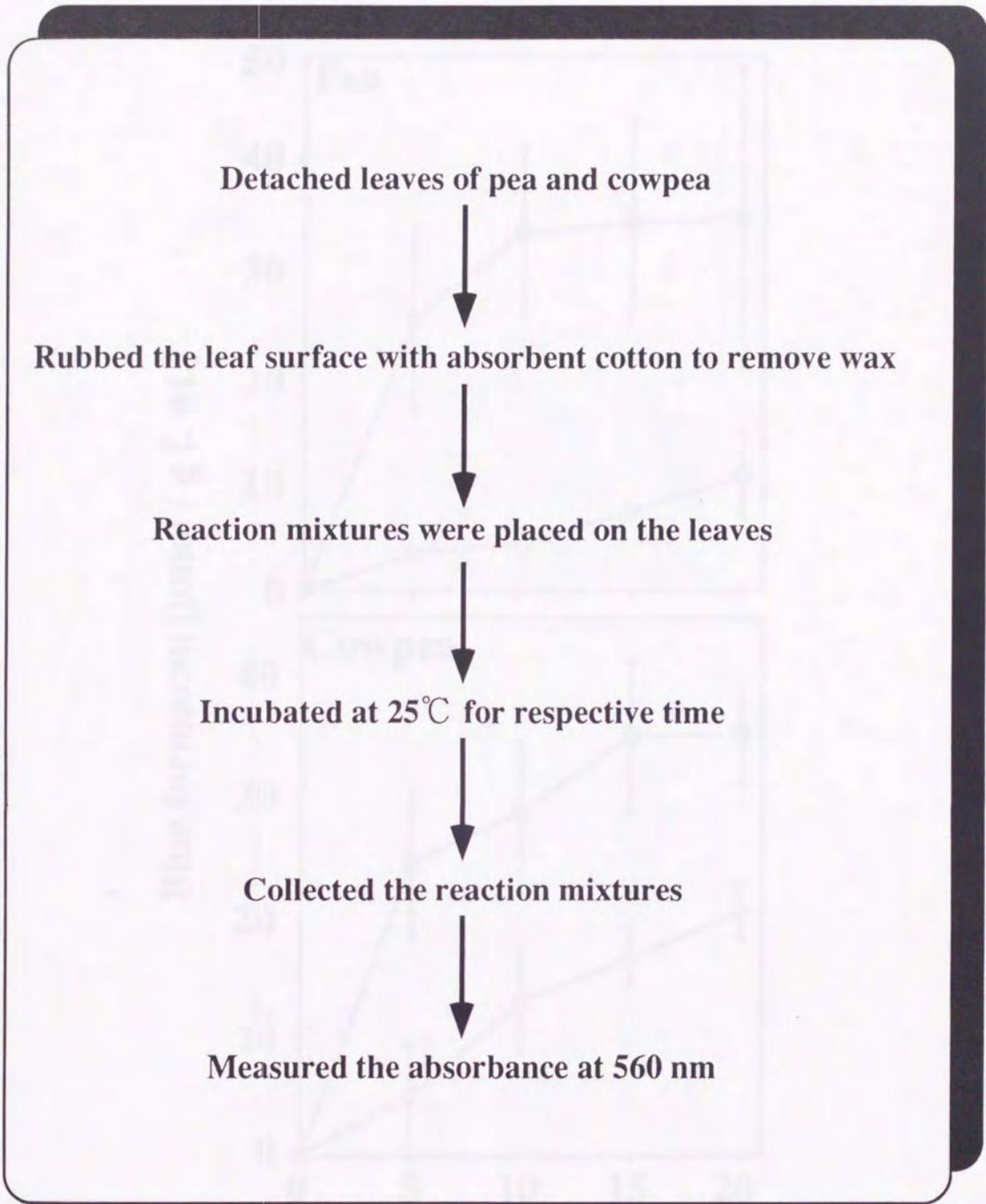


Fig. 4-1 Determination of blue formazan-formation on pea and cowpea leaves surfaces.

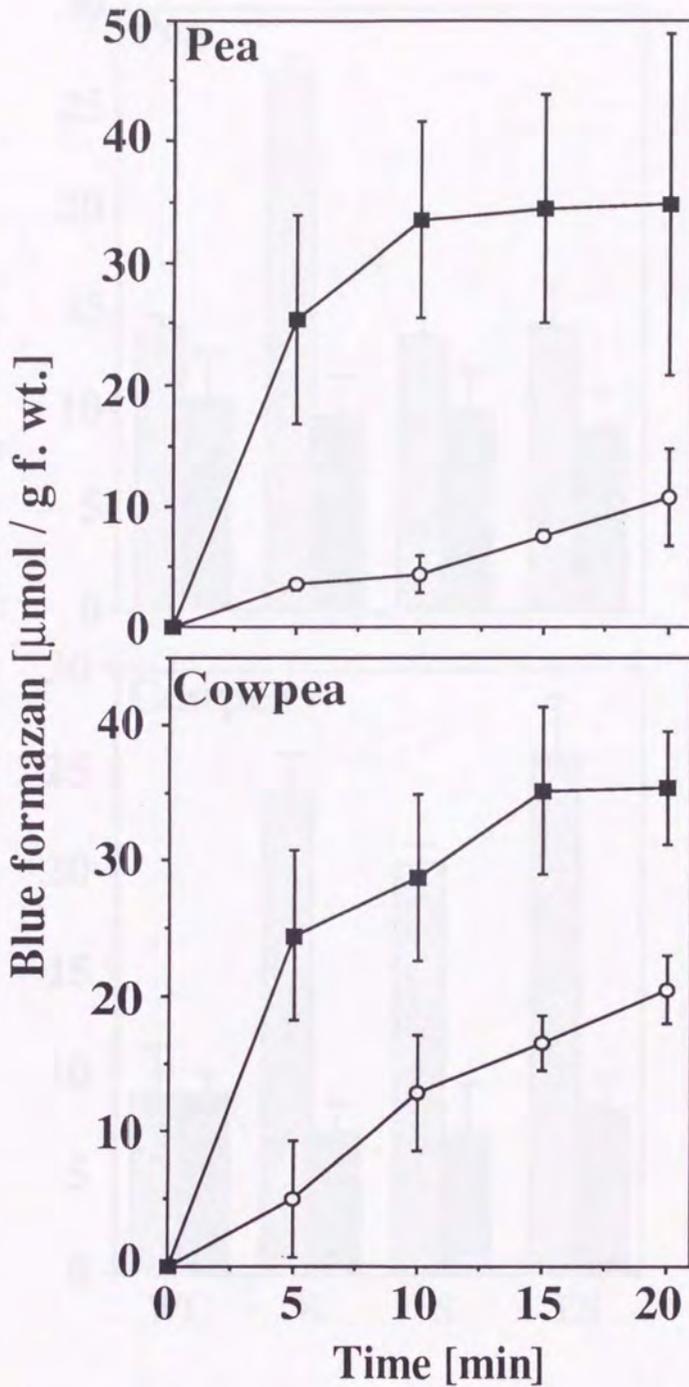


Fig. 4-2 Induction of blue formazan-formation on surfaces of pea and cowpea leaves by treatment with water or the elicitor from *Mycosphaerella pinodes*. The assay was carried out in 30 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ NBT 25°C in the absence (water control, ○) or the presence of the elicitor (■) from *M. pinodes* at the concentration of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (glucose equiv). Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

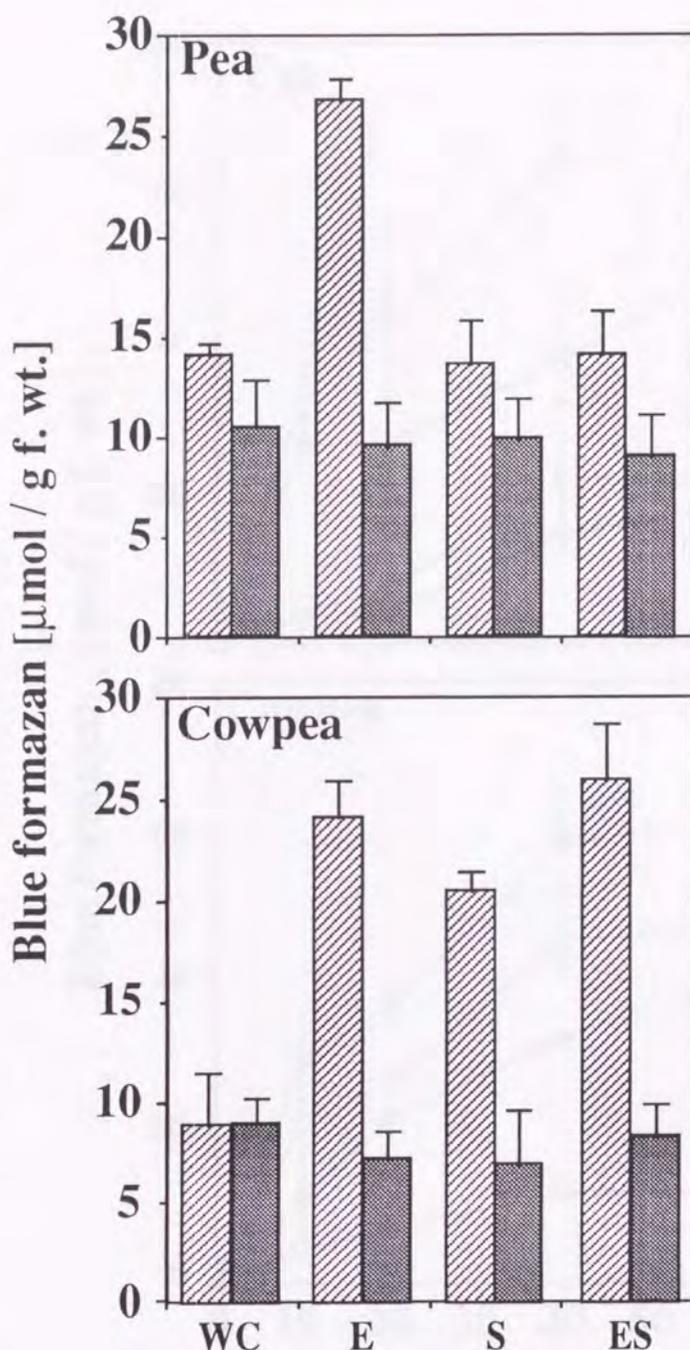


Fig. 4-3 Effects of the elicitor and suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on blue formazan-formation on surfaces of pea and cowpea leaves. The assay was carried out at 25 °C for 5 min in 30 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 2.5 μg / ml NBT in the absence (WC) or presence of the elicitor (100 μg / ml, glucose equiv.; E), the suppressor (100 μg / ml, bovine serum albumin equiv.; S) or the elicitor plus suppressor (ES) with (■) or without (▨) 300 units of SOD. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

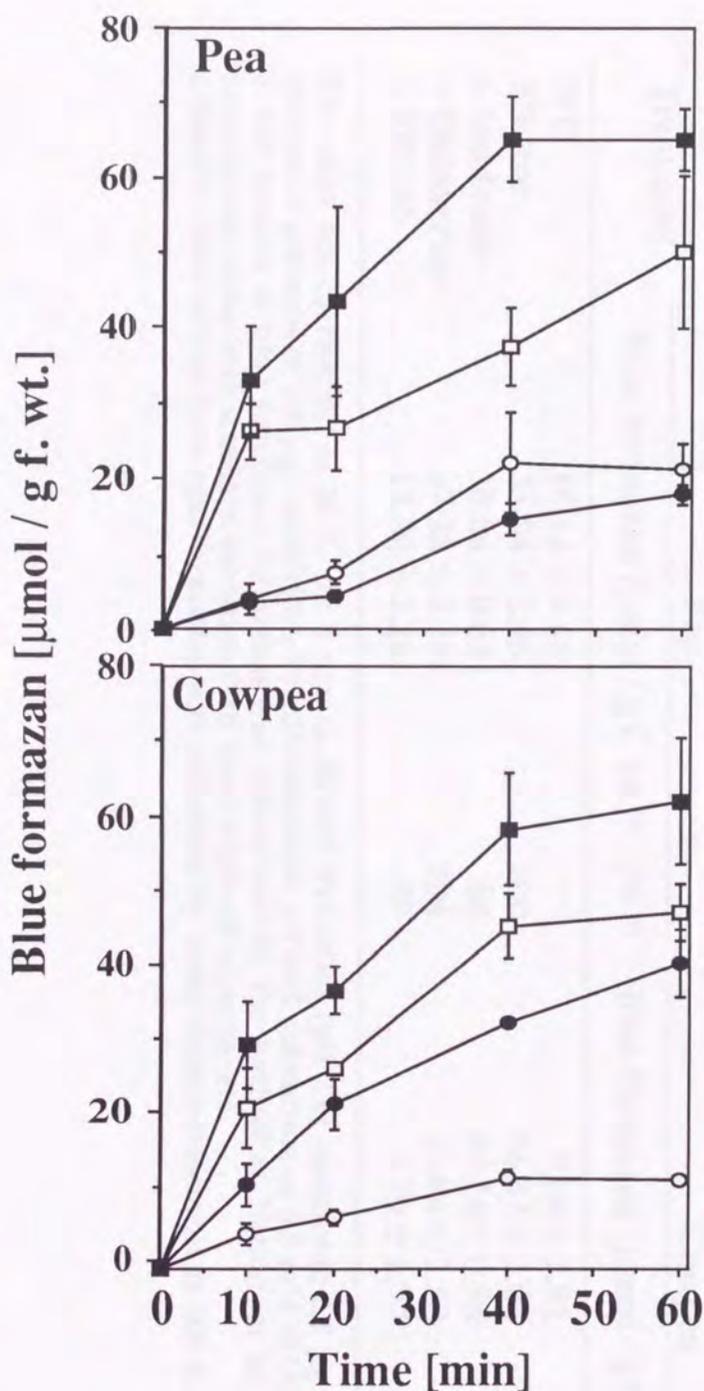


Fig. 4-4 Formation of blue formazan on surfaces of pea and cowpea leaves induced by inoculation with phytopathogenic fungi. The assay was carried out in 30 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ NBT at 25 $^{\circ}\text{C}$ in the absence (WC; ○) or presence of conidia of *Mycosphaerella pinodes*, strain OMP-1 (OMP-1; ●), *M. pinodes*, strain OMP-av (OMP-av; □) or the cause of cucumber anthracnose, *Colletotrichum lagenarium* (C. lag; ■) at 5×10^5 spores/ml. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

Table 4-1. Effects of several inhibitors on elicitor-activated blue formazan-formation on the surface of pea and cowpea leaves

Treatment	Pea		Cowpea	
	Blue formazan [$\mu\text{mol} / \text{g f. wt.}$] ^a	(%) ^b	Blue formazan [$\mu\text{mol} / \text{g f. wt.}$] ^a	(%) ^b
WC	15.14 \pm 0.66	—	7.54 \pm 2.91	—
Elicitor	35.94 \pm 2.46	100	26.83 \pm 2.04	100
+ Imidazole	30.06 \pm 0.63	84	23.24 \pm 0.95	87
+ Quinacrine	37.28 \pm 2.29	104	32.06 \pm 2.52	119
+ SHAM	13.30 \pm 2.26	37	7.79 \pm 1.77	29

The assay was carried out at 25 °C for 5 min in 30 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ NBT in the absence or presence of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ elicitor, 10 mM imidazole, 0.5 mM quinacrine or 0.5 mM SHAM.

a The amount of blue formazan formation was determined by the method of Nathan et al. and each value presents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

b Relative value of blue formazan formation was calculated by using elicitor-treatment as 100 %.

Table 4-2. Effects of neomycin and orthovanadate on elicitor-activated blue formazan-formation on the surface of pea and cowpea leaves

Treatment	Pea		Cowpea	
	Blue formazan [$\mu\text{mol} / \text{g f. wt.}$] ^a	(%) ^b	Blue formazan [$\mu\text{mol} / \text{g f. wt.}$] ^a	(%) ^b
WC	15.14 \pm 0.66	—	7.54 \pm 2.91	—
Elicitor	35.94 \pm 2.46	100	26.83 \pm 2.04	100
+ Neomycin	26.79 \pm 3.27	74	21.29 \pm 0.47	79
+ VO ₄	18.88 \pm 2.28	53	10.51 \pm 2.45	39

The assay was carried out at 25 °C for 5 min in 30 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ NBT in the absence or presence of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ elicitor, 1 mM Na₃VO₄ or 1 mM neomycin.

^a The amount of blue formazan formation was determined by the method of Nathan et al. and each value presents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

^b Relative value of blue formazan formation was calculated by using elicitor-treatment as 100 %.

Table 4-3 Generation of active oxygen species in plant cells induced by abiotic- or biotic-elicitors or by inoculation with phytopathogens

Plants		AOS	Inducer	Induced resistance	Reference
Cowpea	Cultured-cell	O ₂ ⁻	I. V	HR?	EL-Moshaty et al. 1993
Cucumber	Leaf	O ₂ ⁻	I.B	HR	Keppler and Backer 1989
Potato	Tuber	O ₂ ⁻	HWC	HR	Doke 1983
Potato	Leaf	O ₂ ⁻	I. F	HR?	Chai and Doke 1987
Parceley	Cultured-cell	H ₂ O ₂	SA	SAR	Kauss and Jeblick 1995
Rice	Leaf	O ₂ ⁻	I. F	?	Sekizawa et al. 1987
Rice	Leaf	O ₂ ⁻ /H ₂ O ₂	H+I.F	D.T	Aver'yanov et al. 1986
Rose	Cultured-cell	O ₂ ⁻ /H ₂ O ₂	E	?	Auh and Murphy 1995
Soybean	Cultured-cell	H ₂ O ₂	E	HR	Levine et al. 1994
Soybean	Cotyledon	OH•	Hg	PA	Epperlein et al 1986
Spruce	Cultured-cell	H ₂ O ₂	E	?	Schwacke and Hager 1992
Tobacco	Leaf	H ₂ O ₂	E	HR?	Rusterucci et al. 1996
Tomato	Cotyledon	O ₂ ⁻	E	HR?	May et al. 1996

Hg; mercury nitrate, D.T; direct toxicity, E; elicitor, H; heat shock, HR; hypersensitive response, HWC; hyphal wall component, I.B, infection of bacteria, I.F; infection of fungi, I.V; infection of virus, PA; phytoalexin, SA; salicylic acid, SAR; systemic acquired resistance

第5章 分離細胞壁画分における O_2^- 生成と酸化・還元酵素

無傷のエンドウ、ササゲ葉をエンドウ褐紋病菌由来のエリシターで処理すると速やかに O_2^- の生成が認められ、本 O_2^- 生成にはパーオキシダーゼが重要な役割を果たすことが示唆された。一方、サプレッサーは本 O_2^- 生成に対して種特異的に作用することが明らかとなった(第4章)。冒頭にも述べたように無傷植物葉に処理されたエリシターは細胞内、原形質膜には到達しておらず、クチクラ、細胞壁にとどまっている(高見 1993)。しかしながら、植物組織はエリシターを速やかに認識し、上記の O_2^- 生成(第4章)、さらには1時間以内に感染阻害因子の生成を伴って局部的に抵抗化する(Yamamoto et al. 1986)。このことは無傷植物葉におけるエリシターの認識、および抵抗反応の発現の過程には細胞壁が関与しているものと考えられる。即ち、エリシターで処理された無傷植物葉に O_2^- 生成が誘導される過程には「(1) 細胞壁でエリシターが認識され、細胞壁内で O_2^- が生成される。(2) 細胞壁でエリシターが認識され、何らかの情報が原形質膜、あるいは細胞内に伝達され O_2^- が生成される。」という二つの可能性が考えられる。従って、本章では細胞壁でエリシターが認識された後、細胞壁内で O_2^- が生成される可能性とともに、細胞壁における酸化・還元反応に関わる酵素の有無と、これらの酵素活性に対する褐紋病菌由来のエリシター、サプレッサーの影響について調べ、細胞壁における酸化・還元反応と植物の防御応答との関わりについて論議した。

第1節 細胞壁におけるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の生成

細胞壁結合型のパーオキシダーゼが NAD(P)H を酸化することによって H_2O_2 が細胞壁で生成され、リグニン化に必要な H_2O_2 の供給に関わっていると報告されている(Gross et al. 1977, Ishida et al. 1987)。また、HRP を用いた実験で H_2O_2 と同様に O_2^- 生成もパーオキシダーゼによって触媒されることが報告されている(Halliwell 1978)。このことは植物葉表層における O_2^- の供給源が細胞壁である可能性を示唆している。そこで、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分における O_2^- の生成について調べた。

第1項 細胞壁における O_2^- の生成

細胞壁画分における O_2^- の定量は Ishida et al. (1987) の反応系を一部改変して用いた。NADH、*p*-CA、MnCl₂、NBT、30 mM Tris-MES (pH 6.5) を含む反応液をあらかじめ分光光度計のセルに加えておき、細胞壁可溶化画分をピペットマンで添加することによって、反応を開始し、OD 560 nm における吸光度を 10 秒おきに 2 分間測定し、生成されるブルーホルマザンを定量した。ブルーホルマザン量の換算は Nathan et al. (1969) の方法で、既知の NBT をアスコルビン酸で強制的に還元し作成した検量線を用いた(第4章参照)。また、細胞壁可溶化画分において生成されるブルーホルマザンが O_2^- によるものか否かについて、SOD を添加することによって確認した。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM NADH (Sigma)	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
25 μ g/ml NBT (Wako)	5.0	ddH ₂ O	2.5 μ g/ml
200 mM MnCl ₂ (Wako)	5.0	ddH ₂ O	20 mM
5 mM <i>p</i> -CA (Sigma)	5.0	10 % EtOH	0.5 mM
1000 units SOD (Sigma)	5.0	ddH ₂ O	100 units
Solubilized cell wall fraction (1000 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	1.0 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	20.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

結果

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分添加後1分後まで直線的にブルーホルマザンの生成が上昇した (Fig. 5-1)。約 90 % のブルーホルマザン生成は SOD 共存下で顕著に阻害され、反応開始 30 秒後に SOD を添加した場合も添加後のブルーホルマザンの生成が有意に抑制された (Fig. 5-1)。以上の結果から、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中には O₂⁻ 生成活性が存在することが明らかとなった。

第2項 細胞壁可溶化画分における O₂⁻ 生成に対する阻害剤の影響

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中の O₂⁻ 生成活性に対する活性酸素生成酵素の阻害剤の影響について、膜系 NADPH oxidase の阻害剤であるイミダゾール、キナクリン、ピリジンおよび DPI、またパーオキシダーゼ阻害剤の SHAM を用いて調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM NADH	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
25 μ g/ml NBT	5.0	ddH ₂ O	2.5 μ g/ml
200 mM MnCl ₂	5.0	ddH ₂ O	20 mM
5 mM <i>p</i> -CA	5.0	10 % EtOH	0.5 mM
250 μ M DPI (Sigma)	5.0	100 % DMSO	25 μ M
100 mM Imidazole (Ishizu)	5.0	ddH ₂ O	10 mM
200 mM Pyridine (Yoneyama)	5.0	100 % DMSO	20 mM
5 mM Quinacrine (Sigma)	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
Solubilized cell wall fraction (1000 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	1.0 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	20.0	20 μ l	—
Total	50.0	50 μ l	—

結果

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分における O_2^- の生成は膜系 NADPH oxidase の阻害剤であるイミダゾール、キナクリン、ピリジンおよび DPI 処理ではほとんど有意な阻害効果は認められなかった。しかしながら、パーオキシダーゼの阻害剤である SHAM を添加した場合には顕著に O_2^- 生成を阻害された (Fig. 5-2)。以上の結果から、細胞壁可溶化画分における O_2^- の生成には細胞壁結合型のパーオキシダーゼが関与していることが強く示唆された。また、本結果は無傷エンドウ、ササゲ葉表層における O_2^- 生成の結果と符合する。

第3項 細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成に対するオルトバナジン酸、ネオマイシンの影響

P 型 ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸、フォスホリパーゼ C の阻害剤であるネオマイシンはエンドウの防御応答を抑制すること、さらには、オルトバナジン酸は第4項で行った無傷エンドウ、ササゲ葉組織における O_2^- の生成を顕著に抑制することが明らかとなっている。そこでエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成に対するオルトバナジン酸、ネオマイシンの影響について調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM NADH	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
25 μ g/ml NBT	5.0	ddH ₂ O	2.5 μ g/ml
200 mM MnCl ₂	5.0	ddH ₂ O	20 mM
5 mM <i>p</i> -CA	5.0	10 % EtOH	0.5 mM
10 mM Neomycin (Sigma)	5.0	ddH ₂ O	1.0 mM
10 mM Orthovanadate (Wako)	5.0	ddH ₂ O	1.0 mM
Solubilized cell wall fraction (1000 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	1.0 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	20.0	20 μ l	—
Total	50.0	50 μ l	—

結果

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分における O_2^- の生成は無傷エンドウ、ササゲ葉における O_2^- 生成と同様にオルトバナジン酸処理によって顕著に阻害された。しかしながら、ネオマイシン処理では O_2^- の生成はまったく影響を受けなかった (Table 5-2)。以上の結果から、細胞壁可溶化画分中における O_2^- の生成はフォスホリパーゼ C (PIP₂) によって制御される O_2^- 生成は関与していないが、ATPase と連携した O_2^- 生成系が関与している可能性が考えられる。しかしながら、第4章でも述べように、バナジン酸は直接パーオキシダーゼを阻害することが判っており (Serra et al. 1990)、オルトバナジン酸による O_2^- 生成の阻害は ATPase が阻害された結果、ATPase と連携して

いる O_2^- 生成パーオキシダーゼが間接的に阻害されたのか、あるいはオルトバナジン酸によって直接 O_2^- 生成に関与するパーオキシダーゼが阻害された結果なのかは現在のところ明らかではない。第4章の実験結果から無傷エンドウ、ササゲ葉の O_2^- 生成はネオマイシンによって約 20% 程度阻害される。従って、無傷葉における O_2^- 生成には細胞壁と原形質膜（細胞内）の両者が関与しているものと推察できる。

第4項 細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成に対する褐紋病菌エリシター、サプレッサーの作用

本章の第1～5項の実験結果から細胞壁可溶化画分中には細胞壁結合型パーオキシダーゼによって触媒される O_2^- 生成活性が存在することが明らかとなった。そこで本項では細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成活性に対するエンドウ褐紋病菌由来のエリシター、サプレッサーの影響について調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM NADH	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
25 μ g/ml NBT	5.0	ddH ₂ O	2.5 μ g/ml
200 mM MnCl ₂	5.0	ddH ₂ O	20 mM
5 mM <i>p</i> -CA	5.0	10% EtOH	0.5 mM
250～1000 μ g/ml Elicitor	5.0	ddH ₂ O	25～100 μ g/ml
250～1000 μ g/ml Suppressor	5.0	ddH ₂ O	25～100 μ g/ml
1000 units SOD	5.0	ddH ₂ O	100 units
Solubilized cell wall fraction (1000 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	1.0 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	15.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

結果

Fig. 5-2 に示したようにエンドウ、ササゲ由来の細胞壁可溶化画分中にはブルーホルマジン生成活性が存在し、本活性は 100 units SOD の存在下で顕著に抑制された。エリシターはエンドウ、ササゲ両細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成活性を顕著に上昇させた。一方、サプレッサーはエンドウ細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成活性を単独処理で顕著に阻害し、100 units SOD 処理レベルまで抑制した。また、エリシターとの混合処理でもエリシター処理による O_2^- 生成活性の上昇を有意に抑制し、水対照区以下まで抑制した。一方、ササゲ細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成はサプレッサーの共存下で全く抑制されることはなく、サプレッサー単独処理においても、むしろ逆に増高した。また、両菌シグナルで活性化される O_2^- の生成は 100 units の SOD の存在下ではほぼ完全に消去された。

次に濃度の異なるエリシター、サプレッサーの影響を調べたところ、エリシターはエ

エンドウ、ササゲの細胞壁画分における O_2^- 生成を濃度依存的に上昇させ $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ で最高値に達した。一方、サプレッサーはエンドウ由来の画分における O_2^- 生成を濃度依存的に抑制し、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ でほぼ完全に阻害した。しかしながら、ササゲ由来の画分に対しては逆に濃度に依存して活性化し、 $200 \mu / \text{ml}$ サプレッサーは水対照区と比較して O_2^- 生成を約 1.5 倍に上昇させた (Fig. 5-3)。以上の結果から、エンドウ褐紋病菌のエリシターは分離細胞壁可溶化画分中の O_2^- 生成活性を非特異的に上昇させるが、本菌のサプレッサーは種特異的に阻害あるいは上昇させることが明らかとなり、細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成はエンドウ、ササゲの組織における防御応答に対する両シグナルの作用と一致することが判った。またこの結果は、細胞壁が病原菌認識のみならず、その後の防御応答に重要な役割を果たしており、細胞壁で生成される O_2^- が、組織表層において生成する O_2^- の供給源となっている可能性を強く示唆する。

第2節 パーオキシダーゼ活性

第1節の結果から、細胞壁可溶画分における O_2^- 生成はパーオキシダーゼによって触媒されている可能性が強く示唆された。細胞壁、細胞間液には複数のパーオキシダーゼ分子が存在し、リグニン化、エクステンシン (ヒドロキシプロリン、プロリンに富んだ糖タンパク質) の架橋反応の触媒等、植物の生長に重要な役割を果たすことが報告されている (Gross et al. 1977, Ishida et al. 1987, Mader and Amberg-Fischer 1982, Mader and Fussl 1982)。一方、植物と病原菌の相互作用においても Oxidative burst の結果生成される H_2O_2 を用いてリグニン化 (Vance et al. 1980) ヒドロキシプロリン、プロリンに富んだ糖タンパク質の架橋反応を触媒し、物理的障壁の形成に重要な役割を果たしていることが報告されている (Apostol et al. 1989, Bradley et al. 1992, Brisson et al. 1994)。そこで本項ではパーオキシダーゼ活性および、パーオキシダーゼ活性に対するエンドウ褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響について解析した。

第1項 パーオキシダーゼ活性

パーオキシダーゼ活性は Mader and Amberg-Fisher (1982) の方法を一部改変して調べた。グアイアコール、 H_2O_2 を含む 30 mM Tris-MES (pH 6.5) をあらかじめ分光光度計のセルに加えておき、細胞壁可溶化画分を添加することによって反応を開始し、10 秒おきに 2 分間、OD 470 nm における吸光度の増加を測定した。酵素活性の評価は単位時間あたりの吸光度の変化 ($\Delta OD 470 \text{ nm}$) を求め、モル吸光係数 $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使って換算した。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM Guaiacol (Nakarai)	5.0	10 % EtOH	0.5 mM
1 mM H ₂ O ₂ (Wako)	5.0	ddH ₂ O	0.1 mM
Solubilized cell wall fraction (100 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris MES (pH 6.5)	35.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

結果

酵素添加後、速やかに OD 470 nm の吸光度が上昇し、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中に強いパーオキシダーゼ活性が存在することが明らかとなった (Fig. 5-4)。

第2項 パーオキシダーゼ活性に対するエリシター、サプレッサーの影響

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中のパーオキシダーゼ活性に対する、褐紋病菌由来のエリシター、サプレッサーの影響について調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM Guaiacol	5.0	10 % EtOH	0.5 mM
1 mM H ₂ O ₂	5.0	ddH ₂ O	0.1 mM
1000 μ g / ml Elicitor	5.0	ddH ₂ O	100 μ g / ml
1000 μ g / ml Suppressor	5.0	ddH ₂ O	100 μ g / ml
Solubilized cell wall fraction (100 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris MES (pH 6.5)	30.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

結果

エンドウ、ササゲのパーオキシダーゼ活性は褐紋病菌由来のエリシターで非特異的に活性化した。一方、サプレッサーはエンドウのパーオキシダーゼ活性を有意に阻害したが、ササゲのパーオキシダーゼは阻害せず、逆に活性化した (Fig. 5-5)。以上の結果から、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中にパーオキシダーゼ活性はエリシターによって非特異的に活性化され、サプレッサーによって種特異的に制御されることが明らかとなった。このようにパーオキシダーゼ活性が病原菌シグナルによって制御されることについては、パーオキシダーゼによって触媒されるスーパーオキシドアニオンの生成がエリシター、サプレッサーで制御されるという第1節の実験結果と一致する。また、両病原菌シグナルのパーオキシダーゼに対する作用は細胞壁 ATPase に対する影響とも一致する (第2章)。

第3節 細胞壁可溶化画分における過酸化水素の生成

第6項の実験結果から細胞壁可溶化画分中には O_2^- 生成活性が存在すること、また O_2^- 生成活性はパーオキシダーゼ活性に触媒されていることが明らかとなった。細胞壁のパーオキシダーゼは O_2^- 以外にリグニン化に必要な過酸化水素を供給する役割を持つことも報告されている (Gross et al. 1977, Halliwell 1978, Marder and Amberg-Fisher 1982, Marder and Fussl 1982)。そこで本項では細胞壁可溶化画分における H_2O_2 の生成を測定した。

第1項 過酸化水素の生成

過酸化水素の定量には、一般的にスコポレチン蛍光法 (Root et al. 1975, Root and Metcalf 1977)、四塩化チタニウム法 (Brennan and Frenkel 1977) 等が用いられるが、四塩化チタニウム法を用いて過酸化水素の定量を試みたところ、mM オーダー以上の過酸化水素しか検出できなかった。また、スコポレチン蛍光法は反応液に HRP を入れて測定するため、パーオキシダーゼによって生成される H_2O_2 を測定することには適していない。そこで、Halliwell (1978) の方法に準じて O_2^- 生成測定用反応液にパーオキシダーゼの基質の一つであるグアイヤコールを添加し、パーオキシダーゼ活性を測定することによって間接的に過酸化水素の生成を確認した。NADH、*p*-CA、 $MnCl_2$ 、グアイヤコール、エリタター、サプレッサー、および対照区として水を含む 30 mM Tris-MES (pH 6.5) を含む反応液をあらかじめ分光光度計のセル内に加えておき、細胞壁可溶化画分を添加することによって、反応を開始し、テトラグアイヤコールの生成を 10 秒おきに 2 分間、OD 470 nm における吸光度を測定した。また、反応液中に生成される過酸化水素を取り除くため 5、10、25、50 units のカタラーゼを加えた区も設けた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM NADH	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
200 mM $MnCl_2$	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
5 mM <i>p</i> -CA	5.0	10 % EtOH	20 mM
5 mM Guaiacol	5.0	10 % EtOH	0.5 mM
50~500 units Catalase (Sigma)	5.0	ddH ₂ O	5~50 units
Solubilized cell wall fraction (1000 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris MES (pH 6.5)	1.0 μ g
30 mM Tris MES (pH 6.5)	20.0	20 μ l	—
Total	—	50 μ l	—

結果

1 mM H_2O_2 添加区と比較して非常に活性は弱いものの、テトラグアイヤコールの生成が認められた。一方、NADH、 H_2O_2 を添加しない区ではほとんどテトラグアイヤコ

ールの生成は認められなかった (Fig. 5-6)。また、両植物細胞壁可溶化画分におけるテトラグアイヤコールの生成はカタラーゼ処理によって濃度依存的に低下し、カタラーゼ 50 units 処理によってほぼ完全に抑制された (Fig. 5-7)。以上の結果から、細胞壁可溶化画分中には H_2O_2 生成活性が存在することが明らかとなり、細胞壁可溶化画分中で生成される H_2O_2 は NADH の酸化で生じる O_2^- が不均衡化反応の結果生じたものであると考えられる。また、細胞壁可溶化画分における H_2O_2 生成量についてはカタラーゼ 1 unit の H_2O_2 分解量が $1 \mu\text{mol} / \text{min}$ と定義されていることから、タンパク質 1 mg 当たり 1 分間に約 $50 \mu\text{mol}$ 程度生成しているものと考えられる。

第2項 過酸化水素生成に対するエリシター、サプレッサーの影響

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中には NADH を電子供与体とした、 H_2O_2 生成活性が存在することが第1項の実験結果から明らかとなった。そこで本 H_2O_2 生成に対するエンドウ褐紋病菌由来のエリシター、サプレッサーの影響について調べた。

	Vol. (μl)	Solvent	Final conc.
5 mM NADH	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
200 mM MnCl ₂	5.0	ddH ₂ O	20 mM
5 mM p-CA	5.0	10 % EtOH	0.5 mM
5 mM Guaiacol	5.0	10 % EtOH	0.5 mM
1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Elicitor	5.0	ddH ₂ O	100 $\mu\text{g} / \text{ml}$
1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Suppressor	5.0	ddH ₂ O	100 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Solubilized cell wall fraction (1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$)	5.0	30 mM Tris MES (pH 6.5)	1.0 μg
30 mM Tris MES (pH 6.5)	20.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

結果

エリシターはエンドウ、ササゲ両植物由来の細胞壁可溶化画分における H_2O_2 の生成を有意に増高させた。一方、サプレッサーはエンドウ細胞壁可溶化画分における H_2O_2 の生成を顕著に阻害し、ササゲ細胞壁可溶化画分における活性を有意に上昇させた (Fig. 5-8)。以上の結果からエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中の H_2O_2 生成活性は、エリシターによって非特異的に活性化され、サプレッサーによって種特異的に制御されることが明らかとなった。本反応系で生成される H_2O_2 はパーオキシダーゼによる NADH 酸化の結果生成される O_2^- が、不均衡化反応によって H_2O_2 に変換されたと考えられる。従って、 O_2^- 生成がエリシター、サプレッサーで制御を受けるという結果 (第1節) を踏まえて考えると H_2O_2 生成も両病原菌シグナルで制御されるという結果は妥当なものであろう。

第4節 アスコルビン酸オキシダーゼ

アポプラスト、細胞壁における酸化・還元に関わる酵素としてはパーオキシダーゼの他にアスコルビン酸オキシダーゼが知られている (Takahama and Oniki 1994)。アスコルビン酸オキシダーゼはアポプラストに存在し、酸化・還元反応の制御に関与しているアスコルビン酸を酸化し、アスコルビン酸フリーラジカル (monodehydroascorbate) を生成する。本項の実験ではエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分におけるアスコルビン酸オキシダーゼ活性の測定、および本活性に対するエンドウ褐紋病菌由来のエリシター、サプレッサーの影響について調べた。

第1項 アスコルビン酸オキシダーゼ活性

アスコルビン酸オキシダーゼ活性の測定は Takahama and Oniki (1994) の方法に準じた。アスコルビン酸、30 mM Tris-MES (pH 6.0) を含む反応液をあらかじめ分光光度計のセルに加えておき、細胞壁可溶化画分を添加することによって酵素反応を開始し、10 秒ごとに2分間、OD 290 nm における吸光度の減少を測定した。酵素活性の評価は単位時間当たりの吸光度の変化 (Δ OD 290 nm) を計算し、モル吸光係数 $18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて換算した。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM L-ascorbic acid (Wako)	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
Solubilized cell wall fraction (100 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris MES (pH 6.5)	0.5 μ g
30 mM Tris MES (pH 6.5)	40.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

結果

酵素添加後 1 分間は直線的に吸光度の減少が認められ (Fig. 5-9)、細胞壁可溶化画分にアスコルビン酸オキシダーゼ活性が存在することが明らかとなった。

第2項 アスコルビン酸オキシダーゼ活性に対するエリシター、サプレッサーの影響

アスコルビン酸オキシダーゼと防御応答との関連を調べるため、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中のアスコルビン酸オキシダーゼ活性に対する褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響について調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM L-ascorbic acid	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
1000 μ g/ml Elicitor	5.0	ddH ₂ O	100 μ g/ml
1000 μ g/ml Suppressor	5.0	ddH ₂ O	100 μ g/ml
Solubilized cell wall fraction (100 μ g/ml)	5.0	30 mM Tris MES (pH 6.5)	0.5 μ g
30 mM Tris MES (pH 6.5)	35.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

結果

褐紋病菌由来のエリシターはエンドウ、ササゲ両植物由来の細胞壁可溶化画分におけるアスコルビン酸オキシダーゼ活性を有意に増高させた。一方、サプレッサーはエンドウ細胞壁可溶化画分におけるアスコルビン酸オキシダーゼ活性を顕著に阻害したが、ササゲ細胞壁可溶化画分における活性は阻害せず、逆に有意に上昇させた (Fig. 5-10)。以上の結果からエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中のアスコルビン酸オキシダーゼ活性は、細胞壁 ATPase、パーオキシダーゼ活性同様に、エリシターによって非特異的に活性化され、サプレッサーによって種特異的に制御されることが明らかとなった。

第5節 リンゴ酸脱水素酵素

細胞壁可溶化画分中にはパーオキシダーゼによって触媒される NADH 依存性の $O_2^- \cdot H_2O_2$ 生成活性が存在し、褐紋病菌エリシターで活性化され、サプレッサーによって種特異的に制御されることが明らかとなった。このような結果から、活性酸素が細胞壁における病原菌シグナルの認識後の抵抗反応、あるいは抵抗反応誘導の第二次シグナルとして働いている可能性が示唆された。細胞壁、アポプラストにおいて O_2^- 、 H_2O_2 が生成されることは以前から報告されてきたが (Gross et al. 1977, Ishida et al. 1987)、活性酸素生成に必要な電子供与体が細胞外に十分量存在しているのかについては疑問視されてきた。近年、細胞間液中には数 nmol \sim μ mol 程度の NAD^+ 、 $NADH$ が存在することが報告されており (Shinkle et al. 1992)、細胞間液中の NAD^+ は細胞間液、あるいは細胞壁に存在するリンゴ酸脱水素酵素によって $NADH$ に変換されると考えられている (Changci et al. 1989, Frenhner and Conn 1987, Gross 1977)。そこで本節の実験ではエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中にリンゴ酸脱水素酵素活性の測定、および本活性に対するエンドウ褐紋病菌由来のエリシター、サプレッサーの影響について調べた。

第1項 リンゴ酸脱水素酵素活性

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中のリンゴ酸脱水素酵素活性の測定は Gross (1977) の方法を一部改変して行った。 β - NAD^+ 、リンゴ酸、20 mM Tris-HCl (pH 7.6) を含む反応液をあらかじめ分光光度計のセル内に加えておき、ピペットマンで細胞壁可

溶化画分を添加することによって酵素反応を開始し、OD 340 nm における吸光度の変化を 10 秒おきに 2 分間測定し、生成される NADH の量を測定した。NADH 量は既知の濃度の NADH の OD 340 nm における吸光度を測定して作成した検量線を用いて求めた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM L-Malate (Wako)	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
10 mM NAD ⁺ (Wako)	5.0	ddH ₂ O	1 mM
Solubilized cell wall fraction (1000 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris MES (pH 6.5)	1.0 μ g
30 mM Tris MES (pH 6.5)	35.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

NADH 標準直線

$$Y = -3.9122 + 0.26674 X$$

X : 吸光度 (OD 340 nm \times 1,000) Y : NADH 量 (μ M)

結果

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分を添加すると、直線的に OD 340 nm における吸光度が上昇し、反応開始後、40 秒付近ではほぼ活性は頭打ちになった (Fig. 5-11)。以上の結果から、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中にはリンゴ酸脱水素酵素活性が存在することが明らかとなった。

第2項 リンゴ酸脱水素酵素活性に対するエリシター、サプレッサーの影響

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分のリンゴ酸脱水素酵素活性に対する褐紋病菌エリシター、サプレッサーの影響について調べた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
5 mM L-Malate	5.0	ddH ₂ O	0.5 mM
10 mM NAD ⁺	5.0	ddH ₂ O	1 mM
1000 μ g / ml Elicitor	5.0	ddH ₂ O	100 μ g / ml
1000 μ g / ml Suppressor	5.0	ddH ₂ O	100 μ g / ml
Solubilized cell wall fraction (1000 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris MES (pH 6.5)	1 μ g
30 mM Tris MES (pH 6.5)	30.0	ddH ₂ O	—
Total	—	—	—

(2) 結果

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中のリンゴ酸脱水素酵素活性はエリシター、サ

プレッサーの何れを添加した場合にもまったく影響を受けなかった (Fig. 5-12)。以上の結果から、細胞壁に存在するリンゴ酸脱水素酵素活性はエリシター、サプレッサーの受容体や細胞壁 ATPase、パーオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼとはあまり密接な連携はないものと考えられる。

第6節 ウエスタンブロットティング解析

本章第1～5節の実験結果から、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中にはエンドウ褐紋病菌由来のエリシター、サプレッサーによって制御されるパーオキシダーゼ活性、アスコルビン酸オキシダーゼ活性、およびスーパーオキシドアニオン/過酸化水素生成活性、また、病原菌シグナルによって制御はされないものの、リンゴ酸脱水素酵素酵素活性が存在することが明らかとなった。そこで本節では、これらの酵素活性を担うタンパク質分子の同定を行うため、パーオキシダーゼ抗体、アスコルビン酸オキシダーゼ抗体、リンゴ酸脱水素酵素酵素抗体を用いたウエスタンブロットティング解析を行った。

(1) ウエスタンブロットティング解析

エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜へ転写後、パーオキシダーゼ抗体、アスコルビン酸オキシダーゼ抗体、リンゴ酸脱水素酵素酵素抗体を一次抗体として反応させ、HRP 標識した 2 次抗体を反応させ、HRP 用発色基質を用いてパーオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素酵素の検出を行った (詳しい方法は第3章を参照)。

使用抗体

1 次抗体 : 抗 HRP ポリクローナル抗体 (Sigma)

: 抗カボチャアスコルビン酸オキシダーゼポリクローナル抗体 (Rockland)

: 抗ブタ心臓リンゴ酸脱水素酵素酵素ポリクローナル抗体 (Calzyme)

2 次抗体 : HRP 標識 Anti-Rabbit IgG (Bio Rad)

結果

抗 HRP 抗体、抗カボチャアスコルビン酸オキシダーゼ抗体を用いた解析では、両抗体に反応性を持つタンパク質が各々 10 個以上存在した (Fig. 5-13)。抗 HRP 抗体と相互作用する主要なタンパク質の推定分子量は 105.6、89.8、85.1、78.5、72.4、68.6、61.6、55.3、49.7、44.6、37.9、30.6、26.0、24.7、17.9、11.6 であり、抗カボチャアスコルビン酸オキシダーゼ抗体と相互作用する主要なタンパク質の推定分子量は 105.6、89.8、85.1、78.5、72.4、68.6、61.6、55.3、49.7、44.6、37.9、26.0 であった。細胞壁可溶化画分中にはパーオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼとも非常に多くの分子種が存在し、さらに抗 HRP 抗体、抗カボチャアスコルビン酸オキシダーゼ抗体で検出されたバンドを比較すると、共通のバンド (下線で示した) も多く存在することが判

った。また、エンドウ、ササゲの両植物を比較すると、パーオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼともバンドの濃さには多少違いがあるものの、含まれるタンパク質のパターンはほぼ同一のものであった。一方、抗ブタ心臓リンゴ酸脱水素酵素抗体を用いた解析では相互作用するタンパク質は検出できなかった (Data not shown)。以上の結果から、パーオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼについては、酵素活性のみならず免疫学的方法で確認することができ、多くの分子種が存在することが判った。また、パーオキシダーゼ抗体、アスコルビン酸オキシダーゼ抗体で認められたバンドのうち共通のものがいくつか存在したことから、これらの酵素は共通した構造を持つ酵素であるか、あるいは分子種によって役割が異なる可能性も否定できない。この点については今後明らかにすべき課題であろう。一方、リンゴ酸脱水素酵素については活性は存在するものの、免疫学的手法では検出できなかった。この点については、用いた抗体がパーオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼとは異なり、動物の酵素由来であったため抗体との反応性が低かったものと考えられる

第7節 まとめ

本章の実験結果からエンドウ、ササゲ分離細胞壁から NaCl で可溶化画分中に O_2^- 生成活性が存在することが明らかとなった。本 O_2^- 生成活性に対する活性酸素生成酵素の阻害剤の影響について調べた結果、b 型のチトクロームに結合し、 O_2^- の生成を阻害するイミダゾール、ピリジン (Iizuka et al. 1985)、フラビントタンパク質に作用し O_2^- の生成を阻害するキナクリン、DPI (Cross and Jones 1991) ではほとんど影響を受けなかった。これに対してペルオキシダーゼの阻害剤である SHAM は細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成を顕著に阻害した。このように異なる作用点を持つ 2 種の膜系 NADPH oxidase 阻害剤では阻害されず、ペルオキシダーゼの阻害剤である SHAM で阻害されたことから、細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成にはパーオキシダーゼが関与している可能性は高い。Halliwell (1978) は西洋ワサビのパーオキシダーゼを用いて細胞壁における H_2O_2 、 O_2^- の生成反応について詳細に研究し、その過程を Table 5-3 に示したように報告している。これによればパーオキシダーゼによる O_2^- 、 H_2O_2 の生成活性は、マンガンイオン、*p*-CA が必要であり、カタラーゼ存在下で阻害されることになる。エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成はマンガンイオン、*p*-CA の非存在下で著しく低下し、カタラーゼによって濃度依存的に阻害されることが判明している (三宅 1995)。この結果は上記の Halliwell (1978) が示した西洋ワサビのパーオキシダーゼの実験と一致しており、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成は細胞壁結合型のパーオキシダーゼによって触媒されているという考えを支持する。エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中の O_2^- 生成活性は褐紋病菌由来のエリシターで非特異的に活性化され、サプレッサーによって種特異的に制御されることが明らかとなった。この結果から、細胞壁における O_2^- 生成がエンドウ、ササゲの初期防御応答に重要な役割を持つ可能性が示唆され、無傷エンドウ、ササゲ葉において生成される O_2^- の供

給に関与している可能性が考えられる。また、この結果は細胞壁における O_2^- 生成系（パーオキシダーゼ）と病原菌シグナルの受容体が密接に関連していることを示しているものと考えられる。一方、第2、3章の実験結果から、細胞壁 ATPase が病原菌シグナルの受容体と複合体として存在している可能性が示唆されている。細胞壁 ATPase と O_2^- 生成系（パーオキシダーゼ）の関連については、西洋ワサビのパーオキシダーゼ抗体を用いた免疫沈降によって ATPase がパーオキシダーゼと共沈し、さらには細胞壁 ATPase の精製過程におけるパーオキシダーゼの挙動が一致していた（第3章）。また機能的にも細胞壁における O_2^- 生成が P 型 ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸で阻害され（Table 5-2）、細胞壁 ATPase の基質となる ATP、CTP、GTP、UTP を添加することで O_2^- 生成活性が上昇した（三宅 1995）。以上の結果から、病原菌シグナルの受容体、細胞壁 ATPase、 O_2^- 生成系（パーオキシダーゼ）が1つの装置として存在、機能している可能性が強く示唆される。

近年、植物と病原菌の相互作用の過程の極めて初期段階で O_2^- 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ 等の活性酸素種が生成される”Oxidative burst”という現象が数多く報告されている（Baker and Orlandi 1995）。Oxidative burst の際に活性酸素種の供給に関わる酵素についてはさまざまな植物を用いて報告されている（Table 5-3）。Auh and Murphy (1995) はバラの培養細胞に疫病菌（*Phytophthora* spp.）のエリシターを処理しておこる O_2^- 、 H_2O_2 の生成は原形質膜に局在する NADPH oxidase が関与していることをいくつかの阻害剤を用いて報告している。また、同様に Doke and Miura (1995) は非親和性ジャガイモ疫病菌接種、あるいは HWC エリシターを処理したジャガイモ塊茎より調製したミクロソーム画分に NADPH 依存性の O_2^- 生成活性が存在することを報告しており、原形質膜に局在する NADPH oxidase が O_2^- 生成に関与していることを示している。一方、カリフラワーから調製した原形質膜を用いた報告では、原形質膜に局在するパーオキシダーゼが O_2^- 生成を触媒すると報告されている（Askerlund et al. 1987）。しかし、細胞壁に局在するパーオキシダーゼが O_2^- 、 H_2O_2 の生成に関与しているとの報告も多数存在する（Bolwell 1995, Gross et al. 1977, Halliwell 1978, Marder and Amberg-Fisher 1982, Marder and Fussl 1982）。本章実験の結果は O_2^- 、 H_2O_2 の生成には細胞壁に局在するパーオキシダーゼが関与しているという報告と一致する。

エリシターによる O_2^- 、 H_2O_2 生成の活性化のメカニズムについてはさまざまな報告が存在し、ダイズの培養細胞を用いた系ではエリシター処理によっておこる H_2O_2 の生成の活性化はフォスホリパーゼ C (PLC) の阻害剤であるネオマイシン、プロテインキナーゼ阻害剤の K-252a で阻害される（Legendre et al. 1993）。この系における H_2O_2 生成の活性化は「膜局在型受容体でのエリシターの認識→ポリフォスフォイノシチド代謝系 (PI、PIP キナーゼ) の活性化→ PLC の活性化→プロテインキナーゼの活性化→ NADPH oxidase の活性化→ H_2O_2 の生成の増高」という過程を経て起こるものと推察できる。一方、インゲンの培養細胞では「膜局在型受容体でのエリシターの認識→イオンチャンネルの活性化→細胞外 pH のアルカリ化→至適 pH がアルカリにある細胞壁パー

オキシダーゼの活性化→ H_2O_2 の生成の増高」という過程を経て起こると報告されている (Bolwell 1995)。本研究の結果からは褐紋病菌エリシター処理によるエンドウ、ササゲの細胞壁における $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ 生成活性化のメカニズムの詳細は不明であるが、しかしながら、第3章の実験結果から、病原菌シグナルの受容体と非常に密接な関係にあると考えられる細胞壁 ATPase とパーオキシダーゼが複合体として存在、機能している可能性が示唆され、さらに本章の第1節の実験より、 O_2^- 生成活性は細胞壁 ATPase を阻害するオルトバナジン酸によって顕著に阻害されたが、細胞壁 ATPase を阻害しないネオマイシンは同様に O_2^- 生成活性を抑制しなかった。以上の結果から、 $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ 生成に関与するパーオキシダーゼは病原菌シグナルの受容体、および細胞壁 ATPase の近傍に存在し、「細胞壁局在型受容体→細胞壁 ATPase の活性化→相互作用する細胞壁結合型パーオキシダーゼの活性化→ $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ の生成の増高」という過程を経て起こると推察され、この反応の最終段階では細胞外の SOD が関与している (Ogawa et al. 1996, Steffen and Wingsle 1994) 可能性も否定できない。褐紋病菌のサブレッサーの一次作用点が ATPase にあると仮定すると、宿主であるエンドウの細胞壁 ATPase 活性を阻害することによって、褐紋病菌は O_2^- 生成の増高を回避しているものと推察できる。

細胞外あるいは細胞壁で活性酸素種の生成が起こることについては以前から報告されており、上記のように最近では病原菌認識後の Oxidative burst にも関与している可能性が示唆されている。しかしながら、これらの活性酸素生成反応に必要な NADH 等の電子供与体が細胞外に存在するか、あるいは存在しても Oxidative burst やリグニン化に必要な活性酸素を供給できる十分量の電子供与体が存在しているか否かについては議論的になっている。しかし、近年の報告では細胞間液中には数 μM 程度の NAD^+ が存在すること (Shinkle et al. 1992)、また、酸化された NADH (NAD^+) を還元するリンゴ酸脱水素酵素の存在が示されており (Lii et al. 1989, Frenhner and Conn 1987, Gross 1977)、NADH の酸化、還元を繰り返す、サイクルの存在が想定できる。実際、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中にリンゴ酸脱水素酵素活性が存在することが明らかとなり、細胞外の NADH の供給に重要な役割を持っているものと考えられる。また、Bolwell (1996) によると、エリシター処理したインゲン培養細胞の細胞間液には NAD(P)H 、アスコルビン酸、グルタチオン、システインとも異なる未同定の還元物質が存在し、本物質はエリシター刺激に応答して細胞内から供給されると考えられている。このように、エンドウ、ササゲにおいてもエリシターや病原菌感染の刺激により細胞内から NADH をはじめとする電子供与体の供給量が増加するようなシステムが存在しているのかもしれない。

細胞壁をはじめとするアポプラストにパーオキシダーゼが存在することは、古くから知られていた。パーオキシダーゼはリグニン化、細胞壁タンパク質の架橋反応等、植物の生長や病害抵抗性と深く関わっている。一般的にパーオキシダーゼの活性は過酸化水素をはじめとする基質の供給によって制御されていると考えられてきた。エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中にはパーオキシダーゼ活性が存在しており、褐紋病菌由来の

エリシター、サプレッサーによって制御されることが明らかとなった。この結果は、パーオキシダーゼによって触媒される O_2^- の生成がこれら病原菌シグナルによって制御された結果と一致する。また、このように可溶化後のパーオキシダーゼ活性が病原菌シグナルによって直接制御を受けることから、パーオキシダーゼによって触媒されるいくつかの防御応答の発現は、従来考えられていた基質の供給による活性制御に加えて、酵素自体の活性変化も重要な要因であろう。

また、本章の実験からエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中にはアスコルビン酸オキシダーゼ活性が存在し、本活性も褐紋病菌エリシター、サプレッサーによって制御されることが明らかとなった。防御応答におけるアスコルビン酸オキシダーゼの役割については定かではない。アスコルビン酸は細胞外に一定程度含まれており、生理学的作用としては O_2^- の消去、および NADH の酸化、フェノール成分の過酸化、細胞壁タンパク質の架橋反応等の酸化、過酸化反応を抑制、あるいはアスコルビン酸パーオキシダーゼの基質として細胞外での過酸化水素の消去等、アポプラストにおける酸化、還元反応の制御に関わっていると考えられている (Otter and Polle 1994, Takahama 1993, Takahama and Oniki 1992, 1994)。このような報告を参考に考えると、エリシターによって活性化されたアスコルビン酸オキシダーゼは、酸化反応を抑制するアスコルビン酸をモノデヒドロアスコルビン酸に変換することによって消去し、細胞外での O_2^- 、 H_2O_2 の生成、リグニン化、細胞壁タンパク質の架橋反応等、防御応答に関わる酸化(過酸化)反応を進行させる環境を作り出すのに重要な役割を持っているのではないかと考えられる。一方、この過程で生じたモノデヒドロアスコルビン酸は、細胞外に存在するモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼによって再度、アスコルビン酸へ変換されるという、一連の酸化、還元反応で細胞外の環境の維持がなされているものと考えられる (Dalton et al. 1993)。

以上述べたように、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分にはパーオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素活性、 O_2^-/H_2O_2 生成活性が存在し、リンゴ酸脱水素酵素を除く酵素活性はエンドウ褐紋病菌のエリシター、サプレッサーによって制御されることが判った。この結果を総合的に考察すると、病原菌シグナルの受容後、活性酸素種の生成をはじめとする細胞壁レベルでの酸化、還元状態が速やかに変化することが考えられ、またこの変化が防御応答の発現に非常に重要な役割を持っていることが示唆される。また、植物は速やかな酸化、還元状態の変化を引き起こすため、細胞壁中に酸化、還元酵素を病原菌シグナルの受容体、あるいは ATPase と近接して複合体(装置)として配置しているものと想像できる。

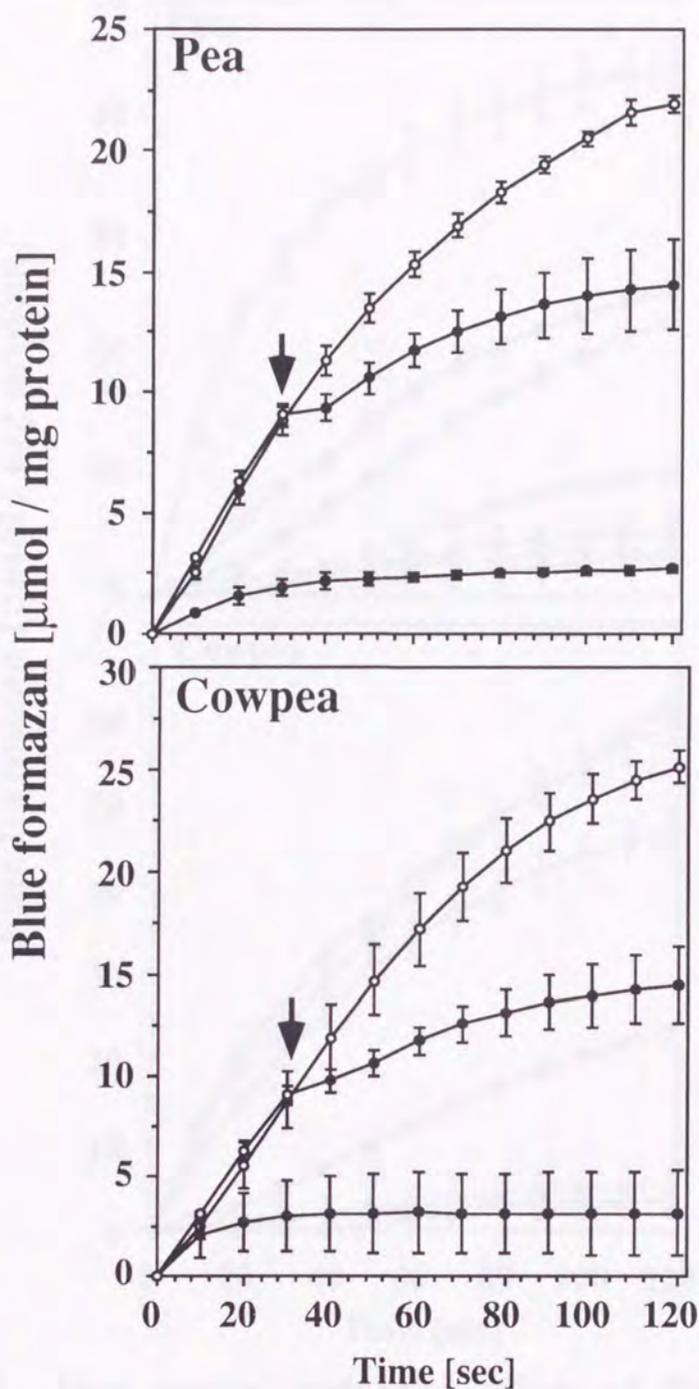


Fig. 5-1 Blue formazan-formation in the fraction solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at 25°C for 2 min in Tris-MES (pH 6.5) containing 20 mM MnCl₂, 2.5 μg / ml NBT, 0.5 mM NADH and 0.5 mM *p*-coumaric acid in the absence (○) or presence (■) of 100 units of SOD. The amount of blue formazan was determined by the method of Nathan et al. (1969). Arrow heads indicated the addition of 100 units of SOD 30 sec after the start of reaction. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

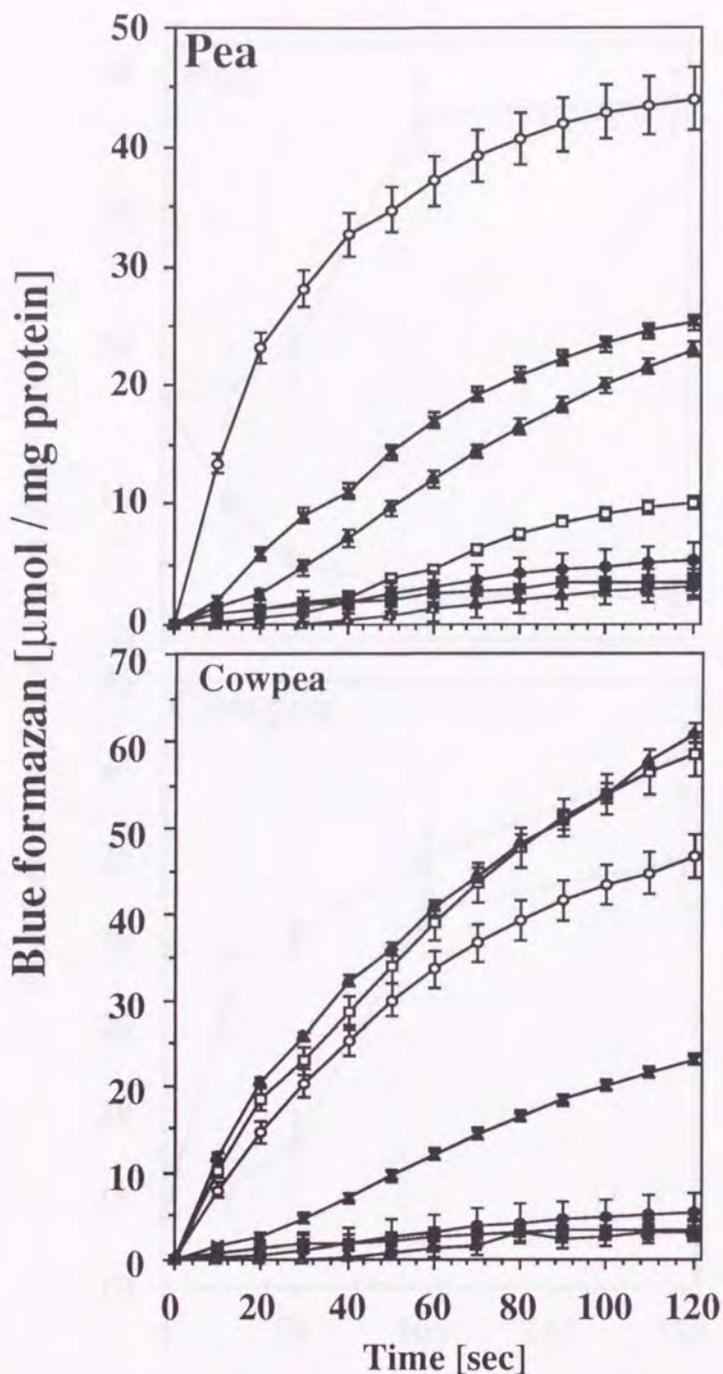


Fig. 5-2 Time course study and effects of the elicitor and suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on blue formazan formation in the fraction solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at 25°C for 2 min in Tris-MES (pH 6.5) containing 20 mM MnCl₂, 2.5 μg / ml NBT, 0.5 mM NADH and 0.5 mM *p*-coumaric acid in the absence (×) or presence of 100 units of SOD (△), 100 μg / ml of elicitor alone (○), 100 μg / ml of suppressor alone (□), the elicitor plus suppressor (▲), elicitor plus SOD (○) and suppressor plus SOD (■). The blue formazan was determined by the method of Nathan et al. (1969). Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

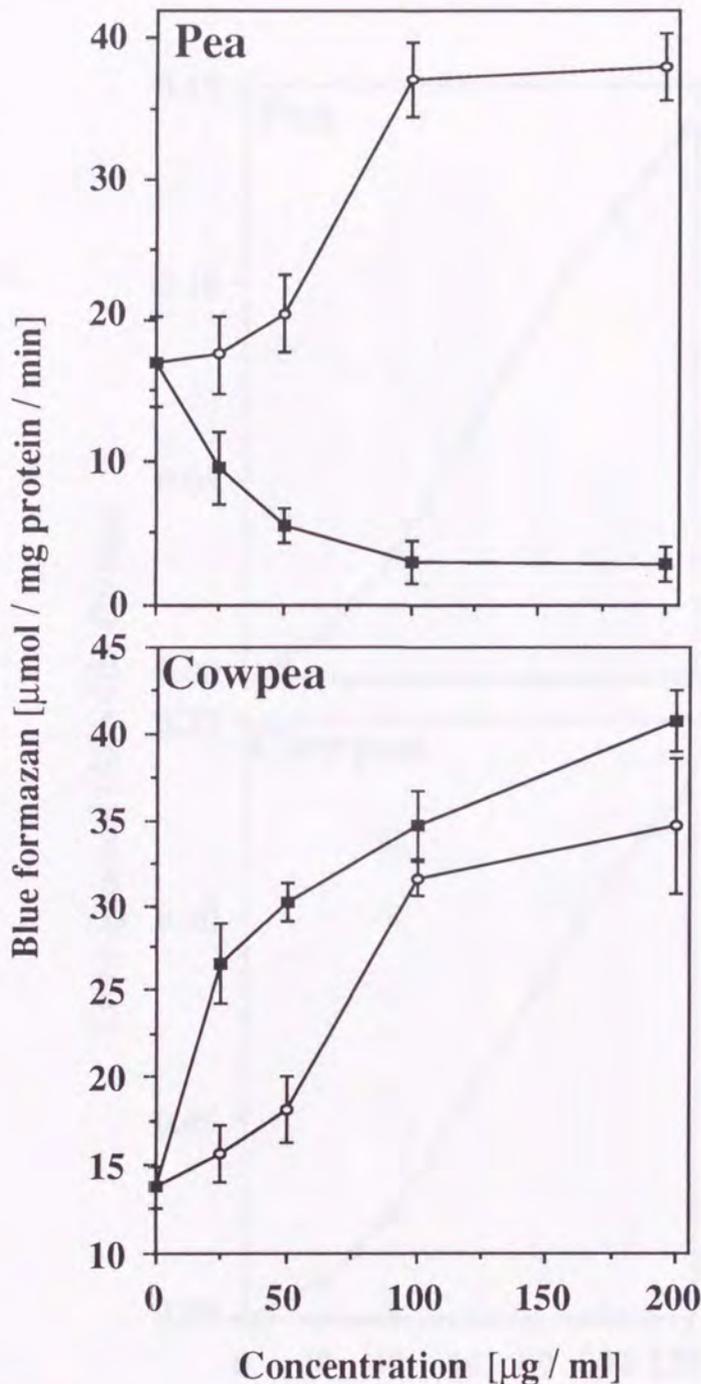


Fig. 5-3 Induction or suppression by the elicitor and suppressor from *Mycosphaerella pinodes* of blue formazan formation in the fraction solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at 25°C for 2 min in Tris-MES (pH 6.5) containing 20 mM MnCl₂, 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ NBT, 0.5 mM NADH and 0.5 mM *p*-coumaric acid in the absence (0 $\mu\text{g} / \text{ml}$) or presence of several concentrations of the elicitor alone (○) or suppressor alone (■). The blue formazan was determined by the method of Nathan et al. (1969). Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

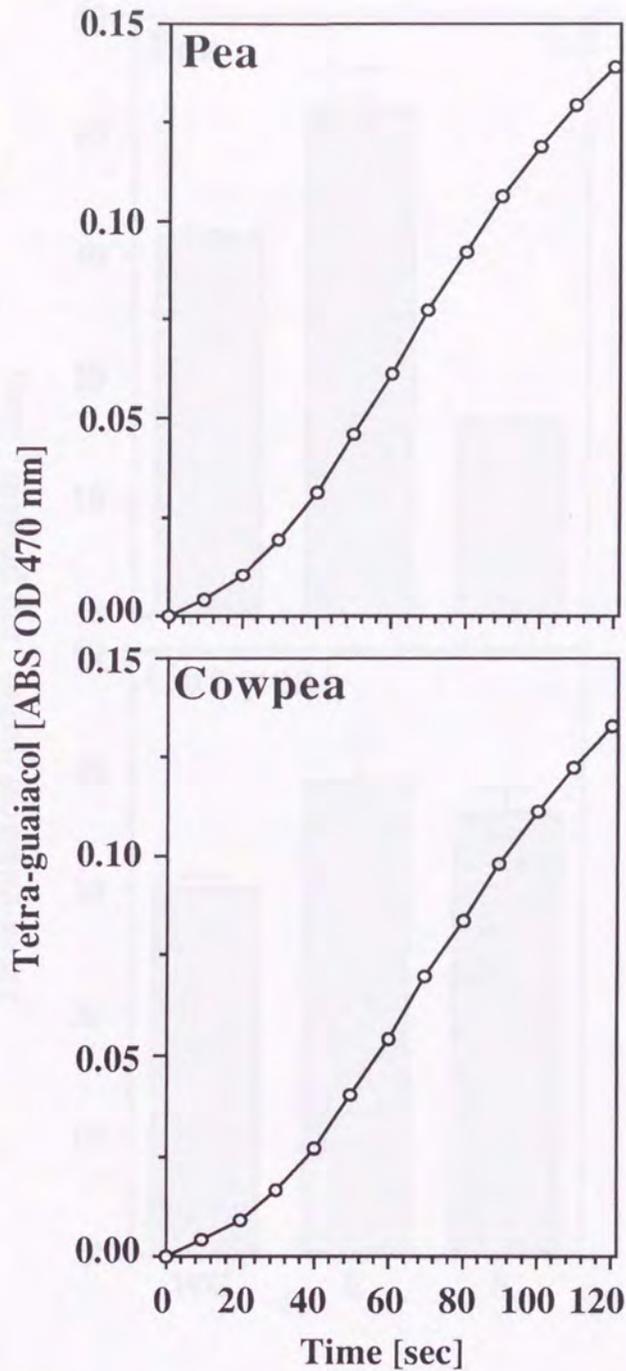


fig. 5-4 The activity of guaiacol peroxidase in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at 25°C for 2 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.0) containing 0.5 mM guaiacol and 1 mM H₂O₂. The specific activities of guaiacol peroxidase in pea and cowpea fraction were 31.57 ± 0.72 and 30.13 ± 1.17 ($\mu\text{mol} / \text{mg}$ protein / min), respectively.

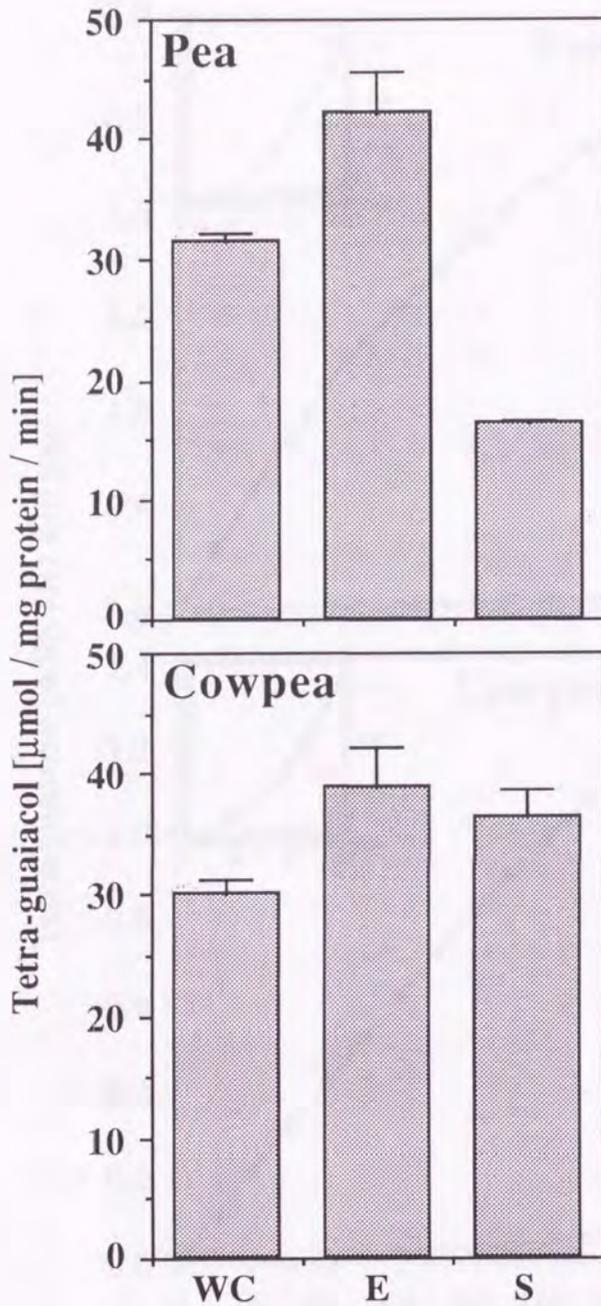


fig. 5-5 Effects of the elicitor and suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on the activity of guaiacol peroxidase in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at 25°C for 2 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.0) containing 0.5 mM guaiacol and 1 mM H₂O₂ in the absence (WC) or presence of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ elicitor (E) or 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ suppressor (S) from *M. pinodes*. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

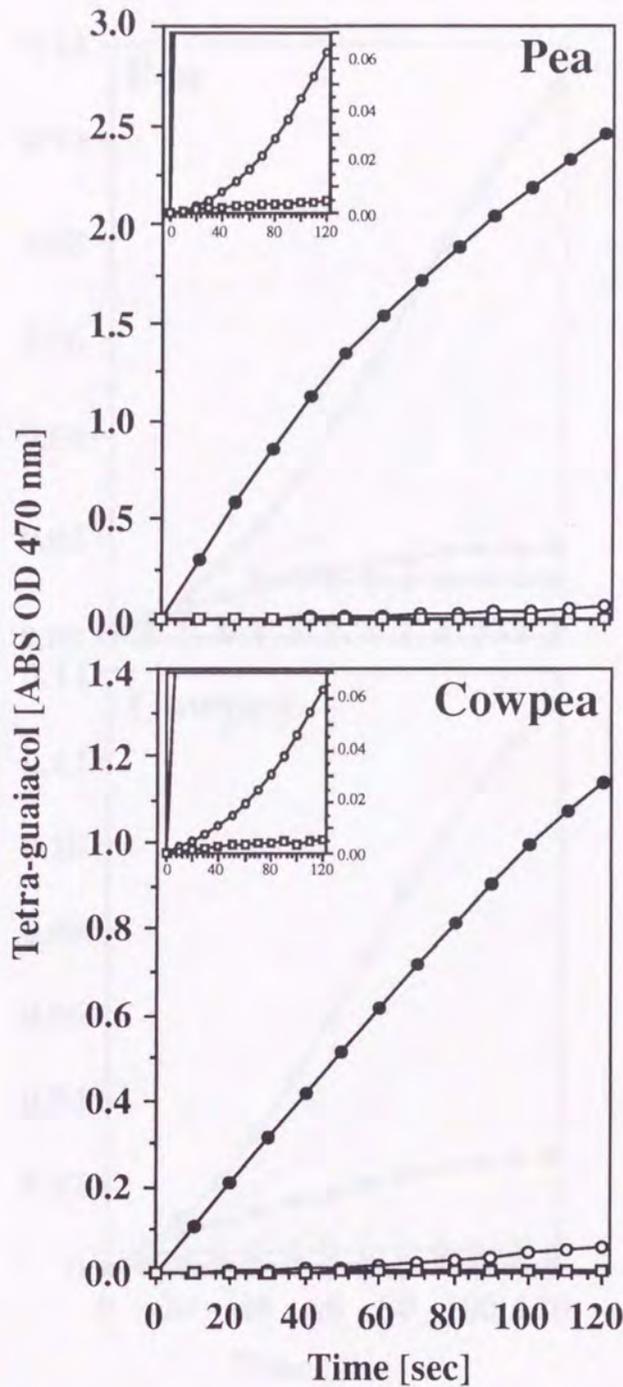


fig. 5-6 Generation of H_2O_2 during NADH-oxidation in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at $25^\circ C$ for 2 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) containing 0.5 mM guaiacol in the absence (\square) or presence of (\circ) 0.5 mM NADH, 20 mM $MnCl_2$ and *p*-coumaric acid. The assay was also carried out in the reaction mixture containing 1 mM H_2O_2 (\bullet) as a control. The inset showed the same data of which Y axis was magnified.

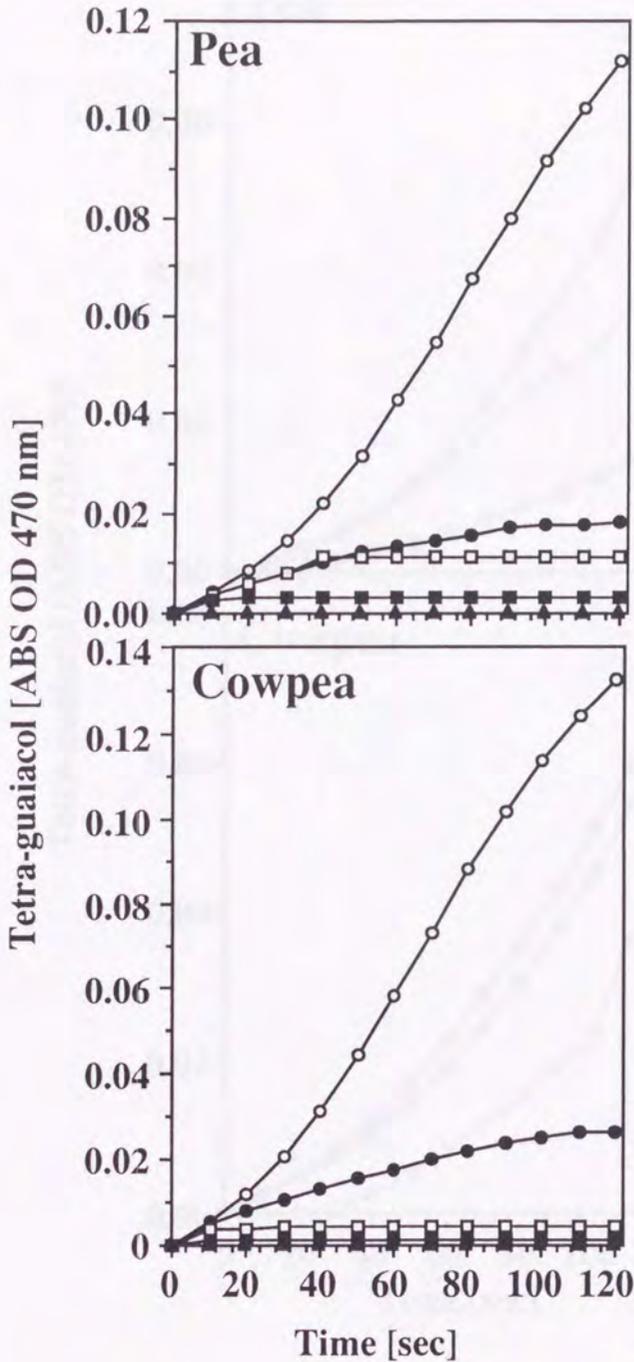


fig. 5-7 Effect of catalase on generation of H_2O_2 during NADH-oxidation in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at $25^\circ C$ for 2 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) containing 0.5 mM guaiacol, 0.5 mM NADH, 20 mM $MnCl_2$ and *p*-coumaric acid in the absence (○) or presence of catalase at the concentration of 5 (●), 10 (□), 25 (■) and 50 units (▲).

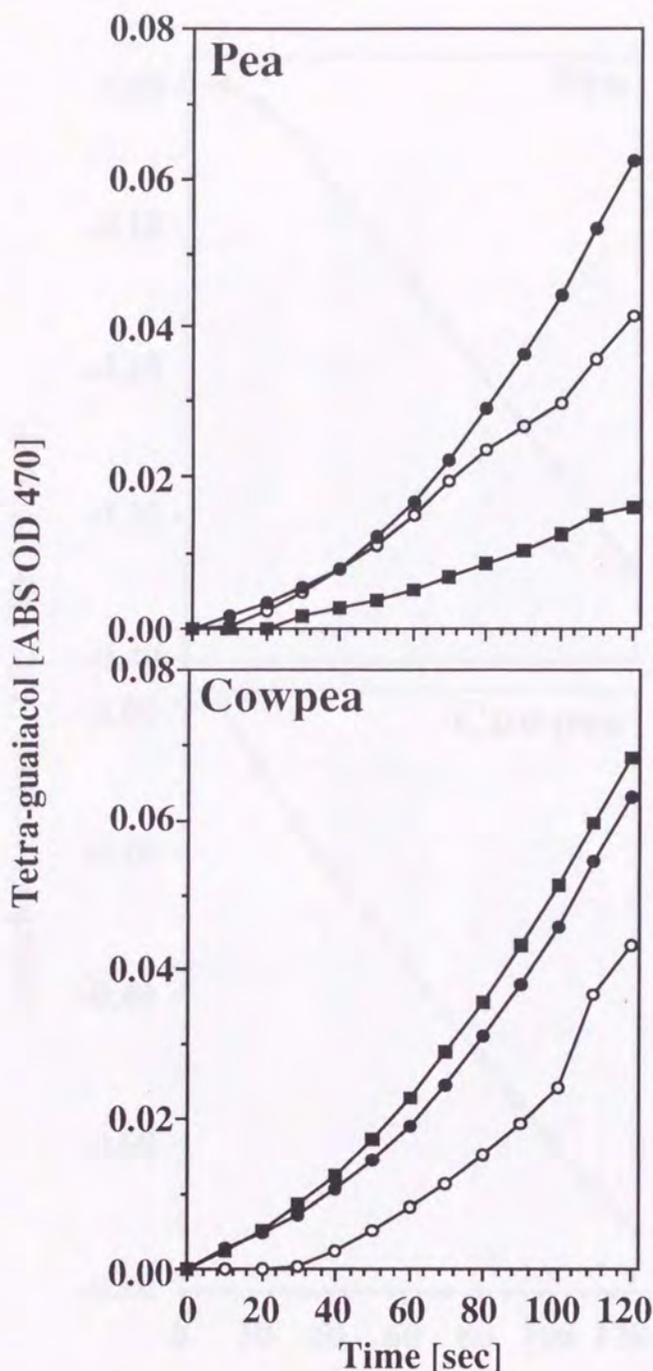


fig. 5-8 Effects of the elicitor and suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on generation of H_2O_2 during NADH-oxidation in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at $25^\circ C$ for 2 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) containing 0.5 mM guaiacol, 0.5 mM NADH, 20 mM $MnCl_2$ and *p*-coumaric acid in the absence (○) or presence of 100 µg / ml elicitor (●) or 100 µg / ml suppressor from *M. pinodes* (■).

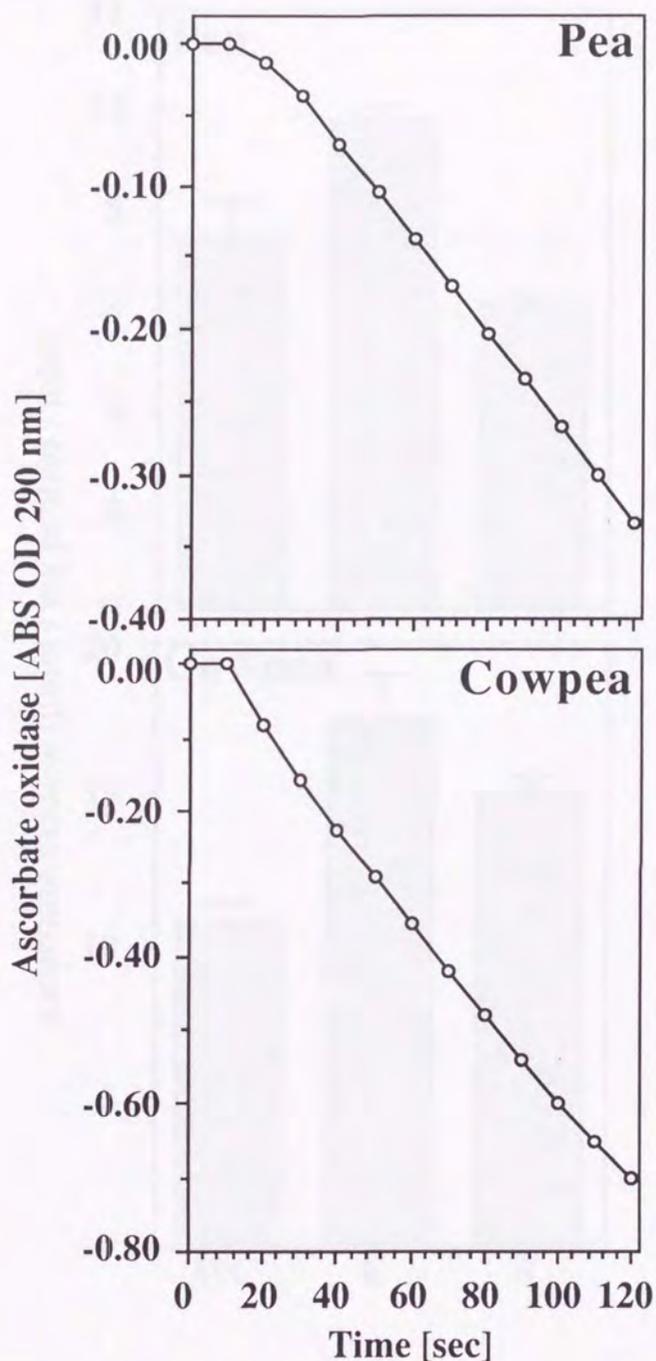


fig. 5-9 The activity of ascorbate oxidase in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at 25°C for 2 min in 20 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 0.5 mM ascorbic acid. The specific activities of ascorbate oxidase in pea and cowpea fraction were 7.45 ± 0.69 and 10.65 ± 0.76 ($\mu\text{mol} / \text{mg protein} / \text{min}$), respectively.

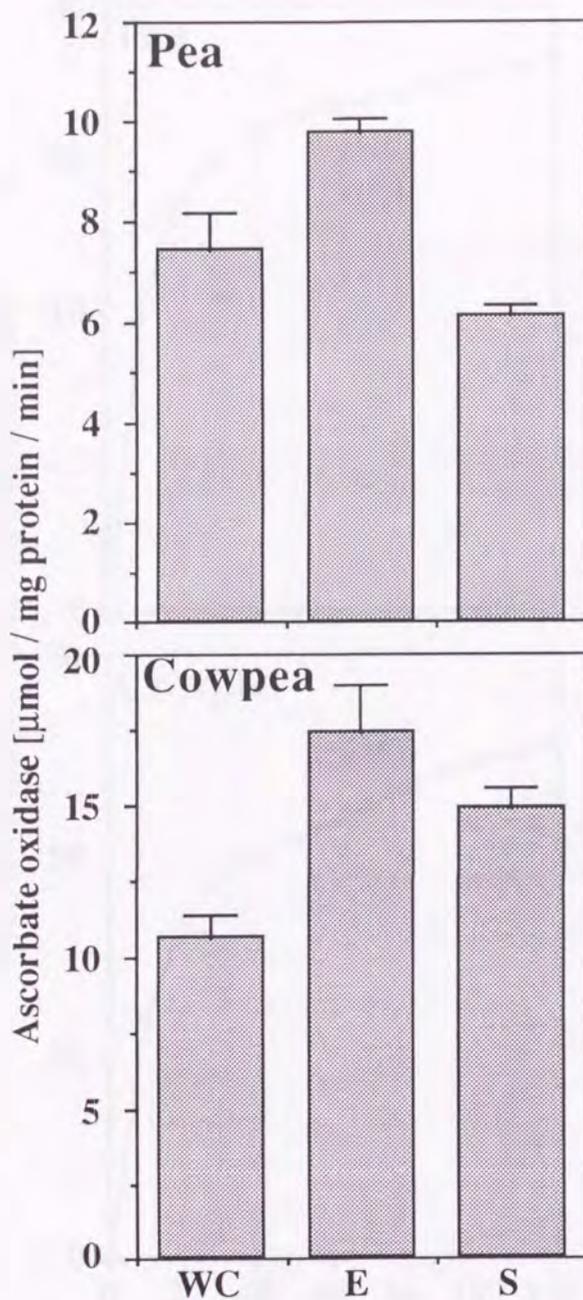


fig. 5-10 Effects of the elicitor and suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on the activity of ascorbate oxidase in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at 25°C for 2 min in 20 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 0.5 mM ascorbate in the absence (WC) or presence of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ elicitor (E) or 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ suppressor (S) from *M. pinodes*. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

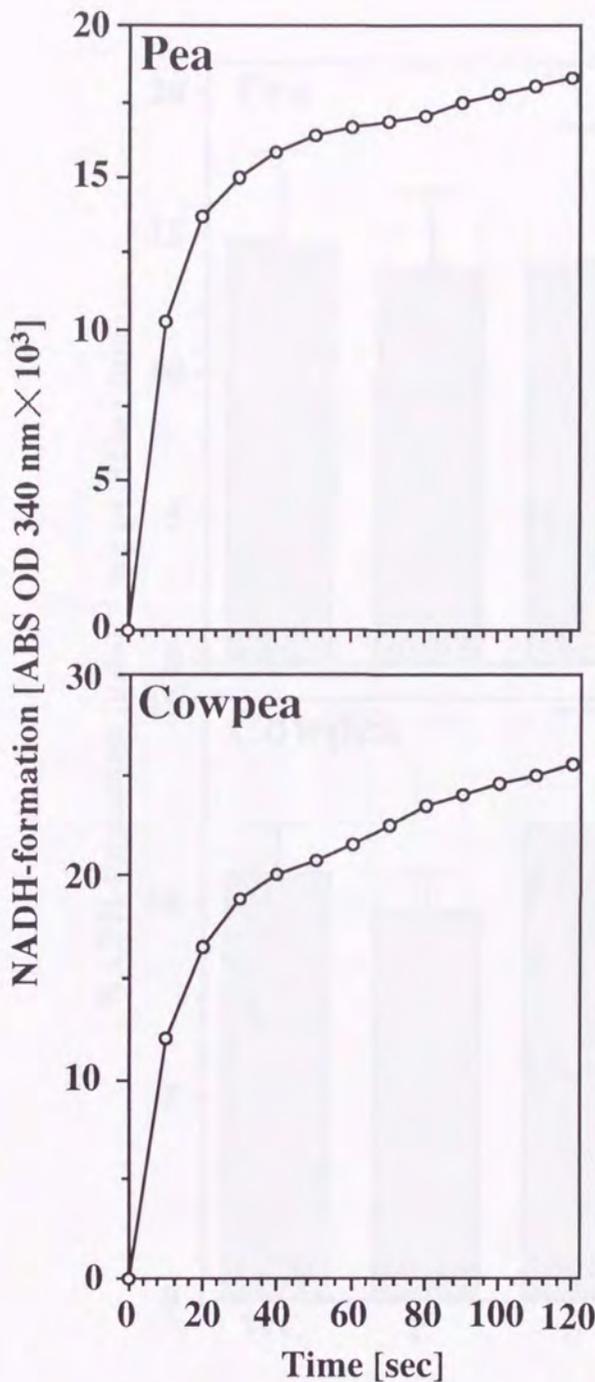


fig. 5-11 The activity of malate dehydrogenase in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at 25°C for 2 min in 20 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 0.5 mM NAD⁺ and 1 mM malate. The specific activities of malate dehydrogenase in pea and cowpea fractions were 14.63 ± 3.27 and 10.63 ± 1.27 ($\mu\text{mol} / \text{mg protein} / \text{min}$), respectively.

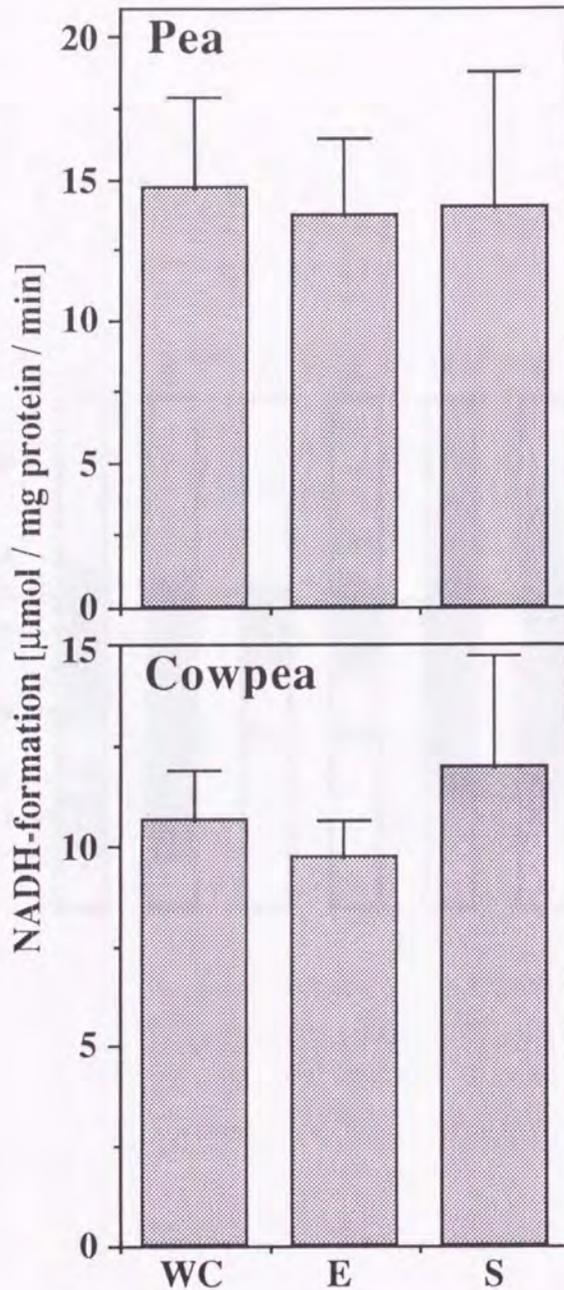


fig. 5-12 Effects of the elicitor and suppressor from *Mycosphaerella pinodes* on the activity of malate dehydrogenase in the fractions solubilized from cell walls of pea and cowpea. The assay was carried out at 25°C for 2 min in 20 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 0.5 mM NAD⁺ and 1 mM malate in the absence (WC) or presence of the elicitor (E) or suppressor (S) from *M. pinodes* at the concentration of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

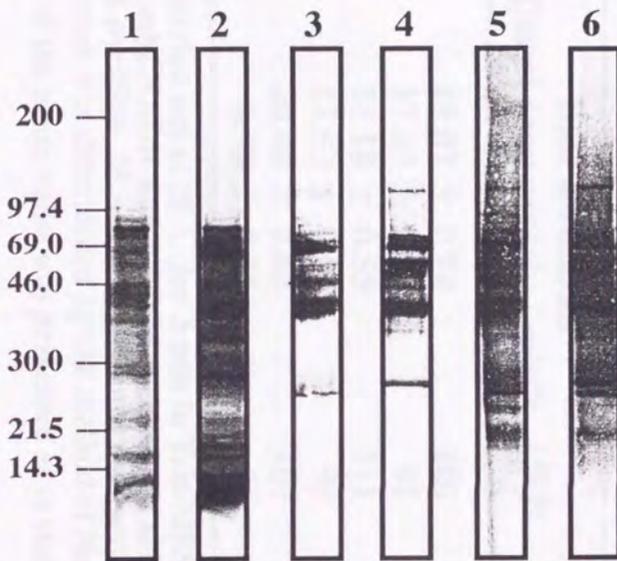


Fig. 5-13 Western blot analysis of proteins solubilized from cell walls of pea and cowpea seedlings. One micrograms of protein from pea (lane 1, 3 and 5) and cowpea (lane 2, 4 and 6) fractions were separated by SDS-PAGE and were subjected to silver-staining (lane 1 and 2), or were electrophoretically transferred to PVDF membranes. The bolts were subjected to an immunoblot analysis with a rabbit antiserum raised against a ascorbate oxidase from cucurbita (lane 3 and 4) or a horseradish peroxidase (lane 5 and 6).

Table 5-1. Effects of several inhibitors on blue formazan-formation in solubilized cell wall fractins of pea and cowpea

	Pea		Cowpea	
	Blue formazan [$\mu\text{mol} / \text{mg protein} / \text{min}$] ^a	(%) ^b	Blue formazan [$\mu\text{mol} / \text{mg protein} / \text{min}$] ^a	(%) ^b
Water control	19.07 \pm 0.74	100	19.39 \pm 0.65	100
+Imidazole	17.39 \pm 0.81	91	21.08 \pm 1.32	108
+Pyridine	21.18 \pm 0.55	111	18.96 \pm 0.66	98
+DPI	17.52 \pm 0.69	92	18.29 \pm 0.76	94
+Quinacrine	20.44 \pm 0.68	107	22.73 \pm 1.15	117
+SHAM	6.78 \pm 0.36	36	8.43 \pm 0.35	43

^a The assay was carried out at 25 °C for 2 min in Tris-MES (pH 6.5) containing 20 mM MnCl₂, 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ NBT, 0.5 mM NADH and 0.5 mM *p*-coumaric acid in the absence or presence of 10 mM imidazole, 20 mM pyridine, 25 μM DPI, 0.5 mM quinacrine or 5 mM SHAM, and the amount of formed blue fromazan was determined by the method of Nathan et al. (1969).

^b The percentage of the mean value was presented as to that of the water control.

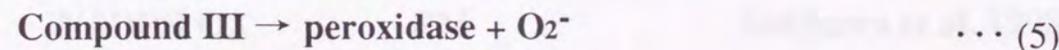
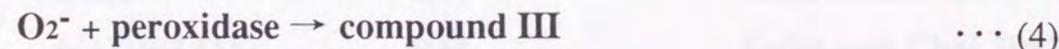
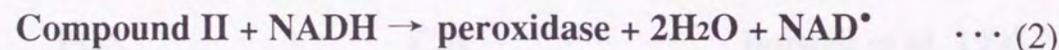
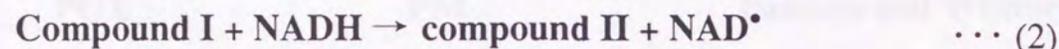
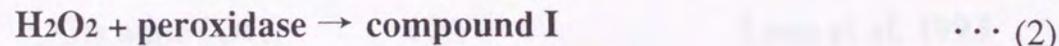
Table 5-2. Effects of orthovanadate and neomycin on blue formazan-formation in the solubilized cell wall fractions

	Pea		Cowpea	
	Blue formazan [$\mu\text{mol} / \text{mg protein} / \text{min}$] ^a	(%) ^b	Blue formazan [$\mu\text{mol} / \text{mg protein} / \text{min}$] ^a	(%) ^b
Water control	19.07 \pm 0.74	100	19.39 \pm 0.65	100
+Na ₃ VO ₄	8.68 \pm 0.75	46	2.90 \pm 0.47	15
+Neomycin	19.18 \pm 1.16	101	19.38 \pm 1.73	100

^a The assay was carried out at 25 °C for 2 min in Tris-MES (pH 6.5) containing 20 mM MnCl₂, 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ NBT, 0.5 mM NADH and 0.5 mM *p*-coumaric acid in the absence or presence of 1 mM Na₃VO₄ or 1 mM neomycin, and the amount of formed blue fromazan was determined by the method of Nathan et al. (1969).

^b The percentage of the mean value was presented as to that of the water control

Table 5-3 Reaction of NADH-oxidation and O₂⁻ / H₂O₂-formation as presented by Haliwell (1977)



(1) Decreased by SOD (Starting reaction); (2) Inhibited by catalase (Peroxidatic reactions); (3) Stimulated by Mn²⁺; (4) Inhibited by phenols; (5) Accelerated by phenols; (6) Accelerated by SOD.

Table 5-4 The responsible enzymes for generation of active oxygen species in plants

Plants	Enzyme	Localization	Reference
Barley	Germine (OO)	CW	Lane et al. 1993
Commelina	POX	PM	Pantoja and Willmer 1988
French bean	Cyt P-450	MS	Rodgers et al. 1993
French bean	POX	CW	Bolwell et al. 1995
Horseadish	POX	CW	Gross et al. 1977
Lierwort	POX	CW	Isida et al. 1987
Potato	NADPH OX	PM	Doke and Chai 1985
Rice	NADPH OX	PM	Sekizawa et al. 1990
Rose	NADPH OX	PM?	Auh and Murphy 1995
Spruce	NADH OX	CW	Otter and Polle 1994
Tobacco	POX	CW	Mader and Amberg-Fisher 1982
Tomato	POX	PM?	Vera-Estrella et al. 1993

Cyt P-450, cytochrome P-450; CW, cell wall; MS, microsome; NADH OX, NADH oxidase; NADPH OX, NADPH oxidase; OO, oxalate oxidase; PM, plasma membrane; POX, peroxidase

第6章 抵抗反応における細胞壁の役割

～細胞壁－原形質膜間の情報伝達：インテグリンの関与～

エンドウ褐紋病菌と植物の相互作用において、細胞壁が病原菌シグナルの受容、あるいは宿主特異性決定に重要な役割を持つことが第2、3、4章の実験結果から示唆された。しかしながら、細胞壁における病原菌の認識後、どのような経路で情報が原形質膜、細胞内に伝達されるのか、あるいはどのような分子が情報伝達に関わっているかについては明らかではない。動物細胞では細胞が細胞外マトリクスと結合することにより (Fig. 6-1)、細胞骨格の背向変化の制御、細胞増殖、細胞形態、細胞間の結合、あるいは細胞外からの情報伝達をはじめとする様々な生命活動に重要な役割を担うと報告されている (Edwards 1995, Ruslahti and Piershbacher 1987)。細胞と細胞外マトリクスとの結合にはフィブロネクチン (Hynes and Yamada 1982)、ヴィトロネクチン (Smith and Cheresch 1988)、コラーゲン (Dedhar et al. 1987) をはじめとする細胞外糖タンパク質と、原形質膜に存在するフィブロネクチン受容体、ヴィトロネクチン受容体等のインテグリンファミリーという膜貫通型タンパク質が関与しており、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (Arg - Gly - Asp : RGD) というペプチド配列を介して行われている (Edwards 1995, Ruslahti and Piershbacher 1987)。一方、植物においても細胞壁と原形質膜 (細胞内) の連結が存在し (Fig. 6-1)、オオセキショウモの葉肉細胞の原形質流動が RGD 配列を含む合成ペプチドによって異常が起こることや (Ryu et al. 1996)、RGD 配列を含む合成ペプチドを含む培地で培養したダイズの培養細胞は、細胞壁形成や細胞分裂の異常が認められ (Schindler et al. 1989)、さらに抗-ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体と相互作用する原形質膜タンパク質が存在すると報告されている。そこで本章の実験では細胞壁－原形質膜間の情報伝達における、細胞壁－原形質膜連結の可能性について調べた。

第1節 RGD ペプチドのエンドウの防御応答に対する影響

エンドウの動的抵抗反応における細胞壁－原形質膜間の連結の関与について、インテグリンと細胞外マトリクスの結合に重要な RGD 配列を含む合成ペプチドを用いて、エンドウの防御応答に対する影響について調べた。なお、対照区として動物細胞における実験で一般的に用いられている、RGD のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した RGE 配列を含むペプチドをコントロールペプチドとして用いた。

第1項 RGD ペプチドのピサチンの蓄積に対する影響

まずエンドウの動的抵抗反応の1つであるピサチン蓄積に対する RGD ペプチドの影響を調べた。

(1) 方法

播種後、6 - 7 日のエンドウ黄化胚軸の中央部を 1.5 cm の長さに切断し、さらに軸方

向に沿って二分し、アルミホイル上に滴下したエリシター、RGD ペプチド、RGE ペプチド、エリシターと各々のペプチドの混合液、および対照区として蒸留水に切断面が接するようにして置いて、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で湿室下で 18 時間静置した。また、RGD ペプチド、RGE ペプチドの前処理における影響については、調製したエンドウ胚軸の切断面をあらかじめ RGD ペプチド、RGE ペプチド、および対照区としての脱イオン水に浸し、0、1、3、6 時間の静置の後、各処理液に移し変え、さらに 18 時間静置した。ピサチンの抽出および定量は Masuda et al. (1983) の方法に準じて行った。各液を処理後 18 時間後の胚軸をエタノールで固定し、 80°C で 30 分間抽出し、抽出液を減圧下で乾固した。残留分をピサチン定量用の溶媒 $50 \mu\text{l}$ に溶解後、 $10 \mu\text{l}$ をピサチン定量に供試した。

処理液組成 (終濃度)

水対照区	: 脱イオン水
エリシター単独処理区	: $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ エリシター
RGD ペプチド単独処理	: $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP; Takara)
RGE ペプチド単独処理区	: $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro (GRGESp; Takara)
エリシター + RGD 混合処理区	: $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ エリシター + $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ GRGDSP
エリシター + RGD 混合処理区	: $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ エリシター + $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ GRGESp

ピサチン分析装置、分析条件

- ・島津高速液体クロマトグラフ LC - 3A
- ・島津高速液体クロマトグラフ用紫外線分光光度計検出器 2PD - 3A
- ・分析カラム : E. Merck Lichrosorb Si - 100 (4 mm × 250 mm)
- ・溶媒 : n - ヘキサン / テトラヒドロフラン / 酢酸 = 88 / 12 / 0.5 (v / v / v)
- ・流速 : 2.0 ml / min
- ・圧力 : $80 \text{ kg} / \text{cm}^2$
- ・検出波長 : UV. 309 nm
- ・検出感度 : Abs. 0.02
- ・分析温度 : 25°C

本分析条件では、ピサチンは保持時間約 5.8 分に溶出される (Masuda et al. 1983)。ピサチン蓄積量は精製標品の OD 309 nm における吸光度 (OD309 nm 1.0 = $43.6 \mu\text{g} / \text{ml}$) から標準直線を作成し換算した。

(2) 結果

RGD、RGE ペプチド単独処理ではピサチン蓄積を誘導することはなかった。また、対照区として用いた RGE ペプチドはエリシターで誘導されるピサチン蓄積に対して、同時処理、および前処理のいずれの場合においても阻害効果は認められなかった。一方、RGD ペプチドはエリシターと同時処理した場合には有意差は認められないもののピサチン蓄積を抑制する傾向が認められた。さらに、RGD ペプチドを前処理した場合には前処理時間の長さによって阻害効果を示し、エリシター単独処理と比較して、前処理 1 時間では約 40 %、3 時間では約 60 %、6 時間では約 80 % のピサチン蓄積を抑制した。特に 6 時間の前処理によってほぼ水対照区レベルまでピサチン蓄積を抑制された (Fig. 6-2. 3)。即ち、RGD ペプチドは見かけ上、褐紋病菌サプレッサーや、情報伝達に関わると推定される ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸、フォスフォリパーゼ C の阻害剤であるネオマイシンと同等のピサチン蓄積阻害効果を示した (Yamada et al. 1989, Toyoda et al. 1992, Yoshioka et al. 1990)。以上の結果は、エンドウの動的抵抗性の一つであるピサチン蓄積の誘導にインテグリンを介する細胞壁-原形質膜間の連結が重要な役割を持っている可能性を示唆する。一方、RGD ペプチドによるピサチン蓄積の阻害には前処理時間が必要であった点については、「(1) 作用部位に到達するための時間が必要であった、(2) 本来植物細胞における結合分子と入れ替わるためにある程度の時間が必要である。」という 2 点が考えられる。

第 2 項 エンドウ原形質膜画分、細胞壁 ATPase に対する RGD ペプチドの影響

第 1 項の結果から RGD ペプチドは配列特異的にピサチン蓄積を抑制し、ピサチン蓄積における細胞壁-原形質膜間の連結の重要性が示唆された。Kato et al. (1993) は褐紋病菌の生産する糖ペプチドサプレッサーのうち、構造の明らかとなったサプレシン A、B の構成ペプチドである SSG、SSGDET および、関連した数種の合成ペプチドを用いた実験から、ペプチド部分がサプレッサー活性を担っていると報告している。この報告からは RGD ペプチドが本来の作用点 (細胞壁-原形質膜間の連結) に作用したのではなく、サプレッサー的な作用を示した結果である可能性が考えられた。そこで本項では褐紋病菌サプレッサーの作用点であると推定される、原形質膜画分や細胞壁画分の ATPase に対する RGD ペプチドの影響について調べた。

(1) 方法

RGD ペプチド、対照区としての RGE ペプチド単独での原形質膜画分、細胞壁 ATPase に対する影響を調べた。各濃度に調製した RGD ペプチド、RGE ペプチド、および対照区として脱イオン水を含む反応液をエッペンドルフチューブに加え、上蓋に原形質膜画分、および細胞壁可溶化画分は付着させ、軽く遠心することによって酵素を添加し、反応を開始した。25℃で 20 分間インキュベートし、反応終了後、氷冷して酵素

反応を停止させ、0.42 % モリブデン酸アンモニウム：10 % アスコルビン酸を 5：1 に混合した発色液を加えた。25℃で 30 分間インキュベートし OD 820 nm における吸光度を測定した。ATPase 活性の評価は無機リン酸の放出量を Perlin and Spanswick (1981) の方法で定量した。なお、実験に際しては ATP の非酵素的分解、原形質膜画分、細胞壁画分の持ち込みのリン酸および RGD、RGE ペプチド自体の吸光度差し引いて酵素活性とした。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM ATP (Sigma)	2.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
30 mM MgSO ₄	2.5	ddH ₂ O	3 mM
20~2000 μ g/ml GRGDSP	2.5	ddH ₂ O	20~200 μ g/ml
20~2000 μ g/ml GRGESP	2.5	ddH ₂ O	20~200 μ g/ml
Plasma membrane fraction (100 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	0.5 μ g
Solubilized cell wall fraction (20 μ g / ml)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	12.5	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

(2) 結果

エンドウ原形質膜画分、および細胞壁画分の ATPase 活性はいずれ濃度の RGD、RGE ペプチドによっても阻害されなかった。特にピサチン蓄積を阻害した 200 μ g / ml を処理してもまったく影響を受けなかった (Fig. 6-4)。以上の結果から、RGD ペプチドによるピサチン蓄積阻害作用は原形質膜 ATPase、および細胞壁 ATPase の酵素を直接阻害して防御応答を抑制するという、サプレッサーとして作用した結果ではないものと考えられる。これは RGD ペプチドがエリシターと同時処理でほとんどピサチン蓄積を阻害しない結果からも指示される。

第2節 細胞壁—原形質膜相互作用に関わるタンパク質

第1項 ヴイトロネクチン受容体様タンパク質

第1節の実験からエンドウには細胞壁—原形質膜間の連結が存在し、エンドウの防御応答に重要な役割を持つ可能性が示唆された。このことはエンドウ原形質膜にインテグリン様のタンパク質が存在している可能性を示している。ダイズ培養細胞より調製した原形質膜画分にはインテグリンの1つであるヴィトロネクチン受容体様のタンパク質が存在していることが報告されている (Schindler et al. 1989)。そこで本節の実験では抗ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体を用いて、エンドウ原形質膜中にヴィトロネクチン受容体様のタンパク質が存在しているか否かについて、ウエスタンブロッティングによって解析した。

(1) 方法

エンドウ原形質膜画分を SDS-PAGE で分離し、エレクトロブロットティングによって PVDF 膜に転写後、抗ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体を一次抗体として反応させ、アルカリフォスファターゼ標識した 2 次抗体を反応させ、アルカリフォスファターゼ用発色基質を用いてヴィトロネクチン様のタンパク質の検出を行った (詳しい方法は第 3 章を参照)。

使用抗体

1 次抗体 : 抗ヒトのヴィトロネクチン受容体ポリクローナル抗体 (Rabbit)

2 次抗体 : アルカリフォスファターゼ標識 Anti-Rabbit IgG (UBI)

(2) 結果

抗ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体を用いて、ウエスタンブロットティングを行ったところ、6 本のバンドが認められ、各々のバンドの推定分子量は 96.2、86.7、65.0、51.5、39.7、33.9 kDa であった (Fig. 6-5)。以上の結果から、エンドウ原形質膜にはヴィトロネクチン受容体様タンパク質が存在していることが明らかとなった。ダイズの培養細胞由来の原形質膜画分中には抗ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体と相互作用する推定分子量 72.0 kDa のタンパク質が存在すると報告されており (Schindler et al. 1989)、エンドウ黄化胚軸由来の原形質膜に存在するヴィトロネクチン受容体様タンパク質とは分子量が異なった。本結果は植物種によってインテグリン (ヴィトロネクチン受容体) の分子種が異なる可能性を示している。

第 2 項 原形質膜と相互作用する細胞壁のタンパク質

第 1 項の実験でエンドウ原形質膜中にはヴィトロネクチン受容体様タンパク質の存在が明らかとなり、エンドウにおいても細胞壁と原形質膜が物理的に結合している可能性が示唆された。そこで本項の実験ではエンドウ細胞壁画分中に原形質膜と直接相互作用するタンパク質が存在するか否かについてファーウエスタンブロットティング法を用いて実験を行った。

(1) 方法

1-1 ファーウエスタンブロットティング

ファーウエスタンブロットティング解析は伊藤 (1995) の方法に準じて行った。SDS-PAGE でエンドウ原形質膜タンパク質を分画し、エレクトロブロットティングで PVDF 膜に転写した後、膜を 50 mM Tris-HCl (pH 8.3) で洗浄した。原形質膜のタンパク質を再生した場合の影響をみるため、再生処理区と未再生処理区で比較した。再生処理は平野 (1993) の方法に準じ、タンパク質を転写した膜を洗浄後、下記の変性バッファーを用いて 25 °C で 1 時間振とうした。50 mM Tris-HCl (pH 7.6) で洗浄後、再生バッファー中

に 4℃で 24 時間静置し、タンパク質の再生を行った。一方、未再生処理膜の場合、変性、再生バッファーの代わりに TPBS を用いて同様にインキュベートした。その後、TPBS で 15 分間の洗浄を 3 回繰り返す、ブロッキングバッファーで 25℃で 1 時間振とうし、1-2 で示す方法であらかじめビオチン化した細胞壁可溶化画分で 2 時間インキュベートした。TPBS で 15 分間の洗浄を 3 回繰り返す、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (Sigma) で 25℃で 1 時間振とうし、TPBS で 15 分間、3 回洗浄し、アルカリフォスファターゼ基質を用いてビオチン化細胞壁タンパク質の検出を行った。なお、タンパク質の非特異的吸着の程度を調べるため BSA を同様の方法でビオチン化したものを対照区として用いた。

・ PBS	: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7.4)
・ TPBS	: 0.05 % Tween 20, PBS
・ 変性バッファー	: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM DTT, 2 mM EDTA, 7 M 塩酸グアニジン
・ 再生バッファー	: 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM NaCl, 1 % (w/v) BSA, 0.1 % Nonidet P-40, 2 mM EDTA
・ ブロッキングバッファー	: 0.2 % ブロッキング試薬 (Amersham ECL ; RPN 2202), TTBS

1-2 細胞壁可溶化画分のビオチン化

細胞壁可溶化タンパク質のビオチン化はタンパク質ビオチン化キット (Amersham ECL ; RPN2202) を用いて行った。Bicarbonate バッファーに溶解し、2 mg / ml に調製した細胞壁可溶化画分 100 μ l に 8 μ l のビオチン化試薬を加え 25℃で 1 時間静置し、細胞壁可溶化画分タンパク質をビオチン化した。また、過剰なビオチン化試薬の反応を止めるため、1 mg の BSA を加え、25℃で 1 時間インキュベートした。また、対照区として用いる BSA についても細胞壁可溶化タンパク質と同様の方法でビオチン化した。

(2) 結果

対照区として用いたビオチン化 BSA を処理した膜では膜の再生処理の有無に関わらず、若干の発色は見られるものの明確なバンドとしては検出されなかった。一方、ビオチン化細胞壁可溶化画分を添加した膜では膜の再生処理の有無に関係なく、推定分子量 65.0 kDa に単一のバンドとして検出され、抗ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体で見られたバンドの 1 つと分子量がほぼ一致した (Fig. 6-6)。以上の結果から、エンドウ細胞壁中には原形質膜と結合するタンパク質が存在し、原形質膜上の 65.0 kDa のヴィトロネクチン受容体様タンパク質と相互作用している可能性が示唆された。また、今回の

実験では PVDF 膜に転写後の原形質膜タンパク質の再生処理は、細胞壁タンパク質との結合にはあまり影響を与えないことが判った。

第3項 原形質膜—細胞壁相互作用に対する RGD ペプチドの影響

第2項の実験から細胞壁可溶化画分中には原形質膜と物理的に相互作用（結合）するタンパク質が存在することが明らかとなった。そこで本項では原形質膜—細胞壁相互作用における RGD 配列の役割について、細胞壁タンパク質の原形質膜タンパク質への結合に対する RGD ペプチドの影響について調べた。

(1) 方法

第2項の方法に準じ、今回は再生処理を行わずに調べることにした。ビオチン化細胞壁可溶化タンパク質を添加するに先立って、終濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ の GRGDSP、GRGESP ペプチドをそれぞれ 1 時間前処理し、対照区は TPBS で同様にインキュベートし、RGD、RGE ペプチドの結合に対する影響を調べた。

(2) 結果

対照区では第2項の結果と同様に 65.0 kDa にバンドが認められ、RGE ペプチド処理では対照区同様にバンドが認められた。一方、RGD ペプチド処理区では原形質膜の 65.0 kDa タンパク質への細胞壁タンパク質の結合が顕著に阻害された。以上の結果から、細胞壁可溶化タンパク質と原形質膜の 65.0 kDa のヴィトロネクチン受容体様タンパク質と相互作用には RGD 配列が重要であることが明らかとなった (Fig. 6-7)。即ち、動物細胞における細胞外マトリクスとインテグリンの相互作用に類似した原形質膜—細胞壁相互作用がエンドウにおいて存在することが判った。また、第2項の実験で PVDF 膜に転写した原形質膜タンパク質の再生処理の有無に関係なく、原形質膜タンパク質と細胞壁タンパク質の結合が認められたことについても、本結合が RGD という短いアミノ酸配列を介して行われているため、タンパク質の変性や、それに伴う立体構造の変化の影響を受けにくかったものと考えられる。

第4項 アクチン結合タンパク質

動物細胞では膜貫通型のタンパク質であるインテグリンは、細胞外で細胞外マトリクスと結合するとともに、細胞内で微小管やアクチンをはじめとする細胞骨格系のタンパク質と結合しており、細胞骨格の動的変化や細胞外からの情報伝達に参与していることが知られている (Edwards 1995, Ruslahti and Piershbacher 1987)。一方、植物においてもタバコの細胞壁の HRGP が膜貫通型タンパク質を介して微小管と相互作用していることが報告されている (Akashi and Shibaoka 1991)。そこで本項の実験では、原形質膜中の細胞骨格と相互作用するタンパク質の存在をビオチン化したアクチンを用いたファウエスタンプロッキングを用いて調べた。

(1) 方法

1-1 ファーウエスタンブロッティング

ファーウエスタンブロッティングは第3項と同様の方法で行った。SDS-PAGE でエンドウ原形質膜画分を分離し、エレクトロブトッティングでPVDF膜に転写した。ブロッキング後、ビオチン化アクチンを処理し、アクチン結合タンパク質をアルカリフォスファターゼ標識したストレプトアビジンを用いて検出した。また、細胞壁タンパク質と結合する原形質膜タンパク質とアクチン結合タンパク質を比較するため、ビオチン化細胞壁タンパク質を用いた実験も同様に行った。

1-2 ビオチン化アクチンの調製

市販のヒヨコ骨格筋由来のアクチン (UBI#13-101) をタンパク質ビオチン化キット (Amersham ECL; RPN2202) を用いてビオチン化した。PBS に対して 4°C で 90 分間透析したアクチンを PBS で 1 mg/ml に調製し、アクチン溶液 400 μ l に対してビオチン化試薬を 80 μ l、20 \times bicarbonate バッファーを 125 μ l、脱イオン水を 1392.5 μ l、Tween 20 を 2.5 μ l 加え、全体積を 2500 μ l にし、25°C で 1 時間インキュベートした。その後、4 倍量の 1% BSA を含む PBS で平衡化した分子ふるいカラムセファデックス G 25 にアクチン溶液を供試、1 ml 毎に回収し、5 つの画分を得た (F1~F5)。なお、目的とするビオチン化アクチンについては SDS-PAGE 解析の結果、F2 に最も多く含まれていることが判ったので (杉本 1995)、以下の実験には F2 を用いることとした。

(2) 結果

Fig. 6-8 に示したように、ビオチン化細胞壁タンパク質を用いた実験では、第2、3項の実験結果同様に、推定分子量 65.0 kDa にバンドが認められた。一方、ビオチン化アクチンを用いて解析したところ、メジャーなバンドが4本 (推定分子量 56.3、44.5、39.6、29.5 kDa) と、マイナーなバンドが2本 (推定分子量 89.9、67.1 kDa) が認められた。また、ビオチン化細胞壁タンパク質を用いた実験で検出できる、65.0 kDa の位置にはアクチンの結合を示すバンドは認められなかったが、抗-ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体と相互作用した6本のバンドのうち 39.7 kDa タンパク質はアクチン結合タンパク質の 39.6 kDa と非常に移動度が類似していた。以上の結果から、エンドウ原形質膜画分にはアクチンと直接相互作用するタンパク質が複数存在し、そのうちの1つは原形質膜のヴィトロネクチン受容体様タンパク質と相互作用する可能性が示唆された。また、細胞壁タンパク質と相互作用する原形質膜タンパク質と、原形質膜中のアクチン結合タンパク質との分子量が異なったことから、細胞壁-原形質膜-細胞骨格間の連結は原形質膜の単一タンパク質を介したものではないことが判った。一般的に動物細胞では細胞外マトリクス受容体であるインテグリンは分子種によって異なるものの基本的には α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体で存在、機能しており、分子種によっては α 鎖がさらに S=S 結合した長鎖と短鎖とから構成されていることが知られている (Ruslahti and

Piershbacher 1987)。このような動物細胞での報告から考えると、エンドウ原形質膜中のインテグリンも複数のサブユニットから構成されており、それぞれのサブユニットが細胞外のリガンド結合部位、細胞内の細胞骨格系タンパク質結合部位として個別に機能している可能性が考えられる。

第3節 まとめ

エンドウの防御応答の一つであるピサチンの蓄積は、RGD 配列を含む合成ペプチドで配列特異的に抑制された。RGD ペプチドによるピサチン蓄積抑制効果はペプチドの前処理時間に依存して強くなり、6 時間の前処理ではほぼ水処理レベルまで抑制された (Fig. 6-1, 2)。一方、抑制効果を示すために前処理が必要であった点については、本来の結合分子との置換のために時間が必要である可能性が考えられる。また、原形質膜画分、細胞壁可溶化画分の ATPase 活性を指標に、RGD ペプチドの *in vitro* での影響について調べたところ、2、20、200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ のいずれの濃度の RGD ペプチドも原形質膜画分、細胞壁可溶化画分の ATPase 活性を全く阻害せず、RGD ペプチドはエンドウの原形質膜、細胞壁の防御応答に関わる酵素を直接阻害することはなかった (Fig. 6-3)。以上の結果から RGD ペプチドはピサチン蓄積を抑制するが、褐紋病菌のサブレッサーとは異なる作用でピサチン蓄積を抑制する、即ち RGD ペプチド本来の作用点である細胞外マトリクス (細胞壁) と原形質膜間の連結部位に作用したことを強く示唆する。エンドウ褐紋病菌由来のサブレッサーはエリシターとの同時処理でピサチンの蓄積を抑制し (Oku et al. 1980, Shiraishi et al. 1991b, 1994)、さらにはエリシターの処理後にサブレッサーを与えても PAL の蓄積が顕著に抑制される (加藤, 1993)。このような結果もサブレッサーと RGD ペプチドの作用が異なるという考えを支持する。一方、RGD ペプチドが細胞壁-原形質膜間の結合へ作用し、結合を切ることによってピサチン蓄積を抑制するメカニズムについては、「(1) 細胞壁から原形質膜 (細胞内) への情報伝達が阻害された。(2) 細胞骨格系の再構築等の細胞骨格の安定化が阻害された。」の2点が考えられる。

エンドウの原形質膜画分中には、原形質膜-細胞外マトリクスの連結に関与するタンパク質の1つであるヴィトロネクチン受容体様のタンパク質がウエスタンブロットティングの結果、少なくとも6本 (推定分子量 96.2、86.7、65.0、51.5、39.7、33.9 kDa) 認められた (Fig. 6-4)。また、ビオチン化細胞壁タンパク質を用いたファーウエスタンブロットティング解析の結果、細胞壁タンパク質と推定分子量 65.0 kDa の原形質膜タンパク質が結合することが明らかとなり (Fig. 6-5)、ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体で見られたバンドの1つと分子量がほぼ一致した。また、本結合は RGD ペプチドによって特異的に阻害された (Fig. 6-6)。一方、ビオチン化アクチンを用いたファーウエスタンブロットティング解析では、原形質膜画分中に複数のアクチン結合タンパク質 (推定分子量 89.9、67.1、56.3、44.5、39.6、29.5 kDa) が存在したが、細胞壁タンパク質と相互作用する 65.0 kDa の原形質膜タンパク質とは結合しなかった。しかしながら、

ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体と相互作用した原形質膜画分の6本のバンドのうち39.7 kDa タンパク質とはほぼ移動度が一致した (Fig. 6-7)。以上の結果から、エンドウ原形質膜中にはインテグリンの1つであるヴィトロネクチン受容体様のタンパク質が存在し、細胞壁、あるいは細胞骨格と直接相互作用している可能性が示唆された。特に原形質膜のヴィトロネクチン受容体様のタンパク質と細胞壁タンパク質との結合は、動物細胞における細胞外マトリクスとの接着同様に RGD 配列を認識して行われていることが判った。また、細胞壁タンパク質と相互作用するヴィトロネクチン受容体様のタンパク質と、原形質膜中のアクチン結合タンパク質が異なったこと、さらには複数のヴィトロネクチン受容体様のタンパク質が存在したことから、細胞壁-原形質膜-細胞骨格の間の結合はタンパク質1分子を介して行われているのではなく、複数のタンパク質を介して行われているものと考えられた。即ち、エンドウ原形質膜のヴィトロネクチン受容体様のタンパク質は本来サブユニットで機能しており、細胞外マトリクスとの結合を担うタンパク質鎖、細胞骨格系との結合を担うタンパク質鎖等が各々存在し、複合体として機能している可能性が考えられる。

動物細胞では細胞外マトリクスと細胞の結合が、様々な生命活動、例えば、細胞同士の接着・凝集 (Hynes 1992)、ウイルスの吸着 (Vogel et al. 1993) さらには細胞外からの情報伝達にも重要な役割を持っている (Ruslahti and Piershbacher 1987)。ヒトの繊維芽細胞にフィブロネクチンや RGD 配列を含む合成ペプチドを与えると、Rho1、Rac1、Ras、Raf をはじめとする G タンパク質や、MEK、ERK、JNK 等の MAP キナーゼカスケードを構成するプロテインキナーゼ等の様々な情報伝達関連分子が、インテグリン分子を中心に集合することが報告されている (Miyamoto et al. 1995) また、プロテインキナーゼ C の活性化 (Vuori and Ruslahti 1993)、 Na^+/H^+ アンチポーターの活性化 (Schwartz et al. 1991)、チロシンキナーゼの活性化、細胞内のアルカリ化、分泌、分化の誘導 (Hynes 1992) や、コラーゲナーゼやメタロプロテイナーゼ、ストロメリシン等の細胞外マトリクス分解酵素をコードする遺伝子の発現等 (Werb et al. 1989) もインテグリンを介した情報伝達によって制御されている。

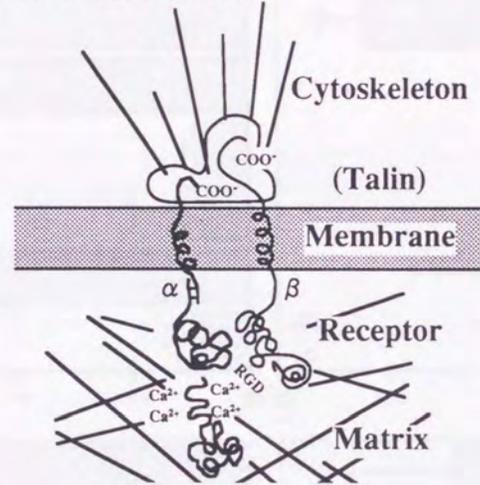
近年、植物においても細胞壁-原形質膜間の結合とその重要性が報告されている (Review see; Roberts 1989, 1990)。タマネギの表皮細胞には Hechtian strands と呼ばれているプラズモデスマータとは独立した細胞壁-原形質膜間の結合が報告されている (Pont-Lezica et al. 1993)。また、タバコの培養細胞の細胞骨格の低温耐性には原形質膜のインテグリンを介した細胞壁と細胞骨格の連結が重要であること (Akashi and Shibaoka 1991)、ダイズの細胞を RGD ペプチドを含む培地で培養すると細胞分裂や細胞壁の構築に以上が生じることが報告されている (Schindler et al. 1989)。また、植物の生理、生長のみならず、エンドウと根留菌 (*Rhizobium leguminosarum*) との相互作用には RGD 配列が必要であること (Swart et al. 1994)、植物と根頭癌腫病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) との相互作用において RGD 配列を介した細胞への接着が病原性に関与しており、接着能が低下した癌腫病菌の系統は非病原性となることが報

待されている (Wagner and Matthysse 1992)。このように、異種の細胞-細胞間の相互作用にもインテグリンが関与していることが考えられる。

細胞壁-原形質膜間の結合に関わる細胞外マトリクスの分子については、タバコの培養細胞、タマネギの表皮細胞については細胞壁の HRGP が結合に関与していると考えられている (Akashi et al. 1993, Akashi and Shibaoka 1991, Pont-Lezica et al. 1993, Shibaoka 1993)。また、HRGP 以外では、動物細胞のヴィトロネクチンに類似した細胞外タンパク質の存在がタバコ (Zhu et al. 1994)、ユリ、ソラマメ、ダイズ、トマトで示されており (Sanders et al. 1991)、ダイズでは RGD 配列を持つタンパク質が単離されている (Odani et al. 1987)。また、ダイズの培養細胞では細胞外マトリクスタンパク質のみならず、膜貫通型の細胞外マトリクスの受容体であるヴィトロネクチン受容体様のタンパク質が存在することが報告されている (Schindler et al. 1989)。

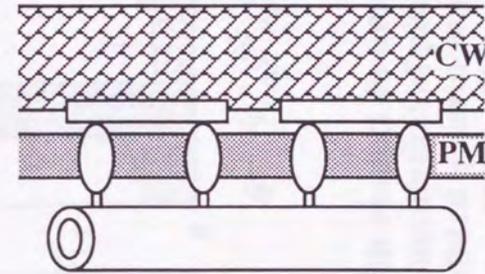
エンドウ褐紋病菌の生産するエリシター、サプレッサーの受容、特に宿主特異性決定には細胞壁が重要である可能性が示唆された。しかしながら、このような仮説は細胞壁での病原菌シグナルの受容後の原形質膜、あるいは細胞内への情報伝達機構の存在なくしては成立しない。本章の実験結果から細胞外マトリクス (細胞壁) と原形質膜の結合がエンドウの防御応答に重要な役割を持つことが示唆され、原形質膜上のインテグリンを介した細胞壁-原形質膜間の情報伝達系が存在する可能性が強く示唆された。

Mammalian cell



Ruoulahti and Pierschbacher (1987)

Plant cell



Akashi and Shibaoka (1991)

Fig. 6-1 Schematic illustration of interactions between extracellular matrix (cell wall) and cytoskeleton via plasma membrane protein in mammalian and plant cells

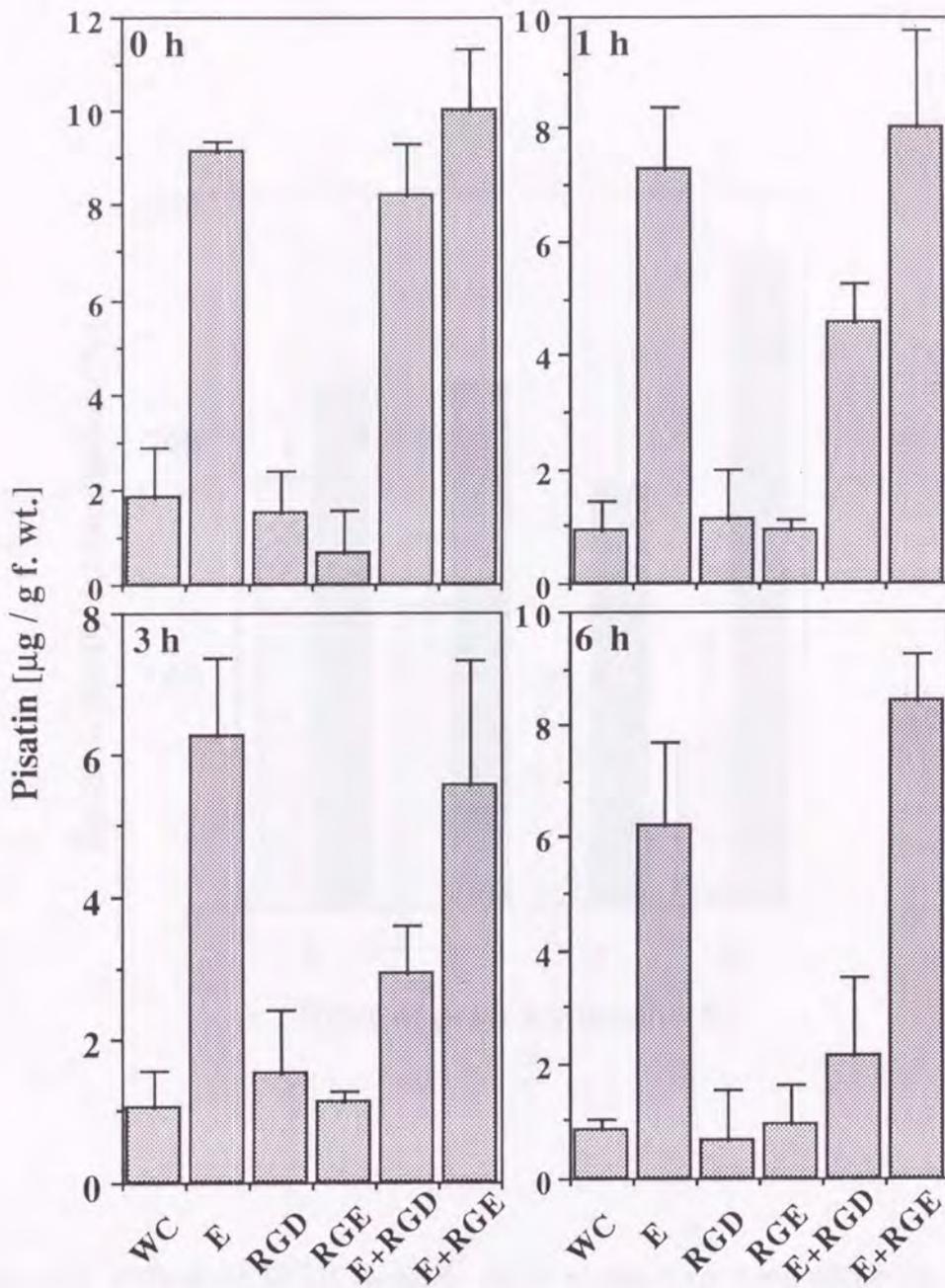


Fig. 6-2 Effect of RGD peptide with respect to time after the addition before elicitor treatment on the accumulation of pisatin in etiolated pea epicotyle. The amount of accumulated pisatin was determined 18 h after treatment with distilled water (WC), 500µg ml⁻¹ elicitor from *Mycosphaerella pinodes* (E), 200µg ml⁻¹ hexapeptide GRGDSP (RGD), GRGESP (RGE), elicitor plus GRGDSP (E+RGD) or elicitor plus GRGESP (E+RGE). The epicotyls were pretreated with these peptides 0, 1, 3 or 6 h before elicitor treatment, respectively. Bar and line indicate the mean and standard deviation of results from triplicate experiments.

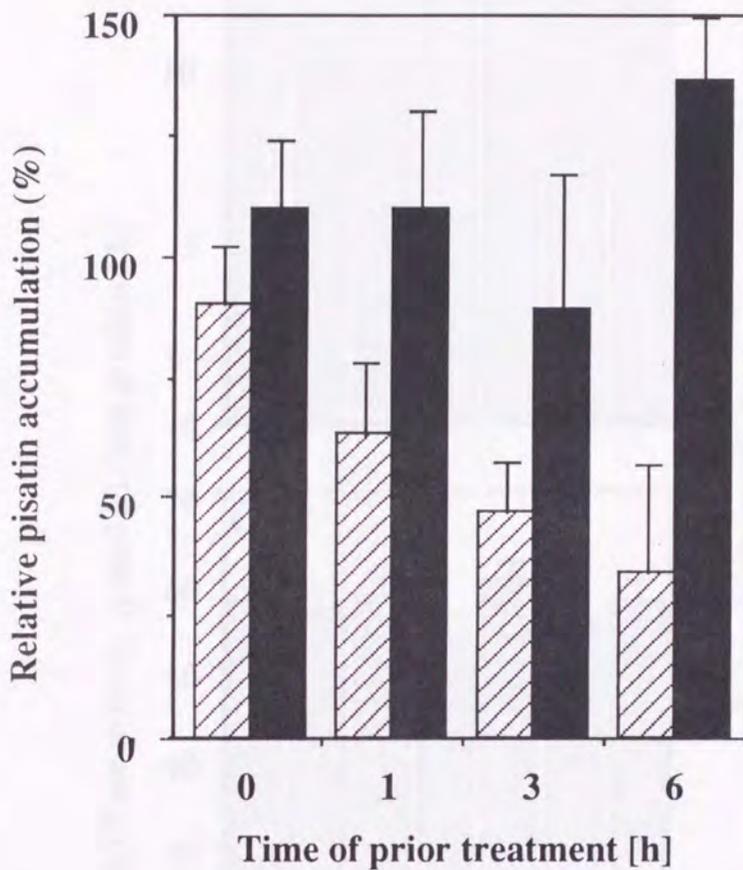


Fig. 6-3 Effect of RGD peptide with respect to time after the addition before elicitor treatment on accumulation of pisatin in etiolated pea epicotyls. The amount of accumulated pisatin was determined 18 h after treatment with 500 μ g / ml elicitor from *Mycosphaerella pinodes* elicitor plus 200 μ g / ml GRGDSP (▨) or elicitor plus 200 μ g / ml GRGESP (■). These peptides were treated 0, 1, 3, 6 h before elicitor treatment, respectively. The accumulated pisatin in pea epicotyls by treatment with elicitor was $9.11 \pm 0.22 \mu\text{g} / \text{g. f. wt.}$ The relative values of accumulated pisatin are represented as percentage to elicitor treatment. Bar and line indicated mean and standard deviation of results from triplicate experiments.

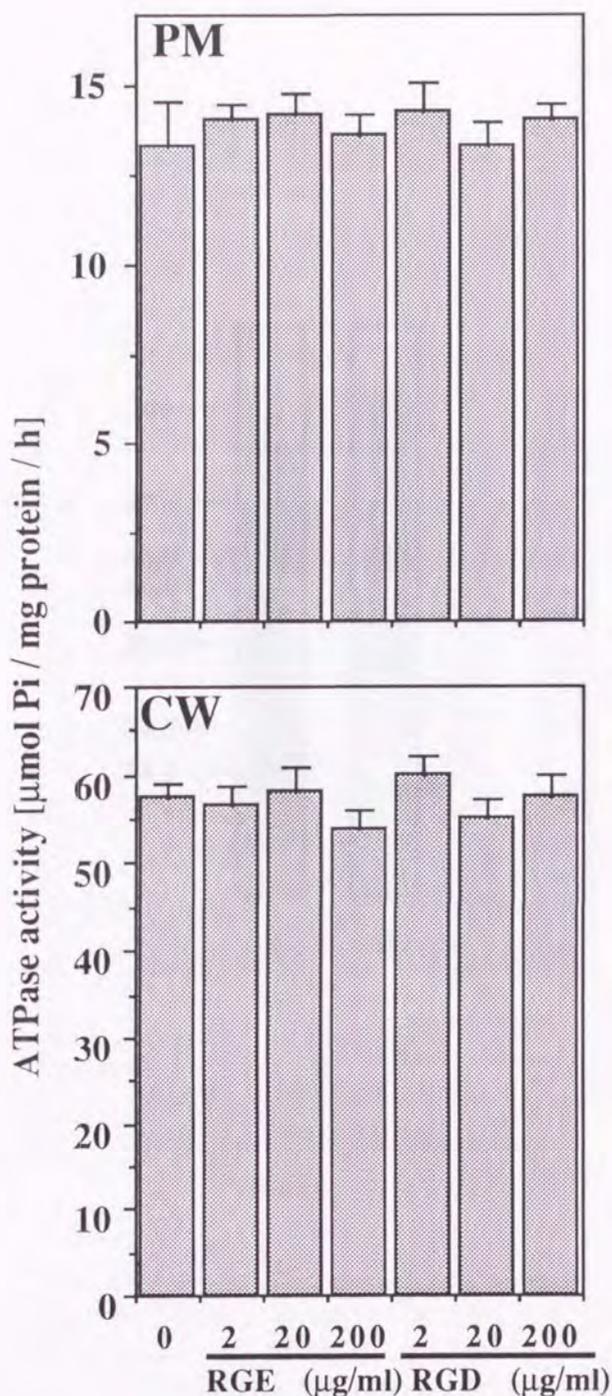


Fig. 6-4 Effects of RGD peptide on activities of ATPases in the pea plasma membrane (PM) and the fraction solubilized from pea cell wall (CW). The assay was carried out at 25°C for 20 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) in the absence or presence of hexapeptide, GRGDSP (RGD) or GRGESP (RGE) at the concentration of 2, 20 and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ by the method of Perlin and Spanswick (1981). Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

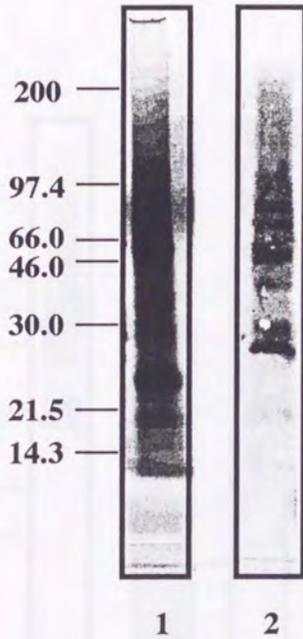


Fig. 6-5 Western blot analysis of plasma membrane proteins from pea epicotyls. One milligram of protein was separated by SDS-PAGE and subjected to silver-staining (lane 1), or were electrophoretically transferred to PVDF membranes (lane 2). The blots were subjected to an immunoblot analysis with a rabbit antiserum raised against a human vitronectin receptor.

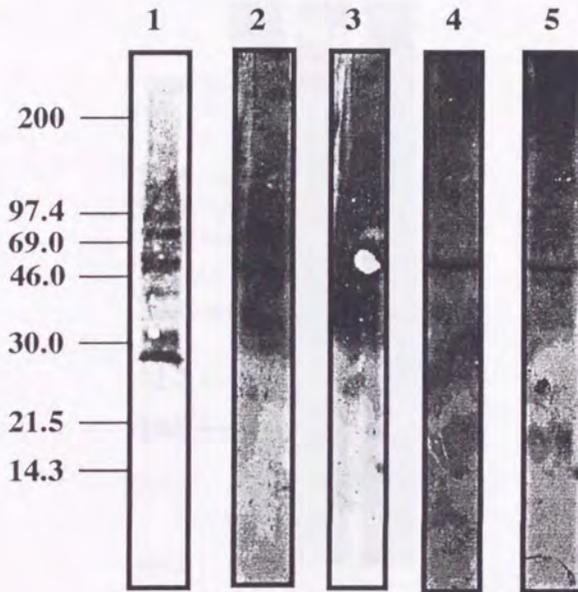


Fig. 6-6 Far-western blot analysis of the interaction between cell wall proteins and plasma membrane proteins. One milligram of plasma membrane protein was separated by SDS-PAGE and then were electrophoretically transferred to PVDF membrane. The membranes were then renatured (lane 3 and 5) or were not (lane 2 and 4). The blots were subjected to far-western blot analysis with biotinylated BSA (lane 2 and 3) or cell wall proteins (lane 4 and 5). Lane 1 indicated the plasma membrane proteins cross-reacted with a rabbit antiserum raised against human vitronectin receptor as shown figure 6-5.

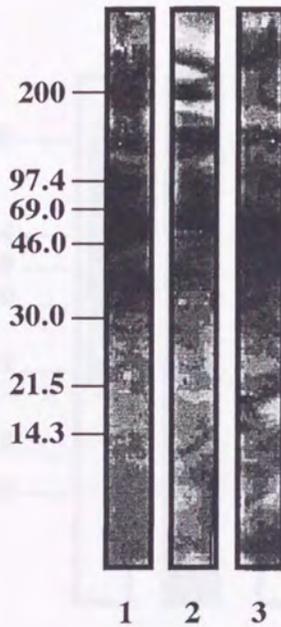


Fig. 6-7 Effects of RGD and RGE peptide on the interaction between cell wall proteins and plasma membrane proteins. One milligram of plasma membrane protein was separated by SDS-PAGE and then were electrophoretically transferred to PVDF membrane. The blots were subjected to far-western blot analysis with biotinylated cell wall proteins without (lane 1) or with prior treatment with RGD (lane 2) or RGE (lane 3) for 1 h.

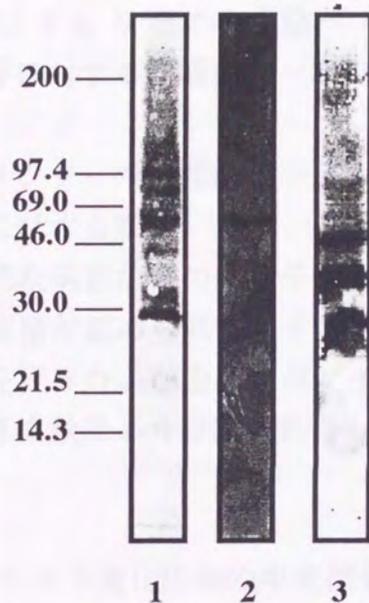


Fig. 6-8 Far-western blot analysis of the interaction between cell wall proteins and plasma membrane proteins. One milligram of plasma membrane protein was separated by SDS-PAGE and then were electrophoretically transferred to PVDF membranes. The bolts were subjected to far-western blot analysis with biotinylated cell wall proteins (lane 2) or biotinylated actin (lane 3). Lane 1 indicated the plasma membrane proteins cross-reacted with a rabbit antiserum raised against human vitronectin receptor as shown figure 6-5.

第7章 合成モデルエリシターのエンドウの防御応答、および細胞壁機能に対する影響

エンドウ褐紋病菌は柄孢子発芽液中に植物の防御応答を誘導するエリシターを分泌するが、エリシターのうち1分子が精製され、 $\text{Glc}\beta\text{1-6Man}\alpha\text{1-6Man}$ の三糖がセリンを介してタンパク質鎖とO-グリコシド結合した、分子量70,000あるいは140,000の高分子糖タンパク質であることが明らかとなっている (Matsubara and Kuroda 1987; Fig. 7-1)。本章の実験ではエリシターの構造-活性相関、エリシター活性の最小単位、さらにはエリシターの受容体を同定するためのプローブを検索することを目的とし、 $\text{Glc}\beta\text{1-6Man}\alpha\text{1-6Man}$ の三糖を単位とする9種の合成糖ペプチド(合成モデルエリシター)を供試し、エンドウの防御応答に対する影響を調べた。

第1節 合成モデルエリシターの生理活性

第1項 ピサチン蓄積に対する影響

有傷エンドウ組織を褐紋病菌由来の高分子エリシターで処理すると、ファイトアレキシンであるピサチンの蓄積が認められる。そこで、ピサチン蓄積に対する合成エリシターの影響について実験を行った。なお、糖ペプチド(合成モデルエリシター)については共立薬科大学の竹田忠紘教授より分譲されたものを用いた (Takeda et al. 1994; Fig. 7-2)。

(1) 方法

播種後、6-7日のエンドウ黄化胚軸の中央部を1.5 cmの長さに切断し、さらに軸方向に沿って二分し、アルミホイル上に滴下したエリシター、合成エリシター、および対照区として蒸留水に切断面が接するようにして置いて、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で湿室下で18時間静置した。ピサチンの抽出および定量はMasuda et al. (1983)の方法に準じて行った。各液を処理後18時間後の胚軸をエタノールで固定し、 80°C で30分間抽出し、抽出液を減圧下で乾固した。残留分をピサチン定量用の溶媒 $50\mu\text{l}$ に溶解後、 $10\mu\text{l}$ をピサチン定量に供試した。

処理液組成 (終濃度)

水対照区	: 脱イオン水
エリシター単独処理区	: $500\mu\text{g/ml}$ エリシター
合成エリシター単独処理区	: $10, 100, 1000\mu\text{M}$ 合成エリシター No. 1~9

(2) 結果

供試したいずれの合成エリシターもエンドウ黄化胚軸にピサチン蓄積を誘導したが、ピサチン蓄積量は非常にわずかであり、エンドウ褐紋病菌由来の高分子エリシター程の活性は示さず、処理した濃度に依存して蓄積量が増加するような傾向も認められなかつ

た (Fig. 7-3)。以上の結果から、今回供試した合成エリシターはピサチン蓄積誘導活性は持つものの、非常に弱いものであることが判った。

第2項 エンドウ褐紋病菌の形態形成に対する影響

無傷エンドウ組織に褐紋病菌由来の高分子エリシターを滴下すると、処理された部分に局所的な抵抗化が誘導される。そこで無傷エンドウ葉における局部抵抗性に対する合成エリシターの影響について調べることにした。本項では局部抵抗性に対する影響を調べることに先立って、エンドウ褐紋病菌の発芽および穿孔等の形態形成に対して直接的な影響（毒性）が認められるか否かについて調べた。

(1) 発芽率、穿孔率の測定方法

エンドウ褐紋病菌の発芽率、穿孔率の測定は Yamamoto et al. (1986) の方法に準じて行った。発芽率の検定は、エンドウ褐紋病菌柄孢子と褐紋病菌エリシター、合成エリシター No. 1~9、あるいは対照区として蒸留水を混合し、孢子濃度を 5×10^5 spores / ml に調製した孢子懸濁液をスライドガラス上に滴下し、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で 18 時間静置し、コットンブルーで染色後、孢子の発芽を光学顕微鏡下で測定した。エンドウ褐紋病菌の穿孔については褐紋病菌柄孢子と褐紋病菌エリシター、合成エリシター No. 1~9、あるいは対照区として蒸留水を混合し、孢子濃度を 5×10^5 spores / ml に調製した孢子懸濁液をエタノールで細胞を固定した（植物の抵抗反応の影響を除いた）剥離表皮組織に接種し、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で 18 時間静置し、コットンブルーで染色後、孢子の表皮細胞への穿孔を光学顕微鏡下で測定した。発芽率は発芽孢子 / 全孢子数、穿孔率は穿孔孢子数 / 全発芽孢子数の百分率で表わした。

処理液組成（終濃度）

水対照区	: 脱イオン水
エリシター単独処理区	: $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ エリシター
合成エリシター単独処理区	: $20 \mu\text{M}$ 合成エリシター No. 1~9

(2) 結果

褐紋病菌エリシターおよびいずれの合成エリシターも褐紋病菌柄孢子の発芽に対してはまったく影響を与えなかった (Fig. 7-4)。一方、穿孔に対する影響については、合成エリシター No. 6 以降の分子量の大きいもので若干穿孔を阻害する傾向が伺えたものの、さほど顕著な影響は認められなかった (Fig. 7-5)。以上の結果から、今回供試した合成エリシターは褐紋病菌の形態形成に対する直接的な影響はほとんどないものと考えられる。

第3項 無傷エンドウ葉における局部抵抗性に対する影響

第2項の実験結果から、9種の合成エリシターは褐紋病菌に対して直接的な影響（毒性、静菌性）は認められなかった。そこで、合成エリシターの局部抵抗性の誘導の有無について調べた。

(1) 感染率の測定方法

エンドウ褐紋病菌の感染率の測定は Yamamoto et al. (1986) の方法に準じて行った。感染率の検定は、褐紋病菌エリシター、合成エリシター No. 1~9、あるいは対照区として蒸留水各々 10 μ l をあらかじめワックスを脱脂綿で拭きとった無傷のエンドウ黄化胚軸に滴下し、2時間静置後、孢子濃度を 10×10^5 spores / ml に調製した孢子懸濁液 10 μ l を処理液上に滴下し、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で 18 時間静置し、メタノールで固定後、コットンブルーで染色し、孢子の感染を光学顕微鏡下で測定した。感染率は感染した孢子 / 発芽孢子の百分率で表わした。

処理液組成（終濃度）

水対照区	: 脱イオン水
エリシター単独処理区	: 500 μ g / ml エリシター
合成エリシター単独処理区	: 20 μ M 合成エリシター No. 1~9

(2) 結果

水対照区では約 40 % の孢子が感染を成立させたのに対して、褐紋病菌エリシター処理では感染率は約 5 % にまで低下し、局部抵抗化が誘導された。一方、合成エリシターの影響は、合成エリシター No. 1 は有意な影響は認められなかったが、No. 2 処理で感染率の低下が認められ、No. 3 以降の分子量の大きい合成エリシターでは顕著な感染率の低下が認められた (Fig. 7-6)。以上の結果から、合成エリシターのうち少なくとも No. 3 以降は局部的な抵抗化を誘導するエリシター（インデューサー）として作用することが判った。また、全体的な傾向として分子量が大きくなるのに比例して、局部抵抗性誘導活性が強くなる傾向が伺えた。

第4項 無傷エンドウ葉におけるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 生成誘導

第1、3項の実験結果から9種の合成エリシターは、ファイトアレキシン誘導活性は非常に弱いものの、無傷エンドウ葉に対して局部的な抵抗性を誘導する活性を有することが明らかとなった。このことはエンドウ組織表層での抵抗反応を誘導する活性を持つことを示している。一方、第4章の実験結果から無傷エンドウ葉上のエンドウ褐紋病菌エリシターも速やかに認識され、 O_2^- が生成され、エンドウの組織表層における初期防御応答に関与している可能性が示唆された。そこで本項では9種の合成エリシターの O_2^- 生成誘導活性について調べた。

(1) 方法

第4章の結果よりエリシター処理後5分以内にブルーホルマザン生成が増高することが判ったので、処理5分後に測定することとした。褐紋病菌エリシター、9種の合成エリシター、あるいは対照区として蒸留水を含むNBT反応液50 μ lを無傷エンドウ、ササゲ葉に滴下し、5分後に処理液を回収し、OD 560 nmにおける吸光度を測定し、ブルーホルマザンの生成を定量した。なお、エンドウによるブルーホルマザンの生成量の評価は、エリシター、合成エリシターによるNBTの還元への直接的な影響を除くため、葉に処理しない反応液におけるブルーホルマザンの生成量を差し引き、検量線に基づき処理液下の組織重1g当たりの生成量を求めた(第4章参照)。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
25 μ g / ml NBT (Wako)	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	2.5 μ g / ml
1000 μ g / ml Elicitor	5.0	ddH ₂ O	100 μ g / ml
200 μ M Synthetic Elicitor No. 1-9	5.0	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	20 μ M
30 mM Tris-MES (pH 7.6)	40.0	ddH ₂ O	—
Total	50.0	—	—

(2) 結果

第4章の実験結果同様に、エンドウ褐紋病菌のエリシター処理では水対照区と比較して顕著にブルーホルマザンの生成が上昇した。一方、合成糖ペプチド No. 1、2 についてはほとんど誘導作用は認められなかった。一方、有意な差はないものの No. 3 でブルーホルマザンの生成を上昇させる傾向があり、No. 4 以降の合成糖ペプチドは有意にブルーホルマザンの生成を上昇させた (Fig. 7-7)。また、全体的な傾向として合成糖ペプチドの分子量が大きくなるのに比例して、ブルーホルマザンの生成誘導活性が強くなる傾向が伺えた。以上の結果から、合成糖ペプチドのうち No. 4 以降はO₂⁻生成を誘導するエリシター (インデューサー) として作用することが判った。

第5項 細胞壁 ATPase に対する合成モデルエリシターの影響

エンドウ黄化胚軸より調製した細胞壁画分中の ATPase 活性はエンドウ褐紋病菌由来のエリシターによって活性化される。このようなことから、細胞壁 ATPase が菌シグナルの認識に関与しているものと考えられる。しかしながら、合成モデルエリシターはエンドウ組織表層における初期防御応答を誘導することが、第3、4項の結果から明らかとなった。そこで本項では合成糖ペプチドの *in vitro* における作用について細胞壁 ATPase 活性を指標に調べた。

(1) 方法

ATPase 活性は無機リン酸の放出量を Perlin and Spanswick (1981) の方法に準じて測定

することによって評価した。合成糖ペプチド、褐紋病菌エリシター、あるいは対照区として蒸留水を含む反応液に酵素液添加し、反応を開始した。25℃で 20 分間インキュベート後、随時調製した 0.42 % モリブデン酸アンモニウムと 10 % アスコルビン酸を 5:1 に混合した発色液を添加し、25℃で 30 分間インキュベートし、OD 820 nm における吸光度を測定し、反応液中の無機リン酸の濃度を定量した。酵素活性の評価は細胞壁可溶化画分を入れない区を設け、ATP の非酵素的分解および酵素、合成糖ペプチド自体の発色を差し引いた値を換算式（第 2 章参照）に代入して求めた。

	Vol. (μ l)	Solvent	Final conc.
30 mM ATP (Wako)	2.5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	3 mM
30 mM MgSO ₄ (Wako)	2.5	ddH ₂ O	3 mM
1000 μ g/ml Elicitor	2.5	ddH ₂ O	100 μ g/ml
200 μ M Synthetic Elicitor No. 1 ⁹	2.5	ddH ₂ O	20 μ M
Solubilized cell wall fraction (20 μ g / ml)	5	30 mM Tris-MES (pH 6.5)	0.1 μ g
30 mM Tris-MES (pH 6.5)	12.5	ddH ₂ O	—
Total	25.0	—	—

(2) 結果

エンドウ褐紋病菌由来のエリシター処理では、第 3 章の結果同様に ATPase の活性化が認められた。一方、合成糖ペプチド No. 1 は細胞壁 ATPase に対して影響を与えなかった。しかしながら、合成糖ペプチド No. 2、3 は有意な差は認められないものの ATPase を活性化する傾向が認められ、No. 4 ~ 9 の合成糖ペプチドは有意に ATPase 活性を上昇させた (Fig. 7-8)。次に褐紋病菌エリシターと合成糖ペプチドの混合処理の影響について調べたところ、ほとんどすべての合成糖ペプチドはエリシター処理による細胞壁 ATPase の活性化に有意な影響は与えなかったが、合成糖ペプチド No. 3、6、7、8、9 は相加的に ATPase 活性を上昇させる傾向が、No. 5 は逆に褐紋病菌エリシターによる ATPase の活性化を抑制するような傾向が認められた (Fig. 7-9)。以上の結果から、No. 4 以降の合成糖ペプチドは細胞壁 ATPase に対してエリシターとして作用すること、さらに合成糖ペプチド No. 5 は褐紋病菌エリシターと結合部位で競合している可能性が示唆された。しかしながら、全般的に今回供試した濃度では褐紋病菌エリシターとの混合処理の作用は顕著ではなかった。

第 2 節 まとめ

病原微生物の攻撃を受けた植物は、速やかに応答し、数々の防御応答を発現させる。このような防御応答の発現は病原菌の襲来を認識することが引き金となる。植物の防御応答を誘導するような物質をエリシター、あるいはインデューサーと呼んでいる。近年、

様々な病原菌の培養ろ液、細胞壁あるいは膜成分よりエリシターが分離されてきている (Darvill and Albersheim 1984, Ebel and Cosio 1994)。その中にはダイズ疫病菌の細胞壁由来のグルカンエリシター (Keen et al. 1983, Yoshikawa et al. 1993)、病原菌の細胞壁成分であるキチン断片等の糖エリシター (Harn et al. 1981, Ryan 1988)、またトマト葉かび病や炭そ病菌が培地中に放出する糖ペプチドエリシター (Beissman et al. 1992, Coleman et al. 1992, Roby et al. 1987)、トマト葉かび病が感染した細胞間液中に生成されるペプチドエリシター (De Wit and Spikeman 1982, Van den Ackerveken et al. 1993) 等、様々な構成成分からなっている。また、これに加えて植物細胞壁のペクチン断片等、内性エリシターと呼ばれる植物自身の構成成分がエリシターとなる例も報告されている (Ryan 1988)。また、エリシターの活性最小単位やエリシター活性に必要な構造特異性についても詳細に研究がなされている。ダイズ疫病菌の細胞壁由来のグルカンエリシターの活性最小単位は $[\beta\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{6)}]_5$ の二番目と四番目の位置に $\beta\text{-1,3}$ 結合のグルコースが側鎖として結合した構造であり、構造特異性は極めて高く、側鎖の位置が異なった場合、あるいは 1-6 結合のグルコース一部が他の糖に置き換わった場合には、顕著なエリシター活性の低下が認められる (Yoshikawa et al. 1993)。また、直鎖構造を持つ $\alpha\text{-1,4}$ -アセチルグルコサミンの重合体であるキチン、 $\alpha\text{-1,4}$ -グルコサミンの重合体であるキトサンのエリシター活性を示す最小の重合度 (DP) は 5 である (Darvill and Albersheim 1984, Ebel and Cosio 1994, Ryan 1988)。また、内性エリシターである植物細胞壁由来のペクチン断片のオリゴガラクチュロン酸は DP が 9~12 でファイトアレキシンを誘導するが、DP が 9 以下になると顕著にエリシター活性が低下し、単糖のガラクチュロン酸では全くエリシター活性を示さない (Darvill and Albersheim 1984, Eberl and Cosio 1994, Ryan 1988)。このように様々な成分で構成されるエリシターは活性を示す際に厳密な構造特異性を持っている。

エンドウ褐紋病菌は柄胞子が発芽する際に高分子のエリシターを生産する。褐紋病菌のエリシターはピサチンの蓄積 (Shiraishi et al. 1978, Yamada et al. 1989)、感染阻害因子の生産 (Yamamoto et al. 1986)、PR タンパク質の発現 (Yoshioka et al. 1992b)、スーパーオキシドアニオン生成 (第4章) 等の様々な防御応答をエンドウに誘導する。褐紋病菌柄胞子発芽液の高分子エリシター画分には数多くの分子が存在するが、その内の一分子が単離、精製、構造決定され、 $\text{Glc}\beta\text{1-6Man}\alpha\text{1-6Man}$ の三糖がセリンを介してペプチド鎖と *O*-グリコシド結合した、分子量 70,000~140,000 の高分子糖タンパク質であることが明らかとなった (Matsubara and Kuroda 1987)。本章の実験ではエンドウ褐紋病菌のエリシターの活性最小単位を調べることを目的として $\text{Glc}\beta\text{1-6Man}\alpha\text{1-6Man}$ の三糖を基本とした 9 種の合成糖ペプチドを用い (Takeda et al. 1994; Fig 7-2)、エンドウの防御応答について調べた。9 種の合成糖ペプチドはピサチン蓄積を誘導したが、ピサチン蓄積誘導活性は褐紋病菌エリシターと比較して非常に弱かった (Fig. 7-3)。しかしながら、供試した 9 種の合成糖ペプチドのうち No. 2~9 はエンドウ組織に局所的な抵抗化を誘導し (Fig. 7-6)、合成糖ペプチド No. 4~9 はエンドウ組織表層における

O₂⁻生成を誘導した (Fig. 7-7)。さらに、合成糖ペプチド No. 4~9 は *in vitro* において細胞壁 ATPase を活性化した (Fig. 7-8)。また、合成糖ペプチドによる局部抵抗化、スーパーオキシドアニオン生成の誘導、細胞壁 ATPase の活性化は合成糖ペプチドの分子量に依存している傾向が伺えた。以上の結果から、今回供試した合成糖ペプチドのうち特に No. 4~9 はエンドウ組織表層における防御応答のエリシターとして作用することが判った。このことから合成糖ペプチド No. 4~9 はエンドウの初期防御応答を解析する際に有用なモデルエリシターとなりえるものと考えられる。また、合成糖ペプチド No. 4~9 は細胞壁 ATPase に対しても褐紋病菌エリシターと同様な作用を有し、その効果も組織同様に分子量に依存して強くなる傾向があった。この結果は細胞壁 ATPase の活性制御とエンドウ組織表層における防御応答が相関している可能性を示しており、合成糖ペプチド No. 4~9 は初期防御応答の解析のみならず、エリシターの受容体同定のためのプローブとして有用であろうと考えられる。

今回の一連の実験結果から、合成糖ペプチドは植物組織表層における局部抵抗化やスーパーオキシドアニオンを顕著に誘導したが、ピサチン蓄積誘導活性は褐紋病菌のエリシターと比較して非常に弱いことが判った。このような現象は他のエリシターを用いた実験でも認められており、エリシター断片の大きさによって誘導される抵抗反応の種類が異なることが知られている。例えば、植物細胞壁由来のペクチン断片は重合度が 9~12 ではファイトアレキシンを誘導するが、重合度が 8 以下になると顕著に活性が低下する (Ryan 1988)。しかしながら、ファイトアレキシン誘導活性は持たない DP 2、3 のガラクチュロン酸は HRGP 蓄積を誘導し (Boudart et al. 1995)、DP 2~6 のガラクチュロン酸は PR-タンパク質であるプロテイナーゼ阻害タンパク質の蓄積を誘導する (Ryan 1988)。このような報告と考えあわせると、植物表層における抵抗反応の引き金となる認識装置とファイトアレキシン蓄積に関わる認識装置は機能的にも、分子的にも異なる可能性が考えられた。一方、今回供試した合成糖ペプチドはファイトアレキシンを誘導する高分子エリシターの一部を人工的に合成したものである (Takeda et al. 1994)。従ってこれらの糖ペプチドがピサチン蓄積を誘導しなかったことについては、合成糖ペプチドの大きさ (分子量)、認識部位と結合数、あるいはより複雑な高次構造がピサチン誘導には必要である可能性が示唆された。この点については将来明らかにされることが必要であろう。

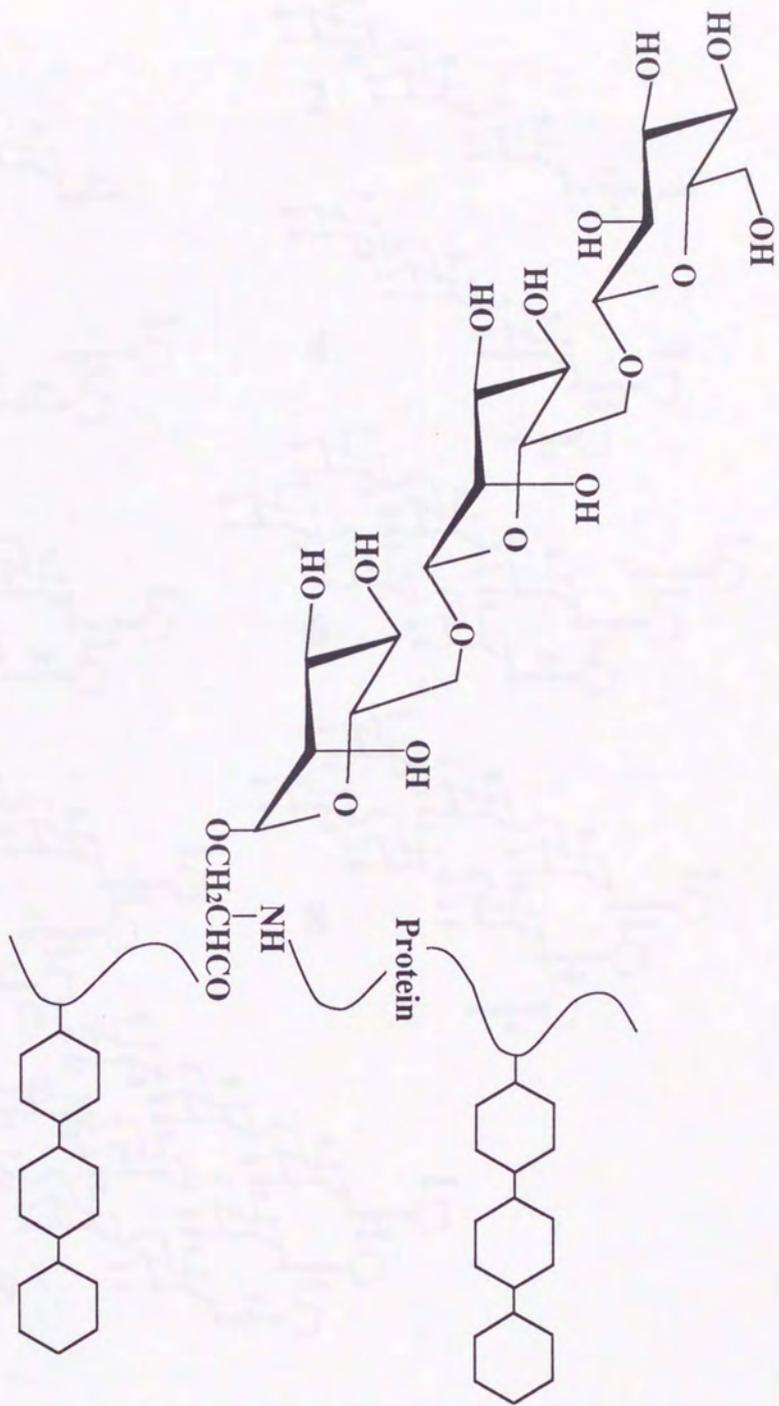


Fig. 7-1 Structure of glycopeptide-elicitor from *Mycosphaarella pinodes* (Matsubara and Kuroda 1987)

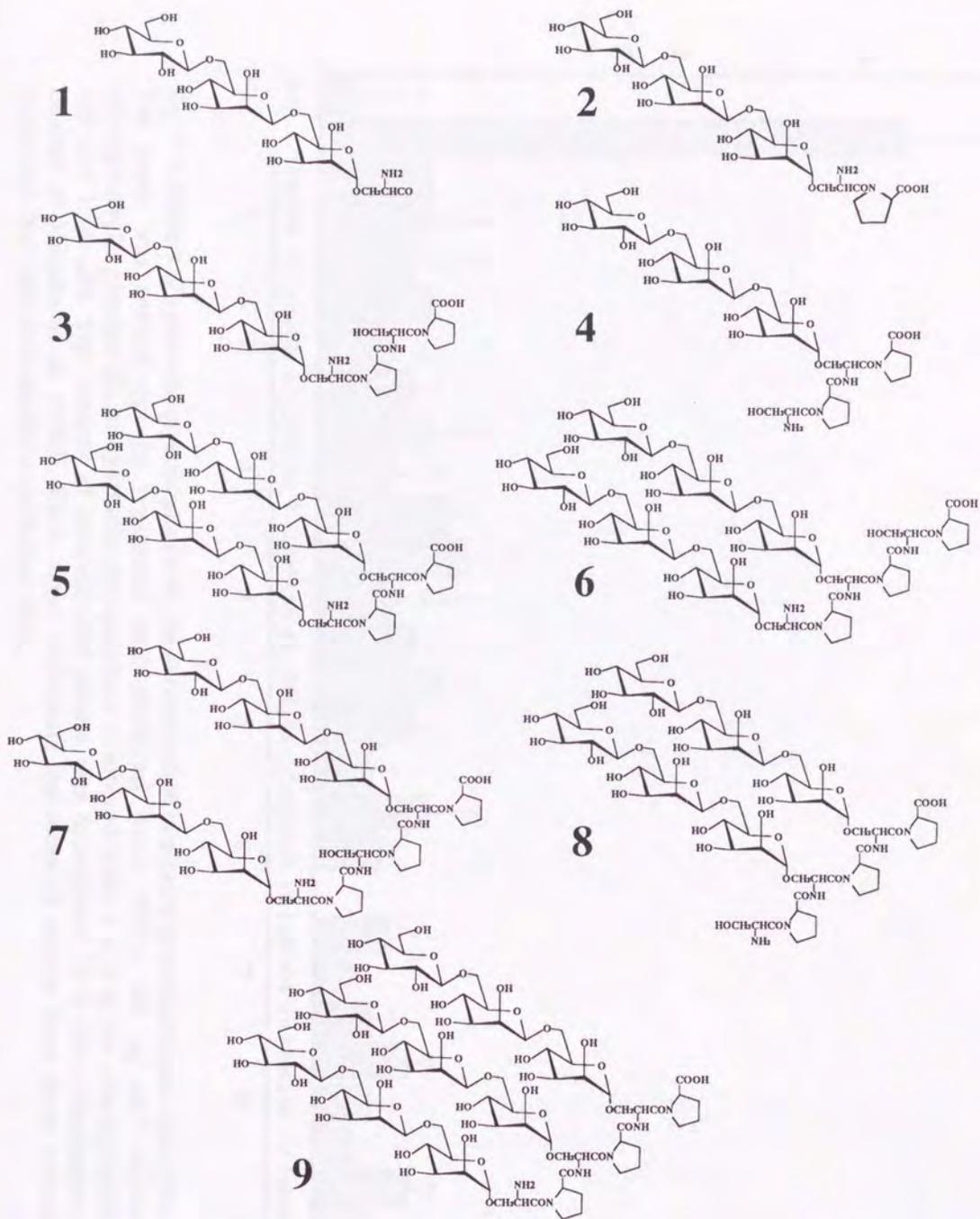


Fig. 7-2 Structures of synthetic glycopeptides numbered from 1 to 9.

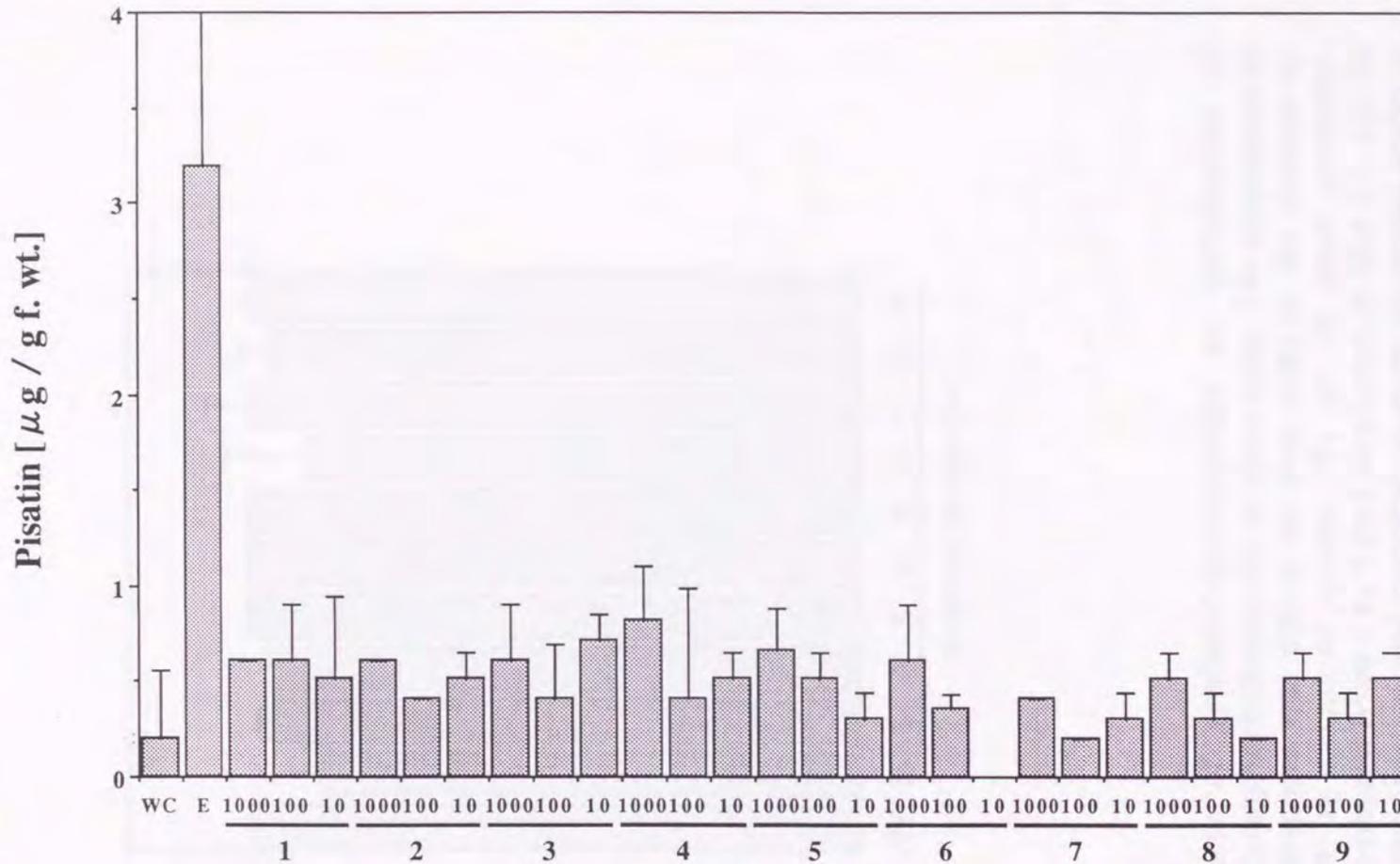


Fig. 7-3 Effects of synthetic-glycopeptides on the accumulation of pisatin in etiolated pea epicotyls. The assay was carried out by treatment with sterilized water (WC), $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ elicitor from *Mycosphaerella pinodes* (E) or synthetic-glycopeptides numbered from 1 to 9 at the concentration of 10, 100 and 1000 μM . The amount of accumulated pisatin was determined 18 h after treatments by the method of Masuda et al. (1983). Each value represents the mean of results from three epicotyls per treatment. Bar indicates standard deviation (SD).

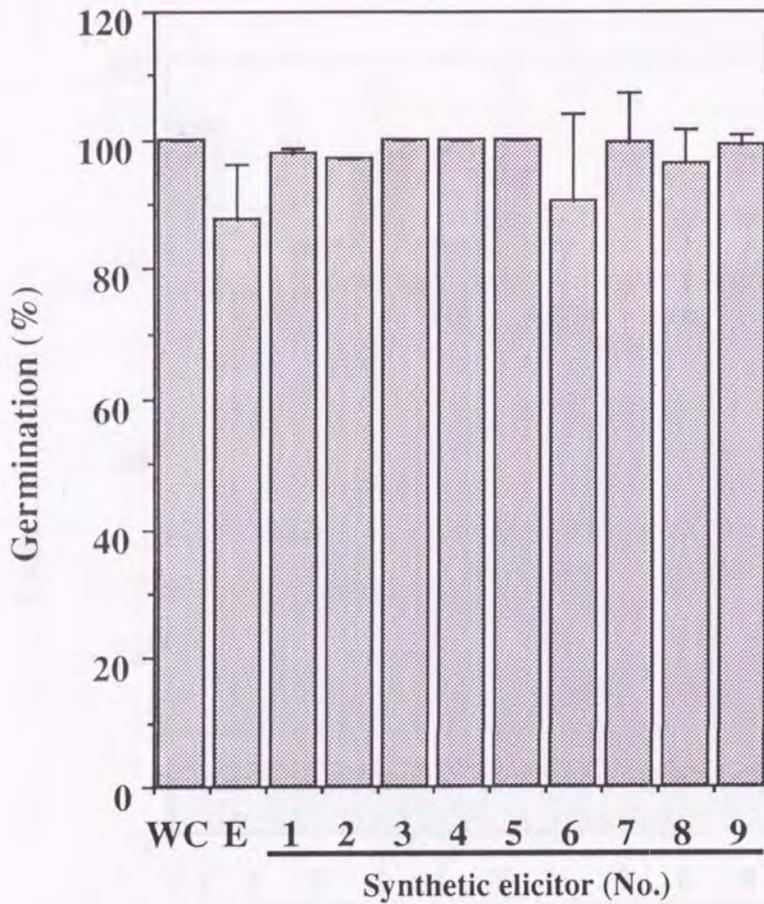


Fig. 7-4 Effects of synthetic-glycopeptides on germination of pycnospore of *Mycosphaerella pinodes* on glass slide. The suspension of *M. pinodes*-pycnospores was placed on glass slide in the absence or presence of 100 μg / ml of elicitor (E) or 20 μmol synthetic-glycopeptides numbered from 1 to 9 and incubated at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ for 18 h. The rates of germination and penetration were measured under a microscope after staining with lactophenol cotton blue by the method of Yamamoto et al. (1986). Each value represents the mean with standard deviation (SD) of the results from triplicate experiments.

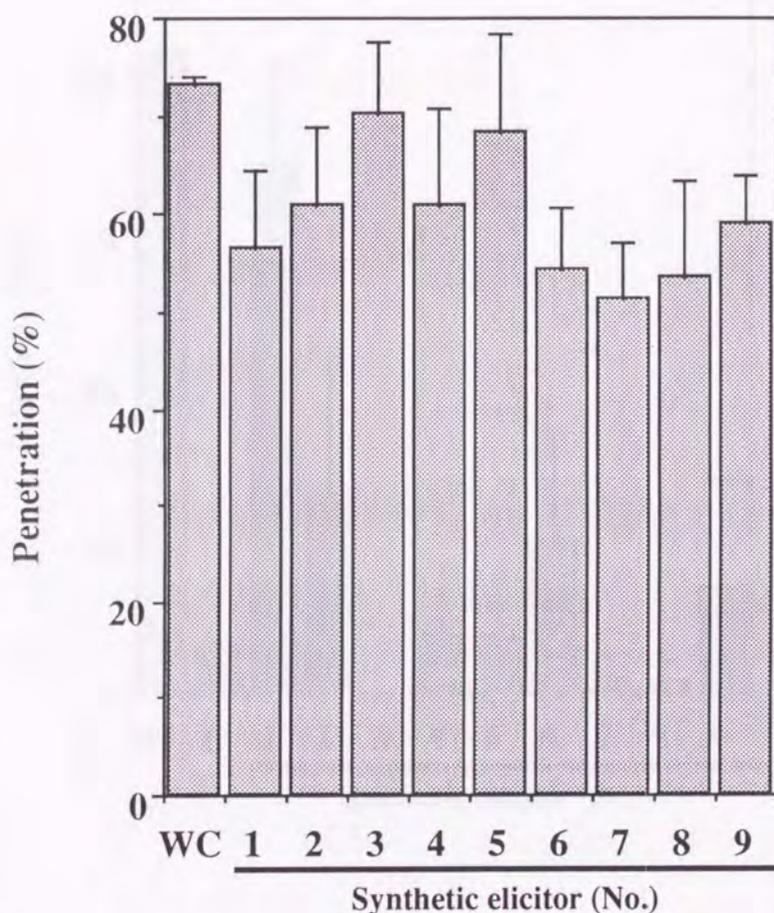


Fig. 7-5 Effects of synthetic-glycopeptides on penetration through ethanol-killed pea epidermis. The suspension of *M. pinodes*-pynospores was placed on ethanol-killed epidermis in the absence or presence of 20 μmol synthetic-glycopeptides numbered from 1 to 9 and incubated at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ for 18 h. The penetration rate were determined under a microscope after staining with lactophenol cotton blue by the method of Yamamoto et al. (1986). Each value represents the mean with standard deviation (SD) of the results from triplicate experiments.

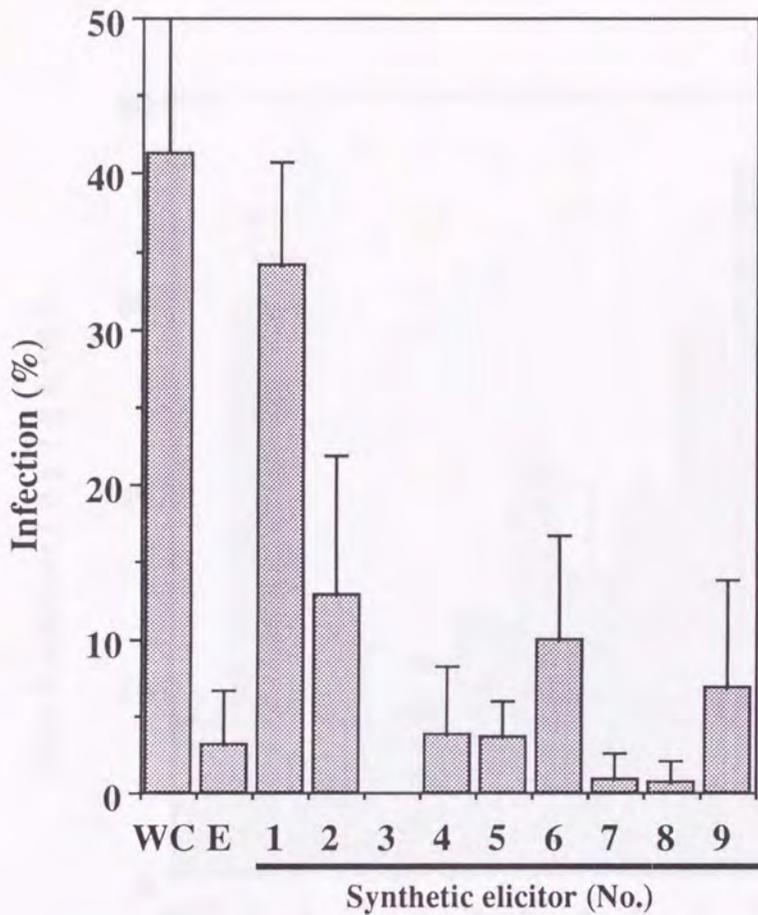


Fig. 7-6 Induction of local resistance on pea epicotyl tissues by treatment with synthetic glycopeptides. Test solutions in the absence (WC) or presence of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of elicitor (E) or 20 μmol synthetic-glycopeptides numbered from 1 to 9 were placed on surface, and incubated at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ for 2 h. After incubation, suspension of *M. pinodes*-pycnospores was placed on the droplet and incubated at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ for 18 h. The percentage of infection was determined under a microscope by the method of Yamamoto et al. (1986). Each value represents the mean with standard deviation (SD) of the results from triplicate experiments.

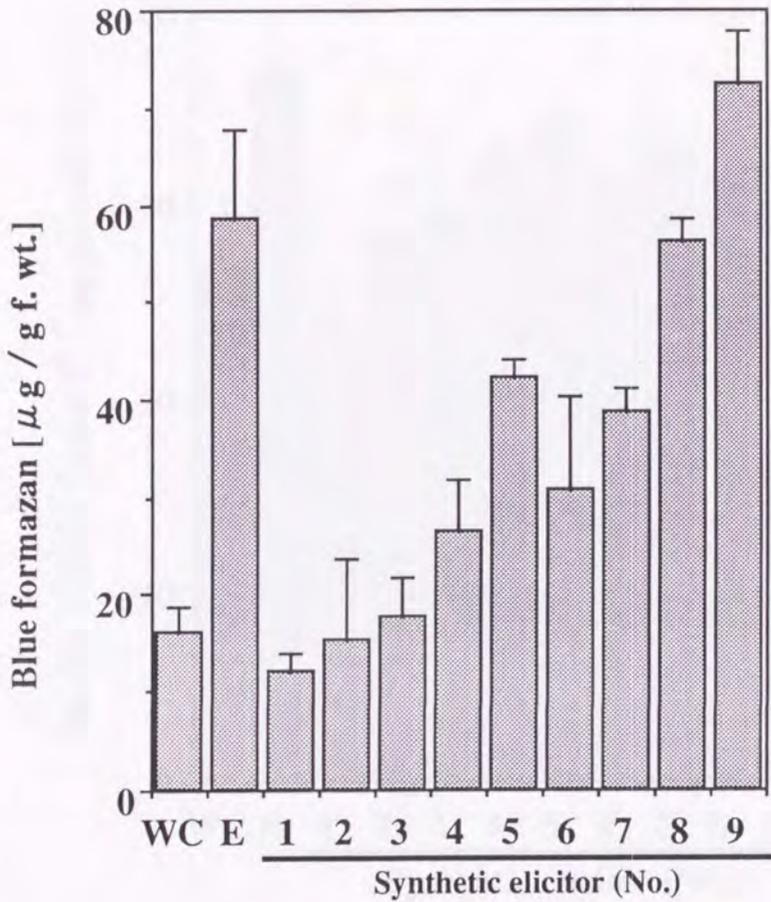


Fig. 7-7 Effects of synthetic-glycopeptides on blue formazan-formation on surface of pea leaves. The assay was carried out at 25 °C for 5 min in 30 mM Tris-MES (pH 7.6) containing 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ NBT in the absence (WC) or presence of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of the elicitor from *Mycosphaerella pinodes* (E) or 20 μM of synthetic-glycopeptides numbered from 1 to 9. Each value represents the mean with standard deviation (SD) from triplicate experiments.

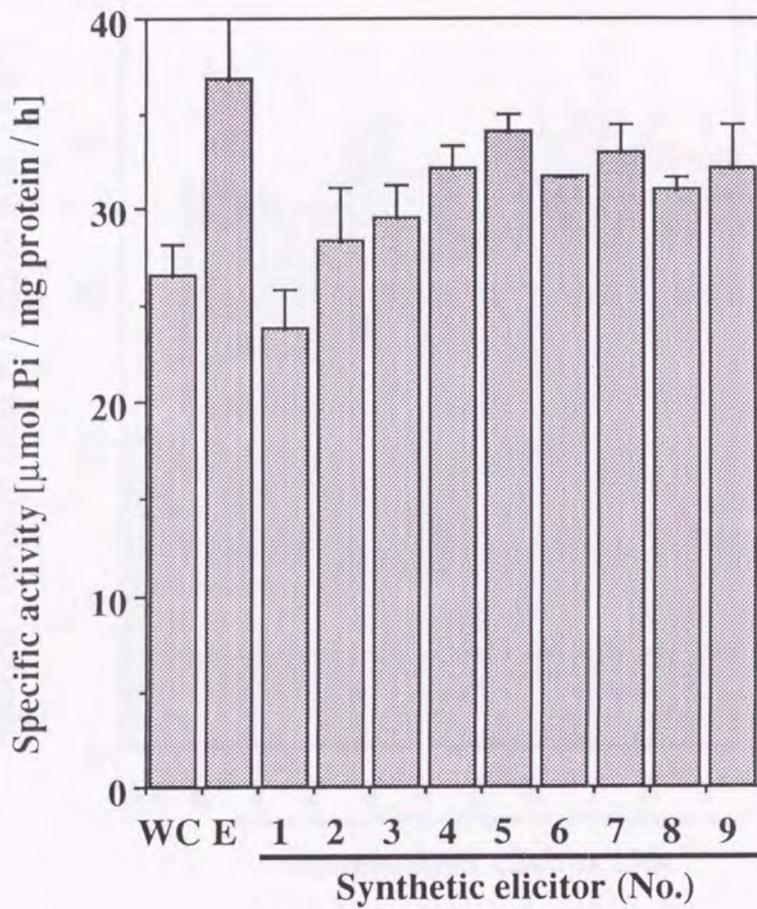


Fig. 7-8 Effects of synthetic-glycopeptides on the activities of ATPases solubilized from the cell wall fraction of pea. The assay for ATPase activity was carried out at 25°C for 20 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) that contained 3 mM Mg-ATP in the absence (water control; WC) or presence of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ elicitor (E), 20 μM synthetic-glycopeptides numbered from 1 to 9. Each value represents the mean with standard deviation (SD) of results from triplicate experiments.

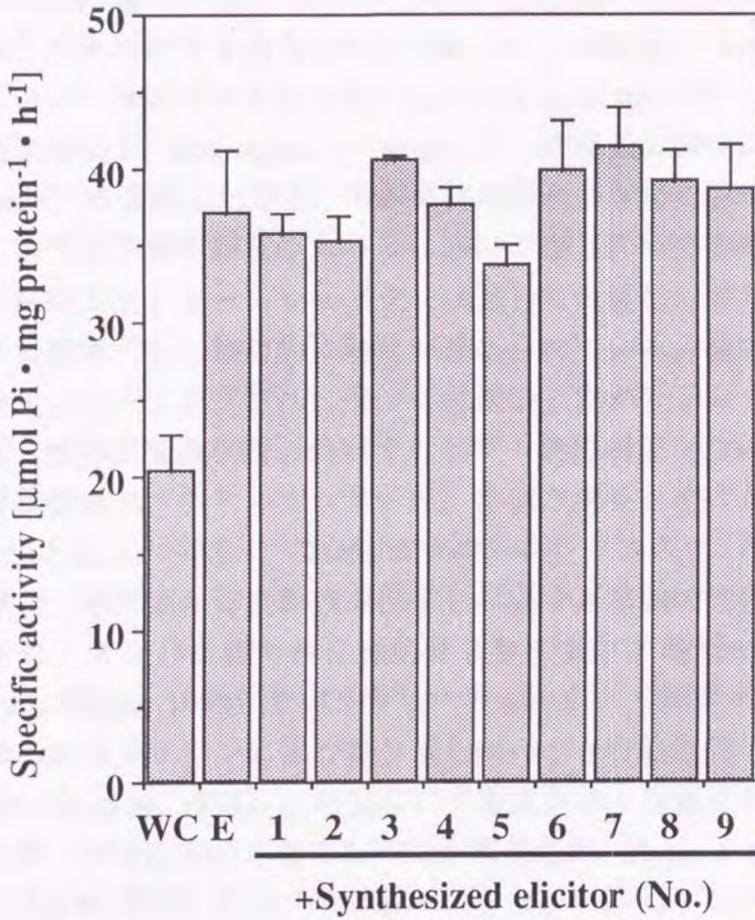


Fig. 7-9 Effects of the concomitant presence of synthetic-glycopeptides with *Mycosphaerella pinodes* -elicitor on the activities of ATPases solubilized from the cell wall fraction of pea. The assay for ATPase activity was carried out at 25°C for 20 min in 30 mM Tris-MES (pH 6.5) that contained 3 mM Mg-ATP in the absence (water control; WC) or presence of 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ elicitor alone (E) or a mixture of the elicitor and synthetic-glycopeptides numbered from 1 to 9. Each value represents the mean with standard deviation (SD) of results from triplicate experiments.

第8章 総合考察

植物病理学において解明されるべき重要な問題の1つとして、植物-病原菌間における宿主特異性決定機構が挙げられる。古くは Flor (1956) がアマとアマのさび病を用いて、宿主の感染反応を制御する各遺伝子に対応して、病原菌には病原性を調節する遺伝子が存在するという”遺伝子対遺伝子説 (Gene for gene theory)” を提唱した。これは宿主の持つ抵抗性遺伝子 (Resistance gene) と、病原菌の持つ非病原性 (力) 遺伝子 (Avirulence gene) が遭遇した場合にのみ抵抗反応が引き起こされるというもので、多くの植物品種と病原糸状菌や細菌のレースにおける相互作用で認められる。この説は分子レベルでは特異的エリシター・レセプター説として発展しており、レース-品種間の特異性を決定する機構として精力的に研究が進められている。植物病原細菌では非病原性遺伝子が数多くクローニングされ、遺伝子対遺伝子説が分子レベルで論議されるようになった。一方、植物病原糸状菌においてもトマト葉枯病菌 (*Cladosporium fulvum*) が生産する品種特異的なペプチドエリシターが、本菌の感染を受けたトマトの細胞間液から分離され (De Wit et al. 1983)、遺伝子がクローニングされた (Vanden Ackervenk et al. 1993)。また、病原菌の非病原性遺伝子に対応する植物の抵抗性遺伝子もトマトでクローニングされ、タンパク質の相互作用に重要であり、複数のレセプターキナーゼ (Torii et al. 1996, Walker 1994) やポリガラクトクトロナーゼ阻害タンパク質 (Lorenzo et al. 1994) に見られるロイシンに富む繰り返し配列を含む細胞外ドメインを持つタンパク質であった (Jones et al. 1994)。さらに、本遺伝子は1塩基を欠損させることのみによって葉かび病菌へ抵抗性を示さなくなったと報告され (Joosten et al. 1994)、レース品種間の特異性決定機構が分子レベルで明らかとなってきた。しかしながら、病原菌が植物への感染の過程で生産する物質中にはレース特異的エリシターのみならず、植物の種、品種に関係なく抵抗反応を誘導する非特異的なエリシターを分泌することは多くの病原菌で知られており、エリシターを生産しない植物病原菌は存在しない。この事実は病原菌は少なくとも非特異的エリシターで誘導される宿主の抵抗反応を回避する何らかのメカニズムを備えていることを強く示唆している。

エンドウ褐紋病菌が宿主エンドウへの感染の過程で柄孢子発芽液中に生産する低分子糖ペプチドサプレッサーは、同様に発芽液に生産される高分子糖ペプチドエリシターによって誘導される防御応答を著しく抑制 (遅延) し、さらには本来エンドウには感染できない非病原菌の感染も成立させる (Oku et al. 1980, Shiraishi et al. 1991b, 1994, Yoshioka et al. 1992b)。一方、このサプレッサーは本菌の非宿主に対しては防御応答を抑制できないだけでなく、逆にエリシターとして作用する (Shiraishi et al. 1991b)。本結果は、サプレッサーは本菌の病原性因子であるとともに、宿主特異性決定因子であることを示唆する (Shiraishi et al. 1991b, 1992, 1994, Yoshioka et al. 1990)。

近年、褐紋病菌サプレッサーの作用点についての解析が進められた結果、本サプレッサーは宿主の ATPase を阻害することが明らかとなった。実際、エンドウ、インゲン、

ササゲ、ダイズ、オオムギの葉をサプレッサーで処理すると、宿主エンドウの ATPase のみが阻害されること (Shiraishi et al. 1991a)、さらには P 型 ATPase の阻害剤である オルトバナジン酸がサプレッサーと同様にエンドウ組織 (バナジン酸は他種植物組織の 防御応答も非特異的に阻害する) の防御応答を抑制することが明らかとなった (Yoshioka et al. 1990, 1992a, 1992b)。しかしながら、上記の植物種から調製した原形質膜画分の ATPase 活性は、特異的であるはずの本サプレッサーによって植物種に関係なく阻害され、組織で見られた特異性は認められなかった (Shiraishi et al. 1991a)。以上の知見から、本論文では「宿主特異性決定には植物細胞壁が重要な役割を持っている」という仮説をたて、植物の病原菌認識、特に宿主特異性決定における植物細胞壁の役割、特に細胞壁中の ATPase および酸化、還元酵素について注目してこれらの病原菌シグナル応答と特異性決定との関連について解析した。

第 2 章で示したように、エンドウ、ササゲの黄化胚軸より調製した細胞壁画分から NaCl を用いて細胞壁タンパク質を可溶化した。11 種の指標酵素活性からエンドウ、ササゲの細胞壁画分への他のオルガネラの混入はほとんどないことが判った (Table 1-1)。エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中にはある種のフォスファターゼ活性が存在し、そのうち ATPase 活性 (細胞壁 ATPase) は褐紋病菌のサプレッサーに対して種特異的な応答をすることが判った (Fig. 2-1)。細胞壁 ATPase は基質特異性、至適 pH、二価イオン要求性、薬剤感受性、SDS-PAGE、およびウエスタンブロットティング解析から原形質膜 ATPase とは異なることを明らかにした (Fig. 2-1, 2, 3, 4, Fig. 3-7, 8)。また、細胞壁 ATPase は褐紋病菌のエリシターで植物種に関係なく、非特異的に活性化された。一方、サプレッサーは、宿主エンドウ由来の細胞壁 ATPase のみを阻害し、非宿主ササゲの細胞壁 ATPase は逆に活性化し、エリシターとしての作用を示した (Fig. 2-5)。これら病原菌シグナルに対する応答性は可溶化していない細胞壁画分の状態でも保持されており、非宿主植物であるササゲ、インゲン、ダイズの細胞壁 ATPase もサプレッサーによって活性化され、サプレッサーに対する細胞壁の応答性は極めて種特異的であることが判った (Fig. 2-6)。これらの結果は細胞壁には特有の ATPase 活性が存在し、これら病原菌シグナルの受容・認識に重要な役割を担っている可能性を示している。換言するならば、褐紋病菌のエリシター、サプレッサーの受容体が細胞壁 ATPase の近傍に存在する、あるいは細胞壁 ATPase 自体が病原菌シグナルの受容体である可能性強くが示唆される。

このように、細胞壁 ATPase が病原菌の認識や宿主特異性に深く関与する可能性が本実験結果から示唆されたが、実際に細胞壁 ATPase が機能するためには、細胞壁、あるいは細胞間液等のアポプラストに ATP が存在している必要がある。しかしながら、ATP が原形質膜を容易に通り抜けることは考えにくく、また、現在のところ植物において細胞外に ATP をはじめとする高エネルギーリン酸結合したヌクレオチドが存在するという報告はない。一方、動物細胞ではエキソサイトーシスによって放出される細胞外の ATP が様々な生理作用を持つことが知られている (黒田 1990, Gordon 1986)。細胞

外に放出された ATP の生理的機能は血管の収縮、血小板の凝集、神経情報伝達等が知られている (黒田 1990, Gordon 1986)。細胞外に放出された ATP の作用は細胞表層に存在するプリン作動型受容体に認識され、アデニル酸シクラーゼやフォスホリパーゼ C をはじめとする細胞内情報伝達に関わる酵素の活性調節や (Boyer et al. 1989, Cooper et al. 1989, 黒田 1990, Gordon 1986, London and Wolff 1977, Martin and Harden 1989)、細胞外に触媒部位を持つエクト型プロテインキナーゼの基質になり、細胞-細胞間の相互作用や接着などの発分化、形態形成に関わっていると考えられている (黒田 1990)。細胞外 ATP は最終的にはエクト型 ATPase、エクト型 5'-ヌクレオチダーゼによってアデノシンやアデニンヌクレオチドに分解され、細胞内に再度取り込まれ ATP に戻される (黒田 1990)。植物においても細胞外に ATP が放出されるメカニズムが存在するのか、また細胞外の ATP 濃度がエリシター、サプレッサー等の病原菌シグナルによって制御されるのか等今後明らかにすべき課題も多い。

以上のように、細胞壁 ATPase が病原菌シグナル、特にサプレッサーに対して種特異的応答性を示すことから、本細胞壁 ATPase を精製することで、病原菌シグナルの受容体、あるいはその後の情報伝達に関わる分子複合体 (装置) が分離できる可能性が示唆された。そこで、まずエンドウ細胞壁 ATPase の精製を試みた。硫酸塩析→ATP アガロースカラム→陰イオン交換カラム Mono Q の 3 つの段階を踏んで ATPase 活性に富む 2 画分を得た (Fig. 3-1, 2)。この 2 画分の ATPase はエリシターで活性化され、サプレッサーで阻害され、病原菌シグナルに対する応答性を保持した画分であることが判った (Fig. 3-3)。この結果も病原菌シグナルの受容体と細胞壁 ATPase が非常に密接な関係にあることを示している。Native-PAGE で精製度を確認するとともに ATPase、パーオキシダーゼ (POX) 活性染色を行った。全タンパク質を銀染色したところ、2 画分とも 91.7 kDa のメジャーなバンドと複数のマイナーなバンドが認められた。しかしながら、興味深いことに ATPase、POX 活性染色の結果、両活性とも銀染色で認められたバンドに相当する位置に活性が認められ、ATPase、POX 活性を示すタンパク質の移動度がほぼ同一であった (Fig. 3-4)。さらに、HRP 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、本法によって沈殿部に ATPase 活性が認められ、ATPase は POX と供沈することが判った (Fig. 3-5)。このことから細胞壁 ATPase と POX が複合体として存在する可能性が強く示唆された。次に、部分精製画分中の ATPase、および POX を同定するため、ウエスタンブロットティング解析を行ったところ、複数の POX 分子が存在し、その中で最もメジャーなタンパク質は 61.2 kDa であった (Fig. 3-6)。一方、ATPase については緑豆の ATPase 抗体および、FSBA を用いて ATP 結合タンパク質の同定の 2 つの方法で検出を試みたところ単一のバンドとして検出され、分子量が 54.9 kDa であることが判った (Fig. 3-7, 8)。以上の結果から、部分精製 ATPase 画分中には複数の POX が存在することが判った。一方、ATPase については緑豆の ATPase 抗体と相互作用するタンパク質と ATP 結合タンパク質が同一の移動度 (54.9 kDa) に検出されたことから、細胞壁 ATPase の本体は 54.9 kDa のタンパク質であろうと考えられる。一般的に原形質膜

ATPase の分離量は約 100 kDa と報告されており (Serrano 1989)、細胞壁 ATPase は諸性質 (Fig. 2-1~4, Table 2-1) とともに原形質膜 ATPase とは分子量も大きく異なることが明らかとなった。植物組織には ATPase、酸性フォスファターゼをはじめとするある種のフォスファターゼが細胞外、細胞壁に存在することは以前から知られていた (Duff et al. 1994, Kivilaan et al. 1961, Ricard 1981, Tadano et al. 1993)。しかしながら、これらのフォスファターゼの役割、特に植物と病原菌の相互作用における役割については報告されていない。さらには細胞壁中で複数のタンパク質 (酵素) が機能的複合体、即ち装置として存在しているという報告は皆無である。今後、細胞壁 ATPase をはじめとする病原菌シグナルの受容にかかわる細胞壁中の認識と情報伝達に関わる装置のメンバーの特定が必要であろう。

一般的に植物と病原菌の相互作用において、病原菌の認識は植物の原形質膜上においてなされると考えられてきた。*Phytophthora megasperma* の生産するオリゴペプチドエリシター (Nurnberger et al. 1994)、糸状菌の細胞壁構成成分であるキトサン (Shibuya et al. 1996)、*Phytophthora megasperma* の細胞壁から調製した β -グルカンエリシター (Cheong et al. 1993, Yoshikawa 1983, Yoshikawa and Sugimoto 1997)、あるいは *Cladosporium fulvum* の AVR9 ペプチドエリシター (Kooman-Gersmann et al. 1996) の結合タンパク質は植物の原形質膜に存在すると報告されている。また、*Fusicoccum amygdali* の生産するの毒素であるフシコクシン (Korthout et al. 1994, Johansson et al. 1993, Lanfermeijer and Prins 1994, Oecking and Weiler 1991)、あるいは *Alternaria alternata* の生産する宿主特異的毒素である AF 毒素 (Namiki et al. 1986)、AK 毒素 (Otani et al. 1989) 等の病原性に関わる分子の作用点も植物の原形質膜にあると報告されている。一方、第 2、3 章の実験結果から、エリシター、サプレッサー等の病原菌シグナルは植物の原形質膜に到達する以前においても細胞壁で認識されており、特にサプレッサーに対する種特異的な応答に関わる認識は細胞壁でなされているものと考えられる。実際、エンドウ褐紋病菌の生産するサプレッサーのうち単離、構造決定されたサプレシン A (Sup A) の結合タンパク質について RMD 解析したところ、エンドウ細胞壁可溶化画分中には Sup A と特異的に結合するタンパク質の存在が明らかとなっている (杉浦 1996)。また、同様の RMD 解析からエンドウ褐紋病菌の高分子エリシターに特異的に結合するタンパク質がエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分に存在すること (Data not shown)、さらにエンドウ組織にピサチンを誘導するナタマメのレクチンであるコンカナバリン A (Con A; Toyoda et al. 1995) の結合タンパク質は原形質膜のみならず、細胞壁中にも存在し、Con A アガロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーでエンドウ細胞壁可溶化画分中の Con A 結合タンパク質を分離したところ ATPase、POX 活性が顕著に濃縮されており、Con A の認識するタンパク質と細胞壁 ATPase、および POX が密接に関連していることが示唆されている (Sugimoto et al. 1996)。このように植物の外界からのシグナル認識に関わる分子が細胞壁に存在することが次第に明らかになってきており、認識に関わる分子の同定が今後の大きな課題であろう。

序論にも述べたがエンドウ褐紋病菌の生産するエリシターを無傷のエンドウ組織に滴下した場合、エリシターは原形質膜や細胞内には移行せず、クチクラ、細胞壁上にとどまっている。しかしながら、エンドウは速やかにエリシターを認識し、感染阻害因子の生成とそれに伴う局所的な抵抗化を発現する（高見 1992, Yamamoto et al. 1986）。このことは無傷エンドウ組織における病原菌シグナルの受容には細胞壁が深く関わっていることを示している。しかしながら、無傷エンドウ組織における抵抗反応については、上記の感染阻害因子の生成以外は明らかとなっていない。そこでエリシターで誘導される無傷植物組織における抵抗反応について、特に近年、数多く報告されているスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の生成を指標に調べた。無傷エンドウ、ササゲ葉にエリシターを滴下すると 5 分以内に O_2^- の生成が認められ (Fig. 4-2)、本 O_2^- 生成に対してサプレッサーは、宿主エンドウの O_2^- 生成は抑制したが、非宿主ササゲの O_2^- は抑制せず、逆に単独で O_2^- 生成を誘導した (Fig. 4-3)。さらに、非病原菌の接種でも 10 分以内に O_2^- 生成が認められ、褐紋病菌 OMP-1 は宿主エンドウに対しては O_2^- 生成を誘導しなかった (Fig. 4-4)。また、数種の阻害剤の実験から、エリシターで無傷エンドウ、ササゲ葉に生成される O_2^- の供給には POX が関与していることが判った (Table 4-1)。以上の結果からエンドウ、ササゲの初期防御応答に O_2^- の生成が関与していることが示唆され、褐紋病菌 OMP-1 は宿主エンドウの O_2^- 生成をサプレッサーを生産することで回避しているものと推察された。

Oxidative burst と呼ばれる現象は、植物-病原菌間相互作用において数多く報告されている。Table 4-3 に示したように Oxidative burst の結果生成される活性酸素種の防御応答における役割については、過敏感細胞死を誘導する第二次シグナル (Beleid et al. 1993, Doke 1983a, Keppler et al. 1986, Levine et al. 1994)、ファイトアレキシン誘導の第二次シグナル (Doke 1983a, Epperlein et al. 1986)、全身獲得抵抗性誘導のシグナル (Chen et al. 1993, Kauss and Jeblick 1995)、直接的な毒性による病原菌への攻撃 (Averyanov et al. 1986) 等の報告がある。エンドウにおいてエリシター処理、あるいは非病原菌で葉組織表層に生成される O_2^- の防御応答における役割について解析したところ、有傷エンドウ組織をエリシターで処理した場合に誘導されるピサチンの蓄積はアスコルビン酸、SOD、タイロン、マンニトール、カタラーゼ等の活性酸素の消去剤で阻害されることはなく、活性酸素種はファイトアレキシン蓄積には関与していないものと考えられた (藤井 1997)。一方、無傷エンドウ葉にエリシター処理で誘導される局所的な抵抗化 (感染阻害因子生成) は SOD、タイロン、マンニトール、カタラーゼのいずれを処理した場合も阻害された (稲田 1997)。即ち、エンドウ葉表層で生成される O_2^- はファイトアレキシン蓄積ではなく、無傷エンドウ葉組織に誘導される感染阻害因子の生成を伴う局所的な抵抗化と密接な関係があるものと考えられる。 O_2^- の生成による局所的な抵抗化のメカニズムについては、今後さらに詳細な解析を要するであろう。

上記のように無傷エンドウ、ササゲ葉上のエリシターも速やかに認識され、 O_2^- を生成することが判った。そこで O_2^- の供給源について、細胞壁でエリシターが認識された

後、細胞壁内で O_2^- が生成される可能性について調べたところ、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分中には NADH 依存性の O_2^- 生成活性が存在した (Fig. 5-1)。各種阻害剤の実験から本 O_2^- 生成には POX が関与していることが判った (Table 5-1)。エンドウ褐紋病菌のエリシターはエンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成を非特異的に上昇させた。一方、サプレッサーはエンドウにおける O_2^- 生成を単独で抑制し、エリシターとの混合処理ではエリシター処理で上昇する O_2^- 生成を水対照区のレベルに抑制した。しかしながら、ササゲ細胞壁可溶化画分では、エリシター処理による O_2^- 生成活性の上昇はサプレッサーの共存下で抑制されないだけでなく、サプレッサー単独処理においても、逆に O_2^- 生成活性を増高させた (Fig. 5-2, 3)。以上の結果から、エンドウ褐紋病菌のエリシターは細胞壁可溶化画分中の O_2^- 生成活性を非特異的に活性化するが、本菌のサプレッサーは種特異的に作用すること、つまり細胞壁可溶化画分中の O_2^- 生成活性は病原菌シグナルによって制御されることが明らかとなった。また、以上の結果は無傷エンドウ、ササゲ葉で見られた O_2^- 生成と酷似している。即ち、細胞壁可溶化画分における O_2^- 生成はエンドウ、ササゲの初期防御応答に非常に重要であり、無傷エンドウ、ササゲ葉を病原菌シグナルで処理した場合に生成される O_2^- の供給に深く関与している可能性が示唆された。また、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶化画分には O_2^- 生成以外に H_2O_2 生成、POX、アスコルビン酸オキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素活性が存在し (Fig. 5-4, 7, 9, 11)、リンゴ酸脱水素酵素を除く酵素活性はエンドウ褐紋病菌のエリシター、サプレッサーによって制御されることが判った (Fig. 5-5, 8, 10)。即ち、「病原菌シグナルの受容体・細胞壁 ATPase・POX・アスコルビン酸オキシダーゼ」といった複合体が細胞壁に存在している可能性が考えられる。この結果から病原菌シグナルの受容後、活性酸素種の生成をはじめとする細胞外の酸化、還元状態が速やかに変化することは十分予想される。さらに、このような細胞外の環境変化が細胞内の代謝にも影響を与えるのではないだろうか。

無傷エンドウ組織において生成される O_2^- は局所的な抵抗化 (感染阻害因子の生成) に関与している可能性についてはすでに述べた。このような観点から感染阻害因子生成のメカニズムについて分離細胞壁画分を用いて解析した (未掲載)。エンドウ、ササゲの細胞壁画分をエリシターで処理すると 1 時間以内に組織で生成される感染阻害因子と性質が非常に類似した物質の生成が認められた (稲田 1995)。また、この感染阻害物質の生成は無傷組織における感染阻害因子の生成と同様に、活性酸素の消去剤であるカタラーゼ、マンニトール、SOD、タイロンの共存下で顕著に阻害された (稲田 1997)。いずれの消去剤を用いた場合においても感染阻害物質の生成が阻害された点については、 O_2^- と H_2O_2 の存在下で Harber - Weiss 反応の結果生成される $OH\cdot$ が最終的に重要であると考えられる。以上の結果から、細胞壁は病原菌の認識のみならず極めて初期の防御応答を発現する場としても重要な役割を持つものと考えられる。このようにエンドウ組織表層でおこる極めて初期の防御応答発現のメカニズムが次第に明らかになってきており、組織や分離細胞壁で生成される感染阻害因子の同定が急がれるところである。

エンドウ褐紋病菌と植物の相互作用において、細胞壁が病原菌シグナルの受容、あるいは宿主特異性決定に重要な役割を持つことが第2、3、4章の実験結果から示唆された。しかしながら、細胞壁における病原菌の認識後、どのような経路で情報が原形質膜、細胞内に伝達されるのか、あるいはどのような分子が情報伝達に関わっているかについては明らかではない。そこで細胞外マトリクスと細胞骨格の連結に関わる膜貫通タンパク質であるインテグリンを介した細胞壁-原形質膜間の情報伝達の可能性について調べた。エンドウの防御応答の一つであるピサチンの蓄積は細胞外マトリクスとインテグリンの結合に重要な RGD 配列を含む合成ペプチドで配列特異的に抑制され、ピサチン蓄積抑制効果はペプチドの前処理時間に依存し、6 時間の前処理でほぼ水処理レベルに抑制した (Fig. 6-1,2)。しかしながら、RGD ペプチドは原形質膜、および細胞壁 ATPase を阻害しなかった (Fig. 6-3)。以上の結果から、細胞壁と原形質膜間の連結がエンドウの防御応答に重要な役割を持つ可能性が示唆された。また、エンドウの原形質膜画分中には、原形質膜-細胞外マトリクスの連結に関与するタンパク質の1つであるヴィトロネクチン受容体様のタンパク質がウエスタンブロットティングの結果、少なくとも6本 (推定分子量 96.2、86.7、65.0、51.5、39.7、33.9 kDa) 認められた (Fig. 6-4)。また、ビオチン化細胞壁タンパク質を用いたファーウエスタンブロットティング解析の結果、ヒトのヴィトロネクチン受容体抗体と相互作用する原形質膜タンパク質のうち 65.0 kDa のタンパク質が細胞壁タンパク質と RGD 配列特異的に結合すること (Fig. 6-5,6)、細胞骨格系のタンパク質の1つであるアクチンと結合する原形質膜タンパク質は複数認められ、そのうちの1つはヒトのヴィトロネクチン受容体抗体と相互作用する原形質膜タンパク質のうち 39.7 kDa のタンパク質とほぼ一致した (Fig. 6-7)。以上の結果から、エンドウ原形質膜中にはインテグリンの1つであるヴィトロネクチン受容体様のタンパク質が存在し、細胞壁、あるいは細胞骨格と直接相互作用している可能性が示唆された。特に原形質膜のヴィトロネクチン受容体様のタンパク質と細胞壁タンパク質との結合は、動物細胞における細胞外マトリクスとの接着同様に RGD 配列を認識して行われていることが判った。また、細胞壁タンパク質と相互作用するヴィトロネクチン受容体様のタンパク質と、原形質膜中のアクチン結合タンパク質が異なったこと、さらには複数のヴィトロネクチン受容体様のタンパク質が存在したことから、細胞壁-原形質膜-細胞骨格の間の結合 (連絡) はタンパク質1分子を介して行われているのではなく、複数のタンパク質を介して行われていることが伺えた。つまり、エンドウ原形質膜のヴィトロネクチン受容体様のタンパク質は本来サブユニットで機能しており、細胞外マトリクスとの結合を担うタンパク質鎖、細胞骨格系との結合を担うタンパク質鎖等が各々存在し、集合体として機能している可能性が高い。

動物細胞では細胞と細胞外マトリクスとの結合が様々な生命活動に重要な役割を持っており、細胞外からの情報伝達にも重要な役割を持っていると報告されている (Hynes 1992, Miyamoto et al. 1995, Schwartz et al. 1991, Vuori and Ruslahti 1993, Werb et al. 1989)。近年、植物においても細胞壁-原形質膜間の結合とその重要性がダイズ、タバコ、

タマネギ等で報告されており (Akashi et al. 1993, Akashi and Shibaoka 1991, Pont-Lezica et al. 1993, Roberts 1989, 1990, Schindler et al. 1989, Shibaoka et al. 1993)、HRGP や ヴィトロネクチン様細胞外タンパク質、ヴィトロネクチン受容体様タンパク質等の結合に関わる分子の存在も報告されている (Akashi et al. 1993, Akashi and Shibaoka 1991, Pont-Lezica et al. 1993, Sanders et al. 1991, Schindler et al. 1989, Shibaoka et al. 1993)。エンドウ褐紋病菌の生産するエリシター、サプレッサーの受容、特に宿主特異性決定には細胞壁が重要である可能性が示唆された。しかしながら、このような仮説は細胞壁での病原菌シグナルの受容後の原形質膜、あるいは細胞内への情報伝達機構の存在なくしては成立しない。第6章の実験結果から細胞外マトリクス (細胞壁) と原形質膜の結合がエンドウの防御応答に重要な役割を持つことが示唆され、原形質膜上のインテグリンを介した細胞壁-原形質膜間の情報伝達系が存在する可能性が高いものと思われる。今後、細胞壁-原形質膜間の情報伝達機構、あるいは宿主特異性決定のメカニズムの解明が今後の重要な課題である。

以上のように植物の細胞壁は病原菌シグナルの第一次作用部位であり、病原菌認識、宿主特異性決定、あるいはその後の防御応答に重要な役割を持つ可能性が強く示唆され、エリシター、サプレッサーの受容体が細胞壁に存在することが想定されるがその実態については明らかにはなっていない。近年、エンドウ褐紋病菌が柄孢子発芽液中に生産するエリシターが精製され、 $\text{Glc}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ の三糖がセリンを介してタンパク質鎖と O -グリコシド結合した、分子量 70,000 ~ 140,000 の高分子糖タンパク質であることが明らかとなっている (Matsubara and Kuroda 1987; Fig 7-1)。そこでエリシター活性の最小単位、さらにはエリシターの受容体を同定するためのプローブを検索することを目的とし、 $\text{Glc}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ の三糖を単位とする 9 種の糖ペプチド (Takeda et al. 1994; Fig. 7-2) を合成し、エンドウの防御応答に対する影響を調べた。9 種の合成糖ペプチドはピサチン蓄積を誘導したが、ピサチン蓄積誘導活性は褐紋病菌エリシターと比較して非常に弱かった (Fig. 7-3)。しかしながら、供試した 9 種の合成糖ペプチドのうち No. 2 ~ 9 はエンドウ組織に局所的な抵抗化を誘導し (Fig. 7-6)、合成糖ペプチド No. 4 ~ 9 はエンドウ組織表層における O_2^- 生成を誘導した (Fig. 7-7)。さらに、合成糖ペプチド No. 4 ~ 9 は *in vitro* において細胞壁画分 ATPase を活性化した (Fig. 7-8)。また、合成糖ペプチドによる局部抵抗化、 O_2^- 生成の誘導、細胞壁画分 ATPase の活性化は合成糖ペプチドの分子量に依存している傾向が伺えた。以上の結果から、今回供試した合成糖ペプチドのうち特に No. 4 ~ 9 はエンドウ組織表層における防御応答のエリシターとして作用するが、ピサチン蓄積誘導活性は褐紋病菌のエリシターと比較して非常に弱いことが判った。このようにエリシター断片の大きさによって誘導される抵抗反応の種類が異なることについては、植物の持つ内性エリシターであるガラクチュロン酸で詳細に調べられている。植物細胞壁由来のペクチン断片は重合度が 9 ~ 12 ではファイトアレキシンを誘導するが、重合度 (Degree of polymelization; DP) が 8 以下になると顕著に活性が低下する (Darvill and Albersheim 1984, Ebel and Cossio 1994, Ryan

1988)。しかしながら、ファイトアレキシン誘導活性は持たない DP 2、3 のガラクチュロン酸は HRGP 蓄積を誘導し (Boudart et al. 1995)、DP 2 ~ 6 のガラクチュロン酸は PR タンパク質であるプロテイナーゼ阻害タンパク質の蓄積を誘導する (Ryan 1988)。このような報告と考えあわせると、植物表層における抵抗反応の引き金となる認識とファイトアレキシン蓄積に関わる認識は独立して存在、あるいは機能している装置を介している可能性が考えられる。今回供試した合成糖ペプチドはファイトアレキシンを誘導する高分子エリシターの一部を人工的に合成したものである (Takeda et al. 1994)。従って、これらの糖ペプチドがピサチン蓄積を誘導しなかったことについては、一定程度以上の大きさ (分子量)、あるいはより複雑な高次構造が必要である可能性が考えられる。この点については将来的にさらに大きな糖ペプチドを合成し、調べる必要がある。しかしながら、合成糖ペプチド No. 4 ~ 9 はエンドウ組織表層での初期防御応答の解析に有用なモデルエリシターとなりえること、さらにはエンドウ組織表層でのエリシター認識に関わる受容体の同定のための有用なプローブとなりえるものと考えられる。

以上のように、植物の異物認識機構に関わる分子の実態に関する情報はかなり集積してきたものと考えられる。一方、序論にも述べたように、現在見ることのできる植物と病原菌の関係は、長きにわたる共進化の「結果」であることは想像に難くない。それは病原菌の巧妙な戦略とそれに対抗する植物の知恵の結晶であるといえる。しかしながら、このような高度なやりとり (共進化) の過程を経て残ってきた病原菌も植物に異物として認識されるエリシターを生産する。一方、植物側においても病原性因子の受容体を備えている。このような自身に対して不利になるような分子を何故生産し続けなければならなかったのだろうか? 病原菌の持つ非病原性遺伝子の産物と考えられる特異的エリシターは、変異や欠損という比較的単純な変化 (進化) によって植物に認識されなくなり、単一の抵抗性遺伝子導入によって得られた抵抗性品種は、数年のうちにその品種を特異的に侵すレースの出現が見られるということについてはすでに述べた (Briggs and Johal 1994)。このことは病原菌が自分自身にとって不利な形質は変化させる能力を持っていることを示している。つまり、このような能力を持っているにも関わらずエリシターを生産するのは、エリシターを分泌せざるを得ない状態にある、つまりエリシターは病原菌自身にとって何らかの必須の、もしくは有利になるような因子であるか、あるいは発芽等の過程で出てくる細胞壁の断片等、回避し難いものであると考えられる。一方、植物は一見不利な性質である病原菌に感染される性質 (病気に罹る性質) を支配している病原性因子の受容体を持っているものと考えられる。この点についても病原菌の生産するエリシター同様に、病原性因子の受容体は、基本的な認識や代謝に関わるタンパク質等の植物にとって必須の分子、もしくは生存に有利になるような分子であると考えられる。従って、このような分子を欠損した場合、植物自身の生命自体が維持できなくなるため、不利ではあるものの植物体内で維持され続けているのではなかろうか。エンバクのヴィクトリア葉枯病菌の生産する宿主特異的毒素であるヴィクトリンの作用部位は植物の光呼吸に重要なグリシン脱炭素酵素であると報告されている (Navarre and

Wolpert 1995, Wolpert et al. 1996)。一方、エンドウ褐紋病菌はこの点について非常に顕著な例と思われる。現在褐紋病菌に抵抗性のエンドウ品種については幾つかの報告はあるものの (Clulow et al. 1991, 1992)、完全に抵抗性品種と呼ぶにふさわしい品種は存在していない。また、EMS (Ethyl methane sulfonate) 処理し、人為的に突然変異を誘発させ、得られた植物中にも褐紋病菌に抵抗性を示す品種は存在しなかった (Data not shown)。つまり、いずれのエンドウ品種もサプレッサーに対する受容体を持っているものと考えられる。この点については褐紋病菌の病原性因子であるサプレッサーの作用点が、植物の基本的な代謝や恒常性の維持に関わる ATPase の阻害にあることを考えると、抵抗性品種が存在せず、さらに容易に作出出来ないというのは理解に難くない。一方、病原菌側から見ると、植物にとって必須な分子 (タンパク質、酵素) に作用する因子を進化の過程で獲得したと考えると、その戦略は驚くべきものであり、そのような戦略を身につけたものだけが、病原菌として生き残ってきたのかもしれない。

植物の細胞壁はその名の示す通り植物細胞を囲む”壁”であり、植物の形の規定や、外界からのストレスに対する物理的な障壁として細胞を守るといった静的なものであると長い間考えられてきた。しかしながら、近年細胞壁に関する詳細な研究がなされるに連れて、細胞壁には糖類のみならず、様々タンパク質や酵素、あるいはフェノール性の物質が存在し、今までのイメージとは異なり非常に動的で、生長過程や外界からのストレスに対応して劇的に変化することが明らかになってきた (Fry et al. 1992, Showalter 1993, Vaner and Lin 1989)。植物細胞が伸長、あるいは分裂する際には細胞壁に存在する β -1,3 グルカナーゼをはじめとする細胞壁分解酵素による細胞壁繊維の分解 (Fry et al. 1992)、またキシログルカン転移酵素による細胞壁繊維の繋ぎ変え (Nishitani and Tominaga 1992) 等が起こること、また細胞壁の酸伸長に関与するエクспанシンと呼ばれるタンパク質の存在も明らかにされている (McQueen-Mason et al. 1992)。また、植物ホルモンの1つであるオーキシン結合タンパク質 (Jones et al. 1993, MacDonald et al. 1991) やインシュリン結合タンパク質 (Watanabe and Hirano 1994)、あるいは動物の上皮組織成長因子 (Epidermis growth factor; EGF) の受容にかかわる EGF ファミリーと高い相同性を持つ、細胞壁結合型プロテインキナーゼ (Wall-associate kinase; Wak-1) が細胞壁に存在するとの報告があり (He et al. 1996)、内性シグナルの受容、情報伝達にも関与しているものと推察される。一方、植物と病原菌の相互作用においては β -フルクトシダーゼ (Benhamou et al. 1991)、 β -1, 3 グルカナーゼ (Benhamou et al. 1989, Mauch et al. 1989)、キチナーゼ (Benhamou et al. 1990)、脂質輸送タンパク質 (Nielsen et al. 1996, Molina et al. 1993, Pyee et al. 1994, Segura et al. 1993) 等の抗菌性タンパク質が存在し、病原菌の感染やエリシター処理で増加することが知られている。また、病原菌の感染やエリシター処理で細胞壁のリグニン化 (Vance et al. 1980) や HRGP、PRGP 等の細胞壁構成タンパク質が細胞壁結合型パーオキシダーゼによって架橋され (Bradley et al. 1992)、病原菌の攻撃に対する物理的な障壁となっている。また、HRGP については病原菌の感染やエリシター処理で増加することや (Boudart et al. 1995)、

感染部位に蓄積すること (O'Connell et al. 1990)、あるいは直接病原菌を凝集させることが報告されている (Mellon and Helgeson 1982)。また、細胞壁は外界からのシグナルの受容、第二次シグナルの生成の場として機能しているとも考えられている (Ralton et al. 1986)。実際、植物細胞壁成分であるペクチンが、病原菌の持つ酵素によって分解されて生じるオリゴガラクトン酸は内性のエリシターとして作用し (Darvill et al. 1984, Harn et al. 1981, Ryan 1988)、細胞壁に存在するポリガラクトナーゼ阻害タンパク質は、エリシター活性を持つオリゴガラクトン酸の生成に関与していると考えられている (Cervone et al. 1989, Lorenzo et al. 1994)。また、植物病原細菌の1つである *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* の生産する HarpinPss の受容部位は細胞壁であること (Hoyos et al. 1996)、細胞壁結合型のプロテインキナーゼは、タバコモザイクウイルスの細胞間移行タンパク質をリン酸化することによってウイルスの全身移行を阻害している (Citovsky et al. 1993) 等、植物細胞壁は糸状菌、細菌、ウイルスといった様々な病原体との相互作用において重要な役割を持っている。

従来、植物と病原菌相互作用における出発点は原形質膜にあると考えられ、研究が進められてきた。しかしながら、植物の構造について考えて見ると、細胞の周りには非常に厚く、固い細胞壁に囲まれており、実際の病原菌の感染の場で起こることを理解するためには、細胞壁を無視して考えることは出来ない。本論文の結果を総合的にまとめ、想定される植物-病原菌間の相互作用のモデルについて Fig. 8-1 に示した。エンドウ褐紋病菌の発芽に伴って分泌されるエリシター (非宿主の場合サプレッサー) は細胞壁に存在する受容体で認識され、受容体と密接に連携している ATPase の活性化、アスコルビン酸オキシダーゼ、パーオキシダーゼの活性化が起こり、パーオキシダーゼによって触媒される O_2^- 、 H_2O_2 をはじめとする活性酸素種の生成がおこり、感染阻害因子の生成等の初期の防御壁が形成される。また、受容体で認識された情報はさらに細胞外マトリクス糖タンパク質であるヴィトロネクチン様タンパク質を介して、膜貫通型受容体インテグリンファミリーであるヴィトロネクチン受容体様タンパク質に伝達され、さらにヴィトロネクチン受容体様タンパク質と結合している細胞骨格系 (細胞内) に伝達され、防御遺伝子の発現、防御応答を誘導しているものと考えられる。一方、エンドウ褐紋病菌はサプレッサーを生産することによって、宿主のエンドウの細胞壁 ATPase、アスコルビン酸オキシダーゼ、パーオキシダーゼの活性、さらには O_2^- 、 H_2O_2 をはじめとする活性酸素種の生成、感染阻害因子の生成等の初期の防御応答の発現や細胞内への情報伝達を遮断 (遅延) することによって遺伝子発現を伴うような防御応答をも抑制し、宿主細胞への感染を成立させているものと推察できる。

以上の結果を総合すると、植物細胞の最外層に位置する植物固有のオルガネラである細胞壁は病原菌の認識、宿主特異性決定に重要な役割を持っており、さらには病原菌認識後の防御応答、あるいは防御応答誘導のための第二次シグナル生成の場として重要な働きをしており、一方、病原菌の生産する病原性因子であるサプレッサーの作用部位でもあり、植物細胞の受容性 (罹病化) にも関与していることが明らかとなった。今後、

実際の病原菌の感染の場で起こる出来事をさらに正確に理解することによって、将来新たな病害の防除法の確立、具体的には細胞壁における病原菌シグナル（特にサプレッサー）の受容体や防御応答発現に関わるエフェクター分子の特定と、それらの改変による抵抗性品種の作出や、サプレッサーの作用を特異的に打ち消す薬剤の開発等応用的な側面での研究が重要な課題である。



Fig. 2-1. Proposed model for signal transduction cascade for defense responses. CW, cell wall; ER, endoplasmic reticulum; Nox, nitric oxide; PLA, plasma membrane-associated phospholipase A2; PLC, phospholipase C; PKC, protein kinase C; PKA, protein kinase A; PKL, protein kinase L; DAG, diacylglycerol; IP3, inositol 1,4,5-trisphosphate; DAGL, diacylglycerol lipase; DAGL1, diacylglycerol lipase 1; DAGL2, diacylglycerol lipase 2; DAGL3, diacylglycerol lipase 3; DAGL4, diacylglycerol lipase 4; DAGL5, diacylglycerol lipase 5; DAGL6, diacylglycerol lipase 6; DAGL7, diacylglycerol lipase 7; DAGL8, diacylglycerol lipase 8; DAGL9, diacylglycerol lipase 9; DAGL10, diacylglycerol lipase 10; DAGL11, diacylglycerol lipase 11; DAGL12, diacylglycerol lipase 12; DAGL13, diacylglycerol lipase 13; DAGL14, diacylglycerol lipase 14; DAGL15, diacylglycerol lipase 15; DAGL16, diacylglycerol lipase 16; DAGL17, diacylglycerol lipase 17; DAGL18, diacylglycerol lipase 18; DAGL19, diacylglycerol lipase 19; DAGL20, diacylglycerol lipase 20; DAGL21, diacylglycerol lipase 21; DAGL22, diacylglycerol lipase 22; DAGL23, diacylglycerol lipase 23; DAGL24, diacylglycerol lipase 24; DAGL25, diacylglycerol lipase 25; DAGL26, diacylglycerol lipase 26; DAGL27, diacylglycerol lipase 27; DAGL28, diacylglycerol lipase 28; DAGL29, diacylglycerol lipase 29; DAGL30, diacylglycerol lipase 30; DAGL31, diacylglycerol lipase 31; DAGL32, diacylglycerol lipase 32; DAGL33, diacylglycerol lipase 33; DAGL34, diacylglycerol lipase 34; DAGL35, diacylglycerol lipase 35; DAGL36, diacylglycerol lipase 36; DAGL37, diacylglycerol lipase 37; DAGL38, diacylglycerol lipase 38; DAGL39, diacylglycerol lipase 39; DAGL40, diacylglycerol lipase 40; DAGL41, diacylglycerol lipase 41; DAGL42, diacylglycerol lipase 42; DAGL43, diacylglycerol lipase 43; DAGL44, diacylglycerol lipase 44; DAGL45, diacylglycerol lipase 45; DAGL46, diacylglycerol lipase 46; DAGL47, diacylglycerol lipase 47; DAGL48, diacylglycerol lipase 48; DAGL49, diacylglycerol lipase 49; DAGL50, diacylglycerol lipase 50; DAGL51, diacylglycerol lipase 51; DAGL52, diacylglycerol lipase 52; DAGL53, diacylglycerol lipase 53; DAGL54, diacylglycerol lipase 54; DAGL55, diacylglycerol lipase 55; DAGL56, diacylglycerol lipase 56; DAGL57, diacylglycerol lipase 57; DAGL58, diacylglycerol lipase 58; DAGL59, diacylglycerol lipase 59; DAGL60, diacylglycerol lipase 60; DAGL61, diacylglycerol lipase 61; DAGL62, diacylglycerol lipase 62; DAGL63, diacylglycerol lipase 63; DAGL64, diacylglycerol lipase 64; DAGL65, diacylglycerol lipase 65; DAGL66, diacylglycerol lipase 66; DAGL67, diacylglycerol lipase 67; DAGL68, diacylglycerol lipase 68; DAGL69, diacylglycerol lipase 69; DAGL70, diacylglycerol lipase 70; DAGL71, diacylglycerol lipase 71; DAGL72, diacylglycerol lipase 72; DAGL73, diacylglycerol lipase 73; DAGL74, diacylglycerol lipase 74; DAGL75, diacylglycerol lipase 75; DAGL76, diacylglycerol lipase 76; DAGL77, diacylglycerol lipase 77; DAGL78, diacylglycerol lipase 78; DAGL79, diacylglycerol lipase 79; DAGL80, diacylglycerol lipase 80; DAGL81, diacylglycerol lipase 81; DAGL82, diacylglycerol lipase 82; DAGL83, diacylglycerol lipase 83; DAGL84, diacylglycerol lipase 84; DAGL85, diacylglycerol lipase 85; DAGL86, diacylglycerol lipase 86; DAGL87, diacylglycerol lipase 87; DAGL88, diacylglycerol lipase 88; DAGL89, diacylglycerol lipase 89; DAGL90, diacylglycerol lipase 90; DAGL91, diacylglycerol lipase 91; DAGL92, diacylglycerol lipase 92; DAGL93, diacylglycerol lipase 93; DAGL94, diacylglycerol lipase 94; DAGL95, diacylglycerol lipase 95; DAGL96, diacylglycerol lipase 96; DAGL97, diacylglycerol lipase 97; DAGL98, diacylglycerol lipase 98; DAGL99, diacylglycerol lipase 99; DAGL100, diacylglycerol lipase 100.

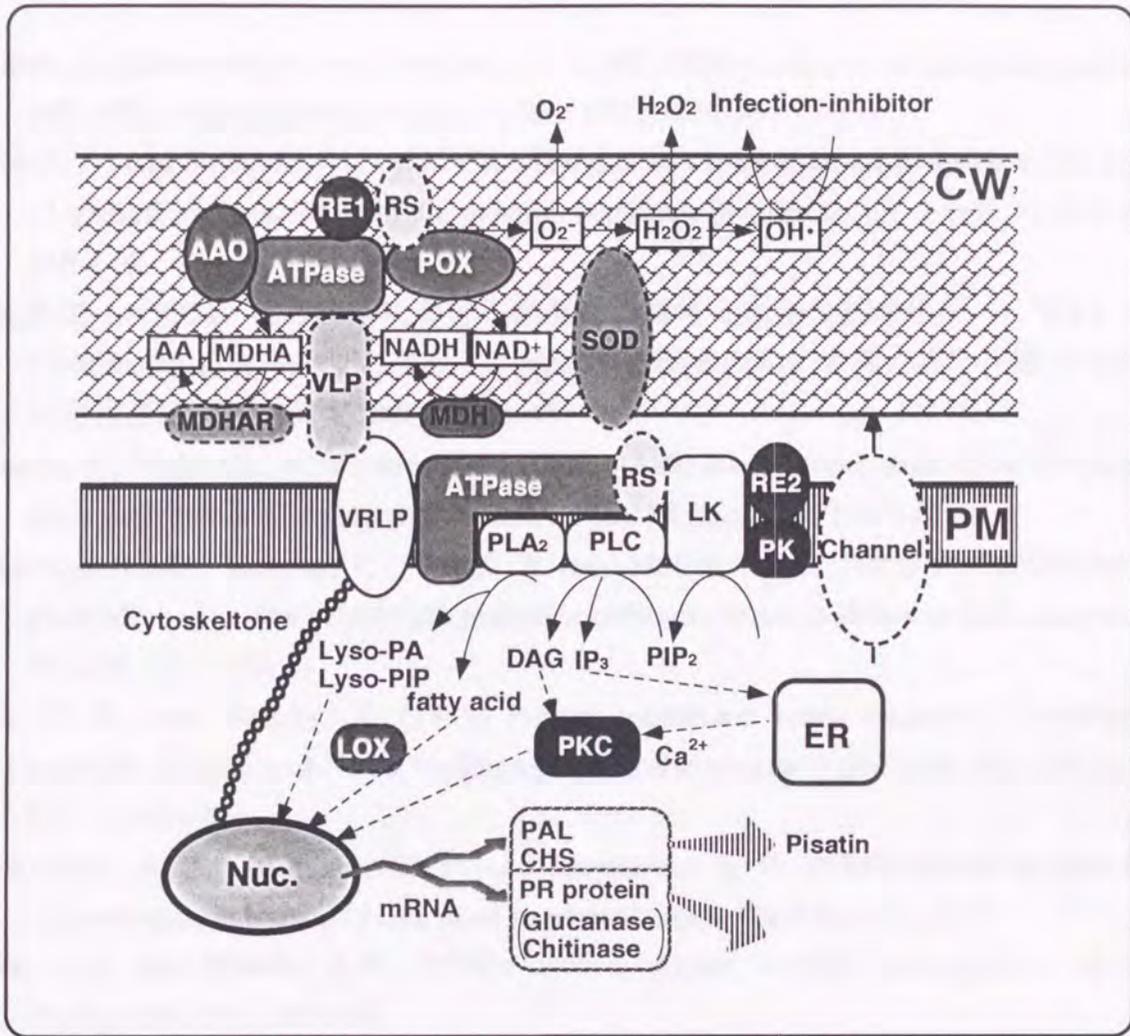


Fig. 8-1 Proposal model for signal transduction cascade for defense responses. CW, cell wall; ER, endoplasmic reticulum; Nuc, nuclear; PM, plasma membrane; AAO, ascorbate oxidase; MDAR, monodehydroascorbate reductase; MDH, malate dehydrogenase; POX, peroxidase; RE, a putative receptor for elicitor; RS, a putative receptor for suppressor; SOD, superoxide dismutase; VLP, vitronectin like protein; VRLP, vitronectin receptor like protein; AA, ascorbic acid; DAG, diacylglycerol; IP₃, inositol 1,4,5-triphosphate; MDHA, monodehydroascorbate; PA, phosphatidic acid; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; LK, lipid kinase; LOX, lipoxygenase; PLA, phospholipase A; PLC, phospholipase C; PKC, protein kinase C; CHS, chalcone synthase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase

References

- Akashi, T., Kawasaki, S. and Shibaoka, H. (1990) Stabilization of cortical microtubules by the cell wall in cultured tobacco cells. *Planta* 182 : 363-369.
- Akashi, T., and Shibaoka, H. (1991) Involvement of transmembrane proteins in the association of cortical microtubules with the plasma membrane in tobacco BY-2 cell. *J. Cell Sci.* 98 : 169-174.
- 秋光和也 (1995) 植物感染における病原性の獲得と宿主の感受化 ～ HST 生成菌 *Cochlioborus* を中心として～ ” 植物感染機構の進化を考える ” 平成7年度植物感染生理談話会、講演要旨集 pp. 38-47.
- Apostol, I., Heinstein, P. F. and Low, P. S. (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90 : 109-116.
- Askerlund, P. C., Larsson, C., Widell, S. and Moller, I. M. (1987) NAD(P)H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. *Plant Physiol.* 71 : 9-19.
- Auh, C. K. and Murphy, T. (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol.* 107 : 1214-1247.
- Averyanov, A. A., Lapikava, V. P. and Djawakhia, V. G. (1993) Active-oxygen mediates heat-induced resistance of rice plant to blast disease. *Plant Sci.* 92 : 27-34.
- Baker, C.J. and Orlandi, E.W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33 : 299-321.
- Beissmann, B. Engels, W., Marticke, K-H. and Reisener, H. J. (1992) Elicitor-active glycoproteins in apoplastic fluids of stem-rust-infected wheat leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40 : 79-89.
- Benhamou, N., Grenier, J., Asselin, A. and Legrand M. (1989) Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. *Plant Cell* 1 : 1209-1221.
- Benhamou, N., Grenier, J. and Chrispeels, M. J. (1991) Accumulation of β -fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen. *Plant Physiol.* 97 : 739-750.
- Benhamou, N., Joosten, M. H. A. J. and De Wit, P. J. G. M. (1990) Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiol.* 92 : 1108-1120.
- Bolwell, G. P. (1996) The origin of the oxidative burst in plants. *Biochem. Soc. Transact.* 24 : 438-441.
- Bolwell, G. P., Butt, V., Davies, D. and Zimmerlin, A. (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad. Res.* 23 : 517-532.

- Boudart, G., Dechamp-Guillaume, G., Lafitte, C., Ricart, G., Barthe, J-P., Mazau, D. and Esquerre-Tugaye, M-T. (1995) Elicitors and suppressors of hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase. *Eur. J. Biochem.* 232 : 449-457.
- Boyer, J. L., Downes, C. P. and Harden, T. K. (1989) Kinetics of activation of phospholipase C by P₂y purinergic receptor agonists and guanine nucleotide. *J. Biol. Chem.* 264 : 884-890.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Bradley, D. J. Kjellbom, P. and Lamb, C. J. (1992) Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70 : 21-30.
- Brennan, T. and Frenkel, C. (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* 59 : 411-416.
- Briggs, S. P. and Johal, G. (1994) Genetic patterns of plant host-parasite interactions. *TIG J.* 10 : 12-14.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R. and Lamb, C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6 : 1703-1712.
- Cervone, F., Harn, M. G., Lorenzo, G. D., Darvill, A. and Albersheim, P. (1989) Host-Pathogen Interaction XXVIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol.* 90 : 542-548.
- Chai, H. B. and Doke, N. (1987) Superoxide anion generation : A response of potato leaves to infection with *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 77 : 645-649.
- Chen, Z., Silva, H. and Klessig, D. F. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1885.
- Cheong, J., Cote R. A. F., Enkerli J. and Hahn M. G. (1993) Solubilization of functional plasma membrane-localized hepta- β -glucoside elicitor-binding proteins from soybean. *Plant Physiol.* 103 : 1173-1182.
- Chrambach A. (1980) Electrophoresis and electrofocusing on polyacrylamide gel in the study of native macromolecules. *Mol. Cell. Biochem.* 29 : 23-46.
- Citovsky, V., McLean, B. G., Zupan, J. R. and Zambryski, P. (1993) Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Gene Develop.* 7 : 904-910.
- Clulow, S. A., Matthews, P. and Lewis, B. G. (1991) Genetical analysis of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea seedlings. *Euphytica* 58 : 183-189.
- Clulow, S. A., Lewis, B. G. and Matthews, P. (1992) Expression of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in *Pisum sativum*. *Plant Pathol.* 41 : 362-369.

- Coleman, M. J., Mainzer, J. and Dickerson, A. G. (1992) Characterization of a fungal glycoprotein that elicits a defense response in French bean. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40 : 333-351.
- Cooper, C. J., Morris, A. J. and Harden, T. (1989) Guanine nucleotide-sensitive interaction of a radiolabeled agonist with a phospholipase C-linked P₂y-purinergeric receptor. *J. Biol. Chem.* 264 : 6202-6206.
- Cross, A. R. and Jones, O.T.G. (1991) Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim. Biophys. Acta.* 1075 : 281-298.
- Dalton, D. A., Baird, L. M., Langeberg, L., Taugher, C. Y., Anyan, W. R., Vance, C. P. and Sarath, G. (1993) Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules. *Plant Physiol.* 102 : 481-489.
- Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1984) Phytoalexins and their elicitors - A defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35 : 243-275.
- Dedhar, S., Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. (1987) A cell surface receptor complex for collagen type I recognized the Arg-Gly-Asp sequence. *J. Cell Biol.* 104 : 585-593.
- De Wit, P. J. G. M. and Spikman, G. (1982) Evidence for occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiol. Plant. Pathol.* 21 : 1-11.
- Doke, N. (1975) Prevention of the hypersensitive reaction of potato cells to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* by constituents of the zoospores. *Physiol. Plant. Pathol.* 7 : 1-7.
- Doke, N. (1983a) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 345-357.
- Doke, N. (1983b) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 359-367.
- Doke, N. and Chai, B. (1985) Activation of superoxide generation and enhancement of resistance against compatible races of *Phytophthora infestans* in potato plants treated with digitonin. *Physiol. Plant Pathol.* 27 : 32-334.
- Doke, N and Miura, Y. (1995) *In vitro* activation of NADPH-dependent O₂⁻ generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissue by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46 : 17-28.
- Doubis, S. M., Gilles, K. A., Halmiton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* 28 : 350-356.

- Duff, S. M., Sarath, G. and Plaxton, W. C. (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant.* 90 : 791-800.
- Ebel, J. and Cosio, E. G. (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148 : 1-36.
- Edwards, S. W. (1995) Cell signaling by integrins and immunoglobulin receptor in primed neutrophils. *TIBS* 20 : 362-367.
- EL-Monshaty, F. I., Pike, S. M., Novacky, A. J. and Sehgal, O. P. (1993) Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43 : 109-119.
- Epperlein, M., Noronha-Dutra, A. A. and Strange, R. N. (1986) Involvement of the hydroxy radical in the abiotic elicitation of phytoalexins in legumes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 28 : 67-77.
- Farmer, E. E. and Ryan, C. A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wounding-inducible proteinase inhibitor. *Plant Cell* 4 : 129-134.
- Flor, H. H. (1956) The complementary genetic system in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8 : 29-54.
- 藤井匡寛 (1997) エンドウ病害抵抗性と活性酸素生成系の関連について。岡山大学卒業論文。
- Frehner, M. and Conn, E. E. (1987) The linamarin β -glucosidase in costa rican wild lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) is apoplastic. *Plant Physiol.* 84 : 1296-1300.
- Gordon, J. L. (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233 : 309-319.
- Gross, G. G. (1977) Cell wall-bound malate dehydrogenase from horseradish. *Phytochemistry* 16 : 319-321.
- Gross, G. G., Janse, C. and Elstner, E. F. (1977) Involvement of malate, monophenols, and hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta.* 136 : 271-276.
- Hahn, M. G., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1981) Host-pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* 68 : 1161-1169.
- Hahn, M., Jungling, S. and Knogge, W. (1993) Cultivar-specific elicitation of barley defense reactions by the phytotoxic peptide NIP1 from *Rhynchosporium secalis*. *Mol. Plant Micro. Int.* 6 : 745-754.
- Halliwell, B. (1978) Lignin synthesis : The generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese(II) and phenols. *Planta* 140 : 81-88.
- Hayashi, T. and Ohsumi, C. (1994) Endo-1,4- β -glucanase in cell wall of stems of auxin-treated pea seedlings. *Plant Cell Physiol.* 35 : 419-424.

- He, Z-H., Fujiki, M. and Kohern, B. D. (1996) A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271 : 19789-19793.
- Heath M. C. (1981) A generalized concept of host-parasite specificity. *Phytopathology* 71 : 1121-1123.
- 平野 久 (1993) 遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析。pp. 182-183. 東京化学同人
- Hodges, T. K. and Leonard, R. T. (1974) Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. *Methods Enzymol.* 32 : 329-406.
- Hoyos, M. E., Stanley, C. M., He, S. Y., Pu, X-A. and Novacky, A. (1996) The interaction of HarpinPss, with plant cell walls. *Mol. Plant Micro. Int.* 9 : 608-616.
- Hynes, R. O. (1992) Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 : 11-25.
- Hynes, R. O. and Yamada, H. K. (1982) Fibronectins: Multifunctional modular glycoprotein. *J. Cell Biol.* 95 : 369-377.
- 稲田温子 (1995) 植物病害抵抗性における細胞壁の役割 岡山大学 卒業論文
- 稲田温子 (1997) 植物の防御応答における細胞壁の役割～活性酸素の関与について～ 岡山大学 修士論文
- 伊藤俊樹 (1996) Far-Western 法によるタンパク質-タンパク質間相互作用の検出。タンパク質の分子間相互作用実験法 pp. 47-58. 羊土社
- Iizuka, T., Kanegasaki, S., Makino, R., Tanaka, T. and Ishimura, Y. (1985) Pyridine and imidazole reversibly inhibit the respiratory burst in porcine and human neutrophils : Evidence for the involvement of cytochrome b588 in the reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130 : 621-626.
- Ishida, A., Ookubo, K. and Ono, K. (1987) Formation of hydrogen peroxide by NAD(P)H oxidation with isolated cell wall-associated peroxidase from cultured liverwort cells, *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* 28 : 723-726.
- Jimenez, D. R., Yokomi, R-K., Mayer, R. T. and Shapiro, J. P. (1995) Cytology and physiology of silverleaf whitefly-induced squash silverleaf. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 46 : 227-242.
- Johansson, F., Sommarin, M. and Larsson C. (1993) Fusaric acid activates the plasma membrane H⁺-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell* 5 : 321-327.
- Jones, A. M. and Herman, E. M. (1993) KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiol.* 101 : 595-606.
- Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J. and Jones, J. D. C. (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266 : 789-793.

- Joosten, M. H. A. J., Cozijnsen, T. J. and De Wit, P. J. G. M. (1994) Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 367 : 384-386.
- Kato, T., Shiraishi, T., Toyoda, K., Saitoh, K., Satoh, Y., Tahara, M., Yamada, T. and Oku, H. (1993) Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes by fungal suppressors from *Mycosphaerella pinodes* and their peptide moieties. *Plant Cell Physiol.* 34: 439-445.
- Kauss, H. and Jebelick, W. (1995) Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H₂O₂. *Plant Physiol.* 108 : 1171-1178.
- Kauss, H., Kohle, H. and Jeblick, W. (1983) Proteolytic activation and stimulation by Ca²⁺ of glucan synthase from soybean cell. *FEBS Lett.* 158 : 84-88.
- Keen, N. T., Yoshikawa, M. and Wong, M. C. (1983) Phytoalexin elicitor activity of carbohydrate from *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* and other source. *Plant Physiol.* 71 : 466-471.
- Keen, N. T., Tsurushima, T., Midland, S., Sims, J., Lee, S-W, Hutcheson, S., Atkinson, M., Okinaka, Y., Yamaoka, N., Takeuchi, Y. and Yoshikawa, M. (1996) The syringoride elicitors specified by avirulence gene D and their specific perception by *Rpg4* soybean cells. In Molecular aspects of pathogenicity and host resistance requirements for signal transduction, Ed. by Kunoh, H. et al. Amer. Phytopathol. Soc. Press. St. Paul, pp.139-148.
- Keppler, L. D. and Baker, C. J. (1989) O₂- initiates lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco cells suspension. *Phytopathology* 79 : 555-562.
- Kimura, T., Maeshima, M. and Asashi, T. (1988) Immunological studies om ATPases in mung bean hypocotyl plasma membrane : Proposal presence of two molecular species of ATPase. *Plant Cell Physiol.* 29 : 883-888.
- Kivilaan, A., Beaman, T. C. and Bandurski, R. S. (1961) Enzymatic activities with cell wall preparation from corn coleoptiles. *Plant Physiol.* 36: 605-610.
- 児玉基一郎 (1996) 植物感染の特異性：宿主特異的毒素生成菌を例にして。”植物の感染生理学研究的現状と将来展望”平成8年度植物感染生理談話会、講演要旨集 pp. 56-66.
- Kohmoto, K. and Otani, H. (1991) Host recognition by toxic plant pathogens. *Experientia* 47 : 755-764.
- Kooman-Gersmann, M., Honee, G., Bonnema, G. and De Wit, P. J. G. M. (1996) A high-affinity binding site for the AVR9 peptide elicitor of *Cladosporium fulvum* is present on plasma membranes of tomato and other solanaceous plants. *Plant Cell.* 8 : 929-938.
- Korthout, H. A. A., van der Hoeven, P. C. J., Wagner, M. J., Hunnik, E. V and De Boer, A. H. (1994) Purification of the fusicoccin-binding protein from oat root plasma membrane

- by affinity Chromatography is biotinylated fusicoccin. *Plant Physiol.* 105 : 1281-1288.
- Kuc, J. (1972) Phytoalexins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 10 : 207-232.
- 黒田洋一郎 (1990) ATP・アデノシン受容体と記憶シナプスの可塑性。蛋白質・核酸・酵素 35 : pp. 757-766.
- Lane, B. G., Dunwell, J. M., Ray, A. A., Scmitt, M. R. and Cuming, A. C. (1993) Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J. Biol. Chem.* 268 : 12239-12242.
- Lanfermeijer F. C. and Prins H. B. A. (1994) Modulation of H⁺-ATPase activity by fusicoccin in plasma membrane vesicles from oat (*Avena sativa* L.) roots. A comparison of modulation by fusicoccin, trypsin and lysophosphatidylcholine. *Plant Physiol.* 104 : 1277-1285.
- Legendre, L., Yueh, Y.G., Crain, R., Haddock, N., Heinstein, P.F. and Low, P.S. (1993). Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *J. Biol. Chem.* 268 : 24559-24563.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79 : 583-593.
- Li, Z-C., McClure, J. W. and Hagerman, A. E. (1989) Soluble and bound apoplastic activity for peroxidase, β -D-glucosidase, malate dehydrogenase, and nonspecific arylesterase, in barley (*Hordeum vulgare* L.) and oat (*Avena sativa* L.) primary leaf. *Plant Physiol.* 90 : 185-190.
- London, C and Wolff, J. (1977) Two-distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5482-5486.
- Lorenzo, G. D., Cervone, F., Bellincampi, D., Caprari, C., Clark, A. J., Desiderio, A., Devoto, A., Forrest, R., Leckie, F., Nuss, L. and Salvi, G. (1994) Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochem. Soc. Transact.* 22 : 394-397.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- MacDonald, H., Jones, A. M. and King, P. J. (1991) Photoaffinity labeling of soluble auxin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266 : 7393-7399.
- MacQueen-Mason, S., Durachko, D. M. and Cosgrove, D. J. (1992) Endogenous proteins that induced cell wall expansion in plant. *Plant Cell* 4 : 1425-1433.
- Mader, M. and Amberg-Ficher, V. (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. *Plant Physiol.* 70 : 1128-1131.
- Mader, M. and Fussl, R. (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. II. Regulation by phenolic compounds. *Plant Physiol.* 70 : 1132-1134.
- Martin, M. W. and Harden, T. K. (1989) Agonist-induced desensitization of a P_{2y}-purinergic

- receptor-regulated phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 264 : 19535-19539.
- Massey, V. (1953) Fumarase. *Methods Enzymol.* 1 : 729-735.
- Masuda, Y., Shiraishi, T, Ouchi, S and Oku, H. (1983) A rapid and accurate analysis of isoflavonoid phytoalexins by high-performance liquid chromatography. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49 : 558-560.
- Matsubara, M. and Kuroda, H. (1987) The structure and physiological activity of glycoprotein secreted from conidia of *Mycosphaerella pinodes* II. *Chem. Pharm. Bull.* 35(1) : 249-255.
- Mauch, F. and Staehelin, A. (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3 glucanase in bean leaves. *Plant Cell* 1: 447-457.
- May, M. J., Hammond-Kosack, K. E. and Jones, D. G. (1996) Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitor of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol.* 110 : 1367-1379.
- Mellon, E. J. and Helgeson, J. P. (1982) Interaction of hydroxyproline-rich glycoprotein from tobacco callus with potential pathogen. *Plant Physiol.* 70 : 401-405.
- 三宅千寿 (1995) 植物細胞壁の病害抵抗性における役割 ~細胞壁における O_2^- 生成について。岡山大学 卒業論文。
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S., K. and Yamada, K. M. (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell. Biol.* 131 : 791-805.
- Molina, A., Segura, A. and Garcia-Olmedo, F. (1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitor of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* 316 : 119-122.
- Montillet, J-L. and Degousee, M. (1991) Hydroperoxydes induced glyceollin accumulation in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 29 : 689-694.
- Namiki, F., Yamamoto, M., Nishimura, S., Nakatsuka, S., Goto, T., Kohmoto, K. and Otani, H. (1986) Studies on host-specific AF-toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing *Alternaria* black spot of strawberry (4) Protective effect of AF-toxin II on AF-toxin I-induced toxin action and fungal interaction. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 52 : 428-436.
- Nathan, D.G., Baehner, R.L. and Weaver, D.K. (1969) Failure of nitroblue tetrazorium reduction in the phagocytic vacuoles of leukocytes in chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 48 : 1895-1904.
- Navarre, D. A. and Wolpert, T. J. (1995) Inhibition of the glycine decarboxylase multienzymes complex by the host-selective toxin victorin. *Plant Cell* 7 : 463-471.
- Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M. and Mikkelsen, J. D. (1996) New antifungal proteins from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) showing homology to non-specific lipid transfer

- proteins. *Plant Mol. Biol.* 31 : 539-552.
- Nishitani, K. and Tominaga, T. (1992) Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* 267 : 21058-21064.
- Nurnberger T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W. R., Hahlbrock K. and Scheel D. (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78 : 449-460.
- O'Connell, R. J., Brown, I. R., Mansfield, J. W., Baliey, J. A., Mazau, D., Rumeau, D. and Esquerre-Tugaye, M-T. (1990) Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoprotein accumulating in melon and bean at sites of resistance to bacteria and fungi. *Mol. plant Micro. Int.* 3 : 33-40.
- Odani, S., Koide, T. and Ono, T. (1987) Amino acid sequence of a soybean (*Glycine max*) seed polypeptide having a poly(L-aspartic acid) structure. *J. Biol. Chem.* 262 10502-10505.
- Oeching, C. and Weiler, R. W. (1991) Characterization and purification of the fusicoccin-binding complex from plasma membranes of *Commelina communis*. *Eur. J. Biochem.* 199 : 685-689.
- Ogawa, K., Kanematsu, S. and Asada, K. (1996) Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 37 : 790-799.
- 大柳善彦 (1961) スーパーオキシドと医学。pp. 1-4. 共立出版。
- Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi (1977) Suppression of induction of phytoalexin, pisatin by low-molecular-weight substances from spore germination fluid of pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Naturwissenschaften* 64: 643.
- Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1987) Role of specific suppressor in pathogenesis of *Mycosphaerella pinodes*. In Molecular determinant of Plant Disease. Ed by Nishimura S. et al. pp. 145-156. Jp. Sci. Soc. Press. Tokyo Springer-verlag Berlin.
- Oku, H., Shiraishi, T., Ouchi, S., Ishiura, M. and Matsueda, R. (1980) A new determinant of pathogenicity in plant disease. *Naturwissenschaften* 67: 310.
- Otani, H., Kodama, M. and Kohmoto, K. (1996) Physiological and molecular aspects of *Alternaria* host-specific toxin and plant interactions. In Molecular aspects of pathogenicity and host resistance requirements for signal transduction, Ed. by Kunoh, H. et al. Amer. Phytopathol. Soc. Press. St. Paul, pp.257-267.
- Otani, H., Tomiyama, Y., Okamoto, H., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1989) Effect of AK-toxin produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype on membrane Potential of pear cell. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 55 : 466-468.
- Otter, T. and Polle, A. (1994) The influence of Apoplastic ascorbate on the activities of cell

- wall-associated peroxidase and NADH oxidase in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Cell Physiol.* 35 : 1231-1238.
- Ouch, S., Oku, H., Hibino, C. and Akiyama, I. (1974) Induction of accessibility to a non pathogen by preliminary inoculation with pathogen. *Phytopath. Z.* 79 : 142-154.
- Pantoja, O. and Willmer, C. M. (1988) Redox activity and peroxidase activity associated with the plasma membrane of guard-cell protoplasts. *Planta* 174 : 44-50.
- Ouchi, S., Oku, H., Nakabayashi, H. and Oka, K. (1975) Some characteristic of the heat-induced susceptibility demonstrated in powdery mildew of barley. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 41 : 453-465.
- Pedreno, M. A., Ferrer, M. A., Gaspar, Th., Munoz, R. and Rosbarcelo, A. (1995) The polyfunctionality of cell wall peroxidases avoids the necessity of an independent H₂O₂-generating system for phenolic coupling in the cell wall. *Plant Peroxidase Newslett.* No. 5 : 3-7.
- Perlin, D. S. and Spanswick, R. M. (1981) Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membrane. *Plant Physiol.* 68: 521-526.
- Pichorner, H., Couperus, A., Korori, S. A. A. and Ebermann, R. (1992) Plant peroxidase has a thiol oxidase function. *Phytochemistry* 31 : 3371-3376.
- Pont-Lezica, R. F. McNally, J. G. and Pickard, B. G. (1993) Wall-to-membrane linkers in onion epidermis: some hypotheses. *Plant Cell Env.* 16 : 111-123.
- Pyee, J., Yu, H. and Kolattukudy, P. E. (1994) Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli. *Arch. Biochem. Biophys.* 311 : 460-468.
- Racker, E. (1962) Ribulose diphosphate carboxylase from spinach leaves. *Method Enzymol.* 5: 266-270.
- Ralton, J. E., Howlett, B. J, and Clarke, A. E. (1986) Receptor in host-pathogen interactions. *In Hormones, Receptors and Cellular Interactions in Plants*, Edited by C. M. Chadwick and D. R. Garrod, pp. 281-318. Cambridge University Press, London.
- Ricard, J., Noat, G., Crasnier, M. and Job, D. (1981) Ionic control of immobilized enzymes - Kinetics of acid phosphatase bound to plant cell walls. *Biochem. J.* 195 : 357-367.
- Roberts, K. (1989) The plant extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1 : 1020-1027.
- Roberts, K. (1990) Structure at the plant cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2 : 920-928.
- Roby, D., Toppan, A. and Esquerre-Tugaye, M-Y. (1987) Cell surface in plant micro-organism interactions VIII. Increased proteinase inhibitor activity in melon plants in response to infection by *Colletotrichum lagenarium* or to treatment with an elicitor fraction from this fungus. *Physiol. Plant Mol. Plant Pathol.* 30 : 453-460.
- Rodgers, M. W. Zimmerlin, A., Werck-Reichhart, D. and Bolwell, G. P. (1993) Microsomal associated heme proteins from French bean : Characterization of the cytochrome P450 cinnamate-4-hydroxylase and two peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 304 : 74-80.

- Root, R. K., Metcalf, J., Oshino, N., and Chance, B. (1975) H₂O₂ released from human granulocytes during phagocytosis. *J. Clin. Invest.* 55 : 945-955.
- Root, R. K. and Metcalf, J. (1977) H₂O₂ released from human granulocytes during phagocytosis. *J. Clin. Invest.* 60 : 1266-1279.
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238 : 491-497.
- Rusterucci, C., Stallaert, V., Milat, M-L., Pugin, A., Ricci, P. and Blein, J-P. (1996) Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* 111 : 885-891.
- Ryan, C. A. (1988) Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. *Biochemistry* 27 : 8879-8883.
- Ryu, J. H., Takagi, S., Mizuno, K. and Nagai, R. (1996) Effects of synthetic RGD and RYD peptides on the stationary organization of actin cytoskeleton. *Plant Cell Physiol.* 137 : s139.
- Sanchez, M. L., Doke, N. and Kawakita, K. (1993) Elicitor-induced chemiluminescence in cell suspension cultures of tomato, sweet pepper and tobacco plants and its inhibition by suppressors from *Phytophthora* spp. *Plant Sci.* 88 : 141-148.
- Sanders, L. C., Wang, C-S., Walling, L. L., Lord, E. M. (1991) A homolog of the substrate adhesion molecule vitronectin occurs in four species of flowering plants. *Plant Cell* 3 : 629-635.
- Schindler, M., Meiners, S. and Cheresch, D. A. (1989) RGD-dependent linkage between plant cell wall and plasma membrane : Consequences for growth. *J. Cell Biol.* 108 : 1955-1965.
- Schmitt, M. and Radler, F. (1988) Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170 : 2192-2196.
- Schwacke, R. and Hager, A. (1992) Fungal elicitors induced a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca²⁺ and protein-kinase activity. *Planta* 187 : 136-141.
- Schwartz, M. A., Lechene, C. and Ingber, D. E. (1991) Insoluble fibronectin activate Na/K antiporter by clustering and immobilizing integrin $\alpha 5 \beta 1$, independent of cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 7849-7856.
- Segura, A., Moreno, M. and Garcia-Olmedo, F. (1993) Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett.* 332 : 243-246.
- Sekizawa, Y., Haga, M., Hirabayashi, E., Takeuchi, N. and Takino, Y. (1987) Dynamic behavior of superoxide generation in rice leaf tissue infected with blast fungus and its regulation by some substances. *Agric. Biol. Chem.* 51 : 763-770.
- Serra, M. A., Sabbioni, E., Marchesini, A., Pintar, A. and Valott, M. (1990) Vanadate as an

- inhibitor of plant and mammalian peroxidases. *Biol. Trace Ele. Res.* 23 : 151-164.
- Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann, Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 :61-94.
- Shibaoka H. (1993) The use of tobacco BY-2 cells for studies of the plant cytoskeleton. In Cellular and Molecular Biology in Plant Cell Cultures, Edited by A. Komamine et al. pp. 3-15. The Botanical Society of Japan, Tokyo.
- Shibuya, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J. and Ito, Y. (1996) Localization and binding characteristics of a high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at cell surface. *Plant Cell Physiol.* 37 : 894-898.
- Shinkle, J. R., Swoap, S. J. and Jones, R. (1992) Cell wall free space of *Cucumis* hypocotyls contains NAD and a blue light-regulated peroxidase activity. *Plant Physiol.* 98 : 1336-1341.
- Shiraishi, T., Araki, M., Yoshioka, H., Kobayashi, I., Yamada, T., Ichinose, Y., Kunoh, H. and Oku, H. (1991a) Inhibition of ATPase activity in plasma membranes *in situ* by a suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 32 : 1067-1075.
- Shiraishi, T., Oku, H., Yamashita, M. and Ouchi, S. (1978) Elicitor and suppressor of pisatin induction in spore germination fluid of pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 44: 659-665.
- Shiraishi, T., Saitoh, K., Kim, H. M., Kato, T., Tahara, M., Oku, H., Yamada, T. and Ichinose, Y. (1992) Two suppressors, suppressin A and B, secreted by a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33: 663-667.
- Shiraishi, T., Yamada, T., Oku, H. and Yoshioka, H. (1991b) Suppressor production as a key factor for fungal pathogenesis. In Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants, Edited by S. S. Patil et al., pp. 151-162. Springer-Verlag, New York.
- Shiraishi, T., Yamada, T., Saitoh, K., Kato, T., Toyoda, K., Yoshioka, H., Kim, H. M., Ichinose, Y., Tahara, M. and Oku, H. (1994) Suppressor : Determinants of specificity produced by plant pathogens. *Plant Cell Physiol.* 35 : 1107-1119.
- Showalter A. M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5 : 9-23.
- Steffen, S and Wingsle, G. (1994) *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta* 192 : 195-201.
- 杉浦徹也 (1996) エンドウによる褐紋病菌サプレッサーの認識機構。岡山大学 卒業論文
- 杉本 恵 (1996) エリシターの受容体の分離とその解析。岡山大学卒業論文。
- Sugimoto, M., Kiba, A., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (1996) Concanavaline A-binding proteins exist in cell wall of pea plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62 : 620

(Suppl.)

- Smith, J. W. and Cheresch, D. A. (1988) The Arg-Gly-Asp binding domain of the vitronectin receptor. *J. Biol. Chem.* 263 : 18726-18731.
- Suzuki, K. and Shinshi, H. (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* 7 : 639-647.
- Swart, S., Logman, T. J. J., Smit, G., Lugtenberg, B. J. J. and Kijne, J. (1994) Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of Rhizobiaceae. *Plant Mol. Biol.* 24 : 171-183.
- Tadano, T., Ozawa, K., Sakai, H., Osaki, M. and Matsui, H. (1993) Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. *Plant Soil* 155/156 : 95-98.
- Takahama, U. (1993) Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid : Different effects of Ascorbic acid on oxidation of conyferyl alcohol by apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidase from epicotyls from *Vigna Angularis*. *Plant Cell Physiol.* 34 : 809-817.
- Takahama, U. and Oniki, T. (1993) Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 33 : 379-387.
- Takahama, U. and Oniki, T. (1994) The association of ascorbate and ascorbate oxidase in the apoplast with IAA-enhanced elongation of epicotyls from *Vigna Angularis*. *Plant Cell Physiol.* 35 : 357-266.
- 高橋英樹、寺岡徹、細川大二郎、Klessig, F. (1996) 病害抵抗におけるサリチル酸を介した情報伝達機構。”植物感染生理学研究の現状と将来展望”平成8年度植物感染生理談話会、講演要旨集 pp. 111-120.
- 高見賢嗣 (1992) 病原菌の生産するエリシターに対する植物の応答について。岡山大学修士論文。
- Takeda, T., Kanemitsu, T., Ishiguro, M., Ogihara, Y. and Matsubara, M. (1994) Synthesis of a glycopeptide with phytoalexin elicitor activity I. Synthesis of a triglycosyl L-serine and triglycosyl L-serine-L-proline dipeptide. *Carbohydr. Res.* 256 : 59-69.
- Thanutong, P., Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1982) Isolation and partial characterization of an elicitor of pisatin production from spore germination fluid of pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Sci. Rep. Fac. Agric. Okayama Univ.* 59: 1-9.
- Torii, K. U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R. F. and Komeda, Y. (1996) The Arabidopsis *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 8 : 735-746.
- 豊田和弘 (1994) 病原菌シグナルによる膜情報伝達系の制御。岡山大学 博士論文
- Toyoda K., Shiraishi T., Yoshioka H., Yamada T., Ichinose Y. and Oku H. (1992) Regulation

- of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33 : 445-452.
- Toyoda K., Shiraishi T., Yamada T., Ichinose Y. and Oku H. (1993) Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol.* 34 : 729-735.
- Tuan, R. S. and Knowles, K. A. (1984) Calcium-activated ATPase of the Chick embryonic chorionallantoic membrane. Identification, developmental expression, and topographic relationship with calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.* 259 (5) : 2754-2763.
- Vance, C. P., Kink, I. K., and Sherwood, R. T. (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18 : 259-288.
- Van den Ackerveken, G. F. J. M., Vossen, P. and DeWit, P. J. G. M. (1993) The AVR 9 race-specific elicitor of *Cladosporium fulvum* is processed by endogenous and plant proteases. *Plant Physiol.* 103 : 91-96.
- Varner J. E. and Lin L. S. (1989) Plant cell wall architecture. *Cell* 56 : 231-239.
- Vera-Estrella, R., Blumwald, E. and Higgins, V.J. (1992) Effect of specific elicitor of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. Evidence for the involvement of active oxygen species. *Plant Physiol.* 99 : 1208-1215.
- Vogel, B. E., Lee, S-J., Hildebrand, A., Craig, W., Pierschbacher, M. D., Wong-Staal, F. and Ruoslahti, E. (1993) A novel integrin specificity exemplified by binding of the $\alpha v \beta 2$ integrin to the basic domain of the HIV tat protein and vitronectin. *J. Cell Biol.* 121 : 461-468.
- Vuori, K. and Ruoslahti, E. Activation of protein kinase C precedes $\alpha 5 \beta 1$ integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J. Biol. Chem.* 268 : 21459-21463.
- Wagner, V. T. and Mattysse, A. G. (1992) Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension cultured cells. *J. Bacteriol.* 174 : 5999-6003.
- Walker, J. C. (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant. Mol. Biol.* 26 1599-1609.
- Watanabe, Y and Hirano, H. (1994) Nucleotide sequence of the basic 7S globulin gene from soybean. *Plant Physiol.* 105 : 1019-1020.
- Werb, Z., Tremble, P .M., Behrendtsen, O., Crowley, E. and Damsky, C. H. (1989) Signal transduction through the fibronectin receptor induced collagenase and stromelysin gene expression. *J. Cell Biol.* 109 : 877-889.
- Wolpert, T. J., Navarre, D. A., Lorang, J. M. and Moore, D. L. (1996) Evaluation of the glycine decarboxylase complex as the possible site of action of victorin. In *Molecular aspects of pathogenicity and host resistance requirements for signal transduction*, Ed. by Kunoh, H. et al. Amer. Phytopathol. Soc. Press. St. Paul, pp.245-256.

- Wu, G., Ellen, J. B., Lawrence, E. B., Levine, E. B., Fitzsimmons, K. C. and Shah, D. M. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*. 7 : 1357-1368.
- Yamada, T., Hashimoto, H., Shiraishi, T. and Oku, H. (1989) Suppression of pisatin, phenylalanine ammonia-lyase mRNA, and chalcone synthase mRNA by putative pathogenicity factor from the fungus *Mycosphaerella pinodes*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 256-261.
- Yamamoto, Y., Oku, H., Shiraishi, T., Ouchi, S. and Koshizawa, K. (1986) Non-specific induction of pisatin and local resistance in pea leaves by elicitor from *Mycosphaerella pinodes*, *M. melonis* and *M. ligulicola* and effect of suppressor from *M. pinodes*. *J. Phytopathol.* 117: 136-143.
- Yoshida, S., Kawata, T., Uemura, M. and Niki, T. (1986) Properties of plasma membrane isolated from Chilling -sensitive etiolated seedlings of *Vigna radiata* L. *Plant Physiol.* 80 : 152-160.
- Yoshikawa, M. and Sugimoto, K. (1993) A specific binding site on soybean membranes for a phytoalexin elicitor released from fungal cell walls by β -1,3-endoglucanase. *Plant Cell Physiol.* 34 : 1229-1237.
- Yoshikawa, M., Matama, N. and Masago, H. (1981) Release of a soluble phytoalexin elicitor from mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* by soybean tissues. *Plant Physiol.* 62 : 1032-1035.
- Yoshikawa, M., Yamaoka, N. and Takeuchi, Y. (1993) Elicitors: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant Cell Physiol.* 34 : 1163-1173.
- Yoshioka, H., Hayakawa Y. and Doke N. (1995) Suppression of phenylalanine ammonia-lyase mRNA accumulation by suppressor from *Phytophthora infestans*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61 : 7-12.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Kawamata, S., Nasu, K., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992a) Orthovanadate suppresses accumulation of phenylalanine ammonia-lyase mRNA and chalcone synthase mRNA in pea epicotyls induced by elicitor from *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33: 201-204.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Nasu, K., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992b) Suppression of activation of chitinase and β -1,3-glucanase in pea epicotyls by orthovanadate and suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 58: 405-410.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1990) Suppression of pisatin production and ATPase activity in pea plasma membranes by orthovanadate, verapamil and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 31: 1139-

Zhu, J-K., Damsz, B., Kononowicz, A. K., Bressan, R. A. and Hasegawa, P. M. (1994) A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 α . *Plant Cell* 6 : 393-404.

... (faint, mostly illegible text) ...

... (faint, mostly illegible text) ...

... (faint, mostly illegible text) ...

摘要

植物-病原菌間の特異性決定機構の解明は、植物病理学において最重要課題の1つである。このメカニズムの解明に向けて、エンドウ褐紋病菌と宿主、非宿主植物を用いて解析した。エンドウ褐紋病菌は柄胞子が発芽する際に抵抗性誘導因子（エリシター）と特異性決定を担う抵抗性抑制因子（サプレッサー）を生産する。サプレッサーはエリシターによって誘導される複数の防御応答を抑制（遅延）する。近年、サプレッサーの作用点の解析が進められ、宿主の ATPase 阻害にあることが判った。実際に、植物葉をサプレッサーで処理すると、宿主エンドウの ATPase のみが阻害されること、さらには P 型 ATPase の阻害剤であるオルトバナジン酸がエンドウの防御応答を抑制することが明らかとなった。しかしながら、数種の植物から調製した原形質膜画分の ATPase 活性は、植物種に関係なく阻害され、組織で見られた特異性は認められなかった。これらの結果は、宿主特異性決定には植物細胞壁が重要な役割を担っていることを強く示唆する。そこで、本研究ではこれら病原菌シグナルの認識機構や植物-病原菌間の特異性決定における細胞壁の役割について解析した。

褐紋病菌の宿主エンドウ、非宿主ササゲより細胞壁画分を調製後、NaCl を用いて可溶性タンパク質を得た。11 種のマーカー酵素活性を測定したところ、原形質膜をはじめとする他のオルガネラの混入はほとんど認められなかった。細胞壁可溶性画分中には薬剤感受性、基質特異性、至適 pH、二価イオン要求性等の諸性質が原形質膜 ATPase とは異なる ATPase (NTPase) が存在することが判った。本細胞壁 ATPase は褐紋病菌のエリシターによって非特異的に活性化され、サプレッサーによって種特異的に制御された。さらに ATP アガロースカラム、陰イオン交換カラムを用いて部分精製した細胞壁 ATPase もエリシター、サプレッサーに同様な応答性を持つことが明らかとなった。このことはエリシターの植物組織に対する非特異的作用、およびサプレッサーの植物の防御応答に対する種特異的な作用を反映しており、植物細胞壁が病原菌の認識と宿主特異性決定に重要な役割を果たすこと、さらには細胞壁 ATPase 自体かその近傍に病原菌シグナルの受容体が存在する可能性を強く示唆している。

そこで O_2^- 生成を指標に無傷エンドウ、ササゲ葉における防御応答について調べた。無傷葉における O_2^- 生成はエリシターで 5 分以内に誘導されたが、サプレッサーによって種特異的に制御されること、また O_2^- は非病原菌接種で生成が誘導されるが、病原菌接種では誘導されないことが判った。さらに、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶性画分中には NADH 依存性の O_2^- 生成活性が存在し、ATPase とまったく同様に病原菌シグナルに応答性を持つ（エリシターで非特異的に活性化し、サプレッサーによって種特異的に制御される）ことが判った。このことは無傷エンドウ、ササゲ葉における O_2^- 生成と一致しており、エンドウ、ササゲ葉における O_2^- の生成に細胞壁が深く関与することが判った。また、 O_2^- 生成のみならず、エンドウ、ササゲの細胞壁可溶性画分中には H_2O_2 生成、パーオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素

活性が存在し、このうちリンゴ酸脱水素酵素活性を除く活性は、エリシター、サブレッサーによって ATPase と同調的に制御されること、さらにパーオキシダーゼは細胞壁 ATPase と精製過程における挙動が一致することが判った。このことから、病原菌シグナルの認識後、細胞壁における酸化、還元状態が速やかに変化すること、また酸化、還元状態の変化に必要な酵素群は細胞壁中で複合体（装置）を形成していることが推察された。

このように病原菌シグナルの第一義的な認識の場は細胞壁であるものと考えられるが、多様な細胞応答に結びつくためには細胞壁で認識された情報は細胞内へ伝達される必要がある。そこで、細胞壁と原形質膜間の情報伝達系の検索を目的とし、細胞外マトリクスと細胞骨格の連結に関わる膜貫通タンパク質であるインテグリン様タンパク質の有無を調べ、エンドウの防御応答における役割について解析した。細胞外マトリクスとインテグリンの結合に関与するアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) の配列を含む合成ペプチドはエリシターとの同時処理では有意な影響は認められなかったものの、前処理した場合には前処理時間の長さに依存したピサチン蓄積阻害が認められた。一方、RGD ペプチドは原形質膜および細胞壁 ATPase を阻害することではなく、褐紋病菌サブレッサーとは作用は異なった。エンドウ原形質膜中にはインテグリン様タンパク質が複数存在し、それらのタンパク質中には細胞壁タンパク質、細胞骨格系タンパク質と相互作用する分子が存在することが明らかとなった。以上の結果からインテグリン様タンパク質を介した細胞壁-原形質膜（細胞内）間の情報伝達系が存在する可能性が示唆された。

以上のように植物の細胞壁は病原菌シグナルの第一次作用部位であり、病原菌認識、宿主特異性決定、あるいはその後の防御応答に重要な役割を持つ可能性が強く示唆された。一方、エリシター、サブレッサーの受容体が細胞壁に存在することが想定されるがその実態については明らかではない。エンドウ褐紋病菌の生産するエリシターについては 1 分子が精製され、 $\text{Glc}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ の三糖がセリンを介してタンパク質鎖と O-グリコシド結合した、分子量 70,000 ~ 140,000 の高分子糖タンパク質であることが明らかとなっている (Matsubara and Kuroda 1986)。そこでエリシター活性の最小単位、さらにはエリシターの受容体を同定するためのプローブを検索することを目的とし、 $\text{Glc}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ の三糖を単位とする 9 種の糖ペプチドを合成し、エンドウの防御応答に対する影響を調べた。エンドウの防御応答について調べた。9 種の合成糖ペプチドはピサチン蓄積を誘導したが、ピサチン蓄積誘導活性は褐紋病菌エリシターと比較して非常に弱かった。しかしながら、供試した 9 種の合成糖ペプチドのうち No. 2~9 はエンドウ組織に局所的な抵抗化を誘導し、合成糖ペプチド No. 4~9 はエンドウ組織表層におけるスーパーオキシドアニオン生成を誘導した。さらに、合成糖ペプチド No. 4~9 は *in vitro* において細胞壁画分 ATPase を活性化した。また、合成糖ペプチドによる局部抵抗化スーパーオキシドアニオン生成の誘導、細胞壁画分 ATPase の活性化は合成糖ペプチドの分子量に依存している傾向が伺えた。以上の結果から、今回供試した合成糖ペプチドのうち特に No. 4~9 はエンドウ組織表層における防御応答のエリシター

として作用することが判った。このことから合成糖ペプチド No. 4~9 はエンドウの初期防御応答を解析、およびエリシターの受容体同定の有用なモデルエリシターとなりえるものと考えられる。

以上の結果を総合すると、植物細胞の最外層に位置する植物固有のオルガネラである細胞壁が病原菌の認識、宿主特異性決定の場であり、さらには病原菌認識後の防御応答、あるいは防御応答誘導のための第二次シグナル生成の場として重要な働きを担うものと考えられる。また、エンドウ褐紋病菌はサプレッサーを分泌することによりエンドウの細胞壁 ATPase やそれと同調的に制御される酵素群の活性を阻害することにより、細胞内へのシグナルの伝達を阻止（攪乱）し、防御応答の発現を抑制（回避）することによって感染を成立させているものと推察できる。

謝辞

本研究は、岡山大学農学部 白石友紀教授、中筋房夫教授、山田哲治教授の御指導のもとに、行ったものである。この場を借りて厚く御礼申し上げる。研究遂行および論文作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を頂いた岡山大学農学部 白石友紀教授に深く感謝の意を表す。また、研究遂行上、御指導、御助言を頂いた岡山大学農学部 山田哲治教授、一瀬勇規助教授に厚く御礼申し上げる。また、論文作成に当たり貴重な御助言頂いた岡山大学理学部 佐藤公行教授、岡山大学薬学部 土屋友房教授に感謝の意を表す。また研究遂行上、貴重な ATPase 抗体を分譲して頂いた名古屋大学農学部 旭 正先生（現福井県立大学）、合成モデルエリシターを分譲して頂いた共立薬科大学 竹田忠紘教授、名古屋市立大学 金光卓也博士、ならびにウリ類炭そ病菌系統 104T を分譲して頂いた三重大学生物資源学部 久能 均教授に深い感謝の意を表す。研究を実施するにあたり、多大な御援助、御助言を頂いた加藤敏朗博士（現新日本製鐵株式会社先端技術研究所）、豊田和弘博士（現岩手生物工学研究所）、金 洪模博士、山口祥子女史、天野政史氏（現株式会社埼玉原種育成会）、河原智治氏（現デュポン株式会社農業科学研究所）、稲田温子女史、杉浦徹也氏、杉本 恵女史、三宅千寿女史（現岡山県庁）、藤井匡寛氏をはじめ、岡山大学農学部植物感染病学研究室、並びに応用遺伝子工学研究室の諸氏、諸先輩方に厚く御礼申し上げます。

