解説

イネいもち病菌の付着器形成—分化誘導から器官形成まで

鎌倉 高志

理化学研究所微生物制御研究室

(平成9年11月20日受理)

Recognition of Environmental Cues and Appressorium Formation
of *Magnaporthe grisea*

Takashi KAMAKURA

Microbial Toxicology Laboratory, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN),
Wako, Saitama 351-0198, Japan

はじめに

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*, 完全世代 *Magnaporthe grisea*) のイネへの侵入・感染に、付着器の形成およびその機能発現が必須であることは周知の事実である¹⁾。現在有効な抗いもち剤として用いられている薬剤のいくつかは、メラニン合成阻害活性によりこの付着器の機能を阻害することによって、いもち病防除効果を発揮している²⁾。こうした薬剤の有効性によってもこの感染特異的器官の重要性がわかるとともに、それが感染時に分化する極めて特殊な器官であるがゆえに、その阻害剤は低毒性の薬剤として利用できる可能性があるという点でも関心が持たれてきた。付着器形成並びにその機能発現にはメラニン合成のほかにも多くの因子が関与していることは明白であり、それらの因子を解明し機能を理解することは、新たな付着器阻害剤のデザインにつながる可能性を秘めていると期待できよう。

近年、付着器形成および機能発現について、分子生物学的アプローチを含むさまざまな研究が進展し、いもち病菌研究においてはレース特異性に関する非病原性遺伝子 (*AVR* genes) の研究^{3,4)}と並んで、二つの大きな柱の一つとなった感がある。本稿では、筆者が出席した1997年3月に米国 Asilomar で開催された19th Fungal Genetics Conference (以下 FGC) で得られた比較的新しい情報を含め、いもち病菌の付着器形成並びに機能発現に関する最近の研究の動向を紹介したい。図1はこの総説の道標として、本稿で解説するものを中心に、いもち病菌の胞子から付着器の成熟までの過程並びにそれぞれの過程に關与する遺伝子、因子を模

式的に描いたものである。なお、両国際会議での口頭発表内容、追加のポスターなど、文献引用の困難な一部の情報については筆者のメモや私信をもとにしたものであり、なるべく正確を期したものの不完全なものもありうることをあらかじめご理解いただきたい。

付着器形成誘導に関する外的因子

いもち病菌の胞子 (分生子) は、イネ植物体表面に落下した後、水の存在下で発芽し、発芽管を伸長しながら、何らかの外的あるいは内的な引き金により発芽管先端に付着器を形成すると考えられてきた⁵⁾。もちろん発芽管自体が付着器形成スイッチを「On」にして発芽してくるという、「誘導因子」を必要としない仮説もありうるであろう。いもち病菌においては、重要な前提として、この発芽から付着器形成に至る足場となる固体基質の物質的な選択性が甘いということがある^{6,7)}。固体表面に落ちた胞子は、その先端にあらかじめ格納された STM (Spore Tip Mucilage) によって、固体に接着する^{8,9)}、その際接着する相手は、イネ植物体表面である必要はなく、STM が接着しさえすればどんな固体でもよい¹⁰⁾。また、その後のステップも、イネ以外の植物表面や、プラスチックやガラスを含む多くの固体上で進行し付着器形成にまで至ることから、おおよそいもち病菌の発芽から付着器形成までの範囲では菌側の宿主選択的な認識と挙動というものはないようである。しかしながら、付着器形成が見られない条件というものも確かに存在することから、やはりなんらかの付着器形成誘導因子 (あるいは形成阻害因子) というものの存在が考えられる^{10,11)}。

日本の研究者の間では、古くから新品のスライドグラス

図1 イネいもち病菌の胞子接着から付着器形成までに関わる諸因子

各ステージ間を結ぶ矢印と交差する2重線で示されたものは、そのステップの阻害活性を持つ因子である。イタリックは、それぞれのステージ付近で機能するものと考えられる、すでにクローン化された遺伝子を示す。

上で発芽させたいもち病菌発芽管は付着器を形成せず、使い込んだ、あるいはスチールウールのようなもので付傷しながら洗浄したスライドガラス上では付着器が形成されるという半ば経験的な知見があった。1987年 Hoch, Staplesらによって *Uromyces appendiculatus* が、植物表面の凹凸を認識して付着器形成を誘導するという報告がなされ^{12,13)}、筆者らの研究室でも、傷つきスライドガラスの経験から、いもち病菌においても同様な認識、ただしインゲンさび病菌よりも甘い認識が存在する可能性ということを考えたのであるが、走査電顕レベルで明らかに平坦な樹脂(例えばテフロンやポリカーボネート)上で、スライドガラスのようなばらつきもなく高頻度で付着器を形成する事実から、他の因子を考える必要があるという結論に達した。スライドガラスのミステリーは世界中の研究者の間で、色々な形で気付かれ、特にガラスメーカーによる違いが顕著であることがわかり、あらゆるスライドガラスはクロム硫酸等で完全に洗浄しなければ、均一化できないということに落ち着きそうである(J. Sweigard, J. Hamerら, FGC)。ただし、スライドガラス上での付着器形成能については、洗浄並びに菌株による差異も含めて、未だ意見が食い違っている¹⁴⁾。どちらにせよ、いもち病菌が、種々の固体上で付着器を形成することから、それを逆に利用して、いろいろな付着器形成因子が検討され、それらの因子として以下のようなものが考えられている。

1) 化学的因子

化学的因子に関しては、いもち病菌がガラスや樹脂などの人工基質上で付着器を形成することから、付着器形成に

必要不可欠な化学的因子は存在しないと考えられている。問題は、付着器分化を促進、または阻害する物質にはどういふものがあるかという点である。

いもち病菌の感染の場であるイネ植物最表層に存在する本菌の利用可能な有機物について筆者には全く知識がないが、クチクラ層外が栄養的に極めて貧困であろうと漠然と想像できる。また、豊富な栄養条件下で、植物病原菌が過剰なエネルギーを消費してまで植物体に侵入を企てるであろうかという素朴な直観も多くの人が抱くものであろう。いもち病菌の付着器形成を検定するためには、通常胞子を滅菌水で懸濁して基質上に滴下するのであるが、この際水のかわりに液体培地などに懸濁すると、付着器の形成率が低下する場合も観察される。しかしながら筆者らがグルコース溶液を用い試験したところ、そうした形成率の有意な低下は見られなかった⁷⁾。ペプトン水を用いても同様で、単なるエネルギー源や単純なN源によって付着器形成率が有意な影響を受けるものではないと結論した。他の研究グループでもおおむね同様の結論が常識となりつつあったのであるが、実はいくつかの液体培地で、ばらつきのため有意とは見えないが、付着器形成率が低下する場合があるという点に真実が隠されており、Beckermanらにより2%以上の濃度のYE (Yeast Extract) が付着器形成を著しく阻害することが報告された¹⁵⁾。通常の培地では、YEを使用していたとしてもその濃度は0.5%ないし1%程度であり、時に付着器形成率が低下するという観察もこの濃度ゆえのことだったのかもしれない。YEのどの成分が付着器形成阻害活性を有するかは未だ明らかにされていない。また、YE

の付着器阻害活性の研究から、意外な阻害物質、酵母の接合フェロモンである α -factor が得られた¹⁶⁾。当初、これが YE 中の付着器形成阻害物質本体として単離されたが、 α -factor では後に詳述するように YE の阻害活性を説明できないことから主たる活性は別の物質が持つものと考えられている。

これらは付着器形成の阻害因子であるが、付着器形成を誘導する化学的因子として、イネ葉面に存在する特定のワックスが見いだされている¹⁷⁻¹⁹⁾。ほかの植物病原菌でもこうしたワックスの認識の例があること²⁰⁾、特定のワックス成分だけを認識するという点で非常に興味深い。

2) 固体基質表面の疎水性

現在最も広く認知されているいもち病菌の付着器誘導因子は、いもち病菌の発芽管が接着して伸長する場である固体表面の疎水性である^{9,21)}。Lee, Dean らによる研究で、固体表面の疎水性と付着器形成率には正の相関関係があることが示された^{22,23)}。厳密には正の相関関係というより、必要条件としての疎水性に閾値があると言ったほうが正しいかもしれない。いもち病菌がイネに感染する際現実には接触するのがクチクラワックスであることを考えると、疎水性が付着器形成を誘導すること自体が大変受け入れやすいものである。この疎水性を誘導因子とする考え方は、後述する付着器形成に関係する遺伝子 *MPGI*²⁴⁾が、糸状菌菌体表面の疎水的性質に関する hydrophobin^{25,26)}をコードしていたことから、さらに重要視されて現在に至っている。

3) 固体基質表面の硬度

筆者らは、以前より固体表面の疎水性が付着器分化誘導の決定要因であるという説に、大筋でその傾向があることは認めつつも少なからず疑問を抱いていた。そのきっかけの一つが、今となっては誰もアッセイ系としては用いなくなったスライドガラスの問題であり、Dean らは初期の研究では、明らかに付着器形成を誘導しない親水性の固体基質としてスライドガラスを用いていたのであるが、筆者らの系では、洗浄が必要とはいえ、スライドガラスは付着器形成観察の好適な基質として用いられてきた。この問題は上述したように、全く別の要因によるものであろうと結論付けられたわけであるが、その他にも、筆者らを含む日本の研究者達が付着器形成と侵入糸の観察に用いてきたセロファンが、疎水性の高い基質とは考えにくかったことがある。Dean らと筆者らでは疎水性検定の方法が異なるため厳密な比較は難しいが、彼らの系でも、再現性良く付着器形成の誘導が全く見られない基質はゲルボンドの親水面だけと言ってよく、ガラスも含めてそれ以外の物質はほとんど疎水性ということになりかねない（あるいはほとんどの物質が油脂で汚染されている？）状態であった。

いくら疎水性の高い物質でも、液体または非常に柔らかいもの（例えば流動パラフィン）の上ではいもち病菌は付

着器を形成しない⁷⁾。また、寒天プレート培地上ではいもち病菌は付着器を形成しない。これは寒天が明らかに親水性の基質であるからと説明されてきた。そこで、筆者らは非常に濃度の高い寒天上での付着器形成を試みたのであるが、プレートとして調製できる寒天濃度に限界があり、次善の策として、調製した寒天プレートをさらにインキュベーター内で保温し、徐々に乾燥させることにより、寒天プレート状態のまま硬度を上げることを試みた。結果は、寒天表面の親水性（水滴を落とした際速やかに拡散、吸収される）は当初と変わらないように見えるが、インキュベーターの時間が長くなるにつれ、すなわち硬度が上がるにつれ、それと相関していもち病菌は付着器を形成するようになったのである⁷⁾。この実験ではあまりにあまいなパラメーターが多いため、疎水性をほとんど変化させることなく自由に硬度を調整できる樹脂を用いて同じ観察を行ったところ、やはり固体表面硬度と、付着器形成率の間には正の相関関係が見られた²⁷⁾。

付着器形成の全く見られない基質であるゲルボンドの親水面は、実はポリスチレンのフィルムにアガロースまたはアクリルアミドのゲルをコーティングすることにより作られている。そのような極めて薄いゲルでも寒天プレートと同様に考えられるか否かは不明であるが、つまるところゲル上では付着器形成は起こらないということに集約されてしまう可能性は否定できない。

これらの結果から、筆者らは、いもち病菌の付着器形成には、ある程度以上の硬度を持った固体基質が必要条件としてあり、その表面の疎水性は付着器形成誘導に促進的に働くものであると考えているのであるが、基質表面硬度の問題は現在では少なくとも一つの重要な因子として認められている¹⁾。

他に、ここでは特に触れなかった光などの因子もあるが、ここでは他の総説^{14,28)}を参照していただくとして省略する。

付着器形成誘導といもち病菌の固体基質への接着

いもち病菌が、固体基質の表面硬度とその疎水性を付着器形成誘導の外的因子として認識しているのではないかということがわかってきたわけであるが、基質表面の硬度や疎水性といった物理的因子を認識するメカニズムには興味を持たれる。インゲンさび病菌の凹凸認識も物理的認識であり、これには細胞骨格系の関与と²⁹⁾、感圧性の細胞膜イオンチャンネルが機能しているらしいということが報告されている³⁰⁾。いもち病菌では、この点は未だ不明であるが、この問題に間接的にであれ関りうるいもち病菌の固体基質への接着についての研究がある。

前述したように、1988 年 Hamer らにより、胞子先端の STM による宿主上への分生子の接着が感染の一番最初の

ステップの要素であることが報告されている⁹⁾。そして、この接着はあらかじめ ConA を加えることにより阻害される^{9,31)}ことから、 α -linked glucosyl または mannosyl 型の糖鎖を持つ接着因子の存在が想定された。胞子発芽後も発芽管周囲に走査電顕で明らかに観察可能な接着物質 (Mucilage, STM とは異なる) が見られ、非常に強固に固体表面に接着しながら胞子発芽管は伸長する^{9,32,33)}。この接着しながら伸長する発芽管を各種の酵素で処理してみたところ、タンパク質分解酵素、糖鎖分解酵素のいくつかにより発芽管からの付着器形成が顕著に抑えられた³³⁾。この場合胞子発芽管の固体基質表面への接着能は失われており、電顕観察でも、Mucilage を失った像が得られたため、主として Mucilage の分解による効果と考えられた。すなわち、発芽管が、固体表面に強固に接着しながら伸長することが付着器形成誘導の重要な条件であることがわかったのである。

さらに胞子の接着を阻害する ConA を胞子接着が成立した後の発芽最初期段階のサンプルに加えたところ興味深い現象が見られた。ConA は、すでに接着が成立した胞子はもちろん、伸長する発芽管の固体基質への接着を阻害することなく付着器形成だけを阻害したのである³³⁾。他の α -linked glucosyl または mannosyl 型の糖鎖結合性のものも含む各種のレクチンでは WGA にやや活性が見られたが、この阻害活性はほぼ ConA 特異的なものであった。この結果は、先の糖蛋白分解酵素処理と異なり、ConA によってある程度特異的に阻害される細胞表層因子が、付着器形成誘導に関っている可能性を示唆している。Howard らの電顕観察により、伸長する発芽管の最先端部分にも STM とよく似た接着物質が見いだされたが (R. Howard, FGC)、この接着部分の中に、ConA 感受性の特殊な接着因子、あるいは物理的因子のセンサーの役割をする因子が存在するのかもしれない。

いもち病菌の付着器形成が、菌体自身が強固な固体基質の上に固定されているということ認識することにより誘導されるものと仮定し、その接着強度に基質の疎水性が影響すると考えれば、固体基質の硬度と疎水性の問題は統一的に説明できるものと考えらる。しかし、最近この問題について、その解釈に苦しむデータが現れ、そう単純なものではない可能性が出てきた。

固体表面認識による付着器形成誘導 に関わる菌体因子・遺伝子

DuPont 社の Sweigard らが REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) 法³⁴⁾で取得した変異株の中に非常に奇妙なものが現れた (J. Sweigard, FGC)。この変異座位 *pth11* は、テフロンなどの疎水性の高い基質表面での付着器形成能を欠損しているにもかかわらず、比較的親水的な表面 (例えばアセテートフィルム) 上での付着器形成能に

ほとんど変化がなかったのである。この変異株により、少なくとも疎水性認識機構と硬度認識、あるいはその他の認識は独立な事象として分離できる可能性が高まった。しかしながらその説明は難しい。REMI 法で得られた変異株である以上その遺伝子そのものの変異形態は機能欠損であると考えてよい。疎水性認識による付着器形成誘導機構が、正の調節によるものであれ、負の調節であれ、その経路の一部を欠損しても、親水性の比較的高い基質で依然として付着器形成を誘導できるということをどう説明すればよいであろうか。本来、親水性または固体硬度を積極的に認識して付着器形成を誘導する信号伝達経路が存在し、疎水性の高い表面においてだけ、他の固体表面上と比較して少なくとも一つの余分な因子が必要となるという仮定は出来るが、これは付着器形成が親水性よりも疎水性の固体表面で誘導されやすいということと整合性がとりにくい。強いてこの説をとるとして、いもち病菌がイネ葉面で発芽感染能力を獲得する進化の過程で、クチクラワックスに親和性を持つことの出来る菌体表層因子を獲得したということも考えられなくはなさそうであるが、困ったことに、この遺伝子 *PTH11* は、塩基配列レベルからの推測では 7 回膜貫通型蛋白の構造を持っており、少なくとも細胞壁より外側にまで到達する「疎水性基質専用接着剤」のようなものでもなさそうである。疎水性認識に関わる特殊なセンサーのようなものではないかとも考えられ、今後の解析が期待されている。

他に通常付着器の誘導されにくい親水性の高い基質上でも付着器を効率良く形成する、すなわち疎水性認識能を失った挙動を示すものとして、*smol* の変異がある³⁵⁾。*smol* は Spore Morphology から命名されたのでわかるように、本来胞子の形態異常を示す変異であるが、付着器の奇形および固体表面認識異常も引き起こし、病原性が低下する。胞子形成に関わる遺伝子と付着器形成遺伝子との間にどの程度関連性があるのかについては不明であるが、興味が持たれる。

話は前後するが、いもち病菌の付着器分化誘導に関する遺伝子として、最初にクローンされたものは *MPGI* 遺伝子である²⁴⁾。この遺伝子はいもち病菌感染イネ植物葉から植物体ごと磨細して調製した全 cDNA から、いわゆるディファレンシャルハイブリダイゼーション法により、いもち病菌特異的な配列として得られたものであり、この手法で得られるものの特徴とも言える感染時に非常に高発現する性質を持つ遺伝子である。*MPGI* は、糸状菌菌体表面に疎水の性質を与え、胞子形成時の気中菌糸の形成等に重要な役割を果たす hydrophobin^{25,26)}と構造的ホモロジーを持つものと推定された。事実 *MPGI* の遺伝子破壊株では、菌糸叢が親水の性質を示し (通常水滴をおくと菌糸叢の疎水性により水玉が出来るのであるが、*MPGI* 欠損株では Easily

wettable と呼ばれる、水滴が速やかに菌糸叢内に浸潤する形質をもつ)、電顕観察によっても hydrophobin により形成される菌体表層の桿状構造物が欠損株では失われていることから、hydrophobin そのものであると結論された³⁶⁾。MPGI 欠損株は、付着器形成能を著しく低下しており(皆無ではない)、それに見合うレベルで植物感染能も大きく低下していた²⁴⁾。本遺伝子は、いもち病菌の病原性に直接関与する遺伝子としてクローンされた最初のものであり、いもち病菌の固体表面認識に関与する因子をコードした遺伝子としても最初に見いだされたものとなった¹⁵⁾。その後の研究で、MPGI 遺伝子産物は、トランスに働かうものであることが観察された。すなわち、MPGI 欠損株を同野生型株と同じ基質の上に共存させると欠損株の付着器形成能が回復する(D. Ebbole, FGC)。すなわち、hydrophobin は、菌体表面から一部放出され、あるいは剥離し、基質表面を介して欠損株の固体表面認識に影響することを意味している。hydrophobin は細胞膜のリン脂質、あるいは界面活性剤のように、疎水性末端と親水性末端を持つとされ、物質表面に、その表面が疎水性であれば疎水性末端を接する方向で、また、親水性であればその逆向きに分子層を形成する性質を持つ。こうした分子が菌体外にも放出されるのであれば、これまでの付着器形成を誘導する固体基質表面の疎水性に関する議論はどうになってしまうのか。筆者はまだその答えを得ていない。

他にも細胞接着にかかわる因子として、いもち病菌からヒトロネクチン抗体、並びにフィブロネクチン抗体と反応する表層タンパクの存在が報告されており³⁷⁾、付着器形成誘導と固体表面認識についての問題が、単なる菌体の植物表面への接着という現象のレベルから、糸状菌の物理パラメーターセンサーの問題、高等動植物とも共通性のある細胞接着因子の関与の可能性など基礎生物学的にも非常に面

白い問題に発展し、今後議論が沸騰する分野になりそうである。

細胞内情報伝達

これまで述べてきたように、イネいもち病菌が、固体表面の物理的因子を認識し、付着器形成を誘導をするという現象は、様々な議論の余地を残しながらもおおむね認められ、それに関わる菌側因子の候補も得られるレベルにまで研究が進展しつつある。肝心な認識センサー部分は未だにブラックボックスであるが、とにかくなんらかの機構により外的因子を認識した後は、細胞内情報伝達系を介して付着器形成に関わる遺伝子群の発現が誘導されるはずである。細胞内情報伝達系の研究は生物学全般の一つのホットな領域であり、それゆえに、既知の情報伝達因子のいもち病菌での機能を探るというアプローチが当然考えられ、現在の研究の一つの大きな流れを作っている。最初に見いだされたこの系統の因子は、cAMP であった。Lee, Dean らのグループにより、通常付着器形成が誘導されない親水面上での付着器誘導物質として報告され、cyclic nucleotide phosphodiesterase の阻害剤である IBMX でも同様な効果があることから、菌体内の cAMP 濃度を上昇させると、固体表面認識の有無に関らず付着器形成が誘導されることが明らかになった²²⁾。cAMP により、他の阻害剤、例えば前述した ConA の効果なども回復される。cAMP が関係するとすれば、当然 cAMP-dependent protein kinase の関与が推定され、同酵素をコードする *CPKA* gene がクローン化され、遺伝子破壊体が作成された³⁸⁾。この欠損株では、当初 cAMP 感受性および付着器形成能と病原性がどちらも失われていると報告されたが、後に、付着器形成に著しい遅延を生じるといふ形質が正しいものであるとわかり³⁹⁾、付着器形成に必須というよりも、効率よい付着器形成に必要である遺伝子であるとされ、本遺伝子の機能を補う少なくとももう一系統の protein kinase A を介した信号伝達経路が存在するものと推定されている。

MAP kinase もいもち病菌の付着器形成に重要な役割を持つ。既知の他の生物の MAP kinase の塩基配列情報を利用して、いもち病菌から三つの MAP kinase がクローニングされた(J.-R. Xu, FGC)。PMK1, 2, 3 と命名されたこれらの MAP kinase は、それぞれ酵母の MAP kinase *FUS3/KSS1*, *HOG1*, *SLT2* と相同性を持つが、その機能は酵母のものとは直接関連づけることができるとは限らない。中でも PMK1 を欠損した遺伝子破壊体では、付着器形成能が失われており、固体表面認識から付着器形成誘導に至る情報伝達系で重要な機能を持つものと推測された⁴⁰⁾。この欠損株では、cAMP による回復も不完全であり、cAMP を介した信号伝達系は MAP kinase を介した信号伝達系と、互いに協調的に機能しつつも、原則的に独立の経路で

図2 いもち病菌発芽管細胞内情報伝達系の模式図

あるものと考えられている。*PMK3* 欠損では、付着器形成は起こるが、その先の植物体への侵入が見られず、付着器の機能成熟の段階、あるいは付着器とは直接関係しない他の病原性因子の発現と関係するものと見られている。

PMK2 欠損の表現形質は明らかではない。

cAMP-*CPKA* は、信号伝達の間付近に位置するものであり、MAP kinase は細胞内情報伝達の最終段階付近に関与するものである。現時点ではメカニズムが不明である固体表面認識のステップ直後付近、すなわち細胞内情報伝達の発信地点付近に関与するものとして、GTP binding protein (G protein) の解析が行われた。これも他の生物の既知の G protein alpha subunit の塩基配列情報をもとに、三つの相同的遺伝子が得られ、*mag A*, *B*, *C* と命名された。このうち *mag B* の遺伝子破壊体が、不稔性を示すとともに、孢子形成能並びに付着器形成能が大幅に減少する形質を示すことが見いだされた⁴¹⁾。

このように G protein, protein kinase, MAP kinase と、細胞内情報伝達系の主なメンバーはイネいもち病菌の器官分化においてもやはりそれぞれ重要な役割を果たしている。また、Calcium dependent (Calmodulin dependent) な信号伝達系も付着器形成に関与していると考えられており、その系統のメンバーの関与についての報告が出る日も近いであろう。

つい最近報告された興味深い現象として、酵母の接合フェロモンである α -factor がいもち病菌の特定の Mating type (*MAT1-2*) のみの付着器形成を抑制することが見いだされた¹⁶⁾。これは上で述べた Yeast Extract の付着器形成阻害活性の研究から見つかった副産物である。Yeast Extract は Mating type に依存しない阻害活性を持つこと、作用する α -factor の濃度が、非常に高いことから、 α -factor 自体が Yeast Extract に含まれる付着器形成阻害物質本体とは考えられない。しかしながら、子囊菌同士とはいえ系統的にかなり距離のある酵母の接合フェロモンが、いもち病菌においても接合型特異的な作用を持つこと自体は興味深い。その後の研究で、 α -factor の合成アナログを用いて、酵母に対する α -factor としての活性と、いもち病菌に対する付着器形成阻害活性の間に相関関係があることが見いだされている (J. Beckerman, FGC)。さらに、いもち病菌の培養濾液から、培養菌体と異なる接合型のいもち病菌の付着器形成を阻害する活性が見いだされ、まさしくいもち病菌の接合フェロモンレセプターを介した作用を持つのではないかと思われた。日本においては多くの株が雌性不稔性であり、不完全菌として分類されてきたいもち病菌が、交配のシグナルを感染よりも優先する調節機構を持っていることには意外な感がある。ただし、この現象は、交配可能な菌株を用いて見いだされており、筆者らの持つ雌性不稔性、あるいは不稔性菌株によって追試してみたいと考えている。

現在までのいもち病菌の細胞内情報伝達系に関する知見を簡単な図にまとめてみた (図2)。

付着器の機能発現

付着器の形態分化以降、侵入に至る過程は紙数も尽きてきたため、ここではごく簡単に触れることにする。付着器形成後、いもち病菌は付着器周辺、正確には隔壁を含む細胞壁直下にメラニン層を形成する⁹⁾。メラニン層はいもち病菌の付着器からの感染に必須であることはわかっている^{2,42)}。この役割についてはいまだ決定的な説がなかった。メラニン層を形成した付着器内には 3.0 M という非常に高濃度のグリセロールが蓄積されることが見いだされた⁴³⁾。細胞質内にそのような高濃度の溶質を蓄積することにより、約 8 MPa (80 気圧) という膨圧を発生する⁴⁴⁾。これはこれまで常圧下に生存する生物が発生する圧力としてもっとも高いものであり、この膨圧を利用し、アクチンに富んだ細い侵入糸を付着器直下から伸長して、堅いイネの表皮を突き破って侵入する⁴⁵⁾。付着器はこの圧力による侵入糸の穿孔の反作用に耐えることができるよう、大量の接着物質で周囲を固め、固体基質に強固に接着するのであるが、侵入糸を出す付着器下面 (植物体との接触部分) には接着物質はおろかメラニン層、キチン層 (細胞壁) すらも見られず、そのかわりに電顕観察によると接触部分最外周付近に O リングのような構造を形成し、あたかも耐圧パッキングをしているかのように見える^{6,46)}。メラニン合成阻害剤などでメラニン層を脆弱なものにしてやると、細胞内のグリセロールの漏出が見られるようになり、その結果として恐るべき膨圧の発生は抑制される (R. Howard, FGC)。メラニン層単体の機械的強度を測定したデータはなく、メラニン層が膨圧を支える防壁として機能している可能性も否定できないが、おそらくこのグリセロールの封じ込めという役割がもっとも重要なものであるという考え方が現在広く受け入れられている。細胞内に蓄積されるグリセロールのソースについては、胞子内貯蔵糖であるトレハロースか、グリコーゲンであろうと言われているが、結論は出していない。

付着器形成から機能発現の間に必要な遺伝子はメラニン合成系遺伝子をはじめいくつか知られており、それらは図1中にまとめた。

おわりに

現時点では、接合フェロモンの作用のようなユニークな現象もいくつか見いだされているが、基本的には情報伝達系因子に関する既知の情報を用いて、同様の因子がいもち病菌においても機能しているということを網羅的に検索している段階とも言える。こうしたアプローチだけでは他の生物を用いた研究でブラックボックスとされている部分に

いずれ行き当たることは明白である。その時、いもち病菌のゲノムサイズと発現遺伝子数が酵母に次いで小さいという、真核多細胞生物材料の中では特筆すべき長所を活かして、いもち病菌から逆に高等真核生物にまで波及するような新たな発見を期待することもあながち夢ではあるまい。もちろんいもち病菌に固有の細胞因子の発見も期待できる。付着器形成が事実上単細胞状態で行われる細胞分化である点も材料として有利であろう。

こうして得られた知識はいもち病の病害制御にどのように応用できるであろうか。いもち病菌の付着器をアタックすることが病害制御に有効であることはメラニン合成阻害剤の成功を見ても明らかであるが、メラニン合成阻害以外に、本稿で述べてきたような、付着器形成誘導に関わる諸因子を阻害するようなものはありうるだろうか。

いもち病菌の固体表面認識に関わるセンサーはいまだ明らかになっていないが、これが解明できれば、このセンサーからの付着器分化のトリガー信号の発信を抑制する手段を考えうるかもしれない。付着器分化に必須である胞子並びに発芽管の接着を阻害する物質で植物表面を処理する方法も考えうるが、よほど無害で安価なものでなければ処理量の点から考えて難しいであろう。続く細胞内信号伝達の過程は、おそらく各種の生物での共通性が高く、いもち病菌がよほど特殊な情報伝達経路や因子を持たないかぎり毒性の低い阻害手段を考えるのは困難であろう。Yeast Extract 中の付着器形成阻害物質には興味を持たれ、その同定が待たれるところである。接合フェロモンレセプターをターゲットとし、接合フェロモン受容信号を誤発信させる方法も面白いだろう。ただし、この場合各接合型に対応する2種類の物質を必要とすることになるだろう。

いもち病菌の付着器形成に関わる研究は、まだ始まったばかりと言っているうちに、ここ数年、予想以上の速度で世界的に進展している。今後数年間にはさらに驚くべき量の情報が得られるであろうし、現時点でやや後れを取った感のある日本からの情報発信が強く期待される。

引用文献

- 1) R. J. Howard & B. Valent: *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 491 (1996)
- 2) C. P. Woloshuk & H. D. Sisler: *J. Pesticide Sci.* **7**, 161 (1982)
- 3) J. A. Sweigard, A. M. Carroll, S. Kang, L. Farrall, F. G. Chumley & B. Valent: *Plant Cell* **7**, 1221 (1995)
- 4) M. A. Mandel, V. W. Crouch, U. P. Gunawardena, T. M. Harper & M. J. Orbach: *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 1102 (1997)
- 5) T. C. Jelitto, H. A. Page & N. D. Read: *Planta* **194**, 471 (1994)
- 6) T. M. Bourett & R. J. Howard: *Can. J. Bot.* **68**, 329 (1990)
- 7) J.-Z. Xiao, T. Watanabe, T. Kamakura, A. Ohshima & I. Yamaguchi: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **44**, 227 (1994)
- 8) E. J. Braun & R. J. Howard: *Protoplasma* **181**, 202 (1994)
- 9) J. E. Hamer, R. J. Howard, F. G. Chumley & B. Valent: *Science* **239**, 288 (1988)
- 10) N. D. Read, L. J. Kellock, H. Knight & A. J. Trewavas: "Perspectives in Plant Cell Recognition," ed. by J. A. Callow & J. R. Green, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 137-172, 1992
- 11) P. E. Kolattukudy, L. M. Rogers, D. Li, C.-S. Hwang & M. A. Flaishman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4080 (1995)
- 12) H. C. Hoch, R. C. Staples, B. Whitehead, J. Comeau & E. D. Wolf: *Science* **235**, 1659 (1987)
- 13) R. C. Staples & H. C. Hoch: *Exp. Mycol.* **11**, 163 (1987)
- 14) R. A. Dean: *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 211 (1997)
- 15) J. L. Beckerman & D. J. Ebbole: *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 450 (1996)
- 16) J. L. Beckerman, F. Naider & D. J. Ebbole: *Science* **276**, 1116 (1997)
- 17) T. Uchimiya, N. Ogasawara, Y. Nanba & H. Ito: *Agric. Biol. Chem.* **43**, 383 (1979)
- 18) T. Uchimiya & K. Okuyama: *Phytochemistry* **29**, 91 (1990)
- 19) S. Kumar & R. Sridhar: *Int. J. Trop. Plant Dis.* **5**, 131 (1987)
- 20) G. K. Podila, L. M. Rogers & P. E. Kolattukudy: *Plant Physiol.* **103**, 267 (1993)
- 21) R. D. Gilbert, A. M. Johnson & R. A. Dean: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **48**, 335 (1996)
- 22) Y. H. Lee & R. A. Dean: *Plant Cell* **5**, 693 (1993)
- 23) Y. H. Lee & R. A. Dean: *FEMS Microbiol. Lett.* **115**, 71 (1994)
- 24) N. J. Talbot, D. J. Ebbole & J. E. Hamer: *Plant Cell* **5**, 1575 (1993)
- 25) J. G. H. Wessels, O. M. H. de Vries, S. A. Asgeirsdóttir & F. H. J. Schuren: *Plant Cell* **3**, 793 (1991)
- 26) J. G. H. Wessels: *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 413 (1994)
- 27) J. Z. Xiao, T. Watanabe, S. Sekido, W. B. Choi, T. Kamakura & I. Yamaguchi: *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1225 (1997)
- 28) R. W. Emmett & D. G. Parberry: *Annu. Rev. Phytopathol.* **13**, 147 (1975)
- 29) Y. H. Kwon, H. C. Hoch & R. C. Staples: *Protoplasma* **165**, 37 (1991)
- 30) X.-L. Zhou, M. A. Stumpf, H. C. Hoch & C. Kung: *Science* **253**, 1415 (1991)
- 31) T. M. Bourett, M. A. Piccollelli & R. J. Howard: *Exp. Mycol.* **17**, 223 (1993)
- 32) G. L. Jones, J. A. Bailey & R. J. Oconnell: *Mycol. Res.* **99**, 567 (1995)
- 33) J.-z. Xiao, A. Ohshima, T. Kamakura, T. Ishiyama & I. Yamaguchi: *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**, 639 (1994)
- 34) Z. Shi, D. Christian & H. Leung: *Phytopathology* **85**, 329 (1995)
- 35) J. E. Hamer, B. Valent & F. G. Chumley: *Genetics* **122**, 351 (1989)
- 36) N. J. Talbot, M. J. Kershaw, G. E. Wakley, O. M. H. Devries, J. G. H. Wessels & J. E. Hamer: *Plant Cell* **8**, 985 (1996)
- 37) R. A. Dean, Y.-H. Lee, T. K. Mitchell & D. S. Whitehead: "Rice Blast Disease," ed. by R. S. Zeigler, S. A. Leong & P. S. Teng, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 23-34, 1994
- 38) T. K. Mitchell & R. A. Dean: *Plant Cell* **7**, 1869 (1995)
- 39) J. R. Xu, M. Urban, J. A. Sweigard & J. E. Hamer: *Mol.*

-
- Plant-Microbe Interact.* **10**, 187 (1997)
- 40) J. R. Xu & J. E. Hamer : *Genes Dev.* **10**, 2696 (1996)
- 41) S. Liu & R. A. Dean : *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 1075 (1997)
- 42) M. H. Wheeler & A. A. Bell : *Curr. Top. Med. Mycol.* **2**, 338 (1988)
- 43) J. C. deJong, B. J. McCormack, N. Smirnoff & N. J. Talbot : *Nature* 389, 244 (1997)
- 44) R. J. Howard, M. A. Ferrari, D. H. Roach & N. P. Money : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11281 (1991)
- 45) N. P. Money & R. J. Howard : *Fungal Genet. Biol.* **20**, 217 (1996)
- 46) R. J. Howard & M. A. Ferrari : *Exp. Mycol.* **13**, 403 (1989)