学会賞受賞者講演

ムギ類うどんこ病菌感染過程の細胞学的研究*

久 能 均**

Hitoshi KUNOH**: Cytological Studies on Infection Process of *Erysiphe graminis*

外部寄生性のうどんこ病菌は宿主植物の表皮組織に吸器を挿入し、そこから養分を吸収して植物表面上に菌糸および胞子を形成するので、感染過程の細胞学的研究素材としてはきわめて好都合である。

1. *Erysiphe graminis* 分生胞子の第一発芽管

ムギ類うどんこ病菌 *Erysiphe graminis* の分生胞子は複数の発芽管を形成し、そのうちの一本が太くなって付着器になり宿主に侵入して吸器を形成するとされていた。また、付着器からの侵入が行われる時には、細胞壁分解酵素が分泌されるために付着器下の宿主細胞壁は変性し、付着器を取り巻くようにいわゆるハローが形成されることも古くから知られていた。これらの光顕観察に基づいて、*E. graminis* の分生胞子の場合には、付着器に発達する発芽管のみが侵入能力をもち、他の発芽管には侵入能がないと考えられてきた。しかし、分生胞子を接種したオオムギ葉を化学固定し、走査電顕で観察したところ、付着器に発達しない短い発芽管の周囲にもハローが認められる場合が多いことに気がついた。侵入しないはずの短小発芽管がなぜハローを誘導するのか。この疑問を解決するために、走査電顕に組み込まれたミクロマニピュレーターを用いて、ハローを誘導している短小発芽管の周囲の宿主細胞壁を裏返したところ、発芽管先端直下に相当する細胞壁内側にパピラが誘導されていた。さらに、注意深く短小発芽管を裏返し、接着面を露出させたところ、発芽管の接着面から侵入菌糸が形成され、それに相当する侵入孔が宿主細胞壁に見られることが確認された。これらの観察結果によって、付着器以外の短小発芽管も宿主侵入を行うことが明らかになっ

た。

次の疑問は、侵入を行う短小発芽管と付着器との関係および前者の機能は何かという点である。この疑問を解決するためには、生細胞上に接種した胞子の形態形成とそれに呼応した宿主細胞の反応を解析する必要がある。ムギ類の子葉鞘は維管束と二層の表皮系からなっている。実体顕微鏡下で外側の表皮系を取り除くと、細胞一層からなる内側表皮系を得ることができた。この表皮系に維管束をつけたままにしておき、塩化カルシウムの液に浮かべておくと、約1週間は生きたままの細胞状態を維持できる。この表皮系に分生胞子を接種して生体観察をしたところ、接種後0.5~1時間内にまず短小発芽管が一本形成され、その後約1時間以内にこの発芽管が侵入し、細胞内に細胞質凝集、さらにパピラ形成を誘導することが明らかになった。しかし、この侵入によって吸器はけって形成されなかった。接種後約3~3.5時間でパピラ誘導がおこった後に同じ胞子から別の太い発芽管が形成され、それが徐々に膨潤、伸長して付着器に発達することが明らかになった。短小発芽管は一胞子から数本生じることがあるが、そのうちの一本だけが宿主侵入を行う。これらの観察に基づいて、付着器侵入に先だって宿主侵入を行う発芽管を第一発芽管と命名した。その後の観察によって、第一発芽管は *Erysiphe* 属の他の種や他の属のうどんこ病菌には存在しないことが明らかにされた。また、機能として、宿主細胞への胞子の固着、宿主細胞からの養分補給、乾燥条件下で宿主細胞から水分を補給する役割を果たしているのではないかとこの結果が得られている。

* 平成3年4月2日 平成3年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

** 三重大学生物資源学部 Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu 514, Japan

2. 植物細胞による病原菌、非病原菌識別に関する細胞学的研究

われわれの研究室の研究はその後、オオムギ子葉鞘の内側表皮系（以下子葉鞘と記す）を用いて、宿主細胞が病原菌と非病原菌をいかに識別するのかという問題について、徹底した細胞レベルの観察を行う方向に移って行った。

第一に行った実験は、宿主の同一細胞に病原菌、非病原菌の各一胞子を侵入させた時におのおのの菌の感染率に変化がおこるか否かを明らかにすることを目的とした。まず、二枚の子葉鞘を用意し、一方（子葉鞘A）に *E. graminis*（病原菌）、他方（子葉鞘B）にエンドウどんこ病菌 *E. pisi*（非病原菌）の胞子を疎らに接種した。数時間培養した後、子葉鞘Aを取り出し *E. graminis* の一胞子が侵入を試みようとする一細胞を顕微鏡下で選別した。この細胞上に、子葉鞘Bで発芽している *E. pisi* の一胞子を光顕ミクロマニピュレーターで移植し、両方の胞子が同一細胞に侵入するように操作した。その後培養を続けながら、子葉鞘Aを適宜取り出し上記の細胞を観察した。付着器からの侵入がおこる直前になると、子葉鞘細胞内の侵入地点に細胞質凝集がおこる。この細胞質凝集をマーカーとして、両胞子が侵入を開始する時期を確認した。さらに培養を続け、接種後24時間目に両胞子の吸器形成成否を確認した。本実験では、吸器形成を感染の成立と定義している。このような一細胞観察を120例以上繰り返してその結果を集計した。それによると、*E. graminis* が *E. pisi* よりも60分以上先に侵入した細胞では、本来単独では感染に成功しないはずの *E. pisi* も感染できるようになり、逆に *E. pisi* が *E. graminis* よりも60分以上先に侵入した細胞では、前者は無論感染できないが、本来容易に感染できるはずの后者も感染しにくくなることが明らかになった。これらの結果を総合すると、いずれかの菌が侵入すると60分以内に細胞状態が変化することが分かる。この細胞状態の実体は明らかではないが、われわれは病原菌が先に侵入することによって細胞に受容性が誘導され、逆に非病原菌が先に侵入することによって細胞に拒否性が誘導されると現時点では解釈している。

ここまでの実験では、細胞質凝集という形態的に見分けやすい現象をマーカーとして解析してきたが、菌が侵入する以前に子葉鞘細胞が病原菌、非病原菌を識別している可能性はないのかという疑問が生じてきた。そこで、われわれは二枚の子葉鞘におのおの *E. graminis* と *E. pisi* の胞子を別個に接種し、直後から

ビデオカメラで現象を連続的に観察した。*E. pisi* の付着器は接種後4~5時間に成熟し、付着器突起の一つが子葉鞘表面に接着する。この現象は前出の走査電顕マニピュレーターで確認された。おもしろいことに、接着した成熟付着器突起の真下を細胞質系が通過するようになり、徐々にその数が増加するようになった。付着器成熟の時点は、細胞質凝集が見られる時点すなわち侵入開始前4~5時間前に相当する。一方、*E. graminis* の付着器も接種後6~7時間目には突起を生じて成熟するが、この場合には細胞質凝集がおこるまで付着器突起下の細胞内の細胞質系には何も変化がおこらない。ただし、接種された *E. graminis* の中の約20~30%は侵入に失敗して吸器形成できないが、このような場合に限って、侵入前に成熟付着器直下を通過する細胞質系が観察された。これらの観察を行っている間に、細胞質系の位置が変化するばかりではなく、その数が増加したり、細胞質流動の速度も変化することに気がついた。つぎの問題点は、これらの変化要因を客観的な数的データでいかに表現するかという点である。数々の試行錯誤の後に、細胞にシリコンオイルの小滴をインジェクション顕微鏡で注入し、その移動をビデオカメラでモニターすることによって、細胞質流動の速度を推定する方法を考案した。また、ターゲットになっている一細胞の写真を焦点深度を変えて数枚撮影し、それぞれの写真から読み取れる細胞質系の位置を白紙にトレースして重ね合わせることによって、一細胞内の細胞質系の数を推定しようとした。その結果、接種した胞子の付着器が侵入に失敗して吸器形成できない場合には、侵入に先立つ数時間以前から細胞質系の数が増加し、細胞質流動の速度も上昇するが、付着器が侵入に成功して吸器を形成する場合には、侵入に先立つこのような細胞変化は認められないことが明らかになった。これらの結果は、菌が感染に成功するか否かが、実際に侵入が開始される数時間前にはすでに細胞内で決定されていることを示している。他の一連の細胞化学的な観察によって、細胞骨格の一つであるアクチンが細胞質系に含まれており、成熟付着器に対する細胞反応にはアクチンが関与している可能性が示されている。

つぎにわれわれは、菌が侵入を開始する数時間前におこる一連の細胞反応と細胞の拒否性とは相関があるのかという疑問につきあたった。この疑問を解くために、子葉鞘一細胞上に *E. pisi* を接種し、この胞子のさまざまな形態形成の段階でマニピュレーターで細胞上から発芽胞子を取り除き、別の子葉鞘上で発芽させ

ておいた *E. graminis* を直ちに同じ細胞上にマニピュレーターで移植し、培養した。*E. graminis* の感染率が対照区のそれよりも有意に低下すれば、除去前までに *E. pisi* によって拒否性が誘導されたことになる。数十回の反復実験によって、*E. pisi* は遅くとも付着器成熟期あるいはそれまでに *E. graminis* の感染を約 50% 抑制する程度の拒否性を細胞に誘導することが確認された。

上述の一連の細胞観察と移植実験から、非病原菌 *E. pisi* は拒否性を誘導する化学的因子を分泌している可能性が高くなった。このような因子を純寄生菌から抽出する場合に、植物細胞上で形態形成させた菌体を用いることはできない。なぜなら、抽出物に植物細胞の成分が混入することが避けられないからである。純寄生菌の場合にはこの点が弱点であるが、純寄生菌にとって宿主の生細胞は生活史を完結させるために必要なのであって、すべての形態形成の段階に生細胞が必要なわけではない。この考えに沿って、*E. pisi* の胞子が発芽から付着器形成までの形態形成を行える基質を検索したところ、ガラス板が最適であることが明らかになった。そこで、大量の *E. pisi* の胞子をガラス板上で培養し、付着器が成熟した時期に菌体外分泌物を水抽出した。この時水中で菌体が破裂し、内容物が漏出しないことを確認している。抽出物を透析した後に凍結乾燥し、その水溶液を粗標品として実験に用いた。粗標品を希釈した水溶液に子葉鞘を浮かべて、*E. graminis* を接種してその感染率を検定したところ、感染を約 50% 抑制する程度の拒否性が誘導されることが明らかとなった。このような検定法を用いて、拒否性が誘導されることが分かっても、これはあくまでも子葉鞘という組織全体を処理して得られた結果であり、しかも菌が実際に感染する面とは逆の子葉鞘面を処理しているわけであるから、上述の細胞観察によって明らかにした菌一胞子と一細胞との相互反応と安易に対比させることはできない。

つぎの難問は、子葉鞘の菌接種面から、しかも一細胞レベルで粗標品処理する方法はないのかという点である。もし、このような方法が確立され、菌に対するのと同じような反応が細胞レベルで観察されれば、菌抽出物の作用がより正確に解析できると考えた。抽出物の担体となりそうな各種の素材を検討した結果、カラムクロマトのゲル粒子に検定試料を吸着乾燥させ、マニピュレーターで一細胞上にのせると、細胞表面の水によって粒子から試料が遊離し、細胞内に浸透することが明らかになった。この新たに開発した方法によって、粗標品で一細胞を処理したところ、*E. pisi* の成熟付着器下で認められた反応とほぼ同じ細胞質反応が確認され、しかも成熟付着器が誘導する拒否性と同じ程度の拒否性が誘導されることも明らかになった。粗標品をさらに HPLC で分画し、ゲル粒子を用いて同様の検定を行い、拒否性誘導活性をもつ成分が少なくとも 3 つ存在すること、そのうちの一成分が特に強い活性をもっていることを確認した。現在、この拒否性誘導因子の分画を続けて、純化、構造決定を目指している。

以上述べてきたように、われわれの研究室の研究は、丹念な一細胞レベルの生体観察を基礎にして、生理、生化学的研究の方向に進んでおり、やがては純寄生菌における宿主-菌相互関係を分子生物学的に解析することを目指している。一見ほぼ均一に見える単純な子葉鞘の各細胞の生理状態が、子葉鞘上に占めるその位置や齢によって異なっていることも明らかにすることができたので、いずれの方向に研究が進むとしても一細胞レベルで現象を解析する方法を模索し続けたいと考えている。

稿を終えるに当たり、これまで懇切丁寧な指導を賜った学会の諸先生方、諸先輩、ならびに日夜実験に取り組んでいただいた三重大学の卒業生、学生諸氏に深謝の意を表する。